

(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
2018年7月5日(05.07.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/123540 A1

(51) 国際特許分類:

A01K 67/027 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/044372

(22) 国際出願日: 2017年12月11日(11.12.2017)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2016-254900 2016年12月28日(28.12.2016) JP

(71) 出願人: 国立大学法人広島大学(HIROSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁目3番2号 Hiroshima (JP).

(72) 発明者: 川上 秀史 (KAWAKAMI Hideshi); 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立大学法人広島大学原爆放射線医科学研究

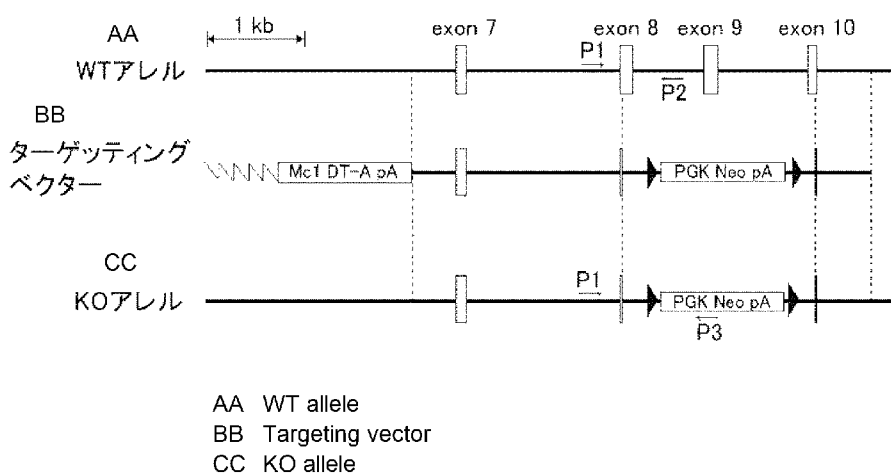
所内 Hiroshima (JP). 倉持 真人(KURAMOCHI Masahito); 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立大学法人広島大学原爆放射線医科学研究所内 Hiroshima (JP). 丸山 博文(MARUYAMA Hirofumi); 〒7348553 広島県広島市南区霞一丁目2番3号 国立大学法人広島大学大学院医歯薬保健学研究科内 Hiroshima (JP).

(74) 代理人: 木村 満(KIMURA Mitsuru); 〒1010054 東京都千代田区神田錦町二丁目7番地 協販ビル2階 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,

(54) Title: KNOCKOUT NONHUMAN ANIMAL, METHOD FOR CREATING KNOCKOUT NONHUMAN ANIMAL, AND METHOD FOR SCREENING DRUG FOR PREVENTING OR TREATING AMYOTROPHIC LATERAL SCLEROSIS OR DEMENTIA

(54) 発明の名称: ノックアウト非ヒト動物、ノックアウト非ヒト動物の作製方法、及び筋萎縮性側索硬化症又は認知症の治療薬又は予防薬のスクリーニング方法



(57) Abstract: A knockout nonhuman animal, wherein a region including a part of exon 8, all of exon 9, and a part of exon 10 in the optineurin gene is substituted by a foreign gene. The foreign gene may be a drug resistance gene. In the knockout nonhuman animal, significantly more TDP-43 positive inclusions may be detected in spinal motor neurons and motor nerve fibers than in a wild type.

(57) 要約: ノックアウト非ヒト動物は、オプチニューリン遺伝子におけるエクソン8の一部、エクソン9の全部及びエクソン10の一部を含む領域が外来遺伝子に置換されている。前記外来遺伝子は、薬剤耐性遺伝子である、こととしてもよい。該ノックアウト非ヒト動物は、脊髄運動ニューロン及び運動神経線維に、野生型より有意に多くのTDP-43陽性封入体が検出される、こととしてもよい。

[続葉有]

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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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：

ノックアウト非ヒト動物、ノックアウト非ヒト動物の作製方法、及び筋萎縮性側索硬化症又は認知症の治療薬又は予防薬のスクリーニング方法

技術分野

[0001] 本発明は、ノックアウト非ヒト動物、ノックアウト非ヒト動物の作製方法、及び筋萎縮性側索硬化症又は認知症の治療薬又は予防薬のスクリーニング方法に関する。

背景技術

[0002] 筋萎縮性側索硬化症（Amyotrophic Lateral Sclerosis、ALS）は、主に大脳皮質運動野、脳幹及び脊髄における運動ニューロンが次第に変性する神経変性疾患である。ほとんどのALS患者は発症して1～5年以内に人工呼吸器が必要になるか死に至る。ALS患者の大半が孤発性であり、約10%程度が家族性である。

[0003] 次世代シーケンサー技術によりALSの原因遺伝子が次々と明らかになっている。ALSの原因遺伝子として、オプチニューリン（OPTN）遺伝子、TAR-DNA binding protein 43kD（TDP-43）遺伝子（TARDBP）、superoxide dismutase 1（SOD1）遺伝子、fused in sarcoma/translocated in liposarcoma（FUS/TLS）遺伝子、chromosome 9 open reading frame 72（C9orf72）遺伝子等の20以上もの遺伝子が同定されている。

[0004] TDP-43は、剖検脳においてALS症例の90%に病因物質として認められる。TDP-43は、ALSに加え、前頭側頭葉型認知症等の変性部位に出現するユビキチン陽性封入体の構成因子である。TDP-43は、不均一核内リボ核酸タンパク質（heterogeneous nuclea

r r i b o n u c l e o p r o t e i n、h n R N P) の一種である。T D P - 4 3 は、m R N A 又は h n R N P と結合し、m R N A の安定化、h n R N A の選択的スプライシング及び転写調節等に関与する。

[0005] 特許文献1には、変異T D P - 4 3 を発現するように改変したノックインマウスが開示されている。当該マウスの脳切片では、細胞質に異常封入体が観察された。特許文献2では、O P T N 遺伝子の変異のため、遺伝性A L S 患者及び孤発性A L S 患者由来の検体において、O P T N が発現しないことが示されている。

[0006] マウスにおいてO P T N をコードするO p t n 遺伝子をノックアウトしたマウスが非特許文献1に報告されている。当該マウスは、O p t n^{tm1a} (EUC OMM) ^{Wtsi}マウスを用いて作製され、O p t n 遺伝子のエクソン3を欠く。非特許文献1によれば、当該マウスの中枢神経系で髄鞘形成不全及び軸索変性の進展が見られた。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第2013／180214号

特許文献2：特開2011-067193号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Yasushi Ito、外20名、「R I P K 1 m e d i a t e s a x o n a l d e g e n e r a t i o n b y p r o m o t i n g i n f l a m m a t i o n a n d n e c r o p t o s i s i n A L S」、2016年、Science、353、6299、p. 603-608

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 上記特許文献2及び非特許文献1のマウスでは、運動ニューロン内にT D P - 4 3 陽性封入体及びA L S の病理学的特徴であるゴルジ体の断片化が観

察されていない。上記特許文献 1 に開示されたマウスでは、細胞質に異常封入体が認められるものの、TDP-43 に変異が入っている。ALS 患者の 90% では TDP-43 には変異がないため、上記特許文献 1 に開示されたマウスにおける異常封入体の形成機序は、実際の ALS と異なることが考えられる。したがって、ヒトの疾患の発症メカニズムをより忠実に再現できるモデル動物が求められている。

[0010] 本発明は、上記実情に鑑みてなされたものであり、ヒトの疾患の発症メカニズムをより忠実に再現できるノックアウト非ヒト動物、ノックアウト非ヒト動物の作製方法、及び筋萎縮性側索硬化症又は認知症の治療薬又は予防薬のスクリーニング方法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

[0011] 本発明の第 1 の観点に係るノックアウト非ヒト動物は、
オプチニューリン遺伝子におけるエクソン 8 の一部、エクソン 9 の全部及びエクソン 10 の一部を含む領域が外来遺伝子に置換されている。

[0012] この場合、前記外来遺伝子は、
薬剤耐性遺伝子である、
こととしてもよい。

[0013] 上記本発明の第 1 の観点に係るノックアウト非ヒト動物は、
脊髄運動ニューロン及び運動神経線維に、野生型より有意に多くの TDP-43 陽性封入体が検出される、
こととしてもよい。

[0014] 上記本発明の第 1 の観点に係るノックアウト非ヒト動物は、
脊髄運動ニューロンに、野生型より有意に多くの断片化されたゴルジ体が検出される、
こととしてもよい。

[0015] 上記本発明の第 1 の観点に係るノックアウト非ヒト動物は、
げっ歯類である、
こととしてもよい。

- [0016] 上記本発明の第1の観点に係るノックアウト非ヒト動物は、
マウスである、
こととしてもよい。
- [0017] 上記本発明の第1の観点に係るノックアウト非ヒト動物は、
筋萎縮性側索硬化症モデル動物又は認知症モデル動物である、
こととしてもよい。
- [0018] 本発明の第2の観点に係るノックアウト非ヒト動物の作製方法は、
オプチニューリン遺伝子におけるエクソン8の一部、エクソン9の全部及び
エクソン10の一部を含む領域を外来遺伝子に置換する置換ステップを含む。
- [0019] 本発明の第3の観点に係る筋萎縮性側索硬化症又は認知症の治療薬又は予防薬のスクリーニング方法は、
上記本発明の第1の観点に係るノックアウト非ヒト動物を用いる。

発明の効果

- [0020] 本発明によれば、ヒトの疾患の発症メカニズムをより忠実に再現できる。

図面の簡単な説明

- [0021] [図1] O p t n 遺伝子のノックアウトのための遺伝子改変の概略を示す図である。
- [図2] O p t n ノックアウトマウス (K O) の遺伝子型を示す図である。
- [図3] O P T N に関するウエスタンブロット法の結果を示す図である。
- [図4] 抗 O P T N 抗体で免疫染色した腰髄の画像を示す図である。画像中のバーの長さは 100 μ m に相当する。
- [図5] (A) は、抗 T D P - 43 抗体で免疫染色した 24 か月齢の K O 及び野生型 (W T) の腰髄の画像を示す図である。(B) は、切片における T D P - 43 陽性封入体を含む運動ニューロンの個数を示す図である ($n = 4$)。エラーバーは標準誤差を示す。
- [図6] (A) は、抗 T D P - 43 抗体及び抗ユビキチン (U b) 抗体で二重染色した K O の腰髄の画像を示す図である。(B) は、T D P - 43 陽性及び

Ub陽性封入体を有する運動ニューロンの割合を示す図である（ $n=4$ ）。エラーバーは標準誤差を示す。

[図7] (A) は、抗TDP-43抗体及び抗sequestosome 1/p62 (p62) 抗体で二重染色したKOの腰髄の画像を示す図である。(B) は、TDP-43陽性及びp62陽性封入体を有する運動ニューロンの割合を示す図である（ $n=4$ ）。エラーバーは標準誤差を示す。

[図8] (A) は、抗TDP-43抗体及び抗p62抗体で二重染色したKOの運動ニューロンの画像を示す図である。(B) はTDP-43及びp62の二重陽性の運動ニューロンの割合を示す図である（ $n=4$ ）。エラーバーは標準誤差を示す。

[図9] 抗GM130抗体及び抗コリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) 抗体で二重染色した脊髄における運動ニューロンの画像を示す図である。画像中のバーの長さは $10\mu\text{m}$ に相当する。

[図10] 抗ニューロフィラメント (NF) 抗体及び抗S100 β 抗体で二重染色したWT及び12か月齢、18か月齢、24か月齢のKOの運動ニューロンの画像を示す図である。画像中のバーの長さは $20\mu\text{m}$ に相当する。

[図11] 抗TDP-43抗体及び抗NF抗体で二重染色したWT及び12か月齢、18か月齢、24か月齢のKOの運動ニューロンの画像を示す図である。画像中のバーの長さは $20\mu\text{m}$ に相当する。

[図12] (A) は24か月齢のWT及びKOにおけるヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色した腓腹筋切片の画像を示す図である。(B) は抗TDP-43抗体で免疫染色した24か月齢のWT及びKOの腓腹筋切片の画像を示す図である。(C) は抗p62抗体で免疫染色した24か月齢のWT及びKOの腓腹筋切片の画像を示す図である。(D) は抗Ub抗体で免疫染色した24か月齢のWT及びKOの腓腹筋切片の画像を示す図である。画像中のバーの長さは $20\mu\text{m}$ に相当する。

発明を実施するための形態

[0022] 本発明に係る実施の形態について添付の図面を参照して説明する。なお、

本発明は下記の実施の形態及び図面によって限定されるものではない。

[0023] (実施の形態)

本実施の形態に係るノックアウト非ヒト動物は、ヒトでなければ特に限定されず、脊椎動物、好ましくは哺乳類、より好ましくはげっ歯類である。具体的には、ノックアウト非ヒト動物としては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ウシ及びサル等が挙げられる。汎用性及び利便性を考慮すると、好適にはノックアウト非ヒト動物はマウスである。

[0024] 以下では、本実施の形態に係るノックアウト非ヒト動物として、マウスを用いた場合について説明する。本実施の形態に係るノックアウトマウスは、O p t n 遺伝子におけるエクソン 8 の一部、エクソン 9 の全部及びエクソン 10 の一部を含む領域（以下、「エクソン 8 等を含む領域」ともいう）が外来遺伝子に置換されている。より詳細には、エクソン 8 等を含む領域は、エクソン 8 の一部、エクソン 9 の全部、エクソン 10 の一部に加え、エクソン 8 とエクソン 9 との間のイントロン及びエクソン 9 とエクソン 10 との間のイントロンを含む領域である。

[0025] O p t n 遺伝子のエクソン 8 の一部とは、エクソン 8 の 5' 末端から 2 番目以降の任意の塩基からエクソン 8 の 3' 末端の塩基までをいう。O p t n 遺伝子のエクソン 10 の一部とは、エクソン 10 の 5' 末端から 3' 末端の塩基を除く任意の塩基までをいう。好適には、エクソン 8 等を含む領域は、エクソン 8 の 5' 末端から 21 番目の塩基から、エクソン 10 の 3' 末端から 5' 末端に向かって 12 番目の塩基までの領域である。

[0026] 当該ノックアウトマウスの作製方法は、O p t n 遺伝子のエクソン 8 等を含む領域を外来遺伝子に置換する置換ステップを含む。置換ステップでは、例えば、マウスの胚性幹（E S）細胞における野生型の O p t n 遺伝子のエクソン 8 等を含む領域を外来遺伝子に置換すればよい。エクソン 8 等を含む領域と外来遺伝子との置換は、公知の方法で行うことができる。例えば、エクソン 8 等を含む領域と外来遺伝子との置換には、相同組換え法、レトロウ

イルスベクター法、レンチウイルスベクター法及び人工ウイルスベクター法等を用いることができる。また、エクソン8等を含む領域と外来遺伝子との置換に、TALEN、zinc finger nuclease (ZFN) 及びCRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat and CRISPR-associated protein) システム等のゲノム編集技術を用いてもよい。

[0027] 外来遺伝子は、置換後にOPTNが正常に発現しないものであれば特に限定されない。Optn遺伝子のエクソン8等を含む領域が外来遺伝子に置換されたESクローンの選別のために、外来遺伝子としては薬剤耐性遺伝子が好ましい。薬剤耐性遺伝子は、例えば、ネオマイシン耐性遺伝子及びピューロマイシン耐性遺伝子である。なお、相同組換えされたESクローンの選別を効率化するために、ポジティブ・ネガティブ選別法を採用してもよい。この場合、薬剤耐性遺伝子に加えて、薬剤感受性遺伝子を使用してもよい。

[0028] 例えば、エクソン8等を含む領域と外来遺伝子との置換には、野生型におけるOptn遺伝子のエクソン8等を含む領域を相同組換え技術によってネオマイシン耐性遺伝子に置換するためのターゲティングベクターを用いるのが好ましい。ターゲティングベクターをマウスES細胞に電気穿孔法等で導入し、得られたネオマイシン耐性クローンからDNAを抽出し、polymerase chain reaction (PCR) 及びサザンブロット法により相同組換えされたESクローンを選別する。

[0029] 選別したESクローンをマウス受精卵胚盤胞に顕微注入し、野生型マウスの胎内に戻して得られるキメラマウスと、野生型マウスとの交配によりヘテロ接合体の雄及び雌が得られる。次に、ヘテロ接合体の雄及び雌を交配することで、エクソン8等を含む領域が外来遺伝子に置換されたOptn遺伝子のホモ接合体マウスを得ることができる。なお、ターゲティングベクターを導入したES細胞が同一系統のマウスの交配で得られたES細胞ではない場合、同一系統のマウスで戻し交配を繰り返して、マウスの系統を純化させ

るのが好ましい。

[0030] OPTNの欠損は、上記ノックアウトマウスの脊髄抽出物を対象としたマウス抗OPTN抗体を用いたウエスタンブロット法で、OPTNが検出されないことで確認できる。

[0031] 次に、本実施の形態に係るノックアウトマウスの病理学的特徴を以下に説明する。該ノックアウトマウスでは、脊髄運動ニューロン及び運動神経線維に、野生型より有意に多くのTDP-43陽性封入体が検出される。また、当該ノックアウトマウスでは、脊髄運動ニューロンに、野生型より有意に多くの断片化されたゴルジ体が検出される。TDP-43陽性封入体及びゴルジ体は、下記実施例2に示すように、それぞれ抗TDP-43抗体及びゴルジ体のマーカーに対する抗体、例えば抗GM130抗体を用いて、ノックアウトマウスの腰髄切片を免疫組織化学染色することで検出できる。この場合、比較のために、野生型のマウスの腰髄切片も同様に免疫組織化学染色し、TDP-43陽性封入体及びゴルジ体を評価すればよい。

[0032] ここで「有意に多く」とは、統計学上の有意な差をもって多いことを意味する。例えば、免疫組織化学染色で比較する場合、複数の切片についてTDP-43陽性封入体を有する運動ニューロンの個数を計数し、切片における運動ニューロンの平均個数を算出し、野生型及びノックアウトマウスの平均個数の差を、t検定等の統計学的手法で検定すればよい。ゴルジ体の断片化については、染色像の画像処理に基づいて、例えば局在が独立した所定強度以上のゴルジ体を示すシグナルの個数を野生型とノックアウトマウスとで比較すればよい。

[0033] 上記ノックアウトマウスは、18か月齢以上、20か月齢以上、22か月齢以上、又は24か月齢以上で脊髄運動ニューロンの20～40%、25～35%又は28～32%にTDP-43陽性封入体が形成される。

[0034] また、上記ノックアウトマウスの脊髄運動ニューロンでは、オートファジー受容体タンパク質であるp62陽性凝集体が検出される。p62陽性凝集体が検出される脊髄運動ニューロンは、TDP-43陽性封入体を有する場

合が多い。さらに、p 6 2 陽性凝集体及びT D P - 4 3 陽性封入体の両方を有する脊髄運動ニューロンの2 0 ~ 4 0 %、2 5 ~ 3 5 %又は2 8 ~ 3 2 %は、T D P - 4 3 及びp 6 2 の混在した封入体を有する。

[0035] 上記ノックアウトマウスは、坐骨神経に形態学的変化が見られる。坐骨神経の形態学的変化は、例えば、神経線維とS 1 0 0 β の重なり及び脱髄を示唆するS 1 0 0 β 陽性シュワン細胞に包まれていない神経線維の増加、及び野生型よりも細い神経線維の増加である。また、坐骨神経においても上記ノックアウトマウスでは、神経線維内及び神経線維の周囲にT D P - 4 3 陽性封入体が野生型より有意に多く見られる。また、坐骨神経において上記ノックアウトマウスでは、神経線維内にp 6 2 陽性凝集体が野生型より有意に多く見られる。

[0036] 上記ノックアウトマウスの用途は特に限定されない。脊髄運動ニューロン及び運動神経線維におけるT D P - 4 3 陽性封入体、p 6 2 陽性凝集体の検出又は増加及びゴルジ体の断片化の検出又は増加等から、上記ノックアウトマウスは、神経変性疾患、特にA L S モデル動物又は認知症モデル動物として好適である。例えば、上記ノックアウトマウスは、A L S 及び認知症、特に前頭側頭葉型認知症の発症メカニズムの解明及び病態の理解に有用である。

[0037] 上記ノックアウトマウスの用途として、好ましくはA L S 及び認知症の治療薬又は予防薬のスクリーニング方法が挙げられる。上記ノックアウトマウスを用いる当該スクリーニング方法は、例えば、ノックアウトマウスに被験物質を投与する投与ステップと、該ノックアウトマウスのA L S 又は認知症に関する指標を評価する評価ステップとを含む。投与ステップでは、成体の中期及び後期のノックアウトマウスを用いるのがA L S 及び認知症の病理をより忠実に再現する点で好ましい。

[0038] 上記ノックアウトマウスへの被験物質の投与では、化合物、抗体、ペプチド及びD N A アプタマー等の被験物質を、上記ノックアウトマウスに投与する。投与の方法は、特に限定されないが、被験物質に適切な方法を選択する

のが好ましい。投与の方法としては、例えば、経口投与、腹腔内投与、静脈注射及び皮下注射等が挙げられる。被験物質の投与は、単回でもよいし、複数回であってもよい。被験物質の濃度は、被験物質の種類によって適宜決定すればよい。また、被験物質の濃度を数段階希釈した複数の濃度の被験物質を投与してもよい。

[0039] 評価ステップにおける指標としては、歩行等の行動指標、筋力、神経変性、脊髄運動ニューロン及び運動神経線維における TDP-43 陽性封入体、p62 陽性凝集体及びゴルジ体の断片化等の病理評価が挙げられる。評価ステップでは、被験物質を投与された上記ノックアウトマウスと、被験物質を投与されなかった上記ノックアウトマウスとの間で、ALS 又は認知症に関する指標を比較してもよい。指標によって ALS 又は認知症を改善した被験物質を ALS 又は認知症の治療薬又は予防薬の候補として選抜すればよい。

[0040] 以上詳細に説明したように、上記ノックアウトマウスは、下記実施例 2 に示すように、その病理学的特徴からヒトの疾患、特に ALS 及び認知症の発症メカニズムをより忠実に再現できる。

[0041] なお、上記ノックアウトマウスの一部、例えば、臓器、組織及び細胞も ALS 及び認知症の治療薬又は予防薬のスクリーニング方法に使用することができる。

実施例

[0042] 以下の実施例により、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

[0043] (実施例 1 : Optn ノックアウトマウスの作製)

図 1 は、Optn ノックアウトマウス作製のためのジーンターゲティング法の概略を示す。まず、WT における Optn 遺伝子におけるエクソン 8 等を含む領域を相同組換え技術によってネオマイシン抵抗性カセット (PGK Neo pA) に置換するためのターゲティングベクターを構築した。より詳細には、マウスゲノム Dec. 2011 (GRCm38/mm10) における chr2:5033142-5035063 がネオマイシン抵

抗性カセットと入れ替わるようにターゲティングベクターを設計した。雄のCBAマウスと雌のC57BL/6マウスとを交配させて得られるF1胚由来のT2胚性幹細胞にターゲティングベクターを電気穿孔法で導入し、ネオマイシン耐性コロニーを回収した。

[0044] 次に、サザンブロッティング法で、ネオマイシン耐性コロニーから適切な組換え体のコロニーを選別した。選別された2つの独立したクローンをICRマウスの8細胞期胚に顕微注入し、雌の野生型C57BL/6マウスの胎内に戻してキメラマウスを出産させ、育成した。少なくとも5回の戻し交配を経て得られたヘテロ接合体の雄及び雌を交配して、以下の実施例で用いるOptn遺伝子が改変されていない野生型（以下、「WT」とする）及びOptn遺伝子がノックアウトされたOptnノックアウトマウス（以下、「KO」とする）の同腹子を得た。

[0045] 生殖細胞系伝達は、常法に従って、マウスの尾から採取したDNAをテンプレートとしたPCRで確認した。WTアレルのPCRのプライマーとして、フォワードプライマー及びリバープライマーを、それぞれ図1のP1及びP2の矢印に示される位置に設計した。一方、KOアレルのPCRのプライマーとして、フォワードプライマー及びリバープライマーを、それぞれ図1のP1及びP3の矢印に示される位置に設計した。WTのフォワードプライマー及びKOアレルのフォワードプライマーは共通で、その塩基配列を配列番号1に示す。WTのリバープライマーの塩基配列及びKOアレルのリバープライマーの塩基配列をそれぞれ配列番号2、3に示す。WTアレルの場合、PCR産物のサイズは466bpである。KOアレルの場合、PCR産物のサイズは840bpである。

[0046] マウスの腰髄を、5倍量(w/v)の放射性免疫沈降法(radio immunoprecipitation assay、RIPA)バッファー中で、氷上均質化させた。RIPAバッファーの組成は、150mM NaCl、1%NP-40、1%デオキシコール酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、1X プロテアーゼ阻害剤カクテル(cOmplete

e ULTRA Tablets、Roche Diagnostics社製）、1X フォスファターゼ阻害剤カクテル（PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail、Roche Diagnostics社製）及び50mM Tris-HCl（pH7.4）である。均質化した試料を、4℃、12000rpmで15分間遠心分離し、上清を回収した。10%ポリアクリルアミドゲルの各レーンにRIP A抽出物を20μgずつ流した。

[0047] 脊髄抽出物のウエスタンブロット法に用いた抗体は、マウス抗OPTN抗体（N末端、sc-166576、1:800、Santa Cruz Biotechnology社製）、ウサギ抗OPTN抗体（内部セグメント、ab101592、1:800、Abcam plc社製；C末端、#100000、1:1000、Cayman Chemical社製）、西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体ヤギ抗マウスIgG抗体（1:10000、R&D Systems社製）及び西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体ヤギ抗ウサギIgG抗体（1:10000、R&D Systems社製）である。

[0048] （結果）

図2は、電気泳動で分離したPCR産物のバンドを示す。Optn遺伝子を有するWT（+/+）には、466bpのバンドが認められたのに対して、KO（-/-）では、870bpのバンドが確認された。OPTNのタンパク質に関しても、図3のウエスタンブロット法の結果に示すように、KOでは、脊髄抽出物にOPTNのN末端、内部セグメント及びC末端のいずれも検出されなかった。KOは24か月齢まで飼育したが、生存期間、体重及び運動機能において明確な影響は現れなかった。

[0049] （実施例2：免疫組織化学染色を用いた病理学的特徴の解析）

75mg/kgのペントバルビタールを腹腔内に投与することでマウスを深麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸バッファーで灌流固定した。脊髄又は大腿の中間の坐骨神経を採り出して4%パラホルムアルデヒド

リン酸バッファーにそれぞれ一晩及び2時間後固定した。固定した組織をスクロース置換後、20 μ mの厚さの凍結切片をクライオスタットで作製した。

[0050] 5%正常ブタ血清を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に1時間、切片を浸漬し、さらに、一次抗体を含む0.05%Triton-X100含有PBS(PBS-T)に4℃で一晩、切片を浸漬した。一次抗体を反応させた後、切片を洗浄し、適切なAlexa Fluor(商標)488/594複合体二次抗体(1:500、Vector Laboratories社製)を含むPBS-Tに浸漬した。二次抗体を反応させた後、切片をVectashield(Vector Laboratories社製)で封入した。なお、腰髄の切片については、自家蛍光を抑制するために、Vectashieldで封入する前にズダンブラック溶液で処理した。共焦点レーザー顕微鏡(LSM510、Carl Zeiss AG社製)を用いて切片を撮像し、解析した。

[0051] 上記で使用した一次抗体は、ウサギ抗TDP-43抗体(10782-2-AP、1:5000、Proteintech Group社製)、ヤギ抗ChAT抗体(AB144P、1:500EMD Millipore社製)、モルモット抗p62抗体(GP62-C、1:5000、PROGEN Biotechnik GmbH社製)、ウサギ抗p62抗体(#018-22141、1:5000、和光純薬工業社製)、ウサギ抗Ub抗体(Z0458、1:2000、Agilent Technologies社製)、ウサギ抗S100 β 抗体(ab52642、1:200、Abcam plc社製)、マウス抗NF抗体(ab24564、1:2000、Abcam plc社製)及びマウス抗GM130抗体(610823、1:1000、BD Bioscience社製)である。

[0052] 運動ニューロンの計数は、腰髄切片を10枚間隔ごとに1枚採取して計12枚用意し、抗ChAT抗体で免疫染色して行った。免疫染色では、一次抗体反応まで進めた後、切片をビオチン標識二次抗体、VECTASTAIN

Elite ABC Kit (Vector Laboratories 社製) に順次反応させ、ジアミノベンジジンで発色させた。対比染色はヘマトキシリン染色を行った。

[0053] 筋肉内の神経の免疫染色には、凍結した腓腹筋を $30\ \mu\text{m}$ の厚さの切片とし、30分間、4%パラホルムアルデヒドリン酸バッファーで固定した。固定後、切片を抗TDP-43抗体、抗Ub抗体又は抗p62抗体で免疫染色した。免疫染色した切片を、デジタルカメラ (DP72、Olympus 社製) を備えた光学顕微鏡 (ECLIPSE E600、Nikon Instruments 社製) で撮像した。画像の加工及び解析には、ZEN (Carl Zeiss AG 社製)、Image-J 及び Adobe Photoshop CS 5.1 (Adobe Systems 社製) を用いた。

[0054] Student's t 検定を含む統計処理は、統計解析ソフト EZR で行った。P 値が 0.05 未満の時に統計学的有意な差とした。

[0055] (結果)

図4は、抗OPTN抗体で染色した腰髄を示す。WTの腰髄ではOPTNが検出されたのに対し、KOでは、OPTNは検出されなかった。次に、ALS患者で見られる封入体の有無を、抗TDP-43抗体を使った免疫染色でKOの運動ニューロンにおいて確認した。図5(A)は、抗TDP-43抗体で染色し、さらにヘマトキシリンで対比染色した24か月齢のKO及びWTにおける腰髄を示す。KOの運動ニューロンの一部ではTDP-43が核内になく細胞質内に散在している染色像が得られた。それらの中の一部の運動ニューロンにおいて、矢印で示すように細胞質内にTDP-43陽性の点状封入体を確認できた。

[0056] 定量解析の結果、24か月齢のKOの脊髓運動ニューロンの約30%でTDP-43陽性封入体が形成されていた (図5(B) 参照)。なお、クリューバー・バレー染色でKOの脊髓のミエリンについて調べた。灰白質及び白質ともに明確な変化は見られなかった。KOの脊髓運動ニューロンの数を調

べたがWTに対して大きな変化はなかった。大脳皮質運動野及び海馬をHE染色で調べたが、明確な組織学的変化は見られなかった。

[0057] TDP-43陽性封入体がユビキチン陽性であることが考えられたため、抗TDP-43抗体及び抗Ub抗体による二重染色で調べたが、図6(A)に示すように、ほとんどの運動ニューロンでUb陽性封入体が確認できなかった。しかし、図6(B)に示すように、存在したUb陽性封入体は全てTDP-43陽性封入体を有する運動ニューロンであった。

[0058] 次に、オートファジー受容体タンパク質p62陽性凝集体について調べた。図7(A)は、抗TDP-43抗体及び抗p62抗体で二重染色したKOの腰髄を示す。p62陽性凝集体が多数の運動ニューロンで確認された。図7(B)に示すように、該運動ニューロンの多くがTDP-43陽性封入体を有する運動ニューロンであった。

[0059] 図8(A)は、抗TDP-43抗体及び抗p62抗体で二重染色したKOの運動ニューロンを示す。図8(B)に示すように、TDP-43陽性封入体とp62凝集体とを有する運動ニューロンの約30%がTDP-43とp62の混在した封入体を有することがわかった。したがって、KOにおいて、ヒトALSの特徴であるTDP-43/p62を含む封入体を確認できた。これらのことから、OPTN欠損によりタンパク質の恒常性が破綻している可能性が示唆された。

[0060] TDP-43/p62を含む封入体に加えて、ヒトALSにおける顕著な病理学的特徴であるゴルジ体の断片化を評価した。図9は、ゴルジ体のマーカーであるGM130に対する抗体で染色した脊髄における運動ニューロンを示す。KOでは、運動ニューロンにおいて断片化したGM130陽性のシグナルが観察された。KOの運動ニューロンの約10%でゴルジ体の断片化が起きていた。

[0061] 続いて、KOにおける運動ニューロンの軸索を含む坐骨神経への影響を調べた。図10に示すように、WTでは24か月齢でもほとんどの神経線維がS100β陽性シュワン細胞によって髄鞘を形成していることが確認できた。

。しかし、KOでは12か月齢で、形態学的変化を示唆する神経線維とS100βのシグナルの重なりが見られた。このことは、KOでは運動ニューロンの軸索が形態的に影響を受けていることを示唆している。さらに、KOでは、生後経過とともに軸索の径が細くなっていた。また、KOでは、18か月齢及び24か月齢においてかなりの数の神経線維がS100β陽性シュワン細胞に巻かれていないことが示された。このため、KOでは成体の中期及び後期において脱髄が起こっていることが示唆された。なお、坐骨神経の断面積及び神経線維の密度には、WTとKOとの間に統計学的に有意な差はなかった。

[0062] 上記の坐骨神経の形態学的変化が脊髄の封入体出現よりも早期に起きていることから、TDP-43陽性封入体がKOの坐骨神経でも形成されるかを調べた。図11に示すように、WTでは24か月齢で、TDP-43が神経線維周囲に散在していた。これに対しKOでは、12か月齢で神経線維内及びその周辺に検出された。この封入体の大きさは、18か月齢及び24か月齢で増大した。坐骨神経の神経線維内においてもp62陽性凝集体が観察された。このことから、KOでは、運動ニューロンにおける形態学的変化が細胞体よりも軸索で早期に起きていることが示唆された。

[0063] 上記で明らかになったKOにおける軸索変性が見られたことから筋肉における神経支配及び除神経による筋萎縮について検討した。そこで、HE染色で腓腹筋の形態を調べたが、WTとKOとで顕著な違いは見られなかった。しかし、腓腹筋切片内の脛骨神経束において一部神経線維が消失していた。詳細には、図12(A)に示すように、腓腹筋内の脛骨神経束の約10%で消失が見られ、ミエリン鞘の欠落及び線維症が起きていた。KOの脊髄及び坐骨神経に封入体を確認されたことから、脛骨神経においてTDP-43陽性封入体及びp62凝集体を調べた。坐骨神経と異なり、図12(B)、(C)にそれぞれ示すように、24か月齢でも筋内神経の線維内にはTDP-43陽性及びp62陽性封入体が検出されなかった。一方、図12(D)の矢印に示すように、KOでは、筋内神経の線維内にUb陽性封入体を認めた

。

[0064] 本実施例により、O p t n 遺伝子のエクソン 8 等を含む領域をネオマイシン耐性遺伝子に置換した K O は、ヒトにおける A L S 及び認知症の病理学的特徴を有することが示された。

[0065] 本発明は、本発明の広義の精神と範囲を逸脱することなく、様々な実施の形態及び変形が可能とされるものである。また、上述した実施の形態は、本発明を説明するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。すなわち、本発明の範囲は、実施の形態ではなく、特許請求の範囲によって示される。そして、特許請求の範囲内及びそれと同等な発明の意義の範囲内で施される様々な変形が、本発明の範囲内とみなされる。

[0066] 本出願は、2016年12月28日に出願された、日本国特許出願2016-254900号に基づく。本明細書中に日本国特許出願2016-254900号の明細書、特許請求の範囲、図面全体を参照として取り込むものとする。

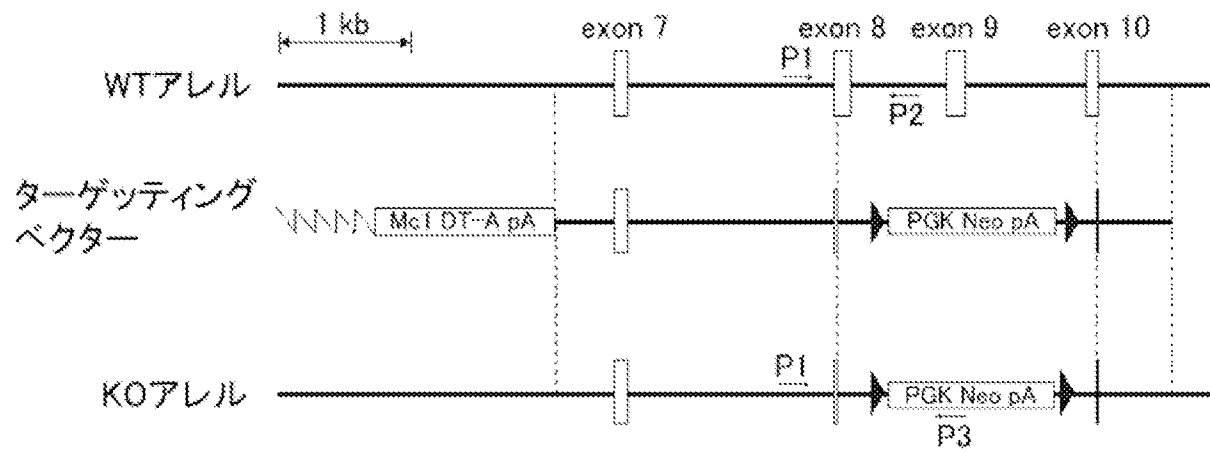
産業上の利用可能性

[0067] 本発明は、A L S 及び認知症のモデル動物及び A L S 及び認知症の治療薬又は予防薬のスクリーニング方法に好適である。

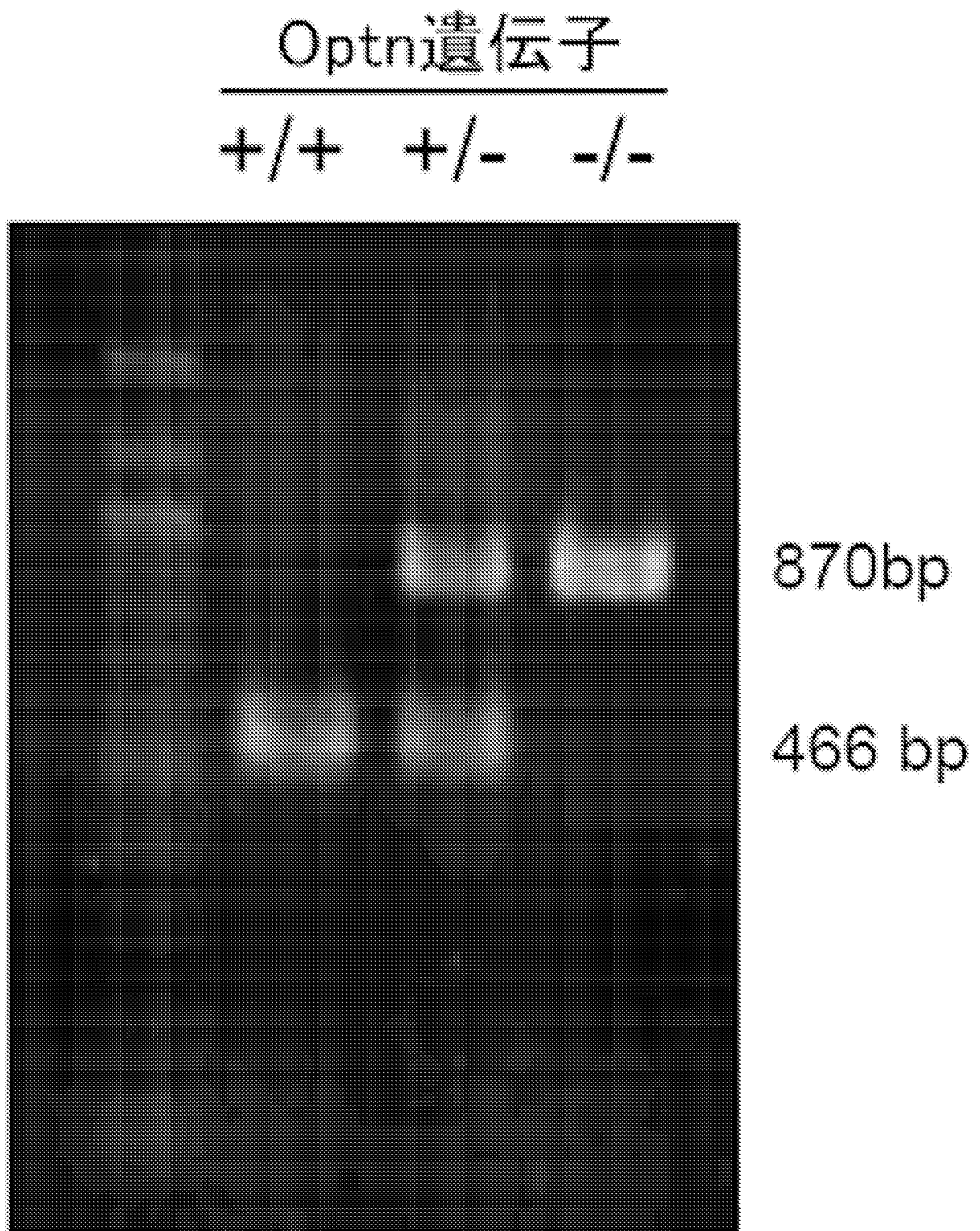
請求の範囲

- [請求項1] オプチニューリン遺伝子におけるエクソン8の一部、エクソン9の全部及びエクソン10の一部を含む領域が外来遺伝子に置換されている、
ノックアウト非ヒト動物。
- [請求項2] 前記外来遺伝子は、
薬剤耐性遺伝子である、
請求項1に記載のノックアウト非ヒト動物。
- [請求項3] 脊髄運動ニューロン及び運動神経線維に、野生型より有意に多くのTDP-43陽性封入体が検出される、
請求項1又は2に記載のノックアウト非ヒト動物。
- [請求項4] 脊髄運動ニューロンに、野生型より有意に多くの断片化されたゴルジ体が検出される、
請求項1から3のいずれか一項に記載のノックアウト非ヒト動物。
- [請求項5] げっ歯類である、
請求項1から4のいずれか一項に記載のノックアウト非ヒト動物。
- [請求項6] マウスである、
請求項1から5のいずれか一項に記載のノックアウト非ヒト動物。
- [請求項7] 筋萎縮性側索硬化症モデル動物又は認知症モデル動物である、
請求項1から6のいずれか一項に記載のノックアウト非ヒト動物。
- [請求項8] オプチニューリン遺伝子におけるエクソン8の一部、エクソン9の全部及びエクソン10の一部を含む領域を外来遺伝子に置換する置換ステップを含む、
ノックアウト非ヒト動物の作製方法。
- [請求項9] 請求項1から7のいずれか一項に記載のノックアウト非ヒト動物を用いる、
筋萎縮性側索硬化症又は認知症の治療薬又は予防薬のスクリーニング方法。

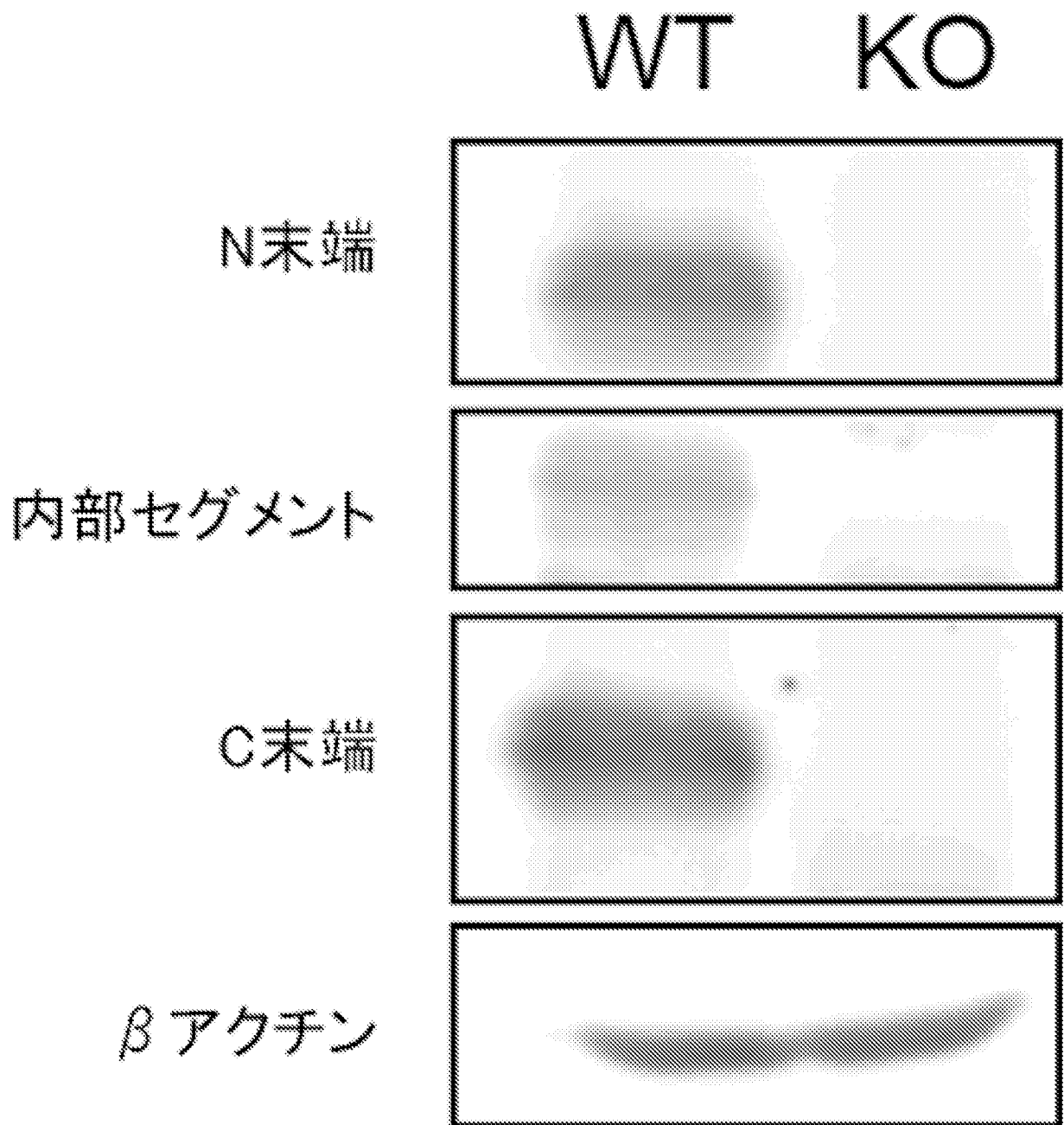
[図1]



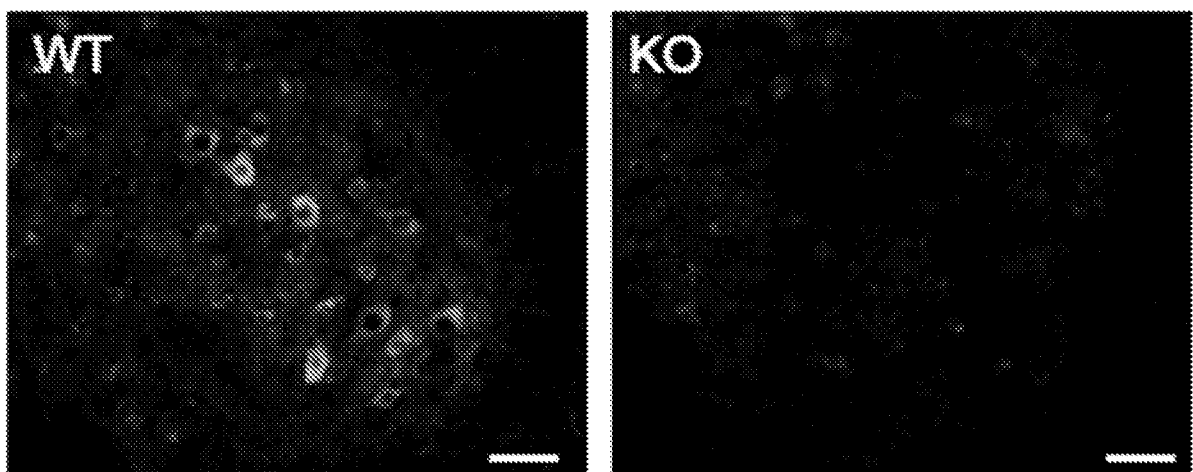
[図2]



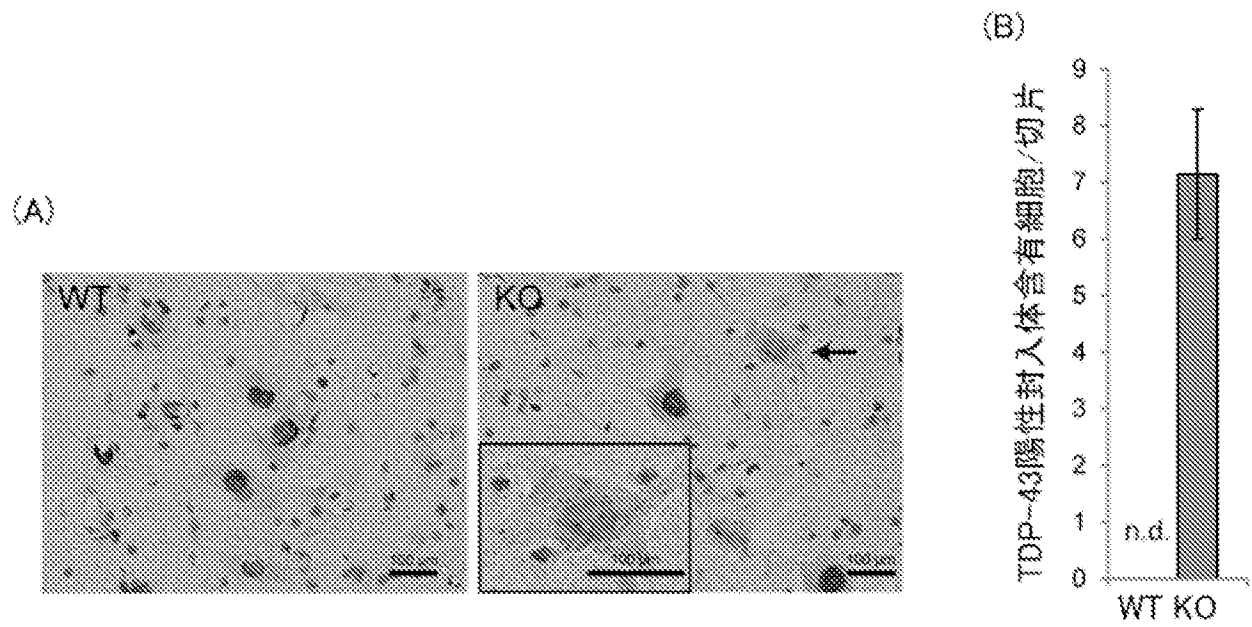
[図3]



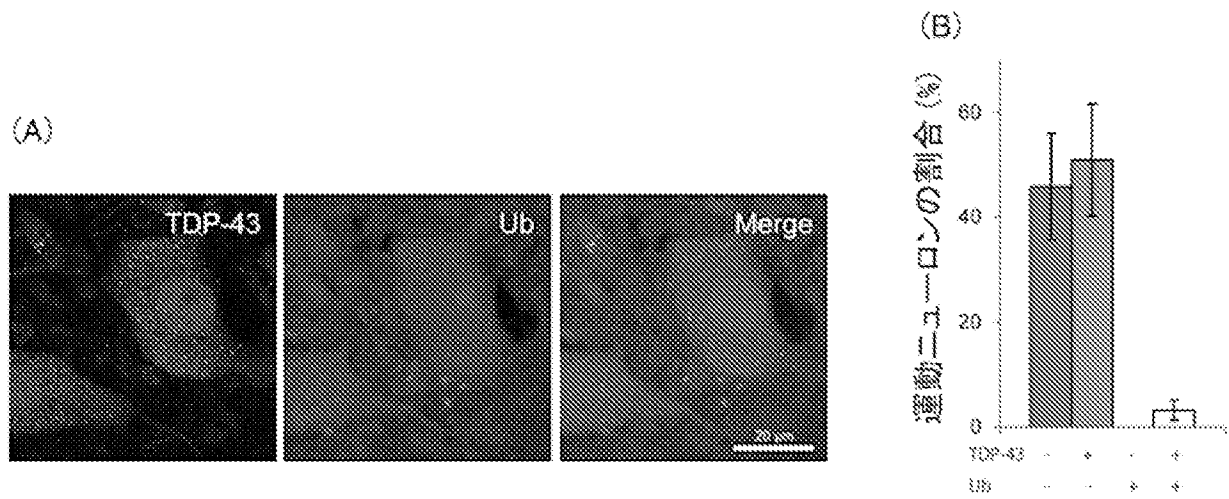
[図4]



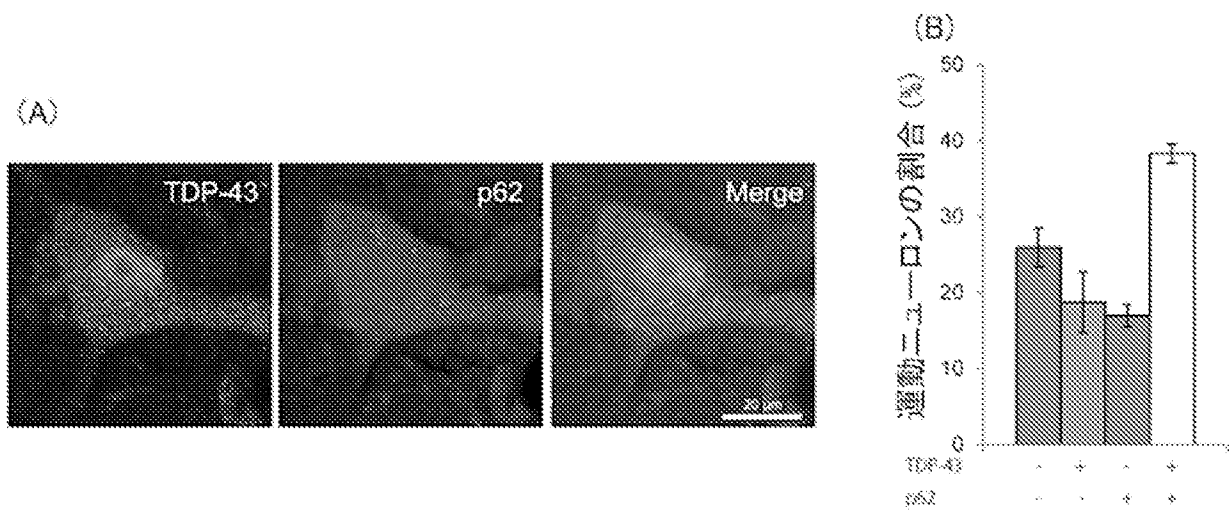
[図5]



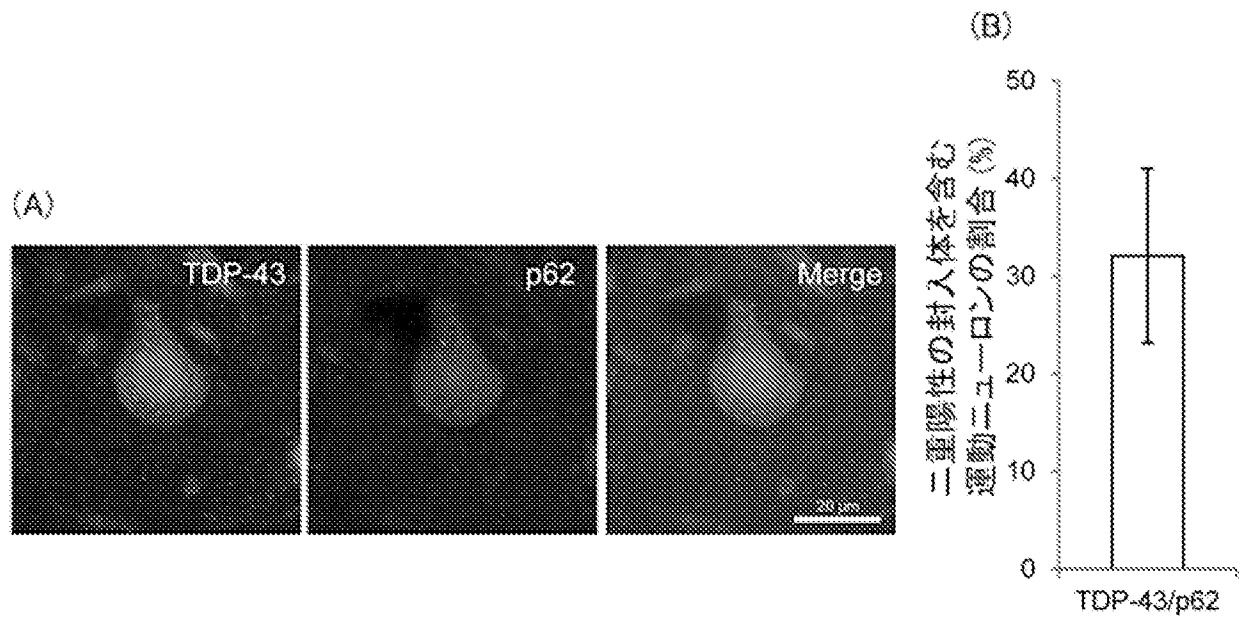
[図6]



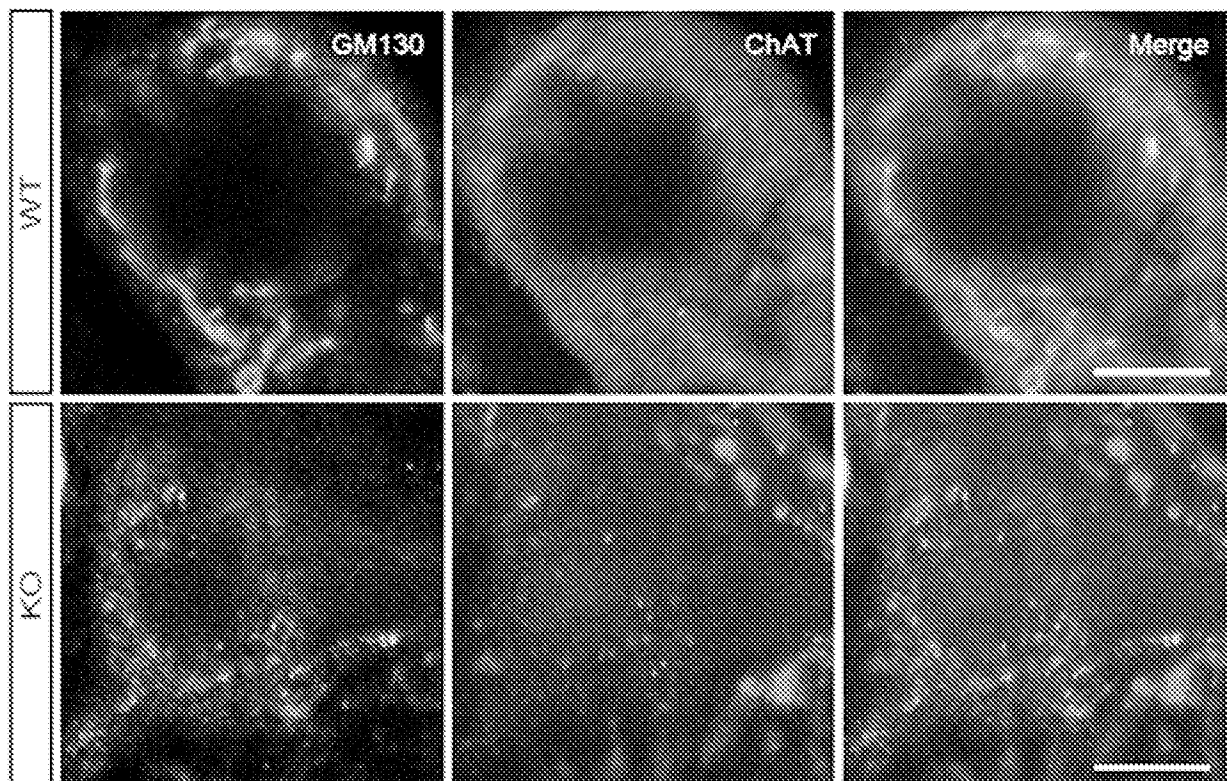
[図7]



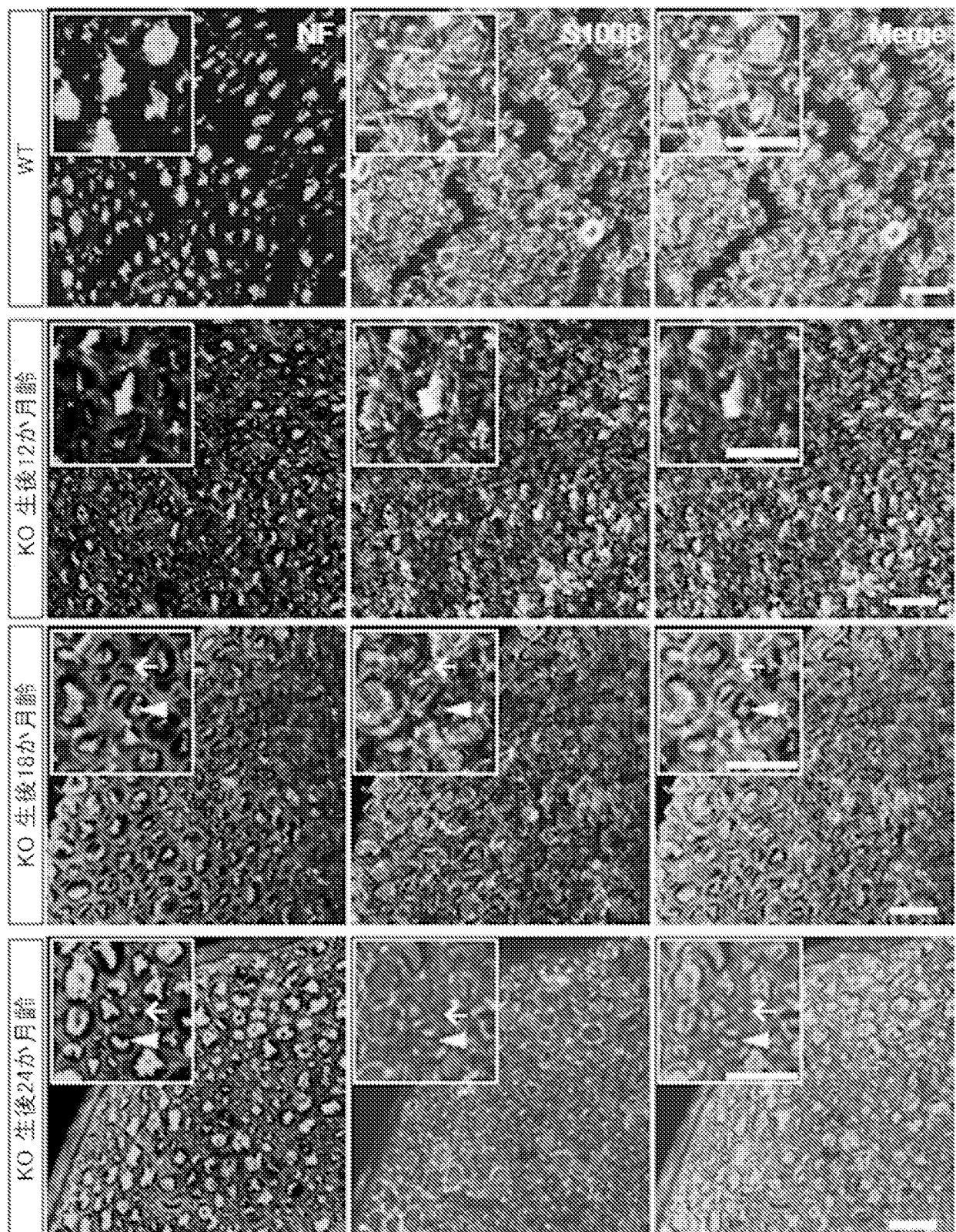
[図8]



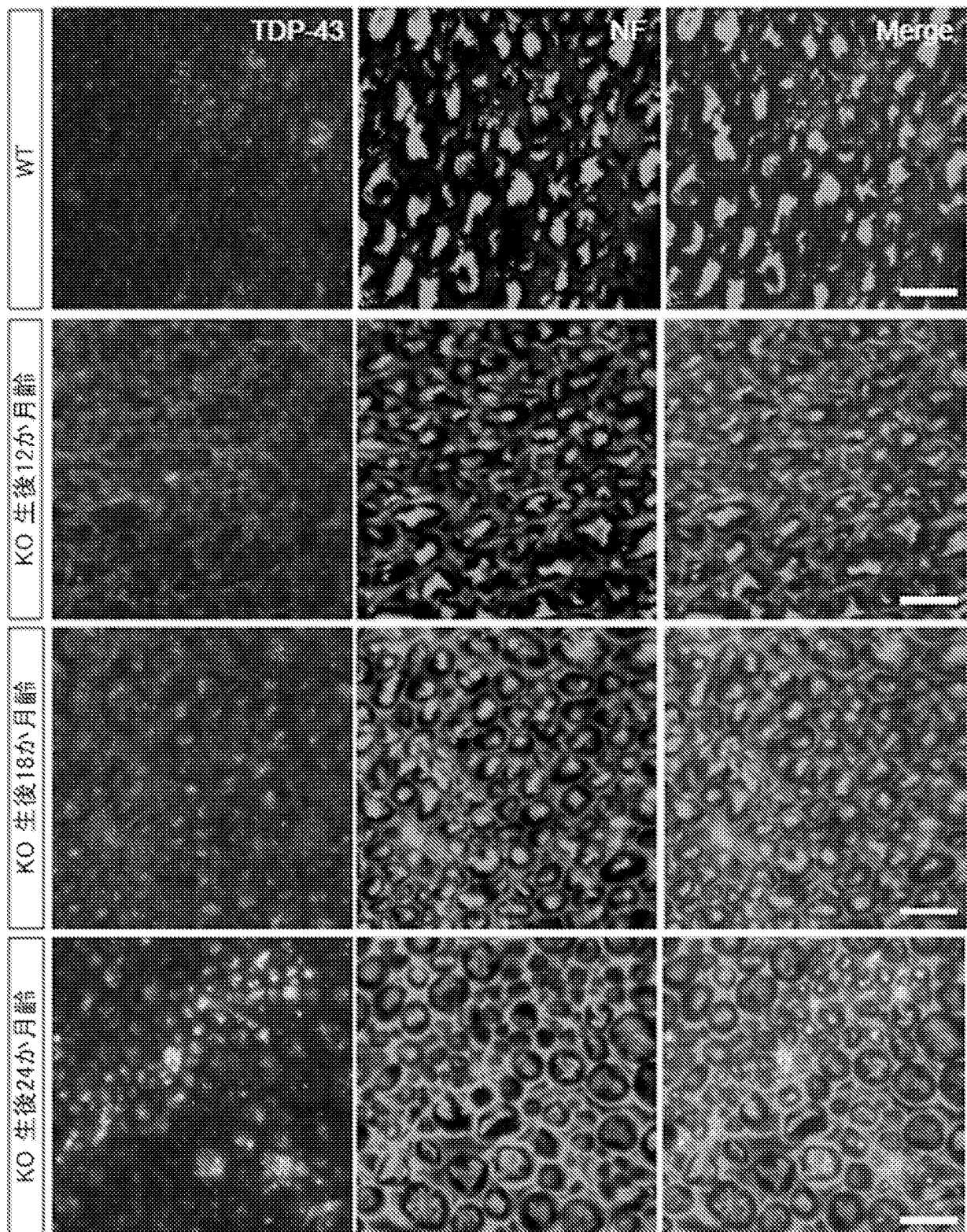
[図9]



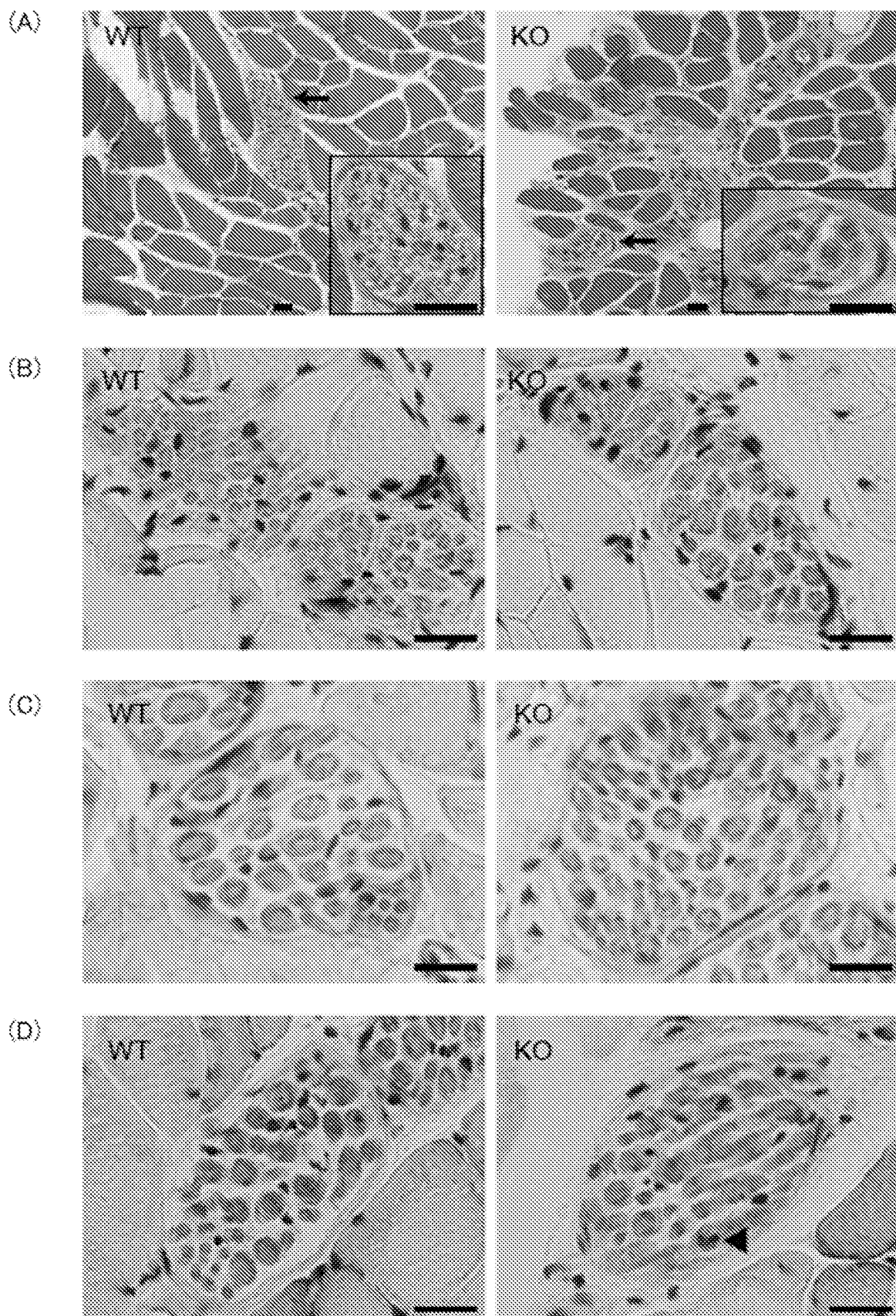
[図10]



[図11]



[図12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/044372

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. A01K67/027 (2006.01) i, C12N15/09 (2006.01) i, G01N33/15 (2006.01) i, G01N33/50 (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)

Int. Cl. A01K67/027, C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996

Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	丸山博文, 筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスの作成, ブレインサイエンス・レビュー, 2013, p. 169-182, page 170, paragraph [0003] to page 174, paragraph [0002], page 178, paragraph [0003] to page 181, paragraph [0002], fig. 2, 5, non-official translation (MARUYAMA, Hirofumi, Creating a model mouse for Amyotrophic Lateral Sclerosis, Brain Science Review 2013)	1-9
A	REZAIE, T. et al., Molecular cloning, genomic structure, and protein characterization of mouse optineurin, Genomics, 2005, Vol. 85, p. 131-138, page 132, left column bottom to paragraph [0002], fig. 1	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2017/044372

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ITO, Y. et al., RIPK1 mediates axonal degeneration by promoting inflammation and necroptosis in ALS, SCIENCE, 5 August 2016, vol. 353, pp. 603-608, abstract, etc.	1-9
A	ASHBURN, F. S. et al., Generation of a Novel Optineurin Knockout Mouse, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2014, vol. 55, 5710, entire text	1-9
A	JP 2011-67193 A (HIROSHIMA UNIVERSITY) 07 April 2011, claims & US 2012/0272345 A1, claims & US 2014/0186836 A1 & US 2016/0338328 A1 & WO 2011/024822 A1 & EP 2471916 A1	1-9
A	BO, R. D. et al., Novel optineurin mutations in patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis, J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2011, vol. 82, pp. 1239-1243, abstract, table 1, fig. 2	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A01K67/027(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(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 (I P C))

Int.Cl. A01K67/027, C12N15/09, G01N33/15, G01N33/50

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 8 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 8 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 8 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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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
A	丸山博文, 筋萎縮性側索硬化症のモデルマウスの作成, ブレインサイエンス・レビュー, 2013, p. 169-182, 170 ページ第 3 段落-174 ページ第 2 段落、178 ページ第 3 段落-181 ページ第 2 段落、図 2、図 5	1-9
A	REZAIE, T., et al., Molecular cloning, genomic structure, and protein characterization of mouse optineurin, Genomics, 2005, Vol. 85, p. 131-138, 132 ページ左欄下から 2 段落、図 1	1-9

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ 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、一般的技術水準を示すもの | 「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 |
| 「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 | 「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 |
| 「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) | 「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 |
| 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 | 「&」 同一パテントファミリー文献 |
| 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願 | |

国際調査を完了した日

2 8 . 0 2 . 2 0 1 8

国際調査報告の発送日

1 3 . 0 3 . 2 0 1 8

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

飯室 里美

4 N

2 9 3 6

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

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
A	ITO, Y., et al., RIPK1 mediates axonal degeneration by promoting inflammation and necroptosis in ALS, SCIENCE, 5 AUGUST 2016, Vol.353, p.603-608, 要約等	1-9
A	ASHBURN, F.S., et al., Generation of a Novel Optineurin Knockout Mouse, Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2014, Vol.55, 5710, 全文	1-9
A	JP 2011-67193 A (国立大学法人広島大学) 2011.04.07, 特許請求の範囲 & US 2012/0272345 A1、特許請求の範囲 & US 2014/0186836 A1 & US 2016/0338328 A1 & WO 2011/024822 A1 & EP 2471916 A1	1-9
A	BO, R.D., et al., Novel optineurin mutations in patients with familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis, J Neurol Neurosurg psychiatry. 2011, Vol.82, p.1239-1243, 要約、表1、図2	1-9