

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-304365

(P2005-304365A)

(43) 公開日 平成17年11月4日(2005.11.4)

| (51) Int. Cl. <sup>7</sup> | F I                                | テーマコード (参考) |
|----------------------------|------------------------------------|-------------|
| AO1K 67/027                | AO1K 67/027                        | 2G045       |
| C12N 15/09                 | C12Q 1/02                          | 4B024       |
| C12Q 1/02                  | GO1N 33/15                         | 4B063       |
| GO1N 33/15                 | GO1N 33/50                         |             |
| GO1N 33/50                 | GO1N 33/53                         |             |
|                            |                                    |             |
|                            | 審査請求 有 請求項の数 7 O L (全 25 頁) 最終頁に続く |             |

|           |                              |           |  |
|-----------|------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2004-124758 (P2004-124758) | (71) 出願人  | 503360115<br>独立行政法人科学技術振興機構<br>埼玉県川口市本町4丁目1番8号   |
| (22) 出願日  | 平成16年4月20日(2004.4.20)        | (74) 代理人  | 100107984<br>弁理士 廣田 雅紀   |
|           |                              | (72) 発明者  | 審良 静男<br>大阪府高槻市辻子1-7-16  |
|           |                              | (72) 発明者  | 山本 雅裕<br>大阪府箕面市小野原東<br>4-19-36-2   |
|           |                              |           | O 5  |
|           |                              | F ターム(参考) | 2G045 AA29 AA40 BA11 BB50 CB01<br>4B024 AA11 CA04 CA05 CA06 CA12<br>DA02 FA10 GA18 HA08 HA14 |
|           |                              |           | 最終頁に続く   |

(54) 【発明の名称】 TLRリガンド及びIL-1応答障害性モデル動物

## (57) 【要約】

【課題】 TLRリガンド/IL-1に応答するIL-6の産生が障害されているTLRリガンド/IL-1応答傷害性モデル非ヒト動物や、かかる非ヒト動物を利用した、TLRリガンド/IL-1に対する応答の促進物質又は抑制物質や、アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変の予防・治療薬のスクリーニング方法を提供すること。

【解決手段】 I B - をコードする非ヒト動物の内在性遺伝子の全部又は一部が破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性化され、I B - を発現する機能を喪失し、TLRリガンド及びIL-1に応答するIL-6の産生が障害されている、TLRリガンド/IL-1不応答性モデル非ヒト動物を作出する。また、かかる非ヒト動物と被検物質を用いて、TLRリガンド/IL-1に対する応答の促進物質又は抑制物質や、アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変の予防・治療薬をスクリーニングする。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

I B - をコードする非ヒト動物の内在性遺伝子の全部又は一部が破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性化され、I B - を発現する機能を喪失し、TLRリガンド及びIL - 1に应答するIL - 6の産生が障害されていることを特徴とするTLRリガンド及びIL - 1不応答性モデル非ヒト動物。

## 【請求項 2】

TLRリガンドが、LPS、BLP、PGN、MALP - 2、R - 848又はCpGDNAであることを特徴とする請求項 1 記載のTLRリガンド及びIL - 1不応答性モデル非ヒト動物。

10

## 【請求項 3】

アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変を呈することを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のTLRリガンド及びIL - 1不応答性モデル非ヒト動物。

## 【請求項 4】

非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか記載のTLRリガンド及びIL - 1不応答性モデル非ヒト動物。

## 【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の非ヒト動物と、被検物質と、TLRリガンド若しくはIL - 1又はこれらの含有物とを用いて、前記非ヒト動物におけるTLRリガンド若しくはIL - 1又はこれらの含有物に应答するIL - 6の産生の程度を測定・評価することを特徴とするTLRリガンド若しくはIL - 1又はこれらの含有物に対する应答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

20

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 4 のいずれか記載の非ヒト動物に由来する免疫細胞と、被検物質と、TLRリガンド若しくはIL - 1又はこれらの含有物とを用いて、前記免疫細胞におけるTLRリガンド若しくはIL - 1又はこれらの含有物に应答するIL - 6の産生の程度を測定・評価することを特徴とするTLRリガンド若しくはIL - 1又はこれらの含有物に対する应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 7】

請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の非ヒト動物に被検物質を投与し、前記非ヒト動物におけるアトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変の程度を測定・評価することを特徴とするアトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変の予防・治療薬のスクリーニング方法。

30

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、I B - 遺伝子がロックアウトされたToll様受容体(TLR)に対するリガンド(TLRリガンド)及びインターロイキン - 1(IL - 1)应答障害性モデル非ヒト動物や、かかるモデル非ヒト動物を用いたTLRリガンド又はIL - 1に対する应答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法等に関する。

40

## 【背景技術】

## 【0002】

自然免疫系は、細菌やウイルスなどの病原体の侵入を感知しそれを排除する生体防御システムである。自然免疫系がひとたび微生物の存在を感知すると炎症性サイトカインを産生し、生体内で炎症を引き起こす。それと同時に、T細胞やB細胞といったリンパ球の活性化を誘導し侵入してきた微生物に対する感染防御機構を成立させる。この自然免疫系における微生物の認識に関与している受容体としてTLRファミリーが知られている。このTLRファミリーや、TLRファミリーの細胞内ドメインと相同な細胞内領域を有する炎症性インターロイキン - 1受容体(IL - 1R)ファミリーメンバーを刺激すると、転写因子NF - BやAP - 1などを活性化し、TNF - , IL - 6やIL - 12p40と

50

いった炎症性サイトカインなど多数のタンパク質の発現を誘導することが知られている。

【0003】

かかる免疫応答に関係ある遺伝子の1つにI B - (MAIL及びINAPとしても知られる)と呼ばれる核タンパク質がある(例えば、非特許文献1~6参照)。I B - は、そのC末端部位にアンキリンリピートを有する核タンパク質であり、I BファミリーメンバーであるBcl-3と高い相同性を示す(例えば、非特許文献4~6参照)。インビトロでの研究の結果、I B - の異所性発現によりNF- B応答性レポーターの活性が抑制されるが、このことから、I B - がNF- Bに対する負の制御因子として機能することが示唆されている(例えば、非特許文献4参照)。一方、I B - の過剰発現により、線維芽細胞においてLPSに誘導されるIL-6産生が促進され、IL-6産生におけるI B - の正の効果を示唆されたとの報告もある(例えば、非特許文献5参照)。従って、I B - の機能が潜在的な共活性化分子又は共抑制化因子であるかどうかについては今後の検討が必要である。IL-1又はLPSによる刺激は、マクロファージ細胞株及び線維芽細胞においてI B - を誘導することが明らかになっている。IL-1Rと、LPSの受容体であるTLR4は、細胞内シグナル伝達経路を共有することも知られている(例えば、非特許文献1~3参照)。

10

【0004】

TLR及びIL-1Rシグナル伝達経路はアダプタータンパク質のMyD88を利用して下流へとシグナルを送り、その結果、Cox-2を含む炎症関連因子が発現される(例えば、非特許文献7~9参照)。MyD88依存性経路に加え、TLR3及びTLR4シグナル伝達経路にはMyD88非依存性経路があり、このMyD88非依存性経路はインターフェロンI型(IFN)や、IP-10などのIFN誘導性遺伝子の発現を誘導する(例えば、非特許文献10~12参照)。また、炎症性サイトカイン産生に關与するTLR/IL-1Rを介したMyD88依存性経路は、NF- B及びマイトジェン活性化タンパク質(MAP)キナーゼを活性化することが知られている(例えば、非特許文献13~15参照)。

20

【0005】

【非特許文献1】Annu. Rev. Immunol. 21, 335-376 (2003)

【非特許文献2】Annu. Rev. Immunol. 20, 197-216 (2002)

【非特許文献3】Curr Opin Pharmacol. 3, 396-403 (2003)

【非特許文献4】J Biol Chem. 276, 27657-27662 (2001)

【非特許文献5】FEBS Lett. 485, 53-56 (2000)

【非特許文献6】J Biol Chem. 276, 12485-12488 (2001)

【非特許文献7】Science. 278, 1612-1615 (1997)

【非特許文献8】Immunity. 7, 837-847 (1997)

【非特許文献9】Mol Cell. 2, 253-258 (1998)

【非特許文献10】Nature. 413, 732-738 (2001)

【非特許文献11】J Immunol. 167, 5887-5894 (2001)

【非特許文献12】Immunity. 17, 251-63 (2002)

【非特許文献13】Cell. 109 Suppl, S81-96 (2002)

【非特許文献14】J Endotoxin Res. 6, 453-457 (2000)

【非特許文献15】Mol Cell. 11, 293-302 (2003)

30

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の課題は、TLRリガンド及びIL-1に応答するIL-6の産生が障害されているTLRリガンド及びIL-1応答障害性モデル非ヒト動物や、かかるTLRリガンド及びIL-1応答障害性モデル非ヒト動物を利用した、TLRリガンド又はIL-1に対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法や、アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変の予防・治療薬のスクリーニング方法を提供することにある。

50

## 【課題を解決するための手段】

## 【0007】

TLRやIL-1Rシグナルの活性化により誘導されるタンパク質の一つであるI B- を欠損するマウスを作製したところ、TLRやIL-1Rリガンド(受容体に結合する成分)の刺激による、IL-6, IL-12p40といったある種の遺伝子の発現がほとんど認められなくなったことから、TLR/IL-1Rシグナル伝達経路において活性化する一群の遺伝子発現にI B- が必要不可欠であることを見出した。また、TNF- 産生が正常であっても、I B- 欠損マウスでは、TLRリガンド及びIL-1に応答するIL-6の産生が著しく損なわれることや、I B- が過剰発現されると、転写因子NF- Bを經由してIL-6プロモーターの基礎活性がアップレギュレートされることや、さらに内因性I B- はNF- Bのp50サブユニットと特異的に会合して、刺激を受けることによりIL-6プロモーターの近傍領域にリクルートされることを見出した。また、NF- B1/p50欠損マウスには、TLR/IL-1Rを介した応答という点において、I B- 欠損マウスと類似の表現型が認められることや、エンドトキシンに誘導されるIL-12p40やGM-CSF等の他の遺伝子の発現は、I B- 欠損マクロファージでは欠如していたことを見出した。LPSによるI B- の誘導がIL-6の誘導に先立って生じるとしても、TLR/IL-1Rを介した応答の中には、誘導性I B- を必要とする少なくとも2段階の遺伝子発現において調節されるものがあると考えられる。本発明は以上の知見に基づき完成するに至ったものである。

10

20

## 【0008】

すなわち本発明は、I B- をコードする非ヒト動物の内在性遺伝子の全部又は一部が破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性化され、I B- を発現する機能を喪失し、TLRリガンド及びIL-1に応答するIL-6の産生が障害されていることを特徴とするTLRリガンド及びIL-1不応答性モデル非ヒト動物。(請求項1)や、TLRリガンドが、LPS、BLP、PGN、MALP-2、R-848又はCpGDNAであることを特徴とする請求項1記載のTLRリガンド及びIL-1不応答性モデル非ヒト動物。(請求項2)や、アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変を呈することを特徴とする請求項1又は2記載のTLRリガンド及びIL-1不応答性モデル非ヒト動物。(請求項3)や、非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項1~3のいずれか記載のTLRリガンド及びIL-1不応答性モデル非ヒト動物。(請求項4)に関する。

30

## 【0009】

また本発明は、請求項1~4のいずれかに記載の非ヒト動物と、被検物質と、TLRリガンド若しくはIL-1又はこれらの含有物とを用いて、前記非ヒト動物におけるTLRリガンド若しくはIL-1又はこれらの含有物に産生するIL-6の産生の程度を測定・評価することを特徴とするTLRリガンド若しくはIL-1又はこれらの含有物に対する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5)請求項1~4のいずれか記載の非ヒト動物に由来する免疫細胞と、被検物質と、TLRリガンド若しくはIL-1又はこれらの含有物とを用いて、前記免疫細胞におけるTLRリガンド若しくはIL-1又はこれらの含有物に産生するIL-6の産生の程度を測定・評価することを特徴とするTLRリガンド若しくはIL-1又はこれらの含有物に対する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6)に関する。

40

## 【0010】

さらに本発明は、請求項1~4のいずれかに記載の非ヒト動物に被検物質を投与し、前記非ヒト動物におけるアトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変の程度を測定・評価することを特徴とするアトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変の予防・治療薬のスクリーニング方法。(請求項7)に関する。

## 【発明の効果】

## 【0011】

本発明によると、TLRやIL-1Rシグナル伝達経路における遺伝子発現は従来考え

50

られてきたNF- $\kappa$ BやAP-1の活性化という一段階しかないという考え(1段階発現制御)ではなく、IL-1の事前の発現誘導というさらなる一段階必要不可欠であるという「TLRやIL-1Rシグナル応答における2段階(多段階)発現制御」という新たな概念が提起され(図8参照)、TLR/IL-1Rによる多段階遺伝子発現制御機構を解明することが可能となる。また、IL-1欠損マウスはアトピー性皮膚炎様症状を呈することから、今後その局所における病理学的な解析と遺伝子発現制御の詳細な解析とが融合することにより、これまで原因不明であった難治性疾患に対する新たな治療戦略の構築に結実することが期待される。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0012】

本発明のTLRリガンド及びIL-1不応答性モデル非ヒト動物としては、IL-1をコードする非ヒト動物の内在性遺伝子の全部又は一部が破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性化され、IL-1を発現する機能を喪失し、野生型において発現されるIL-1を発現する機能が損なわれ、TLRリガンド及びIL-1に反応するIL-6の産生が障害されている非ヒト動物であれば特に制限されるものではなく、上記TLRリガンドとしては、グラム陰性菌の細胞壁に特異的な糖脂質であるリポポリサッカライド(LPS; TLR4リガンド)、細菌由来リポプロテイン(BLP; TLR1/TLR2リガンド)、細菌細胞壁の骨格構造であるN-アセチルグルコサミンとN-アセチルムラミン酸の繰返し多糖類に比較的短いペプチド鎖が結合したペプチドグリカン(PGN; TLR2リガンド)、マイコプラズマ属に属する細菌に由来するマクロファージ活性化リポペプチド(MALP-2; TLR6/TLR2リガンド)、合成化合物R-848(TLR7リガンド)及び細菌由来非メチル化CpGモチーフを有するDNA(CpGDNA; TLR9リガンド)などを挙げることができる。

##### 【0013】

本発明において不応答性とは、TLRリガンドやIL-1による刺激に対する生体又は生体を構成する細胞、組織若しくは器官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を意味する。したがって、本発明においてTLRリガンド及びIL-1不応答性モデル非ヒト動物とは、TLRリガンドやIL-1による刺激に対して、生体又は生体を構成する細胞、組織若しくは器官の反応性が低下しているか、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。これらの中でも、アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変を呈する非ヒト動物が好ましい。また、TLRリガンドやIL-1による刺激としては、LPS等のTLRリガンドやIL-1を生体に投与する生体における刺激や、生体から分離された細胞にLPS等のTLRリガンドやIL-1を接触させる試験管内の刺激等を挙げることができる。

##### 【0014】

本発明のIL-1を発現する機能を喪失した非ヒト動物として、IL-1<sup>-/-</sup>マウスの他、例えばIL-1遺伝子の機能が欠損したIL-1<sup>-/-</sup>ラット等の齧歯目動物を例示することができる。これらIL-1遺伝子の機能が欠損した非ヒト動物としては、メンデルの法則に従い出生してくるIL-1<sup>-/-</sup>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IL-1遺伝子の機能が欠損した動物の作製方法を、IL-1<sup>-/-</sup>マウスを例にとって以下説明する。

##### 【0015】

IL-1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IL-1遺伝子由来のプロン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IL-1遺伝子は、プラスミドベクター等を用いてサブクローンし、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IL-1をコードする遺伝子の全部又は一部をpMC1ネオ遺伝子カセット等に置換し、3'末端側にジフテリアトキシンAフラグメント(DT-A)遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子等の遺伝子を導入するこ

10

20

30

40

50

とによって、ターゲットベクターを作製する。

【0016】

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やガンシクロピア（GANC）等の抗生物質により相同的組換えを起こしたES細胞を選択する。また、この選択されたES細胞が目的とする組換え体かどうかを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；I B - <sup>+/+</sup>）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、本発明のI B - <sup>+/+</sup>マウスを作製することができる。また、I B - <sup>+/+</sup>マウスにおいて、I B - <sup>+/+</sup>が生起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスからRNAを単離してノーザンブロット法等により調べたり、またこのマウスにおけるI B - <sup>+/+</sup>の発現をウエスタンブロット法等により調べる方法がある。

10

【0017】

また、作出されたI B - <sup>+/+</sup>マウスがTLRリガンド及びIL-1に対して不応答性であることは、例えば、LPSをI B - <sup>+/+</sup>マウスのマクロファージ、単核細胞、樹状細胞などの免疫細胞にインビトロ又はインビボで接触せしめ、かかる細胞におけるIL-6、IL-12p40、GM-CSF等の産生量を測定することにより、あるいは、高年齢（例えば10週齢、好ましくは15週齢以上）のマウスにおけるアトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変の発症の程度を観察することにより確認することができる。

20

【0018】

本発明のTLRリガンド若しくはIL-1又はこれらの含有物に対する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、本発明の非ヒト動物と、被検物質と、TLRリガンド若しくはIL-1又はこれらの含有物とを用いて、前記非ヒト動物におけるTLRリガンド若しくはIL-1又はこれらの含有物に反応するIL-6の産生の程度を測定・評価する方法や、本発明の非ヒト動物に由来するマクロファージ、脾臓細胞、樹状細胞等の免疫細胞と、被検物質と、TLRリガンド若しくはIL-1又はこれらの含有物とを用いて、前記免疫細胞におけるTLRリガンド若しくはIL-1又はこれらの含有物に反応するIL-6の産生の程度を測定・評価する方法であれば特に制限されるものではなく、かかる本発明の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。

30

【0019】

本発明のモデル非ヒト動物から得られるマクロファージ等の免疫細胞と、被検物質と、TLRリガンド若しくはIL-1又はこれらの含有物とを共に培養し、該免疫細胞におけるIL-6産生の程度を測定・評価するスクリーニング方法や、本発明の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TLRリガンド若しくはIL-1又はこれらの含有物の存在下で培養し、該免疫細胞におけるIL-6産生の程度を測定・評価するスクリーニング方法や、本発明のモデル非ヒト動物にTLRリガンド若しくはIL-1又はこれらの含有物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被検物質の存在下で培養し、該免疫細胞におけるIL-6産生の程度を測定・評価するスクリーニング方法や、本発明のモデル非ヒト動物にTLRリガンド若しくはIL-1又はこれらの含有物と被検物質とを同時又はどちらか一方を先に投与し、該非ヒト動物から得られる免疫細胞におけるIL-6産生の程度を測定・評価するスクリーニング方法を挙げることができる。

40

【0020】

本発明のアトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変の予防・治療薬のスクリーニング方法としては、本発明の非ヒト動物に被検物質を投与し、前記非ヒト動物におけるアトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変の程度を測定・評価する方法であれば特に制限されず、被検物質の投与は、アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変の発症前であっても、発症後でもよく、

50

発症前投与で症状が改善されれば予防薬として、発症後投与で症状が改善されれば治療薬として有用である。上記アトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変の程度を測定・評価する方法としては、眼瞼の浮腫、口唇と顔面の浮腫、顔面と首、前肢屈曲部位、胸部における湿疹や脱毛、前肢による搔痒行動、顔面の皮膚が剥離し、滲出、血痂、びらんの有無を目視等により観察する方法を挙げることができる。

#### 【0021】

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

#### 【実施例1】

#### 【0022】

10

[ TLR / IL - 1 R 刺激による I B - の特異的誘導 ]

IL - 1 又は LPS による刺激は、マクロファージ細胞株及び線維芽細胞において I B - を誘導し、IL - 1 R と LPS の受容体である TLR 4 は、細胞内シグナル伝達経路を共有していることから、他の TLR リガンドにも応答して I B - が誘導されるかどうかを調べた。IL - 1 及び LPS に加え、ペプチドグリカン ( PGN ) ( TLR 2 リガンド )、細菌性リポタンパク質 ( BLP ) ( TLR 1 / TLR 2 リガンド )、フラゲリン ( flagellin ) ( TLR 5 リガンド )、MALP - 2 ( TLR 6 / TLR 2 リガンド )、R - 848 ( TLR 7 リガンド )、及び CpG DNA ( TLR 9 リガンド ) による刺激を受けても I B - の mRNA は腹腔マクロファージ又は肺由来正常細胞で著しく誘導されたが、TNF - による刺激では誘導は認められなかった ( 図 1 a )。他方、I B ファミリーの別のメンバーである I B - 及び Bcl - 3 は、TLR リガンドや IL - 1 同様に TNF - にも応答して誘導された。これらを総合すると I B - 及び Bcl - 3 と異なり、I B - の誘導は TLR / IL - 1 R による刺激に対して特異的に認められる。

20

#### 【0023】

次に、I B - の誘導が MyD88 依存性又は MyD88 非依存性経路によって調節されるかどうかを調べてみた。MyD88 欠損マウスから得た胚線維芽細胞 ( MEFs ) では、IL - 1 及び LPS に応答する I B - の誘導は完全に欠如していた ( 図 1 b )。従って I B - は、TLR / IL - 1 R シグナル伝達の MyD88 依存性経路における誘導性タンパク質であることがわかった。

30

#### 【実施例2】

#### 【0024】

[ I B - 遺伝子ノックアウトマウス ]

TLR / IL - 1 R 応答における I B - のインビボでの役割を解明するために、標的遺伝子破壊法により I B - 欠損マウスを作製した。I B - の中心部分をコードするエキソン 2 つをネオマイシン耐性 ( neo<sup>R</sup> ) 遺伝子に置き換えたターゲティングベクターを構築した ( 図 2 a )。胚幹 ( ES ) 細胞で相同的組換えが生じたことがサザンブロット分析により確認され、正しくターゲットされた ES 細胞を用いて変異対立遺伝子をもつマウスを作製した ( 図 2 b )。ホモ接合型マウスは予想されるメンデルの法則に従って生まれた。変異マウスにおける I B - mRNA の発現をノーザンブロット分析により調べた。LPS は、野生型細胞で I B - 誘導を刺激したが、I B - 欠損細胞では I B - mRNA は全く認められなかった ( 図 2 c )。免疫ブロット分析の結果からも、I B - 遺伝子が破壊されることにより I B - タンパク質の発現が消失することがさらに確認された ( 図 2 d )。I B - 欠損マウスの B リンパ球及び T リンパ球は正常な構成を示していた。しかし、I B - 欠損脾臓細胞では LPS 応答性の増殖が損なわれていたが、CD40、IL - 4 及び IgM に対する応答性は損なわれず ( 図 2 e 及び 2 f )、I B - 欠損細胞で TLR 4 応答が損なわれることを示唆している。

40

#### 【0025】

さらに、高齢の I B - 欠損マウスは全てアトピー性皮膚炎様の炎症性皮膚病変を呈

50

した(図6a)。皮膚表現型に関する分析の詳細は数々の文献に記載されている。

【実施例3】

【0026】

[ I B - 欠損細胞における免疫応答と I B - 誘導のキネティクス ]

次に、腹腔マクロファージにおける L P S に誘導される炎症関連分子の産生を分析した。 I F N - 存在下で野生型マクロファージは L P S に応答して T N F - 及び硝酸オキシド ( N O ) を産生した ( 図 3 a ) 。 I B - 欠損マウスにおいて L P S 誘導性の T N F - 及び N O の産生は正常であっても、 I L - 6 の産生は著しく減少していた。さらに、 C p G D N A 、 R - 8 4 8 、 P G N 、 M A L P - 2 、 B L P 等、別の T L R リガンドに刺激される I L - 6 の産生もまた I B - 欠損細胞では顕著に阻害されていた ( 図 3 b 、 3 c 、 及び 3 d ) 。また、 I B - 欠損細胞では、 I L - 1 応答性の I L - 6 産生の欠如が認められた。しかし T N F - 誘導性 I L - 6 産生は、野生型及び I B - 欠損細胞の両方で同程度に観察された ( 図 3 e ) 。次いで、 L P S に応答する I L - 6 m R N A の発現を調べた。 L P S は、野生型細胞において I L - 6 m R N A 誘導を刺激した。これとは全く対照的に、 I B - 欠損細胞における I L - 6 m R N A レベルは劇的に減少しており ( 図 3 f ) 、 I B - 欠損細胞における I L - 6 産生量の減少が、 m R N A 誘導欠損を反映している可能性を示している。

10

【0027】

前記のように、炎症性サイトカイン産生に關与する T L R / I L - 1 R を介した M y D 8 8 依存性経路は、 N F - B 及びマイトジェン活性化タンパク質 ( M A P ) キナーゼを活性化することが知られているが、 I L - 1 に応答する N F - B 及び M A P キナーゼの活性化は、野生型及び I B - 欠損細胞の両方において同程度だった ( 図 6 b 及び 図 6 c ) 。次に、完全長 I B - 又は欠損変異型 I B - を、培地又は I L - 1 で処理した I B - 欠損 M E F s にトランスフェクトした。 I L - 1 刺激条件下では、完全長 I B - は、 I B - 欠損細胞における I L - 6 産生の減少を回復させたが、欠損変異型 I B - ではかかる回復は認められず ( 図 3 g ) 、 N F - B 及び M A P キナーゼの活性化同様に I B - 発現もまた T L R / I L - 1 を介した I L - 6 の産生にとって必要であることが示唆された。

20

【0028】

前記のように、 I B - と I L - 6 はいずれも T L R リガンド及び I L - 1 に対して応答する誘導遺伝子であることがこれまでに報告されていることから、これら両遺伝子のキネティクスを測定するため、腹腔マクロファージを用いて経時的ノーザンプロット分析を行った。 L P S 刺激の 3 0 分後に I B - が誘導されていることが観察され、 1 2 0 分後にかかる誘導が最大値に到達した。他方 I L - 6 m R N A は、 I B - 又は T N F - の誘導よりさらに後の時点で誘導された ( 図 3 h ) 。これらの結果を総合すると、 T L R / I L - 1 R を介した I L - 6 遺伝子の発現には、それに先立って I B - が誘導されることが必要であることが示唆される。 I B - が T L R / I L - 1 R を經由するシグナル伝達経路における誘導性タンパク質でもあることから、 T L R / I L - 1 R を介した炎症性 I L - 6 の産生は少なくとも 2 段階で制御されていると考えられる。

30

【実施例4】

【0029】

[ I L - 6 プロモーター上の I B - の試験管内における分析 ]

I B - が、リガンドに誘導される I L - 6 プロモーターの活性化を促進するかどうかを調べるため、 I L - 6 又は E L A M 1 遺伝子のいずれかのプロモーターを有するルシフェラーゼレポータープラスミドを、対照又は I B - 発現ベクターと共に R A W 2 6 4 . 7 細胞に導入した。 L P S は、 I L - 6 及び E L A M 1 プロモーター両方の活性を投与量依存で刺激した。 I B - が過剰発現する場合、 R A W 2 6 4 . 7 細胞において I L - 6 のプロモーター活性がさらに亢進されるが、 E L A M 1 においてはその傾向が認められなかったことを見出した ( 図 4 a ) 。かかる亢進傾向が非刺激細胞で観察されたことから、 I B - の異所性発現が、未刺激 R A W 2 6 4 . 7 細胞において I L - 6 プロモ

40

50

ーターの活性に正の効果を示すかどうかを調べた。I B - の導入量を増加することにより、I L - 6プロモーターの基礎活性が未刺激細胞においてもアップレギュレートされることが観察された(図4b)。

#### 【0030】

次に、I B - の過剰発現の亢進に、I L - 6プロモーターのどの部位が関与しているかを調べてみた。I L - 6プロモーターのNF - B結合部位が、活性化に重要な役割を担っていることが明らかになっているので、野生型レポーター又はNF - B結合部位が欠損している変異型レポーターをP19胚性癌細胞にトランスフェクトした(Proc Natl Acad Sci U S A. 90, 10193-10197(1993))。I B - が異所性発現することにより、野生型レポーターが活性化された。それとは対照的に変異型レポーターを導入した場合は、I B - の過剰発現の効果は完全に消失した(図4c)。

#### 【0031】

I L - 6プロモーターのB部位におけるI B - の特異的関与を直接調べるために、I B - 、NF - B p50、NF - B、RelAの各抗体及び対照抗体を用いるクロマチン免疫沈降アッセイ(ChIP)を行った。LPSで刺激した細胞をp50及びRelAにより免疫沈降した場合、I L - 6及びELAM1プロモーターのB部位は検出されたが、I L - 6遺伝子の3'末端では認められなかった。特に、既に報告(Mol Cell. 9, 625-636 (2002))されているように、非刺激細胞のI L - 6B部位においてp50サブユニットは容易に検出された。それとは全く対照的に、LPS刺激細胞においてI L - 6B部位は、I B - と免疫共沈降したが、ELAM1B部位においてもI L - 6遺伝子の3'末端においてもかかる免疫共沈降は生じず(図4d)、I L - 6プロモーターにおけるI B - の選択的関与が明らかになった。

#### 【0032】

最後にI B - とNF - Bファミリーメンバーとの会合を検討した。免疫沈降分析の結果、I B - タンパク質とp50との相互作用が認められたが、RelA、RelB、c-Rel、p52サブユニットのいずれとも相互作用を生じなかった(図4e)。これらの知見から、I B - による正の効果がp50サブユニットとの会合を介してもたらされることが示された。

#### 【実施例5】

#### 【0033】

[NF - B1欠損マウスにおけるTLR/I L - 1Rの応答及びI B - 欠損細胞のマイクロアレイ分析]

遺伝子学的手法により上記仮説を確認するため、NF - B1/p50欠損マウスから腹腔マクロファージ及びMEFsを得て、LPS誘導性のサイトカイン産生を分析した。既に報告されているように、IFN - 存在下においてNF - B1欠損マクロファージにおけるLPS誘導性TNF - の産生は、野生型細胞の場合と変化がなかった。他方、NF - B1欠損細胞では、LPSに応答するI L - 6産生が損なわれていた(Cell. 80, 321-330 (1995), Proc Natl Acad Sci U S A. 97, 12705-12710 (2000)、及び図5a)。また、I L - 1や他のTLRリガンドに誘導されるI L - 6産生は、NF - B1欠損細胞で著しく損なわれていた(図5b)。結果的に、NF - B1欠損マウスにおけるTLR/I L - 1Rを介した応答は、I B - 欠損マウスにおける応答を想起させるものであった。

#### 【0034】

さらに、NF - B1欠損細胞においてI B - の異所性発現がI L - 6の産生を誘導するかどうかを試験した。野生型細胞と比較して、I B - を介したI L - 6の産生はNF - B1欠損MEFsでは減少しており、NF - B1がI B - の効果を発揮する際に重要な役割を果たしていることが示唆される(図5c)。I L - 1及びTNF - による刺激のいずれも、NF - B及びMAPキナーゼ等、類似のシグナル伝達分子セットの活性化をもたらし、I L - 6が発現される。しかし、I L - 1/TLRリガンドを経由するシグナル伝達は、I B - をI L - 6プロモーターに特異的に補充するが、T

NF- $\kappa$ B を經由するシグナル伝達にはそのような補充は認められず(図5d)、TLR/IL-1RとTNFRの応答性の間にみられる差異が説明できると推察される。

#### 【0035】

次に、マイクロアレイ分析により、IL-6 によって調節される他のLPS誘導性遺伝子を検索した。IL-6 の欠損により、多数のLPS誘導性遺伝子が顕著な影響を受けていた(図7a)。次にそれら遺伝子のいくつかをノーザンブロット分析にかけて精度を確認した。それら遺伝子の中で、LPSに誘導されたGM-CSF、IL-12p40、G-CSF、C/EBP $\beta$  及びエンドセリン1の発現は、IL-6 欠損マクロファージでは減少しており(図5e)、IL-6に加え、IL-6 が上記遺伝子の発現を調節していることを示している。実際、経時的ノーザンブロット分析の結果からは、LPS 10  
に応答する上記遺伝子の誘導に関する動態は、TNF- $\alpha$  よりむしろIL-6のキネティクスに似ていることが示され(図3h及び図7b)、TLR/IL-1Rシグナル伝達経路における上記遺伝子の少なくとも2段階ある調節モデルをさらに支持している。

#### 【0036】

最後に、IL-6 の要件が、試験した遺伝子の B 部位の配列と相関しているかどうかを調べた。しかし、プロモーターに別々の B 部位が含まれ、相当する B 部位の配列間に共通の特徴があるか識別することができず(図7c)、特定プロモーター上で機能するIL-6 の能力は、NF- $\kappa$ B の能力同様に、恐らく、B 部位におけるDNA-タンパク質相互作用によってのみ決まる訳ではなく、隣接塩基配列と結合又は相互作用する他の転写因子又はコアクチベーターによっても決定されると考えられる(EMBO J. 22, 55 20  
30-5539 (2003))。さらに、それらの中でIL-6プロモーターの B 部位と最大の同一性を示すIL-6 プロモーターの B 部位にも関わらず(図7c)、LPS誘導性のIL-6 mRNAの発現は通常NF- $\kappa$ B 1欠損細胞で観察され(図7d)、LPSに  
応答するIL-6 自体の調節が、IL-6の調節とは異なることが示唆される。

#### 【0037】

本発明において、IL-6 がTLR/IL-1Rを介した免疫応答に重要な役割を果たしていることの遺伝学的証拠を示した。特にTLR/IL-1Rを介したIL-6産生  
の場合には、その適切な産生のためには、NF- $\kappa$ B及びMAPキナーゼの活性化同様に、IL-6 が先行して発現することが必要であると考えられる。IL-6 自体が誘導性タンパク質であることから、TLR/IL-1Rを介したIL-6発現は、2段階の機  
30  
構で調節されている可能性がある。また、マイクロアレイ分析の結果から、IL-6 がIL-6以外のLPS誘導性遺伝子を制御している可能性が示された。IL-6 依存性遺伝子発現の分子的基础を解明する分析をさらに行うことにより、TLR/IL-1Rを介したMyD88依存性免疫応答に関する新たな知見が期待される。

#### 【実施例6】

#### 【0038】

##### [方法]

##### (1) IL-6 欠損マウスの作製

129/SVマウスゲノムライブラリーからIL-6 遺伝子を有するゲノムDNAを単離し、制限酵素マッピング及び配列分析により特徴付けを行った。IL-6 の中心部  
40  
分をコードする2.0kb断片をneo<sup>R</sup>カセットに置き換えることにより、ターゲッティングベクターを構築し、負の選択を行うために上記ゲノム断片中のPGKプロモーターによって転写される単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼを挿入した(図2a)。このターゲッティングベクターを胚性幹細胞(E14.1)にトランスフェクトした。G418とガンシクロピアに二重に耐性をもつコロニーを選択し、PCR及びサザンブロッティングによるスクリーニングを行った。2つの異なる相同組換え体をC57BL/6雌マウスにマイクロインジェクションし、ヘテロ接合体F1世代を交配させてIL-6 欠損マウスを得た。これら異なるクローンから得られたマウスは同じ表現型を示した。6~8週齢のIL-6 欠損マウス及びそれらの同腹野生型を本発明の実験に用いた。全ての動物実験は、微生物病研究所附属実験動物研究委員会(大阪大学、大阪、日本)の承認を得て  
50

実施した。

【0039】

(2) 試薬及びマウス

サルモネラ菌 (Salmonella Minnesota Re 595) 由来の L P S と黄色ブドウ球菌 (S. aureus) 由来の P G N は、それぞれSigma社とFluka社から購入した。M A L P - 2 及び C p G オリゴデオキシヌクレオチドは文献 (J Immunol. 164, 554-557 (2000), Nature. 408, 740-745 (2000)) 記載の方法に従って調製した。フラゲリン及び R - 8 4 8 はそれぞれ A. Adrem 博士及び H. Tomizawa 博士から提供を受けた。I B - に対するポリクローナル抗体は、細菌で発現させたマウス I B - タンパク質の C 末端部分を用いてウサギを免疫して得た。リン酸化 E R K、J N K 及び p 3 8 に対する各抗体は Cell Signaling 社から購入した。E R K、J N K、p 3 8、R e l A、p 5 0、c - R e l 及び C / E B P - のそれぞれに対する抗体は Santa Cruz 社から入手した。組換え T N F - 及び I L - 1 は Genzyme 社から入手した。N F - B 1 / p 5 0 欠損マウス又は M y D 8 8 欠損マウスは文献 (Cell. 80, 321-330 (1995), Proc Natl Acad Sci U S A. 89, 1473-1476 (1992)) 記載の方法に従って調製した。

10

【0040】

(3) 炎症性サイトカイン濃度及び N O の測定

チオグリコール酸に誘導される腹腔マクロファージ又は M E F s を 9 6 ウエルプレート (マクロファージは 1 ウエルあたり  $5 \times 10^4$  細胞、M E F s は  $1 \times 10^4$  細胞) において所定濃度の所定リガンド共存下で培養した。製造者マニュアルに従って E L I S A を行い、培養上清の T N F - 及び I L - 6 の濃度を測定した (T N F - には Genzyme 社製、I L - 6 には R & D 社製)。N O 濃度は製造者 (DOJINDO) の指示に従い、Griess 法により測定した。

20

【0041】

(4) 電気泳動移動度シフトアッセイ

$10 \text{ ng ml}^{-1}$  の I L - 1 で M E F s ( $1 \times 10^6$ ) を所定期間刺激した。文献 (Nature. 408, 740-745 (2000)) 記載の方法に従い、細胞から核抽出物を精製し、N F - B の D N A 結合部位に対する特異的プローブの共存下でインキュベートし、電気泳動にかけ、オートラジオグラフィーで視覚化した。

【0042】

(5) プラスミド及びレトロウイルストランスフェクション

レポータープラスミドは、マウス I L - 6 遺伝子の 5' フランキング領域 (- 1 2 4 0 / + 4 0) で構成され、図 4 a 及び 4 b で使用した。図 4 c で用いたレポータープラスミドは文献収載のものである (Proc Natl Acad Sci U S A. 90, 10193-10197 (1993), Proc Natl Acad Sci U S A. 89, 1473-1476 (1992))。E L A M 1 プロモーター由来ルシフェラーゼレポータープラスミドは、D. T. Golenbock から譲られたものである。完全長 I B - (Full) 又は C 末端部位を欠く欠変異型 I B - (C、J Biol Chem. 276, 27657-27662 (2001)) を文献収載の方法どおりにして p M R X レトロウイルスベクターにクローニングした (J Biol Chem. 278, 36005-36012 (2003))。Plat - E パッケージング細胞は、T. Kitamura 博士の厚意で提供を受けた (Gene Ther. 7, 1063-1066 (2000))。要点を述べると、レトロウイルスを作出するために、リポフェクタミン 2 0 0 0 試薬 (Invitrogen 社製) を用いて Plat - E 細胞にトランスフェクトし、トランスフェクションの 6 0 時間後にレトロウイルスを含む Plat - E 細胞の培養上清を回収した。 $4 \mu \text{g} / \text{ml}$  のポリブレン存在下で M E F s を 6 時間感染させ、感染 4 8 時間後に分析した。

30

40

【0043】

(6) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

SUPERFECT トランスフェクション試薬 (QIAGEN 社製) を用い、レポータープラスミドを対照又は I B - 発現ベクターのいずれかと共に R A W 2 6 4 . 7 及び P 1 9 細胞に一過性に共トランスフェクトした。文献記載 (2 8 , 2 9) の方法に従い、全細胞溶解物のルシフェラーゼ活性をデュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (Promega 社

50

製、Maiden, W1) を用いて測定した (Nat Immunol. 3, 392-398 (2002), Nat Immunol. 2, 835-841 (2001))。

【0044】

(7) クロマチン免疫沈降 (ChIPアッセイ)

ChIPアッセイは基本的に説明書にあるプロトコール (Upstate Biotechnology社製) に則って行った。概要を述べると、LPS ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ 、3時間)、IL-1 ( $10 \text{ ng ml}^{-1}$ 、3時間) 又はTNF- $\alpha$  ( $10 \text{ ng ml}^{-1}$ 、3時間) で、 $2 \times 10^6$  個のRAW264.7細胞又は $5 \times 10^5$ 個のMEFsをそれぞれ刺激し、ホルムアルデヒドを用い、37℃で60分間固定した。これらの細胞を溶解し、超音波処理にかけて分断 (sheared) し、特異的抗体共存下で一晩インキュベーションし、続いて鮭精子DNA (Upstate Biotechnology社製) で飽和したプロテインAアガロースの共存下でインキュベーションした。沈殿DNAを以下のプライマーを用いて定量PCR (35~40サイクル) で分析した。

10

【0045】

定量PCRに使用したプライマー；

IL-6プロモーターのB部位には、

5'-CGATGCTAAACGACGTCACATTGTGCA-3' (配列番号1)

及び5'-CTCCAGAGCAGAATGAGCTACAGACAT-3' (配列番号2)

IL-6プロモーターの3'遺伝子セグメントには、

5'-GCAGATGGACTTAGCTCGTCTCATTCA-3' (配列番号3)

及び5'-CCACTCCTTCTGTGACTCCAGCTTATC-3' (配列番号4)

20

ELAM1プロモーターのB部位には、

5'-GATGCAGTTGAGAATTTCTCTTAGCC-3' (配列番号5)

及び5'-TGGAATAGTTGTTCTGGCGTTGGATCC-3' (配列番号6)

【0046】

(8) ウェスタンブロット分析及び免疫沈降

腹腔マクロファージ及びMEFsを所定リガンドで所定期間刺激した。1.0% Nonidet-P40、150mM NaCl、20mM Tris-Cl (pH 7.5)、5mM EDTA及び蛋白質阻害物質 (Roche社製) を含む溶解緩衝液に上記細胞を溶解した。この細胞溶解物をSDS-PAGEにより溶解し、PVDF膜上に移した。免疫沈降を行うため、細胞溶解物をプロテインGセファロース<sup>TM</sup> (Amersham Pharmacia Biotech社製) で2時間前処理 (preclear) し、所定抗体1.0 $\mu\text{g}$ を含むプロテインGセファロース<sup>TM</sup>共存下において4℃で12時間攪拌下でインキュベーションした。免疫沈降物を溶解緩衝液で4回洗浄し、Laemmliサンプル緩衝液を用いて沸騰溶出し、I $\beta$ を用い、上述のとおりにしてウェスタンブロットングに供した。

30

【0047】

(9) 遺伝子チップ分析

野生型腹腔マクロファージ及びI $\beta$ 欠損腹腔マクロファージを用い、LPSに反応するマイクロアレイ分析 (Affimetrix社製) を文献記載の方法 (Blood. 102, 4123-4129 (2003)) に従って行った。GeneSpring6.0 (Silicon Genetics社製) ソフトウェアを使用して遺伝子発現のカラー画像を作成した。

40

【図面の簡単な説明】

【0048】

【図1】I $\beta$ がTLR/IL-1R刺激により特異的に誘導されることを示す図である。a.  $100 \text{ ng ml}^{-1}$  BLP、 $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  PGN、 $30 \text{ ng ml}^{-1}$  MALP-2、 $100 \text{ nM}$  R-848、 $3 \mu\text{M}$  CpG DNA、 $10 \text{ ng ml}^{-1}$  IL-1、 $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  LPS、 $100 \text{ ng ml}^{-1}$  フラゲリン、及び $10 \text{ ng ml}^{-1}$  TNF- $\alpha$  で2時間、腹腔マクロファージ及び肺一次細胞を刺激した。全RNA ( $10 \mu\text{g}$ ) を抽出し、ノーザンブロット分析にかけて、I $\beta$ 、Bcl-3、I $\beta$ 、及び $\beta$ -アクチンの発現を調べた。b.  $10 \text{ ng ml}^{-1}$  IL-1、 $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  LPSで野

50

生型マウス及びMyD88欠損マウスのMEFsを所定期間刺激した。全RNA(10 µg)を抽出し、ノーザンブロット分析にかけ、I $\beta$ -、Cox-2、IP-10、及び $\beta$ -アクチンの発現を調べた。

【図2】マウスI $\beta$ -遺伝子におけるターゲット破壊の様子を示す図である。a. I $\beta$ -遺伝子、ターゲティングベクター及び予測される破壊遺伝子の構造を示す図である。黒い囲みはIkBとなるエクソン部位を示す。制限酵素：E, EcoRI。b. ヘテロ接合体を交配させて出生したマウスのサザンブロット分析の結果を示す図である。ゲノムDNAをマウス尾部から抽出し、EcoRIで消化し、電気泳動にかけ、a. に示した放射標識プローブとハイブリダイズさせた。サザンブロットの結果、野生型マウス(+ / +)では、10.3 kbのバンド1本が認められ、ホモ接合体マウス(- / -)では2.2 kbのバンドが認められ、ヘテロ接合体マウス(+ / -)では両方のバンドが認められた。c. 10 ng ml<sup>-1</sup> LPSで刺激した腹腔マクロファージのノーザンブロット分析の結果である。細胞から抽出した全RNA(10 µg)の電気泳動を行い、ナイロン膜上に移し、I $\beta$ -及び $\beta$ -アクチンを用いてハイブリダイズさせた。d. 腹腔マクロファージのウエスタンブロット分析の結果を示す図である。細胞溶解物を $\beta$ -I $\beta$ -と共に免疫ブロッティングに供した。同じ溶解物を $\beta$ -ERK1/2とも免疫ブロッティングに供してタンパク質の発現を観察した。e, f. 所定濃度のLPS、10 µg ml<sup>-1</sup>の $\beta$ -CD40、200 U ml<sup>-1</sup>のIL-4、及び10 µg ml<sup>-1</sup>の $\beta$ -IGMの共存下で脾臓細胞を48時間培養した。培養時間の最後12時間に[<sup>3</sup>H]チミジン(1 µCi)をパルスした。[<sup>3</sup>H]チミジンの取込み量をシンチレーションカウンター(Packard社製)で測定した。 10

【図3】I $\beta$ -欠損細胞における免疫応答、並びにI $\beta$ -誘導のキネティクスを示す図である。a, b, c, d. 野生型マウス及びI $\beta$ -欠損マウス由来の腹腔マクロファージを、30 ng ml<sup>-1</sup> IFN- $\gamma$ 存在下において、所定濃度のPGN、R-848、CpG DNAと共に、10 ng ml<sup>-1</sup> LPS、100 ng ml<sup>-1</sup> BLP及び30 ng ml<sup>-1</sup> MALP-2の共存下で24時間培養した。培養上清中のIL-6、TNF- $\alpha$ 、及びNOの濃度を測定した。表記した数値は、3回試験した結果の平均値 $\pm$ SDである。N.D. 検出されず。e. 野生型マウス及びI $\beta$ -欠損マウス由来のMEFsを10 ng ml<sup>-1</sup> IL-1 $\beta$ 及び10 ng ml<sup>-1</sup> TNF- $\alpha$ で刺激した。24時間後に上清を回収し、ELISAでIL-6を調べた。表記した数値は、3回試験した結果の平均値 $\pm$ SDである。N.D. 検出されず。f. 腹腔マクロファージを10 ng ml<sup>-1</sup> LPSで所定期間刺激した。全RNA(5 µg)を抽出し、ノーザンブロット分析を行い、IL-6、TNF- $\alpha$ 、及び $\beta$ -アクチンの発現を調べた。g. 完全長I $\beta$ - (Full)をレトロウイルスを用いてトランスフェクションすることによりI $\beta$ -欠損MEFsにおけるIL-1 $\beta$ 応答性が復活するが、欠変異型I $\beta$ - (C)を細胞へ導入しても復活しなかったことを示す図である。10 ng ml<sup>-1</sup> IL-1 $\beta$ の存在下又は不在下における培養上清中のIL-6濃度をELISAで測定した。表記した数値は、3回試験した結果の平均値 $\pm$ SDである。h. 電気泳動により分離(resolve)した野生型腹腔マクロファージをLPSで刺激したことにより生じたI $\beta$ -、IL-6及びTNF- $\alpha$ に由来するmRNA転写物を表す二重RNA産物を示す図である。別個に由来する野生型細胞を用いて別々に2回行った実験結果をPhosphorImagerで定量し、 $\beta$ -アクチンに対する任意ユニットにおける所定遺伝子のmRNA量をグラフに表した(左はI $\beta$ -及びIL-6、右はTNF- $\alpha$ )。 30

【図4】IL-6プロモーター上のI $\beta$ -の試験管内分析の結果を示す図である。a. 対照又はI $\beta$ -発現プラスミドのいずれかと共に、マウスIL-6プロモーター又はELAM1プロモーターのいずれかのルシフェラーゼレポーター構築物をRAW264.7細胞に一過性にトランスフェクトした。ルシフェラーゼ活性は、非トランスフェクト細胞から調製した溶解物によって示されるバックグラウンドに対して何倍に増加したかで表した。データは個別に3回行った実験を代表するものである。3回の実験全てにおいて、所定濃度のLPSで細胞を刺激した。b. 所定量のI $\beta$ -発現ベクターを一定量の 40

IL-6 レポータープラスミドと共に、無処理の RAW264.7 細胞に一過性に細胞へ導入した。データは個別に3回行った実験を代表するものである。c. 野生型又は変異型 IL-6 プロモーターのいずれかであるレポーター構築物を、対照又は I B - 発現プラスミドのいずれかと共に、P19 胚性癌細胞に一過性に細胞へ導入した。それぞれの場合のレポーター構築物に関し、溶解物によって示されるバックグラウンドに対する I B - 発現細胞の増加率をモック発現細胞の増加率で割ることにより、ルシフェラーゼ活性を正規化した。d. ChIP には、無処理の (-) 又は LPS 処理した (+) ( $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  で3時間) RAW264.7 細胞から得たクロマチンを、表記の所定抗体と共に用いた。IL-6 B 部位 (左)、IL-6 遺伝子の 3' 領域、(中央)、又は ELAM1 プロモーター (右) における沈殿 DNA を PCR (ChIP) で測定した。データは個別に2回行った実験を代表するものである。e. 非刺激腹腔マクロファージ又は LPS で刺激した ( $10 \text{ ng ml}^{-1}$ ) 腹腔マクロファージを所定抗体と共に免疫沈降させた。その後、I B - と共に免疫沈降溶解物の免疫プロットングを行った。

【図5】NF- $\kappa$ B 欠損マウスにおける TLR / IL-1R の応答及び I B - 欠損細胞のマイクロアレイ分析の結果を示す図である。a. 野生型及び NF- $\kappa$ B 欠損マウスの腹腔マクロファージを  $30 \text{ ng ml}^{-1}$  IFN- $\gamma$  存在下で  $10 \text{ ng ml}^{-1}$  LPS と24時間共培養した。培養上清中の IL-6 及び TNF- $\alpha$  の濃度を ELISA で測定した。図に示す値は3回試験した結果の平均値  $\pm$  SD である。b.  $30 \text{ ng ml}^{-1}$  IFN- $\gamma$  存在下において、また  $100 \text{ ng ml}^{-1}$  BLP、 $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  PGN、 $30 \text{ ng ml}^{-1}$  MALP-2、 $100 \text{ nM}$  R-848、 $3 \mu\text{M}$  CpG DNA、 $10 \text{ ng ml}^{-1}$  IL-1 又は  $10 \text{ ng ml}^{-1}$  TNF- $\alpha$  の共存下で、野生型及び NF- $\kappa$ B 欠損マウスの腹腔マクロファージ及び MEFs を24時間培養した。IL-1 及び TNF- $\alpha$  に誘導される IL-6 産生を MEFs によって分析した。ELISA により、培養上清中の IL-6 濃度を測定した。表記値は3回試験した結果の平均値  $\pm$  SD である。c. 完全長 I B - (Full) 又は欠失変異型 I B - ( $\Delta$ C) を野生型及び NF- $\kappa$ B 欠損 MEFs にレトロウイルスを用いて細胞へ導入した。また、 $10 \text{ ng ml}^{-1}$  TNF- $\alpha$  を用いて非細胞導入細胞の同株を刺激した。培養上清中の IL-6 濃度を ELISA により測定した。表記値は3回試験した結果の平均値  $\pm$  SD である。d. 無処理の (-)、IL-1 で処理した (上、+) ( $10 \text{ ng ml}^{-1}$  で3時間) 又は TNF- $\alpha$  で処理した (下、+) ( $10 \text{ ng ml}^{-1}$  で3時間) MEFs から得たクロマチンと、図に示す所定抗体を用いて ChIP を行った。インプット用の沈殿 DNA (左)、又は IL-6 kB 部位 (右) の PCR (ChIP) アッセイを行った。データは2回行った実験結果を代表するものである。e. 野生型及び NF- $\kappa$ B 欠損マウスの腹腔マクロファージを  $10 \text{ ng ml}^{-1}$  LPS で所定期間刺激した。全 RNA ( $5 \mu\text{g}$ ) を抽出し、ノーザンブロット分析にかけて所定プローブの発現を調べた。

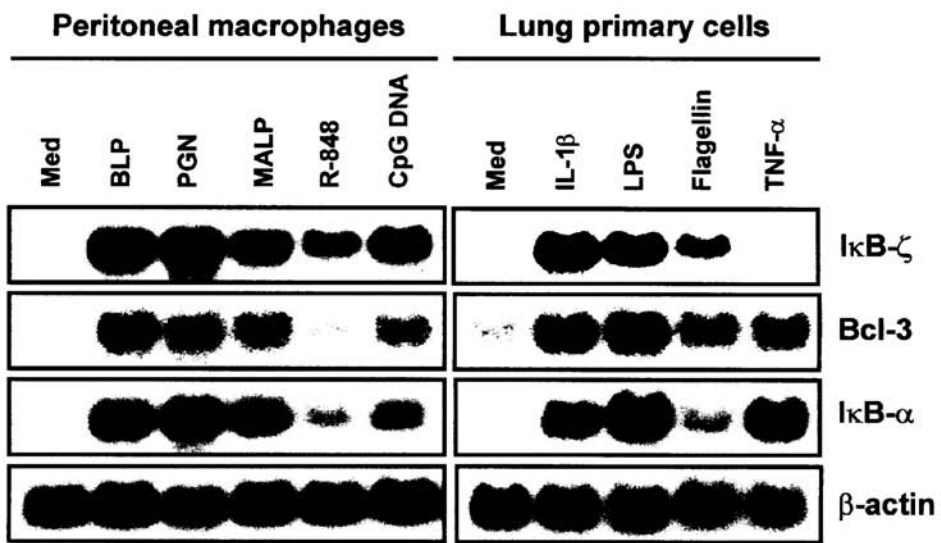
【図6】I B - 欠損マウスにおけるインビボでの IL-6 産生、並びに I B - 欠損 MEFs におけるシグナル伝達経路の、IL-1 に誘導される活性化の様子を示す図である。a. 16週齢の I B - 欠損マウス (右) 及び野生型マウス (左) の全体像である。b.  $10 \text{ ng ml}^{-1}$  IL-1 で MEFs を所定期間刺激した。核抽出物を調製し、NF- $\kappa$ B 特異的プローブを用いる EMSA により、NF- $\kappa$ B の DNA 結合活性を測定した。c. 抗リン酸化 JNK、p38、及び ERK 抗体を用いる細胞抽出物をウエスタンブロットングに供し、JNK、p38 及び ERK の活性も測定した。

【図7】統計的に選択した遺伝子を用いる LPS 誘導性遺伝子の遺伝子発現分析の結果を示す図である。a.  $100 \text{ ng ml}^{-1}$  LPS に応答する野生型マクロファージ及び I B - 欠損マクロファージの遺伝子発現プロフィールを比較する Affimetrix マイクロアレイ分析の結果から得た実験的系等図及び遺伝子系統図である。「発現された」遺伝子は赤色で示し、「少なく発現された」遺伝子は青色で示した。相対発現レベルを右のカラムに示した。b. 電気泳動によって分離した野生型腹腔マクロファージに対する LPS 刺激を受けて、I B - 、GM-CSF 及び IL-12p40 に由来する mRNA 転写物を表す二重 RNA 産物を示す図である。別々に由来する野生型細胞を用いて行う別々の2回の

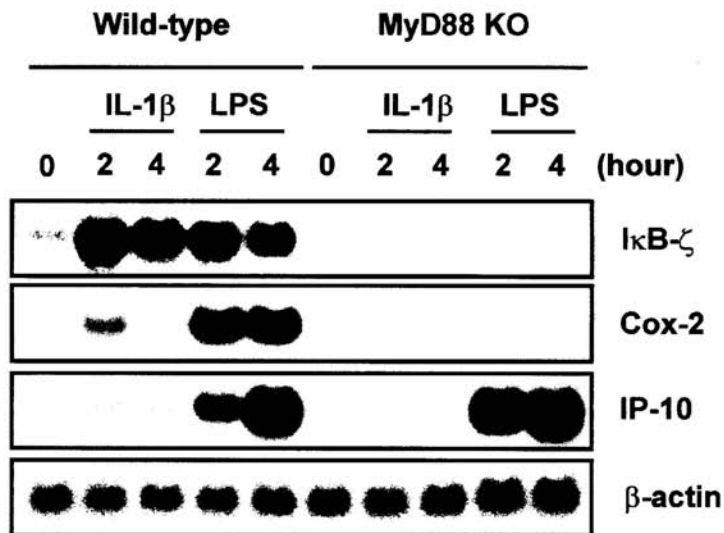
実験をPhosphorImagerで定量し、 $\beta$ -アクチンに対する任意ユニットにおける所定遺伝子のmRNA量をグラフに表した(左はI $\beta$ - $\beta$ 及びIL-12p40、右はGM-CSF)。c. 検索対象のプロモーター/エンハンサーのNF- $\kappa$ B部位を示す図である。マッピングしたときに転写開始部位に相当する位置を示す。d. 野生型及びNF- $\kappa$ B1欠損マウスの腹腔マクロファージを $10\text{ ng ml}^{-1}$  LPSで所定期間刺激した。全RNA(5  $\mu$ g)を抽出し、ノーザンプロット分析により、所定プローブの発現を調べた。

【図8】I $\beta$ - $\beta$ を介したTLR/IL-1Rシグナルによる多段階遺伝子発現機構を説明する模式図である。

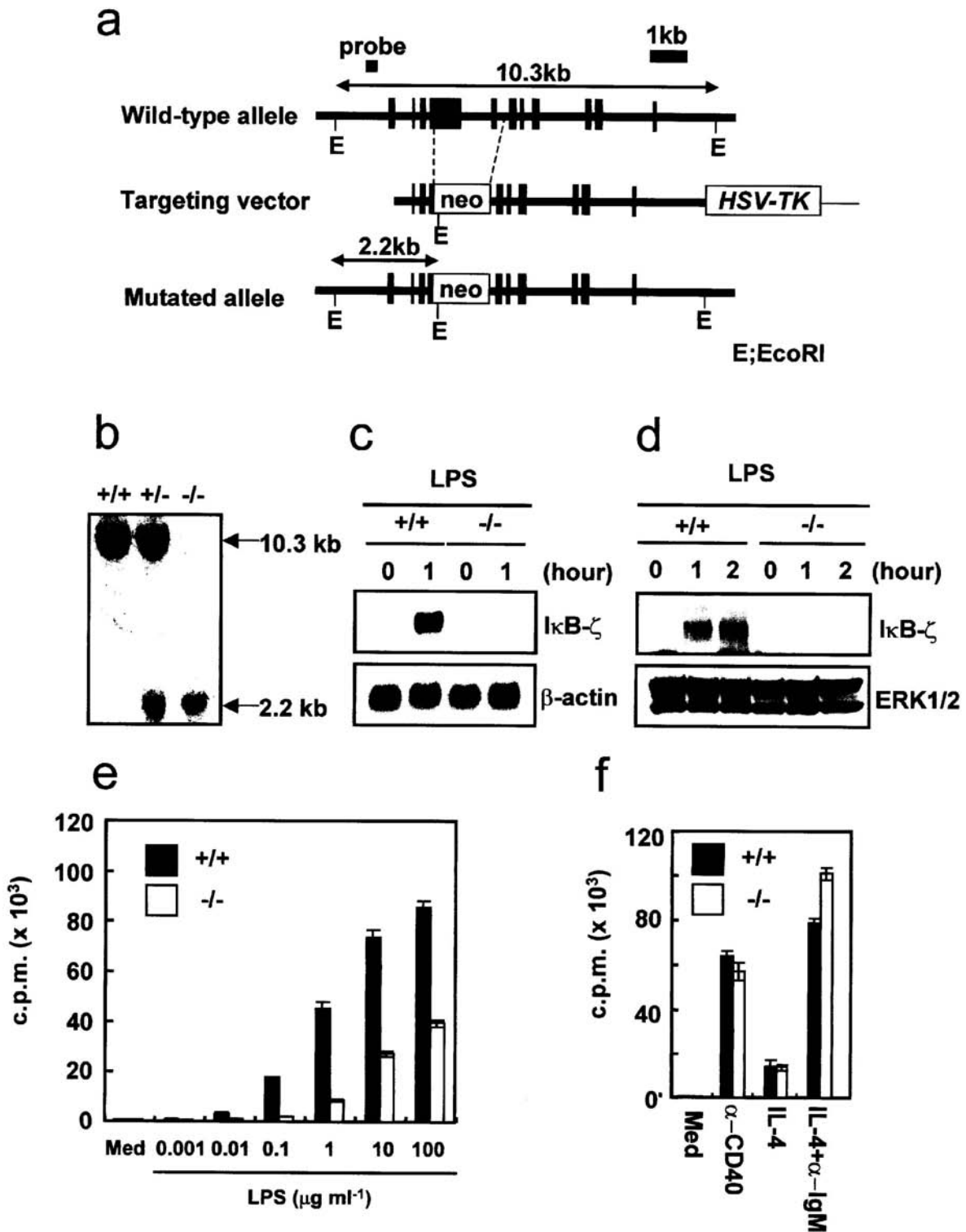
【 図 1 】  
a



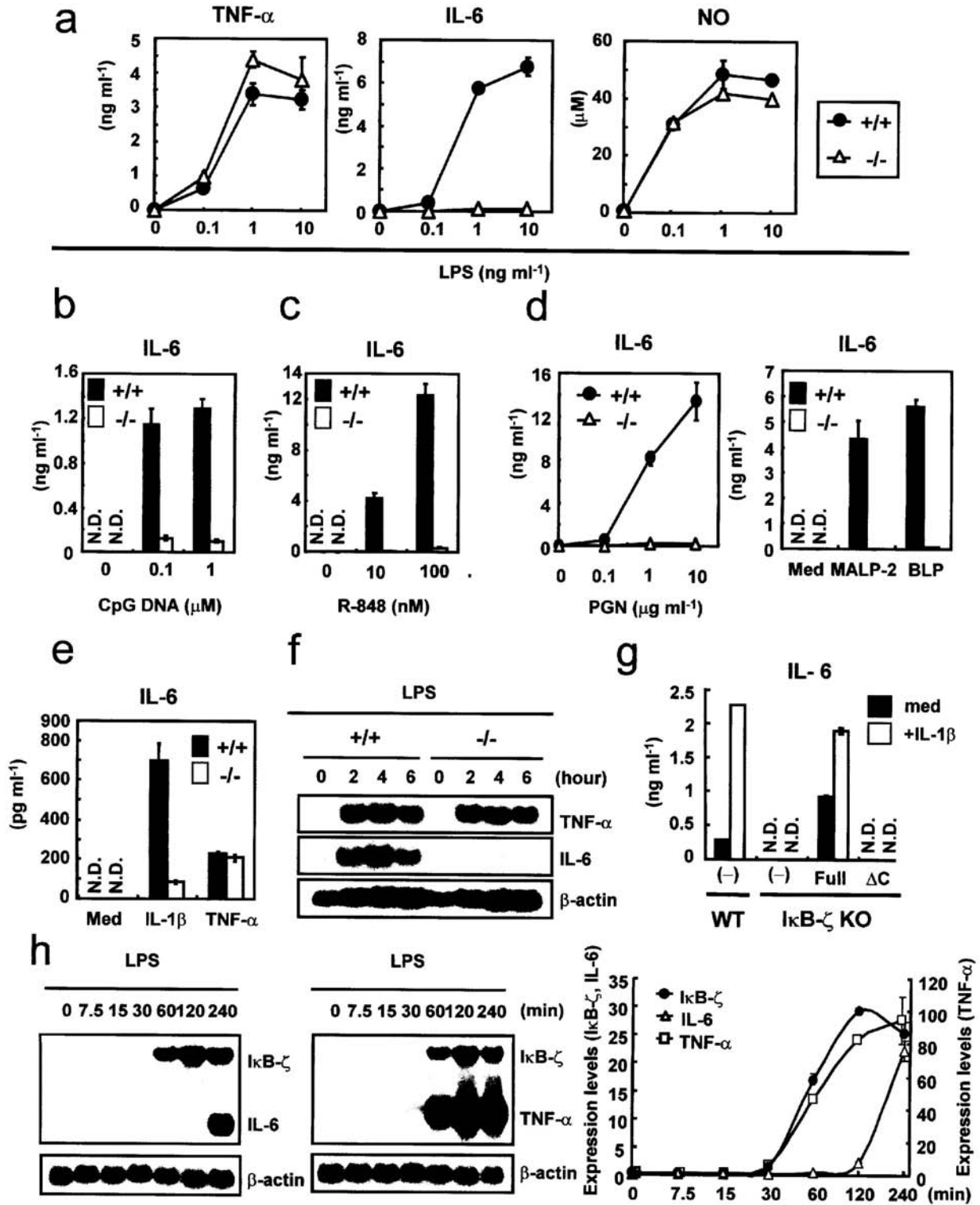
b



【 図 2 】

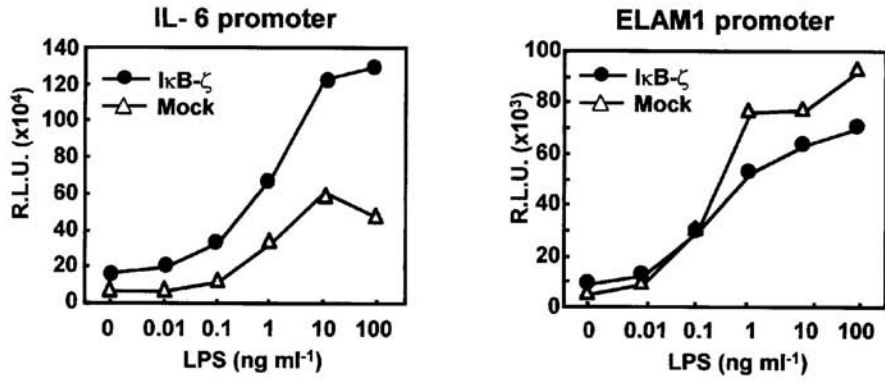


【 図 3 】

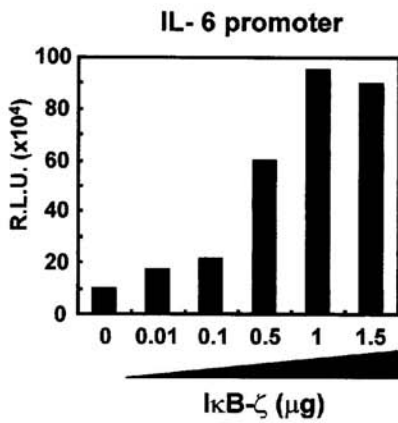


【 図 4 】

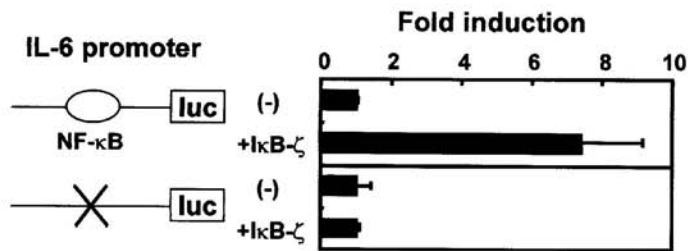
a



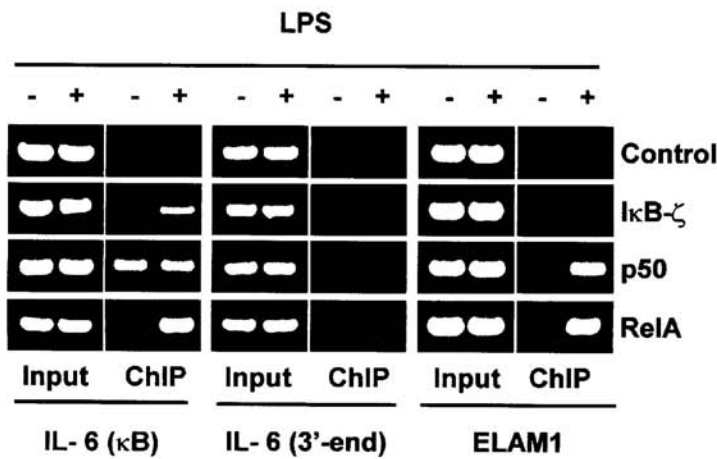
b



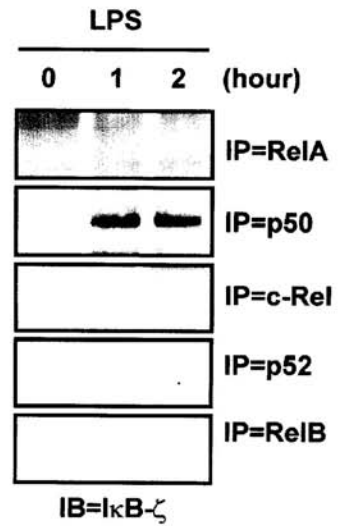
c



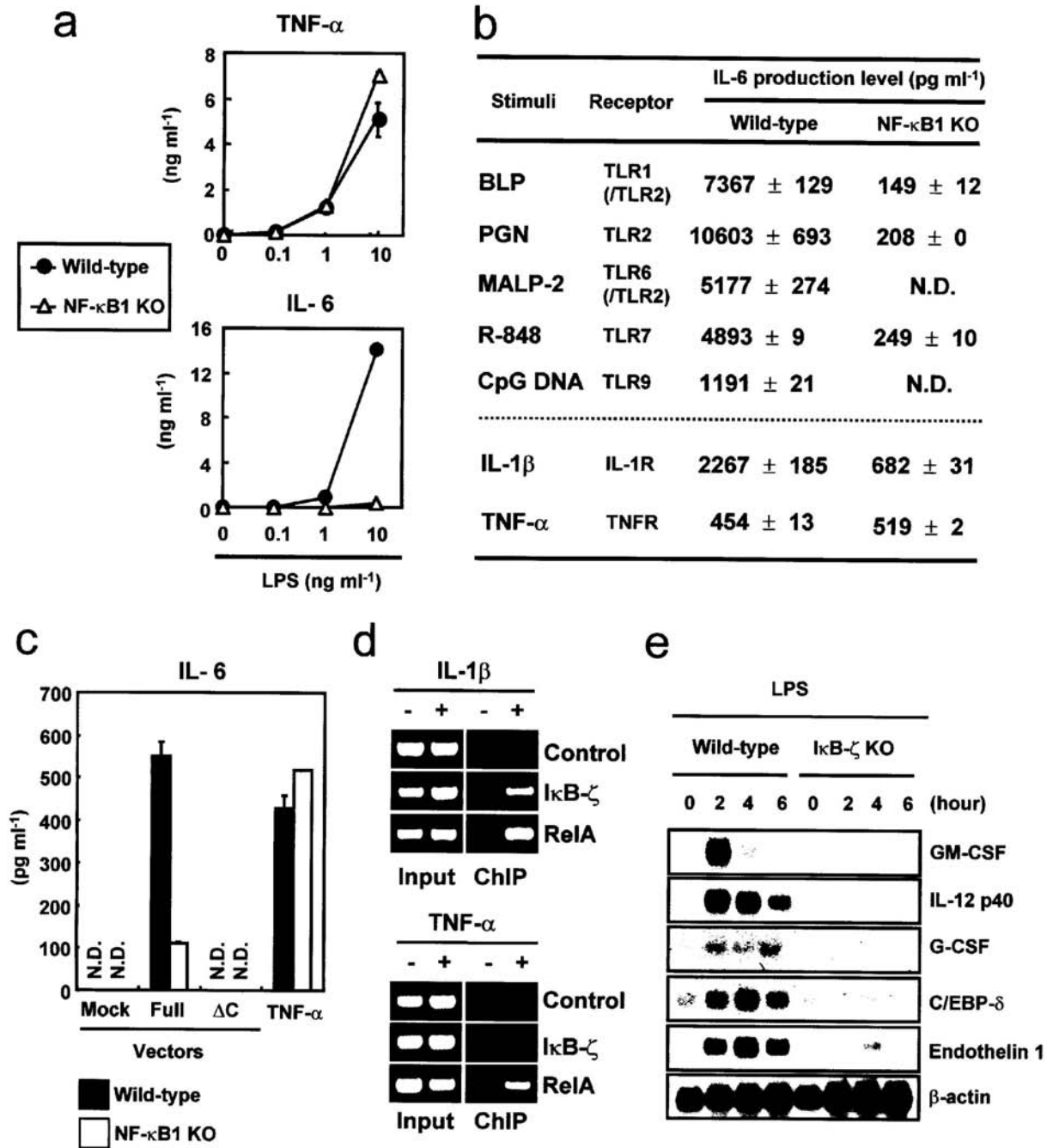
d



e

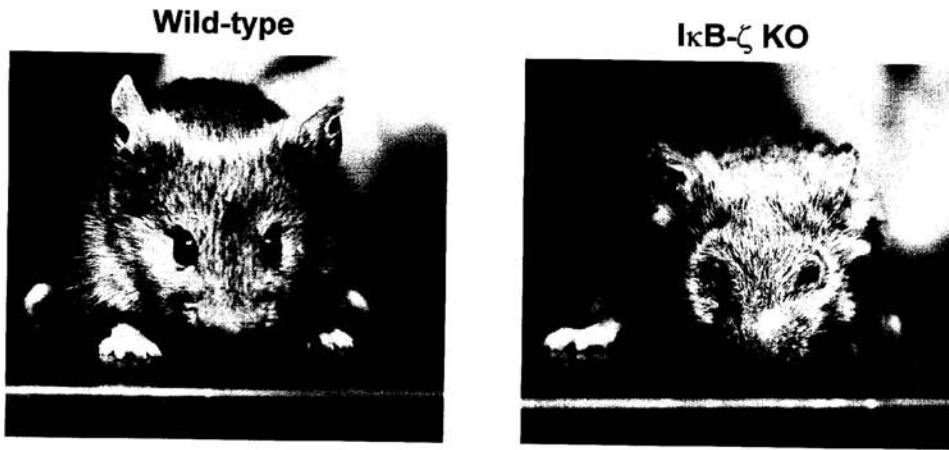


【 図 5 】

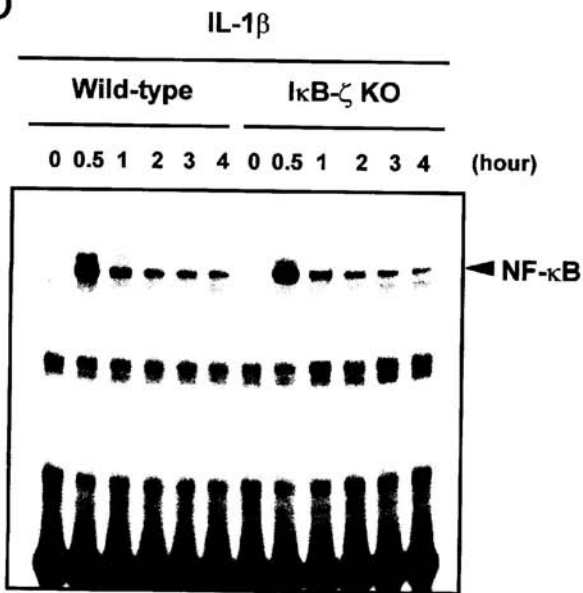


【 図 6 】

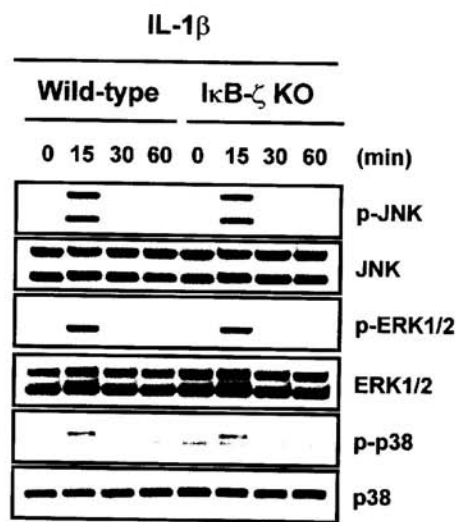
a



b

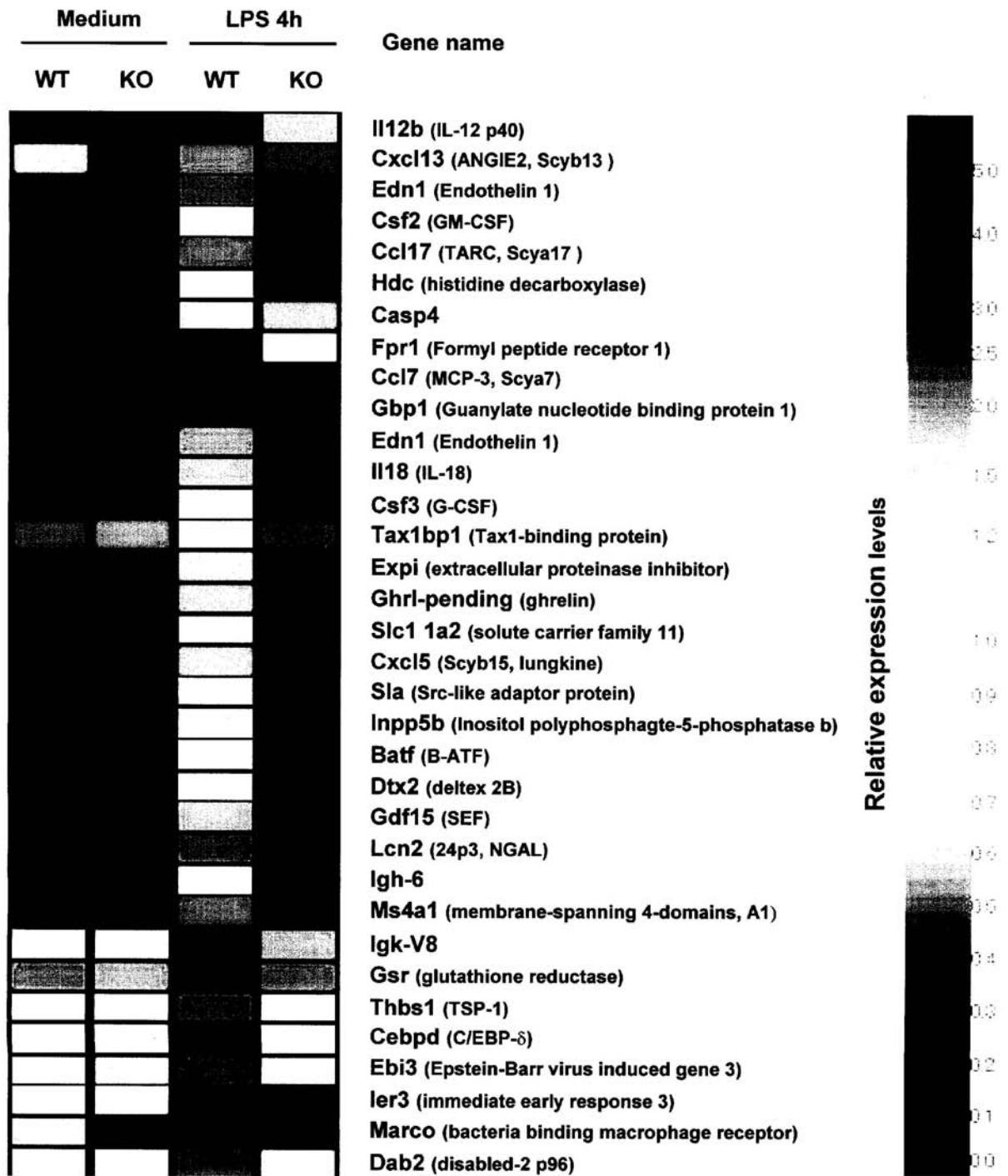


c



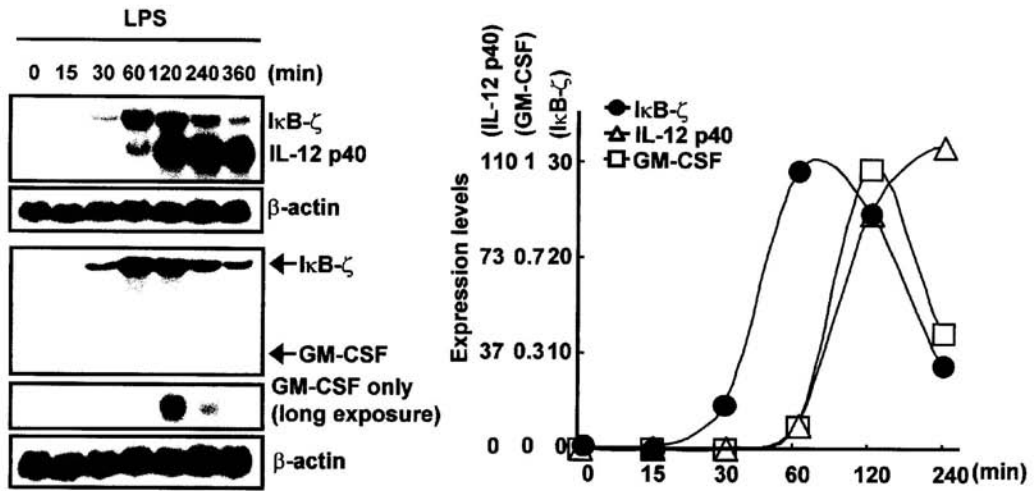
【 7 a 】

a



【 図 7 b 】

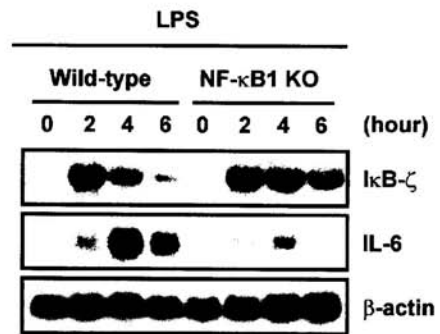
**b**



**c**

| Gene         | NF-κB site | Position    |
|--------------|------------|-------------|
| IL-6         | GGGATTTTCC | -73/-64     |
| GM-CSF       | GGGAACTACC | -82/-91     |
| IL-12 p40    | AAAATTCCCC | -131/-122   |
| G-CSF        | GGTAATTTCC | -64/-53     |
| Endothelin 1 | GGGCATTTCC | -1911/-1902 |
| C/EBP-δ      | AGGATTTTCC | -1026/-1017 |
| IκB-ζ        | GGGAATTTCC | -227/-218   |

**d**



【 図 8 】

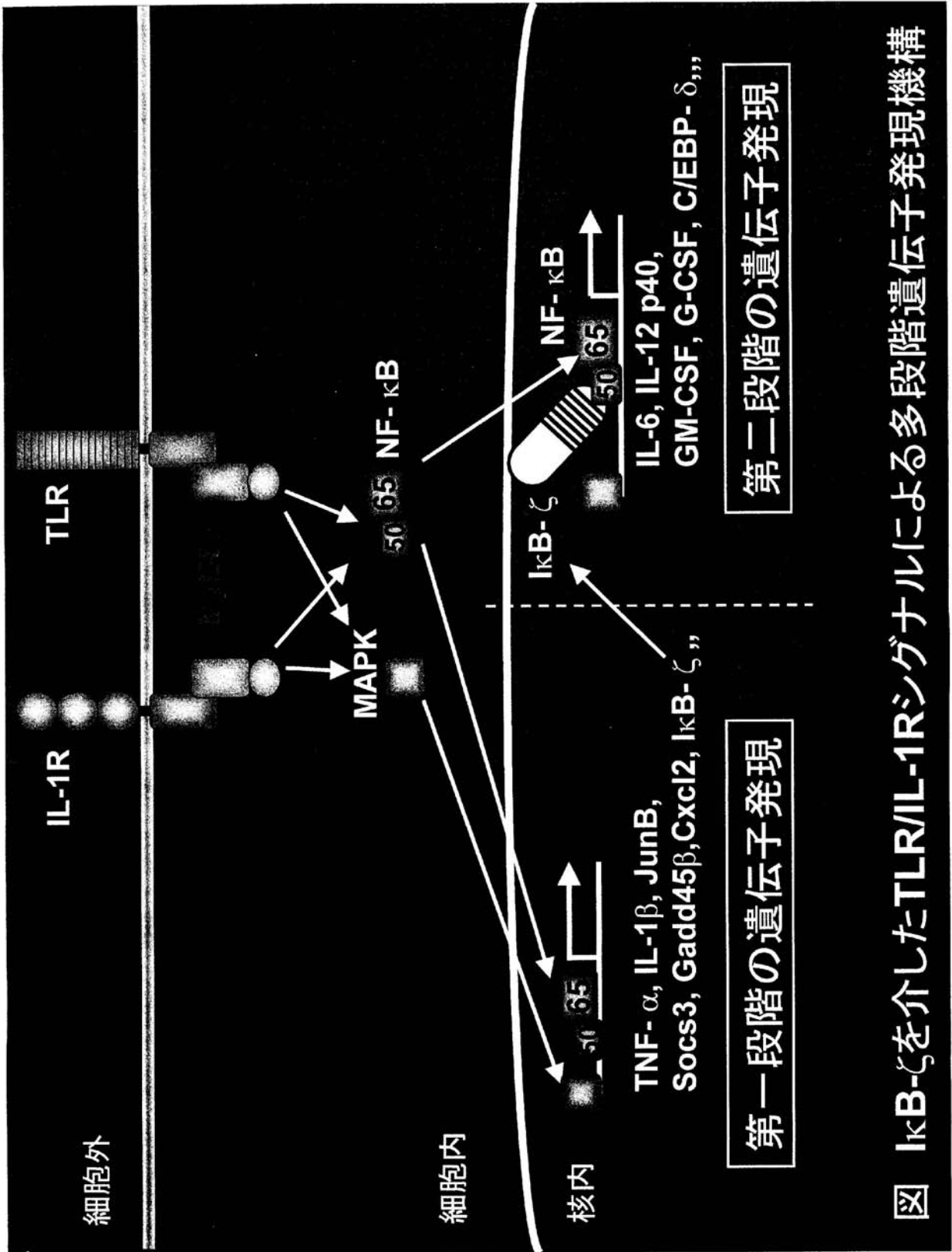


図 IκB-ζを介したTLR/IL-1Rシグナルによる多段階遺伝子発現機構

【 配列表 】

2005304365000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

G 0 1 N 33/53

F I

C 1 2 N 15/00

Z N A A

C 1 2 N 15/00

A

テーマコード(参考)

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ20 QQ79 QR48 QR69 QR77 QR80 QS12 QS24  
QS28 QS36 QX01

|                |   |         |            |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译)        | tlr配体和il-1反应障碍的模型动物   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2005304365A</a>   | 公开(公告)日 | 2005-11-04 |
| 申请号            | JP2004124758  | 申请日     | 2004-04-20 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 独立行政法人科学技术振兴机构  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 独立行政法人科学技术振兴机构  |         |            |
| [标]发明人         | 審良 静男<br>山本 雅裕  |         |            |
| 发明人            | 審良 静男<br>山本 雅裕  |         |            |
| IPC分类号         | A01K67/027 C07K14/47 C12N15/09 C12N15/85 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53   |         |            |
| CPC分类号         | C07K14/4702 A01K67/0276 A01K2217/075 A01K2227/105 A01K2267/0393 C12N15/8509 G01N33/5088   |         |            |
| FI分类号          | A01K67/027 C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.P C12N15/00.ZNA.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A C12N15/85.P C12N15/85.Z   |         |            |
| F-TERM分类号      | 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/CB01 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/FA10 4B024/GA18 4B024/HA08 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ20 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR69 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS12 4B063/QS24 4B063/QS28 4B063/QS36 4B063/QX01 |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>   |         |            |

摘要(译)

要解决的问题：获得具有TLR配体/ IL-1反应问题的非人类模型动物，其中响应TLR配体/ IL-1的IL-6产生有缺陷，促进剂或抑制对TLR配体的反应/ IL-1使用非人动物并提供筛选预防/治疗剂以抵抗特异性皮炎样炎性皮肤病变的方法。ZOLUTION：对TLR配体/ IL-1无反应的非人类模型动物，其中编码非人类动物I $\kappa$ B- $\zeta$ 的内源基因的全部或部分被遗传改变如破坏/缺乏/替代等灭活，表达I $\kappa$ B- $\zeta$ 的功能丧失，产生对TLR配体和IL-1缺陷的IL-6产生。使用非人动物和待检查的物质，筛选针对TLR配体/ IL-1的应答的促进剂或抑制剂以及针对特异性皮炎样炎性皮肤病变的预防/治疗剂。Z

特開2005-1104 (P2005-1104)  
(43) 公開日 平成17年11月4日(2005.11.04)

|                            |                               |           |
|----------------------------|-------------------------------|-----------|
| (51) Int. Cl. <sup>7</sup> | FI                            | テーマコード(参) |
| A01K 67/027                | A01K 67/027                   | 2G045     |
| C12N 15/09                 | C12Q 1/02                     | 4B024     |
| C12Q 1/02                  | G01N 33/15                    | Z 4B063   |
| G01N 33/15                 | G01N 33/50                    | Z         |
| G01N 33/50                 | G01N 33/53                    | P         |
|                            | 審査請求有 請求項の数 7 O L (全 25 頁) 最終 |           |

|           |                              |          |   |
|-----------|------------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2004-124758 (P2004-124758) | (71) 出願人 | 503360115<br>独立行政法人科学技術振興機構<br>埼玉県川口市本町4丁目1番8号                                |
| (22) 出願日  | 平成16年4月20日(2004.4.20)        | (74) 代理人 | 100107984<br>弁理士 廣田 登紀  |
|           |                              | (72) 発明者 | 審良 静男<br>大阪府高槻市辻子1-7-16   |
|           |                              | (72) 発明者 | 山本 雅裕<br>大阪府箕面市小野原<br>4-19-3  |
|           |                              | O 5      |   |
|           |                              | Fターム(参考) | 2G045 AA29 AA40 BA11 BB50<br>4B024 AA11 CA04 CA05 CA06<br>DA02 FA10 GA18 HA08 |