

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02007/144974

発行日 平成21年12月17日 (2009.12.17)

(43) 国際公開日 平成19年12月21日 (2007.12.21)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
AO1K 67/027 (2006.01)	AO1K 67/027 ZNA	4B024
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	4B063
GO1N 33/15 (2006.01)	GO1N 33/15 Z	
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 N	
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

出願番号 特願2008-521089 (P2008-521089)
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2006/322715
 (22) 国際出願日 平成18年11月15日 (2006.11.15)
 (31) 優先権主張番号 特願2006-162896 (P2006-162896)
 (32) 優先日 平成18年6月12日 (2006.6.12)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

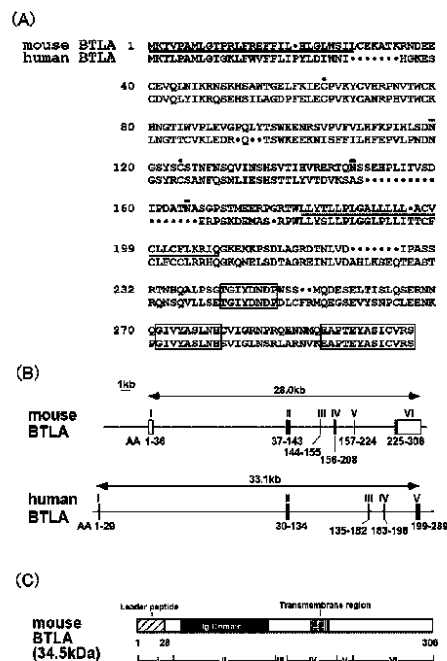
(71) 出願人 304021831
 国立大学法人 千葉大学
 千葉県千葉市稲毛区弥生町1番33号
 (72) 発明者 渡邊 紀彦
 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号
 国立大学法人千葉大学医学部附属病院内
 (72) 発明者 大矢 佳寛
 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番1号
 国立大学法人千葉大学大学院医学研究院内
 Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BA80 CA02 DA02
 FA10 FA20 GA18 GA25 HA20
 4B063 QA05 QA19 QQ02 QQ08 QQ21
 QQ41 QQ61 QQ89 QQ91 QR72
 QR77 QR80

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 自己免疫性非ヒト動物及びそれを用いたスクリーニング方法

(57) 【要約】

染色体上の B T L A 遺伝子の一部もしくは全部が欠損し、野生型において発現される B T L A を発現する機能が失われており、B T L A が認識するリガンドに対する応答性が特異的に障害されているマウスを全身性自己免疫疾患、特に自己免疫性肝炎疾患モデルとして利用する。この自己免疫疾患・自己免疫性肝炎自然発症マウスを、自己免疫疾患診断法、病原となる自己抗原、自己免疫応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニングに用いる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

染色体上の B T L A の一部もしくは全部が欠損している非ヒト動物。

【請求項 2】

前記非ヒト動物は、自己免疫性疾患を発症することを特徴とする請求項 1 記載の非ヒト動物。

【請求項 3】

自己免疫性肝炎の病理像を呈することを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の非ヒト動物。

【請求項 4】

前記非ヒト動物が、マウスであることを特徴とする請求項 1 乃至 3 のいずれか一つに記載の非ヒト動物。 10

【請求項 5】

請求項 1 乃至 4 のいずれか一つに記載の非ヒト動物に由来する細胞または生体組織を用いて、野生型に比して増加または減少している自己抗原、自己抗体、細胞表面マ - カ - 、血清中蛋白、酵素、無機物質、遺伝子を測定することを特徴とする自己免疫疾患診断法のスクリーニング方法。

【請求項 6】

請求項 1 乃至 4 のいずれか一つに記載の非ヒト動物に由来する免疫担当細胞または血中免疫グロブリンと被検物質とを用いて、前記免疫担当細胞における被検物質に対する応答や前記免疫グロブリンと被検物質の結合を測定・評価することを特徴とする自己抗原のスクリーニング方法。 20

【請求項 7】

請求項 1 乃至 4 のいずれか一つに記載の非ヒト動物と被検物質を用いて、前記非ヒト動物における被検物質に対する応答を測定することを特徴とする自己抗原のスクリーニング方法。

【請求項 8】

請求項 1 乃至 4 のいずれか一つに記載の非ヒト動物に由来する免疫担当細胞と被検物質とを用いて、前記免疫担当細胞における自己抗原に対する応答を測定することを特徴とする自己免疫応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 9】 30

請求項 1 乃至 4 のいずれか一つに記載の非ヒト動物と被検物質を用いて、前記非ヒト動物における自己抗原に対する応答を測定することを特徴とする自己免疫状態の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、自己免疫性非ヒト動物及びそれを用いたスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【0002】 40

リンパ球上には抗原を認識する抗原レセプタ - の他に抗原提示細胞上の種々のリガンドと結合し、活性化促進または抑制のシグナルを伝達する補助レセプタ - が存在する。これらは副刺激分子と呼ばれ、その機能により促進性副刺激分子と抑制性副刺激分子に大別される。例えば、Tリンパ球（T細胞）は外来抗原に対しては強力に応答し、自己抗原に対しては反応せず免疫寛容（トレランス）が維持されるが、このような抗原認識後のT細胞の適切な免疫応答には、T細胞レセプタ - （TCR）を介する抗原特異的なシグナルに加えて、T細胞表面の副刺激分子からの副刺激シグナルが大きく関与していることが知られている（例えば、下記非特許文献1、2参照）。

【0003】

抑制性副刺激分子はリンパ球の活性化や増殖、サイトカイン産生を抑制することにより免疫応答を負に制御している。抑制性副刺激分子にはCTLA-4やPD-1と呼ばれるもの 50

が既に同定され、機能解析が進められている（例えば、下記非特許文献 3～5 参照）。これらの抑制性副刺激分子は、その欠陥が生体内でトランスの破綻や自己免疫疾患の発症をきたすことがノックアウト（欠損）マウスの解析から明らかとなり、リンパ球の活性化閾値の設定や過剰な免疫応答の停止などに非常に重要な役割を果たしていると考えられている（例えば、下記非特許文献 6～8 参照）。

【0004】

自己免疫疾患とは、本来は細菌・ウイルスや腫瘍などの自己と異なる異物を認識し排除する役割を担う免疫系が、自分自身の正常な細胞や組織に対してまで過剰に反応し攻撃を加えてしまうことで症状を来す疾患の総称である。自己免疫疾患は、全身にわたり影響が及ぶ全身性自己免疫疾患と、特定の臓器だけが影響を受ける臓器特異的疾患の 2 種類に分けることができるが、例えば関節リウマチや全身性エリテマト・デス（SLE）、シェーグレン症候群などに代表される膠原病は、全身性自己免疫疾患である。自己免疫疾患患者では自分の体の構成成分（自己抗原）と反応する自己抗体がしばしば発見され、自己に対する正常な免疫制御システムが機能していないことが明らかとなっている。すなわち抗原が「自己」と認識された場合でも抗原特異的なヘルパ-T細胞は活性化され、B細胞や細胞障害性T細胞を活性化する（自己反応性リンパ球）。その結果、自己抗原に対する自己抗体が産生され、自己反応性細胞障害性T細胞は、自己標的細胞を障害する。その際、自己反応性リンパ球が認識する自己抗原の違いにより、障害される臓器病変は異なり種々の自己免疫疾患が発症する。健常者でも自己反応性リンパ球は僅かに存在するとされるが、抑制性副刺激シグナルを含む種々の抑制要因により自己免疫疾患を発症することはない。

10

20

【0005】

自己免疫性肝炎は、肝細胞障害の発症と持続に自己免疫機序が関与していると考えられる慢性に経過する肝炎であり、中年以降に好発することが特徴とされる疾患である。持続性又は反復性の血清トランスアミナゼ（GOT、GPT）の上昇、高ガンマグロブリン血症、血清中の自己抗体陽性（抗核抗体、抗DNA抗体、抗平滑筋抗体、肝腎ミクロゾーム抗体など）を特徴とする。他の自己免疫疾患の合併がおよそ1/3の症例で見られ、合併頻度の高いものとしては慢性甲状腺炎、慢性関節リウマチ、シェーグレン症候群などがある。また、治療に際し免疫抑制剤やコルチコステロイドが効果を奏する疾患である。

【0006】

本発明者らは、マウス由来の活性化CD4陽性T細胞の二つのサブセットであるTh1細胞とTh2細胞における遺伝子発現の相違をDNAチップによりスクリーニングすることにより、新規の抑制性副刺激分子であるBTLA（Band T Lymphocyte Attenuator）を同定した（下記非特許文献 9 参照）。図 1 は BTLA のアミノ酸配列の比較を示している。

30

【0007】

BTLA はリンパ球上に発現する抑制性副刺激分子であり、BTLA 刺激により T 細胞の増殖や IL-2 などのサイトカイン産生が抑制されることから、生体内において免疫応答を負に制御し免疫系のホメオスタシスすなわちトランスを維持する機能を果たしていると推定されている（例えば下記非特許文献 9 参照）。また、BTLA のリガンド、HVEM がヒト生体内では肝臓に比較的多く発現しているという報告もあり（下記非特許文献 10 参照）、BTLA が肝臓においてトランスに重要な役割を果たしている可能性が示唆されている。

40

【0008】

【非特許文献 1】Annu. Rev. Immunol., 2001, 19, 565-594

【非特許文献 2】Annu. Rev. Immunol., 2001, 19, 225-252

【非特許文献 3】Annu. Rev. Immunol., 1996, 14, 233-258

【非特許文献 4】Curr. Opin. Cell Biol., 1999, 11, 203

50

- 2 1 0

【非特許文献5】Trends . Immunol .、2001、22、265-268

【非特許文献6】Science、1995、270、985-988

【非特許文献7】Immunity、1999、11、141-151

【非特許文献8】Science、2001、291、319-322

【非特許文献9】Nat . Immunol .、2003、4、670-679

【非特許文献10】J . Biol . Chem .、1997、272、14029-14032

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0009】

確かに上記非特許文献9、10に記載の報告によるとBTLAの機能欠陥や低下により免疫応答が活性化しやすくなり、免疫寛容の破綻すなわち自己免疫疾患の発症、特に自己免疫性肝炎をきたす可能性を考えることが出来る。しかしながら、非特許文献9にはBTLAを欠損した生体の加齢後の疾病発症に関してまで報告されておらず検討もされていない。

【0010】

そこで本発明の課題は、自己免疫疾患特に自己免疫性肝炎モデル非ヒト動物やそれらを用いた臓器障害の解析方法や治療薬のスクリーニング法等を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

20

【0011】

上記課題を解決する本発明の一形態に係る非ヒト動物は、染色体上のBTLAの一部もしくは全部が欠損していることを特徴とする。ここで、配列表にBTLAの遺伝子配列を示しておく。

【0012】

また、限定されるわけではないが、上記非ヒト動物は自己免疫性肝炎の病理像を呈することや、マウスであることが望ましい。

【0013】

また、本発明の一形態にかかわる自己免疫疾患診断法のスクリーニング方法は、細胞または生体組織を用いて、野生型に比して増加または減少している自己抗原、自己抗体、細胞表面マーカー、血清中蛋白、酵素、無機物質の発現が増加または減少している遺伝子を測定すること、免疫担当細胞または血中免疫グロブリンと被検物質とを用いて前記免疫担当細胞における被検物質に対する応答や前記免疫グロブリンと被検物質の結合を測定すること、非ヒト動物における被検物質に対する応答を測定すること、免疫担当細胞と被検物質とを用いて免疫担当細胞における自己抗原に対する応答を測定すること、自己抗原に対する応答を測定することが望ましい。

30

【発明の効果】

【0014】

以上、本発明により、自己免疫疾患特に自己免疫性肝炎モデル非ヒト動物やそれらを用いた臓器障害の解析方法や治療薬のスクリーニング法等を提供することができる。

40

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

本発明の一実施形態に係る非ヒト動物は、BTLA遺伝子の一部もしくは全部が欠損し、野生型において発現されるBTLAを発現する機能が失われており、BTLAが認識するリガンドに対する応答性が特異的に障害されているモデル非ヒト動物であれば特に制限されるものではなく、BTLAが認識するリガンドとしては、これまで同定されているものとしてはHVE Mがあるが、便宜上、HVE Mの他、未同定のBTLA結合タンパクやこれらリガンドを担持するキャリアもBTLAが認識するリガンドに包含される(以下、「本件リガンド類」という)。

【0016】

50

自己免疫疾患発症とは、本件リガンド類による刺激に対する免疫担当細胞の反応性が低下しているか、あるいはほぼ失われていることにより過剰な免疫応答を惹起し血清学的異常や臓器障害を呈することを意味する。したがって、本発明において自己免疫疾患自然発症モデル非ヒト動物とは、本件リガンド類による刺激に対して、免疫担当細胞のBTLAを介した反応が低下しているか、あるいはほぼ失われているマウス、ラット、ウサギ等のヒト以外の動物をいう。また、自己免疫応答を誘導する刺激としては、生体内での自己抗原への自然暴露や、生体から分離された細胞に自己抗原ないし自己由来細胞を接触させるインビトロでの刺激等を挙げることができる。

【0017】

そして、本発明の一実施形態に係る非ヒト動物は、本件リガンド類に対して不応答性であり、種々の自己抗原に対しては過剰応答性である非ヒト動物を挙げることができ、具体的には、BTLA遺伝子の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物を挙げることができる。

10

【0018】

BTLA遺伝子の機能が欠損した動物は、BTLA欠損マウスの他、BTLA遺伝子の発現機能が欠損したラット等の齧歯目動物を例示することができる。これらBTLA遺伝子の発現機能が欠損した非ヒト動物は、メンデルの法則に従い出生してくるBTLA-/-非ヒト動物が、正確な比較実験をすることができる同腹の野生型と共に得ることができる点で好ましい。かかるBTLA遺伝子の発現機能が欠損した動物の作製方法を、BTLA欠損マウスを例にとって以下説明する。

【0019】

BTLA遺伝子は、マウス遺伝子ライブラリーをPCR法等により増幅し、得られた遺伝子断片をマウスBTLA遺伝子由来のプロープを用いてスクリーニングすることができる。スクリーニングされたBTLA遺伝子は、プラスミドベクター等を用いてサブクローニングし、制限酵素マッピング及びDNAシーケンシングにより特定することができる。次に、このBTLAをコードする遺伝子の全部又は一部をネオマイシン耐性遺伝子カセット等に置換し、3'末端側にジフテリアトキシンAフラグメント(DT-A)遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子等の遺伝子を導入することによって、ターゲットベクターを作製する。

20

【0020】

この作製されたターゲティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション(電気穿孔)法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418やガンシクロビル(GANC)等の抗生物質により相同的組換えを起こしたES細胞を選択する。また、この選択されたES細胞が目的とする組換え体かどうかをザンブロット法等により確認することが好ましい。その確認されたES細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型マウスと交雑させると、ヘテロ接合体マウス(F1マウス:+/-)を得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスを交雑させることによって、BTLA-/- (BTLA欠損)マウスを作製することができる。また、BTLA欠損マウスにおいて、BTLA遺伝子が発現していないことを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスからRNAを単離してノザンブロット法等で解析する、またはこのマウスにおけるBTLAの発現をウエスタンブロット法、抗BTLA抗体や可溶性HVE Mを利用したフロサイトメトリ法等により調べる方法がある。

30

40

【0021】

また、作出されたBTLA欠損マウスが本件リガンド類に対して不応答性であることは、例えば、HVE Mを強制発現させた抗原提示細胞と抗原をBTLA欠損マウスの抗原特異的CD4陽性T細胞にインビトロで接触せしめ、かかる細胞における増殖反応やIL-2などのサイトカインの産生量などを測定することにより確認することができる。

【0022】

作出されたBTLA欠損マウスはSPF環境のマウス飼育施設において長期に飼育すると

50

、次第に自己免疫状態を発症し、6ヶ月齢頃より高グロブリン血症、抗核抗体などの自己抗体の出現を認め、12ヶ月齢頃には唾液腺、肺、関節、肝臓などの複数の臓器における自己免疫性臓器障害を来す。この時点での肝病理像は肝細胞壊死とグリソン鞘領域の piecemeal necrosis を伴う慢性肝炎像を呈し、いわゆる自己免疫性肝炎に類似している。

【0023】

本発明の一実施形態に係る非ヒト動物やモデル動物由来の免疫細胞、血中タンパクは、BTLAの作用機序の解明や自己免疫を誘導する自己抗原のスクリーニングの他、自己免疫応答の抑制物質若しくは促進物質のスクリーニング等に用いることができる。自己免疫応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法としては、モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞と被検物質を用いて、前記免疫細胞における被検物質に対する応答を測定・評価するスクリーニング方法や、モデル非ヒト動物個体と被検物質を用いて、前記モデル非ヒト動物個体における被検物質に対する応答を測定・評価するスクリーニング方法であれば特に制限されるものではなく、かかるスクリーニング方法の実施の形態を以下に例を挙げて説明する。

10

【0024】

例えば、本発明の一実施形態に係るモデル非ヒト動物から得られる脾臓細胞又はリンパ球等の免疫細胞と、被検物質を共に培養し、該免疫細胞における細胞活性の程度を測定・評価するスクリーニング方法や、モデル非ヒト動物に被検物質をあらかじめ投与した後、該非ヒト動物から得られる免疫細胞を培養し、該免疫細胞における細胞活性の程度を測定・評価するスクリーニング方法を挙げることができる。

20

【0025】

上記脾臓細胞またはリンパ球等の免疫細胞における細胞活性の程度の測定・評価方法としては、IL-2、IFN、IL-4等のサイトカインの産生量を測定・評価する方法や細胞の増殖の程度や表面マーカーの変化を測定・評価する方法を、それぞれ例示することができる。また、免疫細胞における細胞活性の程度を測定・評価するに際し、対照としてモデル非ヒト動物の野生型非ヒト動物、特に同腹の野生型非ヒト動物の測定値と比較・評価することが個体差による誤差をなくすることができるので好ましい。

【0026】

本発明の一実施形態に係る自己免疫疾患自然発症に対する促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法により得られる促進物質又は抑制物質は、インビボにおけるBTLAシグナル伝達におけるメカニズムの解明に有用であり、特に抑制物質は自己免疫疾患の予防・治療剤として使用しうる可能性がある。自己免疫疾患の予防・治療効果が期待できる上記促進物質を医薬品として用いる場合は、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。またこれら医薬品を用いる予防若しくは治療方法においては、患者の性別・体重・症状に見合った適切な投与量を、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができる他、スプレ

30

40

【0027】

以下、発明の一実施例について、図面を参照して説明する。但し、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

(実施例)

【0028】

本発明者らは、BTLAの生理学的役割を解明するために、ジントアゲティングによりBTLA欠損マウスを作製した。マウスのBTLA遺伝子は、6個のエクソンからなる。本発明者らは、タゲティングベクターを構築し、エクソン3～エクソン6をネオマイシン耐性遺伝子カセットに置換した。正確なタゲティングを行なった2つのESクロン

50

を C 5 7 B L / 6 の胚盤胞中にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作製した。キメラマウスの仔と C 5 7 B L / 6 雌マウスとを交雑させ、サザンブロット分析により変異対立遺伝子の伝達をモニターした。ヘテロ接合体マウスを交配させて、B T L A 遺伝子の無発現変異を保有する子孫を作製した。B T L A 欠損マウスは、予想されたメンデル比で生まれ、発達上の異常は認められなかった。B T L A 遺伝子の欠損を確認するために、野生型脾臓細胞及び B T L A 欠損脾臓細胞から得た全 R N A に対し、ノ - ザンブロット分析を行なった。B T L A 欠損マウスにおいて、B T L A の転写物は認められなかった。

【 0 0 2 9 】

B T L A のアミノ酸配列と構造を図 1 に示す。図 1 (A) は、マウス B T L A とヒト B T L A のアミノ酸配列の比較であり、リ - ダ - 配列と膜貫通部分を実線で示している。図中 (-) は細胞外領域の N - グリコシレ - ション部位であり、図中 (・) は I g ドメイン形成に必須なシステイン残基である。図 1 (B) は、B T L A 遺伝子の構造を示す。黒四角部分はアミノ酸をコーディングする領域を、白四角部分は 5 ' 側及び 3 ' 側非翻訳領域を示している。四角上の口 - マ数字はエクソン番号を、四角下の算用数字は各エクソンにコードされるアミノ酸の番号を示す。図 1 (C) はマウス B T L A のドメイン構造である。リ - ダ - 配列はエクソン 1 に、I g ドメインはエクソン 2 に、膜貫通部位はエクソン 4 に存在している。マウス B T L A の c D N A は N 末端に一つの I g ドメインを有する約 3 8 k D a 、 3 0 6 アミノ酸のタンパクをコードしている。ヒト B T L A は 2 8 9 アミノ酸より成り、マウスの B T L A と約 6 0 % のホモロジ - を有している。B T L A はマウスではナイ - プ T 細胞でごく弱く発現し、活性化に伴い発現が上昇する。T h 2 細胞に分化すると発現は消失し、T h 1 細胞特異的となる。また、脾臓ナイ - プ B 細胞にも発現が認められる。一部のマウスでは N K 細胞、マクロファ - ジ、樹状細胞にも発現を認めるという報告もある。組織レベルでは B T L A は脾臓とリンパ節で強く発現が認められる。T 細胞ハイブリド - マに B T L A を遺伝子導入し、抗体で C D 3 と B T L A を同時架橋すると、B T L A はチロシンリン酸化される。また、チロシンリン酸化に伴い、B T L A に細胞質内フォスファターゼである S H P - 2 ・ S H P - 2 が結合する。上記の T 細胞ハイブリド - マを固相化した抗体で C D 3 と B T L A を同時に刺激すると、抗 C D 3 抗体単独刺激に比較し、I L - 2 産生が低下する。

【 0 0 3 0 】

図 2 は、B T L A ノックアウト (欠損) マウスの作成と遺伝子欠損の確認を示すものである。(A) は、上から順に B T L A 遺伝子、タ - ゲティングベクター、予測された破壊遺伝子の構造を示す。黒四角部分は、コードしたエクソンを示す。制限酵素については、B g は B g 1 I I を、X は X b a I を、B は B a m H I を、E は E c o R I を、S a l は S a l I を、X h は X h o I を、T K はチミジンキナーゼ遺伝子を、n e o はネオマイシン耐性遺伝子を示す。相同組み替えにより B T L A のエクソン 3 から 6 を欠失すると B g 1 I I による切断で野生型は 1 4 . 2 K b 、ノックアウトマウスでは 8 . 4 K b の D N A 断片を生じた。(B) は、ヘテロ接合体のインタ - クロスで生じた子孫のサザンブロット分析である。マウスの尾部からゲノム D N A を抽出し、B g 1 I I で切断し、(A) に示した放射能標識したプロ - プを用いて電気泳動にかけ、ハイブリダイゼ - ションを行なった。サザンブロットにより、野生型マウス (+ / +) には単一の 1 4 . 2 k b バンドが、ホモ接合体マウス (- / -) には 8 . 4 k b バンドが、ヘテロ接合体マウス (+ / -) にはその両方のバンドが得られた。(C) は、ヘテロ接合体のインタ - クロスで生じた子孫の脾臓細胞より全 R N A を抽出しノ - ザンブロット分析をおこなった図である。マウス B T L A の全長 c D N A をプロ - プとしてハイブリダイゼ - ションを行ったところ、野生型マウス (+ / +) には B T L A 遺伝子 m R N A が検出されたが、ヘテロ接合体マウス (+ / -) では B T L A 遺伝子 m R N A が減少し、ホモ接合体マウス (- / -) では B T L A 遺伝子 m R N A が検出されなかった。

【 0 0 3 1 】

B T L A 欠損マウスは正常に発生・成熟し、若い成体マウスは外見上特に異常は認められなかった。若い成体における血球系細胞の分化をフロ - サイトメトリ - にて調べたが、リ

10

20

30

40

50

ンパ球、顆粒球、マクロファージ、マスト細胞、NK細胞等の数や表面マーカー等に異常は認められなかった。しかしリンパ球増殖反応を検討したところ、BTLA欠損マウス由来のT細胞は抗CD3抗体による刺激に対して野生型T細胞と比較して過剰な増殖を示した。さらにBTLA欠損マウスをOVA特異的TCRトランスジェニックマウス(DO-Tgマウス)と交配し、このマウス由来の脾臓ナイーブT細胞よりTh1細胞を作成し、抗原刺激に対するリンパ球増殖反応を検討した。その結果やはりBTLA欠損Th1細胞は野生型Th1細胞と比較し、増殖が増強していることが明らかとなった。一方、BTLA欠損ナイーブT細胞はTh1分化条件(IL-12+抗IL-4抗体)あるいはTh2分化条件(IL-4+抗IL-12抗体)で抗原刺激するとそれぞれ正常にTh1、Th2細胞に分化することより、BTLAシグナル自体はTh1/Th2分化には関与しないと考えられる。

10

【0032】

BTLAのインビボにおける役割を調べるためにBTLA欠損マウスを抗原(NP-KLH)で免疫し、血中の特異抗体(抗NP抗体)価の上昇をELISA法で測定した。その結果免疫4週間における抗NP抗体価はIgG1/IgG2a/IgG2bのサブクラスでいずれも野生型の3倍程度上昇していた。さらにTh1依存性免疫応答として知られるExperimental autoimmune encephalomyelitis(EAE)について検討したところ、129系遺伝背景の野生型に比して、BTLAKOマウスでは発症率や発症時のclinical scoreが上昇し、また発症時期は早くかつ症状が遷延化する事が判明した。

20

【0033】

図3は、BTLA欠損マウスにおいて免疫系の機能解析を行い、自己免疫疾患の発症、高ガンマグロブリン血症、抗核抗体が出現したことを示す。(A)は、BTLA欠損マウスを長期飼育すると、6ヶ月齢頃より死亡し始め、野生型マウスに比べ早期に死亡したことを示す。長期飼育したBTLA欠損マウスは外見上明らかな異常を呈さず、また感染症や悪性新生物の所見も認められなかった。(B)は、BTLA欠損マウスにおける高ガンマグロブリン血症を示す。7ヶ月齢のマウスの血清中ガンマグロブリンをELISA法により測定した。BTLA欠損マウスでは野生型に比べIgG1、IgG2aのサブクラスで優位に上昇がみられ、高ガンマグロブリン血症を発症していた。(C)は、BTLA欠損マウスにおける抗核抗体の出現を示す。6~9ヶ月齢及び12ヶ月齢のマウスより採血し、血清中抗核抗体をELISA法により測定し、6ヶ月齢の正常マウスの血清を標準血清とし、相対的な抗核抗体価を測定した。BTLA欠損マウスでは野生型に比べ6~9ヶ月齢で有意な抗核抗体価の上昇を認め、12ヶ月齢ではさらに高い抗核抗体価を呈した。BTLA欠損マウスは、SPF環境のマウス飼育施設において長期に飼育すると、野生型マウスに比べ早期に死亡した。長期飼育したBTLA欠損マウスは外見上明らかな異常を呈さず、また感染症や悪性新生物の所見も認められず、死因については後述のように自己免疫疾患を発症しその全身の臓器障害により死亡に至ることが明らかとなった(図3A)。

30

【0034】

7ヶ月齢のBTLA欠損マウスにおいて血清中の免疫グロブリンをELISA法にて測定すると、野生型マウスと比較し、有意に高グロブリン血症を呈することが明らかとなった。この時の特にIgG1、IgG2aサブクラスのグロブリンが増加していた(図3B)。さらに血清中の自己抗体の有無について検討してみると、BTLA欠損マウスでは抗核抗体(図3C)、抗二本鎖DNA抗体、抗ミトコンドリア抗体等の自己抗体が有意に血中に増加していた。これらのことはBTLA欠損マウスが全身的な自己免疫状態を来していることを意味する。

40

【0035】

12ヶ月齢のBTLA欠損マウスのリンパ組織をフローサイトメトリ法にて解析すると、脾臓内のT細胞、B細胞、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞などの細胞数は野生型と比較して変化はなかった。しかしながら、BTLA欠損マウスの脾臓内CD4陽性T細胞の表面マーカーを解析すると、野生型の脾臓内CD4陽性T細胞と比較し、CD25、

50

CD69の上昇とCD62Lの低下という活性化を示す変化を認めた。このことはBTLA欠損マウスの生体内でCD4陽性T細胞が何らかの抗原（おそらく自己抗原）を認識し活性化したことを示している。

【0036】

12ヶ月齢のBTLA欠損マウスの諸臓器における変化を解析すると、唾液腺では野生型マウスでは正常所見であるのに対し、BTLA欠損マウスでは唾液腺の腺管周囲を中心とした著明なリンパ球浸潤を認めた。肺では野生型マウスでは正常所見であるのに対し、BTLA欠損マウスでは肺の気管支と血管の周囲にリンパ球細胞浸潤を認めた。これらの所見はヒトの全身性自己免疫疾患であるシェーグレン症候群の病理所見に類似している。また関節内にも軽度の炎症細胞浸潤を認めた。

10

【0037】

図4は、BTLA欠損マウスにおける肝機能異常の出現を示すものである。6、9、12ヶ月齢の野生型およびBTLA欠損マウスより血清を採取し、血清GOT、GPT、-GTP、ALP、T-Bilを経時的に測定した。12ヶ月齢のBTLA欠損マウスでは、6ヶ月齢頃から徐々に肝機能異常（血清GOT、GPTの上昇）が出現し、12ヶ月齢では野生型と比較し有意にGOT、GPTが高値となっていた。肝病理像を見ると、肝細胞領域の肝細胞壊死所見およびグリソン鞘領域の削り取り壊死（piecemeal necrosis）や門脈における内皮細胞炎（endothelialitis）の所見がみられ、自己免疫性肝炎に特徴的な所見が認められた。図5は、BTLA欠損マウスにおける臓器障害の状態を示す図である。（A）は、12ヶ月齢のBTLA欠損マウスおよび野生型マウスより臓器を採取し病理切片を作成しヘマトキシリン・エオジン染色を行ったときの図である。左2列は野生型、右2列はBTLA欠損マウスの病理像で、各々左側が弱拡大（100倍）像、右側が強拡大（400倍）像である。a、bは肺組織を示す。BTLA欠損マウスでは気管支周囲と血管周囲の肺実質にリンパ球を主体とする著明な炎症細胞浸潤を認める。c、dは唾液腺（顎下腺）を示す。BTLA欠損マウスでは唾液腺組織内にリンパ球を主体とする著明な炎症細胞浸潤を認める。e、fは肝臓を示す。中心静脈領域、肝細胞領域、グリソン鞘領域の何れも野生型マウスでは異常所見を認めないが、BTLA欠損マウスではグリソン鞘周囲にはリンパ球と思われる小円形細胞浸潤がみられ、削り取り壊死（piecemeal necrosis）像を呈しており、肝実質内にも孤立性の肝細胞壊死巣（spotty necrosis）を認める。門脈、胆管の内皮細胞障害所見（endothelialitis）も認められており、自己免疫反応の特徴を有している。g、hは腎臓を示す。野生型、BTLA欠損マウスのいずれにも明らかな異常所見を認めない。（B）は、BTLA欠損マウスにおける自己免疫性肝炎を示す。12ヶ月齢の野生型マウス（a、b）及びBTLA欠損マウス（c、d）より肝臓を採取し病理切片を作成しヘマトキシリン・エオジン染色（左）と鍍銀染色（右）を行った。いずれも強拡大（400倍）像を示す。白矢印は門脈（portal vein、PV）、黒三角は胆管（bile duct、BD）、白い点線と赤三角はともにグリソン鞘領域と肝細胞領域の境界を示す。BTLAノックアウトマウスではグリソン鞘領域から肝細胞領域にまたがるリンパ球と好中球を主体とする炎症細胞浸潤と肝細胞壊死の所見（piecemeal necrosis）の所見を認め、自己免疫性肝炎の病理像に一致する。

20

30

40

【0038】

以上のとおり、BTLA欠損マウスは、自然に全身性自己免疫性疾患を発症し特に他の副刺激分子の欠損マウスにはないユニークな病変として自己免疫性肝炎を発症した。これらの結果はBTLAが生体内において自己に対する異常な免疫反応を抑制しており、特に肝臓における免疫寛容の成立に重要な副刺激分子であることを示している。

【産業上の利用可能性】

【0039】

本発明非ヒト動物は、慢性肝炎をはじめとする全身の臓器での自己免疫性臓器障害を生ずるため、ヒトの膠原病や自己免疫性肝炎等の新たな検査法や診断法のスクリーニングに利

50

用できる。また、これまで詳細不明とされていた各臓器において炎症を誘導する自己抗原のスクリーニングが可能となる。さらに、自己免疫性臓器障害の抑制物質若しくは促進物質のスクリーニングが可能となり、膠原病や自己免疫性肝炎等のヒトの疾病に対する薬剤の開発に有用な情報を得ることができる。BTLAノックアウトマウスは若い個体は一見正常であり生殖機能も保たれているが、加齢に伴い多彩な自己免疫疾患を発症する。このことはヒトにおける膠原病や自己免疫性肝炎の発症に類似しており、膠原病・自己免疫性肝炎の自然発症モデルとしてより生理的な状態に近い動物モデルが提供できると言える。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】BTLAのアミノ酸配列と構造を示す図である。

10

【図2】BTLAノックアウトマウスの作成と遺伝子欠損の確認を示す図である。

【図3】BTLA欠損マウスにおける自己免疫疾患の発症、高ガンマグロブリン血症、抗核抗体の出現を示す図である。

【図4】BTLA欠損マウスにおける肝機能異常の出現を示す図である。

【図5】BTLA欠損マウスにおける臓器障害の状態を示す図である。

【 図 1 】

(A)

mouse BTLA 1 MKTVPAMLGTPRLFREFFIL•HLGLWSILCEKATKRNDDE
human BTLA MKTLPAMLGTGKLEFWVFFLIPYLDIWNID••••••••HGKES

40 CEVQLNIKRNSKHSAWTGELFKIECPVKYCVHRPNVTWCK
CDVQLYIKRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWCK

80 HNGTIWVPLEVGPQLYTSWEENRSVPVFLHFKPIHLSDN
LNGTTCVKLEDR•Q••TSWKEEKNISFFILHFEPVLPNDN

120 GSYS[•]CSTNFNSQVINSHSVTIHVRERTQ[•]NSSEHPLITVSD
GSYRCSANFQSNLIESHSTTLYVTDVKSAS••••••••••

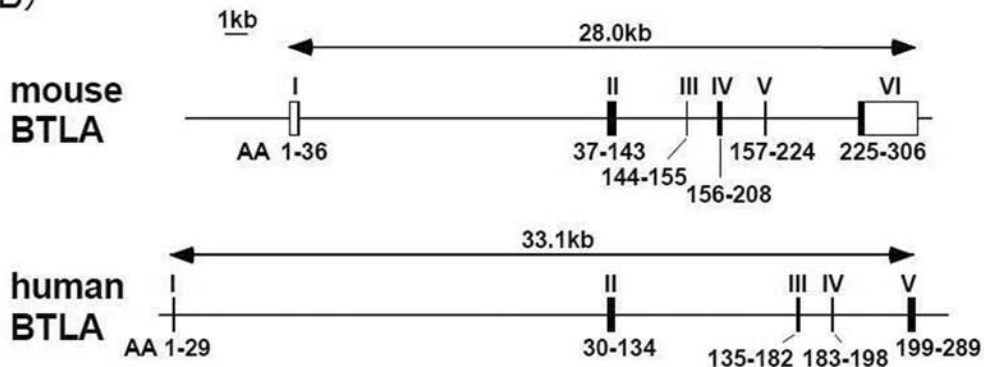
160 IPDAT[•]NASGPSTMEERPGRTWLLY[•]TLLPLGALLLLL•ACV
••••••••ERPSKDEMAS•RPWLLYSLLPLGGPLLLITTCF

199 CLLCFLKRIQGKEKKPSDLAGRDTNLVD••••••••IPASS
CLFCCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEAST

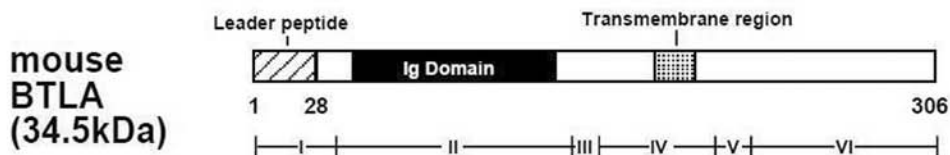
232 RTNHQALPSGTFGIYDNDPWSS••MQDESELTISLQSERNN
RQNSQVLLSEFGIYDNDPDLCFRMQEGSEVYSNPCLEENK

270 QGIVYASLNHCVIGRNPRQENMQEAPTEYASICVRS
PGIVYASLNHSVIGLNSRLARNVKEAPTEYASICVRS

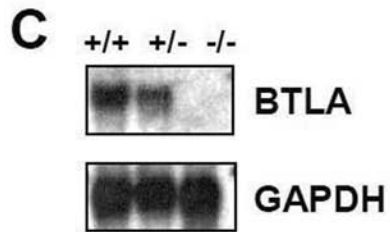
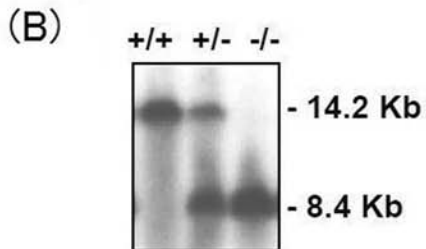
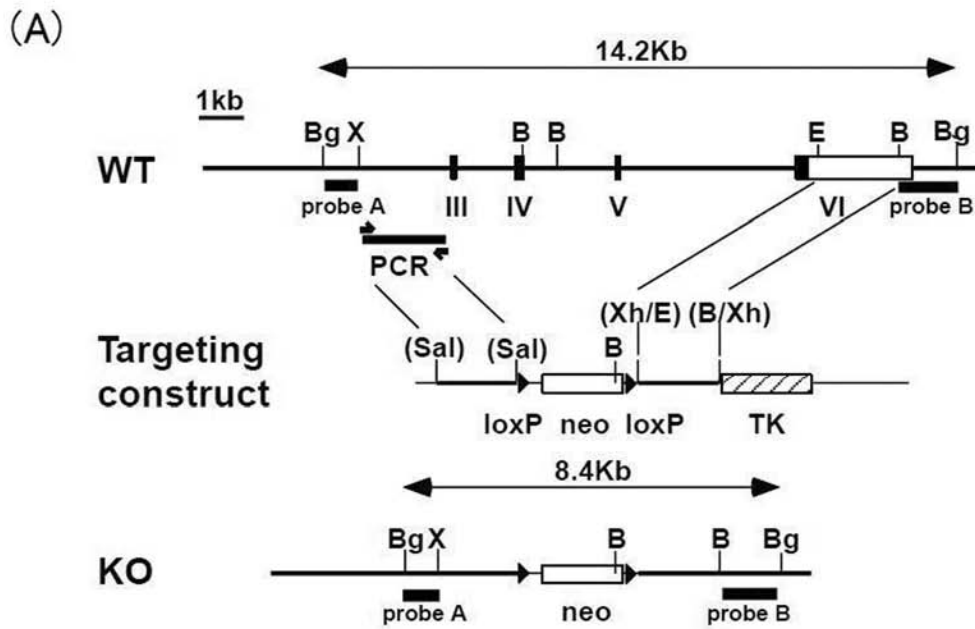
(B)



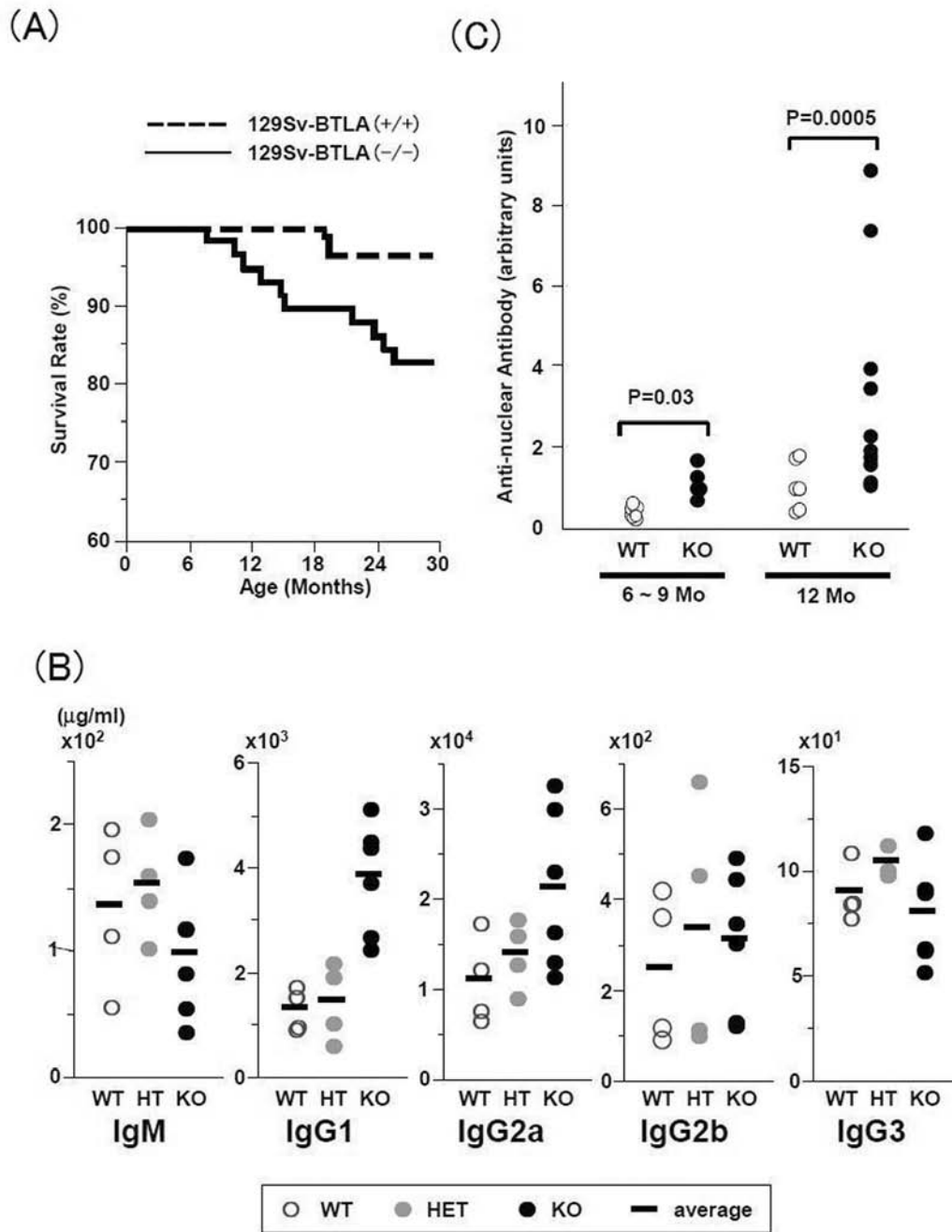
(C)



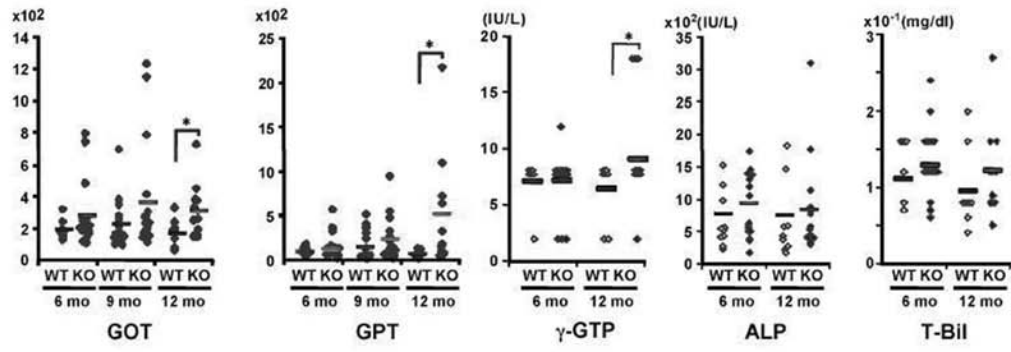
【 図 2 】



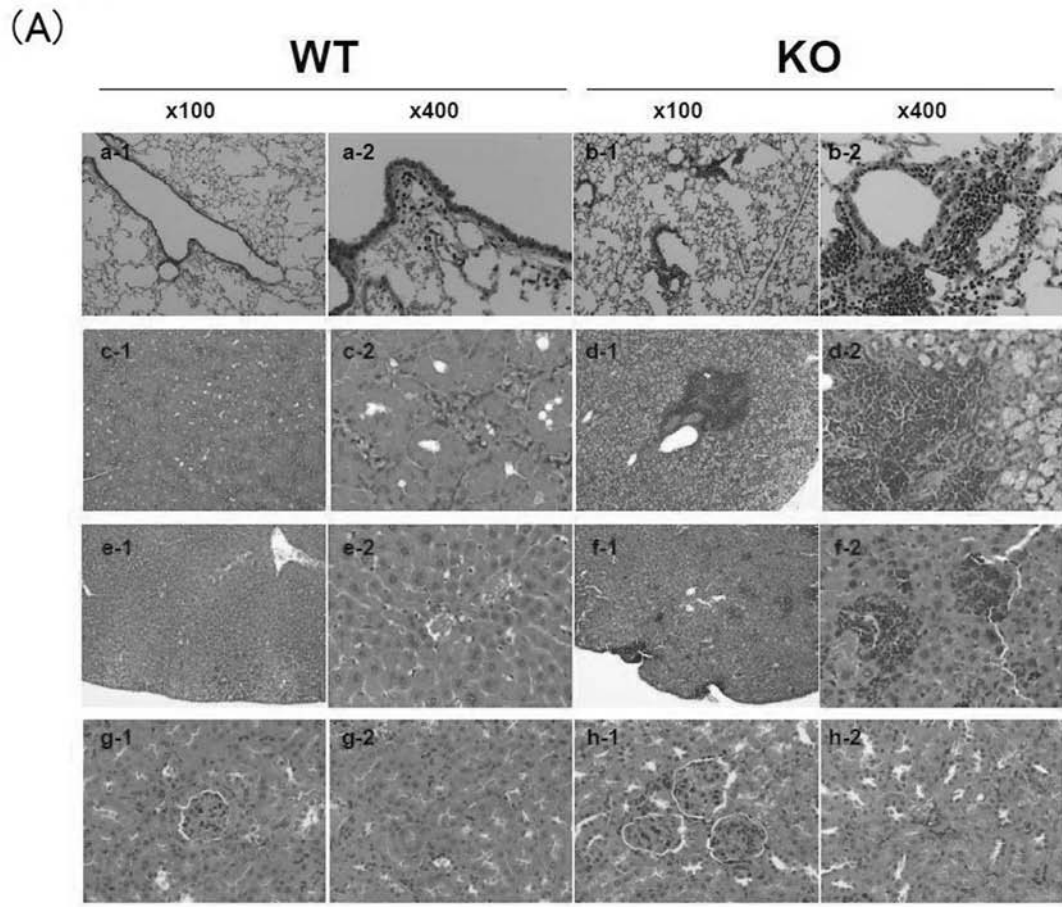
【 図 3 】



【 図 4 】

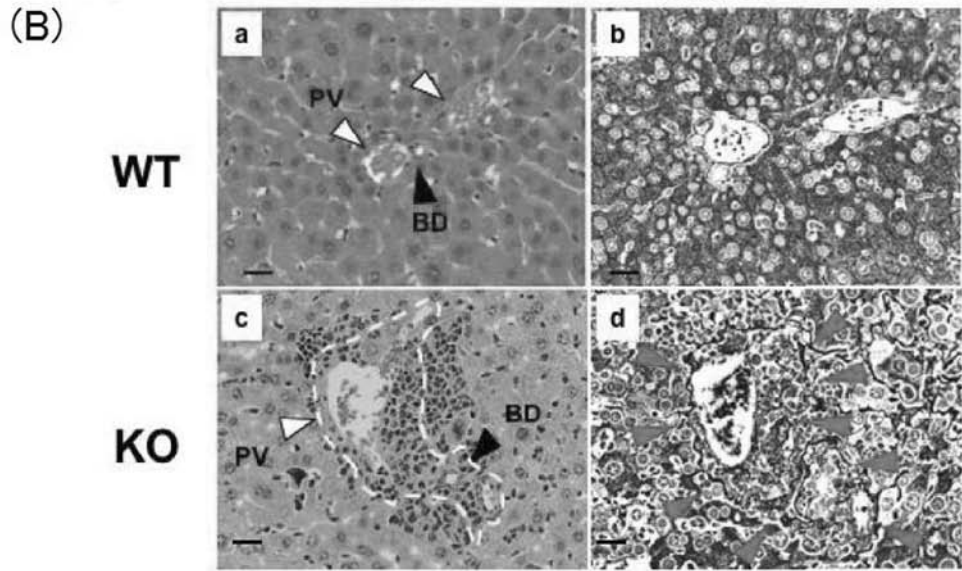


【 図 5 】



H&E

Silver stain



【 配列表 】

[2007144974000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2006/322715
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A01K67/027(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01K67/027, C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (STN), WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed, JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Norihiko WATANABE, "B7x-BTLA, Atarashii Yokuseisei costimulation System, Mol.Med., 2003, Vol.40, special extra issue, pages 81 to 90, full text	1-9
X	Norihiko WATANABE, "B and T lymphocyte attenuator (BTLA) o Kaishita Men'eki Yokusei", Clinical Immunology, 2005, Vol.43, No.3, pages 285 to 290, full text	1-4
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 January, 2007 (10.01.07)		Date of mailing of the international search report 16 January, 2007 (16.01.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2006/322715	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A01K67/027(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. A01K67/027, C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS (STN), WPIDS (STN), GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq, PubMed, JSTPlus (JDream2)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	渡辺紀彦, B7x-BTLA, 新しい抑制性 costimulation システム, Mol. Med., 2003, Vol. 40, 臨時増刊号, p. 81-90, 全文	1-9	
X	渡辺紀彦, B and T lymphocyte attenuator (BTLA) を介した免疫抑制, 臨床免疫, 2005, Vol. 43, No. 3, p. 285-290, 全文	1-4	
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー		の日の後に公表された文献	
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの		「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの		「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)		「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 10.01.2007		国際調査報告の発送日 16.01.2007	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 柴原 直司	4B 3534
		電話番号 03-3581-1101 内線	3448

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (2005年4月)

フロントページの続き

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

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	自身免疫非人类动物及其使用方法		
公开(公告)号	JPWO2007144974A1	公开(公告)日	2009-12-17
申请号	JP2008521089	申请日	2006-11-15
申请(专利权)人(译)	国立大学法人千叶		
[标]发明人	渡邊紀彦 大矢佳寛		
发明人	渡邊 紀彦 大矢 佳寛		
IPC分类号	A01K67/027 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	G01N33/5767 A01K67/0276 A01K2217/075 A01K2227/105 A01K2267/0325 C07K14/70503 C12N15/8509 G01N2800/24		
FI分类号	A01K67/027.ZNA C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/53.N C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/AA20 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/DA02 4B024/FA10 4B024/FA20 4B024/GA18 4B024/GA25 4B024/HA20 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ21 4B063/QQ41 4B063/QQ61 4B063/QQ89 4B063/QQ91 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QR80		
优先权	2006162896 2006-06-12 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

删除了部分或全部染色体上BTLA基因的小鼠，丧失了野生型表达BTLA的表达功能，并且对BTLA识别的配体的反应性特别受损。它被用作自身免疫性疾病，尤其是自身免疫性肝炎疾病的模型。该自身免疫性疾病/自发性自身免疫性肝炎小鼠用于自身免疫性疾病的诊断方法，病原性自身抗原的筛选，促进或抑制自身免疫应答的物质。

