

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7623785号
(P7623785)

(45)発行日 令和7年1月29日(2025.1.29)

(24)登録日 令和7年1月21日(2025.1.21)

(51)国際特許分類

A 0 1 K	67/027 (2024.01)	A 0 1 K	67/027	
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z
C 1 2 N	15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/09	1 1 0
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	

請求項の数 8 (全52頁)

(21)出願番号 特願2019-552004(P2019-552004)
 (86)(22)出願日 平成30年3月21日(2018.3.21)
 (65)公表番号 特表2020-515248(P2020-515248)
 A)
 (43)公表日 令和2年5月28日(2020.5.28)
 (86)国際出願番号 PCT/US2018/023565
 (87)国際公開番号 WO2018/175581
 (87)国際公開日 平成30年9月27日(2018.9.27)
 審査請求日 令和3年3月9日(2021.3.9)
 審判番号 不服2023-2760(P2023-2760/J1)
 審判請求日 令和5年2月17日(2023.2.17)
 (31)優先権主張番号 62/474,358
 (32)優先日 平成29年3月21日(2017.3.21)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73)特許権者 398066918
 ザ ジャクソン ラボラトリー
 THE JACKSON LABORATORY
 アメリカ合衆国 メイン州 バー ハーバー¹⁰
 メイン ストリート 600
 513288654
 インディアナ ユニバーシティー リサーチ
 アンド テクノロジー コーポレイション
 アメリカ合衆国 47405 インディアナ州 ブルーミントン, インディアナ
 アベニュー, ストリート 107
 (74)代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトAPOE4およびマウスTrem2 p . R47Hを発現する遺伝子改変されたマウス、ならびにその使用の方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

非家族性遅発型アルツハイマー病の遺伝子改変マウスモデルであって、そのゲノムが、ヒトAPOE4タンパク質 (APOE4p) をコードするデオキシリボ核酸 (DNA) 配列、およびR47H点変異を有するマウスTrem2タンパク質 (Trem2p) をコードするDNA配列を含むマウスを含み、前記マウスにおいて、前記ヒトAPOE4pおよび前記マウスTrem2pが発現され、前記マウスが、非家族性遅発型アルツハイマー病に関連する1つまたは複数の症状または徵候を呈し、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pの発現を伴い、かつ、非家族性遅発型アルツハイマー病に関連する前記1つまたは複数の症状または徵候が、APOE3発現マウスまたは野生型対照マウスと比較した脳血管外漏出である、マウスモデル。

【請求項2】

前記APOE4pが、配列番号1のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のマウスモデル。

【請求項3】

前記マウスTrem2pが、配列番号3のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のマウスモデル。

【請求項4】

前記APOE4pが、配列番号1のアミノ酸配列を含み、かつ、前記マウスTrem2pが、配列番号3のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のマウスモデル。

【請求項 5】

前記非家族性遅発型アルツハイマー病に関連する 1 つまたは複数の症状または徵候が、
 (a) 対照と比較して、前記マウスの脳内の著しく多いミクログリアの存在；
 (b) 対照と比較して、前記マウスの脳内の著しく多いアミロイド斑の存在；
 (c) 対照と比較して、前記マウスの脳内の著しく多いタウ凝集物の存在；
 (d) 対照と比較して、前記マウスの脳内の著しく多い炎症の存在；
 (e) 対照と比較して、前記マウスの脳内の著しく多いシナプスおよび / またはニューロンの欠損の存在；
 (f) 対照と比較して、前記マウスの脳内の著しく多い認知障害の存在；
 (g) 対照と比較して、前記マウスにおける著しく多いフレイルおよび加齢の徵候の存在；
 (h) 対照と比較して、前記マウスの脳内の著しく多い血流障害の存在；ならびに
 (i) 対照と比較して、前記マウスの血液、血清または組織における非家族性遅発型アルツハイマー病の 1 つまたは複数のバイオマーカーの存在、レベル、および / または機能の著しい差

から選択され、前記対照が A P O E 3 発現マウスまたは野生型マウスである、請求項 1 に記載のマウスモデル。

【請求項 6】

ヒトアルツハイマー病の推定処置についてスクリーニングするための方法であって、
 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のマウスモデルのマウスに前記推定処置を投与する
 ステップと、
 非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する 1 つまたは複数の症状または徵候の変化について前記マウスを評価するステップと
 を含む、方法。

【請求項 7】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のマウスモデルを作製する方法であって、
 遺伝子改変を前記マウスのゲノム内に導入するステップ
 を含む、方法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のマウスモデルを作製する方法であって、
 ヒト A P O E 4 タンパク質 (A P O E 4 p) をコードするデオキシリボ核酸 (D N A)
 配列をそのゲノムに含む第 1 のマウスを、 R 4 7 H 点変異を有するマウス T r e m 2 タン
 パク質 (T r e m 2 p) をコードする D N A 配列をそのゲノムに含む第 2 のマウスと交雑
 させて、前記マウスモデルを作製するステップ
 を含む、方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【 0 0 0 1 】**

関連出願への相互参照

本出願は、 2 0 1 7 年 3 月 2 1 日に出願された米国仮特許出願番号第 6 2 / 4 7 4 , 3
 5 8 号からの優先権を主張しており、その全体の内容は、参考として本明細書中に援用さ
 れる。

【 0 0 0 2 】

政府支援

本発明は、国立衛生研究所によって授与された A G 0 5 4 3 4 5 の下、政府支援でなさ
 れた。政府は本発明において特定の権利を有する。

【 0 0 0 3 】

発明の分野

本発明は、概して、ヒトアルツハイマー病のモデルとして有用な遺伝子改変マウスに関
 する。特定の態様では、本発明は、ヒト A P O E 4 およびマウス T r e m 2 p . R 4 7
 H を発現する遺伝子改変マウスならびにその使用方法に関する。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0004】

発明の背景

アルツハイマー病（A D）のための療法の開発に対する主要な障害のうちの1つは、前臨床試験において使用する動物モデルが存在しないことである。この1つの理由は、既存のモデルが、家族性の変異に基づいているが、臨床集団の大半が、非家族性遅発型A Dを有するためであり得る。

【0005】

家族性または早発型アルツハイマー病は、アミロイド前駆体タンパク質（A P P）遺伝子における変異もしくはその過剰発現、またはプレセニリン遺伝子（P S E N 1またはP S E N 2）における変異により引き起こされる。これらのすべては、神経毒性であると考えられているAベータ42ペプチド産生の増加を生じる。家族性アルツハイマー病の態様を模倣する、数百とまではいかないまでも多数のマウスモデルが作成されている。多くの処置は、これらの家族性アルツハイマー病マウスモデルにおいて有効であることが明らかとなっているが、臨床試験において試験した場合は、いずれも有効ではなかった。

10

【0006】

対照的に、遅発型アルツハイマー病は、ヒトアルツハイマー病患者集団の95～98%を占めるが、単純で明解な遺伝的病因を有しない。遅発型アルツハイマー病は、老化のプロセスと相互作用する多様な遺伝的および環境的要因に起因する多因子症候群であると考えられる。この複雑さのため、遺伝的要因は、未だ十分には理解されておらず、ヒトにおける遅発型アルツハイマー病の有用なマウスモデルは、これまでに報告されていない。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

発明の要旨

ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p の発現を伴う、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する1つまたは複数の症状または徵候を特徴とする遺伝子改変マウスであって、マウスのゲノムが、1) プロモーターに動作可能に連結されたヒトA P O E 4 タンパク質（A P O E 4 p）をコードするD N A配列、および2) プロモーターに動作可能に連結された、p . R 4 7 H変異を有するマウスT r e m 2 タンパク質（T r e m 2 p）をコードするD N A配列を含み、マウスが、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p を発現する、遺伝子改変マウスが本発明の態様に従って提供される。本発明の態様によれば、マウスは、A P O E 4 p をコードするD N A配列について、およびT r e m 2 p をコードするD N A配列についてホモ接合性である。

30

【0008】

ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p の発現を伴う、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する1つまたは複数の症状または徵候を特徴とする遺伝子改変マウスであって、マウスのゲノムが、1) プロモーターに動作可能に連結されたヒトA P O E 4 タンパク質（A P O E 4 p）をコードするD N A配列、および2) プロモーターに動作可能に連結された、p . R 4 7 H変異を有するマウスT r e m 2 タンパク質（T r e m 2 p）をコードするD N A配列を含み、マウスが、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p を発現し、A P O E 4 p が、配列番号1のアミノ酸配列を含むか、またはA P O E 4 p が、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号2とハイブリダイズする核酸の相補体によりコードされる、遺伝子改変マウスが本発明の態様に従って提供される。本発明の態様によれば、マウスは、A P O E 4 p をコードするD N A配列について、およびT r e m 2 p をコードするD N A配列についてホモ接合性である。

40

【0009】

ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p の発現を伴う、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する1つまたは複数の症状または徵候を特徴とする遺伝子改変マウスであって、マウスのゲノムが、1) プロモーターに動作可能に連結されたヒトA P O E 4 タンパ

50

ク質 (APOE4p) をコードするDNA配列、および2)プロモーターに動作可能に連結された、p.R47H変異を有するマウスTrem2タンパク質 (Trem2p) をコードするDNA配列を含み、マウスが、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現し、マウスTrem2pが、配列番号3のアミノ酸配列を含むか、またはマウスTrem2pが、高度にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号4とハイブリダイズする核酸の相補体によりコードされる、遺伝子改変マウスが本発明の態様に従って提供される。本発明の態様によれば、マウスは、APOE4pをコードするDNA配列について、およびTrem2pをコードするDNA配列についてホモ接合性である。

【0010】

ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pの発現を伴う、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する1つまたは複数の症状または徵候を特徴とする遺伝子改変マウスであって、マウスのゲノムが、1)プロモーターに動作可能に連結されたヒトAPOE4タンパク質 (APOE4p) をコードするDNA配列、および2)プロモーターに動作可能に連結された、p.R47H変異を有するマウスTrem2タンパク質 (Trem2p) をコードするDNA配列を含み、マウスが、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現し、APOE4pが、配列番号1のアミノ酸配列を含むか、またはAPOE4pが、高度にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号2とハイブリダイズする核酸の相補体によりコードされ、マウスTrem2pが、配列番号3のアミノ酸配列を含むか、またはマウスTrem2pが、高度にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号4とハイブリダイズする核酸の相補体によりコードされる、遺伝子改変マウスが本発明の態様に従って提供される。本発明の態様によれば、マウスは、APOE4pをコードするDNA配列について、およびTrem2pをコードするDNA配列についてホモ接合性である。

10

【0011】

ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pの発現を伴う、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する1つまたは複数の症状または徵候を特徴とする遺伝子改変マウスであって、マウスのゲノムが、1)プロモーターに動作可能に連結されたヒトAPOE4タンパク質 (APOE4p) をコードするDNA配列、および2)プロモーターに動作可能に連結された、p.R47H変異を有するマウスTrem2タンパク質 (Trem2p) をコードするDNA配列を含む、B6(SJL)-Apoetm1.1(APOE*4)Adiuj Trem2em1Adiuj/Jマウスであり、マウスが、APOE4pをコードするDNA配列について、およびTrem2pをコードするDNA配列についてホモ接合性であり、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現する、遺伝子改変マウスが本発明の態様に従って提供される。

20

30

【0012】

アルツハイマー病の処置における使用のための処置についてスクリーニングするための方法であって、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pの発現を伴う、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する1つまたは複数の症状または徵候を特徴とする、本発明の態様に従って提供される遺伝子改変マウスであって、マウスのゲノムが、1)プロモーターに動作可能に連結されたヒトAPOE4タンパク質 (APOE4p) をコードするDNA配列、および2)プロモーターに動作可能に連結された、p.R47H変異を有するマウスTrem2タンパク質 (Trem2p) をコードするDNA配列を含み、マウスが、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現する、遺伝子改変マウスに処置を施すステップと、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pの発現を伴う1つまたは複数の症状または徵候に対する処置効果をマウスにおいて評価するステップとを含む、方法が本発明の態様に従って提供される。本発明の態様によれば、マウスは、APOE4pをコードするDNA配列について、およびTrem2pをコードするDNA配列についてホモ接合性である。本発明の態様によれば、処置効果を評価するステップは、遺伝子改変マウスに対する処置効果を対照と比較することを含む。本発明の態様によれば、対照は、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発

40

50

現しないマウスに処置を施すステップと、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現しないマウスに対する処置効果を評価するステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、野生型C57BL/6Jマウスに処置を施すステップと、野生型C57BL/6Jマウスに対する処置効果を評価するステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、APOE3発現マウスに処置を施すステップと、APOE3発現マウスに対する処置効果を評価するステップとを含む。

【0013】

アルツハイマー病の処置における使用のための処置についてスクリーニングするための方法であって、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pの発現を伴う、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する1つまたは複数の症状または徴候を特徴とする、本発明の態様に従って提供される遺伝子改変マウスであって、マウスのゲノムが、1)プロモーターに動作可能に連結されたヒトAPOE4タンパク質(APOE4p)をコードするDNA配列、および2)プロモーターに動作可能に連結された、p.R47H変異を有するマウスTrem2タンパク質(Trem2p)をコードするDNA配列を含み、マウスが、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現し、APOE4pが、配列番号1のアミノ酸配列を含むか、またはAPOE4pが、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号2とハイブリダイズする核酸の相補体によりコードされる、遺伝子改変マウスに処置を施すステップと、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pの発現を伴う1つまたは複数の症状または徴候に対する処置効果をマウスにおいて評価するステップとを含む、方法が本発明の態様に従って提供される。本発明の態様によれば、マウスは、APOE4pをコードするDNA配列について、およびTrem2pをコードするDNA配列についてホモ接合性である。本発明の態様によれば、処置効果を評価するステップは、遺伝子改変マウスに対する処置効果を対照と比較することを含む。本発明の態様によれば、対照は、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現しないマウスに処置を施すステップと、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現しないマウスに対する処置効果を評価するステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、野生型C57BL/6Jマウスに処置を施すステップと、野生型C57BL/6Jマウスに対する処置効果を評価するステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、APOE3発現マウスに処置を施すステップと、APOE3発現マウスに対する処置効果を評価するステップとを含む。

【0014】

アルツハイマー病の処置における使用のための処置についてスクリーニングするための方法であって、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pの発現を伴う、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する1つまたは複数の症状または徴候を特徴とする、本発明の態様に従って提供される遺伝子改変マウスであって、マウスのゲノムが、1)プロモーターに動作可能に連結されたヒトAPOE4タンパク質(APOE4p)をコードするDNA配列、および2)プロモーターに動作可能に連結された、p.R47H変異を有するマウスTrem2タンパク質(Trem2p)をコードするDNA配列を含み、マウスが、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現し、マウスTrem2pが、配列番号3のアミノ酸配列を含むか、またはマウスTrem2pが、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号4とハイブリダイズする核酸の相補体によりコードされる、遺伝子改変マウスに処置を施すステップと、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pの発現を伴う1つまたは複数の症状または徴候に対する処置効果をマウスにおいて評価するステップとを含む、方法が本発明の態様に従って提供される。本発明の態様によれば、マウスは、APOE4pをコードするDNA配列について、およびTrem2pをコードするDNA配列についてホモ接合性である。本発明の態様によれば、処置効果を評価するステップは、遺伝子改変マウスに対する処置効果を対照と比較することを含む。本発明の態様によれば、対照は、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現しないマウスに処置を施すステップと、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現しないマウスに対する処置効果を評価する

10

20

30

40

50

ステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、野生型 C 5 7 B L / 6 J マウスに処置を施すステップと、野生型 C 5 7 B L / 6 J マウスに対する処置効果を評価するステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、A P O E 3 発現マウスに処置を施すステップと、A P O E 3 発現マウスに対する処置効果を評価するステップとを含む。

【 0 0 1 5 】

ヒト A P O E 4 p およびマウス T r e m 2 p の発現を伴う、非家族性遅発型アルツハイマー病に関する 1 つまたは複数の症状または徵候を特徴とする、本発明の態様に従って提供される遺伝子改変マウスであって、マウスのゲノムが、1) プロモーターに動作可能に連結されたヒト A P O E 4 タンパク質 (A P O E 4 p) をコードする D N A 配列、および 2) プロモーターに動作可能に連結された、 p . R 4 7 H 変異を有するマウス T r e m 2 タンパク質 (T r e m 2 p) をコードする D N A 配列を含み、マウスが、ヒト A P O E 4 p およびマウス T r e m 2 p を発現し、 A P O E 4 p が、配列番号 1 のアミノ酸配列を含むか、または A P O E 4 p が、高度にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号 2 とハイブリダイズする核酸の相補体によりコードされ、マウス T r e m 2 p が、配列番号 3 のアミノ酸配列を含むか、またはマウス T r e m 2 p が、高度にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号 4 とハイブリダイズする核酸の相補体によりコードされる、遺伝子改変マウスに処置を施すステップと、非家族性遅発型アルツハイマー病に関する、ヒト A P O E 4 p およびマウス T r e m 2 p の発現を伴う 1 つまたは複数の症状または徵候に対する処置効果をマウスにおいて評価するステップとを含む、方法が本発明の態様に従って提供される。本発明の態様によれば、マウスは、 A P O E 4 p をコードする D N A 配列について、および T r e m 2 p をコードする D N A 配列についてホモ接合性である。本発明の態様によれば、処置効果を評価するステップは、遺伝子改変マウスに対する処置効果を対照と比較することを含む。本発明の態様によれば、対照は、ヒト A P O E 4 p およびマウス T r e m 2 p を発現しないマウスに処置を施すステップと、ヒト A P O E 4 p およびマウス T r e m 2 p を発現しないマウスに対する処置効果を評価するステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、野生型 C 5 7 B L / 6 J マウスに処置を施すステップと、野生型 C 5 7 B L / 6 J マウスに対する処置効果を評価するステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、A P O E 3 発現マウスに処置を施すステップと、A P O E 3 発現マウスに対する処置効果を評価するステップとを含む。

【 0 0 1 6 】

アルツハイマー病の処置における使用のための処置についてスクリーニングするための方法であって、ヒト A P O E 4 p およびマウス T r e m 2 p の発現を伴う、非家族性遅発型アルツハイマー病に関する 1 つまたは複数の症状または徵候を特徴とする、本発明の態様に従って提供される遺伝子改変マウスであって、マウスのゲノムが、1) プロモーターに動作可能に連結されたヒト A P O E 4 タンパク質 (A P O E 4 p) をコードする D N A 配列、および 2) プロモーターに動作可能に連結された、 p . R 4 7 H 変異を有するマウス T r e m 2 タンパク質 (T r e m 2 p) をコードする D N A 配列を含む、 B 6 (S J L) - A p o e t m 1 . 1 (A P O E * 4) A d i u j T r e m 2 e m 1 A d i u j / J マウスであり、マウスが、 A P O E 4 p をコードする D N A 配列について、および T r e m 2 p をコードする D N A 配列についてホモ接合性であり、ヒト A P O E 4 p およびマウス T r e m 2 p を発現する、遺伝子改変マウスに処置を施すステップと、非家族性遅発型アルツハイマー病に関する、ヒト A P O E 4 p およびマウス T r e m 2 p の発現を伴う 1 つまたは複数の症状または徵候に対する処置効果をマウスにおいて評価するステップとを含む、方法が本発明の態様に従って提供される。本発明の態様によれば、処置効果を評価するステップは、遺伝子改変マウスに対する処置効果を対照と比較することを含む。本発明の態様によれば、対照は、ヒト A P O E 4 p およびマウス T r e m 2 p を発現しないマウスに処置を施すステップと、ヒト A P O E 4 p およびマウス T r e m 2 p を発現しないマウスに対する処置効果を評価するステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、野生型 C 5 7 B L / 6 J マウスに処置を施すステップと、野生型 C 5 7 B L / 6 J マウスに対す

10

20

30

40

50

る処置効果を評価するステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、A P O E 3 発現マウスに処置を施すステップと、A P O E 3 発現マウスに対する処置効果を評価するステップとを含む。

【 0 0 1 7 】

ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p の発現を伴う、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する1つまたは複数の症状または徵候を特徴とする、本発明の態様に従って提供される遺伝子改変マウスであって、マウスのゲノムが、1) プロモーターに動作可能に連結されたヒトA P O E 4 タンパク質(A P O E 4 p)をコードするDNA配列、および2) プロモーターに動作可能に連結された、p. R 4 7 H変異を有するマウスT r e m 2 タンパク質(T r e m 2 p)をコードするDNA配列を含み、マウスが、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 pを発現する、遺伝子改変マウスに化合物を投与するステップと、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p の発現を伴う1つまたは複数の症状または徵候に対する化合物の作用をマウスにおいて評価するステップとを含む、アルツハイマー病の処置における使用のための化合物についてスクリーニングするための方法が本発明の態様に従って提供される。本発明の態様によれば、マウスは、A P O E 4 p をコードするDNA配列について、およびT r e m 2 p をコードするDNA配列についてホモ接合性である。本発明の態様によれば、化合物の作用を評価するステップは、遺伝子改変マウスに対する化合物の作用を対照と比較することを含む。本発明の態様によれば、対照は、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p を発現しないマウスに化合物を投与するステップと、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p を発現しないマウスに対する化合物の作用を評価するステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、野生型C 5 7 B L / 6 Jマウスに化合物を投与するステップと、野生型C 5 7 B L / 6 Jマウスに対する化合物の作用を評価するステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、A P O E 3 発現マウスに化合物を投与するステップと、A P O E 3 発現マウスに対する化合物の作用を評価するステップとを含む。

【 0 0 1 8 】

アルツハイマー病の処置における使用のための化合物についてスクリーニングするための方法であって、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p の発現を伴う、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する1つまたは複数の症状または徵候を特徴とする、本発明の態様に従って提供される遺伝子改変マウスであって、マウスのゲノムが、1) プロモーターに動作可能に連結されたヒトA P O E 4 タンパク質(A P O E 4 p)をコードするDNA配列、および2) プロモーターに動作可能に連結された、p. R 4 7 H変異を有するマウスT r e m 2 タンパク質(T r e m 2 p)をコードするDNA配列を含み、マウスが、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p を発現し、A P O E 4 p が、配列番号1のアミノ酸配列を含むか、またはA P O E 4 p が、高度にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号2とハイブリダイズする核酸の相補体によりコードされる、遺伝子改変マウスに化合物を投与するステップと、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p の発現を伴う1つまたは複数の症状または徵候に対する化合物の作用をマウスにおいて評価するステップとを含む、方法が本発明の態様に従って提供される。本発明の態様によれば、マウスは、A P O E 4 p をコードするDNA配列について、およびT r e m 2 p をコードするDNA配列についてホモ接合性である。本発明の態様によれば、化合物の作用を評価するステップは、遺伝子改変マウスに対する化合物の作用を対照と比較することを含む。本発明の態様によれば、対照は、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p を発現しないマウスに化合物を投与するステップと、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p を発現しないマウスに対する化合物の作用を評価するステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、野生型C 5 7 B L / 6 Jマウスに化合物を投与するステップと、野生型C 5 7 B L / 6 Jマウスに対する化合物の作用を評価するステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、A P O E 3 発現マウスに化合物を投与するステップと、A P O E 3 発現マウスに対する化合物の作用を評価するステップとを含む。

10

20

30

40

50

【0019】

ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pの発現を伴う、非家族性遅発型アルツハイマー病に関する1つまたは複数の症状または徴候を特徴とする、本発明の態様に従って提供される遺伝子改変マウスであって、マウスのゲノムが、1)プロモーターに動作可能に連結されたヒトAPOE4タンパク質(APOE4p)をコードするDNA配列、および2)プロモーターに動作可能に連結された、p.R47H変異を有するマウスTrem2タンパク質(Trem2p)をコードするDNA配列を含み、マウスが、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現し、マウスTrem2pが、配列番号3のアミノ酸配列を含むか、またはマウスTrem2pが、高度にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号4とハイブリダイズする核酸の相補体によりコードされる、遺伝子改変マウスに化合物を投与するステップと、非家族性遅発型アルツハイマー病に関する、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pの発現を伴う1つまたは複数の症状または徴候に対する化合物の作用をマウスにおいて評価するステップとを含む、アルツハイマー病の処置における使用のための化合物についてスクリーニングするための方法が本発明の態様に従って提供される。本発明の態様によれば、マウスは、APOE4pをコードするDNA配列について、およびTrem2pをコードするDNA配列についてホモ接合性である。本発明の態様によれば、化合物の作用を評価するステップは、遺伝子改変マウスに対する化合物の作用を対照と比較することを含む。本発明の態様によれば、対照は、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現しないマウスに化合物を投与するステップと、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現しないマウスに対する化合物の作用を評価するステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、野生型C57BL/6Jマウスに化合物を投与するステップと、野生型C57BL/6Jマウスに対する化合物の作用を評価するステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、APOE3発現マウスに化合物を投与するステップと、APOE3発現マウスに対する化合物の作用を評価するステップとを含む。

【0020】

アルツハイマー病の処置における使用のための化合物についてスクリーニングするための方法であって、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pの発現を伴う、非家族性遅発型アルツハイマー病に関する1つまたは複数の症状または徴候を特徴とする、本発明の態様に従って提供される遺伝子改変マウスであって、マウスのゲノムが、1)プロモーターに動作可能に連結されたヒトAPOE4タンパク質(APOE4p)をコードするDNA配列、および2)プロモーターに動作可能に連結された、p.R47H変異を有するマウスTrem2タンパク質(Trem2p)をコードするDNA配列を含み、マウスが、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現し、APOE4pが、配列番号1のアミノ酸配列を含むか、またはAPOE4pが、高度にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号2とハイブリダイズする核酸の相補体によりコードされ、マウスTrem2pが、配列番号3のアミノ酸配列を含むか、またはマウスTrem2pが、高度にストリンジエントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号4とハイブリダイズする核酸の相補体によりコードされる、遺伝子改変マウスに化合物を投与するステップと、非家族性遅発型アルツハイマー病に関する、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pの発現を伴う1つまたは複数の症状または徴候に対する化合物の作用をマウスにおいて評価するステップとを含む、方法が本発明の態様に従って提供される。本発明の態様によれば、マウスは、APOE4pをコードするDNA配列について、およびTrem2pをコードするDNA配列についてホモ接合性である。本発明の態様によれば、化合物の作用を評価するステップは、遺伝子改変マウスに対する化合物の作用を対照と比較することを含む。本発明の態様によれば、対照は、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現しないマウスに化合物を投与するステップと、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現しないマウスに対する化合物の作用を評価するステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、野生型C57BL/6Jマウスに化合物を投与するステップと、野生型C57BL/6Jマウスに対する化合物の作用を評価するステップとを含む。本

10

20

30

40

50

発明の態様によれば、対照は、A P O E 3 発現マウスに化合物を投与するステップと、A P O E 3 発現マウスに対する化合物の作用を評価するステップとを含む。

【0021】

アルツハイマー病の処置における使用のための化合物についてスクリーニングするための方法であって、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p の発現を伴う、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する1つまたは複数の症状または徴候を特徴とする、本発明の態様に従って提供される遺伝子改変マウスであって、マウスのゲノムが、1) プロモーターに動作可能に連結されたヒトA P O E 4 タンパク質(A P O E 4 p)をコードするDNA配列、および2) プロモーターに動作可能に連結された、p. R 4 7 H変異を有するマウスT r e m 2 タンパク質(T r e m 2 p)をコードするDNA配列を含む、B 6 (S J L) - A p o e t m 1 . 1 (A P O E * 4) A d i u j T r e m 2 e m 1 A d i u j / J マウスであり、マウスが、A P O E 4 p をコードするDNA配列について、およびT r e m 2 p をコードするDNA配列についてホモ接合性であり、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p を発現する、遺伝子改変マウスに化合物を投与するステップと、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p の発現を伴う1つまたは複数の症状または徴候に対する化合物の作用をマウスにおいて評価するステップとを含む、方法が本発明の態様に従って提供される。本発明の態様によれば、マウスは、A P O E 4 p をコードするDNA配列について、およびT r e m 2 p をコードするDNA配列についてホモ接合性である。本発明の態様によれば、化合物の作用を評価するステップは、遺伝子改変マウスに対する化合物の作用を対照と比較することを含む。本発明の態様によれば、対照は、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p を発現しないマウスに化合物を投与するステップと、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p を発現しないマウスに対する化合物の作用を評価するステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、野生型C 5 7 B L / 6 J マウスに化合物を投与するステップと、野生型C 5 7 B L / 6 J マウスに対する化合物の作用を評価するステップとを含む。本発明の態様によれば、対照は、A P O E 3 発現マウスに化合物を投与するステップと、A P O E 3 発現マウスに対する化合物の作用を評価するステップとを含む。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】図1は、本明細書の実施例において詳細に記載するヒト化A p o E 4 発現構築物の模式図である。

【0023】

【図2】図2は、B 6 (S J L) - A p o e t m 1 . 1 (A P O E * 4) A d i u j T r e m 2 e m 1 A d i u j / J (一般名B 6 J . A P O E 4 / T r e m 2) マウス(レーン4~6)由来の脳組織および対照(野生型(W T)C 5 7 B L / 6 J (B 6 Jと略す))マウス(レーン1~3)脳組織のウエスタンプロットの画像である。

【0024】

【図3A】図3Aは、12カ月齢のB 6 J . A P O E 4 / T r e m 2 マウスおよび12カ月齢のC 5 7 B L / 6 J 対照マウスから得られる血液試料における高密度リボタンパク質(H D L)についてのアッセイの結果を示すグラフである。

【0025】

【図3B】図3Bは、12カ月齢のB 6 J . A P O E 4 / T r e m 2 マウスおよび12カ月齢のC 5 7 B L / 6 J 対照マウスから得られる血液試料における低密度リボタンパク質(L D L)についてのアッセイの結果を示すグラフである。

【0026】

【図3C】図3Cは、12カ月齢のB 6 J . A P O E 4 / T r e m 2 マウスおよび12カ月齢のC 5 7 B L / 6 J 対照マウスから得られる血液試料における総コレステロールについてのアッセイの結果を示すグラフである。

【0027】

【図4】図4は、免疫染色してコラーゲンIV(C o l I V)およびフィブリリン(フィブ

10

20

30

40

50

リノゲン)を示す7～8カ月齢のB6J.APOE4/Trem2組織の代表的画像とともに、同様に免疫染色した、対照C57BL/6J(B6Jと略す)マウス由来の脳の類似の矢状切片から取得した代表的画像を示す。

【0028】

【図5】図5は、野生型対照B6Jマウスと比較した、B6J.APOE4/Trem2マウスにおける発現変動遺伝子の遺伝子発現ヒートマップである。

【発明を実施するための形態】

【0029】

発明の詳細な説明

本発明は、概して、非家族性遅発型アルツハイマー病のモデルであり、そのゲノムに外因的に導入した非家族性遅発型ADの2つのリスク因子をコードし、これによりマウスが、ヒトアポリポタンパク質E4(APOE4)およびマウスTrem2 p.R47Hタンパク質を産生する遺伝子改変マウスに関する。

【0030】

ヒトアポリポタンパク質は、APOE2、APOE3およびAPOE4と名付けられた3つのアイソフォームを有する多型タンパク質である。これらの3つのアイソフォームは、タンパク質のアミノ酸配列の130位および176位のアミノ酸(アミノ酸シグナルペプチド18個を有しない成熟APOEタンパク質の112位および158位に対応する)の同一性に関して互いに異なる。APOE2は、130位および176位の両方のシステインを特徴とし、APOE3は、130位のシステインおよび176位のアルギニンを特徴とし、APOE4は、130位および176位の両方のアルギニンを特徴とする。1つまたは複数のAPOE4対立遺伝子を有する個体は、非家族性遅発型ADを発症するリスクがより高く、病理に関するいくつかの機構が提唱されている。例えば、DiBattistaら、2016年、Exp. Neurol. 280巻：97～105頁；Buら、Nature Reviews Neuroscience、2009年、10巻：333～344頁；Huangら、Cell、2017年、168巻：1～15頁；およびTambiniら、EMBO Reports、2016年、17巻：27～36頁を参照されたい。

【0031】

Trem2(ミエロイド細胞に発現するトリガー受容体2)は、脳ミクログリアにより発現する免疫食作用受容体である。Trem2は、細胞片の食作用を引き起こし、炎症応答の態様を制御する。TREM2 p.R47Hにおける稀なバリエントは、ヒトにおいて、アルツハイマー病と著しく関連する。

【0032】

特定の実施形態では、本発明は、そのゲノムが、ヒトAPOE4タンパク質をコードするDNA配列、およびR47H点変異を有するマウスTrem2タンパク質をコードするDNA配列を含む遺伝子改変マウスに関する。

【0033】

ヒトAPOE4タンパク質(以下APOE4pまたは「ヒトAPOE4」)をコードするヒトAPOE4 DNA配列(以下APOE4g)を本明細書において配列番号2として示す。コードされるAPOE4pを本明細書において配列番号1として示す。

【0034】

R47H点変異を有するマウスTrem2タンパク質(以下Trem2pまたは「マウスTrem2p」)をコードするマウスTrem2変異体DNA配列(以下Trem2g)を本明細書において配列番号4として示す。コードされるTrem2pを本明細書において配列番号3として示す。

【0035】

本発明の方法の実施形態による遺伝子改変マウスにおいて、1つまたは複数の遺伝子改変をマウスゲノム内に導入して、APOE4pのバリエントおよび/またはTrem2pのバリエントをコードすることができる。

【0036】

10

20

30

40

50

本明細書において使用する場合、用語「バリアント」は、配列番号1または配列番号3の対応するタンパク質と比較して、そのアミノ酸配列に1つまたは複数の変異を含む、APOE4pまたはTrem2pを指す。例えば、このような変異は、APOE4pまたはTrem2pのバリアントが、配列番号1または配列番号3のAPOE4pまたはTrem2pの機能的特性をそれぞれ保持する限り、1つまたは複数のアミノ酸の置換、付加、および/または欠失であり得る。

【0037】

特定の実施形態では、本発明の実施形態によるAPOE4pバリアントは、配列番号1に対してその全長にわたって少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれより高い同一性を有し、本明細書において配列番号1として示す、アミノ酸シグナルペプチド18個を含むAPOE4タンパク質のアミノ酸130位および176位としてR(アルギニン)およびR(アルギニン)を有し、さらに配列番号1のAPOE4pの機能的特性を保持する。

10

【0038】

特定の実施形態では、本発明の実施形態によるAPOE4pバリアントは、配列番号15に対してその全長にわたって少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれより高い同一性を有し、本明細書において配列番号15として示す、アミノ酸シグナルペプチド18個を含まないAPOE4タンパク質のアミノ酸112位および158位としてR(アルギニン)およびR(アルギニン)を有し、さらに配列番号15のAPOE4pの機能的特性を保持する。

20

【0039】

特定の実施形態では、本発明の実施形態によるTrem2pバリアントは、配列番号3に対してその全長にわたって少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれより高い同一性を有し、配列番号3のTrem2pの機能的特性を保持する。

20

【0040】

変異は、CRISPR技術等の標準的な分子生物学的技術を使用して導入することができる。代替的技術は、部位特異的変異誘発およびPCRによる変異誘発等を含む。当業者は、APOE4pおよびマウスTrem2pタンパク質の機能特性を変えることなく、1つまたは複数のアミノ酸の変異を導入することができることを認識しているであろう。

30

【0041】

APOE4p、Trem2pおよびバリアントの機能特性の評価のためのアッセイは、当技術分野において公知である。

【0042】

保存的アミノ酸置換をAPOE4pおよびTrem2pタンパク質に行って、APOE4pおよびTrem2pバリアントを生成することができる。保存的アミノ酸置換は、当技術分野において認識されている、あるアミノ酸を、類似の特性を有する別のアミノ酸で置換することである。例えば、各アミノ酸は、次の特性：電気陽性、電気陰性、脂肪族、芳香族、極性、疎水性および親水性のうちの1つまたは複数を有するものと記載され得る。保存的置換は、特定の構造的または機能的特性を有するあるアミノ酸を、同一の特性を有する別のアミノ酸と置換することである。酸性アミノ酸は、アスパラギン酸、グルタミン酸を含み、塩基性アミノ酸は、ヒスチジン、リシン、アルギニンを含み、脂肪族アミノ酸は、イソロイシン、ロイシンおよびバリンを含み、芳香族アミノ酸は、フェニルアラニン、グリシン、チロシンおよびトリプトファンを含み、極性アミノ酸は、アスパラギン酸、グルタミン酸、ヒスチジン、リシン、アスパラギン、グルタミン、アルギニン、セリン、スレオニンおよびチロシンを含み、疎水性アミノ酸は、アラニン、システイン、フェニルアラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、プロリン、バリンおよびトリプトファンを含み、保存的置換は、各群におけるアミノ酸間の置換を含む。アミノ酸はまた、相対的サイズ、アラニン、システイン、アスパラギン酸、グリシン、アスパラギン、プロリン、スレオニン、セリン、バリン、典型的に低分子であると考えられるすべて

40

50

に関して記載され得る。

【0043】

APOE4pおよびTrem2pバリアントは、合成アミノ酸類似体、アミノ酸誘導体および／または非標準アミノ酸を含むことができ、例示的に、アルファ-アミノ酪酸、シトルリン、カナバニン、シアノアラニン、ジアミノ酪酸、ジアミノピメリン酸、ジヒドロキシ-フェニルアラニン、ジエンコル酸、ホモアルギニン、ヒドロキシプロリン、ノルロイシン、ノルバリン、3-ホスホセリン、ホモセリン、5-ヒドロキシトリプトファン、1-メチルヒスチジン、3-メチルヒスチジン、およびオルニチンを含むが、これらに限定されない。

【0044】

遺伝コードの縮重の性質により、配列番号2および配列番号4以外の核酸配列が、APOE4pおよびTrem2pをそれぞれコードし、このような選択的核酸をマウスゲノム内に導入して、APOE4pおよびTrem2pを発現する本開示の遺伝子改変マウスを作製することができることが当業者により理解されよう。

10

【0045】

単数形の用語「1つの(a)」、「1つの(an)」および「その(the)」は、限定することを意図せず、他に明示的に記述しない限り、または文脈上他に明らかに指示しない限り、複数形の指示対象を含む。

【0046】

用語「発現すること」および「発現する」は、遺伝子を転写して対応するmRNAを產生すること、および／またはmRNAを翻訳して対応するタンパク質を產生することを指す。

20

【0047】

APOE4pおよびTrem2pバリアントは、配列番号2または配列番号4と高度な同一性を有する核酸によりそれぞれコードされる。APOE4pバリアントをコードする核酸の相補体は、高ストリンジエンシー条件下で、APOE4pをコードする配列番号2と特異的にハイブリダイズさせる。Trem2pバリアントをコードする核酸の相補体は、高ストリンジエンシー条件下で、Trem2pをコードする配列番号4と特異的にハイブリダイズさせる。

【0048】

30

用語「核酸」は、1本鎖、2本鎖、オリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを含む任意の形態の1つより多くのヌクレオチドを有するRNAまたはDNA分子を指す。用語「ヌクレオチド配列」は、核酸の1本鎖形態のオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドにおけるヌクレオチドの順序付けを指す。

【0049】

用語「ハイブリダイゼーション」および「ハイブリダイズさせる」は、相補性核酸の対形成および結合を指す。ハイブリダイゼーションは、当技術分野において周知のように、核酸の相補性の程度、核酸の融解温度Tm、およびハイブリダイゼーション条件のストリンジエンシー等の因子に応じて、2つの核酸間において様々な程度で生じる。

【0050】

40

用語「ハイブリダイゼーション条件のストリンジエンシー」は、温度、イオン強度、ならびにホルムアミドおよびデンハルト液等の特定の一般的な添加剤に関するハイブリダイゼーション培地の組成の条件を指す。特定の核酸に関する特定のハイブリダイゼーション条件の決定は、例えば、J. SambrookおよびD.W. Russell、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press；第3版、2001年；ならびにF.M. Ausubel編、Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols；第5版、2002年に記載のように、慣例的なものであり、当技術分野において周知である。高ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件は、実質的に相補性な核酸のハイブリダイゼーションのみを可能とする条件である。典型的には、約85～100%の相補性を有する核酸は、高度に相補性であるとみなされ、高ストリンジエン

50

シー条件下ハイブリダイズさせる。中程度のストリンジエンシー条件は、中程度の相補性、すなわち約50～84%の相補性を有する核酸、ならびに高度な相補性を有する核酸がハイブリダイズする条件により例示される。対照的に、低ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件は、低度の相補性を有する核酸がハイブリダイズする条件である。

【0051】

用語「特異的ハイブリダイゼーション」および「特異的にハイブリダイズさせる」は、特定の核酸を、試料中の標的核酸以外の核酸と実質的にハイブリダイズさせずに、標的核酸とハイブリダイズさせることを指す。

【0052】

ハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件のストリンジエンシーは、当業者に周知のように、プローブおよび標的のTmならびにハイブリダイゼーションおよび洗浄の条件のイオン強度を含む、いくつかの因子に依存する。ハイブリダイゼーションおよび所望のハイブリダイゼーションストリンジエンシーを達成する条件は、例えば、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2001年；およびAusubel, F.ら(編)、Short Protocols in Molecular Biology、Wiley、2002年に記載されている。

10

【0053】

高ストリンジエンシーハイブリダイゼーション条件の例は、約100ヌクレオチドを超える長さの核酸を、6×SSC、5×デンハルト液、30%のホルムアミド、および100マイクログラム/m1の変性サケ精子を含む溶液中に37で一晩ハイブリダイズさせ、その後、0.1×SSCおよび0.1%のSDSの溶液中で60で15分間洗浄することである。SSCは、0.15MのNaCl/0.015Mのクエン酸Naである。デンハルト液は、0.02%のウシ血清アルブミン/0.02%のフィコール/0.02%のポリビニルピロリドンである。

20

【0054】

用語「相補性」は、ヌクレオチド間のワトソン-クリック塩基対形成を指し、詳細には、2つの水素結合によりアデニン残基に連結するチミンまたはウラシル残基、および3つの水素結合により連結するシトシンおよびグアニン残基と相互に水素結合するヌクレオチドを指す。一般には、核酸は、特定の第2のヌクレオチド配列に対して「パーセント相補性」を有すると記載されるヌクレオチド配列を含む。例えば、ヌクレオチド配列は、特定の第2のヌクレオチド配列に対して80%、90%または100%の相補性を有することができ、これは、配列の10分の8、10分の9または10分の10のヌクレオチドが、特定の第2のヌクレオチド配列に対して相補性であることを示す。例えば、ヌクレオチド配列3'-TCGA-5'は、ヌクレオチド配列5'-AGCT-3'に対して100%相補性である。さらに、ヌクレオチド配列3'-TCGA-は、ヌクレオチド配列5'-TTAGCTGG-3'の領域に対して100%相補性である。

30

【0055】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列のパーセント同一性を判定するために、配列を整列させて最適に比較する(例えば、第1のアミノ酸または核酸の配列にギャップを導入して、第2のアミノ酸または核酸配列と最適にアラインメントを行うことができる)。次いで、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドを比較する。第1の配列の位置が、第2の配列の対応する位置と同一のアミノ酸残基またはヌクレオチドで占められている場合は、分子は、その位置において同一である。2つの配列間のパーセント同一性は、それらの配列により共有される同一の位置の数の関数である(すなわち、%同一性 = 同一の重複位置の数 / 位置の総数 × 100%)。一実施形態では、2つの配列は、同一の長さであるか、または対照配列の全長の1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%または10%以下で長さが異なる。

40

【0056】

2つの配列間のパーセント同一性の判定はまた、数学的アルゴリズムを使用して達成することができる。2つの配列の比較に利用する数学的アルゴリズムの好みの非限定的な

50

例は、KarlinおよびAltschul、1993年、PNAS 90巻：5873 5877頁のように改変されたKarlinおよびAltschul、1990年、PNAS 87巻：2264 2268頁のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、Altschulら、1990年、J. Mol. Biol. 215巻：403頁のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込む。BLASTヌクレオチド検索は、例えば、スコア=100、ワード長=12に設定したNBLASTヌクレオチドプログラムパラメータにより行って、本発明の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得る。BLASTタンパク質検索は、例えば、スコア50、ワード長=3に設定したXBLASTプログラムパラメータにより行って、本発明のタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得る。ギャップを挿入したアラインメントを得て比較するために、Altschulら、1997年、Nucleic Acids Res. 25巻：3389 3402頁に記載のようにGapped BLASTを利用する。あるいは、PSI-BLASTを使用して、分子間の距離関係を検出する反復検索を行う（同文献）。BLAST、Gapped BLASTおよびPSI-Blastプログラムを利用する場合は、それぞれのプログラムのデフォルトパラメータ（例えば、XBLASTおよびNBLASTのパラメータ）を使用する（例えば、NCBIのウェブサイトを参照）。配列の比較に利用する数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例は、MyersおよびMiller、1988年、CABIOS 4巻：11 17頁のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、GCG配列アラインメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込む。ALIGNプログラムを利用してアミノ酸配列を比較する場合は、PAM120加重残基表（weight residue table）、ギャップ長ペナルティ12およびギャップペナルティ4を使用する。

【0057】

2つの配列間のパーセント同一性は、上記のものと同様の技術を使用して、ギャップありか、またはなしで判定する。パーセント同一性の算出では、典型的に、完全な一致のみを計数する。

【0058】

APOE4p、Trem2pまたはそれらのいずれかのバリエントをコードする核酸は、周知の方法を使用して、天然のソースから単離するか、組換えにより作製するか、または化学合成技術により生成することができる。

【0059】

遺伝子改変マウス

【0060】

そのゲノムが、プロモーターに動作可能に連結されたAPOE4pをコードする核酸を含み、この場合、その動物が、コードされるAPOE4pを発現し、そのゲノムが、プロモーターに動作可能に連結されたTrem2pをコードする核酸を含み、この場合、この動物が、コードされるTrem2pを発現する、遺伝子改変マウスが本発明の実施形態に従って提供される。

【0061】

そのゲノムが、内在性マウスApoeプロモーターに動作可能に連結されたAPOE4pをコードする核酸を含み、この場合、この動物が、コードされるAPOE4pを発現し、そのゲノムが、内在性マウスTrem2プロモーターに動作可能に連結されたTrem2pをコードする核酸を含み、この場合、この動物が、コードされるTrem2pを発現する、遺伝子改変マウスが本発明の実施形態に従って提供される。

【0062】

種々の方法のいずれかを使用して、遺伝子改変をマウスゲノム内に導入し、APOE4pおよびTrem2pを発現する遺伝子改変マウスを作製することができる。

【0063】

そのゲノムが、プロモーターに動作可能に連結されたAPOE4pをコードする核酸を含み、この場合、この動物が、コードされるAPOE4pを発現し、そのゲノムが、プロモーターに動作可能に連結されたTrem2pをコードする核酸を含み、この場合、この

10

20

30

40

50

動物が、コードされる Trem2p を発現する、本発明の実施形態による遺伝子改変マウスを作製するためのゲノム編集方法は、部位特異的変異誘発、組換えに基づいた方法およびスクレアーゼゲノム編集技術を含むが、これらに限定されない。

【0064】

ゲノム編集技術を使用して、ゲノムの所定の標的部位に別々の変異を導入することによりゲノム配列を改変することができる。

【0065】

例えば、ゲノム配列の1つまたは複数のスクレオチドは、ゲノム編集技術を使用して1つまたは複数の種々のスクレオチドと置換し、これによりゲノム配列に、非改変ゲノム配列と比較して、単一のアミノ酸が異なるか、または複数のアミノ酸が異なるタンパク質をコードさせることができる。

10

【0066】

ゲノム編集技術をまた使用して、ゲノム内の所定の標的部位にコード配列を挿入する、「ノックイン」技術によりゲノム配列を改変することができる。

【0067】

本明細書において使用する場合、用語「標的部位」および「標的配列」は、遺伝子編集技術の一般的文脈において、編集する染色体配列の部分を定義する核酸配列を指す。

【0068】

例えば、タンパク質をコードする核酸配列をゲノムの所定の標的部位に挿入し、これによりタンパク質をコードする核酸をゲノムに含有させ、タンパク質を発現させることができる。核酸配列はまた、プロモーターを含有させて、コードされるタンパク質の発現を推進することができるか、またはある位置に核酸を挿入し、これにより核酸が内在性プロモーターに動作可能に連結される場合、コードされるタンパク質の発現を内在性プロモーターにより推進することができる。

20

【0069】

本発明の特定の態様によれば、ゲノム編集技術を使用して第1のマウスのゲノム内に点変異を導入し、これによりマウスに Trem2p をコードさせ、「ノックイン」ゲノム編集技術により第2のマウスのゲノムの Apoe4 遺伝子内にヒトAPOE4 をコードする核酸を挿入し、これにより、図1に示すように、マウス Apoe4 遺伝子のエキソン1ならびにヒトAPOE4 遺伝子のエキソン2、3および4を含む「ヒト化」APOE4 遺伝子を第2のマウスのゲノムに含有させる。次いで、第1および第2のマウスを自然に、または人工的方法により繁殖させて、そのゲノムがAPOE4p をコードするDNA配列およびTrem2p をコードするDNA配列を含む遺伝子改変マウスを得る。

30

【0070】

本発明の特定の態様によれば、CRISPRゲノム編集技術を使用して第1のマウスのゲノム内に点変異を導入して、これによりマウスに Trem2p をコードさせ、「ノックイン」CRISPRゲノム編集技術により第2のマウスのゲノムの Apoe4 遺伝子内にヒトAPOE4 をコードする核酸を導入し、これにより、図1に示すように、マウス Apoe4 遺伝子のエキソン1ならびにヒトAPOE4 遺伝子のエキソン2、3および4を含む「ヒト化」APOE4 遺伝子を第2のマウスのゲノムに含有させる。次いで、第1および第2のマウスを自然に、または人工的方法により繁殖させて、そのゲノムがAPOE4p をコードするDNA配列およびTrem2p をコードするDNA配列を含む遺伝子改変マウスを作製する。

40

【0071】

ゲノム編集は、例えば、本明細書に記載の方法、ならびにJ. P. SundbergおよびT. Ichiki編、Genetically Engineered Mice Handbook、CRC Press、2006年；M. H. HofkerおよびJ. van Deursen編、Transgenic Mouse Methods and Protocols、Humana Press、2002年；A. L. Joyner、Gene Targeting: A Practical Approach、Oxford University Press、2000年；Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory P

50

ress、2002年12月15日；ISBN-10：0879695919；Kursad Turksen（編）、*Embryonic stem cells: methods and protocols in Methods Mol Biol.* 2002年、185巻、Humana Press；*Current Protocols in Stem Cell Biology*、ISBN：978047015180；Meyerら、PNAS USA、2010年、107巻（34号）、15022～15026頁；およびDoudna, J.ら（編）CRISPR-Cas: A Laboratory Manual、2016年、CSHPで詳述される方法により行う。いくつかのゲノム編集技術の簡潔な説明を本明細書において記載する。

【0072】

マウスの遺伝子改変のためのヌクレアーゼ技術

【0073】

遺伝子改変方法、例えば、これに限定されないが、ヌクレアーゼ遺伝子編集技術を使用して、ゲノム内の所定の標的部位に所望のDNA配列を導入することができ、これには例えば、ホーミングエンドヌクレアーゼ、インテグラーゼ、メガヌクレアーゼ、トランスポゾンを使用する方法、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、転写活性化因子様（TAL）、クラスター化した規則的配置の短回文構造リピート（CRISPR）- CasまたはDrosophila組換え関連タンパク質（DRAP）を使用するヌクレアーゼ媒介プロセスがある。簡潔には、使用し得る遺伝子改変方法は、ES細胞、iPS細胞、体細胞、受精した卵母細胞または胚内に標的TALEN、ZFN、CRISPRまたはDRAPをコードするRNA分子および少なくとも1つのオリゴヌクレオチドを導入し、次いで、所望の遺伝子改変を有する、ES細胞、iPS細胞、体細胞、受精した卵母細胞または胚を選択するステップを含む。

10

【0074】

例えば、これらに限定されないが、CRISPR法、TAL（転写活性化因子様）エフェクター法、ジンクフィンガー媒介ゲノム編集、またはDRAP等のヌクレアーゼ技術によりマウスのゲノム内の所定の標的部位に所望の核酸配列を導入して、そのゲノムがプロモーターに動作可能に連結されたAPOE4pをコードする核酸を含み、この場合、この動物が、コードされるAPOE4pを発現し、そのゲノムがプロモーターに動作可能に連結されたTrem2pをコードする核酸を含み、この場合、この動物が、コードされるTrem2pを発現する、本発明の実施形態に従って提供される遺伝子改変マウスを作製することができる。

20

【0075】

本明細書において使用する場合、用語「標的部位」および「標的配列」は、ヌクレアーゼ遺伝子編集技術の文脈において、編集する染色体配列の部分を定義する核酸配列、ならびに結合に十分な条件が存在する場合、認識および結合するようにヌクレアーゼを改変する核酸配列を指す。

30

【0076】

CRISPR-Casシステム

【0077】

CRISPR（クラスター化した規則的配置の短回文構造リピート）は、配列決定された細菌の約40%および配列決定された古細菌の90%のゲノムに見出される複数の短い直列リピートを含む座位であり、外来DNAエレメントに対する抵抗性を付与する。Horvath、2010年、*Science*、327巻：167～170頁；Barrangouら、2007年、*Science*、315巻：1709～1712頁；およびMakarovaら、2011年、*Nature Reviews Microbiology*、9巻：467～477頁を参照されたい。

40

【0078】

CRISPRリピートは、24～48塩基対のサイズ範囲である。これらは通常、ヘアピン等の2次構造の形成を意味するおよその2回転対称構造を示すが、正確には回文構造ではない。CRISPRリピートは、同様の長さのスペーサーにより分離される。

【0079】

CRISPR関連（cas）遺伝子は、CRISPRリピート-スペーサーアレイを伴

50

うことが多い。40個を超える種々のCasタンパク質ファミリーが記載されている(Haftら2005年、PLoS Comput Biol. 1巻(6号): e60頁)。cas遺伝子と反復構造との特定の組合せを使用して、8つのCRISPRサブタイプが定義されており、そのいくつかは、リピート関連ミステリアスタンパク質(RAMP)をコードするさらなる遺伝子モジュールと関連している。

【0080】

種々の生物において多種多様なCRISPRシステムが存在し、最も単純なものうちの1つは、*Streptococcus pyogenes*由来のII型CRISPRシステムであり、Cas9タンパク質および2つのRNAをコードする単一の遺伝子のみ、成熟CRISPR RNA(crRNA)ならびに部分的相補性のトランスクレッセス作用RNA(tracrRNA)は、外来DNAのRNAガイドサイレンシングに必要十分である(Gasiunasら、2012年、PNAS 109巻: E2579~E2586頁; Jinekら、2012年、Science 337巻: 816~821頁)。crRNAの成熟には、tracrRNAおよびRNase IIIを必要とする(Deltchevaら、2011年、Nature 471巻: 602~607頁)。しかし、この必要性は、tracrRNA-crRNA複合体を模倣する、デザインしたヘアピンを含む改変低分子ガイドRNA(sgRNA)を使用することにより回避することができる(Jinekら、2012年、Science 337巻: 816~821頁)。sgRNAと標的DNAとの間の塩基対形成では、Cas9のエンドヌクレアーゼ活性により2本鎖切断(DSB)を生じる。結合特異性は、sgRNA-DNA塩基対形成とDNA相補領域に並置される短鎖DNAモチーフ(プロトスペーサー隣接モチーフ[PAM]配列: NGG)の両方により判定する(MarraffiniおよびSontheimer、2010年、Nature Reviews Genetics、11巻: 181~190頁)。例えば、CRISPRシステムは、Cas9タンパク質およびsgRNAの2つの分子の最小のセットを必要とし、したがって、宿主に依存しない遺伝子標的化プラットフォームとして使用することができる。Cas9/CRISPRは、部位選択的RNAガイドゲノム編集、例えば、標的化挿入に利用することができる。例えば、Carroll、2012年、Molecular Therapy 20巻: 1658~1660頁; Changら、2013年、Cell Research 23巻: 465~472頁; Choら、2013年、Nature Biotechnol 31巻: 230~232頁; Congら、2013年、Science 339巻: 819~823頁; Hwangら、2013年、Nature Biotechnol 31巻: 227~229頁; Jiangら、2013年、Nature Biotechnol 31巻: 233~239頁; Maliら、2013年、Science 339巻: 823~826頁; Qiら、2013年、Cell 152巻: 1173~1183頁; Shenら、2013年、Cell Research 23巻: 720~723頁; およびWangら、2013年、Cell 153巻: 910~918頁を参照されたい。特に、Wangら、2013年、Cell 153巻: 910~918頁は、オリゴヌクレオチドと組み合わせてCRISPR/Cas9システムを使用した標的挿入を記載している。

【0081】

TAL(転写活性化因子様)エフェクター

【0082】

転写活性化因子様(TAL)エフェクターまたはTALE(転写活性化因子様エフェクター)は、植物病原菌属のXanthomonasに由来し、これらのタンパク質は、植物転写活性化因子を模倣して植物転写物を操作する。Kayら、2007年、Science、318巻: 648~651頁を参照されたい。

【0083】

TALエフェクターは、タンデムリピートを集中させたドメインを含み、各リピートがアミノ酸を約34個含む。このアミノ酸は、これらのタンパク質のDNA結合特異性の鍵である。加えて、このTALエフェクターは、核局在化配列および酸性転写活性化ドメインを含む。総説については、Schornackら2006年、J. Plant Physiol.、163巻(3号): 256~272頁; ScholzeおよびBoch、2011年、Curr Opin Microbiol、14巻: 47~53頁を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0084】

T A L エフェクターの特異性は、タンデムリピートに見出される配列に依存する。この反復配列は、約 1 0 2 b p を含み、このリピートは、典型的に、相互に 9 1 ~ 1 0 0 % 相同である (Bonasら、1989年、*Mol Gen Genet* 218巻：127 ~ 136 頁)。リピートの多型は、通常 1 2 位および 1 3 位に位置し、T A L エフェクター標的配列の連續するヌクレオチドの同一性とともに、1 2 位および 1 3 位の高頻度可変性 2 残基間の同一性において 1 対 1 対応関係があると考えられる。MoscouおよびBogdanove 2 0 0 9 年、*Science* 326巻：1501 頁；ならびにBochら、2 0 0 9 年、*Science* 326巻：1509 ~ 1512 頁を参照されたい。2 つの高頻度可変性残基は、反復可変 2 残基 (R V D) として公知であり、これによって、ある R V D が、D N A 配列のあるヌクレオチドを認識し、各 T A L エフェクターの D N A 結合ドメインが、広範な認識部位 (15 ~ 30 n t) を高精度で標的とすることができるとを確実とする。実験的には、これらの T A L エフェクターの D N A 認識のコードは、1 2 位および 1 3 位の H D 配列が、シトシン (C) への結合を生じ、N G が T に結合し、N I が A、C、G または T に結合し、N N が A または G に結合し、I G が T に結合するように決定されている。これらの D N A 結合リピートを、リピートの新たな組合せおよび数を有するタンパク質に構築して、新たな配列と相互作用可能な人工転写因子を作製し、植物細胞におけるレポーター遺伝子の発現を活性化している (Bochら 2 0 0 9 年、*Science* 326巻：1509 ~ 1512 頁)。これらの D N A 結合ドメインは、すべての細胞型における、標的ゲノム編集または標的遺伝子制御の分野において一般的適用性を有することが明らかとなっている。Gajら、*Trends in Biotechnol.* 2013年、31巻(7号)：397 ~ 405 頁を参照されたい。さらに、変異 T A L エフェクターは、哺乳動物細胞の天然 *Xanthomonas* T A L エフェクターまたはタンパク質において自然に見出されない、ヌクレアーゼ等の外因性の機能性タンパク質エフェクタードメインと関連して機能することが明らかとなっている。T A L ヌクレアーゼ (T A L N または T A L E N) は、T A L をヌクレアーゼと組み合わせることにより構築することができ、例えば、N 末端または C 末端の F o k I ヌクレアーゼドメインがある。Kimら 1996 年、*PNAS* 93巻：1156 ~ 1160 頁；Christianら 2 0 1 0 年、*Genetics* 186巻：757 ~ 761 頁；Liら、2 0 1 1 年、*Nucleic Acids Res* 39巻：6315 ~ 6325 頁；およびMillerら、2 0 1 1 年、*Nat Biotechnol* 29巻：143 ~ 148 頁。N H E J により欠失を引き起こす T A L E N の機能性は、ラット、マウス、ゼブラフィッシュ、*Xenopus*、メダカ、ラットおよびヒト細胞において明らかとなっている。Ansaiら、2 0 1 3 年、*Genetics*、193巻：739 ~ 749 頁；Carlsonら、2 0 1 2 年、*PNAS*、109巻：17382 ~ 17387 頁；Hockemeyerら、2 0 1 1 年、*Nature Biotechnol.*、29巻：731 ~ 734 頁；Leiら、2 0 1 2 年、*PNAS*、109巻：17484 ~ 17489 頁；Mooreら、2 0 1 2 年、*PLoS ONE*、7巻：e37877 頁；Stroudら、2 0 1 3 年、*J. Biol. Chem.*、288巻：1685 ~ 1690 頁；Sungら、2 0 1 3 年、*Nature Biotechnol* 31巻：23 ~ 24 頁；Weversら、2 0 1 3 年、*PNAS* 110巻：3782 ~ 3787 頁。

【0085】

このような T A L E N の生成方法は、米国特許第 8,420,782 号、第 8,450,471 号、第 8,450,107 号、第 8,440,432 号および第 8,440,431 号、ならびに米国特許出願公開第 2013/0137161 号および第 2013/0137174 号にさらに記載されている。

【0086】

他の有用なエンドヌクレアーゼは、例えば、H h a I、H i n d I I I、N o t I、B b v C I、E c o R I、B g / I および A l w I を含むことができる。いくつかのエンドヌクレアーゼ (例えば、F o k I) は 2 量体としてのみ機能するという事実を利用して、T A L エフェクターの標的特異性を増強することができる。例えば、いくつかの場合では、各 F o k I 単量体は、異なる D N A 標的配列を認識する T A L エフェクター配列に融合させることができ、2 つの認識部位が近接している場合のみ、不活性単量体は、実際に集

10

20

30

40

50

合して機能性酵素を生成する。ヌクレアーゼを活性化するDNA結合を必要とすることにより、高度に部位特異的な制限酵素を生成することができる。

【0087】

一部の実施形態では、TALENは、核局在化シグナルまたは配列(NLS)をさらに含むことができる。NLSは、TALENヌクレアーゼタンパク質を標的化して、染色体の標的配列において2本鎖切断端を核内に導入することを促進するアミノ酸配列である。

【0088】

核局在化シグナルは、当技術分野において公知であり、例えば、Makkerら1996年、Curr Biol. 6巻：1025～1027頁を参照されたい。NLSは、SV40ラージT抗原由来の配列PKKKRKV(配列番号16)、Kalderon1984年、Cell. 39巻：499～509頁；ヌクレオプラスミン由来のRPAAATKKAGQAKKK(配列番号17)、Dingwallら、1988年、J Cell Biol.、107巻、841～9頁を含む。さらなる例は、McLaneおよびCorbett2009年、IUBMB Life、61巻、697～70頁；Dopieら2012年、PNAS、109巻、E544～E552頁に記載されている。

10

【0089】

切断ドメインは、任意のエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼから得ることができる。切断ドメインが由来し得るエンドヌクレアーゼの非限定的な例は、制限エンドヌクレアーゼおよびホーミングエンドヌクレアーゼを含むが、これらに限定されない。例えば、2002～2003年Catalog、New England Biolabs、Beverly, Mass.；およびBelfortら(1997年)Nucleic Acids Res. 25巻：3379～3388頁を参照されたい。DNAを切断するさらなる酵素は、公知であり、例えば、SIヌクレアーゼ、マンギビーンヌクレアーゼ、臍臍DNase I、小球菌ヌクレアーゼ、酵母HOエンドヌクレアーゼがある。Linnら(編)Nucleases、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1993年をまた参照されたい。これらの酵素のうちの1つもしくは複数、またはこれらの機能性断片は、切断ドメインのソースとして使用することができる。

20

【0090】

ジンクフィンガー媒介ゲノム編集

【0091】

遺伝子編集のため、例えば、相同性による修復プロセスを介する標的挿入のためのジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)の使用は、十分に確立されている。例えば、Carberyら、2010年、Genetics、186巻：451～459頁；Cuiら、2011年、Nature Biotechnol.、29巻：64～68頁；Hauschildら、2011年、PNAS、108巻：12013～12017頁；Orlandoら、2010年、Nucleic Acids Res.、38巻：e152～e152頁；ならびにPorteusおよびCarroll、2005年、Nature Biotechnology、23巻：967～973頁を参照されたい。

30

【0092】

ZFN媒介プロセスの構成要素は、DNA結合ドメインおよび切断ドメインを有するジンクフィンガーヌクレアーゼを含む。このようなものは、例えば、Beerliら(2002年)Nature Biotechnol.、20巻：135～141頁；Paboら(2001年)Ann. Rev. Biochem.、70巻：313～340頁；Isalanら(2001年)Nature Biotechnol.、19巻：656～660頁；Segalら(2001年)Curr. Opin. Biotechnol.、12巻：632～637頁；およびChooら(2000年)Curr. Opin. Struct. Biol.、10巻：411～416頁；ならびに米国特許第6,453,242号および第6,534,261号に記載されている。標的配列に対するジンクフィンガー結合ドメインをデザインおよび選択する方法は、当技術分野において公知であり、例えば、Seraら、Biochemistry 2002年、41巻、7074～7081頁；米国特許第6,607,882号、第6,534,261号および第6,453,242号を参照されたい。

40

【0093】

一部の実施形態では、ジンクフィンガーヌクレアーゼは、核局在化シグナルまたは配列(NLS)をさらに含むことができる。NLSは、ジンクフィンガーヌクレアーゼタンパ

50

ク質を標的化して、染色体の標的配列において2本鎖切断端を核内に導入することを促進するアミノ酸配列である。核局在化シグナルは、当技術分野において公知である。例えば、Makkerhら(1996年)Current Biology 6巻:1025~1027頁を参照されたい。

【0094】

切断ドメインは、任意のエンドヌクレアーゼまたはエキソヌクレアーゼから得ることができる。切断ドメインが由来し得るエンドヌクレアーゼの非限定的な例は、制限エンドヌクレアーゼおよびホーミングエンドヌクレアーゼを含むが、これらに限定されない。例えば、2002~2003年Catalog、New England Biolabs、Beverly, Mass.；およびBelfortら(1997年)Nucleic Acids Res. 25巻:3379~3388頁を参照されたい。DNAを切断するさらなる酵素は、公知である(例えば、S Iヌクレアーゼ、マングビーンヌクレアーゼ、臍臓DNase I、小球菌ヌクレアーゼ、酵母HOエンドヌクレアーゼ)。Linnら(編)Nucleases、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1993年をまた参照されたい。これらの酵素のうちの1つもしくは複数(またはこれらの機能性断片)は、切断ドメインのソースとして使用することができる。切断ドメインはまた、上記のように、2量体を形成して切断を活性化することを必要とする、酵素またはその部分に由来し得る。

【0095】

2つのジンクフィンガーヌクレアーゼは、各ヌクレアーゼが活性酵素2量体のうちの単量体を含むため、切断に必要とされ得る。あるいは、単一のジンクフィンガーヌクレアーゼは、活性酵素2量体を生成する両方の単量体を含むことができる。制限エンドヌクレアーゼ(制限酵素)は、多くの種に存在し、DNAに(認識部位に)配列特異的に結合し、結合部位で、または結合部位付近でDNAを切断することができる。特定の制限酵素(例えば、IIS型)は、認識部位から除去された部位でDNAを切断し、分離可能な結合および切断ドメインを有する。例えば、IIS型酵素Fok Iは、一方の鎖のその認識部位から9番目のヌクレオチド、および他方の鎖のその認識部位から13番目のヌクレオチドのDNAの2本鎖切断を触媒する。例えば、米国特許第5,356,802号、第5,436,150号および第5,487,994号ならびにLiら(1992年)PNAS 89巻:4275~4279頁；Liら(1993年)PNAS 90巻:2764~2768頁；Kimら(1994年)PNAS 91巻:883~887頁；Kimら(1994年)J. Biol. Chem. 269巻:31号、978頁~31号、982頁を参照されたい。したがって、ジンクフィンガーヌクレアーゼは、少なくとも1つのIIS型制限酵素由来の切断ドメインおよび1つまたは複数のジンクフィンガー結合ドメインを含むことができ、これらは、改変してもしなくてよい。例示的IIS型制限酵素は、例えば、国際公開WO 07/014275に記載されており、この開示の全体を参照により本明細書に組み込む。さらなる制限酵素はまた、分離可能な結合および切断ドメインを含み、これらも本開示により検討する。例えば、Robertsら(2003年)Nucleic Acids Res. 31巻:418~420頁を参照されたい。切断ドメインが結合ドメインから分離可能である、例示的なIIS型制限酵素は、Fok Iである。この特定の酵素は、2量体として活性である(Bitinaiteら、1998年、PNAS 95巻:10号、570頁~10号、575頁)。したがって、本開示の目的において、ジンクフィンガーヌクレアーゼに使用するFok I酵素の部分は、切断単量体とみなされる。したがって、Fok I切断ドメインを使用する標的2本鎖切断では、それぞれがFok I切断単量体を含む、2つのジンクフィンガーヌクレアーゼを使用して、活性酵素2量体を再構成することができる。あるいは、ジンクフィンガー結合ドメインおよび2つのFok I切断単量体を含む単一のポリペプチド分子も使用することができる。ある特定の実施形態では、例えば、それぞれその全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許公開第2005/0064474号、第2006/0188987号、および第2008/0131962号に記載されているように、切断ドメインは、ホモ2量体化を最小化するか、または防ぐ1つまたは複数の改変切断単量体を含むことができる。非限定的な例として、Fok Iの446位、447位、479位、483位、484

10

20

30

40

50

位、486位、487位、490位、491位、496位、498位、499位、500位、531位、534位、537位および538位のアミノ酸残基はすべて、Fok I切断半ドメインの2量体化に影響する標的である。偏性ヘテロ2量体を形成する、Fok Iの例示的改変切削単量体は、第1の切削単量体がFok Iのアミノ酸残基490位および538位に変異を含み、第2の切削単量体がアミノ酸残基486位および499位に変異を含む、対を含む。したがって、一実施形態では、アミノ酸490位の変異は、Glu(E)をLys(K)と置換し、アミノ酸残基538位の変異は、Ile(I)をLys(K)と置換し、アミノ酸残基486位の変異は、Gln(Q)をGlu(E)と置換し、499位の変異は、Ile(I)をLys(K)と置換する。詳細には、改変切削単量体は、ある切削単量体において490位をEからKに、および538位をIからKに変異させて「E490K:I538K」と呼ばれる改変切削単量体を作製することにより、ならびに別の切削単量体において486位をQからEに、および499位をIからLに変異させて「Q486E:I499L」と呼ばれる改変切削単量体を作製することにより調製することができる。上記の改変切削単量体は、異常な切削が最小化または消失した偏性ヘテロ2量体変異体である。改変切削単量体は、適した方法を使用して、例えば、米国特許公開第2005/0064474号に記載の野生型切削単量体(Fok I)の部位特異的変異誘発により調製することができる。

【0096】

上記のジンクフィンガーネクレアーゼは、2本鎖切削を標的組込み部位に導入するため改変することができる。2本鎖切削は、標的組込み部位であり得るか、または組込み部位から最大1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、100もしくは1000ヌクレオチド離れ得る。一部の実施形態では、2本鎖切削は、組込み部位から最大1、2、3、4、5、10、15または20ヌクレオチド離れ得る。他の実施形態では、2本鎖切削は、組込み部位から最大10、15、20、25、30、35、40、45または50ヌクレオチド離れ得る。さらに他の実施形態では、2本鎖切削は、組込み部位から最大50、100または1000ヌクレオチド離れ得る。

【0097】

D R A P技術は、米国特許第6,534,643号、第6,858,716号および第6,830,910号ならびにWattら、2006年に記載されている。

【0098】

必要に応じて、タンパク質をコードする核酸配列をゲノムのランダム標的部位に挿入し、これによりゲノムにタンパク質をコードする核酸を含有させることができる。典型的には、ランダム挿入では、核酸配列にはまた、プロモーターを含有させて、挿入した核酸の発現を推進させる。

【0099】

さらに必要に応じて、所望のタンパク質、APOE4p、Trem2pまたはAPOE4pとTrem2pの両方をコードする核酸をApoe4遺伝子またはTrem2遺伝子以外のゲノムの所定の標的部位に挿入する。

【0100】

例えば、所望のタンパク質、APOE4p、Trem2pまたはAPOE4pとTrem2pの両方をコードする核酸を、確実な発現を生じさせることが公知のゲノムの所定の標的部位、例えば、HprtまたはRosa26座位に挿入する。

【0101】

態様によれば、所定の標的部位でのゲノム編集では、標的化構築物は、組換えDNA技術を使用して作製し、細胞内の標的内在性遺伝子と相同な5'および3'配列を含む。標的化構築物は、ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、ハイグロマイシンまたはピューロマイシン等の選択可能なマーカー、所望のタンパク質、APOE4p、Trem2pまたはAPOE4pとTrem2pの両方をコードする核酸、ならびに必要に応じてポリアデニル化シグナルをさらに含む。所望のタンパク質をコードする核酸の的確な転写および翻訳を確実とするために、所望のタンパク質をコードする核酸は、内因性遺伝子座を有する

フレーム内、またはスプライス受容部位にあり、配列内リボソーム進入部位（IRES）配列を含むことができる。

【0102】

このような標的化構築物は、これに限定されないが、幹細胞等の所望の細胞型にトランスクレクトし、細胞をスクリーニングして、的確なゲノム編集イベントをPCR、サザンプロットまたは配列解析を使用して検出する。的確なゲノム編集イベントを有する細胞を、ELISAまたはウエスタンプロット解析等のタンパク質解析により、コードされるタンパク質の発現について、さらに解析することができる。必要に応じて、Creリコンビナーゼまたはフリッパーーゼ（F1p）等のリコンビナーゼで幹細胞を処理することにより、選択可能なマーカーをコードする核酸を除去するように構成することができる。リコンビナーゼ処理の後、所望のタンパク質をコードする核酸の存在について細胞を解析する。

10

【0103】

的確なゲノム編集イベントを有する細胞を選択し、上記のように着床前胚内に注入する。キメラの雄を選択して繁殖させる。毛色、およびPCR、サザンプロットまたは配列決定等の遺伝子解析により、ES細胞ゲノムの遺伝について子を解析することができ、例えば、タンパク質解析（ウエスタンプロット、ELISA）または他の機能性アッセイにより、所望のタンパク質の発現について試験することができる。的確なタンパク質を発現する子を相互交雑させて、遺伝子改変（単数または複数）についてホモ接合性のマウスを作製する。

20

【0104】

APOE4pおよびTrem2pを発現する遺伝子改変マウスの作製は、適切な核酸、例えば、所望のタンパク質をコードする1つもしくは複数の核酸、および/または1つもしくは複数の発現構築物、例えば、タンパク質もしくはRNA（例えば、CRISPRにおける使用のためのcas9またはガイドRNA）をコードする発現構築物を、着床前胚または幹細胞、例えば、胚性幹細胞（ES）細胞または誘導多能性幹（iPS）細胞内へ注入またはトランスクレクションすることを含むことができる。

30

【0105】

用語「発現構築物」および「発現力セット」は、配列をコードする所望の核酸を含み、動作可能に連結されたコード配列の発現に必要な、または望ましい1つまたは複数の制御エレメントを含む2本鎖組換えDNA分子を指すために本明細書において使用する。

【0106】

用語「制御エレメント」は、本明細書において使用する場合、核酸配列の発現のある様態を調節するヌクレオチド配列を指す。例示的な制御因子は、例示的に、エンハンサー、配列内リボソーム進入部位（IRES）、イントロン、複製起点、ポリアデニル化シグナル（pA）、プロモーター、転写終結配列、および上流制御ドメインを含み、これらは、核酸配列の複製、転写、転写後プロセシングに寄与する。当業者は、発現構築物における、これらの、および他の制御エレメントを、単なる慣例的実験で選択および使用することが可能である。発現構築物は、組換えまたは合成により、周知の方法を使用して作製することができる。

30

【0107】

用語「動作可能に連結された」は、本明細書において使用する場合、第2の核酸と機能的な関係にある核酸を指す。

40

【0108】

制御エレメントは、特定の実施形態において、プロモーターである発現力セットに含まれる。用語「プロモーター」は、本明細書において使用する場合、所望の分子をコードする核酸配列等の転写される核酸配列に動作可能に連結されたDNA配列を指す。プロモーターは、一般に、転写される核酸配列の上流に位置し、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子により特異的に結合させるための部位をもたらす。特定の実施形態では、プロモーターは、一般に、転写されて所望の分子を生成する核酸配列の上流に位置し、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子により特異的に結合させるための部位をもたらす。含まれる

50

プロモーターは、構成的プロモーターであり得るか、または誘導発現をもたらすことができ、遍在性の組織特異的または細胞型特異的発現をもたらすことができる。

【0109】

発現構築物に含むことができる遍在性プロモーターは、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK-1) プロモーター、ベータ-アクチンプロモーター、ROSA26 プロモーター、熱ショックタンパク質70 (Hsp70) プロモーター、EF-1アルファ遺伝子コード伸長因子1アルファ (EF1) プロモーター、真核生物翻訳開始因子4A (eIF-4A1) プロモーター、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) プロモーターおよびCMV (サイトメガロウイルス) プロモーターを含むが、これらに限定されない。

10

【0110】

これらのプロモーターおよび他のプロモーターは、Abboud, S. L.ら、J. Histochem およびCytochem.、51巻(7号)：941～949頁、2003年；Schorppら、Nuc I. Acids Res.、24巻(9号)：1787～1788頁、1996年；McBurney, M. W.ら、Devel. Dynamics、200巻：278～293頁、1994年；ならびにMajumder, M.ら、Blood、87巻(8号)：3203～3211頁、1996年に例示するように当技術分野において公知である。

【0111】

プロモーターに加えて、サイトメガロウイルス (CMV) 初期エンハンサー要素およびSV40 エンハンサー要素等の1つまたは複数のエンハンサー配列を含むことができるが、これらに限定されない。

20

【0112】

さらに含まれる配列は、ベータ-グロビンイントロンまたはジェネリックイントロン、転写終結配列、ならびにこれらに限定されないが、SV40-pA、ベータ-グロビン-pA およびSCF-pA 等のmRNAポリアデニル化 (pA) 配列等のイントロン配列を含む。

【0113】

発現構築物は、細菌細胞における增幅に必要な配列、例えば、選択マーカー (例えば、カナマイシンまたはアンピシリン抵抗性遺伝子) およびレブリコンを含むことができる。

【0114】

発現構築物を着床前胚内へDNA注入する方法では、発現構築物は、必要に応じて、線状化した後、マウス着床前胚内に注入する。好ましくは、発現構築物は、受精卵母細胞内に注入する。受精卵母細胞は、過排卵させた雌から交配の翌日 (0.5 dpc) に採取し、発現構築物を用いて注入する。注入した卵母細胞は、一晩培養するか、または0.5日 p.c の偽妊娠させた雌の卵管内に直接移植する。

30

【0115】

過排卵、卵母細胞の回収、発現構築物注入および胚移植の方法は、当技術分野において公知であり、Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2002年12月15日；ISBN-10: 0879695919 に記載されている。

40

【0116】

PCR、サザンプロットまたは配列決定等のDNA解析により、所望の変異または挿入配列の存在について子を試験することができる。例えば、ELISAまたはウエスタンプロット解析により、所望の変異または挿入配列を保有しているマウスをタンパク質発現について試験することができる。

【0117】

あるいは、核酸または発現構築物は、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿およびリポフェクション等の周知の方法を使用して、幹細胞 (ES細胞またはiPS細胞) 内にトランスクレプトすることができる。PCR、サザンプロットまたは配列決定等のDNA解析により、所望の変異または挿入配列の存在について細胞をスクリーニングする

50

。例えば、E L I S A またはウエスタンプロット解析等のタンパク質解析により、所望の変異または挿入配列を有する細胞を機能発現について試験することができる。

【0118】

特定の株用に最適化した培地中でマウス E S 細胞を増殖させる。典型的には、E S 培地は、15%のウシ胎仔血清 (F B S) または合成もしくは半合成の等価物、2 mMのグルタミン、1 mMのピルビン酸Na、0.1 mMの非必須アミノ酸、50 U / mlのペニシリンおよびストレプトマイシン、0.1 mMの2-メルカプトエタノールならびに100 U / mlのL I F (いくつかの細胞株用に、これらに加えて分化の化学阻害物質) をダルベッコ改变イーグル培地 (D M E M) 中に含む。詳細な説明は、当技術分野において公知である (Tremmlら、2008年、*Current Protocols in Stem Cell Biology*、第1章：ユニット1C.4)。E S 細胞分化阻害物質の総説については、Buehr, M.ら (2003年)、*Genesis of embryonic stem cells, Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 358巻、1397～1402頁を参照されたい。

【0119】

所望の変異または挿入配列を組み込む選択された細胞は、着床前胚内に注入することができる。マイクロインジェクションでは、トリプシンとEDTAの混合物を使用してE S またはi P S 細胞を単一細胞にし、その後、E S 培地中に再懸濁する。精密に引き延ばされたガラス針 (内径20～25マイクロメートル) を使用して単一細胞の群を選択し、マイクロマニピュレーターを装着した倒立顕微鏡を使用して、胚透明帯を介して胚盤胞腔 (胞胚腔) 内に導入する。

【0120】

胚盤胞注入に代わって、幹細胞を初期胚 (例えば、2細胞、4細胞、8細胞、前桑実胚または桑実胚) 内に注入することができる。レーザーまたはピエゾパルスで穿孔した透明帯の開口により、注入を促進することができる。胚盤胞1つ、または8細胞期の胚1つあたり選択された幹細胞 (E S またはi P S 細胞) 約9～10個、4細胞期の胚1つあたり幹細胞6～9個、および2細胞期の胚1つあたり幹細胞約6個を注入する。幹細胞の導入後、5%CO₂、窒素中5%O₂において、37℃で数時間、胚を回復させるか、または一晩培養し、その後、偽妊娠させたレシピエントの雌に移植する。幹細胞注入のさらなる代替法では、桑実胚期の胚を用いて幹細胞を凝集することができる。これらのすべての方法は、十分に確立されており、幹細胞キメラを作製するために使用することができる。より詳細な説明については、*Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*、第3版 (A. Nagy, M. Gertsenstein, K. Vintersten, R. Behringer, Cold Spring Harbor Laboratory Press、2002年12月15日; ISBN-10: 0879695919; Nagyら、1990年、*Development* 110巻、815～821頁; US7,576,259: Method for making genetic modifications; US7,659,442; US7,294,754; およびKrausら2010年、*Genesis* 48巻、394～399頁を参照されたい。

【0121】

偽妊娠させた胚レシピエントは、当技術分野において公知の方法を使用して用意する。簡潔には、6～8週齢の繁殖性の雌マウスを、精管切除されたまたは繁殖不能な雄と交配して、外科的に導入された胚の維持に役立つホルモン状態を誘導する。交尾後2.5日 (d p c) に、胚盤胞を含む幹細胞を最大15個、子宮と卵管の接合部に非常に近い子宮角内に導入する。初期の胚および桑実胚では、このような胚を *in vitro* で胚盤胞に培養するか、または胚形成期に応じて0.5 d p cまたは1.5 d p cの偽妊娠させた雌の卵管に移植する。移植胚由来のキメラの子は、移植時の胎齢に応じて移植後16～20日で産まれる。キメラの雄を選択して繁殖させる。毛色、およびPCR、サザンプロットまたは配列決定等の遺伝子解析により、E S 細胞ゲノムの遺伝について、子を解析することができる。さらに、タンパク質解析 (ウエスタンプロット、E L I S A) または他の機能性アッセイにより、コードされるタンパク質 (単数または複数) の発現を解析すること

10

20

30

40

50

ができる。

【0122】

本発明の遺伝子改変マウスは、遺伝子改変についてヘテロ接合性またはホモ接合性であり得る。

【0123】

本発明の態様によれば、本発明の遺伝子改変マウスは、マウスがAPOE4pを発現する「ノックイン」ヒト化APOE4改変についてヘテロ接合性またはホモ接合性であり得、また、マウスがTrem2pを発現する、Trem2pをコードする変異ゲノム配列についてヘテロ接合性またはホモ接合性であり得る。

【0124】

APOE4pを発現するホモ接合性遺伝子改変マウスは、Trem2pを発現するホモ接合性遺伝子改変マウスと交雑させて、改変と、APOE4pおよびTrem2pの両方の発現とについて、ともにホモ接合性の共通遺伝子系統を実施形態に従って作製することができる。

10

【0125】

本発明の遺伝子改変マウスは、種々の系統のいずれかであり得る。

【0126】

遺伝子改変は、単離したマウス胚性幹(ES)細胞、マウス誘導多能性幹(iPS)細胞、マウス体細胞、受精したマウス卵母細胞(接合子)またはマウス胚のゲノム内にノックイン法により導入して、本発明の遺伝子改変マウスを作製することができる。

20

【0127】

本発明の実施形態は、その細胞のすべて、または実質的にすべてにおいて所望の遺伝子改変を含む遺伝子改変マウス、ならびにその細胞のすべてではないが、いくつかにおいて所望の遺伝子改変を含む遺伝子改変マウスを提供する。

【0128】

本発明の態様による遺伝子改変マウスは、ヒトにおける遅発型アルツハイマー病のリスクの増加と関連する1つまたは複数のさらなる遺伝子バリエントを含むことができる。

【0129】

処置および化合物の同定

【0130】

ヒトアルツハイマー病の推定処置についてスクリーニングするための方法であって、マウスのゲノムが、1)プロモーターに動作可能に連結されたヒトAPOE4タンパク質(APOE4p)をコードするDNA配列、および2)プロモーターに動作可能に連結された、p.R47H変異を有するマウスTrem2タンパク質(Trem2p)をコードするDNA配列を含み、マウスが、APOE4pおよびTrem2pを発現し、マウスが、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する、APOE4pおよびTrem2pの発現を伴う1つまたは複数の症状または徵候を特徴とする、本発明の遺伝子改変マウスに、アルツハイマー病の推定処置を施すステップと、マウスに対する推定処置の効果を評価するステップとを含む、方法が本発明の実施形態に従って提供される。

30

【0131】

ヒトアルツハイマー病の推定処置についてスクリーニングするための方法であって、マウスゲノムが、1)プロモーターに動作可能に連結されたヒトAPOE4タンパク質(APOE4p)をコードするDNA配列、および2)プロモーターに動作可能に連結された、p.R47H変異を有するマウスTrem2タンパク質(Trem2p)をコードするDNA配列を含む、B6(SJL)-Apoetm1.1(APOE*4)AdiujTrem2em1Adiuj/Jマウスであって、APOE4pをコードするDNA配列について、およびTrem2pをコードするDNA配列についてホモ接合性であり、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現するマウスに、アルツハイマー病の推定処置を施すステップと、マウスに対する推定処置の効果を評価するステップとを含む、方法が本発明の実施形態に従って提供される。

40

50

【 0 1 3 2 】

アルツハイマー病の処置における使用のための化合物についてスクリーニングするための方法であって、本発明の遺伝子改変マウスに化合物を投与するステップと、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する、ヒト A P O E 4 p およびマウス T r e m 2 p の発現を伴う 1 つまたは複数の症状または徵候の処置における化合物の作用を評価するステップとを含む、方法が本発明の態様に従って提供される。非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する、ヒト A P O E 4 p およびマウス T r e m 2 p の発現を伴う 1 つまたは複数の症状または徵候の処置における化合物の作用を評価するステップは、好ましくは、評価の結果を適した対照、例えば、これらに限定されないが、 A P O E 3 発現マウスまたは野生型マウス（例えば、 A p o e 遺伝子を保有するマウス）等の対照に対する化合物の作用と比較することを含む。

【 0 1 3 3 】

このような徵候および症状は、 1) A P O E 3 発現マウスまたは野生型対照マウス等の対照と比較して、本発明の遺伝子改変マウスの脳において著しく多いミクログリアの存在と、 2) A P O E 3 発現マウスまたは野生型対照マウス等の対照と比較して、本発明の遺伝子改変マウスの脳において著しく多いアミロイド斑の存在と、 3) A P O E 3 発現マウスまたは野生型対照マウス等の対照と比較して、本発明の遺伝子改変マウスの脳において著しく多いタウ凝集物の存在と、 4) A P O E 3 発現マウスまたは野生型対照マウス等の対照と比較して、本発明の遺伝子改変マウスの脳において著しく多い炎症の存在と、 5) A P O E 3 発現マウスまたは野生型対照マウス等の対照と比較して、本発明の遺伝子改変マウスの脳において著しく多いシナプスおよび / またはニューロンの欠損の存在と、 6) A P O E 3 発現マウスまたは野生型対照マウス等の対照と比較して、本発明の遺伝子改変マウスの脳において著しく多い認知障害の存在と、 7) A P O E 3 発現マウスまたは野生型対照マウス等の対照と比較して、加齢した本発明の遺伝子改変マウスにおいて著しく多いフレイルの徵候の存在と、 8) A P O E 3 発現マウスまたは野生型対照マウス等の対照と比較して、本発明の遺伝子改変マウスの脳において著しく多い血流障害の存在と、 9) A P O E 3 発現マウスまたは野生型対照マウス等の対照と比較して、本発明の遺伝子改変マウスの血液、血清、または組織における非家族性遅発型アルツハイマー病の 1 つまたは複数のバイオマーカーの存在、レベル、および / または機能の著しい差と、 10) A P O E 3 発現マウスまたは野生型対照マウス等の対照と比較した、本発明の遺伝子改変マウスにおける脳血管外漏出と、 11) A P O E 3 発現マウスまたは野生型対照マウス等の対照と比較した、本発明の遺伝子改変マウスにおける高密度リポタンパク質、および低密度リポタンパク質、ならびに / またはコレステロール等の 1 つまたは複数の血中リポタンパク質のレベルとのうちの任意の 1 つまたは複数を含むが、これらに限定されない。

【 0 1 3 4 】

本発明の態様によれば、化合物の作用を評価するステップが、マウスのゲノムが、 1) プロモーターに動作可能に連結されたヒト A P O E 4 タンパク質 (A P O E 4 p) をコードする D N A 配列、および 2) プロモーターに動作可能に連結された、 p . R 4 7 H 变異を有するマウス T r e m 2 タンパク質 (T r e m 2 p) をコードする D N A 配列を含み、マウスが、 A P O E 4 p および T r e m 2 p を発現し、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する A P O E 4 p および T r e m 2 p の発現を伴う 1 つまたは複数の症状または徵候を特徴とする、本発明の遺伝子改変マウスに対する化合物の作用を、対照と比較することを含む、ヒトアルツハイマー病の推定処置についてスクリーニングするための方法が提供される。

【 0 1 3 5 】

本発明の態様によれば、化合物の作用を評価するステップが、 B 6 (S J L) - A p o e t m 1 . 1 (A P O E * 4) A d i u j T r e m 2 e m 1 A d i u j / J マウスに対する化合物の作用を、対照と比較することを含む、ヒトアルツハイマー病の推定処置についてスクリーニングするための方法が提供される。

【 0 1 3 6 】

10

20

30

40

50

適した対照は、例えば、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現しないマウスに化合物を投与するステップと、このマウスに対する化合物の作用を評価するステップとを含む。適した対照は、例えば、APOE3発現マウスまたは野生型対照マウスに化合物を投与するステップを含む。野生型対照マウスは、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pを発現しない任意のマウスであり得る。適した対照は、例えば、野生型C57BL/6Jマウスに化合物を投与するステップと、野生型C57BL/6Jマウスに対する化合物の作用を評価するステップとを含む。

【0137】

非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pの発現を伴う症状または徵候は、これらに限定されないが、イムノアッセイ、核酸アッセイ、組織化学的染色、認知アッセイ、*in vivo*画像診断法、動物的身体的評価、脳血管外漏出の評価、ならびに組織および/または細胞の形態学的評価を含む、当技術分野において周知の方法により評価することができる。

【0138】

使用し得るイムノアッセイは、当技術分野において周知であり、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、例えば、これらに限定されないが、抗原捕捉ELISA、間接ELISA、固定細胞ELISA；免疫クロマトグラフィー；抗原捕捉法；フローサイトメトリー；免疫プロット；免疫沈降法；免疫拡散法；競合イムノアッセイ；免疫細胞化学法；ラジオイムノアッセイ；およびこれらのいずれかの組合せを含むが、これらに限定されない。イムノアッセイの一般化した詳細は、例示的にWild, D.、The Immunoassay Handbook、第3版、Elsevier Science、2005年；Gosling, J. P.、Imunoassays: A Practical Approach, Practical Approach Series、Oxford University Press、2005年；E. HarlowおよびD. Lane、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1988年；F. BreitlingおよびS. Dube I.、Recombinant Antibodies、John Wiley & Sons、New York、1999年；H. Zola、Monoclonal Antibodies: Preparation and Use of Monoclonal Antibodies and Engineered Antibody Derivatives, Basics: From Background to Bench、BIOS Scientific Publishers、2000年；B.K.C. Lo、Antibody Engineering: Methods and Protocols、Methods in Molecular Biology、Humana Press、2003年；F. M. Ausubelら編、Short Protocols in Molecular Biology、Current Protocols、Wiley、2002年；Ormerod, M. G.、Flow Cytometry: a practical approach、Oxford University Press、2000年；ならびにGivan, A. L.、Flow Cytometry: first principles、Wiley、New York、2001年を含む、標準的参考文献に記載されている。

【0139】

本発明の態様によれば、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する核酸解析物を、本発明の遺伝子改変マウスにおいて、野生型マウスと比較して検出する核酸アッセイは、核酸增幅技術、例えば、これらに限定されないが、PCR、RT-PCR、ライゲーションによるPCRおよびphi-29PCR；核酸ハイブリダイゼーション技術、例えば、これらに限定されないが、ノーザンプロット、サザンプロット、RNaseプロテクションアッセイ、ドットプロット、トランスクリプトーム解析、および*in situ*ハイブリダイゼーションを含むが、これらに限定されない。試料中の核酸の定性的および定量的アッセイの両方のための核酸アッセイは、例示的に、J. SambrookおよびD.W. Russell、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press；第3版、2001年；F. M. Ausubelら編、Short Protocols in Molecular Biology、Current Protocols、Wiley、2002年；C.W. Dieffenbachら、PCR Primer: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、2003年；ならびにV. Demidovら、DNA Amplification: Current Technologies and Applications、Taylor & Francis、2004年を含む、標準的参考文献に詳細に記載されている。

10

20

30

40

50

【0140】

使用し得るバイオマーカーアッセイは、当技術分野において周知であり、脳脊髄液 (C S F) 、血液、血清、または組織中の、A およびタウ種、ニューロフィラメント、ニューログラニン、インターロイキン、T N F 、G M - C S F 、および可溶性T r e m 2 のアッセイを含むが、これらに限定されない。

【0141】

使用し得る認知アッセイは、当技術分野において周知であり、空間記憶、短期記憶、長期記憶のアッセイ、実行機能のアッセイ、注意を要する作業課題、例えば、3 および 5 択の系列反応時間試験、処理速度試験、セットシフティング試験、逆転学習作業課題、物体記憶アッセイ、パターン認識アッセイ、受動的回避記憶アッセイ、馴化アッセイ、および新規物体認識アッセイ、水迷路試験、恐怖条件付け試験、ラジアルアームの水迷路試験、Y 字迷路試験、T 字迷路試験、ならびにオープンフィールド馴化試験を含むが、これらに限定されない。

10

【0142】

使用し得る動物の身体的評価法は、当技術分野において周知であり、A P O E 3 発現マウスまたは野生型マウス等の対照と、正常な加齢に対する対照として比較した本発明の遺伝子改変マウスにおけるフレイルの指標の評価を含むが、これに限定されない。

【0143】

使用し得るin vivo 画像診断法は、当技術分野において周知であり、磁気共鳴画像診断法 (M R I) 、コンピュータ断層撮影 (C T) 画像診断法、X線、光学画像診断法、および超音波画像診断法を含むが、これらに限定されない。このような画像診断技術を使用して、これらに限定されないが、アミロイドまたはタウの凝集物、血流異常、病理学的なニューロンの欠損、およびグルコース代謝異常を含む、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p の発現を伴う1つまたは複数の症状または徵候を評価することができる。

20

【0144】

野生型マウスと比較した、および / または臨床試料と比較した、本発明の遺伝子改変マウスのトランスクリプトームのプロファイル、プロテオミクスのプロファイル、および代謝プロファイルのうちの1つまたは複数に対する変化の評価は、当技術分野において周知の方法を使用して行うことができる。

30

【0145】

炎症の評価は、これらに限定されないが、I L - 8 、I L - 11 、T N F - アルファ、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (G M - C S F) 、T G F - ベータ、V E G F 、単球走化因子 - 1 、マクロファージ遊走阻害因子、s 1 0 0 B 、フィブリノゲン、およびインターフェロンガンマ誘導性タンパク質 1 0 等の1つまたは複数の炎症バイオマーカーのアッセイにより行うことができる。このようなアッセイは、本発明の遺伝子改変マウスおよび野生型マウスから得られる試料、例えば、脳、脊髄、血液、血漿、血清、脳脊髄液または他の関連する組織もしくは体液の試料について行うことができる。

【0146】

組織および / または細胞の形態学的評価は、組織および / または細胞の組織化学的または細胞化学的染色を用いた、または用いない、肉眼解剖学の身体検査ならびに / または組織および / もしくは細胞の顕微鏡検査を含むことができる。組織および / または細胞の形態学的評価は、シナプスおよびニューロンの欠損の評価を含むことができる。

40

【0147】

アルツハイマー病の処置における使用のための化合物についてスクリーニングするための方法であって、本発明の遺伝子改変マウスに化合物を投与するステップと、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p の発現を伴う、アミロイドおよび / またはタウに対する化合物の作用をマウスにおいて評価するステップとを含む、アルツハイマー病を有するか、アルツハイマー病を有すると疑われる個々のヒト対象における、方法が本発明の態様に従って提供される。特定の実施形態によれ

50

ば、アミロイドおよび／またはタウに対する化合物の作用を評価するステップは、アミロイドおよび／またはタウのレベルおよび／または局在性を評価することを含む。特定の実施形態によれば、アミロイドおよび／またはタウに対する化合物の作用を評価するステップは、本発明の遺伝子改変マウスにおけるアミロイドおよび／またはタウ凝集物を評価すること、例えば、凝集物のサイズ、数、位置またはこれらのいずれか2つもしくはそれよりも多くの組合せの評価を含む。

【0148】

脳血管外漏出は、非家族性遅発型アルツハイマー病の鍵となる様態であり、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pの発現により脳血管外漏出が生じることは、本発明の驚くべき予想外の知見である。

10

【0149】

非家族性遅発型アルツハイマー病を有するか、または非家族性遅発型アルツハイマー病を有することが疑われる個々のヒト対象における、非家族性遅発型アルツハイマー病の処置における使用のための化合物についてスクリーニングするための方法であって、本発明の遺伝子改変マウスに化合物を投与するステップと、非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する、ヒトAPOE4pおよびマウスTrem2pの発現を伴う脳血管外漏出に対する化合物の作用をマウスにおいて評価するステップとを含む、方法が本発明の態様に従つて提供される。脳血管外漏出に対する化合物の作用を評価するステップは、脳血管透過性の評価を含むが、これに限定されない。用語「脳血管透過性」は、フィブリノゲンまたはアルブミン等の大型の分子および物質の移動に対してはバリアとして作用する一方で、水、イオン、特定の薬物および栄養素等の小型の分子または物質が、血管壁を超えて、正常に移動することを可能とする血管壁の能力を指す。用語「脳血管外漏出」は、フィブリノゲンおよびアルブミン等の大型の分子および物質が血管壁から漏出することとなる、血管の異常性を指す。脳血管外漏出を評価するためのアッセイは、当技術分野において周知であり、本発明の遺伝子改変マウスから単離した細胞または組織を使用するin vitroのアッセイ、およびin vivoアッセイを含む。脳血管外漏出のin vivoアッセイの非限定的な例としては、標識したタンパク質（例えば、エバンスブルー標識アルブミン）の静脈内注入、および脳組織における色素標識タンパク質の外観の評価が挙げられ、例えば、Raduら、An in vivo Assay to Test Blood Vessel Permeability.、J. Vis. Exp. 2013年、(73号)：50062頁を参照されたい。

20

【0150】

推定処置は、化合物の投与等の任意の処置法であり得るが、これに限定されない。用語「化合物」は、本明細書において使用する場合、限定されず、低分子の化学物質および生物学的製剤、例えば、抗体を含む、ペプチド、タンパク質、糖タンパク質等を包含する。

30

【0151】

本発明の組成物および方法の実施形態を以下の実施例において説明する。これらの実施例は、例示目的のために提供され、本発明の組成物および方法の範囲に対する限定とはみなされない。

【実施例】

【0152】

40

実施例

【0153】

APOE4pをコードするDNA配列をそのゲノムに有する遺伝子改変マウスの作製

【0154】

マウスApoE4遺伝子は、第7染色体上の19, 696, 109~19, 699, 166に位置する。マウスApoEのエキソン1を含むマウス5'ホモロジーアームを定義する4980bpのマウス配列（配列番号9）、ヒト遺伝子のエキソン2~4をコードするヒトタンパク質を含む4292bpのヒトAPOE4配列（配列番号10）、ならびに1.5kbのさらなるフランкиングヒト配列を3'UTRの後に含有させて任意の潜在的制御配列を含む、APOE4遺伝子標的化構築物を作製した。

50

【0155】

図1は、ヒト化A p o E 4構築物（「m / h A P O E 標的化ベクターE 4」を参照）の模式図を示す。図1では、エキソン4'上の(C C)は、アイソフォームE 4のp. R 3 1 0およびR 1 7 6においてそれぞれアルギニンをコードするエキソン4に存在するn tを示す。(T T)を有するアイソフォームE 2は、C 1 3 0とC 1 7 6の両方においてシステインをコードするが、E 3 (T C)は、C 1 3 0 R部位においてシステインを、R 1 7 6部位においてアルギニンをコードする。

【0156】

ヒトA P O E 4エキソン4は、この遺伝子のA p o E 4アイソフォームをコードする配列を含み、R 1 3 0およびR 1 7 6においてアルギニンをコードするヌクレオチド配列をコードする。A P O E 4は、アミノ酸シグナルペプチド1 8個をタンパク質のN末端に含み、これによりシグナルペプチドを含むA P O E 4が、3 1 7個のアミノ酸となり、A P O E 2、A P O E 3およびA P O E 4の間で異なる変異アミノ酸が、1 3 0位および1 7 6位に存在することに留意されたい。成熟A P O Eタンパク質（アミノ酸2 9 9個）では、A P O E 2、A P O E 3およびA P O E 4の間で異なる変異アミノ酸は、1 1 2位および1 5 8位に存在する。

10

【0157】

F r t _ n e o _ F r t 選択カセット（F N Fカセット、配列番号1 1）をヒト配列の後に挿入し、その後、N d e 1制限部位を挿入した（サザンスクリーニングを容易とするため）。F N Fカセットの後に5 1 6 6 b pのマウス配列（配列番号1 2）である3' ホモロジーアームが続く。得られる1 4 , 4 3 8 b pの合成構築物を、リコンビニアリング技術を使用してp B l i g h tベクターにクローン化し、m A p o E _ h A P O E 4 _ P G K _ n e o _ m A P O Eと呼ばれる、胚性幹細胞における遺伝子標的化のための構築物を作製した。

20

【0158】

A p o E 4遺伝子標的化構築物を、C 5 7 B 1 6マウス系統の培養した胚性幹（E S）細胞内にエレクトロポレーションにより導入した。相同組換えにより、すべての正常マウス制御配列（加えて非コードエキソン配列）をヒトA P O E 4タンパク質コードエキソン2 ~ 4とともに保持する座位を作製した。的確な標的化を確かめるために、トランスフェクトしたE S細胞をサザンプロットによりスクリーニングした。的確に標的化された3つのクローンを確認した。的確に標的化された座位を含むE S細胞をC 5 7 B L / 6 Jの胚に導入し、得られたキメラマウスをC 5 7 B L / 6 Jマウスと繁殖させた。生殖系列において改変座位を保有する子を同系交配させて、ホモ接合遺伝子改変ゲノムを作製した。すべてのF 1交配により、メンデルの座位分布による正常な産仔数が生じた。

30

【0159】

T r e m 2 pをコードするD N A配列をそのゲノムに有する遺伝子改変マウスの作製

【0160】

C a s 9 RNA (1 0 0 n g) および単一のガイド配列 (5 0 n g) G A A G C A C T G G G G G G A G A C G C A（配列番号7）を前核注入することにより、ヌクレオチドG > A点変異（配列番号8における8 9番目のn tの下線の大文字「A」）を、アミノ酸配列をR 4 7 Hで変化させるため、ならびに2つのサイレント変異（リシンA A G > A A A（配列番号8における9 3番目のn tの下線の小文字「a」）およびアラニンG C C > G C A（配列番号8における9 6番目のn tの下線の小文字「a」））を（相同性による修復におけるドナー配列の再切断を防ぐために）遺伝子内に含む、1 8 3 n tのドナーオリゴ（4 0 n g）を有するT r e m 2 R 4 7 H K I対立遺伝子

40

50

【化1】

(GCCCTAACACCCACGGTGCTGCAGGGCATGGCCGCCAGTCCTTGAGGGTGTCA
 TGTACTTATGACGCCCTGAAGCACTGGGGGAGACCAAGCTGGTGTCGGCAGC
 TGGGTGAGGAGGGCCCATGCCAGCGTGTGGTGAGCACACACGGTGTGGCTGC
 TGGCCTCCTGAAGAAGCGG, 配列番号 8)

をジャクソン研究所 (Jackson Laboratory) において作製した。C R I S P R 法により特異的 R 4 7 H ノックインが生じ、サイレント変異がファウンダーマウスの Trem 2 遺伝子に存在した。 10

【0161】

生殖系列において改変対立遺伝子を保有する子を同系交配させて、ホモ接合遺伝子改変ゲノムを作製した。すべての F 1 交配により、メンデルの座位分布による正常な産仔数が生じた。得られた近交マウス系統は、C 5 7 B L / 6 J - Trem 2 em 1 Ad pmc / J (一般名 Trem 2 R 4 7 H K I (JAX)) と名付けられ、Trem 2 p を発現する。

【0162】

A P O E 4 p をコードする D N A 配列および Trem 2 p をコードする D N A 配列をそのゲノムに有する遺伝子改変マウスの作製

【0163】

本実施例では、ヒト A P O E 4 p を発現する近交マウス系統である B 6 (S J L) - A poe tm 1.1 (APOE * 4) Ad pmc / J (一般名 A P O E * 4 K I (JAX)) を、マウス Trem 2 p を発現する近交マウス系統である C 5 7 B L / 6 J - Trem 2 em 1 Ad pmc / J (一般名 Trem 2 R 4 7 H K I (JAX)) と交雑させることにより遺伝子改変マウスを作製した。ヒト化 A P O E 4 対立遺伝子とマウス Trem 2 遺伝子の R 4 7 H 対立遺伝子の両方についてホモ接合性である得られる遺伝子改変マウスは、B 6 (S J L) - A poe tm 1.1 (APOE * 4) Ad i u j Trem 2 em 1 Ad i u j / J (かつては B 6 (S J L) - A poe tm 1.1 (APOE * 4) Ad pmc Trem 2 em 1 Ad pmc / J あり、 A P O E 4 X Trem 2 R 4 7 H (JAX) マウスと略す)、一般名 B 6 J . A P O E 4 / Trem 2 と名付けられ、ヒト A P O E 4 とマウス Trem 2 p の両方を発現する。 30

【0164】

非家族性遅発型アルツハイマー病の遺伝子改変マウスモデルの検証

【0165】

組織の回収、タンパク質の単離および切片作製

【0166】

マウスに致死量のケタミン / キシラジンを腹腔内注入により投与し、1 × P B S (リン酸緩衝食塩水) で経心的に灌流を行った。脳を解剖し、右半球は、急速凍結させてタンパク質を単離し、一方、左半球は、4 % のパラホルムアルデヒド中に 4 で一晩固定した。固定した半球を 1 × P B S ですすぎ、10 % のスクロース中に、その後、30 % のスクロース中に 4 で凍結保護し、最終的に O C T (最適切断温度化合物) に包埋した。凍結脳を 25 μm の切片にし、必要とされるまで -80 で保存した。タンパク質をトリゾール試薬 (Life Technologies, Cat # 15596 - 018) により製造者のガイドラインに従って抽出した。タンパク質ペレットを 8 M の尿素と 1 % の S D S が 1 : 1 の溶液中に再懸濁した。 40

【0167】

免疫蛍光法、チオフラビン S 染色、および画像取込

【0168】

凍結切片を P B T (1 % の Triton X - 100 を加えた 1 × P B S) で 5 分間すぎ、次いで、Liberate Antibody Binding Solution

10

20

30

40

50

(L.A.B. - Polysciences Inc.) 溶液 500 μL を用いて室温 (RT) で 20 分間インキュベートして抗原を回収した。次いで、スライドを次の 1 次抗体：ウサギポリクローナル抗 GFAP (1:200, Dako)、ウサギポリクローナル抗 IBA1 (1:250, Wako)、ウサギポリクローナル抗 NeuN (1:100, Cell Signaling Inc.)、マウスモノクローナル抗非リノ酸化ニューロフィラメント (1:200, Covance) およびヒツジポリクローナル抗 TREM2 (1:200, RD Systems) 中に 4 で一晩インキュベートした。ヒツジポリクローナル抗 TREM2 抗体は、Trem2 欠損マウスを使用してあらかじめ検証した。すべての抗体を 10% の正常なヤギまたはロバ血清を含む PBTB (1 × PBS、1% の Triton X-100 および 1% の BSA) 中に希釈した。1 次インキュベーションの後、切片を PBT 中で 3 回洗浄し、適切な 2 次抗体 (ヤギ抗ウサギ Alexa Fluor 488 / 594 / 633、ヤギ抗マウス Alexa Fluor 488、ロバ抗ヒツジ Alexa Fluor 594、1:1000 希釈、Life Technologies) とともに RT で 2 時間インキュベートした。
10

【0169】

次いで、すべての切片を DAPI で対比染色し、Aqua Polymount (Polysciences) を用いてマウントした。チオフラビン S 染色では、IBA1 および GFAP で染色した切片を 1% のチオフラビン S (水:エタノール比 1:1 で希釈) でさらに対比染色した。スライドを 1% のチオフラビン S 中に RT で 8 分間インキュベートし、80% のエタノールで、次いで、95% エタノールで、最終的には dH₂O で洗浄し、マウントした。Leica SP5 共焦点顕微鏡または Zeiss Axio Imager. Z2 を使用して画像を取得した。各抗体については、正確な定量化のために同一のパラメータを使用してすべての画像を取り込んだ。
20

【0170】

雄雌両方由来の切片において最初の観察を行った。性別間の明白な差が存在しなかったため、少なくとも 4 ~ 6 匹の雄マウス由来の脳切片について細胞数の定量化を行った。ブラークの計数では、各マウスの嗅内皮質領に存在するブラークの数を定量した。IBA1+ 細胞では、各マウスの中央の脳の切片由来の、嗅内皮質領または海馬領の皮質の等しく間隔をあけた 5 つの画像を取り込んだ (20 × の光学レンズを使用)。NeuN+ 細胞では、等しく間隔をあけた 5 つの画像を取り込んだ (20 × の光学レンズを使用)。ブラークと関連する IBA1+ 細胞では、1 つの脳あたり 8+ ブラークの画像を画像化した (20 × の光学レンズを使用)。
30

【0171】

画像を処理し、cell counter plugin for ImageJ / FIJI を使用して 20 × 画像におけるすべての細胞を計数した。細胞特異的抗体染色 (例えば、IBA1 または NeuN) と関連する DAPI 染色核として単一細胞を決定した。各マウス由来の 5 つの画像の細胞数を集計し、次いで、全マウスで平均化した。すべての細胞計数アッセイについて、マウスの数および食餌を研究者に対してマスクした。

【0172】

ウエスタンプロット解析により B6 (SJL) - Apoetm1.1 (APOE*4) Adiuj Trem2 em1 Adiuj / J (一般名 B6J.APOE4 / Trem2) マウスにおけるヒト APOE 4 の発現を実証する
40

【0173】

脳抽出物 (タンパク質約 25 マイクログラム) を 2 × Laemmli 試料緩衝液 (Bio-Rad 1610737) で希釈し、4 ~ 20% の勾配で泳動し (Bio-Rad ミニプロティアント GX 456-1096)、ニトロセルロース膜 (Invitrogen IB301001) に移した。

【0174】

5% の脱脂粉乳でプロットをブロッキングし、1:100 に希釈したヒト APOE 4 特異的抗体 (Novus Biologicals NBP1-49529) により +4 で
50

一晩プロープした。次いで、プロットを 1 : 30, 000 に希釈した 2 次抗体 (Millipore ヤギ抗マウス HRP AP191P) により室温で 2 時間プロープした。ECL 化学発光試薬 (GE Healthcare RP/N 2109) を使用して Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare 28906838) 上でプロットを検出した。

【0175】

ヒト APOE 4 バリアントに特異的な抗体を (Novus Biologicals NB P1-49529 を 1 : 100 希釈で) 使用して、C57BL/6J (B6J と略す) または B6J. APOE 4 / Trem2 の脳組織由来のタンパク質約 25 マイクログラムのウエスタンプロットをプロープした。図 2 は、B6J. APOE 4 / Trem2 (レーン 4 ~ 6) 由来の脳組織および対照 (WT (B6J)、レーン 1 ~ 3) 脳組織のウエスタンプロットの画像である。図 2 に示すように、ヒト APOE 4 タンパク質発現は、B6J. APOE 4 / Trem2 マウス由来のタンパク質においてのみ検出された。

【0176】

血液化学検査は B6J. APOE 4 / Trem2 マウスにおける代謝の変化を示す

【0177】

APOE バリアントは、リポタンパク質およびコレステロール代謝を差次的に制御することが明らかとなっている。APOE 4 バリアントによりアルツハイマー病のリスクが増加する機構は未知であるが、代謝の変化に対するこれらの作用が役割を果たすものと考えられている。12 カ月齢の B6J. APOE 4 / Trem2 (図 3A、3B および 3C において APOE 4 / Trem2 と略す) マウスおよび 12 カ月齢の C57BL/6J 対照マウスから得られる血液試料を、高密度リポタンパク質 (HDL)、低密度リポタンパク質 (LDL) および総コレステロールについて、標準的血液化学検査法に従って試験した。

【0178】

回収時に抽出した血液を EDTA でコーティングしたバイアルに氷上で保存し、さらに、5000 RPM で 15 分間遠心分離した。血漿を採取し、アリコートに分けて -80 で長期保存した。血漿アリコートを次：総コレステロール (mg/dL)、LDL (mg/dL)、HDL (mg/dL) についてプロファイリングした。高密度リポタンパク質 (HDL) コレステロールは、Wako L タイプ HDL-C キット (Wako 99100101) を使用して製造者の指示に従って試験した。LDL は、Beckman Coulter LDL コレステロールキット (Beckman Coulter OSR 6196) を使用して製造者の指示に従って試験した。総コレステロールは、Beckman Coulter コレステロールキット (Beckman Coulter OSR 6116) を使用して試験した。

【0179】

結果を図 3A、3B および 3C にそれぞれ示す。これらのデータは、B6J. APOE 4 / Trem2 マウスが、総コレステロールの減少および LDL と HDL の両方のレベルの減少を含む、コレステロール代謝の APOE 4 依存的変化を有することを示す。

【0180】

免疫組織化学的検査は B6J. APOE 4 / Trem2 マウスにおける脳血管外漏出および炎症を示す

【0181】

12 / 12 時間の明 / 暗サイクルにより、すべてのマウスを繁殖および飼育した。IACUC 承認手順に従って 8 カ月齢のマウスに致死量のケタミン / キシラジンを腹腔内に注入した。マウスに 1 × PBS (リン酸緩衝食塩水) で灌流を行い、脳全体を摘出した。一方の半球を 4 % のパラホルムアルデヒド中に +4 で一晩固定した。固定の後、組織を 1 × PBS ですすぎ、10 % のスクロース中に +4 で一晩インキュベートし、次いで、30 % のスクロース中に 4 で一晩インキュベートした。次いで、脳を最適切断温度 (OCT) 化合物中に凍結し、切片作製まで -80 で保存した。凍結した脳を 25 ミクロンの切片にし、スライドガラス上にマウントし、免疫蛍光染色に必要とされるまで -80 で

10

20

30

40

50

保存した。

【0182】

スライドを乾燥させ、4%のPFA中で後固定した。その後、切片をdiH₂O中に37℃で3分間浸漬し、次いで、0.2NのHCl中0.5mg/mLのペプシンに移して37℃で15分間インキュベートした。切片をdiH₂O中で3分間さらに洗浄し、加湿したチャンバーに移して1×PBS中で洗浄した。切片は、1×PBT中のウサギ抗フィブリン(1:200)およびヤギ抗COL1IV(抗コラーゲンIV)(1:40)中に+4℃で一晩インキュベートした。スライドを1×PBT中で洗浄し、1:1000の濃度の適切な2次抗体(ロバ抗ウサギIgG594、ロバ抗ヤギ488)中に室温で2時間インキュベートした。組織をDAPIで対比染色し、Aqua-Poly mount(Polyscience Inc.)を使用してマウントした。拡大率20×のZeiss Axio Imager上で染色を画像化した。

【0183】

B6J.APOE4/Trem2マウスの脳の矢状切片をフィブリノゲン(フィブリン)について免疫染色して、脳血管外漏出を検出した。7~8カ月齢のB6J.APOE4/Trem2の組織の代表的な画像を、対照C57BL/6J(B6Jと略す)マウス由来の脳の類似の矢状切片から取得した代表的な画像とともに図4に示す。矢印は、血管外部のフィブリン免疫染色により示されるように脳血管外漏出を示す。血管は、コラーゲンIV(Col1IV)の免疫染色により示される。

【0184】

血管損傷は、遅発型アルツハイマー病の鍵となる態様であり得る。家族性アルツハイマー病のいくつかの既存のマウスモデルは、脳アミロイド血管症(CAA)を実証しているが、B6J.APOE4/Trem2マウスは、家族性アルツハイマー病変異を過剰発現せずに血管障害を示す最初のモデルである。

【0185】

転写解析はB6J.APOE4/Trem2モデルにおける遺伝子発現のADと関連する変化を実証する

【0186】

NanoString Neuropathology遺伝子パネルを用いて遺伝子発現解析を実行した。このアッセイでは、770種の神経病理関連遺伝子の発現を測定する。およそ8カ月齢の雌マウスをB6J.APOE4/Trem2系統およびC57BL/6J(B6Jと略す)系統について、各系統の3つの生物学的複製を用いて試験した。

【0187】

全RNAを脳ホモジネートから抽出した。組織をTRIzol Reagent(Ambion)中に溶解およびホモジナイズし、次いで、必要に応じてDNase分解ステップを含む製造者のプロトコールに従って、miRNeasy Mini kit(Qiagene)を使用して、RNAを単離した。試料の濃度および質をNanodrop 2000分光光度計(Thermo Scientific)およびRNA 6000 Nano LabChip assay(Agilent Technologies)を使用して試験した。

【0188】

RNAをハイブリダイズし、NanoStringプローブを用いて製造者の指示に従ってマルチプレックス解析を行った。RNA含量の変動性を説明するために、標的遺伝子数をハウスキーピング遺伝子に対して正規化した。Nanostring nSolver Analysis Softwareを使用してデータを解析した。

【0189】

B6J.APOE4/Trem2系統における各遺伝子の発現を対照C57BL/6J系統と比較し、有意な(p < 0.05)発現を有する遺伝子を、図5に示すように、直線回帰モデルにより同定した。図5は、C57BL/6Jと比較した、B6J.APOE4/Trem2における発現変動遺伝子の遺伝子発現ヒートマップである。発現値は、各遺

10

20

30

40

50

伝子の C 5 7 B L / 6 J の平均と比較した Log 2 倍の変化である。

【 0 1 9 0 】

このパネルにおいて使用するプローブは、マウス Apoe は検出するが、ヒト APOE は検出しない。このモデルマウスでは、Apoe がヒト APOE 4 バリアントにより置換されているために Apoe 発現が検出されず、これは、最も強力に下方制御された転写物として示される。

【 0 1 9 1 】

発現変動遺伝子のリストには、脳機能および神経変性に関連する複数の遺伝子が含まれる。Gene Ontology Biological Process および Plant Pathway アノテーションデータベースを検索して、これらの遺伝子により表されるプロセスおよび経路を同定した。関係するプロセスは、B6J.APOE4/Trem2 系統における発現変動遺伝子により表される経路およびプロセスを示す表 I の結果を含むが、これらに限定されない。注目すべきことに、これらの関連し合うプロセスおよび経路は、多くの神経変性との高度な関係を含む。

【表 1】

表 I	
プロセスまたは経路	遺伝子
アルツハイマー病-アミロイドセクレターゼ経路	Pcsk2, Mapk10, Mapk9, Prkcz
5HT2型受容体媒介シグナル伝達経路	Slc18a2, Plcb2, Slc6a4, Gng2, Prkcz
ケモカインおよびサイトカインシグナル伝達経路 により媒介される炎症	Akt3, Gnao1, Plcb3, Arrb2, Il6, Myh10, Gng2
化学シナプス伝達の調節	Cnr1, Stx1a, Arrb2, Unc13a, Cdk5, Calb1, Slc6a4, Gria4
ニューロンの発達	Cnr1, Thy1, Mapk10, Hcn1, Cdk5, Chl1, Il6, Mapk9, Myh10, Uchl1
認知	Cnr1, Amph, Cdk5, Calb1, Chl1, Slc6a4, Chmp2b
アポトーシスシグナル伝達	Akt3, Mapk10, Mapk9, Casp7, Prkcz
加齢	Cnr1, Slc18a2, Gnao1

【 0 1 9 2 】

本明細書において使用する科学的および技術的用語は、当業者により一般に理解される意味を有することを意図する。このような用語は、例示的に、J. Sambrook および D.W. Russell、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、第3版、2001年；F.M. Ausubel編、Short Protocols in Molecular Biology、Current Protocols、第5版、2002年；B. Albertsら、Molecular Biology of the Cell、第4版、Garland、2002年；D.L. Nelson および M.M. Cox、Lehninger Principles of Biochemistry、第4版、W.H. Freeman & Company、2004年；Herdewijn, P. (編)、Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications, Methods in Molecular Biology、Humana Press、2004年；A. Nagy、M. Gertsenstein、K. Vintersten、R. Behringer (編) 2002年、Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual、第3版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、ISBN-10: 0879695919；ならびに K. Turksen (編) Embryonic stem cells: methods and protocols in Methods in Molecular Biology、2002年、185頁、Humana Press；Current Protocols in Stem Cell Biology、ISBN: 9780470151808 を含

10

20

30

40

50

む種々の標準的参考文献の文脈において見出され、定義および使用されている。

【0193】

配列

A P O E 4 p のアミノ酸配列を、A P O E 4 p をコードする例示的核酸配列とともに示す。

【0194】

配列番号 1 : A P O E 4 p (アミノ酸 317 個)

【化2】

MKVLWAALLVTFLAGCQAKVEQAVETEPEPELRRQQTEWQSGQRWELALGRFWDY
 LRVWVQTLSEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRAR
 LSKELEQAAQARLGADMEDVRGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRKR
 LLRDADDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPL
 QERAQAWGERLRARMEEMGSRTRDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQ
 ARLKSWFEPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

10

【0195】

配列番号 2 : アミノ酸シグナルペプチド 18 個を含むヒト A P O E 4 p をコードするヒト A P O E 4 ゲノム D N A 配列のエキソン 2、3 および 4

20

30

40

50

【化3-1】

ACTGGCCAATCACAGGCAGGAAGATGAAGGTTCTGTGGCTCGTGTGGTCA
 CATTCCCTGGCAGGTATGGGGGGGGCTTGCTCGTTCCTCCCCGCTCTCCCCCT
 CTCATCCCTACCTCAACCTCTGGCCCCATTCAAGGCAGACCCCTGGGCCCCCTCTC
 TGAGGCTTCTGTGCTGCTTCCTGGCTCTGAACAGCGATTGACGCTCTGGGCT
 CGGTTCCCCCATCCTGAGATAGGAGTTAGAAGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTG
 TGTGTTGTTGTTGTTGAGATGAAGTCTCGCTCTGTCGCCAGGCTGGAGTG
 CAGTGGCGGGATCTCGCTCACTGCAAGCTCCGCCCTCCAGGTCCACGCCATTCT
 CCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGACTACAGGCACATGCCACCACACCCGA
 CTAACTTTTGTATTTCACTAGAGACGGGGTTCAACATGTTGGCCAGGCTGGT
 CTGGAACCTCTGACCTCAGGTGATCTGCCGTTCGATCTCCAAAGTGCTGGGA
 TTACAGGCGTGAGCCACCGCACCTGGCTGGAGTTAGAGGTTCTAATGCATTGC
 AGGCAGATAGTGAATACCAAGACACGGGGCAGCTGTGATCTTATTCTCCATCACC
 CCCACACAGCCCTGCCTGGGCACACAAGGACACTCAATAACATGCTTTCCGCTG
 GGCGCGGTGGCTCACCCCTGTAATCCCAGCACTTGGGAGGCAAGGTGGAGG
 ATCACTTGAGCCCAGGAGTTCAACACCCAGCCTGGCAACATAGTGAGACCCCTGT
 CTCTACTAAAAATAACAAAAATTAGCCAGGCATGGTCCCACACACCTGTGCTCTCA
 GCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGGATCGCTGAGCCCAGAAGGTCAAGGTTG
 CAGTGAACCATGTTCAAGGCTGAGGAGGATCGCTGAGCCCAGAAGGTCAAGGTTG
 TGTTATAAATAACATAATGCTTCCAAGTGATTAACCGACTCCCCCTCACCCCTG
 CCCACCATGGCTCCAAGAACATTTGTGGAGCACCTCTGTGTGCCCTAGGTA
 CTAGATGCCTGGACGGGTCAAGAAGGACCCCTGACCCACCTTGAACCTGTTCCACA
 CAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGCCGGAGCCCCGAG
 CTGCGCCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCGCTGGAACTGGCACTGGGT
 CGCTTTGGATTACCTGCGCTGGGTGAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGG
 AGCTGCTCAGCTCCAGGTCAACCAGGAACGTAGGGTGGAGTGTCCCCATCCTGCC
 CTTGACCCCTCTGGTGGCGGCTATAACCTCCCCAGGTCCAGGTTCTATTCTGCC
 TGTCGCTAAGTCTGGGGGGCTGGGTCTGCTGGTTAGCTTCTCTCAGCTTGTCTCTC
 TTCTGACTCCTGGCTTAGCTCTGGATATCTCTCTCAGCTTGTCTCTC
 TTCCCCCTCTGACTCAGTCTCTCACACTCGTCTGGCTGTCTCTGTCCTCCCTAG
 CTCTTTATATAAGAGACAGAGAGATGGGTCTCACTGTGTTGCCAGGCTGGTCT
 TGAACCTCTGGCTCAAGCGATCCCTCCGCCCTGGCCTCCAAAGTGCTGGGATT
 AGAGGCATGAGGCCACCTTGCCCGGCCTCTAGCTCCTCTCGTCTGCTCTG
 CCTCTGCATCTGCTCTGCATCTGTCTCTGCTCTGCTCTGCTCTGCCCCGT

10

20

30

40

50

【化3-2】

TCCTTCTCTCCCTCTGGGTCTCTGGCTCATCCCCATCTCGCCCCCCCCATCCC
 AGCCCTTCTCCCCGCCTCCCACTGTGCGACACCCCTCCGCCTCTCGGCCGCAGG
 GCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAATCGGAACTGGAG
 GAACAACGTACCCCCGGTGGCGGAGGAGACGCCGGCACGGCTGTCCAAGGAGCT
 GCAGGCCGGCGCAGGCCGGCTGGCGGGACATGGAGGACGTGCGCGGCCGCC
 TGGTGCAGTACCGCGCGAGGTGCAGGCCATGCTCGCCAGAGCACCGAGGAGC
 TGCAGGTGCGCTCGCCTCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCTCCCGA
 TGCCGATGACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAAGGCCGGGCCGAGGG
 CGCCGAGCGCGGCCCTCAGCGCCATCCCGAGGCCCTGGGGCCCTGGTGGAAACA
 GGGCCGCGTGCAGGCCACTGTGGCTCCCTGGCCGGCCAGCCGCTACAGGA
 GCGGGCCCAGGCCTGGGGCGAGCGGCTGCGCGCGGATGGAGGAGATGGGCA
 GCCGGACCCGCGACCGCCTGGACGAGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGC
 GCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATAACGCTGCAGGCCGAGGCCCTCCAG
 GCCCGCCTCAAGAGCTGGTCAGGCCCTGGTGGAAAGACATGCAGCGCCAGTGG
 GCCGGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCGTGGCACCAAGGCCGCCCTGTG
 CCCAGCGACAATCACTGAACGCCGAAGCCTGCAGCCATGCGACCCACGCCACC
 CCGTGCCTCCTGCCTCCCGCAGCCTGCAGCGGGAGACCCCTGTCCCCGCCAGC
 CGTCCCTGGGGTGGACCCCTAGTTAATAAGATTACCAAGTTACAGCA

10

【0196】

配列番号3: Trem2p (アミノ酸249個、R47H変異)

20

【化4】

MGPLHQFLLLITALSQALNTVLQGMAGQSLRVSCTYDALKHWGRHKAWCRQLG
 EEGPCQRVVSTHGVWLLAFLKKRNGSTVIADDTLAGTVITLKNLQAGDAGLYQCQ
 SLRGREAEVLQKVLVEVLEDPLDDQDAGDLWVPEESSSFEGAQVEHSTSQRVSSCGS
 PLAYHLPPLSKESRDLLPTHLHSPPGLRSPEQVSCSQHPLGCGQQAEAGNTCGQR
 AGLWPRCWAPTSDPHWTRRYVREF

【0197】

配列番号4: Trem2pをコードする変異マウスゲノムDNA配列(1056ヌクレオチド)

30

40

50

【化5】

ACTTCAAGGGAAAAGCAAGATCTTGCACAAGGTCCCCCTCCGGCTGGCTGCTGGC
 AAAGGAAAGGTGCCATGGGACCTCTCACCAAGTTCTCCTGCTGCTGATCACAGC
 CCTGTCCAAGCCCTAACACCAACGGTGCAGGGCATGGCCGCCAGTCCTTG
 AGGGTGTCTGATGTACTTATGACGCCCTGAAGCACTGGGGGAGACACAAaGC_aTGGT
 GTCGGCAGCTGGTGAGGAGGGCCCATGCCAGCGTGTGGTGAGCACACACGGTG
 TGTGGCTGCTGGCCTCTGAAGAACGCGGAATGGGAGCAGTCATCGCAGATG
 ACACCCCTGCTGGAACCGTACCCATCACTCTGAAGAACCTCCAAGCCGGTGACGC
 GGGCCTCTACCAAGTGTAGAGTCTCCGAGGCCGAGAGGCTGAGGTCTGCAGAA
 AGTACTGGTGGAGGTGCTGGAGGACCCCTAGATGACCAAGATGCTGGAGATCT
 CTGGGTCCCCGAGGAGTCATCGAGTTCTGAGGGTGCCAAGTGGAACACAGCAC
 CTCCAGGCAGGTTCATCCTGTGGTCACCTCTAGCCTACCAACCTCCTCCTCTT
 CCAAGGAATCAAGAGACCTCCTCCCACCCACCTCCATTCTCCTCCTGGCCT
 GCGTTCTCCTGAGCAAGTTCTGAGCCAGCATTCTGGGTGTGGOCAGGGG
 CAGGCAGAAGCCGGAACACCTGTGGTCAGAGGGCTGGACTGTGGCCAAGATGC
 TGGGCACCAACTTCAGATCCTCACTGGACCCGGAGGTACGTGAGAGAATTCTGA
 GTGGGAGGGAGAACTACAGCTTAAGTCCAGCCAGGAGTCATCCAGCCTGCATGC
 TCTCCCTCCTCACCAAGACTCTGTTCTGCTACTTTGCTTCAGAGGCCGCT
 CTGCCTCAAGCCCACCTATCCTGGAGCAGGAATACTGGTGTACATCTGTGTT
 GAGTGGGAAAGACAGCTGGATGGTGTCAACTCTGCACTTGACATTAAC
 ACATTCTCCACACACCAA

10

20

【0198】

配列番号5：Trem2p（アミノ酸249個、マウス野生型タンパク質、R47H変異なし）

【化6】

MGPLHQFLLLITALSQALNTTVLQGMAGQSLRVSCTYDALKHWGRRKAWCRQLG
 EEGPCQRVVSTHGVWLLAFLKKRNGSTVIADDTLAGTVITLKNLQAGDAGLYQCQ
 SLRGREAEVLQKVLVEVLEDPLDDQDAGDLWVPEESSSFEGAQVEHSTS
 RQVSSCGSPLAYHLPPLSKESRDLLPTLHSSPPGLRSPEQVSCSQHPLGC
 QQAEGNTCOQRAGLWPRCWAPTSDPHWTRRYVREF

30

【0199】

配列番号6：Trem2マウス野生型タンパク質をコードするマウス野生型ゲノムDNA配列（1056ヌクレオチド）

40

50

【化 7】

ACTTCAAGGGAAAAGCAAGATCTTGCACAAGGTCCCCCTCCGGCTGGCTGCTGGC
 AAAGGAAAGGTGCCATGGGACCTCTCACCAGTTCTCCTGCTGCTGATCACAGC
 CCTGTCCAAGCCCTAACACCAACGGTGCTGCAGGGCATGGCCGGCCAGTCCTG
 AGGGTGTCACTGTACTTATGACGCCCTGAAGCAGTGGGGAGACGCAAGGCCTGG
 TGTGGCAGCTGGGTGAGGAGGGCCATGCCAGCGTGTGGTGAGCACACACGGT
 GTGTGGCTGCTGGCCTTCTGAAGAACGGAATGGGAGCACAGTCATCGCAGAT
 GACACCCTTGCTGGAACCGTCACCATCACTCTGAAGAACCTCCAAGGCCGGTGAC
 GCGGGCCTTACCAAGTGTAGAGTCTCGAGGCCGAGAGGCTGAGGTCTGCAG
 AAAGTACTGGTGGAGGTGCTGGAGGACCCCTAGATGACCAAGATGCTGGAGAT
 CTCTGGTCCCCGAGGAGTCATCGAGTTGAGGGTCCCCAAGTGGAACACACAGC
 ACCTCCAGGCAGGTTCATCCTGTGGTCACCTCTAGCCTACCAACCTCCTCCT
 TTCCAAGGAATCAAGAGACCTCCTCCCACCCACCTCCATTCTCTCCTCCTGGCC
 TGCCTCTCCTGAGCAAGTTCTGCAGCCAGCATCCTCTGGCTGTGGCCAGGG
 GCAGGCAGAACGCCGGAACACCTGTGGTCAGAGGGCTGGACTGTGGCCAAGATG
 CTGGGCACCAACTCAGATCCTCACTGGACCCGGAGGTACGTGAGAGAATTCTG
 AGTGGGAGGAGAACTACAGCTTAAGTCCAGCCAGGAGTCAATCCAGCCTGCATG
 CTCTCCCTCCTCCACCAAGACTCTGTTCTGCTACTTTGCTTCAGAGGCCGCC
 TCTGCCTCAAGCCCACCTATCCTGGAGCAGGAATACTGGTGTACATCTGTGT
 TGAGTGGGAAGACAGCTGGATGGTTGTCTGCAACTCTGCACTTGGACATTA
 AACATTCTCCACACACCAA

10

20

30

【0200】

配列番号7：Trem2 CRISPRガイド

G A A G C A C T G G G G A G A C G C A

【0201】

配列番号8：ヌクレオチドG > A点変異（このオリゴ配列における89番目のヌクレオチドにおける）を、アミノ酸配列をR47Hで変化させるため、ならびに2つのサイレント変異（リシンAAG > AAA（このオリゴ配列における93番目のヌクレオチドにおける）およびアラニンGCC > GCA（このオリゴ配列における96番目のヌクレオチドにおける））を、相同性による修復におけるドナー配列の再切断を防ぐために遺伝子内に含むTrem2修復オリゴ（183ヌクレオチド）

30

【化8-1】

GCCCTCAACACCAACGGTGCTGCAGGGCATGGCCGGCCAGTCCTGAGGGTGTCA
 TGTACTTATGACGCCCTGAAGCAGTGGGGAGACACAAAGCAGTGTGTGGCTGC

【化8-2】

TGGGTGAGGAGGGCCATGCCAGCGTGTGGTGAGCACACACGGTGTGTGGCTGC
 TGGCCTCCTGAAGAACGCGG

【0202】

配列番号9：マウスゲノム内に挿入される「ヒト化」マウスApoe構築物に含まれる5' ホモロジーアーム（4980ヌクレオチド：マウスApoe4エキソン1およびマウスApoe4イントロン2配列の757ヌクレオチド）。

40

50

【化9-1】

CCTGTATCTCAGGGTTGAGAGGGAAAGAGAGTGGGGTTCCAGATGCCACATCC
 CTTGATACTAGTCCTCACCCAACTCTGCTCTCTAGTGAACAACCTGGTGGCTAC
 AGTAACGCTGGGCCAGGCAGGCATGCATGCGACGTATTACCACAAAGCCAGTGA
 CCAGGTGAGCCGGAGGGAGCGCCTAGCTGTGGTCCCAGGCTGGTTGCTGGT
 GCAGTTGGTATGCCAGGAGTCTAATGGGCCACTCACATGTGTGCCGGGCCCTC
 TCTCCCCCAGCTGCAGGTGGTGTGGAGTTGAGGCCAGCACCAGGATGCAGGA
 CACCAGTGCCTCTTGGTATCAGCTGGACCTGCCAAGGCCAACTTCCCTTTA
 AAGGTAAGGAAGGCCCTAGCTCCCTGGGAACAGGCCAGATAAGACTCAG
 CTGCTGTGGTAGAGTCCATGGAAATAGGGAGGTGAACATGTGTGGAG
 TGGCGGGGACTCTGTGCAGCTCCAAATTACTCTGGTGGCTGTCAAACAGTGG
 GGCTCCTACCCCTGGCATGTTAGTACATGTGGGGCTCGCTTAAGCCCTCT
 TCCCATTCCCCTAGCAAGCTCTGGCCCTCCCCACTCACTCTTACCTTACTTG
 GAGTTCTCTATTGTGTGATGAAACACTATGATGGTAAACAGCTAGGGAGCAA
 GAGGTATGTTGGGTACAACCTCAGGTGGCATGCCTACCACTGAGGAGAAGAT
 GGGGCAGGACTCAGCAGAAAGCTGAAGGCAAGCTGATGCAGAAGGCCCTGTGG
 GAGTGCTGCTTGGCTGCTCTTATGGCTCCTAGCCTGCTCTTATAGCCTC
 CGGACCATTAGCCCAGGGTCCCCACTGAAAATAATCTGGTACTCCCACATCA
 ATCACTTAGAAAGTGCCTACAGGCTGCTGCTGCCCTAGCTAATGGAGACATA
 TGTATTGAGGTTCCCTCAGCTGGATCTTGAGTTCAAGACCAGCCTGGTCTACA
 GAGCAAGTCTGGACAGCCAGGGCTACCCAGAGAAACCCCTGTCTCAGAAAAGA
 AAAAAAAAGAAAAAGGTGGGGTGGGTGACTAGCTTGTATAAAACTAGCCAGC
 ACAGCAGGAAAGCTGTGAATAGTGACAGCCAGGTTAGAACCTCATTCTGCG
 CAGTGACATGGTTGTCAAGCCTGGCGGTGTTGAGCCACTAAAGGGTGTG
 TGATGGCTGGAGTGGCTTGGTGTGACTTAGGACATACGGTCCGTTGTGGCT
 ACCATAGAGATGGTGGCCAGGCACATCAAGCCACCCAGTCTCTGCCCGCTCTC
 GGCCCACAGGCTCTGTGAACAGTAACCTGGATCGTGGCGCCACGCTGGAGAAGA
 AGCTTCCGCCCTGCCCTGACACTGTCCTCTGCGCCTCTGAACCACCGCAA
 GAATAAGTCCCTGTGGCTTGGCTCACCATGGCTGAGCCCTCTGTGCTTCC
 TCTGCAGACCATCGCTGGCCGGCTGCCCTCCCCCTCCCTCTCTTGGGGT
 TGGGGCAGTGGGAAGGAGGGACCTCCATGCCAAGGATCCCCAGCGCCAGGG
 GACAGTGCCCAGGGGCTGGGTCCCGAGGGAGTCTGGATCTGAAGGGCA
 TTGCGATTGTGAGCGCCAGGCAGAGGGCGAGAGGCGCTGTACACAGGCTAGA
 AAGGAAAGACTGATGTCCTCTGAGGGCAGCAGAGGGAGCGCCAGGCCCTGT
 CACTTCCCCCTCCACCCCTCCATAGAAATCATGTTATAAGTTATGGAAAACCGG
 GACATTACAGAAAAAAACTAAAAACAAAAATACGTGGAAAAAA
 AAAATAGGATCTGGGAGGCCTCGGTTCTCCAGTTGACATGGTTGCCAGCA
 GGCAGGCCAGGGTTAGAAAGCACAGCAGCACCAAGCAGTTAGAGAAAGCT
 TGGCCAGGCATGGTACACCCCTCTGCTCTGGGACTACACTGCCGAACATCA
 GAGGCCTGGCCTCACCAAGGAGGGTGGCTCCAGGTCACTCGCCTCTGTGCA
 GCCCGAGAGCTGGCAGAGGACTTGTCTCTGTAACACAGGGTGGGGCAGGGAG
 ACAGGGCTCAGGAGCCCTCCCTGCCCCAACAGGGCTGAGGTGGTAGCTGTGCT

10

20

30

40

50

【化9-2】

GACTTCTCCCAGTGGGAAGGTCAAGAGGTCTCAGAAACTCAGGAAGAAACCGA
 GTTCCCTGGAAGTTCAAGCACAATAAGGAAAGTTACTCTGGGAGGAACGGGCC
 GCACCTTCCCAGGCTGAAACAGGAATGTCAAGTTGTTTGTAAATTITGT
 TGAAAGATGTAGCTCTGGGCCTCACGTGTCAGGCAGGTCTGCTGGGTTCC
 CTGCTTTCCTGAGGCCTGCTCTGGGGCTGCGATAAGGGCCTCAGATTGGGCT
 CTGCATCTCACTGTCACCTCATGGCATCCAAAGGGAAAGCAAAGACTCAC
 GAACTGGTCAGTGTCTAGACCGCAGCACTAAGACCCCTCTACTGCCTGGGCT
 GAGATGGGAGCTGGCCCTAGCAACCCATGAAAATCATCTCACACACCCAGTC
 CTTGCCAGTGTCTGAAGCCAAGCTAACAGGCCTGGGCTGCCAGGCACCC
 TGTACGTACCTTGGAGGCCAGGTGTTCCGCCTGCCATCCTGCAGAATCATGT
 TTTGCCGTGCTGGTGCACAGGCTAGCTAGCAAGCTGCTGTGGCTCT
 TGGGAACAGGGAACCTGTGAGGCAGTGTCTAGCAAGCTGCTGTGGCTCT
 GAGCCCCCTGTCTACCTGACTTCCCAGGTACAATGGCTTCCCACITTTGGGG
 TTTTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTTCAAGACAGGGTTCTGTGAGTCC
 TGTCGGTCTGGAACTCACTTGTAGACCAGGCTGCCCTCAACTCAGAAATTCA
 CCTGCCCTGCCCTCAAGTGCCTGGGATTATGGGATTAAAGGCATGTGCCACC
 CCCAGCTGGCTTCCACTTTAGCCAGGACTCATTCTATTACCTGAGCTCGGG
 ATCTCCTGCCCTCAGCTTGCAATGGCTAGCACTATAGACCCATGTCCAGTGA
 ATGACTTATGGCTGTTTTTTTTTTTTTTATGTGCATTAGTGT
 TGCCTGCATGTATGCCCTCGTGAGGGTAGCAGATCTTGGTGTACAGTTGTGAGC
 TGCTGTGTTGGTGTGCGATTGAACTAGGTCTGTGAAATGCAGTCAGTGCT
 CCTAACCTCTGAGTCATCTCTCCAGCTCCTGCTCTGCTTTATGAGGAAAAAG
 AAAAGAGAAGTGGCTTGAGAGTGGAAAATGCACATGCAGGGGTGCACACCTGCA
 GTCCCAGCATGCTACAGCAGAGGAGAAGGACCTTGTGGTTAGAGGCAGCC
 TGAGAATCTTATCTCAAAACAACCTTTAAATGTGCTGTAGGGTAGCTCTT
 CCCTCCCAAGGTGACACATCTGGCAATGCCAGAAACAGATCAGGAGCATCAC
 GCITGGTTTCCCAGGGCTGGCTTAATGTATGGCTTCAAAACCCATCGGGAGCC
 CACTGAACAGCTCTGAAGGAACCTGGAGCACGTCCCAGCCITGGAATGGAAAGA
 GTTCACCTGTGGTGGAGGAATCAACAAACGAGGGATCCAGAACAAACGATCTCA
 CCCCAGAAGCTGAGCCTCTAGCCCCCACCACCCATTCCATTAGGCTGCCAG
 CTCITTTCTTACAATGCACCAAGACCCCGGGGAAAGGGAAAGGAGCGGTCTCA
 GTGCCCTAGTACCAAGGCCTGGATTATTCAATGAGGTGTCGGCTCCCTTGT
 CGGGGGAGGGGAGCAGGGGGTACAAGGCATCCAAACTCCACCTCTTCTG
 CCTGCTGTGAAGGGGGAGAGAACAAACCCGCTCGTACAGGGGCTGGCACAG
 CCCGCCCTAGCCCTGAGGAGGGGGGGACAGGGGGAGTCCTATAATTGGACCG
 GTCTGGGATCCGATCCCCTGCTCAGACCCCTGGAGGCTAAGGACTTGT
 GAGCTGGTAAGACAAGCTGGCTGGGATTCAACCCAGGGACCTGGTAGGATGT
 GGGCTGGGAACCTTGAGATCCCCGGAGTCCAGGAAACAGGCACAAGAATTGGA
 AAAGCAGGAGCACGATAGAAGTCTGGGGACAAACTAAGGACTCGAGGTAA
 CTAGCCTTGCCAGAGTCAGAGCAGGTGGAGGGGTTACCTCAGGAAGGAGTAC
 GGGACTGTGGTGACGGCGTACCGGCTCAACTAGGAACCATCTATGGCGAAA
 AAACCTGGGATGAGCCTTAGGCTGTTTATATAAATACCTACTGATITCCATCA
 CAGTCCCCAAGTAACCCGGACTGGTTCAAAACTGTGGCTCTCATGGCTGAGCTC
 CCTAAGTCTGTAAGTGTGGAGGGTACCACTCGCAGGGATGGAGGACGATTAA
 AAAATCGTGTAAATTAAACACAAATGGAAAGCAGGACTTAGCCGGAAAGAAAG
 AGGAATGTAAGCTGGACCACCGCTGGCCCTGTGAAGTGGATTGAAACCC
 GGAGAGGGAGCTGGAAATTGGCAGCGGATCCACCCGGGGTGGCAGGAGATAGC
 GAACTCGGCAAGGGGAGGTAAACAGACCTTGGGAAGAGCGGGTGTCTGTTT
 GGAGATGTGTGATGGCTCACAGATCTGAGAAGGAAAGATGGGTTCTCTGGG

10

20

30

40

【化9-3】

TGGCCGGAGTCCCTCCACCCCGCCCCCTGGTGTCAAAGACAATTTCCTCC
 GCAG

【0203】

配列番号10：ヒトAPOE4遺伝子のエキソン2、3および4、ならびにヒトAPOE4遺伝子の1500ヌクレオチド3'UTRをエキソン4の後に含む、マウスゲノム内に挿入される「ヒト化」マウスApoe構築物に含まれるDNA配列(4292ヌクレオチド)。

50

【化 10 - 1】

ACTGGCCAATCACAGGCAGGAAGATGAAGGTTCTGTGGGCTGCGTGTGGTCA
 CATTCCCTGGCAGGTATGGGGGGGGCTGCTCGGTCCCCCGCTCTCCCCCT
 CTCATCCTCACCTCAACCTCCTGGCCCCATTCAAGGCAGACCCCTGGGCCCCCTCTC
 TGAGGCTTCTGTGCTGCTCCTGGCTCTGAACACAGCAATTGACGCTCTGGGCT
 CGGTTCCCCCATCCTGAGATAGGAGTTAGAAGTTGTTGTTGTTGTTGT
 TGTTGTTGTTGTTGTTGAGATGAAGTCTCGCTCTGCGCCAGGCTGGAGTG
 CAGTGGCGGGATCTCGCTCACTGCAAGCTCCGCCCTCCAGGTCACGCCATTCT
 CCTGCCTCAGCCTCCCAAGTAGCTGGACTACAGGCACATGCCACCAACCCGA
 CTAACTTTTGTATTTCAGTAGAGACGGGTTTACCATGTTGCCAGGCTGGT
 CTGGAACCTCCTGACCTCAGGTGATCTGCCGTTTCGATCTCCCAAAGTGCTGGGA
 TTACAGGCGTGAGCCACCGCACCTGGCTGGAGTTAGAGGTTCTAATGCAATTGC
 AGGCAGATAGTGAATACCAGACACGGGGCAGCTGTGATCTTATTCTCCATCACC
 CCCACACAGCCCTGCCTGGGGCACACAAGGACACTCAATAACATGCTTTCCGCTG
 GGCGCGTGGCTCACCCCTGTAATCCCAGCACCTGGGAGGCCAAGGTGGAGG
 ATCACTTGAGCCCAGGAGTTCAACACCAAGCCTGGCAACATAGTGAGACCCGT
 CTCTACTAAAAATACAAAAATTAGCCAGGCATGGTGCCACACACCTGTGCTCTCA
 GCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGGAGGATCGCTTGAGCCCAGAAGGTCAAGGTG
 CAGTGAACCATGTTCAAGGCCGCTGCACTCCAGCCTGGTGACAGAGCAAGACCC
 TGTTTATAAATACATAATGCTTCCAAGTGATTAAACCGACTCCCCCTCACCTG
 CCCACCATGGCTCCAAAGAACATTGTGGAGCACCTCTGTGTGCCCTAGGTA
 CTAGATGCCTGGACGGGTCAGAAGGACCCCTGACCCACCTGAACTTGTCCACA
 CAGGATGCCAGGCCAAGGTGGAGCAAGCGGTGGAGACAGAGGCCGGAGCCGAG
 CTGCGCAGCAGACCGAGTGGCAGAGCGGCCAGCGCTGGGAACCTGGCACTGGT
 CGCTTTGGGATTACCTGCGCTGGGTGCAAGACACTGTCTGAGCAGGTGCAGGAGG
 AGCTGCTCAGCTCCAGGTACCCAGGAACGTAGGTGAGTGTCCCCATCCTGCC
 CTTGACCCCTCTGGTGGCGGCTATAACCTCCCCAGGTCCAGGTTCTAGCTTCTCT
 TGTCGCTAAGTCTGGGGCTTAGCTCTGGATATCTCTCTCAGCTTGCTCTCTC
 TTCTGACTCCTGGCTTAGCTCTGGATATCTCTCTCAGCTTGCTCTCTC
 TTCCCTCTGACTCAGTCTCTCACACTCGCTGGCTCTGTCTCTGTCTCT
 CTCTTTATATAGAGACAGAGAGATGGGGTCTCACTGTGTTGCCAGGCTGGTCT
 TGAACCTCTGGGCTCAAGCGATCCTCCGCCCTGGCCTCCAAAGTGCTGGGATT
 AGAGGCATGAGCCACCTGCCGCCCTCTAGCTCTCTTCGCTCTGCCCTGC
 CCTCTGCATCTGCTCTGCATCTGTCTGTCTCTCTCTCGGCCCTGCCCTG
 TCCCTCTCTCCCTCTGGGTCTCTCTGGCTCATCCCCATCTGCCGCCCTGCC
 AGCCCTCTCCCCGCCCTCCACTGTGCGACACCCCTCCGCCCTCGGCCGCCAGG
 GCGCTGATGGACGAGACCATGAAGGAGTTGAAGGCCTACAAATCGGAACGTGGAG
 GAACAACTGACCCCGGTGGCGAGGAGACGCCAGGGCTGTCCAAGGAGCT
 GCAGGCGGCCAGGCCCGGCTGGCGGGACATGGAGGACGTGCGGCCAGAGCACCGAGGAGC
 TGGTGCAGTACCGCGGGCAGGTCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGC

10

20

30

40

50

【化10-2】

TGCAGGGTGCCTCGCCTCCCACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCCTCCGCGA
 TGCCGATGACCTGCAGAAGCGCTGGCAGTGTACCAAGGCCGGGCCGAGGG
 CGCCGAGCGCGGCCCTCAGGCCATCCGCGAGCGCTGGGCCCTGGTGAACA
 GGGCCGCGTCCGGGCCACTGTGGCTCCCTGGCCGGCAGCGCTACAGGA
 GCGGGCCAGGCCTGGGCCAGCGCTGCAGGAGATGGAGGAGATGGCA
 GCCGGACCCGCGACCCTGGACGGTGAAGGAGCAGGTGGCGGAGGTGCGC
 GCCAAGCTGGAGGAGCAGGCCAGCAGATAACGCCCTGCAGGCCAGGCCCTCCAG
 GCGGCCCTCAAGAGCTGGTCAGGCCCTGGTGAAGACATGCAGGCCAGTGG
 GCCGGCTGGTGGAGAAGGTGCAGGCTGCCCTGGCACCAGGCCGCCCTGTG
 CCCAGCGACAATCACTGAACGCCAGGCCATGCCAGGCCACCGCCACC
 CCGTGCCTCCTGCCCTCCGCGAGCCTGCAGCGGGAGACCCCTGTCCCCCCCCAGC
 CGTCCTCCTGGGTGGACCTAGTTAATAAGATTACCAAGTTACGCATCT
 GCTGGCCTCCCCCTGTGATTCTCTAAGCCCCAGCCTCAGTTCTCTGCC
 ACATACTGGCCACACAATTCTCAGCCCCCTCCATCTGTGTCTGTGTATC
 TTTCTCTCTGCCCTTTTTTTAGACGGAGTCTGGCTCTGTCAACCAGGCTA
 GAGTGCAGTGGCACGATCTGGCTCACTGCAACCTCTGCCCTGGTCAAGCG
 ATTCTGTCCTCAGTAGCTGGATTACAGGCTCACACCACACCCGGCTAAT
 TTTGTATTTTAGTAGAGACGAGCTTCACCATGTTGCCAGGCAGGTCTCAA
 CTCCTGACCAAGTGATCCACCCGCCCTCCAAAGTGCTGAGATTACAGGC
 GAGCCACCATGCCGCCCTGCCCTTTCTTTAGGGGCAGGAAAGGT
 CTCACCCIGTCACCCGCATCACAGCTCACTGCAGCCTCCACCTCTGGACTCAA
 GTGATAAGTGATCCCTCCGCCAGCCCTTCCAGTAGCTGAGACTACAGGCGCAT
 ACCACTAGGATTAATTGGGGGGGGGTGGTGTGTGGAGATGGGTCTGGC
 TTTGTTGCCAGGCTGATGTGAAATTCTCTGGCTCAAGCGATACTCCACCTTG
 CCTCCTGAGTAGCTGAGACTACTGGCTAGCACCACACCCAGCTTTATTAT
 TATTGAGAGACAAGGTCTCAATAATGTTGCCAGGCTAGTCTCAAACCCCTGG
 CTCAAGAGATCCTCCGCATCGGCCCTCCAAAGTGCTGGATTCCAGGCATGG
 GCTCCGAGCCGGCCTGCCAACCTAATAACTTGTCTCAGAGTTGCAACTC
 CAAATGACCTGAGATTGGTGCCTTATCTAAGCTATTTCATTCTGCTGT
 CATTATTCTCCCCCTCTCTCCTCCAGTCTATCTGATACTGCCCTCCACCC
 ACCCTGCACCCCATCCCACCCCTGTCTCTCCCTGTCAGGAGACTCTGG
 CTTCCTGTTCTCCACCTCTATCTTATCTCTCCCTACGGTTCTTCTT
 CTCCCCGGCCTGCTGTTCTCCCCAACCCCCCTCATCTGGATTCTCTGCC
 ATTCACTGAGCTCTGCTCTCCGGTTCCCTGAGCTAGCTGTCCT
 TCACCCACTGTGAACTGGGTTCCCTGCCAACCCCTCATCTCTTTCTTCTT
 TTTTTTTTTTTTTTTGAGACAGAGTCTGCTCTGGCCAGCC
 TGGAGTGCAGTGGTGCAATCTGGTCACTGCAACCTCCACTTCCCAGATTCAAG
 CAATTCTCCTGCCCTAGCCTCCAGAGTAGCTGGATTACAGGCGTGTCCCAC
 ACCCGACTAATTGTATTGGTAGAGACAAGGCTCGGATTGTT

10

20

30

40

【0204】

配列番号11：「ヒト化」マウスApoE構築物の9272および9273ヌクレオチドの間に挿入して、リコンビナーゼによるこのカセットの除去前に選択を可能とする、Fr t P G K n e o Fr tカセットと後続のNde1制限酵素部位(CATATG)(1834ヌクレオチド)。

【化11-1】

GAAGTTCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACCTCAGGTCTGAAGAGGAGTTACG
 TCCAGCCAAGCTAGCTGGCTGCAGGTCGAAATTCTACCGGGTAGGGAGG

50

【化11-2】

CGCTTTCCAAGGCAGTCTGGAGCATGCCCTAGCAGCCCCGCTGGGCACCTG
 GCGCTACACAAGTGGCCTCTGGCCTCGCACACATTCCACATCCACCGTAGGCGC
 CAACCGGCTCCGTTCTTGGTGGCCCCCTCGGCCACCTCTACTCCTCCCCTAGT
 CAGGAAGTTCCCCCCCCGCCAGCTCGCTCGAGGACGTGACAATGGA
 AGTAGCACGTCTCACTAGTCAGTCAGATGGACAGCACCGCTGAGCAATGGAA
 GCGGGTAGGCCTTGGGGCAGCGGCCAATAGCAGCTTGCTCCTCGCTTCTGG
 GCTCAGAGGCTGGGAAGGGGTGGGTCGGGGCGGGCTCAGGGCGGGCTCAG
 GGGCGGGCGGGCGCCGAAGGTCTCCGGAGGCCCCCATCTGCACGCTTCA
 AAAGCGCACGTCTGCCCGCTGTTCTCCTCTTCATCTCCGGCCTTCGACCT
 GCAGCCTGTTGACAATTAAATCATCGGCATAGTATATCGGCATAGTATAATACGAC
 AAGGTGAGGAACAAACCATGGGATCGGCCATTGAACAAGATGGATTGCACGCA
 GGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTGGCTATGACTGGGACAACAG
 ACAATCGGCTGCTCTGATGCCCGCTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGCGCCCG
 TTCTTTGTCAGACCGACCTGTCGGTGCCTGAATGAAGTGCAGGACGAGGC
 AGCGCGGCTATCGTGGCTGGCACGACGGCGTTCCCTGCGCAGCTGTGCTCGAC
 GTTGTCACTGAAGCGGAAAGGGACTGGCTGCTATTGGCGAAGTGCCGGGAG
 GATCTCCTGTCATCTCACCTGCTCCTGCCAGAAAGTATCCATCATGGCTGATG
 CAATGCGCGGCTGCATACGCTGATCCGGTACCTGCCATTGACCAACCAAGC
 GAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCGGTCTGTCGATCA
 GGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGCTCGGCCAGCGAACTGTTGCCAG
 GCTCAAGGCGCGCATGCCGACGGCGATGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGC
 CTGCTTGCCTGAATATCATGGTGGAAATGGCCGCTTCTGGATTCATCGACTGT
 GGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCGTGAT
 ATTGCTGAAGAGCTTGGCGGGAATGGCTGACCGCTCCTCGTGTACGGTA
 TCGCCGCTCCCGATTGCGCATGCCCTCATGCCCTTGTACGAGTTCTTC
 TGAGGGGATCAATTCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTCTAGTT
 GCCAGCCATCTGTTGCTTGCCTTCCCGTGCCTTGCACCTGGAAGGTGCC
 ACTCCCACGTCCCTTCTAATAAAATGAGGAATTGCATCGATTGTCTGAGTA
 GGTGTCAATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATT
 GGGAAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCCGTGGCTCATGGCTCTGAGG
 CGGAAAGAACCAAGCTGGGCTCGACTAGAGCTTGCAGAACCTTCGAAGTCCCT
 ATTCTCTAGAAAGTATAGGAACCTCCATATG

10

20

30

【0205】

配列番号12：マウスゲノム内に挿入される「ヒト化」マウスApoE構築物に含まれる3'ホモロジーアーム(5166ヌクレオチド)。

【化12-1】

AAACCTGATGGAGAAGATAACAGGCCTCTGGCTACCAACCCATCATCACCCC
 AGTGGCCCAGGAGAATCAATGAGTATCCTCTCCTGTCGAACAACATCCATA
 TCCAGCCAGGTGGCCCTGCTCAAGCACCTCTGGCCCTCTGGTGGCCCTTGCTT
 AATAAAAGATTCTCCGAGCACATTCTGAGTCTCTGTGAGTGAATTCAATCAGCTTC
 AGCCTCAGTTATTGTTTGCCTTACCTAGCACACATTCCATGGCCCTGTCACT
 ATCTGTAGAGGGAGGTGGTTTGCAAGCAATAGAAATGAAGCCTAGGACCTAGCA
 ACATAAAAGAACAAAGTGAATCTACCACTGAGCCACGCCACAGCCCTCACTGGG
 GGATTCTAGGCAGGGCTCTACCACTGAGCCACCCACAGCCTCTGGGCTACTGGGAA
 TCATATCTACCACTGAGTCACGCCCTCCAGCCCTCACTACGGGAATTCTAGTC
 AGTAGCTCTACCACTGAGCCACACCCACAGCCTCTGGGCTCTCACCGCCCCCT
 ACCCCTGGATTCTAGGCATGGCTCATTTATTATTTATTAAAGATTGT
 ATCTTATGTATAAGGTACACTGCAGCTGCTTCAGGCAGGTCCCATTACAGA

40

50

【化12-2】

TGGTTGTGAGCCACCATGTGGTGCTGGATTGAACTCAGGACTTATAGAAGAG
 TAGTCAGTGCTCTTAACGTGAGCCATCTCTCCAGCACCCAGTACAGGCTCTCT
 ATTAGCTATATCCACCCCTCTTTAGTCTGAATATTTGAATCTTGTGTTCAAATC
 TTGCACTCCCTCTAGCCTAGTTGGCTTGAATATTGAATCTTGTGTTCAAATC
 AATCTCTACAGGAACGTGAGAAAGGCATGTACCACTCATGTGGTCAGTTGGCT
 ACTTTTCCCAACTTCCCAAGCACCCACTGCACAGCTATGCCITGAATCAATCAC
 ATGTAAGAGACCAGGGTCGCCAGGGCGTGTACTTTCTGGTTGTCITATCTCTC
 CTCCCTCCGCTCTAGTCTTATGTACACCCCTCTCCTIGCCTTGTCTCTCTCTT
 CCTCTAGGCTTCCCTTCTGGCTTCTGTTCTGATCCTCTGTTATCTCACCC
 CCCGCGTTCTTGTCTGGGCTTGGTGGCGGTTCTACGGTTCTACGTG
 GCTTTGGAACCTCAGCCTTCTCCCTGCTGAAGTTAGCTGGATCTTGCTCC
 CTCTGGGTCACTGGGCCCTAGCCCCATTCTTCTCCCTGCCTGTGCTGCATGCCT
 TTTGACTTCCCAGCAAGTGTATGGAGAGTGAAGTCAAGGCTGGGACACAAAAC
 CATTCTCCCCATGTCTGGTACTCAAAGGGTCATGGTGAAGCTGGAGAGCCCC
 TGGCTGGCTTCTCCCTCCACCCCTCAGTCTCAGGGACTCAGCAGGGCTCCAC
 TAACAGGGCAGGCTAGGGCTGAGCTGTCTGGTGGGCCAAGGCTTCAG
 AACTCAACTGCCTCTGGCACACCCGAGCCTGCAGCTTCTGGCATCAAACTC
 AGCATTATCTGGAGGCAGGCACACTCCCACACATGACTCATTAGGCCAATGA
 GAAGATGGTCGGTGGCTAGTGAACAGGCCCTAGACAGCCACACTCATGCC
 AGGGCTAGGAGCACACCCAGAGCCTCACTACTCTCAAATATCAAGATGAGG
 GGAGAGTATAGAGGGATGTCTCCCTCTGAAGACCTGAATTATTGTGATGTTATT
 TGAGCCACGCTGGCTTGAACTCTGAACCCCTCTGCCTCATCTCAAAGGCTGGA
 ATTACAGGTTCGGCCACTAGGCCTATCTGAGAACCTAGTAAATTCTACAGAAGA
 GAGTTGTTTCACTGGTTGAACAGGGCTCGTGTACCCAGAGCTACTCTT
 CCAACTCACTGTAGAGCCAAGGATGACCTGAACTCTGGCTTCTGGCTCCGAG
 TCTCGGTACTGGTAGACAATGTGTGATCCTAACCCCCAGTTATGTGGTGCT
 ATACAGATGGCATCCAGGGTTCTGCATGCTGGACAGGTCAACCAACCGA
 GCCACATCCTCCTCATCATCACTTGTGTTGGTTCAATCCAGAGCTCATG
 GAGCCCAAGCTGGCTCAATCTATATAACCAAGACTGTGCCTGGCTTCTGTCT
 CTACCTAACAAATGATGGTGGATGCAGGGATGTACAACCAGGAGCAGGCC
 ACTCTAAACGAAGAAGGAACCCACCTCCCTGTTGGCAGACCTGGAGGTGGGG
 CAAGGACCACAGAAAAGACATTACAGAACTAGGGATCGTAAGGAAGTCATGGAG
 GCCAGCCTGTTGTACAGAGTGAGTCCAGGACAGCCAGGGTACACAGAGGAAA
 ACAAGAAGGAAAAAAAGAAGAACACTGAATGACTAGCAGTTAGA
 ACCCTAGCTGTGCTTCCGTACCTGACAGGAGCTGGCACAGGAAGCCCTGTTGCT
 AAGAGTAGGATGACACTGGAAAGCACCAAGCAGACTGGCAGAGTAAGGGGGAAAT
 CTGTTACATTATTCAAGATGGCGCTGAGGACTGAGCAGGACTCCTTCAAGAAG
 CAAAAGGGTCAGGCCCTGGTCCCACAGGGACTGGAAGCTAGCTAGCGCCGAGTT
 GGCCCCAGAGATGTCGAACCCAGCCAGGGTCGAGAATCTGTTCCACCCCTTCA
 CAACCATCCCCCTGTTGCGTCCCACCCCCACCCCCGCCAACTGACACG
 TGGGTGCAAGGGCACCAGGCCAGCCAACCTAGAGTCTGGCCCTTAGGCCACC
 AGCTGCCAGGGGGCACTGTGGTCAATGACAGCTCTGGGGAGGGGGAGGAA
 GGGCCTGGACTCTAGCCTGAGAGAAAGGATGTTGTGGAAGGAGGGGGAGGGA
 GGCAAGTTAGGGCCTGCAGGGGCCTAGGAGGGCCCACAAGACCTAAAAACGGG
 GGAAGGGGGTTGTGCCAGTTAGGGGACACTATGGAGCTCTGCAAGCTAACAGGG
 CTCTTAGCTTCTTGCAAGTTGACTAGCTGAAGAGGCAACTCTAAGGAAGGGA
 GATGAGGGGATGCCAAGATCCCAGAGAGCATCCGAGGAGGTCTGAGGGTGCA
 GATGCAAAGGCATTGGAGGTGAAGGGAGCCAGGGTGCAGCATCCGGGACAGAA
 TGTGAGCTGAGGCTCCGGTCAAGGAGAAGGTAGAGAAGAGCTAACCTGAGGAT

10

20

30

40

50

【化12-3】

GCAGTGTGAGCTAGGGGTGAGATGGGGGTGAGGGGAGITGTTGTAAGACCCCC
 CCCCTTAAGGTGGACAGCCTCAGAGAGAGAGTGAATGGCAGAGCAGCCAAG
 GCTGGGTGGAGATCAATGAGATTGGAAGTGAAGGATGCTGACCAGTGACGAGCC
 TTGGGCCTAAATAAAAAGCCTGGATGTGGGATCTGCCTCCAGTATCGACCAGA
 ATGACAGAAGAGAGTGGCTGGTGTGGTGTGGCATGCCTGTAATCCCA
 GCAACTCACTAGAGAGGCAGAGGCAGGAGCATCACAAATTCCAGGCCAGCCAA
 AAAGCCTATGTAAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGTGGT
 GGACACAGAGACAAGGGGGAGGCTCAAGGGGGAGGGCGACCAGCTGCTCCGCC
 CCCTCCCCAACCGGTTAACCTCTGTGCAGGATCCTCCCACCGCCATGGGCCTCC
 TGAGAGATCCTTAGATCCAGGTTAGTGCATAGGAAAGTGTCCCCCCTACCTAC
 AGCTAAGGGATTGGGTGGTGGATCATGGTGGAGGGCGGTGGTGAATACTAGC
 GATGTCCCCCGCTACCCGTGCGCTGCCTCCAGGGTGCCTCCACCGCCATGGGCCTCC
 GGCTCTTCATCGCTCTTCCTGTCTGATTGTGGTGTAGCCATGACCTTGGAAAGGT
 AAGAAAGAGCCTTGGAAAGGTAAGAAAGAGGCTTGGAAAGTGTGAAGTGGCCTTG
 TGCCTGCGGCCAGGCTTAGAAGACCTCGAGGAGGGCTGTAGGTCCTTCTG
 TGTATCATTCACACTACCGCCCTCCATCGTCCCCATCCCACCTGCCAGGTGCCT
 TATTTTGTGTCAAAGTGGGTGCTGAAGGAGGCAACTCTGTCCAGAAAAGACGC
 AGTAACCAATGACCTAGGATACCACCCTTGGAAATTGGCTAATCTCCTAGAAGG
 GGCGGAGCGTAAAACAAGGAGGTGAGAGGTGCAGTAAAATCAAGTGTCCAAT
 ACCCTCCCCATGCTAATGAGTTGCTCGCAACCCCTCTCGCGGCAGGCCAGCCC
 CGGCCAGGCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCCAGGCC
 TGAAGGAGTTGGAACACTTGGAAAGACAAGGCCAGGCCAGGCCATTGAACATA
 TCAAACAGAAGGAAATTGACCAAGACCCGGTAGGACCTTCAAGGGCACGGG
 CGGGTGGT
 GACAGTCCACACTGACACAATGGGAAACTGCACCAAGTGTGACACTTCC
 CTGAAGTCATAGAACTGTATCTGAAGTCATTGAACTGGATGTCAGTGTGCTCGTA
 GTGTGGAGACAGGCGGTGTAACTCCCAGCCAAGTGTAGAGATGTTCCAAGTCC
 TAGTGAAGGGCCAAGCTAGGCGCTGACTGGTAGGACAGACCCCTGACCCCTCC
 CTGTGTACTCTGAGACAGGTATGACTTGAGTCTCCAGACAGAGAAAGAATGT
 AGGAGAGTTGGGGCAGGGCACAGCAGAAGCTGTACAGGCCAGGCCAGGCCAG
 TTACACTGGCCAAAGAGAGATTAGGGCATGCTGGGTAAGAAACTAGCCAGGCCAG
 TGGTGGCGCACACCTTGATCCCAGTATTGAGGAGGCCAGGCCAGATCTCT
 TTGAGGCCAGGCTGATTGGAGCTAGTCTAGGAAAGCCAGGCCAGGCCAG
 ACCCTGCTCAACACCACCACCCCCC

10

20

30

【0206】

配列番号13：野生型アミノ酸配列 - マウスApoE

【化13】

MKALWAVLLVTLLTGCLAEGERPEVTDQLEWQSNQPWEQALNRFWDYLRLWVQTLSDQVQEELQSSQVTQELTALMEDTMTEVKAYKKELEEQLGPVAEETRARLGKEVQA
 AQARLGADMEDLRNRLGQYRNEVHTMLGQSTEEIRARLSTHLRKMRKRLMRDAED
 LQKRLAVYKAGAREGAERGVSAIRERLGPLVEQGRQRTANLGAGAAQPLRDRAQA
 FGDRIRGRLEEVGNQARDRLEEVREHMEEVRSKMEEQTQQIRLQAEIFQARLKGWFE
 PIVEDMHRQWANLMEKIQASVATNPITPVAQENQ

40

【0207】

配列番号14：アミノ酸配列 - ヒトAPOE3

【化14-1】

MKVLWAALLVTFLAGCQAKVEQAVETEPEPELRRQQTEWQSGQRWELALGRFWY
 LRWVQTLSEQVQEELLSSQVTQELRALMDETMKELKAYKSELEEQLTPVAEETRAR
 LSKELOAAQARLGADMEDVCGRLVQYRGEVQAMLGQSTEELRVRLASHLRKLRKR

50

【化14-2】

LLRDADDLQKRLAVYQAGAREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPL
QERAQAWGERLARMEEMGSRDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQ
ARLKSWFEPLVEDMQRQWAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

【0208】

配列番号15: A P O E 4 p (アミノ酸299個)

【化15】

KVEQAVETEPEPELRRQQTEWQSGQRWELALGRFWDYLWVQITLSEQVQEELLSSQ
VTQELRALMDETMKELKAYKSELEELQTPVAEETRARLSKELQAAQARLGADMED
VRGRLVQYRGEVQAMILGQSTEELRVRLASHLRKLRKRLRDADDLQKRLAVYQAG
AREGAERGLSAIRERLGPLVEQGRVRAATVGSLAGQPLQERAQAWGERLARMEE
MGSRDRLDEVKEQVAEVRAKLEEQAQQIRLQAEAFQARLKSWFEPLVEDMQRQ
WAGLVEKVQAAVGTSAAPVPSDNH

10

【0209】

本明細書において言及するいかなる特許または刊行物も、各刊行物それが参照により組み込まれるものと詳細かつ個別に示されるのと同じ程度に、参照により本明細書に組み込む。

【0210】

20

本明細書に記載の遺伝子改変マウスおよび使用方法は、現在のところ、例示的な好ましい実施形態の代表的なものであり、本発明の範囲を限定することを意図しない。その範囲内の変化や他の使用は、当業者であれば思いつくものと予想される。このような変化および他の使用は、特許請求の範囲に記載される本発明の範囲を逸脱することなくなされ得る。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p の発現を伴う、非家族性遅発型アルツハイマー病に関する1つまたは複数の症状または徵候を特徴とする遺伝子改変マウスであって、前記マウスのゲノムが、1) プロモーターに動作可能に連結されたヒトA P O E 4 タンパク質(A P O E 4 p)をコードするDNA配列、および2) プロモーターに動作可能に連結された、p. R 4 7 H変異を有するマウスT r e m 2 タンパク質(T r e m 2 p)をコードするDNA配列を含み、前記マウスが、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p を発現する、遺伝子改変マウス。

30

(項目2)

前記A P O E 4 p が、配列番号1のアミノ酸配列を含むか、または前記A P O E 4 p が、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号2とハイブリダイズする核酸の相補体によりコードされる、項目1に記載の遺伝子改変マウス。

(項目3)

前記マウスT r e m 2 p が、配列番号3のアミノ酸配列を含むか、または前記マウスT r e m 2 p が、高度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で配列番号4とハイブリダイズする核酸の相補体によりコードされる、項目1に記載の遺伝子改変マウス。

40

(項目4)

前記マウスのゲノムが、1) プロモーターに動作可能に連結されたヒトA P O E 4 タンパク質(A P O E 4 p)をコードするDNA配列、および2) プロモーターに動作可能に連結された、p. R 4 7 H変異を有するマウスT r e m 2 タンパク質(T r e m 2 p)をコードするDNA配列を含む、B 6 (S J L) - A p o e^{tm1.1(A P O E * 4) Adi uj} T r e m 2 ^{em1Adiuj/J}マウスであり、前記マウスが、A P O E 4 p をコードするDNA配列について、およびT r e m 2 p をコードするDNA配列についてホモ接合性であり、ヒトA P O E 4 p およびマウスT r e m 2 p を発現する、項目1に記載の遺伝子改変マウス。

50

(項目 5)

アルツハイマー病の処置における使用のための化合物についてスクリーニングするための方法であって、

項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改変マウスに化合物を投与するステップと、
非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する、ヒト A P O E 4 p およびマウス T r e m
2 p の発現を伴う 1 つまたは複数の症状または徴候の処置に対する前記化合物の作用をマ
ウスにおいて評価するステップと
を含む、方法。

(項目 6)

前記化合物の作用を評価するステップが、項目 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の遺伝子改
変マウスに対する前記化合物の作用を、対照と比較することを含む、項目 5 に記載のアル
ツハイマー病の処置における使用のための化合物についてスクリーニングするための方法。

10

(項目 7)

前記対照が、

ヒト A P O E 4 p およびマウス T r e m 2 p を発現しないマウスに前記化合物を投与す
るステップと、

前記化合物の作用を前記マウスにおいて評価するステップと
を含む、項目 6 に記載のアルツハイマー病の処置における使用のための化合物についてス
クリーニングするための方法。

(項目 8)

20

前記対照が、

野生型 C 5 7 B L / 6 J マウスに前記化合物を投与するステップと、

前記化合物の作用を前記野生型 C 5 7 B L / 6 J マウスにおいて評価するステップと
を含む、項目 6 または 7 に記載のアルツハイマー病の処置における使用のための化合物に
ついてスクリーニングするための方法。

(項目 9)

前記対照が、

A P O E 3 発現マウスに前記化合物を投与するステップと、

前記化合物の作用を前記 A P O E 3 発現マウスにおいて評価するステップと
を含む、項目 6 または 7 に記載のアルツハイマー病の処置における使用のための化合物に
ついてスクリーニングするための方法。

30

(項目 10)

ヒト A P O E 4 p およびマウス T r e m 2 p の発現を伴う、実質的に本明細書で記載さ
れる非家族性遅発型アルツハイマー病に関係する 1 つまたは複数の症状または徴候を特徴
とする遺伝子改変マウス。

(項目 11)

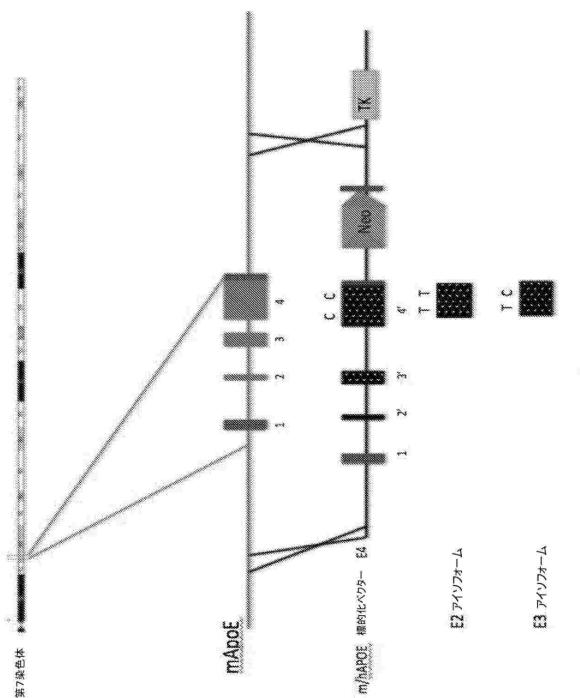
実質的に本明細書で記載されるアルツハイマー病の処置における使用のための化合物に
ついてスクリーニングするための方法。

40

50

【図面】

【図 1】



【図 2】

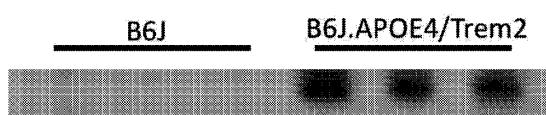


FIG. 2

FIG. 1

10

20

【図 3 A】

直接 HDL (mg/dL)

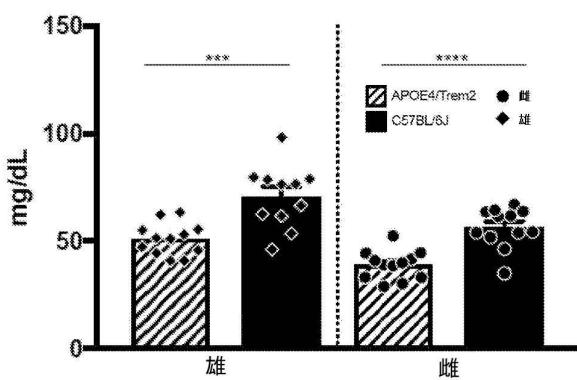


FIG. 3A

【図 3 B】

直接 LDL (mg/dL)

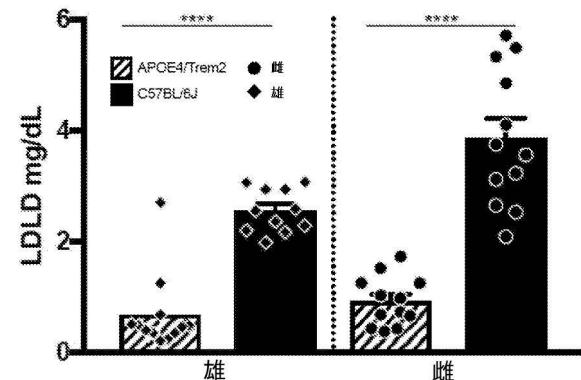


FIG. 3B

30

40

50

【図3C】

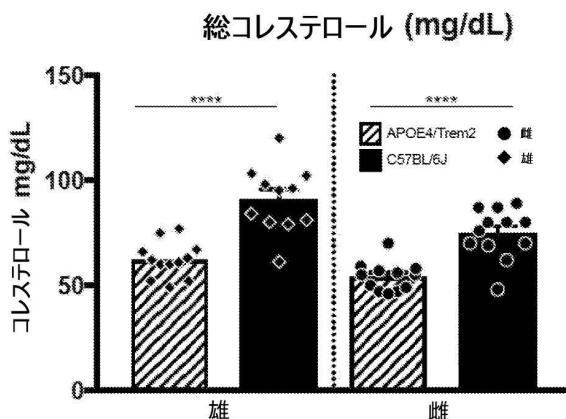


FIG. 3C

【図4】

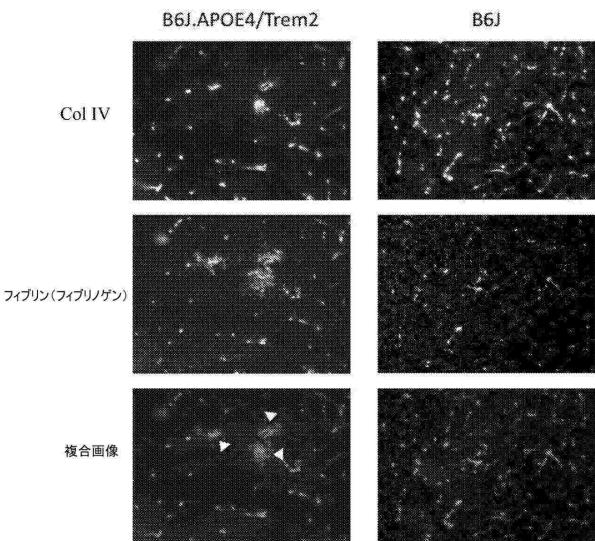
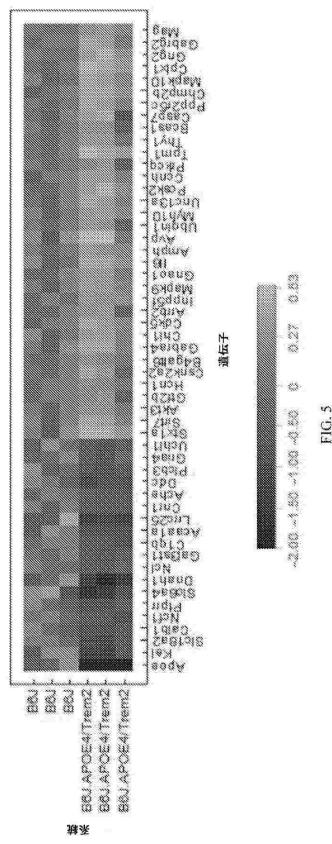


FIG. 4

【 図 5 】



۳

【配列表】

0007623785000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(74)代理人 100113413
弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674
弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641
弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332
弁護士 山本 健策

(72)発明者 ハウエル, ガレス
アメリカ合衆国 メイン 04660, マウント デザート, ブレンダン レーン 10

(72)発明者 サスナー, マイケル
アメリカ合衆国 メイン 04609, バー ハーバー, レッジローン アベニュー 116

(72)発明者 カーター, グレゴリー
アメリカ合衆国 メイン 04675, シール ハーバー, ピーオー ボックス 432

(72)発明者 ラム, ブルース
アメリカ合衆国 インディアナ 46032, カーメル, ウィンデミア 10487

合議体
審判長 上條 肇
審判官 北田 祐介
審判官 高堀 栄二

(56)参考文献
特開2008-000027 (JP, A)
特表2002-507898 (JP, A)
特開2001-057885 (JP, A)
特開2001-017028 (JP, A)
国際公開第2014/074942 (WO, A1)
Building Better Mouse Models for Late-Onset Alzheimer's, ALZFORUM, 2017年01月20日, p. 1-8, URL: <https://www.alzforum.org/news/research-news/building-better-mouse-models-late-onset-alzheimers>
野島 博, 医薬 分子生物学(改訂第3版), 2014年03月30日, p. 213-215
Yu-Wen Alvin Huang et al., Cell, 2017年01月26日, Vol. 168, p. 427-441
Unbiased Screen Fingers TREM2 Ligands That Promote A Uptake, ALZFORUM, 2016年07月22日, p. 1-5, URL: <https://www.alzforum.org/news/conference-coverage/unbiased-screen-fingers-trem2-ligands-promote-a-uuptake>
Olena Korvatska et al., JAMA Neurology, 2015年08月, Vol. 72, No. 8, p. 920-927

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C07K
C12N
A01K
G01N