

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】平成19年9月13日(2007.9.13)

【公表番号】特表2003-506076(P2003-506076A)
 【公表日】平成15年2月18日(2003.2.18)
 【出願番号】特願2001-515806(P2001-515806)
 【国際特許分類】

C 1 2 N 5/06 (2006.01)

A 0 1 K 67/02 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 5/00 E

A 0 1 K 67/02

【手続補正書】

【提出日】平成19年7月24日(2007.7.24)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 胚幹細胞表現型を発現する未分化のトリ細胞の持続性培養物を取得する方法であって、

(a) 始生殖細胞を含有するトリ生殖腺細胞を原条形成後のトリ胚から集め；

(b) そのトリ生殖腺細胞を予め調整しておいたフィーダーマトリックスと接触させて付着させ；そして

(c) 本質的には、胚幹細胞表現型を発現する未分化のトリ細胞よりなるトリ細胞培養物を取得するのに十分な時間、そのトリ生殖腺細胞を培地の存在下に予め調整しておいたフィーダーマトリックスで増殖させる；

ことを含んでなる方法。

【請求項2】 トリ生殖腺細胞を14期～45期の胚から集める、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 トリ生殖腺細胞を15期～31期の胚から集める、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 トリ生殖腺細胞を27期～30期の胚から集める、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 トリ生殖腺細胞を約10,000～約20,000細胞の範囲数で予め調整しておいたフィーダーマトリックスと接触させて付着させる、請求項1に記載の方法。

【請求項6】 約20,000のトリ生殖腺細胞を予め調整しておいたフィーダーマトリックスと接触させて付着させる、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 予め調整しておいたフィーダーマトリックスが繊維芽細胞を含んでなる、請求項1に記載の方法。

【請求項8】 繊維芽細胞が約40,000～約60,000細胞の範囲数で予め調整しておいたフィーダーマトリックスに存在する、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 繊維芽細胞が約50,000～約60,000細胞の範囲数で予め調整しておいたフィーダーマトリックスに存在する、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 繊維芽細胞が約55,000～約60,000細胞の範囲数で予め調整しておいたフィーダーマトリックスに存在する、請求項9に記載の方法。

【請求項 1 1】 約 60,000 の繊維芽細胞が予め調整しておいたフィーダーマトリックスに存在する、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】 繊維芽細胞がマウス繊維芽細胞である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 1 3】 マウス繊維芽細胞がマウス繊維芽細胞フィーダー層を形成する、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】 マウス繊維芽細胞がマウス S T O 繊維芽細胞である、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 5】 未分化のトリ細胞を培地の存在下に予め調整しておいた繊維芽細胞フィーダーマトリックスで少なくとも 3 日間増殖させる場合に幹細胞表現型を保持することができる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 6】 トリ胚が、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ウズラおよびキジの胚よりなる群から選択される胚である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】 トリ胚がニワトリ胚である、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 8】 培地が調整培地である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 1 9】 胚幹細胞表現型を発現する未分化のトリ細胞の持続性培養物を取得する方法であって、

(a) 始原生殖細胞を含有するトリ生殖腺細胞を原条形成後のトリ胚から集め；

(b) そのトリ生殖腺細胞を予め調整しておいた繊維芽細胞フィーダー細胞マトリックスと接触させて付着させ；そして

(c) 本質的には、胚幹細胞表現型を発現する未分化のトリ細胞よりなるトリ細胞培養物を取得するのに十分な時間、そのトリ生殖腺細胞を培地の存在下にフィーダー細胞マトリックスで増殖させる；
ことを含んでなる方法。

【請求項 2 0】 トリ生殖腺細胞を 1 4 期～4 5 期の胚から集める、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】 トリ生殖腺細胞を 1 5 期～3 1 期の胚から集める、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】 トリ生殖腺細胞を 2 7 期～3 0 期の胚から集める、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】 トリ生殖腺細胞を約 10,000～約 20,000 生殖腺細胞の範囲数でフィーダー細胞マトリックスと接触させて付着させる、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 4】 約 20,000 のトリ生殖腺細胞をフィーダー細胞マトリックスと接触させて付着させる、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】 繊維芽細胞が約 40,000～約 60,000 細胞の範囲数で繊維芽細胞フィーダーマトリックスに存在する、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 6】 繊維芽細胞が約 50,000～約 60,000 細胞の範囲数で繊維芽細胞フィーダーマトリックスに存在する、請求項 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 7】 繊維芽細胞が約 55,000～約 60,000 細胞の範囲数で繊維芽細胞フィーダーマトリックスに存在する、請求項 2 6 に記載の方法。

【請求項 2 8】 約 60,000 の繊維芽細胞が繊維芽細胞フィーダーマトリックスに存在する、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】 繊維芽細胞フィーダーマトリックスがマウス繊維芽細胞を含んでなる、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 3 0】 マウス繊維芽細胞がマウス S T O 繊維芽細胞である、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】 未分化のトリ細胞を培地の存在下に繊維芽細胞フィーダーマトリックスで少なくとも 3 日間増殖させる場合に幹細胞表現型を保持することができる、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 3 2】 トリ胚が、ニワトリ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ウズラおよびキジの胚よりなる群から選択される胚である、請求項 1 9 に記載の方法。

【請求項 33】 トリ胚がニワトリ胚である、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】 培地が調整培地である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 35】 胚幹細胞表現型を発現する未分化のニワトリ細胞の持続性培養物を取得する方法であって、

(a) 生殖腺細胞を 27 期～30 期のニワトリ胚から集め；

(b) その生殖腺細胞を予め調整しておいたマウス繊維芽細胞フィーダー細胞層と接触させて付着させ；そして

(c) 持続性トリ細胞培養物を取得するのに十分な時間、その生殖腺細胞を調整培地の存在下に予め調整しておいたマウス繊維芽細胞フィーダー細胞層で増殖させ、その持続性トリ細胞培養物は、本質的には、胚幹細胞表現型を発現する未分化のトリ細胞よりなる；ことを含んでなる方法。

【請求項 36】 生殖腺細胞を約 10,000～約 20,000 生殖腺細胞の範囲数で予め調整しておいたマウスフィーダー細胞層と接触させて付着させる、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】 約 20,000 の生殖腺細胞を予め調整しておいたマウスフィーダー細胞層と接触させて付着させる、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】 繊維芽細胞が約 40,000～約 60,000 細胞の範囲数で予め調整しておいたマウス繊維芽細胞フィーダー層に存在する、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 39】 繊維芽細胞が約 50,000～約 60,000 細胞の範囲数で予め調整しておいたマウス繊維芽細胞フィーダー層に存在する、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】 繊維芽細胞が約 55,000～約 60,000 細胞の範囲数で予め調整しておいたマウス繊維芽細胞フィーダー層に存在する、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】 約 60,000 の繊維芽細胞が予め調整しておいたマウス繊維芽細胞フィーダー層に存在する、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】 予め調整しておいたマウス繊維芽細胞フィーダー細胞層がマウス STO 繊維芽細胞フィーダー細胞層である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 43】 未分化のトリ細胞を培地の存在下に予め調整しておいたマウス繊維芽細胞フィーダー層で少なくとも 3 日間増殖させる場合に幹細胞表現型を保持することができる、請求項 35 に記載の方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0006

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0006】

発明の要約

胚幹細胞表現型を発現する未分化のトリ細胞の持続性培養物を取得する方法を開示する。その方法の好ましい態様は、(a) 始原生殖細胞を含有するトリ細胞を原条形成後のトリ胚から集め；(b) そのトリ細胞を予め調整しておいたフィーダーマトリックスと接触させて付着させ；そして(c) 本質的には、胚幹細胞表現型を発現する未分化のトリ細胞よりなるトリ細胞培養物を取得するのに十分な時間、そのトリ細胞を培地の存在下にフィーダーマトリックスで増殖させる；ことを含んでなる。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0007

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0007】

そのトリ細胞は、14 期以降の胚 (H & H)、好ましくは 14 期～45 期の胚、より好ましくは 15 期～31 期の胚、そしてさらにより好ましくは 27 期～30 期の胚から集

める。より好ましくは、そのトリ細胞を約10,000～約20,000細胞の範囲数でフィーダーマトリックスと接触させて付着させる。さらにより好ましくは、約20,000のトリ細胞をフィーダーマトリックスと接触させて付着させる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0024

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0024】

図4Cは、3日間培養した後の、PGC由来のES細胞の大きなコロニーを図示する。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0027

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0027】

図4Fは、5日間培養した後の、PGC由来のES細胞コロニーの高倍率像を図示する。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0040

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0040】

当業界で知られている手順に従って、本明細書中で使用するフィーダーマトリックスを構築する。上述したように、フィーダーマトリックスを予め調整しておくのが好ましい。

「予め調整しておく」という用語は、始原生殖細胞を含有する生殖腺細胞をフィーダーマトリックスと接触させて付着させるより前の時間、例えば、フィーダーマトリックスによる増殖因子または他の因子の産生を開始させて確立するのに十分な時間、フィーダーマトリックスを培地の存在下に培養することを意味する。実験例に開示するように、始原生殖細胞を含有する生殖腺細胞をフィーダーマトリックスと接触させて付着させるより前に、フィーダーマトリックス自体を1～2日間培養することにより、フィーダーマトリックスを予め調整しておく。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0049

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0049】

トリ種において、レシピエントの胚へと注入した場合に生存能力を保有する、あるドナーの細胞型を単離している。Etchesら, Poultry Science 72: 882-887 (1993); Etchesら, Avian Incubationにおいて、第22章、Butterworth Publishers (1990); Verrinder Gibbinsら, Fourth World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Edinburgh (1990); Petitteら, Development 108, 185-189 (1990)を参照されたい。これらの試験は、X期の胚（産卵時の胚）から誘導された胞胚葉細胞が、比較可能なレシピエントのX期の胚に移された場合でも生存能力を持ったままであることを示した。このように、本発明は、トリの表現型を変える新たな方法、および本明細書中に開示するトリ胚幹細胞でそのように産生されたトリを提供する。その方法は、本明細書中に開示するトリ胚幹細胞にインビトロでDNA配列を（例えば、レトロウイルスベクターでの電気穿孔またはトランスフォーメーシ

ョンにより) トランスフェクトした後、そのトランスフェクトした胚幹細胞を、孵化後のトリにおいて表現型の変化(例えば、タンパク質発現の変化、増殖率、試料効率、疾患抵抗性、またはこれらの因子全ての組み合わせの変化)をもたらすのに有効であるDNA配列と共に、トリ胚を含有する卵へと(例えば、卵黄嚢へと、または漿尿膜へと、好ましくは胚下腔へと、そして好ましくは初期の胚発生の中に(例えば、インキュベーションの2または3日前に、そして最も好ましくはインキュベーションの1日前に)) 注入することを含んでなる。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0056

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0056】

ベクターは、目的の遺伝子をコードするDNAを増幅および／または発現させるために本明細書中で使用する製可能なDNA構築物である。適当な発現ベクターは、そのベクターを正しい宿主へと導入した場合にクローンcDNAまたはゲノムDNAを正しい方向で発現させることができる調節要素を有するであろう。そのような要素には、典型的には、限定されるものではないが、転写に関与する細胞タンパク質と特異的に相互作用するプロモーター領域、または誘発剤の投与により誘発可能であり得るプロモーター領域、結合した非相同プロモーター、スプライスアクセプターおよび／またはドナー配列からの転写を何倍も刺激することができるエンハンサー要素、並びに終止およびポリアデニル化シグナルが含まれる。翻訳を可能とすることができるリボソーム結合部位のための配列も必要であって、これを発現させるべき遺伝子に操作可能なように結合させる。最近、骨格筋構造遺伝子および必須近位プロモーター配列の両方の上流に位置して、操作可能なように互いに関連する、筋肉に特異的なプロモーターが単離された(MarおよびOrdahl, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 85, 6404-6408 (1988))。ベクターは、プラスミド、ウイルス(例えば、アデノウイルス、サイトメガロウイルス)、ファージ、および組換えにより宿主ゲノムへと組み込み可能なDNAフラグメントを含んでなる。そのベクターは、場合により、独立して宿主ゲノムを複製して機能するのがよく、または幾つかの場合には、ゲノム自体へと組み込むのがよい。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0058

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0058】

実施例1

生殖腺細胞の収集

EDTAを使用して、生殖腺PGCおよびストローマ細胞の混合物を27-30期(H & H)の胚生殖腺から集めた。単細胞懸濁液を得よう注意する。特に、27-30期(H & H)のニワトリ胚からの生殖腺を適当な(blunt)切開により集めて、 Ca^{2+} および Mg^{2+} を含んでいないリン酸緩衝食塩水(PBS(-))1滴にプールした。胚から集めた後、1.5mlのEppendorfチューブ中、その生殖腺を0.02% EDTA 1mlへと入れた後、37℃のインキュベーターに10分間入れた。次いで、そのチューブを200Gで3分間遠心分離にかけて、上澄みを除去した。次いで、集めた生殖腺を、10% ウシ胎児血清(FBS)を含むDMEMと共に、細胞濾過器(FALCON(登録商標)2360、細孔径100 μM)から新たなチューブへと通した。これは、単細胞懸濁液を与えた。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】 0 0 6 0

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【 0 0 6 0 】

実施例 2

生殖腺細胞の培養

生殖腺細胞を S T O フィーダー層で 3 - 5 日間培養して、抗 S S E A - 1 で染色した。単一の S S E A - 1 陽性 P G C 数および S S E A - 1 陽性コロニー数を、培養の 0、1、3 および 5 日目に試験した。最も多くの場合、多数の P G C の死が最初の 2 4 時間の培養物で起こり、続いて、単一の P G C 数の増大が 3 - 5 日目に起こった。生殖腺 P G C の生存および増殖は、S T O フィーダー層の質、播種した S T O 細胞数、S T O フィーダー層の予調整、および初期に播種した生殖腺細胞数により影響を受ける。実験の間に、多数の変動が F B S の 1 つのバッチ内で観察され、F B S 起源が培養物に影響を及ぼし得ることが提唱された。