

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6460482号
(P6460482)

(45) 発行日 平成31年1月30日(2019.1.30)

(24) 登録日 平成31年1月11日(2019.1.11)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10 Z N A
C 1 2 N 5/071 (2010.01)	C 1 2 N 5/071
C 1 2 N 5/075 (2010.01)	C 1 2 N 5/075
C 1 2 N 5/076 (2010.01)	C 1 2 N 5/076
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/09 Z

請求項の数 18 (全 38 頁)

(21) 出願番号	特願2015-543183 (P2015-543183)	(73) 特許権者	504132272
(86) (22) 出願日	平成26年2月28日 (2014. 2. 28)		国立大学法人京都大学
(65) 公表番号	特表2016-508365 (P2016-508365A)		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(43) 公表日	平成28年3月22日 (2016. 3. 22)	(74) 代理人	100080791
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/055888		弁理士 高島 一
(87) 国際公開番号	W02014/133194	(74) 代理人	100125070
(87) 国際公開日	平成26年9月4日 (2014. 9. 4)		弁理士 土井 京子
審査請求日	平成29年2月13日 (2017. 2. 13)	(74) 代理人	100136629
(31) 優先権主張番号	61/771, 619		弁理士 鎌田 光宜
(32) 優先日	平成25年3月1日 (2013. 3. 1)	(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	100117743
			弁理士 村田 美由紀
		(74) 代理人	100163658
			弁理士 小池 順造

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多能性幹細胞から生殖細胞への分化誘導方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

単離したエピブラスト又はエピブラスト様細胞(EpiLC)から、始原生殖細胞様細胞(PGCLC)を製造する方法であって、該エピブラスト又はEpiLCに

- (i) Blimp1、Prdm14及びTfap2c;
- (ii) Blimp1及びPrdm14;
- (iii) Blimp1及びTfap2c;
- (iv) Prdm14及びTfap2c;並びに
- (v) Prdm14;

から成る群より選択される外来性転写因子を発現させ、それによって、該エピブラスト又はEpiLCをBMP4の非存在下でPGC状態へ誘導することを含む方法。

10

【請求項2】

外来性転写因子又はそれをコードする核酸が、エピブラスト又はEpiLCに導入される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

外来性転写因子をコードする核酸が、エピブラスト又はEpiLCの誘導に先立ち、条件付き発現を可能とする形態で、エピブラスト又はEpiLCに導入されている、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

エピブラスト又はEpiLCが、外来性転写因子をコードする核酸を1~5日間発現する条件

20

下で培養される、請求項3に記載の方法。

【請求項5】

EpiLCが、

(i) アクチピンA (ActA)の存在下、あるいは

(ii) ActAと、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)及び/又はKnockout (商標) Serum Replacement (KSR)の存在下で、

多能性幹細胞(PSC)を培養することにより得られる、請求項1~4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】

PSCが、胚性幹細胞(ESC)又は人工多能性幹細胞(iPSC)である、請求項5に記載の方法。 10

【請求項7】

外来性転写因子をコードする核酸が、PGCLCからの消失を可能とする形態である、請求項1~6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

核酸が、プラスミド、エピソードベクター、トランスポゾン、アデノウイルスベクター及びセンダイウイルスベクターから成る群より選択されるベクターで運ばれる、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

EpiLCが、マウス又はヒトに由来する、請求項1~8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】 20

(i) Blimp1、Prdm14及びTfap2c;

(ii) Blimp1及びPrdm14;

(iii) Blimp1及びTfap2c;

(iv) Prdm14及びTfap2c;

(v) Prdm14;

から成る群より選択される転写因子、又は該転写因子をコードする核酸を含む、単離したエピプラスト又はEpiLCをBMP4の非存在下でPGCLCへ誘導するための試薬。

【請求項11】

転写因子が前記(i)、(iii)、(iv)又は(v)のいずれかである、請求項10に記載の試薬。

【請求項12】 30

転写因子をコードする核酸が、条件付き発現を可能とする形態である、請求項10又は11に記載の試薬。

【請求項13】

(i) Blimp1、Prdm14及びTfap2c;

(ii) Blimp1及びTfap2c;

(iii) Prdm14及びTfap2c;並びに

(iv) Prdm14;

から成る群より選択される外来性転写因子をコードする核酸を、条件付き発現を可能とする形態で含む、単離したエピプラスト、EpiLC又はPSC。

【請求項14】 40

(a) 請求項13に記載のエピプラスト又はEpiLC、及び

(b) 該エピプラスト又はEpiLCに含まれる外来性転写因子の条件付き発現を誘導する試薬を含む、

単離したエピプラスト又はEpiLCをPGCLCへ誘導するためのキット。

【請求項15】

(a) 請求項13に記載のPSC;

(b) (i) ActA、あるいは

(ii) bFGF及び/又はKSR;

を含む、PSCをEpiLCへ誘導するための試薬;及び

(c) 該EpiLCに含まれる外来性転写因子の条件付き発現を誘導する試薬;

50

を含む、単離したPSCをPGCLCへ誘導するためのキット。

【請求項16】

以下の工程I)及びII)を含む、PSCからPGCLCを製造する方法：

I) (i)ActAの存在下、あるいは

(ii)ActAと、bFGF及び/又はKSRの存在下で、

PSCを培養することによりEpiLCを製造する工程；

II) 工程I)で得られたEpiLCを、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法によりPGCLCへ誘導する工程。

【請求項17】

III) 工程II)で得られた細胞からBlimp1陽性細胞を選択する工程

10

をさらに含む、請求項16に記載の方法。

【請求項18】

請求項16又は17に記載の方法により得られたPGCLCを、精子若しくはその前駆細胞、又は卵子若しくはその前駆細胞に分化誘導することを含む、精子若しくはその前駆細胞、又は卵子若しくはその前駆細胞を製造する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の技術分野

本発明は、転写因子を用いエピブラスト様細胞から始原生殖細胞様細胞を誘導する方法、そのための該転写因子を含有する試薬、該方法により得られる始原生殖細胞様細胞を含有する細胞集団、及び該細胞集団から生殖細胞系列に属する細胞を誘導する方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

発明の背景

生殖細胞系列は、合体して全能性の接合子を形成する雄性及び雌性配偶子の形成により、生命の継続を確かなものとする。生殖細胞の決定及び発生は、生殖及び遺伝において、極めて重要である。マウスにおいて、精子及び卵母細胞のいずれもの前駆細胞である始原生殖細胞(PGC)は、最も重要なものとして骨形成タンパク質4(BMP4)を含む、胚体外組織からのサイトカインに反応して、エピブラストに生じる(非特許文献1及び2)。私たちは、近年、アクチピンA(ActA)及び塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を含むサイトカインを用いて、胚性幹細胞(ESC)/誘導多能性幹細胞(iPSC)をエピブラスト様細胞(EpiLC)へ誘導し、その後、BMP4を含むサイトカインを用いて、始原生殖細胞様細胞(PGCLC)へと誘導する培養系を確立した(特許文献1、非特許文献3及び4)。雄性及び雌性PGCLCは、精子形成及び卵子形成への最大限の潜在力を有し、従って、生殖細胞決定経路及びそれに続くin vitroでの発生の機構を明らかにしかつ制御する可能性を有するかもしれない(特許文献1、非特許文献3及び4)。

30

【0003】

サイトカインに換えて、外来性転写因子(TF)の強制発現が、PGC決定のキーとなる内因性の転写回路を活性化するかもしれない。しかしながら、私たちの以前の研究により、いくつかのキーとなるTFが同定された一方で、PGC決定には、多数の遺伝子の複雑な制御が関わるということが明らかになった(非特許文献5)。結果的に、生殖細胞運命の誘導に十分なTF、及びキーとなるTFの正確な作用機構は、依然として不明である。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】国際公開第2012/020687号

【非特許文献】

【0005】

50

【非特許文献1】Lawson, K. A. et al. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev*13, 424-436. (1999).

【非特許文献2】Ohinata, Y. et al. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell* 137, 571-584 (2009).

【非特許文献3】Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S. & Saitou, M. Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*146, 519-532 (2011).

【非特許文献4】Hayashi, K. et al. Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science* 338, 971-975 (2012).

【非特許文献5】Kurimoto, K. et al. Complex genome-wide transcription dynamics orchestrated by Blimp1 for the specification of the germ cell lineage in mice. *Genes Dev* 22, 1617-1635 (2008).

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従って、本発明の目的は、サイトカインを用いず、外来性TFの強制発現を用いて、高効率及び高い再現性で、エピブラストの培養均等物(すなわち、EpiLC)のエピブラストから、正常な生殖細胞及び健康な子孫の作製に適したPGCLCを誘導する方法を提供することである。もう一つの本発明の目的は、PGC決定のためのキーとなる内因性の転写回路をエピブラスト/EpiLCに活性化させるTF又はそれらをコードする核酸を含有する、エピブラスト又はEpiLCからPGCLCを誘導するための試薬を提供することである。

20

【課題を解決するための手段】

【0007】

この目的を達成するために、私たちが以前に報告したin vitroでの哺乳動物の生殖細胞決定経路を再現する系(特許文献1、非特許文献3及び4、上記を参照)に基づいて、その強制発現によりEpiLCにPGC運命を授けるのに十分であるかもしれないTFを探索することを試みた。私たちは、3つのTF、Blimp1(Prdm1としても知られる)、Prdm14及びTfap2c(AP2としても知られる)がBMP4により刺激されたエピブラスト/EpiLCで発現するため、これらの因子に注目することを決定した(例えば、図2bを参照)。まず、私たちは、Blimp1及びstella(Dppa3/Pgc7としても知られる)制御要素の制御下で、それぞれmVenus及びECFPを発現(BVSC)(*Reproduction* 136, 503-514 (2008))し、構成的に活性なRosa26遺伝子座の制御下でリバーステトラサイクリン調節性トランス活性化因子(rtTA)を発現(*Cell* 121, 465-477 (2005))するESC(BVSCR26rtTA ESC)を得た(図1a)。発生期間中、stellaは、確立したPGCにおいて、発現を開始する一方で、Blimp1の発現は、PGC決定の開始を意味し(*Nature* 436, 207-213 (2005); *Nature* 418, 293-300 (2002); *Mech Dev* 113, 91-94. (2002))、BVSCの発現は、in vivo及びin vitroのいずれにおいても、PGC決定及び発生の信頼できる指標である(*Cell* 146, 519-532 (2011); *Science* 338, 971-975 (2012); *Reproduction* 136, 503-514 (2008))。

30

次に、私たちは、テトラサイクリン制御要素(TRE)の制御下で、Blimp1、Prdm14又はTfap2cを発現するpiggyBacトランスポゾンベースのベクターを構築し(図5d)、BVSCR26rtTA ESC(XY核型)(図5a~c)にこれらのベクターを組込んで(infected)、3つ全てのTF(BVSCR26rtTA BP14A細胞)、3つのTFのうち2つ(BVSCR26rtTA BP14、BA及びP14A細胞)又は3つのTFのうち1つ(BVSCR26rtTA B、P14及びA細胞)の導入遺伝子を有するBVSCR26rtTA ESCを単離した(図1a、図5d、e)。

40

【0008】

私たちは、ActA及びbFGFを用いて、TFが組込まれたBVSCR26rtTA ESCをEpiLCへ誘導し(*Cell* 146, 519-532 (2011); *Science* 338, 971-975 (2012))、その後、PGCLC誘導に関連するサイトカイン(BMP4、LIF、SCF、BMP8b及びEGF; *Cell* 146, 519-532 (2011); *Science* 338, 971-975 (2012))の非存在下、ドキシサイクリン(Dox)を用いて培養した。結果として、3つのTF(Blimp1、Prdm14及びTfap2c; BP14A)又は3つのうち2つのTF(BP14、BA及びP1

50

4A)の同時過剰発現は、内因性転写回路を用いて、EpiLCを迅速かつ高効率にPGC状態へ向かわせる。EpiLCのPGC状態への誘導には、Blimp1(B)又はTfap2c(A)でなく、Prdm14(P14)が最低限必要である。

【0009】

TF誘導のPGC状態は、PGCにおけるキーとなるトランスクリプトーム及びエピジェネティックな再プログラム化を再構成し、しかし、*in vivo*及び*in vitro*でのBMP4を含むサイトカインによるPGC決定に付随して起こる中胚葉プログラムは回避することが、定量的PCR(Q-PCR)及びグローバル遺伝子発現解析により明らかになった。

【0010】

重要なことに、TF誘導のPGCLCは、精子形成及び繁殖可能な子孫に確実に寄与する。

10

【0011】

私たちは、これらの知見に基づきさらに研究を行い、本発明を開発した。

【0012】

従って、本発明は、以下のものを提供する。

[1] 単離したエピプラスト又はエピプラスト様細胞(EpiLC)から始原生殖細胞様細胞(PGCLC)を製造する方法であって、該エピプラスト又はEpiLCに

(i) Blimp1、Prdm14及びTfap2c;

(ii) Blimp1及びPrdm14;

(iii) Blimp1及びTfap2c;

(iv) Prdm14及びTfap2c; 並びに

20

(v) Prdm14;

から成る群より選択される外来性転写因子を発現させ、それによって、一時的な中胚葉プログラムを獲得することなく、該エピプラスト又はEpiLCをPGC状態へ誘導することを含む、方法。

[2] 外来性転写因子又はそれをコードする核酸がエピプラスト又はEpiLCに導入される、上記[1]に記載の方法。

[3] 外来性転写因子をコードする核酸が、エピプラスト又はEpiLCの誘導に先立ち、条件付き発現を可能とする形態で、エピプラスト又はEpiLCに導入されている、上記[1]に記載の方法。

[4] エピプラスト又はEpiLCが、外来性転写因子をコードする核酸を1~5日間発現する条件下で培養される、上記[3]に記載の方法。

30

[5] EpiLCが、アクチピンA(ActA)の存在下、任意でさらに塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)及び/又はKnockout(商標)Serum Replacement(KSR)の存在下で、多能性幹細胞(PSC)を培養することにより得られる、上記[1]~[4]のいずれか1つに記載の方法。

[6] PSCが、胚性幹細胞(ESC)又は誘導多能性幹細胞(iPSC)である、上記[5]に記載の方法。

[7] 外来性転写因子をコードする核酸が、PGCLCからの消失を可能とする形態である、上記[1]~[6]のいずれか1つに記載の方法。

[8] 核酸が、プラスミド、エピソードベクター、トランスポゾン、アデノウイルスベクター及びセンダイウイルスベクターから成る群より選択されるベクターで運ばれる、上記[7]に記載の方法。

40

[9] EpiLCが、マウス又はヒトに由来する、上記[1]~[8]のいずれか1つに記載の方法。

[10] (i) Blimp1、Prdm14及びTfap2c;

(ii) Blimp1及びPrdm14;

(iii) Blimp1及びTfap2c;

(iv) Prdm14及びTfap2c;

(v) Prdm14;

から成る群より選択される転写因子、又は該転写因子をコードする核酸を含む、単離したエピプラスト又はEpiLCをPGCLCへ誘導するための試薬。

[11] 転写因子をコードする核酸が、エピプラスト又はEpiLCにおいて条件付き発現を可能

50

とする形態である、上記[10]に記載の試薬。

[12] (i) Blimp1、Prdm14及びTfap2c;

(ii) Blimp1及びPrdm14;

(iii) Blimp1及びTfap2c;

(iv) Prdm14及びTfap2c;並びに

(v) Prdm14;

から成る群より選択される外来性転写因子をコードする核酸を含み、該核酸がエピプラスト又はEpiLCにおいて条件付き発現を可能とする形態である、単離したエピプラスト又はEpiLC。

[13] (i) Blimp1、Prdm14及びTfap2c;

(ii) Blimp1及びPrdm14;

(iii) Blimp1及びTfap2c;

(iv) Prdm14及びTfap2c;並びに

(v) Prdm14;

から成る群より選択される外来性転写因子をコードする核酸を含み、該核酸がPSCから分化したEpiLCにおいて条件付き発現を可能とする形態である、単離したPSC。

[14] 上記[12]に記載のエピプラスト又はEpiLC、及びエピプラスト又はEpiLCに外来性転写因子を発現させる試薬を含む、単離したエピプラスト又はEpiLCをPGCLCへ誘導するためのキット。

[15] 上記[13]に記載のPSC; ActA並びに任意選択でbFGF及び/又はKSRを含む、PSCをEpiLCへ誘導するための試薬; 及びEpiLCに外来性転写因子を発現させる試薬を含む、単離したPSCをPGCLCへ誘導するためのキット。

[16] 以下の工程I)及びII)を含む、PSCからPGCLCを製造する方法:

I) ActAの存在下、任意選択でさらにbFGF及び/又はKSRの存在下で、PSCを培養することによりEpiLCを製造する工程;

II) 工程I)で得られたEpiLCを、上記[1]~[9]のいずれか1つに記載の方法によりPGCLCへ誘導する工程。

[17] III) 工程II)で得られた細胞からBlimp1陽性細胞を選択する工程

をさらに含む、上記[16]に記載の方法。

[18] 細胞ソースとして、上記[16]又は[17]に記載の方法により得られるPGCLC細胞集団を利用することを含む、エピプラストに由来するさまざまな細胞型を製造する方法。

【発明の効果】

【0013】

ここに、私たちは、BMP4を含むサイトカインを用いない、3つのTF、Blimp1、Prdm14及びTfap2cの同時過剰発現により、EpiLCが内因性転写回路を用いて迅速かつ高効率にPGC状態へと向かうことを示す。その上、TF誘導PGCLCは、精子形成及び繁殖可能な子孫に確実に寄与する。臨床応用(例、不妊治療)を考慮すると、無血清及び異種物不含条件下で生殖細胞を調製することが、非常に望ましい。ヒト組換えサイトカインは高価であるため、本発明は、ヒト治療用の生殖細胞製造のコストを減少させるのに貢献する。

【0014】

私たちの知見は、生殖細胞状態を作り出す転写論理に対する新しい洞察だけでなく、哺乳動物の配偶子形成の、TFベースの再構成及び制御の基盤もまた提供する。

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は、転写因子によるPGC様状態の誘導を示す。図1a、BVSCR26rtTA細胞、及び転写因子及び - geoの発現を駆動するテトラサイクリン応答性プロモーターを有するpiggyBacトランスポゾンベースベクターのスキーム。図1b、6日間の観察期間中の、Dox(1.5 µg/ml)を用いた(上)又は用いない(下)場合における、BVSCR26rtTA BP14A細胞から誘導したEpiLCの浮遊凝集塊中のBVSCの誘導。バー、200 µm。図1c、BVSCR26rtTA BP14A細胞(Lin e 3 - 3)から誘導したEpiLC浮遊凝集塊(上)又は親BVSCR26rtTA細胞から誘導したEpiLC浮遊

10

20

30

40

50

凝集塊(下)における、Dox(1.5 μ g/ml)によるBVSC誘導のFACS解析。図1d、4日間の観察期間中の、TF(BP14A)若しくはサイトカインにより誘導されたBV陽性細胞(それぞれ、赤及びオレンジ)又はDoxを用いた親BVSCR26rtTA細胞(灰色)からのEpiLC全凝集塊における、Q-PCRにより測定した、表示した遺伝子の発現。それぞれの遺伝子について、2つの独立したハウスキーピング遺伝子Arbp及びPpiaの平均Ct値からの Ctを \log_2 スケールで示す。それぞれの遺伝子について、2回の技術的複製を伴う2回の独立した実験の平均値を示す。図1e、表示した細胞の多数の独立クローンにおける、誘導後12時間での全外来性TF転写産物のレベルに対してプロットされた、d2におけるBVSC誘導の効率。

【図2】図2は、TFによるPGC様状態の誘導に、BMP4シグナリングは関与しないが、適切なエピジェネティックバックグラウンドが必要であることを示す。図2a、ALK2/3阻害剤LDN193189(120pM)を用いた又は用いていない、BVSCR26rtTA BP14A(Line 3-3)由来EpiLCにおける2日目でのDox(1.5 μ g/ml)によるBVSCの誘導、又は親BVSCR26rtTA由来EpiLCにおけるBMP4(500ng/ml)によるBVSCの誘導。誘導を行わない陰性コントロールを、右に示す。バー、200 μ m。図2b、LDN193189を用いた又は用いていない、Doxにより誘導したEpiLC全凝集塊(BVSCR26rtTA BP14A細胞)、又はBMP4により誘導したEpiLC全凝集塊(BVSCR26rtTA細胞)での、2日目における、表示した遺伝子の発現。それぞれの遺伝子について、2つの独立したハウスキーピング遺伝子Arbp及びPpiaの平均Ct値からの Ctを、 \log_2 スケールで示す。図2c、BVSCR26rtTA BP14A ESC(上)又はEpiLC(下)の浮遊凝集塊における、2日目にDoxを用いた又は用いていないBVSCの誘導。バー、200 μ m。図2d、図2cに示す細胞における、BVSC誘導のFACS解析。

【図3】図3は、TF又はサイトカインによるPGCLC誘導中の、グローバル転写プロファイル、及びTF-PGCLCのエピジェネティックな特性を示す。図3a、表示した細胞のPCA。図3b、d4 BV陽性TF(BP14A)-PGCLC(GFP陽性、点線で描いた、Line 3-3)における、EpiLC(DNMT3B陽性、Line 3-3)のものと比較した、H3K9me2(上)又はH3K27me3(下)レベル(赤)の免疫蛍光解析。DAPI染色を左に示す。バー、20 μ m。図3c、EpiLC及びd4 BV陽性TF(BP14A、Line 3-3)-PGCLCにおける、インプリンティング遺伝子のメチル化可変領域(differentially methylated region(DMR))中のメチル化シトシンの亜硫酸水素塩配列解析。白色円及び黒色円は、非メチル化及びメチル化シトシンを表す。

【図4】図4にTF(BP14A)-PGCLCからの精子形成及び繁殖可能な子孫を示す。図4a、精細管への注入用のBV陽性TF(BP14A、Line 3-10)-PGCLCのFACS。図4b、精子形成を示す、TF-PGCLCを注入されたW/W^yマウスの精細管。矢印は空の細管を指す。バー、500 μ m。図4c、外見上正常な精子形成を示す、TF-PGCLCを注入したW/W^yマウス精巣切片のヘマトキシリンエオジン染色。アスタリスクは空の細管を指す。バー、50 μ m。図4d、TF-PGCLCからの精子(矢印)。バー、50 μ m。図4e、ICSIによるTF-PGCLC由来精子の野生型卵母細胞への注入により作製した、前核期の接合子。バー、50 μ m。図4f、図4eの接合子の2細胞胚。バー、50 μ m。図4g及び4h、TF-PGCLC由来精子に由来する、外見上正常な子孫(g、h)及び胎盤(g)。図4i、外来性TF、BVSC及びR26rtTAによる、TF-PGCLC由来精子の子孫の遺伝子型決定。図4j、TF-PGCLC由来精子に由来する繁殖可能な雌。図4k、TF(BP14A)-PGCLC又はCk-PGCLCによる精子形成。

【図5】図5は、テトラサイクリンの制御下で、キーとなる転写因子を発現する、BVSCR26rtTA ESCの作製を示す。図5a、親BVSCR26rtTA ESCにより作製したキメラ。図5b、親BVSCR26rtTA ESCを有するキメラ仔の出生率。図5c、親BVSCR26rtTA ESCのキメラにおける、生殖系列伝播。図5d、 β -geoと共にクローニングした遺伝子の発現を駆動する、テトラサイクリン応答性プロモーターを有するpiggyBacトランスポゾンベクターの略図。Bimp1、Prdm14及びTfap2cをattB1及びattB2間にクローニングし、IRES(内部リボソーム導入配列)を介して β -geoと共に発現させた。図5e、それぞれのBVSCR26rtTAトランスフェクタントにおいて組込まれたpiggybackトランスポゾンベクターのコピー数を見積もるための、サザンプロット解析。黒色バーで表示したBamHIサイトの下流の β -geo断片を、プローブとして使用した。それぞれのトランスフェクタントの推定コピー数を、下部に表示する。

10

20

30

40

50

【図6】図6は、BVSCR26rtTA BP14A ESCから誘導したEpiLCの浮遊凝集塊における、Dox濃度依存的なBVSCの誘導を示す。図6a、ESCから誘導したEpiLC浮遊凝集塊中における、DoxによるキーとなるTFの誘導スキーム。36時間誘導した親BVSCR26rtTA ESC由来EpiLCは、サイトカインによる最も高効率なPGCLC誘導を示したので、私たちは、一貫して、BVSCR26rtTA ESCトランスフェクタントから36時間誘導したEpiLCを、DoxによるキーとなるTFの誘導のために使用した。図6b、12時間Doxにより誘導した、BVSCR26rtTA BP14A細胞(Line 3-3)からのEpiLC浮遊凝集塊中のBV陽性細胞における、表示した遺伝子の発現レベル。それぞれの遺伝子について、2つの独立したハウスキーピング遺伝子Arbp及びPpiaの平均CT値からのCTを \log_2 スケールで示す。それぞれの遺伝子について、2回の技術的複製(technical replicates)を伴う2回の独立した実験の平均値を示す。図8も参照。図6c、12時間Doxを用いた又は用いていないBVSCR26rtTA BP14A細胞からのEpiLC浮遊凝集塊を解離させた単一の細胞の、 α -ガラクトシダーゼ染色。バー、20 μ m。図8も参照。図6d、BVSCR26rtTA BP14A ESC(Line 3-10)から誘導されたEpiLCの浮遊凝集塊における、Dox濃度依存的なBVSCの誘導。表示した濃度のDox(μ g/ml)又はサイトカイン[BMP4(500ng/ml)、LIF(1000U/ml)、BMP8A(500ng/ml)、SCF(100ng/ml)、EGF(50ng/ml)]で、2日間処理したEpiLCの浮遊凝集塊の、明視野(BF)画像並びにBV及びSCに対する免疫蛍光画像を示す。バー、200 μ m。図6e、図6dに示すEpiLCの浮遊凝集塊における、BV及びBVSC陽性細胞の百分率をFACSにより決定した。図6f、親BVSCR26rtTA ESCからのEpiLC浮遊凝集塊における、6日間のサイトカイン誘導性BVSC発現。バー、200 μ m。

【図7】図7は、1つ又は2つのTFによる、PGC様状態の誘導を示す。図7a、BVSCR26rtTA BP14A、BP14、BA、P14A、B、P14及びA細胞並びに親BVSCR26rtTA細胞から誘導されたEpiLC浮遊凝集塊における、Dox(1.5 μ g/ml)を用いた(左)又は用いない(右)、2日目におけるBVSCの誘導。それぞれの細胞型からの、3つの独立したクローンの結果を示す。バー、200 μ m。図7b、FACSで解析した、BVSCR26rtTA BP14、BA、P14A、B、P14及びA細胞から誘導したEpiLCの浮遊凝集塊における、2日及び4日でのBVSCの誘導。解析に使用したクローン番号を、丸括弧中に示す。図7c、FACSにより決定した、図7aに示したEpiLC浮遊凝集塊における、BVSC陽性細胞の百分率。各株について、少なくとも2回の独立した実験からの範囲値を伴う平均値を示す。図7d、Q-PCRにより測定した、TF(BP14A、BP14、BA、P14A、P14)誘導BV陽性細胞若しくはサイトカイン誘導BV陽性細胞又はDoxを4日間用いた親BVSCR26rtTA細胞からの全EpiLC凝集塊における、表示した遺伝子の発現。それぞれの遺伝子について、2つの独立したハウスキーピング遺伝子Arbp及びPpiaの平均CT値からのCTを \log_2 スケールで示す。それぞれの遺伝子について、2回の技術的複製を伴う2回の独立した実験の平均値を示す。

【図8】図8は、Doxにより誘導された外来性TF転写産物レベルの定量化を示す。図8a、表示した配列の増幅に使用したプライマーペアの増幅効率の定量化。図8b、BVSCR26rtTA BP14A細胞若しくは親BVSCR26rtTA細胞からDoxにより又は親BVSCR26rtTA細胞からサイトカインにより48時間誘導したEpiLC全浮遊凝集塊における、Q-PCRにより測定した、外来性及び内因性Blimp1、Prdm14及びTfap2cの発現レベル。それぞれの遺伝子について、2つの独立したハウスキーピング遺伝子Arbp及びPpiaの平均CT値からのCTを \log_2 スケールで示す。それぞれの遺伝子について、2回の技術的複製を伴う2回の独立した実験の平均値を示す。図8c、Doxを12時間用いた又は用いてない、BVSCR26rtTA BP14A、BP14、BA、P14A、B、P14及びA細胞からのEpiLC浮遊凝集塊の、解離させた単一細胞における、 α -ガラクトシダーゼ陽性細胞の百分率。図8d、8e、8f、8g、BVSCR26rtTA BP14A(クローン3-3、3-6、3-10)、BP14(クローン4-2、4-6、4-7)、BA(クローン5-3、5-4、5-10)、P14A(クローン6-1、6-2、6-4、6-5)、B(クローン2-1、2-4、2-6)、P14(クローン7-1、7-5、7-8)及びA(クローン8-2、8-4、8-7)細胞から12時間のDoxにより誘導されたEpiLC全浮遊凝集塊における、 α -ガラクトシダーゼ(全外来性TF転写産物レベルを反映する、d)、外来性Blimp1(e)、Prdm14(f)及びTfap2c(g)の発現レベルの測定。それぞれの系統について、少なくとも2回の独立した実験からの、標準偏差(SD)を伴う平均値を示す。ここで留意すべきは、それぞれのクローンにおいて、 α -ガラクトシダーゼにより測定した全

10

20

30

40

50

外来性転写産物レベルは、発現する各TFに特異的なプライマーにより測定した各外来性TFレベルの和とほぼ等しいことである。

【図9】図9は、マイクロアレイ解析及びエピジェネティックプロファイリング用の細胞のFACS並びに「コアPGC遺伝子」及び「壁側中胚葉遺伝子」を示す。図9a、図3aに示したマイクロアレイによるグローバル転写解析に使用した細胞のFACS。赤の四角で描いたBV陽性細胞を、マイクロアレイ解析用に使用した。図9b、(上)外来性TFを持たないがDox処理したEpiLC/コントロールEpiLCにおけるものと比較して、d2 TF(BP14A) - PGCLCにおいて、上方制御された遺伝子(「コアPGC遺伝子」)。(下)EpiLCのものとは比較して、d2 Ck - PGCLCにおいて上方制御されたが、d2 TF - PGCLCでは上方制御されなかった遺伝子(「壁側中胚葉遺伝子」)。マイクロアレイ解析により定義される発現レベルは、下部に示すように段階的な色コードで表される。キーとなる遺伝子の記号は、右に示す。解析には、少なくとも2つの独立した標本を用いた。図9c、EpiLC及び図3bで用いたd4 BV陽性TF(BP14A、Line 3-3) - PGCLCのFACS解析。

【図10】図10は、TF(BP14A) - PGCLC由来の精子に由来する、胚発生及び子孫の成長を示す。図10a、ESCにおけるBP14Aの活性化により誘導したSC陽性細胞を移植した精巣(右)。コントロールとして、移植していない精巣を左に示す。バー、1mm。図10b、ヘマトキシリンエオジンにより染色した、SC陽性細胞由来のテラトーマを有する精巣の組織学的切片。左パネル中、黒色四角で描かれた領域は、右パネルに拡大する。(右、上)繊毛内胚葉様細胞(ciliated endoderm-like cell)に覆われており造血細胞を有する骨髓をもつ骨が形成される。(右、下)高分化した神経細胞及び神経線維が目立っていた。バー:(左パネル) 100µm、(右パネル)、100µm。図10c、TF(BP14A) - 及びCk - PGCLC由来の精子に由来する、胚の発生。図10d、TF(BP14A) - 及びCk - PGCLC由来の精子に由来する、子孫の成長。図10e、TF(BP14A)由来の精子に由来するマウス(番号で表示した、図4i)の生殖能力。

【発明を実施するための形態】

【0016】

発明の詳細な説明

(I) エピブラスト又はEpiLCからPGCLCを製造する方法

本発明は、例えばBMP4、LIF、SCF、BMP8b及びEGF等のサイトカインを用いずに、外来性に導入された、PGCにおいて特異的な発現を示す特定のTFを、エピブラスト又はEpiLCに発現させることを含む、単離したエピブラスト又はEpiLCから、PGCLCを製造する方法を提供する。

【0017】

(Ia) エピブラスト及びその調製

出発材料として使用される「エピブラスト」は、哺乳動物(例、マウス、ヒト、サル、ラット、ウサギ、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ、ヒツジ、ヤギ等、好ましくはマウス及びヒト)胚盤胞の内部細胞塊に由来する、原腸陥入前のエピブラスト細胞(マウスにおいて、胎生期(E)5.5~E6.0日であるがE6.25を超えるものではない)である。本発明において使用されるエピブラストは、哺乳動物胚を適切な緩衝液中に単離し、トリプシン/パンクレアチンで胚を処理し、ピペッティングにより近位内胚葉(VE)を除去し、ガラスニードルによって胚体外外胚葉(ExE)を切り取ることにより調製することができる。単離したエピブラストは、10~20%KSR等を添加した無血清培地中で培養することができる。

【0018】

(Ib-1) EpiLC

出発材料として使用される「エピブラスト様細胞(EpiLC)」は、多能性幹細胞(PSC)に由来する、原腸陥入前のエピブラスト細胞の培養均等物である。具体的には、EpiLCは、以下の特性のいずれか又はいずれをも有する細胞として定義される:

- (1) 分化誘導前のPSCと比較して、Fgf5、Wnt3及びDnmt3bから選択される少なくとも1つの遺伝子発現の上昇;
- (2) 分化誘導前のPSCと比較して、Gata4、Gata6、Sox17及びBlimp1から選択される少なくとも1つの遺伝子発現の減少。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 9 】

より好ましくは、本発明のEpiLCは、以下の特性を有する：

- (1) 持続的なOct3/4の遺伝子発現；
- (2) 分化誘導前のPSCと比較して、Sox2及びNanogの遺伝子発現の減少；
- (3) 分化誘導前のPSCと比較して、Fgf5、Wnt3及びDnmt3bの遺伝子発現の上昇；並びに
- (4) 分化誘導前のPSCと比較して、Gata4、Gata6、Sox17及びBlimp1の遺伝子発現の減少。

【 0 0 2 0 】

(Ib-2) PSCからEpiLCへの分化誘導

本発明のEpiLCは、以前に記載したように(WO 2012/020687; Cell 146, 519-532 (2011); Science 338, 971-975 (2012))、PSCから調製することができる。

10

【 0 0 2 1 】

(Ib-2(i)) PSC及びその調製

出発材料として使用される「多能性幹細胞(PSC)」は、未分化状態を保持しながら増殖することを可能とする「自己複製」、及び胚の3つ全ての一次胚葉に分化することを可能とする「多能性」を保有する、いかなる未分化細胞でもあってもよい。例としては、胚性幹(ES)細胞、核移植により得られるクローン胚に由来する胚性幹細胞(ntES細胞)、生殖幹細胞(「GS細胞」)、胚性生殖細胞(「EG細胞」)、誘導多能性幹(iPS)細胞、培養線維芽細胞又は骨髓幹細胞由来の多能性細胞(Muse細胞)等が挙げられる。好ましい多能性幹細胞は、ES細胞、ntES細胞及びiPS細胞である。

20

【 0 0 2 2 】

(A) 胚性幹細胞

ES細胞は、ヒト、マウス等の哺乳動物の初期胚(例えば、胚盤胞)の内部細胞塊から樹立された、多能性と自己複製による増殖能を有する幹細胞である。

【 0 0 2 3 】

ES細胞は、受精卵の8細胞期、桑実胚後の胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚由来の幹細胞であり、成体を構成するいかなる細胞にも分化する能力、いわゆる、分化多能性と、自己複製に基づく増殖能を有する。ES細胞は、1981年にマウスにおいて発見され(M. J. Evans及びM.H. Kaufman (1981), Nature 292:154-156)、それ以降、ヒト、サル等の霊長類においてもES細胞株が樹立された(J.A. Thomson et al. (1998), Science 282:1145-1147; J.A. Thomson et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 7844-7848; J. A. Thomson et al. (1996), Biol. Reprod., 55: 254-259; J.A. Thomson and V.S. Marshall (1998), Curr. Top. Dev. Biol., 38:133-165)。

30

【 0 0 2 4 】

ES細胞は、対象動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取り出し、線維芽細胞フィーダー細胞上で、内部細胞塊を培養することにより樹立することができる。また、継代培養による細胞の維持は、LIF、bFGFなどの物質を添加した培養液を用いて行うことができる。ヒト及びサルES細胞の樹立及び維持方法は、例えば、USP5,843,780; Thomson JA, et al. (1995), Proc Natl. Acad. Sci. U S A. 92:7844-7848; Thomson JA, et al. (1998), Science. 282:1145-1147; H. Suemori et al. (2006), Biochem. Biophys. Res. Commun., 345:926-932; M. Ueno et al. (2006), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:9554-9559; H. Suemori et al. (2001), Dev. Dyn., 222:273-279; H. Kawasaki et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:1580-1585; Klimanskaya I, et al. (2006), Nature. 444: 481-485等に記載されている。

40

【 0 0 2 5 】

ES細胞作製のための培地として、例えば、0.1mM 2 -メルカプトエタノール、0.1mM 非必須アミノ酸、2mM L - グルタミン酸、20%KSR及び4ng/ml bFGFを添加したDMEM/F - 12培地を用いて、37℃、2%CO₂/98%大気、湿潤雰囲気下で、ヒトES細胞を維持することができる(O. Fumitaka et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26:215-224)。加えて、ES細胞は、3~4日毎の継代を必要とし、この場合、1mM CaCl₂及び20%KSRを含有するPBS中で、例えば、0.25%トリプシン及び0.1mg/ml コラゲナーゼIVを用いて、継代を行うことができる。

50

【 0 0 2 6 】

ES細胞は、通常、アルカリホスファターゼ、Oct - 3/4、Nanog等の遺伝子マーカーの発現を指標として用い、リアルタイムPCR法により選択することができる。具体的には、ヒトES細胞の選択について、例えばOCT - 3/4、NANOG、ECAD等の遺伝子マーカーの発現が指標として使用され得る(E. Kroon et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26:443-452)。

【 0 0 2 7 】

ヒトES細胞株として、例えば、WA01(H1)及びWA09(H9)がWiCell Research Instituteから入手可能であり、KhES - 1、KhES - 2及びKhES - 3が京都大学再生医科学研究所(京都、日本)から入手可能である。

【 0 0 2 8 】

(B) 生殖幹細胞

生殖幹細胞は、精巣に由来する多能性幹細胞であり、精子形成の起源となる細胞である。この細胞は、ES細胞のようにさまざまな系列の細胞に分化誘導可能であり、例えば、マウス胚盤胞への移植によるキメラのマウスの作出できる等の特性を示す(M. Kanatsu-Shinohara et al. (2003) Biol. Reprod., 69:612-616; K. Shinohara et al. (2004), Cell, 119:1001-1012)。生殖幹細胞は、グリア細胞株由来神経栄養因子(GDNF)を含有する培地中で自己複製可能であり、ES細胞のものと同様の培養条件下で継代を繰り返すことにより生殖幹細胞を製造することができる(Masanori Takehashi et al., (2008), Experimental Medicine, Vol. 26, No. 5(Suppl.), pp. 41 - 46, YODOSHA (Tokyo, Japan))。

【 0 0 2 9 】

(C) 胚性生殖細胞

胚性生殖細胞は、胎生期の始原生殖細胞から樹立される、ES細胞のものと同様の多能性を有する細胞である。胚性生殖細胞は、LIF、bFGF、幹細胞因子等の物質の存在下で始原生殖細胞を培養することにより樹立することができる(Y. Matsui et al. (1992), 細胞, 70:841-847; J.L. Resnick et al. (1992), Nature, 359:550-551)。

【 0 0 3 0 】

(D) 誘導多能性幹細胞

誘導多能性幹(iPS)細胞は、体細胞に由来する人工的な幹細胞であって、特異的な再プログラム化因子をDNA又はタンパク質の形態で体細胞に導入することにより製造することができ、ES細胞とほぼ同等の特性(例、分化多能性及び自己複製に基づく増殖能)を示す(K. Takahashi及びS. Yamanaka (2006) Cell, 126:663-676; K. Takahashi et al. (2007), Cell, 131:861-872; J. Yu et al. (2007), Science, 318:1917-1920; Nakagawa, M. et al., Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2008); WO2007/069666)。再プログラム化因子は、ES細胞で特異的に発現される遺伝子、その遺伝子産物若しくはその非コードRNA、ES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子、その遺伝子産物若しくはその非コードRNA、又は低分子量化合物で構成されてもよい。再プログラム化因子に含まれる遺伝子の例としては、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c - Myc、N - Myc、L - Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15 - 2、Tcl1、beta - catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3、Glis1等が挙げられる。これらの再プログラム化因子は、単独で、あるいは組合わせて使用してもよい。再プログラム化因子の組合わせの例としては、WO 2007/069666、WO2008/118820、WO2009/007852、WO2009/032194、WO2009/058413、WO2009/057831、WO2009/075119、WO2009/079007、WO2009/091659、WO2009/101084、WO2009/101407、WO2009/102983、WO2009/114949、WO2009/117439、WO2009/126250、WO2009/126251、WO 2009/126655、WO2009/157593、WO2010/009015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO2010/111409、WO2010/111422、WO2010/115050、WO2010/124290、WO2010/147395、WO 2010/147612、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells. 26: 2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat Biotechnol. 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:47

10

20

30

40

50

5-479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), Nat Cell Biol. 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), Nat. Biotech., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010), Nature. 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28:713-720及びMaekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-9に記載されている組み合わせが挙げられる。

【 0 0 3 1 】

前記再プログラム化因子の例としては、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤[例、バルプロ酸(VPA)、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC1293及びM344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNA及びshRNA(例、HDAC1 siRNA Smartpool(登録商標)(Millipore)、HDAC1に対するHuSH 29mer shRNA構築物(OriGene)等)等の核酸性発現阻害剤]、MEK阻害剤(例、PD184352、PD98059、U0126、SL327及びPD0325901)、グリコーゲン合成酵素キナーゼ-3阻害剤(例、Bio及びCHIR99021)、DNAメチル基転移酵素阻害剤(例、5-azacytidine)、ヒストンメチル基転移酵素阻害剤[例えば、BIX-01294等の低分子阻害剤、並びにSuv39h1、Suv39h2、SetDB1及びG9aに対するshRNA及びsiRNA等の核酸ベースの発現阻害剤等]、L-チャンネルカルシウム作動物質(例えば、Bayk8644)、酪酸、TGFβ阻害剤又はALK5阻害剤(例、LY364947、SB431542、616453及びA-83-01)、p53阻害剤(例えば、p53に対するsiRNA及びshRNA)、ARID3A阻害剤(例、ARID3Aに対する、siRNA及びshRNA)、例えばmiR-291-3p、miR-294、miR-295、mir-302等のmiRNA、Wntシグナリング(例えば、可溶性Wnt3a)、神経ペプチドY、プロスタグランジン(例、プロスタグランジンE2及びプロスタグランジンJ2)、hTERT、SV40LT、UTF1、IRX6、GLIS1、PITX2、DMRTBI等の樹立効率の増強に用いられる因子が挙げられるが限定されない。本願明細書中、樹立効率の増強に使用されるこれらの因子は、再プログラム化因子と特に区別されない。

【 0 0 3 2 】

再プログラム化因子がタンパク質の形である場合、例えば、リポフェクション、細胞透過性ペプチド(例、HIVに由来するTAT、及びポリアルギニン)との融合、マイクロインジェクション等の方法により体細胞に導入してもよい。

【 0 0 3 3 】

再プログラム化因子がDNAの形である場合、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体等のベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクション等を用いる方法により体細胞に導入してもよい。ウイルスベクターの例としては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター(Cell, 126, pp.663-676, 2006; Cell, 131, pp.861-872, 2007; Science, 318, pp.1917-1920, 2007)、アデノウイルスベクター(Science, 322, 945-949, 2008)、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター(日本の血球凝集性ウイルスベクター)(WO 2010/008054)等が挙げられる。人工染色体ベクターの例としては、ヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC、PAC)等が挙げられる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用のプラスミドを使用することができる(Science, 322:949-953, 2008)。ベクターは、核再プログラム化物質が発現できるように、プロモーターの制御配列、エンハンサー、リポソーム結合配列、ターミネーター、ポリアダニル化サイト等を含むことができ、さらに必要に応じて、薬剤耐性遺伝子(例えば、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子等)の選択マーカー配列、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリア毒素遺伝子等、緑色蛍光タンパク質(GFP)、bグルクロニダーゼ(GUS)、FLAG等のレポーター遺伝子配列等を含むことができる。また、前記ベクターは、体細胞への導入後、再プログラム化因子をコードする遺伝子又はプロモーターと結合させた再プログラム化因子をコードする遺伝子を、共に切除するために、それらの前後にLoxP配列を有してもよい。

【 0 0 3 4 】

RNAの形態の場合、例えば、リポフェクション、マイクロインジェクション等の手段により体細胞に導入してもよく、かつ分解を抑制するため5-メチルシチジン及びプソイド

10

20

30

40

50

ウリジンを組入れたRNA(TriLink Biotechnologies)を使用してもよい(Warren L, (2010) Cell Stem Cell. 7:618-630)。

【 0 0 3 5 】

iPS細胞を誘導するための培地の例としては、10～15%のFBSを含有する、DMEM、DMEM/F12又はDME培地(これらの培地は、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸、b-メルカプトエタノール等を必要に応じてさらに含有し得る)、又は市販の培地[例えば、マウスES細胞培養用の培地(TX-WES培地、Thromb-X)、霊長類ES細胞用の培地(霊長類ES/iPS細胞の培地、Reprocell)、無血清培地(mTeSR、Stemcell Technologies)]等が挙げられる。

【 0 0 3 6 】

培養方法の例としては、5%CO₂の存在下、37℃、10%FBSを含有するDMEM又はDMEM/F12培地中、体細胞を再プログラム化因子に接触させ、約2～7日間培養し、それ以降は、フィーダー細胞(例、マイトマイシンC処理したSTO細胞、SNL細胞等)上に細胞を再播種し、体細胞及び再プログラム化因子の接触約10日後からbFGFを含有する霊長類ES細胞用培地中で細胞を培養することによって、該接触から約30～約45日以上後にiPS様コロニーを得ることができる。

【 0 0 3 7 】

あるいは、37℃、5%CO₂下にて、フィーダー細胞(例、マイトマイシンC処理したSTO細胞、SNL細胞等)上で、細胞を、10%FBSを含有するDMEM培地(LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸、b-メルカプトエタノール等を必要に応じさらに含有し得る)中で培養し、それにより、約25～約30日又はそれ以上後に、ES様コロニーを得ることができる。望ましくは、フィーダー細胞に換えて、再プログラム化のため体細胞それ自身を用いる方法、又は細胞外基質(例、ラミニン-5(W02009/123349)及びMatrigel(BD))を用いる方法(Takahashi K, et al. (2009), PLoS One. 4:e8067又はW02010/137746)が挙げられる。

【 0 0 3 8 】

前記に加え、無血清培地を用いた培養方法も、例として挙げることができる(Sun N, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:15720-15725)。さらに、樹立効率を増強するため、iPS細胞は、低酸素条件下(0.1%以上かつ15%以下の酸素濃度)(Yoshida Y, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:237-241又はW02010/013845)で樹立してもよい。

【 0 0 3 9 】

前記培養の間は、培養開始2日目から、1日1回、培地を新鮮な培地に交換する。核再プログラム化に使用される体細胞の細胞数は限定されないが、100cm²培養ディッシュあたり、約5×10³～約5×10⁶細胞である。

【 0 0 4 0 】

iPS細胞は、形成したコロニーの形態に基づき、選択することができる。体細胞が再プログラム化された時に発現する遺伝子(例、Oct3/4、Nanog)と連動して発現する薬剤耐性遺伝子をマーカー遺伝子として導入する場合、対応する薬剤を含有する培地(選択培地)中で培養することにより樹立したiPS細胞を選択することができる。マーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子である場合、iPS細胞は、蛍光顕微鏡を用いた観察により選択することができ、発光酵素遺伝子である場合、発光基質の添加によりiPS細胞を選択することができ、発色酵素遺伝子である場合、発色基質の添加によりiPS細胞を選択することができる。

【 0 0 4 1 】

本願明細書中使用される用語「体細胞」は、卵子、卵母細胞及びES細胞等の生殖系列細胞及び全能性細胞を除いた任意の動物細胞(好ましくは、ヒトを含めた哺乳動物の細胞)を意味する。体細胞は、胎児(仔)の体細胞、新生児(仔)の体細胞及び成熟し健全な若しくは病原性の体細胞のいずれをも無制限に包含し、初代培養細胞、継代細胞及び確立された細胞株のいずれをも無制限に包含する。体細胞の具体例としては、(1)例えば神経幹細胞、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)、(2)組織前

10

20

30

40

50

駆細胞、(3)リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋細胞、線維芽細胞(皮膚細胞等)、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞(膵外分泌細胞等)、脳細胞、肺細胞、腎細胞及び脂肪細胞等の分化した細胞等が挙げられる。

【0042】

体細胞のソースとしての哺乳動物個体の選択は特に制限されない；しかしながら、最終産物としてPGC様細胞を、ヒトにおける不妊等の疾患の治療に使用する場合、移植片拒絶及び/又はGvHDを予防するという観点から、体細胞は、患者本人の細胞であるか、あるいは患者のHLA型と同一又は実質的に同一であるHLA型を有する他人から採取されることが好ましい。本明細書中使用される「実質的に同一であるHLA型」とは、ドナーのHLA型が、免疫抑制剤等の使用を伴う患者に移植した場合に、ドナーの体細胞由来のiPSの分化誘導により得られた移植細胞が生着可能である程度に、患者のものと一致することを意味する。例えば、主たるHLA(HLA-A、HLA-B及びHLA-DRの主要な3遺伝子座、あるいはさらにHLA-Cwを含む4遺伝子座)が同一であるHLA型等が挙げられる(以下同様の意味を適用)。PGC様細胞をヒトに投与(移植)しないが、例えば、患者の薬剤感受性又は副作用を評価するスクリーニング用の細胞ソースとして使用する場合、同じように、患者本人又は薬剤感受性又は副作用と関連する同じ遺伝子多型を有する別の人間から体細胞を採取する必要がある。

10

【0043】

(E) ナイーヴヒトES細胞及びiPS細胞

胚盤胞期胚から誘導される従来型のヒトES細胞は、マウスES細胞と非常に異なる生物学的(形態学的、分子的及び機能的)特性を有する。マウス多能性幹細胞は、LIF依存的なES細胞とbFGF依存的なエピプラスト幹細胞(EpiSC)という2つの機能的に区別される状態で存在し得る。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EpiSCのそれに類似していることが示唆されている。近年、LIFの存在下にOct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc及びNanogを異所的に誘導するか(Cell Stem Cells, 6: 535-546, 2010を参照)、あるいはLIF並びにGSK3及びERK1/2経路阻害剤を組合わせて、Oct3/4、Klf4及びKlf2を異所的に誘導にする(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, オンライン出版doi/10.1073/pnas.1004584107を参照)ことにより、マウスES細胞様多能性状態のヒトES細胞及びiPS細胞(ナイーブヒトES細胞及びiPS細胞ともいう)が樹立されている。これらのナイーブヒトES細胞及びiPS細胞は、それらの多能性が従来型のヒトES細胞及びiPS細胞のそれと比較して未熟であるため、本発明の好ましい出発材料であるかもしれない。

20

30

【0044】

(F) 核移植によるクローン胚に由来するES細胞

nt ES細胞は、核移植技術により作製されたクローン胚に由来するES細胞であり、受精卵に由来するES細胞としてほぼ同じ特性を有する(T. Wakayama et al. (2001), Science, 292:740-743; S. Wakayama et al. (2005), Biol. Reprod., 72:932-936; J. Byrne et al. (2007), Nature, 450:497-502)。すなわち、未受精卵の核を体細胞の核と置き換えることにより得られるクローン胚に由来する胚盤胞の内部細胞塊から樹立されたES細胞が、nt ES(核移植ES)細胞である。nt ES細胞の作製のため、核移植技術(J.B. Cibelli et al. (1998), Nature Biotechnol., 16:642-646)及びES細胞作製技術(上記)の組合わせを用いることができる(Kiyoka Wakayama et al., (2008), Experimental Medicine, Vol. 26, No. 5(Suppl.), pp. 47 - 52)。核移植において、哺乳動物の除核した未受精卵に体細胞の核をインジェクションし、数時間培養することにより再プログラム化を行うことができる。

40

【0045】

(G) Multilineage-differentiating Stress Enduring細胞(Muse細胞)

Muse細胞は、WO2011/007900に記載された方法により製造された多能性幹細胞である。さらに詳細には、線維芽細胞又は骨髄間質細胞を、長時間、好ましくは8時間又は16時間、トリプシン処理し、その後、浮遊状態で細胞を培養することにより得られる多能性を有

50

する細胞であり、SSEA - 3及びCD105陽性である。

【 0 0 4 6 】

(Ib-2(ii)) PSCからEpiLCへの分化誘導

分化誘導用の基本培地としては、例えば、Neurobasal培地、Neural Progenitor Basal培地、NS - A培地、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、最小必須培地 (MEM)、Eagle MEM、MEM、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、Glasgow MEM、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地、199培地、DMEM / F12培地、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer ' s培地、及びこれらの混合培地などが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 7 】

培地は、血清含有培地又は無血清培地であり得る。好ましくは、無血清培地が使用され得る。無血清培地 (SFM) とは、未処理又は未精製の血清をいずれも含まない培地を意味し、従って、精製された血液由来成分又は動物組織由来成分 (増殖因子など) を含有する培地を含み得る。血清 (例えば、ウシ胎児血清 (FBS)、ヒト血清など) の濃度は、0 ~ 20 %、好ましくは0 ~ 5%、より好ましくは0 ~ 2%、最も好ましくは0% (すなわち、無血清) であり得る。SFMは任意の血清代替物を含んでよく、又は含まなくてもよい。血清代替物は、アルブミン (例えば、脂質リッチアルブミン、組換えアルブミン等のアルブミン代替物、植物デンプン、デキストラン及びタンパク質加水分解物等)、トランスフェリン (又は他の鉄輸送体)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2 -メルカプトエタノール、3' -チオグリセロール又はこれらの均等物などを適切に含有する材料を含み得る。かかる血清代替物は、例えば、W098 / 30679に開示された方法により調製できる。あるいは、より簡便にするため、任意の市販の材料も使用され得る。かかる市販の材料としては、Knockout (商標) Serum Replacement (KSR)、Chemically - defined Lipid concentrated、及びGlutamax (Invitrogen) が挙げられる。

【 0 0 4 8 】

培地は、その他の自体公知の添加物も含み得る。添加物は、本発明の方法により原腸陥入前のエピプラスト細胞と同等であるEpiLCが製造され得る限り限定されない; 例えば、成長因子 (例えば、インスリン等)、ポリアミン (例えば、プトレシン等)、ミネラル (例えば、セレン酸ナトリウム等)、サッカライド (例えば、グルコース等)、有機酸 (例えば、ピルビン酸、乳酸等)、アミノ酸 (例えば、非必須アミノ酸 (NEAA)、L - グルタミン等)、還元剤 (例えば、2 -メルカプトエタノール等)、ビタミン (例えば、アスコルビン酸、d - ビオチン等)、ステロイド (例えば、[ベータ] - エストラジオール、プロゲステロン等)、抗生物質 (例えば、ストレプトマイシン、ペニシリン、ゲンタマイシン等)、緩衝剤 (例えば、HEPES等)、栄養添加物 (例えば、B27サプリメント、N2サプリメント、StemPro - Nutrient Supplement等) 等について言及し得る。各添加物は自体公知の濃度範囲で含有されることが好ましい。

【 0 0 4 9 】

本発明のEpiLCの製造方法において、多能性幹細胞は、フィーダー細胞の存在下又は非存在下にて培養してもよい。フィーダー細胞は、本発明の方法によりEpiLCが製造され得る限り、限定されない; 例えばESC及びiPSC等の多能性幹細胞の培養に使用するために、自体公知のフィーダー細胞を使用することができる; 例えば、線維芽細胞 (マウス胚性線維芽細胞、マウス線維芽細胞細胞株ST0等) について言及し得る。フィーダー細胞は、自体公知の方法、例えば、放射線 (ガンマ線など)、抗癌剤 (マイトマイシンC等) での処理などにより、不活性化されていることが好ましい。しかし、本発明の好ましい実施態様において、多能性幹細胞は、無フィーダー条件下で培養される。

【 0 0 5 0 】

多能性幹細胞からEpiLCへの分化誘導用培地 (培地A) は、基本培地に必須の添加物としてアクチビンAを含有する。アクチビンAの濃度は、例えば、約5ng / ml以上、好ましくは約10ng / ml以上、より好ましくは約15ng / ml以上、かつ例えば、約40ng / ml以下、好ましくは約30ng / ml以下、より好ましくは25ng / ml以下である。

【 0 0 5 1 】

10

20

30

40

50

培地Aには、bFGF及び／又はKSRをさらに含有することが好ましい。塩基性FGF及びKSRは、有効濃度範囲で存在する場合に、EpiLCの誘導効率を顕著に増大させる。bFGFの濃度は、例えば、約5ng/ml以上、好ましくは約7.5ng/ml以上、より好ましくは約10ng/ml以上であり、かつ、例えば、約30ng/ml以下、好ましくは約20ng/ml以下、より好ましくは約15ng/ml以下である。KSRの濃度は、例えば、約0.1w/w%以上、好ましくは約0.3w/w%以上、より好ましくは約0.5w/w%以上であり、また、例えば、約5w/w%以下、好ましくは約3w/w%以下、より好ましくは約2w/w%以下である。

【0052】

特に好ましい実施態様において、培地Aは、基本培地に加えて、アクチビンA、bFGF及びKSRを含有する。これらの成分の適切な濃度は、アクチビンAについては約10～約30ng/ml、好ましくは約15～約25ng/ml、bFGFについては約7.5～約20ng/ml、好ましくは約10～約15ng/ml、KSRについては約0.3～約3w/w%、好ましくは約0.5～約2w/w%の範囲に亘って選択することができる。

【0053】

培地Aが含有するアクチビンA及びbFGFは、そのソースに関して限定されず、任意の哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、サル、ブタ、ラット、イヌなど）の細胞から単離及び精製してよい。培養に供する多能性幹細胞と同種のアクチビンA及びbFGFを使用することが好ましい。アクチビンA及びbFGFは、化学的に合成されてもよく、無細胞翻訳系を用いて生化学的に合成されてもよく、或いは各タンパク質をコードする核酸を有する形質転換体から製造されてもよい。アクチビンA及びbFGFの組換え産物は市販されている。

【0054】

多能性幹細胞をEpiLCに誘導するために使用される培養器は、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マルチプレート、マルチウェルプレート、マイクロスライド、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック、及びローラーボトルを包含し得るが、特に限定されない。培養器は細胞接着性であり得る。細胞接着性の培養器は、器表面の細胞接着性を改善させる目的で、細胞外マトリックス（ECM）などの任意の細胞接着用基質でコートされたものであり得る。細胞接着用基質は、多能性幹細胞又はフィーダー細胞（用いられる場合）の接着を目的とする任意の材料であり得る。細胞接着用基質としては、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、ポリ-L-オルチニン、ラミニン及びフィブロネクチン、並びに例えばマトリゲル等のそれらの混合物、並びに溶解細胞膜調製物（lysed cell membrane preparation）が挙げられる（Klimanskaya I et al 2005. Lancet 365 : p1636 - 1641）。

【0055】

この培養において、多能性幹細胞を上記培養器上に播き、例えば、約 $10^4 \sim 10^5$ 細胞/cm²、好ましくは約 $2 \sim 8 \times 10^4$ 細胞/cm²の細胞密度とし、1～10%CO₂/99～90%大気雰囲気下、インキュベーター中で約30～40、好ましくは約37で、3日未満、好ましくは約2日間（例、48±12時間、好ましくは48±6時間）培養する。培養の結果として、扁平なエピプラスト様構造を有する細胞が一様に現れる。

【0056】

EpiLCへの分化の事実は、例えば、RT-PCRを用いて、EpiLC及び／又は多能性幹細胞マーカー遺伝子の発現レベルを解析することにより確認することができる。上記のように、EpiLCは、(1)分化誘導前のPSCと比較して、Fgf5、Wnt3及びDnmt3bから選択される少なくとも1つの遺伝子発現が上昇する、及び(2)分化誘導前のPSCと比較して、Gata4、Gata6、Sox17及びBlimp1から選択される少なくとも1つの遺伝子発現が減少する細胞として定義される。従って、EpiLCへの分化の事実は、培養により得られた細胞において、Fgf5、Wnt3及びDnmt3bから選択される少なくとも1つの発現レベル、並びに／又はGata4、Gata6、Sox17及びBlimp1から選択される少なくとも1つの発現レベルを決定し、分化誘導前の多能性幹細胞における発現レベルと比較することにより確認することができる。

【0057】

(1c) エピプラスト又はEpiLCからPGCLCへの分化誘導

このように得られたエピプラスト又はEpiLCに、外来性に導入した、PGCにおいて特異的な発現を示す、特定のTFを発現させることにより、BMP4を含むサイトカインを用いずに、エピプラスト又はEpiLCをPGC様細胞(PGCLC)へ誘導することが可能となる。

【0058】

エピプラスト又はEpiLCをPGCLCへ誘導することができるTFの組み合わせとしては、以下の(i)~(v)が挙げられる：

- (i) Blimp1、Prdm14及びTfap2c;
- (ii) Blimp1及びPrdm14;
- (iii) Blimp1及びTfap2c;
- (iv) Prdm14及びTfap2c; 並びに
- (v) Prdm14。

10

【0059】

以下に、これらのTFを「本発明のPGCLC誘導物質」とも称する。本発明のPGCLC誘導物質は、タンパク質又はそれをコードする核酸の形で、エピプラスト又はEpiLCに導入してもよい。

【0060】

本発明のPGCLC誘導物質としては、例えば、任意の哺乳動物(例、ヒト、マウス、ラット、サル、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ等)に由来するBlimp1、Prdm14又はTfap2cタンパク質、又はそれらをコードする核酸などを使用することができる。標的エピプラスト又はEpiLCの由来と同一の種であることが好ましい。

20

【0061】

本発明において使用されるBlimp1の例としては、配列番号2(NCBI accession number: NP_001189.2として登録)に示すアミノ酸配列から成るヒトBリンパ球誘導成熟タンパク質1(BLIMP1)、配列番号4(NCBI accession number: NP_031574.1として登録)に示すアミノ酸配列から成るマウスBlimp1、及び他の哺乳動物におけるそれらのオルソログ(GeneCards(登録商標)ヒト遺伝子データベースを参照)、その多型変異体(例、G74S(dbSNP No.: rs2185379)、D203E(dbSNP No.: rs811925)、そのスプライシング変異体(例、075626-2、075626-3;UniProtKB/Swiss-Protデータベースを参照)等)が挙げられる。あるいは、前記タンパク質のいずれかと90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上、さらにより好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上のアミノ酸同一性を有し、かつ該タンパク質の機能(例、PGC特異的なプロモーターの転写活性化等)と同等の機能を有するタンパク質であってもよい。本明細書中、アミノ酸配列の同一性は、blastpプログラム(NCBI BLAST(National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool))を用いて、以下の条件下で計算することができる(期待値=10; ギャップを許す;マトリックス=BLOSUM62; フィルタリング=OFF)。

30

【0062】

本発明において使用されるPrdm14の例としては、配列番号6(NCBI accession number: NP_078780.1として登録)に示すアミノ酸配列から成るヒトPR domain containing 14(PRDM14)、配列番号8(NCBI accession number: NP_001074678.1として登録)に示すアミノ酸配列から成るマウスPrdm14、及び他の哺乳動物におけるそのオルソログ(GeneCards(登録商標)ヒト遺伝子データベースを参照)、その多型変異体、そのスプライシング変異体等が挙げられる。あるいは、前記タンパク質のいずれかと、90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上、さらにより好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上のアミノ酸同一性を有し、かつ該タンパク質の機能(例、PGC特異的なプロモーターの転写活性化等)と同等の機能を有するタンパク質であってもよい。ここで、アミノ酸配列の同一性は、前記と同様の方法で計算することができる。

40

【0063】

本発明において使用されるTfap2cの例としては、配列番号10(NCBI accession number: NP_003213.1として登録)に示すアミノ酸配列から成るヒト転写因子AP-2 gamma(TFAP2C)

50

、配列番号12(NCBI accession number: NP_033361.1として登録)に示すアミノ酸配列から成るマウスTfap2c、及び他の哺乳動物におけるそのオルソログ(GeneCards(登録商標)ヒト遺伝子データベースを参照)、その多型変異体(例、K244E; Genome Res. 14:2121-2127(2004)を参照)、そのスプライシング変異体等が挙げられる。あるいは、前記タンパク質のいずれかと90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上、さらにより好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上のアミノ酸同一性を有し、該タンパク質の機能(例、PGC特異的なプロモーターの転写活性化等)と同等の機能を有するタンパク質であってもよい。ここで、アミノ酸配列の同一性は、前記と同様の方法で計算することができる。

【0064】

Blimp1、Prdm14又はTfap2cは、前記タンパク質のいずれか及び細胞透過性ペプチド(例、HIVに由来するTAT及びポリアルギニン)の融合タンパク質であってもよい。

10

【0065】

Blimp1をコードする核酸の例としては、配列番号1に示すヌクレオチド配列からなるヒトBリンパ球誘導成熟タンパク質1(BLIMP1)cDNA(NCBI accession number: NM_001198.3として登録)、配列番号3に示すヌクレオチド配列からなるマウスBlimp1cDNA(NCBI accession number: NM_007548.2として登録)、及び他の哺乳動物におけるそのオルソログ、その転写変異体、そのスプライシング変異体等が挙げられる。あるいは、前記核酸のいずれかと90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上、さらにより好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上のヌクレオチド同一性を有し、かつ該核酸によりコードされるタンパク質の機能(例、PGC特異的なプロモーターの転写活性化等)と同等の機能を有するタンパク質をコードする核酸であってもよい。ここで、ヌクレオチド配列の同一性は、NCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) のblastnプログラムを用いて、以下の条件下で計算することができる(期待値=10;ギャップを許す;フィルタリング=ON;マッチスコア=1;ミスマッチスコア=-3)。あるいは、ストリンジентな条件下で、前記いずれかの核酸の相補鎖とハイブリダイゼーションすることができる程度の相補関係にある正鎖を有するものであってもよい。ここで、ストリンジентな条件とは、Berger及びKimmel(1987, Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA)に教示されるように、複合体又はプローブと結合する核酸の融解温度(T_m)に基づき決定することができる。例えば、ハイブリダイゼーション後の洗浄条件としては、通常、「1×SSC、0.1%SDS、37℃」程度が挙げられる。相補鎖は、かかる条件下において洗浄した場合にも対象とする正鎖とのハイブリダイゼーション状態を維持する相補鎖であることが好ましい。特に限定されるものではないが、より厳しいハイブリダイゼーション条件としては、「0.5×SSC、0.1%SDS、42℃」程度の洗浄条件、「0.1×SSC、0.1%SDS、65℃」程度のより厳しい洗浄条件であって、洗浄後でも正鎖及び相補鎖のハイブリダイゼーション状態を維持することができるものが挙げられる。

20

30

【0066】

Prdm14をコードする核酸の例としては、配列番号5に示すヌクレオチド配列からなるヒトPR domain containing 14(PRDM14)cDNA(NCBI accession number: NM_024504として登録)、配列番号7に示すヌクレオチド配列からなるマウスPrdm14cDNA(NCBI accession number: NM_001081209として登録)、及び他の哺乳動物におけるそのオルソログ、その転写変異体、そのスプライシング変異体等が挙げられる。あるいは、前記核酸のいずれかと90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上、さらにより好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上のヌクレオチド同一性を有し、かつ該核酸によりコードされるタンパク質の機能(例、PGC特異的なプロモーターの転写活性化等)と同等の機能を有するタンパク質をコードする核酸であってもよい。ここで、ヌクレオチド配列の同一性は、上記に記載のものと同様の方法で計算することができる。あるいは、ストリンジентな条件下で、前記いずれかの核酸の相補鎖とハイブリダイゼーションすることができる程度の相補関係にある正鎖を有してもよい。ここでストリンジентな条件とは上記に定義するものである。

40

50

【 0 0 6 7 】

Tfap2Cをコードする核酸の例としては、配列番号9に示すヌクレオチド配列からなるヒト転写因子AP - 2 gamma(TFAP2C)cDNA(NCBI accession number: NM_003222として登録)、配列番号11に示すヌクレオチド配列からなるマウスTfap2C cDNA(NCBI accession number: NM_009335として登録)、及び他の哺乳動物におけるそのオルソログ、その転写変異体、そのスプライシング変異体等が挙げられる。あるいは、前記核酸のいずれかと、90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上、さらにより好ましくは98%以上、最も好ましくは99%以上のヌクレオチド同一性を有し、かつ該核酸によりコードされるタンパク質の機能(例、PGC特異的なプロモーターの転写活性化等)と同等の機能を有するタンパク質をコードする核酸であってもよい。ここで、ヌクレオチド配列の同一性は、前記と同様の方法で計算することができる。あるいは、ストリンジェントな条件下で、前記いずれかの核酸の相補鎖とハイブリダイゼーションすることができる程度の相補関係にある正鎖を有してもよい。ここで使用されるストリンジェントな条件とは上記に定義するものである。

10

【 0 0 6 8 】

Blimp1、Prdm14又はTfap2cをコードする核酸は、DNA、RNA又はDNA/RNAキメラであってもよい。加えて、核酸は、一本鎖、二本鎖DNA、二本鎖RNA又はDNA:RNAハイブリッドであってもよい。好ましくは、二本鎖DNA又は一本鎖RNAである。かかるRNAとして、5 - メチルシチジン及びプソイドウリジンを組み入れたRNA(TriLink Biotechnologies)、又はホスファターゼ処理により得られる修飾RNAを、分解の抑制のため、使用してもよい。

20

【 0 0 6 9 】

Blimp1、Prdm14及びTfap2c並びにそれらをコードする核酸は、例えば前記ヒト又はマウスBlimp1、Prdm14及びTfap2cのcDNA配列情報に基づいて、それぞれのタンパク質をコードする核酸を容易に単離することにより得ることができ、または必要に応じて、組換えタンパク質を製造するか、あるいは化学的に合成することにより得ることができる。

【 0 0 7 0 】

エピブラスト又はEpiLCにおいて本発明のPGCLC誘導物質を発現する方法は、特に限定されず、例えば、以下の方法が使用され得る。ここで、「発現」とは、PGCLC誘導物質がBlimp1、Prdm14又はTfap2cをコードする核酸である場合、Blimp1、Prdm14又はTfap2cタンパク質が、核酸からの細胞内(転写及び)翻訳によって製造されることを意味し、PGCLC誘導物質がBlimp1、Prdm14又はTfap2cタンパク質である場合、タンパク質の細胞内導入と同様であることを意味する。

30

【 0 0 7 1 】

前記PGCLC誘導物質がDNAの形態の場合、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体等のベクターを、例えばリポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクション等の方法によって、エピブラスト又はEpiLCに導入してもよい。ウイルスベクターの例としては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター等が挙げられる。人工染色体ベクターの例としては、ヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC、PAC)等が挙げられる。プラスミドの例としては、哺乳動物細胞用のプラスミドが挙げられる。ベクターは、Blimp1、Prdm14又はTfap2cをコードするDNAを発現することができるように、プロモーター、エンハンサー、リポソーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイト等の制御配列を含むことができ、さらに必要に応じて、例えば薬剤耐性遺伝子(例えば、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子等)などの選択可能マーカー配列、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリア毒素遺伝子等、例えば蛍光タンパク質、b-グルクロニダーゼ(GUS)、FLAG等レポーター遺伝子配列等を含み得る。プロモーターとしては、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(ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ)プロモーター、EF - aプロモーター、CAGプロモーター及びTREプロモーター(連続した7つのtetO配列をもつ

40

50

Tet応答要素を有する最小CMVプロモーター)。TREプロモーターを使用する場合、同一の細胞において、tetRおよびVP16ADとの融合タンパク質またはリバース(reverse)tetR(rtetR)およびVP16ADとの融合タンパク質を同時に発現させることが望ましい。。ここで、TREプロモーターを有しリバースtetR(rtetR)及びVP16ADの融合タンパク質の発現を可能とするベクターを、薬剤応答性誘導ベクターと称する。また、プロモーター及びプロモーターと操作可能に連結されたBlimp1、Prdm14又はTfap2cをコードするDNAからなる発現カセットを、エピプラスト又はEpiLCの染色体に導入し、かつ必要に応じてそこから切り離すため、前記ベクターは、発現カセットの前及び後にトランスポゾン配列を有していてもよい。トランスポゾン配列は特に限定されないが、piggyBacを挙げることができる。別の実施態様において、発現カセットを除去するため、発現カセットの前及び後にLoxP配列を有していてもよい。

10

【0072】

前記PGCLC誘導物質がRNAの形である場合、例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション、マイクロインジェクション等の方法により、エピプラスト又はEpiLCに導入してもよい。PGCLC誘導物質がタンパク質の形である場合、リポフェクション、細胞透過性ペプチド(例、HIV由来のTAT及びポリアルギニン)との融合、マイクロインジェクション等の方法により、エピプラスト又はEpiLCに導入してもよい。

【0073】

外来性PGCLC誘導物質は、PGCLC誘導のためエピプラスト又はEpiLCの培養(すなわち、BM P4を含むサイトカインの非存在下で培養)開始から少なくとも3日以内、望ましくは培養開始から1日以内、より望ましくは培養の開始直後に、エピプラスト又はEpiLCに発現させてもよい。PGCLC誘導用の培養を開始してから3日後にPGCLC誘導物質を発現させる場合、PGCLC誘導効率が減少するかもしれない。外来性PGCLC誘導物質の発現が維持される期間は特に限定されないが、望ましくは1日以上、かつ好ましくは10日以下(例、1、2、3、4、5、6、7、8、9又は10日)、より好ましくは1~6日、さらにより好ましくは1~5日、最も好ましくは2~4日(例、2、3又は4日)である。発現を維持する方法は特に限定されないが、PGCLC誘導物質が、例えばプラスミド、RNA又はタンパク質などの、非組込み型でありかつエピソームとして複製しない分子である場合、導入は望ましい期間の間中、複数回行うことができる(例えば、プラスミドの導入については2日毎に1回、RNA又はタンパク質の直接導入については毎日1回)。別の実施態様において、DNAの形であるPGCLC誘導物質(例、ウイルス又は非ウイルスベクター)を、細胞での条件付き発現を可能とする形態で、エピプラスト又はEpiLCに導入してもよい。例えば、薬剤(Tet)応答性誘導ベクターを使用する場合、テトラサイクリン、又はドキシサイクリンのなどのその誘導体を、培地へ所望の期間中追加することによって、発現を維持する方法；トランスポゾン配列を有するベクターを使用する場合、所望の期間の経過後、細胞からPGCLC誘導物質を取り除くためにトランスポゼースを導入することを含む方法；LoxP配列を有するベクターを使用する場合、所望の期間の経過後、細胞からPGCLC誘導物質を取り除くためにCreリコンビナーゼを導入することを含む方法等を、例として挙げることができる。Tet応答性誘導ベクターに換えて、メタロチオネインプロモーターを含有するベクターなどの、他の当分野で公知の誘導ベクターも用いてもよい。

20

30

40

【0074】

DNAの形であるPGCLC誘導物質を、エピプラスト又はEpiLCでの条件付き発現を可能とする形態で導入する場合、PGCLC誘導物質はエピプラスト又はEpiLCの誘導に先立ちエピプラスト又はEpiLCに導入されてもよい。例えば、EpiLC分化誘導前に、PSCにPGCLC誘導物質を導入することができる。EpiLC誘導の出発材料であるPSCがiPS細胞である場合、再プログラム化因子とPGCLC誘導物質を体細胞に共導入することができる。あるいは、関心のあるPGCLCがマウスなどの非ヒト動物の細胞である場合、エピプラストでの条件付き発現を可能とする形態であるPGCLC誘導物質を有するトランスジェニック動物の胚から、エピプラストを単離することができる。同様に、非ヒト動物のPSCは、かかるトランスジェニック動物に由来する適切な細胞ソースから、調製することができる。

50

【 0 0 7 5 】

ヒト治療への臨床応用を考慮すると、PGCLC誘導物質は、腫瘍形成のリスクを避けるため、エピプラスト又はEpiLCのゲノムに組込まれず、染色体外で安定して維持されもしないことが好ましい。従って、好ましい実施態様において、PGCLC誘導物質は、迅速に作製されたPGCLCからの消失を可能とする形態である。この目的のためPGCLC誘導物質として、プラスミド、RNA又はタンパク質が例示されるかもしれない。PGCLC誘導物質がDNAの形である場合、プラスミド、アデノウイルスベクター、センダイウイルスベクター、エピソームベクターなどの非組み込み型ベクターを、好適に使用してもよい。センダイウイルスベクター又はエピソームベクターは、染色体外で比較的長期間維持されるかもしれないので、siRNAによりPGCLCから取り外し可能なセンダイウイルスベクター、又はCre - loxP系によりPGCLCから取り外し可能なエピソームベクターを使用することがより好ましい。あるいは、PGCLC誘導物質を、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター及びトランスポゾンなどの組み込みベクターの形態で、エピプラスト又はEpiLCに導入する場合、ベクターは、Cre - loxP系トランスポゼースにより、作製したPGCLCの染色体から取り外してもよいように設計されることが好ましい。

10

【 0 0 7 6 】

PGCLC誘導のためのPGCLC誘導物質を導入したエピプラスト又はEpiLCの培養は、エピプラスト又はEpiLCをPGC状態へ誘導するために有効な量のBMP4(すなわち、100ng/ml未満、好ましくは50ng/ml未満、より好ましくは10ng/ml未満)を少なくとも含むサイトカインを添加しないことを除いては、WO2012/020687、Cell 146, 519-532 (2011)又はScience 338, 971-975 (2012)に記載されているように行ってもよい。最も好ましくは、培地は、検出可能な量のBMP4を欠く。

20

【 0 0 7 7 】

PGCLC誘導用の基本培地としては、上記のEpiLC誘導において用いるために例示された基本培地(1b-2(ii)を参照)が、同様に、好ましく使用される。培地は、本発明の方法により、正常な精子形成に寄与する能力を有するPGCLCを、一時的な中胚葉プログラムを経ることなく製造することができる限り、EpiLC誘導において用いるために例示されたものと同様の添加物を含有してもよい。

【 0 0 7 8 】

培地は、血清含有又は無血清培地(SFM)であり得る。好ましくは、無血清培地が使用され得る。血清(例えば、ウシ胎児血清(FBS)、ヒト血清等)の濃度は、0~20%、好ましくは0~5%、より好ましくは0~2%、最も好ましくは0%(すなわち、無血清)であり得る。SFMは、KSRなどの任意の血清代替物も含有してもよく、しなくてもよい。

30

【 0 0 7 9 】

本発明のPGCLC誘導用培地は、本発明の方法により、正常な精子形成に寄与する能力を有するPGCLCを、一時的な中胚葉プログラムを経ることなく製造することができる限り、BMP4以外の、LIF、SCF、BMP8b及びEGFなどのサイトカインを含有することができる。好ましくは、培地は、LIFを含有しないか、あるいは少量のLIF(例、300U/ml未満、より好ましくは100U/ml未満)を含有する。より好ましくは、培地は、SCF及び/又はBMP8b及び/又はEGFを含有しないか、あるいは少量をさらに含有する(例、SCFについては、30ng/ml未満、より好ましくは10ng/ml未満;BMP8bについては100ng/ml未満、より好ましくは50ng/ml未満;EGFについては10ng/ml未満、より好ましくは5ng/ml未満)。最も好ましくは、培地は、検出可能量の、BMP4、LIF、SCF、BMP8b及びEGFを欠く。

40

【 0 0 8 0 】

本発明のPGCLC誘導培養においては、エピプラスト又はEpiLCを、例えば、約 $3 \sim 10 \times 10^4$ 細胞/mL、好ましくは約 $4 \sim 8 \times 10^4$ 細胞/mLの細胞密度となるように、自体公知の細胞非接着性又は低接着性の培養器に播種し、約 $30 \sim 40^\circ\text{C}$ 、好ましくは約 37°C で、 $1 \sim 10\% \text{CO}_2 / 99 \sim 90\%$ 大気雰囲気中、導入したPGC誘導物質が発現するための期間、例えば、1~10日、好ましくは1~6日、より好ましくは1~5日、最も好ましくは2~4日(例、2、3又は4日)インキュベーター内で培養する。

50

【 0 0 8 1 】

PGCLCへの分化の事実は、例えば、RT-PCRによりBlimp1の発現を解析すること等により確認することができる。必要に応じて、さらに、他の遺伝子及び細胞表面抗原の発現も検討することができる。他の遺伝子の例としては、Stellaが挙げられる。Blimp1プロモーター及び/又はStellaプロモーターの制御下に、蛍光タンパク質をコードする遺伝子を有する、エピプラスト又はEpiLC(あるいはそれらのソースとしての、胚又はPSC)を、出発材料として使用する場合、PGCLCへの分化の事実は、FACS解析により確認することができる。出発細胞が、ヒト由来のESC又はiPSCなどで、適切なトランスジェニックレポーターをもたない場合、PGCLCで特異的に発現する1つ以上の細胞表面抗原を用いたFACS解析等により、PGCLCへの分化の事実を確認することが好ましい。細胞表面抗原としては、好ましくはSSEA-1及びインテグリン 3が例示される。

10

【 0 0 8 2 】

本発明の、胚から単離したエピプラスト、又はES細胞及びiPS細胞などのPSCから誘導したEpiLCから、PGCLCを製造する方法は、*in vivo*及び*in vitro*においてBMP4を含むサイトカインによるPGC決定に付随して起こる中胚葉プログラムを回避するという点で特徴付けられる。結果として、本発明の方法によると、サイトカインを用いた場合よりも短い期間で、PGCLCを得ることができる。重要なことに、本発明の方法により得られるPGCLCは、*in vivo*でのPGC決定とは異なり、中胚葉プログラムを経ないにもかかわらず、精子形成及び繁殖可能な子孫に対して、サイトカイン誘導PGCLCと同等もしくはより大きく確実に寄与する。

20

【 0 0 8 3 】

(II) EpiLCからのPGCLCの製造用キット

別の形態において、本発明は、EpiLCからのPGCLCの製造用キットを提供する。該キットは、前記本発明のPGCLC誘導物質、すなわち、以下のTF:

- (i) Blimp1、Prdm14及びTfap2c;
- (ii) Blimp1及びPrdm14;
- (iii) Blimp1及びTfap2c;
- (iv) Prdm14及びTfap2c;
- (v) Prdm14;あるいは、

該TFのいずれか又は上記(i)~(v)をコードする核酸(例、該核酸のアルコール沈殿物、凍結TE溶液及び凍結乾燥物等;タンパク質の凍結乾燥物及び適切な緩衝液中に溶解した凍結液等)を含むPGCLC細胞誘導物質、該因子導入用の、前記ベクター、細胞、試薬及び培地を含有し得る。このキットは、PGCLCへの誘導工程について記載しているプロトコル又は説明書をさらに含有してもよい。

30

【 0 0 8 4 】

好ましい実施態様において、本発明の、エピプラスト又はEpiLCからPGCLCを製造するためのキットは、

- (i) Blimp1、Prdm14及びTfap2c;
- (ii) Blimp1及びPrdm14;
- (iii) Blimp1及びTfap2c;
- (iv) Prdm14及びTfap2c;並びに
- (v) Prdm14;

40

から成る群より選択される外来性転写因子をコードする核酸を含む単離したエピプラスト又はEpiLCを含有し、該核酸は、エピプラスト又はEpiLCにおいて条件付き発現を可能とする形態である。キットは、PGCLC誘導物質の発現を誘導するための試薬をさらに含有し得る。該試薬としては、Tet応答性誘導ベクター用のドキシサイクリン(Dox)、メタロチオネインプロモーター制御下のベクター用の金属イオンなどを例示してもよい。

【 0 0 8 5 】

別の好ましい実施態様において、本発明の、PSCからPGCLCを製造するためのキットは、

- (i) Blimp1、Prdm14及びTfap2c;

50

- (ii) Blimp1及びPrdm14;
- (iii) Blimp1及びTfap2c;
- (iv) Prdm14及びTfap2c;並びに
- (v) Prdm14;

から成る群より選択される外来性転写因子をコードする核酸を含有する単離したPSCを含み、該核酸は、PSCから分化したEpiLCにおいて、条件付き発現を可能とする形態である。キットはさらに、ActA並びに任意選択でbFGF及び/又はKSRを含むPSCをEpiLCへ誘導するための試薬;並びにPGCLC誘導物質の発現を誘導するための前記試薬を含有し得る。

【0086】

これに関連して、本発明は、以下の工程I)及びII)を含む、PSCからPGCLCを製造する方法も提供する:

- I) ActAの存在下、任意選択でさらにbFGF及び/又はKSRの存在下で、PSCを培養することによりEpiLCを製造する工程;
- II) 上記の方法のいずれかにより、工程I)で得られたEpiLCをPGCLCへ誘導する工程。該方法はさらに工程III)を含み得る:
- III) 工程II)で得られた細胞から、Blimp1陽性細胞を選択する工程。FACS用の選択マーカーとしては、PGCLCに特異的な表面抗原、SSEA-1、インテグリン-3等を使用してもよい。

【0087】

(III) エピプラスト又はEpiLCに由来する、PGCLCを含む細胞集団

本発明は、前述の工程により製造された、胚から単離したエピプラスト又はPSCから誘導されたEpiLCに由来するPGCLCを含む細胞集団を提供する。細胞集団は、PGCLCの精製された集団であってもよく、PGCLC以外の細胞が1種類以上共存在してもよい。ここで、「PG様細胞(PGCLC)」は、分化誘導前のEpiLCと比較してBlimp1及び/又はStellaの発現上昇を示し、正常な精子形成に寄与する能力を有し、かつ免疫不全マウスに移植した場合にテラトマを形成しない細胞として定義される。上述のように、出発材料として、Blimp1プロモーター及び/又はStellaプロモーターの制御下に蛍光タンパク質をコードする遺伝子を有する胚又はPSCを用いてPGCLCへ誘導する場合、Blimp1及び/又はStella陽性PGCLCは、セルソーターを用いて、前述の工程で得られた細胞集団からソーティングすることにより容易に単離及び精製することができる。PGCLCは、Blimp1及びStellaに付随してその発現が上昇する遺伝子(例、Nanog)の制御下のレポーターをマーカーとして用いたFACSによっても単離及び精製することができる。

【0088】

(IV) 多能性幹 (pluripotent stem) 細胞に由来するPGCLCの使用

本発明の、胚から単離したエピプラスト又はPSCから誘導されたEpiLCに由来するPGCLCは、様々な目的のために使用することができる。例えば、レシピエント動物の精巣に移植されたPGCLCは、精巣における精子形成及び健康な子孫の発生に確実に寄与することができるので、不妊又は生殖組織の遺伝性疾患の治療に使用することができる。

【0089】

PGCLCの精巣への移植は、PGCLCを用いWO2012/020687又はCell 146, 519-532 (2011)に記載されているものと同様の方法で行うことができる。

【0090】

本発明のPGCLCは、卵子形成にも使用することができる(Science 338, 971-975 (2012)を参照)。

【0091】

本発明のPGCLC(PGCLCを含む細胞集団を含む;以下に同じ)は、非経口製剤、好ましくは、従来手段により医薬上許容可能な担体を混合した注射剤、懸濁剤又は点滴剤などとして製造される。非経口製剤が含有することができる医薬上許容可能な担体の例としては、生理食塩水、並びにグルコース及び他の補助薬を含有する等張液(例、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウム等)などの注射用の水性液体を挙げられる。本発明の剤

10

20

30

40

50

は、例えば、緩衝剤(例、リン酸緩衝溶液、酢酸ナトリウム緩衝溶液)、無痛化剤(例、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン等)、安定剤(例、ヒト血清アルブミン、ポリエチレン・グリコール等)、保存剤、酸化防止剤等と共に調合してもよい。

【0092】

本発明の剤を、水性懸濁液として調製する場合、PGCLCは、約 1.0×10^6 ~ 約 1.0×10^7 細胞/mlの細胞密度となるよう前記水性液体の1つに懸濁する。

【0093】

本発明の剤は、幹細胞の凍結保存に通常使用される条件下で、凍結保存することができ、使用直前に融解させることができる。

【0094】

このように得られた調製物は、安定で毒性が低いため、ヒトなどの哺乳動物に安全に投与することができる。精子形成に使用する場合、投与の方法は特に限定されないが、製剤は、好ましくは、精細管への注射又は点滴により投与される。雄性不妊患者用については、例えば、通常、投与量当たりのPGCLC量に基づき約 1.0×10^5 ~ 約 1×10^7 細胞の量の剤を、単回又は約1~2週間間隔で2~10回投与することが簡便である。

【0095】

以下に、後述の実施例により本発明をより具体的に記載するが、本発明は後述の実施例によって何ら限定されるものではない。

【実施例】

【0096】

方法

1. 動物

【0097】

全ての動物実験は、京都大学の動物実験ガイドラインに従って行った。BVSCトランスジェニックマウス(C57BL/6バックグラウンド、Acc. No. BV, CDB0460T; SC CDB0465T : <http://www.cdb.riken.jp/arg/TG%20mutant%20mice%20list.html>)は、以前に報告したように確立した(Reproduction 136, 503-514 (2008))。B6;129-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(rtTA^{M2})^{Jae}Col1a1^{tm2(tetO-Pou5f1)}^{Jae}/Jマウス(Cell 121, 465-477 (2005))(stock number: 006911)はJackson Laboratoryより購入した。WBB6F1-W/W^vマウスはSLC(静岡、日本)より購入した。}

【0098】

2. ESCの樹立

Rosa26 - rtTAノックインアレルのホモ接合マウスは、両遺伝子座のヘテロ接合マウスB6;129-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(rtTA^{M2})^{Jae}Col1a1^{tm2(tetO-Pou5f1)}^{Jae}/Jの掛け合わせにより得た。それらをBVSCトランスジェニックマウスと交配させ、胎生期(E)2.5で、胚盤胞を回収した。BVSC - R26rtTA ESCを、PCR遺伝子型決定により選択して樹立し、N2B27「2i+LIF」条件下で維持した(Nature 453, 519-523 (2008))。本研究においては雄性細胞株を使用した。}

【0099】

3. キメラ形成試験

BVSC - R26rtTA ESCをトリプシン処理し、単一細胞懸濁液を調製した。ICR(アルビノ)雌マウスから得たE3.5胚盤胞の胞胚腔に、ピエゾ駆動マイクロマニピュレーターを用いて、およそ15個のESC/胚を注入した。注入された胚を、E2.5の偽妊娠したICR雌マウスの子宮に移植した。キメラマウスは、E18.5で帝王切開により分娩された。キメリズムは、毛色によって決定した。生殖系列への寄与を確認するため、ICR雌マウスとの試験交配を行った。

【0100】

4. ベクター構築

マウスBlimp1コード配列(CDS)(エクソン3のATGから)及びTfap2c変異体1(Accession number: NM_009335.2)CDSを、それぞれ、SalI - AviTag - XhoI及びNotIサイト並びにNotI及び

10

20

30

40

50

EcoRIサイトで挟み、PCRによりクローニングした。Prdm14CDSは、AG - P14により得た(Cell Stem Cell 12, doi: 10.1016/j.stem.2012.12.012 (2013))。

【 0 1 0 1 】

Sall - Kosak - Avi - Blimp1 - NotIカセットを、pPyCAG - cHA - IPプラスミド(Mol Cell Biol 22, 1526-1536 (2002))のXhoI/NotIサイトにサブクローニングし、このカセットをpENTR1A Dual Selectionベクター(Invitrogen)のEcoRI/NotIサイトに再度サブクローニングした。Prdm14及びTfap2cについて、KpnI - Kosak - 3×FLAG - XhoI - G4S_Linker - SpeI及びBamHI - Kosak - V5 - G4S_Linker - NotI断片のそれぞれを、PCR又は合成オリゴヌクレオチドリンカーのライゲーションにより、N末端に付加した。3×FLAG - Prdm14及びV5 - Tfap2cカセットを、pENTR1AのKpnI/NotI及びBamHI/EcoRIサイトに、それぞれサブクローニングした。最後に、それらを、LRクロナーゼII酵素ミックス(Invitrogen)を用いて、PB - TETデスティネーションベクター(Addgene)(Nature 458, 766-770 (2009))に移動させた。pPB CAG - hphを構築するために、SpeI及びEcoRI(平滑化した(filled))の消化によりpCAGGSプラスミドから得られるCAGプロモーター断片を、SpeI/MscIで消化したGG131ベクター(Development 137, 3185-3192 (2010); Gene 108, 193-199 (1991))に挿入した。PCR又はオリゴヌクレオチド合成により操作した全ての配列を確認した。全ての付加配列を表1に示し、クローニング用のプライマー配列を表2に記載する。

【 0 1 0 2 】

【表1】

Sall-Kosak-AviTag-XhoI(*Blimp1* Exon3 ATG)

GTCGACGCCACCATGTCCGGCCTGAACGACATCTTCGGCGCTCAGAAAATC
GAATGGCACGAACTCGAG-(ATG)

KpnI-Kosak-3×FLAG-XhoI-G4S_Linker-SpeI(*Prdm14* ATG)

GGTACCGCCACCATGGACTACAAGGACCACGACGGAGATTATAAGGATCAC
GATATCGACTATAAGGATGACGACGATAAGCTCGAGTCTGGTGGCGGTGGCT
CGGGCGGAGGTGGGTCTGGGTGGCGGGATCAACTAGT-(ATG)

BamHI-Kosak-V5-G4S_Linker-NotI(*Tfap2c* ATG)

GGATCCGCCACCATGGGCAAGCCCATCCCTAACCCCTCTGCTGGGCCTGGA
CAGCACCTCTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGAGGTGGGTCTGGGTGGCGGCG
GATCAAGCGGCCGC-(ATG)

【 0 1 0 3 】

【表2】

Sall-	GCGGTTCGACGCCACCATGTCCGGCCTGAA
Kosak+A11+A2:B19+A2:C21	CGACATCTTCGGCGCTCAGAAAATCGAATG
+A2:B19	GCACGAACTCGAGATGAAAATGGACATG
Blimp1-2568TAG-NotI_R2	GCGGCGGCCGCCTAAGGATCCATCGGTTC AACTGT
NotI_Tcfap2c_var1_F	AAAGCGGCCGCATGTTGTGGAAAATAAC
Tfap2c_var1_EcoRI_R	ATAGAATTCTTACTTCCTGTGCTTTT
Avi-Blimp1_qF1	TGGTGCCTGTAAAGGTCAAAC
Avi-Blimp1_AttB2_qR1	GGCGGAATTAGCTTATCGAC
3xFLAG-Prdm14_qF1	TCCTGGATCAAGAGGCTTTC
3xFLAG-Prdm14_AttB2_qR2	ACTAGCTAGAGCGGCCATCAC
V5-Tfap2c_qF1	ATTCCAGCAAGACGATGGAG
V5-Tfap2c_AttB2_qR1	GGCGGAATTAGCTTATCGAC
b-geo_qF1	GCTTGCCGAATATCATGGTG
b-geo_qR1	CTTCAGCAATATCACGGGTAGC
Blimp1_CDS_qF1	GCCCACCTGCAGAAACTACTAC
Blimp1_CDS_qR1	CCAGAATGCAATCGAAGGTG
Prdm14_CDS_qF1	CTTCCAGCCTGAACAAGCAC
Prdm14_CDS_qR1	GGAGTATGCTGGAGGCAGTG
Tfap2c_CDS_qF1	CCACGCGGAAGAGTATGTTG
Tfap2c_CDS_qR1	GTTGTTCCCGTTGGGTGTC

【0104】

5. トランスフェクション及びサブクローンの選択

BVSC - R26rtTA ESCに、「2i+LIF」条件下、60mmディッシュ中フィーダー細胞(マウス胚性線維芽細胞)上で、Lipofectamine2000(Invitrogen)を用いてキーとなる因子pPBCAG - hp h及びpCAGGS - mPBを含有するPB - TETベクターを、トランスフェクトした。ベクターDNAの全量は、8 µgより低かった。ハイグロマイシンB(150 µg/ml)(Sigma)でトランスフェクタントを選択し、PCRを用いて導入遺伝子についての遺伝子型を同定した。遺伝子型同定用のプライマー配列を表3に示す。

【0105】

【表3】

遺伝子型	
Avi-Blimp1_F3	AAATCGAATGGCACGAACTC
Avi-Blimp1_R2	GCATCCAGTTGCTTTTCTCC
3xFLAG-Prdm14_F2	ATCGACTATAAGGATGACGAC
3xFLAG-Prdm14_R1	GAGGTTCTAAAGTGAAGTGTAG
V5-Tfap2c_F1	ATGGGCAAGCCCATCCCTAACCT
V5-Tfap2c_R3	AAGGAGGCGGCTGGTACTCTGCAAC
Blimp1-mVenus_F	ACTCATCTCAGAAGAGGATCTG
Blimp1-mVenus_R	CACAGTCGAGGCTGATCTCG
Stella-ECFP_F	CGAGCTAGCTTTTGAGGCTT
Stella-ECFP_R	AACTTGTGGCCGTTTACGTC
Rosa-rtTA	
olMR8545_F	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT
olMR8546_R	GGAGCGGGAGAAATGGATATG
olMR8052_R	GCGAAGAGTTTGTCTCAACC

10

20

30

40

50

【 0 1 0 6 】

6. サザンブロッティング

ゲノムDNA8マイクログラムを単離し、BamHIで消化した。DNA断片を0.7%アガロースゲル中で電気泳動し、Hybond N+(GE healthcare)に移し、UV架橋した。-geoプローブをPB-TETのRsrII/SmaI消化により得て、³²P(PerkinElmer)でランダムプライマーDNA標識キットVer.2.0(TaKaRa)により標識し、Illustra ProbeQuantスピンカラム(GE Healthcare)を用いて精製した。放射性同位体画像を、BASシステム(富士フィルム)を用いて、取り込んだ。

【 0 1 0 7 】

7. TF - 及びCk - PGCLC

トランスフェクトしたESCを、誘導に先立ち、無フィーダー条件に適応させた。EpiLC分化は、以前に報告した(Cell 146, 519-532 (2011))ように行った。分化の36時間後に細胞を採取し、凝集させるよう(2,000細胞/ウェルで開始した)、1.5 µg/ml Dox(Clonetech)を含むGK15中リピジュアコート96ウェルプレート(NOF)で培養した。以前に記載した(Cell 146, 519-532 (2011))ように、BMP4(500ng/ml)、BMP8A(500ng/ml)、SCF(100ng/ml)、LIF(1000U/ml)及びEGF(50ng/ml)により、PGCLCを誘導した。LDN193189(120pM;Stemgent)は、Dox又はCkと同時に添加した。基底状態のESCからの凝集塊も、上記のように、Doxを含むGK15中で培養した。

【 0 1 0 8 】

8. 逆転写(RT)及びQ - PCR

内因性転写産物を評価するために、TF誘導BV陽性細胞を、図1c及び図7bに示すゲートを用いて2日目(d2)及び4日目(d4)でFACSソーティングした。d2 CK - PGCLC及びd4 CK - PGCLCのために使用したソーティングゲートを、図9aに示す。凝集塊は、特別に定めのない限り、トリプシン処理し、まとめて溶解した。全RNAを、RNeasy micro(QIAGEN)を用いて精製し、oligo - dTプライマーが用意されたSuperScriptIII(Invitrogen)を用い、製造者の説明書に従ってRTを行った。Power SYBR(Applied Biosystems)及びCFX384(BioRad)を用いて、リアルタイムPCRを行った。遺伝子発現レベルを、Arbp及びPpia14の平均Ct値で標準化(Mech Dev 113, 91-94 (2002))した Ct(log₂スケール)として示す。内因性転写産物を外来性のものから判別するため、oligo - dTプライマー(Invitrogen)及び関心のあ

る遺伝子特異的なプライマーのいずれをもRTに使用し、RTプライミング部位及び増幅領域間の距離の差によるRTバイアスを減少させた。鋳型として対応する単位複製配列を内部に有するpGEM - T - Easyプラスミドを用いて、新しく設計したプライマーセットの増幅効率を決定した。内因性及び外来性のいずれの発現レベルをも検証するため、CDSプライマーを用いて標本を同時に試験した(データは示さない)。プライマー配列を表4に記載する(Biol Reprod 75, 705-716 (2006); Nucleic Acids Res 34, e42 (2006))。

【 0 1 0 9 】

10

20

30

【表4】

定量的RT-PCR	
<i>Blimp1_F</i>	AGCATGACCTGACATTGACACC
<i>Blimp1_R</i>	CTCAACACTCTCATGTAAGAGGC
<i>Prdm14_F</i>	ACAGCCAAGCAATTTGCACTAC
<i>Prdm14_R</i>	TTACCTGGCATTTCATTGCTC
<i>Tfap2c_F</i>	GGGCTTTTCTCTCTTGGCTGGT
<i>Tfap2c_R</i>	TCCACACGTCACCCACACAA
<i>Nanos3_F</i>	CACTACGGCCTAGGAGCTTGG
<i>Nanos3_R</i>	TGATCGCTGACAAGACTGTGGC
<i>stella_F</i>	AGGCTCGAAGGAAATGAGTTTG
<i>stella_R</i>	TCCTAATTCTTCCCGATTTTCG
<i>Pou5f1_F</i>	GATGCTGTGAGCCAAGGCAAG
<i>Pou5f1_R</i>	GGCTCCTGATCAACAGCATCAC
<i>Sox2_F</i>	CATGAGAGCAAGTACTGGCAAG
<i>Sox2_R</i>	CCAACGATATCAACCTGCATGG
<i>Nanog_F</i>	CTTTCACCTATTAAGGTGCTTGC
<i>Nanog_R</i>	TGGCATCGGTTTCATCATGGTAC
<i>Dnmt3a_F</i>	GACTCGCGTGCAATAACCTTAG
<i>Dnmt3a_R</i>	GGTCACTTTCCTCACTCTGG
<i>Dnmt3b_F</i>	CTCGCAAGGTGTGGGCTTTTGTAAAC
<i>Dnmt3b_R</i>	CTGGGCATCTGTCATCTTTGCACC
<i>Hoxa1_F</i>	GTGACTAGTCTTCTGCATGTCCG
<i>Hoxa1_R</i>	TCTGCTCTGGACCACATCACTC
<i>Hoxb1_F</i>	GATCCTACAGGTCTTGGGACC
<i>Hoxb1_R</i>	AGCTCAAAGGCACTGAACTGAG
<i>T_F</i>	ATCAGAGTCCTTTGCTAGGTAG
<i>T_R</i>	GTTACAATCTTCTGGCTATGC
<i>Gata6_F</i>	CACAGTCCCCGTTCTTTTACTG
<i>Gata6_R</i>	GTGGTACAGGCGTCAAGAGTG
<i>Arbp_F</i>	CAAAGCTGAAGCAAAGGAAGAG
<i>Arbp_R</i>	AATTAAGCAGGCTGACTTGGTTG
<i>Ppia_F</i>	TTACCCATCAAACCATTCTTCTG
<i>Ppia_R</i>	AACCCAAAGAACTTCAGTGAGAGC

【0110】

9. LacZ染色

12時間において、細胞凝集塊をトリプシン処理し、2%パラホルムアルデヒド及び0.2%グルタルアルデヒドで固定した。Cytospin4(Thermo Scientific)を用いて固定した細胞を広げ、LacZ染色溶液で一晩染色した(Nature 458, 766-770 (2009))。

【0111】

10. フローサイトメトリー解析及びセルソーティング

細胞凝集塊から標本の調製は、本質的には、以前に記載した(Cell 146, 519-532 (2011))ように行った。蛍光活性化セルソーティング(FACS)は、FACS Aria又はFACS Aria III(BD)セルソーターを用いて行った。BV及びSC蛍光は、それぞれFITC及びAmCyan Horizon V500チャンネルで検出した。FACSDiva(BD)又はFlowjo(Tree Star Inc.)ソフトウェアで、データを解析した。

【0112】

11. 免疫蛍光染色

BV陽性細胞は、BP14A誘導4日目凝集塊から、図9cに示すゲートを用いてソーティングし、EpiLCと1:1の比で混合して、MASコートのスライドガラスに広げた。免疫蛍光染色は

10

20

30

40

50

、以前に報告した(Cell 146, 519-532 (2011))ように行った。本研究において使用した一次抗体(Ab)は、以下のとおりであった:抗GFP(ラット、モノクローナルAb(MAb);Nacalai Tesque)、抗DNMT3B(マウス、MAb;Imgenex)、抗H3K27me3(ウサギ、ポリクローナルAb(pAb);Millipore)及び抗H3K9me2(ウサギ、pAb)。二次抗体は以下のとおりであった:Alexa Fluor 568抗ウサギIgG、Alexa Fluor488抗ラットIgG及びAlexa Fluor647抗マウスIgG(3つ全てInvitrogenより)。画像は、共焦点レーザー走査型顕微鏡(Olympus FV1000)を用いて取り込んだ。

【0113】

12. 亜硫酸水素塩配列決定

ゲノムDNAを単離し、EpiTect亜硫酸水素塩キット(QIAGEN)を用いて、製造者の説明書に従い亜硫酸水素塩処理を行った。Snrpn及びH19のメチル化可変領域は、以前に報告された(Genomics 79, 530-538)ようにPCRにより増幅した。配列を決定し、QUMA(<http://quma.cdb.riken.jp/top/index.html>)(Nucleic Acids Res 36, W170-175 (2008))で解析した。

【0114】

13. cDNA増幅及びマイクロアレイ解析

図9aの赤の長方形で囲まれた細胞は、FACSによりソーティングした。ここで留意すべきは、2日目でのCK-PGCLC及びTF-PGCLCのソーティングにおいてバックグラウンドレベルが異なったことである。全RNA単離、逆転写及びcDNAの増幅は、以前に記載した(Cell 146, 519-532 (2011); Nucleic Acids Res 34, e42 (2006))ように行った。GeneChipマウスゲノム430_2.0アレイ(Affimetrix)で標本を解析した。データを、dChipで標準化し、log₂スケールで示す(Proc Natl Acad Sci U S A 98, 31-36 (2001))。解析用のプローブ選択基準は、以下のとおりであった:(1)最大発現スコア 8、(2)最大差次的発現レベル 2、(3)遺伝子に対する複数のプローブがある場合、プローブ間の最高平均発現レベル。既報のデータ(GSE30056(GSM744095-GSM744096, GSM744101-GSM744104))を、解析に含めた(Cell 146, 519-532 (2011))。私たちは、4,479のプローブを選択し、R(バージョン2.15.1)(R Development Core Team, R Foundation for Statistical Computing, 2012)を用いて主成分分析(PCA)を行った。差次的遺伝子発現分析のため、私たちは、以下の基準に従い、生物学的デュプリケート(duplicates)又はクアドロプリケート(quadruplicates)を平均し、「コアPGC遺伝子」(図9b、上)及び「壁側中胚葉遺伝子」(補足図9b、下)を選択した。「コアPGC遺伝子」は、i)BP14A誘導2日目において、EpiLC及びDox使用2日目の親クローンのいずれと比較しても、4倍より多く上方制御され;ii)E9.5PGCにおいて下方制御されない(差次的発現レベルが、BP14A誘導2日目のものと比較して、2倍未満大きい)ものであった。「壁側中胚葉遺伝子」は、PGCLC d2において、EpiLC及びBP14A誘導2日目のいずれと比較しても、少なくとも4倍の上方制御を示した。代表的な遺伝子を明記する。

【0115】

14. 精細管注入

指定した細胞集団をFACSによりソーティングした後、基本的には以前に記載された(Development 132, 117122 (2005))ように、W/W^yマウス(7dpp)の新生仔の精巣に、1×10⁴細胞/精巣を注入した。必要に応じて免疫抑制のため、抗マウスCD4抗体(50mg/投与量、クローンGK1.5;eBioscience又はBiolegend)を、0日目、2日目又は4日目に、腹腔内に注入した(Biol Reprod 68, 167-173 (2003))。注入10週後に、移植された精巣を解析した。ヘマトキシリン及びエオジン染色のため、精巣標本をブアン溶液で固定し、パラフィンに包埋し、薄片にした。

【0116】

15. 卵細胞質内精子注入法(ICSI)

基本的には以前に報告された(Biol Reprod 52, 709-720 (1995))ように、ICSIを行った。簡潔には、精子形成コロニーを有する精細管を穏やかに刻み、精原細胞懸濁液を調製した。精子を、BDF1マウスから回収した卵母細胞に注入した。in vitro胚培養後、2細胞期胚をE0.5偽妊娠マウス(ICR)の卵管に移した。仔は、E18.5で帝王切開により分娩された。遺伝子型決定PCRに使用したプライマー配列を表3に記載する。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 7 】

結果

私たちは、mVenus及びECFPをそれぞれBlimp1及びstella(Dppa3/Pgc7としても知られる)制御要素の制御下で発現し(BVSC)(Reproduction 136, 503-514 (2008))、構成的に活性なRosa26遺伝子座の制御下で、リバーステトラサイクリン調節性トランス活性化因子(rtTA)(Cell 121, 465-477 (2005))(BVSCR26rtTA ESC)(図1a)を発現するESCを得た。マウスの発生期間中、Blimp1の発現は、PGC決定の始まりを意味する一方で、stellaは確立したPGCにおいて発現を開始し、in vivo及びin vitroのいずれにおいても、BVSC発現はPGCの決定及び発生の信頼できる指標である(Cell 146, 519-532 (2011); Science 338, 971-975 (2012); Reproduction 136, 503-514 (2008))。私たちは、テトラサイクリン制御要素(TRE)の制御下でBlimp1、Prdm14又はTfap2cを発現するpiggybackトランスポゾンベースのベクターを構築し、これらのベクターをBVSCR26rtTA ESC(XY核型)(図5a~c)に組込んで、3つ全てのTF(BVSCR26rtTA BP14A細胞)、3つのTFのうち2つ(BVSCR26rtTA BP14、BA及びP14A細胞)又は3つのTFのうち1つ(BVSCR26rtTA B、P14及びA細胞)の導入遺伝子を有するBVSCR26rtTA ESCを単離した(図1a、5d及び5e)。

10

【 0 1 1 8 】

私たちは、まず、3つのTFの同時強制発現がEpiLCを生殖細胞運命へ誘導するか否かを検討した。私たちは、BVSCR26rtTA BP14A細胞(以下、BP14A細胞、Line3-3)をEpiLCへ誘導し、その後、関連するサイトカインの非存在下、テトラサイクリンアナログであるドキシサイクリン(Dox, 1.5 µg/ml)を用いてあるいは用いずに、~2,000EpiLCの浮遊凝集塊を作製した(図6a)。Doxを用いないEpiLCの浮遊凝集塊は、6日間にわたってBVSCの発現を示さなかった(図1b)。反対に、Doxを用いたものは、驚くべきことに、早ければDox処理の2日目(d2)に強いBVSCの発現を示した(図1b)。私たちは、Doxが外来性のTFを迅速にかつ高レベルでほぼ全てのEpiLCにおいて誘導したことを確認した(図6b、c)。

20

【 0 1 1 9 】

蛍光活性化セルソーティング(FACS)により、Dox処理の2日目において、該細胞の~80%より多く及び~30%より多くが、それぞれBV及びSCを発現し(図1c)、BVSC誘導の効率、Doxの量依存的である(図6d、e)ということが明らかになった。とりわけ、DoxによるBVSCの誘導は、サイトカインによるものよりも、はるかに高効率でかつ早かった:最も典型的には、サイトカイン(BMP4、LIF、BMP8A、SCF、EGF)は、強いBV及びSCを、それぞれおよそ2日目及び4日目に誘導する(Cell 146, 519-532 (2011); Science 338, 971-975 (2012))(図6f)。

30

【 0 1 2 0 】

Doxにより誘導されたBVSC陽性細胞は、増殖を示し、4日目まで持続したが、それ以降は減少した(図1b)。他のBP14A系統(Line3-6、3-10)も、Doxにより類似したBVSC誘導を示した(図7a、c)。

【 0 1 2 1 】

これらの知見は、Doxにより誘導された3つのTF、BLIMP1、PRDM14及びTFAP2Cが、EpiLCにおいて、BVSC導入遺伝子の素早く強い活性化に十分であることを実証した。

【 0 1 2 2 】

私たちは、次にTF(BP14A)誘導BV陽性細胞において、96時間の過程における、PGC決定に関連する遺伝子の発現をQ-PCRにより検討しようと試みた。

40

【 0 1 2 3 】

私たちは、まず、誘導した細胞凝集塊全体において、外来性TFの強い誘導が、内因性のBlimp1、Prdm14及びTfap2cの活性化に先行することを確認した(図8a、b)。私たちは、サイトカインがBV陽性細胞を誘導する場合のように、TFによって、PGC決定のキーとなる遺伝子(Blimp1、Prdm14、Tfap2c、Nanos3、stella、Pou5f1、Sox2、Nanog)の上方制御及びキーとなるエピジェネティックな修飾因子(Dnmt3a及びDnmt3b)の下方制御を示すBV陽性細胞が誘導されることを見出した(図1d)。興味深いことに、in vivoにおいてもPGC決定の間にみられる、Hoxa1、Hoxb1及びT(Brachyury)(Nature 418, 293-300 (2002); Biol Reprod

50

75, 705-716 (2006); Genes Dev 22, 1617-1635 (2008))などのキーとなる中胚葉遺伝子の一時的な上方制御とそれに続く抑制がみられた(Cell 146, 519-532 (2011))サイトカイン誘導BV陽性細胞と反対に、TF誘導BV陽性細胞は、これらの遺伝子の一時的な上方制御がみられず、むしろこれらの発現が低レベルで継続するか全くみられないことに、私たちは気が付いた(図1d)。

【 0 1 2 4 】

これらの知見により、TF(BP14A)誘導BV陽性細胞は、PGCと同様の転写プログラムを獲得するが、それらは、*in vivo*におけるPGC決定の間及びサイトカインによるPGCLC誘導のいずれにおいても明白である一時的な中胚葉プログラムの獲得を欠くことが示唆される(下記を参照)。

【 0 1 2 5 】

私たちは、次に、3つのTFのうちの2つの強制発現又は3つのTFのうちの1つの強制発現が、EpiLC浮遊凝集塊中に、BVSCを誘導するか解析した(私たちは、各TFの組み合わせについて及び各TFについて、少なくとも3つの独立した系統を評価した)。

【 0 1 2 6 】

私たちは、3つのTFと比較して全てより低効率ではあるものの、P14A、それほどではないにせよBP14及びBA、並びに際立ってPrdm14単独により、BVSCが活性化したことを見出した(図7a~c)。私たちは、BA誘導凝集塊(3系統のうち2つ)が幾分脆弱に見え小さいままであり(図7a)、Blimp1又はTfap2c単独の強制発現がBVSCを活性化しなかったことを確認した(図7a~c)。

【 0 1 2 7 】

私たちは、全ての系統が、Dox処理中、本質的に一様な外来性TFの誘導を示すことを確認した(図8c~g)。Dox処理中に、BVSCR26rtTA P14細胞においての外来性Prdm14のものと同等に高いレベルに、外来性Blimp1を発現するBVSCR26rtTA B細胞を単離することができなかつたという点に注目すべきである(図8d)。

【 0 1 2 8 】

2つのTF(P14A、BP14、BA)及び単一のTF(Prdm14)は、3つのTF(BP14A)誘導BV陽性細胞のものと非常によく似た遺伝子発現動態を示すBV陽性細胞を誘導し(図7d)、いったんPGC決定のキーとなる転写回路が活性化すると、誘導された細胞が似た転写プロファイルを獲得することが示唆される。

【 0 1 2 9 】

私たちは、その次に、BVSC誘導率と外来性TF発現のレベルとの間の関連を決定した。図1e(図7c及び8dに基づいたデータ)に示すように、BP14Aは、同じような全外来性TF転写産物レベルであるP14A又はBA又はP14よりもはるかに高効率にBVSCを誘導し、EpiLCにおけるPGC様転写プロファイルの活性化に対し、Blimp1、Prdm14及びTfap2cが相乗的な効果を示すことが示唆された。

【 0 1 3 0 】

TFがサイトカインシグナリング、特にBMP4シグナリングを活性化し、回りまわってEpiLCをPGC様状態へ誘導するという可能性を除外するため、私たちは、BMP4シグナリング阻害剤[アクチビン受容体様キナーゼ2/3(ALK2/3)阻害剤、LDN193189]を用いて又は用いずに、EpiLCにおいてBP14Aを誘導した。

【 0 1 3 1 】

図2aに示すように、LDN193189は、BMP4によるEpiLCにおけるBV誘導を高効率に妨げたが、BP14AによるBVSC誘導へは効果がなかった。Q-PCR解析により、LDN193189はBMP4によるBlimp1及びPrdm14誘導を阻害したが、BP14Aによるものは阻害しない(図2b)ことを確認し、TFによるPGC様状態の誘導は、TFによるPGCプログラムの直接的な活性化に起因することが実証された。

【 0 1 3 2 】

私たちは、その後、TFによるPGC様状態の誘導が、エピジェネティックなバックグラウンドとして、EpiLC状態を必要とするか否かを検討した。BP14AはEpiLCを確実にPGC様状態

10

20

30

40

50

へ誘導したが、ESCにおけるBP14A誘導は、幾分特異な表現型、BVを伴わない非常に強いISC活性化をもたらした(図2c、d)。

【 0 1 3 3 】

私たちは、従って、適切なエピジェネティックバックグラウンドが、TFによるPGC様状態の強い誘導に必須であることを結論付ける。

【 0 1 3 4 】

TF誘導PGC様細胞(以下TF - PGCLCという)の特性をさらに十分に特徴付けるため、私たちは次に、TF - PGCLC[BP14A(d2及びd4)、BP14(d2)、P14A(d2)、P14(d2)により誘導されたBV陽性細胞]のグローバル転写プロファイルをマイクロアレイ解析により決定し、それらを、*in vivo*のPGC[胎生期(E)9.5のPGC]、及びサイトカインで誘導したd2、d4及びd6PGCLC(以下Ck - PGCLCという)のものと比較した(図9a)(Cell 146, 519-532 (2011))。

10

【 0 1 3 5 】

TFの組み合わせ又はTFの誘導期間に関わりなく、全てのTF - PGCLCが、d4及びd6 Ck - PGCLC並びにそれほどではないにせよE9.5PGCのトランスクリプトームとも似ている、類似のトランスクリプトームを有するということが主成分分析(PCA)により明らかになり(図3a)、外来性TFが、類似のPGC様状態を作る、PGC決定のキーとなる内因性転写回路を、外来性TFの組み合わせに依存するさまざまな効率において活性化するという発想が裏付けられた。

【 0 1 3 6 】

TF誘導PGC様状態への適切なエピゲノムの必要性と一致して(図2c、d)、ESCにおいてBP14Aにより誘導されたSC陽性細胞のトランスクリプトームは、TF/Ck - PGCLC及びPGCのものとは、明らかに異なっており、ESCのものと近かった(図3a)。とりわけ、d2 Ck - PGCLCは、TF - PGCLC、d4及びd6 Ck - PGCLC並びにE9.5PGCのものと大幅に異なるグローバル転写プロファイルだが、E5.75エピプラストのものとにより似たプロファイルを示し、d2 Ck - PGCLCは、EpiLC/エピプラスト状態からPGC様状態の獲得への一時的な状態を表すことが示唆された(図3a)。

20

【 0 1 3 7 】

私たちは、EpiLC/外来性TFを有さないがDoxで処理したコントロールEpiLCにおけるものと比較し、d2 TF(BP14A) - PGCLCにおいて上方制御された個別の遺伝子に目を向け、Blimp1(内因性)、Prdm14(内因性)、Tfap2c(内因性)、stella、Sox2、Klf2、Tcl1、Esrrb、Elf3、Kit、Lifr、Nr5a2、Gjb3、Tdh、Spnb3、Pygl、Mbp、Mtap7、Npnt及びAU015386などの遺伝子が強い上方制御を示すことを見出した:これら全ての遺伝子(「コアPGC遺伝子」)が、d4及びd6 Ck - PGCLC並びにE9.5PGCにおいても上方制御された(図9b)。

30

【 0 1 3 8 】

私たちは、次に、EpiLCにおけるものと比較して、d2 Ck - PGCLCにおいて上方制御を示したが、d2 TF - PGCLCにおいては示さなかった遺伝子を検討し、この解析から、Hoxa1、Hoxb1、Hoxb2、Evx1、T(Brachyury)、Cdx1、Cdx2、Hand1、Snai1、Mesp1、Id1、Msx1、Msx2、Nkx1.2、Isl1、Mixl1、Rspo3、Wnt5a、Fgf8及びBmp4遺伝子(これら(「壁側中胚葉遺伝子」)の全てがおおよそE6.75 ~ E7.25のPGC前駆細胞において一時的な上方制御を示し、かつ壁側中胚葉プログラムを表す(Genes Dev 22, 1617-1635 (2008)))が、d2 Ck - PGCLCにおいて一時的に上方制御されるが、d2 TF - PGCLCにおいては上方制御されず、E9.5PGCと同様にこれらの遺伝子がd4及びd6 Ck - PGCLCにおいても下方制御されたことを明らかにした(図9b)。

40

【 0 1 3 9 】

まとめると、これらの知見は、BMP4によるPGC決定により、キーとなるPGCプログラム及び壁側中胚葉プログラムのいずれもが活性化され、後者は最終的には前者により抑制されること、及び、キーとなるTFの直接的な活性化により、キーとなるPGCプログラムがEpiLCに授けられるが壁側中胚葉プログラムはされないことのゲノムワイドスケールの証拠を提供する。

【 0 1 4 0 】

私たちは、次に、TF - PGCLCのエピジェネティックなプロファイルを評価した。免疫蛍

50

光解析により、排他的にDNMT3B陽性であったEpiLCと比較して、BV陽性d4 TF - PGCLCは、DNMT3Bが陰性であったかあるいは極めて弱く、ヒストンH3リシン9のジメチル化(H3K9me2)のレベルの減少及びH3K27のトリメチル化(H3K27me3)のレベルの上昇を示したことが明らかになった(図3b、図9c)。亜硫酸水素塩配列決定による刷り込み状態の解析は、BV陽性d4 TF - PGCLCが、父性インプリントを受けたH19及び母性インプリントを受けたSnrpnについて、インプリントを保持することを示した(図3c)。

【0141】

これらの知見は、BV陽性d4 TF - PGCLCが、d6 Ck - PGCLC及びE8.5~E9.5の移動するPGCと同様のエピゲノムを獲得することを示唆する(Cell 146, 519-532 (2011); Development 134, 2627-2638 (2007))。

【0142】

Dox除去の際、TF - PGCLCは外来性TFを遮断されるが、それらの内因性転写プログラム継続するはずであり、従って、適切な精子形成用の前駆細胞として提供してもよい。

【0143】

この可能性を調査するため、私たちは、BP14AによりTF - PGCLCを誘導し、BV陽性細胞(d3、d4及びd6において)(図4a)を精製して、内因性生殖細胞欠損W/W^yマウス(Cell 146, 519-532 (2011); Development 132, 117-122 (2005))の新生仔精細管に、それらを移植した。移植10週後、私たちは、移植された精巣を単離し、精子形成を伴う精細管の存在を検討した。著しく、TF - PGCLC特にd3及びd4でソーティングしたものが移植された精巣は、精子形成の兆候を有する多くの細管を含んでいた(図4b、k):これらの細管は、実際に適切な形態を有する精子を豊富に含有した(図4c、d)。

【0144】

組織学的試験により、TF - PGCLCに由来する精子の形成は正常な方法で進行するということが明らかになった(図4c)。コントロールCk - PGCLCも、適切な精子形成に寄与した(図4k)。反対に、ESCにおけるBP14Aの活性化により誘導されるSC陽性細胞は、精子形成に寄与しなかったが、かわりに、移植された精巣8中の6において、多くのテラトーマ病巣を形成した(図4k、図10a、b)。私たちは、卵細胞質内精子注入法(ICSI)(Biol Reprod 52, 709-720 (1995))により、TF - PGCLC由来の精子と、野生型卵母細胞を受精させた。結果として得られる接合子は、みだところ正常な方法で2細胞胚へ発生した(図4e、f、図10c)。私たちは、これらの胚を仮親の卵管に移し、19日後、極めて正常な胎盤を伴う健全な子孫を得た(図4g、h)。これらの子孫は、実際に外来性TFのための導入遺伝子及びBVSCR26rtTAを有していたが(図4i)、にもかかわらず、繁殖可能な成体に正常に成長した(図4j、図10d、e)。

【0145】

私たちは、TF - PGCLCが精子形成及び健全な子孫のための真の前駆細胞として機能すると結論付けた。

【0146】

私たちは、ここで検討した3つのTF、BLIMP1、PRDM14及びTFAP2Cが、適切なエピジェネティックバックグラウンドの上で、キーとなるPGCプログラムを相乗的な方法で活性化することを実証してきた。3つのTFの相乗的な作用は、それらの互いの制御を示唆する。私たちは、PRDM14が活性化の最小必要条件であり、BLIMP1単独又はTFAP2C単独のいずれも、それ自身でPGCプログラムを活性化するには十分でないことも示してきた。

【0147】

私たちが提示してきた系により、PGCにおけるエピジェネティックな再プログラム化(ゲノムワイドDNA脱メチル化及びヒストン修飾の変化(Development 139, 15-31 (2012)))の正確な機構を明確にする機会が提供されるだけでなく、適切なエピジェネティックバックグラウンドの上、キーとなるTFがどのように働くかを決定する機構研究を実施する重要性が指摘された。生殖細胞発生の際に重大な工程のTFベースの制御を調査することもまた、実現可能であるはずである。生殖細胞発生の際のTFベースの操作は、ヒトを含む、マウス以外の哺乳動物に対しても適用可能であるかもしれない。

10

20

30

40

50

【0148】

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。従って、本発明は添付の「請求の範囲」の精神及び範囲に包含されるすべての変更を含むものである。

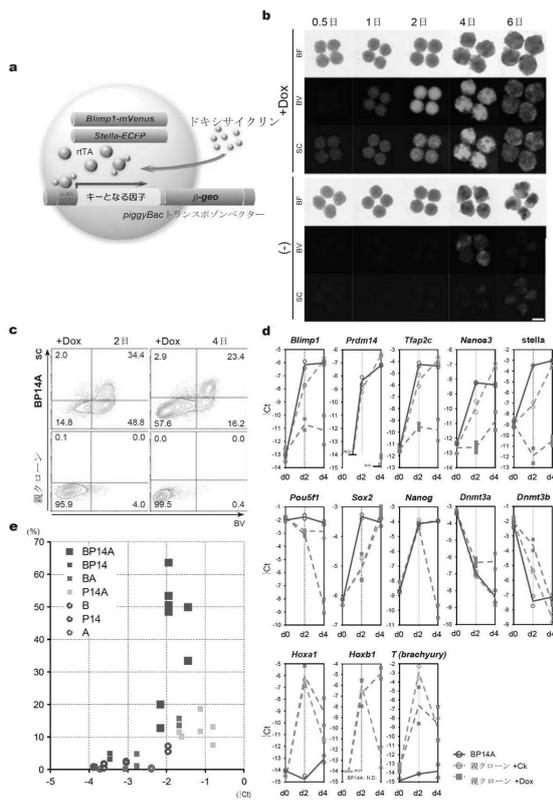
【0149】

ここで述べられた特許及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。

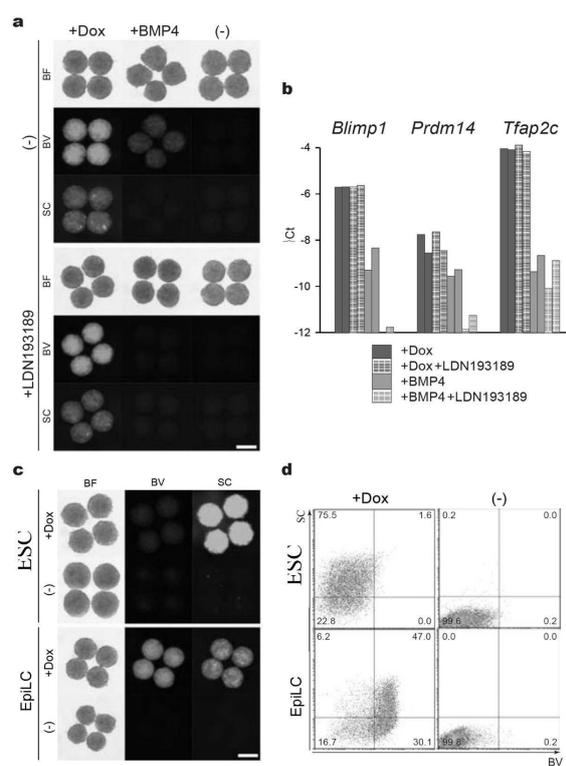
【0150】

本願は、米国に出願された特許出願第61/771,619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。

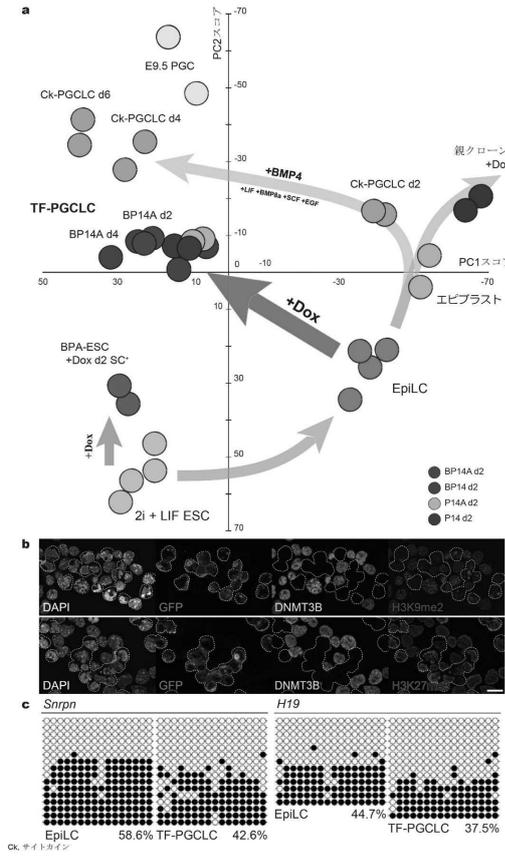
【図1】



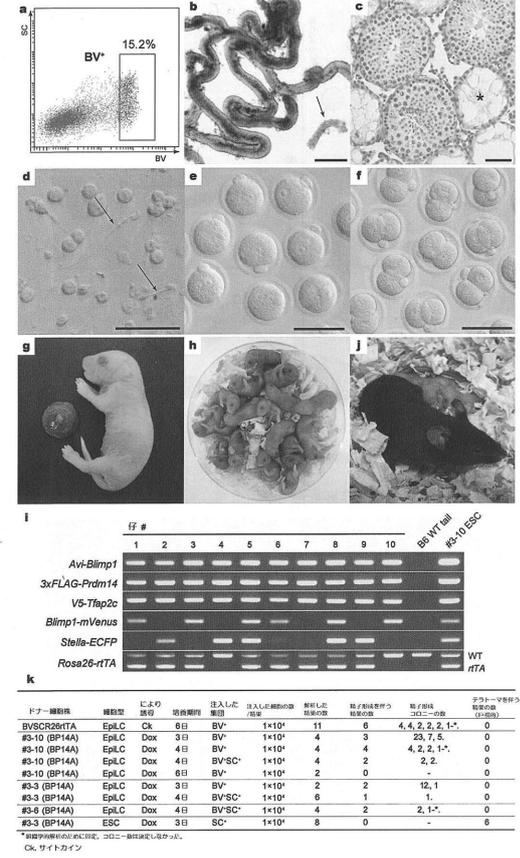
【図2】



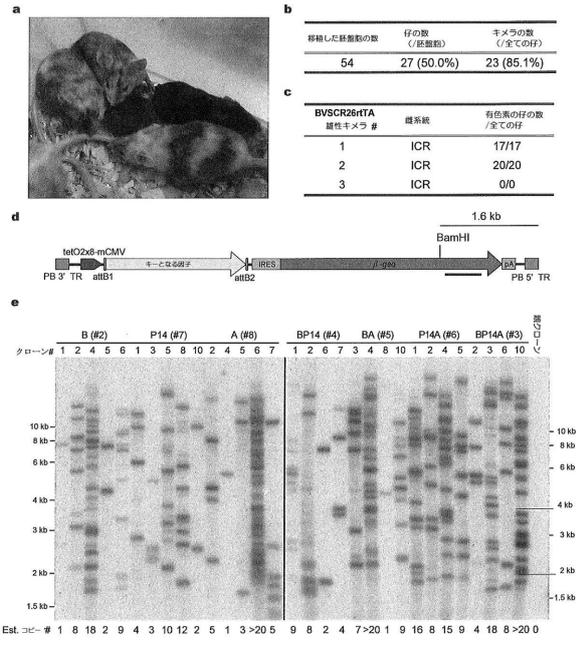
【図3】



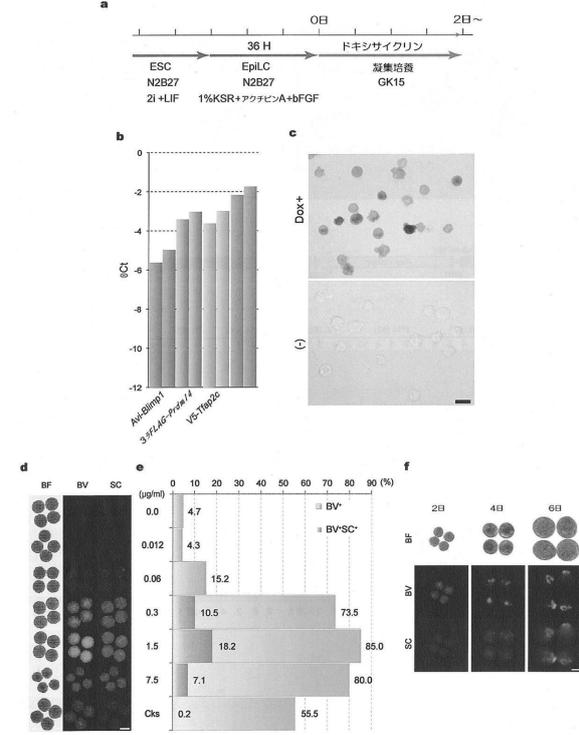
【図4】



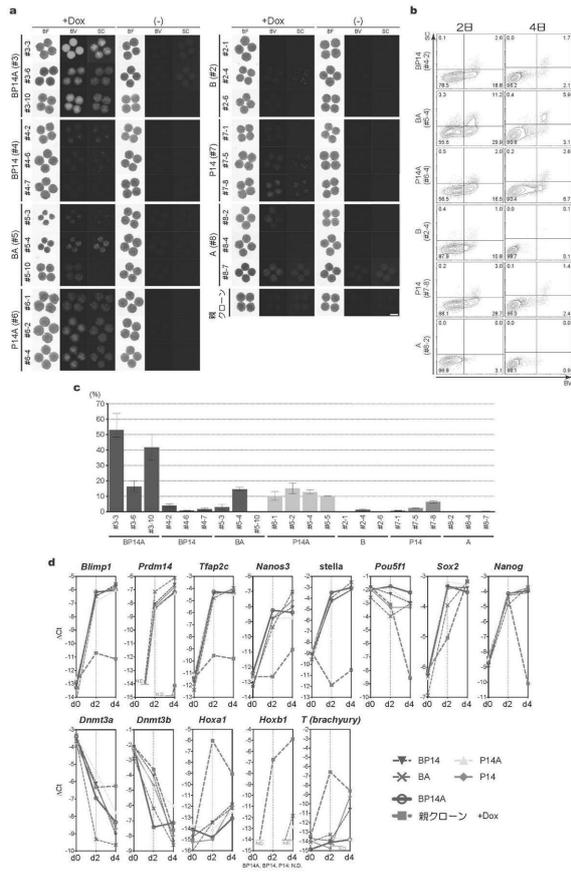
【図5】



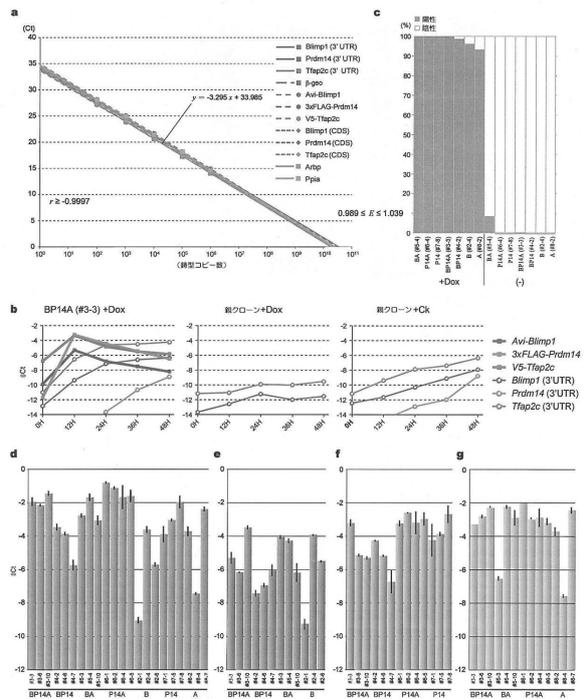
【図6】



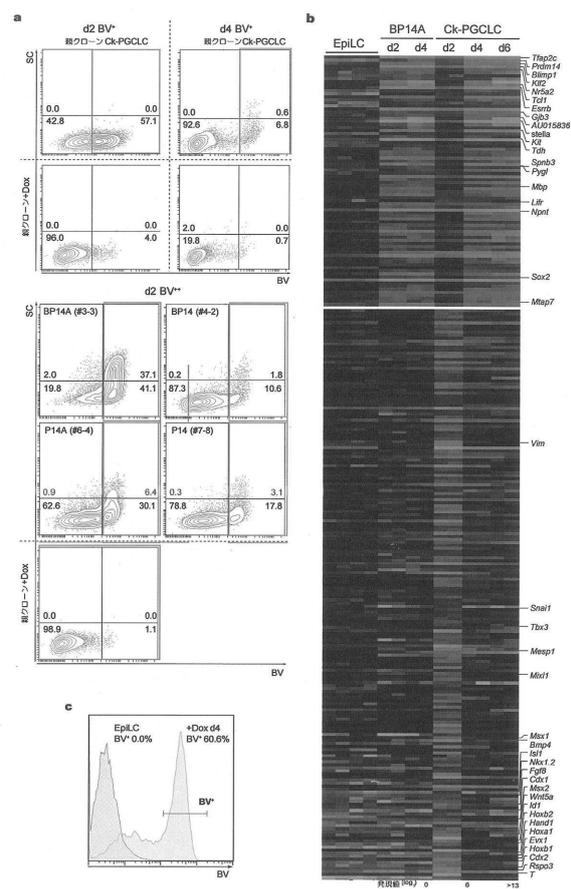
【 図 7 】



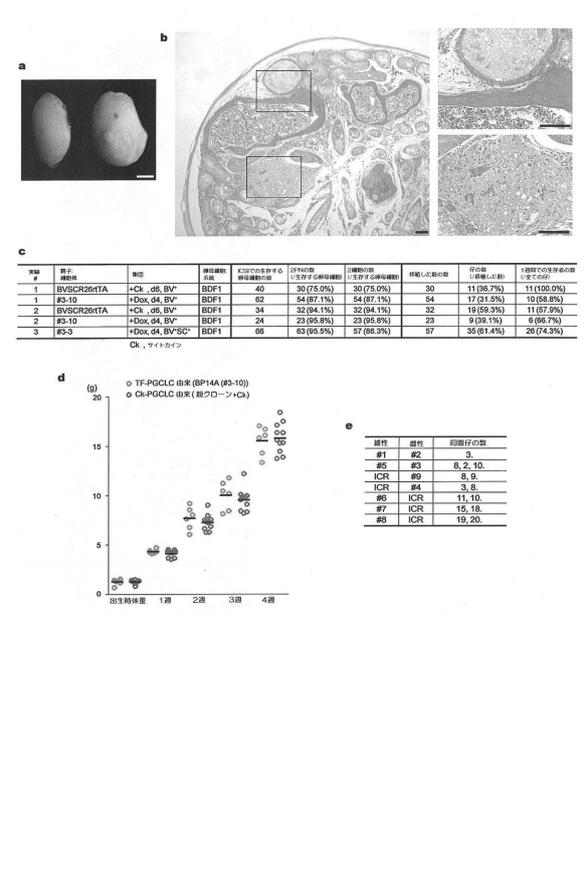
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【配列表】

0006460482000001.app

フロントページの続き

(74)代理人 100174296

弁理士 當麻 博文

(72)発明者 中木 文雄

京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 斎藤 通紀

京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 国際公開第2012/020687(WO, A1)

Cell Cycle, 2008, Vol.7, No.22, p.3514-3518

J. Biol. Chem., 2011, Vol.286, No.12, p.10641-10648

Cell Stem Cell, 2012, Vol.10, p.425-439

Nature genetics, 2008, Vol.40, No.8, p.1016-1022

Current Biology, 2011, Vol.21, p.1759-1765

Development, 2005, Vol.132, No.6, p.1315-1325

Science, 2012, Vol.338, p.971-975

Cell, 2011, Vol.146, p.519-532

Cell Stem Cell, 2012, Vol.11, p.110-117

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00 - 5/28

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPIDS/WPIX(STN)