(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
2005 年12 月8 日 (08.12.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/115133 A1

(51) 国際特許分類[7]: A01K 67/027, C12N 5/10, 15/10, 15/11

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/010002

(22) 国際出願日: 2005 年5 月25 日 (25.05.2005)

(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2004-158174 2004 年5 月27 日 (27.05.2004) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人京都大学 (Kyoto University) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町３６番地１ Kyoto (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 篠原 隆司 (SHINOHARA, Takashi) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内 Kyoto (JP). 篠原 美都 (SHINOHARA, Mito) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院医学研究科内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目１番１号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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, 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 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) **Title:** METHOD OF GENE INTRODUCTION IN IN-VIVO SPERMATOGENIC CELL

(54) **発明の名称:** 生体内精子形成細胞への遺伝子導入方法

(57) **Abstract:** A process for producing a nonhuman vertebrate animal retaining germ cells having a target gene introduced therein, characterized in that the target gene is injected in the testis of a nonhuman vertebrate animal in which no tight junction between Sertoli cells is present so as to effect introduction of the target gene in germ cells, thereby obtaining a nonhuman vertebrate animal retaining the germ cells having the target gene introduced therein. In this process, with respect to animal species and lines wherein in-vitro transduction has been difficult as well, individuals retaining germ cells, especially spermatogenic stem cells, having a target gene introduced therein can be obtained with extremely high efficiency. Further, as gene introduction can be attained without the need to reduce the number of spermatogenic stem cells in the testis, the procreative power of male having gene injection can be retained as compared with the in-vitro transduction in germ cells, so that transgenic sperms and transgenic animals can be easily produced.

(57) 要約: 本発明は、目的遺伝子が導入された生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物の製造方法であって、セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない非ヒト脊椎動物の精巣内へ該目的遺伝子を注入することにより該目的遺伝子を生殖細胞へ導入し、該目的遺伝子が導入された該生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物を得ることを特徴とする方法を提供する。本発明の方法を用いれば、これまでインビトロでの形質導入が困難であった動物種や系統においても、目的遺伝子が導入された生殖細胞、特に精原幹細胞を保持する個体を極めて高い効率で得ることが可能である。また、精巣内の精原幹細胞の数を減らすことなく遺伝子導入が達成されるので、インビトロでの生殖細胞への形質導入時と比較して、遺伝子が注入される雄の生殖力が保持され、トランスジェニック精子やトランスジェニック動物を容易に製造することが可能である。

WO 2005/115133 A1

明細書

生体内精子形成細胞への遺伝子導入方法

技術分野

本発明は、目的遺伝子が導入された生殖細胞、特に精原幹細胞を保持する非ヒト脊椎動物の製造方法、該方法により製造された目的遺伝子が導入された生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物、トランスジェニック精子の製造方法、該製造方法により製造されたトランスジェニック精子、トランスジェニック動物の製造方法、該製造方法により製造されたトランスジェニック動物等に関する。

背景技術

生殖細胞は、子孫に親のゲノム情報を伝達する独特の能力を有する。生殖系列の修飾は、過去２０年間、かなりの注目を集めてきた。それは、インビボで遺伝子を操作するストラテジーを提供するからである。その適用は、基礎生物医学研究から農業生産までの範囲にわたる(Manipulating the Mouse Embro, (Cold Spring Harbor Press, New York), pp1-29, 2003)。生殖系列細胞を修飾するための現在の技術は、雌から得られる卵母細胞、卵または初期胚に基づいている。卵培養と移入技術の発展により、雌個体から得られる生殖系列細胞の修飾の基礎が提供された。しかし、該技術は、マウスで最も広範に使用されるが、他の動物種のために雌から得られる生殖細胞を使用する試みは、異なる生殖挙動と、卵の獲得および操作の困難性故に限定されてきた(Reproduction in farm animals, (Lippincott Silliams & Willins, Philadelphia, Pennsylvania), pp1-40, 2000)。注入胚の１％超のトランスジェニック動物を得ることは困難である。従って、広範な適用を有する生殖系列修飾の新規プロトコルを確立する必要性が明白に存在している。

雌性生殖細胞は、出生前に増殖を終えるが、全ての雄性生殖細胞は、自己更新する能力を有する精原幹細胞を起源としている(J. Androl., 21, 776-798, 2000)。これらの細胞は、生涯を通して増殖し続け、精子形成を支持する。限定された寿命を有する分化した生殖細胞とは対照的に、幹細胞に基づいた遺伝子導入は、トランス

フェクトされた幹細胞が、莫大数のトランスジェニック精子を継続的に産生するであろうという点で明白な利点を有する。導入遺伝子を有する単一のラット幹細胞は、約２０００のトランスジェニック精子を産生し得る(Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, (Cache River Press, Clearwater, Florida), pp. 1-40, 1990)。従って、多数のトランスジェニック動物が、初代 (founder) 雄から産生され得る。この目的を達すべく、多くのグループは、インビトロで精原幹細胞へ形質導入することによって、トランスジェニック動物を作出することに成功した。マウスおよびラットからの精原幹細胞が、短期間培養において、レトロウイルスにより形質導入され、精子形成を行うために、不稔レシピエント動物に移植された(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 13090-13095, 2001 ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 14931-14936, 2002)。雌と交配することによって、雌ベースのトランスジェニック方法と同等の効率をもって、レシピエントはトランスジェニック動物を産生した。

この技術は、雄性生殖系列操作の新たな可能性を示したが、幾つかの限界を有する。インビトロ形質導入アプローチの主要な欠点は、精原細胞移植後のレシピエント動物の低生殖率である (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 11298-11302, 1994)。理由の一つは、ドナー細胞の効率的な定着に不可欠な内因性精子形成の除去は、ドナー細胞定着のためのレシピエント精巣の環境にダメージをしばしば与えるということである(Tissue Cell, 31, 461-472, 1999 ; Biol. Reprod., 69, 412-420, 2003;Dev. Biol., 263, 253-263, 2003;Hum. Reprod., 18, 2660-2667, 2003)。更に、幹細胞の最適培養条件が存在しなかったことにより、幹細胞数のかなりの減少が起こり(Biol. Reprod., 67, 874-879, 2002 ; Biol. Reprod., 68, 2207-2214, 2003)、該非存在はまた、低生殖力をもたらす。幹細胞のほんの１０～２０％だけが、１週の間、インビトロで生存する(Biol. Reprod., 67, 874-879, 2002 ; Biol. Reprod., 68, 2207-2214, 2003)。また、同種異系のドナー細胞の拒絶のために(Biol. Reprod., 68, 167-173, 2003 ; Reproduction, 126, 765-774, 2003 ; Biol. Reprod., 69, 1940-1944, 2003)、精原細胞移植の適用は、免疫適合性レシピエントが容易には入手できない他の動物種の大部分においては、尚限定されている。これらの理由のた

めに、精原細胞移植後の生殖力の回復効率は限定され、該効率により、遺伝子導入のための該技術の実際的適用が妨げられている。

精原幹細胞によりトランスジェニック動物を作出するための潜在的に競争力のある代替策は、インビボで幹細胞に遺伝子を導入することである。このアプローチは、幹細胞の移植も培養も必要としないからである。しかし、精原幹細胞のこのような直接的形質導入の試みは、殆ど成功していない(Mol. Reprod. Dev, 233, 45-49, 1997 ; J. Virol., 63, 2134-2142, 1989 ; FEBS Lett., 475, 7-10, 2000 ; FEBS Lett., 487, 248-251, 2000 ; Hum. Gene Ther., 9, 1571-1585, 1998 ; Gene Dev., 1, 366-375, 1987 ; Biochem. Biophys. Res. Commun., 233, 45-49, 1997)。一研究では、導入遺伝子は、インビボエレクトロポレーションによって生殖系列に組み込まれたが、発現は長く続かず、導入遺伝子は、分化した生殖細胞に導入されたことを示唆した(Biol. Reprod., 59, 1439-1444, 1998)。別の研究では、導入遺伝子は、生殖系列に組み込まれず、主にセルトリ細胞で発現することが知見された(Biol. Reprod., 67, 712-717, 2002)。インビボで精原幹細胞をトランスフェクトする困難性は、精巣において幹細胞の数が少ないこと（10^4精巣細胞当たり２～３個の幹細胞）によってのみでは説明できない(Cell and Molecular Bology of the Testis, (Oxford University Press, New York), pp266-295, 1993 ; Mutation Res., 290, 193-200, 1993)。より効率的なウイルスベースのアプローチによっても可能ではなかったからである。成体の精巣の精細管中への種々のタイプのウイルスベクターの微注入によっても、インビボで生殖系列細胞に形質導入することができず(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 7524-7529, 2002 ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 1383-1388, 2002)、動物実験は、このアプローチを用いた生殖系列伝達を示さなかった。幹細胞は、生殖系列ニッシェ（niche）内に保護され、それが、幹細胞への導入遺伝子又はウイルス粒子の接近を阻害していると現在は考えられている(FEBS Lett., 475, 7-10, 2000 ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 7524-7529, 2002)。

上記事情に鑑み、本発明は、雄性の生殖細胞、特に精原幹細胞へ目的遺伝子をより効率よく導入し、目的遺伝子が導入された生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物を高い効率で製造する方法を提供することを目的とする。

発明の開示

上記目的を達成すべく鋭意研究した結果、セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない脊椎動物の精巣に目的遺伝子を注入することにより、極めて効率的に生殖細胞へ該目的遺伝子を導入することができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

即ち、本発明は以下に関する。

（1）目的遺伝子が導入された生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物の製造方法であって、セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない非ヒト脊椎動物の精巣へ該目的遺伝子を注入することにより生殖細胞へ該目的遺伝子を導入し、該生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物を得ることを特徴とする、方法。

（2）該生殖細胞が精原幹細胞である、上記（1）に記載の方法。

（3）該目的遺伝子が注入される該非ヒト脊椎動物が幼若である、上記（1）に記載の方法。

（4）該目的遺伝子を精細管内へ注入する、上記（1）に記載の方法。

（5）該目的遺伝子がベクターに組み込まれている、上記（1）に記載の方法。

（6）該ベクターがウイルスベクターである、上記（5）に記載の方法。

（7）該ウイルスベクターがレトロウイルスベクターである、上記（6）に記載の方法。

（8）該ベクターがプラスミドベクターである、上記（5）に記載の方法。

（9）該目的遺伝子が該生殖細胞の染色体へ組み込まれるように導入される、上記（1）に記載の方法。

（10）上記（1）に記載の方法により製造された、目的遺伝子が導入された生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物。

（11）トランスジェニック精子の製造方法であって、セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない非ヒト脊椎動物の精巣へ目的遺伝子を注入することにより生殖細胞へ該目的遺伝子を導入し、該生殖細胞由来の精子を得ることを特徴とする、トランスジェニック精子の製造方法。

（１２）上記（１１）に記載の方法により製造された、トランスジェニック精子。

（１３）非ヒトトランスジェニック脊椎動物の製造方法であって、セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない非ヒト脊椎動物の精巣へ目的遺伝子を注入することにより生殖細胞へ該目的遺伝子を導入し、該生殖細胞由来の精子を得、該精子と卵を受精させることにより該目的遺伝子が導入された動物個体を得ることを特徴とする、非ヒトトランスジェニック脊椎動物の製造方法。

（１４）自然交配により該精子と卵を受精させる、上記（１３）に記載の方法。

（１５）顕微受精により該精子と卵を受精させる、上記（１３）に記載の方法。

（１６）該目的遺伝子が該動物個体の子孫に伝達される、上記（１３）に記載の方法。

（１７）上記（１３）に記載の方法により製造された非ヒトトランスジェニック脊椎動物。

（１８）以下の（ｉ）及び（ｉｉ）を含む、目的遺伝子が導入された生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物の製造用キット：

（ｉ）セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない非ヒト脊椎動物；

（ｉｉ）該脊椎動物の精巣へ該目的遺伝子を注入することにより生殖細胞へ該目的遺伝子を導入し、該生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物を得ることによって、該目的遺伝子が導入された生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物を製造できる、または製造すべきであることを記載した記載物。

（１９）以下の（ｉ）及び（ｉｉ）を含むトランスジェニック精子製造用キット：

（ｉ）セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない非ヒト脊椎動物；

（ｉｉ）該脊椎動物の精巣へ目的遺伝子を注入することにより生殖細胞へ該目的遺伝子を導入し、該生殖細胞由来の精子を得ることによって、トランスジェニック精子を製造できる、または製造すべきであることを記載した記載物。

（２０）以下の（ｉ）及び（ｉｉ）を含む非ヒトトランスジェニック脊椎動物製造用キット：

（ｉ）セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない非ヒト脊椎動物；

（ｉｉ）該脊椎動物の精巣へ目的遺伝子を注入することにより生殖細胞へ該目的遺伝子を導入し、該生殖細胞由来の精子を得、該精子と卵を受精させることにより該目的遺伝子が導入された動物個体を得ることによってトランスジェニック脊椎動物を製造できる、または製造すべきであることを記載した記載物。

本発明の方法を用いれば、これまでインビトロでの形質導入が困難であった動物種や系統においても、目的遺伝子が導入された生殖細胞、特に精原幹細胞を保持する個体を極めて高い効率で得ることが可能である。また、精巣内の精原幹細胞の数を減らすことなく遺伝子導入が達成されるので、インビトロでの生殖細胞への形質導入時と比較して、遺伝子が注入される雄の生殖力が保持され、トランスジェニック精子やトランスジェニック動物を容易に作製することが可能である。

図面の簡単な説明

図１は未成熟及び成熟精巣の肉眼的及び組織学的外観を示す図である。仔（Ａ及びＣ）及び成体（Ｂ及びＤ）の精巣を示す。Ａは仔の精巣の肉眼的外観である。Ｂは成体の精巣の肉眼的外観である。Ｃは仔の精巣の組織学的外観である。Ｄは成体の精巣の組織学的外観である。矢印は精原細胞を示す。仔の精巣では分化した生殖細胞が存在せず、精細管の構造が成体のそれと異なっている。バーはＡ及びＢにおいては１ ｍｍに、Ｃ及びＤにおいては 50 μｍ にそれぞれ相当する。染色：ヘマトキシリンおよびエオシン染色。

図２はインビボでの精原幹細胞のレトロウイルス形質導入を示す図である。青い管は、形質導入された精原幹細胞からのコロニーを示す。Ａはレトロウイルスによって形質導入された精巣の肉眼的外観である。Ｂ～Ｅは感染細胞の増殖パターンである。Ｂは形質導入された精巣中の典型的なコロニーである。該コロニーは、末端で非対称である。Ｃは同一精巣での同様の非対称コロニーである。Ｄは異なる精巣での青い細胞のクラスターである（矢印）。Ｂ又はＣのものと比較して、コロニーの末端（矢頭）での異なる染色パターンが認められる。Ｅは精巣での青細胞のクラスターである。それは、Ｄと同様である。Ｆは形質導入された精巣からの精細管の切片の組織学的外観である。正常な精子形成の出現が認められる。細長い精子細胞

が観察される。Gは#2Bからの精巣の肉眼的外観である。Hは#2Bと野生型雌との交配から得られるＦ１子孫からの精巣である。生殖系列の伝達と導入遺伝子の発現を示している。バーはA、GおよびHにおいては1mm に、B～Eにおいては100μmに、Fにおいては20μmにそれぞれ相当する。染色：Ｘ－Ｇａｌ（A～H）；ヘマトキシリンおよびエオシン（F）。

図３は#2B由来の仔からのＢａｍＨＩ消化ー尾ゲノムＤＮＡのサザンブロット解析を示す図である。Aは野生型雌と#2B雄性マウス由来のＦ１子孫からのＤＮＡの解析結果である。１４匹の代表的子孫の２匹（雌#29及び雄#37）は、ＬａｃＺ導入遺伝子を含んでいた。BはＦ２世代へのウイルス導入遺伝子の伝達を示す。#29（Ｆ１雌）と#37（Ｆ１雄）は、Ｆ２世代に導入遺伝子を伝達した。

発明の詳細な説明

本発明に係る目的遺伝子が導入された生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物の製造方法は、セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない脊椎動物の精巣へ目的遺伝子を注入することにより生殖細胞へ該目的遺伝子を導入し、該生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物を得ることを特徴とする方法である。

本発明において用いられる脊椎動物としては、例えば、哺乳動物、鳥、魚、両生動物および爬虫類動物が挙げられる。哺乳動物としては、特に限られないが、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類やウサギ等の実験動物、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ミンク等の家畜、イヌ、ネコ等のペット、サル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジーなどの霊長類を挙げることが出来る。鳥類としては、ニワトリ、ウズラ、アヒル、ガチョウ、シチメンチョウ、オーストリッチ、エミュ、ダチョウ、ホロホロ鳥、ハト等を挙げることができる。脊椎動物は、好ましくは哺乳動物である。

本発明の方法において用いられる目的遺伝子は特に限定されず、導入が望まれる任意の遺伝子であってよい。例えば、ポリペプチドをコードする遺伝子、アンチセンス核酸やsiRNA、miRNA、stRNA、リボザイム、デコイ核酸のような機能的な核酸分

子をコードする遺伝子等が挙げられる。当該遺伝子は核酸（ＤＮＡ又はＲＮＡ）として供せられる。

目的遺伝子の起源も特に限定はされず、該目的遺伝子が導入される生殖細胞と同種の生物由来のもの、異種の生物由来のもの、化学的に合成されたもの、さらにはこれらの組合せであっても良い。また、目的遺伝子のサイズも、本発明の方法によって生殖細胞へ該目的遺伝子を導入することができる範囲であれば特に限定されない。

また、これらの目的遺伝子には、その発現を調節するための適当なプロモーター、エンハンサー等の調節要素が付加されていても良い。

該プロモーターは、生殖細胞内で、あるいは目的遺伝子が導入された生殖細胞に由来する子孫動物の細胞内で該目的遺伝子の発現を調節できるものであれば特に限定されない。組織非特異的プロモーターを用いれば、生殖細胞やその生殖細胞に由来する子孫動物の広汎な組織において目的遺伝子の発現を調節することが可能である。組織非特異的プロモーターとしては、例えば、ＣＡＧプロモーター、ＳＲαプロモーター、ＥＦ１αプロモーター、ＣＭＶプロモーター、ＰＧＫプロモーター、Ｕ６プロモーター、ｔＲＮＡプロモーター等が挙げられ、目的に応じて、あるいは発現させる目的遺伝子の種類に応じて適宜選択することができる。また、組織特異的プロモーターを用いれば、目的遺伝子が導入された生殖細胞に由来する子孫動物において、組織特異的に目的遺伝子を発現させることができ、例えば肝臓特異的プロモーターであるα１ＡＴプロモーターを用いれば、肝細胞特異的に、骨格筋特異的αーアクチンプロモーターを用いれば骨格筋特異的に、神経特異的エノラーゼプロモーターを用いれば神経特異的に、血管内皮細胞特異的ｔｉｅプロモーターを用いれば血管内皮細胞特異的にそれぞれ発現させることができる。

また、目的遺伝子と共にマーカー遺伝子を導入することができる。マーカー遺伝子を用いることにより、目的遺伝子が導入された生殖細胞を容易に選別することが可能となる。マーカー遺伝子としては、緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein）、青色蛍光タンパク質（Blue Fluorescent Protein）、黄色蛍光タンパク質（Yellow Fluorescent Protein）、シアン蛍光タンパク質（Cyan Fluorescent Pr

otein）、赤色蛍光タンパク質（Red Fluorescent Protein）等の蛍光タンパク質や、β－ガラクトシダーゼ等の酵素等が挙げられる。

本発明の方法においては、導入に用いられる目的遺伝子はベクターに組み込まれていてもよい。ベクターとしては、プラスミドベクター、ＰＡＣ、ＢＡＣ、ＹＡＣ、ウイルスベクター等が挙げられ、適宜選択することが出来る。

ウイルスベクターとしてはモロニーマウス白血病ウイルス、レンチウイルス等のレトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスウイルス、アデノ随伴ウイルス、パルボウイルス、セムリキ森林ウイルス、ワクシニアウイルス、センダイウイルス等が挙げられる。特に、レトロウイルスによる遺伝子導入は、遺伝子が染色体へ組み込まれるように導入されるので、好ましい。また、レンチウイルスは分裂及び非分裂細胞の両方に感染し、遺伝子を導入することができる。

目的遺伝子は遺伝子導入試薬と共に精巣に注入することができる。遺伝子導入試薬とは、遺伝子や遺伝子が組み込まれたベクターと複合体を形成する等の機序により、細胞内への遺伝子の導入を促進する試薬である。

遺伝子導入にウイルスベクター特にレトロウイルスベクターを用いる場合には、遺伝子導入試薬としてはレトロネクチン、ファイブロネクチン、ポリブレン等を用いることができる。

また、遺伝子導入においてプラスミドベクター等を用いる場合、遺伝子導入試薬としては、リポフェクチン、リプフェクタミン（lipfectamine）、DIMRIEC、スーパーフェクト及びエフェクチン（Qiagen）、ユニフェクチン、マキシフェクチン、DOTMA、DOGS（トランスフェクタム；ジオクトアデシルアミドグリシルスペルミン）、DOPE（1,2-ジオールエオイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン）、DOTAP（1,2-ジオールエオイル-3-トリメチルアンモニウムプロパン）、DDAB（ジメチルジオクトアデシルアンモニウム臭化物）、DHDEAB（N,N-ジ-n-ヘキサアデシル-N,N-ジヒドロキシエチルアンモニウム臭化物）、HDEAB（N-n-ヘキサアデシル-N,N-ジヒドロキシエチルアンモニウム臭化物）、ポリブレン、あるいはポリ（エチレンイミン）（PEI)等を用いることが出来る。

本発明においては、目的遺伝子がセルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない脊椎動物の精巣へ注入される。そのような精巣においては、注入された遺伝子の精細管の腔側からの生殖細胞、特に精原幹細胞への接近性が高く、当該細胞へ効率よく目的遺伝子を導入することができる。セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない脊椎動物としては、同種の健康な成体の野生型脊椎動物のセルトリ細胞間のタイトジャンクションと比較して、その形態や機能が不完全な雄性脊椎動物であれば特に限定されない。セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在しているか否かは、摘出した精巣を組織学的に解析すること等により当業者であれば容易に決定することができる。

セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない脊椎動物としては、例えば幼若動物（本明細書中、未成熟動物又は仔（pup）という場合がある）や、カドミウムやサイトカラシン等の薬剤によって該タイトジャンクションが破壊された動物、セルトリ細胞間のタイトジャンクションの形成にかかわる因子が欠損した動物等が挙げられる。

本発明において、幼若動物とは、動物の成長過程において、セルトリ細胞間のタイトジャンクションが形成される時期より若い出生後動物をいう。該タイトジャンクションが形成される時期は、脊椎動物の種類により異なるため、一概に定めることは出来ないが、マウスでは２週齢、ラットでは２～３週齢、ウサギでは１０週齢、ウシでは２０～３２週齢、アカゲザルでは１０～１５月齢、マーモセット（Marmoset monkey）では５～６月齢などが例示される。

また、幼若動物のセルトリ細胞の間には、成体動物に見られるような分化した生殖細胞の多層も存在しておらず、このことも精細管の腔側からの精原幹細胞等の生殖細胞への目的遺伝子の接近性を向上させ、目的遺伝子の生殖細胞への導入効率の向上に寄与し得る。更に、幼若動物の生殖細胞、特に精原幹細胞は、成体動物のそれと比較してより活発に分裂しており、遺伝子導入への感受性が高く、目的遺伝子の導入効率の向上に寄与し得、特にレトロウイルスベクターによる遺伝子導入において有利である。

本発明の方法においては、目的遺伝子が生殖細胞と接触するように精巣内に注入されるのであれば、注入箇所は特に限定されないが、セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない動物においては、精細管内からの生殖細胞への接近性が高いので、好ましくは目的遺伝子は精細管内へ注入される。

このとき、目的遺伝子の注入方法としては、特に限定されないが、例えば、精細管内への直接注入、輸出管からの注入、精巣網からの注入等が挙げられ、注入対象である動物の種類や、操作の容易性等を考慮して適宜選択できる。例えばマウス等のげっ歯類においては、輸出管からの注入が好ましく用いられ、ウシ等の家畜においては精巣網からの注入が好ましく用いられる。上述の方法により目的遺伝子を注入することで、該遺伝子は効率よく精細管内に浸潤し、生殖細胞へ到達する。

また、目的遺伝子の精巣への注入の後に、該精巣への電気パルス付加を行うことによっても、効率よく生殖細胞へ該目的遺伝子を導入し得る（例えば特開 2001-309736 号公報参照）。

本発明の方法において目的遺伝子が導入され得る生殖細胞としては、雄性の生殖細胞であれば特に限定されないが、例えば精原幹細胞、精原細胞、雄性生殖細胞（gonocyte）、精祖細胞、精母細胞、精娘細胞、精細胞、精子等が挙げられる。特に、精原幹細胞は自己更新能力を有し、生涯を通して増殖し続け、精子形成を支持するため、目的遺伝子が導入された該細胞は該目的遺伝子が導入された莫大数の精子を継続的に産生し得るため、生殖細胞としては精原幹細胞が好ましい。

また、上述の方法により、生殖細胞へ目的遺伝子を導入し、該生殖細胞由来の精子を得ることにより、当該目的遺伝子が導入されたトランスジェニック精子を製造することができる。本発明はこのようなトランスジェニック精子の製造方法を提供する。

目的遺伝子が生殖細胞へ導入されたか否かは、本発明の方法により製造された脊椎動物から生殖細胞や精子を採取し、当該細胞中に導入された遺伝子に由来する領域が存在するか否かを検出することにより行うことができる。より具体的には、採取した生殖細胞等から染色体ＤＮＡを採取し、導入遺伝子特異的なプライマーペアを用いたＰＣＲ法による増幅や、導入遺伝子特異的なプローブを用いたサザンブロ

ット法等により該遺伝子の存在を検出することが出来る。あるいは目的遺伝子の産物（タンパク質等）を検出することによっても、目的遺伝子が導入されたか否かを判別することが出来る。

また、目的遺伝子と共にマーカー遺伝子が導入された場合は、該マーカー遺伝子の存在を検出することによって、目的遺伝子が導入されたか否かを判別することが出来る。例えばマーカー遺伝子が蛍光タンパク質である場合は、該蛍光を検出することによって、またマーカー遺伝子がβガラクトシダーゼ等の酵素である場合は、該酵素に対応する発色基質を用いることにより、目的遺伝子の導入の有無を判別することが出来る。

あるいは、マーカー遺伝子を指標にすることにより、自体公知の方法によって、目的遺伝子が導入された生殖細胞や精子を選別し、単離することも出来る。

生殖細胞へ導入された遺伝子が染色体に組み込まれない場合は、細胞内や組織中に存在するＤＮＡ分解酵素により分解されるため短期間（約２週間）で消失する。この期間を超えて導入された遺伝子が生殖細胞内に存在する場合は、該遺伝子は染色体に組み込まれているものと考えられる。本発明の方法によれば、目的遺伝子は生殖細胞へ一過的に導入されるばかりでなく、染色体に組み込まれるように導入され得る。生殖細胞の染色体へ組み込まれた遺伝子は、生殖細胞由来の精子や子孫にまで安定して伝達され得る。

また、精原幹細胞以外の生殖細胞（すなわち分化した生殖細胞）は自己更新能を有さないため、該細胞から産生された精子は、精子形成の１サイクルに要する期間（マウスにおいては約３５日）までに消失すると考えられている（J. Androl., 21, 776-798, 2000、Cell and Molecular Biology of the Testis, (Oxford University Press, New York), pp. 266-295, 1993、Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, (Cache River Press, Clearwater, Florida), pp. 1-40, 1990 参照）。したがって、目的遺伝子を注入後、当該期間が経過した後においても、該遺伝子の存在が生殖細胞中に確認される場合は、該遺伝子が精原幹細胞へ導入されたことを示す。精原幹細胞は自己更新能力を有し、生涯を通して増殖し続け、精子形成を支持するため、目的遺伝子が導入された該細胞は該目的遺伝子が導入され

た莫大数の精子を継続的に産生し得る。一方、精原幹細胞以外の生殖細胞に目的遺伝子が導入された場合は、当該遺伝子が導入された精子は一過性に産生されることになる。

更に、上述の方法により、生殖細胞へ目的遺伝子を導入し、該生殖細胞由来の精子を得、該精子と卵を受精させて該目的遺伝子が導入された動物個体を得ることにより、トランスジェニック動物を製造することが出来る。本発明はこのようなトランスジェニック動物の製造方法を提供する。

卵とは精子が受精可能な雌性配偶子をいう。卵としては、例えば、卵細胞、卵母細胞等が挙げられる。

精子と卵の受精は、自然交配、顕微受精、ＩＶＦ等の周知の方法により行うことができ、特に限定されないが、技術的に容易である点を考慮すると自然交配により行われることが好ましい。該自然交配は通常、目的遺伝子が注入された雄と野生型雌とを交配させることにより行われる。

目的遺伝子と共にマーカー遺伝子が生殖細胞へ導入される場合などは、当該マーカー遺伝子を指標として目的遺伝子が導入された精子を選別、単離し、当該精子を卵と人工受精（顕微受精、ＩＶＦ等）し、偽妊娠動物の子宮に移入することにより、目的遺伝子が導入された動物個体を高い効率で得ることが出来る。

また、目的遺伝子の精巣への注入の後に、該精巣への電気パルス付加を行う場合においても、顕微受精により精子と卵を受精させることが好ましい。

得られた動物個体に目的遺伝子が伝達されているか否かは、得られた動物個体から染色体ＤＮＡを採取し、導入遺伝子特異的なプライマーペアを用いたＰＣＲ法による増幅や、導入遺伝子特異的なプローブを用いたサザンブロット法等により該遺伝子の存在を検出することにより判別することが出来る。あるいは目的遺伝子の産物（タンパク質）を検出することによっても、目的遺伝子が動物個体に伝達されたか否かを判別することが出来る。

更に、得られたトランスジェニック動物を同種の野生型動物と、あるいはトランスジェニック動物同士を交配することにより、導入された遺伝子はさらにそれらの子孫へ伝達される。

また、本発明は、以下の（ｉ）及び（ｉｉ）：

（ｉ）セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない非ヒト脊椎動物；

（ｉｉ）上述の方法により、該脊椎動物の精巣へ該目的遺伝子を注入することにより生殖細胞へ該目的遺伝子を導入し、該生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物を得ることによって、該目的遺伝子が導入された生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物を製造できる、または製造すべきであることを記載した記載物；

を含む、目的遺伝子が導入された生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物の製造用キットを提供する。当該キットは、更に、任意の遺伝子、コントロール遺伝子（生殖細胞内への導入が容易に確認できる遺伝子；例えば上述のマーカー遺伝子）、ベクター、遺伝子導入試薬等を含んでいてもよい。当該キットを用いれば、上述の方法により、容易に任意の遺伝子が導入された生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物を製造することが可能である。

また、本発明は、以下の（ｉ）及び（ｉｉ）：

（ｉ）セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない非ヒト脊椎動物；

（ｉｉ）上述の方法により、該脊椎動物の精巣へ目的遺伝子を注入することにより生殖細胞へ該目的遺伝子を導入し、該生殖細胞由来の精子を得ることによって、トランスジェニック精子を製造できる、または製造すべきであることを記載した記載物；

を含むトランスジェニック精子製造用キットを提供する。当該キットは、更に、任意の遺伝子、コントロール遺伝子（生殖細胞内への導入が容易に確認できる遺伝子；例えば上述のマーカー遺伝子）、ベクター、遺伝子導入試薬等を含んでいてもよい。当該キットを用いれば、上述の方法により、容易に任意の遺伝子が導入されたトランスジェニック精子を製造することが可能である。

更に、本発明は、以下の（ｉ）及び（ｉｉ）：

（ｉ）セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない非ヒト脊椎動物；

（ｉｉ）上述の方法により、該脊椎動物の精巣へ目的遺伝子を注入することにより生殖細胞へ該目的遺伝子を導入し、該生殖細胞由来の精子を得、該精子と卵を受精

させることにより該目的遺伝子が導入された動物個体を得ることによってトランスジェニック動物を製造できる、または製造すべきであることを記載した記載物；を含む非ヒトトランスジェニック動物製造用キットを提供する。当該キットは、更に、交配用雌性動物、任意の遺伝子、コントロール遺伝子（生殖細胞内への導入が容易に確認できる遺伝子；例えば上述のマーカー遺伝子）、ベクター、遺伝子導入試薬等を含んでいてもよい。当該キットを用いれば、上述の方法により、容易に任意の遺伝子が導入されたトランスジェニック動物を製造することが可能である。

上述の目的遺伝子が導入された生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物の製造用キット、トランスジェニック精子製造用キット、トランスジェニック動物製造用キットの構成要素は、全体が一つのパッケージとして提供されていてもよいが、複数のパッケージに分離して提供されてもよい。

以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

実施例

実験材料及び方法

（動物及び微注入方法）

Ｃ５７ＢＬ／６（Ｂ６）、ＢＡＬＢ／Ｃ、Ｃ３Ｈ及びＡマウスは、日本ＳＬＣ（静岡、日本）から購入された。未成熟仔マウス（５－１０日齢）と成体マウス（４－６週齢）の両方が、ウイルス感染のために用いられた。一部の実験では、手術されたマウスは、野生型Ｂ６雌と交配させられ、トランスジェニック子孫が産生された。精巣注入のために、レトロウイルス粒子含有ＤＭＥＭ／１０％ウシ胎仔血清（ＤＭＥＭ／ＦＣＳ）の約２μｌが、未成熟精巣の精細管に導入され、１０μｌが、成熟精巣の精細管に導入された。後者はより大きいからである。微注入は精巣輸出管注入を伴い（Int. J. Dev. Biol. 41, 111-122, 1997参照）、各レシピエント精巣中において管の７５－８５％を満たした。成体マウスは、Ａｖｅｒｔｉｎ注射（６４０ｍｇ／ｋｇ）を用いて麻酔された。仔マウスは、氷上に置かれ、低温誘導麻酔が引き起こされた（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 6186-6191, 2001参照）。一部

の実験では、氷への長期間暴露を避けるために、一方の精巣のみが微注入された。仔マウスは、手術後、雌親に戻され、少なくとも６週後に、交配のために使用された。

（レトロウイルスの調製）

複製欠損でエコトロピックなモロニー白血病レトロウイルスである$Gen^{-}pgk\beta gal$が、精原幹細胞を感染させるのに用いられた（J. Virol., 65, 2314-2319, 1991参照）。このレトロウイルスは、ホスホグリセレートキナーゼ１（Ｐｇｋ）遺伝子のプロモーターの下、Ｅ．ｃｏｌｉ　ＬａｃＺ遺伝子を発現する；当該レトロウイルスは、精原幹細胞を感染させるのに以前用いられている（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 6186-6191, 2001及びFEBS Lett., 475, 7-10, 2000参照）。ウイルス粒子は、ＤＭＥＭ／ＦＣＳ中、ＧＰ＋Ｅ８６レトロウイルスパッケージング細胞から安定に産生された（J. Virol., 65, 2314-2319, 1991参照）。最初のウイルス力価は、3×10^{5}コロニー形成単位／ｍｌ（ＮＩＨ　３Ｔ３細胞）であった。ウイルス馴化培地（virus-conditioned medium）は、コンフルエントな細胞の４８時間培養物から回収され、０．４５μｍフィルターを通され、夾雑細胞残渣が除去され、使用まで－８０℃で凍結された。ウイルス濃縮の方法は以前に記載されている（Hum. Gene Ther., 7, 1735-1742, 1996参照）。端的に言えば、凍結融解ウイルスストックは、ポリブレン（シグマ）１０μｇ／ｍｌが添加され、ウイルス上清２００ｍｌが６０００×ｇで１６時間遠心分離された。ウイルスペレットは、２５Ｇ針を用い、ＤＭＥＭ／ＦＣＳ　１－２ｍｌ中に懸濁され、エッペンドルフチューブに分注された。ウイルス上清は、６０００×ｇで１６時間更に遠心分離され、２０－３０μｌに懸濁された。ウイルス上清は、採取後直ちに使用した。レトロウイルス濃縮物の最終力価は、約10^{9}コロニー形成単位／ｍｌであった。レトロウイルス調製の全ての作業は４℃で行われた。当該ウイルスの力価は、以前の研究(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 13090-13095, 2001、FEBS Lett., 475, 7-10, 2000)で使用されたものよりも有意に高く、遺伝子導入効率の増加に寄与し得る。

（精巣の分析）

感染細胞を可視化するために、レトロウイルス感染を受けた精巣は、(Biol. Reprod., 60, 1429-1436, 1999)に記載されたように、５－ブロモ－４－クロロ－３－インドリル β－Ｄ－ガラクトシド（Ｘ－ｇａｌ）（和光純薬工業、大阪、日本）によって、ＬａｃＺ発現に関し染色された。生殖細胞のクラスターは、管の基底面の５０％超を占め、長さが少なくとも０．１mmであるとき、コロニーとして定義された。コロニー化の効率は、立体顕微鏡下、コロニーの合計数を計測することによって評価された。全ての切片は、ヘマトキシリンとエオシンで染色された。統計的解析は、スチューデントｔ－テストによって行われた。

（サザンブロット）

ゲノムＤＮＡは、フェノール／クロロホルム抽出、次いで、エタノール沈殿によって、各子孫からの尾サンプルから単離された。ＤＮＡ１０μｇがＢａｍＨＩで消化され、１．０％アガロースゲルで分離された。ＤＮＡの転写及びハイブリダイゼーションは、通常のプロトコルに従って行われた。ＬａｃＺ　ｃＤＮＡのＢａｍＨＩ－ＮｃｏＩフラグメント（約２２００塩基対）が、ハイブリダイゼーションのプローブとして用いられた。

結果

（精細管へのレトロウイルス注入による精原幹細胞の感染）

成熟精細管のセルトリ細胞間には生殖細胞の多層とタイトジャンクションが存在する（Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, (Cache River Press, Clearwater, Florida), pp.1-40, 1990参照）。対照的に、未成熟精巣は、１層の精原細胞しか有せず、タイトジャンクションを欠いていた（図１）。これらの構造的な差異に基づき、未成熟精細管中に微注入されたレトロウイルスは、成熟精細管中に注入されたときと比較して、幹細胞を含む精原細胞により良き接近性を有するであろう、という仮説を本発明者は立てた。この可能性を検討するために、濃縮Ｇｅｎ⁻ｐｇｋβｇａｌレトロウイルスが、Ｂ６マウスの未成熟および成熟精巣の精細管内に微注入され、導入効率が比較された。微注入２月後、マウスは屠殺され、精巣はＬａｃＺ活性について染色され、感染細胞の存在が検査された。８

個の成熟精巣のいずれも、ＬａｃＺ染色を示さなかったが（データは示さず）、６個の未成熟精巣のうち３個は、ＬａｃＺ陽性細胞のクラスターを示し（図２Ａ）、レトロウイルス感染が成功裏に生じたことが示された。ＬａｃＺ染色のパターンは、これらの精巣で変動があった（図２Ｂ－Ｅ）。ＬａｃＺ発現クラスターの幾つかは、精細管の長く、青い広がりであって、移植された精原幹細胞からの精子形成コロニーに類似していた（Biol. Reprod., 66, 1491-1497, 2003 参照）。これらのコロニーは、非対称末端を有し、しばしば、中央で暗い染色領域を有し、それは、生殖細胞分化が起こったことを示した（図２Ｂ及びＣ）。更に、精細管中に広範に散在したＬａｃＺ陽性細胞の他のクラスターが存在した（図２Ｄ及びＥ）。組織学的解析は、ＬａｃＺ染色を有する精子形成を示し、精原幹細胞は、本発明の方法によって感染されることができることが確認された（図２Ｆ）。

（レトロウイルス感染精原幹細胞からのトランスジェニックマウスの製造）

感染した幹細胞が、トランスジェニック動物を産生できるかどうかを本発明者は次に検討した。レトロウイルスが、５－１０日齢の B6、C3H、BALB/C 及びＡマウス（初代マウス）の精細管に微注入された。各系統について、少なくとも２回の別々の実験が行われた。６～８週間後、当該動物は、子孫を産生するために、２～３匹の野生型雌マウスと共にケージに入れられた。結果を表１及び２に示す。

表　1

系統	注入された動物の数*	繁殖力のある動物の数（%）	トランスジェニック子孫を産ませた動物の数（%）
B6	17	12 (70)	3 (18)
C3H	4	4 (100)	2 (50)
BALB	9	9 (100)	1 (11)
A	6	6 (100)	2 (33)

表１は異なるマウス系統からのトランスジェニックマウス産生の効率を示す。

＊は２～６回の試験からの結果を示す。

表　2

初代[a]	系統	解析までの時間（日数）	精巣重量（mg）		コロニー/精巣[b]		最初のトランスジェニックまでの時間[c]（日数）	トランスジェニック/全子孫[d]（%）
			R	L	R	L		
N	B6	479	87.5	86.0	2	0	82	4/132 (3.0)
2A	B6	477	100.4	-	2	-	110	1/115 (0.9)
2B	B6	477	110.7	-	21	-	174	4/123 (3.2)
2N	C3H	381	91.5	-	2	-	101	1/127 (0.8)
2O	C3H	273	85.2	80.2	1	3	177	1/59 (1.7)
2Q	BALB	314	NA[a]	NA[a]	NA[a]	NA[a]	50	6/150 (4)
3I	A	259	-	82.3	-	0	124	1/42 (2.4)
3J	A	260	96.6	-	0	-	97	4/61 (6.6)

表２はインビボで感染した精原幹細胞からのトランスジェニックマウスの創生を示す。

Ｒ，右精巣；Ｌ，左精巣。動物のうちの２匹（１Ｎ及び２Ｏ）は両側にウイルス注入を受けている。

NA[a]，解析前に動物が死んだため該当しない（ウイルス注入後３１４日）。

[b]各精巣における青いコロニーの数，生殖細胞のクラスターは、管の基底面の５０％超を占め、長さが少なくとも０．１ｍｍであるとき、コロニーとして定義された。

[c]移植から、該動物が生ませた最初のトランスジェニック子孫の誕生までの日数。

[d]分子はトランスジェニック子孫の数；分母は個々の動物からの子孫の全数。

感染した動物の一部は、手術に付随するヘルニアのため、子孫を生ませることができなかったが（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 6186-6191, 2001参照）、レトロウイルスを受け取った動物の平均８６％は子孫を生ませた（表１）。精巣の重量は、正常で未処理マウスのそれと同等であった。野生型雌との交配から生じた全ての子孫は、ＬａｃＺ遺伝子特異的プローブを用いたサザンブロティングによって導入遺伝子の存在について検討され、各初代マウスからの４０～１３２匹の子孫が、手術後６～１６月の間にわたり試験された。

合計で、生殖力のある動物の２６％（８／３１）は、解析期間中、導入遺伝子を有する子孫を生ませた（表１）。初代雄から産生されたトランスジェニック動物の割合は、０．８（１／１２７）～６．６％（４／６１）の範囲で、平均２．８％であった（表２）。親のクロモソームの半分しか、精原幹細胞から子孫に伝達されないので、精子の５．６％が、形質導入幹細胞から由来することを結果は示す。幹細胞に形質導入するのに使用された系統の遺伝学的効果を結論するためには、動物数が少なすぎるかもしれないが、４匹のＣ３Ｈマウスのうち２匹（５０％）は、トランスジェニック子孫を産生した（表１）。対照的に、９匹のＢＡＬＢ／Ｃマウスのうち１匹（１１％）が、ＬａｃＺ導入遺伝子を有する子孫を産生した。最初の導入遺伝子は、早くもレトロウイルス感染後５０日でＢＡＬＢ／Ｃ初代マウスからの子孫において出現したが、平均は１１４日であった。導入遺伝子は、レトロウイルスによって感染された精原幹細胞からの起源であった。なぜなら、分化した生殖細胞から産生された精子は、３５日までに消失するであろうからである(J. Androl., 21, 776-798, 2000、Cell and Molecular Biology of the Testis, (Oxford University Press, New York), pp. 266-295, 1993、Histological and Histopathological Evaluation of the Testis, (Cache River Press, Clearwater, Florida), pp.1-40, 1990 参照)。

初代動物は２５９～４７９日後に屠殺され、レトロウイルス感染の程度を検討した。動物がトランスジェニック子孫を産生したかどうかにかかわらず、ＬａｃＺ染色は精巣において見出された（図２Ｇ）。しかし、青コロニー数は、非トランスジェニック子孫の初代動物よりも、トランスジェニック子孫を産生した初代動物に関し有意に大きかった（３．４４±２．２２　ｖｓ　０．０３±０．０３　コロニー／精巣；平均値±標準誤差；Ｐ＜０．０５）。一方、コロニー数と、初代マウスからのトランスジェニック子孫の割合との間の有意な連関は無かった。興味深いことに、トランスジェニック子孫を産生したレシピエントの２匹（＃３Ｉおよび３Ｊ）においては、検査時には青コロニーが見出されず、導入遺伝子を有する幹細胞が増殖を終えたか消失したことが示唆された。しかし、他の初代マウスからの精巣の組織学的解析は、正常と認められる組織化を有する完全な精子形成を示した（データ

は示さず）。半接合Ｆ１マウスでのＬａｃＺ導入遺伝子の発現が、異なる動物の多くの器官において観察された（図２Ｈ）。

最後に、導入遺伝子が次世代に伝達されうるかどうかを検討した。#2B 初代マウスからの雄と雌の両方の子孫を使用し、各トランスジェニックマウスは、非トランスジェニック野生型Ｂ６マウスと交配させられ、Ｆ２子孫を産生した。雄性トランスジェニックマウスからの８匹の子孫のうち６匹と、雌マウスからの３匹の子孫のうち１匹は、サザンブロット解析において導入遺伝子の存在を示し（図３）、導入遺伝子の安定な伝達が確認された。Ｆ２動物でのＬａｃＺ導入遺伝子の発現は、Ｆ１世代のそれと同様であった。

（考察）

本発明の方法によれば、精原幹細胞等の生殖細胞へ、インビボで形質導入することができ、トランスジェニック動物を産生できる。

本発明の方法が、従来法であるインビトロトランスフェクション法と比較して優れている点としては、精巣内の精原幹細胞の数を減らすことなく遺伝子導入が達成されるので、遺伝子が注入される雄の生殖力が保持されることが挙げられる。精原細胞移植では、ドナー細胞の広範な定着が、生殖力の回復に不可欠である。幹細胞の少なくとも１５％が、除去処置後、生殖力を回復するのに必要であると推定されている。しかし、これは、達成するのは困難である。幹細胞数は、短時間培養中でさえ、減少し、細胞の限定量のみが、精細管中に導入できるからである。更に、移植のための内因性幹細胞の除去は、生殖力回復のための生殖細胞環境にダメージを与えるばかりか、全身毒性を発揮し、レシピエント動物の死をもたらす。実際、除去への感受性における系統又は年齢差異のため、除去プロトコルは最適化するのが困難である。対照的に、本願発明のアプローチは、無処理（intact）で、野生型の動物を用いる。それらの精巣は、幹細胞の正常数を有するので、それらは、目的遺伝子を注入後、効率的に子孫を生ませることができよう。

また、本発明の方法の重要なもう一つの利点は、該方法が、動物の遺伝的背景に依存しないことである。インビトロ形質導入アプローチの成功は、精原細胞移植に付随する問題のために、遺伝学的背景に影響される。実際、マウス精原幹細胞から

のトランスジェニック子孫は、宿主の調製の困難性およびドナー細胞の拒絶のために、遺伝学的に不稔の変異レシピエントから得られたのみであった（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 13090-13095, 2001）。対照的に、本発明の方法を用いた場合、４つの異なる系統でトランスジェニック子孫を産生できたので、この問題を解決する有望な方向が示唆される。トランスジェニック子孫を産生する動物の割合は、インビトロアプローチを使用するものよりも低いが（上記実施例での２２％　対 以前の研究での３３－３８％）、このことは、より高い力価の調製物を使用することによって、そして、レンチウイルスなどの特定タイプのレトロウイルスを使用することによって、改良され得よう。従って、本発明の方法は、インビトロ遺伝子導入アプローチに付随する困難性を克服し、精原幹細胞等の生殖細胞を操作する機会を増加させる。

上記実施例の興味深い観察は、レトロウイルスに感染した精巣におけるＬａｃＺ染色の変動するパターンである。幹細胞を枯渇させた精巣で発達したコロニーは、一般的には均一で、対称性末端を有するが(Biol. Reprod., 60, 1429-1436, 1999)、上記実施例で観察されたものは、変動するパターンを示し、非対称性末端を有した。ＬａｃＺ染色は、おそらく単一の幹細胞の形質導入を起源としているので、上記実施例の結果は、野生型の精巣での精原幹細胞は、除去された環境でのドナー幹細胞とは異なる様式で増殖し、精原細胞又は精原幹細胞の挙動は、正常な精子の形成過程で非常に変動性でありうることを示唆する。このことは、移植幹細胞からの精子形成のパターンは、精細管での他の生殖細胞の存在によって影響されるという最近の報告(Biol. Reprod., 66, 1491-1497, 2003)と一致している。事実、上記実施例におけるコロニーパターンは、精原細胞移植後、野生型レシピエント精巣で観察されるドナー細胞由来コロニーと顕著な類似性を示した。生殖細胞間のこのような相互作用は、幾つかの他の研究で以前に示され(Biol. Reprod., 66, 1491-1497, 2003、Cell Tissue Kinet., 7, 165-172, 1974、Arch. B cell Pathol. Include. Mol. Pathol., 33, 67-80, 1980)、幹細胞増殖の組織特異的インヒビターである「シャローン（chalone）」によって媒介されると考えられた。幹細胞の増殖カイネティックスは、レトロウイルスにより個々の幹細胞に特異的に印を付けることによって、他の

自己更新組織でよく研究されているが(Genes Dev., 4, 220-232, 1990、J. Invest. Dermatol., 109, 377-383, 1997)、精原幹細胞増殖とその制御のダイナミクスについては殆ど知られていない。本発明の方法によるインビボ幹細胞形質導入を用いた更なる研究は、このような解析に有用であろう。

本発明の方法の潜在的に重要な適用は、通常のトランスジェニック技術が不可能か又は非効率的であることが証明されている動物 (Reproduction in farm animals, (Lippincott Silliams & Willins, Philadelphia, Pennsylvania), pp. 1-40, 2000) の遺伝子導入である。マウス及び雄ウシでの精原幹細胞の長期間培養系の最近の確立は、インビトロでの形質導入方法を改良し得、動物の遺伝子導入での新たな発展を潜在的に導き得るが(Biol. Reprod., 68, 272-281, 2003、Biol. Reprod., 69, 612-616, 2003、J. Androl., 24, 661-669, 2003)、このような培養系は、他の多くの種では培養条件の更なる改善を要する可能性があり、また精原細胞移植に付随する問題を、解決する必要がある。特に、内因性生殖細胞の除去は、大きな身体サイズ、異なる精巣構造及び内分泌環境のため、大動物では困難である。更に、幹細胞を濃縮する幾つかの方法が、げっ歯類で確立され、生殖力回復率を増大するのに使用できようが(Proc. Natl. Acad. Sci USA, 97, 8346-8351, 2000、EMBO Rep. 3, 753-759, 2002、Biol. Reprod., 70, 70-75, 2004)、他の動物での精原幹細胞は、より少なくしかキャラクタライズされておらず、幹細胞の濃縮方法は利用できない。しかし、微注入技術は、多くの動物種で既に確立されているので(Hum. Reprod., 17, 55-62, 2002、Hum. Reprod., 14, 144-150, 1999)、未成熟動物への遺伝子の微注入は、他の動物種に容易に拡張できる。家畜等の大動物の未成熟精巣は一般的に、精細管への注入の流れに対する抵抗がより少なく、本技術の適用を容易にする(Hum. Reprod., 14, 144-150, 1999)。従って、精原幹細胞のインビボ形質導入は、今や、精原幹細胞の操作の新たな戦略を提供し、この価値ある細胞集団を理解し、使用する努力を加速する。

産業上の利用可能性

本発明の方法を用いれば、これまでインビトロでの形質導入が困難であった動物種や系統においても、目的遺伝子が導入された生殖細胞、特に精原幹細胞を保持する個体を極めて高い効率で得ることが可能である。また、精巣内の精原幹細胞の数を減らすことなく遺伝子導入が達成されるので、インビトロでの生殖細胞への形質導入時と比較して、遺伝子が注入される雄の生殖力が保持され、トランスジェニック精子やトランスジェニック動物を容易に作製することが可能である。従って、本発明の方法を用いて、家畜に任意の遺伝子を導入することにより家畜の品種改良をすることが可能であり農業分野において有用である。また、本発明の方法を用いて、動物に種々の有用物質の産生を行わせることが可能であり、医薬医療分野において有用である。

本出願は日本で出願された特願２００４－１５８１７４（出願日：２００４年５月２７日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

1． 目的遺伝子が導入された生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物の製造方法であって、セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない非ヒト脊椎動物の精巣へ該目的遺伝子を注入することにより生殖細胞へ該目的遺伝子を導入し、該生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物を得ることを特徴とする、方法。

2． 該生殖細胞が精原幹細胞である、請求項１に記載の方法。

3． 該目的遺伝子が注入される該非ヒト脊椎動物が幼若である、請求項１に記載の方法。

4． 該目的遺伝子を精細管内へ注入する、請求項１に記載の方法。

5． 該目的遺伝子がベクターに組み込まれている、請求項１に記載の方法。

6． 該ベクターがウイルスベクターである、請求項５に記載の方法。

7． 該ウイルスベクターがレトロウイルスベクターである、請求項６に記載の方法。

8． 該ベクターがプラスミドベクターである、請求項５に記載の方法。

9． 該目的遺伝子が該生殖細胞の染色体へ組み込まれるように導入される、請求項１に記載の方法。

１０． 請求項１に記載の方法により製造された、目的遺伝子が導入された生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物。

１１． トランスジェニック精子の製造方法であって、セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない非ヒト脊椎動物の精巣へ目的遺伝子を注入することにより生殖細胞へ該目的遺伝子を導入し、該生殖細胞由来の精子を得ることを特徴とする、トランスジェニック精子の製造方法。

１２． 請求項１１に記載の方法により製造された、トランスジェニック精子。

１３． 非ヒトトランスジェニック脊椎動物の製造方法であって、セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない非ヒト脊椎動物の精巣へ目的遺伝子を注入することにより生殖細胞へ該目的遺伝子を導入し、該生殖細胞由来の精子を得、

該精子と卵を受精させることにより該目的遺伝子が導入された動物個体を得ることを特徴とする、非ヒトトランスジェニック脊椎動物の製造方法。

１４．　自然交配により該精子と卵を受精させる、請求項１３に記載の方法。

１５．　顕微受精により該精子と卵を受精させる、請求項１３に記載の方法。

１６．　該目的遺伝子が該動物個体の子孫に伝達される、請求項１３に記載の方法。

１７．　請求項１３に記載の方法により製造された非ヒトトランスジェニック脊椎動物。

１８．　以下の（ｉ）及び（ｉｉ）を含む、目的遺伝子が導入された生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物の製造用キット：

（ｉ）セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない非ヒト脊椎動物；

（ｉｉ）該脊椎動物の精巣へ該目的遺伝子を注入することにより生殖細胞へ該目的遺伝子を導入し、該生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物を得ることによって、該目的遺伝子が導入された生殖細胞を保持する非ヒト脊椎動物を製造できる、または製造すべきであることを記載した記載物。

１９．　以下の（ｉ）及び（ｉｉ）を含むトランスジェニック精子製造用キット：

（ｉ）セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない非ヒト脊椎動物；

（ｉｉ）該脊椎動物の精巣へ目的遺伝子を注入することにより生殖細胞へ該目的遺伝子を導入し、該生殖細胞由来の精子を得ることによって、トランスジェニック精子を製造できる、または製造すべきであることを記載した記載物。

２０．　以下の（ｉ）及び（ｉｉ）を含む非ヒトトランスジェニック脊椎動物製造用キット：

（ｉ）セルトリ細胞間のタイトジャンクションが存在していない非ヒト脊椎動物；

（ｉｉ）該脊椎動物の精巣へ目的遺伝子を注入することにより生殖細胞へ該目的遺伝子を導入し、該生殖細胞由来の精子を得、該精子と卵を受精させることにより該目的遺伝子が導入された動物個体を得ることによってトランスジェニック脊椎動物を製造できる、または製造すべきであることを記載した記載物。

図 1

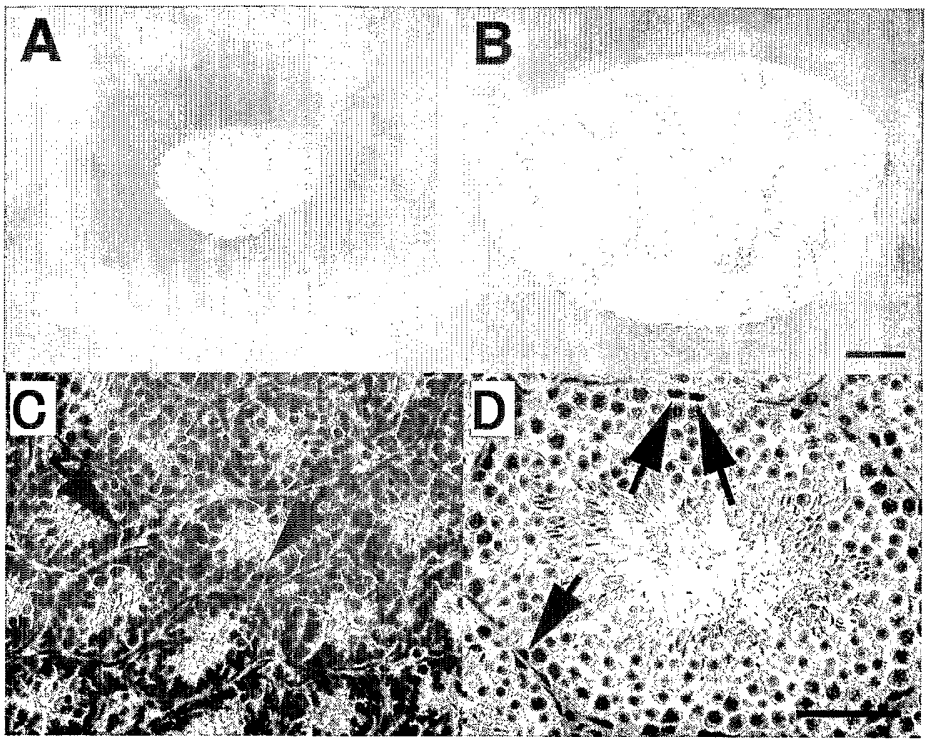


図 2

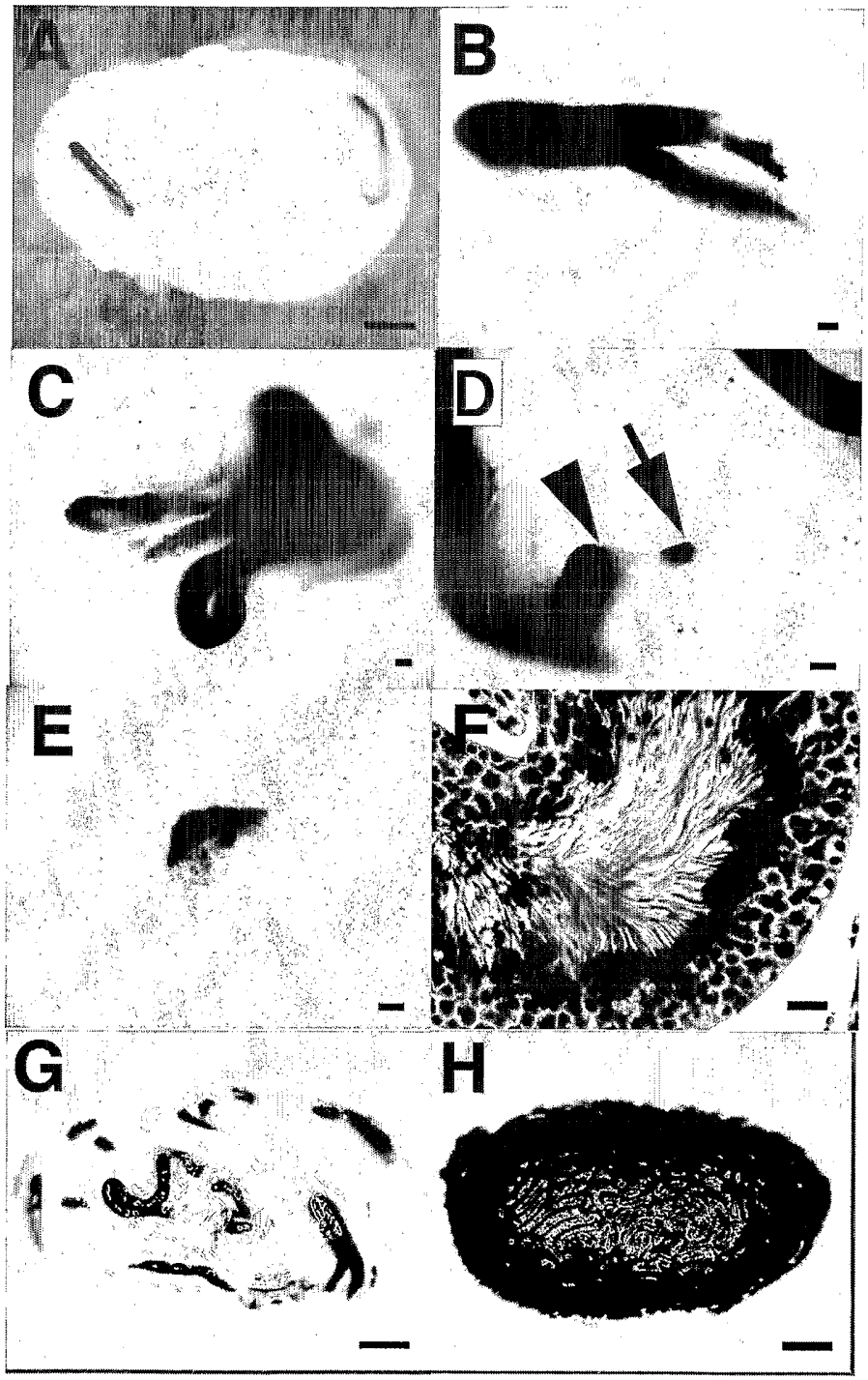
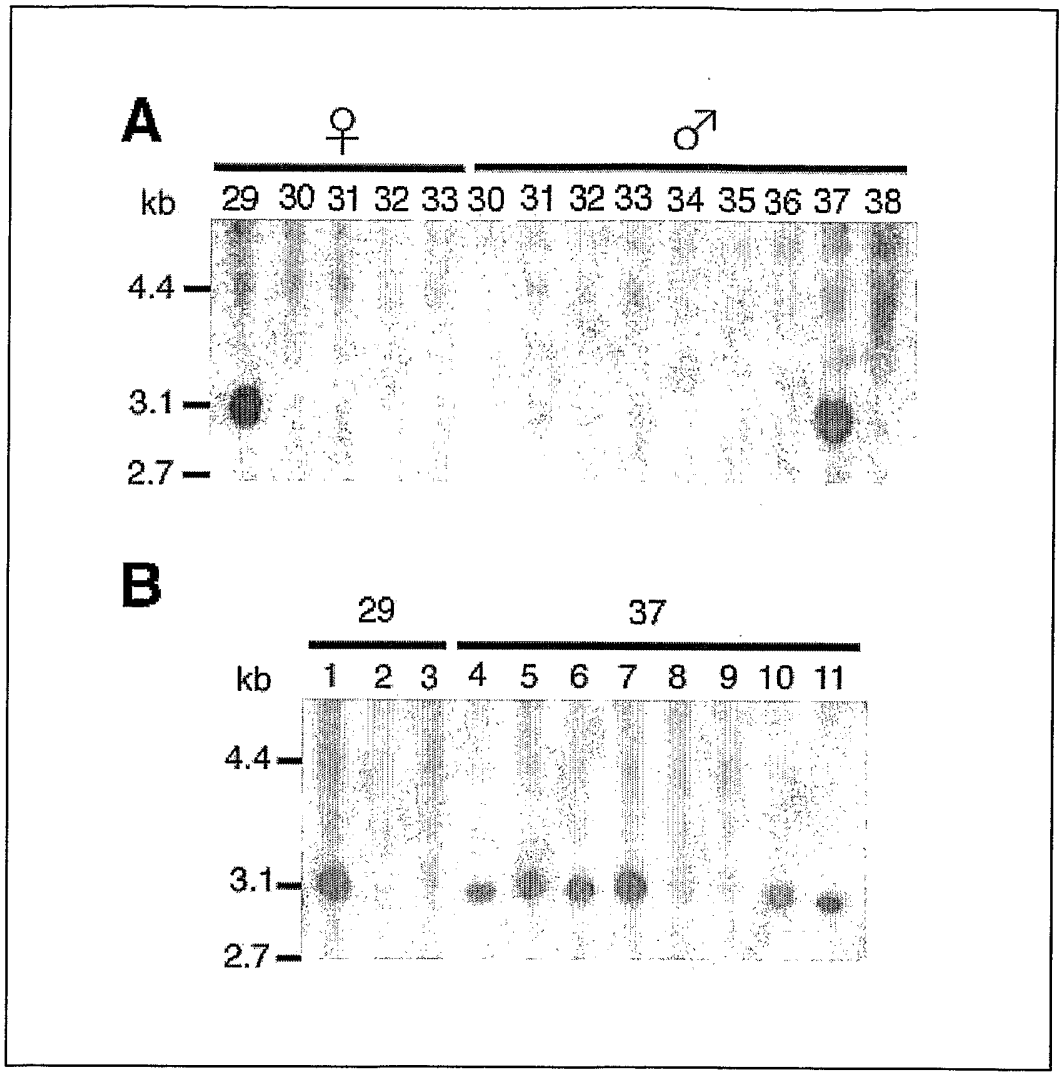


図 3


A
♀
♂
kb
29 30 31 32 33 30 31 32 33 34 35 36 37 38
4.4
3.1
2.7
B
29
37
kb
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
4.4
3.1
2.7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2005/010002

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] A01K67/027, C12N5/10, C12N15/10, C12N15/11

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[7] A01K67/00-67/033, C12N1/00-15/90

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 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus(JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2001-309736 A (President of The Kyoto University), 06 November, 2001 (06.11.01), & US 2002/0016977 A1 & EP 001127486 A1 & CA 002338138 A & AU 000758102 B & CA 002338138 A1	1-5,8-17/6, 7,18-20
Y	JP 2001-523468 A (CEDARS-SINAI MEDICAL CENTER, IMPERIAL COLLEGE OF SCIENCE, TECHNOLOGY AND MEDICCINE), 27 November, 2001 (27.11.01), & JP 2002-543814 A & US 006316692 B1 & US 2002/0053092 A1 & US 006734338 B1 & US 006455305 B1 & EP 000944722 A & WO 1999/025863 A1	1-20

☒ 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 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	Date of mailing of the international search report
08 August, 2005 (08.08.05)	23 August, 2005 (23.08.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2005/010002

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-180197 A (National Agricultural Research Organization, Hideo GOTO), 02 July, 2003 (02.07.03), (Family: none)	1-20

国際調査報告

国際出願番号 PCT／JP2005／010002

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.[7] A01K67/027, C12N5/10, C12N15/10, C12N15/11

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.[7] A01K67/00 - 67/033, C12N1/00 - 15/90

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	1922－1996年
日本国公開実用新案公報	1971－2005年
日本国実用新案登録公報	1996－2005年
日本国登録実用新案公報	1994－2005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）

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus(JOIS),

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	関連する請求の範囲の番号
X/Y	JP 2001-309736 A (京都大学長) 2001.11.06 & US 2002/0016977 A1 & EP 001127486 A1 & CA 002338138 A & AU 000758102 B & CA 002338138 A1	1-5,8-17/6,7,18-20
Y	JP 2001-523468 A (セダーシナイ メディカル センター、インペリアル カレッジ オブ サイエンス テクノロジー アンドメディスン) 2001.11.27 & JP 2002-543814 A & US 006316692 B1 & US 2002/0053092 A1 & US 006734338 B1 & US 006455305 B1 & EP 000944722 A & WO 1999/025863 A1	1-20

☑ 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 08. 08. 2005	国際調査報告の発送日 23.8.2005
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100－8915 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） 斎藤 真由美 4B 3541 電話番号 03－3581－1101 内線 3448

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	関連する請求の範囲の番号
Y	JP 2003-180197 A　(独立行政法人農業技術研究機構、後藤　英夫) 2003.07.02 （ファミリーなし）	1-20