

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年2月4日(04.02.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/017039 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/070798
- (22) 国際出願日: 2014年7月31日(31.07.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: 株式会社トランスジェニック(TRANS-GENIC INC.) [JP/JP]; 〒8620976 熊本県熊本市中央区九品寺二丁目1番24号 Kumamoto (JP). 国立大学法人熊本大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号 Kumamoto (JP). 国立大学法人群馬大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION GUNMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 Gunma (JP).
- (72) 発明者: 山村 研一(YAMAMURA, Kenichi); 〒8608555 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 岩脇 隆夫(IWAWAKI, Takao); 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 国立大学法人群馬大学内 Gunma (JP). 及川 大輔(OIKAWA,

Daisuke); 〒3718510 群馬県前橋市荒牧町四丁目2番地 国立大学法人群馬大学内 Gunma (JP). 石川智夫(ISHIKAWA, Tomoo); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町7丁目1番14株式会社トランスジェニック内 Hyogo (JP).

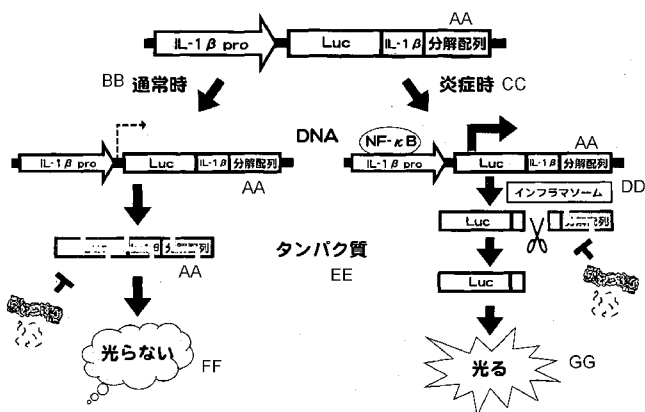
- (74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ

[続葉有]

(54) Title: INFLAMMATION REPORTER SYSTEM

(54) 発明の名称: 炎症レポーターシステム

図 3



- AA Decomposition sequence
- BB Normal state
- CC Inflammatory state
- DD Inflammasome
- EE Protein
- FF Non-luminescent
- GG Luminescent

(57) Abstract: A method for detecting an inflammatory reaction characterized by comprising using a transformant or transgenic non-human animal, which carries a vector introduced thereto, said vector comprising promoter of a gene encoding an inflammatory cytokine, a gene encoding a reporter protein, the gene encoding the aforesaid inflammatory cytokine and a gene encoding a protein decomposition signal sequence, and detecting the inflammatory reaction induced by an inflammatory stimulus in the aforesaid transformant or transgenic non-human animal.

(57) 要約: 炎症性サイトカインをコードする遺伝子のプロモーター、レポータータンパク質をコードする遺伝子、前記炎症性サイトカインをコードする遺伝子、及びタンパク質分解シグナル配列をコードする遺伝子を含むベクターが導入された形質転換体又はトランスジェニック非ヒト動物を用いて、炎症性刺激により当該形質転換体又はトランスジェニック非ヒト動物に惹起される炎症反応を検出することを特徴とする炎症反応の検出方法。

WO 2016/017039 A1

(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：炎症レポーターシステム

技術分野

[0001] 本発明は、炎症反応の検出方法に関する。

背景技術

[0002] 炎症反応は多くの疾患の症状とも深く関連する生体反応のひとつであり、それらの病態を理解したり、その治療戦略を考案したりする上で重要な研究対象になっている。それゆえに炎症の実態を検出できる技術の開発は不可欠である。

一般的な炎症反応は、次のメカニズムにより起こることが解明されている。すなわち、細菌やウイルスなどの感染源が体内に侵入すると、感染源は細胞表面の受容体で感知されサイトカインの分泌が起こる。そのサイトカインを指標にしてマクロファージなどの免疫細胞が感染部位に遊走され、感染源を撃退する。その撃退時の免疫細胞による活発な働きから、炎症時に特有の発赤、発熱、疼痛、腫脹が起こるとされている。

[0003] この炎症反応に大きく関わり、炎症マーカーとしても注目されるサイトカインとして、インターロイキン-1ベータ (IL-1 β) が知られている。IL-1 β は、炎症刺激がない時には殆ど分泌されないが、炎症刺激により各組織において、非常に高いレベルで産生、分泌されることが知られている (図1)。

IL-1 β は、以下の特徴的な二段階の制御により厳密に調節されることも分かっている。IL-1 β の遺伝子発現は、炎症反応によって惹起される転写因子NF- κ Bにより活性化され、IL-1 β 遺伝子発現の活性化に伴い、前駆型であるproIL-1 β の産生が促進される。その後、proIL-1 β はインフラマソームで活性化されたカスパーゼによって切断を受け、分泌可能な成熟型IL-1 β に変換される (図2)、というものである。

[0004] ルシフェラーゼや赤色蛍光蛋白質をレポーター分子としたIL-1 β 遺伝子発現のモニタリングについては、既に報告がある (非特許文献1, 2)。これら

の報告では、レポーター分子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、その炎症モデルにおいて、レポーターシグナルを検出でき、生体イメージング解析にも利用可能であることを示している。しかしながら、この方法では、炎症反応のカスケードの1因子である転写制御だけに頼っており、生理的な炎症反応のモニタリングとしては不十分であると考えられる。

また一方、インフラマソームで制御されるレポーターシステムについても報告されている(非特許文献3)。この報告では、非炎症時には凝集構造をとることで不活性状態となっているレポーター分子が、炎症刺激によりインフラマソームが機能することで単量体化して活性を示すように設計されている。しかし、これもインフラマソームだけに頼っており、感度としては十分でなく、また、このシステムは、生体マウスにおいて機能するかどうかについての検証がなされていない。

[0005] 他方、各種の生体内刺激又は外部刺激、例えば酸化ストレスや小胞体ストレスによりタンパク質の発現を行い、その現象を可視化する試みも行われている(特許文献1、2、非特許文献4、5)。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開2012/099279号パンフレット

特許文献2：特許第4446057号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Li L. et al “Functional imaging of interleukin 1 beta expression in inflammatory process using bioluminescence imaging in transgenic mice” BMC Immunol., vol. 9., 49 (2008)

非特許文献2：Matsushima H. et al “Intravital imaging of IL-1beta production in skin” J. Invest. Dermatol., vol. 130, 1571-1580 (2010)

非特許文献3：Bartok E. et al “iGLuc: a luciferase-based inflammasome and protease activity reporter” Nat. Methods., vol. 10., 147-154 (2013)

非特許文献4 : Scientific Reports 2012;2:229. Epub 2012 Jan 19.

非特許文献5 : Nature Medicine 10, 98102 (1 January 2004)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明では、特に生体内の微小領域における局所的な炎症反応を、高効率・高感度に検出・測定できる技術を提供することを目的とする。また、本検出方法を容易に利用できるようにするための遺伝子ベクター、さらには、*in vivo*での研究開発に使用できるようにするため、本レポーターシステムの遺伝子ベクターを導入したトランスジェニックマウスを提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、IL-1 β 遺伝子とインフラマソームにより二段階で制御される炎症反応のメカニズムを利用することで、生理的な炎症反応のモニタリングを高効率・高感度に行うことができるレポーターシステムを構築できることを見出し、その方法とこの方法を搭載した遺伝子ベクター及び、トランスジェニックマウスを構築することで、本発明を完成した。

すなわち、本発明は以下の通りである。

- [0010] (1) 炎症性サイトカインをコードする遺伝子のプロモーター、レポータータンパク質をコードする遺伝子、前記炎症性サイトカインをコードする遺伝子、及びタンパク質分解シグナル配列をコードする遺伝子を含むベクター。
- (2) 炎症性サイトカインがインターロイキン1 β である(1)に記載のベクター。
- (3) レポータータンパク質がルシフェラーゼである(1)又は(2)に記載のベクター。
- (4) 炎症性サイトカインをコードする遺伝子は、カスパーゼにより認識されるペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むものである(1)～(3)のいずれか1項に記載のベクター。

(5) 前記(1)～(4)のいずれか1項に記載のベクターを含む形質転換体。

(6) 前記(1)～(4)のいずれか1項に記載のベクターが導入されたトランスジェニック非ヒト動物。

(7) 非ヒト動物がマウスである(6)に記載のトランスジェニック非ヒト動物。

(8) 炎症性刺激によりレポータータンパク質が発光シグナルとして検出される、(5)に記載の形質転換体又は(6)若しくは(7)に記載のトランスジェニック非ヒト動物。

(9) 前記(5)に記載の形質転換体又は(6)～(8)のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物を用いて、炎症性刺激により当該形質転換体又はトランスジェニック非ヒト動物に惹起される炎症反応を検出することを特徴とする炎症反応の検出方法。

(10) 炎症性サイトカインをコードする遺伝子は、炎症反応により惹起される転写因子NF- κ Bにより発現されるものである、(9)に記載の方法。

(11) 炎症性刺激によりレポータータンパク質を発光シグナルとして検出する、(9)又は(10)に記載の方法。

(12) 前記(5)に記載の形質転換体又は(6)～(8)のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物に、炎症性刺激下で候補物質を接触させ、炎症反応の有無を指標として抗炎症物質を選択することを特徴とする抗炎症物質のスクリーニング方法。

(13) 前記(5)に記載の形質転換体又は(6)～(8)のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物を含む、炎症反応検出用又は抗炎症物質のスクリーニング用キット。

発明の効果

[0011] 本発明により、炎症反応のモニタリングを高効率・高感度に行うことができるレポーターシステムが提供される。本発明のシステムは、炎症反応を可視化することができ、感度及び効率が極めて高い。

図面の簡単な説明

- [0012] [図1]リポポリサッカライド (LPS) による炎症刺激後のIL-1 β 値の変化を示す図である。 使用LPS：シグマ#L2654、使用濃度：3～4 $\mu\text{g}/\text{g}$ 体重
- [図2]IL-1 β の産生及び分泌制御機構を示す図である。
- [図3]IL-1 β を利用した炎症レポーターシステムの構築を示す図である。
- [図4]レポーター遺伝子を一過的に導入したRAW264でのレポーター活性を示す図である。 使用LPS：シグマ#L2654、使用濃度：2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- [図5]LPS刺激後の炎症レポーターマウスから発するシグナルを示す図である。 使用LPS：シグマ#L2654、使用濃度：3～4 $\mu\text{g}/\text{g}$ 体重
- [図6]レポーター遺伝子を一過的に導入したRAW264でのレポーター活性を示す図である。 使用LPS：シグマ#L2654、使用濃度：2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、処理時間：48 h
- [図7]本発明のベクターの構築図である。
- [図8]マウスの系統間におけるLPS刺激前後のレポーターシグナルを比較した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明を詳細に説明する。

1. ベクター等及び検出方法

本発明において使用されるベクターは、複数の遺伝子を連結した融合遺伝子を含むものであり、炎症性サイトカインをコードする遺伝子のプロモーター制御下で、レポーター分子、カスパーゼ認識配列及びタンパク質分解シグナル配列の融合タンパク質を発現するものである。

本発明において、「炎症性サイトカイン」とは、細菌などの抗原などによって活性化されたヘルパーT細胞、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞などから産生されるサイトカインであり、マクロファージやその他の免疫系細胞、血管内皮細胞、破骨細胞を活性化するサイトカインである。このような炎症性サイトカインとして、例えばIL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18、腫瘍壊死因子(TNF)などが挙げられる。炎症性サイトカインを

コードする遺伝子は、炎症反応により惹起される転写因子NF- κ Bにより発現される。

[0014] 本発明においては、これらの炎症性サイトカインをコードする遺伝子又はその部分配列を使用することができる。上記炎症性サイトカインをコードする遺伝子及びこれらの遺伝子のプロモーターの情報は公知である。部分配列は、炎症応答性を有する限り特に長さ限定されるものではなく、炎症応答性発現増強や炎症応答性プロセッシングなどを指標として長さ及び領域を決定することができる。

[0015] IL-1 β : アクセション番号NM_008361.3
IL-6 : アクセション番号NM_031168.1
IL-8 : アクセション番号NM_009140.2
IL-12 : アクセション番号NM_001159424.1
IL-13 : アクセション番号NM_008355.3
IL-17 : アクセション番号NM_010552.3
IL-18 : アクセション番号NM_008360.1
TNF : アクセション番号NM_001278601.1
IL-1 β プロモーター : アクセション番号NC_000068.7
IL-6 プロモーター : アクセション番号NC_000071.6
IL-8 プロモーター : アクセション番号NC_000071.6
IL-12 プロモーター : アクセション番号NC_000069.6
IL-13 プロモーター : アクセション番号NC_000077.6
IL-17 プロモーター : アクセション番号NC_000067.6
IL-18 プロモーター : アクセション番号NC_000075.6
TNF プロモーター : アクセション番号NC_000083.6

[0016] 本明細書では、説明の便宜上IL-1 β を例に説明する。

IL-1 β 遺伝子のプロモーター下流にレポーター遺伝子を連結し、その下流に例えばIL-1 β 部分配列と蛋白質分解シグナル配列を付加した遺伝子コンストラクトを作製する。IL-1 β 部分配列においてコードされるペプチドリンカ

ーにはカスパーゼにより認識される配列（カスパーゼ認識配列）を含む。そして、当該IL-1 β 部分配列によりコードされるペプチドリンカーは、インフラマソームと呼ばれるタンパク質複合体により活性化されたカスパーゼ（カスパーゼ-1）が作用する領域であり、カスパーゼにより当該ペプチドリンカーが切断される。

[0017] このような遺伝子コンストラクトを持つ細胞において、炎症レポーターシステムを示す概要を図3に示す。図3は炎症性サイトカインとしてIL-1 β を例示し、レポーター分子としてルシフェラーゼ（Luc）を例示したものである。もちろん、炎症性サイトカイン及びレポーター分子は図3に示すIL-1 β 及びLucに限定されるものではない。

図3において、炎症刺激がない場合には、IL-1 β 遺伝子プロモーターが作動しないので、レポーター遺伝子の発現は活性化されることはない。仮に、発現がリークしたとしても、やはり炎症刺激がないためインフラマソームが働かず、発現したレポーター分子-カスパーゼ認識配列-蛋白質分解シグナル配列からなる融合蛋白質は、その蛋白質分解シグナル配列の作用により、積極的にユビキチン-プロテアソーム系で分解されることになる。

他方、炎症刺激がある場合、転写因子であるNF- κ Bによりプロモーターが作動することでレポーター遺伝子の発現は活性化され、産生されたレポーター分子は、インフラマソームによるカスパーゼの活性化により蛋白質分解シグナル配列から切り離され、レポーター分子それぞれ単独で安定化し、レポータータンパク質の発光シグナル（レポーターシグナル）として高レベルで検出することができる。この検出結果は可視化され、モニターに表示された画像により確認することができる。

[0018] 本発明の一態様においては、IL-1 β 遺伝子のプロモーター制御下で、レポーター分子と、カスパーゼ認識配列（IL-1 β のアミノ酸配列の一部を構成する）と、蛋白質分解シグナル配列との融合蛋白質を発現する構造とした遺伝子ベクターを、マウス由来マクロファージ様細胞RAW264株に一過的に導入した。この細胞株の培養液中に、大腸菌細胞膜構成成分であるLPS（Lipopolysa

ccharide, リポ多糖) を添加すると、有意なレポーター活性の上昇が認めることができる (図4)。

また、当該遺伝子ベクターをC57BL/6系統の前核期受精卵にインジェクションすることにより、トランスジェニックマウスを作製した。このトランスジェニックマウスの腹腔内にLPSを投与することで炎症刺激を与え、投与直後と、4時間後、24時間後のルシフェラーゼの発光シグナルの変化を生体イメージング装置で検出する。全身の組織において、炎症反応に依存する発光が観察することができる (実施例、図5)。

レポータータンパク質 (レポーター分子) としては、例えば、ルシフェラーゼ、GFP (緑色蛍光蛋白質)、DsRed (赤色蛍光蛋白質)、LacZ (β -ガラクトシダーゼ) などを利用することができ、また、遺伝子ベクターもプラスミドDNA、ウイルスベクターなどの形態をとることができるが、本発明はこれに限定されるものではない。

[0019] これらのレポータータンパク質をコードする遺伝子は公知であり、国内外のバイオ試薬メーカーなどから入手することができる。

「タンパク質分解シグナル配列」とは、E3リガーゼにより積極的にポリユビキチン化され、結果としてプロテアソームにより消化されやすい配列を意味し、本発明において使用されるタンパク質分解シグナル配列として、GL1配列やPEST配列などが挙げられる。これらのタンパク質分解シグナル配列をコードする遺伝子は公知であり、国内外のバイオ試薬メーカーなどから入手することができる。

[0020] 本発明の形質転換体は、遺伝子ベクターを宿主に導入することにより得ることができる。

遺伝子ベクターを導入する宿主も特に限定はされず、原核生物 (大腸菌、乳酸菌等) や真核細胞 (酵母) 等の単細胞生物であってもよく、また、ヒト由来細胞 (HeLa, HEK293等) やマウス由来細胞 (NIH3T3等) の株化培養細胞、あるいはその他の動物細胞も使用できる。プロモーター直下に上記遺伝子を連結する方法は周知である (Molecular Cloning: A Laboratory Manual (4

th Edition)、Gold Spring Harbor Laboratory Press (2012))。遺伝子ベクターの宿主への導入は、電気穿孔法(エレクトロポレーション)、市販のリポフェクション試薬を用いたリポフェクション法、ウイルスベクターによる方法など、広く公知の方法によって実施することができる(上記Molecular Cloning等を参照のこと)。

[0021] 本レポーター遺伝子ベクターを導入したトランスジェニック非ヒト動物は、マウス、ラット、イヌ、サル、ヤギなどで作製することができるが、これらの非ヒト動物に限定されるものではない。トランスジェニック非ヒト動物は、それぞれの動物の受精卵に、マイクロインジェクターを用いて遺伝子ベクターDNAを注入することで作製できるし、あるいは、相同組換え法により胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)を樹立してから、トランスジェニック動物を作製することもできる。マイクロインジェクション法などはいずれも当該技術分野の当業者にとって容易に実施できる公知の方法である(上記Molecular Cloning等を参照のこと)。

本発明において使用されるトランスジェニック非ヒト動物は、個体に限定されるものではなく、当該トランスジェニック非ヒト動物由来の生体材料、例えば細胞、器官、組織、胚などを使用することもできる。

[0022] 2. スクリーニング方法

本発明において、抗炎症物質の候補となる被検物質(候補物質)は、特に限定されるものではなく、例えば、ペプチド、タンパク質、DNA、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液などが挙げられ、これら化合物は新規化合物であってもよいし、公知化合物であってもよい。これら被検物質は塩を形成していてもよく、被検物質の塩としては、生理学的に許容される酸(例えば無機酸など)や塩基(例えば有機酸など)などとの塩が用いられ、生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。被検物質は、単一の物質を独立に試験しても、混合物(ライブラリーなどを含む)について試験をしてもよい。複数の被検物質を含むライブラリーとしては、合成化合物ライブラリー(コンビナトリアルライブラリーなど)、ペプチドラ

イブラリー（コンビナトリアルライブラリーなど）などが挙げられる。

[0023] 本発明においては、トランスジェニック非ヒト動物に炎症性物質を投与して（炎症性刺激を与えて）炎症反応を惹起させ、この動物に被検物質を接触させて炎症反応の抑制効果を調べる態様、及びトランスジェニック非ヒト動物に被検物質を接触させた後に炎症性物質を投与して炎症反応を惹起させ、この動物における炎症反応の抑制効果を調べる態様がある。どちらの態様も、炎症反応の抑制効果が得られた被検物質は、炎症性疾患（例えば感染症、リウマチ、アレルギー）の治療薬又は予防薬、すなわち抗炎症剤として選択することができる。

[0024] 被検物質投与の対象となるトランスジェニック非ヒト動物（被検動物）及び対照動物としては、特に限定されるものではないが、通常、同種の非ヒト動物を用いる。また被験動物及び対照動物は、同性及び同齢の動物を用いることがより好ましい。

本発明において、形質転換体を使用する場合は、形質転換体に被検物質を接触させた後、この形質転換体に炎症性物質を接触させて炎症反応の抑制効果を調べる態様、及び形質転換体に炎症性物質を接触させて炎症反応を惹起し、この形質転換体に被検物質を接触させて炎症反応の抑制効果を調べる態様がある。

炎症反応を抑制するかどうかは、炎症性刺激によりレポータータンパク質が発光シグナルとして検出されるか否かを指標とし、得られる検出結果を指標として抗炎症物質を選択する。

[0025] 「接触させる」とは、被検物質を非ヒト動物に投与する態様、被検物質を形質転換体又は生体材料に添加する態様、被検物質の存在下で培養する態様などがある。トランスジェニック非ヒト動物自体に被検物質を接触させるには、被検物質をこれらの動物に注射等により接種すればよい。被検物質を形質転換体又は生体材料に添加する態様は、細胞の培養物に被検物質を添加すること、組織や器官等に被検物質を添加することなどが挙げられる。「培養物」とは、細胞、培養液、細胞抽出物のいずれをも意味する。「被検物質の

存在下で培養する」とは、細胞と被検物質とが接触する条件下で培養することを意味し、被検物質の上記細胞等との接触は、例えば、細胞培養培地又は各種緩衝液（例えば、HEPES緩衝液、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、トリス塩酸緩衝液など）の中に被検物質を添加して、細胞を一定時間インキュベートすることにより実施することができる。

培養物中に添加される被検物質の濃度は化合物の種類（溶解度、毒性等）により異なるが、例えば、100ng/ml～10μg/mlの範囲で適宜選択される。インキュベート時間としては、例えば、4～48時間が挙げられる。

[0026] 3. キット

本発明は、炎症性サイトカインをコードする遺伝子のプロモーター、レポータータンパク質をコードする遺伝子、前記炎症性サイトカインをコードする遺伝子、及びタンパク質分解シグナル配列をコードする遺伝子を含むベクターが導入された形質転換体又はトランスジェニック非ヒト動物を含む、炎症反応検出用又は抗炎症物質のスクリーニング用キットを提供する。

本発明の形質転換体又はトランスジェニック非ヒト動物を炎症性疾患や炎症反応の検出薬として用いる場合には、上記形質転換体又はトランスジェニック非ヒト動物を他の試薬、例えば、蒸留水、緩衝試薬、炎症惹起物質、使用説明書などを含めることができる。

実施例

[0027] 以下、実施例により本発明を具体的かつ詳細に説明するが、これらは、本発明の範囲を限定するものではない。

[0028] 遺伝子ベクターの構築

マウス由来IL-1β遺伝子上流約5kbpの領域を、マウス由来細胞から抽出したゲノムDNAを材料としてクローニングした。クローニング領域の直下にHSV由来のTK遺伝子プロモーターを融合し、この融合プロモーターの下流にPhotinus pyralis由来 改変型ルシフェラーゼ (GL4, 約1.7kbp)、さらにその下流にマウス由来 IL-1βの部分配列 (17-216aa) をコードする塩基配列、さらにその下流にGL1(Saccharomyces cerevisiae由来)-PEST(マウス由来)配列、SV4

0由来ポリA配列を接続したベクター（図7）（配列番号1）を構築した。

IL-1 β 遺伝子のクローニングは以下の通り行った。

[0029] マウス由来IL-1 β 遺伝子の上流約5kbpの領域について

全領域を4部分に分割して、それぞれPCR法を用いてクローニングした。いずれの部分においても使用したPCRキットはPrime Star (Takara)、鋳型DNAはマウスES細胞由来ゲノムDNA、反応条件は98°C ; 10秒、55°C ; 5秒、72°C ; 2分の35回サイクルである。使用プライマーは部分ごとに異なり、以下の通りである。

第1部分

5側プライマー ; aaaactagttcgtcttttgagaaagtcagggcag (配列番号2)

3側プライマー ; gaataggcatcgataaacaagattc (配列番号3)

第2部分

5側プライマー ; gaatcttgtttatcgatgcctattc (配列番号4)

3側プライマー ; aaactcgaggcacatgcatgaagacgaatggcc (配列番号5)

第3部分

5側プライマー ; aaactcgagatgcatgtgccttcctccaaatc (配列番号6)

3側プライマー ; gtaggagctagcccgggtgagtag (配列番号7)

第4部分

5側プライマー ; aaaactagttcgtcttttgagaaagtcagggcaggaac (配列番号8)

3側プライマー ; aaaactagtcacaaggaagcttggtggagaggatc (配列番号9)

なお、各部分の連結はClaIサイト、EcoT22Iサイト、SmaIサイトを用いて行った。

[0030] マウス由来 IL-1 β 遺伝子の部分 (17-216aa) 領域について

全領域を一割してPCR法を用いてクローニングした。使用したPCRキットはPrime Star (Takara)、鋳型DNAはマウス胎盤由来の逆転写産物、反応条件は98°C ; 10秒、55°C ; 5秒、72°C ; 1分の35回サイクルである。

使用プライマーは5側プライマー ; aaaggtaccgatgagaatgacctgttctttg (配列番号10)、3側プライマー ; aaactcgagaaaccgtttttccatcttcttc (配列番号11)

号11)である。

[0031] 培養細胞への一過的導入

上記の通り構築した遺伝子ベクターを、マウス由来マクロファージ様細胞RAW264株に一過的に導入した。

トランスフェクションには、Effectene (Qiagen) を用い、トランスフェクション後24時間の細胞を回収して実験に供試した。一過的な発現細胞の培養液に、2 μ g/mLの濃度でLPS (Sigma #L2654) を添加し、添加後48時間のルシフェラーゼ発光量を、ルミノメーターで定量測定した。対照として、LPS無添加群を設けた。また、従来型のIL-1 β 遺伝子発現のみを検出するレポーターシステムとして、IL-1 β 遺伝子のプロモーター下流にGL4を接続したベクターを作製し、これをトランスフェクション処理した細胞で同様に試験を行った。

[0032] その結果、図6に示すレポーターシグナルが得られた。本発明のベクター、従来型のベクターいずれを導入した細胞でも、LPS刺激により有意なレポーターシグナルの上昇が認められた。しかし、その感度においては、本発明品は従来型のものより2倍以上向上していた。

[0033] トランスジェニックマウスの作製

切り出し精製した遺伝子ベクターを、C57BL/6系統のマウスから採取した前核期受精卵200個にインジェクションし、71匹の産子を得た。産子の体組織から抽出したゲノムDNAを用いて遺伝子型を解析し、ゲノムに遺伝子ベクターが挿入されているファウンダーマウス18匹を得た。ファウンダーマウス4匹それぞれを野生型C57BL/6系統マウスと交配させ、F1世代マウスを作出し、LPS (Sigma #L2654) を腹腔内に投与したときのレポーター分子の反応を調べた。

その結果、系統番号No. M1の個体において、最もS/N比に優れており、この系統を炎症レポーターマウスとして確立した。(図8)。

[0034] トランスジェニックマウスを用いた炎症反応の可視化

確立した炎症レポーターマウスの腹腔内に、3 mg/kg wtの濃度でLPS (Sigma #L2654) を投与した。投与後0h、4h、24時間に生体イメージング装置 (IVI

S) を用いて、ルシフェラーゼ発光を観察した。その結果、全身の組織から、ルシフェラーゼの発光シグナルを捉えることができた（図5）。

配列表フリーテキスト

[0035] 配列番号1～11：合成DNA

請求の範囲

- [請求項1] 炎症性サイトカインをコードする遺伝子のプロモーター、レポータータンパク質をコードする遺伝子、前記炎症性サイトカインをコードする遺伝子、及びタンパク質分解シグナル配列をコードする遺伝子を含むベクター。
- [請求項2] 炎症性サイトカインがインターロイキン1 β である請求項1に記載のベクター。
- [請求項3] レポータータンパク質がルシフェラーゼである請求項1又は2に記載のベクター。
- [請求項4] 炎症性サイトカインをコードする遺伝子は、カスパーゼにより認識されるペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含むものである請求項1～3のいずれか1項に記載のベクター。
- [請求項5] 請求項1～4のいずれか1項に記載のベクターを含む形質転換体。
- [請求項6] 請求項1～4のいずれか1項に記載のベクターが導入されたトランスジェニック非ヒト動物。
- [請求項7] 非ヒト動物がマウスである請求項6に記載のトランスジェニック非ヒト動物。
- [請求項8] 炎症性刺激によりレポータータンパク質が発光シグナルとして検出される、請求項5に記載の形質転換体又は請求項6若しくは7に記載のトランスジェニック非ヒト動物。
- [請求項9] 請求項5に記載の形質転換体又は請求項6～8のいずれか1項に記載のトランスジェニック非ヒト動物を用いて、炎症性刺激により当該形質転換体又はトランスジェニック非ヒト動物に惹起される炎症反応を検出することを特徴とする炎症反応の検出方法。
- [請求項10] 炎症性サイトカインをコードする遺伝子は、炎症反応により惹起される転写因子NF- κ Bにより発現されるものである、請求項9に記載の方法。
- [請求項11] 炎症性刺激によりレポータータンパク質を発光シグナルとして検出

する、請求項 9 又は 10 に記載の方法。

[請求項 12] 請求項 5 に記載の形質転換体又は請求項 6～8 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物に、炎症性刺激下で候補物質を接触させ、炎症反応の有無を指標として抗炎症物質を選択することを特徴とする抗炎症物質のスクリーニング方法。

[請求項 13] 請求項 5 に記載の形質転換体又は請求項 6～8 のいずれか 1 項に記載のトランスジェニック非ヒト動物を含む、炎症反応検出用又は抗炎症物質のスクリーニング用キット。

図 1

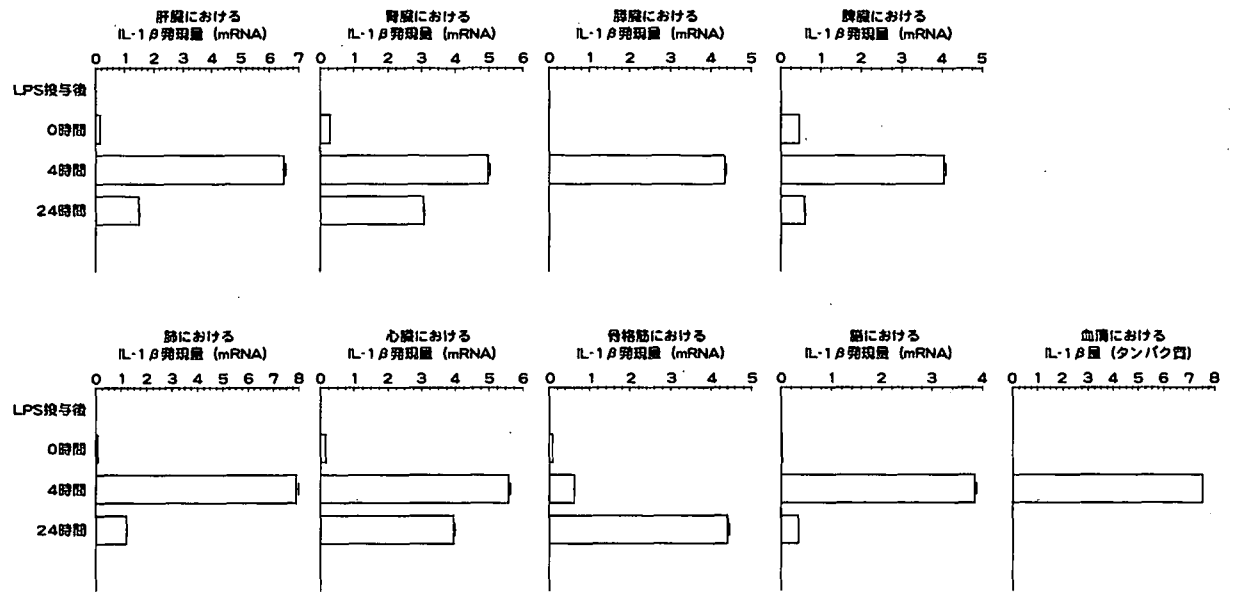


図 2

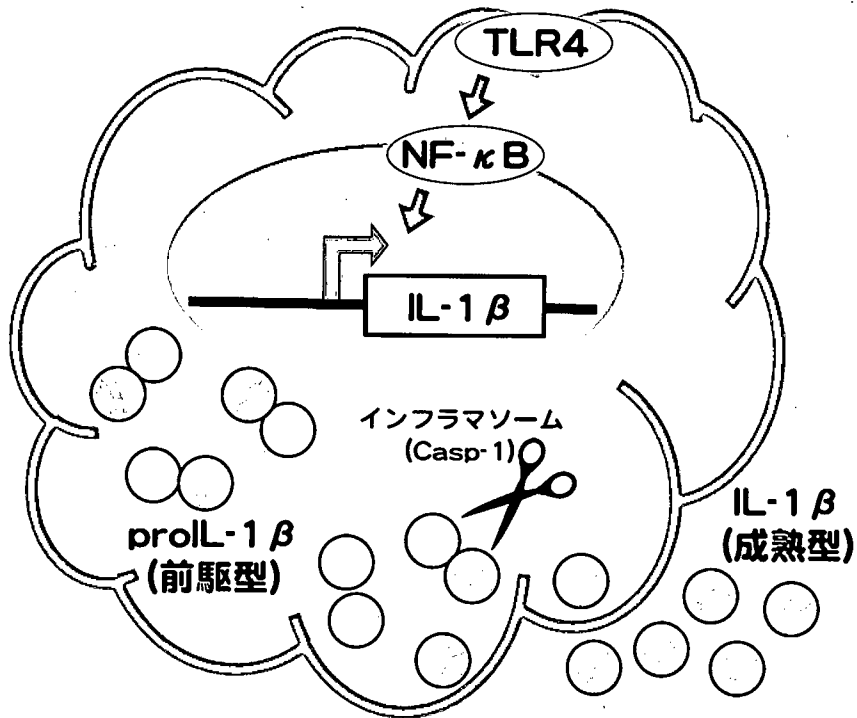


図 3

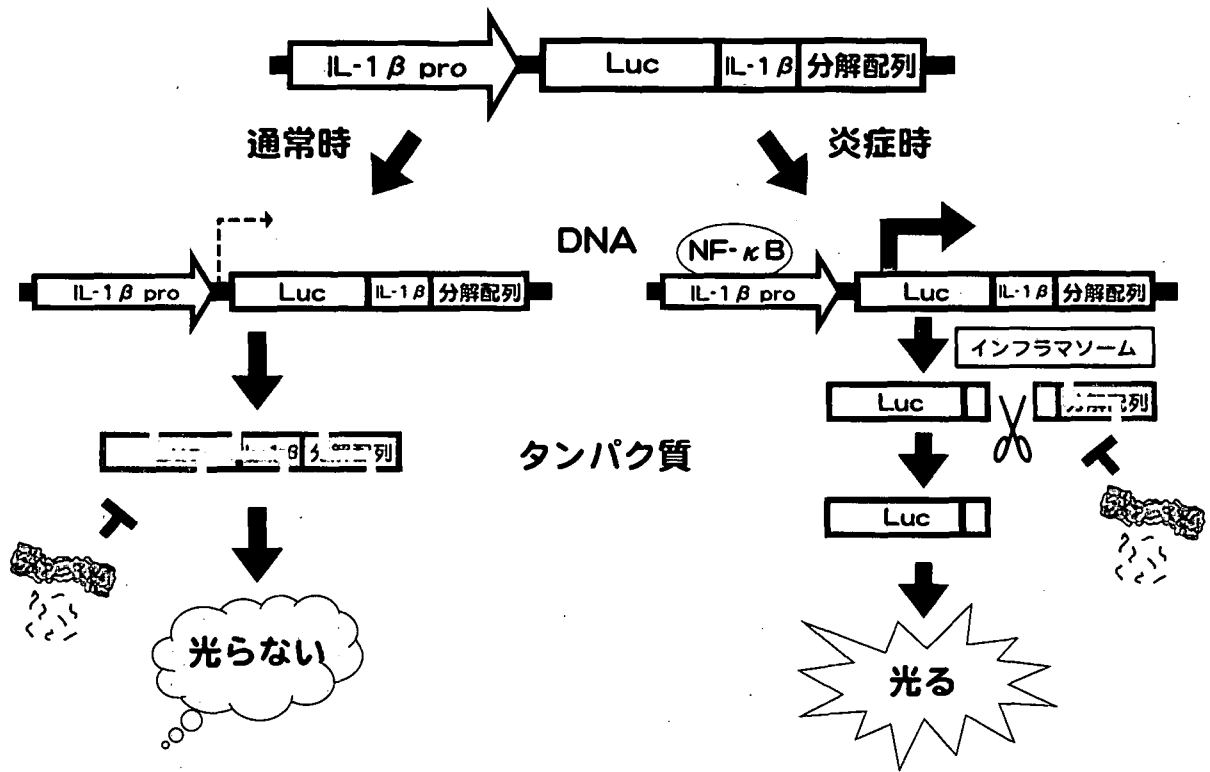


図 4

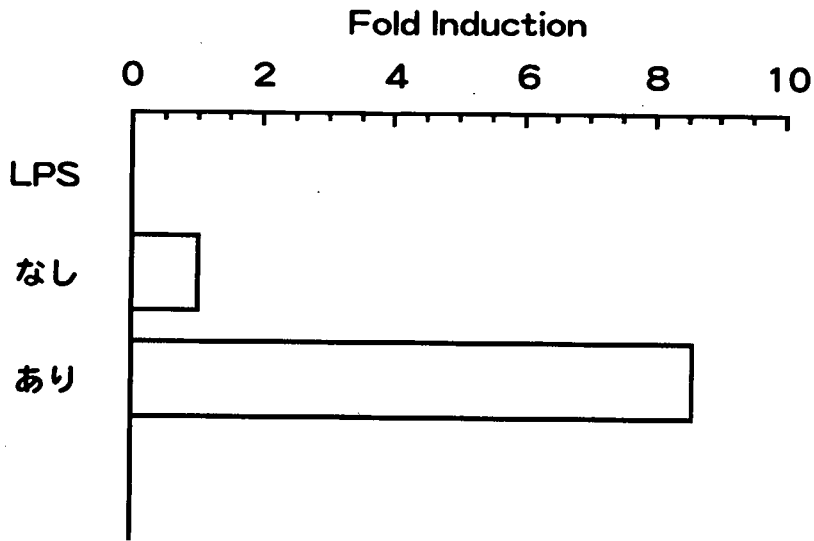


図 5

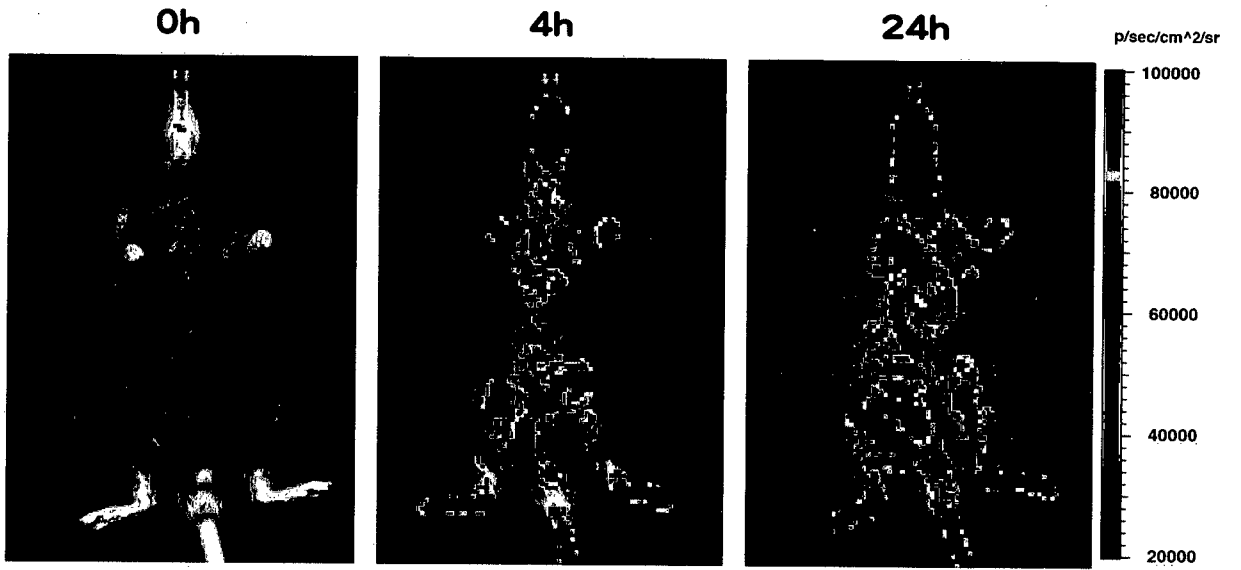
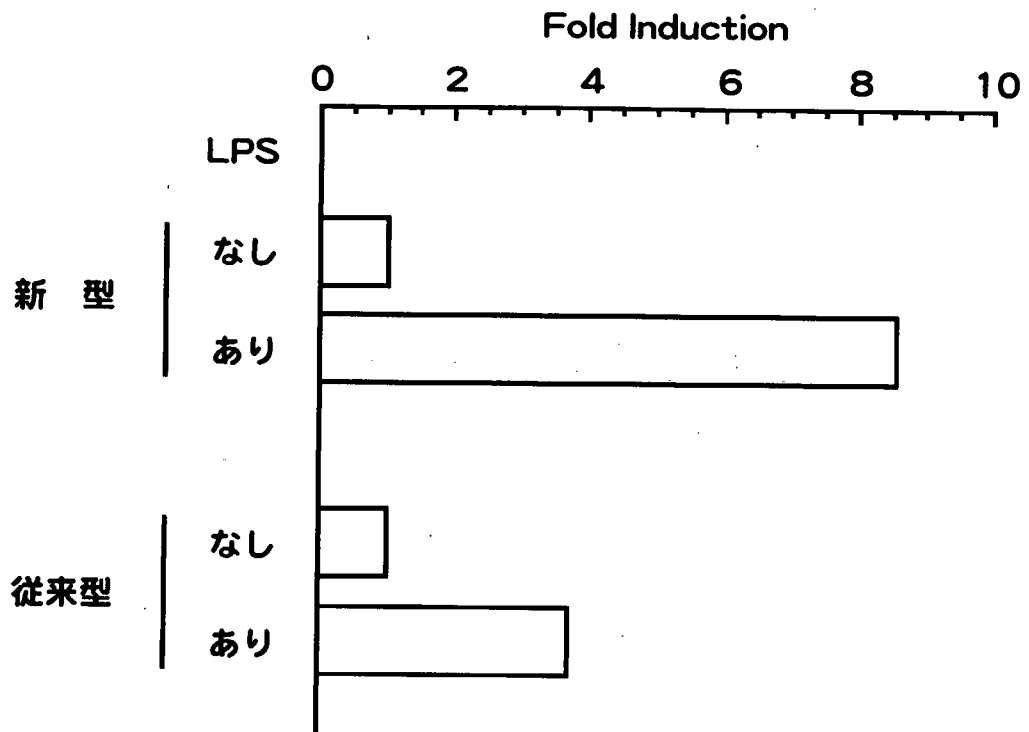
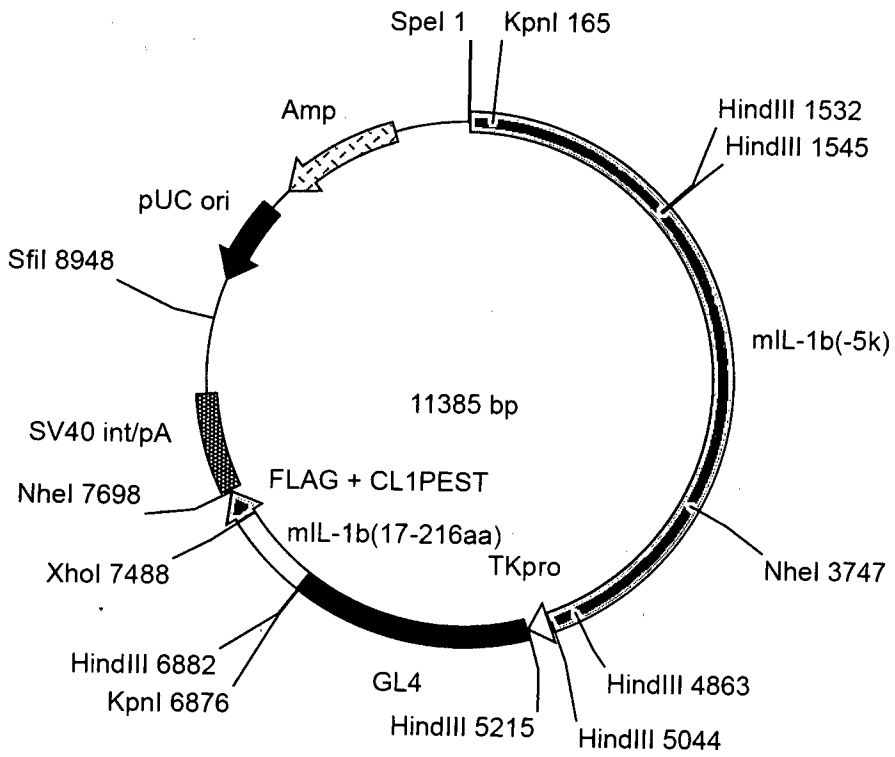
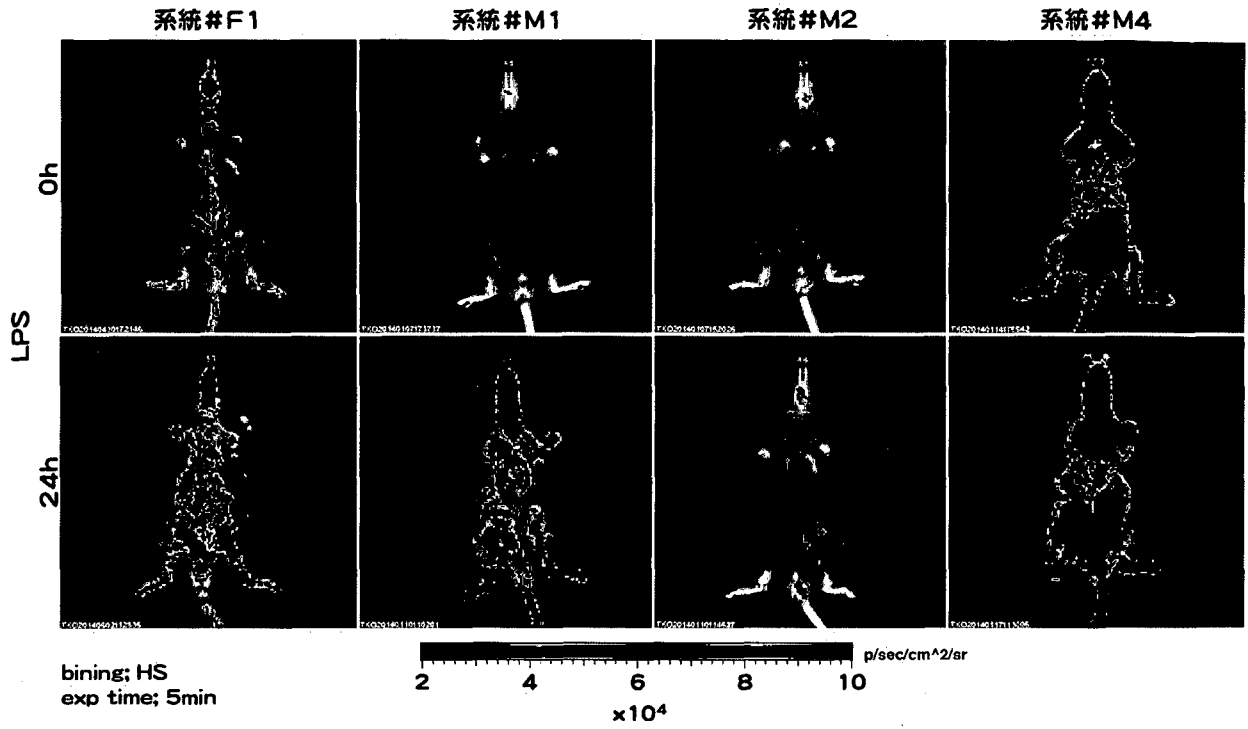


図 6



☒ 7





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/070798

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/09(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, A01K67/027

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII), WPIDS/WPIX (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	CROXFORD L. Andrew, et al., "Cytokine reporter mice in immunological research: perspectives and lessons learned", Immunology, 2010, Vol.132, p.1-8	<u>1, 3, 5-8</u> 1-13
Y	LI Limei, et al., "Functional imaging of interleukin 1 beta expression in inflammatory process using bioluminescence imaging in transgenic mice", BMC Immunology, 2008, Vol.9, p.49	1-13
Y	LI Limei, et al., "Bioluminescence imaging for IL-1β expression in experimental colitis", Journal of Inflammation, 2013, Vol.10, p.16	1-13

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 30 October, 2014 (30.10.14)	Date of mailing of the international search report 11 November, 2014 (11.11.14)
--	--

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/070798

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MATSUSHIMA Hironori, et al., "Intravital Imaging of IL-1 β Production in Skin", Journal of Investigative Dermatology, 2010, Vol.130, p.1571-1580	1-13
Y	JP 2007-209227 A (Tokyo Metropolitan Organization for Medical Research), 23 August 2007 (23.08.2007), paragraphs [0014] to [0016] (Family: none)	1-13
A	JP 9-500533 A (Merck & Co., Inc.), 21 January 1997 (21.01.1997), & EP 724628 A4 & WO 1995/003397 A1	1-13
A	WO 99/37142 A1 (NOVO NORDISK A/S), 29 July 1999 (29.07.1999), & AU 2512299 A	1-13
A	WO 2013/054846 A1 (Nissin Foods Holdings Co., Ltd.), 18 April 2013 (18.04.2013), (Family: none)	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, A01K67/027		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamIII), WPIDS/WPIX(STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	CROXFORD L. Andrew, et al., "Cytokine reporter mice in immunological research: perspectives and lessons learned", Immunology, 2010, Vol.132, p.1-8	1,3,5-8 1-13
Y	LI Limei, et al., "Functional imaging of interleukin 1 beta expression in inflammatory process using bioluminescence imaging in transgenic mice", BMC Immunology, 2008, Vol.9, p.49	1-13
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 30.10.2014	国際調査報告の発送日 11.11.2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 鳥居 敬司 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 4045

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	LI Limei, et al., "Bioluminescence imaging for IL-1 β expression in experimental colitis", Journal of Inflammation, 2013, Vol.10, p.16	1-13
Y	MATSUSHIMA Hironori, et al., "Intravital Imaging of IL-1 β Production in Skin", Journal of Investigative Dermatology, 2010, Vol.130, p.1571-1580	1-13
Y	JP 2007-209227 A (財団法人 東京都医学研究機構) 2007.08.23, 【0014】 ～【0016】 (ファミリーなし)	1-13
A	JP 9-500533 A (メルク エンド カンパニー インコーポレーテッド) 1997.01.21, & EP 724628 A4 & WO 1995/003397 A1	1-13
A	WO 99/37142 A1 (NOVO NORDISK A/S) 1999.07.29, & AU 2512299 A	1-13
A	WO 2013/054846 A1 (日清食品ホールディングス株式会社) 2013.04.18, (ファミリーなし)	1-13