

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2006年8月3日 (03.08.2006)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2006/080314 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/06 (2006.01) *A61P 15/00* (2006.01)
A01K 67/02 (2006.01) *A61P 15/08* (2006.01)
A61K 35/48 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/301063
- (22) 国際出願日: 2006年1月24日 (24.01.2006)
- (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2005-017870 2005年1月26日 (26.01.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 辻村 晃 (TSUJIMURA, Akira) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 藤田 和利 (FUJITA, Kazutoshi) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 松宮 清美 (MATSUMIYA, Kiyomi) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 奥山 明彦 (OKUYAMA, Akihiko) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 大田 浩 (OHTA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島
- 南町2-2-3 独立行政法人理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 三枝 英二, 外 (SAEGUSA, Eiji et al.); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜 T N K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, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, 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, LV, 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 REMOVING LEUKEMIC CELLS FROM CELLS ORIGINATING IN TESTIS INFILTRATED WITH LEUKEMIA AND REAGENT KIT TO BE USED THEREIN

(54) 発明の名称: 白血病浸潤精巢に由来する細胞集団から白血病細胞を除去する方法、及びそれに用いられる試薬キット

(57) Abstract: It is intended to provide a method for completely removing leukemic cells from cells involving leukemic cells and spermatogonia and a reagent which is appropriately usable in conducting this method. It is also intended to provide seminal cells of a nonhuman vertebrate obtained by the above method and use of the same. A fraction containing spermatogonial stem cells (a spermatogonial stem cell fraction) is obtained from male reproductive cells containing leukemic cells to be tested. Next, a cell fraction, which is non-reactive to both of an antibody against a surface marker not expressed in the spermatogonia and another antibody against a surface marker expressed in the leukemic cells, is obtained from the above fraction.

(57) 要約: 白血病細胞と精祖細胞を含有する細胞集団から、白血病細胞を完全に除去するための方法、及び当該方法の実施に好適に使用することのできる試薬を提供する。また、上記の方法で取得した非ヒト脊椎動物の精細胞、及びその用途を提供する。白血病細胞を含む被験雄性生殖細胞集団から精原幹細胞を含有する画分(精原幹細胞画分)を取得し、次いで当該画分から精祖細胞に発現しない表面マーカーに対する抗体及び白血病細胞に発現する表面マーカーに対する抗体の両方に対して非反応の細胞画分を取得する。

WO 2006/080314 A1

明 細 書

白血病浸潤精巣に由来する細胞集団から白血病細胞を除去する方法、及びそれに用いられる試薬キット

技術分野

[0001] 本発明は、白血病浸潤精巣から得られる雄性生殖細胞の細胞集団の中から、白血病細胞を完全に除去する方法に関する。また、本発明は上記方法の実施に好適に使用される試薬キットに関する。さらに本発明は、上記方法によって白血病細胞が完全に除去されてなる非ヒト雄性生殖細胞、及びその用途に関する。

背景技術

[0002] 小児の悪性疾患(癌)の中でも最も多い白血病は、近年、放射線治療と抗癌剤投与等の化学療法等を複数組み合わせる集学的治療により完治が期待できるようになってきた。しかしながら、集学的治療により精巣内の生殖細胞は破壊され、第2次性徴以後にこうした集学的治療を行った患者の約50%が男性不妊症になることが報告されている(例えば、非特許文献1等参照)。思春期以降の男性の場合は、射出精子を凍結保存しておき、必要に応じて卵細胞質精子注入術を行うことにより、挙児を得ることが可能であるが、思春期以前の小児では射出精子を得ることはできず、更に精巣内でも精子形成が行われていないため、将来のために精子を取得し凍結保存しておくことができない。このため、小児悪性疾患の治療後に生じ得る男性不妊症を防止し、また治療する方法が求められている。

[0003] かかる小児悪性疾患治療による男性不妊症に対する治療法(不妊治療)として、悪性疾患に対する治療前に予め精巣から自己の精細胞を採取して凍結保存しておき、悪性疾患治療後に、それを精細管内に自己移植し、造精能を回復する方法(精細管内移植法)、また治療前に予め自己の精巣から採取した精祖細胞を体外培養して増殖させ、悪性疾患治療後に、それを精細管内に自己移植し、造精能を回復する方法(精祖細胞の体外培養及び精細管内移植)が提案されている(例えば、非特許文献2等参照)。しかしながら、これらの方法によれば、治療前に採取した精細胞や精祖細胞に癌細胞が混入している可能性があるため、悪性疾患治療によって悪性疾患

が完治しても、その後の不妊治療(精細管内移植)によって癌が再発してしまう危険性がある。このように、従来より提案されている不妊治療は癌細胞の混入という問題を有しており、これが臨床応用に至る障壁となっている。

[0004] このため、移植細胞として、癌細胞を完全に除去して生殖細胞だけを取り出すことのできる方法を開発することが急務となっているが、未だ報告がないのが現状である。

非特許文献1: Thomson, A.B., Campbell, A.J., Irvine, D.C., Anderson, R.A., Kelnar, C.J., and Wallace, W.H.: "Semen quality and spermatozoal DNA integrity in survivors of childhood cancer: a case-control study." /Lancet/. 2002;360:361-367

非特許文献2: Aslam I, Fishel S, Moore H, Dowell K, Thornton S., "Fertility preservation of boys undergoing anti-cancer therapy: a review of the existing situation and prospects for the future." Hum Reprod. 2000 Oct;15(10):2154-9

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0005] 以上のように、小児白血病は、集学的治療によって完治するようになったものの、治療後に男性不妊症になる確率が高く、その治療方法が求められていた。そこで本発明の目的は、当該男性不妊症の治療に使用する移植精細胞として、癌細胞(白血病細胞)が全く混入していない精製度の高い精祖細胞を取得するために、白血病細胞と精祖細胞を含有する細胞集団から、白血病細胞を完全に除去するための方法を提供することを目的とする。また、本発明は当該方法の実施に好適に使用することのできる試薬を提供することを目的とする。さらに、本発明は上記の方法で取得した非ヒト脊椎動物の精細胞、及びその用途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

[0006] 本発明者らは、上記課題を解決すべく、鋭意検討を重ねていたところ、フローサイトメトリーにおいて、精原幹細胞を含む細胞画分(以下、「精原幹細胞画分」ともいう)をゲーティングし、さらに得られた精原幹細胞画分から、セルソーティングにより、精祖細胞に発現しない表面マーカーに対する抗体及び白血病細胞に発現する表面マーカーに対する抗体の両方に対して非反応の細胞画分を取得することによって、白血

病細胞を含む被験雄性生殖細胞の集団から白血病細胞を完全に分離または除去することができることを見出した。更に、本発明者らは、上記方法によって白血病細胞を分離除去した雄性生殖細胞は、正常な生殖能を有する精子を形成する能力を備えていることを確認し、当該方法によって得られた雄性生殖細胞が化学療法によって生じる男性不妊治療に有効に利用できることを確信した。本発明はかかる知見に基づいて完成したものである。

[0007] すなわち、本発明は、下記の態様を包含するものである：

項1. 白血病細胞を含む被験雄性生殖細胞集団から、白血病細胞を分離または除去する方法であって、当該被験雄性生殖細胞集団から、精原幹細胞を含有する画分(精原幹細胞画分)を取得し、次いで当該画分から精祖細胞に発現しない表面マーカーに対する抗体及び白血病細胞に発現する表面マーカーに対する抗体の両方に対して非反応の細胞画分を取得する方法。

[0008] 項2. 精祖細胞に発現しない表面マーカーが、MHC-クラスI、 β 2-ミオグロブリン、及びSca-1よりなる群から選択される少なくとも1つであり、白血病細胞に発現する表面マーカーが、CD2、CD7、CD10、CD13、CD3、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD33、CD34、CD38、CD45、CD54、CD56、CD65、HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DPおよびTCRよりなる群から選択される少なくとも1つである、項1記載の方法。

[0009] 項3. フローサイトメトリーによって行う方法であって、精祖細胞に発現しない表面マーカーに対する抗体及び白血病細胞に発現する表面マーカーに対する抗体として、直接又は間接的に蛍光標識された抗体を用いて、当該抗体に対して非反応の細胞画分の取得を蛍光活性化セルソーティングによって実施する項1または2記載の方法。

[0010] 項4. 白血病細胞を含む被験雄性生殖細胞集団が、白血病に罹患した雄性脊椎動物の精巣から取得した生殖細胞の集団である、項1乃至3のいずれかに記載する方法。

[0011] 項5. 白血病細胞を含む被験雄性生殖細胞集団から白血病細胞を分離または除去するための試薬キットであって、少なくとも蛍光活性化セルソーティング用抗体として、精祖細胞に発現しない表面マーカーに対する抗体及び白血病細胞に発現する

表面マーカーに対する抗体を含む、試薬キット。

- [0012] 項6. 精祖細胞に発現しない表面マーカーが、MHC-クラスI、 β 2-ミオグロブリン、及びSca-1よりなる群から選択される少なくとも1つであり、白血病細胞に発現する表面マーカーが、CD2、CD3、CD7、CD10、CD13、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD33、CD34、CD38、CD45、CD54、CD56、CD65、HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DPおよびTCRよりなる群から選択される少なくとも1つである、項5記載の試薬キット。
- [0013] 項7. 非ヒト雄脊椎動物に由来する白血病細胞を含有する被験雄性生殖細胞集団から、項1乃至4のいずれかの方法によって白血病細胞を分離除去することによって得られる、非ヒト雄性生殖細胞。
- [0014] 項8. 項7記載の非ヒト雄性生殖細胞を、ドナーまたは同種のレシピエント雄脊椎動物の精巢中に移入し、当該雄脊椎動物をその種の雌脊椎動物と交配して、非ヒトの子孫脊椎動物を生産する方法。
- [0015] 項9. 上記雄脊椎動物が無精子症の非ヒト雄脊椎動物である、項8記載の方法。
- [0016] 項10. 交配が、雄脊椎動物とその種の雌脊椎動物との自然交配、雄脊椎動物の精子による雌脊椎動物の人工授精、雄脊椎動物の精子による雌脊椎動物の卵子のインビトロ受精、細胞質内精子注入、帯下状媒精、及び部分的帯層離断よりなる群から選択される方法によって達成される項8または9記載の方法。
- [0017] 項11. 無精子症の非ヒト雄脊椎動物の生殖能力を回復する方法であって、項7記載の非ヒト雄性生殖細胞を、無精子症のドナーまたは同種のレシピエント非ヒト雄脊椎動物の精巢中に移入することを含む、方法。

発明の効果

- [0018] 悪性腫瘍(白血病)が発生した小児の約70%が治療に成功し、長期生存するようになった現在、治療を受けた男児が生殖年齢時に男性不妊症になっていることは、患者に大きな精神的苦痛を与えるものであり、早急な対策が切望されている。本発明の方法によれば、白血病浸潤精巢から取得した精細胞集団から白血病細胞を完全に除去することができるため、当該方法によって得られる精細胞は、男児に対する化学療法により生じる男性不妊症の治療に好適に利用することができる。

発明を実施するための最良の形態

[0019] (I) 白血病細胞の分離又は除去方法

本発明の白血病細胞の分離又は除去方法は、白血病細胞を含む被験雄性生殖細胞集団の中から、白血病細胞を完全に分離または除去することのできる方法である。当該方法は、白血病細胞を含む被験雄性生殖細胞集団から、精原幹細胞を含有する画分(精原幹細胞画分)を取得し、次いで当該画分から更に、精祖細胞に発現しない表面マーカーに対する抗体及び白血病細胞に発現する表面マーカーに対する抗体の両方に対して非反応の細胞画分を取得することによって実施することができる。

[0020] 本発明の方法が対象とする細胞集団(被験細胞集団)は、白血病細胞が混在してなる雄性生殖細胞である。通常、当該被験細胞集団は、白血病に罹患した雄脊椎動物の精巣から取得することができる。ここで雄性生殖細胞としては、精子細胞及びその前駆細胞を挙げることができる。精子細胞の前駆細胞には、精祖細胞(精原幹細胞を含む)、精母細胞、及び精子細胞が含まれる。好ましくは精祖細胞(精原幹細胞を含む)またはこれを少なくとも含む雄性生殖細胞である。

[0021] ここで対象とする脊椎動物には、ヒト、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ブタ、マウス、ラット、スナネズミ、ハムスター、ウサギ、海生哺乳類、厚皮動物、ウマ、ヒツジ、ブタ、及びウシ等の哺乳類;及びアヒル、ガチョウ、シチメンチョウ、ニワトリ等を含む鳥類が含まれる。

[0022] 精巣から被験細胞集団(生殖細胞集団)の取得は、当業界における公知の方法に従って行うことができる。例えば後述する実施例に詳細に説明するように、被験細胞集団は、被験者(被験ヒトおよび非ヒト動物を含む)の精巣から得られる精細管から取得することができる。具体的には、精巣組織から得られた精細管を裁断して、例えば膵臓トリプシン、コラゲナーゼI型、または膵臓デオキシリボヌクレアーゼI型といった酵素を含む溶液(例えば修正DMEM培地等)中でインキュベーション(酵素反応)して非破損細胞を遊離させることによって、被験細胞集団(生殖細胞集団)を取得することができる。なお、精細管は、被験者から採取した精巣またはその一部の組織から白膜を剥離して調製するか、または採取した精巣組織をコラゲナーゼまたはデオキシリボ

ヌクレアーゼ(DNAse)といった酵素で処理し、得られた精細管組織から調製することができる。

[0023] 斯くして調製される被験細胞集団から白血病細胞を分離除去するには、当業界公知の細胞選別及び回収技術(例えば、D.N.Weir編者らの“The Handbook of Experimental Immunology, 1-4巻”:A. Radbruch編者らの“Flow Cytometry and Cell Sorting”(Spring Verlag, 1992):およびOlweus, Jら, 1997、Proc. Natl. Acad.Sci.,USA 94: 1255 1-12556など)を制限なく使用することができる。好ましくはフローサイトメリー、特に蛍光活性化セルソーティングを有するフローサイトメリーが使用される。すなわち、本発明の方法は、好適には上記の方法によって調製される被験細胞集団を、フローサイトメリーに供する工程を含む。

[0024] フローサイトメリーを用いた本発明の方法は、具体的には、下記の(a)及び(b)の工程を行うことによって実施することができる:

(a) 被験細胞集団を、精祖細胞に発現しない表面マーカーに対する抗体(以下、「抗-非精祖細胞-抗体」という)及び白血病細胞に発現する表面マーカーに対する抗体(以下、「抗-白血病細胞-抗体」という)と反応させる工程、及び

(b) (a)で処理した被験細胞集団をフローサイトメリーに供し、

b-1). 精原幹細胞画分をゲーティングする工程、

b-2). ゲーティングした精原幹細胞画分から、「抗-非精祖細胞-抗体」及び「抗-白血病細胞-抗体」の両方に対して非反応の画分(以下、「抗-非精祖細胞-抗体(-)/抗-白血病細胞-抗体(-)画分」という)をソーティングする工程。

[0025] 上記(a)の工程(標識工程)において、精祖細胞に発現しない表面マーカーとしては、制限されないが、MHC-クラスI、 β 2-ミオグロブリン、及びSca-1を挙げることができる[Kubota, H., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 100, 6487-6492 (2003); Shinohara, T., et al., Proc Natl Acad Sci U S A 97, 8346-8351 (2000); Koshimizu, U., et al., Mol Reprod Dev 40, 221-227 (1995); Moore, T.J., et al., Endocrinology 143, 3171-3174 (2002)]. 好ましくはMHC-クラスIまたは β 2-ミオグロブリンである。また、白血病細胞に発現する表面マーカーとしては、制限されないが、CD2、CD3、CD7、CD10、CD13、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD33、CD34、CD38、CD45、CD54

、CD56、CD65、HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DPおよびTCR(T細胞レセプター)を挙げることができる[Hotta,C. et al. Immunogenetics 51, 624-631 (2000)]。好ましくはCD45である。精祖細胞に発現しない表面マーカーと白血病細胞に発現する表面マーカーの組合せとしては、はMHC-クラスIとCD45の組合せ、または β 2-ミオグロブリンとCD45の組合せを好適に例示することができる。

[0026] 本発明で用いられる「抗体」は、上記の各種表面マーカーに対する抗体である限り、任意のアイソタイプ(IgA、IgG、IgE、IgD、IgM)のポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、抗体フラグメント(例えば、抗原結合部位を含むFab断片、F(ab')₂断片、Fab'断片、scFvのようなFv断片、単離された重鎖(H鎖)や軽鎖(L鎖))等の別を問わない。好ましくは上記の各種表面マーカーに対するモノクローナル抗体またはその抗体フラグメントである。なお、上記の各種表面マーカー(MHC-クラスI、 β 2-ミオグロブリン、Sca-1、CD2、CD3、CD7、CD10、CD13、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD33、CD34、CD45、CD54、CD56、CD65、HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DP、およびTCR)に対するモノクローナル抗体はいずれも公知であり、例えば、BD Biosciences PharMingen社等から商業的に入手することができる。

[0027] 上記(a)工程(標識工程)は、(i)精祖細胞に発現しない表面マーカーに対する抗体(抗-非精祖細胞-抗体)と(ii)白血病細胞に発現する表面マーカーに対する抗体(抗-白血病細胞-抗体)とを組み合わせ用い、被験細胞集団をこれらの抗体の両方と反応させることによって実施することができる。抗-非精祖細胞-抗体としては、上記MHC-クラスIに対する抗体(抗-MHC-クラスI抗体)、 β 2-ミオグロブリンに対する抗体(抗- β 2-ミオグロブリン抗体)、及びSca-1に対する抗体(抗-Sca-1抗体)のいずれか1つを使用することもできるが、これらを2種以上組み合わせ使用することもできる。好ましくは抗-MHC-クラスI抗体、または抗- β 2-ミオグロブリン抗体である。

[0028] 抗-白血病細胞-抗体としては、上記CD2、CD3、CD7、CD10、CD13、CD15、CD14、CD19、CD20、CD21、CD22、CD33、CD34、CD38、CD45、CD54、CD56、CD65、HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DPまたはTCRに対する抗体(抗-CD2抗体、抗-CD3抗体、抗-CD7抗体、抗-CD10抗体、抗-CD13抗体、抗-CD14抗体、抗-CD15抗体、抗-CD19抗体、抗-CD20抗体、抗-CD21抗体、抗-CD22抗体、抗-CD33抗体、抗-CD

34抗体、抗-CD38抗体、抗-CD45抗体、抗-CD54抗体、抗-CD56抗体、抗-CD65抗体、抗-HLA-DR抗体、抗-HLA-DQ抗体、抗-HLA-DP抗体または抗-TCR抗体)のいずれか1つを使用することもできるが、これらを2種以上組み合わせて使用することもできる。好ましくは抗-CD45抗体である。

[0029] 抗-非精祖細胞-抗体と抗-白血病細胞-抗体との組み合わせとしては、抗-MHC-クラスII抗体と抗-CD45抗体との組み合わせ、または抗- β 2-ミオグロブリン抗体と抗-CD45抗体との組み合わせを挙げることができる。

[0030] これらの抗体は、蛍光活性化セルソーティングの実施のために、蛍光色素で標識されていることが好ましい。かかる蛍光色素としては、当業界でフローサイトメトリー用蛍光色素として公知のものを任意に使用することができる。好ましくは、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、フィコエリスリン(Phycoerythrin:PE)、PE-Cy5(PE-Cyanin5)、PE-Cy5.5(PE-Cyanin5.5)、PE-Cy7(PE-Cyanin7)、ローダミンイソチオシアネート、テキサスレッド(Texas Red)、ECD(PE-Texas Red-x)、アロフィコサニン(APC)、APC-Cy7(APC-Cyanin 7, PharRed)、Per-CP(Peridinin Chlorophyll Protein)、及びPerCP-Cy5.5(Per-CP-Cyanin5.5)等を挙げることができる。

[0031] 標識は、上記抗体に上記蛍光色素を共有結合で結合することによって行うことができるが、かかる結合には当業界で公知の方法を使用することができる(例えば、E.Harlow & D.Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual"(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988))。また、簡便には、商業的に入手できる、予め蛍光色素で標識された抗体(例えば「フローサイトメトリー用蛍光標識抗体」)を用いることもできる。なお、本発明の抗体は、一般には、蛍光色素によって標識されることが好ましいが、例えば化学発光標識や生物発光標識等の、他の標識の使用を制限するものではない。

[0032] また上記の抗体は、蛍光色素で標識されていなくても、蛍光色素で標識できるものであってもよい。かかる抗体としては、例えばビオチンまたはストレプトアビジンで処理されてなる抗体を挙げることができる。この場合、蛍光色素を結合したストレプトアビジンまたはビオチンと反応させることによって、ビオチン-アビジン反応を介して、抗体を間接的に蛍光色素で標識することができる。また、蛍光色素で標識されていない抗体

は、蛍光色素で標識してなるその2次抗体と反応させることによって、間接的に蛍光色素で標識することができる。

[0033] (a)工程(標識工程)において、被験細胞集団と抗体との反応は、被験細胞が生存し、且つ細胞表面に発現している抗原(表面マーカー)とそれに対する抗体とが抗原-抗体反応する条件下で行うことができる。この限りにおいて特に制限されないが、例えば、反応溶媒として、被験細胞に等張またはそれに同等のリン酸緩衝化生理食塩水などの緩衝化生理食塩水を用いることができる。

[0034] 斯くして(a)工程で得られた被験細胞集団は、次いで(b)工程(フローサイトメリー工程)に供される。当該フローサイトメリー工程は、b-1)精原幹細胞画分をゲーティングする工程(ゲーティング工程)、及びb-2)ゲーティングした精原幹細胞画分から、「抗-非精祖細胞-抗体」及び「抗-白血病細胞-抗体」の両方に対して非反応の画分〔抗-非精祖細胞-抗体(-)/抗-白血病細胞-抗体(-)画分〕をソーティングする工程(ソーティング工程)の少なくとも2工程から構成される。

[0035] (ゲーティング工程)

ゲーティング工程は、(a)工程(標識工程)で得られた被験細胞集団に対するフローサイトメリーにおいて、前方散乱光(FSC:Forward scatter)と側方散乱光(SSC:Side scatter)で、死細胞やゴミを多く含むFSC^{low}領域及び体細胞(セルトリ細胞など)を多く含むSSC^{high}領域を除いた、いわゆるFSC^{high}/SSC^{low}領域であって、精原幹細胞を含む画分(精原幹細胞画分)にゲートをかけることによって実施することができる。なお、前方散乱光(FSC)は、レーザー光が被験細胞集団に当たったときに生じる散乱光であって細胞の大きさを反映し、側方散乱光(SSC)は、レーザー光が被験細胞集団に当たったときに生じる直角方向に散乱する光であって細胞の内部構造(複雑さ)を反映する。

[0036] 制限はされないものの、例えば図1のa及びbに示すように、X軸及びY軸をそれぞれ測定パラメーターFSC及びSSCとする2パラメーターヒストグラム[リニア・スケール(常数目盛り):X軸:0~1000、Y軸:0~1000]において、上記FSC^{high}/SSC^{low}領域は、X軸が50~1000、Y軸が0~600の領域、好ましくはX軸が100~1000、Y軸が0~500の領域、より好ましくはX軸が200~1000、Y軸が0~400の領域として設定することがで

きる。

[0037] (ソーティング工程)

ソーティング工程は、上記ゲーティング工程によって特定した精原幹細胞画分について、フローサイトメトリーによって得られる「抗-非精祖細胞-抗体」及び「抗-白血病細胞-抗体」との反応結果から、「抗-非精祖細胞-抗体」及び「抗-白血病細胞-抗体」の両方に対して反応しない画分〔抗-非精祖細胞-抗体(-)/抗-白血病細胞-抗体(-)画分〕を取得することによって実施される。当該工程は、好適には蛍光活性化セルソーティング(FACS)を使用して行うことができる。この場合「抗-非精祖細胞-抗体」及び「抗-白血病細胞-抗体」として好適には、上述するように、蛍光色素で直接または間接的に標識された抗体が使用される。ここで、「抗-非精祖細胞-抗体」及び「抗-白血病細胞-抗体」の標識には、互いに発光波長が重複しない、異なる蛍光色素を用いることが好ましい。なお、蛍光活性化セルソーティング(FACS)は、例えば「フローサイトメトリー—実戦プロトコール」、広川、化学と生物 実験ライン、M.G. Ormerod(編集);「Flow Cytometry and Sorting (2nd Edition)」, Myron R. Melamed et al, Wiley-Liss, Inc. NY, 1990;「フローサイトメトリー—手技と実際—」第2版 太田和雄 監修、蟹書房、1988年などに記載される方法によって実施することができる。

[0038] 蛍光活性化セルソーティング(FACS)は、具体的には「抗-非精祖細胞-抗体」の標識に使用した蛍光色素の発光(蛍光)と「抗-白血病細胞-抗体」の標識に使用した蛍光色素の発光(蛍光)をパラメーターとする、少なくとも2次元の分析によって行われる。かかる分析によって精原幹細胞画分は4つの画分に分画することができる。かかる4つの画分は具体的に、1)「抗-非精祖細胞-抗体」及び「抗-白血病細胞-抗体」の両方に対して反応しない画分〔抗-非精祖細胞-抗体(-)/抗-白血病細胞-抗体(-)画分〕、2)「抗-非精祖細胞-抗体」に対して反応し、且つ「抗-白血病細胞-抗体」に対して反応しない画分〔抗-非精祖細胞-抗体(+)/抗-白血病細胞-抗体(-)画分〕、3)「抗-非精祖細胞-抗体」に対して反応せず、且つ「抗-白血病細胞-抗体」に対して反応する画分〔抗-非精祖細胞-抗体(-)/抗-白血病細胞-抗体(+画分〕、4)「抗-非精祖細胞-抗体」及び「抗-白血病細胞-抗体」の両方に対して反応する画分〔抗-非精祖細胞-抗体(+)/抗-白血病細胞-抗体(+画分〕に分類することができる。かか

る4画分への分類は、「抗-非精祖細胞-抗体」及び「抗-白血病細胞-抗体」との反応によって生じる精原幹細胞画分の発光(蛍光)に基づいて行なわれる。

[0039] 斯くして、得られる4画分のうち、1)「抗-非精祖細胞-抗体」及び「抗-白血病細胞-抗体」の両方に対して非反応の画分[抗-非精祖細胞-抗体(-)/抗-白血病細胞-抗体(-)画分]をソーティングすることによって、被験細胞集団から白血病細胞を完全に分離除去することができ、白血病細胞を含まない精原幹細胞画分を取得することができる。

[0040] なお、1)「抗-非精祖細胞-抗体(-)/抗-白血病細胞-抗体(-)画分」のセルソーティングは、FACSの慣用法に従って、当該画分に属する細胞を、静電氣的にチューブに偏向を受けられる個々の液体小滴の中に分離することによって行うことができる。

[0041] フローサイトメトリーを用いた本発明の方法は、前述する(a)工程(標識工程)と(b)工程(フローサイトメトリー工程)を有するものであればよいが、さらに、(a)工程(標識工程)において、被験細胞集団を死細胞染色剤と反応させる操作、及び(b)工程(フローサイトメトリー工程)において、死細胞染色剤で標識された被験細胞を除去する操作を備えるものであってもよい。ここで被験細胞集団を死細胞染色剤と反応させる操作は、細胞が生存し、且つ死細胞が当該染色剤で染まる条件で行うことができ、この限りにおいて条件を特に問うものではない。死細胞染色剤で標識された被験細胞を除去する操作は、好適には(b)のゲーティング工程(b-1)後、例えばソーティング工程(b-2)と同時、またその前後に行うことができる。具体的には、ソーティング工程(b-2)において、「抗-非精祖細胞-抗体(-)/抗-非精祖細胞-抗体(-)画分」であって且つ死細胞染色剤で標識されない画分(死細胞染色剤(-)画分)をソーティングするか、または「抗-非精祖細胞-抗体(-)/抗-非精祖細胞-抗体(-)画分」をソーティングする前後に、死細胞染色剤で標識されない画分(死細胞染色剤(-)画分)をソーティングすることによって行うことができる。

[0042] なお、ここで死細胞染色剤としては、死細胞を特異的に染色する色素であれば特に制限はされないが、例えばTrypan Blue、Erythrosin B、Propidium iodide (PI)、及び7-amino-actinomycin D等の公知の蛍光色素を用いることができる。

[0043] (II) 試薬キット

本発明は、また白血病細胞を含む被験雄性生殖細胞集団から白血病細胞を分離または除去するために用いられる試薬キットを提供する。当該試薬キットは、同一または分離した容器内に、少なくとも(1)精祖細胞に発現しない表面マーカーに対する抗体、及び(2)白血病細胞に発現する表面マーカーに対する抗体を含むことを特徴とする。

[0044] (1)の抗体としては、具体的には、MHC-クラスIに対する抗体(抗MHC-クラスI抗体)、 β 2-ミクログロブリンに対する抗体(抗 β 2-ミクログロブリン抗体)、及びSca-1に対する抗体(抗Sca-1抗体)を挙げることができる。好ましくは抗MHC-クラスI抗体、または抗 β 2-ミクログロブリン抗体である。また(2)の抗体としては、具体的には、CD2、CD3、CD7、CD10、CD13、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD33、CD34、CD38、CD45、CD54、CD56、CD65、HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DP、またはTCRのいずれかに対する抗体(抗-CD2抗体、抗-CD3抗体、抗-CD7抗体、抗-CD10抗体、抗-CD13抗体、抗-CD14抗体、抗-CD15抗体、抗-CD19抗体、抗-CD20抗体、抗-CD21抗体、抗-CD22抗体、抗-CD33抗体、抗-CD34抗体、抗-CD38抗体、抗-CD45抗体、抗-CD54抗体、抗-CD56抗体、抗-CD65抗体、抗-HLA-DR抗体、抗-HLA-DQ抗体、抗-HLA-DP抗体または抗-TCR抗体)を挙げることができる。好ましくは抗-CD45抗体である。(1)の抗体(抗-非精祖細胞-抗体)と(2)の抗体(抗-白血病細胞-抗体)との組み合わせとしては、抗-MHC-クラスI抗体と抗-CD45抗体との組み合わせ、または抗- β 2-ミオグロブリン抗体と抗-CD45抗体との組み合わせを挙げることができる。

[0045] これらの抗体(1)及び(2)は、対象とする抗原(細胞マーカー)に対して特異的に結合する抗体であればよく、その限りにおいて任意のアイソタイプ(IgA、IgG、IgE、IgD、IgM)のポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、抗体フラグメント[例えば、抗原結合部位を含むFab断片、F(ab')₂断片、Fab'断片、scFvのようなFv断片、単離された重鎖(H鎖)や軽鎖(L鎖)]等の別を問わない。好ましくはモノクローナル抗体、またはその抗体フラグメントである。

[0046] これらの抗体(1)及び(2)は、制限はされないが、標識剤と結合した抗体(標識抗体)であってもよい。抗体の標識は、検出可能な標識であれば特に制限されず、放射性

または非放射性同位体による標識、化学発光標識、生物発光標識、蛍光標識を挙げることができる。

[0047] 蛍光活性化セルソーティングに使用する抗体には、蛍光色素と結合した標識抗体(蛍光標識抗体)を用いることが好ましい。かかる蛍光色素としては、当業界でフローサイトメトリー用蛍光色素として公知のものを任意に使用することができる。好ましくは、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、フィコエリスリン(Phycoerythrin:PE)、PE-Cy5(PE-Cyanin5)、PE-Cy5.5(PE-Cyanin5.5)、PE-Cy7(PE-Cyanin7)、ローダミンイソチオシアネート、テキサスレッド(Texas Red)、ECD(PE-Texas Red-x)、アロフィコサニン(APC)、APC-Cy7(APC-Cyanin 7, PharRed)、Per-CP(Peridinin ChlorophyllProtein)、及びPerCP-Cy5.5(Per-CP-Cyanin5.5)等を挙げることができる。

[0048] 標識は、公知の方法を用いて、前述する抗体に上記蛍光色素を共有結合させることによって行うことができる(例えば、E.Harlow & D.Lane, "Antibody: A Laboratory Manual"(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1988)。また、簡便には、商業的に入手できる蛍光色素標識抗体(例えば「フローサイトメトリー用蛍光標識抗体」)を用いることもできる。

[0049] またこれらの抗体(1)及び(2)は、蛍光色素標識抗体でなくても、蛍光色素等の標識剤で標識できるものであってもよい。かかる抗体としては、例えばビオチンまたはストレプトアビジンで処理されてなる抗体を挙げることができる。この場合、当該抗体を、蛍光色素等の標識剤を結合したストレプトアビジンまたはビオチンと反応させることによって、ビオチン-アビジン反応を介して、間接的に標識剤(蛍光色素等)で標識することができる。従ってこの場合、本発明の試薬キットには、他の試薬成分として、蛍光色素等の標識剤を結合したストレプトアビジンまたはビオチンを含むことが好ましい。また、抗体(1)または(2)として標識されていない抗体を使用する場合は、試薬キットに、他の試薬成分として蛍光色素等の標識剤で標識してなる2次抗体(上記各抗体と特異的に結合する抗体)を含むことが好ましい。この場合、上記抗体(1)または(2)を、当該2次抗体と反応させることによって、間接的に標識剤(蛍光色素等)で標識することができる。

[0050] 本発明の試薬キットは、少なくとも上記(1)の抗体及び(2)の抗体を有するものであれ

ばよく、同一または別途分離された容器内に、他の試薬を含有するものであってもよい。かかる他の試薬としては、例えば、前述する蛍光色素等の標識剤を結合したストレプトアビジンまたはビオチン、または蛍光色素等の標識剤で標識してなる2次抗体を挙げることができる。また、他の試薬として、死細胞染色剤(例えば、Trypan Blue、Erythrosin B、Propidium iodide (PI)、及びEthidium bromide (EB)、7-amino-actinomycin D等)、反応溶媒(例えば、リン酸緩衝化生理食塩水などの緩衝化生理食塩水など)、およびコントロール試薬を挙げるができる。なお、コントロール試薬としては、具体的には、脊椎動物の精細胞またはその疑似物を挙げるができる。疑似物としては、例えばその表面に精細胞の表面マーカーを有するビーズを挙げることができる。

[0051] (III) 非ヒト雄性生殖細胞集団及びその用途

本発明はまた、非ヒト雄脊椎動物に由来する、白血病細胞を含有する被験雄性生殖細胞集団から、上記(I)に記載する方法によって白血病細胞を分離除去することによって得られる、非ヒト雄性生殖細胞集団に関する。

[0052] ここで脊椎動物としては、非ヒト霊長類、イヌ、ネコ、ブタ、マウス、ラット、スナネズミ、ハムスター、ウサギ、海生哺乳類、厚皮動物、ウマ、ヒツジ、ブタ、及びウシ等の哺乳類;及びアヒル、ガチョウ、シチメンチョウ、ニワトリ等を含む鳥類といったヒト以外の脊椎動物を挙げるができる。好ましくは、一般的に薬物の有効性や安全性を確認するための生物学的試験(前臨床試験、非臨床試験)に使用される非ヒト脊椎動物である。本発明の非ヒト雄性生殖細胞集団は、上記(I)に記載する方法によって得られる非ヒト精細胞の集合物であって、白血病細胞が完全に除去されており、且つ少なくとも正常な生殖能を有する精子を形成する能力を有する精祖細胞(精原幹細胞)を含むことを特徴とする。なお、精細胞集団を構成する精細胞の数は、正常な生殖能を有する精子を形成する能力を有する精祖細胞(精原幹細胞)を含むものであれば、特に制限されない。

[0053] 当該非ヒト雄性生殖細胞集団(精細胞集団)は、同種非ヒト脊椎動物の正常な子孫を生産するために使用することができる。具体的には、かかる子孫の生産は、まず上記の非ヒト雄性生殖細胞集団(精細胞集団)をドナーあるいは同種のレシピエント雄

脊椎動物の精巣内に移入し、その中で成熟させて精子とし、その雄脊椎動物を同種の雌脊椎動物と交配することによって行うことができる。

[0054] 精細胞集団の精巣内への移入は、精細胞が精巣の精細管中に留まるような条件で行われればよく、斯くして、精細管中のライディヒ細胞またはセルトリ細胞等のサポート細胞の作用をうけて、卵子を受精し得る自己運動性の一俵体細胞(雄性配偶子、精子)に成熟する。精細胞集団の精巣内への移入は、通常マイクロピペットを使用する直接注入法によって行うことができる。この際、併せて、精原幹細胞の分化に関わるライディヒ細胞またはセルトリ細胞等のサポート細胞を移入してもよい。移入する細胞濃度は、本発明の効果を得ることができれば特に制限されないが、 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^5$ 細胞/ $10 \mu\text{l}$ 液体の範囲を例示することができる。

[0055] なお、精細胞集団を移植する対象の雄脊椎動物は、精細胞集団に由来するドナー雄脊椎動物であっても、また同種のレシピエント雄脊椎動物であってもよい。また、制限はされないが、当該精細胞集団を移植する対象の雄脊椎動物としては、好ましくは精子形成能が消失または低下した無精子症の雄脊椎動物を挙げることができる。無精子症の雄脊椎動物は、例えば、雄脊椎動物に、細胞毒性アルキル剤(例えば、ブスルファン、クロラムブシル、シクロホスファミド、メルファラン、エチルエタンスルホン酸等)を投与するか(化学的処理)、または当該化学的処理と γ 照射などの放射線処置とを併用することによって得ることができる。

[0056] 移入した精細胞を精巣内で精子まで成熟させた後、その雄脊椎動物を同種の雌脊椎動物と交配することによって、雄性及び雌性配偶子が結合して受精が生起し、一定の妊娠期間後、これらの脊椎動物の子孫が誕生する。雄性及び雌性配偶子の結合(交配)は、自然的交尾(自然交配)、またはインビトロまたはインビボの人工的交配手段によって行うことができる。かかる人工的交配手段としては、制限されないが、例えば人工媒精、人工授精、インビトロ受精、細胞質内精子注入、帯下状媒精、または部分的帯層離断などを挙げることができる。斯くして誕生する子孫は、白血病の発症なく正常であり、さらにその後続世代を産生する正常な生殖機能を備えることができる(繁殖性)。

[0057] 従って、本発明の方法は、ヒト以外の悪性疾患動物(白血病動物)の化学的処理に

よる雄性不妊症を矯正して正常な生殖機能を回復させ、正常な子孫を得るために使用することができるが、さらに、例えば前臨床試験などのように、ヒトの雄性不妊症に対する治療効果を予測評価するためにも有効に利用することができる。

[0058] また、(1)の方法によって得られる非ヒト雄性生殖細胞集団(精細胞集団)は、同種非ヒト脊椎動物の生殖能力の回復に有効に使用することができる。かかる方法は、上記非ヒト雄性生殖細胞集団(精細胞集団)を、無精子症のドナーまたは同種のレシピエント非ヒト脊椎動物の精巢中に移入することによって行うことができる。当該方法は、精子形成障害を有する非ヒト脊椎動物の治療に好適に用いられる。また本発明の方法による非ヒト脊椎動物に対する治療効果は、本発明方法のヒトに対する生殖的適用の可能性を示唆するものである。従って、本発明の方法は、例えば前臨床試験などのように、ヒトの雄性不妊症に対する治療効果を予測評価するために有効に利用することができる。

実施例

[0059] 以下に実施例を挙げて本発明の詳細を説明するが、本発明は実施例だけに限定されるものではない。特に言及しない限り、下記の実施例において「%」は「w/w%」を意味するものとする。なお、動物実験はすべて、国立大学法人大阪大学(日本)の実験動物の注意および使用上のガイドラインに従って行った。

[0060] 実施例1

マウス雄性生殖細胞(精細胞)から白血病細胞を分離・除去するために使用する細胞表面マーカーの確認

(1)本発明において、フローサイトメリーによる蛍光活性化セルソーティング(FACS)によって、白血病細胞と精細胞とを分離するために用いる細胞表面マーカーは少なくとも2つの条件を満たしている必要がある。第一に、白血病細胞の混入なく100%純粋な精細胞が取得できること、第二に、取得した精細胞が、移植後に精子形成することのできる精祖細胞を含んでいることである。そこで、細胞表面マーカーとして、CD45とMHCクラスI[MHCクラスI重鎖(H-2K^b/H-2D^b)を使用]を用いて、これらの有効性を調べた。

[0061] (2)細胞の調製

具体的には、白血病細胞としてC1498細胞株(C57BL/6起源のマウスの白血病細胞株)を、また精細胞として、正常なC57BL/6マウスの精巣から単離した精細胞を使用した。

[0062] なお、精細胞は下記のようにして調製した。まず精巣から白膜を除き、精細管を、20 mM HEPESでpH 7.3に緩衝化した、コラゲナーゼ・Type IV(1mg/ml)(シグマ・ケミカル社)を含むダルベッコの修正イーグル培地 (DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium)に入れて、5分間手で振盪しながら15分間、37°Cで培養した。得られた精細管を、カルシウムフリーのリン酸塩緩衝化生理食塩水 (PBS) で2度洗浄し、次いでこれを0.25%のトリプシンおよびDNase I(100 μ g/ml)(シグマ)を含むPBSの中で、5分間隔で振盪しながら、37°Cで15分間培養した。これに、1/2容量の10%の胎仔牛血清(FBS)を含むDMEMを加え、得られた細胞懸濁液を30 μ m孔サイズを有するナイロン製のメッシュでろ過し、大きな塊の細胞を除去した。斯くして得られた細胞懸濁液を精細胞として使用した。

[0063] (3) 細胞免疫染色

免疫染色はKubotaらの方法(Kubota, H., Avarbock, M.R. & Brinster, R.L. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 100, 6487-6492 (2003))に従って行った。

[0064] 具体的には、上記の各精細胞を、0.5%のFBSを含むPBS(PBS/FBS)に懸濁し、氷上で20分間、ビオチンを結合した抗H-2K^b/H-2D^b抗体(28-8-6; BD Biosciences Pharmingen、サンディエゴ(CA))(以下、「ビオチン結合-抗H-2K^b/H-2D^b抗体」という)と共に培養した。次いで、多量のPBS/FBSで2度洗浄した後、蛍光活性化セルソーティング (FACS) するために、蛍光標識した。具体的にはPE(phycoerythrin)を結合したストレプトアビジン(BD Biosciences Pharmingen)(以下、「PE結合-ストレプトアビジン」という)とFITC(Fluorescein isothiocyanate)を結合した抗CD45抗体(30-F11; BD Biosciences Pharmingen)(以下、「FITC結合-抗CD45抗体」という)と共に20分間培養した。なお、上記第1抗体(ビオチン結合-抗H-2K^b/H-2D^b抗体)および第2の試薬(PE結合-ストレプトアビジン、FITC結合-抗CD45抗体)はいずれも5 μ g/mlの濃度で使用した。

- [0065] 蛍光標識したこれらの細胞を最終洗浄した後、 $1 \mu\text{g/ml}$ ヨウ化プロピジウム (PI: propidium iodide) (シグマ・ケミカル社) (死細胞染色剤) を含む PBS/FBS に再懸濁し (4×10^6 細胞/ml)、フローサイトメリーに供するまで、暗室の氷上で保管した。
- [0066] (4) フローサイトメリーによる解析
セルソーティングは、488nm のアルゴン・レーザー (250mW) を装備した FACS ヴァンテージ (BD Biosciences、サンホセ) を用いて行った。アルゴンイオンレーザーは、蛍光色素 FITC、PE、及び PI を励起するために使用し、FITC から生じた蛍光は 530nm のフィルタ、及び PE 及び PI から生じた蛍光は 575nm のフィルタで集め、検出した。
- [0067] (3) で蛍光標識した各細胞をそれぞれフローサイトメリーに供した。C1498 細胞 (白血病細胞) 及び精細胞について得られた、前方散乱光 (FSC: Forward-scatter) 及び側方散乱光 (SSC: Side-scatter) をパラメーターとする 2 パラメーターヒストグラムを図 1 の a 及び b にそれぞれ示す。各細胞について、 FSC^{high} および SSC^{low} 細胞集団エリア (G1) 内のクラスターをゲーティングし (図 1a、b)、得られたゲート領域の細胞 (G1 画分) について、次に、表面マーカーに対する抗体である抗 H-2K^b/H-2D^b 抗体及び抗 CD45 抗体、ならびに PI による標識の有無を調べた。
- [0068] なお、抗 H-2K^b/H-2D^b 抗体による標識の有無は、ビオチン-アビジン反応によって抗 H-2K^b/H-2D^b 抗体に間接的に結合した PE の蛍光に基づいて、また抗 CD45 抗体による標識の有無は、抗 CD45 抗体に結合した FITC の蛍光に基づいて評価した。
- [0069] C1498 細胞 (白血病細胞) 及び精細胞の各 G1 画分について、測定パラメーターとして抗 H-2K^b/H-2D^b 抗体の標識に使用した PE、及び死細胞染色剤 (PI) の蛍光を Y 軸に、抗 CD45 抗体の標識に使用した FITC の蛍光を X 軸にとり、解析したヒストグラム (クオドランツリージョン) を図 1 の c 及び d にそれぞれ示す。
- [0070] 図 1c に示すように、C1498 細胞については、ゲート領域 (FSC^{high} および SSC^{low} 細胞集団エリア) (G1) 内の細胞の 99.7% が、抗 H-2K^b/H-2D^b 抗体および抗 CD45 抗体の両方に反応した (陽性反応)。一方、図 1d に示すように、精細胞についてはゲート領域 (FSC^{high} および SSC^{low} 細胞集団エリア) (G1) 内の細胞の 93.5% が、抗 H-2K^b/H-2D^b 抗体および抗 CD45 抗体の両方に対して陰性であった。そして、抗 H-2K^b/H-2D^b 抗体及び抗 CD45 抗体に対する陰性画分 [抗 H-2K^b/H-2D^b 抗(-) / 抗 CD45 抗体(-) 画

分] (G2) にはC1498細胞は一切含まれていなかった(図1c, d)。さらに、当該画分(G2)の細胞は、死細胞染色剤であるPIに対しても陰性を示した。

[0071] しかしながら、抗H-2K^b/H-2D^b抗体に対して陽性で抗CD45抗体に対して陰性の画分[抗H-2K^b/H-2D^b抗体(+)/抗CD45抗体(-)画分] (G4) にはC1498細胞が0.3%含まれていた。なお、「抗H-2K^b/H-2D^b抗体(-)/抗CD45(-)抗体画分」(G3)に含まれる細胞が精細胞であることは、TRA 98(精細胞の核に対する特異マーカー)に対して陽性反応を示すことから確認された(Tanaka, H. et al., Int J Androl 20, 361-366 (1997))。

[0072] 以上の結果から、2つの抗体(CD45に対する抗体、MHCクラスI重鎖(H-2K^b/H-2D^b)に対する抗体)を組み合わせて用いることによって、精細胞と白血病細胞とを厳格に分離することができることが判明した(図1)。

[0073] 実施例2

ヒト雄性生殖細胞(精細胞)から白血病細胞を分離・除去するために使用する細胞表面マーカーの確認

(1)ヒトの細胞を対象として、細胞表面マーカー(CD45に対する抗体[以下、「抗-CD45抗体」という]、ヒトMHCクラスIに相当するHLA-A,B,Cに対する抗体[以下、抗HLA-A,B,C抗体という])の有効性を調べた。

[0074] (2)細胞の調製

ヒト白血病細胞としてJurkat細胞株(ヒト白血病細胞株)を使用した。

[0075] (3)細胞免疫染色

免疫染色は、実施例1(3)と同様にKubotaらの方法に従って行った。具体的には、上記のヒト白血病細胞を0.5%のFBSを含むPBS(PBS/FBS)に懸濁し、フローサイトメトリーするために、PE(phycoerythrin)を結合した抗HLA-A,B,C抗体(28-8-6; BD Biosciences PharMingen、サンディエゴ(CA))(以下、「PE結合-抗HLA-A,B,C抗体」とFITC(Fluorescein isothiocyanate)を結合した抗CD45抗体(30-F11; BD Biosciences PharMingen)(FITC結合-抗CD45抗体)と共に20分間培養した。蛍光標識したこれらの細胞を最終洗浄した後、1 μg/ml ヨウ化プロピジウム(PI: propidium iodide)(シグマ・ケミカル社)(死細胞染色剤)を含むPBS/FBSに再懸濁し(4×10⁶細胞/ml)、フローサイトメ

トリーに供するまで暗室の氷上で保管した。

[0076] (4)フローサイトメトリーによる解析

フローサイトメトリーは実施例1(4)と同様の方法で行った。具体的には、(3)で蛍光標識した各細胞をそれぞれフローサイトメトリーに供した。ヒト白血病細胞について得られた、前方散乱光(FSC:Foward-scatter)及び側方散乱光(SSC:Side-scatter)をパラメーターとする2パラメーターヒストグラムを図2のaに示す。各細胞について、FSC^{high}およびSSC^{low}細胞集団エリア(G1)内のクラスターをゲーティングし(図2a)、得られたゲート領域の細胞(G1画分)について、次に、表面マーカーに対する抗体である抗HLA-A,B,C抗体及び抗CD45抗体、ならびにPIによる標識の有無を、実施例1と同様の方法により調べた。

[0077] Jurkat細胞株(ヒト白血病細胞)の各G1画分について、測定パラメーターとして抗HLA-A,B,C抗体の標識に使用したPE、及び死細胞染色剤(PI)の蛍光をY軸に、抗CD45抗体の標識に使用したFITCの蛍光をX軸にとって、解析したヒストグラム(クオドラントリージョン)を図2のbに示す。図2bに示すように、ゲート領域(FSC^{high}およびSSC^{low}細胞集団エリア)(G1)内の細胞の99.6%が、抗HLA-A,B,C抗体および抗CD45抗体の両方に反応した(陽性反応)。一方、抗HLA-A,B,C抗体及び抗CD45抗体に対する陰性画分[抗HLA-A,B,C抗体(-)/抗CD45抗体(-)画分](G2)にはJurkat細胞株(ヒト白血病細胞)は一切含まれていなかった(図2b)。さらに、当該画分(G2)の細胞は、死細胞染色剤であるPIに対しても陰性を示した。

[0078] 以上の結果から、2つの抗体(CD45に対する抗体、ヒトMHCクラスI(HLA-A,B,C)に対する抗体)を組み合わせて用いることによって、ヒト精細胞とヒト白血病細胞とを厳格に分離することができることが判明した(図2)。

[0079] 実施例3

(1)ドナー雄脊椎動物およびレシピエント雄脊椎動物の調製

(1-1)ドナー雄脊椎動物の調製

ドナー雄脊椎動物として白血病に罹患したマウス(白血病マウス)を使用した(以下、「ドナー・マウス」ともいう)。当該白血病マウスは、C57BL/6マウス(3週齢、静岡実験動物センターより入手)またはacrosin/eGFP(Acr3-EGFP)及びpCX-EGFP(C57BL/6

TgN(acro/act-EGFP)Osbc3-N01-FJ002)を有することによってGFP(Green Fluorescent Protein)を発現するように組み換えられた遺伝子組換えマウス(6週齢)(以下、「GFPマウス」と称する)[Ohta, H., et al., Dev Growth Differ 42, 105-112 (2000); Nakanishi, T. et al, FEBS Lett 449, 277-283 (1999)]に、200 μ lのPBS で調製した 1×10^7 個のC1498細胞[C57BL/6起源のマウスの白血病細胞株、ATCCより入手]を腹腔内注入することによって作成した。なお、このC1498細胞(白血病細胞)の接種量は、予備試験で予め最適量を決めておいた。

[0080] これらの白血病マウス(C57BL/6マウス、GFPマウス)は、C1498細胞を注入してから2週間後に白血病の末期症状である出血性腹水を発症して死亡した。死亡後、両方の精巣を切除して取得した。

[0081] (1-2) レシピエント雄脊椎動物の調製

レシピエント雄脊椎動物として、精子形成能を消失させた雄マウスを使用した(以下、「レシピエント・マウス」と称する)。当該レシピエント・マウスは、C57BL/6マウス(4週齢、静岡実験動物センターより入手)に、慢性骨髄性白血病の治療に使用されるアルキル化剤であるブスルファン(40mg/kg、シグマ・ケミカル社、セントルイス)を投与することによって精子形成能を消失させて、作成した。

[0082] (2) ドナー雄脊椎動物からの雄性生殖細胞(精細胞)の調製

(1)で作成したドナー・マウス(C1498注入したC57BL/6マウス、C1498注入したGFPマウス)から切除した精巣から精細胞を取得した。また比較対照用に、正常なC57BL/6マウスからも精巣を切除し、精細胞を取得した。詳細には、まず各精巣から白膜を除き、精細管を、20mM HEPESでpH 7.3に緩衝化した、コラゲナーゼ・Type IV(1mg/ml)(シグマ・ケミカル社)を含むダルベッコの修正イーグル培地(DMEM:Dulbecco's modified Eagle's medium)に入れて、5分間手で振盪しながら15分間、37°Cで培養した。得られた精細管を、カルシウムフリーのリン酸塩緩衝化生理食塩水(PBS)で2度洗浄し、次いでこれを0.25%のトリプシンおよびDNase I(100 μ g/ml)(シグマ)を含むPBSの中で、5分間隔で振盪しながら、37°Cで15分間培養した。これに、1/2容量の10%の胎仔牛血清(FBS)を含むDMEMを加え、得られた細胞懸濁液を30 μ m孔サイズを有するナイロン製のメッシュでろ過し、大きな塊の細胞を除去して、精細胞を調製した。

なお、以下、C1498注入したGFPマウスに由来する精細胞を「GFP精細胞」、C1498注入したC57BL/6マウス及び正常なC57BL/6マウスに由来する精細胞を「非GFP精細胞」と称して両者を区別する。

[0083] (3)細胞免疫染色

実施例1の(3)と同様に、Kubotaらの方法に従って、(2)で取得した精細胞を免疫染色した。

[0084] 具体的には、上記の各精細胞(非GFP精細胞、GFP精細胞)を、0.5%のFBSを含むPBS(PBS/FBS)に懸濁し、氷上で20分間、ビオチンを結合した抗H-2K^b/H-2D^b抗体(28-8-6; BD Biosciences PharMingen、サンディエゴ(CA))と共に培養した。次いで、多量のPBS/FBSで2度洗浄した後、蛍光活性化ソーティング(FACS)するために、非GFP精細胞については、PE結合-ストレプトアビジン(BD Biosciences PharMingen)とFITC結合-抗CD45抗体(30-F11; BD Biosciences PharMingen)と共に20分間培養した。また、GFP精細胞については、PE結合-ストレプトアビジンとPE-Cy5を結合した抗CD45抗体(30-F11; BD Biosciences PharMingen)と共に20分間培養した。なお、上記第1抗体(ビオチン結合-抗H-2K^b/H-2D^b抗体)および第2の試薬(PE結合-ストレプトアビジン、FITC結合-抗CD45抗体またはPE-Cy5結合-抗CD45抗体)はいずれも5 μ g/mlの濃度で使用した。

[0085] 反応後、これらの精細胞は最終洗浄した後、死細胞染色剤であるヨウ化プロピジウム(Pi: propidium iodide)(シグマ・ケミカル社)を1 μ g/ml含むPBS/FBSに再懸濁し(4 \times 10⁶細胞/ml)、蛍光活性化ソーティング(FACS)に供するまで、暗室の氷上で保管した。

[0086] (4)フローサイトメトリー及びセルソーティング

(3)で得られた精細胞のうち、C1498注入したC57BL/6マウス(白血病マウス)に由来する非GFP精細胞を、実施例1(4)と同様にして、フローサイトメトリーに供した。レーザーはFITC、PE、およびPIを励起するために使用し、FITCから生じた蛍光は530nmのフィルタ、PE及びPIから生じた蛍光は575nmのフィルタで集め、検出した。この非GFP精細胞の、前方散乱光(FSC: Forward-scatter)及び側方散乱光(SSC: Side-scatter)による2パラメーターヒストグラムを図3のaに示す。これから、FSC^{high}およびSSC^{low}

細胞集団エリア(G1)内のクラスターをゲーティングし(図3a)、得られた細胞(G1画分)について、実施例1(4)と同様にして、抗H-2K^b/H-2D^b抗体、抗CD45抗体及びPIによる標識の有無を調べた。なお、抗H-2K^b/H-2D^b抗体による標識の有無は、ビオチン-アビジン反応によって抗H-2K^b/H-2D^b抗体に間接的に結合したPEの蛍光に基づいて、また抗CD45抗体による標識の有無は、抗CD45抗体に結合したFITCの蛍光に基づいて評価した。C57BL/6マウス(白血病マウス)に由来する非GFP精細胞のG1画分について、抗H-2K^b/H-2D^b抗体に対する反応、抗CD45抗体に対する反応及びPIに対する反応を3パラメーターヒストグラムで示した結果を図3のbに示す。

[0087] 抗H-2K^b/H-2D^b抗体、抗CD45抗体及びPIに反応しない細胞集団エリア(G2)(陰性画分)をゲーティングし、当該細胞画分[抗H-2K^b/H-2D^b抗体(-)/抗CD45抗体(-)/PI(-)画分](G2画分)を「精細胞画分」としてソーティングした。また、抗H-2K^b/H-2D^b抗体及び抗CD45抗体に反応する細胞集団エリア(G3)(陽性画分)をゲーティングし、当該細胞画分[抗H-2K^b/H-2D^b抗体(+)/抗CD45抗体(+)](G3画分)を「白血病細胞画分」としてソーティングした(図3b)。なお、細胞は10%のFBSを含む2ml DME M(DMEM/FBS)を入れた5ml容量のチューブ内にソートした。FSC閾値をセットして細胞残屑を除外した。得られたG2画分及びG3画分の細胞は、それぞれ全非GFP精細胞の51.4%及び2.5%に相当した。

[0088] 斯くしてソーティングした各画分の細胞の生存能力をトリパンブルー排除能によって評価した。ソートした各細胞を遠心分離し、10mlの冷DMEM/FBSに再懸濁し、5%のCO₂でガス処理して、4°Cで終夜保存した。

[0089] このようにして、10,000例のデータを、CELLQuestソフトウェア(BD Biosciences)で解析した。

[0090] (5) 腹腔内への注入

(4)において、C1498注入したC57BL/6マウス(白血病マウス)の非GFP精細胞からソーティングした精細胞画分(G2)及び白血病細胞画分(G3)の細胞を、それぞれ100 µl PBS/FCSに懸濁した。精細胞画分の濃度は 2×10^6 細胞/mlであり、白血病細胞画分の濃度はおよそ 1×10^5 細胞/mlであった。各細胞の懸濁液を、レシピエント・マウスに腹腔内注入した。その結果、精細胞画分(G2)の細胞を注入した12匹のマウスは

全て300日間白血病の発症なく生存した。一方、白血病細胞画分(G3)の細胞を注入した12匹のマウスは全て40日以内に出血性の腹水を有する末期白血病の典型的な兆候を示し、死亡した(図3c)。このことから、精細胞画分(G2)には白血病細胞が混入していないことが判明した。

[0091] (6) C1498注入したGFPマウスから単離した精細胞の移植

C1498注入したGFPマウスから取得したGFP精細胞を、(4)に記載する方法に従って、フローサイトメトリーに供した。レーザーはPE、PE-Cy5およびPIを励起するために使用し、PE及びPIから生じた蛍光は575nmのフィルタ、およびPE-Cy5から生じた蛍光は682nmのフィルタで集めて検出した。まずFSC^{high}およびSSC^{low}細胞集団エリア(G1)内のクラスターをゲーティングし、得られた細胞(G1画分)について、上記(4)と同様にして、抗H-2K^b/H-2D^b抗体、抗CD45抗体及びPIによる標識の有無を調べた。なお、抗H-2K^b/H-2D^b抗体による標識の有無は、ビオチン-アビジン反応によって抗H-2K^b/H-2D^b抗体に間接的に結合したPEの蛍光に基づいて、また抗CD45抗体による標識の有無は、抗CD45抗体に結合したPE-Cy5の蛍光に基づいて評価した。GFPマウスから取得したGFP精細胞はFITC陽性領域に位置するため、上記(4)で使用したFITC結合-抗CD45抗体の代わりにPE-Cy5結合-抗CD45抗体を用いた。

[0092] 抗H-2K^b/H-2D^b抗体、抗CD45抗体及びPIに反応しない細胞集団エリア(G2)(陰性画分)をゲーティングし、当該細胞画分[抗H-2K^b/H-2D^b抗体(-)/抗CD45抗体(-)/PI(-)画分](G2画分)を「精細胞画分」としてソーティングした。得られた精細胞画分(G2)を、注入培地(138mM NaCl、8.1mM Na₂HPO₄、2.7mM KCl、1.1mM KH₂PO₄、0.1mM EDTA、5.5mMグルコース、5mg/mlウシ血清アルブミン、100 μg/ml DNase I および0.4mg/mlのトリパンブルー)で洗浄した[Brinster, R.L. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 91, 11298-11302 (1994)]。得られた精細胞画分(G2)に含まれる生細胞の割合は、トリパンブルー排除能の測定により95%以上であることが確認された。

[0093] 洗浄した精細胞画分(G2)の細胞を、1×10⁸細胞/mlの濃度になるように注入培地に懸濁し、これをドナー細胞懸濁液とした。

[0094] 斯くして得られたドナー細胞懸濁液を、レシピエント・マウスの精巣に、1つの精巣当たりおよそ10 μlの割合で投与した。具体的には、ブスルファン処理して精子形成能

を消失させたレシピエント・マウス(ブスルファン処理後4週間め)の精巣輸出管の中に、上記ドナー細胞懸濁液を注入した(精細胞移植)[Ohta, H., et al., Dev Growth Differ 42, 105-112 (2000)]。精細胞移植から8週間後も、このレシピエント・マウスが全て(n=6)生存していた(図4)。

[0095] 一方、比較実験のため、同様に、C1498注入したGFPマウスから、セルソーティングすることなく取得した精細胞(GFP精細胞)を、同様に移植したレシピエント・マウスは、移植から2週間以内に全て(n=6)末期白血病の典型的な兆候を示した(図4)。この末期白血病の兆候を示したマウスを移植から2週間目に屠殺し、精巣を取得し、分析に供した。具体的には、精巣をBouinの溶液中に固定し、パラフィンに埋め込み、これから5 μ m厚の切片を作成して、ヘマトキシロンとエオシンで染色した。その結果、図5a及びbに示すように、白血病細胞の混入が認められた。

[0096] 一方、セルソーティングして得られた上記ドナー細胞懸濁液を移植したレシピエント・マウスの精巣を紫外線(UV)光に曝露させて、オリンパスSZX-12カメラで撮影した。その結果、12匹のレシピエント・マウスのうち11匹の精巣の精細管中に、移植したドナー精細胞(GFPドナー精細胞)が観察された(図5d~f)。そこでこのレシピエント・マウスの精巣を、エチレングリコール・メタクリル酸塩(Technovit 8100; Kultzer, Wehrheim(ドイツ))に埋め込み、4°Cで4%のパラホルムアルデヒドに終夜固定し、5 μ m厚の連続切片を、50 μ m間隔で調製した。調製した切片をGFP蛍光で観察した後、ヘマトキシロンで染色し、顕微鏡の下で観察した。その結果、図5g~iに示すように、GFPドナー精細胞を含む精細管中で、正常な精子形成及び成熟した精子が観察された。また、その精巣には、組織学的分析によって、白血病細胞は認められなかった。

[0097] 以上のことから、本発明の方法でセルソーティングによって得られた精細胞画分(G2)には、精子形成能を有する精祖細胞の十分な数を含んでおり、白血病細胞は混入していないことが確認された。

[0098] (7)卵細胞質内への精子注入

上記のレシピエント・マウスの精巣から得られた精子が、正常な繁殖能力を有するかどうかを調べた。

[0099] まず、セルソーティングにより得られた上記ドナー細胞懸濁液を移植したレシピエ

ト・マウスの精巣から、移植後8週目に精子を取得した。具体的には、蛍光実体顕微鏡の下で、緑の蛍光を発する精細管をレシピエントの精巣から集め、これをはさみで裁断し、Hepes-CZB培地中に懸濁した(GFP精液懸濁液)。

[0100] 一方、成熟した卵母細胞は雌性マウス(BDF1)から下記のようにして集めた。

[0101] まず雌性マウス(BDF1)に、5IUの妊馬血清性腺刺激ホルモン(帝国臓器社)を腹腔内投与し、次いで48時間後に5IUのヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG; 帝国臓器社)を腹腔内投与することによって、過剰に排卵を誘導した。hCG注入後13-15時間めに、卵管膨大部から成熟した卵母細胞を集めた。集めた卵母細胞は、Hepes-CZB培地で調製した0.1%の牛精巣のヒアルロニダーゼ(シグマ)で処理することによって卵丘細胞から遊離させた。得られた卵母細胞を洗浄し、精子注入まで37°C、5%のCO₂条件下で、新鮮なCZB培地中で保存した。

[0102] レシピエント・マウスの精巣から集められたGFP精液懸濁液の約2 μlを、12%(w/v)ポリビニルピロリドン(PVP; Mr 360 000; 和光純薬工業)を含むHepes-CZB培地1滴と混合した。精子の頸部領域に圧電性のパルスを当てることによって、精子の頭部を、尾部と分離して、Kimuraらの方法(Kimura, Y. & Yanagimachi, R. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. Biol Reprod 52, 709-720 (1995))に従って、上記で調製した卵母細胞に注入した。斯くして得られた卵母細胞は、空气中、37°Cおよび5%のCO₂の条件下、CZB培地中で培養した。形成された42の胚(エンブリオ)のうち40(95.2%)が培養24時間以内に、2細胞期に発展した。その2細胞期の胚を、0.5-dpcの偽妊娠したICR雌性マウスの卵管へ移植したところ、合計12匹のマウス(28.6%)が生まれた。ヘミ接合性のGFP遺伝子組換えマウスを使用したので、得られた仔マウスの約半分(5匹)が励起光の下でGFPに由来する緑色の蛍光を示した。これは受精した精子が移植したGFP精細胞に由来することを示す。このことから、レシピエント・マウスの精巣からセルソーティングによって得られた精細胞画分(G2)から派生した精子が正常な繁殖能力を有すること、すなわち当該精細胞画分(G2)に含まれる精細胞は十分な精子形成能を備えていることが確認された。

[0103] <考察>

今まで、小児癌に対する化学療法によって生じる無精子症の男性に、父親になる

機会を与える臨床技術はない。この問題を克服する方法として、精祖細胞および精母細胞を有する思春期前の患者であれば、化学療法の前に精巣組織を取得して保存しておく方法がある。精巣の精細管は化学療法の後も機能的なセルトリ細胞を含んでいるので〔Ohta, H., et al., Int J Androl 24, 15-23 (2001); Ohta, H., et al., Development 127, 2125-2131 (2000)〕、精細管に精祖細胞や精母細胞を自家移植することによって未熟な精細胞を精子まで成熟させることができる。しかしながら、これを臨床に応用するには、克服すべき3つのハードルがある。第1に、再発を防止するために、移植する精細胞から癌細胞を一つ残らず除去しなければならない〔Jahnukainen, K., et al., Cancer Res 61, 706-710 (2001); Goldie, H., et al., Cancer Res 13, 125-129 (1953)〕。第2に、一つの精巣はレシピエントの精巣として残しておかなければならないから、もう一方の精巣から分離した少量の精細胞(特に精祖細胞)を生体外で増殖させなければならない。第3に、単離した未熟な精細胞(精祖細胞)は、自家移植によって正常な精祖細胞となり、更に生じる成熟した精子が受胎可能となるようなものでなければならない。

[0104] 上記の第2番目のハードルに関しては、最近、精祖細胞がin vitroで培養でき、長期間にわたり増殖生存することが報告された〔Nagano, M., et al., Biol Reprod 68, 2207-2214 (2003); Kanatsu-Shinohara, M. et al. Biol Reprod 69, 612-616 (2003)〕。精祖細胞は、5か月間の培養で、 10^{14} 倍に増殖する。また第3番目のハードルに関しては、私たちは、既に、正常な精祖細胞を形成する精細胞の移植方法を確立し〔Brinster, R.L. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 91, 11298-11302 (1994); Brinster, R.L. et al., Proc Natl Acad Sci U S A 91, 11303-11307 (1994); Kanatsu-Shinohara, M. et al. Hum Reprod 18, 2660-2667 (2003)〕、また移植された精細胞が正常な精子形成能及び受胎能力を有することを報告した〔Ohta, H. et al., Int J Androl 24, 15-23 (2001); Ohta, H., et al., Development 127, 2125-2131 (2000); Ohta, H., et al., Dev Growth Differ 42, 105-112 (2000); Kimura, Y. et al., Biol Reprod 52, 709-720 (1995)〕。これらの従来技術によって、上記の第2と第3のハードルは回避できる。

[0105] 残る問題は、第1の問題、すなわち精巣の精細胞から癌細胞を完全に分離し、移植後の再発を防止する方法を開発することである。上記の実施例に示すように、私た

ちは、フローサイトメリーによるセルソーティングにより、 FSC^{high}/SSC^{low} の細胞集団画分(G1)を取得し、さらにこの画分から蛍光活性化セルソーティング(FACS)により、抗H-2K^b/H-2D^b抗体および抗CD45抗体と反応しない抗H-2K^b/H-2D^b抗体(-)/抗CD45抗体(-)画分(G2)を取得することによって、白血病マウスの精巣から精祖細胞活性を有する精細胞を、白血病細胞と完全に分離して取得するのに成功した。そして、この精細胞を移植細胞として使用することで、ブスルファン(慢性骨髄性白血病の治療に使用されるアルキル化剤)で処理して精子形成能を消失させた雄性マウスの生殖能力を、白血病を引き起こすことなく、復元することに成功した。

- [0106] 以上説明するように、フローサイトメリーにより、 FSC^{high}/SSC^{low} の細胞集団(G1)のゲーティングと、2つの表面マーカー(H-2K^b/H-2D^bおよびCD45)を用いたFACSとを組み合わせることによって、白血病細胞をすべて除去して精祖細胞活性を有する精細胞画分(G2)を取得することが可能になった。当該精細胞画分(G2)を注入した12匹のマウスはすべて300日間にわたり白血病の発症することなく生存した。予備試験により10個のC1498細胞の接種を受けたマウスが40日以内で白血病になること、また、わずか1個のC1498細胞の接種を受けたマウスもまた白血病になることが確認されていることから[Goldie, H., et al., Cancer Res 13, 125-129 (1953)]、上記精細胞画分(G2)から白血病細胞が完全に除去されていることが示された。また、得られた精細胞を移植したレシピエント・マウスは白血病に罹患せず、正常な精子を形成して、その精子から正常なマウスが誕生した。このことは、小児白血病の抗癌治療に伴う男性不妊の治療に、本発明の方法によって白血病細胞を分離除去して得られる精細胞の自家移植が有効であることを示すものである。

図面の簡単な説明

- [0107] [図1]図a及びcは、白血病細胞(C1498細胞)のフローサイトメリーの結果を、図b及びdは正常なC57BL/6マウスに由来する精細胞(Germ cells)のフローサイトメリーの結果を示す。図aとbは、それぞれ白血病細胞(C1498細胞)及び精細胞について得られた、前方散乱光(Forward scatter:FSC)及び側方散乱光(Side scatter:SSC)に対する2パラメーターヒストグラムを示す。図cは、白血病細胞(C1498細胞)について上記2パラメーターヒストグラムからゲーティングした FSC^{high} と SSC^{low} の細胞集団画分(G1

画分)の、抗CD45抗体、抗H-2K^b/H-2D^b抗体、及びPI(propidium iode)に対する反応を示すヒストグラムである(4分割)。図dは、精細胞について上記2パラメーターヒストグラムからゲーティングしたFSC^{high}とSSC^{low}の細胞集団画分(G1画分)の、抗CD45抗体、抗H-2K^b/H-2D^b抗体、及びPIに対する反応を示すヒストグラムである(4分割)。

[図2]図a及びbは、ヒト白血病細胞(Jurkat細胞株)のフローサイトメリーの結果を示す。図aはヒト白血病細胞について得られた前方散乱光(Forward scatter:FSC)及び側方散乱光(Side scatter:SSC)に対する2パラメーターヒストグラムを示す。図bは、ヒト白血病細胞について上記2パラメーターヒストグラムからゲーティングしたFSC^{high}とSSC^{low}の細胞集団画分(G1画分)の、抗CD45抗体、抗HLA-A,B,C抗体、及びPIに対する反応を示すヒストグラムである(4分割)。

[図3]実施例3(4)で行ったフローサイトメリーの結果を示す図である。図aは、C1498注入したマウスの精細胞(非GFP精細胞)の、前方散乱光(Forward scatter:FSC)及び側方散乱光(Side scatter:SSC)に対する2パラメーターヒストグラムであり、図bは、上記2パラメーターヒストグラムからゲーティングしたFSC^{high}とSSC^{low}の細胞集団画分(G1画分)の、抗CD45抗体、抗H-2K^b/H-2D^b抗体、及びPI(propidium iode)に対する反応を示すヒストグラムである(4分割)。H-2K^b/H-2D^b(-)およびCD45(-)画分(G2画分)は精細胞を、H-2K^b/H-2D^b(+)およびCD45(+)画分(G3画分)は、白血病細胞を含む。図cは FACSによって分離したG2画分(精細胞画分)(破線)及びG3画分(白血病細胞)(実線)をレシピエント・マウスに腹腔内注入した後の当該レシピエント・マウスの生存率(survival (%))を経時的(days)に示した図である。

[図4]C1498注入したGFPマウスに由来するGFP精細胞のうち、フローサイトメリーによってセルソーティングしたG2画分の精細胞(点線、n=6)、またはセルソーティングしないで取得した精細胞(実線、n=6)を、それぞれレシピエント・マウスの精細管に移植した後の、当該マウスの生存率(survival (%))を経時的(days)に示す図である。

[図5]ブスルファンで処理した無精子症のレシピエント・マウスの精細管に、白血病GFPマウスの精細胞を移植した後の、当該レシピエント・マウスの精巣を観察した結果を示す。図a及びbは、セルソーティングしない精細胞を移植した後2週間目のレシピエント・マウスの精巣の切片をヘマトキシロンおよびエオシンで染色した結果を示す。図

cは、白血病GFPマウスの精巣からセルソーティングした精細胞画分(G2画分)を移植した後8週目のレシピエント・マウスの精巣を示す画像であり、図dはそれを蛍光検出した画像である。図eは、そのレシピエント・マウスの精巣から取り出した精細管の画像、及び図fは、それを蛍光検出した画像である。移植したドナー精細胞(緑)がレシピエントの精細管中に集積しているのが認められる。図gは、レシピエント・マウスの精巣から単離した精細胞を示す。図h及びiは、ソートされた精細胞画分を移植したレシピエント・マウスの精巣の切片をヘマトキシロン染色(図h)した画像、それを蛍光検出した画像(図i)である。なお、各図のスケールバーの大きさは、図a、c、d、e、fについては1mm、図bについては10 μ m、図gについては20 μ m、図h、iについては100 μ mである。

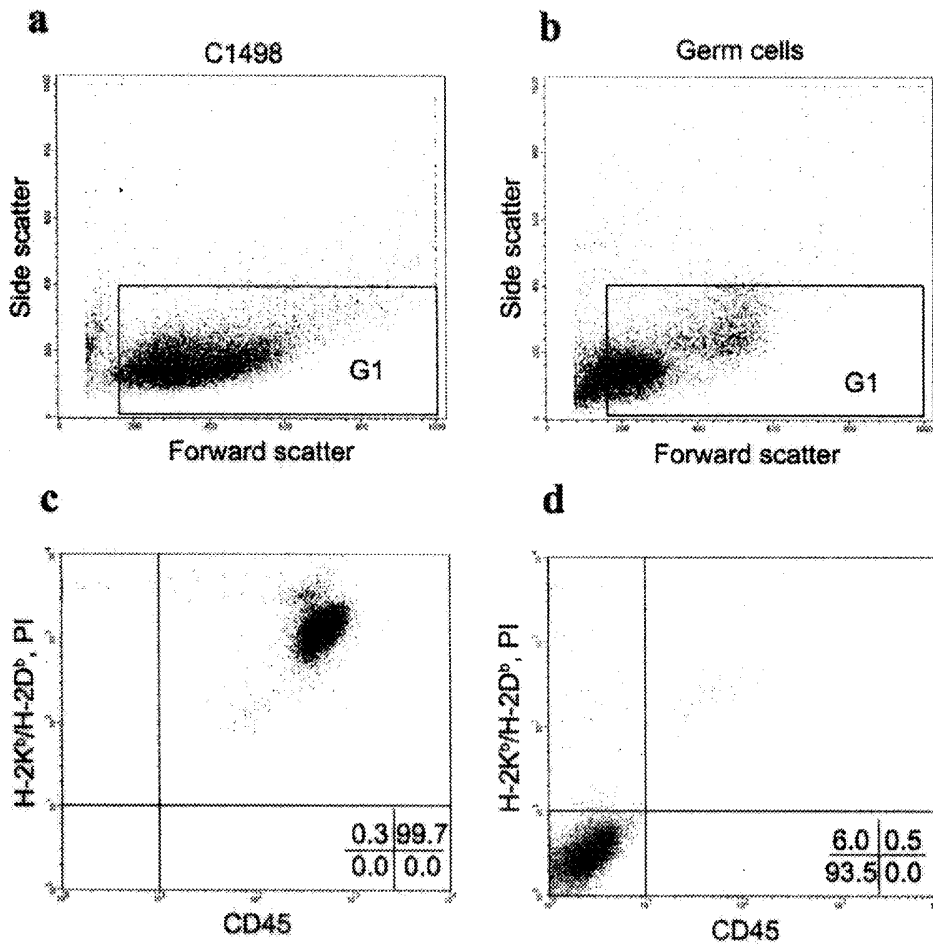
[図6]図aは、実施例3(6)においてセルソーティングして取得したGFP精細胞(ドナー精細胞)を移植したレシピエント・マウスの精巣から得られたGFP精子を、卵母細胞質内に注入して交配することによって誕生した正常な子孫(仔マウス)を示す。図bは、それを蛍光下で観察した結果である。これから移植したドナー精細胞に由来する精子が正常であることがわかる。

請求の範囲

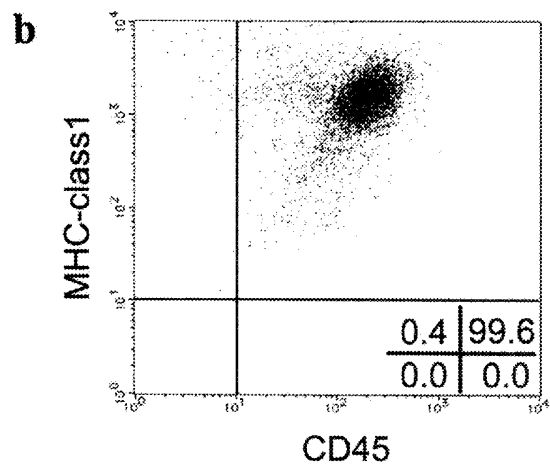
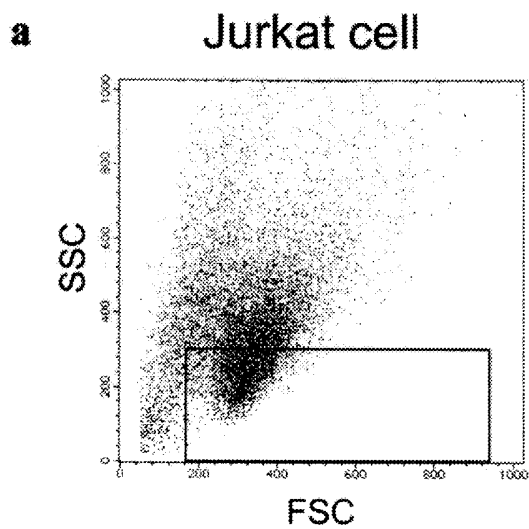
- [1] 白血病細胞を含む被験雄性生殖細胞集団から、白血病細胞を分離または除去する方法であって、当該被験雄性生殖細胞集団から、精原幹細胞を含有する画分(精原幹細胞画分)を取得し、次いで当該画分から精祖細胞に発現しない表面マーカーに対する抗体及び白血病細胞に発現する表面マーカーに対する抗体の両方に対して非反応の細胞画分を取得する方法。
- [2] 精祖細胞に発現しない表面マーカーが、MHC-クラスI、 β 2-ミオグロブリン、及びSc a-1よりなる群から選択される少なくとも1つであり、白血病細胞に発現する表面マーカーが、CD2、CD3、CD7、CD10、CD13、CD14、CD15、CD19、CD20、CD21、CD22、CD33、CD34、CD38、CD45、CD54、CD56、CD65、HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DP およびTCRよりなる群から選択される少なくとも1つである、請求項1記載の方法。
- [3] フローサイトメトリーを用いて行う方法であって、精祖細胞に発現しない表面マーカーに対する抗体及び白血病細胞に発現する表面マーカーに対する抗体として、直接又は間接的に蛍光標識された抗体を用いて、当該抗体に対して非反応の細胞画分の取得を蛍光活性化セルソーティングによって実施する請求項1または2記載の方法。
- [4] 白血病細胞を含む被験雄性生殖細胞集団が、白血病に罹患した雄性脊椎動物の精巢から取得した生殖細胞の集団である、請求項1乃至3のいずれかに記載する方法。
- [5] 白血病細胞を含む被験雄性生殖細胞集団から白血病細胞を分離または除去するための試薬キットであって、少なくとも蛍光活性化セルソーティング用抗体として、精祖細胞に発現しない表面マーカーに対する抗体及び白血病細胞に発現する表面マーカーに対する抗体を含む、試薬キット。
- [6] 精祖細胞に発現しない表面マーカーが、MHC-クラスI、 β 2-ミオグロブリン、及びSc a-1よりなる群から選択される少なくとも1つであり、白血病細胞に発現する表面マーカーが、CD2、CD3、CD7、CD10、CD13、CD15、CD14、CD19、CD20、CD21、CD22、CD33、CD34、CD38、CD45、CD54、CD56、CD65、HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DP およびTCRよりなる群から選択される少なくとも1つである、請求項5記載の試薬キット

- 。
- [7] 非ヒト雄脊椎動物に由来する白血病細胞を含有する被験雄性生殖細胞集団から、請求項1乃至4のいずれかの方法によって白血病細胞を分離除去することによって得られる、非ヒト雄性生殖細胞集団。
- [8] 上記請求項7記載の非ヒト雄性生殖細胞集団を、ドナーまたは同種のレシピエント雄脊椎動物の精巢中に移入し、当該雄脊椎動物を同種の雌脊椎動物と交配して、非ヒトの子孫脊椎動物を生産する方法。
- [9] 上記レシピエント雄脊椎動物が無精子症の非ヒト雄脊椎動物である、請求項8記載の方法。
- [10] 交配が、雄脊椎動物と同種の雌脊椎動物との自然交配、雄脊椎動物の精子による雌脊椎動物の人工授精、雄脊椎動物の精子による雌脊椎動物の卵子のインビトロ受精、細胞質内精子注入、帯下状媒精、及び部分的帯層離断よりなる群から選択される方法によって達成される請求項8または9記載の方法。
- [11] 無精子症の非ヒト雄脊椎動物の生殖能力を回復する方法であって、請求項7記載の非ヒト雄性生殖細胞を、無精子症のドナーまたは同種のレシピエント非ヒト雄脊椎動物の精巢中に移入することを含む、方法。

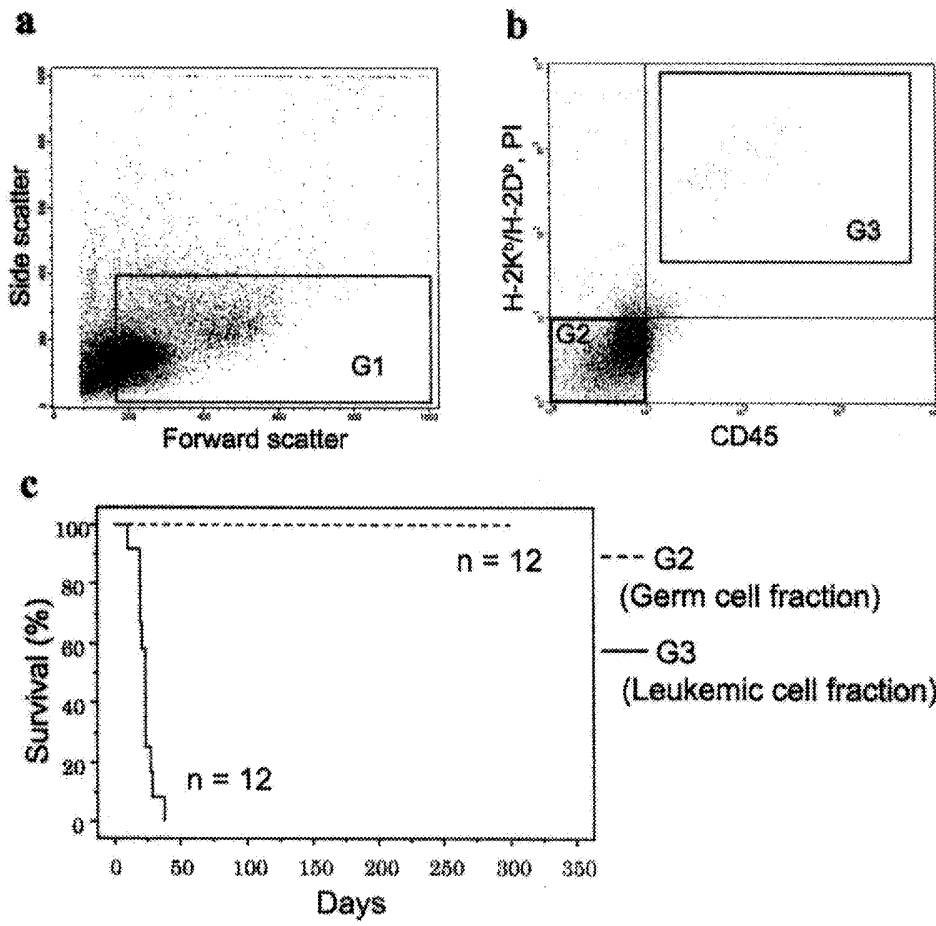
[図1]



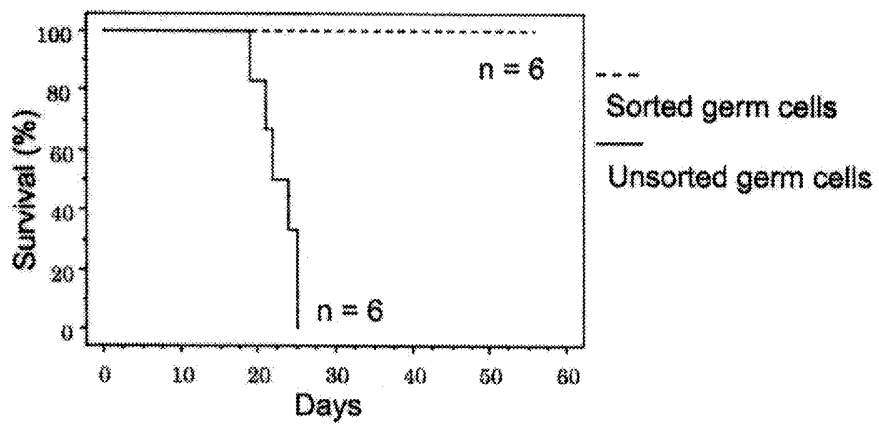
[図2]



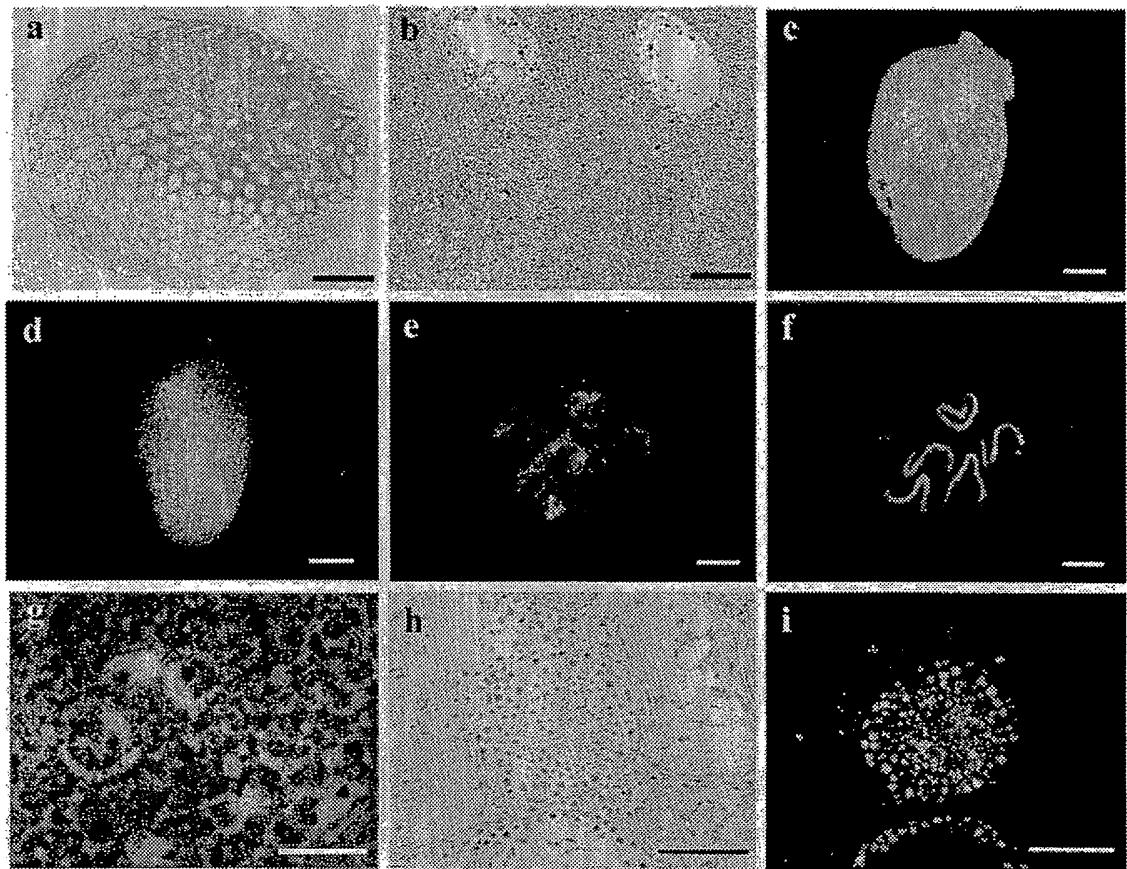
[図3]



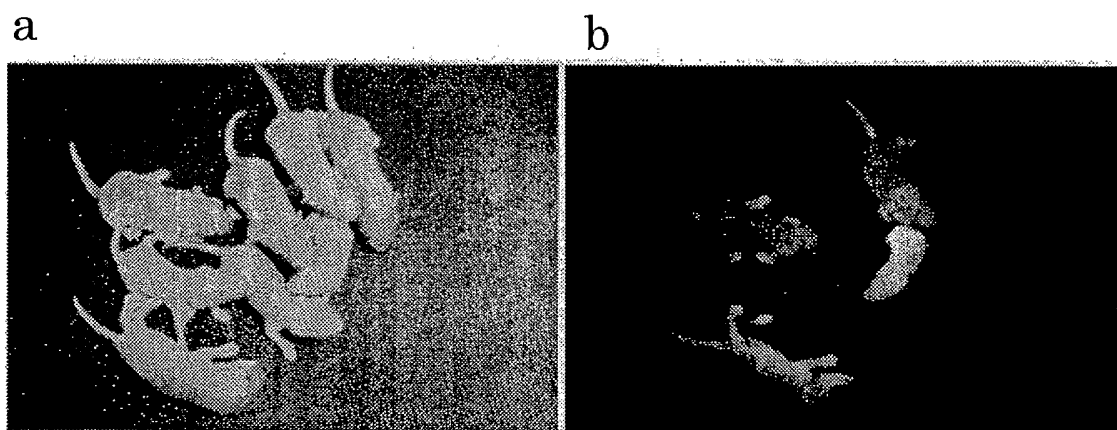
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/301063

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N5/06 (2006.01), A01K67/02 (2006.01), A61K35/48 (2006.01), A61P15/00 (2006.01), A61P15/08 (2006.01)		
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) C12N5/06 (2006.01), A01K67/02 (2006.01), A61K35/48 (2006.01), A61P15/00 (2006.01), A61P15/08 (2006.01)		
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 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS/WPI (DIALOG), PubMed, JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FUJITA, K. et al., Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia, J.Clin.Invest., 16 January, 2005 (16.01.05), Vol.115, No.7, pages 1855 to 1861, Medline[online]; United States National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA[retrieved on 24 April, 2006 (24.04.06)], page 1855, right column, 14th to 10th lines from the bottom; page 1859, right column, 7th to 1st lines from the bottom; a whole article	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 April, 2006 (24.04.06)		Date of mailing of the international search report 02 May, 2006 (02.05.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/301063

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JAHNUKAINEN K. et al., Intratesticular transplantation of testicular cells from leukemic rats causes transmission of leukemia, Cancer Res., 2001, Vol.61, No.2, pages 706 to 710, particularly, abstract	1-11
Y	KUBOTA, H. et al., Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 2003, Vol.100, No.11, pages 6487 to 6492, particularly, abstract, page 6489, Fig. 1	1-11
Y	BELOV L. et al., Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray, Cancer Res., 2001, Vol.61, No.11, pages 4483 to 4489, particularly, abstract	1-11
Y	BRINSTER RL. et al., Germline stem cell transplantation and transgenesis, Science, 2002, Vol.296, No.5576, pages 2174 to 2176, a whole article	8-11
A	SHINOHARA, T. et al., Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells, Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 2000, Vol.97, No.15, pages 8346 to 8351	1-11
A	GUILLAUMEUX T. et al., Expression of HLA class I genes in meiotic and post-meiotic human spermatogenic cells, Biol.Reprod., 1996, Vol.55, No.1, pages 99 to 110	1-11
A	BRINSTER RL. et al., Spermatogenesis following male germ-cell transplantation, Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 1994, Vol.91, No.24, pages 11298 to 11302	1-11
P,X	Kazutoshi FUJITA et al., 'Hakketsubyo Model Mouse ni Okeru Seisaibo Tanriho no Kaihatsu', The Japanese Journal of Urology, Vol.96, No.2, 10 March, 2005 (10.03.05), page 185(221)	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N5/06(2006.01), A01K67/02(2006.01), A61K35/48(2006.01), A61P15/00(2006.01), A61P15/08(2006.01)

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. C12N5/06(2006.01), A01K67/02(2006.01), A61K35/48(2006.01), A61P15/00(2006.01), A61P15/08(2006.01)

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 1971-2006年
 日本国実用新案登録公報 1996-2006年
 日本国登録実用新案公報 1994-2006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/WPI(DIALOG), PubMed, JSTPlus(JDream2)

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	FUJITA K et al., Transplantation of spermatogonial stem cells isolated from leukemic mice restores fertility without inducing leukemia, J Clin Invest, 2005.01.16, vol.115, no.7, p.1855-1861 Medline [online]; United States National Library of Medicine, Bethesda, MD, USA [retrieved on 24 April 2006]、第 1855 頁右欄下から 14-10 行、第 1859 頁右欄下から 7-1 行、及び、全体	1-11
Y	JAHNUKAINEN K et al., Intratesticular transplantation of testicular cells from leukemic rats causes transmission of leukemia, Cancer Res, 2001, vol.61, no.2, p.706-710、特に要約参照	1-11

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 24.04.2006
 国際調査報告の発送日 02.05.2006

国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 光本 美奈子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B	9 3 5 9
--	---	-----	---------

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	KUBOTA H et al., Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells., Proc Natl Acad Sci U S A., 2003, vol.100, no.11, p.6487-6492、特に要約、第 6489 頁図 1 等参照	1 - 1 1
Y	BELOV L et al., Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray, Cancer Res, 2001, vol.61, no.11, p.4483-4489、特に要約参照	1 - 1 1
Y	BRINSTER RL et al., Germline stem cell transplantation and transgenesis, Science, 2002, vol.296, no.5576, p.2174-2176、全体参照	8 - 1 1
A	SHINOHARA T et al., Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells, Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, vol.97, no.15, p.8346-8351	1 - 1 1
A	GUILLAUDEUX T et al., Expression of HLA class I genes in meiotic and post-meiotic human spermatogenic cells, Biol Reprod, 1996, vol.55, no.1, p.99-110	1 - 1 1
A	BRINSTER RL et al., Spermatogenesis following male germ-cell transplantation, Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, vol.91, no.24, p.11298-11302	1 - 1 1
PX	藤田和利ら、「白血病モデルマウスにおける精細胞単離法の開発」、日本泌尿器科学会雑誌、第 96 巻第 2 号、2005. 03. 10, 第 185 (221) 頁	1 - 1 1