

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第1部門第1区分  
 【発行日】平成24年6月7日(2012.6.7)

【公表番号】特表2008-531004(P2008-531004A)  
 【公表日】平成20年8月14日(2008.8.14)  
 【年通号数】公開・登録公報2008-032  
 【出願番号】特願2007-556601(P2007-556601)  
 【国際特許分類】

A 0 1 K 67/027 (2006.01)  
 C 1 2 N 15/09 (2006.01)  
 C 1 2 Q 1/02 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/15 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/50 (2006.01)

【F I】

A 0 1 K 67/027  
 C 1 2 N 15/00 A  
 C 1 2 Q 1/02  
 G 0 1 N 33/15 Z  
 G 0 1 N 33/50 Z

【誤訳訂正書】

【提出日】平成24年4月3日(2012.4.3)

【誤訳訂正1】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0014

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0014】

本発明を導く実験では、以下の実験システムを用いた：第一に、ゲノムマウス DNAライブラリー（マウス株129 Sv）を、fra - 2の4種のエキソンに結合する標識オリゴヌクレオチドを有するマウスfra - 2遺伝子のためにスクリーニングした。Fra - 2全長遺伝子座を単離し、特徴付け、及び配列を決定した。該4種のエキシソンの配列は、公表されているマウスFra - 2 cDNA配列と完全に対応した（Foletta et al., 1994）。主要組織適合遺伝子複合体クラスI抗原H2 - K<sup>b</sup>のためのプロモーター（Grigoriadis et al., 1993）を、fra - 2遺伝子座の前にクローン化し、偏在性導入遺伝子発現を可能にする。生体内における導入遺伝子活性を監視するために、IRES - EGFP（Zhu et al., 1999）配列を、fra - 2遺伝子座の後にクローン化し、それに続いてFBJ - マウスサルコーマウィルスの長い末端反復（LTR）をクローン化して、fra - 2 mRNAを安定化させ且つ間葉細胞における導入遺伝子発現を保証した（Grigoriadis et al., 1993）。さらに、loxPサイトを、エキソン2の前且つエキソン4の後に配置し、導入遺伝子発現の異なる導入遺伝子コピー数及び濃度により、導入遺伝子多量体のCre - 媒介欠損及び数種の遺伝子導入システムの生成を可能にする。

【誤訳訂正2】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0024

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0024】

実施例では、以下の材料及び方法を用いた：  
 fra - 2<sup>tg</sup>マウスの生成

fra - 2全長遺伝子座は、ゲノム DNAライブラリーから単離し、配列を決定し、及びpBS IIベクターにクローン化する。主要な組織適合性の複雑な分類Iの抗原H2 - K<sup>b</sup>のためのプロモーター (Grigoriadis et al., 1993) を、fra - 2遺伝子座の前にクローン化して、偏在的な導入遺伝子発現を可能にする。導入遺伝子活性を監視するために、IRES - EGFP (Zhu et al., 1999) 配列を、FBJ - マウスサルコーマウィルスの長い末端反復 (LTR) 配列の後に続いているfra - 2遺伝子座の後にクローン化する (Grigoriadis et al., 1993)。さらに、loxP部位を、エキソン2の前及びエキソン4の後ろに配置し、導入遺伝子多量体のCre - 媒介欠乏、及び異なる導入遺伝子のコピー数を有する数種の遺伝子導入システムの生成、を可能にする。遺伝子導入構築物を、受精したC57Bl/76卵母細胞の前核に注入し、3種の独立性遺伝子導入システムを確立する。

【誤訳訂正3】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0028

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0028】

実施例1

fra - 2<sup>tg</sup>マウスの生成及びキャラクタリゼーション

ゲノムfra - 2遺伝子座を、遺伝子導入ベクター上に広範な活性H2K<sup>b</sup>プロモーターの前且つIRES - EGFPレポーター遺伝子の後に配置する (図1A)。FBJ - マウスサルコーマウィルスの長い末端反復 (LTR) 配列をfra - 2 mRNAの安定化のため、且つ間葉細胞における導入遺伝子発現を保証するために含ませる。エキソン2の前及びエキソン4の後ろに配置されるさらなるloxP部位により、導入遺伝子マルチマーのCre - 媒介欠失、並びに異なる導入遺伝子コピー数及び異なる導入遺伝子発現量を有する複数の遺伝子導入システムの生成、が可能となる。異なる導入遺伝子コピー数を有する3種の別個の遺伝子導入システムが生成されている (図1B)。系統12及び13は高濃度の導入遺伝子を発現し (図1C)、それぞれ4、60 (4コピー、60コピー) の導入遺伝子コピーを有する。系統15は2 (コピー) の導入遺伝子コピーのみを有し、いかなる顕在的導入遺伝子発現も示さない (図1C)。かなりの導入遺伝子発現が、脳を除く系統12及び13の全ての組織で観察することができる (図1D)。

【誤訳訂正4】

【訂正対象書類名】明細書

【訂正対象項目名】0034

【訂正方法】変更

【訂正の内容】

【0034】

【図1】A) fra - 2遺伝子導入ベクターの概略スキーム。H2k<sup>b</sup>プロモーターをfra - 2発現に用いる。fra - 2の後にIRES - EGFPレポーター遺伝子を用いて導入遺伝子活性を監視し、LTR配列をmRNA安定化のために含ませる。LoxP部位は、導入遺伝子のCre - リコンビナーゼ - 媒介欠乏を可能にする。H2K<sup>b</sup> : H2Kbプロモーター ; E1 - E4 : fra - 2のエキソン1 - 4 ; ポリA : ポリアデニル化信号 ; Hind III : サザンプロット分析に用いた限定部位。B) ゲノムにおける導入遺伝子のコピー数を決定するための3種の遺伝子導入システム (12、13、15) のサザンプロット分析。マウスの尾からのDNAをHind IIIで温浸させ、fra - 2のエキソン2に対応する配列でプローブする。野生タイプ及び遺伝子導入バンドの位置を示す。定量化は、遺伝子導入システム12、13及び15のそれぞれに対して4回、60回及び2回の遺伝子導入コピーを明らかにした。C) 遺伝子導入システム12、13及び15からの2種の組織 (肝臓及び心臓) によるfra - 2発現のためのRNase保護検定。Fra - 2の発現は、系統12及び13の両組織で同程度まで増加する。導入遺伝子発現は遺伝子導入システム15では全く検出されない。GAPDHの発現は、ローディング・コントロールとして用いる。D) 大人 (6週間目) の遺伝子導入マウス (系統13) の異なる組織によるRNase保護検定。導入遺伝子は、脳、thy : 胸腺、kid : 腎臓、spl : 脾臓、cal : 頭頂部を除いて偏在して発現する。

【図2】A) fra - 2<sup>tg</sup>マウスの早期致死率を示すKaplan Meierプロット。fra - 2導入遺伝子の高い発現を有するマウス(系統12及び13)は成人期に病気になり、6週間目辺りで死に始めた。早期致死率は、導入遺伝子の発現を全く示さない系統15のマウスでは見られない。B) fra - 2<sup>tg</sup>マウスの体重に対する増加した肺の比。肺の重さの増加が、系統12及び13の遺伝子導入マウスで観察される(ここでは系統12を示す)が、系統15では観察されない。肺の重さの大きな増加は、遺伝子導入マウスの致死率と一致する。病気は、体重の損失、毛の外見、マウスの弱さ及び息切れにより判断される。

【図3】A) fra - 2<sup>tg</sup>肺の全体的な形態。系統12及び13のマウスは、明らかな線維症を有する劇的に増加した肺を示す。B) fra - 2<sup>tg</sup>肺のH&E - 染色切片。系統12及び13のマウスは、間質性肺線維症(上部のパネル)及び血管の狭窄(下部のパネル)を示す。

【図4】A) fra - 2<sup>tg</sup>における強皮症様症候群の発生。コラーゲンのためのアニリンブルー染色(青色)は、fra - 2<sup>tg</sup>マウスにおける線維性障害は肺に限定されないが、他の器官(肝臓、皮膚及び心臓が例として示されている)でも観察できることを明らかにした。B) fra - 2<sup>tg</sup>マウスの肺におけるコラーゲン発現の同時PCR分析。線維性コラーゲンタイプI及びタイプIIIの発現は、病気のマウスの肺で増加した。

【図5】A) fra - 2<sup>tg</sup>マウスにおける肺性線維症は、血管及び炎症性細胞の血管周囲の移入で始まる。fra - 2<sup>tg</sup>肺のH&E - 染色は、肺性線維症における最初のイベントとしての炎症を説明する(上部のパネル)。炎症性細胞は、主にCD3 - 陽性T - 細胞(黒色染色、矢じり)及び顆粒細胞などのエステラーゼ - 陽性骨髄細胞(赤色染色、矢じり)からなる。B) 炎症は、RNase保護検定によって説明されるfra - 2<sup>tg</sup>マウスの肺におけるケモカイン及びサイトカインの蓄積を引き起こす。

【図6】A) fra - 2<sup>tg</sup>骨髄で再構築された野生タイプのマウスにおける全く深刻でない肺性線維症。致死量の放射線照射の後にfra - 2<sup>tg</sup>骨髄で再構築された野生タイプのマウスの肺及び肝臓切片は、線維症が容易には移植され得ないことを実証する。B) 野生タイプの骨髄で再構築された野生タイプのマウスからの骨髄細胞のFACSプロフィール。C) fra - 2<sup>tg</sup>骨髄で再構築された野生タイプのマウスからの骨髄細胞のFACSプロフィール。ほとんど全ての骨髄細胞が導入遺伝子発現を反映するEGFPレポーター遺伝子を発現することに注意。D) 器官/体重比は、全く深刻でない肺性線維症がfra - 2<sup>tg</sup>骨髄で再構築された野生タイプのマウスで発生することを確証する。

【図7】A) 野生タイプの骨髄で再構築されたfra - 2<sup>tg</sup>マウスにおける深刻な肺性線維症。致死量の放射線照射の後に野生タイプの骨髄で再構築されたfra - 2<sup>tg</sup>マウスの肺及び肝臓切片は、野生タイプの骨髄の存在下で線維症が発症することを実証する。B) 野生タイプの骨髄で再構築された野生タイプのマウスからの骨髄細胞のFACSプロフィール。C) 野生タイプの骨髄で再構築されたfra - 2<sup>tg</sup>マウスからの骨髄細胞のFACSプロフィール。ほとんど全ての遺伝子導入EGFP - 陽性細胞が消失したことに注意。D) 器官/体重比は、肺性線維症が野生タイプの骨髄で再構築されたfra - 2<sup>tg</sup>マウスで発生したことを確証する。

【図8】A) fra - 2<sup>tg</sup>マウスの全層創傷後の遅れた創傷治癒。Fra - 2遺伝子導入マウスは、背中の皮膚の全層創傷後に遅れた創傷閉鎖を示す(上部パネル:創傷後8日目、下部パネル:創傷後11日目)。B) コラーゲンからなる増加した量の肉芽組織が、fra - 2遺伝子導入マウスの創傷で見える(創傷後11日目;上部パネル:H&E - 染色;下部パネル:コラーゲンのための青色CAB - 染色)。C) 創傷治癒の定量化は、fra - 2遺伝子導入マウスにおける遅れた創傷閉鎖が早ければ創傷後3日で始まることを説明する。D - G) 創傷時及び創傷後3日目に採取された皮膚生検によるRNase保護検定。fra - 2を除くAP - 1要素(D)、基質メタロプロテイナーゼ(E)、TIMPs(E)、サイトカイン(F)、TGF - 群要素(F)及びケモカイン(G)の発現における違いは観察することができない。