

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5493231号
(P5493231)

(45) 発行日 平成26年5月14日 (2014. 5. 14)

(24) 登録日 平成26年3月14日 (2014. 3. 14)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
A O 1 K 67/027 (2006. 01)	A O 1 K 67/027
A 6 1 K 48/00 (2006. 01)	A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 9/10 (2006. 01)	A 6 1 P 9/10
A 6 1 K 35/74 (2006. 01)	A 6 1 K 35/74 A
請求項の数 12 (全 22 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2009-552497 (P2009-552497)	(73) 特許権者	504147243
(86) (22) 出願日	平成21年2月4日 (2009. 2. 4)		国立大学法人 岡山大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/051907		岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号
(87) 国際公開番号	W02009/099112	(74) 代理人	100080791
(87) 国際公開日	平成21年8月13日 (2009. 8. 13)		弁理士 高島 一
審査請求日	平成24年1月30日 (2012. 1. 30)	(74) 代理人	100125070
(31) 優先権主張番号	特願2008-24071 (P2008-24071)		弁理士 土井 京子
(32) 優先日	平成20年2月4日 (2008. 2. 4)	(74) 代理人	100136629
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 鎌田 光宣
前置審査		(74) 代理人	100121212
			弁理士 田村 弥栄子
		(74) 代理人	100122688
			弁理士 山本 健二
		(74) 代理人	100117743
			弁理士 村田 美由紀
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規DNA断片およびその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の (a) または (b) のいずれかの単離された DNA であって、急性虚血期において一過的かつ血管内皮細胞特異的な転写促進活性を有する DNA。

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列からなる DNA

(b) 上記 (a) の DNA と 90 % 以上の同一性を有する塩基配列からなる DNA

【請求項 2】

以下の (a) または (b) のいずれかである、請求項 1 記載の DNA。

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列の部分塩基配列であって、塩基番号 5 2 7 ~ 1 3 4 6 で示される塩基配列を含む DNA

(b) 上記 (a) の DNA と 90 % 以上の同一性を有する塩基配列からなる DNA

【請求項 3】

請求項 1 または 2 記載の DNA を含むプロモーターを含む発現ベクターであって、該プロモーターに作動可能に連結される遺伝子を、急性虚血期において一過的かつ血管内皮細胞特異的に発現させ得るベクター。

【請求項 4】

前記プロモーターに作動可能に連結された予防および／または治療用遺伝子をさらに含むことを特徴とする、請求項 3 記載のベクター。

【請求項 5】

請求項 4 記載のベクターを含んでなる、予防および／または治療用遺伝子の産物を急性

虚血状態の血管内皮細胞に選択的に送達させ得るドラッグデリバリーシステム。

【請求項 6】

請求項 4 記載のベクターを含んでなる、急性虚血性疾患の予防および／または治療剤。

【請求項 7】

前記プロモーターに作動可能に連結されたレポーター遺伝子をさらに含むことを特徴とする、請求項 3 記載のベクター。

【請求項 8】

請求項 7 記載のベクターを含んでなる、急性虚血性疾患の診断用試薬。

【請求項 9】

請求項 7 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。

10

【請求項 10】

請求項 4 記載のベクターを用いることを特徴とする、ヒトを除く動物の急性虚血性疾患の予防および／または治療方法。

【請求項 11】

急性虚血性疾患を予防および／または治療するための、請求項 4 記載のベクター。

【請求項 12】

急性虚血性疾患の予防および／または治療剤の製造のための、請求項 4 記載のベクターの使用。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、低酸素状態において一過的に、特に急性虚血期に血管内皮細胞特異的に遺伝子の転写を促進し得る DNA 断片およびその用途に関する。詳しくは、本発明は、ADAMTS1 遺伝子プロモーターの特定の領域を含む DNA、該 DNA を含むベクター、並びに該ベクターを用いた血管内皮細胞の低酸素状態を伴う疾患の予防および／または治療、低酸素状態の血管内皮細胞の検出などに関する。

【背景技術】

【0002】

急性虚血を的確に診断し、かつ速やかに治療することは、急性期に有効な治療法が存在しない心筋梗塞や脳梗塞といった急性虚血性疾患に対して極めて重要なことである。

30

【0003】

急性心筋梗塞後の治癒過程において、細胞外マトリックス (ECM) が重要な役割を果たしていることが知られている。ECM 分子が集積と分解の間で劇的に変化することで心筋梗塞後の心筋リモデリングがなされており、そしてプロテアーゼやそのインヒビター、増殖因子などの多様な生物学的物質が ECM 再構成に関与していることが報告されている。特にこの過程では、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の発現が亢進し、活性化することが分かっている。

【0004】

また心筋梗塞後の心筋リモデリングには、副側血管の形成および発生 (血管新生) も影響を与えることから、急性心筋梗塞における血管新生増殖因子の役割も注目されている。血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) は、血管内皮マイトジェンであり、血管新生に関与すると考えられている。VEGF は冠状動脈の結紮後 1 時間以内に発現が亢進する。またエリスロポエチンは赤血球の増殖を促進するホルモンであって、低酸素状態で発現が亢進する。

40

【0005】

しかしながら、VEGF やエリスロポエチンは、特定の臓器や器官で発現が誘導されるわけでもなく、虚血時間が長引くにつれてより発現が増加するという時間依存性を有している。そのため、これらをバイオマーカーとして特定の組織の低酸素状態を見極めることは困難であったし、一過的な急性虚血状態 (例えば、急性虚血性疾患) の原因を特定する

50

ことも困難であった。

【0006】

ADAMTS (A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin motifs) は、近年発見されたMMPである。ADAMTSは通常の組織では発現が認められないが、LPS刺激により誘導され、MMPよりも広範な種々の基質を認識する。

【0007】

また、ADAMTSはECMを分解するだけでなく、血管新生阻害剤として機能することが報告されている。例えば、ADAMTS-1および8は抗血管新生作用を有することが報告されており（非特許文献1参照）、ADAMTS-1はFGF-2により誘導される血管形成を抑制し、かつVEGFにより誘導される血管新生を阻害することが報告されている。さらにADAMTS-1はVEGFに結合し、その受容体であるVEGFR2のリン酸化を阻害することも知られている（非特許文献1参照）。

10

【0008】

これらの知見に基づいて、本発明者らは、ADAMTSが急性心筋梗塞に関与しているとの仮説を立て、ラットの心筋梗塞モデルにおいて、ADAMTS-1が心筋梗塞部およびその辺縁部の、主に血管内皮細胞や心筋細胞において高発現していることを見出した（非特許文献2および3参照）。

【非特許文献1】J. Biol. Chem., 1999 Aug 13; 274 (33) : 23349-23357

20

【非特許文献2】Connective Tissue, 34, 87 (2002)

【非特許文献3】J. Biochem. 136, 439-446 (2004)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明の目的は、早期診断が疾患の治療や予後に大きく影響する心筋梗塞等の急性虚血性疾患を発症の初期の段階で検出する手段を提供することである。また、当該疾患の病変部位に効率よく薬剤を送達し得るドラッグデリバリーシステムを提供し、以って急性虚血性疾患の新規かつ有効な予防および／または治療手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】

30

【0010】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討した結果、ADAMTS-1タンパク質が急性虚血の初期段階で血管内皮細胞特異的に分泌されることを発見した。そこで、ADAMTS-1のプロモーター領域に低酸素状態で特異的に遺伝子の発現を亢進させ得る配列が存在するか否かを検証した結果、低酸素状態で誘導されるエリスロポエチンやVEGF等の遺伝子の転写調節領域に共通して存在するハイポキシア応答エレメント（以下、HREという場合がある）のコンセンサス配列がADAMTS-1のプロモーター領域にも複数存在することが明らかとなり、さらにHREを含む特定の領域が、低酸素状態において一過的に、かつ血管内皮細胞特異的に遺伝子の転写を促進することを見出した。

本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに到った。

40

【0011】

即ち、本発明は以下のとおりである。

[1] 以下の(a)～(d)のいずれかの単離されたDNA。

(a) 配列番号1に示される塩基配列からなるDNA

(b) 上記(a)のDNAの部分DNAであって、塩基番号167～174、284～291、414～422、427～434、487～494、862～869、1034～1041および1398～1405で示される各塩基配列からなるハイポキシア応答エレメントの少なくとも1つを含み、かつ低酸素状態において一過的に、血管内皮細胞特異的な転写促進活性を有するDNA

50

(c) 上記 (a) または (b) の DNA の非ヒト哺乳動物オルソログ

(d) 上記 (a) ~ (c) のいずれかの DNA と 80 % 以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ低酸素状態において一過的に、血管内皮細胞特異的な転写促進活性を有する DNA

[2] 以下の (a) ~ (c) のいずれかである、[1] 記載の DNA。

(a) 配列番号 1 に示される塩基配列の部分塩基配列であって、塩基番号 527 ~ 1346 で示される塩基配列を含み、かつ低酸素状態において一過的に、血管内皮細胞特異的な転写促進活性を有する DNA

(b) 上記 (a) の DNA の非ヒト哺乳動物オルソログ

(c) 上記 (a) または (b) の DNA と 80 % 以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつ低酸素状態において一過的に、血管内皮細胞特異的な転写促進活性を有する DNA

10

[3] [1] または [2] 記載の DNA を含むプロモーターを含む発現ベクターであって、該プロモーターに作動可能に連結される遺伝子を、低酸素状態において一過的に、血管内皮細胞特異的に発現させ得るベクター。

[4] 低酸素状態における一過的発現が急性虚血期に起こることを特徴とする、[3] 記載のベクター。

[5] 前記プロモーターに作動可能に連結された予防および／または治療用遺伝子をさらに含むことを特徴とする、[3] または [4] 記載のベクター。

[6] [5] 記載のベクターを含んでなる、予防および／または治療用遺伝子の産物を低酸素状態の血管内皮細胞に選択的に送達させ得るドラッグデリバリーシステム。

20

[7] [5] 記載のベクターを含んでなる、血管内皮細胞の低酸素状態を伴う疾患の予防および／または治療剤。

[8] 疾患が急性虚血性疾患である、[7] 記載の剤。

[9] 前記プロモーターに作動可能に連結されたレポーター遺伝子をさらに含むことを特徴とする、[3] または [4] 記載のベクター。

[10] [9] 記載のベクターを含んでなる、低酸素状態の血管内皮細胞を検出するための試薬。

[11] 急性虚血性疾患の診断用である、[10] 記載の試薬。

[12] [9] 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。

[13] [5] 記載のベクターを用いることを特徴とする、血管内皮細胞の低酸素状態を伴う疾患の予防および／または治療方法。

30

[14] 血管内皮細胞の低酸素状態を伴う疾患を予防および／または治療するための、[5] 記載のベクター。

[15] 血管内皮細胞の低酸素状態を伴う疾患の予防および／または治療剤の製造のための、[5] 記載のベクターの使用。

【発明の効果】

【0012】

本発明の DNA は、低酸素状態において一過的に、特に急性虚血期に、血管内皮細胞特異的に遺伝子の転写を促進することができるので、該 DNA を含むプロモーターを含む本発明のベクターは、低酸素状態の血管内皮細胞内で所望の遺伝子を一過的に発現させることができる。即ち、該遺伝子の産物（タンパク質、RNA）である薬剤を、低酸素状態の血管内皮細胞に選択的に送達することができる。

40

また、該プロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したベクターは、低酸素状態の血管内皮細胞を検出するのに用いることができ、急性虚血性疾患などの血管内皮細胞の低酸素状態を伴う疾患の診断が可能である。

さらに、該プロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したベクターが導入されたトランスジェニック非ヒト動物は、低酸素状態の部位を容易に可視化することができるので、低酸素状態あるいは急性虚血性疾患の動物モデルを作製するための動物材料として用いることができる。

【図面の簡単な説明】

50

【0013】

【図1】低酸素時のヒト臍帯静脈内皮細胞（HUV EC）におけるADAMTS-1の発現を示す図である。

【図2】低酸素時の内皮細胞以外の細胞におけるADAMTS-1の発現を示す図である。（A）ヒト網膜色素上皮細胞（ARPE）；（B）ヒト線維芽細胞；（C）ヒト心筋細胞（H9C2）

【図3-1】低酸素時の各種細胞におけるADAMTS-1の発現を示す図である。左から、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUV EC）；サル腎細胞（COS7）；ヒト平滑筋細胞（SMC）

【図3-2】低酸素時の各種細胞におけるADAMTS-1の発現を示す図である。左から、ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUV EC）；ヒト線維芽細胞；サル腎細胞（COS7）；ヒト網膜色素上皮細胞（ARPE）

【図4】低酸素時の各種血管内皮細胞におけるADAMTS-1の発現を示す図である。左から、ヒト微小血管内皮細胞（HMEC）；ヒト肺動脈内皮細胞（HPAEC）

【図5】ヒトADAMTS-1遺伝子のプロモーター領域、5'UTRおよびコード領域の一部の塩基配列を示す図である。ボックスで囲んだ配列はHREコンセンサス配列の一部を示す。大文字で太字のTATAおよびATGはそれぞれTATA配列および開始コドンを示す。小文字はプロモーター領域（配列番号1に相当）、大文字は転写領域を示す。

【図6】種々の長さのADAMTS-1プロモーター断片の模式図である。

【図7】低酸素時のHUV ECにおける種々の長さのADAMTS-1プロモーター断片のプロモーター活性を示す図である。各コンストラクトは図6にそれぞれ対応する。（F1は-1814～-37）

【図8】低酸素時のHUV ECにおけるADAMTS-1プロモーター断片（ADAMTS1-P1はF3、ADAMTS1-P2はF6）のプロモーター活性を示す図である。低酸素状態は、塩化コバルトを添加して24時間経過した状態である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

本発明は、低酸素状態において一過的に、かつ血管内皮細胞特異的に下流の遺伝子の転写を促進し得る新規DNA（以下、「本発明のDNA」ともいう）を提供する。ここで「低酸素状態」とは、酸素分圧が、血管内皮細胞の生理的条件における正常時の酸素分圧よりも低下した状態であって、特にHIF-1および／またはHIF-2発現の急激な上昇を引き起こす状態をいう。正常時の酸素分圧は体内の各臓器によっても大きく異なるが、HIF-1等の低酸素性遺伝子応答を引き起こす酸素分圧としては、例えば40mmHg以下の状態が挙げられる。動物個体において生じる低酸素状態の代表例として虚血が挙げられる。また、培養下の細胞や組織においては、酸素濃度が1～5%の状態をいう。

【0015】

「一過的」とは、低酸素状態の期間のうちのある一定の期間をいうが、好ましくは低酸素状態の初期段階であり、血管内皮細胞の種類によっても異なるが、例えばヒト臍帯静脈内皮細胞（HUV EC）等では低酸素状態におかれた直後～約12時間後、好ましくは約1～6時間後、例えばヒト冠動脈内皮細胞（HCAEC）等では約1～約3日後の期間が挙げられる。動物個体において生じる低酸素状態としては、急性虚血時に相当する期間である。

【0016】

本発明のDNAは、配列番号1に示される塩基配列であるヒトADAMTS-1プロモーターの一部（転写開始点の直前から上流2039塩基）、あるいは少なくとも1つのHREコンセンサス配列を含むその部分DNAと同一又は実質的に同一の塩基配列を有し、かつ低酸素状態において一過的に、血管内皮細胞特異的な転写促進活性を有するDNAである。ここで「HREコンセンサス配列」とは、hypoxia-inducible transcription factor（HIF）-1および／またはHIF-2が結合し得る高度に保存された配列であって、「BACGTSK（ここでAはアデニンを

示し、BはG（グアニン）、C（シトシン）またはT（チミン）を示し、SはGまたはCを示し、KはGまたはTを示す）」からなる塩基配列、あるいは該塩基配列から1ないし3個、好ましくは1ないし2個の塩基が置換、欠失、付加または挿入された塩基配列であって、H I F-1および／またはH I F-2が結合し得る配列を意味する。変異H R E配列へのH I F-1、H I F-2の結合能は、公知のゲルシフトアッセイなどにより容易に評価することができる。

なお、H I F-1、H I F-2にはそれぞれ α および β の2つのサブユニットが存在するが、本明細書では特に限定されず、H R Eコンセンサス配列は、いずれか一方のサブユニットに結合し得る配列であってもよいし、両サブユニットからなる複合体に結合し得るものであってもよい。

10

【0017】

配列番号1に示される塩基配列中のH R Eコンセンサス配列としては、塩基番号167～174、284～291、414～422、427～434、487～494、862～869、1034～1041および1398～1405で示される各塩基配列が挙げられる。従って、これらの塩基配列の少なくとも1つを含み、かつ低酸素状態において一過的に、血管内皮細胞特異的な転写促進活性を有する限り、いかなるDNAも本発明のDNAに包含され得る。

好ましくは、本発明のDNAは、配列番号1に示される塩基配列の部分塩基配列であって、塩基番号527～1346で示される塩基配列と同一又は実質的に同一の塩基配列を含み、かつ低酸素状態において一過的に、血管内皮細胞特異的な転写促進活性を有するDNAである。

20

【0018】

「実質的に同一の塩基配列」としては、配列番号1に示される塩基配列もしくはその部分塩基配列において、1) 1もしくは2以上の塩基（好ましくは1～50塩基、より好ましくは1～10塩基、いっそう好ましくは1～5、4、3もしくは2塩基）が他の塩基で置換された塩基配列、2) 1もしくは2以上の塩基（好ましくは1～50塩基、より好ましくは1～10塩基、いっそう好ましくは1～5、4、3もしくは2塩基）が欠失した塩基配列、3) 1もしくは2以上の塩基（好ましくは1～50塩基、より好ましくは1～10塩基、いっそう好ましくは1～5、4、3もしくは2塩基）が挿入された塩基配列、4) 1もしくは2以上の塩基（好ましくは1～50塩基、より好ましくは1～10塩基、いっそう好ましくは1～5、4、3もしくは2塩基）が付加された塩基配列及び5) それらを組み合わせた塩基配列であって、低酸素状態において一過的に、かつ血管内皮細胞特異的な転写促進活性を有するものが挙げられる。転写促進活性は、H I F-1またはH I F-2との結合アッセイ、あるいは調べるべき塩基配列を含むプロモーターの制御下にあるレポーター遺伝子（例：ルシフェラーゼ、Green Fluorescent Protein (GFP) 等）の低酸素状態下における発現を調べることにより検定することができる。上記の置換、欠失、挿入もしくは付加は、H R Eコンセンサス配列以外の部分においてなされることが望ましい。

30

【0019】

あるいは、「実質的に同一の塩基配列」として、配列番号1に示される塩基配列に相補的な塩基配列からなるDNAと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズしうるDNAであって、低酸素状態において一過的に、かつ血管内皮細胞特異的な転写促進活性を有するものが挙げられる。ここで、「ストリンジェントな条件」とは、配列番号1に示される塩基配列と80%以上の相同性を有する塩基配列がハイブリダイズする条件を意味する。好ましくは、配列番号1に示される塩基配列と90%以上、より好ましくは95%以上の相同性を有する塩基配列からなるDNAがハイブリダイズする条件が挙げられる。尚、本明細書における塩基配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；フィルタリング=ON；マッチス

40

50

コア＝1；ミスマッチスコア＝－3）にて計算することができる。具体的な「ストリンジェントな条件」としては、例えば、「モレキュラー・クローニング：ア・ラボラトリー・マニュアル 第2版（Molecular Cloning：A Laboratory Manual 2nd ed.）」（T. Maniatisら編集、コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー発行、1989年）に記載の条件等、例えば、6×SSC（sodium chloride／sodium citrate）中45℃でのハイブリダイゼーション反応の後、0.2×SSC／0.1％ SDS中65℃での一回以上の洗浄などが挙げられる。当業者は、ハイブリダイゼーション溶液の塩濃度、ハイブリダイゼーション反応の温度、プローブ濃度、プローブの長さ、ミスマッチの数、ハイブリダイゼーション反応の時間、洗浄液の塩濃度、洗浄の温度等を適宜変更することにより、所望のストリンジェンシーに容易に調節することができる。

10

【0020】

他の「実質的に同一の塩基配列」として、例えば、ヒト以外の哺乳動物（例：マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ハムスター、ウシ、ウマ、ヒツジ、サル、イヌ、ネコ等）由来のADAMTS-1遺伝子プロモーター中の配列番号1に示される塩基配列に対応する塩基配列、または少なくとも1つのHREコンセンサス配列を含むその一部などが挙げられる。他の哺乳動物におけるオルソログは、配列番号1に示される塩基配列をクエリーにして、ヒト以外の哺乳動物のゲノムおよび／またはcDNAのデータベースに対してBLASTやFASTAを用いて検索をかけるか、あるいは、例えばJackson研究所から提供されるMouse Genome Informatics（<http://www.informatics.jax.org/>）でaccession番号や遺伝子記号／遺伝子名をキーワードにして検索をかけ、ヒットしたデータのMammalian Orthologyの情報にアクセスする等によって、その配列情報を取得することができる。

20

【0021】

本発明のDNAにより、低酸素状態において一過的に遺伝子の転写が促進され得る血管内皮細胞はいかなるものであってもよく、例えば、臍帯静脈内皮細胞、冠動脈内皮細胞、脳血管内皮細胞、大動脈内皮細胞、肺動脈内皮細胞、上腸間膜動脈内皮細胞、腎動脈内皮細胞等が挙げられるが、それらに限定されない。

【0022】

本明細書における「転写促進活性」とは、TATAボックスなどのbasalなプロモーター配列と協働して、低酸素状態において一過的に、かつ血管内皮細胞特異的に、その下流におかれた遺伝子の転写を促進する能力を意味し、自体basalなプロモーター活性を有しないものも、本発明のDNAに包含される。

30

【0023】

本発明のDNAは酸または塩基との生理学的に許容される塩であってもよく、例えば、生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、中でも、無機酸（例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸）との塩などが用いられる。

40

【0024】

本発明のDNAは、ヒトまたは他の哺乳動物（例：マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ハムスター、ウシ、ウマ、ヒツジ、サル、イヌ、ネコ等）由来の細胞〔例えば、肝細胞、脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞、線維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例：マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、もしくは間質細胞、またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など〕もしくはそれらの細胞が存在するあらゆる組織〔例えば、脳、脳の各部位（例：嗅球、扁桃核、大脳基底球、海馬、視床、視床下部、大脳皮質、延髄、小脳）、

50

脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管（例：大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、唾液腺、末梢血、前立腺、睾丸、卵巣、胎盤、子宮、骨、軟骨、関節など] から抽出したゲノムDNAより、公知のADAMTS-1遺伝子プロモーター配列をプローブとして、該プロモーター領域を含むゲノムDNAをクローニングし、DNA分解酵素、例えば、適当な制限酵素を用いて所望の部分プロモーター配列を含むDNA断片に切断、ゲル電気泳動で分離後、所望のバンドを回収してDNAを精製することにより調製することができる。あるいは、上記細胞の粗抽出液もしくはそこから単離したゲノムDNAを鋳型として、配列番号1に示される塩基配列を基に合成したプライマーを用いたPCRにより、ADAMTS-1プロモーターの部分配列を増幅、単離することもできる。

10

【0025】

また、本発明のDNAは、配列番号1に示される塩基配列を基に、市販のDNA/RNA自動合成装置を用いて化学合成することによっても得ることができる。

【0026】

本発明はまた、上記本発明のDNAを含むプロモーターを含む発現ベクターであって、該プロモーターに作動可能に連結される遺伝子を、低酸素状態において一過的に、血管内皮細胞特異的に発現させ得るベクターを提供する。

【0027】

本発明のDNAがTATAボックスなどのbasalなプロモーター配列を含む場合（配列番号1の塩基番号1551～1554には推定のTATAボックスが存在する）には、該DNA自体をプロモーターとして使用することができるが、basalなプロモーター配列を含まない場合は、他の公知の哺乳動物発現用プロモーター、例えばSRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、HSV-tkプロモーターなどに由来するbasalなプロモーター活性を付与する塩基配列が付加される。さらに他の転写制御シス配列（例：CAATボックス、GCボックス等）を適当な位置に配置することもできる。

20

【0028】

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド（例：pBR322, pBR325, pUC12, pUC13）、枯草菌由来のプラスミド（例：pUB110, pTP5, pC194）、酵母由来プラスミド（例：pSH19, pSH15）、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルス、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neoなどが用いられる。

30

【0029】

本発明のベクターとしては、上記の他に、所望によりスプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、複製起点などを含有しているものを用いることができる。ポリA付加シグナルは本発明のDNAを含むプロモーターの下流に、マルチクローニングサイトを介して連結することが好ましい。尚、選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neo^rと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。

40

【0030】

また、必要に応じて、シグナル配列をコードする塩基配列（シグナルコドン）をプロモーターとポリA付加シグナルの間に付加して分泌発現ベクターとしてもよい。シグナル配列としては、例えば、インシュリン・シグナル配列、α-インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などが用いられ得る。

【0031】

上記の各ベクター構成要素を、制限酵素やリガーゼを用いた周知慣用の遺伝子操作によって適切に連結することにより、本発明のベクターを構築することができる。

50

【0032】

上述の通り、本発明のDNAは、好ましくは、動物個体において生じる低酸素状態としては急性虚血時に相当する時期に、一過的にかつ血管内皮細胞特異的に遺伝子の転写を促進することができるので、該DNAを含むプロモーターを含む本発明のベクターは、好ましくは急性虚血期特異的な発現ベクターである。

【0033】

本発明のベクターは、低酸素状態において一過的に、好ましくは急性虚血期特異的に、血管内皮細胞特異的に遺伝子の転写を促進し得るので、該ベクターのプロモーターの下流に、低酸素状態の血管内皮細胞で発現させることにより疾患を予防および／または治療し得るタンパク質もしくはRNA（例えば、アンチセンスRNA、siRNA等）をコードする遺伝子（単に「予防および／または治療用遺伝子」ともいう）を作動可能に連結して得られるベクターを、該疾患の予防および／または治療を必要とする哺乳動物、好ましくはヒトに投与することにより、該疾患を予防および／または治療することができる。

従って、本発明は、上記本発明のベクターを含んでなる、血管内皮細胞の低酸素状態を伴う疾患の予防および／または治療剤を提供する。ここで「血管内皮細胞の低酸素状態を伴う疾患」としては、血管の閉塞、硬化、痙攣や、血液循環障害などによって急激に組織への血液供給が途絶え、低酸素状態に陥ることで発生する疾患（本明細書では「急性虚血性疾患」と総称する）や、内部環境として低酸素状態を有する癌、特に増大している時期の癌などが挙げられる。急性虚血性疾患としては、具体的には、虚血性心疾患（不安定狭心症、心筋梗塞、急性冠症候群など）、虚血性脳疾患（脳梗塞、TIAなど）、虚血性肺疾患（肺梗塞など）、腎梗塞、急性腸間膜動脈閉塞症、急性動脈閉塞症、網膜動脈閉塞症、網膜静脈閉塞症、虚血性腸疾患（虚血性大腸炎など）などが挙げられる。さらに「血管内皮細胞の低酸素状態を伴う疾患」には、臓器移植後の虚血再灌流障害も含まれる。

【0034】

本発明における予防および／または治療用遺伝子、即ち、血管内皮細胞の低酸素状態を伴う疾患、好ましくは急性虚血性疾患を予防および／または治療し得る遺伝子としては、例えば、VEGF、エリスロポエチン、肝細胞増殖因子（HGF）、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic FGF）、内皮由来一酸化窒素合成酵素（eNOS）、Integrin-linked kinase、Mcl-1等のいわゆる血管新生にかかわる遺伝子、抗アポトーシス作用を有する遺伝子（たとえばBcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1など）や酸化ストレス応答遺伝子を発現させるNF-κBと結合する遺伝子断片ならびに虚血耐性遺伝子などが挙げられる。これらの遺伝子の塩基配列はいずれも公知であるので、該塩基配列をもとにプライマーを作製し、ヒトもしくは他の哺乳動物由来の細胞、組織または臓器より調製したゲノムDNA画分または全RNAもしくはmRNA画分をそれぞれ鋳型として用い、Polymerase Chain Reaction（以下、「PCR法」と略称する）またはReverse Transcriptase-PCR（以下、「RT-PCR法」と略称する）によって、予防および／または治療用遺伝子を直接増幅することができる。あるいは、予防および／または治療用遺伝子は、上記した細胞、組織または臓器より調製したゲノムDNAまたは全RNAもしくはmRNAの断片を適当なベクター中に挿入して調製されるゲノムDNAライブラリーおよびcDNAライブラリーから、コロニーもしくはプラークハイブリダイゼーション法またはPCR法などにより、それぞれクローニングすることもできる。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。

【0035】

得られた予防および／または治療用遺伝子を適当な制限酵素で消化し、同様に処理してプロモーターとポリA付加シグナルの間に開裂させた本発明のベクターと、リガーゼを用いてライゲーションさせることにより、予防および／または治療用遺伝子が作動可能に連結されたベクターを作製することができる。

【0036】

本発明のベクターは、低酸素状態において一過的に、好ましくは急性虚血期特異的に、血管内皮細胞特異的に遺伝子の転写を促進し得るので、血管内皮細胞以外の細胞に導入されたベクターは、予防および／または治療用遺伝子を発現することができない。その結果、予防および／または治療用遺伝子の産物は、血管内皮細胞に選択的に、しかも低酸素状態において一過的に送達されたと同様の効果を奏する。

従って、本発明はまた、一側面において、本発明のベクターを含んでなる、予防および／または治療用遺伝子の産物を低酸素状態の血管内皮細胞に選択的に送達させ得るドラッグデリバリーシステムを提供する。

【0037】

本発明のベクターを、血管内皮細胞の低酸素状態を伴う疾患の予防および／または治療剤として使用する場合は、該ベクターを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って製剤化することができる。該ベクターは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与することができる。

【0038】

例えば、該ベクターは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該ベクターを、生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに、一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

【0039】

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのようない甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中に活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例：エタノール）、ポリアルコール（例：プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例：ポリソルベート80TM、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

【0040】

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

【0041】

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや他の哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ハムスター、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）に対して投与することができる。

【0042】

本発明のベクターの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に、例えば心筋梗塞患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば注射剤の形では、通常、例えば心筋梗塞患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を投与するのが好都合である。他の動物の場合も、ヒト60kgあたりに換算した量を投与することができる。

【0043】

一方、本発明のベクターのプロモーターの下流に、レポーター遺伝子を作動可能に連結して、哺乳動物の細胞、組織もしくは個体に導入すると、該レポーター遺伝子は、低酸素状態のある特定の時期、好ましくは急性虚血期に代表される低酸素状態の初期段階にある血管内皮細胞において特異的に発現するので、該レポーター遺伝子にコードされるレポータータンパク質を検出することにより、低酸素状態、特に急性虚血期の血管内皮細胞を検出することができる。

従って、本発明はまた、レポーター遺伝子が作動可能に連結された本発明のベクターを含んでなる、低酸素状態の血管内皮細胞を検出するための試薬を提供する。

【0044】

本発明の検出用試薬に用いられるレポーター遺伝子としては、例えば、ルシフェラーゼ、GFP、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等をコードする遺伝子が挙げられるが、これらに限定されない。低酸素状態、特に急性虚血期の血管内皮細胞を迅速に検出するという目的を考慮すると、画像診断が可能なレポーター遺伝子が特に好ましい。例えばレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いた場合、本発明の検出試薬を哺乳動物に投与して本発明のベクターを導入した後、ルシフェリンを該動物に投与し、超高感度冷却CCDカメラを搭載したリアルタイムin vivoイメージング装置（例えば、住商ファーマインターナショナル（株）のIVIS200など）を用いて、化学発光をデジタル画像として可視化することにより、容易に低酸素状態の血管内皮細胞を検出することができる。

【0045】

好ましくは、本発明の検出用試薬は、血管内皮細胞の低酸素状態を伴う疾患、好ましくは急性虚血性疾患に罹患しているか、将来罹患することが疑われる哺乳動物、好ましくはヒトに投与することにより、当該疾患の診断薬として用いることができる。したがって、本発明の検出用試薬は、好ましくは前記本発明の予防・治療剤の場合と同様に、該ベクターを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、常套手段に従って製剤化することができる。該ベクターは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与することができる。投与経路および投与量についても、前記本発明の予防・治療剤の場合に準じて決定することができる。

【0046】

上記のように、レポーター遺伝子が作動可能に連結された本発明のベクターを導入した哺乳動物の細胞、組織もしくは個体では、該レポーター遺伝子の発現をモニタリングすることにより、低酸素状態、特に急性虚血期の血管内皮細胞を容易に検出することができる。従って、該ベクターを導入したトランスジェニック動物は、低酸素状態あるいは急性虚血性疾患の動物モデルを作製するための動物材料として、好ましく用いることができる。

【0047】

本発明のトランスジェニック（Tg）動物は、非ヒト哺乳動物の受精卵や、未受精卵、精子およびその前駆細胞（始原生殖細胞、卵原細胞、卵母細胞、卵細胞、精原細胞、精母細胞、精細胞等）などに、好ましくは受精卵の胚発生の初期段階（さらに好ましくは8細胞

10

20

30

40

50

胞期以前)において、リン酸カルシウム共沈殿法、電気穿孔(エレクトロポレーション)法、リポフェクション法、凝集法、顕微注入(マイクロインジェクション)法、遺伝子銃(パーティクルガン)法、DEAE-デキストラン法などの遺伝子導入法によって、本発明のベクターを導入することにより作製される。また、該遺伝子導入法により、非ヒト哺乳動物の体細胞、組織、臓器などに該ベクターを導入し、細胞培養、組織培養などに利用することもでき、さらに、この細胞を上述の胚(もしくは生殖)細胞と公知の細胞融合法を用いて融合させることにより遺伝子導入動物を作製することもできる。

【0048】

また、このようにして作製されたTg動物の生体の一部も、Tg動物個体と同様な目的に用いることができる。本発明の遺伝子導入動物の生体の一部としては、肝臓、心臓、腎臓、副腎、血管、消化管、脳などの臓器や、当該臓器由来の組織片および細胞などが好ましく例示される。

【0049】

本発明で対象とし得る「非ヒト哺乳動物」は、トランスジェニック系が確立されたヒト以外の哺乳動物であれば特に制限はなく、例えば、ウシ、サル、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、ラット、マウスなどが挙げられる。好ましくは、ウサギ、イヌ、ネコ、モルモット、ハムスター、マウス、ラット等であり、なかでも疾患モデル動物作製の面から個体発生および生物サイクルが比較的短く、繁殖が容易な齧歯動物がより好ましく、とりわけマウス(例えば、純系としてC57BL/6系統、DBA2系統など、交雑系としてB6C3F₁系統、BDF₁系統、B6D2F₁系統、BALB/c系統、ICR系統など)およびラット(例えば、Wistar、SDなど)が好ましい。

また、哺乳動物以外にもニワトリなどの鳥類が本発明で対象とする「非ヒト哺乳動物」と同様の目的に用いることができる。

【0050】

好ましい一実施態様においては、本発明のベクターは、マイクロインジェクション法により対象となる非ヒト哺乳動物の初期胚に導入される。

【0051】

対象非ヒト哺乳動物の初期胚は、同種の非ヒト哺乳動物の雌雄を交配させて得られる体内受精卵を採取するか、あるいは同種の非ヒト哺乳動物の雌雄からそれぞれ採取した卵と精子を体外受精させることにより得ることができる。

用いる非ヒト哺乳動物の齢や飼育条件等は動物種によってそれぞれ異なるが、例えばマウス(好ましくはC57BL/6J(B6)などの近交系マウス、B6と他の近交系とのF₁など)を用いる場合は、雌が約4～約6週齢、雄が約2～約8月齢程度のものが好ましく、また、約12時間明期条件(例えば7:00-19:00)で約1週間飼育したものが好ましい。

体内受精は自然交配によってもよいが、性周期の調節と1個体から多数の初期胚を得ることを目的として、雌非ヒト哺乳動物に性腺刺激ホルモンを投与して過剰排卵を誘起した後、雄非ヒト哺乳動物と交配させる方法が好ましい。雌非ヒト哺乳動物の排卵誘発法としては、例えば初めに卵胞刺激ホルモン(妊馬血清性性腺刺激ホルモン、一般にPMSGと略する)、次いで黄体形成ホルモン(ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン、一般にhCGと略する)を、例えば腹腔内注射などにより投与する方法が好ましいが、好ましいホルモンの投与量、投与間隔は非ヒト哺乳動物の種類によりそれぞれ異なる。例えば、非ヒト哺乳動物がマウス(好ましくはC57BL/6J(B6)などの近交系マウス、B6と他の近交系とのF₁など)の場合は、通常、卵胞刺激ホルモン投与後、約48時間後に黄体形成ホルモンを投与し、直ちに雄マウスと交配させることにより受精卵を得る方法が好ましく、卵胞刺激ホルモンの投与量は約20～約50IU/個体、好ましくは約30IU/個体、黄体形成ホルモンの投与量は約0～約10IU/個体、好ましくは約5IU/個体である。

一定時間経過後、膣栓の検査等により交配を確認した雌非ヒト哺乳動物の腹腔を開き、卵管から受精卵を取り出して胚培養用培地(例:M16培地、修正Whitten培地、

10

20

30

40

50

BWW培地、M2培地、WM-H E P E S培地、BWW-H E P E S培地等）中で洗って卵丘細胞を除き、微小滴培養法等により5%炭酸ガス／95%大気下でDNA顕微注入まで培養する。直ちに顕微注入を行わない場合、採取した受精卵を緩慢法または超急速法等で凍結保存することも可能である。

【0052】

一方、体外受精の場合は、採卵用雌非ヒト哺乳動物（体内受精の場合と同様のものが好ましく用いられる）に上記と同様に卵胞刺激ホルモンおよび黄体形成ホルモンを投与して排卵を誘発させた後、卵子を採取して受精用培地（例：TYH培地）中で体外受精時まで微小滴培養法等により5%炭酸ガス／95%大気下で培養する。他方、同種の雄非ヒト哺乳動物（体内受精の場合と同様のものが好ましく用いられる）から精巣上体尾部を取り出し、精子塊を採取して受精用培地中で前培養する。前培養終了後の精子を含む受精用培地に添加し、微小滴培養法等により5%炭酸ガス／95%大気下で培養した後、2個の前核を有する受精卵を顕微鏡下で選抜する。直ちにDNAの顕微注入を行わない場合は、得られた受精卵を緩慢法または超急速法等で凍結保存することも可能である。

【0053】

受精卵へのDNAの顕微注入は、マイクロマニピュレーター等の公知の装置を用いて常法に従って実施することができる。簡潔に言えば、胚培養用培地の微小滴中に入れた受精卵をホールディングピペットで吸引して固定し、インジェクションピペットを用いてDNA溶液を雄性もしくは雌性前核、好ましくは雄性前核内に直接注入する。導入DNAはCsCl密度勾配超遠心等で高度に精製したものをを用いることが好ましい。また、導入DNAは制限酵素を用いてベクター部分を切断し、直鎖状にしておくことが好ましい。

【0054】

DNA導入後の受精卵は胚培養用培地中で微小滴培養法等により5%炭酸ガス／95%大気下で1細胞期～胚盤胞期まで培養した後、偽妊娠させた受胎用雌非ヒト哺乳動物の卵管または子宮内に移植される。受胎用雌非ヒト哺乳動物は移植される初期胚が由来する動物と同種のものであればよく、例えば、マウス初期胚を移植する場合は、ICR系の雌マウス（好ましくは約8～約10週齢）などが好ましく用いられる。受胎用雌非ヒト哺乳動物を偽妊娠状態にする方法としては、例えば、同種の精管切除（結紮）雄非ヒト哺乳動物（例えば、マウスの場合、ICR系の雄マウス（好ましくは約2月齢以上））と交配させて、膣栓の存在が確認されたものを選択する方法が知られている。

受胎用雌は自然排卵のものを用いてもよいし、あるいは精管切除（結紮）雄との交配に先立って、黄体形成ホルモン放出ホルモン（一般にLHRHと略する）もしくはその類縁体を投与し、受精能を誘起させたものを用いてもよい。LHRH類縁体としては、例えば、 $[3, 5-D i I - T y r ^5] - L H - R H$ 、 $[G l n ^8] - L H - R H$ 、 $[D - A l a ^6] - L H - R H$ 、 $[d e s - G l y ^{10}] - L H - R H$ 、 $[D - H i s (B z l) ^6] - L H - R H$ およびそれらのE t h y l a m i d eなどが挙げられる。LHRHもしくはその類縁体の投与量、ならびにその投与後に雄非ヒト哺乳動物と交配させる時期は、非ヒト哺乳動物の種類によりそれぞれ異なる。例えば、非ヒト哺乳動物がマウス（好ましくはICR系のマウスなど）の場合には、通常、LHRHもしくはその類縁体を投与した後、約4日目に雄マウスと交配させることが好ましく、LHRHあるいはその類縁体の投与量は、通常、約10～60 μg ／個体、好ましくは約40 μg ／個体である。

【0055】

通常、移植される初期胚が桑実胚期以後の場合は受胎用雌の子宮に、それより前（例えば、1細胞期～8細胞期胚）であれば卵管に胚移植される。受胎用雌は、移植胚の発生段階に応じて偽妊娠からある日数が経過したものが適宜使用される。例えばマウスの場合、2細胞期胚を移植するには偽妊娠後約0.5日の雌マウスが、胚盤胞期胚を移植するには偽妊娠後約2.5日の雌マウスが好ましい。受胎用雌を麻酔（好ましくはA v e r t i n、ネンブタール等が使用される）後、切開して卵巣を引き出し、胚培養用培地に懸濁した初期胚（約5～約10個）を胚移植用ピペットを用いて、卵管腹腔口もしくは子宮角の卵管接合部付近に注入する。

【0056】

移植胚が首尾よく着床し受胎雌が妊娠すれば、自然分娩もしくは帝王切開により仔非ヒト哺乳動物が得られる。自然分娩した受胎雌にはそのまま哺乳を継続させればよく、帝王切開により出産した場合は、産仔は別途用意した哺乳用雌（例えばマウスの場合、通常に交配・分娩した雌マウス（好ましくはICR系の雌マウス等））に哺乳させることができる。

【0057】

受精卵細胞段階におけるDNAの導入は、導入DNAが対象非ヒト哺乳動物の生殖系列細胞および体細胞のすべてに存在するように確保される。導入DNAが染色体DNAに組み込まれているか否かは、例えば、産仔の尾部より分離抽出した染色体DNAをサザンハイブリダイゼーションまたはPCR法によりスクリーニングすることにより検定することができる。上記のようにして得られる仔非ヒト哺乳動物（F₀）の生殖系列細胞において本発明のベクターが存在することは、その後代（F₁）の動物全てが、その生殖系列細胞および体細胞のすべてに、本発明のDNAを含むプロモーターの制御下にあるレポーター遺伝子が存在することを意味する。

10

通常、F₀動物は相同染色体の一方にのみ導入DNAを有するヘテロ接合体として得られる。また、個々のF₀個体は相同組換えによらない限り異なる染色体上にランダムに挿入される。相同染色体の両方に導入DNAを有するホモ接合体を得るためには、F₀動物と非トランスジェニック動物とを交雑してF₁動物を作製し、相同染色体の一方にのみ導入DNAを有するヘテロ接合体の兄妹同士を交雑すればよい。1遺伝子座にのみ導入DNAが組み込まれていれば、得られるF₂動物の1/4がホモ接合体となる。

20

【0058】

上記のようにして得られる本発明のTg動物に、例えば、血管血紫などの外科的手法を施すことにより、虚血性疾患モデルを作製することができる。また、マウス等では容易に担癌動物を作製することが可能であるが、癌組織は内部環境として低酸素状態を有するので、癌誘発モデルにおける発癌部位を迅速に検出・同定するのに、該Tg動物は有用である。

【実施例】

【0059】

以下、参考例および実施例を示してさらに具体的に本発明を説明する。以下は代表的な参考例および実施例を示すものでこれらに限定されるものではなく、本発明の技術的思想を逸脱しない範囲内で種々の応用が可能である。

30

【0060】

[参考例1] 低酸素状態の培養細胞におけるADAMTS-1 mRNAの検出

(1) 細胞培養

ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）は2% FCSを含むEBM-2培地（ケンプレックス社製）で、ヒト網膜色素上皮細胞（ARPE）は10% FCSを含むDMEM培地（シグマ社製）で、ヒト皮膚線維芽細胞は10% FCSを含むDMEM培地（シグマ社製）で、ヒト心筋線維芽細胞株（H9C2）は、10% FCSを含むDMEM培地（シグマ社製）で、サル腎臓細胞株（COS7）は、10% FCSを含むDMEM培地（シグマ社製）で、マウス大動脈平滑筋細胞株（SMC）は、10% FCSを含むDMEM培地（シグマ社製）で、ヒト微小血管内皮細胞（HMEC）は2% FCSを含むEBM-2培地（ケンプレックス社製）で、ヒト肺動脈内皮細胞（HPAEC）は2% FCSを含むEBM-2培地（ケンプレックス社製）で、それぞれ培養した。

40

【0061】

(2) 低酸素培養とADAMTS-1 mRNAの抽出

3×10⁵個の上記細胞を、サブコンフルエントな状態で炭酸ガス培養器の中で培養し、窒素ガスを充てんすることで低酸素状態（1% O₂）を作りだした。各細胞を1時間、3時間、6時間および24時間（HCAECについてはさらに48時間および72時間）培養し、RNAをAGPC法にて抽出した。

50

【0062】

(3) ADAMTS-1 mRNA発現量の測定

ADAMTS-1のmRNA発現量は、LightCycler rapid thermal cycler system (Roche社製)を用いたリアルタイムPCR法で測定した。詳細には、mRNAをテンプレートにして、逆転写酵素 (Reverse transcriptase, SS-IIインビトロジェン社)を用いてcDNAを合成した後に、ADAMTS-1特異的プライマーをデザインし、リアルタイムPCR反応を行った。内部標準として α チューブリンもしくは β -アクチンを用いて補正し、定量化した。

Upperプライマー:

CACTCTGCGGAAC TTTTGC (配列番号2)、もしくは
CTCCGGTGGCTTAGTG GTGT (配列番号3)

Lowerプライマー:

GCA TCATCATGTGGCATGTTA (配列番号4)、もしくは
TGTTTTTCCGTTATTGTCTG (配列番号5)

【0063】

結果を図1～4に示す。ADAMTS-1は、低酸素状態の血管内皮細胞で発現が亢進した (図1および図3)。即ち、HUV ECを用いた場合は急性期 (1時間～3時間)の低酸素状態において著しく発現が亢進することが分かった (図1)。またヒト微小血管内皮細胞やヒト肺動脈内皮細胞を用いた場合でも、急性期 (3時間)の低酸素状態において著しく発現が亢進することが分かった (図4; なお図4中、*印は $P < 0.05$ であることを示す)。一方、他の組織の細胞では、低酸素状態におけるADAMTS-1の発現量に著しい差異は生じなかった (図2および図3)。以上のことから、ADAMTS-1が低酸素状態の各種血管内皮細胞で発現が亢進することが明らかになった。

【0064】

[実施例1] ADAMTS-1プロモーター中の急性虚血期および血管内皮細胞特異的転写促進活性を有する領域の同定

(1) ADAMTS-1プロモーター断片のクローニング

ヒトgenomic DNAデータベースより、染色体21qにADAMTS1が存在することが知られているので、その開始コドン上流をプロモーター領域と考えた。データベースからprimerを設計し、PCRしてTAベクターにクローニングし、塩基配列を確認した。当該塩基配列を図5に示す。

【0065】

(2) 種々の長さのADAMTS-1プロモーター断片を含むレポータープラスミドの作製

図6に示される、長さの異なる7種のADAMTS-1プロモーター断片を作製した。データベースからそれぞれprimerを設計し、PCRしてTAクローニングした。シーケンスを確認して突然変異のないことを確認した後に、pMetLuc-Reporter (クロンテック社)に、EcoRI-EcoRIの制限酵素部位でそれぞれの長さのプロモーターDNAを挿入した。

【0066】

(3) 急性虚血期および血管内皮細胞特異的転写促進活性を有する領域の同定

上記(2)で作製した、種々の長さのADAMTS-1プロモーター断片を含む7種のレポータープラスミドを、エレクトロポレーション法にてそれぞれ内皮細胞に導入し、18時間後に培養液を交換した。24時間 normoxia (20% O_2)の後、培養上清を回収 (normoxia-medium)、新しい培養上清に交換した後、hypoxiaに24時間設定した。培養上清を回収 (hypoxia-medium) した。クロンテック社のReady-To-GlowTM Secreted Luciferase Reporter Systemに含まれる、1×Substrate/Reaction bufferを添加して、それぞれの培養上清中に含まれるルシフェラーゼ濃

10

20

30

40

50

度を測定し、低酸素状態におけるルシフェラーゼ／正常状態におけるルシフェラーゼを求めることによって、低酸素状態での転写促進活性を検討した。結果を図7に示す。

【0067】

〔実施例2〕低酸素刺激細胞へのプラスミドの導入と遺伝子発現

市販のGFP発現用プラスミド（pZsGreen1-1ベクター、クロンテック社製）を利用して、ADAMTS-1プロモーターによってGFPが誘導されるようにしたコンストラクトを作製した。

次いでこのプラスミドをエレクトロポレーション法（マイクロポレーター：MP-100 NanoEntek社 韓国製）にてそれぞれHUVEC（ 2×10^5 ／24ウェル）に、（1000V 30msec 2パルス刺激）導入し24時間後、hypoxiaを化学的に模倣する塩化コバルト（100 μ M）を添加し24時間培養した。次いで共焦点顕微鏡を用いて励起波長488nmでGFP発現細胞を観察した。結果を図8に示す。

なお図8中、陽性コントロールとして哺乳動物細胞に恒常的に発現するCMVプロモーター下流にGFPを連結したベクターを構築し、これをHUVECに同様に導入したものをを用いた。またADAMTS1-P1はプロモーター配列としてF3断片を、ADAMTS1-P2はプロモーター配列としてF6断片を適用したものを示す。

【産業上の利用可能性】

【0068】

本発明のDNAを含むプロモーターを含む本発明のベクターは、遺伝子産物（タンパク質、RNA）である薬剤を、低酸素状態の血管内皮細胞に選択的に送達することができるので、急性虚血性疾患などの血管内皮細胞の低酸素状態を伴う疾患の予防および／または治療に有用である。また、該プロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したベクターは、急性虚血性疾患などの血管内皮細胞の低酸素状態を伴う疾患の早期診断に有用である。さらに、該プロモーターの下流にレポーター遺伝子を連結したベクターが導入されたトランスジェニック非ヒト動物は、低酸素状態あるいは急性虚血性疾患の動物モデルを作製するための動物材料として有用である。

本出願は、日本で出願された特願2008-024071を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含される。

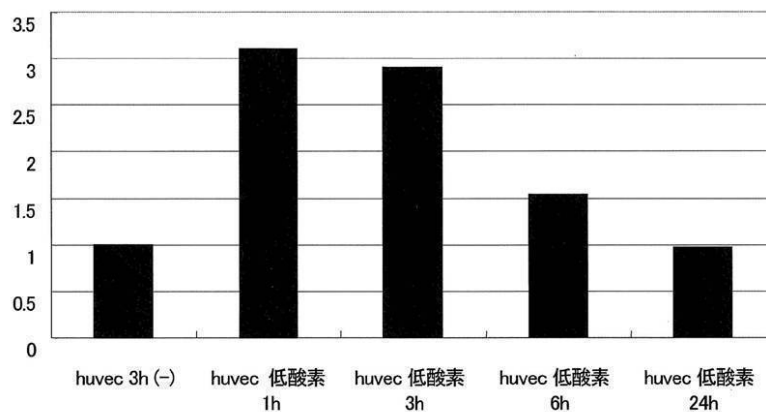
【図 5】

```

actaagccct tcagaagtaa gcagagttgc ttctctctgc catctttgct catttgattt    60
ttctctgata gtgggaagca atgtttttgt ttgtttttt caagtangca atctgcctag    120
gaaaaaagaa gttagaagac atccggaana gaagctgtgt aagaggacag tggagagaa    180
ctagaaagaa cgtttctgac tggagccaac tgaagtggag aagatctgag gaggagcag    240
gaaagaccoc agatctactt gtagcccaac aagagaccgg acggaggttg ggcgaaag    300
cggagaccag tttagacact aacgcggagg cgcagaggtg tggaggttg ggcgcgccc    360
gggctagagg cgcctctctt cgcctatgtc ccgcgggctt tcgcgcttg aaacagctc    420
ttctctggg ttcttagacc cctccacttt tttagagaga agagccactc agttttttt    480
cctagagacc gttagtgaga cctctctctg ctttgtaac gaggatatsg ccttttccct    540
tcctagtagg aagagagagg agggctcggg gaaggaagcc gatttcttc ttcccccct    600
tgacgcttg ctagccccag cgtctctgag tggcccccgg taggaaagt gggcttctg    660
gcgtttctg cagcctgag ctaggcttg cagctctgt tagtgaag cagcagact    720
ggcaggagcc gattctttt cgaatgaaga agaaaagcg caattccct cttatgtct    780
agggaatiga gcgcgtccc agtcaacca ttccagaat gtgaacagg gccctacaa    840
agtctctct gtagaagagg tggctgagg ggtgggggtt gtagaagat gaagcataa    900
gcaaacatat tttaaatcc agatctagg aagtgtacc tggccctca ccaggcatg    960
cttttggg gaagcagg gccagcttt cctagaaaa gctggaggga agagagaca    1020
ggcagcgtt aagagctcc tggcagctt ggaagtggga gaagtgggt aggtatitt    1080
tctagagagt gtaccctag ctatctctt agatgggga agagggaact gaggagag    1140
ggaagagac ccaggcagc tccagatag ggaatgttg aagaaggac tgcgttctc    1200
aacgaaccc tccctctg gaaccgagc ccagcaggt aactagtta ccgaacagg    1260
gggtgggga ggaagggtg tccaggaac cgcgaggga gaaaaggtt ggaaggaga    1320
gtctctccc tggagggcc ccagcagtac aaagtgtgg tcaacagcc ccttccgccc    1380
ctagattgac gacagtgcc gtagagctag cgcgagagct gccctctcc cctccgagc    1440
ccgcagcag gacacagtt tagcacaaac ggaagcaggg gcgcgtctt tggatagaa    1500
aaggccaaa gggagaggtt agatggggg tggagtttc actgtccc TATAaaga    1560
cgcgtggtt gccgtctt tgcctctt ggaagcggc tccagccag agctatttc    1620
aagccaggt tgcctacag ggcgagagg ggaagacct gacagagtg agcaacatc    1680
cagccagag gaaagccga gaaagggcc aggaacaa cctcgttg cctcagccc    1740
gaaagcccc cagagcgtt ctgtccag cagagcaat ctgcctagc ctgcctca    1800
gtgtccaa ctttgctg gaaagaaac ttccgcgc cgcgagac tgcagcct    1860
ccttttagt actccagg cttaggtgt agcgcctt ggcgcctt cnaagata    1920
atagaaatg ttaatttaa caatccagc cagccagac aggtttgt ctcagccc    1980
gaactaaag tccctctc ctgcctgc tagagaggt gtctcttg gctccatgc    2040
AGCAGCTGT GCGGAGGG TTGGAAGG GCAAGCTGG CAGGACATG GGAAGGGG    2100
AGGAGGCTC GGGGCTCG AGCTTGGG CCGTACCAC CTCCTGCTG CTGGCGGG    2160
CGCTACTGC CTGTGGAG G
2181

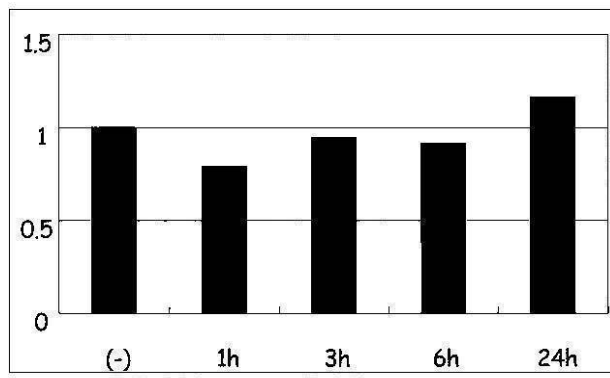
```

【図 1】

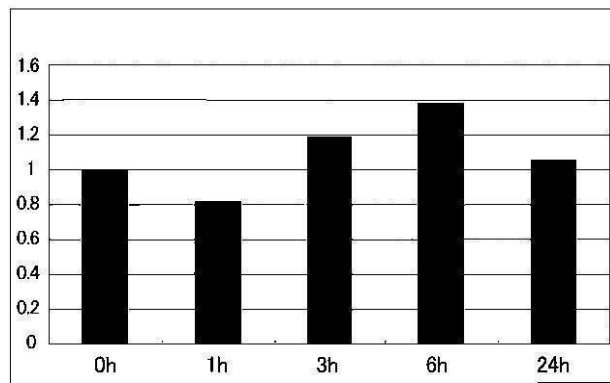


【図 2】

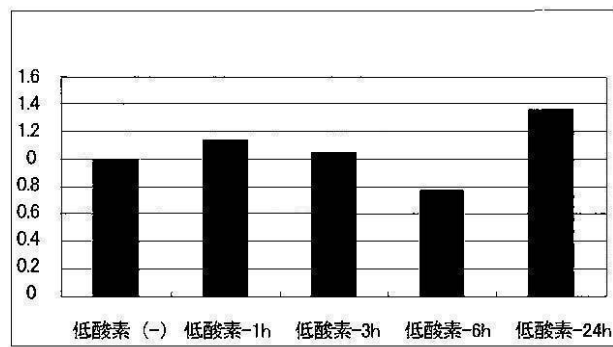
(A)



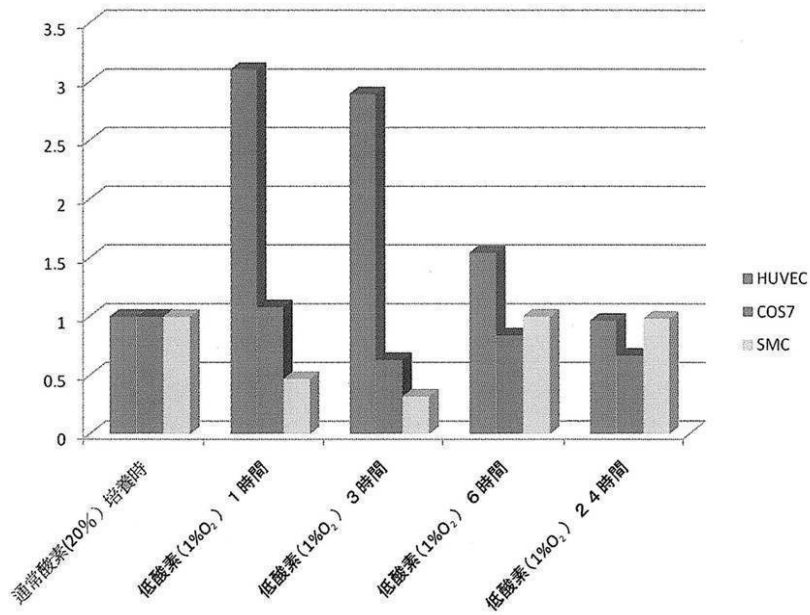
(B)



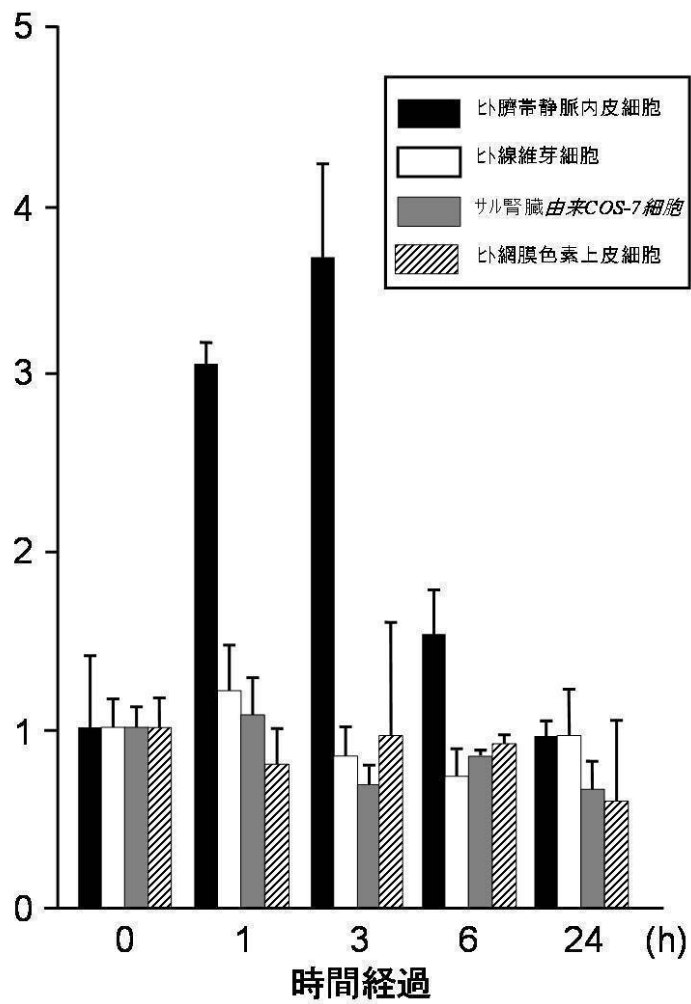
(C)



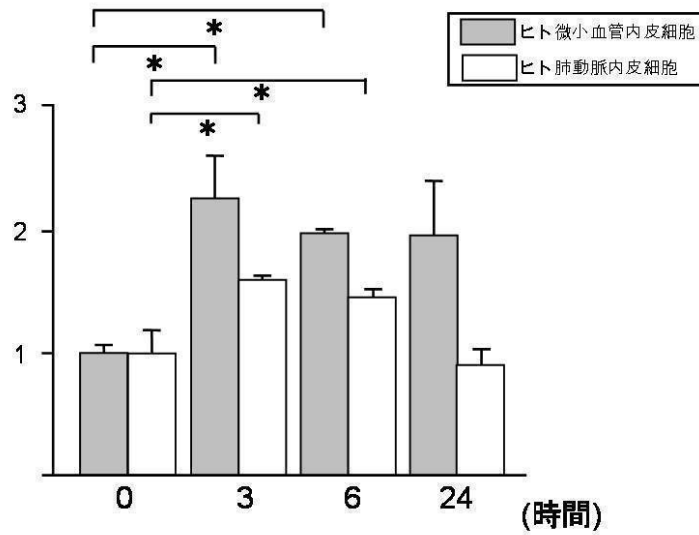
【図 3 - 1】



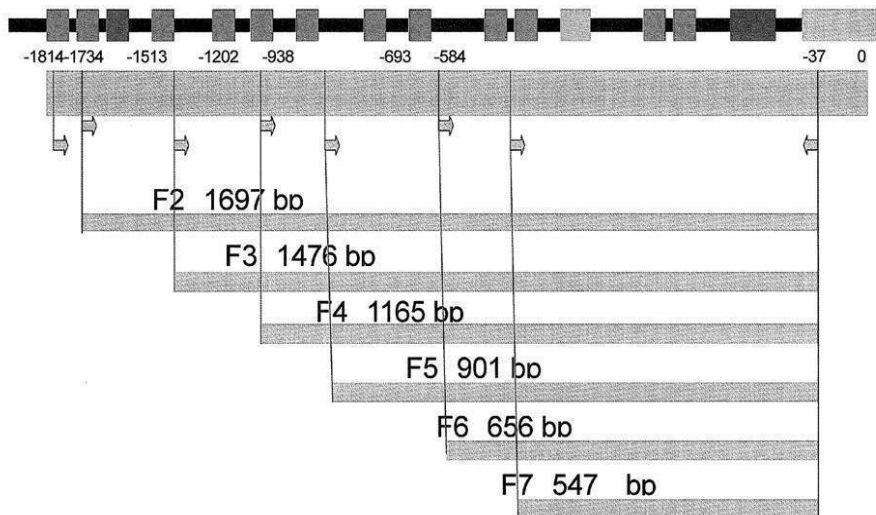
【図 3 - 2】



【図 4】

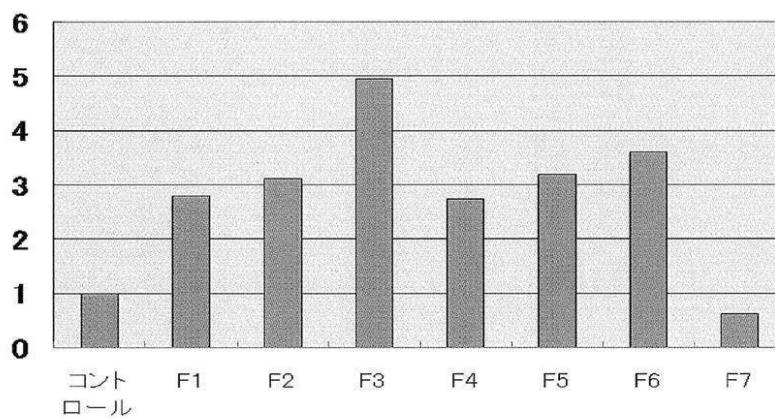


【図 6】

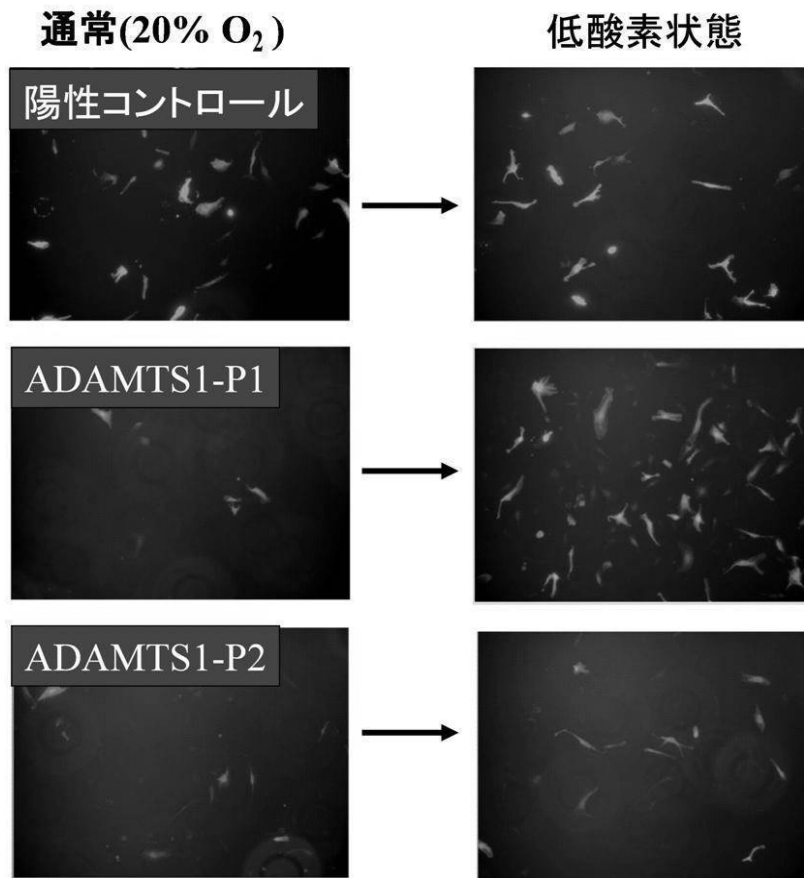


【図 7】

ルシフェラーゼ・アッセイ



【図 8】



【配列表】

[0005493231000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	36/06	(2006.01)	A 6 1 K 35/72
A 6 1 K	35/76	(2006.01)	A 6 1 K 35/76
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A

(72)発明者 廣畑 聡
岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内

(72)発明者 二宮 善文
岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内

(72)発明者 草地 省藏
岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内

(72)発明者 オメル、ファルク ハティボール
岡山県岡山市北区鹿田町二丁目5番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内

審査官 荒木 英則

(56)参考文献 特開2005-095173 (JP, A)
DOYLE, K.M.H., et al., Molecular Endocrinology, 2004年, 18(10), pp.2463-2478
NAKAMURA, K., et al., ADAMTS-1, a disintegrin and metalloprotease with thrombospondin motif-1, is a novel hypoxic immediate gene expressed by endothelial cells, Circ. J., 2004年 3月 1日, 68(suppl.1), p.110(要旨番号FRS-078)
中村 圭吾ら, ラット実験的心筋梗塞モデルにおける新規メタロプロテアーゼADAMTS-1発現様式の検討, Connective tissue, 2002年, 34(1), p.87 (要旨番号P-26)
NAKAMURA, K., et al., Dynamic induction of ADAMTS-1 gene in the early phase of acute myocardial infarction, J. Biochem., 2004年, 136, pp.439-446
SHIBATA, T., et al., Development of a hypoxia-responsive vector for tumor-specific gene therapy, Gene Ther., 2000年, 7(6), pp.493-498

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 15/00-15/09
A 0 1 K 67/00-67/027
A 6 1 K 35/00-36/06
A 6 1 K 48/00
A 6 1 P 1/00-43/00
C 1 2 Q 1/00-1/68
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)
JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq