

(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
2019年3月28日(28.03.2019)



(10) 国際公開番号

WO 2019/059158 A1

- (51) 国際特許分類:
A01K 67/027 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2018/034390
- (22) 国際出願日: 2018年9月18日(18.09.2018)
- (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 2017-178552 2017年9月19日(19.09.2017) JP
- (71) 出願人: 学校法人明治大学 (MEIJI UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1018301 東京都千代田区神田駿河台1-1 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 長嶋 比呂志 (NAGASHIMA, Hiroshi); 〒2148571 神奈川県川崎市多摩区東三田1-1-1 明治大学生田キャンパス内 Kanagawa (JP). 松成 ひとみ (MATSUNARI, Hitomi); 〒2148571 神奈川県川崎市多摩区東三田1-1-1 明治大学生田キャンパス内 Kanagawa (JP). 中野 和明 (NAKANO, Kazuaki); 〒2148571 神奈川県川崎市多摩区東三田1-1-1 明治大学生田キャンパス内 Kanagawa (JP). 長谷川航希 (HASEGAWA, Koki); 〒2148571 神奈川県川崎市多摩区東三田1-1-1 明治大学生田キャンパス内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 野村 健一, 外 (NOMURA, Kenichi et al.); 〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町3丁目30番の1 農機会館4階 Kanagawa (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, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR DEVELOPING ORGAN LACKING SPECIFIC FUNCTIONAL CELL

(54) 発明の名称: 特定の機能細胞を欠損する臓器を発達させる方法

(57) Abstract: In order to establish a means for producing functional cells such as β cells in the body of an animal such as a pig, the present invention provides a method for developing a secondary organ using a non-human animal in which formation of an organ is inhibited. The method includes a step of raising a newborn or fetus of a non-human animal, in which formation of an organ is inhibited, by at least supplementing a portion of the function of the organ for which formation is inhibited.

(57) 要約: ブタなどの動物体内に、 β 細胞などの機能細胞を作製する手段の確立を目的として、臓器の形成が阻害された非ヒト動物を用いて二次臓器を発達させる方法であって、前記臓器の形成が阻害された非ヒト動物の新生仔又は胎仔を、形成が阻害された前記臓器の機能の少なくとも一部を補完して、育成する工程を含む方法を提供する。



WO 2019/059158 A1

明 細 書

発明の名称： 特定の機能細胞を欠損する臓器を発達させる方法

技術分野

[0001] 本発明は、臓器の形成が阻害された非ヒト動物を用いて二次臓器を発達させる方法に関する。また、本発明は、特定の機能細胞を欠損する二次臓器を有する非ヒト動物に関する。更にまた、本発明は、細胞の作製方法に関する。更にまた、本発明は、特定の機能細胞を欠損している二次臓器に関する。

背景技術

[0002] 胚盤胞補完法とは、臓器が欠損した動物の胚盤胞に、正常動物の細胞を注入し、正常動物の細胞由来の臓器を形成させる方法である。この胚盤胞補完法を利用し、本発明者は、膵臓欠損ブタ由来の胚（ホスト胚）に、正常ブタ由来の胚（ドナー胚）を注入し、仮親の体内で成長させることにより、ドナー由来の膵臓を持ったキメラブタの作出に成功している（非特許文献1）。非特許文献1では、ブタ同士のキメラを作出しているが、ドナーとしてヒト多能性幹細胞を用いれば、ヒト膵臓を持ったブタの作出も可能であり、そのようなヒト膵臓は、膵島移植などに利用し得る。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：Matsunari et al., PNAS 110: 4557-4562(2013)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] ブタなどの動物体内に、ヒトの臓器（膵臓など）や機能細胞（ β 細胞など）を作製することができるようになれば、ドナー不足に悩む移植医療の問題を解決できる。

[0005] 一方で、発生の初期段階においてヒトと動物のキメラ状態を誘導し、それによって作製された臓器や機能細胞をヒトに移植することは、現状倫理的に解決すべき課題が多い。それに比べると、発生の初期段階においてヒトと動

物のキメラ状態を誘導せず、ブタなどの動物の臓器において、ヒトに定着可能な特定の機能細胞（ β 細胞など）を増殖させ、その機能細胞をヒトに移植するような細胞移植を行うことは、倫理的な障壁が低いと考えられる。

[0006] しかしながら、このような細胞移植を行うための細胞の増殖に適した、特定の機能細胞（例えば β 細胞など）だけが存在せず、かつ当該特定の機能細胞を作製及び増殖させるための環境として機能する臓器又は組織は、これまで知られていなかった。

[0007] 本発明は、このような背景の下、動物体内に機能細胞を作製する手段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

[0008] 膵臓形成が阻害されたブタ新生仔は、高血糖及び消化不良により出生後3日程度で死亡する。本発明者は、このような新生仔を生存させるため、インスリンと複合消化酵素を投与して育成したところ、成長に伴い本来膵臓が形成される部位に、膵臓様組織が形成されることを見出した。また、この膵臓様組織は、消化酵素やグルカゴンを産生するようになるが、インスリンを産生するようにはならないこと（即ち、 β 細胞は形成されないこと）も見出した。胎仔時には見られなかったこの膵臓様組織が、上記育成により、発達を開始し、さらにインスリンを産生する β 細胞が形成されない一方で、他の内分泌細胞や外分泌細胞を備えるような不完全な膵臓として形成されることは全く予想外のことであった。また、消化酵素やグルカゴンが産生されるにもかかわらず、インスリンだけが産生されないことも、全く予想外のことであった。

[0009] 上記育成により形成される β 細胞を欠損する膵臓様組織は、 β 細胞以外の環境（組織構造や機能など）を備えており、 β 細胞の前駆細胞や多能性幹細胞を増殖させるための「あき空間」として非常に優れていると考えられる。従って、この β 細胞を欠損する膵臓様組織にヒト由来の β 細胞の前駆細胞などを移植することにより効率的にヒト β 細胞を作製できると考えられる。

[0010] 本発明は、以上の知見に基づき完成されたものである。

[0011] 即ち、本発明は以下の〔1〕～〔18〕を提供するものである。

〔1〕臓器の形成が阻害された非ヒト動物を用いて二次臓器を発達させる方法であって、以下の工程を含むことを特徴とする方法、

（1）前記臓器の形成が阻害された非ヒト動物の新生仔又は胎仔を、形成が阻害された前記臓器の機能の少なくとも一部を補完して、育成する工程。

[0012] 〔2〕前記二次臓器は、前記育成において補完した機能の少なくとも一部が損なわれたまま発達する〔1〕記載の方法。

[0013] 〔3〕前記二次臓器が、特定の機能細胞を欠損する臓器であることを特徴とする〔1〕又は〔2〕に記載の方法。

[0014] 〔4〕前記機能細胞が、 β 細胞であることを特徴とする〔3〕に記載の方法。

[0015] 〔5〕前記工程（1）において、前記非ヒト動物の遺伝子改変により臓器形成を阻害することを特徴とする〔1〕乃至〔4〕のいずれかに記載の方法。

[0016] 〔6〕形成が阻害された前記臓器が膵臓であり、形成が阻害された膵臓の機能の補完を、少なくともインスリン及び消化酵素の投与により行うことを特徴とする〔1〕乃至〔5〕のいずれかに記載の方法。

[0017] 〔7〕前記遺伝子改変が、前記非ヒト動物においてPdx1プロモーター制御下でHes1遺伝子を過剰発現させることであることを特徴とする〔5〕に記載の方法。

[0018] 〔8〕前記非ヒト動物がブタであることを特徴とする〔1〕乃至〔7〕のいずれかに記載の方法。

[0019] 〔9〕臓器の形成が阻害された非ヒト動物の新生仔又は胎仔を育成することによって得られる非ヒト動物であって、特定の機能細胞を欠損する二次臓器を有することを特徴とする非ヒト動物。

[0020] 〔10〕前記臓器が膵臓であり、前記機能細胞が β 細胞であることを特徴とする〔9〕に記載の非ヒト動物。

[0021] 〔11〕前記非ヒト動物の新生仔又は胎仔がPdx1プロモーター制御下でHes1遺伝子を過剰発現させることにより臓器形成が阻害されたものであることを

特徴とする〔10〕に記載の非ヒト動物。

[0022] 〔12〕前記非ヒト動物がブタであることを特徴とする〔9〕乃至〔11〕のいずれかに記載の非ヒト動物。

[0023] 〔13〕臓器の形成が阻害された非ヒト動物の新生仔又は胎仔の育成によって発達させた二次臓器であって、特定の機能細胞を欠損していることを特徴とする二次臓器。

[0024] 〔14〕前記臓器が膵臓であり、前記機能細胞が β 細胞であることを特徴とする〔13〕に記載の二次臓器。

[0025] 〔15〕前記非ヒト動物の新生仔又は胎仔がPdx1プロモーター制御下でHes1遺伝子を過剰発現させることにより臓器形成が阻害されたものであることを特徴とする〔14〕に記載の二次臓器。

[0026] 〔16〕前記非ヒト動物がブタであることを特徴とする〔13〕乃至〔15〕のいずれかに記載の二次臓器。

[0027] 〔17〕前記二次臓器に、移植した細胞が定着していることを特徴とする〔13〕乃至〔16〕のいずれかに記載の二次臓器。

[0028] 〔18〕〔1〕又は〔2〕に記載の非ヒト動物を育成する工程を含むことを特徴とする、非ヒト動物体内での細胞の作製方法。

[0029] 本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2017-178552の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

発明の効果

[0030] 本発明は、臓器形成が阻害された非ヒト動物を用いて二次臓器を発達させる方法、特定の機能細胞を欠損する二次臓器を有する非ヒト動物、細胞の作製方法、及び特定の機能細胞を欠損している二次臓器を提供する。

図面の簡単な説明

[0031] [図1]膵臓形成阻害ブタ（右）及び野生型ブタ（左）の内臓の写真。

[図2]膵臓形成阻害ブタ及び野生型ブタの体重（上）と血糖値（下）の経時的変化を示す図。

[図3]膵臓形成阻害ブタ及び野生型ブタの血液生化学値（23日齢及び60日齢）

を示す図。

[図4]膵臓形成阻害ブタ（右）及び野生型ブタ（左）の膵臓組織の免疫染色の結果を示す写真（38日齢）。膵臓形成阻害ブタの膵臓は、グルカゴン産生細胞を含む膵島様構造を持つが、インスリンの産生がみられなかった。

[図5]介護育成（インスリン及び消化酵素を投与する育成）によって発達させた膵臓形成阻害ブタの二次膵臓（右）及び野生型ブタの膵臓（左）の写真。外部から細胞を注入するのに十分な容積を有する。

[図6]介護育成によって発達させた膵臓形成阻害ブタの膵臓組織（下段）及び野生型ブタの膵臓組織（上段）のHE染色写真。膵臓形成阻害ブタの小葉は野生型ブタの小葉に比べ小さかったが、 β 細胞以外の組織を備えていた。

[図7]膵臓形成阻害ブタ（上段）及び野生型ブタ（下段）の体重、膵臓重量、及び膵臓重量比を示す図。

[図8]膵臓形成阻害ブタ（右）及び野生型ブタ（左）の膵臓組織のアミラーゼの免疫染色の結果を示す写真。膵臓形成阻害ブタの膵臓組織中にアミラーゼ陽性細胞が認められた。

[図9]繊維芽細胞を移植した膵臓形成阻害ブタの膵臓組織の写真。左がHE染色画像、右が蛍光画像である。移植した繊維芽細胞は、CM-Dilで染色している。

[図10]膵臓形成阻害ブタ（右）及び野生型ブタ（左）網膜の免疫組織化学的染色像。膵臓形成阻害ブタの網膜では、糖尿病網膜症による新生血管が発生している。

[図11]膵臓形成阻害ブタ（右）及び野生型ブタ（左）の右眼の写真。膵臓形成阻害ブタは、糖尿病に特徴的な白内障を発症している。

発明を実施するための形態

[0032] 以下、本発明を詳細に説明する。

(A) 臓器形成が阻害された非ヒト動物を用いて二次臓器を発達させる方法

本発明の臓器形成が阻害された非ヒト動物を用いて二次臓器を発達させる方法は、(1) 前記臓器の形成が阻害された非ヒト動物の新生仔又は胎仔を

、形成が阻害された前記臓器の機能の少なくとも一部を補完して、育成する工程を含むことを特徴とするものである。

[0033] 形成を阻害する臓器としては、膵臓を挙げることができるが、生存した新生仔又は胎仔を得ることができる臓器であれば、膵臓以外の臓器であってもよい。膵臓以外の臓器としては腎臓を挙げることができる。

[0034] 臓器形成の阻害は、臓器を有する非ヒト動物の遺伝子を改変する遺伝子改変により行うことができる。例えば、膵臓の形成を阻害する場合は、Pdx1遺伝子のプロモーターにHes1遺伝子を連結したPdx1-Hes1遺伝子を用いる、すなわちPdx1プロモーター制御下でHes1遺伝子を過剰発現させて行うことができる (Matsunari et al., PNAS 110: 4557-4562(2013))。また、薬剤の投与によって、臓器形成を阻害してもよい。一方、Pdx1遺伝子を破壊することによって臓器形成を不可能としてしまうと、本発明の効果が得られない。腎臓の形成を阻害する場合は、Six2-Notch2 遺伝子を過剰発現させること (Fujimura et al., J Am Soc Nephrol, 21:803-810, 2010)や、Sall1やPax2等腎臓発生を制御する遺伝子の発現阻害又は抑制することによって行うことができる。

[0035] 臓器形成を阻害させる動物は、ヒト以外の動物であればどのような動物でもよいが、好ましくは、哺乳動物である。動物の具体例としては、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、サルを挙げることができる。これらの中でも、ブタを好ましい動物として挙げることができる。

[0036] 本発明において「二次臓器」とは、形成が阻害された臓器（例えば膵臓）が本来形成される体内の部位に、非ヒト動物を育成し成長させることによって形成された臓器様の組織をいう。二次臓器は、本来の臓器としての機能を100%有していてもよく、一部しか有していなくてもよい。好ましい二次臓器としては、特定の機能細胞を欠損する二次臓器を挙げることができる。ここで、「機能細胞」とは、臓器中に含まれる細胞で何らかの機能を持つ細胞を意味し、例えば、膵臓における α 細胞、 β 細胞、 γ 細胞などである。好

ましい機能細胞としては、 β 細胞を挙げることができる。特定の機能細胞を欠損する好ましい臓器としては、 β 細胞を欠損する膵臓を挙げることができる。

- [0037] 臓器形成が阻害された非ヒト動物の新生仔又は胎仔は、公知の方法によって得ることができる。例えば、Pdx1-Hes1遺伝子を利用して膵臓形成を阻害したブタの新生仔又は胎仔は、以下の(a)~(d)の方法により得ることができる。
- 。
 - (a)Pdx1-Hes1 遺伝子を組み込んだ精子を用いて、野生型雌に人工授精を行う。
 - 。
 - (b)Pdx1-Hes1 遺伝子を組み込んだ精子を用いて野生型雌に由来する卵に体外授精を施す。
 - (c)Pdx1-Hes1 遺伝子を組み込んだ精子を産する雄を、野生型雌と交配する。
 - (d)Pdx1-Hes1 遺伝子を組み込んだ体細胞の核移植によって、クローンブタを作出する。

- [0038] 「形成が阻害された臓器の機能の少なくとも一部を補完する」とは、例えば、臓器が本来産生する酵素やホルモン若しくはそれらと同等の機能を有する薬剤を投与すること、臓器の機能を代替する細胞等を移植すること、又は臓器の機能を代替する機器を使用することなどである。臓器の機能は、完全に補完される必要はなく、非ヒト動物の新生仔又は胎仔が生存できる限り部分的な補完であってもよい。具体的な補完方法は、臓器の種類に応じて適宜決めることができる。例えば、膵臓の機能を補完する場合は、膵臓が産生するホルモンや消化酵素の全部又は一部を投与すればよい。具体的には、膵臓はグルカゴン、インスリン、ソマトスタチンなどのホルモンを産生するので、これらの全部又は一部を投与することができ、また、タンパク質分解酵素（キモトリプシン、トリプシン）、多糖分解酵素（アミラーゼ）、脂肪分解酵素（リパーゼ）などの消化酵素を産生するので、これらの全部又は一部を投与することができる。また、膵臓が産生するホルモンや消化酵素そのものを投与する代わりに、それらと同等の機能を有する薬剤を投与してもよい。

膵臓の機能を補完する好ましい育成方法としては、インスリン及び消化酵素を投与する育成方法を挙げることができる。ここで投与する消化酵素としては、タンパク質分解酵素、多糖分解酵素、及び脂肪分解酵素を挙げることができる。

[0039] 新生仔又は胎仔の育成は、形成が阻害された臓器の機能の少なくとも一部を補完すること以外は、通常の方法に従って行うことができる。

[0040] 上記方法により形成させた二次臓器には、後述するように、ヒト由来の細胞を移植する場合があるが、このような異種移植により拒絶反応が起きる。この拒絶反応を回避するため、二次臓器を発達させる非ヒト動物の遺伝子を改変し、免疫不全（SCID）を誘導することが好ましい。このような免疫不全を誘導する方法は、多くの文献において報告されており、本発明者もIL2RG遺伝子のノックアウトにより免疫不全ブタを作製している（Watanabe et al., PLoS One 8(10): e76478 (2013)）。従って、免疫不全の誘導は、このような文献の記載に従って行うことができる。また、免疫系確立前の胎仔に多量のヒト由来の細胞を移植することにより、ヒト由来の細胞に対する免疫寛容を誘導することが可能なので、そのような方法によって異種移植による拒絶反応を回避してもよい。

[0041] 二次臓器を発達させるための育成期間は特に限定されない。発達させた二次臓器を後述する機能細胞の作製方法に用いる場合には、機能細胞を採取できる時期まで育成を行う。

[0042] (B) 非ヒト動物

本発明の非ヒト動物は、臓器形成が阻害された非ヒト動物の新生仔又は胎仔を育成することによって得られる非ヒト動物であって、特定の機能細胞を欠損する二次臓器を有することを特徴とするものである。

[0043] 本発明の非ヒト動物は、後述する機能細胞の作製方法に用いることができるが、それ以外にも、疾患や奇形のモデル動物として用いることもできる。例えば、欠損した特定の機能細胞が、インスリン産生に寄与する β 細胞である非ヒト動物の場合、糖尿病に起因する合併症、例えば網膜症、腎症、神経

障害、血管障害や白内障などのモデル動物として用いることができる。

[0044] 機能細胞の種類、特定の機能細胞を欠損する二次臓器の種類、臓器形成を阻害させる動物の種類は上記の「臓器形成が阻害された非ヒト動物を用いて二次臓器を発達させる方法」と同様のものでよい。また、臓器形成を阻害する方法、及び新生仔又は胎仔を育成する方法も上記の「臓器形成が阻害された非ヒト動物を用いて二次臓器を発達させる方法」と同様に行うことができる。

[0045] なお、上述のように、本明細書においては、「非ヒト動物」という「物」を構造や特性ではなく、製造方法によって特定しているが、これは、「非ヒト動物」は生物であることから、その構造や特性は極めて複雑であり、それらを特定する作業を行うことは、著しく過大な経済的支出や時間を必要とするからである。

[0046] (C) 機能細胞の作製方法

本発明の機能細胞の作製方法は、(1) 前記非ヒト動物の前記二次臓器に、少なくとも前記機能細胞の前駆細胞又は多能性幹細胞を移植する工程及び(2) 前記前駆細胞又は前記多能性幹細胞を前記機能細胞に誘導する工程を含むことを特徴とするものである。

[0047] 「機能細胞の前駆細胞」とは、幹細胞から発生し、機能細胞へ分化することのできる細胞を意味し、例えば、膵臓における α 細胞の前駆細胞、 β 細胞の前駆細胞、 γ 細胞の前駆細胞などである。好ましい機能細胞の前駆細胞としては、 β 細胞の前駆細胞を挙げることができる。機能細胞の前駆細胞の代わりに、適切に分化誘導した多能性幹細胞を移植してもよい。多能性幹細胞としては、胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)などを用いることができる。また、機能細胞の前駆細胞や多能性幹細胞に加え、他の細胞を移植してもよい。例えば、膵臓の場合、膵島形成に関連する細胞を移植することが好ましい。膵島形成に関連する細胞の例としては、間質細胞や血管の誘導に関連する細胞、内分泌細胞等が挙げられる。

[0048] 本発明の機能細胞の作製方法は、ヒトへの移植用の機能細胞の作製を主た

る目的とするものなので、移植する前駆細胞や多能性幹細胞はヒト由来のものであることが好ましい。

[0049] 二次臓器に移植する細胞の数は、動物の種類、細胞の種類、二次臓器の種類などに応じて適宜決めることができ、特に限定されるものではないが、例えば、ブタの膵臓に細胞を移植する場合は、通常、 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^8$ である。

[0050] 移植を行う時期は、細胞の種類、二次臓器の種類、動物の種類などに応じて適宜決めることができ、特に限定されるものではないが、ブタの膵臓に細胞を移植する場合は、通常、ブタの日齢が10～90日である時期に行う。

[0051] 移植する細胞がヒト由来の細胞である場合、異種移植による拒絶反応が起きる。細胞を移植する非ヒト動物が、上述した免疫不全動物又はヒト由来の細胞に対する免疫寛容を誘導した動物であれば、これを回避できるが、そうでない場合は、非ヒト動物に免疫抑制剤（例えば、シクロスポリンなど）を投与することにより、拒絶反応を回避することが好ましい。

[0052] 特定の機能細胞を欠損する二次臓器は、特定の機能細胞を欠くものの、他の機能細胞や組織を備えていることから、特定の機能細胞に分化し易い環境を有しているといえることができる。従って、この臓器に、前駆細胞や多能性幹細胞を移植した場合、特別な処理をしなくても、それらは特定の機能細胞に分化していくと考えられる。但し、特定の機能細胞への分化を促進するため、薬剤や成長因子などの物質を二次臓器に注入してもよい。

[0053] 移植後適当な時期に二次臓器から機能細胞を採取する。採取時期は、細胞の種類、二次臓器の種類、動物の種類などに応じて適宜決めることができ、特に限定されるものではないが、ブタの膵臓から β 細胞を採取する場合は、通常、移植から1～12ヶ月後に採取する。

[0054] ヒト由来の機能細胞を非ヒト動物中で作製することは、本発明の方法以外の方法、例えば、胚盤胞補完法などによっても可能であるが、本発明の方法は、以下の点で、従来の方法よりも優れている。

[0055] (a)胚盤胞補完法では、胚盤胞のような発生の初期段階にヒト由来の細胞を移植する。このような発生の初期段階に移植を行うとヒト由来の細胞は希釈さ

れてしまう。即ち、移植されたヒト由来の細胞の一部は機能細胞に分化するが、大部分は機能細胞以外の細胞に分化あるいは消失するため、得られるヒト由来の機能細胞の量は少なくなる。これに対し、本発明の方法では、既に分化した臓器にヒト由来の細胞を移植するので、移植した細胞の大部分が機能細胞に分化し、多量のヒト由来の機能細胞を得られると考えられる。

[0056] (b) 胚盤胞補完法では、胚盤胞にヒト由来の細胞を移植するが、胚盤胞中に含まれる細胞は未分化な細胞であり、これらは時間の経過に伴い成体の細胞に分化していく。移植されたヒト由来の細胞は、このような宿主細胞の分化進度に合わせながら、自らも分化していかなければ最終的に機能細胞になることはできない。このため、宿主細胞の分化進度との関係で、機能細胞になることができないヒト由来の細胞も多数存在すると考えられる。本発明の方法では、既に分化した臓器にヒト由来の細胞を移植するので、前記した宿主細胞の分化進度との問題は生じないと考えられる。

[0057] (D) 二次臓器

本発明の二次臓器は、臓器形成が阻害された非ヒト動物の新生仔又は胎仔の育成によって発達させた二次臓器であって、特定の機能細胞を欠損していることを特徴とするものである。

[0058] 機能細胞の種類、特定の機能細胞を欠損する二次臓器の種類、臓器形成を阻害させる動物の種類は上記の「臓器形成が阻害された非ヒト動物を用いて二次臓器を発達させる方法」と同様のものでよい。また、臓器形成を阻害する方法、及び新生仔又は胎仔を育成する方法も上記の「臓器形成が阻害された非ヒト動物を用いて二次臓器を発達させる方法」と同様に行うことができる。

実施例

[0059] 次に、実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0060] [実施例1] 膵臓形成が阻害されたブタ新生仔の取得

本発明者は、以前に、Pdx1-Hes1遺伝子を有し、膵臓形成が阻害されたブタ

由来の胚（ホスト胚）に正常ブタ由来の胚（ドナー胚）を注入した後、これを仮親の体内で成長させることにより、ドナー由来の膵臓を持つキメラブタを作出している（Matsunari et al., PNAS 110: 4557-4562(2013)）。このキメラブタの雄を、野生型雌ブタと自然交配することにより、常に一定の割合で膵臓形成が阻害された新生仔を得ることができる。

[0061] 本実施例において使用する膵臓形成が阻害されたブタ新生仔は、このようなキメラブタとの自然交配により取得した。

[0062] 〔実施例2〕 膵臓形成が阻害されたブタ新生仔の育成

Pdx1-Hes1遺伝子を有することにより膵臓形成を阻害された（厳密には痕跡的な膵臓組織のみを有する。）ブタ新生仔は、内分泌細胞（インスリンを生産する β 細胞など）と外分泌細胞を欠く。そのため、出生後は強度の高血糖及び消化不良のために、3日程度で死亡する。

[0063] このような膵臓形成阻害ブタ新生仔に、インスリンと複合消化酵素を適宜投与することにより、血糖値を正常値に近づけ、かつ個体成長と膵臓の発達を誘導した。

[0064] 1) インスリン製剤：

レベミル（ノボノルディクス）0.2-0.3 IU/kg/回 1日2回あるいはトレシーバ（ノボノルディクス）1日1回を投与した。

[0065] 2) インスリン投与方法：

皮下注射、あるいはインスリンポンプによって連続的に投与した。

[0066] 3) 消化酵素複合剤：

ベリチーム（塩野義製薬）を、日量150mg-750mgを代用乳あるいは固形（粉末）飼料に混合して給与した。ベリチームには、リパーゼ、セルラーゼ、ビオチン、オキサリジン、パンクレアチンが含まれる。

[0067] 4) 飼料および給餌法：

0-7日齢では、代用乳の人工哺乳あるいは母豚による哺乳を行い、8日齢以後は、代用乳粉末あるいは粉末飼料による制限給餌（自由摂食ではなく、一日量を決めた給餌）を行った。

[0068] 〔実施例3〕 膵臓形成が阻害されたブタ新生仔の介護育成に伴う膵臓の発達

1) 血糖値制御と成長：

膵臓形成が阻害されたブタ新生仔を実施例2に記載の方法により育成した結果、図2に示すように血糖値はある程度制御され、個体は成長した。

[0069] 2) 血液生化学値：

膵臓形成阻害ブタの血液生化学値（図3）は、インスリン産生が廃絶していることと、成長に伴いグルカゴン産生が認められることを示す。グルカゴン産生は、発達した膵臓組織の免疫染色においても確認された（図4）。一方、インスリン産生は膵臓組織の免疫染色においても認められなかった（図4）。

[0070] 3) 膵臓の発達：

膵臓形成阻害ブタ新生仔の介護育成によって、膵臓組織は発達した（図5、6）。膵臓組織の大きさは、野生型に比べて約10分の1であったが（図7）、アミラーゼの産生も認められた（図8）。

[0071] 〔実施例4〕 β 細胞を欠く膵臓組織への自家細胞の移植

膵臓形成阻害ブタ新生仔の介護育成によって発達させた膵臓組織は、特定の機能細胞である β 細胞を欠くものの、他の機能細胞・組織を備えていることから、その組織中に特定の機能細胞の前駆細胞や、適切に分化誘導した多能性幹細胞を移植することで、特定の機能細胞を定着・増殖させることができると推測される。

[0072] これを確認するため、3.5ヶ月齢の膵臓形成阻害ブタの膵臓組織内に、自家細胞（繊維芽細胞）を注入した。その結果、自家細胞はコロニーを形成した（図9）。移植細胞が β 細胞の前駆細胞あるいは多能性幹細胞であった場合、膵臓組織の環境を利用して β 細胞の形成・増殖が可能であると推測される。すなわち、発達過程にある膵臓形成阻害ブタの膵臓組織内の環境にヒト多能性幹細胞を定着させることによって、ヒトの膵臓機能細胞（ β 細胞等）を発達させ得ると考えられる。

[0073] 〔実施例 5〕 膵臓形成が阻害されたブタの疾患

1) 糖尿病性網膜症

膵臓形成が阻害されたブタ新生仔を実施例 2 に記載の方法により育成し、育成 80 日後の網膜の免疫組織化学的染色像を観察した結果、糖尿病性網膜症に特徴的な病理像が確認された（図 10）。一方、野生型の同期間育成後の網膜は健常であった（図 10）。

[0074] 2) 白内障

膵臓形成が阻害されたブタ新生仔を実施例 2 に記載の方法により育成し、育成 39 日後の眼を観察した結果、白内障を発症していることが確認された（図 11）。一方、野生型の同期間育成後の眼は健常であった（図 11）。

[0075] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

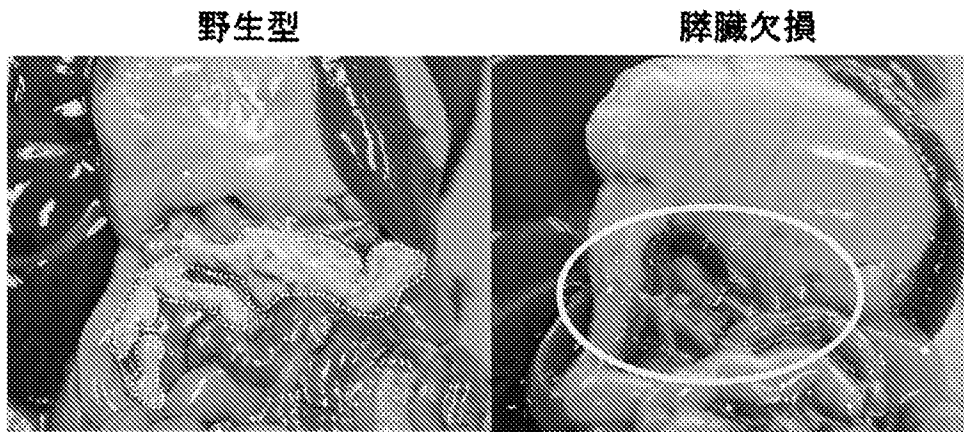
[0076] 本発明は、特定の機能細胞を欠損する二次臓器を有する非ヒト動物に関するものなので、このような動物を取り扱う産業分野に利用可能である。

請求の範囲

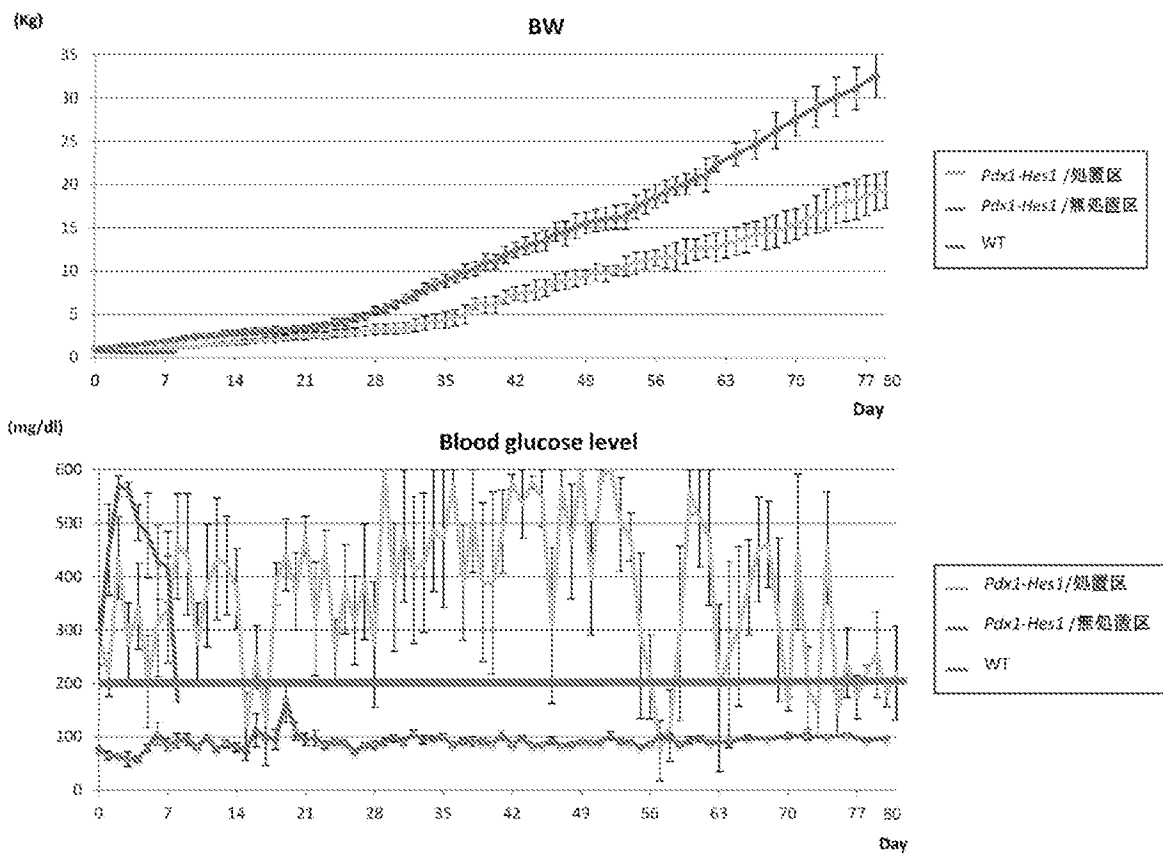
- [請求項1] 臓器の形成が阻害された非ヒト動物を用いて二次臓器を発達させる方法であって、以下の工程を含むことを特徴とする方法、
- (1) 前記臓器の形成が阻害された非ヒト動物の新生仔又は胎仔を、形成が阻害された前記臓器の機能の少なくとも一部を補完して、育成する工程。
- [請求項2] 前記二次臓器は、前記育成において補完した機能の少なくとも一部が損なわれたまま発達する請求項1記載の方法。
- [請求項3] 前記二次臓器が、特定の機能細胞を欠損する臓器であることを特徴とする請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 前記機能細胞が、 β 細胞であることを特徴とする請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 前記工程(1)において、前記非ヒト動物の遺伝子改変により臓器形成を阻害することを特徴とする請求項1乃至4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 形成が阻害された前記臓器が膵臓であり、形成が阻害された膵臓の機能の補完を、少なくともインスリン及び消化酵素の投与により行うことを特徴とする請求項1乃至5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 前記遺伝子改変が、前記非ヒト動物においてPdx1プロモーター制御下でHes1遺伝子を過剰発現させることであることを特徴とする請求項5に記載の方法。
- [請求項8] 前記非ヒト動物がブタであることを特徴とする請求項1乃至7のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項9] 臓器の形成が阻害された非ヒト動物の新生仔又は胎仔を育成することによって得られる非ヒト動物であって、特定の機能細胞を欠損する二次臓器を有することを特徴とする非ヒト動物。
- [請求項10] 前記臓器が膵臓であり、前記機能細胞が β 細胞であることを特徴とする請求項9に記載の非ヒト動物。

- [請求項11] 前記非ヒト動物の新生仔又は胎仔がPdx1プロモーター制御下でHes1遺伝子を過剰発現させることにより臓器形成が阻害されたものであることを特徴とする請求項10に記載の非ヒト動物。
- [請求項12] 前記非ヒト動物がブタであることを特徴とする請求項9乃至11のいずれか一項に記載の非ヒト動物。
- [請求項13] 臓器の形成が阻害された非ヒト動物の新生仔又は胎仔の育成によって発達させた二次臓器であって、特定の機能細胞を欠損していることを特徴とする二次臓器。
- [請求項14] 前記臓器が膵臓であり、前記機能細胞が β 細胞であることを特徴とする請求項13に記載の二次臓器。
- [請求項15] 前記非ヒト動物の新生仔又は胎仔がPdx1プロモーター制御下でHes1遺伝子を過剰発現させることにより臓器形成が阻害されたものであることを特徴とする請求項14に記載の二次臓器。
- [請求項16] 前記非ヒト動物がブタであることを特徴とする請求項13乃至15のいずれか一項に記載の二次臓器。
- [請求項17] 前記二次臓器に、移植した細胞が定着していることを特徴とする請求項13乃至16のいずれか一項に記載の二次臓器。
- [請求項18] 請求項1又は2に記載の非ヒト動物を育成する工程を含むことを特徴とする、非ヒト動物体内での細胞の作製方法。

[図1]



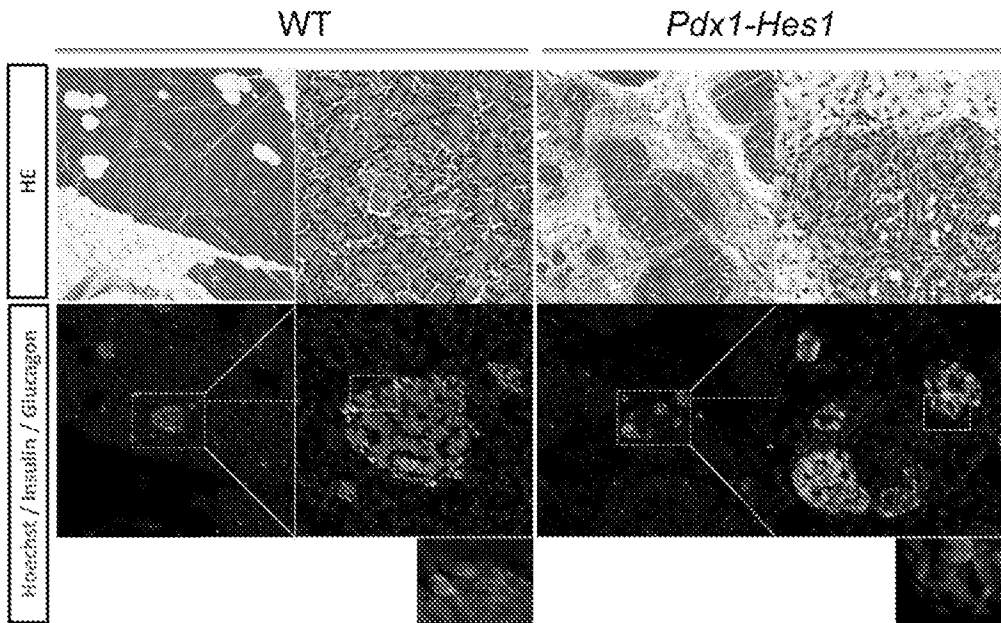
[図2]



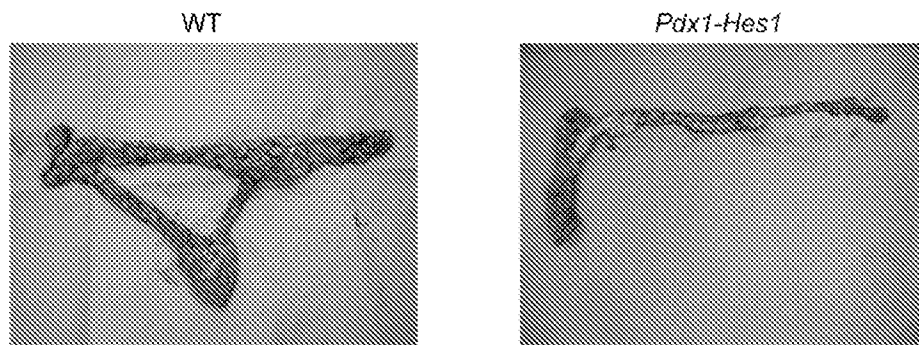
[图3]

Parameters	Day23		Day60	
	WT(n=4)	<i>Pdx1-Hes1</i> 処置区(n=4)	WT(n=4)	<i>Pdx1-Hes1</i> 処置区(n=3)
Area (μm ²)	2925±0.1h	3075±0.44	475±0.0s	47±0.0f
ExR (μm ² /cell)	18.57±1.83	24.82±2.54	10.55±0.68	1.11±1.1
Nc (μm ² /cell)	137.4±0.5	138.4±0.3	143.7±0.65	151.3±0.33
Cl (μm ² /cell)	98±0.71	94.5±2.1	105.5±0.47	96.5±0.31
P (μm ² /cell)	1047±0.18	707.5±0.33	1005±0.26	76±0.17
SP (μm ²)	5925±3.75	5575±1.17	65±2.71	807±0.39
γGt (μm ²)	31±1.1	30.8±0.38	11.8±0.3	11.7±0.28
γGt (μm ² /cell)	22.5±0.6	46.8±6.6	27.25±7.75	45±3.61
TCRβ (μm ² /cell)	47±12.32	64.5±9.52	39±8.42	65.1±6.02
PDLC (μm ² /cell)	44.5±8.24	35.8±5.24	40±9.29	45±3.06
Mr (μm ² /cell)	247.5±0.79	21±0.07	72±0.59	25±0.11
PDLC (μm ²)	117±1.1	11.5	11.5	11.5
PDLC (μm ² /cell)	24.7±0.19	1.1	6.25±0.55	1.1
PDLC (μm ²)	102.5±0.7	105.5±16.01	111.75±7.31	60.7±0.35
LDH (μm ²)	90±0	659.25±40.28	780.25±01.96	543.7±21.66
γGt (μm ²)	11.5	11.5	11.5	11.5

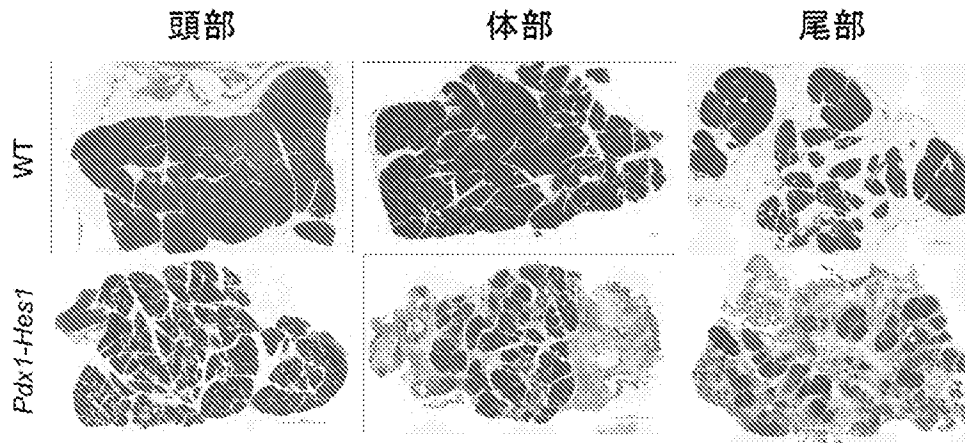
[图4]



[图5]



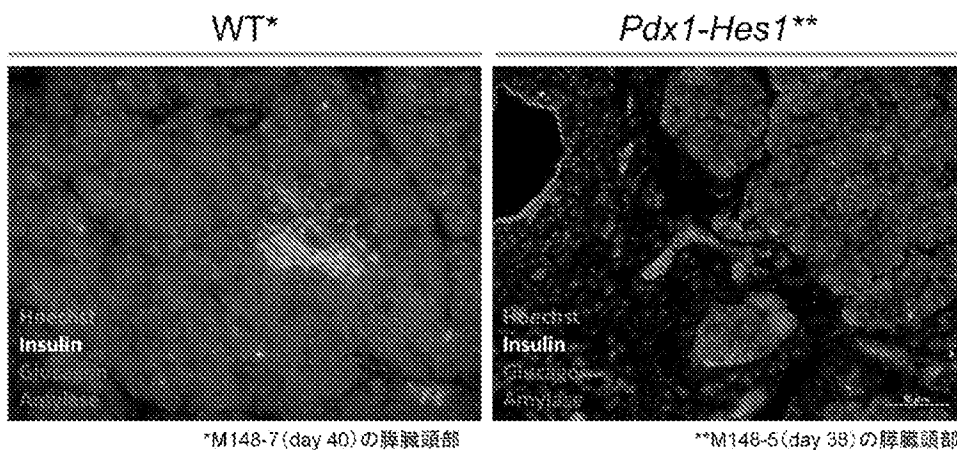
[図6]



[図7]

	日齢	No	体重(kg)	膵臓重量(g)	膵臓重量/体重
Pdx1-Hes1	38	#M148-5	2.03	0.72	0.03%
	80	#M220-4	19.04	5.11	0.03%
		#M220-6	17.45	4.12	0.02%
		#M148-3	23.51	5.45	0.02%
		Ave	20 ^a	4.89 ^a	0.02% ^a
WT	80	#M220-5	29.50	42.34	0.14%
		#M220-7	40.00	63.27	0.16%
		#M148-9	29.00	45.02	0.16%
		#M148-10	36.00	64.96	0.18%
	Ave	33.62 ^b	53.89 ^b	0.16% ^b	

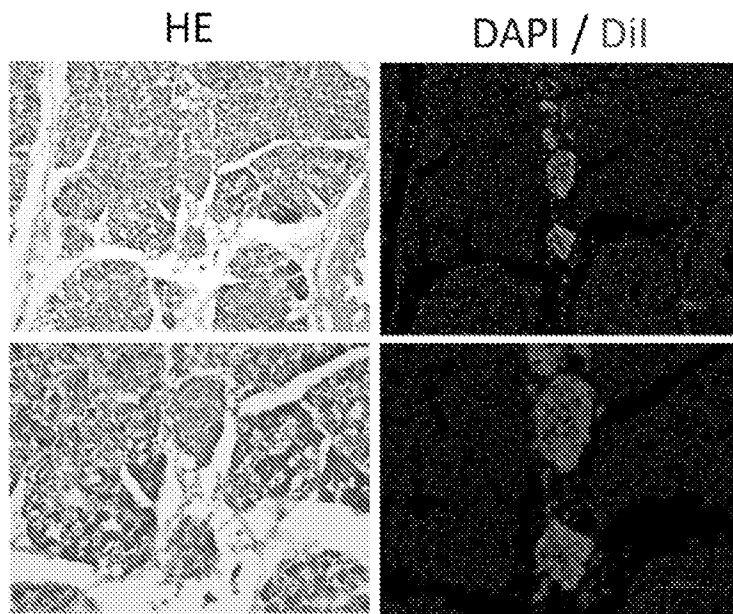
[図8]



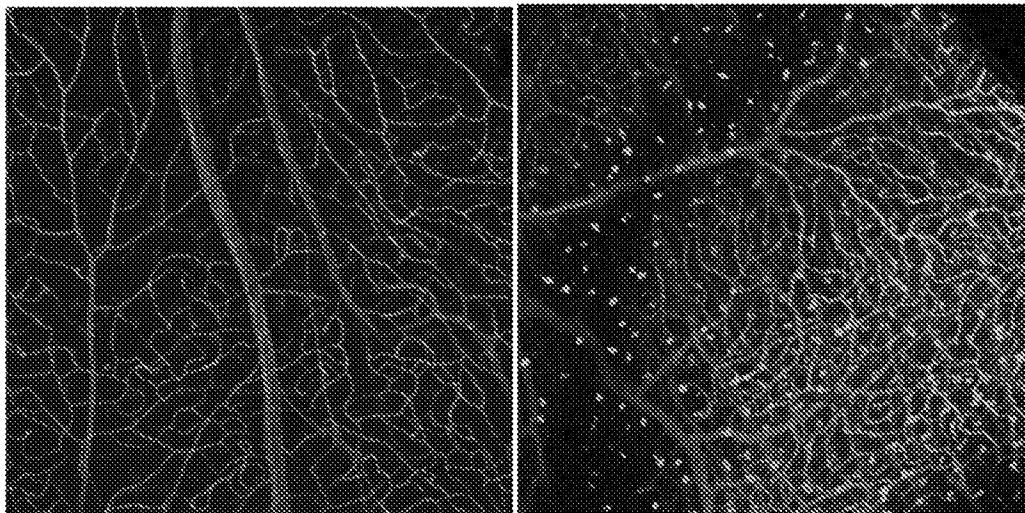
*M148-7 (day 40) の膵臓頭部

**M148-5 (day 38) の膵臓頭部

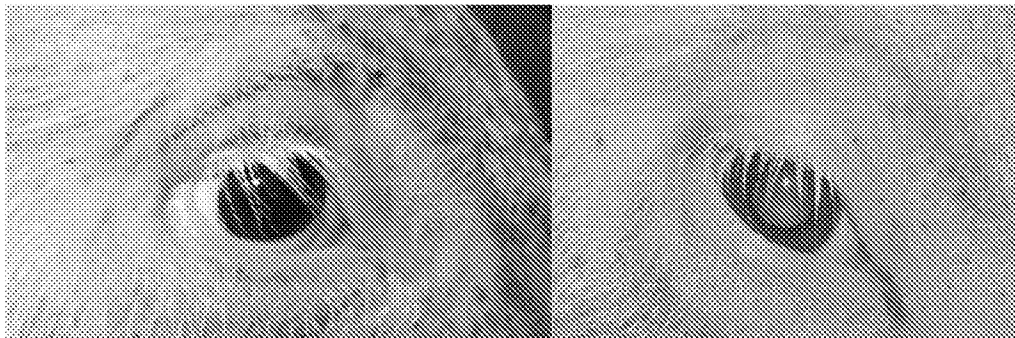
[図9]



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/034390

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. A01K67/027 (2006.01) i, C12N5/071 (2010.01) i, C12N15/09 (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, C12N5/071, C12N15/09

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), Cplus/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.
X A	JP 2002-509736 A (RESEARCH DEVELOPMENT FOUNDATION) 02 April 2002, entire text, in particular, claims 1-10, examples 5-14 & WO 1999/050657 A1 entire text, in particular, claims 1-10, examples 5-14 & US 6147275 A & EP 1068524 A1 & CN 1302376 A & KR 10-2001-0042329 A	1-3, 5, 9, 13, 18 4, 6-8, 10-12, 14-17

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
13 December 2018 (13.12.2018)

Date of mailing of the international search report
25 December 2018 (25.12.2018)

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/JP2018/034390

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	JP 07-509363 A (THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA) 19 October 1995, entire text, in particular, claims 1-41, page 4, upper left column, lines 5-13 & WO 1994/002601 A1 entire text, in particular, claims 1-41, page 5, lines 15-27 & EP 0652949 A1	9, 12-13, 16-17 8, 12, 16 1-7, 10-11, 14-15, 18
X Y A	JP 2000-510000 A (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.) 08 August 2000 entire text, in particular, examples 1-8, page 6, lines 1-28, page 17, lines 18-26, claims 1-27, claims 29-31 & WO 1998/029566 A2 entire text, in particular, examples 1-8, page 1, line 8 to page 2, line 19, page 15, lines 9-21, claims 1-27, 29-31 & EP 0655926 A1 & US 6071697 A	1-6, 9-10, 13-14, 17-18 8, 12, 16 7, 11, 15
A	長嶋比呂志, 松成ひとみ. 遺伝子改変ブタを利用してヒトに移植可能な臓器を作る研究: 異種再生臓器移植へのチャレンジ, 腎と透析, 2014, vol. 77, no. 6, pp. 881-887, non-official translation (NAGASHIMA, Hiroshi, MATSUNARI, Hitomi, "Research for using genetically modified pig to produce organs transplantable into human: Cross-species organ regeneration and transplantation", KIDNEY AND DIALYSIS)	1-18
A	JP 2013-501528 A (REVIVICOR, INC.) 17 January 2013 & US 2016/0278350 A1 & WO 2011/020120 A2 & EP 2464219 A2 & KR 10-2012-0050485 A & CN 102548394 A	1-18
A	WO 2010/021390 A1 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) 25 February 2010 & US 2011/0067125 A1 & EP 2258166 A1 & CN 102196722 A	1-18
A	JP 2003-512846 A (THE UNIVERSITY OF CONNECTICUT) 08 April 2003 & US 6525242 B1 & WO 2001/032009 A1 & EP 1225801 A1	1-18
A	JP 09-500618 A (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 21 January 1997 & US 6060049 A & WO 1994/027622 A1 & EP 0700297 A1	1-18
A	JP 2005-535732 A (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 24 November 2005 & US 2004/0028658 A1 & WO 2004/003164 A2 & EP 2453009 A1 & CA 2489376 A	1-18

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. A01K67/027(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)i</p>												
<p>B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. A01K67/027, C12N5/071, C12N15/09</p>												
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2018年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2018年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2018年	日本国実用新案登録公報	1996-2018年	日本国登録実用新案公報	1994-2018年		
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2018年											
日本国実用新案登録公報	1996-2018年											
日本国登録実用新案公報	1994-2018年											
<p>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)</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP 2002-509736 A (リサーチ ディベロップメント ファンデーション) 2002.04.02,</td> <td>1-3, 5, 9, 13, 18</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>全文、特に、請求項1-10、実施例5-14 & WO 1999/050657 A1 全文、特に、請求項1-10、実施例5-14 & US 6147275 A & EP 1068524 A1 & CN 1302376 A & KR 10-2001-0042329 A</td> <td>4, 6-8, 10-12, 14-17</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	X	JP 2002-509736 A (リサーチ ディベロップメント ファンデーション) 2002.04.02,	1-3, 5, 9, 13, 18	A	全文、特に、請求項1-10、実施例5-14 & WO 1999/050657 A1 全文、特に、請求項1-10、実施例5-14 & US 6147275 A & EP 1068524 A1 & CN 1302376 A & KR 10-2001-0042329 A	4, 6-8, 10-12, 14-17	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号										
X	JP 2002-509736 A (リサーチ ディベロップメント ファンデーション) 2002.04.02,	1-3, 5, 9, 13, 18										
A	全文、特に、請求項1-10、実施例5-14 & WO 1999/050657 A1 全文、特に、請求項1-10、実施例5-14 & US 6147275 A & EP 1068524 A1 & CN 1302376 A & KR 10-2001-0042329 A	4, 6-8, 10-12, 14-17										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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）</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「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	
「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												
<p>国際調査を完了した日 13.12.2018</p>	<p>国際調査報告の発送日 25.12.2018</p>											
<p>国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員) 伊達 利奈 電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>	<p>4 B 3960</p>										

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
X	JP 07-509363 A (ザ トラスティーズ オブ ザ ユニバーシティ オブ ペンシルベニア) 1995.10.19,	9, 12-13, 16-17
Y	全文、特に、請求項 1-4 1、第 4 頁左上欄第 5 行-第 1 3 行	8, 12, 16
A	& WO 1994/002601 A1 全文、特に、請求項 1-4 1、第 5 頁第 1 5 行-第 2 7 行 & EP 0652949 A1	1-7, 10-11, 14-15, 18
X	JP 2000-510000 A (マックス-プランク-ゲゼルシャフト ツール フェル デルング デル ヴィッセンシャフテン エー. ヴェー.) 2000.08.08,	1-6, 9-10, 13-14, 17-18
Y	全文、特に、実施例 1-8、第 6 頁第 1 行-第 2 8 行、第 1 7 頁第 1 8 行-第 2 6 行、請求項 1-2 7、請求項 2 9-3 1	8, 12, 16
A	& WO 1998/029566 A2 全文、特に、実施例 1-8、第 1 頁第 8 行-第 2 頁第 1 9 行、第 1 5 頁第 9 行-第 2 1 行、請求項 1-2 7、請求項 2 9-3 1 & EP 0655926 A1 & US 6071697 A	7, 11, 15
A	長嶋 比呂志, 松成 ひとみ. 遺伝子改変ブタを利用してヒトに移植可能な臓器を作る研究: 異種再生臓器移 植へのチャレンジ. 腎と透析, 2014, Vol.77, No.6, pp.881-887	1-18
A	JP 2013-501528 A (レビビコア, インコーポレイテッド) 2013.01.17, & US 2016/0278350 A1 & WO 2011/020120 A2 & EP 2464219 A2 & KR 10-2012-0050485 A & CN 102548394 A	1-18
A	WO 2010/021390 A1 (国立大学法人 東京大学) 2010.02.25, & US 2011/0067125 A1 & EP 2258166 A1 & CN 102196722 A	1-18
A	JP 2003-512846 A (ユニバーシティ オブ コネチカット) 2003.04.08, & US 6525242 B1 & WO 2001/032009 A1 & EP 1225801 A1	1-18
A	JP 09-500618 A (ザ・ジョーンズ・ホプキンス・ユニバーシティ) 1997.01.21, & US 6060049 A & WO 1994/027622 A1 & EP 0700297 A1	1-18

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	JP 2005-535732 A (ザ ジェネラル ホスピタル コーポレーション) 2005.11.24, & US 2004/0028658 A1 & WO 2004/003164 A2 & EP 2453009 A1 & CA 2489376 A	1-18