

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-528095

(P2005-528095A)

(43) 公表日 平成17年9月22日(2005.9.22)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 5/00	B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2003-582284 (P2003-582284) (86) (22) 出願日 平成15年3月25日 (2003.3.25) (85) 翻訳文提出日 平成16年11月25日 (2004.11.25) (86) 国際出願番号 PCT/US2003/009054 (87) 国際公開番号 W02003/085105 (87) 国際公開日 平成15年10月16日 (2003.10.16) (31) 優先権主張番号 60/369,009 (32) 優先日 平成14年4月1日 (2002.4.1) (33) 優先権主張国 米国 (US)	(71) 出願人 504267622 ジーティーシー バイオセラピューティッ クス インコーポレイテッド GTC BIOTHERAPEUTICS , INC. アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 1702 フラミンガム クロッシング ブ ルヴァード 175 スイート 410 (74) 代理人 100073184 弁理士 柳田 征史 (74) 代理人 100090468 弁理士 佐久間 剛
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 哺乳類種における核移植に使用するための細胞株を選択する方法

(57) 【要約】

本発明は、融合および分裂指標を単独でまたは組み合わせで含む細胞株の融合成績が、核移植またはマイクロインジェクション計画において成功する細胞株を選択するための手段であることを実証するデータを提供する。細胞株を選択するこの技術および方法は、ヤギ、ブタ、齧歯類、霊長類、ウサギ、およびウシを含むさまざまな哺乳類の非ヒト種の生きた子孫の産生のための、活性化および融合した核移植可能な胚の作製において、付加的な選択肢および改善をもたらす。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

- (i) ドナー核の供給源として使用する所望の分化哺乳類細胞を得る；
- (ii) ドナー核の供給源である前記細胞と同種の哺乳類から、少なくとも 1 つの卵母細胞を得る；
- (iii) 前記少なくとも 1 つの卵母細胞を除核する；
- (iv) 前記所望の分化細胞または細胞核を、前記除核卵母細胞へ移入する；
- (v) 細胞対を同時に融合および活性化して第一のトランスジェニック胚を形成する；
- (vi) 細胞対を活性化して、最初の電気ショックの後に活性化されたトランスジェニック胚を作成する；
- (vii) 前記活性化した第一および / または第二のトランスジェニック胚を、発生の 2 細胞期より大きくなるまで培養する；および
- (viii) 胚が発生して胎児になるように、前記第一および / または第二のトランスジェニック胚を宿主哺乳類へ移植する；工程を含み、

10

ここで、カリオプラストとして使用する所望の分化哺乳類細胞株が、分裂および / または融合パターンの客観的なパラメータに基づいて選択されることを特徴とする、核移植過程を介して非ヒト哺乳類をクローニングする方法。

【請求項 2】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、中胚葉に由来することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

20

【請求項 3】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、内胚葉に由来することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、外胚葉に由来することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、胎児体細胞組織に由来することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

30

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、胎児体細胞に由来することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、繊維芽細胞に由来することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、有蹄類に由来することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 9】

前記ドナー細胞またはドナー細胞核が、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ヤギ、およびバッドアローより成る群から選択される有蹄類に由来することを特徴とする請求項 1 または 8 記載の方法。

40

【請求項 10】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、成体非ヒト哺乳類の体細胞に由来することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 11】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、上皮細胞、神経細胞、表皮細胞、ケラチン生成細胞、造血細胞、メラニン細胞、軟骨細胞、B リンパ球、T リンパ球、赤血球、マクロファージ、単球、繊維芽細胞、および筋細胞より成る群から選択されることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

50

【請求項 1 2】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、皮膚、肺、脾臓、肝臓、胃、腸、心臓、生殖器官、膀胱、腎臓、および尿道より成る群から選択される器官に由来することを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 3】

除核前に、前記少なくとも 1 つの卵母細胞を *in vivo* で成熟させることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 4】

除核前に、前記少なくとも 1 つの卵母細胞を *in vitro* で成熟させることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 1 5】

前記非ヒト哺乳類が齧歯類であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 6】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、非休止期の体細胞、または前記非休止期の体細胞から単離された核であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 1 7】

胎児が発生して子孫となることを特徴とする請求項 1 または 8 記載の方法。

【請求項 1 8】

in vitro 成熟の約 10 から 60 時間後に、前記少なくとも 1 つの卵母細胞を除核すること

20

【請求項 1 9】

前記分化哺乳類細胞または細胞核を前記除核卵母細胞へ挿入する前に、所望の遺伝子を、前記分化哺乳類細胞または細胞核中に挿入し、またはそれらから除去し、または改変させることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 0】

請求項 1 または 19 記載の方法によって得られた子孫。

【請求項 2 1】

前記核移植手順の結果として作製された子孫がキメラであることを特徴とする請求項 19 記載の方法によって得られた子孫。

30

【請求項 2 2】

サイトカラシン B がクローニング手続に使用されることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 3】

サイトカラシン B がクローニング手続に使用されないことを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 2 4】

(i) ドナー核の供給源として使用する所望の分化哺乳類細胞を得る；
 (ii) ドナー核の供給源である前記細胞と同種の哺乳類から、少なくとも 1 つの卵母細胞を得る；
 (iii) 前記少なくとも 1 つの卵母細胞を除核する；
 (iv) 前記所望の分化細胞または細胞核を、前記除核卵母細胞へ移入する；
 (v) 細胞対を同時に融合および活性化して第一のトランスジェニック胚を形成する；
 (vi) 細胞対を活性化して、最初の電気ショックの後に活性化された第一のトランスジェニック胚を作成する；および
 (vii) 前記活性化した胚から得られた細胞を培養して、培養内部細胞塊を得る；工程を含み、

40

ここで、カリオプラストとして使用する所望の分化哺乳類細胞株が、分裂および/または融合パターンの客観的なパラメータに基づいて選択されることを特徴とする、培養内部細胞塊を作成する方法。

50

【請求項 25】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、中胚葉に由来することを特徴とする請求項 24 記載の方法。

【請求項 26】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、内胚葉に由来することを特徴とする請求項 24 記載の方法。

【請求項 27】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、外胚葉に由来することを特徴とする請求項 24 記載の方法。

【請求項 28】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、胎児体細胞組織に由来することを特徴とする請求項 24 記載の方法。

【請求項 29】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、胎児体細胞に由来することを特徴とする請求項 24 記載の方法。

【請求項 30】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、繊維芽細胞に由来することを特徴とする請求項 24 記載の方法。

【請求項 31】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、有蹄類に由来することを特徴とする請求項 24 記載の方法。

【請求項 32】

前記ドナー細胞またはドナー細胞核が、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、ヤギ、およびバウワローより成る群から選択される有蹄類に由来することを特徴とする請求項 24 または 31 記載の方法。

【請求項 33】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、成体哺乳類の体細胞に由来することを特徴とする請求項 24 記載の方法。

【請求項 34】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、上皮細胞、神経細胞、表皮細胞、ケラチン生成細胞、造血細胞、メラニン細胞、軟骨細胞、B リンパ球、T リンパ球、赤血球、マクロファージ、単球、繊維芽細胞、および筋細胞より成る群から選択されることを特徴とする請求項 24 記載の方法。

【請求項 35】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、皮膚、肺、脾臓、肝臓、胃、腸、心臓、生殖器官、膀胱、腎臓、および尿道より成る群から選択される器官に由来することを特徴とする請求項 24 記載の方法。

【請求項 36】

除核前に、前記少なくとも 1 つの卵母細胞を *in vivo* で成熟させることを特徴とする請求項 24 記載の方法。

【請求項 37】

除核前に、前記少なくとも 1 つの卵母細胞を *in vitro* で成熟させることを特徴とする請求項 24 記載の方法。

【請求項 38】

前記哺乳類細胞が齧歯類に由来することを特徴とする請求項 24 記載の方法。

【請求項 39】

ドナー核またはドナー細胞核の供給源として使用する前記分化哺乳類ドナー細胞が、非休止期の体細胞、または前記非休止期の体細胞から単離された核であることを特徴とする請求項 24 記載の方法。

【請求項 40】

10

20

30

40

50

前記培養内部細胞塊胚のうち任意のものが発生して非ヒト子孫となることを特徴とする請求項 2 4 または 3 1 記載の方法。

【請求項 4 1】

in vitro 成熟の約 1 0 から 6 0 時間後に、前記少なくとも 1 つの卵母細胞を除核することを特徴とする請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 4 2】

前記分化哺乳類細胞または細胞核を前記除核卵母細胞へ挿入する前に、所望の遺伝子を、前記分化哺乳類細胞または細胞核中に挿入し、またはそれらから除去し、または改変させることを特徴とする請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 4 3】

請求項 2 4 または 4 2 記載の方法によって得られた子孫。

【請求項 4 4】

前記核移植手順の結果として作製された任意の非ヒト子孫がキメラであることを特徴とする請求項 4 2 記載の方法によって得られた子孫。

【請求項 4 5】

サイトカラシン B が手続に使用されることを特徴とする請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 4 6】

サイトカラシン B が手続に使用されないことを特徴とする請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 4 7】

サイトカラシン B が手続に使用されることを特徴とする請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 4 8】

前記培養内部細胞塊が、移植用の機能器官を開発するのに用いられることを特徴とする請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 4 9】

前記培養内部細胞塊が、器官形成に用いられることを特徴とする請求項 2 4 記載の方法。

【請求項 5 0】

(i) ドナー核の供給源として使用する所望の分化哺乳類細胞を得る；

(ii) ドナー核の供給源である前記細胞と同種の哺乳類から、少なくとも 1 つの卵母細胞を得る；

(iii) 前記卵母細胞を除核する；

(iv) 前記所望の分化細胞または細胞核を、前記除核卵母細胞へ移入する；

(v) 少なくとも 2 回の電気ショックを細胞対に用いて、該細胞対の活性化および融合した胚への融合および活性化を開始させる；

(vi) 前記活性化および融合した胚を、発生 of 2 細胞期より大きくなるまで培養する；

(vii) 胚が発生して胎児になるように、前記第一および / または第二のトランスジェニック胚を宿主哺乳類へ移植する；工程を含み、

ここで、前記少なくとも 2 回の電気ショックの 2 番目は、最初の電気ショックの少なくとも 1 5 分後に与えられ；

前記分化哺乳類細胞または細胞核を前記除核卵母細胞へ挿入する前に、所望の遺伝子が、前記分化哺乳類細胞または細胞核中に挿入され、それらから除去され、または改変され；さらに

カリオプラストとして使用する所望の分化哺乳類細胞株が、分裂および / または融合パターンの客観的なパラメータに基づいて選択されることを特徴とする、核移植過程を介して非ヒト哺乳類をクローニングする方法。

【請求項 5 1】

核移植によって非ヒト哺乳類をクローニングするための改良された方法であって、

核移植 (NT) 単位を形成するための、非ヒト哺乳類のドナー細胞または非ヒト哺乳類のドナー細胞核の、該ドナー細胞またはドナー細胞核と同一の種の非ヒト哺乳類の除核卵母細胞への導入、

NT 単位の前記種の代理母の子宮への移植、および

10

20

30

40

50

N T 単位を発生させクローン哺乳類にすることを含み、
プレスクリーニングした分化哺乳類細胞株をカリオプラストとして利用し、該カリオプラストが成功した分裂パターンに基づいて選択されることを特徴とする方法。

【請求項 5 2】

核移植によって非ヒト哺乳類をクローニングするための改良された方法であって、

核移植 (N T) 単位を形成するための、非ヒト哺乳類のドナー細胞または非ヒト哺乳類のドナー細胞核の、該ドナー細胞またはドナー細胞核と同一の種の非ヒト哺乳類の除核卵母細胞への導入、

N T 単位の前記種の代理母の子宮への移植、および

N T 単位を発生させてクローン哺乳類にすることを含み、

プレスクリーニングした分化哺乳類細胞株をカリオプラストとして利用し、該カリオプラストが成功した融合パターンに基づいて選択されることを特徴とする方法。

【請求項 5 3】

核移植によって非ヒト哺乳類をクローニングするための改良された方法であって、

核移植 (N T) 単位を形成するための、非ヒト哺乳類のドナー細胞または非ヒト哺乳類のドナー細胞核の、ドナー細胞またはドナー細胞核と同一の種の非ヒト哺乳類の除核卵母細胞への導入、

N T 単位の前記種の代理母の子宮への移植、および

N T 単位を発生させクローン哺乳類にすることを含み、

プレスクリーニングした分化哺乳類細胞株をカリオプラストとして利用し、該カリオプラストが成功した分裂および融合パターンに基づいて選択されることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は非ヒト哺乳類における核移植または核マイクロインジェクション手順に使用する優れた 1 または複数の細胞株の選択のための改良された方法に関する。より詳細には、本発明は、優れた細胞株の予備選択を可能にする判定基準を提供することによって、そのような遺伝子導入計画の結果を改善する方法を提供する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

本発明は概して、体細胞核移植 (S C N T) の分野および望ましいトランスジェニック動物の作製に関する。より具体的には、本発明は、優れた体細胞由来細胞株を選択、作製、および増殖させ、これらの細胞株を形質転換させ、およびこれらの形質転換細胞および細胞株を用いてトランスジェニック非ヒト哺乳類動物種を作製する方法に関する。典型的にはこれらのトランスジェニック動物は、生物医薬、抗体および組み換えタンパク質を含む所望の分子の製造に用いられる。

【 0 0 0 3 】

体重、乳含量、乳産生量、乳分泌期間、および疾患抵抗性の増加のようなある種の望ましい性質または特徴を有する動物が長い間望まれている。従来の交配過程は、いくつかの特に望ましい性質を有する動物を作製することができるが、しばしばこれらの性質はいくつかの望ましくない特徴を伴い、また時間が掛かり、費用を要し、さらに信頼性が低い。さらに、これらの過程は、特定の系統の動物において、当該種の遺伝成分には全く欠けている望ましいタンパク質医薬のような遺伝子産物を作らせることは全くできない (すなわち、牛乳中にヒトまたはヒト化抗体) 。

【 0 0 0 4 】

トランスジェニック動物の作製を可能にする技術の開発は、特定の性質を持つように操作されたかまたはある種のタンパク質またはその他の医薬的または商業的価値を有する化合物分子を発現するように設計された動物の作製において卓抜した精度をもたらす手段を提供する。すなわち、トランスジェニック動物は、生存する体細胞および / または発生の早い段階の生殖細胞に意図的に導入された遺伝子を有する動物である。その動物が発生し

10

20

30

40

50

成長すると、遺伝子操作によってその動物に加えられたタンパク質産物または特定の発生前の変化が顕在化する。

現在、トランスジェニック家畜の作製のために利用できる方法は、非効率的で時間を要し、しばしば細胞株選択技術の悪さまたは選択細胞の生存能力の低さのために、通常、非常に低い割合の生存可能な胚をもたらす。

導入遺伝子の開発中に、通常、DNA配列は標的細胞核の遺伝子全体の中にランダムに挿入され、このことはさまざまな問題の原因となり得る。これらの問題の第一は、挿入不活性化であり、これは挿入DNAによるコード配列または調節配列の破壊による必須遺伝子の不活性化である。もう1つの問題は、導入遺伝子が全く組み込まれないかまたは、組み込まれるが発現されないことである。さらに別の問題は、遺伝物質内での位置効果による不正確な調節の可能性である。これは、同一のトランスジェニック構造を用いて作成された別々の創始者動物間の、遺伝子発現レベルおよび遺伝子調節の正確さにおける可変性を称する。このように、多数の創始者動物を作製して、トランスジェニック系統の維持を保証するような態様で導入遺伝子が発現することが確認されたものがそのうちの5%未満であることは珍しくない。

10

【0005】

さらに、トランスジェニック家畜作製の効率は低く、作製された子孫100匹のうち1匹がトランスジェニック動物であるような効率であることは珍しくない(Wall, 1997)。その結果、トランスジェニック動物の作製に伴うコストは、発現動物1個体あたり25~50万ドル程度になり得る(Wall, 1997)。

20

核移植およびマイクロインジェクションの先行技術の方法は、通常、トランスジェニック動物の作製に必要な手順に対して細胞の質を結びつける客観的因子を何ら考慮することなく選択された胚細胞および体細胞および細胞株を用いてきた。この類の研究および細胞供給は、非特許文献1および非特許文献2に代表される。これらの研究の両方で、細胞株は胎生10日未満の胚に由来するものであった。両方の研究で、選択された細胞はクローニング手順に使用するドナー細胞の明らかな分化を防ぐために支持細胞上で維持されたが、他の選択方法、技術、または手順は用いられなかった。本発明は、少なくとも1つの適合性の客観的試験での成績に基づいて、核移植およびマイクロインジェクション手順への適合性について選択した分化細胞をカリオプラストとして使用する。本発明はまた、胚細胞型の使用も、分化ドナー核から開始したクローン胚と同様に、本発明の方法を用いてスクリーニングできることを考慮する。

30

【非特許文献1】Campbell et al., Nature, 1996

【非特許文献2】Stice et al., Biol. Reprod., 1996

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

このように、トランスジェニック動物はさまざまな方法によっていくつかの異なる種で作製されているが、所望のタンパク質を大量に発現するかまたは導入遺伝子の挿入によって引き起こされた遺伝子変化を明示することができるトランスジェニック動物を合理的な費用で容易におよび再現性を持って作製する方法はまだ無い。

40

【0007】

したがって、トランスジェニック動物の開発において作製効率の向上を可能にする、核移植手順におけるカリオプラストの供給源としての細胞株を選択する改良法が必要とされている。本発明は、核移植またはマイクロインジェクション手順に最適である細胞株を選択する能力を高める。現在、核移植手順においてカリオプラストの供給源として使用されている劣った細胞株によるものとされる非常に高い程度の成功および失敗があり、本発明はこれらの効率を改善する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

要約すると、本発明は、核移植過程を介して非ヒト哺乳類をクローニングするための改

50

良された方法を提供するものであり、該方法は、核移植手順のためのドナー核の供給源として使用する所望の分化哺乳類細胞株を得る；ドナー核の供給源である細胞と同種の哺乳類から、少なくとも1つの卵母細胞を得る；その少なくとも1つの卵母細胞を除核する；所望の分化細胞または細胞核を、除核卵母細胞へ移入する；細胞対を同時に融合および活性化して最初のトランスジェニック胚を形成する；融合して最初のトランスジェニック胚を生じない細胞対を活性化する；活性化された最初のトランスジェニック胚を、発生期の2細胞期より大きくなるまで培養する；および、胚が発生して胎児になるように最初のトランスジェニック胚を適当な宿主哺乳類へ移植する；工程を含み、カリオプラストとして使用する所望の分化哺乳類細胞株が、分裂および/または融合パターンの客観的なパラメータに基づいて選択されることを特徴とする。典型的には、上記の方法は、前記分化哺乳類細胞または細胞核を前記除核卵母細胞へ挿入する前に所望の遺伝子が挿入、除去、または改変されたドナー細胞核を使用することによって達成される。また、好ましくは、使用される卵母細胞を、除核前に *in vitro* で成熟させるという事実注意到意する。

【0009】

さらに、本発明の方法はまた、除核およびドナー体細胞と融合し、さらに同時に活性化し、分裂中期IIで停止したヤギ卵母細胞の使用によって、トランスジェニック動物の作製の最適化をもたらす。トランスジェニッククローン動物の1個体の乳の分析は、ヒトの所望の標的遺伝子導入タンパク質産物の高レベルの産生を示した。

【0010】

本発明は、たとえば、細胞、組織、および器官移植に使用することができる、CICM細胞、胎児、または子孫の入手可能性を高めるに用いることができることを指摘することもまた重要である。胎児細胞または成体細胞を動物から採取してそれをクローニング手順で使用することによって、さまざまな細胞、組織、およびおそらく器官を、器官形成を通じて発生する際にクローン胎児から得ることができる。細胞、組織、および器官は、クローン子孫からも同様に単離することができる。この過程は、細胞および遺伝子治療を含む多数の医学的および獣医学的治療に「材料」の供給源を提供することができる。細胞が由来する動物にその細胞を移植で戻す場合、免疫拒絶は回避される。また、多数の細胞型をこれらのクローンから単離することができるため、同一の種の動物間および種間での免疫拒絶を避けるために、造血キメラといった方法を用いることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

下記の略語は本明細書中で指定の意味を有する；

略語注；

体細胞核移植 (SCNT)

培養内部細胞塊 (CICM)

核移植 (NT)

合成卵管液 (SOF)

胎児ウシ血清 (FBS)

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

ウシ血清アルブミン (BSA)

用語解説；

ウシ - さまざまな種のウシまたはそれに関連するもの

ヤギ - さまざまな種のヤギまたはそれに関連するもの

細胞対 - 融合および/または活性化前の除核卵母細胞と体細胞カリオプラストまたは胎児カリオプラスト

サイトカラシンB - 核分裂を起こさない一方で細胞質分裂を選択的におよび可逆的に阻害する特定菌類の代謝産物。

【0012】

細胞質体 - 真核細胞の細胞質物質

融合スライド - 距離を開けて固定した平行電極用のスライドガラス。細胞対を電極間に置

き、融合および活性化のために電流を受けさせる

カリオプラスト - 細胞から除核によって得られる、細胞質の狭い縁と原形質膜で囲まれた細胞核。

【0013】

核移植 - または「核移植術」は、ドナー細胞由来の核が除核卵母細胞へ移植されるクローニング方法を称する

処女生殖の - 精子の貫通無しでの卵母細胞からの胚の発生。

【0014】

再構成胚 - 再構成胚は、除核手順を介して自身の遺伝物質が除去されている卵母細胞である。それは融合事象後の成体体細胞または胎児体細胞の遺伝物質の卵母細胞への配置を介して「再構成」されている

10

体細胞 - 生殖細胞以外の生物身体の任意の細胞

体細胞核移植 - 治療的クローニングともいい、それによって体細胞が除核卵母細胞と融合される過程である。体細胞の核は遺伝情報を提供する一方、卵母細胞は胚の発生に必要な栄養およびその他のエネルギー産生材料を提供する。いったん融合が起こると、細胞は全能性であり、最終的には発生して胚盤胞になり、そこで内部細胞塊が単離される

トランスジェニック生物 - 宿主がその染色体構成中に導入遺伝子の遺伝的性質を獲得するように、別の生物に由来する遺伝物質が実験的に導入された生物。

【0015】

本発明によると、ヤギおよびウシ等の哺乳類の優れた遺伝子型の増殖がより高い効率で提供される。このことは、証明された遺伝的優位性またはその他の望ましい性質を有する成体動物の繁殖を可能にし、ここでの優位性は細胞品質の客観的試験の優れた成績およびトランスジェニック動物産生に関する適合性を含む。

20

【0016】

例えば、ヤギ、齧歯類、ウシ、およびウサギ等の多数の重要な哺乳類種の作製の成功率において向上するであろう。本発明によって、採取してクローニング手順に使用することができ、さらにその後トランスジェニック動物の作製に必要な手順、方法、および技術についての適合性を示す客観的パラメータに基づいて検査される、潜在的に何十億の胎児細胞または成体細胞が存在する。このことは、潜在的に、多数の同一子孫を短期間に生じ、関係する全体コストを軽減して効率を改善する。

30

【0017】

加えて、本発明は、体細胞あるいは分化した胎児または成体哺乳類の細胞株に由来する細胞核を用いるクローニング手順に関する。これらの細胞株は、下記で触れるように、後で血清中へ再導入される、血清飢餓培養した分化した胎児または成体ヤギまたはウシの（場合に応じて）細胞集団および細胞株の使用を含み、これらの細胞はドナー核と同一の種の除核卵母細胞へ移植される。核はクローン胚の発生を導くように再プログラムされ、クローン胚はその後レシピエント雌に移植されて胎児および子孫を生じ、または培養内部細胞塊（CICM）を生じるのに用いることができる。クローン胚はまた、受精胚と組み合わせてキメラ胚、胎児、および/または子孫を生じることができる。

【0018】

40

Wilmutら(1997)は融合率および胚発生を彼らの成功したクローニング研究について報告したが(Campbellら(1996)によって先に報告されているが)、別の細胞株より統計的に有意に優れていた1つの細胞株についてこれらのパラメータのどちらかまたは両方が有意であることについては報告していない。多数のその他の研究が、融合率だけ(Kasinathan et al., 2001; Lai et al., 2001; Keefer et al., 2002; Reggio et al., 2001;およびFitchev et al., 1999)、融合および分裂(Kato et al., 2000; Zakhartchenko et al., 1996; Zakhartchenko et al., 2001; Verma et al., 2000; Liu et al., 2001; Park et al., 2001; and Booth et al., 2001)、または融合無しの分裂(Kuholzer et al., 2001; Zou et al., 2002; and Kou et al., 2000)について報告し続けた。これらの報告もまた、融合および/または分裂の統計的に有意に高い率に基づいて、所定の細胞株

50

が核移植手順におけるカリオプラストの供給源としての使用において優れていることについて示唆も教示もしていない。

【0019】

本発明はまた、2つの事象(events)間に遅れが無い同時の融合および活性化による、体細胞核移植での効率の向上をもたらす。本研究の目的は、核移植計画で生存可能な子孫を作成するのに使用する可能性のある細胞株の指標としての融合および/または分裂との関連を調査することであった。

【0020】

ドナーカリオプラストの除核細胞質体への融合、および結果として生じる細胞対の続く活性化は、体細胞核移植によって生きた子孫を順調に生じるために必要な重要な工程である。ドナーカリオプラストの細胞質体への電気融合は、使用される最も一般的な方法である。しかしながら、より重要なこととして、多数の家畜種において胚発生の過程を開始するために核移植方法論で用いられる、いくつかの活性化方法、および活性化工程のタイミングが公開されている。哺乳類では、種差がある一方、最初のシグナル事象およびその後受精時に精子によって誘導される Ca^{2+} 振動は、結果として卵母細胞の活性化および胚発生をもたらす通常の過程である(Fissore et al., 1992およびAlberio et al., 2001)。 Ca^{2+} 可動化の化学的および電気的方法の両方が、体細胞核移植によって作製された対を活性化するのに現在用いられている。しかし、これらの方法は、典型的なin vivo受精パターンにおける精子と同様の Ca^{2+} 振動パターンを生じない。

【0021】

体細胞を利用したヒツジにおける成功の最初の報告(Wilmot et al., 1997)以来、核移植において顕著な進歩が起きている。以来、多数の他の種が、体細胞から(Baguisi et al., 1999およびCibelli et al., 1998)さまざまな成功の程度でクローニングされている。多数の他の胎児および成体(Zou et al., 2001およびWells et al., 1999)、ならびに胚(Yang et al., 1992; Bondioli et al., 1990; and Meng et al., 1997)の体細胞の組織型も報告されている。カリオプラストが再構成されるとき細胞周期段階もまた、異なる実験方法論において決定的に重要であると報告されている(Kasinathan et al., Biol. Reprod. 2001; Lai et al., 2001; Yong et al., 1998; and Kasinathan et al., Nature Biotech. 2001)。

先行技術の方法は、核移植手順のために無作為に調達された初期胚の割球の使用に依存する。この手法は、利用可能な胚割球の数が少量であること、およびそのような細胞に外来の遺伝物質を導入することができないことによって制限される。対照的に、分化した胚、胎児、または成体の体細胞が核移植のためのカリオプラストドナーとして機能することの発見は、生殖細胞系列の改変のために幅広い可能性を提供する。本発明に基づいて、核移植のために組み換え体細胞株を使用すること、および、「再構成」胚の使用を含む核移植方法においてより首尾よく使用することができる優れた細胞株を選択してこの手順の効率を改善することは、従来の遺伝子導入方法の効率を高めるだけでなく、トランスジェニック動物作製の効率も顕著に向上させる一方で、創始者動物のモザイクの問題を克服する。

【0022】

我々は、同時の電気融合および活性化によって、ヤギ種およびその他の動物において生きた子孫を首尾よく作製できることを以前に示している。最近の一連の実験で、我々は、精子に誘導される Ca^{2+} 振動をより綿密に模倣し、胚と生きた子孫の両方を体細胞核移植によって作製するために、最初の成功した同時の電気融合および活性化に続く、追加の電気活性化事象の使用について評価した。最後に、我々は、最初の同時の電気融合および活性化事象でうまく融合しなかった除核細胞質体とドナーカリオプラストとを再融合させ、ヤギ胚と生きた子孫の両方を体細胞核移植によって生じる能力について評価した。

【0023】

カリオプラストと除核細胞質体との電気融合の効率は、使用した種および細胞型に基づいて変動する。しかし、ヤギを用いた我々の経験では、および他者によって報告された通

10

20

30

40

50

り(Baguisi et al., 1999; およびStice et al., 1992)、最初の融合の試みの間にうまく融合しない対の部分集合が存在する。これらの実験で、我々は失敗した最初の同時の電気融合および活性化の後の追加の再融合の試みが、ヤギ胚と生きた子孫の両方を体細胞核移植によって生じさせる能力について特定した。実験において、データは、再融合が、生きた子孫を生じさせることができ、さらに同時の電気融合および活性化のみ(Baguisi et al., 1999)、または最初の成功した同時の電気融合および活性化後の1回の追加の電気活性化事象と比較して、より効率的であることを実証した。その後の実験で、我々は融合しなかった対の再融合が、発生55日目に妊娠を確立できる核移植胚を作製できたという我々の観察を確認した。

【0024】

このように、本発明で使用される方法論および系を介して、客観的な細胞選択基準の使用によって効率が向上した体細胞核移植によって、トランスジェニック動物(ヤギ)が作製された。

【0025】

以上の発明は、理解のための図面によって一部詳細に説明されているが、ある種の変化および改変を実施しうることが当業者に明らかである。したがって、説明および実施例は、添付の請求項によって特定される本発明の範囲を制限すると解釈すべきでない。

【0026】

Wilmut et al.およびCampbell et al.は、単一の電気パルスで再構成胚の融合に用い、その後、胚の化学的活性化の前に数時間遅延させることを報告した。その他の報告は、さまざまな種における活性化に使用することができるさまざまな電気的および化学的刺激について記載している(Koo et al., 2000; およびFissore A., et al.,)。本発明は、2つの事象の間に遅延が無い同時の融合および活性化による体細胞核移植の使用、ならびにその後の活性化および融合した胚への追加の電気パルスの使用を提供する。しかし、ここで提供される細胞選択技術は、Wilmut et al.およびCampbell et al.によって提供された従来の方法を含む幅広い核移植技術を、それらの方法で用いられる「開始材料」または細胞を改善することによって改善する。同様に、ヤギの細胞および細胞株に関してここで利用された技術は、さまざまな他の哺乳類の細胞株においても有用である。本発明の方法は、種にかかわらず、調査した細胞の特徴、すなわち客観的判定基準としての分裂および/または融合に依存する。したがって、本発明は、効率を高め、さらにトランスジェニック動物または細胞株を作成する方法をより確実でかつ効率的にする核移植技術を提供する。

【実施例】

【0027】

材料および方法

発情期同期化および卵母細胞ドナーとして用いられるドナー雌の過剰排卵、および顕微操作は、特に参照により本開示に含まれるGavin W. G. 1996に記載通りに実施した。初代体細胞の単離および確立、およびカリオプラスドナーとして用いられる体細胞のトランスフェクションおよび調製もまた上述の通り実施した。初代体細胞は、標準的な脂質ベースのトランスフェクション手法を用いて所望の遺伝子を導入された動物組織から得られた分化非生殖細胞である。トランスフェクト細胞を試験し、核移植用のドナー細胞として使用するためにBaguisi et al., 1999に記載の通り培養し調製したのは導入遺伝子陽性細胞であった。核酸を可視化するために、DNA染色色素ヘキスト(商標)33342またはその他の蛍光感受性組成物を用いて卵母細胞を染色して、または染色しないで、除核および再構成手順を実施することにも注意すべきである。しかしながら、好ましくは、分裂中期核板の遺伝物質の照明のためにヘキスト33342を約0.1~5.0 μg/mlで使用する。

【0028】

約0.1~5.0 μg/mlのHoechst 33342を用いて卵母細胞を染色し、さらに遺伝物質/分裂中期核板の紫外線照明を用いて(それらを用いなくても実施することができる)除核および再構成を実施した。除核および再構成の後、胎児ウシ血清(1%

10

20

30

40

50

から15%)ならびに100U/mlペニシリンおよび100μg/mlストレプトマイシンを補足した平衡化した合成卵管液培地(SOF/FBS)中でカリオプラスト/細胞質体対をインキュベートした。37~39にて、空気中約5%のCO₂を含有する加湿チャンバー内で、融合前に少なくとも30分間、対をインキュベートした。

【0029】

融合は、2個の電極で構成された融合スライドを用いて実施した。融合スライドを融合シャーレの中に置き、融合スライドの電極を覆うのに十分な量の融合緩衝液でシャーレを満たした。

【0030】

細胞対を培養インキュベーターから取り出し、融合緩衝液で洗浄した。実体顕微鏡を用いて、カリオプラスト/細胞質体の接合部を電極に平行にして、細胞対を電極の間の等距離に置いた。これらの実験では、BTX ECM 2001エレクトロセルマニピュレーターを用いて、20(20~60でよい)μ秒間、約2.0から3.0kV/cmの最初の単一の同時の融合および活性化電気パルスを経細胞対に加えた。融合処理した細胞対を新しい融合緩衝液の液滴に移した。融合処理した対を平衡化SOF/FBSを用いて洗浄し、その後(1から10μg/mlの)サイトカラシンBを含むかまたは含まない平衡化SOF/FBSへ移した。37~39にて、空気中に約5%のCO₂を含有する加湿チャンバー内で細胞対をインキュベートした。

【0031】

融合の約30分後から、カリオプラスト/細胞質体融合を測定した。最初の融合および活性化処理の1時間(15分~1時間)後から、20(20~60)μ秒間、約2.0kV/cmの追加の単一の電気パルス(2倍パルス)を経融合対に加えて、追加の活性化を促進させた。別の方法として、もう1つの群の融合細胞対には、最初の融合および活性化処理後1時間(15分~1時間)から、20μ秒間、約2.0kV/cmの追加の3つの電気パルス(4倍パルス)を経15分間隔で加えて、追加の活性化を促進させた。融合しなかった細胞対は、最初の融合および活性化処理の1時間後から、20(20~60)μ秒間、約2.6から3.2kV/cmの単一の電気パルスを加えて融合を促進させることによって再融合した。すべての融合したおよび融合処理した細胞対を、(1から10μg/mlの)サイトカラシンBを含むかまたは含まないSOF/FBSへ戻した。少なくとも30分間、37~39にて、空気中に約5%のCO₂を含有する加湿チャンバー内で細胞対をインキュベートした。

【0032】

再融合の約30分後から、カリオプラスト/細胞質体再融合の成功を測定した。融合処理した細胞対を平衡化SOF/FBSで洗浄し、その後(1から10μg/mlの)シクロヘキシミドを含むかまたは含まない平衡化SOF/FBSへ移した。37~39にて、空気中に約5%のCO₂を含有する加湿チャンバー内で、最大4時間、細胞対をインキュベートした。

シクロヘキシミド処理後、ウシ血清アルブミン(0.1%から1.0%)および100U/mlペニシリンおよび100μg/mlストレプトマイシンを添加した平衡化SOF培地(SOF/BSA)を用いて細胞対をよく洗浄した。細胞対を平衡化SOF/BSAへ移し、24~48時間、37~39にて、約6%O₂、5%CO₂、および残りの量の窒素を含む加湿ユニット式インキュベーター内に静置して培養した。時間相応の発生を示す核移植胚(24から48時間で1細胞から最大8細胞)を、仮母の同期化レシピエントへ移植した。

【0033】

表1に示すデータは、2001年9月から2002年2月初めまでに発生した創始者トランスジェニック動物の作製のための製造核移植研究からのものである。この表は、実験作製の試み、具体的には胚採取、除核、融合、分裂、および移植データの詳細を説明する。

10

20

30

40

【表 1】

核移植データ 2001/2002期

	2001/2002期 (2001年8月27日 ～2002年2月8日)	
排卵総数	7151	
ドナー数	495	
排卵数/ドナー	14.4	
回収卵子数	4201 (排卵数の 59%)	
卵子数/ドナー	8.5	10
排卵および吸引された卵子数	4452	
除核数	4215 (回収卵母細胞の 95%)	
再構成数	3947 (除核した卵母細胞の 94%)	
融合を試みた対の数	3633 (再構成された卵母細胞の 92%)	
融合した対の数	2904 (融合の試みの 80%)	
分裂数	1145 (融合した対の 39%) (48 時間にて 58%)	
移植した核移植胚数	2120	
レシピエント数	345	
胚の数/レシピエント	6.1 (範囲 1-15)	
妊娠数	19 週を通じ 24 (40) / 305 (7.9%)	20
産仔数	未定	

【0034】

本発明により関連する情報を下記の表 2 に示し、データは、妊娠対非妊娠動物で分けた融合および分裂率に基づいて示され、所定の細胞集団または細胞株で融合および/または分裂率がより高い場合に、妊娠の進展およびトランスジェニック動物の誕生を予測するのにより高い総合的な成功を収めたことを示唆する。

【表 2】

融合および分裂による GTC 核移植妊娠の概要

	核移植レシピエント、US 陽性 (50 日目)	核移植レシピエント、US 陰性	
レシピエント数	26	139	
実験数	17	35	
細胞株数	13	15	
融合の試みの数	826	1424	
融合数 (%)	686 ^a (83)	1093 ^b (77)	
融合範囲 (%)	(57-100)	(32-100)	40
48 時間での分裂数/融合 数 (%)	239/339 (71) ^a	376/721 (52) ^b	
(範囲%)	(57-92)	(22-93)	

^{a, b} 異なる上付き文字付きの同一行の値は有意差がある (P<0.001)。

【0035】

核移植計画に使用するための優れた細胞株を予め選択する能力は、注目すべき意味合いを有する。本明細書中で言及した出版物に見られるように、相当数の核移植研究において成功は限られている。これらの出版物の多くにおいて、実施した相当数の研究が、非常に

粗末な結果をもたらし、または個々の細胞（カリオプラスト）株について子孫が全く得られなかった。

【0036】

任意の核移植計画の成功に最も重要なことは、カリオプラストと除核した細胞質体との適当な融合があることである。しかしながら、同等に重要なのは、再構成胚（カリオプラストおよび細胞質体）が正常胚として挙動し、分裂および発生して生存可能な胎児、さらに究極的には生きた仔となることである。上述したように、本実験の結果は、融合および分裂の両方が、個別にまたは組み合わせで、どの細胞株が核移植手順に好ましいかを統計的に有意な態様で予測できることを示す。各パラメータは単独でどの細胞株を利用するか

10

【0037】

本発明に基づき、特定の細胞株または細胞集団の特性は、それぞれの出版物における融合、融合と分裂、または分裂単独に関連して、核移植計画において使用する細胞株を評価する際に重要でかつ統計的に有意である。さらに踏み込んで、本発明の要素は、胚の核指数（核を有する再構成された核移植胚に由来する割球の数）もまた細胞株成績の関連指標であることを実証する。

【0038】

本質的に、本発明は、融合および分裂の指数の単独または組み合わせでの使用を介して、核移植計画の順調な開始および結果を向上させるのに有用な優れた細胞株を選択する方法を提供する。

20

【0039】

ヤギ

本研究の細胞および細胞株のドナーとして使用した、純血種および雑種のスクレイピーに感染していないアルパイン種、ザーネン種、およびトッゲンブルグ種乳用ヤギの群は、適正農業規範 (Good Agricultural Practice, GAP) ガイドラインに基づいて維持した。

【0040】

ヤギ胎児体細胞の細胞株の単離

カリオプラストドナーとして使用する初代ヤギ胎児繊維芽細胞株は、35日および40日胎児から得た。胎児を外科的に取り出し、平衡化したリン酸緩衝生理食塩水（PBS、 Ca^{++} / Mg^{++} を含まない）に入れた。38℃にて10分間0.025%トリプシン、0.5 mM EDTAに曝露した胎児組織を磨砕することによって単細胞懸濁液を調製した。細胞を胎児細胞培地 [10%胎児ウシ血清 (FBS) を含み、ヌクレオシド、0.1 mM 2-メルカプトエタノール、2 mM L-グルタミン、および1% ペニシリン / ストレプトマイシン（各10,000 I.U. / ml）を添加した平衡化199培地 (M199, Gibco)] を用いて洗浄し、25 cm² フラスコで培養した。初代胎児細胞の集密単層を、4日間の培養後にトリプシン処理によって採取し、その後、培養で維持するかまたは低温保存した。

胚再構成用のドナー細胞の調製

胎児体細胞を、胎児細胞培地を入れた4ウェルプレートに播種し、培養（5% CO₂、39℃）で維持した。48時間後、培地を新しい低血清（0.5% FBS）胎児細胞培地に交換した。低血清培地に交換後2～7日間、48から72時間毎に低血清胎児細胞培地で培地交換し、（カリオプラストドナーとして使用する）体細胞をトリプシン処理によって採取した。除核卵母細胞との融合の少なくとも6時間前に、10% FBSを含む、2 mM L-グルタミン、1% ペニシリン / ストレプトマイシン（各10,000 I.U. / ml）を添加した平衡化M199に細胞を再懸濁させた。

【0041】

卵母細胞回収

卵母細胞ドナー雌は以前に記載されている通り同期化および過剰排卵させ (Gavin W. G., 1996)、精管切除した雄と48時間の期間に交尾させた。回収後、10% FBSを含む、2 mM L-グルタミンおよび1% ペニシリン / ストレプトマイシン（各10,000

50

I . U . / m l) を添加した平衡化 M 1 9 9 で卵母細胞を培養した。

【 0 0 4 2 】

細胞質体調製および除核

すべての卵母細胞を、除核前 1 5 から 3 0 分間、サイトカラシン B (Sigma、1 0 % F B S 含有 S O F 中 $5 \mu g / m l$) で処理した。分裂中期 II 卵母細胞において、2 5 から 3 0 0 m のガラスピペットを用いて、第一極体および極体周囲の隣接する細胞質 (細胞質の ~ 3 0 %) を吸引して分裂中期核板を除去することによって除核した。除核後、すべての卵母細胞を直ちに再構成した。

【 0 0 4 3 】

核移植および再構成

ドナー細胞注入は、卵母細胞除核に用いたのと同じの培地中で実施した。1 個のドナー細胞をガラスピペットを用いて透明帯と卵細胞膜の間に置いた。細胞 - 卵母細胞対を、電気融合および活性化の手順の前に S O F 中で 3 0 から 6 0 分間インキュベートした。再構成された卵母細胞は、融合緩衝液 (3 0 0 m M マンニトール、0 . 0 5 m M $C a C l_2$ 、0 . 1 m M $M g S O_4$ 、1 m M $K_2 H P O_4$ 、0 . 1 m M グルタチオン、0 . 1 m g / m l B S A) 中で 2 分間平衡化した。電気融合および活性化は、室温にて、「融合スライド」 (間隙 $5 0 0 \mu m$; BTX-Genetronics, San Diego, CA) に組み込まれた 2 個のステンレス鋼電極を有する融合培地で満たした融合室内で実施した。

【 0 0 4 4 】

融合スライドを用いて融合を実施した。融合スライドを融合シャーレ内に置き、融合スライドの電極を覆うのに十分な量の融合緩衝液でシャーレを満たした。対を培養インキュベーターから取り出し、融合緩衝液を用いて洗浄した。実体顕微鏡を用いて、カリオプラスト / 細胞質体の接合部を電極に平行にして、電極の間の等距離に細胞対を置いた。活性化および融合を促進するために対に加える電圧範囲は $1 . 0 k V / c m$ から $1 0 . 0 k V / c m$ までとすることができることに注意する。しかしながら、好ましくは、最初の単一の同時の融合および活性化電気パルスは、好ましくは少なくとも $2 0 \mu$ 秒の間、 $2 . 0$ から $3 . 0 k V / c m$ の電圧範囲を有し、最も好ましくは $2 . 5 k V / c m$ である。これを B T X E C M 2 0 0 1 エレクトロセルマニピュレーターを用いて細胞対に加えた。マイクロパルスの持続時間は $1 0$ から $8 0 \mu$ 秒間まで変えることができる。処理後、通常新しい融合緩衝液の液滴に処理した対を移す。融合処理した対を平衡化 S O F / F B S を用いて洗浄し、その後サイトカラシン B を含むかまたは含まない平衡化 S O F / F B S へ移した。サイトカラシン B を使用する場合、その濃度は 1 から $1 5 \mu g / m l$ までの範囲で変えることができ、非常に好ましくは $5 \mu g / m l$ である。 $3 7 \sim 3 9$ にて、空気中に約 5 % の $C O_2$ を含有する加湿チャンバー内で対をインキュベートした。本開示で提供される任意の手順を通じて、サイトカラシン B の代わりにマンニトールを使用できることに注意する (H E P E S 緩衝マンニトール (0 . 3 m m) をベースとする $C a^{2+}$ および B S A を含む培地) 。

【 0 0 4 5 】

融合後 $1 0$ から $9 0$ 分の間に、非常に好ましくは融合後 $3 0$ 分で開始して、実際のカリオプラスト / 細胞質体融合の存在を測定する。本発明の目的のためには、融合した対は追加の活性化処理 (2 倍パルス) を受けることができる。この追加のパルスは、 $1 0$ から $8 0 \mu$ 秒間の時間範囲で、電圧の強さに関しては $0 . 1$ から $5 . 0 k V / c m$ まで変えることができる。しかしながら好ましくは、融合した対は $2 0 \mu$ 秒間、 $0 . 4$ または $2 . 0 k V / c m$ の、追加の単一の電気パルス (2 倍パルス) を受ける。追加のパルスの実施は最初のパルスの少なくとも $1 5$ 分間時間後に開始することができ、非常に好ましくはしかし、この追加のパルスは、追加の活性化を促進するため最初の融合および活性化処理後 $3 0$ 分間から 2 時間後に開始する。他の実験では、融合しなかった対を単一の電気パルスで再融合した。この追加のパルスの電圧の範囲および時間は、最初の融合パルスの少なくとも $1 5$ 分後から開始して、少なくとも $1 0 \mu$ 秒間、 $1 . 0 k V / c m$ から $5 . 0 k V / c m$ まで変化させてよい。より好ましくはしかし、追加の電気パルスは、融合を促進するため

10

20

30

40

50

に最初の融合および活性化処理の30分ないし1時間後から20 μ 秒間、2.2から3.2 kV/cmまで変化させた。すべての融合したおよび融合処理した対を、5 μ g/mlのサイトカラシンBを加えたSOF/FBSへ戻した。少なくとも20分間、好ましくは30分間、37~39 $^{\circ}$ Cにて、空気中に約5%のCO₂を含有する加湿チャンバー内で対をインキュベートした。

【0046】

本発明の方法の別の形は、追加の活性化を促進するために、最初の融合および活性化処理の少なくとも15分、好ましくは30分から1時間後に開始する、少なくとも20 μ 秒間の、好ましくは2.0 kV/cmの、追加の単一の電気パルス(2倍パルス)を細胞対に与える。この追加の活性化パルスの電圧範囲は、1.0から6.0 kV/cmまでの範囲で変えることができる。

10

【0047】

別の方法として、追加の活性化を促進するために、その後の試みで、最初の融合および活性化処理の少なくとも30分後に開始して、最も好ましくは2.0 kV/cmにて20 μ 秒間、15から30分間隔で、少なくとも3回の追加の単一の電気パルス(4倍パルス)を残りの融合した対に与えた。しかし、この追加の手続では、この追加の活性化パルスの電圧範囲は1.0から6.0 kV/cmまで変えることができ、持続時間は10 μ 秒間から60 μ 秒間まで変えることができ、開始は最初の融合処理後15分まで短く、または4時間まで長くすることができたことに注意する。その後の実験で、融合しなかった対は、融合を促進するために最初の融合および活性化処理の1時間後に開始した2.6から3.2 kV/cm、20 μ 秒間の単一の電気パルスで再融合した。融合したおよび融合処理した対は、サイトカラシンBを含むかまたは含まない平衡化SOF/FBSへ戻した。少なくとも20分間、好ましくは30分間、37~39 $^{\circ}$ Cにて、空気中に約5%のCO₂を含有する加湿チャンバー内で対をインキュベートした。サイトカラシンBを使用する場合、その濃度は1から15 μ g/mlまで変えることができ、非常に好ましくは5 μ g/mlである。37~39 $^{\circ}$ Cにて、空気中に約5%のCO₂を含有する加湿チャンバー内で少なくとも30分間、対をインキュベートした。マンニトールをサイトカラシンBの代替として使用することができる。

20

【0048】

再融合の30分後に開始して、カリオプラスト/細胞質体の再融合の成功を測定した。融合処理した対を、平衡化SOF/FBSで洗浄し、その後シクロヘキシミドを加えた平衡化SOF/PBSへ移した。37~39 $^{\circ}$ Cにて、空気中に約5%のCO₂を含有する加湿チャンバー内で最大4時間、対をインキュベートした。

30

シクロヘキシミド処理後、少なくとも0.1%、好ましくは少なくとも0.7%、好ましくは0.8%のウシ血清アルブミン、および100 U/mlペニシリンおよび100 μ g/mlストレプトマイシンを含む平衡化SOF培地(SOF/BSA)を用いて対をよく洗浄した。対を平衡化SOF/BSAへ移し、24~48時間、37~39 $^{\circ}$ Cにて、約6% O₂、5% CO₂、および残りの窒素を含む加湿ユニット式培養器内で静置して培養した。時間相応の発生を示す核移植胚(24から48時間で1細胞から最大8細胞)を、仮母の同期化レシピエントへ移植した。

40

【0049】

核移植胚培養およびレシピエントへの移植

すべての核移植胚を、10% FBS含有SOF(50 μ l)の鉱物油を被せた小滴中で培養した。胚をレシピエント雌へ移植する前に、5% CO₂を含む加湿した39 $^{\circ}$ Cインキュベーター内で48時間、胚を培養し続けた。レシピエント胚の移植は、以前に記載された通りに実施した(Baguisi et al., 1999)。

【0050】

妊娠および周産期ケア

ヤギについて、現行の発情期の初日から25日目からの超音波検査によって妊娠を判定した。胎児の生存能力を評価するため、妊娠75日目まで毎週、その後は月1回雌を評価

50

した。152日を超えて継続した妊娠については、5mgのPGF20 (Lutalyse (商標), Upjohn) を用いて分娩を誘導した。分娩は処置後24時間以内に生じた。仔は出生直後に母ヤギから離し、分娩後1時間以内に加熱処理した初乳を与えた。

【0051】

クローン動物の遺伝子型分析

出生直後に、血液試料および耳の皮膚生検を、雌のクローン動物 (たとえばヤギ) および代理母からゲノムDNA単離のために採取した。まず特定の遺伝子導入標的タンパク質についてのプライマーを用いてPCRによって各試料を分析し、次いでその特定標的タンパク質のcDNAを用いたサザンブロットに供した。各試料について、5μgのゲノムDNAをEcoRI (New England Biolabs, Beverly, MA) を用いて消化し、0.7%アガロースゲル (SeaKem (登録商標), ME) で電気泳動し、当該分野で既知の標準的手順に従ってキャピラリー転写によってナイロン膜 (MagnaGraph (商標), MSI, Westboro, MA) 上に固定化した。Prime-It (登録商標) キット (Stratagene, La Jolla, CA) を用いて、32P dCTPで標識した1.5 kbのXho I から Sal I hAT cDNA断片で膜をプロービングした。ハイブリダイゼーションは65℃にて一晩実施した。0.2×SSC、0.1%SDSを用いてブロットを洗浄し、X-OMAT (登録商標) ARフィルムに48時間曝露した。

10

【0052】

本発明の開発中に実施された実験で、除核および再構成後に、カリオプラスト/細胞質体の対を、1%から15%胎児ウシ血清、好ましくは10%のFBS、および100U/mlペニシリンおよび100μg/mlストレプトマイシンを添加した平衡化した合成卵管液培地 (SOF/FBS) 中でインキュベートした。37~39℃にて、空気中に約5%のCO₂を含有する加湿チャンパー内で、融合前に少なくとも30分間、対をインキュベートした。

20

【0053】

本発明は、トランスジェニック胚の作製に結びつく手順において優れた細胞の使用を提供することによって、遺伝子導入手順の効率の向上をもたらす。これらのトランスジェニック胚は仮母動物に移植することができ、またはクローン増殖させて保存または利用することができる。また、強化され改良された核移植手順を、これらの細胞をin vitroで改変および選択する能力と組み合わせることによって、この手順は以前のトランスジェニック胚技術より効率的である。本発明によると、これらのトランスジェニッククローン胚はCICM細胞株またはその他の胚細胞株を作製するのに用いることができる。したがって、本発明は、遺伝子工学技術を助ける未分化の、選択されていない、ランダムな細胞株を得てin vitroで維持する必要を無くす。

30

【0054】

このように、一態様では、本発明は哺乳類をクローニングする方法を提供する。一般的に、下記の工程を含む核移植過程によって哺乳類を作製することができる：

- (i) ドナー核の供給源として使用する所望の分化哺乳類細胞を得る；
- (ii) ドナー核の供給源である細胞と同種の哺乳類から卵母細胞を得る；
- (iii) 前記卵母細胞を除核する；
- (iv) 所望の分化細胞または細胞核を、除核卵母細胞へ移入する；
- (v) 細胞対を同時に融合および活性化して第一のトランスジェニック胚を形成する；
- (vi) 第二の活性化電気ショックを与えることによって、融合して第一のトランスジェニック胚を形成しなかった細胞対の活性化を続け、第二のトランスジェニック胚を形成する；
- (vii) 前記活性化した第一および/または第二のトランスジェニック胚を、発生の2細胞期より大きくなるまで培養する；および
- (viii) 胚が発生して胎児になるように、前記第一および/または第二のトランスジェニック胚を宿主哺乳類へ移植する。

40

【0055】

50

本発明はまた、遺伝子操作哺乳類またはトランスジェニック哺乳類をクローニングする方法を含み、それによって、分化哺乳類細胞または細胞核を除核卵母細胞へ挿入する前に、分化哺乳類細胞または細胞核において所望の遺伝子が挿入、除去、または改変される。

【0056】

上記の方法に従って得られた哺乳類、およびそれらの哺乳類の子孫もまた、本発明によって提供される。本発明は好ましくはヤギまたはウシをクローニングするのに用いられるが、任意の哺乳類種に用いることができる。本発明はさらに、核移植胎児および、核移植およびキメラ子孫の、細胞、組織、および器官移植の分野における使用を提供する。

【0057】

別の一態様では、本発明はC I C M細胞を作製する方法を提供する。その方法は、

- (i) ドナー核の供給源として使用する所望の分化哺乳類細胞を得る；
- (ii) ドナー核の供給源である細胞と同種の哺乳類から卵母細胞を得る；
- (iii) 前記卵母細胞を除核する；
- (iv) 所望の分化細胞または細胞核を、除核卵母細胞へ移入する；
- (v) 細胞対を同時に融合および活性化して第一のトランスジェニック胚を形成する；
- (vi) 融合して第一のトランスジェニック胚を形成しないが最初の電気ショック後に活性化した細胞対を、追加の電気ショックを含む少なくとも1つの追加の活性化手続を与えることによって活性化し、第二のトランスジェニック胚を形成する；
- (vii) 前記活性化した第一および/または第二のトランスジェニック胚を、発生の2細胞期より大きくなるまで培養する；および
- (viii) 前記培養した活性化した胚から得られた細胞を培養し、C I C M細胞を得る；工程を含む。

10

20

【0058】

また、ここに記載の方法から得られたC I C M細胞は、細胞、組織、および器官移植の分野で、または、トランスジェニック胎児または子孫を含む胎児または子孫の作製において有利に使用される。分化哺乳類細胞は、初期胚段階を過ぎた細胞である。分化細胞は、外胚葉、中胚葉、または内胚葉組織または細胞層から得ることができる。

【0059】

融合および活性化を促進するために細胞対を複数の電気ショックに曝露する別の方法もまた使用することができる。一般的に、哺乳類は下記の工程を含む核移植過程によって作製される：

30

- (i) ドナー核の供給源として使用する所望の分化哺乳類細胞を得る；
- (ii) ドナー核の供給源である細胞と同種の哺乳類から卵母細胞を得る；
- (iii) 前記卵母細胞を除核する；
- (iv) 所望の分化細胞または細胞核を、除核卵母細胞へ移入する；
- (v) 活性化および融合した胚への前記細胞対の融合および活性化を開始するため、少なくとも2回の電気ショックを細胞対に用いる；
- (vi) 前記活性化および融合した胚を、発生の2細胞期より大きくなるまで培養する；および
- (vii) 胚が発生して胎児になるように、前記第一および/または第二のトランスジェニック胚を宿主哺乳類へ移植する；

ここで、前記少なくとも2回の電気ショックの2番目は、最初の電気ショックの少なくとも15分後に与えられる。

40

【0060】

ヒト細胞を含む哺乳類細胞は、周知の方法によって得ることができる。本発明で有用な哺乳類細胞は、例として、上皮細胞、神経細胞、表皮細胞、ケラチン生成細胞、造血細胞、メラニン細胞、軟骨細胞、リンパ球（BおよびTリンパ球）、赤血球、マクロファージ、単球、単核細胞、繊維芽細胞、心筋細胞、およびその他の筋細胞、などを含む。さらに、核移植に使用する哺乳類細胞は、たとえば、皮膚、肺、脾臓、肝臓、胃、腸、心臓、生殖器官、膀胱、腎臓、尿道およびその他の泌尿器官、など、さまざまな器官から得ること

50

ができる。これらは適当なドナー細胞の単なる例である。適当なドナー細胞、すなわち、本発明に有用な細胞は、体の任意の細胞または器官から得ることができ、融合および/または分裂試験におけるそれらの成績に基づいてスクリーニングされる。本方法は、トランスジェニック動物作製において全体的な増加をもたらすであろう。

【0061】

繊維芽細胞は、胎児および成体動物から多量に得ることができるため、理想的な細胞型である。繊維芽細胞はいくらか分化していて、そのため、以前はクローニング手順に用いるには適しない細胞型と考えられていた。重要なこととして、これらの細胞は、*in vitro*で速やかな倍加時間で容易に増殖させることができ、遺伝子ターゲッティング手順および本発明に基づく客観的な選別または複合的なスクリーニング技術において使用するために、クローン増殖させることができる。再び、本発明は、分化細胞型が用いられるため新規である。その細胞は容易に*in vitro*で増殖、遺伝子改変、および選択することができるため、本発明は有利である。

10

【0062】

卵母細胞用の適当な哺乳類供給源は、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ブタ、ウサギ、モルモット、マウス、ハムスター、ラット、霊長類、などを含む。好ましくは、卵母細胞はヤギおよび有蹄類、非常に好ましくはヤギから得られる。卵母細胞を単離する方法は当該分野でよく知られている。本質的にこれは卵母細胞を、哺乳類、たとえばヤギの卵巣または生殖器官から単離することを含む。ヤギ卵母細胞の容易に利用可能な供給源は、ホルモン誘導された雌の動物からである。

20

【0063】

遺伝子工学、核移植、およびクローニングといった技術の順調な利用のためには、好ましくは、卵母細胞が核移植用のレシピエント細胞として用いられる前に、およびそれらが精子細胞によって受精されて胚へと発生する前に、*in vivo*で卵母細胞を成熟させる。*in vivo*で成熟した分裂中期II卵母細胞は、核移植技術で順調に使用することができる。本質的に、成熟した分裂中期II卵母細胞は、発情期の開始後またはヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)または類似のホルモンの注射後数時間の、過剰排卵していないかまたは過剰排卵した動物から外科的に回収する。

【0064】

さらに、遺伝子導入技術を介して動物ゲノムを改変する能力は、組み換えタンパク質の製造に新しい選択肢を提供することに注意すべきである。トランスジェニック家畜の乳中のヒト組み換え医薬の産生は、微生物バイオリクター(たとえば、翻訳後修飾の欠如、不適切なタンパク質折りたたみ、高い精製コスト)または動物細胞バイオリクター(たとえば、高い資本コスト、高価な培地、低収量)に伴う多数の問題を解決する。

30

【0065】

除核および核移植の際の卵母細胞の成熟段階は、核移植方法の成功に重要であることが報告されている(First and Prather 1991)。一般的に、順調な哺乳類の胚クローニング方法は、分裂中期II卵母細胞をレシピエント卵母細胞として用いるが、それはこの段階で卵母細胞が、受精精子を処理するように導入された核を処理するのに十分「活性化」され得るかまたは活性化していると考えられているためである。家畜、特にヤギでは、卵母細胞活性化期間は一般的に、卵母細胞原形質膜への精子の接触および貫通時に生じる。

40

【0066】

約10から40時間まで、好ましくは約16~18時間にわたる一定時間の成熟期間後、卵母細胞を除核する。好ましくは除核前に卵母細胞を取り出し、卵丘細胞の除去前に、1mg/mlのヒアルロニダーゼを含むEMCARE培地中に置く。これは非常に細い内径のピペットを通した繰り返しのピペッティングによって、または短時間ボルテックスにかけることによって達成することができる。裸にした卵母細胞をその後、極体に関して選別し、そして極体の存在によって選択された分裂中期II卵母細胞を核移植に用いる。その後、除核する。

【0067】

50

除核は、参照によって本開示に含まれる米国特許第4,994,384号に記載されたような、既知の方法によって達成することができる。たとえば、即時の除核のために、好ましくは7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のサイトカラシンBを含むEMCARE培地中に分裂中期II卵母細胞を置くか、あるいはたとえば10% FBSを加えたCR1aのような胚培養培地等の適当な培地中に置き、その後、好ましくは24時間以内、より好ましくは16~18時間後に除核する。

【0068】

極体および隣接する細胞質を除去するためにマイクロピペットを用いて、顕微外科的に除核を達成することができる。次いで、卵母細胞をスクリーニングして、除核が成功したものを特定することができる。このスクリーニングは、EMCAREまたはSOF中の1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の33342ヘキスト色素を用いて卵母細胞を染色し、次いで卵母細胞を紫外線照射下で10秒未満の時間観察することによって達成することができる。その後、除核が成功した卵母細胞を適当な培地中に置くことができる。

10

【0069】

本発明では、好ましくはin vitroまたはin vivo成熟の開始後約10時間から約40時間まで、より好ましくはin vitroまたはin vivo成熟の開始後約16時間から約24時間まで、最も好ましくはin vitroまたはin vivo成熟の開始後約16~18時間の間にレシピエント卵母細胞を除核する。

【0070】

次に、除核卵母細胞と同一の種の1個の哺乳類細胞を、除核卵母細胞の卵黄周囲腔に移入し、活性化胚を作製した。哺乳類細胞および除核卵母細胞は、当該分野で既知の方法に基づき活性化胚を作製するのに使用する。たとえば、細胞を電気融合によって融合することができる。電気融合は、原形質膜の一過性の破壊を引き起こすのに十分である電気のパルスを提供することによって達成される。膜が速やかに修正されるため、この原形質膜の破壊は非常に短い。したがって、2つの隣接する膜に破壊がもたらされ、修正時に脂質二重層が混ざり合う際に、2個の細胞間に小さなチャンネルが開く。そのような小さな開口部の熱力学的不安定性が原因で、それは2個の細胞が1つになるまで拡大する。この過程のさらなる考察については、Pratherらによる米国特許第4,994,384号(その全体が参照により本開示に含まれる)を参照する。たとえば、スクロース、マンニトール、ソルビトール、およびリン酸緩衝液を含む、さまざまな電気融合培地を使用することができる。また、融合剤としてセンダイウイルスを用いて融合を達成することもできる(Ponimaskin et al., 2000)。

20

30

また、一部の 경우에는 (たとえば小さいドナー核について)、エレクトロポレーション融合を用いるよりも、核を直接卵母細胞へ注入することが好ましい。そのような技術は、その全体が参照により本開示に含まれる、Collas and Barnes, Mol. Reprod. Dev., 38; 264-267 (1994)に開示されている。

【0071】

活性化した胚は、既知の方法によって活性化することができる。そのような方法は、たとえば、本質的には低温または実質的には冷涼な温度ショックを活性化した胚に与えることによって、生理学的温度より低温で活性化した胚を培養することを含む。これは、活性化した胚を、胚が通常曝露される生理学的温度条件よりも低温である室温にて培養することによって非常に便利に行うことができる。

40

【0072】

別の方法として、既知の活性化剤の適用によって活性化を達成することができる。たとえば、受精最中における精子による卵母細胞の貫通は、灌流卵母細胞を活性化して、核移植後により多数の生存可能な妊娠および複数の遺伝的に同一な仔を生じることが示されている。また、電気的および化学的ショックといった処理を用いて、融合後に核移植胚を活性化することができる。適当な卵母細胞活性化方法は、その全体が参照により本開示に含まれる、Susko-Parrishらへの米国特許第5,496,720号の主題である。

【0073】

50

さらに、優れているとして選択された細胞株を順次活性化するための手順も存在するが、活性化は同時に行うことによって最も良く達成される。

【0074】

活性化に関しては下記の細胞事象が生じる；

- (i) 卵母細胞中の二価陽イオンのレベルの上昇、および
- (ii) 卵母細胞中の細胞タンパク質のリン酸化の低下。

【0075】

上記の事象は、たとえばマグネシウム、ストロンチウム、バリウム、またはカルシウムを、たとえばイオノフォアの形で二価陽イオンを卵母細胞の細胞質に導入することによって、外因的に刺激して起こすことができる。二価陽イオンレベルを上昇させるその他の方法は、電気ショックの使用、エタノールを用いた処理、およびケージ化キレート剤を用いた処理を含む。リン酸化は、既知の方法によって、たとえば、6 - ジメチル - アミノプリン、スタウロスポリン、2 - アミノプリン、およびスフィンゴシンといったセリン - スレオニンキナーゼ阻害因子のようなキナーゼ阻害因子の添加によって低下させることができる。別の方法として、細胞タンパク質のリン酸化は、たとえばホスファターゼ 2 A およびホスファターゼ 2 B といった、ホスファターゼの卵母細胞への導入によって阻害することができる。

10

【0076】

したがって、活性化および融合した「再構成胚」の利用可能性の向上をもたらす本発明の実施形態は、本発明の原理の応用の単なる例示と理解すべきである。核移植またはマイクロインジェクション手順における用途のための細胞または細胞株の改良された選択のための開示された方法の要素の、形式における変化、使用方法、および適用は新規であり、本発明の精神または添付の請求の範囲を逸脱することなく改変および/または用いることができることは前述の説明から明らかである。

20

【0077】

参照により本開示に含まれる参考文献：

【参考文献】

【0078】

1. Alberio R, *et al.*, *Mammalian Oocyte Activation: Lessons from the Sperm and Implications for Nuclear Transfer*, INT J DEV BIOL 2001; 45: 797-809.
2. Alberio R, *et al.*, *Remodeling of Donor Nuclei, DNA Synthesis, and Ploidy of Bovine Cumulus Cell Nuclear Transfer Embryos: Effect of Activation Protocol*, MOL REPROD DEV 2001; 59: 371-379.
3. Baguisi A, *et al.*, *Production of Goats by Somatic Cell Nuclear Transfer*, NAT BIOTECH 1999; 17: 456-461.
4. Booth PJ, *et al.*, *Effect of Two Activation Treatments and Age of Blastomere Karyoplasts on In Vitro Development of Bovine Nuclear Transfer Embryos*, MOL REPROD DEV 2001; 60: 377-383. 10
5. Bondioli K, *et al.*, *Cloned Pigs from Cultured Skin Fibroblasts Derived from A H-Transferase Transgenic Boar*, MOL REPROD DEV 2001; 60: 189-195.
6. Bondioli K, *et al.*, *Production of Identical Bovine Offspring by Nuclear Transfer*, THERIOGENOLOGY 1990; 33: 165-174.
7. Campbell, KHS, *et al.*, *Sheep Cloned by Nuclear Transfer From a Cultured Cell Line*, NATURE 1996; 380: 64-66. 20
8. Cibelli JB, *et al.*, *Cloned Transgenic Calves Produced From Nonquiescent Fetal Fibroblasts*. SCIENCE 1998; 280: 1256-1258.
9. Collas P, and Barnes FL., *Nuclear Transplantation by Microinjection of Inner Cell Mass and Granulosa Cell Nuclei*, MOL REPROD DEV. 1994 Jul;38(3):264-7.
10. Collas P. *Electrically Induced Calcium Elevation, Activation, and Parthenogenic Development of Bovine Oocytes*. MOL REPROD 1993; 34: 212-223.
11. Ducibella T., *Biochemical and Cellular Insights Into the Temporal Window of Normal Fertilization*, THERIO 1998; 49: 53-65. 30
12. Edmunds, T. *et al.*, *Transgenically Produced Human Antithrombin – Structural and Functional Comparison to Human Plasma-Derived Antithrombin*, BLOOD 1998; 91:4561-4571.
13. First NL, *et al.*, *Genomic Potential in Mammals*, DIFFERENTIATION 1991 Sep;48(1):1-8.
14. Fitchev P, *et al.*, *Nuclear Transfer in the Rat: Potential Access to the Germline*. TRANSPLANT PROCEED. 1999; 31: 1525-1530.
15. Kasinathan P, *et al.*, *Effect of Fibroblast Donor Cell Age and Cell Cycle on Development of Bovine Nuclear Transfer Embryos In Vitro*, BIOL REPROD 2001; 64(5): 1487-1493. 40

16. Kasinathan P, *et al.*, *Production of Calves from G1 Fibroblasts*, NATURE BIOTECH 2001; 19: 1176-1178.
17. Kato Y. *et al.*, *Cloning of Calves from Various Somatic Cell Types of Male and Female Adult, Newborn and Fetal Cows*, J REPROD FERT 2000; 120: 231-237.
18. Keefer CL, *et al.*, *Production Of Cloned Goats After Nuclear Transfer Using Adult Somatic Cells*, BIOL REPROD 2002; 66: 199-203.
19. Koo DB, *et al.*, *In Vitro Development of Reconstructed Porcine Oocytes after Somatic Cell Nuclear Transfer*. BIOL REPROD 2000; 63: 986-992. 10
20. Kuhholzer B, *et al.*, *Clonal Lines Of Transgenic Fibroblast Cells Derived From The Same Fetus Result In Different Development When Used For Nuclear Transfer In Pigs*, BIOL REPROD 2001; 64: 1695-1698.
21. Lai, L, *et al.*, *Feasibility of Producing Porcine Nuclear Transfer Embryos by Using G2/M-Stage Fetal Fibroblasts as Donors*, BIOL REPROD 2001; 65: 1558-1564.
22. Liu J-L, *et al.*, *Refrigeration of Donor Cells in Preparation for Bovine Somatic Nuclear Transfer*, REPROD 2001; 122: 801-808.
23. Meng L, *et al.*, *Rhesus Monkeys Produced by Nuclear Transfer*, BIOL REPROD 1997; 57: 454-459. 20
24. Park KW, *et al.*, *Developmental Potential of Porcine Nuclear Transfer Embryos Derived from Transgenic Fibroblasts Infected with the Gene for the Green Fluorescent Protein: Comparison of Different Fusion/Activation Conditions*, BIOL REPROD 2001; 65: 1681-1685.
25. Polejaeva IA, *et al.*, *Cloned Pigs Produced by Nuclear Transfer from Adult Somatic Cells*, NATURE 2000; 407: 86-90.
26. Ponimaskin E, *et al.*, *Sendai Virosomes Revisited: Reconstitution with Exogenous Lipids Leads to Potent Vehicles for Gene Transfer*, VIROLOGY, 2000 Apr 10;269(2):391-403. 30
27. Reggio BC, *et al.*, *Cloned Transgenic Offspring Resulting From Somatic Cell Nuclear Transfer in the Goat: Oocytes Derived from Both Follicle-Stimulating Hormone-Stimulated and Nonstimulated Abattoir-Derived Ovaries*, BIOL REPROD 2001; 65: 1528-1533.
28. Stice SL, *et al.*, *Pluripotent Bovine Embryonic Cell Lines Direct Embryonic Development Following Nuclear Transfer*, BIOL REPROD. 1996 Jan; 54(1):100-10. 40
29. Stice SL and JM Robl, *Nuclear Reprogramming in Nuclear Transplant Rabbit Embryo*, BIOL REPROD 1998; 39(3): 657-64.
30. Verma PJ, *et al.*, *In Vitro Development Of Porcine Nuclear Transfer Embryos Constructed Using Fetal Fibroblasts*. MOL REPROD DEV 2000; 57: 262-269.

31. Wakayama T, *et al.*, *Full Term Development of Mice from Enucleated Oocytes Injected with Cumulus Cell Nuclei*, NATURE 1998; 394: 369-374.
32. Wall RJ, *et al.*, *Transgenic Dairy Cattle: Genetic Engineering on a Large Scale*, J DAIRY SCI. 1997 Sep;80(9):2213-24.
33. Wells DN, *et al.*, *Production of Cloned Calves Following Nuclear Transfer with Cultured Adult Mural Granulosa Cells*, Biol Reprod 1999; 60: 996-1005.
34. Willadsen SM, *Nuclear Transplantation in Sheep Embryos*, NATURE 1986; 320: 63-65. 10
35. Wilmut I, *et al.*, *Viable Offspring Derived From Fetal and Adult Mammalian Cells*. NATURE 1997; 385: 810-813.
36. Yang X, S Jiang, A Kovacs and RH Foote, *Nuclear Totipotency of Cultured Rabbit Morulae to Support Full-Term Development Following Nuclear Transfer*, BIOL REPROD 1992; 47: 636-643.
37. Yong Z and L Yuqiang, *Nuclear-Cytoplasmic Interaction and Development of Goat Embryos Reconstructed by Nuclear Transplantation: Production of Goats by Serially Cloning Embryos*, BIOL REPROD 1998; 58: 266-269. 20
38. Zakhartchenko V, *et al.*, *Nuclear Transfer in Cattle Using in Vivo-Derived Vs. in Vitro-Produced Donor Embryos: Effect of Developmental Stage*, MOL REPROD DEV 1996; 44: 493-498.
39. Zakhartchenko V, *et al.*, *Nuclear Transfer in Cattle with Non-Transfected and Transfected Fetal or Cloned Transgenic Fetal and Postnatal Fibroblasts*, MOL REPROD DEV 2001; 60: 362-369.
40. Zou X, *et al.*, *Generation Of Cloned Goats (Capra Hircus) From Transfected Foetal Fibroblast Cells, The Effect Of Donor Cell Cycle*, MOL REPROD DEV 2002; 61: 164-172. 30

【図面の簡単な説明】

【 0 0 7 9 】

【図 1】図 1 は、核移植を介してクローン動物を作製する過程の一般化された概略図を示す。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/09054

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER												
IPC(7) : C12N 15/00, 15/63, 15/85, 15/87, 15/09, 15/74, 5/00, 5/02												
US CL : 800/24; 435/455, 463, 320.1, 325												
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) U.S. : 800/24; 435/455, 463, 320.1, 325												
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched												
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet												
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT												
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.										
Y	LANZA, R.P. et al. Cloning of an Endangered Species (Bos gaurus) Using Interspecies Nuclear Transfer. Cloning. 2000, Vol 2. No. 2, pages 79-90.	1, 4, 7-14, 16, 17, 20, 50-53										
Y ✓	WO 97/07668 A1 (ROSLIN INSTITUTE) 6 March 1997 (06.03.1997), see entire document.	1-53										
Y	WO 97/07669 A1 (ROSLIN INSTITUTE) 6 March 1997 (06.03.1997), see entire document.	1-53										
Y ✓	US 6,235,970 B1 (STICE et al) 22 May 2001 (22.05.2001), see entire document.	1-53										
Y ✓	WO 99/45100 A1 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 10 September 1999 (10.09.1999), see entire document.	1-53										
Y ✓	WO 98/30683 A2 (UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS) 16 July 1998 (16.07.1998), see entire document.	1-53										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.												
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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											
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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											
"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)	"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											
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family											
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed												
Date of the actual completion of the international search 08 August 2003 (08.08.2003)		Date of mailing of the international search report 21 AUG 2003										
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Thai-An N. Ton <i>Deborah C. ...</i> Telephone No. 703-308-0196 <i>John Callan for</i>										

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/09054

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
CAPLUS, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, LIFESCI, WEST
search terms: nuclear transfer, cloning

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NI,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 メリカン, デイヴィッド

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01518 フィスクデイル ブルックフィールド ロード 296

(72)発明者 バトラー, ロビン イー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01562 スペンサー メイプル ストリート 89

(72)発明者 ギャヴィン, ウィリアム ジー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 01509 ダッドリー ダッドリー オックスフォード ロード 86

Fターム(参考) 4B024 AA20 CA01 DA02 GA03 GA12 GA18

4B065 AA90X AB01 AB04 AC14 BA01 BA08 BD41 BD50 CA44 CA60