

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4690630号
(P4690630)

(45) 発行日 平成23年6月1日(2011.6.1)

(24) 登録日 平成23年2月25日(2011.2.25)

(51) Int. Cl.

F 1

AO1K 67/027	(2006.01)	AO1K 67/027	
AO1K 67/00	(2006.01)	AO1K 67/00	D
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	Z N A A
GO1N 33/15	(2006.01)	GO1N 33/15	Z
GO1N 33/50	(2006.01)	GO1N 33/50	Z

請求項の数 10 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2002-130964 (P2002-130964)
 (22) 出願日 平成14年5月2日(2002.5.2)
 (65) 公開番号 特開2003-319734 (P2003-319734A)
 (43) 公開日 平成15年11月11日(2003.11.11)
 審査請求日 平成17年4月21日(2005.4.21)
 審判番号 不服2008-3188 (P2008-3188/J1)
 審判請求日 平成20年2月12日(2008.2.12)

(73) 特許権者 503360115
 独立行政法人科学技術振興機構
 埼玉県川口市本町四丁目1番8号
 (74) 代理人 100107984
 弁理士 廣田 雅紀
 (72) 発明者 三宅 健介
 東京都目黒区駒場3丁目6-15 東大駒
 場第2宿舍202号

合議体
 審判長 鵜飼 健
 審判官 加々美 一恵
 審判官 鈴木 恵理子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 MD-2 遺伝子改変モデル非ヒト動物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

T L R 4 の会合分子である M D - 2 をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とするグラム陰性菌膜成分 L P S 不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項2】

非ヒト動物が齧歯目動物であることを特徴とする請求項1記載のグラム陰性菌膜成分 L P S 不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項3】

齧歯目動物がマウスであることを特徴とする請求項2記載のグラム陰性菌膜成分 L P S 不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項4】

マウスが、M D - 2 遺伝子の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリAシグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲティングベクターを構築し、該ターゲティングベクターを線状化した後、胚幹細胞に導入し、M D - 2 遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られるM D - 2 ノックアウトマウスであることを特徴とする請求項3記載のグラム陰性菌膜成分 L P S 不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項5】

10

20

MD - 2 遺伝子の第 1 エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換し、ジフテリア毒素遺伝子を MD - 2 遺伝子の 3 末端につないで、ターゲティングベクターを構築したことを特徴とする請求項 4 記載のグラム陰性菌膜成分 L P S 不応答性モデル非ヒト動物。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 記載のグラム陰性菌膜成分 L P S 不応答性モデル非ヒト動物に、ヒト MD - 2 遺伝子の塩基多型を導入し、その応答を測定・評価することを特徴とするグラム陰性菌膜成分 L P S 応答性物質の評価・スクリーニング方法。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 記載のグラム陰性菌膜成分 L P S 不応答性モデル非ヒト動物に、異種動物の MD - 2 遺伝子を導入し、該モデル非ヒト動物に被検物質を作用させて、その応答を測定・評価することを特徴とするグラム陰性菌膜成分 L P S 応答性物質の評価・スクリーニング方法。

10

【請求項 8】

異種動物の MD - 2 遺伝子が、ヒトの MD - 2 遺伝子であることを特徴とする請求項 7 記載のグラム陰性菌膜成分 L P S 応答性物質の評価・スクリーニング方法。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 5 記載のグラム陰性菌膜成分 L P S 不応答性モデル非ヒト動物に、異種動物の MD - 2 遺伝子を導入し、該モデル非ヒト動物にエンドトキシンショックを誘発して、その応答を測定・評価することを特徴とする、モデル非ヒト動物を用いた異種動物 MD - 2 遺伝子の評価法。

20

【請求項 10】

異種動物の MD - 2 遺伝子が、ヒトの MD - 2 遺伝子であることを特徴とする請求項 9 記載のモデル非ヒト動物を用いた異種動物 MD - 2 遺伝子の評価法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、T L R 4 (Toll-like receptor 4) の会合分子である MD - 2 をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したグラム陰性菌膜成分 L P S 不応答性モデル非ヒト動物及びその利用方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

L P S (lipopolysaccharide) はグラム陰性菌細胞壁外葉の主たる構成成分で、免疫担当細胞ばかりでなく、血管内皮細胞、線維芽細胞など様々な細胞の活性化を誘導する。つまり、生体は分子或いは細胞レベルで L P S を認識することによって、グラム陰性菌の侵入を察知している。L P S を認識しシグナルを伝達する分子は、長い間検索されてきた結果、最近になってようやく明らかにされた。30 年程前に見つかった C 3 H / H e J マウスは L P S 低応答性を示すミュータントマウスである。同様な L P S 低応答性を示すマウスとして C 5 7 B L / 1 0 S c C r も報告されていたが、これらのマウスの原因遺伝子がポジショナルクローニングによって T L R 4 (Toll-like receptor 4) であると同定された (Poltrak, A. et al., Science, 282, 2085-2088, 1998、Qureshi, S. et al., J. Exp. Med., 189, 615-625, 1999)。

30

40

【0003】

T L R 4 は、ショウジョウバエにおいて真菌を認識し感染防御を誘導する分子 Toll のヒト及びマウスホモログである (Rock, F. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 588-593, 1998)。長い間探し求められてきた L P S 認識分子は、ハエからヒトにまで保存されている病原体認識分子の 1 つであることが確認された。しかしながら、L P S 認識は多くの分子が関与するプロセスで、T L R 4 単独では説明できないことが明らかにされている。本発明者は T L R 4 の L P S 認識を制御する分子として、R P 1 0 5 / M D - 1、M D - 2 などを報告してきた。

【0004】

50

L P S 認識機構と T L R s (Toll-like receptors) の関係についても解明されてきた。L P S の活性中心はリピド A と呼ばれ、N アセチルグルコサミン 2 分子に脂肪酸が結合したものである。リピド A にコア抗原、さらに O 抗原とばれる糖類がつながったものが L P S である。L P S は低い濃度でもマクロファージ、B 細胞、樹状細胞、好中球、血管内皮細胞、線維芽細胞など実に様々な細胞の活性化を誘導する。つまりこれらの細胞は L P S を認識することができる。L P S 認識機構は多くの分子が関わる複雑なプロセスである (実験医学 Vol.19(2001)No.5, P81)。菌体上にある L P S はまず、血清中の L P S 結合タンパク質 (L B P) によって外膜から遊離され、もう一つの L P S 結合タンパク質である C D 1 4 へ単体の形で転送される。(Wright, S. D. et al., Science, 249, 1431-1433, 1990、Pugen, J. et al., Immunity, 1, 509-516, 1994)。

10

【 0 0 0 5 】

C D 1 4 は血清タンパク質として血中に、或いは細胞表面タンパク質として単球、マクロファージ上に存在している。C D 1 4 / L P S 複合体は L P S 単独の場合に比べて、1 0 0 ~ 1 0 , 0 0 0 分の 1 の低い濃度で細胞の活性化を誘導する (Wright, S. D., J. Immunol., 155, 6-8, 1995)。しかし、C D 1 4 は細胞質内ドメインをもたないために L P S シグナルを細胞内へそれ自身では伝達することができない。そこで L P S シグナルを細胞内へ伝達するための新たなレセプター分子の存在が指摘され、検索が続けられていた。最近ようやくその L P S レセプターの実体が T L R 4 であると同定された。

【 0 0 0 6 】

ハエの Toll レセプターは、個体発生の際に腹側への分化誘導シグナルを伝達するレセプター分子として発見されたが、その後真菌感染を察知して感染防御反応を誘導する役割をもっていることが報告された (Lemaitre, B. et al., Cell, 86, 973-983, 1996)。更に、Toll によく似た分子 T L R (Toll-like receptor) をマウスやヒトももっていることが 1 9 9 7 年に明らかにされ、その 1 つである T L R 4 が長い間謎であった L P S / エンドトキシン認識分子であった。ところが、細胞株を用いた実験で、T L R 4 単独では L P S を認識できないという結果が報告された。

20

【 0 0 0 7 】

マウス I L - 3 依存性細胞株 B a / F 3 やヒト腎臓由来 2 9 3 細胞株はそれ自身 L P S に応答しないし、これらの細胞にヒト T L R 4 を発現させたトランスフェクタントも L P S に対する応答性は認められない。その理由として L P S 応答には T L R 4 に加えて他の分子が必要である可能性が考えられた。本発明者は R P (radio-protective) 1 0 5 の細胞外ドメインの L R R (leucine-rich repeat) が T L R 4 のそれとよく似ていることに注目し、v-myb regulated gene の 1 つである M D - 1 が R P 1 0 5 と会合するところから、T L R 4 も M D - 1 と会合するのではないかと考えた。しかしながら両方の遺伝子を細胞株に発現させ、免疫沈降で共沈降できるかどうかを調べたが有意な会合は検出できなかった。そこで、T L R 4 に会合する M D - 1 類似分子の存在を想定し、データベースで検索を行い、ヒト妊娠子宮由来の遺伝子を得ることに成功した (Shimazu, R. et al., J. Exp. Med., 189, 1777-1782, 1999、特開平 2000 - 262290 号公報)。

30

【 0 0 0 8 】

この分子はアミノ酸 1 6 0 個からなり、M D - 1 とアミノ酸で約 2 3 % 一致していることから、M D - 2 という名前をつけた。ヒト M D - 2 をマウス I L - 3 依存性細胞株 B a / F 3 に単独で発現させても細胞表面には検出されないが、T L R 4 と共発現させると細胞表面で検出されるようになり、しかもその分布を共焦点レーザー顕微鏡で比較したところほぼ一致していた。さらに、抗ヒト T L R 4 モノクローナル抗体 (H T A 1 2 5) で T L R 4 を免疫沈降すると、M D - 2 が共沈された。これらの実験結果から、R P 1 0 5 / M D - 1 と同様に T L R 4 / M D - 2 複合体も細胞表面上に発現していることが確認された。

40

【 0 0 0 9 】

T L R 4 / M D - 2 複合体による L P S 認識、シグナル伝達の機構を明らかにするために、T L R 4 の L P S 認識における M D - 2 会合の役割が検討された。

50

マウスIL-3依存性細胞株Ba/F3にヒトTLR4単独、或いはTLR4/MD-2複合体を発現させ、LPS刺激によるNF- κ B活性化を、予めBa/F3細胞株に導入しておいたNF- κ Bレポーター遺伝子を用いたルシフェラーゼアッセイで調べた結果、TLR4単独ではLPS刺激によるNF- κ Bの活性化は検出されなかったが、TLR4/MD-2複合体を発現した細胞株はLPS応答性を示した。そこで、MD-2を共発現させることによって、獲得されたLPS応答がTLR4を介しているかどうかを確認するために、TLR4に対するモノクローナル抗体(HTA125)を加えたところ、LPS刺激によるNF- κ B活性化が特異的に阻害された。(実験医学Vol.19(2001)、No.5、P83)。したがって、TLR4/MD-2複合体がLPSを認識し、シグナルを伝達していることが明らかになった。

10

【0010】

上記するようなこれまでの結果は、全て細胞株を用いた実験であり、正常細胞においてTLR4/MD-2の発現やそのLPS認識について検討する必要があった。本発明者は新たに、マウスTLR4/MD-2複合体を特異的に認識するモノクローナル抗体(MTS510)の確立に成功した(Akashi, S. et al., J. Immunol., 164, 3471-3475, 2000)。この抗体を用いて腹腔マクロファージを染色したところ、TLR4/MD-2複合体の発現が確認された。また、LPS刺激で誘導される腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor: TNF)の産生をこの抗体は特異的に抑制した。更に、LPSで腹腔マクロファージを刺激すると、細胞表面上のTLR4/MD-2複合体の発現が低下した。この発現低下はng/mlという低濃度のLPS刺激でもみられるが、ペプチドグリカンなど他の病原体由来の物質による刺激では認められなかった。またCD14など他の細胞表面分子では同様な発現低下は認められず、TLR4/MD-2に特異的な現象であった(Nomura, F. et al., J. Immunol., 164, 3476-3479, 2000)。

20

【0011】

これらの結果から、TLR4/MD-2は正常マクロファージ表面上にも発現しており、LPSの認識やシグナル伝達を司っていることが明らかとなった。TLR4やMD-2はともに広範に発現されており、マクロファージばかりでなく、線維芽細胞や血管内皮細胞など、非免疫担当細胞においてもTLR4/MD-2複合体がLPS認識にかかわっている可能性がある。

30

【0012】

以上のとおり、近年、グラム陰性菌細胞壁外葉の構成成分であるLPSを認識してグラム陰性菌の進入を察知し、応答する機構における、TLR4及びその会合分子であるMD-2の役割については、徐々にその説明が進んできた。しかし、これまでの結果は、遺伝子や細胞レベルの実験を主とするものであり、今後は解析の方向として、TLR4の病原体認識機構を更に分子レベルで明らかにするとともに、生体レベルの更なる説明が期待されている。

【0013】**【発明が解決しようとする課題】**

本発明の課題は、グラム陰性菌細胞壁外葉の構成成分であるLPSを認識してグラム陰性菌の侵入を察知し、応答する機構の生体レベルでの説明を目的として、該機構関与遺伝子をノックアウトしたモデル非ヒト動物を構築すること、及び該モデル非ヒト動物を用いての異種動物の遺伝子物質の機能の評価や、薬剤開発のための機能活性物質のスクリーニングや、病態説明のための診断を行う方法を提供することにある。

40

【0014】**【課題を解決するための手段】**

Toll-like receptor 4 (TLR4)はグラム陰性菌の膜成分LPS (lipopolysaccharide)を認識する。本発明者は、TLR4に会合する分子MD-2を取得し、TLR4によるLPS認識に重要であることを細胞株を用いて説明してきた。今回、上記課題を解決するためにMD-2遺伝子を欠損したマウスを構築し、そのマウスがLPSに全く応答しないことからMD-2が生体レベルでもLPS応答に必須の分子であることを確認した。本

50

発明は、このマウスのような、非ヒトモデル動物を用いての異種動物の遺伝子物質の機能の評価や、薬剤開発のための機能活性物質のスクリーニングや、病態解明のための診断を行う方法を提供することよりなる。

【0015】

本発明のMD-2遺伝子を欠損した非ヒトモデル動物は、特にLPSが関与する疾患の解明や治療法の開発に利用できるものである。

即ち、リポ多糖(LPS; lipopolysaccharide)はグラム陰性細菌の膜構成成分の一つで強く免疫細胞、血管内皮細胞などを活性化する。その強い活性のために多くの疾患との関連が指摘されている。特に重篤な疾患がエンドトキシンショックである。この疾患はLPSによる免疫系の活性化によってサイトカインが過剰に産生されることが原因で、ショック状態に陥る疾患であり、多くの場合死に至る。多くの疾患で制御しきれなくなった最後に、エンドトキシンショックで死亡することが多く、病院内での死因として重要である。エンドトキシンショック治療薬の開発は遅れているが、その原因としてLPSの認識機構そのものが明らかになっていなかったことが挙げられる。特に、LPSを認識し、活性化シグナルを伝達する分子は長い間謎であったが、最近その認識分子の本体がToll-like receptor 4(TLR4)と、その細胞外ドメインに会合するMD-2によって構成されるTLR4/MD-2であることが明らかになった。

【0016】

MD-2分子は、細胞外に分布する分子で、TLR4と会合する可能性も指摘されていたが、エンドトキシンショックに対する治療薬開発において、TLR4ばかりでなく、MD-2も標的分子となりうるかどうか、明らかにすることが重要であった。そのためには、生体内でMD-2がTLR4によるLPS応答にどれだけ寄与しているか明らかにする必要があった。本発明者は、今回、MD-2遺伝子改変マウス(MD-2遺伝子機能欠損(ノックアウト)マウス)を作製し、MD-2が欠損した状態におけるLPS応答を調べた。その結果、今までのところ、MD-2遺伝子機能欠損(ノックアウト)マウスのLPS応答は完全に欠損していた。また、エンドトキシンショックを誘発しても、MD-2ノックアウトマウスは抵抗性を示した。この結果はMD-2が生体内でのTLR4によるLPS認識、シグナル伝達に必須の分子であると同時に、エンドトキシン疾患の原因でもあることを示している。したがって、TLR4と同様にLPS関連疾患の新規治療薬開発のための標的分子となりうることをMD-2遺伝子機能欠損(ノックアウト)マウスが示したことになる。

【0017】

本発明の遺伝子改変非ヒトモデル動物は、MD-2遺伝子機能を欠損させたものであるが、本発明の特徴として、マウスMD-2を標的分子とする利点として最も重要な点はLPSに特異的なことである。TLR4あるいはその下流のMyD88などのシグナル伝達分子を標的とすると、多のTLRと共通しているため、他のTLRへの影響を考慮する必要がある。その点、MD-2はTLR4に特異的であり、MD-2を標的とする薬剤においては他のTLRへの影響を心配する必要は無い。さらにMD-2はTLR4と異なり、アミノ酸160個と比較的小さく、また分泌タンパク質で膜貫通部位も持たない。そのため構造生物学的解析が比較的容易である。

【0018】

本発明のMD-2遺伝子機能を欠損させた非ヒトモデル動物は、ペプチドや組換えタンパク質などを薬剤として開発する上で、特に有利である。MD-2を標的とする薬剤を開発する上で、重要なことはスクリーニングシステムである。例えば、動物実験を行う上で、MD-2ノックアウトマウスにヒトのMD-2を発現させることで、よりヒトに近い動物実験が可能となる。また、エンドトキシンショックへの感受性に関わるヒトMD-2の1塩基多型(SNIP)機能解析においてもMD-2ノックアウトマウスを利用することができる。MD-2遺伝子機能を欠損させたノックアウトマウスにいろいろなSNIPを持つヒトのMD-2を発現させ、エンドトキシンショックを誘発することで、それぞれのSNIPの評価が可能となる。

10

20

30

40

50

このように、本発明のMD - 2 遺伝子機能を欠損させた非ヒトモデル動物は、LPS が関与する疾患の診断、治療法の開発に有利に利用することができるものである。

【0019】

すなわち本発明は、(1) TLR4 の会合分子であるMD - 2 をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したことを特徴とするグラム陰性菌膜成分LPS 不応答性モデル非ヒト動物や、(2) 非ヒト動物が齧歯目動物であることを特徴とする上記(1)記載のグラム陰性菌膜成分LPS 不応答性モデル非ヒト動物や、(3) 齧歯目動物がマウスであることを特徴とする上記(2)記載のグラム陰性菌膜成分LPS 不応答性モデル非ヒト動物や、(4) マウスが、MD - 2 遺伝子の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリAシグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲティングベクターを構築し、該ターゲティングベクターを線状化した後、胚幹細胞に導入し、MD - 2 遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られるMD - 2 ノックアウトマウスであることを特徴とする上記(3)記載のグラム陰性菌膜成分LPS 不応答性モデル非ヒト動物や、(5) MD - 2 遺伝子の第1エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換し、ジフテリア毒素遺伝子をMD - 2 遺伝子の3 末端につないで、ターゲティングベクターを構築したことを特徴とする上記(4)記載のグラム陰性菌膜成分LPS 不応答性モデル非ヒト動物からなる。

【0020】

また本発明は、(6) 上記(1) ~ (5)記載のグラム陰性菌膜成分LPS 不応答性モデル非ヒト動物に、ヒトMD - 2 遺伝子の塩基多型を導入し、その応答を測定・評価することを特徴とするグラム陰性菌膜成分LPS 応答性物質の評価・スクリーニング方法や、(7) 上記(1) ~ (5)記載のグラム陰性菌膜成分LPS 不応答性モデル非ヒト動物に、異種動物のMD - 2 遺伝子を導入し、該モデル非ヒト動物に被検物質を作用させて、その応答を測定・評価することを特徴とするグラム陰性菌膜成分LPS 応答性物質の評価・スクリーニング方法や、(8) 異種動物のMD - 2 遺伝子が、ヒトのMD - 2 遺伝子であることを特徴とする上記(7)記載のグラム陰性菌膜成分LPS 応答性物質の評価・スクリーニング方法や、(9) 上記(1) ~ (5)記載のグラム陰性菌膜成分LPS 不応答性モデル非ヒト動物に、異種動物のMD - 2 遺伝子を導入し、該モデル非ヒト動物にエンドトキシンショックを誘発して、その応答を測定・評価することを特徴とする、モデル非ヒト動物を用いた異種動物MD - 2 遺伝子の評価法や、(10) 異種動物のMD - 2 遺伝子が、ヒトのMD - 2 遺伝子であることを特徴とする上記(9)記載のモデル非ヒト動物を用いた異種動物MD - 2 遺伝子の評価法からなる。

【0021】

【発明の実施の形態】

本発明は、グラム陰性菌の膜成分LPS (lipopolysaccharide) を認識するToll-like receptor 4 (TLR4) の会合分子であるMD - 2 をコードする遺伝子機能を染色体上で欠損させ、グラム陰性菌膜成分LPS 不応答性モデル非ヒト動物を構築することよりなる。非ヒト動物としては、齧歯目動物が有利に利用され、該齧歯目動物としては、特にマウスが有利に用いることができる。

MD - 2 をコードする遺伝子を取得するには、公知のMD - 2 遺伝子配列からプローブを作製し、該プローブを用いて、遺伝子ライブラリーからスクリーニングにより、全MD - 2 遺伝子或いは一部の遺伝子フラグメントを取得し、用いることができる。また、例えば、マウスMD - 2 遺伝子のように、市販の遺伝子クローン(ゲノムシステムズ社(St. Louis, MO))を用いることもできる。

【0022】

MD - 2 遺伝子機能を欠損した非ヒトモデル動物を構築するには、MD - 2 遺伝子の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、ポリAシグナルとマーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲティングベクターを構築し、該ターゲティングベクターを線状化した

10

20

30

40

50

後、胚幹細胞に導入し、MD - 2 遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、非ヒト動物の胚盤胞中にマイクロインジェクションし、キメラ非ヒト動物を作製し、このキメラ非ヒト動物と野生型非ヒト動物とを交配させてヘテロ接合体非ヒト動物を作製し、かかるヘテロ接合体非ヒト動物をインタークロスすることによってMD - 2 ノックアウト非ヒト動物を得ることよりなる。本発明における実施例においては、ターゲッティングベクターの構築に際し、MD - 2 遺伝子の第 1 エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換し、ジフテリア毒素遺伝子をMD - 2 遺伝子の 3 末端につないで、ターゲッティングベクターを構築した。

【 0 0 2 3 】

本発明のグラム陰性菌膜成分 L P S 不応答性モデル非ヒト動物の作製方法を、MD - 2 遺伝子機能を欠損したノックアウトマウスを例にとって説明する。市販の遺伝子クローン (ゲノムシステムズ社 (St. Louis, MO)) から入手したMD - 2 遺伝子クローンをサブクローンし、DNAシーケンシングにより特定したMD - 2 遺伝子クローン、を用意する。このMD - 2 をコードする遺伝子の全部又は一部をネオ遺伝子カセット等に置換し、3 末端側にジフテリアトキシン A フラグメント (DT - A) 遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (HSV - tk) 遺伝子等の遺伝子を導入することによって、ターゲットベクターを作製する。

【 0 0 2 4 】

この作製されたターゲッティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション (電気穿孔) 法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G 4 1 8 やガンシクロピア (GANC) 等の抗生物質により相同的組換えを起こしたES細胞を選択する。また、この選択されたES細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。その確認されたES細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型マウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体マウス (F1 マウス: + / -) を得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせることによって、本発明のMD - 2 ノックアウトマウスを作製することができる。また、MD - 2 ノックアウトマウスにおいてMD - 2 が生起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスからRNAを単離してノーザンブロット法等により調べたり、またこのマウスにおけるMD - 2 の発現をウエスタンブロット法等により調べる方法がある。

【 0 0 2 5 】

また、作出されたMD - 2 ノックアウトマウスがグラム陰性菌膜成分 L P S 不応答性であることは、例えば、急性反応期タンパク質である血清アミロイド A (SAA) の誘導、或いは、L P S で誘導したエンドトキシンショック下における生存、TNF や I L 6 のようなサイトカインの過剰産生の状況を測定することにより確認することができる。

【 0 0 2 6 】

本発明のグラム陰性菌膜成分 L P S 不応答性モデル非ヒト動物は、塩基配列のような被検物の導入や、ペプチドや組み換えタンパク質のような被検物質を作用させて、その応答を測定・評価することにより、L P S 応答性物質の評価・スクリーニングを行い、MD - 2 を標的とする薬剤の開発に用いることができる。

また、本発明のグラム陰性菌膜成分 L P S 不応答性モデル非ヒト動物は、ヒトMD - 2 遺伝子の塩基多型 (SNIP) のような、異種動物のMD - 2 遺伝子を導入し、異種動物を用いて異種動物のMD - 2 遺伝子の機能解析を行うことができる。例えば、グラム陰性菌膜成分 L P S 不応答性モデルマウスに、いろいろなSNIPを持つヒトMD - 2 遺伝子を発現させ、エンドトキシンショックを誘発することで、それぞれのSNIPの評価が可能となる。

【 0 0 2 7 】

更に、本発明のグラム陰性菌膜成分 L P S 不応答性モデル非ヒト動物は、該動物に、異種動物のMD - 2 遺伝子を導入し、該モデル非ヒト動物にエンドトキシンショックを誘発し

10

20

30

40

50

て、その応答を測定・評価することにより異種動物MD-2遺伝子の診断を行うことができる。例えば、グラム陰性菌膜成分LPS不応答性モデルマウスに、ヒトのMD-2遺伝子を導入し、該モデルマウスにエンドトキシンショックを誘発して、その応答を測定・評価することにより、マウスを用いてヒトMD-2遺伝子の診断を行うことができる。

【0028】

【実施例】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

[材料と方法]

(試薬、細胞、マウス)

大腸菌由来のリポ多糖(LPS)、その活性中心であるリピドA(サルモネラ菌由来)、リポタイコ酸(ブドウ球菌由来)はSigma社(St. Louis, MO)製のものを使用した。ブドウ球菌由来のペプチドグリカン(Fluka社製のものを使用した。オリゴDNAは北海道システムサイエンス社製のものを使用した。D-GalacosamineはSigma社製のものを使用した。

【0029】

(MD-2ノックアウトマウス作製)

MD-2遺伝子クローンはゲノムシステムズ社(St. Louis, MO)製のものを使用した。その遺伝子の第1エクソンをネオマイシン耐性遺伝子で置換した。ジフテリア毒素遺伝子はMD-2遺伝子の3'末端につないだ。線状にしたDNAをE14由来ES細胞に導入し、G418耐性で、ジフテリア遺伝子で死ななかったESクローンを得た。そのなかで、MD-2遺伝子が組み換えられたクローンを1個得た。このクローンを日本SLC社に送り、キメラマウス作製を依頼した。そのマウスをC57BL/6と交配し、ESクローン由来のヘテロ、さらにヘテロ同士の交配によりホモのマウスを得た。

【0030】

(リバーstransクリプターゼ-PCR(RT-PCR))

骨髓由来マクロファージの全RNAを和光純薬工業社製のISOGENを用いて抽出し、それからcDNAを合成した。アクチン、MD-2、TLR4の遺伝子の増幅は以下のプライマーを用いて行った。

プライマーの配列は、次のとおり：

mouse (m) -actin-sense, 5'-GAGAGGGAAATCGTGCGTGACATC-3'; 配列番号 1

m -actin anti-sense, 5'-GAATGTAGTTTCATGGATGCC-3'; 配列番号 2

mMD-2 sense, 5'-ATGTTGCCATTT- ATTCTCTTTTCGACG-3'; 配列番号 3

mMD-2 anti-sense, 5'-ATTGACATCACGGCGGTGAATGATG-3'; 配列番号 4

mTLR4 sense, 5'-TATCCACTGTAGCATTTCTGATATACC-3'; 配列番号 5

mTLR4 anti-sense, 5'-CTCTGCTGTTTGCTCAGGATTCGAGGC-3'; 配列番号 6

【0031】

(B細胞精製、活性化)

マウス脾臓B細胞は、DYNAL社製のDynaビーズに抗CD43抗体S7をつけたものを用いてT細胞を除去することで精製した。精製したB細胞は96穴プレートに 2×10^5 /ウェルで蒔き、LPSやRP105に対する抗体で刺激した。培養3日目にトリチウム標識のサイミジンを加え、6時間皿に培養した後にそのDNAをグラスフィルターに回収し、取り込まれたトリチウムのカウントを測定することで、増殖反応を測定した。

【0032】

(樹状細胞の誘導、活性化)

骨髓細胞を24穴プレートに 1×10^6 /ウェルで蒔き、マウスGM-CSF存在下で6日間培養した後に、リピドA、CpGなどで刺激し、サイトカイン産生などを測定した。

【0033】

(マクロファージの誘導、活性化)

10

20

30

40

50

骨髄細胞を10cmディッシュにM-CSF存在下で7日間培養した細胞を用いた。細胞を回収した後、リポDやCpGで刺激し、サイトカインの産生を測定した。

【0034】

(サイトカイン産生)

ELISA (Enzyme-linked immunoadsorbent assay) はBiosource International社製のキットを用いて行った。

【0035】

(細胞の染色)

細胞は抗体で染色した後にフローサイトメーター(ベクトンディッキンソン社製、FACSscan)を用いて解析した。

10

【0036】

(胎児由来線維芽細胞の確立とレトロウイルスを用いた遺伝子導入法)

マウス胎児由来線維芽細胞は約13.5日からの胎児から確立した。レトロウイルスを用いた遺伝子導入にはPLAT-E細胞(東大医科研、北村俊雄先生より分与)にベクターを導入してレトロウイルスの産生を誘導した。産生されたウイルスを胎児由来線維芽細胞に感染させることで、遺伝子を導入した。

【0037】

(共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析)

3.5cmディッシュに蒔いておいた細胞をバッファーで洗い、3.7%ホルムアルデヒドで固定する。その後0.2%のTritonX-100で膜に穴をあけてからフラッグに対するピオチン抗体とインキュベートする。細胞を洗った後にテキサスレッド標識ストレプトアビジンでフラッグを染色した。ゴルジ体、小胞体を染色するにはBODIPY FL-ceramide、ER-tracker (Molecular Probe社製)をそれぞれ用いた。共焦点レーザーはZeiss社のLSM510を用いた。

20

【0038】

[実験結果]

(MD-2遺伝子改変マウスの作製)

MD-2の免疫系における役割を明らかにするためにMD-2遺伝子改変マウスを作製した。MD-2遺伝子の第1エクソンはアミノ末端の37個のアミノ酸をコードするが、そのエクソンをネオマイシン耐性遺伝子に置き換えた(図1a)。ホモのマウスはサザンハイブリダイゼーションで確認し(図1b)、そのマウスの骨髄から誘導したマクロファージでのMD-2 mRNAの発現をRT-PCRで調べても検出されなかった(図1c)。タンパク質の発現はMTS510というモノクローナル抗体で確認した。この抗体はTLR4に対する抗体であるが、TLR4単独には反応せず、TLR4/MD-2複合体にのみ反応する。この抗体で骨髄由来マクロファージを染色しても発現は検出されなかった(図1d)。MD-2の発現が欠損していてもRP105、MD-1、CD14の発現に異常は認められなかった(図1d)。

30

MD-2は神経系や血液系の細胞に、発生初期からその発現が報告されている。MD-2ノックアウトマウスは健康に生まれ、肉眼的所見、フローサイトメトリーによる所見では特にこれらの臓器に異常は認められなかった。

40

【0039】

(ピトリオにおけるB細胞、マクロファージ、樹状細胞のLPS応答性)

脾臓からB細胞を精製し、リポDで刺激し、B細胞活性化による細胞表面分子CD86の発現上昇と増殖反応を調べたところ、野生型のB細胞では反応が認められたが、MD-2欠損B細胞では全く反応しなかった。MD-2欠損B細胞はTLR9のリガンドであるCpGや抗RP105抗体には問題なく反応した(図2a~b)。

次に骨髄細胞から誘導したマクロファージをリポD、TLR2リガンドペプチドグリカン、TLR9リガンドCpGで刺激し、サイトカインの産生をELISAで測定した。MD-2欠損マクロファージは腫瘍壊死因子(TNF)もIL-6も産生しなかった(図3a)。またリポテイコ酸に対してもMD-2欠損マクロファージは反応しなかった。

50

樹状細胞は自然免疫と獲得免疫の連携に重要な役割を持つ細胞である。骨髄細胞からGM-CSFで誘導した樹状細胞をリポDで刺激した。野生型樹状細胞はIL-12を産生し、CD86やCD40の発現上昇を示したが、MD-2欠損樹状細胞はCpGに反応し、リポDには反応しなかった(図3b、c)。

【0040】

(ピポにおけるLPS応答)

CD14はLPS応答に重要であるが、中にはTLR4に依存するが、CD14には依存しない反応もある。急性反応期タンパク質である血清アミロイドA(SAA)の誘導もそのひとつである。そこでSAAの誘導におけるMD-2の役割を調べてみた。MD-2ノックアウトマウスにLPSを投与し、血中のSAAの濃度を測定したところ、野生型マウスではSAAが誘導されたが、MD-2ノックアウトマウスでは誘導されなかった(図4a)。

10

【0041】

次にエンドトキシンショックをLPSで誘導し、MD-2の役割を調べてみた。LPSと、その毒性を増幅させるガラクトサミンを同時に投与したところ、野生型マウスはすべて10時間以内に死亡したが、MD-2ノックアウトマウスはすべて生き残った(図4b)。エンドトキシンショックによる死亡としてTNFやIL-6などのサイトカインの過剰産生がその一因として挙げられる。そこで、LPSとガラクトサミン投与後に採血し、血中のサイトカインを測定したところ、野生型ではTNF、IL-6、IL-12の産生が誘導されたが、MD-2ノックアウトマウスでは産生が認められなかった(図4c)。大量のLPS単独投与でもエンドトキシンショックは誘導されるが、その系でもMD-2ノックアウトマウスは野生型マウスに比べて低反応性を示した(図4d)。

20

最後にグラム陰性菌ネズミチフス菌の感染実験を行った。野生型マウスに比べてMD-2ノックアウトマウスは細菌感染に対する反応性が低くなり、細菌感染防御機能が低下する結果、ネズミチフス菌の感染により、死亡率が上昇した(図4e)。

【0042】

(TLR4の細胞内分布におけるMD-2の役割)

本発明者は最近RP105の細胞表面への発現にMD-1が必須であることを報告した。MD-1とMD-2が類似していることを考慮するとMD-2もTLR4の細胞内での分布に影響している可能性がある。その点を明らかにするために胎児由来線維芽細胞(EF)細胞を確立し、TLR4遺伝子を導入して発現させ、その分布をTLR4につけておいたFLAGタグを染色することで調べた(図5; 参考写真1参照)。野生型EF細胞ではTLR4は細胞内の核周辺と細胞表面に検出された。細胞表面では興味深いことにLeading Edgeと呼ばれる部位にその発現が集中していた。一方MD-2欠損EF細胞では細胞表面への発現が認められず、核周辺の細胞内のみTLR4が検出された(図5a)。細胞内での局在を明らかにするためにゴルジ体、小胞体のマーカーとしてそれぞれセラミド、ERトラッカーによる染色を同時に行ったところ、MD-2欠損EF細胞は細胞内のゴルジ体を集積している事が明らかになった(図5b)。これらの結果はMD-2がTLR4の細胞内における分布の制御に重要な役割をなしていることを示している。

30

【0043】

【発明の効果】

グラム陰性菌細胞壁外葉の構成成分であるLPSを認識してグラム陰性菌の侵入を察知し、応答する機構における、TLR4及びその会合分子であるMD-2の役割については、徐々にその解明が進んできた。しかし、これまでの結果は、遺伝子や細胞レベルの実験を主とするものであった。本発明においては、グラム陰性菌の侵入を察知し、応答する機構に参与するMD-2遺伝子をノックアウトしたモデル非ヒト動物を構築することに成功し、TLR4会合分子であるMD-2の役割について生体レベルでの解明を可能とした。更に、本発明におけるMD-2遺伝子をノックアウトしたモデル非ヒト動物の構築により、該ノックアウト非ヒトモデル動物を用いて、異種動物の遺伝子物質の機能の評価や、薬剤開発のための機能活性物質のスクリーニングや、病態解明のための診断を行う方法の提供

40

50

を可能とした。本発明のMD - 2 遺伝子をノックアウトしたモデル非ヒト動物の優れた点として、本発明においてはMD - 2 を標的分子としたので、例えばTLR 4 やその下流のMyD 8 8 などのシグナル伝達分子を標的とした場合のように他のTLR への影響を考慮する必要がなく、LPS に特異的に標的を絞ることができるということである。したがって、本発明のノックアウト非ヒトモデル動物を用いた薬剤の開発に際しても、MD - 2 に特異的に作用する薬剤を開発することが可能で、薬剤開発上、有利となる。

【 0 0 4 4 】

【 配 列 表 】

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> Generation of MD-2 gene-modified mouse

<130> A211P02

10

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

20

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

30

<223> Description of Artificial Sequence:mouse (m)-
beta-actin-sense

<400> 1

gagagggaaa tcgtgcgtga catc

24

40

<210> 2

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:m-beta-actin
anti-sense 10

<400> 2
gaatgtagtt tcatggatgc c 21

<210> 3
<211> 27 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:mMD-2 sense

<400> 3 30
atgttgccat ttattctctt ttcgacg 27

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mMD-2
anti-sense

<400> 4

attgacatca cggcgggtgaa tgatg

25

10

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mTLR4 sense

20

<400> 5

tatccactgt agcatttctg atatacc

27

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:mTLR4
anti-sense

40

<400> 6

ctctgctgtt tgctcaggat tcgaggc

27

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の実施例において、作製したMD - 2 遺伝子改変マウスの第 1 エクソン部の遺伝子構造 (1 a)、ホモのマウスのサザンハイブリダイゼーションの確認の結果 (1

50

b)、MD-2 mRNAの発現をRT-PCRで調べた結果(1c)、タンパク質の発現をモノクローナル抗体で確認した結果(1d)、MD-2の発現が欠損した場合の、RP105, MD-1、CD14の発現への影響(1d)を示す図である。

【図2】本発明の実施例において、作製したMD-2遺伝子改変マウスの脾臓から採取したB細胞のピトロにおけるLPS応答を試験した結果を示す図である。

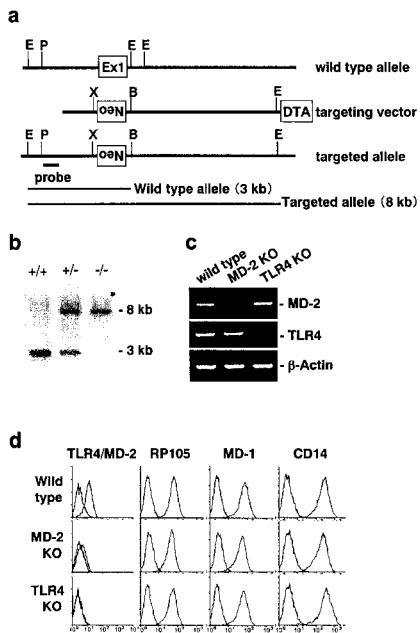
【図3】本発明の実施例において、作製したMD-2遺伝子改変マウスの骨髄細胞から誘導したマクロファージや樹状細胞のLPS応答を試験した結果を示す図である。

【図4】本発明の実施例において、作製したMD-2遺伝子改変マウスのピボにおけるLPS応答試験において、SAA誘導の結果(4a)、ガラクトサミンを投与したエンドトキシンショック付与における生存の結果(4b)、血中のサイトカインを測定した結果(4c)、大量のLPS単独投与における生存率の野生型マウスとの比較の結果(4d~e)を示す図である。

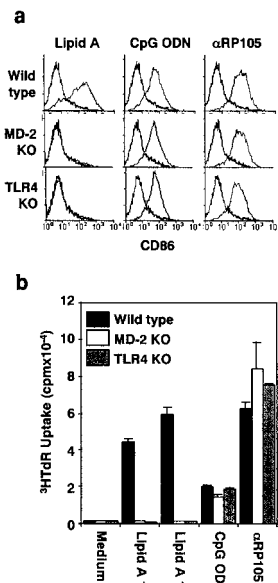
【図5】本発明の実施例において、作製したMD-2遺伝子改変マウスから確立した胎児由来線維芽細胞におけるTLR4の局在を調べた結果である。野生型の線維芽細胞との比較(a)およびゴルジ体や小胞体のマーカーとの2重染色を示す(b)図である。

10

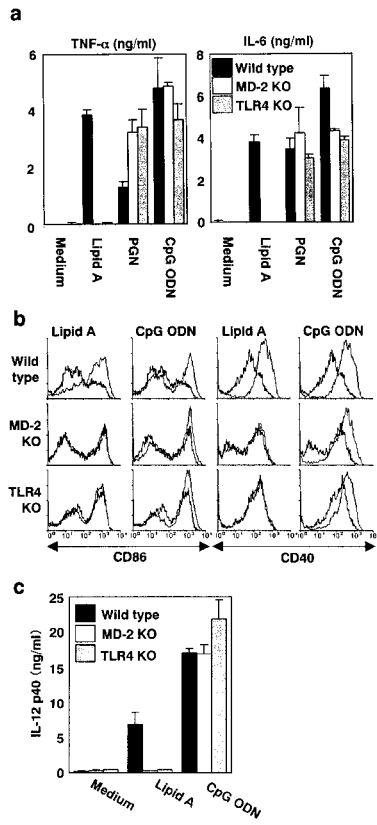
【図1】



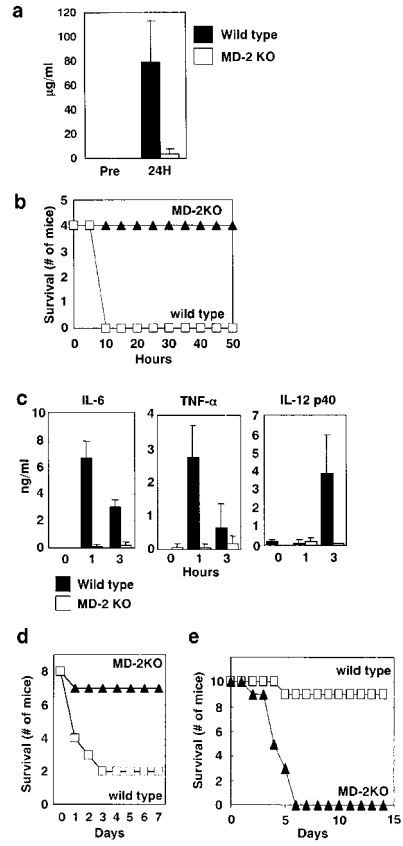
【図2】



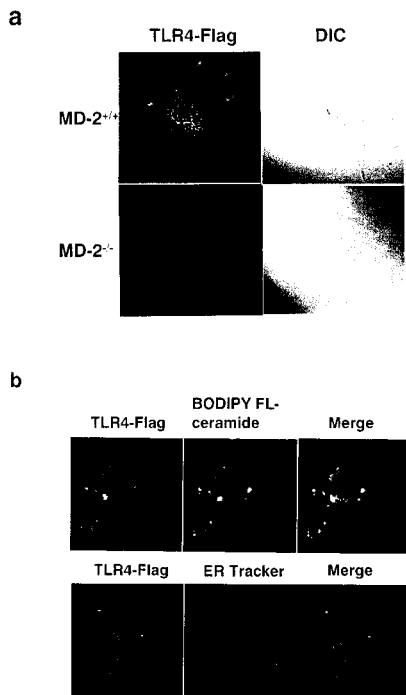
【 3 】



【 4 】



【 5 】



フロントページの続き

(56)参考文献 特開2000-262290(JP,A)

J Immunol.(2000) Vol.164、No.7 p3471-3475

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A01K67/027

C12N15/00-15/90

PubMed

BIOSIS/WPI(DIALOG)

JSTPlus(JDream2)