

(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
2012年3月8日(08.03.2012)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/029784 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 5/0735 (2010.01)
A01K 67/027 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/069612
- (22) 国際出願日: 2011年8月30日(30.08.2011)
- (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 2010-194910 2010年8月31日(31.08.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人熊本大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KUMAMOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8608555 熊本県熊本市黒髪2丁目3番1号 Kumamoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 荒木 正健 (ARAKI Masatake) [JP/JP]; 〒8600811 熊本県熊本市本荘2丁目2番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP). 荒木 喜美 (ARAKI Kimi) [JP/JP]; 〒8600811 熊本県熊本市本荘2丁目2番1号 国立大学法人熊本大学内 Kumamoto (JP).
- (74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号 福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (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, 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, QA, 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.
- (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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
- 国際調査報告 (条約第21条(3))
 - 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示 (規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii))

(54) Title: METHOD OF ESTABLISHING MOUSE STRAIN

(54) 発明の名称: マウス系統を樹立する方法

(57) Abstract: A method of producing a chimera animal, characterized by transplanting, into a host animal, an aggregate of a first pluripotent stem cell that is of interest to strain establishment, a second pluripotent stem cell in which the ability to form germ cells is absent or decreased, and embryo.

(57) 要約: 系統樹立の目的となる第一の多能性幹細胞と、生殖細胞形成能が欠如又は低下した第二の多能性幹細胞と、胚との集合体を宿主動物に移植することを特徴とするキメラ動物の作製方法。



WO 2012/029784 A1

明 細 書

発明の名称： マウス系統を樹立する方法

技術分野

[0001] 本発明は、多能性幹細胞から効率良くマウス系統を樹立する方法に関する。

背景技術

[0002] 通常、ES細胞からキメラマウスを作製する場合、目的とするES細胞と正常マウス胚、つまり2種類の細胞を混ぜることで、個体発生を可能にすることが出来る。そして、ES細胞を用いて種々のキメラ動物を作製する試みがなされている（特許文献1、2）。

しかしながら、ES細胞の性質によっては、ES細胞の混合割合（キメラ率）の高いキメラ胚において、個体発生が正常に進まず、出生前に死んでしまうことがある。他方、キメラ率の高いキメラは生まれるが、精子形成能に異常が有り、マウス系統を樹立できないES細胞も存在する。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：米国特許出願公開第2005/0125853号明細書

特許文献2：国際公開第2006/009297号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明は、多能性幹細胞から効率良くマウスなどの動物系統を樹立する方法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

[0005] 本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、目的の遺伝子が改変された多能性幹細胞を、精子形成能が低下又は欠如した多能性幹細胞とともに胚と混合し、その混合胚を仮親に移植することにより目的のマウス系統を効率良く樹立することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、系統樹立の目的となる第一の多能性幹細胞と、生殖細胞形成能が欠如又は低下した第二の多能性幹細胞と、胚との集合体を宿主動物に移植することを特徴とするキメラ動物の作製方法である。

多能性幹細胞としては、例えばES細胞又はiPS細胞が挙げられる。また、本発明の一つの態様において、生殖細胞形成能は、例えば精子形成能である。

移植の宿主動物としては、特に限定されるものではないが、マウスを例示することができる。

[0006] 本発明において、第二の多能性幹細胞は、受託番号がNITE BP-973、受領番号がNITE ABP-1135、又は受領番号がNITE ABP-1136で示される細胞を使用することができる。また、好ましい態様において、第二の多能性幹細胞はエピジェネティックな性質を有するものである。

また、本発明は、生殖細胞形成能が欠如又は低下した多能性幹細胞からなる、系統樹立の目的となる多能性幹細胞の系統樹立効率を高めることができるヘルパー細胞である。このようなヘルパー細胞としては、例えば受託番号がNITE BP-973、受領番号がNITE ABP-1135、又は受領番号がNITE ABP-1136で示されるものが挙げられる。

発明の効果

[0007] 本発明により、多能性幹細胞から効率良くマウス系統を樹立する方法が提供される。本発明の方法は、精子形成能に異常のない目的とするES細胞由来の仔を効率良く得ることができる。

発明を実施するための形態

[0008] 以下、本発明を詳細に説明する。

1. 概要

本発明は、系統樹立の目的となる第一の多能性幹細胞と、生殖細胞形成能が欠如又は低下した第二の多能性幹細胞（ヘルパー細胞）と、胚との集合体を宿主動物に移植することを特徴とするキメラ動物の作製方法であり、ヘルパー細胞を使用することにより多能性幹細胞から効率良く動物系統を樹立することができるものである。

ES細胞単独ではキメラ率の高い動物（例えばキメラマウス）を得ることが出来ないことが多いが、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞と、精子形成能力が無い、あるいは精子形成能力が低いES細胞（ヘルパーES細胞）とを胚に混ぜて宿主動物に移植することにより、効率良くキメラ動物を樹立することができる。

本発明の方法は、系統樹立の目的の多能性幹細胞と、ヘルパー細胞と、正常胚の3種類の細胞を混ぜてキメラ動物（例えばキメラマウス）を作製する方法である。ヘルパー細胞の寄与により、個体発生は正常に進み、キメラ率の高いキメラ胚を得ることが出来る。そして、このキメラマウス（オス）を正常メスマウスと交配することにより、精子形成能に異常の無い目的とするES細胞由来の仔を効率良く得ることが出来、マウス系統を樹立できる。

[0009] 2. 第一の多能性幹細胞

本発明において使用される第一の多能性幹細胞は、キメラ動物を作製する際に胚の中に注入される細胞であり、系統樹立の目的となる細胞である。「系統樹立」とは、細胞が生殖系列（germline）に入って動物の形質が次世代に引き継がれるようになることを意味する。

第一の多能性幹細胞の種類は特に限定されるものではなく、例えば、正常胚性幹細胞（ES細胞）、iPS細胞、遺伝子が改変された細胞などが挙げられる。

ES細胞として、TT2細胞、AB-1細胞、J1細胞、R1細胞などを適宜選択して使用することができるが、本発明においては、これらのES細胞に、さらに改良を加えたものを用いることもできる。例えば、TT2 ES細胞を、フィーダー細胞が無くても維持できるように改良した細胞（KTPU10 ES細胞、KTPU8 ES細胞など）が挙げられる。

[0010] iPS細胞（induced pluripotent stem cells）は、人工多能性幹細胞又は誘導多能性幹細胞と呼ばれており、線維芽細胞などの体細胞へ数種類の転写因子遺伝子を導入することにより、ES細胞と同等の分化多能性を獲得した細胞である。

マウスのiPS細胞は、マウス線維芽細胞にOct3/4、Sox2、c-Myc及びKlf4の4つの遺伝子を導入することにより樹立されたものであり（Takahashi K. et al., Cell 126 : 663-676, 2006）、ヒトのiPS細胞も樹立されている（Takahashi K. et al., Cell 131, 861-872, 2007）。

[0011] また、所定の目的遺伝子の機能が野生型と比較して低下するように、又は当該目的遺伝子がノックアウトされるように操作（ターゲティング）された細胞も、本発明の系統樹立の目的となる多能性幹細胞として使用することができる。目的遺伝子を改変する（遺伝子をターゲティングする）には、通常のノックアウト手法、遺伝子トラップ法などを採用することができる。遺伝子トラップ法とは、トラップベクターを多能性幹細胞に導入すると、ランダムに動物の内在性遺伝子に組込まれることを利用するものであり、トラップベクターがゲノム上の特定の遺伝子に入り込んで、当該特定の遺伝子を捕まえる手法である（例えば、Araki K. et al., Cellular and Molecular Biology 45(5), 737-750, 1999を参照）。

[0012] 3. 第二の多能性幹細胞

第二の多能性幹細胞は、生殖能が無い、あるいは野生型と比較して生殖能が低い多能性幹細胞であり、上記第一の多能性幹細胞とミックスして胚と集合体を形成させるものである。第一の多能性幹細胞単独では系統樹立効率の高いキメラ動物を得ることが困難である場合でも、第二の多能性幹細胞を導入することで、第一の多能性幹細胞の系統樹立効率を高くすることができる。従って、第二の多能性幹細胞を「ヘルパー細胞」（ES細胞を使用したときは「ヘルパーES細胞」）という。

[0013] ヘルパー細胞は、生殖能が無い又は低い性質を有する限り限定されるものではない。本発明においては、精子形成能力が無いもの又は精子形成能力が低いものであることが好ましい。ヘルパー細胞の種類は第一の多能性幹細胞と同様にES細胞、iPS細胞などの多能性幹細胞である。

ヘルパーES細胞として、Ayu21-16 ES 細胞株、Ayu21-16EG4 ES 細胞株、あるいはCTB28 ES細胞株を使用することができる。Ayu21-16 ES細胞は、一般的

にノックアウトマウス作製によく用いられているTT2 ES細胞 (Yagi T. et al., Anal. Biochem., 214, 70-76, 1993) をフィーダー細胞が無くても維持できるように改良したKTPU10 ES細胞に、可変型遺伝子トラップベクターを導入して得られたトラップクローンのひとつであり、マウス染色体9番上にあるheat shock protein 8 (Hspa8)という遺伝子をトラップしている。

[0014] Ayu21-16 ES細胞は、「Ayu21-16」と称し、2010年8月25日付（受領日）で、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 N I T E バイオテクノロジー本部 特許微生物寄託センター）にブダペスト条約に基づき国際寄託した。その受託番号は、「NITE BP-973」である（原寄託日：2010年8月25日）。

Ayu21-16 ES細胞の詳細情報はデータベースEGTC [<http://egtc.jp>] で公開しており、一部抜粋して列記する。

[0015] <Ayu21-16>

DDBJ/GenBank/EMBL Accession Number ; AB187233

Gene Name ; heat shock protein 8

Gene Symbol ; Hspa8

Genomic Location ; chr9:40,609,200-40,613,500

Synonyms ; Hspa10, Hsc73, Hsc70, Hsc71, 70kDa, Hsp73

NCBI Gene ID ; 15481

MGI ID ; 105384

IGTC ID ; 12489

KEGG Pathway ; mmu03040 Spliceosome

mmu04010 MAPK signaling pathway

mmu04144 Endocytosis

mmu04612 Antigen processing and presentation

CARD ID ; 687

[0016] また、本発明においては、上記Ayu21-16ES 細胞株にレポーター遺伝子を導入した細胞株、あるいは、Ayu21-16ES 細胞株に含まれるレポーター遺伝子を

他のレポーター遺伝子に入れ替えた細胞株をヘルパー細胞として使用することができる。例えば、Ayu21-16ES 細胞株のトラップベクター内にあるレポーター遺伝子 β -geo を、別のレポーター遺伝子であるEGFP遺伝子に置換した細胞株（「Ayu21-16EG4ES」という）を用いることができる。

導入する遺伝子は上記レポーター遺伝子に限定されるものではなく、RFP遺伝子、DsRed遺伝子などを導入することができる。これにより、蛍光を指標として他の細胞と区別することができる。

[0017] Ayu21-16 EG4 ES細胞は、「Ayu21-16EG4」と称し、2011年8月25日付（受領日）で、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 N I T E バイオテクノロジー本部 特許微生物寄託センター）にブダペスト条約に基づき国際寄託した。その受領番号（受領書に記載）は、「NITE ABP-1135」である。

[0018] また、CTB28 ES細胞はTT2 ES細胞（Yagi T. et al., Anal. Biochem., 214, 70-76, 1993）をフィーダー細胞が無くても維持できるように改良したKTPU 8 ES細胞に、所定遺伝子がノックアウトされるようにターゲティングベクターを導入して得ることができる。

CTB28 ES細胞は、「CTB28」と称し、2011年8月25日付（受領日）で、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター（〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 N I T E バイオテクノロジー本部 特許微生物寄託センター）にブダペスト条約に基づき国際寄託した。その受領番号（受領書に記載）は、「NITE ABP-1136」である。

[0019] 本発明の第二の多能性幹細胞、特にヘルパーES細胞はエピジェネティックな性質を有するヘルパー細胞である。

ここで、「エピジェネティック」とは、DNAの塩基配列の変化を伴わず、遺伝子の発現を活性化又は不活性化する修飾を意味し、ゲノム自身の変異以外のメカニズムで遺伝子の発現に影響を与える現象である。このような修飾として、一般には、例えばDNAのメチル化、ヒストンのアセチル化又はメチル化、あるいはリン酸化などが挙げられる。本発明においては、生殖細胞形成能

が欠如または低下しているという第二の多能性幹細胞の特徴は、エピジェネティックな性質に由来するものであり、次世代以降に受け継がれないものである。

[0020] 4. キメラ動物の作製

キメラ動物の作製は標準的な方法で行うことができる。本発明において使用される動物の種類は非ヒト哺乳動物であり、特に限定されるものではない。例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスターなどのげっ歯類動物、ウサギ、イヌ、ネコ、サル等の実験動物、あるいはヒツジ、ヤギ、ブタ、ウマ、ウシ等の家畜が用いられる。本発明においては、取り扱いが容易で繁殖もしやすい点でマウス又はラットが好ましい。

以下、説明の便宜上、マウスを例に説明する。

系統樹立の目的となる多能性幹細胞（ES細胞、iPS細胞等）及びヘルパー細胞を、胚内に入れる。この細胞移植胚を偽妊娠仮親の子宮内に移植して出産させることによりキメラマウスを作製する。

ここで、「胚」とは、個体発生における受精から出生までの段階の個体を意味し、2細胞期胚、4細胞期胚、8細胞期胚、桑実期胚、胚盤胞などを包含する。

[0021] 多能性幹細胞を胚内に入れて集合体を作製する方法として、マイクロインジェクション法、凝集法などの公知手法を用いることができる。「集合体」とは、第一及び第二の多能性幹細胞並びに胚が同一空間内に集まって形成する集合体を意味し、第一及び第二の多能性幹細胞が胚に注入された形態、胚を個々の細胞にばらして、第一及び第二の多能性幹細胞とともに凝集する形態のいずれをも意味する。

キメラ胚の作製は、まず、ホルモン剤により過排卵処理を施した雌マウスを、雄マウスと交配させる。その後、8細胞期胚を用いる場合には受精から2.5日目に、胚盤胞を用いる場合には受精から3.5日目に、それぞれ卵管又は子宮から初期発生胚を回収する。回収した胚に、第一の多能性幹細胞（系統樹立の目的細胞）及び第二の多能性幹細胞（ヘルパー細胞）を注入し、キメラ

胚を作製する。第一の多能性幹細胞と第二の多能性幹細胞の混合比率は、1 : 9 ~ 9 : 1 であり、好ましくは1 : 1 である。

[0022] マイクロインジェクション法を採用する場合は、回収した胚に、第一及び第二の多能性幹細胞を注入して細胞の集合体を作製する。

また、凝集法を採用する場合は、第一及び第二の多能性幹細胞をミックスして、透明帯を除去した正常胚にふりかけて凝集させればよい。

一方、仮親にするための偽妊娠雌マウスは、正常性周期の雌マウスを、精管結紮などにより去勢した雄マウスと交配することにより得ることができる。作出した偽妊娠マウスに対して、上述の方法により作製したキメラ胚を子宮内移植し、その後出産させることによりキメラマウスを作製することができる。

このようなキメラマウスの中から、多能性幹細胞移植胚由来の雄マウスを選択する。選択した雄のキメラマウスが成熟した後、このマウスを純系マウス系統の雌マウスと交配させる。そして、誕生した子マウスに、第一の多能性幹細胞に由来するマウスの被毛色が現れることにより、多能性幹細胞がキメラマウスの生殖系列へ導入されたことを確認することができる。

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例 1

[0023] Ayu21-16 ES細胞 (NITE BP-973) は、得られるキメラマウスが100%キメラ (ES細胞の寄与率がほぼ100%であると毛色から判断されるマウス) である確率が高く、かつ生まれるキメラマウスの匹数も多い。しかし得られたキメラマウスのオスにおいて、交配時 (生後8週以降) までに精巢の萎縮等による精子形成不全が見られ、仔 (F1) が得にくいという特徴がある。偶然得ることができたF1マウスにおいては精子形成異常が観察されず、特に問題なくマウスラインを樹立することができた (CARD R-BASEにも寄託済み)。

従って、キメラマウスオスにおいて観察される精子形成不全は、ノックアウトされた遺伝子 (Hspa8) の影響ではなく、このES細胞に特有な性質 (エ

ピジェネティックな性質)と考えられる。

このAyu21-16 ES細胞のトラップベクター内にあるレポーター遺伝子： β -geoを、別のレポーター遺伝子であるEGFP遺伝子に置換し、これをAyu21-16EG4 ES 細胞株（ヘルパーES細胞株）とした。なお、レポーター遺伝子の置換は、可変型遺伝子トラップ法の特徴を生かして、公開している方法で行った（例えば、Taniwaki T. et al., Dev. Growth Differ., 47, 163-172, 2005を参照）。

[0024] このES細胞及びその分化した細胞は、レポータータンパク質GFP(green fluorescence protein)を発現するため、紫外線を照射すると緑色の蛍光を発し、蛍光顕微鏡下でそれ以外の細胞から容易に識別することが出来る。

通常の方法でキメラ率の高いキメラマウスを得ることが出来ず、系統を樹立する事ができなかったES細胞株と、Ayu21-16EG4 ES 細胞株（ヘルパーES細胞）とを混合してキメラマウスを作製した。また、オスのキメラマウスを正常メスマウスと交配させ、目的とするES細胞由来の精子が受精して仔が得られたかどうか、すなわちキメラマウスにおいて目的とするES細胞が生殖系列(Germline)に入ったかどうかを検討し、その成績を表1に示した。

異なる10系統のES細胞株について実験を行ない、6系統(60%)において目的とするES細胞由来のF1マウスを得ることが出来た(表1)。

[0025] [表1]

No.	ES細胞の名称	Germline 状況	
		単一ライン	Ayu21-16EG4混合ライン
1	Ayu21-W181	×	×
2	Ayu21-W143	×	○
3	Ayu21-B196	×	○
4	Ayu21-T256	×	×
5	Ayu21-W45	×	×
6	mRBP4-19	×	○
7	Girk2CKO	×	×
8	Ayu21-T191	×	○
9	Ayu21-T346	×	○
10	Ayu21-T343	×	○

[0026] Ayu21-B196について、その詳細な実験データを記載する。

Ayu21-B196 ES細胞は、TT2 ES細胞をフィーダーフリー化したKTPU8 ES細胞に、可変型遺伝子トラップベクターpU-21Bを導入して得られたトラップクローンのひとつである。

Ayu21-B196 ES細胞は、マウス染色体6番上にあるadiponectin receptor 2 (Adipor2)という遺伝子をトラップしている。その詳しい情報についてもEGT Cで公開しているが、一部抜粋して列記する。

[0027] <Ayu21-B196>

DDBJ/GenBank/EMBL Accession Number ; AB299416

Gene Name ; adiponectin receptor 2

Gene Symbol ; Adipor2

Genomic Location ; chr6:119,302,000-119,370,000

Synonyms ; D6Ucla1e

NCBI Gene ID ; 68465

MGI ID ; 93830

IGTC ID ; 287

KEGG Pathway ; mmu04920 Adipocytokine signaling pathway

CARD ID ; 1437

[0028] このAyu21-B196 ES細胞を用いて、まず通常の方法でキメラマウスの作製を試みた。過排卵処理後、オスマウスと交配しプラグが得られたICRメスマウスを購入し、卵管灌流により2細胞期胚を回収した。KSOM培地を用いて一晚培養し、4細胞期胚または桑実胚まで発生が進んだ正常胚を用いてアグリゲーション法によりキメラマウス作製を行なった。

正常胚の透明帯を除去した後、胚1個に対して数十個のAyu21-B196 ES細胞を振りかけて凝集させ、一晚培養して融合した胚145個を、仮親（偽妊娠状態にしたICRメスマウス）5匹に移植した。17日後帝王切開を行なったが、発生途中で死亡した胚ばかりで、生きているキメラマウスを得ることは出来なかつ

た。

[0029] そこで本発明の方法を用いてキメラマウス作製を試みた。通常の方法と同様に、過排卵処理後、オスマウスと交配しプラグが得られたICRメスマウスを購入し、卵管灌流により2細胞期胚を回収した。KSOM培地を用いて一晚培養し、4細胞期胚または桑実胚まで発生が進んだ正常胚を用いてアグリゲーション法によりキメラマウス作製を行なった。

Ayu21-B196 ES細胞とヘルパーES細胞（Ayu21-16EG4 ES細胞株）とをミックスし、透明帯を除去した正常胚に振りかけて凝集させ、一晚培養して融合した胚125個を、仮親5匹に移植した。

17日後仮親3匹は自然分娩しており、合計10匹の仔が生まれ、そのうち8匹は黒目で2匹が白目であった。残り2匹の仮親について帝王切開を行なったが、生きている仔はいなかった。毛色から判断した100%キメラオスマウスが3匹得られたので、B6メスマウスと交配し、その仔（F1）の遺伝型を調べたところ、レポーター遺伝子geoを持っているマウス、即ちAyu21-B196 ES細胞由来のマウスがいることを確認した。つまり、通常の方法ではキメラマウスさえ生まれなかったAyu21-B196 ES細胞に関して、ヘルパーES細胞を使用することにより、100%キメラマウスを得ることが出来、生殖系列に入ることを確認した。

[0030] 本発明の方法を用いることにより、単独ではマウスラインを樹立することが出来なかった10系統のES細胞に関して、6系統のマウスラインを樹立することが出来た。

精子形成に重要な働きをしている遺伝子は、Ar (androgen receptor), Kit (kit oncogene), Tex11 (testis expressed gene 11)など多数報告されている。ジャクソン研究所が公開しているデータベースMGI (Mouse Genome Informatics)には、様々なマウスの表現型を集めたMammalian Phenotype Ontology Annotationsというデータベースが含まれている。その中には、「arrest of spermatogenesis」（精子形成不全）という表現型を示すマウスライン（200系統）が示されている。そのリストは、ウェブサイトから容易に入手するこ

とができる<http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=mpAnnotSummary&id=MP:0001155>) 。

今後、このような精子形成に重要な遺伝子をノックアウトしたES細胞をヘルパーES細胞として利用することにより、さらに好成績を収めることも出来る。

実施例 2

[0031] 実施例 1 と同様に、通常の方法でキメラ率の高いキメラマウスを得ることが出来ず、系統を樹立する事ができなかったES細胞株と、CTB28 ES 細胞株（ヘルパーES細胞、NITE ABP-1136）とを混合してキメラマウスを作製した。また、オスのキメラマウスを正常メスマウスと交配させ、目的とするES細胞由来の精子が受精して仔が得られたかどうか、すなわちキメラマウスにおいて目的とするES細胞が生殖系列（Germline）に入ったかどうかを検討し、その成績を表 2 に示した。

異なる 3 系統のES細胞株について実験を行ない、全ての系統（100%）において目的とするES細胞由来のF1マウスを得ることが出来た（表 2）。

[0032] [表2]

No.	ES細胞の名称	Germline 状況	
		単一ライン	CTB28混合ライン
1	Ayu21-W52	×	○
2	Ayu21-W234	×	○
3	Ayu21-W321	×	○

産業上の利用可能性

[0033] 本発明の方法は、多能性幹細胞から効率良くマウス系統を樹立することができる点で有用である。

請求の範囲

- [請求項1] 系統樹立の目的となる第一の多能性幹細胞と、生殖細胞形成能が欠如又は低下した第二の多能性幹細胞と、胚との集合体を宿主動物に移植することを特徴とするキメラ動物の作製方法。
- [請求項2] 多能性幹細胞がES細胞又はiPS細胞である請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 生殖細胞形成能が精子形成能である請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 宿主動物がマウスである請求項1に記載の方法。
- [請求項5] 第二の多能性幹細胞が、受託番号がNITE BP-973、受領番号がNITE ABP-1135、又は受領番号がNITE ABP-1136で示される細胞である請求項1に記載の方法。
- [請求項6] 生殖細胞形成能が欠如又は低下した多能性幹細胞からなる、系統樹立の目的となる多能性幹細胞の系統樹立効率を高めることができるヘルパー細胞。
- [請求項7] 受託番号がNITE BP-973、受領番号がNITE ABP-1135、又は受領番号がNITE ABP-1136で示される細胞からなる、系統樹立の目的となる多能性幹細胞の系統樹立効率を高めることができるヘルパー細胞。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/069612

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, C12N5/0735(2010.01)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)

C12N15/09, A01K67/027, C12N5/0735

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/009297 A1 (Yasumitsu NAGAO), 26 January 2006 (26.01.2006), claims 12, 17 to 21, 32 to 35; page 25, lines 6 to 10 & US 2007/0250943 A1 & EP 1779724 A1	1-7
X	WO 2004/092357 A1 (Shadan Hojin Shirankai), 28 October 2004 (28.10.2004), page 2, lines 18 to 23 & JP 4226598 B & US 2006/0265774 A1 & EP 1616944 A1 & CA 2522050 A & AU 2004230971 A	6-7

☒ 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
24 November, 2011 (24.11.11)Date of mailing of the international search report
06 December, 2011 (06.12.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/069612

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2004-65040 A (Japan Science and Technology Corp.), 04 March 2004 (04.03.2004), paragraphs [0003], [0029] (Family: none)	6-7
X	TANAKA S. et al., Dullard is required for mouse primordial germ cell formation, Program Abstr Book Annu Meet Jpn Soc Dev Biol, 2010.07.06, Vol.43, p.226	6-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, C12N5/0735(2010.01)i

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 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, A01K67/027, C12N5/0735

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 年

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(JDreamII)

C. 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	WO 2006/009297 A1 (長尾恭光) 2006.01.26, 請求項 1 2, 1 7 ~ 2 1, 3 2 ~ 3 5, 第 2 5 頁 6 ~ 1 0 行, & US 2007/0250943 A1 & EP 1779724 A1	1-7
X	WO 2004/092357 A1 (社団法人芝蘭会) 2004.10.28, 第 2 頁 1 8 ~ 2 3 行, & JP 4226598 B & US 2006/0265774 A1 & EP 1616944 A1 & CA 2522050 A & AU 2004230971 A	6-7

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「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
「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
「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)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「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

「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

「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

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 4 . 1 1 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

0 6 . 1 2 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上 條 肇

4 B

9 4 5 3

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

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 2004-65040 A (科学技術振興事業団) 2004.03.04, 【0003】、【0029】段落 (ファミリーなし)	6-7
X	TANAKA S. et al., Dullard is required for mouse primordial germ cell formation, Program Abstr Book Annu Meet Jpn Soc Dev Biol, 2010.07.06, Vol.43, p.226	6-7