

(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2004-73073

(P2004-73073A)

(43) 公開日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 A	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027 Z N A	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 A	4 B O 6 3
G O 1 N 33/15	G O 1 N 33/15 Z	
G O 1 N 33/50	G O 1 N 33/50 Z	

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2002-237562 (P2002-237562)	(71) 出願人	396020800 科学技術振興事業団
(22) 出願日	平成14年8月16日 (2002.8.16)	(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
		(72) 発明者	審良 静男 大阪府高槻市辻子1丁目7-16
		Fターム(参考)	2G045 AA34 AA35 AA40 BA11 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 DA02 EA04 GA11 HA12 4B063 QA18 QQ08 QQ43 QR08 QR42 QR56 QS25 QS34 QX07

(54) 【発明の名称】 エンドトキシン及びリポタンパク・リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物

## (57) 【要約】

【課題】 TLRファミリーのアダプタータンパク質であるTIRAPの機能解明に有用な、細菌の菌体成分であるリポタンパク・リポペプチド、ペプチドグリカン、エンドトキシン等の細菌菌体成分に不応答性のモデル非ヒト動物や、これら細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物を用いた細菌菌体成分に対する応答の促進物質又は抑制物質や、これら促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法等を提供すること。

【解決手段】 TIRAP遺伝子の機能が染色体上で欠損したTIRAP<sup>-/-</sup>マウスを製作し、該TIRAP<sup>-/-</sup>マウスが、リポタンパク・リポペプチド等のTLR2が認識するリガンドやエンドトキシン等のTLR4が認識するリガンドに対する応答性が特異的に傷害されていることを確認する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

T I R A P 遺伝子の機能が染色体上で欠損し、T L R 2 が認識するリガンド及び T L R 4 が認識するリガンドに対する応答性が特異的に傷害されていることを特徴とするエンドトキシン及びリポタンパク・リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物。

**【請求項 2】**

L P S、P G N、M A L P - 2 に不応答性で、C p G O D N、I L - 1、ポリ I : C、R - 8 4 8 に応答性であることを特徴とする請求項 1 記載のエンドトキシン及びリポタンパク・リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物。

**【請求項 3】**

非ヒト動物がマウスであることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載のエンドトキシン及びリポタンパク・リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物。

10

**【請求項 4】**

マウス遺伝子ライブラリーからマウス T I R A P 遺伝子由来のプロープを用いてスクリーニングすることにより得られた T I R A P 遺伝子部位の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、マーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲティングベクターを構築し、該ターゲティングベクターを線状化したのち胚性幹細胞に導入し、T I R A P 遺伝子機能を欠損した標的胚性幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られることを特徴とする請求項 3 記載のエンドトキシン及びリポタンパク・リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物。

20

**【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、T L R 2 が認識するリガンド若しくは T L R 4 が認識するリガンド又はこれらの含有物とを用いて、前記免疫細胞における T L R 2 が認識するリガンド若しくは T L R 4 が認識するリガンド又はこれらの含有物に対する応答を測定・評価することを特徴とする T L R 2 が認識するリガンド若しくは T L R 4 が認識するリガンド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】**

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、T L R 2 が認識するリガンド若しくは T L R 4 が認識するリガンド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 T L R 2 が認識するリガンド若しくは T L R 4 が認識するリガンド又はこれらの含有物に対する応答を測定・評価することを特徴とする T L R 2 が認識するリガンド若しくは T L R 4 が認識するリガンド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。

30

**【請求項 7】**

請求項 5 又は 6 に記載の T L R 2 が認識するリガンド若しくは T L R 4 が認識するリガンド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により得られることを特徴とする T L R 2 が認識するリガンド若しくは T L R 4 が認識するリガンド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。

40

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は、T o l l 様受容体 ( T o l l L i k e R e c e p t o r : T L R ) のシグナル伝達を仲介する T I R A P 遺伝子の機能が欠損した非ヒト動物、特にエンドトキシン、リポタンパク・リポペプチド等の T L R 2 が認識するリガンド及び T L R 4 が認識するリガンド ( 以下、「T L R 2 及び T L R 4 リガンド」という ) に対して不応答性の T I R A P ノックアウトマウスや、これらを用いた T L R 2 及び T L R 4 リガンド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等に関する。

50

## 【0002】

## 【従来の技術】

トール (Toll) 遺伝子は、ショウジョウバエの胚発生中の背腹軸の決定 (Cell 52, 269-279, 1988, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12, 393-416, 1996)、また成体における侵入病原体を検出する自然免疫に関与しており (Nature 406, 782, 2000; Nat. Immunol. 2, 675, 2001; Annu. Rev. Immunol. 20, 197, 2002)、かかる Toll は、細胞外領域にロイシンリッチリピート (LRR) を有する I 型膜貫通受容体である。また、免疫反応や感染時の応答、造血、ウイルス感染や腫瘍細胞の障害に重要な役割を果たしている細胞間シグナル伝達物質であるサイトカインの中でも、リンパ球間でシグナルを伝え合うサイトカインはインターロイキン (以下「IL」という) と呼ばれているが、前記 I 型膜貫通受容体の細胞質内領域は、哺乳類 IL-1 受容体 (IL-1R) の細胞質内領域と相溶性が高いことが明らかとなっている (Nature 351, 355-356, 1991, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12, 393-416, 1996, J. Leukoc. Biol. 63, 650-657, 1998)。

## 【0003】

近年、Toll 遺伝子の哺乳類のホモログが同定され (Nature 388, 394-397, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 588-593, 1998, Blood 91, 4020-4027, 1998, Gene 231, 59-65, 1999)、ヒト TLR ファミリーについては、TLR2 や TLR4 等これまでに10種が報告されている。TLR ファミリーの役割は、細菌の共通構造を認識するパターン認識受容体 (PRR: pattern recognition receptor) として、別々の病原体会合分子パターン (PAMPs: pathogen-associated molecular patterns) を識別し、転写因子である NF- $\kappa$ B の核内への移行を導く同様の細胞内シグナル伝達経路の活性化を引き起こす。かかるシグナル伝達経路は、最終的には炎症性サイトカインを産生させ、宿主防衛反応を誘起し、さらに獲得免疫に対しても宿主防衛反応を誘起させる。また、近年多くの TLR リガンドが報告されている。

## 【0004】

TLR2 は、ペプチドグリカン (PGN)、細菌由来トリアシル化リポタンパク質、マイコプラズマ由来ジアシル化リポタンパク質、及びクルーズトリパノソーマ (Trypanosoma cruzi) の GPI アンカーなどのさまざまな細菌成分を認識する (Science 285, 732, 1999; Science 285, 736, 1999; J. Biol. Chem. 274, 33419, 1999; Immunity 11, 443, 1999; J. Immunol. 164, 554, 2000; Nature 401, 811, 1999; J. Immunol. 167, 416, 2001)。TLR4 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 (以下 LPS) に応答する際必須である。TLR5 は、細菌の鞭毛のタンパク質成分であるフラジェリンを認識するとされている。さらに、病原体特異的なヌクレオチド、及びヌクレオチド類似体も TLR は認識し、TLR3、TLR7 及び TLR9 は、ウイルス二重鎖 RNA、イミダゾキノリン、細菌由来非メチル化 CpG モチーフ (5'-Pu-Pu-CpG-Pyr-Pyr-3') を有する DNA (CpG DNA) の認識に、それぞれ関与している (Nature 406, 782, 2000; Nat. Immunol. 2, 675, 2001; Annu. Rev. Immunol. 20, 197, 2002; Nat. Immunol. 3, 196, 2002)。

## 【0005】

TLR を介するシグナル伝達経路において、シグナル伝達の起点となるのは、Toll / インターロイキン-1 受容体 (TIR) ドメインであり、なかでも TLR4 からのシグナ

ル伝達経路がよく知られている (Hoffman, J. A. et al.: Science, 284: 1313-1318, 1999)。TLR4の活性化によりアダプター分子であるMyD88を介し、セリン/スレオニンキナーゼIRAKを活性化し、転写因子NF- $\kappa$ BのインヒビターであるI $\kappa$ Bの分解を引き起こし、最終的にNF- $\kappa$ Bが核へ移行し転写を開始する。このTLRからのシグナル伝達経路は、進化的にもよく保存されており、ショウジョウバエにおいては、TubeがMyD88に、PelleがIL-1R-associated kinase (以下IRAK) に、CactusがI $\kappa$ Bに、DifやDorsalがNF- $\kappa$ Bにそれぞれ相当する。

#### 【0006】

MyD88は、IL-1R相同領域とデスドメインからなる細胞質内タンパク質であり、MyD88遺伝子は、当初、IL-6による刺激分化により、骨髄白血球細胞M1をマクロファージへ速やかに誘導する骨髄細胞分化初期応答遺伝子として分離されたことで知られている。MyD88は、IL-1RやIL-18Rシグナルにも関わっており、免疫機構において、非常に重要な働きを担っているため (Adachi, O. et al.: Immunity, 9: 143-150, 1998)、MyD88遺伝子が欠損した (MyD88<sup>-/-</sup>) マウスは細菌の感染に弱く、特にグラム陽性菌の感染にはTLR2遺伝子が欠損した (TLR2<sup>-/-</sup>) マウスよりさらにその感染に弱いことが報告されている (Takeuchi, O. et al.: J Immunol., 165: 5392-96, 2000)。

#### 【0007】

さらにMyD88<sup>-/-</sup> マウスは、TLRが認識するほとんどの微生物由来成分に対して炎症性の応答を示さず (Akira et al.: Nature Immunol. 2, 675-680, 2001; Annu. Rev. Immunol. 20: 197-216, 2002)、IFN誘発遺伝子の誘導及び樹状細胞の成熟を含むいくつかのLPS応答は認められているが、炎症性サイトカインを全く産生していない。また、MyD88欠損マクロファージは、LPSのみならずグラム陽性菌細胞壁成分、ペプチドグリカン (PGN)、細菌由来リポプロテイン (BLP)、細菌由来非メチル化CpGモチーフを有するDNA (CpG DNA) などに対する炎症性サイトカインの産生が認められていない (Hacker, H. et al.: J. Exp. Med., 192: 595-600, 2000)。しかし、TLR4が介するシグナル伝達経路の場合、MyD88<sup>-/-</sup> マウスにおいて、LPSが誘導する応答が観察されたため、MyD88非依存的なシグナル伝達経路の存在が示唆されている (Akira et al.: Nature Immunol. 2, 675-680, 2001; Medzhitov Nature Rev. Immunol. 1: 135-145, 2001)。MyD88非依存的経路は、LPSが誘導するIFN誘発遺伝子の発現と樹状細胞 (DC) の成熟に寄与していることが報告されている (Kawai et al.: J. Immunol. 167: 5887-94, 2001; Kaisho et al.: J. Immunol. 166: 5688-94, 2001)。インビトロでの研究により、LPSが誘導するMyD88非依存的シグナル伝達経路の活性化には、TIRAPと呼ばれるアダプター分子が関与していることが知られている (Hornig et al.: Nature Immunol. 2, 835-841, 2001; Toschakov et al.: Nature Immunol. 3, 392-98, 2002)。

#### 【0008】

##### 【発明が解決しようとする課題】

TIRAP遺伝子は、TLRの細胞質内領域としてTLRファミリー間で保存されているTIRドメインを有し、かつTLR4のシグナル伝達を仲介するアダプターとして同定されている (Hornig et al.: Nature Immunol. 2, 835-841, 2001) が、その生理学的機能は未だ明らかではない。本発明の課題は

、インピボにおける細菌菌体成分刺激によるシグナル伝達に対するTLRファミリーのアダプタータンパク質であるTIRAPの機能解明に有用な、特にエンドトキシンショックや肺炎などの感染症対策、及び該感染症を併発した際の治療対策において有用な、マイコプラズマ属、スピロヘータ属、エセリシア属等に属する細菌の菌体成分であるリポタンパク・リポペプチドや、グラム陽性菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンやグラム陰性菌の細胞壁成分であるエンドトキシン等の細菌菌体成分に不応答性のモデル非ヒト動物や、これら細菌菌体成分不応答性モデル非ヒト動物を用いた細菌感染症に対する促進物質又は抑制物質や、これら促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法等を提供することにある。

#### 【0009】

10

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究した結果、プラスミドベクターを用いてES細胞で相同的組換えによってTIRAP遺伝子領域の3'末端部分をコードした2つのエキソン領域をネオマイシン耐性遺伝子に置き換え、また3'末端側にHSV-tk遺伝子を導入させて、G418とガンサイクロヴィア(gancyclovir)の両者に対して抵抗性を示すES細胞クローンをスクリーニングし、このES細胞クローンをC57BL/6のマウスの胚盤胞(blastocysts)の中に注入し、その生殖系列をとおして、メンデルの法則に従い出生してくるTIRAP遺伝子の機能が欠損したTIRAP<sup>-/-</sup>マウスが得られた。このTIRAP<sup>-/-</sup>マウスは健康で、Bリンパ球及びTリンパ球の組成に異常は認められなかった。さらに、かかるTIRAP<sup>-/-</sup>マウスは、LPSに対する脾細胞の増殖、及び腹腔マクロファージの炎症性サイトカイン産生が生じず、MyD88<sup>-/-</sup>マウスの場合と同様、LPSが誘導するNF- $\kappa$ BとMAPキナーゼの活性化は、遅々としたものであった。しかし、IFN誘発遺伝子の発現と樹状細胞の成熟は、TIRAP<sup>-/-</sup>マウスで観察された。また、TIRAP<sup>-/-</sup>マウスは、TLR3、TLR7、又はTLR9のリガンドに対しては正常な応答を示したが、TLR2やTLR4によって認識されるサイトカインの産生、並びにリポタンパク・リポペプチド及びエンドトキシンに応答したシグナル伝達の活性化は損なわれていた。これらから、TIRAPがLPSの誘導するMyD88非依存的経路の活性化に必須でないことと、TLR2及びTLR4を介するMyD88依存的なシグナル伝達経路におけるアダプター分子として機能していることとを確認し、本発明を完成するに至った。

20

30

#### 【0010】

すなわち本発明は、TIRAP遺伝子の機能が染色体上で欠損し、TLR2が認識するリガンド及びTLR4が認識するリガンドに対する応答性が特異的に傷害されていることを特徴とするエンドトキシン及びリポタンパク・リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物(請求項1)や、LPS、PGN、MALP-2に不応答性で、CpG ODN、IL-1、ポリI:C、R-848に応答性であることを特徴とする請求項1記載のエンドトキシン及びリポタンパク・リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物(請求項2)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又は2記載のエンドトキシン及びリポタンパク・リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物(請求項3)や、マウス遺伝子ライブラリーからマウスTIRAP遺伝子由来のプロープを用いてスクリーニングすることにより得られたTIRAP遺伝子部位の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、マーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲティングベクターを構築し、該ターゲティングベクターを線状化したのち胚性幹細胞に導入し、TIRAP遺伝子機能を欠損した標的胚性幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られることを特徴とする請求項3記載のエンドトキシン及びリポタンパク・リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物(請求項4)に関する。

40

#### 【0011】

また本発明は、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

50

質と、TLR2が認識するリガンド若しくはTLR4が認識するリガンド又はこれらの含有物とを用いて、前記免疫細胞におけるTLR2が認識するリガンド若しくはTLR4が認識するリガンド又はこれらの含有物に対する応答を測定・評価することを特徴とするTLR2が認識するリガンド若しくはTLR4が認識するリガンド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）や、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、TLR2が認識するリガンド若しくはTLR4が認識するリガンド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TLR2が認識するリガンド若しくはTLR4が認識するリガンド又はこれらの含有物に対する応答を測定・評価することを特徴とするTLR2が認識するリガンド若しくはTLR4が認識するリガンド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）や、請求項5又は6に記載のTLR2が認識するリガンド若しくはTLR4が認識するリガンド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により得られることを特徴とするTLR2が認識するリガンド若しくはTLR4が認識するリガンド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（請求項7）に関する。

10

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明のエンドトキシン及びリポタンパク・リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物としては、TIRAP遺伝子の機能が染色体上で欠損し、TLR2が認識するリガンド及びTLR4が認識するリガンドに対する応答性が共に特異的に傷害されているモデル非ヒト動物であれば特に制限されるものではなく、TIRAP遺伝子に加えてMyD88遺伝子等他の遺伝子の機能が染色体上で欠損している多重欠損モデル非ヒト動物も本発明の対象となり、上記TLR2が認識するリガンドとしては、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）、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）、細菌由来トリアシル化リポタンパク質、マイコプラズマ由来ジアシル化リポタンパク質、クルーズトリパノソーマ（Trypanosoma cruzi）のGPiアンカーなどのマイコプラズマ属、スピロヘータ属、エセリシア属等に属する細菌の菌体成分であるリポタンパク・リポペプチドを例示することができ、また、TLR4が認識するリガンドとしては、主としてグラム陰性菌の外膜成分として存在するエンドトキシンとも呼ばれるリポ多糖（LPS）、グラム陽性細菌の細胞壁成分であるリポテイコ酸（LTA）、結核菌（Mycobacterium tuberculosis）溶解物、グラム陽性菌細胞壁成分等を例示することができ、また本発明においては、便宜上、TLR2が認識するリガンド又はTLR4が認識するリガンドの他、これらリガンドを担持するキャリアや、これらリガンドが細胞表層に存する細菌菌体自体も本発明におけるTLR2が認識するリガンド又はTLR4が認識するリガンドに含まれる（以下、「本件リガンド類」という）。

20

30

【0013】

本発明において不応答性とは、本件リガンド類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、本発明においてエンドトキシン及びリポタンパク・リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物とは、本件リガンド類による刺激に対して、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。また、本件リガンド類による刺激としては、エンドトキシンやリポタンパク・リポペプチドを生体に投与するインビボでの刺激や、生体から分離された細胞にエンドトキシンやリポタンパク・リポペプチドを接触させるインビトロでの刺激等を挙げることができる。

40

【0014】

そして、本発明におけるエンドトキシンやリポタンパク・リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物としては、リポタンパク・リポペプチド、ペプチドグリカン、グラム陽性菌細胞

50

壁画分、エンドトキシン、リポテイコ酸、結核菌溶解物等の細菌菌体成分などの本件リガンド類に対して不応答性であり、TLR9のリガンドであるCpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)、IL-1、フィトヘマグルチニン(PHA)、TLR3のリガンドであるポリI:C、TLR7リガンドである合成化合物R-848に対しては応答性である非ヒト動物を挙げることができ、具体的には、TIRAP遺伝子の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物を挙げることができる。

#### 【0015】

本発明においてTIRAP遺伝子の機能の欠損とは、染色体上のTIRAP遺伝子の一部もしくは全部が欠損し、野生型において発現されるTIRAPを発現する機能が失われていることをいい、また、TIRAP遺伝子の機能が欠損した動物としては、TIRAP<sup>-/-</sup>マウスの他、例えばTIRAP遺伝子の機能が欠損したラット等の齧歯目動物を例示することができる。これらTIRAP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TIRAP<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TIRAP遺伝子の機能が欠損した動物の作製方法を、TIRAP<sup>-/-</sup>マウスを例にとって以下説明する。

10

#### 【0016】

TIRAP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TIRAP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TIRAP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TIRAP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とによって、ターゲットベクターを作製する。

20

#### 【0017】

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サザンブロット法等により確認することが好ましい。その確認されたES細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型マウスと交雑させると、ヘテロ接合体マウス(F1マウス: +/-)を得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスを交雑させることによって、本発明のTIRAP<sup>-/-</sup>マウスを作製することができる。また、TIRAP<sup>-/-</sup>マウスにおいて、TIRAP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TIRAP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。

30

#### 【0018】

また、作出されたTIRAP<sup>-/-</sup>マウスが本件リガンド類に対して不応答性であることは、例えば、マイコプラズマ属、スピロヘータ属、エセリシア属等に属する細菌の菌体成分であるリポタンパク・リポペプチドをTIRAP<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TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12等の産生量や、脾細胞の増殖応答や、脾細胞表面でのCD40、CD80、CD86、MHCクラスII等の抗原の発現量や、NF- $\kappa$ B、JNK、IRAK等のTLRのシグナル伝達経路における分子の活性化を測定することや、グラム陰性菌の細菌細胞壁成分であるLPSをTIRAPノックアウトマウスに静脈注射等により投与し、発熱、ショック、白血球や血小板の減少、骨髄出血壊死、血糖低下、IFN誘発、Bリンパ球(骨髄由来免疫応答細胞)の活性化等のエンドトキシンの生物

40

50

活性を測定することや、T I R A P ノックアウトマウスのマクロファージと脾細胞に、細菌由来のL P S、又はグラム陽性菌菌体成分であるペプチドグリカン、リポテイコ酸、結核菌溶解物等の存在下において、例えばT N F 誘発、脾細胞増殖応答、脾細胞表面でのM H C クラスI I 抗原の発現を測定することにより確認することができる。

【0019】

本発明のT I R A P ノックアウトマウスは、細菌の菌体成分であるリポタンパク・リポペプチドに不応答性であり、また現在までエンドトキシン低応答性として知られているC 3 H / H e J マウスよりもエンドトキシン応答性が低下しており、ショック症状は全く認められず、T I R A P ノックアウトマウス由来のマクロファージ及び脾細胞は、エンドトキシンに対して不応答性であるばかりでなく、グラム陽性細菌細胞壁成分であるペプチドグリカン、リポテイコ酸、結核菌溶解物等に対しても不応答性であって、他方I L - 4 やI F N -  $\gamma$  に対して応答性であることから、本件リガンド類に対して不応答性であるノックアウトマウスは、リポタンパク・リポペプチド、エンドトキシン、ペプチドグリカン、リポテイコ酸等の作用機序の解明や、エンドトキシンショック、結核や肺炎等の細菌性感染症に対する治療戦略を考案する上で有用なモデルとすることができる。

10

【0020】

本発明のエンドトキシン及びリポタンパク・リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物や該モデル動物由来のマクロファージ、脾臓細胞、樹状細胞等の免疫細胞は、T L R 2 及びT L R 4 リガンドの作用機序の解明の他、T L R 2 及びT L R 4 リガンドに対する応答の抑制物質若しくは促進物質のスクリーニング等に用いることができる。本発明の本件リガンド類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、本発明のモデル非ヒト動物に由来する免疫細胞と、被検物質と、本件リガンド類とを用いて、前記免疫細胞における本件リガンド類に対する応答を測定・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と、被検物質と、本件リガンド類とを用いて、前記モデル非ヒト動物における本件リガンド類に対する応答を測定・評価するスクリーニング方法であれば特に制限されるものではなく、かかる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。

20

【0021】

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、脾臓細胞又は樹状細胞等の免疫細胞と、被検物質と、本件リガンド類とを共に培養し、該免疫細胞における細胞活性の程度を測定・評価するスクリーニング方法や、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本件リガンド類の存在下で培養し、該免疫細胞における細胞活性の程度を測定・評価するスクリーニング方法や、本発明のモデル非ヒト動物に本件リガンド類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細胞活性の程度を測定・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本件リガンド類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細胞活性の程度を測定・評価するスクリーニング方法を挙げることができる。

30

【0022】

上記マクロファージ、脾臓細胞等の免疫細胞における細胞活性の程度の測定・評価方法としては、免疫細胞がマクロファージの場合、マクロファージにおけるI L - 6、T N F -  $\alpha$ 、I L - 1 2 等のサイトカインの産生量や、N F -  $\kappa$  B のD N A 結合作用の程度を測定・評価する方法を、免疫細胞が脾臓細胞の場合、脾臓細胞の増殖の程度や、脾臓細胞におけるM H C クラスI I の発現量を測定・評価する方法を、それぞれ例示することができる。また、免疫細胞における細胞活性の程度を測定・評価するに際し、対照として本発明のモデル非ヒト動物の野生型非ヒト動物、特に同腹の野生型非ヒト動物の測定値と比較・評価することが個体差によるバラツキをなくすることができるので好ましい。

40

【0023】

本発明のT L R 2 が認識するリガンド若しくはT L R 4 が認識するリガンド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により得られる促進物

50

質又は抑制物質は、インビボにおける細菌菌体成分刺激によるシグナル伝達におけるメカニズムの解明に有用であり、特に促進物質は細菌感染症の予防・治療剤として使用しうる可能性がある。細菌感染症の予防・治療効果が期待できる上記促進物質を医薬品として用いる場合は、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、pH緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。またこれら医薬品を用いる予防若しくは治療方法においては、患者の性別・体重・症状に見合った適切な投与量を、経口的又は非経口的に投与することができる。すなわち通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできる。

10

【0024】

【実施例】

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

実施例1 (TIRAPノックアウトマウスの作製)

ジーン・ターゲッティングによりTIRAPノックアウトマウスを作製するため、TIRAPゲノムDNAを129/SvJマウスゲノムライブラリー(Stratagene社製)からマウスTIRAP遺伝子由来のプロープを用いてTIRAP遺伝子のスクリーニングを行い、さらにマウスTIRAP遺伝子を含むプラスミドを精製することにより、TIRAP遺伝子を単離し、pBluescript IISK(+)ベクター(Stratagene社製)中でサブクローンし、制限酵素マッピング及びDNA配列決定によりTIRAP遺伝子(配列番号1、2)であることを確認した。ターゲッティングベクターは、マウスTIRDメインの一部をコードする1.6kb断片をネオマイシン耐性遺伝子カセット(neo)(Stratagene社製)で置換し、負の選択マーカーとしてMC1プロモーターにより作動する単純ヘルペスウィルスチミジンキナーゼ(HSV-TK)を挿入することにより構築した(図1)。得られたターゲッティングベクターをSalIにより線状化し、胚性幹細胞(ES細胞)にエレクトポレーション法により導入し、G418及びガンシクロピアの両者に抵抗性を示す二重耐性コロニーを選択し、PCRでスクリーニングを行った。また、ES細胞内の遺伝子の相同的組換えをサザンプロットで確認した。かかるスクリーニングにより得られた相同的組換え体を、C57BL/6雌マウス由来の杯盤胚にマイクロインジェクションし、ヘテロ接合体のF1子孫をインタークロスしてTIRAPノックアウトマウスを得た。

20

30

【0025】

ホモ接合体(-/-)において、TIRAP遺伝子の機能が欠損していることを確認するためサザンプロット分析を行った。マウスの尾部より抽出したゲノムDNAをEcoRIで分解した遺伝子断片と、放射能標識をしたマウスTIRAP遺伝子由来のプロープを用いてサザンプロット法により確認した。その結果、野生型(+/+ )には単一の6.7kbバンドが、ホモ接合体(-/-)には2.7kbバンドが、ヘテロ接合体(+/-)にはその両方のバンドが得られた(図2左)。また、ホモ接合体(-/-)において、TIRAP遺伝子が発現していないことを確認するためノーザンプロット分析を行った。胚繊維芽細胞から抽出した全RNA10µgを電気泳動にかけ、ナイロン膜に移し、プロープとしてTIRAPのN末端断片又はC末端断片を用いてハイブリダイズした。ポジティブコントロールとして -アクチン特異的配列をプロープとして用い、同じ膜を同様にハイブリダイズした。TIRAP cDNAのN末端断片をプロープとして使用した場合には、かかるノックアウトマウスからのTIRAP転写物は、野生型マウスのものとほぼ同じサイズのバンドが検出された。C末端断片をプロープとして使用した場合には、野生型マウスに検出されたバンドがノックアウトマウスには検出されなかった(図2右)。

40

【0026】

さらに、RT-PCR分析により、かかるノックアウトマウスのTIRAP遺伝子はne

50

o 遺伝子を含んでいることがわかった。また、TIRAPのN末端領域に停止コドンが出現していた(図3)。TIRAP遺伝子が分裂するとTIRAPタンパク質がノックアウトマウスで産生されない。このようにして得られたTIRAPノックアウトマウスは健康で、フローサイトメトリーで定量したところ、Bリンパ球及びTリンパ球の組成に異常は認められなかった。かかるTIRAPノックアウトマウス及びその野生型の同腹仔を実験に使用した。

#### 【0027】

実施例2 (TIRAPノックアウトマウス脾細胞のLPS応答性)

TIRAPは、LPSの認識に不可欠なTLR4に特異的に会合するアダプターとして同定されているため、TLR4のリガンドであるLPSに応答する野生型マウス及びTIRAPノックアウトマウスの脾細胞の応答性をサルモネラ・ミネソタRe-595のLPS (Sigma社製)を用いて調べた。また、対照としてTLR9のリガンドであるCpGオリゴデオキシヌクレオチド(CpG ODN)を用いて脾細胞の応答性についても調べた。LPS及びCpG ODNは、文献(Hemmiet al., Nature 408, 740-745, 2000)記載のとおり調製し、使用した。野生型マウス、TIRAPノックアウトマウスそれぞれの脾細胞( $1 \times 10^5$ )を単離し、種々の濃度(0、0.1、1、10又は100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )のLPSで、また種々の濃度(0、0.01、0.1、1又は10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )のCpG ODNで脾細胞を刺激し培養した。培養から48時間後に1  $\mu\text{Ci}$ の $[^3\text{H}]$ -チミジン(デュボン社製)を添加し、更に12時間培養し、 $[^3\text{H}]$ の摂取量をシンチレーションカウンター(パッカー社製)で測定した。野生型脾細胞はLPS及びCpG ODNによる刺激に対し、投与量依存的な増殖を示した。しかし、TIRAPノックアウトマウス脾細胞は、CpG ODN刺激に対しては正常な応答を示したが、LPS刺激に対してはなんら増殖応答を示さなかった(図4)。

#### 【0028】

次に、1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のRe-595 LPS又は0.1  $\mu\text{M}$ のCpG ODNを使用し、Re-595のLPS及びCpG ODNに対する応答における野生型マウス及びTIRAPノックアウトマウスのそれぞれの脾臓B細胞表面の主要組織適合遺伝子複合体(MHC)クラスII(I-A<sup>b</sup>分子)の発現についてフローサイトメトリーにより調べた。野生型マウス及びTIRAPノックアウトマウスのそれぞれの脾臓B細胞( $1 \times 10^6$ )をLPS又はCpG ODNの存在下及び非存在化で48時間培養した。培養後細胞を採取し、ビオチン化抗マウスI-A<sup>b</sup>抗体(ファージン社製)に、フルオレセインイソシアネート(FITC;ファージン社製)で標識したストレプトアビジンを結合させたFITC標識化抗体により、それらの細胞表面におけるI-A<sup>b</sup>分子に結合させて細胞を染色した。染色した細胞をセルクエストのソフトウェア(ベクトンディッキンソン社製)により蛍光活性化セルソーターキャリバー(FACS Calibur)で分析した。その結果、野生型脾臓B細胞は、LPS及びCpG ODNと培養した際、細胞表面でMHCクラスIIの発現の増大が見られた。これに対し、TIRAPノックアウトマウス脾臓B細胞においてはLPSと培養した際、MHCクラスIIの発現が激減していた。しかし、CpG ODNと培養した際、MHCクラスIIの発現は減少しなかった(図5)。このように、TIRAPノックアウトマウス脾臓B細胞のLPSに対する応答には欠陥が認められる。

#### 【0029】

実施例3 (TIRAPノックアウトマウス脾細胞のIL-1、PHA応答性)

MyD88、TRAF6及びIRAK-4を欠損したマウスにおいて認められるように、IL-1受容体ファミリーを介したシグナル伝達経路は、TLRのものと同じシグナル伝達経路を利用している(Adachi et al., Immunity, 9, 143-150, 1998; Lomaga et al., Gene Dev., 13, 1015-24, 1999; Naito et al., Gene Cells, 4, 353-62, 1999; Suzuki et al., Nature, 416, 750-56, 2002)。IL-1やIL-1との共刺激物であるフィトヘマグルチニン(PHA)が誘導するTIRAPノックアウトマウスの脾細胞の増殖について調

10

20

30

40

50

べるため、IL-1 の100U/ml存在下、PHAの10ng/ml存在下、IL-1 とPHAの共存在下で、野生型マウス及びTIRAP<sup>-/-</sup>マウスの脾細胞を72時間培養して増殖させ、その後1μCiの[<sup>3</sup>H]-チミジンを添加し、更に12時間培養し、[<sup>3</sup>H]の摂取量をシンチレーションカウンターで測定した。脾細胞の増殖は、細胞内に取りこまれた[<sup>3</sup>H]チミジンの[<sup>3</sup>H]量を測定することにより求めた。野生型脾細胞及びTIRAP<sup>-/-</sup>脾細胞は、IL-1存在下、PHA存在下、及びIL-1とPHAの共存在下で培養した際に、増殖が増大した(図6)。これは、IL-1やPHAに対し、TIRAP<sup>-/-</sup>マウスが正常に応答することを示している。

#### 【0030】

実施例4(TIRAPノックアウトマウス腹腔マクロファージの各種TLRリガンドに応答した炎症性サイトカイン産生) 10

次に、野生型マウス及びTIRAP<sup>-/-</sup>マウスの腹腔マクロファージから、LPSが誘導する炎症性サイトカイン産生について分析した。TIRAP<sup>-/-</sup>マウス及び野生型マウスのそれぞれの腹腔内に4%のチオグリコール酸培地(DIFCO社製)を2mlずつ注入し、3日後に各マウスの腹腔内から腹膜滲出細胞を単離し、これらの細胞を10%のウシ胎仔血清(GIBCO社製)を添加したRPMI1640培地(GIBCO社製)中で37℃にて2時間培養し、氷温のハンス緩衝液(Hank's buffered salt solution: HBSS; GIBCO社製)で洗浄することにより非付着細胞を取り除き、付着細胞を腹膜マクロファージとした。得られた各腹腔マクロファージを1ng/mlのRe-595LPSを用いて24時間培養し、培養上澄液中のIL-6、TNF-α及びIL-12の濃度を常法によりELISAで測定した(図7; 3回の平均±SD、N.D.検出せず)。野生型マウスの腹腔マクロファージは、LPSに応答してIL-6、TNF-α及びIL-12を産生した。しかしTIRAP<sup>-/-</sup>マクロファージでは、LPSが誘導するIL-6、TNF-α及びIL-12の産生は、まったく認められなかった。 20

#### 【0031】

同様に、他のTLRリガンドへの応答を分析するため、10nMの合成化合物R-848(TLR7リガンド; Hemmi et al., Nature Immunol. 3, 196-200, 2002)に記載のとおり合成し、精製した。)及び1μMのCpG ODN(TLR9リガンド)を用いて、培養上澄液中のIL-6、TNF-α、及びIL-12の濃度をELISAで測定した(図8)。野生型マクロファージ及びTIRAP<sup>-/-</sup>マクロファージは、CpG ODN及びR-848に応答して、同程度のTNF-α、IL-6及びIL-12を産生した。さらに、各種濃度の、TLR2のリガンドであるマイコプラズマ由来リポペプチドMALP-2(Takeuchi-MALPに記載のとおり合成し、精製した。)及びStaphylococcus aureus(黄色ブドウ球菌)ペプチドグリカン(PGN)(Fluka社製)を用いて培養上澄液中のIL-6、TNF-α、IL-12をELISAで測定した(図9)。野生型マクロファージでは、MALP-2に応答したTNF-α、IL-6及びIL-12の投与量依存的な産生が見られた。しかし、TIRAP<sup>-/-</sup>マウスではTNF-α、IL-6及びIL-12の産生が激減していた。PGNが誘導するTNF-α、IL-6及びIL-12の発現も著しく減少していた。次に、TLR3のリガンドであるポリI:C(Amersham社製)で野生型マウス及びTIRAP<sup>-/-</sup>マウスの腹腔マクロファージを4時間及び8時間刺激し、全RNAを抽出し、ノーザンブロット法でIFN-β mRNAの発現を分析した。その際コントロールとして18SリボソームRNAを使用した。野生型マウス及びTIRAP<sup>-/-</sup>マウスの両方で、IFN-β mRNAの発現が誘導された(図10)。 30 40

#### 【0032】

これらの結果から、TIRAP<sup>-/-</sup>マウスはTLR3、TLR7、及びTLR9が認識する微生物成分に対しては野生型マウスと同様正常な応答を示すが、TLR2リガンド及びTLR4リガンドへの応答は減少することが分かった。 50

## 【0033】

実施例5 (TIRAPノックアウトマウス腹腔マクロファージにおける各種TLRリガンドに応答したシグナル伝達カスケードの活性化)

さらに、LPS、MALP-2、及びR-848に対する応答によるNF- $\kappa$ Bの活性化について調べた。文献(Takeuchi-MALP, Hemmi 2002)記載のとおりフェノール-クロロホルム-石油エーテル抽出手順により調製し、100 ng/mlのRe-595 LPS (Sigma社製)、3 ng/mlのMALP-2、及び10 nMのR-848で腹腔マクロファージ( $1 \times 10^6$ )をそれぞれ0分、10分、20分、60分間刺激し、細胞から核抽出物を精製し、NF- $\kappa$ B DNA結合部位に特異的なプローブを用いてインキュベーションを行い、電気泳動にかけ、文献(Kawai et al., Immunity 11: 115-22; 1999)記載の方法に準じて、オートラジオグラフィーで視覚化し、EMSAで定量した(図11; 矢印は誘導されたNF- $\kappa$ B複合体を示す)。LPS刺激に対する応答によるNF- $\kappa$ BのDNA結合作用は、野生型マクロファージの核抽出物では10分後には観察されたが、TIRAP<sup>-/-</sup>マクロファージの核抽出物では10分後には観察されなかったものの、20分後以降にはかなりの量が観察された。MALP-2刺激に対する応答によるNF- $\kappa$ BのDNA結合作用は、野生型マクロファージの核抽出物では10分後には観察されたが、TIRAP<sup>-/-</sup>マウスにおいては著しく阻害されていた。また、R-848刺激に対する応答によるNF- $\kappa$ BのDNA結合作用は、野生型、TIRAP<sup>-/-</sup>マウス共に正常な応答が観察された。

10

20

## 【0034】

次に、野生型マウス腹腔マクロファージ及びTIRAP<sup>-/-</sup>マウス腹腔マクロファージをそれぞれ100 ng/mlのLPS、3 ng/mlのMALP-2、100 nMのR-848で10分間及び20分間刺激した後、1.0%のNonidet-P40、150 mMのNaCl、20 mMのトリス-Cl (pH 7.5)、5 mMのEDTA及びプロテアーゼ阻害剤カクテル(Roche社製)を含む溶解緩衝液中に、かかる細胞を溶解した。細胞溶解液をSDS-PAGEで溶かし、PVDF膜(BioRad社製)に移した。ERK1/2、JNK及びp38に特異的な抗体(いずれもSanta Cruz社製)並びにリン酸化ERK1/2、リン酸化JNK及びリン酸化p38に特異的な抗体(いずれもCell Signaling社)で上記PVDF膜をプロットし、enhanced chemiluminescence system(NEN Life Science Product社製)で視覚化することによりウェスタンプロット分析を行った(図12)。LPS、MALP-2、R-848それぞれの刺激によって、野生型マクロファージではERK1/2、JNK、及びp38がリン酸化され活性化が誘導された。TIRAP<sup>-/-</sup>腹腔マクロファージでは、LPSが誘導する活性化には時間のずれが生じていたものの観察された。これはMyD88<sup>-/-</sup>マウスで観察される結果(Kawai et al.: Immunity 11: 115-22; 1999)と酷似している。また、MALP-2が誘導するERK1/2、JNK、及びp38の活性化は認められなかったが、R-848が誘導する活性化は野生型マクロファージと同程度であった。これらは、TIRAPがTLR2仲介シグナル伝達経路に深く関与していることを示している。

30

40

## 【0035】

IRAK-1はMyD88の下流で活性化しているが、TIRAPがIRAK-1の上流で機能しているかどうかについて検討するため、ウサギ抗IRAK-1ポリクローナル抗体(Hayashibara Biochemical Laboratories社製)を用いて、LPS、MALP-2又はR-848で刺激した腹腔マクロファージの溶解液の免疫沈降を行った。文献(Sato et al., II)記載のとおり、インビトロキナーゼアッセイを行い、IRAK-1のキナーゼ活性を測定し、抗IRAK-1抗体で同じ溶解液をプロットし、IRAK-1の作用を分析した(図13)。その結果、野生型マクロファージは、LPS、MALP-2、及びR-848で刺激すると、IRAK-

50

1の自動リン酸化(Auto)が誘導された。しかし、TIRAP<sup>-/-</sup>マウスにおいては、R-848に応答して自動リン酸化が誘導されたが、LPS及びMALP-2に応答した自動リン酸化は観察されなかった。これらの結果は、TIRAPはMyD88と同様にIRAKに近いレベルで作用するが、MyD88とは異なり、TLR2及びTLR4を介するIRAKの活性化に特異的に関与することを示唆している。

#### 【0036】

実施例6(TIRAPノックアウトマウス腹腔マクロファージにおけるLPSが誘導するMyD88非依存的シグナル伝達経路の活性化)

次にTIRAPの欠損がMyD88非依存的シグナル伝達に影響するかどうかについて検討するため、野生型、TIRAP<sup>-/-</sup>、及びMyD88<sup>-/-</sup>の腹腔マクロファージを100ng/mlのRe-595LPSで、それぞれ0時間、1時間、2時間、4時間刺激し、全RNA(5μg)を抽出し、ノーザンブロットでIFN誘導遺伝子であるIP-10、GARG-16、及びIRG-1の発現をそれぞれ分析した。また、 $\alpha$ -アクチン特異的プローブを用いて、同じ膜を再びハイブリダイズし、mRNA誘導について分析した(図14)。LPSが誘導するIP-10、GARG-16、及びIRG-1の発現は、野生型、TIRAP<sup>-/-</sup>、及びMyD88<sup>-/-</sup>の腹腔マクロファージにおいて同程度に観察された。

10

#### 【0037】

10ng/mlのGM-CSFを用いて、野生型マウス及びTIRAP<sup>-/-</sup>マウスの骨髓細胞を6日間培養して未成熟の樹状細胞を回収し、0.1ng/mlのRe-595LPS存在下又は非存在下の新しい培地でさらに2日間培養した。次にCD40、CD80、CD86をビオチン結合抗体と反応させたのち、PE標識ストレプトアビジンで染色し、染色した細胞をセルクエストのソフトウェア(ベクトンディッキンソン社製)により蛍光活性化セルソーターキャリバー(FACS Calibur)で分析した(図15)。その結果、野生型マウスでは、MHCクラスII並びにその共刺激分子であるCD80、CD86及びCD40の発現増大が誘導された。また、TIRAP<sup>-/-</sup>も同様に、LPSに応答してMHCクラスII並びにCD80、CD86及びCD40の発現が増大した。

20

#### 【0038】

MyD88非依存的シグナル伝達では、LPSに応答してIRF-3が活性化されることが知られている(Kawai et al.: J Immunol. 167, 5887-94, 2001)。そのため、LPSが誘導するIRF-3の活性化を分析するため、100ng/mlのLPSで、腹腔マクロファージを1時間又は2時間刺激し、細胞溶解液を調製し、未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、抗IRF-3抗体でイムノブロットを行い、IRF-3の単量体及び二量体を検出した(図16)。野生型マウス腹腔マクロファージはホモ二量体を形成した。また、TIRAP<sup>-/-</sup>マウス腹腔マクロファージでも同様に観察された。このことは、LPSが誘導するIRF-3の活性化が、TIRAPの非存在下でも影響を受けないことを示している。また、腹腔マクロファージを10分間又は20分間LPSで刺激し、細胞溶解液を調製し、抗リン酸化PKR抗体(Biosource社製)を用いたウェスタンブロットによりリン酸化PKRを検出した(図17)。野生型マウス腹腔マクロファージでは10分間のLPS刺激でPKRのリン酸化が見られたが、TIRAP<sup>-/-</sup>マウス腹腔マクロファージでは20分間のLPS刺激でPKRのリン酸化が見られた。これらのことから、LPSが誘導するMyD88非依存的シグナル伝達経路の活性化にTIRAPは不可欠とはいえない。

30

40

#### 【0039】

このように、TIRAP<sup>-/-</sup>マウスにおいて、LPSが誘導するMyD88非依存的シグナル伝達経路の活性化は弱まっていない。すなわち、MyD88がTIRAPの欠損を補ってMyD88非依存的経路を活性化するという可能性が依然として残っていることから、TIRAP遺伝子とMyD88遺伝子の両方を欠損したダブルノックアウトマウスを作製し、LPSが誘導するIFN誘発遺伝子の発現を分析した。TIRAP/MyD88

50

二重欠損マウスの腹腔マクロファージをLPSで刺激すると、野生型腹腔マクロファージと同程度の、IP-10、GARG-16、及びIRG-1のmRNA発現を誘導した(図18)。さらに、TIRAP/MyD88二重欠損マウスの樹状細胞も野生型細胞と同様に、LPSに应答してMHCクラスII並びにCD80、CD86及びCD40の発現が増大した(図19)。これらの結果は、TIRAP<sup>-/-</sup>マウス及びMyD88<sup>-/-</sup>マウスで観察されたものと類似していた。すなわち、TIRAPがLPS应答に対し、TLR4を介するMyD88非依存的シグナル伝達経路ではなくMyD88依存的シグナル伝達経路で作用することが示され、またTLR2を介するシグナル伝達経路に深く関与していることも示された。これまでに、どのTLRファミリーメンバーを介する炎症性应答にもMyD88が必須であることが示されているが、TIRAPにより、TLR2及びTLR4を介するシグナル伝達経路の両方がそれぞれ特異性をもつことがわかった。

10

【0040】

【発明の効果】

本発明のTIRAPノックアウトマウス等のエンドトキシン及びリポタンパク・リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物は、リポタンパク・リポペプチド等のTLR2が認識するリガンドや、エンドトキシン等のTLR4が認識するリガンドに対して不応答性であるため、TLR2が認識するリガンドやTLR4が認識するリガンドに対する应答の抑制物質若しくは促進物質のスクリーニングが可能となり、ひいては、細菌による感染成立の分子機構の解明における新たな有用情報を得ることができ、TLR2が認識するリガンド及びTLR4が認識するリガンドの作用機序の解明や、各種感染症の治療薬の開発や、エンドトキシンショックや、結核や肺炎等の細菌性感染症に対する治療戦略を構築する上で有用なモデルとすることができる。

20

【0041】

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> non-human animal model irresponsive to endotoxin and lipoprotein·l  
ipopeptide

<130> B02P02

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2277

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (405)..(1127)

<400> 1

cagcgtggag ccgcgtagac titaagaaac aatatcaacc agcataccga aacacagatc 60

ccgagtccta ccaagccact tttcacaggc tttcttgtgt aacctgcatc cagaacagta 120

10

20

30

40

agtctatatg gagacaccaa gacctaggaa gactgttgaa ggccatggtc agcaggaggt 180

gcaaaccat gcaatctacc tggaatcggc tgccttcacc attttatgac tttgtttgcc 240

tagctgacgg atctcaaatg cctctctggc caggigaagc ggagaacaat cgcctacca 300

agttcatacc ttgatggctg atccatgaag ttcagactgg atctcttctc tcccgccttt 360

cccccaatgc ctgctcttcc atggttagtt tggaggcctg cact atg gct tca tcc 416

Met Ala Ser Ser

1

tcc tcc gtc cca gcc tcc tcc act ccg tcc aag aag cct cga gac aag 464

Ser Ser Val Pro Ala Ser Ser Thr Pro Ser Lys Lys Pro Arg Asp Lys

5

10

15

20

ata gct gac tgg ttc agg cag gct ctg ttg aag aag ccc aag aag atg 512

Ile Ala Asp Trp Phe Arg Gln Ala Leu Leu Lys Lys Pro Lys Lys Met

25

30

35

ccg atc tcc cag gaa agc cac ctc tat gat ggt tca cag aca gcc aca 560

Pro Ile Ser Gln Glu Ser His Leu Tyr Asp Gly Ser Gln Thr Ala Thr

40

45

50

cag gat ggt ctc tca ccc tcg agc tgc agc tca ccc ccg agt cac agt 608

Gln Asp Gly Leu Ser Pro Ser Ser Cys Ser Ser Pro Pro Ser His Ser

55

60

65

10

20

30

40



Met Leu Gln Ala Leu Thr Glu Ala Pro Ala Ser Glu Gly Cys Thr Ile  
 185 190 195

ccc ctg ctg tcc ggc ctg tcc aga gcc gcc tac ccg ccg gaa ctc cga 1040  
 Pro Leu Leu Ser Gly Leu Ser Arg Ala Ala Tyr Pro Pro Glu Leu Arg  
 200 205 210

ttc atg tac tat gtg gat ggc aga ggc aag gac gga ggc ttt tac caa 1088  
 Phe Met Tyr Tyr Val Asp Gly Arg Gly Lys Asp Gly Gly Phe Tyr Gln  
 215 220 225

gtc aag gag gct gtt ata cac tat ctg gag aca cta agc tgacacttgg 1137  
 Val Lys Glu Ala Val Ile His Tyr Leu Glu Thr Leu Ser  
 230 235 240

gctttcataa gaaaagctgg gaatagctca cagcagtcac taatccagta tatacagcag 1197

agccagagcc agctgcaccc tgtttaigac acaggatcag atcgtcacca gcttccatta 1257

tcgtggccc acaagatggc caggctgaag atgggaacca cccccgcaag gagaccagga 1317

agaagatggg gactccccaa gaagggcagg aggaagccag ggactcccc aggaagacaa 1377

cgaggaagtc agaaattcga gttgtcaagg gactgtgcta tcgggaaggt cagcagtgtc 1437

ccctctgcgc tgaactggat aggaagctga tacatggctg tcttcttct ctggcatcag 1497

gcacggggga aatggatacc actcctcaag aggggtgaac ccgattgatg agccagaagt 1557

10

20

30

40

igcctagggg agctgagaag aggtggcaag tatccagtcc ttcacacaca cacacactac 1617

igaaactctt ccccagagat gtcaactcac ctacaaaaac tgggaagacac gttcatcccc 1677

atactgaatt tcaccttttg aaaaaaaaaatg tcattaaaaa tgcacccccga ggggctgggg 1737

agacagtggt tcagcgggta agaactcttg ttgcitttcc agaggatcca ggttcaattc 1797

10

ccaggatcca caiggtgact cccaacctta tctataacte tgcctccagg ggatctgatg 1857

cttctciga ccaagacctc ctgagcacc aggtacacac gtgaacacct ccatagatgc 1917

aggcaaaaca atcatacaca taaagaaatc ttccitttta catcagaagt gcaaacctag 1977

20

gactctagat ggagtcctg gtaggcttgc ttagcatacc tgagggtctg gattctacct 2037

ccagcaccac caaaacaaag gagaaaacac aaacctggca gctgctctgt atccagaaac 2097

aggtaagaag aaggaaagcc aggtgagcc aggcgggtgt ggcacacgcc tttaatccca 2157

gcactcggga ggcatlggca ggcggattc tgagttcgag gccagcctgg tctacagagt 2217

30

tcccgacag ccagggtac acagagaaac cctgtctcga aaaaccaaaa aaaaaaaaaa 2277

<210> 2

<211> 241

<212> PRT

40

<213> Mus musculus

<400> 2

Met Ala Ser Ser Ser Ser Val Pro Ala Ser Ser Thr Pro Ser Lys Lys  
 1 5 10 15

Pro Arg Asp Lys Ile Ala Asp Trp Phe Arg Gln Ala Leu Leu Lys Lys  
 20 25 30

10

Pro Lys Lys Met Pro Ile Ser Gln Glu Ser His Leu Tyr Asp Gly Ser  
 35 40 45

Gln Thr Ala Thr Gln Asp Gly Leu Ser Pro Ser Ser Cys Ser Ser Pro  
 50 55 60

20

Pro Ser His Ser Ser Pro Glu Ser Arg Ser Ser Pro Ser Ser Cys Ser  
 65 70 75 80

Ser Gly Met Ser Pro Thr Ser Pro Pro Thr His Val Asp Ser Ser Ser  
 85 90 95

Ser Ser Ser Gly Arg Trp Ser Lys Asp Tyr Asp Val Cys Val Cys His  
 100 105 110

30

Ser Glu Glu Asp Leu Glu Ala Ala Gln Glu Leu Val Ser Tyr Leu Glu  
 115 120 125

Gly Ser Gln Ala Ser Leu Arg Cys Phe Leu Gln Leu Arg Asp Ala Ala  
 130 135 140

40

Pro Gly Gly Ala Ile Val Ser Glu Leu Cys Gln Ala Leu Ser Arg Ser  
 145 150 155 160

His Cys Arg Val Leu Leu Ile Thr Pro Gly Phe Leu Arg Asp Pro Trp  
 165 170 175

Cys Lys Tyr Gln Met Leu Gln Ala Leu Thr Glu Ala Pro Ala Ser Glu  
 180 185 190

Gly Cys Thr Ile Pro Leu Leu Ser Gly Leu Ser Arg Ala Ala Tyr Pro  
 195 200 205

Pro Glu Leu Arg Phe Met Tyr Tyr Val Asp Gly Arg Gly Lys Asp Gly  
 210 215 220

Gly Phe Tyr Gln Val Lys Glu Ala Val Ile His Tyr Leu Glu Thr Leu  
 225 230 235 240

Ser

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の T I R A P ノックアウトマウス及び野生型マウス及びターゲッティングベクターの遺伝子地図を示す図である。

【図 2】左：本発明の T I R A P ノックアウトマウス及び野生型マウスそれぞれにおける E S 細胞内の相同的組換えを、サザンブロットにより確認した結果を示す図である。右：本発明の T I R A P ノックアウトマウス及び野生型マウスそれぞれにおける T I R A P m R N A の発現について確認するため、N 末端断片、C 末端断片 - アクチンをプローブとして分析を行った結果を示す図である。

【図 3】本発明の T I R A P ノックアウトマウスにおける破壊された T I R A P 遺伝子の N 末端領域の c D N A 配列及び予想されるアミノ酸配列を示す図である。数字は開始コドンからの c D N A の位置を示し、強調文字は野生型 T I R A P 遺伝子産物と分裂された T I R A P 遺伝子産物との共通部分を示す。

【図 4】本発明の T I R A P ノックアウトマウス及び野生型マウスの脾細胞それぞれの L P S 及び C p G O D N に対する応答性の結果を示す図である。

【図 5】本発明の T I R A P ノックアウトマウス及び野生型マウスの脾臓 B 細胞表面の M H C クラス I I の発現を示す図である。

【図 6】本発明の T I R A P ノックアウトマウス及び野生型マウスの脾細胞の I L - 1 存在下、P H A 存在下、I L - 1 と P H A の共存在下における増殖を測定した結果を示す図である。

【図 7】本発明の T I R A P ノックアウトマウス及び野生型マウスの腹腔マクロファージ

の、L P S が誘導する炎症性サイトカイン産生について測定した結果を示す図である。

【図 8】本発明の T I R A P ノックアウトマウス及び野生型マウスの腹腔マクロファージの、R - 8 4 8 及び C p G O D N が誘導する炎症性サイトカイン産生について測定した結果を示す図である。

【図 9】本発明の T I R A P ノックアウトマウス及び野生型マウスの腹腔マクロファージの、M A L P - 2 及び S . a u r e u s P G N が誘導する炎症性サイトカイン産生について測定した結果を示す図である。

【図 10】本発明の T I R A P ノックアウトマウス及び野生型マウスの腹腔マクロファージのポリ I : C が誘導する I F N - m R N A の発現を分析した結果を示す図である。

【図 11】本発明の T I R A P ノックアウトマウス及び野生型マウスの腹腔マクロファージを L P S、M A L P - 2、又は R - 8 4 8 で刺激し視覚化した結果を示す図である。 10

【図 12】本発明の T I R A P ノックアウトマウス及び野生型マウスの腹腔マクロファージを L P S、M A L P - 2、又は R - 8 4 8 で刺激し、M A P キナーゼの活性化を分析した結果を示す図である。

【図 13】本発明の T I R A P ノックアウトマウス及び野生型マウスの腹腔マクロファージを L P S、M A L P - 2 又は R - 8 4 8 で刺激し、I R A K - 1 のリン酸化活性を分析した結果を示す図である。

【図 14】本発明の T I R A P ノックアウトマウス、野生型マウス及び M y D 8 8 ノックアウトマウスの腹腔マクロファージを L P S で刺激し、I P - 1 0、G A R G - 1 6、及び I R G - 1 の発現を分析した結果を示す図である。 20

【図 15】本発明の T I R A P ノックアウトマウス及び野生型マウスの骨髄由来樹状細胞を L P S で刺激し、細胞表面に発現している抗原量を分析した結果を示す図である。

【図 16】本発明の T I R A P ノックアウトマウス及び野生型マウスの腹腔マクロファージを L P S で刺激し、I R F - 3 の単量体形及び二量体形を検出した結果を示す図である。

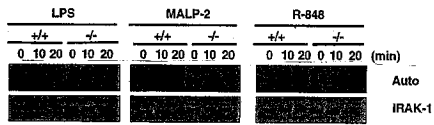
【図 17】本発明の T I R A P ノックアウトマウス及び野生型マウスの腹腔マクロファージを L P S で刺激し、ウェスタンブロットによりリン酸化 P K R を検出した結果を示す図である。

【図 18】本発明の T I R A P / M y D 8 8 ダブルノックアウトマウス及び野生型マウスの腹腔マクロファージを L P S で刺激し、I P - 1 0、G A R G - 1 6、及び I R G - 1 の発現を分析した結果を示す図である。 30

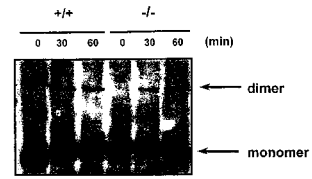
【図 19】本発明の T I R A P / M y D 8 8 ダブルノックアウトマウス及び野生型マウスの骨髄由来樹状細胞を L P S で刺激し、細胞表面に発現している抗原量を分析した結果を示す図である。



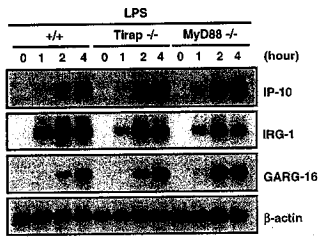
【 13 】



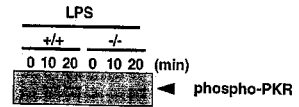
【 16 】



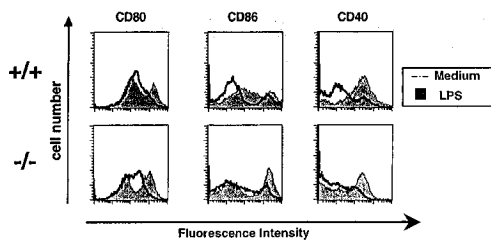
【 14 】



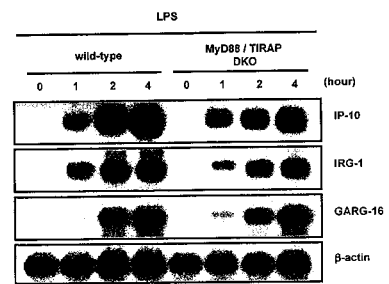
【 17 】



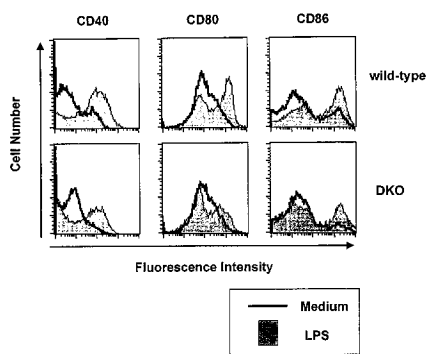
【 15 】



【 18 】



【 19 】



## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I		テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M	
	G 0 1 N 33/566		

专利名称(译)	内毒素和脂蛋白·脂肽无反应模型非人类动物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004073073A</a>	公开(公告)日	2004-03-11
申请号	JP2002237562	申请日	2002-08-16
[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)	科学技术振兴事业团		
[标]发明人	審良 静男		
发明人	審良 静男		
IPC分类号	A01K67/027 C07K14/47 C12N15/09 C12N15/85 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G11C13/00		
CPC分类号	C12N15/8509 A01K67/0276 A01K2217/075 A01K2227/105 A01K2267/03 C07K14/4702		
FI分类号	C12N15/00.A A01K67/027.ZNA C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 A01K67/027 C12N15/85.P C12N15/85.Z C12N5/00.202.C C12N5/0735		
F-TERM分类号	2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA12 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ43 4B063/QR08 4B063/QR42 4B063/QR56 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX07 4B065/AA90		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种对细菌细胞成分（例如脂蛋白/脂肽，肽聚糖，内毒素等）无反应的非人类动物模型，细菌细胞成分可用于阐明TRAP家族衔接子蛋白TIRAP和提供了使用不响应这些细菌细胞成分的非人类动物模型来促进或抑制对细菌细胞成分的应答的物质，以及启动子或抑制剂的筛选方法。解决方案：产生了TIRAP<sup>-/-</sup>小鼠，其中TIRAP基因的功能在染色体上不足，并且TIRAP<sup>-/-</sup>小鼠识别被TLR2识别的配体（例如脂蛋白/脂肽）和TLR4识别的配体（例如内毒素）。证实了对配体的反应性特别受损。

图 4 ]

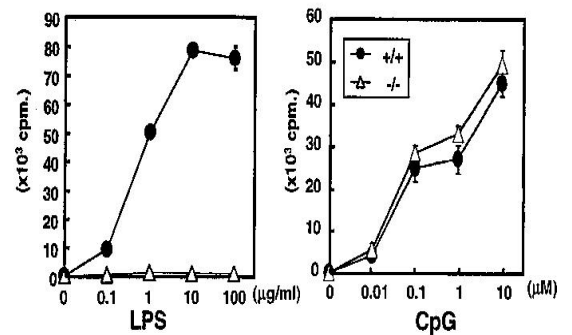


图 5 ]