

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013年6月20日(20.06.2013)



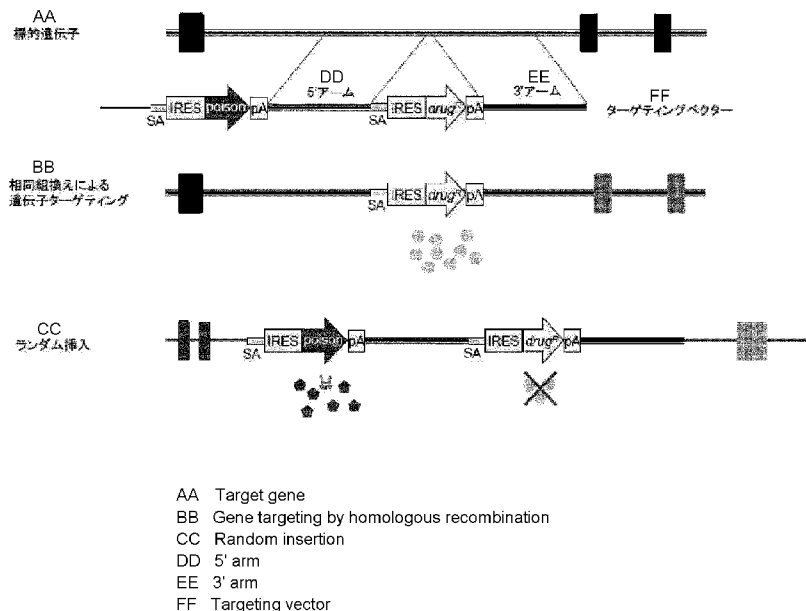
(10) 国際公開番号
WO 2013/089123 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/082160
- (22) 国際出願日: 2012年12月12日(12.12.2012)
- (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 2011-272072 2011年12月13日(13.12.2011) JP
- (71) 出願人: 公立大学法人横浜市立大学(PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION YOKOHAMA CITY UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒2360027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸2番2号 Kanagawa (JP).
- (72) 発明者: 足立 典隆(ADACHI, Noritaka); 〒2360027 神奈川県横浜市金沢区瀬戸2番2号 公立大学法人横浜市立大学内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 間山 世津子, 外(MAYAMA, Setsuko et al.); 〒2210835 神奈川県横浜市神奈川区鶴屋町3丁目30番の1農機会館4階 Kanagawa (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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: GENE TARGETING VECTOR, AND METHOD FOR USING SAME

(54) 発明の名称: 遺伝子ターゲティングベクター及びその利用方法



(57) Abstract: Provided is a gene targeting vector which enables highly efficient gene targeting. A gene targeting vector having a structure which sandwiches a positive selection marker between homologous DNA in the 5' upstream region of a target site and homologous DNA in the 3' downstream region of the target site, wherein a DNA sequence enabling bicistronic expression and a splice acceptor site are added 5' upstream of the positive selection marker, and a splice acceptor site is also added 5' upstream of the homologous DNA in the 5' upstream region of the target site.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2013/089123 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

効率が高い遺伝子ターゲティングを可能とする遺伝子ターゲティングベクターを提供する。 標的部
位の 5'上流領域に相同な DNA と標的部位の 3'下流領域に相同な DNA とでポジティブ選択マーカ
ーを挟む
構造を持つ遺伝子ターゲティングベクターであって、前記ポジティブ選択マーカ
ーの 5'上流にスプライ
スアクセプター部位とパイストロン性発現を可能にする DNA 配列とが付加されており、さら
に、前記
標的部位の 5'上流領域に相同な DNA の 5'上流にもスプライスアクセプター部位が付加され
ている前記ベ
クター。

明 細 書

発明の名称： 遺伝子ターゲティングベクター及びその利用方法

技術分野

[0001] 本発明は、遺伝子ターゲティングベクター及びその利用方法に関する。

背景技術

[0002] 細胞が備えている相同組換え能を利用して、ゲノム上の特定の遺伝子だけを破壊、ないし人為的に導入したDNA断片と置き換えることができる（非特許文献1、2）。これを遺伝子ターゲティングと呼ぶ。この手法は、個々の遺伝子機能解析に絶大な威力を発揮してきただけでなく、理想的な遺伝子治療法や品種改良法としても期待されている（非特許文献3）。しかし、一般的な高等動植物細胞における遺伝子ターゲティングの効率は極めて低く、改良法の開発が望まれている。マーカー遺伝子にプロモーターを持たせない、エクソントラップ型のターゲティングベクターを用いるとランダム挿入体の出現頻度が低下し、遺伝子ターゲティング効率の上昇が見込めることがわかっている（非特許文献4、5）。しかし、非標的遺伝子中へのランダム挿入によってもマーカー遺伝子の発現が起こりうるため、さらなる効率化へ向けての改良法の開発が求められていた。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1：Capecchi, MR (1989) Altering the genome by homologous recombination. Science 244: 1288-1292

非特許文献2：Vasquez KM, Marburger K, Intody Z, et al. (2001) Manipulating the mammalian genome by homologous recombination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 8403-8410

非特許文献3：Yanez RJ, Porter AC (1998) Therapeutic gene targeting. Gene Ther 5: 149-159

非特許文献4：Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, et al. (1998) Requiremen

t for p53 and p21 to Sustain G2 Arrest After DNA Damage. Science 282: 1497-1501

非特許文献5: Adachi N, So S, Iizumi S, et al. (2006) The human pre-B cell line Nalm-6 is highly proficient in gene targeting by homologous recombination. DNA Cell Biol. 25: 19-24

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0004] 本発明は、効率が高い遺伝子ターゲティングを可能とする遺伝子ターゲティングベクターを提供することを目的とする。
- [0005] また、本発明は、効率が高い遺伝子ターゲティングを可能とする遺伝子ターゲティングベクターを利用して、遺伝子ノックアウト細胞を作製する方法を提供することも目的とする。

課題を解決するための手段

- [0006] 遺伝子ターゲティングの効率が極めて低いという問題点の最大の要因は、細胞に導入したターゲティングベクターがゲノム上のランダムな位置に挿入される反応（ランダム挿入）が高頻度で起こってしまうことにある。しかし、プロモーターレス型のターゲティングベクターを用いることでターゲティング効率の上昇が期待できるため、こうしたベクター、特にエクソントラップ型のターゲティングベクターを簡便迅速に作製できるようになれば、一定の技術革新が見込めるはずである。
- [0007] 本願発明者は、遺伝子ターゲティングベクター（例えば、エクソントラップ型のターゲティングベクター）において、IRES配列や2A配列などのバイシストロン性発現を可能にするDNA配列を選択マーカーの5'上流に付加することにより、遺伝子ターゲティング効率を向上させる技術を開発した（特願2011-118564、平成23年5月27日出願）。
- [0008] しかし、特願2011-118564の遺伝子ターゲティングベクターでは、正しくターゲティングされたクローンだけでなく、非標的遺伝子中へのランダム挿入が起こったクローンでも選別に使用したマーカー遺伝子（ポジティブ選択マ

ーカ遺伝子)の発現が起こるため、ネガティブ選択の効果が十分とは言えなかった(図4A, B)。

[0009] 本願発明者は、特願2011-118564の遺伝子ターゲティングベクターにおける標的部位の5' 相同領域の上流に、スプライスアクセプター配列を持つ自殺遺伝子などのネガティブ選択マーカを付加することにより、ランダム挿入を起こしたクローンでのポジティブ選択マーカ遺伝子の発現が起こらないようにすることで、遺伝子ターゲティング効率をさらに向上させることに成功し、本発明を完成させるに至った(図5)。なお、本発明においては、遺伝子ターゲティングベクターにネガティブ選択マーカとなる遺伝子を付加しなくても、標的部位の5' 相同領域の上流にスプライスアクセプター配列を付加することで、同様の効果(すなわち、ランダム挿入を起こしたクローンでの選別に使用したマーカ遺伝子の発現が起こらない)が得られると考えられる。本発明の手法をExon-Trap Positive/Negative Selection 法(ExTraPNS法)と命名する。

[0010] 本発明の要旨は以下の通りである。

(1) 標的部位の5' 上流領域に相同なDNAと標的部位の3' 下流領域に相同なDNAとでポジティブ選択マーカを挟む構造を持つ遺伝子ターゲティングベクターであって、前記ポジティブ選択マーカの5' 上流にスプライスアクセプター部位とバイシストロン性発現を可能にするDNA配列とが付加されており、さらに、前記標的部位の5' 上流領域に相同なDNAの5' 上流にもスプライスアクセプター部位が付加されている前記ベクター。

(2) ポジティブ選択マーカにポリA配列が付加されているが、プロモーターは付加されていない(1)記載のベクター。

(3) 標的部位の5' 上流領域に相同なDNAの5' 上流に付加されたスプライスアクセプター部位の3' 下流にポリA配列が付加されている(1)又は(2)記載のベクター。

(4) 標的部位の5' 上流領域に相同なDNAの5' 上流に付加されたスプライスアクセプター部位と、その3' 下流に付加されたポリA配列との間に、ネガテ

ィブ選択マーカーが導入されている（３）記載のベクター。

（５）さらにリニア化部位が導入されている（１）～（４）のいずれかに記載のベクター。

（６）（１）～（５）のいずれかに記載の遺伝子ターゲティングベクターを用いて、細胞に遺伝子変異を導入することを含む、遺伝子ノックアウト細胞を作製する方法。

発明の効果

[0011] 本発明により、遺伝子ターゲティングを、従来よりも高効率で行うことができるようになった。本発明の方法は、特に、エクソントラップ型ターゲティングベクターを使用した遺伝子ターゲティングに効果的である。本発明は、基礎生物学分野、医療分野、農畜産分野における遺伝子ノックアウト／ノックインの汎用化・効率化に有効である。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願、特願2011 - 27207 2の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]ターゲティングベクターの構造。（A）一般的な置換型ターゲティングベクターの構造。ターゲティングベクターを細胞内に導入し、選択薬剤存在下でコロニー形成を行うと、標的部位と薬剤耐性遺伝子が組換わった相同組換え体と、染色体上のランダムな位置にターゲティングベクターが挿入された非相同組換え体を得られるが、後者のほうが圧倒的多数を占める。つまり、相同組換え体および非相同組換え体のいずれも薬剤耐性遺伝子をもつため、この薬剤選別だけでは相同組換え体の取得は困難である。しかし、いずれかのアームの外側にDT-Aなどの自殺遺伝子を付加しておくと、非相同組換え体は染色体上に組込まれた自殺遺伝子の発現によって死滅する。図中の楕円は細胞を、その中の棒状の四角は染色体を表す。染色体中の濃い灰色の領域は標的部位、染色体およびターゲティングベクター中の薄い灰色の領域は相同領域を表す。また、ターゲティングベクターのアームに挟まれた領域は薬剤耐性遺伝子を、黒い四角の領域はDT-Aをそれぞれ表す。（B）プロモーター

レス型ターゲティングベクターの構造の一例。置換型ターゲティングベクターとは異なり、ポジティブ選択マーカとして用いる遺伝子に独自のプロモーターをもたせない。このため、理論上、相同組換えによるターゲティングが起こったときのみ、染色体上の標的遺伝子のプロモーターが使われてマーカ遺伝子の発現がオンとなる。

[図2] Multisite Gateway technologyを利用したターゲティングベクター作製の概略。両端にattB配列をもつ5' -アームと3' -アームをPCR増幅したのち、BP組換え反応によって5' -エントリークローンと3' -エントリークローンを作製する (A)。得られた2つのエントリークローンと、pENTR IRES-Hyg、pDEST R4-R3にネガティブ選択用のカセットSA-IRES-DTA-polyAを付加したプラスミドを用いて、LR組換えによりターゲティングベクターを作製する (B)。Hygはハイグロマイシン耐性遺伝子、DTAはジフテリア毒素Aフラグメント遺伝子、Km^rはカナマイシン耐性遺伝子、Amp^rはアンピシリン耐性遺伝子をそれぞれ表す。

[図3] アーム増幅のためのPCRの概略とプライマー配列。attB配列で挟むように各アームをPCRで増幅する。プライマー配列中の下線部は各att配列を、Nは鋳型特異的配列、枠で囲った部分はI-SceIの認識配列をそれぞれ示す。鋳型特異的配列は25nt程度の長さにするとうよい。

[図4] 特願2011-118564のエクソントラップ型ターゲティングベクターによる遺伝子ターゲティング。(A) 一般的な置換型のエクソントラップ型ターゲティングベクターの構造。5' -アームと3' -アームの間にポジティブ選択マーカをもつ。ポジティブ選択マーカは独自のプロモーターをもたない代わりに、5' 上流にスプライスアクセプター部位、および、バイシストロン性発現を可能にするDNA配列をもつ。3' 下流にはポリA付加シグナルが付加されている。(B) 特願2011-118564のエクソントラップ型ターゲティングベクターによる遺伝子ターゲティングの問題点。相同組換えによるターゲティングにより標的遺伝子中に挿入されたクローンだけでなく (図上)、非標的遺伝子中へのランダム挿入が起こったクローンにおいても (図下)、ポジティブ選

択マーカ－遺伝子の発現が起こりうる。特に、発現レベルの高い遺伝子中に挿入されたクローンでは、標的遺伝子中に挿入されたクローンよりも強い薬剤耐性を獲得できる。このため、エクソントラップのみではネガティブ選択の効果十分であるとは言えない。

[図5]新規に開発した、ネガティブ選択用のカセットをもつエクソントラップ型ターゲティングベクターを用いた ExTraPNS法による遺伝子ターゲティング（図6の上段に示したベクターを用いた場合を例にとる）。5' 相同領域の上流に、スプライスアクセプター配列をもつ自殺遺伝子が付加されているため、ランダム挿入を起こしたクローンにおいてポジティブ選択マーカ－遺伝子の発現が起こる可能性が大幅に減少する。相同組換えによるターゲティングが起こった場合は、ネガティブ選択用のカセットの挿入は起こらない。このため、遺伝子ターゲティング効率の上昇が見込める。なお、ネガティブ選択マーカ－となる遺伝子を付加しなくても、5' アームの上流にスプライスアクセプター配列を付加しておけば（図6の下段に示したベクター）同様の効果が期待できる。

[図6]ExTraPNS法による遺伝子ターゲティングに使用できる、ネガティブ選択用のカセットをもつエクソントラップ型ターゲティングベクターの構造の例。上段に示した自殺遺伝子の代わりに、蛍光タンパク質遺伝子（ここではGFP遺伝子）を付加することもできる（中段）。また、単に、5' アームの上流にスプライスアクセプター配列を付加するだけでもよい（下段）。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明の実施の形態についてより詳細に説明する。

[0014] 遺伝子ターゲティングは、相同組換え機構を利用して、染色体上の任意の位置に変異を入れる技術である。しかし、高等生物における相同組換え頻度は低く、一般に細胞内に導入したターゲティングベクターが標的部位に挿入される頻度に比べ、異なる部位にランダムに挿入される頻度の方が100倍以上高い。そこで、相同組換え体を効率よく選別、取得できるよう、ターゲティングベクターに工夫を施す必要がある。最もよく用いられている置換型ター

ゲティングベクターは、標的部位（欠失させたい領域）の5' 上流領域および3' 下流領域と相同なDNA断片（以下、それぞれ「5' アーム」および「3' アーム」とよぶこともある）でポジティブ選択マーカ（図1では、薬剤耐性遺伝子）を挟むような構造をもつ（図1A）。ポジティブ選択マーカとしては、Hyg（ハイグロマイシン耐性遺伝子）、Puro（ピユーロマイシン耐性遺伝子）、 β -geo（ β ガラクトシダーゼ遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子）などの薬剤耐性遺伝子、GFP遺伝子などの蛍光タンパク質遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子などが例示される。相同組換えが起こると標的部位がポジティブ選択マーカと置き換わるため、これを指標として組換え体を選別することができる。ただし、非相同組換えによってランダムに挿入されてもマーカ遺伝子の発現は起こる。このため、非相同組換え体を除去するための工夫として、ターゲティングベクター中のアームの外側にネガティブ選択用の遺伝子を付加しておくのが一般的である。ネガティブ選択用の遺伝子としては、HSV-TK、DT-Aなどの自殺遺伝子などが例示される。別の方法として、プロモーターをもたない薬剤耐性遺伝子（ポジティブ選択マーカ）を用いるプロモーターレス法（「エクソントラップ法」も含む）がある（図1B）。この方法では、相同組換えが起こるとポジティブ選択マーカ遺伝子の発現がオンになる。ただし、非相同組換えによるランダム挿入によってもポジティブ選択マーカ遺伝子の発現がオンになる可能性がある。本発明では、後者の反応による組換え体を減少させるための手法を考案した（ExTraPNS法）。

[0015] 本明細書では、Multisite Gateway technology(Iiizumi, S, Nomura, Y, So, S, et al. (2006) Simple one-week method to construct gene-targeting vectors: application to production of human knockout cell lines. *Biotechniques* 41: 311-316)を利用した置換型ターゲティングベクターの作製法を例にとって説明する（図2）。

[0016] 具体的には、まずattB4配列とattB1配列を両端にもつ5' アーム（本発明における「標的部位の5' 上流領域と相同なDNA断片」に該当する。）とpDONR P

4-P1RおよびattB2配列とattB3配列を両端にもつ3' アーム（本発明における「標的部位の3' 下流領域と相同なDNA断片」に該当する。）とpDONR P2R-P3間でBP組換えを行うことにより、5' エントリークローンおよび3' エントリークローンをそれぞれ作製する。（5' アームと3' アームはゲノミックPCRにより増幅、取得しておく。）

5' アーム増幅用のリバースプライマーは、標的遺伝子のエクソン上に設計しておくといよい。これにより、標的遺伝子上において上流のエクソンからポジティブ選択マーカ遺伝子（が挿入されたエクソン）へのナチュラルなスプライシングを可能にするSA部位（splice acceptor site）を5' アーム中に含めることができる。SA部位は、標的遺伝子のスプライスアクセプター配列（SA配列）に限定されるわけではなく、他のSA部位を用いてもよい。

[0017] 3' アーム増幅用のリバースプライマー（もしくは5' アーム増幅用のフォワードプライマー）に、ベクター直鎖化のための制限酵素サイト（例えば、I-SceI）を付加しておくといよい（図3）。これにより、直鎖化に使用する制限酵素を決定するためのマッピング実験を省略することができる。

[0018] 次に、この二つのエントリークローンと、attL1配列とattL2配列の間にハイグロマイシン耐性遺伝子を導入したpENTR IRES-Hyg、pDEST R4-R3（Invitrogen）にネガティブ選択用のカセット（ここでは、SA-IRES-DTA-polyA）を付加したプラスミドとの四者間でLR組換えを行う。この2ステップだけで、エクソントラップ型の置換型ターゲティングベクターが完成する（図2）。

[0019] ハイグロマイシン耐性遺伝子（他の選択用マーカでもよい。）の5' 上流には、バイシストロン性発現を可能にするDNA配列（例えば、IRES配列（internal ribosomal entry site； mRNA内部のリボソーム進入サイト； encephalomyocarditis virus（EMCV）由来のものなど）、2Aペプチド配列（2A “self-cleaving” peptide； Thosea asigna virus（TaV）由来のものなど）、IRES2など）を付加する。選択用マーカの5' 上流にバイシストロン性発現を可能にするDNA配列が存在するため、遺伝子ターゲティングが起こると標的遺伝子のプロモーターに依存して選択用マーカの遺伝子発現が起こる。

- [0020] ハイグロマイシン耐性遺伝子はlox71とloxPで挟んでおくといよい。これにより、遺伝子ターゲティングの後、Creの一過性発現により、選択用マーカをゲノム中から除去することができる。ただし、マーカ除去のための手法はこれに限定されない。すなわち、他のlox配列やFRT配列などの部位特異的組換え酵素の標的配列も利用することができる。
- [0021] また、エントリークローンpENTR IRES-Hygにスプライスアクセプター部位を導入してもよい。スプライスアクセプター部位を導入することにより、5'アーム増幅用のリバースプライマーを（エクソンではなく）イントロン中に設定できる。
- [0022] SA-IRES-DTA-polyAのカセットを5'アームの上流に付加しておく、ポジティブ選択マーカのSAよりも上流に別の（つまり、DTAの）SAが存在することになるため、ランダム挿入がおこったクローンが薬剤耐性を獲得する確率が大幅に減少する（図5）。DTA遺伝子の代わりに、他の自殺遺伝子（例えば、HSV-TK）、蛍光タンパク質マーカ等の他の遺伝子（例えば、GFP遺伝子、DsRed遺伝子）を用いてもよい。あるいは、何も遺伝子（やIRES）を挿入せず、単にSA-polyAのカセットを付加するだけでもよい（図6）。
- [0023] ネガティブ選択用のカセットにDTA遺伝子のような自殺遺伝子やGFP遺伝子のような蛍光タンパク質遺伝子などのネガティブ選択マーカを入れる場合には、IRES、2Aペプチド配列などのバイストロン性発現を可能にするDNA配列を付加するとよいが、ネガティブ選択用のカセットに遺伝子やcDNAを入れない場合には、バイストロン性発現を可能にするDNA配列は付加しなくてもよい。
- [0024] 以上、ターゲティングベクターの作製（具体的には5'アームと選択用マーカと3'アームを連結するステップ）はInvitrogen社のMultiSite Gatewayシステムを利用する場合を例にとり説明したが、連結方法はこの手法に限定されない。すなわち、その他の分子生物学的方法による作製や利用（たとえば制限酵素やリガーゼを利用した一般的な手法やIn-Fusion PCR Cloningなど）も可能である。エントリークローン（つまりGatewayのシステム）を利用せず

に、通常の方法でターゲティングベクターを作製するためのベースとなるようなベクターとしては、選択用マーカを含み、標的部位の5' 上流領域と相同なDNA断片と標的部位の3' 下流領域と相同なDNA断片を組み込むための部位、および、リニア化部位が組み込まれているベクターを使用するとよい。

[0025] 本発明の遺伝子ターゲティングベクターを用いて、細胞に遺伝子変異を導入することにより、遺伝子ノックアウト細胞を作製することができる。遺伝子ノックアウト細胞は、公知の方法（例えば、Adachi, N, So, S, Iizumi, S, et al. (2006) The human pre-B cell line Nalm-6 is highly proficient in gene targeting by homologous recombination. *DNA Cell Biol.* 25: 19-24; Adachi, N, Nishijima, H, Shibahara, K (2008) Gene targeting using the human Nalm-6 pre-B cell line. *BioScience Trends.* 2: 169-180; Toyoda, E, Kagaya, S, Cowell, IG, et al. (2008) NK314, a topoisomerase II inhibitor that specifically targets the alpha isoform. *J. Biol. Chem.* 283: 23711-23720) で作製することができる。簡単に説明すると、制限酵素でターゲティングベクターを直鎖化した後、エレクトロポレーション法などの遺伝子導入法により細胞に導入し、細胞を培養し、コロニーを形成させる。次いで、適宜マーカを利用して、遺伝子変異が導入された細胞を選択する。ホモで遺伝子変異が導入された細胞（ホモ破壊株）を得るには、選択用マーカを代えて、第2の遺伝子ターゲティングを行うとよい。また、部位特異的組換え酵素発現ベクター（例えば、Cre組換え酵素発現ベクターであるプラスミドpBS185）を細胞に導入することにより、選択用マーカを除去することができる。選択用マーカを除去した細胞には、別の変異を導入することができる。遺伝子ターゲティングに適した細胞としては、ヒトNalm-6細胞、ニワトリDT40細胞、マウスES細胞などを例示することができるが、これらに限定されることはない。むしろ本発明により、一般的なヒト細胞株でも遺伝子ターゲティングが容易になった。以下、ヒト線維肉腫由来がん細胞株HT1080（ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンクより入手可能；http://www.jhsf.or.jp/cgi-bin/HSRRB/C_ViewDetail.cgi?jcrb=IF050354）を使

った実験の説明を詳述する。本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例

[0026] [実施例 1]

(材料及び方法)

[0027] ターゲティングベクターの構築

準備するもの

1. ExTaq™ ポリメラーゼ (タカラバイオ)

2. PCRプライマー: HPRT遺伝子の増幅を例にとる。

5' アーム増幅用

(1) HPRT 5' Fw, 5' - GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGCACATCACAGGTACCATATCA
GTG -3' (配列番号 1);

(2) HPRT 5' Rv (エクソン上に設定する), 5' - GGGGACTGCTTTTTTGTACAAAC
TTCACATCTCGAGCAAGACGTTTCAGT -3' (配列番号 2);

3' アーム用

(3) HPRT 3' Fw, 5' - GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGCCTGCAGGATCACATTGTAGC
CCTCTGTGTGC -3' (配列番号 3);

(4) HPRT 3' Rv (リニア化部位となるI-SceIサイトを付加しておく), 5' -
GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCTATATTACCCTGTTATCCCTAGCGTAACTCAGGGTAGAAAT
GCTACTTCAGGC -3' (配列番号 4)

3. MultiSite Gateway (登録商標) Three Fragment Vector Construction Kit (Invitrogen)

4. 薬剤耐性遺伝子が組み込まれたエントリークローン (pENTR IRES-Hyg)

pENTR IRES-Hygは、pENTR loxPプラスミド (Iizumi, S, Nomura, Y, So, S, et al. (2006) Simple one-week method to construct gene-targeting vectors: application to production of human knockout cell lines. Biotechniques 41: 311-316) をNotIで消化した後、lox71, IRES, Hyg, pA, loxPを順次付加して作製した。lox71とloxPは合成リンカーDNAを用いて付加した

。IRESとpAはpIRESベクター（タカラバイオ；http://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.asp?unitid=U100004407）に由来する。HygはpENTR lox-Hyg (Iiizumi, S, Nomura, Y, So, S, et al. (2006) Simple one-week method to construct gene-targeting vectors: application to production of human knockout cell lines. *Biotechniques* 41: 311-316) に由来する。

5. デスティネーションベクター (pDEST R4-R3) (Invitrogen)

6. デスティネーションベクター (pDEST R4-R3 SA-IRES-DTA-pA)

pDEST R4-R3 SA-IRES-DTA-pAは、以下の手順で作製した。

1. プライマー DTA-Sal Fw (5'-GTCGACATGGATCCTGATGATGTTGTTGAT-3') (配列番号7) と DTA-Not Rv (GCGGCCGCTTAGAGCTTAAATCTCTGTAGGTA) (配列番号8) を用いてPCRを行い、得られたDTA遺伝子断片をpIRESベクター (Clontech, Cat. No. 631605) のNotIサイトにサブクローニングした。PCRは KOD-Plus- DNAポリメラーゼ (TOYOBO) を使用し、下記の条件で行った。

94°C 2 min

94°C 30 sec

65°C 30 sec ×35サイクル

68°C 40 sec

68°C 7 min

2. pSAβgeoプラスミド (Friedrich, G. & Soriano P. *Genes Dev.* 5, 1513-1523, 1991) をBamHIで消化し、Klenow断片を用いて末端を平滑化したのち、SA部位 (adenovirus type 2 major late transcript splice acceptorに由来) を含む約200 bpの断片を上記1. で作製したベクターのIRES配列の上流 (XhoIサイト； Klenow断片により平滑末端化) に付加した。

3. 上記2. で作製したプラスミドをBglIIとPvuIで消化し、平滑末端化したのち、SA-IRES-DTA-pAを含むDNA断片を pDEST R4-R3プラスミド (Invitrogen) のAflIIIサイト (Klenow断片により平滑末端化) に付加した。

7. 抗生物質含有LB寒天培地：50 μg/mlカナマイシンまたは50 μg/mlアンピ

シリンを含むLB寒天培地

[0028] プロトコール

1. ヒトゲノムDNAを鋳型として下記の条件でPCRを行い、att配列で挟まれたH PRTゲノム断片を取得した。5' アームの増幅にはプライマー(1)と(2)を、3' アームの増幅にはプライマー(3)と(4)を使用した。

[0029] [表1]

94°C	2 分	} 35サイクル
94°C	40 秒	
68°C	1 分	
72°C	3 分	
72°C	7 分	

[0030] 2. PCR産物を市販のキットで精製し、定量した。

3. BP組換え反応により、5' -エントリークローンおよび3' -エントリークローンを作製した(図2A)。下記のサンプルを0.5 mlチューブ内で混合した。

pDONR P4-P1R または pDONR P2R-P3	50 fmoles
PCRで増幅した5' -アームまたは3' -アーム	50 fmoles
全量	8 μ l (TE溶液であわせる)

4. 上記反応液4 μ l に1 μ lのBPクロナーゼ II酵素ミックスを加え、よく混合した。

5. 25°Cで4~5時間インキュベートした。

6. 1 μ lの2 μ g/ μ l プロテイナーゼKを加え、よく混合した。

7. 37°Cで10分インキュベートした。

8. 5 μ lの反応液を50 μ lの大腸菌コンピテントセルと混和し、形質転換を行った。回復培養後、組換え体を50 μ g/ml カナマイシンを含むLB寒天培地に播いた。

9. カナマイシン耐性コロニーを5~10個単離し、アルカリSDS法でプラスミドDNAを抽出した。アガロースゲル電気泳動により、目的のプラスミドと予想されるクローンを2~3個選んだ。これらの候補プラスミドを適当な制限酵素で

消化したのち、アガロースゲル電気泳動を行い、目的のプラスミドであることを確認した。

10. 得られた 5'、3' 各エントリークローンを市販のキットで精製し、定量した。

11. LR組換え反応により、ターゲティングベクター (pHPRT-IRES-Hyg) を作製した (図2B)。各サンプルを下記のとおり0.5 mlチューブ内で混合した。

pDEST R4-R3 または pDEST R4-R3 SA-IRES-DTA-pA	20 fmoles
5' -エントリークローン	10 fmoles
3' -エントリークローン	10 fmoles
pENTR IRES-Hyg	10 fmoles
全量	8 μ l (TE溶液 であわせる)

12. 上記反応液4 μ l に1 μ lのLRクロナーゼプラス酵素ミックスを加え、よく混合した。

13. 25°Cで16時間インキュベートした。

14. 1 μ lの2 μ g/ μ l プロテイナーゼKを加え、よく混合した。

15. 37°Cで10分インキュベートした。

16. 5 μ lの反応液を50 μ lの大腸菌コンピテントセルと混和し、形質転換を行った。回復培養後、組換え体を50 μ g/ml アンピシリンを含むLB寒天培地に播いた。

17. アンピシリン耐性コロニーを5~10個単離し、アルカリSDS法でプラスミドDNAを抽出した。アガロースゲル電気泳動により、目的のプラスミドと予想されるクローンを2~3個選んだ。これらの候補プラスミドを適当な制限酵素で消化したのち、アガロースゲル電気泳動を行い、目的のプラスミド (すなわちターゲティングベクター) であることを確認した。

18. ターゲティングベクターをキットで精製し、定量した。

[0031] ターゲティングベクターの直鎖化

準備するもの

1. 制限酵素 I-SceI、10x I-SceI反応バッファー、10 mg/ml BSA (New England Biolabs)
2. 3 M 酢酸ナトリウム：酢酸ナトリウム 40.81 gを純水80 mlに溶かしたのち、酢酸でpHを5.2に合わせ、全量を100 mlとしたもの
3. TE溶液：10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、0.1 mM EDTA (pH 8.0) (4℃保存)

[0032] プロトコール

1. ターゲティングベクターを制限酵素 I-SceI で消化した。各試薬を下記のとおり混合し、37℃で4時間以上インキュベートした。

ターゲティングベクター	50 μ g
10x I-SceI バッファー	40 μ l
100x BSA (10 mg/ml)	4 μ l
I-SceI	15 ユニット
全量	400 μ l (滅菌水であわせる)

2. 40 μ lの3 M酢酸ナトリウムと0.9 mlのエタノールを加え、よく混合した。
3. 15,000 rpmで5分遠心した。
4. 0.5 mlの70%エタノールで3回洗浄した。
5. 3回目の遠心後、クリーンベンチ内で滅菌済みチップを使って上清を除去し、風乾した。
6. TE溶液を加え、DNAを溶解した (DNA濃度が2~4 μ g/ μ lとなるようにした)。
7. 65℃で15分インキュベートした。

[0033] エレクトロポレーション法による遺伝子導入およびコロニー形成

準備するもの

1. 増殖培地：ES培地 (日水製薬) に10% 仔ウシ血清 (HyClone) を加えたもの。湯浴で37℃に保温しておく。

2. 直鎖化したターゲティングベクター
3. Cell Line Nucleofector (登録商標) Kit T (Lonza)
4. 選択薬剤 (100 mg/ml ハイグロマイシンB) : 1 gのハイグロマイシンBを純水10 mlに溶かし、ろ過滅菌したもの (4°C保存)

[0034] プロトコール

1. 対数増殖期にあるヒトHT1080細胞 (2×10^6 個以上) を50 ml遠心チューブに回収した。
2. 1,100 rpmで5分遠心し、上清を静かに除いた。
3. 細胞塊にSolution Tを100 μ l加え、細胞数をカウントした。
4. 2×10^6 個の細胞と直鎖化したターゲティングベクター2 μ gを混合し、Solution Tで100 μ lとしたのち、専用のキュベットに移した。
5. キュベットをエレクトロポレーション装置 (Nucleofector II, Lonza) にセットした。
6. プログラムL-005を実行した。
7. 全量をただちに増殖培地4 mlの入った60 mmディッシュに移した。
8. 上記細胞液を1 mlずつ増殖培地9 mlの入った90 mmディッシュ (×4枚) に移した。
9. 37°Cで48時間培養した。
10. トリプシン処理した後1,100 rpmで5分間遠心し、細胞を回収した。
11. 適量の増殖培地に懸濁し、細胞数をカウントした。
12. $2 \sim 4 \times 10^5$ cells/dishとなるように、90 mmディッシュ (増殖培地9 ml) に播種した。
13. 37°Cで24時間培養した後、25~40 μ lの選択薬剤 (100 mg/ml ハイグロマイシン) を加えた。
14. 37°Cで2週間培養し、コロニー形成を行った。

[0035] コロニーの単離とターゲットクローンの選別

準備するもの

1. 選択培地 (ハイグロマイシンB含有培地) : 増殖培地にハイグロマイシンB

- を0.25~0.4 mg/mlとなるよう加えたもの
- 0.1%トリプシン液：0.1%トリプシン/0.02%EDTA/PBS⁻
 - 溶解バッファー：20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)、250 mM 塩化ナトリウム、1% SDS
 - 10 mg/ml プロテイナーゼK：100 mgのプロテイナーゼKを純水10 mlに溶かし、ろ過滅菌したもの (-20°C保存)
 - 飽和NaCl溶液
 - ExTaq™ ポリメラーゼ
 - PCRプライマー (遺伝子ターゲティングの確認用； Iizumi et al. *Nucleic Acids Res.* 2008 Nov;36(19):6333-6342.)
HPRT-F, 5'-TGAGGGCAAAGGATGTGTTACGTG-3' (配列番号5)
HPRT-R, 5'-TTGATGTAATCCAGCAGGTCAGCA-3' (配列番号6)

[0036] プロトコール

- 選択培地を1.5 ml, 増殖培地を0.75 mlずつそれぞれ24ウェルプレートに分注した。
- 0.1%トリプシン液で処理した後、軽くピペッティングしながら選択培地1.5 mlの入ったウェルに移した (ゲノム抽出用)。
- 細胞を移した24ウェルプレートから、0.25 ml細胞液を取り増殖培地0.75 mlの入ったウェルに移した (継代用)。
- 37°Cで2~3日培養した。
- ゲノム抽出用24ウェルプレートの各培養液を除去したのち、250 μ lの溶解バッファーと1 μ lの10 mg/mlプロテイナーゼKを加え、よくピペッティングしながら1.5 mlチューブへ移した。
- 37°Cで一晩 (または55°Cで1時間) インキュベートした。
- 80 μ lの飽和NaCl溶液を加え、よく混合した。
- さらに250 μ lの2-プロパノールを加え、よく混合した。
- 15,000 rpm、4°Cで15分遠心を行った。
- 沈殿を除き、0.5 mlの70%エタノールで洗浄した。

11. 沈殿を30~100 μ lのTE溶液に溶解させた。
12. 調製したゲノムDNAを鋳型として、プライマーHPRT-FとHPRT-Rを用いて下記の反応条件でPCRを行い、ターゲットクローンをスクリーニングした。

[0037] [表2]

94°C	2分	}	35サイクル
94°C	40秒		
60°C	1分		
72°C	2分20秒		
72°C	7分		

[0038] 薬剤耐性遺伝子として、ハイグロマイシン耐性遺伝子の代わりに、ピューロマイシン耐性遺伝子又はeGFP遺伝子とピューロマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子を用いて、上記の操作を繰り返し、ターゲティングベクターを作製した。

[0039] また、バイシストロン性発現を可能にするDNA配列として、IRES配列の代わりに、IRES2配列又は2Aペプチド配列を用いて、上記の操作を繰り返し、ターゲティングベクターを作製した。

[0040] PCRスクリーニングで陽性と判断されたクローンについては、正しい相同組換え反応が起こっていることをサザンブロット解析により確認した。

(結果)

ヒトHT1080細胞を用いて行った遺伝子ターゲティングの結果を下記の表にまとめる。「ネガティブ(負)選択(DT-A)あり」では、SA-IRES-DTA-pAカセットを5'アームの上流に付加したターゲティングベクターを使用した。

[0041]

[表3]

	ターゲティングベクター	食選択 (DT-A)	ターゲティング効率 (%)	相対ランダム挿入頻度
実験1	HPRT-IRES-Hyg	なし	0 (0/133)	1
		あり	3.7 (1/27)	0.13
実験2	HPRT-2A-Puro	なし	1.7 (2/116)	1
		あり	4.7 (2/43)	0.649
実験3	HPRT-2A-eGFP-2A-Puro	なし	0.4 (1/250)	1
		あり	3.6 (2/56)	0.076

[0042] 以上の結果の通り、エクソントラップ型のターゲティングベクターを使用し、これにネガティブ選択用のカセットを導入すると、ランダム挿入頻度の著しい低下に伴い、高効率で遺伝子ターゲティングを行えることがわかった。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

[0043] 本発明は、基礎生物学分野、医療分野、農畜産分野における遺伝子ノックアウトや遺伝子トラップの汎用化・効率化に有効である。

配列表フリーテキスト

[0044] <配列番号1>

配列番号1は、ヒトHPRT遺伝子を標的とする5' アーム増幅用のフォワードプライマーのDNA配列を示す。

5' - GGGGACAACTTTTGTATAGAAAAGTTGCACATCACAGGTACCATATCAGTG -3'

(下線部はattB4配列である)

<配列番号2>

配列番号 2 は、ヒトHPRT遺伝子を標的とする5' アーム増幅用のリバースプライマーのDNA配列を示す。

5' - GGGGACTGCTTTTTTGTACAACTTGCACATCTCGAGCAAGACGTTCAGT -3'

(下線部はattB1配列である)

<配列番号 3>

配列番号 3 は、ヒトHPRT遺伝子を標的とする3' アーム増幅用のフォワードプライマーのDNA配列を示す。

5' - GGGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGCCTGCAGGATCACATTGTAGCCCTCTGTGTGC -3'

(下線部はattB2配列である)

<配列番号 4>

配列番号 4 は、ヒトHPRT遺伝子を標的とする3' アーム増幅用のリバースプライマーのDNA配列を示す。

5' - GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCTATATTACCCTGTTATCCCTAGCGTAACTCAGGGTAG
AAATGCTACTTCAGGC -3'

(下線部はattB3配列である)

<配列番号 5>

配列番号 5 は、遺伝子ターゲティングの確認用のPCRプライマー(HPRT-F)のDNA配列を示す。

HPRT-F, 5' -TGAGGGCAAAGGATGTGTTACGTG-3'

<配列番号 6>

配列番号 6 は、遺伝子ターゲティングの確認用のPCRプライマー(HPRT-R)のDNA配列を示す。

HPRT-R, 5' -TTGATGTAATCCAGCAGGTCAGCA-3'

<配列番号 7>

配列番号 7 は、プライマー DTA-Sal Fw (5' -GTCGACATGGATCCTGATGATGTTGTTGAT-3')のDNA配列を示す。

<配列番号 8>

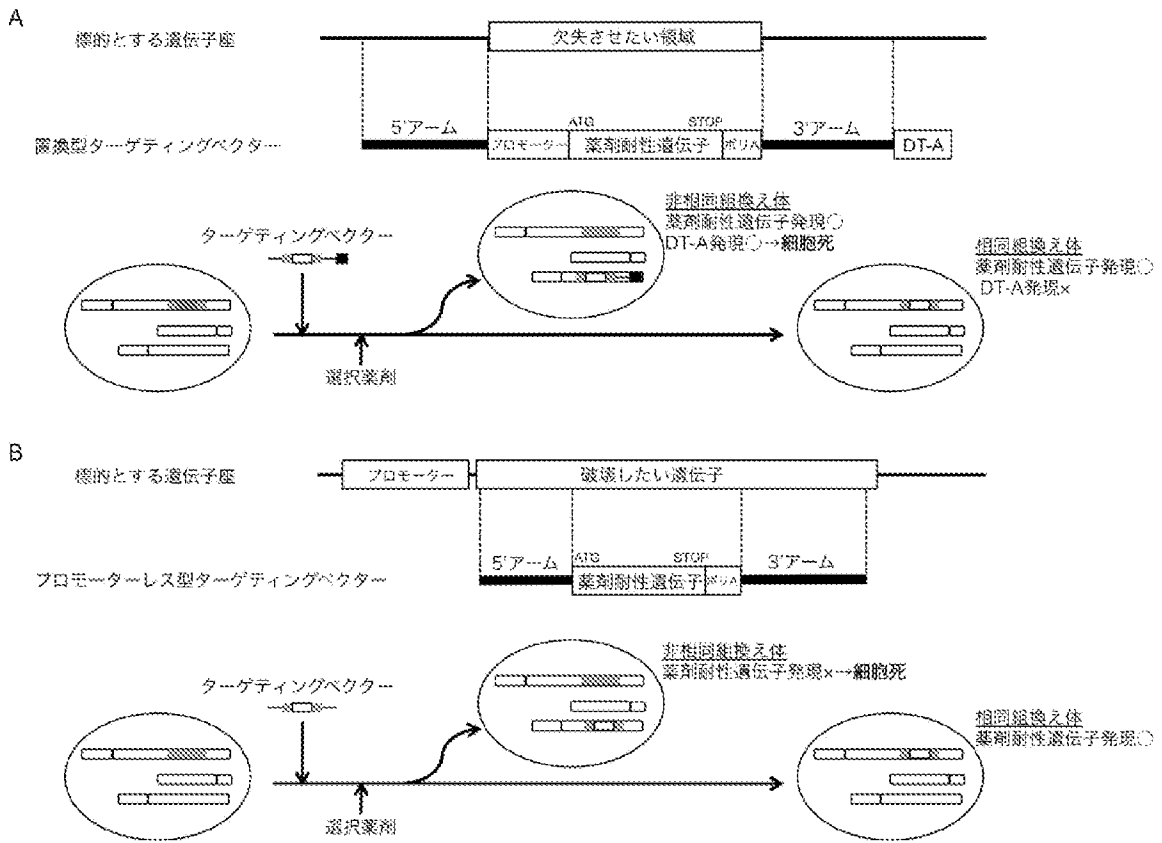
配列番号 8、プライマー DTA-Not Rv (GCGGCCGCTTAGAGCTTTAAATCTCTGTAGGTA)

のDNA配列を示す。

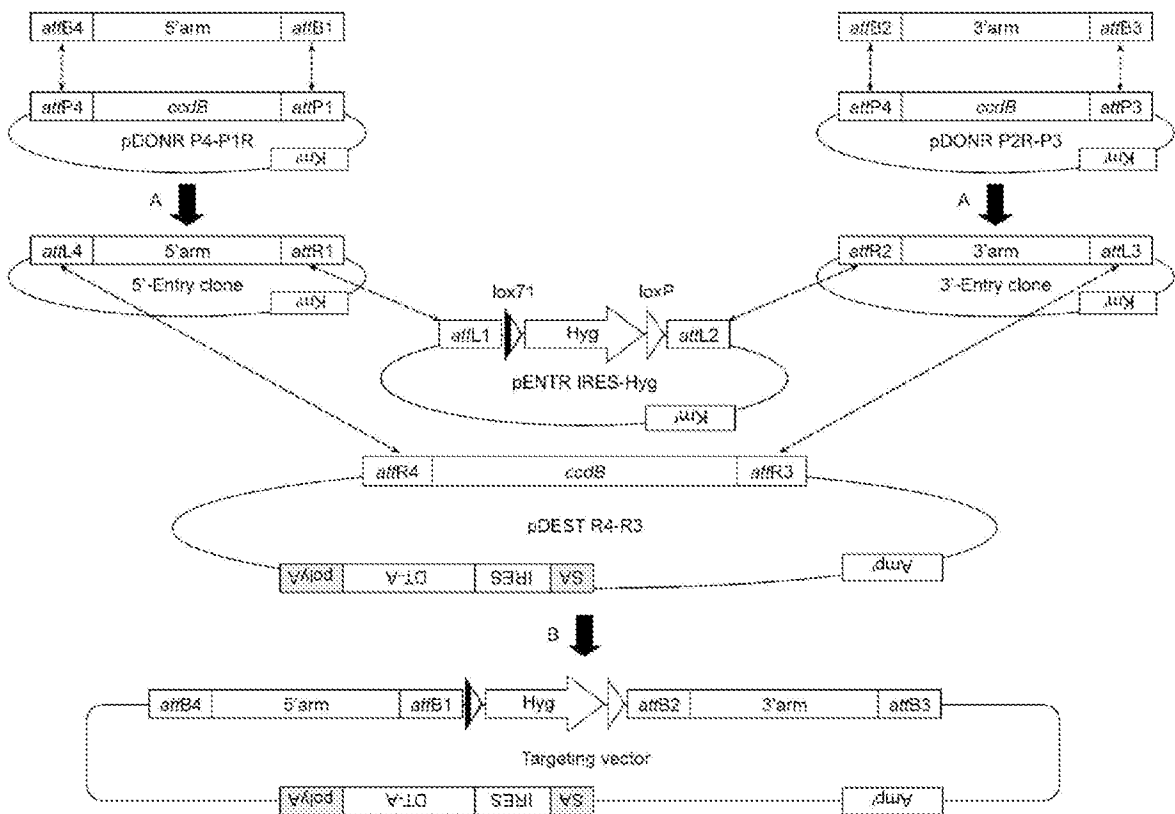
請求の範囲

- [請求項1] 標的部位の5' 上流領域に相同なDNAと標的部位の3' 下流領域に相同なDNAとでポジティブ選択マーカを挟む構造を持つ遺伝子ターゲティングベクターであって、前記ポジティブ選択マーカの5' 上流にスプライスアクセプター部位とバイシストロン性発現を可能にするDNA配列とが付加されており、さらに、前記標的部位の5' 上流領域に相同なDNAの5' 上流にもスプライスアクセプター部位が付加されている前記ベクター。
- [請求項2] ポジティブ選択マーカにポリ A 配列が付加されているが、プロモーターは付加されていない請求項 1 記載のベクター。
- [請求項3] 標的部位の5' 上流領域に相同なDNAの5' 上流に付加されたスプライスアクセプター部位の3' 下流にポリ A 配列が付加されている請求項 1 又は 2 記載のベクター。
- [請求項4] 標的部位の5' 上流領域に相同なDNAの5' 上流に付加されたスプライスアクセプター部位と、その3' 下流に付加されたポリ A 配列との間に、ネガティブ選択マーカが導入されている請求項 3 記載のベクター。
- [請求項5] さらにリニア化部位が導入されている請求項 1～4 のいずれかに記載のベクター。
- [請求項6] 請求項 1～5 のいずれかに記載の遺伝子ターゲティングベクターを用いて、細胞に遺伝子変異を導入することを含む、遺伝子ノックアウト細胞を作製する方法。

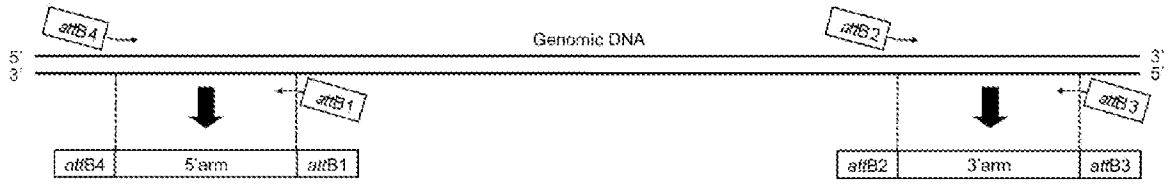
[図1]



[図2]



[図3]



attB4プライマー： 5'-GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN -3'

attB1プライマー： 5'-GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN -3'

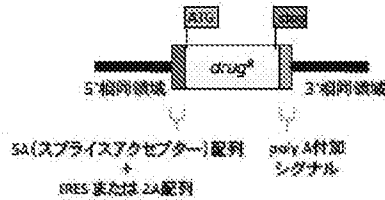
attB2プライマー： 5'-GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN -3'

attB3プライマー： 5'-GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGCTATATTACCCGTATCCCTANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN -3'

I-SceIサイト

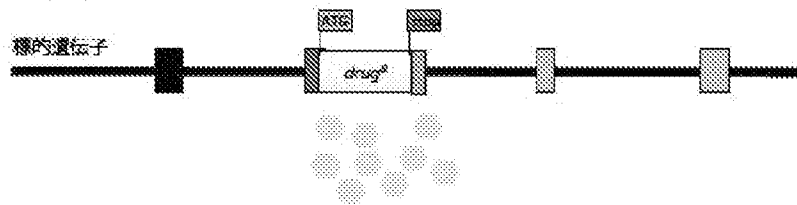
[図4]

A

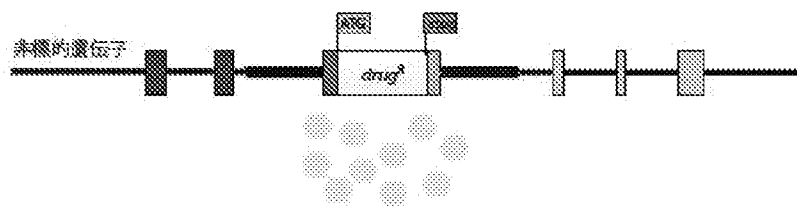


B

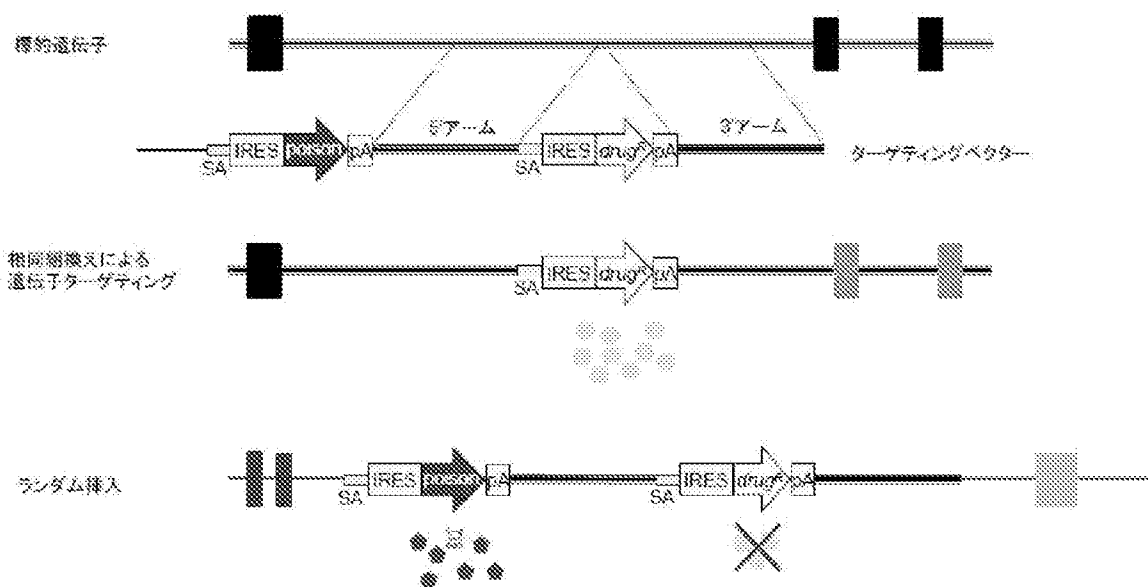
▶ 遺伝子ターゲティング



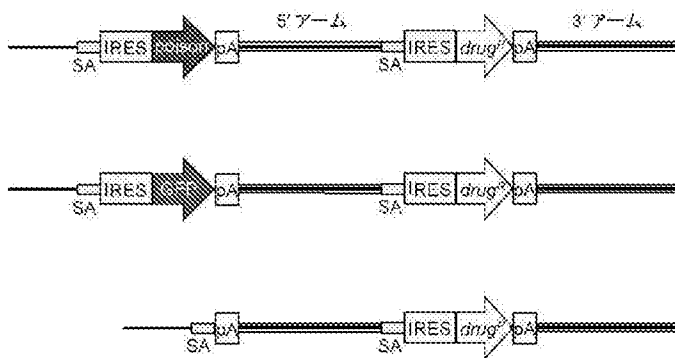
▶ ランダム挿入



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/082160

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(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)

C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, 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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDREAMII), PubMed, Science Direct, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 9-500005 A (The University of Edinburgh), 07 January 1997 (07.01.1997), abstract; claims; page 13, lines 19 to 25; page 14, line 25 to page 15, line 12; page 17, lines 7 to 21; fig. 1 to 3, 8 & US 6150169 A1 & EP 0695361 A	1-3, 5, 6/1-6
Y	US 5922601 A (BIOTRANSPLANT, INC.), 13 July 1999 (13.07.1999), abstract; fig. 1, 2; examples (Family: none)	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
28 February, 2013 (28.02.13)

Date of mailing of the international search report
12 March, 2013 (12.03.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

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, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(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. C12N15/09, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, 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
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2013年
 日本国実用新案登録公報 1996-2013年
 日本国登録実用新案公報 1994-2013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)
 CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamII), PubMed, Science Direct, WPI

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	JP 9-500005 A (ザ ユニバーシティー オブ エディンバラ) 1997.01.07, 要約、特許請求の範囲、13ページ19-25行、14ページ25行-15ページ12行、17ページ7-21行、図1-3、8 & US 6150169 A1 & EP 0695361 A	1-3, 5, 6/1-6
Y	US 5922601 A (BIOTRANSPLANT, INC.) 1999.07.13, 要約、図1、2、実施例 (ファミリーなし)	1-6

☐ 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。

<p>* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な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</p>	<p>の日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献</p>
--	---

国際調査を完了した日 28.02.2013	国際調査報告の発送日 12.03.2013
--------------------------	--------------------------

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) 北田 祐介	4 N	4 8 6 8
	電話番号 03-3581-1101 内線 3488		