

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5804280号
(P5804280)

(45) 発行日 平成27年11月4日(2015.11.4)

(24) 登録日 平成27年9月11日(2015.9.11)

(51) Int.Cl. F I
C 1 2 N 5/0787 (2010.01) C 1 2 N 5/00 2 O 2 P
C 1 2 Q 1/02 (2006.01) C 1 2 Q 1/02

請求項の数 10 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2012-509792 (P2012-509792)	(73) 特許権者	504132272
(86) (22) 出願日	平成22年9月8日(2010.9.8)		国立大学法人京都大学
(65) 公表番号	特表2013-503601 (P2013-503601A)		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(43) 公表日	平成25年2月4日(2013.2.4)	(74) 代理人	100100549
(86) 国際出願番号	PCT/JP2010/065893		弁理士 川口 嘉之
(87) 国際公開番号	W02011/030915	(74) 代理人	100090516
(87) 国際公開日	平成23年3月17日(2011.3.17)		弁理士 松倉 秀実
審査請求日	平成25年9月4日(2013.9.4)	(74) 代理人	100126505
(31) 優先権主張番号	61/240,376		弁理士 佐貫 伸一
(32) 優先日	平成21年9月8日(2009.9.8)	(74) 代理人	100131392
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 丹羽 武司
		(72) 発明者	中畑 龍俊
			日本国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 i P S細胞研 究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多能性幹細胞からの肥満細胞の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト多能性幹細胞からヒト肥満細胞を製造する方法であって、以下の工程を含む方法。

(a) ヒト多能性幹細胞を、ヒト多能性幹細胞のCD34発現造血前駆細胞への分化を促進させるのに適した条件下で培養する工程、

(b) 工程(a)で得られた細胞をトロンボポエチン(TPO)、Flt3リガンド、SCF、IL-6およびIL-3を含む造血因子の存在下で培養する工程、および

(c) 工程(b)で得られた細胞をTPO、Flt3リガンド、SCF、IL-6を含むがIL-3を含まない造血因子を含有する無血清培地中で培養する工程。

【請求項2】

工程(a)における前記条件は、血管内皮増殖因子(VEGF)の存在下で哺乳動物胎児のAGM領域から得られた細胞と共培養するという条件である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記工程(b)および工程(c)が、浮遊培養で行われる、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記哺乳動物胎児のAGM領域から得られた細胞が、AGM-S3である、請求項2または3に記載の方法。

【請求項5】

ヒト多能性幹細胞が、ヒト人工多能性幹細胞である、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

製造されたヒト肥満細胞が、以下のマーカー遺伝子を発現している、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法；c-kit、tryptase、chymase、IgEレセプター、Cathepsin-G、CD 203c、Carboxypeptidase-AおよびCD88。

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法でヒト人工多能性幹細胞からヒト肥満細胞を製造し、製造されたヒト肥満細胞と試験物質とを接触して、当該ヒト肥満細胞に対する (a) アポトーシス誘導、(b) 脱顆粒抑制および (c) 炎症性メディエーター産生抑制、のうち少なくとも一つの作用を示す試験物質をスクリーニングする方法。

【請求項 8】

前記ヒト人工多能性幹細胞が、気管支喘息、アレルギー性疾患、またはアトピー性皮膚炎を罹患する対象の体細胞から製造された人工多能性幹細胞である、請求項 7 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 9】

前記試験物質が、気管支喘息、アレルギー性疾患、またはアトピー性皮膚炎に対する既知の治療薬である、請求項 7 または 8 に記載のスクリーニング方法。

【請求項 10】

前記ヒト人工多能性幹細胞が、Fc RIベータ鎖に変異を有するヒト人工多能性幹細胞である、請求項 7 から 9 のいずれか 1 項に記載のスクリーニング方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト多能性幹細胞からヒト肥満細胞を製造する方法に関する。より詳細には、本発明は、(a) ヒト多能性幹細胞を、ヒト多能性幹細胞のCD34発現造血前駆細胞への分化を促進させるのに適した条件下で培養する工程、および(b) 前記工程 (a) で得られた細胞をトロンボポエチン (TPO) およびFlt3リガンドを含む造血因子の存在下で培養する工程を含む、ヒト多能性幹細胞からヒト肥満細胞を製造する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

喘息、花粉症、鼻炎、皮膚炎の主な原因であるアレルギー反応の異常は、人口の 20% 以上が有しているといわれ、社会上の問題となっている。これらのアレルギー反応は、ハウスダストや花粉などの抗原がIgEと結合し、その複合体が肥満細胞上のIgE受容体に作用することにより肥満細胞が活性化するという過程をたどる。活性化した肥満細胞は、ヒスタミンを始めとした種々のケミカルメディエーターを遊離し、アレルギー反応の進展や炎症状態を引き起こす。

【0003】

従って、アレルギー性疾患の治療薬の開発と評価のため肥満細胞を用いることが必要である。そこで、必要な肥満細胞を調製するため、臍帯血から分化誘導すること (非特許文献 1)、または、サルES細胞から分化誘導 (非特許文献 2) することが試みられている。

【0004】

近年、線維芽細胞に、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc遺伝子を導入し強制発現させることによって、マウスおよびヒトの人工多能性幹細胞 (iPS細胞) が相次いで樹立された (特許文献 1、非特許文献 3、4)。

しかし、このヒトiPS細胞からヒト肥満細胞の分化誘導を成功した例はこれまでにない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献 1】WO 2007/069666 A1

【非特許文献】

【0006】

10

20

30

40

50

【非特許文献1】Saito H. et al., J Immunol., 157: 343-350 (1996)

【非特許文献2】FENG MA, et al., STEM CELLS, 26: 706-714 (2008)

【非特許文献3】Takahashi, K. and Yamanaka, S., Cell, 126: 663-676 (2006)

【非特許文献4】Takahashi, K. et al., Cell, 131: 861-872 (2007)

【発明の概要】

【0007】

本発明の目的は、多能性幹細胞から効率よく肥満細胞を製造することである。したがって、本発明の課題は、ヒト多能性幹細胞、特にヒト人工多能性幹細胞を肥満細胞へ分化誘導する培養条件を提供することである。

【0008】

本発明者らは、上記の課題を解決すべく、まず樹立された人工多能性幹細胞をマウス胎児のAGM領域から得られた細胞と共培養を行った後、得られた細胞を適切なサイトカインを含有する培地を用いて浮遊培養にて増殖させた。続いて、トロンボポエチン(TPO)を含むがIL-3を含まない適切なサイトカインを含有する無血清培地を用いてさらに4週間以上培養して、肥満細胞を分化誘導した。すると、肥満細胞に特有の細胞表面マーカーを発現する細胞が、80%以上の効率で樹立された。

【0009】

以上の結果から、本発明者らは、人工多能性幹細胞を適切な培養条件で培養し、段階を踏んで分化誘導をすることで、効率よく肥満細胞を製造することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0010】

すなわち、本発明は以下の通りである。

[1]ヒト多能性幹細胞からヒト肥満細胞を製造する方法であって、以下の工程を含む方法を提供する。

(a)ヒト多能性幹細胞を、ヒト多能性幹細胞のCD34発現造血前駆細胞への分化を促進させるのに適した条件下で培養する工程、および

(b)工程(a)で得られた細胞をトロンボポエチン(TPO)およびFlt3リガンドを含む造血因子の存在下で培養する工程。

[2]工程(a)における前記条件は、血管内皮増殖因子(VEGF)の存在下で哺乳動物胎児のAGM領域から得られた細胞と共培養するという条件である、[1]に記載の方法。

[3]工程(b)における前記造血因子が、さらに、幹細胞因子(SCF)およびIL-6を含む、[1]に記載の方法。

[4]工程(b)は、次の工程を連続的に含む、[3]に記載の方法。

(1)TPO、Flt3リガンド、SCF、IL-6およびIL-3を含む造血因子の存在下での浮遊培養、
(2)TPO、Flt3リガンド、SCF、IL-6を含むがIL-3を含まない造血因子を含有する無血清培地中での浮遊培養。

[5]前記哺乳動物胎児のAGM領域から得られた細胞が、AGM-S3である、[1]に記載の方法。

[6]ヒト多能性幹細胞が、ヒト人工多能性幹細胞である、[1]に記載の方法。

[7]製造されたヒト肥満細胞が、以下のマーカー遺伝子を発現している、[1]に記載の方法；c-kit、tryptase、chymase、IgEレセプター、Cathepsin-G、CD203c、Carboxypeptidase-AおよびCD88。

[8][1]に記載の方法でヒト人工多能性幹細胞から製造されたヒト肥満細胞と試験物質とを接触して、当該ヒト肥満細胞に対する(a)アポトーシス誘導、(b)脱顆粒抑制、および(c)炎症性メディエーター産生抑制のうち少なくとも一つの作用を示す試験物質をスクリーニングする方法。

[9]前記ヒト人工多能性幹細胞が、気管支喘息、アレルギー性疾患、またはアトピー性皮膚炎を罹患する対象の体細胞から製造された人工多能性幹細胞である、[8]に記載のスクリーニング方法

[10]前記試験物質が、気管支喘息、アレルギー性疾患、またはアトピー性皮膚炎に対す

10

20

30

40

50

る既知の治療薬である、[8]に記載のスクリーニング方法

[1 1]前記ヒト人工多能性幹細胞が、Fc RIベータ鎖に変異を有するヒト人工多能性幹細胞である、[8]に記載のスクリーニング方法。

本発明を用いることで、ヒト多能性幹細胞から効率よくヒト肥満細胞が製造できる。このことより、ヒト肥満細胞を用いたアレルギー性疾患の治療薬のスクリーニング方法、または、個々の患者から樹立したヒト肥満細胞を用いて個人に最適な治療薬を選別する、いわゆるオーダーメイド治療薬の選択において極めて有用である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

10

【図 1】AGM-3 (A) およびヒト人工多能性幹細胞である253G1 (B) の位相差顕微鏡における画像を示す。

【図 2】253G1細胞を、20ng/mlのヒトVEGFおよび15%FBSを含有するDMEMを培地として用いてAGM-S3細胞と14日間共培養した後の位相差顕微鏡における画像を示す。右図へ、左図における枠内を拡大した画像を示す。

【図 3】100ng/mlのSCF、100ng/mlのヒトIL-6、10ng/mlのヒトFlt3-ligandを含む無血清培地を用いて52日間培養して樹立した肥満細胞の位相差顕微鏡における画像を示す。

【図 4】樹立した肥満細胞のMay-Giemsa (A)、Toluidine Blue (B) またはAlcian Blue 溶液 (C) による染色像を示す。

【図 5】樹立した肥満細胞に対する抗c-kit抗体、抗chymase抗体、抗tryptase抗体を用いた免疫染色像、およびこれらの像の合成像を示す。

20

【図 6】樹立した肥満細胞に対する抗IgEレセプター抗体 (CRA-1)、抗Cathepsin-G抗体、抗CD203c抗体、抗Carboxypeptidase-A抗体および抗CD88抗体を用いた免疫染色像を示す。

【図 7】ヒト多能性幹細胞から成熟肥満細胞 (MCs) への誘導の計画図を示す。

【図 8】(A) 共培養 3 日目における未分化hESC (H1) コロニーの位相差顕微鏡像、(B) 共培養 1 4 日目における玉石様細胞の健全な増殖の位相差顕微鏡像、および(C) 敷石様細胞を示している(B)における培養と同じ培養の拡大写真を示す。

【図 9】IL-3存在下または非存在下におけるステップ 2 での細胞増殖のグラフを示す。hESC (H1) およびAGMS-3細胞 (ステップ 1) の共培養における 5×10^5 個の細胞は、IMDM, 10% FBS (F), および様々なサイトカインの組み合わせから成る浮遊培養に置換した (ステップ 2)。S, 6, 3, V, およびPは、それぞれSCF, IL-6, IL-3, VEGF, および血小板由来成長因子(PDGF)を意味する。

30

【図 1 0】(A) MC培養における10週目のhESCs (H1) 由来肥満細胞の位相差顕微鏡像、および肥満細胞を(B) May-Grunwald-Geimsa, (C) toluidine Blue, (D) alcian Blue, (E) ヒトCarboxypeptidase-A, (F) ヒトcathepsin-G, (G) c-Kit, (H) tryptase, (J) c-Kit, または(K) chymaseで肥満細胞を免疫染色して得た顕微鏡像、および、(I) (G)および(H)の合成像、(L) (G)および(H)の合成像を示す。

【図 1 1】透過型電子顕微鏡による10週目のhESCs-MCの写真を示す。

【図 1 2】hESC (H1)-MCsのフローサイトメトリープロファイルを示す。

40

【図 1 3】compound 48/80およびsubstance Pの刺激によるhESC-MCsからのヒスタミン放出のグラフを示す。

【図 1 4】(A) および(B) 長期培養におけるhESC-MCsの増殖のグラフ、(C) および(D) MC培養における15ヶ月目のhESC-MCsのc-KitおよびFc RIについてのフローサイトメトリープロファイルを示す。

【図 1 5】様々なhESCsおよびhiPSCs (ヒトiPS細胞) が肥満細胞を産生する能力のグラフを示す。空白および黒いバーは、hESCs (H1, KhES-1およびKhES-3) およびhiPSCs (253G1, 253G4および201B6) のMC培養における10週目の全細胞およびc-Kit陽性細胞をそれぞれ示す。

【発明を実施するための形態】

50

【0012】

本発明は、ヒト多能性幹細胞を適切なサイトカインを含有する培地を用いて分化誘導し、ヒト肥満細胞を製造する方法を提供する。

【0013】

I. 多能性幹細胞

本発明において「多能性幹細胞」とは、胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）に代表される未分化・多能性を維持する細胞を指す。ES細胞は体細胞から核初期化されて生じたES細胞であっても良い。またES細胞以外では、始原生殖細胞に由来するEmbryonic Germ Cell（EG cell）、精巣から単離されたmultipotent germline stem cell（mGS cell）、骨髄から単離されるMultipotent adult progenitor cell（MAPC）などが挙げられる。本発明において、これら多能性幹細胞の由来はヒト由来である。本発明において、多能性幹細胞は好ましくはiPS細胞である。

10

iPS細胞の製造方法は以下に示す。

【0014】

II. iPS細胞の製造方法(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、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。細胞の分化の程度や細胞を採取されるヒトの年齢などに特に制限はなく、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。

20

30

【0015】

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型が同一である他人から体細胞を採取することが望ましい。

【0016】

ヒト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p53の機能阻害物質（さらに必要に応じて、他の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。

40

【0017】

(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転写因子（群）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）でありうる。本発明に用いられる核初期化物質は、WO 2007/069666に記載の遺伝子であってもよい。より詳細には、Oct3/4, Klf4, Klf1, Klf2, Klf5, Sox2, Sox1, Sox3, Sox15,

50

Sox17, Sox18, c-Myc, L-Myc, N-Myc, TERT, SV40 Large T antigen, HPV16 E6, HPV16 E7, Bmi1, Lin28, Lin28b, Nanog, EsrrbまたはEsrrgが例示される。これらの初期化物質は、iPS細胞樹立の際には、組み合わせられて使用されてもよく、上記初期化物質を、少なくとも1つ、2つもしくは3つ含む組み合わせであり、好ましくは4つを含む組み合わせである。具体的には、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, Sox2, c-Myc（ここで、Sox2はSox1, Sox3, Sox15, Sox17またはSox18で置換可能である。Klf4はKlf1, Klf2またはKlf5で置換可能である。また、c-MycはL-MycまたはN-Mycで置換可能である。）

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

10

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

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

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

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

(7) Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc, Lin28

(8) Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc, Lin28, SV40LT

(9) Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc, Lin28, TERT, SV40LT

(10) Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc, SV40LT

(11) Oct3/4, Esrrb, Sox2, c-Myc（EsrrbはEsrrgで置換可能である。）

(12) Oct3/4, Klf4, Sox2

20

(13) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, SV40LT

(14) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, HPV16 E6

(15) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, HPV16 E7

(16) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, HPV6 E6, HPV16 E7

(17) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, Bmi1

(18) Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28

(19) Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28, SV40LT

(20) Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28, TERT, SV40LT

(21) Oct3/4, Klf4, Sox2, SV40LT

(22) Oct3/4, Esrrb, Sox2（EsrrbはEsrrgで置換可能である。）

30

上記において、Lin28に代えてLin28bを用いることもできる。

【0018】

また、上記(1)-(22)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)-(22)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。

【0019】

これらの組み合わせの中で、Oct3/4, Sox2, Klf4およびc-Mycの4因子並びにOct3/4, Sox2, およびKlf4の3因子が、好ましい核初期化物質の例として挙げられる。さらにSV40 Large T antigenを加えた5因子または4因子も好ましい。

40

【0020】

上記の各核初期化物質のヒト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、当業者は容易にこれらのcDNAを単離することができる。尚、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28, Lin28b, Esrrb, EsrrgのヒトcDNA配列情報は、それぞれ下記に示す；Oct3/4（NM_002701）、Sox2（NM_003106）、Klf4（NM_004235）、c-Myc（NM_002467）、Lin28（NM_024674）、Lin28b（NM_001004317）、Esrrb（NM_004452）およびEsrrg（NM_001438）。

【0021】

50

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。

【 0 0 2 2 】

(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。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BioPORTER Protein Delivery Reagent (Gene Therapy Systems)、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Penetratin 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 °C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。

【 0 0 2 3 】

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 (Rousselle, C. et al. Mol. Pharmacol. 57, 679-86 (2000))、HN-1 (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 4 】

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して行うことができる。

【 0 0 2 5 】

マイクロインジェクションは、先端径1 μm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 6 】

タンパク質導入操作は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回以下等) 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。導入操作を繰り返す場合の間隔としては、例えば6 ~ 48時間、好ましくは12 ~ 24時間が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0027】

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が好ましい。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。

【0028】

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。

10

【0029】

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。

【0030】

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 Maus 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。

20

【0031】

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、ピューロマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

【0032】

核初期化物質である核酸（初期化遺伝子）は、各々別個の発現ベクター上に組み込んでもよいし、1つの発現ベクターに2種類以上、好ましくは2~3種類の遺伝子を組み込んでもよい。遺伝子導入効率の高いレトロウイルスやレンチウイルスベクターを用いる場合は前者が、プラスミド、アデノウイルス、エピゾーマルベクターなどを用いる場合は後者を選択することが好ましい。さらに、2種類以上の遺伝子を組み込んだ発現ベクターと、1遺伝子のみを組み込んだ発現ベクターとを併用することもできる。

30

【0033】

上記において複数の初期化遺伝子（例えば、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycから選択される2つ以上、好ましくは2~3遺伝子）を1つの発現ベクターに組み込む場合、これら複数の遺伝子は、好ましくはポリシストロニック発現を可能にする配列を介して発現ベクターに組み込むことができる。ポリシストロニック発現を可能にする配列を用いることにより、1種類の発現ベクターに組み込まれている複数の遺伝子をより効率的に発現させることが可能になる。ポリシストロニック発現を可能にする配列としては、例えば、口蹄疫ウイルスの2A配列（PLoS ONE3, e2532, 2008, Stem Cells 25, 1707, 2007）、IRES配列（U.S. Patent No. 4,937,190）などが挙げられ、好ましくは2A配列を用いることができる。

40

【0034】

初期化遺伝子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

50

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細胞由来の分化細胞から再生された組織における発癌リスクを高める可能性があるため、初期化遺伝子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。

10

【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などのポリアデ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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

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。

【0039】

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、Yu et al., Science, 324, 797-801 (2009) に開示されている。本発明の特に好ましい実施態様においては、エピゾーマルベクターの複製に必要なベクター要素の5'側および3'側にloxP配列を同方向に配置したエピゾーマルベクターに初期化遺伝子を挿入した発現ベクターを構築し、これを体細胞に導入することにより、該ベクターを構成する外来核酸因子（初期化遺伝子を含む）が一過的にも細胞のゲノム中に組み込まれることなく、早い段階でエピソームとして存在する該ベクターがiPS細胞から脱落する。

10

【0040】

本発明に用いられるエピゾーマルベクターとしては、例えば、EBV、SV40等に由来する自律複製に必要な配列をベクター要素として含むベクターが挙げられる。自律複製に必要なベクター要素としては、具体的には、複製開始点と、複製開始点に結合して複製を制御するタンパク質をコードする遺伝子であり、例えば、EBVにあっては複製開始点oriPとEBNA-1遺伝子、SV40にあっては複製開始点oriとSV40 large T antigen遺伝子が挙げられる。

【0041】

また、エピゾーマル発現ベクターは、初期化遺伝子の転写を制御するプロモーターを含む。該プロモーターとしては、前記と同様のプロモーターが用いられ得る。また、エピゾーマル発現ベクターは、前記と同様に、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などをさらに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等が挙げられる。

20

【0042】

エピゾーマルベクターは、例えば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。具体的には、例えばScience, 324: 797-801 (2009)等に記載される方法を用いることができる。

【0043】

iPS細胞から初期化遺伝子の複製に必要なベクター要素が除去されたか否かの確認は、該ベクター要素内部および/またはloxP配列近傍の塩基配列を含む核酸をプローブまたはプライマーとして用い、該iPS細胞から単離したエピソーム画分を鋳型としてサザンブロット分析またはPCR分析を行い、バンドの有無または検出バンドの長さを調べることにより実施することができる。エピソーム画分の調製は当該分野で周知の方法と用いて行えばよく、例えば、Science, 324: 797-801 (2009)等に記載される方法を用いることができる。

30

【0044】

(D) p53の機能阻害物質

本発明は、上記の核初期化物質に加えて、p53の機能阻害物質を接触させることがより好ましい。本明細書において「p53の機能阻害物質」とは、(a)p53タンパク質の機能もしくは(b)p53遺伝子の発現を阻害し得る限り、いかなる物質であつてもよい。すなわち、p53タンパク質に直接作用してその機能を阻害する物質や、p53遺伝子に直接作用してその発現を阻害する物質のみならず、p53のシグナル伝達に関与する因子に作用することにより、結果的にp53タンパク質の機能やp53遺伝子の発現を阻害する物質も、本明細書における「p53の機能阻害物質」に含まれる。好ましくは、p53の機能阻害物質は、p53遺伝子の発現を阻害する物質であり、より好ましくはp53に対するsiRNAやshRNAをコードする発現ベクターである。

40

【0045】

p53タンパク質の機能を阻害する物質としては、例えば、p53の化学的阻害物質、p53の

50

ドミナントネガティブ変異体もしくはそれをコードする核酸、抗p53アンタゴニスト抗体もしくはそれをコードする核酸、p53応答エレメントのコンセンサス配列を含むデコイ核酸、p53経路を阻害する物質などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、p53の化学的阻害物質、p53のドミナントネガティブ変異体もしくはそれをコードする核酸、p53経路阻害物質が挙げられる。

【 0 0 4 6 】

(D1) p53の化学的阻害物質

p53の化学的阻害物質としては、例えば、WO 00/44364に開示されるpifithrin (PFT) - 及び- に代表されるp53阻害剤、Stormら (Nat. Chem. Biol. 2, 474 (2006)) に開示されるPFT- μ 、それらの類縁体及びそれらの塩 (例えば、塩酸酸、臭素酸塩等の酸付加塩 など) 等が挙げられるが、これらに限定されない。これらのうち、PFT- 及びその類縁体 [2-(2-Imino-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiazol-3-yl)-1-p-tolyloethanone, HBr (製品名: Pifithrin-)] 及び1-(4-Nitrophenyl)-2-(4,5,6,7-tetrahydro-2-imino-3(2H)-benzothiazolyl)ethanone, HBr (製品名: Pifithrin- , p-Nitro)]、PFT- 及びその類縁体 [2-(4-Methylphenyl)imidazo[2,1-b]-5,6,7,8-tetrahydrobenzothiazole, HBr (製品名: Pifithrin- , Cyclic)] 及び2-(4-Nitrophenyl)imidazo[2,1-b]-5,6,7,8-tetrahydrobenzothiazole (製品名: Pifithrin- , p-Nitro, Cyclic)]、PFT- μ [Phenylacetylenylsulfonamide (製品名: Pifithrin- μ)] は、Merck社より市販されている。

10

【 0 0 4 7 】

体細胞へのp53の化学的阻害物質の接触は、該阻害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)、RPMI 1640培地、199培地、F12培地など) 中に、阻害物質濃度がp53の機能阻害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阻害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。阻害物質濃度は用いる阻害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。

20

【 0 0 4 8 】

p53遺伝子は癌抑制遺伝子として知られており、p53の恒常的な機能阻害は発癌のリスクを高める可能性がある。p53の化学的阻害物質は、培地に添加するだけで細胞への導入が可能であるという利点に加えて、iPS細胞の誘導後に該阻害物質を含む培地を除去することにより、容易かつ迅速にp53の機能阻害を解除できる点でも有用である。

30

【 0 0 4 9 】

(D2) p53のドミナントネガティブ変異体

p53のドミナントネガティブ変異体としては、体細胞に内在する野生型p53タンパク質と競合的に作用して、その機能を阻害し得る限り特に制限はないが、例えば、マウスp53のDNA結合領域に位置する275位 (ヒトの場合は278位) のプロリンをセリンに点変異させたp53P275S (de Vries, A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 2948-2953 (2002))、マウスp53の14-301位 (ヒトp53では11-304位に対応) のアミノ酸を欠失させたp53DD (Bowman, T., Genes Develop., 10, 826-835 (1996)) などが挙げられる。その他にも、例えば、ヒトp53の61位のセリンをアラニンに点変異させたp53S61A、ヒトp53の135位のシステインをチロシンに点変異させたp53C135Y、ヒトp53の138位のアラニンをバリンに点変異させたp53A138V、ヒトp53の175位のアルギニンをヒスチジンに点変異させたp53R175H、ヒトp53の273位のアルギニンをヒスチジンに点変異させたp53R273H、ヒトp53の281位のアスパラギン酸をアスパラギンに点変異させたp53D281Nなどが知られており、同様に使用することができる。

40

【 0 0 5 0 】

p53のドミナントネガティブ変異体は、例えば、以下の手法により得ることができる。まず、ヒトのp53 cDNA配列情報に基づいて適当なオリゴヌクレオチドをプローブもしくは

50

プライマーとして合成し、マウスまたはヒトの細胞・組織由来のmRNA、cDNAもしくはcDNAライブラリーから、ハイブリダイゼーション法や(RT-)PCR法を用いてマウスまたはヒトp53 cDNAをクローニングし、適当なプラスミドにサブクローニングする。変異を導入しようとする部位のコドン(例えば、p53P275Sの場合、開始コドンから塩基配列中塩基番号951-953で示されるcct)を所望の他のアミノ酸をコードするコドン(例えば、p53P275Sの場合、tct)に置換した形で、当該部位を含むプライマーを合成し、これを用いてp53 cDNAを挿入したプラスミドを鋳型とするインバースPCRを行うことにより、目的のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸を取得する。p53DDのような欠失変異体の場合には、欠失させる部位の外側にプライマーを設計して、同様にインバースPCRを行えばよい。このようにして得られたドミナントネガティブ変異体をコードする核酸を宿主細胞に導入し、該細胞を培養して得られる培養物から組換えタンパク質を回収することにより、所望のドミナントネガティブ変異体を取得することができる。

10

【0051】

体細胞へのドミナントネガティブ変異体の接触は、上記タンパク質の核初期化物質の場合と同様に実施することができる。上述のように、p53の恒常的な機能阻害は発癌のリスクを高める可能性があるが、p53のドミナントネガティブ変異体は、導入された細胞内でプロテアーゼによる分解を受けて徐々に消失し、それに応じて細胞に内在するp53の機能が回復することから、該変異体タンパク質の使用は、得られるiPS細胞を治療用途で利用する場合のように、高度な安全性を要求される場合に好適であり得る。

【0052】

20

(D3) p53のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸

本発明の別の好ましい実施態様において、p53機能阻害物質は、p53のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸である。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、好ましくはDNAである。また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。p53のドミナントネガティブ変異体をコードするcDNAは、該変異体タンパク質の作製について上記した手法によりクローニングすることができる。

【0053】

単離されたcDNAは、前記核初期化物質である核酸(初期化遺伝子)の場合と同様に、適当な発現ベクターに挿入され、体細胞に導入され得る。

【0054】

30

(D4) p53経路阻害物質

ここでp53経路とは、p53を活性化し得るあらゆる上流のシグナルカスケードおよび活性化p53によって媒介されるあらゆる下流のシグナルカスケードを包含する意味で用いられる。したがって、p53経路阻害物質には、上記シグナル伝達経路のいずれかを阻害するいかなる物質も含まれるが、好ましい一実施態様においては、p53経路阻害物質はp53によりその転写が活性化されるp21の発現もしくは機能(Myc阻害活性)を阻害する物質であり、例えば、p21に対するsiRNA、shRNA、アンチセンス核酸、リボザイム等が挙げられる。p21の発現を阻害するこれらの核酸は、後記p53に対するsiRNA、shRNA、アンチセンス核酸、リボザイムと同様の方法により設計・合成し、体細胞に導入することができる。当該核酸は、それらを発現するベクターの形態で提供されてもよく、該ベクターは、後記p53に対するsiRNA、shRNA、アンチセンス核酸、リボザイムを発現するベクターと同様の方法により構築し、体細胞に導入することができる。

40

【0055】

別の好ましい一実施態様においては、p53経路阻害物質はARF-MDM2-p53経路を阻害する物質であり、例えば、ARF-MDM2-p53経路阻害物質として、p53に直接結合してその核外輸送やユビキチン化を促進するMDM2もしくはそれをコードする核酸、p53へのMDM2の作用を阻害するp19^{ARF}やATM(ataxia-telangiectasia mutated)の発現もしくは機能を阻害する物質(例えば、これらの因子に対するsiRNAやshRNA)等が挙げられる。

【0056】

(D5) その他の物質

50

p53タンパク質の機能を阻害するその他の物質として、例えば、抗p53アンタゴニスト抗体もしくはそれをコードする核酸が挙げられる。抗p53アンタゴニスト抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。抗体のアイソタイプは特に限定されないが、好ましくはIgG、IgMまたはIgA、特に好ましくはIgGが挙げられる。また、該抗体は、完全抗体分子の他、例えばFab、Fab'、F(ab')₂等のフラグメント、scFv、scFv-Fc、ミニボディー、ダイアボディー等の遺伝子工学的に作製されたコンジュゲート分子、あるいはポリエチレングリコール(PEG)等の蛋白質安定化作用を有する分子等で修飾されたそれらの誘導体などであってもよい。抗p53アンタゴニスト抗体は、p53またはその部分ペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。また、公知の抗p53アンタゴニスト抗体として、例えば、PAb1801 (Oncogene Science Ab-2) 及びDO-1 (Oncogene Science Ab-6) (Gire and Wynford-Thomas, Mol. Cell. Biol., 18, 1611-1621 (1998)) 等が挙げられる。抗p53アンタゴニスト抗体をコードする核酸は、抗p53モノクローナル抗体産生ハイブリドーマから常法により単離することができる。得られるH鎖及びL鎖遺伝子を連結して単鎖抗体をコードする核酸を作製することもできる。

10

【0057】

p53タンパク質の機能を阻害する別の物質として、抗p21アンタゴニスト抗体もしくはそれをコードする核酸が挙げられる。抗p21アンタゴニスト抗体及びそれをコードする核酸も、上記抗p53アンタゴニスト抗体及びそれをコードする核酸と同様にして作製することができる。

20

【0058】

p53タンパク質の機能を阻害するさらに別の物質は、p53応答エレメントのコンセンサス配列(例、Pu-Pu-Pu-G-A/T-T/A-C-Py-Py-Py (Pu: プリン塩基, Py: ピリミジン塩基))を含むデコイ核酸である。このような核酸は上記塩基配列情報に基づいてDNA/RNA自動合成機で合成することができる。あるいはそのようなデコイ核酸は市販されている(例、p53 transcription factor decoy (GeneDetect.com))。

【0059】

抗p53アンタゴニスト抗体及び抗p21アンタゴニスト抗体はp53のドミナントネガティブ変異体と同様に、また、該抗体をコードする核酸は該変異体をコードする核酸と同様にして、それぞれ細胞に導入することができる。また、上記デコイ核酸は、リポフェクション法などにより細胞に導入することができる。

30

【0060】

一方、p53遺伝子の発現を阻害する物質としては、例えば、p53に対するsiRNAもしくはshRNA、p53に対するsiRNAもしくはshRNAを発現するベクター、p53に対するアンチセンス核酸及びp53に対するリボザイム等が挙げられるが、好ましくはp53に対するsiRNA、shRNA及びsiRNA、shRNAを発現するベクターである。

【0061】

(D6) p53に対するsiRNA及びshRNA

p53に対するsiRNAは、ヒトのp53 cDNA配列情報(NCBI No. NM_000546)に基づいて、例えば、Elbashirら(Genes Dev., 15, 188-200 (2001))の提唱する規則に従って設計することができる。siRNAの標的配列としては、原則的にはAA+(N)19であるが、AA+(N)21もしくはNA+(N)21であってもよい。また、センス鎖の5'末端がAAである必要はない。標的配列の位置は特に制限されるわけではないが、5'-UTR及び開始コドンから約50塩基まで、並びに3'-UTR以外の領域から標的配列を選択することが望ましい。標的配列のGC含量も特に制限はないが、約30-約50%が好ましく、GC分布に偏りがなく繰り返しが少ない配列が望ましい。尚、下記(b2)のsiRNAもしくはshRNAを発現するベクターの設計において、プロモーターとしてp0III系プロモーターを使用する場合、ポリメラーゼの転写が停止しないように、4塩基以上TまたはAが連続する配列は選択しないようにすべきである。

40

【0062】

上述の規則に基づいて選択された標的配列の候補群について、標的以外のmRNAにおいて

50

16-17塩基の連続した配列に相同性がないかどうかを、BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 等のホモロジー検索ソフトを用いて調べ、選択した標的配列の特異性を確認する。特異性の確認された標的配列について、AA (もしくはNA) 以降の19-21塩基にTTもしくはUUの3'末端オーバーハングを有するセンス鎖と、該19-21塩基に相補的な配列及びTTもしくはUUの3'末端オーバーハングを有するアンチセンス鎖とからなる2本鎖RNAをsiRNAとして設計する。また、shRNAは、ループ構造を形成しうる任意のリンカー配列 (例えば、8-25塩基程度) を適宜選択し、上記センス鎖とアンチセンス鎖とを該リンカー配列を介して連結することにより設計することができる。

【0063】

siRNA及び/又はshRNAの配列は、種々のwebサイト上に無料で提供される検索ソフトを用いて検索が可能である。このようなサイトとしては、例えば、Ambionが提供するsiRNA Target Finder (http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/siRNA_finder.html) 及びpSilencer™ Expression Vector用 インサート デザインツール (http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/psilencer_converter.html)、RNAi Codexが提供するGeneSeer (<http://codex.cshl.edu/scripts/newsearchhairpin.cgi>) がこれらに限定されず、QIAGEN、タカラバイオ、SiSearch、Dharmacon、Whitehead Institute、Invitrogen、Promega等のwebサイト上でも同様に検索が可能である。

【0064】

p53に対するsiRNAは、上記のようにして設計されたセンス鎖及びアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドをDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、例えば、適当なアニーリング緩衝液中、約90～約95℃で約1分程度変性させた後、約30～約70℃で約1～約8時間アニーリングさせることにより調製することができる。また、p53に対するshRNAは、上記のようにして設計されたshRNA配列を有するオリゴヌクレオチドをDNA/RNA自動合成機で合成し、上記と同様にしてセルフアニーリングさせることによって調製することができる。

【0065】

siRNA及びshRNAを構成するヌクレオチド分子は、天然型のRNAでもよいが、安定性 (化学的および/または対酵素) や比活性 (mRNAとの親和性) を向上させるために、種々の化学修飾を含むことができる。例えば、ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンス核酸を構成する各ヌクレオチドのリン酸残基 (ホスフェート) を、例えば、ホスホロチオエート (PS)、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾リン酸残基に置換することができる。また、各ヌクレオチドの糖 (リボース) の2'位の水酸基を、-OR (Rは、例えばCH₃ (2'-O-Me)、CH₂CH₂OCH₃ (2'-O-MOE)、CH₂CH₂NH₂、CH₂CONHCH₃、CH₂CH₂CN等を示す) に置換してもよい。さらに、塩基部分 (ピリミジン、プリン) に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基やカチオン性官能基の導入、あるいは2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換などが挙げられる。

【0066】

RNAの糖部のコンフォメーションはC2'-endo (S型) とC3'-endo (N型) の2つが支配的であり、一本鎖RNAではこの両者の平衡として存在するが、二本鎖を形成するとN型に固定される。したがって、標的RNAに対して強い結合能を付与するために、2'酸素と4'炭素を架橋することにより、糖部のコンフォメーションをN型に固定したRNA誘導体であるBNA (LNA) (Imanishi, T. et al., Chem. Commun., 1653-9, 2002; Jepsen, J.S. et al., Oligonucleotides, 14, 130-46, 2004) やENA (Morita, K. et al., Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 22, 1619-21, 2003) もまた、好ましく用いられ得る。

【0067】

但し、天然型RNA中のすべてのリボヌクレオシド分子を修飾型で置換すると、RNAi活性が失われる場合があるので、RISC複合体が機能できる最小限の修飾ヌクレオシドの導入が必要である。

【0068】

p53に対するsiRNAは、例えば、Ambion (例、Ambion Cat# AM16708, siRNA ID# 69659,

10

20

30

40

50

69753, 69843, 187424, 187425, 187426) や Santa Cruz (例、Santa Cruz Cat# sc-29436, 44219) 等から購入することもできる。

また、ヒトp53に対するsiRNAおよびshRNAも、上記のいずれかの検索ソフトを用いて、ヒトp53 cDNAの配列 (NCBI No. NM_000546) 等をクエリーとして入力することにより設計し、合成することができ、あるいはAmbion等から購入することもできる。具体的には、Science, 296, 550-553 (2002) に記載されるp53に対するshRNAなどが例示される。

【0069】

p53に対するsiRNAもしくはshRNAの体細胞への接触は、プラスミドDNAの場合と同様に、リポソーム法、ポリアミン法、エレクトロポレーション法、ビーズ法等を用いて、該核酸を細胞内へ導入することにより実施することができる。カチオニックリポソームを用いた方法が最も一般的で、導入効率も高い。Lipofectamine2000やOligofectamine (Invitrogen) などの一般的な遺伝子導入試薬の他、例えば、GeneEraserTM siRNA transfection reagent (Stratagene) 等のsiRNA導入に適した導入試薬も市販されている。

【0070】

(D7) p53に対するsiRNAもしくはshRNAを発現するベクター

siRNAを発現するベクターには、タンデムタイプとステムループ (ヘアピン) タイプとがある。前者はsiRNAのセンス鎖の発現カセットとアンチセンス鎖の発現カセットをタンデムに連結したもので、細胞内で各鎖が発現してアニーリングすることにより2本鎖のsiRNA (dsRNA) を形成するというものである。一方、後者はshRNAの発現カセットをベクターに挿入したもので、細胞内でshRNAが発現しdicerによるプロセッシングを受けてdsRNAを形成するというものである。プロモーターとしては、polIII系プロモーター (例えば、CMV前初期プロモーター) を使用することもできるが、短いRNAの転写を正確に行わせるために、polIII系プロモーターを使用するのが一般的である。polIII系プロモーターとしては、マウスおよびヒトのU6-sRNAプロモーター、ヒトH1-RNase P RNAプロモーター、ヒトバリン-tRNAプロモーターなどが挙げられる。また、転写終結シグナルとして4個以上Tが連続した配列が用いられる。

【0071】

このようにして構築したsiRNAもしくはshRNA発現カセットを、次いでプラスミドベクターやウイルスベクターに挿入する。このようなベクターとしては、核初期化物質である核酸 (初期化遺伝子) について上記したと同様のものが、好ましく利用され得る (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、セングアイウイルスなどのウイルスベクターや、動物細胞発現プラスミド、エピソーマルベクターなど)。使用するベクターは、初期化遺伝子の場合と同様、得られるiPS細胞の用途に応じて適宜選択され得る。あるいは、p53に対するshRNAをコードする発現ベクターとして、市販のプラスミド (例えば、Addgene社から市販されるpMK0.1-puro p53 shRNA2: #10672等) をもとに作製したレトロウイルス等のウイルスベクター、プラスミドベクター、エピソーマルベクターなどを使用することもできる。必要に応じて、上記Cre-loxPシステムやpiggyBacトランスポゾンシステムを利用することもできる。

【0072】

p53に対するsiRNAもしくはshRNAを発現するベクターの体細胞への接触は、上記のようにして調製されるプラスミドベクター、エピソーマルベクターもしくはウイルスベクターを細胞に導入することにより行われる。これらの遺伝子導入は、初期化遺伝子について上記したと同様の手法で行うことができる。

【0073】

(D8) その他の物質

p53遺伝子の発現を阻害する他の物質として、p53に対するアンチセンス核酸やリボザイムが挙げられる。

アンチセンス核酸は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。アンチセンス核酸がDNAの場合、標的RNAとアンチセンスDNAとによって形成されるRNA:DNAハイブリッドは、内在性RNase Hに認識されて標的RNAの選択的な分解を引き

10

20

30

40

50

起こすことができる。したがって、RNase Hによる分解を指向するアンチセンスDNAの場合、標的配列は、p53 mRNA中の配列だけでなく、p53遺伝子の初期転写産物におけるイントロン領域の配列であってもよい。アンチセンス核酸の標的領域は、該アンチセンス核酸がハイブリダイズすることにより、結果としてp53蛋白質への翻訳が阻害されるものであればその長さに特に制限はなく、p53 mRNAの全配列であっても部分配列であってもよく、短いもので約15塩基程度、長いものでmRNAもしくは初期転写産物の全配列が挙げられる。合成の容易さや抗原性、細胞内移行性の問題等を考慮すれば、約15～約40塩基、特に約18～約30塩基からなるオリゴヌクレオチドが好ましい。標的配列の位置としては、5'-及び3'-UTR、開始コドン近傍などが挙げられるが、それらに限定されない。

【0074】

リボザイムとは、狭義には、核酸を切断する酵素活性を有するRNAをいうが、本明細書では配列特異的な核酸切断活性を有する限りDNAをも包含する概念として用いるものとする。リボザイムとして最も汎用性の高いものとしては、ウイロイドやウイルソイド等の感染性RNAに見られるセルフスプライシングRNAがあり、ハンマーヘッド型やヘアピン型等が知られている。ハンマーヘッド型は約40塩基程度で酵素活性を発揮し、ハンマーヘッド構造をとる部分に隣接する両端の数塩基ずつ（合わせて約10塩基程度）をmRNAの所望の切断部位と相補的な配列にすることにより、標的mRNAのみを特異的に切断することが可能である。

【0075】

アンチセンス核酸やリボザイムはDNA/RNA自動合成機を用いて合成することができる。これらを構成するヌクレオチド分子もまた、安定性、比活性などを向上させるために、上記のsiRNAの場合と同様の修飾を受けていてもよい。

【0076】

あるいは、アンチセンス核酸やリボザイムは、siRNAの場合と同様に、それらをコードする核酸の形態で使用することもできる。

【0077】

p53の機能阻害物質は、体細胞の核初期化工程においてp53の機能を阻害するのに十分な様式で体細胞に接触させる必要がある。この条件が満たされる限り、核初期化物質とp53の機能阻害物質とは、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、p53の機能阻害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p53の機能を阻害しうることから、遺伝子導入処理から一定期間細胞を培養した後に、p53の化学的阻害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p53の機能阻害物質とがいずれもウイルスベクター、プラスミドベクター、エピソーマルベクター等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。

【0078】

(E) iPS細胞の樹立効率改善物質

上記の初期化因子等に加え、公知の他のiPS細胞樹立効率改善物質を体細胞に接触させることにより、iPS細胞の樹立効率をさらに高めることが期待できる。そのような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^o (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等）等の核酸性発現阻害剤など〕、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-calcium channel agonist（例えばBayk8644）(Cell Stem Cell, 3, 568-574 (2008))、UTF1(Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、Wnt Signaling（例

10

20

30

40

50

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))、ES細胞特異的miRNA (例えば、miR-302-367クラスター (Mol. Cell. Biol. doi:10.1128/MCB.00398-08、W02009/075119)、miR-302 (RNA (2008) 14: 1-10)、miR-291-3p, miR-294およびmiR-295 (以上、Nat. Biotechnol. 27: 459-461 (2009)))等が挙げられるが、それらに限定されない。前記において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。

【0079】

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はないであろう。

10

【0080】

これら他のiPS細胞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応じて、p53の機能阻害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。

20

【0081】

他の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く、該物質の物性に応じて、p53の機能阻害物質について上記したと同様のタイミングで体細胞と接触させることができる。

【0082】

(F) 培養条件による樹立効率の改善

体細胞の核初期化工程において低酸素条件下で細胞を培養することにより、iPS細胞の樹立効率をさらに改善することができる。本明細書において「低酸素条件」とは、細胞を培養する際の雰囲気中の酸素濃度が、大気中のそれよりも有意に低いことを意味する。具体的には、通常の細胞培養で一般的に使用される5-10% CO₂/95-90%大気中の酸素濃度よりも低い酸素濃度の条件が挙げられ、例えば雰囲気中の酸素濃度が18%以下の条件が該当する。好ましくは、雰囲気中の酸素濃度は15%以下(例、14%以下、13%以下、12%以下、11%以下など)、10%以下(例、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下など)、または5%以下(例、4%以下、3%以下、2%以下など)である。また、雰囲気中の酸素濃度は、好ましくは0.1%以上(例、0.2%以上、0.3%以上、0.4%以上など)、0.5%以上(例、0.6%以上、0.7%以上、0.8%以上、0.95以上など)、または1%以上(例、1.1%以上、1.2%以上、1.3%以上、1.4%以上など)である。

30

【0083】

細胞の環境において低酸素状態を創出する手法は特に制限されないが、酸素濃度の調節可能なCO₂インキュベーター内で細胞を培養する方法が最も容易であり、好適な例として挙げられる。酸素濃度の調節可能なCO₂インキュベーターは、種々の機器メーカーから販売されている(例えば、Thermo scientific社、池本理化学工業、十慈フィールド、和研薬株式会社などのメーカー製の低酸素培養用CO₂インキュベーターを用いることができる)。

40

【0084】

低酸素条件下で細胞培養を開始する時期は、iPS細胞の樹立効率が正常酸素濃度(20%)の場合に比して改善されることを妨げない限り特に限定されず、体細胞への核初期化物質の接触より前であっても、該接触と同時であっても、該接触より後であってもよいが、

50

例えば、体細胞に核初期化物質を接触させた直後から、あるいは接触後一定期間（例えば、1ないし10（例、2,3,4,5,6,7,8または9）日）おいた後に低酸素条件下で培養することが好ましい。

【0085】

低酸素条件下で細胞を培養する期間も、iPS細胞の樹立効率が正常酸素濃度（20%）の場合に比して改善されることを妨げない限り特に限定されず、例えば3日以上、5日以上、7日以上または10日以上で、50日以下、40日以下、35日以下または30日以下の期間等が挙げられるが、それらに限定されない。低酸素条件下での好ましい培養期間は、雰囲気中の酸素濃度によっても変動し、当業者は用いる酸素濃度に応じて適宜当該培養期間を調整することができる。また、一実施態様において、iPS細胞の候補コロニーの選択を、薬剤耐性を指標にして行う場合には、薬剤選択を開始する迄に低酸素条件から正常酸素濃度に戻すことが好ましい。

10

【0086】

さらに、低酸素条件下で細胞培養を開始する好ましい時期および好ましい培養期間は、用いられる核初期化物質の種類、正常酸素濃度条件下でのiPS細胞樹立効率などによっても変動する。

【0087】

核初期化物質およびp53の機能阻害物質（さらに必要に応じて他の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。通常の培地に分化抑制因子として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の共存下で培養される。マウス胎仔由来の線維芽細胞としては、通常STO細胞株（ATCC CR L-1503）等がフィーダーとしてよく使われるが、iPS細胞の誘導には、STO細胞にネオマイシン耐性遺伝子とLIF遺伝子を安定に組み込んだSNL細胞（SNL76/7 STO細胞；ECACC 07032 801）（McMahon, A. P. & Bradley, A. Cell 62, 1073-1085 (1990)）等がよく使われている。しかしながら、本発明においては、マウス胎仔由来の初代線維芽細胞（MEF）を用いた方がヒトiPS細胞の樹立効率がより改善されるので、MEFの使用がより好ましい。マイトマイシンC処理済のMEFは、ミリポア社やリプロセル社から市販されている。これらの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。

20

30

【0088】

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テ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（ β -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）遺伝子とピュー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。

40

【0089】

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

50

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、アルカリフォスファターゼ染色や、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。

【0090】

III. 多能性幹細胞の肥満細胞への分化誘導方法

本発明の多能性幹細胞の肥満細胞への分化誘導方法は、以下の2つの工程を含む方法である。

(a) ヒト多能性幹細胞を、ヒト多能性幹細胞のCD34発現造血前駆細胞への分化を促進させるのに適した条件下で培養する工程、および

(b) 工程(a)で得られた細胞をトロンボポエチン(TPO)およびFlt3リガンドを含む造血因子の存在下で培養する工程。

10

【0091】

好ましくは、工程(b)における造血因子は、さらに、幹細胞因子(SCF)およびIL-6を含む。

より好ましくは、上記の(b)の工程へ進む前に細胞を増殖させる工程を含む、以下の3つの工程を含む方法である。

(a) ヒト多能性幹細胞を、VEGFの存在下で哺乳動物胎児のAGM領域から得られた細胞と共培養する工程、

(a') 工程(a)で得られた細胞を、TPO、SCF、IL-6、IL-3およびFlt3リガンドを含む造血因子の存在下で浮遊培養する工程、および

20

(b) 工程(a')で得られた細胞を、TPO、Flt3リガンド、SCF、IL-6を含むがIL-3を含まない造血因子を含有する無血清培地中で浮遊培養する工程。

本発明において、工程(a')では、VEGFまたはPDGFを加えてもよい。

【0092】

ここで、「ヒトCD34発現造血前駆細胞への分化を促進させるのに適した条件」とは、例えば、血管内皮増殖因子(VEGF)存在下で、哺乳類胎児のAGM領域から得られた細胞との共培養、マウス胎仔線維芽細胞上またはOP9細胞上での培養、または、胚様細胞塊形成およびその後フィブロネクチンやコラーゲンIVなどの基質を利用することができる限定分化条件下での培養を意味する。

【0093】

30

ここで、「AGM(aorta, gonad and mesonephros)領域」とは、胎仔内部の背側大動脈、生殖腺・中腎で囲まれた部分を指し、好ましくは、10.5日のマウス胎児の前記領域である。AGM領域から得られた細胞は、好ましくは造血細胞を除くために線処理される。AGM領域から得られた細胞として具体的には、特開2001-37471に記載の方法で樹立された細胞が挙げられ、この細胞ではVECAM-1、CD13およびSca-1が陽性であり、IL-6とoncostatin Mが産生されている。特に好ましくは、特開2001-37471に記載のAGM-S3である。共培養の際、ヒト多能性幹細胞に対してAGM領域から得られた細胞が過剰に存在していることが望ましい。また、AGM領域から得られた細胞は、共培養前に、放射線処理もしくはマイトマイシンC処理により増殖機能を欠損させることが望ましい。

【0094】

40

「造血因子」とは、血球の分化・増殖を促進する因子であり、ステムセルファクター(Stem Cell Factor(SCF))、コロニー刺激因子(Colony-Stimulating Factor(CSF))、顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte-(G-)CSF)、エリスロポエチン(Erythropoietin(EP0))、Flt3 ligand、インターロイキン類およびトロンボポエチン(Thrombopoietin(TPO))などがある。ここで、インターロイキン類は、白血球から分泌されるタンパク質で、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、およびIL-9などを含む30種以上がある。本発明において、「サイトカイン」という用語は造血因子と区別しない。好ましくは、SCF、TPO、Flt3 ligand、IL-3、およびIL-6またはSCF、TPO、Flt3 ligand、およびIL-6である。

【0095】

50

「無血清培地」とは、動物由来の血清を含んでいない培地を意味し、アルブミンまたはアルブミン代替物、トランスフェリンまたはトランスフェリン代替物、および、インシュリンまたはインシュリン代替物のいずれか一つを含有してもよい。本発明において、好ましい無血清培地とは、血清の代わりに、StemSpan(R) SFEM (Stemcell社)を含有する培地である。培地は、基本培地に、サイトカインを加えて作成されてもよく、基本培地は、最小必須培地 (MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) およびイスコフ改変ダルベッコ培地 (IMDM) などを用いてもよい。

【 0 0 9 6 】

本発明において、特記がない限り、培地は基本培地として作成してよい。その基本培地の例としては、IMDM培地や199培地、イーグル最小必須培地 (EMEM)、アルファ-MEM培地、

10

【 0 0 9 7 】

「浮遊培養」とは、非接着型の培養皿を用いて、細胞を培養することを意味する。

【 0 0 9 8 】

接着型の培養の場合は、細胞の接着特性の向上のために、培養皿の表面をコラーゲンI、コラーゲンIV、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ラミニン、フィブロネクチン、マトリゲル™ (Becton, Dickinson and Company)などの細胞支持基質でコートしてもよい。

20

【 0 0 9 9 】

Flt3リガンドとは、NCBI NM_001459で示された核酸配列情報であらわされることができ、細胞膜貫通型のチロシンリ酸化酵素であるflt3をレセプターとするサイトカインである。

【 0 1 0 0 】

本発明において使用するVEGF、造血因子、Flt3リガンドなどのサイトカインは、天然のものを用いてもよいし、遺伝子工学により調製したりコンビナントサイトカインを用いてもよい。その際、これらのサイトカインの全長を含む必要は無く、レセプターとの結合に関する領域を含む一部分の蛋白質やペプチドでもよい。また、レセプターとの結合力を失わない程度にアミノ酸配列や立体構造に改変を加えた蛋白質やペプチドでもよい。さらには、

30

【 0 1 0 1 】

各サイトカインの濃度は、目的の細胞が得られる濃度であれば特に問わないが、VEGFの場合は、5 ng/mlから50 ng/mlでもよく、好ましくは、10 ng/mlから20 ng/mlであり、SCFの場合は、50 ng/mlから200 ng/mlであり、好ましくは、100 ng/mlであり、IL-3の場合は、5 ng/mlから50 ng/mlであり、好ましくは、10 ng/mlであり、IL-6の場合は、50 ng/mlから200 ng/mlであり、好ましくは、100 ng/mlであり、Flt3リガンドの場合は、5 ng/mlから50 ng/mlであり、好ましくは、10 ng/mlであり、TPOの場合は、5 ng/mlから50 ng/mlであり、好ましくは、10 ng/mlである。

40

【 0 1 0 2 】

肥満細胞は、少なくともIgE レセプター、c-kitおよびtryptaseを発現する細胞であり、好ましくは、chymaseも同時に発現している細胞であり、より好ましくは、Cathepsin-G、CD203c、Carboxypeptidase-AおよびCD88を発現する細胞である。

【 0 1 0 3 】

各工程の期間は、「(a)ヒト多能性幹細胞を、VEGFの存在下で哺乳動物胎児のAGM領域から得られた細胞と共培養する」工程は、10日以上であり、好ましくは、10日以上18日以下である。「(1') VEGFおよび造血因子の存在下での浮遊培養により細胞を増殖する」工程は、5日以上であり、好ましくは、5日以上7日以下である。「(b)得られた細胞を造血因子およびFlt3リガンドの存在下で無血清培地にて培養する」工程は、28日以上であり、好

50

ましくは、28日以上140日以下である。

【0104】

IV.スクリーニング方法

有効成分のスクリーニング方法

本発明は、前述のように得られた肥満細胞と試験物質とを接触させ、肥満細胞に対する (a) アポトーシスの誘導、(b) 脱顆粒の抑制、および (c) 炎症性メディエーターの産生抑制の少なくとも1つの作用を有するヒト肥満細胞の活性化を抑制する物質のスクリーニング方法を提供する。

【0105】

本発明における試験物質は、いかなる公知化合物および新規化合物であってもよく、例えば、核酸、糖質、脂質、蛋白質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、あるいは微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

10

【0106】

スクリーニングの方法においては、肥満細胞を試験物質と接触させ、肥満細胞の (a) アポトーシスの誘導、(b) 脱顆粒の抑制、(c) 炎症性メディエーターの産生抑制の程度を測定する。そしてその程度と、試験物質と接触させない肥満細胞の場合の程度とを比較して、(a) アポトーシスの誘導、(b) 脱顆粒の抑制および/または (c) 炎症性メディエーターの産生抑制の程度を、試験物質と接触させない場合と比較して著しく変化させる試験物質を、効果的な構成要素として選択する。

20

【0107】

ここで、アポトーシスの検出は、ヨウ化プロピディウム (PI) やヘキスト 33258 等の核酸染色試薬や、蛍光標識アネキシン V などの膜構造の変化を検出する方法が好ましく用いられる。中でもヨウ化プロピディウム (PI)、FITC 標識アネキシン V が特に好ましい。

【0108】

また、脱顆粒の検出方法は、IgE 抗体を該肥満細胞と結合させ、抗原と接触させて刺激することによって遊離される炎症性メディエーターを検出する方法が例示される。炎症性メディエーターとしては、ヒスタミン、ベータヘキソサミニダナーゼやトリプターゼなどの細胞顆粒内蛋白質、IL-6、TNF やロイコトリエン B4 などの刺激応答により合成される生理活性物質を挙げることができるが、それらに限定されるものではない。この他にも、IgE 抗体を介さない経路で、該肥満細胞を刺激することもまた可能である。すなわち、抗原以外の種々の生理的刺激によっても、肥満細胞は炎症性メディエーターを放出する。このような刺激して反応を引き起こす物質の例としては、DNP-HSA (dinitrophenol-human serum albumin) に代表される抗原物質、抗 IgE 抗体、抗 IgE 受容体抗体、C3a, C5a などの補体成分、サブスタンス P や CGRP などの神経ペプチド、イオノマイシン、ATP などを挙げることができる。また、炎症性メディエーターを測定する代わりに、表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置を用いて肥満細胞の、IgE 抗体を感作した後の抗原刺激または IgE 抗体を介さない刺激により生み出す大きな共鳴角の変化を検出することによっても、脱顆粒の検出が検出できる。

30

40

【0109】

炎症性メディエーターの産生抑制の検出方法として、肥満細胞内に存在する炎症性メディエーターの量を検出することで行われうる。

【0110】

このようにして、スクリーニングされた試験物質は、気管支喘息、アレルギー性疾患およびアトピー性皮膚炎の治療薬として使用しうる。

【0111】

オーダーメイド治療薬をスクリーニングする方法

本発明において、「オーダーメイド治療薬」とは、ある患者個人の個性にかなった最適

50

な治療薬を意味する。

本発明では、気管支喘息、アレルギー性疾患およびアトピー性皮膚炎を罹患する対象の体細胞から製造された人工多能性幹細胞を分化誘導させることにより得られた前記肥満細胞と既存の治療薬を接触させ、該肥満細胞に対する (a) アポトーシスの誘導、 (b) 脱顆粒の抑制および (c) 炎症性メディエーターの産生抑制の少なくとも1つの作用を有する治療薬のスクリーニング方法を提供する。このように、スクリーニングされた治療薬は、人工多能性幹細胞を樹立された対象にとって最適な治療薬と成りうる。

【 0 1 1 2 】

本発明における既存の治療薬として、ケミカルメディエーター遊離抑制剤 (例えば、クロモグリク酸ナトリウム (インタール)、トラニラスト (リザベン)、アンレキサノクス (ソルファ)、ペミロラストカリウム (アレギサル) 等)、ケミカルメディエーター受容体拮抗薬 (例えば、(1)d-マレイン酸クロルフェニラミン (ポララミン)、フマル酸クレマスチン (タベジール)、フマル酸ケトチフェン (ザジテン)、塩酸アゼラスチン (アゼプチン)、オキサトミド (セルテクト)、メキタジン (ゼスラン、ニボラジン)、フマル酸エメダスチン (ダレン、レミカット)、塩酸セチリジン (ジルテック)、塩酸レボカバステン (リボスチン)、塩酸フェキソフェナジン (アレグラ)、塩酸オロパタジン (アレロック) 等の抗ヒスタミン薬、(2)ラマトロバン (バイナス) 等のトロンボキサンA2拮抗薬、(3)プラナルカスト水和物 (オノン) 等のロイコトリエン拮抗薬等)、Th2サイトカイン抑制薬 (例えば、トシル酸スプラタスト (アイピーディー) 等)、ステロイド薬 (例えば、(1)プロピオン酸ベクロメタゾン (ベコナーゼ、アルデシン、リノコート)、フルニソリド (シナクリン)、プロピオン酸フルチカゾン (フルナーゼ) 等の局所ステロイド薬、(2)セレスタミン (マレイン酸クロルフェニラミン配合剤) 等の経口ステロイド薬等)、自律神経作用薬 (例えば、(1)硝酸ナファゾリン (プリピナ)、硝酸テトラヒドロゾリン (ナーベル)、塩酸オキシメタゾリン (ナシピン)、塩酸トラマゾリン (トーク) 等の刺激薬、(2)臭化イプラトロピウム (アトロベント)、臭化フルトロピウム (フルプロン) 等の抗コリン薬等)、生物製剤 (例えば、ノイロトロピン、アストレメジン、MSアンチゲン等) 等が挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 1 1 3 】

Fc RIベータ鎖遺伝子の181番目のアミノ酸イソロイシンがロイシンの変異とアトピー素因とが強く相関することが示唆されている。このように、アトピー素因へ遺伝子変異が関連しうる。そこで、本発明は、少なくともFc RIベータ鎖に変異を有する患者から得られたiPS細胞を用いて、肥満細胞へ分化させ上記の治療薬のスクリーニングを行うことで、遺伝性の疾患に特異的に効果を有する治療薬のスクリーニング方法を提供する。

【 0 1 1 4 】

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。

【実施例】

【 0 1 1 5 】

実施例 1

細胞

AGM-S3細胞の樹立および培養は、以下に記載の従来の方法で行った (特開2001-37471)。簡潔には、AGM-S3細胞は、マウス胎児からAGM領域を切除し、造血細胞を除去させるため線を照射した後、限界希釈法によりクローニングして樹立した。このAGM-S3は、ヒト造血幹細胞の増殖支持活性を有することが確認されている。AGM-S3細胞の写真を図1のAに示す。一方、iPS細胞(253G1)は山中博士から提供を受け、下記の従来法で培養した(Nakagawa M, et al., Nat Biotechnol 26 (1), 101, 2008)。すなわち、253G1細胞は、ヒト真皮由来の線維芽細胞より、Oct3/4、Sox2およびKlf4を導入することにより樹立された。なお、253G1細胞はRIKEN CELL BANKから入手することも可能である。253G1細胞の写真を図1Bに示す。

【 0 1 1 6 】

免疫蛍光染色

iPS細胞由来の肥満細胞を収集し、ガラススライド上に遠心分離した。そしてサイトスピンの標本は、May-Grunwald-Geimsa, acidic toluidine blue, およびalcian blueで染色した。肥満細胞特異的tryptase測定およびchymase測定のため、既に報告されている通り、免疫蛍光染色法を用いた(Ma F, et al., Proc Natl Acad Sci US 105, 13087, 2008)。簡潔には、マウスおよびヤギ抗ヒトtryptaseモノクローナル抗体(mAbs) (それぞれDakoCytomationおよびSanta Cruz)、マウス抗ヒトchymaseモノクローナル抗体(Chemicon, Temecula, CA)、およびマウスまたはウサギ抗ヒトc-Kit抗体(それぞれNichirei およびIBL)を用いた。

【0117】

10

肥満細胞への分化誘導法ステップ1

あらかじめ培養し放射線処理を行ったAGM-S3細胞の上に、20から30個の253G1細胞のコロニーを添加し、20ng/mlのヒトVEGF (WAKO) および15%FBSを含有するDMEMを培地として用いて14日間培養し、造血前駆細胞を樹立した。この時、培地は3日に1度交換した。樹立した細胞の写真を図2に示す。ここで、10ng/mlのヒトVEGFおよび10%FBSを含有するIMEM (Improved Minimal Essential Medium) を培地として用いても、同様の細胞が得られた。従って、いずれの培地を用いても良いことが確認された。

【0118】

20

ステップ2

ステップ1で樹立した細胞をプレートから剥離させ、100ng/mlのヒトSCF(WAKO)、10ng/mlのヒトIL-3、100ng/mlのヒトIL-6、10ng/mlのヒトFlt3-ligand (FL) (R&D Systems)、10ng/mlのヒトthrombopoietin (TPO) および10%のFBSを含有するIMDM (10ng/mlのヒトVEGFを含むまたは含まない) を培地として用いて5日間から7日間浮遊培養し、細胞を増殖させた。

【0119】

ステップ3

100ng/mlのSCF、100ng/mlのヒトIL-6、10ng/mlのヒトFLおよびStemSpan(R) SFEMを10%含有した無血清IMDM培地へ交換し、4週以上培養し、肥満細胞を樹立した。この時、培地は1週に2度交換した。ステップ1開始から52日目における樹立した細胞の写真を図3に示す。肥満細胞の収率は、95%以上であった。ここで、10ng/mlのヒトIL-3、10ng/mlのヒトTPOをさらに含む培地を用いたところ、安定して高い収率で同質の肥満細胞が得られた。

【0120】

30

肥満細胞の評価

上記のように樹立した肥満細胞を、May-Giemsa、Toluidine BlueまたはAlcian Blue溶液で染色した。染色像を、それぞれ図4のA、BおよびCに示す。また、c-kit、tryptase、chymaseに対する抗体を用いて免疫染色を行った。これらの染色像および組み合わせによる共染色像を図5に示す。さらに、IgE-R (CRA-1)、Cathepsin-G、CD203c、Carboxypeptidase-A、CD88に対する抗体を用いて免疫染色を行った。染色像を、それぞれ図6のA、B、C、DおよびEに示す。上記のマーカー遺伝子は全て陽性であった。

【0121】

40

実施例2細胞

32~36代継代のヒト胚性幹細胞(ESCs)であるH1細胞は、すでに報告されている通り(JA Thomson, et al., Science 282, 1145, 1998 or F Ma, et al., Proc Natl Acad Sci US 105, 13087, 2008)、DMEM/F12, 20%ノックアウト血清代替物(Invitrogen), 1mM グルタミン, 0.1mM メルカプトエタノール, 1% 非必須アミノ酸 (Invitrogen), および4-5 ng/ml 塩基性線維芽細胞増殖因子(b-FGF) (WAKO, Osaka)から成るKO培地にて、マウス胎児繊維芽細胞(MEF)上で培養した。H1細胞は毎週、機械的剥離によって継代した。他のhESC (ヒト胚性幹細胞)株であるKhES-1およびKhES-3は、中辻博士より提供を受けた(H Sue

50

mori, et al., Biochem Biophys Res Commun. 345, 926, 2006)。それぞれ18～22代および20～22代継代した細胞であり、記載されている通りにこれらを維持し、毎週継代をした。hESCsの使用は、日本の文部科学省の委員会によって承認された。AGM-S3細胞については上述の通りであった。

【0122】

形態学的観察および免疫蛍光染色

某日、MC培養内の細胞を収集し、ガラススライドへ遠心分離した。そして得られたサイトスピンの標本は、May-Grunwald-Geimsa, acidic toluidine blue, およびalcian blueで染色した。MC特異的tryptase測定およびchymase測定のために既に報告されている通り(Ma F, et al., Proc Natl Acad Sci US 105, 13087, 2008)、免疫蛍光染色法を用いた。これらの測定には、マウスおよびヤギ抗ヒトtryptaseモノクローナル抗体(mAbs) (それぞれDakoCytomationおよびSanta Cruz)、マウス抗ヒトchymaseモノクローナル抗体(Chemicon, Temecula, CA)、およびマウスまたはウサギ抗ヒトc-Kit (それぞれNichireiおよびIBL)を用いた。MCはまた、透過型電子顕微鏡にて観察した。

10

【0123】

フローサイトメトリー

非特異的結合を阻止するために、細胞は正常ウサギ血清でブレインキュベートし、fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE)、またはallophycocyanin (APC)を結合した様々な抗体で染色した。染色した細胞はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、FACScalibur cytometry system (BD Biosciences, San Jose, CA)を用いて解析した。Propidium iodide (PI)で染色された死細胞は除外した。データはFlowjo softwareを用いて解析した。この解析では、CD45 (DakoCytomation), c-Kit (Nichirei), CD31 (BD Biosciences), Fc RI (CRA-1, eBioscience), CD203c (Beckman Coulter), CD88 (Serotec)、およびHLA-DR (BD Biosciences)に対するモノクローナル抗体を使用した。

20

【0124】

肥満細胞の活性化

刺激のために、96ウェルプレート内の25 μ lの細胞懸濁液(4×10^5 MCs/ml)にsubstance P (Sigma), compound 48/80、または対照培地を添加し、さらに37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートした。反応は200 μ lの氷冷した緩衝液を添加することで停止させた。細胞は4 $^{\circ}$ C下、300 \times gで7分間遠心して分離し、その上清を回収した。細胞ペレットは、0.5% Triton-Xおよび0.1%ウシ血清アルブミン(BSA)を含有する200 μ lの緩衝液で再懸濁し、液体窒素で急速冷凍して、4回融解をさせた。4 $^{\circ}$ C下、12,000 \times gで15分間遠心した後、水溶性抽出物を回収した。ヒスタミン量はELISAヒスタミンキット (Beckman Coulter)で測定した。

30

【0125】

iPS細胞から肥満細胞への分化誘導方法

成熟肥満細胞(MCs)を産生するための3ステップの培養方法の図解を図7に示している。

【0126】

ステップ1

はじめに、 $1.5 \sim 1.6 \times 10^4$ 個の未分化hESCs (およそ30コロニー、1コロニーあたり500～2000細胞)を成長させるのに適するような6ウェルに、放射線照射した 1×10^5 個のAGM-S3細胞をプレートした。緩やかな適応を確保するために、共培養のはじめの3日間はhESCsを維持するための培地を添加した。未分化hESCsコロニーが大きくなり始めたとき(図8A)、10%ウシ胎児血清(FBS)を含み、5.5 μ g/mL ヒトトランスフェリン(Sigma), 2 mM L-グルタミン, 50 μ g/mL アスコルビン酸、および20 ng/ml 血管内皮増殖因子(VEGF) (WAKO, Osaka)の混合物が追加されたイスコフ改変ダルベッコ培地(IMDM)に培養液を変えた。その培養液は2日ごとに交換した。連続培養の間、hESCsコロニーは、内皮型の凝集に見えるような周辺を有する中胚葉型の凝集に分化し始めた。共培養8～10日目では、これらの周辺部位の周りで、その大部分が血管芽細胞特性を有するCD34⁺前駆細胞

40

50

胞であるいくつかの敷石様細胞の集合および増殖を観察することができた(図8Bおよび8C)。13~15日目においては、その共培養を0.25% trypsin/EDTA溶液(Wako)で処理し、さらに次のステップ2で使用するために、造血前駆細胞を含む全ての細胞を回収した。共培養14日目の単一6ウェルから、合計 $1.48 \pm 0.48 \times 10^6$ 個の細胞(H1細胞株(n=9))では、 $14.0 \pm 3.1\%$ のCD34⁺細胞(n=3)が生成された。クローン培養においてこれら14日目の共培養細胞からは、 2.5×10^4 個の細胞あたり 121.3 ± 5.1 個の造血コロニーが産生された。しかし2週間後には培養条件の悪化のため、その共培養においてこれらの造血細胞はさらなる増殖をすることができず、また成熟することはできなかった。

【0127】

ステップ2

hESC由来の造血前駆細胞から成熟肥満細胞を作製するために、このステップでは、ステップ1で得られた全共培養細胞を非接着性35mm培養皿(Sumilon, プレート表面が細胞接着に対し抵抗性がある)において培養し、10%ウシ胎児血清(FBS)、および造血前駆細胞の成長に適したサイトカイン(SCF, IL-3, IL-6, FL, TPO)の混合物を含むIMDMで促進した。その培養7日後、増殖した細胞の大部分は骨髄性前駆細胞の特性を有する造血細胞であった。7日目における、ある6ウェルの全共培養細胞からは $1.75 \pm 0.6 \times 10^6$ 個の細胞に増殖し(n=5)、これははじめの未分化hESC数の29~117倍の数であった。CD34⁺細胞の濃度は9.1倍であった。このステップにおいて、IL-3の添加は細胞の増殖を非常に支持する一方、IL-3非添加で他の添加(PDFGまたはVEGF)の場合は、ほとんど細胞の増殖をもたらさなかったが(図9)、これは胚性造血におけるIL-3の重要な役割を示している。しかし、このIL-3で指向された培養においてその1週間後には、大部分の細胞は骨髄性前駆細胞の表現型を共有し、継続的に顆粒球およびマクロファージへと分化したものの、c-kit⁺肥満細胞はほとんどなかった。従ってステップ3ではIL-3は除去した。

【0128】

ステップ3

hESC由来の前駆細胞を、IMDMおよび、SCF, FL, IL-6, およびTPOを添加した10% SFEM (Stem Cells Tech.)における無血清MC培養に切り替えた。培養液の半分量を1週間に2回新しい培養液に交換した。このステップでは全体の細胞増殖は次第に減少したが、c-kit⁺/tryptase⁺/chymase⁺ 肥満細胞の割合は増加した。これら成熟肥満細胞の純度は8~10週目でおよそ80%に達し(図10A および 10G~10L)、また15~20週目ではほぼ100%に達した。

【0129】

肥満細胞の評価

形態学的に成熟hESC-MCsは典型的に巨大なサイズを示し(直径平均 $18.7 \pm 5.8 \mu\text{m}$, n=12)、粗い濃染顆粒と1~3分葉した核を保持し、May-Grunwald-Geimsa染色により好塩基球の染色特性を共有していた(図10B)。toluidine blue, およびalcian blue染色に対してもまたメタクロマチック染色パターンを示し(それぞれ図10Cおよび10D)、ヒトCarboxypeptidase-Aおよびcathepsin-Gに対する抗体では陽性染色された(それぞれ図10Eおよび10F)。透過型電子顕微鏡観察では、hESC-MCsは様々な密度の多数の顆粒および十分に発達したミトコンドリアを有していることが示された。ヒト肥満細胞に典型的な渦巻き型の顆粒球も見つめられた(図11)。フローサイトメリーの解析では、これらのhESC-MCsはc-Kit, CD45, CD13, および CD81を高度に発現し、CD31を中程度に発現、およびIgEレセプター(Fc RI)に高親和性であることが明らかにされたが、ヒト成熟肥満細胞と同一であるCD34およびHLA-DRは発現していないことが明らかにされた(図12)。興味深いことに、これらhESC由来の肥満細胞はまた、両者ともヒト皮膚派生結合組織型肥満細胞(CT-MCs)に特異的なマーカーとして認識されているCD88およびCD203cを共発現していた。これらの結果により、この実施例で開発したhESC-MCsはヒトCT-MCsの表現型を保有していることが示唆された。さらにhESC-MCsは、ヒスタミンを放出させるSubstance Pおよびcompound 48/80に反応して用量依存的に脱顆粒を示した(図13)。しかもhESC-

10

20

30

40

50

MCsはこの培養においてMCの特性を失うことなく、増殖率は低いものの持続的であり、ここまで19ヶ月超えるという長い寿命を示した(図14)。これらの結果は、本培養系においてhESCから産生された肥満細胞が、特有のプロテアーゼを発現しているという事実だけでなく、特定の薬理的な刺激によって脱顆粒できるという理由にもよって、機能的にCT-MCsへ成熟するという証拠をもたらした。

【0130】

実施例3

細胞

ヒトiPSC株である253G1 (Oct4, Sox2, およびKlf4の3因子が導入されている) (Nakagawa M, et al., Nat Biotechnol 26 (1), 101, 2008)、および201B6 (Oct4, Sox2, Klf4, およびc-Mycの4因子が導入されている) (Takahashi K, et al., Cell 131, 861, 2007) は山中博士より提供を受けた。これらhiPSC株は報告されている通りに維持し、継代をした。

10

【0131】

様々な多能性幹細胞に由来する肥満細胞の比較

成熟肥満細胞は上述と同じ方法により、様々なhESC株(KhES-1およびKhES-3)およびhiPSC株(253G1, 253G4, および201B6)から作製した。すべてのhESC株およびhiPSC株由来の肥満細胞は細胞株間において定量的な偏差はあったものの、形態学的観察、toluidine blue およびalcian blue染色に対するメタクロマチック染色パターン、c-Kit, tryptase, chymase, Fc RI, Carboxypeptidase-A, cathepsin-G, CD88およびCD203cの発現、およびフローサイトメリーのプロファイルにおいて、H1細胞株由来の肥満細胞と同じ表現型を示した(図15)。

20

【0132】

このように、3ステップ培養法を用いた本発明の培養系により、hESCsおよびiPSCsの両者からほぼ100%の純度で、多数の機能的な成熟肥満細胞が効率的に産生され、これらによって、肥満細胞が関与する疾患、特に様々なアレルギー性疾患を治療する薬剤の開発に役立つ新規な方法が提供されるべきである。さらに重要なことには、テーラーメイドhiPSC-MCsの産生が、MCの成長と遺伝的に関連をもったそれらの異常を制御する機構を明らかにする理想的なモデルとなり、最終的には個々の患者に対して最も適した治療を提供できるようになる。

30

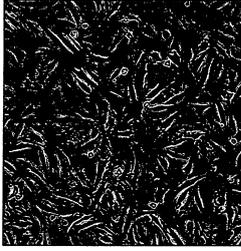
【産業上の利用可能性】

【0133】

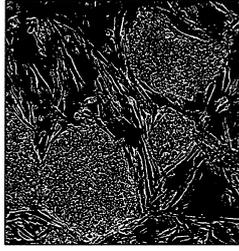
本発明により、ヒト多能性幹細胞からヒト肥満細胞を効率的に産生できる。従って本発明は、ヒト肥満細胞を用いたアレルギー性疾患治療薬のスクリーニング、および個々の患者から樹立したヒト肥満細胞を用いて個人に最も適した治療薬を選択する、いわゆるテーラーメイド医療の治療薬の選択に非常に有用である。

【 ① 】

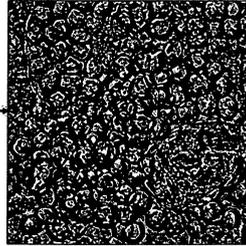
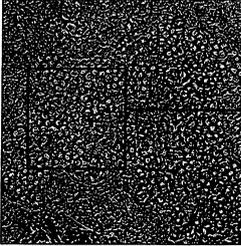
A: AGM-S3



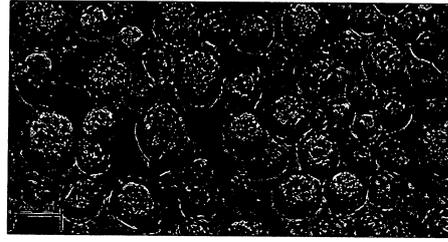
B: 253G1



【 ② 】

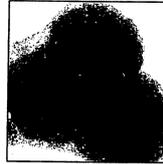


【 ③ 】

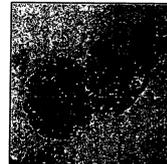


【 ④ 】

A: May-Geimsa



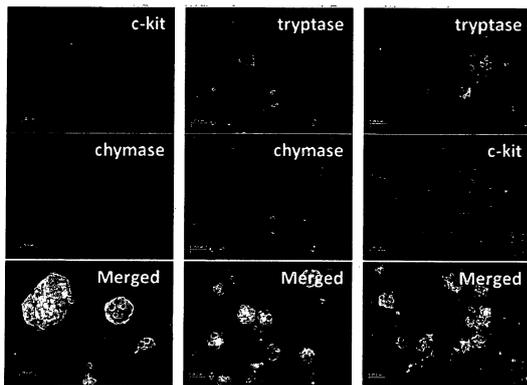
B: Tuluidine Blue



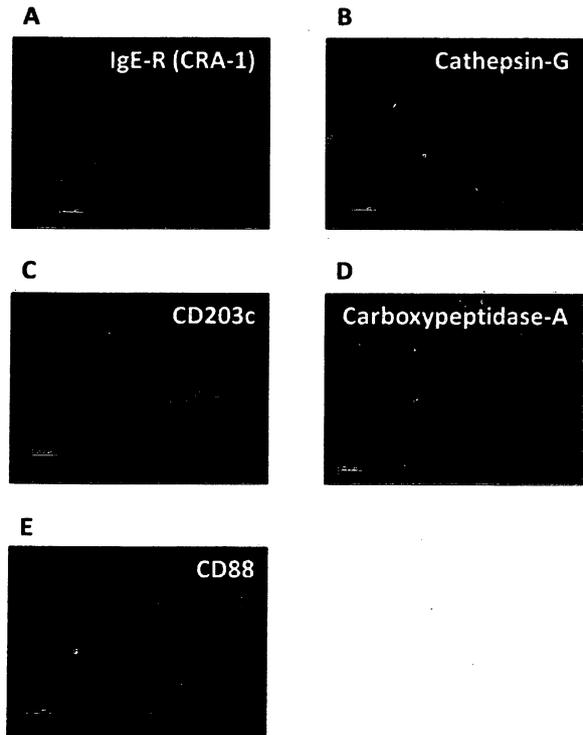
C: Alcian Blue



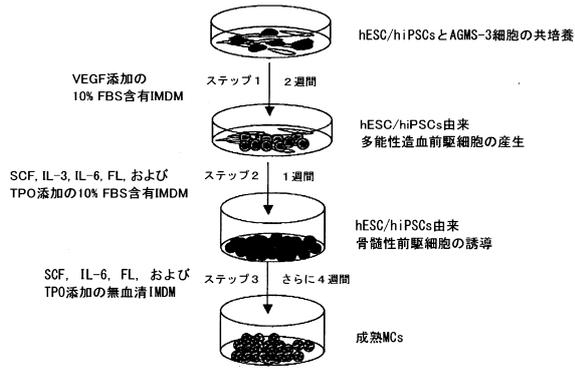
【 ⑤ 】



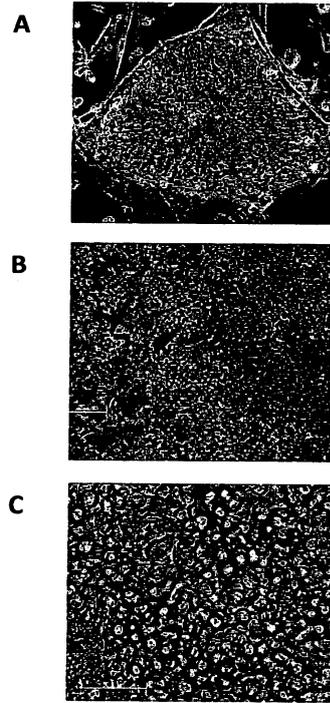
【 ⑥ 】



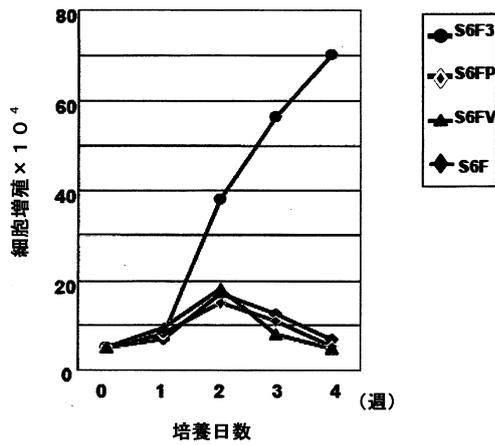
【 図 7 】



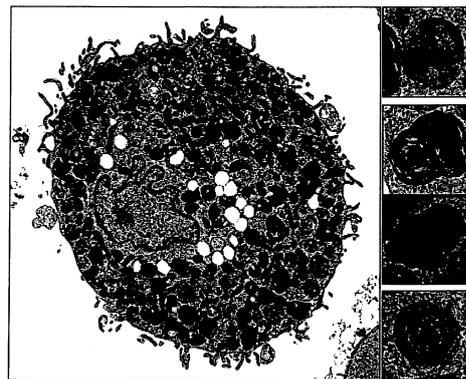
【 図 8 】



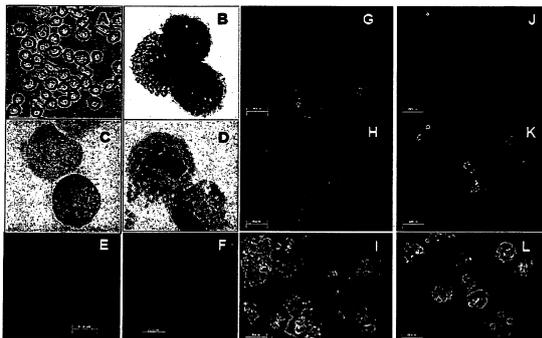
【 図 9 】



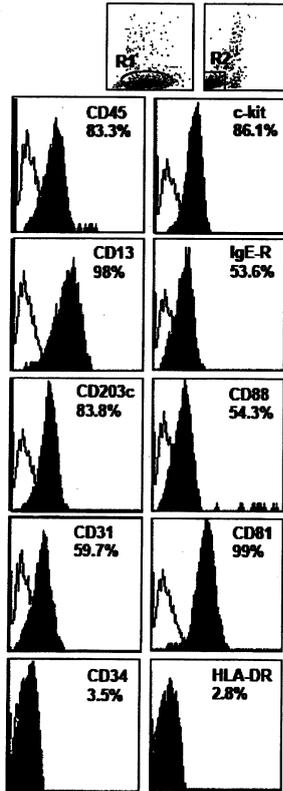
【 図 1 1 】



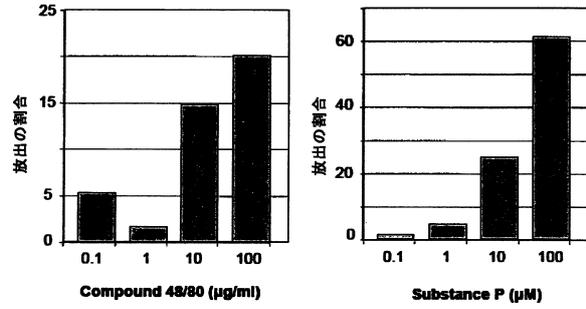
【 図 1 0 】



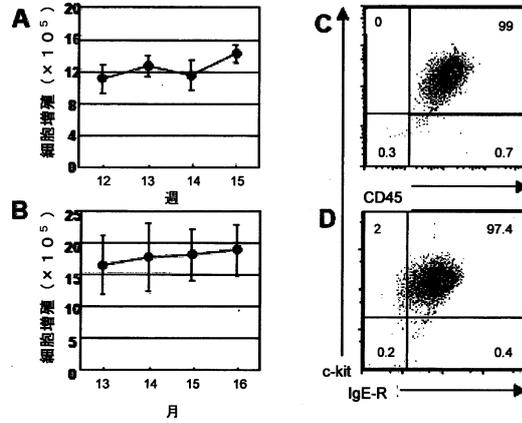
【 1 2 】



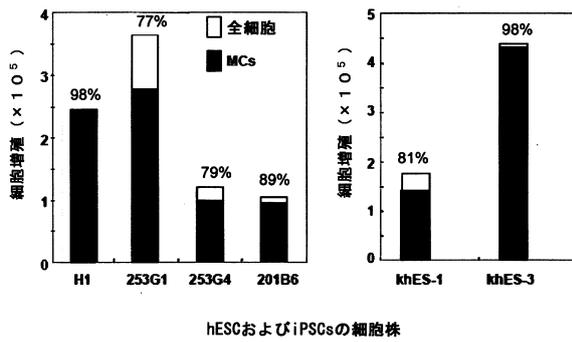
【 1 3 】



【 1 4 】



【 1 5 】



フロントページの続き

(72)発明者 辻 浩一郎

日本国東京都港区白金台4-6-1 東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター内

(72)発明者 馬 峰

日本国東京都港区白金台4-6-1 東京大学医科学研究所 幹細胞治療研究センター内

審査官 鳥居 敬司

- (56)参考文献 特開2001-037471(JP,A)
特表2011-519568(JP,A)
特表2012-519005(JP,A)
Int. J. Hematol., 2007, Vol.85, No.5, p.371-379
炎症・再生, 2007, Vol.27, No.4, p.398
Stem Cells, 2008, Vol.26, No.3, p.706-714
Experimental Hematology, 2006, Vol.34, p.320-329
Development, 2004, Vol.131, No.8, p.1869-1879
Blood, 1999, Vol.93, No.10, p.3338-3346
Clin. Sci., 1997, Vol.93, p.279-286
メディカルバイオ, 2008, Vol.5, No.6, p.24-27

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00-5/28
C12Q 1/00-1/70
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
WPIDS/WPIX(STN)