

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
G 0 1 N 33/15		G 0 1 N 33/15	Z 2 G 0 4 5
A 0 1 K 67/027		A 0 1 K 67/027	4 B 0 2 4
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	H 4 B 0 6 3
33/53		33/53	Y
// C 1 2 N 15/09	ZNA	C 1 2 Q 1/68	A
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 89数) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001 - 521146(P2001 - 521146)	(71)出願人	ザ・ジェネラル・ホスピタル・コーポレイ ション アメリカ合衆国02110マサチューセッツ州ボ ストン、フルート・ストリート55
(86)(22)出願日	平成12年9月8日(2000.9.8)	(72)発明者	バージェソン, ロバート アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01 945 マーブルヘッド ノーガス アヴェニ ュー 84
(85)翻訳文提出日	平成14年3月11日(2002.3.11)	(72)発明者	アマノ, サトシ 神奈川県横浜市金沢区福浦2 - 12 - 1
(86)国際出願番号	PCT/US00/24637	(74)代理人	弁理士 柳田 征史 (外 1 名)
(87)国際公開番号	W001/017343		
(87)国際公開日	平成13年3月15日(2001.3.15)		
(31)優先権主張番号	09/393,483		
(32)優先日	平成11年9月10日(1999.9.10)		
(33)優先権主張国	米国(US)		
(81)指定国	E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , J P		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 皮膚に対する効果に関して、化合物を評価する方法。

(57)【要約】

本発明は、皮膚に対する効果に関して、処置について評価する方法を提供する。また、本発明は、皮膚代謝プロモーターに結合したレポーター遺伝子を包含する、例えばマウス等の非ヒトトランスジェニック動物を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 皮膚に対する効果に関して、処置を評価する方法であって：

皮膚代謝関連プロモーターに結合したレポーター遺伝子を包含するトランスジェニック動物を提供し、ここで該レポーター遺伝子が発光または蛍光産物をコードしており；

前記トランスジェニック動物に対して処置を施し；さらに、

前記レポーター遺伝子の発現を評価して、それによって皮膚に対する処置の効果に関して前記処置を評価する；各工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項2】 前記処置が化合物を含み、該化合物を前記トランスジェニック動物の皮膚に適用することによって化合物を投与することを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 前記トランスジェニック動物が、トランスジェニックミニブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、またはトランスジェニックマウスより成る群から選択されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項4】 前記皮膚代謝関連プロモーターが、ヒト皮膚代謝関連プロモーターであることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項5】 前記皮膚代謝関連プロモーターが、細胞外マトリックスタンパク質の代謝を制御するプロモーター、バーシカンプロモーター、マトリックスメタロプロテイナーゼプロモーター、血管内皮細胞増殖因子プロモーター、ヒアルロン酸シンターゼプロモーター、MMP 2またはMMP 9プロモーター、および好中球エラスターゼプロモーターよりなる群から選択されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項6】 前記レポーター遺伝子が、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、グリーン蛍光タンパク質、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペロキシダーゼ、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子よりなる群から選択されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項7】 前記処置を続いて施す工程をさらに含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項8】 前記レポーター遺伝子の発現を対照値と比較する工程をさらに含むことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項9】 前記トランスジェニック動物が、第2皮膚代謝関連プロモーターに結合したレポーター遺伝子を包含しており、該第2皮膚代謝プロモーターが第1皮膚代謝関連プロモーターと異なっていることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項10】 前記レポーター遺伝子発現の評価工程が、動物の生涯の間に少なくとも1回反復されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項11】 最初と次の評価工程が、1、10、30、60、90、180、365、または700日ほども間隔が空けられることを特徴とする請求項10記載の方法。

【請求項12】 前記最初と次の評価工程が、生きた動物において実施されることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項13】 皮膚代謝関連プロモーターに結合したレポーター遺伝子を包含する非ヒトトランスジェニック動物であって、該レポーター遺伝子が発光または蛍光産物をコードすることを特徴とする非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項14】 前記皮膚代謝関連プロモーターが、バーシカンプロモーター、マトリックスメタロプロテイナーゼプロモーター、血管内皮細胞増殖因子プロモーター、ヒアルロン酸シンターゼプロモーター、MMP2またはMMP9プロモーター、および好中球エラスターゼプロモーターよりなる群から選択されることを特徴とする請求項13記載の非ヒトトランスジェニック動物。

【請求項15】 トランスジェニック動物における導入遺伝子の発現を分析する方法であって：

生きたトランスジェニック動物を提供し；

導入遺伝子配列によってコードされたまたは導入遺伝子の調節要素の制御下にある、レポーター遺伝子の存在または不在を、前記生きたトランスジェニック動物において評価し、該レポーター遺伝子が発光または蛍光産物をコードしており；

それによって導入遺伝子の発現を分析する；各工程を含むことを特徴とする方

法。

【請求項16】 レポーターがGFPであることを特徴とする請求項15記載の方法。

【請求項17】 評価工程が、動物の生涯の間に少なくとも1回反復されることを特徴とする請求項15記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****発明の背景**

本発明は、例えばバーシカン(versican)、VEGF、またはMMPプロモーターのような皮膚の健康、老化、または外観に関連する遺伝子のプロモーターに結合したレポーター遺伝子を発現するトランスジェニック動物、および例えば化合物等の処置の皮膚に対する効果の評価においてそのような動物を用いる方法に関するものである。

【0002】**発明の概要**

本発明者は、レポーター遺伝子に結合した皮膚 - 代謝プロモーターを包含する1つ以上の構成物を有するトランスジェニック動物を用いることによって、皮膚の健康または外観の増強において用いるための例えば毛抜きまたは毛剃りによる脱毛あるいは化合物投与等の処置を評価できることを発見した。

【0003】

従って、本発明は、皮膚に対する効果に関して、例えば毛抜きまたは毛剃りによる脱毛または化合物投与等の処置を評価する方法に関する。本発明は：

皮膚代謝関連プロモーター、好ましくはヒトプロモーターに結合したレポーター遺伝子を包含するトランスジェニック動物を提供し；

そのトランスジェニック動物またはその組織に対して処置を施し；さらに、

レポーター遺伝子の発現を評価して、それによって皮膚に対する処置の効果に関してその処置を評価する；

各工程を含む。

【0004】

生きた動物に、化合物投与等の処置を施すことができる。他の実施形態において、化合物投与等の処置をトランスジェニック動物から採取した例えば細胞等の組織に施しても差し支えない。

【0005】

化合物投与等の処置の効果を、生きたトランスジェニック動物、死んだトラン

スジェニック動物、あるいは生きたまたは死んだトランスジェニック動物から採取した組織において、評価することができる。

【0006】

好ましい実施形態において、評価は、共焦点顕微鏡による、例えば蛍光信号等の信号の検出を含む。

【0007】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子の発現の評価工程は動物の生涯の間に少なくとも1回反復される。最初と次の評価工程は、1、10、30、60、90、180、365、または700日程度まで間隔が空いていて差し支えない。最初と次の評価工程はいずれも、例えば共焦点顕微鏡を用いて、生きた動物において実施することができる。

【0008】

好ましい実施形態において、処置は化合物の投与を含み、さらに、化合物は：トランスジェニック動物の皮膚に化合物を適用し；化合物を全身投与し；化合物を経口投与し；あるいは化合物を好ましくは皮膚または皮下に注射する：ことによって投与される。好ましい実施形態において、例えばSDSまたはDMSOを含む製剤化等、皮膚の透過性を高める界面活性剤または物質等の適切な運搬手段を用いて化合物を投与する。

【0009】

好ましい実施形態において、トランスジェニック動物は非ヒトトランスジェニック動物である。例えば、トランスジェニック動物は、トランスジェニックミニブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例えばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス（Takeda et al., 1991, L. Am. Geriatr. 39: 911-919を参照）、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のトランスジェニックマウスであって差し支えない。最も好ましい動物はマウスである。

【0010】

好ましい実施形態において、プロモーターはトランスジェニック動物に対して異種であって差し支えなく、すなわち、プロモーターは別の種に由来して差し支

えない。他の好ましい実施形態において、プロモーターはトランスジェニック動物と同じ種に由来する。特に好ましい実施形態において、皮膚代謝関連プロモーターは、ヒト皮膚代謝関連プロモーターである。

【0011】

特に好ましい実施形態において、皮膚代謝関連プロモーターは：例えばバーシカンプロモーター等のプロテオグリカンプロモーターのような、膜貫通タンパク質または細胞外マトリックス成分をコードする遺伝子由来のプロモーター；例えばMMP1、MMP2、MMP3、MMP4、MMP5、MMP6、MMP7、MMP8またはMMP9プロモーター等のマトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)プロモーターのような皮膚において発現されているプロテアーゼ由来のプロモーター；例えば血管内皮細胞増殖因子プロモーター等の血管機能に影響を及ぼす遺伝子由来のプロモーター；例えばヒアルロン酸シンターゼ1プロモーター、ヒアルロン酸シンターゼ2プロモーター、またはヒアルロン酸シンターゼ3プロモーター等のヒアルロン酸シンターゼプロモーター；例えばMMP2またはMMP9、好ましくはMMP9プロモーター等の皮膚において発現されているコラゲナーゼのためのプロモーター；好中球エラスターゼプロモーターである。

【0012】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は、例えば着色または発光産物を産生する酵素のような酵素等の比較的容易に検出できる産物を産生する。特に好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン蛍光タンパク質遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、西洋ワサビペロキシダーゼ遺伝子、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子であって差し支えない。

【0013】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子評価を行う前に、反復して処置を施す。

【0014】

好ましい実施形態において、処置は化合物の投与を含み、本方法はさらに1回以上のトランスジェニック動物への化合物の次の投与を含む。好ましい実施形態

において、1、2、3または4週間以上の間隔でトランスジェニック動物に化合物を投与する。化合物は、一定のレベルで投与しても、様々なレベル範囲で投与しても差し支えない。好ましい実施形態において、UV照射または他の皮膚に損傷を与える処置の前、間、または後に、トランスジェニック動物に化合物を投与する。

【0015】

好ましい実施形態において、本方法は、例えば未処置トランスジェニック動物におけるレポーター遺伝子の発現レベルのような対照値に対して、レポーター遺伝子の発現を比較する工程をさらに含む。

【0016】

好ましい実施形態において、トランスジェニック動物は、第2皮膚代謝関連プロモーターに結合した第2レポーター遺伝子をさらに包含しており、その第2皮膚代謝関連プロモーターは第1皮膚代謝関連プロモーターと異なっている。第1プロモーターに結合したレポーター遺伝子は、第2プロモーターに結合したレポーター遺伝子と同じであっても異なっても差し支えない。例えば、トランスジェニック動物は：バーシカンプロモーターに結合した第1レポーター遺伝子、および血管内皮細胞増殖因子プロモーターに結合した第2レポーター遺伝子；バーシカンプロモーターに結合した第1レポーター遺伝子、およびヒアルロン酸シンターゼプロモーターに結合した第2レポーター遺伝子；ヒアルロン酸シンターゼプロモーターに結合した第1レポーター遺伝子、および血管内皮細胞増殖因子プロモーターに結合した第2レポーター遺伝子；マトリックスメタロプロテイナーゼ(MMP)プロモーターに結合した第1レポーター遺伝子、およびMMP2またはMMP9、好ましくはMMP9プロモーターに結合した第2レポーター遺伝子；マトリックスプロテイナーゼ(MMP)プロモーターに結合した第1レポーター遺伝子、および好中球エラスターゼプロモーターに結合した第2レポーター遺伝子；MMP2またはMMP9、好ましくはMMP9プロモーターに結合した第1レポーター遺伝子、および好中球エラスターゼプロモーターに結合した第2レポーター遺伝子：を包含していて差し支えない。好ましい実施形態において、トランスジェニック動物は、その両方がアップレギュレートされている2つの

構成物を包含していて差し支えない。好ましい実施形態において、トランスジェニック動物は、その両方がダウンレギュレートされている2つの構成物を包含していて差し支えない。

【0017】

好ましい実施形態において、本方法は、第2皮膚代謝関連プロモーターに結合したレポーター遺伝子の発現を評価することをさらに含む。

【0018】

好ましい実施形態において、化合物は：化粧品；非毒性物質；1つ以上の管轄においてヒト用の薬物または化粧用途で認可されている物質；それらのレチノイドまたは誘導体； $TGF\beta$ ； $TGF\alpha$ である。

【0019】

好ましい実施形態において、本方法は、トランスジェニック動物に第2の処置を施す工程をさらに含む。第2の処置は、皮膚に傷をつけまたは損傷を与え、皮膚細胞を殺すような処置であって差し支えなく、あるいは例えば毛抜き、毛剃り、または脱毛剤の塗布による脱毛を含んでいて差し支えなく、あるいは通常、望ましくない皮膚の状態をもたらす。第2の処置は、水、乾燥剤、刺激剤、炎症性物質、光またはUV照射の適用であって差し支えない。第2処置を与えた場合における、処置に反応したレポーター遺伝子発現を特定し、さらに必要に応じて第2処置を与えなかった場合の反応と比較する。

【0020】

別の態様において、本発明は、皮膚に対する効果に関して、例えば毛抜きまたは毛剃りによる脱毛あるいは化合物投与等の処置を評価する方法に関する。本方法は：

好ましくはヒトの、バーシカンプロモーターに結合したレポーター遺伝子を包含する、例えばマウス等のトランスジェニック動物を提供し；

トランスジェニック動物またはそれらから採取した組織に、例えば毛抜きまたは毛剃り等による脱毛あるいは化合物投与等の処置を施し；さらに、

レポーター遺伝子の発現を評価し、それによって皮膚の老化に対する効果に関してその処置を評価する；各工程を含む。

【0021】

生きた動物に、化合物投与等の処置を施して差し支えない。他の実施形態では、例えばトランスジェニック動物から採取した組織に、化合物投与等の処置を施す。

【0022】

生きたトランスジェニック動物、死んだトランスジェニック動物、あるいは生きたまたは死んだトランスジェニック動物から採取した組織において、化合物投与等の処置の効果を評価することができる。

【0023】

好ましい実施形態において、評価は、共焦点顕微鏡による、例えば蛍光信号等の信号の検出を含む。

【0024】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子の発現の評価工程は動物の生涯の間に少なくとも1回反復される。最初と次の評価工程は、1、10、30、60、90、180、365、または700日程度まで間隔が空いていて差し支えない。最初と次の評価工程はいずれも、例えば共焦点顕微鏡を用いて、生きた動物において実施することができる。

【0025】

好ましい実施形態において、処置は化合物の投与を含み、さらに化合物は：トランスジェニック動物の皮膚に化合物を適用し；化合物を全身投与し；化合物を経口投与し；あるいは化合物を好ましくは皮膚または皮下に注射する：ことによって投与される。好ましい実施形態において、例えばSDSまたはDMSOを含む製剤化等、皮膚の透過性を高める界面活性剤または物質等の適切な運搬手段を用いて化合物を投与する。

【0026】

好ましい実施形態において、トランスジェニック動物は非ヒトトランスジェニック動物である。例えば、トランスジェニック動物は、トランスジェニックミニブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例えばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス

、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のトランスジェニックマウスであって差し支えない。最も好ましい動物はマウスである。

【0027】

好ましい実施形態において、バーシカンプロモーターはヒトバーシカンプロモーターである。

【0028】

好ましい実施形態において、レポーターは、例えばグリーン蛍光タンパク質のような、好ましくは外因性基質または補因子の添加無しに発光または蛍光を発するような発光または蛍光産物である。

【0029】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は、例えば着色または発光産物を産生する酵素のような酵素等の比較的容易に検出できる産物を産生する。特に好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン蛍光タンパク質遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、西洋ワサビペロキシダーゼ遺伝子、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子であって差し支えない。

【0030】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子評価を行う前に、反復して処置を施す。

【0031】

好ましい実施形態において、処置は化合物の投与を含み、本方法はさらに1回以上のトランスジェニック動物への化合物の次の投与を含む。好ましい実施形態において、1、2、3または4週間以上の間隔でトランスジェニック動物に化合物を投与する。化合物は、一定のレベルで投与しても、異なるレベル範囲で投与しても差し支えない。好ましい実施形態において、UV照射または他の皮膚に損傷を与える処置の前、間、または後に、トランスジェニック動物に化合物を投与する。

【0032】

好ましい実施形態において、本方法はさらに、例えば未処置トランスジェニック動物におけるレポーター遺伝子の発現レベルのような対照値に対して、レポーター遺伝子の発現を比較する工程を含む。

【0033】

好ましい実施形態において、本方法はさらに、第2皮膚代謝関連プロモーターに結合したレポーター遺伝子の発現を評価することを含む。

【0034】

好ましい実施形態において、化合物は：化粧品；非毒性物質；1つ以上の管轄においてヒト用薬物または化粧用途で認可されている物質；それらのレチノイドまたは誘導体；TGF β ；TGF α である。

【0035】

好ましい実施形態において、本方法はさらに、トランスジェニック動物に第2の処置を施す工程を含む。第2の処置は、皮膚に傷をつけまたは損傷を与え、皮膚細胞を殺すような処置であって差し支えなく、あるいは例えば毛抜き、毛剃り、または脱毛剤の塗布による脱毛を含んでいて差し支えなく、あるいは通常、望ましくない皮膚の状態をもたらす。第2の処置は、水、乾燥剤、刺激剤、炎症性物質、光またはUV照射の適用であって差し支えない。第2処置を与えた場合における処置に反応したレポーター遺伝子発現を特定し、さらに必要に応じて第2処置を与えなかった場合の反応と比較する。

【0036】

別の態様において、本発明は、皮膚に対する効果に関して、例えば毛抜きまたは毛剃りによる脱毛あるいは化合物投与等の処置を評価する方法に関する。本方法は：

好ましくはヒトの、マトリックスメタロプロテイナーゼプロモーターに結合したレポーター遺伝子を包含する、例えばマウス等のトランスジェニック動物を提供し；

トランスジェニック動物またはそれらから採取した組織に処置を施し；さらに、
レポーター遺伝子の発現を評価し、それによって皮膚の老化に対する効果に関

してその処置を評価する；各工程を含む。

【0037】

生きた動物に、化合物投与等の処置を施して差し支えない。他の実施形態では、例えばトランスジェニック動物から採取した組織に、化合物投与等の処置を施す。

【0038】

生きたトランスジェニック動物、死んだトランスジェニック動物、あるいは生きたまたは死んだトランスジェニック動物から採取した組織において、化合物投与等の処置の効果を評価することができる。

【0039】

好ましい実施形態において、評価は、共焦点顕微鏡による、例えば蛍光信号等の信号の検出を含む。

【0040】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子の発現の評価工程は動物の生涯の間に少なくとも1回反復される。最初と次の評価工程は、1、10、30、60、90、180、365、または700日程度まで間隔が空いていて差し支えない。最初と次の評価工程はいずれも、例えば共焦点顕微鏡を用いて、生きた動物において実施することができる。

【0041】

好ましい実施形態において、処置は化合物の投与を含み、さらに化合物は：トランスジェニック動物の皮膚に化合物を適用し；化合物を全身投与し；化合物を経口投与し；あるいは化合物を好ましくは皮膚または皮下に注射する：ことによって投与される。好ましい実施形態において、例えばSDSまたはDMSOを含む製剤化等、皮膚の透過性を高める界面活性剤または物質等の適切な運搬手段を用いて化合物を投与する。

【0042】

好ましい実施形態において、トランスジェニック動物は非ヒトトランスジェニック動物である。例えば、トランスジェニック動物は、トランスジェニックミニブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例え

ばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のトランスジェニックマウスであって差し支えない。最も好ましい動物はマウスである。

【0043】

好ましい実施形態において、マトリックスメタロプロテイナーゼプロモーターはヒトマトリックスメタロプロテイナーゼプロモーターである。

【0044】

好ましい実施形態において、レポーターは、例えばグリーン蛍光タンパク質のような、好ましくは外因性基質または補因子の添加無しに発光または蛍光を発するような発光または蛍光産物である。

【0045】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は、例えば着色または発光産物を産生する酵素のような酵素等の比較的容易に検出できる産物を産生する。特に好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン蛍光タンパク質遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、西洋ワサビペロキシダーゼ遺伝子、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子であって差し支えない。

【0046】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子評価を行う前に、反復して処置を施す。

【0047】

好ましい実施形態において、処置は化合物の投与を含み、本方法はさらに1回以上のトランスジェニック動物への化合物の次の投与を含む。好ましい実施形態において、1、2、3または4週間以上の間隔でトランスジェニック動物に化合物を投与する。化合物は、一定のレベルで投与しても、異なるレベル範囲で投与しても差し支えない。好ましい実施形態において、UV照射または他の皮膚に損傷を与える処置の前、間、または後に、トランスジェニック動物に化合物を投与する。

【0048】

好ましい実施形態において、本方法は、例えば未処置トランスジェニック動物におけるレポーター遺伝子の発現レベルのような対照値に対して、レポーター遺伝子の発現を比較する工程をさらに含む。

【0049】

好ましい実施形態において、本方法は、第2皮膚代謝関連プロモーターに結合したレポーター遺伝子の発現を評価することをさらに含む。

【0050】

好ましい実施形態において、化合物は：化粧品；非毒性物質；1つ以上の管轄においてヒト用薬物または化粧用途で認可されている物質；それらのレチノイドまたは誘導体； $TGF\beta$ ； $TGF\alpha$ である。

【0051】

好ましい実施形態において、本方法はさらに、トランスジェニック動物に第2の処置を施す工程を含む。第2の処置は、皮膚に傷をつけまたは損傷を与え、皮膚細胞を殺すような処置であって差し支えなく、あるいは例えば毛抜き、毛剃り、または脱毛剤の塗布による脱毛を含んでいて差し支えなく、あるいは通常、望ましくない皮膚の状態をもたらす。第2の処置は、水、乾燥剤、刺激剤、炎症性物質、光またはUV照射の適用であって差し支えない。第2処置を与えた場合における処置に反応したレポーター遺伝子発現を特定し、さらに必要に応じて第2処置を与えなかった場合の反応と比較する。

【0052】

別の態様において、本発明は、皮膚に対する効果に関して、例えば毛抜きまたは毛剃りによる脱毛あるいは化合物投与等の処置を評価する方法に関する。本方法は：

好ましくはヒトの、血管内皮細胞増殖因子プロモーターに結合したレポーター遺伝子を包含する、例えばマウス等のトランスジェニック動物を提供し；

トランスジェニック動物に処置を施し；さらに、

レポーター遺伝子の発現を評価し、それによって皮膚の老化に対する効果に関してその処置を評価する；各工程を含む。

【0053】

生きた動物に、化合物投与等の処置を施して差し支えない。他の実施形態では、例えばトランスジェニック動物から採取した組織に、化合物投与等の処置を施す。

【0054】

生きたトランスジェニック動物、死んだトランスジェニック動物、あるいは生きたまたは死んだトランスジェニック動物から採取した組織において、化合物投与等の処置の効果を評価することができる。

【0055】

好ましい実施形態において、評価は、共焦点顕微鏡による、例えば蛍光信号等の信号の検出を含む。

【0056】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子の発現の評価工程は動物の生涯の間に少なくとも1回反復される。最初と次の評価工程は、1、10、30、60、90、180、365、または700日程度まで間隔が空いていて差し支えない。最初と次の評価工程はいずれも、例えば共焦点顕微鏡を用いて、生きた動物において実施することができる。

【0057】

好ましい実施形態において、処置は化合物投与を含み、さらに化合物は：トランスジェニック動物の皮膚に化合物を適用し；化合物を全身投与し；化合物を経口投与し；あるいは化合物を好ましくは皮膚または皮下に注射する：ことによって投与される。好ましい実施形態において、例えばSDSまたはDMSOを含む製剤化等、皮膚の透過性を高める界面活性剤または物質等の適切な運搬手段を用いて化合物を投与する。

【0058】

好ましい実施形態において、トランスジェニック動物は非ヒトトランスジェニック動物である。例えば、トランスジェニック動物は、トランスジェニックミニブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例えばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス

、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のトランスジェニックマウスであって差し支えない。最も好ましい動物はマウスである。

【0059】

好ましい実施形態において、血管内皮細胞増殖因子プロモーターはヒト血管内皮細胞増殖因子プロモーターである。

【0060】

好ましい実施形態において、レポーターは、例えばグリーン蛍光タンパク質のような、好ましくは外因性基質または補因子の添加無しに発光または蛍光を発するような発光または蛍光産物である。

【0061】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は、例えば着色または発光産物を産生する酵素のような酵素等の比較的容易に検出できる産物を産生する。特に好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン蛍光タンパク質遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、西洋ワサビペロキシダーゼ遺伝子、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子であって差し支えない。

【0062】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子評価を行う前に、反復して処置を施す。

【0063】

好ましい実施形態において、処置は化合物投与を含み、本方法はさらに1回以上のトランスジェニック動物への化合物の次の投与を含む。好ましい実施形態において、1、2、3または4週間以上の間隔でトランスジェニック動物に化合物を投与する。化合物は、一定のレベルで投与しても、異なるレベル範囲で投与しても差し支えない。好ましい実施形態において、UV照射または他の皮膚に損傷を与える処置の前、間、または後に、トランスジェニック動物に化合物を投与する。

【0064】

好ましい実施形態において、本方法はさらに、例えば未処置トランスジェニック動物におけるレポーター遺伝子の発現レベルのような対照値に対して、レポーター遺伝子の発現を比較する工程を含む。

【0065】

好ましい実施形態において、本方法はさらに、第2皮膚代謝関連プロモーターに結合したレポーター遺伝子の発現を評価することを含む。

【0066】

好ましい実施形態において、化合物は：化粧品；非毒性物質；1つ以上の管轄においてヒト用薬物または化粧用途で認可されている物質；それらのレチノイドまたは誘導体；TGF β ；TGF α である。

【0067】

好ましい実施形態において、本方法はさらに、トランスジェニック動物に第2の処置を施す工程を含む。第2の処置は、皮膚に傷をつけまたは損傷を与え、皮膚細胞を殺すような処置であって差し支えなく、あるいは例えば毛抜き、毛剃り、または脱毛剤の塗布による脱毛を含んでいて差し支えなく、あるいは通常、望ましくない皮膚の状態をもたらす。第2の処置は、水、乾燥剤、刺激剤、炎症性物質、光またはUV照射の適用であって差し支えない。第2処置を与えた場合における処置に反応したレポーター遺伝子発現を特定し、さらに必要に応じて第2処置を与えなかった場合の反応と比較する。

【0068】

別の態様において、本発明は、皮膚に対する効果に関して、例えば毛抜きまたは毛剃りによる脱毛あるいは化合物投与等の処置を評価する方法に関する。本方法は：

好ましくはヒトの、ヒアルロン酸シンターゼプロモーターに結合したレポーター遺伝子を包含する、例えばマウス等のトランスジェニック動物を提供し；

トランスジェニック動物に処置を施し；さらに、

レポーター遺伝子の発現を評価し、それによって皮膚の老化に対する効果に関してその処置を評価する；各工程を含む。

【0069】

生きた動物に、化合物投与等の処置を施して差し支えない。他の実施形態では、例えばトランスジェニック動物から採取した組織に、化合物投与等の処置を施す。

【0070】

生きたトランスジェニック動物、死んだトランスジェニック動物、あるいは生きたまたは死んだトランスジェニック動物から採取した組織において、化合物投与等の処置の効果を評価することができる。

【0071】

好ましい実施形態において、評価は、共焦点顕微鏡による、例えば蛍光信号等の信号の検出を含む。

【0072】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子の発現の評価工程は動物の生涯の間に少なくとも1回反復される。最初と次の評価工程は、1、10、30、60、90、180、365、または700日程度まで間隔が空いていて差し支えない。最初と次の評価工程はいずれも、例えば共焦点顕微鏡を用いて、生きた動物において実施することができる。

【0073】

好ましい実施形態において、処置は化合物投与を含み、さらに化合物は：トランスジェニック動物の皮膚に化合物を適用し；化合物を全身投与し；化合物を経口投与し；あるいは化合物を好ましくは皮膚または皮下に注射する：ことによって投与される。好ましい実施形態において、例えばSDSまたはDMSOを含む製剤化等、皮膚の透過性を高める界面活性剤または物質等の適切な運搬手段を用いて化合物を投与する。

【0074】

好ましい実施形態において、トランスジェニック動物は非ヒトトランスジェニック動物である。例えば、トランスジェニック動物は、トランスジェニックミニブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例えばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等の

トランスジェニックマウスであって差し支えない。最も好ましい動物はマウスである。

【0075】

好ましい実施形態において、ヒアルロン酸シンターゼプロモーターはヒトヒアルロン酸シンターゼプロモーターである。

【0076】

好ましい実施形態において、レポーターは、例えばグリーン蛍光タンパク質のような、好ましくは外因性基質または補因子の添加無しに発光または蛍光を発するような発光または蛍光産物である。

【0077】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は、例えば着色または発光産物を産生する酵素のような酵素等の比較的容易に検出できる産物を産生する。特に好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン蛍光タンパク質遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、西洋ワサビペロキシダーゼ遺伝子、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子であって差し支えない。

【0078】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子評価を行う前に、反復して処置を施す。

【0079】

好ましい実施形態において、処置は化合物投与を含み、本方法はさらに1回以上のトランスジェニック動物への化合物の次の投与を含む。好ましい実施形態において、1、2、3または4週間以上の間隔でトランスジェニック動物に化合物を投与する。化合物は、一定のレベルで投与しても、異なるレベル範囲で投与しても差し支えない。好ましい実施形態において、UV照射または他の皮膚に損傷を与える処置の前、間、または後に、トランスジェニック動物に化合物を投与する。

【0080】

好ましい実施形態において、本方法はさらに、例えば末処置トランスジェニッ

ク動物におけるレポーター遺伝子の発現レベルのような対照値に対して、レポーター遺伝子の発現を比較する工程を含む。

【0081】

好ましい実施形態において、本方法はさらに、第2皮膚代謝関連プロモーターに結合したレポーター遺伝子の発現を評価することを含む。

【0082】

好ましい実施形態において、化合物は：化粧品；非毒性物質；1つ以上の管轄においてヒト用薬物または化粧用途で認可されている物質；それらのレチノイドまたは誘導体；TGF β ；TGF α である。

【0083】

好ましい実施形態において、本方法はさらに、トランスジェニック動物に第2の処置を施す工程を含む。第2の処置は、皮膚に傷をつけまたは損傷を与え、皮膚細胞を殺すような処置であって差し支えなく、あるいは例えば毛抜き、毛剃り、または脱毛剤の塗布による脱毛を含んでいて差し支えなく、あるいは通常、望ましくない皮膚の状態をもたらす。第2の処置は、水、乾燥剤、刺激剤、炎症性物質、光またはUV照射の適用であって差し支えない。第2処置を与えた場合における処置に反応したレポーター遺伝子発現を特定し、さらに必要に応じて第2処置を与えなかった場合の反応と比較する。

【0084】

別の態様において、本発明は、皮膚に対する効果に関して、例えば毛抜きまたは毛剃りによる脱毛あるいは化合物投与等の処置を評価する方法に関する。本方法は：

好ましくはヒトの、MMP2またはMMP9、好ましくはMMP9プロモーターに結合したレポーター遺伝子を包含する、例えばマウス等のトランスジェニック動物を提供し；

トランスジェニック動物またはそれらから採取した組織に処置を施し；さらに、

レポーター遺伝子の発現を評価し、それによって皮膚の老化に対する効果に関してその処置を評価する；各工程を含む。

【0085】

生きた動物に、化合物投与等の処置を施して差し支えない。他の実施形態では、例えばトランスジェニック動物から採取した組織に、化合物投与等の処置を施す。

【0086】

生きたトランスジェニック動物、死んだトランスジェニック動物、あるいは生きたまたは死んだトランスジェニック動物から採取した組織において、化合物投与等の処置の効果を評価することができる。

【0087】

好ましい実施形態において、評価は、共焦点顕微鏡による、例えば蛍光信号等の信号の検出を含む。

【0088】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子の発現の評価工程は動物の生涯の間に少なくとも1回反復される。最初と次の評価工程は、1、10、30、60、90、180、365、または700日程度まで間隔が空いていて差し支えない。最初と次の評価工程はいずれも、例えば共焦点顕微鏡を用いて、生きた動物において実施することができる。

【0089】

好ましい実施形態において、処置は化合物投与を含み、さらに化合物は：トランスジェニック動物の皮膚に化合物を適用し；化合物を全身投与し；化合物を経口投与し；あるいは化合物を好ましくは皮膚または皮下に注射する：ことによって投与される。好ましい実施形態において、例えばSDSまたはDMSOを含む製剤化等、皮膚の透過性を高める界面活性剤または物質等の適切な運搬手段を用いて化合物を投与する。

【0090】

好ましい実施形態において、トランスジェニック動物は非ヒトトランスジェニック動物である。例えば、トランスジェニック動物は、トランスジェニックミニブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例えばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス

、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のトランスジェニックマウスであって差し支えない。最も好ましい動物はマウスである。

【0091】

好ましい実施形態において、MMP 2またはMMP 9、好ましくはMMP 9プロモーターはヒトMMP 2またはMMP 9、好ましくはMMP 9プロモーターである。

【0092】

好ましい実施形態において、レポーターは、例えばグリーン蛍光タンパク質のような、好ましくは外因性基質または補因子の添加無しに発光または蛍光を発するような発光または蛍光産物である。

【0093】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は、例えば着色または発光産物を産生する酵素のような酵素等の比較的容易に検出できる産物を産生する。特に好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン蛍光タンパク質遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、西洋ワサビペロキシダーゼ遺伝子、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子であって差し支えない。

【0094】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子評価を行う前に、反復して処置を施す。

【0095】

好ましい実施形態において、処置は化合物投与を含み、本方法はさらに1回以上のトランスジェニック動物への化合物の次の投与を含む。好ましい実施形態において、1、2、3または4週間以上の間隔でトランスジェニック動物に化合物を投与する。化合物は、一定のレベルで投与しても、異なるレベル範囲で投与しても差し支えない。好ましい実施形態において、UV照射または他の皮膚に損傷を与える処置の前、間、または後に、トランスジェニック動物に化合物を投与する。

【0096】

好ましい実施形態において、本方法はさらに、例えば未処置トランスジェニック動物におけるレポーター遺伝子の発現レベルのような対照値に対して、レポーター遺伝子の発現を比較する工程を含む。

【0097】

好ましい実施形態において、本方法はさらに、第2皮膚代謝関連プロモーターに結合したレポーター遺伝子の発現を評価することを含む。

【0098】

好ましい実施形態において、化合物は：化粧品；非毒性物質；1つ以上の管轄においてヒト用薬物または化粧用途で認可されている物質；それらのレチノイドまたは誘導体； $TGF\beta$ ； $TGF\alpha$ である。

【0099】

好ましい実施形態において、本方法はさらに、トランスジェニック動物に第2の処置を施す工程を含む。第2の処置は、皮膚に傷をつけまたは損傷を与え、皮膚細胞を殺すような処置であって差し支えなく、あるいは例えば毛抜き、毛剃り、または脱毛剤の塗布による脱毛を含んでいて差し支えなく、あるいは通常、望ましくない皮膚の状態をもたらす。第2の処置は、水、乾燥剤、刺激剤、炎症性物質、光またはUV照射の適用であって差し支えない。第2処置を与えた場合における処置に反応したレポーター遺伝子発現を特定し、さらに必要に応じて第2処置を与えなかった場合の反応と比較する。

【0100】

別の態様において、本発明は、皮膚に対する効果に関して、例えば毛抜きまたは毛剃りによる脱毛あるいは化合物投与等の処置を評価する方法に関する。本方法は：

好ましくはヒトの、好中球エラスターゼプロモーターに結合したレポーター遺伝子を包含する、例えばマウス等のトランスジェニック動物を提供し；

トランスジェニック動物またはそれらから採取した組織に処置を施し；さらに、
レポーター遺伝子の発現を評価し、それによって皮膚の老化に対する効果に関

してその処置を評価する：

各工程を含む。

【0101】

生きた動物に、化合物投与等の処置を施して差し支えない。他の実施形態では、例えばトランスジェニック動物から採取した組織に、化合物投与等の処置を施す。

【0102】

生きたトランスジェニック動物、死んだトランスジェニック動物、あるいは生きたまたは死んだトランスジェニック動物から採取した組織において、化合物投与等の処置の効果を評価することができる。

【0103】

好ましい実施形態において、評価は、共焦点顕微鏡による、例えば蛍光信号等の信号の検出を含む。

【0104】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子の発現の評価工程は動物の生涯の間に少なくとも1回反復される。最初と次の評価工程は、1、10、30、60、90、180、365、または700日程度まで間隔が空いていて差し支えない。最初と次の評価工程はいずれも、例えば共焦点顕微鏡を用いて、生きた動物において実施することができる。

【0105】

好ましい実施形態において、処置は化合物投与を含み、さらに化合物は：トランスジェニック動物の皮膚に化合物を適用し；化合物を全身投与し；化合物を経口投与し；あるいは化合物を好ましくは皮膚または皮下に注射する：ことによって投与される。好ましい実施形態において、例えばSDSまたはDMSOを含む製剤化等、皮膚の透過性を高める界面活性剤または物質等の適切な運搬手段を用いて化合物を投与する。

【0106】

好ましい実施形態において、トランスジェニック動物は非ヒトトランスジェニック動物である。例えば、トランスジェニック動物は、トランスジェニックミニ

ブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例えばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のトランスジェニックマウスであって差し支えない。最も好ましい動物はマウスである。

【0107】

好ましい実施形態において、好中球エラスターゼプロモーターはヒト好中球エラスターゼプロモーターである。

【0108】

好ましい実施形態において、レポーターは、例えばグリーン蛍光タンパク質のような、好ましくは外因性基質または補因子の添加無しに発光または蛍光を発するような発光または蛍光産物である。

【0109】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は、例えば着色または発光産物を産生する酵素のような酵素等の比較的容易に検出できる産物を産生する。特に好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン蛍光タンパク質遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、西洋ワサビペロキシダーゼ遺伝子、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子であって差し支えない。

【0110】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子評価を行う前に、反復して処置を施す。

【0111】

好ましい実施形態において、処置は化合物投与を含み、本方法はさらに1回以上のトランスジェニック動物への化合物の次の投与を含む。好ましい実施形態において、1、2、3または4週間以上の間隔でトランスジェニック動物に化合物を投与する。化合物は、一定のレベルで投与しても、異なるレベル範囲で投与しても差し支えない。好ましい実施形態において、UV照射または他の皮膚に損傷を与える処置の前、間、または後に、トランスジェニック動物に化合物を投与す

る。

【0112】

好ましい実施形態において、本方法はさらに、例えば未処置トランスジェニック動物におけるレポーター遺伝子の発現レベルのような対照値に対して、レポーター遺伝子の発現を比較する工程を含む。

【0113】

好ましい実施形態において、本方法はさらに、第2皮膚代謝関連プロモーターに結合したレポーター遺伝子の発現を評価することを含む。

【0114】

好ましい実施形態において、化合物は：化粧品；非毒性物質；1つ以上の管轄においてヒト用薬物または化粧用途で認可されている物質；それらのレチノイドまたは誘導体； $TGF\beta$ ； $TGF\alpha$ である。

【0115】

好ましい実施形態において、本方法はさらに、トランスジェニック動物に第2の処置（化合物以外）を施す工程を含む。第2の処置は、皮膚に傷をつけまたは損傷を与え、皮膚細胞を殺すような処置であって差し支えなく、あるいは例えば毛抜き、毛剃り、または脱毛剤の塗布による脱毛を含んでいて差し支えなく、あるいは通常、望ましくない皮膚の状態をもたらす。第2の処置は、水、乾燥剤、刺激剤、炎症性物質、光またはUV照射の適用であって差し支えない。第2処置を与えた場合における処置に反応したレポーター遺伝子発現を特定し、さらに必要に応じて第2処置を与えなかった場合の反応と比較する。

【0116】

別の態様において、本発明は、例えばバーシカンプロモーターに結合したレポーター遺伝子を包含するトランスジェニック動物のような、この中に記載の非ヒトトランスジェニック動物に関する。

【0117】

好ましい実施形態において、トランスジェニック動物は非ヒトトランスジェニック動物である。例えば、トランスジェニック動物は、トランスジェニックミニブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例

例えばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス (Takeda et al., 1991, L. Am. Geriatr. 39: 911-919を参照)、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のトランスジェニックマウスであって差し支えない。最も好ましい動物はマウスである。

【0118】

好ましい実施形態において、バーシカンプロモーターはヒトバーシカンプロモーターである。

【0119】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は、例えば着色または発光産物を産生する酵素のような酵素等の比較的容易に検出できる産物を産生する。特に好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン蛍光タンパク質遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、西洋ワサビペロキシダーゼ遺伝子、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子であって差し支えない。

【0120】

別の態様において、本発明は、例えばマトリックスメタロプロテイナーゼプロモーターに結合したレポーター遺伝子を包含する、例えばマウスのような非ヒトトランスジェニック動物またはそれらから採取した組織に関する。

【0121】

好ましい実施形態において、トランスジェニック動物は非ヒトトランスジェニック動物である。例えば、トランスジェニック動物は、トランスジェニックミニブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例えばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のトランスジェニックマウスであって差し支えない。最も好ましい動物はマウスである。

【0122】

好ましい実施形態において、マトリックスメタロプロテイナーゼプロモーターはヒトマトリックスメタロプロテイナーゼプロモーターである。

【0123】

好ましい実施形態において、レポーターは、例えばグリーン蛍光タンパク質のような、好ましくは外因性基質または補因子の添加無しに発光または蛍光を発するような発光または蛍光産物である。

【0124】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は、例えば着色または発光産物を産生する酵素のような酵素等の比較的容易に検出できる産物を産生する。特に好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン蛍光タンパク質遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、西洋ワサビペロキシダーゼ遺伝子、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子であって差し支えない。

【0125】

別の態様において、本発明は、例えば血管内皮細胞増殖因子プロモーターに結合したレポーター遺伝子を包含する、例えばマウスのような非ヒトトランスジェニック動物またはそれらから採取した組織に関する。

【0126】

好ましい実施形態において、トランスジェニック動物は非ヒトトランスジェニック動物である。例えば、トランスジェニック動物は、トランスジェニックミニブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例えばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のトランスジェニックマウスであって差し支えない。最も好ましい動物はマウスである。

【0127】

好ましい実施形態において、血管内皮細胞増殖因子プロモーターはヒト血管内皮細胞増殖因子プロモーターである。

【0128】

好ましい実施形態において、レポーターは、例えばグリーン蛍光タンパク質のような、好ましくは外因性基質または補因子の添加無しに発光または蛍光を発

するような発光または蛍光産物である。

【0129】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は、例えば着色または発光産物を産生する酵素のような酵素等の比較的容易に検出できる産物を産生する。特に好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン蛍光タンパク質遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、西洋ワサビペロキシダーゼ遺伝子、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子であって差し支えない。

【0130】

別の態様において、本発明は、例えばヒアルロン酸シンターゼプロモーターに結合したレポーター遺伝子を包含する、例えばマウスのような非ヒトトランスジェニック動物またはそれらから採取した組織に関する。

【0131】

好ましい実施形態において、トランスジェニック動物は非ヒトトランスジェニック動物である。例えば、トランスジェニック動物は、トランスジェニックミニブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例えばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のトランスジェニックマウスであって差し支えない。最も好ましい動物はマウスである。

【0132】

好ましい実施形態において、ヒアルロン酸シンターゼプロモーターはヒトヒアルロン酸シンターゼプロモーターである。

【0133】

好ましい実施形態において、レポーターは、例えばグリーン蛍光タンパク質のような、好ましくは外因性基質または補因子の添加無しに発光しまたは蛍光を発するような発光または蛍光産物である。

【0134】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は、例えば着色または発光産物

を産生する酵素のような酵素等の比較的容易に検出できる産物を産生する。特に好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン蛍光タンパク質遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、西洋ワサビペロキシダーゼ遺伝子、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子であって差し支えない。

【0135】

別の態様において、本発明は、例えばI V型コラゲナーゼプロモーターに結合したレポーター遺伝子を包含する、例えばマウスのような非ヒトトランスジェニック動物またはそれらから採取した組織に関する。

【0136】

好ましい実施形態において、トランスジェニック動物は非ヒトトランスジェニック動物である。例えば、トランスジェニック動物は、トランスジェニックミニブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例えばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のトランスジェニックマウスであって差し支えない。最も好ましい動物はマウスである。

【0137】

特に好ましい実施形態において、MMP 2またはMMP 9、好ましくはMMP 9プロモーターはヒトMMP 2またはMMP 9、好ましくはMMP 9プロモーターである。

【0138】

好ましい実施形態において、レポーターは、例えばグリーン蛍光タンパク質のような、好ましくは外因性基質または補因子の添加無しに発光または蛍光を発するような発光または蛍光産物である。

【0139】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は、例えば着色または発光産物を産生する酵素のような酵素等の比較的容易に検出できる産物を産生する。特に好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は β -ガラクトシダーゼ遺伝子、

ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン蛍光タンパク質遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、西洋ワサビペロキシダーゼ遺伝子、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子であって差し支えない。

【0140】

別の態様において、本発明は、例えば好中球エラスターゼプロモーターに結合したレポーター遺伝子を包含する、例えばマウスのような非ヒトトランスジェニック動物またはそれらから採取した組織に関する。

【0141】

好ましい実施形態において、トランスジェニック動物は非ヒトトランスジェニック動物である。例えば、トランスジェニック動物は、トランスジェニックミニブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例えばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のトランスジェニックマウスであって差し支えない。最も好ましい動物はマウスである。

【0142】

好ましい実施形態において、好中球エラスターゼプロモーターはヒト好中球エラスターゼプロモーターである。

【0143】

好ましい実施形態において、レポーターは、例えばグリーン蛍光タンパク質のような、好ましくは外因性基質または補因子の添加無しに発光または蛍光を発するような発光または蛍光産物である。

【0144】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は、例えば着色または発光産物を産生する酵素のような酵素等の比較的容易に検出できる産物を産生する。特に好ましい実施形態において、レポーター遺伝子は β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン蛍光タンパク質遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、西洋ワサビペロキシダーゼ遺伝子、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子であって差し支えない。

【0145】

別の態様において、本発明は、この中に記載されているプロモーター - レポーター遺伝子構成物に関する。

【0146】

別の態様において、本発明は、組織におけるGFPの存在または分布を分析する方法に関する。本方法は：

GFPを含有する例えば組織切片等の組織試料を提供し；

蛍光発光または蛍光発光の欠損を評価または検出し、その検出工程が水溶液での洗浄または固定の前になされ；

それによって組織中のGFPを分析する；各工程を含む。

【0147】

好ましい実施形態において、検出工程前に組織を凍結する。検出前に試料を固定剤と接触させない。

【0148】

好ましい実施形態において、組織は、例えば、トランスジェニックミニブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例えばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス (Take da et al., 1991, L. Am. Geriatr. 39: 911-919を参照)、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のトランスジェニックマウスに由来し；GFPは、GFPをコードする導入遺伝子配列から発現され、または例えば導入遺伝子のプロモーター - またはエンハンサー等の導入遺伝子の調節要素の制御下で発現される。

【0149】

好ましい実施形態において、プロモーターはヒトプロモーターである。

【0150】

好ましい実施形態において、検出工程は、例えば蛍光またはエピ蛍光(epi-fluorescent)顕微鏡のような顕微鏡を用いた試料の検査を含む。

【0151】

好ましい実施形態において、評価工程は、共焦点顕微鏡を用いた、例えば蛍光

信号等の信号の検出を含む。

【0152】

本方法において、この中に記載の動物を用いることができる。

【0153】

別の態様において、本発明は、例えば毛嚢の外側毛根鞘のような毛嚢においてレポーター分子を発現する動物において、毛周期の段階を特定する方法に関する。本方法は、レポーター発現の存在または不在を評価または検出することを含み、存在することは成長毛周期（発育相）に関連し、かつ不在は休止毛周期（テロゲンおよびカトゲン(catogen)）に関連する。

【0154】

好ましい実施形態において、レポーター分子は、例えば外側毛根鞘等の毛嚢において発現されているプロモーターの制御下にある。

【0155】

好ましい実施形態において、プロモーターはヒトプロモーターである。

【0156】

好ましい実施形態において、レポーターは、例えばグリーン蛍光タンパク質のような、好ましくは外因性基質または補因子の添加無しに発光しまたは蛍光を発するような発光または蛍光産物である。

【0157】

好ましい実施形態において、レポーター分子はGFPである。

【0158】

好ましい実施形態において、動物は、例えば、トランスジェニックミニブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例えばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のトランスジェニックマウスのような、トランスジェニック動物である。

【0159】

本方法において、この中に記載の動物を用いることができる。

【0160】

好ましい実施形態において、プロモーターは、VEGFプロモーター、パーシカンプロモーター、またはこの中に記載の他のプロモーターである。

【0161】

別の態様において、本発明は、創傷治癒を分析する方法に関する。本方法は：VEGFプロモーターの制御下でレポーター分子を発現する動物を提供し；創傷におけるレポーター分子の存在または不在を検出し；それによって創傷治癒を分析する；各工程を含む。

【0162】

好ましい実施形態において、検出工程は記録される。

【0163】

好ましい実施形態において、動物または動物由来の組織に、化合物投与等の処置を施す。そのような実施形態において、本方法を用いて、創傷治癒に対する処置の効果を評価することができる。処置対象または組織からの結果と、未処置対象または組織からの結果とを比較するのが望ましい。

【0164】

好ましい実施形態において、レポーターは、例えばグリーン蛍光タンパク質のような、好ましくは外因性基質または補因子の添加無しに発光または蛍光を発するような発光または蛍光産物である。

【0165】

好ましい実施形態において、レポーター分子はGFPである。

【0166】

好ましい実施形態において、動物は、例えば、トランスジェニックミニブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例えばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のトランスジェニックマウスのような、トランスジェニック動物である。

【0167】

本方法において、この中に記載の動物を用いることができる。

【0168】

好ましい実施形態において、プロモーターはヒトプロモーターである。

【0169】

別の態様において、本発明は、GFP導入遺伝子を包含するトランスジェニック動物におけるGFPを分析する方法に関する。本方法は：

動物または動物由来の組織中におけるGFPの存在または不在を評価または検出する第1工程；および（必要に応じて）、

動物または動物由来の組織中におけるGFPの存在または不在を評価または検出する第2工程；さらに、

それによってGFP発現を分析する；各工程を含む。

【0170】

好ましい実施形態において（本方法またはこの中に記載の他の方法における）、GFPはレッドシフトGFPである。

【0171】

好ましい実施形態において、動物は、例えば、トランスジェニックミニプタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例えばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のトランスジェニックマウスのような、トランスジェニック動物である。本方法において、この中に記載の動物を用いることができる。

【0172】

好ましい実施形態において、第1工程と第2工程の間に、1、5、10、20、30、60、180、365日以上経過する。

【0173】

好ましい実施形態において、組織は皮膚組織である。

【0174】

好ましい実施形態において、検出工程は生きた動物において実施される。

【0175】

好ましい実施形態において、プロモーターはヒトプロモーターである。

【0176】

好ましい実施形態において、評価工程は、共焦点顕微鏡を用いた、例えば蛍光信号等の信号の検出を含む。

【0177】

別の態様において、本発明は、例えばトランスジェニックマウスまたはブタのようなトランスジェニック動物における導入遺伝子の発現を分析する方法に関する。本方法は：

生きたトランスジェニック動物を提供し；

導入遺伝子配列によってコードされたまたは例えばプロモーターまたはエンハンサー等の導入遺伝子の調節要素の制御下にある、例えばGFP等のレポーター遺伝子の存在または不在を評価または検出し；

それによって導入遺伝子の発現を分析する；各工程を含む。

【0178】

好ましい実施形態において、動物は、例えば、トランスジェニックミニブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例えばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のトランスジェニックマウスのような、トランスジェニック動物である。本方法において、この中に記載の動物を用いることができる。

【0179】

好ましい実施形態において、レポーターは、VEGFプロモーターまたはこの中に記載の別のプロモーターの制御下にある。

【0180】

好ましい実施形態において、プロモーターはヒトプロモーターである。

【0181】

好ましい実施形態において、皮膚において発現されているプロモーターである。

【0182】

好ましい実施形態において、評価工程は、共焦点顕微鏡を用いた、例えば蛍光信号等の信号の検出を含む。

【0183】

好ましい実施形態において、組織は皮膚組織である。

【0184】

好ましい実施形態において、検出工程は生きた動物において実施される。

【0185】

好ましい実施形態において、本方法は動物の生涯の間に少なくとも1回反復される。本方法の最初と次の評価工程は、1、10、30、60、90、180、365、または700日程度まで間隔が空いていて差し支えない。

【0186】

好ましい実施形態において、レポーターは、例えばグリーン蛍光タンパク質のような、好ましくは外因性基質または補因子の添加無しに発光または蛍光を発するような発光または蛍光産物である。

【0187】

別の態様において、本発明は、生きた動物における遺伝子発現を評価する方法に関する。本方法は：

例えばレッドシフトGFPのようなGFP等のレポーター遺伝子を含む導入遺伝子を包含する、生きたトランスジェニック動物を提供し；

生きたトランスジェニック動物における、例えばGFP等のレポーター分子の存在または不在を評価または検出し、それによって生きた動物における遺伝子発現を分析する；各工程を含む。

【0188】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子をコードする配列は、例えばヒトプロモーターのような予め選択されたプロモーターの制御下にある。予め選択されたプロモーターは、例えば：バーシカンプロモーター等のプロテオグリカンプロモーターのような、膜貫通タンパク質または細胞外マトリックス成分をコードする遺伝子由来のプロモーター；MMP1、MMP2、MMP3、MMP4、MMP5、MMP6、MMP7、MMP8またはMMP9プロモーター等のマトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）プロモーターのような皮膚において発現されているプロテアーゼ由来のプロモーター；血管内皮細胞増殖因子プロモ-

ター等の血管機能に影響を及ぼす遺伝子由来のプロモーター；ヒアルロン酸シンターゼ1プロモーター、ヒアルロン酸シンターゼ2プロモーター、またはヒアルロン酸シンターゼ3プロモーター等のヒアルロン酸シンターゼプロモーター；MMP2またはMMP9、好ましくはMMP9プロモーター等の皮膚において発現されているコラゲナーゼのためのプロモーター；あるいは好中球エラスターゼプロモーターのような、皮膚代謝関連プロモーターであって差し支えない。

【0189】

VEGFプロモーターは好ましいプロモーターである。好ましい実施形態において、プロモーターは、炎症性血管新生、または腫瘍増殖においてアップレギュレートまたはダウンレギュレートされているプロモーターである。

【0190】

好ましい実施形態において、トランスジェニック動物は非ヒトトランスジェニック動物である。例えば、トランスジェニック動物は、トランスジェニックミニブタ、トランスジェニックモルモット、トランスジェニックラット、または例えばヘアレスマウス、ヌードマウス、例えばSAMマウスのような老化促進マウス、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のトランスジェニックマウスであって差し支えない。最も好ましい動物はマウスである。

【0191】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子の発現の評価の前、間、または後に、処置を動物に施す。処置は化合物投与であって差し支えない。化合物は：トランスジェニック動物の皮膚に化合物を適用し；化合物を全身投与し；化合物を経口投与し；あるいは化合物を好ましくは皮膚または皮下に注射する：ことによって投与される。好ましい実施形態において、例えばSDSまたはDMSOを含む製剤化等、皮膚の透過性を高める界面活性剤または物質等の適切な運搬手段を用いて化合物を投与する。

【0192】

好ましい実施形態において、評価は、共焦点顕微鏡による、例えば蛍光信号等の信号の検出を含む。

【0193】

好ましい実施形態において、レポーター遺伝子の発現の評価工程は動物の生涯の間に少なくとも1回反復される。最初と次の評価工程は、1、10、30、60、90、180、365、または700日程度まで間隔が空いていて差し支えない。最初と次の評価工程はいずれも、例えば共焦点顕微鏡を用いて、生きた動物において実施することができる。

【0194】

好ましい実施形態において、レポーターは、例えばグリーン蛍光タンパク質のような、好ましくは外因性基質または補因子の添加無しに発光または蛍光を発するような発光または蛍光産物である。

【0195】

動物全体を用いたin vivoで、あるいはこの中に記載のトランスジェニック動物に由来する例えば皮膚等の組織または細胞、または皮膚-代謝プロモーター/レポーター遺伝子構成物で形質転換した細胞由来の細胞（好ましくは皮膚細胞もしくは組織）を用いたin vitroで、本発明の方法を実施して差し支えない。

【0196】

この中で用いているように、「トランスジェニック動物」は、1つ以上の、好ましくは実質的に全ての、その動物中の細胞が導入遺伝子を包含するような、例えばミニブタ、モルモット、またはマウスもしくはラット等の齧歯動物のような、非ヒト動物等の動物である。導入遺伝子は、直接的に、あるいはマイクロインジェクション、トランスフェクション、または例えば組換えウィルスを用いたインジェクションのようなインジェクションによる細胞前駆体への導入によって間接的に、細胞に導入することができる。遺伝子操作の用語は、組換えDNA分子の導入を称する。組換えDNA分子は、染色体内に組み込まれても差し支えなく、あるいは染色体外で複製するDNAであっても差し支えない。

【0197】

トランスジェニック動物は、例えば導入遺伝子に対してヘテロ接合性であってもホモ接合性であっても差し支えない。

【0198】

この中で用いられている「齧歯動物」の用語は、齧歯目系統の全ての動物を称する。

【0199】

この中で用いられている「レポーター遺伝子」は、その発現がプロモーターに制御されるように、皮膚代謝関連プロモーターの下流に融合している核酸配列を称する。レポーター遺伝子は、通常、その活性を容易に測定できるタンパク質をコードする。例えば、レポーター遺伝子は、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン蛍光タンパク質遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、西洋ワサビペロキシダーゼ遺伝子、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子等の、その細胞において自然では認められない、例えば酵素のような測定可能なタンパク質をコードする遺伝子であって差し支えない。好ましい実施形態において、レポーター産物は、それが結合しているプロモーターの活性を示唆する信号を提供できる。好ましいレポーターは、発光または蛍光を発するようなものである。好ましいレポーターは、外因性基質の添加無しに、*in vivo*で発光または蛍光を発することができる。特に適切なレポーターは、グリーン蛍光タンパク質である。例えば、EGFP、EBFP、EYFP、d2EGFP、ECFP、GFPuvのようなグリーン蛍光タンパク質の修飾変異体は、グリーン蛍光タンパク質の用語に含まれる。EGFPは特に好ましい。それらGFPの変異体は、CLONTECH, Laboratories, Inc. Palo Alto, CA.によって市販されている。さらには、GFPおよびその変異体は、以下の引例において提供されており、それら引例の全てが参照によってこの中に組み込まれている：Chalfie, M. et al. (1994) Science 263: 802-805; Prasher, D.C., et al. (1992) Gene 111: 229-233; Inouye, S. & Tsuji, F.I. (1994) FEBS Letters 341: 277-280; Wang, S. & Hazelrigg, T. (1994) Nature 369: 400-403; Cody, C.W., et al. (1993) Biochemistry 32: 1212-1218; Inouye & Tsuji, F.I. (1994) FEBS Letters 351: 211-214; Heim, R., et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91: 12501-12504; Yang, T.T., et al. (1996) Nucleic Acids Res. 24 (22): 4592-4593; Cormack, B.P., et al. (1996) Gene 173: 33-38; Crameri, A., et al. (1996) Nature Biotechnol. 12: 315-319; Haas, J. et al., (

1996) Curr. Biol. 6: 315-324; Galbraith, D.W., et al. (1995) Methods Cell Biol. 50: 1-12; Living Colors Destabilized EGFP Vectors (April 1998) CLONTECHniques XIII(2): 16-17, Living Colors pEBFP Vector (April 1997) CLONTECHniques XII(2): 16-17; Heim, R & Tsien, R.Y. (1996) Curr. Biol. 6: 178-182; Ormo, et al. (1996) Science 273: 1392-1395; Mitra, R.D. et al. (1996) Gene 173: 13-17.

【0200】

この中で用いられている「皮膚代謝関連プロモーター」の用語は、皮膚において転写的に活性であるプロモーターを称する。それは皮膚特異的である必要はない。そのようなプロモーターが自然に認められる遺伝子は、皮膚の維持または適切な機能に関連する遺伝子である。例えば、そのような遺伝子は細胞外マトリックスの一部であるタンパク質、細胞外マトリックスの維持または分解に関連するタンパク質、あるいは皮膚への栄養の供給に関連するタンパク質をコードする遺伝子であって差し支えない。例えばバーシカンプロモーターの活性断片のような、この中で挙げられているプロモーターの活性断片または類似物を、本発明の方法、組成物、および動物において用いることができる。ヒトゲノムDNA由来の機能的ヒトバーシカンプロモーターの839bp断片(-559から+280)(Naso, M.F., Zimmermann, D.R. & Iozzo, R.V. (1994) J. Biol. Chem., 269, 32999-33008)を、バーシカンプロモーターを用いる方法において使用することができる。

【0201】

本発明の実施形態は、生きた動物において、in situで、導入遺伝子発現を評価することを可能とする。例えばGFPレポーター分子のような発光または蛍光レポーターは、そのような実施形態において特に好都合である。

【0202】

この中で用いられている「動物に化合物を投与する」とは、動物または細胞に処置を施し、送達し、または適用することを称する。投与は、局所適用によって、非経口または経口経路によって、筋肉注射、皮下/皮内注射、静脈注射、口腔内投与によって、経皮送達によって、あるいは経鼻または気道経路による投与によって、行うことができる。最も好ましい投与は、局所適用、あるいは皮下また

は皮内注射である。

【0203】

本発明の方法は、皮膚に対する効果に関して、化合物を迅速かつ効率的に評価することを可能とする。

【0204】

本発明の他の特徴および利点は、以下の詳細な記載および請求項から明らかである。

【0205】

発明の詳細な説明

プロモーター

本発明の方法は、皮膚に対する効果に関して、化合物を評価することを可能とする。本発明の方法を用いて、例えば化粧品としての使用のため、皮膚の健康または外観に対する効果に関して化合物を評価することができる。皮膚に対する効果は、通常、皮膚代謝関連プロモーターの制御下にある遺伝子の発現に対する効果として特定される。そのようなプロモーターとして：例えば真皮または表皮等の皮膚の成分である産物；皮膚の水分補給または栄養摂取に影響を与える産物；皮膚成分の合成または分解を促進させる産物；皮膚の脈管構造に影響を及ぼす産物；毛嚢代謝に影響を与える産物；皮膚腺構造に影響を与える産物；皮下筋肉組織に影響を与える産物；脂肪組織に影響を与える産物；あるいは皮神経に影響を与える産物：の発現を調節するようなものが挙げられる。

【0206】

本発明の方法は、例えば皮膚の弾力性、皮膚に皺が寄る傾向、例えば光またはUVによる損傷等の損傷に抵抗しまたはそれらを修復する皮膚の能力、増殖循環(growth cycling)または色素沈着を含む毛嚢の代謝、皮下筋肉の正常な緊張および機能、あるいは皮神経による神経伝達のような、皮膚の外観または健康に関連するパラメーターに対する効果について、化合物を評価するのに有用である。一般的に、それらパラメーターに対する効果は、例えば任意のそれらパラメーターに影響を与える産物をコードする遺伝子に通常結合しているプロモーターの制御下に置かれたレポーター遺伝子の発現に対する効果によって、間接的に評価され

る。

【0207】

そのような皮膚代謝関連プロモーターの例として、バーシカンプロモーター；マトリックスメタロプロテイナーゼプロモーター；血管内皮細胞増殖因子プロモーター；ヒアルロン酸シンターゼプロモーター；例えばMMP 2またはMMP 9、好ましくはMMP 9プロモーター；好中球エラスターゼプロモーター；が挙げられる。

【0208】

バーシカンプロモーターは、バーシカン遺伝子の発現を調節し、Naso M. F. et al. (1994) J. Biol. Chem. 269 (52): 32999-33008に記載されており、その内容の全てが参照によってこの中に組み込まれる。バーシカンは、皮膚の真皮および表皮において発現されている大きなモジュールのコンドロイチン硫酸プロテオグリカンである。バーシカンは細胞外マトリックスに付着し続けている間、大量の水と結合し、それによって皮膚に水分を補給しかつ満たす。従って、本遺伝子のアップレギュレーションをもたらす化合物が好ましい。

【0209】

マトリックスメタロプロテイナーゼプロモーターは、マトリックスメタロプロテイナーゼ遺伝子の発現を調節する。マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMPs) は、細胞外マトリックスプロテアーゼのファミリーに属しており、Mauch C. et al. (1994) Arch. Dermatol. Res. 287: 107-114に記載されている。その名前が意味するように、それらマトリックスメタロプロテイナーゼは、例えば皮膚の真皮および表皮における細胞外マトリックスの分解に関連する。従って、本遺伝子のダウンレギュレーションをもたらす化合物が好ましい。

【0210】

血管内皮細胞増殖因子プロモーターは、血管内皮細胞増殖因子遺伝子の発現を調節し、例えば、Tisher E. (1991) J. Biol. Chem. 266 (18): 11947-11954に記載されており、その内容は参照によってこの中に組み込まれる。血管内皮細胞増殖因子は、血管内皮細胞のためのミトジェンであり、結果として、皮膚の下の微小血管系の増殖を誘導し、さらに血管透過性を高めることができる。微小血

管系および血管の透過性の亢進は、皮膚のより良好な栄養供給（例えば真皮および表皮へのより良好な栄養運搬）および水分補給を可能とする。従って、本遺伝子のアップレギュレーションをもたらす化合物が好ましい。

【0211】

ヒアルロン酸シンターゼ（HAS1-3）プロモーターは、ヒアルロン酸シンターゼ（HAS1-3）遺伝子の発現を調節し、Itano N. et al. (1996) BBRC 222: 816-820; Watanabe K. (1996) J. Biol. Chem. 271 (38): 22945-22948; およびSpicer A. P. (1997) J. Biol. Chem. 272 (14): 8957-8961にそれぞれ記載されており、それらの内容は参照によってこの中に組み込まれる。ヒアルロン酸シンターゼは、その名前が意味するように、直鎖の未分枝グリコサミノグリカンであるヒアルロン酸の合成に関連する。ヒアルロン酸はバーシカンに結合し、通常他のプロテオグリカンのためのアンカーとして作用し、プロテオグリカン「ネットワーク」の安定化につながる。結果として、ヒアルロン酸は（バーシカンと同様に）、皮膚に水分を補給しかつ満たすのを助ける。従って、本遺伝子のアップレギュレーションをもたらす化合物が好ましい。

【0212】

I V型コラゲナーゼプロモーターは、I V型コラゲナーゼ遺伝子の発現を調節し、Huhtala P. (1991) J. Biol. Chem. 266 (36): 16485-16490に記載されており、その内容の全てが参照によってこの中に組み込まれる。I V型コラゲナーゼは、細胞外マトリックスプロテアーゼファミリーの別のメンバーであり、例えば皮膚の真皮および表皮における細胞外マトリックスの種々の成分の分解に関連する。従って、本遺伝子のダウンレギュレーションをもたらす化合物が好ましい。

【0213】

好中球エラスターゼプロモーターは、好中球エラスターゼ遺伝子の発現を調節し、Takahashi H. (1988) J. Biol. Chem. 263 (29): 14739-14747に記載されており、その内容の全てが参照によってこの中に組み込まれる。好中球エラスターゼは、例えば皮膚の真皮および表皮において、細胞外マトリックスのほとんどのタンパク質成分（エラスチンを含む）を切断することができる強力なセリンプロテアーゼである。従って、本遺伝子のダウンレギュレーションをもたらす化合物

が好ましい。

【0214】

トランスジェニック動物

本発明の方法において用いることができるトランスジェニック動物として、例えばミニブタ、モルモット等のブタ；あるいは、例えばヘアレスマウス(例えば、Begona M. et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 7717-7721に記載)、ヌードマウス、老化促進マウス(例えば、Takeda et al., 1991, L. Am. Geriatr. 39: 911-919に記載)、もしくは促進老化の表現型を示すトランスジェニックミュータントマウス等のマウスまたはラット等の齧歯動物のような非ヒト動物が挙げられ；それら動物中の1つ以上、好ましくは実質的に全ての細胞が導入遺伝子を包含する。トランスジェニック動物は導入遺伝子に対してモノ接合性であってもヘテロ接合性であっても差し支えない。マウスが好ましい対象動物である。

【0215】

トランスジェニック動物の構築

例えばマウスのようなトランスジェニック動物を作る方法は、当業界で公知である。1つの方法を以下に記載する。

【0216】

胚の注入/移植

胚の操作およびマイクロインジェクションの方法が、例えばマウスの胚を操作するために記載されている(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., 1986, その内容は参照によってこの中に組み込まれる)。妊馬血清(PMS)およびその48時間後にヒト絨毛性ゴナドトロピンで、過剰排卵させた6週令メスマウスからマウス接合子を採取することができる。処置されたメスマウスをオスマウスと一緒に置き、翌朝、膣栓を確認した。発情のために擬妊娠メスマウスを選択し、確認済み精管切除オスマウスと一緒に置き、レシピエントとして用いた。接合子を採取し、卵丘細胞を除去する。さらに、未分化胚芽細胞を回収することができる。オスマウスと交尾したメスマウスから前核胚を回収する。妊馬血清(PMS)でメスマウスを処置して、卵胞増殖およびヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)を誘導し、排卵を誘導する。ダルベッコの改良リン酸

緩衝生理食塩水 (DPBS) 中に胚を回収し、さらに、10%ウシ胎仔血清を補足したダルベッコの改良必須培地 (DMEM) 中において維持した。

【0217】

顕微鏡に接続した標準のマイクロマニピュレーターを用いて、導入遺伝子構成物のマイクロインジェクションを実施する。例えば、通常、マイクロインジェクション操作の間、油の下で100マイクロリットルのDPBS中に胚を保持する。DNA溶液を雄性前核にマイクロインジェクションする。前核の隆起によって注入の成功をモニターする。同様の技術を用いて、未分化胚芽細胞に組換えES細胞を注入することができる。注入後直ぐに、例えば精管切除オスマウスと交尾した成熟マウスのようなレシピエントのメスに胚を移植する。一般的なプロトコルにおいて、レシピエントのメスに麻酔し、卵管を露出させるため腰部付近(paralumbur)を切開し、卵管の膨大部に胚を移植する。体壁を縫合し、創傷クリップで皮膚を閉じた。

【0218】

標的構成物の存在に関するスクリーニング

標準プロトコルによって、出生後、トランスジェニック動物を特定することができる。サザンブロットおよび/またはPCRを用いて標的構成物の存在に関して、尾組織からのDNAをスクリーニングすることができる。生殖細胞系中に標的構成物を担持すると思われる場合には、モザイクのように思われる子孫をさらにお互いに交配させて、ホモ接合性トランスジェニック動物を作る。子孫が生殖細胞系伝達を有するか否かが不明である場合には、親の種または他の種と交尾させて、ヘテロ接合性に関して子孫をスクリーニングして差し支えない。DNAのサザンブロットおよび/またはPCR増幅によってヘテロ接合体を特定する。

【0219】

ヘテロ接合体をさらにお互いに交配させて、ホモ接合性トランスジェニック子孫を作ることができる。交配の産物であるマウス、ならびにヘテロ接合体であることが分かっているマウスおよび野生型マウスに由来する当量のゲノムDNAのサザンブロットによってホモ接合体を特定することができる。サザンブロットをスクリーニングするためのプローブは、上記のように設計することができる。

【0220】

トランスジェニック子孫を特定および特徴付けする他の手段は当業界で公知である。例えば、ノーザンブロットを用いて、レポーター遺伝子をコードする転写体の存在または不在に関して、mRNAを検証することができる。さらには、ウェスタンブロットを用いて、導入遺伝子によってコードされるタンパク質に対する抗体またはマーカー遺伝子産物に対する抗体を用いてウェスタンブロットを検証することによって、導入遺伝子が発現されているそれら子孫の様々な組織中における導入遺伝子の発現レベルを評価することができる。最後に、適切な抗体を用いて、子孫由来の様々な細胞のin situ 分析（例えば細胞を固定しさらに抗体で標識する）および/またはFACS（蛍光標示式細胞分取器）分析を実施して、導入遺伝子産物の存在または不在を調べることができる。

【0221】

他のトランスジェニック動物

本発明の方法において、他のトランスジェニック動物を用いても差し支えない。様々な動物を作る方法は当業界で公知である。トランスジェニックブタを作るプロトコルは、White and Yannoutsos, Current Topics in Complement Research: 64th Forum in Immunology, pp. 88-94; 米国特許第5,523,226号; 米国特許第5,573,933号; 国際特許出願公開第W095/04744号に記載されている。トランスジェニックラットを作るプロトコルは、Bader and Ganten, Clinical and Experimental Pharmacology and physiology, Supp. 3: S81-S87, 1996に記載されている。トランスジェニックウシを作るプロトコルは、Transgenic Animal Technology, A Handbook, 1994, ed., Carl A. Pinkert, Academic Press, Inc.に記載されている。トランスジェニックヒツジを作るプロトコルは、Transgenic Animal Technology, A Handbook, 1994, ed., Carl A. Pinkert, Academic Press, Inc.に記載されている。全ての特許および引例が参照によってこの中に組み込まれる。

【0222】

レポーター遺伝子

本発明の方法は、少なくとも部分的に、皮膚代謝に関連する遺伝子のプロモ-

ターに対して結合したレポーター遺伝子に基づく。レポーター遺伝子は、検出可能な産物、好ましくは、例えば蛍光を発する遺伝子産物のような比較的容易に検出され得る産物、あるいは着色産物の形成によって検出され得る反応を触媒する産物をコードする任意の遺伝子であって差し支えない。例えば、レポーター遺伝子は、着色または蛍光産物のような検出可能な産物を産生する酵素のような酵素をコードするものであって差し支えない。レポーター遺伝子は当業界で公知であり、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、グリーン蛍光タンパク質遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、西洋ワサビペロキシダーゼ遺伝子、またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子が挙げられる。レポーター遺伝子は、例えば、Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に記載されている。

【0223】

実施例

実施例1：導入遺伝子の構築

導入遺伝子を構築するため、当業界で公知のPCRに基づく技術を用いて、ヒトバーシカンプロモーターの839 bp断片（ヌクレオチド-559から+280；転写開始位置は+1）をヒトゲノムDNAから得た。図1に示すようにXhoI-EcoRIで制限切断することによって線状化されたpNASSbetaベクター（Clontech）に、バーシカンプロモーター断片を挿入した。そのベクターは、 β -ガラクトシダーゼレポーター遺伝子（lacZ）、ならびにポリアデニル酸シグナルを包含する。そのベクターは、高レベルの導入遺伝子発現の可能性を最適化するため、RNAスプライス供与および受容配列も包含する。前核注入のための線状導入遺伝子DNA断片を得るため、EcoRIおよびXbaI酵素でベクターを切断した。線状導入遺伝子DNA断片は4732 bpの長さである。

【0224】

実施例2：トランスジェニックマウスの作成

線状導入遺伝子DNA断片を、DBA2 x C57BL6(DBF1)マウス(Charles River, Bo

ston)の受精卵母細胞に注入し、さらにその卵を擬似妊娠代理母に移植した。サザンブロットによって、ヒトバーシカンプロモーター断片の染色体組込みに関して子孫(F0)を調べた。簡単に説明すると、3週令マウスの尾からゲノムDNAを単離し、BamHIまたはPstIの何れかの制限エンドヌクレアーゼで消化した。ゲル上でDNA断片を分離し、次にナイロン膜上に移した。トランスジェニックマウスを作るのに用いられたヒトバーシカン導入遺伝子の1.3 bp BamHI-EcoRV断片を用いて、膜をハイブリダイズさせた。サザン分析によって、7つの独立した系列が導入遺伝子挿入を示した。導入遺伝子のコピー数は、1から10以上の範囲で異なっていた。

【0225】

実施例3：β-ガラクトシダーゼ組織化学分析

様々な発生段階(E11.5dからE17.5d)の採取したマウス胚を、胚の段階に応じて30分から12時間に亘り、PBS中の0.5%グルタルアルデヒドで固定し、30%スクロースに移し、さらにOCT(Tissue Tek, CA)化合物中において凍結した。15 μmの厚さの切片を調製してスライドに載せた。同じ固定液で5分間切片を再固定し、PBSで1回、次に洗剤洗浄液で10分間洗浄した。1 mg/mlのX-gal(Sigma)、10 mMのフェロシアン化物、および10 mMのフェリシアン化を含有する反応バッファー中において染色を行った。37℃で3-6時間インキュベーションを行った。PBSで洗浄後、切片を標本にするかあるいはエオシンで対比染色した。成体組織のため、同じ固定液をマウスに環流させて、所望の臓器を切開し、後の固定を行い、スクロースに浸し、さらにOCT化合物で凍結させた。皮膚組織のため、背部の皮膚組織ブロックの5 mmストリップを15分から1時間固定し、上記のように3-6時間X-galで染色した。洗浄後、皮膚組織ストリップをパラフィン包埋し、さらにマイクロトームを用いて8 μmの切片に切った。

【0226】

実施例4：in situハイブリダイゼーション

当業界で公知の方法を用いて、3'末端標識オリゴヌクレオチドプローブを用いた放射活性in situハイブリダーゼーションを実施した。過剰な非標識オリゴ

ヌクレオチドの存在下、標識オリゴヌクレオチドでいくつかの切片をハイブリダイズさせることによって、in situシグナルの特異性を調べた。

【0227】

lacZおよび内因性マウスバーシカンプロブを用いたトランスジェニック胚切片(E13.5)のin situハイブリダイゼーションによって、導入遺伝子の発現パターンを調べた。何れかのプロブを用いて、発生中の肢芽、腎臓、脳、および軟骨において発現が観察された。E13.5、E15.5、E17.5胚、7日、40日の新生マウス、さらには4ヶ月(成体)トランスジェニックマウスの切片における、 β -ガラクトシダーゼ組織化学分析によってLacZ発現を調べた。早くもE13.5dにおいて、腎臓、脳、軟骨、および肢芽で強い間充織発現が観察された。発現レベルは出生まで一定に維持された。出生後7日のマウスにおいて、胚性組織と比較して、 β -ガラクトシダーゼ染色が低下し、成体組織では殆ど全く発現が観察されなかった。他の組織とは対照的に、出生後30日のマウス由来の真皮乳頭(発育相の毛周期)は再び極めて強い β -ガラクトシダーゼ染色を示し、2毛周期の間、同じ β -ガラクトシダーゼレベルを発現し続けた。

【0228】

皮膚組織において、毛芽(毛嚢中の将来の真皮乳頭)はE15.5dにおいて強い β -ガラクトシダーゼ活性を発現し、出生後7日まで(最初の毛周期の間)その活性が維持された。E15.5d-新生マウスの皮膚においても、真皮線維芽細胞で時々 β -ガラクトシダーゼ染色が観察された。しかしながら、 β -ガラクトシダーゼ染色は、出生後7日の皮膚組織において低下した。

【0229】

実施例5：UV照射

密接に離間させたずらりと並んだ5つのPUVAランプを用いて、UVAでの照射を実施した。UVA検出器を用いて、それらランプの配列から30cmでの出力を測定した。

【0230】

出生後4日のバーシカントランスジェニックマウスの背部皮膚に30 J/cm² UVAで照射した。 β -ガラクトシダーゼ染色のため、24時間後、背部皮膚組織

生検試料を処理し、トランスジェニックマウス由来の未処置対照皮膚組織と比較した。 β -ガラクトシダーゼ組織化学分析は、対照と比較して、UVA照射皮膚の上部真皮において、 β -ガラクトシダーゼ染色の増強を示した。

【0231】

実施例6：VEGF-GFPトランスジェニックマウス

in vivoでのヒトVEGF遺伝子発現の調節機構を解明するため、ヒトVEGFのプロモーター領域（図2に示されている）の3kbp断片によって駆動されるグリーン蛍光タンパク質レポーター構成物を包含するトランスジェニックマウスを作った。培養されたヒトケラチノサイトにおけるトランスフェクション測定法によって、その構成物がin vitroで機能的であることを確認した。VEGF-GFPの3つの独立したトランスジェニック系列が得られかつPCR分析によって確認された。構成的な内皮細胞発現、および創傷皮膚におけるケラチノサイト誘導VEGF発現を調べるため、背部皮膚に2mmの皮膚穿孔を行い、48時間後に生検試料を採取した。直ぐに組織を4%パラホルムアルデヒドで固定し、蛍光および共焦点顕微鏡で、凍結切片を調べた。VEGF-GFPトランスジェニック系列は、表皮および上部真皮の下ならびに時折さらに深部の真皮における、新生微小血管網で、明るいGFP蛍光を示した。いくつかの組織において、毛嚢も陽性であった。創傷組織において、表皮の創傷境界において連続的なGFP発現が観察されたが、非創傷領域ではケラチノサイト発現は観察されず、創傷治癒におけるVEGF発現の誘導可能性を確認した。VEGF-GFPトランスジェニック系列から調製した初代培養ケラチノサイトも培養3日後GFP蛍光を示した。それら結果を合わせると、GFPは、in vitroおよびin vivoでのVEGF発現を調べるための潜在的に有用な手段である。本研究を以下にさらに詳細に説明する。

【0232】

トランスジェニックマウスの皮膚における、ヒト血管内皮細胞増殖因子プロモーターによって駆動されるグリーン蛍光タンパク質の発現の劇的な変化を以下のように分析した。

【0233】

トランスジェニックマウスを用いた遺伝子発現研究は、3つの古典的なレポーター遺伝子 - lacZ(β -ガラクトシダーゼ)、ルシフェラーゼ、またはCAT(クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ)の内の1つを用いることが最も一般的である。レポーター遺伝子活性の検出は、通常、lacZの場合における組織染色のため、またはルシフェラーゼおよびCATのための複雑な測定法のために、組織を動物から取り出すことが必要であり、生きた動物における遺伝子調節の変化を見る可能性を排除または少なくとも困難にする。

【0234】

最近、代替の蛍光レポーター分子である、グリーン蛍光タンパク質(GFP)(Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW and Prasher DC: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science 263: 802-5, 1994)、または修飾GFP(EGFP)(Zhang G, Gurtu V and Kain SR: An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun 227: 707-11, 1996)が開発された。GFPはそれ自体本質的に蛍光を発し、処置を施すことなく信号が目に見える(Misteli T and Spector DL: Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. Nat Biotechnol 15: 961-4, 1997)。GFPが表皮において誘導された場合、動物を屠殺することなく、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、遺伝子発現の変化を観察することが可能である。in vivoで悪性腫瘍組織における血管新生および血管透過性を誘導する血管因子であるヒト血管内皮細胞増殖因子(VEGF)のプロモーターを用いて、トランスジェニックマウスの皮膚においてレポーター遺伝子としてGFPを発現させる。表皮のケラチノサイトにおけるVEGF発現は、表皮の創傷治癒の境界においてアップレギュレートされており、さらに例えばTPAのようなホルボールエステルの局所適用によってもアップレギュレートされる。

【0235】

トランスジェニックマウスにおける、ヒトVEGF-GFPの遺伝子活性の信号変化でのGFPの発現および反応性を以下に説明する。発現パターンは内因性VEGFのパターンと一致し、さらに、切除術の後に何ら処理することなく、そ

のままの組織において、共焦点顕微鏡を用いて、GFP - 派生蛍光を局在化および可視化することができる。

【0236】

導入遺伝子構成物

GCに富むVEGFプロモーターのPCRに基づく増幅は困難なことが多いため、プローブとしてRT-PCRによって得た500bp cDNA断片を用いて、ヒトゲノムライブラリー(Clontech, CA)から、ヒトVEGFの5' - フランキングDNAを含むVEGFゲノムクローンの5.0kb断片を単離した。制限酵素消化によって特定クローンを分析し、次に、2453 bp EcoRI-AgeI断片(-2271から+91)(Tischer E, Michell R, Harman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC and Abraham JA: The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. J Biol Chem 266: 11947-54, 1991)をアガロースゲルから切り出した。そのプロモーター断片をGFPベクター(pEGFP-1 cut EcoRI and XmaI)中に挿入した。発現効率を最大にするため、16s/19sスプライス供与および受容シグナルもプロモーターとGFP遺伝子との間に挿入した。

【0237】

GFPベクターのin vitro発現

得られた哺乳類発現ベクター中の導入遺伝子を、まず培養ヒトケラチノサイト中にトランスフェクトして、選択された遺伝子領域がVEGF発現を促進させていることを確認した。VEGF - GFPベクターまたはCMVプロモーター - 駆動GFP対照ベクター(pEGFP-N1; Clontech)のどちらかを初代培養ヒトケラチノサイトにトランスフェクトした。全てのトランスフェクションにおいてポリブレンおよびDMSO法を用いた。

【0238】

トランスジェニックマウスの作成

EcoRIおよびAflIIIを用いて前核注入のための線状断片(その断片はポリアデニル酸シグナル配列も含む)を切り出した。次に、その導入遺伝子配列を、DBA2 x C57Bl6(DBF1)マウス(Charles River Laboratories, Boston, MA)の受精卵母細胞

に注入し、さらにその卵を擬似妊娠代理母に移植した。ゲノムPCRによって、導入遺伝子の染色体組込みに関して子孫(F0)を調べた。全ての実験はF1またはF2子孫マウスを用いて行った。

【0239】

そのままの皮膚組織の共焦点顕微鏡観察のため、トランスジェニック初代マウスとSKH-1ヘアレスマウス(Charles River Laboratories)とを交配させることによって、ヘアレスの遺伝的背景のVEGF-GFPトランスジェニックマウスを作った。したがって、オスのヘミ接合性トランスジェニックマウス(v/-HH)をメスのヘアレスマウス(-/-hh)と交配させて、PCR検出およびそのヘアレス発現型によって容易に選択できるF2世代のVEGF-GFPヘアレスマウス(v/-hh)を得た。

【0240】

GFP検出のための組織調製、およびGFP発現部位からの不鮮明なまたは拡散したGFP派生蛍光のエピ顕微鏡観察の解決法

最終的に、新鮮に切断しかつ固定していない組織ブロックを、クリオスタットを用いて直接12 μ mの厚さの凍結切片にスライスした。培地を載せたり長期間スライドを保存することなく、切片を作成後直ぐに、FITC/TRITC二重励起、および発光フィルター(Chroma, *VT)を用いてエpi蛍光顕微鏡観察を実施し、組織自己発光からのGFP派生蛍光信号を顕著にした。

【0241】

創傷およびTPA処置の方法

4 - 6週令の若い成体トランスジェニックマウスの剃った背部皮膚に2mm生検穿孔で皮膚傷を作った。48時間後、正常組織および創傷組織を採取し、ドライアイス上で直ぐに凍結させた。

【0242】

TPAによるVEGF mRNAの誘導のため、アセトン中の単一量の5 μ TPAをトランスジェニックマウスの背部皮膚に局所適用し、さらに12時間後皮膚生検試料を採取した。

【0243】

全ての動物処置は、M G H動物管理および使用協会(Animal Care and Use Committee)の認可を有する。

【0244】

抗VEGFおよび抗GFP免疫組織化学分析

PBS (pH 7.2)中の4%パラホルムアルデヒドを用いて、室温で5分間、トランスジェニックマウスの皮膚の凍結切片を固定した。製品(Vectpr Labs. UK)に記載されているABC法を用いて、スライドに載せた切片において免疫組織化学染色を実施し、着色基質としてDABを用いるペロキシダーゼ反応によって可視化させた。

【0245】

共焦点顕微鏡

共焦点顕微鏡観察のため、組織の上に直接カバースリップを置いた。帯域通過フィルター530/30nmを有するLeica TCSNT4D共焦点顕微鏡システムを用い、515 - 545nmの間の波長で発光を検出して、切片またはそのままの組織試料を分析した。核を可視化するため、5 µg/mlの7 - アミノアクチノマイシンD (SIGMA, USA) 溶液を用いて周囲温度で20分間対比染色し、PBSで洗浄し、さらにフルオロマウント - G (Southern Biotechnology, AL)で標本にした。

【0246】

ヒトケラチノサイトにおけるVEGFプロモーター駆動GFP発現

内因性VEGFのための機能的プロモーター活性の領域はあまり特徴付けされていないため、まず2.5kbのヒトVEGFの5' - フランキングDNAをGFP哺乳類ベクターに挿入し、さらにトランスフェクトされた初代培養ヒトケラチノサイトにおいてモニターした。対照培養はCMVプロモーター駆動GFPベクターでトランスフェクトした。VEGF - GFP蛍光は、トランスフェクションの48時間後初めて現れ、さらにほんのわずかな割合(%)の細胞のみが陽性であった。CMV - GFP蛍光は、24時間以内に現れ、さらに殆ど全ての細胞が陽性であった。VEGF - GFP信号はCMV - GFP対照の信号に強さにおいて類似しており、その構成物がin vitro培養系において機能的であることを確実にした。(陽性対照としてのヒトサイトメガロウィルス(CMV)前初期プロモーター

駆動GFPでトランスフェクトした培養ケラチノサイトにおいて、ならびにVEGF-GFPでトランスフェクトした培養ケラチノサイトにおいて、トランスフェクションの48時間後蛍光を観察した)。

【0247】

トランスジェニックマウスにおけるGFPの発現

30匹の初代マウスにおいて、導入遺伝子染色体組込みに関して陽性である4つの系列をPCR分析によって検出した。尾組織のエピ蛍光顕微鏡によって調べ、陰性の野生型マウスと比較した結果、それら系列の内の3系列が、表皮中において検出可能なGFP派生蛍光信号を示した。新生トランスジェニックマウスにおけるGFP発現を特定した(VEGF-GFPトランスジェニックマウス由来の尾から、および陰性野生型の同腹子由来の類似組織から採取した、新鮮な固定していない組織において蛍光を特定した)。また、新生VEGF-GFPトランスジェニックマウスから採取した組織：肺(肺胞中に蛍光が見られる)；脳の側脳室(側面上皮において蛍光が観察される)；および脊椎軟骨；(心臓上皮)を含む：において蛍光が特定された。それら3系列のF1新生マウスにおいてVEGFプロモーターの発現パターンを評価した。in situハイブリダイゼーション研究においてVEGFを発現することが既に分かっている肺、腎、および脳を、GFP蛍光に関して調べるために選択した。予想通り、肺胞および脳の側脳室壁においてGFP発現が観察された。腎臓の糸球体においてGFP信号を検出することは困難であった。GFP蛍光は、発生中の軟骨組織(例えば脊椎軟骨)の軟骨細胞においても検出可能であった。

【0248】

GFPは創傷治癒の境界において発現される

未刺激の正常表皮ケラチノサイトは弱いGFP蛍光のみを示すため、創傷治癒の間におけるVEGF-駆動GFPの誘導性について調べた。皮膚生検組織を取り出した48時間後に、かさぶたの下で創傷治癒表皮は、隣接する傷つけられていない表皮と比較して、非常に強くかつ顕著な蛍光信号を示した。その蛍光信号は、隣接切片における、抗GFPおよび抗VEGF免疫組織化学分析によって検出されるVEGF/GFP発現と相関した。GFP発現は皮膚の創傷治癒によっ

て誘導される (V E G F - G F P トランスジェニックマウスに穿孔生検によって傷をつけた。蛍光顕微鏡による評価のため、傷部分から組織を採取した。(a) 生検の 4 8 時間後の創傷治癒境界において、かさぶたの下の上皮において強い蛍光が観察された。(b) 隣接切片を抗 G F P 抗体と反応させた。(c) 抗マウス V E G F 抗体で隣接切片を免疫染色した。対照切片を正常ヤギ血清で処理した。非特異的ペロキシダーゼ染色が、かさぶた、ならびに (b) および (c) において観察された)。

【 0 2 4 9 】

T P A 処置による G F P の誘導

ホルボールエステルの適用による表皮 G F P の誘導についても調べた。トランスジェニックマウスの皮膚に T P A を適用した 1 2 時間後に蛍光信号の蓄積が観察されたが、アセトンのみで処置した場合には G F P 発現の基底レベルを示したのみである。その信号は、ケラチノサイトの細胞質ゾルまたは核よりもむしろ上皮のバソプレート(basolateral)表面に局在化することが分かった。抗 G F P 免疫染色は、基底細胞の細胞質ゾルにおいて信号を産生し、G F P が基底細胞を起源としかつ少なくとも一部の G F P タンパク質が細胞内に残っていることを示唆する。

【 0 2 5 0 】

共焦点顕微鏡による G F P の直接的検出

より正確に G F P 蛍光信号を局在化させるため、新鮮な凍結切片を固定し、さらに核対比染色のために 7 - A A D と共にインキュベートし、レーザー共焦点顕微鏡下で観察した。予想通り、分散可能な G F P の殆どがその工程の間に失われたが、創傷治癒 - 誘導 - 表皮発現は影響を受けないで維持された。傷が付けられていない表皮において時折蛍光が検出され、我々の観察において、蛍光は基底細胞の外側に局在化しているように見えた。固定および激しい洗浄後でさえ、毛嚢の外側毛根鞘において G F P 由来の蛍光は変化しないで維持された。毛嚢のより高い倍率での観察において、蛍光 G F P 信号が核マーカーと完全に一緒に局在化していることが分かり、毛嚢の G F P が核内に安定に残っていることを示唆する。このことは、脊椎軟骨における軟骨細胞にも該当する。

【0251】

共焦点顕微鏡によるそのままの表皮におけるGF Pの直接検出

生きたGF Pトランスジェニックマウスの皮膚においてGF Pが検出される可能性を調べるため、共焦点イメージングによって、切開したヘアレスマウスの皮膚を調べた。生きた表皮の光学的横断面は明るい蛍光を示した。対応する凍結切片は、その蛍光が基底細胞に由来することを示した。より高い倍率で、GF Pがケラチノサイトの周りの細胞外空間に局在することが示された。X-Z共焦点イメージングによって、そのシグナルが表皮の基底層内にあることを確かめた。新鮮な固定していないトランスジェニックマウスの皮膚の生検組織を採取し、直ぐにレーザー共焦点顕微鏡を走査させることによって、共焦点顕微鏡によるそのままの皮膚におけるGF P発現の検出を行った。表皮の光学的横断面は、個々の上皮細胞の周りに蛍光を示す。核を示すため7-AADで対比染色した対応皮膚領域の凍結切片は、真皮—表皮接合部において蛍光を示した。共焦点X-Zイメージは、基底ケラチノサイトの近くで蛍光を示した。

【0252】

本研究は、ヒトVEGFプロモーターによって駆動されるGF Pの発現パターンが、mRNA検出で認められるものと、空間的および時間的に対応することを示した。

【0253】

サザンブロットまたはゲノムPCRのより退屈な操作無しに、簡単なエピ蛍光顕微鏡によって、皮膚表皮においてGF Pを発現するトランスジェニックマウスの交配から得られる子を容易に選択した。

【0254】

新鮮な未処置の組織ブロックが明るい蛍光を発したとしても、切片におけるGF P派生蛍光を検出するのは当初の困難があった。様々な方法を調べた後、水溶液処理が直ぐにGF P蛍光を洗い流してしまうことが分かった。このことは、凍結切片を作成する前に組織ブロックを固定することによって部分的に克服されるが、最初に表皮ケラチノサイトに存在していたような、いくつかの部位からの蛍光は、依然として失われまたはその染色パターンが変化した。固定は、皮膚の微

小血管系において、GFPによって生じる蛍光から区別できない蛍光を誘導した。その部位における蛍光は、固定していない組織ではみられず、in situハイブリダイゼーション法を用いた研究において、微小血管系ではVEGF発現は報告されていない。従って、元のGFP信号を保つための最も効果的な方法は、OCT化合物無しに、新鮮に切開した皮膚から直ぐに凍結切片を作成し、その後すばやく蛍光顕微鏡によって調べる方法である。その不測の困難性は、GFPトランスジェニックマウスの成功の報告が現在までに非常に少ないことを説明する。

【0255】

in situ ハイブリダイゼーションによって、肺、および脳の側脳室において、顕著なVEGF発現が報告されている。VEGF-GFPマウスの組織の評価は、それら知見を確認している。腎臓の糸球体に蛍光が観察されないのは、トランスジェニックマウスを作るためにここで用いられているVEGF DNAの2.2kbの5'-フランキング領域に対する組織特異的応答要素を欠くせいであるか、あるいは検出限界以下の信号のせいであろう。

【0256】

1週令の子から採取した皮膚において、正常な表皮ケラチノサイトは、基底レベルのGFP発現を示したが、毛嚢の外側毛根鞘では明るい蛍光が観察された。週令が上のマウスの皮膚は、毛嚢において同等のGFP発現を示さず、従って、毛嚢におけるVEGF発現は毛周期依存的であろう。脊椎において認められかつ以前報告されているように、毛嚢および軟骨細胞における蛍光は特に印象的である。それら信号は肺または脳において観察される信号よりもかなり強いものである。レーザー共焦点顕微鏡観察は、それら位置におけるGFPが核内に限定されていることを示した。そのような核局在化は、組織処理の間における蛍光産物の拡散を減らす傾向があるため、見かけの信号を強くすることができる。ある組織では核に局在化するが他の組織では局在化しない理由はまだ説明できないが、導入遺伝子中に核局在化コンセンサス配列が含まれていることが有用であると予測される。

【0257】

創傷治癒モデルの間およびTPA処置の後にGFPタンパク質が誘導されるこ

とがこの中に示されており、レポーターGFP発現パターンが、高度に、VEGFプロモーター依存的であることを確認している。また、ショウジョウバエの胚において報告されているような(Davis I, Girdham CH, O'Farrell PH "A nuclear GFP that marks nuclei in living Drosophila embryos; Dev. Biol. 170: 726-9 (1995))、ゆっくりの発色団形成による蛍光信号産生の潜在的遅延の問題をそれらデータは無視している。そのような困難性を見越して、GFPのレッド-シフト変異体をそれら研究のために選択し、さらに、皮膚ならばより内部の組織において、発色団の正確な折り畳みが生じていると思われる。また、長期間の遺伝子発現をモニターするためにレポーターを用いることを妨害するような、皮膚における長期間の半減期をGFPが有する問題がある。より過剰の高いトランスジェニックマウスの皮膚の毛嚢における蛍光の消失は、GFPタンパク質が妥当な半減期を有することを示唆する。

【0258】

GFP信号の検出のための無傷皮膚のレーザー共焦点顕微鏡評価は、GFPが表皮内において容易に検出されることを示唆する。それら結果は、in vivoでの長期間の遺伝子発現の非侵襲的モニタリングためにGFPトランスジェニックマウスを用い得ることを示唆する。生きたマウスの皮膚の顕微鏡評価のための技術はすでに用いられている。トランスジェニックGFPレポーター遺伝子の使用と組み合わせる場合、使用する動物の数を減らし、簡単なモニターシステムを使用し、さらに同じ個体における遺伝子発現の変化を長期間モニターすることを可能とするため、そのようなシステムは従来のトランスジェニックレポーター遺伝子動物法を超える大きな利点を有する。トランスジェニックマウスの皮膚におけるGFPのin vivo発現の我々の成功は、有用なモニターおよびスクリーニング手段を提供することによって、皮膚におけるVEGF遺伝子発現の理解を高めるであろう。VEGF発現に関連すると考えられる表現型を有するマウスに育てた場合に特に魅力的である。本モデルは老化過程の間における皮膚の恒常性に焦点を合わせた研究においても利点を有する。

【0259】

実施例7：トランスジェニックマウスの皮膚および毛真皮乳頭におけるヒトバ

ーシカンプロモーター活性の発達および加齢に伴う変化

特に皮膚組織における、ヒトバーシカンの時間的 - 空間的発現パターンをさらに調べるため、ヒトバーシカンのコアタンパク質のための機能的プロモーターによって駆動されるlacZレポーター構成物を包含するトランスジェニックマウスを作り、さらに、胚から、新生マウス、生体段階までの、得られたトランスジェニックマウス由来の組織切片を β -ガラクトシダーゼ組織化学分析によって調べた。

【0260】

導入遺伝子の構築

P C Rに基づく技術によってヒトゲノムDNAから、エキソン1 ; (Naso MF, Zimmermann DR and Iozzo RV, "Characterization of the complete genomic structure of the human versican gene and functional analysis of its promoter", J. Biol. Chem. 269: 32999-33008(1994))を含む、機能的ヒトバーシカンプロモーターの839bp断片(転写開始位置を+1として、-559から+280)を得て、直接配列決定によって、正確な配列を確認した。ポリアデニル酸シグナルを有する β -ガラクトシダーゼレポーター遺伝子(lacZ)供給源としてpNASS2 β ベクター(Clontech)を用いた。高レベルの導入遺伝子発現の可能性を最適化するため、そのベクターはRNAスプライス供与および受容配列も包含する。XhoI-EcoRI制限部位を用いて、スプライス供与 / 受容配列の前にバーシカンプロモーター断片を挿入した。EcoRI-XbaI 4732 bp断片として、前核注入のための線状導入遺伝子DNAを得た。

【0261】

トランスジェニック動物の作成

線状構成物を、DBA2 $\times$ C57BL6(DBF1)マウス(Charles River, Boston)の受精卵母細胞に注入し、さらにその卵を擬似妊娠代理母に移植した。サザンハイブリダイゼーションによって、ヒトバーシカンプロモーター構成物の染色体組込みに関して子孫(F0)を調べた。3週令マウスの尾からゲノムDNAを単離し、BamHIまたはPstIの何れかの制限エンドヌクレアーゼで消化した。トランスジェニックマウスを作るのに用いられたヒトバーシカン導入遺伝子の1.3 kb BamHI-Eco

RV断片を用いて、ナイロン膜上の分画DNA断片をハイブリダイズさせた。サザン分析によって、単一の挿入から10以上の範囲の異なるコピー数を有する7つの独立した系列が導入遺伝子挿入を示した。

【0262】

β-ガラクトシダーゼ組織化学分析

採取した初期から中期 (E11.5dからE15.5d)のマウス胚を、胚の段階に応じて30分から12時間に亘りPBS中の0.5%グルタルアルデヒドで固定し、30%スクロースに移し、さらにOCT化合物中において凍結した。15 μmの厚さの切片を調製してスライドに載せた。同じ固定液で5分間切片を再固定し、PBSで1回、次に洗剤洗浄液で10分間洗浄した。1 mg/mlのX-gal (Sigma)、10 mMのフェロシアン化物、および10 mMのフェリシアン化を含有する反応バッファー中において染色を行った。37℃で3 - 6時間インキュベーションを行った。PBSで洗浄後、切片を標本にするかあるいはエオシンで対比染色した。成体組織のため、同じ固定液をマウスに環流させて、所望の臓器を切開し、後の固定を行い、スクロースに浸し、さらにOCT化合物で凍結させた。より良好な形態を保つため、いくつかの初期から中期の胚(E11.5dからE15.5d)にパラフィン切片処理を施した。皮膚組織のため、背部の皮膚組織ブロックの5 mmストリップを15分から1時間固定し、上記のように3 - 6時間X-galで染色した。洗浄後、皮膚組織ストリップをパラフィン包埋し、さらにマイクロトームを用いて8 μmの切片に切った。

【0263】

in situハイブリダイゼーション

in situハイブリダイゼーション用の胚性組織を新鮮に調製したDEPC-処理PBS中の4%パラホルムアルデヒドで固定し、脱水させ、RNaseを含まない条件下で、標準パラフィン包埋プロトコルによって処理した。以前記載のように(Kishimoto J. Cox H, Deverne EB, and Emson PC “Cellular Localization of Putative Odorant Receptor Messenger RNAs in Olfactory and Chemosensory Neurons- A Non Radioactive In situ Hybridization Study” Molecular Brain Research 23: 33-39 (1994))、E13.5d胚の8 μm切片において、ジゴキシゲニン標

識非放射性in situハイブリダイゼーションを実施した。PCRによって、LacZ用のcDNAおよびマウスパーシカンアンチセンスプローブを調製し、さらにpBluescriptII(stratagene)中にサブクローン化した。製品の使用説明書に基づいて、RNA標識キット(Boehringer)を用いてジゴキシゲニン標識RNAプローブを調製した。スライド上のパラフィン切片をキシレン中においてすばやく脱ロウ処理し、100%、90%、70%エタノールによって脱水させ、0.1M PBS(pH 7.5)で洗浄し、さらに0.2Nの塩酸で10分間処理した。0.02%ペプシン(0.2N HCl中)を用いて、37℃で30分間切片を処理し、その後、4%パラホルムアルデヒドで酵素を不活性化した。0.2%グリシン溶液(PBS中)で3回すすいだ後、0.1Mトリエタノールアミン中の0.25%無水酢酸/0.9% NaCl中において室温で10分間スライドをアセチル化し、さらに70%、80%、90%エタノールによって部分的に脱水しかつ簡単に乾燥させた。約0.1µg/mlのジゴキシゲニン標識RNAプローブ(使用前に沸騰によって変性させた)をハイブリダーゼーションバッファー(50% 脱イオンホルムアルデヒド、4×SSC、10%硫酸デキストラン、1×Denhardt's溶液)に加え、カバースリップ下で、55℃において、16-18時間スライドをインキュベートした。カバースリップを注意深く取り除き、2×SSC/0.1%SDS中において室温で30分間切片を洗浄し、続いて、0.1×SSC/0.1%SDS中において60℃で30分間、2回洗浄した。ハイブリダイズしたプローブを可視化するための免疫組織化学法は、抗体結合アルカリホスファターゼを用いた。比色反応は、ニトロブルーテトラゾリウム(Boehringer)および5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-ホスフェート(Boehringer)を添加することによって開始し、室温で6-24時間インキュベートした。グリセリンゼリーでスライドを埋め込み、4℃で保存した。

【0264】

以前記載のように(Kishimoto J. Keverne EB, Hardwick J, Emson PC, "Localization of nitric oxide synthase in the mouse olfactory and vomeronasal system: a histochemical, immunological and in situ hybridization study" European J. of Neuroscience 5: 1684-1694 (1993))、3'末端標識オリゴヌクレオチドプローブを用いた放射活性in situハイブリダーゼーションを実施し

た。マウスバーシカンアンチセンスオリゴヌクレオチドプローブは、5' - C C G T T C T G G G C C A C C A A G A C A G T C G T C T C C - 3'、5' - T G A C C G C C C C G A T A T C C A A A C A A G C C T G T T - 3'、5' - T C C G A C A G C C A G C C G T A A T C G C A T T G G T C A - 3'であった。過剰な非標識オリゴヌクレオチドの存在下、標識オリゴヌクレオチドでいくつかの切片をハイブリダイズさせることによって、in situシグナルの特異性を調べた。

【0265】

細胞培養

トランスジェニックマウスの皮膚由来の繊維芽細胞初代培養のため、新生トランスジェニックマウスの皮膚を採取し、0.25%トリプシン中において18時間インキュベートした。処理された表皮シートおよび真皮をさらにコラゲナーゼで1時間消化した。MEM培地(GIBCO) + 10% FCS中に細胞を拡散させ、トリプシン処理後3日ごとに継代した。β—ガラクトシダーゼ組織化学分析のため、培養繊維芽細胞をPBS中の0.2%グルタルアルデヒドで2分間固定し、続いて、洗剤洗浄液で5分間洗浄し、さらに染色反応を30℃で18時間実施した。反応を止めた後、5 µg/mlの7-アミノアクチノマイシンD(SIGMA, USA)溶液を用いて室温で20分間対比染色し、PBSで洗浄し、さらにフルオロマウント-G(Southern Biotechnology, AL)で埋め込んだ。

【0266】

バーシカン-lacZトランスジェニックヘアレスマウスの作成

バーシカンプロモーター活性の加齢に伴う変化を調べる目的で毛嚢のlacZ発現を評価するため、トランスジェニック初代マウスとSKH-1マウス(Charles River Laboratories)とを交配させることによって、ヘアレス遺伝的背景のバーシカン-lacZトランスジェニックマウスを得た。従って、オスのヘミ接合性トランスジェニックマウス(v/-HH)をメスのヘアレスマウス(-/-hh)と交配させて、ゲノムPCRによって選択された導入遺伝子陽性の子(v/-Hh)を再びヘアレスマウスに戻し交配させて、PCR検出およびそのヘアレス外観の組合せによって容易に選択できるF2世代のバーシカン-lacZヘアレスマウス(v/-hh)を得た。

【0267】

バーシカン - lacZトランスジェニックマウスの作成

導入遺伝子挿入に関して、PCRおよびサザンブロットング分析の両方によって、全部で27匹の初代マウスの内6匹の陽性系列が検出された。導入遺伝子のコピー数は、細胞当たり、1から20コピーを超える範囲であった。尾皮膚でのX-gal組織化学反応を用いて、lacZ染色に関してそれらマウスをさらにスクリーニングした。尾におけるLacZ染色の強さは、導入遺伝子のコピー数と相関しなかった。A4681(1-2コピー)およびA4688(20コピーを超える)は尾毛において同程度の強さのlacZ染色を示し、20コピーを超えるコピー数を有するA4679は尾においてわずかに薄い染色を示したのみである。尾皮膚における染色が最も強くかつ良好な繁殖挙動を有するため、将来の研究のためにトランスジェニック系列A4681を選択した。全ての将来の分析は、DBA/2系統と交配させることによって得られたF1-F3子孫において実施した。

【0268】

胚性組織におけるlacZ発現の分布

間充織凝縮(mesenchymal condensation)領域内の発生中の前および後ろ肢(E13.5)、および外胚葉において、非常に強い染色が観察された。外胚葉の発現は肢の先端に限定されていた。放射標識アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いたin situ ハイブリダイゼーションは、肢芽の凝縮間充織において、同様の内因性マウスバーシカンmRNAを発現した。

【0269】

E15.5胚において、腎系球体、嗅上皮の間充織組織、舌の間充織組織および筋肉、ならびに顎下腺において、強いlacZ染色が観察された。軟骨の周りの軟骨膜細胞、血管、発生中の後脳および前脳の縁、平滑筋も陽性であった。

【0270】

LacZ、および内因性マウスバーシカンプローブならびに対照センスプローブを用いた、トランスジェニック胚切片(E13.5)でのジゴキシゲニン非放射性in situ ハイブリダイゼーションによって、肢を除いて、予測された発現パターンを確認した。腎臓、嗅上皮、前肢の骨の軟骨、および脊椎軟骨において、両方でmRNA

A発現が観察され、導入遺伝子の妥当な発現パターンおよびタイミングを確認した。

【0271】

胚性皮膚におけるヒトバーシカン活性

X - g a l 組織化学分析によって、E13.5、E14.5、E15.5、およびE17.5の胚由来の発生中の皮膚において、LacZ発現を調べた。E13.5dでは、後ろおよび前肢を除いて外胚葉全体において基本的に全く染色が観察されず、凝縮の最も早い段階であると思われる単一の間充細胞において、時折のわずかなLacZ染色が認められた。ひげの毛芽はその段階で既にlacZ染色を示した。E14.5において、外胚葉ブラコード(毛穴)の下に結合した凝縮間充細胞は明らかにlacZ陽性であり、完全に陰性である周りの散在間充細胞と非常に対照的であった。位相差写真は、個々のβ - g a l 陽性凝縮間充細胞を示した。それら陽性部位の数は、全胚性組織の矢状 - 中期の胚切片当たり4 - 5であった。E15.5において、毛穴の下のそれら陽性凝縮間充細胞は、さらに強さを増し、かつ容積(すなわち細胞数)が増加した。E17.5において、lacZ陽性の真皮乳頭の数および強さは劇的に高まったが、それでもまだ、将来の真皮乳頭内に高度に限定されていた。わずかな表皮ブラコード(すなわち上皮ケラチノサイト)がそれ自体lacZ染色を示したが、大部分が間充細胞にまだ限定されていた。

【0272】

トランスジェニックマウスの皮膚における毛周期依存的ヒトバーシカン活性

出生後7日から、14日、28日、40日、4ヶ月までの週令のトランスジェニックマウスの皮膚切片においてlacZ染色を調べた。後期胚性皮膚における毛真皮乳頭細胞での強いlacZ染色は、新生マウスの皮膚まで続き、さらに最初の発育相の毛周期の間続いた。真皮乳頭細胞内に強い染色が限定された。興味深いこととして、出生後7日の中期から後期の発育相段階において、比較的強い染色が内部毛根鞘においても観察された。しかしながら、後期の発育相段階において、lacZ染色は再び真皮乳頭細胞にのみ限定された。また、テロゲン毛の後期において、棍毛ではlacZ染色は観察されなかった。第2の毛周期において、増殖している真皮乳頭(第2の発育相の毛周期)は再び強いlacZ染色を示し、さらに、第2の

発育相の毛周期の後、毛真皮乳頭におけるlacZ活性は、長いテロゲン毛周期に亘って、ほぼ完全に低下した。

【0273】

培養繊維芽細胞におけるヒトバーシカン活性

新生トランスジェニック系列の真皮繊維芽細胞由来の初代培養真皮繊維芽細胞は、特定集団の細胞および毛クランプ(hair clamp)の中央(明らかに真皮乳頭)においてのみlacZ染色を示した。全ての強く染色された細胞は円形であったため、それらは毛真皮乳頭由来であろう。しかしながら、最初の継代後、陽性細胞の形状は多様化しかつ円形に限定されず、2継代において、樹状突起を有する典型的な繊維芽細胞様の細胞を含んでいた。それら陽性細胞集団は、最初の継代後少なくとも6継代まで維持されたが、ある数の細胞(全細胞数を明確に指示する対比核染色によって特定された)は継代の間中全く染色されなかった。陽性細胞のおおよその数は50%を越えなかった。染色の強さは継代と共に次第に衰えた。

【0274】

トランスジェニックマウスの皮膚におけるヒトバーシカン活性の加齢に伴う変化

x-gal染色のための反応時間を18時間まで長くすると、若年から生体までのトランスジェニックマウスの皮膚において、毛真皮乳頭以外の上部真皮で、より強い染色を示した。そのような長時間のインキュベーション条件下での新生マウスの皮膚において、毛嚢を有するほとんどの真皮(ヘアレスマウスは最初の周期においてのみ正常な毛を有している)がかなりの検出可能な染色を示した。若年マウスの皮膚は、上部真皮において差別的に、線維芽細胞にのみ由来する拡散染色を示し、一方、高齢マウスはかすかな染色を示すのみであり、トランスジェニックマウスの皮膚におけるヒトバーシカンプロモーター活性が加齢と共に低下することを示唆する。

【0275】

実施例8：生きた動物におけるレポーター遺伝子発現の評価

方法：

共焦点顕微鏡

共焦点顕微鏡を用いて生きたトランスジェニックマウスでの完全なそのままの皮膚を調べるため、アバーティンの腹腔内投与によってヘアレス VEGF - GFP トランスジェニックマウスを麻酔した。仰臥位でペトリディッシュに直接マウスを置いた。上記と同じように、皮膚の定位を容易にするためインクで処置領域に印をつけて、TPAまたはアセトン処理を背部皮膚に行った。帯域通過フィルター530/30nmを有するLeica TCSNT4D共焦点顕微鏡システムを用い、515 - 545nmの間の波長で発光を検出して、マウスの皮膚切片またはそのままの皮膚を分析した。

【0276】

共焦点顕微鏡による生きたトランスジェニックヘアレスマウスのそのままの皮膚の表皮におけるGFPの直接検出

GFP誘導を生きたVEGF - GFP トランスジェニックマウスの皮膚において直接検出できるか否かを調べるため、アセトンまたはTPAを施したトランスジェニックヘアレスマウス（同じ個体）の皮膚を麻酔条件下で共焦点イメージングで直接調べた。正常な生きた表皮を貫く光学的横断面は検出可能な蛍光を示し、さらにTPAで処置した皮膚は12時間後、蛍光陽性領域の拡大を示した。非トランスジェニック野生型の同腹子は、検出可能な特異的蛍光を全く示さなかった。より高い倍率で、TPA処置皮膚は、GFPがケラチノサイトの周りの細胞外空間に局在化することを示した。X - Z共焦点イメージングは、その信号が表皮の基底層内にあることを確認した。

【0277】

生きたトランスジェニックマウスのそのままの皮膚のGFP信号の検出のためのレーザー共焦点顕微鏡評価は、GFPが表皮内において容易に検出されることを示唆する。それら結果は、in vivoでの長期間の遺伝子発現の非侵襲的モニタリングのためにGFPトランスジェニックマウスを用い得ることを示唆する。トランスジェニックGFPレポーター遺伝子を共焦点顕微鏡のような顕微鏡評価の技術と組み合わせる場合、使用する動物の数を減らし、簡単なモニターシステムを使用し、さらに同じ個体における遺伝子発現の変化を長期間モニターすることを可能とするため、そのようなシステムは従来のトランスジェニックレポーター

遺伝子動物法を超える大きな利点を有する。

【0278】

トランスジェニックマウスの皮膚におけるGFPのin vivo発現の我々の成功は、有用なモニターおよびスクリーニング手段を提供することによって、例えば炎症性および新生物性の皮膚疾患等におけるVEGF遺伝子発現の調節の理解を高めるであろう。VEGF発現に関連すると考えられる発現型を有するマウスに育てた場合に特に魅力的である。そのような新規な実験モデルは、VEGF遺伝子の調節に関するin vivo研究も可能とする。また、トランスジェニック動物でのそのようなGFPレポーターシステムは、老化過程の間における皮膚の恒常性に焦点を合わせた研究においても利点を有する。

【0279】

実施例9：ヒトMMP9トランスジェニックマウス

MMP9(ゼラチナーゼB、92kD、I V型コラゲナーゼは、細胞外マトリックス(ECM)成分を分解できるマトリックスメタロプロテイナーゼのメンバーの1つである。本酵素(MMP9)は、I V型およびV型コラゲナーゼ、ゼラチンおよびエラスチンを分解することが分かっている。光老化を生じさせるUVBによって誘導されることも分かっている(Fisher, G.J., Nature 379, 335, 1996)。その遺伝子の5'フランキング領域(-670配列位置から+1転写開始位置まで)は、HT1080細胞のレポーター遺伝子(CAT)の発現を駆動するのに十分である(Sato, H., Oncogene 8, 395, 1993)。

【0280】

導入遺伝子の構築

導入遺伝子を構築するため、当業界で公知のPCRに基づく技術を用いて、ヒトMMP9プロモーターの733 bp断片(ヌクレオチド-714から+19; 転写開始位置は+1)をヒトゲノムDNAから得た。2つの異なるレポーター遺伝子、β-ガラクトシダーゼレポーター遺伝子(lacZ)およびグリーン蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を構築のために用いた。

【0281】

β-ガラクトシダーゼレポーター遺伝子(lacZ)を含む構成物を構築するため、

好中球エラスターゼプロモーターが挿入されかつBg1 II 部位を有する修飾pNASS betaベクター (Clontech) をBg1 II-XhoIで制限切断して線状化し、MMP 9 プロモーター断片を挿入した。前核注入のための導入遺伝子DNA断片を得るため、Bg1 IIおよびHind III酵素でベクターを切断した。線状導入遺伝子DNA断片は4630 bpの長さであった。

【0282】

グリーン蛍光タンパク質遺伝子 (GFP) 遺伝子を含む構成物を構築するため、pEGFP-1(Clontech)をベースとするスプライス供与 / 受容を有する修飾ベクターpEGFP-1-SVをHind III-Kpn Iで制限切断して線状化し、同じMMP 9 プロモーター断片を挿入した。前核注入のための導入遺伝子DNA断片を得るため、Hind IIIおよびAf1 II酵素でベクターを切断した。線状導入遺伝子DNA断片は1928 bpの長さであった。

【0283】

トランスジェニックマウスの作成

線状導入遺伝子DNA断片を、ヘアレスマウス(SKH 1; Charles River, Boston)の受精卵母細胞に注入した。その卵を擬似妊娠代理母に移植した。サザンロットによって、lacZまたはGFP断片の染色体組込みに関して子孫 (F0) を調べた。lacZ導入遺伝子の検出のため、尾から抽出したゲノムDNAをNci Iで消化し、ゲル上で分離し、次にナイロン膜上に移した。Nci Iで消化した導入遺伝子DNA断片をプローブに用いた。2つの独立した系列が導入遺伝子挿入を示した。GFP導入遺伝子の検出のため、尾ゲノムDNAをHinc IIで消化した。2つの独立した系列が導入遺伝子挿入を示した。

【0284】

β-ガラクトシダーゼ組織化学分析

初代 (F0) から得たF1マウスをβ-ガラクトシダーゼ組織化学分析のために用いた。2週令マウスの後ろ肢の骨をPBS中の0.5%グルタルアルデヒドで30分間固定した。PBSで3回および洗剤洗浄液で1回洗浄後、1mg/mlのX-gal (Sigma)、10mMのフェロシアン化物、および10mMのフェリシアン化を含有する反応バッファーと共に37℃でインキュベーションを行った。2時間

インキュベートした後、導入遺伝子を有するF1マウスにおいて青い染色が観察されたが、導入遺伝子を包含しない兄弟では全く染色が観察されなかった。それらの結果は、in situハイブリダイゼーションにおいて2週令マウスの骨でMM P9が発現していることを示した報告と一致する(Reponen, P., Journal of Cell Biology 124, 1091, 1994)。_____

【0285】

実施例10：ヒト好中球エラスターゼトランスジェニックマウス

好中球エラスターゼは広範囲のタンパク質を攻撃できる強力なセリンプロテアーゼである。本酵素を欠くヘアレスマウスは、UVB照射によって生じる光老化の1つの兆候である弾性線維症に罹らない(Starcher, B., Connective Tissue Research, 31, 133, 1995)。従って、好中球エラスターゼは光老化において重要な役割を果たすと考えられる。

【0286】

導入遺伝子の構築

導入遺伝子を構築するため、当業界で公知のPCRに基づく技術を用いて、ヒト好中球エラスターゼの1299 bp断片(ヌクレオチド-1280から+19; 転写開始位置は+1)をヒトゲノムDNAから得た。EcoRI-XhoIで制限切断して線状化されたpNASSbetaベクター(Clontech)に、その好中球エラスターゼプロモーター断片を挿入した。前核注入のための導入遺伝子DNA断片を得るため、EcoRIおよびXbaI酵素でベクターを切断した。線状導入遺伝子DNA断片は5179 bpの長さであった。

【0287】

等価物

当業者は、日常的な実験のみを用いて、この中に記載の本発明の特定実施形態の多くの等価物を認識または考えつくであろう。そのような等価物は以下の請求項によって包含されることが意図されている。

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、ヒトバーシカン-lacZ導入遺伝子の構築の略図

【図2】

図2は、血管内皮細胞増殖因子 - グリーン蛍光タンパク質 [V E G F - G F P] 導入遺伝子構成物の略図

【図3】

図3は、5069pb M M P 9 プロモーター - G F P 構成物のヌクレオチド配列である

【図4】

図4は、7383bp M M P 9 プロモーター - β - G a l 構成物のヌクレオチド配列である

【図1】

ヒトバーシカン-lacZ 導入遺伝子の構築

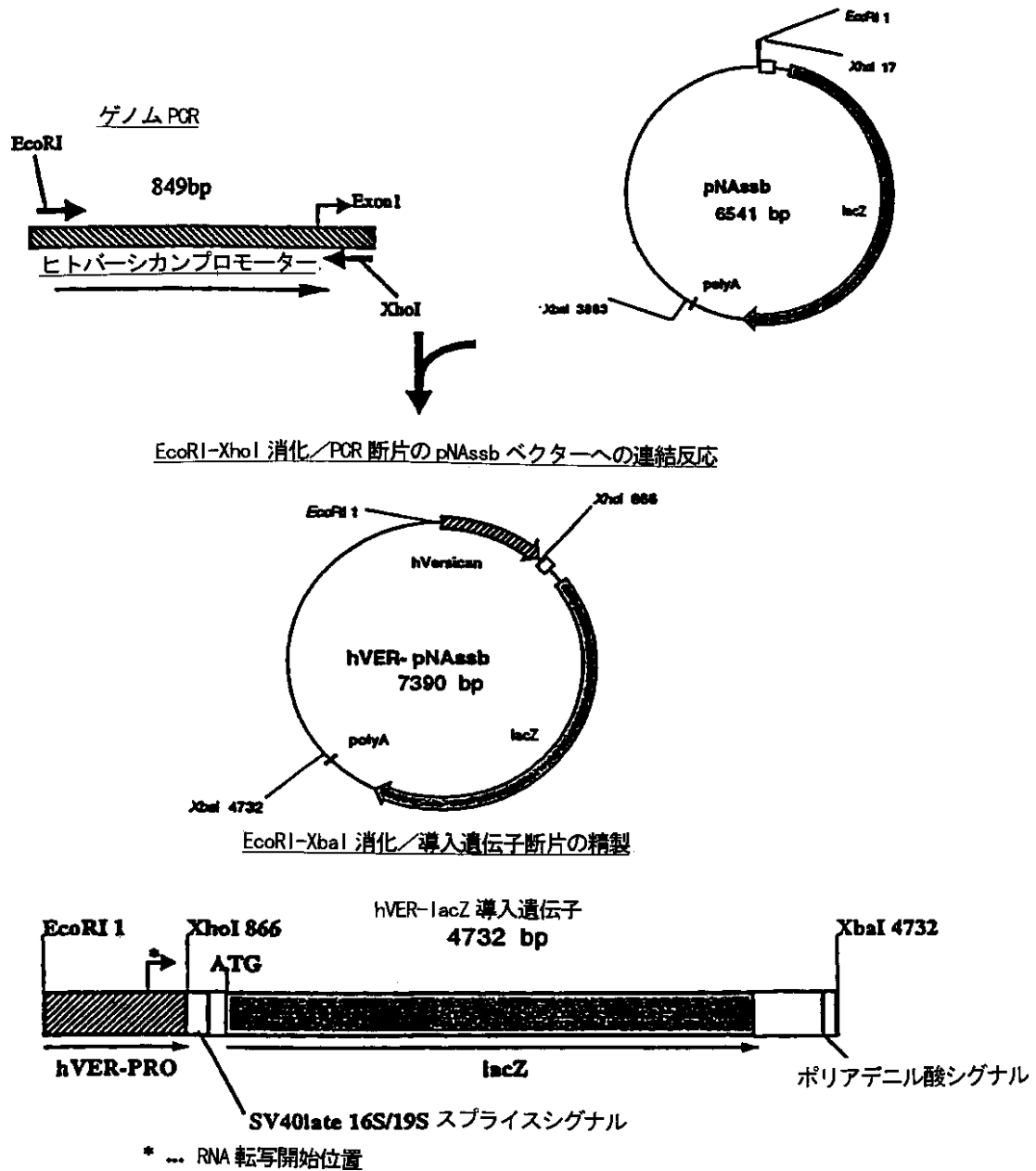
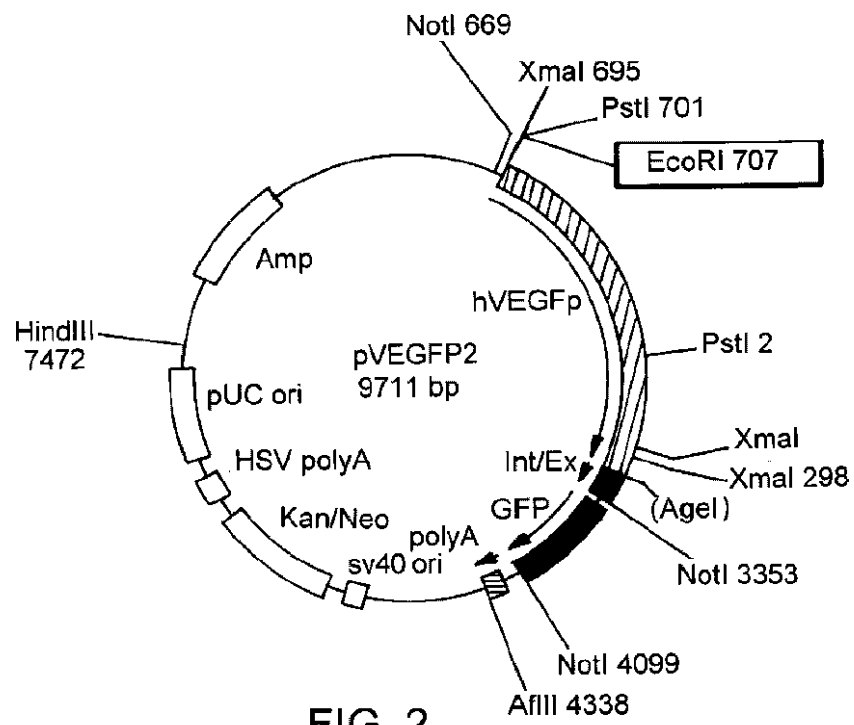


FIG. 2



【図3A】

10 tagattatc tagogtacc ggaatcagat ctccagatcca agcttccga ggtccgaag gaagagagta aagccatgco tgcgttttcc tagagctgc tactgtccc ttactgtccc
 atcaataag atccgatgg cctgagctca cctgagctga gctccagat tcgaaggct ccaggacttc cttctctcat ttccgttacc acgacaaag atctccgag atgacagggg aatgtccgg
 130 tgaagattca gcttgaggaa gacaggggggt tgcctccagtg gaattcccca gctttcccta ccaagagccca ttccctccgc cccagatga agcagggaga ggaagctggag tcaaaagagg
 acttctaagt cggagcctt ctgtcccca acgggggccc cttaaagggt cgaacggat tgcctccgggt aaggaagggg ggggtctctc tgcctctctc ccttcgactc agttctctcc
 250 ctgtcaggga gggaaaaaga ggaacagacc tggagtgtgg ggaagggttt gggagaggata tctgacctgg gagggggtgt tgcacaaagg caaggatggg caagggggat cattagttc
 gacagtccct cctttttt cctgtctgg acctccacc cctcccaaa cctccctat agactggacc ctcccccaca acgttttccg gtctctacc ggtccoccta gtaataaaag
 370 agaagaagt ctccaggagt ctccatccac ttccatccac gactggtgac ctccgaagt ctggttccat accctccag gagggtcgaag tagggggagg gagggaagt atgtcaaggg
 tctttctca ggtccctca gaagtagtg aagggaacc gactggtgac ctccgaagt ctggttccat accctccag gagggtcgaag tagggggagg gagggaagt atgtcaaggg
 490 acaagctcg cagtttgcaa aacctacc cctccctgag ggcctgggt ttccctcggg tctgggtctc tgcctgact ggcagtgag actgcgggaa actgcgggaa gggagggtgg
 tgtccgagc gtcaaacgt ttgggatgg gagggactc ccggagcca aaggagccc agacccaga accgactgaa accgactgaa accgactgaa accgactgaa accgactgaa
 610 tctaagccct ttctcatgct ggtgtgcca cacacacaca cacacacaca cacacacaca ccttgacccc tgaactgca cttgctctgc aaggaggggt ggggtcagag
 acattcggga aagaglacga ccacagcgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gggactgggg actcagtcgt gaacggagag tteccccc ccccgatgc
 730 gaggcctcc ttaaaagccc cacaaagca gctgagtgca gacaccttg cctccacgg taccgaggg ccgggagatcca agatctgggt actogaggaa ctacaaacc agaaagtcaa
 ctccggagg aatttcgggg gtgtgtgtgt cgaactcagt ctgtggagac gggagtgccc atggcgggg ggcctcaggt tctagagcca tgagctcct gatttttgg tctttcaatt
 850 ctgttaagt tagtctttt gtottttatt taagggtccc gatccgtgg tgggtcaat caaagaactg ctccctcagc tctccagtg gatgttccct ttacttctag gctgtacgg aagtgttact
 gaccattcaa atcagaaaaa cagaaataa agtccaggc ctaggccacc accacgttta gttcttgac gaggagtcac ctacacagga aatgaagatc cggacatgcc ttccacatga
 970 tctctctaa aagctgcgga atgtacccg cggccgcaat tcccggtccg caccatggcg agcaaggcg agagctgtt caccggggtg gtgcccaccc tggctcagct ggaagggag
 agacagatt ttccagcct taacatggc gccggggtta agggccagcg gtggtaccac tcttcccg tctccgacaa gtggccccc caggggtagg accagctcga cctgcctg
 1090 gtaaacggc acaagttcag cgtgtccggc gaggggcagg gcgatgccac ctacggcag ctgacctga agttctctc caccacggc aagctggcc tgcctggcc caccctctg
 catctggcg tgtccagtc gacagggc cctccgctcc cgtccagtg gatgcgggt gatgcgggt tcaagtagag gtgtggccg ttccagggc acgggacagg gtggagagc
 1210 accacctga cctacggcgt gcaagtcttc agccgtacc ccgaccacat gaagagac gacttctca agtccgcat gcccgaaagg taactccagg taactccagg taactccagg
 tgtgggact ggtgccga cgtacgaag tggggatgg ggtgggtga ctctctctc ctgaagat tcaaggggta cggcttccc atgcagttcc tgcggtgga gaagaagtc

FIG. 3A

【図3B】

1330 ggcagcgca actacaaagc cccgcgcgag gtagagttcg agggcgacac cctagtgaac cgcctgcgac tgaagggcga cgaattcaag gagagcgga acatcctggg gcacaaqctg
 ctagctccgt tgatgtcttg ggcgcgcgct cacttcaagc tcccgctgtg ggaacacttg ggaactatgg ggcagtagtg acttcccgta gctgaagctg cctctgcgt tgtaggaacc cgtgtttgag
 1450 gagtacaact acaacagcga caactgtctat atcatggcgg acaagcagaa gaaaggcgaac aaggtgaact tcaagatccg ccacacacac gagagcggga ggcgcgcgga ggcgcgcgga
 ctcactgtga tgtgtgtggt gttgcagata tagtacgggc tgttgcctt cttgcgctag ttcacactga agttctagc ggtgtgtgag cctctgcgt cgcacgtga ggcgtgtggt
 1570 taccagcaga acaaccccat cggcgacggc cccgtgtcgc tgcgcgacaa ccaactacatg agcacccagt cgcgcctcag caaagacccc aacgagaagc ggcgtcacat ggtcctctctg
 atggtcgtct tctgagggga ggcgcgcgga cccgtgtcgc ggcgcgcgga cccgtgtcgc tgcgcgcgga cccgtgtcgc ggcgcgcgga cccgtgtcgc ggcgcgcgga cccgtgtcgc
 1690 ggcgtgtcga cccgcgcgga ggcgcgcgga ggcgcgcgga ggcgcgcgga ggcgcgcgga ggcgcgcgga ggcgcgcgga ggcgcgcgga ggcgcgcgga ggcgcgcgga ggcgcgcgga
 1810 accctccaca cctccctctg aacctgaac ataaatgaa tgcattgtt gttgttaact tgtttatggc agcttataat ggttacaact aaggaatag catcaccaat ttcacacata
 tggaggggtg ggagggggac ttggacttgg tttttactt acgttaacaa caacaaatga acaaaatag cgaatataa tgcgaatga tgcgaatga tgcgaatga tgcgaatga tgcgaatga
 1930 aagcattttt ttcactgcac tctagtgtg gttgtgcaca caaacagggt tgcgtatga catagaatto cgcatttaac attcgcact ataaacaaat ttaagcga atttaaaac aatttagctg
 ttctgtaaaa aagtagcga agatcaaac caaacagggt tgcgtatga catagaatto cgcatttaac attcgcact ataaacaaat ttaagcga atttaaaac aatttagctg
 2050 tcatatttta accaatggc cgaacatggc aaatccctt ataatcaaa agaatagacc gaagtagggt tgaagtgtgt tccagtttgg acaagagtc cactattaa gaaagtggac
 agtaaaaaat tggttatccg gotttagcgg ttttagggaa tatttagtt tttttatgg cttatccca actatccca actatccca actatccca actatccca actatccca
 2170 tccaaagcga aagggcgaaa aacgtctat cagggcgatg gccactacg tgaacacatca cctaataca gttttttgg gtcaggtgac cgttaagcga taaatggga cootaaaggg
 aggttgcat ttcacgcttt ttggagata gtcccgctac ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc
 2290 agcccccga tttagagcttg acggcggaag cggcggaacg tggcggaaga ggaaggggaag aagcggaag ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc
 tgggggcta atcttgaag tgcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc
 2410 accacacccg cccgcgttca tgcgcgttca cagggcgctg cagggcgctg cagggcgctg cagggcgctg cagggcgctg cagggcgctg cagggcgctg cagggcgctg
 tgggtgtggc ggcgcgttca acggcggaat cgcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc ggcgcgttc
 2530 atggacaaat aacctgata aatgcttcaa taatattga aaggaagag tctgtggcg gaaagacaa gctgtggaaat gctgtggaaat gctgtggaaat gctgtggaaat gctgtggaaat
 tactctgta ttgggactat ttaagaaagt attataact tttctcttc aggaactcgc cttcttgggt cgaacacctta caacagctca atccacacac ttccaggggt ccagaggggtc

FIG. 3B

【図 3 D】

[illegible]

FIG. 3D

【図 4 A】

```

10      gaattgcct gggtaaaagt gaggtaaccc ttgagagcaa cagacgagga gaggatggaa ggcctggccc ccaagaatga gccctgaggt 90
      ctaagcgga cccactttca ctaagggggc aaccttcggt gtctgctact ctctcaactt ccggaaacggg ggttcttact cgggactcca

100     tcaggggagcg gctggagtgga gccgggcccc gatctccga ggtctctgaag gaagagagta aagccatgtc tgcctatgtc tagaggtgtc 180
      agtctctcgc cgaccttact cggcccggggt cttagagggt ccaggacttc ctctctctat ttccgttaacg aogaaaaag atctccgacg

190     tactgtcccc tttaactgcc tgaagattca gccctgcgaa gacagggggt tgcctccagt gaattcccca gccctggcta gcagagcccc 270
      atgacagggg aaatgacggg acttttaagt cggacgcctt ctgtcccca accgggtcac cttaaggggt cggaaacggat cgtctcgggt

280     ttctctccgc cccagatga agcagggaga ggaagctgag tcaaaagag cgtgcaggga gggaaaaaga ggacagagcc tggaggtgtg 360
      aagggaaggc ggggtctact tctccctct ccttcgactc agttctctcc gacagtccct cctttttct cctgtctcgg acctcaaccc

370     ggagggggtt ggggaggata tctgacctgg gagggggtgt tgcaaaagc caagatggg ccagggggat cattagttc agaaaagat 450
      cctccccaac cccctctat agactggacc ctcccccca acgtttctcg gtctccacc cgtgttccct acccttagg gaggctcgaag tagggggagg

460     ctcagggagt cttccatcac ttctccctgg ctgacctg gactgtgac ctccgaaagt ctggttccct acccttagg gaggctcgaag tagggggagg 540
      gagtccctca gaaggtagt aaagggaacc gactgtgac ctccgaaagt ctggttccct acccttagg gaggctcgaag tagggggagg

550     ctccctttca tacagttccc acaagctctg cagtttgcaa aacctacc ctcctctgag ggcctgggt ttctcgggg tctgggtctt 630
      gagggaaagt atgtcaaggg tgttcgagac gtcaaacgtt ttggatggg gaggggactc cgggagccca aaggagcccc agacccccga

640     tgcctgactt ggcagtggag actgcggga gtggagagag gaggaggtgg tgaagccct ttctcatgt cttctgcca cacaacaca 720
      acggacagaa ccgtcacctc tgacgcctgt cactctctc ctctccac acattcggga aagagtacga ccacgacgtt gttgtgtgt

730     cacaacaca cacaacaca cactgacccc ctgactcga cttgactgtc aagagggggt ggggtcacag gagggtccc 810
      gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gggactgggg actcagtcgt gaacggacac ttctcccca cccagtgct ctcggggagg

820     tttaaggccc caaacacaga gctgcagtc aacactctg ccttcacct cagaggaacty aaaaacaga aagttaactg gtaagtttag 900
      aatttcgggg gtgtgtgtgt cgacgtcagt ctgtggagac gggagtggga gctccttgac tttttgtct ttcattgac cattcaatc

910     totttttgtc tttttttc ggtcccggt ccggtgggtg tgcacatcaa agaacgtctc ctcagtggat gttgccctta cttctagggc 990
      agaaaaaacg aaataaagt ccaggggccta ggcacacc accgtttagt tcttgacgag gagtcaccta caacggaaat gagatctcgg

```

FIG. 4A

【図 4 B】

1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 tgtacggaag tottacttct gctctaaag ctccgaatt ctaccgcgg ccgcaattcc cggggatcga aagagctgc taaagcaaaa
 acatgccttc acaatgaaga cgagatttct gacgccttaa catggcgcc ggggttaagg gccctagct ttctcgagc atttcgtttt

 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170
 aagaagtcac catgtcgttt actttgacca acaagaact gatttcggt gcgggtctgg gaggcattgg tctggacacc agcaagggagc
 ttcttcagtg gtacagcaaa tgaactgtgt tgttttga ctaaaagcaa cggccagacc ctccgtaacc agacctgtgg tcgttctctg

 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 tgcctcaagcg cgatcccgtc gttttacaac gtgtgactg ggaagccct ggggttaccg aacttaactg ccttgcagca catcccccctt
 acgagttcgc gctagggcag caaatgttg cagcactgac ccttttggga ccgcaatggg ttgaattagc ggaacgtagt gtagggggaaa

 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350
 tcggcagctg gcgtaatagc gaagagccc gcaccgatg cccttcccaa cagttgcgca gcttgaatgg cgaatggcgc ttgcctcgt
 agcggtcgcg cgcattatcg cttctccggg cgtggctagc gggaaagggt gtcaagcggt cggacttacc gcttaaccgc aaacggacaa

 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 ttccggcacc agaagcgtg ccgaaaact ggctgaatg ccatcttct gaagccgata ctgtcgtcgt cccctcaaac tggcagatgc
 aagggcgttg tcttgcacac ggccttttga ccgacctcac gctagaagga ctccggctat gacagcagca ggggagtttg accgtctacg

 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530
 acggttacga tgcggccatc tacaccaacg taacctatcc cattacggtc aatcccgct ttcttccac ggagaatccg acgggttatt
 tggcaatgct acggggtag atggtgtgc attggatagg gtaatgcag ttagggcgca aacaagggtg ccttttaggc tgcaccaaaa

 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 actcgcctac atttaactgt gatgaagct ggctacagga aggcagacg cgaattattt ttgatggcgt taactcgcg ttctcatcgt
 tgagcgagt taaattacaa ctactttgga ccgatgtct tccggctgc gcttaataaa aactaccgca attgagccgc aaagttagca

 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710
 ggtgcaacgg gcgtgggtc ggttacggcc aggaacagtcg ttbgcgtct gaattgacc tgagcgcat tttacgcgc ggaacaaacc
 ccacgttgc cgggaccacg ccaatgcggg tccgttcagc aaacggcaga cttaaactgg actcgcgtaa aaatggcggg ccttttttgg

 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 gcctcgggt gatgggtgctg cgttggagtg acggcagtta totggaagt caggatatgt gggggatgag cggcattttc cgtgacgtct
 cggagcgcca ctaccacgac gcaacctcac tgcgtccaat agaccttcta gtcctataca ccgctacttc gccgtaaaag gcattgcaga

 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 cgttgcgtga taaaccgact acacaaatca gggatttcca tgttgccact ccgtttaatg atgatttcag ccggcgtgta ctggaggtg
 gcaacgacgt atttggctga tgtgttagt cgttaaaagt acaacggtga gcgaaattac tactaaagtc ggcgcgacat gactctccag

 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 aagttcagat gtgcggcgag ttgcgtgact aactacgggt aacagttct ttatggcagg gtgaacgca ggtcgccagc ggcaccgcgc

 1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070
 ctttcggcgg tgaattatc gatggcgctg gtggttatgc cgaatcgctc acactagtc tgaacgtcga aaacccgaaa ctgtggagcg
 gaagcgcc actttaatag ctactcgcac caccatacag gctagcgag tgtgatgag acttgacgt ttgggcttt gacacctgcg

FIG. 4B

【図 4C】

2080 ccgaatccc gaatctctat cgtgcggtgg ttgaactgaa caccgcgcac 2120 ggcaagctga ttgaagcaga agcctggcat gtcggtttcc 2160
 ggcttttaggg cttagagata gcaagccacc aacttgacgt tgggcgctg ccgtggact aacttcgtct toggagccta cagccaaagg
 2170 gcgaggtgcg gattgaaaat ggtctgtgc tgcgaaacgg caagcgttg ctgaticgag gccttaaccg tcaagagcat catoctctgc
 cgtctccacgc ctaactttta ccagacgacg acgacttgc gttcggaac gattagctc cgcattgggc agtgcctccta gtaggagacg
 2260 atggtcagggt catggatgag cagacgatgg tgdaggatat cctgctgatg aagcagaaca actttaaccg cgtgcgctgt togcattatc
 taccagttcca gtacctactc gtctgctacc acgtctcata ggacgactac ttgctcttgt tgaatttcg cgtgcggaaca agtgtaatag
 2350 cgaaccatcc gctgtgttac acgtgtgtgc accgtatacg cctgtatgtg gtggatgaag ccaatatgtg aaocaaagc atgtgtccaa
 gcttggtagg cgaacacatg tgcgacacgc tggcgatgac atggcgctca ctcgcttgcg cattgcgtt accacgtcgc ttgggtgccc taccacggtt
 2440 tgaatcgtct gaccgatgat ccgcgctggc taccggcgat gagggaacgc gtaacggaa ttgtgcagcg cgatcgtaac caoccgatg
 acttagcaga ctggctacta ggcggaacgc atggcgctca ctcgcttgcg cattgcgtt accacgtcgc ttgggtgccc gctagcatta gtgggtccac
 2530 tgatcatctg tgcgctgggg aatgaantcag gccacggggc taataccgac gctgtgata gctggatcaa atctgttcgat ccttcccgcc
 actagtagac cagcgacccc ttaacttagtc cgtgtccgctg attagtctg cggagactag cgacctagt tagacagcta ggaaggcgg
 2620 cgggtgcagta tgaaggcggc ggagccgcaca ccaogcccac cgatatatt ttgcctcgtatg acgcgccgct ggaatgaagac cagccctcc
 gcaacgtcat acttccgcg cctcggtgt ggtgcggtg gtataataa acgggtatca tgcgcgga cctactctg gtgggaagg
 2710 tgaatcgtct gaaatgtcc atcaaaaat ggcttctgt acctggagag acgcgcccgc tgatcctttg cgaataagcc cagcgatgg
 gcgactcgg cttactcgg tagtttttta ccgaagcga tggacctc tgcgcggcg actaggaaac gcttatgcg gtgcgctacc
 2800 gtaacagtct tggcgttcc gctaaatct ggcaggcgtt tgcctagat cccgtttac agggcggtt tcccgccgaa gcaagacctg accacactag
 cattgtcaga accgcgaag cgaattatga ccgtccgcaa agcagtcata gggggcaatg tcccgccgaa gcaagacctg accacactag
 2890 agtcgctgat taatatgat gaaaacgca acccgtgtc ggcttacgc gctgattttg gcgatacgc gaacgacgc cagttctgta
 tcaagcacta attatacta cttttgcgt tgggcaccag ccgaatgcg caactaaaac cgtatgcg cttgctagcg gtcaagacat
 2980 tgaacggtct ggtccttgcg gaccgcagc cgcattccagc gctgacggaa gcaaaacac ccagacgatt ttccagttc cgtttatccg
 acttgccaga ccagaacg ctggcgtgctg gcgtaggtcg cgaatgcctt cgtttgtg tgcgtctcaa aaagggtcaag gcaaataggc
 3070 ggcaaacat cgaagtgcac agcgaatccc tgttccgtca tagcgataac gagctcctgc actggatgggt ggcgctgat ggtaaagcgc
 ccgttttgta gcttactgg tcgcttatgg acaaggcagt atcgctatg atcgctatg tccgaggaag tgacctacca ccgagccta ccatcggcg

FIG. 4C

【図 4 D】

3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240
 tggcaagcgg tgaagtgcct ctggatgtcg ctccacaagg taacacgttg attgaactgc ctgaactacc gcagccggag agcggcgggc
 accgttgcgc acttcacgga gacctacage gagggtgtcc attgtcaac taacttgacg gacttgatgg cgtcgggctc tgcggggccc

 3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330
 aactctggct cacagtacc gtagtcaac cgaacgcgac cgcattggtca gaagccgggc acatccgcgc ctggcagcag tggcgtctgg
 ttgagaccga ggtcatgctg catcacgttg gcttgctgtg gcgtaccagt ctccggcccg tgaagtgcgc gaacgtctgc accgagacc

 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400 3410 3420
 cggaaaacct cagttgacg ctcccgcgc cgttccacgc catcccgat ctgacacca gogaaatgga tttttgcac gaqttgggta
 gcttttggga gtcacactgc gaggggcgc gcagggtgcg tagggcgtg gactggtggt cgttttacct aaaaacgtag ctgcacctat

 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510
 ataagcgttg gcaatttaac cgcagtcag gctttcttc acagatgtgg attgggata aaaaacaact gctgacgcgc ctgcgcgatac
 tattcgcac cgttaattg ggggtcagtc cgaagaagaag tgtctacac taacggctat tttttgttga cgaactgggc gacggcgttag

 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 agttcacccg tgcacgcctg gataacgaca ttgocgttaag tgaacgcacc cgcattgacc ctaacgcctg ggtcgaacgc tggaaaggcg
 tcaagtgggc acgtggcgac ctattgctgt aaccgcattc acttcgctcg gcgttaactgg gattgcggac cgaacttgcg accttcgcgc

 3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690
 cggggcattt ccaggccgcg gcagcgttgt tgcagtgac ggcagataca cttgctgacg cgggtctgat taacgacgct cacgcgttgc
 gccgggtaat ggtccggtt cgtcgaaca acgtcacgtg ccgtctatgt gaacgactac gccacgacta atgctggcga gtgcgcacgc

 3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780
 agcatcagg gaaaacctt ttatcagcc ggaacccta ccgattatgt ggtatgggc aaatggcgat taacctgat gttgaagtgg
 tcttagtccc cttttggaat aaatagtcgg ccttttgat ggcctaacta ccatcaccag ttacgcgta atggcaacta caacttcacc

 3790 3800 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870
 cgagcgatac accgataccg ggcgcgattg gcctgaactg ccagttggcg caggttagcag agcgggttaa ctgcttcgga ttagggcgcg
 gctcgtctatg tggcgtaggc cgcgctaac cggacttgac ggtcgacgc gtccatcttc tgcgcattt gaacgagcct aatcccggcg

 3880 3890 3900 3910 3920 3930 3940 3950 3960
 aagaaaaacta tcccgaccgc cttactgcgc cctgttttga ccgtcgggat ctgccattgt cagacatgta taccccgtae gtcttcgga
 ttcttttgat aggtctggcg gaatgaaggc ggacaaaaact ggagacccta gacgttaaa gtctgtacat atgggggcatg cagaaaggct

 3970 3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050
 gcgaaaaacgg tctgcgtgc ggaacgcgcg aattgaatta tggcccaaac cagtggcgcg gcgaactcca gttcaacata agccgctaca
 cgtttttgac agacgcagc cctgcgcgc ttaacttaac accgggtgtg gtacccgcgc cgttgaagg caagtgttag tggcgtatgt

 4060 4070 4080 4090 4100 4110 4120 4130 4140
 gtcaacagca actgatggaa accagccatc gccatctgct gcacgcgaa gaaggacat ggttgatata cgcgcgttcc catatgggga
 cagttgttgt tgaactacett tggtcggtag cggtagacga cgtgcgcct cttoctgtt ccgacttata gctgccaag gtataccct

 4150 4160 4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230
 ttggtggcga cgactcctgg agcccgctcag tatcggcgga attacagtg agcgcgggc gtacacatta ccagttgttc tgggtctaaa
 aaccaccgct gctgaggacc ttgggcaagtc atagccgct taatgtcgac ttgcggccag cgtatgtaat ggtcaaccag accacagttt

FIG. 4D

【図 4 E】

4240 aataataa 4250 aacgggag 4260 coagtgtg 4270 ccgtattg 4280 ccgtattg 4290 acattatg 4300 acattatg 4310 acattatg 4320 acattatg
 ttattattat tggccgtg ggtacagc ggtacagc ggtacagc ggtacagc ggtacagc ggtacagc ggtacagc ggtacagc
 4330 tgggtttt 4340 tttttttt 4350 tttttttt 4360 tttttttt 4370 tttttttt 4380 tttttttt 4390 tttttttt 4400 tttttttt 4410 tttttttt
 agcnaataa gaaagaaat atgaaaaat agtaccctg gatgaaggc ggtgaaggc ggtgaaggc ggtgaaggc ggtgaaggc ggtgaaggc
 4420 aaagtgtac 4430 ggtattatt 4440 ttttccgt 4450 ttttccgt 4460 ttttccgt 4470 ttttccgt 4480 ttttccgt 4490 ttttccgt 4500 ttttccgt
 ttttccgtat cccataataa aaacggcgat aaagagaa aaagagaa aaagagaa aaagagaa aaagagaa aaagagaa aaagagaa aaagagaa
 4510 tggactctag 4520 gggcgccg 4530 ggtacagc 4540 ggtacagc 4550 ggtacagc 4560 ggtacagc 4570 ggtacagc 4580 ggtacagc 4590 ggtacagc
 agctgagat cgcggcgc cctaggtgt taattatc taattatc taattatc taattatc taattatc taattatc taattatc taattatc taattatc
 4600 tttatttgg 4610 aaatttgg 4620 ttttccgt 4630 ttttccgt 4640 ttttccgt 4650 ttttccgt 4660 ttttccgt 4670 ttttccgt 4680 ttttccgt
 aaataaacac ttaaacact aagataacg aataaacat ggtatattc ggtatattc ggtatattc ggtatattc ggtatattc ggtatattc ggtatattc ggtatattc
 4690 atgtttcag 4700 ttcaggggg 4710 ggtgtggg 4720 ggtgtggg 4730 ggtgtggg 4740 ggtgtggg 4750 ggtgtggg 4760 ggtgtggg 4770 ggtgtggg
 taataagtc agtccccc ccaacccc ccaacccc ccaacccc ccaacccc ccaacccc ccaacccc ccaacccc ccaacccc ccaacccc
 4780 tagctgttc 4790 ctgtgtgaa 4800 ttgtttcc 4810 ttgtttcc 4820 ttgtttcc 4830 ttgtttcc 4840 ttgtttcc 4850 ttgtttcc 4860 ttgtttcc
 atcgacaag gacacactt acaataggc ggtgttaa ggtgttaa ggtgttaa ggtgttaa ggtgttaa ggtgttaa ggtgttaa ggtgttaa ggtgttaa
 4870 tgaagtgt 4880 aactcact 4890 cgtcactg 4900 cgtcactg 4910 cgtcactg 4920 cgtcactg 4930 cgtcactg 4940 cgtcactg 4950 cgtcactg
 actcactga ttgagtga ttaacgca cgtcactg cgtcactg cgtcactg cgtcactg cgtcactg cgtcactg cgtcactg cgtcactg cgtcactg
 4960 caacgcgc 4970 gtagagcg 4980 gtagagcg 4990 gtagagcg 5000 gtagagcg 5010 gtagagcg 5020 gtagagcg 5030 gtagagcg 5040 gtagagcg
 gttgcgcgc ccttcgcgc aacgcgca aacgcgca aacgcgca aacgcgca aacgcgca aacgcgca aacgcgca aacgcgca aacgcgca aacgcgca
 5050 gcggtatcag 5060 ctcactcaa 5070 ggcggtata 5080 ggcggtata 5090 ggcggtata 5100 ggcggtata 5110 ggcggtata 5120 ggcggtata 5130 ggcggtata
 cgccatagc ggtgagtt cgcctatt cgcctatt cgcctatt cgcctatt cgcctatt cgcctatt cgcctatt cgcctatt cgcctatt cgcctatt cgcctatt
 5140 aagccagga 5150 accgtataa 5160 ggcgcgtt 5170 ggcgcgtt 5180 ggcgcgtt 5190 ggcgcgtt 5200 ggcgcgtt 5210 ggcgcgtt 5220 ggcgcgtt
 ttcggttct tggcattt cgcgcgca cgcgcgca cgcgcgca cgcgcgca cgcgcgca cgcgcgca cgcgcgca cgcgcgca cgcgcgca cgcgcgca
 5230 cagaggtgc 5240 gaaacggc 5250 agactata 5260 agactata 5270 agactata 5280 agactata 5290 agactata 5300 agactata 5310 agactata
 gtctccacc ctttggtg tcttgatc tcttgatc tcttgatc tcttgatc tcttgatc tcttgatc tcttgatc tcttgatc tcttgatc tcttgatc tcttgatc

FIG. 4E

【図 4 F】

5320 cttaccggat acctgtccgc ctcttccct tcgggaagcg tggcgcttcc tcatactca cagctgaggt atctcagttc ggtgtaggtc 5390
 gaatggccta tggacaggcg gaaagaggga agcccttcgc accgggaag agtatcgagt ggacatcca tagagtcaag ccacatccag 5400
 5410 gttcgcctca agctgggctg tgtgcacgaa ccccccttc agccgcagcg ctggcgctta tccggtaact atcgctcttg gtccaaacccg 5490
 caagcgaggt tcgacccgac acacgtgctt gggggggcag tcgggctggc gacgcggaat agggcattga tagcagaact caggttgggc 5500
 5500 gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gctactggta acagatttag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gtttttgaag 5580
 cattctgtgc tgaatagcgg tgaatcgctg cggtagccat tglcctaact gtctcgctcc atacatccg cagcatgtct caagaacttc 5590
 5590 tggtagcccta actacggcta cactagaagg acagtatttg gtactgagcg tctgtgaag ccagttacct toggaaaaag agttggtagc 5670
 accatcggt tgaatcggt gtgatcttcc tgtcataaac catagacgcg agacgacttc ggtcaatgga agccttttcc tcaaccatcg 5680
 5680 tcttgatccg gcaaacaaac cacgcgtggt agcgttggtt tttttgttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa 5760
 agaactaggc cgtttgtttg gtggcgacca tcggcaccac aaaaacaaac gttcgtcgtc taatgcgctg ctttttttcc tagagtctct 5770
 5770 gatcctttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtggg acgaaacttc acgttaaggg attttgtgca tgagatctac aaaaaggatc 5850
 ctagaaaact agaaaagatg cccagactg cagatcacct tgccttttag tgcacttccc taaaaccagt actctaactg tttttcctag 5860
 5860 ttcaactaga tccttttaaa ttaaaaatga agttttaaat caatctaag tatatatgag taaacttggt ctgacagtta ccaatgctta 5930
 aagtggatct aggaataatt aatttttact tcaaaattta gttagatttc atatatactc atttgaacca gactgtcaat ggttacggaat 5940
 5950 atcagtgagg cacttatctc agcgtatctg ctatttcgtt catccatagt tgcctgactc ccgctgctgt agataactac gatacgggag 6030
 tagtcaactc ggggatagag tcgctagaca gataaagcaa gtaggtatca acggactgag gggcagcaca tctattgatg ctatgccttc 6040
 6040 ggottaaceat ctgggccccg tgttgcaatg ataccggcag acccagcttc accggctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga 6120
 cogaatggta gaocgggggtc acgacgtttac tatggcgttc tgggtgcgag tggccgaggt cttaaattgc gtbatttggt cggtcggcct 6130
 6130 agggccgagc gcagaagtgg tccttgcact ttatccgctt ccatacagtc tattaatgtt tgcgcgggaag cttagagtaag tagttcgcca 6210
 tccccggctc cgtcttccac aggacgttga aataggcgga ggtaggctag ataattatgc ggtcccttcg gatctcattc gtcaagcggt 6290
 6220 gtttaatagtt tgcgcgaactg tgttgccatt gctacaggca tcgtgggtgc agcgtcgtcg ttttggtatgg ctctcatccag ctccgggtcc 6300
 caattatcaa acgcgttgc acaacggtga cgtatgtcgt agcaccacag tgcgagcagc aaaccatacc gaagtaagtc gagggcaagg 6370
 6310 caacgatcaa ggcgagttac atgatccccc atgttgtgca aaaaagcgtt tagctccttc ggtccctccg tcgttgtcag aagtaagtig 6380
 gttgtagtt cagctcaatg tactaggggg tactaacagt tttttcgcca atcgaggaag caagggaggt agaaacagtc ttcattcaac 6390

FIG.4F

【 図 4 G 】

```

6400      6410      6420      6430      6440      6450      6460      6470      6480
gcgcagtggt tatcaactcat ggttatggca gcaatgcata attctctttac tctctatggca tccgttaagat gctttttctgt gactgggtgag
cgcggtcaca atagttagta ccaataacgt cgtgacgtat taagagaatg acaagtacggt aggcattcta cgaagaagaca ctgaccactc

6490      6500      6510      6520      6530      6540      6550      6560      6570
tactcaacca agtcattctg agaatagtgt atgogggagc agagtgtgtc ttgcoogggcg tcaatacggg ataatacogc gccacatago
atgagtggtg toagtaagac tcttatacaca tacgocgtcg gctcaacgag aacggggcgc agttaigccc tattatggcg cgggtgtatcg

6580      6590      6600      6610      6620      6630      6640      6650      6660
agaactttaa aagtgctcat cattggaaaa cgtctctcgg ggcgaataact ctcaaggatc ttaccgctgt tgaatccag ttcatgttaa
tcttgaaatt ttcaacgagta gtaacctttt gcaagaagcc ccgcttttga gatttcttag aatggcgaca actctaggtc aagctacatt

6670      6680      6690      6700      6710      6720      6730      6740      6750
ccactcgtg caccacaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga gcaaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa
gggtgagcac gtgggttgac tagaagtctgt agaaaatgaa agtggtcgca aagaccact ctcttttctc ctccggtttt acggcggtttt

6760      6770      6780      6790      6800      6810      6820      6830      6840
aagggaataa gggcgacacg gaattgttga atactcatc tcttctcttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg
ttcccttatt cccgctgtgc ctttacaact tatgagtag agaaaggaaa agttataata actctgtaaa tagtcccaat aacagagtag

6850      6860      6870      6880      6890      6900      6910      6920      6930
acgggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaata taggggttcc ggcgcacattt ccccgaaaaag tgccacctga cgtctaaaga
tcgctatgtg ataaaattac ataaatcttt ttatttgttt atccccaaag cgggtgtaaa ggggcttttc acggtggact gcagattctt

6940      6950      6960      6970      6980      6990      7000      7010      7020
accattatta tcatgacatt aacctataaa aataggcgta tcacagggcc ctctctcttc gcgcgttttc gtgatgacgg tgaataacctc
tggtataaat agtactgtaa ttggatatatt ttatccgcct agtgcctcgg gaaagcagag cgcggcaaacg caetactgcc acttttgag

7030      7040      7050      7060      7070      7080      7090      7100      7110
tgacacatgc agctcccgga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga caagcccgtc agggcgcgtc agcgggtgtt
actgttagc togaggccct ctgccagtgat cgaacagaca ttccgctacg gccctcgtct gtccgggagc tcccggcgag tcgcccaaa

7120      7130      7140      7150      7160      7170      7180      7190      7200
ggcgggtgtc ggggctgggt taactatgcg gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatcggtt gtgaataacc gcacagatgc
ccggccacag ccccgaccga attgatagcg cgtagtctcg tctaacatga ctctcactg gtatacgca cauttatgg cgtgtctacg

7210      7220      7230      7240      7250      7260      7270      7280      7290
gtaaaggaaa aataccgcct caggggccat tcgccattca ggctgcgcaa ctggttggaa gggcgatccg tgccgggcctc ttctctatta
cattctctct ttatggcgta gtccgcggtg agcggtaatg cgaagcgtt gacaacctt cccgtagcc acgcccggag aagcgataat

7300      7310      7320      7330      7340      7350      7360      7370      7380
cgccaggttg cgaaggggg atgtgctgca aggcgattaa gttgggtaac gccagggttt tccacgtcac gacgttgtaa aacagcggcc
gggttgagcc gctttccccc tacacgacgt tccgctaatt caacctatg cgaaccacaa aggggtcaagt ctgcaacatt ttgtgcgg

```

7383

agt

tca

FIG. 4G

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/24637
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) :A01K 67/00 US CL :300/3, 8 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) U.S. : 300/3, 8 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NONE Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS MEDLINE CAPLUS EAST		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X - Y	MOHAN et al. Developmental and wound-inducible expression of a gelatinase B promoter-lacZ fusion gene in transgenic mice. J. Invest. Dermatol. 1996, Vol. 106, page 906, Abstract 604, see entire abstract	1-6 and 10-15 ----- 1, 7, 8, 15-17
X	CACHON-GONZALEZ et al. Structure and expression of the hairless gene of mice. PNAS, USA. August 1994, Vol. 91, pages 7717-7721, see paragraph bridging pages 7720-7721.	15, 17, 18, and 25
X	BRAGHETTA et al. Distinct regions control transcriptional activation of the alpha1(VI) collagen promoter in different tissues of transgenic mice. J. Cell Biol., November 1996, Vol. 135, No. 4, pages 1163-1177, see entire article.	1, 3, 6 and 8
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 "B" earlier document 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 "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 OCTOBER 2000		Date of mailing of the international search report 28 NOV 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>Dorothy Lawrence Fox</i> MICHAEL C. WILSON Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/24637

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	DAVIS et al. A nuclear GFP that marks nuclei in living <i>Drosophila</i> embryos; maternal supply overcomes a delay in the appearance of zygotic fluorescence. Dev. Biol. 1995, Vol. 170, pages 726-729, see entire article.	1, 7, 8, 15-17

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト [*] (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 N 15/00	Z N A A
(72)発明者	キシモト, ジロウ アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02181 ウェレスリー ウスター ストリ ート 353		
(72)発明者	ニシヤマ, トシロウ 神奈川県横浜市金沢区福浦 2 - 12 - 1		
(72)発明者	エハマ, リツコ 神奈川県横浜市金沢区福浦 2 - 12 - 1		
F タ-ム(参考)	2G045 AA40 BA11 CB01 CB09 FA11 FB02 FB03 GC15 4B024 AA11 CA04 EA04 FA02 GA11 HA12 4B063 QA07 QQ02 QR32 QS05 QS34		

专利名称(译)	评价化合物对皮肤的影响的方法。		
公开(公告)号	JP2003520946A	公开(公告)日	2003-07-08
申请号	JP2001521146	申请日	2000-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	总医院集团		
申请(专利权)人(译)	总医院集团		
[标]发明人	バージェソンロバート アマノサトシ キシモトジロウ ニシヤマトシロウ エハマリツコ		
发明人	バージェソン,ロバート アマノ,サトシ キシモト,ジロウ ニシヤマ,トシロウ エハマ,リツコ		
IPC分类号	A01K67/027 C07K14/435 C12N9/64 C12N9/66 C12N15/09 C12N15/85 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	C12N15/8509 A01K67/0275 A01K67/0278 A01K2207/15 A01K2217/00 A01K2217/05 A01K2227/105 A01K2227/108 A01K2267/0393 C07K14/43595 C12N9/6448 C12N9/6491 C12N2830/008		
FI分类号	G01N33/15.Z A01K67/027 G01N33/50.H G01N33/53.Y C12Q1/68.A C12N15/00.ZNA.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/CB01 2G045/CB09 2G045/FA11 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/GC15 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA07 4B063/QQ02 4B063/QR32 4B063/QS05 4B063/QS34		
优先权	09/393483 1999-09-10 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了一种评估对皮肤的影响的治疗方法。本发明还提供了一种非人转基因动物，例如小鼠，其含有与皮肤代谢启动子相连的报道基因。

