

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公表特許公報** (A) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 509028

(P2003 - 509028A)

(43)公表日 平成15年3月11日(2003.3.11)

(51) Int. Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 0 1 K 67/027	4 B 0 2 4
A 0 1 K 67/027		A 6 1 K 31/711	4 B 0 6 3
A 6 1 K 31/711		35/23	4 B 0 6 5
35/23		35/30	4 C 0 8 4
35/30		35/34	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 (全 43数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 522404(P2001 - 522404)

(86)(22)出願日 平成12年9月6日(2000.9.6)

(85)翻訳文提出日 平成14年3月7日(2002.3.7)

(86)国際出願番号 PCT/US00/24398

(87)国際公開番号 W001/018193

(87)国際公開日 平成13年3月15日(2001.3.15)

(31)優先権主張番号 60/152,354

(32)優先日 平成11年9月7日(1999.9.7)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/155,107

(32)優先日 平成11年9月22日(1999.9.22)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 アドバンスド セル テクノロジー、インコーポレイテッド

アメリカ合衆国、マサチューセッツ、ウスター、ワン イノベーション ドライブ

(72)発明者 ランザ、ロバート

アメリカ合衆国 マサチューセッツ、クリントン、サウス メドウ ロード 35

(72)発明者 ウエスト、マイケル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ、ボストン、コモンウェルス アヴェニュー 333、ナンバー7

(74)代理人 弁理士 浅村 皓 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核移植技術を用いた免疫適合性を有する細胞及び組織を産生する方法

(57)【要約】

本発明は、核の移植及びクローン化の技術を用いて、移植及び組織工学の目的のための免疫適合性組織及び細胞を作成する方法に関する。また、発現した導入遺伝子及び細胞及び組織を作り上げる他の遺伝的操作の免疫適合性への影響を決定する方法も、本発明に含まれる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 動物モデルにおけるクローン化細胞又は組織の免疫適合性を試験する方法であって、

- a. 供与体動物から細胞を採取し；
 - b. 該細胞から受容体の卵母細胞又は他の好適な受容体細胞に核を移植して胚を産生し；
 - c. 該胚から少なくとも1個の細胞を有する胚、胚盤及び/又は幹細胞を単離し；
 - d. 該胚、胚盤及び/又は幹細胞を、対照の胚盤及び/又は幹細胞と同時に該供与体動物に注入し；及び
 - e. 注入部位での奇形腫の形成を検査する；
- ことを含む方法。

【請求項2】 核の移植に先立ち、該供与体動物からの該細胞に異種の遺伝子を移入する、請求項1記載の方法。

【請求項3】 該供与体及び対照の胚盤及び/又は幹細胞が皮下又は腰部筋膜に注入される、請求項1記載の方法。

【請求項4】 該奇形腫が形成された場合は、それを除去して胚葉の存在を検査する、請求項1記載の方法。

【請求項5】 胚葉が形成された場合は、特異的な細胞型を検出又は単離する目的でそれを分離する、請求項4記載の方法。

【請求項6】 該供与体動物から採取される細胞が繊維芽細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項7】 該異種遺伝子が、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP)、 β -ガラクトシダーゼ及びルシフェラーゼから成るグループから選択されるレポーター遺伝子である、請求項2記載の方法。

【請求項8】 該異種遺伝子が分泌されるタンパク質をコードする、請求項2記載の方法。

【請求項9】 該タンパク質が免疫応答を発生する、請求項8記載の方法。

【請求項10】 該タンパク質が治療用のタンパク質である、請求項8記載の方法。

【請求項11】 胚葉細胞が、細胞分化を制御する潜在的な発生の信号を評価するためのアッセーに更に用いられる、請求項5記載の方法。

【請求項12】 胚葉の中で見出される少なくとも1つの型の細胞が組織を作り出すために用いられる、請求項5記載の方法。

【請求項13】 該作り出された組織が、免疫適合性を試験するために供与体動物に再移植される、請求項12記載の方法。

【請求項14】 該作り出された組織が、平滑筋、骨格筋、心筋、皮膚、腎臓及び神経組織から成るグループから選択される、請求項12記載の方法。

【請求項15】 移植のために免疫適合性を有する組織を産生する方法であって：

- a. 意図する移植の受容体から供与体細胞を採取し；
 - b. 該細胞から受容体の卵母細胞又は他の好適な受容体細胞へ核を移植して胚又は胎児を産生し；
 - c. 胚又は胎児から移植に必要とされる型の細胞を単離し；及び
 - d. 該細胞から組織を作り出す；
- ことを含む方法。

【請求項16】 該ステップ(c)と(d)との間に、追加のステップとして：

- i. 該胚から胚盤及び/又は幹細胞を単離し；
 - i i. 該胚盤及び/又は幹細胞を免疫無防備状態の動物に注入し；
 - i i i. その結果生じた奇形腫を単離し；
 - i v. 奇形腫から移植に必要とされる型の細胞を単離し、ここで、該奇形腫細胞は該免疫適合性を有する組織を作り出すために用いられる；
- ことを含む、請求項15記載の方法。

【請求項17】 該組織が、同質遺伝子型核DNA及び異質遺伝子型ミトコンドリアDNAを含む細胞を含有する、請求項15記載の方法。

【請求項18】 該組織が、同質遺伝子型核DNA及び異質遺伝子型と同質

遺伝子型ミトコンドリアDNAの混合物を含む細胞を含有する、請求項15記載の方法。

【請求項19】 該組織が、平滑筋、骨格筋、心筋、皮膚、腎臓及び神経組織から成るグループから選択される、請求項15記載の方法。

【請求項20】 移植を必要とする患者に免疫適合性の移植体を提供する方法であって：

- a. 該患者から供与体細胞を採取し；
- b. 該細胞から受容体の卵母細胞又は他の好適な受容体細胞に核を移植して胚を産生し；
- c. 該胚から胚盤及び／又は幹細胞を単離し；
- d. 奇形腫を形成するために該胚盤及び／又は幹細胞を免疫無防備状態の動物に注入し；
- e. その結果生じた奇形腫を単離し；
- f. 奇形腫から移植に必要とされる型の細胞を単離し；
- g. 該細胞から組織を作り出し；及び
- h. 該作り出した組織を該患者に移植する；

ことを含む方法。

【請求項21】 該免疫無防備状態の動物がスキッド又はヌードマウスである、請求項20記載の方法。

【請求項22】 該意図する移植の受容体から採取する供与体細胞が繊維芽細胞である、請求項20記載の方法。

【請求項23】 該作り出した組織が、平滑筋、骨格筋、心筋、皮膚、腎臓及び神経組織から成るグループから選択される、請求項20記載の方法。

【請求項24】 該作り出した組織が、同質遺伝子型核DNA及び異質遺伝子型ミトコンドリアDNAを有する細胞を含む、請求項20記載の方法。

【請求項25】 請求項20記載の方法により作り出された組織。

【請求項26】 請求項20記載の方法により産生した単離した組織。

【請求項27】 該動物が有蹄類である、請求項1記載の方法。

【請求項28】 該有蹄類がウシである、請求項27記載の方法。

- 【請求項29】 該動物が有蹄類である、請求項15記載の方法。
- 【請求項30】 該有蹄類がウシである、請求項29記載の方法。
- 【請求項31】 該動物が有蹄類である、請求項16記載の方法。
- 【請求項32】 該有蹄類がウシである、請求項31記載の方法。
- 【請求項33】 該意図する移植の受容体がヒトである、請求項20記載の方法。
- 【請求項34】 該患者がヒトである、請求項16記載の方法。
- 【請求項35】 該供与体細胞が核の移植に先立ち遺伝子的に変えられる、請求項16記載の方法。
- 【請求項36】 該遺伝子的な変更が、少なくとも1つの異種遺伝子の移入を含む、請求項35記載の方法。
- 【請求項37】 該遺伝子的な変更が、少なくとも1つの未変性遺伝子の分断を含む、請求項35記載の方法。
- 【請求項38】 クローン化細胞から生産された少なくとも1つの奇形腫を含有する動物。
- 【請求項39】 該動物が有蹄類である、請求項38記載の動物。
- 【請求項40】 該有蹄類がウシである、請求項39記載の動物。
- 【請求項41】 該少なくとも1つの奇形腫が腰部筋膜に位置する、請求項38記載の動物。
- 【請求項42】 該奇形腫が動物の免疫システムによって拒絶されない、請求項38記載の動物。
- 【請求項43】 該奇形腫が同質遺伝子型核DNA及び異質遺伝子型ミトコンドリアDNAを有するクローン化細胞を含む、請求項42記載の動物。
- 【請求項44】 請求項38記載の動物から単離した奇形腫。
- 【請求項45】 奇形腫が3つの胚葉の全てに由来する細胞を含有する、請求項44記載の奇形腫。
- 【請求項46】 該奇形腫がクローン化有蹄類の細胞から誘導される、請求項44記載の奇形腫。
- 【請求項47】 該奇形腫がクローン化ウシの細胞から誘導される、請求項

46記載の奇形腫。

【請求項48】 該奇形腫が、同質遺伝子型核DNA及び異質遺伝子型ミトコンドリアDNA、又は、異質遺伝子型と同質遺伝子型ミトコンドリアDNAの混合物を有するクローン化細胞を含む、請求項48記載の奇形腫。

【請求項49】 同質遺伝子型核DNA及び異質遺伝子型ミトコンドリアDNAを含む安定な移植体。

【請求項50】 該移植体の細胞が、同質遺伝子型体細胞から異質遺伝子型受容体細胞への核移植によって作られる、請求項49記載の移植体。

【請求項51】 該組織が、腎臓、心筋及び骨格筋より成るグループから選択される、請求項49記載の移植体。

【請求項52】 種交差核移植を用いてミトコンドリアの組織適合性抗原を同定する方法であって：

- a. 供与体哺乳動物から細胞を採取し；
 - b. 該供与体哺乳動物から、該核供与体以外の哺乳動物種の少なくとも2つの受容体卵母細胞又は他の好適な受容体細胞へ核を移植して胚を産生し、ここで、該少なくとも2つの受容体細胞は、ミトコンドリアDNAに関して異質遺伝子型であり；
 - c. 該胚から、少なくとも1つの細胞を有する胚、胚盤及び/又は幹細胞を単離し；
 - d. 該胚、胚盤及び/又は幹細胞を別々に該供与体哺乳動物に再注入して、特異的なパネルの抗体及び/又はリンパ球を産生し；及び
 - e. 該供与体哺乳動物の免疫システムによって認識されるミトコンドリア抗原及び/又はエピトープを同定するために、該異質遺伝子型ミトコンドリア背景に対応して産生される抗体及び/又はリンパ球のパネルを比較する；
- ことを含む方法。

【請求項53】 該胚、胚盤及び/又は幹細胞が、核及びミトコンドリアDNAの両者に関して、核供与体に対して同質遺伝子型である別の哺乳動物に注入される、請求項52記載の方法。

【請求項54】 請求項52記載の方法において同定されるミトコンドリア

抗原に特異的な抗体。

【請求項55】 請求項52記載の方法において同定されるミトコンドリア
抗原に特異的なリンパ球。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本出願は、1999年9月7日出願された米国特許仮出願番号第60/152、354号及び1999年9月22日出願された米国特許仮出願番号第60/155、107号の恩典を主張する。

【0002】**(技術分野)**

本発明は、移殖の目的のための免疫適合性組織及び細胞を工夫するためにクローン化、発生生物学、及び組織工学の分野を組み合わせたものである。更に本発明は、核移植技術を用いた移殖のための治療用細胞及び組織を産生する方法、及び、そのような組織の免疫適合性を検証し又は評価する方法を開示するものである。

【0003】**(背景技術)**

ここ10年ほどの期間はクローン化の科学の顕著な進歩によって特徴づけられており、クローン化羊、即ち「ドリー」(Roslin BioMed)の誕生、「ミラ」(Genzyme Transgenics)と名付けられた三つ子のクローン化山羊や1ダースを超えるクローン化ウシ(ACT)などがそれを証明している。クローン化を可能にする技術も向上し、今や哺乳動物を成体の分化した細胞からの核を用いてクローン化することができるほどであり、その核が、核を取り出したあとの卵母細胞に導入されると、「リプログラミング(reprogramming)」を行うということを今や科学者は知っている。本明細書に全文を引用することにより取り込まれている、米国特許第5、945、577号を参照されたい。

【0004】

胚ならびに胚幹細胞を成体の分化した細胞からの核を用いて産生することができるという事実は、器官、細胞、及び組織移殖の分野での興味ある意味合いを有するものである。現在数千人の患者が好適な器官の供与者を待っており、移殖を待ちながら入手性と適合性の両者の問題に直面している。もし、移植を必要とす

る患者から採取した細胞の核から産生された胚幹細胞を作成することができ、移植に必要な細胞型に分化するように誘導することが可能ならば、移植時の拒絶反応と免疫抑制剤による危険性を取り除くことが可能である。

【0005】

胚幹細胞は、3つの異なる胚葉から細胞へ分化するように誘導されている。例えば、Andersonらは、ウシ及びブタの繊維芽細胞からの内細胞塊(ICM)及び胚盤が、無胸腺マウスの腎囊の下に移殖されると、外胚葉由来、中胚葉由来及び内胚葉由来の分化した細胞型を含む奇形腫に発達することを示した。Animal Repro. Sci. 45:231-240(1996)。更に、細胞分化の引き金となる発生の信号は、解読が始まりつつある。例えば、Gourdieらは、胚の筋細胞がインパルス発生パーキンジェ(Purkinje)繊維細胞に分化することを示した。Proc. Natl. Acad. Sci. 95:6815-6818(1998年6月)。更にまた、ニュージャージー医科歯科大学(University of Medicine and Dentistry of New Jersey, UMDNJ)の研究者達は、最近、骨髄細胞の神経細胞への形質転換を報告している(ワシントンポスト、2000年8月15日号、A6頁)。このように、胚幹細胞又は奇形腫から分化した細胞を単離し、移植に使用するためにそれらの細胞を特定の細胞型へ分化するように誘導することは可能な筈である。

【0006】

加えて、組織工学の分野で生まれた技術を用いることによって、組織や器官を分化した細胞から設計し、それを移植に用いることは可能である。例えば、Shinokahらは、合成した生分解性の(ポリラクチノポリグリコール酸 polylactinlpolyglycolic acid)管状骨組み上に細胞を接種して培養することによって、生体肺動脈の自家移植を考案した。L. Thorac. Cardiovasc. Surg. 115:536-546(1998)。Zundらは、ヒト繊維芽細胞をエンドセリン処理してから呼吸可能なメッシュに接種すると、道管や心臓弁のようなヒトの組織を産生するのに有用であることを示した。Eur. J. Cardiac-Thorac. Surg. 13:1

60-164(1998). Freedらは、微小重力をシミュレートした条件下で細胞を培養すると、軟骨や心臓組織を作るのに有利であることを示した。In Vitro Cell Dev. Bid. - Animal 33:381-385(1997年5月)。

【0007】

しかしながら、細胞の発生や分化に関する分野、及び組織工学の分野には問題点もある。例えば、Andersonらによって作られた奇形腫は、自然形成した胚から作られた。このように、胚の遺伝子型は個々の胚ごとに固有のものである。そのような細胞は、供与体動物に移殖した場合、全ての異質遺伝子型組織と同様に依然移殖拒絶を誘発するので、移殖には適切ではない。殆どの自家移植組織工学は、これとは対照的に、実際の受容体動物からの細胞を用いて実施されてきた。そのような技術は、細胞又は器官に欠陥を有する患者、すなわち、恐らく遺伝子発現欠損又は突然変異遺伝子の発現に起因する欠陥を有する患者に対して、好適な移植器官を提供しないであろう。更に、患者の器官が文字通り機能しない患者にとって、その患者自身の細胞を用いて新しい器官を作り出すことは不可能であろう。このように、移殖患者の処置に細胞の分化や発生の概念及び組織工学を適用するには多くの欠陥がある。

【0008】

(発明の概要)

本発明は、移殖用の作り上げられた細胞や組織の使用に関して、いまだ解決しなければならない不確実性に向けられたものである。本発明は、クローン化された免疫適合性を有する、発生学的に分化した細胞を、移殖のための組織に作り上げる方法、及びそのような細胞を移殖を必要とする患者に使用方法を開示するものである。特に、そのような組織は、治療用タンパク質を発現するように設計することができる。移殖用の組織や細胞は、全て核移植によって同一の元の供与体細胞から作られるので、作り上げられた組織の全ての細胞は、興味のある異種遺伝子を発現する。従って、本発明の方法は、更にまた、組織を標的にした遺伝子治療に貴重な新たな手段を提供する。

【0009】

本発明は、また、遺伝的に操作した特定の細胞が、移殖のための免疫適合性を有する器官を与えるか否かを決定する方法を提供するものである。例えば、本発明は、クローン化細胞のミトコンドリア適合性、及び、特に動物モデルにおいて、遺伝子導入による発生学的に分化した細胞の免疫適合性を評価する方法を開示するものである。このような評価は、移殖に使用する治療用の組織の適合性に関して重要な情報を提供し、更に免疫適合性を有する組織を提供するために、これらのパラメーターを制御するための基礎を提供するものである。

【0010】

(発明の詳細な説明)

本発明は、クローン化技術を用いた免疫適合性の組織を産生する方法を目的とする。開示された方法によって産生された細胞及び組織も、また、作り上げられた組織の移殖によって産生された安定な移殖体がそうであるように、本発明に含まれる。安定な移殖体とは、核の供与体へ移殖した時に免疫応答や拒絶反応を不適切に起こすことがない、又は、少なくとも非クローン化対照移殖組織に対して、移殖拒絶を避ける上で実質的な改善を提供する移植体と定義される。

【0011】

核移植によって作られるクローン化細胞は、供与体細胞又は動物に対して完全に同一ではなく、例えば、そのような細胞は、一般的に、供与体細胞のミトコンドリアDNAがなく、受容体の核を取り出した卵母細胞又は他の細胞のミトコンドリアDNAを獲得しており、一般には、胚形成の間存在する完全に模擬的な条件であるイン・ビボ環境では作り出されないため、そのような細胞が供与体動物に再移植された場合、完全に免疫適合性であるか否かという疑問が起こる。

【0012】

例えば、NADHデヒドロゲナーゼのアミノ末端から作られるND1、及び、COI遺伝子のアミノ末端にコードされるMiHAペプチドのようなマウスのミトコンドリアペプチドは、非-古典的MHCクラスI分子、例えば、H-2M3aによってベータ-2-ミクログロブリンと組み合わされて細胞の表面に存在するということが示されている(Vyasら、1992、「H-2M3aの生化学的特異性(Biochemical specificity of H-2M

3a)」、*J. Immunol.* 149(11):3605-11; Morseら、1996、「COIミトコンドリア遺伝子はH2-M3によって表現される弱い組織適合性抗原をコードする(The COI mitochondrial gene encodes a minor histocompatibility antigen presented by H2-M3)」、*J. Immunol.* 156(9):3301-7)。NDIペプチドの1つの残基における対立遺伝子の変化が、外来性の対立遺伝子を示す細胞を、特異的な細胞毒性を有するT細胞による細胞溶解作用に感じ易くするという事も示されている(Lovelandら、1990、60(6):971-80)。ラットの組織適合性に関係するミトコンドリアペプチドは、マウスの対立遺伝子ND1ペプチドと同じではないが、同様のシステムがラットでも同定されている(Daviesら、1991、「非定型的抗原に対する細胞溶解特異性を有するT細胞の発生I、ラットのミトコンドリア抗原(Generation of T cells with lytic specificity for atypical antigens I. A mitochondrial antigen in the rat)」、*J. Exp. Med.* 173:823-32)。

【0013】

このように、細胞の表面に示されるミトコンドリアペプチドは、組織適合性抗原として作用することができ、2つの別々のシステムがマウス及びラットにおいてそれぞれ同定されている。同様のシステムが他の哺乳動物に存在しないという理由はない。それ故、外来性のミトコンドリアは、核移植法で作られる治療用組織を拒絶する結果に終わることが予想される。代わりに、本発明者らは、驚くべきことに、本発明の方法の実施において、核移植法で作られた異質遺伝子型のミトコンドリアを有する細胞が、核の供与体へ移殖されても拒絶されないということを見出した。

【0014】

異質遺伝子型のミトコンドリアを有するクローン化組織が移殖の後でも拒絶されないという事実にもかかわらず、移殖適合性への疑問は、そのような細胞が導

入遺伝子を移入したり、又は移殖組織の機能を改善したり、補ったり又は支えたりするために他の何らかの遺伝子操作を行った場合、更に切実にさえなる。従って、本発明は、動物モデルのクローン化細胞又は組織の免疫適合性を試験し、必要に応じてそのような細胞又は組織の免疫適合性を高めるための方法及び動物モデルを提供する。一般的にそのような方法は：

- a . 供与体動物から細胞を採取し；
 - b . 該細胞から受容体の卵母細胞又は他の好適な受容体細胞へ核を移植して胚を産生し、所望により治療用の異種DNAを導入し；
 - c . 該胚から胚盤、内細胞塊及び／又は幹細胞を単離し；
 - d . 該胚盤及び／又は幹細胞を該供与体動物に注入し、同時に対照の胚盤及び／又は幹細胞を注入し；及び
 - e . 注入部位について奇形腫の形成、及びそれに続く拒絶の兆候を調べる；
- ことを含む。

【0015】

本発明の目的のために、奇形腫は、全形成能を有する細胞から生じた外胚葉、中胚葉又は内胚葉の誘導体を含む、分化した細胞のグループと定義される。対照となる胚盤、内細胞塊又は幹細胞は、試験動物（異質遺伝子型又は異種核DNA）由来の供与体細胞を用いて作られたものではなく、従って、そのような胚盤又は細胞から作られた奇形腫は、供与体動物において拒絶されるか、又は、決して成長することはないと思われる。供与体動物（同質遺伝子型）及び異質遺伝子型受容体の卵母細胞又は他の好適な受容体細胞からの核を用いて作られる奇形腫も、また、移殖に用いられた場合、組織適合性抗原としてミトコンドリア対立遺伝子の提示のために拒絶されるものと思われる。このように、そのような治療用の組織が移殖時の拒絶を引き起こさないということは、実に驚くべきことである。

【0016】

供与体及び対照の胚盤、内細胞塊及び／又は幹細胞は、一般的には筋肉内への注入、腎嚢下、皮下又は腰部筋膜内に導入される。奇形腫が形成された場所では、それを取り除いて胚葉の有無を調べ、胚葉は更に、特異的な細胞型を検出する目的で分離される。奇形腫の形成が、免疫適合性についての初期の示唆を与える

が、特に移入した異種遺伝子が細胞型に特異的なプロモーターから発現される場合には、特異的な細胞型を作り、供与体動物に再導入して更に免疫適合性を調べる。異質遺伝子型のミトコンドリアを有する本発明のクローン化組織が拒絶されなかったとすれば、このシステムは導入遺伝子の組織適合性への影響を試験するには理想的であり、それによって、該供与体動物からの細胞は、核移植の前に異種遺伝子を用いて形質移入される。

【0017】

一般的に、本発明の方法は、供与体動物のどのような細胞を用いても実施することが可能である。好適な細胞の例として、B細胞、T細胞のような免疫細胞、樹状細胞、ケラチノサイトのような皮膚細胞、上皮細胞、軟骨細胞、卵丘細胞、神経細胞、心細胞、食道細胞、始原生殖細胞、肝臓、胃、腸、肺、腎臓などを含む種々の器官の細胞である。一般的に、最も適した細胞は組織培養で容易に増殖し、容易に形質移入し得るものである。異種DNAを移入し核移植を実施する細胞型は、好ましくは、繊維芽細胞である。

【0018】

動物モデルは、奇形腫を形成し免疫適合性を研究するのに好適な動物であればどのような動物でもよい。好ましい動物は有蹄類であり、より好ましい動物はウシである。この他では、動物はヒト以外の霊長類、例えば、マントヒヒ又はカニクイザルである。大型動物は、より大きい奇形腫を形成し易く、それによって免疫評価及び移植のためにより多くの細胞を提供するので好ましい。好適な動物の例としては、ブタ、イヌ、ウマ、バッファロー及びヤギが挙げられる。

【0019】

本発明に含まれるものとして、種交差した動物モデルのクローン化した奇形腫の免疫適合性を試験する方法がある。例えば、供与体動物の核を、他の種の(異種の)受容体の卵母細胞又は他の好適な受容体細胞に移植する場合である。受容体細胞からのミトコンドリアを有するクローン化した奇形腫は、次いで、胚盤、内細胞塊及び/又は幹細胞を供与体動物に注入することによって免疫適合性を試験する。特に好ましいのは、近縁の種を含む交差種モデルで、その場合、受容体細胞のミトコンドリアタンパク質は、供与体の核と組み合わせさせて機能すること

が期待される。

【0020】

例えば、ニューヨークタイムス、1998年11月12日号の報告(Nicholas Wade、「ヒトの細胞が胚の状態に帰る、科学者が主張(Human Cells Revert to Embryo State, Scientists Assert)」)によると、雌ウシのミトコンドリアはヒトの核と機能することは期待できないが、チンパンジー及びゴリラのミトコンドリアは、ヒトの細胞の中で機能することが期待される。実際、ウェブサイトのwww.globalchange.comに記載されているように、科学者はすでにキメラの「ジープ(geep)」(ヒツジとヤギの複合体)や「カマス(camas)」(ラクダとラマの複合体)を作り出しており、近縁種の細胞及び細胞内器官は機能的に適合し得ることを示唆している(「ブッシュ、キメラに電報」、デイリーテレグラフ、1998年1月22日号、27頁、「ジープ:ヤギとヒツジの種交差交配(It's a geep: cross-breeding goats and sheep)」、タイムス、1984年2月27日号、71頁、「ジープに出会う:一部がヤギ-一部がヒツジ(Meet the geep: part goat-part sheep)」、Science、1984年、5巻:6頁、も参照)。Jakovcicらによると(1975年、「異なる真核生物のミトコンドリアDNA間の配列相同性(Sequence homology between mitochondrial DNAs of different eukaryotes)」、Biochem. 14(10):2043-50)、mtDNA配列の進化的拡がりは、独特の配列をした核DNA配列に対するそれと同様の比率で起こるとみられている。

【0021】

そのような種交差モデルは、異種移殖の研究において特に関連し、組織適合性抗原として作用するミトコンドリアタンパク質を同定するための便利なモデルを提供する。もし受容体細胞のミトコンドリアが、奇形種を用いて、免疫学的には適合しないが機能的に適合することが証明されれば、ミトコンドリア抗原及び細胞表面に表示されるが単一種内では対立遺伝子の変化を示さないペプチド類を同

定することは可能であろう。そのようなモデルは、移植治療のためのクローン化細胞及び組織の免疫適合性を更に高めるために、受容体細胞の関連するミトコンドリア抗原を核移植供与体からのそれらと入れ替える方向へ向かって、組み換えDNAの方法論を加速するであろう。

【0022】

例えば、もしクローン化した「交差種」奇形腫もまた拒絶の兆候を示すならば、本発明に従って、例えば、適合性を有するミトコンドリア抗原を発現する受容体細胞を選ぶことによって、又は組織適合性を有するエピトープと入れ替えることによって、クローン化細胞及び組織が核供与体と確実に適合し得るステップを取ることができる。実際のところ、ある研究者グループは、あるショウジョウバエの種の内在性ミトコンドリアDNAを、他の種のミトコンドリアDNAと完全に入れ替えたことを報告している(Nikiら、1989、ショウジョウバエにおけるミトコンドリアDNAの完全な置換(Complete replacement of mitochondrial DNA in *Drosophila*)、*Nature*, 341(6242):551-2)。このように、いかなる特別の核移植供与体に対しても、又は、ミトコンドリア表現型の混合体に対してさえも、すなわち、同質遺伝子型及び異質遺伝子型、又は、同質遺伝子型及び種交差に対して、所望するミトコンドリア表現型を有する受容体細胞を作り上げることは可能な筈である。

【0023】

ミトコンドリア抗原の組織適合性に関与するミトコンドリア遺伝子又はDNA断片、特に種交差モデルにおけるそれは、本発明の方法を用いることによって直ちに同定し得る。例えば、特定の哺乳動物の核供与体からの同質遺伝子型の核は、近縁種の異なった異質遺伝子型ミトコンドリア背景に移植可能であり、ミトコンドリアのエピトープに対して特異的な抗体及びリンパ球を単離し同定するために、そのような細胞を使用して核移植供与体を免疫化することができる。核供与体を免疫化して得られる抗体及びリンパ球の特異性を比較することによって、免疫認識及び恐らく交差種モデルにおける移植体拒絶に帰結するミトコンドリア抗原及びエピトープを同定することが可能である。そのようなミトコンドリア抗原

及びエピトープの同定は、対応するコードのDNAの交換を可能にし、その結果、交差種核移植によって作られたクローン化組織の移植拒絶を避けることができる。

【0024】

このように、本発明は、種交差核移植を用いて、ミトコンドリア組織適合性抗原を同定する方法を包含し、その方法は：

供与体哺乳動物より細胞を採取し；

該供与体哺乳動物から少なくとも2つの受容体卵母細胞又は該核供与体以外の哺乳動物種の他の好適な受容体細胞へ核を移植して胚を産生し、ここで、該少なくとも2つの受容体細胞は、ミトコンドリアDNAに関して異質遺伝子型であり；

該胚より胚盤及び／又は幹細胞を単離し；

該胚盤及び／又は幹細胞を該供与体哺乳動物に別々に再注入して、抗体及び／又はリンパ球の特異的なパネルを産生し；及び

該異質遺伝子型ミトコンドリア背景に対応して作られる抗体及び／又はリンパ球のパネルを比較して、該供与体哺乳動物の免疫システムによって認識されるミトコンドリア抗原及び／又はエピトープを同定する；

ことを含む。

【0025】

このような方法で同定されたミトコンドリア抗原に対して特異的な抗体及びリンパ球（両者ともヘルパーであり細胞毒性のT細胞及びB細胞）もまた本発明に含まれ、ミトコンドリアペプチド、抗原、及びそれらをコードするDNA又はDNA断片も同様である。

【0026】

クローン化された哺乳動物を再びクローン化し、核及びミトコンドリアDNAの両者に対して同質遺伝子型のクローン化哺乳動物の系統を作る能力は、異質遺伝子型のミトコンドリアを含む種交差したクローン化細胞を別々の哺乳動物に同時に注入し、それによって異なるミトコンドリア背景に特異的な抗体及びリンパ球の検索を加速することを可能にする。核移植を老化した細胞を若返らせるため

に用いることができるという観察に基づく、クローン化哺乳動物を再びクローン化する方法は、本明細書と同時に出版され、共通に譲渡され、全文を引用することにより取り込まれている同時係属出願番号第 _____ 号に開示されている。もちろん、単一の受容体哺乳動物又は細胞系統からの複数の卵母細胞又は他の好適な受容体細胞を用いて、1つの供与体から核移植を実施することによって、同質遺伝子型のミトコンドリアDNAを有するクローン化哺乳動物を作ることにも可能である。このように、本発明の方法は、また、抗体及び/又はリンパ球のパネルを単離するために、核及びミトコンドリアDNAの両者に関して、核供与体に対して同質遺伝子型である別の哺乳動物に該胚盤及び/又は幹細胞を注入する場合にも実施してよい。

【0027】

本発明は、また、異種タンパク質を発現する移殖のための治療用クローン化組織を作る方法も含む。本発明の方法に用いられる異種DNAは、移殖受容体で発現されるべき治療用タンパク質をコードしてよいが、また、奇形腫での遺伝子発現を監視する目的のレポーター遺伝子であってもよい。レポーター遺伝子は、遺伝子の発現を監視するのに便利ないかなるものであってもよいが、好ましくは、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein、GFP)、ベータガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、それらの変性体、抗生物質耐性マーカー、又は他のマーカー類から選ばれる。

【0028】

また、組織特異性プロモーター又は組織特異性エンハンサーの使用は、所望する組織型において、異種DNAの発現を選択する手段を提供する。別のいい方をすれば、細胞は細胞表面マーカーの発現特性に基づいて選択されてよい。例えば、造血幹細胞はCD34の発現に基づいて選択される。

【0029】

供与体細胞は、また、削除及びゲノムへの挿入を含んでもよく、元の遺伝子の発現を妨げたり改善したりもするが、好ましくは、供与体細胞は、意図する移植の受容体において分泌され治療的機能を発揮するタンパク質をコードする異種遺伝子で形質移入される、つまり、突然変異を起こした、又は発現しない元の遺伝

子を交換する。発現したタンパク質が免疫応答を示すことが認められる場合は、免疫適合性を試験するために動物モデルに用いられる動物は、次いで免疫応答の評価及び抗体又は細胞毒性を有するT細胞クローンの単離に使用される。

【0030】

クローン化組織の免疫適合性を試験するために用いられる動物に作られた奇形腫は、また、細胞の分化及び発達を制御する分子信号の研究にも有用である。例えば、推定される発生プロモーター、エンハンサー、リプレッサー及び他の遺伝子制御配列で設計されたレポーター遺伝子構築物を、核移植に先だって供与体の核に挿入し、次いで奇形腫を肉眼又は他の手段によって監視し、どの段階でレポーター遺伝子の発現が開始されるかを観察する。

【0031】

上記のように、分化した奇形腫細胞は分割されて、それぞれ特定の細胞又は組織の免疫適合性を試験するために用いられる。ひとたび興味を引くような特定の細胞型が同定されると、本明細書に記載された及び当業者に公知の方法を用いて組織を作り上げることに用いられる。開示された動物モデルは、免疫適合性のための組織工学における新規なマトリックス物質の試験において、特定の役割を見出す。本発明の好ましい作り上げた組織は、平滑筋、骨格筋、心筋、皮膚、腎臓及び神経組織から成るグループから選択される。

【0032】

このように、本発明は、また、移殖のための免疫適合性を有する組織を産生する方法にも関与し、それは：

- a . 意図する移殖の受容体から供与体細胞を採取し；
- b . 該細胞から受容体の卵母細胞又は他の好適な受容体細胞へ核を移植して、胚を産生し；
- c . 該胚から胚盤、内細胞塊及び／又は幹細胞を単離し；
- d . 該胚盤、内細胞塊及び／又は幹細胞を免疫無防備状態の動物に注入し；
- e . その結果生じた奇形腫を単離し；
- f . 奇形腫から移殖に必要とされる型の細胞を単離し、及び所望により該細胞を成長因子を用いてイン・ビトロで増殖し；及び

g . 該細胞又は細胞の組み合わせから組織を作り上げる ;
ことを含む。

【0033】

また、細胞の分化と発生の信号が同定されるので、あらかじめ奇形腫を形成することなしに、組織工学及び移植のために所望の細胞型を作ることには可能である。なぜなら、特定の細胞型の発生はイン・ビトロで行われるからである。別のいい方をすれば、現在、少なくともヒト以外の哺乳動物では、奇形腫を作るよりも、むしろ成長中の胚又は胎児から直接クローン化組織を手に入れることが可能である。しかしながら、もし権威のある英国科学倫理委員会が立法措置を取るに至れば、次はヒトであり、少なくとも胚発生の最初の2週間で発達する細胞型の採取である(Weiss、「英国委員会はヒト胚クローン化の認可を推進(British panel urges allowing human embryo cloning)」、ワシントンポスト、2000年8月17日号、A26頁を参照)。

【0034】

組織工学は、例えば、三次元の骨組み又は可溶性の手術用糸の構成に使われるような生分解性ポリマーを使用して遂行される。そのような方法は、Tissue Engineering社及びOrganogenesis社のような企業によって特許や特許以外の文献として数多く報告されている。組織工学分野の特許又は文献の例として、米国特許第5,948,429号、第5,709,934号、第5,983,888号、第5,891,558号、第5,709,934号、第5,851,290号、第5,800,537号、第5,882,929号、第5,800,537号、第5,891,558号、第5,709,934号、第5,891,617号、第5,518,878号、第5,766,937号、第5,733,337号、第5,718,012号、第5,712,163号及び第5,256,418号が挙げられ、これらは全て全文を引用することにより取り込まれている。またRobert Langer及びJohn Vacantiによる多数の特許及び文献が引用されている。彼らは二人とも組織再生研究の分野で多くの業績をあげている。これらの多くの特許で考察されている

ように、血管組織の発生を促進する生物学的物質、即ち成長因子や血管新生を促進する他の化合物を含むことが望ましい。

【0035】

特に、産生した免疫適合性組織及び細胞は、移植を必要とする患者に免疫適合性を有する移植を提供する方法において有用である。そのような方法は、更に、上記ステップに加え、そのように作り上げられた組織を患者に移植することを含む。本発明者らは、更に驚くべきことに、同質遺伝子型核DNA及び異質遺伝子型ミトコンドリアDNAを含むクローン化細胞は移植拒絶を誘発しないということを見出したという事実は、ミトコンドリアの損傷、例えば、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、又は、レーバー遺伝性視神経傷害(LHON)に苦しむ元の細胞を置き替える移植に対して、特別の関係を有する。このような場合、同質遺伝子型核DNA及び異質遺伝子型ミトコンドリアDNAを有するクローン化組織は、免疫反応を誘発せず、移植に最も理想的な組織である。そのような組織は、最も近い組織適合性の組み合わせを提供するのみならず、損傷を受けたミトコンドリアを含む組織が置き替えられる、ミトコンドリア遺伝子治療をも成し遂げる。

【0036】

例えば、Dhaliwal及び共同研究者達は、最近、ALS患者の脳組織が30倍もの頻度で「共通の突然変異」、即ち、ミトコンドリア及び他の疾患の患者の様々な組織で見られる4977塩基対の変異欠落が起こることを示した。(「ALS患者の脳におけるミトコンドリアDNA欠損変異レベルの上昇(Mitochondrial DNA deletion mutation levels are elevated in ALS brains)」、Mol. Neurosci. 11(113):2507-9)。実際、mtDNA⁴⁹⁷⁷の蓄積は、健康な年配の人達の脳、心臓、筋肉中に認められており、このことはこれらの組織における加齢プロセスへの寄与を示唆している(Soong and Amheim, 1995, Methods Neurosci, 26:105-28)。このように、異質遺伝子型の「若い」ミトコンドリアDNAを有するクローン化組織は、患者自身の細胞よりも加齢に関係したミトコンドリアの変異がないことによって利点を提供する。

【0037】

DNA修復メカニズム及びヒストンが相対的に欠如しているために、ミトコンドリアDNAはゲノムDNAよりも加齢に関係した変異に対してより影響を受け易いと信じられている(Dhaliwalら、2000)。しかしながら、母系に伝わる遺伝性ミトコンドリア変異も存在して特定の組織で発現する。これは本出願のクローン化及び組織工学技術によって有利に作用する。

【0038】

例えば、レーバー遺伝性視神経傷害(LHON)は稀にみられる視神経の疾患であり、これは影響を受けた殆どの患者の法的(legal)盲の原因となる。これは母系に伝わるミトコンドリアDNAの変異によるものであるが、しかし、この疾患は一般に人生の後半になって発現する(最初の眼の突然の視力喪失は、一般に10-50才の時に起こる)(Zickermann、1998、「病原性ヒトミトコンドリア変異ND1/3460の分析、及びその近傍に厳密に保存された残基の変異... (Analysis of the pathogenic human mitochondrial mutation ND1/3460, and mutations of strictly conserved residues in its vicinity...), Biochem. 37(34):11792-6」。アイオワ大学の分子眼科学研究所の研究者達は、変異を検出する改良された方法を開発し、それはLHONの診断に用いられている。

【0039】

本発明のクローン化、組織工学、移殖技術は、特にミトコンドリアの変異に関連した疾患組織を取り替えるのに価値があり、その場合、クローン化組織は一般的に同質遺伝子型核DNAを所有しているが、ミトコンドリアDNAは異質遺伝子型である。従って、例えば、LHON患者に移殖するための作り上げた神経組織は、ミトコンドリアDNAの遺伝子治療を遂行しながら、同時に罹患した視神経組織の取り替えも行なう。

【0040】

上記のように、該供与体細胞は、少なくとも1つの異種遺伝子の移入、又は、少

なくとも1つの元の遺伝子の分断又は置換によって、核の移植に先立ち遺伝的に変更を加えられてもよい。そのようなゲノムの修飾は、移殖を受ける受容体自身のゲノムが必要なタンパク質を発現できない場合、又は、変異したタンパク質を発現し、その結果元来の組織又は細胞が正しく機能しないような場合に、特に有用である。これとは別に又はこれに追加して、もし事前の免疫適合性試験で、例えば、ミトコンドリアDNAの異質遺伝子型又は異種の差異によって、ある種の拒絶が関与することが示唆された場合は、核移植に先立って、供与体細胞を、免疫拒絶を妨げる又は減じるようなタンパク質を発現する遺伝子で形質移入してもよい。

【0041】

本発明の方法は、特に自己ペプチドの異常発現に基づく自己免疫疾患によって損傷した組織を修復し置換する場合に、特に有用である。例えば、原発性胆管肝硬変(PBC)は肝臓内胆管の進行性の炎症性閉塞によって特徴付けられる慢性自己免疫肝臓疾患で最終的には肝硬変へ進行する(Melegħr、2000、「小児胆管肝硬変におけるピルビン酸脱水素酵素及びクエン酸合成酵素のサブユニットに対する自己抗体(Autoantibodies against subunits of pyruvate dehydrogenase and citrate synthase in a case of paediatric biliary cirrhosis)」、Gut 2:753-6)。疾患は自己ミトコンドリアタンパク質への耐性低下を特徴とし、高濃度の抗-ミトコンドリア抗体と関係していて、その抗体は当業者に公知の技術によって検出し得る(Leungら 1991、「原発性胆管肝硬変の診断におけるデザイナー組み換えミトコンドリア抗原の利用(Use of designer recombinant mitochondrial antigens in the diagnosis of primary biliary cirrhosis)」、Hepatol. 15(3):367-72)。肝臓移殖は、疾患の進行した患者にとって治療法の選択肢の1つになっている(Sebagħ、1998、「肝臓移植後の原発性胆汁性肝硬変の再発予測の組織学的特徴(Histological features predictive

of recurrence of primary biliary cirrhosis after liver transplant)」、Transplantation, 65(10):1328-33)。

【0042】

PBCの抗-ミトコンドリア抗体は、一般的に、ピルビン酸脱水素酵素複合体(PDC)のE2サブユニットの制限エピトープを認識するが、この複合体は、正常な場合にはミトコンドリアに運ばれ、内部の膜と緩やかに結合している、核にコードされたタンパク質である。PDCタンパク質は、通常は免疫システムからは遮蔽されているが、PBC患者は胆管の上皮細胞の表面にPDC-E2を発現することが示されている(Joplinら、1992、「原発性胆管肝硬変患者の肝臓及び門脈リンパ節へのジヒドロリポアミドアセチルトランスフェラーゼ(E2)の分布：免疫組織化学的研究(Distribution of dihydrolipoamide acetyltransferase (E2) in the liver and portal lymph nodes of patients with primary biliary cirrhosis: an immunohistochemical study)」、Hepatology, 14:442-7)。このように、いかにしてPBCが発病するかについての1つの説は、核の遺伝的变化、即ち、E2を外膜へ導く主配列における突然変異のような変化が、PDC-E2のミトコンドリアへの輸送に影響を与えているというものである(Bjorkland and Totterman、1994、「原発性胆管肝硬変は自己免疫疾患か？(Is primary biliary cirrhosis an autoimmune disease?)」、Scand. J. Gastroenterol. 29 Suppl. 204:32-9)。

【0043】

このように、PBCの場合、移植のための肝細胞及び組織の産生に先立ち、自己免疫疾患に繋がる核の欠陥に対して、核移植により産生した細胞を修正することができる。即ち、主配列の置換による修正である。結果として、PBC患者への移殖用クローン化細胞及び組織は、拒絶を避けるために最も免疫適合性が高い

組織を提供するのみでなく、自己免疫疾患それ自身に関連した核遺伝子を修復する、遺伝子治療を遂行するものでもある。本発明の方法は、疾患の過程に關与する核の突然変異が同定されている疾患を有する、いかなる組織の移植及び遺伝子治療に対しても同様に価値がある。例えば、火傷、血液障害、ガン、慢性の痛み、糖尿病、小人症、てんかん、心筋梗塞などの心疾患、血友病、不妊症、腎臓疾患、肝臓疾患、変形性関節症、骨粗鬆症、発作、情動障害、アルツハイマー病、酵素欠損、ハンチントン病、低コレステロール症、上皮小体機能不全症、免疫不全、ルーゲーリッグ病、黄斑消失、多発性硬化症、筋ジストロフィー、パーキンソン病、リウマチ性関節炎及び脊髄損傷などの治療が挙げられる。

【0044】

これに關して、本発明者らは、また、本発明のクローン化方法が老化細胞の若返りを可能にするということを見出し、それによって、クローン化組織の遺伝的年齡について、前記の全てのことがらを見出したことについても注目すべきである。米国特許出願番号第09 / _____号の開示は、本発明との共有であるが、核移植を用いた一次細胞の若返りに關しての発明者らの驚くべき觀察を報告しており、本明細書に全文を取り込んでいる。クローン化の過程が老化した細胞を若返らせるという発見は、1つ以上の異種遺伝子を発現する、又は1つ以上の遺伝子がロックアウトされる治療用組織を設計するのに特に關係している。なぜなら、そのような組織は同じ遺伝的背景を持った1次細胞をクローン化又は再クローン化することによって、產生することができるからである。

【0045】

受容体細胞のミトコンドリアDNAに、当業者に公知の方法を用いて変更を加えることも、また、可能である(Wheelerら、1997、「マウスミトコンドリアゲノムの外因性遺伝子の挿入による修飾(Modification of the mouse mitochondrial genome by insertion of an exogenous gene)」、Gene 198(102:203-9); Yamaokaら、2000、「マウスミトコンドリア無DNA細胞のラットミトコンドリアDNAによる完全な再増殖... (Complete repopulation of mouse m

mitochondrial DNA-less cells with rat mitochondrial DNA...」、Genetics 155 (1): 301-7を参照)。これは、移殖用の免疫適合性細胞又は組織を産生するために有用と思われ、特に、ミトコンドリア抗原がクローン化細胞によって表示され、クローン化細胞が核の供与体に再移殖される際、免疫応答を発生する場合に有用である。或いはまた、もし予備試験の結果、ミトコンドリアDNAの違いによって移植拒絶が関与することが示される場合は、特に異種ミトコンドリアの場合、好適な受容体細胞がミトコンドリア適合性に基づいて特別に選択されてよい。

【0046】

いかなる動物も、開示された方法によって産生された細胞及び組織からの恩典を受けるものの、好ましい移殖の受容体はヒトである。意図した移殖の受容体がヒトの場合、核移植、即ち、該ヒトからいずれかのヒト受容体卵母細胞へ繊維芽細胞核が移植された後、奇形腫が形成される。なぜなら、発生のために細胞をリプログラム(reprogram)するのは、供与体(意図した移殖の受容体)のゲノムであるからである。ヒトの核供与体及び受容体から作られる奇形腫は、スキッド及びヌードマウスのような免疫無防備状態の動物の中に形成され、そこから単離される。

【0047】

上記のように形成された奇形腫を除去し、胚葉の形成を検査する。そのような胚葉を更に分割し、又は細胞型が明白になるまで分化させる。次いで、明白な細胞型を使用して移植用の組織を作り上げる。好ましくは、該組織は、平滑筋、骨格筋、心筋、皮膚、腎臓及び神経組織のグループから選択される。更に開示された方法によって産生された組織及び細胞も本発明に含まれる。

【0048】

ヒトの「治療用クローン化」の概念は、患者の1つの細胞、即ち、繊維芽細胞から、核を取り出した受容体の卵母細胞又は他の好適な受容体の細胞に、核を移植することである。リプログラミング(reprogramming)の後、供与された体細胞の核は全形成能を再取得し、胚発生のサイクルを開始することが

できる。生じた胚に由来する多分化能を有する幹細胞は、患者の核ゲノムを保持し、次いで、損傷を受けた心臓組織を置換するための心筋細胞、糖尿病患者のインシュリン生成 β -細胞、骨関節症のクロンドロサイト(chondrocyte)、パーキンソン病治療のドーパミン作動性ニューロンのような、置換用の細胞に分化するように誘導される。

【0049】

本発明の方法は、これらの様々な組織の移殖に伴う免疫応答を取り除くか、又は、少なくとも実質的に緩和するものであり、従って、サイクロスポリン、イモラン、FK-506、グルココルチコイド、及びそれらの変成体のような免疫抑制剤の必要性を除外するものである。これらの免疫抑制剤は、ガン、感染症、腎疾患及び骨粗鬆症を含む広範囲にわたる重大な合併症の危険性を有している。しかしながら、少なくともある場合には、少なくとも初期に抗-拒絶反応薬剤を使用することがやはり好ましい。上記で考察したように、移殖された細胞は免疫学的には移殖の受容体の細胞とは同一ではないかもしれないが、それでも受容体の1つの細胞の核は、供与体として機能する。これは、特に異種ミトコンドリアの場合に、ミトコンドリアDNAの違いによって引き起こされるものであり、又は移入された異種DNAの結果もたらされる、又は核移植にしばしば影響する人工的な環境による抗原の差によって引き起こされ得る。特に、そのような環境は、胚の発達の間存在する細胞環境と擬似的に同一ではない。

【0050】

例えば、長期間培養された細胞は、培養の結果抗原的には異なっているかもしれないということは公知である(「抗原ドリフト」と呼ばれる現象)。従って、移植に先立って、例えば、可溶性のCD40、CD40-リガンド拮抗剤を用いた処理、低温培養、供与体抗原をマスクする抗体の使用、又は紫外線照射(例えば、islets)によって細胞又は組織を耐性にすることが依然好ましい。

【0051】

制限するものではないが、本発明の範囲と精神を以下の考察及び実施例を参照して例示する。

【0052】

実施例1

本実験は、発症前の大型動物：ウシ（*Bos taurus*）において、核移植により産生した細胞の免疫適合性を試験する目的で計画された。

【0053】

月齢約8ないし10ヶ月（体重約500ないし1000ポンド）のホルスタイン種去勢牛の成牛3頭を、Thomas Morris社（Maryland）から購入し、Massachusetts大学のSouth Deerfield農場（Amherst）へ出荷した。核移植のための繊維芽細胞を採取するために、各動物から刻耳により皮膚生体組織を得た。増殖緑色蛍光タンパク質（enhanced green fluorescent protein: eGFP）をコードするレポーター遺伝子を発現するプラスミドを細胞に移入し、移入された細胞をネオマイシンを用いて選別した。PCR及び/又はFISHにより分析された精製した細胞を、すでにNature（1998）Biotechnol. 16: 642 - 646（本明細書に引用して取り込まれている）に記載されたようにして、核移植に用いた。

【0054】

次いで、少なくとも1つの細胞を有する単離した胚、又は、ウシ胚盤胞/幹細胞から産生した胚盤/内細胞塊を、供与体去勢牛の腰部筋膜（各動物の2部位に（同一動物の）実験用幹細胞、2部位に（同一動物の）実験用胚盤、2部位に内細胞塊、及び4部位に（異なる動物の）対照幹細胞）に注入する。2ヵ月後奇形腫について筋肉を検査する。同定した腫瘍は全て除去し組織学的な分析を行う。

【0055】

この操作を、キシラジン20mg/酒石酸ブトルファノール8mgを尾部静脈に投与したIVを用いて、立位の動物に実施する。腰部筋膜領域をクリップし、2%のリドカインを腰部全体に局所麻酔的に投与して、外科的に調製する。動物には、予防手段として術後3日間、抗生物質（セフィロファール塩酸塩50mg/cc、1cc/100ポンド）を投与すべきである。手術部位の苦痛及び膨潤を抑えるために、術後直ちに、フルニキシメグルミン・カプセル、1cc/100ポンドを筋肉内又は腎嚢下に単独注射する。もし奇形腫の形成が腰部筋膜に見

られない場合は、他の部位、例えば皮下を分析する。

【0056】

「異なる動物」の幹細胞とは対照的に、「同一動物」の幹細胞は宿主（核の供与体）動物中に生き残る、又は、外部のミトコンドリアペプチドに対する細胞毒性を有するT細胞の応答又は他の免疫反応に依存して、より活発に又は長く生き残ることが期待される。更に、3つの胚葉、即ち、外胚葉、中胚葉及び内胚葉由来の全ての細胞が、「同一動物」の奇形腫の中に見られることが期待される。

【0057】

実施例2

本実施例は、免疫無防備状態の動物モデルにおける奇形腫形成を試験する目的で計画した。本実施例は、分化した細胞を産生して単離し、そして移植のための作り上げた組織を設計するために、移植を必要とする患者からの、核移植によって産生しクローン化した細胞を、SCIDマウス又は他の免疫無防備状態の動物内で増殖する方法に関する。

【0058】

GFPを移入したES細胞を、2頭のホルスタイン種去勢牛の成牛から誘導した（2つの異なるES細胞系統を各動物から誘導した）。ICMを12日令の芽細胞嚢子から誘導した。

【0059】

細胞調製及び注入手順：

細胞を（いずれも約100細胞以下の細片に）粉碎し、1ml容量の注射器に、各200マイクロリットル、好ましくは100マイクロリットルずつ装填した。

【0060】

ICMを機械的に単離し、1ml容量の注射器に100ないし150マイクロリットルずつ装填した。

【0061】

細胞を、HECM肝臓中で室温にて保存した。

【0062】

注入操作には22ゲージの針を使用した。細胞は、SCIDマウスの後脚の骨格筋中に注入した。

【0063】

マウス番号	処理	量	観察結果
1	雌ウシ番号25から、 14日目、ICM	6	100
2	雌ウシ番号22から、 14日目、ICM	9	注射器内に3ICMが残っていることが認められた。
3	サル、種交差 (ウシへ)、 4-8細胞胚	90	-
4	ES 22. B	1プレート (30mm)	-
5	ES 22. B	3プレート	-
6	ES 22. C	1プレート	-
7	ES 22. C	3プレート	-
8	ES 25. E	1プレート	-
9	ES 25. E	3プレート	-
10右	ES 25. F	1プレート	-
10左	ES 25. F	3プレート	-

【0064】

SCIDマウスの骨格筋に注入されたウシ幹細胞及びICMを、7ないし8週後(細胞を更に長くそのままにしておくか、又はより短期間で取り除くことは可能であるが)回収した。ES細胞の注入を受けたマウス(マウス番号7及び9)2匹に、小さな結節性病変を同定した。

【0065】

総合検査：

2 x 2 mmのサイズの乳白色の結節を、マウス番号7の坐骨神経近傍の右後脚から取り出した。これは、ES 22. C. の3つのプレートの注入に対応する。

1 x 1 mmサイズの乳白色の結節を、マウス番号9の筋肉組織内に同定した。これは、ES 25. F. の3つのプレートの注入に対応する。

【0066】

組織学的分析：

マウス番号7： 奇形腫の組織学的切片を、ヘマトキシリン及びエオシン（H & E）、サフラニン - O、並びにシトケラチン（AE1 / AE3）及びアルファ平滑筋アクチン抗体を用いた免疫細胞化学を用いて分析した。

【0067】

H & E： 注入された細胞は、骨格筋組織内に丸い組織塊を形成した。奇形腫は、中心に細胞碎片を有する、4つの異なったサイズの区画（compartments）から成っていた。組織形成は各区画の壁上に認められた（データは示されていない）。奇形腫の中に、上皮細胞（円形核）及び間質細胞（紡錘形核）が認められた（データは示されていない）。軟骨、硬骨又は脂肪組織の形跡はなかった。

【0068】

サフラニン - O： 染色試験で陰性の結果が得られ、軟骨の組織形成はないことが示唆された。

【0069】

AE1 / AE3抗体を用いた免疫細胞化学： 奇形腫の切片は、上皮細胞の染色試験に陽性の結果を示した（データは示されていない）。

【0070】

アルファ平滑筋アクチン抗体を用いた免疫細胞化学： 筋肉組織の染色試験に陽性の小さい島が、奇形腫内に認められた（データは示されていない）。取り出された組織は、上皮、平滑筋及び間質の組織要素を示した。奇形腫の中に、軟骨、硬骨及び脂肪組織は同定されなかった。

【0071】

マウス番号9： 取り出した結節の組織学的分析は、骨格筋塊を示した。顕微鏡による検査では、他の組織形成は認められなかった。

【0072】

実施例3

治療的なクローン化の全ての潜在能力を実現するためには、より複雑な組織及

び器官をイン・ビトロで再構築することが重要であろう。クローン化は最も重要な問題 - 免疫適合性 - を取り除くか、或いは著しく軽減すると思われるが、細胞を結合して機能構造を産生し又は再生する仕事は、依然残されている。

【0073】

例えば、心筋梗塞は、西欧の国々の入院患者の間で発生する最も一般的な診断の1つである。個々の又は小グループの心筋細胞の注入は、ある種の局所的な梗塞の処置の助けにはなるものの、はん痕形成、心臓破裂及び他の合併症の危険が大きい、より進行した虚血性障害を持つ患者においては、価値があるものとは思えない。組織工学は、細胞を組織化して、心臓の損傷部を修復するために使用し得る三次元の心筋の「パッチ」を作る可能性を提供する。心筋及び皮膚や血管の代用品のような比較的簡単な他の組織に対しては、組織工学は、ポリマーの骨組み塊又はシートの上に細胞を接種することを含み得る。腎臓、肝臓又は心臓全体さえも含むような、より複雑な生命器官の産生には、組み合わせが極めて複雑な異なる細胞型及び物質を組み立てることが必要になる。

【0074】

動物モデルにおいて用いる目的で組織を作り上げるためには、上記のようにウシ内細胞塊 / 胚盤 / 幹細胞を産生し、ヌード又はSCIDマウスの後脚筋肉に注入する。注入から7ないし8週後得られる奇形腫を除去し、種々の細胞型を単離して培地中で培養する。平滑及び / 又は骨格筋、心筋細胞のシート又は「パッチ」、弾性を有する軟骨、(毛嚢の配置を含む)皮膚、及び尿を分泌するミニチュア腎臓を含む腎臓を含む多数の組織が、クローン化した細胞から産生することができる。これらの組織 / 器官の構築物は、次いで供与体細胞の生体組織を採取した元の成体動物へ再移植される。

【0075】

以下のデータは、核DNAに対しては同質遺伝子型であり、ミトコンドリアDNAに対しては異質遺伝子型の組織が安定な移植体を形成し、核移植の宿主において免疫応答を起こさないことを示す。このことは、そのようなクローン化細胞及び組織が、多くの医学的な応用に対して有用性を有することを支持するとともに、種の異なるマウスでミトコンドリアの組織適合性抗原に反応して認められる

ミトコンドリア抗原に対する、細胞毒性を有するT細胞の応答を想定すると、極めて驚くべきことである。

【0076】

細胞培養及び接種

ウシの腎臓、心臓、骨格筋、軟骨及び皮膚からの細胞を、クローン化した異質遺伝子の(対照の)40日令の胎児から採取し、別々にイン・ビトロで増殖した。

【0077】

腎臓：

腎臓組織を鋭利な腱切り挟みで小片(1mm²)に裁断した。腎臓組織の断片をコラーゲナーゼ・ディスパーゼ(1mg/ml)を用いて消化した。細胞を回収し、リン酸塩緩衝食塩水で洗浄し、培養皿に固定した。DMEM、HEPES 3.1g/l、Pen/Strep(5ml/500ml)、L-グルタミン146mg/L及びFBS10%(Sigma社、St. Louis、MO)から成る培地で細胞を増殖した。

【0078】

筋肉：

心筋及び骨格筋を、10%胎児ウシ血清を追加した、Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM、HyClone Laboratories社、Logan、Utah)を用いた組織体外移植技術によって処理した。細胞を、5%のCO₂を含有し37℃に維持された加湿雰囲気の中でインキュベートした。2つの筋細胞型を別々に増殖し、所望の細胞数を得た。細胞をトリプシン処理し、収集し、洗浄し、そして計測して接種に供した。

【0079】

ポリマー：

ポリグリコール酸ポリマーの不織布シート(1×2cm)を細胞送達ベヒクルとして用いた。ポリマーメッシュは、直径15µmの繊維及び繊維間距離0-200µmで構成され、空隙率95%であった。この骨格は、8ないし12週間で

加水分解により崩壊するように設計された。ポリマーを酸化エチレン中で殺菌し、細胞を発送するまで殺菌条件下に置いた。

【0080】

埋め込み (implantation)

無胸腺マウス：

ウシ胎児組織から得た細胞がイン・ビボで組織を形成するかどうかを確認するため、ポリマー骨格に接種した心筋細胞、骨格筋細胞及び軟骨細胞を、無胸腺マウスの背側の皮下空間に移植した。マウスを移植後1週間、1ヶ月及び3ヶ月で殺処理し、分析に供した ($n = 4$)。

【0081】

去勢牛： 各細胞型を、別々に、ポリグリコール酸ポリマー ($1 \times 2 \text{ cm}$) 上に 50×10^6 細胞 / cm^3 (細胞型当たり $n = 4$) の濃度で接種した。細胞 - ポリマー骨組みを、細胞をクローン化した同一の去勢牛の側腹部の皮下空間に移植した。対照の (核異質遺伝子型の) 胎児から得た細胞は、その去勢牛の反対側の側腹部に移植した。6週間後に全ての移植体を取り出し、分析に供した。

【0082】

分析

無胸腺マウスへの埋め込み：

ホルマリン固定したパラフィン包埋組織の 5μ の切片を裁断し、ヘマトキシリン及びエオシン (H & E) で染色した。取り出した組織の細胞型を同定するために、特異的な抗体を用いて免疫細胞化学的な分析を実施した。アルデヒド褐素 (fuschin) - アルシアン (alcian) ブルーを用いた組織化学的分析、単クローン性抗コラーゲン II (Chemicon社、St. Louis、MO) を用いた免疫細胞化学的研究を行なって、作り上げた軟骨の構造を同定した。単クローン性筋節性トロポミオシン (Sigma社、St. Louis、MO) 及びトロポニン I (Chemicon社、Temecula、CA) の抗体を用いて、骨格筋及び心筋の繊維をそれぞれ検出した。アビジン - ビオチン検出システムを用いて、免疫標識化を行なった。メチルグリーンを用いて、切片の対比染色を行なった。

【0083】

去勢牛への移植：

免疫細胞化学的及び組織学的分析：

ホルマリン固定したパラフィン包埋組織の5 μ の切片を裁断し、ヘマトキシリン及びエオシン(H&E)で染色した。取り出した組織の細胞型を同定するために、特異的な抗体を用いて免疫細胞化学的な分析を実施した。過ヨウ素酸シッフ試薬(Sigma社、St. Louis、MO)を用いた組織化学的分析、及び多クローン性抗アルカリ性ホスファターゼ及び抗オステオポンチン(Chemicon社、Temecula、CA)を用いた免疫細胞化学的研究を行なって、腎臓の細胞を同定した。単クローン性筋節性トロポミオシン(Sigma社、St. Louis、MO)及びトロポニンI(Chemicon社、Temecula、CA)の抗体を用いて、骨格筋及び心筋の繊維をそれぞれ検出した。アルデヒド褐素-アルシアンブルー及び単クローン性抗コラーゲンII(Chemicon社、St. Louis、MO)を用いて、軟骨組織の移植体を染色した。ケラチノサイトを同定するために、抗サイトケラチン5/6、AE1/AE3を用いた。気道上皮を検出するために、気管支纖毛抗体を用いた。免疫T及びB細胞を同定するために、抗CD6抗体を用いた。アビジン-ビオチン検出システムを用いて、免疫標識化を行なった。メチルグリーンを用いて、切片の対比染色を行なった。

【0084】

結果

密集状態に増殖した細胞を、ポリマーの骨組みとともに動物に移植し、合併症を伴うことなく取り出した。取り出した時点で移植体はそれぞれ元のサイズを維持しており、纖維症の兆候は認められなかった。

【0085】

去勢牛から回収した移植体：

組織化学的及び免疫細胞化学的分析：

組織学的検査の結果は、移植体全体にわたって広範囲にわたる血管新生を示し、ポリマー繊維の周囲には多核巨大細胞の存在が認められた。しかしながら、対

照の異質遺伝子型の骨組み全体にわたって、より多くの炎症細胞が存在した。移植組織（即ち、腎臓、骨格筋、心臓、軟骨細胞及びケラチノサイト）の組織細胞推計学的分析の結果は、クローン化組織型に対して、対照の移植体/構成体のリンパ球浸潤が統計学的に有意な（ $p < 0.05$ ；スチューデントのt-検定）増加を示すということを示唆した（データは示されていない）。このデータは、対照の移植対が初期の移植拒絶を起こしているということを示唆している。

【0086】

作り出した（engineered）腎臓組織：

組織学的に糸球体様構造が、取り出した骨組みに認められた（データは示されていない）。過ヨウ素酸シッフ試薬を用いた組織化学的分析の結果、腎臓管状細胞を同定した（データは示されていない）。アルカリホスファターゼ抗体を用いた免疫細胞化学的研究の結果、基部管状細胞の存在を確認した。オステオポンチン抗体を用いた研究の結果は、ウシ組織系においては陰性であった。

【0087】

作り出した筋肉組織：

取り出した心筋及び骨格筋細胞の移植体は、いずれの場合も空間的に配向した筋繊維を示した（データは示されていない）。トロポミオシン抗体を用いた免疫細胞化学的研究の結果、構成体の中に骨格筋繊維を同定した（データは示されていない）。抗トロポニンIによる心筋繊維の染色は陽性であった（データは示されていない）。

【0088】

クローン化組織のmtDNAが受容体の卵母細胞からのものであるということを証明するため、核供与体及びクローン化した胚のmtDNAの配列を調べた。配列のデータから、mtDNAは実際に異なっており、特に、核供与体と比較して、クローン化組織において4つの異なった対応するヌクレオチドがあるd-ループ領域において異なるということが確認された。

【0089】

実施例4

上記の結果は、異質遺伝子型背景への核移植によって、移植のためのクローン

化組織を産生することが可能であること、及び、クローン化した奇形腫又は胚細胞の培養から単離し又は構築した分化した細胞及び組織を、著しい拒絶の兆候なしに、供与体動物に再移植することができることを示唆している。核移植技術が、ミトコンドリアの不適合な組み合わせにも拘わらず、細胞及び器官の移植に関与する免疫応答を除外できる可能性を有するということを、更に確認するため、本発明者らは、次に、異なるミトコンドリア背景を有する、完全に生育したクローン間の移植を実施する。

【0090】

これらの実験のために、相互皮膚移植を試験するための2つのグループの動物群：(1) Trans Ovaの4頭のクローン化雌ウシ(動物CL53-8、CL53-9、CL53-10及びCL53-11)、及び(2) LSUの5頭のクローン化ヤギ、を用意した。試験を実施するために、2つのグループの動物間で相互皮膚移植体(直径約2~3cm)を交換する。自己移植体は陽性の対照となるのに対して、遺伝子的に無関係な動物からの移植体は陰性の対照となる。移植体について免疫拒絶の兆候を監視し、もしそれらが壊死し始め、その部位が班点を示した場合は取り除く。もし拒絶が認められた場合は、次いで第二組の移植体を移植し、結果を確認するが、この場合は程度が加速されて拒絶される筈である。

【0091】

全てのクローン化雌ウシ及び全てのクローン化ヤギは、同一の核ゲノムを有する。しかしながら、mtDNAは母系遺伝によって伝達されるので、動物は、実際、異なった卵母細胞由来のミトコンドリアを有する遺伝的キメラであると予想される(このことは、数多くのクローン化動物についてすでに記載されている)。動物のこれらのパネルを「区別」している多型性を、皮膚移植体の生存/拒絶と直ちに関連づけることができるように、関与する全ての固体からのmtDNAの配列を得るための実験が進行中である。もし相関があるなら、標的ペプチドを同定し、そのペプチドをコードしている関与するmtDNAを単離するためのイン・ビトロ・アッセイを実施する。

【0092】

ミトコンドリアDNAの多型性を決定することに照準を当てた実験は、また、一般的に、mtDNAのキメラ現象のレベルについての情報を明らかにするであろう。例えば、mtDNAの配列が明らかになれば、多型性の最も著しい領域、最も可能性があるのはD-ループであるが、を選択し、この染色体部分を増幅しクローン化する。次いである範囲のクローンの配列を調べ、この領域の変化の程度を決定する。ミトコンドリアに対して異質遺伝子型である、十分な数の核クローンからのmtDNAの配列を用いて、キメラ現象のレベルの正確な予測を決定することができる。血液サンプルも、また、一定期間ごとに収集し、各種の免疫学的アッセイを行なう予定である。組織適合性については、そのパネル内で異質遺伝子型の細胞を用いて、標準のMLC及びCMLを行なう予定である。

【0093】

考察

上記に提示されたデータによって示されるように、本発明は、組織工学及び移植の目的のために、クローン化した分化した細胞及び組織を得ることが可能であるということを例示するものである。本発明は、また、外来性のミトコンドリアペプチドの故に、移植拒絶が予想されるという事実にも拘わらず、異質遺伝子型ミトコンドリアを有する、核移植によって産生したクローン化細胞を用いて、安定な移植を達成し得るということを例示するものである。マウスにおけるMt aシステム及びラットに同定される同様のシステムの観点からみて、本方法を用いて作り上げたウシの組織が、核供与体に再移植された場合拒絶されないということは驚くべきことである。

【0094】

何故本発明のクローン化した組織に移植拒絶が見られないかについては、いくつかの理由があり得る。いかなる特別の理論にもとらわれることなしに、1つの仮定は、M t f、M i H A及び他のミトコンドリア抗原を提供するげっ歯類における特別のM H C分子が、高級哺乳動物から進化したというものである。実際、M t f及びM i H Aペプチドを提供するH - 2 M 3 a、マウス・クラスI分子は、マウス染色体17上のH - 2コンプレックスのテロメア末端にある、M 3遺伝子によってコードされている(Fischer Lindahlら、「マウスの

母系的に受け継がれた抗原：モデル移植抗原 (Maternally transmitted antigen of mice: a model transplantation antigen)」、Annu. Rev. Immunol. 1991; 9: 351 - 72)。染色体のこの領域における多くの遺伝子は、マウスとヒトの間で保存されているものの、例えば、この領域のMHCクラスI遺伝子は、種間から独立して分岐し進化しているように見える (Jonesら、1999、「マウスの基部H2-M領域におけるMHCクラスI及び非クラスI遺伝子の構成 (MHC class I and non-class I gene organization in the proximal H2-M region of the mouse)」、Immunogenetics 49(3): 183 - 95)。実際、H2-M領域はL1の反復が多く、ある仮説によれば、進化の柔軟性と関連している (Yoshinoら、1997、「マウス染色体17上の遠位MHCクラスI領域のゲノム進化 (Genomic evolution of the distal MHC class I region on mouse chromosome 17)」、Hereditas 127(1-2): 141 - 8)。

【0095】

もう一方の仮説は、恐らく付加的なメカニズムが高等哺乳動物において進化したという説であり、そのメカニズムは、特に、ヒトの加齢はしているがそれ以外は健全な多くの組織が、加齢に関連したミトコンドリアの突然変異を含むことが示されていることに見られるように、MHCの情報の中で、ミトコンドリアの抗原に対する免疫反応を調節する (Soong及びAmheim、1995)。実施例4に記載した進行中の実験は、一定の割合のmtDNA中に存在する多形現象を同定することに特に役立ち、また、ミトコンドリアの抗原に対して異常を表示し、それを認識するに至るまでの間、mtDNAの中に起こる変化を同定するための有用なモデルシステムとして、機能するものと思われる。

【0096】

いずれにせよ、本発明以前に、げっ歯類のミトコンドリアの組織適合性について何が公知であり、何が理解されていたかに拘わらず、本明細書に記載された治

療用のクローン化ウシ組織を用いて達成された結果は、他の有蹄類及びより高級な哺乳動物に展開できると予測することができる。このように、本発明は、移植という文脈の中で、核移植によって発生させたクローン化組織の治療的な有用性を確証する。更に、同質遺伝子型の核背景の中で、異質遺伝子型の及び異種ミトコンドリアタンパク質の免疫適合性を試験するためのモデルを提供することにより、本発明は、哺乳動物内及び哺乳動物間に存在し、ミトコンドリアの安定性及び種ごとの別々の進化に貢献している免疫調節システムを解読する道の仕上げを行なうものである。

【國際調查報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/24398
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12N 15/00, 15/09, 15/63, 5/00 US CL : 800/21, 22, 25, 8, 13; 435/455, 325, 320.1; 424/93.1, 93.21 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. : 800/21, 22, 25, 8, 13; 435/455, 325, 320.1; 424/93.1, 93.21 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) WEST, NPL, MEDLINE search terms: nuclear transfer, cloning, mitochondria, immune, heterologous, xenogeneic, allogeneic, cell transplantation		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	STICE et al. Cloning: New Breakthroughs Leading to Commercial Opportunities. Theriogenology. 1998, Vol. 49, pages 129-138, see entire document.	1-52
Y	WOLF et al. Nuclear Transfer in Mammals: Recent Developments and Future Perspectives. Journal of Biotechnology. 27 October 1998, Vol. 65, Issue 2-3, pages 99-110, see entire document.	1-52
Y	US 5,453,366 A (SIMS et al.) 26 September 1995, see entire document.	1-19
<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 *B* earlier document 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 20 NOVEMBER 2000		Date of mailing of the international search report 04 JAN 2001
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer JILL D. MARTIN JOYCE BRIDGERS PARALEGAL SPECIALIST CHEMICAL MATRX Telephone No. (703) 308-0196 <i>Joyce Bridgers</i>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/24398

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAGAO et al. Heterologeous Mitochondria DNA Introduced by Nuclear Transfer Influences the Developmental Ability of Mouse Embryos In Vitro. Theriogenology. 01 January 1997, Vol. 47, Issue 1, page 233, see entire document.	1-19, 52
A	LANZA et al. Successful Transplantation of Encapsulated Porcine Islets into Diabetic Rats, Rabbits, and NOD Mice Without Immunosuppression. Cell Transplantation. 10 September 1996, Vol. 5, Issue 5S-2, page 52, see entire document.	1-55
A	LANZA et al. Immunoisolation: At a Turning Point. Immunology Today. March 1997, Vol. 18, No. 3, pages 135-139, see entire document.	1-55

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コ-ト' (参考)
A 6 1 K	35/34	A 6 1 K	4 C 0 8 7
	35/36		4 H 0 4 5
	48/00	C 0 7 K	
C 0 7 K	16/30	C 1 2 Q	
C 1 2 N	5/10	G 0 1 N	Z
C 1 2 Q	1/02	C 1 2 N	Z N A A
G 0 1 N	33/53		B

(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y ,
 D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I
 T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J
 , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L ,
 M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K
 E , L S , M W , M Z , S D , S L , S Z , T Z , U G
 , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D ,
 R U , T J , T M) , A E , A L , A M , A T , A U ,
 A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C
 N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , E E , E S
 , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U ,
 I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K
 R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V
 , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O ,
 N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S
 I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A
 , U G , U S , U Z , V N , Y U , Z A , Z W

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA54 CA04 DA02
 GA11 HA11
 4B063 QA01 QA19 QQ08 QR73 QS31
 4B065 AA90X AA99Y AB01 AC20
 BA01 CA46
 4C084 AA13 CA18 ZA011 ZA361
 ZA811 ZA891 ZA941
 4C086 AA01 AA02 EA16 ZA01 ZA36
 ZA81 ZA89 ZA94
 4C087 AA01 AA02 BB41 BB45 BB47
 BB48 BB63 BB64 BB65 ZA01
 ZA36 ZA81 ZA89 ZA94
 4H045 AA11 CA40 DA75 EA51 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2003509028A5	公开(公告)日	2007-11-08
申请号	JP2001522404	申请日	2000-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	先进细胞技术公司		
申请(专利权)人(译)	先进细胞技术公司		
当前申请(专利权)人(译)	先进细胞技术公司		
[标]发明人	ランザロバート ウエストマイケル		
发明人	ランザ、ロバート ウエスト、マイケル		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K31/711 A61K35/23 A61K35/30 A61K35/34 A61K35/36 A61K48/00 C07K16/30 C12Q1/02 G01N33/53 C12N5/10		
CPC分类号	A01K67/0271 C12N2517/04 A61K35/12		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K31/711 A61K35/23 A61K35/30 A61K35/34 A61K35/36 A61K48 /00 C07K16/30 C12Q1/02 G01N33/53.Z C12N5/00.B		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA54 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/GA11 4B024/HA11 4B063 /QA01 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QR73 4B063/QS31 4B065/AA90X 4B065/AA99Y 4B065 /AB01 4B065/AC20 4B065/BA01 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/CA18 4C084/ZA011 4C084/ZA361 4C084/ZA811 4C084/ZA891 4C084/ZA941 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/ZA01 4C086 /ZA36 4C086/ZA81 4C086/ZA89 4C086/ZA94 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB41 4C087/BB45 4C087/BB47 4C087/BB48 4C087/BB63 4C087/BB64 4C087/BB65 4C087/ZA01 4C087/ZA36 4C087 /ZA81 4C087/ZA89 4C087/ZA94 4H045/AA11 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA51 4H045/FA74		
优先权	60/155107 1999-09-22 US 60/152354 1999-09-07 US		
其他公开文献	JP2003509028A		

摘要(译)

本发明涉及使用核转移和克隆技术产生用于移植和组织工程的免疫相容性组织和细胞的方法。本发明还包括确定对表达的转基因和组成细胞和组织的其他遗传操作对免疫相容性的影响的方法。