

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6109740号
(P6109740)

(45) 発行日 平成29年4月5日 (2017.4.5)

(24) 登録日 平成29年3月17日 (2017.3.17)

(51) Int. Cl.

F I

A O 1 K 67/027 (2006.01)

A O 1 K 67/027 Z N A

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

G O 1 N 33/15 (2006.01)

G O 1 N 33/15 Z

G O 1 N 33/50 (2006.01)

G O 1 N 33/50 Z

請求項の数 7 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2013-533243 (P2013-533243)
 (86) (22) 出願日 平成23年10月26日 (2011.10.26)
 (65) 公表番号 特表2013-544075 (P2013-544075A)
 (43) 公表日 平成25年12月12日 (2013.12.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/068696
 (87) 国際公開番号 W02012/055891
 (87) 国際公開日 平成24年5月3日 (2012.5.3)
 審査請求日 平成25年4月12日 (2013.4.12)
 審判番号 不服2015-21163 (P2015-21163/J1)
 審判請求日 平成27年11月30日 (2015.11.30)
 (31) 優先権主張番号 10189446.7
 (32) 優先日 平成22年10月29日 (2010.10.29)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 591003013
 エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー
 F. HOFFMANN-LA ROCH
 E AKTIENGESELLSCHAFT
 スイス・シーエイチ-4070バーゼル・
 グレンツアーヘルストラッセ124
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 IL33のN末端ドメインが欠失している炎症マウスモデル

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

IL-33遺伝子の発現産物のアミノ酸1-67を欠失している、炎症性疾患モデルマウス。

【請求項 2】

請求項1記載のマウスに由来する、組織もしくは器官外植片またはそれらの培養物。

【請求項 3】

炎症性疾患のモデルとしての、請求項1記載のマウス、請求項1記載のマウスに由来する細胞株もしくは初代細胞培養物、または請求項2記載の組織もしくは器官外植片の使用。

【請求項 4】

抗炎症性化合物のスクリーニングのための、請求項3記載の炎症性疾患のモデルの使用

10

【請求項 5】

抗炎症性化合物の薬理学的効果の評価のための、請求項3記載の炎症性疾患のモデルの使用。

【請求項 6】

請求項1記載のマウスに候補化合物を投与する段階を含む、抗炎症性化合物のスクリーニングのための方法。

【請求項 7】

請求項1記載のマウスに抗炎症性化合物を投与する段階を含む、該抗炎症性化合物の薬理学的効果の評価のための方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、IL-33遺伝子のN末端ドメインが欠損している非ヒト動物に関連する。また、特に、抗炎症性化合物のスクリーニング法、ならびに、所定の抗炎症性化合物の薬理学的特性を評価および最適化するための方法に関する、炎症性疾患のインビボモデルとしての該非ヒト動物の使用も、本明細書において提供される。

【背景技術】

【0002】

インターロイキン33 (IL-33) サイトカインは、インターロイキン1 (IL-1) ファミリー 10
の最も新しいメンバーである。その核局在化のため、当初は「高内皮細静脈由来の核内因子」と記載されていた。IL-33は、主として、繊維芽細胞、ならびに上皮細胞、内皮細胞、および気道平滑筋細胞により発現されている。IL-33は、IL-1受容体関連タンパク質ST2 20
のリガンドである。ST2受容体は、ほぼすべての自然免疫細胞 (肥満細胞、好塩基球、好酸球、好中球、ナチュラルキラー (NK) 細胞、およびマクロファージ) において、ならびにNK TおよびTヘルパー (Th) 2細胞において発現されている。標的細胞上のST2とIL-33の相互作用は、炎症誘発性、Th1、Th2、およびTh17サイトカインの発現および分泌、ならびに、Th1、Th2、および自然免疫エフェクター機能に参与するケモカインの発現を誘発することができる (刊行された論文および準備中のHicksらの原稿)。IL-33は、その炎症誘発性サイトカインドメインを通して、特異的な表面受容体に結合する。さらに、IL-33はまた 20
、典型的なDNA結合ヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフを含有するN末端ドメインを有する。核内の非切断型のIL-33は、ヘテロクロマチンにおけるヒストン2Aおよび2Bと相互作用してクロマチンの圧縮を促進し、潜在的な転写抑制因子として機能する。IL-33が、核内で転写抑制を制御すること、および古典的受容体を介してシグナル伝達し、強力な炎症誘発性サイトカインとして作用することの二重の機能を発揮するように見られる他のクロマチン関連サイトカイン (IL-1 およびHMGB1) に類似していることを示す、強い支持が存在する。従って、IL-33は、HMGB1と同様に、損傷関連分子パターン (DAMP) 分子のより大きなファミリーに属する「アラミン (alarmin)」として機能し得ることが、提唱されている。

【0003】

IL-33/ST2軸は、疾患を有する組織における高レベルの発現により確認されるように、ヒト炎症性疾患の病態生理学において中心的な役割を果たす。IL-33および/またはその可溶性受容体ST2のいずれかの上昇したレベルが、関節リウマチ (RA)、炎症性腸疾患 (IBD)、乾癬性および潰瘍性大腸炎、急性好酸球性肺炎、重症喘息、突発性肺線維症、肝臓線維性疾患、アトピー性皮膚炎、全身性硬化症、自己免疫および外傷患者において観察される。IL-33/ST2軸は、ヒトにおけるその役割と同様に、マウス炎症モデルにおいて重要であることが示されている。IL-33は、コラーゲン誘導関節炎 (CIA)、アレルギー性結膜炎、および実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を悪化させる。抗体でのIL-3/ST2シグナル伝達の妨害は、アレルギー性気道炎症およびブレオマイシン誘導肺傷害の消散に有益であることが示されている。慢性腸炎症のIBDマウスモデルにおいてIL-33が上方制御されていることも、最近示されている (Oboki et al, PNAS 2010 107 (43) 18581-18586 (非特許文献1))。 40

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Oboki et al, PNAS 2010 107 (43) 18581-18586

【発明の概要】

【0005】

非ヒト動物は、任意の非ヒト動物であってもよい。非ヒト動物は、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはラットまたはマウスなどの齧歯動物であり、最も好ましくは非 50

ヒト動物はマウスである。好ましい態様において、該非ヒト動物はマウスであり、かつ、IL-33遺伝子のN末端の欠失は、IL-33遺伝子のN末端のDNA結合ドメイン全体の欠失を含む。好ましくは、マウスにおけるIL-33遺伝子の該N末端の欠失は、IL-33遺伝子の発現産物のアミノ酸1-67の欠失を含む。

【0006】

非ヒト動物は、IL-33のN末端欠失についてヘテロ接合性またはホモ接合性であってもよい。好ましくは、非ヒト動物は、IL-33のN末端欠失についてヘテロ接合性である。

【0007】

IL-33遺伝子のN末端が欠損している本発明の非ヒト動物は、炎症性疾患の典型的な特徴を示す。例えば、本発明のマウスは、正常な出生率および生後約3~4か月までの成長、その後の、耳における出血性病変および繰り返し観察される胸腔における大きな凝塊、より小さなサイズ、ならびに全身の病的状況などの特徴を有する。これらのマウスは、病理学検査において、慢性多病巣性心筋炎；腸壁が肥大した慢性化膿性の強度の回腸炎；顕著な水腎症および腎萎縮症を伴う慢性尿管炎；肺における中等度で多病巣性の血管周囲浸潤巣；免疫器官、肺、および腸における好酸球およびマクロファージの顕著な増殖を伴う脾臓過形成；を含む多臓器炎症を呈する。

【0008】

本発明の非ヒト動物は、炎症性表現型を呈するため、インビボ炎症モデルとして有用である。IL-33のN末端が欠失しているこの非ヒト動物は、IL-33機能不全と炎症性障害との間の因果関係を実際に証明し、かつ、患者におけるIL-33の異常な過剰産生を減少または消滅させることを目標とした方向性を有する治療戦略の設計を可能にするために役立ち得る。細胞外区画中へのIL-33の大量の産生および分泌が、この重症の炎症性状態の原因であるため、この新規かつ独特の非ヒト動物モデルは、非ヒトIL-33またはその受容体ST2との交差反応性が認められる場合、IL-33薬物候補のインビボでの有効性および効力を評価するために使用することもできる。従って、本発明の第2の目的において、該非ヒト試験動物を、特に、抗炎症性化合物のスクリーニングに関する、炎症性疾患のインビボモデルとして使用する。一つの態様において、IL-33のN末端が欠失している本発明の非ヒト動物に候補化合物を投与する段階を含む、抗炎症性化合物のスクリーニングのための方法が提供される。一つの態様において、該方法は、a) IL-33のN末端が欠失している非ヒト動物を提供する段階、b) 該非ヒト動物に候補化合物を投与する段階、c) 該非ヒト動物の炎症症状を、該化合物を投与していないIL-33のN末端が欠失している非ヒト動物の炎症症状と比較する段階を含み；該炎症症状を緩和する化合物が、抗炎症性化合物として選択される。

【0009】

候補化合物は、低分子、(ポリ)ペプチド、(糖)タンパク質、抗体または抗体断片、(ポリ)または(オリゴ)ヌクレオチド、ヌクレオシド、脂質、それらの組み合わせ、およびそれらの改変された誘導体を含むが、それらに限定されない。

【0010】

スクリーニングされる候補化合物の投与の方法は、経口投与および非経口投与(例えば、静脈内投与、腹腔内投与、および鼻腔内投与)を含むが、それらに限定されない。経口投与の場合、候補剤は、投与のために飼料に混合されてもよい。

【0011】

候補剤は、薬学的に許容される従来の賦形剤(担体および希釈剤など)または添加剤との組み合わせで投与されてもよい。さらに、候補剤は、リポソーム(例えば、正電荷を有するリポソーム)またはナノ粒子の中にカプセル化されるか、またはそれらに結合(もしくは付着)されて、投与されてもよい。

【0012】

評価は、例えば、肉眼での観察、体重の測定、組織病理学的観察(例えば、組織染色後の顕微鏡観察)、およびFACS解析により、指標として、炎症症状の鎮静または回復、体重の増加、回腸(ileon)の肥厚からの回復などを用いて行うことができる(下記の実施例

10

20

30

40

50

を参照されたい)。

【0013】

IL-33のN末端が欠失している対象動物またはそれに由来する細胞の使用を通して、細胞のIL-33と結合、調節、拮抗、または刺激 (agonize) するリガンドまたは基質を同定することができる。特に関心の対象とするのは、ヒト細胞に対して低い毒性を有する抗炎症性化合物についてのスクリーニングアッセイである。インビボ研究、投与後の薬物の局在化の測定、標識化インビトロタンパク質間結合アッセイ、タンパク質-DNA結合アッセイ、電気泳動移動度シフトアッセイ、タンパク質結合についての免疫アッセイなどを含む、多種多様のアッセイを、この目的のために使用してもよい。特定のアッセイに応じて、動物全体、またはそれに由来する細胞を使用してもよい。細胞は、動物から新しく単離してもよいし、または培養において不死化してもよい。

10

【0014】

本発明の別の態様において、IL-33薬物候補のインビボでの有効性および効力などの薬理学的効果の評価のために、該インビボモデルを使用する。従って、本発明の別の態様において、IL-33のN末端が欠失している本発明の非ヒト動物にIL-33薬物候補を投与する段階を含む、該IL-33薬物候補の薬理学的効果の評価のための方法が提供される。

【0015】

本発明はまた、同一または別の遺伝子型と繁殖させることにより得られる、本発明により提供されるようなIL-33のN末端が欠失している非ヒト動物の子孫に関連する。好ましくは、子孫は、同一の遺伝子型と繁殖させることにより得られる。該子孫は、上述のIL-33のN末端が欠失している非ヒト動物のようなIL-33のN末端欠失を含む。本発明のさらなる目的は、炎症性疾患のインビボモデルとしての該子孫の使用である。一つの態様において、該子孫を、抗炎症性化合物のスクリーニングのためのインビボモデルとして使用する。別の態様において、該子孫を、抗炎症性化合物の薬理学的効果の評価のためのインビボモデルとして使用する。

20

【0016】

さらに、本発明は、上述のようなIL-33のN末端が欠失している非ヒト動物またはその子孫に由来する、細胞株または初代細胞培養物に関連する。

【0017】

さらに、本発明はまた、上述のようなIL-33のN末端が欠失している非ヒト動物またはその子孫に由来する、組織もしくは器官外植片またはそれらの培養物を提供する。

30

【0018】

本発明はまた、上述のようなIL-33のN末端が欠失している非ヒト動物またはその子孫に由来する、組織または細胞抽出物を提供する。

【0019】

本発明の別の態様において、IL-33のN末端が欠失している非ヒト動物またはその子孫に由来する、上記の細胞株または初代細胞培養物、組織もしくは器官外植片またはそれらの培養物、組織または細胞抽出物を、炎症性疾患のモデルとして使用する。上記で概説したように、一つの態様において、該炎症性疾患のモデルを、抗炎症性化合物のスクリーニングのために使用し、別の態様において、該炎症性疾患のモデルを、抗炎症性化合物の薬理学的効果の評価のために使用する。

40

[本発明1001]

IL-33遺伝子のN末端が欠失している、非ヒト動物。

[本発明1002]

IL-33遺伝子のN末端のDNA結合ドメイン全体が欠失している、本発明1001の非ヒト動物

。

[本発明1003]

哺乳動物である、本発明1001または1002の非ヒト動物。

[本発明1004]

齧歯動物である、本発明1003の非ヒト動物。

50

[本発明1005]

非ヒト動物がマウスであり、かつ、IL-33遺伝子のN末端の欠失が、IL-33遺伝子の発現産物のアミノ酸1-67の欠失を含む、本発明1004の非ヒト動物。

[本発明1006]

同一または別の遺伝子型の動物と繁殖させることにより得られる、本発明1001～1005のいずれかの非ヒト動物の子孫。

[本発明1007]

本発明1001～1005のいずれかの非ヒト動物または本発明1006の子孫に由来する、細胞株または初代細胞培養物。

[本発明1008]

本発明1001～1005のいずれかの非ヒト動物または本発明1006の子孫に由来する、組織もしくは器官外植片またはそれらの培養物。

[本発明1009]

炎症性疾患のモデルとしての、本発明1001～1005のいずれかの非ヒト動物、本発明1006の子孫、本発明1007の細胞株もしくは初代細胞培養物、または本発明1008の組織もしくは器官外植片の使用。

[本発明1010]

抗炎症性化合物のスクリーニングのための、本発明1009の炎症性疾患のモデルの使用。

[本発明1011]

抗炎症性化合物の薬理学的効果の評価のための、本発明1009の炎症性疾患のモデルの使用。

[本発明1012]

本発明1001～1005のいずれかの非ヒト動物または本発明1006のその子孫に候補化合物を投与する段階を含む、抗炎症性化合物のスクリーニングのための方法。

[本発明1013]

本発明1001～1005のいずれかの非ヒト動物または本発明1006のその子孫に抗炎症性化合物を投与する段階を含む、該抗炎症性化合物の薬理学的効果の評価のための方法。

[本発明1014]

本質的に明細書において記載されるような、非ヒト動物、使用、および方法。

【発明を実施するための形態】【0020】

IL-33遺伝子のN末端などの、遺伝子における欠失を有する非ヒト動物を産生するための方法は、当技術分野において周知である。適当な方法は、すなわち、Hogan B et al: Manipulating the mouse embryo, A laboratory manual, 2nd Edition (1994), Cold Spring Harbor Laboratory Pressにおいて記載されている。

【0021】

本明細書において使用される「IL-33遺伝子」という用語は、DVS27 ; NF-HEV ; NFEHEV ; C9orf26 ; DKFZp586H0523 ; RP11-575C20.2 ; IL33、IL-1F11、9230117N10Rik、RGD1311155などとしても公知であるインターロイキン33遺伝子に、とりわけ関連する。該遺伝子は、推定上のDNA結合ヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフを有するN末端ドメイン、およびC末端サイトカインドメインを含む。IL33遺伝子は、ヒト、チンパンジー、イヌ、ウシ、マウス、およびラットにおいて保存されている。例として、マウスIL-33遺伝子のDNA配列を、SEQ ID. 1に示す。「IL-33遺伝子の発現産物」という用語は、IL-33遺伝子の翻訳されたタンパク質、すなわちIL-33タンパク質を指す。

【0022】

本明細書において使用される「IL-33のN末端欠失」は、IL-33遺伝子のN末端のすべてまたは一部が改変されている（例えば、置換、欠失、付加、および/もしくは挿入されている）かまたは破壊されており、それによりIL-33遺伝子の発現産物が、N末端ドメインの全体もしくは一部を欠如し、かつ/またはN末端ドメインの機能を呈さないことを意味する。本明細書において使用されるN末端ドメインは、IL-33のDNA結合および核局在化を担う

10

20

30

40

50

推定上のヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフを含む。好ましい態様において、非ヒト動物はマウスであり、かつ、マウスでのIL-33遺伝子発現産物（IL-33タンパク質）のアミノ酸1-67が改変または破壊されている。

【0023】

IL-33のN末端が欠失している非ヒト動物、またはIL-33遺伝子のN末端が欠損している非ヒト動物、またはIL-33のN末端の遺伝子ノックアウト非ヒト動物などのような非ヒト動物が、本明細書において示される。一つの特別な好ましい態様において、IL-33遺伝子のN末端の該改変は、DsRedカセットのノックインを通して達成され、従ってIL-33遺伝子のN末端部分を欠失させる。従って、該非ヒト動物はDsRed-IL33/COOH非ヒト動物とも呼ばれる。本明細書において使用される「野生型」という用語は、完全長IL-33遺伝子を有する非ヒト動物を指す。

10

【0024】

本明細書において記載される「非ヒト動物」は、ヒトではない任意の動物を指す。好ましくは、非ヒト動物は哺乳動物であり、より好ましくは、ラットまたはマウスなどの齧歯動物であり、最も好ましくは、非ヒト動物はマウスである。

【0025】

上述のIL-33のN末端が欠失している非ヒト動物は、炎症性疾患の処置のためのモデルとして使用することができる。それにより非ヒトインビボモデルにおいて炎症性疾患に対する潜在的に非炎症性の化合物の効果を調査することが可能になる。遺伝子導入動物は、遺伝子導入ヒトmAb11抗体について免疫寛容であるため、例えばMab 11などの治療用抗体での長期的処置の効果を決定することができる。また、細胞外IL-33レベルに対する効果、ならびに炎症性疾患の過程および動態を追跡することができる。

20

【0026】

本明細書において使用される「炎症性疾患」という用語は、炎症を特徴とする、任意の健康障害または異常機能状態に関連する。とりわけ、本明細書において使用される「炎症性疾患」という用語は、IL-33の増加したレベルに関連する疾患、例えば、炎症性腸疾患、関節リウマチ、じんましん、アテローム硬化性血管疾患、乾癬性大腸炎、潰瘍性大腸炎、急性好酸球性肺炎、重症喘息、突発性肺線維症、肝臓線維性疾患、アトピー性皮膚炎、全身性硬化症、自己免疫疾患などであるがそれらに限定されない疾患に関連する。

【0027】

本明細書において使用される「抗炎症性化合物」は、炎症性応答を減少させる、詳細には、IL-33の生物学的作用に影響を及ぼす能力を有する任意の分子を意味する。そのようなものとして、「抗炎症性化合物」は、低分子、（ポリ）ペプチド、（糖）タンパク質、抗体または抗体断片、（ポリ）または（オリゴ）ヌクレオチド、ヌクレオシド、脂質、それらの組み合わせ、およびそれらの改変された誘導体を含むが、それらに限定されない。「抗炎症性化合物」はまた、shRNA、マイクロRNA、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、spiegelmer、LNAもしくはPNAオリゴマー、またはそれらの組み合わせなどの、RNA干渉を媒介する分子も含む。本明細書において使用される推定上の抗炎症性化合物はまた、「IL-33薬物候補」または「候補化合物」とも示される。

30

【図面の簡単な説明】

40

【0028】

【図1】図1a：IL-33の標的変異の模式図。開始コドンにおいてDsRedカセットを挿入し、アミノ酸68位でIL-33と融合させた。図1b：ターゲティング戦略。RFP：赤色蛍光タンパク質；tm1：標的変異1；wt：野生型；マーカー：マーカーX（Roche）；kb：1キロ塩基対；EcoRI：制限エンドヌクレアーゼ部位；NeoR. ネオマイシン選択カセット；三角形：lox部位。

【図2】ヘテロ接合性DsRedIL-33/COOHノックインマウスの表現型。成長の遅延、逆立った毛皮。

【図3】ヘテロ接合性DsRedIL-33/COOHノックインマウスの表現型。器官形態。

【図4】ヘテロ接合性DsRedIL-33/COOHノックインマウスの表現型。野生型マウスと比較

50

した器官形態。SI：小腸；He：心臓；Th：胸腺；Ki：腎臓；Lu：肺；Sp：脾臓；Li：肝臓。Co⁺：胸腔における血液凝塊。

【図5】ヘテロ接合性DsRedIL-33/C00Hノックインマウスの表現型。回腸の肥厚。縦方向に切開した腸の組織標本。

【図6】FACS解析によるヘテロ接合性DsRedIL-33/C00Hノックインマウス（DsRedIL-33/C00H-KI）の表現型。表示した器官の細胞懸濁液を、以下の定義された表面マーカーに特異的な抗体で染色した：CD45（APC-Cy7標識）、全白血球；CD11b（アロフィコシアニン、APC標識）、マクロファージ；SiglecF（フィコエリトリンPE標識）、好酸球；Gr1（PE-Cy7標識）、顆粒球；F4/80（Alexa 488標識）、単球。染色した細胞を、FACS Canto I装置（BD Corp.）を用いて捕捉し、FlowJoソフトウェアで解析した。Y軸：SiglecF、X軸：F4/80。図は、様々な細胞集団の染色の重ね合わせを示し、DsRedIL-33/C00Hノックインマウスは、SiglecFおよびF4/80の高発現により判定されるように、好酸球の増加を有する（印をつけた集団を参照されたい、「Eos」=好酸球）。

10

【図7】ヘテロ接合性DsRedIL-33/C00Hノックインマウスの表現型。血清IL-33レベル。

【実施例】

【0029】

実施例が本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではないとの条件で、本発明を次により詳細に、実施例によって説明する。

【0030】

実施例1：ターゲティングベクターの作製：

20

ターゲティングベクター（SEQ ID. NO. 2）を、Gene Bridges GmbH, Heidelbergにより供給されるようリコンビニアリング（recombineering）技術を用いて作製した。ベクターは、以下の要素を含有する。

1-70	IL-33エクソン1b
71-3871	イントロン
3872-3882	IL-33エクソン2
3883-4557	dsRedモノマーCDS
4558-4579	IL-33エクソン3
4580-4590	イントロン配列
4591-4626	lox部位
4625-6040	ネオマイシン選択カセット
6041-6074	lox部位
6075-6571	イントロン配列
6572-6682	IL-33エクソン4
6683-7285	イントロン
7286-7603	pBluescript SKII+
7604-8463	ジフテリア毒素選択カセット
8464-10697	pBluescript SKII+

30

【0031】

ターゲティングベクターを、BALB/c ES細胞における相同組み換えのために使用した。PCRスクリーニング戦略（オリゴヌクレオチドの配列は下記を参照されたい）を用いて、陽性クローンを同定した。Cre発現プラスミドのエレクトロポレーション後に、部位特異的な組み換えによりインビトロでネオマイシン選択カセットの除去がもたらされる。ES細胞クローンの胚盤胞注入の後、キメラ動物を繁殖させて、F1およびF2世代の生検材料のDNA調製物を使用し、PCR（図1bにおけるPCR AB、CD、EF、およびEFG）を用いて標的変異の同定および遺伝子型決定を確認した。

40

オリゴヌクレオチド

オリゴヌクレオチドA: TAG AAA GAG CCC AGT GTT AAG C (SEQ ID. NO. 3)
 オリゴヌクレオチドB: GGC TTG CCC TCG CCC TCG (SEQ ID. NO. 4)
 オリゴヌクレオチドC: CAC CTG CGA CTT CAA GAC C (SEQ ID. NO. 5)
 オリゴヌクレオチドD: ACG ATT CCT TAG TGA TGG GGC (SEQ ID. NO. 6)
 オリゴヌクレオチドE: GTT GCT TCT GAT GAC TTC AGG (SEQ ID. NO. 7)
 オリゴヌクレオチドF: GCA ATA GCC CTT GCC AAG GC (SEQ ID. NO. 8)
 オリゴヌクレオチドG: TGC TGT TCC AGC CTC TGT TGG (SEQ ID. NO. 9)

10

【 0 0 3 2 】

実施例2：IL-33N末端ノックアウトマウスの作製

2種のBalb/cバックグラウンドに遺伝子改変したノックインマウスモデルを作製した。第1の変異体は、N末端の細胞内転写因子様活性を標的として蛍光色素DsRedモノマーでインフレーム置換し(DsRed-IL33/COOH)、機能的なサイトカインドメインは完全に保持する(図1)。第2の変異体は、炎症誘発性サイトカインドメインを蛍光色素DsRedでのインフレームノックインにより置換し、DNA結合ドメインは無傷のまま保持する(NH2/L33-DsRed)。

【 0 0 3 3 】

実施例3：IL-33N末端ノックアウトマウスの特徴決定

20

予想外に、IL-33N末端ドメインを失っているが細胞質中の有効な炎症誘発性サイトカイン活性を維持している、遺伝子操作したヘテロ接合性変異体マウス(DsRed-IL33/COOH)は、生後4か月ごろに死亡した。それらは、出生時明らかに正常であり、進行的に病気になり、4~5か月後に約60%の推定表現型浸透率で最終的に瀕死状態になる。生後3~4か月で、これらの変異体は、耳における血性病変および肥大した腹部を示し始める。剖検時には、大量の脾腫、腸炎症を示唆する回腸(ileum)の肥厚、胸腔における大きな凝塊の存在、および腎萎縮症が、繰り返し観察される(図2~5)。FACS解析における様々な器官のより精密な検査により、肺、脾臓、リンパ球、パイエル板、および末梢血における強度の好酸球増加が示された(図6)。血清IL-33レベルは、DsRed-IL33/COOHノックアウトマウスにおいて上昇している(図7)。

30

【 0 0 3 4 】

考察

本発明者らは、最近、IL-33の鼻腔内投与が、間質におけるマクロファージ起源の多核巨細胞を伴う重度の肺炎を誘発することを見出した(準備中のHicksらの原稿)。同様に、IL-33はまた、組織病理学により示されるように、骨髓性/顆粒球性細胞の大きなクラスターを伴う骨髓過形成も誘発した(準備中のHicksらの原稿)。さらに、高レベルの可溶性IL-33が、これらのマウスの末梢血の血漿中に見出され、本発明者らのDsRed-IL33/COOH変異体動物において見られる免疫病理学的効果が、細胞質中の完全に活性を有するDsRed-IL33/COOHサイトカインの連続的な存在および細胞外区画中へのその可能性のある放出の結果であり、従って仮定されているように強力な内因性DAMPシグナルとして挙動することを、強く示唆する。

40

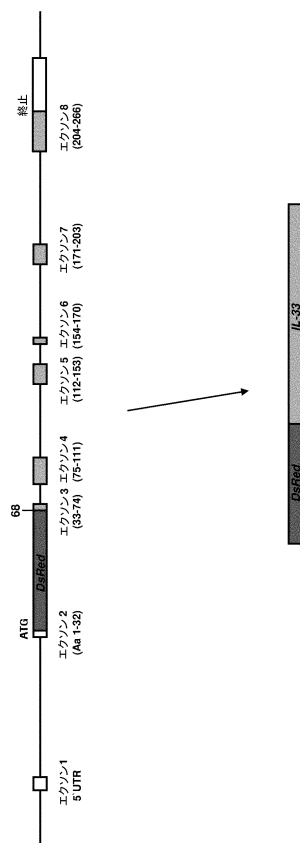
【 0 0 3 5 】

従って、IL-33のN末端ドメインをノックアウトするこの「アラミン」様効果は、組織損傷、壊死、または自己免疫後に強力な危険シグナルが放出される際のヒト免疫病理学的状態(その診断は未知のままである)と類似している。IL-1RAをコードする遺伝子のホモ接合性変異または欠失を有しかつそれがmAbにより遮断される患者における重症の多臓器炎症の発生は、多くの自己炎症性疾患におけるIL-1 およびIL- の中心的な役割を実証している(Weber et al, Science signaling, 3, 2010)。恐らく、IL-33の遺伝的変異は、この「危険」と予想される分子の過剰発現および/または分泌をもたらす可能性があり、自己炎症性またはアレルギー性疾患の病因論に貢献する可能性がある。まさに、IL-33

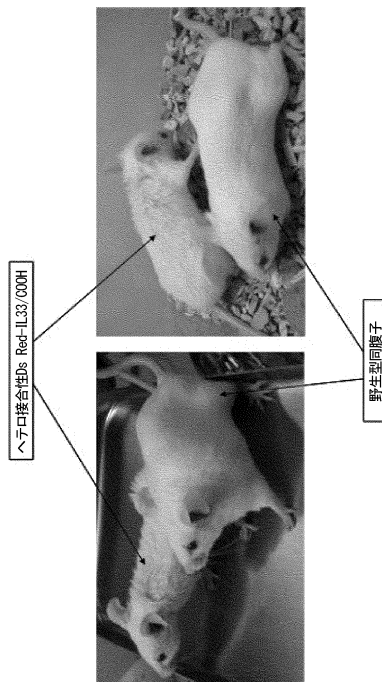
50

遺伝子における多型およびより高いIL-33レベルとスギ花粉症の罹病性との間の正の関連が、最近示されている (Sakashita et al. Clin. Exp. Allergy Dec 2008)。

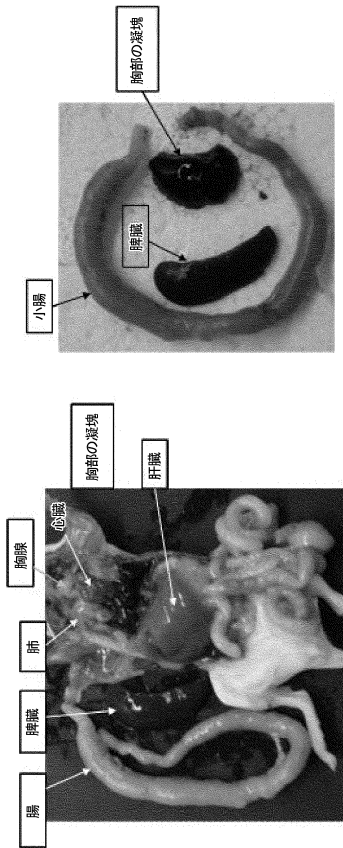
【図 1】



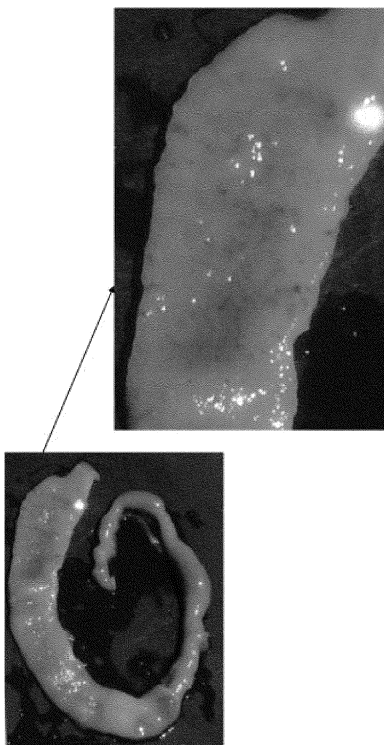
【図 2】



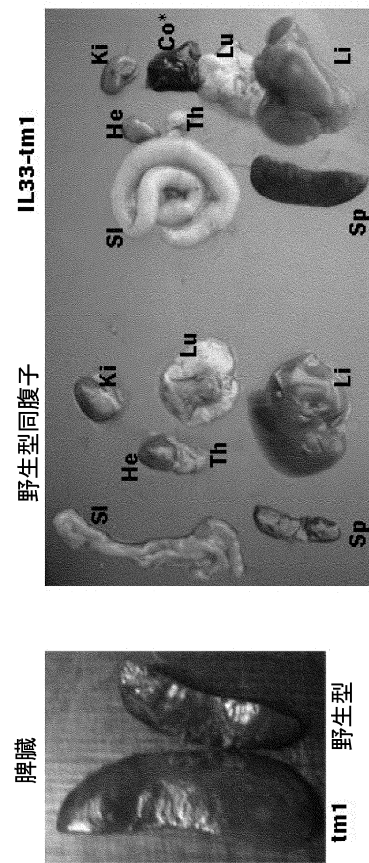
【図 3】



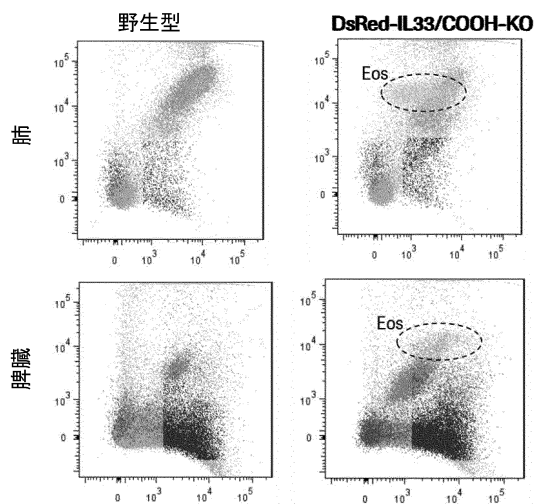
【図 5】



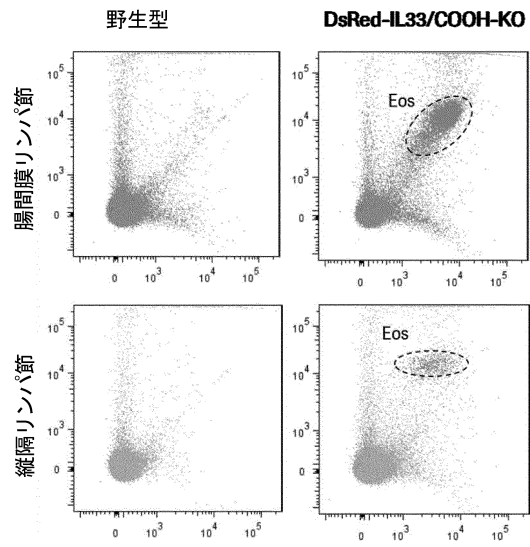
【図 4】



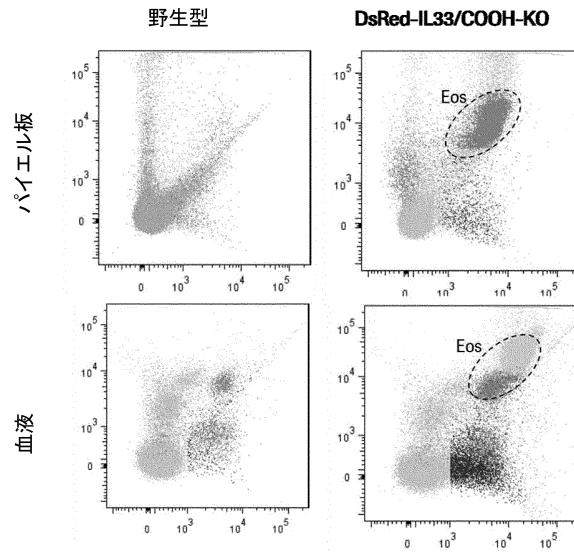
【図 6 - 1】



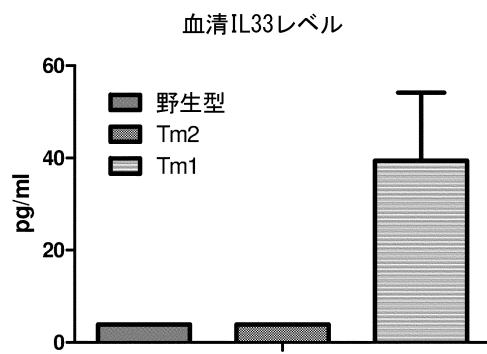
【図 6 - 2】



【図 6 - 3】



【図 7】



【配列表】

0006109740000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一
- (74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光
- (74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一
- (74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦
- (74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
- (74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘
- (74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥
- (72)発明者 コテ シエラ ハビエル
アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 チャペル ヒル サリックス ストリート 122
- (72)発明者 イグレスias アントニオ
ドイツ連邦共和国 フライブルク ブロンバークシュトラッセ 15
- (72)発明者 マイヤー クラス アイコ
スイス連邦 バーゼル ロスリンガーシュトラッセ 37

合議体

審判長 中島 庸子
審判官 山崎 利直
審判官 長井 啓子

(56)参考文献 PNAS, 2007年, Vol. 104, No. 1, p. 282-287

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC C12N 15/00
CAPLUS
MEDLINE
BIOSIS
EMBASE(STN)
JSTplus
JMEDplus
JST7580(JDreamIII)