

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-528062

(P2013-528062A)

(43) 公表日 平成25年7月8日(2013.7.8)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 O 2 4 B 0 2 4
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2013-514391 (P2013-514391)	(71) 出願人	597160510 リジェネロン・ファーマシューティカルズ ・インコーポレイテッド REGENERON PHARMACEUTICALS, INC. アメリカ合衆国 10591-6707 ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソーミル・リバー・ロード 777番
(86) (22) 出願日	平成23年6月10日 (2011.6.10)	(74) 代理人	100078282
(85) 翻訳文提出日	平成25年1月10日 (2013.1.10)	(74) 代理人	弁理士 山本 秀策
(86) 國際出願番号	PCT/US2011/039997	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開番号	W02011/156723		
(87) 國際公開日	平成23年12月15日 (2011.12.15)		
(31) 優先権主張番号	61/353,896		
(32) 優先日	平成22年6月11日 (2010.6.11)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	13/157,728		
(32) 優先日	平成23年6月10日 (2011.6.10)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 X Y E S 細胞からの繁殖可能な X Y 雌動物の生成

(57) 【要約】

X Y ドナー細胞と適切な宿主胚から、表現型的に雌の繁殖可能動物を作製するための方法および組成物を記述する。培養において X Y ドナー細胞(これは、宿主胚への導入および適切な宿主における懐胎後に、繁殖可能な X Y 雌動物をもたらすこととなる)を維持するための培地および方法を提供する。ドナー X Y 細胞と宿主胚から F 0 世代における繁殖可能な雌動物を作製するための方法および組成物を記述し、ヘテロ接合性の F 0 繁殖可能な雄とヘテロ接合性の F 0 繁殖可能な雌の同胞から、改変についてホモ接合性である F 1 後代を作製するための方法も記述する。

Fertility Analysis of Phenotypically Female F0 Generation Mice Derived from XY ES Cell Clones							
Clone	Genotype	F0s Set Up to Breed (#)	F0s with Litters (#)	F0s with Litters (%)	Litters (#)	Total Pups (#)	Pups Per Litter (#)
550a-H1	XY	2	1	50	3	11	3.7
529a-E2	XY	1	0	0	0	0	---
533a-A5	XY	2	2	100	8	55	6.9
5315b-D1	XY	1	1	100	8	48	6
5311b-D1	XY	4	1	25	4	37	9.3
5310a-D4	XY	1	1	100	8	32	5.3
5310a-B1	XY	6	6	100	34	188	5.5
5315a-A5	XY	2	2	100	11	75	6.8
5137b-E1	XY	2	2	100	12	74	6.2
524d-A5	XY	1	0	0	0	0	---
1553a-A10	XY	2	0	0	0	0	---
1533b-A2	XY	2	1	50	2	16	8
1330a-D5	XY	1	1	100	2	15	7.5
1313b-F3	XY	2	1	50	1	2	2
1222b-B3	XY	1	1	100	1	10	10
11485a-G1	XY	1	1	100	8	49	6.2
884a-D1	XY	2	0	0	0	0	---
Summary		33 (2)	21 (2)	63%	88 (2)	592 (3)	6 (avg)

FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

F0世代における繁殖可能な雌のXYマウスを作製するための方法であって、

(a) 培地内にドナーXYマウスES細胞を維持する工程であって、該培地は、

(i) 基本培地と、

(ii) マウスES細胞を培養中に維持するのに適したサプリメント

とを含み、ここで、該基本培地は、200mOsm/kgから329mOsm/kg未満の重量オスモル濃度、約11～13mS/cmの導電率、約50～110mMの濃度のアルカリ金属およびハロゲン化物の塩、約17～30mMの炭酸塩濃度、約85～130mMの全アルカリ金属ハロゲン化物塩濃度および炭酸塩濃度、ならびにこれらの任意の2つ以上の組み合わせ、からなる群から選択される特性を呈する、工程と；

(b) 該ドナーXYマウスES細胞を宿主胚に導入する工程と；

(c) 該宿主胚を懐胎させる工程と；

(d) XY雌マウス後代を得る工程であって、性的成熟に達した時点で該XY雌マウスは繁殖可能である、工程と

を含む方法。

【請求項 2】

前記ドナーXYマウスES細胞が、遺伝子改変を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記遺伝子改変が、1つまたは複数の内在性核酸配列、1つまたは複数の核酸の置換、内在性核酸配列の異種性核酸配列との置き換え、ノックアウト、およびノックインを含む、請求項2に記載の方法。

【請求項 4】

前記遺伝子改変が、STEP2遺伝子のノックアウトである、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記基本培地が、50±5mM NaCl、26±5mM炭酸塩、および218±22mOsm/kgを呈する、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記基本培地が、約3mg/mL NaCl、2.2mg/mL炭酸水素ナトリウム、および218mOsm/kgを呈する、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記基本培地が、87±5mM NaCl、18±5mM炭酸塩、および261±26mOsm/kgを呈する、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記基本培地が、約5.1mg/mL NaCl、1.5mg/mL炭酸水素ナトリウム、および261mOsm/kgを呈する、請求項1～4、および請求項7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記基本培地が、110±5mM NaCl、18±5mM炭酸塩、および294±29mOsm/kgを呈する、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記基本培地が、約6.4mg/mL NaCl、1.5mg/mL炭酸水素ナトリウム、および294mOsm/kgを呈する、請求項1～4、および請求項9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

前記基本培地が、87±5mM NaCl、26±5mM炭酸塩、および270±27mOsm/kgを呈する、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 12】

前記基本培地が、約5.1mg/mL NaCl、2.2mg/mL炭酸水素ナトリウム

10

20

30

40

50

、および 270 mOsm/kg を呈する、請求項1～4、および請求項11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記基本培地が、 $87\pm5\text{ mM NaCl}$ 、 $26\pm5\text{ mM 炭酸塩}$ 、 $86\pm5\text{ mM グルコース}$ 、および $322\pm32\text{ mOsm/kg}$ を呈する、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】

前記基本培地が、約 5.1 mg/mL NaCl 、 $2.2\text{ mg/mL 炭酸水素ナトリウム}$ 、 15.5 mg/mL グルコース 、および 322 mOsm/kg を呈する、請求項1～4、および請求項13のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項15】

遺伝子改変についてホモ接合であるF1世代におけるトランスジェニックマウスを生成する方法であって、

請求項1～14のいずれか一項に記載のF0 XY繁殖可能雌マウスを同齢集団F0 XY雄マウスと交雑させる工程であって、ここで、該F0 XY繁殖可能雌マウスと該F0 XY雄マウスはそれぞれ、該遺伝子改変についてヘテロ接合性である、工程と、該遺伝子改変についてヘテロ接合性であるF1後代マウスを得る工程とを含む方法。

【請求項16】

前記遺伝子改変が、1つまたは複数の内在性核酸配列、1つまたは複数の核酸の置換、内在性核酸配列の異種性核酸配列との置き換え、ノックアウト、およびノックインを含む、請求項15に記載の方法。

20

【請求項17】

前記F0 XY繁殖可能雌マウスが、請求項6に従って作製される、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

請求項15～17のいずれか一項に従って生成される、遺伝子改変についてホモ接合であるトランスジェニックマウス。

【請求項19】

請求項1～14のいずれか一項に従って生成される繁殖可能な雌のXYマウス。

30

【請求項20】

前記基本培地が、 $50\pm5\text{ mM NaCl}$ 、 $26\pm5\text{ mM 炭酸塩}$ 、および $218\pm22\text{ mOsm/kg}$ を呈する、請求項19に記載の繁殖可能な雌のXYマウス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

分野

本発明は、XY胚性幹（「ES」）細胞から得られ、XY核型を有する、繁殖可能な雌動物の生産に関する。特定の実施形態では、XYドナーマウスのES細胞から繁殖可能なXY雌マウスを作製するための方法および組成物を記述する。表現型的雌の形成に有利に働く体外受精方法も記述する。

40

【背景技術】

【0002】

背景

遺伝子改変されたマウスを作製するためにはほぼ全ての一般的に用いられるES細胞株は、遺伝子型的雄の（XY）ES細胞株である。結果として、F0世代では、すべてのXY動物は、雄である。大抵の遺伝子改変は、2つの存在する対立遺伝子のうちの1つの改変をもたらすようにXY ES細胞をターゲティングすることによって実施される、すなわち、ドナーマウスES細胞は、その遺伝子改変についてヘテロ接合性である。しかし、その遺伝子改変についてホモ接合性であるマウスを得ることが、しばしば望ましい。本質的

50

に十分には E S 細胞由来でない雌マウスが、改変を含む F 0 世代において生まれるので、F 0 雄は通常、少なくとも 1 匹の雌 (F 1 雌) が該遺伝子改変についてヘテロ接合性であり得るような同腹仔を産生するように、雌 (例えは、対応する近交系の雌) と交配させる。次いで、ヘテロ接合性の F 1 雌を、F 1 ヘテロ接合性の雄と交雑させて、ホモ接合性の後代を得る。こうした交配に必要なのは、高費用かつ時間がかかるステップである。F 0 世代における交配対を産生すること、または、大部分または十分にドナー (X Y 雄) E S 細胞由来である F 0 雌を少なくとも産生することが望ましい。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 3】

ドナー雄 (X Y) ドナー E S 細胞と宿主胚から、F 0 世代における繁殖可能な雌動物を作製するための方法および組成物の必要性が、当技術分野で存在する。

10

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 4】

要旨

一実施態様では、X Y ドナー細胞からヒトでない繁殖可能な雌の動物を作製するための方法であって、以下を含む方法が提供される：(a) ヒトでない X Y ドナー細胞をヒトでない宿主胚に導入してキメラ胚を形成する工程；および(b) このキメラ胚を懷胎させてヒトでない雌動物を形成する工程。ここで、ヒトでない雌動物は、X Y であり、性的成熟に達した時点で繁殖可能である。

20

【0 0 0 5】

一実施形態では、ヒトでない動物は、マウスである。

【0 0 0 6】

一実施形態では、ヒトでない X Y 雌動物は、F 0 世代で形成される。一実施形態では、F 0 世代におけるヒトでない雌の X Y 動物は、マウスであり、100%、ドナー細胞由来の毛色を有する。一実施形態では、F 0 世代において形成されるヒトでない雌の X Y 動物は、少なくとも 90%、92%、94%、96%、98%、または 99.8%、X Y ドナー細胞由来である。一実施形態では、F 0 世代におけるヒトでない雌の X Y 動物は、約 100%、ドナー細胞由来である。一実施形態では、宿主胚細胞の、F 0 世代におけるヒトでない雌の X Y 動物に対する寄与は、2000 細胞中の 1 細胞 (0.05%) を検出することが可能な定量分析によって求められ、雌の X Y 動物の組織は、宿主胚細胞寄与に関して少しもプラスではない。

30

【0 0 0 7】

一実施形態では、ドナー細胞は、遺伝子改変を含む。一実施形態では、遺伝子改変は、内在性核酸配列の完全なまたは部分的な欠失；1つまたは複数の核酸の置換；内在性核酸配列、例えは遺伝子の、異種性核酸配列との完全なまたは部分的な置き換え；ノックアウト；および / またはノックインを含む。

【0 0 0 8】

一実施形態では、該方法は、遺伝子改変についてヘテロ接合性の F 0 世代 X Y 雄を、遺伝子改変についてヘテロ接合性の F 0 世代 X Y 雌 (例えは同胞) と交配する工程と、前記交配から遺伝子改変についてホモ接合性の F 1 世代動物を得る工程とをさらに含む。

40

【0 0 0 9】

一実施形態では、宿主胚への導入前の X Y ドナー細胞は、基本培地とサプリメントとを含む培地内に維持される。ここで、基本培地は、以下からなる群から選択される特性を呈する：(a) 約 250 ~ 310 mOsm / kg の重量オスモル濃度；(b) 約 11 ~ 13 mM の導電率；(c) 約 60 ~ 105 mM の濃度のアルカリ金属およびハロゲン化物塩；(d) 約 20 ~ 30 mM の炭酸塩濃度；(e) 多くとも約 85 ~ 130 mM の総アルカリ金属ハロゲン化物塩および炭酸塩濃度；ならびに(f) これらの組み合わせ。

【0 0 1 0】

一実施形態では、サプリメントは、培養中に E S 細胞を維持するための成分を含む。一

50

実施形態では、サプリメントは、1種または複数のウシ胎児血清（FBS）、グルタミン、抗生物質（1種または複数）、ピルビン酸、可欠アミノ酸、2-メルカプトエタノール、およびLIFを含む。

【0011】

一実施形態では、基本培地は、低塩のD MEMである。具体的実施形態では、低塩のD MEMのNaCl濃度は、85～130mMである。一実施形態では、基本培地は、低い重量オスモル濃度のD MEMである。具体的実施形態では、低い重量オスモル濃度のD MEMの重量オスモル濃度は、250～310mOsm/kgである。一実施形態では、基本培地は、低導電率のD MEMである。具体的実施形態では、低導電率のD MEMの導電率は、11～13mS/cmである。

10

【0012】

一実施形態では、ドナー細胞は、宿主胚への導入前に、約1、2、3、4、5、6日、1週間、8、9、110、11、または12日、2週間、3週間、または4週間またはそれ以上の間、サプリメントを加えた列挙した基本培地内に維持される。具体的実施形態では、ドナー細胞は、宿主胚への導入前に少なくとも1週間、サプリメントを加えた基本培地内に維持される。具体的実施形態では、ドナー細胞は、宿主胚への導入前に、2～4週間、サプリメントを加えた基本培地内に維持される。

【0013】

一実施形態では、宿主胚は、2細胞期、4細胞期、8細胞期、16細胞期、32細胞期、または64細胞期の胚である。別の実施形態では、宿主胚は、胚盤胞である。一実施形態では、胚は、桑実期前段階、桑実期、緊密化していない桑実期、および緊密化した桑実期から選択される段階にあるものである。一実施形態では、胚の段階は、Theiler (1989)「The House Mouse: Atlas of Mouse Development」、Springer-Verlag、New Yorkに記載されているTheiler段階に準拠して、Theiler段階1(TS1)、TS2、TS3、TS4、TS5、およびTS6から選択される。具体的実施形態では、Theiler段階は、TS1、TS2、TS3、およびTS4から選択される。一実施形態では、胚は、透明帯を含み、ドナー細胞は、透明帯における孔を通して胚に導入されたES細胞である。

20

【0014】

一実施形態では、胚は、胚盤胞前駆胚を含む。一実施形態では、胚は、桑実期胚である。具体的実施形態では、桑実期胚は、密な状態である。一実施形態では、胚は、透明帯の無い胚である。

30

【0015】

一実施形態では、XYドナー細胞は、ES細胞、人工多能性幹(iPS)細胞、多能性細胞、および全能性細胞から選択される。具体的実施形態では、XYドナー細胞は、マウスES細胞であり、宿主胚は、マウス胚である。

【0016】

一実施形態では、XYドナー細胞は、マウス近交系由来のES細胞である。一実施形態では、XYドナー細胞は、ハイブリッドまたはマウス非近交系由来のES細胞である。

40

【0017】

一実施形態では、宿主胚は、マウス宿主胚である。一実施形態では、マウス宿主胚は、近交系由来、別の実施形態では、ハイブリッドまたは非近交系由来である。一実施形態では、ドナー細胞は、マウスドナー細胞である。一実施形態では、宿主胚とドナー細胞が、両方ともマウスであり、それぞれが、129系統、C57BL/6系統、129とC57BL/6の混合、BALB/c系統、またはSwiss Webster系統であるマウスから独立に選択される。具体的実施形態では、マウスは、50% 129と50% C57BL/6である。一実施形態では、マウスは、129P1、129P2、129P3、129X1、129S1（例えば、129S1/SV、129S1/SV1m）、129S2、129S4、129S5、129S9/SvEvH、129S6（129/SV

50

E v T a c)、1 2 9 S 7、1 2 9 S 8、1 2 9 T 1、1 2 9 T 2 である系統からなる群から選択される1 2 9 系統である(例えば、F e s t i n g ら(1 9 9 9) R e v i s e d n o m e n c l a t u r e f o r s t r a i n 1 2 9 m i c e、M a m m a l i a n G e n o m e 1 0 : 8 3 6 を参照のこと)。一実施形態では、マウスは、C 5 7 B L 系統であり、具体的実施形態では、C 5 7 B L / A、C 5 7 B L / A n、C 5 7 B L / G r F a、C 5 7 B L / K a L w N、C 5 7 B L / 6、C 5 7 B L / 6 J、C 5 7 B L / 6 B y J、C 5 7 B L / 6 N J、C 5 7 B L / 1 0、C 5 7 B L / 1 0 S c S n、C 5 7 B L / 1 0 C r、C 5 7 B L / O l a から選択される。具体的実施形態では、マウスは、前述の1 2 9 系統と前述のC 5 7 B L / 6 系統の混合である。別の具体的実施形態では、マウスは、前述の1 2 9 系統の混合、または前述のB L / 6 系統の混合である。具体的実施形態では、混合の1 2 9 系統は、1 2 9 S 6 (1 2 9 / S v E v T a c) 系統である。

10

【0 0 1 8】

一実施形態では、X Y 雌マウスは、その生存期間に、1、2、3、4、5、6、7、8、または9匹の同腹の生存マウスを生じる。一実施形態では、X Y 雌マウスは、同腹につき少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10匹の仔を生じる。一実施形態では、X Y 雌マウスは、同腹につき約4～6匹の仔を生じる。一実施形態では、X Y 雌マウスは、2～6匹の同腹仔を生じ、ここで、各同腹仔は、少なくとも2、3、4、5、または6匹の仔を含む。一実施形態では、約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、または50%の仔が、X Y の雌の仔である。具体的実施形態では、約15%～25%が、X Y の雌の仔である。

20

【0 0 1 9】

一実施態様では、遺伝子改変についてヘテロ接合性であるX Y E S 細胞を用いる、遺伝子改変についてホモ接合性であるマウスを作製するための方法が提供される。一実施形態では、この方法は、X Y ドナー E S 細胞を遺伝子改変してヘテロ接合性のX Y ドナー E S 細胞を形成する工程と、該ヘテロ接合性X Y ドナー E S 細胞を低塩および/または低い重量オスモル濃度または低導電率の培地内に維持する工程と、該ヘテロ接合性X Y ドナー E S 細胞を桑実期前の宿主胚に導入する工程と、該宿主胚を懐胎させる工程と、ヘテロ接合性の改変を含み、かつ少なくとも一部分はドナー E S 細胞由来である、繁殖可能なF 0 世代の雌X Y マウスを、懐胎後に得る工程と、ヘテロ接合性の改変を含み、かつ少なくとも一部分はドナー E S 細胞由来である、繁殖可能なF 0 世代の雄X Y マウスを、懐胎後に得ることと、該F 0 雄とF 0 雌を交配して、ホモ接合性の改変を含むF 1 後代を得る工程とを含む。

30

【0 0 2 0】

一実施形態では、F 0 世代の雌X Y マウスおよび/またはF 0 世代の雄X Y マウスは、少なくとも20%以上、ドナー E S 細胞由来である。一実施形態では、F 0 雌X Y マウスは、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、または80%、ドナー E S 細胞由来である。

【0 0 2 1】

一実施形態では、F 0 世代の雌X Y マウスおよび/または雄X Y マウスは、少なくとも90%、ドナー E S 細胞由来である。一実施形態では、F 0 世代の雌X Y マウスは、少なくとも92%、94%、96%、98%、99%、または99.8%、ドナー E S 細胞由来である。一実施形態では、F 0 の雌X Y マウスおよび/またはF 0 の雄X Y マウスは、100%、E S 細胞由来の毛色を有する。

40

【0 0 2 2】

一実施形態では、F 0 世代マウスは、X Y 卵母細胞を含む。

【0 0 2 3】

一実施形態では、F 1 世代の後代マウスは、完全にドナー E S 細胞由来のゲノムを含む。

【0 0 2 4】

50

一実施形態では、ES細胞由来のマウスを十分に生じさせる、F0世代の雄とF0世代の雌マウスとの交雑の頻度は、100%である。

【0025】

一実施態様では、マウス仔の同腹仔を產生するための方法であつて、本発明に従つて調製されたXYドナーES細胞を宿主マウス胚に導入する工程と、この胚を適切なマウスにおいて懷胎させる工程と、性的成熟に到達した時点で繁殖可能なXY雌マウスである少なくとも1匹のXY雌マウス仔を含むマウス仔の同腹仔を得る工程とを含む方法が提供される。

【0026】

一実施形態では、性的成熟に到達した時点で繁殖可能である、生まれるXY雌マウス仔の割合は、約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、または50%である。具体的実施形態では、該割合は、約15~25%である。

10

【0027】

一実施態様では、培養中にXY ES細胞を維持するための方法が提供され、ここで、XY ES細胞は、XY ES細胞の宿主胚への導入後に、また適切な雌マウスにおける懷胎後に雌のXYマウスの発生を促進するまたは該発生に有利に働く条件下で維持される。この方法は、基本培地とサプリメントとを含む適切な培地内に雄のES細胞を維持することを含む。ここで、基本培地は、約240~320mOsm/kgの重量オスモル濃度、約10~14mS/cmの導電率、約50~105mMのアルカリ金属ハロゲン化物塩濃度、10~40mMの炭酸濃度の塩、および/または約80~140mMのアルカリ金属塩と炭酸塩の合計濃度を呈する。一実施形態では、XY ES細胞は、宿主胚への導入前に1、2、3、4、5、または6日、または1週間、8、9、110、11、または12日、2週間、3週間、または4週間の間、培地(ES細胞を維持するためのサプリメントを含む)内に維持される。具体的実施形態では、ES細胞は、宿主胚への導入前に、約2~4週間、培地(ES細胞を維持するためのサプリメントを含む低塩の基本培地)内に維持される。

20

【0028】

一実施形態では、基本培地は、多くとも約320、310、300、290、280、270、260、250、または240mOsm/kgの重量オスモル濃度を呈する。一実施形態では、基本培地は、多くとも約240~320、250~310、または260~300mOsm/kgの重量オスモル濃度を呈する。具体的実施形態では、基本培地は、約270mOsm/kgの重量オスモル濃度を呈する。

30

【0029】

一実施形態では、基本培地は、多くとも約10.0、10.5、11.0、11.5、12.0、12.5、13.0、13.5、または14.0mS/cmの導電率を呈する。一実施形態では、基本培地は、多くとも約10~14mS/cmまたは11~13mS/cmの導電率を呈する。具体的実施形態では、基本培地は、約12~13mS/cmの導電率を呈する。

【0030】

具体的実施形態では、基本培地は、約12~13mS/cmの導電率および約260~300mOsm/kgの重量オスモル濃度を呈する。さらなる具体的実施形態では、基本培地は、約90mM NaClの濃度の塩化ナトリウムを含む。さらなる具体的実施形態では、塩化ナトリウムの濃度は、約70~95mMである。さらなる具体的実施形態では、基本培地は、約35mMよりも低い濃度の炭酸水素ナトリウムを含む。さらなる具体的実施形態では、炭酸水素ナトリウムの濃度は、約20~30mMである。

40

【0031】

一実施形態では、基本培地は、多くとも約100mMのアルカリ金属およびハロゲン化物の塩の濃度を呈する。一実施形態では、アルカリ金属およびハロゲン化物の塩は、NaClである。一実施形態では、アルカリ金属塩およびハロゲン化物の濃度は、高くとも90、80、70、60、または50mMである。一実施形態では、基本培地中のアルカリ

50

金属およびハロゲン化物の塩の濃度は、約 60 ~ 105、70 ~ 95、または 80 ~ 90 mM である。具体的実施形態では、該濃度は、約 85 mM である。

【0032】

一実施形態では、基本培地は、炭酸の塩の濃度を呈する。一実施形態では、炭酸の塩は、ナトリウム塩である。一実施形態では、ナトリウム塩は、炭酸水素ナトリウムである。一実施形態では、基本培地中の炭酸塩の濃度は、高くとも 40、35、30、25、または 20 mM である。一実施形態では、基本培地中の炭酸塩の濃度は、約 10 ~ 40、別の実施形態では、約 20 ~ 30 mM である。具体的実施形態では、該濃度は、約 25 または 26 mM である。

【0033】

一実施形態では、基本培地中のアルカリ金属およびハロゲン化物の塩と、炭酸の塩との濃度の合計は、多くとも 140、130、120、110、100、90、または 80 mM である。一実施形態では、基本培地中のアルカリ金属およびハロゲン化物の塩と、炭酸の塩との濃度の合計は、約 80 ~ 140、85 ~ 130、90 ~ 120、95 ~ 120、または 100 ~ 120 mM である。具体的実施形態では、基本培地中のアルカリ金属およびハロゲン化物の塩と、炭酸の塩との濃度の合計は、約 115 mM である。

10

【0034】

一実施形態では、アルカリ金属およびハロゲン化物の塩と、炭酸の塩とのモル比は、2.5 よりも大きい。一実施形態では、この比は、約 2.6 ~ 4.0、2.8 ~ 3.8、3 ~ 3.6、または 3.2 ~ 3.4 である。一実施形態では、この比は、3.3 ~ 3.5 である。具体的実施形態では、この比は、3.4 である。

20

【0035】

一実施形態では、基本培地は、約 250 ~ 310 mM / kg の重量オスモル濃度および約 60 ~ 105 mM のアルカリ金属およびハロゲン化物の塩の濃度を呈する。さらなる実施形態では、基本培地は、約 20 ~ 30 mM の炭酸の塩の濃度を有する。さらなる実施形態では、アルカリ金属およびハロゲン化物の塩と、炭酸の塩との濃度の合計は、約 80 ~ 140 mM である。さらなる実施形態では、基本培地の導電率は、約 12 ~ 13 mS / cm である。

30

【0036】

一実施態様では、本明細書に記述する条件下で、培養中にドナー XY ES 細胞を維持するための方法が提供される。ここで、キメラ胚を形成するためのドナー XY ES 細胞の宿主胚への導入後に、また適切な動物における懷胎後に、キメラ胚は、少なくとも 90%、XY であり、かつ性的成熟に達した時点で繁殖可能である雌であるマウス仔に発育する。

30

【0037】

一実施形態では、マウス仔は、少なくとも 92%、94%、96%、98%、または 99.8%、XY である。

【0038】

一実施態様では、繁殖可能な XY 雌動物を作製するための方法であって、XY ドナー細胞を、該ドナー細胞の宿主胚への導入の前に、低塩の基本培地を含む培地内に維持する工程と、ドナー細胞を宿主胚に導入する工程と、該宿主胚を予定日まで適切な動物において懷胎させる工程と、懷胎後にそこから XY 雌動物を得る工程とを含む方法が提供される。ここで、性的成熟に到達した時点で、該 XY 雌動物は繁殖可能である。

40

【0039】

一実施形態では、XY ドナー細胞は、マウス ES 細胞であり、宿主胚は、XX 雌マウス由来の胚である。

【0040】

一実施形態では、ドナー細胞が維持される培養は、本明細書に記述する通りの基本培地と、培養中にマウス ES 細胞を維持するのに適した 1 種または複数のサプリメントとを含む。具体的実施形態では、培養中にマウス ES 細胞を維持するのに適した 1 種または複数

50

のサプリメントは、FBS (90mL FBS / 0.5L 基本培地)、グルタミン (2.4ミリモル / 0.5L 基本培地)、ピルビン酸ナトリウム (0.6ミリモル / 0.5L 基本培地)、可欠アミノ酸 (<0.1ミリモル / 0.5L 基本培地)、2-メルカプトエタノール、LIF、および1種または複数の抗生物質である。

【0041】

一実施形態では、ドナー細胞は、ドナー細胞を宿主胚に導入する前に、少なくとも1、2、3、4、5、または6日、または1週間、8、9、110、11、または12日、2週間、3週間、または4週間の間、低塩の基本培地を含む培地内に維持される。具体的実施形態では、ドナー細胞は、ドナー細胞を宿主胚に導入する前に、少なくとも2~4週間の間、低塩の基本培地を含む培地内に維持される。

10

【0042】

一実施形態では、ドナー細胞は、低塩の基本培地を含む培地内に維持（例えば凍結）され、このドナー細胞は、低塩の基本培地を含むこの培地内で解凍され、ドナー細胞を宿主胚に導入する前に少なくとも1、2、3、または4日間、またはそれ以上の間、該培地内に維持される。具体的実施形態では、ドナー細胞は、低塩の基本培地を含む培地内で少なくとも1回継代され、この細胞は、低塩の基本培地を含むこの培地内で凍結され、この細胞は、低塩の基本培地を含む培地内で解凍され、宿主胚への導入の前に、1、2、3、4、5、または6日以上、または1週間、8、9、110、11、または12日、2週間、3週間、4週間、またはそれ以上の間成長させられる。

20

【0043】

一実施形態では、ドナー細胞は、宿主胚への導入の前に、1、2、3、または4日の間、維持される。一実施形態では、ドナー細胞は、列挙した基本培地を含む培地内に3日間維持される。

【0044】

一実施態様では、同じF0世代における、各々が十分にドナーES細胞由来である繁殖可能なマウスの交配対を作製するための方法であって、以下を含む方法が提供される：基本培地と本明細書に記述した通りのサプリメントを含む培養中にドナー雄マウスXYES細胞を維持する（ここで、ES細胞は、基本培地およびサプリメント内に、少なくとも1日の間、維持される）工程と；該ES細胞を宿主胚（例えば、XXマウス由来）に導入してキメラ胚を形成する工程と；該キメラ胚を適切なマウス中で予定日まで懐胎させる工程と；該適切なマウスから、十分にドナーES細胞由来であるF0世代の繁殖可能な雄XYマウスと十分にドナーES細胞由来であるF0世代の繁殖可能な雌XYマウスを含む、マウス仔の同腹仔を得ること。

30

【0045】

一実施形態では、ドナーES細胞は、遺伝子変異を含む。一実施形態では、ドナーES細胞は、ヘテロ接合性である遺伝子変異を含む。一実施形態では、ドナーES細胞は、ヘテロ接合性の遺伝子変異を含み、F0世代の繁殖可能な雄マウスとF0世代の繁殖可能な雌XYマウスは、該遺伝子変異についてそれぞれヘテロ接合性であり、該F0世代の繁殖可能な雄と該F0世代の繁殖可能な雌は、互いに交配されて、該遺伝子変異についてホモ接合性のF1世代マウスである後代を生じる。

40

【0046】

一実施形態では、ES細胞は、2日、3日、または4日、またはそれ以上の間、維持される。

【0047】

一実施態様では、F0世代における繁殖可能な雌のXYマウスを作製するための方法であって、(a)ドナーXYマウスES細胞を、基本培地と、培養中にマウスES細胞を維持するのに適したサプリメントとを含む培地内に維持する工程と、(b)該ドナーXYマウスES細胞を宿主胚に導入する工程と、(c)該宿主胚を懐胎させる工程と、(d)XY雌マウス後代を得る（ここで、性的成熟に達した時点で、該XY雌マウスは繁殖可能である）工程とを含む方法が提供される。この実施態様による基本培地は、(1)200m

50

Osm / kg から 329 mOsm / kg 未満までの重量オスモル濃度、(2) 約 11 ~ 13 mM / cm の導電率、(3) 約 50 ~ 110 mM の濃度のアルカリ金属およびハロゲン化物の塩、(4) 約 17 ~ 30 mM の炭酸塩濃度、および(5) 約 85 ~ 130 mM の総アルカリ金属ハロゲン化物塩および炭酸塩濃度、から選択される 1 つまたは複数の特性を呈する。

【0048】

一実施形態では、ドナー XY マウス ES 細胞は、遺伝子改変を含む。いくつかの実施形態では、遺伝子改変は、1 つまたは複数の内在性核酸配列、1 つまたは複数の核酸の置換、内在性核酸配列の異種性核酸配列との置き換え、ノックアウト、およびノックインを含む。ある特定の実施形態では、遺伝子改変は、STEP 2 遺伝子のノックアウトである。

10

【0049】

一実施形態では、基本培地は、50 ± 5 mM NaCl および 26 ± 5 mM 炭酸塩を特に含有し(を呈し)、重量オスモル濃度は 218 ± 22 mOsm / kg である。具体的実施形態では、基本培地は、約 3 mg / mL NaCl および 2.2 mg / mL 炭酸水素ナトリウム、それに伴い約 218 mOsm / kg の重量オスモル濃度を呈する。

【0050】

別の実施形態では、基本培地は、87 ± 5 mM NaCl および 18 ± 5 mM、それに伴い 261 ± 26 mOsm / kg の重量オスモル濃度を呈する。具体的実施形態では、基本培地は、約 5.1 mg / mL NaCl および 1.5 mg / mL 炭酸水素ナトリウム、それに伴い約 261 mOsm / kg の重量オスモル濃度を呈する。

20

【0051】

別の実施形態では、基本培地は、110 ± 5 mM NaCl および 18 ± 5 mM 炭酸塩を呈し、重量オスモル濃度は、294 ± 29 mOsm / kg である。具体的実施形態では、基本培地は、約 6.4 mg / mL NaCl および 1.5 mg / mL 炭酸水素ナトリウム、それに伴い約 294 mOsm / kg の重量オスモル濃度を呈する。

【0052】

別の実施形態では、基本培地は、87 ± 5 mM NaCl および 26 ± 5 mM 炭酸塩、それに伴い約 270 ± 27 mOsm / kg の重量オスモル濃度を呈する。具体的実施形態では、基本培地は、約 5.1 mg / mL NaCl および 2.2 mg / mL 炭酸水素ナトリウム、それに伴い約 270 mOsm / kg の重量オスモル濃度を呈する。

30

【0053】

別の実施形態では、基本培地は、87 ± 5 mM NaCl、26 ± 5 mM 炭酸塩、および 86 ± 5 mM グルコース、それに伴い 322 ± 32 mOsm / kg の重量オスモル濃度を呈する。具体的実施形態では、基本培地は、約 5.1 mg / mL NaCl、約 2.2 mg / mL 炭酸水素ナトリウム、および約 15.5 mg / mL グルコース、それに伴い約 322 mOsm / kg の重量オスモル濃度を呈する。

【0054】

一実施態様では、F1 世代における、遺伝子改変についてホモ接合性のトランスジェニックマウスを生じる方法であって、(a) 前述の方法に従って生成される F0 XY 繁殖可能雌マウスを同齢集団 F0 XY 雄マウスと交雑させる工程と、(b) 該遺伝子改変についてヘテロ接合性である F1 後代マウスを得る工程とを含む方法が提供される。この実施態様によれば、F0 XY 繁殖可能雌マウスと F0 XY 雄マウスはそれぞれ、該遺伝子改変についてヘテロ接合性である。いくつかの実施形態では、遺伝子改変は、1 つまたは複数の内在性核酸配列、1 つまたは複数の核酸の置換、内在性核酸配列の異種性核酸配列との置き換え、ノックアウト、およびノックインを含む。

40

【0055】

ある具体的実施形態では、F0 XY 繁殖可能雌マウスは、基本培地が 50 ± 5 mM NaCl および 26 ± 5 mM 炭酸塩、それに伴い 218 ± 22 mOsm / kg の重量オスモル濃度を呈するような前述の方法に従って作製される。特定の実施形態では、基本培地

50

は、約 3 mg / mL NaCl および 2.2 mg / mL 炭酸水素ナトリウム、それに伴い約 218 mOsm / kg の重量オスモル濃度を呈する。

【0056】

一実施態様では、前述の方法に従って生成される、遺伝子改変についてホモ接合性のトランシジェニックマウスが提供される。

【0057】

一実施態様では、前述の方法のいずれかに従って生成される、繁殖可能な雌の XY マウスが提供される。一実施形態では、ES 細胞（該細胞から XY 雌マウスが得られる）が、 $50 \pm 5 \text{ mM}$ NaCl および $26 \pm 5 \text{ mM}$ 炭酸塩、それに伴い $218 \pm 22 \text{ mOsm / kg}$ の重量オスモル濃度を呈する基本培地内に維持された。具体的な実施形態では、基本培地は、約 3 mg / mL NaCl および 2.2 mg / mL 炭酸水素ナトリウム、それに伴い約 218 mOsm / kg の重量オスモル濃度を呈する。

10

【0058】

特段の記述がある、または文脈から明らかであるのではない限り、本明細書に記述するいかなる実施態様または実施形態も、互いに組み合わせができる。

【図面の簡単な説明】

【0059】

【図 1】図 1 は、様々な XY ES 細胞クローニングから作製される F0 世代の雌 XY マウスを使用する交配の結果を示す。

20

【図 2】図 2 は、低塩の DMEM、DMEM、または FS (Wnt-3a - 調整培地、すなわち、Wnt-3a - 発現構築物を形質移入されたマウス L 細胞によって調整された培地)、NaCl、および NaHCO₃ を補足した低塩の DMEM と共にインキュベートされる ES 細胞からの XY 雌マウスの產生を示す。

20

【発明を実施するための形態】

【0060】

詳細な説明

この開示に引用されるすべての刊行物を、参考により本明細書に組み込む。

【0061】

語句「基本培地」には、培養中に ES 細胞を成長または維持する際の使用に適した、（サプリメントが追加された）当技術分野で知られた基本培地（例えば DMEM）が含まれる。繁殖可能な XY 雌を作製するのに適した基本培地（すなわち「低塩の DMEM」）は、培養中に ES 細胞を維持するために一般的に使用される基本培地とは異なる。概して基本培地について論じる目的で、繁殖可能な XY 雌を作製するのに適していない基本培地を、このセクションでは、また、以下の表中では、「DMEM」として記述する（例えば典型的な DMEM 培地）。繁殖可能な XY 雌を作製するのに適した基本培地について論じる目的で、語句「低塩の DMEM」が使用される。培養中に ES 細胞を維持するために一般的に使用される基本培地（例えば DMEM）と、繁殖可能な XY 雌を作製するのに適した基本培地（例えば「低塩の DMEM」）との違いは、本明細書に明確に述べる。語句「低塩の DMEM」は、便宜のために使用され；繁殖可能な XY 雌を作製するのに適した DMEM は、「低塩」に限定されない、本明細書に記述する特性も含まれる特性を呈する。例えば、本明細書で提供される通りに、塩化ナトリウムおよび / または炭酸水素ナトリウム濃度を変えることによって（これは、表 1 に示される DMEM と比較した場合に異なる重量オスモル濃度および異なる導電率もたらすことになる）、繁殖可能な XY 雌を作製するのに適した、表 1 に示される DMEM を作製することができる。基本培地の例は、様々な型のダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）（例えば Invitrogen DME M、カタログ番号 11971-025）である（表 1）。適切な低塩の DMEM は、KO-DMEMTM（Invitrogen カタログ番号 10829-018）として市販されている。基本培地は、一般的に、ドナー細胞として使用するための細胞を培養において維持するために使用される場合、当技術分野で知られたいくつかのサプリメントが補足される。この開示では、こうしたサプリメントは、「サプリメント」または「+ サプリメン

30

40

50

ト」として示される。

【0062】

【表1-1】

表1:ES細胞を維持するためのDMEM基本培地		
成分	mg/L	mM
グリシン	30	0.4
L-アルギニン・HCl	84	0.398
L-シスチン・2HCl	63	0.201
L-グルタミン	584	4
L-ヒスチジン・HCl・H ₂ O	42	0.2
L-イソロイシン	105	0.802
L-ロイシン	105	0.802
L-リシン・HCl	146	0.798
L-メチオニン	30	0.201
L-フェニルアラニン	66	0.4
L-セリン	42	0.4
L-スレオニン	95	0.798
L-トリプトファン	16	0.0784
L-チロシンジナトリウム塩二水和物	104	0.398
L-バリン	94	0.803
塩化コリン	4	0.0286
D-パントテン酸カルシウム	4	8.39 × 10 ⁻³
葉酸	4	9.07 × 10 ⁻³
ナイアシンアミド	4	0.0328
ピリドキシン・HCl	4	0.0196
リボフラビン	0.4	1.06 × 10 ⁻³

【0063】

【表1-2】

チアミン・HCl	4	0.0119
イノシトール	7.2	0.04
塩化カルシウム(CaCl ₂)(無水)	200	1.8
硝酸第二鉄(Fe(NO ₃) ₃ ・9H ₂ O)	0.1	2.48 × 10 ⁻⁴
硫酸マグネシウム(MgSO ₄)(無水)	97.67	0.814
塩化カリウム(KCl)	400	5.33
D-グルコース(デキストロース)	4500	25
フェノールレッド	15	0.0399
DMEMのNaCl/NaHCO ₃ 含有量		
炭酸水素ナトリウム(NaHCO ₃)	3700	44.05
塩化ナトリウム(NaCl)	6400	110.34
低塩DMEMのNaCl/NaHCO ₃ 含有量		
炭酸水素ナトリウム(NaHCO ₃)	<3700	<44.05
塩化ナトリウム(NaCl)	<6400	<110.34

用語「サプリメント」または語句「+サプリメント」としては、培養中にドナー細胞を成長または維持するために、例えば培養中にドナー細胞の多能性または全能性を維持するために、基本培地に添加される要素が挙げられる。例えば、培養中に非ヒトES細胞を成長または維持するのに適した培地サプリメントとしては、ウシ胎児血清(FBS)、グルタミン、ペニシリンとストレプトマイシン(例えばペニストレップ(penstrep))、ピルビン酸塩(例えばピルビン酸ナトリウム)、可欠アミノ酸(例えばMEMNEAA)、2-メルカプトエタノール、およびLIFが挙げられる。

【0064】

培養中に非ヒトドナー細胞を維持するための培地の種々の実施形態では、約500mLの基本培地に、以下のサプリメントが添加される: 約90mL FBS(例えばHyclone FBSカタログ番号SH30070.03)、約2.4ミリモルのグルタミン(例えば約12mLの200mMグルタミン溶液、例えばInvitrogenカタログ番号25030-081)、ペニシリン:ストレプトマイシン(例えば60,000単位のペニシリンGナトリウムと60mgの硫酸ストレプトマイシン(約51mgのNaClを含む) ; 例えば約6mLのInvitrogenペニストレップ(pennstrep)、カタログ番号15140-122)、約0.6ミリモルのピルビン酸ナトリウム(例えば6mLの100mMピルビン酸ナトリウム、Invitrogenカタログ番号11360-070)、約0.06ミリモルの可欠アミノ酸(例えば約6mLのMEMNEAA、例えばInvitrogenカタログ番号11140-050のMEMNEAA)、約1.2mL 2-メルカプトエタノール、および約1.2マイクログラムのLIF(例えば約120マイクロリットルの10⁶単位/mL LIF調製物; 例えば、約120マイクロリットルのMillipore ESGROTM-LIF、カタログ番号ESG1107)。繁殖可能なXY雌を作製するために、XY ES細胞を維持するための基本培地を構成する場合、一般的に、同じサプリメントがほぼ同じ量で用いられるが、基本培

10

20

30

40

50

地の組成は（D M E Mとは、例えば、上の表に記述した培地とは）異なることとなり、その違い（1つまたは複数）は、本明細書で教示する違い（1つまたは複数）に相当する。

【0065】

いくつかの実施形態では、サプリメントとしては、W n t - 調整培地、例えば、W n t - 3 a - 調整培地が挙げられる。

【0066】

ドナー細胞および／または宿主胚に関する用語「動物」としては、哺乳類、魚類、および鳥類が挙げられる。哺乳類としては、例えば、ヒト、ヒトでない靈長類、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット）、家畜（例えば、ウシ種、例えば、雌牛、去勢牛、など；ヒツジ種、例えば、ヒツジ、ヤギ、など；ならびにブタ種、例えば、ブタおよびイノシシ）が挙げられる。鳥類としては、例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、ダチョウ、ガチョウ、アヒル、などが挙げられる。ドナー細胞および／または宿主胚に関する語句「ヒトでない動物」は、ヒトを除外する。

10

【0067】

種々の実施形態では、ドナー細胞および／または宿主胚は、1つまたは複数の以下のもの由来ではない：A k o d o n種、M y o p u s種、M i c r o t u s種、T a l p a種。種々の実施形態では、ドナー細胞および／または宿主胚は、通常の野生型特性がX Y 雌繁殖性であるような、いかなる種由来でもない。種々の実施形態では、ドナー細胞または宿主胚に遺伝子改変が存在する場合、その遺伝子改変は、X Y YまたはX X Y、T d y ネガティブの性転換、T d y ポジティブの性転換、X 0 改変、異数性、S R Y 転座または改変、f g f 9 - / - 遺伝子型、あるいはS O X 9 改変ではない。

20

【0068】

（概要）

ドナーE S 細胞と宿主胚から、ヒトでない動物、例えばマウスを作製するための方法は、当技術分野で知られている。ドナーE S 細胞は、細胞が宿主胚に住み着く能力を高め、また、このようにしてドナーE S 細胞と宿主胚によって形成される動物に、ある程度または実質的にある程度寄与するような、ある種の特性について選択される。形成される動物は、E S 細胞の遺伝子型（例えば、X Y またはX X ）に基づくと、雄または雌であり得る。

30

【0069】

マウスを作製するための大部分のE S 細胞株は、雄のX Y 遺伝子型を有する。哺乳類の性別決定においては、Y染色体が優性であるので、X Y E S 細胞が宿主胚に導入されて懷胎される場合、第1世代（F 0 ）では、ほとんどいつも、キメラである、すなわち雄のドナーE S 細胞（X Y ）由来である細胞と、雄の（X Y ）または雌（X X ）であり得る宿主胚由来である細胞とを含有する、表現型的に雄の動物がもたらされる。F 0 世代において表現型的な雌が認められる限りは、これらは一般的に、X Y E S 細胞の雌のX X 胚への導入に起因し、そのE S 細胞の寄与が、胚の生殖隆起を雄性化するのに不十分であるようなキメラがもたらされる。大抵の場合、こうした雌のキメラは、X Y E S 細胞由来である卵母細胞を生じないので、E S 細胞ゲノムを次世代に伝達する能力がない。稀に、雌のキメラは、X Y E S 細胞由来である卵母細胞を生成せず；こうした雌は、E S 細胞ゲノムを次世代に伝達することができる（例えば、B r o n s o n ら（1995）H i g h i n c i d e n c e o f X X Y a n d X Y Y m a l e s a m o n g t h e o f f s p r i n g o f f e m a l e c h i m e r a s f r o m e m b r y o n i c s t e m c e l l s 、 P r o c . N a t l . A c a d . S c i U S A 9 2 : 3 1 2 0 ~ 3 1 2 3 を参照のこと）。

40

【0070】

X Y 遺伝子型をもつ表現型的に雌のマウスは、特定の突然変異の結果として生じ得る。例えば、L o v e l l - B a d g e ら（1990）X Y f e m a l e m i c e r e s u l t i n g f r o m a h e r i t a b l e m u t a t i o n i n t h e p r i m a r y t e s t i s d e t e r m i n i n g g e n e 、 T d y 、 D e v

50

elopment 109: 635~646を参照のこと；また、Colvinら(2001)Male-to-Female Sex Reversal in Mice Lacking Fibroblast Growth Factor 9、Cell 104(6): 875~889(Fgf-/-XY females that die at birth from lung hypoplasia)も参照のこと。南アメリカのAkadon種のげっ歯類は、XY雌を含む(Hoekstraら(2000)Multiple origins of XY female mice (genus Akodon): phylogenetic and chromosomal evidence、Proc. R. Soc. Lond. B 267: 1825~1831を参照のこと)が、こうしたマウス由来のES細胞株は、一般的に入手できず、仮に存在したとしても、広範には使用されない。10

【0071】

ある場合、例えば、VELOCIMOUSE(登録商標)方法(例えば、米国特許第7,659,442号、第7,576,259号、第7,294,754号、およびPoueymirouら(2007)F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses、Nat. Biotech. 25(1): 91~99(各々を参照により本明細書に組み込む)を参照のこと)を使用する場合、十分にドナーES細胞由来であるF0世代マウスを得ることが可能である。普通の状況および標準の実験条件下では、XYドナーES細胞は、十分にES細胞由来の表現型的に雄のマウスしか生じないのでに対し、XXまたはXであるES細胞(Y染色体を失っているXY ES細胞)は、十分にES細胞由来の表現型的に雌のマウスしか生じない。雄および雌の十分にES細胞由来のマウスから、標的とされるホモ接合性の突然変異を有するマウスを生じるには、交雑させた場合に、F2世代におけるホモ接合性の後代を生じる潜在的 possibilityを有するようなF1世代のヘテロ接合性の雄および雌を第一に生じるために、それに続く2世代の交配が必要である。20

【0072】

本発明者らは、XYドナー細胞(例えば、表現型的に雄のマウス由来であるXYドナー細胞)と適切な宿主胚から、表現型的に雌の繁殖可能なXYマウスを作製するための方法を考案した。この方法は、F0世代における交配対(雄のF0と雌のF0)を形成することが可能な、F0世代におけるこうしたマウスを作製することを含む。これは、ドナー細胞がヘテロ接合性の遺伝子変化を含み、かつホモ接合性のマウスが所望される場合に特に有用である。この開示は、ドナーマウスXY ES細胞から表現型的に雌の繁殖可能なXYマウスを作製するという趣旨で、本発明を例示するが、本明細書に記述する方法および組成物は、任意の適切なヒトでない細胞(例えば、iPS細胞、ES細胞、または多能性細胞)および任意の適切なヒトでない胚から、表現型的に雌のXYの繁殖可能なヒトでない動物を作製するために適用することができる。30

【0073】

ドナー細胞を宿主胚に導入することによって動物を產生するためにドナー細胞が使用される場合に、このようにして產生された動物が表現型的に雌の繁殖可能なXY動物を含むようにドナー細胞を維持するための条件を含めた、方法および組成物を記述する。表現型的に雌の繁殖可能なXY動物としては、排卵し、かつ該動物における排卵によって生成された卵の受精後に胚を懷胎する(胚を予定日まで懷胎し、生きて生まれる動物を出産することを含めて)のに十分な、表現型的に雌の特性を呈する動物が挙げられる。40

【0074】

本発明者らは、種々の実施形態において、少なくとも約10%、15%、20%、または25%以上の確率で、XYマウスES細胞から繁殖可能な雌のXYマウスの出生をもたらす方法を考案した。

【0075】

動物管理50

一実施態様では、精細胞と卵細胞から雌動物を產生するための方法であって、低塩の基本培地を含む培地内に、精細胞および／または卵細胞を、受精の前に1、2、3、または4日、またはそれ以上の間、維持する工程と、精細胞と卵細胞とを、受精を可能にして受精卵を形成させるような条件下で接触させる工程と、懷胎のために適切な宿主に受精卵を移植する工程と、宿主において懷胎させる工程と、雌動物を含む同腹仔を得る工程とを含む方法が提供される。

【0076】

一実施形態では、受精卵は、低塩の基本培地を含む培地内に、適切な宿主への移植の前に、1、2、3、または4日、またはそれ以上の間、さらに維持される。

【0077】

一実施態様では、受精卵または胚からの雌動物の產生に有利に働く方法であって、低塩の基本培地を含む培地内に、適切な宿主への移植の前に、1、2、3、または4日、またはそれ以上の間、受精卵または胚を維持する工程と、受精卵または胚を懷胎のために適切な宿主に移植する工程と、該受精卵または胚を宿主において懷胎させる工程と、雌動物を含む同腹仔を得る工程とを含む方法が提供される。

【0078】

一実施態様では、雌の愛玩動物、雌の家畜、科学研究対象としての雌動物、または絶滅危惧種の動物を作製するために、本発明の方法および組成物が用いられる。一実施形態では、動物は、マウス、ラット、ハムスター、サル、類人猿、ネコ、イヌ、雌牛、ウマ、雄牛、ヒツジ、ヤギ、ブタ、シカ、およびバイソンである。

10

20

30

【実施例】

【0079】

実施例1：ドナーX Y ES細胞および宿主胚

ドナー細胞および宿主胚。ドナーES細胞は、129S6C57B16/F1ハイブリッドES細胞であった。ドナーES細胞は、10%DMSOを含有する凍結培地内で、使用まで凍結した。解凍後、ドナーES細胞を、基本培地および以下に記述するサブリメント内に維持した。宿主胚は、Swiss Webster(SW)マウス由来であり、KSOM培地(Millipore)内に、使用まで維持した。従来記載されている通りに、8細胞胚を得た(Poueymirouら(2007)Nature Biotech. 25(1):91~99;米国特許第7,659,442号、第7,576,259号、および第7,294,754号)。

【0080】

DMEM ES細胞：DMEM内で調製および凍結したES細胞を、DMEM内で解凍し、3日間成長させ、DMEM内で宿主胚にマイクロインジェクションした。

【0081】

低塩DMEM ES細胞：低塩のDMEM内で調製および凍結したES細胞を、低塩のDMEM(KO-DMEM)内で解凍し、3日間成長させ、DMEM内で宿主胚にマイクロインジェクションした。

【0082】

FS低塩DMEM：低塩のDMEM内で調製および凍結したES細胞を、低塩のDMEM(440mL)+10%Wnt-3a-調整培地(FS)(60mL)内で解凍および維持し、DMEM内で宿主胚にマイクロインジェクションした。

40

【0083】

低塩のDMEM+NaCl+NaHCO₃：NaCl(1,300mg/L)およびNaHCO₃(1,500mg/L)を添加した低塩のDMEM内で調製および凍結したES細胞を、DMEM内で宿主胚にマイクロインジェクションした。

【0084】

10%Wnt-3a-調整培地(FS)：Wnt-3a-調整培地を、Wnt-3a発現ベクター(ATCCCRL-2647)で形質転換させたマウスL細胞の培養から作製した。(DMEMの代わりにKO-DMEMTMが使用されること以外は)ATCCC

50

指示書に従って、Fibras stageTM (New Brunswick) システム内で、L細胞を成長させる。

【0085】

実施例2：ドナーES細胞由来であるF0世代マウスの作製

F0世代マウスの產生。マウスES細胞が、本明細書に記述する通りのサプリメントを加えた基本培地内に維持されること以外は、従来記載されている通りに (Poueymirouら(2007)Nature Biotech. 25(1): 91~99; 米国特許第7,659,442号、第7,576,259号、および第7,294,754号)、VELOCIMOUSE(登録商標)方法を使用して、8細胞期の桑実期前の宿主胚にドナーES細胞を導入した。マイクロインジェクションについては、ES細胞を成長させて胚にマイクロインジェクションし、この胚を、代理母への移植の前に、KSOMまたはD MEM培地内で、終夜培養した。

10

【0086】

実施例3：ドナーXY ES細胞由来のF0世代繁殖可能雌マウス

典型的なプロトコルでは、ES細胞は、KO-D MEMTMの存在下で解凍され、1代継代される(約5日)。次いで、継代した細胞を、遺伝子ターゲティングベクターで電気穿孔し、次いで、KO-D MEMTM(Invitrogen カタログ番号10829-018)を含む培地内で、10日間、選択下におく。薬物抵抗性の細胞を、KO-D MEMTMを含む培地内で、採取および展開し、次いで凍結する。マイクロインジェクションについては、KO-D MEMTM内で細胞を解凍し、KO-D MEMTM内で3日間成長させ、次いで、D MEM中の胚にマイクロインジェクションする。次いで、この胚を懐胎のために代理母に導入する。

20

【0087】

交配対を選択するために、マウス仔を、外性器の外見に基づいて、最初に雄または雌と特徴付けた。図1は、F0 XY雌が、高い繁殖率を呈することを示す。33匹のF0 XY雌のうちの21匹が、同腹仔を生じた。

【0088】

実施例4：D MEMの低塩のD MEMとの比較

重量オスモル濃度は、Advanced(登録商標)Model 3250 Single Sample Osmometerで測定した。導電率は、Mettler Toledo GmbH SevenMultiTM ECN #15055導電率計で測定した。

30

【0089】

XY ES細胞からのF0世代XY雌の形成に対する、低塩のD MEMおよびD MEM(それぞれサプリメントを含む)の効果を研究した。表2は、追加の塩および/またはサプリメントを含むおよび含まない基本培地の重量オスモル濃度および導電率の値を示す。表示「+サプリメント」=以下のものの(0.5Lの基本培地への)の添加: 90mL Hyclone FBS(カタログ番号SH30070.03)、12mLのInvitrogenグルタミン溶液(カタログ番号25030-081)、6mLのInvitrogen Pen Strep(カタログ番号15140-122)、6mLのInvitrogenピルビン酸ナトリウム(カタログ番号11360-070)、6mLのMEM NEAA(Invitrogenカタログ番号111140-050)、1.2mL 2-メルカプトエタノール、および120マイクロリットルのMillipore ES GROTM-LIF(カタログ番号ESG1107)。

40

【0090】

図2は、宿主胚へのマイクロインジェクションの前に、異なる培地内で成長させた、XY ES細胞の比較を示す。低塩のD MEM内で成長および維持され、次いで胚に注入されたXY ES細胞は、XY雌を生じた。NaClおよびNaHCO₃を補足した低塩のD MEM内で成長および維持され、次いで胚に注入されたXY ES細胞は、XY雌を生じなかつた。これは、XY ES細胞が低塩のD MEM内に維持された場合に、XY雌の

50

生成が促進されることと、X Y E S 細胞の性比を、基本培地の塩濃度を変えることによって操作することができるこを実証する。低塩のD M E MにW n t - 3 a - 調整培地(10% F S)を添加することは、F 0 X Y 雌の生成の頻度を増大させた。

【0091】

さらに、E S 細胞が、低塩のD M E M内に維持された場合、F 0 におけるE S 細胞由來のマウスを產生する効率は増大した。E S 細胞由來の仔の、F 0 世代において產生された仔全体に対する比は、D M E M内に維持されたE S 細胞について約23%から、低塩のD M E M内に維持されたE S 細胞について61%まで、10% W n t - 3 a - 調整培地を補足した低塩のD M E M内に維持されたE S 細胞について72%まで増大した。図2を参照のこと。

10

【0092】

【表2】

表2:DMEMと低塩のDMEMの物理的特性比較

ES細胞用の培地	導電率(mS/cm)	重量オスモル濃度(mOsm/kg)
低塩のDMEM、単独	12.84	270
DMEM、単独	15.40	337
低塩のDMEM+NaHCO ₃ +NaCl、単独	15.82	342
低塩のDMEM、+サプリメント	12.75	279
DMEM、+サプリメント	14.91	330
低塩のDMEM+NaHCO ₃ +NaCl、+サプリメント	15.29	335

20

実施例5：F 0 世代マウスの分析

毛色。マウスを、ドナーX Y E S 細胞(野ネズミ色)および宿主胚(白色)からの毛色寄与について分析した。F 0 世代マウスは一匹も、宿主胚からの毛色寄与を呈さなかつた。

30

【0093】

性別。F 0 世代仔を、外性器の外観検査によって雌または雄と特定した。F 0 仔には、性別が割り当てられ、外観検査に基づいて、交配のためにつがいにした。

【0094】

遺伝子型判定。X 染色体上の配列に特異的なT A Q M A N ^{T M} Q P C R 分析を使用して、X 染色体の存在を検出した。Y 染色体上の配列に特異的なT A Q M A N ^{T M} Q P C R 分析を使用して、Y 染色体の存在を検出した。表現型的に雌のF 0 世代マウスの遺伝子型判定は、試験されたそれらの表現型的に雌のマウスにおけるX 染色体の單一コピーとY 染色体の單一コピーを示した。

40

【0095】

核型分析。6匹のF 0 世代X Y 雌を、核型分析した。核型分析結果は、6匹すべてが、正常なX および正常なY 染色体を有することを示した。

【0096】

X Y 雌の生殖解剖学。いくつかのF 0 世代X Y 雌を、内部生殖器について検査した。検査したすべてのF 0 X Y 雌は、正常な雌の内部生殖器を有するように見えた。各生殖器(卵巣、卵管、子宮)からの組織サンプルを遺伝子判定し、その結果、これらの組織が、一様なX Y 遺伝子型を有することが示された。

【0097】

実施例6：E S 細胞由來の仔およびX Y 雌を產生する効率に対する重量オスモル濃度の

50

効果の分析

低塩の低炭酸塩のD M E M内に維持されたX Y E S細胞からのX Y雌の産生に対する重量オスモル濃度の効果を判定するために、低塩の低炭酸塩のD M E Mに、グルコースを加えて、重量オスモル濃度をD M E Mの重量オスモル濃度の範囲内にした。Advanced (登録商標) Model 3250 Single-Sample Osmometerで、重量オスモル濃度を測定した。

【0098】

ドナーX Y E S細胞を、特に5.1m g / m L N a C l、2.2m g / m L N a H C O ₃、および15.5m g / m Lグルコースを含有し、重量オスモル濃度が322m Osm / kgである、低塩、低炭酸塩、高グルコースのD M E M (「D M E M - L S / L C / H G」)内に維持した。V E L O C I M O U S E (登録商標)方法(上記)によって、前記E S細胞を胚に移植すると、E S細胞由来の得られたすべてのF 0後代の15%は、表現型的に雌のX Yマウスであった。F 0世代における陰性対照として、D M E M (「D M E M」: 6.4m g / m L N a C l、3.7m g / m L N a H C O ₃、および4.5m g / m Lグルコース; 329m Osm / kg)内に維持したE S細胞から、表現型的に雌でないX Yマウスを得た。この15% F 0 X Y雌の結果は、D M E M由来のE S細胞(329m Osm / L)から得られる0% F 0 X Y雌と、低塩の低炭酸塩のD M E M (「D M E M - L S / L C」: 5.1m g / m L N a C l、2.2m g / m L N a H C O ₃、および4.5m g / m Lグルコース; 270m Osm / kg)内に維持されたE S細胞由来である27.8% F 0 X Y雌マウスとの間にある。したがって、一つの解釈は、重量オスモル濃度が、すべてではないが、いくらかの雌性化効果を提供することである。別の説明は、低塩および/または低炭酸塩が、雌性化効果を提供し、高グルコースが、X Y E S細胞の雌性化をある程度妨げるということである。表3を参照のこと。

【0099】

【表3】

表3:ES細胞由来の仔およびF0 XY雌に対する、重量オスモル濃度、塩、および炭酸塩の効果

培地	重量オスモル濃度(mOsm/L)	NaCl(mg/mL)	NaHCO ₃ (mg/mL)	グルコース(mg/mL)	E S細胞由来の仔/仔全体	E S細胞由来の仔	
						XY雄	XY雌
DMEM	329	6.4	3.7	4.5	13/58(22.4%)	13/13	0/13(0%)
DMEM-LS/LC	270	5.1	2.2	4.5	36/71(50.7%)	26/36	10/36(27.8%)
DMEM-LS/LC/HG	322	5.1	2.2	15.5	20/50(40%)	17/20	3/20(15%)
DMEM-VL S/LC	218	3.0	2.2	4.5	53/58(91.4%)	35/53	18/53(34.0%)
DMEM-LS/VLC	261	5.1	1.5	4.5	50/57(87.7%)	33/50	17/50(34%)
DMEM-VLC	294	6.4	1.5	4.5	49/68(72.1%)	35/49	14/49(28.6%)

さらに、F 0におけるE S細胞由来のマウスを産生する効率(表3)は、E S細胞が、D M E M - L S / L C / H G内に維持された場合(すなわち約40%)、D M E M内に維

10

20

30

40

50

持された E S 細胞の効率よりも高い（すなわち約 22%）が、D M E M - L S / L C 内に維持された E S 細胞の効率（すなわち約 51%）ほど高くはない。表 3 を参照のこと。

【0100】

実施例 7：E S 細胞由来の仔および X Y 雌を産生する効率に対する塩濃度の効果の分析
X Y E S 細胞からの X Y 雌の産生に対する、塩濃度またはイオン強度の効果を判定するために、E S 細胞を、非常に低い塩（D M E M - V L S / L C : 3.0 m g / m L N a C l、2.2 m g / m L N a H C O 3、4.5 m g / m L グルコース、218 m O s m / k g）内に維持した。V E L O C I M O U S E（登録商標）方法（上記）によって、前記 E S 細胞を胚に移植すると、E S 細胞由来の得られたすべての F 0 後代の 34% は、表現型的に雌の X Y マウスであり；D M E M - L S / L C 対照の 27.8% というレベルに対するわずかな増大であった。興味深いことに、D M E M - V L S / L C 培地内に維持された E S 細胞の移植から得られた F 0 仔の 91.4% が、E S 細胞由来であったのに対し；D M E M - L S / L C および D M E M 対照では、それぞれ 50.7% および 22.4% のみが、E S 細胞由来であった。

10

【0101】

別の実験では、E S 細胞を、高塩かつ低炭酸塩の培地（D M E M - H S / V L C : 6.4 m g / m L N a C l、1.5 m g / m L N a H C O 3、4.5 m g / m L グルコース、294 m O s m / k g）内に維持した。V E L O C I M O U S E（登録商標）方法（上記）によって、前記 E S 細胞を胚に移植すると、E S 細胞由来の得られたすべての F 0 後代の 28.6% は、表現型的に雌の X Y マウスであり；D M E M - L S / L C 対照の 27.8% というレベルに対するわずかな増大であった。興味深いことに、D M E M - H S / V L C 培地内に維持された E S 細胞の移植から得られた F 0 仔の 72.1% が、E S 細胞由来であったのに対し；D M E M - L S / L C および D M E M 対照では、それぞれ 50.7% および 22.4% のみが、E S 細胞由来であった。

20

【0102】

これらの結果は、低塩および / または低炭酸塩が、E S 細胞由来の F 0 後代と F 0 X Y 雌との両方の割合の増大に寄与することを立証する（表 3 を参照のこと）。

30

【0103】

実施例 8：E S 細胞由来の仔および X Y 雌を産生する効率に対する炭酸塩濃度の効果の分析

X Y E S 細胞からの X Y 雌の産生に対する、炭酸塩濃度の効果を判定するために、E S 細胞を、低塩かつ非常に低い炭酸塩の培地（D M E M - L S / V L C : 5.1 m g / m L N a C l、1.5 m g / m L N a H C O 3、4.5 m g / m L グルコース、261 m O s m / k g）内に維持した。V E L O C I M O U S E（登録商標）方法（上記）によって、前記 E S 細胞を胚に移植すると、E S 細胞由来の得られたすべての F 0 後代の 34% は、表現型的に雌の X Y マウスであり；D M E M - L S / L C 対照の 27.8% というレベルに対するわずかな増大であった。興味深いことに、D M E M - L S / V L C 培地内に維持された E S 細胞の移植から得られた F 0 仔の 87.7% が、E S 細胞由来であったのに対し；D M E M - L S / L C および D M E M 対照では、それぞれ 50.7% および 22.4% のみが、E S 細胞由来であった。

40

【0104】

これらの結果は、低炭酸塩が、E S 細胞由来の F 0 後代と F 0 X Y 雌との両方の割合の増大に寄与することを立証する（表 3 を参照のこと）。

【0105】

実施例 9：F 0 X Y 雌マウスの表現型

F 0 X Y の表現型的に雌のマウスは、同系統の F 1 X X の表現型的に雌のマウスと比較した場合に、比較的正常な表現型的特質を呈していた。しかし、X Y 雌マウスは、各身体的パラメータについて、より広範囲の値を確実に呈していた。成体 X Y 雌の体重は、約 15 グラムから約 30 グラムの範囲であり、平均は約 21.5 グラムであった。成体 X X 雌の体重は、約 16 グラムから約 17 グラムの範囲であり、平均は約 16.8 グラムで

50

あつた。肛門と生殖器の間の距離の比を、体重の比（肛門生殖器間距離（cm）/体重（g））として測定および算出した。この比は、F0 XY 雌については、約0.11cm/gから約0.24cm/gの範囲であり、平均は約0.16cm/gであった。この比は、F1 XX 雌については、約0.17cm/gから約0.19cm/gの範囲であり、平均は0.18cm/gであった。

【0106】

XY 雌マウスと XX 雌マウスについて、様々な臓器（例えば、肝臓、腎臓、心臓および肺、ならびに脾臓）の相対質量間に有意な差はなかった。相対質量は、臓器質量（mg）/体重（g）として表される。F0 X0 雌の肝臓の相対質量は、約35mg/gから約50mg/gの範囲であり、平均は約42mg/gであった。F1 XX 雌の肝臓の相対質量は、約37.5mg/gから約46.9mg/gの範囲であり、平均は約42.5mg/gであった。F0 X0 雌の腎臓の相対質量は、約11.5mg/gから約15mg/gの範囲であり、平均は約13.4mg/gであった。F1 XX 雌の腎臓の相対質量は、約12.6mg/gから約13.8mg/gの範囲であり、平均は約13.7mg/gであった。F0 X0 雌の心臓と肺の合計相対質量は、約14.3mg/gから約18.9mg/gの範囲であり、平均は約16.1mg/gであった。F1 XX 雌の心臓と肺の合計相対質量は、約14.7mg/gから約16.1mg/gの範囲であり、平均は約15.9mg/gであった。F0 X0 雌の脾臓の相対質量は、約2.7mg/gから約6.6mg/gの範囲であり、平均は約3.3mg/gであった。F1 XX 雌の脾臓の相対質量は、約2.7mg/gから約4.0mg/gの範囲であり、平均は約3.8mg/gであった。

【0107】

F0 XY 雌マウスは、同系のF1 XX 雌と比較した場合に、比較的正常な血清濃度の電解質、酵素、グルコース、タンパク質、脂質、および他の徵候を有することが示された。しかし、XY 雌マウスは、それぞれ測定された血清パラメータについて、より広範囲の値を確実に呈していた。成体XY 雌の血清ナトリウム濃度が、約150mEq/Lから約159mEq/Lの範囲であったのに対して；XX 雌の該濃度は、約148mEq/Lから約155mEq/Lの範囲であった。

【0108】

成体XY 雌の血清カリウム濃度が、約0.7mEq/Lから約7mEq/Lの範囲であったのに対して；XX 雌の該濃度は、約0.7mEq/Lであった。

【0109】

成体XY 雌の血清塩化物濃度が、約111mEq/Lから約121mEq/Lの範囲であったのに対して；XX 雌の該濃度は、約113mEq/Lから約120mEq/Lであった。

【0110】

成体XY 雌の血清カルシウム濃度が、約7mEq/Lから約9mEq/Lの範囲であったのに対して；XX 雌の該濃度は、約7mEq/Lであった。

【0111】

成体XY 雌の血清アルカリホスファターゼ濃度が、約124U/Lから約285U/Lの範囲であったのに対して；XX 雌の該濃度は、約191U/Lから約236U/Lの範囲であった。

【0112】

成体XY 雌の血清アラニンアミノトランスフェラーゼ濃度が、約21U/Lから約285U/Lであったのに対して、XX 雌の該濃度は、約13U/Lから約34U/Lの範囲であった。

【0113】

成体XY 雌の血清アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ濃度が、約42U/Lから約190U/Lの範囲であったのに対して；XX 雌の該濃度は、約42U/Lから約269U/Lの範囲であった。

10

20

30

40

50

【0114】

成体XY雌の血清リパーゼ濃度が、約16U/Lから約49U/Lの範囲であったのに対しても；XX雌の該濃度は、約21U/Lから約26U/Lの範囲であった。

【0115】

成体XY雌の血清グルコース濃度が、約227mg/dLから約319mg/dLの範囲であったのに対して；XX雌の該濃度は、約255mg/dLから約270mg/dLの範囲であった。

【0116】

成体XY雌の血清総タンパク質濃度が、約4.6mg/dLから約5.2mg/dLの範囲であったのに対して；XX雌の該濃度は、約4.6mg/dLから約4.8mg/dLの範囲であった。10

【0117】

成体XY雌の血清アルブミン濃度が、約3mg/dLから約3.5mg/dLの範囲であったのに対して；XX雌の該濃度は、約3.1mg/dLから約3.2mg/dLの範囲であった。

【0118】

成体XY雌の血清コレステロール（総）濃度が、約58mg/dLから約108mg/dLの範囲であったのに対して；XX雌の該濃度は、約61mg/dLから約85mg/dLの範囲であった。

【0119】

成体XY雌の血清トリグリセリド濃度が、約42mg/dLから約89mg/dLの範囲であったのに対して；XX雌の該濃度は、約39mg/dLから約48mg/dLの範囲であった。20

【0120】

成体XY雌の血清HDL濃度が、約29mg/dLから約57mg/dLの範囲であったのに対して；XX雌の該濃度は、約23mg/dLから約42mg/dLの範囲であった。

【0121】

成体XY雌の血清LDL濃度が、約3.7mg/dLから約11mg/dLの範囲であったのに対して；XX雌の該濃度は、約3.7mg/dLから約13mg/dLであった。30

【0122】

成体XY雌の血中尿素窒素（BUN）濃度が、約12mg/dLから約27mg/dLの範囲であったのに対して；XX雌の該濃度は、約18mg/dLから約21mg/dLの範囲であった。

【0123】

成体XY雌の血清マグネシウム濃度が、約1.6mg/dLから約3.2mg/dLの範囲であったのに対して；XX雌の該濃度は、約2.1mg/dLであった。

【0124】

成体XY雌の血清無機リン酸塩濃度が、約5.1mg/dLから約10mg/dLの範囲であったのに対して；XX雌の該濃度は、約7.2mg/dLから約8.4mg/dLの範囲であった。40

【0125】

成体XY雌の血清尿酸濃度が、約0.9mg/dLから約3.5mg/dLの範囲であったのに対して；XX雌の該濃度は、約0.7mg/dLから約2.2mg/dLの範囲であった。

【0126】

実施例10：F1世代におけるホモ接合性の遺伝子改変されたマウスの生成
遺伝子改変についてホモ接合性のF1マウスが作製された可能性があるかどうかを判定するに、STEP2遺伝子の、少なくとも1つのノックアウトされた対立遺伝子を50

含有する F0 XY 雄マウスを、同じ STEAP2 遺伝子ノックアウトを含有する XY 雄の同齢集団と交配した。この STEAP2 (前立腺の 6 回膜貫通上皮抗原 2 (Six transmembrane epithelial antigen of prostate 2)) 遺伝子は、三価鉄還元酵素および銅還元酵素活性を有する推定上の 6 膜金属還元酵素 (6 membrane metallo-reductase) をコードし、また、in vitro での鉄と銅両方の細胞取り込みを刺激することが示されている。細胞表面抗原として、STEAP2 は、前立腺癌における診断または治療の潜在的な標的である。STEAP2 は、未処置の原発性前立腺癌種とホルモン不応性前立腺癌腫との両方において良性前立腺肥大症よりも、有意に上昇し、これは、STEAP2 が、前立腺癌の発生に関与することを示唆していた。STEAP2 KO マウスは、報告されていない。O h g a m i ら、BLOOD、vol. 108 (4) : 1388 ~ 1394、2006 を参照のこと。結果を、表 4 に示す。

10

20

30

表4: F0 XY雄×F0 XY雌から得られるSTEAP2 F1同齢集団の遺伝子型

性別表現型	性染色体(数／%)	STEAP2遺伝子型(数／%)		
		Wt/wt	Wt/KO	KO/KO
雌	XX (7/15%)	2/4.3%	3/6.4%	2/4.3%
	XO (4/8.5%)	1/2.1%	1/2.1%	2/4.3%
	XY (0/0%)	0/0%	0/0%	0/0%
雄	XY (17/36%)	6/12.8%	6/12.8%	5/10.6%
	XXY (8/17%)	3/6.4%	3/6.4%	2/4.3%
	XYY (11/23.5%)	3/6.4%	3/6.4%	5/10.6%

【図 1】

XY ES細胞クローンから得られる表現型的に雌のF0世代マウスの繁殖性分析						
クローン	遺伝子型	交配するためのF0準備数	同腹仔を有するF0(%)	同腹仔(数)	仔全体(数)	同腹仔あたりの仔数
830a-H1	XY	2	1	50	3	11
829a-E2	XY	1	0	0	0	—
5339a-A5	XY	2	2	100	8	55
5319a-D1	XY	1	1	100	8	48
5311b-D1	XY	4	1	25	4	37
5310a-D4	XY	1	1	100	6	32
5310a-B1	XY	6	6	100	34	188
5310a-A6	XY	2	2	100	11	75
5137b-E1	XY	2	2	100	12	74
294d-A5	XY	1	0	0	0	—
1553a-A10	XY	2	0	0	0	—
1533b-A2	XY	2	1	50	2	16
13304a-D5	XY	1	1	100	2	15
1313h-F3	XY	2	1	50	1	2
12221b-B3	XY	1	1	100	1	10
11465d-G1	XY	1	1	100	6	49
834a-D1	XY	2	0	0	0	—
まとめ		33(Σ)	21(Σ)	63%	98(Σ)	592(Σ)
						6(平均)

FIG. 1

【図 2】

XY ES細胞から、F0世代におけるXY雌の形成に対するD MEMおよび低塩D MEMの効果						
ESクローニング	培地	XY雌のV/M(数)	生まれた仔(数)	雌のV/M(数)	雌のV/M(数)	XY遺伝子型判定
1 d-G4	低塩D MEM	50	19	8	4	すべての雌はXYである
2 d-A1	低塩D MEM	50	5	0	0	すべての雌はXYである
3 e-C2	低塩D MEM	50	4	3	1	すべての雌はXYである
4 e-D1	低塩D MEM	50	22	12	2	すべての雌はXYである
5 e-H2	低塩D MEM	50	14	10	0	—
6 e-H3	低塩D MEM	50	11	6	0	—
	合計	300	75	39	7	すべての雌はXYである
8 d-C6	低塩D MEM+1.0% F/S	50	14	2	5	すべての雌はXYである
9 d-A5	低塩D MEM+1.0% F/S	50	26	7	7	すべての雌はXYである
10 e-B6	低塩D MEM+1.0% F/S	50	18	8	5	すべての雌はXYである
11 e-A5	低塩D MEM+1.0% F/S	50	18	13	3	すべての雌はXYである
12 e-C6	低塩D MEM+1.0% F/S	50	19	11	3	—
13 e-F5	低塩D MEM+1.0% F/S	50	19	13	5	すべての雌はXYである
	合計	300	114	54	28	すべての雌はXYである
15 d-H9	低塩D MEM+NaCl+NaHCO ₃	50	30	9	0	—
16 d-C10	低塩D MEM+NaCl+NaHCO ₃	50	14	4	0	—
17 e-A9	低塩D MEM+NaCl+NaHCO ₃	50	3	0	0	—
18 e-G8	低塩D MEM+NaCl+NaHCO ₃	50	22	3	0	—
19 e-H9	低塩D MEM+NaCl+NaHCO ₃	50	2	0	0	—
	合計	250	71	16	0	—

FIG. 2

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/039997

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A01K67/027 C12N9/02 C12N15/873
ADD.

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)
A01K C12N

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

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LI J ET AL: "Non-equivalence of cloned and clonal mice", CURRENT BIOLOGY, CURRENT SCIENCE, GB, vol. 15, no. 18, 20 September 2005 (2005-09-20), pages R756-R757, XP025346605, ISSN: 0960-9822, DOI: 10.1016/J.CUB.2005.09.010 [retrieved on 2005-09-20] page R756 ----- -/-	1-4, 15-20

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 document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

25 August 2011

06/09/2011

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Brero, Alessandro

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2011/039997

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>BRONSON S K ET AL: "High incidence of XXY and XYY males among the offspring of female chimeras from embryonic stem cells.", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA 11 APR 1995 LNKD- PUBMED:7724525, vol. 92, no. 8, 11 April 1995 (1995-04-11), pages 3120-3123, XP000002657450, ISSN: 0027-8424 abstract page 3120</p> <p>-----</p> <p>DECHIARA T M ET AL: "VelociMouse: Fully ES Cell-Derived F0-Generation Mice Obtained from the Injection of ES Cells into Eight-Cell-Stage Embryos", METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, HUMANA PRESS INC, NJ, US, vol. 530, 1 January 2009 (2009-01-01), pages 311-324, XP008113126, ISSN: 1064-3745, DOI: 10.1007/978-1-59745-471-1_16 the whole document</p> <p>-----</p> <p>POUEYMIROU WILLIAM T ET AL: "F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 25, no. 1, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 91-99, XP002464122, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT1263 cited in the application the whole document</p> <p>-----</p>	1-20
A		1-20
A		1-20

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(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,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,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

(72)発明者 オーバック， ウィジテク

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー
ロード 777

(72)発明者 デチアラ， トーマス

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー
ロード 777

(72)発明者 ポエミロウ， ウィリアム

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー
ロード 777

(72)発明者 フレンドウェイ， ディビッド

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー
ロード 777

(72)発明者 バレンズエラ， ディビッド

アメリカ合衆国 ニューヨーク 10591, タリータウン, オールド ソー ミル リバー
ロード 777

F ターム(参考) 4B024 AA10 AA20 CA01 CA09 CA11 GA11 HA01 HA11
4B065 AA90X AA90Y AB01 AC20 BA01 CA60