

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/087916

発行日 平成29年3月16日 (2017.3.16)

(43) 国際公開日 平成27年6月18日 (2015.6.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
AO1K 67/027 (2006.01)	AO1K 67/027 ZNA	4B063
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 24 頁)

出願番号 特願2015-552485 (P2015-552485)	(71) 出願人 304026696 国立大学法人三重大学 三重県津市栗真町屋町1577
(21) 国際出願番号 PCT/JP2014/082691	
(22) 国際出願日 平成26年12月10日 (2014.12.10)	
(31) 優先権主張番号 特願2013-256900 (P2013-256900)	(74) 代理人 100108280 弁理士 小林 洋平
(32) 優先日 平成25年12月12日 (2013.12.12)	(72) 発明者 ガバザ エステバン セサル 日本国三重県津市江戸橋2丁目174番地 三重大学大学院医学系研究科内
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(72) 発明者 田口 修 日本国三重県津市江戸橋2丁目174番地 三重大学医学部附属病院内
	(72) 発明者 小林 哲 日本国三重県津市江戸橋2丁目174番地 三重大学医学部附属病院内

最終頁に続く

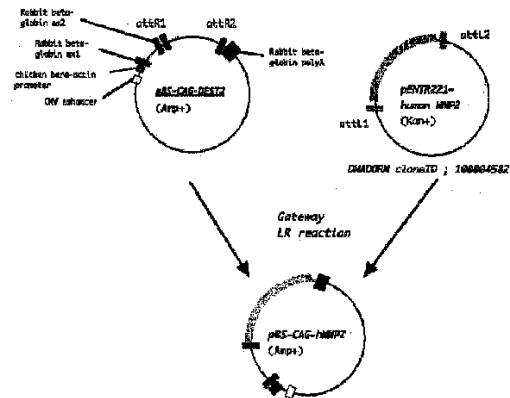
(54) 【発明の名称】 ヒトMMP2を発現するトランスジェニック非ヒト哺乳類動物

(57) 【要約】

【課題】 ヒトマトリックスメタロプロテアーゼ2 (human matrix metalloproteinase 2 ; hMMP2) を全身組織に発現するトランスジェニック (TG) 非ヒト哺乳類動物を提供すること、及びCOPD発症モデル動物を提供すること。

【解決手段】 遺伝子発現用プロモーターと、その下流に配置されて全身性に発現を誘導されるhMMP2の全遺伝子領域とを含むことを特徴とするhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物によって達成される。このとき、遺伝子発現用プロモーターは、アクチンプロモーターであることが好ましく、非ヒト哺乳類動物はマウスであることが好ましい。このTG非ヒト哺乳類動物に、タバコ煙抽出物を吸引させることにより、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) を発症させることができる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

遺伝子発現用プロモーターと、その下流に配置されて全身性に発現を誘導されるヒトマトリックスメタロプロテアーゼ2 (human matrix metalloproteinase 2 ; hMMP2) の全遺伝子領域とを含むことを特徴とするhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物。

【請求項 2】

前記遺伝子発現用プロモーターは、アクチンプロモーターであることを特徴とする請求項 1 に記載のhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物。

【請求項 3】

上記非ヒト哺乳類動物は、マウスであることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物。 10

【請求項 4】

遺伝子発現用プロモーターの下流にヒトマトリックスメタロプロテアーゼ2 (human matrix metalloproteinase 2 ; hMMP2) の全遺伝子領域を発現可能な状態で組み込んでhMMP2発現コンストラクトを構築し、このhMMP2発現コンストラクトを受精卵に導入後、非ヒト哺乳類動物に移植し、分娩させることを特徴とするhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物の作製法。

【請求項 5】

前記移植した非ヒト哺乳類動物に分娩させた後に、各産子をファウンダー候補個体として保育し、各ファウンダー候補個体の組織からゲノムDNAを抽出後に前記hMMP2発現コンストラクトの有無を確認し、hMMP2発現コンストラクトの存在を確認できたファウンダー個体を得ることを特徴とする請求項 4 に記載のhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物の作製法。 20

【請求項 6】

前記遺伝子発現用プロモーターが、アクチンプロモーターであることを特徴とする請求項 4 または 5 に記載のhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物の作製法。

【請求項 7】

前記非ヒト哺乳類動物が、マウスであることを特徴とする請求項 4 ~ 6 のいずれか一つに記載のhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物の作製法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一つに記載のhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物、又は請求項 4 ~ 7 のいずれか一つに記載のhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物の作製法によって作製された非ヒト哺乳類動物にタバコおよび/またはタバコ煙の成分含有物、プレオマイシン、並びにアルブミンから選択される少なくとも1つを投与することにより、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、肺線維症、気道リモデリング、肺高血圧症の少なくとも1つを発症させることを特徴とするモデル動物の作製法。 30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトMMP2 (matrix metalloproteinase 2 ; メタロプロテアーゼ2 : 以下「hMMP2」という) を発現するトランスジェニック (TG) 非ヒト哺乳類動物に関する。 40

【背景技術】

【0002】

マトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase ; MMP) は、活性中心に金属イオンを含むタンパク質分解酵素の総称であるメタロプロテアーゼの一群である。MMPには、1, 2, 3, 7, 8, 9, 10など20種類以上のタイプが知られている。MMPは、コラーゲン・プロテオグリカン・エラスチンなどから成る細胞外マトリックスの分解、細胞表面に発現するタンパク質の分解、及び生理活性物質のプロセッシングなどの作用を示す。MMPのうち、ヒトMMP1 (hMMP1) を発現するトランスジェニック (TG) 非ヒト哺乳類動物 (マウス) の報告がある (非特許文献 1)。このTGマウスでは、肺組織中にhMMP1を発現するものの、全身の臓器での発現は認められない。また、hMMP2を全身に発現するTG非ヒト哺乳 50

類動物については、知られていなかった。

【0003】

一方、慢性閉塞性肺疾患（COPD）は、以前から病理学的に肺気腫と称されていた疾患概念と、臨床的に慢性気管支炎と呼ばれていた疾患概念を統一した総称である。2001年の国際ガイドライン（GOLD）および日本呼吸器学会の診療ガイドラインにこれらのことが明記され、日本および国際的な学会レベルでも本疾患概念は公式のものとなっている。COPDのうち肺気腫は、肺胞壁の破壊的变化を伴う疾患であり、気道や終末細気管支から末梢にかけての含気区域が異常に拡大する病態を示す。COPDの進行は緩慢ではあるが、放置するとさらに肺性心に移行する。COPDは、20年以上の喫煙歴を経て発症する病気である。日本では2011年のCOPDによる死亡者数は16,639人であり、増加傾向にある。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】D'Armiento J, Dalal SS, Okada Y, Berg RA, Chada K., Collagenase expression in the lungs of transgenic mice causes pulmonary emphysema, Cell. 1992 Dec 11;71(6):955-61.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

hMMP2の全身での作用を知るために、全身でhMMP2を発現するTG非ヒト哺乳類動物が望まれているが、現在までのところ、そのようなTG非ヒト哺乳類動物は得られていなかった。

20

また、COPDの治療、予防法を研究するためには、良好なモデル動物の開発が望まれており、いくつかの研究開発が行われているものの、満足できるモデル動物は開発されていない。

本発明は、上記した事情に鑑みてなされたものであり、その目的は、hMMP2を全身組織に発現するTG非ヒト哺乳類動物を提供すること、及びCOPD等のモデル動物を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

上記課題を達成するために本発明に係るhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物は、遺伝子発現用プロモーターと、その下流に配置されて全身性に発現を誘導されるhMMP2の全遺伝子領域とを含むことを特徴とする。

30

プロモーターとしては、特に限定されないが、例えばCAGプロモーター、アクチンプロモーター、hTERTプロモーター、PSAプロモーター、c-mycプロモーター、GLUTプロモーター、OCT3/4プロモーター、NANOGプロモーター、Nestinプロモーター、HSP70プロモーター、HSP90プロモーター、p53プロモーター、アルブミンプロモーター、TNF-alphaプロモーター、SV40プロモーター、EF1-プロモーター、CMV-iプロモーター、CMVプロモーターなどを用いることができる。また、アクチンプロモーターを用いる場合に、その由来種は限定されず、ヒト、ニワトリ由来のものが用いられる。

上記発明において、非ヒト哺乳類動物としては、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ウシ、サルなどが含まれるが、このうち取り扱いの点で、マウスが好ましい。また、マウスの場合には、その系統はC57BL/6Jであることが好ましい。

40

また、hMMP2の発現量を増加させるために、プロモーター領域の上流に、エンハンサーを設けることが好ましい。エンハンサーとしては、特に限定されないが、例えば、CMVエンハンサー、SV40エンハンサー、hTERTエンハンサーなどを用いることができる。エンハンサーとしては、1つのみではなく、2つ以上の同一又は別のエンハンサーを用いたり、異なる複数のエンハンサーを組み合わせて用いることもできる。異なる複数のエンハンサーを用いる場合、その順番は限定されない。例えば、hTERTエンハンサー、SV40エンハンサー、CMVエンハンサーをこの順で連結したものが例示される。

但し、hMMP2の発現量が高すぎると、TG非ヒト哺乳類動物の平均寿命が短くなりすぎる

50

可能性があるため、過度な発現については、適当に調整すべきである。

別の発明に係るhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物の作製法は、遺伝子発現用プロモーターの下流にヒトマトリックスメタロプロテアーゼ2 (human matrix metalloproteinase 2 ; hMMP2) の全遺伝子領域を発現可能な状態で組み込んでhMMP2発現コンストラクトを構築し、このhMMP2発現コンストラクトを受精卵に導入後、非ヒト哺乳類動物に移植し、分娩させることを特徴とする。

このとき、非ヒト哺乳類動物に分娩させた後に、各産子をファウンダー候補個体として保育し、各ファウンダー候補個体の組織からゲノムDNAを抽出後に前記hMMP2発現コンストラクトの有無を確認し、hMMP2発現コンストラクトの存在を確認できたファウンダー個体を得ることが好ましい。

また、前記遺伝子発現用プロモーターが、CAGプロモーターまたはアクチンプロモーターであることが好ましい。また、前記非ヒト哺乳類動物が、マウスであることが好ましい。

本発明によって得られたTG非ヒト哺乳類動物は、自然に肺気腫を含む慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、肺外病変 (腎障害、肝障害、被嚢性腹膜硬化症) 等を発症するという特徴を有し、誘発物質を投与させることにより、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) や肺外病変 (腎障害、肝障害、被嚢性腹膜硬化症) 等をより短期間で発症させることができる他、肺線維症や、気道リモデリング、肺高血圧症等を発症させることができる。なおCOPDが悪化することにより、筋肉量減少、骨粗鬆症、貧血、心血管病変を発症することが知られており、本発明のTG非ヒト哺乳類動物はそれら疾患モデルにもなる。誘発物質としては、タバコ煙、タバコ煙抽出物またはタバコ成分の含有物の他、アルブミン、プレオマイシン、環境汚染物質、プロテアーゼ等が挙げられる。またその投与方法としては、吸引、静脈注射、経口投与、腹腔内投与、皮下投与、経気管投与等が挙げられる。

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、全身にhMMP2を発現すると共に、長期的には自然にCOPDや肺外病変を発症し、タバコ煙抽出物等の投与により、COPDや肺外病変を短期間で発症または肺線維症や、気道リモデリング、肺高血圧症を発症するTG非ヒト哺乳類動物を提供できる。ここで長期的とは8ヶ月から12ヶ月程度をいい、短期間とは2週から4週程度をいう。このhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物を用いることにより、COPD等に関する研究を飛躍的に発展させられる。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】hMMP2発現コンストラクト (発現ベクター) の構築ストラテジーを示す図である。

【図2】hMMP2発現コンストラクトの概要を示すマップである。

【図3】CAG発現コンストラクトとhMMP2 cDNAの接合部分の塩基配列を確認した結果を示す図である。

【図4】hMMP2発現コンストラクトを各種の制限酵素で分解し、電気泳動したときのフラグメントを示すゲル写真図である。

【図5】CAG-hMMP2発現コンストラクトの精製結果を示すゲル写真図である。(A)CAG-hMMP2発現コンストラクトをHind III+Spe Iで分解したものを分析用1%アガロースゲルで電気泳動した結果を示す写真図、(B)CAG-hMMP2発現コンストラクトのHind III+Spe Iフラグメントを分離用0.8%アガロースゲルで電気泳動した結果を示す写真図、(C)分離用アガロースゲルから切り出し、精製した後のCAG-hMMP2を分析用1%アガロースゲルで電気泳動した結果を示す写真図である。

【図6】ファウンダー候補個体の尾部組織から抽出したゲノムDNA、CAG-hMMP2発現コンストラクト、1,3,10,30コピーとコントロールのマウスゲノムDNAを含む陽性対照、及びコントロールのマウスゲノムDNAのみを含む陰性対照DNAを制限酵素EcoR Iで分解した後にアガロースゲルで電気泳動した結果を示す写真図である。

10

20

30

40

50

【図7】CAG-hMMP2発現コンストラクトの特異的なシグナルを検出するために、 $[^{32}\text{P}]$ ラベル化プローブを用いたサザン・ハイブリダイゼーションを実施した結果を示す写真図である。

【図8】hMMP2発現TGマウス・ファウンダー個体の尾部DNAを用いたサザン・ハイブリダイゼーションを実施し、既知コピー数のコントロールシグナルの信号強度を比較した写真図である。

【図9】hMMP2発現TGマウスの各種組織において、hMMP2導入遺伝子と内在マウスMmp2遺伝子の発現をRT-PCRによって調べた結果を示す写真図である。

【図10】hMMP2発現TGマウスと野生型マウスの各種組織において、hMMP2導入遺伝子と内在マウスMmp2遺伝子の発現をRT-PCRによって調べた結果を示す写真図である。

【図11】野生型マウスの通常肺CT画像である。(A)背骨方向に垂直な方向の断面画像、(B)背骨方向に沿った断面画像を示す(図12において同じ)。

【図12】hMMP2発現TGマウスの肺CT画像である。矢印にて示す低減衰野は、肺気腫を示している。

【図13】生理食塩水を吸入させたマウスと、タバコ煙抽出物を吸入させたhMMP2発現TGマウスにおいて、気管支肺胞洗浄液(BALF)の白血球数を比較したグラフである。

【図14】野生型マウス通常肺の染色後の顕微鏡写真図である。

【図15】hMMP2発現TGマウスにタバコ煙抽出物を吸入させた後の肺の顕微鏡写真図である。

【図16】hMMP2発現TGマウスを用いたCOPDにおけるNF- κ B siRNAの抑制効果を調べた結果を示す肺の顕微鏡写真図である。

【図17】各群から抽出したサンプルについて、(A)BALF総細胞数、(B)TNF- α 濃度、(C)IFN- γ 濃度、(D)脾臓中のCD8⁺T細胞数割合、(E)脾臓CD4/CD8比、(F)TNF- α /GAPDH比を測定した結果を示すグラフ、及び(G)TNF- α の発現を確認した写真図である。

【図18】hMMP2発現TGマウスに対するプレオマイシンの影響を確認した結果を示すデータである。(A)BALF総細胞数を示すグラフ、(B)BALF中総蛋白量を示すグラフ、(C)肺組織中のMCP-1/GAPDHを示すグラフ、(D)hMMP2発現TGマウスに生理食塩水を投与した群の肺の顕微鏡写真図及び(E)hMMP2発現TGマウスにプレオマイシンを投与した群の肺の顕微鏡写真図である。

【図19】hMMP2発現TGマウスに対する卵白アルブミンの影響を確認した結果を示すデータである。(A)BALF総細胞数を示すグラフ、(B)肺組織中IL5/GAPDHを示すグラフ、(C)肺組織中IL-4 mRNAを示すグラフ、(D)肺組織中IL-13/GAPDHを示すグラフ、(E)hMMP2発現TGマウスに生理食塩水を投与した群の肺の顕微鏡写真図及び(F)hMMP2発現TGマウスに卵白アルブミンを感作した群の肺の顕微鏡写真図である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

次に、本発明の実施形態について、図表を参照しつつ説明するが、本発明の技術的範囲は、これらの実施形態によって限定されるものではなく、発明の要旨を変更することなく様々な形態で実施できる。

< hMMP2発現TGマウスの作製 >

1. hMMP2発現ベクターの構築

図1に示すように、hMMP2 cDNA(アクセション番号: BC002576)をクローニングしたpENTRベクター(pENTR221-human MMP2)からGateway LR反応(インビトロジェン)を使用して、hMMP2 cDNAフラグメントをpBS-CAG-DESTZベクターにサブクローニングすることで、hMMP2発現ベクターpBS-CAG-hMMP2を構築した(図1、図2)。hMMP2発現コンストラクトには、TGマウスの遺伝子解析用に、1つのみのEcoRI部位を持つように設定した。

hMMP2 cDNAの発現は、ヒトサイトメガロウイルスの前初期エンハンサー(CMV enhancer)に続いて、トリアクチンのプロモーター及び第1エクソンとイントロンを連結したトリアクチン(Chicken β -actin promoter)によって行った。ストップコドンとポリ(A)シグナルを持つhMMP2の転写物は、ウサギ β -グロビン(Rabbit β -globin)のポリ(A)配列

10

20

30

40

50

(Poly A signal)の上流に連結した(図2)。hMMP2は図1, 2中でhuman MMP2またはHuman MMP2の記載を用いているが同じものを示す記号として使用している。

【0010】

導入遺伝子のmRNA転写物は、トリ アクチンの第1エクソン(これは転写されるものの翻訳はされない)の一部として構築されており、hMMP2 cDNAが転写される。

hMMP2発現コンストラクトを構築後に、シーケンス解析と制限酵素マッピングにより、hMMP2 cDNA接合部分のDNA配列を確認した。その結果、計画通りにhMMP2 cDNAがCAG発現ベクターにクローニングされていることが確認された(図3)。また、制限酵素Dra I, EcoR I, Hind III, Nco I, Sac I, Spe Iによるフラグメントは、予想される断片サイズと一致した(図4)。

10

以上の結果より、hMMP2発現コンストラクトの構築を完了した。

【0011】

2. TGマウス作製用直鎖DNAの精製

DH5 コンピテント細胞(インビトロジェン)にhMMP2の発現ベクターpBS-CAG-hMMP2を導入処理した後、アンピシリンを含むLBアガー培地上に播き、アンピシリン耐性株を選択した。アンピシリン耐性株のシングルコロニーをピックアップし、液体培地で一昼夜振盪培養した。

クローニングしたpBS-CAG-hMMP2をプラスミド抽出キット(キアゲン社製プラスミド・ミディキット)にて精製し、制限酵素Hind III + Spe Iを加えて、37℃、16時間反応した。ベクター由来のDNA断片とhMMP2発現用のDNA断片が生成していることを1%アガロースゲル電気泳動により確認した(図5(A))。その後、フェノール/クロロホルム抽出及びイソプロパノール沈澱によりDNA断片を回収した。

20

【0012】

回収後のDNA断片TEに再溶解し、0.8%アガロースゲルにて電気泳動した後、分離したDNA断片のうち、hMMP2発現用のDNA断片を切り出した。切り出したDNA断片をDNA抽出キット(キアゲン、DNAゲル抽出キット)にて精製し、1%アガロースゲル電気泳動により精製度を確認すると共に、NanoDrop分光光度計(旭テクノグラス社)により、その濃度を決定した。DNA断片を2ng/μLとなるように希釈し、マイクロインジェクション用のhMMP2発現用DNA(CAG-hMMP2発現コンストラクト)溶液を得た。この溶液は、試験に使用するまで-25℃にて保存した。

30

【0013】

3. 発現コンストラクトの受精卵へのマイクロインジェクション

PMSG及びhCG投与により過排卵誘起した雌性マウスから受精卵を採取し、マイクロインジェクション法により、CAG-hMMP2発現コンストラクトを導入した。偽妊娠処置したマウスの卵管にCAG-hMMP2発現コンストラクトを導入した受精卵を移植した。

過排卵誘起して交配したC57BL/6J雌性マウスから、862個の受精卵を採取した。このうち266個の受精卵にCAG-hMMP2発現コンストラクトを注入した。注入後の受精卵を顕微鏡下で観察したところ、236個の受精卵はマイクロインジェクションを行った後も安定な状態を保っていた。このうち210個の受精卵を偽妊娠マウスに移植できた。

40

【0014】

4. hMMP2発現TGマウスの育成とファウンダー個体の確認

(1)hMMP2発現TGマウスの育成

CAG-hMMP2発現コンストラクトをマイクロインジェクションしたC57BL/6Jマウス受精卵から自然分娩により得た産子を離乳まで保育した。hMMP2 TGマウスのファウンダー候補個体を3週齢で離乳し、固定識別のための耳標を付けた後に、尾部組織を生検し、解析に供するまで-80℃にて保管した。

210個の受精卵を移植して約3週間の妊娠期間を経た後に、CAG-hMMP2発現コンストラクトを注入した受精卵を移植した仮親マウスから65頭のマウス産子を得ることができた。これらの産子を分娩した仮親に哺育させた結果、65頭全ての個体を離乳まで育成できた。これらの離乳した全ての個体と離乳後に死亡した個体の一部から尾部組織のサンプルを回収

50

した。

発現コンストラクトを導入した初期胚からの産子数及び離乳数は良好であった。このことから、発現コンストラクトが注入されたことによる受精卵の発生、分化への悪影響はなかったと考えられた。

【 0 0 1 5 】

(2)hMMP2発現TGマウス・ファウンダー候補個体のジェノタイピング

-80にて保存したhMMP2 TGマウスの候補個体の尾部組織を室温で融解し、1%SDS（和光純薬工業株式会社）、1mg/mLアクチナーゼE（科研製薬株式会社）及び0.15mg/mLプロテアーゼK（メルク株式会社）を含む溶解用緩衝液を加え、55にて16時間振盪して組織を可溶化した。フェノール抽出、及びフェノール/クロロホルム抽出を行って、組織から可溶化したゲノムDNAに結合するタンパク質を除去した。ゲノムDNAに混在するRNAをRNaseA（シグマ）により分解した後、イソプロパノール沈澱により高分子ゲノムDNAを析出した。ゲノムDNAを70%エタノールで洗浄して風乾した後、50 μ LのTEに再溶解した。

10

各検体から調製したゲノムDNA溶液のDNA濃度を吸光法により決定し、各検体のDNA濃度の値から5 μ gのDNAに相当するゲノムDNA溶液の容量を求めた。

マイクロインジェクションに使用したCAG-hMMP2発現コンストラクトを1, 3, 10及び30コピーとなるように希釈し、別に調製したコントロールマウスのゲノムDNA 5 μ gを添加し、サザンプロット用の陽性対照DNAを調製した。一方、コントロールマウスのゲノムDNA 5 μ gをサザンプロット用の陰性対照DNAとした。

離乳まで生育できたhMMP2 TGマウス、ファウンダー候補個体の組織から抽出して調製したゲノムDNA濃度は5 μ gのDNAを用いるサザン解析に十分な回収量であった（表1）。

20

【 0 0 1 6 】

【表 1】

(ng/ μ l)					(ng/ μ l)				
サンプル番号	個体ID	性別	誕生日	ゲノムDNA濃度	サンプル番号	個体ID	性別	誕生日	ゲノムDNA濃度
1	1.1	♂	10/12/20	473	41	5.1	♀	10/12/20	573
2	1.2	♂	10/12/20	664	42	5.2	♀	10/12/20	851
3	1.3	♂	10/12/20	280	43	5.3	♀	10/12/20	841
4	1.4	♂	10/12/20	443	44	5.4	♀	10/12/20	783
5	1.5	♂	10/12/20	749	45	5.5	♀	10/12/20	545
6	1.6	♂	10/12/20	182	46	5.6	♀	10/12/20	893
7	1.7	♂	10/12/20	668	47	5.7	♀	10/12/20	970
8	1.8	♂	10/12/20	720	48	5.8	♀	10/12/20	902
9	1.9	♂	10/12/20	780	49	5.9	♀	10/12/20	403
10	1.10	♂	10/12/20	504	50	5.50	♀	10/12/20	700
11	2.1	♂	10/12/20	484	51	6.1	♀	10/12/20	575
12	2.2	♂	10/12/20	568	52	6.2	♀	10/12/20	638
13	2.3	♂	10/12/20	574	53	6.3	♀	10/12/20	671
14	2.4	♂	10/12/20	556	54	6.4	♀	10/12/20	617
15	2.5	♂	10/12/20	663	55	6.5	♀	10/12/20	885
16	2.6	♂	10/12/20	914	56	6.6	♀	10/12/20	665
17	2.7	♂	10/12/20	483	57	6.7	♀	10/12/20	984
18	2.8	♂	10/12/20	836	58	7.1	♂	10/12/20	714
19	2.9	♂	10/12/20	777	59	7.2	♂	10/12/20	629
20	2.20	♂	10/12/20	845	60	7.3	♂	10/12/20	500
21	3.1	♂	10/12/20	737	61	7.4	♂	10/12/20	640
22	3.2	♂	10/12/20	418	62	7.5	♂	10/12/20	1160
23	3.3	♂	10/12/20	929	63	7.6	♂	10/12/20	754
24	3.4	♂	10/12/20	913	64	7.7	♂	10/12/20	606
25	3.5	♂	10/12/20	735	65	7.8	♂	10/12/20	1031
26	3.6	♂	10/12/20	476					
27	3.7	♂	10/12/20	613					
28	3.8	♂	10/12/20	1021					
29	3.9	♂	10/12/20	761					
30	3.30	♂	10/12/20	632					
31	4.1	♀	10/12/20	741					
32	4.2	♀	10/12/20	774					
33	4.3	♀	10/12/20	845					
34	4.4	♀	10/12/20	1042					
35	4.5	♀	10/12/20	946					
36	4.6	♀	10/12/20	843					
37	4.7	♀	10/12/20	605					
38	4.8	♀	10/12/20	592					
39	4.9	♀	10/12/20	1013					
40	4.40	♀	10/12/20	403					

10

20

30

【0017】

各検体から調製したゲノムDNA、陽性対照DNA及び陰性対照DNAに制限酵素EcoR Iを加えて、37、16時間の反応を行った。生成したゲノムDNAのEcoR I断片をイソプロパノール沈澱により析出し、70%エタノールで洗浄して風乾した後、TEに再溶解した。これらのゲノムDNA断片を1.2%アガロースゲルを用いて電気泳動し、アガロースゲル中に分離したゲノムDNA断片をUVトランスイルミネータにより可視化し、スケールと共に撮影した。

40

図6に示すように、電気泳動後のアガロースゲルには、高分子量から低分子量にわたるDNA断片が観察され、生成した様々なサイズのゲノムDNA断片が電気泳動により均一に分離されていることが確認された。

このアガロースゲルを0.25N塩酸に浸して10分間穏やかに振盪した後、0.4N水酸化ナトリウムに浸して、更に10分間穏やかに振盪した。0.4N水酸化ナトリウムを用いたキャピラリー法により、アガロースゲル中に分離したゲノムDNA断片を室温で16時間、ナイロンメンブレン(Hybond-XL; GEH)にトランスファした。ゲノムDNA断片をトランスファしたナイロンメンブレンを2×SSCに浸して10分間穏やかに振盪した後に風乾し、ハイブリダイゼ

50

ーションに用いるまで室温で保存した。

【 0 0 1 8 】

DNAラベル化キット (Megaprime DNA Labelling System; GEH) を用いて、ランダムプライム法により、hMMP2プローブ2フラグメントを $[^{32}\text{P}]$ 標識した。セファデックススピンカラム (ProbeQuant G-50 Micro Columns; GEH) を用いて $[^{32}\text{P}]$ 標識フラグメントを生成し、 $[^{32}\text{P}]$ ラベル化hMMP2プローブとした。

ゲノムDNA断片をトランスファしたナイロンメンブレンをハイブリダイゼーション緩衝液に入れて、65℃にて1時間プレインキュベートした。その後、95℃、5分間加熱した直後に5分間氷冷し、変性した $[^{32}\text{P}]$ ラベル化hMMP2プローブを加えて、65℃、4時間インキュベートした。その後、ナイロンメンブレンを取り出し、0.1%SDS、0.5×SSCで65℃にて約15分間洗浄した。放射能サーベイメータでメンブレンに結合したプローブに由来する放射性をモニタし、放射活性がほぼ一定となるまで洗浄を繰り返した。

10

【 0 0 1 9 】

洗浄後のメンブレンをラップフィルムで覆い、暗室内でX線フィルム (BioMax MS; コダック) を重ねた後、オートラジオグラフィカセットに入れた。4週間感光した後にX線フィルムを現像した。CAG-hMMP2発現コンストラクトに由来する2.1kbの特異的シグナルをオートラジオグラフィで検出し、 $[^{32}\text{P}]$ ラベル化プローブとのハイブリダイゼーションによる特異的なシグナルをもたらす個体をhMMP2 TGマウス、ファウンダー個体として同定した。各個体のシグナル強度を陽性対照DNAのシグナル強度と比較して、ゲノムに導入したCAG-hMMP2発現コンストラクトのコピー数を概算した。

20

図7に示すように、 $[^{32}\text{P}]$ ラベル化プローブを用いたハイブリダイゼーションにより、全ての陽性対照であるCAG-hMMP2発現コンストラクトの断片から発現コンストラクトに由来する特異的なシグナルを検出できた。全ての陽性対照から発現コンストラクト由来のハイブリダイゼーションシグナルを検出できたことから、 $[^{32}\text{P}]$ ラベル化プローブを用いたサザン解析により、宿主ゲノムに導入された1コピー以上の発現コンストラクトを検出できることが分かった。

また、図8に示すように、尾部DNAを用いたサザンプロットングによって、65頭のファウンダー候補個体のうち2匹について(3%)、導入遺伝子が確認された。これらのトランスジェニックマウスファウンダーに導入した発現コンストラクトのコピー数は、1コピー~3コピーであった。

30

【 0 0 2 0 】

< hMMP2発現TGマウスにおける各種組織中のhMMP2の発現 >

トリゾール試薬 (インビトロジェン) と添付マニュアルに従って、マウスの各組織からRNAを精製した。RNAサンプルを、オリゴdTを使用してスーパースクリプト (インビトロジェン) によって逆転写し、DNAを得た。PCR反応にはPTC-100サーマルコントローラ (MJリサーチ) を使用し、94℃にて10秒間、60℃にて20秒間、72℃にて40秒間を1サイクルとして、28サイクル (GAPDHについて) または38サイクル (ヒトMMP2及びマウスMmp2) を実施し、最後に72℃にて5分間の伸長反応を行った。逆転写反応を行わないRNAサンプルについて、コントロール反応を行った。GAPDH、マウスMmp2、及びヒトMMP2遺伝子の増幅に用いたプライマーは、次の通りであった。mGapdhについては、センスプライマーとして、5'-CCCTTATTGACCTCAACTACATGGT-3' (配列番号1)、アンチセンスプライマーとして、5'-GAGGGGCCATCCACAGTCTTCTG-3' (配列番号2)、mMmp2については、センスプライマーとして、5'-CACCACCGAGGACTATGACC-3' (配列番号3)、アンチセンスプライマーとして、5'-TGTTGCCAGGAAAGTGAAG-3' (配列番号4)、hMMP2については、センスプライマーとして、5'-TACTGGATCTACTCAGCCAGCAC-3' (配列番号5)、アンチセンスプライマーとして、5'-CAGGATCCATTTTCTTCTTACC-3' (配列番号6) を用いた。

40

【 0 0 2 1 】

図9には、hMMP2発現TGマウスの各種組織 (全血 (Whole Blood)、胸腺 (Thymus)、脾臓 (Spleen)、骨髄 (Bone Marrow)、脳 (Brain)、心臓 (Heart)、胃 (Stomach)、腸 (Intestine)、骨格筋 (Skeletal Muscle)、脂肪組織 (Adipose Tissue)、腎臓 (Kidn

50

ey)、肝臓(Liver)、肺(Lung)、皮膚(Skin)、卵巣(Ovary)、子宮(Uterus)、精巣(Testis)、精嚢(Seminal Vesicle)、前立腺(Prostate)及び膵臓(Pancreas)において、外来性hMMP2遺伝子と内在マウスMmp2遺伝子の発現をRT-PCRによって調べた結果を示した。Gapdhは陽性対照として用いた。内在性のマウスMmp2は、多くの組織で発現が認められたが、各組織での発現量には大きな幅があった。また、マウスMmp2のバンドが確認されない組織(全血、骨髄、精嚢、前立腺及び膵臓)も認められた。一方、hMMP2は、評価した全ての組織中において、大量の発現が認められた。

図10には、hMMP2発現TGマウスと野生型マウスの各組織(脾臓、心臓、骨格筋、脂肪組織、腎臓、肝臓、肺、皮膚)において、hMMP2遺伝子とmMmp2遺伝子の発現をRT-PCRによって調べた結果を示した。hMMP2遺伝子の発現は、TGマウスでは全ての組織で認められた一方、野生型マウスでは検出されなかった。mMmp2遺伝子の発現は、TGマウスと野生型マウスとにおいて、組織間での違いが認められなかった。図9中mMmp2とMouse Mmp2は同じものを示す記号として使用している。

10

【0022】

<コンピュータ断層撮影法による所見>

野生型マウス及びhMMP2発現TGマウスの肺の状態をコンピュータ断層撮影法(CT)にて観察した。図11には、野生型マウスの通常肺のCT画像を示した。図12には、hMMP2発現TGマウスの肺のCT画像を示した。低減衰野(矢印で示す領域)は、肺気腫であることを示している。

<タバコ煙抽出物の吸入投与後のhMMP2発現TGマウスの重篤な炎症変化と慢性閉塞性肺疾患>

20

hMMP2発現TGマウスにタバコ煙抽出物及び生理食塩水を吸入させた後、気管支肺胞洗浄液(BALF)中の白血球数を計数した。

図13に示すように、生理食塩水を吸入させたhMMP2発現TGマウス(MMP2/saline)と比較すると、タバコ煙抽出物を吸入させたhMMP2発現TGマウス(MMP2/タバコ)では、BALF中の白血球数が増加した。このことは、TGマウスでは炎症が増悪したことを示している。

【0023】

<肺の組織学的所見>

野生型マウス、及びタバコ煙抽出物を吸入させたhMMP2発現TGマウスのそれぞれについて、肺の組織学的所見を観察した。各マウスの肺組織をヘマトキシリン・エオシン(hematoxylin eosin)で染色し、顕微鏡下で観察した。

30

図14には、野生型マウスの通常肺の顕微鏡写真図を示した。図15には、タバコ煙抽出物を吸入させた後のhMMP2発現TGマウスの肺の様子を示した。hMMP2発現TGマウスの肺では、慢性閉塞性肺疾患(COPD)の増悪(実線矢印)が見られ、血管周囲及び気管支周囲における白血球の浸潤が増加した(点線矢印)。

【0024】

<hMMP2発現TGマウスを用いたCOPDにおけるNF- κ B siRNAの抑制効果>

COPDの発症には、炎症性細胞及び肺組織構成細胞の活性化によるTNF- α 、IL-1 β 、IL-6などの炎症性サイトカインの産生が必要で、phosphatidylinositol-3-kinase (PI3)-protein kinase C-nuclear factor- κ B(NF- κ B)の経路が重要な役割を果たしている。そこで、NF- κ B経路の細胞内シグナル伝達機構に着目して、COPDの発症に及ぼすNF- κ Bの吸入siRNAの効果を検討した。

40

1. 試験方法

マウスを5群に分けて、次のようにして設定した。すなわち、(A)野生型マウスに生理食塩水を吸入させた群(野生型マウス+生理食塩; n=6)、(B)hMMP2発現TGマウスに生理食塩水を吸入させた群(MMP-2マウス+生理食塩; n=5)、(C)野生型マウスに煙草煙抽出液を吸入させた群(野生型マウス+煙草煙抽出液; n=10)、(D)hMMP2発現TGマウスに煙草煙抽出液を吸入させた群(MMP-2マウス+煙草煙抽出液; n=10)及び(E)hMMP2発現TGマウスに煙草煙抽出液を吸入させ、点鼻内にNF- κ B siRNAを投与した群(MMP-2マウス+煙草煙

50

抽出液 + NF B siRNA ; n=3) とした。

(1) 喫煙誘発COPDマウスモデルの作成

hMMP2発現TGマウスに毎日60分、2週間タバコ煙抽出液を暴露させ、肺気腫モデルを作成した。コントロールとして、C57BL/6野生型マウスを使用した。

(2) 核酸投与方法

NF B siRNAは、タバコ煙抽出液の暴露前に、0、2、4、6、8、10、12 日目に蒸留水で溶解し、鼻腔内投与した。

(3) RT-PCR

RT-PCR方法によりmRNA発現を検討した。Total RNA は肺組織からTRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA) で処理して単離した。Single-strand cDNAの合成はreverse transcriptase (Invitrogen) とoligo (dT) を利用して行った。目的cDNAの増幅はAB Applied Biosystem 7600とGold AmpliTaq (AB Applied Biosystem, Foster city, CA)、及び目的cDNAの特異プライマを用い、反応液は94 10分後、94 30秒、55 30秒、72 30秒の反応を至適サイクル数行った。PCR productは2%アガロース電気泳動後、ethidium bromideで発色した。NIH imaging systemで密度解析を行い、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の発現強度を標準とし、サイトカインなどのmRNA発現の比較検討を行った。

10

(4) 細胞数の測定及び生化学検査

気管支肺洗浄液 (BALF) 中の総細胞数は、ChemoMetec (Allerod, Denmark) Nucleocounter を用いて測定した。

20

(5) データは、ANOVAにより統計学的検討を行った。

【 0 0 2 5 】

2 . 試験結果

結果を図 1 6 及び図 1 7 に示した。

図 1 7 に示すように、非投与のhMMP2発現TGマウス群 (MMP-2マウス + 生理食塩)、野生型マウスに煙草煙抽出液を投与した群 (野生型マウス + 煙草煙抽出液) に比べ、hMMP2発現TGマウスに煙草煙抽出液を投与した群 (MMP-2マウス + 煙草煙抽出液) では、BALF総細胞数、TNF、IFN 及び脾臓CD8T細胞が有意に増加した。また、脾臓CD4/CD8は有意に減少した。一方、hMMP2発現TGマウスに煙草煙抽出液及びNF B siRNAを投与した群 (MMP-2マウス + 煙草煙抽出液 + NF B siRNA) では、これらの値は有意に減少し、脾臓CD4/CD8は回復した。なお図 1 7 (F) は、図 1 7 (G) の各バンドの密度を定量化したものである。

30

図 1 6 に示すように、図 1 7 (F) において炎症に關与するTNF のmRNAの発現が同程度であったコントロール群 (C) 野生型マウス + 煙草煙抽出液) と、hMMP2発現TGマウスに煙草煙抽出液を投与した群 (D) MMP-2マウス + 煙草煙抽出液) とを比較すると、hMMP2発現TGマウスに煙草煙抽出液を投与した群 (D) MMP-2マウス + 煙草煙抽出液) において肺胞壁の破壊が大きく生じており、COPDが有意に増悪していることがわかった。一方、hMMP2発現TGマウスに煙草煙抽出液を投与した群 (D) MMP-2マウス + 煙草煙抽出液) に比べ、hMMP2発現TGマウスに煙草煙抽出液及びNF B siRNAを投与した群 (E) MMP-2マウス + 煙草煙抽出液 + NF B siRNA) では、肺胞壁の破壊が抑制されており、肺気腫とCOPDの変化が有意に低下していることがわかった。

40

以上より、hMMP2発現TGマウス群は煙草煙抽出液を投与することにより、COPDを多発していることがわかった。

【 0 0 2 6 】

< hMMP2発現TGマウスに対するプレオマイシンの影響 >

hMMP2発現TGマウスに対し、浸透圧ポンプを用いて、生理食塩水又はプレオマイシンを投与し、プレオマイシンの影響を調べた。被験群として、生理食塩水を投与した群 (MMP-2マウス + 生理食塩水、n=4) と、プレオマイシンを投与した群 (MMP-2マウス + プレオマイシン、n=4) の2群を用いた。

プレオマイシンを投与するため、hMMP2発現TGマウス (メス、8週齢) にペントバルビタールを腹腔内投与後、マウス背部皮下にALZET浸透圧ポンプを埋め込んだ。ALZET浸透圧ポ

50

ンプには、プレオマイシン又は生理食塩水溶液200 μ Lをあらかじめ注入した。

浸透圧ポンプの埋め込み後21日目に、ペントバルビタールをマウス腹腔内投与し、麻醉下のマウスの頸部皮膚および筋肉を剥離し、気管を露出させた。留置針を用いて生理食塩水を気管内へ注入し、気管支肺胞洗浄液 (BALF) を回収した。次いで、開胸し、生理食塩水で灌流を行い、肺組織 (LUNG Tissue) を摘出した。

RT-PCR方法によりmRNA発現を検討した。Total RNA は肺組織からTRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA) で処理して単離した。Single-strand cDNAの合成はreverse transcriptase (Invitrogen) とoligo (dT) を利用して行った。目的cDNAの増幅はAB Applied Biosystem 7600とGold AmpliTaq (AB Applied Biosystem, Foster city, CA)、及び目的cDNAの特異プライマを用い、反応液は94 10分後、94 30秒、55 30秒、72 30秒の反応を至適サイクル数行った。PCR productは2%アガロース電気泳動後、ethidium bromideで発色した。NIH imaging systemで密度解析を行い、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現強度を標準とし、サイトカインなどのmRNA発現の比較検討を行った。

10

気管支肺方洗浄液中の総細胞数はChemoMetec (Allerod, Denmark) Nucleocounter を用いて測定した。気管支肺洗浄液中の総蛋白量はdye-binding assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いて測定した。また、データはANOVAによって、統計的に評価した。

【 0 0 2 7 】

結果を図 1 8 に示した。生理食塩水を投与したコントロール群 (MMP-2マウス + 生理食塩水) に比べ、プレオマイシンを投与した群 (MMP-2マウス + プレオマイシン) では、BALF総細胞数 (A)、BALF中総蛋白量 (B) 及び肺組織中のmonocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) (C) は、有意に高値を示した。また、プレオマイシンを投与した群では、コントロール群に比べ、肺気腫の変化が有意に強度であった (D)。

20

以上より、hMMP2発現TGマウス群はプレオマイシンを投与することにより、肺胞壁の破壊が大きく生じており、COPDを多発していることがわかった。

【 0 0 2 8 】

< hMMP2発現TGマウスに対する卵白アルブミンの影響 >

hMMP2発現TGマウスに対し、卵白アルブミンを腹腔内投与で感作させた後、ネブライザーで卵白アルブミンを5日間吸引させ、喘息モデルを作製した。コントロールマウスには、生理食塩水を与えた。被験群として、生理食塩水を投与した群 (MMP-2マウス + 生理食塩水、n=3) と、腹腔内及び吸入卵白アルブミンを投与した群 (MMP-2マウス + 卵白アルブミン、n=3) の2群を用いた。

30

試験開始から0,7,14及び21日目に卵白アルブミン10 μ gとAl(OH)₃ 1mg、又は生理食塩水を腹腔内に投与した後、28,29,30,31及び32日目に2%卵白アルブミン又は生理食塩水を吸入させた。試験開始から33日目にマウスにペントバルビタールを腹腔内投与し、麻醉科のマウスの頸部皮膚及び筋肉を剥離し、気管を露出させた。留置針を用いて生理食塩水を気管内へ注入し、気管支肺胞洗浄液 (BALF) を回収した。次いで、開胸し、生理食塩水で灌流を行い、肺組織を (LUNG Tissue) 摘出した。

RT-PCR方法によりmRNA発現を検討した。Total RNA は肺組織からTRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA) で処理して単離した。Single-strand cDNAの合成はreverse transcriptase (Invitrogen) とoligo (dT) を利用して行った。目的cDNAの増幅はAB Applied Biosystem 7600とGold AmpliTaq (AB Applied Biosystem, Foster city, CA)、及び目的cDNAの特異プライマを用い、反応液は94 10分後、94 30秒、55 30秒、72 30秒の反応を至適サイクル数行った。PCR productは2%アガロース電気泳動後、ethidium bromideで発色した。NIH imaging systemで密度解析を行い、Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現強度を標準とし、サイトカインなどのmRNA発現の比較検討を行った。

40

気管支肺方洗浄液中の総細胞数はChemoMetec (Allerod, Denmark) Nucleocounter を用いて測定した。気管支肺洗浄液中の総蛋白量はdye-binding assay (Bio-Rad Laboratories

50

s, Hercules, CA)を用いて測定した。また、データはANOVAによって、統計的に評価した。

【 0 0 2 9 】

結果を図 1 9 に示した。生理食塩を投与したコントロール群 (MMP-2マウス + 生理食塩) に比べ、卵白アルブミンで感作した群 (MMP-2マウス + 卵白アルブミン) では、気管支肺洗浄液 (BALF) 中の総細胞数 (A) が有意に多く、肺組織中のインターロイキン-5 (IL5; B), インターロイキン-4 (IL4; C) 及びインターロイキン-13 (IL13; D) の発現が有意に高値を示した。気管支炎及び肺気腫の程度 (E) も卵白アルブミンで感作されたマウスでは、コントロール群に比べ、有意に強度であった。

以上より、hMMP2発現TGマウス群は卵白アルブミンを投与することにより、肺胞壁の破壊が大きく生じており、COPDを多発していることがわかった。

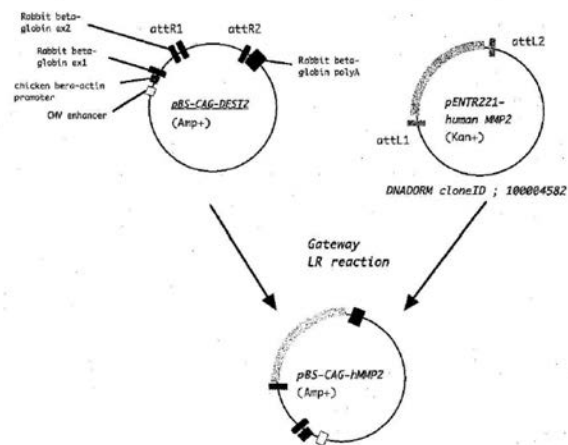
10

【 0 0 3 0 】

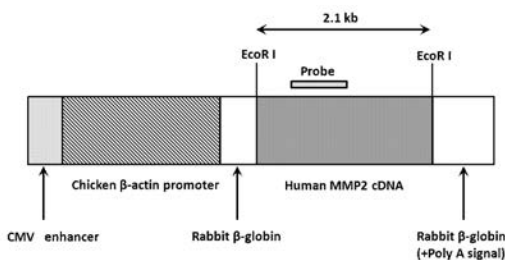
このように本願実施形態によれば、全身にhMMP2を発現するTGマウスを提供できた。このTGマウスは、自然発症的にCOPDを発症するので、COPDに関する研究を飛躍的に発展させられる。なお、実施形態における誘発物質として、タバコ煙、タバコ煙抽出物またはタバコ成分の含有物、アルブミン、プレオマイシンを例示したが、その他の誘発物質として、環境汚染物質、プロテアーゼ等であってもよく、複数の誘発物質を併用してもよい。また実施形態における投与方法として、煙草煙やその抽出液、アルブミンの吸引、プレオマイシンの腹腔内投与を例示したが、その他の投与方法として、静脈注射、経口投与、皮下投与、経気管投与等であってもよい。

20

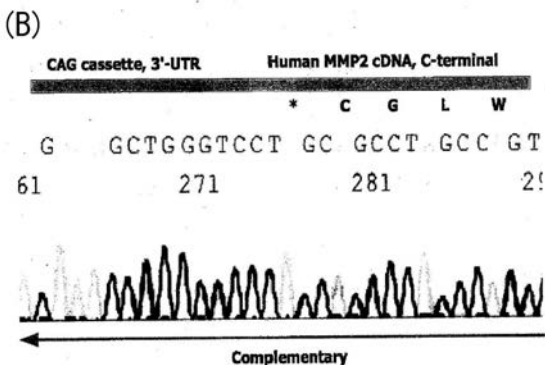
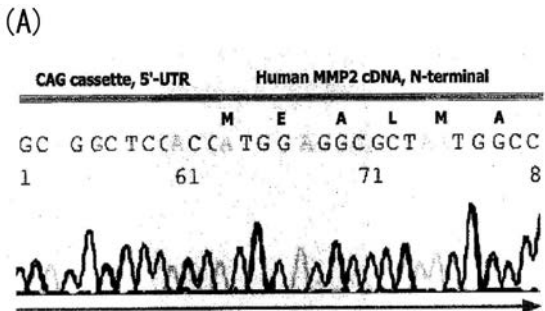
【 図 1 】



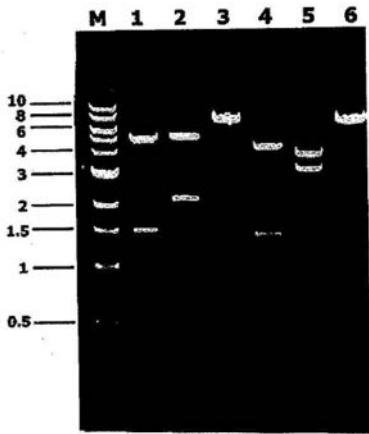
【 図 2 】



【 図 3 】

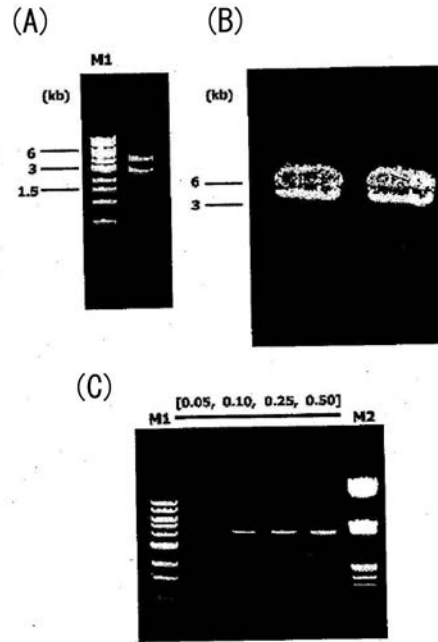


【 図 4 】

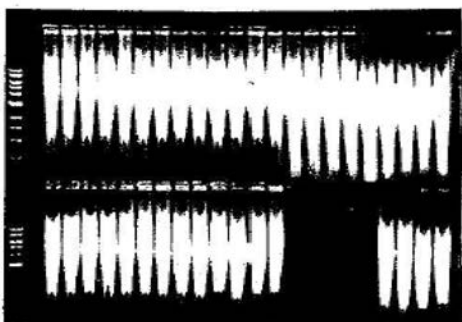


- | | |
|--|---|
| (1) DraI
5093 bp
1504 bp
692 bp
19 bp | (4) NcoI
4405 bp
1394 bp
843 bp
381 bp
285 bp |
| (2) EcoRI
5201 bp
2107 bp | (5) SacI
3965 bp
3127 bp
216 bp |
| (3) HindIII
7308 bp | (6) SpeI
7308 bp |

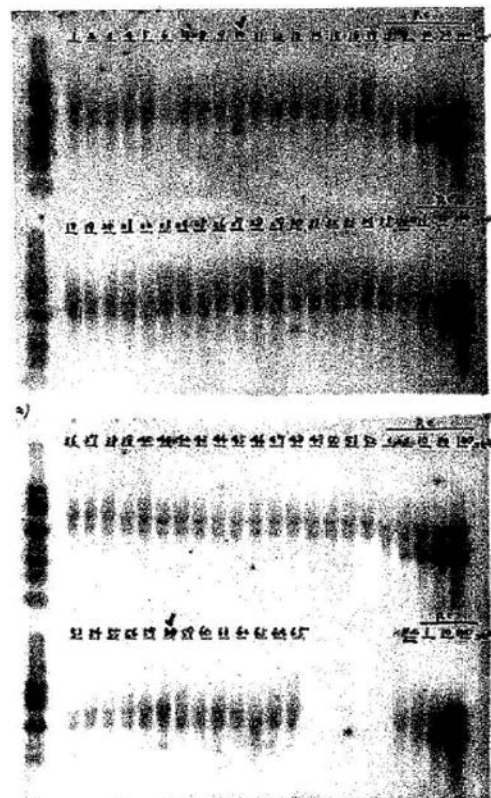
【 図 5 】



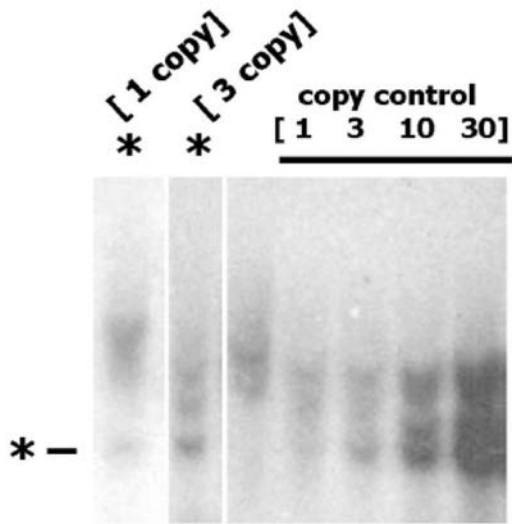
【 図 6 】



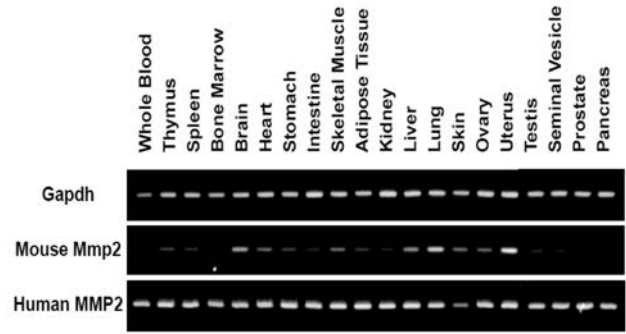
【 図 7 】



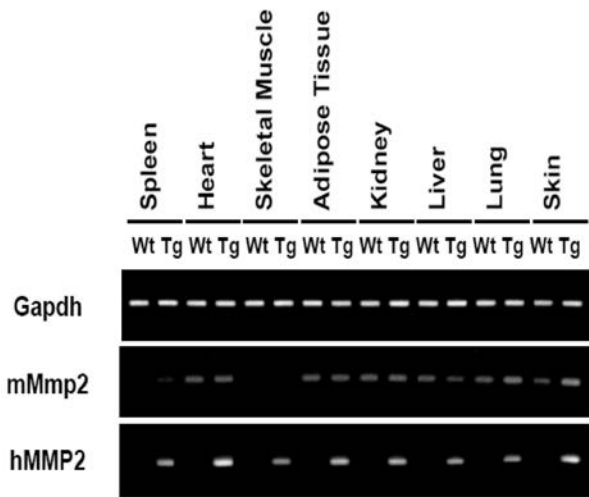
【 図 8 】



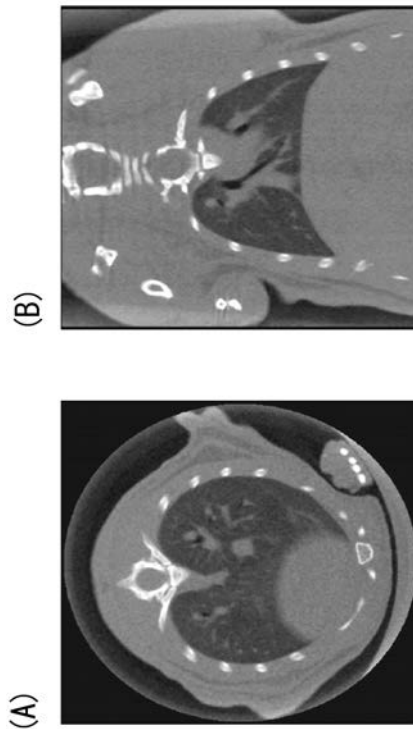
【 図 9 】



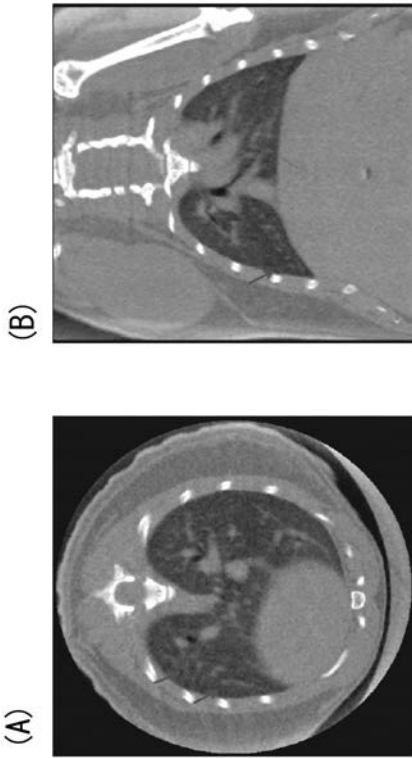
【 図 1 0 】



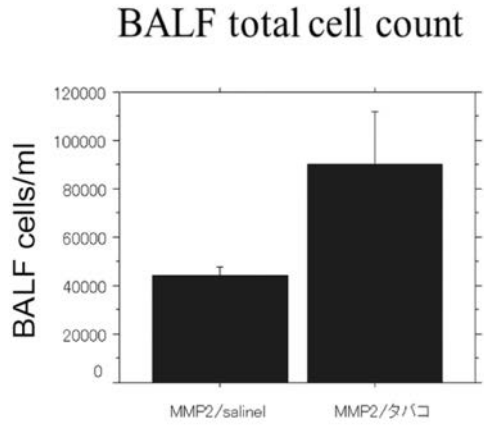
【 図 1 1 】



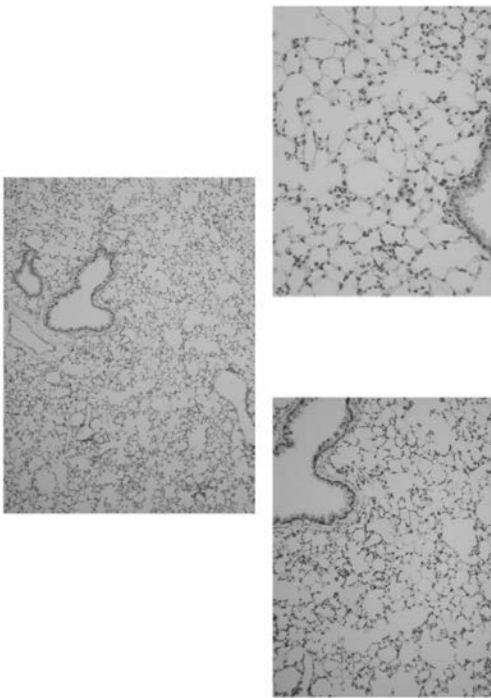
【 図 1 2 】



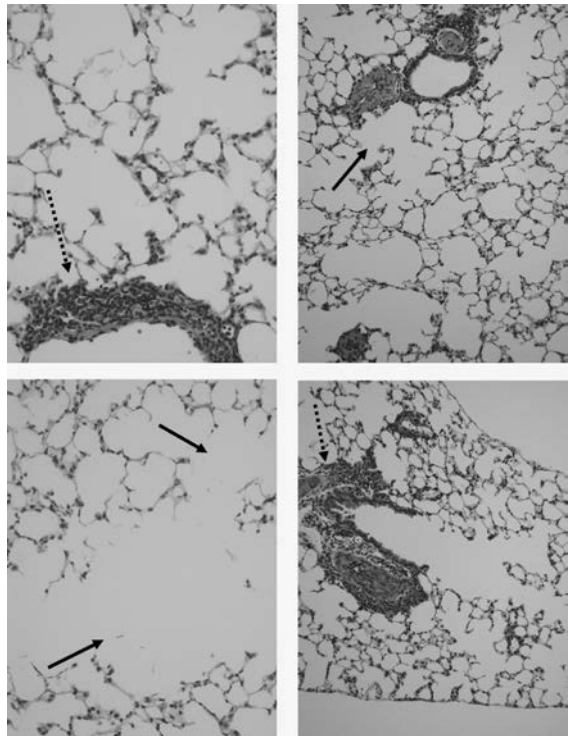
【 図 1 3 】



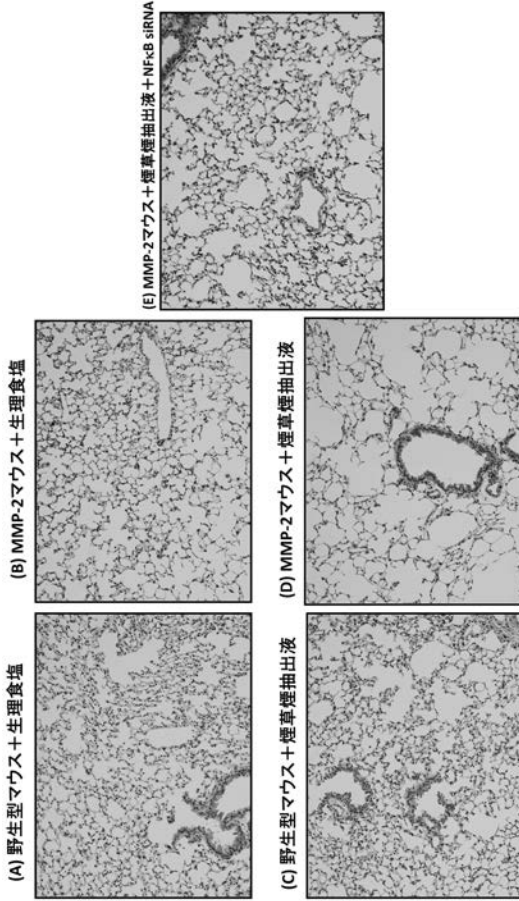
【 図 1 4 】



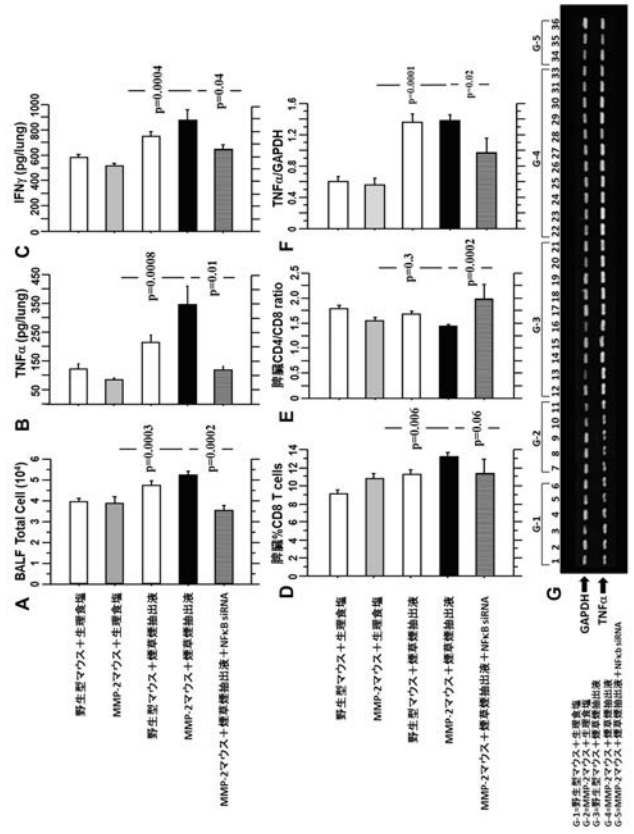
【 図 1 5 】



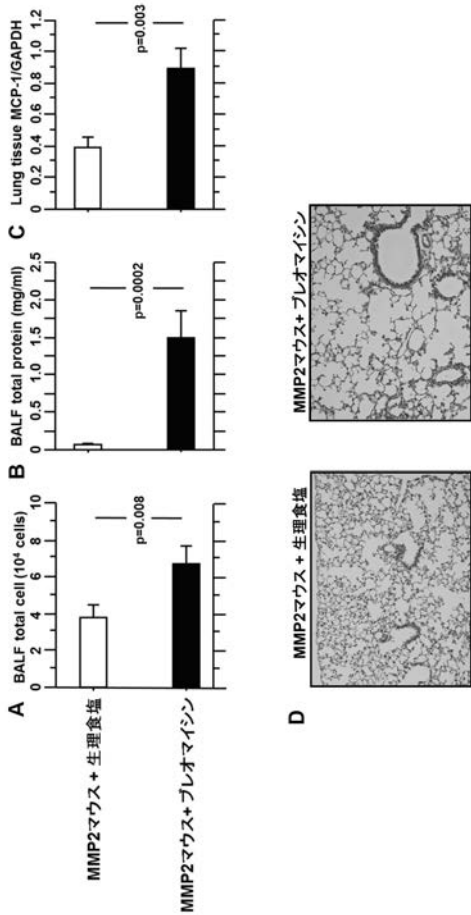
【 図 1 6 】



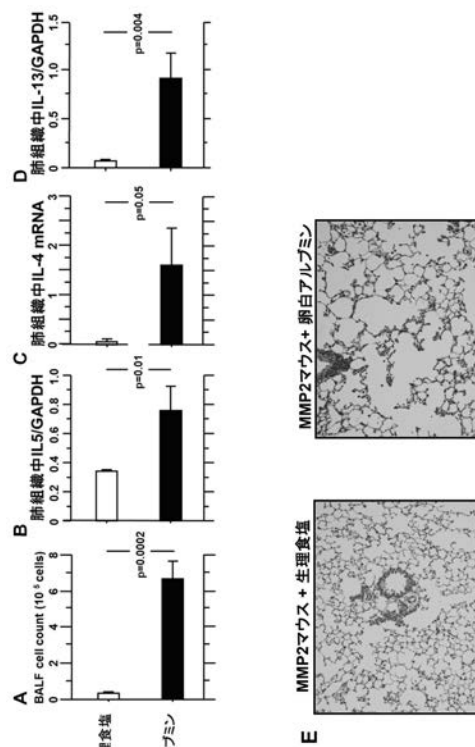
【 図 1 7 】



【 図 1 8 】



【 図 1 9 】



【配列表】

2015087916000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成27年6月15日(2015.6.15)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトサイトメガロウイルスの前初期エンハンサーと アクチンプロモーター(CAG)と、その下流に配置されて全身性に発現を誘導されるヒトマトリックスメタロプロテアーゼ2(human matrix metalloproteinase 2; hMMP2)の全遺伝子領域とを含むことを特徴とするhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物。

【請求項2】

(削除)

【請求項3】

上記非ヒト哺乳類動物は、マウスであることを特徴とする請求項1に記載のhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物。

【請求項4】

ヒトサイトメガロウイルスの前初期エンハンサーと アクチンプロモーター(CAG)の下流にヒトマトリックスメタロプロテアーゼ2(human matrix metalloproteinase 2; hMMP2)の全遺伝子領域を発現可能な状態で組み込んでhMMP2発現コンストラクトを構築し、このhMMP2発現コンストラクトを受精卵に導入後、非ヒト哺乳類動物に移植し、分娩させることを特徴とするhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物の作製法。

【請求項5】

前記移植した非ヒト哺乳類動物に分娩させた後に、各産子をファウンダー候補個体として保育し、各ファウンダー候補個体の組織からゲノムDNAを抽出後に前記hMMP2発現コンストラクトの有無を確認し、hMMP2発現コンストラクトの存在を確認できたファウンダー個体を得ることを特徴とする請求項4記載のhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物の作製法。

【請求項6】

(削除)

【請求項7】

前記非ヒト哺乳類動物が、マウスであることを特徴とする請求項4または5に記載のhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物の作製法。

【請求項8】

請求項1若しくは3に記載のhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物、又は請求項4, 5若しくは7のいずれか一つに記載のhMMP2発現TG非ヒト哺乳類動物の作製法によって作製された非ヒト哺乳類動物にタバコおよび/またはタバコ煙の成分含有物、プレオマイシン、並びにアルブミンから選択される少なくとも1つを投与することにより、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、肺線維症、気道リモデリング、肺高血圧症の少なくとも1つを発症させることを特徴とするモデル動物の作製法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/082691
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A01K67/027(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01K67/027, C12N15/09 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, CiNii, WPIDS/WPIX (STN),		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	BERGMAN, M. R., et al., Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction, American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology, 2006.12.08, Vol. 292, p. H1847-H1860, Abstract, MATERIALS AND METHODS	1-7 8
X A	CHENG, S., et al., Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury, The FASEB Journal, 2006, Vol. 20, p. E1248-E1256, ABSTRACT, MATERIALS AND METHODS	1-7 8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 09 March 2015 (09.03.15)		Date of mailing of the international search report 17 March 2015 (17.03.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/082691

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> A	ZHOU, H. Z., et al., Transgenic MMP-2 expression induces latent cardiac mitochondrial dysfunction, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007.06.22, Vol. 358, No. 1, p. 189-195, Abstract, Methods	<u>1-7</u> 8
<u>X</u> A	DAHI, S., et al., Transgenic expression of matrix metalloproteinase-2 induces coronary artery ectasia, International Journal of Experimental Pathology, 2011, Vol. 92, p. 50-56, Materials and methods	<u>1-7</u> 8
A	JP 2007-167060 A (Kao Corp.), 05 July 2007 (05.07.2007), & JP 2009-92 A & US 2007/0143866 A1 & US 2008/0010695 A1	1-8
A	JP 8-511507 A (UNIVERSITY OF PITTSBURGH OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION), 03 December 1996 (03.12.1996), & US 5858355 A & EP 701563 A1 & WO 1994/020517 A1	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/082691

Continuation of B. FIELDS SEARCHED
Electronic data base consulted during the international search
(name of data base and, where practicable, search terms used)

Thomson Innovation

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2014/082691									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A01K67/027(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n											
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. A01K67/027, C12N15/09											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015年										
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) CAPUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, CiNii, WPI/DL/WPI(X)(STN), Thomson Innovation											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X A	BERGMAN, M. R., et al., Cardiac matrix metalloproteinase-2 expression independently induces marked ventricular remodeling and systolic dysfunction, American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology, 2006.12.08, Vol. 292, p. H1847-H1860, Abstract, MATERIALS AND METHODS	1-7 8									
<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		の日の後に公表された文献									
「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		「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									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 09.03.2015		国際調査報告の発送日 17.03.2015									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 太田 雄三	4B 3959								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3448								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 8 2 6 9 1
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	CHENG, S., et al., Matrix metalloproteinase 2 and basement membrane integrity: a unifying mechanism for progressive renal injury, The FASEB Journal, 2006, Vol. 20, p. E1248-E1256, ABSTRACT, MATERIALS AND METHODS	1-7 8
X A	ZHOU, H. Z., et al., Transgenic MMP-2 expression induces latent cardiac mitochondrial dysfunction, Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007.06.22, Vol. 358, No. 1, p. 189-195, Abstract, Methods	1-7 8
X A	DAHI, S., et al., Transgenic expression of matrix metalloproteinase-2 induces coronary artery ectasia, International Journal of Experimental Pathology, 2011, Vol. 92, p. 50-56, Materials and methods	1-7 8
A	JP 2007-167060 A (花王株式会社) 2007.07.05, & JP 2009-92 A & US 2007/0143866 A1 & US 2008/0010695 A1	1-8
A	JP 8-511507 A (ユニバーシティー オブ ピッツバーグ オブ ザ コモンウェルス システム オブ ハイヤー エデュケーション) 1996.12.03, & US 5858355 A & EP 701563 A1 & WO 1994/020517 A1	1-8

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

Fターム(参考) 4B063 QA13 QQ02 QQ08 QQ43 QR32 QR62 QR72 QR77 QS02 QS25
QS34 QS38 QX01

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)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184条の10第1項(実用新案法第48条の13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。