

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/155904

発行日 平成29年4月13日 (2017. 4. 13)

(43) 国際公開日 **平成27年10月15日 (2015. 10. 15)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027 Z N A	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁)

出願番号 特願2016-512568 (P2016-512568)	(71) 出願人 505246789 学校法人自治医科大学 東京都千代田区平河町二丁目6番3号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2014/076768	
(22) 国際出願日 平成26年10月7日 (2014. 10. 7)	
(31) 優先権主張番号 特願2014-78986 (P2014-78986)	(71) 出願人 801000027 学校法人明治大学 東京都千代田区神田駿河台1-1
(32) 優先日 平成26年4月7日 (2014. 4. 7)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100140109 弁理士 小野 新次郎
	(74) 代理人 100075270 弁理士 小林 泰
	(74) 代理人 100101373 弁理士 竹内 茂雄
	(74) 代理人 100118902 弁理士 山本 修

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子ノックアウトブタ

(57) 【要約】

発明者らは、ブタにおいて、従来技術の欠点を解消し効率的に遺伝子改変を行う方法を開発すること、また、繁殖年齢に達する前に致死となる遺伝子ノックアウトブタの繁殖を可能にすることを課題とした。

本発明は、目的遺伝子に対して特異的なZincフィンガーヌクレアーゼをコードするmRNAを使用して、目的遺伝子を切断することにより、遺伝子ノックアウトブタ細胞を作製し、その細胞核を取り出し、除核未受精卵に移植の上、代理母子宮に移し、遺伝子ノックアウトブタ個体を作出した。このようにして作出した遺伝子ノックアウトブタは、実施例のXSCIDブタのように繁殖年齢に達し得ない致死的なものがあるが、正常胚を用いる胚盤胞補完技術により繁殖可能な遺伝子ノックアウトブタを作出できることも示した。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

目的遺伝子の配列を標的とするZincフィンガードメインおよびヌクレアーゼを含むZincフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）タンパク質をコードするmRNAを細胞内に導入する工程；

細胞内において目的遺伝子を標的とするZFNタンパク質を作製する工程；

ZFNタンパク質の作用により、ゲノム中の目的遺伝子のDNA配列を切断し、除去する工程；

細胞内のDNA損傷修復機構により、切断されたゲノム部分をつなぎ直す工程；

を含む、目的遺伝子がロックアウトされた細胞の製造方法。

10

【請求項 2】

細胞が、ブタの細胞である、請求項1に記載の製造方法。

【請求項 3】

ZFNタンパク質が、複数のZincフィンガードメインを含む、請求項1または2に記載の製造方法。

【請求項 4】

ZFNタンパク質に含まれるヌクレアーゼが、FokI、またはSts Iである、請求項1～3のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項 5】

目的遺伝子が、インターロイキン-2受容体 遺伝子（IL2RG遺伝子）である、請求項1～4のいずれか1項に記載の製造方法。

20

【請求項 6】

請求項1～5のいずれかの方法により目的遺伝子がロックアウトされた細胞を製造する工程；

その後、製造された目的遺伝子がロックアウトされた細胞から核を取り出し、除核未受精卵細胞中に体細胞核移植する工程；

体細胞核移植により作製した初期胚を、代理母の子宮内に胚移植し、胚発生を行う工程；

を含む、遺伝子ロックアウト動物の作出方法。

30

【請求項 7】

請求項1～5のいずれかの方法により目的遺伝子がロックアウトされた細胞を製造する工程；

その後、製造された目的遺伝子がロックアウトされた細胞から核を取り出し、除核未受精卵細胞中に体細胞核移植して、ホスト胚を作製する工程；

健常ブタの細胞から核を取り出し、除核未受精卵細胞中に体細胞核移植して、ドナー胚を作製する工程；

ドナー胚の桑実胚期までの細胞を、桑実胚期までのホスト胚に注入する工程；

ドナー胚由来の細胞を注入したホスト胚の初期胚を、代理母の子宮内に胚移植し、胚発生を行う工程；そして

目的遺伝子がロックアウトされた精子を形成することができるキメラオス個体を選抜する工程；

40

を含む、繁殖可能な遺伝子ロックアウトオス動物の作出方法。

【請求項 8】

請求項1～5のいずれかの方法により目的遺伝子がロックアウトされた細胞を製造する工程；

その後、製造された目的遺伝子がロックアウトされた細胞から核を取り出し、除核未受精卵細胞中に体細胞核移植して、ホスト胚を作製する工程；

健常ブタの細胞から核を取り出し、除核未受精卵細胞中に体細胞核移植して、ドナー胚を作製する工程；

ホスト胚およびドナー胚の桑実胚期までの細胞を分散させ、ドナー胚由来の細胞、ホス

50

ト胚由来の細胞を混合して、凝集胚を作製する工程；

凝集胚から胚盤胞を形成させた後、胚盤胞を代理母の子宮内に胚移植し、胚発生を行う工程；そして

目的遺伝子がロックアウトされた精子を形成することができるキメラオス個体を選抜する工程；

を含む、繁殖可能な遺伝子ロックアウトオス動物の作出方法。

【請求項 9】

目的遺伝子が、IL2RG遺伝子で

ある、請求項6～8のいずれか1項に記載の遺伝子ロックアウト動物の作出方法。

【請求項 10】

IL2RG遺伝子のコード領域の一部または全部が欠損し、IL2RG遺伝子の機能が喪失された、遺伝子ロックアウト動物。

【請求項 11】

X染色体連鎖性重症複合型免疫不全症（XSCID）を生じる、請求項8に記載の遺伝子ロックアウト動物。

【請求項 12】

動物が、ブタ、サル、ラット、マウス、ウシ、ヒツジから選択される、請求項10または11に記載の遺伝子ロックアウト動物。

【請求項 13】

動物がブタである、請求項12記載の遺伝子ロックアウト動物。

【請求項 14】

IL2RG遺伝子以外の遺伝子に、外来遺伝子がゲノム中に導入されていない、請求項10～13のいずれか1項に記載の遺伝子ロックアウト動物。

【請求項 15】

請求項6～9のいずれかの方法により作出される、請求項10～14のいずれか1項に記載の遺伝子ロックアウト動物。

【請求項 16】

胸腺を復活させた繁殖可能なオスブタである、請求項10～15のいずれか1項に記載の遺伝子ロックアウト動物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

ブタは、遺伝学的に見た場合に、ヒトとの遺伝学的距離がマウスとヒトとのあいだの遺伝学的距離よりも大きいにもかかわらず、解剖学的特徴、生理学的特徴そして血液学的特徴はマウスよりもヒトに類似している。そのため、ヒトに対して高度に価値のある、外挿可能な情報を提供することができる大型実験動物として興味を集めている。

【0002】

今日まで、様々なヒト疾患（例えば、嚢胞性線維症、糖尿病、アルツハイマー病、および網膜色素変性）についてのブタモデルが、作出されてきた。さらに、ヒトに異種移植するための器官/組織のドナーとして、遺伝子修飾されたブタを使用することに付いての研究が、進められている（非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3）。

【0003】

内在性遺伝子のロックアウト（KO）は、遺伝子機能の解析やヒト疾患を模倣する動物モデルの作出のための有用なツールである。これまでに、相同組換えにより遺伝子的に修飾された胚性幹細胞（ES細胞）を使用して、様々な遺伝子ロックアウトマウスが作出されてきた。ブタの場合には、信頼性のあるES細胞が樹立されておらず、ES細胞を利用できないことから、体細胞を使用した相同組換え技術を用いて遺伝子ロックアウト細胞を取得し、これを核ドナー細胞として体細胞核移植（SCNT）技術と組み合わせて使用して、遺伝子ロックアウトブタを作出してきた。しかしながら、哺乳動物の培養細胞に付いては相同組換

10

20

30

40

50

えの効率性が低い（頻度、 $10^{-6} \sim 10^{-8}$ ）ため、実際に個体を得るまでには多くの時間を要し、この非効率性と煩雑さのためにノックアウトブタの作出が妨げられており（非特許文献4～非特許文献6）、そして相同組換え技術を介したノックアウトブタの作出は、依然として限定的である。

【0004】

新たな技術の一つとして、Zincフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）を使用して、内在性遺伝子をノックアウトする方法があり、そしてこの方法は、哺乳動物における相同組換えの非効率性や複雑性を解消することを期待されている（非特許文献7）。遺伝子操作されたZFNは、Zincフィンガー-DNA-結合ドメインおよびDNA切断ドメインを含む人工の制限酵素である（非特許文献8）。本発明者らは、以前に、*in vitro*でのブタの初代胎仔線維芽細胞における遺伝子ノックアウトが、ZFNを使用して可能であること（非特許文献9）、そしてZFNにより遺伝子的に修飾された体細胞が体細胞核移植（SCNT）の後に遺伝子ノックアウトブタを作出することができること（非特許文献10～非特許文献13）を、それぞれ初めて示した。これらの研究においては、ZFNをコードするプラスミドDNAを、体細胞または体細胞核移植（SCNT）のための核ドナー細胞中に導入した。

10

【0005】

しかしながら、プラスミドDNAは、細胞のゲノム中に無作為に組み込まれる可能性もあり、それが内在性遺伝子の破壊およびZFNの構成的発現を引き起こす可能性がある。従来のZincフィンガーヌクレアーゼを用いたノックアウトブタの作出では、Zincフィンガーヌクレアーゼの発現にプラスミドDNAが利用されている。プラスミドDNAを用いた方法は、動物個体のゲノムに外来遺伝子が挿入される懸念があり、このことは動物が持つ本来の遺伝子を破壊してしまうリスクを含んでいることを意味する。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Dai Y, et al. (2002) Nat Biotechnol 20: 251-255.

【非特許文献2】Lai L, et al. (2002) Science 295: 1089-1092.

【非特許文献3】Elliott RB, et al. (2007) Xenotransplantation 14: 157-161.

【非特許文献4】Porter AC, and Itzhaki JE (1993) Eur J Biochem 218: 273-281.

【非特許文献5】Brown JP, et al. (1997) Science 277: 831- 834.

30

【非特許文献6】van Nierop GP, et al. (2009) Nucleic Acids Res 37: 5725-5736.

【非特許文献7】Geurts AM, et al. (2009) Science 325: 433.

【非特許文献8】Kim YG, et al. (1996) Proc Natl Acad Sci U S A 93: 1156- 1160.

【非特許文献9】Watanabe M, et al. (2010) Biochem Biophys Res Commun 402: 14-18.

【非特許文献10】Whyte JJ, et al. (2011) Mol Reprod Dev 78: 2.

【非特許文献11】Hauschild J, et al. (2011) Proc Natl Acad Sci U S A 108: 12013-12017.

【非特許文献12】Li P, et al. (2012) J Surg Res 181: e39-45.

【非特許文献13】Yang D, et al. (2011) Cell Res 21: 979-982.

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の発明者らは、プラスミドDNAを用いて遺伝子ノックアウトを行う場合の上述した様な欠点を解消し、ブタにおいて効率的に遺伝子改変が可能となる方法を開発することを課題とした。そこで、研究グループは、mRNAが通常ではゲノムへ組み込まれないことを利用し、ZincフィンガーヌクレアーゼをコードするmRNAと体細胞核移植技術と組み合わせることにより、目的以外の遺伝子機能を傷つけるリスクのない安全なノックアウトブタの作出を試みた。

【課題を解決するための手段】

【0008】

50

本発明は、ノックアウトの目的とする遺伝子の特異的に標的とするように設計されたZincフィンガードメインと、標的とするDNAを切断するためのヌクレアーゼとから構成されるZFNをコードするmRNAを使用して、目的遺伝子を切断して部分的に欠損を生じさせた後、生体が有するDNA修復機構を利用して切断後の遺伝子をつなぎ合わせることにより、遺伝子ノックアウトブタ細胞を作製し、その細胞を使用して遺伝子ノックアウトブタ個体を作成した。

【0009】

本発明の具体的な例として、ブタインターロイキン-2受容体 遺伝子（IL2RG遺伝子、重症複合型免疫不全症の原因遺伝子）におけるエクソン1の配列を標的とするように設計された、12塩基を認識する4箇所のZincフィンガードメインを有するZFNを構築し、このZFNを用いてブタIL2RG遺伝子ノックアウト細胞を作製し、これを用いてブタIL2RG遺伝子ノックアウトブタを作成した。このようにして作成したIL2RG遺伝子ノックアウトブタは、その免疫不全の故、感染症により早死してそのままでは繁殖年齢まで成長することができないが、胚盤胞補完技術により胸腺を復活させた生存可能（すなわち、繁殖可能）なIL2RGノックアウトブタ（オス）を作成することができることも示した。

【発明の効果】

【0010】

遺伝子ノックアウトの方法として知られていた相同組換え法やZFNプラスミドDNA法の場合には、ゲノム中の意図しない部位にターゲティングベクターが組み込まれる危険性が存在していたが、本発明の方法により、ZFNをコードするmRNAを使用することにより、ゲノム中に外来性のDNAを挿入することなく、遺伝子ノックアウト細胞を作製することができ、安全性の高い遺伝子ノックアウト法を開発することに成功した。また、本発明の方法では、遺伝子ノックアウト細胞を比較的短期間に作製することができることから、遺伝子ノックアウト動物を作成するまでの時間を大幅に短縮することができた。

【0011】

また、具体的な態様として作成したX染色体連鎖性重症複合型免疫不全症(XSCID)ブタは、T細胞に加えて、腫瘍細胞や移植細胞に対する免疫機能に重要な働きを持つナチュラルキラー（NK）細胞を欠損しているが、B細胞は存在する。ブタXSCIDにおいてB細胞が存在するのはヒトXSCIDと同じであるが、マウスX-SCIDにはB細胞がない。したがって、X-SCIDにおいてはヒトをよりよく反映する動物モデルはマウスではなくブタである。しかも、XSCIDブタは、身体のサイズがヒトと類似しており、生理学的にもヒトと非常によく似ていることから、ヒトの様々な疾患モデルとしてがん研究、幹細胞移植研究、創薬研究などに幅広く利用されるモデル動物となるだけでなく、人工臓器製造のためのベースの動物として活用が可能になると考えられる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、遺伝子ノックアウトの手法の特徴をまとめた図である。

【図2】図2は、ブタIL2RG遺伝子を標的とするZFNの設計および核ドナー細胞の作製を示す図である。

【図3】図3は、IL2RGノックアウトブタの作出と、その作出されたブタの遺伝子的、タンパク質的な解析の結果を示す図である。

【図4】図4は、IL2RGノックアウトブタの表現型を、組織学的に確認した結果を示す図である。

【図5】図5は、IL2RGノックアウトブタにおける単核細胞のフローサイトメトリー解析の結果を示す図である。

【図6】図6は、胚盤法補完によるIL2RGノックアウトブタと野生型（WT）ブタとの間でのキメラ個体の作製と、生後の体重推移を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明は、第一の態様において、以下の方法を含む目的遺伝子がノックアウト（KO）さ

10

20

30

40

50

れた細胞の製造方法を提供する：

目的遺伝子の配列を標的とするZincフィンガードメインおよびヌクレアーゼを含むZincフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）タンパク質をコードするmRNAを細胞内に導入する工程；

細胞内において目的遺伝子を標的とするZFNタンパク質を作製する工程；

ZFNタンパク質の作用により、ゲノム中の目的遺伝子のDNA配列を切断し、除去する工程；

細胞内のDNA損傷修復機構により、切断されたゲノム部分をつなぎ直す工程。

【0014】

従来技術において、目的遺伝子がロックアウトされた細胞の製造方法として、相同組換えによる方法や、プラスミドDNAを用いたジンクフィンガーヌクレアーゼによる遺伝子ロックアウト方法などが知られていた。

【0015】

相同組換えによる遺伝子ロックアウトの方法では、目的遺伝子の遺伝子機能をなくすためにターゲティングベクターを使用して、目的遺伝子のヌクレオチド配列中に外来遺伝子を導入することが必須であるが、ゲノム中の意図しない部位にターゲティングベクターが組み込まれる危険性があった。また、相同組換えの効率自体が非常に低く、目的とする遺伝子ロックアウト細胞を得られるまでに長い時間がかかってしまうという欠点もあった。

【0016】

このような欠点を解消する方法として、目的遺伝子のヌクレオチド配列を標的としたZFNタンパク質を利用する方法が開発された。この方法では、ZFNタンパク質をコードするプラスミドDNAを細胞に組み込み、細胞内で目的遺伝子のヌクレオチド配列を標的としたZFNタンパク質を発現させて、目的遺伝子を切断し、ロックアウトする。しかしながら、この方法では、遺伝子ロックアウト効率が高まり、結果として目的とする細胞を得られるまでにかかる時間も大幅に短縮することができるものの、この方法においても、目的とするZFNタンパク質をコードするプラスミドDNAを細胞に導入する必要があり、ゲノム中の意図しない部位にプラスミドベクター由来の外来遺伝子（ZFN遺伝子など）が組み込まれる危険性があった（図1を参照）。

【0017】

本発明においては、このような従来からの遺伝子ロックアウトの技術に伴う欠点を解消することを目的として、目的遺伝子の配列を標的とするZincフィンガードメインおよびヌクレアーゼを含むZFNタンパク質をコードするmRNAを使用することとした。具体的には、目的遺伝子の配列を標的とするZincフィンガードメインおよびヌクレアーゼを含むZFNタンパク質をコードするmRNAを細胞内に導入し、細胞内のタンパク質翻訳系を使用して目的とするZFNタンパク質を作製し、そのZFNタンパク質の作用により、ゲノム中の目的遺伝子のDNA配列を切断・除去し、ゲノムの切断部分同士を細胞内のDNA損傷修復機構によりつなぎ直すことにより、目的遺伝子を欠失した細胞を製造することができる。

【0018】

ZFNをコードするmRNAを利用する際の利点として、ZFN発現が一過性である点を挙げることができる。このことにより、標的以外の変異が生じる可能性が大幅に減少することが挙げられる。標的以外の変異は、ZFN技術の潜在的な制限的要素であったが、ZFNをコードするmRNAを導入することで、ゲノム変異のリスクなく、細胞質内でZFNの翻訳を即時に誘導することができ、それにより核内の内在性の遺伝子に変異を生じたり破壊する可能性を低減することができた。この方法は、mRNAを細胞に導入することから、目的遺伝子の配列を標的とするZFNタンパク質をコードするDNA（外来性のDNA）が細胞内で存在することがなく、結果的に、外来性遺伝子を含む外来性DNAがゲノム中に組み込まれる危険性がなく、従来技術の問題点を解消することができる。

【0019】

これまで、ZFNをコードするmRNAを、受精卵中に直接注入することにより、遺伝子ロックアウトを行う方法が、げっ歯類動物において報告されている（Mashimo T, et al. (201

10

20

30

40

50

0) PLoS One 5: e8870 ; Carbery ID, et al. (2010) Genetics 186: 451- 459. ; Cui X, et al. (2011) Nat Biotechnol 29: 64-67)。しかしながら、ブタにおいては、受精卵への遺伝子導入方法が確立されていないため、ZFNをコードするmRNAを使用したノックアウトブタの作出はまだ報告されていない。したがって、本発明は、好ましい一態様において、ブタの細胞において目的遺伝子がノックアウトされた細胞を製造する。

【0020】

本発明において使用するZFNタンパク質は、そのタンパク質内にZincフィンガードメインを含むことを特徴とする。Zincフィンガーは、DNA結合性を有するタンパク質であり、1つのZincフィンガードメインは、3個のヌクレオチドを認識し、結合することができる。当該技術分野において、任意の3個のヌクレオチドの組み合わせそれぞれに対して、Zincフィンガータンパク質の構成がすでにわかっている。したがって、このZincフィンガータンパク質のアミノ酸配列を、標的ヌクレオチドとの関係についての既知の知見に基づいて組み合わせることにより、標的とする任意のヌクレオチド配列を認識することができるように改変することができる。ZFNタンパク質には、複数の、例えば3~10個の、好ましくは3~6個の、Zincフィンガードメインを含むことができる。前述したように、1つのZincフィンガードメインは、3個のヌクレオチドを認識し、結合することができることから、たとえば3個のZincフィンガードメインを含む場合には9ヌクレオチドを認識し、6個のZincフィンガードメインを含む場合には18ヌクレオチドを認識することができる。

【0021】

本発明において使用するZFNタンパク質は、そのタンパク質内にヌクレアーゼドメインを含むこともまた特徴とする。このようなヌクレアーゼとしては、II型制限酵素FokI由来の配列非依存的DNA切断ドメインとして一般的に利用されているが、これ以外のヌクレアーゼであっても例えばSts Iなどのヌクレアーゼを使用することができる。

【0022】

このような構造のZFNタンパク質をコードするmRNAを細胞内に導入し、細胞内のタンパク質翻訳系を使用して、目的とするZFNタンパク質を作製する。細胞内において、このZFNタンパク質は、Zincフィンガードメインにより目的遺伝子の標的DNA配列に対して特異的に結合し、ヌクレアーゼドメインにより目的遺伝子の特定の部分を切断する。切断されたDNAは、細胞内に内在するDNA修復機構により、相同組換えあるいは非相同末端連結により修復されるが、結果的に目的遺伝子の一部を欠損させ、その結果、目的遺伝子が機能を欠失した状態の細胞、すなわち目的遺伝子がノックアウトされた細胞、を製造することができる。

【0023】

ZFNタンパク質のZincフィンガードメインのアミノ酸配列を適宜改変することにより、標的とするヌクレオチド配列を自由に規定することができることから、標的とする目的遺伝子(標的ヌクレオチド)は全く限定されない。

【0024】

本発明においては、第二の態様において、第一の態様の製造方法により製造された目的遺伝子がノックアウトされた細胞を核ドナーとして、遺伝子ノックアウト動物を作出する方法を提供する。具体的には、以下の工程を含む、遺伝子ノックアウト動物の作出方法を提供する：

第一の態様の製造方法により製造された目的遺伝子がノックアウトされた細胞を製造する工程；

その後、製造された目的遺伝子がノックアウトされた細胞から核を取り出し、除核未受精卵細胞中に体細胞核移植する工程；

体細胞核移植により作製した初期胚を、代理母の子宮内に胚移植し、胚発生を行う工程。

【0025】

本発明の第二の態様における遺伝子ノックアウト動物の作出方法においては、第一の態様において製造された細胞を核ドナーとして、得られた核を体細胞核移植技術により、除

10

20

30

40

50

核未受精卵細胞に移植することを特徴とする。この方法により作製した核移植された未受精卵細胞由来の初期胚を、代理母の子宮に移し、その子宮内で胚発生を行わせ、個体（クローン動物）を作出する方法である。

【0026】

体細胞核移植技術は、体細胞クローニングとも言われるが、核を除いた未受精卵へ、体細胞の核を移植（融合）することによって初期胚を作製し、作製した初期胚を代理母の子宮に移し、個体（クローン）を作出する方法である。胚は、体細胞由来の核を有するので、発生する胚は、元の体細胞の核と同一の遺伝情報を持つことを特徴とする。そして、本発明の第一の態様における目的遺伝子をノックアウトした細胞は、増殖させることができるので、同一の核を複製することができる。したがって、本発明の第二の態様の方法において、第一の態様で作製した細胞を核ドナーとして使用することにより、目的遺伝子がノックアウトされた同じ遺伝子構成を有するクローン動物を、作出することができる。

10

【0027】

本発明の第三の態様として、第一の態様における目的遺伝子がノックアウトされた細胞の製造方法、および第二の態様における遺伝子ノックアウト動物の作出方法を使用して、インターロイキン-2受容体（IL2RG）遺伝子を目的遺伝子として選択し、ブタにおいて、インターロイキン-2受容体遺伝子（IL2RG遺伝子）のノックアウト動物を作出することを試みた。

【0028】

この態様において目的遺伝子として選択したIL2RG遺伝子は、オス細胞のX-染色体上にあり、共通鎖（c）をコードする遺伝子である。IL2受容体c鎖が機能しない場合にはインターロイキンの作用が伝達されない。しかも、IL2受容体c鎖を受容体は、インターロイキン-2（IL-2）、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-21の6種類のインターロイキンにより幅広く使用されていることから、これらすべてのインターロイキンのシグナルが細胞内に伝わらなくなり、結果として重い免疫不全状態となることが知られている。ヒトおよびマウスにおいて、この遺伝子の変異により、細胞性免疫および体液性免疫の深刻な欠損により特徴づけられる、X染色体連鎖性重症複合型免疫不全症（XSCID）が引き起こされることが知られている（Noguchi M, et al. (1993) Cell 73: 147-157 ; Buckley RH (2004) Annu Rev Immunol 22: 625-655）。

20

【0029】

マウスにおいて作出されたIL2RG遺伝子の変異に基づく免疫不全症を生じるノックアウト動物の場合には、病態としてはヒトのXSCIDと類似する病態を示すものの、マウス自体の寿命が短命であることから、ヒトの疾患のモデルマウスを作出するためには適していないという欠点があった。そのため、当該技術分野においては、生存期間が長く、ヒトの疾患のモデルとなりうる動物の開発が求められていた。

30

【0030】

本発明においては、ブタを材料として、IL2RG遺伝子を標的とするZFNをコードするmRNAを使用して、本発明の第一の態様にしたがってIL2RG遺伝子ノックアウトブタ細胞を製造し、ついで本発明の第二の態様にしたがって、IL2RG遺伝子ノックアウトブタ細胞の核を核ドナーとして、ブタの除核未受精卵に体細胞核移植して、IL2RG遺伝子のノックアウトブタを作出した。

40

【0031】

このノックアウトブタのリンパ球表現型を確認したところ、オスブタにおいて、T細胞、およびNK細胞がほぼ消失していることが示され、その表現型から、作出したノックアウトブタが、XSCID表現型を発症させることができることを示した。従来知見によれば、ヒトXSCID患者においては、T細胞およびNK細胞の数が顕著に減少しているが、B細胞の数は依然として正常であり、たまに増加していることもあるが、XSCIDマウスおよびXSCIDラットにおいては、T細胞およびB細胞の数の大幅な減少が報告されている。このことから、げっ歯類動物のXSCIDモデルの表現型は、ヒトXSCIDの症状を必ずしも模倣しているわけではないことが知られていた。これに対して、本発明において作出されたIL2RGノックアウ

50

トブタは、T細胞とNK細胞とを欠損しており、B細胞数については正常であることが示された。このような表現型は、ヒトXSCIDを正確に模倣しているモデルであると考えられる。

【0032】

この方法でロックアウト動物を作出する場合、ZFNをコードするmRNAにより、抗生物質選択を行うことなく、遺伝子ロックアウト細胞を作製することができる。実際、体細胞核移植（SCNT）のために十分な数の核ドナー細胞が、非常に短期間（およそ3週間）で得られた。さらに、本件発明においてZFNをコードするmRNAにより作製されたIL2RG-ロックアウト細胞は、核ドナー細胞の若返り活性化（rejuvenation）をすることなく、そして続けて再クローニングを行うこともなく、満期産でクローン化胎仔を作出することが可能になった。これまでの相同組換え法では、ロックアウト動物が得られるまでに平均して12~18ヶ月の期間を必要としていたが、本発明の方法においては、結果的に、ロックアウト細胞の確立のために要した期間も含めて、ブタの妊娠期間約114日（4ヶ月弱）を考慮しても、満期産でクローン化胎仔を6ヶ月以内と、約1/2~1/3程度の期間で作出することができた。この時間的な大幅な短縮は、ロックアウトブタの作出に際して非常に有用である。

10

【0033】

また、本発明の第二の態様においては、体細胞核移植によりロックアウト胚の作製を行うことから、生まれてくるブタの全ての細胞に、目的遺伝子のロックアウトが入っており、必然的に遺伝子ロックアウトが、生殖系列の細胞（卵細胞または精原細胞などの生殖細胞）にも伝達される。本発明で一例として作出したIL2RG遺伝子の遺伝子ロックアウトブタは、XSCIDの性質を有し、オスでのみ症状を発生する。

20

【0034】

XSCID動物は、上述したようにオスでのみ症状を発生することから、IL2RG遺伝子の遺伝子ロックアウトをヘテロで保持するメスでは症状を発生しない。したがって、いったん遺伝子ロックアウト動物が作出された場合、ロックアウトの維持管理はヘテロのメス動物で行い、その交配により、理論的には生まれてくるオスの半分がXSCIDとなることにより、XSCID動物を生産することができる。

【0035】

しかし、より簡単な方法は、XSCIDを呈するオスの個体であっても、胚盤胞補完技術（Matsunari et al., PNAS, 4557-4562, 2013; Nakano et al. PLoS One, e61900, 2013）により、IL2RG遺伝子がロックアウトされていても生存が可能（すなわち、繁殖可能）なオス個体を作出することである。

30

【0036】

注入法による胚盤法補完技術（Matsunari et al., PNAS, 4557-4562, 2013）による遺伝子ロックアウトオス動物は、

本願明細書において記載したいずれかの方法などの方法により、目的遺伝子がロックアウトされた細胞を製造する工程；

その後、製造された目的遺伝子がロックアウトされた細胞から核を取り出し、除核未受精卵細胞中に体細胞核移植して、宿主胚を作製する工程；

健常動物の細胞から核を取り出し、除核未受精卵細胞中に体細胞核移植して、ドナー胚を作製する工程；

40

ドナー胚の桑実胚期までの細胞を、桑実胚期までの宿主胚に注入する工程；

ドナー胚由来の細胞を注入した宿主胚の初期胚を、代理母の子宮内に胚移植し、胚発生を行う工程；そして

目的遺伝子がロックアウトされた精子を形成することができるキメラオス個体を選抜する工程；

を含む、繁殖可能な遺伝子ロックアウトオス動物の作出方法により作出することができる。

【0037】

一方、凝集法による胚盤法補完技術（Nakano et al. PLoS One, e61900, 2013）による遺伝子ロックアウトオス動物は、

50

本願明細書において記載したいずれかの方法などの方法により、目的遺伝子がノックアウトされた細胞を製造する工程；

その後、製造された目的遺伝子がノックアウトされた細胞から核を取り出し、除核未受精卵細胞中に体細胞核移植して、ホスト胚を作製する工程；

健常動物の細胞から核を取り出し、除核未受精卵細胞中に体細胞核移植して、ドナー胚を作製する工程；

ホスト胚およびドナー胚の桑実胚期までの細胞を分散させ、ドナー胚由来の細胞、ホスト胚由来の細胞を混合して、凝集胚を作製する工程；

凝集胚から胚盤胞を形成させた後、胚盤胞を代理母の子宮内に胚移植し、胚発生を行う工程；そして

目的遺伝子がノックアウトされた精子を形成することができるキメラオス個体を選抜する工程；

を含む、繁殖可能な遺伝子ノックアウト動物の作出方法により作出することができる。

【0038】

いずれの方法によっても、作出された繁殖可能な遺伝子ノックアウト動物は、

・目的遺伝子がノックアウトされたホスト胚由来の細胞と、健常動物のホスト胚由来の細胞とのキメラであり；

・生殖系列の細胞はホスト胚由来である；

・目的遺伝子がノックアウトされたことにより生じる機能欠損は、健常動物由来の細胞により補完される；

という特徴を有する。

【0039】

本願発明においては、この様な方法により、様々な動物における遺伝子ノックアウトオス動物を作出することができる。様々な動物としては、ブタ、サル、ラット、マウス、ウシ、ヒツジなどを挙げることができる。

【0040】

繁殖可能なオス個体(X^*Y と XY のキメラ)を作出すれば、健常メス個体(XX)との交配により、 $IL2RG$ 遺伝子のヘテロ欠損のメス個体(XX^*)を作出することができる(表1(A))。 $IL2RG$ 遺伝子ヘテロ欠損のメス個体(XX^*)を繁殖可能な $IL2RG$ 遺伝子欠損オス個体(X^*Y と XY のキメラ)と交配することにより、 $IL2RG$ 遺伝子ホモ欠損のメス個体(X^*X^* 、 $XSCID$ を呈する)および $IL2RG$ 遺伝子ヘテロ欠損のオスの個体(X^*Y 、 $XSCID$ を呈する)を得ることができる(表1(B))。繁殖可能なオス個体の精子を保存することにより健常メス個体を利用した $XSCID$ ブタの繁殖をより効率的に行うことができる。

【0041】

10

20

30

【表 1】

表 1:

(A) 繁殖可能な IL2RG 遺伝子 KO オスと WT メスとの交配による F1 産仔の遺伝子構成予想

	X	X
X*	XX*	XX*
Y	XY	XY

10

(B) F1 の IL2RG 遺伝子ヘテロ KO 雌から得られる F2 産仔の遺伝子構成予想 (WT 雄との交配の場合[左]とキメラ雄と交配の場合[右])

	X*	X		X*	X
X	X*X	XX	X*	X*X*	X*X
Y	X*Y	XY	Y	X*Y	XY

20

【 0 0 4 2 】

また、表 1 で示される遺伝子型の個体の体細胞を用いることにより、体細胞核移植 (SCNT) 後に生きた子孫動物を発生させることもできる。本発明において、本発明者らは、ブタの初代培養細胞における内在性遺伝子を、Zincフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) をコードする mRNA を使用してノックアウトすることができることを見出した。それにより体細胞クローニングにより、遺伝子ノックアウトブタの効率的な作出が可能になる。

【実施例】

【 0 0 4 3 】

本発明に関連するすべての動物実験は、明治大学の Institutional Animal Care and Use Committee により承認を受けた (IACUC10-0004)。すべての化学物質は、それ以外の明示をしない限り、Sigma-Aldrich Chemical Co. (MO, USA) から購入した。

30

【 0 0 4 4 】

実施例 1: Zincフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) の設計

本実施例においては、ブタの細胞において遺伝子のノックアウト (KO) に使用することができる Zincフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) の設計を行った。

【 0 0 4 5 】

ブタ IL2RG 遺伝子用の特注の ZFN プラスミドを、Toolgen Inc. から取得した。これらの ZFN の設計および有効性は、Toolgen Inc. (Seoul, South Korea) により行われた。ヒト、マウス、およびラットの IL2RG と同様に、ブタの IL2RG は、X 染色体上で見出され、そして 8 つのエクソンから構成される。この研究において、本発明者らは、ブタの IL2RG のエクソン 1 を標的とする ZFN を構築した。構築されたそれぞれの ZFN は、12塩基を認識する 4箇所の Zincフィンガードメインを有した (図 2A)。図 2A において、コード領域および非翻訳領域は、それぞれ灰色および白の箱囲みで示される。ZFN は、ヌクレアーゼドメイン (Fok I) および DNA 結合ドメイン (Zincフィンガータンパク質) からなり、そして Zincフィンガータンパク質の認識配列に下線を引いた。そして、この ZFN のペア (右および左) は、それぞれ 4 つの Zincフィンガータンパク質を含み、そして右側の ZFN および左側の ZFN の両方であわせて 24 bp の標的配列を認識する (図 2A)。

40

【 0 0 4 6 】

ZFN をコードする mRNA の作製のために、ZFN プラスミドのそれぞれを、制限酵素 Xho I を用いて消化した。直鎖化したプラスミドを、次に、フェノール/クロロホルムを用いて精

50

製し、*in vitro*転写のための高品質のDNA鋳型を生成した。キャップ化したZFN mRNAを、MessageMAX T7 ARCA-キャップ化メッセージ転写キット (Cambio, Cambridge, UK) を使用して、*in vitro*転写を介して、線状DNAテンプレートから作製した。次に、ポリ(A)ポリメラーゼテイリングキット (Cambio) を使用するポリアデニル化により、それぞれのmRNAに対してポリ(A)テールを付加した。ポリ(A)-テール付加されたZFNをコードするmRNAを、次いで、MEGAclearキット (Life Technologies, CA, USA) を用いるスピンカラムを使用し、そして最終的に400 ng/ μ lのRNase-不含有水に再懸濁することにより、精製した。

【0047】

実施例2：IL2RG遺伝子ノックアウト細胞の作製

本実施例においては、実施例1で作製したZFNのmRNAを使用して、図2Bに示されるフローチャートにしたがって、ブタのIL2RGノックアウト細胞を作製した。

10

【0048】

IL2RG遺伝子ノックアウト細胞を作製するための前駆株として、ブタの胎仔線維芽細胞(オス系)の初代培養を使用した。線維芽細胞およびその誘導体(ノックアウト細胞)を、I型コラーゲン-コートされたディッシュまたはプレート(Asahi Glass, Tokyo, Japan)上に播き、そして15%FBS(Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan)および1 \times 抗生物質溶液(Life Technologies)を添加したMEM(Life Technologies)中、5%CO₂を含む湿潤雰囲気中、37℃にて培養した。

【0049】

胎仔線維芽細胞を、70~90%コンフルエントにまで培養し、D-PBS(-)(Life Technologies)を使用して2回洗浄し、そして0.05%トリプシン-EDTA(Life Technologies)を用いて処置し、細胞を単離・回収した。その後、細胞(4 \times 10⁵)を再懸濁し、40 μ lのRバッファー(Neon Transfection System, Life Technologiesの一部として供給される)、そして2 μ lのZFNをコードするmRNA溶液(400 ng/ μ l)を添加した。その後、細胞を、以下の条件：パルス電圧、1,100 V；パルス幅、30 ms；およびパルス数、1(プログラム#6)；でエレクトロポレーションした。エレクトロポレーションの後、細胞を、抗生物質を含まない上述した培養液中24時間、その後抗生物質を含む培養液中で、32℃にて3日間培養した(一過性冷ショック)。

20

【0050】

mRNAの導入後、そして一過性の冷却ショック処理の後、目に見えるような形態学的異常は、胎仔線維芽細胞において検出されなかった。一過性冷ショック処理の後、回復のために、細胞を、コンフルエントに達するまで37℃で培養し、その後限界希釈を行い、5枚の96-ウェルプレート中で192個の単一細胞由来クローンを得た。限界希釈後12日目に、それぞれのウェル中で相対的に高いコンフルエント(>50%)の細胞を選択し、そしていくつかに分取してさらなる培養および変異解析のために使用した。一方、限界希釈の後、低コンフルエントでの(約50%)細胞は、さらなる実験のためには使用しなかった。

30

【0051】

得られた192個の単一細胞由来細胞株のうち、ZFN誘導性変異を有する細胞株が1つ確立され(1/192、0.5%)、そしてこの細胞株(#98、図2B)を体細胞核移植(SCNT)用の核ドナーとして使用した。野生型IL2RGの開始コドン領域(SEQ ID NO: 1)との比較に基づくDNA配列解析から、これらの細胞が3-bpの置換およびブタのIL2RGの主要な転写開始点および開始コドン(ATG)にまたがる86-bpの欠失を有することが示され(図2C、SEQ ID NO: 2)、この変異がIL2RG機能を破壊することが示された。図2Cにおいて、上側配列および下側配列は、それぞれ、IL2RGのWT配列およびクローン#98の配列を示す。クローン#98における欠失変異およびヌクレオチド置換は、それぞれ、ハイフンおよび黒四角で示している。IL2RGの開始コドンは、点線箱囲みで示される。ZFN結合部位およびZFN切断部位は、それぞれ、二重下線および箱囲みで示される。主要な転写開始部位は、 \square で示される。3週間培養することにより、十分な数のノックアウト細胞を、体細胞核移植(SCNT)用に調製した。

40

【0052】

50

実施例3：IL2RGノックアウトクローンブタの作出

本実施例においては、実施例2において作製したブタのIL2RGノックアウト細胞を核ドナー細胞として用いて、ブタノックアウトクローン化胎仔を作製し、そのブタノックアウトクローン化胎仔におけるZFN-誘導性の変異の解析を行った。

【0053】

体細胞核移植（SCNT）は、以下の様に行った。第一極体を含む *in vitro* で成熟させた卵母細胞を、0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ デメコルシン、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ サイトカラシンB（CB）、および10% FBSの存在下で10 mM HEPES、0.3%（w/v）ポリビニルピロリドン（PVP）を含むTyrodeラクトース培地中で、先端面取りをしたピペットを使用して、極体およびそのそばの細胞質を、穏やかに吸引することにより脱核させた。

10

【0054】

2日間の血清飢餓による細胞周期同期の後、線維芽細胞（クローン#98）を核ドナーとして使用した。単一ドナー細胞を、脱核卵母細胞の卵胞腔中に挿入した。ドナー細胞-卵母細胞複合体を、0.15 mM MgSO_4 、0.01%（w/v）PVA、および0.5 mM HEPESを含む280 mM マンニトール（Nacalai Tesque, Kyoto, Japan）（pH 7.2）溶液中に配置し、そして2本の電極ニードルの間に保持した。単一の直流電流（DC）パルス（273 V/mm, 20 μs ）および4 Vのパルス前-およびパルス後-交流電流（AC）場を1 MHzにて5秒間、印加することにより、体細胞ハイブリダイザー（LF201; NEPA GENE, Chiba, Japan）を用いて膜融合を誘導した。

20

【0055】

IL2RGノックアウト細胞により再構成させた体細胞核移植（SCNT）胚の発生能を、*in vitro* で調べた。2回複製で行った実験で作出された403個の体細胞核移植（SCNT）胚のうち、237個（58.8%）が胚盤胞に発生した（表2）。この胚盤胞形成率は、本発明者等の以前の研究（Matsunari H, et al. . (2012) In: Miyagawa S, editor, Xenotransplantation . Rijeka, Croatia: InTech. pp. 37-54）において報告された胚盤胞形成率と同等であった。

【0056】

次に、再構成した胚を、4 mg/ml BSAを添加したPZM5培地中で1~1.5時間培養し、その後電氣的に活性化した。電氣的活性化の誘導では、再構成した胚を、280 mM マンニトール、0.05 mM CaCl_2 、0.1 mM MgSO_4 、および0.01%（w/v）PVAから成る活性化溶液で満たした融合チャンバスライドの2本のワイヤ電極（1.0 mmの距離）の間に配置した。単一の150 V/mmのDCパルスを、パルスジェネレータ装置（Multiporator; Eppendorf, Hamburg, Germany）を使用して、100 μs のあいだ印加した。

30

【0057】

活性化の後、再構成した胚を、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のCBおよび500 nM Scriptaidを添加したPZM5中に3時間移した。胚を500 nM Scriptaidを添加したPZM5中に移し、さらに12~14時間のあいだ培養した。インキュベーションの後、胚をPZM5中でさらに培養し、そしてディッシュを5% CO_2 および90% N_2 の湿潤雰囲気下、38.5 $^{\circ}\text{C}$ にて維持した。桑実胚期を越えて、10% FBSを添加したPZM5中で、胚を培養した。

【0058】

40

【表2】

表2：体細胞核移植（SCNT）胚の in vitro 発生と IL2RG ノックアウトブタの作出

再構成 SCNT 胚の in vitro 発生

SCNT 胚再構成	403
2 日目に正常に分割した胚	308 (76.4%)
5 日目に胚盤胞期の胚	237 (58.8%)

IL2RG ノックアウトブタの作出

レシピエント	P177	P178
胚盤胞移植 a	100	99
妊娠	+	+
クローン胚取得	4 (4.0%)	— (流産) b

10

a 5~6 日目の胚

b 妊娠 46 日目

【0059】

20

次に、体細胞核移植（SCNT）により得られた199個の胚盤胞（図3A）を、交雑種の未成熟メスブタ（Large White/Landrace x Duroc）、体重100~105 kg、を、体細胞核移植（SCNT）胚のレシピエントとして使用して、妊娠させた。2頭のレシピエントメスブタに対しては、1,000 IUのeCG（ASKA Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan）の単回筋肉内注射により、発情期を誘導した。eCGの注射後66時間後に、1,500 IUのhCG（Kyoritsu Seiyaku Corporation, Tokyo, Japan）の筋肉内注射を行うことにより、排卵を誘導し、発情期を同期させた（P177およびP178；表2）。5~6日間培養した体細胞核移植（SCNT）胚を、hCG注射のおよそ146時間後に、レシピエントの卵管に外科的に移植した。

【0060】

30

妊娠は、両方のメスブタとも、妊娠39日目に確認した。XSCID動物の誕生後の日和見感染は、コンベンショナルな飼育環境下では避けられないことである。したがって、満期産の4頭のオスのIL2RG ノックアウトクローンブタ胎仔を、妊娠113日目に、1頭のレシピエントメスブタ（P177）から帝王切開により得た（図3B）。4頭の子ブタの体重および体長は、それぞれ、0.56~1.16 kgの範囲、および22~28 cmの範囲であった。もう一頭のレシピエントメスブタ（P178）は、妊娠46日目に流産した。

【0061】

実施例4：IL2RG ノックアウトクローンブタの解析

本実施例においては、実施例3において作出したIL2RG ノックアウトクローンブタのマクロ的またはミクロ的な性質に関して解析した結果を示す。

【0062】

40

(4-1) 遺伝子解析

まず、IL2RG ノックアウトクローンブタが遺伝子的に目的としたものとして作出されているかをPCR遺伝子型決定およびDNA配列解析により調べた。IL2RG-ZFNの標的領域を、MightyAmp DNAポリメラーゼ（Takara Bio, Shiga, Japan）および対応するプライマー（5'-A TAGTGGTGT CAGTGTGATT GAGC（SEQ ID NO: 3）および5'-TACGAACTGA CTTATGACTT ACC（SEQ ID NO: 4））を使用して、細胞クローンからの直接PCRにより増幅した。

【0063】

次いで、PrimeSTAR HS DNAポリメラーゼ（Takara Bio）および適切なプライマー（5'-ATACCCAGCT TTCGTCTCTG C（SEQ ID NO: 5）および5'-TTCCAGAATT CTATACGACC（SEQ ID NO: 6））を使用して、ネスト化PCRを行った。次に、ZFN標的領域を含むPCRフラグメントを

50

、配列決定プライマー5'-AGCCTGTGTC ATAGCATAC (SEQ ID NO: 7)、BigDye Terminator Cycle シークエンシングキット、およびABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies) を使用して、調べた。クローン化胎仔における変異の解析を行うため、DNeasy Tissue and Blood Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を使用して、胎仔の尾バイオプシーからゲノムDNAを抽出し、次いでPCR遺伝子型決定およびDNAシークエンシングを上述したように行った。全ての新たな配列データは、DDBJ/EMBL/GenBankに登録済みである (AB846644-AB846648)。

【 0 0 6 4 】

得られた4匹のクローンブタについてのPCR遺伝子型決定の結果 (図3C; M: DNAマーカー) およびクローンブタにおけるIL2RGのDNA配列解析の結果 (図3D) をそれぞれ示した。4頭のクローンブタのPCR遺伝子型決定およびDNA配列解析により、4頭全てのブタが核ドナー細胞と同一の変異 (3-bpの置換およびおよび86-bpの欠失; 図3Cおよび図3D) を有することが示された。図3Dにおいて、矢印および箱囲みは、核ドナー細胞 (クローン#98) の変異と同一の変異を示す。

10

【 0 0 6 5 】

(4-2) タンパク質解析

次に、IL2RGノックアウトクローンブタが遺伝子発現上の観点から目的としたものとして作出されているかをウェスタンブロット解析により調べた。IL2RGノックアウトブタおよび年齢を合わせたWTブタを犠死させた後、切り出した脾臓を、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque) を含むRIPAバッファー (Thermo Scientific, MA, USA) 中でホモジナイズし、そして遠心分離にかけ、そして上清を回収した。ローリー法に基づくDCタンパク質アッセイ (Bio-Rad, CA, USA) を使用して、サンプルのタンパク質濃度を定量した。脾臓抽出物由来のおよそ40 µgのタンパク質を、10% SDS-PAGEにかけ、そして電気ブロッティングによりHybond-P PVDFメンブレン (GE Healthcare Bio-Sciences, NJ, USA) に転写した。

20

【 0 0 6 6 】

メンブレンを室温にて30分間、Blocking One (Nacalai Tesque) を用いてブロッキングした。ブロッキングした後、抗-IL2RG抗体 (1:200希釈; Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) により室温にて1時間、インキュベーションし、そしてHRP-複合化抗-ウサギIgG抗体 (1:5,000希釈; Santa Cruz Biotechnology) により室温にて1時間、メンブレンをインキュベーションした。プロットを、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare Bio-Sciences) を使用して発色させた。シグナルは、ImageQuant LAS-4000システム (GE Healthcare Bio-Sciences) を用いて検出し、そして画像化した。泳動対照として、 α -アクチンを使用した。

30

【 0 0 6 7 】

IL2RGノックアウトブタの脾臓におけるIL2RGタンパク質のウェスタンブロットの結果を示す (図3E; M: タンパク質標準マーカー)。このウェスタンブロット解析により、4頭全てのブタがIL2RGタンパク質を欠失していることがさらに示された (図3E)。

【 0 0 6 8 】

(4-3) 組織学的解析

IL2RGノックアウトブタおよび年齢を合わせたWTブタを犠死させた後、全体的な解剖学的解析に供した。その肉眼的解析から、4頭全てのIL2RGノックアウトブタとも、胸腺を完全に欠損していることが示された (図4A、図4B)。図4Aにおいて、白い矢頭はWTブタにおける正常胸腺を示す。

40

【 0 0 6 9 】

次に、犠死させた動物から取り出した脾臓を、10% 中性緩衝ホルマリン溶液 (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) 中で固定し、パラフィン中に包埋し、切片を製作し、そして標準的な方法でヘマトキシリン-エオジンで染色した。

【 0 0 7 0 】

脾臓の組織学的解析の顕微鏡像を図4Cおよび図4Dに示す。これらの図において、WTブタ

50

およびIL2RGノックアウトブタの脾臓の組織学的解析を行った。脾臓の白髄が、点線の白丸により示される(Bar=100 μm)。野生型(WT)ブタにおいては、末梢リンパ鞘組織(PALS)の白髄におけるリンパ球の存在が明確に示された(図4C)、一方IL2RGノックアウトブタでは、PALS中に非常に僅かかまたは全くリンパ球が存在しないことが示された(図4D)。赤脾髄における胚血液生成は、WTブタおよびIL2RGノックアウトブタの両方共ににおいて強力であった(データは示さず)。WTブタおよびIL2RGノックアウトブタの末梢血(PB)中のリンパ球集団のカウントは、4頭のブタについての平均±SD値として、それぞれWTブタにおいて $15.7 \pm 2.2 \times 10^2 / \mu\text{l}$ およびIL2RGノックアウトブタにおいて $6.5 \pm 3.0 \times 10^2 / \mu\text{l}$ であり、このことから、IL2RGノックアウトブタにおいてリンパ球数が顕著に減少したことが示され、WTブタについての値とIL2RGノックアウトブタについての値(n=4)との間で、統計的に有意差があることを示す(*P<0.01; 図4E)。

10

【0071】

(4-4)細胞学的解析

さらに、フローサイトメトリー解析を使用して、末梢血単核細胞の細胞組成を解析した。

【0072】

末梢血単核細胞を、赤血球溶解溶液PharmLyse(Becton Dickinson, 以下BDと略す, NJ, USA)を使用してIL2RGノックアウトブタの全血および脾臓から採取し、そして 1×10^6 個の細胞を、マウス抗-ブタCD3e(Abcam, Cambridge, UK)、CD4a抗体(BD)、CD8a抗体(BD)、CD16抗体(AbDSerotec, NC, USA)、CD45RA抗体(AbDSerotec)、および単球および顆粒球抗体(M/G, Abcam)と共に30分間室温でインキュベーションした。

20

【0073】

インキュベーションの後、細胞懸濁液を洗浄し、そして1%FBS(w/v)を添加したPBS(-)により再懸濁した。IL2RG-ノックアウトブタの末梢血および脾臓から単離された細胞集団を、488-nmアルゴンレーザーを備えたFACSCaliburフローサイトメーター(BD)を使用して評価した。細胞のデブリおよび凝集物を、二変数前方散乱/側方散乱(FSC/SSC)パラメータを使用して、除去した。

【0074】

全ての解析において、事実上のリンパ球集団を取り出し、そしてサンプル当たりゲートを通じた 1×10^4 個の事象を取得し、そしてCELLQuest Proソフトウェア(BD)を使用して解析した。

30

【0075】

IL2RGノックアウトブタの末梢血におけるT細胞、B細胞、およびNK細胞のフローサイトメトリー解析を図5Aに示す。この結果から、IL2RGノックアウトブタにおけるCD3+ T細胞の数(0.3%±0.1%)が、WTブタ(74.0%±10.2%)と比較して大幅に低いことが示された(P<0.0001)(図5A)。

【0076】

さらに、IL2RGノックアウトブタは、CD3+CD4+ T細胞およびCD3+CD8+ T細胞を欠損していることも明らかになった。IL2RGノックアウトブタにおけるB細胞集団(CD3-およびCD45RA+)は、WTブタにおけるB細胞集団と同様であったことが観察されたが、NK細胞の数(単球/顆粒球-, CD3-, およびCD16+)は、WTブタと比較して、IL2RGノックアウトブタにおいて顕著に低下した(IL2RGノックアウト、0.9%±0.2% vs. WT、8.1±4.5%; P=0.004)。

40

【0077】

末梢血中で見られるように、脾臓T細胞の数(IL2RGノックアウト、0.2%±0.1% vs. WT、28.1%±10.9%; P<0.0001)およびNK細胞の数(IL2RGノックアウト、0.8%±0.3% vs. WT、3.9%±0.8%; P=0.0001)は、IL2RGノックアウトブタにおいて顕著に減少した(図5B)。このように、IL2RGノックアウトブタにおいては、T細胞およびNK細胞のほとんど完全な欠損が見られ、この減少は、ヒトXSCID患者の場合と同様であった。

【0078】

50

ドットプロットは、T細胞垂集団の境界線についてCD3細胞、CD4細胞、およびCD8細胞を、そして末梢血中のT細胞、B細胞、およびNK細胞垂集団の分化についてCD3細胞、CD45RA細胞、およびCD16細胞（非-骨髄性画分中、すなわち、単球/顆粒球（M/G）-陰性）を、それぞれ示す。（図5B）IL2RGノックアウトブタの脾臓における単核細胞の中のT細胞（CD3+）およびNK細胞（M/G-、CD3-、CD16+）の集団。データは、4頭の得られたブタの平均±SD値を示す。

【0079】

実施例5：繁殖可能なIL2RGノックアウトブタ(オス)の作出へ向けた胚盤胞補完(1)

本実施例においては、実施例3において作製したノックアウトブタの繁殖可能性について検討を行った。

10

【0080】

実施例3にて作出したIL2RGノックアウトブタ（オス）は、実施例4で示すとおり免疫不全の表現型を示す。従って、娩出後は日和見感染等の要因により死亡し、通常環境の飼育では繁殖に利用することはできない。そこで、すでにブタにおいて原理が証明されている胚盤胞補完法を用いて（Matsunari et al., PNAS, 4557-4562, 2013 ; Nakano et al. PLoS One, e61900, 2013）、IL2RGノックアウトブタの表現型を補完し、繁殖可能なIL2RGノックアウトブタの作出を試みた。

【0081】

IL2RGノックアウト細胞由来のクローン胚（これをホスト胚とする）に対し、健常ブタの細胞で作成したクローン胚（これをドナー胚とする）を用いて、胚盤胞補完処理を施した。胚盤胞補完のためにキメラ胚の作製は基本的には松成ら（Matsunari et al., PNAS, 4557-4562, 2013）による注入法、中野らによる凝集法（Nakano et al. PLoS One, e61900, 2013）を基に作出した。いずれの場合においても、ドナー胚の細胞中で、ヒト化Kusabira-Orange（huKO）蛍光タンパク質を発現させた。

20

【0082】

注入法において、ドナー胚（huKO標識されたもの）は、健常メスブタの細胞から取り出した核を除核未受精卵に体細胞核移植技術により導入することにより作出し、この核移植胚（ドナー胚、day 4、桑実胚期）を0.1 mM EDTA-2Na（Ca²⁺/Mg²⁺不含PBS、0.01%ポリビニルアルコール添加）にて細胞を分散させ、0.25%プロナーゼ溶液で透明体を消化した。ドナー胚由来の割球は、ガラスキャピラリーを用い穏やかにピペッティングにより胚から得た。ホスト胚は、実施例3にて作出したIL2RGノックアウトブタ（オス）の細胞を核供給源として使用して、その核を除核未受精卵に体細胞核移植技術により導入することにより作出した。約10個のドナー（割球）をマイクロマニピュレーションによりホスト胚の中心ヘインジェクションした。ホスト細胞とドナー細胞とが混在するキメラ胚盤胞を得るために、インジェクトした胚を48時間in vitroで培養した。

30

【0083】

一方、凝集法においては、ドナー胚、ホスト胚ともにDay 4（桑実胚期）の核移植胚として作製し、これらをそれぞれEDTA-2Naで分散させ、プロナーゼ処理により、透明帯を消化した。ガラスキャピラリーを用いて穏やかにピペッティングすることで割球を分離した。ドナー胚由来の細胞、ホスト胚由来の細胞ともに、胚1つ分の割球をマイクロウェルに投入しすることにより凝集胚を作製した。その後、凝集胚は24時間培養し、胚盤胞に発生させた。

40

【0084】

胚盤胞期に発達したキメラ胚盤胞124個を2頭のレシピエント雌の子宮内に移植した結果、2頭が妊娠し、分娩に至った。合計6頭の産仔が得られ、そのうちPCR法を用いた遺伝子解析、蛍光観察により1頭の死産仔がキメラ個体であった。このキメラ個体の剖検の結果、胸腺が正常に形成されていることが確認された。この結果は、IL2RGノックアウトブタでは形成不全となっている胸腺が、胚盤胞補完処理によって復活したことを示す。また、臓器や生殖器官の異常も観察されなかった。以上のことから、今回得られた個体は死産であったが、生存し得た場合には、正常な繁殖能力を有する雄に成長し得ると考えられる。

50

本実施例は死産のデータではあるものの、原理的には胸腺の復活（胚盤胞補完）を証明しており、繁殖可能なIL2RGノックアウトブタ（オス）の作出の可能性を示している。

【0085】

実施例6：繁殖可能なIL2RGノックアウトブタ(オス)の作出へ向けた胚盤胞補完(2)

本実施例においては、実施例5において示したヒト化Kusabira-Orange (huKO) 蛍光タンパク質を発現させたブタのキメラ胚を用いた胚盤胞補完に引き続き、実施例3において作製したノックアウトブタの繁殖可能性について更なる検討を行った。

【0086】

具体的には、IL2RGノックアウト細胞由来のクローン胚（ホスト、オス）に対して、毛色が黒色の野生型ブタの細胞で作製したクローン胚（ドナー、メス）を用いた点以外は、実施例5において説明をした胚盤胞補完処理の注入法にしたがって行った。

10

【0087】

キメラの判定は、実施例5における蛍光タンパク質によるキメラ判定とは異なり、毛色が黒色のドナーを用いることにより、出生後に性別と毛色によりキメラの判定が可能になる様に、実験を設計した。

【0088】

2頭のレシピエントメスブタ（M107個体およびM108個体）の子宮内に、胚盤胞期に発達したキメラ胚盤胞各62個（計124個）を移植した。この結果、1頭のメスブタ（M107個体）が妊娠をし、分娩に至った。このメスブタからは、合計6頭の産仔（全頭がオス個体）が得られ、そのうち、性別と毛色（野生型ブタの黒色の毛色と、ノックアウトブタの茶色の毛色のキメラである場合、茶色の毛と黒色の毛）が混ざったような毛色になることによる判定およびPCR法を用いた遺伝子解析により、6頭中2頭の産仔がキメラ個体（M107-1個体、M107-3個体）であることが明らかになった。これらの動物は、生殖器官に付いてはオス（すなわち、IL2RGノックアウト細胞由来のホスト胚由来）であり、順調に生育することから胸腺などの免疫器官は正常（すなわち、健常ブタ由来）であることが推測される。このことから、これらのキメラ産仔個体が、繁殖可能なSCIDブタであることが明らかになった。これらの2頭のキメラ産仔は、離乳期を超えても1.5ヶ月の段階まで体重を増加しつつ順調に生育しており、2.5ヶ月経過後も生存している。

20

【0089】

これに対して、6頭のうちの非キメラであった4頭（SCIDブタ）は、いずれも生後0～12日で死亡した。

30

【0090】

【表3】

表3：IL2RGノックアウトブタとWTブタキメラ胚の胚移植試験の結果

レシピエントNo.	キメラ作出法	移植胚数	妊娠	産仔数 (うち死産)	キメラ	IL2RG KO (ホスト)	WT (ドナー)
M107	注入	62	+	6 (0)	2	4	0
M108	注入	62	-	NA	NA	NA	NA
計		124	1/2	6 [4.8%]	2 [1.6%]	4 [3.2%]	0 [0%]

40

【0091】

この実施例において示されるように、通常の飼育環境下においては、SCIDブタは生後間もなく死亡してしまうことが示された。一方、キメラ産仔の場合には、順調に体重が増加し（図6を参照）、出生から2.5ヶ月を経過しても生存している。

【0092】

50

このようなキメラ胚由来の産仔個体は、依然として生存中、生育中であることから、剖検の対象とすることができないため、胸腺が存在しているかどうかを実際確認することはできない。しかしながら、これらの個体から血液を採取して、末梢血中の免疫系細胞の構成を確認することはできる。その結果、IL2RGノックアウトブタ (SCID) ではT細胞とNK細胞がほとんど存在しないのに対し、SCIDキメラ胚由来産仔ではT細胞とNK細胞が存在することが示された(表4を参照)。

【0093】

【表4】

表4：胚盤胞補完によるT細胞とNK細胞の回復

ブタ	CD4 T細胞 (CD3+CD4+)	CD8 T細胞 (CD3+CD8+)	NK細胞 (M-G-CD3+CD16+)
SCID	0.1%	0.1%	0.3%
キメラ1	20.0%	11.4%	10.8%

10

【0094】

これらの結果から、これらの個体が順調に成長し、胚盤胞補完が成功していることが示されており、繁殖可能なIL2RGノックアウトブタ(オス)個体の作出が可能であることが示された。

20

【産業上の利用可能性】

【0095】

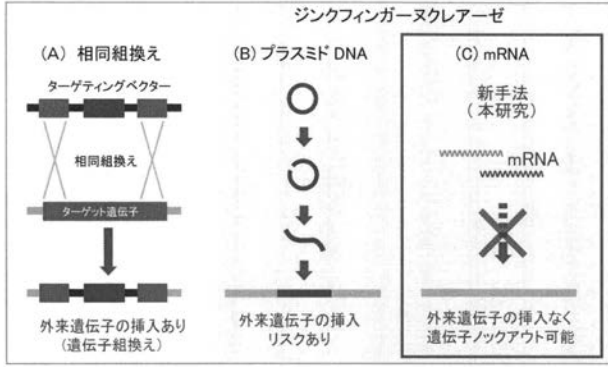
遺伝子ノックアウトの方法として知られていた相同組換え法やZFNプラスミドDNA法の場合には、ゲノム中の意図しない部位にターゲティングベクターが組み込まれる危険性が存在していたが、本発明の方法により、ZFNをコードするmRNAを使用することにより、ゲノム中に外来性のDNAを挿入することなく、遺伝子ノックアウト細胞を作製することができ、安全性の高い遺伝子ノックアウト法を開発することに成功した。また、本発明の方法では、遺伝子ノックアウト細胞を比較的短期間に作製することができることから、遺伝子ノックアウト動物を作出するまでの時間を大幅に短縮することができた。

30

【0096】

また、具体的な態様として作出したXSCIDブタは、T細胞、B細胞に加えて、腫瘍細胞や移植細胞に対する免疫機能に重要な働きを持つナチュラルキラー(NK)細胞を欠損しているが、XSCIDブタは、身体のサイズがヒトと類似しており、生理学的にもヒトと非常によく似ていることから、ヒトの様々な疾患モデルとしてがん研究、幹細胞移植研究、創薬研究などに幅広く利用されるモデル動物となるだけでなく、人工臓器製造のためのベースの動物として活用が可能になると考えられる。

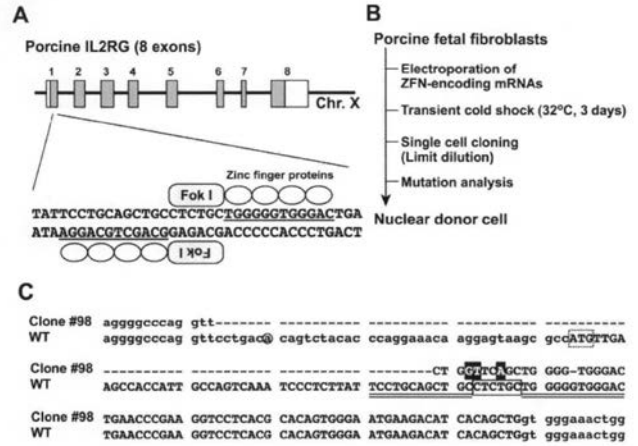
【 図 1 】



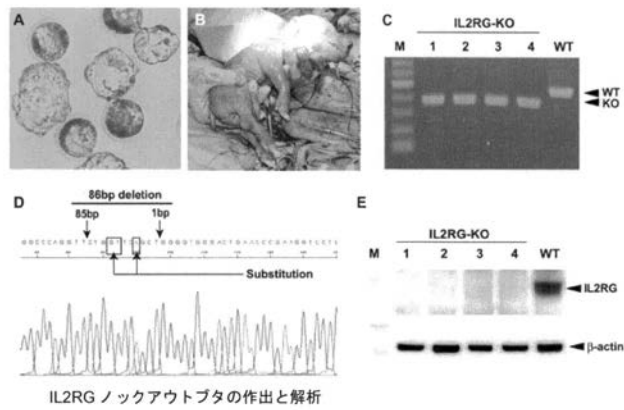
	(A) 相同組換え	ジンクフィンガーヌクレアーゼ	
		(B) プラスミド DNA	(C) mRNA [本研究]
効 率	非常に低い	非常に高い	非常に高い
操 作	煩 雑	簡 便	簡 便
時 間	12 カ月	6 カ月	6 カ月
安全性	外来遺伝子導入あり	外来遺伝子導入リスクあり	外来遺伝子導入なし

遺伝子ノックアウトに伴う外来遺伝子挿入のリスク

【 図 2 】

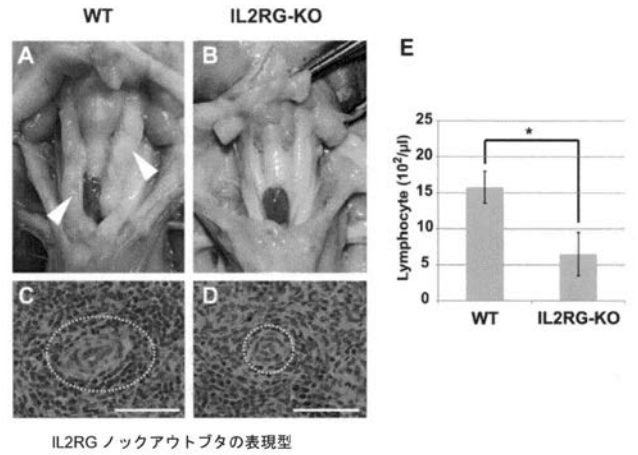


【 図 3 】



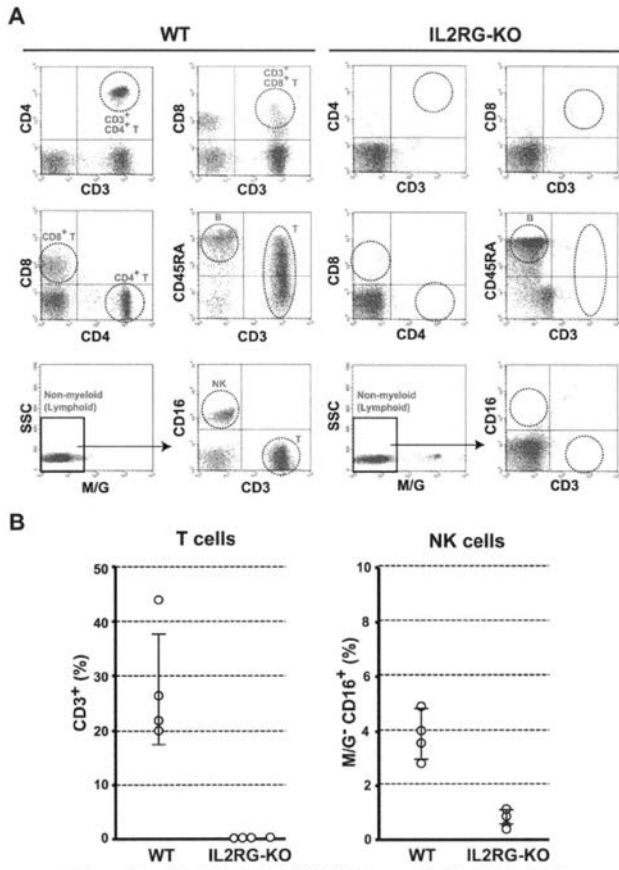
IL2RG ノックアウトブタの作出と解析

【 図 4 】



IL2RG ノックアウトブタの表現型

【 図 5 】

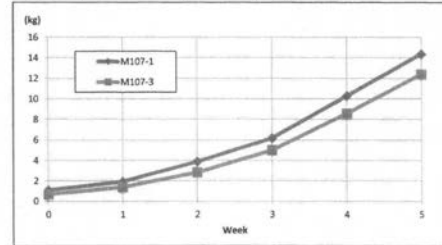


【 図 6 】

体重と生存日数

	産仔数	誕生時体重 (平均)	生存日数
キメラ	2	882g	2頭生存中 (現在約1.5ヶ月齢)
SCID (非キメラ)	4	770g	0~12日齢で死亡

2頭のキメラ (M107-1, M107-3)の体重増加



【 配列表 】

2015155904000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/076768
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N15/09(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/00-15/90, A01K67/027, C12N5/10 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 1996-2014 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2014 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2014 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WATANABE M. et.al., Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA. Plos One, 2013, vol.8, no.10, pp.e76478(1-8) (Materials and Methods)	<u>1-7, 9-16</u> 1-9, 14-16
X Y	Taisuke MATSUDA et al., "Buta Ran ni Okeru mRNA injection-ho o Mochiita Zinc Finger Nucleases ni yoru Idenshi Knockout", Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Program Yoshishu, 2013, 3P-0980 (entire text)	<u>1-5, 10-14, 16</u> 1-9, 14-16
<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 December 2014 (24.12.14)		Date of mailing of the international search report 13 January 2015 (13.01.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/076768

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> <u>Y</u> <u>A</u>	WHYTE Y. Y. et.al., Cell biology symposium: zinc finger nucleases to create custom-designed modifications in the swine (<i>Sus scrofa</i>) genome. J. Anim. Sci., 2012, vol.90, no.4, pp.1111-1117 (page 1113, right column, 1st paragraph)	<u>1-4</u> <u>1-9,14-16</u> 10-13
<u>X</u> <u>Y</u> <u>A</u>	MASHIMO T. et.al., Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. Plos One, 2010, vol.5, no.1, pp.e8870(1-7) (Materials and Methods)	1,3-5,10-12, <u>14</u> <u>1-9,14-16</u> 10-13
<u>X</u> <u>Y</u>	JP 2010-110254 A (Primetech Corp.), 20 May 2010 (20.05.2010), claims (Family: none)	10-13 1-9,14-16
<u>X</u> <u>Y</u>	SUZUKI S. et.al., Il2rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs. Cell Stem Cell, 2012, vol.10, no.6, pp.753-758 (SUPPLEMENTAL INFORMATION)	10-13 1-9,14-16
<u>Y</u> <u>A</u>	MATSUNARI H. et.al., Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013, vol.110, no.12, pp.4557-4562 (Materials and Methods)	<u>6-7,9,15-16</u> <u>1-5,8,10-14</u>
<u>Y</u> <u>A</u>	NAKANO K. et.al., Generating porcine chimeras using inner cell mass cells and parthenogenetic preimplantation embryos. Plos One, 2013, vol.8, no.4, pp.e61900(1-10) (Methods)	<u>8-9,15-16</u> <u>1-7,10-14</u>

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 6 7 6 8									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i											
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/00-15/90, A01K67/027, C12N5/10											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2014年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2014年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2014年	日本国実用新案登録公報	1996-2014年	日本国登録実用新案公報	1994-2014年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2014年										
日本国実用新案登録公報	1996-2014年										
日本国登録実用新案公報	1994-2014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) CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X Y	WATANABE M. et.al., Generation of interleukin-2 receptor gamma gene knockout pigs from somatic cells genetically modified by zinc finger nuclease-encoding mRNA. Plos One, 2013, vol.8, no.10, pp.e76478(1-8) (Materials and Methods 等)	1-7, 9-16 1-9, 14-16									
X Y	松田泰輔 外, ブタ卵における mRNA injection 法を用いた Zinc Finger Nucleases による遺伝子ノックアウト. 日本分子生物学会年会プログラム・要旨集, 2013, 3P-0980 (全文)	1-5, 10-14, 16 1-9, 14-16									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献									
「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		「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									
「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		「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									
「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者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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 24.12.2014		国際調査報告の発送日 13.01.2015									
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) 戸来 幸男	4 B 3 9 6 4								
		電話番号 03-3581-1101 内線	3448								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 7 6 7 6 8
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
<u>X</u> <u>Y</u> A	WHYTE Y. Y. et.al., Cell biology symposium: zinc finger nucleases to create custome-designed modifications in the swine (<i>Sus scrofa</i>) genome. J. Anim. Sci., 2012, vol.90, no.4, pp.1111-1117 (第1113頁右欄第1段落等)	<u>1-4</u> <u>1-9, 14-16</u> 10-13
<u>X</u> <u>Y</u> A	MASHIMO T. et.al., Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. Plos One, 2010, vol.5, no.1, pp.e8870(1-7) (Materials and Methods 等)	1, 3-5, <u>10-12, 14</u> <u>1-9, 14-16</u> 10-13
<u>X</u> <u>Y</u>	JP 2010-110254 A (プライムテック株式会社) 2010.05.20. (請求項等) (ファミリーなし)	<u>10-13</u> 1-9, 14-16
<u>X</u> <u>Y</u>	SUZUKI S. et.al., Il2rg gene-targeted severe combined immunodeficiency pigs. Cell Stem Cell, 2012, vol.10, no.6, pp.753-758 (SUPPLEMENTAL INFORMATION 等)	<u>10-13</u> 1-9, 14-16
<u>Y</u> A	MATSUNARI H. et.al., Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013, vol.110, no.12, pp.4557-4562 (Materials and Methods 等)	<u>6-7, 9, 15-16</u> 1-5, 8, 10-14
<u>Y</u> A	NAKANO K. et.al., Generating porcine chimeras using inner cell mass cells and parthenogenetic preimplantation embryos. Plos One, 2013, vol.8, no.4, pp.e61900(1-10) (Methods 等)	<u>8-9, 15-16</u> 1-7, 10-14

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

特許法第30条第2項適用申請有り (1) 公開者/科学技術振興機構(JST)、学校法人明治大学、学校法人自治医科大学 刊行物名/科学技術振興機構(JST)プレスリリース、「効率的な方法で、短期間に免疫のないブタを作ることに成功」 発行日/平成25(2013)年10月8日 (2) 公開者/渡邊将人(Masahito Watanabe)、中野和明(Kazuaki Nakano)、松成ひとみ(Hitomi Matsunari)、松田泰輔(Taisuke Matsuda)、前原美樹(Miki Maehara)、金井貴博(Takahiro Kanai)、小林美里奈(Mirina Kobayashi)、松村幸奈(Yukina Matsumura)、坂井理恵子(Rieko Sakai)、倉本桃子(Momoko Kuramoto)、林田豪太(Gota Hayashida)、浅野吉則(Yoshinori Asano)、高柳就子(Shuko Takayanagi)、新井良和(Yoshikazu Arai)、梅山一大(Kazuhiro Umeyama)、長屋昌樹(Masaki Nagaya)、花園豊(Yutaka Hanazono)、長嶋比呂志(Hiroshi Nagashima) 掲載年月日/平成25(2013)年10月9日 掲載アドレス/<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0076478> [http://www.plosone.org/article/](http://www.plosone.org/article/fetchObject.action?uri=info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0076478&representation=PDF) (3) 公開者:科学技術振興機構(JST)、学校法人明治大学、学校法人自治医科大学 掲載年月日/平成25(2013)年10月10日 掲載アドレス/<http://www.jst.go.jp/press.html> <http://www.jst.go.jp/pr/announce/20131010/index.html>

(出願人による申告) 戦略的創造研究推進事業 チーム型研究(CREST)、研究領域:「人工多能性幹細胞(iPS細胞)作製・制御等の医療基盤技術」

(74) 代理人 100107386

弁理士 泉谷 玲子

(72) 発明者 花園 豊

栃木県下野市薬師寺3311-1 学校法人自治医科大学内

(72) 発明者 渡邊 将人

神奈川県川崎市多摩区東三田1-1-1 明治大学生田キャンパス内

(72) 発明者 長嶋 比呂志

神奈川県川崎市多摩区東三田1-1-1 明治大学生田キャンパス内

Fターム(参考) 4B065 AA90X AB01 AC20 BA04 CA44 CA46 CA60

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。