

明 細 書

発明の名称： 遺伝子ノックイン非ヒト動物

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子ノックイン非ヒト動物および、遺伝子ノックイン非ヒト動物を用いた化合物の評価方法に関する。

背景技術

[0002] 抗体医薬など、分子標的に対する特異性の高い治療薬の開発が数多くなされており、その前臨床評価をより適切に行うためにヒト化マウスなどのヒト化非ヒト動物の要望が高まっている。ヒト化マウスを作成する手法として、マウスにヒトの遺伝子を発現するようにした、いわゆるトランスジェニックマウスと、マウス遺伝子をヒト遺伝子に置換するジーンターゲティング法が広く知られており、かかる手法により作成されたヒト化マウスが数多く報告されている。しかしながら、トランスジェニックマウスのように、単純にヒトの遺伝子を発現するようにしたベクターを導入したマウスでは期待する発現様式を呈さないことが多い。例えば pCAGGS ベクターを用いてヒトインターロイキン-6 (IL-6) 受容体遺伝子を過剰発現させたマウスが報告されているが（非特許文献1）、このトランスジェニックマウスはプロモーターが強力なため、ヒト IL-6 (hIL-6) 受容体の発現レベルは高く、本来の発現部位以外の組織や細胞にも異所性に発現する。また、マウス内因性の IL-6 受容体も発現する。一方、マウス遺伝子をヒト遺伝子に置換するジーンターゲティング法により作製する、いわゆるノックインマウスにおいては、全長のヒト遺伝子のコード配列を標的のマウス遺伝子に挿入する場合には、転写された mRNA においては、マウス遺伝子の終止コドンの遙かに上流に、挿入したヒト遺伝子の終止コドン (premature termination codon, PTC) が存在し、かつ、この終止コドンの下流にマウス遺伝子に由来するエキソン-エキソン結合部が存在するという構造となる。この構造が、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (N

MD機構)により認識されてmRNAが分解を受けるため、目的の遺伝子発現量が得られないことが多い。その対策として、コード配列の直下にポリA付加シグナルを付加してマウスに挿入することが行われている。これにより、転写されるmRNAにおいて、PTCの下流に標的遺伝子由来のエキソン-エキソン結合部が生じない構造となるため、NMDは生じない。しかしながら、一般的に、スプライスアウトされないmRNAの発現量は低下することが知られている(非特許文献2)。このように非ヒト動物内因性の遺伝子発現を抑え、かつ生理的に妥当なレベルで外来遺伝子を発現させることができる非ヒト動物の作成は非常に困難であった。

[0003] ところで、hp7配列はGCに富んだ塩基配列であり、RNAに転写された際に強固なステムループを形成することが知られている。hp7配列の機能に関しては、これまでに2つの論文にて報告されている。1つ目の論文では、翻訳開始点より5'上流側にこの配列が存在する場合、40Sリボソームサブユニットがヘアピンの5'側で停止し、翻訳が阻害されることが報告されている(非特許文献3)。最近報告されたもう1つの論文では、hp7配列がNMDの対象となるPTCとエキソン-エキソン結合部の間に存在すると、NMDが抑制されることが記載されている(非特許文献4)が、その効果は弱いものである。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1: J. Exp. Med. 1995, Nov. 1; 182 (5): 1461-1468

非特許文献2: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 836-840.

非特許文献3: Mol. Cell. Biol. 1989: 9: 5134-5142.

非特許文献4: Nucleic Acid Research. 2012, doi: 10.1093/nar/gks344

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明は、非ヒト動物の内因性遺伝子（標的遺伝子）の発現を欠損させ、かつ生理的に妥当なレベルで外来遺伝子を発現させることができる非ヒト動物を提供するとともに、該動物を用いた化合物の評価方法を提供することを目的とする。さらに本発明は、該評価方法を利用した所望の活性を有する抗体の生産方法を提供することをも目的とする。

課題を解決するための手段

- [0006] 本発明者らは、上記課題を解決すべく、内因性の標的遺伝子の発現を欠損させ、生理的に妥当なレベルで、挿入した外来遺伝子を発現させることができるマウスの作製を試みた。そして、鋭意検討の結果、外来遺伝子の終止コドンの下流に h p 7 配列とポリ A 付加シグナルを付加して、マウスの標的遺伝子内に挿入することにより、当該マウスにおいて、ヒトにおいて報告されている血中濃度と同等の濃度で外来遺伝子を発現させることができることを見出した。
- [0007] このマウスに挿入された外来遺伝子にはポリ A 付加シグナルが付加されているため、挿入した外来遺伝子からはスプライスアウトされない m R N A が生じる。上記の通り、スプライスアウトされない m R N A の発現量は低下することが知られているが（非特許文献 2）、本発明においては、h p 7 配列の使用により、このような発現の低下を回避することができた。
- [0008] h p 7 配列を NMD の対象となる P T C とエキソン-エキソン結合部の間に挿入することにより NMD を抑制することは知られているが（非特許文献 4）、本発明においては h p 7 配列の下流にポリ A 付加シグナルが存在し、P T C の下流にエキソン-エキソン結合部は生じないため、NMD 機構による認識はない。
- [0009] このように、本発明において、h p 7 配列の使用により、NMD 機構の抑制以外の機序により、生理的に妥当なレベルで外来遺伝子を発現させることができたことは、予想外の驚くべき知見である。

[0010] また、本発明者らは、マウスのインターロイキン-6 受容体遺伝子内に、ヒトインターロイキン-6 受容体遺伝子を挿入したマウスにおいて、ヒトインターロイキン-6 遺伝子を過剰発現させることにより、当該マウスが、ヒトインターロイキン-6 あるいはヒトインターロイキン-6 受容体に起因する疾患の症状を呈し、この症状がヒト型化中和抗体の投与により改善されることを見出した。このヒト型化中和抗体を投与したマウスにおいては、可溶性ヒトインターロイキン-6 受容体の血中濃度が上昇していたが、この点もヒトにおける症状と共通であった。さらなる利点として、ヒト型化中和抗体を投与したマウスにおいては、この中和抗体を認識する内因性のマウス抗体の産生が抑制されていた。すなわち、本発明者らは、ヒトインターロイキン-6 あるいはヒトインターロイキン-6 受容体に起因する疾患の病態を示す優れたモデル動物の作製にも成功した。このモデル動物を利用すれば、被験物質における、疾患の治療効果、薬物動態、血中から可溶性ヒトインターロイキン-6 受容体を除去する活性などを簡便に測定することが可能である。さらに、このような評価系を利用することにより、所望の活性を有する抗体などの開発を効率的に行うことが可能である。

[0011] 本発明は、以上の知見に基づくものであり、具体的には以下を含む。

[0012] [1] 任意の外来遺伝子をコードするDNAの3'側にhp7配列をコードするDNAおよびポリA付加シグナルをコードするDNAが付加されたDNAを、非ヒト動物のゲノム上に存在する任意の標的遺伝子の同一読み取り枠に挿入したことを特徴とする非ヒト動物。

[0013] [2] 前記外来遺伝子がヒトインターロイキン-6 受容体遺伝子である、[1]に記載の非ヒト動物。

[0014] [3] 前記非ヒト動物のゲノム上に存在する任意の標的遺伝子がインターロイキン-6 受容体遺伝子である、[1]～[2]のいずれか1つに記載の非ヒト動物。

[0015] [4] 健常なヒトにおける可溶性インターロイキン-6 受容体の血中濃度と同等の血中濃度で可溶性ヒトインターロイキン-6 受容体を発現する、[2

]～[3]のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物。

[0016] [5] 非ヒト動物がげっ歯類である、[1]～[4]のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物。

[0017] [6] 非ヒト動物がマウスである、[1]～[5]のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物。

[0018] [7] ヒトインターロイキン-6 を過剰発現させた、[1]～[6]のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物。

[0019] [8] 被験物質における、ヒトインターロイキン-6 またはヒトインターロイキン-6 受容体に起因する疾患の治療効果を評価する方法であって、
(a) 被験物質を、[7]に記載の非ヒト動物に投与する工程と、
(b) 前記被験物質を投与した非ヒト動物において、ヒトインターロイキン-6 またはヒトインターロイキン-6 受容体に起因する疾患の症状が抑制されたか否かを測定する工程、
とを含んで成る方法。

[0020] [9] ヒトインターロイキン-6 あるいはヒトインターロイキン-6 受容体に起因する疾患がキャスルマン病である、[8]に記載の方法。

[0021] [1 0] 被験物質の薬物動態学的特性を評価する方法であって、
(a) 被験物質を、[1]～[7]のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物に投与する工程と、
(b) 前記被験物質を投与した非ヒト動物における被験物質の血中濃度を測定する工程、
とを含んで成る方法。

[0022] [1 1] 被験物質における、血中から可溶型ヒトインターロイキン-6 受容体を除去する活性を評価する方法であって、
(a) 被験物質を、[2]～[7]のいずれか 1 つに記載の非ヒト動物に投与し、
(b) 前記被験物質を投与した非ヒト動物において、可溶型ヒトインターロイキン-6 受容体の血中濃度を測定する工程、

とを含んで成る方法。

[0023] [12] 被験物質がヒトインターロイキン-6受容体に対する抗体である、[7]～[11]のいずれか1つに記載の方法。

[0024] [13] ヒトインターロイキン-6またはヒトインターロイキン-6受容体に起因する疾患の治療効果を有する、ヒトインターロイキン-6受容体に対する抗体の生産方法であって、

(a) ヒトインターロイキン-6受容体に対する抗体を生産する工程、

(b) 前記抗体を、[7]に記載の非ヒト動物に投与する工程、

(c) 前記抗体を投与した非ヒト動物において、ヒトインターロイキン-6またはヒトインターロイキン-6受容体に起因する疾患の症状が抑制されたか否かを測定する工程、および

(d) ヒトインターロイキン-6またはヒトインターロイキン-6受容体に起因する疾患の症状を抑制する抗体を選抜する工程、

を含んで成る方法。

[0025] [14] ヒトインターロイキン-6あるいはヒトインターロイキン-6受容体に起因する疾患がキャスルマン病である、[13]に記載の方法。

[0026] [15] 所望の薬物動態学的特性を有する、ヒトインターロイキン-6受容体に対する抗体の生産方法であって、

(a) ヒトインターロイキン-6受容体に対する抗体を生産する工程、

(b) 前記抗体を、[2]～[7]のいずれか1つに記載の非ヒト動物に投与する工程、

(c) 前記抗体を投与した非ヒト動物における前記抗体の血中濃度を測定する工程、

、および

(d) 所望の血中濃度を有する抗体を選抜する工程、

を含んで成る方法。

[0027] [16] 血中から可溶型ヒトインターロイキン-6受容体を除去する活性を有する、ヒトインターロイキン-6受容体に対する抗体の生産方法であつ

て、

(a) ヒトインターロイキン-6受容体に対する抗体を生産する工程、

(b) 前記抗体を、[2]～[7]のいずれか1つに記載の非ヒト動物に投与する工程、

(c) 前記抗体を投与した非ヒト動物において、可溶型ヒトインターロイキン-6受容体の血中濃度を測定する工程、および

(d) 可溶型ヒトインターロイキン-6受容体の血中濃度を低下させる抗体を選抜する工程、

を含んで成る方法。

[0028] [17] (e) 選抜された抗体をキメラ化、またはヒト型化する工程をさらに含んで成る、[13]～[16]のいずれか1項に記載の抗体の生産方法。

[0029] [18] [1]～[7]のいずれかに記載の非ヒト動物を作製するためのDNAであって、任意の外来遺伝子をコードするDNAの3'側にhp7配列をコードするDNAおよびポリA付加シグナルをコードするDNAが付加されたDNA。

[0030] [19] [1]～[7]のいずれかに記載の非ヒト動物を作製するためのベクターであって、[18]に記載のDNAを保持するノックインベクター。

[0031] [20] [1]～[7]のいずれかに記載の非ヒト動物を作製するための形質転換細胞であって、[19]に記載のノックインベクターが導入された形質転換細胞。

発明の効果

[0032] 本発明のノックイン非ヒト動物は、非ヒト動物内因性の遺伝子発現を抑え、かつ生理的に妥当なレベルで外来遺伝子を発現することができる。従って、本発明のノックイン非ヒト動物を利用すれば、抗体医薬などの分子標的に対する特異性の高い治療薬を適切に評価できる。

図面の簡単な説明

[0033] [図1A]図1Aは、マウスインターロイキン-6受容体(IL6ra)遺伝子のゲノムDNAの構造(1)と、挿入されるノックインベクター(2)との

関係を模式的に示す図である。ノックインベクターは、完全長ヒトインターロイキン-6受容体（hIL6R） cDNA、hp7配列、ポリA付加シグナル、およびネオマイシン耐性遺伝子を有する。

[図1B]図1Bは、マウスインターロイキン-6受容体遺伝子のゲノムDNA（a）とノックインベクター（b）とが相同性組換えを起して、ノックインされたゲノムDNA（c）が生成される様子を模式的に示す図である。さらに（c）に組換え酵素Creを作用させて、ネオマイシン耐性遺伝子カセットを除去することにより、ヒトインターロイキン-6受容体遺伝子ノックインアレル（d）を完成させる過程を示す。図中の矢印は、ヒトインターロイキン-6受容体遺伝子のノックインを検出するために使用したプライマーの設定位置を示す。

[図2]図2は、ヒトインターロイキン-6受容体遺伝子ノックインマウスの樹立の過程で得られた各遺伝子型を解析したPCRの代表例を示す。

[図3]図3は、ヒトインターロイキン-6受容体遺伝子ノックインマウスおよび野生型マウスにおけるインターロイキン-6受容体の遺伝子発現特性を示す図である。

[図4]図4は、ホモ型およびヘテロ型のヒトインターロイキン-6受容体遺伝子ノックインマウスおよび野生型マウスにおける血漿中の可溶性ヒトインターロイキン-6受容体（hsIL-6R）濃度の測定結果を示すグラフである。KI/KI、KI/+および+/+は、それぞれホモ型ノックインマウス、ヘテロ型ノックインマウスおよび野生型を示す。

[図5]図5は、野生型マウスおよびホモ型のヒトインターロイキン-6受容体遺伝子ノックインマウスでの、種特異的なインターロイキン-6（リガンド）に対する反応性を示したグラフである。

[図6]図6は、ヒトインターロイキン-6受容体遺伝子ノックインマウスとヒトインターロイキン-6トランスジェニックマウスとの交雑によるダブルトランスジェニックマウス樹立におけるPCRによる遺伝子型解析の代表的な検出例を示す。

[図7]図7は、ヒト型化キャッスルマン病モデルマウスへの各種抗体（TCZあるいはMR16-1）投与実験における剖検時の脾臓重量を示すグラフである。

[図8]図8は、ヒト型化キャッスルマン病モデルマウスへのTCZ投与実験での脾臓における形質細胞の増加の抑制効果を示す組織像である。A：hIL6Rノックインマウス、B：TCZ非投与のヒト型化キャッスルマン病モデルマウス、C：TCZを投与したヒト型化キャッスルマン病モデルマウス。

[図9]図9は、ヒト型化キャッスルマン病モデルマウスへの各種抗体（TCZあるいはMR16-1）投与実験における剖検時の血漿中可溶性ヒトインターロイキン-6受容体およびヒトインターロイキン-6濃度を示す図である。

[図10]図10は、ヒト型化キャッスルマン病モデルマウスへの各種抗体（TCZあるいはR16-1）投与実験における剖検時の血漿中抗TCZ抗体タイターを示す図である。

[図11A]図11Aは、マウスPou5f1遺伝子のゲノムDNAの構造（1）と、挿入されるノックインベクター（2）との関係を模式的に示す図である。ノックインベクターのうち、コントロールベクターは、ネオマイシン耐性（neo）遺伝子 cDNAを有し、hp7pAベクターは、ネオマイシン耐性（neo）遺伝子 cDNA、hp7配列、およびポリA付加シグナルを有する。ノックインベクターにおいて、ネオマイシン耐性（neo）遺伝子 cDNAは、その翻訳開始点がマウスPou5f1遺伝子のエクソン1の翻訳開始点と一致するように、当該エクソン1内に挿入されている。

[図11B]図11Bは、マウスPou5f1遺伝子のゲノムDNA（a）とノックインベクター（b）とが相同性組換えを起して、ノックインされたゲノムDNA（c）が生成される様子を模式的に示す図である。図中の矢印は、neo遺伝子のノックインを検出するために使用したプライマーの設定位置を示す。

発明を実施するための形態

[0034] 本発明は、任意の外来遺伝子をコードするDNAの3'側にhp7配列をコードするDNAおよびポリA付加シグナルをコードするDNAが付加されたDNAを、非ヒト動物のゲノム上に存在する任意の標的遺伝子の同一読み取り枠に挿入したことを特徴とする非ヒト動物を提供する。

[0035] 本発明における「外来遺伝子」とは、本発明の非ヒト動物に導入する遺伝子を意味する。本発明における外来遺伝子は、由来する生物種を限定することなく使用することができる。例えば、ヒトの疾患治療薬の評価などの目的で本発明の非ヒト動物を使用する場合には、外来遺伝子としては、疾患治療薬の標的分子となるヒト遺伝子が好ましい。ヒトインターロイキン-6あるいはヒトインターロイキン-6受容体に起因する疾患のモデルとして本発明の非ヒト動物を使用する場合には、外来遺伝子としては、ヒトインターロイキン-6受容体遺伝子が特に好ましい。本発明の「ヒトインターロイキン-6受容体遺伝子」は、ヒトインターロイキン-6と結合し、細胞膜上にシグナル伝達分子gp130と会合することによって細胞内にシグナルを伝達する機能を有する分子をコードする遺伝子である。典型的には、GeneBankにて#NM_000565の番号で登録されている塩基配列を本発明において使用することができる。

[0036] また、外来遺伝子としては、緑色蛍光タンパク質（GFP）、 β -ガラクトシダーゼなどのレポータ遺伝子、薬剤（ネオマイシン等）耐性遺伝子などの選択マーカー遺伝子を使用することも可能である。外来遺伝子としては、2以上の遺伝子の組み合わせを使用することも可能である。この場合において、特定の遺伝子の両側にloxP配列を付加しておけば、Creを作用させることにより、当該特定の遺伝子を事後的に除去することができる。また、外来遺伝子には、該遺伝子の発現を調節するエンハンサなどが付加されていてもよい。外来遺伝子の形態は特に限定されず、例えば、cDNAであっても、ゲノムDNAであってもよい。

[0037] 本発明においては、外来遺伝子をコードするDNAの3'側にhp7配列をコードするDNAおよびポリA付加シグナルをコードするDNAを付加す

る。ここで「h p 7 配列」は、GGGGCGCGTGGTGGCGGCTGCAGCCGCCACCAACGCGCCCCの塩基配列（配列番号：1）である。また、「ポリA付加シグナル」は、真核生物遺伝子の最終エキソンの終止コドンの3' 下流の非翻訳領域に存在し、mRNAの3' 末端におよそ50～200個のアデニンヌクレオチドを付加するために必要な6塩基対のAATAAAを含む塩基配列である。

[0038] 本発明における「非ヒト動物」としては、特に限定されず、マウス、ラット、ハムスターなどのげっ歯類、サル、チンパンジーなどの非ヒト霊長類、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ブタなどの哺乳動物や、鳥類、両生類、爬虫類、魚類などを用いることが可能であるが、好ましくはげっ歯類であり、さらに好ましくはマウスである。

[0039] 本発明における「標的遺伝子」とは、外来遺伝子を挿入する対象となる非ヒト動物の遺伝子を意味する。また、「同一読み取り枠」とはmRNAがタンパク質に翻訳される際に読み取られる3塩基毎の塩基配列の単位を意味する。「同一読み取り枠に挿入」とは、標的遺伝子の開始コドンATGと外来遺伝子の開始コドンATGとが一致するように、外来遺伝子を挿入することを意味する。これにより、非ヒト動物における標的遺伝子のプロモーターと挿入した外来遺伝子とが作用可能に結合し、当該プロモーターの活性化にตอบสนองして外来遺伝子が発現するようになる。外来遺伝子の挿入の際には、破壊した標的遺伝子が元来の読み枠にて再び翻訳される可能性をなくす観点から、標的遺伝子のATG以降の配列について、3の倍数ではない塩基数の配列を欠損させることが好ましい。また、本発明において外来遺伝子は、標的遺伝子の本来の翻訳開始点が存在するエキソンのみに挿入されている（すなわち、標的遺伝子の標的エキソンのみと相同組換えが生じている）ことが好ましい。また、ポリA付加シグナルの3' 下流側にはI o x P配列、F r t配列やR o x配列といった組換え酵素の認識配列が存在していてもよい。

[0040] 本発明の非ヒト動物は、挿入される外来遺伝子がヒトインターロイキン-6受容体である場合には、可溶性ヒトインターロイキン-6受容体の血中濃

度が、健常なヒトにおける可溶性インターロイキン-6受容体と同等の濃度であることが好ましい。ここで、健常なヒトにおける可溶性インターロイキン受容体の濃度とは、 $15 \sim 70 \text{ ng/ml}$ をいう。非ヒト動物のが可溶性ヒトインターロイキン受容体の濃度の測定方法としては、実施例に記載の測定方法を用いることができる。

[0041] 本発明の非ヒト動物は、例えば、ヒトインターロイキン-6あるいはヒトインターロイキン-6受容体に起因する疾患のモデル動物として使用する場合には、さらにヒトインターロイキン-6を過剰発現していることが好ましい。ヒトインターロイキン-6の「過剰発現」とは、非ヒト動物のインターロイキン-6の内因性の発現量を超えて発現していることを意味する。ヒトインターロイキン-6を過剰発現させるための方法としては特に限定されないが、例えば主要組織適合性抗原H-2Ld遺伝子プロモータを使用した発現ベクターを用いて、ヒトインターロイキン-6遺伝子を非ヒト動物のゲノム内に導入することにより過剰発現させることができる。主要組織適合性抗原H-2Ld遺伝子プロモータとしては、文献(Miyazaki, J. et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83, 9537-9541)に記載のプロモータを利用することができる。発現ベクターとしては、遺伝子工学に利用されるベクターであれば特に限定されず、例えばプラスミドベクター、ウィルスベクター、コスミドベクター、細菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)および他の非プラスミドベクターなどを使用することができる。「ヒトインターロイキン-6あるいはヒトインターロイキン-6受容体に起因する疾患」としては、例えば、キャッスルマン病、慢性関節リウマチ、多発性骨髄腫、敗血症、メサングウム増殖性腎炎、癌悪液質などが挙げられる。

[0042] 本発明はまた、前記非ヒト動物を作製するためのDNA、前記DNAを保持するノックインベクターおよび前記ノックインベクターが導入された形質転換細胞を提供する。

[0043] 本発明における、「非ヒト動物を作製するためのDNA」は、任意の外来

遺伝子をコードするDNAの3'側にhp7配列をコードするDNAおよびポリA付加シグナルをコードするDNAが付加されたDNAである。

[0044] 本発明の「DNAを保持するノックインベクター」とは、前記非ヒト動物を作製するためのDNAを、相同組換えによって、宿主中の標的遺伝子領域に挿入する能力を有するベクターであり、前記非ヒト動物を作製するためのDNAの5'側に5'アーム（標的部位の5'上流の塩基配列と相同な塩基配列）が配置され、3'側に3'アーム（標的部位の3'下流の塩基配列と相同な塩基配列）が配置されている。本発明においてノックインベクターは、前記非ヒト動物を作製するためのDNAが、宿主中の標的遺伝子の同一読み取り枠に挿入されるように構築される。ノックインベクターにおいて、任意の外来遺伝子は、その翻訳開始点が標的遺伝子のエクソン1の翻訳開始点と一致するように、当該エクソン1内に挿入されていることが好ましい。すなわち、ノックインベクターにおいて、任意の外来遺伝子の翻訳開始点の5'側には、標的遺伝子のエクソン1の翻訳開始点よりも上流の塩基配列が配置されていることが好ましい。

[0045] また、本発明のノックインベクターは、宿主細胞内において複製する能力を有することが好ましい。このようなベクターは、例えば、前記非ヒト動物を作製するためのDNAを公知のベクターに挿入することにより構築することができる。公知のベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、細菌人工染色体（BAC）ベクター、酵母人工染色体（YAC）ベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターが挙げられる。

[0046] 本発明の「ノックインベクターが導入された形質転換細胞」は、前記非ヒト動物を作製するためのDNAを保持するノックインベクターが導入された細胞である。ノックインベクターが導入される宿主細胞は、前記非ヒト動物の細胞または前記非ヒト動物の細胞に分化可能な細胞（細胞の集団を含む）である。このような宿主細胞としては、目的に応じて種々の細胞を用いることができ、例えば、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞、精子幹細胞などの生殖細胞へ分化する能力を有する生殖系列幹細胞、受精卵が挙げられ

る。前記宿主細胞への前記ノックインベクターの導入は、エレクトロポレーション法などの公知の方法で行うことができる。前記多能性幹細胞をマイクロインジェクション法などの公知の方法で初期胚に注入し、これを仮親に移植して発生させることにより、キメラ動物を得ることができる。また、このキメラ動物を繁殖させることにより、その後代から、ノックインアレルがホモ接合体化された個体を得ることができる。また、生殖系列幹細胞を用いる場合には、エレクトロポレーション法などの公知の方法にてノックインベクターを導入して標的組換えを行なった細胞を、動物の生殖巣に移植して生殖細胞に分化させ、その動物を交配することにより、あるいは、動物より採取した生殖細胞を利用して、ノックイン動物を作出することが可能である。生殖系列幹細胞を用いた遺伝子改変動物の作出する方法に関しては、文献（K a n a t s u - S h i n o h a r a , M . e t a l . (2 0 0 8) B i o l . R e p r o d . 7 9 , 1 1 2 1 - 1 1 2 8 ）を参照のこと。受精卵を用いる場合には、ノックインベクターを、ゲノム上の標的領域に特異的な標的配列に結合して切断するZ i n c F i n g e r N u c l e a s e (Z F N) 、 T r a n s c r i p t i o n A c t i v a t o r - l i k e E f f e c t o r N u c l e a s e (T A L E N) などの人工ヌクレアーゼやC l u s t e r e d R e g u l a r l y I n t e r s p a c e d S h o r t P a l i n d r o m i c R e p e a t (C R I S P R) / C a s 9 などとともに受精卵へ注入し、その受精卵を仮親に移植して発生させることにより、ノックイン動物を作製することが可能である。Z F N およびT A L E N を用いた方法に関しては、それぞれ文献（C u i , X . e t a l . (2 0 1 1) N a t . B i o t e c h n o l . 2 9 , 6 4 - 6 7 ）および文献（L i , T . e t a l . (2 0 1 1) N u c l e i c A c i d s R e s . 3 9 , 6 3 1 5 - 6 3 2 5 ）に記載されている。C R I S P R / C a s 9 を用いた方法に関しては、文献（Y a n g , H . e t a l . (2 0 1 3) C e l l . i n p r e s s . ）に記載されている。さらに、動物の精巣あるいは卵巣にノックインベクタ

ーを注入して、エレクトロポレーション等の手法により生殖細胞を、直接、遺伝子組換えし、その後、交配を行うことなどによりノックインアレルを有する個体を得ることが可能である（Niu, Y. et al. (2008) J. Genet. Genomics. 35, 701-714）。

[0047] 本発明の非ヒト動物は、被験物質における、疾患の治療効果、薬物動態、血中から可溶性ヒトインターロイキン-6受容体を除去する活性など種々の評価に利用することが可能である。従って、本発明は、このような本発明の非ヒト動物を利用した被験物質の評価方法をも提供する。

[0048] 本発明の評価方法に用いる「被験物質」としては、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、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出物などが挙げられる。好ましくはヒトインターロイキン-6受容体に対する抗体であり、例えばPM-1抗体（J. Immunol. 143:2900-2906, 1989）、hPM-1抗体（国際公開92/19759号公報）などが挙げられる。被験物質の非ヒト動物への投与は、例えば、尾静脈投与、皮下投与、腹腔内投与、経口投与、経鼻投与、経皮投与、経肺投与などで行うことができる。

[0049] 被験物質の評価の態様としては、以下が挙げられる。例えば、被験物質を投与した本発明の非ヒト動物において、ヒトインターロイキン-6またはヒトインターロイキン-6受容体に起因する疾患の症状が抑制されたか否かを測定することにより、被験物質における、ヒトインターロイキン-6またはヒトインターロイキン-6受容体に起因する疾患の治療効果を評価することができる。疾患の症状が抑制されたか否かの評価においては、本発明の非ヒト動物（他の非ヒト動物との交配により得られる子孫も含む）のみならず、当該非ヒト動物から採取した臓器、組織、細胞、血液などの生体材料を用いることも可能である。ヒトインターロイキン-6あるいはヒトインターロイキン-6受容体に起因する疾患の症状が抑制されたか否かは、例えば疾患がキャッスルマン病の場合には、脾臓腫大の改善および脾臓重量増加の正常化などで判断することができる。

- [0050] また、被験物質を投与した本発明の非ヒト動物において、被験物質の血中濃度を測定することにより、被験物質の薬物動態学的特性を評価することもできる。ここで「薬物動態学的特性」とは、動物の体内における被験物質の有効血中濃度、血中半減期や消失速度等の特性を意味する。被験物質の血中濃度の測定の手法については特に限定されるものではない。被験物質がタンパク質（抗体を含む）である場合には、例えば、ELISA法が挙げられ、被験物質が低分子化合物である場合には、例えば、液体クロマトグラフ質量分析（LC-MS）法が挙げられる。血中濃度から薬物動態学的特性を評価する方法論については、文献（Igawa et al. (2010) Nat. Biotechnol. 28:1203-1207）を参照のこと。
- [0051] また、被験物質を投与した本発明の非ヒト動物において、可溶性ヒトインターロイキン-6受容体の血中濃度を測定することにより、被験物質における、血中から可溶性ヒトインターロイキン-6受容体を除去する活性を評価することもできる。可溶性ヒトインターロイキン-6受容体の濃度の測定の手法については特に限定されるものではないが、例えばELISA法が挙げられる。
- [0052] この方法においては、さらに、被験物質の血中濃度も測定することにより、血中から可溶性ヒトインターロイキン-6受容体を除去するのに必要な被験物質の用量を評価することができる。被験物質の血中濃度の測定については、上記の方法を使用することができる。
- [0053] 上記本発明の被験物質の評価方法を利用することにより、所望の活性を有するヒトインターロイキン-6受容体に対する抗体を効率的に生産することが可能である。従って、本発明は、このような抗体の生産方法をも提供する。
- [0054] 本発明の抗体の生産方法においては、まず、ヒトインターロイキン-6受容体に対する抗体を生産する。
- [0055] モノクローナル抗体を生産する方法としては、代表的には、コーラーおよ

びミルスタインの方法 (Kohler & Milstein, Nature, 256:495 (1975)) が挙げられる。この方法における細胞融合工程に使用される抗体産生細胞は、抗原であるヒトインターロイキン-6 受容体で免疫された動物 (例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、サル、ヤギ) の脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血白血球などである。免疫されていない動物から予め単離された上記の細胞またはリンパ球などに対して、抗原を培地中で作用させることによって得られた抗体産生細胞も使用することが可能である。ミエローマ細胞としては公知の種々の細胞株を使用することが可能である。ハイブリドーマは、例えば、抗原で免疫されたマウスから得られた脾臓細胞と、マウスミエローマ細胞との間の細胞融合により産生され、その後のスクリーニングにより、ヒトインターロイキン-6 受容体に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを得ることができる。ヒトインターロイキン-6 受容体に対するモノクローナル抗体は、ハイブリドーマを培養することにより、また、ハイブリドーマを投与した哺乳動物の腹水から、取得することができる。

[0056] 上記抗体をコードするDNAをハイブリドーマやB細胞などからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主細胞 (例えば哺乳類細胞株、大腸菌、酵母細胞、昆虫細胞、植物細胞など) に導入することにより、抗体を組換え抗体として産生させることもできる (例えば、Antibody Production: Essential Techniques, 1997 WILEY、Monoclonal Antibodies, 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS、Eur. J. Biochem. 192:767-775 (1990))。トランスジェニック動物作製技術を用いて、抗体遺伝子が組み込まれたトランスジェニック動物 (ウシ、ヤギ、ヒツジまたはブタなど) を作製すれば、そのトランスジェニック動物のミルクから、抗体遺伝子に由来するモノクローナル抗体を大量に取得することも可能である。

[0057] キメラ抗体は、例えば、抗原をマウスに免役し、そのマウスモノクローナ

ル抗体の遺伝子から抗原と結合する抗体可変部（可変領域）を切り出して、ヒト骨髓由来の抗体定常部（定常領域）遺伝子と結合し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入して産生させることにより取得することができる（例えば、特開平7-194384号公報、特許3238049号公報、米国特許第4816397号公報、米国特許第4816567号公報、米国特許第5807715号公報）。

[0058] ヒト型化抗体は、非ヒト由来の抗体の抗原結合部位（CDR）の遺伝子配列をヒト抗体遺伝子に移植（CDRグラフティング）することにより作製することができる（例えば、特許2912618号、特許2828340号公報、特許3068507号公報、欧州特許239400号公報、欧州特許125023号公報、国際公開90/07861号公報、国際公開96/02576号公報参照）。

[0059] ヒト抗体の作製においては、免疫することで、ヒト抗体のレパートリーを生産することが可能なトランスジェニック動物（例えばマウス）を利用することが可能である（例えば、Nature, 362:255-258(1992)、Intern. Rev. Immunol, 13:65-93(1995)、J. Mol. Biol, 222:581-597(1991)、Nature Genetics, 15:146-156(1997)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:722-727(2000)、特開平10-146194号公報、特開平10-155492号公報、特許2938569号公報、特開平11-206387号公報、特表平8-509612号公報、特表平11-505107号公報）。

[0060] こうして生産した抗体を本発明の非ヒト動物に投与し、抗体を投与した非ヒト動物において、ヒトインターロイキン-6またはヒトインターロイキン-6受容体に起因する疾患の症状が抑制されたか否かを測定し、当該症状を抑制する抗体を選抜することにより、ヒトインターロイキン-6またはヒトインターロイキン-6受容体に起因する疾患の治療効果を有する、ヒトインターロイキン-6受容体に対する抗体を取得することができる。

- [0061] また、生産した抗体を投与した非ヒト動物において、抗体の血中濃度を測定し、所望の血中濃度を有する抗体を選抜することにより、所望の体内動態を有する、ヒトインターロイキン-6受容体に対する抗体を取得することができる。
- [0062] さらに、生産した抗体を投与した非ヒト動物において、可溶型ヒトインターロイキン-6受容体の血中濃度を測定し、可溶型ヒトインターロイキン-6受容体の血中濃度を低下させる抗体を選抜することにより、血中から可溶型ヒトインターロイキン-6受容体を除去する活性を有する、ヒトインターロイキン-6受容体に対する抗体を取得することができる。
- [0063] こうして活性の評価および選抜を行った抗体がマウスモノクローナル抗体などである場合には、当該抗体をキメラ化またはヒト型化して、ヒトに投与した場合に抗原性が少なく、ひいては副作用の少ない抗体を取得することができる。

実施例

- [0064] 次に、実施例により、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。
- [0065] [実施例1] ヒトIL6R遺伝子ノックインマウスの作出

(1) ノックインベクターの構築

マウスインターロイキン-6遺伝子 (Il6ra) のゲノム領域がクローニングされている大腸菌人工染色体 (BAC) クローンを用いた。このBAC上のマウスIl6ra遺伝子の標的領域に、ヒトインターロイキン-6受容体遺伝子のコーディング配列 (GeneBank #NM000565)、hp7配列、ポリA付加シグナル、loxP配列、ネオマイシン耐性 (neo) 遺伝子カセットおよびloxPの順に接続したDNA断片を、Red/E-Tシステム (GeneBridges) を利用して相同組換えにて挿入した。その際、BAC上のマウスIl6ra遺伝子のエクソン1に存在する翻訳開始点とヒトIL6R遺伝子の翻訳開始点を一致させるように挿入し、かつマウスIl6ra遺伝子のエクソン1内部の翻訳開始点以降の塩基配列を

40塩基対だけ欠損させた。なお、薬剤耐性遺伝子であるneoにはpgk遺伝子のプロモータが付加されており、ES細胞内ではneo遺伝子が発現する。しかしながら、neo遺伝子は上流に導入したhIL6R遺伝子の発現を抑制する可能性が予測される。そこで、後に、neo遺伝子を除去できるように、neo遺伝子の両側にはloxP配列(ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT(配列番号:2))を配置した。Creを作用させると組換えによって、loxP配列の間に挟まれたneo遺伝子が除去される仕組みになっている。次いで、ノックインベクターを線状化可能とするため、BAC上のマウスIl6ra遺伝子の5'側上流の領域に制限酵素NotI認識配列(GCGGCCGC)をアンピシリン耐性遺伝子とともに挿入した。

[0066] (2) ES細胞への導入

ES細胞(129SvEvマウス由来)に上記のhIL6Rノックインベクターをエレクトロポレーションにより導入し、G418による選択培養後に得られた薬剤耐性クローンより、相同組換え体をPCR法によってスクリーニングした。ノックインベクターは、60μgをNotIで直鎖状化し、フェノール/クロロホルム抽出後、エタノール沈殿させPBSに溶解して用いた。

[0067] スクリーニングで用いるES細胞は96穴プレートで培養し、1ウェルあたり200μlのPBS溶液で2回洗浄後、以下の組成の細胞溶解緩衝液(10×LA緩衝液II(TAKARA LA Taq用)5μl;5% NP-40 5μl;プロテイナーゼK(TAKARA,20mg/ml)4μl;蒸留水36μl)を加えて55℃2時間処理し、続いて95℃にて15分処理することで、プロテイナーゼKを失活させてPCRサンプルとした。

[0068] PCR反応混合物は、サンプル1μl、10×LA緩衝液II 2.5μl、25mM MgCl₂ 2.5μl、dNTP(2.5mM)4μl、プライマー(各50μM)各0.2μl、LA Taq(TAKARA)0.25μl、および蒸留水14.35μl(全25μl)とした。また、PCR

条件は、94℃にて5分間の前加熱、98℃にて10秒間、68℃にて3分30秒間の増幅サイクル35サイクル、並びに68℃にて7分間の複加熱とした。

[0069] 使用したプライマーは以下の通りである。相同組換えを起こしたES細胞のサンプルでは、約2.2kbのバンドが増幅される。プライマーは、P6Ra1をノックインベクター上の相同アームよりも5'上流側のマウスIl6raゲノム領域に配置し、hRLI6__11638RをhIL6R cDNA内に配置した(図1を参照)。P6Ra1(前方)5'-ACAGGG CCTTAGACTCACAGC-3'(配列番号:3); hRLI6__11638R(後方)5'-AACTTGCTCCCGACACTACTGG-3'(配列番号:4)。

[0070] (3) ノックインマウスの作出

相同組換えESクローンをトリプシン処理により浮遊させ、ES細胞培地で洗浄した。48時間間隔で5IUのウマ絨毛ゴナドトロピン(eCG)およびヒト絨毛ゴナドトロピン(hCG)を腹腔内投与することにより、過剰排卵処理を施したC57BL/6J(B6)の雌マウスを同系統の雄マウスと交配した。雌マウスのプラグが確認された日を0.5日とし、妊娠2.5日に子宮および卵管を灌流し、8細胞期から桑実期の胚を回収した。回収した胚を37℃にて一晩培養し、胚盤胞に発生した胚を宿主胚として10~15個のES細胞を注入した。注入後の胚は、偽妊娠2.5日齢のICR系の受容雌の子宮内に移植し、17日後に産仔を得た。ES細胞の胚盤胞への注入により得られた産仔の毛色での判別により、組換えES細胞(野生色)と宿主胚盤胞由来の細胞(黒色)の混在したキメラマウスが得られた。雄キメラマウスは性成熟後にB6雌マウスと交配し、ノックインアレルの次世代マウスへの伝達を、次世代マウスの尾より抽出したゲノムDNAを鋳型としてPCR法により確認した。PCRは上述の相同組換えES細胞のスクリーニングの際に利用した方法にて実施した。その結果、2.2kbのシグナルが検出された個体を得られ、これら個体にはノックインアレルが伝達してい

ることが確認された。

[0071] (4) neo遺伝子の除去

ノックインアレルの伝達が確認された個体の繁殖により得た受精卵の前核に組換え酵素Cre発現ベクターを顕微注入することによって、neo遺伝子カセットを除去した。すなわち、一過性にCreを発現させることによって、ノックインアレルに配置した2ヶ所のLoxP間の組換えが誘導され、neo遺伝子カセットが除去される。Cre発現ベクターの顕微注入後の受精卵は、偽妊娠0.5日のICR系受容雌の卵管内に移植し、19日後に産仔を得た。neo遺伝子カセットの除去の確認は、産仔の離乳後に採取した尾より抽出したゲノムDNAを用いてPCR法によって実施した。

[0072] PCR反応液組成は、サンプル1 μ l、2 $\times$ GC緩衝液112.5 μ l、dNTP (2.5mM) 4 μ l、プライマー (各50 μ M) 各0.25 μ l、LA Taq (TAKARA) 0.25 μ l、および蒸留水6.75 μ l (全25 μ l) とした。また、PCR条件は、94 $^{\circ}$ Cにて4分間の前加熱、94 $^{\circ}$ Cにて30秒間、62 $^{\circ}$ Cにて30秒間、72 $^{\circ}$ Cにて3分間の増幅サイクル35サイクル、並びに72 $^{\circ}$ Cにて7分間の複加熱とした。

[0073] プライマーの設定位置は図1Bに示す。プライマーとしては、mRLI6__10355 (5' -TCTGCAGTAGCCTTCAAAGAGC-3' (配列番号: 5)) およびmRLI6__11166R (5' -AACCA GACAGTGTCACATTCC-3' (配列番号: 6)) を使用した。PCR反応により、neoカセットが除去される前の個体のサンプルでは、ノックインアレルに由来する増幅産物として4.2kbと野生型アレル由来の0.8kbのシグナルが検出されるのに対して、neoカセットが除去された個体のサンプルでは約2.7kbと野生型アレル由来の0.8kbのシグナルが検出された (図2)。

[0074] (5) ノックインマウスの樹立

neo遺伝子カセットの除去が確認されたマウスの繁殖により、ノックインアレルをホモ接合体化した個体を得た。ホモ接合体の確認はPCRにて行

った。PCR反応はneo遺伝子カセットの除去を確認した際の反応系と同様に実施した。ホモ接合体ではノックインアレルに由来する2.7kbのシグナルは検出されるが、野生型アレル由来の0.8kbのシグナルは検出されないことを指標として、ホモ接合体を確認した(図2)。

[0075] (6) ヒトIL6RおよびマウスIl6raの発現確認

ー組織RNAを用いたRT-PCR法での確認ー

ホモ接合体のノックインマウスおよび野生型マウスの組織RNAを用いてRT-PCR法によりヒトIL6RおよびマウスIl6raの発現を解析した。肝臓、脾臓、胸腺、腎臓、心臓および肺より組織RNAを調製した。各1μgの組織RNAを鋳型として、SuperScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen)により、Oligo dT(20)プライマーを用いて逆転写反応を行なうことによってcDNAを合成した。合成されたcDNAを鋳型としてPCRを行なうことによって、ヒトIL6RおよびマウスIl6raを検出した。ヒトIL6Rの検出は、ノックインアレルにおけるhIL6R遺伝子の挿入位置である翻訳開始点よりも上流側の5'非翻訳領域に設定したフォワードプライマー6RIK-s1(5'-CCCGGCTGCGGAGCCGCTCTGC-3'(配列番号:7))およびヒトIL6R特異的なリバースプライマーRLI6-a1(5'-ACAGTGATGCTGGAGGTCCCTT-3'(配列番号:8))の組合せを使用して実施した。一方、マウスIl6raの検出は、上述のフォワードプライマー6RIK-s1およびマウスIl6ra特異的なリバースプライマー6RLIcA2(5'-AGCAACACCGTGAACTCCTTTG-3'(配列番号:9))の組合せを使用して実施した。PCR反応液の組成は、サンプル1μl、2×GC緩衝液112.5μl、dNTP(2.5mM)4μl、プライマー(各50μM)各0.25μl、LA Taq(TAKARA)0.25μl、および蒸留水6.75μl(全25μl)とした。また、PCR条件は、94℃にて2分間の前加熱、94℃にて30秒間、62℃にて3

0秒間、72℃にて1分間の増幅サイクル30サイクル、並びに72℃にて5分間の複加熱とした。ヒトIL6Rの増幅産物は880bp、マウスIl6raの増幅産物は846bpに検出されるが、ホモ接合体のhIL6Rノックインマウスの各組織ではヒトIL6Rのみが検出され、マウスIl6raは検出されなかった。また、野生型マウスの各組織からはヒトIL6Rは検出されず、マウスIl6raのみが検出された(図3)。この結果より、デザイン通りにノックインベクターが相同組換えを起こし、マウスIl6raのかわりにヒトIL6Rが発現するマウスが得られたことが確認された。

[0076] ー血漿中のヒトIL6R濃度の測定ー

イソフルラン吸入麻酔下にて開腹し、腹部大静脈より採取した血液より分離した血漿中の可溶型ヒトIL6R濃度を、Quantikine Human IL-6sR Immunoassay Kit (R&D Systems)を用いて測定した。その結果、血漿中可溶型hIL6R濃度は、ホモ型のノックインマウスでは $22.1 \pm 5.0 \text{ ng/ml}$ 、ヘテロ型ノックインマウスでは $11.5 \pm 4.1 \text{ ng/ml}$ と定量された。なお、野生型マウスにおいては血漿中に可溶型hIL6Rは検出されなかった(図4)。ホモ型ノックインマウスでは、ヒトにおいて報告されている血中濃度と同等の濃度(Nishimoto N. et. al. (2008) Blood. 112:3959-3969)であった。

[0077] ー種特異的なリガンド反応性の確認ー

ホモ型ノックインマウスおよび野生型マウスに、 $4 \mu\text{g}/\text{体重kg}$ となるようマウスIL6あるいはヒトIL6を腹腔内投与し、その6時間後に採血して、血中の血清アミロイドA(SAA)濃度を、SAA ELISA Kit (Invitrogen)を用いて定量した。なお、投与用IL6の溶媒としては、マウス血漿が0.5%となるようにリン酸緩衝生理食塩液(PBS)に添加した溶液を使用し、溶媒のみを投与する対照群を設けた。その結果、ホモ型ノックインマウスはヒトIL6にのみ反応して血漿SAAレベルの上昇が認められたが、マウスIL6に対する反応性は認められなかった。

(図5)。一方、野生型マウスはヒトIL6にもマウスIL6にも反応して血漿SAAレベルの上昇が認められた(図5)。マウスIL6raはマウスIL6にもヒトIL6にも結合する一方、ヒトIL6RはヒトIL6に結合するがマウスIL6には結合しないことが知られており、本実験の結果は、この知見に合致するものである。従って、ホモ型ノックインマウスでは、設計通り、マウスIL6raが発現せず、代わりにヒトIL6Rが発現し、かつ機能していることが明らかとなった。

[0078] 本発明におけるノックインアレルより転写されたhIL6R遺伝子のmRNAは、スプライスアウトされない構造であるため、NMD機構によって分解を受けないが、その一方で、スプライスアウトされない遺伝子の発現量は低くなることが知られている。しかしながら、本発明のhIL6Rノックインマウスでは、血中の可溶性hIL6R濃度が健常人における血中濃度と同等であり、さらに投与したヒトIL6にも十分反応してSAAを産生することが確認された。このことは、ポリA付加シグナルとともに挿入したhp7が、スプライスアウトされない構造のために本来であれば低下するはずのhIL6R発現量の安定化に寄与したことを示す。

[0079] [実施例2] ヒト化キャッスルマン病モデルマウスの樹立と評価

(1) ヒト化キャッスルマン病モデルマウスの樹立

hIL6Rノックインマウスを、H-2Ld ヒトIL6トランスジェニックマウス(Cytokine, 2002, Dec. 21; 20(6): 304-311)と交配することによりダブルトランスジェニックマウスを作出した。各個体の組織より抽出したゲノムDNAを用いてPCR法により遺伝子型を解析し、ホモ型のhIL6Rノックインアレルを有し、かつhIL6トランスジーンを有する個体を選別した。hIL6Rノックインアレルの検出には上述のPCR反応系を利用した。すなわち、PCR反応液組成はサンプル1μl、2×GC緩衝液112.5μl、dNTP(2.5mM)4μl、プライマー(各50μM)各0.25μl、LA Taq(TAKARA)0.25μl、および蒸留水6.75μl(全25μl)とし

た。また、PCR条件は、94℃にて4分間の前加熱、94℃にて30秒間、62℃にて30秒間、72℃にて3分間の増幅サイクル35サイクル、並びに72℃にて7分間の複加熱とした。プライマーはmRLI6__10355 (5' - TCTGCAGTAGCCTTCAAAGAGC - 3' (配列番号: 10)) およびmRLI6__11166R (5' - AAC CAGACA GTGTCACATTCC - 3' (配列番号: 11)) を使用した。PCR反応により、ノックインアレルは約2.7 kbのシグナル、野生型アレルは0.8 kbのシグナルとして検出された(図6)。さらに、PCR法によりhIL6トランスジーンを検出を行なった。すなわち、PCR反応液組成は、サンプル1 μl、10×Ex緩衝液2.5 μl、dNTP (2.5 mM) 2 μl、プライマー (各50 μM) 各0.1 μl、Ex Taq (TAKARA) 0.25 μl、および蒸留水19.05 μl (全25 μl) とした。PCR条件は、94℃にて4分間の前加熱、94℃にて30秒間、65℃にて30秒間、72℃にて30秒間の増幅サイクル35サイクル、並びに72℃にて7分間の複加熱とした。プライマーは、フォワードプライマーとして「5' - ACCCTCTTCAGAACGAATTGACAAA - 3' (配列番号: 12))」を、リバープライマーとして「5' - AGCTGCGCAGAAATGAGATGAGTTGT - 3' (配列番号: 13))」を使用した。hIL6トランスジーンは0.45 kbの鎖長に検出された(図6)。ホモ型のhIL6Rノックインアレルを有し、かつhIL6トランスジーンを有するマウスでは、キャッスルマン病様の症状、すなわち全身のリンパ節の腫脹および脾臓の腫大が確認された。以上から、病態の原因がヒトIL6の過剰産生であり、その受容体であるIL6Rもヒト型化されているヒト型化キャッスルマン病モデルマウスが樹立できた。

[0080] (2) ヒト型化キャッスルマン病モデルマウスへのhIL6R特異的中和抗体の投与による治療効果の検討

上述のヒト型化キャッスルマン病モデルマウスを用いてhIL6R中和抗体の薬効評価が可能かどうかの検討を実施した。ヒト化キャッスルマン病モ

デルマウスへ4週齢時に2mg/bodyのヒト型化抗ヒトIL6Rモノクローナル抗体（トシリズマブ、以下TCZ）を尾静脈内投与し、その翌週より0.1、0.25あるいは0.5mg/bodyのTCZを2回/週の頻度にて4週間、皮下投与した。比較対照として、4週齢時に2mg/bodyのラット抗マウスIL6raモノクローナル抗体（MR16-1）を尾静脈内投与し、その翌週より0.1mg/bodyのMR16-1を2回/週にて4週間皮下投与した。溶媒の生理食塩液を投与する群も設定した。さらにIL6raについて野生型、かつhIL6トランスジーンを有するマウスにも上記と同様の抗体投与を実施した。また、hIL6RノックインマウスあるいはIL6raの野生型マウスで、hIL6トランスジーンを有していないマウスを、病態を発症しない対照群として用い、同様のプロトコールにて生理食塩液の投与のみ実施した。なお、いずれの実験群も5匹の個体を使用した。最終投与の4日後にイソフルラン吸入麻酔下にて開腹し、全採血後に放血することによって安楽死処置し、脾臓を採取した。採取した血液はヘパリン血漿を分離し、-80℃フリーザにて保存した。脾臓は重量測定し、一部をRNA調製用として-80℃に凍結保存して、残りは10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬した。

[0081] hIL6トランスジーンを有していないhIL6Rノックインマウスあるいは野生型マウスの脾臓重量は、溶媒投与のみ行なった場合には、いずれも 0.08 ± 0.01 gであり、IL6受容体がヒト化されたことによる脾臓重量には影響は認められなかった。次に、野生型IL6受容体を有するhIL6トランスジェニックマウスの場合、溶媒投与のみ行なった群では、脾臓重量は 0.34 ± 0.09 gと脾臓の腫大が認められた。一方、hIL6トランスジーンを有するhIL6Rノックインマウス（すなわちヒト型化キャッスルマン病モデルマウス）に溶媒投与のみ行なった場合には、脾臓重量は 0.26 ± 0.03 gであり、IL6受容体をヒト型化しても、マウス型受容体を発現しているマウスと同様に脾臓の腫大が認められた。

[0082] TCZ投与により、ヒト型化キャッスルマン病モデルマウスでは、脾臓の

腫大が著明に抑制された（図 7）。すなわち、0.1、0.25 および 0.5 mg/body の TCZ 投与群において、脾臓重量（平均値 ± 標準偏差）はそれぞれ 0.14 ± 0.03 g、 0.14 ± 0.02 g および 0.13 ± 0.03 g であり、溶媒投与群の脾臓重量 0.26 ± 0.03 g と比較して統計学的に有意な重量低下が認められた。一方、MR16-1 投与群の脾臓重量は 0.34 ± 0.11 g であり、溶媒投与群と比較して有意差は認められなかった。また、野生型 *Il6ra* を有する *hIL6* トランスジェニックマウスでは、溶媒投与群で 0.34 ± 0.09 g と脾臓腫大が認められるが、TCZ 投与はいずれの投与用量においても脾臓腫大の抑制は認められず（ 0.45 ± 0.26 g）、一方、MR16-1 投与群では 0.12 ± 0.01 g までの著明な重量低下が認められた。

[0083] 脾臓の病理組織学的な解析では、ヒト型化キャッスルマン病モデルマウスにおいて形質細胞の増加および白脾髄数の増加が認められたが、TCZ 投与によっていずれの所見についても改善が認められた（図 8、表 1）。

[0084] [表1]

トシリズマブ投与および非投与のヒト型化キャッスルマンモデルマウスにおける脾臓の病理組織学的解析

所見	グレード	<i>Il6ra^{hIL6R/hIL6R}</i>		
		No Tg 生理食塩液	<i>hIL6</i> Tg 生理食塩液	<i>hIL6</i> Tg TCZ*
形質細胞の増加	—	3/3	0/3	4/5
	±	0/3	2/3	1/5
	+	0/3	1/3	0/5
白脾髄数の増加	—	3/3	0/3	1/5
	+	0/3	0/3	4/5
	++	0/3	3/3	0/5

グレード：±，微弱；+，弱；++，中程度。

表内数値は所見が認められた動物数/評価動物数を示す。

＊、トシリズマブ（TCZ）投与

[0085] 血漿中の可溶性 *hIL6R* 濃度は、Quantikine Human *IL-6sR* Immunoassay Kit（R&D Systems、DR600）を用いて測定した。血漿 *hIL6* 濃度は、Human *IL-*

6 ELISA Kit (Invitrogen, KHC0062) を用いて測定した。その結果、ヒト型キャッスルマン病モデルマウスにおいて、TCZの投与によって、血漿可溶型hIL6R濃度およびhIL6濃度のいずれにも著明な上昇が認められた(図9)。すなわち、血漿可溶型hIL6R濃度は、溶媒投与群で $21 \pm 7 \text{ ng/ml}$ であったのに対して、0.1、0.25および0.5 mg/bodyのTCZ、2回/週の投与によって、 713 ± 387 、 1066 ± 126 および $1120 \pm 171 \text{ ng/ml}$ と著明な上昇が認められた。一方、MR16-1の投与では血漿可溶型hIL6R濃度 $21 \pm 2 \text{ ng/ml}$ であり、溶媒投与群と同様の濃度を呈した。血漿中hIL6濃度は、溶媒投与群で $163 \pm 112 \text{ pg/ml}$ であったのに対し、0.1、0.25および0.5 mg/bodyのTCZ、2回/週の投与によって、 936 ± 350 、 1194 ± 394 および $1204 \pm 325 \text{ pg/ml}$ と著明な上昇が認められた。一方、MR16-1の投与では血漿hIL6濃度は $163 \pm 36 \text{ pg/ml}$ であり、溶媒投与群と同様の濃度を呈していた。

[0086] キャッスルマン病患者や慢性関節リウマチ患者へのTCZ投与によって、血中の可溶型IL6R濃度やIL6濃度が上昇することは報告されている(Blood, 2008 112:3959-3969)。TCZが、血中の可溶型IL6Rと複合体を形成することによってクリアランスが延長することが可溶型IL6Rの血中濃度の上昇の原因であると考察されている。また、TCZと結合していないIL6Rの存在比率が低下することによって、血中のIL6濃度も上昇すると考えられている。本実験にてTCZを投与したヒト型化キャッスルマン病モデルマウスにおいても同様の機構によって可溶型hIL6RおよびhIL6の上昇が生じたと考察される。また、hIL6Rノックインマウスおよびヒト型化キャッスルマン病モデルマウスの血漿中hIL6R濃度は、キャッスルマン病患者や慢性関節リウマチ患者にて報告されているTCZ投与前の血中濃度と同様であることから、ヒト患者における抗原の血中レベル変化を予測するための有効なモデルマウスとなることが

期待される。特に、抗体投与後の、血中の可溶性 h I L 6 R の推移をモニタリングすることによって、抗体による血中から h I L 6 R を除去する機能を評価することが可能であると考えられる。しかも、マウスという小実験動物であるので、比較検討するための被験抗体の必要量も少量に抑えることができる。

[0087] ー血漿中抗 T C Z 抗体タイターの評価ー

剖検の際に得られた血漿サンプルを用いて抗 T C Z 抗体タイターを測定した。すなわち、血漿サンプルをビオチン標識 T C Z 抗体および S U L F O R T A G 標識 T C Z 抗体と混合して一晩インキュベーションした後に、M S D ー ストレプトアビジンプレートに添加した。次いで、E C L (e n h a n c e d c h e m i l u m i n e s c e n c e) 基質を添加して化学発光の強度を測定した。その結果、インターロイキンー6受容体が野生型の h I L 6 トランスジェニックマウスでは T C Z 投与により、いずれの用量においても極めて高い抗 T C Z 抗体タイターを呈したのに対し、ヒト型化キャスルマン病モデルマウスでは T C Z のいずれの用量においても抗 T C Z 抗体の産生は極めて抑制されていた (図 10)。このことにより、T C Z の作用によってインターロイキンー6からのシグナルを遮断することによって抗 T C Z 抗体の産生を抑制されることが明らかとなった。

[0088] [実施例3] マウス P o u 5 f 1 遺伝子座へのネオマイシン耐性遺伝子のノックイン

(1) ノックインベクターの構築

マウス P o u 5 f 1 遺伝子のエクソン1に存在する翻訳開始点とネオマイシン耐性 (n e o) 遺伝子の翻訳開始点を一致させるようにネオマイシン耐性 (n e o) 遺伝子を挿入し、かつマウス P o u 5 f 1 遺伝子のエクソン1内部の翻訳開始点以降の塩基配列を107塩基対だけ欠損させたノックインベクターを構築した。その際、n e o 遺伝子の終止コドンの直下に h p 7 配列、ポリA付加シグナルを接続した h p 7 p A ベクターと、h p 7 配列、ポリA付加シグナルを接続せず、内因性のポリA付加シグナルを利用するコン

トロールベクターとを構築した。また、ノックインベクターの相同アームとして、Pou5f1遺伝子の上述の翻訳開始点よりも1.7 kb上流までのゲノムDNA、およびエクソン1の欠損領域以降の約5 kbのゲノムDNAを接続した構造とし、ベクターpMC1DTA (A+T/pau) (Yagi T. et al. (1993) Anal Biochem. 214: 77-86) に挿入した。ノックインベクター上の相同アームの5'端に制限酵素NotI認識配列 (GCGGCCGC) を作製しているので、NotIにて線状化可能である。ベクターの構造を図11Aに示す。

[0089] (2) ES細胞への導入

ES細胞 (C57BL/6Nマウス由来) に上記のノックインベクターをエレクトロポレーションにより導入し、G418による選択培養を行なった。ノックインベクターはNotIで線状化し、フェノール/クロロホルム抽出後、エタノール沈殿させPBSに溶解して用いた。なお、ES細胞 2×10^7 個に対して、20 μ gのノックインベクターが導入されるように濃度を調製してエレクトロポレーションを行なった。なお、それぞれのベクターについて、ES細胞へのエレクトロポレーションは、再現性を確認するために、各2回実施した。エレクトロポレーション後にES細胞を播種し、その24時間後より、G418を300 μ g/mLとなるように培地に添加して選択培養を行なった。

[0090] (3) 相同組換えクローンの検出のためのPCRスクリーニング

hp7pAベクターに由来するES細胞コロニーをピックアップして、相同組換えの効率を検討した。すなわち、ES細胞を96穴プレートで培養し、1ウェルあたり200 μ lのPBS溶液で2回洗浄後、以下の組成の細胞溶解緩衝液 (10 $\times$ LA緩衝液II (TAKARA LA Taq用) 5 μ l; 5% NP-40 5 μ l; プロティナーゼK (TAKARA, 20 mg/mL) 4 μ l; 蒸留水36 μ l) を加えて55 $^{\circ}$ C 2時間処理し、続いて95 $^{\circ}$ Cにて15分処理することで、プロティナーゼKを失活させてPCRサンプルとした。

[0091] PCR反応混合物は、サンプル $1\mu\text{l}$ 、 $10\times\text{LA}$ 緩衝液 $1\mu\text{l}$ 、 $2.5\mu\text{l}$ 、 25mM MgCl_2 $2.5\mu\text{l}$ 、 dNTP (2.5mM) $4\mu\text{l}$ 、プライマー (各 $50\mu\text{M}$) 各 $0.1\mu\text{l}$ 、 LA Taq (TAKARA) $0.25\mu\text{l}$ 、および蒸留水 $14.55\mu\text{l}$ (全 $25\mu\text{l}$) とした。また、PCR条件は、 94°C にて2分間の前加熱、 98°C にて10秒間、 60°C にて15秒、次いで 68°C にて3分間の増幅サイクル35サイクル、並びに 68°C にて5分間の複加熱とした。

[0092] 使用したプライマーは以下の通りである。相同組換えを起こしたES細胞のサンプルでは、約 2.2kb のバンドが増幅される。プライマーは、 Pou4175F2 をノックインベクター上の相同アームよりも5'上流側のマウス Pou5f1 ゲノム領域に配置し、 neo8916R を neo 遺伝子cDNA内に配置した (図11Bを参照)。 Pou4175F2 (前方) 5'-AAGTCGCTGCCTTTATTTAGGTCTTCCAACCTAACCC-3' (配列番号: 14); neo0891R (後方) 5'-TTCA GTGACAACGTCGAGCACAGCTGC-3' (配列番号: 15)。

[0093] Pou5f1 遺伝子領域への neo 遺伝子ノックインベクター導入後、G418耐性となったES細胞クローン数および相同組換えクローン数および効率を表2にまとめた。

[0094] [表2]

Pou5f1 遺伝子領域への neo 遺伝子ノックインベクター導入成績

ベクター	エレクトロポレーション			クローン数		相同組換え体/ G418 耐性 (%)
		ES 細胞数	ベクター (μg)	G418 耐性	相同組換え体	
コントロール ベクター	1	0.6×10^7	20	0	-	-
	2	0.6×10^7	20	0	-	-
	合計			0	-	-
hp7pA ベクター	1	0.6×10^7	20	82	34	41%
	2	0.6×10^7	20	85	30	35%
	合計			167	64	38%

[0095] まず、コントロールベクターを導入した場合には、播種10日後にES細胞コロニーの生育状況を観察したところ、正常に生育したES細胞コロニーは得られなかった。一方、hp7pAベクターを導入した場合には、正常に生育したES細胞コロニーが観察された。

[0096] 両ノックインベクターの相同アームの鎖長は全く同一であるので、相同組換えによって標的領域にneo遺伝子が挿入される効率は同程度と考えられるが、コントロールベクターの場合には、たとえneo遺伝子が期待通りの領域に挿入されたとしても、G418耐性を呈するには不十分な量のneo遺伝子しか発現しなかったと考えられる。

[0097] hp7pAベクターを導入した場合には、2回のエレクトロポレーションに由来する167個のG418耐性クローンが得られた。それらのG418耐性クローンを上述のPCR系にて解析した結果、相同組換えによりneo遺伝子がノックインされているクローンは167クローン中64クローンであった(38%)。hp7pAベクターを導入した場合、相同組換えにて内因性Pou5f1遺伝子の標的領域にneo遺伝子が翻訳開始点を合わせた形で挿入されると、ES細胞で活性化されているPou5f1遺伝子のプロモータの制御によってneoが発現し、G418耐性となったと考えられる。また、PCRの結果、陰性であったクローンは、neo遺伝子が、標的領域ではなく、染色体上のランダムな位置に存在し、ES細胞で活性化されている何らかの遺伝子プロモータの下流に導入されたものと考えられる。すなわち、その挿入位置の近傍に存在するプロモータの活性によってneoが発現し、G418耐性を獲得したクローンであると判断された。これらの結果により、標的領域に挿入されたか、ランダムな位置に挿入されたかによらず、hp7配列およびポリA付加シグナルの存在によって十分なneo遺伝子の発現量が得られたと推察された。

[0098] 本実験では、neo遺伝子を、Pou5f1遺伝子の翻訳開始点を一致させて挿入し、かつ欠損させる標的遺伝子の領域を最小限にしたが、コントロールベクターにて改変した遺伝子アレルより転写されたmRNAは、Pou

5 f 1 遺伝子の終止コドンの遙か上流に、挿入した neo 遺伝子の終止コドン (premature termination codon, PTC) が存在し、かつ、この PTC の下流に Pou 5 f 1 遺伝子に由来するエキソン-エキソン結合部が存在するという構造となる。この構造が、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (NMD 機構) により認識されて mRNA が分解を受けるため、G 4 1 8 耐性を獲得するに十分な neo 遺伝子の発現量が得られなかったと考えられる。仮に、neo 遺伝子の直下にポリ A 付加シグナルのみを付加すると、転写される mRNA において、PTC の下流に標的遺伝子由来のエキソン-エキソン結合部が生じない構造となるため、NMD は生じない。しかしながら、スプライスアウトされない構造であるため、mRNA の発現量は低下する可能性が高いと考えられる (非特許文献 2)。一方、強固なステムループを形成する hp 7 配列を neo 遺伝子の直下に挿入する場合には、NMD が抑制される可能性は期待される (非特許文献 4) が、非特許文献 4 の記述から予測される hp 7 配列単独での NMD 抑制効果は弱いものであり、遺伝子発現の安定化は期待できない。

[0099] 上記を勘案すると、今回の実験結果は、ノックインベクターにて外来遺伝子を標的遺伝子領域に導入する場合、外来遺伝子の直下に hp 7 配列およびポリ A 付加シグナルの両方を挿入することにより、ノックインされた外来遺伝子の発現が安定化する可能性を強く示唆するものである。コントロールベクターと hp 7 p A ベクターのいずれを用いたとしても、相同組換えにて標的領域に neo 遺伝子が挿入された場合には、5' 上流領域は全く同一なので、プロモータによる転写制御は両ベクターとも相違はないと考えられる。つまり、この neo 遺伝子の発現量の差の要因は、mRNA の構造において終止コドンの下流に位置する hp 7 およびポリ A 付加シグナルの両者を同時に挿入することによって mRNA が安定化されたためであることが強く示唆される。しかも、ポリ A 付加シグナルを挿入していることから、本ベクターの構造は NMD を引き起こすものではないので、hp 7 配列の作用は既知の NMD 抑制効果とは異なる新たに見出された機能によるものであると考えら

れる。

産業上の利用可能性

[0100] 本発明は、非ヒト動物の内因性の遺伝子（標的遺伝子）の発現を欠損させ、かつ生理的に妥当なレベルで外来遺伝子の発現することができる非ヒト動物を提供するとともに、該動物を用いた化合物の評価方法を提供するものである。従って、本発明は、特に、分子標的に対する特異性の高い治療薬の開発に利用可能である。

配列表フリーテキスト

[0101] 配列番号 1

<223> hp7配列

配列番号3～15

<223> 人工的に合成されたプライマーの配列

請求の範囲

- [請求項1] 任意の外来遺伝子をコードするDNAの3'側にhp7配列をコードするDNAおよびポリA付加シグナルをコードするDNAが付加されたDNAを、非ヒト動物のゲノム上に存在する任意の標的遺伝子の同一読み取り枠に挿入したことを特徴とする非ヒト動物。
- [請求項2] 前記外来遺伝子がヒトインターロイキン-6受容体遺伝子である、請求項1に記載の非ヒト動物。
- [請求項3] 前記非ヒト動物のゲノム上に存在する任意の標的遺伝子がインターロイキン-6受容体遺伝子である、請求項1～2のいずれか1項に記載の非ヒト動物。
- [請求項4] 健常なヒトにおける可溶型インターロイキン-6受容体の血中濃度と同等の血中濃度で可溶型ヒトインターロイキン-6受容体を発現する、請求項2～3のいずれか1項に記載の非ヒト動物。
- [請求項5] 非ヒト動物がげっ歯類である、請求項1～4のいずれか1項に記載の非ヒト動物。
- [請求項6] 非ヒト動物がマウスである、請求項1～5のいずれか1項に記載の非ヒト動物。
- [請求項7] ヒトインターロイキン-6を過剰発現させた、請求項1～6のいずれか1項に記載の非ヒト動物。
- [請求項8] 被験物質における、ヒトインターロイキン-6またはヒトインターロイキン-6受容体に起因する疾患の治療効果を評価する方法であって、
(a) 被験物質を、請求項7に記載の非ヒト動物に投与する工程と、
(b) 前記被験物質を投与した非ヒト動物において、ヒトインターロイキン-6またはヒトインターロイキン-6受容体に起因する疾患の症状が抑制されたか否かを測定する工程、
とを含んで成る方法。
- [請求項9] ヒトインターロイキン-6あるいはヒトインターロイキン-6受容

体に起因する疾患がキャッスルマン病である、請求項 8 に記載の方法。

- [請求項10] 被験物質の薬物動態学的特性を評価する方法であって、
- (a) 被験物質を、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物に投与する工程と、
 - (b) 前記被験物質を投与した非ヒト動物における被験物質の血中濃度を測定する工程、
- とを含んで成る方法。

- [請求項11] 被験物質における、血中から可溶型ヒトインターロイキン-6 受容体を除去する活性を評価する方法であって、
- (a) 被験物質を、請求項 2 ～ 7 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物に投与し、
 - (b) 前記被験物質を投与した非ヒト動物において、可溶型ヒトインターロイキン-6 受容体の血中濃度を測定する工程、
- とを含んで成る方法。

- [請求項12] 被験物質がヒトインターロイキン-6 受容体に対する抗体である、請求項 7 ～ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

- [請求項13] ヒトインターロイキン-6 またはヒトインターロイキン-6 受容体に起因する疾患の治療効果を有する、ヒトインターロイキン-6 受容体に対する抗体の生産方法であって、
- (a) ヒトインターロイキン-6 受容体に対する抗体を生産する工程、
 - (b) 前記抗体を、請求項 7 に記載の非ヒト動物に投与する工程、
 - (c) 前記抗体を投与した非ヒト動物において、ヒトインターロイキン-6 またはヒトインターロイキン-6 受容体に起因する疾患の症状が抑制されたか否かを測定する工程、および
 - (d) ヒトインターロイキン-6 またはヒトインターロイキン-6 受容体に起因する疾患の症状を抑制する抗体を選抜する工程、

を含んで成る方法。

[請求項14] ヒトインターロイキン-6あるいはヒトインターロイキン-6受容体に起因する疾患がキャスルマン病である、請求項13に記載の方法。

[請求項15] 所望の薬物動態学的特性を有する、ヒトインターロイキン-6受容体に対する抗体の生産方法であって、

(a) ヒトインターロイキン-6受容体に対する抗体を生産する工程、

(b) 前記抗体を、請求項2～7のいずれか1項に記載の非ヒト動物に投与する工程、

(c) 前記抗体を投与した非ヒト動物における前記抗体の血中濃度を測定する工程、

、および

(d) 所望の血中濃度を有する抗体を選抜する工程、
を含んで成る方法。

[請求項16] 血中から可溶型ヒトインターロイキン-6受容体を除去する活性を有する、ヒトインターロイキン-6受容体に対する抗体の生産方法であって、

(a) ヒトインターロイキン-6受容体に対する抗体を生産する工程、

(b) 前記抗体を、請求項2～7のいずれか1項に記載の非ヒト動物に投与する工程、

(c) 前記抗体を投与した非ヒト動物において、可溶型ヒトインターロイキン-6受容体の血中濃度を測定する工程、および

(d) 可溶型ヒトインターロイキン-6受容体の血中濃度を低下させる抗体を選抜する工程、

を含んで成る方法。

[請求項17] (e) 選抜された抗体をキメラ化、またはヒト型化する工程をさらに

含んで成る、請求項 13～16 のいずれか 1 項に記載の抗体の生産方法。

[請求項18] 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物を作製するための DNA であって、任意の外来遺伝子をコードする DNA の 3' 側に h p 7 配列をコードする DNA およびポリ A 付加シグナルをコードする DNA が付加された DNA。

[請求項19] 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物を作製するためのベクターであって、請求項 18 に記載の DNA を保持するノックインベクター。

[請求項20] 請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の非ヒト動物を作製するための形質転換細胞であって、請求項 19 に記載のノックインベクターが導入された形質転換細胞。