

(19)日本国特許庁 ( J P )

# (12)特許公報 ( B 2 )

(11)特許番号

## 特許第3421744号

( P 3 4 2 1 7 4 4 )

(45)発行日 平成15年 6月30日(2003.6.30)

(24)登録日 平成15年 4月25日(2003.4.25)

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

G01N 33/68

G01N 33/68

A01K 67/027

A01K 67/027

C07K 14/47

C07K 14/47

C12N 15/09

ZNA

C12Q 1/02

C12Q 1/02

G01N 33/50

Z

請求項の数 8 (全26頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 24279( P 2001 - 24279)

(73)特許権者 391012394

東北大学長

宮城県仙台市青葉区片平 2丁目 1番 1号

(22)出願日 平成13年 1月31日(2001.1.31)

(72)発明者 北本 哲之

宮城県仙台市青葉区星陵町 2 - 1 東北

(65)公開番号 特開2002 - 228665( P 2002 - 228665 A )

大学医学部内

(43)公開日 平成14年 8月14日(2002.8.14)

(72)発明者 三好 一郎

宮城県仙台市青葉区星陵町 2 - 1 東北

審査請求日 平成13年 2月 1日(2001.2.1)

大学医学部内

(72)発明者 毛利 資郎

福岡県福岡市東区馬出 3 - 1 - 1 九州

大学医学部内

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外 1名)

審査官 宮澤 浩

最終頁に続く

(54)【発明の名称】プリオン病感染因子のスクリーニング方法

1

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒト化プリオンタンパク質遺伝子を発現するノックイン非ヒト動物の濾胞樹状細胞 ( FDC ) における異常プリオンタンパク質の沈着を指標とすることを特徴とする、サンプル中のヒトのプリオン病感染因子のスクリーニング方法。

【請求項 2】 サンプルを該非ヒト動物に腹腔内、脳内、血管内、または経口投与することを特徴とする、請求項 1 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 3】 FDCにおける異常プリオンタンパク質の沈着を、組織学的検出法、電気泳動法、及び/または結合アッセイによって検出することを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 4】 FDCにおける異常プリオンタンパク質の沈着を、サンプル投与後 1 4日 ~ 7 0 0 日で検出するこ

2

とを特徴とする、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法。

【請求項 5】 ヒト化プリオンタンパク質が、非ヒト動物プリオンタンパク質遺伝子のエクソン 3 の一部をヒトプリオンタンパク質のエクソン 3 の一部と置換したものである、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法。

【請求項 6】 ヒト化プリオンタンパク質が、ヒトプリオンタンパク質におけるヒト特異的アミノ酸残基のうち C 末端側の 6 残基が上記スクリーニングに使用する非ヒト動物プリオンタンパク質の対応するアミノ酸残基と置換したものである、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法。

【請求項 7】 ヒト化プリオンタンパク質が、配列番号 6 または 7 に示すアミノ酸配列を含むものである、請求

10

項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法。

【請求項 8】 ヒト化プリオンタンパク質遺伝子を発現するノックイン非ヒト動物にヒトのプリオン病感染因子を投与すると共に、該感染因子の投与前、投与後、または感染因子の投与と同時に該動物に被験物質を投与し、異常プリオンタンパク質のFDCにおける沈着、またはFDCから脳への移行を阻害するか否かを判定することを含む、ヒトのプリオン病の予防及び/または治療のための薬剤のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、サンプル中のヒトまたはヒト以外のプリオン病感染因子のスクリーニング方法、新規組み換えプリオンタンパク質、該タンパク質を発現するトランスジェニック動物及びノックイン動物に関する。

【0002】

【従来の技術】クロイツヘルト・ヤコブ病 (Creutzfeldt-Jacob病、以下CJDと略す) は、神経難病の一つであり、初老期に痴呆をきたす疾患である。発病すると、患者は約 3 - 5 ヶ月後にはいわゆる寝たきりの植物状態となりやがて死に至る。CJDに対する有効な治療法はなく、対症療法のみ行われているのが現状である。

【0003】CJDは、単なる痴呆をきたす神経変性疾患という側面だけでなく、ヒトからヒトへ、または動物から動物へ感染することが知られている。ヒトの脳を食べることによって感染したと考えられているkuru病、成長ホルモン製剤によって感染したCJD、最近問題となっている硬膜移植後のCJD等がヒトからヒトへの感染の例である。また、イギリスで問題となっている新変異型CJD (new variant CJD, nvCJD) は牛海綿状脳症 (bovine spongiform encephalopathy, BSEと略す。一般的には狂牛病と呼ばれている) のウシからヒトへの感染と考えられている。

【0004】1982年、CJDの感染因子はタンパク質性のものであるという仮説から、プリオンという感染因子が命名された。1985年には感染因子プリオンを構成するプリオンタンパク質の遺伝子がクローニングされた。この結果、プリオンタンパク質は正常な動物の脳でも発現しており、発病した患者においては、正常型プリオンタンパク質とは明確に区別可能な異常型プリオンタンパク質が沈着していることが明らかになった。現在、ヒトにおけるプリオンの異常に起因するいわゆるプリオン病として、上記kuru病、CJDの他、Gerstmann-Strausler症候群 (GSSと略す)、致死性家族性不眠症 (Fatal familial insomnia; FFIと略す) が知られている。

【0005】ヒトの場合、プリオンタンパク質は253個のアミノ酸から構成されており (配列番号 2)、N末端の22アミノ酸からなるシグナル配列、C末端の23アミノ

酸が除去された後、糖脂質GPI (Glycosyl-phosphatidyl-inositol) を介して細胞膜表面上に結合しているタンパク質である (配列番号 3)。

【0006】一方、1989年にプリオンタンパク質遺伝子の変異が発見され、家族性であるGSSや家族性のCJDがプリオンタンパク質のアミノ酸 1 個の変異のみで発病することが見出され、プリオンタンパク質がCJDにおいて重要な役割を持っていることが明らかとなった。

【0007】また、上記nvCJDは、若年 (10代から30代) で発病し、他のCJDで知られている中枢神経系における異常型プリオンタンパク質の沈着だけでなく、他のCJDでは認められなかったリンパ装置の濾胞樹状細胞 (Follicular Dendritic Cell:FDC) への沈着も認められることが報告された (Hill A.F.ら、Lancet 1997, 349:99-100)。nvCJDは、キャリアー患者の存在がどの程度であるかが不明であり、イギリスにおいては血液製剤をイギリスの自国の血液で供給することを禁止する程の深刻な問題となっている。

【0008】その理由の一つとして、同一種におけるプリオンの伝播 (感染) は容易であり、感染率が高く、また潜伏期間も短いのに対し、一つの種から別の種への移行には長期の潜伏期間が必要であり、感染率も非常に低いという事実が挙げられる。この種間障壁のために、動物モデル等を用いてCJD等のヒトプリオン病の感染因子の存在を検出することは非常に困難なものであった。

【0009】例えば、上記nvCJDについて、ヒト型トランスジェニックマウスへの感染実験が試みられている (Hill, A.F.ら、Nature 1997 Oct 2;389(6650):448-50) が、発症までに長い潜伏期間 (228日以上) を要し、成功率も高いものではなかった (5 6 匹中 2 5 匹のみ成功)。最近、ウシ型のトランスジェニックマウスを用い、約250日の潜伏期間で感染したことが報告されている (Scott M.R.ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1999, 96:15137-42)。

【0010】また、試料中のプリオンの検出方法として、トランスジェニック動物を用いた系が報告されている (特表平11-510496号) が、マウスを用いた例では50日前後でのスクレイピーの発症が報告されているが、ヒトのプリオン病に関しては発症までに200日近くを要している。

【0011】一方、本発明者等は、オートクレーブ法という新しい免疫染色法を用いてCJD患者及びCJD感染マウスの中枢神経のシナプスに異常プリオンタンパク質が沈着することを証明した (Kitamoto, T.ら、Am. J. Pathol. 140:1285-1294 (1992);Muramoto, T.ら、Am. J. Pathol. 140:1411-1420 (1992))。また、中枢神経系以外の細胞、FDCでも異常プリオンタンパク質が沈着することも発見した (Kitamoto, T.ら、J. Virol. 65:6292-6295 (1991))。FDCへの異常プリオンタンパク質の沈着は、マウスの発病よりずっと以前の段階から検出でき、

発病前診断が可能である (Muramoto, T.ら、Am. J. Pathol. 140:1411-1420 (1992); Muramoto, T.ら、Am. J. Pathol. 143:1470-1479 (1993))。

【 0 0 1 2 】 通常、感染因子 (マウスプリオン) のマウスへの頭蓋内投与では、マウスは120-140日で発病するが、FDCへの異常プリオンタンパク質の沈着を指標とすると、投与30日後には感染因子を投与されたマウスの全てで検出が可能であった。

【 0 0 1 3 】

【 発明が解決しようとする課題 】 上記のように、血液製剤等の医薬品のプリオンによる感染の有無を迅速に決定するために、動物モデル等によるCJD等のヒトプリオン病感染因子の早期検出が必要とされている。

【 0 0 1 4 】 また、FDCへの異常プリオンタンパク質の沈着はマウスの系でのみ証明されており、従来ヒトのCJDでは検出できなかった。また、野生型マウスにおいては、ヒト及びマウス間の種差が存在するために、ヒトCJDからの初代の感染実験ではFDCへの異常プリオンタンパク質の沈着が認められないことが知られている (Muramoto, T.ら、J. Virol. 67:6808-6810 (1993))。従って、ヒトのプリオンタンパク質の異常を直接検出する方法が必要とされていた。

【 0 0 1 5 】

【 課題を解決するための手段 】 本発明者等は、上記実情に鑑み鋭意検討した結果、ヒト及びマウスのプリオンタンパク質由来の新規組み換えプリオンタンパク質を作製し、これを導入したトランスジェニック動物及びノックイン動物を作製した。その結果、これまでにない短期間でサンプル中のヒトプリオン病感染因子を検出できる、非常に有効なスクリーニング方法を開発することに成功した。

【 0 0 1 6 】

すなわち、本発明は、以下の ( 1 ) ~ ( 2 6 ) を提供する。( 1 ) 非ヒト動物の濾胞樹状細胞 (FDC) における異常プリオンタンパク質の沈着を指標とすることを特徴とする、サンプル中のヒトまたはヒト以外のプリオン病感染因子のスクリーニング方法。

( 2 ) 該非ヒト動物がヒト化プリオンタンパク質遺伝子を発現するトランスジェニック動物であることを特徴とする、上記 ( 1 ) に記載のスクリーニング方法。

【 0 0 1 7 】 ( 3 ) 該非ヒト動物がヒト化プリオンタンパク質遺伝子を発現するノックイン動物であることを特徴とする、上記 ( 1 ) に記載のスクリーニング方法。

( 4 ) サンプルを該非ヒト動物に腹腔内、脳内、血管内、または経口投与することを特徴とする、上記 ( 1 ) から ( 3 ) のいずれかに記載のスクリーニング方法。

( 5 ) FDCにおける異常プリオンタンパク質の沈着を、組織学的検出法、電気泳動法、及び/または結合アッセイによって検出することを特徴とする、上記 ( 1 ) から ( 4 ) のいずれかに記載のスクリーニング方法。

【 0 0 1 8 】 ( 6 ) FDCにおける異常プリオンタンパク質の沈着を、サンプル投与後 1 4 日 ~ 7 0 0 日で検出することを特徴とする、上記 ( 1 ) から ( 5 ) のいずれかに記載のスクリーニング方法。

( 7 ) ヒト化プリオンタンパク質が、非ヒト動物プリオンタンパク質遺伝子のエクソン 3 の一部をヒトプリオンタンパク質のエクソン 3 の一部と置換したものである、上記 ( 1 ) から ( 6 ) のいずれかに記載のスクリーニング方法。

10 【 0 0 1 9 】 ( 8 ) ヒト化プリオンタンパク質が、ヒトプリオンタンパク質におけるヒト特異的アミノ酸残基のうちC末端側の6残基が上記スクリーニングに使用する非ヒト動物プリオンタンパク質の対応するアミノ酸残基と置換したものである、上記 ( 1 ) から ( 6 ) のいずれかに記載のスクリーニング方法。

( 9 ) ヒト化プリオンタンパク質が、配列番号 6 または 7 に示すアミノ酸配列を含むものである、上記 ( 1 ) から ( 6 ) のいずれかに記載のスクリーニング方法。

20 ( 1 0 ) 非ヒト動物プリオンタンパク質遺伝子のエクソン 3 の一部をヒトプリオンタンパク質遺伝子のエクソン 3 の一部と置換した組み換え遺伝子によってコードされることを特徴とする、組み換えヒト化プリオンタンパク質。

【 0 0 2 0 】 ( 1 1 ) ヒトプリオンタンパク質におけるヒト特異的アミノ酸残基のうちC末端側の6残基が非ヒト動物プリオンタンパク質の対応するアミノ酸と置換したものである、組み換えヒト化プリオンタンパク質。

( 1 2 ) 配列番号 6 または 7 に示すアミノ酸配列を含む、組み換えヒト化プリオンタンパク質。

30 ( 1 3 ) 上記 ( 1 0 ) から ( 1 2 ) のいずれかに記載のタンパク質をコードする遺伝子またはその断片。

【 0 0 2 1 】 ( 1 4 ) 下記の ( a ) ~ ( c ) のヌクレオチド配列を含む遺伝子またはその断片。

( a ) 配列番号 4 に示すヌクレオチド配列、( b ) 配列番号 4 に示すヌクレオチド配列と縮重関係にあるヌクレオチド配列、( c ) ( a ) または ( b ) の配列にストリンジентな条件下でハイブリダイズし得るヌクレオチド配列であって、上記 ( 1 0 ) に記載のタンパク質をコードするヌクレオチド配列。

40 【 0 0 2 2 】 ( 1 5 ) 上記 ( 1 3 ) または ( 1 4 ) に記載の遺伝子またはその断片を含有するベクター。

( 1 6 ) 上記 ( 1 3 ) または ( 1 4 ) に記載の遺伝子またはその断片が導入されたトランスジェニック動物。

( 1 7 ) 上記 ( 1 3 ) または ( 1 4 ) に記載の遺伝子またはその断片が導入されたノックイン動物。

( 1 8 ) FDCにおいてヒト化プリオンタンパク質を発現することを特徴とするトランスジェニック動物。

( 1 9 ) FDCにおいてヒト化プリオンタンパク質を発現することを特徴とするノックイン動物。

50 【 0 0 2 3 】 ( 2 0 ) 脳及び/又はFDCにおいて上記

( 1 0 ) から ( 1 2 ) のいずれかに記載のタンパク質を発現してなるトランスジェニック動物。

( 2 1 ) 脳及びノ又はFDCにおいて上記( 1 0 ) から ( 1 2 ) のいずれかに記載のタンパク質を発現してなるノックイン動物。

( 2 2 ) 上記( 1 0 ) から ( 1 2 ) のいずれかに記載のタンパク質を発現するトランスジェニック動物の作出方法。

( 2 3 ) 上記( 1 0 ) から ( 1 2 ) のいずれかに記載のタンパク質を発現するノックイン動物の作出方法。

【 0 0 2 4 】 ( 2 4 ) 以下の ( a ) ~ ( f ) の工程 :

( a ) 非ヒトプリオンタンパク質遺伝子またはその断片を含むベクターを構築し、( b ) 上記非ヒトプリオンタンパク質遺伝子のエクソン 3 の一部をヒトプリオンタンパク質のエクソン 3 の一部と置換し、( c ) 3' 非翻訳領域にloxPで囲まれた抗生物質耐性遺伝子を挿入し、

( d ) 得られた改変ベクターを該非ヒトのES細胞に導入し、( e ) 相同組み換えの認められたクローンからキメラ動物を作成し、( f ) F 1 動物の受精卵にCre酵素発現プラスミドを導入して抗生物質耐性遺伝子を削除する、ことを含む、上記( 2 3 ) に記載のノックイン動物の作出方法。

【 0 0 2 5 】 ( 2 5 ) 上記( 1 8 ) 若しくは( 2 0 ) に記載のトランスジェニック動物、または上記( 1 9 ) 若しくは( 2 1 ) に記載のノックイン動物を使用することを特徴とする、ヒトまたはヒト以外のプリオン病の予防及びノまたは治療のための薬剤のスクリーニング方法。

( 2 6 ) 上記( 1 8 ) 若しくは( 2 0 ) に記載のトランスジェニック動物、または上記( 1 9 ) 若しくは( 2 1 ) に記載のノックイン動物を使用することを特徴とする、血液製剤等ヒトまたはヒト以外の動物の臓器に由来するあらゆる医薬品、食品、化粧品等の安全性試験を行うための方法。

【 0 0 2 6 】

【発明の実施の形態】以下、本発明について更に詳細に説明する。本明細書において、「非ヒト動物」とは、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ブタ、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ等の哺乳動物、鳥類及び魚類をいう。本発明において、非ヒト動物は特に限定されるものではないが、飼育及び操作上の点から特に好ましくはマウスである。

【 0 0 2 7 】本明細書において、「異常プリオンタンパク質」とは、正常型プリオンタンパク質の立体構造が変化し、界面活性剤で不溶性となり、タンパク分解酵素で部分的に消化されなくなったプリオンタンパク質をいう。ヒトならびに動物のプリオン病では、正常プリオンタンパク質の他に必ずこの異常プリオンタンパク質が存在し、その存在の証明は、タンパク分解酵素処理後のウエスタンブロット法や、タンパク質抽出後の電子顕微鏡

を用いた異常プリオンタンパク質から構成されるアミロイド繊維の検出、そして本発明者等が開発したオートクレーブ法を利用した免疫染色法 ( Shin, R. W.ら、Lab. Invest. 64:693-702 (1991); Kitamoto, T.ら、J. Viro l. 65:6292-6295 (1991); Kitamoto, T.ら、Am. J. Pat hol. 140:1285-1294 (1992) ) による検出などによって確かめられる。

【 0 0 2 8 】また、本明細書において、「感染因子」とは、ヒトまたは本発明のトランスジェニック動物またはノックイン動物に投与した場合にプリオン病を発症させる能力を有する因子をいい、具体的には、ヒト由来またはヒト以外の動物由来の異常プリオンタンパク質もしくはその断片、またはこれらを含むものをいう。感染因子を含むサンプルとしては、例えばヒトまたはヒト以外の動物由来の血液製剤等の医薬品、食品、化粧品等が挙げられる。

【 0 0 2 9 】更に、本明細書において、「ヒト化プリオンタンパク質」とは、発現させる宿主となる非ヒト動物が本来発現するプリオンタンパク質の一部がヒトプリオンタンパク質の配列と置き換わっているものをいい、例えば、非ヒト動物プリオンタンパク質遺伝子のコーディング領域の一部をヒトプリオンタンパク質遺伝子の対応領域と置換した組み換え遺伝子によってコードされる組み換えヒト化プリオンタンパク質、ヒトプリオンタンパク質におけるヒト特異的アミノ酸残基のうちの一部の残基が非ヒト動物プリオンタンパク質の対応するアミノ酸残基と置換した組み換えヒト化プリオンタンパク質等が挙げられる。

【 0 0 3 0 】本発明において好適に用いられるヒト化プリオンタンパク質として、特に非ヒト動物プリオンタンパク質遺伝子のエクソン 3 の一部をヒトプリオンタンパク質遺伝子のエクソン 3 の一部と置換した組み換え遺伝子によってコードされる組み換えヒト化プリオンタンパク質が挙げられる。この組み換えヒト化プリオンタンパク質は、マウス等の非ヒト動物のプリオンタンパク質遺伝子のエクソン 3 の一部を組み換えによってヒトプリオンタンパク質遺伝子のエクソン 3 の一部と置換することにより得られる遺伝子を、例えばベクターに組み込んで宿主に導入し、発現させることによって得ることができる。ここで、「エクソン 3 の一部」とは、エクソン 3 のプリオンタンパク質翻訳領域に存在するSmaI部位からBstEII部位までの領域を必須に含む配列のことをいう。尚、プリオンタンパク質遺伝子において、タンパク翻訳領域はエクソン 3 のみに存在する。

【 0 0 3 1 】このような遺伝子組み換え等の、本明細書に記載の遺伝子工学的手法は、当分野において通常用いられるものであり、当業者であれば、本明細書の記載に基づいて適宜行うことができる。

【 0 0 3 2 】本発明に係るヒト化プリオンタンパク質は、具体的には、例えば以下の ( a ) ~ ( f ) の工程 :

10

20

30

40

50

( a ) 非ヒトプリオンタンパク質遺伝子またはその断片を含むベクターを構築し、( b ) 上記非ヒトプリオンタンパク質遺伝子のエクソン 3 の一部をヒトプリオンタンパク質のエクソン 3 の一部と置換し、( c ) 3' 非翻訳領域に loxp で囲まれた抗生物質耐性遺伝子を挿入し、( d ) 得られた改変ベクターを該非ヒトの ES 細胞に導入し、( e ) 相同組み換えの認められたクローンからキメラ動物を作成し、( f ) F 1 動物の受精卵に Cre 酵素発現プラスミドを導入して抗生物質耐性遺伝子を削除することによって得られるノックイン動物により、上記ヒト化タンパク質が発現する。

【 0 0 3 3 】また、ヒト化プリオンタンパク質は、ヒトプリオンタンパク質において、ヒト特異的であることが知られているアミノ酸残基のうち、例えば C 末端側の 6 残基が非ヒト動物プリオンタンパク質の対応するアミノ酸残基と置換したものと、部位特異的突然変異誘発、または化学的合成等の当業者に公知の手法により得ることができる。

【 0 0 3 4 】ヒトプリオンタンパク質遺伝子の塩基配列は配列番号 1 に示す塩基配列として、そのアミノ酸配列は、配列番号 2 に示す全アミノ酸配列として知られているが、N 末端の 22 アミノ酸からなるシグナル配列、C 末端の 23 アミノ酸が除去された配列番号 3 のアミノ酸配列にプロセシングされて成熟タンパク質となる。この配列番号 3 において、33、34、50、58、75、87、90、116、121、123、133、144、146、193、197、198、205、206、及び 208 番目の残基がヒト特異的であるとされている (Kretzschmar, H.A. ら、DNA 1986, 5:315-24)。本発明者等は、これらヒト特異的アミノ酸の非ヒト動物の対応アミノ酸との置換について種々検討した結果、本発明に係るスクリーニング方法の使用において、特に C 末端側の 6 残基が非ヒト動物プリオンタンパク質の対応するアミノ酸残基と置換したものが好適であることを見出した。この配列の一例を配列番号 6 または 7 に示す。配列番号 6 は、コドン 1 2 9 がメチオニンであり、配列番号 7 は、コドン 1 2 9 がバリンである。この多型は正常なヒトプリオンタンパク質でも見られるものであり、ヒトの各種プリオン病で見られる異常プリオンタンパク質においても存在する。

【 0 0 3 5 】本発明はまた、本発明に係る上記ヒト化プリオンタンパク質をコードする遺伝子またはその断片、及び該遺伝子またはその断片を含有するベクターを提供する。

【 0 0 3 6 】本発明に係るヒト化プリオンタンパク質をコードする遺伝子は、上記配列番号 6 または 7 に示すアミノ酸配列を含む組み換えヒト化プリオンタンパク質をコードするものであるが、他の態様として、例えば配列番号 4 に示すヌクレオチド配列を含む遺伝子、及び配列番号 4 に示すヌクレオチド配列と縮重関係にあるヌクレオチド配列を含む遺伝子、及びこれらの配列にストリン

ジェントな条件下でハイブリダイズし得るヌクレオチド配列を含む遺伝子を挙げることができる。ここで、ストリンジェントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成される条件をいう。例えば、相補性が高いヌクレオチド配列、すなわち 90% 以上、好ましくは 95% 以上の相補性を有するヌクレオチド配列同士はハイブリダイズし、それより相補性が低いヌクレオチド配列同士はハイブリダイズしない条件が挙げられる。より具体的には、ナトリウム濃度が 15 ~ 300mM、好ましくは 15 ~ 75mM であり、温度が 50 ~ 60 °C、好ましくは 55 ~ 60 °C の条件をいう。遺伝子としては、DNA 及び RNA のいずれでも良く、また合成によって得られるものであっても良い。また、「断片」とは、プリオンタンパク質遺伝子の一部であって、好ましくは配列番号 2 におけるコドン 85 からコドン 230 までをコードするヌクレオチド配列を含むが、この配列の欠損型であっても良く、最短 300 ヌクレオチド程度の長さのものをいう。

【 0 0 3 7 】該遺伝子またはその断片を含有するベクターとしては、該遺伝子が導入される宿主動物細胞中で発現し得るものであればいずれでも良く、当分野において使用されるものであれば特に限定されるものではないが、例えばアクチンプロモーターを利用した細胞でも発現が認められるベクター等が挙げられる。また、該遺伝子の発現を調節し得るプロモーター、エンハンサー、その他の調節遺伝子等を適宜組み込むことができる。本発明において好適に使用できるプロモーターとしては、例えば FDC における発現を促進するようなプロモーター、例えば CD21 (Cr2) 遺伝子のプロモーター等が挙げられ、文献として例えば Zabel, M.D. ら、J. Immunol. 2000 Oct. 15; 165(8):4437-45 を参照すれば良い。

【 0 0 3 8 】一方、従来、プリオンタンパク質遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの作製は既に報告されている (Telling G.C. ら、Cell 1995, Oct. 6:83(1) 79-90)。一つは、図 1 C に示すように、完全なヒト型のプリオンタンパク質の遺伝子を導入したものであり、CJ D 発病までの潜伏期間は約 250 日であった。もう一つは、図 1 A に示すように、KpnI サイトから BstEII サイトまでがヒトプリオンタンパク質由来の配列であり、N 末端及び C 末端がマウスプリオンタンパク質由来の配列となっているタンパク質の遺伝子を導入し、潜伏期間が約 200 日となったものである。これに対して本発明のトランスジェニックマウスは、図 1 B に示すように、N 末端から BstEII サイトまでがヒトプリオンタンパク質由来の配列であり、C 末端がマウスプリオンタンパク質由来の配列となっているタンパク質の遺伝子を導入したものである。

【 0 0 3 9 】本発明者等は、図 1 B に模式的に示すタンパク質をコードする遺伝子 (配列番号 6 または 7) を導入したトランスジェニックマウスを作製し、ホモの場合で発病までの潜伏期間が平均 147 日のものを得ることが

できた。従って、本発明は、配列番号 6 または 7 に示す組み換えヒト化プリオンタンパク質を発現するトランスジェニック動物を提供する。本発明において、トランスジェニック動物は、ホモであってもヘテロであっても良いが、好ましくはホモ型である。

【 0 0 4 0 】しかしながら、トランスジェニック動物は、遺伝子がどの染色体上のどの位置に導入されているか不明であり、また、上記のような短い潜伏期間を示すものを得るためには、プリオンタンパク質遺伝子のノックアウト動物と交配しなければならない。本発明者等は、以前にマウス遺伝子をヒト型に置き換える、ES細胞を使った遺伝子置換法を確立している (Kitamoto, T. 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000 1001 1002 1003 1004 1005 1006 1007 1008 1009 1010 1011 1012 1013 1014 1015 1016 1017 1018 1019 1020 1021 1022 1023 1024 1025 1026 1027 1028 1029 1030 1031 1032 1033 1034 1035 1036 1037 1038 1039 1040 1041 1042 1043 1044 1045 1046 1047 1048 1049 1050 1051 1052 1053 1054 1055 1056 1057 1058 1059 1060 1061 1062 1063 1064 1065 1066 1067 1068 1069 1070 1071 1072 1073 1074 1075 1076 1077 1078 1079 1080 1081 1082 1083 1084 1085 1086 1087 1088 1089 1090 1091 1092 1093 1094 1095 1096 1097 1098 1099 1100 1101 1102 1103 1104 1105 1106 1107 1108 1109 1110 1111 1112 1113 1114 1115 1116 1117 1118 1119 1120 1121 1122 1123 1124 1125 1126 1127 1128 1129 1130 1131 1132 1133 1134 1135 1136 1137 1138 1139 1140 1141 1142 1143 1144 1145 1146 1147 1148 1149 1150 1151 1152 1153 1154 1155 1156 1157 1158 1159 1160 1161 1162 1163 1164 1165 1166 1167 1168 1169 1170 1171 1172 1173 1174 1175 1176 1177 1178 1179 1180 1181 1182 1183 1184 1185 1186 1187 1188 1189 1190 1191 1192 1193 1194 1195 1196 1197 1198 1199 1200 1201 1202 1203 1204 1205 1206 1207 1208 1209 1210 1211 1212 1213 1214 1215 1216 1217 1218 1219 1220 1221 1222 1223 1224 1225 1226 1227 1228 1229 1230 1231 1232 1233 1234 1235 1236 1237 1238 1239 1240 1241 1242 1243 1244 1245 1246 1247 1248 1249 1250 1251 1252 1253 1254 1255 1256 1257 1258 1259 1260 1261 1262 1263 1264 1265 1266 1267 1268 1269 1270 1271 1272 1273 1274 1275 1276 1277 1278 1279 1280 1281 1282 1283 1284 1285 1286 1287 1288 1289 1290 1291 1292 1293 1294 1295 1296 1297 1298 1299 1300 1301 1302 1303 1304 1305 1306 1307 1308 1309 1310 1311 1312 1313 1314 1315 1316 1317 1318 1319 1320 1321 1322 1323 1324 1325 1326 1327 1328 1329 1330 1331 1332 1333 1334 1335 1336 1337 1338 1339 1340 1341 1342 1343 1344 1345 1346 1347 1348 1349 1350 1351 1352 1353 1354 1355 1356 1357 1358 1359 1360 1361 1362 1363 1364 1365 1366 1367 1368 1369 1370 1371 1372 1373 1374 1375 1376 1377 1378 1379 1380 1381 1382 1383 1384 1385 1386 1387 1388 1389 1390 1391 1392 1393 1394 1395 1396 1397 1398 1399 1400 1401 1402 1403 1404 1405 1406 1407 1408 1409 1410 1411 1412 1413 1414 1415 1416 1417 1418 1419 1420 1421 1422 1423 1424 1425 1426 1427 1428 1429 1430 1431 1432 1433 1434 1435 1436 1437 1438 1439 1440 1441 1442 1443 1444 1445 1446 1447 1448 1449 1450 1451 1452 1453 1454 1455 1456 1457 1458 1459 1460 1461 1462 1463 1464 1465 1466 1467 1468 1469 1470 1471 1472 1473 1474 1475 1476 1477 1478 1479 1480 1481 1482 1483 1484 1485 1486 1487 1488 1489 1490 1491 1492 1493 1494 1495 1496 1497 1498 1499 1500 1501 1502 1503 1504 1505 1506 1507 1508 1509 1510 1511 1512 1513 1514 1515 1516 1517 1518 1519 1520 1521 1522 1523 1524 1525 1526 1527 1528 1529 1530 1531 1532 1533 1534 1535 1536 1537 1538 1539 1540 1541 1542 1543 1544 1545 1546 1547 1548 1549 1550 1551 1552 1553 1554 1555 1556 1557 1558 1559 1560 1561 1562 1563 1564 1565 1566 1567 1568 1569 1570 1571 1572 1573 1574 1575 1576 1577 1578 1579 1580 1581 1582 1583 1584 1585 1586 1587 1588 1589 1590 1591 1592 1593 1594 1595 1596 1597 1598 1599 1600 1601 1602 1603 1604 1605 1606 1607 1608 1609 1610 1611 1612 1613 1614 1615 1616 1617 1618 1619 1620 1621 1622 1623 1624 1625 1626 1627 1628 1629 1630 1631 1632 1633 1634 1635 1636 1637 1638 1639 1640 1641 1642 1643 1644 1645 1646 1647 1648 1649 1650 1651 1652 1653 1654 1655 1656 1657 1658 1659 1660 1661 1662 1663 1664 1665 1666 1667 1668 1669 1670 1671 1672 1673 1674 1675 1676 1677 1678 1679 1680 1681 1682 1683 1684 1685 1686 1687 1688 1689 1690 1691 1692 1693 1694 1695 1696 1697 1698 1699 1700 1701 1702 1703 1704 1705 1706 1707 1708 1709 1710 1711 1712 1713 1714 1715 1716 1717 1718 1719 1720 1721 1722 1723 1724 1725 1726 1727 1728 1729 1730 1731 1732 1733 1734 1735 1736 1737 1738 1739 1740 1741 1742 1743 1744 1745 1746 1747 1748 1749 1750 1751 1752 1753 1754 1755 1756 1757 1758 1759 1760 1761 1762 1763 1764 1765 1766 1767 1768 1769 1770 1771 1772 1773 1774 1775 1776 1777 1778 1779 1780 1781 1782 1783 1784 1785 1786 1787 1788 1789 1790 1791 1792 1793 1794 1795 1796 1797 1798 1799 1800 1801 1802 1803 1804 1805 1806 1807 1808 1809 1810 1811 1812 1813 1814 1815 1816 1817 1818 1819 1820 1821 1822 1823 1824 1825 1826 1827 1828 1829 1830 1831 1832 1833 1834 1835 1836 1837 1838 1839 1840 1841 1842 1843 1844 1845 1846 1847 1848 1849 1850 1851 1852 1853 1854 1855 1856 1857 1858 1859 1860 1861 1862 1863 1864 1865 1866 1867 1868 1869 1870 1871 1872 1873 1874 1875 1876 1877 1878 1879 1880 1881 1882 1883 1884 1885 1886 1887 1888 1889 1890 1891 1892 1893 1894 1895 1896 1897 1898 1899 1900 1901 1902 1903 1904 1905 1906 1907 1908 1909 1910 1911 1912 1913 1914 1915 1916 1917 1918 1919 1920 1921 1922 1923 1924 1925 1926 1927 1928 1929 1930 1931 1932 1933 1934 1935 1936 1937 1938 1939 1940 1941 1942 1943 1944 1945 1946 1947 1948 1949 1950 1951 1952 1953 1954 1955 1956 1957 1958 1959 1960 1961 1962 1963 1964 1965 1966 1967 1968 1969 1970 1971 1972 1973 1974 1975 1976 1977 1978 1979 1980 1981 1982 1983 1984 1985 1986 1987 1988 1989 1990 1991 1992 1993 1994 1995 1996 1997 1998 1999 2000 2001 2002 2003 2004 2005 2006 2007 2008 2009 2010 2011 2012 2013 2014 2015 2016 2017 2018 2019 2020 2021 2022 2023 2024 2025 2026 2027 2028 2029 2030 2031 2032 2033 2034 2035 2036 2037 2038 2039 2040 2041 2042 2043 2044 2045 2046 2047 2048 2049 2050 2051 2052 2053 2054 2055 2056 2057 2058 2059 2060 2061 2062 2063 2064 2065 2066 2067 2068 2069 2070 2071 2072 2073 2074 2075 2076 2077 2078 2079 2080 2081 2082 2083 2084 2085 2086 2087 2088 2089 2090 2091 2092 2093 2094 2095 2096 2097 2098 2099 2100 2101 2102 2103 2104 2105 2106 2107 2108 2109 2110 2111 2112 2113 2114 2115 2116 2117 2118 2119 2120 2121 2122 2123 2124 2125 2126 2127 2128 2129 2130 2131 2132 2133 2134 2135 2136 2137 2138 2139 2140 2141 2142 2143 2144 2145 2146 2147 2148 2149 2150 2151 2152 2153 2154 2155 2156 2157 2158 2159 2160 2161 2162 2163 2164 2165 2166 2167 2168 2169 2170 2171 2172 2173 2174 2175 2176 2177 2178 2179 2180 2181 2182 2183 2184 2185 2186 2187 2188 2189 2190 2191 2192 2193 2194 2195 2196 2197 2198 2199 2200 2201 2202 2203 2204 2205 2206 2207 2208 2209 2210 2211 2212 2213 2214 2215 2216 2217 2218 2219 2220 2221 2222 2223 2224 2225 2226 2227 2228 2229 2230 2231 2232 2233 2234 2235 2236 2237 2238 2239 2240 2241 2242 2243 2244 2245 2246 2247 2248 2249 2250 2251 2252 2253 2254 2255 2256 2257 2258 2259 2260 2261 2262 2263 2264 2265 2266 2267 2268 2269 2270 2271 2272 2273 2274 2275 2276 2277 2278 2279 2280 2281 2282 2283 2284 2285 2286 2287 2288 2289 2290 2291 2292 2293 2294 2295 2296 2297 2298 2299 2300 2301 2302 2303 2304 2305 2306 2307 2308 2309 2310 2311 2312 2313 2314 2315 2316 2317 2318 2319 2320 2321 2322 2323 2324 2325 2326 2327 2328 2329 2330 2331 2332 2333 2334 2335 2336 2337 2338 2339 2340 2341 2342 2343 2344 2345 2346 2347 2348 2349 2350 2351 2352 2353 2354 2355 2356 2357 2358 2359 2360 2361 2362 2363 2364 2365 2366 2367 2368 2369 2370 2371 2372 2373 2374 2375 2376 2377 2378 2379 2380 2381 2382 2383 2384 2385 2386 2387 2388 2389 2390 2391 2392 2393 2394 2395 2396 2397 2398 2399 2400 2401 2402 2403 2404 2405 2406 2407 2408 2409 2410 2411 2412 2413 2414 2415 2416 2417 2418 2419 2420 2421 2422 2423 2424 2425 2426 2427 2428 2429 2430 2431 2432 2433 2434 2435 2436 2437 2438 2439 2440 2441 2442 2443 2444 2445 2446 2447 2448 2449 2450 2451 2452 2453 2454 2455 2456 2457 2458 2459 2460 2461 2462 2463 2464 2465 2466 2467 2468 2469 2470 2471 2472 2473 2474 2475 2476 2477 2478 2479 2480 2481 2482 2483 2484 2485 2486 2487 2488 2489 2490 2491 2492 2493 2494 2495 2496 2497 2498 2499 2500 2501 2502 2503 2504 2505 2506 2507 2508 2509 2510 2511 2512 2513 2514 2515 2516 2517 2518 2519 2520 2521 2522 2523 2524 2525 2526 2527 2528 2529 2530 2531 2532 2533 2534 2535 2536 2537 2538 2539 2540 2541 2542 2543 2544 2545 2546 2547 2548 2549 2550 2551 2552 2553 2554 2555 2556 2557 2558 2559 2560 2561 2562 2563 2564 2565 2566 2567 2568 2569 2570 2571 2572 2573 2574 2575 2576 2577 2578 2579 2580 2581 2582 2583 2584 2585 2586 2587 2588 2589 2590 2591 2592 2593 2594 2595 2596 2597 2598 2599 2600 2601 2602 2603 2604 2605 2606 2607 2608 2609 2610 2611 2612 2613 2614 2615 2616 2617 2618 2619 2620 2621 2622 2623 2624 2625 2626 2627 2628 2629 2630 26

ヒト動物、好ましくはヒト化プリオンタンパク質を発現するトランスジェニック動物、特に好ましくは本発明のノックイン動物に感染させる。サンプルの投与は、腹腔内、脳内、若しくは血管内投与、または経口投与のいずれでも良いが、腹腔内投与の場合には、後に記載するように、相対的に多量のサンプルを投与することができ、好ましい。具体的には、血液・臓器等、またはそれに由来する製剤を含む溶液をノックイン動物の腹腔内へ、例えば 2 ml 程度投与し、感染させる。

【 0 0 5 1 】感染後、FDCへの異常プリオンタンパク質の沈着を検出することによって、サンプルによるプリオン病発症の有無を決定することができる。検出方法としては、FDCへの異常プリオンタンパク質の沈着を検出し得るものであればいずれでも良いが、例えば脾臓、リンパ節、腸管のリンパ装置であるパイエル氏板のFDCへの異常プリオンタンパク質の沈着を、電子顕微鏡等によって観察する組織学的検出法、電気泳動法、及び/または異常プリオンタンパク質に対する抗体を放射性または非放射性標識し、結合アッセイを行う方法、例えば *in situ* ハイブリダイゼーション、ウエスタンブロット法、ELISA法等が挙げられる。検出は、感染後経時的に行っても良いが、予め感染因子存在時のFDCへの異常プリオンタンパク質の沈着までの期間を対照サンプルによって決定し、サンプル感染からその期間、例えば75日経過後にFDCへの異常プリオンタンパク質の沈着の有無を検出する方法であっても良い。検出時期は特に限定するものではなく、投与から 1 4 日 ~ 7 0 0 日の間であればいずれでも良い。FDCにおける異常プリオンタンパク質の沈着を指標とすることで、従来と比較して非常に短期間で感染因子の存在を決定することができる。

【 0 0 5 2 】ヒトのプリオン病、とりわけCJDにおいては、マウスモデルのようにFDCに異常プリオンタンパク質の見られる症例はこれまで全く報告されていなかった。このことは、CJDがほとんど孤発例によるもので、外からの感染によらないという事実と一致する。しかし、1996年にイギリスで起こったnvCJDは牛海綿状脳症由来の感染因子が関係していると考えられ、感染性プリオン病に位置付けられている。従って、感染因子の検出は非常に重要となっている。

【 0 0 5 3 】本発明はまた、感染因子を腹腔内、脳内、血管内、または経口投与することによるスクリーニング方法を提供する。従来、感染実験は、主として脳内投与により行われていた。感染因子を含むサンプルを脳内に投与する場合には、投与量が制限されるという制約がある。マウスの脳内には最大限 20  $\mu$ l しか投与できないが、腹腔内であれば 2 ml のサンプルでも投与可能であり、しかも複数回の投与も可能である。

【 0 0 5 4 】感染因子の濃度が低いと考えられている血液を含む一般臓器のバイオアッセイでは、この100倍に及ぶ量的な差は大きくその検出感度に影響する。例えば

CJD感染マウスの場合、脳内投与による感染実験では、脳ではLD50が  $10^{-8}$  / g であり、血液は  $10^{-3}$  / g 以下である。これは、脳内投与として 20  $\mu$ l を使用した結果であるが、腹腔内投与では100倍量のサンプルを投与することが可能となり、これによって  $10^{-3}$  / g の臓器（血液）の感染実験を  $10^{-5}$  / g に相当する高い感染性臓器（脾臓等）と同じレベルにすることができる。従って、腹腔内投与は、サンプル中の感染因子のスクリーニング方法において、今後非常に期待される投与方法である。

【 0 0 5 5 】これまで、ヒトのトランスジェニックマウスモデルでは、感染因子の腹腔内投与での発病は報告されていない。本発明者等のトランスジェニックマウスのデータから、FDCに異常プリオンタンパク質が沈着しないと、腹腔内投与等の末梢からの発病は困難であることが示唆された。また、頭蓋内投与では発病するが、腹腔内投与では発病しないSCIDマウス（T細胞及びB細胞が欠損）では、FDCへの異常プリオンタンパク質の沈着は認められない。このことは、FDCへの異常プリオンタンパク質の沈着が生じないと脳へ異常プリオンタンパク質が伝播されないことを示す。

【 0 0 5 6 】本発明のノックインマウスは、感染因子投与によって初めてヒト型異常プリオンタンパク質が沈着したものであり、これを用いて腹腔内投与を行った。投与後平均283日において、1 1 匹全ての発病が確認された。すなわち、本発明において、末梢からのヒトプリオン感染が初めて成功したのである（表 5 ）。

【 0 0 5 7 】更に、本発明は、本発明のトランスジェニック動物、または本発明のノックイン動物を使用することを特徴とする、ヒトまたはヒト以外のプリオン病の予防及び/または治療のための薬剤のスクリーニング方法を提供する。

【 0 0 5 8 】上記のように、本発明のトランスジェニック動物またはノックイン動物を用いて、短期間かつ高感度でFDCにおける異常プリオンタンパク質の沈着を検出することができる。この手法を用い、異常プリオンタンパク質のFDCへの沈着、またはFDCから脳への移行をブロックし得る薬剤を、感染因子投与の前後、あるいは感染因子と同時に被検動物に投与することによって、スクリーニングすることができ、それによって現在非常に大きな問題となっており、有効な薬剤が報告されていないヒトまたはヒト以外のプリオン病の予防及び/または治療のための薬剤を開発することができる。

【 0 0 5 9 】

【実施例】 [ 実施例 1 ] ノックインベクターの作製  
組み換えヒトプリオンタンパク質を調製するために、遺伝子置換ベクターとして、マウスのプリオンタンパク質遺伝子（配列番号 8、配列番号 9 はアミノ酸配列）のエクソン 3 の翻訳領域の 40 番目のアミノ酸であるグリシン（118 番目のヌクレオチド）から 187 番目のアミノ酸であ



るスレオニン（561番目のヌクレオチド）までをヒトのプリオンタンパク質遺伝子と置換したエクソン3を中心とした約10Kbpのコンストラクトを選択した。ノックインベクターは、20Kbpに及び長いイントロンをもつことを特徴とするマウスプリオンタンパク質遺伝子のイントロン2のBamHI部位からエクソン3のSmaI部位までの3.5Kbpを利用し、エクソン3のSmaI部位からBstEII部位までをヒトプリオンタンパク質遺伝子に置換し、エクソン3の3'側非翻訳領域であるApaI部位にloxPで囲まれたPGK-neo遺伝子を挿入した（図4）。ApaIからEcoRVまでの

4 Kbpに及び3'領域はマウスの遺伝子を用いた。  
【0060】ネガティブ選択として、ジフテリア毒素であるDTA遺伝子を3'側に挿入し、NotIでプラスミドを線状化した後、エレクトロポレーションでES細胞に導入した。ES細胞は、G418選択（ネオマイシン選択）の後、120クローンを選び、サザンプロットで解析した。解析した120クローン中4クローンで相同組み換えを確認した。これは、以前本発明者等がloxP-neo-gpt-loxPを用いて行った実験で、陽性率が288クローン中1クローンであったのに比較して、効率が良いものであった。

【0061】得られたノックインベクターで更に相同組み換えの効率を検討したところ、陽性率は1クローン/60クローン、6クローン/180クローン、5クローン/175クローン、2クローン/98クローンと、効率良く陽性クローンが得られることが確認された。

【0062】[実施例2] ノックインマウスの作製マウスへの遺伝子導入は、エレクトロポレーション法でES細胞に導入し、G418耐性のクローンをサザンプロット法によって解析した。相同組み換えの認められた陽性クローン（ES細胞）を桑実胚に導入してキメラマウスを作製し、キメラマウスの交配によってF1マウスを作製した（germ-line化）。陽性F1マウスの交配によって得られた受精卵にCre酵素を発現するプラスミドを導入し、不要になったneo遺伝子を削除し、ヒト型への置換を終了した。

【0063】得られたヘテロ接合体のヒト型ノックインマウス（Ki-ChM）同士を交配してホモ接合体マウスを作製した。得られたノックインマウスは、配列番号6に示す組み換えプリオンタンパク質を発現した（Ki-ChM）。同様に、完全なヒトプリオンタンパク質（配列番号10、通常5回ある8アミノ酸の繰り返し配列が4回となっている）を発現するノックインマウスも対照として作製した（Ki-Hu）。

【0064】[実施例3] トランスジェニックマウスの作製マウスのプリオンタンパク質遺伝子を、2種類のマウス、129SVマウス及びI/Lnマウスからクローニングした。129SVマウスのイントロン2は20Kbp以上と長いものであるため、イントロン2が短いI/Lnマウスの遺伝子も利用した。129SV由来の5'側の5Kbp、I/Lnマウス由来

のエクソン1及び2を含む12KbpのBamHI断片、及び129SV由来のエクソン3領域7Kbpを連結した（図5）。エクソン3は実施例2のノックインマウスと同様にSmaIからBstEII部位までをヒトのプリオンタンパク質に置き換えている。このようにして作製したトランスジェニックベクターをプラスミドから切り出し、BDF1マウスの受精卵に直接導入した。導入に成功したF0マウスを交配し、F1マウスを作製した。このF1マウスで発現量を解析後、ノックアウトマウスと2回交配し、マウスのプリオンタンパク質を発現しない、組み換えプリオンタンパク質（配列番号6または7）のみを発現するマウスを作製した（Tg-ChM及びTg-ChV）。

【0065】[実施例4] ノックインマウス及びトランスジェニックマウスへの脳内投与による感染の確立ヒト孤発性CJD患者の凍結脳から、リン酸緩衝液（PBS）を用いて10%の濃度になるようにガラスホモゲナイザーで脳乳剤を作成し、麻酔下で実施例2で得られたノックインマウス（Ki-ChM, Ki-HuM）と実施例3で得られたトランスジェニックマウス3系統（Tg-ChM#30, Tg-ChV#12, Tg-ChV#21）の右脳半球に27ゲージ針のシリンジを用いて20マイクロリットルずつ脳内接種を行った。接種後の観察記録で自発運動の減少、歩行失調、異常歩行、拳尾反応などの神経症状が現れ、進行し、消瘦、衰弱がみられた個体は安楽死の後、剖検した。神経症状が現れて安楽死までの期間は平均21日程度を要した。潜伏期間は接種日を0日とし安楽死までの期間とした。剖検時に緩衝ホルマリン固定以外に、主要臓器の一部は摂氏マイナス70度に凍結保存した。

【0066】また、すべてのマウスは、プリオン専用の病理標本作製室にてパラフィン包埋、薄切後、HE染色ならびに本発明者の考案したオートクレーブ法による免疫組織染色により、病変と異常プリオンタンパク質沈着による組織診断を行い、プリオン病の有無を確認した。

【0067】その結果、ノックインマウスのうち、コドン129がメチオニンホモ型であるヒト孤発例CJD(129M/M)-H3を接種されたマウスでは、組み換えヒトプリオンタンパク質を発現するKi-ChMマウスの潜伏期間は151±6.7日であった。同じ材料接種のトランスジェニックマウス3系統（Tg-ChM#30, Tg-ChV#12, Tg-ChV#21）はそれぞれ、156±14.2日、175±15.3日、192±4.0日を示した（表1）。全ヒトプリオンタンパク質を発現するKi-HuMマウスの潜伏期間が643±42.9日であるのに対して、著しく潜伏期間が短縮された。一方、導入遺伝子をもたないWild（野生型）マウスにおいては、発病したのは14例中わずか5例36%の発病率であり、その潜伏期間も759±69.8日間であった。

【0068】また、コドン129がバリオンとメチオニンのヘテロ型のヒト孤発例CJD(129V/M)-Suを接種されたノックインマウスでは潜伏期間141±5.3日であり、同じくヘテロ型の孤発例CJD(129V/M)-Phを接種されたトラン



スジェニックマウス 3 系統 ( Tg-ChM#30, Tg-ChV#12, Tg-ChV#21 ) ではそれぞれ、 $154 \pm 20.8$ 日、 $171 \pm 9.2$ 日、 $188 \pm 1.4$ 日の潜伏期間であった ( 表 1 )。

【 0 0 6 9 】

【 表 1 】

【表 1】ヒトプリオンの脳内投与による感染の成立

マウス	接種材料	潜伏期間		発病数頭 /接種頭数	感染率 (%)
		Dayst	SD		
Ki-ChM (ノックインマウス)	孤発例 CJD (129M/M) - H3	151†	6.7	7/7	100
	孤発例 CJD (129V/M) - Su	141†	5.3	5/5	100
Tg-ChM#30 (トランスジェニック)	孤発例 CJD (129M/M) - H3	156†	14.2	11/11	100
	孤発例 CJD (129V/M) - Ph	154†	20.8	5/5	100
Tg-ChV#12 (トランスジェニック)	孤発例 CJD (129M/M) - H3	175†	15.3	18/18	100
	孤発例 CJD (129V/M) - Ph	171†	9.2	10/10	100
Tg-ChV#21 (トランスジェニック)	孤発例 CJD (129M/M) - H3	192†	4.0	3/3	100
	孤発例 CJD (129V/M) - Ph	188†	1.4	2/2	100
Ki-HuM (ノックインマウス)	孤発例 CJD (129M/M) - H3	643†	42.9	4/4	100
Wild (野生型マウス)	孤発例 CJD (129M/M) - H3	759†	69.8	5/14*	36

10%ヒト脳乳劑をマウス脳内に 20μl 接種による

\* ) ほとんどのマウスで明確な臨床症状を欠いていたが、免疫組織診断で陽性と判定された個体は感染成立とみなし発病に加えた

【 0 0 7 0 】これらのことから、実施例 2 及び 3 で得られた本発明のノックインマウス及びトランスジェニックマウスはヒトプリオンに対して非常に高い感受性を要し、これまでの野生型マウスでは長い期間を要し、不確定であったヒトプリオンの感染性の証明が短期間で確実に実施できることが明らかとなった。特に、ノックインマウスではヒトプリオンタンパク質遺伝子の多型である 129 番目のコドンがメチオニンあるいはバリンヘテロ型どちらのヒトプリオンに対しても 150 日前後と、今までに見られない短い潜伏期間で感染が成立した。これは、ヒトのプリオンタンパク質遺伝子多型に対応できることを示す結果である。同時にこれらの感染潜伏期間はマウス順化株プリオンのマウスからマウスの感染潜伏期間に匹敵し、プリオン感染に存在する ‘種の壁’ を越えたと考えられる。さらに、全ヒト型のノックインマウス Ki-HuM の長い潜伏期間に対して、ノックインマウス Ki-ChM が著しい潜伏期間の短縮を示したことは、導入されたベクターとそれにより発現した組み換えヒトプリオンタンパク質が、このマウスの感受性を支配していることが明らかである。

【 0 0 7 1 】【実施例 5】 FDC における異常プリオンタンパク質の組織学的検出  
 実施例 2 及び 3 で得られたノックインマウス及びトランスジェニックマウスの発病後に FDC を調べたところ、トランスジェニックマウスでは異常プリオンタンパク質は検出されなかったが、ノックインマウスでは脾臓、リンパ節、腸管のリンパ装置 (パイエル氏板) の FDC にヒト型の異常プリオンタンパク質の沈着を認めた ( 図 2 A )。

【 0 0 7 2 】【実施例 6】 ウェスタンブロット法によ

る異常プリオンタンパク質の検出

本発明者等は更に、免疫染色で確認した脾臓への異常プリオンタンパク質の沈着を、ウェスタンブロット法においても検討し、ノックインマウスの脾臓において異常プリオンタンパク質の存在を確認した。実施例 2 で得られたノックインマウスを用い、感染させた脾臓、非感染 (対照) の脾臓、及び感染させた脳のウェスタンブロットを分析した。

【 0 0 7 3 】プロテイナーゼ K 処理後にウェスタンブロットにかけた場合、異常プリオンタンパク質からは 3 本のバンドが形成されることが知られている。図 3 に示すように、感染させた脾臓及び脳由来のサンプルでは、下から糖鎖のつかないもの、1ヶ所糖鎖がついたもの、2ヶ所糖鎖がついたものの 3 本のバンドが認められ、異常プリオンタンパク質が存在することが明らかであったが、非感染サンプルでは、相当するバンドは認められなかった。また、脳と比較して、脾臓での異常プリオンタンパク質の量は少ないことも示された。

【 0 0 7 4 】【実施例 7】 ヒト型プリオンタンパク質 C 末端に対する抗体による FDC の免疫染色実験  
 ヒト型プリオンタンパク質の C 末端に対するモノクローナル抗体を作製した。この抗体は、ヒトプリオンタンパク質 (配列番号 2) のコドン 215、219、220 を認識する抗体であり、マウスプリオンタンパク質のそれに相当するコドンのアミノ酸配列とは反応しない。実施例 2 で得られたノックインマウス (Ki-ChM) はこのコドン 215、219、220 がヒト型ではなく、マウス型に置換しているため、このモノクローナル抗体では反応せず、完全ヒト型プリオンタンパク質とのみ反応する。  
 このノックインマウスを、完全ヒト型の異常プリオンタ

ンパク質をもつ孤発例のCJDの脳乳剤で感染させた。FDCが単に接種した完全ヒト型の異常プリオンタンパク質を集積したのであれば、この抗体で染色されるはずであるが、実験ではノックインマウスの異常プリオンタンパク質を全く染めなかった。つまり、単に接種した完全ヒト型のプリオンタンパク質が集まったのではなく、ノックインマウス自身のC末がマウス型となったヒト型プリオンタンパク質が異常になったものがFDCで沈着していたのである。

【 0 0 7 5 】 [ 実施例 8 ] トランスジェニックマウスとノックインマウスの比較

実施例 5 でトランスジェニックマウスではFDCへの異常プリオンタンパク質の沈着が検出できず、ノックインマウスで検出できた理由を検討するために、脾臓での組み換えプリオンタンパク質の発現をウエスタンブロットで測定した。

【 0 0 7 6 】 ノックインマウス ( Ki - ChM ) の脾臓、及び脳においてノックインマウスと比較して組み換えプリオンタンパク質を 2 倍量発現しているトランスジェニックマウス ( Tg - ChV # 12 ) の脾臓での正常型プリオンタンパク質の発現量をウエスタンブロットで検討した。結果を図 6 に示す。図 6 において、 a - d はノックインマウス、 e はトランスジェニックマウスである。 d 及び e は同じ組織重量の脾臓の分画を電気泳動したもので、 d に対して c はその 50 %、 b は 25 %、 a は 12.5 % の組織重量の分画を電気泳動している。 e の免疫反応の強度は b にほぼ相当すると考えられ、トランスジェニックマウスではノックインマウスの約 2 5 % 程度しか発現していないことが明らかとなった。

【 0 0 7 7 】 この結果から、トランスジェニックマウスにおける発現分布は野生型マウスの発現分布と異なることが明らかとなり、トランスジェニックマウスでは、脾臓 ( FDC ) での組み換えプリオンタンパク質の発現が見

【表 2】 ヒトプリオン感染後発病マウスの感染性の確認

接 種 材 料	接種マウス	潜伏期間 (days ± SD)	発病頭数 /接種頭数
接種実験 1 ヒト孤発例 CJD、10%脳乳剤	Ki - ChM	151 ± 6.7	7/7
接種実験 2 発病マウス (接種実験 1) の 10%脳乳剤	Ki - ChM	123 ± 10.0	6/6
接種実験 3 発病マウス (接種実験 1) の 10%脾臓乳剤	Ki - ChM	156 ± 7.9	5/5

【 0 0 8 1 】 [ 実施例 1 0 ] FDCにおけるCJD患者の異常プリオン検出実験

CJD患者の凍結脳をリン酸緩衝液 ( PBS ) を用いて 10 % の濃度になるようにガラスホモゲナイザーで脳乳剤作成し、ノックインマウス ( Ki - ChM ) 腹腔内に 26 ゲージ針のシリンジを用いて 50 マイクロリットルずつ接種を行った。接種後 75 日に安楽死を施し、剖検した。剖検時に緩

られないのではなく、発現量が極めて少ないことから、トランスジェニックマウスでの脾臓のFDC陰性結果につながったものと考えられる。従って、適当な検出方法を用いることにより、本発明のトランスジェニック動物を用いてもFDCでの異常プリオンタンパク質の沈着を検出できることが示された。

【 0 0 7 8 】 [ 実施例 9 ] ヒトプリオン感染後発病マウスの感染性の確認

直接感染実験において、マウスの脳、脾臓に証明された異常プリオンタンパク質の感染性について証明した。孤発性CJD症例の10%脳乳剤を実施例 2 で得られたノックインマウス ( Ki - ChM ) に脳内接種し、発病したノックインマウス ( Ki - ChM ) の脳、脾臓をリン酸緩衝液 ( PBS ) を用いて 10 % の濃度になるようにガラスホモゲナイザーで脳乳剤作成し、麻酔下でノックインマウス ( Ki - ChM ) の右脳半球に 27 ゲージ針のシリンジを用いて 2 0 マイクロリットルずつ脳内接種を行った。本明細書中に記載の実施例すべてのマウス接種実験で行われている定法通り、接種後の観察記録で自発運動の減少、歩行失調、異常歩行、拳尾反応などの神経症状が現れ、進行し、削瘦、衰弱がみられた個体は安楽死の後、剖検、診断した。

【 0 0 7 9 】 その結果、発病マウス脳乳剤を接種したマウスでは 6 頭中 6 頭 ( 100 % ) が発病し、潜伏期間は 123 ± 10.0 日であった。一方、発病マウス脾臓乳剤を接種したマウスでも、 5 頭中 5 頭 ( 100 % ) が発病し、潜伏期間は 156 ± 7.9 日であった。この結果から明らかなごとく、ヒト脳乳剤を接種後発病したノックインマウス ( Ki - ChM ) の脳、脾臓 ( FDC ) には、異常タンパク質の沈着のみならず、感染力もあることが証明された ( 表 2 ) 。

【 0 0 8 0 】

【表 2】

衝ホルマリン固定を行った。主要臓器の一部は摂氏マイナス 7 0 度に凍結保存した。また、すべてのマウスは、プリオン専用の病理標本作製室にてパラフィン包埋、薄切後、HE染色ならびに発明者の考案したオートクレーブ法による免疫組織染色により、FDCにおける異常プリオンタンパク質沈着を検査した。

【 0 0 8 2 】 その結果、コドン 129 がメチオニンホモ型

のヒト孤発例CJD(129M/M)-H3、パリンとメチオニンのヘテロ型ヒト孤発例CJD(129V/M) - Su、ヒト硬膜移植例CJD-TMD-Du/cのいずれの症例のヒトプリオン接種においても、全てのKi-ChMマウスでFDCにおける異常プリオンタンパク質が検出され、検出率100%であった(表3)。  
**【0083】**  
**【表3】**  
**【表3】 FDCにおけるCJD患者の異常プリオン検出**

のヒト孤発例CJD(129M/M)-H3、パリンとメチオニンのヘテロ型ヒト孤発例CJD(129V/M) - Su、ヒト硬膜移植例CJD-TMD-Du/cのいずれの症例のヒトプリオン接種においても、全てのKi-ChMマウスでFDCにおける異常プリオンタンパク質が検出され、検出率100%であった(表3)。  
**【0083】**  
**【表3】**

接種材料	接種マウス	接種後日数	FDC 陽性数 / 検査頭数	検出率
孤発例 CJD (129M/M) - H3 ヒト 10% 脳乳剤	Ki-ChM	75	5/5	100%
孤発例 CJD (129V/M) - Su ヒト 10% 脳乳剤	Ki-ChM	75	5/5	100%
硬膜移植後 CJD-TMD-Du/c ヒト 10% 脳乳剤	Ki-ChM	75	6/6	100%

10%ヒト脳乳剤をマウス腹腔内に50μl接種による

**【0084】 [実施例11]** 硬膜移植例CJDの感染  
 硬膜移植後CJDを発症し確定診断された患者の凍結脳(CJD-TMD-Du/c)をリン酸緩衝液(PBS)を用いて10%の濃度になるようにガラスホモゲナイザーで脳乳剤作成し、ノックインマウス(Ki-ChM)の腹腔内に26ゲージ針のシリンジを用いて50マイクロリットルずつ接種を行った。接種後75日に安楽死を施し、剖検した。剖検時に緩衝ホルマリン固定を行った。主要臓器の一部は摂氏マイナス70度に凍結保存した。また、すべてのマウスは、プリオン専用の病理標本作製室にてパラフィン包埋、薄切後、HE染色ならびに発明者の考案したオートクレーブ法による免疫組織染色により、FDCにおける異常プリオンタンパク質沈着を検査した。その結果、5頭接種した全Ki-ChMマウスの脾臓FDCに異常プリオンタンパク質が検出された(表3)。

20  
30

を除去するために摂氏60度30分間を保持した後、接種までの間、摂氏マイナス70度に凍結保存した。接種に際して、解凍し、ノックインマウス(Ki-ChM)腹腔内に26ゲージ針のシリンジを用いて50マイクロリットルずつ接種を行った。接種後75日に安楽死を施し、剖検した。剖検時に緩衝ホルマリン固定を行った。主要臓器の一部は摂氏マイナス70度に凍結保存した。また、すべてのマウスは、プリオン専用の病理標本作製室にてパラフィン包埋、薄切後、HE染色ならびに発明者の考案したオートクレーブ法による免疫組織染色により、FDCにおける異常プリオンタンパク質沈着を検査した。

**【0086】** その結果、3例のnvCJD患者脳、nv-96/02、nv-96/07、nv-96/45について、それぞれ5頭中5頭、4頭中4頭、4頭中4頭と、100%の検出率で異常プリオンタンパク質が検出された。本発明のノックインマウス(Ki-ChM)のFDCを用いた新しいバイオアッセイ法は英国のnvCJD患者由来プリオンの診断にも有用であった(表4)。

**【0087】**  
**【表4】**

**【0085】 [実施例12]** 英国nvCJD患者由来の異常プリオン検出  
 英国で牛のBSE由来ではないかと推定されている変異型CJD(以下、nvCJDと略す)患者の凍結脳をリン酸緩衝液(PBS)を用いて10%の濃度になるようにガラスホモゲナイザーで脳乳剤を作成し、プリオン以外の感染性因子  
**【表4】 英国 nvCJD 患者の異常プリオン検出**

接種材料	接種マウス	接種後日数	FDC 陽性数 / 検査頭数	検出率
英国 nvCJD ヒト 10% 脳乳剤 nv-96/02	Ki-ChM	75	5/5	100%
英国 nvCJD ヒト 10% 脳乳剤 nv-96/07	Ki-ChM	75	4/4	100%
英国 nvCJD ヒト 10% 脳乳剤 nv-96/45	Ki-ChM	75	4/4	100%

10%ヒト脳乳剤をマウス腹腔内に50μl接種による

**【0088】 [実施例13]** アッセイ系の検討1(脳内投与及び腹腔内投与)

ヒトCJD患者の凍結脳をリン酸緩衝液(PBS)を用いて10%の濃度になるようにガラスホモゲナイザーで脳乳剤を

作成し、プリオン以外の感染性因子を除去するために摂氏60度30分間を保持した後、接種までの間、摂氏マイナス70度に凍結保存した。接種時に解凍し、麻酔下で実施例2で得られたノックインマウス (Ki-ChM) の右脳半球に27ゲージ針のシリンジを用いて20マイクロリットルずつ脳内接種を行った。接種後の観察記録で自発運動の減少、歩行失調、異常歩行、拳尾反応などの神経症状が現れ、進行し、消瘦、衰弱がみられた個体は安楽死の後、剖検した。神経症状が現れて安楽死までの期間は平均21日程度を要した。潜伏期間は接種日を0日とし安楽

【表5】アッセイ系の検討1 (脳内および腹腔内接種)

接種材料	接種マウス	接種ルート	潜伏期間 (days±SD)	発病頭数 /接種頭数
孤発例 CJD (129M/M)、ヒト10%脳乳剤 -H3	Ki-ChM	脳内	151± 6.7	7/7
孤発例 CJD (129M/M)、ヒト10%脳乳剤 -H3	Ki-ChM	腹腔内	283± 9.2	11/11
孤発例 CJD (129V/M)、ヒト10%脳乳剤 -Su	Ki-ChM	脳内	141± 5.3	5/5
孤発例 CJD (129V/M, M232R)、ヒト10%脳乳剤 TMD-232	Ki-ChM	脳内	177± 4.9	4/4
硬膜移植後 CJD、ヒト10%脳乳剤 TMD-Du/C	Ki-ChM	脳内	167± 24.7	6/6

【0090】その結果、ノックインマウスのうち、コドン129がメチオニンホモ型であるヒト孤発例CJD(129M/M) -H3を接種されたマウスでは、潜伏期間は151 ± 6.7日であり、腹腔内接種では潜伏期間は延長したが、283 ± 9.2日で11頭全てが発病した。また、コドン129がバリンとメチオニンのヘテロ型のヒト孤発例CJD(129V/M) -Suを接種されたノックインマウスでは潜伏期間141 ± 5.3日であった。ヘテロ型でコドン232のメチオニンがアルギニンに変換した遺伝子変異をもつヒト脳乳剤では潜伏期間はやや延長し、177 ± 4.9日を呈したが、全例発病した。硬膜移植後のCJDヒト10%脳乳剤TMD-Du/Cも167 ± 24.7日の潜伏期間で発病した。

【0091】これらのことから、本発明のノックインマウス、Ki-ChMは種々のタイプのヒトプリオンに対して高い感受性を有することが明らかになった。また、接種ルートも脳内のみならず、腹腔内接種でも感受性を有することから、様々の末梢からの感染に関してもヒトプリオンの感受性を有することが予測できる。

【0092】【実施例14】アッセイ系の検討2 - 経時的観察

孤発例CJDヒト凍結脳をリン酸緩衝液 (PBS) を用いて10%の濃度になるようにガラスホモゲナイザーで脳乳剤を作成し、プリオン以外の感染性因子を除去するために摂氏60度30分間を保持した後、接種までの間、摂氏マイナ

死までの期間とした。剖検時に緩衝ホルマリン固定以外に、主要臓器の一部は摂氏マイナス70度に凍結保存した。また、すべてのマウスは、プリオン専用の病理標本作製室にてパラフィン包埋、薄切後、HE染色ならびに発明者の考案したオートクレーブ法による免疫組織染色により、病変と異常プリオンタンパク質沈着による組織診断を行い、プリオン病の有無を確認した。

【0089】

【表5】

ス70度に凍結保存した。接種時に解凍し、実施例2で得られたノックインマウス (Ki-ChM) の腹腔内に26ゲージ針のシリンジを用いて50マイクロリットルずつ接種を行った。接種後14日、31日、44日、60日、75日、150日に安楽死させた。剖検時に緩衝ホルマリン固定以外に、主要臓器の一部は摂氏マイナス70度に凍結保存した。また、すべてのマウスは、プリオン専用の病理標本作製室にてパラフィン包埋、薄切後、HE染色ならびに本発明者の考案したオートクレーブ法による免疫組織染色により、病変と異常プリオンタンパク質の検出を行った。

【0093】その結果、免疫組織染色で接種後14日のノックインマウス (Ki-ChM) 4頭中2頭 (50%) のFDCに異常プリオンタンパク質の沈着が認められた。以降、31日から150日まで、全ての接種マウスのFDCに異常プリオンタンパク質が陽性であった。しかしながら、標的臓器である中枢神経系においては14日から150日に至るまで異常プリオンタンパク質の検出、その他の病理組織学的変化は認められなかった。

【0094】本発明のノックインマウス (Ki-ChM) を用いたFDCによるバイオアッセイ法では14日という非常に短い期間で、異常プリオンタンパク質が検出でき、これは持続して検出できることが明らかである (表6)。

【0095】

【表6】

10

30

40

【表 6】Ki-ChM マウス FDC における異常プリオンタンパク質の経時的検出

投与後の日数	FDC 陽性数/検査頭数	検 出 率
14 日	2/4	50%
31 日	6/6	100%
44 日	7/7	100%
60 日	6/6	100%
75 日	5/5	100%
150 日	7/7	100%

【0096】【実施例15】 アッセイ系の検討3 - 濃度の検討

実施例14により、孤発性CJDヒト10%脳乳剤を使い、最短14日で本発明のノックインマウス(Ki-ChM)のFDCで異常プリオンタンパク質の沈着が検出できることを明らかにしたが、次に、接種材料の希釈によりどのくらいの濃度まで検出できるかを検討した。

【0097】上述の孤発性CJDヒト10%(10倍希釈)凍結脳乳剤を解凍し、同じPBSにて1%(100倍希釈)、0.1%(1,000倍希釈)、0.01%(10,000倍希釈)液を調整し、実施例2で得られたノックインマウス(Ki-ChM)の腹腔内に26ゲージ針のシリンジを用いて50マイクロリットルずつ接種を行った。接種後75日に安楽死させ、緩衝ホルマリン液に固定した。標本はプリオン専用の病理標本作製室にてパラフィン包埋、薄切後、本発明者の考案したオートクレーブ法による免疫組織染色により、異常プリオンタンパク質の検出を行った。

【0098】その結果、0.01%(10,000倍希釈)でも80%以上の個体でFDCに異常プリオンタンパク質が検出された。このことから、本発明のノックインマウス(Ki-ChM)のFDCを用いることによって、10,000倍以上の希釈を行っても孤発性CJDヒト脳の感染性を検出することが可能であることが示された。

【0099】【実施例16】 ノックインマウスKi-ChMとKi-HuMの感受性の比較

実施例2で作製した2系統のノックインマウスKi-ChMとKi-HuMを用いて脳内接種と腹腔内接種による感受性の比較試験を行った。すなわち、孤発性CJD症例CJD(129M/M)-H3の10%脳乳剤を実施例2で得られたノックインマウスKi-ChMとKi-HuMの右脳半球に27ゲージ針のシリンジを用いて20マイクロリットルずつ脳内接種を行った。ま

た、腹腔内には26ゲージのシリンジを用いて50マイクロリットルずつ接種した。

【0100】脳内接種では、本明細書中に記載の実施例すべてのマウス接種実験で行われている定法通り、接種後の観察記録で自発運動の減少、歩行失調、異常歩行、挙尾反応などの神経症状が現れ、進行し、消瘦、衰弱がみられた個体は安楽死の後、剖検、診断した。潜伏期間は接種日を0日とし安楽死までの期間とした。剖検時に緩衝ホルマリン固定以外に、主要臓器の一部は摂氏マイナス70度に凍結保存した。

【0101】腹腔内接種では接種後75日に安楽死を施し、剖検した。剖検時に緩衝ホルマリン固定を行った。主要臓器の一部は摂氏マイナス70度に凍結保存した。また、すべてのマウスは、プリオン専用の病理標本作製室にてパラフィン包埋、薄切後、HE染色ならびに発明者の考案したオートクレーブ法による免疫組織染色により、FDCにおける異常プリオンタンパク質の沈着を検査した。

【0102】その結果、ヘテロ接合体のヒト型ノックインマウスKi-ChMは151±6.7日の潜伏期間で全例発症した。一方、完全なヒトプリオンタンパク質(配列番号10、通常5回ある8アミノ酸の繰り返し配列が4回となっている)を発現するノックインマウスKi-HuMでは、全例発症したものの非常に長い潜伏期間643±42.9日を要した。腹腔内接種75日後の脾臓のFDCにおける免疫組織染色ではKi-ChMは100%(5頭中5頭)に異常プリオンタンパク質を検出できたが、Ki-HuMでは80%(5頭中4頭)の検出率にとどまった(表7)。

【0103】

【表7】

ノックインマウスKi-ChMとKi-HuMの感受性比較

マウスの系統		Ki-ChM	Ki-HuM
接種ルート			
脳内接種	潜伏期間 発症数	151±6.7 7/7 (100%)	643±42.9 4/4 (100%)
腹腔内接種	FDC陽性 (75日後)	5/5 (100%)	4/5 (100%)

いずれも孤発例CJD (129M/M) -H3、10%脳乳剤を接種

【0104】脳内接種の潜伏期間と75日後のFDCにおける異常プリオンタンパク質検出率をあわせて考えると、ノックインマウスではコンストラクトの如何に関わらずFDCにおける異常プリオンタンパク質沈着が必ず起こることが明らかとなった。つまり、FDCにプリオンタンパク質が有効に発現するノックイン法を使えば、脳でプリオンタンパク質の異常化の起こりにくい完全ヒト型の動物でも、FDCではある程度有効に異常化が見とめられることが明らかになったわけである。また同時に、潜伏期間の長い系統、すなわち脳での異常化が起こりにくい完全ヒト型の動物でのFDCの陽性率が100%とならないことは、FDCにおける異常プリオンタンパク質の沈着も、マウスのヒトプリオンに対する感受性を反映しており、完全ヒト型のプリオンタンパク質の異常化の起こりにくさの反映でもある。

【0105】

【発明の効果】上記の如く、本発明により、ヒトのプリオンタンパク質に対して従来になく非常に高い感受性を有する動物モデルを作製することができた。また、この動物モデルの使用により、ヒトに対するプリオン病の安全性試験において使用できる新規なスクリーニング方法を提供することができた。

【0106】本発明によって得られたノックイン動物

は、nvCJDの異常プリオンタンパク質のアッセイ系としても非常に優れたものである。特に、腹腔内投与においては、脳内投与と比較して感染因子の接種量を100倍に上げることができ、感染力が低いと考えられる血液でも大量に投与することによって、その感染力を調べることができる。従って本発明のノックイン動物は、ヒトまたはヒト以外の動物由来の血液または臓器から作られる製剤の最終的な安全性試験に必須のものとなることが期待される。

【0107】nvCJDは、ウシ・プリオンタンパク質を経口接種することによってまず扁桃、及び消化器官のリンパ装置のFDCに異常プリオンタンパク質が沈着し、このFDCから脳へ異常プリオンタンパク質が運ばれると考えられている。本発明で得られたノックイン動物は、このnvCJDと同様に末梢の経路からFDCに異常プリオンタンパク質の沈着を起こし、脳へ異常プリオンタンパク質が運ばれて発病することがヒトプリオン感染で証明できたものである。従ってこのモデルは、単に迅速なバイオアッセイの確立だけでなく、将来的にはFDCから脳への異常プリオンタンパク質の移行をブロックする薬剤の開発のスクリーニング系としても役立つものと考えられる。

【0108】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

- <110> President of Tohoku University
- <120> Method of Screening for Infection Factor of Prion Disease
- <130> P00-0219
- <160> 10
- <170> PatentIn Ver. 2.0
- <210> 1
- <211> 762
- <212> DNA
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(762)
- <400> 1

29	30
atg gcg aac ctt ggc tgc tgg atg ctg gtt ctc ttt gtg gcc aca tgg	48
Met Ala Asn Leu Gly Cys Trp Met Leu Val Leu Phe Val Ala Thr Trp	
1                    5                    10                    15	
agt gac ctg ggc ctc tgc aag aag cgc ccg aag cct gga gga tgg aac	96
Ser Asp Leu Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn	
20                    25                    30	
act ggg ggc agc cga tac ccg ggg cag ggc agc cct gga ggc aac cgc	144
Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg	
35                    40                    45	
tac cca cct cag ggc ggt ggt ggc tgg ggg cag cct cat ggt ggt ggc	192
Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly	
50                    55                    60	
tgg ggg cag cct cat ggt ggt ggc tgg ggg cag ccc cat ggt ggt ggc	240
Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly	
65                    70                    75                    80	
tgg gga cag cct cat ggt ggt ggc tgg ggt caa gga ggt ggc acc cac	288
Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His	
85                    90                    95	
agt cag tgg aac aag ccg agt aag cca aaa acc aac atg aag cac atg	336
Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met	
100                    105                    110	
gct ggt gct gca gca gct ggg gca gtg gtg ggg ggc ctt ggc ggc tac	384
Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr	
115                    120                    125	
atg ctg gga agt gcc atg agc agg ccc atc ata cat ttc ggc agt gac	432
Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Ile Ile His Phe Gly Ser Asp	
130                    135                    140	
tat gag gac cgt tac tat cgt gaa aac atg cac cgt tac ccc aac caa	480
Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met His Arg Tyr Pro Asn Gln	
145                    150                    155                    160	
gtg tac tac agg ccc atg gat gag tac agc aac cag aac aac ttt gtg	528
Val Tyr Tyr Arg Pro Met Asp Glu Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val	
165                    170                    175	
cac gac tgc gtc aat atc aca atc aag cag cac acg gtc acc aca acc	576
His Asp Cys Val Asn Ile Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr	
180                    185                    190	
acc aag ggg gag aac ttc acc gag acc gac gtt aag atg atg gag cgc	624
Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg	
195                    200                    205	
gtg gtt gag cag atg tgt atc acc cag tac gag agg gaa tct cag gcc	672
Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln Tyr Glu Arg Glu Ser Gln Ala	
210                    215                    220	
tat tac cag aga gga tcg agc atg gtc ctc ttc tcc tct cca cct gtg	720
Tyr Tyr Gln Arg Gly Ser Ser Met Val Leu Phe Ser Ser Pro Pro Val	
225                    230                    235                    240	
atc ctc ctg atc tct ttc ctc atc ttc ctg ata gtg gga tga	762
Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly	
245                    250	

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 253





33 34

Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met Ala Gly Ala Ala Ala Ala  
85 90 95

Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met  
100 105 110

Ser Arg Pro Ile Ile His Phe Gly Ser Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr  
115 120 125

Arg Glu Asn Met His Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Met  
130 135 140

Asp Glu Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile  
145 150 155 160

Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe  
165 170 175

Thr Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys  
180 185 190

Ile Thr Gln Tyr Glu Arg Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly Ser  
195 200 205

<210> 4  
<211> 768  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Chimera-type prion gene  
<220>  
<221> CDS  
<222> (1)..(768)

<400> 4

atg gcg aac ctt ggc tac tgg ctg ctg gcc ctc ttt gtg act atg tgg 48  
Met Ala Asn Leu Gly Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Thr Met Trp  
1 5 10 15

act gat gtc ggc ctc tgc aaa aag cgg cca aag cct gga ggg tgg aac 96  
Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn  
20 25 30

acc ggt gga agc cgg tat ccc ggg cag ggc agc cct gga ggc aac cgc 144  
Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg  
35 40 45

tac cca cct cag ggc ggt ggt ggc tgg ggg cag cct cat ggt ggt ggc 192  
Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly  
50 55 60

tgg ggg cag cct cat ggt ggt ggc tgg ggg cag ccc cat ggt ggt ggc 240  
Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly  
65 70 75 80

tgg gga cag cct cat ggt ggt ggc tgg ggt caa gga ggt ggc acc cac 288  
Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His  
85 90 95

agt cag tgg aac aag ccg agt aag cca aaa acc aac atg aag cac atg 336  
Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met  
100 105 110

gct ggt gct gca gca gct ggg gca gtg gtg ggg ggc ctt ggc ggc tac 384

35 36

Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr  
115 120 125

rtg ctg gga agt gcc atg agc agg ccc atc ata cat ttc ggc agt gac 432  
Xaa Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Ile Ile His Phe Gly Ser Asp  
130 135 140

tat gag gac cgt tac tat cgt gaa aac atg cac cgt tac ccc aac caa 480

Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met His Arg Tyr Pro Asn Gln  
145 150 155 160

gtg tac tac agg ccc atg gat gag tac agc aac cag aac aac ttt gtg 528  
Val Tyr Tyr Arg Pro Met Asp Glu Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val  
165 170 175

cac gac tgc gtc aat atc aca atc aag cag cac acg gtc acc acc acc 576  
His Asp Cys Val Asn Ile Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr  
180 185 190

acc aag ggg gag aac ttc acc gag acc gat gtg aag atg atg gag cgc 624  
Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg  
195 200 205

gtg gtg gag cag atg tgc gtc acc cag tac cag aag gag tcc cag gcc 672  
Val Val Glu Gln Met Cys Val Thr Gln Tyr Gln Lys Glu Ser Gln Ala  
210 215 220

tat tac gac ggg aga aga tcc agc agc acc gtg ctt ttc tcc tcc cct 720  
Tyr Tyr Asp Gly Arg Arg Ser Ser Ser Thr Val Leu Phe Ser Ser Pro  
225 230 235 240

cct gtc atc ctc ctc atc tcc ttc ctc atc ttc ctg atc gtg gga tga 768  
Pro Val Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly  
245 250 255

<210> 5  
<211> 255  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Description of Artificial Sequence:Chimera-type prion protein  
<220>  
<221> VARIANT  
<222> 129  
<223> Xaa=Met or Val  
<400> 5

Met Ala Asn Leu Gly Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Thr Met Trp  
1 5 10 15

Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn  
20 25 30

Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg  
35 40 45

Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly  
50 55 60

Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly  
65 70 75 80

Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His  
85 90 95

37  
 Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met  
                   100                                  105                                  110  
 Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr  
                   115                                  120                                  125  
 Xaa Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Ile Ile His Phe Gly Ser Asp  
                   130                                  135                                  140  
 Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met His Arg Tyr Pro Asn Gln  
 145                                  150                                  155                                  160  
 Val Tyr Tyr Arg Pro Met Asp Glu Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val  
                                   165                                  170                                  175  
 His Asp Cys Val Asn Ile Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr  
                                   180                                  185                                  190  
 Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg  
                   195                                  200                                  205  
 Val Val Glu Gln Met Cys Val Thr Gln Tyr Gln Lys Glu Ser Gln Ala  
                   210                                  215                                  220  
 Tyr Tyr Asp Gly Arg Arg Ser Ser Ser Thr Val Leu Phe Ser Ser Pro  
 225                                  230                                  235                                  240  
 Pro Val Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly  
                                   245                                  250                                  255

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 209

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:ChM-type prion protein

&lt;400&gt; 6

Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr  
   1                                  5                                  10                                  15  
 Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly  
                   20                                  25                                  30  
 Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly  
                   35                                  40                                  45  
 Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly  
                   50                                  55                                  60  
 Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His Ser Gln Trp Asn Lys Pro  
 65                                  70                                  75                                  80  
 Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met Ala Gly Ala Ala Ala Ala  
                                   85                                  90                                  95  
 Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met  
                   100                                  105                                  110  
 Ser Arg Pro Ile Ile His Phe Gly Ser Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr  
                   115                                  120                                  125  
 Arg Glu Asn Met His Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Met  
                   130                                  135                                  140  
 Asp Glu Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile  
 145                                  150                                  155                                  160  
 Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe  
                                   165                                  170                                  175  
 Thr Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys

39 180 185 190  
 Val Thr Gln Tyr Gln Lys Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Asp Gly Arg Arg  
 195 200 205

Ser  
 <210> 7  
 <211> 209  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:ChV type prion protein  
 <400> 7

Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr  
 1 5 10 15  
 Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly  
 20 25 30  
 Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly  
 35 40 45  
 Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly  
 50 55 60  
 Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His Ser Gln Trp Asn Lys Pro  
 65 70 75 80  
 Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys His Met Ala Gly Ala Ala Ala Ala  
 85 90 95  
 Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Val Leu Gly Ser Ala Met  
 100 105 110  
 Ser Arg Pro Ile Ile His Phe Gly Ser Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr  
 115 120 125  
 Arg Glu Asn Met His Arg Tyr Pro Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Met  
 130 135 140  
 Asp Glu Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile  
 145 150 155 160  
 Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe  
 165 170 175  
 Thr Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys  
 180 185 190  
 Val Thr Gln Tyr Gln Lys Glu Ser Gln Ala Tyr Tyr Asp Gly Arg Arg  
 195 200 205

Ser  
 <210> 8  
 <211> 765  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(765)  
 <400> 8

atg gcg aac ctt ggc tac tgg ctg ctg gcc ctc ttt gtg act atg tgg 48  
 Met Ala Asn Leu Gly Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Thr Met Trp  
 1 5 10 15  
 act gat gtc ggc ctc tgc aaa aag cgg cca aag cct gga ggg tgg aac 96

41  
 Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn  
 20 25 30  
 acc ggt gga agc cgg tat ccc ggg cag gga agc cct gga ggc aac cgt 144  
 Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg  
 35 40 45  
 tac cca cct cag ggt ggc acc tgg ggg cag ccc cac ggt ggt ggc tgg 192  
 Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Thr Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp  
 50 55 60  
 gga caa ccc cat ggg ggc agc tgg gga caa cct cat ggt ggt agt tgg 240  
 Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp  
 65 70 75 80  
 ggt cag ccc cat ggc ggt gga tgg ggc caa gga ggg ggt acc cat aat 288  
 Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His Asn  
 85 90 95  
 cag tgg aac aag ccc agc aaa cca aaa acc aac ctc aag cat gtg gca 336  
 Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Leu Lys His Val Ala  
 100 105 110  
 ggg gct gcg gca gct ggg gca gta gtg ggg ggc ctt ggt ggc tac atg 384  
 Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met  
 115 120 125  
 ctg ggg agc gcc gtg agc agg ccc atg atc cat ttt ggc aac gac tgg 432  
 Leu Gly Ser Ala Val Ser Arg Pro Met Ile His Phe Gly Asn Asp Trp  
 130 135 140  
 gag gac cgc tac tac cgt gaa aac atg tac cgc tac cct aac caa gtg 480  
 Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Tyr Pro Asn Gln Val  
 145 150 155 160  
 tac tac agg cca gtg gat cag tac agc aac cag aac aac ttc gtg cac 528  
 Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His  
 165 170 175  
 gac tgc gtc aat atc acc atc aag cag cac acg gtc acc acc acc acc 576  
 Asp Cys Val Asn Ile Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr  
 180 185 190  
 aag ggg gag aac ttc acc gag acc gat gtg aag atg atg gag cgc gtg 624  
 Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg Val  
 195 200 205  
 gtg gag cag atg tgc gtc acc cag tac cag aag gag tcc cag gcc tat 672  
 Val Glu Gln Met Cys Val Thr Gln Tyr Gln Lys Glu Ser Gln Ala Tyr  
 210 215 220  
 tac gac ggg aga aga tcc agc agc acc gtg ctt ttc tcc tcc cct cct 720  
 Tyr Asp Gly Arg Arg Ser Ser Thr Val Leu Phe Ser Ser Pro Pro  
 225 230 235 240  
 gtc atc ctc ctc atc tcc ttc ctc atc ttc ctg atc gtg gga tga 765  
 Val Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly  
 245 250 255

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 254

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 9

Met Ala Asn Leu Gly Tyr Trp Leu Leu Ala Leu Phe Val Thr Met Trp

43 44

1 5 10 15

Thr Asp Val Gly Leu Cys Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn

20 25 30

Thr Gly Gly Ser Arg Tyr Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg

35 40 45

Tyr Pro Pro Gln Gly Gly Thr Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp

50 55 60

Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Ser Trp

65 70 75 80

Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly Thr His Asn

85 90 95

Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Leu Lys His Val Ala

100 105 110

Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly Gly Tyr Met

115 120 125

Leu Gly Ser Ala Val Ser Arg Pro Met Ile His Phe Gly Asn Asp Trp

130 135 140

Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met Tyr Arg Tyr Pro Asn Gln Val

145 150 155 160

Tyr Tyr Arg Pro Val Asp Gln Tyr Ser Asn Gln Asn Asn Phe Val His

165 170 175

Asp Cys Val Asn Ile Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr Thr Thr Thr

180 185 190

Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Val Lys Met Met Glu Arg Val

195 200 205

Val Glu Gln Met Cys Val Thr Gln Tyr Gln Lys Glu Ser Gln Ala Tyr

210 215 220

Tyr Asp Gly Arg Arg Ser Ser Ser Thr Val Leu Phe Ser Ser Pro Pro

225 230 235 240

Val Ile Leu Leu Ile Ser Phe Leu Ile Phe Leu Ile Val Gly

245 250

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 200

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 10

Lys Lys Arg Pro Lys Pro Gly Gly Trp Asn Thr Gly Gly Ser Arg Tyr

1 5 10 15

Pro Gly Gln Gly Ser Pro Gly Gly Asn Arg Tyr Pro Pro Gln Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly

35 40 45

Gly Gly Trp Gly Gln Pro His Gly Gly Gly Trp Gly Gln Gly Gly Gly

50 55 60

Thr His Ser Gln Trp Asn Lys Pro Ser Lys Pro Lys Thr Asn Met Lys

65 70 75 80

His Met Ala Gly Ala Ala Ala Ala Gly Ala Val Val Gly Gly Leu Gly

85 90 95

Gly Tyr Met Leu Gly Ser Ala Met Ser Arg Pro Ile Ile His Phe Gly

100 105 110



45  
 Ser Asp Tyr Glu Asp Arg Tyr Tyr Arg Glu Asn Met His Arg Tyr Pro  
 115 120 125  
 Asn Gln Val Tyr Tyr Arg Pro Met Asp Glu Tyr Ser Asn Gln Asn Asn  
 130 135 140  
 Phe Val His Asp Cys Val Asn Ile Thr Ile Lys Gln His Thr Val Thr  
 145 150 155 160  
 Thr Thr Thr Lys Gly Glu Asn Phe Thr Glu Thr Asp Val Lys Met Met  
 165 170 175  
 Glu Arg Val Val Glu Gln Met Cys Ile Thr Gln Tyr Glu Arg Glu Ser  
 180 185 190  
 Gln Ala Tyr Tyr Gln Arg Gly Ser  
 195 200

46

【 0 1 0 9 】

【配列表フリーテキスト】

配列番号 4 : キメラ型プリオン遺伝子

配列番号 5 : キメラ型プリオンタンパク質

配列番号 6 : ChM-型プリオンタンパク質

配列番号 7 : ChV-型プリオンタンパク質

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の組み換えプリオンタンパク質の構造を示す模式図である。

【図 2】( A ) FDCへの異常プリオンタンパク質の沈着を示す。

( B ) ヒト型プリオンタンパク質の C 末端を認識する抗

体による免疫染色を示す。

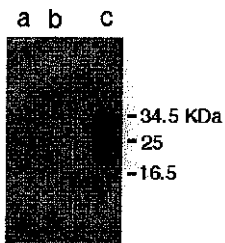
【図 3】異常プリオンタンパク質による脾臓及び脳の感染をウエスタンブロットにより示す。

【図 4】本発明のノックイン動物作製に用いられるベクター（ノックインベクター）及び相同組み換え、Cre-誘導型組み換えによるヒト化の一例を示す。

【図 5】本発明に用いたトランスジェニックベクターの構造を示す。

【図 6】ノックインマウス及びトランスジェニックマウスの脾臓における組み換えプリオンタンパク質の発現をウエスタンブロットにより示す。

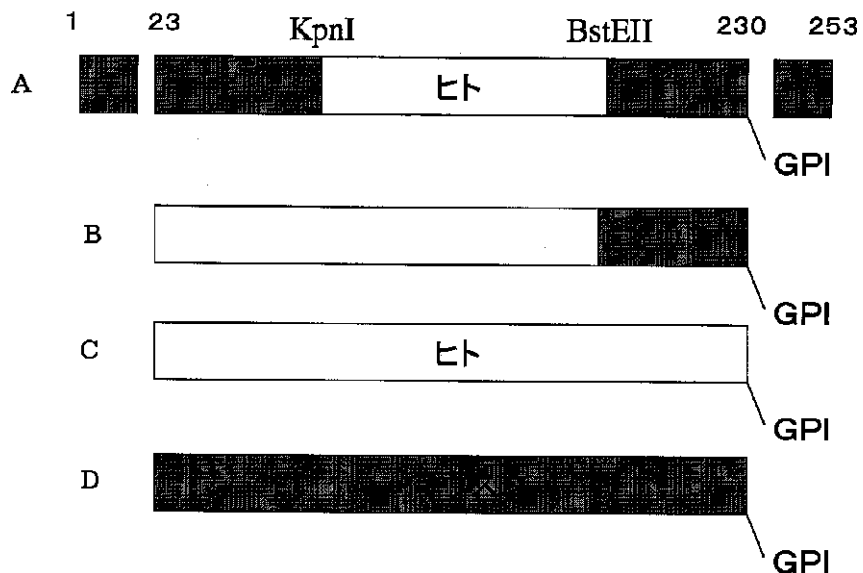
【図 3】



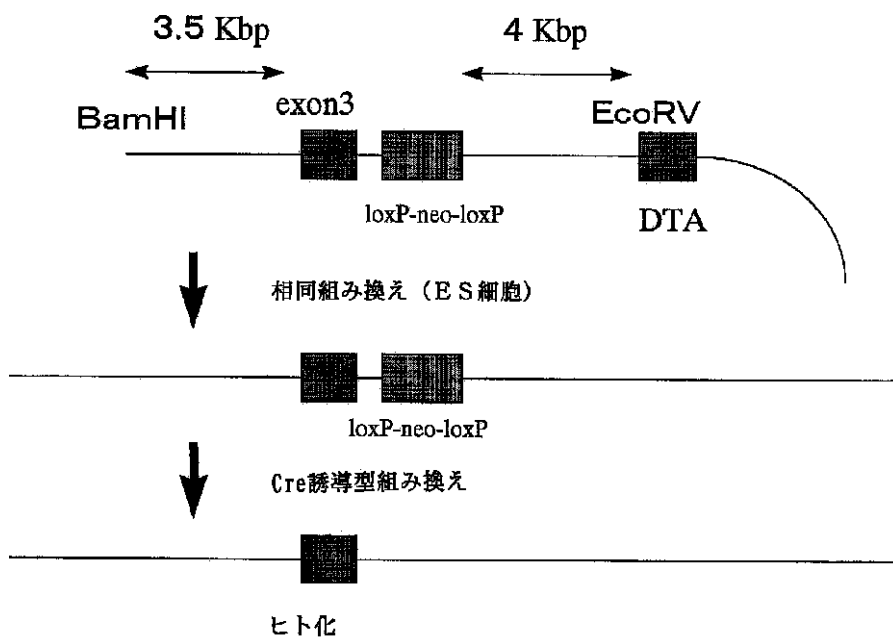
a : 感染脾臓  
b : 対照脾臓  
c : 感染脳

【図 1】

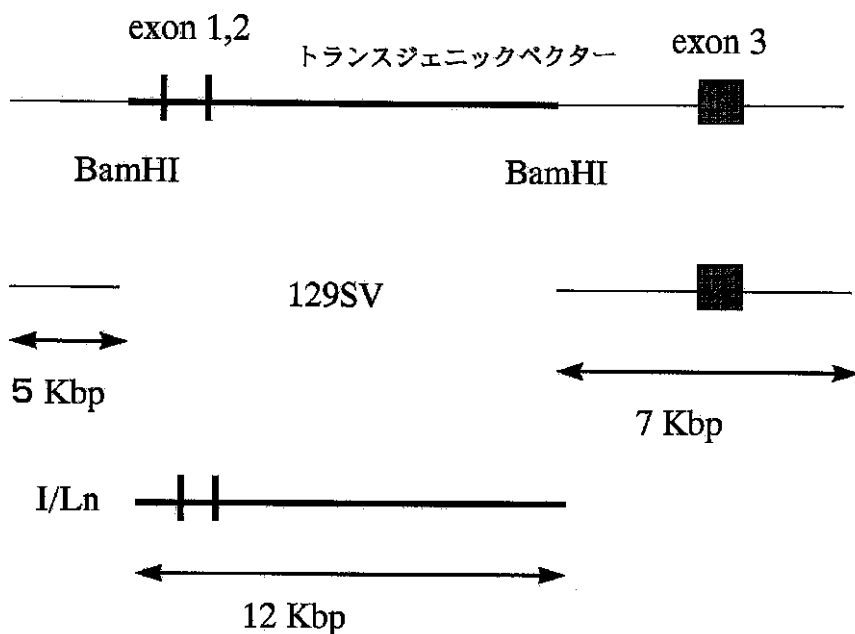
レコンビナント・プリオン蛋白の構造



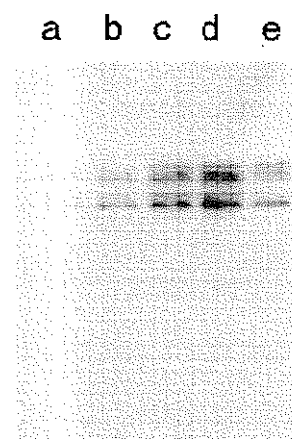
【図 4】



【図 5】

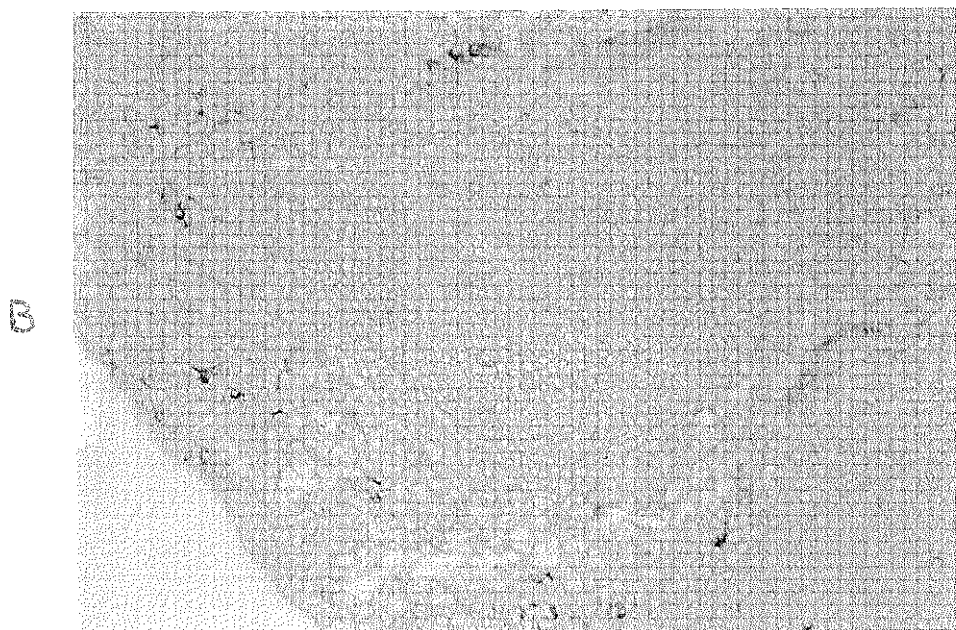
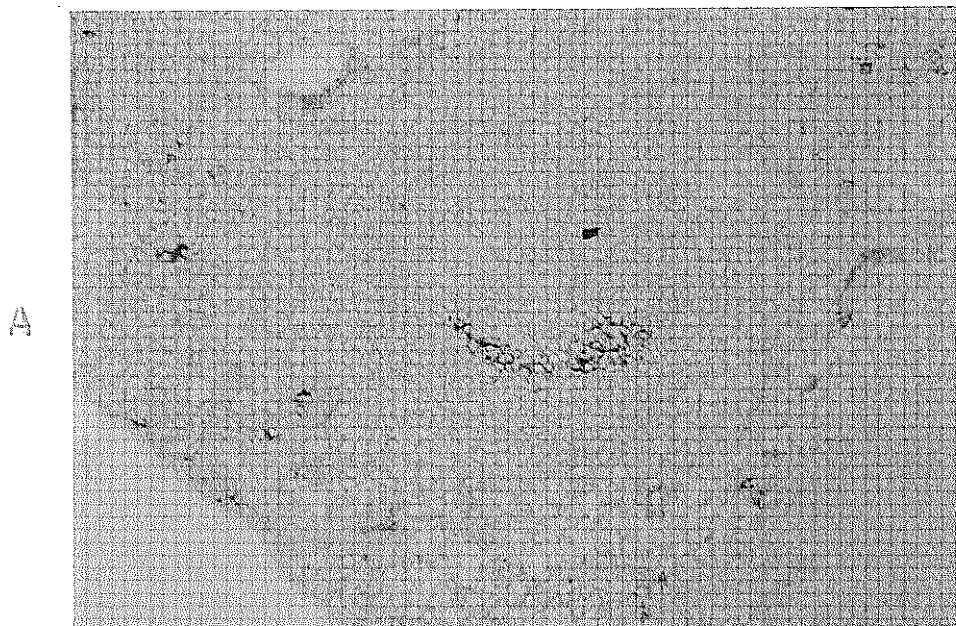


【図 6】



- a : Ki-ChM脾臓 12.5%
- b : Ki-ChM脾臓 25%
- c : Ki-ChM脾臓 50%
- d : Ki-ChM脾臓 100%
- e : Tg129#12脾臓 100%

【 図 2 】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

G 0 1 N 33/50

G 0 1 N 33/569

Z

33/569

C 1 2 R 1:91

// C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/00

Z N A A

( C 1 2 N 5/10

5/00

B

C 1 2 R 1:91)

- (56)参考文献 特表2000 - 517193 ( J P , A )  
 北本哲之, マウス・プリオンの F D C  
 における初期沈着, 厚生省特定疾患 遅  
 発性ウイルス感染調査研究班 平成 8 年  
 度研究報告書, 1997年 3月  
 中村健司, 脳機能の異常の発現の解析  
 モデル系の開発に関する研究, 脳機能の  
 外来因子による異常発現機構解明のため  
 の技術開発に関する研究 ( 第 I I 期:  
 平成 7 ~ 9 年度 ) 成果, 1999年 3月,  
 221 - 228  
 糸原重美, アストロサイト変異マウス  
 の作成と脳機能の解析, 筋ジストロフィ  
 ーモデル及び神経・筋疾患のモデル動物  
 の開発とその病態解明への応用に関する  
 研究 平成 9 ~ , 日本, 2000年, 13 -  
 20

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, D B 名)

G01N 33/68  
 A01K 67/027  
 C07K 14/47  
 C12N 15/09 ZNA  
 C12Q 1/02  
 G01N 33/50  
 G01N 33/569  
 C12N 5/10  
 C12N 5/10  
 C12R 1:91