

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5846558号  
(P5846558)

(45) 発行日 平成28年1月20日 (2016. 1. 20)

(24) 登録日 平成27年12月4日 (2015. 12. 4)

(51) Int. Cl.		F I			
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/0775</b>	<b>(2010. 01)</b>	C 1 2 N	5/00	2 O 2 H
<b>A 6 1 K</b>	<b>35/34</b>	<b>(2015. 01)</b>	A 6 1 K	35/34	
<b>A 6 1 P</b>	<b>21/00</b>	<b>(2006. 01)</b>	A 6 1 P	21/00	
C 1 2 N	15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/00	Z N A A

請求項の数 17 (全 37 頁)

(21) 出願番号	特願2011-554336 (P2011-554336)	(73) 特許権者	504132272
(86) (22) 出願日	平成22年7月9日 (2010. 7. 9)		国立大学法人京都大学
(65) 公表番号	特表2012-532585 (P2012-532585A)		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(43) 公表日	平成24年12月20日 (2012. 12. 20)	(74) 代理人	100080791
(86) 国際出願番号	PCT/JP2010/062023		弁理士 高島 一
(87) 国際公開番号	W02011/004911	(74) 代理人	100125070
(87) 国際公開日	平成23年1月13日 (2011. 1. 13)		弁理士 土井 京子
審査請求日	平成25年6月25日 (2013. 6. 25)	(74) 代理人	100136629
(31) 優先権主張番号	61/270, 479		弁理士 鎌田 光宣
(32) 優先日	平成21年7月9日 (2009. 7. 9)	(74) 代理人	100121212
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田村 弥栄子
		(74) 代理人	100122688
			弁理士 山本 健二
		(74) 代理人	100117743
			弁理士 村田 美由紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多能性幹細胞から骨格筋前駆細胞への分化誘導方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多能性幹細胞からPDGFR 陽性の中胚葉系細胞を製造する方法であって、前記多能性幹細胞を、無血清下、かつActivinA、BMPおよびIGF-1の存在下で培養することを特徴とする、方法。

【請求項 2】

PDGFR 陽性の中胚葉系細胞が原条中胚葉系細胞である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

BMPが、BMP2、BMP4およびBMP7から選択される少なくとも1つを含有する、請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

PDGFR 陽性の中胚葉系細胞から、Myf5陽性かつMyoD陽性である骨格筋前駆細胞を製造する方法であって、前記中胚葉系細胞を、無血清下、かつLiClおよびIGF-1の存在下で培養することを特徴とする、方法。

【請求項 5】

さらにShhの存在下で中胚葉系細胞を培養することを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

PDGFR 陽性の中胚葉系細胞が、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法により得られるものである、請求項 4 又は 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

多能性幹細胞から、Myf5陽性かつMyoD陽性である骨格筋前駆細胞を製造する方法であって、無血清下で以下の1)および2)の工程を経ることを特徴とする、方法：

- 1) ActivinAの存在下で多能性幹細胞を培養する工程、
- 2) 前記1)の工程で得られた細胞をLiClおよびIGF-1の存在下で培養する工程。

## 【請求項 8】

前記工程1)において、さらにBMPおよび/またはIGF-1の存在下で多能性幹細胞を培養することを特徴とする、請求項7に記載の方法。

## 【請求項 9】

BMPが、BMP2、BMP4およびBMP7から選択される少なくとも1つを含有する、請求項8記載の方法。

10

## 【請求項 10】

以下の1)および2)の工程を経ることを特徴とする、請求項7記載の方法：

- 1) ActivinA、BMP4およびIGF-1の存在下で多能性幹細胞を培養する工程、
- 2) 前記1)の工程で得られた細胞をLiCl、ShhおよびIGF-1の存在下で培養する工程。

## 【請求項 11】

前記工程1)および2)の後に、さらに工程3)：

- 3) 前記2)の工程で得られた細胞からPDGFR 陽性細胞を選択する工程、を経ることを特徴とする、請求項7～10のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 12】

多能性幹細胞がiPS細胞またはES細胞である、請求項7～11のいずれか1項に記載の方法。

20

## 【請求項 13】

ActivinA、BMP4およびIGF-1を含有することを特徴とする、多能性幹細胞からPDGFR 陽性の中胚葉系細胞への分化誘導用試薬キット。

## 【請求項 14】

LiClおよびIGF-1を含有することを特徴とする、PDGFR 陽性の中胚葉系細胞から、Myf5陽性かつMyoD陽性である骨格筋前駆細胞への分化誘導用試薬キット。

## 【請求項 15】

多能性幹細胞がiPS細胞またはES細胞である、請求項13または14記載のキット。

30

## 【請求項 16】

請求項4～12のいずれか1項に記載の方法により製造された骨格筋前駆細胞含有細胞集団であって、外因性の初期化遺伝子がゲノム中に組み込まれた、細胞集団。

## 【請求項 17】

外因性の初期化遺伝子が、Oct3/4、Sox2、Klf4およびc-Mycの4種の遺伝子、またはOct3/4、Sox2およびKlf4の3種の遺伝子である、請求項16記載の細胞集団。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、多能性幹細胞、特に人工多能性幹細胞から、骨格筋前駆細胞への分化誘導方法、当該方法に用いるための試薬キット、並びに当該方法により得られる骨格筋前駆細胞に関する。本発明はまた、前記骨格筋前駆細胞を用いたミオパチーの治療に関する。

40

## 【0002】

発明の背景

筋疾患は非常に多くの病気を含んでいるが、その症状の大半は筋肉の萎縮とそれに伴う筋力の低下である。筋肉の萎縮の原因には、筋肉自体に異常がある場合と筋肉を動かす神経に異常がある場合とがあり、前者を筋原性疾患（ミオパチー）、後者を神経原性疾患という。ミオパチーの代表的なものが筋ジストロフィーである。筋ジストロフィーとは、筋線維の壊死と再生を繰り返しながら、次第に筋萎縮と筋力低下が進行する遺伝性筋疾患の総称であり、様々な病型に分類され、病型ごとに原因遺伝子の種類やその変異様式が異な

50

る。

【0003】

筋ジストロフィーの可能性のある根治療法として、幹細胞移植が提唱されている。筋幹細胞としては、筋線維と基底膜との間に存在するサテライト細胞が知られていたが、比較的採取が容易で、ある程度体外で増幅可能な骨髄細胞の中に、筋肉に分化し得る幹細胞が含まれていることが見出されたことから、筋幹細胞移植療法が注目されるようになった。しかし、筋ジストロフィーは遺伝性疾患であるため、患者本人の骨髄を用いることはできないし、骨髄細胞といえども無限に増幅できるわけではない。

【0004】

胚性幹（ES）細胞はほとんどすべての組織に分化できる幹細胞であり、未分化状態を維持したまま、ほぼ無限に増殖させることができる。最近、Darabiらは、筋細胞への分化を促進する転写因子Pax3をマウスES細胞に遺伝子導入して筋形成を誘導し、骨格筋前駆細胞のみをソーティングして筋ジストロフィーモデルマウスに移植することにより、筋肉の機能を一部回復させることに成功した [Darabi, R. et al., Nat. Med., 14: 134-143 (2008)]。しかし、骨格筋前駆細胞への分化に遺伝子操作を伴うため、直ちにヒト臨床に応用することはできない。さらに、ES細胞が抱える倫理上の問題から、患者に適合したES細胞を入手することは容易ではない。

【0005】

近年、マウスやヒト等で胚の破壊を伴わない体細胞由来の人工多能性幹細胞（iPS細胞）が相次いで樹立され [WO 2007/069666 A1; Takahashi, K. and Yamanaka, S., Cell, 126: 663-676 (2006); Okita, K. et al., Nature, 448: 313-317 (2007); Nakagawa, M. et al., Nat. Biotechnol., 26: 101-106 (2008); Takahashi, K. et al., Cell, 131: 861-872 (2007); Yu, J. et al., Science, 318: 1917-1920 (2007)]、ES細胞に代わる移植細胞ソースとして期待を集めている。外来遺伝子の組込みのないより安全なiPS細胞も開発されてきており [Stadtfield, M. et al., Science, 322: 945-949 (2008); Okita, K. et al., Science, 322: 949-953 (2008); Yu, J. et al., Science, 324: 797-801 (2009); Zhou, H. et al., Cell Stem Cell, 4: 381-384 (2009); Kim, D. et al., Cell Stem Cell, 4: 472-476 (2009)]、再生医療への応用が現実味を帯び始めている。しかしながら、iPS細胞から骨格筋前駆細胞への分化を誘導したという報告は皆無である。

【0006】

発明の要約

本発明の目的は、培養条件を最適化することにより、遺伝子操作なしに、iPS細胞を含む多能性幹細胞から骨格筋前駆細胞への分化を誘導する方法を提供することであり、当該方法において培地に添加される培地成分を含む分化誘導試薬キットを提供することである。本発明のさらなる目的は、当該方法により得られる多能性幹細胞由来の骨格筋前駆細胞を用いた、筋ジストロフィー等の筋疾患の治療手段を提供することである。

【0007】

本発明者らは以前、マウスES細胞を、bone morphogenetic protein 4（BMP4）を含む培地で培養した後、塩化リチウム（LiCl）を含む培地でさらに培養することにより、無血清下で骨格筋前駆細胞に分化誘導できることを見出し、特許出願を行っている（特願2008-186348）。ES細胞における分化誘導法はiPS細胞においても有効な場合が多いので、本発明者らはまず、上記方法をマウスiPS細胞に適用してみたが、意外にも、この方法では細胞が全く生存しないことがわかった。

【0008】

そこで、本発明者らは、種々の成長因子を組み合わせることで分化誘導実験を繰り返した結果、Activin Aを含む培地（A培地）でiPS細胞を培養した後、LiCl等のWntシグナル誘導剤を含む培地（B培地）でさらに培養することにより、無血清下で骨格筋前駆細胞に分化誘導できることを初めて見出した。さらに、A培地にBMPおよび/またはインスリン様成長因子-1（IGF-1）をさらに添加し、並びに/あるいはB培地にsonic hedgehog（Shh）および/またはIGF-1をさらに添加することで、分化誘導効率はさらに向上することを見出した。

## 【 0 0 0 9 】

そこで、得られた骨格筋前駆細胞を筋ジストロフィ - モデルマウスに移植したところ、筋線維が多く認められ、炎症の抑制および筋肉組織の修復効果が認められた。さらに、サテライト細胞やジストロフィン発現細胞への分化誘導も認められた。本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

## 【 0 0 1 0 】

すなわち、本発明は以下の通りのものである。

- [1] iPS細胞を用いることを特徴とする、骨格筋前駆細胞の製造方法。
- [2] 骨格筋前駆細胞がMyf5陽性かつMyoD陽性である、上記[1]記載の方法。
- [3] 多能性幹細胞からPDGFR 陽性の中胚葉系細胞を製造する方法であって、前記多能性幹細胞を、無血清下、かつActivin Aの存在下で培養することを特徴とする、方法。 10
- [4] PDGFR 陽性の中胚葉系細胞が原条中胚葉系細胞である、上記[3]記載の方法。
- [5] さらにBMPおよび/またはIGF-1の存在下で多能性幹細胞を培養することを特徴とする、上記[3]または[4]記載の方法。
- [6] BMPが、BMP2、BMP4およびBMP7から選択される少なくとも1つを含有する、上記[5]記載の方法。
- [7] PDGFR 陽性の中胚葉系細胞から骨格筋前駆細胞を製造する方法であって、前記中胚葉系細胞を、無血清下、かつWntシグナル誘導剤の存在下で培養することを特徴とする、方法。
- [8] 骨格筋前駆細胞がMyf5陽性かつMyoD陽性である、上記[7]記載の方法。 20
- [9] Wntシグナル誘導剤が、LiCl、Wnt1、Wnt3aおよびWnt7aから選択される少なくとも1つを含有する、上記[7]または[8]記載の方法。
- [10] さらにShhおよび/またはIGF-1の存在下で中胚葉系細胞を培養することを特徴とする、上記[7]～[9]のいずれかに記載の方法。
- [11] PDGFR 陽性の中胚葉系細胞が、上記[3]～[6]のいずれかに記載の方法により得られるものである、上記[7]～[10]のいずれかに記載の方法。
- [12] 多能性幹細胞から骨格筋前駆細胞を製造する方法であって、無血清下で以下の1)および2)の工程を経ることを特徴とする、方法：
- 1) Activin Aの存在下で多能性幹細胞を培養する工程、
- 2) 前記1)の工程で得られた細胞をWntシグナル誘導剤の存在下で培養する工程。 30
- [13] 骨格筋前駆細胞がMyf5陽性かつMyoD陽性である、上記[12]記載の方法。
- [14] Wntシグナル誘導剤が、LiCl、Wnt1、Wnt3aおよびWnt7aから選択される少なくとも1つを含有する、上記[12]または[13]記載の方法。
- [15] 前記工程1)において、さらにBMPおよび/またはIGF-1の存在下で多能性幹細胞を培養することを特徴とする、上記[12]～[14]のいずれかに記載の方法。
- [16] BMPが、BMP2、BMP4およびBMP7から選択される少なくとも1つを含有する、上記[15]記載の方法。
- [17] 前記工程2)において、さらにShhおよび/またはIGF-1の存在下で、前記工程1)で得られた細胞を培養することを特徴とする、上記[12]～[16]のいずれかに記載の方法。
- [18] 以下の1)および2)の工程を経ることを特徴とする、上記[12]記載の方法： 40
- 1) Activin A、BMP4およびIGF-1の存在下で多能性幹細胞を培養する工程、
- 2) 前記1)の工程で得られた細胞をLiCl、ShhおよびIGF-1の存在下で培養する工程。
- [19] 前記工程1)および2)の後に、さらに工程3)：
- 3) 前記2)の工程で得られた細胞からPDGFR 陽性細胞を選択する工程、
- を経ることを特徴とする、上記[11]～[17]のいずれかに記載の方法。
- [20] 多能性幹細胞がiPS細胞またはES細胞である、上記[3]～[6]および[11]～[19]のいずれかに記載の方法。
- [21] Activin A、BMP4およびIGF-1を含有することを特徴とする、多能性幹細胞からPDGFR 陽性の中胚葉系細胞への分化誘導用試薬キット。
- [22] LiCl、ShhおよびIGF-1を含有することを特徴とする、PDGFR 陽性の中胚葉系細胞か 50

ら骨格筋前駆細胞への分化誘導用試薬キット。

[23] 多能性幹細胞がiPS細胞またはES細胞である、上記[21]または[22]記載のキット。

[24] 上記[1]、[2]および[7]～[20]のいずれかに記載の方法により製造された骨格筋前駆細胞含有細胞集団。

[25] 初期化遺伝子がゲノム中に組み込まれた、上記[24]記載の細胞集団。

[26] 初期化遺伝子が、Oct3/4、Sox2、Klf4およびc-Mycの4種の遺伝子、またはOct3/4、Sox2およびKlf4の3種の遺伝子である、上記[25]記載の細胞集団。

[27] 上記[24]～[26]のいずれかに記載の細胞集団に含まれる骨格筋前駆細胞を有効成分とする、骨格筋再生促進剤。

[28] 上記[24]～[26]のいずれかに記載の細胞集団に含まれる骨格筋前駆細胞を有効成分とする、サテライト細胞形成促進剤。

[29] 筋疾患の治療剤である、上記[27]または[28]記載の剤。

[30] 筋疾患が筋ジストロフィーである、上記[29]記載の剤。

[31] 上記[24]～[26]のいずれかに記載の細胞集団の有効量を、骨格筋再生および/またはサテライト細胞形成を必要とする対象に投与することを特徴とする、該対象における骨格筋再生および/またはサテライト細胞形成方法。

#### 【0011】

本発明によれば、培地中に添加する成長因子を適宜組み合わせることにより、遺伝子操作を経ずに多能性幹細胞から骨格筋前駆細胞に分化誘導することができる。また、本発明によれば、iPS細胞から骨格筋前駆細胞に分化誘導することができるので、ES細胞のような倫理上の制約なしに骨格筋前駆細胞を安定に供給することが可能となる。さらに、本発明によれば、無血清下で多能性幹細胞を骨格筋前駆細胞に分化させることができるので、ロットによるばらつきが少なく、どの細胞クローンを用いても効率よく骨格筋前駆細胞を得ることができる上、医療用途への適用も可能となる。

本発明により得られる骨格筋前駆細胞は、筋肉の炎症抑制および筋肉組織の修復効果があるので、筋ジストロフィーをはじめとする筋疾患における骨格筋再生医療への応用が期待される。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0012】

図1Aは、iPS細胞から原条中胚葉系細胞への分化誘導の条件および評価方法を示した図である。図1Bは、iPS細胞から原条中胚葉系細胞への分化誘導に対するActivin A、IGF-1およびHGFの効果をもとにPDGFR陽性細胞の割合で評価したFACS解析の図(左)、および生細胞数で評価したグラフ(右)である。図1Cは、iPS細胞から原条中胚葉系細胞への分化誘導における播種細胞密度の影響をもとにPDGFR陽性細胞の割合で評価したFACS解析の図である。

図2Aは、iPS細胞から原条中胚葉系細胞への分化誘導に対するActivin Aの濃度の影響をもとにPDGFR陽性細胞の割合で評価したFACS解析の図である。図2Bは、iPS細胞から原条中胚葉系細胞への分化誘導に対するBMP4の濃度の影響をもとにPDGFR陽性細胞の割合で評価したFACS解析の図である。図2Cは、iPS細胞から原条中胚葉系細胞への分化誘導におけるActivin AおよびBMP4の濃度の影響を生細胞数で評価したグラフである。

図3Aは、iPS細胞から原条中胚葉系細胞への分化誘導、および原条中胚葉系細胞から骨格筋前駆細胞への分化誘導の条件および評価方法を示した図である。図3Bは、原条中胚葉系細胞から骨格筋前駆細胞への分化誘導におけるSonic Hedgehog(Shh)の効果をもとにSM/C-2.6陽性細胞の割合で評価したFACS解析の図(左)、およびMyf5の発現で評価したRT-PCRの写真(右)である。図3Cは、原条中胚葉系細胞から骨格筋前駆細胞への分化誘導におけるIGF-1の効果をもとにSM/C-2.6陽性細胞の割合で評価したFACS解析の図(左)、およびMyf5の発現で評価したRT-PCRの写真(右)である。

図4Aは、本発明の分化誘導法により得られたiPS細胞由来中胚葉細胞群をPDGFRをマーカーにしてFACS解析した結果を示す図(左)、および、その細胞群をPDGFR陽性および陰性画分に分離した結果を示す図(右)である。図4Bは、前記PDGFR陽性画分(図中1)および陰性画分(図中2)からRNAを抽出し、各種分化マーカーの発現を調べた結果を示すRT-PCRの

10

20

30

40

50

写真である。図4Cは、SM/C-2.6陽性細胞とPDGFR 陽性細胞との割合を比較した結果を示すFACS解析の図である。図4Dは、PDGFR 陽性細胞をカルジオトキシン処理したマウスの骨格筋に移植し、4週間後にPax7、DsRed、Laminin、DAPIに対する抗体を用いて蛍光免疫染色を行った結果を示す写真である。上段：Pax7陽性でLamininの内側にあるDsRed陽性細胞、下段：Pax7陰性でLamininの外側にあるDsRed陽性細胞。図4Eは、PDGFR 陽性細胞を筋肉内注射（i.m.）した場合と静脈内注射（i.v.）した場合におけるDsRed陽性細胞およびPax7陽性細胞の数を比較した表である。

図5Aは、iPS細胞由来骨格筋前駆細胞（PDGFR 陽性細胞）をDMD-nullマウスの前脛骨筋（T.A.）に筋肉内注射し、4週後に各種組織を解析した結果を示す写真である。図5Bは、同様の組織についてジストロフィンの蛍光免疫染色を行った結果を示す写真である。図5Cは、同様の組織についてDsRedおよびジストロフィンの蛍光免疫染色を行った結果を示す写真である。図5Dは、同様の組織についてDsRedおよびPax7の蛍光免疫染色を行った結果を示す写真である。

10

図6Aは、iPS細胞由来骨格筋前駆細胞（PDGFR 陽性細胞）をDMD-nullマウスの左側の前脛骨筋（T.A.）に筋肉内注射し、4週後に各種組織を解析した結果を示す写真である。図6Bは、同様の組織についてジストロフィンの蛍光免疫染色を行った結果を示す写真である。図6Cは、同様の組織についてDsRedおよびSM/C-2.6の蛍光免疫染色を行った結果を示す写真である。

図7（a～d）は、本発明の分化誘導法により得られたPDGFR 陽性分画および陰性分画を、さらに試験管内で成熟骨格筋へと分化誘導し、Myogeninの免疫染色を行った結果を示す写真である。図7（e）は培養ディッシュ上の全核数とMyogenin陽性の核の割合を示した表である。

20

図8Aは、LiClを添加するタイミングをずらして本発明の分化誘導法を実施した場合の誘導条件および評価方法を示した図である。図8Bは、LiClの添加タイミングによりPDGFR 陽性細胞の割合がどのように変化するかをFACS解析した結果を示す図である。

#### 【0013】

##### 発明の詳細な説明

本発明は、多能性幹細胞から骨格筋前駆細胞を製造する方法を提供する。当該方法は、多能性幹細胞からPDGFR 陽性の中胚葉系細胞に分化させる工程1)と、該中胚葉系細胞から骨格筋前駆細胞に分化させる工程2)とを含む。

30

#### 【0014】

従って、第1の本発明は、多能性幹細胞からPDGFR 陽性の中胚葉系細胞を製造する方法に関する。当該方法は、多能性幹細胞を、無血清下、かつActivin Aの存在下で培養することを含む。

#### 【0015】

出発材料となる多能性幹細胞は、未分化状態を保持したまま増殖できる「自己複製能」と三胚葉系すべてに分化できる「分化多能性」とを有する未分化細胞であれば特に制限されず、例えば、iPS細胞、ES細胞、胚性生殖（EG）細胞、胚性癌（EC）細胞などが挙げられるが、好ましくはiPS細胞またはES細胞である。本発明の方法は、いずれかの多能性幹細胞が樹立されているか、樹立可能である、任意の哺乳動物において適用することができる、例えば、ヒト、マウス、ラット、サル、イヌ、ブタ、ウシ、ネコ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、モルモット、ハムスター等が挙げられるが、好ましくはヒト、マウス、ラット、サル、イヌ等、より好ましくはヒトまたはマウスである。

40

#### 【0016】

##### （1）多能性幹細胞の作製

##### （i）ES細胞

多能性幹細胞はそれぞれ自体公知の方法により取得することができる。例えばES細胞の作製方法としては、例えば、哺乳動物の胚盤胞ステージにおける内部細胞塊を培養する方法（例えば、Manipulating the Mouse Embryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994) を参照）、体細胞核移植によって作製され

50

た初期胚を培養する方法 (Wilmut et al., Nature, 385, 810 (1997); Cibelli et al., Science, 280, 1256 (1998); 入谷明ら, 蛋白質核酸酵素, 44, 892 (1999); Baguisi et al., Nature Biotechnology, 17, 456 (1999); Wakayama et al., Nature, 394, 369 (1998); Wakayama et al., Nature Genetics, 22, 127 (1999); Wakayama et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96, 14984 (1999); Rideout III et al., Nature Genetics, 24, 109 (2000)) などが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 1 7 】

(ii) iPS細胞

iPS細胞は、体細胞に核初期化物質を導入することにより作製することができる。

【 0 0 1 8 】

(a) 体細胞ソース

iPS細胞作製のための出発材料として用いることのできる体細胞は、哺乳動物（例えば、マウスまたはヒト）由来の生殖細胞以外のいかなる細胞であってもよく、例えば、角質化する上皮細胞（例、角質化表皮細胞）、粘膜上皮細胞（例、舌表層の上皮細胞）、外分泌腺上皮細胞（例、乳腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例、副腎髄質細胞）、代謝・貯蔵用の細胞（例、肝細胞）、境界面を構成する内腔上皮細胞（例、I型肺胞細胞）、内鎖管の内腔上皮細胞（例、血管内皮細胞）、運搬能をもつ繊毛のある細胞（例、気道上皮細胞）、細胞外マトリックス分泌用細胞（例、線維芽細胞）、収縮性細胞（例、平滑筋細胞）、血液と免疫系の細胞（例、Tリンパ球）、感覚に関する細胞（例、桿細胞）、自律神経系ニューロン（例、コリン作動性ニューロン）、感覚器と末梢ニューロンの支持細胞（例、随伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、およびそれらの前駆細胞（組織前駆細胞）等が挙げられる。細胞の分化の程度に特に制限はなく、未分化な前駆細胞（体性幹細胞も含む）であっても、最終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における体細胞の起源として使用することができる。ここで未分化な前駆細胞としては、たとえば神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）が挙げられる。

【 0 0 1 9 】

体細胞を採取するソースとなる哺乳動物個体は特に制限されないが、得られるiPS細胞がヒトの非遺伝性筋疾患の治療用途に使用される場合には、拒絶反応が起こらないという観点から、患者本人またはHLAの型が同一もしくは実質的に同一である他人から体細胞を採取することが好ましい。一方、筋ジストロフィー等の遺伝性筋疾患の治療用途に使用される場合は、正常な遺伝子を有し、かつHLAの型が同一もしくは実質的に同一である他人から体細胞を採取することが好ましい。ここでHLAの型が「実質的に同一」とは、免疫抑制剤などの使用により、該体細胞由来のiPS細胞から分化誘導することにより得られた細胞を患者に移植した場合に移植細胞が生着可能な程度にHLAの型が一致していることをいう。たとえば主たるHLA（例えばHLA-A、HLA-BおよびHLA-DRの3遺伝子座）が同一である場合などが挙げられる（以下同じ）。また、ヒトに投与（移植）しない場合、例えば、患者の薬剤感受性や副作用の有無を評価するためのスクリーニング用の細胞のソースとしてiPS細胞を使用する場合には、同様に患者本人または薬剤感受性や副作用と関連する遺伝子多型が同一である他人から体細胞を採取する必要がある。

【 0 0 2 0 】

(b) 核初期化物質

本発明において「核初期化物質」とは、体細胞からiPS細胞を誘導することができる物質（群）であれば、タンパク性因子またはそれをコードする核酸（ベクターに組み込まれた形態を含む）、あるいは低分子化合物等のいかなる物質から構成されてもよい。核初期化物質がタンパク性因子またはそれをコードする核酸の場合、好ましくは以下の組み合わせが例示される（以下においては、タンパク性因子の名称のみを記載する）。

(1) Oct3/4, Klf4, c-Myc

(2) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2（ここで、Sox2はSox1, Sox3, Sox15, Sox17またはSox18で置換可能である。また、Klf4はKlf1, Klf2またはKlf5で置換可能である。さらに、c-My

10

20

30

40

50

cはT58A ( 活性型変異体 ) , N-Myc, L-Mycで置換可能である。 )

(3) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Fbx15, Nanog, Eras, ECAT15-2, Tc11,  $\beta$ -catenin ( 活性型変異体S33Y)

(4) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, TERT, SV40 Large T antigen ( 以下、SV40LT )

(5) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, TERT, HPV16 E6

(6) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, TERT, HPV16 E7

(7) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, TERT, HPV6 E6, HPV16 E7

(8) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, TERT, Bmi1

( 以上、WO 2007/069666を参照 ( 但し、上記(2)の組み合わせにおいて、Sox2からSox18への置換、Klf4からKlf1もしくはKlf5への置換については、Nature Biotechnology, 26, 101-106 (2008)を参照 ) 。 「Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2」の組み合わせについては、Cell, 126, 663-676 (2006)、Cell, 131, 861-872 (2007) 等も参照。 「Oct3/4, Klf2 ( またはKlf5 ) , c-Myc, Sox2」の組み合わせについては、Nat. Cell Biol., 11, 197-203 (2009) も参照。 「Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, hTERT, SV40LT」の組み合わせについては、Nature, 451, 141-146 (2008)も参照。 )

10

(9) Oct3/4, Klf4, Sox2 ( Nature Biotechnology, 26, 101-106 (2008)を参照 )

(10) Oct3/4, Sox2, Nanog, Lin28 ( Science, 318, 1917-1920 (2007)を参照 )

(11) Oct3/4, Sox2, Nanog, Lin28, hTERT, SV40LT ( Stem Cells, 26, 1998-2005 (2008)を参照 )

(12) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Nanog, Lin28 ( Cell Research (2008) 600-603を参照 )

20

(13) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, SV40LT ( Stem Cells, 26, 1998-2005 (2008)も参照 )

(14) Oct3/4, Klf4 ( Nature 454:646-650 (2008)、Cell Stem Cell, 2:525-528(2008))を参照 )

(15) Oct3/4, c-Myc ( Nature 454:646-650 (2008)を参照 )

(16) Oct3/4, Sox2 ( Nature, 451, 141-146 (2008), WO2008/118820を参照 )

(17) Oct3/4, Sox2, Nanog ( WO2008/118820を参照 )

(18) Oct3/4, Sox2, Lin28 ( WO2008/118820を参照 )

(19) Oct3/4, Sox2, c-Myc, Esrrb ( ここで、EsrrbはEsrrgで置換可能である。 Nat. Cell Biol., 11, 197-203 (2009) を参照 )

30

(20) Oct3/4, Sox2, Esrrb ( Nat. Cell Biol., 11, 197-203 (2009) を参照 )

(21) Oct3/4, Klf4, L-Myc

(22) Oct3/4, Nanog

(23) Oct3/4

(24) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Nanog, Lin28, SV40LT ( Science, 324: 797-801 (2009)を参照 )

上記(1)-(24)において、Oct3/4に代えて他のOctファミリーのメンバー、例えばOct1A、Oct6などを用いることもできる。また、Sox2 ( またはSox1、Sox3、Sox15、Sox17、Sox18 ) に代えて他のSoxファミリーのメンバー、例えばSox7などを用いることもできる。さらにLin28に代えて他のLinファミリーのメンバー、例えばLin28bなどを用いることもできる

40

また、上記(1)-(24)には該当しないが、それらのいずれかにおける構成要素をすべて含み、且つ任意の他の物質をさらに含む組み合わせも、本発明における「核初期化物質」の範疇に含まれ得る。また、核初期化の対象となる体細胞が上記(1)-(24)のいずれかにおける構成要素の一部を、核初期化のために十分なレベルで内在的に発現している条件下にあっては、当該構成要素を除いた残りの構成要素のみの組み合わせもまた、本発明における「核初期化物質」の範疇に含まれ得る。

【 0 0 2 1 】

これらの組み合わせの中で、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Lin28およびSV40LTから選択される少なくとも1つ、好ましくは2つ以上、より好ましくは3つ以上が、好まし

50

い核初期化物質の例として挙げられる。

とりわけ、得られるiPS細胞を治療用途に用いることを念頭においた場合、Oct3/4, Sox2およびKlf4の3因子の組み合わせ(即ち、上記(9))が好ましい。一方、iPS細胞を治療用途に用いることを念頭に置かない場合(例えば、創薬スクリーニング等の研究ツールとして用いる場合など)は、Oct3/4, Sox2, Klf4およびc-Mycの4因子のほか、Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2およびLin28の5因子か、それにNanogを加えた6因子(即ち、上記(12))、さらにSV40 Large T加えた7因子(即ち、上記(24))が好ましい。

さらに、上記におけるc-MycをL-Mycに変更した組み合わせも、好ましい核初期化物質の例として挙げられる。

#### 【0022】

上記の各核初期化物質のマウスおよびヒトcDNA配列情報は、WO 2007/069666に記載のNCBI accession numbersを参照することにより取得することができ(Nanogは当該公報中では「ECAT4」との名称で記載されている。尚、Lin28、Lin28b、Esrrb、EsrrgおよびL-MycのマウスおよびヒトcDNA配列情報は、それぞれ下記NCBI accession numbersを参照することにより取得できる。)、当業者は容易にこれらのcDNAを単離することができる。

遺伝子名	マウス	ヒト
Lin28	NM_145833	NM_024674
Lin28b	NM_001031772	NM_001004317
Esrrb	NM_011934	NM_004452
Esrrg	NM_011935	NM_001438
L-Myc	NM_008506	NM_001033081

#### 【0023】

核初期化物質としてタンパク性因子自体を用いる場合には、得られたcDNAを適当な発現ベクターに挿入して宿主細胞に導入し、該細胞を培養して得られる培養物から組換えタンパク性因子を回収することにより調製することができる。一方、核初期化物質としてタンパク性因子をコードする核酸を用いる場合、得られたcDNAを、ウイルスベクター、プラスミドベクター、エピゾーマルベクター等に挿入して発現ベクターを構築し、核初期化工程に供される。

#### 【0024】

#### (c) 核初期化物質の体細胞への導入方法

核初期化物質の体細胞への導入は、該物質がタンパク性因子である場合、自体公知の細胞へのタンパク質導入方法を用いて実施することができる。本発明の骨格筋前駆細胞の製造方法の従来技術に対する優位性の1つが、遺伝子操作なしに骨格筋前駆細胞に分化誘導できる点であるのと同様、ヒトへの臨床応用を念頭におく場合、その出発材料たるiPS細胞も遺伝子操作なしに作製されたものであることが好ましい。

#### 【0025】

そのような方法としては、例えば、タンパク質導入試薬を用いる方法、タンパク質導入ドメイン(PTD)もしくは細胞透過性ペプチド(CPP)融合タンパク質を用いる方法、マイクロインジェクション法などが挙げられる。タンパク質導入試薬としては、カチオン性脂質をベースとしたBioPOTER Protein Delivery Reagent (Gene Therapy Systemes)、Pro-Ject™ Protein Transfection Reagent (PIERCE)及びProVectin (IMGENEX)、脂質をベースとしたProfect-1 (Targeting Systems)、膜透過性ペプチドをベースとしたPenetrain Peptide (Q biogene)及びChariot Kit (Active Motif)、HVJエンベロープ(不活化センダイウイルス)を利用したGenomONE(石原産業)等が市販されている。導入はこれらの試薬に添付のプロトコルに従って行うことができるが、一般的な手順は以下の通りである。核初期化物質を適当な溶媒(例えば、PBS、HEPES等の緩衝液)に希釈し、導入試薬を加えて室温で5-15分程度インキュベートして複合体を形成させ、これを無血清培地に交換した細胞に添加して37℃で1ないし数時間インキュベートする。その後培地を除去して血清含有培地に交換する。

#### 【0026】

PTDとしては、ショウジョウバエ由来のAntP、HIV由来のTAT (Frankel, A. et al, Cell 55, 1189-93 (1988); Green, M. & Loewenstein, P.M. Cell 55, 1179-88 (1988))、Penetratin (Derossi, D. et al, J. Biol. Chem. 269, 10444-50 (1994))、Buforin II (Park, C. B. et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 97, 8245-50 (2000))、Transportan (Poo ga, M. et al. FASEB J. 12, 67-77 (1998))、MAP (model amphipathic peptide) (Oehlke, J. et al. Biochim. Biophys. Acta. 1414, 127-39 (1998))、K-FGF (Lin, Y. Z. et al. J. Biol. Chem. 270, 14255-14258 (1995))、Ku70 (Sawada, M. et al. Nature Cell Biol. 5, 352-7 (2003))、Prion (Lundberg, P. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 299, 85-90 (2002))、pVEC (Elmqvist, A. et al. Exp. Cell Res. 269, 237-44 (2001))、Pep-1 (Morris, M. C. et al. Nature Biotechnol. 19, 1173-6 (2001))、Pep-7 (Gao, C. et al. Bioorg. Med. Chem. 10, 4057-65 (2002))、SynBI (Rouselle, C. et al. Mol. Pharmacol. 57, 679-86 (2000))、HN-I (Hong, F. D. & Clayman, G L. Cancer Res. 60, 6551-6 (2000))、HSV由来のVP22等のタンパク質の細胞通過ドメインを用いたものが開発されている。PTD由来のCPPとしては、11R (Cell Stem Cell, 4:381-384(2009))や9R (Cell Stem Cell, 4:472-476(2009))等のポリアルギニンが挙げられる。

#### 【 0 0 2 7 】

核初期化物質のcDNAとPTDもしくはCPP配列とを組み込んだ融合タンパク質発現ベクターを作製して組換え発現させ、融合タンパク質を回収して導入に用いる。導入は、タンパク質導入試薬を添加しない以外は上記と同様に行うことができる。

#### 【 0 0 2 8 】

マイクロインジェクションは、先端径1 $\mu$ m程度のガラス針にタンパク質溶液を入れ、細胞に穿刺導入する方法であり、確実に細胞内にタンパク質を導入することができる。

#### 【 0 0 2 9 】

iPS細胞の樹立効率を重視するのであれば、核初期化物質を、タンパク性因子自体としてではなく、それをコードする核酸の形態で用いることも好ましい。該核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよいが、また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。好ましくは該核酸は二本鎖DNA、特にcDNAである。

#### 【 0 0 3 0 】

核初期化物質のcDNAは、宿主となる体細胞で機能し得るプロモーターを含む適当な発現ベクターに挿入される。発現ベクターとしては、例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクター、動物細胞発現プラスミド(例、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo)などが用いられ得る。

#### 【 0 0 3 1 】

用いるベクターの種類は、得られるiPS細胞の用途に応じて適宜選択することができる。例えば、アデノウイルスベクター、プラスミドベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクター、エピゾーマルベクターなどが使用され得る。

#### 【 0 0 3 2 】

発現ベクターにおいて使用されるプロモーターとしては、例えばEF1 プロモーター、CAGプロモーター、SR プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV(サイトメガロウイルス)プロモーター、RSV(ラウス肉腫ウイルス)プロモーター、MoMuLV(モロニーマウス白血病ウイルス)LTR、HSV-TK(単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ)プロモーターなどが用いられる。なかでも、EF1 プロモーター、CAGプロモーター、MoMuLV LTR、CMVプロモーター、SR プロモーターなどが好ましい。

#### 【 0 0 3 3 】

発現ベクターは、プロモーターの他に、所望によりエンハンサー、ポリA付加シグナル、選択マーカー遺伝子、SV40複製起点などを含有していてもよい。選択マーカー遺伝子としては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ピューロマイ

10

20

30

40

50

シン耐性遺伝子等が挙げられる。

【0034】

核初期化物質である核酸を含む発現ベクターは、ベクターの種類に応じて、自体公知の手法により細胞に導入することができる。例えば、ウイルスベクターの場合、該核酸を含むプラスミドを適当なパッケージング細胞（例、Plat-E細胞）や相補細胞株（例、293細胞）に導入して、培養上清中に産生されるウイルスベクターを回収し、各ウイルスベクターに応じた適切な方法により、該ベクターを細胞に感染させる。例えば、ベクターとしてレトロウイルスベクターを用いる具体的手段が WO2007/69666、Cell, 126, 663-676 (2006) 及び Cell, 131, 861-872 (2007) に開示されており、ベクターとしてレンチウイルスベクターを用いる場合については、Science, 318, 1917-1920 (2007) に開示がある。iPS細胞を再生医療のための細胞ソースとして利用する場合、初期化遺伝子の発現（再活性化）は、iPS細胞由来の骨格筋前駆細胞から再生された骨格筋組織における発癌リスクを高める可能性があるため、核初期化物質をコードする核酸は細胞の染色体に組み込まれず、一過的に発現することが好ましい。かかる観点からは、染色体への組み込みが稀なアデノウイルスベクターの使用が好ましい。アデノウイルスベクターを用いる具体的手段は、Science, 322, 945-949 (2008) に開示されている。また、アデノ随伴ウイルスも染色体への組み込み頻度が低く、アデノウイルスベクターと比べて細胞毒性や炎症惹起作用が低いので、別の好ましいベクターとして挙げられる。センダイウイルスベクターは染色体外で安定に存在することができ、必要に応じてsiRNAにより分解除去することができるので、同様に好ましく利用され得る。センダイウイルスベクターについては、J. Biol. Chem., 282, 27383-27391 (2007) や特許第3602058号に記載のものを用いることができる。

【0035】

レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターを用いる場合は、いったん導入遺伝子のサイレンシングが起こったとしても、後に再活性化される可能性があるため、例えば、Cre/loxPシステムを用いて、不要となった時点で核初期化物質をコードする核酸を切り出す方法が好ましく用いられ得る。即ち、該核酸の両端にloxP配列を配置しておき、iPS細胞が誘導された後で、プラスミドベクターもしくはアデノウイルスベクターを用いて細胞にCreリコンビナーゼを作用させ、loxP配列に挟まれた領域を切り出すことができる。また、LTR U3領域のエンハンサー - プロモーター配列は、挿入突然変異によって近傍の宿主遺伝子を上方制御する可能性があるため、当該配列を欠失、もしくはSV40などのポリアダニル化配列で置換した3'-自己不活性化（SIN）LTRを使用して、切り出されずゲノム中に残存するloxP配列より外側のLTRによる内因性遺伝子の発現制御を回避することがより好ましい。Cre-loxPシステムおよびSIN LTRを用いる具体的手段は、Chang et al., Stem Cells, 27: 1042-1049 (2009) に開示されている。

【0036】

一方、非ウイルスベクターであるプラスミドベクターの場合には、リポフェクション法、リポソーム法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃法などを用いて該ベクターを細胞に導入することができる。ベクターとしてプラスミドを用いる具体的手段は、例えばScience, 322, 949-953 (2008) 等に記載されている。

【0037】

プラスミドベクターやアデノウイルスベクター等を用いる場合、遺伝子導入は1回以上の任意の回数（例えば、1回以上10回以下、又は1回以上5回以下など）行うことができる。2種以上の発現ベクターを体細胞に導入する場合には、これらの全ての種類の発現ベクターを同時に体細胞に導入することが好ましいが、この場合においても、導入操作は1回以上の任意の回数（例えば、1回以上10回以下、又は1回以上5回以下など）行うことができ、好ましくは導入操作を2回以上（たとえば3回又は4回）繰り返して行うことができる。

【0038】

尚、アデノウイルスやプラスミドを用いる場合でも、導入遺伝子が染色体に組み込まれることがあるため、結局はサザンブロットやPCRにより染色体への遺伝子挿入がないこと

10

20

30

40

50

を確認する必要がある。そのため、上記Cre-loxPシステムのように、いったん染色体に導入遺伝子を組み込んだ後に、該遺伝子を除去する手段を用いることは好都合であり得る。別の好ましい一実施態様においては、トランスポゾンを用いて染色体に導入遺伝子を組み込んだ後に、プラスミドベクターもしくはアデノウイルスベクターを用いて細胞に転移酵素を作用させ、導入遺伝子を完全に染色体から除去する方法が用いられ得る。好ましいトランスポゾンとしては、例えば、鱗翅目昆虫由来のトランスポゾンであるpiggyBac等が挙げられる。piggyBacトランスポゾンを用いる具体的手段は、Kaji, K. et al., Nature, 458: 771-775 (2009)、Woltjen et al., Nature, 458: 766-770 (2009) に開示されている。

【 0 0 3 9 】

別の好ましい非組込み型ベクターとして、染色体外で自律複製可能なエピゾーマルベクターが挙げられる。エピゾーマルベクターを用いる具体的手段は、Science, 324, 797-801(2009)に開示されている。

【 0 0 4 0 】

核初期化物質が低分子化合物である場合、該物質の体細胞への導入は、該物質を適当な濃度で水性もしくは非水性溶媒に溶解し、ヒトまたはマウスより単離した体細胞の培養に適した培地（例えば、約5~20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、RPMI1640培地、199培地、F12培地など）中に、核初期化物質濃度が体細胞において核初期化が起こるのに十分で且つ細胞毒性がみられない範囲となるように該物質溶液を添加して、細胞を一定期間培養することにより実施することができる。核初期化物質濃度は用いる核初期化物質の種類によって異なるが、約0.1nM~約100nMの範囲で適宜選択される。接触期間は細胞の核初期化が達成されるのに十分な時間であれば特に制限はないが、通常は陽性コロニーが出現するまで培地に共存させておけばよい。

【 0 0 4 1 】

(d) iPS細胞の樹立効率改善物質

従来iPS細胞の樹立効率が低いために、近年、その効率を改善する物質が種々提案されている。よって前記核初期化物質に加え、これら樹立効率改善物質を体細胞に接触させることにより、iPS細胞の樹立効率をより高めることが期待できる。

【 0 0 4 2 】

iPS細胞の樹立効率改善物質としては、例えば、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤 [ 例えば、バルプロ酸（VPA）(Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA（例、HDAC1 siRNA Smartpool（登録商標）(Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等）等の核酸性発現阻害剤など]、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤（例えば5'-azacytidine）(Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、G9aヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 [ 例えば、BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2: 525-528 (2008))等の低分子阻害剤、G9aに対するsiRNAおよびshRNA（例、G9a siRNA(human) (Santa Cruz Biotechnology)等）等の核酸性発現阻害剤など]、L-channel calcium agonist（例えばBayk8644）(Cell Stem Cell, 3, 568-574 (2008))、p53阻害剤（例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、UTF1(Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、Wnt Signaling（例えばsoluble Wnt3a）(Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008))、2i/LIF（2iはmitogen-activated protein kinase signallingおよびglycogen synthase kinase-3の阻害剤、PloS Biology, 6(10), 2237-2247 (2008))等が挙げられるが、それらに限定されない。前記で核酸性の発現阻害剤はsiRNAもしくはshRNAをコードするDNAを含む発現ベクターの形態であってもよい。

【 0 0 4 3 】

尚、前記核初期化物質の構成要素のうち、例えばSV40 large T等は、体細胞の核初期化のために必須ではなく補助的な因子であるという点において、iPS細胞の樹立効率改善物質の範疇にも含まれ得る。核初期化の機序が明らかでない現状においては、核初期化に必須の因子以外の補助的な因子について、それらを核初期化物質として位置づけるか、ある

10

20

30

40

50

いはiPS細胞の樹立効率改善物質として位置づけるかは便宜的であってもよい。即ち、体細胞の核初期化プロセスは、体細胞への核初期化物質およびiPS細胞の樹立効率改善物質の接触によって生じる全体的事象として捉えられるので、当業者にとって両者を必ずしも明確に区別する必要性はないであろう。

【0044】

iPS細胞の樹立効率改善物質の体細胞への接触は、該物質が(a) タンパク性因子である場合、(b) 該タンパク性因子をコードする核酸である場合、あるいは(c) 低分子化合物である場合に依りて、核初期化物質についてそれぞれ上記したと同様の方法により、実施することができる。

【0045】

iPS細胞の樹立効率改善物質は、該物質の非存在下と比較して体細胞からのiPS細胞樹立効率が有意に改善される限り、核初期化物質と同時に体細胞に接触させてもよいし、また、どちらかを先に接触させてもよい。一実施態様において、例えば、核初期化物質がタンパク性因子をコードする核酸であり、iPS細胞の樹立効率改善物質が化学的阻害物質である場合には、前者は遺伝子導入処理からタンパク性因子を大量発現するまでに一定期間のラグがあるのに対し、後者は速やかに細胞に作用しうることから、遺伝子導入処理から一定期間細胞を培養した後に、iPS細胞の樹立効率改善物質を培地に添加することができる。別の実施態様において、例えば、核初期化物質とiPS細胞の樹立効率改善物質とがいずれもウイルスベクターやプラスミドベクターの形態で用いられる場合には、両者を同時に細胞に導入してもよい。

【0046】

哺乳動物から分離した体細胞は、核初期化工程に供するに先立って、細胞の種類に応じてその培養に適した自体公知の培地で前培養することができる。そのような培地としては、例えば、約5~20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地(MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、RPMI1640培地、199培地、F12培地などが挙げられるが、それらに限定されない。核初期化物質及びiPS細胞の樹立効率改善物質との接触に際し、例えば、カチオニックリポソームなど導入試薬を用いる場合には、導入効率の低下を防ぐため、無血清培地に交換しておくことが好ましい場合がある。核初期化物質(及びiPS細胞の樹立効率改善物質)を接触させた後、細胞を、例えばES細胞の培養に適した条件下で培養することができる。マウス細胞の場合、通常の培地に分化抑制因子としてLeukemia Inhibitory Factor(LIF)を添加して培養を行う。一方、ヒト細胞の場合には、LIFの代わりに塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)および/または幹細胞因子(SCF)を添加することが望ましい。また通常、細胞は、フィーダー細胞として、放射線や抗生物質で処理して細胞分裂を停止させたマウス胎仔由来の線維芽細胞(MEF)の共存下で培養される。MEFとしては、通常STO細胞等がよく使われるが、iPS細胞の誘導には、SNL細胞(McMahon, A. P. & Bradley, A. Cell 62, 1073-1085 (1990))等がよく使われている。フィーダー細胞との共培養は、核初期化物質の接触より前から開始してもよいし、該接触時から、あるいは該接触より後(例えば1-10日後)から開始してもよい。

【0047】

iPS細胞の候補コロニーの選択は、薬剤耐性とレポーター活性を指標とする方法と目視による形態観察による方法とが挙げられる。前者としては、例えば、分化多能性細胞において特異的に高発現する遺伝子(例えば、Fbx15、Nanog、Oct3/4など、好ましくはNanog又はOct3/4)の遺伝子座に、薬剤耐性遺伝子及び/又はレポーター遺伝子をターゲットィングした組換え体細胞を用い、薬剤耐性及び/又はレポーター活性陽性のコロニーを選択するというものである。そのような組換え体細胞としては、例えばFbx15遺伝子座にgeo(-ガラクトシダーゼとネオマイシンホスホトランスフェラーゼとの融合タンパク質をコードする)遺伝子をノックインしたマウス由来のMEF(Takahashi & Yamanaka, Cell, 126, 663-676 (2006))、あるいはNanog遺伝子座に緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子とピュロマイシン耐性遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス由来のMEF(Okita et al., Nature, 448, 313-317 (2007))等が挙げられる。一方、目視による形態観察で候補

10

20

30

40

50

コロニーを選択する方法としては、例えばTakahashi et al., Cell, 131, 861-872 (2007)に記載の方法が挙げられる。レポーター細胞を用いる方法は簡便で効率的ではあるが、iPS細胞がヒトの治療用途を目的として作製される場合、安全性の観点から目視によるコロニー選択が望ましい。核初期化物質としてOct3/4、Klf4及びSox2の3因子を用いた場合、樹立クローン数は減少するものの生じるコロニーのほとんどがES細胞と比較して遜色のない高品質のiPS細胞であることから、レポーター細胞を用いなくとも効率よくiPS細胞を樹立することが可能である。

【0048】

選択されたコロニーの細胞がiPS細胞であることの確認は、上記したNanog（もしくはOct3/4）レポーター陽性（ピューロマイシン耐性、GFP陽性など）および目視によるES細胞様コロニーの形成によっても行い得るが、より正確を期すために、各種ES細胞特異的遺伝子の発現を解析したり、選択された細胞をマウスに移植してテラトーマ形成を確認する等の試験を実施することもできる。

【0049】

#### (iii) ナイーヴヒトESおよびiPS細胞

胚盤胞期胚から誘導される従来のヒトES細胞は、マウスES細胞と非常に異なる生物学的（形態的、分子的小および機能的）特性を有する。マウス多能性幹細胞は、2つの機能的に区別される状態、即ちLIF依存的なES細胞と、bFGF依存的なエピプラスト幹細胞（EpiSCs）とで存在し得る。分子学的解析から、ヒトES細胞の多能性状態は、マウスES細胞のそれではなく、むしろマウスEpiSCsのそれに類似していることが示唆されている。最近、LIFの存在下にOct3/4、Sox2、Klf4、c-MycおよびNanogを異所的に誘導するか（Cell Stem Cells, 6: 535-546, 2010参照）、LIF並びにGSK およびERK1/2経路阻害剤と組み合わせて、Oct3/4、Sox2およびKlf4を異所的に誘導する（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, オンライン公開doi/10.1073/pnas.1004584107参照）ことにより、マウスES細胞様の多能性状態にあるヒトESおよびiPS細胞（ナイーブヒトESおよびiPS細胞とも呼ばれる）が樹立されている。これらのナイーブヒトESおよびiPS細胞は、それらの多能性が従来のヒトESおよびiPS細胞に比べてより未熟であるため、本発明のための出発材料として好適であり得る。

【0050】

#### (2) 多能性幹細胞からPDGFR 陽性の中胚葉系細胞への分化誘導

分化誘導用の基本培地としては、無血清の最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、RPMI1640培地、199培地、F12培地およびこれらの混合培地、あるいは前記いずれかの培地に、適当濃度の周知慣用の培地添加物（例えば、血清アルブミン、2-メルカプトエタノール、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、エタノールアミン、抗生物質（例、ペニシリン、ストレプトマイシン）等）を補充した培地（例えば、エス・クロン（S-Clone）培地（例えばSF-03；三光純薬））などが挙げられるが、それらに限定されない。

【0051】

多能性幹細胞からPDGFR 陽性の中胚葉系細胞への分化を誘導する、本発明の分化誘導培地（培地A）は、上記基本培地にActivin Aを必須の添加物として含有する。Activin Aは、多能性幹細胞からPDGFR 陽性の中胚葉系細胞への分化誘導において、細胞の生存を濃度依存的に増大させる。Activin Aの濃度は、例えば約1 ng/ml以上、好ましくは約3 ng/ml以上、より好ましくは約5 ng/ml以上である。また、Activin Aの濃度は、例えば約20 ng/ml以下、好ましくは約15 ng/ml以下、より好ましくは10 ng/ml以下である。

【0052】

培地Aには、BMPおよび/またはIGF-1がさらに含有されていることが好ましい。BMPは、有効濃度範囲でPDGFR 陽性細胞の誘導効率を顕著に増大させる。BMPとしては、例えばBMP2、BMP4、BMP7等が挙げられる。BMPは1種であってもよいし、2種以上を組み合わせてもよい。好ましくは、BMP4が単独で、あるいはBMP4と他の1種以上のBMPとの組合せで用いられる。BMPの濃度は、BMP全体で、例えば約5 ng/ml以上、好ましくは約7.5 ng/ml以上、より好ましくは約10 ng/ml以上である。また、BMPの濃度は、BMP全体で、例えば、約

10

20

30

40

50

30 ng/ml以下、好ましくは約20 ng/ml以下、より好ましくは約15 ng/ml以下である。

【0053】

一方、Activin A単独もしくはActivin AおよびBMP存在下でも、IGF-1がないと、細胞の生存度が低下することから、IGF-1は、本分化誘導過程において、少なくとも細胞の生存に大きく影響すると考えられる。IGF-1の濃度は、例えば約1 ng/ml以上、好ましくは約5 ng/ml以上、より好ましくは約10 ng/ml以上である。また、IGF-1の濃度は、例えば約30 ng/ml以下、好ましくは約20 ng/ml以下、より好ましくは約15 ng/ml以下である。

【0054】

特に好ましい態様においては、培地Aは基本培地に加えて、Activin A、BMP4およびIGF-1を含有する。Activin Aの濃度は約3-約15 ng/ml、好ましくは約5-約10 ng/ml、BMP4の濃度は約7.5-約20 ng/ml、好ましくは約10-約15 ng/ml、IGF-1の濃度は約5-約20 ng/ml、好ましくは約10-約15 ng/mlの範囲で適宜選択することができる。

【0055】

培養は、自体公知の培養容器（例えば、ゼラチンもしくはコラーゲンコートした10 cm細胞培養dishなど）中に、多能性幹細胞を、例えば約3-約10 x 10<sup>4</sup>細胞/mL、好ましくは約4-約8 x 10<sup>4</sup>細胞/mL（約3-約10 x 10<sup>5</sup>細胞/10 cm dish、好ましくは約4-約8 x 10<sup>5</sup>細胞/10 cm dish）の細胞密度となるように播種し、インキュベーター中、5% CO<sub>2</sub>/95%大気の大気下、約30-約40℃、好ましくは約37℃で、約2-約7日間、好ましくは約3-約4日間行われる。PDGFR陽性の中胚葉系細胞に分化したことの確認は、例えば、PDGFRに対する抗体とセルソータを用いて、細胞の表面抗原の表現型を解析することにより行うことができる。必要に応じて、さらに他の細胞表面抗原や転写因子の発現についても調べることができる。例えば、他の表面抗原としてはFik1やVEGFR2が、転写因子としては、brachyury(T)やMixl1が挙げられる。多能性幹細胞はまず、最も未熟なPDGFR陽性/Fik1ダブル陽性細胞である原条中胚葉系細胞へと分化し、次いで、筋細胞へと分化するPDGFR陽性/Fik1陰性の沿軸中胚葉系細胞に分化する。一方、血液細胞や心筋細胞へと分化する側板中胚葉系細胞では、PDGFR陰性/Fik1陽性の表現型を示す。本分化誘導工程により得られるPDGFR陽性の細胞フラクションはFik1やbrachyury(T)を発現していることから、大半が原条中胚葉系細胞の分化ステージにあると考えられる。

【0056】

上述のように、第1の本発明の好ましい態様においては、Activin A、BMP4およびIGF-1が培地Aに含有される。従って、本発明はまた、Activin A、BMP4およびIGF-1を含有してなる、多能性幹細胞からPDGFR陽性の中胚葉系細胞への分化誘導試薬キットを提供する。これらの成分は、水もしくは適当な緩衝液中に溶解した形態で提供されてもよく、凍結乾燥粉末として提供され、用時適当な溶媒に溶解して用いることもできる。また、これらの成分はそれぞれ単独の試薬としてキット化されていてよいし、互いに悪影響を与えない限り、2種以上を混合して1つの試薬として提供することもできる。

【0057】

(3) PDGFR陽性の中胚葉系細胞から骨格筋前駆細胞への分化誘導

上記のようにして得られるPDGFR陽性の中胚葉系細胞を、無血清下、かつWntシグナル誘導剤の存在下で培養することにより、骨格筋前駆細胞への分化を誘導することができる。従って、第2の本発明は、PDGFR陽性の中胚葉系細胞から骨格筋前駆細胞を製造する方法に関する。

【0058】

本分化誘導工程（工程2）に供されるPDGFR陽性の中胚葉系細胞は、上記（2）で詳述した工程1）により得られたものに限定されず、いかなる方法により調製されたものであってもよい。例えば、ES細胞を、BMP4を含有する培地中で培養することにより得られるPDGFR陽性の中胚葉系細胞を用いることもできる。しかしながら、好ましくは、工程2）に供されるPDGFR陽性の中胚葉系細胞は、工程1）により調製された、多能性幹細胞由来、好ましくはiPS細胞もしくはES細胞由来の、PDGFR陽性の中胚葉系細胞である。

【0059】

10

20

30

40

50

工程2)における分化誘導用の基本培地としては、上記工程1)と同一組成の無血清培地が、同様に好ましく用いられる。

PDGFR 陽性の中胚葉系細胞から骨格筋前駆細胞への分化を誘導する、本発明の分化誘導培地（培地B）は、上記基本培地に1種以上のWntシグナル誘導剤を必須の添加物として含有する。Wntシグナル誘導剤としては、例えば、LiCl、Wnt1、Wnt3a、Wnt7a等が挙げられる。Wnt1、Wnt3a、Wnt7a等を介するWntシグナルは、筋形成に關与する転写因子Myf5およびMyoDの発現を正に制御しており、LiClは古典的なWntシグナル活性化剤として知られている。好ましくは、Wntシグナル誘導剤としてLiClが用いられる。Wntシグナル誘導剤の濃度は、例えば約1 mM以上、好ましくは約3 mM以上、より好ましくは約5 mM以上である。また、Wntシグナル誘導剤の濃度は、例えば約20 mM以下、好ましくは約15 mM以下、より好ましくは10 mM以下である。

10

#### 【0060】

培地Bには、Shhおよび/またはIGF-1がさらに含有されていることが好ましい。ShhおよびIGF-1は、有効濃度範囲で骨格筋前駆細胞の誘導効率を顕著に増大させる。Shhの濃度は、例えば約5 ng/ml以上、好ましくは約10 ng/ml以上、より好ましくは約15 ng/ml以上である。また、Shhの濃度は、例えば、約50 ng/ml以下、好ましくは約30 ng/ml以下、より好ましくは約25 ng/ml以下である。一方、IGF-1の濃度は、例えば約1 ng/ml以上、好ましくは約5 ng/ml以上である。また、IGF-1の濃度は、例えば約40 ng/ml以下、好ましくは約20 ng/ml以下である。

#### 【0061】

特に好ましい態様においては、培地Bは基本培地に加えて、LiCl、ShhおよびIGF-1を含有する。LiClの濃度は約3-約15 mM、好ましくは約5-約10 mM、Shhの濃度は約10-約30 ng/ml、好ましくは約15-約25 ng/ml、IGF-1の濃度は約1-約40 ng/ml、好ましくは約5-約20 ng/mlの範囲で適宜選択することができる。

20

#### 【0062】

培養は、自体公知の培養容器（例えば、ゼラチンもしくはコラーゲンコートした10 cm細胞培養dishなど）中に、PDGFR 陽性の中胚葉系細胞を、例えば約3-約10 x 10<sup>4</sup>細胞/mL、好ましくは約4-約8 x 10<sup>4</sup>細胞/mL（約3-約10 x 10<sup>5</sup>細胞/10 cm dish、好ましくは約4-約8 x 10<sup>5</sup>細胞/10 cm dish）の細胞密度となるように播種し、インキュベーター中、5% CO<sub>2</sub>/95%大気雰囲気下、約30-約40℃、好ましくは約37℃で、約1-約7日間、好ましくは約2-約4日間行われる。多能性幹細胞からPDGFR 陽性の中胚葉系細胞を誘導する間、LiCl等のWntシグナル誘導剤を培地に添加することもできる。好ましくは、Wntシグナル誘導剤は、多能性幹細胞の分化誘導開始から0日目ないし3日目、より好ましくは1日目または2日目に、培地に添加される。

30

#### 【0063】

骨格筋前駆細胞に分化したことの確認は、例えば、転写因子Myf5およびMyoDの発現を、RT-PCR等により解析することにより行うことができる。必要に応じて、さらに他の転写因子や細胞表面抗原の発現についても調べることができる。例えば、他の転写因子としては、Pax3やPax7が、細胞表面抗原としては、SM/C-2.6やPDGFR $\beta$ が挙げられる。

#### 【0064】

本分化誘導工程により得られるPDGFR 陽性の細胞フラクションはMyf5およびMyoDを発現しており、一方、PDGFR 陰性の細胞フラクションはMyoDを発現していないことから、骨格筋前駆細胞はほとんどがPDGFR 陽性のフラクションに含まれると考えられる。したがって、本発明の好ましい一実施態様においては、本分化誘導工程で得られた細胞培養物から、PDGFR 陽性の細胞フラクションを選択・分離することにより、より純化された骨格筋前駆細胞集団を得ることができる。尚、PDGFR 陰性の細胞フラクションはPax3およびPax7、並びに発生期神経細胞マーカーであるSox1を発現していることから、神経系細胞に分化していると考えられ、本誘導工程で得られる未分画の細胞集団は、例えば、骨格筋再生に加えて神経再生を必要とする場合の移植細胞ソースとして、好ましく使用し得る可能性がある。

40

50

## 【0065】

上述のように、第2の本発明の好ましい態様においては、LiCl、ShhおよびIGF-1が培地Bに含有される。従って、本発明はまた、LiCl、ShhおよびIGF-1を含有してなる、PDGFR陽性の中胚葉系細胞から骨格筋前駆細胞への分化誘導試薬キットを提供する。これらの成分は、水もしくは適当な緩衝液中に溶解した形態で提供されてもよく、(凍結)乾燥粉末として提供され、用時適当な溶媒に溶解して用いることもできる。また、これらの成分はそれぞれ単独の試薬としてキット化されていてもよいし、互いに悪影響を与えない限り、2種以上を混合して1つの試薬として提供することもできる。

## 【0066】

## (4) 多能性幹細胞由来の骨格筋前駆細胞含有細胞集団

本発明はまた、前記工程2)により製造された、多能性幹細胞由来の骨格筋前駆細胞含有細胞集団を提供する。該細胞集団は純化された骨格筋前駆細胞の集団であってもよいし、骨格筋前駆細胞以外の1種以上の細胞が共存していてもよい。ここで「骨格筋前駆細胞」はMyf5陽性かつMyoD陽性の細胞として定義される。上述のように、Myf5陽性かつMyoD陽性の細胞はPDGFR陽性の細胞フラクションにのみ含まれ、またPDGFR陽性細胞の大半はSM/C-2.6陽性でもあるので、純化された骨格筋前駆細胞は、前記工程2)で得られた細胞培養物を、抗PDGFR抗体および/または抗SM/C-2.6抗体を用いてソーティングすることにより得ることができる。

## 【0067】

好ましくは、本発明の骨格筋前駆細胞含有細胞集団は、前記工程1)および2)を経て製造された、iPS細胞もしくはES細胞由来の細胞集団である。iPS細胞が、例えば、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターにより初期化遺伝子を体細胞に導入することにより製造された場合などでは、細胞のゲノム中に初期化遺伝子が組み込まれているので、該iPS細胞由来の骨格筋前駆細胞もまた、そのゲノム中に初期化遺伝子が組み込まれている。iPS細胞由来の骨格筋前駆細胞は、本発明により初めて樹立されたものであるから、ゲノム中に外来の初期化遺伝子が組み込まれた骨格筋前駆細胞は、当然、新規な細胞である。骨格筋前駆細胞のゲノム中に組み込まれる初期化遺伝子としては、iPS細胞の作製に関して上記した核初期化物質をコードする核酸が挙げられるが、好ましくはOct3/4、Sox2、Klf4の3遺伝子か、さらにc-Mycを加えた4遺伝子が挙げられる。

## 【0068】

## (5) 多能性幹細胞由来の骨格筋前駆細胞の用途

このようにして樹立された多能性幹細胞由来の骨格筋前駆細胞は、種々の目的で使用することができる。例えば、筋疾患患者本人やHLAの型が同一もしくは実質的に同一である他人から採取した体細胞を用いて誘導したiPS細胞から分化させた骨格筋前駆細胞を該患者に移植して骨格筋を再生するという、自家もしくは同種異系移植による幹細胞療法が可能となる。さらに、筋疾患患者由来のiPS細胞から分化させた骨格筋前駆細胞は、対応する既存の細胞株よりも実際の患者体内での筋細胞の状態をより反映していると考えられるので、筋疾患治療薬の薬効や毒性のin vitro評価系にも好適に用いることができる。さらに原因が未解明の筋疾患の病理学的研究のツールとしても好ましく用いられ得る。

## 【0069】

以下に、本発明の多能性幹細胞由来の骨格筋前駆細胞の再生医療における使用について詳述する。

後記実施例に示されるように、本発明の骨格筋前駆細胞を筋ジストロフィーモデルマウスに移植したところ、筋線維が多く認められ、炎症の抑制および筋肉組織の修復効果が認められた。またサテライト細胞への分化誘導も認められた。さらに筋注ではなく静注によっても炎症抑制効果が認められたことから、該骨格筋前駆細胞は、筋ジストロフィーをはじめとする種々の筋疾患における骨格筋再生、サテライト細胞形成を促進し、該疾患を治療するのに有用である。

## 【0070】

本発明の骨格筋前駆細胞により治療され得る筋疾患としては、例えば、筋ジストロフィ

10

20

30

40

50

ー（例、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）、ベッカー型筋ジストロフィー、先天性筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、筋緊張性筋ジストロフィー等）、先天性ミオパチー、遠位型ミオパチー、ミトコンドリア病などの遺伝性ミオパチー、多発性筋炎、皮膚筋炎、重症筋無力症などの非遺伝性ミオパチー、脊髄性筋萎縮症、球脊髄性筋萎縮症、筋萎縮性側索硬化症などの神経原性筋疾患などが挙げられるが、それらに限定されない。好ましくは、本発明の骨格筋前駆細胞は、筋原性疾患、特にDMD等の進行性筋ジストロフィーをはじめとする難治性の遺伝性および非遺伝性の筋原性疾患の治療において、骨格筋再生および/またはサテライト細胞形成の促進のために使用され得る。

【0071】

筋ジストロフィーをはじめとする遺伝性筋疾患の治療用の骨格筋前駆細胞としては、患者とHLAの型が同一もしくは実質的に同一である他人から誘導された多能性幹細胞から分化誘導した骨格筋前駆細胞が好ましく使用される。ヒトの再生医療においては、HLAの型が同一もしくは実質的に同一なヒトES細胞を入手することは容易でないため、骨格筋前駆細胞を誘導するための多能性幹細胞としては、ヒトiPS細胞を用いることが好ましい。

【0072】

別の一実施態様においては、遺伝性筋疾患治療用の骨格筋前駆細胞として、患者本人の体細胞由来のiPS細胞から分化させた骨格筋前駆細胞を用いることも可能である。例えば、DMD患者の体細胞から誘導したiPS細胞は、ジストロフィン遺伝子が欠損しているため、iPS細胞に正常なジストロフィン遺伝子を導入する。ジストロフィンcDNAは全長14kbで、筋細胞への遺伝子導入に最適なアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターは約4.5kbの収容力しかないため、現在の遺伝子治療戦略としては、短縮化した機能的なジストロフィン遺伝子（マイクロジストロフィン遺伝子（3.7kb））をAAVベクターで導入するか、あるいはより大きなDNAを挿入できるレトロウイルス/レンチウイルスベクターを用いて6.4kbのミニジストロフィン遺伝子を導入する、または全長ジストロフィン遺伝子を裸でもしくはGuttedアデノウイルスベクターを用いて導入する方法が試みられている。iPS細胞の場合、レトロウイルス/レンチウイルスで最も高い導入効率を得られる他、人工染色体による全長cDNAの導入も可能であるため、遺伝子治療の選択肢が広がるという利点がある。また肢帯型筋ジストロフィーの場合、サルコグリカン遺伝子異常が原因のため、該遺伝子をiPS細胞に導入すればよい。あるいは、iPS細胞の内因性DNA修復機構や相同組換えを利用して、原因遺伝子の変異部位を修復することもできる。即ち、変異部位を正常にした配列を有するキメラRNA/DNAオリゴヌクレオチド（chimeraplast）を導入し、標的配列に結合させてミスマッチを形成させ、内因性DNA修復機構を活性化して遺伝子修復を誘導する。あるいは、変異部位に相同な400-800塩基の一本鎖DNAを導入して相同組換えを起こさせることにより遺伝子修復を行なうこともできる。このようにして得られる、疾患原因遺伝子が修復されたiPS細胞を上記工程1)および2)を経て骨格筋前駆細胞に分化誘導することにより、患者本人由来の正常な骨格筋前駆細胞を製造することができる。

【0073】

しかしながら、遺伝性筋疾患患者は、生来、正常な遺伝子産物を有していないことから、患者本人の骨格筋前駆細胞であっても、正常遺伝子産物（例えば、ジストロフィン）に対する免疫応答が起きる可能性があるため、いずれにせよ、骨格筋前駆細胞の移植に際しては、免疫抑制剤の併用が必要であると考えられる。あるいは、この免疫応答を回避する目的で、DMDの場合、患者骨格筋でも発現しているジストロフィンホモログであるユートロフィン遺伝子を導入してジストロフィン機能を代替させるという方法もある。

【0074】

一方、非遺伝性筋疾患の場合、患者本人の体細胞から誘導したiPS細胞から分化させた骨格筋前駆細胞は、正常な細胞である可能性があるため、そのまま患者への移植に用いることが可能な場合がある。

【0075】

前記工程2)により得られる骨格筋前駆細胞含有細胞集団は、骨格筋前駆細胞をソーティングして純化した細胞で製剤化することもできるし、そのままソートなしで製剤化するこ

10

20

30

40

50

ともできる。ソーティングすることにより用量を低減化することができるが、ソートなしで用いることにより省力化・コスト削減などの利点が見込まれる。また、上述のように、前記工程2)により得られる骨格筋前駆細胞含有細胞集団のうち、PDGFR 陰性フラクシオンは神経系の細胞群であると考えられるので、骨格筋再生とともに神経再生が必要とされる疾患、例えば、神経原性筋疾患の治療において有効であり得る。

#### 【0076】

本発明の骨格筋前駆細胞（骨格筋前駆細胞含有細胞集団を含む。以下同様。）は、常套手段にしたがって医薬上許容される担体と混合するなどして、非経口製剤、好ましくは、注射剤、懸濁剤、点滴剤等の非経口製剤として製造される。当該非経口製剤に含まれ得る医薬上許容される担体としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などの注射用の水性液を挙げるができる。本発明の剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤、酸化防止剤などと配合しても良い。

10

#### 【0077】

本発明の剤を水性懸濁液剤として製剤化する場合、上記水性液に約 $1.0 \times 10^6$ -約 $1.0 \times 10^7$ 細胞/mLとなるように、骨格筋前駆細胞を懸濁させればよい。

このようにして得られる製剤は、安定で低毒性であるので、ヒトなどの哺乳動物に対して安全に投与することができる。投与方法は特に限定されないが、好ましくは注射もしくは点滴投与であり、静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与（患部局所投与）などが挙げられる。後記実施例に示される通り、本発明の剤は、静脈内投与のように全身投与した場合でも、筋損傷部位に選択的に生着することができ、かつ筋肉局所投与と同等の炎症抑制作用、骨格筋再生作用を発揮し得る。したがって、本発明の剤は、特に症状が多く部位で発現している場合には、投与経路として、静脈内投与や動脈内投与などの全身投与を用いることが好ましい。本発明の剤の投与量は、投与対象、治療標的部位、症状、投与方法などにより差異はあるが、通常、DMD患者（体重60kgとして）においては、例えば、静脈内注射の場合、1回につき骨格筋前駆細胞量として約 $1.0 \times 10^5$ -約 $1 \times 10^7$ 細胞を、約1-約2週間隔で、約4-約8回投与するのが好都合である。

20

#### 【0078】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

30

#### 【0079】

##### 実施例

##### < 試薬および方法 >

##### 1. マウスiPS細胞の培養および分化誘導

マウスiPS細胞としては以下の(1)~(3)の3種類を用いた。

- (1) Oct3/4, Klf4, Sox2およびc-Mycの4遺伝子をレトロウイルスでマウスMEFに感染させて得られた「iPS-Nanog-20D-17」[Okita, K. et al., Nature 448, 313-317 (2007)]
- (2) Oct3/4, Klf4およびSox2の3遺伝子をレトロウイルスでマウスTTFに感染させて得られた「iPS-DsRed」[Nakagawa, M. et al., Nat. Biotechnol., 26, 101-106 (2008)]
- (3) Oct3/4, Klf4, Sox2およびc-Mycの4遺伝子をプラスミドでマウスMEFに導入して得られた「Plasmid-iPS」[Okita, K. et al., Science, 322, 949-953 (2008)]

40

マウスiPS細胞の培養は、高橋らの方法[Takahashi, K. and Yamanaka, S., Cell 126, 663-676 (2006)]をわずかに改変し、無フィーダー上で行った。要約すると、培地はDME M(ナカライテスク)に2 mM L-グルタミン(ナカライテスク)、1xNon-essential amino acid (Invitrogen)、100  $\mu$ M 2-mercaptoethanol (Invitrogen)、50 mU/L Penicillin/50  $\mu$ g/L Streptomycinを加えたものを基本培地とし、これに15%になるようにウシ胎児血清 (Invitrogen)を加え、iPS細胞維持培地とした。0.1%ゼラチンであらかじめ10cm細胞培養ディッシュをコートし、ここに37  $^{\circ}$ Cに温めた維持培地を10ml加え、LIF (ESGRO) を10  $\mu$ l添加し

50

、60万個のiPS細胞を播種し、37℃、5% CO<sub>2</sub>、100%湿度環境のインキュベータで培養した。2日後に約10倍に細胞が増殖するので継代を行い、翌日にLIFを添加した新しい維持培地に培地交換をした。

iPS細胞の分化誘導は無血清培地で行った。培地はエスクロンSF-03(三光純薬)に0.2%ウシ血清アルブミン(シグマ)、100 μM 2-mercaptoethanol (Invitrogen)、50 mU/L Penicillin/50 μg/L Streptomycinを加えたものを分化誘導基本培地とし、この中にさまざまな成長因子を加えることで条件の検討をした。最終的に採用した成長因子とその濃度は以下の通りである。

(前半3日間)

BMP4 (Peprtech) 10 ng/ml

Activin A (Peprtech) 5 ng/ml

IGF-1 (Peprtech) 10 ng/ml

(後半3日間)

LiCl (Wako) 5 mM

Sonic Heagehog (R&D) 20 ng/ml

IGF-1 (Peprtech) 5 ng/ml

未分化細胞は継代と同様にディッシュから剥がし、分化誘導基本培地で2回洗った。前半3日間の培養液10mlをコラーゲンタイプIV(新田ゼラチン)でコートした10cm細胞培養ディッシュに加え、この中に50万個の未分化なiPS細胞を播種した。37℃、5% CO<sub>2</sub>、100%湿度環境のインキュベータで3日間培養し、3日後に後半3日間の培養液に培地交換した。計6日間誘導した細胞から、後述する細胞分離法にて骨格筋前駆細胞を分離し、これを以後の実験に用いた。

【0080】

## 2. 細胞の分離

前述の分化誘導法にて誘導したマウスiPS細胞をFACS Aria(ベクトン・ディッキンソン)にて骨格筋前駆細胞とそれ以外の細胞群に分離した。細胞を抗体を用いて染色する方法は以前の方法(Sakurai, H. et al., Stem Cells 24, 575-586 (2006))に準じた。用いた抗体はラットモノクローナル抗体であり、APA5(anti-PDGFR)とECCD2(anti-ECD)およびSM/C-2.6の3種である。前2者は西川博士より譲渡され(Sakurai, H. et al., Stem Cells 24, 575-586 (2006))、後者は山本博士より譲渡された(Fukada, S. et al., Exp Cell Res., 296, 245-255 (2004))。APA5およびSM/C-2.6にはbiotin(PIERCE)を抱合し、ストレプトアビジン-APCを2次抗体として用いることで蛍光を標識した。ECCD2にはAlexa488(Molecular Probes)を定法に従って直接抱合し蛍光を標識した。蛍光標識された細胞は1%ウシ血清アルブミン添加 Hanks' balanced salt solution(Invitrogen)に1 mlあたり5百万個となるように懸濁しFACS Ariaにて蛍光を観察、解析し、PDGFR陽性の分画を分離し回収した。

【0081】

## 3. 遺伝子発現解析

回収した細胞からセパゾールリエージェント(ナカライテスク)を使用し、RNAを抽出した。RNAからのcDNA合成にはSuperScriptII逆転写キット(Invitrogen)を用いた。PCRの試薬はExTaq PCRキット(タカラバイオ)を用い、サーマルサイクラーはPTC200(DNA engine)を使用し、25~35サイクルのPCR反応によりDNAを増幅し電気泳動により解析した。PCRプライマーは以下のものを使用した。

-Actin:

Fw:5' -AGTGTGACGTTGACATCCGT-3' (配列番号:1)

Rv:5' -GCAGCTCAGTAACAGTCCGC-3' (配列番号:2)

PDGFR :

Fw:5' -CTTTGTGCCTCTCGGGATGA-3' (配列番号:3)

Rv:5' -AGGTTACTTGAGTCTCCGGATCTG-3' (配列番号:4)

Pax3:

10

20

30

40

50

Fw:5' -CTGCACTCAAGGGACTCCTC-3' (配列番号:5)

Rv:5' -GTTGTACCTGCTTGGGTTT-3' (配列番号:6)

Pax7:

Fw:5' -CCGTGTTTCTCATGGTTGTG-3' (配列番号:7)

Rv:5' -ACCAGAAGGAGCAGCACTGT-3' (配列番号:8)

Myf5:

Fw:5' -GAGTTTGGGGACCAGTTTGA-3' (配列番号:9)

Rv:5' -GCTTCAGGGCTTCTTTTCCT-3' (配列番号:10)

MyoD:

Fw:5' -TACCCAAGGTGGAGATCCTG-3' (配列番号:11)

Rv:5' -CTGGTTCCCTGTTCTGTGT-3' (配列番号:12)

Sox1:

Fw:5' -GCCCAGGAAAACCCCAAGATG-3' (配列番号:13)

Rv:5' -CCGTTAGCCAGCCGTTGAC-3' (配列番号:14)

【0082】

#### 4. マウスへの移植

使用したマウスは、カルジオトキシンによる再生筋誘導実験ではC57BL/6(日本SLC)を用い、筋ジストロフィーモデルマウスによる実験ではDMD-nullマウス(北里大学理学部・花岡博士より譲渡; Kudoh, H. et al., Biochem Biophys Res Commun., 328, 507-516 (2005))を用いた。動物の移植実験は「京都大学における動物実験の実施に関する規程」に則り行った。

カルジオトキシン投与は移植の3日前に行った。ジエチルエーテル麻酔下で左前脛骨筋に10 $\mu$ Mのカルジオトキシン(Wako)を50 $\mu$ l筋肉注射にて投与した。3日後にFACS Ariaにて分離された骨格筋前駆細胞50万個~100万個を50 $\mu$ lのPBSで懸濁し37 $^{\circ}$ Cに維持し、再びジエチルエーテル麻酔下で左前脛骨筋に筋肉注射にて移植、または眼窩静脈叢より静脈注射にて移植した。

DMD-nullマウスを使用した移植実験では、FACS Ariaにて分離された骨格筋前駆細胞200万個を100 $\mu$ lのPBSで懸濁し37 $^{\circ}$ Cに維持し、ジエチルエーテル麻酔下で両側の前脛骨筋に50 $\mu$ lづつ(100万個づつ)筋肉注射にて移植した。

解析はどちらの実験も28日後にマウスを二酸化炭素にて安楽死させ、前脛骨筋をはじめ大腿四頭筋、前肢伸筋群、横隔膜を切離し、液体窒素にて冷却したイソペンタン(ナカライテスク)に浸して急速冷凍することで、組織切片のサンプルを作成した。組織サンプルはクライオスタット(ライカ)にて10 $\mu$ m厚にスライスし、APSコートのスライドガラス(松浪ガラス)に付着させ乾燥し、組織切片とした。

【0083】

#### 5. 蛍光免疫染色

作成した組織切片は、4%パラホルムアルデヒド(ナカライテスク)/PBSにて室温、20分固定し、PBSで5分間3回洗浄した後、1%ヤギ血清(シグマ)、0.1%ウシ血清アルブミン、0.2%トライトンX-100(ナカライテスク)添加PBSにてブロッキングを室温で1時間行った。一次抗体は上記ブロッキング液中にanti-DsRed(Rabbit Polyclonal: クロンテック)1:500、anti-Laminin-2(Rat Monoclonal: ALEXIS)1:150、anti-Dystrophin(Mouse Monoclonal: シグマ)1:200、anti-SM/C-2.6(Rat Monoclonal: 山元博士より譲渡)1:200の濃度で希釈し使用した。4 $^{\circ}$ Cで16~18時間反応させ、0.2%トライトンX-100添加PBS(PBST)で3回洗浄した後、二次抗体はanti-Rabbit IgG-PE conjugated、anti-Rat IgG-Alexa647 conjugated、anti-Mouse IgG-Alexa647 conjugated、Streptavidin-Alexa488 conjugated(以上全てMolecular Probes)をそれぞれ全て1:500でPBSTに希釈し、室温で2時間反応させた。Anti-Pax7(mouse monoclonal: R&D)はZenon-Alexa488 IgG1ラベリングキット(Molecular Probes)を使用し直接二次抗体と抱合させ、1:100の濃度で0.2%トライトンX-100添加PBSに希釈し、室温で1時間反応させた。その後細胞の核を染色するため5 $\mu$ g/mlのDAPI(シグマ)をPBST中に5000倍に希釈し室温で5分反応させ、PBSにて3回洗浄した後カバーガ

10

20

30

40

50

ラスを乗せ封入した。染色された組織切片はSP5コンフォーカル顕微鏡システム(ライカ)にて観察しデータを取得した。

【0084】

#### 6. 成熟骨格筋分化誘導

FACS Ariaにて分離された分化6日目のiPS細胞のPDGFR陽性及び陰性分画を、I型コラーゲンコート24ウェルディッシュ(IWAKI)に再び播種し培養した。細胞数は1ウェルあたり20万個である。培地はエスクロンSF-03(三光純薬)に0.2%ウシ血清アルブミン(シグマ)、100 μM 2-mercaptoethanol (Invitrogen)、50 mU/L Penicillin/50 μg/L Streptomycinを加えたものを分化誘導基本培地とし、以下の成長因子を加えたものを用いた。なお、死細胞を除去するために、分化誘導開始から24時間後に同じ組成の培地に培地交換を行った。

(前半4日間)

HGF(R&D) 10 ng/ml

bFGF(Peprotech) 2 ng/ml

IGF-1(Peprotech) 2 ng/ml

(後半3日間)

IGF-1(Peprotech) 2 ng/ml

【0085】

#### 7. 培養細胞免疫染色

上記分化誘導にて成熟骨格筋へと分化した細胞を免疫染色で評価した。細胞はディッシュに付着したままの状態、培地を廃棄し4%パラホルムアルデヒド(ナカライテスク)/PBSにて4、10分固定し、PBSで5分間3回洗浄した後、1%ヤギ血清(シグマ)、0.1%ウシ血清アルブミン、0.2%トライトンX-100(ナカライテスク)添加PBSにてブロッキングを室温で1時間行った。一次抗体は上記ブロッキング液中にanti-Myogenin (Rabbit Polyclonal: サンタクルーズ) 1:200の濃度で希釈し使用した。4で16~18時間反応させ、0.2%トライトンX-100添加PBS(PBST)で3回洗浄した後、二次抗体はanti-Rabbit IgG-HRP conjugated (Vector)を1:200でPBSTに希釈し、室温で2時間反応させた。PBSにて3回洗浄した後、HRP発色キット(Dako)にて発色を3分間行った。PBSTで洗浄した後、オールインワン顕微鏡BioZero(キーエンス)にて観察、写真撮影した。また撮影後さらにギムザ染色液(メルク)にて室温10分間核を染色し、PBSにて3回洗浄した後、オールインワン顕微鏡BioZero(キーエンス)にて観察、写真撮影した。それぞれの陽性細胞の計測は、ウェル全体を目視にて観察し解析した。

【0086】

#### 実施例1 iPS細胞から原条中胚葉系細胞への分化誘導

マウスES細胞を用いた研究で確立したBMP4とLiClを用いた無血清誘導法(特願20008-186348; 図1Aの太字部分の方法)と同様に、iPS-Nanog-20D-17、iPS-DsRedおよびPlasmid-iPSを分化誘導したところ、全く細胞が生存しないという結果が得られた。そこでまず、BMP4以外の成長因子を添加することで、iPS細胞の生存を支持し、原条中胚葉系細胞(以下単に「中胚葉」と言う場合もある)への分化を促進するかどうかを検討した。成長因子の候補としてはActivin A、IGF-1、HGFを検討した(図1A、イタリック部分)。Activin Aはすべての培養条件に添加した上で、IGF-1およびHGFを加えないもの、単独でそれぞれ加えたもの、両方を加えたものの4条件を解析した。iPS細胞としてはiPS-Nanog-20D-17を用いた。結果を図1Bに示す。IGF-1が添加されている条件(図1B、2および4)にて細胞の増殖を認め、それ以外の条件ではあまり細胞が生存していなかった(データは示さないが、Activin A添加、IGF-1およびHGF非添加の条件で、IGF-1を添加した場合よりは少ないが細胞が生存している場合もあった)。中胚葉分化の程度をPDGFRの発現を指標として評価すると、IGF-1単独添加群は61.5%、IGF-1、HGF同時添加群は61.7%と同程度の中胚葉への分化を認めた(図1B)。しかしながら、生存細胞数はIGF-1、HGF同時添加群と比較しIGF-1単独添加群で約3倍多く(図1B右)、この結果から初期の3日間の誘導において最も誘導効率の高い成長因子の組み合わせは、BMP4、ActivinA、IGF-1の3種類を同時に添加した場合であることが分かった。

10

20

30

40

50

また、誘導時の播種細胞密度が中胚葉分化に与える影響も検討した(図1C)。結果は10 cmディッシュに50万個の細胞を播種したときが、PDGFR 陽性細胞が50.2%と最も誘導効率が高かった。それ以下の播種数では細胞はあまり生存しておらず、それ以上の100万個の細胞数ではPDGFR 陽性細胞が26.5%と約半分の誘導効率であった(図1C)。

【0087】

#### 実施例2 iPS細胞から原条中胚葉系細胞への分化誘導におけるBMP4およびActivin Aの濃度の影響

iPS細胞から原条中胚葉系細胞への分化誘導におけるBMP4およびActivin Aの濃度の影響を検討した。方法は、前項で決定したActivin A 10 ng/ml, BMP4 10 ng/ml, IGF-1 10 ng/mlの添加条件のうち、Activin Aのみ(図2A)、またはBMP4のみ(図2B)の濃度を変化させ、FACSにてPDGFR の発現を評価した。

Activin Aの濃度による影響を解析してみると、5 ng/ml以上の濃度では40%を超えるPDGFR 陽性細胞が誘導されたが、それ以下になると濃度依存的にPDGFR 陽性細胞の割合が低下した。Activin Aを全く加えない条件では49.6%と高い誘導効率であったが、得られた生存細胞数を見ると、Activin Aを10 ng/ml添加した条件で最も生存細胞数が多く、Activin Aの濃度が減少すると細胞数も減少する傾向が見られ、Activin A 0 ng/mlでは10 ng/mlの約6分の1まで減少した(図2C)。したがって、Activin Aを全く加えない条件では誘導される細胞の割合は高いが、全体の細胞数が減少するため、得られるPDGFR 陽性細胞の数は少なくなることが分かった。以上より、Activin Aは5~10 ng/ml程度の濃度で添加することがより効果的であると考えられた。

次に、BMP4の濃度による影響を見ると、BMP4 10 ng/mlで加えたときが44.7%と最もPDGFR 陽性細胞の割合が高く、5 ng/ml以下の濃度ではすべて25~28%程度の割合に減少した(図2B)。この結果により、BMP4の影響には閾値が存在し、5 ng/ml以下の濃度では中胚葉への誘導効率が減少することが分かった。またBMP4の濃度が減少しても、得られる生存細胞数はあまり変化がないことがわかった(図2C)。

以上の結果により、Activin Aは濃度依存的に分化効率にも細胞増殖にも影響し、BMP4はある閾値以上であれば中胚葉分化を促進し、細胞増殖にはあまり影響しないことが分かった。

【0088】

#### 実施例3 iPS細胞由来原条中胚葉系細胞から骨格筋前駆細胞への分化誘導

前項の結果から、iPS細胞から原条中胚葉系細胞への分化(初期3日間)における必要因子は、Activin A、BMP4、IGF-1の3因子であることが分かったが、原条中胚葉系細胞から骨格筋前駆細胞への分化(後期3日間)を促進する因子は不明であった。本発明者らは、有効な分化誘導方法を見出すべく、iPS細胞を用いて、Wntシグナル誘導剤であるLiClを、単独もしくは他の成長因子と組合せて使用し、骨格筋前駆細胞への分化誘導能を検討した。成長因子の候補として、Sonic Hedgehog (Shh)とIGF-1について、後半3日間の分化培地に添加することにより、骨格筋前駆細胞分化に与える影響を検討した(図3A)。iPS細胞としてはiPS-DsRedを用いた。結果を図3Bに示す。骨格筋前駆細胞への分化の程度はSM/C-2.6の発現を指標に解析し、また全体のRNAにおける骨格筋特異的な転写因子であるMyf5の発現もあわせて解析した。SM/C-2.6は、骨格筋の幹細胞であるサテライト細胞を特異的に染色しうるマーカーであり(Fukada, S. et al., *Exp Cell Res.*, 296, 245-255 (2004))、マウスES細胞誘導系から骨格筋前駆細胞を分離するという報告もなされている(Chang, H. et al., *Generation of transplantable, functional satellite-like cells from mouse embryonic stem cells. Faseb J.*, 23: 1907-1919 (2009))。

まずShhの添加による影響であるが、iPS-DsRedを図3Aのように分化誘導し、後半3日間はLiCl単独のもの、Shh 20 ng/mlを添加したものを計6日間分化誘導し、SM/C-2.6で染色して評価した。結果はShh非添加群ではSM/C-2.6陽性細胞は28.5%であったのに対し、Shh 20 ng/ml 添加群ではSM/C-2.6 陽性細胞は38.8%と10%程度も増加していた(図3B)。またMyf5の発現をRT-PCRで解析すると、Shh非添加群ではMyf5の発現が全く見られないのに対し、Shh添加群ではMyf5が発現しており、20 ng/mlの濃度で最も高い発現を認めた(図3B)

次にIGF-1の効果であるが、Shhと同様にSM/C-2.6の発現を解析すると、IGF-1非添加群では11.9%であったのに対し、IGF-1 5 ng/ml添加群では16.8%と増加していた(図3C)。またMyf5の発現に関しては、IGF-1非添加群ではMyf5の発現が認められないが、IGF-1を添加すると濃度に関係なくMyf5の発現が認められるようになった(図3C)。以上の結果から、iPS細胞の骨格筋前駆細胞への分化誘導にはLiClのみではMyf5が発現せず不十分であり、ShhまたはIGF-1を添加することによって、SM/C-2.6陽性細胞も増加し、Myf5の発現も促進されることが分かった。またShhの至適濃度は20 ng/ml程度であり、IGF-1は少なくとも5 ng/ml以上あれば効果があることが示された。

また、これらの誘導方法により、Plasmid-iPS細胞のクローンにおいても、同様に骨格筋前駆細胞が誘導されることを確認した。

【0089】

#### 実施例4 iPS細胞由来骨格筋前駆細胞の損傷骨格筋に対する効果

前述の無血清誘導法で分化誘導された中胚葉細胞群が、本当に骨格筋の前駆細胞を含むのかどうかを検討した。実施例1~3で確立した分化誘導方法(「試薬および方法」の1.に記載の方法)により分化誘導を行い、分化6日目の細胞をPDGFR<sup>+</sup>をマーカーにして解析したところ、PDGFR<sup>+</sup>は約47%の細胞で発現していた(図4A)。FACS Ariaにてこの細胞群をPDGFR<sup>+</sup>陽性および陰性分画に分離した。それぞれの分離効率は98%以上の高効率であった(図4A、1.PDGFR<sup>+</sup>画分および2.PDGFR<sup>-</sup>画分)。この2つの分画からRNAを抽出し、RT-PCRで遺伝子発現を解析した(図4B; 1がPDGFR<sup>+</sup>画分、2がPDGFR<sup>-</sup>画分)。PDGFR<sup>+</sup>の発現を分離効率の確認として調べたところ、PDGFR<sup>+</sup>はPDGFR<sup>+</sup>陽性分画でのみ発現しており、FACSによる分離が適正であることが示された。次に骨格筋特異的マーカーであるMyf5とMyoDの発現を見ると、Myf5はPDGFR<sup>+</sup>陽性分画でかなり強く発現しており、MyoDはPDGFR<sup>+</sup>陽性分画でのみ発現を認めた。このことから、骨格筋前駆細胞の性格を持った細胞群は、ほとんどがPDGFR<sup>+</sup>陽性分画に含まれていることが分かった。また骨格筋前駆細胞の発生上の起源であるDermomyotomeのマーカーであるPax3、Pax7はPDGFR<sup>+</sup>陽性・陰性どちらの分画にも発現しており、Pax7はむしろPDGFR<sup>-</sup>陰性分画に発現が強く認められた。しかしながらPax3およびPax7は神経系の初期発生においても発現することが知られており、また発生期神経細胞マーカーのSox1の発現を見るとPDGFR<sup>-</sup>陰性分画に強く発現していたことから、PDGFR<sup>-</sup>陰性分画に発現しているPax3およびPax7は、神経系の細胞群を見ている可能性が高いと考えられた。なおβ-actinの発現は、RNAの量が一定であることを示すコントロールである。

また前項で述べた骨格筋前駆細胞のマーカーであるSM/C-2.6とPDGFR<sup>+</sup>の発現を比較すると、SM/C-2.6陽性細胞は全てPDGFR<sup>+</sup>陽性~弱陽性に含まれており、PDGFR<sup>+</sup>陽性分画の中に骨格筋前駆細胞が含まれていると考えられた(図4C)。以上の結果から、分化誘導6日目のPDGFR<sup>+</sup>陽性分画は、骨格筋前駆細胞を含んだ細胞集団であり、PDGFR<sup>-</sup>陰性分画は骨格筋前駆細胞を含まない細胞群であることが示された。

【0090】

次に、このPDGFR<sup>+</sup>陽性細胞群が、生体内においても骨格筋前駆細胞としての性格を有するかどうかを検討した。iPS細胞としてはiPS-DsRed細胞を用いた。iPS-DsRed細胞はDsRedを常時発現しているマウスのTTF由来であることから、細胞がiPS由来であることの指標となる。

iPS-DsRed細胞から誘導したPDGFR<sup>+</sup>陽性細胞を、カルジオトキシン処理をして筋再生を生じさせたマウスの骨格筋に筋肉内注射により移植し、移植4週後にDsRedの発現を解析することで生体内での挙動を評価した(図4D)。これまでの研究で、マウスES細胞由来PDGFR<sup>+</sup>陽性細胞は、損傷骨格筋において骨格筋の幹細胞であるサテライト細胞に分化することが分かっている(Sakurai, H. et al., Stem Cells 26, 1865-1873 (2008))。そこで同様にサテライト細胞へ分化しているかどうかを、サテライト細胞マーカーであるPax7の発現を見ることで解析した(図4D)。結果は、DsRed陽性のiPS細胞由来の細胞が、Pax7陽性でLamininの内側にあるサテライト細胞と考えられる細胞に分化して生着している様子が観

40  
50

察できた(図4D、上段、矢印)。しかし、全ての移植された細胞がPax7陽性であるわけではなく、Pax7陰性でLamininの外側にあるDsRed陽性細胞(図4D、下段、左から2番目のパネル中の矢頭)も認められた。コントロールとして移植レシピエントマウス由来のサテライト細胞も示した(図4D、下段、1番左のパネル中の矢頭)。これらの結果から、iPS細胞由来のPDGFR陽性細胞が、損傷骨格筋内でサテライト細胞へと分化できることが証明された。

#### 【0091】

次に、投与方法について検討した。筋肉内注射のみならず、静脈内注射によってマウスES細胞由来PDGFR陽性細胞を、カルジオトキシン処理筋損傷マウスへと移植し、4週後に組織を解析した(図4E)。図4Eは、倍率400倍で組織を観察した際に、何個の陽性細胞が見えるかをカウントし、5箇所(5視野)の平均値を示したものである。筋肉内注射(i.m.)によって移植した場合でも、静脈内注射(i.v.)によって移植した場合でも、一視野のDsRed陽性細胞の数はほとんど変わりなかった(2.4個対2.6個、図4E、上2段)。また、そのDsRed陽性のiPS細胞由来細胞の中で、Pax7陽性であったもの(Double positive)も筋肉内注射と静脈内注射で大きな差はなかった(0.2個対0.4個、図4E、上2段)。この結果により、iPS細胞由来のPDGFR陽性細胞は筋肉内注射でも静脈内注射でも、同等の移植効率であると考えられた。また興味深いことに、カルジオトキシン処理していないほうの後肢の前脛骨筋(counter)にはDsRed陽性細胞がまったく認められなかった(図4E、上から3段目)。これはiPS細胞由来の骨格筋前駆細胞は、たとえ静脈内注射によって全身に散布されても、炎症により再生シグナルが出ている骨格筋にのみ選択的に生着しているためであると考えられた(図4E、上から3段目)。

一方PDGFR陰性細胞は、カルジオトキシン処理された骨格筋においてはほとんど生着しておらず、静脈内注射、筋肉内注射とも0.2個/視野程度(5視野に1個)の生着数であった。また生着していた細胞も炎症が起こっている間質にのみ認められ、さらにPax7陽性であった細胞は皆無で、サテライト細胞を含む骨格筋の系譜には分化していないと考えられた(図4E、上から4、5段目)。

#### 【0092】

##### 実施例5 iPS細胞由来骨格筋前駆細胞の筋ジストロフィーモデルマウスに対する効果

カルジオトキシン処理マウスへの移植により、iPS細胞由来中胚葉細胞(骨格筋前駆細胞)はサテライト細胞へと分化することが確認されたが、次に筋ジストロフィーモデルマウス(DMD-nullマウス)の生体内で、骨格筋の再生に寄与するかどうかを解析した。分化6日目のiPS細胞由来のPDGFR陽性細胞をFACSにて分離し、8週齢のDMD-nullマウスの前脛骨筋(T.A.)に筋肉内注射にて移植し、4週後に組織を解析した。細胞を何も移植していないコントロールDMD-nullマウスでは、骨格筋間質に炎症細胞の浸潤を非常に多く認め、骨格筋も核が中央に集まり再生中であることが確認された(図5A、一番左)。一方、iPS細胞由来骨格筋前駆細胞を筋肉内注射にて移植したT.A.では、間質の炎症像をほとんど認めず、また骨格筋の核についても、中央に位置するものもあるが、筋線維の辺縁に核がシフトし再生が終わったことを示している筋線維も多く認めた(図5A、左から2番目、\*印)。しかしながら、iPS細胞由来骨格筋前駆細胞を筋肉内注射にて移植したマウスの他の骨格筋を評価すると、前肢、大腿四頭筋、横隔膜のいずれにおいても間質での炎症細胞の浸潤が激しく生じており、筋線維の中心に核が位置しているものがほとんどであった(図5A、中央から右の3枚)。以上の結果により、筋ジストロフィーモデルマウスにおいて、iPS細胞由来骨格筋前駆細胞の骨格筋への移植は、少なくとも筋肉内注射局所での炎症を抑制し筋再生を終焉に向けさせることが確認された。

#### 【0093】

次に上記の組織変化が、ジストロフィンの発現によるものかどうかを解析するために、ジストロフィンの蛍光免疫染色を行い評価した(図5B)。コントロールDMD-nullマウスでは、当然ながらジストロフィンの発現(赤紫で表示)は認められない(図5B、一番左)。しかしながらAnti-Mouse IgG-Alexa647の二次抗体が、炎症細胞の多い組織のIgGを認識したため、炎症部位に一致してぼんやりとした赤紫のシグナルを認めた。この結果はControl IgGを用いたネガティブコントロールサンプルでも同様の部位にシグナルを認めることから

2次抗体のバックグラウンドであることが分かる(図5B、右から2番目)。野生型マウスでのポジティブコントロールでは、筋線維の周囲を取り囲むように網目状にジストロフィンの発現が認められた(図5B、一番右)。そしてiPS細胞由来骨格筋前駆細胞を移植したT.A.では、野生型で見られたものと同様に、筋線維の周囲を取り囲むように網目状にジストロフィンの発現を認めた(図5B、左から2番目)。また、iPS細胞由来骨格筋前駆細胞を移植したマウスの他の骨格筋を評価すると、前肢、大腿四頭筋、横隔膜のいずれにおいても間質での炎症組織に一致したバックグラウンドが認められるものの、網目状のジストロフィンの発現がわずかに観察された。以上の結果から、iPS細胞由来骨格筋前駆細胞は、ジストロフィンを欠損した筋ジストロフィーモデルマウスへ移植することで、筋線維のジストロフィンを産生する細胞として生着し、その結果筋線維にジストロフィンが発現することで筋線維の崩壊が抑制され、骨格筋での炎症が治まり、組織の修復・過再生状態の終焉を促すことが明らかとなった。

#### 【0094】

この筋ジストロフィーモデルマウスの組織の修復が、本当に移植されたiPS細胞由来骨格筋前駆細胞によるものかどうかを検討するため、DsRedを含めた蛍光免疫染色を行った。結果はiPS細胞由来骨格筋前駆細胞を移植したT.A.では、間質でのDsRed陽性細胞も認めたが(図5C、左、矢印)、筋線維内の細胞質にもDsRedが発現しているものもあり(図5C、左、矢頭)、同じ部位でジストロフィンも発現していたため、iPS細胞由来骨格筋前駆細胞がジストロフィンの発現に寄与していると考えられた。一方、直接は移植していない大腿四頭筋においても間質にDsRed陽性細胞を認めた(図5C、右、矢印)。この結果より、筋肉内注射によっても血管内に移植細胞が移行し、全身へと散布している可能性があると考えられた。

#### 【0095】

さらに、筋ジストロフィーモデルマウスに移植され、生着したiPS細胞由来骨格筋前駆細胞が、生体内でサテライト細胞へと分化しているかどうかを検討するために、Pax7とDsRedを含めた蛍光免疫染色を行った(図5D)。DsRed陽性細胞の中で、Pax7を発現するものが確認されたため(図5D、矢印)、iPS細胞由来骨格筋前駆細胞は筋ジストロフィーモデルマウスへの移植においてもサテライト細胞へと分化していることが示された。

骨格筋前駆細胞を移植したDMD-nullマウスの運動機能についても評価を行った。ケージの金網に四肢をつかまらせ、逆さにしてどれだけの時間ぶら下がっていられるかというぶら下がりテストを行った。1回のテストの後、5分休憩して次のテストを行い、計3回のテストの平均時間では、全く移植していないDMD-nullマウスでは約2.3秒であったのに対し、骨格筋前駆細胞を前脛骨筋に筋注にて移植したマウスでは約6.7秒と約3倍に時間が延びた。この結果により、移植による筋組織での炎症の抑制が、運動機能の改善につながっている事が示された。

#### 【0096】

### 実施例6 iPS細胞由来骨格筋前駆細胞の筋ジストロフィーモデルマウスに対する効果(2)

実施例5ではDMD-nullマウスの両方のT.A.にiPS細胞由来のPDGFR陽性細胞を移植したのに対して、本実施例では片方のT.A.のみに移植した点が異なる以外は、実施例5と同じ実験を行った。

分化6日目のiPS細胞由来のPDGFR陽性細胞をFACSにて分離し、8週齢のDMD-nullマウスの左側の前脛骨筋(T.A.)に筋肉内注射にて移植し、4週後に組織をヘマトキシリン・エオジン染色にて解析した(図6A)。細胞を何も移植していないコントロールDMD-nullマウスでは、骨格筋間質に炎症細胞の浸潤を非常に多く認め、骨格筋も核が中央に集まり再生中であることが確認された(e)。一方、iPS細胞由来骨格筋前駆細胞を筋肉内注射にて移植したT.A.では、間質の炎症像をほとんど認めず(a)、また骨格筋の核についても、中央に位置するものもあるが、筋繊維の辺縁に核がシフトし再生が終わったことを示している筋繊維も多く認めた(b,\*印)。しかしながら、iPS細胞由来骨格筋前駆細胞を移植していない右側のT.A.(反対側のT.A.)を評価すると、間質での炎症細胞の浸潤が激しく生じており(c)

、筋繊維の中心に核が位置しているものがほとんどであった(d)。以上の結果により、筋ジストロフィーモデルマウスにおいて、iPS細胞由来骨格筋前駆細胞の骨格筋への移植は、筋肉内注射局所での炎症を抑制し筋再生を終焉に向けさせることが確認された。

【0097】

次に上記の組織変化が、ジストロフィンの発現によるものかどうかを解析するために、ジストロフィンの蛍光免疫染色を行い評価した(図6B)。コントロールDMD-nullマウスでは、当然ながらジストロフィンの発現(緑で表示)は認められない(e,f)。しかしながら野生型マウスでのポジティブコントロールでは、筋繊維の周囲を取り囲むように網目状にジストロフィンの発現を認める(a,b)。そしてiPS細胞由来骨格筋前駆細胞を移植したT.A.では、野生型よりは弱いものの、同様に、筋繊維の周囲を取り囲むように網目状に、しかも斑状にジストロフィンの発現を認めた(c,d)。以上の結果から、iPS細胞由来骨格筋前駆細胞は、ジストロフィンを欠損した筋ジストロフィーモデルマウスへ移植することで、筋繊維のジストロフィンを産生する細胞として生着し、その結果筋繊維にジストロフィンが発現することで筋繊維の崩壊が抑制され、骨格筋での炎症が治まり、組織の修復・過再生状態の終焉を促すことが明らかとなった。

10

【0098】

この筋ジストロフィーモデルマウスの組織の修復が、本当に移植されたiPS細胞由来骨格筋前駆細胞によるものかどうかを検討するため、DsRedを含めた蛍光免疫染色を行った(図6C)。結果はiPS細胞由来骨格筋前駆細胞を移植したT.A.では、主に間質でのDsRed陽性細胞を認めたが(図6C、c、赤い矢印)、筋繊維内の辺縁にもDsRedが発現しているものもあり(図6C、b,e、白い矢印)、同じ部位でサテライト細胞のマーカであるSM/C-2.6も発現していたため、iPS細胞由来骨格筋前駆細胞が生体内でサテライト細胞へと分化していることが示された(図6C、a,c,d,f、白い矢印)。

20

【0099】

#### 実施例7 iPS細胞由来骨格筋前駆細胞のin vitro分化誘導

実施例4で分離した二つの分画(PDGFR 陽性分画、PDGFR 陰性分画)を、さらに試験管内で成熟骨格筋へと分化させる実験を行った。分化誘導は「試験および方法」の6.に記載の方法により行った。結果を図7(a~e)に示す。PDGFR 陽性分画からは成熟骨格筋のマーカであるMyogenin陽性細胞が多数分化したが(a、褐色に染色)、PDGFR 陰性分画ではほとんど認められなかった(b)。Myogenin染色後、Giemsa染色にて核を共染したところ、PDGFR 陽性分画ではMyogenin陽性部分は核と一致しており、間違いなく核内のシグナルであることが分かった(c)。またMyogenin陰性の核も存在し、全てが骨格筋へと分化しているわけではないことも分かった。一方、PDGFR 陰性分画ではほとんどの核がMyogenin陰性であった(d)。培養ディッシュ上の全核数とMyogenin陽性の核の割合を表に示す(e)。PDGFR 陽性分画では12~20%程度が骨格筋へと分化しているのに対し、PDGFR 陰性分画では2%未満と極めて低い出現率であった。このことから、やはり骨格筋前駆細胞の性格を持った細胞群は、ほとんどがPDGFR 陽性分画に含まれていることが示された。

30

【0100】

#### 実施例8 iPS細胞由来骨格筋前駆細胞の出現効率上昇の検討

iPS細胞由来骨格筋前駆細胞の出現効率を上げる方法を検討した。具体的には、今までの実施例において分化誘導開始から3日目に添加していたLiClを、それ以外の日数から添加する検討を行った。プロトコルを図8Aに示す。分化誘導開始から0,1,2,3,4日目よりLiClを添加しつづけるサンプルにおいてFACS解析でPDGFR 陽性分画の出現効率を解析した。結果は分化誘導開始後1日目、または2日目からLiClを添加しつづけることで、60%以上の誘導効率を再現することが出来た(図8B)。この方法は他のiPS細胞クローン(iPS-Ng-20D-17)においても再現することが出来た。

40

【0101】

本発明を好ましい態様を強調して説明してきたが、好ましい態様に変更され得ることは当業者にとって自明であろう。本発明は、本発明が本明細書に詳細に記載された以外の方法で実施され得ることを意図する。したがって、本発明は添付の「請求の範囲」の精神お

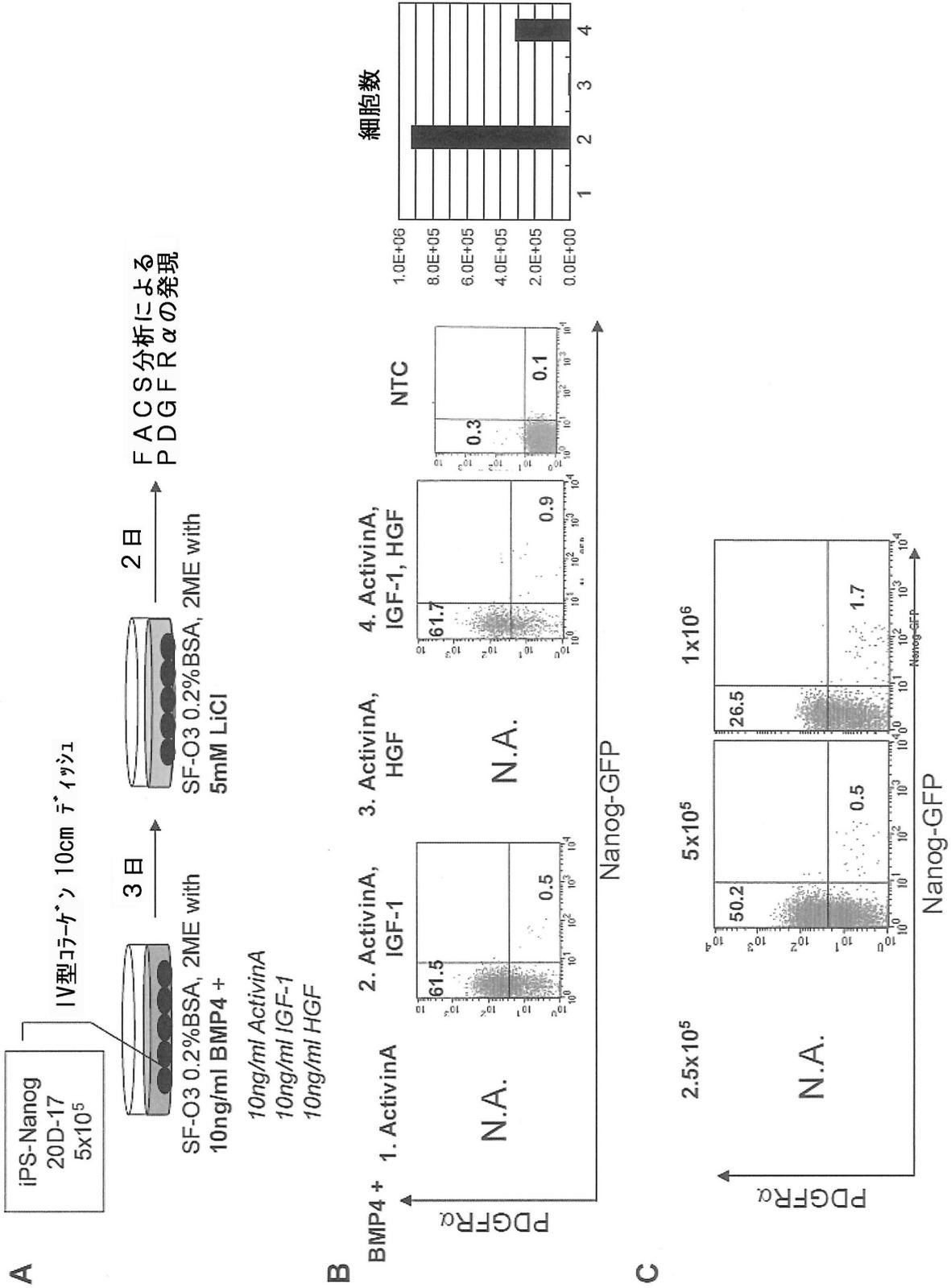
50

よび範囲に包含されるすべての変更を含むものである。

ここで述べられた特許および特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

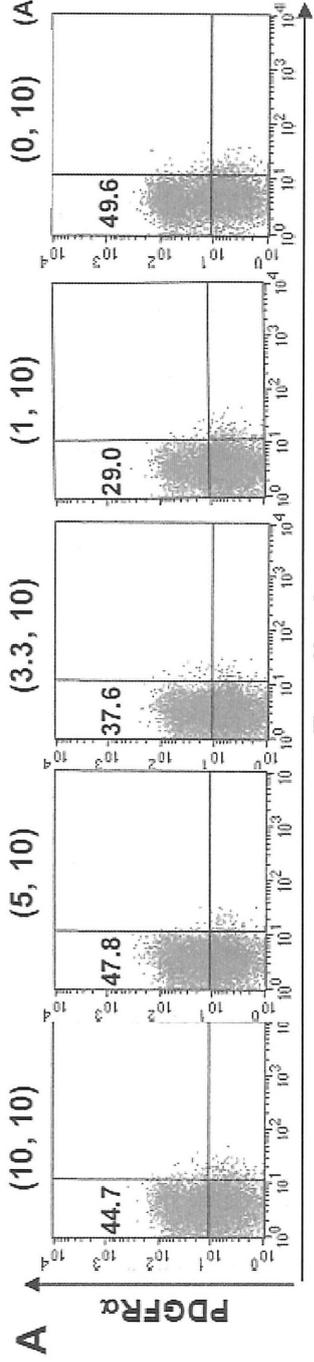
【 0 1 0 2 】

本願は、2009年7月9日付で出願された米国仮特許出願第61/270,479号を基礎としており、その内容は、ここで参照したことにより本明細書に組み込まれる。

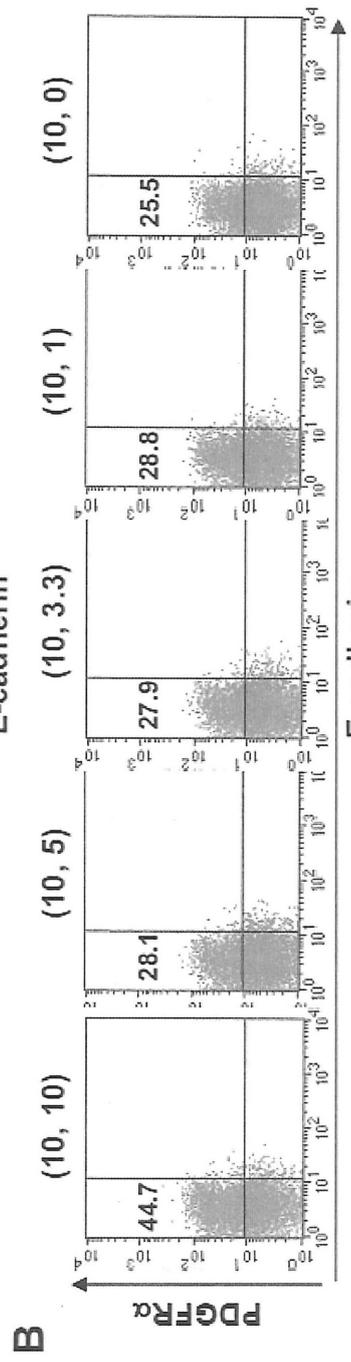


【 図 2 】

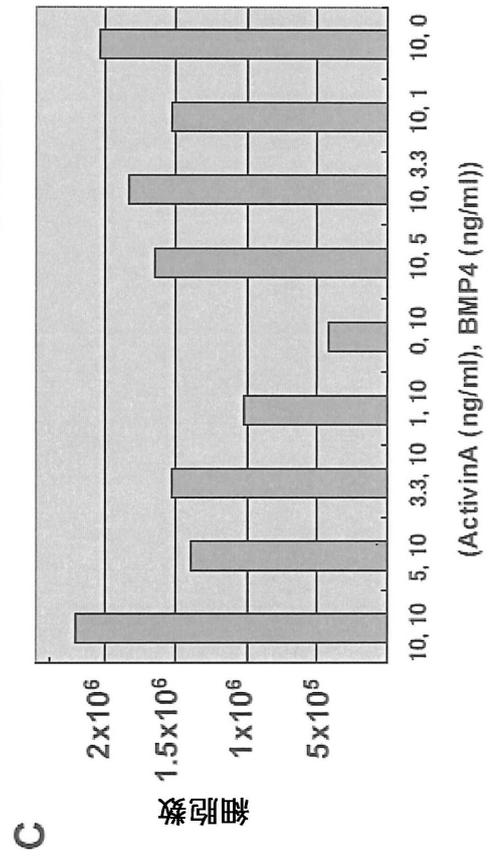
(ActivinA (ng/ml), BMP4 (ng/ml))



E-cadherin

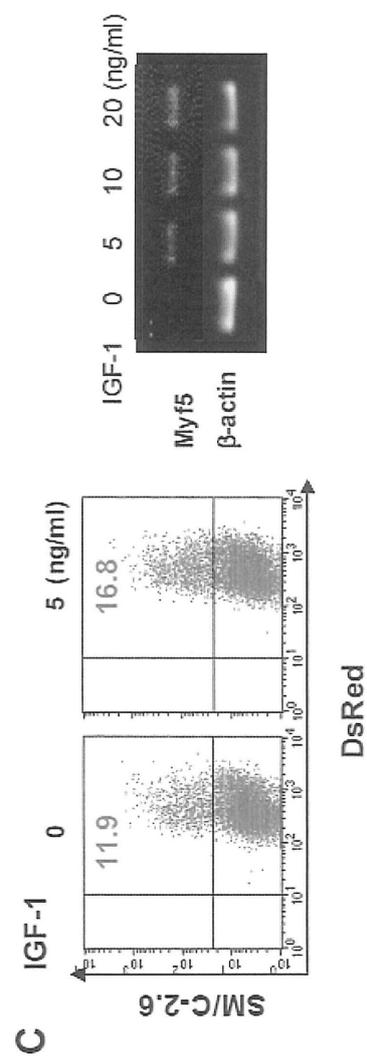
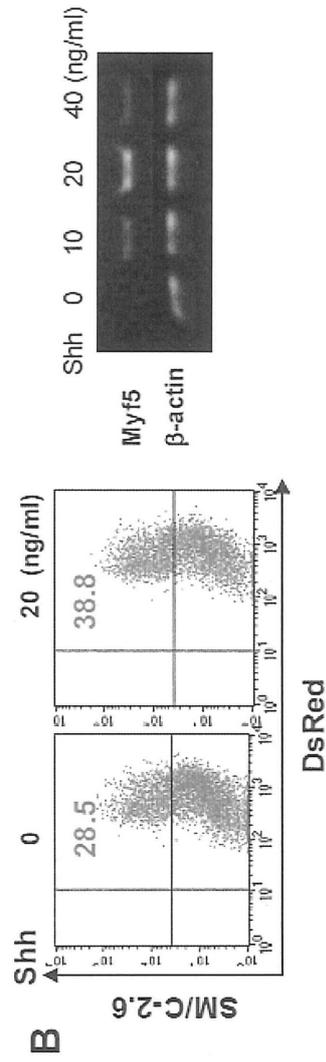
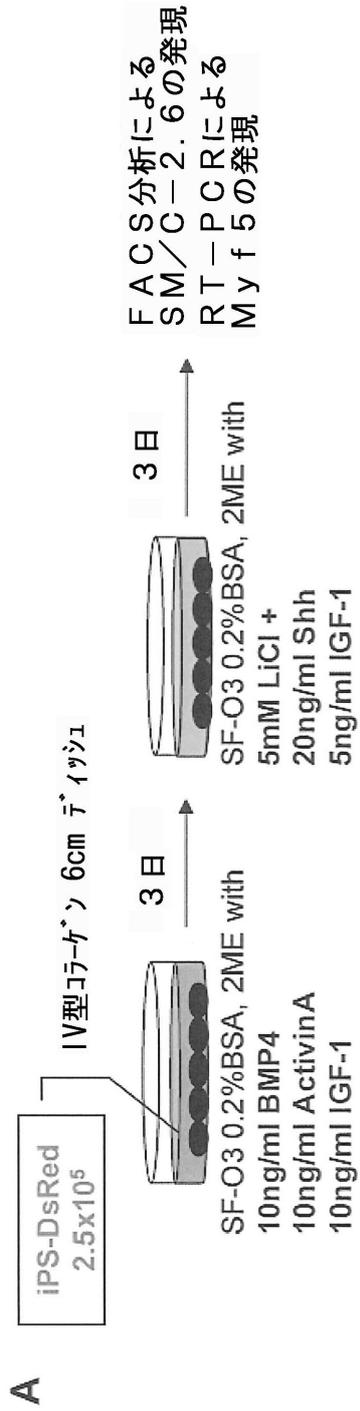


E-cadherin

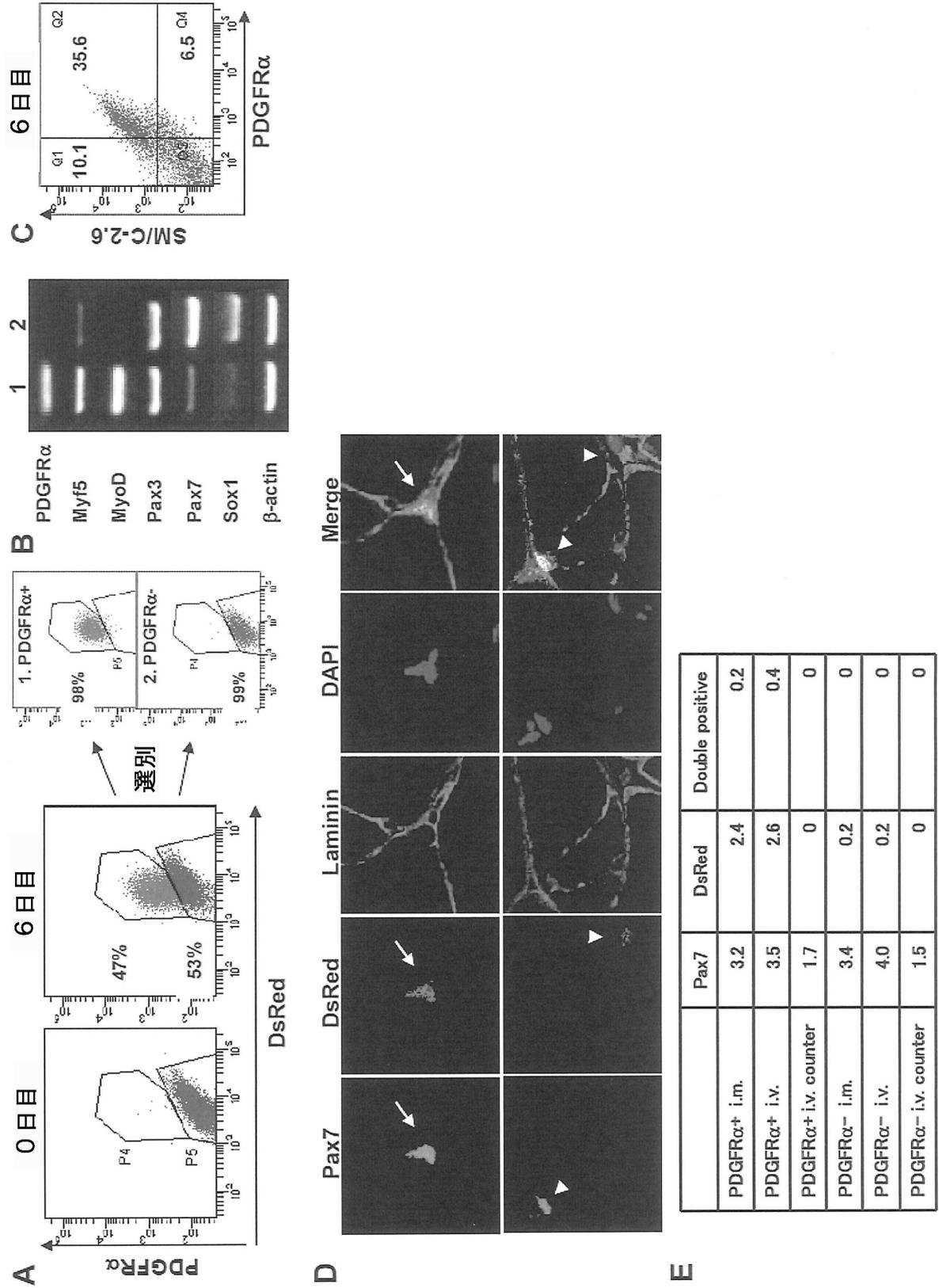


(ActivinA (ng/ml), BMP4 (ng/ml))

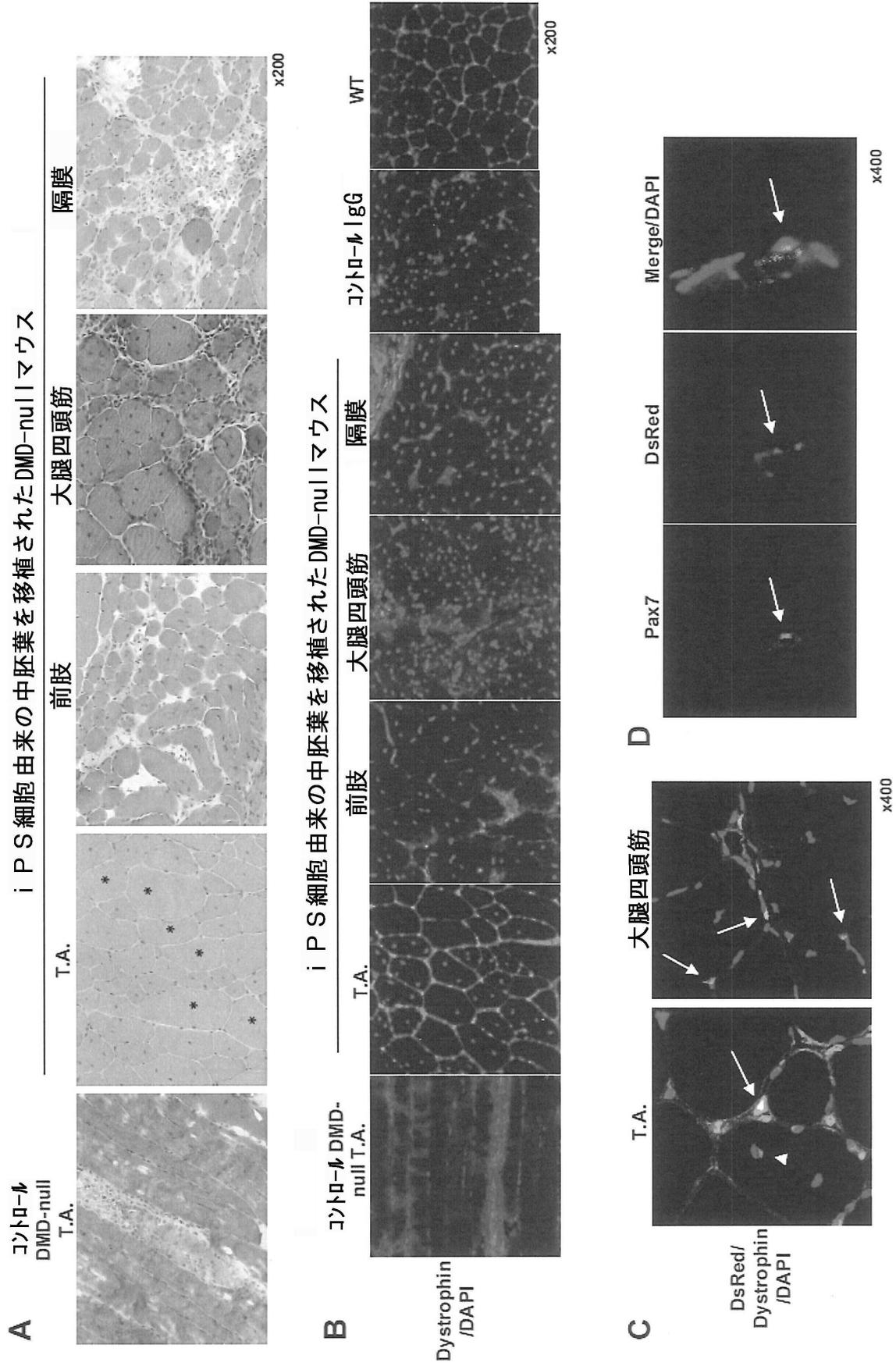
【 図 3 】



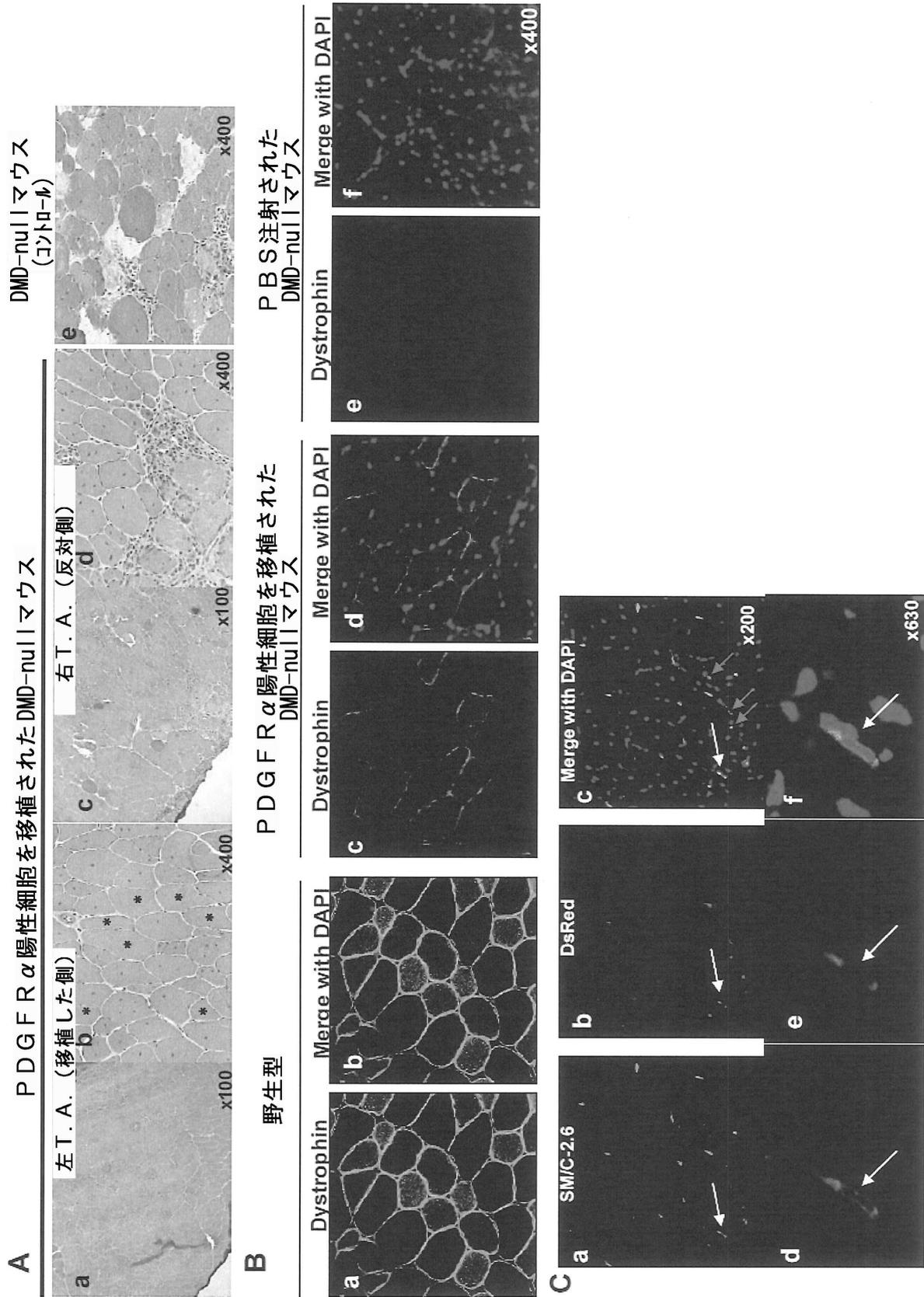
【 図 4 】



【 図 5 】

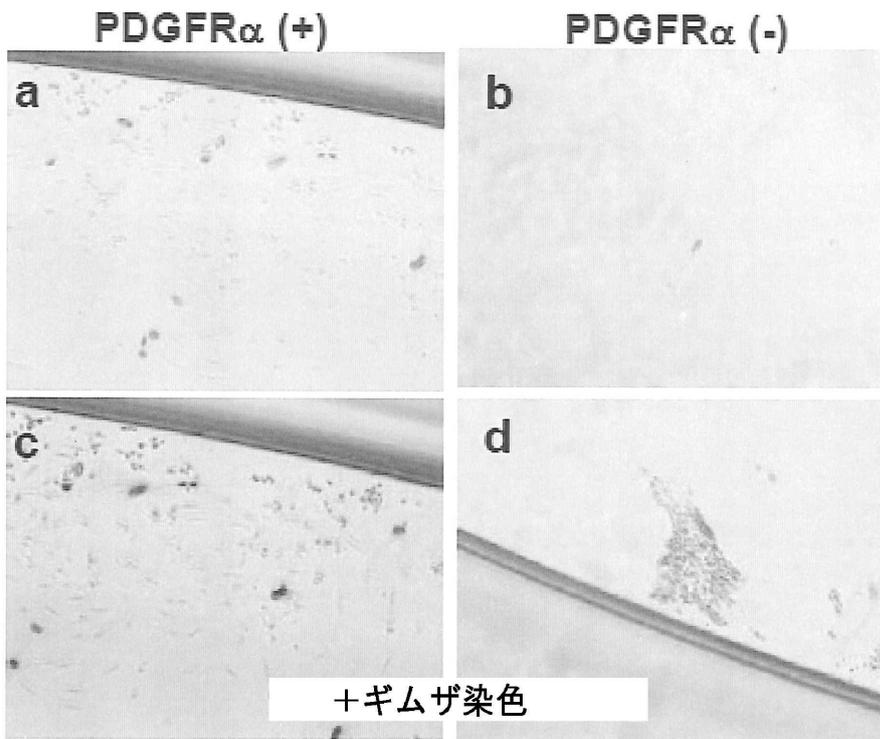


【 図 6 】



【図7】

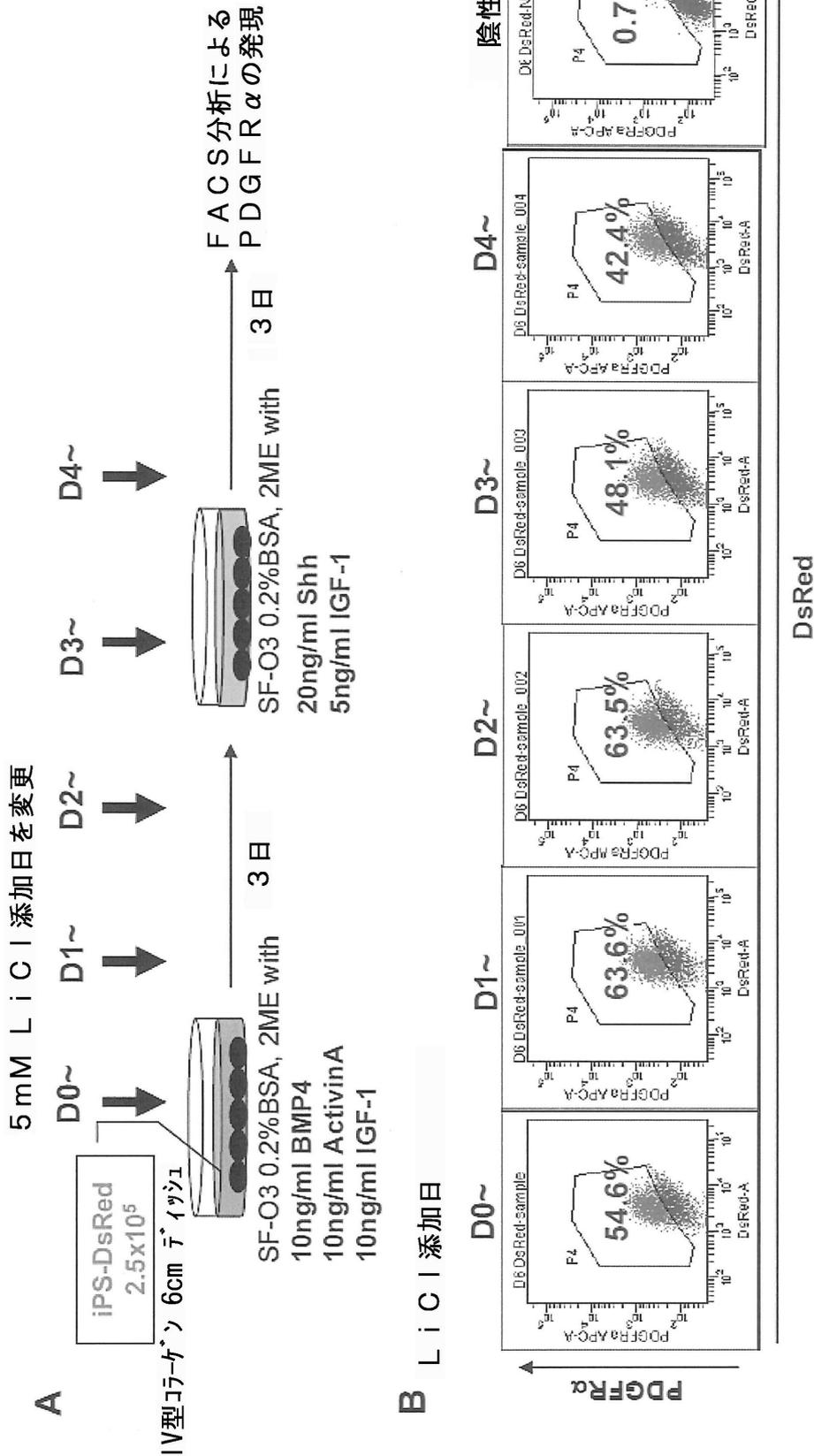
### Myogenin



e

	PDGFR $\alpha$ (+)	PDGFR $\alpha$ (-)
Myog陽性細胞	84 / 401	4 / 216
ギムザ陽性細胞	131 / 1086	3 / 411

【 図 8 】



【 配列表 】

000584655800001.app

## フロントページの続き

- (74)代理人 100163658  
弁理士 小池 順造
- (74)代理人 100174296  
弁理士 當麻 博文
- (72)発明者 桜井 英俊  
京都府京都市左京区聖護院川原町5-3 国立大学法人京都大学iPS細胞研究所内
- (72)発明者 坂口 泰子  
京都府京都市左京区吉田近衛町 国立大学法人京都大学大学院生命科学研究科内
- (72)発明者 瀬原 淳子  
京都府京都市左京区聖護院川原町5-3 国立大学法人京都大学再生医科学研究科内

審査官 大久保 智之

- (56)参考文献 特表2009-512458(JP,A)  
development, 1998年, 125, 4155-4162  
nature medicine, 2008年, 14, 2, 134-143  
cellular signalling, 2003年, 15, 141-149  
stem cell research, 2009年 3月, 2, 155-162  
developmental biology, 2009年 4月 7日, 330, 286-304  
2008 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, MHS 2008 conference papers, 2008年11月 6日, 487-490, <http://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?tp=&arnumber=4752501>参照  
Developmental Biology, 2000年, 224, 189-203  
第81回日本生化学会大会第31回日本分子生物学会年会合同大会プログラム・講演要旨集, 2008年12月 4日, 1T25-5(1P-1089)  
Molecular Biology of the Cell, 2004年, 15, 4544-4555  
differentiation, 2008年, 76, 958-970  
stem cell rev, 2009年 3月 5日, 5, 159-173  
stem cells, 2007年, 25, 29-38  
stem cells, 2008年, 26, 874-885

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/10  
C12N 5/0735  
C12N 5/077  
A61K 35/12  
A61P 21/00  
A61P 21/04  
CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)  
Scopus  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)  
Cinii  
Science Direct