

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2005/110433

発行日 平成20年3月21日(2008.3.21)

(43) 国際公開日 平成17年11月24日(2005.11.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027 Z N A	2 G O 4 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	4 B O 6 3
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	4 B O 6 5
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 43 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2006-513597 (P2006-513597)	(71) 出願人	504190559 五十嵐 和彦 宮城県仙台市青葉区国見ヶ丘1-34-1 2
(21) 国際出願番号	PCT/JP2005/008928		
(22) 国際出願日	平成17年5月17日(2005.5.17)		
(31) 優先権主張番号	特願2004-146863 (P2004-146863)	(71) 出願人	504190571 武藤 哲彦 宮城県仙台市青葉区三条町14-2-46
(32) 優先日	平成16年5月17日(2004.5.17)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(71) 出願人	504190043 山本 雅之 茨城県つくば市竹園3丁目35-10
		(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
		(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 B a c h 2 の発現が人為的に抑制されている非ヒト動物とその利用

(57) 【要約】

bach2遺伝子ノックアウトマウスを作製し、解析した。その結果、bach2遺伝子ノックアウトマウスは、炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群を発症し、また、bach2遺伝子の人為的な発現抑制を行っていないコントロールと比較して、血清中のIgM量が増加することが判明した。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

bach2遺伝子の発現が人為的に抑制されていることを特徴とする非ヒト動物。

【請求項 2】

bach2遺伝子の遺伝子対の一方または双方に外来遺伝子が挿入されていることを特徴とする非ヒト動物。

【請求項 3】

IgM量が増加する、請求項 1 または 2 に記載の非ヒト動物。

【請求項 4】

IgMの製造に用いるための、請求項 3 に記載の非ヒト動物。

10

【請求項 5】

ハイパー IgM症候群を発症する、請求項 1 または 2 に記載の非ヒト動物。

【請求項 6】

ハイパー IgM症候群モデル動物として用いるための、請求項 5 に記載の非ヒト動物。

【請求項 7】

炎症性腸疾患を発症する、請求項 1 または 2 に記載の非ヒト動物。

【請求項 8】

炎症性腸疾患モデル動物として用いるための、請求項 7 に記載の非ヒト動物。

【請求項 9】

bach2遺伝子の発現が人為的に抑制されていることを特徴とする、多分化能を有する非ヒト動物細胞。

20

【請求項 10】

bach2遺伝子の遺伝子対の一方または双方に外来遺伝子が挿入されていることを特徴とする、多分化能を有する非ヒト動物細胞。

【請求項 11】

請求項 1 または 2 に記載の非ヒト動物に由来する細胞。

【請求項 12】

以下の (a) ~ (c) の工程を含む、IgMの製造方法。

(a) 請求項 1 または 2 に記載の非ヒト動物を作製する工程

(b) 作製された非ヒト動物に抗原を免疫する工程

30

(c) 免疫動物から該抗原を認識する IgMを回収する工程

【請求項 13】

以下の (a) ~ (c) の工程を含む、IgMを含む抗血清の製造方法。

(a) 請求項 1 または 2 に記載の非ヒト動物を作製する工程

(b) 作製された非ヒト動物に抗原を免疫する工程

(c) 免疫動物から抗血清を回収する工程

【請求項 14】

以下の (a) ~ (d) のいずれかに記載の DNAを有効成分として含有する、炎症性腸疾患またはハイパー IgM症候群の治療または予防のための薬剤。

(a) Bach2をコードする DNA

40

(b) Bach2Δ C2をコードする DNA

(c) Bach2結合因子MAZRをコードする DNA

(d) MafF、MafG、またはMafKタンパク質をコードする DNA

【請求項 15】

Bach2の発現を抑制するための DNAを有効成分として含有する、IgMを増加させるための薬剤。

【請求項 16】

以下の (a) ~ (c) の工程を含む、Bach2の機能を代替する化合物のスクリーニング方法。

(a) 被検化合物を請求項 1 もしくは 2 に記載の非ヒト動物、または請求項 9 ~ 11 のい

50

ずれかに記載の細胞に投与する工程

- (b) 該非ヒト動物または該細胞の表現型を解析する工程
- (c) 被検化合物を投与していない場合と比較して、該非ヒト動物または該細胞の表現型を相補する化合物を選択する工程

【請求項 17】

以下の (a) ~ (c) の工程を含む、Bach2制御剤のスクリーニング方法。

- (a) 被検化合物をBach2に接触させる工程
- (b) 該Bach2と被検化合物との結合を検出する工程
- (c) 該Bach2と結合する被検化合物を選択する工程

【請求項 18】

10

以下の (a) ~ (c) の工程を含む、Bach2制御剤のスクリーニング方法。

- (a) 被検化合物をBach2に接触させる工程
- (b) 該Bach2の活性を測定する工程
- (c) 被検化合物を投与していない場合と比較して、該Bach2の活性を上昇または減少させる化合物を選択する工程

【請求項 19】

以下の (a) ~ (d) の工程を含む、Bach2制御剤のスクリーニング方法。

- (a) bach2遺伝子のプロモーター領域の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合したDNAを有する細胞または細胞抽出液を提供する工程
- (b) 該細胞または該細胞抽出液に被検化合物を接触させる工程
- (c) 該細胞または該細胞抽出液における該レポーター遺伝子の発現レベルを測定する工程
- (d) 被検化合物を投与していない場合と比較して、該レポーター遺伝子の発現レベルを上昇または減少させる化合物を選択する工程

20

【請求項 20】

以下の (a) ~ (d) の工程を含む、Bach2制御剤のスクリーニング方法。

- (a) Bach2転写制御領域の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合したDNAを有する細胞または細胞抽出液を提供する工程
- (b) Bach2存在下において、該細胞または該細胞抽出液に被検化合物を接触させる工程
- (c) 該細胞または該細胞抽出液における該レポーター遺伝子の発現レベルを測定する工程
- (d) 被検化合物を投与していない場合と比較して、該レポーター遺伝子の発現レベルを上昇または減少させる化合物を選択する工程

30

【請求項 21】

bach2遺伝子の発現量を測定する工程を含む、炎症性腸疾患またはハイパーIgM症候群の検査方法。

【請求項 22】

bach2遺伝子領域における変異を検出する工程を含む、炎症性腸疾患またはハイパーIgM症候群の検査方法。

【請求項 23】

40

bach2遺伝子領域にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む、炎症性腸疾患またはハイパーIgM症候群の検査薬。

【請求項 24】

Bach2に結合する抗体を含む、炎症性腸疾患またはハイパーIgM症候群の検査薬。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、Bach2の発現が人為的に抑制されている非ヒト動物とその利用法に関する。また、本発明は、炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群の治療または予防のための薬剤、IgMを増加させるための薬剤、これら薬剤のスクリーニング方法、並びに炎症性腸疾患

50

およびハイパーIgM症候群の検査方法および検査薬に関する。

【背景技術】

【0002】

活性化B細胞はプラズマ細胞に分化して、免疫グロブリンM (IgM) を分泌するか、またはクラススイッチ組み換え (CSR) を受けて、他のクラスの免疫グロブリンを分泌する (非特許文献1~4参照)。CSRによる抗体機能の多様化は、液性免疫にとって重要である。しかし、分岐の決定がどのようになされるかはなお不明である。

【0003】

in vivoで抗原に曝露した後、B細胞反応は、抗体の親和性を増加させるための可変 (V) 領域エクソンの体細胞超突然変異 (SHM)、および独自のエフェクター機能を行う同じ抗原特異性を有する抗体を産生するための免疫グロブリン重鎖 (IgH) 遺伝子の定常 (C) 領域エクソンのCSRを伴う可能性がある。活性化誘導シチジンデアミナーゼ (AID) は、SHMとCSRの双方にとって必要であり、これらの二つのプロセス間のメカニズムが連鎖していることを示唆する。SHMとCSRはDNAの情報を変化させ、このようにおそらく変異誘発性であるため、それらの展開は厳密に調節されなければならない。さらに、CSRが非IgMプラズマ細胞となる細胞に限って起こることから、CSRは、IgMと非IgMプラズマ細胞とを区別する場合の中心となる。しかし、B細胞において転写因子がCSRとSHMとをどのように調整するかに関してはほとんどわかっていない。

【0004】

尚、本出願の発明に関連する先行技術文献情報を以下に示す。

【非特許文献1】 Snapper, C., Marcu, K. & Zelazowski, P. The immunoglobulin class switch: beyond "accessibility". *Immunity* 6, 217-223 (1997).

【非特許文献2】 Kinoshita, K. & Honjo, T. Linking class-switch recombination with somatic hypermutation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 493-503 (2001).

【非特許文献3】 Manis, J., Tian, M. & Alt, F. Mechanism and control of class-switch recombination. *Trends. Immunol.* 23, 31-39 (2002).

【非特許文献4】 Honjo, T., Kinoshita, K. & Muramatsu, M. Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 165-196 (2002).

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、Bach2の生体内での機能を解明し、抗体産生における役割、さらに疾患との関連性を明らかにすることを課題とする。より具体的には、本発明は、bach2遺伝子の発現が人為的に抑制されている非ヒト動物とその利用法、炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群の治療または予防のための薬剤、IgMを増加させるための薬剤、これら薬剤のスクリーニング方法、並びに炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群の検査方法および検査薬に関する。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を行った。まず、Bach2の生体内での機能を解明するために、bach2遺伝子ノックアウトマウスを作製し、解析した。その結果、bach2遺伝子ノックアウトマウスは、炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群を発症し、また、bach2遺伝子の人為的な発現抑制を行っていないコントロールと比較して、血清中のIgM量が増加することが判明した。また、Bach2欠損B細胞は、CSRおよびSHMにとって必須の酵素であるAIDを発現することができなかった。Bach2は、IgM分泌プラズマ細胞の細胞質に蓄積したが、IgG分泌細胞では核に存在した。B細胞においてBach2が過剰発現されると、in vitroでIgMプラズマ細胞の形成が阻害された。これらの知見により、Bach2が抗体反応の重要な調節物質であることが明らかにされ、IgMプラズマ細胞と非IgMプラズマ細胞とを区別するためのメカニズムが提供された。

【0007】

すなわち本発明は、上記非ヒト動物とその利用法、炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群の治療または予防のための薬剤、IgMを増加させるための薬剤、これら薬剤のスクリーニング方法、並びに炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群の検査方法および検査薬に関し、以下の〔1〕～〔24〕を提供するものである。

- 〔1〕 **bach2**遺伝子の発現が人為的に抑制されていることを特徴とする非ヒト動物。
- 〔2〕 **bach2**遺伝子の遺伝子対の一方または双方に外来遺伝子が挿入されていることを特徴とする非ヒト動物。
- 〔3〕 IgM量が増加する、〔1〕または〔2〕に記載の非ヒト動物。
- 〔4〕 IgMの製造に用いるための、〔3〕に記載の非ヒト動物。 10
- 〔5〕 ハイパーIgM症候群を発症する、〔1〕または〔2〕に記載の非ヒト動物。
- 〔6〕 ハイパーIgM症候群モデル動物として用いるための、〔5〕に記載の非ヒト動物

- 〔7〕 炎症性腸疾患を発症する、〔1〕または〔2〕に記載の非ヒト動物。
- 〔8〕 炎症性腸疾患モデル動物として用いるための、〔7〕に記載の非ヒト動物。
- 〔9〕 **bach2**遺伝子の発現が人為的に抑制されていることを特徴とする、多分化能を有する非ヒト動物細胞。

〔10〕 **bach2**遺伝子の遺伝子対の一方または双方に外来遺伝子が挿入されていることを特徴とする、多分化能を有する非ヒト動物細胞。

- 〔11〕 〔1〕または〔2〕に記載の非ヒト動物に由来する細胞。 20

〔12〕 以下の(a)～(c)の工程を含む、IgMの製造方法。

- (a) 〔1〕または〔2〕に記載の非ヒト動物を作製する工程
- (b) 作製された非ヒト動物に抗原を免疫する工程
- (c) 免疫動物から該抗原を認識するIgMを回収する工程

〔13〕 以下の(a)～(c)の工程を含む、IgMを含む抗血清の製造方法。

- (a) 〔1〕または〔2〕に記載の非ヒト動物を作製する工程
- (b) 作製された非ヒト動物に抗原を免疫する工程
- (c) 免疫動物から抗血清を回収する工程

〔14〕 以下の(a)～(d)のいずれかに記載のDNAを有効成分として含有する、炎症性腸疾患またはハイパーIgM症候群の治療または予防のための薬剤。 30

- (a) **Bach2**をコードするDNA
- (b) **Bach2 Δ C2**をコードするDNA
- (c) **Bach2**結合因子**MAZR**をコードするDNA
- (d) **MafF**、**MafG**、または**MafK**タンパク質をコードするDNA

〔15〕 **Bach2**の発現を抑制するためのDNAを有効成分として含有する、IgMを増加させるための薬剤。

〔16〕 以下の(a)～(c)の工程を含む、**Bach2**の機能を代替する化合物のスクリーニング方法。

- (a) 被検化合物を〔1〕もしくは〔2〕に記載の非ヒト動物、または〔9〕～〔11〕のいずれかに記載の細胞に投与する工程 40

(b) 該非ヒト動物または該細胞の表現型を解析する工程

(c) 被検化合物を投与していない場合と比較して、該非ヒト動物または該細胞の表現型を相補する化合物を選択する工程

〔17〕 以下の(a)～(c)の工程を含む、**Bach2**制御剤のスクリーニング方法。

- (a) 被検化合物を**Bach2**に接触させる工程
- (b) 該**Bach2**と被検化合物との結合を検出する工程
- (c) 該**Bach2**と結合する被検化合物を選択する工程

〔18〕 以下の(a)～(c)の工程を含む、**Bach2**制御剤のスクリーニング方法。

- (a) 被検化合物を**Bach2**に接触させる工程
- (b) 該**Bach2**の活性を測定する工程 50

(c) 被検化合物を投与していない場合と比較して、該Bach2の活性を上昇または減少させる化合物を選択する工程

[19] 以下の(a)～(d)の工程を含む、Bach2制御剤のスクリーニング方法。

(a) bach2遺伝子のプロモーター領域の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合したDNAを有する細胞または細胞抽出液を提供する工程

(b) 該細胞または該細胞抽出液に被検化合物を接触させる工程

(c) 該細胞または該細胞抽出液における該レポーター遺伝子の発現レベルを測定する工程

(d) 被検化合物を投与していない場合と比較して、該レポーター遺伝子の発現レベルを上昇または減少させる化合物を選択する工程

10

[20] 以下の(a)～(d)の工程を含む、Bach2制御剤のスクリーニング方法。

(a) Bach2転写制御領域の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合したDNAを有する細胞または細胞抽出液を提供する工程

(b) Bach2存在下において、該細胞または該細胞抽出液に被検化合物を接触させる工程

(c) 該細胞または該細胞抽出液における該レポーター遺伝子の発現レベルを測定する工程

(d) 被検化合物を投与していない場合と比較して、該レポーター遺伝子の発現レベルを上昇または減少させる化合物を選択する工程

[21] bach2遺伝子の発現量を測定する工程を含む、炎症性腸疾患またはハイパーIgM症候群の検査方法。

20

[22] bach2遺伝子領域における変異を検出する工程を含む、炎症性腸疾患またはハイパーIgM症候群の検査方法。

[23] bach2遺伝子領域にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む、炎症性腸疾患またはハイパーIgM症候群の検査薬。

[24] Bach2に結合する抗体を含む、炎症性腸疾患またはハイパーIgM症候群の検査薬。

。【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1a】 bach2の第一のコードエクソンの代わりにネオマイシン抵抗性遺伝子およびlacZ遺伝子カセットを含むベクターを用いる相同的組み換えによって、bach2遺伝子を破壊したことを示す図である。

30

【図1b】 対照およびターゲティング胚幹(ES)細胞クローンから調製したDNAのサザンブロット分析を示す写真である。SacIで処理したゲノムDNAを、cに示す5'プローブとハイブリダイズした。

【図1c】 抗Bach2抗血清によるそれぞれの遺伝子型の骨髄B細胞抽出物のウェスタンブロット分析を示す写真である。

【図2a】 マウス脾臓の切片をBach2(中央のカラム)およびMadCAM-1、IgM、またはCD3(右のカラム)に関して二重染色した写真である。融合させたカラム(左のカラム)は、Bach2(緑色)およびMadCAM-1、IgM、またはCD3(赤色)を示す。

【図2b】 野生型およびホモ接合変異体同腹子からの骨髄および脾細胞の代表的なFACS分析を示す図である。

40

【図2c】 bach2⁺/+ (白い棒) およびbach2⁻/- (斜線の棒) マウス11例からの骨髄におけるB細胞集団の発生率を示す図である。

【図2d】 bach2⁺/+ (白い棒) およびbach2⁻/- (斜線の棒) マウス11例からの脾臓におけるB細胞集団の発生率を示す図である。

【図2e】 B220⁺脾細胞における辺縁帯B(MZB)および濾胞B(FOB)細胞の相対的発生率を示す図である。

【図2f】 野生型(左)またはbach2⁻/- (右) マウスからの脾臓切片をIgM(緑色)およびMadCAM-1(赤色)によって染色した写真である。下のパネルは、白黒のIgM染色を示す。尺度の一目盛りは100 μmを示した。

50

【図3 a】野生型（白丸）および**bach2**^{-/-}（黒三角）マウス（5～10週齢）からの血清中の免疫グロブリンレベルを示す図である。水平方向のバーは、平均濃度を示す。

【図3 b】**Bach2**^{+/+}（白丸）または**bach2**^{-/-}（黒三角）マウスをDNP-フィコールによって免疫し、0、7、および14日目での抗-DNP IgMおよびIgG3血清レベルを示した図である。血清レベルは、任意の単位で示す（OD_{410 nm}での吸光度）。

【図3 c】**bach2**^{+/+}（白丸）または**bach2**^{-/-}（黒三角）マウスをNP結合ニワトリγ-グロブリン（NP-CGG）によって0および21日目に免疫し、免疫後0、7、14、および28日目での抗-NP IgMおよびIgG1血清レベルを示す図である。

【図3 d】NP-CGG免疫**bach2**^{+/+}（上のパネル）および**bach2**^{-/-}（下のパネル）マウスのMLNからのμアイソタイプのVh186.2転写物における変異発生率を示す図である。特定の位置での置換（黒い棒）またはサイレント変異（白い棒）を残基番号1～94に沿ってプロットした。

【図4 a】野生型（白丸）および**bach2**^{-/-}（黒三角）マウスからのRBC-枯渇脾細胞をLPSおよび表示のサイトカインと共に7日間培養して、分泌された免疫グロブリンレベルを測定した結果を示す図である。

【図4 b】LPSおよび表示のサイトカインによって2日間刺激した脾細胞における各アイソタイプのI_μおよびC_H エキソンを含むGLTの発現量を示す写真である。

【図4 c】LPSおよび表示のサイトカインによって5日間刺激した脾細胞においてI_μおよびC_H エキシソンのそれぞれを含むPSTの発現量を示す写真である。

【図4 d】野生型（白いカラム）および**bach2**^{-/-}（斜線のカラム）のマウスからの精製脾臓B細胞をLPSと共に培養して、BrdU取り込みを測定した結果を示す図である。独立した3回の実験の平均値を示す。括弧内の数値は、LPSの濃度（μg/ml）を示す。

【図4 e】B細胞成熟関連遺伝子の発現量を、0、2、または5日間LPSによって刺激した脾細胞を用いて決定した結果を示す写真である。

【図5 a】LPS刺激野生型脾細胞をBach2、細胞質IgM（上のパネル）、またはIgG（下のパネル）、およびB220に関して染色した写真である。融合した像は、Bach2（緑）、IgM（赤）、IgG（赤）、およびB220（青）を示す。

【図5 b】IgM陽性（細胞174個）、またはIgG陽性（細胞133個）細胞におけるBach2の染色を示す図である。Bach2の染色は、細胞質（核を明確に除く主に細胞質）、散在（diffuse）（双方の区画にほぼ均等に分布）（核+細胞質）、および核として分類した。独立した実験において類似の結果が得られた。

【図5 c】精製野生型脾臓B細胞を、対照（白）、Bach2（斜線）、およびBach2ΔC2（黒）ウイルスに感染させ、EGFPおよびIgM染色に関してFACSによって分析した結果を示す図である。二つの独立した実験からの平均値を示す。

【図6】野生型およびBach2ノックアウトマウスの大腸組織像（ヘマトキシリン・エオジン染色）を示す写真である。Bach2ノックアウトマウスでは、陰か炎、および陰か膿瘍が認められる。

【図7 a b】Bach-2 KOマウスにおける、抗マウスIgG抗体(a)および抗マウスIgM抗体(b)の血清抗体価を示すグラフである。プレ（◆）は免疫前血清抗体価を示し、3-7は3-7回の免疫回数時の血清抗体価を示す。

【図7 c d】Balb/cマウスにおける、抗マウスIgG抗体(c)および抗マウスIgM抗体(d)の血清抗体価を示すグラフである。プレ（◆）は免疫前血清抗体価を示し、2-4は2-4回の免疫回数時の血清抗体価を示す。

【図8】Bach-2 KOマウス(a)およびBalb/cマウス(b)において、吸光度0.5以上の陽性wellのうちIgMの割合を示すグラフである。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明者らは、Bach2の生体内での機能を解明するために、**bach2**遺伝子ノックアウトマウスを作出した。その結果、Bach2の発現減少と炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群の発症、またはIgM量の増加が関連することが明らかとなった。本発明は、この知見に基づ

10

20

30

40

50

くものである。

【0010】

本発明は、bach2遺伝子の発現が人為的に抑制されていることを特徴とする非ヒト動物を提供する。本発明のbach2 (BTB and CNC homology 2)遺伝子 (該遺伝子によってコードされるタンパク質を「Bach2」と記載)は、マウス・ヒトにおいて知られている。各々の配列におけるbach2配列およびBach2配列のアクセッション番号を以下に示す。

- ・AL121787 (ヒトのbach2遺伝子配列 (配列番号: 2) およびBach2配列 (配列番号: 3))
- ・AJ271878 (ヒトのbach2 cDNA配列 (配列番号: 4) およびBach2配列 (配列番号: 3))
- ・NM_007521 (マウスのbach2 cDNA配列 (配列番号: 5) およびBach2配列 (配列番号: 6))

10
Mol. Cell. Biol. 24 (8), 3473–3484 (2004)、Mol. Cell. Biol. 23 (4), 1163–1174 (2003)、J. Biochem. 132 (3), 427–431 (2002)、J. Biol. Chem. 277 (23), 20724–20733 (2002)、Mol. Cell. Biol. 16 (11), 6083–6095 (1996)

【0011】

また、本発明のBach2は上記の例に限定されず、上記Bach2と機能的に同等なタンパク質も含む。機能的に同等なタンパク質には、上記のBach2のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および/または挿入されたアミノ酸配列からなるタンパク質が含まれる。本発明のBach2と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを調製するために、当業者によく知られた他の方法としては、ストリンジェントな条件下でのハイブリダイゼーション技術 (Southern EM: J Mol Biol 98: 503, 1975) やポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 技術 (Saiki RK, et al: Science 230: 1350, 1985、Saiki RK, et al: Science 239: 487, 1988) を利用する方法が挙げられる。

20

【0012】

本発明においてストリンジェントなハイブリダイゼーション条件とは、6M 尿素、0.4% SDS、0.5×SSCの条件またはこれと同等のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を指す。よりストリンジェンシーの高い条件、例えば、6M 尿素、0.4% SDS、0.1×SSCの条件下では、より相同性の高いDNAを単離できると期待される。高い相同性とは、アミノ酸配列全体で少なくとも50%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列の同一性を指す。また、変異体における、変異するアミノ酸数は、通常、30アミノ酸以内であり、好ましくは15アミノ酸以内であり、より好ましくは5アミノ酸以内、さらに好ましくは3アミノ酸以内であり、よりさらに好ましくは2ア

30

【0013】

アミノ酸配列や塩基配列の同一性は、カーリンおよびアルチュールによるアルゴリズム BLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264–2268, 1990、Proc Natl Acad Sci USA 90: 5873, 1993) を用いて判定することができる。

【0014】

本発明において、「bach2遺伝子の発現が抑制されている」とは、人為的な発現抑制を行っていないコントロールと比較して、正常なbach2遺伝子の発現が抑制されている状態 (完全に抑制されている状態も含む) を意味する。例えば、正常なbach2遺伝子の代わりに、Bach2タンパク質としての機能が減少または喪失している変異型タンパク質をコードする変異型bach2遺伝子が発現している状態も、本発明の「bach2遺伝子の発現が抑制されている」に含まれる。

40

【0015】

遺伝子発現の抑制は、当業者において一般的に公知の方法によって行うことができる。例えば、遺伝子改変技術 (標的遺伝子部位の組み換えを促進する酵素、例えば、Cre-loxにおけるCre、の導入による条件的遺伝子改変技術も含む) を用いた方法、アンチセンスDNAを用いた方法、または、RNAi技術を用いた方法等が挙げられる。よって、本発明における「bach2遺伝子の発現が人為的に抑制されている非ヒト動物」には、上記方法で作製された非ヒト動物が含まれる。

【0016】

遺伝子改変技術によって作製された非ヒト動物としては、*bach2*遺伝子の遺伝子対の双方に、ヌクレオチドの挿入、欠失、置換等の遺伝子変異を有する遺伝子改変非ヒト動物が挙げられる。上記*bach2*遺伝子の遺伝子対の双方に外来遺伝子が挿入されている遺伝子改変非ヒト動物は、*bach2*遺伝子の遺伝子対の一方に外来遺伝子が挿入されている遺伝子改変非ヒト動物同士を掛け合わせることで作製できる。本発明は、このようなヘテロサイゴートもまた提供するものである。本発明の遺伝子改変非ヒト動物において、遺伝子変異の存在する部位は、該遺伝子の発現が抑制されるような部位であれば特に制限されず、例えばエクソン部位、プロモーター部位等を挙げることができる。

【0017】

本発明における非ヒト動物が由来する生物種は、通常、ヒト以外の脊椎動物であり、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウス、ラット、ブタ等である。

【0018】

本発明の非ヒト動物は、炎症性腸疾患を発症するので、炎症性腸疾患モデル動物として利用できる。また、本発明の非ヒト動物は少なくとも、血清中のIgMレベルの増加、およびIgGとIgAレベルの低下という形質を示すので、ハイパーIgM症候群モデル動物として利用できる。ここで、ハイパーIgM症候群(高IgM免疫不全症とも言う)とは、IgMレベルは正常ないし増加しているが、IgGとIgAレベルは低下している免疫グロブリン欠乏症であり、IgMレベルの正常ないし増加、IgGとIgAレベルの低下、間欠性好中球減少、正常なB細胞レベル、感染に対する感受性の増加等の種々の形質を示す疾患である(免疫学辞典第2版 東京化学同人 2001 p215、メルクマニユアル 第17版 第4刷 2002年 p1034)。従って本発明の非ヒト動物は、炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群の治療薬の評価に使用できる。該非ヒト動物は、*bach2*遺伝子の人為的な発現抑制を行っていないコントロールと比較して、血清中のIgM量が増加する。よって、該非ヒト動物はまた、抗体(好ましくはIgM)の製造用に利用できる。すなわち、本発明は、本発明の非ヒト動物の炎症性腸疾患モデル用途、ハイパーIgM症候群モデル用途もしくは抗体製造用途、または該非ヒト動物を炎症性腸疾患モデルまたはハイパーIgM症候群モデルとして使用する方法もしくは抗体製造用に使用する方法を提供するものである。

【0019】

ここで炎症性腸疾患(Inflammatory Bowel Disease: IBD)には次の1)、2)が含まれる。

- 1) 原因が明らかな炎症性腸疾患(例えば、バクテリア、ウイルス、薬剤などのより起こるもの)
- 2) 原因が不明の炎症性腸疾患(例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病、膠原病にともなう大腸炎、腸型ベーチェット病)

狭義でのIBDでは潰瘍性大腸炎とクローン病の2つを指す。

本発明において、炎症性腸疾患のうち好ましいものとしては潰瘍性大腸炎およびクローン病、最も好ましいものとしては潰瘍性大腸炎が挙げられる。

【0020】

また、本発明は、*bach2*遺伝子の発現が人為的に抑制されていることを特徴とする、多分化能を有する非ヒト動物細胞を提供する。このような細胞は、本発明の非ヒト動物の製造に利用できる。本発明において*bach2*遺伝子の改変の対象となる多分化能を有する細胞としては、例えばES細胞、EC細胞、骨髄幹細胞、臓器幹細胞が挙げられる。

【0021】

本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、当業者においては一般的に公知の遺伝子工学技術により作製することができる。例えば、以下のようにして遺伝子改変マウスを作製することができる。まず、マウスから*bach2*遺伝子のエクソン部分を含むDNAを単離し、このDNA断片に適当なマーカー遺伝子を挿入し、ターゲッティングベクターを構築する。このターゲッティングベクターをエレクトロポレーション法などによりマウスのES細胞株に導入し、相同組み換えを生じた細胞株を選抜する。挿入するマーカー遺伝子としては、ネオマイシン耐性遺伝子などの抗生物質耐性遺伝子が好ましい。抗生物質耐性遺伝子を挿入した場

合には、抗生物質を含む培地で培養するだけで相同組み換えを生じた細胞株を選抜することができる。また、より効率的な選抜を行うためには、ターゲッティングベクターにチミジンキナーゼ遺伝子などを結合させておくことも可能である。これにより、非相同組み換えを起こした細胞株を排除することができる。また、PCRおよびサザンブロットにより相同組み換え体の検定を行い、**bach2**遺伝子の遺伝子対の一方が不活性化された細胞株を効率よく得ることもできる。

【0022】

相同組み換えを生じた細胞株を選抜する場合、相同組み換え箇所以外にも、遺伝子挿入による未知の遺伝子破壊の恐れがあることから、複数のクローンを用いてキメラ作製を行うことが好ましい。得られたES細胞株をマウス胚盤葉にインジェクションしキメラマウスを得ることができる。このキメラマウスを交配させることで、**bach2**遺伝子の遺伝子対の一方を不活性化したマウスを得ることができる。さらに、このマウスを交配させることで、**bach2**遺伝子の遺伝子対の双方を不活性化したマウスを取得することができる。マウス以外の動物種におけるES細胞あるいはES様細胞の樹立はすでに報告されており、そのような動物においても、同様の手法により、遺伝子改変を行うことができる。

【0023】

また、**bach2**遺伝子の遺伝子対の双方を不活性化したES細胞株は、以下の方法により取得することも可能である。すなわち、遺伝子対の一方を不活性化したES細胞株を高濃度の抗生物質を含む培地で培養することにより、遺伝子対のもう一方も不活性化された細胞株、即ち、**bach2**遺伝子の遺伝子対の双方を不活性化したES細胞株を得ることができる。また、遺伝子対の一方を不活性化したES細胞株を選抜し、この細胞株に再度ターゲッティングベクターを導入し、相同組換えを生じた細胞株を選択することでも作製することができる。ターゲッティングベクターに挿入するマーカー遺伝子は、前出のマーカー遺伝子とは異なるものを使用することが好ましい。

【0024】

また、本発明は、上記非ヒト動物を利用した抗体（好ましくはIgM）または該抗体を含む抗血清の製造方法を提供する。本発明の抗体の抗体製造方法は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト型化抗体（ヒト化抗体と表現されることもある）、あるいはヒト抗体の作製に利用することができる。マウスなどの免疫動物に由来する抗体、あるいはその遺伝子を利用して、免疫動物とヒトのキメラ抗体や、ヒト型化抗体を作製する方法は公知である。また、免疫システムをヒトの免疫システムに置換されたトランスジェニックマウスの**bach2**遺伝子を改変し、得られたマウスを免疫することによって、ヒト抗体を得ることができる。本発明における非ヒト動物には、このようなヒト抗体が生産可能な非ヒト動物もまた含まれる。

【0025】

また、本発明は、非ヒト動物に由来する組織や細胞、非ヒト動物に由来する細胞とマイクロマ細胞とのハイブリドーマなども提供する。本発明の非ヒト動物に由来する細胞には、非ヒト動物から樹立された細胞株が含まれる。上記非ヒト動物由来の細胞株を樹立する方法としては、公知の方法を利用することができる。例えば、げっ歯類においては、胎仔細胞の初代培養の方法を用いることが可能である（新生化学実験講座、18巻、125頁～129頁、東京化学同人、およびマウス胚の操作マニュアル、262頁～264頁、近代出版）。

【0026】

免疫から抗体取得までの方法は公知の方法を用いることができる。免疫原による動物の免疫は、公知の方法にしたがって行われる。一般的な方法としては、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は皮下に注射する。具体的には、免疫原をPBS(Phosphate-Buffered Saline)や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものに対し、所望により通常のアジュバントを適量混合し、乳化後、動物に投与する。アジュバントには、たとえばフロイント完全アジュバントが用いられる。さらに、その後、フロイント不完全アジュバントに適量混合した免疫原を、4～21日毎に数回投与することが好ましい。また、免疫原の免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常

法により確認する。

【0027】

目的の抗体を得るためには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、免疫した動物の血液を採取する。そして採取した血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離して、これを使用してもよい。

【0028】

例えば、目的の抗原をカップリングさせたアフィニティーカラムを用いて、目的の抗原のみを認識する画分を得て、さらにこの画分をプロテインAあるいはプロテインGカラムを利用して精製することにより、IgGあるいはIgMを調製することができる。 10

【0029】

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、動物から抗体産生細胞を採取してクローニングする。抗体産生細胞のクローニングには、細胞融合法を用いることができる。前記抗体産生細胞と融合される他方の親細胞としては、たとえば哺乳動物のミエローマ細胞が用いられる。より好ましくは、融合細胞（ハイブリドーマ）の選択マーカーとなる、特殊な栄養要求性や薬剤耐性を有するミエローマ細胞が挙げられる。

【0030】

前記抗体産生細胞とミエローマ細胞は、基本的には公知の方法に準じて細胞融合させることができる。細胞融合を利用したモノクローナル抗体の作製方法は、たとえばミルステインらによって確立されている (Galfré, G. and Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73, 3-46)。 20

【0031】

細胞融合により得られたハイブリドーマは、選択培養液で培養することにより選択される。選択培養液は、細胞融合に用いたミエローマ細胞の特性などに応じて選択される。選択培養液としては、たとえば、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）が用いられる。ハイブリドーマは、目的とするハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、当該HAT培養液で培養される。通常、数日～数週間培養を継続することにより、ハイブリドーマを選択することができる。次いで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングを行う。 30

【0032】

次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスの腹水としてモノクローナル抗体を回収することができる。腹水からモノクローナル抗体を精製することもできる。モノクローナル抗体の精製には、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、目的の抗原をカップリングしたアフィニティーカラムなどを利用することができる。

【0033】

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の抗体産生細胞を癌遺伝子 (oncogene) やウイルスなどを用いること等により不死化させた細胞を用いることもできる。細胞を不死化するためのウイルスとしては、エプスタインバーウイルス (EBV) などを用いることができる。 40

【0034】

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体とすることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., *THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES*, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ、または抗体を産生する感作リンパ球等の抗体産生細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含 50

する。

【0035】

さらに、本発明の方法により得られた抗体は、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。たとえば、抗体断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv又は重鎖と軽鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させることによって、抗体断片を得ることができる。または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる (例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 47 10
6-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照)。

【0036】

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

【0037】

また、ヒト抗体の取得方法も知られている。ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を目的の抗原で免疫することで目的のヒト抗体を取得することができる (国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/255 85, WO 96/34096, WO 96/33735参照)。

【0038】

また、本発明の方法により得られた抗体は、免疫動物に由来する非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体とすることができる。また免疫動物に由来する非ヒト抗体のCDR (相補性決定領域) とヒト抗体由来のFR (フレームワーク領域) および定常領域からなるヒト型化抗体とすることもできる。

【0039】

これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。具体的には、たとえばキメラ抗体は、免疫動物の抗体の重鎖、および軽鎖の可変領域と、ヒト抗体の重鎖および軽鎖の定常領域からなる抗体である。免疫動物由来の抗体の可変領域をコードするDNAを、ヒト抗体の定常領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることによって、キメラ抗体を得ることができる。

【0040】

ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称される改変抗体である。ヒト型化抗体は、免疫動物由来の抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) を、ヒト抗体の相補性決定領域へ移植することによって構築される。その一般的な遺伝子組換え手法も知られている。

【0041】

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region; FR) を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体定常領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることによりヒト型化抗体を得られる (欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照)。CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851 50

-856)。

【0042】

更に、免疫動物の抗体産生細胞から、抗体をコードする遺伝子を取得することができる。抗体をコードする遺伝子を取得する方法は、制限されない。たとえば、可変領域やCDRをコードする遺伝子を鋳型として、PCR法によって当該遺伝子を増幅することによって抗体をコードする遺伝子を得ることができる。抗体遺伝子をPCR法によって増幅するためのプライマーが公知である。得られた遺伝子を適当な発現系を用いて発現させることによって、目的とする抗体を製造することができる。あるいは、本発明によって得られた遺伝子を、先に述べた種々の改変抗体を製造するために利用することもできる。

【0043】

前記のように得られた抗体は、均一なイムノグロブリン分子にまで精製することができる。精製方法は、特に限定されない。本発明で使用される抗体の分離、精製は通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよい。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、イムノグロブリンを分離、精製することができる(Antibodies : A Laboratory Manual. Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)。上記で得られた抗体の濃度は、吸光度の測定、または酵素結合免疫吸着検定法(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)等により測定することができる。

【0044】

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAを用いたカラムとして、Hyper D, P OROS, Sepharose F. F. (Pharmacia)等が挙げられる。

【0045】

アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる(Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual. Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーはHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

【0046】

また、本発明は、Bach2をコードするDNAの用途を提供する。具体的には、Bach2をコードするDNAを有効成分として含有する、炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群の治療または予防のための薬剤を提供する。

【0047】

さらに、Bach2ΔC2などの改変型Bach2は、構成的に核に存在するので活性型と考えられる。また、MAZRはBach2結合因子でありBリンパ球での発現も高く、Bach2と同様の機能を有することが予想される。また、MafはBach2の二量体形成のパートナーであるが、そのホモ二量体もBach2/Mafヘテロ二量体と同様のDNA配列に結合する。

【0048】

炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群の治療においては、Bach2ΔC2などの改変型cDNA (Hoshino, H., Kobayashi, A., Yoshida, M., Kudo, N., Oyake, T., Motohashi, H., Hayashi, N., Yamamoto, M., and Igarashi, K. Oxidative Stress Abolishes Leptomycin B-sensitive Nuclear Export of Transcription Repressor Bach2 that Counteracts Activation of Maf Recognition Element. J. Biol. Chem. 275, 15370-15376 (2000))、Bach2結合因子MAZRをコードするDNA (XM_223592, AB029397, NM_019574, Kobayashi, A. et al., Mol. Cell. Biol. (2000) 20, 1733-1746)、さらにはBach2の二量体形成のパートナーの小Mafタンパク質 (MafF (NM_012323, BC022952)、MafG (NM_010756)、MafK (NM_010757, NM_002360, NM_145673)) をコードするDNA (Oyake, T. et al., Mol. Cell. Biol. (1996) 16, 6083-6095) を使用することもできる。MafF、MafG、およびMafKをコー

10

20

30

40

50

ドするDNAは、それぞれ単独で使用することもできるだけでなく、組み合わせて使用することもできる。

【0049】

本発明の薬剤におけるDNAの形態としては、特に制限はなく、ゲノムDNA、cDNA、合成DNA、またはそれらDNAを含むベクターであってもよい。また、ゲノムDNA、cDNAは、その由来する生物に特に制限はない。ヒトの疾患の治療や予防に用いる場合には、好ましくは哺乳動物由来であり、最も好ましくはヒト由来である。なおBach2をコードするDNAは、例えば脾臓、骨髄、肝臓、末梢血リンパ球により調製することが可能である。

【0050】

また、本発明は、Bach2の発現を抑制するためのDNAの用途を提供する。具体的にはBach2の発現を抑制するためのDNAを有効成分として含有するIgM増加剤を提供する。このようなDNAとしては、Bach2をコードするDNAに対するアンチセンスRNAをコードするDNA、Bach2をコードするDNAの転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有するRNAをコードするDNA、Bach2をコードするDNAの発現をRNAi効果により抑制するRNAをコードするDNAなどを挙げることができる。

【0051】

アンチセンス核酸は、転写、スプライシングまたは翻訳など様々な過程を阻害することで、標的遺伝子の発現を抑制する（平島および井上：新生化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現（日本生化学会編，東京化学同人） pp.319-347, 1993）。遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的と考えられる。また、コード領域もしくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用することができる。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むDNAも、本発明で利用されるアンチセンスDNAに含まれる。アンチセンスDNAの配列は、形質転換される生物が持つ内在性遺伝子またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に抑制できる限りにおいて、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは、標的遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて標的遺伝子の発現を効果的に抑制するには、アンチセンスDNAの長さは少なくとも15塩基以上であり、好ましくは100塩基以上であり、さらに好ましくは500塩基以上である。通常用いられるアンチセンスDNAの長さは5kbよりも短く、好ましくは2.5kbよりも短い。

【0052】

内在性遺伝子の発現の抑制は、また、リボザイムをコードするDNAを利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子のことを指す。リボザイムには種々の活性を有するものが存在するが、中でもRNAを切断する酵素としてのリボザイムに焦点を当てた研究により、RNAを部位特異的に切断するリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループIイントロン型やRNase Pに含まれるM1 RNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある（小泉誠および大塚栄子：蛋白質核酸酵素，35: 2191, 1990）。

【0053】

例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15という配列のC15の3'側を切断するが、その活性にはU14とA9との塩基対形成が重要とされ、C15の代わりにA15またはU15でも切断され得ることが示されている（Koizumi M, et al: FEBS Lett 228: 228, 1988）。基質結合部位が標的RNA配列と相補的なリボザイムを設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムを作出することができる（Koizumi M, et al: FEBS Lett 239: 285, 1988、小泉誠および大塚栄子：蛋白質核酸酵素 35: 2191, 1990、Koizumi M, et al: Nucl Acids Res 17: 7059, 1989）。例えば、Bach2をコードするDNA中には、標的となり得る部位が複数存在する。

【0054】

また、ヘアピン型リボザイムも本発明の目的に有用である。このリボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される (Buzayan JM: Nature 323: 349, 1986)。ヘアピン型リボザイムからも、標的特異的なRNA切断リボザイムを作出できることが示されている (Kikuchi Y & Sasaki N: Nucl Acids Res 19: 675 1, 1991、菊池洋: 化学と生物 30: 112, 1992)。

【0055】

標的を切断できるように設計されたりボザイムは、適当なプロモーターおよび転写終結配列に連結される。このとき、転写されたRNAの5'端や3'端に余分な配列が付加されていると、リボザイムの活性が失われることがあるが、こういった場合は、転写されたりボザイムを含むRNAからリボザイム部分だけを正確に切り出すために、リボザイム部分の5'側や3'側にシスに働く別のトリミングリボザイムを配置させることも可能である (Taira K, et al: Protein Eng 3: 733, 1990、Dzianott AM & Bujarski JJ: Proc Natl Acad Sci USA 86: 4823, 1989、Grosshans CA & Cech TR: Nucl Acids Res 19: 3875, 1991、Taira K, et al: Nucl Acids Res 19: 5125, 1991)。また、このような構成単位をタンデムに並べ、標的遺伝子内の複数の部位を切断できるようにすることで、より効果を高めることもできる (Yuyama N, et al: Biochem Biophys Res Commun 186: 1271, 1992)。このように、リボザイムを用いて本発明における標的遺伝子の転写産物を特異的に切断することで、該遺伝子の発現を抑制することができる。

【0056】

内在性遺伝子の発現の抑制は、さらに、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二本鎖RNAを用いたRNA interference (RNAi) によっても行うことができる。RNAiとは、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二重鎖RNAを細胞内で発症させると標的内在性遺伝子の発現が抑制される現象のことを指す。RNAiの機構の詳細は明らかではないが、二本鎖RNAが小片に分解され、何らかの形で標的遺伝子の指標となることにより、標的遺伝子が分解されると考えられている。

【0057】

本発明のDNAは、標的配列のインバーテッドリピート間に適当な配列 (イントロン配列が望ましい) を挿入し、ヘアピン構造を持つダブルストランドRNA (self-complementary 'hairpin' RNA (hpRNA)) を作るようなコンストラクト (Smith, N.A. et al. Nature, 407:319, 2000、Wesley, S.V. et al. Plant J. 27:581, 2001、Piccin, A. et al. Nucleic Acids Res. 29:E55, 2001) として使用することが好ましい。

【0058】

RNAiに用いるDNAは、標的遺伝子と完全に同一である必要はないが、少なくとも70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の配列の同一性を有する。また、配列の同一性は上述した手法により決定できる。

上記DNAを生体内に投与する場合には、レトロウイルス、アデノウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクターやリボソームなどの非ウイルスベクターを利用することができる。投与方法としては、in vivo法およびex vivo法を例示することができる。

【0059】

また、上記DNAは、公知の製剤学的方法により製剤化した薬剤として投与を行うことも可能である。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で使用できる。また、例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、ベヒクル、防腐剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0060】

注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩

化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80TM、HCO-50と併用してもよい。

【0061】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

また、本発明の薬剤の投与量は、患者の年齢、症状により適宜選択することができる。 10

【0062】

本発明は、Bach2の機能を代替する化合物のスクリーニング方法を提供する。まず、被検化合物を本発明の非ヒト動物に投与する。本発明のスクリーニング方法に用いる被検化合物としては、例えば、天然化合物、有機化合物、無機化合物、タンパク質、ペプチドなどの単一化合物、並びに、化合物ライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産物、海洋生物抽出物、植物抽出物等を挙げることができる。非ヒト動物への被検化合物の投与は、例えば、経口的または非経口的に行うことができる。被検化合物がタンパク質である場合には、例えば、該タンパク質をコードする遺伝子を有するウイルスベクターを構築し、その感染力を利用して、本発明の非ヒト動物に該遺伝子を導入することも可能である。次いで、該非ヒト動物の表現型を解析する。表現型としては、炎症性腸疾患、ハイパーIgM症候群、糞便中のIgA量、血清中抗体価、感染症（肺炎など）が挙げられるが、これに限定されるものではない。炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群の解析は、実施例に記載の方法で行うことができる。次いで、被検化合物を投与していない場合と比較して、該非ヒト動物の表現型を相補する化合物を選択する。本発明において「相補」には完全な場合だけでなく、不完全な場合も含まれる。さらに、本発明は遺伝子改変非ヒト動物の細胞を用いたスクリーニング方法も提供する。まず、本発明の非ヒト動物の脾臓細胞からBリンパ球を単離し、LPSで刺激し、抗体クラススイッチを誘導する。このとき、被検化合物を投与していない場合と比較して、該非ヒト動物細胞の表現型を相補する化合物を選択する。上記の方法によって、単離された化合物は、炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群の治療または予防のための薬剤として利用できる。 20 30

【0063】

また、本発明は、Bach2制御剤のスクリーニング方法を提供する。本発明のBach2制御剤のスクリーニング方法の第一の態様は、Bach2と結合する化合物のスクリーニングに関するものである。第一の態様においては、まず、被検化合物をBach2に接触させる。次いで、該Bach2と被検化合物との結合を検出する。次いで、該Bach2と結合する被検化合物を選択する。この方法によって、単離された化合物は、炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群の治療または予防のための薬剤、またはIgMを増加するための薬剤として利用できる。また、後述のスクリーニング方法の被検化合物として利用することもできる。

【0064】

Bach2を用いて、これに結合するポリペプチドをスクリーニングする方法としては、当業者に公知の多くの方法を用いることが可能である。このようなスクリーニングは、例えば、免疫沈降法により行うことができる。具体的には、以下のように行うことができる。Bach2をコードするDNAを、pSV2neo, pcDNA I, pCD8などの外来遺伝子発現用のベクターに挿入することで動物細胞などで当該遺伝子を発現させる。発現に用いるプロモーターとしては SV40 early promoter (Rigby In Williamson (ed.), Genetic Engineering, Vol. 3. Academic Press, London, p.83-141(1982)), EF-1 α promoter (Kimら Gene 91, p.217-223 (1990)), CAG promoter (Niwa et al. Gene 108, p.193-200 (1991)), RSV LTR promoter (Cullen Methods in Enzymology 152, p.684-704 (1987)), SR α promoter (Takebe et al. Mol. Cell. Biol. 8, p.466 (1988)), CMV immediate early promoter (Seed and Aruffo Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, p.3365-3369 (1987)), SV40 late promot 40 50

er (Gheysen and Fiers J. Mol. Appl. Genet. 1, p.385-394 (1982)), Adenovirus late promoter (Kaufman et al. Mol. Cell. Biol. 9, p. 946 (1989)), HSV TK promoter 等の一般的に使用できるプロモーターであれば何を用いてもよい。

【0065】

動物細胞に遺伝子を導入することで外来遺伝子を発現させるためには、エレクトロポレーション法 (Chu, G. et al. Nucl. Acid Res. 15, 1311-1326 (1987))、リン酸カルシウム法 (Chen, C and Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752 (1987))、DEAEデキストラン法 (Lopata, M. A. et al. Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717 (1984); Sussman, D. J. and Milman, G. Mol. Cell. Biol. 4, 1642-1643 (1985))、リポフェクチン法 (Derijard, B. Cell 7, 1025-1037 (1994); Lamb, B. T. et al. Nature Genetics 5, 22-30 (1993); Rabindran, S. K. et al. Science 259, 230-234 (1993))等の方法があるが、いずれの方法によってもよい。

【0066】

特異性の明らかとなっているモノクローナル抗体の認識部位 (エピトープ) をBach2のN末またはC末に導入することにより、モノクローナル抗体の認識部位を有する融合タンパク質としてBach2を発現させることができる。用いるエピトープ-抗体系としては市販されているものを利用することができる (実験医学 13, 85-90 (1995))。マルチクローニングサイトを介して、 β -ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP) などとの融合タンパク質を発現することができるベクターが市販されている。また、融合タンパク質にすることによりBach2の性質をできるだけ変化させないようにするために数個から十数個のアミノ酸からなる小さなエピトープ部分のみを導入して、融合タンパク質を調製する方法も報告されている。例えば、ポリヒスチジン (His-tag)、インフルエンザ凝集素 HA、ヒトc-myc、FLAG、Vesicular stomatitis ウイルス糖タンパク質 (VSV-GP)、T7 gene10 タンパク質 (T7-tag)、ヒト単純ヘルペスウイルス糖タンパク質 (HSV-tag)、E-tag (モノクローナルファージ上のエピトープ) などのエピトープとそれを認識するモノクローナル抗体を、Bach2に結合するタンパク質のスクリーニングのためのエピトープ-抗体系として利用できる (実験医学 13, 85-90 (1995))。

【0067】

免疫沈降においては、これらの抗体を、適当な界面活性剤を利用して調製した細胞溶解液に添加することにより免疫複合体を形成させる。この免疫複合体はBach2、それと結合能を有するタンパク質、および抗体からなる。上記エピトープに対する抗体を用いる以外に、Bach2に対する抗体を利用して免疫沈降を行うことも可能である。Bach2に対する抗体は、例えば、Bach2をコードするDNAを適当な大腸菌発現ベクターに導入して大腸菌内で発現させ、発現させたタンパク質を精製し、これをウサギやマウス、ラット、ヤギ、ニワトリなどに免疫することで調製することができる。また、合成したBach2の部分ペプチドを上記の動物に免疫することによって調製することもできる。

【0068】

免疫複合体は、例えば、抗体がマウスIgG抗体であれば、Protein A SepharoseやProtein G Sepharoseを用いて沈降させることができる。また、Bach2を、例えば、GSTなどのエピトープとの融合タンパク質として調製した場合には、グルタチオン-Sepharose 4Bなどのこれらエピトープに特異的に結合する物質を利用して、Bach2の抗体を利用した場合と同様に、免疫複合体を形成させることができる。

【0069】

免疫沈降の一般的な方法については、例えば、文献 (Harlow, E. and Lane, D.: Antibodies, pp.511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988)) 記載の方法に従って、または準じて行えばよい。

【0070】

免疫沈降されたタンパク質の解析にはSDS-PAGEが一般的であり、適当な濃度のゲルを用いることでタンパク質の分子量により結合していたタンパク質を解析することができる。

また、この際、一般的にはBach2に結合したタンパク質は、クマシー染色や銀染色といったタンパク質の通常の染色法では検出することは困難であるので、放射性同位元素である³⁵S-メチオニンや³⁵S-システインを含んだ培養液で細胞を培養し、該細胞内のタンパク質を標識して、これを検出することで検出感度を向上させることができる。タンパク質の分子量が判明すれば直接SDS-ポリアクリルアミドゲルから目的のタンパク質を精製し、その配列を決定することもできる。

【0071】

また、Bach2を用いて、該Bach2に結合するタンパク質を単離する方法としては、例えば、Skolnikらの方法 (Skolnik, E. Y. et al., Cell (1991) 65, 83-90) を用いて行うことができる。すなわち、Bach2と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞、組織よりファージベクター (λ gt11, ZAPなど) を用いたcDNAライブラリーを作製し、これをLB-アガロース上で発現させフィルターに発現させたタンパク質を固定し、精製して標識したBach2と上記フィルターとを反応させ、Bach2と結合したタンパク質を発現するプラークを標識により検出すればよい。Bach2を標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性を利用する方法、Bach2又はBach2に融合したタンパク質 (例えばGSTなど) に特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法又は蛍光を利用する方法等が挙げられる。

【0072】

また、本発明のスクリーニング方法としては、細胞を用いた2-ハイブリッドシステム (Fields, S., and Sternglanz, R., Trends. Genet. (1994) 10, 286-292, Dalton S, and Treisman R (1992) Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612, 「MATCHMARKER Two-Hybrid System」, 「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」, 「MATCHMAKER One-Hybrid System」 (いずれもクロンテック社製)、 「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」 (ストラタジーン社製) を用いて行う方法が挙げられる。

【0073】

2-ハイブリッドシステムにおいては、Bach2またはその部分ペプチドをSRF DNA結合領域またはGAL4 DNA結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、Bach2と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞より、VP16またはGAL4転写活性化領域と融合する形で発現するようなcDNAライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリー由来cDNAを単離する (酵母細胞内でBach2と結合するタンパク質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローンが確認できる)。単離したcDNAを大腸菌に導入して発現させることにより、該cDNAがコードするタンパク質を得ることができる。これによりBach2に結合するタンパク質またはその遺伝子を調製することが可能である。

【0074】

2-ハイブリッドシステムにおいて用いられるレポーター遺伝子としては、例えば、HIS3遺伝子の他、Ade2遺伝子、LacZ遺伝子、CAT遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor type1) 遺伝子等が挙げられるが、これらに制限されない。2ハイブリッド法によるスクリーニングは、酵母の他、哺乳動物細胞などを使って行うこともできる。

【0075】

Bach2と結合する化合物のスクリーニングは、アフィニティークロマトグラフィーを用いて行うこともできる。例えば、Bach2をアフィニティークラムの担体に固定し、ここにBach2と結合するタンパク質を発現していることが予想される被検化合物を適用する。この場合の被検化合物としては、例えば細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被検化合物を適用した後、カラムを洗浄し、Bach2に結合したタンパク質を調製することができる。

【0076】

得られたタンパク質は、そのアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴDNAを合成し、該DNAをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、該タンパク

10

20

30

40

50

質をコードするDNAを得ることができる。

【0077】

また、タンパク質に限らず、Bach2に結合する化合物を単離する方法としては、例えば、固定したBach2に、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、Bach2に結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニング方法 (Wrighton NC; Farrell FX; Chang R; Kashyap AK; Barbone FP; Mulcahy LS; Johnson DL; Barrett RW; Jolliffe LK; Dower WJ., Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 p458-64, Verdine GL., The combinatorial chemistry of nature. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p11-13, Hogan JC Jr., Directed combinatorial chemistry. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p17-9) が当業者に公知である。

【0078】

本発明において、結合した化合物を検出又は測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することもできる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは、Bach2と被検化合物との間の相互作用を微量のタンパク質を用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である (例えばBIAcore、Pharmacia製)。

【0079】

本発明におけるBach2制御剤のスクリーニング方法の第二の態様は、Bach2の活性を制御する (上昇または減少させる) 化合物のスクリーニングに関するものである。第二の態様としては、まず、被検化合物をBach2に接触させる。第二の態様に用いられるBach2の状態としては、特に制限はなく、例えば、精製された状態、細胞内に発現した状態、細胞抽出液内に発現した状態などであってもよい。Bach2が発現している細胞としては、内在性のBach2を発現している細胞、または外来性のBach2を発現している細胞が挙げられる。上記内在性のBach2を発現している細胞としては、培養細胞などを挙げることもできるが、これに限定されるものではない。

【0080】

また、上記外来性のBach2を発現している細胞は、例えば、Bach2をコードするDNAを含むベクターを細胞に導入することで作製できる。ベクターの細胞への導入は、当業者に一般的な方法によって実施することができる。このような外来性のBach2が導入される細胞が由来する生物種としては、特に限定されず、外来タンパク質を細胞内に発現させる技術が確立されている生物種であればよい。

【0081】

また、Bach2が発現している細胞抽出液は、例えば、試験管内転写翻訳系に含まれる細胞抽出液に、Bach2をコードするDNAを含むベクターを添加したものを挙げることもできる。該試験管内転写翻訳系としては、特に制限はなく、市販の試験管内転写翻訳キットなどを使用することが可能である。

【0082】

また、本発明において「接触」は、Bach2の状態に応じて行う。例えば、Bach2が精製された状態であれば、精製標品に被検化合物を添加することにより行うことができる。また、細胞内に発現した状態または細胞抽出液内に発現した状態であれば、それぞれ、細胞の培養液または該細胞抽出液に被検化合物を添加することにより行うことができる。被検化合物がタンパク質の場合には、例えば、該タンパク質をコードするDNAを含むベクターを、Bach2が発現している細胞へ導入する、または該ベクターをBach2が発現している細胞抽出液に添加することで行うことも可能である。また、例えば、酵母または動物細胞等を用いた2ハイブリッド法を利用することも可能である。

【0083】

第二の態様では、次いで、上記Bach2の活性を測定する。Bach2活性としては、転写活性やDNA結合活性が挙げられる。転写活性は、例えば、レポーターアッセイで測定できる。B

ach2結合配列を有するレポーター遺伝子を細胞へ導入することで、その発現レベルに対する被検化合物の効果を測定することができる。またDNA結合活性は、例えば、ゲルシフトアッセイで測定できる。Bach2結合配列を有するDNA断片と細胞抽出液とを混合し、電気泳動法にてBach2/DNA複合体を検出する。被検化合物を細胞に対して、あるいは細胞抽出液に添加し、複合体形成に及ぼす効果を測定することができる。

【0084】

第二の態様においては、次いで、被検化合物を投与していない場合と比較して、該Bach2の活性を上昇または減少させる化合物を選択する。Bach2の活性を上昇させる化合物は、炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群の治療または予防のための薬剤として利用できる。またBach2の活性を減少させる化合物は、IgMを増加するための薬剤として利用できる。 10

【0085】

本発明におけるBach2制御剤のスクリーニング方法の第三の態様は、bach2遺伝子の発現レベルを制御する化合物のスクリーニングに関するものである。第三の態様としては、まず、bach2遺伝子のプロモーター領域の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合したDNAを有する細胞または細胞抽出液を提供する。ここで、「機能的に結合した」とは、bach2遺伝子のプロモーター領域に転写因子が結合することにより、レポーター遺伝子の発現が誘導されるように、bach2遺伝子のプロモーター領域とレポーター遺伝子とが結合していることをいう。従って、レポーター遺伝子が他の遺伝子と結合しており、他の遺伝子産物との融合タンパク質を形成する場合であっても、bach2遺伝子のプロモーター領域に転写因子が結合することによって、該融合タンパク質の発現が誘導されるものであれば、上記「機能的に結合した」の意に含まれる。またbach2遺伝子のプロモーター領域は、データベース上で、bach2 cDNA配列とbach2ゲノム配列を照らしあわせることで抽出することができる。 20

【0086】

上記レポーター遺伝子としては、その発現が検出可能なものであれば特に制限されず、例えば、当業者において一般的に使用されるCAT遺伝子、lacZ遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、 β -グルクロニダーゼ遺伝子 (GUS) およびGFP遺伝子等を挙げることができる。また、上記レポーター遺伝子には、Bach2をコードするDNAもまた含まれる。

【0087】

第三の態様においては、次いで、上記細胞または上記細胞抽出液に被検化合物を接触させる。次いで、該細胞または該細胞抽出液における上記レポーター遺伝子の発現レベルを測定する。レポーター遺伝子の発現レベルは、使用するレポーター遺伝子の種類に応じて、当業者に公知の方法により測定することができる。例えば、レポーター遺伝子がCAT遺伝子である場合には、該遺伝子産物によるクロラムフェニコールのアセチル化を検出することによって、レポーター遺伝子の発現レベルを測定することができる。レポーター遺伝子がlacZ遺伝子である場合には、該遺伝子発現産物の触媒作用による色素化合物の発色を検出することにより、また、ルシフェラーゼ遺伝子である場合には、該遺伝子発現産物の触媒作用による蛍光化合物の蛍光を検出することにより、また、 β -グルクロニダーゼ遺伝子 (GUS) である場合には、該遺伝子発現産物の触媒作用によるGlucuron (ICN社) の発光や5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル- β -グルクロニド (X-Gluc) の発色を検出することにより、さらに、GFP遺伝子である場合には、GFPタンパク質による蛍光を検出することにより、レポーター遺伝子の発現レベルを測定することができる。 30 40

【0088】

また、bach2遺伝子をレポーターとする場合、該遺伝子の発現レベルの測定は、当業者に公知の方法によって行うことができる。例えば、該遺伝子のmRNAを定法に従って抽出し、このmRNAを鋳型としたノーザンハイブリダイゼーション法、またはRT-PCR法を実施することによって該遺伝子の転写レベルの測定を行うことができる。さらに、DNAアレイ技術を用いて、該遺伝子の発現レベルを測定することも可能である。

【0089】

また、Bach2を含む画分を定法に従って回収し、該Bach2の発現をSDS-PAGE等の電気泳動 50

法で検出することにより、遺伝子の翻訳レベルの測定を行うこともできる。また、Bach2に対する抗体を用いて、ウェスタンブロッティング法などを実施し、該Bach2の発現を検出することにより、遺伝子の翻訳レベルの測定を行うことも可能である。

【0090】

第三の態様においては、次いで、被検化合物を投与していない場合と比較して、該レポーター遺伝子の発現レベルを上昇または減少させる化合物を選択する。レポーター遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物は、炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群の治療または予防のための薬剤として利用できる。またレポーター遺伝子の発現レベルを減少させる化合物は、IgMを増加するための薬剤として利用できる。

【0091】

本発明におけるBach2制御剤のスクリーニング方法の第四の態様は、Bach2による転写を制御する化合物のスクリーニングに関するものである。第四の態様としては、まず、Bach2転写制御領域 (Oyake, T. et al., Mol. Cell. Biol. (1996) 16, 6083-6095 ; Muto, A. et al., EMBO J. (1998) 17, 5734-5743 ; Hoshino, H. et al., J. Biol. Chem. (2000) 275, 15370-15376 ; Muto, A. et al., J. Biol. Chem. (2002) 277, 20724-20733) の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合したDNAを有する細胞または細胞抽出液を提供する。Bach2転写制御領域としては、グロビン遺伝子エンハンサーのNF-E2結合配列、抗体重鎖遺伝子エンハンサーのMARE (maf recognition element)などを利用できる。

【0092】

第四の態様においては、次いで、Bach2存在下において、該細胞または該細胞抽出液に被検化合物を接触させる。例えば、Bach2とレポーターが発現している細胞または細胞抽出液に、被検化合物を接触させることができる。第四の態様においては、次いで、該細胞または該細胞抽出液における該レポーター遺伝子の発現レベルを測定する。次いで、被検化合物を投与していない場合と比較して、該レポーター遺伝子の発現レベルを上昇または減少させる化合物を選択する。レポーター遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物は、炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群の治療または予防のための薬剤として利用できる。またレポーター遺伝子の発現レベルを減少させる化合物は、IgMを増加するための薬剤として利用できる。

【0093】

本発明は、bach2遺伝子の発現量を測定する工程を含む、炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群の検査方法を提供する。ここで、「bach2遺伝子の発現」には、bach2のmRNAの発現だけでなく、Bach2タンパク質の発現もまた含まれる。該検査方法によって、bach2遺伝子の発現が減少している場合に、炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群にすでに罹患している、あるいは罹患しやすいと判定される。

【0094】

以下に、本発明の検査方法の態様を例示するが、本発明の検査方法はそれらに限定されるものではない。上記検査方法の一つの態様としては、まず、被検者のRNA試料を調製する。RNA試料は、例えば被検者の脾臓、末梢血リンパ球、腸管生検材料から抽出することができる。

【0095】

本方法においては、次いで、該RNA試料に含まれるBach2をコードするRNAの量を測定する。次いで、測定されたRNAの量を対照と比較する。このような方法としては、ノーザンブロッティング法、DNAアレイ法、または、RT-PCR法等を例示することができる。

【0096】

また、上記検査方法は、Bach2の発現量を測定することにより、下記の如く実施することができる。まず、被検者からタンパク質試料を調製する。タンパク質試料は、例えば被検者の脾臓、末梢血リンパ球、腸管生検材料から調製することができる。

【0097】

本方法においては、次いで、該タンパク質試料に含まれるBach2の量を測定する。次いで、測定されたBach2の量を対照と比較する。このような方法としては、SDSポリアクリル

10

20

30

40

50

アミド電気泳動法、並びにBach2に結合する抗体を用いた、ウェスタンブロッティング法、ドットブロッティング法、免疫沈降法、酵素結合免疫測定法(ELISA)、および免疫蛍光法を例示することができる。

【0098】

また、本発明において、bach2ノックアウトマウスが炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群を発症することが判明した。よって、bach2の遺伝子変異により、ヒト等の炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群が引き起こされていることが示唆される。そこで、本発明は、bach2遺伝子領域における変異を検出する工程を含む、炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群の検査方法を提供する。該検査方法によって、bach2遺伝子領域に変異が生じている場合に、炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群にすでに罹患している、あるいは罹患しやすいと判定される。

10

【0099】

本発明において、bach2遺伝子領域とは、bach2遺伝子および該遺伝子の発現に影響する領域を意味する。該遺伝子の発現に影響する領域としては、特に制限はないが、例えば、プロモーター領域などが例示できる。また、本発明における変異の種類としては、例えば、欠失、置換または挿入変異などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0100】

以下、bach2遺伝子領域に生じた変異を検出する工程を含む検査方法の好ましい態様を記載するが、本発明の方法はそれらの方法に限定されるものではない。

上記検査方法の好ましい態様においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。DNA試料は、例えば被検者の脾臓、末梢血リンパ球、腸管生検材料から抽出した染色体DNA、あるいはRNAを基に調製することができる。

20

【0101】

本方法においては、次いで、bach2遺伝子領域を含むDNAを単離する。該遺伝子領域の単離は、例えば、該遺伝子領域を含むDNAにハイブリダイズするプライマーを用いて、染色体DNA、あるいはRNAを鋳型としたPCR等によって行うことができる。本方法においては、次いで、単離したDNAの塩基配列を決定する。単離したDNAの塩基配列の決定は、当業者に公知の方法で行うことができる。本方法においては、次いで、決定したDNAの塩基配列を、対照と比較する。本発明において、対照とは、正常な(野生型の)bach2遺伝子領域を含むDNAを言う。一般に健常人のbach2遺伝子領域を含むDNAの配列は正常であるものと考えられることから、上記「対照と比較する」とは、通常、健常人のbach2遺伝子領域を含むDNAの配列と比較することを意味する。

30

【0102】

本発明における変異の検出は、以下のような方法によっても行うことができる。まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、調製したDNA試料を制限酵素により切断する。次いで、DNA断片をその大きさに応じて分離する。次いで、検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する。また、他の一つの態様においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、bach2遺伝子領域を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを制限酵素により切断する。次いで、DNA断片をその大きさに応じて分離する。次いで、検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する。このような方法としては、例えば、制限酵素断片長変異(Restriction Fragment Length Polymorphism/RFLP)を利用した方法やPCR-RFLP法等が挙げられる。

40

【0103】

さらに別の方法においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、bach2遺伝子領域を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる。次いで、解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する。分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を対照と比較する。該方法としては、例えばPCR-SSCP(single-strand conformation polymorphism、一本鎖高次構造変異)法(Cloning and polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of anonymous Alu repeats on chromosome 11. Genomics. 1992 Jan 1; 12(1): 139-146.、Detection of p53 gene mutations in huma

50

n brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene*. 1991 Aug 1; 6(8): 1313-1318.、Multiple fluorescence-based PCR-SSCP analysis with postlabeling.、*PCR Methods Appl.* 1995 Apr 1; 4(5): 275-282.)が挙げられる。この方法は操作が比較的簡便であり、また被検試料の量も少なく済む等の利点を有するため、特に多数のDNA試料をスクリーニングするのに好適である。

【0104】

さらに別の方法においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、*bach2*遺伝子領域を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを、DNA変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する。次いで、分離したDNAのゲル上での移動度を対照と比較する。このよ 10
うな方法としては、例えば、変性剤濃度勾配ゲル (denaturant gradient gel electrophoresis: DGGE法) 等を例示することができる。

【0105】

さらに別の方法においては、まず、被検者から調製した*bach2*遺伝子領域を含むDNA、および、該DNAにハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された基板、を提供する。本発明において「基板」とは、ヌクレオチドプローブを固定することが可能な板状の材料を意味する。本発明においてヌクレオチドには、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドが含まれる。本発明の基板は、ヌクレオチドプローブを固定することができれば特に制限はないが、一般にDNAアレイ技術で使用される基板を好適に用いることができる。一般にDNAアレイは、高密度に基板にプリントされた何千ものヌクレオチドで構成されて 20
いる。通常これらのDNAは非透過性(non-porous)の基板の表層にプリントされる。基板の表層は、一般的にはガラスであるが、透過性(porous)の膜、例えばニトロセルロースメンブレンを使用することができる。

【0106】

本発明において、ヌクレオチドの固定(アレイ)方法として、Affymetrix社開発によるオリゴヌクレオチドを基本としたアレイが例示できる。オリゴヌクレオチドのアレイにおいて、オリゴヌクレオチドは通常in situで合成される。例えば、photolithographicの技術(Affymetrix社)、および化学物質を固定させるためのインクジェット(Rosetta Inpharmatics社)技術等によるオリゴヌクレオチドのin situ合成法が既に知られており、いず 30
れの技術も本発明の基板の作製に利用することができる。

【0107】

基板に固定するヌクレオチドプローブは、*bach2*遺伝子領域の変異を検出することができるものであれば、特に制限されない。即ち該プローブは、例えば、*bach2*遺伝子領域を含むDNAにハイブリダイズするようなプローブである。特異的なハイブリダイズが可能であれば、ヌクレオチドプローブは、該遺伝子領域を含むDNAに対し、完全に相補的である必要はない。本発明において基板に結合させるヌクレオチドプローブの長さは、オリゴヌクレオチドを固定する場合は、通常10~100bpであり、好ましくは10~50bpであり、さらに好ましくは15~25bpである。

【0108】

本方法においては、次いで、該*bach2*遺伝子領域を含むDNAと該基板を接触させる。この 40
過程により、上記ヌクレオチドプローブに対し、DNAをハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションの反応液および反応条件は、基板に固定するヌクレオチドプローブの長さ等の諸要因により変動しうるが、一般的に当業者に周知の方法により行うことができる。

【0109】

本方法においては、次いで、該*bach2*遺伝子領域を含むDNAと該基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出する。この検出は、例えば、蛍光シグナルをスキャナー等によって読み取ることによって行うことができる。尚、DNAアレイにおいては、一般的にスライドガラスに固定したDNAをプローブといい、一方溶液中のラベルしたDNAをターゲットという。従って、基板に固定された上記ヌクレオチドを、本明細書 50
においてヌクレオチドプローブと記載する。本方法においては、さらに、検出したハイブ

リダイズの強度を対照と比較する。このような方法としては、例えば、DNAアレイ法 (SNP 遺伝子変異の戦略、松原謙一・榊佳之、中山書店、p128-135、Nature Genetics(1999)22: 164-167) 等が挙げられる。

【0110】

上記の方法以外にも、特定位置の変異のみを検出する目的にはアレル特異的オリゴヌクレオチド (Allele Specific Oligonucleotide/ASO) ハイブリダイゼーション法が利用できる。変異が存在すると考えられる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを作製し、これと DNA でハイブリダイゼーションを行わせると、変異が存在する場合、ハイブリッド形成の効率が低下する。それをサザンブロット法や、特殊な蛍光試薬がハイブリッドのギャップにインターカレーションすることにより消光する性質を利用した方法等により検出することができ

10

【0111】

また、本発明においては、MALDI-TOF/MS法 (SNP 遺伝子多型の戦略、松原謙一・榊佳之、中山書店、p106-117、Trends Biotechnol (2000):18:77-84)、TaqMan PCR法 (SNP 遺伝子多型の戦略、松原謙一・榊佳之、中山書店、p94-105、Genet Anal. (1999)14:143-149)、Invader法 (SNP 遺伝子多型の戦略、松原謙一・榊佳之、中山書店、p94-105、Genome Research (2000)10:330-343)、Pyrosequencing法 (Anal. Biochem. (2000)10:103-110)、AcycloPrime法 (Genome Research (1999)9:492-498)、SNuPE法 (Rapid Commun Mass Spectrom. (2000)14:950-959) 等も使用することができる。

20

【0112】

さらに、本発明は、本発明の検査方法に使用するための検査薬を提供する。その一つの態様としては、bach2 遺伝子領域にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む検査薬である。

【0113】

該オリゴヌクレオチドは、bach2 遺伝子領域を含む DNA (正常型 DNA または変異型 DNA) に特異的にハイブリダイズするものである。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下 (例えば、サンプブルックら、Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 第2版1989に記載の条件) において、他のタンパク質をコードする DNA とクロスハイブリダイゼーションを有意に生じないことを意味する。特異的なハイブリダイズが可能であれば、該オリゴヌクレオチドは、bach2 遺伝子領域を含む DNA に対し、完全に相補的である必要はない。

30

【0114】

bach2 遺伝子領域を含む DNA にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドは、上記本発明の検査方法におけるプローブ (該プローブが固定された基板を含む) やプライマーとして用いることができる。該オリゴヌクレオチドをプライマーとして用いる場合、その長さは、通常15bp~100bpであり、好ましくは17bp~30bpである。プライマーは変異部分を含むbach2 遺伝子領域の少なくとも一部を増幅しうるものであれば、特に制限されない。

【0115】

また、上記オリゴヌクレオチドをプローブとして使用する場合、該プローブは、bach2 遺伝子領域を含む DNA に特異的にハイブリダイズするものであれば、特に制限されない。該プローブは、合成オリゴヌクレオチドであってもよく、通常少なくとも15bp以上の鎖長を有する。

40

【0116】

本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば市販のオリゴヌクレオチド合成機により作製することができる。プローブは、制限酵素処理等によって取得される二本鎖 DNA 断片として作製することもできる。

【0117】

本発明のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いる場合は、適宜標識して用いること

50

が好ましい。標識する方法としては、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、オリゴヌクレオチドの5'端を³²Pでリン酸化することにより標識する方法、およびクレノウ酵素等のDNAポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチド等をプライマーとして³²P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を取り込ませる方法（ランダムプライム法等）を例示することができる。

【0118】

本発明の検査薬の別の態様は、Bach2に結合する抗体を含む検査試薬である。上記抗体は、検査に用いることが可能な抗体であれば、特に制限はなく、例えば実施例に記載の抗体を使用することもできる。抗体は必要に応じて標識される。

【0119】

上記の検査薬においては、有効成分であるオリゴヌクレオチドや抗体以外に、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、タンパク質安定剤（BSAやゼラチンなど）、保存剤等が必要に応じて混合されていてもよい。

なお、明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

【実施例】

【0120】

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

(1) 免疫蛍光染色

脾臓の凍結切片をFITC結合抗マウスIgM、ビオチン結合抗マウスIgM、ビオチン結合抗マウスCD3_ε (145-2C11)、および精製抗マウスMadCAM-1 (MECA-367) 抗体 (BDファーマーミンゲン (BD Pharmingen) 社) によって染色した。Cy3結合ヤギ抗ラットIgG (ロックランド (ROCKLAND) 社) およびCy3-結合アビジンを二次抗体として用いた。RBC-枯渇脾細胞を20 μg/ml LPSと共に2~4日間培養して、スライドガラス上にサイトスピンして、抗Bach2抗血清 (F69-2)、PE結合抗マウスIgM (BDファーマーミンゲン社)、Fcγ断片特異的Cy3結合抗マウスIgG (サブクラス1+2a+2b+3) (ジャクソンイムノリサーチラボラトリーズ (Jackson ImmunoResearch Lab.) 社)、およびAPC-結合抗B220 (BDファーマーミンゲン社) によって染色した。アレクサフルオロ488ヤギ抗ウサギIgG (モレキュラープローブス (Molecular Probes) 社) を二次抗体として用いた。核は、10 μMヘキスト33342によって染色した。撮像は既知の方法により行った (Muto, A. et al., J. Biol. Chem. (2002) 277, 20724-20733)。

【0121】

(2) ターゲティングベクターの構築

マウスbach2のゲノムファージクローンの分析は既知であり (Sun, J. et al., J. Biochem. (2001) 130, 385-392)、詳細な情報は要請に基づき入手できる。Bach2ターゲティングベクター (pB2TV) は、pCMVβベクター (クロンテック (Clontech) 社) に由来するSV40ポリアデニル化 (ポリ (A)) シグナルを含むβ-ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子と、両側にloxP配列が隣接するPGKプロモーター (PGK-neo) によって促進されるネオマイシン抵抗性遺伝子 (neo) とを含むDNA断片を用いて構築した。これらのカセットを、短腕と長腕DNAとのあいだにクローニングした。Bach2-特異的プライマーとベクター配列のプライマーとを用いるPCRによって、3.0 kbpの短腕DNAをゲノムファージクローンから単離した。Bach2特異的プライマーは、5'末端にEcoRI部位を有し (B2SARevプライマー5'-AATTGAgaattcGTTCAAACCCTGGAATAAAGAG-3' (配列番号: 1))、PCR産物をEcoRI DNAとしてクローニングした。6.7 kbpの長腕DNAは、EcoRI部位からファージクローン末端の3'末端までを含んだ。次に、ポリ (A) シグナルを含まない、PGKプロモーター (PGK-DTA) によって促進されるジフテリアトキシンA (DTA) を含むcDNAを短腕を超えてサブクローニングして、構築物を完成させた (図1aを参照のこと)。pB2TVは、NotIによって直鎖状にした。

【0122】

(3) 蛍光活性化セルソーター (FACS) 分析

FACS分析は、マウスCD45R/B220、CD43 (S7)、IgM (R6-60.2)、IgD、TER-119、Ly-6G/Gr-1、CD11b/Mac-1、CD4、CD8、CD21、およびCD23 (BDファーマーミンゲン社) に対する抗体を用いて行った。細胞は、Cell Questソフトウェア (Becton Dickinson社) を備えたFACS caliburを用いて分析した。

【0123】

(4) 免疫グロブリンレベルの決定

免疫グロブリン濃度は、それぞれのマウスIgアイソタイプに関して特異的な抗体およびアルカリホスファターゼ結合二次抗体の基質としてp-ニトロフェニルホスファターゼ (クロノタイプングシステム/AP; サザンバイオテクノロジーアソシエーツ (Clonotyping System/AP; Southern Biotechnology Associates) 社) による標準的な技法を用いて決定した。 10

【0124】

(5) in vivo免疫法とSHMアッセイ

マウス (7~12週齢) にDNP-フィコール (バイオサーチテクノロジーズ (Biosearch Technologies) 社) 100 μ g、またはミョウバンと混合したNP-ニワトリ γ グロブリン (NP-CGG、バイオサーチテクノロジーズ社) 100 μ gの磷酸緩衝生理食塩液 (PBS; ニッスイ社) 溶液を腹腔内に免疫した。抗-DNPおよび抗-NP抗体レベルはそれぞれ、回収剤としてDNP-ウシ血清アルブミン (BSA) およびNP-BSA (バイオサーチテクノロジーズ社) を用いたELISA法により決定した。体細胞超突然変異アッセイは、既知の方法により行った (Muramatsu, M. et al., Cell (2000) 102, 553-563)。 20

【0125】

(6) インビトロクラススイッチアッセイ

RBC-枯渇脾細胞 (1×10^5 個) を96ウェルプレートにおいて総容量200 μ lのRPMI培地で培養した。細胞を20 μ g/ml LPS (0111:B4; シグマ (SIGMA) 社)、10 ng/ml組み換え型マウスIL-4 (BDファーマーミンゲン社)、および1 ng/ml組み換え型ヒトTGF- β 1 (R&Dシステムズ (R&D systems) 社) で、表記の組み合わせで処置した。脾臓のB細胞の増殖は、細胞増殖ELISA、BrdUキット (ロシュ (Roche) 社) を用いて測定した。

【0126】

(7) RT-PCR

RNA調製およびcDNA合成は既知の方法により行った (Muto, A. et al., EMBO J. (1998) 30 17, 5734-5743)。PCRプライマーの配列は要請に応じて利用できる。

【0127】

(8) レトロウイルス感染症

レトロウイルスの調製は既知の方法により行った (Muto, A. et al., J. Biol. Chem. (2002) 277, 20724-20733)。感染前に、精製脾臓B細胞を20 μ g/ml LPSおよび10 ng/ml IL-4によって2日間予め活性化した。予め活性化した細胞を、16 μ g/mlポリブレンを添加したレトロウイルスを含む培地において 5×10^5 個/mlの密度になるように懸濁し、927 g、32°Cで90分間遠心した後、48時間インキュベートした。次に、細胞を洗浄して24時間インキュベートした。FACSを用いて表面のIgMの発現を分析するために、細胞の大きさとヨウ化プロピジウム染色 (PI) とに基づいて生存細胞を選択した。 40

【0128】

[実施例1]

B細胞の抗原依存的最終分化は、脾臓およびリンパ節 (Kinoshita, K. & Honjo, T., Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. (2001) 2, 493-503; Honjo, T., Kinoshita, K. & Muramatsu, M., Annu. Rev. Immunol. (2002) 20, 165-196) のような二次リンパ様臓器内で起こる。抗Bach2抗体 (Oyake, T. et al., Mol. Cell. Biol. (1996) 16, 6083-6095) を用いて、本発明者らは、マウス脾臓におけるBach2の免疫組織化学分析を行った。Bach2は、辺縁洞発現粘膜指向細胞接着分子-1 (MadCAM-1、図2a) によって取り囲まれるリンパ様濾胞内のIgM陽性細胞において発現される。IgM陽性であって、MadCAM-1発現細胞の外側に存在する辺縁帯B細胞は、Bach2陰性であった。Bach2は、T細胞域内のCD3 ϵ -陽性T細胞には 50

検出されなかった。これらの結果は、リンパ様濾胞内の濾胞B細胞においてBach2の発現が高いことを示している。このような発現パターンは、抗体反応におけるBach2の役割を示唆している。この可能性を調べるために、本発明者らは、第一のコードエキソンをneo抵抗性遺伝子カセットに置換することによってマウスbach2^{-/-}遺伝子を破壊した(図1a)。適切にターゲティングした胚幹(ES)細胞クローン(図1b)を用いて、生殖細胞系を通して破壊された遺伝子座を持つ、キメラマウスを得た。bach2^{+/+}マウスを交配したところ、予想されたメンデルの発生率でbach2^{-/-}子孫が得られた。bach2^{-/-}子孫は、明白な異常を示さなかった。骨髄もしくはT細胞数、またはTER-119、Gr-1、Mac-1、CD4、およびCD8(データは示していない)を含むマーカーの細胞表面での発現に有意差を認めなかった。抗Bach2抗体による骨髄抽出物のイムノプロットティングでは、野生型マウスにおいてBach2を検出したが、bach2^{-/-}マウスでは検出しなかった(図1c)。Bach2の非存在下では、造血がほとんど影響を受けないことを確認した後、次に、本発明者らはB細胞の発達を詳細に調べた。骨髄細胞のフローサイトメトリー分析により、骨髄のプロB細胞(B220⁺、汎B細胞マーカー、およびCD43⁺)およびプレ-B細胞(B220⁺、CD43⁻、IgM⁻、およびIgD⁻)は、bach2^{-/-}マウスでは影響を受けないことが示された(図2bおよびc)。対照的に、bach2^{-/-}マウスの骨髄におけるB220^{high} IgM⁺再循環B細胞の数は、対照同腹子の30%未満であった。脾臓において、IgM^{high} IgD^{low}として特徴付けられる未熟なB細胞は、bach2^{-/-}マウスでは正常レベルで存在した。対照的に、成熟B細胞(B220⁺、IgM^{low}およびIgD⁺)は、bach2^{-/-}マウスにおいて有意に減少した(図2bおよびd)。bach2^{+/+}およびBach2^{-/-}マウスの脾臓の絶対数はそれぞれ、3.1×10⁸個±0.7および2.1×10⁸±0.4であった。bach2^{-/-}マウスでは、辺縁域B細胞の分化は濾胞B細胞より影響を受けなかった(図2e)。これらの結果は、抗原刺激が重要な役割を果たすB細胞発達のより後期の段階に、Bach2が関係することを示唆した。本発明者らはまた、脾臓の免疫組織化学分析も行った。野生型およびbach2欠損マウスからの脾臓において、IgM⁺B細胞は、MadCAM-1発現辺縁洞によって取り囲まれる濾胞を形成した(図2f)。これらの結果から、Bach2の非存在下ではリンパ様濾胞の形成が影響を受けないことが示された。

【0129】

[実施例2]

免疫グロブリン産生におけるBach2の役割を評価するために、アイソタイプ特異的酵素結合イムノソルベントアッセイ(ELISA、図3a)によって、血清中の免疫グロブリン濃度を測定した。IgMの量は、野生型マウスよりbach2^{-/-}マウスでは5倍高かった。対照的に、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、およびIgAの平均濃度は、野生型同腹子と比較してbach2^{-/-}マウスではそれぞれ、31%、5%、33%、4%および25%減少した。血清中の免疫グロブリンアイソタイプのこの変化パターンは、免疫不全に関連したハイパーIgM症候群のパターンと類似である(Durandy, A. & Honjo, T., Curr. Opin. Immunol. (2001) 13, 543-548)。

【0130】

Bach2がin vivoで抗原依存的液性免疫応答にとって必要であるか否かを調べるために、bach2^{-/-}マウスをT細胞非依存的抗原(DNP結合フィコール、DNP-フィコール)によって免疫した。免疫前のbach2^{-/-}マウスの血清は、おそらく交叉反応抗体レベルが高いために、対照マウスより高いレベルのNP-結合IgM抗体を含んだ(図3b)。DNP-フィコールによって免疫した後、DNP-結合IgM抗体は、野生型マウスにおいて増加したが、bach2^{-/-}マウスでは同様に高いレベルのままであった。bach2^{+/+}マウスは、特異的IgG3抗体反応が増加したが、bach^{-/-}マウスでは抗体反応は増加しなかった(図3b)。T細胞依存的抗原(NP結合ニワトリγ-グロブリン、NP-CGG)を免疫することによって、T細胞依存的抗体反応を調べた。bach2^{+/+}マウスは、IgG1の強い産生を示したが、bach2^{-/-}マウスは示さなかった(図3c)。これらの結果は併せて、Bach2がアイソタイプ特異的抗体のT細胞非依存的および依存的産生の双方にとって必須であることを示し、bach2^{-/-}マウスにおけるIgH遺伝子のCSRの欠損が原因となる可能性があることを示唆している。

【0131】

B細胞は体細胞超突然変異 (SHM) を受けて、末梢のリンパ様組織の胚中心 (GCs) において特異的抗原に対する高親和性抗体を産生する (Honjo, T., Kinoshita, K. & Muramatsu, M., *Annu. Rev. Immunol.* (2002) 20, 165–196 ; Papavasiliou, F. & Schatz, D., *Ce11* (2002) 109, S35–44)。本発明者らは、Bach2の欠損がSHMの効率に影響を及ぼすか否かを調べた。RNAsを、NP–CGG免疫Bach2^{-/-}マウスおよび野生型同腹子の間葉リンパ節 (MLN) から抽出して、cDNAを合成して、抗ニトロフェニルハプテンをコードする可変領域として十分に特徴が調べられているVH186.2エキソン配列を決定した (Allen, D., Simon, T., Sablitzky, F., Rajewsky, K. & Cumano, A., *EMBO J.* (1989) 7, 1995–2001 ; Jacob, J., Kelsoe, G., Rajewsky, K. & Weiss, U., *Nature* (1991) 354, 389–392)。野生型およびbach2^{-/-}細胞におけるヌクレオチド置換変異発生率はそれぞれ、 2.2×10^{-2} /bp (クローン18個をシーケンシングして、5238塩基中、置換体114個を認めた) および 1.2×10^{-3} /bp (クローン17個をシーケンシングして、4947塩基中、置換6個を認めた) であった。Bach2^{-/-}マウスでは、抗原結合にとって重要である相補性決定領域 (CDRs) にもいくつかの塩基置換を認めた (図3d)。これらの結果は、Bach2がCSRのみならず、SHMにとっても重要であることを明白に証明した。

【0132】

〔実施例3〕

bach2欠損がCSRに影響を及ぼすか否かを決定するために、本発明者らは、リポ多糖類 (LPS) およびサイトカインによって脾臓を処置することによってin vitroでの免疫グロブリン産生を調べた。培養培地中のIgGおよびIgAの濃度は、bach2^{-/-}細胞では野生型細胞より有意に低かった (図4a)。対照的に、bach2^{-/-}脾細胞は対照細胞と比較して比較的正常レベルのIgM分泌を示し、Bach2が抗体産生全般にとって必要である可能性は排除された。これらの結果は、Bach2欠損マウスにおける血清アイソタイプ免疫グロブリン濃度の減少と一致し、Bach2が、IgMプラズマ細胞の発達にとっては重要ではないが、クラススイッチしたプラズマ細胞の発達にとって重要であることを示している。

【0133】

CSRの開始時に、BCRとサイトカインシグナルの組み合わせが、IgH定常領域 (C_H) 遺伝子転写物 (生殖系列IgH定常領域遺伝子転写物、GLT) の特定のクラスを誘導することによって、CSRの特異性を決定する。CSRの完了後、介在 μ (I μ) とスイッチされたC_H エキシソンのそれぞれとを含むスイッチ後転写物 (PST) が発現される。このように、PSTは、スイッチされた座であることの証明である (Snapper, C., Marcu, K. & Zelazowski, P., *Immunity* (1997) 6, 217–223 ; Kinoshita, K. & Honjo, T., *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* (2001) 2, 493–503 ; Manis, J., Tian, M. & Alt, F., *Trends. Immunol.* (2002) 23, 31–39 ; Honjo, T., Kinoshita, K. & Muramatsu, M., *Annu. Rev. Immunol.* (2002) 20, 165–196)。Bach2を必要とするCSRの段階を決定するために、本発明者らは、LPSおよびサイトカインによって刺激したB細胞におけるGLTおよびPSTをRT–PCRによって調べた。2日間培養した後、bach2^{-/-} B細胞における γ 2b、 γ 3、および α GLTsレベルは、野生型B細胞のレベルと同等であった (図4b)。対照的に、 γ 1 GLTは、bach2^{-/-} B細胞において減少した。このように、スイッチ領域のクロマチンの活性化は、 γ 1 GLTを除き、Bach2の非存在下ではほとんど影響を受けない。Bach2は、IgH遺伝子の3'座制御領域に結合するため (Muto, A. et al., *EMBO J.* (1998) 17, 5734–5743)、 γ 1 GLTの発現の変化は、 γ 1 GLT発現にとって特に必要であるエンハンサー機能の欠損による可能性がある (Pinaud, E. et al., *Immunity* (2001) 15, 187–99)。GLTとは対照的に、PSTsは、bach2^{-/-} B細胞において重度に減少した (図4c)。これらの結果は、bach2欠損が、スイッチ領域の切断および/またはライゲーションに共通の異常を引き起こしたことを示している。細胞増殖は、CSRにとって前もって必要であるために、bach2^{-/-} B細胞の増殖活性は、脾臓から精製したB220⁺ B細胞のBrdU取り込みを測定することによって評価した。上記の実験においてプラズマ細胞を誘導するために用いられるLPSに対する反応は、bach2^{-/-} 脾臓B細胞と野生型脾臓B細胞とを区別できなかった (図4d)。これらの結果は、in vitroで

の抗体クラススイッチについて認められた欠損が、Bach2-欠損B細胞におけるLPSに対する反応性の欠如によるものではないことの確証となる。

【0134】

[実施例4]

最も単純なモデルにおいて、Bach2は、CSRおよびSHMに関係する遺伝子の発現を調節する可能性がある。この可能性を、プラズマ細胞の発達に関係する遺伝子の発現を比較することによって調べた。LPSによって刺激した脾臓B細胞を用いて、本発明者らは、B細胞のプラズマ細胞への最終分化を促進することが報告されている転写因子の正常な誘導を観察し (XBP-1 (Reimold, A. et al., Nature (2001) 412, 300-307)、Blimp-1 (Shaffer, A. et al., Immunity (2002) 17, 51-62)、およびIRF-4 (Mittrucker, H. et al., Science (1997) 275, 540-543)、図4e)、Bach2がこれらの因子とは無関係にプラズマ細胞の発達を調節することを示唆している。本発明者らはまた、胚中心の形成にとって必要な遺伝子 (BCL-6 (Ye, B. et al., Nat. Genet. (1997) 16, 161-170) およびOCA-B (Schubart, D., Rolink, A., Kosco-Vilbois, M., Botteri, F. & Matthias, P., Nature (1996) 383, 538-542; Kim, U. et al., Nature (1996) 383, 542-547)) の発現がbach2^{-/-} B細胞において影響を受けなかったことを認めた。Pax-5 (Barberis, A., Widenhorn, K., Vitelli, L. & Busslinger, M., Genes. Dev. (1990) 4, 849-859)、c-Myc (Lin, Y., Wong, K. & Calame, K., Science (1997) 276, 596-599)、およびc-Fos (Monroe, J., J. Immunol. (1988) 140, 1454-1460) は通常、B細胞の最終分化の際にダウンレギュレートされる。その発現は野生型およびbach2^{-/-} の双方において減少した。このように、本発明者らは、プラズマ細胞の発達に関連した転写因子遺伝子の発現パターンに如何なる大きな変化も認めなかった。これとは著しく対比して、SHMとCSR (Muramatsu, M. et al., Cell (2000) 102, 553-563) の双方にとって必要なAIDの発現は、bach2^{-/-} B細胞において重度に減少した (図4e)。SHMおよびCSRにおけるこの十分に特徴が調べられた重要な役割を考慮すると、このbach2欠損B細胞において認められた欠陥は、少なくとも部分的にAID発現の減少に直接帰因しうる。bach2はAIDに対して上位であるが、bach2がAIDを直接調節するか否かがわかっていない。bach2^{-/-} マウスにおける血清中の残存IgGおよびIgAは、CSRのBach2-非依存的調節の存在による可能性がある。Bach1 (Oyake, T. et al., Mol. Cell. Biol. (1996) 16, 6083-6095; Sun, J. et al., EMBO J. (2002) 21, 5216-5224) はB細胞において発現されることから、Bach2の代用となる可能性がある (図4e)。

【0135】

Bach2がCSRおよびSHMにとって重要であることが判明した後、本発明者らは、Bach2がCSRとSHMを実行するための生化学的スイッチの一部である可能性があるという仮説を立てた。Bach2は、核の排出物質Crm1/エクスポーチン1 (Hoshino, H. et al., J. Biol. Chem. (2000) 275, 15370-15376; Muto, A. et al., J. Biol. Chem. (2002) 277, 20724-20733) に依存した核からの排出によって調節されるため、本発明者らは、LPS-誘導プラズマ細胞におけるBach2の細胞内局在をBach2の染色によって調べた。プラズマ細胞は、IgMまたはIgGが細胞質で強く染色されることによって同定された。図5aおよびbに示すように、IgGプラズマ細胞は、Bach2の核または広い範囲 (すなわち、核と細胞質) での染色を示した。対照的に、IgMプラズマ細胞の有意な部分は、Bach2の細胞質局在のみを示した。これらの結果から、IgMプラズマ細胞の発達の際にはBach2の不活化が重要であるという興味深い可能性が示された。Bach2がIgMプラズマ細胞の分化に対して阻害的であるか否かを調べるために、本発明者らは、レトロウイルスベクターを用いて脾臓のB細胞においてBach2またはBach2ΔC2を過剰発現させて、IgMプラズマ細胞の産生に及ぼすその影響を調べた。Bach2ΔC2は、核排出シグナルを欠損し、このため核に蓄積する (Hoshino, H. et al., J. Biol. Chem. (2000) 275, 15370-15376、データは示していない)。図5cに示すように、Bach2またはBach2ΔC2が過剰発現されると、IgM発現細胞数は減少した。初期の遺伝子知見と併せると、これらの結果は、Bach2がIgMと非IgMプラズマ細胞の分岐に関係することを示唆している。

【0136】

プラズマ細胞の分化は、非可逆的なCSRがプラズマ細胞のサブセットに限って選択されることから、造血細胞における系列選択に関して繰り返し疑問を提起する。系列選択に関する研究から、転写因子が個々の系列をプログラムすることが示唆されている。本発明者らの結果は、Bach2が非IgMプラズマ細胞にとって重要な転写因子の一つであるが、IgMプラズマ細胞の産生にとっては重要ではなく阻害的でさえあることを示唆している。さらに、Bach2の細胞内局在は、IgMと非IgMプラズマ細胞の分岐に関する分子メカニズムを提供するように思われる。本発明者らは、細胞質隔離によってBach2を阻害するとIgMプラズマ細胞への分化が可能となるが、核Bach2は、CSRを支持することによって非IgMプラズマ細胞への分化を促進するというモデルを示唆する。CSR特異性の調節（すなわち、CSRに関して選択するためのC領域エクソン）がさらに、Bach2によって導かれる基礎CSRプログラムの上に重ねられる可能性がある。Bach2は、IgMおよび非IgMプラズマ細胞の双方にとって必要なXBP-1のような既知のプラズマ細胞転写因子とは対比をなす (Reimold, A. et al., Nature (2001) 412, 300-307)。併せて考慮すると、本発明者らの知見は、Bach2がこれまで未知の抗体反応の調節物質であることを証明する。B細胞におけるBach2の活性を調節するシグナル伝達カスケードが理解されれば、B細胞活性化と抗体反応のあいだの新しい分子関連を明らかにすることができるであろう。

【0137】

[実施例5]

bach2遺伝子ノックアウトマウスおよび同腹野生型マウスをSPF条件下自由給餌下で飼育した。bach2遺伝子ノックアウトマウスは出生後、野生型マウスと同様の成長を示した。しかし、生後4か月前後より下痢が認められるようになり、体重低下も観察された。

【0138】

さらにbach2遺伝子ノックアウトマウスの大腸をホルマリン固定し、薄切後にHE染色を行った。大腸の組織像を検討した結果、炎症性細胞の浸潤、クリプトアブセス、粘膜肥厚、絨毛構造の破壊など、典型的な炎症性腸疾患の像を認めた(図6)。この結果は、bach2遺伝子ノックアウトマウスが炎症性腸疾患を発症すること、また、粘膜機能の維持や粘膜免疫にBach2が重要な役割を担っていることを示す。単純な仮説としては、bach2遺伝子ノックアウトマウスにおける炎症性腸疾患はBリンパ球の機能不全に由来すると考えられるが、腸管上皮細胞自体においてもBach2が機能している可能性もある。

【0139】

[実施例6]

Bach-2 KOマウス、Balb/cマウス3匹ずつにヒトIL-6 (鎌倉テクノサイエンス KTS102L) を抗原として初回はcomplete freund adjuvant (DIFCO 231131)とともに40 μ g/mouseを、2回目以降はincomplete freund adjuvant (DIFCO 263910)とともに20 μ g/mouseをそれぞれi.p.投与し免疫を行った。血清抗体価が上昇したことを確認した後、最終免疫として抗原を20 μ g/mouseでi.p.投与した。最終免疫の3日後に脾臓を摘出し脾臓細胞を調整した後PEG1500 (ロシュダイアグノスティクス 783 641)を用いてP3U1細胞とfusionを行い、Bach-2 KOマウス、Balb/cマウスそれぞれのマウスから1320 wellの融合細胞を得た。

【0140】

fusion当日をDay 0としてDay 1,2,3,5にHAT培地への培地交換を行い、HAT培地によるハイブリドーマの選別を行った。Day 8に培養上清を回収しELISAによる結合活性測定を行った。

【0141】

結合活性測定はヒトIL-6 (鎌倉テクノサイエンス KTS102L)を抗原としたELISAにより2次抗体に抗マウスIgG抗体あるいは抗マウスIgM抗体を用いて行った。ヒトIL-6はcoating buffer (100 mmol/L NaHCO₃ pH9.6, 0.02 w/v% NaN₃) で1 μ g/mLの濃度に希釈した後、ELISA用96 well プレート (Nunc, Maxisorp) に100 μ L/wellずつ分注し4 $^{\circ}$ Cにて一晩静置し固相化した。プレートをmicro plate washer (Bio-Rad, Model 1550) を用いてrinse buffer (PBS(-), 0.05% Tween 20) で洗浄し、diluent buffer (1/5希釈したBlocking One、

ナカライテスク 03953-95)を200 μ L/well添加し4℃にて一晩静置しブロッキングした。Diluent bufferを除いた後、ハイブリドーマ培養上清をdiluent bufferにて1/4希釈しブロッキングしたELISAプレート2枚に100 μ L/wellずつ添加し室温で1時間反応させた。プレートをrinse bufferで洗浄し、1枚にはhorse radish peroxidase (HRP)標識抗マウスIgG抗体 (Southern Biotechnology Associates 103005)を、もう1枚にはHRP標識抗マウスIgM抗体 (Zymed 626820)を100 μ L/wellずつ添加し室温で1時間放置した。プレートをrinse bufferで洗浄し、ABTS peroxidase基質 (KPL 50-62-01)を100 μ L/well添加し、20分後にABTS peroxidase stop溶液 (KPL 50-85-01)にて反応を停止後microplate reader (Bio-Rad Model 3550)でOD 595 nmを測定した。吸光度で0.5以上を示したwellを陽性と判断した。

10

【0142】

吸光度0.5以上の陽性wellのうちIgMの割合はBalb/cマウスでは10%であったのに対しBach-2 KOマウスでは67%であった。本実施例はBach-2 KOマウスを用いてIgM、または/および、IgM産生ハイブリドーマを高頻度で作成する事が可能であることを示している。

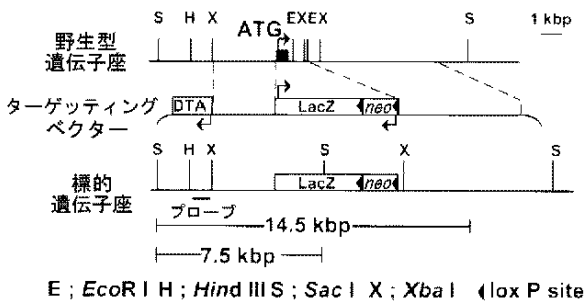
【産業上の利用可能性】

【0143】

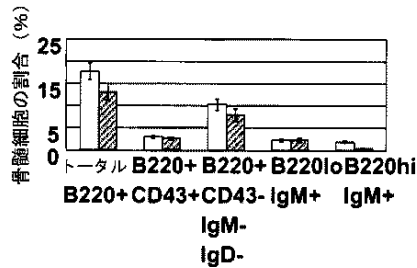
本発明の産業上の有用性の第一点は、本発明の非ヒト動物を利用した抗体または該抗体を含む抗血清の製造方法を提供できる点にある。第二点は炎症性腸疾患およびハイパーIgM症候群の治療または予防のための薬剤、またIgMを増加させるための薬剤を提供できる点にある。第三点は、これら薬剤のスクリーニング系を提供できる点にある。第四点は、bach2遺伝子またはタンパク質の発現量測定により上記疾患の検査方法や検査薬を提供できる点にある。

20

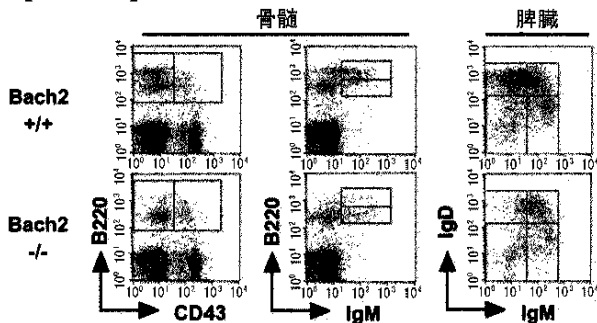
【図1a】



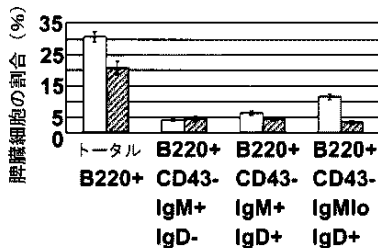
【図2c】



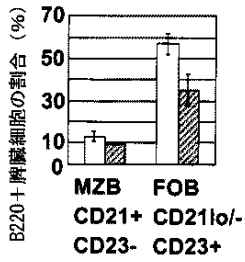
【図2b】



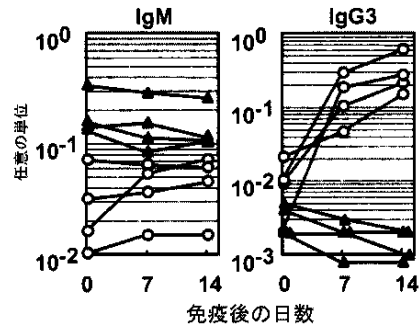
【図2d】



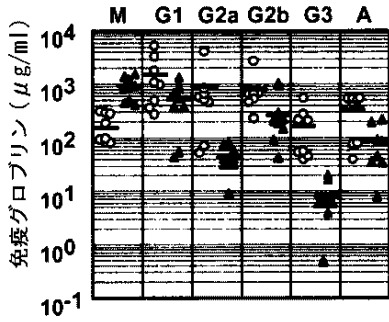
【図 2 e】



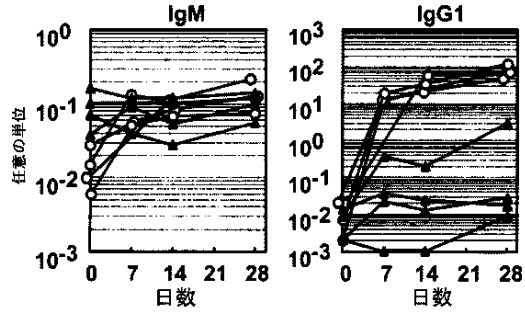
【図 3 b】



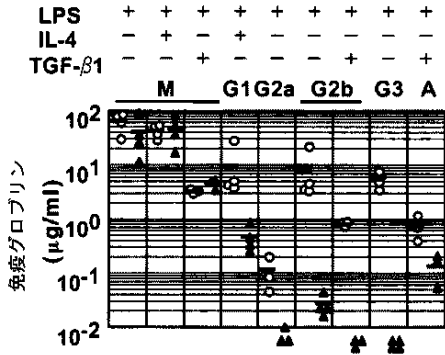
【図 3 a】



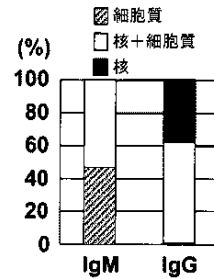
【図 3 c】



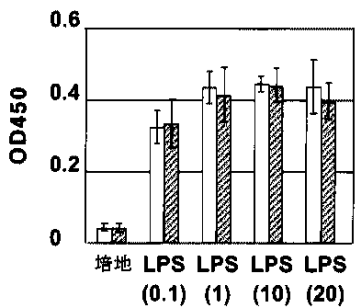
【図 4 a】



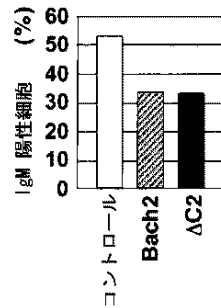
【図 5 b】



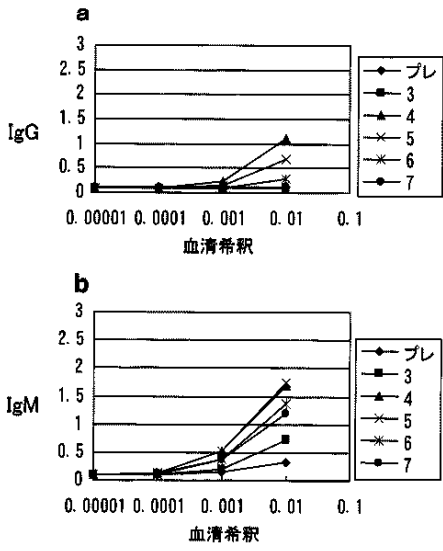
【図 4 d】



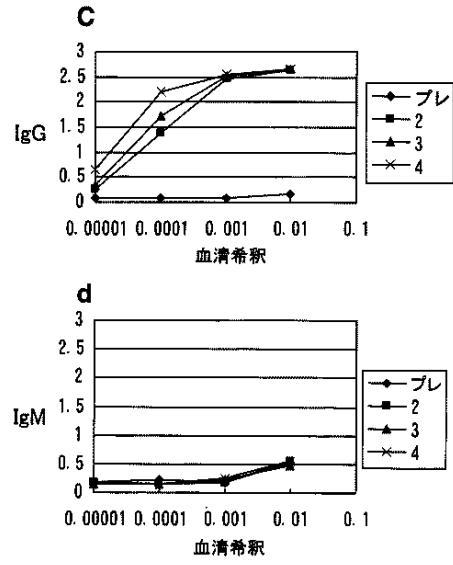
【図 5 c】



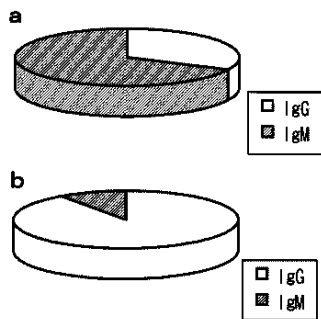
【図 7 a b】



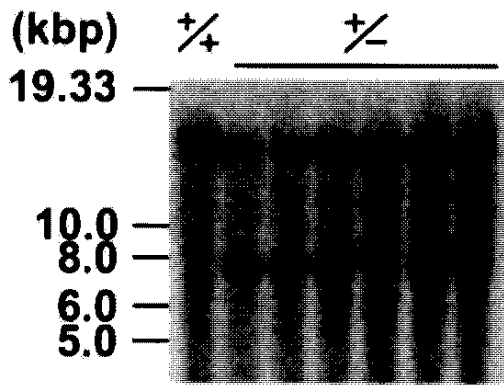
【図 7 c d】



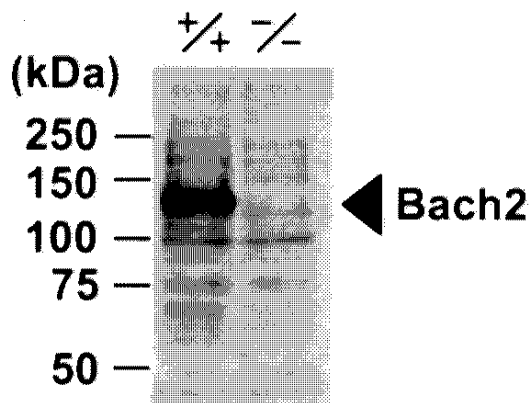
【図 8】



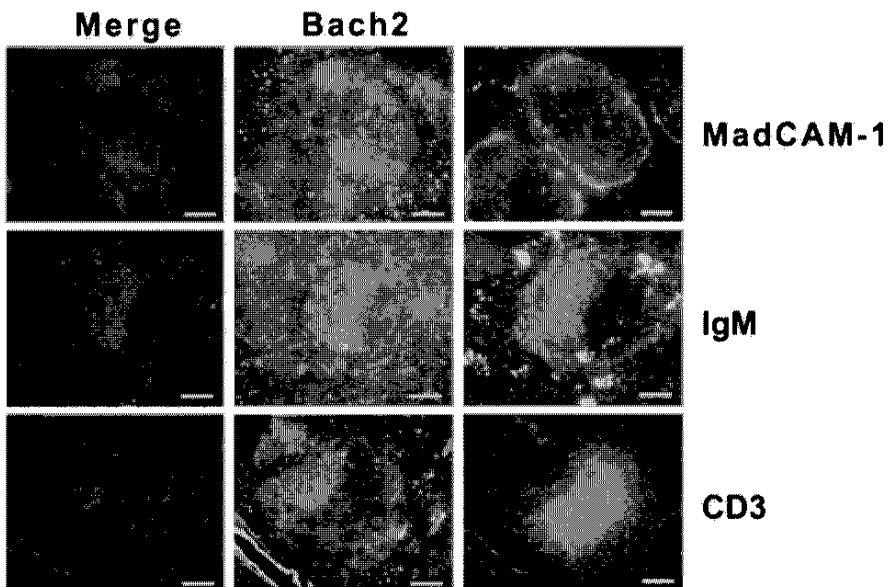
【図 1 b】



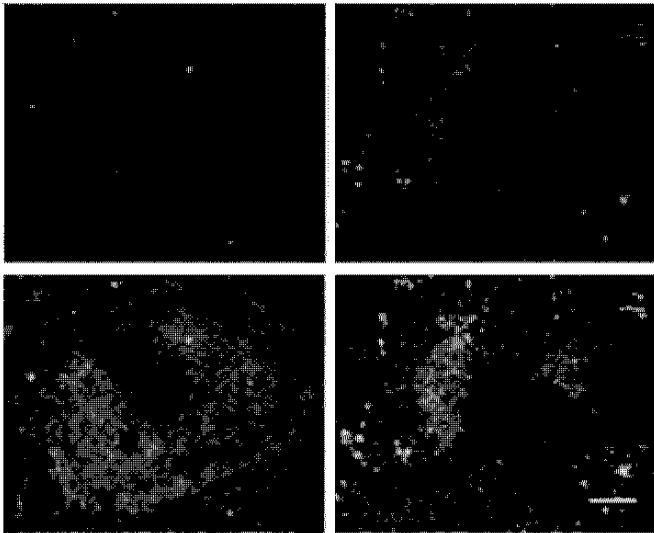
【図 1 c】



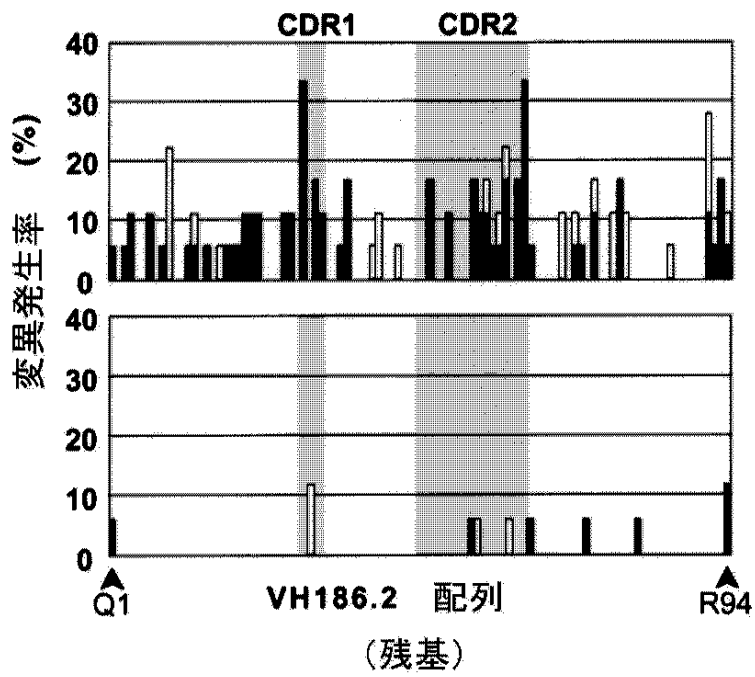
【図 2 a】



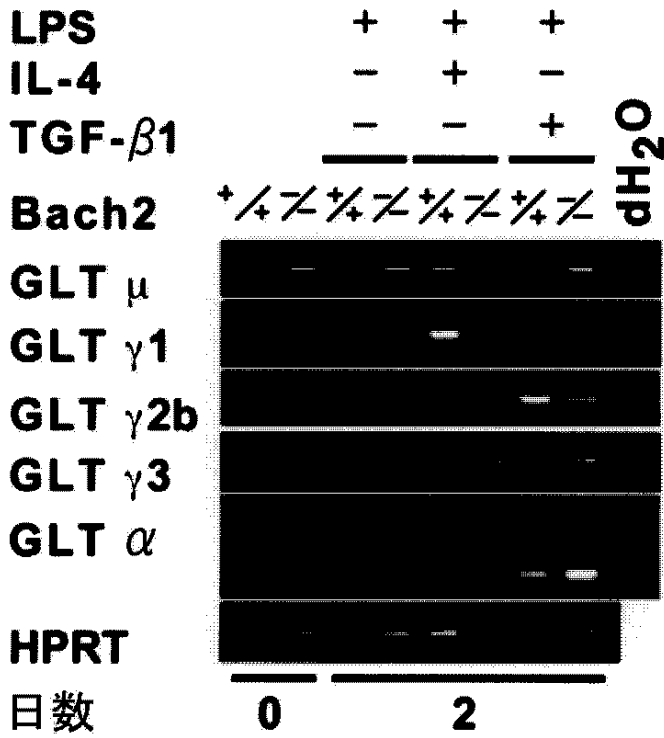
【図 2 f】



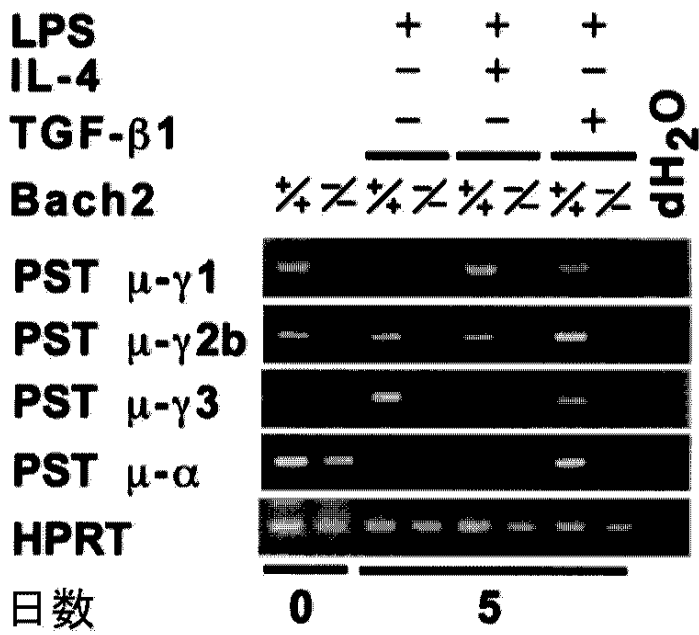
【図 3 d】



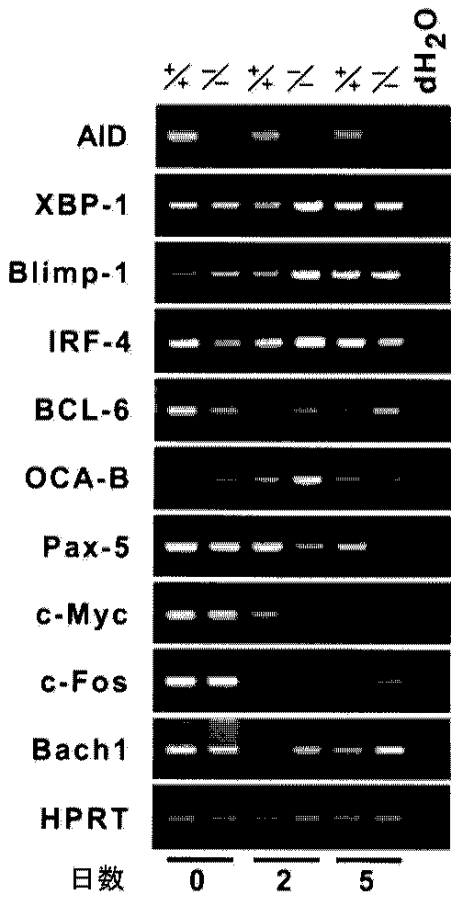
【図 4 b】



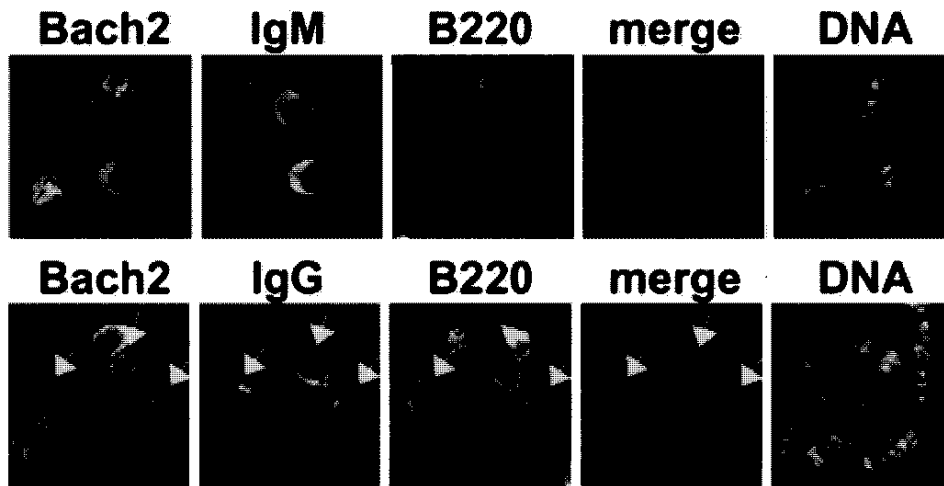
【図 4 c】



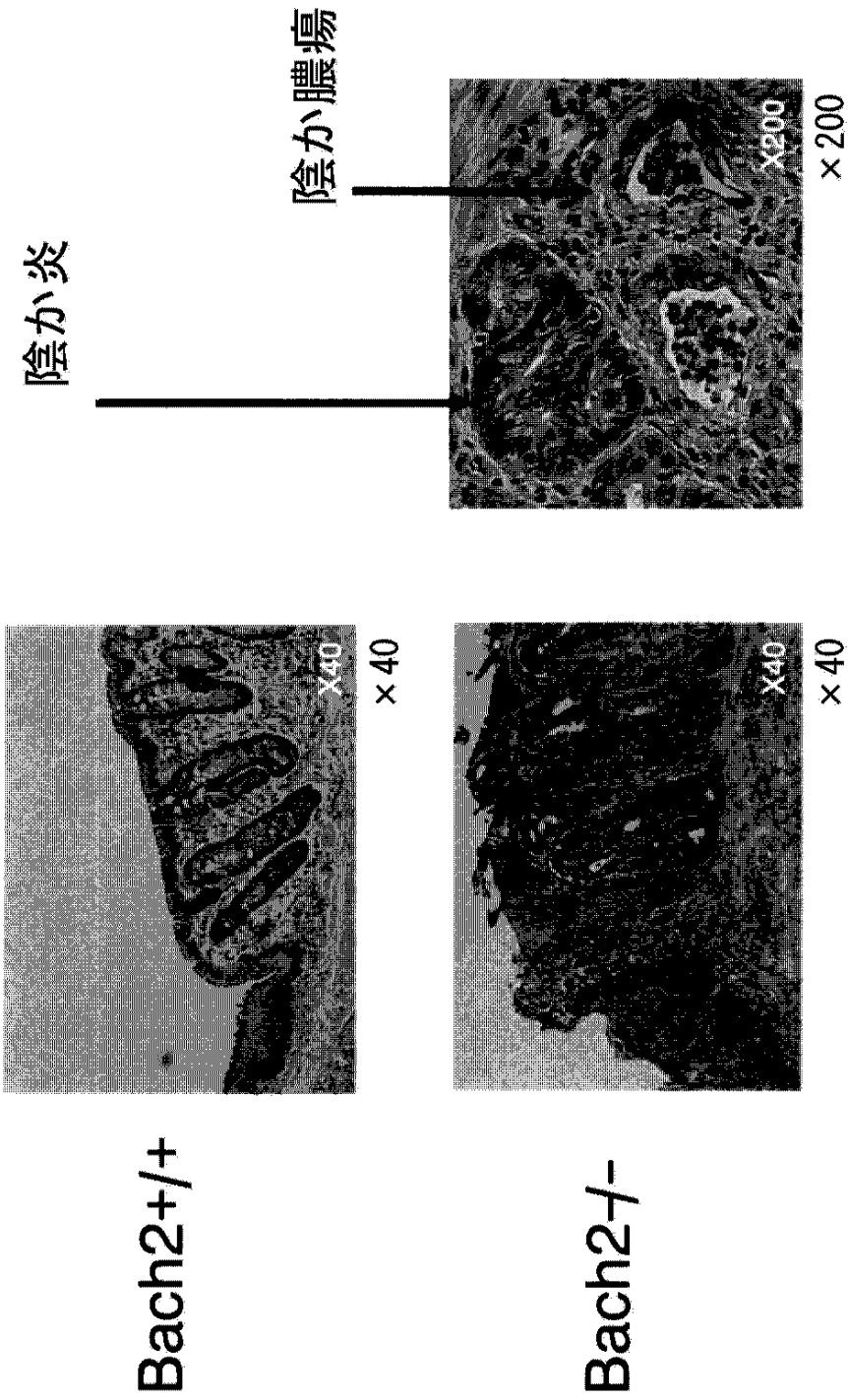
【図 4 e】



【図 5 a】



【図6】



【配列表】
2005110433000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2005/008928
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ A61K31/711, A01K67/027, A61K48/00, A61P1/04, 43/00, C07K16/00, C12N5/10, C12Q1/68, G01N33/15, 33/50 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) Int.Cl. ⁷ A61K31/711, A01K67/027, A61K48/00, C07K16/00, C12N5/10, C12Q1/68, G01N33/15, 33/50 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) MEDLINE (STN), JSTPlus (JOIS), BIOSIS (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SASAKI S. et al., Cloning and expression of human B cell-specific transcription factor BACH2 mapped to chromosome 6p15., Oncogene, 2000, Vol.19, pages 3739 to 3749	1-24
A	HOSHINO H. et al., Oxidative stress abolished leptomycin B-sensitizing nuclear export of transcription repressor Bach2 that counteracts activation of Maf recognition element., J. Biol.Chem., 2000, Vol.275, No.20, pages 15370 to 15376	1-24
A	KOBAYASHI, A. et al., A combinatorial code for gene expression generated by transcription factor Bach2 and MAZR (MAZ-Related Factor) through the BTB/POZ domain., Mol.Cell.Biol., 2000, Vol.20, No.5, pages 1733 to 1746	1-24
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 August, 2005 (08.08.05)		Date of mailing of the international search report 23 August, 2005 (23.08.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008928

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OYAKE T., et al., Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site., Mol.Cell.Biol., 1996, Vol.16, No.11, pages 6083 to 6095	1-24

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/008928	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ A61K31/711, A01K67/027, A61K48/00, A61P1/04, 43/00, C07K16/00, C12N5/10, C12Q1/68, G01N33/15, 33/50			
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. ⁷ A61K31/711, A01K67/027, A61K48/00, C07K16/00, C12N5/10, C12Q1/68, G01N33/15, 33/50			
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			
国際調査で利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) MEDLINE (STN), JSTPlus (JOIS), BIOSIS (DIALOG)			
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	
A	SASAKI S. ET AL, Cloning and expression of human B cell-specific transcription factor <i>BACH2</i> mapped to chromosome 6p15., <i>Oncogene</i> , 2000, Vol.19, p.3739-3749	1-24	
A	HOSHINO H. ET AL, Oxidative stress abolished leptomycin B-sensitized nuclear export of transcription repressor Bach2 that counteracts activation of Maf recognition element., <i>J. Biol. Chem.</i> , 2000, Vol.275, No.20, p.15370-15376	1-24	
A	KOBAYASHI A., A combinatorial code for gene expression generated by transcription factor Bach2 and MAZR (MAZ-Related Factor) through the BTB/POZ domain., <i>Mol. Cell. Biol.</i> , 2000, Vol.20, No.5, p.1733-1746	1-24	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「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 「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 「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) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日の後に公表された文献 「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 「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 「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 「&」 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 08.08.2005		国際調査報告の発送日 23.8.2005	
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) 内藤 伸一	4B 3534
		電話番号 03-3581-1101	内線 3448

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2005/008928

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	OYAKE T., ET AL, Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site., Mol. Cell. Biol., 1996, Vol.16, No.11, p.6083-6095	1-24

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00		4 C 0 8 5
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06		4 C 0 8 6
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	X	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	B	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02		
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	A	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D	
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z	

(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,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,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 五十嵐 和彦

宮城県仙台市青葉区国見ヶ丘 1-34-12

(72)発明者 武藤 哲彦

宮城県仙台市青葉区三条町 14-2-46

(72)発明者 山本 雅之

茨城県つくば市竹園 3丁目 35-10

Fターム(参考) 2G045 AA40 DA12 DA13 DA14 DA36 FB03
 4B024 AA01 AA11 BA61 BA80 CA04 CA05 CA06 CA09 DA02 DA06
 DA12 EA03 EA04 EA10 FA02 FA07 FA10 GA01 GA11 GA18
 GA19 HA08 HA12 HA14
 4B063 QA01 QA17 QA18 QA19 QQ20 QQ42 QQ53 QR08 QR32 QR33
 QR36 QR42 QR55 QR59 QR62 QR66 QR69 QR75 QR76 QR77
 QR82 QS05 QS12 QS16 QS24 QS25 QS28 QS34 QS36 QX02
 4B065 AA91X AA91Y AB01 AB05 AC14 AC20 BA01 BA24 CA24 CA44
 CA46
 4C084 AA02 AA03 AA06 AA13 AA17 BA01 BA02 BA44 BA50 CA21
 CA23 CA36 CA53 DA39 MA17 MA23 MA66 NA14 ZA662 ZB052
 ZB082 ZB112
 4C085 AA12 AA13 AA34 BB17 BB37 CC04 CC05 CC13 CC21 CC22
 DD62 EE01
 4C086 AA01 AA02 AA04 EA16 NA14 ZA66 ZB05 ZB09 ZB11

(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)	非人类动物，人工抑制Bach2的表达及其使用		
公开(公告)号	JPWO2005110433A1	公开(公告)日	2008-03-21
申请号	JP2006513597	申请日	2005-05-17
[标]申请(专利权)人(译)	山本正幸		
申请(专利权)人(译)	五十嵐和彦 武藤哲彦 山本正幸		
[标]发明人	五十嵐和彦 武藤哲彦 山本雅之		
发明人	五十嵐 和彦 武藤 哲彦 山本 雅之		
IPC分类号	A01K67/027 A61K48/00 A61K38/00 A61K31/7088 A61P1/00 A61P29/00 A61P37/06 A61K39/395 C12N15/09 C12N5/10 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/15 A61K31/711 C07K16 /00 G01N33/68		
CPC分类号	A01K67/0276 A01K2217/075 A01K2227/105 A01K2267/01 A01K2267/03 A61P1/00 A61P29/00 G01N33/5032 G01N33/6893 G01N2800/065		
FI分类号	A01K67/027.ZNA A61K48/00 A61K37/02 A61K31/7088 A61P1/00 A61P29/00 A61P37/06 A61K39/395. X C12N15/00.A C12N5/00.B C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/15.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024 /AA11 4B024/BA61 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA12 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/EA10 4B024/FA02 4B024/FA07 4B024 /FA10 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA17 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063 /QR08 4B063/QR32 4B063/QR33 4B063/QR36 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR59 4B063/QR62 4B063/QR66 4B063/QR69 4B063/QR75 4B063/QR76 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS05 4B063 /QS12 4B063/QS16 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B065/AA91X 4B065/AA91Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA01 4B065 /BA24 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA44 4C084/BA50 4C084/CA21 4C084/CA23 4C084 /CA36 4C084/CA53 4C084/DA39 4C084/MA17 4C084/MA23 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA662 4C084/ZB052 4C084/ZB082 4C084/ZB112 4C085/AA12 4C085/AA13 4C085/AA34 4C085/BB17 4C085 /BB37 4C085/CC04 4C085/CC05 4C085/CC13 4C085/CC21 4C085/CC22 4C085/DD62 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/NA14 4C086/ZA66 4C086/ZB05 4C086 /ZB09 4C086/ZB11		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	2004146863 2004-05-17 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

制备并分析bach2基因敲除小鼠。结果发现，bach2基因敲除小鼠产生炎症性肠病和高IgM综合征，其中，血清中IgM的量比不具有人工抑制的bach2基因表达的对照组增加。

【図 2 b】

