

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027
C 1 2 N 15/09		G 0 1 N 33/15 Z
G 0 1 N 33/15		33/50 Z
33/50		C 1 2 N 15/00 A

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 80 頁)

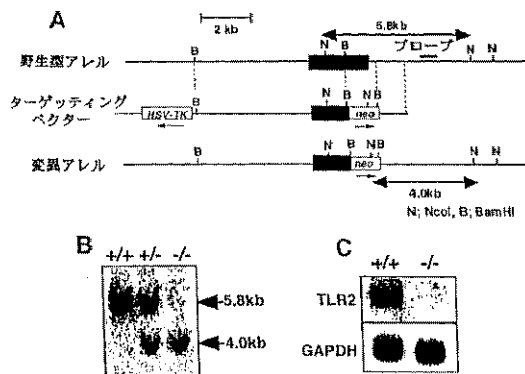
出願番号	特願2000-593182(P2000-593182)	(71)出願人	科学技術振興事業団 埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(21)国際出願番号	PCT/JP00/00132	(72)発明者	審良 静男 日本国大阪府箕面市小野原東六丁目17番18号202
(22)国際出願日	平成12年1月13日(2000. 1. 13)	(72)発明者	竹内 理 日本国大阪府箕面市小野原東四丁目19番3号201
(31)優先権主張番号	特願平11-7365	(72)発明者	竹田 潔 日本国大阪府箕面市小野原東五丁目5番O棟202
(32)優先日	平成11年1月14日(1999. 1. 14)	(74)代理人	弁理士 廣田 雅紀
(33)優先権主張国	日本 (JP)		
(31)優先権主張番号	特願平11-228282		
(32)優先日	平成11年8月12日(1999. 8. 12)		
(33)優先権主張国	日本 (JP)		
(31)優先権主張番号	特願平11-309238		
(32)優先日	平成11年10月29日(1999. 10. 29)		
(33)優先権主張国	日本 (JP)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細菌菌体成分不応答性モデルマウス

(57)【要約】

インピボにおける細菌菌体成分刺激によるシグナル伝達に対するTLRファミリー各メンバーの関わり、特にTLR2やMyD88のインピボにおける役割を明らかにする上で有用なペプチドグリカン、リポタンパク・リポペプチド等に対して不応答性であるノックアウトマウスである。TLR2又はMyD88遺伝子の細胞内領域等を含むエクソン部位の全部または一部の遺伝子フラグメントを、ポリAシグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換することにより構築したターゲッティングベクターを用いた相同組み換え法により作製する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】細菌菌体成分であるリポタンパクノリポペプチドに対して不応答性であることを特徴とする細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項 2】リポタンパクノリポペプチドが、マイコプラズマ属に属する細菌に由来するマクロファージ活性化リポペプチドであることを特徴とする請求項 1 記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項 3】細菌菌体成分であるペプチドグリカンに対して不応答性であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項 4】グラム陽性菌細胞壁画分に対して低応答性であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項 5】細菌菌体成分であるエンドトキシンに対して不応答性であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項 6】細菌菌体成分であるリポテイコ酸に対して不応答性であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項 7】細菌菌体成分である結核菌溶解物に対して不応答性であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項 8】請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物が、TLR2 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物であることを特徴とする細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項 9】請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物が、MyD88 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物であることを特徴とする細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項 10】非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項 11】齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項 10 記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項 1 2】請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞と被検物質とをあらかじめインピトロで接触せしめた後、該マクロファージ又は脾臓細胞を細菌菌体成分の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 1 3】請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞と細菌菌体成分とをあらかじめインピトロで接触せしめた後、該マクロファージ又は脾臓細胞を被検物質の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 1 4】請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞を細菌菌体成分の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 1 5】請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物を細菌により感染させ、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 1 6】請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞を被検物質の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 17】請求項 1～11 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 18】請求項 1～11 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物を細菌により感染させ、該非ヒト動物におけるマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 19】請求項 1～11 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物におけるマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 20】マクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価するに際し、対照として細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物と同種の野生型非ヒト動物の測定値と比較・評価することを特徴とする請求項 12～19 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 21】マクロファージ活性の程度の測定・評価が、該マクロファージにおけるサイトカイン及び/又は亜硝酸イオンの産生量の測定・評価であることを特徴とする請求項 12～20 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 22】脾臓細胞活性の程度の測定・評価が、該脾臓細胞における MHC クラス II の発現量の測定・評価であることを特徴とする請求項 12～20 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 23】細菌菌体成分が、リポタンパク/リポペプチドであることを特徴

とする請求項 12 ~ 22 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 24】リポタンパク/リポペプチドが、マイコプラズマ属、スピロヘータ属又はエセリシア属に属する細菌の菌体成分由来のリポタンパク/リポペプチドであることを特徴とする請求項 23 記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 25】細菌菌体成分が、ペプチドグリカンであることを特徴とする請求項 12 ~ 22 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 26】細菌菌体成分が、エンドトキシンであることを特徴とする請求項 12 ~ 22 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 27】細菌菌体成分が、リポテイコ酸であることを特徴とする請求項 12 ~ 22 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 28】細菌菌体成分が、結核菌溶解物であることを特徴とする請求項 12 ~ 22 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 29】細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、細菌感染症に対する抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 12 ~ 28 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 30】細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、TLR2 に対するアゴニスト又はアンタゴニストであることを特徴とする請求項 12 ~ 28 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 31】細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、インターロイキン - 1 活性の抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 12 ~ 28 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質の

スクリーニング方法。

【請求項 3 2】細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、インターロイキン - 1 8 活性の抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 1 2 ~ 2 8 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 3 3】細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、I F N - 活性の抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 1 2 ~ 2 8 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 3 4】細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、T N F - 活性の抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 1 2 ~ 2 8 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法。

【請求項 3 5】請求項 1 2 ~ 3 4 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法により得られることを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質。

【請求項 3 6】細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、細菌感染症に対する抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 3 5 記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質。

【請求項 3 7】細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、T L R 2 に対するアゴニスト又はアンタゴニストであることを特徴とする請求項 3 5 記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質。

【請求項 3 8】請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質の生物活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法。

【請求項 3 9】請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物と、該非ヒト動物の野生型非ヒト動物とにそれぞれ被検物質を投与して、該被検物質の生物活性を比較・評価することを特徴とする被検物質の評価方法。

【請求項 4 0】生物活性がエンドトキシン活性であることを特徴とする請求項 3 8 又は 3 9 記載の被検物質の評価方法。

【請求項 4 1】生物活性がインターロイキン - 1 活性であることを特徴とする請求項 3 8 又は 3 9 記載の被検物質の評価方法。

【請求項 4 2】生物活性がインターロイキン - 1 8 活性であることを特徴とする請求項 3 8 又は 3 9 記載の被検物質の評価方法。

【請求項 4 3】請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質中の細菌菌体成分を検出することを特徴とする細菌菌体成分の検出方法。

【請求項 4 4】請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物と、該非ヒト動物の野生型非ヒト動物とにそれぞれ被検物質を投与して、該被検物質中の細菌菌体成分を検出することを特徴とする細菌菌体成分の検出方法。

【請求項 4 5】細菌菌体成分が、リポタンパク / リポペプチドであることを特徴とする請求項 4 3 又は 4 4 記載の細菌菌体成分の検出方法。

【請求項 4 6】リポタンパク / リポペプチドが、マイコプラズマ属、スピロヘータ属又はエセリシア属に属する細菌の菌体成分由来のリポタンパク / リポペプチドであることを特徴とする請求項 4 5 記載の細菌菌体成分の検出方法。

【請求項 4 7】細菌菌体成分が、ペプチドグリカンであることを特徴とする請求項 4 3 又は 4 4 記載の細菌菌体成分の検出方法。

【請求項 4 8】細菌菌体成分が、エンドトキシンであることを特徴とする請求項 4 3 又は 4 4 記載の細菌菌体成分の検出方法。

【請求項 4 9】細菌菌体成分が、リポテイコ酸であることを特徴とする請求項 4 3 又は 4 4 記載の細菌菌体成分の検出方法。

【請求項 5 0】マウス遺伝子ライブラリーからマウス E S T クローン由来のプロンプを用いてスクリーニングすることにより得られた T L R 2 遺伝子の細胞内領域を含むエクソン部位の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリ A シグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲティングベクターを構築し、該ターゲティングベクターを線状化した後胚幹細胞に導入し、T L R 2 遺

伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られることを特徴とする TLR2 ノックアウトマウス。

【請求項 51】マウス遺伝子ライブラリーからマウス EST クローン由来のプロープを用いてスクリーニングすることにより得られた NMyD88 遺伝子領域の C 末端部分をコードした 2 つのエクソン領域の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリ A シグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲティングベクターを構築し、該ターゲティングベクターを線状化した後胚幹細胞に導入し、MyD88 遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られることを特徴とする MyD88 ノックアウトマウス。

【 発 明 の 詳 細 な 説 明 】

技 術 分 野

本発明は、マイコプラズマ属、スピロヘータ属、エセリシア属等に属する細菌の菌体成分であるリポタンパクノリポペプチドや、グラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンやグラム陰性菌の細胞壁成分であるエンドトキシン等の細菌菌体成分に不応答性のモデル非ヒト動物に関し、またこれら細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物を用いた細菌感染症に対する抑制物質又は促進物質や、TLR2に対するアゴニストやアンタゴニストのスクリーニング方法等に関する。

背 景 技 術

免疫反応や感染時の応答、造血、ウイルス感染や腫瘍細胞の障害に重要な役割を果たしている細胞間シグナル伝達物質であるサイトカインの中でも、リンパ球間でシグナルを伝え合うサイトカインはインターロイキン（以下「IL」という）と呼ばれている。このILの中で、IL-1は、様々な免疫反応や炎症反応を介しているサイトカインであり、生体の恒常性維持に関与し、感染時や傷を受けた際に単球、マクロファージ、ケラチノサイト、血管内皮細胞等種々の細胞から産生される。IL-1には、同一のレセプターに結合するIL-1 α とIL-1 β の2種類が存在することが知られている。また、IL-1は、T細胞の抗原やマイトジェンによる活性化の際に同時に働き、T細胞からIL-2を分泌させIL-2レセプターの発現を増強してT細胞の増殖を誘導することや、単球やマクロファージに作用しTNF- α 、IL-1、IL-6の産生を誘導することも知られている。

IL-1には、その受容体である2種類のIL-1レセプター（以下「IL-1R」という）があり、タイプI及びタイプIIのどちらのIL-1Rもイムノグロブリン様ドメインが細胞外ドメインに3カ所存在し、タイプIレセプターはT細胞や結合組織で、タイプIIレセプターは脾臓B細胞や骨髄細胞等で発現され、タイプIレセプターはNF- κ Bを核内で誘導することが知られている。また、IL-1RにIL-1 α やIL-1 β と同程度の親和力で結合するが、生物活性を有さないIL-1レセプターアンタゴニスト（以下「IL-1ra」という）があり、IL-1のIL-1Rへの結合を競合的に阻害することも知られて

いる。

IL - 18 は、インターフェロン - (以下「IFN - 」という)の生成を促進し、ナチュラルキラー細胞の活性を高め、IL - 12 と共働してT細胞からIFN - の生成を誘導し、Th1 (IL - 2 産生性ヘルパーT細胞) 応答における重要な役割を果たすことや、機能が似ているIL - 12 とは構造的に異なり、IL - 1 とは類似の構造を有することが知られている。また、IL - 18 は、IL - 1 の場合と同様に、その成熟化のためにIL - 1 変換酵素 (ICE) /カスパーゼ1による分割を必要とする不活性先駆体として産生され、またIL - 1R - 関連キナーゼ (IRAK) 及びNF - Bを活性化することも知られている。

また、これまでにIL - 1Rと相同性を示す分子が複数同定されており、現在これらIL - 1Rファミリーを介するシグナル伝達経路が盛んに研究されている。MyD88は、IL - 1R相同領域とDeathドメインからなる細胞質内タンパク質であり、IL - 1刺激後のIL - 1RコンプレックスへIRAKを取込んで、NF - Bを活性化するアダプター分子として機能することも知られている。また、MyD88遺伝子は、当初、IL - 6による刺激分化により、骨髄白血球細胞M1をマクロファージへ速やかに誘導する骨髄細胞分化初期応答遺伝子として分離されたことも知られている。

また、グラム陰性細菌表層のペプチドグリカンを取り囲んで存在する外膜の重要構成成分であるリポ多糖からなる菌体内毒素はエンドトキシンと呼ばれ、リポ多糖はリポドAと呼ばれる脂質とこれに共有結合した各種の糖から構成されることが知られている。そして、このエンドトキシンは、主として発熱、白血球や血小板の減少、骨髄出血壊死、血糖低下、IFN誘発、Bリンパ球 (骨髄由来免疫応答細胞) の活性化等の生物活性を有することも知られている。

一方、Toll (Toll) 遺伝子は、ショウジョウバエの胚発生中の背腹軸の決定 (Cell 52, 269 - 279, 1988、Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12, 393 - 416, 1996)、また成体における抗真菌性免疫応答に必要であることが知られている (Cell 86, 973 - 983, 1996)。かかるTollは、細胞外領域にロイシンリッチリピート

(L R R) を有する I 型膜貫通受容体であり、この細胞質内領域は、哺乳類インターロイキン - 1 受容体 (I L - 1 R) の細胞質内領域と相同性が高いことが明らかとなっている (N a t u r e 3 5 1 , 3 5 5 - 3 5 6 , 1 9 9 1 、 A n n u . R e v . C e l l D e v . B i o l . 1 2 , 3 9 3 - 4 1 6 , 1 9 9 6 、 J . L e u k o c . B i o l . 6 3 , 6 5 0 - 6 5 7 , 1 9 9 8) 。他の T o l l ファミリーメンバーである 1 8 - w h e e l e r は、抗菌宿主防御に関わっているが抗真菌性免疫応答には関わらないことが明らかになっており、T o l l 経路の選択的活性を介し、ショウジョウバエにおいて特定の病原体が特異的抗菌性免疫応答を誘導することも明らかとなっている (P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 4 , 1 4 6 1 4 - 1 4 6 1 9 , 1 9 9 7 、 E M B O J . 1 6 , 6 1 2 0 - 6 1 3 0 , 1 9 9 7 、 C u r r . O p i n . I m m u n o l . 1 1 , 1 3 - 1 8 , 1 9 9 9) 。

近年、T o l l 様受容体 (T L R) と呼ばれる T o l l の哺乳類のホモログが同定され、T L R 2 や T L R 4 など現在までに 6 つのファミリーが報告されている (N a t u r e 3 8 8 , 3 9 4 - 3 9 7 , 1 9 9 7 、 P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 9 5 , 5 8 8 - 5 9 3 , 1 9 9 8 、 B l o o d 9 1 , 4 0 2 0 - 4 0 2 7 , 1 9 9 8 、 G e n e 2 3 1 , 5 9 - 6 5 , 1 9 9 9) 。この T L R ファミリーは、上記 I L - 1 R と同様にシグナル伝達分子としてのアダプタータンパク質である前記 M y D 8 8 を介し、I L - 1 R 結合キナーゼ (I R A K) をリクルートし、T R A F 6 を活性化し、下流の N F - κ B を活性化することが知られている (J . E x p . M e d . 1 8 7 , 2 0 9 7 - 2 1 0 1 , 1 9 9 8 、 M o l . C e l l 2 , 2 5 3 - 2 5 8 , 1 9 9 8 、 I m m u n i t y 1 1 , 1 1 5 - 1 2 2 , 1 9 9 9) 。また、哺乳類における T L R ファミリーの役割は、細菌の共通構造を認識するパターン認識受容体 (P R R : p a t t e r n r e c o g n i t i o n r e c e p t o r) として、先天的な免疫認識に関わっているとも考えられている (C e l l 9 1 , 2 9 5 - 2 9 8 , 1 9 9 7) 。

上記 P R R により認識される病原体会合分子パターン (P A M P : p a t h o g e n - a s s o c i a t e d m o l e c u l a r p a t t e r n) の一つ

は、グラム陰性菌の外膜の主成分であるリポ多糖 (L P S) であって (C e l l 9 1 , 2 9 5 - 2 9 8 , 1 9 9 7)、かかる U P S が宿主細胞を刺激して宿主細胞に T N F - 、 I L - 1 及び I L - 6 等の各種炎症性 (p r o i n f l a m m a t o r y) サイトカインを産生させること (A d v . I m m u n o l . 2 8 , 2 9 3 - 4 5 0 , 1 9 7 9、A n n u . R e v . I m m u n o l . 1 3 , 4 3 7 - 4 5 7 , 1 9 9 5) や、L P S 結合タンパク質 (L B P : L P S - b i n d i n g p r o t e i n) により捕獲された L P S が細胞表面上の C D 1 4 に引き渡されることが知られている (S c i e n c e 2 4 9 , 1 4 3 1 - 1 4 3 3 , 1 9 9 0、A n n u . R e v . I m m u n o l . 1 3 , 4 3 7 - 4 5 7 , 1 9 9 5)。しかしながら、C D 1 4 は膜貫通ドメインのないグリコシルホスファチジルイノシトール (G P I) アンカータンパク質であり、L P S に対する真のシグナル伝達受容体の存在が考えられている。

上記 T L R ファミリーに属する T L R 4 はグラム陰性菌菌体成分である L P S のシグナル伝達分子であり、かかる T L R 4 をトランスフェクションすると、N F - B の持続的低活性化をもたらす (J . E x p . M e d . 1 8 8 , 2 0 9 1 - 2 0 9 7 , 1 9 9 8、N a t u r e 3 9 5 , 2 8 4 - 2 8 8 , 1 9 9 8)。他方、T L R 2 もインビトロでヒト胎児腎臓 2 9 3 細胞 (h u m a n e m b r y o n i c k i d n e y 2 9 3 c e l l s) に過剰発現させると L P S のシグナルを細胞内に伝えることから、L P S レセプターの候補であると考えられていた。また、G o d a w s k i のグループは、ヒト T L R 2 が C D 1 4 と相互作用して L P S 受容体複合体を形成すると報告している (J . I m m u n o l , 1 6 3 , 6 3 9 - 6 4 3 , 1 9 9 9)。L P S での刺激処理は受容体をオリゴマー化し、次に I R A K を受容体複合体に動員する。これとは対照的に、P o l t o r a k らと Q u r e s h i らのグループは、ポジショナルクローニング法により、T L R 4 が C 3 H / H e J マウスの L P S 低応答性に関する原因遺伝子 (c a u s a t i v e g e n e)、すなわち L p s 遺伝子であることを報告している (S c i e n c e 2 8 2 , 2 0 8 5 - 2 0 8 8 , 1 9 9 8、J . E x p . M e d . 1 8 9 , 6 1 5 - 6 2 5 , 1 9 9 9)。

本発明者らは、T L R 4 が実際に L P S シグナル伝達に関わっていることを T

L R 4 欠損マウスを作製することにより明らかにしている (J . I m m u n o l . 1 6 2 , 3 7 4 9 - 3 7 5 2 , 1 9 9 9) が、これは T L R の一次構造における種特異的差異によるもの、つまりマウスでは T L R 4、ヒトでは T L R 2 により介されている可能性がある。しかしながら、マウス T L R 2 も L P S に対する応答で N F - B を活性化したとの報告がある (J . I m m u n o l . 1 6 2 , 6 9 7 1 - 6 9 7 5 , 1 9 9 9)。また、C h o w らは、C 3 H / H e J マウスに関する結果と一致する結果、すなわちヒト T L R 4 が投与量依存又は時間依存による L P S / C D 1 4 に対する刺激によって N F - B を介する遺伝子発現を活性化し、ヒト 2 9 3 細胞を用いた場合には K i r s c h n i n g らのグループと矛盾する結果を得て、これは 2 9 3 細胞のロットの差にもよるものと推測されると報告している。(J . B i o l . C h e m . 2 7 4 , 1 0 6 8 9 - 1 0 6 9 2 , 1 9 9 9)。

最近、T L R 2 がグラム陰性菌由来の L P S に対する反応性のみに関わっているのではなく (J . I m m u n o l , 1 6 2 , 6 9 7 1 - 6 9 7 5 , 1 9 9 9)、別の共通細菌構造パターンであるグラム陽性菌由来のペプチドグリカン (P G N) とリポテイコ酸 (L T A) のシグナル伝達受容体として作用するとの報告がある (J . B i o l . C h e m . 2 7 4 , 1 7 4 0 6 - 1 7 4 0 9 , 1 9 9 9、J . I m m u n o l , 1 6 3 , 1 - 5 , 1 9 9 9)。また、全グラム陽性菌、可溶性 P G N 及び L T A が、T L R 2 を発現する 2 9 3 細胞の N F - B 活性化を誘導したのに対して、T L R 1 や T L R 4 を発現する細胞内の N F - B 活性化を誘導しなかったことも報告されている (J . B i o l . C h e m . 2 7 4 , 1 7 4 0 6 - 1 7 4 0 9 , 1 9 9 9)。また、T L R 4 ではなくヒト T L R 2 を発現するチャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 繊維芽細胞を、熱殺菌したスタフィロコッカス・アウレウス (S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s) 及びストレプトコッカス・ニューモニエ (S t r e p t o c o c c u s p n e u m o n i a e) 並びにスタフィロコッカス・アウレウス由来 P G N により同様に活性化したとの報告がなされている (J . I m m u n o l . 1 6 3 , 1 - 5 , 1 9 9 9)。

他方、動物やヒトの病原性細菌として知られるマイコプラズマは細胞壁を欠如

しているが、マクロファージを活性化する能力を備えている。これらマクロファージ活性化物質がリポタンパクノリポペプチドであるとの数多くの報告が現在までになされており、かかるリポペプチドのうちの一つであるマイコプラズマ・ファーマンタンス (*M. fermentans*) 由来の 2 k D マクロファージ活性化リポペプチド M A L P - 2 は、その生化学的特性が明らかになっており、かつ合成されたものも利用することができる (*J. Exp. Med.* 185 : 1951, 1997)。この脂質種は 2 つの不斉炭素原子をもち、S, R ラセミ体からなる合成 M A L P - 2 はインピトロでピコモル濃度で天然化合物作用と類似の特異活性を示すことが知られている。そして、M A L P - 2 が N F - B を活性化することを除いては、M A L P - 2 のシグナル経路や細胞表面レセプターについては殆ど知られていない。

その他、マイコバクテリウム (*mycobacterium*) とボレリア・ブルグドルフェリ (*Borrelia burgdorferi*) 由来のリポタンパクノリポペプチドが、インピトロでの T L R 2 を介する宿主細胞の活性化を誘導したことが報告されている (*Science* 285, 736 - 739, 1999、*Science* 285, 732 - 736, 1999)。しかしながら、過剰発現実験から得られる結果は必ずしもインピボでの T L R ファミリーの機能を反映していない。このような応答性を N F - B 活性化に基づいて分析した結果も、これら刺激により仲介される生物学的応答には関連しない (*Infect. Immun.* 66, 1638 - 1647, 1998) と報告されている。

また、人工的に遺伝子を導入し発現させるトランスジェニックマウスと、胚性幹細胞 (以下「E S 細胞」という) を用いて人工的にゲノム上の特定遺伝子を相同組換えにより変化させる遺伝子ターゲティングとを用いた遺伝子欠損マウスを用いると、特定の遺伝子の機能を個体レベルで解析しうることが知られている。そして、一般に、遺伝子欠損マウスはノックアウトマウスと呼ばれているが、T L R 2 ノックアウトマウスや M y D 8 8 ノックアウトマウスは知られていない上に、T L R 2 ノックアウトマウスや M y D 8 8 ノックアウトマウスが細菌菌体成分に対して不応答性であることも知られていなかった。

発明の開示

インビボにおける細菌菌体成分に対する応答は、細胞表面上の各 T L R の発現レベルの差異により変化することが予測されるものの、未だインビボにおける細菌菌体成分刺激によるシグナル伝達に対する T L R ファミリーの各メンバーや T L R ファミリーのアダプタータンパク質である M y D 8 8 の関わりは明らかにされていない。本発明の課題は、インビボにおける細菌菌体成分刺激によるシグナル伝達に対する T L R ファミリー各メンバーや T L R ファミリーのアダプタータンパク質である M y D 8 8 の関わり、特に T L R 2 と M y D 8 8 とのインビボにおける役割を明らかにする上で有用な、マイコプラズマ属、スピロヘータ属、エセリシア属等に属する細菌の菌体成分であるリポタンパクノリポペプチドや、グラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンやグラム陰性菌の細胞壁成分であるエンドトキシン等の細菌菌体成分に不応答性のモデル非ヒト動物、例えば T L R 2 及び N M y D 8 8 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物や、またこれら細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物を用いた細菌感染症に対する抑制物質又は促進物質や、T L R 2 に対するアゴニストやアンタゴニストのスクリーニング方法等を提供することにある。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究した結果、プラスミドベクターを用いて E S 細胞で相同的組換えによって、T L R 2 遺伝子の細胞内領域を含むエキソン領域、又は M y D 8 8 遺伝子領域の C 末端部分をコードした 2 つのエキソン領域を、それぞれネオマイシン耐性遺伝子に置き換え、またそれぞれの C 末端側に H S V - t k 遺伝子を導入させて、G 4 1 8 とガンシクロピアに対して 2 重に抵抗力のある E S 細胞クローンをスクリーニングし、この E S 細胞クローンを C 5 7 B L / 6 のマウスの胚盤胞 (b l a s t o c y s t s) の中に注入し、その生殖系列をとおして、メンデルの法則に従い出生してくる T L R 2 又は M y D 8 8 遺伝子機能が染色体上で欠損した T L R 2 ノックアウトマウスや M y D 8 8 ノックアウトマウスが、生まれてから 2 0 週間は明らかに異常を示さないトランスジェニックマウスであり、また、かかる T L R 2 ノックアウトマウスや M y D 8 8 ノックアウトマウスがグラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンやリポタンパクノリポペプチド等の細菌菌体成分に対して不応答性であることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、細菌菌体成分であるリポタンパク/リポペプチドに対して不応答性であることを特徴とする細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項 1）や、リポタンパク/リポペプチドが、マイコプラズマ属に属する細菌に由来するマクロファージ活性化リポペプチドであることを特徴とする請求項 1 記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項 2）や、細菌菌体成分であるペプチドグリカンに対して不応答性であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項 3）や、グラム陽性菌細胞壁画分に対して低応答性であることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項 4）や、細菌菌体成分であるエンドトキシンに対して不応答性であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項 5）や、細菌菌体成分であるリポテイコ酸に対して不応答性であることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項 6）や、細菌菌体成分である結核菌溶解物に対して不応答性であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項 7）や、請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物が、TLR 2 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物であることを特徴とする細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項 8）や、請求項 1 ~ 7 のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物が、MyD88 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物であることを特徴とする細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項 9）や、非ヒト動物が、齧歯目動物であることを特徴とする請求項 1 ~ 9 のいずれか記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項 10）や、齧歯目動物が、マウスであることを特徴とする請求項 10 記載の細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物（請求項 11）に関する。

また本発明は、請求項 1 ~ 11 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞と被検物質とをあらかじめインビトロで接触せしめた後、該マクロファージ又は脾臓細胞を細菌菌体成分の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対す

る応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 1 2）や、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞と細菌菌体成分とをあらかじめインビトロで接触せしめた後、該マクロファージ又は脾臓細胞を被検物質の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 1 3）や、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞を細菌菌体成分の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 1 4）や、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物を細菌により感染させ、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 1 5）や、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞を被検物質の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 1 6）や、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 1 7）や、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物を細菌により感染させ、該非ヒト

動物におけるマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価すること
を特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニ
ング方法（請求項 18）や、請求項 1～11のいずれか記載の細菌菌体成分に対
して不応答性である非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト
動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物におけるマクロファージ活性又は脾臓細
胞活性の程度を測定・評価することを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の
抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 19）や、マクロファージ
活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価するに際し、対照として細菌菌体成分
に対して不応答性である非ヒト動物と同種の野生型非ヒト動物の測定値と比較・
評価することを特徴とする請求項 12～19のいずれか記載の細菌菌体成分に対
する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 20）や、マ
クロファージ活性の程度の測定・評価が、該マクロファージにおけるサイトカイ
ン及び/又は亜硝酸イオンの産生量の測定・評価であることを特徴とする請求項
12～20のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物
質のスクリーニング方法（請求項 21）や、脾臓細胞活性の程度の測定・評価が
、該脾臓細胞におけるMHCクラスIIの発現量の測定・評価であることを特徴
とする請求項 12～20のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物
質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 22）や、細菌菌体成分が、リポ
タンパク/リポペプチドであることを特徴とする請求項 12～22のいずれか記
載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法
（請求項 23）や、リポタンパク/リポペプチドが、マイコプラズマ属、スピロ
ヘータ属又はエセリシア属に属する細菌の菌体成分由来のリポタンパク/リポペ
プチドであることを特徴とする請求項 23記載の細菌菌体成分に対する応答性の
抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 24）や、細菌菌体成分が
、ペプチドグリカンであることを特徴とする請求項 12～22のいずれか記載の
細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請
求項 25）や、細菌菌体成分が、エンドトキシンであることを特徴とする請求項
12～22のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物
質のスクリーニング方法（請求項 26）や、細菌菌体成分が、リポテイコ酸であ

ることを特徴とする請求項 1 2 ~ 2 2 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 2 7）や、細菌菌体成分が、結核菌溶解物であることを特徴とする請求項 1 2 ~ 2 2 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 2 8）や、細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、細菌感染症に対する抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 1 2 ~ 2 8 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 2 9）や、細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、T L R 2 に対するアゴニスト又はアンタゴニストであることを特徴とする請求項 1 2 ~ 2 8 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 3 0）や、細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、インターロイキン - 1 活性の抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 1 2 ~ 2 8 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 3 1）や、細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、インターロイキン - 1 8 活性の抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 1 2 ~ 2 8 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 3 2）や、細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、I F N - 活性の抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 1 2 ~ 2 8 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 3 3）や、細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、T N F - 活性の抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 1 2 ~ 2 8 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法（請求項 3 4）に関する。

また本発明は、請求項 1 2 ~ 3 4 のいずれか記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法により得られることを特徴とする細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質（請求項 3 5）や、細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、細菌感染症に対する抑制物質又は促進物質であることを特徴とする請求項 3 5 記載の細菌菌体成分に対する

応答性の抑制物質又は促進物質（請求項 3 6）や、細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質が、TLR 2 に対するアゴニスト又はアンタゴニストであることを特徴とする請求項 3 5 記載の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質（請求項 3 7）に関する。

また本発明は、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質の生物活性を評価することを特徴とする被検物質の評価方法（請求項 3 8）や、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物と、該非ヒト動物の野生型非ヒト動物とにそれぞれ被検物質を投与して、該被検物質の生物活性を比較・評価することを特徴とする被検物質の評価方法（請求項 3 9）や、生物活性がエンドトキシン活性であることを特徴とする請求項 3 8 又は 3 9 記載の被検物質の評価方法（請求項 4 0）や、生物活性がインターロイキン - 1 活性であることを特徴とする請求項 3 8 又は 3 9 記載の被検物質の評価方法（請求項 4 1）や、生物活性がインターロイキン - 1 8 活性であることを特徴とする請求項 3 8 又は 3 9 記載の被検物質の評価方法（請求項 4 2）に関する。

また本発明は、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質中の細菌菌体成分を検出することを特徴とする細菌菌体成分の検出方法（請求項 4 3）や、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか記載の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物と、該非ヒト動物の野生型非ヒト動物とにそれぞれ被検物質を投与して、該被検物質中の細菌菌体成分を検出することを特徴とする細菌菌体成分の検出方法（請求項 4 4）や、細菌菌体成分が、リポタンパク / リポペプチドであることを特徴とする請求項 4 3 又は 4 4 記載の細菌菌体成分の検出方法（請求項 4 5）や、リポタンパク / リポペプチドが、マイコプラズマ属、スピロヘータ属又はエセリシア属に属する細菌の菌体成分由来のリポタンパク / リポペプチドであることを特徴とする請求項 4 5 記載の細菌菌体成分の検出方法（請求項 4 6）や、細菌菌体成分が、ペプチドグリカンであることを特徴とする請求項 4 3 又は 4 4 記載の細菌菌体成分の検出方法（請求項 4 7）や、細菌菌体成分が、エンドトキシンであることを特徴とする請求項 4 3 又は 4 4 記載の細菌菌体成分の検出方法（請求項 4 8）や、

細菌菌体成分が、リポテイコ酸であることを特徴とする請求項 4 3 又は 4 4 記載の細菌菌体成分の検出方法（請求項 4 9）に関する。

また本発明は、マウス遺伝子ライブラリーからマウス E S T クローン由来のプローブを用いてスクリーニングすることにより得られた T L R 2 遺伝子の細胞内領域を含むエクソン部位の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリ A シグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲティングベクターを構築し、該ターゲティングベクターを線状化した後胚幹細胞に導入し、T L R 2 遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られることを特徴とする T L R 2 ノックアウトマウス（請求項 5 0）や、マウス遺伝子ライブラリーからマウス E S T クローン由来のプローブを用いてスクリーニングすることにより得られた M y D 8 8 遺伝子領域の C 末端部分をコードした 2 つのエクソン領域の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリ A シグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲティングベクターを構築し、該ターゲティングベクターを線状化した後胚幹細胞に導入し、M y D 8 8 遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られることを特徴とする M y D 8 8 ノックアウトマウス（請求項 5 1）に関する。

発明を実施するための最良の形態

本発明における細菌菌体成分としては、マイコプラズマ属、スピロヘータ属、エセリシア属に属する細菌の菌体成分であるリポタンパクノリポペプチド、細菌細胞壁の骨格構造である N - アセチルグルコサミンと N - アセチルムラミン酸の繰返し多糖類に比較的短いペプチド鎖が結合したペプチドグリカン、主としてグラム陰性菌の外膜成分として存在するエンドトキシンとも呼ばれるリポ多糖（L P S）、グラム陽性細菌の細胞壁成分であるリポテイコ酸（L T A）、結核菌（*M y c o b a c t e r i u m t u b e r c u l o s i s*）溶解物、グラム陽性

菌細胞壁成分等を挙げることができ、また本発明においては、便宜上、上記細菌菌体成分を担持するキャリアや、細菌菌体自体も本発明における細菌菌体成分に含めることとする。

本発明において細菌菌体成分に対する不応答性とは、細菌菌体成分による刺激に対する生体又は生体を構成する細胞、組織若しくは器官の反応性が低下しているか、あるいはほぼ失われていることを意味し、低応答性とは刺激に対する反応性が低下していることを意味する。したがって、本発明において細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物とは、細菌菌体成分による刺激に対して、生体又は生体を構成する細胞、組織若しくは器官の反応性が低下しているか、あるいはほぼ失われているマウス、ラット、ウサギ等のヒト以外の動物をいう。また、細菌菌体成分による刺激としては、細菌菌体成分を生体に投与するインピボでの刺激や、生体から分離された細胞に細菌菌体成分を接触させるインピトロでの刺激等を挙げることができる。そして、本発明における細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物としては、リポタンパクノリポペプチド、ペプチドグリカン、グラム陽性菌細胞壁成分、エンドトキシン、リポテイコ酸、結核菌溶解物等の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物を挙げることができ、具体的には、TLR2ノックアウトマウス等のTLR2遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物や、MyD88ノックアウトマウス等のMyD88遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物を挙げることができる。

本発明において、MyD88又はTLR2遺伝子機能の染色体上での欠損とは、染色体上のMyD88又はTLR2遺伝子の一部もしくは全部が欠損し、野生型において発現されるMyD88又はTLR2を発現する機能が失われていることをいい、また、MyD88又はTLR2遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物としては、MyD88又はTLR2ノックアウトマウスの他、例えばMyD88又はTLR2遺伝子機能が欠損したラット等の齧歯目動物を例示することができる。

本発明における野生型の非ヒト動物とは、上記MyD88又はTLR2遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物と同種の非ヒト動物をいい、マウスの場合を例にとると、メンデルの法則に従い出生してくるF2マウスのうち、MyD8

8 又は T L R 2 非欠損型の同種のマウスをいう。これら F 2 マウスにおける欠損型とその野生型、特に同腹の野生型を同時に実験に供することによって、個体レベルで正確な比較実験をすることができる。上記 M y D 8 8 又は T L R 2 遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物の作製方法を、M y D 8 8 又は T L R 2 が欠損したノックアウトマウスを例にとって以下説明する。

M y D 8 8 又は T L R 2 遺伝子は、マウス遺伝子ライブラリーを P C R 法等により増幅し、マウス E S T クローン由来等のプローブを用いてクローニングすることができる。このクローニングされた M y D 8 8 又は T L R 2 遺伝子を組換え D N A 技術により、M y D 8 8 又は T L R 2 遺伝子の全部又は一部、例えば M y D 8 8 又は T L R 2 遺伝子の細胞内領域を含むエクソン部位の全部又は一部を、ポリ A シグナル遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子等マーカー遺伝子で置換し、5 末端側にジフテリアトキシン A フラグメント (D T - A) 遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (H S V - t k) 遺伝子等の遺伝子を導入してターゲティングベクターを作製し、この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法等により胚幹細胞 (E S 細胞) に導入して培養後、G 4 1 8 やガンシクロピア (G A N C) 等の抗生物質により相同的組換えを起こした E S 細胞を選択する。この選択された E S 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。

上記組換え E S 細胞をマウスの胚盤胞 (b l a s t o c y s t s) 内にマイクロインジェクションし、仮親の子宮に戻すことによってキメラマウスを得ることができる。このキメラマウスは、キメラ率がよいと生まれてくるキメラマウスが雄に片寄るため、野生型の雌と交配させることによってヘテロ組換えマウス (+ / - : F 1) を作出し、そのヘテロ組換えマウスの雄と雌を交配させることによってホモ組換えマウス [F 2 ; 野生型マウス (+ / +) 、 M y D 8 8 又は T L R 2 ノックアウトマウス (- / -)] を得ることができ、これらはすべてメンデルの法則に従い産み出される。そして、本発明の M y D 8 8 又は T L R 2 ノックアウトマウスが生起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスの腹腔マクロファージから R N A を単離してノーザンブロット法等により調べたり、またこのマウスの M y D 8 8 又は T L R 2 の発現を

ウエスタンブロット法等により調べる方法がある。

作出された M y D 8 8 ノックアウトマウスが細菌細胞壁成分に対して不応答性であることは、例えば、マイコプラズマ属、スピロヘータ属、エセリシア属等に属する細菌の菌体成分であるリポタンパクノリポペプチドを M y D 8 8 ノックアウトマウスのマクロファージやヒト単核細胞にインビトロで接触せしめ、かかる細胞における T N F - α や N O ₂ の産生量を測定することや、グラム陰性菌の細菌細胞壁成分である L P S を M y D 8 8 ノックアウトマウスに静脈注射等により投与し、発熱、ショック、白血球や血小板の減少、骨髄出血壊死、血糖低下、I F N 誘発、B リンパ球（骨髄由来免疫応答細胞）の活性化等のエンドトキシンの生物活性を測定することや、M y D 8 8 ノックアウトマウスのマクロファージと脾臓 B 細胞に、細菌由来の L P S、又はグラム陽性菌菌体成分であるペプチドグリカン、リポテイコ酸、結核菌溶解物等の存在下において、例えば T N F 誘発、脾臓 B 細胞増殖応答、脾臓 B 細胞表面での M H C クラス I I 抗原の発現を測定することにより確認することができる。

本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスは、細菌の菌体成分であるリポタンパクノリポペプチドに不応答性であり、また現在までエンドトキシン低応答性として知られている C 3 H / H e J マウスよりもエンドトキシン応答性が低下しており、ショック症状は全く認められず、また、M y D 8 8 ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓 B 細胞は、エンドトキシンに対して不応答性であるばかりでなく、グラム陽性細菌細胞壁成分であるペプチドグリカン、リポテイコ酸、結核菌溶解物等に対しても不応答性であって、他方 I L - 4 や I F N - γ に対して応答性であることから、この細菌菌体成分に対して不応答性であるノックアウトマウスは、リポタンパクノリポペプチド、エンドトキシン、ペプチドグリカン、リポテイコ酸等の作用機序の解明やエンドトキシンショックへの対処方法の確立に有用なモデルとすることができる。

また、作出された T L R 2 ノックアウトマウスが細菌細胞壁成分に対して不応答性であることは、例えば、マイコプラズマ属、スピロヘータ属、エセリシア属等に属する細菌の菌体成分であるリポタンパクノリポペプチドを T L R 2 ノックアウトマウスのマクロファージやヒト単核細胞にインビトロで接触せしめ、かか

る細胞における T N F - α や N O ₂ の産生量を測定することや、 T L R 2 ノックアウトマウスのマクロファージや脾臓 B 細胞に、グラム陽性菌細胞壁成分、グラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカン等の存在下において、 T N F 誘発、脾臓細胞増殖応答、脾臓 B 細胞表面での M H C クラス I I 抗原の発現等を測定することにより確認することができる。そして、本発明の T L R 2 ノックアウトマウスは、細菌の菌体成分であるリポタンパクノリポペプチドやペプチドグリカンに不応答性であり、グラム陽性菌細胞壁成分に対して低応答性であって、 L P S をはじめとして L T A や I L - 4 に対して応答性であることから、上記 T L R 2 ノックアウトマウスは、リポタンパクノリポペプチド、ペプチドグリカン、グラム陽性菌細胞壁成分等の作用機序の解明に有用なモデルとすることができる。

本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物は、細菌菌体成分の作用機序の解明の他、細菌感染症に対する抑制物質若しくは促進物質又は T L R 2 に対するアゴニスト若しくはアンタゴニストなどの細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質若しくは促進物質のスクリーニングや、各種被検物質の生物活性の評価や、細菌菌体成分の検出等に用いることができる。例えば、細菌感染症に対する抑制物質若しくは促進物質又は T L R 2 に対するアゴニスト又はアンタゴニストなどの細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質若しくは促進物質のスクリーニング方法を、以下細菌感染症に対する抑制物質又は促進物質のスクリーニング方法を例にとって説明する。

本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞等と被検物質とをあらかじめインビトロで接触せしめた後、該マクロファージ又は脾臓細胞を細菌菌体成分の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することによる、細菌感染症に対する予防剤、免疫応答回復・促進剤等をスクリーニングする方法や、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞と細菌菌体成分とをあらかじめインビトロで接触せしめた後、該マクロファージ又は脾臓細胞を被検物質の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の

程度を測定・評価することによる、細菌感染症に対する治療剤、症状改善剤等をスクリーニングする方法を挙げることができる。

また、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞を細菌菌体成分の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することによる、細菌感染症に対する予防剤、免疫応答回復・促進剤等をスクリーニングする方法や、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物を細菌により感染させ、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することによる、細菌感染症に対する予防剤、免疫応答回復・促進剤等をスクリーニングする方法を挙げることができる。

また、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞を被検物質の存在下で培養し、該マクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することによる、細菌感染症に対する治療剤、症状改善剤等をスクリーニングする方法や、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られるマクロファージ又は脾臓細胞のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することによる、細菌感染症に対する治療剤、症状改善剤等をスクリーニングする方法を挙げることができる。

さらに、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物を細菌により感染させ、該非ヒト動物におけるマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することによる、細菌感染症に対する予防剤、免疫応答回復・促進剤等をスクリーニングする方法や、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物をあらかじめ細菌により感染させた後、該非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物におけるマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価することによる、細

菌感染症に対する治療剤、症状改善剤等をスクリーニングする方法を挙げることができる。

そして、マクロファージ活性の程度の測定・評価方法としては該マクロファージにおけるサイトカイン及び/又は亜硝酸イオンの産生量を測定・評価する方法を、脾臓細胞活性の程度の測定・評価方法としては該脾臓細胞におけるMHCクラスIIの発現量を測定・評価する方法をそれぞれ例示することができる。また、マクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を測定・評価するに際し、対照として細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物の野生型非ヒト動物、特に同腹の野生型非ヒト動物の測定値と比較・評価することが個体差によるバラツキをなくすることができるので好ましい。このことは、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物を用いる各種被検物質の生物活性の評価や、細菌菌体成分の検出等においても同様である。

本発明のスクリーニング方法の対象となる抑制物質又は促進物質としては、前記細菌感染症に対する抑制物質若しくは促進物質又はTLR2に対するアゴニスト若しくはアンタゴニストの他、マイコプラズマ属、スピロヘータ属又はエセリシア属に属する細菌の菌体成分由来のリポタンパク/リポペプチドや、ペプチドグリカン、エンドトキシン、リポテイコ酸、結核菌溶解物等の細菌菌体成分に対する応答性の抑制物質又は促進物質や、インターロイキン-1活性、インターロイキン-18活性、IFN-活性、TNF-活性等の抑制物質又は促進物質を例示することができる。

なお、TLR2に対するアゴニスト又はアンタゴニストのスクリーニングは、上記のように細菌感染症に対する抑制物質又は促進物質のスクリーニングと同様に行えばよいが、TLR4ノックアウトマウスと一緒に用いることもできる。すなわち、TLR2ノックアウトマウスとTLR4ノックアウトマウス、さらに必要に応じて野生型マウスに被検物質をそれぞれ投与して、該TLR2ノックアウトマウス由来及びTLR4ノックアウトマウス由来のマクロファージ活性又は脾臓細胞活性の程度を比較評価することにより、TLR2及び/又はTLR4に対するアゴニスト又はアンタゴニストをスクリーニングすることもできる。

本発明の被検物質の評価方法は、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性であ

る非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質の生物活性を評価することを特徴とする。本発明の被検物質の評価方法によると、被検物質の生物活性、例えばエンドトキシン活性、インターロイキン - 1 活性、インターロイキン - 1 8 活性等々を評価することができる。例えば、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスを用いて、被検物質のエンドトキシン活性を正確に評価することにより、エンドトキシン拮抗物質等のエンドトキシンによるショックや発熱作用を抑制することができる薬剤の開発に有用な情報を得ることができる。

また、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスを用いて、被検物質の I L - 1 活性を正確に評価することにより、病態モデルマウスにおける I L - 1 の疾患との関わりを検索することができる。このように、被検物質の I L - 1 活性を正確に評価したり、病態モデルマウスにおける I L - 1 の関与を解析することにより、例えば、I L - 1 発現過多に起因するリウマチ様関節炎、移植片対宿主病、喘息等の疾病を治療することができる薬剤の開発に有用な情報を得ることができる。そして、評価対照となる I L - 1 活性としては、フィットヘマグルチニン (P H A)、コンカナバリン A (C o n A) 等のマイトジェンや、低濃度の I L - 2 との共刺激による T 細胞の増殖誘導活性や、単球やマクロファージに作用して T N F - α 、I L - 1、I L - 6 の産生を誘導する活性などを挙げることができる。

そしてまた、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスを用いて、被検物質の I L - 1 活性を正確に評価することにより、例えば、I L - 1 8 の過剰産生に起因する I 型糖尿病や移植片対宿主病等の疾病を治療することができる薬剤の開発に有用な情報を得ることができる。そして、評価対照となる I L - 1 8 活性としては、I F N - γ の生成を促進する活性、N K 細胞活性を高める活性、I L - 1 2 と共働して T 細胞から I F N - γ の生成を誘導する活性、及び I R A K や N F - κ B を活性化する作用を挙げることができる。

本発明の細菌菌体成分の検出方法によると、本発明の細菌菌体成分に対して不応答性である非ヒト動物に被検物質を投与して、該被検物質中に混在する微量の細菌菌体成分、例えばマイコプラズマ属、スピロヘータ属、エセリシア属等に属する細菌の菌体成分由来のリポタンパクノリポペプチド、エセリシア・コリ、クレブシエラ・ニューモニエ、シュードモナス・アエルギノサ、サルモネラ・チフ

イムリウム、セラチア・マルセッセンス、フレクスナー赤痢菌、ビブリオ・コレレエ、サルモネラ・ミネソタ、ポルフィロモナス・ジンジバリス等由来のエンドトキシン、スタフィロコッカス・アウレウス、コリネバクテリウム・ジフテリア、ノカルジア・コエリアカ等由来のペプチドグリカン、ストレプトコッカス・ニューモニア等由来のリポテイコ酸、結核菌の全細胞溶解物等を検出することができる。

以下に、実施例を挙げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の技術的範囲はこれら実施例により限定されるものではない。

実施例 1 (My D 8 8 ノックアウトマウスの作製)

My D 8 8 遺伝子を 1 2 9 / S v J マウス遺伝子ライブラリー (S t r a t a g e n e 社製) からスクリーニングし、p B l u e s c r i p t ベクター (S t r a t a g e n e 社製) 中でサブクローンし、制限酵素マッピング及び DNA シーケンシングにより特定した。ターゲティングベクター (標的ベクター) は、p M C 1 - n e o (S t r a t a g e n e 社製) からのネオマイシン耐性遺伝子で、野生型アレルの 1 . 0 k b 遺伝子断片を置換することにより構築された。置換された遺伝子断片は、I L - 1 R A c P (受容体補助タンパク) の細胞質ドメインに似ているドメインをコードする 2 つのエクソンを含んでいた。ネオマイシン耐性遺伝子は、1 . 1 k b の 5 遺伝子断片と 5 . 2 k b の 3 遺伝子断片をフランキング配列として有していた。次いで、H S V - t k カセットを遺伝子断片の 3 端に導入した。線状化された標識ベクターを E S 細胞 E 1 4 . 1 にトランスフェクションし、G 4 1 8 及びガンシクロヴィアで選択した。両者に抵抗性を示す 1 7 6 個のクローンを、P C R による相同組換えのためにスクリーニングし、図 1 に示すプローブを用いるサザンブロット分析により 3 3 個を確かめた。

3 個の独立的に同定された標的 E S クローンを、C 5 7 B L / 6 マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションした。得られたキメラマウスを、ヘテロ接合体マウスを作製するために、C 5 7 B L / 6 雌マウスと交尾させた。ヘテロ接合体マウスは、ホモ接合体マウスを得るため、インタークロスされ、これらのインタークロスから予測されたメンデル比 (+ / + : + / - : - / - = 5 2 : 9 3 : 5 3) で生まれ、My D 8 8 欠損マウスを作製することができた。本発明の My D

88 ノックアウトマウスは健康に育ち、20週 of 年齢まで異常を示さなかった。突然変異により MyD88 遺伝子の不活性化が生起していることを確認するため、ノーザンブロット分析を行ったところ、MyD88 mRNA は MyD88 欠損マウスの肝臓及び脾臓からは検出されなかった。また、胸腺、脾臓及びリンパ節中の CD3、B220、CD4 及び CD8 のフローサイトメトリーで、リンパ球組成は野生型マウスと比較して MyD88 ノックアウトマウスにおいても変わっていないかった。

実施例 2 (MyD88 ノックアウトマウスのエンドトキシン不応答性)

本発明の MyD88 ノックアウトマウス 10 匹に、大腸菌 (O55 : B5) 由来の LPS を 1 mg 投与し、その生存率によりエンドトキシン不応答性を調べた。対照として同腹の野生型マウス 10 匹を用いた。結果を図 2 に示す。図 2 より、野生型マウスは LPS に応答し、投与後 4 日ですべて死亡したが、本発明の MyD88 ノックアウトマウスは、LPS 投与後 4 日では死亡するものはなく、エンドトキシン不応答性であることを確認することができた。

実施例 3 (MyD88 ノックアウトマウスの IL-1 仲介機能の欠失)

本発明の MyD88 ノックアウトマウスの胸腺細胞 1×10^5 を、T細胞増殖についての IL-1 との共刺激物であるフィトヘマグルチニン (PHA) $2 \mu\text{g} / \text{ml}$ 、コンカナバリン A (ConA) $2.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ 又は $2 \text{ng} / \text{ml}$ の IL-2 のそれぞれと、IL-1 (Genzyme 社) $100 \text{U} / \text{ml}$ との混合物と共に 96 ウェルの培養皿で 72 時間培養し、T細胞を増殖させた。T細胞の増殖は、細胞内に取り込まれた $[^3\text{H}]$ チミジンの $[^3\text{H}]$ 量を測定することにより求めた。その結果、PHA、ConA 又は IL-2 と IL-1 との共存下で培養したとき、同腹子の野生型マウスの胸腺細胞は大いに増殖したが、本発明の MyD88 ノックアウトマウスの胸腺細胞は細胞増殖の増加がほとんど見られなかった (図 3 参照)。また、胸腺細胞に代えて脾臓 B 細胞を用いても、同じような結果が得られることがわかった。

また本発明の MyD88 ノックアウトマウスの胸腺細胞を、ホルボール 12 - ミリスチン酸塩 13 - 酢酸塩パラメトキシアンフェタミン (PMA) $10 \text{ng} / \text{ml}$ 又は ConA $2.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ と IL-2 (Genzyme 社) $20 \text{ng} /$

m l との共存下で上記と同じように培養させ、細胞増殖の増加を見たところ、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスの胸腺細胞と、同腹子の野生型マウスの胸腺細胞とは、I L - 2 と P M A や C o n A との反応に関しては増殖において差が見られなかった（図 3 参照）。これらのことから、I L - 1 が仲介する T 細胞成長シグナルは、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスの胸腺細胞で損なわれていることがわかる。

本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスの静脈内に I L - 1 （G e n z y m e 社）1 μ g を注入し、2 時間後肝臓と血清を取り出した。総 R N A をトリゾール試薬（G I B C O 社）を用いて肝臓から抽出し、この R N A （1 0 μ g ）を電気泳動にかけ、ナイロン膜に移して血清アミロイド A （S A A - I ）、血清アミロイド P （S A P ）及びハプトグロビン（H P ）のような急性期蛋白質について、^{3 2} P でラベルされた c D N A を用いてノーザンプロット分析を行い、m R N A 発現の I L - 1 の誘導増加を同腹子の野生型マウスのものと比較したところ、野生型マウスでは誘導の増加が見られたが、M y D 8 8 ノックアウトマウスでは見られなかった。

また I L - 1 が、腫瘍壊死因子（T N F - ）や I L - 6 のような急性期蛋白質の産生や炎症性のサイトカインを誘導するため、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスと同腹子の野生型マウスから上記の方法で取り出した血清の T N F - や I L - 6 の濃度が増加するかどうかを E L I S A によって測定した。その結果、野生型マウスにおいては I L - 1 によって T N F - や I L - 6 の濃度が増加したが、M y D 8 8 ノックアウトマウスでは T N F - や I L - 6 の濃度が I L - 1 によって増加されることはなかった（図 4 参照）。

以上のことから、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスでは、I L - 1 を介する主な生物学的機能が厳格に欠失していることがわかる。

実施例 4（M y D 8 8 ノックアウトマウスの I L - 1 8 仲介機能の欠失）

I L - 1 8 が N K 細胞の溶解活性を増強することはよく知られている。本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウス及び同腹子の野生型マウスの脾臓 B 細胞を、I L - 1 8 （林原生化学研究所株式会社）2 0 n g / m l の存在下又は不存在下、^{5 1} C r でラベルされたマウスリンホーマ細胞（以下「Y A C - 1」という）標

的細胞といっしょに24時間培養し、4時間後ガンマカウンターを用いて上清中の遊離した⁵¹Crを測定した。その結果、インビトロで脾臓B細胞をIL-18の存在下培養したとき、野生型マウスにおけるYAC-1標的細胞に対する溶解活性は劇的に増強したが、MyD88ノックアウトマウスにおいては増強されることはなかった。なお、IL-18に代えてIL-2を用いた場合には、本発明のMyD88ノックアウトマウスの脾臓B細胞においても溶解活性が増強した(図5参照)。

またインビトロで、本発明のMyD88ノックアウトマウスの脾臓B細胞と同腹子の野生型マウスの脾臓B細胞とを20ng/mlのIL-18で刺激し、24時間培養し、ELISAによって培養上清におけるIFN- γ の産生について測定した。その結果、野生型マウスにおいてはIFN- γ の産生が誘発されたが、本発明のMyD88ノックアウトマウスではIFN- γ の産生は見られなかった(図5参照)。

95%以上の純度に精製された本発明のMyD88ノックアウトマウスの脾臓T細胞及び同腹子の野生型マウスの脾臓T細胞を、2ng/mlのIL-12存在下、抗CD3抗体(20 μ g/ml)(PharMingen社)でコーティングされた培養皿で培養し、4日後細胞を採取し、ハンクス平衡塩溶液で洗浄した。洗浄後の細胞(2×10^5)は、抗CD3抗体(20 μ g/ml)でコーティングされた96ウェルの培養皿で、20ng/mlのIL-18又は2ng/mlのIL-12で、24時間再び刺激され培養された。その培養上清でのIFN- γ の濃度はELISAによって測定し比較された。その結果、本発明のMyD88ノックアウトマウスの脾臓T細胞は、IL-18に応答したIFN- γ の産生を高めることができないことがわかった(図6参照)。

本発明のMyD88ノックアウトマウス及び同腹子の野生型マウスの腹膜内に、熱で殺されたプロピオン酸菌アクネ(*P. acnes*)500 μ gを注入し、7日後脾臓からT細胞を精製した後、20ng/mlのIL-18の存在下又は非存在下、抗CD3抗体(20 μ g/ml)でコーティングされた96ウェルの培養皿で24時間培養し刺激し、その培養上清におけるIFN- γ の濃度をELISAによって測定した。また本発明のMyD88ノックアウトマウス及び同腹

子の野生型マウスの静脈内に、カルメット - ゲラン菌 (B C G) (共和化学) 2 m g を注入し、14日後脾臓からT細胞を精製した後、上記のように24時間培養し刺激し、I F N - の濃度を測定した。その結果、どちらの場合も、野生型マウスにおいてはI L - 18に应答して高レベルのI F N - が産生されたが、本発明のM y D 8 8 ノックアウトマウスではI L - 18の存在下でI F N - の産生を高めることはできなかった (図6参照)。

以上のことから、本発明のM y D 8 8 ノックアウトマウスは、I L - 18欠損マウスと同様に、インピボでのT h 1細胞への発展に欠陥があり、I L - 18を介する主な生物学的活性は完全に欠失していることがわかる。

次に、ドミナントネガティブ (d o m i n a n t n e g a t i v e) M y D 8 8 の突然変異が、I L - 18誘導N F - B活性化も阻害するかどうか検討した。C O S - 7細胞は、N F - B依存ルシフェラーゼレポーター (l u c i f e r a s e r e p o r t e r) 遺伝子と共にM y D 8 8 (アミノ酸152から296) 発現ベクターで過渡的にトランスフェクションし、I L - 18処理後のルシフェラーゼ活性を測定した。M y D 8 8 の共発現 (c o e x p r e s s i o n) はI L - 18誘導活性をほぼ完全に阻害した (図7参照)。

またI L - 18は、A P - 1依存遺伝情報を活性化することから、M y D 8 8 (アミノ酸152から296) がI L - 18誘導A P - 1活性化のドミナントネガティブ突然変異としても働くかどうか試験した。I L - 18での刺激はA P - 1活性を約3 ~ 4倍増加し、この活性化はM y D 8 8 (アミノ酸152から296) の共発現 (c o e x p r e s s i o n) で阻害された (図7参照)。これらの結果は、M y D 8 8 がN F - BとA P - 1のI L - 18誘導活性化に関与していることを示している。

次に、N F - BのI L - 18誘導活性化がM y D 8 8欠損細胞で見られるかどうかを検討した。I L - 12及び抗C D 3抗体の存在下で4日間培養された脾臓T細胞を3時間飢餓状態にした後I L - 18で刺激した。刺激された細胞から抽出された核を、N F - B接合部を含む特定のプローブを用いてゲル移動度シフト (m o b i l i t y s h i f t) 分析を行った。I L - 18誘導N F - B D N A 接着活性は、野生型細胞からの核抽出物中では検出されたが、M y D 8

8 欠損細胞からは検出されなかった。他方、野生型あるいは My D 8 8 欠損胸腺細胞を TNF - で処理すると、ほとんど同レベルの NF - B DNA 接着活性を生じ、N My D 8 8 欠損細胞中の欠損 IL - 1 8 誘導 NF - B 活性は、NF - B の異常機能あるいは調節低下によるものではないことを示した。

NF - B の活性化の誘導に加えて、IL - 1 は C - J u n N 末端キナーゼ (J N K) を活性化することが知られている。IL - 1 8 が J N K の活性化を誘導するかどうか試験するため、代替として GST - c - J u n - 融合蛋白を使ってインビトロキナーゼ分析を行った。IL - 1 8 を使った処理は、野生型マウスの Th 1 - 発達細胞中の J N K の活性化を誘導したが、IL - 1 8 誘導 J N K 活性化は My D 8 8 欠損細胞では見られなかった。反対に J N K の通常の活性が TNF - で処理した My D 8 8 欠損細胞で見られた。IL - 1 8 誘導による NF - B 及び J N K の活性は、My D 8 8 欠損マウス中では欠失している。これらの結果は、My D 8 8 が NF - B 及び J N K の IL - 1 8 誘導活性化に必須であることを示している。

実施例 5 (My D 8 8 ノックアウトマウスのマクロファージと脾臓 B 細胞の細菌細胞壁成分不応答性)

5 - 1 (T L R 4 欠損マウスの作製)

最近、C 3 H / H e J マウスが T o l l 様受容体 (T L R) 4 遺伝子のミスセンス点突然変異により L P S に対して低応答性であることが報告され (S c i e n c e 2 8 2 , 2 0 8 5 - 8 , 1 9 9 8 、 J . E x p . M e d . 1 8 9 , 6 1 5 - 6 2 5 , 1 9 9 9 、 J . I m m u n o l . 1 6 2 , 3 7 4 9 - 3 7 5 2 , 1 9 9 9) 、また本発明者らによって、T L R 4 欠損マウスのマクロファージと脾臓 B 細胞が L P S に低応答性であり、T L R 4 遺伝子が L P S シグナル伝達に不可欠であることが判明した (J . I m m u n o l . 1 6 2 , 3 7 4 9 - 3 7 5 2 , 1 9 9 9) 。そこで、T L R 4 欠損マウスと My D 8 8 欠損マウスとのマクロファージと脾臓 B 細胞の細菌細胞壁成分に対する応答性を比較するために、T L R 4 欠損マウス (1 2 9 / O l a X C 5 7 B L / 6 から交配した F₂) を文献記載 (J . I m m u n o l . 1 6 2 , 1 9 9 9 , 3 7 4 9 - 3 7 5 2) のようにジーンターゲット法により作製した。また、以下の実施例には、年齢が一致す

る野生型マウス、TLR4欠損マウス及びMyD88欠損マウスを使用した。

5 - 2 (細菌細胞壁成分の調製)

フェノール抽出し、ゲル濾過法によって精製されたエセリシア・コリ (*Escherichia coli*) 血清型 O55 : B5 (シグマ社製)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) (シグマ社製)、シュードモナス・アエルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*) 血清型 10 (シグマ社製)、サルモネラ・チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) (シグマ社製)、セラチア・マルセッセンズ (*Serratia marcescens*) (シグマ社製)、フレクスナー赤痢菌 (*Shigella flexneri*) 血清型 1A (シグマ社製)、ビブリオ・コレレエ (*Vibrio cholerae*) 血清型 イナバ 569B (シグマ社製) 等の LPS を購入した。フェノールクロロフォルム石油エーテル抽出法により調製されたサルモネラ・ミネソタ (*Salmonella minnesota*) Re - 595 の LPS は購入した (シグマ社製)。また、文献 (FEBS Lett. 332, 1994, 197 - 201) 記載の方法で、ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) 381 の LPS 及びリピド A を調製した。結核菌の全細胞溶解物は、デュボス培地 (ディフコ社製) で結核菌アオヤマ B 株 (NIH J1635) を 1 ヶ月間培養した後、細胞を回収してリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で再懸濁し、細胞を超音波処理して調製した。

5 - 3 (腹膜マクロファージの調製)

上記作製した野生型マウス、TLR4欠損マウス及びMyD88欠損マウスのそれぞれの腹腔内に 4% のチオグリコール酸塩を 2 ml ずつ注入し、3 日後に腹腔から腹膜滲出細胞を単離し、氷温のハンクス緩衝液 (Hank's buffered salt solution: HBSS) で洗浄することによって腹膜細胞を得た。この細胞を RPMI 1640 培地に浮遊させ、プラスチックシャーレに分注し、37℃ で 2 時間培養し、その後、ハンクス緩衝液で洗浄することにより非付着細胞を取り除き、付着細胞を腹膜マクロファージとして以下の実験に使用した。

5 - 4 (サルモネラ・ミネソタ R e - 5 9 5 の L P S に対する不応答性)

上記野生型マウス(野生型)、TLR4欠損マウス(TLR4 - / -)、MyD88欠損マウス(MyD88 - / -)等のそれぞれの腹膜マクロファージのLPSに対する応答性をサルモネラ・ミネソタ R e - 5 9 5 の L P S を用いて調べた。それぞれのマウスの腹膜マクロファージを、種々の濃度(0、0.01、0.1、1、10又は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)のLPSの存在下で24時間培養して刺激し、LPS応答性のマクロファージから放出される腫瘍壊死因子(TNF-)の濃度をELISAにより測定した(図8A参照)。この結果から、野生型マウスのマクロファージでのTNF-の産生は、LPSの投与量に応じて増加するのに対して、TLR4欠損マウスやMyD88欠損マウスでは、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のLPS刺激においてもTNF-を産生せず、これらがLPS不応答性であることがわかった。

また、サルモネラ・ミネソタ R e - 5 9 5 の L P S に対する脾臓B細胞の応答性についても調べてみた。野生型マウス、TLR4欠損マウス、MyD88欠損マウスのそれぞれの脾臓B細胞(1×10^5)を単離し、96ウェルの培養皿内で培養し、種々の濃度(0、0.01、0.1、1、10又は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)のLPSで脾臓B細胞を刺激した。培養から40時間後に1 μCi の[^3H]-チミジン(デュポント社製)を添加して更に8時間培養し、[^3H]の摂取量をシンチレーションカウンター(パッカー社製)で測定した(図8B参照)。この結果から、LPSの刺激により野生型マウスの脾臓B細胞では、LPSの投与量に依存して細胞増殖反応を促進したが、TLR4欠損マウス又はMyD88欠損マウスのどちらの脾臓B細胞においても、LPSによる細胞増殖反応は見られなかった。

また、フローサイトメトリーにより、R e - 5 9 5 の L P S に対する応答における脾臓B細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスII(I-A^b分子)の発現について調べてみた。野生型マウス、MyD88欠損マウス及びTLR4欠損マウスのそれぞれの脾臓B細胞(1×10^6)を種々の濃度(0、0.01、0.1、1、10又は100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)のLPS共存下に48時間培養した。培養後細胞を採取して、フィコエリトリン(phycoerythrin

i n : P E ; ファーミンジェン社製) で標識した抗 B 2 2 0 抗体、又はビオチン化抗マウス I - A^b 抗体 (ファーミンジェン社製) に、フルオレセインイソシアネート (F I T C ; ファーミンジェン社製) で標識したストレプトアビジンを結合させた F I T C 標識化抗体により、それらの細胞表面における I - A^b 分子に結合させて細胞を染色した。染色した細胞をセルクエストのソフトウェア (ベクトンディッキンソン社製) により蛍光活性化セルソーターキャリバー (F A C S C a l i b u r) で分析した。この結果から、R e - 5 9 5 の L P S は、野生型マウスの脾臓 B 細胞表面での I - A^b 分子の発現を増大しているのに対し、T L R 4 欠損マウスや M y D 8 8 欠損マウスの脾臓 B 細胞では、高濃度の L P S (1 0 0 μ g / m l) で刺激しても、I - A^b 分子の発現は増大しなかった (図 8 C 参照) 。以上のことから、T L R 4 欠損マウスと M y D 8 8 欠損マウスは共にサルモネラ・ミネソタ R e - 5 9 5 の L P S に対して不応答であることがわかる。

5 - 5 (I L - 4 と I F N - に対する T L R 4 欠損マウス及び M y D 8 8 欠損マウスの応答性)

T L R 4 欠損及び M y D 8 8 欠損マウスの脾臓 B 細胞が全ての刺激物に対して不応答性であるかどうかを調べるため、T L R 4 欠損マウス及び M y D 8 8 欠損マウスの脾臓 B 細胞の他の刺激物に対する応答性を検討したところ、以下に示すように応答性は損なわれておらず、これらのマウスは L P S に対する応答性が特異的に欠損していることがわかった。

野生型マウス、M y D 8 8 欠損マウス、及び T L R 4 欠損マウスのそれぞれの脾臓 B 細胞 (1×10^5) を単離し、I L - 4 (G e n z y m e 社製) 及び抗 I g M 抗体の共存下又は抗 C D 4 0 抗体の存在下において 4 0 時間培養し、[³ H] - チミジン (デュポント社製) を添加して更に 8 時間培養し、[³ H] の取込み量をシンチレーションカウンターで測定した (図 9 A 参照) 。この結果から、T L R 4 欠損マウス及び M y D 8 8 欠損マウスの脾臓 B 細胞は、I L - 4 及び抗 I g M 抗体の混合物、又は抗 C D 4 0 抗体に対する応答において、野生型マウスの脾臓 B 細胞と同じ挙動を示した。

次に、野生型マウス、M y D 8 8 欠損マウス、及び T L R 4 欠損マウスのそれ

それぞれの脾臓 B 細胞 (1×10^6) を、 100 U/ml の IL - 4 の存在下又は非存在下において 48 時間培養しそれらの細胞を刺激した。その後、PE 標識抗 B220 抗体又は FITC 標識抗マウス I - A^b 抗体により、脾臓 B 細胞表面の I - A^b 分子と結合させて細胞を染色し、セルクエスト・ソフトウェアを用いて蛍光活性化セルソーターキャリバーで細胞増殖を測定した (図 9 B 参照)。その結果、TLR4 欠損マウス及び MyD88 欠損マウスの脾臓 B 細胞は、IL - 4 に対する応答においても、野生型マウスの脾臓 B 細胞と同じ挙動を示した。

野生型マウス、MyD88 欠損マウス又は TLR4 欠損マウスのそれぞれの腹腔内に、 5000 U の IFN - γ (Genzyme 社製) 又は PBS を投与し、投与から 3 日後に腹膜マクロファージを採取し、FITC 標識抗マウス I - A^b 抗体でマクロファージの膜面に存在する I - A^b 分子と結合させて細胞を染色し、セルクエストのソフトウェアにより蛍光活性化セルソーターキャリバーで分析した (図 9 C 参照)。この結果から、野生型マウス、TLR4 欠損マウス及び MyD88 欠損マウスにおいて、腹膜マクロファージでの I - A^b 分子の発現、すなわち IFN - γ が誘発する細胞増殖の阻害も同程度であった。

5 - 6 (貧食作用分析)

野生型マウス、MyD88 欠損マウス及び TLR4 欠損マウスのマクロファージに 0.025% の蛍光ラテックスビーズ ($0.75 \mu\text{m}$) (ポリサイエンス社製) を加え、 37°C で 2 時間、 CO_2 インキュベーター中で培養した。その後、貧食されなかったビーズを取り除くため、この培養物を PBS で 3 回勢いよく洗浄し、20 分間、 2.5% のホルムアルデヒドを含む PBS でインキュベートし、培養物をホルムアルデヒドで固定した。これらの固定細胞を、Axio phot 顕微鏡 (Carl Zeiss 社製) で視覚化したところ、TLR4 欠損マウス及び MyD88 欠損マウスの腹膜マクロファージは共に、ラテックス粒子を貧食していることがわかった。したがって、これらの他の刺激による TLR4 欠損マウス及び MyD88 欠損マウスのマクロファージの貧食能は損なわれていないことがわかった。

5 - 7 (ポルフィロモナス・ジンジバリスの LPS に対する応答性)

ポルフィロモナス・ジンジバリスの LPS は、LPS 低応答性である C3H /

HeJマウスの細胞の活性化能において、ある程度の反応を示すことから (J . Immunol . 158 , 1997 , 4430 - 6) 、それぞれのマウスのポルフィロモナス・ジンジバリスのLPSに対する応答性を前記サルモネラ・ミネソタRe-595の場合と同様に調べた。野生型マウスのマクロファージでは、ポルフィロモナス・ジンジバリスのLPSの投与量に依存してTNF- α を誘発していたが、TLR4欠損マウスのマクロファージでは、C3H/HeJマウスのマクロファージと同様に低応答性であり、野生型マウスのマクロファージの3分の1程度のTNF- α 産生能を示したに過ぎなかった。これに対し、MyD88欠損マウスのマクロファージでは、高濃度のLPSで刺激しても、検出しうる程度のTNF- α を産生しなかった (図10A参照) 。

また、ポルフィロモナス・ジンジバリス381のLPSに対して、TLR4欠損マウスの脾臓B細胞は低レベルの増殖応答を示し、脾臓B細胞のI-A^b分子の発現を増大させていたが、MyD88欠損マウスの脾臓B細胞は増殖応答を示さず、I-A^b分子の発現も確認できなかった (図10B、C参照) 。また、ポルフィロモナス・ジンジバリス381のリピドAにおいても同様の結果が得られた。これらのことから、ポルフィロモナス・ジンジバリスのLPSに対する応答において、TLR4欠損マウスは低応答性であり、MyD88欠損マウスは不応答性であることがわかった。また、ポルフィロモナス・ジンジバリスのLPSにより誘発されるシグナル伝達に対し、MyD88は必須であるが、TLR4は部分的に寄与していることがわかった。

5 - 8 (大腸菌O55 : B5のLPSに対する応答性)

大腸菌 (O55 : B5) のLPSに対する応答性についても、前記サルモネラ・ミネソタRe-595の場合と同様に調べた。TLR4欠損マウス及びMyD88欠損マウスの腹膜マクロファージでは、野生型マウスのマクロファージと比較して、大腸菌 (O55 : B5) のLPSに対する応答性を損なっていた (図11A) 。しかし、高濃度のLPSで刺激した場合、TLR4欠損マウスのマクロファージは少量のTNF- α を産生したが、それに対してMyD88欠損マウスのマクロファージは、高濃度のLPS刺激においてもTNF- α を産生しなかった。

また、これらマウスの脾臓 B 細胞における増殖応答についても同様な傾向が見受けられた (図 1 1 B 参照)。さらに、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ を超える L P S で刺激した T L R 4 欠損マウスの脾臓 B 細胞は、野生型マウスの脾臓 B 細胞と同程度の I - A^b 分子の発現を示したが、M y D 8 8 欠損マウスの脾臓 B 細胞は $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ の L P S での刺激に対しても I - A^b 分子の発現を示さなかった (図 1 1 C 参照)。以上の結果から、ポルフィロモナス・ジンジバリスの L P S 刺激の場合と同様に、T L R 4 欠損マウスは大腸菌 (O 5 5 : B 5) の L P S に対して低応答性であるが、M y D 8 8 欠損マウスは不応答性であることがわかった。

5 - 9 (ペプチドグリカンに対する応答性)

グラム陽性菌の主要な細胞壁成分であるペプチドグリカン (P G N) がマクロファージを活性化することが報告されている (J . I m m u n o l . 1 5 5 , 1 9 9 5 , 2 6 2 0 - 3 0 、 I n f e c t . I m m u n . 6 2 , 1 9 9 4 , 2 7 1 5 - 2 1)。そこで、スタフィロコッカス・アウレウスの P G N (F l u k a 社製) に対する応答性を前記サルモネラ・ミネソタ R e - 5 9 5 の場合と同様に調べた。P G N で刺激した場合、T L R 4 欠損マウスの腹膜マクロファージは、投与量に依存して野生型マウスのマクロファージとほぼ同程度の T N F - α を産生したが、M y D 8 8 欠損マウスのマクロファージは、高濃度の P G N 刺激に対しても T N F - α を産生しなかった (図 1 2 A 参照)。

スタフィロコッカス・アウレウスの P G N で刺激した場合、野生型マウスの脾臓 B 細胞は細胞増殖応答を示し、M y D 8 8 欠損マウスにおいては野生型マウスと比べて細胞増殖応答が大きく損なわれていたが、その程度が T L R 4 欠損マウスの場合は小さかった (図 1 2 B 参照)。また、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ を超える濃度の P G N で刺激した場合、野生型マウスも T L R 4 欠損マウスも I - A^b 分子発現の増大が観察されたが、M y D 8 8 欠損マウスの脾臓 B 細胞では、 $100 \mu\text{g} / \text{ml}$ の P G N 刺激の場合でも I - A^b 分子の発現の増大は見られなかった (図 1 2 C 参照)。これらのことより、T L R 4 欠損マウスは、黄色ブドウ球菌の P G N に対して野生型マウスとほぼ同様の応答を示すが、M y D 8 8 欠損マウスは不応答性であることがわかった。

5 - 1 0 (リポテイコ酸に対する応答性)

リポテイコ酸 (L T A) は、グラム陽性菌の細胞壁成分であって、単球とマクロファージの活性化を誘導する (*Infect. Immun.* 62, 1994, 2715 - 21) ことから、ストレプトコッカス・ニューモニアの L T A に対する応答性を前記サルモネラ・ミネソタ R e - 595 の場合と同様に調べた。野生型マウスの腹膜マクロファージは、L T A の投与量に応じて T N F - α の産生を増大していた。これに対して、M y D 8 8 欠損マウスのマクロファージでは、高濃度の L T A 刺激に対しても T N F - α を産生しなかった。また、T L R 4 欠損マウスも野生型マウスと比較すると T N F - α の産生が損なわれていたが、100 μ g / m l の L T A 刺激では T N F - α を誘発していた (図 13 A 参照) 。

次に、ストレプトコッカス・ニューモニアの L T A 刺激に対するこれらマウス脾臓 B 細胞の細胞増殖反応と I - A ^b 分子の発現の増大を分析した (図 13 B 参照) 。この結果から、野生型マウスの脾臓 B 細胞は、L T A の投与量に応じて L T A に対する応答を増大させるのに対し、M y D 8 8 欠損マウスの脾臓 B 細胞は、L T A に対する増殖反応を非常に損なっていた。T L R 4 欠損マウスの脾臓 B 細胞においても増殖反応は損なわれていたが、高濃度の L T A で刺激した場合には増殖応答性を示した。また、野生型マウス及び T L R 4 欠損マウスの脾臓 B 細胞では細胞表面において I - A ^b 分子の発現が増大するのに対し、M y D 8 8 欠損マウスの脾臓 B 細胞では増大がみられなかった (図 13 C 参照) 。これらのことから、M y D 8 8 欠損マウスはストレプトコッカス・ニューモニアの L T A 刺激に対して不応答性であることがわかる。

5 - 1 1 (結核菌全細胞溶解物に対する応答性)

結核菌細胞壁成分、特にリポアラビノマンナンは、骨髄性細胞の活性化を誘導することで知られていることから (*J. Immunol.* 149, 1992, 541 - 7、*J. Clin. Invest.* 91, 1993, 2076 - 83)、結核菌全細胞溶解物に対する応答性を前記サルモネラ・ミネソタ R e - 595 の場合と同様に調べた。野生型マウスのマクロファージは、全細胞溶解物の投与量に依存して T N F - α を産生していた。また、T L R 4 欠損マウスのマクロファージも、野生型マウスのものと比較するとわずかであるが T N F - α を産生していた。しかし、M y D 8 8 欠損マウスのマクロファージは、高濃度の全細胞溶解

物に対しても T N F - α を産生しなかった (図 1 4 A 参照) 。

次に、結核菌全細胞溶解物による刺激に対するこれらマウスの応答性について調べた。野生型マウスの脾臓 B 細胞は、全細胞溶解物の投与量に依存して増大する細胞増殖応答と細胞表面での I - A^b 分子の発現を示し、T L R 4 欠損マウスの脾臓 B 細胞でもまた、野生型マウスのものより低いものの細胞増殖応答と I - A^b 分子の発現を示した。これに対して、M y D 8 8 欠損マウスの脾臓 B 細胞では、増殖反応と I - A^b 分子の発現の増大が大きく損なわれており、全細胞溶解物に対して不応答性であることがわかった (図 1 4 B 、 C 参照) 。

5 - 1 2 (他の菌体細胞壁成分に対する応答性)

野生型マウス、T L R 4 欠損マウス及び M y D 8 8 欠損マウスの応答性について、他の菌体細胞壁成分 [クレブシエラ・ニューモニエ、シュードモナス・アウリギノサ 1 0 、サルモネラ・チフィムリウム、フレクスナー赤痢菌、ピブリオ・コレラ等の L P S 、及び大日本製薬株式会社のカワタシゲオ氏から提供されたスタフィロコッカス・エピデルミディス (*S t a p h y l o c o c c u s e q i d e r m i d i s*) の P G N] に対する応答性についても上記と同様に調べた。結果を表 1 に示す。この表 1 から、全ての菌体の成分において、M y D 8 8 欠損マウスが不応答性であることがわかった。

表 1

試料	マウス応答性		
	野生型	TLR4 ^{-/-}	MyD88 ^{-/-}
LPS			
<i>Escherichia coli</i> O55:B5	++	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	++	-	-
<i>Porphyromonas gingivalls</i>	++	+	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	++	+	-
<i>Salmonella minnesota</i> Re595	++	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	++	+	-
<i>Serratia marcescens</i>	++	+	-
<i>Shigella flexneri</i>	++	+	-
<i>Vibrio cholerae</i>	++	+	-
PGN			
<i>Staphylococcus aureus</i>	++	++	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	++	+	-
LTA			
<i>Streptococcus faecalis</i>	++	+	-
結核菌全細胞溶解物			
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	++	+	-

また L P S は、 T L R 4 を独自のシグナル受容体として利用し、不応答性を示すもの（サルモネラ・ミネソタ R e 5 9 5 やクレブシエラ・ニューモニエ等の L P S ）や、 T L R 4 欠損マウスに対して低いが応答性を示すもの（ポルフィロモナス・ジンジバリス、エシェリキア・コリ O 5 5 : B 5、シュードモナス・アウリギノサ、フレクスナー赤痢菌、サルモネラ・チフィムリウム、ビブリオ・コレラ等の L P S ）の 2 つの型に分類できることがわかった。後者の L P S に対して M y D 8 8 欠損マウスは応答性を示さないことから、これらの L P S の認識とシグナル伝達は、 T L R 4 と他の T L R との両方により、及び / 又は M y D 8 8 をアダプター分子として使用する T L R 関連受容体により介されるものと考えられる。

実施例 6（ T L R 2 ノックアウトマウスの作製）

1 2 9 / S v J マウス遺伝子ライブラリー（ストラタジーン社製）から、ヒト

T L R 2 遺伝子と類似したマウス E S T クローン (登録番号 D 7 7 6 7 7) 由来のプローブを用いて、T L R 2 遺伝子をスクリーニングし、p B l u e s c r i p t ベクター (ストラタジーン社製) 中でサブクローンし、制限酵素マッピング及び D N A 配列決定により特定した。ターゲッティングベクターは、T L R 2 遺伝子の細胞内領域を含むエクソン部位 1 . 3 k b の遺伝子フラグメントを、ポリ A シグナルをもつ p M C 1 - n e o (ストラタジーン社製) に置換することにより構築した。かかるターゲッティングベクターは、4 . 8 k b の 5 遺伝子フラグメントと 1 . 0 k b の 3 遺伝子フラグメントとをフランキング配列として有し、H S V - t k カセットを 5 末端に含んでいる。このターゲッティングベクターを S a l I により線状化し、胎生 1 4 . 1 日目の胚幹細胞 (E S 細胞) にエレクトポレーションし、G 4 1 8 及びガンシクロピアに抵抗性を示す 1 2 0 個のクローンを、P C R による相同組換えのためにスクリーニングし、図 1 5 A に示すプローブを用いるサザンブロット分析により 9 個を確かめた。

相同組み換え変異 T L R 2 対立遺伝子を含有していた 3 個の標的 E S クローンを、C 5 7 B L / 6 マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製した。この雄のキメラマウスと C 5 7 B L / 6 雌マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによってホモ接合体マウスを得た (図 1 5 B) 。なお、本発明の T L R 2 欠損マウスはメンデルの法則に従い作製することができ、2 0 週目までは顕著な異常を示さなかった。

相同組み換え変異により T L R 2 遺伝子の不活性化が生起していることを確認するため、野生型マウス (+ / +) 及び T L R 2 ノックアウトマウス (- / -) の腹腔マクロファージ (5×10^6) から抽出した全 R N A (1 5 μ g) を電気泳動にかけナイロン膜に移して、文献 (I m m u n i t y 9 , 1 4 3 - 1 5 0 , 1 9 9 8) 記載の方法と同様に、[32 P] で標識した T L R 2 に特異的な c D N A 又は G A P D H (g l y c e l a l d e h y d e - 3 - p h o s p h a t o d e h y d r o g e n a s e) に特異的な c D N A を用いてノーザンブロット分析を行った。これらの結果から、T L R 2 m R N A は T L R 2 欠損マウスの腹腔マクロファージからは検出されなかった (図 1 5 C) 。また、T L R 2 ノッ

クアウトマウスの胸腺細胞及び脾臓細胞中の C D 3、B 2 2 0、C D 4 及び C D 8 の発現は、野生型マウスのもものと比較しても差異がなかった（図は示さず）。

実施例 7（T L R 2 ノックアウトマウスのエンドトキシン応答性）

本発明の T L R 2 ノックアウトマウス（5 匹）、T L R 4 ノックアウトマウス（5 匹）及び野生型マウス（5 匹）に、それぞれ大腸菌（O 5 5 : B 5）由来の L P S を 1 m g 投与し、その生存率により L P S 不応答性を調べた。結果を図 1 6 に示す。図 1 6 より、本発明の T L R 2 ノックアウトマウス（T L R 2 - / -）及び野生型マウスは L P S に応答し、投与後 4 日でほとんどが死亡したのに対して、T L R 4 ノックアウトマウス（T L R 4 - / -）は、L P S 投与後 6 日目においても死亡するものはなく、エンドトキシン不応答性であることを確認することができた。

実施例 8（T L R 2 ノックアウトマウスのグラム陰性菌の菌体成分に対する応答性）

T L R 2 ノックアウトマウス（T L R 2 - / -）、T L R 4 ノックアウトマウス（T L R 4 - / -）及び野生型マウス（野生型）のそれぞれの腹腔内に 4 % のチオグリコール酸培地（D I F C O 社製）を 2 m l ずつ注入し、3 日後に各マウスの腹腔内から腹膜滲出細胞を単離し、これらの細胞を 1 0 % のウシ胎仔血清（G I B C O 社製）を添加した R P M I 1 6 4 0 培地（G I B C O 社製）中で 3 7 °C にて 2 時間培養し、氷温のハンクス緩衝液（H a n k ' s b u f f e r e d s a l t s o l u t i o n : H B S S ; G I B C O 社製）で洗浄することにより非付着細胞を取り除き、付着細胞を腹膜マクロファージとして以下の実験に使用した。

得られた各腹膜マクロファージを I N F γ （3 0 u n i t / m l）の存在下又は非存在下において、1 . 0 n g / m l の大腸菌由来の合成リピド A（5 0 6 化合物；第一化学薬品社製）又はサルモネラ・ミネソタ R e - 5 9 5 由来の L P S（シグマ社製）といっしょに 2 4 時間培養した。なお、かかる合成リピド A としては、0 . 0 2 5 % のトリエチルアミンを含有し、エンドトキシンを全く含有しない水に可溶化したものを用いた。培養後、培養上清中の I L - 6（図 1 7 A）、T N F - α （図 1 7 B）、N O $_2$ （図 1 7 C）の産生量を測定した。なお、

IL - 6 は固相酵素免疫検定法 (ELISA ; ENDOGEN 社製) により、TNF - は製造者 (Genzyme 社製) の指示に基づき ELISA により、NO₂ は NO₂ / NO₃ アッセイキット (同仁科学研究所社製) を使用した Griess 法により測定した。

上記の結果から、野生型マウス及び TLR2 ノックアウトマウスのマクロファージでは、LPS やリピド A に対して同様な応答を示し、IL - 6 と TNF - を産生していた。また、LPS やリピド A に IFN - を加え培養することにより、さらなる TNF - 産生の増大が確認できた。一方、TLR4 ノックアウトマウスのマクロファージにおいては、IL - 6 と TNF - を産生しなかった。また、野生型マウス又は TLR2 ノックアウトマウスから得られたマクロファージを IFN - の添加したリピド A 又は LPS において培養することにより、NO₂ の産生が確認できた。また、リピド A や LPS の投与量を 1 µg / ml とした場合も前記と同様の結果が得られた (図は示さず) 。

次に、図 17 D に示す各種濃度のサルモネラ・ミネソタ Re - 595 由来の LPS の存在下で、野生型マウス、TLR2 ノックアウトマウス及び TLR4 ノックアウトマウスの各腹腔マクロファージを培養して TNF - の産生を測定した。この結果から、野生型マウス及び TLR2 ノックアウトマウスのマクロファージは、LPS の投与量に応じて同様な増加傾向を示すのに対し、TLR4 ノックアウトマウスのマクロファージは、いかなる濃度でも TNF - を産生しなかった。

実施例 9 (サルモネラ・ミネソタ Re - 595 の LPS に対する応答性)

サルモネラ・ミネソタ Re - 595 の LPS に対する各種マウス (野生型、TLR2 - / - 、TLR4 - / -) の脾臓細胞の応答性について調べた。それぞれのマウスの脾臓細胞 (1×10^5) を単離し、図 18 A に示す各種濃度の LPS により 96 ウェルプレート内で培養して刺激した。培養から 40 時間後に 1 µCi の [³ H] - チミジン (デュポント社製) を添加して更に 8 時間培養し、[³ H] の摂取量をシンチレーションカウンター (パッカー社製) で測定した (図 18 A) 。この結果から、野生型マウス及び TLR2 ノックアウトマウスの脾臓細胞では、LPS の投与量に依存して同様に細胞増殖反応を促進していたが、

T L R 4 欠損マウスの脾臓細胞では、いかなる濃度の L P S 刺激においても L P S による細胞増殖反応は見られなかった。

また、フローサイトメトリーにより、R e - 5 9 5 の L P S に対する応答における B 細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体 (M H C) クラス I I (I - A ^b) の発現について調べてみた。野生型マウス、T L R 2 ノックアウトマウス (2 - / -)、T L R 4 ノックアウトマウス (4 - / -) のそれぞれの脾臓 B 細胞 (1×10^5) を単離し、種々の濃度 (0、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 又は 10^5 n g / m l) の L P S 又は 1 0 0 U / m l の I L - 4 を用いて、9 6 ウェルプレート内で 4 8 時間培養した。培養後細胞を採取して、フィコエリトリン (p h y c o e r y t h r i n : P E ; ファーミンジェン社製) で標識した抗 B 2 2 0 抗体、又はビオチン化抗マウス I - A ^b 抗体 (ファーミンジェン社製) に、フルオレセインイソシアネート (F I T C ; ファーミンジェン社製) で標識したストレプトアビジンを結合させた F I T C 標識化抗体により、それらの細胞表面における I - A ^b 分子に結合させて細胞を染色した。染色した細胞をセルクエストソフトウェア (ベクトンディッキンソン社製) により蛍光活性化セルソーターキャリバー (F A C S C a l i b u r) で分析した (図 1 8 B)。この結果から、R e - 5 9 5 の L P S は、野生型マウス及び T L R 2 ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞表面での I - A ^b 分子の発現を増大しているのに対し、T L R 4 欠損マウスの脾臓 B 細胞では、高濃度の L P S (10^5 n g / m l) で刺激しても、I - A ^b 分子の発現は増大しなかった。以上のことから、T L R 2 ノックアウトマウスは、野生型マウス同様 L P S に対して応答性を示すことがわかった。また、I L - 4 で刺激した場合には、脾臓 B 細胞表面での I - A ^b 分子の発現はどのノックアウトマウスにおいても正常であった。

実施例 1 0 (T L R 2 ノックアウトマウスのマクロファージのグラム陽性菌由来の細胞壁成分不応答性)

上記野生型マウス (野生型)、T L R 2 ノックアウトマウス (T L R 2 - / -)、T L R 4 ノックアウトマウス (T L R 4 - / -) 等のそれぞれの腹膜マクロファージのグラム陽性菌由来の細胞壁成分に対する応答性を、スタフィロコッカス・アウレウス (S . a u r e u s)、コリネバクテリウム・ジフテリア (C .

diphtheriae) 及びノカルジア・コエリアカ (N. coeliaca) の細胞壁調製物を用いて調べた。細胞調製物は、文献 (Biken J. 18, 77-92, 1975、Infect. Immun. 38, 817-824、1982) 記載の方法と同様に、適切な培養条件下で培養した細胞菌体を、ブラウン・メカニカル・セル・ホモジナイザー (MSKモデル; B. Braun Apparatebau社製) 又はDyno-Mill (タイプKDL; Willy A, Biochofen Manufacturing Engineers社製) のいずれかで破壊した。破壊した細胞懸濁液の分画遠心法により得た粗細胞壁画分をプロテアーゼで処理し、細胞壁に元々存在していない成分を除去することにより精製調製した。

それぞれのマウスの腹膜マクロファージを、種々の濃度 (0、0.1、1、10又は100 µg/ml) の上記調製物の存在下で24時間培養して刺激し、それぞれのマクロファージから放出される腫瘍壊死因子 (TNF-) の濃度をELISAにより測定した (図19)。これらの結果から、TLR2ノックアウトマウスのマクロファージは、野生型マウス及びTLR4ノックアウトマウスのものより、グラム陽性菌由来の細胞壁成分に対する応答におけるTNF- の産生が損なわれることがわかった。

実施例11 (TLR2ノックアウトマウスのグラム陽性菌の細胞壁成分に対する応答性)

次に、グラム陽性菌のどの細胞壁成分がTLR2を介してマクロファージを活性化するのかを調べてみた。従来、グラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカン (PGN) 及びリポテイコ酸 (LTA) が単球/マクロファージを活性化するとの報告がある (Infect. Immun. 60, 3664-3672, 1992、Immunity 1, 509-516, 1994、J. Biol. Chem. 271, 23310-23316, 1996、Infect. Immun. 64, 1906-1912, 1996) ことから、10 µg/mlのスタフィロコッカス・アウレウスのPGN (Fluka社製; 図20A) 又は10 µg/mlのスタフィロコッカス・アウレウスのLTA (シグマ社製; 図20C) を用いて、実施例8と同様の方法により、各種マウスの腹膜マクロファージに対

する応答での I L - 6 及び N O₂ の産生量を測定した。また、実施例 10 と同様に、各種マウスの腹膜マクロファージの P G N (図 20 B) 又は L T A (図 20 D) に対する応答での T N F - の産生を測定した。

図 20 A の結果から、野生型マウス及び T L R 4 ノックアウトマウスの腹膜マクロファージでは、P G N に対する応答により I L - 6 を産生するのに対し、T L R 2 ノックアウトマウスのものでは産生しないことがわかった。また、野生型マウス及び T L R 4 ノックアウトマウスの腹膜マクロファージを I F N - の存在下で P G N といっしょに培養すると N O₂ を産生するのに対して、T L R 2 ノックアウトマウスのものでは産生しないことがわかった。一方、野生型マウス及び T L R 2 ノックアウトマウスの腹膜マクロファージでは、L T A に対する応答により I L - 6 を産生するのに対し、T L R 4 ノックアウトマウスのものでは産生しないことがわかった (図 20 C) 。また、野生型マウス及び T L R 2 ノックアウトマウスの腹膜マクロファージを I F N - の存在下で L T A といっしょに培養すると N O₂ を産生するのに対して、T L R 4 ノックアウトマウスのものでは産生しないことがわかった (図 20 C) 。

図 20 B に示されているように、T L R 4 ノックアウトマウスの腹膜マクロファージは、野生型マウスのものと同様に、P G N の投与量に応じて T N F - の産生を増加させるのに対して、T L R 2 ノックアウトマウスのものでは、T N F - 産生が実質的に損なわれており、P G N 不応答性であることがわかった。一方、図 20 D に示されているように、T L R 2 ノックアウトマウスの腹膜マクロファージは野生型マウスのものと同様に、L T A の投与量に応じて T N F - の産生を誘導するのに対し、T L R 4 ノックアウトマウスのものでは、T N F - 産生がなく、L T A 不応答性であることがわかった。以上のことから、グラム陽性菌の細胞壁成分である P G N が T L R 2 を介してマクロファージを活性化することや、L T A が T L R 4 を介してマクロファージを活性化することがわかった。実施例 12 (L P S 又は P G N 刺激によるインビトロでのキナーゼアッセイ及びウェスタンブロット)

T L R ファミリーメンバーは、アダプタータンパク質 M y D 8 8 を介してセリン/トレオニンキナーゼである I R A K を活性化し、次いで r e l 型転写因子で

あるNF- κ Bを活性化する、細胞内シグナル伝達分子として知られている (Mol . Cell 2 , 253 - 258 , 1998、J . Exp . Med . 187 , 2097 - 2101 , 1998、Immunity 11 , 115 - 122 , 1999)。LPS及びPGNが、かかる細胞内シグナル伝達分子を活性化するかどうかを次のようにして調べた。各種マウスの腹腔マクロファージ (1×10^6) を、1 ng / ml のサルモネラ・ミネソタ Re - 595 のLPS又は10 μ g / ml のスタフィロコッカス・アウレウスのPGNで図21に示された時間刺激し、これらの細胞菌体を、溶解緩衝液 (最終濃度で1.0%のトリトンX-100、137 mMのNaCl、20 mMのトリス-HCl、5 mMのEDTA、10%のグリセロール、1 mMのPMSF、20 μ g / ml のアプロチニン、20 μ g / ml のロイペプチン、1 mMのNa₃VO₄ 及び10 mMの β -グリセロリン酸を含有する緩衝液 : pH 8.0) 中にて溶解し、抗IRAK抗体 (林原生化学研究所株式会社) で免疫沈降して、文献 (Biochem . Biophys . Res . Commun . 234 , 183 - 196 , 1998、Immunity 11 , 115 - 122 , 1999) 記載のように、インビトロキナーゼアッセイを行い、IRAKの自己リン酸化を測定した (図21A , BにおけるAuto)。

また、上記溶解物を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離させ、ニトロセルロース膜に移し、この膜を抗IRAK抗体 (Transduction Laboratories社製) でプロットして、エンハンスド・ケミルミネッセンス装置 (デュポン社製) を使用して視覚化した (図21A , BにおけるWB)。以上の結果から、LPSに対する応答でのIRAK活性化は、野生型マウス (野生型) 及びTLR2ノックアウトマウス (TLR2 - / -) において観察できたが、TLR4ノックアウトマウス (TLR4 - / -) では観察できなかった。一方、PGNに対する応答でのIRAK活性化は、野生型マウス及びTLR4ノックアウトマウスのみにおいて確認することができた。これらのことから、LPSはTLR4を、PGNはTLR2をそれぞれ介し認識されることがわかった。

さらに、LPS又はPGNに対する応答によるNF- κ Bの活性化についても調

べてみた。上記 L P S 又は P G N で刺激した各種マウスのマクロファージから核抽出物を精製し、N F - B の D N A 結合部位に対する特異的プローブといっしよにインキュベートし、文献 (I m m u n i t y 9 , 1 4 3 - 1 5 0 , 1 9 9 8) 記載の電気泳動移動度シフト分析により視覚化した。その結果を図 2 1 C , D に示す。なお、図中の矢印は N F - B と特異的プローブとの複合物の位置を示し、矢頭は特異的プローブのみの位置を示している。これらの結果から、L P S に対する応答による N F - B の D N A 結合活性を、野生型マウス及び T L R 2 ノックアウトマウスのマクロファージの核抽出物において検出できたが、T L R 4 ノックアウトマウスのものではかかる活性を検出できなかった。一方、P G N に対する応答による N F - B 活性化は、野生型マウスと T L R 4 ノックアウトマウスのマクロファージで確認できたが、T L R 2 ノックアウトマウスのものでは確認できなかった。これらのことから、T L R 4 は L P S 誘導 N F - B 活性化に、T L R 2 は P G N 誘導 N F - B 活性化に不可欠であることがわかった。

実施例 1 3 (R - M A L P - 2 と S - M A L P - 2 の立体特異的リポペプチド合成及び H P L C 精製)

出発原料として、各々 9 9 % 以上の純粋なエナンチオマーを含有する (S) - (-) - グリシドール及び (R) - (+) - グリシドール (シグマ - アルドリッチ社製) の 2 つの試薬を用いて文献 (I n t . J . P e p t i d e P r o t e i n . R e s . 3 8 5 4 5 , 1 9 9 1) 記載の方法により、S - (2 , 3 - ジハイドロオキシプロピル) - L - システインの立体異性体を合成した。これら立体異性体から N - フルオレニルメトキシカルボニル基で保護された S - [2 (S) , 3 - ビス (パルミトイルオキシ) プロピル] - L - システインと S - [2 (R) , 3 - ビス (パルミトイルオキシ) プロピル] - L - システインとの異性体をそれぞれ合成し、上記文献記載の方法でカップリングし、担体に結合したフルオレニルメトキシカルボニル基で保護されたペプチドを得た。1 0 m g の粗精製 M A L P - 2 を、S P 2 5 0 / 1 0 N u c l e o s i l 3 0 0 - 7 C 8 c o l u m n (M a c h e r e y & N a g e l 社製) を用いて逆相 H P L C によりバッチ処理してさらに精製し、0 . 1 % のトリフルオロ酢酸を含んだ水 /

2 - プロパノールの直線的グラジエントにより 40 で溶出し、活性溶出画分を NO 解離分析によりモニターし、最終生成物は質量分析、及び、正確なペプチド含量を決定するためのアミノ酸分析により特徴づけられた。これら M A L P - 2 を水 / 2 - プロパノール 1 : 1 (容積比) の溶液を用い 1 m g / m l の濃度に調整し、4 で保存した。

実施例 14 (C H 3 / H e J マウスの腹腔マクロファージのリポタンパク / リポペプチドに対する応答性)

C H 3 / H e J 由来のエンドトキシン低応答性マウスから P E C (腹腔滲出細胞) を単離し、これら P E C (6×10^5) を 5 % の F C S と 25 μ M の 2 - メルカプトエタノールを含んだダルベッコ M E M 培地 (D M E M) 1 . 25 m l の入った 24 穴細胞培養プレート中で 37 にて一晩培養した。この培養物から非附着細胞を取り除き、新しい培養液に交換して腹膜マクロファージを調製した。各種濃度 (0 . 1、1、10、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 又は 10^6 p g / m l) の実施例 8 の方法により得られた R - M A L P - 2 又は S - M A L P - 2 と、濃度 30 u n i t / m l の組換えインターフェロン - (r I F N -) の共存下に、上記腹膜マクロファージを培養し、培養上清中の $N O_2^-$ 、T N F - 及び I L - 6 の産生量を測定した (図 22)。T N F - は培養から 3 時間後に E L I S A (G e n z y m e 社製) によって、I L - 6 は培養から 21 時間後に E L I S A (E N D O G E N 社製) によって、 $N O_2^-$ は培養から 46 時間後に $N O_2^- / N O_3^-$ アッセイキット (同仁科学研究所社製) を使用した G r e i s s 法によってそれぞれ測定した。これらの結果から、S - M A L P - 2 より R - M A L P - 2 の方が、腹膜マクロファージに対してより高い特異活性を示すことがわかった。

実施例 15 (ヒト単球のリポタンパク / リポペプチドに対する応答性)

健康なヒトから得られた単球を洗浄後、実験に用いた。実施例 13 の方法により得られた R - M A L P - 2 又は S - M A L P - 2 の各種濃度 (0 . 1、1、10、 10^2 、 10^3 、 10^4 又は 10^5 p g / m l) 下、ヒト単球 (7.5×10^5) を 20 時間刺激した。刺激後、I L - 8、M C P - 1 及び T N F - の産生量を E L I S A により測定した (図 23)。この結果から、実施例 14 のマウ

ス由来のマクロファージの場合と同様に、S - M A L P - 2よりR - M A L P - 2の方がマクロファージ等に分化する前のヒト単球に対してより高い特異活性を示すことがわかった。

実施例 16 (T L R 2 ノックアウトマウスのリポタンパク / リポペプチド不応答性)

野生型マウス (野生型)、T L R 2 ノックアウトマウス (T L R 2 - / -)、T L R 4 ノックアウトマウス (T L R 4 - / -)、M y D 8 8 ノックアウトマウス (M y D 8 8 - / -) のそれぞれの腹膜マクロファージのリポタンパク / リポペプチドに対する応答性を、マイコプラズマ由来のM A L P - 2を用いて調べた。それぞれのマウスの腹膜マクロファージを実施例 14 と同様の方法により単離し、各腹膜マクロファージをr I N F (3 0 u n i t / m l) の存在下 (図 2 4 B 及び D) 又は非存在下 (図 2 4 A 及び C) において、実施例 13 より得られた各種濃度 (0、0 . 1、1、10、10²、10³ 又は10⁴ p g / m l) のR - M A L P - 2又はS - M A L P - 2といっしょに24時間培養した。培養後、培養上清中のT N F - α 及びN O₂⁻ の産生量を測定した (図 2 4)。

上記の結果から、野生型マウス及びT L R 4 欠損マウスの腹膜マクロファージは、R - M A L P - 2の投与量に応じてT N F - α やN O₂⁻ の産生を増加しているのに対して、T L R 2 欠損マウス及びM y D 8 8 欠損マウスの腹腔マクロファージではT N F - α もN O₂⁻ も産生していなかった (図 2 4 A 及び B)。また、S - M A L P - 2においても同様の結果が得られた (図 2 4 C 及び D)。その他、R - M A L P - 2又はS - M A L P - 2刺激によるI L - 6産生も、T L R 2 欠損マウス及びM y D 8 8 欠損マウスの腹腔マクロファージでは不応答性であることが確認された (図示せず)。以上のことから、R - M A L P - 2等のマイコプラズマ由来のリポタンパク / リポペプチドがT L R 2 及びM y D 8 8 を介してマクロファージを活性化することがわかった。

実施例 17 (リポタンパク / リポペプチド刺激によるインビトロでのキナーゼアッセイ及びウェスタンブロット)

実施例 16 の結果から、リポタンパク / リポペプチドが細胞内シグナル伝達分子を活性化するかどうかを調べるために、上記4種のマウスの腹腔マクロファ-

ジ (1×10^6) を、 0.3 ng/ml の R - M A L P - 2 で 10 分間刺激し、実施例 12 と同様に抗 I R A K 抗体を用いてインビトロキナーゼアッセイ (図 25 A の A u t o) 及びウエスタンブロット分析 (図 25 A の W B) や電気泳動移動度シフト分析 (図 25 B) を行った。また、抗 J N K 1 抗体を用いたインビトロキナーゼアッセイ (図 25 C の A u t o) 及びウエスタンブロット分析 (図 25 C の W B) を行った。これらの結果から、 T L R 2 ノックアウトマウス及び M y D 8 8 ノックアウトマウスのマクロファージにおいて、 M A L P に対する I R A K、 N F - κ B 及び J N K の活性化が確認できなかった。以上のことから、マイコプラズマ由来のリポタンパク/リポペプチドは、 T L R 2 及び M y D 8 8 シグナル伝達経路を介して生体反応を引き起こしていることが明かとなった。

産業上の利用可能性

本発明の細菌菌体成分不応答性モデル動物である、 M y D 8 8 ノックアウトマウスは、グラム陰性細菌由来のエンドトキシンや、グラム陽性菌由来のペプチドグリカン、リポテイコ酸、結核菌溶解物等のグラム陽性菌の細胞壁成分や、リポタンパク/リポペプチドなどに対して不応答性であり、また、 T L R 2 ノックアウトマウスは、グラム陽性菌等の細胞壁成分ペプチドグリカンや、リポタンパク/リポペプチド等に対して不応答性であり、グラム陽性菌細胞壁成分に対して低応答性であるため、これらのノックアウトマウスを用いることによって、グラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンや、リポタンパク/リポペプチド等の選択的成分のシグナル受容体に対して有用な情報や、細菌感染症に対する促進物質又は抑制物質、 T L R 2 に対するアゴニストやアンタゴニストなどの細菌菌体成分に対する応答性の促進物質又は抑制物質のスクリーニングや、被検物質のエンドトキシン活性、 I L - 1 活性、 I L - 1 8 活性を評価や、被検物質中の細菌菌体成分の検出が可能となり、ひいては、これらエンドトキシン等の細菌細胞壁成分、 I L - 1、 I L - 1 8 又はこれらのレセプターの過剰な産生等に起因する疾病に対する薬剤の開発に有用な情報や、マイコプラズマ属やスピロヘータ属等の細菌による感染成立の分子機構の解明及び感染症への新たな治療薬の開発に有用な情報を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

第 1 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスと野生型マウスの遺伝子地図を示す図である。

第 2 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスと野生型マウスに大腸菌由来の L P S を投与した場合の生存率を示す図である。

第 3 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスと野生型マウスにおける I L - 1 を介しての T 細胞増殖の結果を示す図である。

第 4 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスと野生型マウスにおける I L - 1 誘導による血中の T N F - と I L - 6 のレベル結果を示す図である。

第 5 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスと野生型マウスにおける I L - 1 8 を介しての N K 細胞の活性化の結果を示す図である。

第 6 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウスと野生型マウスにおける I L - 1 2 と I L - 1 8 の刺激による I F N - の産生の結果を示す図である。

第 7 図は、ドミナントネガティブ M y D 8 8 の突然変異が、I L - 1 8 誘導 N F - B 活性及び A P - 1 活性に関与していることを示す図である。

第 8 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウス、野生型マウス、T L R 4 ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓 B 細胞のサルモネラ・ミネソタ R e - 5 9 5 に対する応答性の結果を示す図である。

第 9 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウス、野生型マウス、T L R 4 ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓 B 細胞の I L - 4 やインターフェロン - に対する応答性の結果を示す図である。

第 1 0 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウス、野生型マウス、T L R 4 ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓 B 細胞のポルフィロモナス・ジンジバリスに対する応答性の結果を示す図である。

第 1 1 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウス、野生型マウス、T L R 4 ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓 B 細胞のエシェリキア・コリ O 5 5 : B 5 に対する応答性の結果を示す図である。

第 1 2 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウス、野生型マウス、T L R 4 ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓 B 細胞のペプチドグリカンに対する応答性の結果を示す図である。

第 1 3 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウス、野生型マウス、T L R 4 ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓 B 細胞のリポテイコ酸に対する応答性の結果を示す図である。

第 1 4 図は、本発明の M y D 8 8 ノックアウトマウス、野生型マウス、T L R 4 ノックアウトマウスのマクロファージ及び脾臓 B 細胞の結核菌全細胞溶解物に対する応答性の結果を示す図である。

第 1 5 図は、本発明の T L R 2 ノックアウトマウスと野生型マウスの遺伝子地図を示す図である。

第 1 6 図は、本発明の T L R 2 ノックアウトマウスと野生型マウスに大腸菌由来の L P S を投与した場合の生存率を示す図である。

第 1 7 図は、本発明の T L R 2 ノックアウトマウス、野生型マウス、T L R 4 ノックアウトマウスにおけるリピド A 又は L P S 誘導による I L - 6、T N F - α 又は N O ₂ の産生量を示す図である。

第 1 8 図は、本発明の T L R 2 ノックアウトマウス、野生型マウス、T L R 4 ノックアウトマウスの脾臓 B 細胞のサルモネラ・ミネソタ R e - 5 9 5 由来 L P S に対する応答性の結果を示す図である。

第 1 9 図は、本発明の T L R 2 ノックアウトマウス、野生型マウス、T L R 4 ノックアウトマウスの腹腔マクロファージのグラム陽性菌の細胞壁成分に対する応答性の結果を示す図である。

第 2 0 図は、本発明の T L R 2 ノックアウトマウス、野生型マウス、T L R 4 ノックアウトマウスにおける P G N 又は L T A 誘導による I L - 6、N O ₂ 又は T N F - α の産生量を示す図である。

第 2 1 図は、本発明の T L R 2 ノックアウトマウス、野生型マウス、T L R 4 ノックアウトマウスにおいて、L P S 又は P G N 刺激によるインビトロでのキナーゼアッセイ、ウエスタンブロット分析及び電気泳動移動度分析の結果を示す図である。

第 2 2 図は、C H 3 / H e J マウスの腹腔マクロファージのリポペプチド M A L P - 2 に対する応答性の結果を示す図である。

第 2 3 図は、ヒト単核細胞のリポペプチド M A L P - 2 に対する応答性の結果

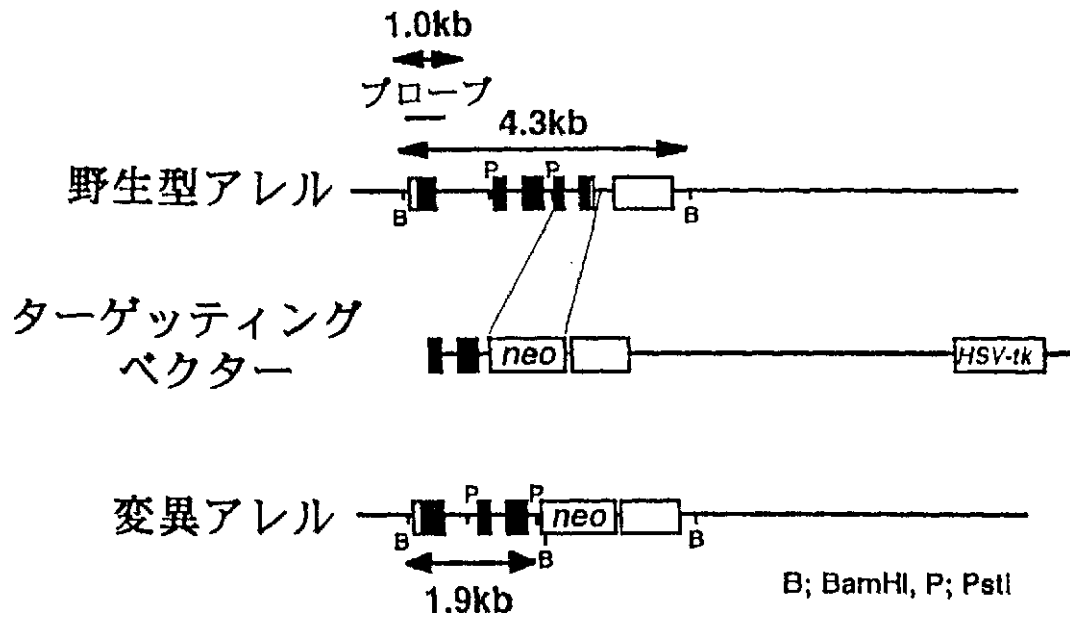
を示す図である。

第 2 4 図は、本発明の T L R 2 ノックアウトマウス、野生型マウス、T L R 4 ノックアウトマウス、M y D 8 8 ノックアウトマウスの腹腔マクロファージのリポペプチド M A L P - 2 に対する応答性の結果を示す図である。

第 2 5 図は、本発明の T L R 2 ノックアウトマウス、野生型マウス、T L R 4 ノックアウトマウス、M y D 8 8 ノックアウトマウスにおいて、リポペプチド M A L P - 2 刺激によるインビトロでのキナーゼアッセイ、ウエスタンブロット分析及び電気泳動移動度分析の結果を示す図である。

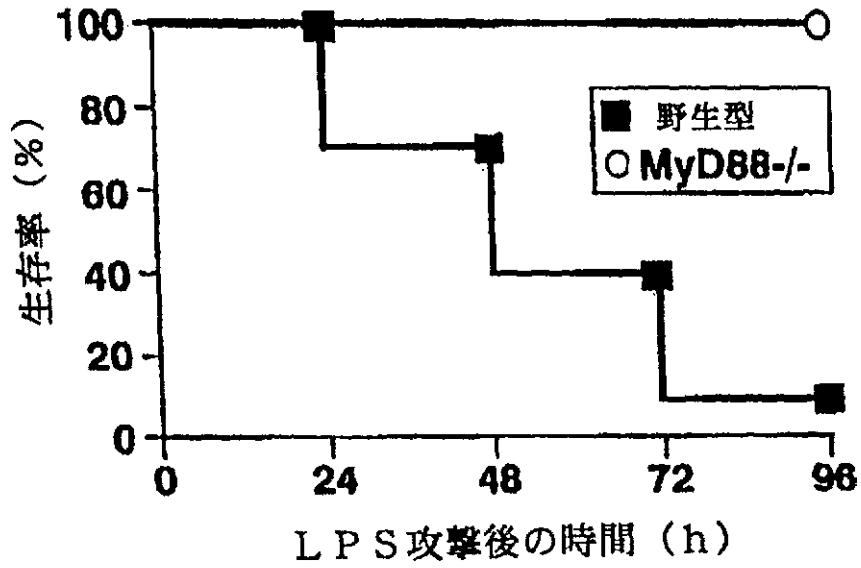
【 図 1 】

第 1 図



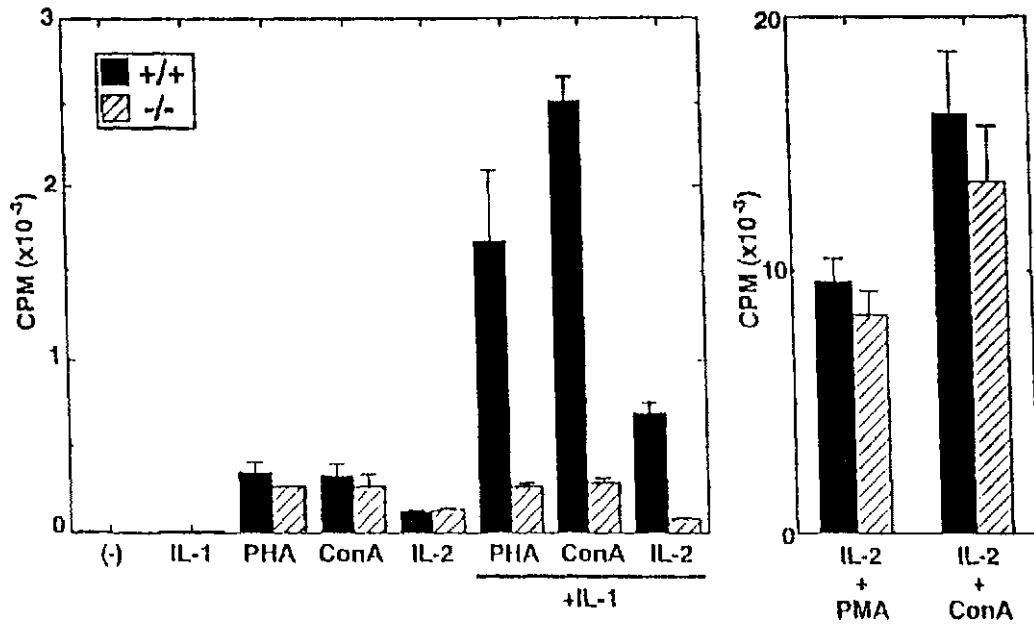
【 図 2 】

第 2 図



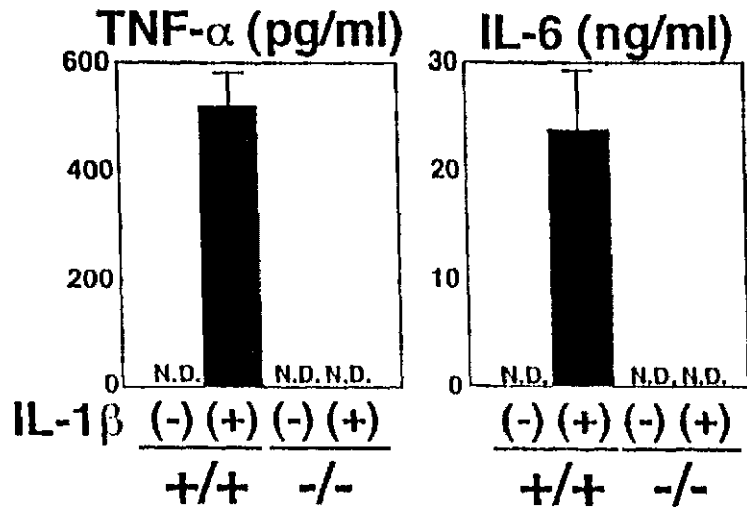
【 図 3 】

第 3 図



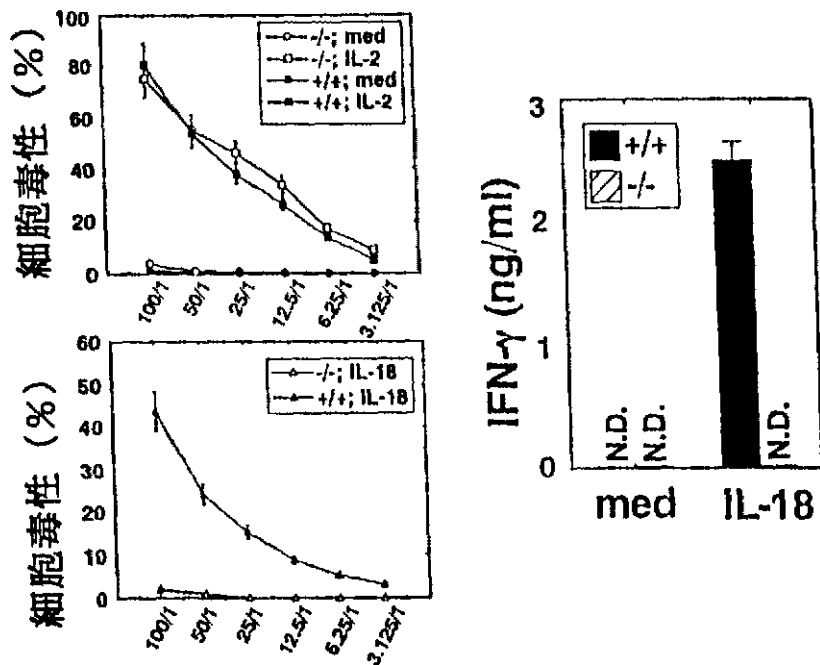
【 図 4 】

第 4 図



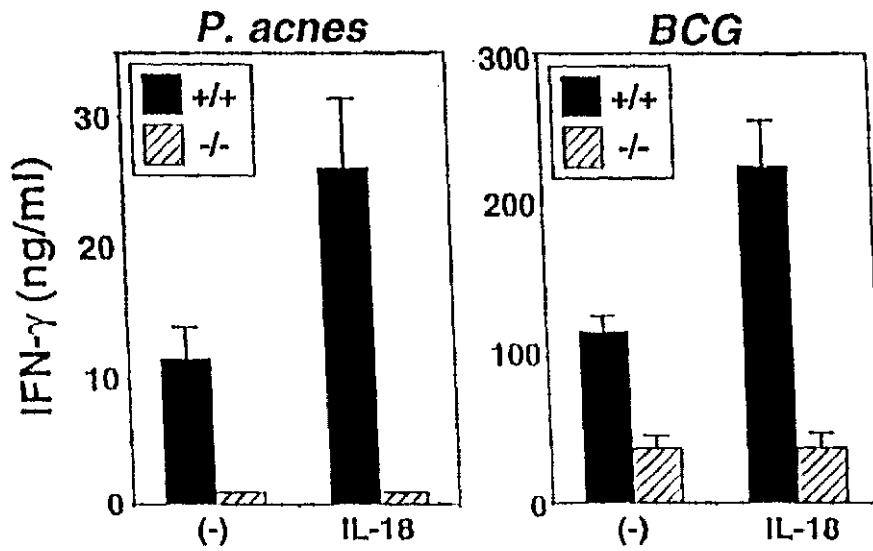
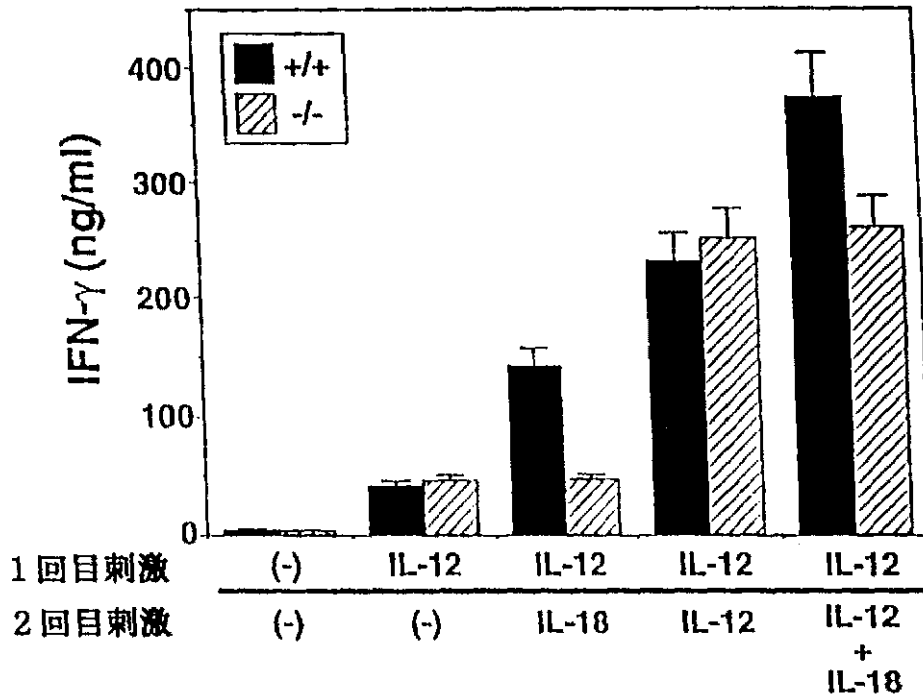
【 図 5 】

第 5 図



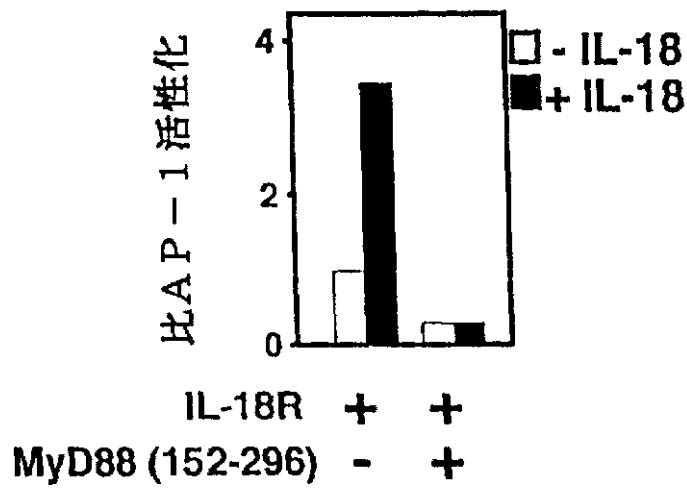
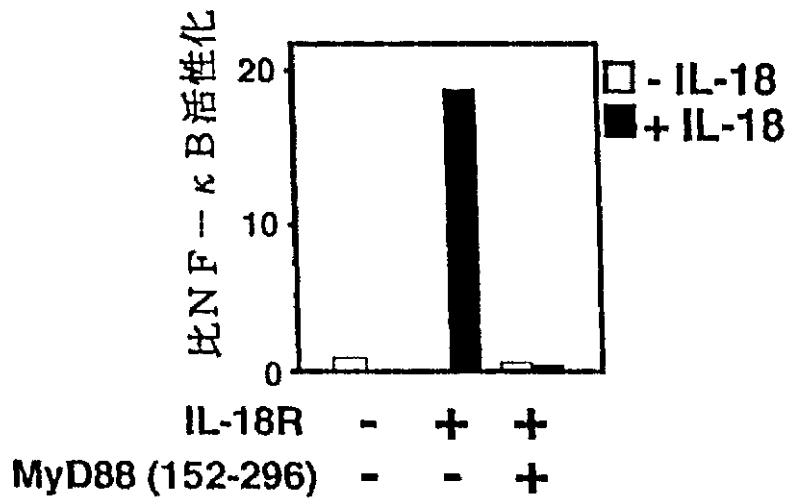
【 図 6 】

第 6 図



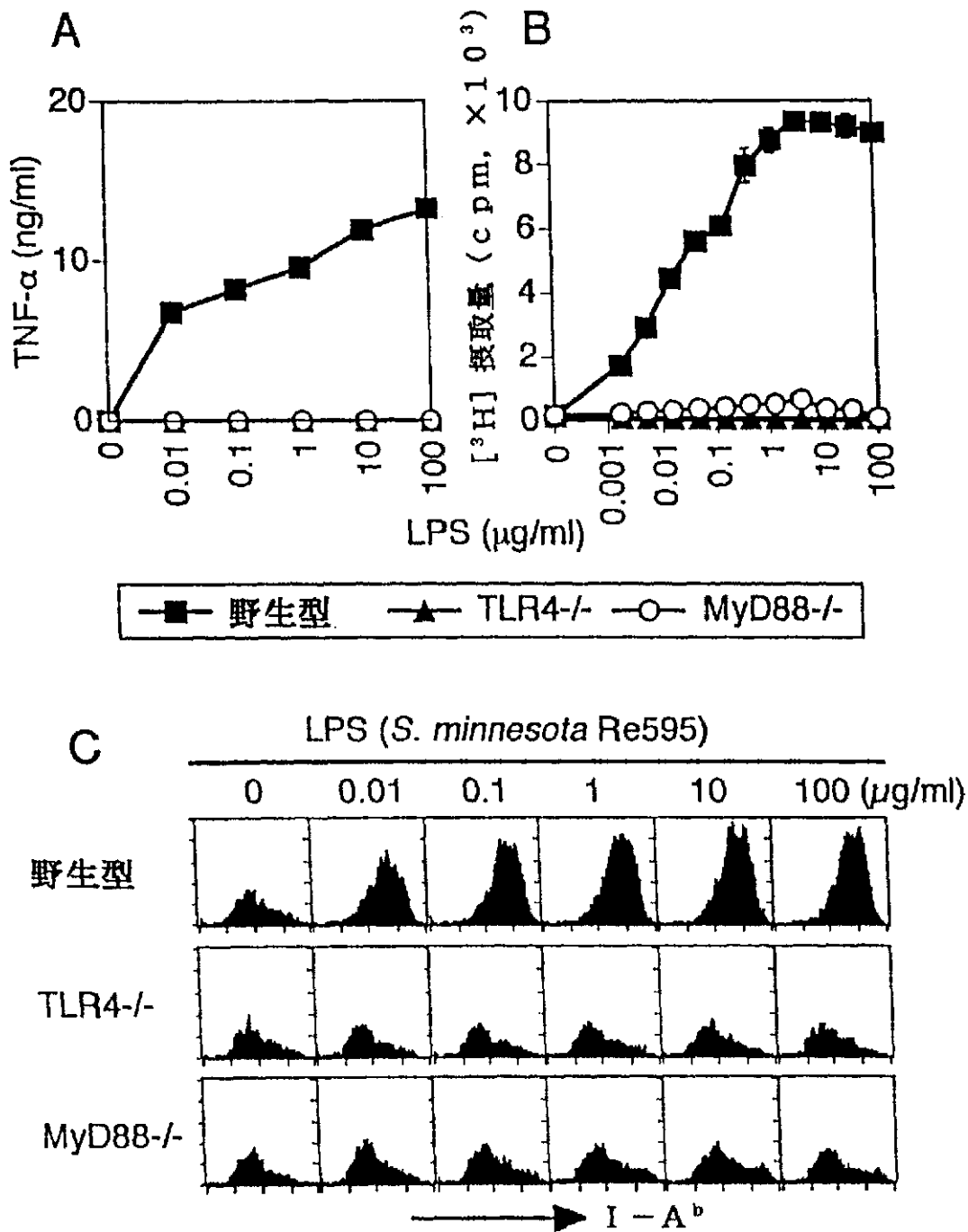
【 図 7 】

第 7 図



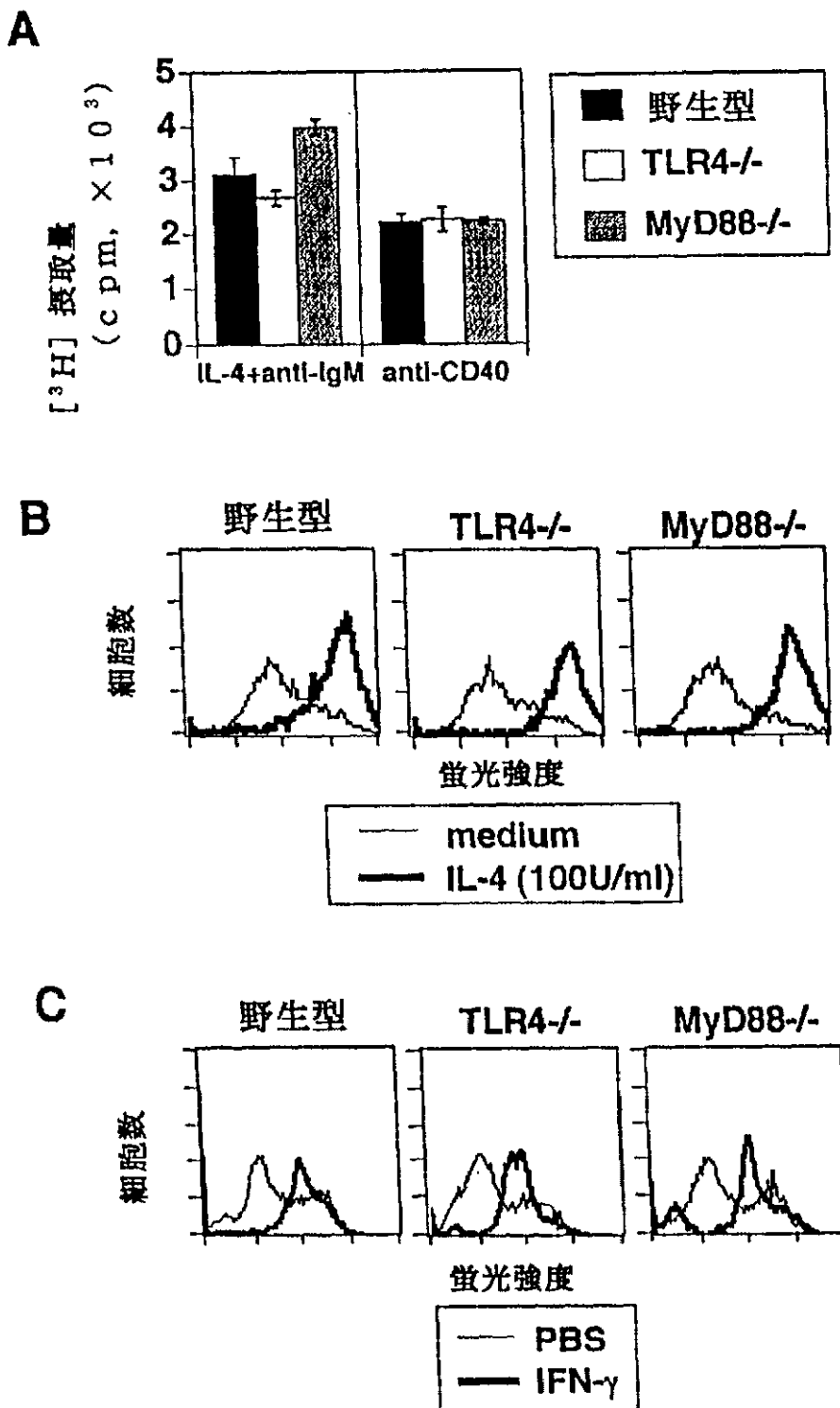
【 図 8 】

第 8 図



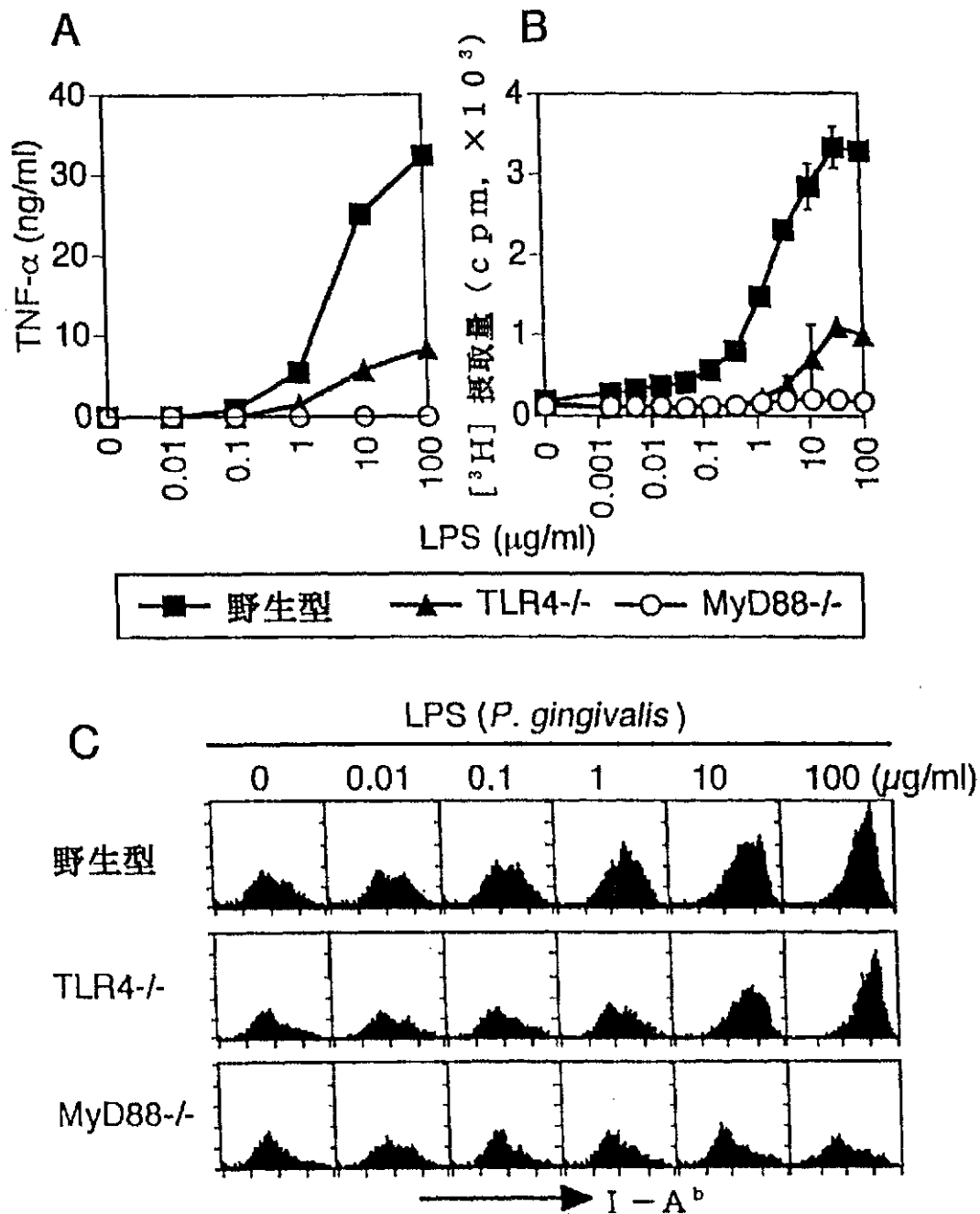
【 図 9 】

第 9 図



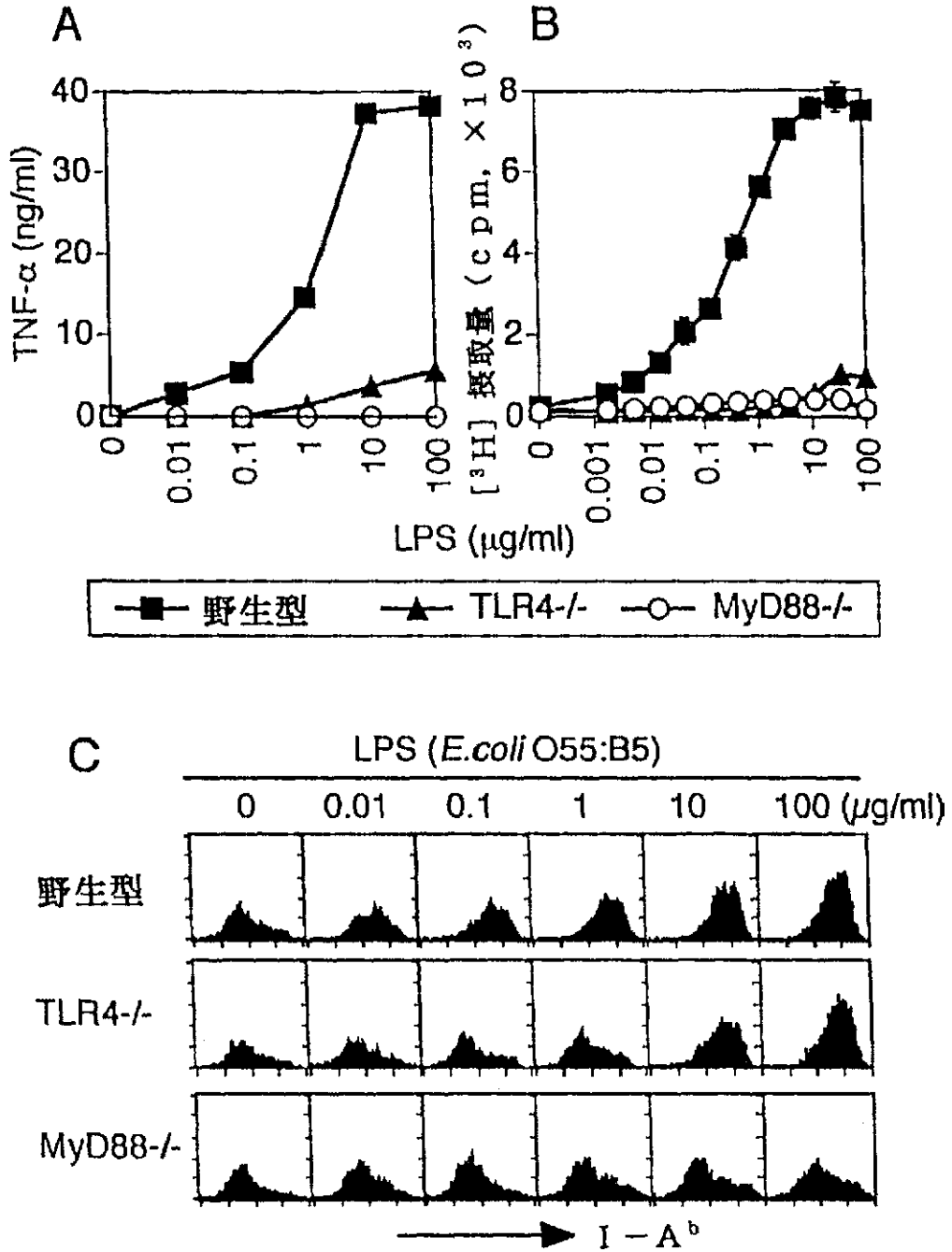
【 図 1 0 】

第 1 0 図



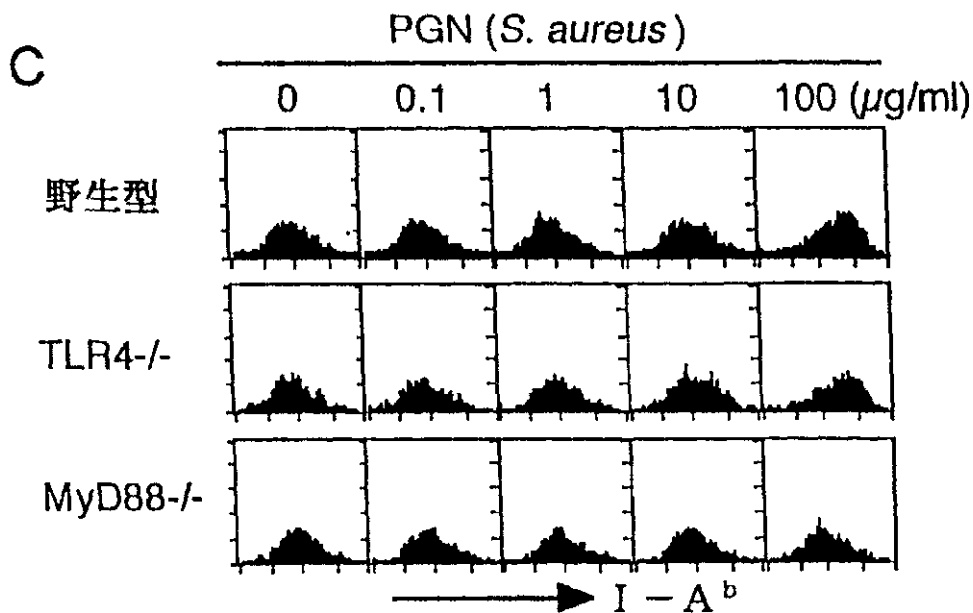
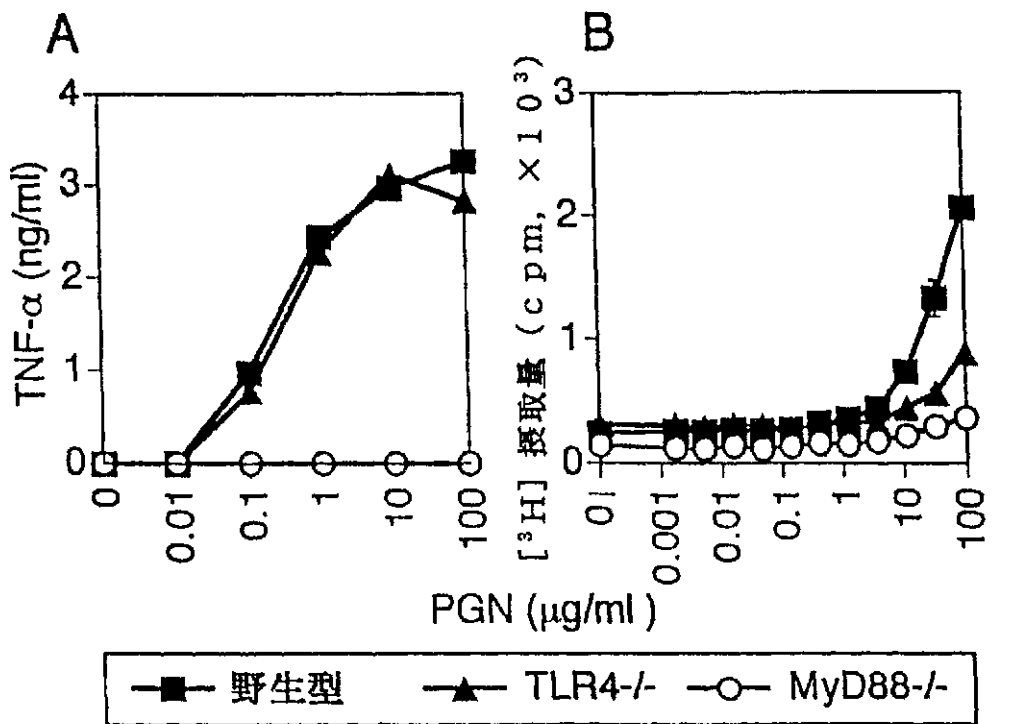
【 図 1 1 】

第 1 1 図



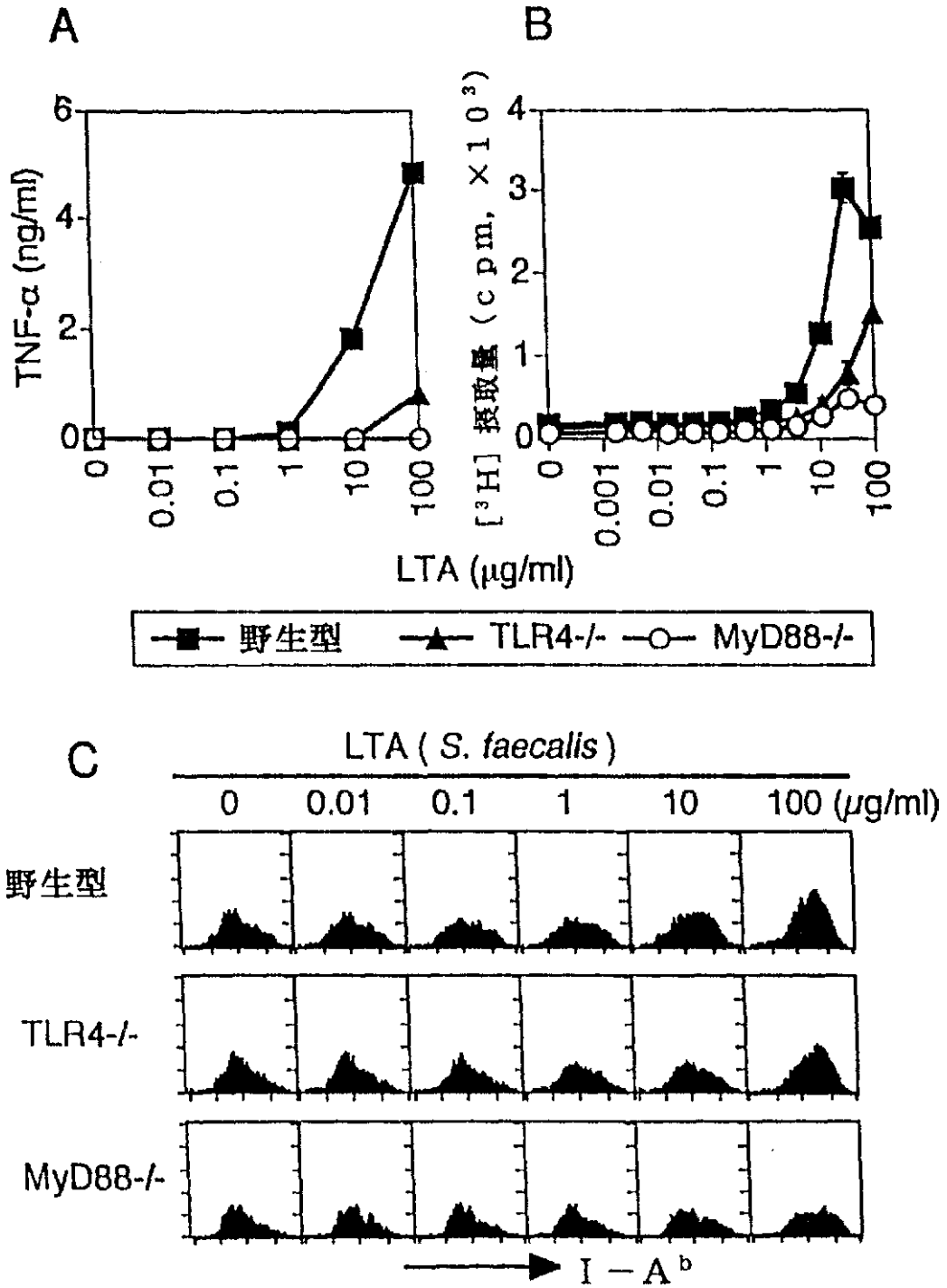
【 図 1 2 】

第 1 2 図



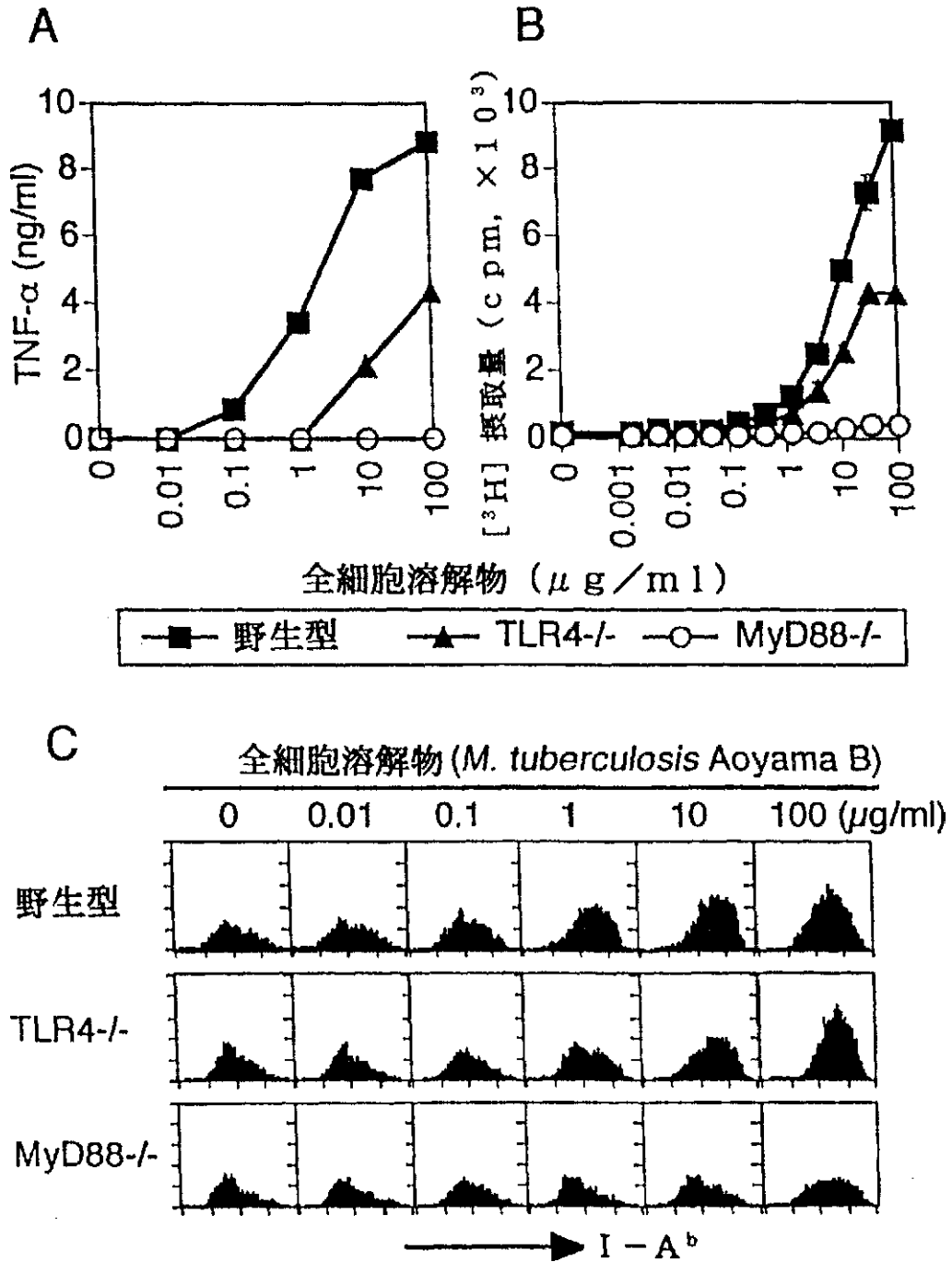
【 図 1 3 】

第 1 3 図



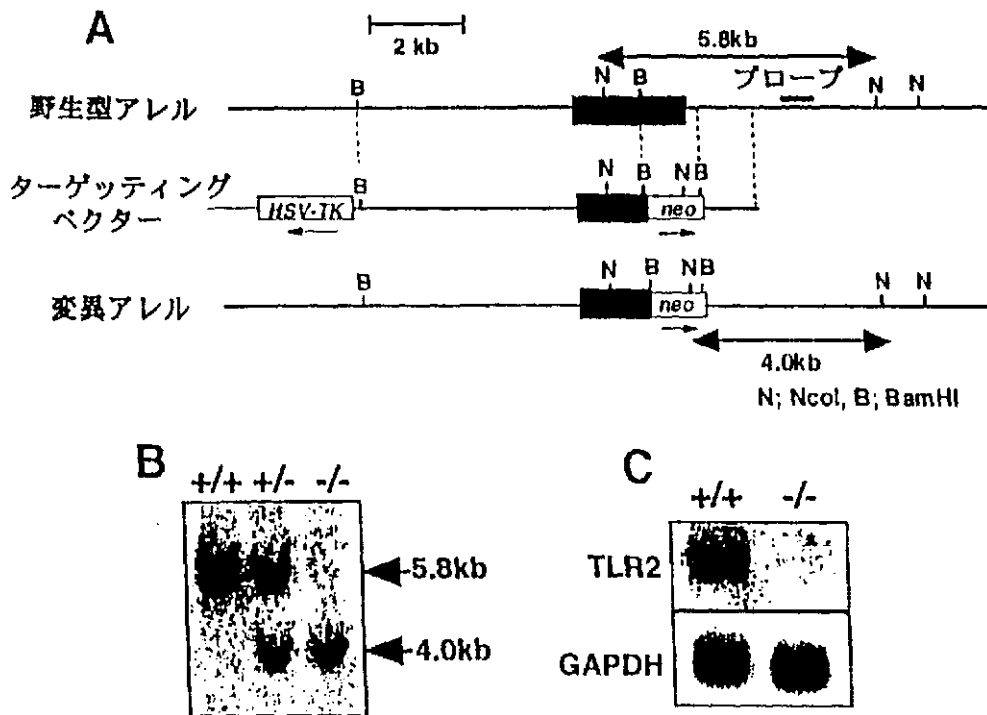
【 図 1 4 】

第 1 4 図



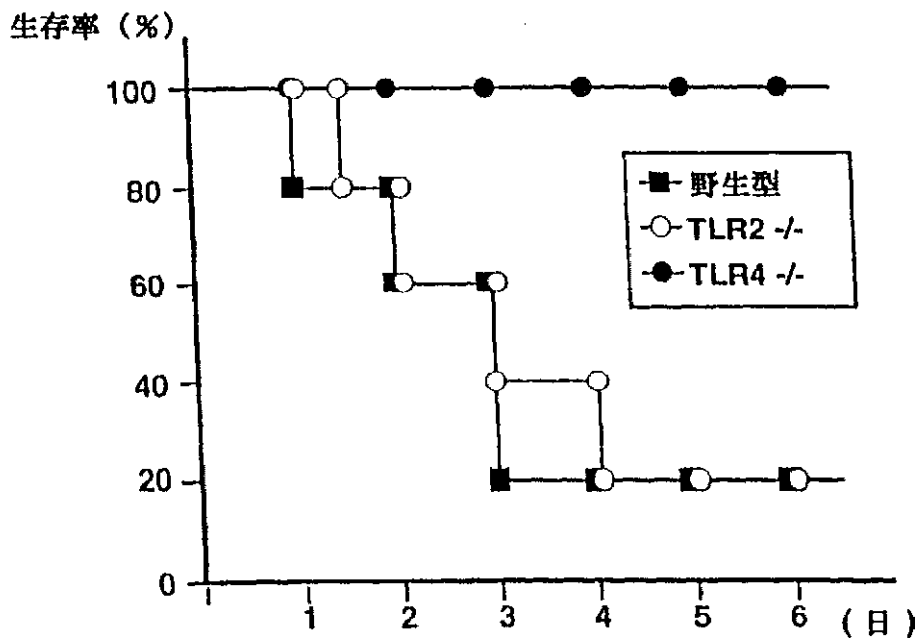
【 図 1 5 】

第 1 5 図



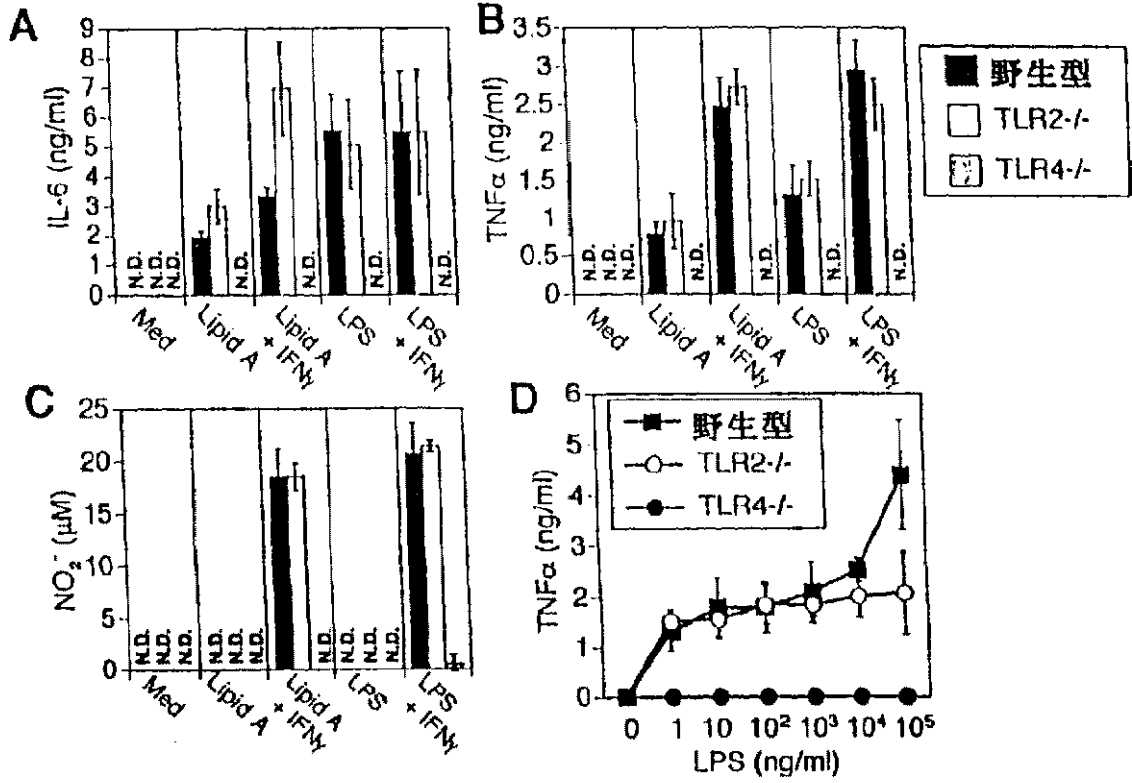
【 図 1 6 】

第 1 6 図



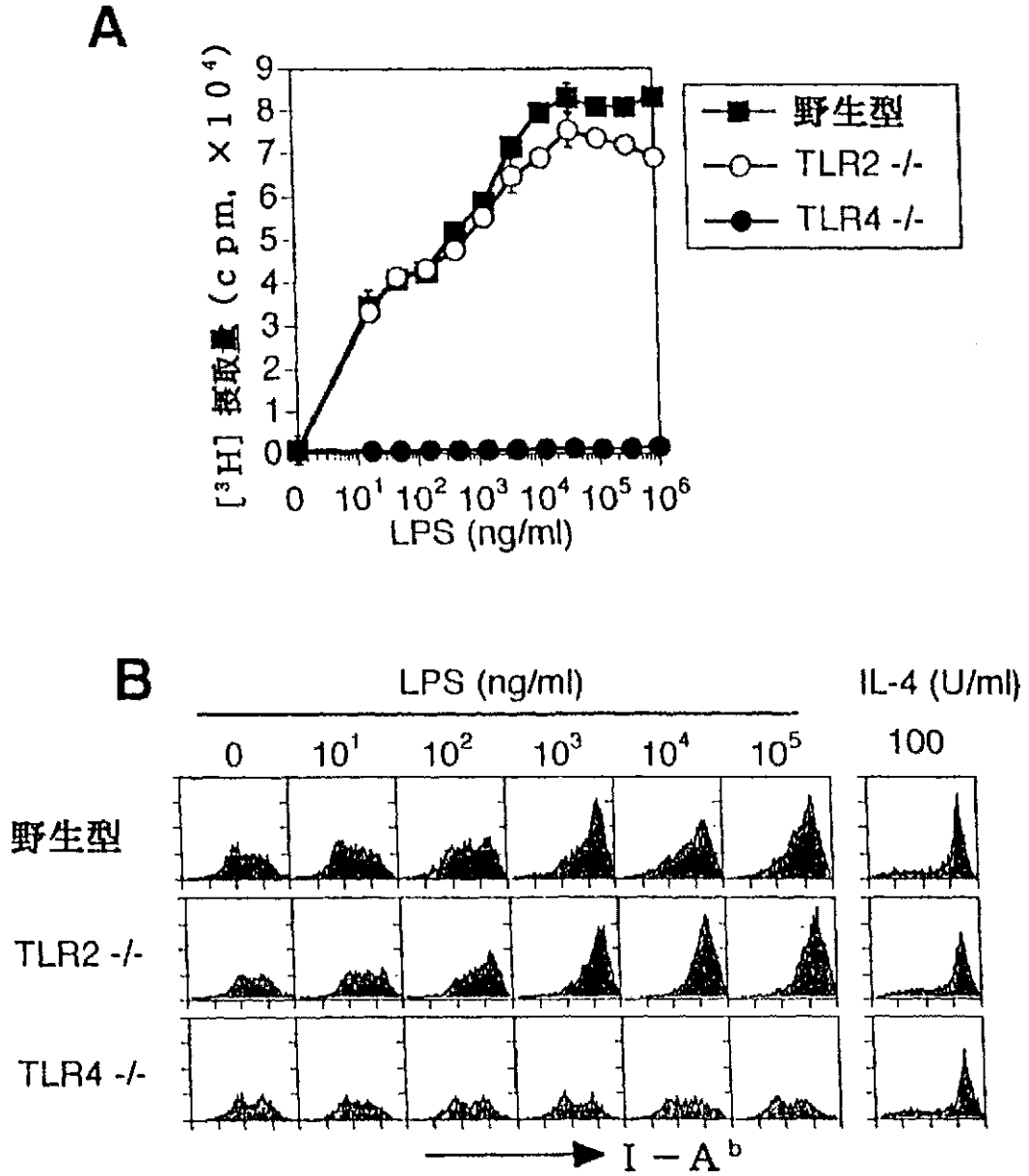
【 図 1 7 】

第 1 7 図



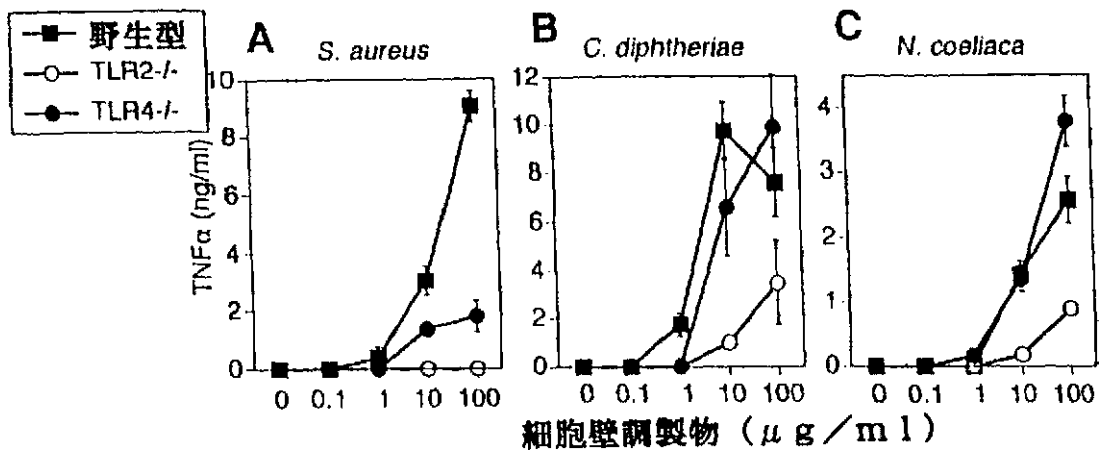
【 図 1 8 】

第 1 8 図



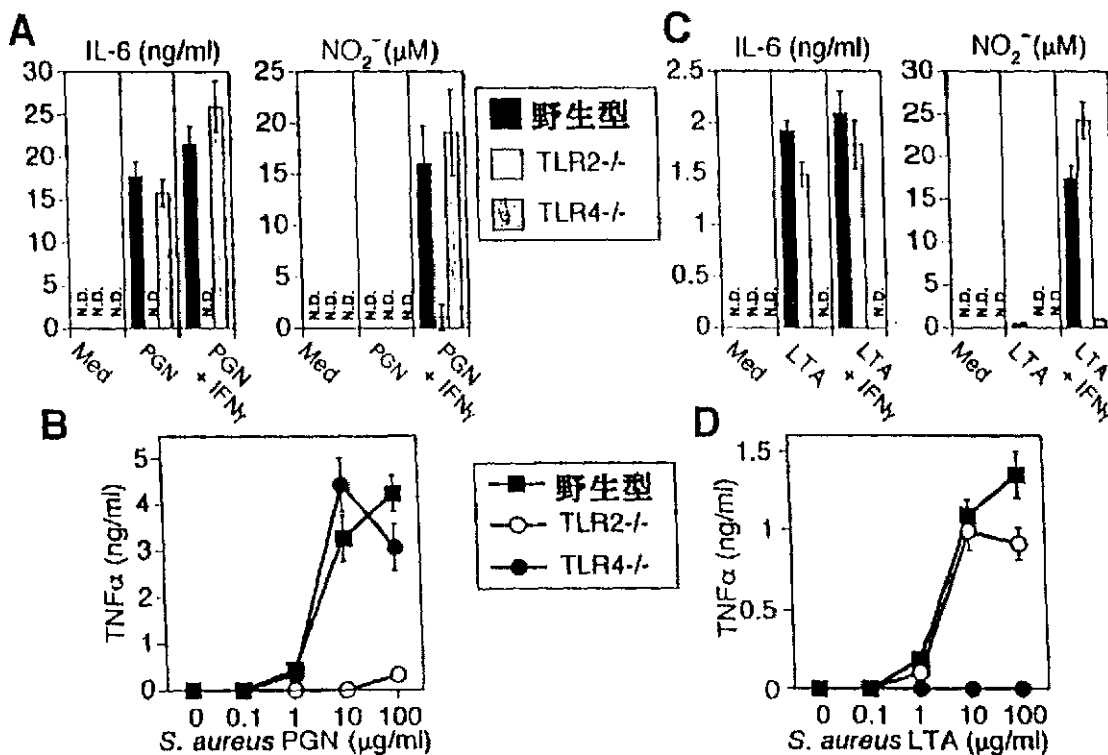
【 図 1 9 】

第 1 9 図



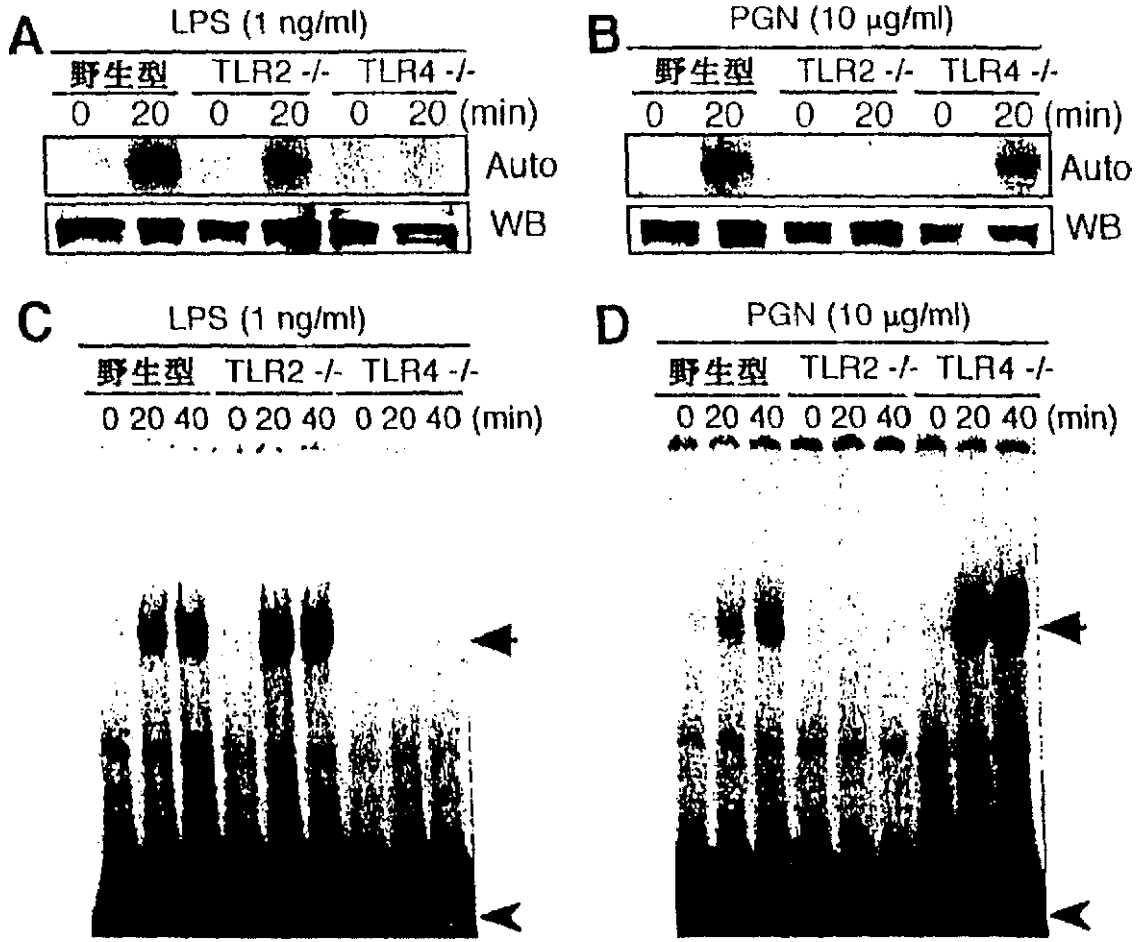
【 図 2 0 】

第 2 0 図



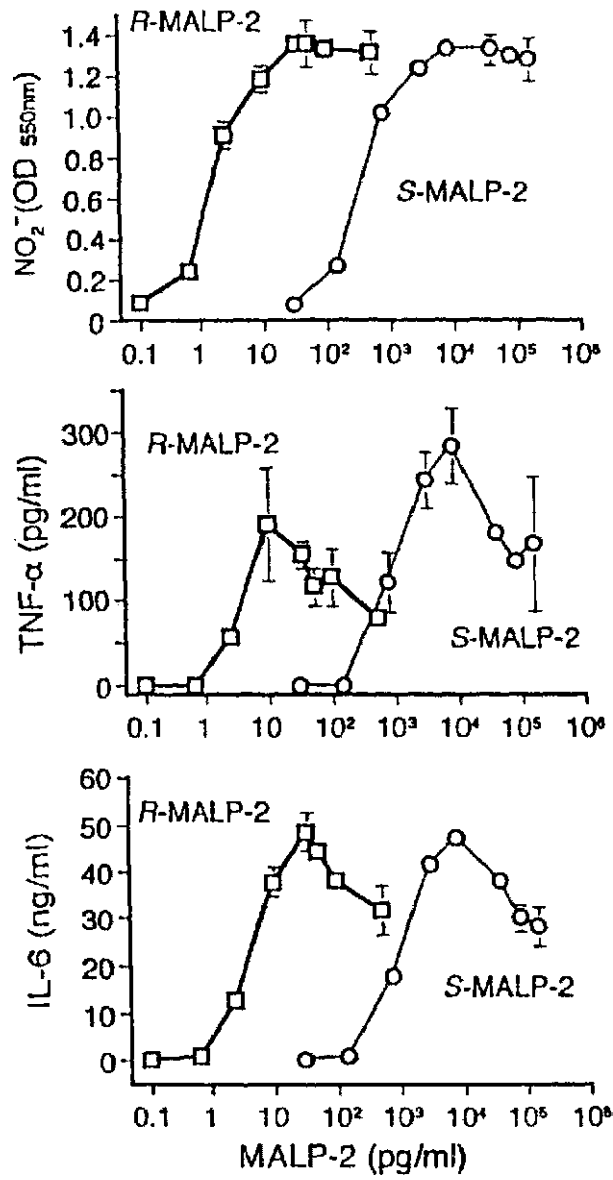
【 図 2 1 】

第 2 1 図



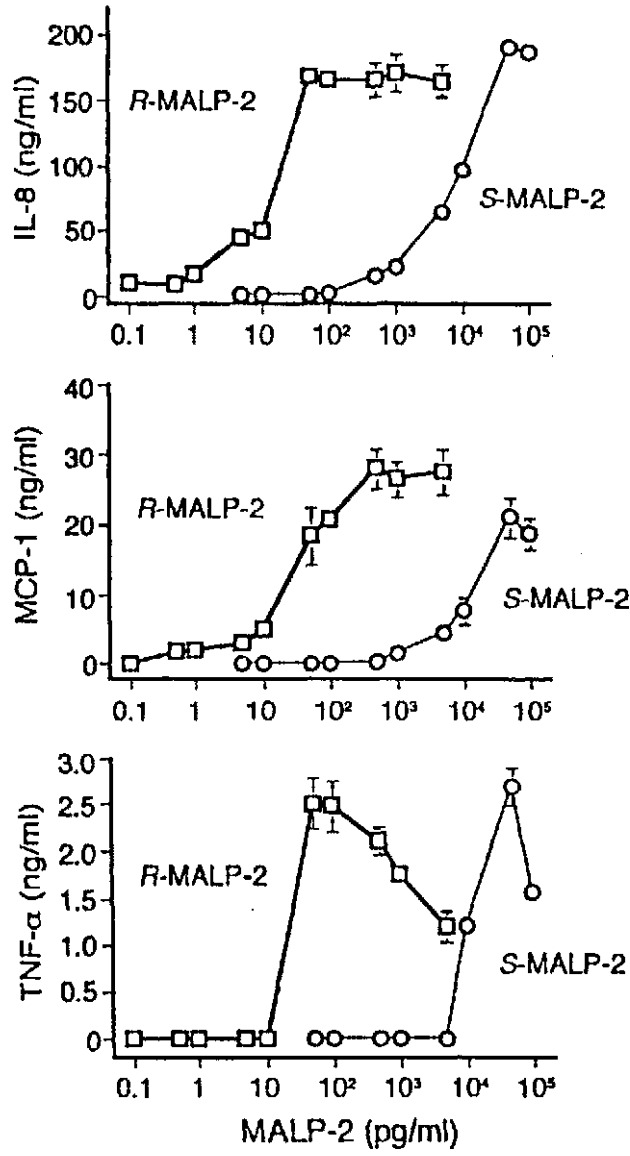
【 図 2 2 】

第 2 2 図



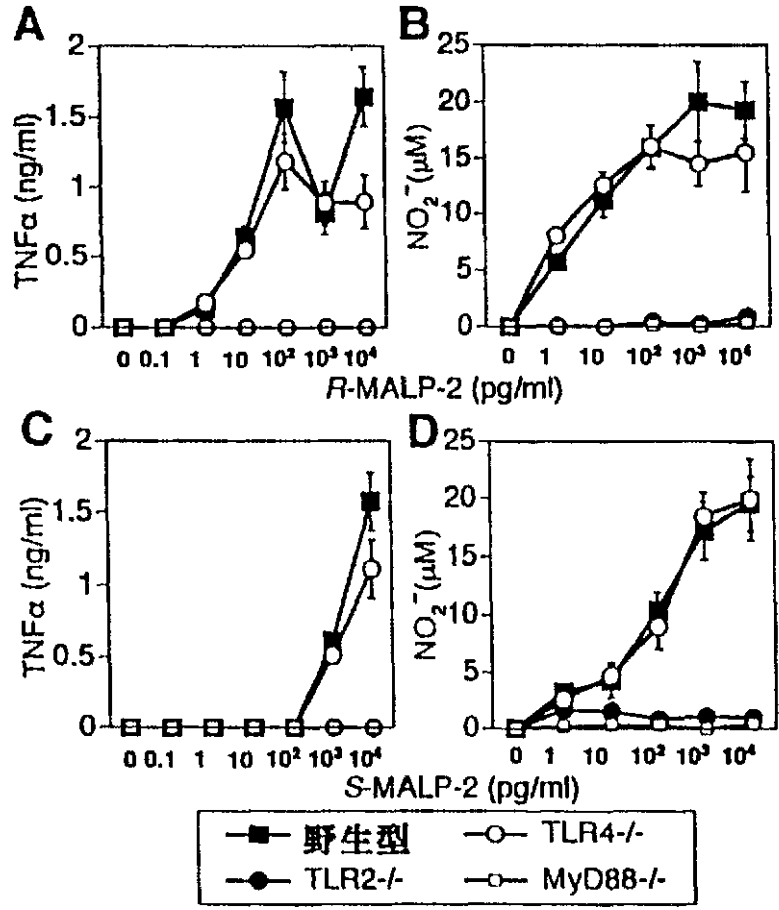
【 図 2 3 】

第 2 3 図



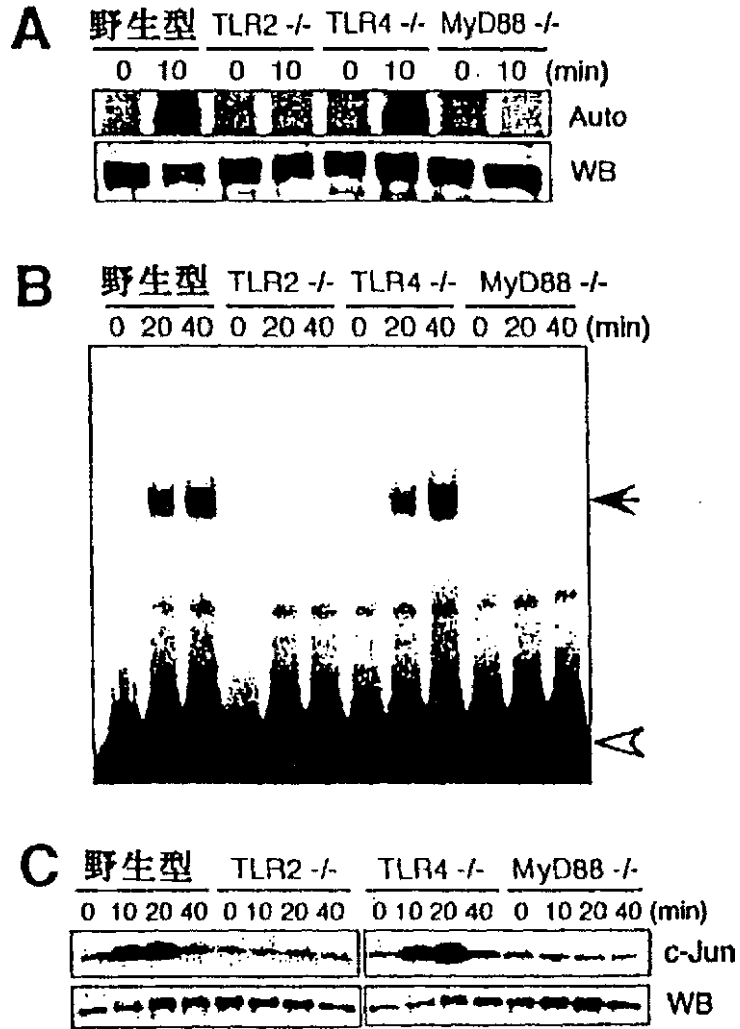
【 図 2 4 】

第 2 4 図



【 図 2 5 】

第 2 5 図



【 国 際 調 査 報 告 】

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JPO0/00132
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl. ⁷ A01K 67/027, G01N 33/50, G01N33/15, C12N 15/09		
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. ⁷ A01K 67/027, G01N 33/50, G01N33/15, C12N 15/09		
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)		
BIOSIS, MEDLINE, WPIDS		
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 請求の範囲の番号
X	Osamu A. et al., Immunity, vol.9, p.143-150 (1998)	1-7, 9-11, 35, 36, 51
Y		8, 12-34, 37-5 0
X	Akira S., 日本免疫学会・学術集会記録(1998)第28巻, 第3頁	1-7, 9-11, 35, 36, 51
Y		8, 12-34, 37-5 0
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 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		の日に後に公表された文献
「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		「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
「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)		「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「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
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		「&」同一パテントファミリー文献
国際調査を完了した日	10.04.00	国際調査報告の発送日
		18.04.00
国際調査機関の名称及び先	特許庁審査官 (権限のある職員)	2B 9123
日本国特許庁 (ISA/JP)	長井 啓子	
郵便番号100-8915		
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	電話番号 03-3581-1101	内線 3236

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1998年7月)

国際調査報告		国際出版番号 PCT/JPO0/00132
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 請求の範囲の番号
X	河合太郎ら, 日本免疫学会・学術集会記録(1998)第28巻, 第280頁	1-7, 9-11, 35, 36, 51
Y		8, 12-34, 37-5 0
X	河合太郎ら, 第21回日本分子生物学会年会・プログラム・講演要 旨集(1998), 第184頁	1-7, 9-11, 35, 36, 51
Y		8, 12-34, 37-5 0
PX	Takeuchi O. et al., Immunity, vol.11, p.443-451 (1999)	1-8, 12, 13, 2 6, 50
PY		9-11, 14-25, 2 7-49, 51
PX	Kawai T. et al., Immunity, vol.11, p.115-122 (1999)	1-7, 9-11, 35, 36, 51
PY		8, 12-34, 37-5 0
X	Hardiman G. et al., Genomics, vol.45, p.332-339 (1997)	9, 51
X	Yang R-B. et al., Nature, vol.395, p.284-288 (1998)	8, 50
X	Kirsching C.J. et al., J.Exp.Med., vol.188, p.2091-2097 (1998)	8, 50
A	Gerard C. et al., Nature, vol.395, p.217-219 (1998)	1-51
Y	Michalek S.M. et al., Journal of Infectious Diseases, vol.141, p.55-63 (1989)	4, 5
Y	Harbour D.V. et al., Brain, Behavior, and Immunity, vol.1, p.123-133 (1987)	4, 5

フロントページの続き

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,
D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I
T , L U , M C , N L , P T , S E) , A U , C A , J
P , U S

(注) この公表は、国際事務局 (W I P O) により国際公開された公報を基に作成したものである。

なおこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録出願) の国際公開の効果は、特許法第 1 8 4 条の 1 0 第 1 項 (実用新案法第 4 8 条の 1 3 第 2 項) により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。