

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02003/005811

発行日 平成16年10月28日 (2004. 10. 28)

(43) 国際公開日 **平成15年1月23日 (2003. 1. 23)**(51) Int. Cl.⁷

F I

A O 1 K 67/027
A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 37/08
C 1 2 N 15/09

A O 1 K 67/027
A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 17/00
A 6 1 P 37/08
G O 1 N 33/15

Z

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 14 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2003-511626 (P2003-511626)	(71) 出願人	000207827 大鵬薬品工業株式会社
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/007047		東京都千代田区神田錦町1-27
(22) 国際出願日	平成14年7月11日 (2002. 7. 11)	(71) 出願人	500282368 中西 憲司
(31) 優先権主張番号	特願2001-212218 (P2001-212218)		兵庫県宝塚市中山桜台7丁目7-7
(32) 優先日	平成13年7月12日 (2001. 7. 12)	(71) 出願人	500282357 水谷 仁
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		三重県津市大園町10-41
(81) 指定国	EP (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), JP, US	(74) 代理人	110000084 特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100068700 弁理士 有賀 三幸
		(74) 代理人	100077562 弁理士 高野 登志雄

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I L - 1 8 遺伝子導入動物

(57) 【要約】

外来性の I L - 1 8 遺伝子を皮膚特異的に発現するように組み込んだ D N A を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物又はその子孫。

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、特異的病原微生物の非存在下で自然発症的にアトピー性皮膚炎を発症するので疾患モデル動物として有用である。本発明のトランスジェニック動物を用いれば、自然免疫によるアトピー性皮膚炎の予防治療用医薬の開発、さらにはアトピー性疾患の発症メカニズムの解明が可能となる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

外来性の I L - 1 8 遺伝子を皮膚特異的に発現するように組み込んだ D N A を有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物又はその子孫。

【請求項 2】

外来性の I L - 1 8 遺伝子を皮膚特異的に発現するように組み込んだ D N A が、外来性 I L - 1 8 遺伝子と皮膚特異的蛋白のプロモータを含む D N A である請求項 1 記載の動物又はその子孫。

【請求項 3】

皮膚特異的蛋白のプロモータが、ケラチンプロモータである請求項 2 記載の動物又はその子孫。 10

【請求項 4】

外来性の I L - 1 8 遺伝子を皮膚特異的に組み込んだ D N A が、ケラチンプロモータの下流に副甲状腺ホルモン遺伝子及び I L - 1 8 遺伝子を結合した D N A である請求項 1 記載の動物又はその子孫。

【請求項 5】

持続的にアトピー性皮膚炎を生ずるものである請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の動物又はその子孫。

【請求項 6】

表皮細胞壊死及び肝障害をほとんど生じないものである請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の動物又はその子孫。 20

【請求項 7】

血中に持続的に成熟型 I L - 1 8 を分泌するものである請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の動物又はその子孫。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項記載の動物又はその子孫に被験物質を投与し、アトピー性皮膚炎の改善効果を検定することを特徴とするアトピー性皮膚炎の予防又は治療用物質のスクリーニング方法。

【請求項 9】

請求項 8 記載のスクリーニング方法によりアトピー性皮膚炎の改善効果を有すると判定される物質を含有するアトピー性皮膚炎の予防又は治療用医薬。 30

【請求項 10】

非ヒト哺乳動物の受精卵に、外来性の I L - 1 8 遺伝子を皮膚特異的に発現するように組み込んだ D N A を導入し、当該受精卵を当該動物の雌に着床させることを特徴とする請求項 1 ~ 7 記載の動物又はその子孫の作製方法。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、アトピー性皮膚炎、特に慢性アトピー性皮膚炎のモデル動物として有用なトランスジェニック動物に関する。

背景技術

アトピー性皮膚炎、喘息、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎等のアトピー性疾患は正常人が反応しない環境抗原等に対して過敏に反応を示し、自己の免疫系による各臓器の破壊、障害を生ずる疾患である。これらの疾患の発生機序にはアレルギー反応を増強する T h 2 型サイトカインの関与が想定されている。その誘導機序、調節機序の解明は生理学及び薬学上重要な意味を持つが、詳細なメカニズムは明らかにされていない。

現在、アトピー性疾患の治療には主として、抗原からの回避、ヒスタミン等のメディエーターの受容体の結合に拮抗する抗ヒスタミン剤、抗炎症ステロイド剤等によるものが知られているが、より特異的な作用機序をターゲットとした治療方法の開発は、適切な実験動物がないことにより妨げられている。

従来、実験動物にアレルギー反応を誘発させるためには、予め抗原又はアレルゲンを繰り 50

返し免疫することにより動物を感作しておいてから当該抗原又はアレルゲンを投与する必要があった。この場合、同時に多数の動物を感作するのは多大な労力を要するばかりでなく、個々の動物間に反応性のばらつきが生じることがあり、実験の再現性の上で問題となることがあった。

近年、NC/Ngaマウスがアトピー性皮膚炎のモデル動物として注目されているが、このマウスに起こる皮膚炎はダニ存在下で初めて発症するもので、その発症率も不安定であり、症状も一定しない。

アトピー性疾患の治療薬の開発には動物実験が不可欠で、特にアトピー性皮膚炎のモデル動物が希求されているが、遺伝的背景が確立され、免疫学的にも明らかで、特異的病原微生物を排除した条件下で各種治療法及び薬剤の開発研究に利用可能なアトピー性皮膚炎モデル動物は現在のところ存在せず、実用に供されていない。

従って、本発明の目的は、アトピー性皮膚炎モデルとして有用な動物を作製することにある。

発明の開示

そこで本発明者らはインターロイキン18(IL-18)に着目した。IL-18は、カスパーゼ1(Caspase-1)と呼ばれるプロテアーゼによってプロセッシングを受けて前駆型から成熟型に変換される。成熟型のIL-18の機能としては、(1)IFN- γ 産生の誘導、(2) Fasリガンド発現の増強によるFas介在性アポトーシスの増強、(3)GM-CSFの誘導、(4)IL-12との共存によるIgE産生抑制等が知られている。また、IL-18は免疫組織以外の骨芽細胞様間質細胞、ケラチノサイト、小腸上皮細胞、副腎皮質細胞、下垂体細胞といったさまざまな組織でも発現されており、その生理学的な役割について活発な研究が行われている(免疫1997-98, 中山書店, 62-72; 臨床免疫, 30(2), 191-198, 1998等参照)。近年、発明者等はIL-18単独で過剰発現した場合は、IL-4及びIL-13の産生を増強し、IgE産生を誘導する知見を得た。このことは、IL-18がアトピー性疾患の発症に関係するTh2型サイトカインに深く関与していることを意味する。従って、IL-18を成熟型に変換するカスパーゼ1の分泌が促進されたモデル動物が作製されれば、アトピー性疾患の発症メカニズムの解明、治療法の開発に有用であると考えた。しかし、カスパーゼ1はアポトーシス誘導酵素であるため、この遺伝子を導入して生体内で発現させるとIL-18分泌のみでなく細胞死効果も発生するという問題があった。

かかる観点から本発明者らはカスパーゼ1遺伝子を皮膚特異的に発現するように組み込んだDNAを導入したトランスジェニック非ヒト哺乳動物を作製し、先に特許出願した(国際公開W001/95710号)。このトランスジェニック動物はアトピー性皮膚炎の症状を呈し、モデル動物として有用である。しかし、このトランスジェニック動物も表皮細胞壊死症状が生じ急性期皮膚炎の症状が見られ、また細菌感染により全身性の肝障害を生じることがあった。

そこで本発明者らは、さらに検討した結果、直接、成熟型IL-18を皮膚特異的に発現するように組み換えたDNAを動物細胞に導入すれば、血中に持続的に成熟型IL-18を分泌し、ダニ、カビ類等の特異的病原微生物を排除した条件下において飼育してもアトピー性皮膚炎の症状を呈するトランスジェニック動物が作製できること、さらに意外にも当該トランスジェニック動物が表皮細胞壊死症状や肝障害がなく、よりヒトのアトピー性皮膚炎に近いモデル動物として有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、外来性のIL-18遺伝子を皮膚特異的に発現するように組み込んだDNAを有するトランスジェニック非ヒト哺乳動物又はその子孫、及びその作製方法を提供するものである。

また本発明は、上記トランスジェニック動物に被験物質を投与し、アトピー性皮膚炎の改善効果を検定することを特徴とするアトピー性皮膚炎の予防又は治療用物質のスクリーニング方法、及び当該スクリーニングによりアトピー性皮膚炎の改善効果を有すると判定される物質を含有するアトピー性皮膚炎の予防又は治療用医薬を提供するものである。

発明を実施するための最良の形態

10

20

30

40

50

本発明のトランスジェニック動物は、体細胞及び生殖細胞に外来性の I L - 1 8 遺伝子を皮膚特異的に発現するように組み込んだ D N A を有する。ここで外来性 I L - 1 8 遺伝子としては、ヒト又はマウスの I L - 1 8 遺伝子が好ましく、例えばヒト成熟型 I L - 1 8 (h I L - 1 8)、マウス成熟型 I L - 1 8 (m I L - 1 8)、ヒト前駆型 I L - 1 8 (h p r o I L - 1 8)、マウス前駆型 I L - 1 8 (m p r o I L - 1 8) 等の遺伝子が挙げられるが、h I L - 1 8 又は m I L - 1 8 が好ましく、m I L - 1 8 の完全なコード領域の 0 . 6 3 k b c D N A が特に好ましい。

外来性の I L - 1 8 遺伝子を皮膚特異的に発現するように組み込んだ D N A としては、外来性 I L - 1 8 遺伝子と皮膚特異的蛋白のプロモータとを含む組み換え D N A が好ましい。ここで、皮膚特異的蛋白のプロモータとしては、皮膚に特異的に存在する蛋白のプロモータが挙げられ、例えばケラチン 1 4、ケラチン 5、ケラチン 1、ケラチン 1 0 等のケラチンプロモータ、インボルクリン等のプロモータが挙げられるが、ケラチンプロモータが特に好ましい。また、I L - 1 8 の分泌を促進させるため、副甲状腺ホルモン遺伝子、例えば p r e p r o 副甲状腺ホルモン (p r e p r o P a r a t h y r o i d h o r m o n e : P T H) 遺伝子のリーダーシーケンスを I L - 1 8 遺伝子に結合するのが好ましい。成熟型 I L - 1 8 を皮膚特異的に発現させ、かつ良好に分泌させるにはケラチンプロモータの下流に副甲状腺ホルモン遺伝子及び I L - 1 8 遺伝子を結合させるのがより好ましい。さらに、遺伝子の発現効率を上げるため - g l o b i n イントロン等のイントロンも結合するのが好ましい。

上記 D N A は、遺伝子導入哺乳動物において、目的とするメッセンジャー R N A の転写を終結する配列 (ポリ A、一般にターミネーターと呼ばれる) を有していることが好ましく、例えば、ウィルス由来、各種哺乳動物由来の各遺伝子の配列を用いて遺伝子発現を操作することができる。好ましくは、前記皮膚特異的蛋白のポリ A、特に好ましくはケラチンのポリ A 等が用いられる。その他、目的の遺伝子をさらに高発現させる目的で、各遺伝子のスプライシングシグナル、エンハンサー領域、真核遺伝子のイントロンの一部を、プロモーター領域の 5' 上流、プロモーター領域と翻訳領域間あるいは翻訳領域の 3' 下流に連結することも可能である。

かくして得られる組み換え D N A を導入するための非ヒト哺乳動物としては、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウス等が挙げられる。好ましくは、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス又はラットであり、なかでもモルモット、ハムスター、マウス、ラット等の齧歯目 (R o d e n t i a) が好ましく、とりわけマウスが好ましい。

本発明のトランスジェニック動物は、例えば非ヒト哺乳動物の受精卵に、前記外来性の I L - 1 8 遺伝子を皮膚特異的に発現するように組み込んだ D N A を導入し、当該受精卵を当該動物の雌に着床させることにより作製される。ここで、受精卵としては、雄精前核時期 (受精後約 1 2 時間位) のものが好ましい。また組み換え D N A の導入方法としては、リン酸カルシウム法、電気パルス法、リポフェクション法、凝集法、マイクロインジェクション法、パーティクルガン法、D E A E - デキストラン法等が挙げられるが、マイクロインジェクション法が特に好ましい。

組み換え D N A を導入した受精卵は、当該受精卵と同種の動物の雌に着床させる。着床の手段は、偽妊娠雌性動物の卵管に人工的に移植、着床させる手段が好ましい。かくして、受精卵を着床させた動物から生まれた仔の中から、目的とする遺伝子を発現している個体を選別し、当該個体を継代すればよい。

得られたトランスジェニック動物に目的遺伝子が含まれているか否かの確認は、皮膚から D N A を採取し、ポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 及びサザンブロットティング法による導入遺伝子の解析によって行うことができる。

かくして得られる本発明のトランスジェニック動物は、皮膚において外来性 I L - 1 8 遺伝子が発現されるため、特異的病原微生物の非存在下でもアトピー性皮膚炎の症状を呈し、かつ長期間生存するという特徴を有する。

すなわち、本発明のトランスジェニック動物は、外来性の I L - 1 8 遺伝子を皮膚のみに

10

20

30

40

50

有し、他の組織、例えば肝臓、腎臓、肺、脳、脾臓では有さない。その結果、本発明のトランスジェニック動物の皮膚には、成熟型IL-18が多量に分泌されている。さらに本発明のトランスジェニック動物の血中には成熟型IL-18が正常動物に比べて大量に含まれている。

本発明のトランスジェニック動物は、24週齢ぐらいからアトピー性皮膚炎の症状を、例えば苔癬化皮膚炎、びらん性皮膚炎等を呈する。このうち、苔癬化皮膚炎の症状は、前記のカスパーゼ1遺伝子導入動物の場合に比べてはっきり特徴的に生じており、本発明のトランスジェニック動物がヒトの慢性皮膚炎により近いものであることを示している。

また、皮膚組織の光学顕微鏡観察では、本発明トランスジェニック動物は24週齢ぐらいから、潰瘍の周辺の厚い表皮には、過角化を伴った炎症又は表皮肥厚といった変化が生じ、病変の真皮には、単核細胞及び肥満細胞の浸潤が生じる。しかし、表皮細胞壊死はほとんど生じない。また、本発明トランスジェニック動物では肝障害がほとんどみられない。ヒトのアトピー性皮膚炎には表皮細胞壊死や肝障害は通常みられないことから、本発明のトランスジェニック動物は、ヒトのアトピー性皮膚炎に極めて近い症状を呈するものであることがわかる。

また、本発明のトランスジェニック動物は、正常動物及び前記のカスパーゼ1遺伝子導入動物に比べて極めて多くの皮膚搔破行動をくり返し、アトピー性皮膚炎特有の強い搔痒を伴うことがわかる。さらに、本発明のトランスジェニック動物は、血中のヒスタミンレベル及びIgEが極めて高いという、アトピー性皮膚炎特有の症状を示す。

このように本発明のトランスジェニック動物は、特異的病原微生物非存在下で、アトピー性皮膚炎の症状を呈するので、アトピー性皮膚炎の症状モデルとして有用である。すなわち、本発明のトランスジェニック動物又はその子孫に被験物質を投与し、アトピー性皮膚炎の改善効果を検定すれば、アトピー性皮膚炎の予防又は治療用物質のスクリーニングが可能となる。ここで、アトピー性皮膚炎の改善効果は、前記血中成熟型IL-18レベルの測定、皮膚中の成熟型IL-18の検出、肉眼観察、皮膚組織の顕微鏡観察、血中ヒスタミンレベルの測定等を単独で又は適宜組み合わせて検定すればよい。また当該スクリーニングによりアトピー性皮膚炎改善効果があると判定された被験物質はアトピー性皮膚炎の予防又は治療用の医薬として有用である。

実施例

次に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明は何らこれに限定されるものではない。

まず、実施例に用いた各種試験方法及び材料について説明する。

(1) ノーザンプロット法

mIL-18のcDNAは、兵庫医大(岡村博士)より入手した(Nature, 378, p88-91, 1995)。全RNAは、後記実施例1により得られたmIL-18トランスジェニックマウス(KIL-18Tg)及びコントロールマウスの組織からIsogen試薬(ニッポンジーン社製)を使用して抽出した。ノーザンプロット解析では、10 μ gの全RNAを2重量%ホルムアルデヒド/アガロースゲル電気泳動により、サイズを分画した。RNAをナイロン膜(Immobilon-N、ミリポア社製)に移し、マウスのIL-18に対応する³²PでラベルしたcDNAをプローブに使用した。ハイブリダイゼーションの後、プロットを42 $^{\circ}$ C、1 \times SSC/0.1重量%SDSで2回、2 \times SSC/0.1重量%SDSで2回洗浄した。その後、プロットを-70 $^{\circ}$ CでX線フィルムに露光した。

(2) サイトカイン、サイトカインアッセイ及び抗体

IL-18の生物学的活性は、IL-18反応性マウスNK細胞を使用してIFN- γ 誘導活性で測定した。リコンビナントマウスIL-18(rmIL-18)、ウサギ抗マウスIL-18中和抗体及びマウスIL-18ELISAキットは林原研究所より入手した。マウスIL-18ELISAキットでは10~1000pg/mLのIL-18を検出可能であった。

(3) 免疫組織化学

10

20

30

40

50

トランスジェニックとワイルドタイプマウスからのバイオプシー標本は、リン酸緩衝ホルマリンで2時間固定した。次いで、パラフィン切片にカットした。サンプルは、直ちに、冷凍組織用包埋剤であるOCT compound (Miles社製)中で、凍結し、-70で保存した。クリオスタットの部分(5 μ m)は、アセトンで5分間、4で固定し、適度に希釈した一次抗体で1時間インキュベートした。洗浄後、結合した一次抗体を基質としてAEC (ダコジャパン社製)を使用してVectastain Eliteキット (Vector Laboratories社製)で視覚化した。

(4) イムノプロット

イムノプロットはJ. Clin. Invest. 87:1066 (1991)に従って行った。Isogenキットを使用して、DNAとRNAを除去した後、トランスジェニックとコントロールマウスからの表皮の細胞ライセートを還元条件下、SDS-サンプルバッファーで懸濁した。電気泳動した蛋白質を、セミドライプロッター (Bio-Rad社製)を使用してニトロセルロース膜 (Schleicher & Schuell社製)に転写した。膜を一次抗体で1時間インキュベートした後、アルカリホスファターゼ標識抗マウスIgG又は抗ウサギIgG抗体で二次インキュベートし、最後に、ウエスタンブール-基質 (Promega社製)で発色させた。

10

実施例 1

(1) DNA構成及びトランスジェニックマウスの作製

prepro副甲状腺ホルモン遺伝子リーダーシーケンス (PTH)と結合したmIL-18の完全なコード領域の0.63kb cDNA (東大医科研、田原博士より入手。Genetherapy, 6, 808-815 (1999)参照)を、ケラチン14プロモータ (シカゴ大学、E. Fuchs博士より入手。Nature, 374, p159 (1995)参照)及びウサギ globinイントロン (京都大学、田中博士より入手。Nature, 374, p159 (1995)参照)に平滑末端ライゲーションによって結合させた (図1: 図1中、K14 promoterはケラチン14プロモータを、globin Intronはウサギ globinイントロンを、PTH-mIL-18は、PTHとmIL-18の完全なコード領域0.63kb cDNAを、K14 polyAはヒトケラチン14ポリAを示す)。得られたDNAフラグメントをC57BL/L6マウス (日本チャールスリバー社)の受精卵へDev. Growth Differ., 39:257 (1997)記載の方法に準じてマイクロインジェクション法により注入した。

20

30

(2) トランスジェニックマウスにおける皮膚でのmIL-18過剰発現の確認

尾部皮膚からのDNAを使用したPCR及びサザンブロッティング法による導入遺伝子の取り込みによって仔をスクリーニングした。トータル50匹誕生したマウスのうち2匹 (2)がmIL-18のトランスジェニックであった (以下、KIL-18Tgと略す)。KIL-18Tgは、誕生時より健康で、正常に成長した。24週齢前においては同腹児のワイルドタイプよりやや小さかった。この時点の後、KIL-18Tgは慢性活動性皮膚炎の症状が明確に発現した。2匹のKIL-18Tgは、ワイルドタイプと交配させた結果、 $\text{KIL-18Tg} : \text{ワイルドタイプ} = 1 : 1$ でKIL-18Tgとワイルドタイプの仔が誕生した。すべての実験は、非トランスジェニックやワイルドタイプ同腹児と導入遺伝子のライン化されたヘテロ接合体との比較で行った。

40

(3) 皮膚の症状

KIL-18Tgは、特別な病原体の検出されない条件のもとで24週から、目の周りの中程度の皮膚炎が著明となり、急速に広範囲の皮膚炎に進展した。これらの症状は、その後数週内に顔、耳、首、胴体、足に広がった。皮膚炎症の慢性化が起こり、皮膚炎は持続した。顔、体幹、四肢の毛は、多数の掻破痕を伴い消失した。

光学顕微鏡レベルでは、KIL-18Tgの表皮は、24週まで特に組織学的変化は認められなかった。24週齢のKIL-18Tgの病変部の厚い表皮は、苔癬化を伴った慢性湿疹様の変化が認められた。病変の真皮には、多くの単核細胞と肥満細胞が浸潤していた。表皮細胞の壊死は認められなかった。

50

高レベルのIL-18が、KIL-18Tgの厚い表皮組織中で検出された。一方、コントロールのマウスではそれは極少量検出されただけであった。

(4) 皮膚における成熟型IL-18の検出

ノーザンブロット解析及びRT-PCRにより、KIL-18Tgの耳表皮、背部表皮、肝臓、腎臓、結腸、肺、脳及び脾臓におけるmIL-18のmRNAを測定した。その結果、0.63kb mIL-18のmRNAは、KIL-18Tgの耳及び背部表面にのみ認められたが、他の組織(肝臓、腎臓、結腸、肺、脳及び脾臓)では認められなかった(図2及び3参照)。なお、図2中、レーン1はKIL-18Tgの、レーン2は非トランスジェニック(ワイルドタイプ)の耳表皮組織のmRNAの検出結果を示す。図3中、レーン1はHindを、レーン2はKIL-18Tgを、レーン3は正常マウス、レーン4は陽性コントロールを示す。

10

(5) 血中におけるIL-18レベル

外因性IL-18による局所でのIL-18の活性化が、成熟型のサイトカインの全身性の蓄積をもたらすのかどうかを検討した。図4に示すように、高レベルのIL-18が有意に誕生後12週及び36週のKIL-18Tgの血清中で認められた。対照的に、ワイルドタイプ(WT)の同腹児では、生存期間中を通じて、血清中でのIL-18のレベルは、低かった(0.1ng/mL以下)。KIL-18Tgの血清IL-18濃度は、高値を維持した。また図4にはカスパーゼ1遺伝子を皮膚特異的に発現するように組み込んだDNAを有するトランスジェニックマウス(国際公開W001/95710号参照、KCASP1Tg)の血清中のIL-18濃度も示した。KIL-18Tgの血清中IL-18濃度は、KCASP1Tgのそれよりも極めて高かった。

20

KIL-18Tgの血清中IL-18が成熟型IL-18であることを確かめるために、KIL-18Tgの血清中IL-18の生物学的活性を検討した。その結果、KIL-18Tgからの血清は、IL-18反応性のクローン化されたナチュラルキラー細胞によるIFN- γ 産生を誘導する能力があることがわかった。さらに、このIFN- γ 誘導能力は、抗IL-18抗体(中和抗体)により完全に阻害された。これは、KIL-18Tgの血清中に活性型IL-18を含んでいることを意味する。しかしながら、IFN- γ は定常状態では、KIL-18Tgの血清中には検出されなかった。このように、KIL-18Tgは循環血中に持続的に成熟型IL-18を分泌していた。

30

(6) トランスジェニックマウスの皮膚搔破行動

目視法に従ってKIL-18Tg及びワイルドタイプ(C57BL/L6マウス)における皮膚搔破回数を60分間測定した。

その結果、図5に示すように、ワイルドタイプの搔破回数は10分間あたり50回以下であるのに対し、KIL-18Tgのそれは10分間あたり300回以上であり、本発明のトランスジェニックマウスには痒みを伴う強い皮疹が生じていることがわかった。またKIL-18Tgの搔破回数はKCASP1Tgのそれよりも多かった。

(7) 血中におけるIgEレベル

KIL-18Tg及びワイルドタイプの血中IgE濃度(ELISA法)を36週齢に測定した。その結果を図6に示す。この結果より、本発明のトランスジェニックマウスは、血中IgEレベルが36週齢で120 μ g/mm以上と極めて高値となることがわかる。また、KIL-18Tgの血中IgEレベルはKCASP1Tgのそれよりも極めて高かった。

40

産業上の利用可能性

本発明のトランスジェニック非ヒト哺乳動物は、特異的病原微生物の非存在下で自然発症的にアトピー性皮膚炎を発症するので疾患モデル動物として有用である。本発明のトランスジェニック動物を用いれば、自然免疫によるアトピー性皮膚炎の予防治療用医薬の開発、さらにはアトピー性疾患の発症メカニズムの解明が可能となる。

【図面の簡単な説明】

図1は、導入に用いた組み換えDNAの結合状態を示す図である。

図2は、KIL-18Tgの耳表皮組織中におけるmIL-18のmRNAの発現を、ノ

50

ーザンプロット解析した結果を示す図である。

図3は、KIL-18Tgの耳表皮組織中におけるmIL-18の同mRNAの発現を、RT-PCRで解析した図である。

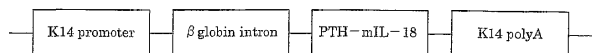
図4は、KIL-18Tg、KCASP1Tg及びワイルドタイプ(WT)における誕生後12週及び36週の血清中IL-18濃度の変化を示す図である。

図5は、KIL-18Tg、KCASP1Tg及びワイルドタイプ(WT)における皮膚搔破回数の測定結果を示す図である。

図6は、KIL-18Tg、KCASP1Tg及びワイルドタイプ(WT)の血中のIgE濃度(36週)を示す図である。

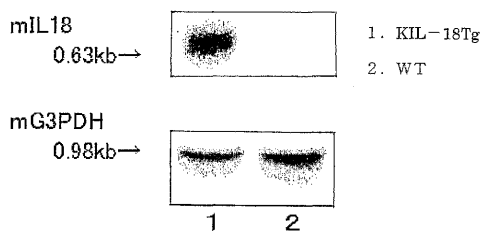
【図1】

図1



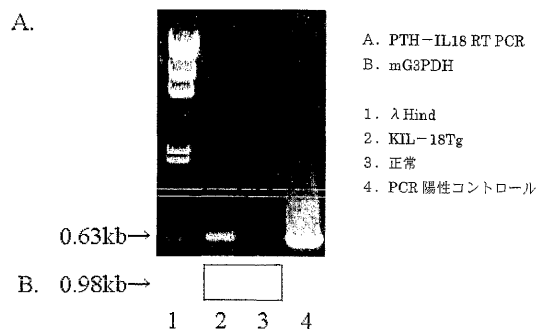
【図2】

図2



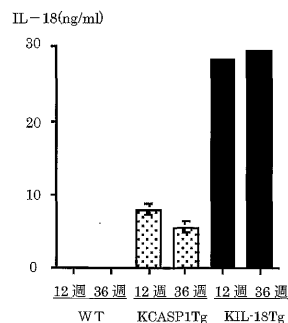
【図3】

図3

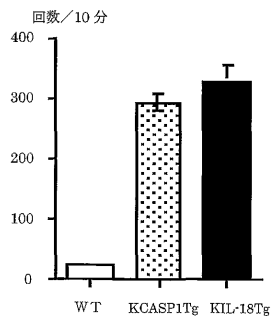


【図4】

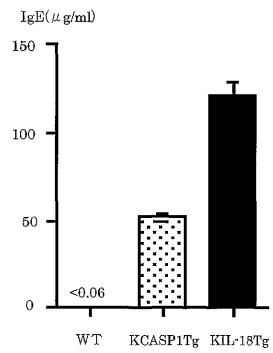
図4



【 図 5 】 图 5



【 図 6 】 图 6



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/07047
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. ⁷ A01K67/027, G01N33/15, G01N33/50, A61K45/00, A61P17/00, A61P37/08		
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 A01K67/027, G01N33/15, G01N33/50, A61K45/00, A61P17/00, A61P37/08		
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) WPIDS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	WO 01/95710 A1 (Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.), 20 December, 2001 (20.12.01), (Family: none)	1-8, 10
A	YAMANAKA K. et al., J.Immunol., Vol.165, pages 997 to 1003 (2000)	1-8, 10
A	HOSHINO T. et al., J.Immunol., Vol.166, pages 7014 to 7018 (15 June, 2001 (15.06.01))	1-8, 10
A	OSAKI T. et al., Gene Therapy, Vol.6, pages 808 to 815 (1999)	1-8, 10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document 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 "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 August, 2002 (29.08.02)		Date of mailing of the international search report 10 September, 2002 (10.09.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/07047**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 9
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
It is not sufficiently supported by the description what specific compounds correspond to the "drugs for preventing or treating" as set forth in claim 9.

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告		国際出願番号	PCT/JPO2/07047	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl. ⁷ A01K 67/027, G01N 33/15, G01N 33/50, A61K 45/00, A61P 17/00, A61P 37/08				
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 A01K 67/027, G01N 33/15, G01N 33/50, A61K 45/00, A61P 17/00, A61P 37/08				
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) WPIDS, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE				
C. 関連すると認められる文献				
引用文献の カテゴリ*	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		
PA	W0 01/95710 A1(Taiho Pharmaceutical Co.,LTD) 2001.12.20 (ファミリーなし)	1-8, 10		
A	Yamanaka K. et al., J.Immunol., vol.165, pp.997-1003 (2000)	1-8, 10		
A	Hoshino T. et al., J.Immunol., vol.166, pp.7014-7018 (2001 J un 15)	1-8, 10		
A	Osaki T. et al., Gene Therapy, vol.6, pp.808-815 (1999)	1-8, 10		
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。				
* 引用文献のカテゴリ 「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 「B」 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」 優先権主張に異議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	29. 08. 02	国際調査報告の発送日	10.09.02	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JIP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区蔵が間三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 長井 啓子	2B	9123	
		電話番号	03-3581-1101 内線 3237	

国際調査報告	国際出願番号 PCT/JPO2/07047
<p>第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)</p> <p>法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、</p> <p>2. <input checked="" type="checkbox"/> 請求の範囲 9 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、請求の範囲 9 の「予防又は治療用医薬」は、具体的にどのような化合物であるのか、明細書によって十分に裏付けられていない。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4 (a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。</p>	
<p>第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 3 の続き)</p> <p>次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。</p>	
<p>1. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。</p> <p>2. <input type="checkbox"/> 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。</p>	
<p>追加調査手数料の異議の申立てに関する注意</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。</p> <p><input type="checkbox"/> 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。</p>	

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 15/00	A

- (74)代理人 100096736
弁理士 中嶋 俊夫
- (74)代理人 100089048
弁理士 浅野 康隆
- (74)代理人 100101317
弁理士 的場 ひろみ
- (74)代理人 100117156
弁理士 村田 正樹
- (74)代理人 100111028
弁理士 山本 博人
- (72)発明者 水谷 仁
三重県津市大園町10-41

(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)	il-18转基因动物		
公开(公告)号	JPWO2003005811A1	公开(公告)日	2004-10-28
申请号	JP2003511626	申请日	2002-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	水谷仁		
申请(专利权)人(译)	大鹏药业有限公司 中西健治 水谷仁		
[标]发明人	水谷仁		
发明人	水谷 仁		
IPC分类号	A01K67/027 A61K45/00 A61P17/00 A61P37/08 C12N15/09 C12N15/85 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68		
CPC分类号	A01K67/0275 A01K2217/05 A01K2227/105 A01K2267/0325 A61P17/00 C12N15/8509 C12N2830/008 G01N33/6869 G01N2500/00		
FI分类号	A01K67/027 A61K45/00 A61P17/00 A61P37/08 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N15/00.A		
代理人(译)	村田正树		
优先权	2001212218 2001-07-12 JP		
其他公开文献	JP4381138B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种新的转基因非人类哺乳动物，其DNA被转移以在皮肤或其后代中特异性表达外源IL-18基因。还包括以下方面的独立权利要求：(1)通过对动物或其后代施用测试物质并检测症状的改善来筛选特应性皮炎的预防剂或治疗剂；(2)含有这样筛选出的物质的预防或治疗特应性皮炎的药物；(3)通过将用于整合的DNA转移以表达外源IL-18基因到非人类哺乳动物的受精卵中来产生动物或其后代，然后将所得的受精卵植入该动物的雌性中。活动：皮肤科；抗炎。没有给出生物学数据。作用机理：原始资料中没有给出。

