

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年11月19日(19.11.2009)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2009/139191 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/002161
- (22) 国際出願日: 2009年5月15日(15.05.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2008-129597 2008年5月16日(16.05.2008) JP
特願 2008-303926 2008年11月28日(28.11.2008) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 学校法人 慶應義塾(KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目15番45号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 天谷雅行 (AMAGAI, Masayuki) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 久保亮治 (KUBO, Akiharu) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 永尾圭介 (NAGAO, Keisuke) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 廣田雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目8番5号若林ビル3階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))



WO 2009/139191 A1

(54) Title: ALLERGIC DISEASE MODEL ANIMALS

(54) 発明の名称: アレルギー疾患モデル動物

(57) Abstract: Provided are a model mouse for allergic diseases such as atopic dermatitis and a dermatitis model mouse which has a lowered skin barrier function. It has been found out that a mouse, in which an endogenous gene encoding filaggrin has been entirely or partially disrupted by deletion, substitution or the like to thereby completely lose the functions of expressing profilaggrin and filaggrin protein, is usable as a model mouse of allergic diseases or atopic dermatitis which has a lowered skin barrier function.

(57) 要約: 本発明の課題は、アトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患モデルマウスや、皮膚バリア機能が低下した皮膚炎モデルマウスを提供することにある。発明者らは、フィラグリン (filaggrin) をコードする内在性遺伝子の全部又は一部を欠損・置換等の遺伝子変異により破壊し、プロフィラグリン及びフィラグリンタンパク質を発現する機能を完全に喪失させたマウスを、皮膚バリア機能が低下したアレルギー疾患やアトピー性皮膚炎のモデルマウスとして使用しうることを見出した。

明 細 書

発明の名称：アレルギー疾患モデル動物

技術分野

[0001] 本発明は、プロフィラグリン及びフィラグリンを発現する機能を喪失させたマウスを、アトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患動物モデルや、皮膚バリア機能が低下している皮膚炎動物モデルとして使用する方法や、プロフィラグリン及びフィラグリンを発現する機能を喪失させたアレルギー疾患モデルマウスや皮膚炎モデルマウス等に関する。

背景技術

[0002] アトピー性皮膚炎 (Atopic Dermatitis) は、主に外的刺激に対する炎症性皮膚病であり、遺伝的な背景によって環境刺激に対する反応が左右される「環境－遺伝的」な疾患である。また、アトピー性皮膚炎患者は気管支喘息など他のアレルギー疾患を併発する 경우가多くあることが知られている。

[0003] これまで、一般的にアトピー性皮膚炎は主に何らかの免疫異常により引き起こされると考えられており、複数の免疫関連遺伝子がアトピー性皮膚炎原因遺伝子として報告されている。そのため、現在までに報告されているアトピー性皮膚炎モデル動物はいずれも免疫機能調節に関わる遺伝子を導入又はノックアウトすることによりアトピー性皮膚炎に類似の症状を誘導したモデル動物である。このようなアトピー性皮膚炎モデル動物としては、例えば、GATA-3トランスジェニックマウス (特許文献1)、TNF- α トランスジェニックマウス (非特許文献1)、IL-18トランスジェニックマウス (非特許文献2)、Caspase-1トランスジェニックマウス (非特許文献3)、カテプシンEノックアウトマウス (非特許文献4) 等を挙げることができる。

[0004] しかし最近になって、アトピー性皮膚炎発症に皮膚バリア機能障害の関与する可能性が示唆されてきている。皮膚バリア機能は、生体の水分保持や外部からの進入物や紫外線等を防ぐものであり、表皮のなかでも最も外層にあ

る角層が特に重要な機能を果たしている。角層は、角化したケラチノサイトにより構成され、体内の他の細胞には全く見出されない特殊な被膜に囲まれたケラチンフィラメントの骨格構築からなる。このケラチンフィラメント骨格構築には表皮ケラチノサイト由来のフィラグリンが不可欠である。フィラグリンは表皮ケラチノサイトで特異的に産生されるタンパク質であり、前駆体であるプロフィラグリンタンパク質が発現した後、直ちにリン酸化し、ケラトヒアリン顆粒に蓄積され、その後脱リン酸、加水分解を経てフィラグリンへと分解される。フィラグリンは、ケラチンフィラメントを凝集させる作用を持つ他、さらに低分子のペプチドに分解され保湿因子や紫外線吸収因子としても働く。

[0005] 欧米の多くのアトピー性皮膚炎患者を対象とした研究の結果、アトピー性皮膚炎の要因となりうる遺伝子変異がフィラグリンタンパク質をコードする遺伝子（FLG遺伝子）上に発見された。この遺伝子変異は、プロフィラグリン及びフィラグリンタンパクの完全な欠損を引き起こすものであり（非特許文献5）、アトピー性皮膚炎患者に高頻度に、喘息を併発しているアトピー性皮膚炎患者にはさらに高頻度に認められることが明らかにされた（非特許文献6）。また、日本においても、同様のFLG遺伝子変異がアトピー性皮膚炎患者に高頻度で認められることが明らかにされている（非特許文献7）。これらの結果は、フィラグリンタンパクの欠損による皮膚バリア機能の低下が、アトピー性皮膚炎や喘息の発症に関与することを示唆しているが、このような皮膚バリア機能障害とアトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患との関連についてはこれまでほとんど注目されておらず、研究が進んでいないのが現状である。今後、アトピー性皮膚炎及び／又は喘息の予防・治療方法を確立するために、プロフィラグリン及びフィラグリンの欠損により皮膚バリア機能が低下したモデル動物は非常に有用であると考えられる。

[0006] 皮膚バリア機能の低下を特徴とする皮膚疾患モデル動物としては、テープストリッピングによって物理的に角質層を剥離する方法や、アセトン等の有機溶媒又は界面活性剤により皮膚バリア機能を構成する脂質成分を脱脂する

方法が公知であるが（例えば、特許文献2、非特許文献10、非特許文献11）、これらのモデル動物はフィラグリン欠損による皮膚バリア機能障害を反映したものではなく、アトピー性皮膚炎発症機構解明のためのモデル動物としては適さない。また、尋常性魚鱗癬モデルマウスとして知られるFlaky Tail (f t) マウスでは、角層構成タンパク質であるロリクリン及びフィラグリンをコードする遺伝子領域の近傍に劣性突然変異が起こっており（非特許文献8）、その表皮では、正常なプロフィラグリンタンパク質（約500 kDa）が産生されず、代わりに、分子量の小さい変異プロフィラグリンタンパク質（220 kDa）が発現していることが明らかにされている（非特許文献8、非特許文献9）。しかし、f t マウスは、（1）自然発生突然変異マウスであるため、フィラグリン遺伝子以外の遺伝子にも変異が起こっている可能性が考えられること、さらに、（2）f t マウスにおいて発現している異常プロフィラグリンタンパク質からもフィラグリンタンパク質やペプチドが分解生成されると考えられることから、プロフィラグリン及びフィラグリンタンパク質を完全に欠失しているアトピー性皮膚炎患者のモデルとしては不十分であると考えられる。以上のように、これまでのところ、アトピー性皮膚炎モデルとなりうるような、プロフィラグリン及びフィラグリンタンパク質が完全に欠損したモデル動物は確立されていない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2004-166696号公報

特許文献2：特開2001-321016号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Matuoka et al., Int Immunol., 11: 987-994, 1999

非特許文献2：Yoshimoto et al., Nat Immunol., 1: 132-137, 2000

非特許文献3：Yamanaka et al., J Immunol., 165: 997-1003, 2000

非特許文献4：Tsukuba et al., J Biochem(Tokyo)., 134: 893-902, 2003

非特許文献5：Smith et al., Nat genet., 38: 337-342, 2006

非特許文献6 : Palmer et al., Nat genet., 38: 441-446, 2006

非特許文献7 : Nomura et al., J Allergy Clin Immunol., 119: 434-440, 2007

非特許文献8 : Rothnagel et al., Genomics, 23: 450-456, 1994

非特許文献9 : Presland et al., J Inv Dermatol., 115: 1072-1081, 2000

非特許文献10 : Kitagaki H, et al. J Invest Dermatol 105: 749-755, 1995

非特許文献11 : Spergel JM, et al. J Clin Invest 101: 1614-1622, 1998

非特許文献12 : Fallon PG. et al., Nat genet 41: 602-608, 2009

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明の課題は、アトピー性皮膚炎等のアレルギー疾患モデルマウスや、皮膚バリア機能が低下した皮膚炎モデルマウスを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0010] 発明者らは、まず、尋常性魚鱗癬モデルマウスである flaky tail (f t) マウスが、上述のようなアトピー性皮膚炎患者のモデルとしても使用することができるか検討する目的で、 f t マウスにおけるプロフィラグリン及びフィラグリンタンパク質の発現について調べてみることにした。フィラグリン遺伝子内の第6フィラグリンリピート上にナンセンス変異を持つ f t マウス（非特許文献12）の皮膚抽出物を電気泳動し、プロフィラグリンタンパク質の繰り返し領域に対する抗体（Rabbit Anti-Filaggrin Polyclonal Antibody, Unconjugated ; Covance Research Products Inc社製 ; Cat# PRB-417P）を用いてウエスタンブロットを行った。その結果、図5-a、右端のレーン“ f t ”に示すように、正常なプロフィラグリンタンパク質の約半分程度の長さの変異プロフィラグリンタンパク質のバンドとともに、フィラグリンタンパク質への分解過程にあるいくつかのバンド、さらに、わずかな成熟型フィラグリンタンパク質のバンドが認められた。フィラグリンタンパク質は、最終的にアミノ酸レベルにまで分解されたものが天然保湿因子として働き、皮膚の保湿およびバリア機能に貢献するとされている。すなわち、 f t マウ

スでは野生型に比べて不十分ではあるものの、天然保湿因子として働きうるフィラグリタンパク質が発現していることが確認できた。これらの結果から、フィラグリタンパク質の機能解析や、フィラグリ欠失による皮膚バリア障害・皮膚バリア障害に起因するアトピー性皮膚炎発症メカニズムの解析のためには、f tマウスでは不十分であり、プロフィラグリタンパク質及びフィラグリタンパク質の発現が完全に欠損したノックアウトマウスの作製が不可欠であることが分かった。

[0011] 続いて、発明者らは、プロフィラグリタンパク質及びフィラグリタンパク質の発現が完全に欠損したノックアウトマウスの作製を試みた。マウスフィラグリタン遺伝子は、非翻訳領域である短いエクソン1、翻訳開始点を含むエクソン2、及びフィラグリタンに特有な10000bpを超える巨大なエクソン3からなっており、エクソン3は長大な翻訳領域と終止コドンとを含んでいる。エクソン3に含まれる翻訳領域は、5'末端と3'末端の短い特異的配列に挟まれて、極めて相同性の高い繰り返し配列が12個連続して存在する特殊な構造をしているため、ターゲティング時の相同組換えにより予測不能な変化が起こりやすいと考えられた。本発明者らは、このような繰り返し配列間での予測不能な変化や非特異的な組換えを避けるために、エクソン3側にshort armを、エクソン1側にlong armをそれぞれ設定してターゲティングベクター(TV1)を作製し、該ターゲティングベクターを用いてプロフィラグリタンパク質及びフィラグリタンパク質の発現が完全に欠損したフィラグリタン遺伝子欠損マウスを作製することに成功した。

[0012] さらに、発明者らは、このフィラグリタン遺伝子欠損マウスの表現型を詳細に検討し、(1)野生型マウスと比較して皮膚バリア機能が低下していること、(2)皮膚透過性が高く、表皮の外側に接触した物質が容易に皮膚のランゲルハンス細胞へ抗原として取り込まれること、(3)ダニ抗原により皮膚炎を誘導することができることを明らかにし、該フィラグリタン遺伝子欠損マウスが皮膚炎、なかでもアトピー性皮膚炎のモデルマウスとして極めて有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0013] すなわち本発明は、(1) フィラグリン (filaggrin) をコードする内在性遺伝子の全部又は一部を欠損・置換等の遺伝子変異により破壊し、プロフィラグリン及びフィラグリンを発現する機能を喪失させたマウスを、アレルギー疾患動物モデルとして使用する方法や、(2) アレルギー疾患がアトピー性皮膚炎であることを特徴とする上記(1)記載の方法や、(3) フィラグリンをコードする内在性遺伝子の全部又は一部を欠損・置換等の遺伝子変異により破壊し、プロフィラグリン及びフィラグリンを発現する機能を喪失させたマウスを、皮膚バリア機能が低下している皮膚炎動物モデルとして使用する方法や、(4) フィラグリンをコードする内在性遺伝子の一部が、エクソン2に含まれる転写開始点からエクソン3に含まれるインフレームのATGまでを含む領域であることを特徴とする上記(1)～(3)のいずれか記載の方法や、(5) フィラグリンをコードする内在性遺伝子の一部が、(a) 相同組換えの際に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子の、エクソン2に含まれる転写開始点からエクソン3に含まれるインフレームのATGまでの領域が、マーカー遺伝子と置換されるように設計されていること；(b) 上記(a)のマーカー遺伝子配列の5'側に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子の5'非翻訳領域を含む配列と相同性のある7 kb以上の遺伝子配列を含むこと；(c) 上記(a)のマーカー遺伝子配列の3'側に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子のエクソン3に含まれるインフレームのATGより下流側の配列と相同性のある1.5 kb以下の遺伝子配列を含むこと；の(a)～(c)の特徴を備えたターゲティングベクターとの相同組換えによりマーカー遺伝子に置換されていることを特徴とする上記(1)～(4)のいずれか記載の方法や、(6) プロフィラグリン及びフィラグリンを発現する機能を喪失させたマウスが、(a) 同種の野生型マウスと比較して角質のアミノ酸量が少ない；(b) 同種の野生型マウスと比較して皮膚の透過性が高い；(c) ダニ抗原の感作により皮膚炎が誘導される；の(a)～(c)の性質を有することを特徴とする上記(1)～(5)のいずれか記載の方法に関する。

[0014] また本発明は、(7) フィラグリンをコードする内在性遺伝子の、エクソン2に含まれる転写開始点からエクソン3に含まれるインフレームのA T Gまでの領域が、マーカー遺伝子と置換され、プロフィラグリン及びフィラグリンを発現する機能を喪失させたことを特徴とするアレルギー疾患モデルマウスや、(8) アレルギー疾患がアトピー性皮膚炎であることを特徴とする上記(7)記載のマウスや、(9) フィラグリンをコードする内在性遺伝子の、エクソン2に含まれる転写開始点からエクソン3に含まれるインフレームのA T Gまでの領域が、マーカー遺伝子と置換され、プロフィラグリン及びフィラグリンを発現する機能を喪失させたことを特徴とする、皮膚バリア機能が低下している皮膚炎モデルマウスや、(10) (a) 相同組換えの際に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子の、エクソン2に含まれる転写開始点からエクソン3に含まれるインフレームのA T Gまでの領域が、マーカー遺伝子と置換されるように設計されていること；(b) 上記(a)のマーカー遺伝子配列の5'側に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子の5'非翻訳領域を含む配列と相同性のある7 k b以上の遺伝子配列を含むこと；(c) 上記(a)のマーカー遺伝子配列の3'側に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子のエクソン3に含まれるインフレームのA T Gより下流側の配列と相同性のある1.5 k b以下の遺伝子配列を含むこと；の(a)～(c)の特徴を備えたターゲティングベクターとの相同性組換えにより、エクソン2に含まれる転写開始点からエクソン3に含まれるインフレームのA T Gまでの領域が、マーカー遺伝子に置換されていることを特徴とする上記(7)～(9)のいずれか記載のマウスや、(11) (a) 同種の野生型マウスと比較して角質のアミノ酸量が少ない；(b) 同種の野生型マウスと比較して皮膚の透過性が高い；(c) ダニ抗原の感作により皮膚炎が誘導される；の(a)～(c)の性質を有することを特徴とする上記(7)～(10)のいずれか記載のマウスに関する。

[0015] さらに本発明は、(12) (a) 相同組換えの際に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子の、エクソン2に含まれる転写開始点からエクソン3に

含まれるインフレームのATGまでの領域が、マーカー遺伝子と置換されるように設計されていること；（b）上記（a）のマーカー遺伝子配列の5'側に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子の5'非翻訳領域を含む配列と相同性のある7 kb以上の遺伝子配列を含むこと；（c）上記（a）のマーカー遺伝子配列の3'側に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子のエクソン3に含まれるインフレームのATGより下流側の配列と相同性のある1.5 kb以下の遺伝子配列を含むこと；の（a）～（c）の特徴を備えたターゲティングベクターに関する。

発明の効果

[0016] 上述のように、フィラグリントタンパク質は表皮のケラチンフィラメント構築に関与するだけでなく、ペプチドレベルにまで分解された後に保湿因子等としても働いており、皮膚バリア機能に重要な役割を果たしている。本発明のプロフィラグリン及びフィラグリンを発現する機能を完全に喪失させたマウスを、アレルギー疾患動物モデルや皮膚炎動物モデルとして使用することにより、皮膚バリア機能の形成及び維持におけるフィラグリンの役割を分子レベルで解析するとともに、アレルギー疾患や皮膚炎における皮膚バリア機能の関与を解明することが可能となり、皮膚バリア機能の低下により引き起こされるアレルギー疾患や皮膚炎の発症機構の解明や、その予防・治療効果を有する物質のスクリーニングが可能となる。さらに、本発明の皮膚バリア機能が低下したマウスは、アトピー性皮膚炎と喘息発症との関連を解明するための動物モデルとしても好適に用いることができる。これまでにアトピー性皮膚炎の臨床定義を満たすモデル動物は多々知られているが、抗原暴露から感作が成立するまでの疾患発症機序を正しく反映したモデルの報告は全くない。既存のモデルマウスの中でアトピー性皮膚炎の発症過程に近いと思われるものは反復抗原塗布モデル(非特許文献10及び11)であるが、これらはテープストリッピングなどの機械刺激やパッチによる抗原の閉鎖塗布により皮膚バリアを人為的に壊した後に、マウスに抗原を塗布して感作を成立させている。すなわち、バリアを通過して体内に入った抗原に対して、どのよ

うな反応が起こるかを解析するためのモデルである。それに対して、本発明のプロフィラグリン及びフィラグリンを発現する機能を喪失させたアトピー性皮膚炎発症モデルマウスは、皮膚のバリア障害によりそもそも何が起こるのか、特に、抗原が皮膚バリアを通過してから感作が成立するまでの、アトピー性皮膚炎の発症の最初期を解析することのできる初めてのモデルとなる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]本発明のマウスフィラグリン遺伝子ターゲティングベクター（TV1）のデザインを示す図である。

[図2]野生型フィラグリン遺伝子（Wildtype allele）、ターゲティングベクター、ならびに相同組換え後の変異フィラグリン遺伝子（Targeted allele）を示す図である。本発明のターゲティングベクターを用いてフィラグリン遺伝子のエクソン2の途中からエクソン3の一部までをPGK-neoと置換することにより、本来のスタートコドン及びフィラグリン遺伝子内に存在する全てのインフレームのATGを消失させることができる。

[図3]本発明のターゲティングベクターを用いて作製された陽性細胞（ES clone 832）のlong arm側の遺伝子型をサザンブロット法により解析した結果を示す図である。

[図4-a]本発明のキメラマウスの交配によって作製されたF1マウスのlong arm側の遺伝子型をサザンブロット法で解析した結果を示す図である。

[図4-b]本発明のBA1ハイブリッドESを用いて得られたクローンのshort arm側の遺伝子型をサザンブロット法で解析した結果を示す図である。

[図4-c]本発明のBA1ハイブリッドESを用いて得られたクローンにおいて、129マウス由来のゲノムに相同組換えが起こった場合に得られるキメラマウス及びF1マウスの遺伝子型を示す図である。

[図4-d]本発明のBA1ハイブリッドESを用いて得られたクローンにおいて

、B6マウス由来のゲノムに相同組換えが起こった場合に得られるキメラマウス及びF1マウスの遺伝子型を示す図である。

[図5-a] Flaky Tailマウス及び本発明のマウスの皮膚抽出物中に存在するプロフィラグリン及びフィラグリンタンパクをウエスタンブロット法により検出した結果を示す図である。図中、+/+は野生型を、+/-はヘテロ接合体（FLG^{+/-}）を、-/-はホモ接合体（FLG^{-/-}）を、ftはFlaky Tailマウスをそれぞれ示す。

[図5-b] 本発明のFLG^{+/-}及びFLG^{-/-}マウスの皮膚抽出物中に存在するプロフィラグリン及びフィラグリンタンパクをウエスタンブロット法により検出した結果を示す図である。図中、+/+は野生型を、+/-はヘテロ接合体（FLG^{+/-}）を、-/-はホモ接合体（FLG^{-/-}）をそれぞれ示す。

[図6] 本発明のFLG^{+/-}及びFLG^{-/-}マウスの皮膚組織におけるプロフィラグリン及びフィラグリンタンパク発現を免疫組織染色により検出した結果を示す図である。図中、+/+は野生型を、+/-はヘテロ接合体を、-/-はホモ接合体をそれぞれ示し、写真は上から、ヘマトキシリン・エオジン（HE）、フィラグリン（FLG）、ロリクリン（LOR）、インボルクリン（INV）の染色結果を示す。

[図7] 本発明FLG^{-/-}マウスの角層に含まれるアミノ酸の量を、野生型マウスと比較した結果を示す図である。図中、WTは野生型を、KOはホモ接合体（FLG^{-/-}）をそれぞれ示す。

[図8] 本発明FLG^{-/-}マウスの角層に含まれるアミノ酸の種類を野生型マウスと比較した結果、フィラグリンに多く含まれるアミノ酸が顕著に減少していることを示す図である。図の縦軸はFLG^{-/-}又は野生型マウスの角層に含まれる各アミノ酸量（モル数）を、横軸はフィラグリンタンパク質に含まれる量の多い順に左から右にアミノ酸の種類を並べた結果を示している。図中、WTは野生型を、KOはホモ接合体（FLG^{-/-}）をそれぞれ示す。

[図9] 野生型及びFLG^{-/-}マウスの手を、従来の臨界点乾燥方法により処理して白金を蒸着した後、通常の走査型電子顕微鏡（低真空チャンバーを有さ

ない)で観察した結果を示す図である。

[図10-a]野生型マウスの手をグルタルアルデヒドで固定してt-ブチルメタノールで乾燥処理した後、 -20°C の冷却ステージを装備した低真空走査型電子顕微鏡により観察した結果を示す図である。

[図10-b]FLG^{-/-}マウスの手をグルタルアルデヒドで固定してt-ブチルメタノールで乾燥処理した後、 -20°C の冷却ステージを装備した低真空走査型電子顕微鏡により観察した結果を示す図である。

[図10-c]野生型マウスの腹部より採取した皮膚をグルタルアルデヒドで固定してt-ブチルメタノールで乾燥処理した後、 -20°C の冷却ステージを装備した低真空走査型電子顕微鏡により観察した結果を示す図である。下段は上段パネルの四角の部分の拡大図である。

[図10-d]FLG^{-/-}マウスの腹部より採取した皮膚をグルタルアルデヒドで固定してt-ブチルメタノールで乾燥処理した後、 -20°C の冷却ステージを装備した低真空走査型電子顕微鏡により観察した結果を示す図である。下段は上段パネルの四角の部分の拡大図である。図中、矢印は本来角質に覆われているはずの未熟な表皮層が露出している箇所を示す。

[図11-a]in vivo共焦点ラマン分光装置 (Model3510;River Diagnostic社製)を用いて、in vivoマウス角層内分子濃度解析を行った結果を示す図である。図中、WTは野生型を、KOはホモ接合体 (FLG^{-/-})をそれぞれ示す。

[図11-b]in vivo共焦点ラマン分光装置 (Model3510;River Diagnostic社製)を用いて、in vivoマウス角層内分子濃度解析を行った結果を示す図である。図中、WTは野生型を、KOはホモ接合体 (FLG^{-/-})をそれぞれ示す。

[図12]本発明のFLG^{-/-}マウスの皮膚組織における、ランゲルハンス細胞 (赤)の細胞体へのbiotin (緑)の取り込みを示す図である。図中、+/+は野生型を、-/-はホモ接合体 (FLG^{-/-})をそれぞれ示す。

[図13]本発明のFLG^{-/-}マウスの耳にコナヒョウヒダニ抽出粗抗原を隔日で

8回塗布した結果を示す図である。野生型マウスでは皮膚炎所見を認めなかったが、本発明のフィラグリン欠損マウスでは、皮膚炎所見の特徴である痂皮・鱗屑付着・血管拡張・皮膚硬化が3匹中2匹で顕著に認められた。

[図14]本発明のFLG^{-/-}マウスの耳にコナヒョウヒダニ抽出粗抗原を隔日で16回塗布した後に、組織を染色した結果を示す図である。野生型と比較してFLG^{-/-}マウスでは耳介が腫脹し、表皮組織が海綿状態であることが明らかとなった。また、真皮の炎症細胞浸潤が認められた。図中、+/+は野生型を、-/-はホモ接合体（FLG^{-/-}）をそれぞれ示す。

発明を実施するための形態

[0018] 本発明の動物モデルとして使用する方法としては、フィラグリンをコードするマウスの内在性遺伝子の全部又は一部を破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性化し、プロフィラグリン及びフィラグリンを発現する機能を喪失させたマウスを、アレルギー疾患動物モデルや皮膚バリア機能が低下した皮膚炎動物モデルとして使用する方法であれば特に制限されず、なかでもアトピー性皮膚炎及び/又は喘息動物モデルとして使用する方法をより具体的に例示することができる。また、動物モデルとして使用する方法には、例えば、後述するスクリーニング方法における使用形態や、アトピー性皮膚炎と喘息発症との関連を解明するためのモデルとしての使用形態を挙げることができる。次に、本発明のアレルギー疾患モデルマウスや皮膚炎モデルマウス、より具体的には、アトピー性皮膚炎モデルマウス、喘息モデルマウス、アトピー性皮膚炎・喘息モデルマウス等としては、フィラグリンをコードするマウスの内在性遺伝子の全部又は一部を破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性化し、プロフィラグリン及びフィラグリンを発現する機能を喪失させたマウスであって、皮膚バリア機能が低下したマウスであれば特に制限されるものではなく、該マウスの表現型としては、例えば、(a) 同種の野生型マウスと比較して角質のアミノ酸量が少ない；(b) 同種の野生型マウスと比較して皮膚の透過性が高い；(c) ダニ抗原の感作により皮膚炎が誘導される；等を具体的に挙げるることができる。

[0019] 皮膚バリア機能は、生体の水分保持や外部からの進入物や紫外線等を防ぐものであり、表皮のなかでも最も外層にある角層が特に重要な機能をはたしている。フィラグリンは、ケラチノサイトの角化にともないプロフィラグリンから分解生成され、ケラチン線維を凝集させる。その後、角層上層でフィラグリンはさらに低分子のペプチドに分解され、保湿や紫外線吸収因子となる。このため、フィラグリン発現の低下又は欠損した場合、表皮、特に角層の形成が正常に行われず、水分保持機能や外部の刺激を防ぐ皮膚バリア機能障害が起こる。本発明の皮膚バリア機能が低下した皮膚炎モデル動物は、特定の刺激を与えることにより人為的に皮膚炎を発症させることが可能であり、上記特定の刺激としては、本発明のモデルマウスに皮膚炎を発症させることができるものであれば特に制限されないが、例えば、ダニ抗原などの特定の物質の皮膚への接触や、特定の物質の投与や、紫外線曝露や、特定の温度や湿度など外的環境による刺激等を挙げることができるが、なかでも、ダニ抗原による刺激を好適に挙げることができる。

[0020] 本発明のプロフィラグリン及びフィラグリンを発現する機能が低下又は喪失したマウスとしては、エクソン2に含まれる転写開始点からエクソン3に含まれるインフレームのATGまでの領域が、マーカー遺伝子と置換され、FLG遺伝子の機能が欠損したFLG^{-/-}マウスであれば特に制限されるものではないが、エクソン2に含まれる転写開始点からエクソン3に含まれるインフレームのATGまでの領域が、(a) 相同組換えの際に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子の、エクソン2に含まれる転写開始点からエクソン3に含まれるインフレームのATGまでの領域が、マーカー遺伝子と置換されるように設計されていること；(b) 上記(a)のマーカー遺伝子配列の5'側に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子の5'非翻訳領域を含む配列と相同性のある7 kb以上の遺伝子配列を含むこと；(c) 上記(a)のマーカー遺伝子配列の3'側に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子のエクソン3に含まれるインフレームのATGより下流側の配列と相同性のある1.5 kb以下の遺伝子配列を含むこと；の(a)～(c)の特徴を

備えたターゲティングベクターとの相同性組換えにより、マーカー遺伝子に置換されているマウスであることが好ましい。かかるFLG遺伝子の機能が欠損したマウスの作製方法を、以下説明する。

[0021] FLG遺伝子は、マウス遺伝子ライブラリーをPCR法等により増幅し、得られた遺伝子断片をマウスFLG遺伝子由来のプロンプを用いてスクリーニングすることができる。スクリーニングされたFLG遺伝子は、プラスミドベクター等を用いてサブクローンし、制限酵素マッピング及びDNAシーケンシングにより特定することができる。次に、このFLGをコードする遺伝子の全部又は一部をpMC1ネオ遺伝子カセット等に置換し、3'末端側にジフテリアトキシンAフラグメント(DT-A)遺伝子や単純ヘルペスウィルスのチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子等の遺伝子を導入することによって、ターゲティングベクターを作製する。

[0022] 作製されたターゲティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション(電気穿孔)法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418やガンシクロビア(GANC)等の抗生物質により相同的組換えを起こしたES細胞を選択する。また、この選択されたES細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。その確認されたES細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型マウスと交雑させると、本発明のヘテロ接合体マウス(F1マウス; FLG^{+/-})を得ることができ、このヘテロ接合体マウスを交雑させることによって、本発明のホモ接合体FLG^{-/-}マウスを作製することができる。また、このFLG^{-/-}を野生型マウスと交雑させることで、FLG^{-/+}マウスを得ることも出来る。上記FLG^{-/+}及びFLG^{-/-}マウスにおける、フィラグリンの発現を確認する方法としては、例えば、上記マウスの細胞や組織における遺伝子発現をノーザンブロット法や、RT-PCR法等より確認する方法や、タンパク発現をウェスタンブロット法や免疫染色法等により確認する方法を挙げることができるが、上

記マウスの皮膚組織におけるプロフィラグリン及びフィラグリンタンパク発現をウエスタンブロット法や免疫組織染色法により確認することが好ましく、なかでも、プロフィラグリンからのフィラグリンへの段階的な分解過程にあるタンパク質を検出することができることから、プロフィラグリンタンパク質の繰り返し領域に対する抗体（Rabbit Anti-Filaggrin Polyclonal Antibody, Unconjugated; Covance Research Products Inc社製; Cat# PRB-417P）を用いたウエスタンブロット法より確認することが特に好ましい。

[0023] 作出されたFLG^{-/-}マウスの皮膚バリア機能の低下は、例えば、目視による外観の観察や、角質水分量や角質アミノ酸量の測定などにより非侵襲的に確認することができる他、FLG^{-/-}マウスの表皮組織切片をヘマトキシリン・エオジン染色した後に顕微鏡下で組織学的に調べることや、マウスの皮膚組織をt-ブチルメタノールで処理した後に低真空走査型電子顕微鏡により観察することでより詳細に確認することができる。さらに、作出されたFLG^{-/-}マウスの角質バリア透過性については、下記実施例に記載のような、細胞膜非透過性のタンパク質ビオチン化試薬であるSulfo-NHS-LG-Biotinを用いた角質バリア透過性評価方法により調べることが可能である。

[0024] 本発明の動物モデルとして使用する方法の一形態である、経皮曝露により皮膚バリア機能の低下した動物の免疫応答反応に影響を与えるアレルギー誘導又は抑制物質のスクリーニング法としては、本発明のFLG^{-/-}マウスに被験物質を投与及び/又は曝露し、前記マウスにおける、動物個体、組織、器官若しくは細胞に現れる表現形の変化を、同種の野生型マウスに該被験物質を投与及び/又は曝露した場合と比較・評価するスクリーニング法であれば特に制限されるものではなく、スクリーニングに際しては、フィラグリンを発現する機能を喪失させたFLG^{-/-}マウスを、同腹の野生型と比較・評価することが好ましい。上記被験物質の投与及び曝露する方法は、被験物質の性質に依存して選択することができ、例えば、経口投与、経鼻投与、皮下への注射、皮膚への塗布、皮膚への接触、スプレーでの噴霧等を挙げることができる。また、上記表現形の変化としては、動物個体、組織、器官若しくは細

胞に現れる表現形の変化であれば特に制限されないが、なかでも、アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変の程度の変化や、気管支喘息病変の程度の変化等を好例として挙げるができる。上記アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変の程度は、例えば、皮膚外観の観察や、搔破行動回数の計測や、血中の I g G 及び／又は I g E 濃度の測定や、表皮組織中の免疫細胞浸潤の検出や、表皮細胞のサイトカイン産生量の測定等を行うことにより、また、上記気管支喘息病変の程度は、例えば、肺気管支組織における免疫細胞浸潤の検出や、気道抵抗圧の測定や、鼻腔抵抗の測定や、鼻腔容量の測定等を行うことにより比較・評価することができ、アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変の程度と、気管支喘息病変の程度の比較・評価を同時に行うこともできる。

[0025] また、本発明の動物モデルとして使用する方法の一形態であるアレルギー疾患の予防・治療剤のスクリーニング方法としては、本発明の F L G^{-/-}マウスに、被検物質とアレルギー誘導物質を投与及び／又は曝露し、動物個体、組織、器官若しくは細胞に現れる表現形の変化を、被検物質を投与及び／又は曝露しない場合と比較・評価するスクリーニング法であれば特に制限されないが、スクリーニングに際しては、F L G^{-/-}マウスを、同腹の野生型マウスと比較・評価することが好ましい。上記被験物質とアレルギー誘導物質の投与及び／又は曝露する方法、被験物質の性質に依存して選択することができ、例えば、経口投与、経鼻投与、皮下への注射、皮膚への塗布、皮膚への接触、スプレーでの噴霧等を挙げることができ、被験物質とアレルギー誘導物質を同時に投与及び／又は曝露することも、被験物質とアレルギー誘導物質のどちらかを先に投与及び／又は曝露することもでき、また、上記アレルギー誘導物質としては、特に制限されるものではないが、ダニ抗原を例として好適に挙げることができ、アレルギー誘導により抗原刺激する方法としては、特に制限がないが、例えば、前記アレルギー誘導を適度な溶媒に溶解し、マウスの皮膚に塗布（感作）し、一定の期間（例えば、数日間）を置いて複数回の塗布を行う（誘発、チャレンジ）方法が挙げることができ、感作部位と誘発部位とは同一であっても、異なってもよい。上記表現形の変化

としては、動物個体、組織、器官若しくは細胞に現れる表現形の変化であれば特に制限されないが、なかでも、アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変の程度の変化や、気管支喘息病変の程度の変化等を好例として挙げるができる。上記アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変の程度は、例えば、皮膚外観の観察や、搔破行動回数の計測や、血中の I g G 及び／又は I g E 濃度の測定や、表皮組織中の免疫細胞浸潤の検出や、表皮細胞のサイトカイン産生量の測定等を行うことにより、また、上記気管支喘息病変の程度は、例えば、肺気管支組織における免疫細胞浸潤の検出や、気道抵抗圧の測定や、鼻腔抵抗の測定や、鼻腔容量の測定等を行うことにより比較・評価することができ、アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変の程度と、気管支喘息病変の程度の比較・評価を同時に行うこともできる。

[0026] 本発明のターゲティングベクターとしては、フィラグリンをコードする遺伝子上流又は／及び発現領域の、少なくとも一部の配列の欠失、置換、および／または他の配列の挿入を起こすことにより、フィラグリン遺伝子の機能が喪失するように設計されたものであれば特に制限されないが、組み換えES細胞の選別のために、ポジティブ（陽性）及び／又はネガティブ（陰性）選別を行うマーカーとして機能する遺伝子の配列が挿入されるように設計されており、また、フィラグリン遺伝子の繰り返し配列による際に非特異的な組換えを防ぐように設計されたものが好ましい。具体的には、フィラグリンをコードする内在性遺伝子の、エクソン2に含まれる転写開始点からエクソン3に含まれるインフレームのATGまでの領域が、マーカー遺伝子と置換されるように設計されており、且つ、マーカー遺伝子配列の5'側に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子の5'非翻訳領域を含む配列と相同性のある7kb以上の遺伝子配列を、マーカー遺伝子配列の3'側に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子のエクソン3に含まれるインフレームのATGより下流側の配列と相同性のある1.5kb以下の遺伝子配列を含むターゲティングベクターを好例として挙げるができる。

[0027] 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範

図はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例 1

[0028] [ターゲティングベクターのデザイン]

マウスフィラグリン (mFLG) 遺伝子は、非翻訳領域である短いエクソン 1、翻訳開始点を含むエクソン 2、及びフィラグリンに特有な 10000 bp を超える巨大なエクソン 3 からなっている。第 3 エクソンは、開始直後にインフレームの ATG を持ち、第 3 エクソンの開始点から約 700 bp が特異的配列であり、その下流に 1 スパンが約 750 bp の繰り返し配列が 16 回繰り返される特殊な構造を持っている。このため、第 2 エクソンの ATG のみを破壊しても、第 3 エクソン開始直後にあるインフレームの ATG から転写が開始された場合、ほぼフィラグリン遺伝子の全長が正常に転写されてしまうと考えられる。したがって、ターゲティングベクターの構築にあたっては、第 2 エクソンの ATG から第 3 エクソンの ATG までを全て含む、約 1.9 kb を欠失させるように設計した (図 1)。また、繰り返し配列をできる限り避けるために、long arm を上流側に、short arm を下流側に設定した。short arm については、第 3 エクソンの ATG を欠失させるために、第 3 エクソンの ATG よりも下流に設定する必要があるが、短すぎるとターゲティング効率が非常に落ちるため、short arm を短くしすぎることはできない。そこで、short arm は第 3 エクソンの ATG 以降の特異的配列約 700 bp に、1 スパンが約 750 bp の繰り返し配列のうち前半の約 500 bp の配列を加えて、約 1200 bp の長さとした。

実施例 2

[0029] [ターゲティングベクターの構築]

mFLG 遺伝子座を含む BAC clones (RP23-346B13、及び、RP23-39E22) を取得した。配列番号 1 及び 2 に示される 2 種類のプライマーを合成し、GeneBridges 社の sRed/ET システムを用いて BAC クローンよりターゲティングベクター構築に必要なフィラグリン遺伝子を

含むゲノムDNA配列（chromosome 3において上記プライマーによって挟まれた範囲のゲノムDNA）をクローニングし、さらに、Backboneベクターにサブクローニングした。次に、neoカセットを挿入するため、制限酵素EcoRIの認識配列（GAATTC）をエクソン2にある翻訳開始点上にin vitro mutagenesisにて作製（GATGTC>>GGATCCに変更）し、BsiWIの認識配列（CGTACG）をin vitro mutagenesisにてエクソン3の頭の領域に作製（CAAATG>>CGTACG）した。その上でEcoRI及びBsiWIにて制限酵素処理後、両端をEcoRI-BsiWIにて切断したFrt/loxP-neo配列（配列番号3）を挿入し、ターゲティングベクターTV1を作製した。

実施例 3

[0030] [ESの作製とサザンブロット解析による陽性クローンの確認]

まず、C57BL6のES細胞を用いて、電圧ポレーションによるTV1の導入を試みたが、陽性細胞を得ることができなかった。このため、細胞をBA1ハイブリッドのES細胞（B6マウスと129マウスのハイブリッド）に変更し、再度電圧ポレーションによるTV1の導入を行った。

陽性クローンを確認のためには通常PCRが用いられるが、本実験においてはフィラグリン遺伝子の繰り返し配列のためにPCRによる確認は不可能であった。このため、繰り返し配列直前の配列をプローブとして用いたサザンブロット解析を行い、陽性クローンを検索することとした。プローブの位置を図2に示す。上述のように、short armにはフィラグリン遺伝子の繰り返し配列の前半の500bpの配列が含まれるが、この配列は、その下流にほぼ100%一致する配列が15回繰り返し出現する。このために、short arm側は、16回繰り返される繰り返し配列（1スパンが約750bp）のどこかで予期せぬ相同組換えが起こる可能性がある。short arm側で正しく相同組換えが起こっていることを証明するためには、short arm側のサザンブロット解析が必要となる。通常のサザンブロット解析にはshort armの外側（すなわちターゲティング

ベクターには含まれない配列)を用いてプローブを作製するが、このターゲッティングベクターにおいてはshort armの外側は繰り返し配列となっており、short armの外側にプローブを作製することができない。そこで、ターゲッティングベクターのshort arm内部にプローブを作製した。また、サザンブロットに用いるゲノム切断制限酵素を検索した結果、唯一、Msc Iのみが使用可能であることが分かった(図2)。上述のように、フィラグリリン遺伝子は15の繰り返し配列を含んでいるが、この繰り返し配列は完全に同一の配列が繰り返されているのではなく、繰り返し配列ごとに異なる配列が一部含まれている。Msc I認識配列は、そのような繰り返し配列ごとに異なる配列中に存在している。このため、Msc IによりゲノムDNAを消化した後に、上記のプローブ用いたサザンブロット解析を行うことにより、相同組換えが正しい位置で起こっているクローンを検出することが可能である。また、全く予期せぬ場所で組換えが起こった場合も、検出されるバンドの高さが変化することで検出可能であると考えられた。

[0031] 上述のサザンブロット解析によりBA1ハイブリッドESを用いて得られたクローンの遺伝子型を確認した結果、全く予想外のことに、10kbと6kbの2本のバンドが検出された(図4-a、lane 3及び11)。この結果は、ESクローン作製に用いた細胞が、B6マウスと129マウスのハイブリッドES細胞であることが原因であると予想されたため、B6マウス、129マウスそれぞれのゲノムをMsc Iにて切断し、サザンブロット解析を行った。その結果、10kbのバンドは129マウスゲノム由来、6kbのバンドはB6マウスゲノム由来であることが明らかとなった。また、バンドの大きさから、フィラグリリン遺伝子の繰り返し配列内にあるMsc Iサイトに多型があると考えられた。このようなエクソン内部の遺伝子多型は非常にめずらしく、変異が入りやすい繰り返し配列を持つ遺伝子独特のものであると考えられた。この多型のため、以後の解析はさらに困難となった。ターゲッティングによって得られたクローンに対して、まずlong arm側のサザンブロット解析を行い、long arm側で目的の相同組換えが

起こっているクローン#824を得た(図3)。次に、#824のゲノムをMscIにて切断しサザンブロットを行ったところ、10kb、6kbのバンドが得られたことから、このクローンではshort arm側も正しい場所で相同組換えが起こっている可能性が高いと考えられた。しかし、クローン#824において、B6ゲノムまたは129ゲノムのいずれのフィラグリン遺伝子と相同組換えが起こったかは、この時点では不明であった。

[0032] [キメラマウスの作製]

ESクローン#824を胚盤胞に導入して仮親に移植することによりキメラマウスを作製し、さらに、B6マウスと掛け合わせてF1ヘテロマウスを得た(追加図4-b及びc)。このF1ヘテロマウスのゲノムをMscIにて切断しサザンブロット解析を行ったところ、F1ヘテロマウスでは6kbのバンドのみが得られた。この結果から、ESクローン#824において、129マウス由来ゲノムのフィラグリン遺伝子ではなく、B6マウス由来ゲノムのフィラグリン遺伝子において正しく相同組換えが起こっていたことが、この時点ではじめて証明された。本ターゲティングにおける、相同組換えが正しい位置で起こったかどうかの確認方法は、フィラグリン遺伝子の繰り返し配列の非常な特殊性に対応して開発した独自性の高い方法である。

実施例 4

[0033] [FLG遺伝子欠損マウスにおけるフィラグリン発現解析]

実施例3で作製されたFLG^{+/-}及びFLG^{-/-}マウスにおいて、フィラグリンタンパク質の発現が特異的に減少又は欠損しているかどうかを確認するために、ウエスタンブロット解析及び免疫組織染色を行った。

図5-aに、Flaky Tailマウス及び本発明のマウスの皮膚抽出物中に存在するプロフィラグリン及びフィラグリンタンパクをウエスタンブロット法により検出した結果を示す。野生型マウス(+/+),ヘテロマウス(+/-)、フィラグリンノックアウトマウス(-/-)では、フィラグリンの前駆体であるプロフィラグリンタンパク質のバンドと、プロフィラグリンタンパク質が段階的に分解されていくことを示すラダー状のバンド、および成熟型であるフィ

ラグリタンパク質のバンドが認められた。一方、ノックアウトマウスではこれら全てのバンドが完全に消失していた。このことから、1. 使用している抗体はフィラグリン特異的な抗体であり、フィラグリン以外の蛋白を認識することはないこと、2. フィラグリンノックアウトマウスでは、プロフィラグリンおよびフィラグリンタンパク質のいずれも全く産生されていないこと、が明らかとなった。また、flaky tailマウスでは、通常のプロフィラグリンタンパク質の約半分程度の長さの変異プロフィラグリンタンパク質のバンドと、わずかな成熟型フィラグリンタンパク質のバンドを認めた。

[0034] 図5-bに、野生型 (+/+)、ヘテロ (+/-) 及びホモ (-/-) 欠損マウスの皮膚抽出物中の、角質局在タンパク質の発現をウエスタンブロット法により検討した結果を示す。前述のように、FLG^{-/-}マウスでは、プロフィラグリン及びフィラグリンタンパクはともに全く検出されなかったが、代表的な角質局在タンパクであるロリクリン及びインボルクリンは、野生型、FLG^{+/-}、及びFLG^{-/-}のいずれにも発現しており、その発現量に明らかな差は認められなかった。各レーンに同量のサンプルが泳動されていることは、コントロールであるβ-アクチンの発現量が一定であることから確認できる。

[0035] 図6に、野生型 (+/+)、ヘテロ (+/-) 及びホモ (-/-) 欠損マウスの皮膚組織におけるフィラグリンタンパク発現を免疫組織染色により検討した結果を示す。上述のウエスタンブロット法による実験結果と同様に、FLG^{-/-}マウスではフィラグリンタンパクは全く検出されなかった。また、ロリクリン (LOR) 及びインボルクリン (INV) は、野生型、FLG^{+/-}、及びFLG^{-/-}のいずれにも同様に発現していた。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色の結果には明らかな差は認められなかった。

以上の結果から、FLG^{-/-}マウスの皮膚組織中においてはフィラグリンタンパクの発現が完全に欠損していることが明らかとなった。

実施例 5

[0036] [FLG遺伝子欠損マウスの表現型解析]

FLG^{-/-}マウス、FLG^{+/-}、及び、同腹の野生型マウスを用いて、以下の比較実験を行った。

(角質のアミノ酸組成分析)

日齢4のFLG^{-/-}及び野生型マウスを用いて、角層に含まれるアミノ酸の量及び種類を分析した。マウスの背部皮膚約1.5×2.0cm²の領域から、メンディングテープ(Scotch)を用いて計6回のテープストリッピングを行い、角層サンプルを採取した後、トルエンを用いてメンディングテープより計4回にわけて角層を抽出した。抽出物をエバポレートして溶媒を除去した後、10%スルホサリチル酸に抽出物を溶解し、アミノ酸分析装置(日立社製)によりアミノ酸分析を行った。その結果、FLG^{-/-}マウスにおける角質単位面積あたりのアミノ酸モル数は、野生型と比較して著明に減少していた(図7)。また、図8は、縦軸にFLG^{-/-}又は野生型マウスの角層に含まれる各アミノ酸量(モル数)を、横軸にフィラグリンタンパク質に含まれる量の多い順に左から右にアミノ酸の種類を並べた結果を示している。この図から、フィラグリンタンパク質に多く含まれているアミノ酸ほど顕著に減少しているが、フィラグリンタンパク質にあまり含まれていないアミノ酸も減少していることが明らかとなった。以上の結果から、FLG^{-/-}マウスでは、角質内アミノ酸量が減少していることが明らかとなった。

[0037] (低真空走査型電子顕微鏡による角質組織解析)

日齢5のFLG^{-/-}及び野生型マウス皮膚を採取し、グルタルアルデヒドで固定した。t-ブチルメタノールで乾燥処理した後、-20°Cの冷却ステージを装備した低真空走査型電子顕微鏡(日立S-3400N;日立社製)により観察した。図10-a~図10-dに結果を示すように、t-ブチルエタノールを選択することにより皮表の形態を良好に保持することができ、また、低真空走査型電子顕微鏡を選択することにより組織の真空による破損を最小限に留め、本来の形態を観察することを可能となった。低真空走査型電子顕微鏡は反射電子、または二次電子を検出する2つの異なるモードで観察した。

[0038] 図10-a及び図10-bは、生理的に角質が厚い手（paw）の観察を行った結果である。野生型マウスの手の皮表は層状の角質で鏡状に覆われているのに対し（図10-a）、フィラグリン欠損型マウスでは表面が平滑、層状の角層に乏しい所見が得られた（10-b）。これらの結果から、フィラグリンを欠損することにより正常な層状の角質構造を形成できない可能性が示唆された。

[0039] 図10-c及び図10-dは、体幹の皮膚（腹部）の観察を行った結果である。下段は上段パネルの四角の部分の拡大図である。野生型マウスの皮表は層状、もしくはリボン状の角層に覆われているのに比し、フィラグリン欠損型マウスではこの構造が存在しない箇所が多く認められ、下層の有核細胞層を透見して見る事ができた。以上の結果より、野生型マウスでは角質が層状の構造を取りながら皮膚最外層のバリアーを形成しているのに比べ、フィラグリン欠損型マウスではこの構造が正常に形成されないか、容易に脱落してしまうため本来角質に覆われているはずの未熟な表皮層が露出していることが示唆された。

[0040] なお、図9は上記実験の対照として、従来の臨界点乾燥を行い、白金を蒸着した後、通常の走査型電子顕微鏡（低真空チャンバーを有さない）で観察した結果を示す。試料の前処理および走査型電子顕微鏡の試料チャンバーの低真空により組織のアーティファクトが強く、表現型を判断するのが極めて困難であった。

[0041] （角層内分子濃度解析）

*in vivo*共焦点ラマン分光装置（Model3510;River Diagnostic社製）を用いて、*in vivo*マウス角層内分子濃度解析を行った。日齢2～5のFLG^{-/-}及び野生型マウスをそれぞれ各5匹ずつ用意し、その腹部皮膚表面より深さ2 μ m間隔で、マウスの角層の厚さの範囲内に収まる8 μ mまでを測定した。光源として785nmのレーザーを用い、400～1800 cm^{-1} の指紋領域と呼ばれる領域を調べ、各種アミノ酸およびその代謝産物を定量化した。NMF（Natural Moisturizing Factor）は、serine、glycin

e、pyrrolidone-5-carboxylic acid (PCA)、proline、ornithine、histidine (pH4)、histidine (pH7)、alanineという主要構成要素のラマンスペクトルの総和により測定した。

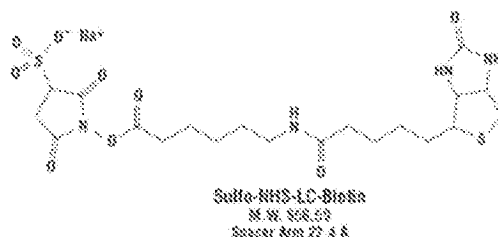
[0042] なお、図に表したNMF、各種アミノ酸等の分子濃度プロファイルは、FLG^{-/-}及び野生型マウスとの間で変化が最も少ないと考えられるケラチンのラマンスペクトルシグナル強度を基準値とした時の、これらの各分子の相対値として求めた。図11-a及びbに結果を示すように、FLG^{-/-}マウスにおいては、天然保湿因子と呼ばれる成分が著明に減少していることが明らかとなった。以上の結果から、予想されたとおり、FLG^{-/-}マウスの角層では野生型と比較して水分量が減少し、皮膚が乾燥していることが示唆された。

[0043] (FLG遺伝子欠損マウスの皮膚バリア機能解析)

FLG遺伝子欠損マウスの皮膚バリア機能が低下しているかどうかを確認するために、表皮の抗原提示細胞であるランゲルハンス細胞への取り込み量による皮膚バリア機能評価方法を開発し、FLG^{-/-}及び野生型マウスにおける皮膚バリア機能について検討した。

従来の皮膚に抗原を外用してランゲルハンス細胞の抗原取り込みを評価する方法においては、FITCなどの角質バリアを容易に通過する試薬が用いられてきた。しかし、角質バリアを容易に通過する試薬を用いた方法では、フィラグリン欠失による角質バリア通過性の変化を観察することはできない。そこで、我々は細胞膜非透過性のタンパク質ビオチン化試薬であるSulfo-NHS-LC-Biotinを用いた角質バリア通過性評価方法を確立し、はじめて角質バリア通過性の変化を観察を可能にした。Sulfo-NHS-LC-Biotinの構造式を以下に示す。

[0044] [化1]



[0045] Sulfo-NHS-LG-Biotin (#21335 ; Thermo Scientific社製) を7週齢のメスのFLG^{-/-}マウス、及び、同腹の野生型マウスの耳の内側の皮膚表面に塗布し、ランゲルハンス細胞への取り込みを蛍光顕微鏡を用いて観察した。具体的には、Sulfo-NHS-LG-Biotin[10mg/mL in PBS/0.7mM GaCl₂]を皮膚表面に塗布し、24時間後にマウスの耳を採取した。耳の皮膚を軟骨より剥離して3.8%チオシアン化アンモニウム/リン酸バッファにて37°C、20分間処理した後、真皮から表皮をメカニカルに剥離した。続いて、表皮を95%エタノールにて固定し、抗MHC Class II IA + IE 抗体 [M5/114.15.2] (eBioscience社製) によりランゲルハンス細胞を、avidin-Alexa488 (Invitrogen社製) によりビオチン化タンパク質を染色し、Leica TCS SP5 レーザーコンフォーカル顕微鏡 (ライカ社製) を用いて観察した。

[0046] 図12に示すように、野生型マウスでは、ランゲルハンス細胞 (赤) へのbiotin (緑) の取り込みは見られなかったが、FLG^{-/-}マウスでは、ランゲルハンス細胞 (赤) の細胞体に、取り込まれたbiotin (緑) が蓄積している像 (矢印) が頻繁に観察された。これらの結果から、FLG^{-/-}マウスでは、皮膚のバリア機能が障害されており、角質の外側に塗布された物質が、容易に皮膚バリアをつきぬけて表皮内に侵入し、ランゲルハンス細胞に抗原として取り込まれることが示された。

実施例 6

[0047] [ダニ抗原感作による皮膚炎の誘導]

まず、FLG^{-/-}マウスにおいて、経皮的に塗布した抗原に対する感作が成立しやすいか否かについて検討した。6~8週齢のFLG^{-/-}マウス(n=3)と同腹の野生型マウス(n=4)のそれぞれにおいて、コナヒョウヒダニ抽出粗抗原を隔日で両耳に塗布した。図13に、8回塗布後の写真を示す。フィラグリン欠損型マウスは、図13に示すように、皮膚炎所見の特徴である痂皮・鱗屑付着・血管拡張・皮膚硬化が3匹中2匹で顕著に認められた。一方、同腹の野生型マウスでは、4匹とも明らかな皮膚炎所見を認めなかった。すなわちFLG^{-/-}マウスでは経皮的な抗原感作が起こりやすいと考えられた。

。

[0048] さらに、コナヒョウヒダニ抽出粗抗原を16回塗布後のFLG^{-/-}マウスと同腹の野生型マウスの耳を採取し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色により組織学的な変化を検討した。図14に結果を示すように、野生型と比較してFLG^{-/-}マウスの耳では、耳介が腫脹（厚さが増加）しており、表皮部分（写真の色の濃い部分）では細胞の隙間が白く抜けて見えることから表皮組織が海綿状態であることが明らかとなった。また、真皮には炎症細胞浸潤が認められた。

実施例 7

[0049] [フィラグリン欠損マウスにおける抗原感作亢進のメカニズムの解析]

フィラグリン欠失により、皮膚における抗原感作が成立しやすくなるメカニズムとしては、（1）フィラグリン欠失により皮膚の角層バリアが脆弱となり、抗原が皮膚を通過して免疫系に暴露されやすくなる、（2）フィラグリン欠失により皮膚と免疫系細胞との相互作用が変調して抗原に対して感作が起こりやすくなる、という大きく分けて2つの可能性が考えられる。（1）については、様々な物質の皮膚角層バリアの通過性・透過性をラマン分光顕微鏡・ツーフォトン顕微鏡・質量分析顕微鏡を用いて測定した。また、皮膚を通過して抗原提示細胞に取り込まれた抗原をFACS（フローサイトメトリー）を用いて定量的に解析することで、抗原の皮膚通過量の変化を測定する。一方、（2）については定常状態およびtape stripやパッチテストにおける表皮および真皮の各種抗原提示細胞の活性化度合に対して、フィラグリン欠失が及ぼす影響を測定する。

実施例 8

[0050] [フィラグリン欠損による皮膚バリア障害に対するバリア機能補充薬の開発]

フィラグリンノックアウトマウスの皮膚炎モデルを用いて、バリア機能を補填することにより皮膚炎発症を予防できる薬剤のスクリーニングを行う。

実施例 9

[0051] [慢性的な抗原刺激によるアトピー性皮膚炎モデルマウスの開発]

フィラグリノックアウトマウスでは経皮的な抗原感作が起こりやすいことを示した。すなわちフィラグリノックアウトマウスでは、経皮的な抗原感作が生後すぐから慢性的に起こっていると考えられる。フィラグリノックアウトマウスを用いて、慢性的な抗原刺激によるアトピー性皮膚炎モデルマウスの開発を行う。

実施例 10

[0052] [アトピー性皮膚炎モデルにおける抗原提示細胞の役割の解析]

経皮的に侵入した抗原は、表皮ランゲルハンス細胞および真皮樹状細胞により捕捉され免疫系に抗原提示されることが考えられる。真皮樹状細胞には複数のサブセットが存在することが最近報告された。しかし表皮ランゲルハンス細胞および真皮樹状細胞サブセットそれぞれの抗原提示における役割分担はほとんど不明である。Langerin-DTA, Langerin-DTR, CD11c-DTRマウスとフィラグリノックアウトマウスを掛け合わせることで、各種の皮膚抗原提示細胞を欠失したフィラグリノックアウトマウスを作成し、アトピー性皮膚炎発症における各種の抗原提示細胞の役割分担を解明する。これらの抗原提示細胞の働きを抑制したり、免疫寛容に働く抗原提示細胞の働きを賦活化したりすることにより、アトピー性皮膚炎の発症予防・治療の新しい方法を開発する。

請求の範囲

- [請求項1] フィラグリン (filaggrin) をコードする内在性遺伝子の全部又は一部を欠損・置換等の遺伝子変異により破壊し、プロフィラグリン及びフィラグリンを発現する機能を喪失させたマウスを、アレルギー疾患動物モデルとして使用する方法。
- [請求項2] アレルギー疾患がアトピー性皮膚炎であることを特徴とする請求項1記載の方法。
- [請求項3] フィラグリンをコードする内在性遺伝子の全部又は一部を欠損・置換等の遺伝子変異により破壊し、プロフィラグリン及びフィラグリンを発現する機能を喪失させたマウスを、皮膚バリア機能が低下している皮膚炎動物モデルとして使用する方法。
- [請求項4] フィラグリンをコードする内在性遺伝子の一部が、エクソン2に含まれる転写開始点からエクソン3に含まれるインフレームのATGまでを含む領域であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載の方法。
- [請求項5] フィラグリンをコードする内在性遺伝子の一部が、以下の(a)～(c)の特徴を備えたターゲティングベクターとの相同組換えによりマーカー遺伝子に置換されていることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載の方法。
- (a) 相同組換えの際に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子の、エクソン2に含まれる転写開始点からエクソン3に含まれるインフレームのATGまでの領域が、マーカー遺伝子と置換されるように設計されていること；
- (b) 上記(a)のマーカー遺伝子配列の5'側に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子の5'非翻訳領域を含む配列と同源性のある7kb以上の遺伝子配列を含むこと；
- (c) 上記(a)のマーカー遺伝子配列の3'側に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子のエクソン3に含まれるインフレームのAT

Gより下流側の配列と相同性のある1.5 kb以下の遺伝子配列を含むこと；

[請求項6] プロフィラグリン及びフィラグリンを発現する機能を喪失させたマウスが、以下の(a)～(c)の性質を有することを特徴とする請求項1～5のいずれか記載の方法。

(a) 同種の野生型マウスと比較して角質のアミノ酸量が少ない；

(b) 同種の野生型マウスと比較して皮膚の透過性が高い；

(c) ダニ抗原の感作により皮膚炎が誘導される；

[請求項7] フィラグリンをコードする内在性遺伝子の、エクソン2に含まれる転写開始点からエクソン3に含まれるインフレームのATGまでの領域が、マーカー遺伝子と置換され、プロフィラグリン及びフィラグリンを発現する機能を喪失させたことを特徴とするアレルギー疾患モデルマウス。

[請求項8] アレルギー疾患がアトピー性皮膚炎であることを特徴とする請求項7記載のマウス。

[請求項9] フィラグリンをコードする内在性遺伝子の、エクソン2に含まれる転写開始点からエクソン3に含まれるインフレームのATGまでの領域が、マーカー遺伝子と置換され、プロフィラグリン及びフィラグリンを発現する機能を喪失させたことを特徴とする、皮膚バリア機能が低下している皮膚炎モデルマウス。

[請求項10] 以下の(a)～(c)の特徴を備えたターゲティングベクターとの相同性組換えにより、エクソン2に含まれる転写開始点からエクソン3に含まれるインフレームのATGまでの領域が、マーカー遺伝子に置換されていることを特徴とする請求項7～9のいずれか記載のマウス。

(a) 相同組換えの際に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子の、エクソン2に含まれる転写開始点からエクソン3に含まれるインフレームのATGまでの領域が、マーカー遺伝子と置換されるように設

計されていること；

(b) 上記 (a) のマーカー遺伝子配列の5'側に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子の5'非翻訳領域を含む配列と相同性のある7 kb以上の遺伝子配列を含むこと；

(c) 上記 (a) のマーカー遺伝子配列の3'側に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子のエクソン3に含まれるインフレームのATGより下流側の配列と相同性のある1.5 kb以下の遺伝子配列を含むこと；

[請求項11] 以下の (a) ~ (c) の性質を有することを特徴とする請求項7~10のいずれか記載のマウス。

(a) 同種の野生型マウスと比較して角質のアミノ酸量が少ない；

(b) 同種の野生型マウスと比較して皮膚の透過性が高い；

(c) ダニ抗原の感作により皮膚炎が誘導される；

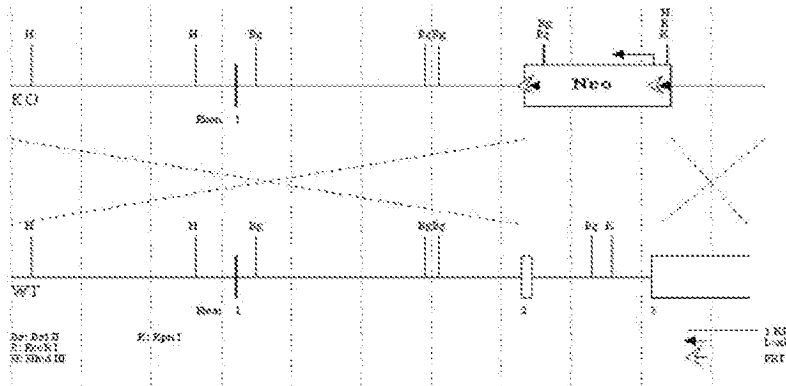
[請求項12] 以下の (a) ~ (c) の特徴を備えたターゲティングベクター。

(a) 相同組換えの際に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子の、エクソン2に含まれる転写開始点からエクソン3に含まれるインフレームのATGまでの領域が、マーカー遺伝子と置換されるように設計されていること；

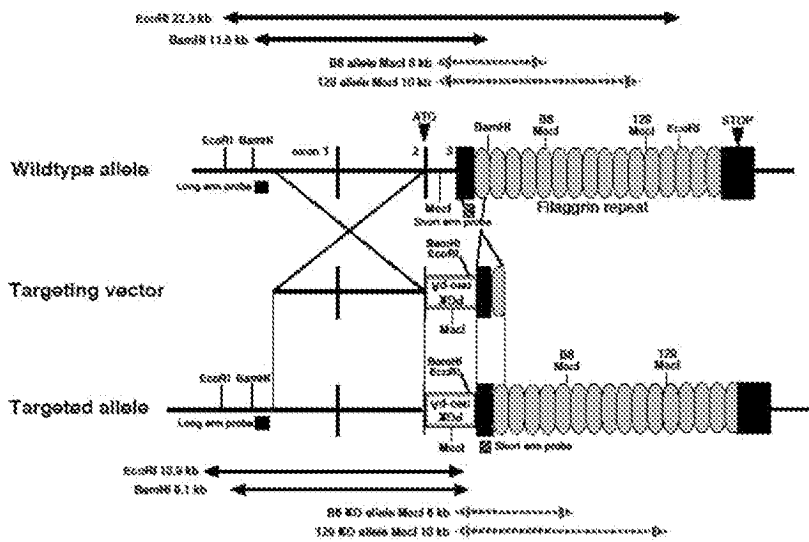
(b) 上記 (a) のマーカー遺伝子配列の5'側に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子の5'非翻訳領域を含む配列と相同性のある7 kb以上の遺伝子配列を含むこと；

(c) 上記 (a) のマーカー遺伝子配列の3'側に、フィラグリンをコードする内在性遺伝子のエクソン3に含まれるインフレームのATGより下流側の配列と相同性のある1.5 kb以下の遺伝子配列を含むこと；

[图1]

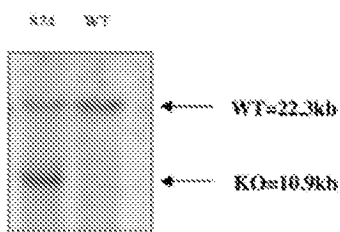


[图2]



[图3]

ES clone 824: EcoRI digestion



Southern blotting

EcoRI digestion

WT allele: 22.3K

KO allele: 10.9K

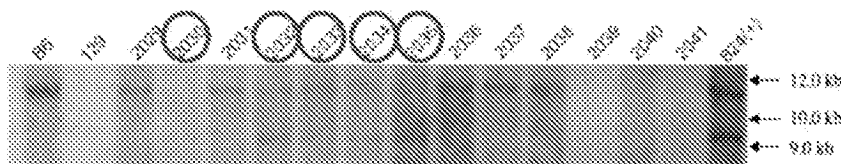
BamHI digestion

WT allele: 11.8K

KO allele: 8.1K

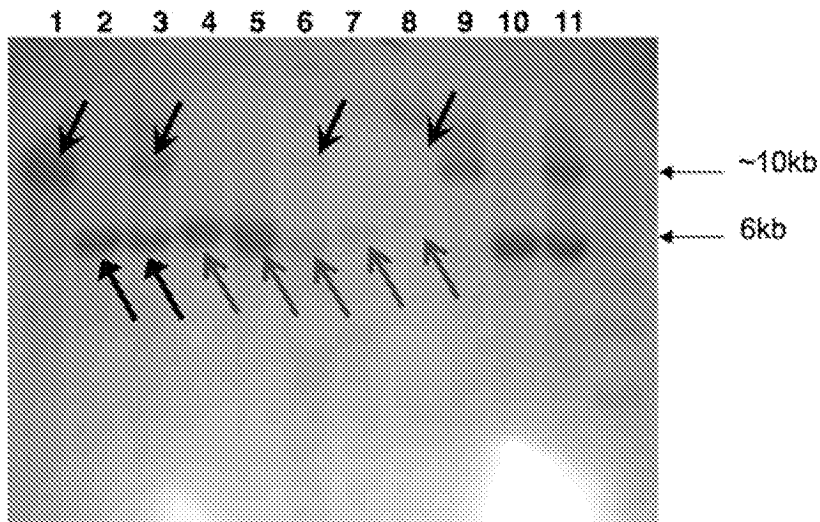
[图4-a]

F1 hetero mouse: BamHI digestion



[圖4-b]

MscI digestion: Southern blotting with short arm probe



Lanes 1 and 9: 129 WT DNA

Lanes 2 and 10: B6 WT DNA

Lanes 3 and 11: Hybrid WT DNA

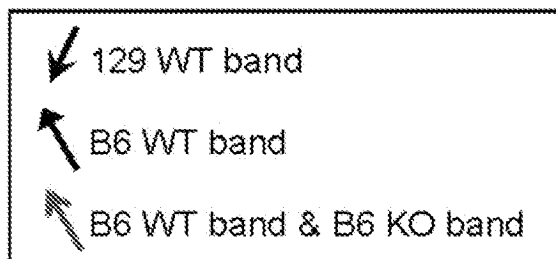
Lane 4: Mouse #2030 (female; has KO band hybridized with LA probe)

Lane 5: Mouse #2033 (female; has KO band hybridized with LA probe)

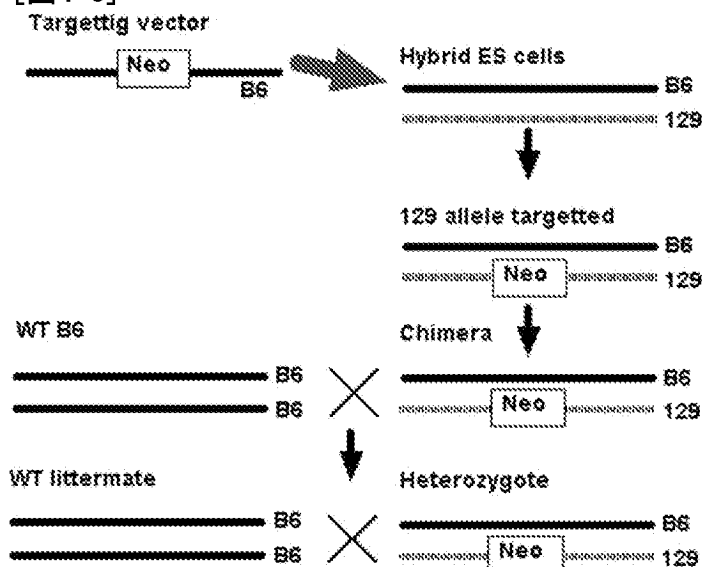
Lane 6: Mouse #2040 (WT littermate)

Lane 7: Mouse #2041 (male; has KO band hybridized with LA probe)

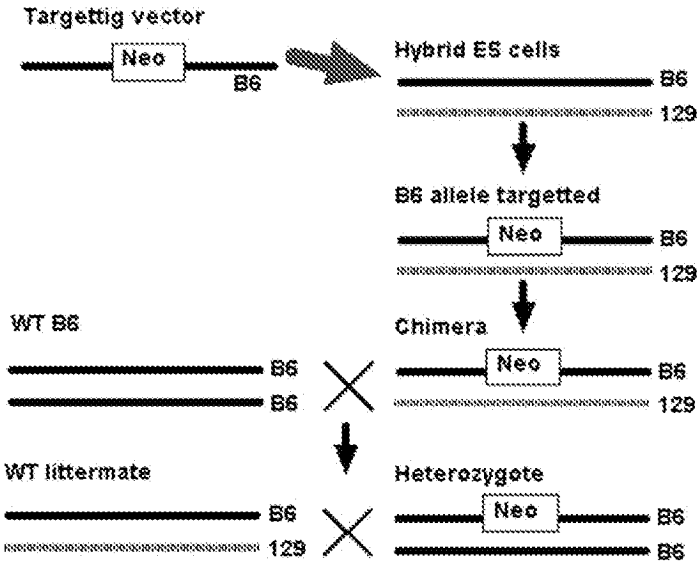
Lane 8: Clone #824



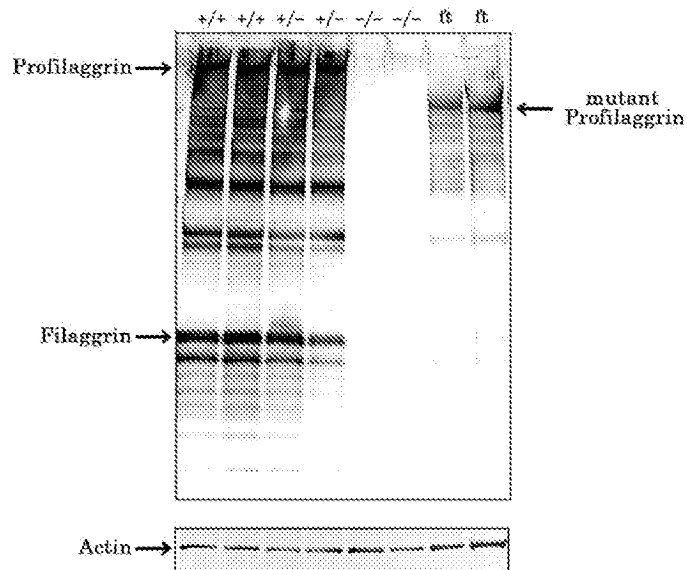
[圖4-c]



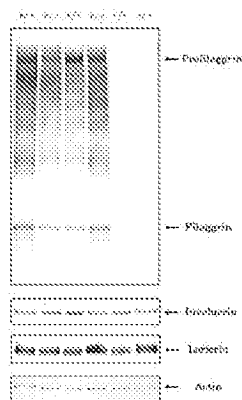
[圖4-d]



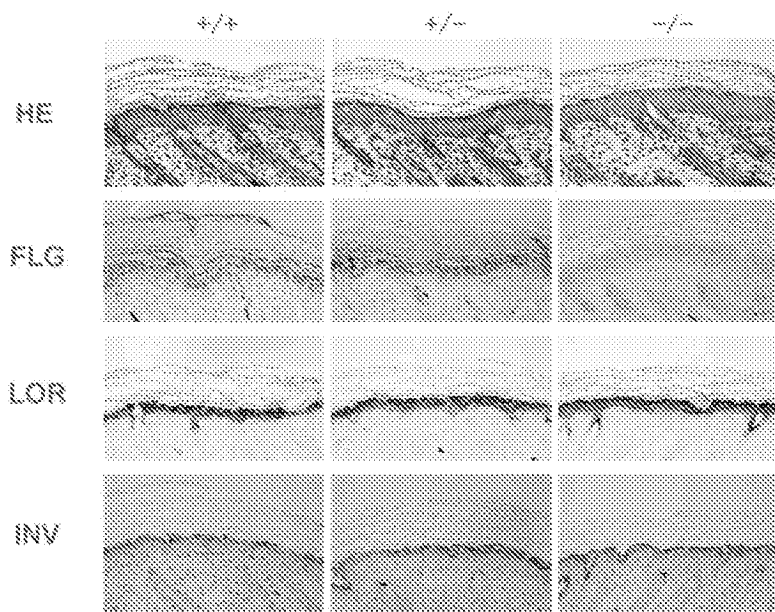
[圖5-a]



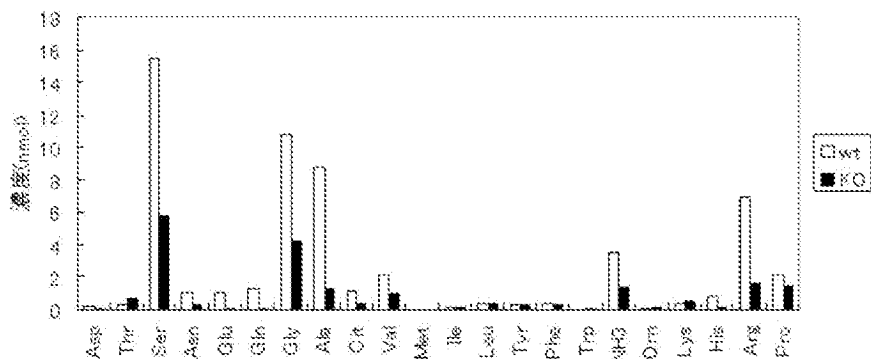
[圖5-b]



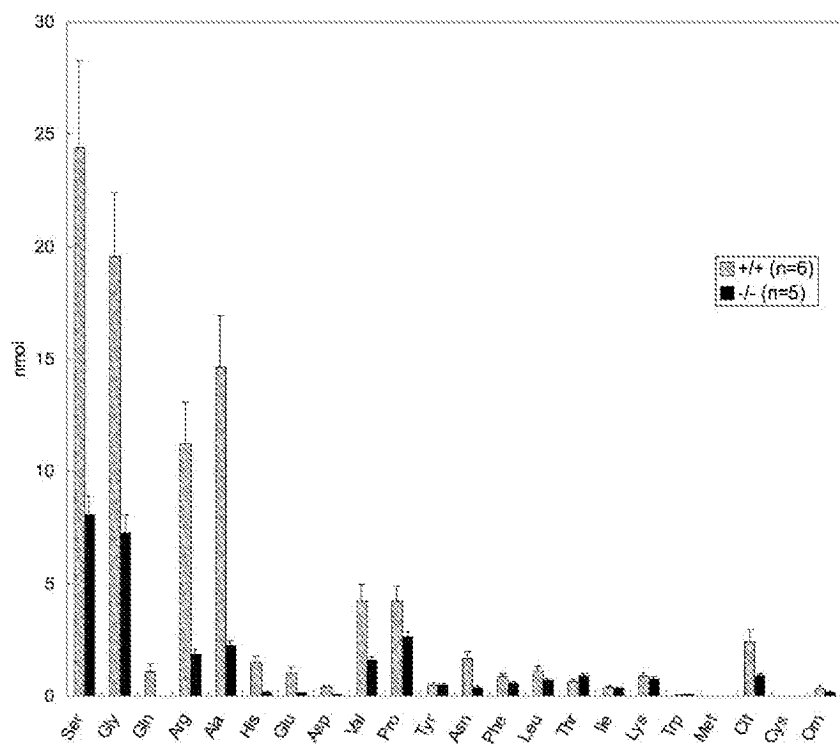
[図6]



[図7]

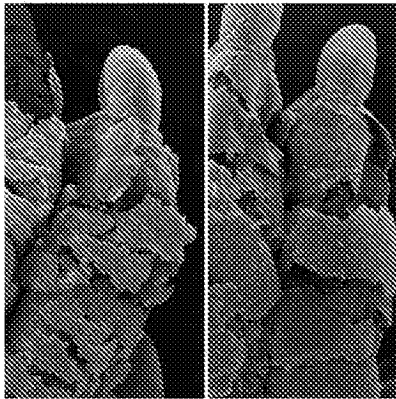


[図8]



[図9]

フィラグリン野生型 フィラグリン欠損型

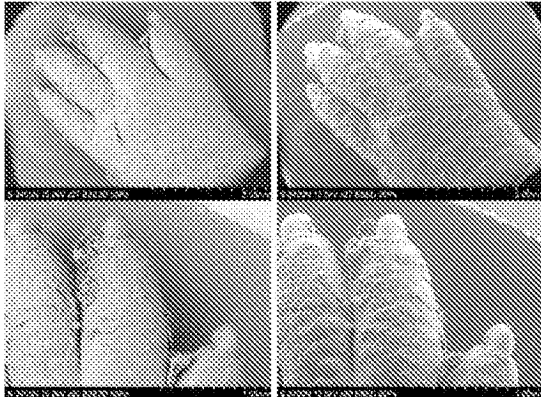


[図10-a]

フィラグリン野生型

反射電子モード

二次電子モード

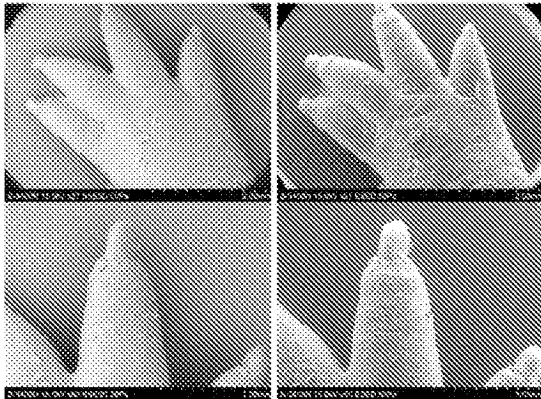


[図10-b]

フィラグリン欠損型

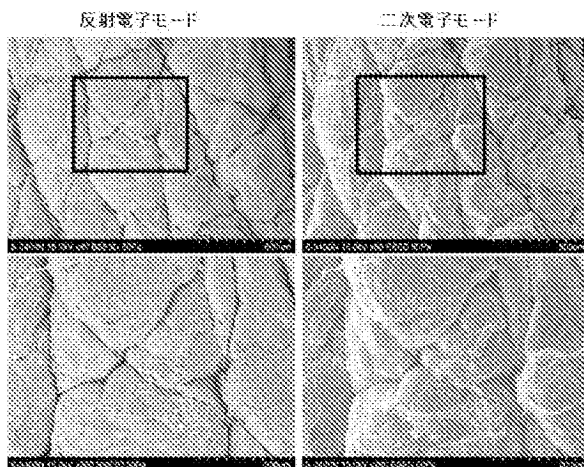
反射電子モード

二次電子モード



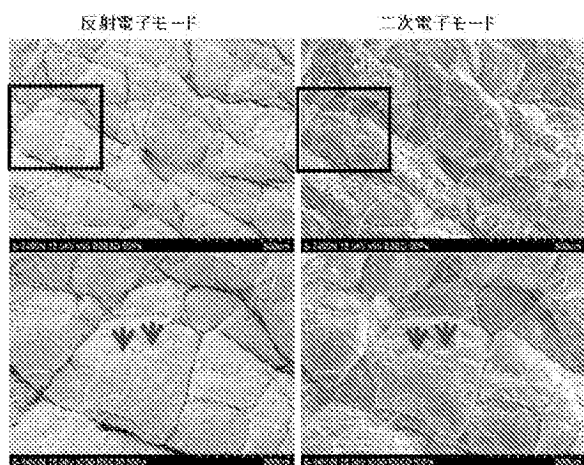
[図10-c]

フィラゲリン野生型

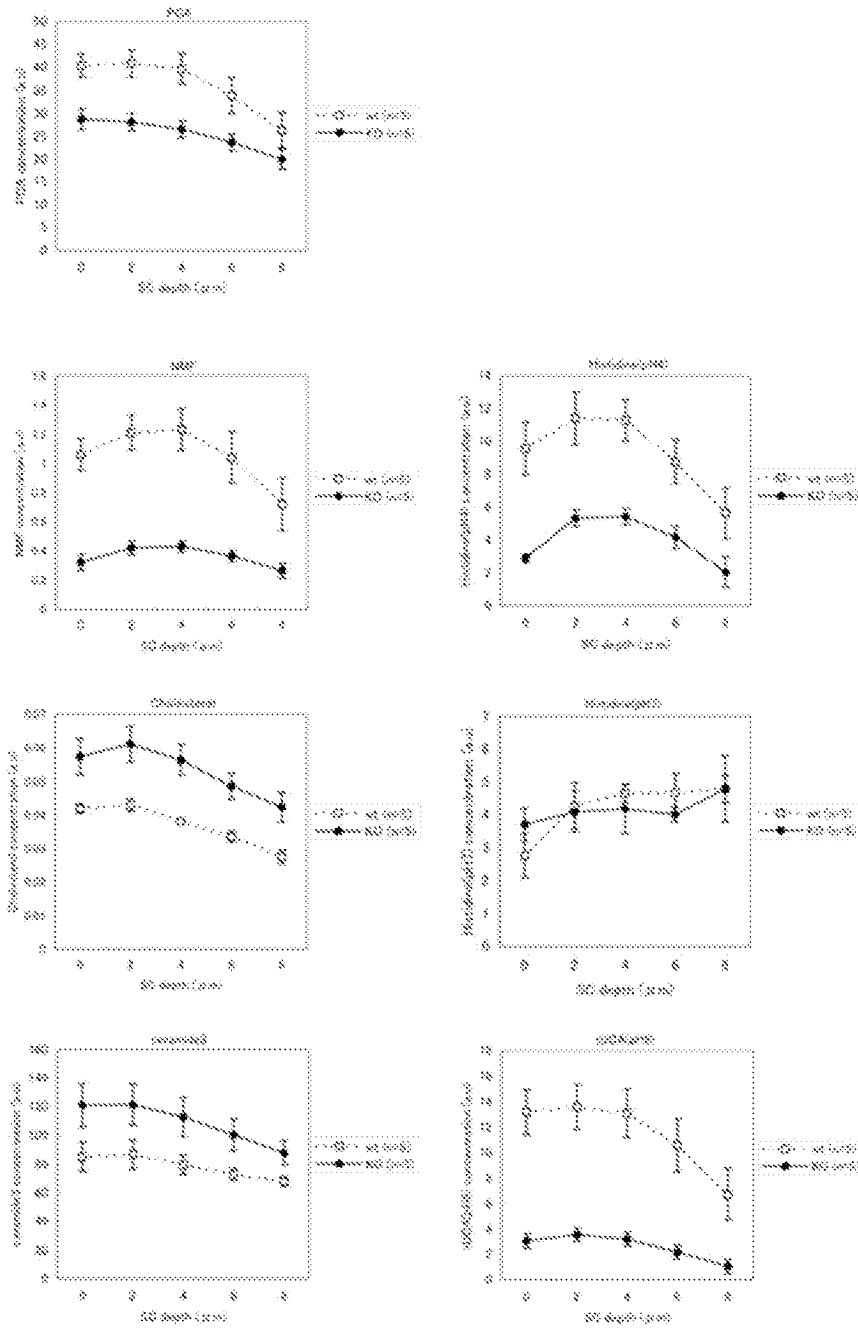



[図10-d]

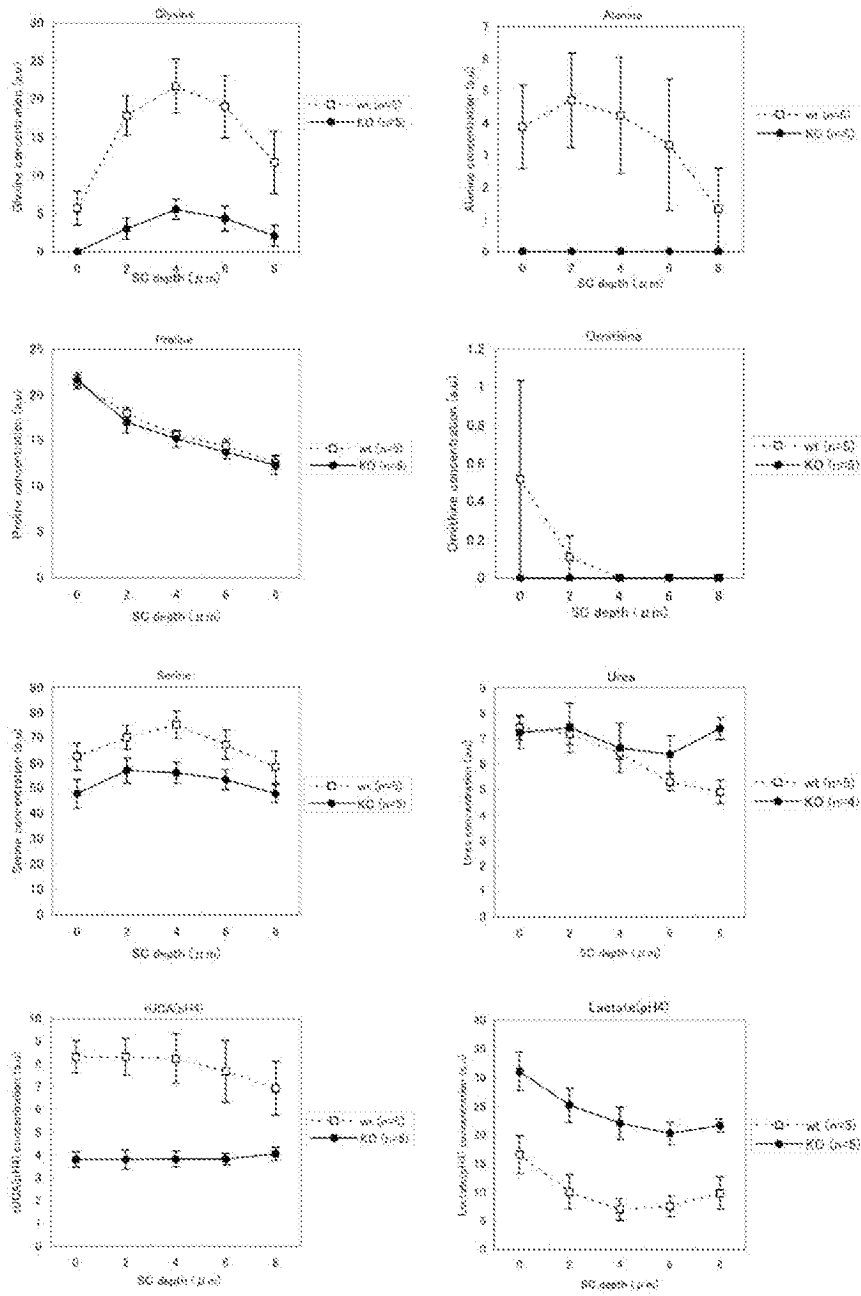
フィラゲリン欠損型



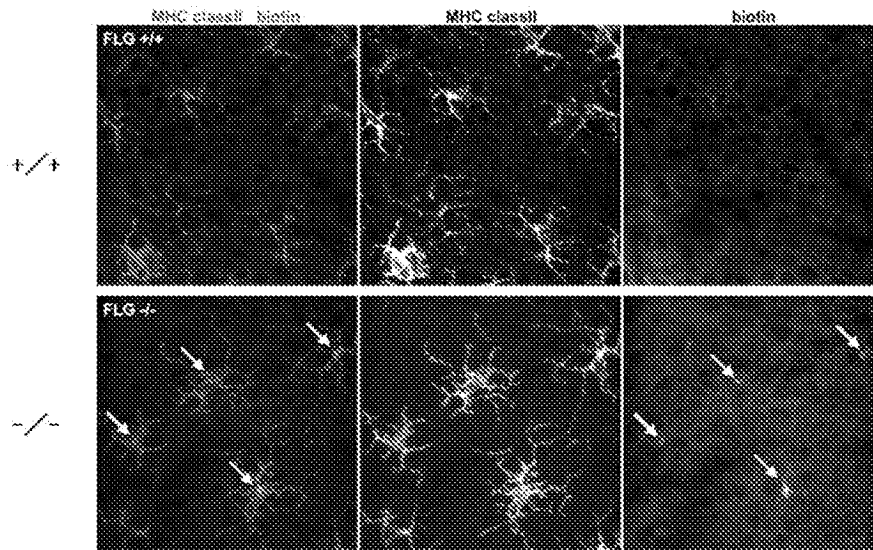
[Fig. 11-a]



[11-b]

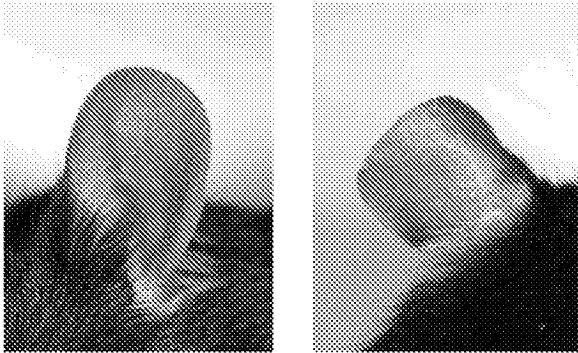


[12]

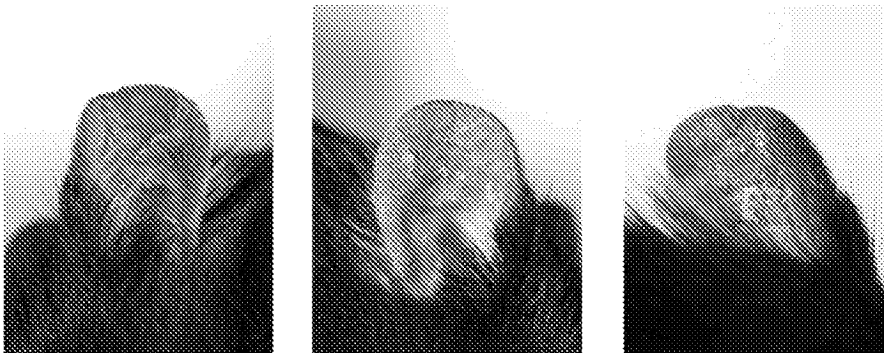


[図13]

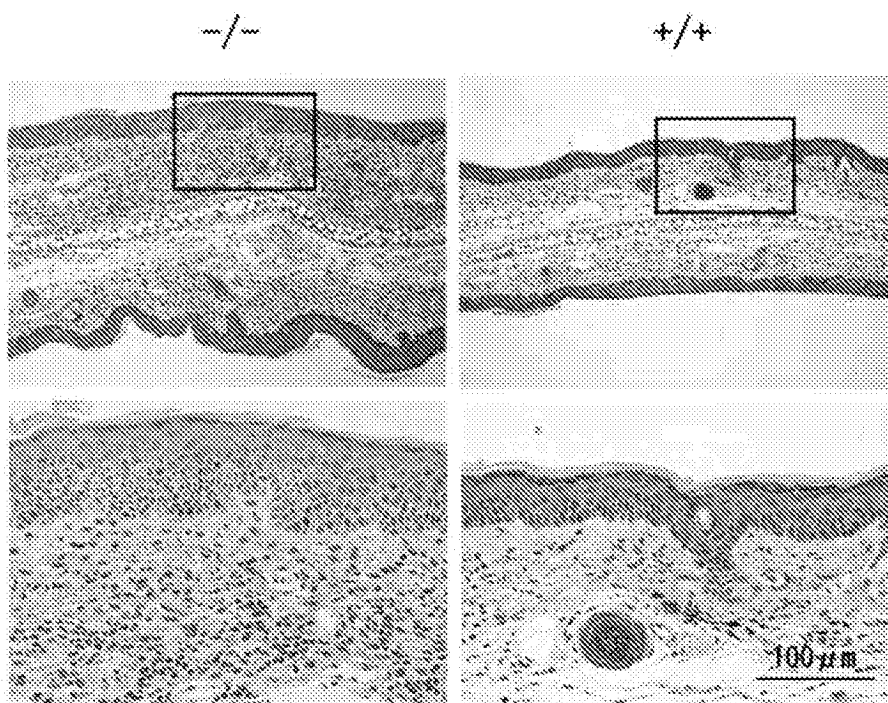
野生型



フィラグリン欠損型



[図14]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/002161

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01) i, A01K67/027(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, Science Direct

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | Masayuki AMAGAI, "Barrier Kino Shogai ni yoru Atopic Shikkan Byotai Kaimei ni Kansuru Kenkyu", Kosei Rodo Kagaku Kenkyu Seika Database [online], 08 April, 2008 (08.04.08), [Retrieved on 03 June, 2009 (03.06.09)], Retrieved from the Internet: Bunken Bango 200729027A | 1-3,6 |
| X | Masayuki AMAGAI, "Barrier Kino Shogai ni yoru Atopic Shikkan Byotai Kaimei ni Kansuru Kenkyu Heisei 19 Nendo Sokatsu Kenkyu Hokoku", Kosei Rodo Kagaku Kenkyuhi Hojokin Men'eki Arrergy Shikkan Yobo·Chiryō Kenkyu Jigyo, 2008.03, pages 1 to 61 | 1-3,6 |

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

| | |
|---|--|
| Date of the actual completion of the international search 03 June, 2009 (03.06.09) | Date of mailing of the international search report 16 June, 2009 (16.06.09) |
|---|--|

| | |
|--|--------------------|
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/002161

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | PALMER, C.N. et al, Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis, Nat. Genet., 2006, Vol.38, No.4, pp.441-446 | 1-3,6 |
| A | R.W. Old, translated by Mutsuo SEKIGUCHI, Idenshi Sosa no Genri, Baifukan Co., Ltd., 2000, 5th edition, page 341 | 1-3,6 |
| A | Edited by Masami MURAMATSU, Tadashi YAMAMOTO, Jikken Igaku Bessatsu Shintei Idenshi Kogaku Handbook, Yodosha Co., Ltd., 1999, revised third edition, pages 234 to 256 | 1-3,6 |
| A | DENECKER, G. et al, Caspase-14 reveals its secrets, J. Cell Biol., 2008.02.11, Vol.180, No.3, pp.451-458 | 1-3,6 |
| A | DENECKER, G. et al, Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss, Nat. Cell Biol., 2007, Vol.9, No.6, pp.666-674 | 1-3,6 |
| A | HARA-CHIKUMA, M. et al, Epidermal-specific defect of GPI anchor in Pig-a null mice results in Harlequin ichthyosis-like features, J. Invest. Dermatol., 2004, Vol.123, No.3, pp.464-469 | 1-3,6 |
| A | CARNINCI, P. et al, Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution, Nat. Genet., 2006, Vol.38, No.6, pp.626-635 | 1-3,6 |
| A | Yoshihide HAYASHIZAKI et al., "Atarashii Idenshi Chosetsu Mechanism 'Broad-gata' no Chosetsu Ryoiki o Hakken -Koto Dobutsu no Idenshi no 'Switch', Ooku wa Shinka Sokudo ga Hayai Newtype-", Riken, Japan, Press Release [online], 2006, [Retrieved on 04 June, 2009 (04.06.09)], Retrieved from the Internet:<URL: http://www.riken.go.jp/r-world/info/release/press/2006/060429/detail.html > | 1-3,6 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/002161

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 4, 5, 7-12
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
(See extra sheet.)

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet (2)

Although "transcription initiation point contained in exon 2" appears in claims 4, 5, 7, 9, 10 and 12, the description of the present case states nothing concerning the position of exon 2 to which the transcription initiation point corresponds in practice.

Although it has been actually known that there are a number of transcription initiation points including the medium part of gene (second exon and downstream thereof) and the back part (final exon) other than the frontmost part of gene (upstream of first exon) (see, for example, "Nat. Genet.", 2006, Vol.38, NO.6, pp.626-635", "RIKEN, Japan Prerelease [online], 2006, [Retrieved on 2009.06.04], Retrieved from the Internet:URL:<http://www.riken.go.jp/r-world/info/release/press/2006/060429/detail.html>, etc.)", it cannot be considered as self-evident that exon 2 of filaggrin gene contains a transcription initiation point and the particular position to which it corresponds.

Thus, it is impossible to clearly understand the scopes of the inventions according to the above-described claims and claims 4, 5 and 7 to 12 of the present case which depend on these claims.

For the same reason as described above, it is also impossible to clearly understand the scope of the invention according to the part of claim 6 of the present case which refers to claims 4 and 5.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09, A01K67/027

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, Science Direct

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
|-----------------|--|----------------|
| X | 天谷雅行, バリア機能障害によるアトピー性疾患病態解明に関する研究, 厚生労働科学研究成果データベース [online], 2008.04.08, [Retrieved on 2009.06.03], Retrieved from the Internet:文献番号 200729027A | 1-3, 6 |
| X | 天谷雅行, バリア機能障害によるアトピー性疾患病態解明に関する研究 平成19年度 総括研究報告, 厚生労働科学研究費補助金 免疫アレルギー疾患予防・治療研究事業, 2008.03, pp.1-61 | 1-3, 6 |

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

| | |
|---|---|
| <p>* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> | <p>の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献</p> |
|---|---|

| | |
|---|---|
| 国際調査を完了した日 03.06.2009 | 国際調査報告の発送日 16.06.2009 |
| 国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号 | 特許庁審査官 (権限のある職員) 吉森 晃 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 |

4 B 3 6 3 3

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|--|----------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
| X | PALMER,C.N. et al, Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis, Nat. Genet., 2006, Vol.38, No.4, pp.441-446 | 1-3, 6 |
| A | R.W.オールド 著, 関口睦夫 訳, 遺伝子操作の原理, 株式会社 培風館, 2000, 第5版, p.341 | 1-3, 6 |
| A | 村松正實 山本雅 編集, 実験医学別冊 新訂 遺伝子工学ハンドブック, 株式会社 羊土社, 1999, 改訂第3版, pp.234-256 | 1-3, 6 |
| A | DENECKER,G. et al, Caspase-14 reveals its secrets, J. Cell Biol., 2008.02.11, Vol.180, No.3, pp.451-458 | 1-3, 6 |
| A | DENECKER,G. et al, Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss, Nat. Cell Biol., 2007, Vol.9, No.6, pp.666-674 | 1-3, 6 |
| A | HARA-CHIKUMA,M. et al, Epidermal-specific defect of GPI anchor in Pig-a null mice results in Harlequin ichthyosis-like features, J. Invest. Dermatol., 2004, Vol.123, No.3, pp.464-469 | 1-3, 6 |
| A | CARNINCI,P. et al, Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution, Nat. Genet., 2006, Vol.38, No.6, pp.626-635 | 1-3, 6 |
| A | 林崎良英 他, 新しい遺伝子調節メカニズム「ブロード型」の調節領域を発見-高等動物の遺伝子の「スイッチ」、多くは進化速度が速いニュータイプ-, 独立行政法人 理化学研究所 プレスリリース[online], 2006, [Retrieved on 2009.06.04], Retrieved from the Internet:<URL: http://www.riken.go.jp/r-world/info/release/press/2006/060429/detail.html > | 1-3, 6 |

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求項 4, 5, 7-12 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
特別ページ参照

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求項4, 5, 7, 9, 10, 12には、「エクソン2に含まれる転写開始点」とあるが、該転写開始点が具体的にエクソン2のどの位置に相当するのか本願明細書に記載されていない。

たしかに、転写開始点は遺伝子の最前部(第1エクソンの上流)以外にも、遺伝子の中ほど(第2エクソンやその下流)や後部(最終エクソン)にも数多く存在することが知られてはいるものの(例えば、「Nat. Genet., 2006, Vol.38, No.6, pp.626-635」、「独立行政法人 理化学研究所 プレスリリース[online], 2006, [Retrieved on 2009.06.04], Retrieved from the Internet:<URL: <http://www.riken.go.jp/r-world/info/release/press/2006/060429/detail.html>>」等を参照)、フィラグリン遺伝子のエクソン2に転写開始点が含まれること、及びそれが具体的にどの位置に相当するかについてまで自明であったとは認められない。

したがって、上記請求項とそれを引用する請求項である、本願請求項4, 5, 7-12に係る発明については、発明の範囲を明確に把握することができない。

なお、本願請求項6に係る発明の請求項4, 5を引用する部分についても、上記同様に、発明の範囲を明確に把握することができない。