

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6246125号
(P6246125)

(45) 発行日 平成29年12月13日(2017.12.13)

(24) 登録日 平成29年11月24日(2017.11.24)

| (51) Int. Cl. | | F I | |
|---------------|------------------|---------|--------|
| C 1 2 N | 5/0735 (2010.01) | C 1 2 N | 5/0735 |
| C 1 2 N | 5/10 (2006.01) | C 1 2 N | 5/10 |
| C 1 2 Q | 1/04 (2006.01) | C 1 2 Q | 1/04 |

請求項の数 13 (全 41 頁)

| | | | |
|---------------|-------------------------------|-----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2014-532154 (P2014-532154) | (73) 特許権者 | 504132272 国立大学法人京都大学 |
| (86) (22) 出願日 | 平成25年1月7日(2013.1.7) | | 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 |
| (65) 公表番号 | 特表2015-505240 (P2015-505240A) | (74) 代理人 | 100120293 弁理士 中谷 智子 |
| (43) 公表日 | 平成27年2月19日(2015.2.19) | (72) 発明者 | 上杉 志成 日本国京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 |
| (86) 国際出願番号 | PCT/JP2013/050501 | (72) 発明者 | 平田 直 日本国京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 |
| (87) 国際公開番号 | W02013/103156 | (72) 発明者 | 村田 亜沙子 日本国京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内 |
| (87) 国際公開日 | 平成25年7月11日(2013.7.11) | | |
| 審査請求日 | 平成27年10月21日(2015.10.21) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 61/584,110 | | |
| (32) 優先日 | 平成24年1月6日(2012.1.6) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多能性細胞を選別するための方法

(57) 【特許請求の範囲】

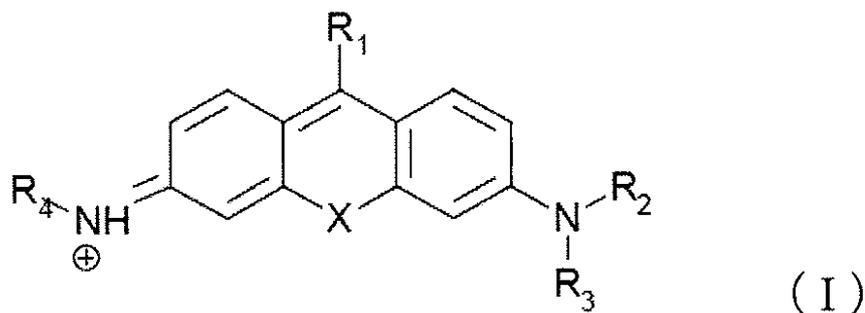
【請求項1】

以下の工程を含む、E S細胞又はi P S細胞を選別する方法であって：

(i) 細胞試料を、MDR 1トランスポーターを介して分化細胞から排除される化合物と接触させる工程；および

(i i) 前記化合物を蓄積した細胞を、E S細胞又はi P S細胞として検出する工程、ここで、前記化合物が式(I)

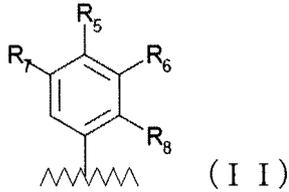
【化1】



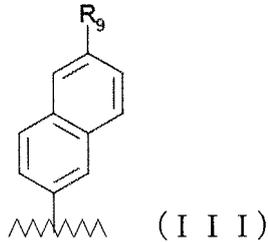
[式中、

R₁ は式(I I)、(I I I) および(I V)：

【化 2】

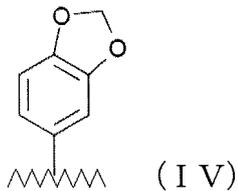


【化 3】



10

【化 4】



20

(ここで、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 および R_9 はそれぞれ水素、ハロゲン、炭素数 1 ~ 6 のアルキル、フェニル、 $-OR_{10}$ および $-SR_{10}$ からなる群より選択され、 R_{10} は炭素数 1 ~ 6 のアルキルまたはアリールである)

からなる群より選択され；

R_2 、 R_3 および R_4 はそれぞれ水素、炭素数 1 ~ 6 のアルキルおよび $-(CH_2)_mNR_{11}R_{12}$ からなる群より選択され、ここで m は 1 ~ 12 の整数であり、 R_{11} および R_{12} はそれぞれ水素、炭素数 1 ~ 6 のアルキルおよびクロロアセチルからなる群より選択されるか、または R_2 および R_3 は、 R_2 および R_3 が結合する窒素原子と共に式 (V) :

30

【化 5】



(V) (l は 1 ~ 6 の整数である)

の環状構造を形成し；

X は O、S、NH および NR_{13} (R_{13} は炭素数 1 ~ 6 のアルキル) からなる群より選択される]

40

の構造を有する、方法。

【請求項 2】

R_2 および R_3 がそれぞれ水素、メチル、エチル、ジメチルアミノエチルおよび 10 - クロロアセチルアミノデシルからなる群より選択されるか、または R_2 および R_3 が 1 - ピペリジニルの環状構造を形成し；

R_4 がメチルであり；

R_5 が水素、フッ素、メトキシ、フェノキシ、メチルチオ、メチル、プロピルおよびフェニルからなる群より選択され；

R_6 および R_7 がそれぞれ水素、フッ素、塩素、メトキシおよびメチルからなる群より選

50

択され；

R₈ がフッ素であり；

R₉ がメトキシであり；そして

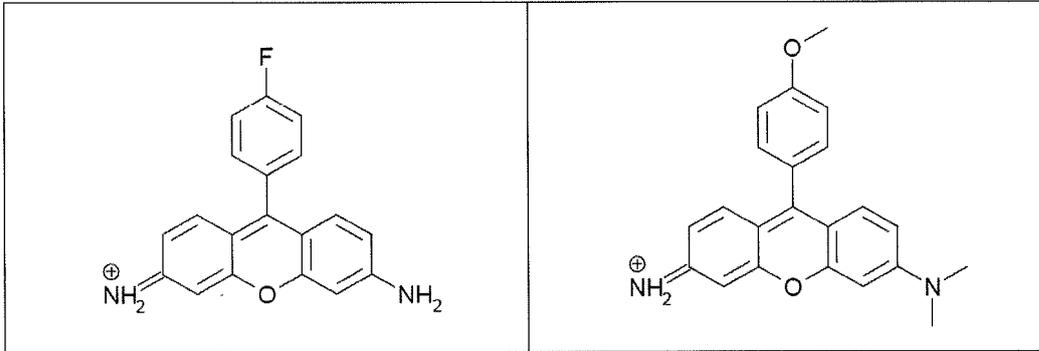
X が O、S およびメチルアミノからなる群より選択される；

請求項 1 記載の方法。

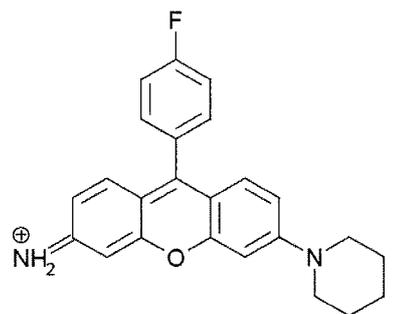
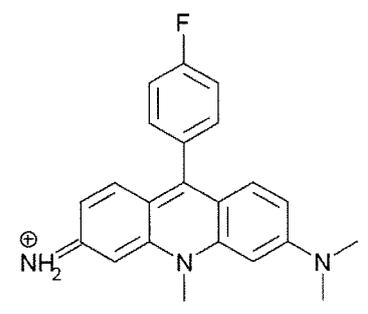
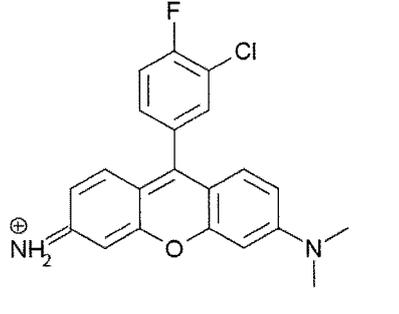
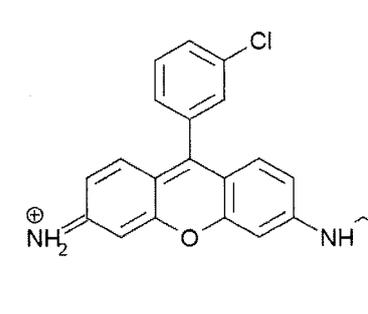
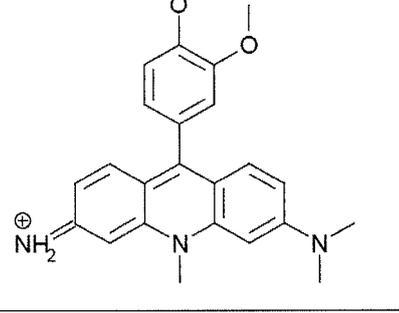
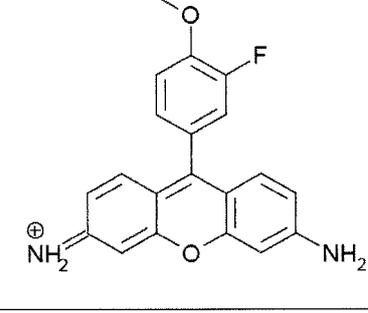
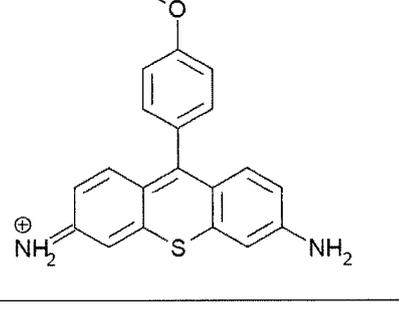
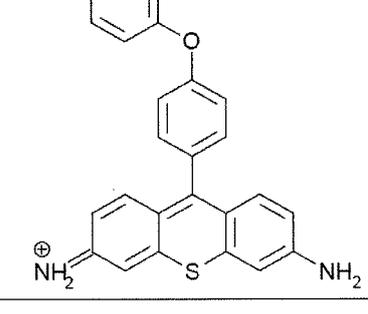
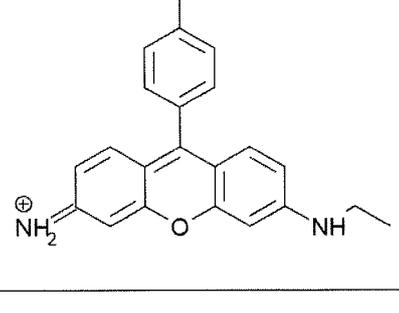
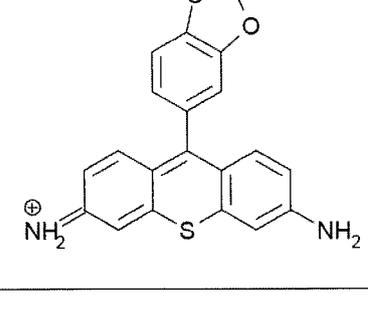
【請求項 3】

前記化合物が以下の表 1 に示す式からなる群より選択される、請求項 2 記載の方法。

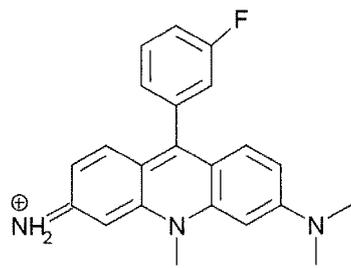
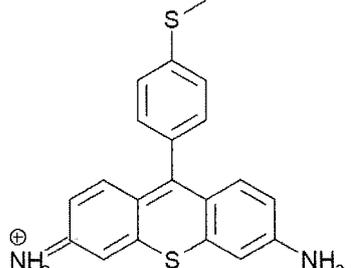
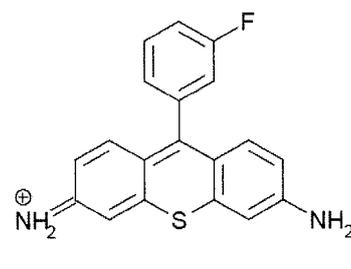
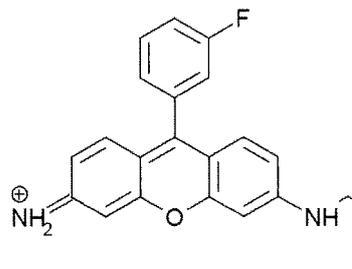
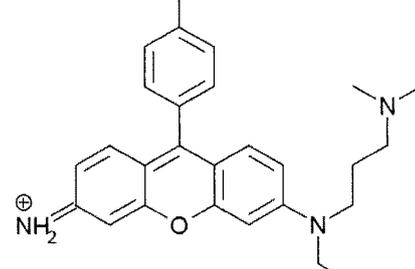
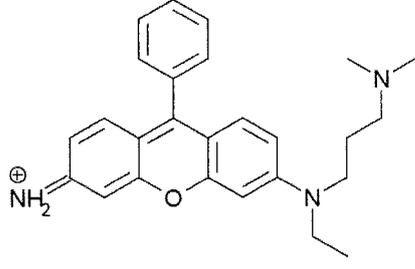
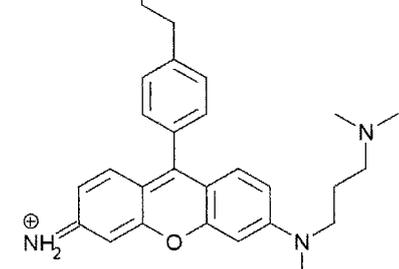
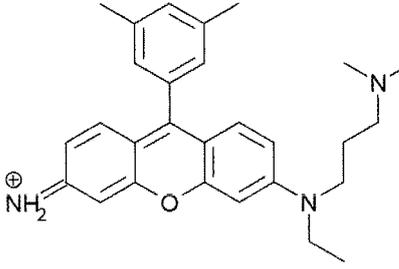
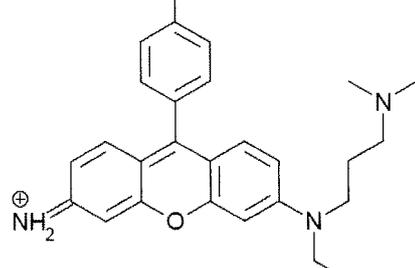
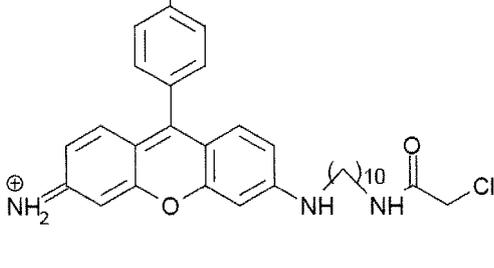
【表 1 - 1】



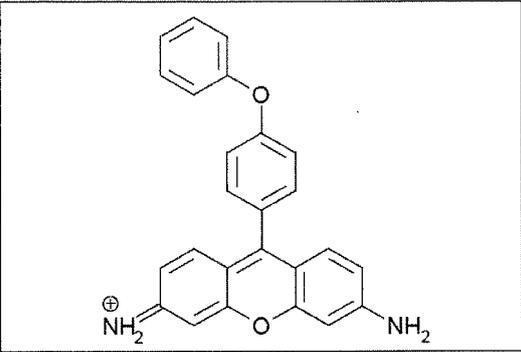
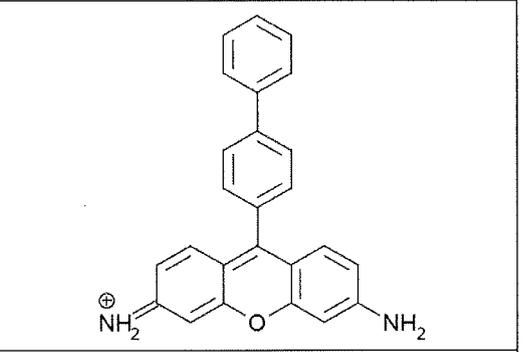
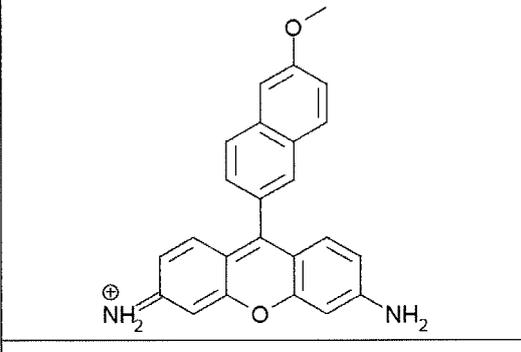
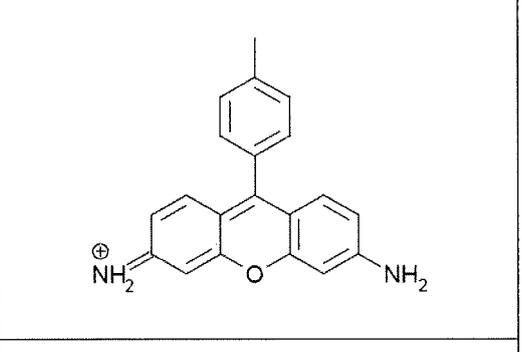
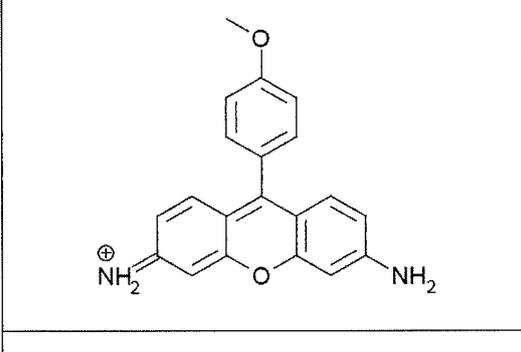
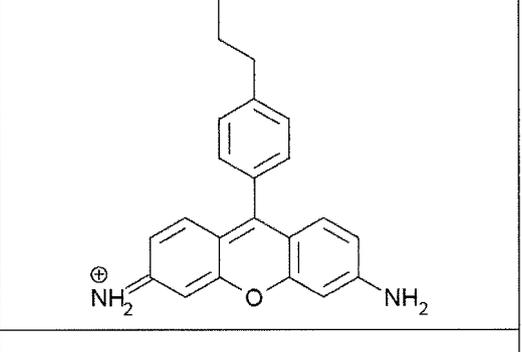
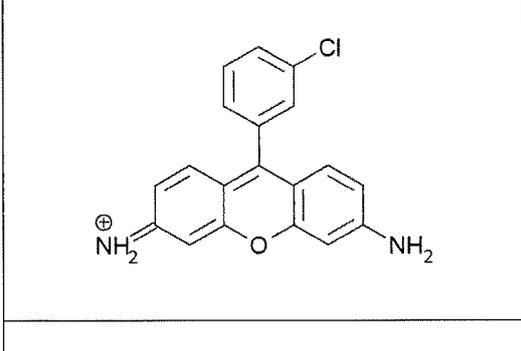
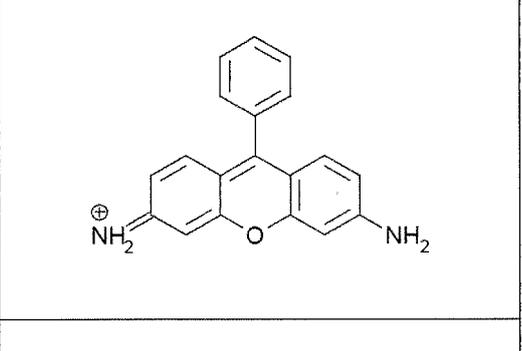
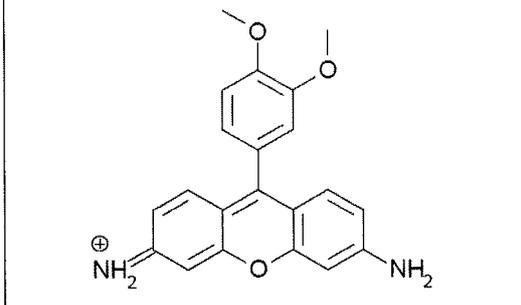
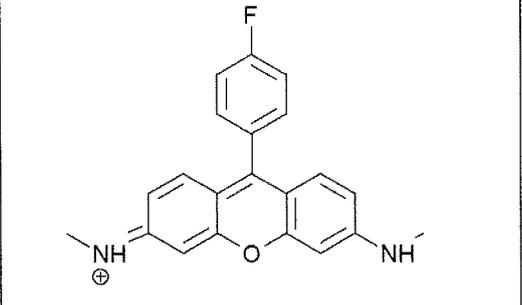
【表 1 - 2】

| | | |
|---|--|----|
|  |  | 10 |
|  |  | 20 |
|  |  | 30 |
|  |  | 30 |
|  |  | 40 |

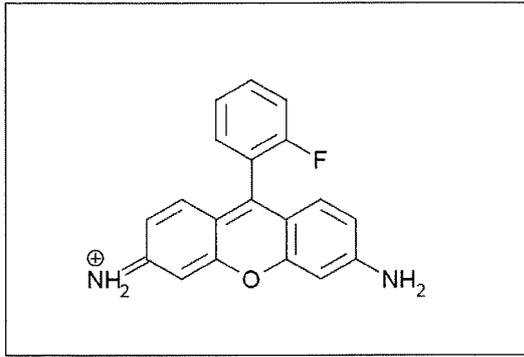
【表 1 - 3】

| | | |
|---|--|----|
|  |  | 10 |
|  |  | 20 |
|  |  | 30 |
|  |  | 40 |
|  |  | 40 |

【表 1 - 4】

| | | |
|---|--|----|
|  |  | 10 |
|  |  | 20 |
|  |  | 30 |
|  |  | 40 |
|  |  | 40 |

【表 1 - 5】

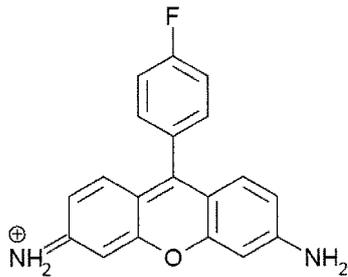


10

【請求項 4】

前記化合物が次の式：

【化 6】



20

である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

前記細胞試料が初期化因子を導入した体細胞である、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記初期化因子が Oct ファミリー遺伝子またはその遺伝子産物、 Sox ファミリー遺伝子またはその遺伝子産物、 Klf 4 ファミリー遺伝子またはその遺伝子産物、および Myc ファミリー遺伝子またはその遺伝子産物、からなる群より選択される少なくとも 1 つの因子である、請求項 5 記載の方法。

30

【請求項 7】

前記細胞試料が、体細胞への分化を誘導された E S 細胞又は i P S 細胞 からなる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 8】

請求項 1 記載の方法により E S 細胞又は i P S 細胞 を選別し、選別された前記細胞を選択する工程を含む、E S 細胞又は i P S 細胞 を選択する方法。

【請求項 9】

請求項 1 記載の方法により E S 細胞又は i P S 細胞 を選別し、選別された前記細胞を細胞試料から排除する工程を含む、分化した細胞を選択する方法。

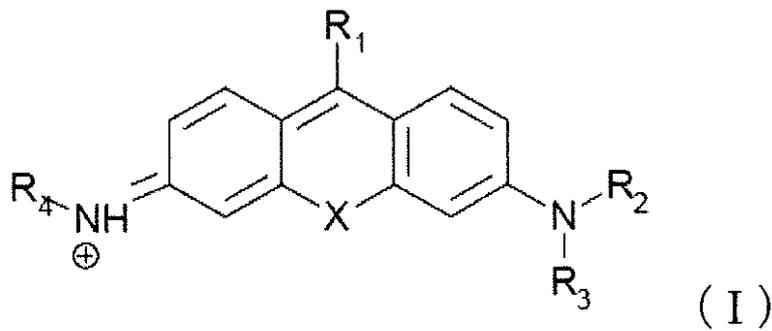
40

【請求項 10】

M D R 1 トランスポーターを介して分化細胞から排除される化合物を含む、E S 細胞又は i P S 細胞 を選別するためのキットであって、

ここで、前記化合物が式 (I) :

【化7】

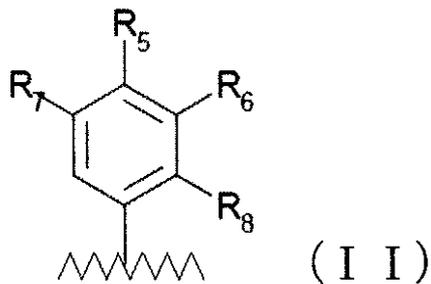


10

[式中、

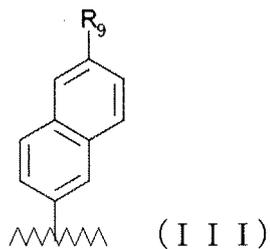
R₁ は式 (I I)、(I I I) および (I V) :

【化8】



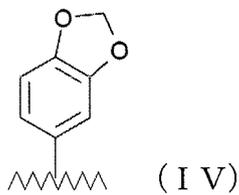
20

【化9】



30

【化10】



40

(ここで、R₅、R₆、R₇、R₈ および R₉ はそれぞれ水素、ハロゲン、炭素数 1 ~ 6 のアルキル、フェニル、-OR₁₀ および -SR₁₀ からなる群より選択され、R₁₀ は炭素数 1 ~ 6 のアルキルまたはアリールである)

からなる群より選択され；

R₂、R₃ および R₄ はそれぞれ水素、炭素数 1 ~ 6 のアルキルおよび -(CH₂)_mNR₁₁R₁₂ からなる群より選択され、ここで m は 1 ~ 12 の整数であり、R₁₁ および R₁₂ はそれぞれ水素、炭素数 1 ~ 6 のアルキルおよびクロロアセチルからなる群より選択されるか、または R₂ および R₃ は、R₂ および R₃ が結合する窒素原子と共に式 (V) :

【化 1 1】



(V) (1は1～6の整数である)

の環状構造を形成し；

XはO、S、NHおよびNR_{1 3} (R_{1 3}は炭素数1～6のアルキル)からなる群より選択される]

の構造を有する、キット。

10

【請求項 1 1】

R₂およびR₃がそれぞれ水素、メチル、エチル、ジメチルアミノエチルおよび10-クロロアセチルアミノデシルからなる群より選択されるか、またはR₂およびR₃が1-ピペリジニルの環状構造を形成し；

R₄がメチルであり；

R₅が水素、フッ素、メトキシ、フェノキシ、メチルチオ、メチル、プロピルおよびフェニルからなる群より選択され；

R₆およびR₇がそれぞれ水素、フッ素、塩素、メトキシおよびメチルからなる群より選択され；

R₈がフッ素であり；

20

R₉がメトキシであり；そして

XがO、Sおよびメチルアミノからなる群より選択される；

請求項 1 0 記載のキット。

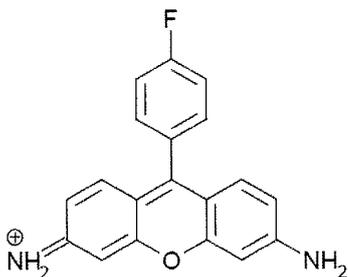
【請求項 1 2】

前記化合物が表 1 に示す式からなる群より選択される、請求項 1 1 記載のキット。

【請求項 1 3】

前記化合物が次の式：

【化 1 2】



30

である、請求項 1 2 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0 0 0 1】

本発明は、多能性細胞と分化した細胞とを含む試料等の細胞試料から、多能性細胞を選別する方法に関する。本発明はまた、多能性細胞を選択する方法および分化した細胞を選択する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

ヒト胚性幹 (ES) 細胞 (Thomson, J. A. et al. Science 1998, 282, 1145-1147) および人工多能性幹 (iPS) 細胞 (Takahashi, K. et al. Cell 2007, 131, 861-872) は、無限に増殖し、種々の細胞型へと分化する細胞であり、基礎生物学研究のための有用なツールとして、また再生医療のための有望な資源として用いられてきた。そのような進展

50

にも関わらず、幹細胞の臨床的な応用には多くの問題が残っている。少量の未分化幹細胞を含む細胞試料を移植した動物モデルにおいて奇形腫が発生したことにより、安全性に対する懸念が提起されている。より安全な幹細胞治療のためには、未分化幹細胞の検出および除去のための戦略が必要である。

【 0 0 0 3 】

ヒト多能性幹細胞の検出のため、SSEA-4 (stage-specific embryonic antigen 4) に対する抗体が広く使用されてきた (Shevinsky, L. H. et al. Cell 1982, 30, 697-705)。SSEA-4 は初期胚の細胞表面に発現する糖脂質であり、ヒトESおよびEC (embryonic carcinoma) 細胞の表面に選択的に提示されるが、その理由は分かっていない (Henderson, J. K. et al. Stem Cells 2002, 20, 329-337)。ヒト幹細胞の他のマーカーの例としては、Oct3/4 およびNanogが挙げられ、これらは幹細胞の未分化状態を維持するために必要な転写因子であり、分化の際に下方制御される (Rosner, M. H. et al. Nature 1990, 345, 686-692, and Mitsui, K. et al. Cell 2003, 113, 631-642)。これらに対する抗体は多能性細胞の検出において極めて有用であるが、不安定なタンパク質ツールであるため、高額であり、また細胞の固定や透過処理といった注意を要する処理が必要である。ヒト幹細胞の他のルーチンマーカーとしては、アルカリフォスファターゼが挙げられる (Thomson, J. A. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1995, 92, 7844-7848)。その酵素活性を利用したアッセイは幹細胞を検出するための簡便かつ極めて有用な方法であるが、多能性幹細胞に対する特異性に関しては大きな懸念がある。なぜなら、この酵素はハウスキーピング酵素であり、他の多くの種類の細胞に広く発現しているためである。

10

20

【発明の概要】

【 0 0 0 4 】

多能性幹細胞を高度に特異的に選別するため、本願発明者らは鋭意研究を行い、その結果、多能性細胞を、MDR1トランスポーターを介して多能性細胞から排除される化合物を用いて選別することが可能であることを発見し、本発明を完成させるに至った。

【 0 0 0 5 】

本発明は以下の特徴を有する。

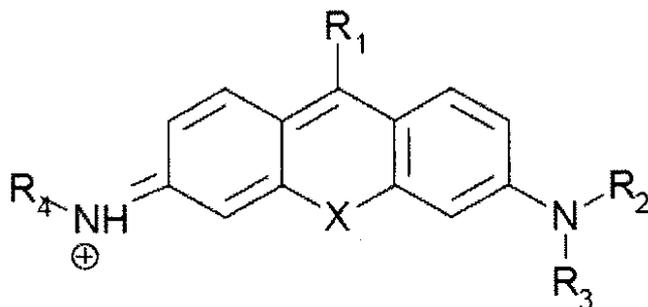
[1] 以下の工程を含む、多能性細胞を選別する方法：

(i) 細胞試料を、MDR1トランスポーターを介して多能性細胞から排除される化合物と接触させる工程；および

(i i) 前記化合物を蓄積した細胞を、多能性細胞として検出する工程。

[2] 前記化合物が式 (I)

【化 1】



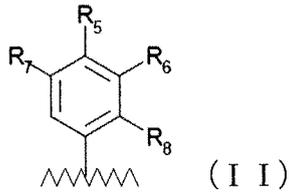
(I)

40

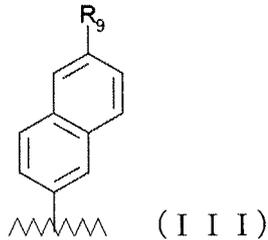
[式中、

R₁ は式 (I I)、(I I I) および (I V) :

【化2】

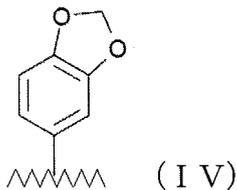


【化3】



10

【化4】



20

(ここで、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 および R_9 はそれぞれ水素、ハロゲン、炭素数 1 ~ 6 のアルキル、フェニル、 $-OR_{10}$ および $-SR_{10}$ からなる群より選択され、 R_{10} は炭素数 1 ~ 6 のアルキルまたはアリアルである)

からなる群より選択され；

R_2 、 R_3 および R_4 はそれぞれ水素、炭素数 1 ~ 6 のアルキルおよび $-(CH_2)_mNR_{11}R_{12}$ からなる群より選択され、ここで m は 1 ~ 12 の整数であり、 R_{11} および R_{12} はそれぞれ水素、炭素数 1 ~ 6 のアルキルおよびクロロアセチルからなる群より選択されるか、または R_2 および R_3 は、 R_2 および R_3 が結合する窒素原子と共に式 (

30

【化5】



(V) (l は 1 ~ 6 の整数である)

の環状構造を形成し；

X は O 、 S 、 NH および NR_{13} (R_{13} は炭素数 1 ~ 6 のアルキル) からなる群より選択される]

40

の構造を有する、[1] 記載の方法。

[3] R_2 および R_3 がそれぞれ水素、メチル、エチル、ジメチルアミノエチルおよび 10 - クロロアセチルアミノデシルからなる群より選択されるか、または R_2 および R_3 が 1 - ピペリジニルの環状構造を形成し；

R_4 がメチルであり；

R_5 が水素、フッ素、メトキシ、フェノキシ、メチルチオ、メチル、プロピルおよびフェニルからなる群より選択され；

R_6 および R_7 がそれぞれ水素、フッ素、塩素、メトキシおよびメチルからなる群より選択され；

R_8 がフッ素であり；

50

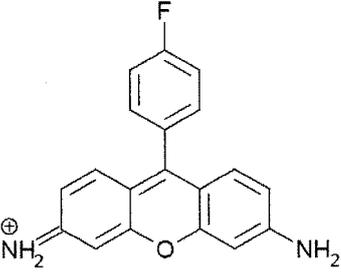
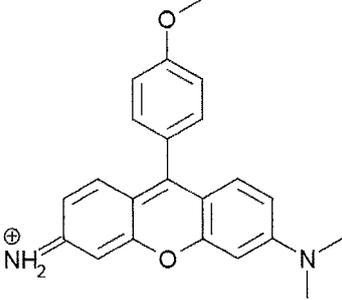
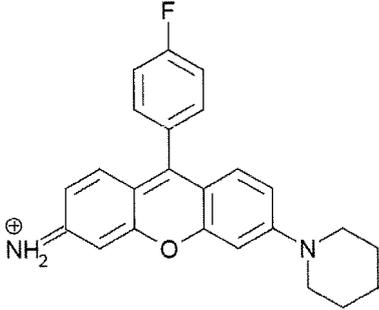
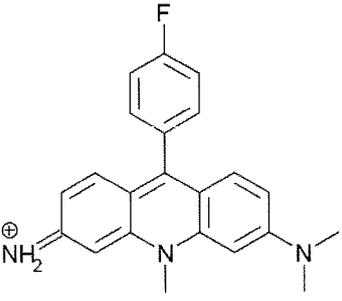
R₉ がメトキシであり；そして

X が O、S およびメチルアミノからなる群より選択される；

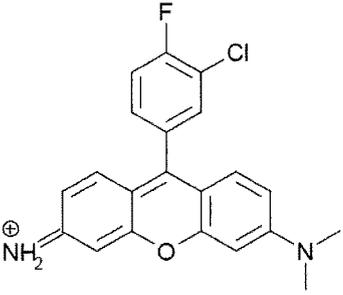
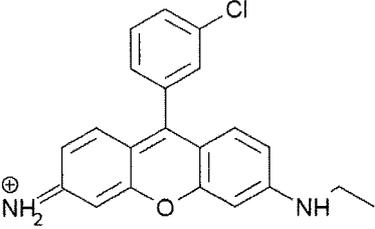
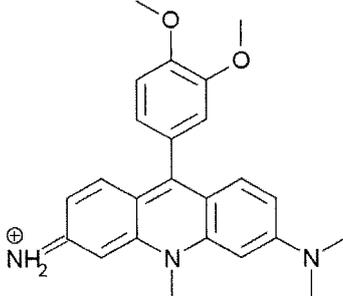
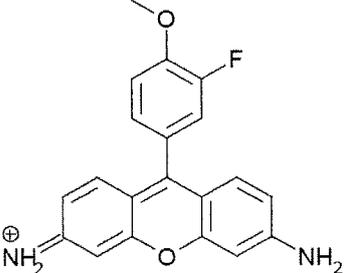
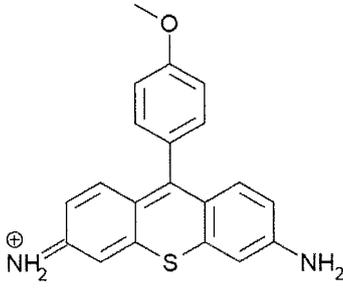
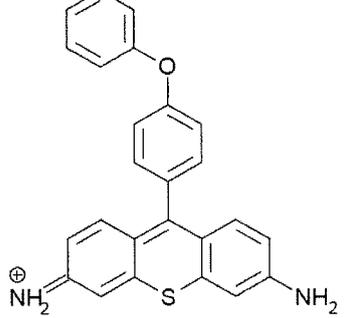
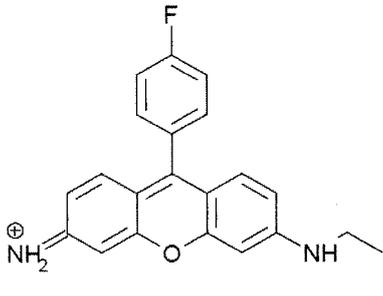
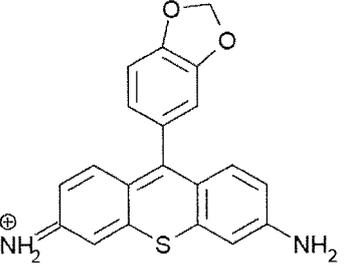
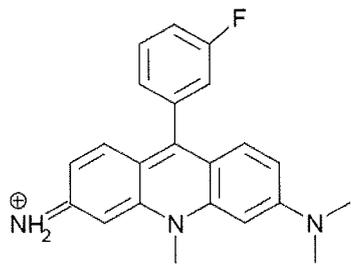
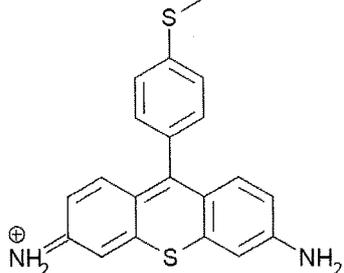
[2] 記載の方法。

[4] 前記化合物が以下の表 1 に示す式からなる群より選択される、[3] 記載の方法。

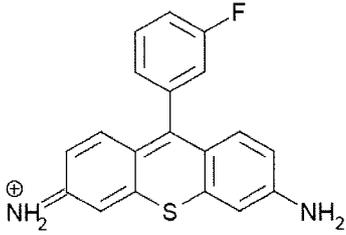
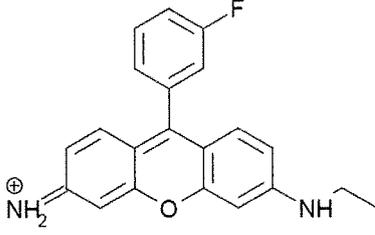
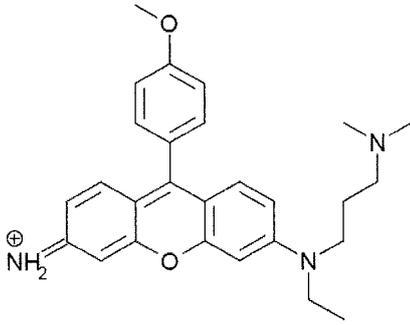
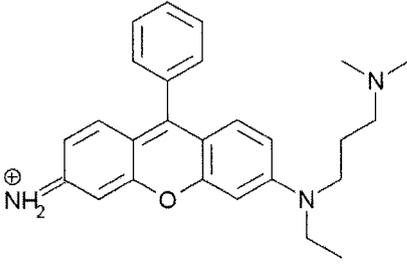
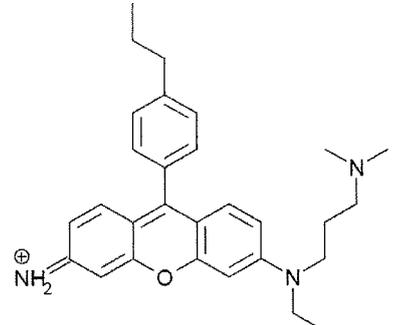
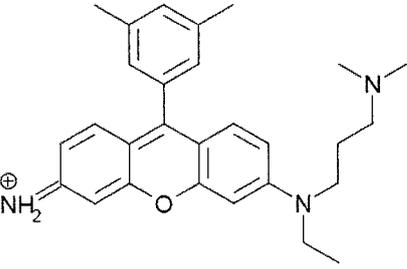
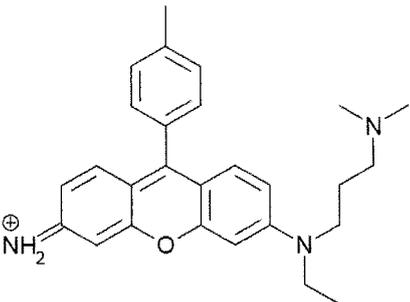
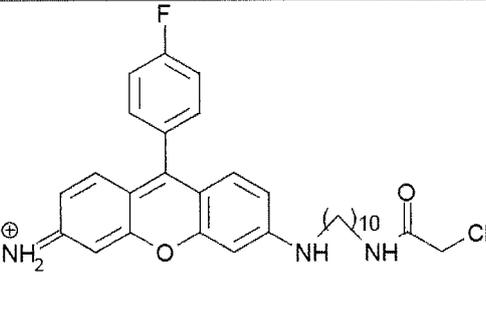
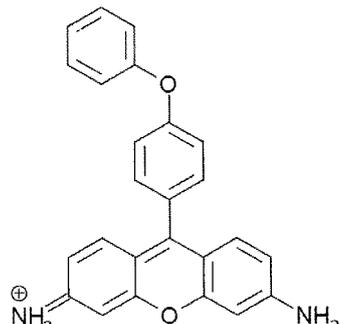
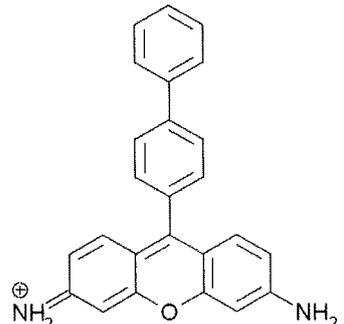
【表 1 - 1】

| | | |
|--|---|----|
|  |  | 10 |
|  |  | 20 |

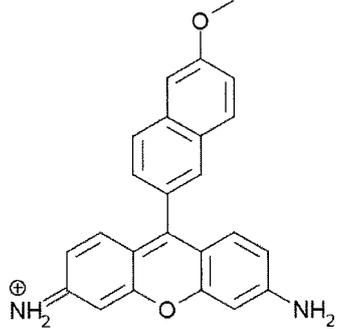
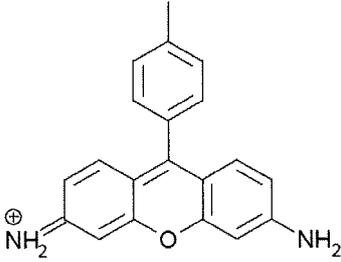
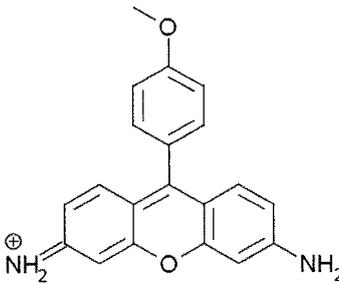
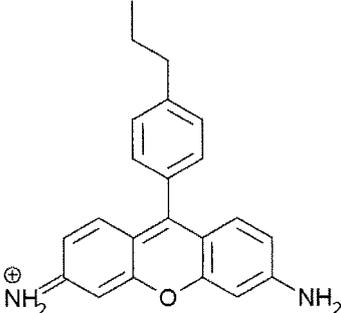
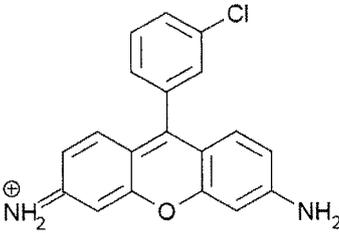
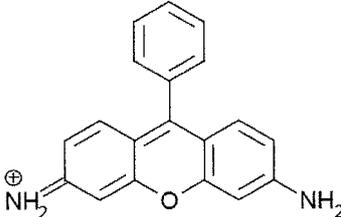
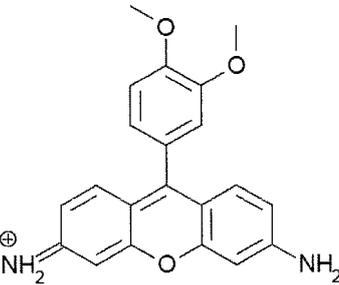
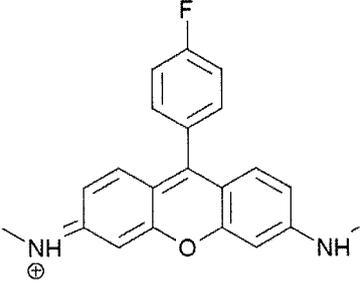
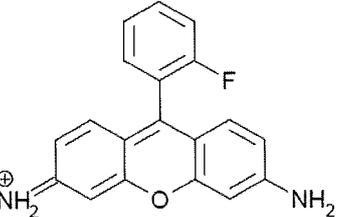
【表 1 - 2】

| | | |
|---|--|----|
|  |  | 10 |
|  |  | 20 |
|  |  | 30 |
|  |  | 30 |
|  |  | 40 |

【表 1 - 3】

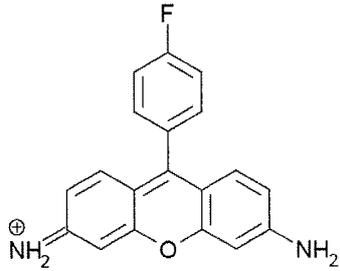
| | | |
|---|--|----|
|  |  | 10 |
|  |  | 20 |
|  |  | 30 |
|  |  | 40 |
|  |  | |

【表 1 - 4】

| | | |
|---|--|----|
|  |  | 10 |
|  |  | 20 |
|  |  | 30 |
|  |  | 30 |
|  | | 40 |

[5] 前記化合物が次の式：

【化 6】



10

である、[4] 記載の方法。

[6] 前記細胞試料が初期化因子を導入した体細胞である、[1] 記載の方法。

[7] 前記初期化因子が Oct ファミリー遺伝子またはその遺伝子産物、 Sox ファミリー遺伝子またはその遺伝子産物、 Klf4 ファミリー遺伝子またはその遺伝子産物、および Myc ファミリー遺伝子またはその遺伝子産物、からなる群より選択される少なくとも 1 つの因子である、[6] 記載の方法。

[8] 前記細胞試料が、体細胞への分化を誘導された多能性細胞からなる、[1] 記載の方法。

[9] [1] 記載の方法により多能性細胞を選別し、選別された前記細胞を選択する工程を含む、多能性細胞を選択する方法。

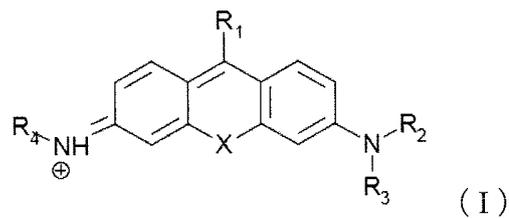
20

[10] 請求項 1 記載の方法により多能性細胞を選別し、選別された前記細胞を細胞試料から排除する工程を含む、分化した細胞を選択する方法。

[11] MDR1 トランスポーターを介して多能性細胞から排除される化合物を含む、多能性細胞を選別するためのキット。

[12] 前記化合物が式 (I) :

【化 7】

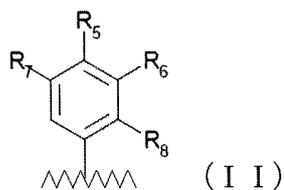


30

[式中、

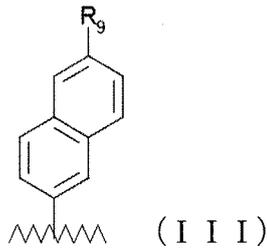
R_1 は式 (I I)、(I I I) および (I V) :

【化 8】



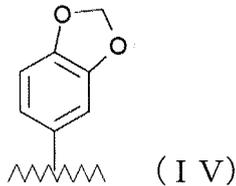
40

【化 9】



【化 10】

10



(ここで、 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 および R_9 はそれぞれ水素、ハロゲン、炭素数 1 ~ 6 のアルキル、フェニル、 $-OR_{10}$ および $-SR_{10}$ からなる群より選択され、 R_{10} は炭素数 1 ~ 6 のアルキルまたはアリールである)

からなる群より選択され；

20

R_2 、 R_3 および R_4 はそれぞれ水素、炭素数 1 ~ 6 のアルキルおよび $-(CH_2)_mNR_{11}R_{12}$ からなる群より選択され、ここで m は 1 ~ 12 の整数であり、 R_{11} および R_{12} はそれぞれ水素、炭素数 1 ~ 6 のアルキルおよびクロロアセチルからなる群より選択されるか、または R_2 および R_3 は、 R_2 および R_3 が結合する窒素原子と共に式 (V)：

【化 11】



(V) (l は 1 ~ 6 の整数である)

30

の環状構造を形成し；

X は O 、 S 、 NH および NR_{13} (R_{13} は炭素数 1 ~ 6 のアルキル) からなる群より選択される]

の構造を有する、[1 1] 記載のキット。

[1 3] R_2 および R_3 がそれぞれ水素、メチル、エチル、ジメチルアミノエチルおよび 10 - クロロアセチルアミノデシルからなる群より選択されるか、または R_2 および R_3 が 1 - ピペリジニルの環状構造を形成し；

R_4 がメチルであり；

R_5 が水素、フッ素、メトキシ、フェノキシ、メチルチオ、メチル、プロピルおよびフェニルからなる群より選択され；

40

R_6 および R_7 がそれぞれ水素、フッ素、塩素、メトキシおよびメチルからなる群より選択され；

R_8 がフッ素であり；

R_9 がメトキシであり；そして

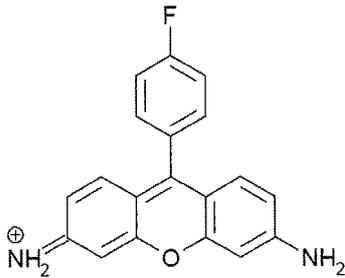
X が O 、 S およびメチルアミノからなる群より選択される；

[1 2] 記載のキット。

[1 4] 前記化合物が表 1 に示す式からなる群より選択される、[1 3] 記載のキット。

[1 5] 前記化合物が次の式：

【化12】



10

である、[14]記載のキット。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】図1のパネルAは、各化合物(1~21および26~36)で処理したヒトiPS細胞の蛍光像(写真)である。スケールバーは300μm。図1中、パネルB~Dは、化合物1(2μM)で3時間染色したヒトiPS細胞およびフィーダー細胞(B)、蛍光標識した抗SSEA-4抗体(-SSEA-4-Alexa647)で染色したヒトiPS細胞およびフィーダー細胞(C)、ならびに、化合物1および-SSEA-4-Alexa647で二重染色したヒトiPS細胞およびフィーダー細胞(D)のフロー

20

【図2】図2は、化合物1(4μM)とともに4.5時間インキュベートした、部分的に分化したヒトiPS細胞(a)、化合物1(1μM)とともに2時間インキュベートしたヒトES細胞(b)、および化合物1(1μM)とともに2時間インキュベートした、分化した細胞(ヒトES細胞を500nMレチノイン酸で4日間処理して得られたもの)の、明視野像(左)(写真)および蛍光顕微鏡像(右)(写真)である。スケールバーは300μm。

【図3】図3のパネルa~d(写真)は、明視野像(a)、化合物1で染色したヒトiPS細胞の蛍光顕微鏡像(b)、9.6nM Mitotracker Red(c)、およびそれらを重ねた像(d)である。図3のパネルeおよびf(写真)は、CCCP(5μM)の存在下、化合物1(1μM)で2時間染色したヒトiPS細胞の明視野像(e)および蛍光顕微鏡像(f)である。スケールバーは150μm。

30

【図4】図4のパネルaは、ES細胞(白抜きのバー)およびhiPS細胞(網掛けバー)における、ABC B1(MDR1)、ABC C1(MRP1)およびABC G2(BCRP)トランスポーターの発現量のグラフである。図4のパネルbは、ヒトES細胞(白抜きのバー)および分化した細胞(網掛けバー)におけるABC B1(MDR1)、ABC C1(MRP1)およびABC G2(BCRP)トランスポーターの増加倍率を示すグラフである。それぞれのバーは5つのhES細胞株(KhES-1、KhES-2、KhES-3、KhES-4、KhES-5)からなる。図4のパネルcおよびd(写真)は、MDR1を発現しない細胞株であるKB3-1(c)およびMDR1を発現するモデル細胞株(KB/MDR1)(d)を、化合物1で染色した際の蛍光顕微鏡像である。スケールバーは2μm。

40

【図5】図5のパネルaおよびb(写真)は、未分化ES細胞(a)およびヒトES細胞に由来する分化した細胞(b)を、化合物1(1μM)で1時間染色した際の明視野像(左)および蛍光顕微鏡像(右)である。スケールバーは100μm。図5のパネルc~eは、化合物1とともにインキュベートしたヒトES細胞および分化した細胞(c)、AlexaFluor647標識抗MDR1抗体で処理したヒトES細胞および分化した細胞(d)、およびシクロスポリンA(CsA)処理後に化合物1とともにインキュベートしたヒトES細胞および分化した細胞(e)のフローサイトメトリーヒストグラムである。

50

【図6】図6のパネルaは、K P - 1、抗C D 4 5抗体、抗C D 2 3 5抗体、抗C D 4 1 a抗体、抗C D 4 3抗体および抗S S E A - 4抗体で染色されたヒトE S細胞および該E S細胞由来の造血細胞に対する、フローサイトメトリー分析による蛍光ヒストグラムである。図6のパネルbは、K P - 1で染色された（K P - 1（+）と記載）、または染色されていない（K P - 1（-）と記載）ヒトi P S細胞および該i P S細胞由来の心筋細胞に対する、フローサイトメトリー分析による蛍光ヒストグラムである。

【図7】図7のパネルaは、心筋細胞におけるA B Cトランスポーターの発現プロファイルである。A B Cトランスポーターのm R N A発現レベルを、ヒトE S細胞（K h - E S - 3細胞株、白抜きのバー）と心筋細胞（黒塗りのバー）とで比較したもの。図7のパネルb（写真）は、A B C C 5発現細胞によるK P - 1の排出を示す。G F P融合A B C C 5の発現ベクターをH E K 2 9 3細胞にトランスフェクションした。K P - 1で処理した（K P - 1（+）と記載）、または処理していない（K P - 1（-）と記載）H E K 2 9 3およびA B C C 5発現H E K 2 9 3について、5 5 5 n mのショートパスエミッションフィルターを用いてG F PおよびK P - 1両者の観察を行った。また、5 6 0のロングパスエミッションフィルターを用いてK P - 1のみの観察を行った。

【発明を実施するための形態】

【0007】

本発明は、次の工程を含む、多能性細胞を選別する方法を提供する：

(i) 細胞試料を、M D R 1トランスポーターを介して多能性細胞から排除される化合物と接触させる工程；および

(ii) 前記化合物を蓄積した細胞を、多能性細胞として検出する工程。

【0008】

M D R 1トランスポーターのヌクレオチド配列情報、およびM D R 1 c D N Aにコードされるタンパク質のアミノ酸配列情報は、N C B Iアクセッション番号N M _ 0 0 0 9 2 7を参照して得ることができる。

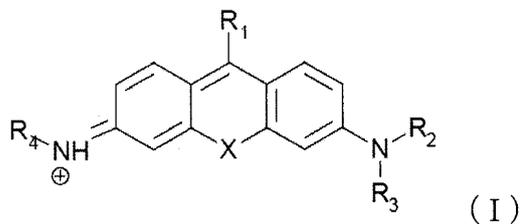
【0009】

多能性細胞からM D R 1トランスポーターを介して排除される前記化合物は、実施例5に記載されるように、M D R 1を有する、または有しない細胞を用いて認識することができる。

【0010】

本発明の一態様において、多能性細胞からM D R 1トランスポーターを介して除去される前記化合物は、式(I)：

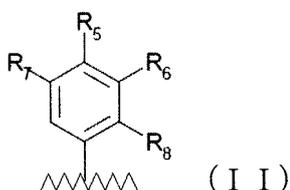
【化13】



[式中、

R₁は式(II)、(III)および(IV)：

【化14】



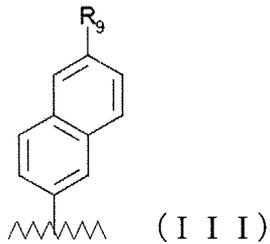
10

20

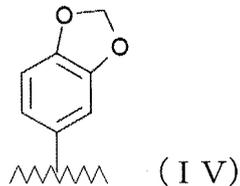
30

40

【化15】



【化16】



(R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 および R_9 はそれぞれ水素、ハロゲン、炭素数 1 ~ 6 のアルキル、フェニル、 $-OR_{10}$ および $-SR_{10}$ からなる群より選択され、ここで R_{10} は炭素数 1 ~ 6 のアルキルまたはアリールであり、好ましくは、 R_5 は水素、フッ素、メトキシ、フェノキシ、メチルチオ、メチル、プロピルおよびフェニルからなる群より選択され、 R_6 および R_7 はそれぞれ水素、フッ素、塩素、メトキシおよびメチルからなる群より選択され、 R_8 はフッ素であり、 R_9 はメトキシである)

からなる群より選択され；

R_2 、 R_3 および R_4 はそれぞれ水素、炭素数 1 ~ 6 のアルキルおよび $-(CH_2)_mNR_{11}R_{12}$ からなる群より選択され、ここで m は 1 ~ 12 の整数であり、 R_{11} および R_{12} はそれぞれ水素、炭素数 1 ~ 6 のアルキルおよびクロロアセチルからなる群より選択されるか、または R_2 および R_3 は、 R_2 および R_3 が結合する窒素原子と共に式 (III) :

【化17】



(III) (l は 1 ~ 6 の整数である)

の環状構造を形成し、好ましくは、 R_2 および R_3 がそれぞれ水素、メチル、エチル、ジメチルアミノエチルおよび 10 - クロロアセチルアミノデシルからなる群より選択されるか、または R_2 および R_3 が 1 - ピペリジニルの環状構造を形成し、 R_4 がメチルであり；

X は O 、 S 、 NH および NR_{13} (R_{13} は炭素数 1 ~ 6 のアルキル) からなる群より選択され、好ましくは X は O 、 S およびメチルアミノからなる群より選択される]

【0011】

本発明において、炭素数 1 ~ 6 のアルキルとは、炭素数 1 ~ 6 の直鎖または分岐鎖飽和炭化水素基、すなわち、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、 n -ブチル、 sec -ブチル、イソブチル、 $tert$ -ブチル、ヘブチルまたはヘキシルを意味する。

【0012】

本発明の一態様において、より好ましい化合物は、以下の表 2 中に記載されるものである。

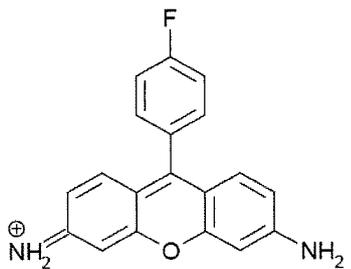
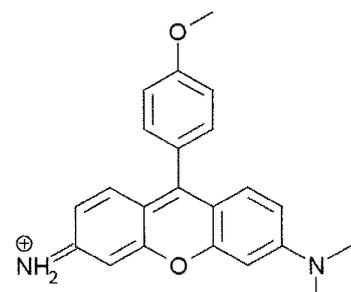
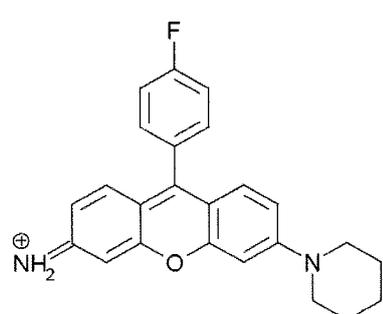
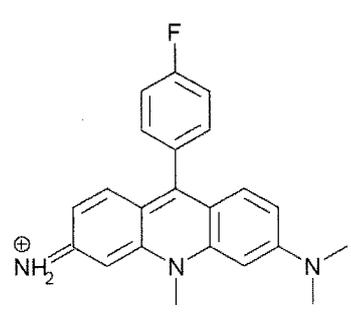
10

20

30

40

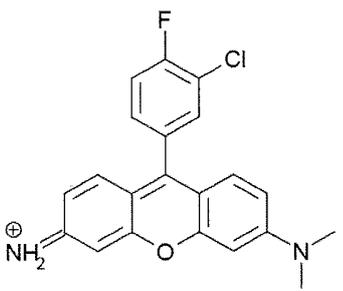
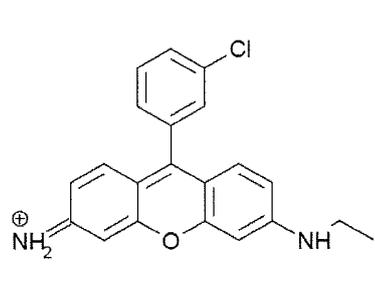
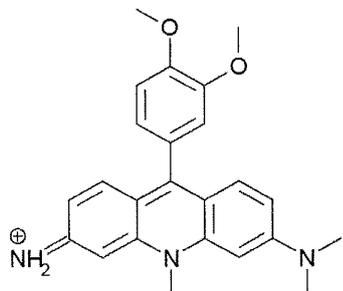
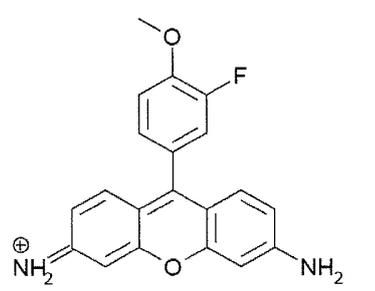
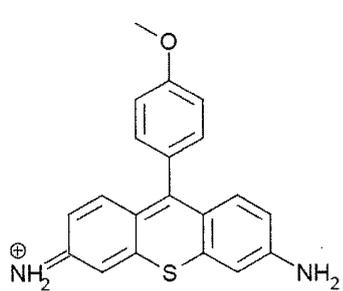
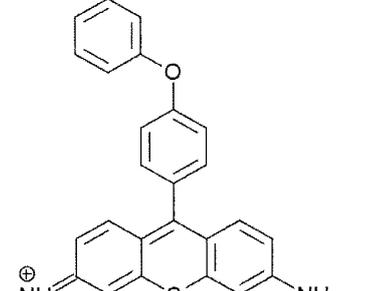
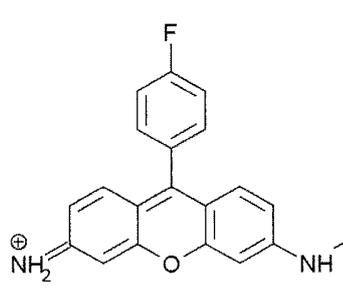
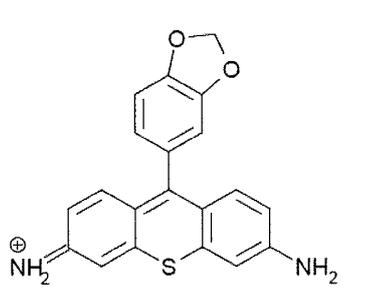
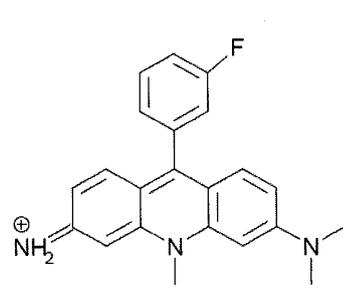
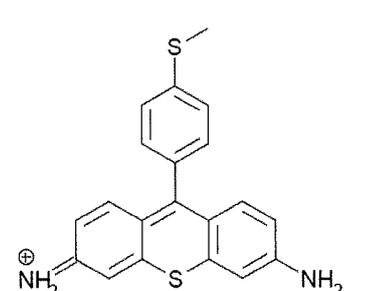
【表 2 - 1】

| No | 化合物構造 | No | 化合物構造 |
|----|---|----|--|
| 1 |  | 2 |  |
| 3 |  | 4 |  |

10

20

【表 2 - 2】

| | | | |
|----|---|----|--|
| 5 |  | 6 |  |
| 7 |  | 8 |  |
| 9 |  | 10 |  |
| 11 |  | 12 |  |
| 13 |  | 14 |  |

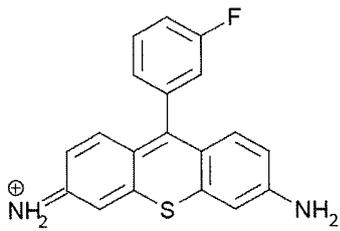
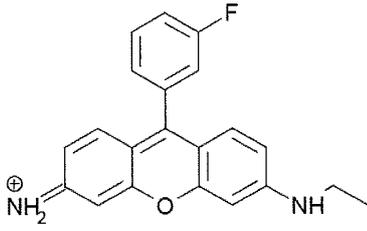
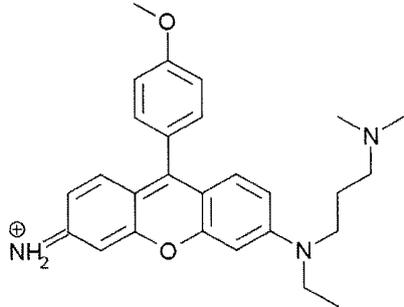
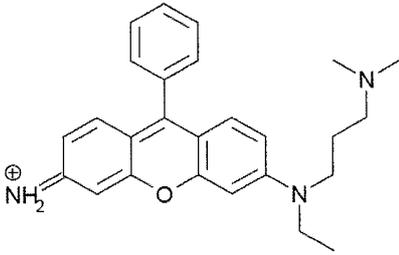
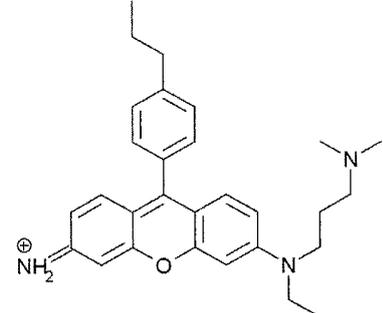
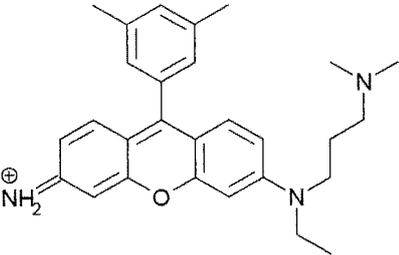
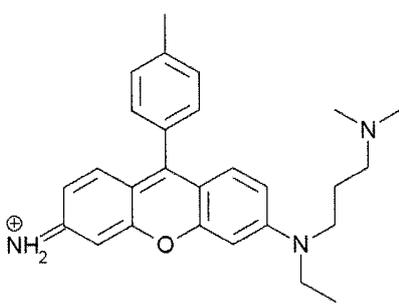
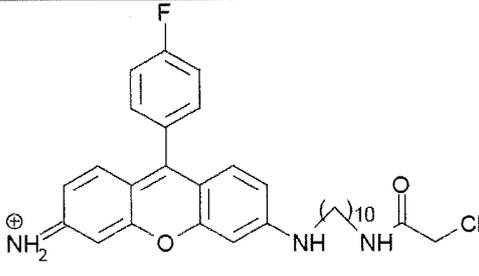
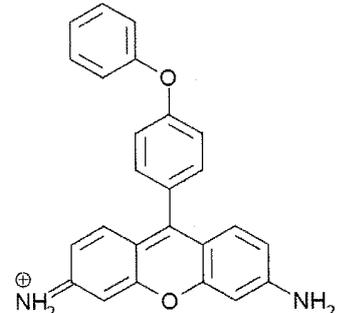
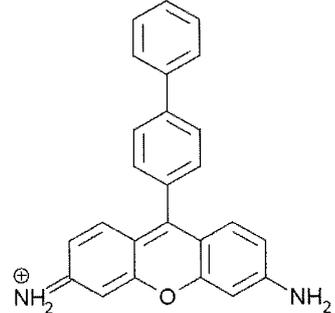
10

20

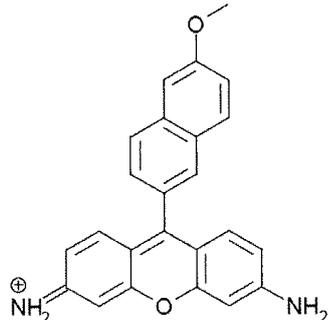
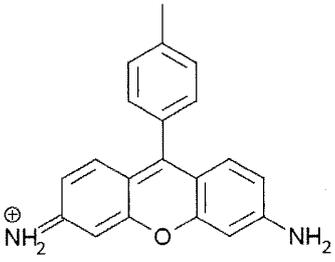
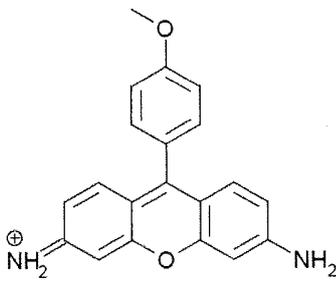
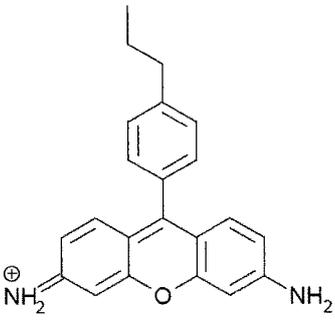
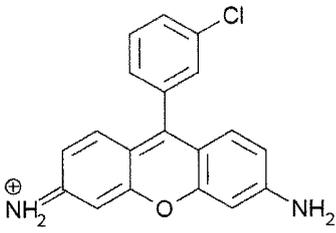
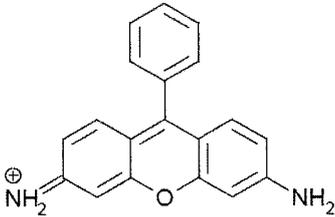
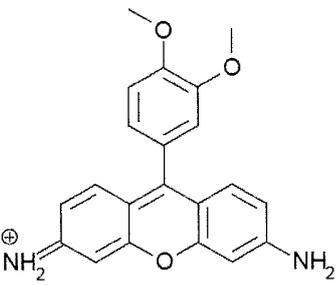
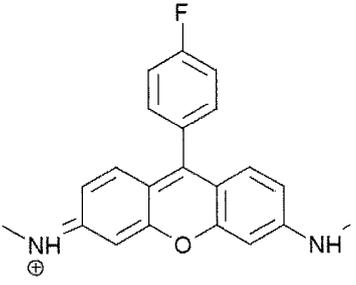
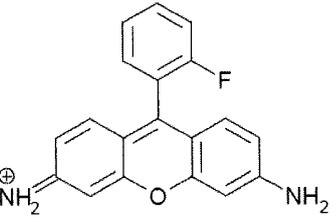
30

40

【表 2 - 3】

| | | | | |
|----|---|----|--|----|
| 15 |  | 16 |  | 10 |
| 17 |  | 18 |  | 20 |
| 19 |  | 20 |  | 30 |
| 21 |  | 22 |  | 40 |
| 26 |  | 27 |  | |

【表 2 - 4】

| | | | | |
|----|---|----|--|----|
| 28 |  | 29 |  | 10 |
| 30 |  | 31 |  | 20 |
| 32 |  | 33 |  | 30 |
| 34 |  | 35 |  | 40 |
| 36 |  | | | 50 |

【0013】

本発明の方法で使用される前記化合物はこれら化合物の塩であってもよい。それらの塩は当業者に周知であり、好ましい例として、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸およびリン酸等の無機酸との塩；ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒

石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸および p - トルエンスルホン酸等の有機酸との塩；ナトリウム塩およびカリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩およびバリウム塩等のアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩；アンモニウム塩；トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2, 6 - ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、N, N - ジエチルアミン、シクロヘキシルアミン、N, N' - ジシクロヘキシルアミン、N, N' - ジベンジルエチレンジアミン、N, N - ジメチルアミノピリジン (DMAP)、1, 4 - ジアザビシクロ [2 . 2 . 2] オクタン (DABCO)、1, 5 - ジアザビシクロ [4 . 3 . 0] ノネン - 5 (DBN)、1, 8 - ジアザビシクロ [5 . 4 . 0] ウンデク - 7 - エン (DBU) 等の有機塩基との塩；アルギニン、リジンおよびオルニチン等の塩基性アミノ酸との塩；アスパラギン酸およびグルタミン酸等の酸性アミノ酸との塩；等が挙げられる。

10

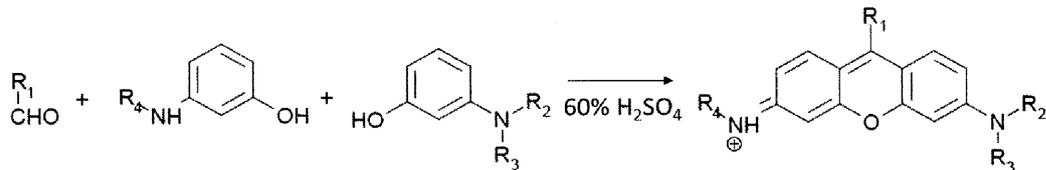
【 0 0 1 4 】

一態様において、本発明の方法で用いられる前記化合物は米国特許出願公開第 2 0 0 8 / 0 1 2 4 7 5 1 号に記載の反応により調製することができる。

【 0 0 1 5 】

他の態様においては、次の合成スキームが提供される。

【 化 1 8 】



20

前記化合物が官能基（水酸基等）を有する場合、該官能基を必要に応じてあらかじめ保護し、上記反応後に常法によって脱保護してもよい。

【 0 0 1 6 】

本発明において、前記の多能性細胞を選別する方法は、前記化合物を蓄積した細胞を多能性細胞として検出するさらなる工程を含む。例えば、前記化合物を蓄積した細胞は該化合物の蛍光を測定することにより、または該化合物に対する抗体を使用することにより、検出することができる。

30

【 0 0 1 7 】

前記多能性細胞は、生体に存在するすべての細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ。該多能性幹細胞の例としては、胚性幹 (ES) 細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹細胞 (「ntES細胞」)、生殖幹細胞 (「GS細胞」)、胚性生殖細胞 (「EG細胞」)、および人工多能性幹 (iPS) 細胞が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい前記多能性幹細胞の例として、ES細胞、ntES細胞、およびiPS細胞が挙げられる。

【 0 0 1 8 】

(A) 胚性幹細胞

ES細胞は、ヒトやマウスなど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とを有する幹細胞である。

ES細胞は、受精卵の8細胞期、桑実胚期後の胚である、胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚由来幹細胞であり、成体を構成するあらゆる細胞に分化する能力、いわゆる分化多能性と、自己複製による増殖能とを有している。ES細胞は、マウスで1981年に発見され (M. J. Evans and M. H. Kaufman (1981), Nature 292:154-156)、その後、ヒト、サルなどの霊長類でも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; および J. A. Thomso

40

50

n and V. S. Marshall (1998), *Curr. Top. Dev. Biol.*, 38:133-165)。

E S細胞は、対象動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取出し、内部細胞塊をフィーダー細胞である線維芽細胞の上で培養することによって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、白血病抑制因子(LIF)、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)などの物質を添加した培地を用いて行うことができる。ヒトおよびサル(E S細胞)の樹立と維持の方法については、例えば、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; およびH. Kawasaki et al. (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:1580-1585などに記載されている。

ヒトE S細胞は、例えば0.1 mM 2-メルカプトエタノール、0.1 mM 非必須アミノ酸、2 mM L-グルタミン酸、20% KSR及び4 ng/ml bFGFを補充したDMEM/F-12培地を使用し、37℃、5% CO₂ 湿潤雰囲気下で維持することができる。また、E S細胞は、3~4日おきに継代する必要があり、このとき、継代は、例えば1 mM CaCl₂ 及び20% KSRを含有するPBS中の0.25% トリプシン及び0.1 mg/ml コラゲナーゼIVを用いて行うことができる。

E S細胞の選択は、一般に、アルカリホスファターゼ、Oct-3/4、Nanogなどの遺伝子マーカーの発現を指標にして行うことができる。特に、ヒトE S細胞の選択では、OCT-3/4、NANOG、などの遺伝子マーカーの発現をReal-Time PCR法で検出したり、細胞表面抗原であるSSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81を免疫染色法にて検出することで行うことができる(Klimanskaya et al. (2006), *Nature*, 444:481-485)。

ヒトE S細胞株である例えばKHES-1、KHES-2及びKHES-3は、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。

【0019】

(B) 生殖幹細胞

生殖幹細胞は、精巣由来の多能性幹細胞であり、精子形成のための起源となる細胞である。この細胞は、E S細胞と同様に、種々の系列の細胞に分化誘導可能であり、例えばマウス胚盤胞に移植するとキメラマウスを作出できる性質をもつ(M. Kanatsu-Shinohara et al. (2003) *Biol. Reprod.*, 69:612-616; K. Shinohara et al. (2004), *Cell*, 119:101-1012)。生殖幹細胞は、神経膠細胞系由来神経栄養因子(GDNF)を含む培地で自己複製可能であるし、またE S細胞と同様の培養条件下で継代を繰り返すことによって、生殖幹細胞を得ることができる(竹林正則ら(2008), *実験医学*, 26巻, 5号(増刊), 41~46頁, 羊土社(東京、日本))。

【0020】

(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、E S細胞と同様な多能性をもつ細胞であり、LIF、bFGF、幹細胞因子などの物質の存在下で始原生殖細胞を培養することによって樹立しうる(Y. Matsui et al. (1992), *Cell*, 70:841-847; J.L. Resnick et al. (1992), *Nature*, 359:550-551)。

【0021】

(D) 人工多能性幹細胞

人工多能性幹(iPS)細胞は、ある特定の核初期化物質を、DNAまたはタンパク質の形態で体細胞に導入することまたは薬剤によって当該核初期化物質の内在性のmRNAおよびタンパク質の発現を上昇させることによって作製することができる、E S細胞とほぼ同等の特性、例えば分化多能性と自己複製による増殖能、を有する体細胞由来の人工の幹細胞である(K. Takahashi and 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; M. Nakagawa et al. (2008) *Nat. Biotechnol.*, 26: 101-106; WO 2007/069666; およびWO 2010/068955)。核初期化物質は、E S細胞に特異的に発現している遺伝子またはE

10

20

30

40

50

S細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子もしくはそれらの遺伝子産物であればよく、特に限定されないが、例えば、Oct3/4、Klf4、Klf1、Klf2、Klf5、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Sox18、c-Myc、L-Myc、N-Myc、TERT、SV40 Large T antigen、HPV16 E6、HPV16 E7、Bmi1、Lin28、Lin28b、Nanog、Esrrb、Esrrg、およびGlis1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、組み合わされて使用されてもよい。例えば、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。

【0022】

上記の各核初期化物質のマウスおよびヒトcDNAのヌクレオチド配列並びに当該cDNAにコードされるタンパク質のアミノ酸配列情報は、WO 2007/069666に記載のNCBIアクセッション番号を参照することにより得られる。また、L-Myc、Lin28、Lin28b、Esrrb、Esrrg、およびGlis1のマウスおよびヒトのcDNA配列およびアミノ酸配列の情報については、それぞれ下記NCBIアクセッション番号を参照することにより取得できる。当業者は、当該cDNA配列またはアミノ酸配列情報に基づいて、常法により所望の核初期化物質を調製することができる。

| 遺伝子名 | マウス | ヒト |
|--------|--------------|--------------|
| L-Myc | NM_008506 | NM_001033081 |
| Lin28 | NM_145833 | NM_024674 |
| Lin28b | NM_001031772 | NM_001004317 |
| Esrrb | NM_011934 | NM_004452 |
| Esrrg | NM_011935 | NM_001438 |
| Glis1 | NM_147221 | NM_147193 |

【0023】

これらの核初期化物質は、タンパク質の形態で、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチドとの結合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよいし、あるいは、DNAの形態で、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクターの使用、リポフェクション、リポソームの使用、またはマイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよい。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター（以上、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（Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 85, 348-62, 2009）などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC、PAC）などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる（Science, 322:949-953, 2008）。ベクターには、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができる。使用されるプロモーターとしては、例えばEF1プロモーター、CAGプロモーター、SRプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどが用いられる。なかでも、EF1プロモーター、CAGプロモーター、MoMuLV LTR、CMVプロモーター、SRプロモーターなどが好ましい。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など）、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列；緑色蛍光タンパク質（GFP）、グルクロニダーゼ（GUS）、FLAGなどのレポーターの遺伝子配列；などを含むことができる。また、上記ベクターには、体細胞への導入後、核初期化物質をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合す

10

20

30

40

50

る核初期化物質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L o x P配列を有してもよい。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 p i g g y B a c 等が挙げられる (Kaji, K. et al., (2009), Nature, 458: 771-775 ; Woltjen et al., (2009), Nature, 458: 766-770 ; WO 2010/012077)。さらに、ベクターには、染色体への組み込みがなくとも複製されて、エピソーマルに存在するように、リンパ指向性ヘルペスウイルス (lymphotrophic herpes virus)、BKウイルスまたは牛乳頭腫ウイルス (Bovine papillomavirus) の起点とそれらの複製に係る配列を含んでいて

10

もよい。例えば、E B N A - 1 および o r i P 配列、または L a r g e T および S V 4 0 o r i 配列を含むことが挙げられる (WO 2009/115295、WO 2009/157201、およびWO 2009/149233)。また、複数の核初期化物質を同時に導入するために、ポリシストロニックに発現させる発現ベクターを用いてもよい。ポリシストロニックに発現させるためには、遺伝子をコードする配列の間は、I R E S または口蹄病ウイルス (F M D V) 2 A コード領域により結合されていてもよい (Science, 322:949-953, 2008 および WO 2009/092042 2009/152529)。

【 0 0 2 4 】

核初期化に際して、i P S 細胞の誘導効率を高めるために、上記の因子の他に、例えば、ヒストンデアセチラーゼ (H D A C) 阻害剤 [例 例 ば、バルプロ酸 (V P A) (Nat. B i o t e c h n o l . , 26(7): 795-797 (2008))、トリコスタチン A、酪酸ナトリウム、M C 1 2 9 3、M 3 4 4 等の低分子阻害剤、H D A C に対する s i R N A および s h R N A (例、H D A C 1 s i R N A S m a r t p o o l (登録商標) (M i l l i p o r e)、H u S H 2 9 m e r s h R N A C o n s t r u c t s a g a i n s t H D A C 1 (O r i G e n e) 等) 等の核酸性発現阻害剤など]、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば 5 ' - a z a c y t i d i n e) (Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、G 9 a ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 [例 例 ば、B I X - 0 1 2 9 4 (Cell Stem Cell, 2: 525-528 (2008)) 等の低分子阻害剤、G 9 a に対する s i R N A および s h R N A (例、G 9 a s i R N A (h u m a n) (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y) 等) 等の核酸性発現阻害剤など]、L - c h a n n e l

20

30

c a l c i u m a g o n i s t (例えば B a y k 8 6 4 4) (Cell Stem Cell, 3, 568-574 (2008))、p 5 3 阻害剤 (例えば p 5 3 に対する s i R N A および s h R N A) (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、W n t S i g n a l i n g a c t i v a t o r (例えば s o l u b l e W n t 3 a) (Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008))、L I F または b F G F などの増殖因子、A L K 5 阻害剤 (例えば、S B 4 3 1 5 4 2) (Nat. Methods, 6: 805-8 (2009))、m i t o g e n - a c t i v a t e d p r o t e i n k i n a s e s i g n a l l i n g 阻害剤、g l y c o g e n s y n t h a s e k i n a s e - 3 阻害剤 (PLoS Biology, 6(10), 2237-2247 (2008))、m i R - 2 9 1 - 3 p、m i R - 2 9 4、m i R - 2 9 5 などの m i R N A (R.L. Judson et al., Nat. Biotech., 27:459-461 (2009))、等を使用することができる。

40

【 0 0 2 5 】

核初期化物質の内在性のタンパク質の発現上昇に使用する薬剤としては、6 - プロモインジルピン - 3 ' - オキシム、インジルピン - 5 - ニトロ - 3 ' - オキシム、バルプロ酸、2 - (3 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル) - 1, 5 - ナフチリジン、1 - (4 - メチルフェニル) - 2 - (4, 5, 6, 7 - テトラヒドロ - 2 - イミノ - 3 (2 H) - ベンゾチアゾリル) エタノン H B r (ピフィスリン - アルファ)、プロスタグランジン J 2 およびプロスタグランジン E 2 等が例示される (WO 2010/068955)。

【 0 0 2 6 】

i P S 細胞誘導のための培地としては、例えば (1) 1 0 ~ 1 5 % F B S を含有する D

50

MEM、DMEM/F12またはDME培地（これらの培地にはさらに、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、非必須アミノ酸類、
-メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）、(2) bFGFまたはSCF
を含有するES細胞用培地、例えばマウスES細胞用培地（例えばTX-WES培地、トロンボX社）または霊長類ES細胞用培地（例えば霊長類（ヒト&サル）ES細胞用培地（リプロセル、京都、日本）、mTESR-1）、などが含まれる。

【0027】

培養法の例としては、たとえば、37℃、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DMEMまたはDMEM/F12培地中で体細胞と核初期化物質（DNAまたはタンパク質）を接触させ約4～7日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞（たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等）上にまきなおし、体細胞と核初期化物質の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞用培地で培養し、該接触から約30～約45日またはそれ以上ののちにES細胞様コロニーを生じさせることができる。また、iPS細胞の誘導効率を高めるために、5～10%と低い酸素濃度の条件下で培養してもよい。

10

あるいは、その代替培養法として、体細胞は、フィーダー細胞（たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等）上で10%FBS含有DMEM培地（これにはさらに、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、非必須アミノ酸類、
-メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）で培養し、培養から約25～約30日またはそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。

20

【0028】

上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培地と培地交換を行う。また、核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ100cm²あたり約5×10³～約5×10⁶細胞の範囲である。

【0029】

マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子を用いた場合は、対応する薬剤を含む培地（選択培地）で培養を行うことによりマーカー遺伝子発現細胞を選択することができる。またマーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合は蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、また発色酵素遺伝子の場合は発色基質を加えることによって、マーカー遺伝子発現細胞を検出することができる。

30

【0030】

本明細書中で使用する「体細胞」は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、サル、ブタ、ラット等）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する動物の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。

40

本発明において、体細胞を採取する由来となる哺乳動物個体は特に制限されないが、好ましくはヒトである。

50

【 0 0 3 1 】

(E) 核移植により得られたクローン胚由来の E S 細胞

n t E S 細胞は、核移植技術によって作製されたクローン胚由来の E S 細胞であり、受精卵由来の E S 細胞とほぼ同じ特性を有している (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換することによって得られたクローン胚由来の胚盤胞の内部細胞塊から樹立された E S 細胞が n t E S (n u c l e a r t r a n s f e r E S) 細胞である。n t E S 細胞の作製のためには、核移植技術 (J. B. Cibelli et al. (1998), Nat. Biotechnol., 16:642-646) と E S 細胞作製技術 (上記) との組み合わせが利用される (若山清香ら (2 0 0 8) , 実験医学, 26 巻, 5 号 (増刊) , 47 ~ 52 頁)。核移植においては、哺乳動物の除核した未受精卵に、体細胞の核を注入し、数時間培養することで再プログラム化することができる。

10

【 0 0 3 2 】

(F) 融合幹細胞

体細胞と卵子もしくは E S 細胞とを融合させることにより、融合させた E S 細胞と同様な多能性を有し、さらに体細胞に特有の遺伝子も有する幹細胞である (Tada M et al. Curr Biol. 11:1553-8, 2001 ; Cowan CA et al. Science. 2005 Aug 26;309(5739):1369-73)。

【 0 0 3 3 】

本発明の方法は、上述の初期化因子を導入した体細胞を含む細胞試料から多能性細胞を選別する場合に用いることができる。

20

本発明はまた、体細胞への分化を誘導された多能性細胞を含む細胞試料から多能性細胞を選別する場合にも用いることができる。

ここで、多能性細胞は、特定の臓器細胞およびその前駆細胞へ分化を誘導されるのみでなく、内胚葉細胞、中胚葉細胞および外胚葉細胞等の広範な細胞型を含む細胞集団へと分化を誘導されてもよい。本発明の標的となる臓器の例としては、皮膚、血管、角膜、腎臓、心臓、肝臓、臍帯、腸、神経、肺、胎盤、膵臓、脳、四肢末梢、および網膜等が挙げられるが、これらに限定されない。当業者に自明の任意の分化誘導法を用いることができる。例としては、特開2002-291469に記載される神経幹細胞への分化誘導法、特開2004-121165に記載される膵幹様細胞への分化誘導法、および特表2003-505006に記載される造血細胞への分化誘導法が挙げられる。さらに、胚様体の形成による分化誘導法の例として、特表2003-523766等に記載される方法等が挙げられる。

30

【 0 0 3 4 】

他の態様において、本発明の方法は、前記化合物を蓄積した細胞を選択することにより多能性細胞を選択するために使用することができる。

他の態様において、本発明の方法は、前記化合物を蓄積した細胞を除去することにより分化した細胞を選択するために使用することができる。

他の態様において、多能性細胞を選別するためのキットが提供される。該キットは上述の化合物、培養液等を含んでいてよい。該キットはさらに選別のための手順書または説明書を含んでいてよい。

40

【 実施例 】

【 0 0 3 5 】

< 材料 >

シクロスポリン A を和光純薬工業株式会社より購入した。マウスモノクローナル抗 M D R 1 抗体 (M R K 1 6) を協和メデックス株式会社より購入した。蛍光標識二次抗体を、M o l e c u l a r P r o b e s より購入した。牛胎児血清 (F B S) を I n v i t r o g e n より購入した。D u l b e c c o ' s M o d i f i e d E a g l e ' s M e d i u m (D M E M) をナカライテスク株式会社より購入した。

【 0 0 3 6 】

50

<化合物1とともにインキュベートしたヒトiPS細胞の、蛍光顕微鏡およびFACS分析による評価>

ヒトiPS細胞(クローン#201B7)(Takahashi, K. et al. Cell 2007, 131, 861-872)を、6穴プレート中、SNLフィーダー細胞上に 2×10^5 細胞/ウェルの密度でプレATINGした(McMahon, A.P. and Bradley, A., Cell, 62, 1073-1085, 1990)。プレATINGの6日後、細胞を $2 \mu\text{M}$ 化合物1(表2)とともに3時間インキュベートした(この時点で蛍光顕微鏡像を取得した)。細胞をAccutase(Invitrogen)で単一細胞に分離し、a-SSEA-4-Alexa 647で30分間室温にて染色した。洗浄後、FACS(FACS Aria II)分析を行った。

【0037】

<部分的に分化したヒトiPS細胞の蛍光顕微鏡イメージング>

ヒトiPS細胞(クローン#201B7)を96穴プレート中のSNLフィーダー細胞上にプレATINGした。プレATINGの5日後、iPS細胞のドーナツ型コロニーが偶然いくつか得られた。これらの細胞を、 $4 \mu\text{M}$ 化合物1とともに、4.5時間37でインキュベートした。蛍光顕微鏡像をCarl Zeiss Axioskopを使用して取得した。

【0038】

<ヒトのES細胞および分化した細胞の蛍光顕微鏡イメージング>

hES細胞株、KhES-1を、先に記載の通り維持した(Suemori, H. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006, 345, 926-932)。hESCの分化を誘導するため、細胞をMatrigel被覆プレート上に播種し、10%FBSを加えたDMEM中で500nMのall-transレチノイン酸(Sigma R2625)とともに4日間培養した。 $1 \mu\text{M}$ の化合物1で2時間染色後、細胞をPBSでリンスし、新鮮な(色素を含まない)培地中に保持した。DP72を使用し、Olympus IX71による蛍光顕微鏡観察を行った。

【0039】

<細胞培養>

ヒトMDR1を安定に発現しているKB/MDR1、およびKB3-1宿主細胞(Ueda, K et al., PNAS 84, 3004-3008, 1987)を、37の加湿インキュベーター(5%CO₂)中において、10%FBSを添加したDMEM中で維持した。

【0040】

<蛍光化合物の蓄積>

細胞を、35mm/ガラスベースディッシュ(IWAKI)中で、10%FBSを添加したDMEM中、ディッシュあたり 5×10^5 細胞の密度で24~48時間継代培養した。その後、細胞を、10%FBSおよび前記化合物を添加したDMEM中、37にて2時間インキュベートし、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄し、共焦点顕微鏡(LSM 700; Carl Zeiss)で観察した。

【0041】

<免疫染色>

細胞をカバーガラス上で増殖させ、PBS+(0.1mg/ml CaCl₂およびMgCl₂・6H₂Oを含むPBS)中の4%パラホルムアルデヒドで20分間室温にて固定した。PBS+で希釈した10%ヤギ血清で1時間ブロッキングを行った後、細胞を $5 \mu\text{g/ml}$ MRK16とともにインキュベートし、次いで蛍光標識二次抗体とともにインキュベートした。

【0042】

<PCR>

RNAを5種類のヒトES(hES)細胞株(KhES-1、KhES-2、KhES-3、KhES-4、KhES-5)および3種類のヒトiPS(hiPS)細胞株(IMR90-1、IMR90-4、201B7)から調製した。ファーストストランドcDNAを逆転写酵素(Applied Biosystems)を用いて合成した。遺伝子

10

20

30

40

50

発現プロファイルを、44種類のABCトランスポーターと4種類のハウスキーピング遺伝子(GAPDH、18S、HPRT1、GUSB)とをカバーするTaqMan Array Gene Signature 96-Well Plate, Human ABC Transporters (Applied Biosystems)を用いた定量的リアルタイムPCR(RT-PCR)により分析した。発現量をGAPDHに対して標準化した。

【0043】

<化合物1とともにインキュベートしたヒトES細胞および分化した細胞の、FACS分析による評価>

細胞を上記のように調製した。1 μ Mの化合物1で1時間染色した後、細胞をPBSで10
リンスし、さらに24時間培養した。DP72を使用し、Olympus IX71による
蛍光顕微鏡観察を行った。化合物1による染色中およびその後の分析を行うまでの培養
中、CsAを10 μ Mの濃度で添加した。FACS分析のため、細胞を氷冷PBSで二回
洗浄した後、0.25%トリプシン-EDTAを用いて単一細胞に分離し、直接分析のため
の懸濁液を得た。未処理の未分化または分化したhESCのベースラインを参照すること
により、化合物1を含む細胞の割合を、FACS Caliburフローサイトメーター
(Becton Dickinson, CA, USA)上で試験した。

【0044】

<ヒトiPS細胞のスクリーニング>

Young-Tae Changのグループより蛍光化合物ライブラリーの提供を受け 20
た(Ahn, Y-H., Lee, J-S. and Chang, Y-T. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 4510-4511
)。ヒトiPS細胞(クローン#201B2)を96穴プレート内のSNLフィーダー細胞
上にプレATINGした。プレATINGして5日後、蛍光化合物を最終濃度4 μ Mで
添加した。一晚インキュベートしたあと、蛍光顕微鏡像をCarl Zeiss Axio
skopを用いて取得した。

【0045】

<二次元ゲル電気泳動(2-DE)>

ヒトiPS細胞を化合物1のクロロアセチル誘導体(化合物22)(1 μ M)で4時間
処理し、その後PBSで2回洗浄した。CTK溶液(Reprocell)処理によって 30
SNLフィーダー細胞を除去した後、ヒトiPS細胞をAccutase処理により回収
した。ProteoExtract^R Cytosol/Mitochondria Fractionation kitを添付の説明書に従って使用し、細胞ペレットからミ
トコンドリア分画を得た。Ampholine(pH3.5-10, Phamalyte
3-10 for IEF, GE Healthcare)を用いて等電点電気泳動
(IEF)を行った。その後、IEFストリップを10%SDS-PAGEゲル上で分離し
、二次元解析を行った。二次元蛍光イメージをTyphoon 9400スキャナー(GE
healthcares)を用いて532nm/580nmの励起/発光波長にて取得した。蛍光標識スポットをゲルから切り出し、質量分析を行った。

【0046】

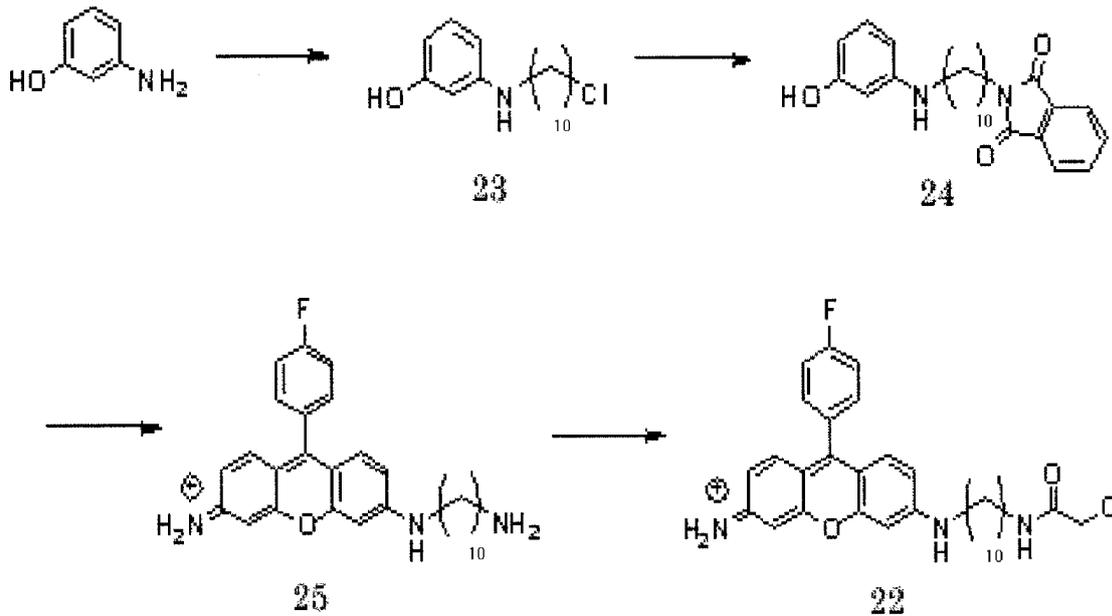
<部分的に分化したヒトiPS細胞の蛍光顕微鏡イメージング>

ヒトiPS細胞(クローン#201B7)を24穴プレート内のSNLフィーダー細胞
上にプレATINGした。プレATINGから1日後、細胞を1 μ Mの化合物1とともに
4時間37 $^{\circ}$ Cにてインキュベートした。化合物1をPBSによる洗浄で除いた後、細胞を
9.6nM MitORedとともに30分間37 $^{\circ}$ Cにてインキュベートした。細胞をP
BSでリンスし、新鮮な(色素を含まない)培地で保持した。蛍光顕微鏡像をCarl
Zeiss Axioinvert 100Mを用いて取得した。

【0047】

<化合物23、24、25、および22の合成>

【化19】



10

20

【0048】

化合物23

1, 10 - ジクロロデカン (8 . 7 3 g , 4 1 . 3 m m o l) およびトリエチルアミン (6 m L) を、DMF (4 0 m L) 中の *m* - アミノフェノール (3 . 8 5 g , 3 5 . 3 m m o l) 溶液に添加した。該混合物を 1 0 0 で 3 日間攪拌した。飽和 NaHCO_3 水溶液で反応をクエンチし、EtOAc で抽出を行った。有機層を合わせて食塩水で洗浄し、無水 MgSO_4 で乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮した。残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製し (シリカゲル、ヘキサン : EtOAc = 9 : 1 ~ 1 : 1)、表題化合物を得た (1 . 9 2 g , 6 . 7 6 m m o l 、収率 1 9 %) 。褐色油 ; $R_f = 0 . 5 7$ (3 3 % EtOAc - hexane) ; $^1\text{H NMR}$ (6 0 0 M H z , $\text{DMSO}-d_6$) 8 . 8 4 (s , 1 H) , 6 . 8 0 (d d , $J = 7 . 6 , 8 . 3$ H z , 1 H) , 5 . 9 7 (d , $J = 7 . 6$ H z , 1 H) , 5 . 9 4 (s , 1 H) , 5 . 9 2 (d , $J = 8 . 2$ H z , 1 H) , 5 . 3 6 (s , 1 H) , 3 . 6 1 (m , 2 H) , 2 . 8 9 (m , 2 H) , 1 . 6 9 (m , 2 H) , 1 . 4 9 (m , 2 H) , 1 . 3 5 - 1 . 2 5 (m , 1 2 H) ; $^{13}\text{C NMR}$ (1 5 0 M H z , $\text{DMSO}-d_6$) 1 5 8 . 3 , 1 5 0 . 6 , 1 2 9 . 5 , 1 0 3 . 7 , 1 0 3 . 0 , 9 8 . 9 , 4 5 . 6 , 4 3 . 1 , 3 2 . 2 , 2 9 . 2 , 2 9 . 1 \times 2 , 2 8 . 9 , 2 8 . 4 , 2 6 . 9 , 2 6 . 4 ; FABMS m/z 2 8 3 [M^+] ; $\text{C}_{16}\text{H}_{26}\text{NOCl}$ に対する HRMS 計算値 [M^+] 2 8 3 . 1 7 0 3 , 測定値 2 8 3 . 1 7 0 8 。

30

【0049】

化合物24

フタルイミドカリウム (1 . 8 8 g , 1 0 . 1 m m o l) を DMF (2 0 m L) 中の化合物 2 3 (1 . 9 2 g , 6 . 7 6 m m o l) の溶液に加えた。該混合物を 1 0 0 で一晩攪拌した。飽和 NaHCO_3 水溶液で反応をクエンチし、EtOAc で抽出を行った。有機層を合わせて食塩水で洗浄し、無水 MgSO_4 で乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮した。残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製し (シリカゲル、ヘキサン : EtOAc = 5 : 1 ~ 1 : 1)、表題化合物を得た (1 . 8 3 g , 4 . 6 4 m m o l 、収率 6 9 %) 。褐色油 ; $R_f = 0 . 5 1$ (3 3 % EtOAc - hexane) ; $^1\text{H NMR}$ (6 0 0 M H z , $\text{DMSO}-d_6$) 8 . 8 3 (s , 1 H) , 7 . 8 3 (m , 2 H) , 7 . 8 1 (m , 2 H) , 6 . 7 9 (d d , $J = 8 . 3 , 7 . 6$ H z , 1 H) , 5 . 9 7 (d , $J = 8 .$

40

50

2 Hz, 1 H), 5.94 (s, 1 H), 5.91 (d, J = 7.5 Hz, 1 H), 5.34 (brs, 1 H), 3.54 (m, 2 H), 2.88 (m, 2 H), 1.56 (m, 2 H), 1.47 (m, 2 H), 1.29 - 1.22 (m, 12 H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) 168.1, 168.3, 150.6, 134.5, 131.8, 129.5, 123.1, 103.7, 103.1, 98.9, 60.9, 43.1, 37.5, 32.7, 29.2, 29.1, 29.0 \times 2, 28.9, 28.7, 28.0, 26.9, 26.4, 25.7; FABMS m/z 394 [M⁺]; C₂₄H₃₀N₂O₃ に対する HRMS 計算値 [M⁺] 394.2256, 実測値 394.2250.

【0050】

化合物 25

4-フルオロベンズアルデヒド (242 g、1.95 mmol) および m-アミノフェノール (213 g、1.95 mmol) を 60% H₂SO₄ (10 mL) 中の化合物 24 (770 g、1.95 mmol) の溶液に加えた。該混合物を 130 で一晩攪拌した。反応液を氷水で希釈し、濾過した。沈殿物を蒸留水 (DW) で洗浄し、メタノールに溶解し、減圧下で濃縮した。残渣を HPLC (Inertsil ODS-3、methanol:0.1% TFA-DW=0:1~1:0) で精製し、表題化合物を得た (34 g、0.059 mmol、収率 3%)。紫色油; ^1H NMR (600 MHz, 酢酸- d_4) 7.51 (dd, J = 8.9, 5.5 Hz, 2 H), 7.40 (dd, J = 8.9, 8.9 Hz, 2 H), 7.31 (d, J = 8.9 Hz, 2 H), 6.98 - 6.93 (m, 2 H), 3.40 (m, 2 H), 3.04 (m, 2 H), 1.74 - 1.67 (m, 4 H), 1.44 - 1.32 (m, 12 H); ^{13}C NMR (150 MHz, DMSO- d_6) 164.0, 162.4, 158.6, 158.3, 158.1, 157.9, 132.2, 132.08, 132.02, 128.4, 118.2, 117.0, 116.2, 116.1, 113.2, 113.0, 97.3, 94.1, 43.0, 39.0, 29.1, 29.0 \times 2, 28.9, 28.7, 28.2, 27.2, 26.6, 26.0; FABMS m/z 460 [M⁺]; C₂₉H₃₅FN₃O に対する HRMS 計算値 [M⁺] 460.2764, 実測値 460.2765.

【0051】

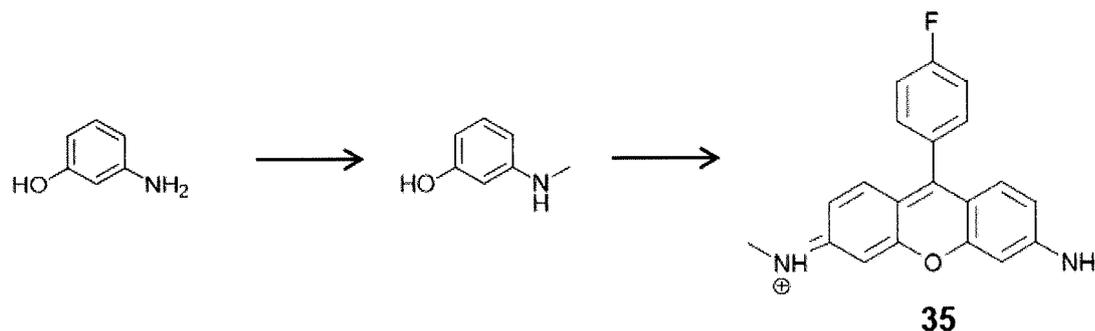
化合物 22

塩化クロロアセチル (30 μ L、0.39 mmol) および トリエチルアミン (100 μ L) を DMF (1.5 mL) 中の化合物 25 (82.5 mg、0.12 mmol) の溶液に加えた。該混合物を 37 で 3 日間攪拌した。反応液をメタノールで希釈し、濾過した。ろ液を HPLC (Inertsil ODS-3、methanol:0.1% TFA-DW=0:1~1:0) で精製し、表題化合物を得た (21 mg、0.032 mmol、収率 27%)。紫色油; FABMS m/z 536 [M⁺]; C₃₁H₃₆ClFN₃O₂ に対する HRMS 計算値 [M⁺] 536.2480, 実測値 536.2488.

【0052】

<化合物 35 の合成>

【化 20】



10

20

30

40

50

【0053】

化合物35

N-メチルアミノフェノールを先の論文の通り合成した (Charng-Sheng Tsai, et al., Chem. Comm., 46, 5575-5577, 2010)。簡単に述べると、DMF中のm-アミノフェノール(1.51 g、13.84 mmol)、CH₃I(2.16 g、15.22 mmol)およびK₂CO₃(2.10 g、15.19 mmol)を室温で19時間攪拌した。該混合物を蒸留水で希釈し、EtOAcで抽出を行った。有機層を合わせて食塩水で洗浄し、無水Na₂SO₄で乾燥し、減圧下で濃縮した。残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィーで精製し(シリカゲル、ヘキサン:EtOAc=1:0~3:7)、表題化合物を得た(褐色油、658 mg、5.34 mmol、収率39%)。

10

【0054】

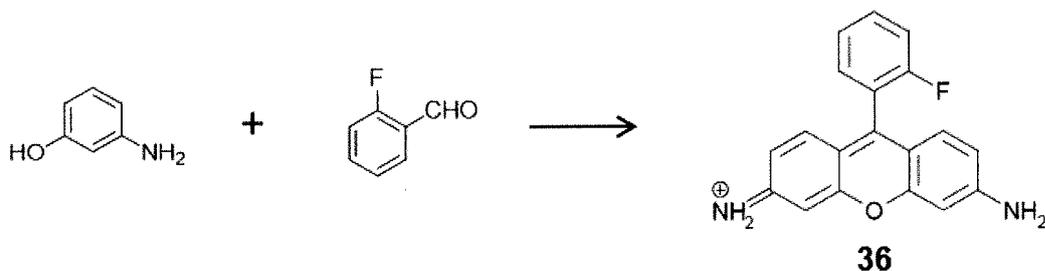
上記N-メチルアミノフェノール(411 mg、3.34 mmol)をメタンサルホン酸(11 mL)中の4-フルオロベンズアルデヒド(150 mg、1.21 mmol)の溶液に加えた。該混合物を120℃で22時間攪拌した。反応液を蒸留水で希釈し、K₂CO₃で中和した。得られた混合物をEtOAcで抽出した。有機層を合わせて食塩水で洗浄し、無水MgSO₄で乾燥し、濾過し、減圧下で濃縮した。残渣をHPLC(Inertsil ODS-3、methanol:0.1%TFA-DW=0:1~1:0)で精製し、表題化合物を得た(23 mg、0.052 mmol、収率4%)。紫色油; ¹H NMR(300 MHz, CD₃OD) 7.45-7.36(m, 4H), 7.21(d, J=9.1 Hz, 2H), 6.81(d, J=9.3 Hz, 2H), 6.69(s, 2H), 2.99(s, 6H)。

20

【0055】

<化合物36の合成>

【化21】



30

【0056】

化合物36

m-アミノフェノール(1.31 g、12 mmol)をメタンサルホン酸(12 mL)中の2-フルオロベンズアルデヒド(502 mg、4.04 mmol)の溶液に加えた。該混合物を120℃で24時間攪拌した。反応液を蒸留水で希釈し、K₂CO₃で中和した。沈殿物を濾過し、メタノールに溶解した。得られた溶液をセライト濾過し、ろ液をHPLC(Inertsil ODS-3、メタノール:0.1%TFA-DW=0:1~1:0)で精製し、表題化合物を得た(10 mg、0.025 mmol、収率0.6%)。紫色油; ¹H NMR(300 MHz, CD₃OD) 7.76-7.69(m, 1H), 7.51-7.40(m, 3H), 7.24(d, J=9.0 Hz, 2H), 6.86(d, J=9.0 Hz, 2H), 6.82(s, 2H)。

40

【0057】

<結果>

ヒト多能性幹細胞に対して選択的な蛍光プローブを見いだすため、326種の蛍光化合物の化学ライブラリーをスクリーニングした。ヒトiPS細胞をフィーダー細胞よりも強く染色する31種のローダミン系分子(表2に示す化合物1~21および26~34)が

50

、画像ベースのスクリーニングにより単離された(図1A)。さらに、表2に示す合成化合物35および36により、ヒトiPS細胞をフィーダー細胞よりも強く染色することができた(図1A)。

【0058】

化合物1のヒトiPS細胞に対する選択性をフローサイトメトリーにより定量的に分析した(図1B~D)。ヒトiPS細胞とフィーダー細胞との混合物を、化合物1(図1B)、AlexaFluor 647標識抗SSEA-4抗体(図1C)、またはその両者(図1D)で処理した。フローサイトメトリーにより、化合物1陽性集団(43.4%)が化合物1陰性集団(56.6%)から明瞭に分離された。SSEA-4陽性(37.6%)および陰性(62.4%)集団は同様な分布パターンを示し、細胞が二重染色された際には基本的にすべてのSSEA-4陽性細胞が化合物1によっても同時に染色された(42.4%)が、SSEA-4陰性細胞はそうではなかった(55.2%)。これらの結果は、化合物1はiPS細胞を特異的に染色することができ、ヒトiPS細胞のフィーダー細胞からの分離に好適に使用できることを示している。

10

【0059】

iPS細胞が過剰に増殖すると、iPS細胞コロニーの中央部が分化を始め、iPS細胞のドーナツ型コロニーが形成される傾向がある。化合物1ではこれらのコロニーの未分化の部分が選択的に染色されたが、前記中央部分は染色されなかった(図2a)。この観察を検証するため、ヒトES細胞を用いた同様な実験を行った。ヒトES細胞を化合物1で処理すると、ES細胞コロニーはフィーダー細胞よりも強く染色された(図2b)。レチノイン酸による部分的な分化により、コロニーにより薄く染まった部分が生じた(図2c)。これらの観察から、化合物1によって、分化した細胞から多能性幹細胞を区別することができる可能性が示唆された。

20

【0060】

化合物1は細胞透過性であると思われ、その細胞内分布はミトコンドリアマーカであるMitoTracker Red(MitoRed)の細胞内分布と重複する(Minami kawa, T. et al. J. Cell Sci. 1999, 112, 2419-2430)(図3a-d)。MitoRedではヒトiPS細胞およびフィーダー細胞両者のミトコンドリアが染色されたが、化合物1ではiPS細胞のミトコンドリアのみが染色された。これらの結果は、化合物1がヒト多能性細胞のミトコンドリア中に局在することを示唆する。化合物1の染色を、ミトコンドリア膜電位を変化させる脱共役試薬であるCCCP(Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone)の存在下で試験した。化合物1の染色パターンはCCCPの存在下でも同一のままであった。この結果は、化合物1の染色特性が膜電位に依存しないものであることを示している(図3e)。化合物1と相互作用するミトコンドリアタンパク質を単離するため、化合物1のクロロアセチル誘導体(化合物22)を合成した。化合物22の選択性は化合物1のものよりもやや低い、ヒトiPS細胞のミトコンドリアにやはり局在する。染色されたミトコンドリアを化合物22を用いた処理によってヒトiPS細胞から単離し、蛍光標識されたミトコンドリアタンパク質を二次元SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した。マスシーケンシング分析の結果、蛍光標識されたタンパク質のペプチド配列はこれまでに報告されているADH1タンパク質のものであることが分かった(Kim, Y. K. et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2011, 50, 2761-2763)。しかし、ADH1は数多くの細胞型で多量に発現される酵素であることから、化合物1の選択性のメカニズムは依然として不明である。

30

40

【0061】

ヒトiPS細胞およびヒトES細胞の異物排出に関与する4種のABCタンパク質の発現パターンを、定量的RT-PCRによって調べた(図4a)。これら両者のヒト多能性細胞がABCC1(MRP1)およびABCG2を高度に発現していたが、ABCB1(MDR1)およびABCC2(MRP2)トランスポーターは(たとえ発現していたとしても)わずかしかが発現していなかった。ヒトES細胞と、ヒトES細胞からレチノイン酸により調製された分化した細胞(CDX2を高度に発現する栄養外胚葉様細胞)とで発現

50

パターンの比較を行った(図4b)。ABC G2およびABC B1(MDR1)は分化した細胞において高度に発現していた(それぞれ29倍および24倍)。これらの結果は、ABC B1(MDR1)が化合物1の排除に重要な役割を担っている可能性を示している。

【0062】

MDR1発現モデル細胞株(KB/MDR1)を、MDR1を発現しない細胞株であるKB3-1から樹立した。KB/MDR1およびKB3-1を化合物1で2時間処理した。その後、蛍光顕微鏡下でそれらの画像を観察した(図4c、4d)。MDR1を発現しないKB3-1細胞は化合物1で強く染色されたが、KB/MDR1細胞においては蛍光シグナルは検出不可能であった。すなわち、化合物1はABC B1(MDR1)の優れた基質であることが示された。同様な実験をABC G2およびABC C1(MRP1)で行った。ABC G2およびABC C1(MRP1)の発現量に関わらず、化合物1によって細胞が染色された。すなわち、化合物1はこれら2種のトランスポーターの基質でないことが示された。以上の結果を総合的に見ると、化合物1はABC B1(MDR1)の選択的基質であり、ABC B1(MDR1)の発現量によって化合物1による染色強度が変化することが示唆される。

【0063】

化合物1の選択性と分化の際のMDR1誘導との関係を調べるため、ヒトES細胞とヒトES細胞からレチノイン酸によって得られた分化した細胞とを化合物1で処理した(図5a、b)。ヒトES細胞は強い蛍光を示した一方で、分化した細胞は弱い蛍光しか示さなかった。細胞のフローサイトメトリー分析では、ヒトES細胞は分化した細胞の約100倍の強度で染色された(図5c)。同様なフローサイトメトリー分析を蛍光標識MDR1抗体を用いて行ったところ、分化した細胞におけるMDR1の選択的発現が確認された(図5d)。分化した細胞を化合物1および公知のMDR1阻害剤であるシクロスポリンAで処理したところ、分化した細胞も化合物1で標識された(図5e)。これらの結果を総合的に見ると、化合物1の選択性を決定するのは、ヒト多能性細胞では発現が抑制されており、分化の際に誘導されるABC B1(MDR1)による選択的輸送であることがわかる。

KP-1による、ヒトES細胞由来造血細胞の染色が試験された(Takayama et al., Blood 111, 5298-5306, 2008 または Takayama et al., J Exp Med 207, 2817-2830, 2010)(図6A)。FACS分析の結果、KP-1によってSSEA-4陽性ヒトES細胞と、CD45、CD235、CD41aまたはCD43を発現するヒト初期造血細胞とが区別されることが示され、KP-1は初期造血をモニタリングするのに有用であることが示唆された。

次に、臨床的に重要な別の分化過程である心筋形成について、KP-1によるモニタリングが可能かどうか調べた。先の研究(Wang et al., Bba-Biomembranes 1461, 177-200, 2011)に記載の方法に変更を加えて心筋分化を行った。簡単に述べると、ヒトiPS細胞をヒトラミン211(BioLamina, Sweden)でコートした3.5cmの培養皿上で培養した。心筋コロニーの生成を促進するため、WNTシグナル伝達阻害剤を心筋分化3~9日目に添加した。心筋コロニーを15日目に回収し、浮遊培養で7~10日間培養した。フローサイトメトリーで確認したところ、KP-1によってヒトiPS細胞とヒトiPS細胞由来心筋細胞とを区別することができた(図6B)。ヒトiPS細胞に由来する心筋細胞における44種のヒトABCトランスポーターの発現パターンをRT-PCRによって調べた(図7A)。驚くべき事に、ABC G2もABC B1も心筋形成中に誘導されなかった。代わりに、2種の細胞表面膜ABCトランスポーター、ABC A1およびABC C5が分化中に誘導された。ABC D3も誘導されたが、このペルオキシゾームABCタンパク質はKP-1の選択性には関与していないと思われた。ABC A1およびABC C5がKP-1の排出を引き起こす能力を、HEK293細胞で各トランスポーターを過剰発現させることによって調べた。その結果、KP-1はABC C5の優れた基質である(図7B)が、ABC A1に対してはそうではないことが示された(図示

10

20

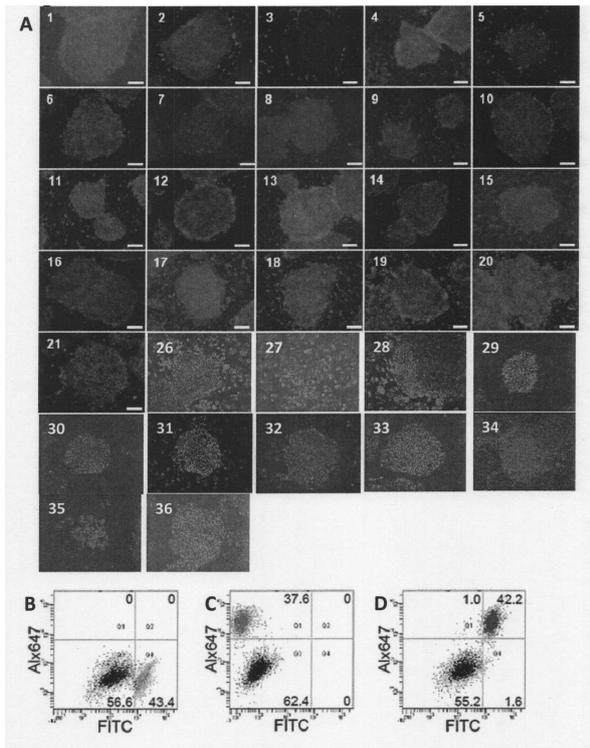
30

40

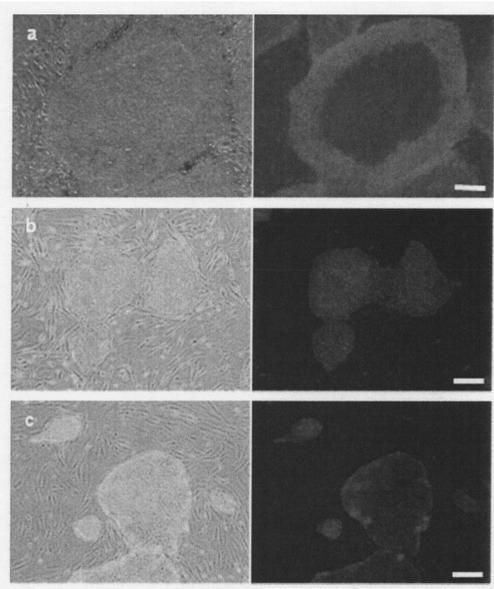
50

せず)。K P - 1 は分化によって誘導される広範な A B C トランスポーターの基質として作用する可能性がある。

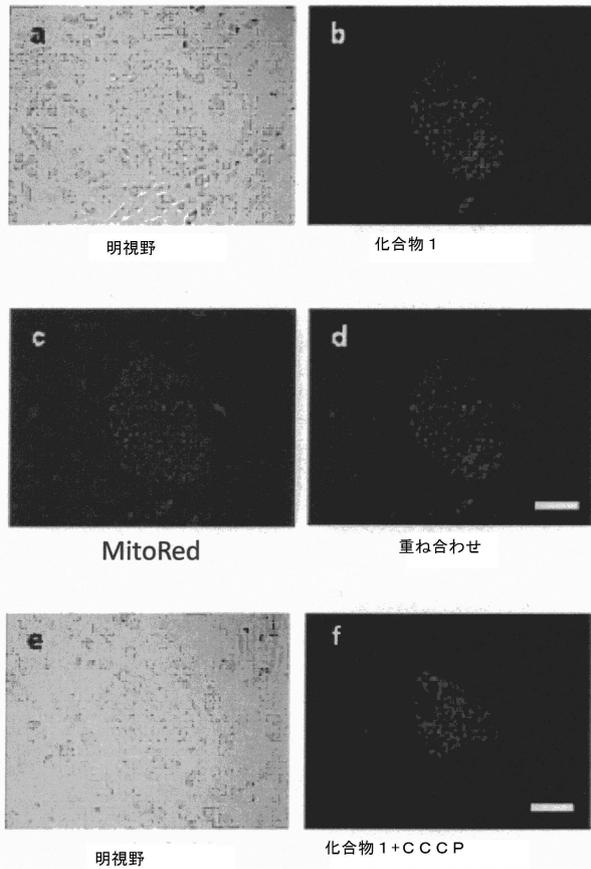
【 図 1 】



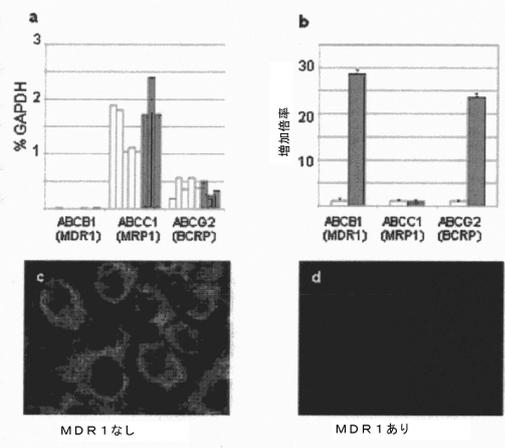
【 図 2 】



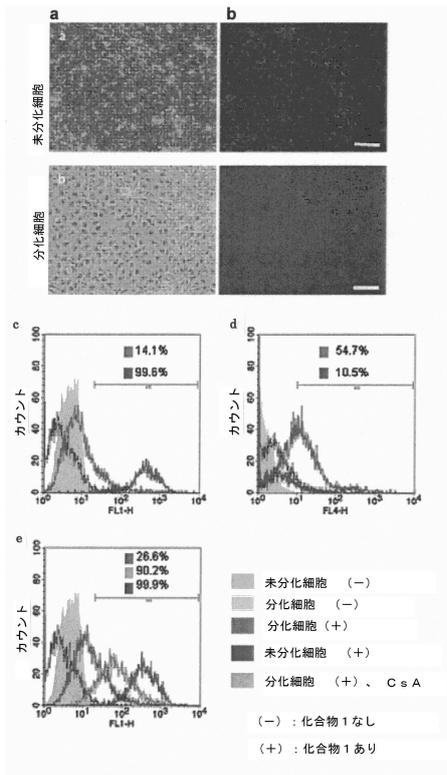
【 図 3 】



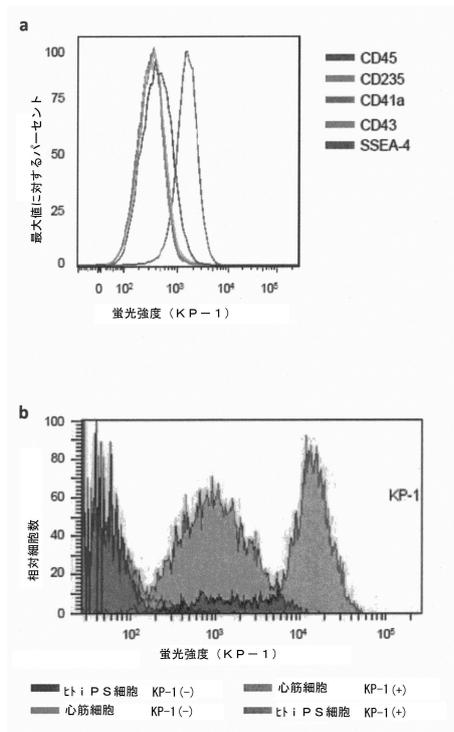
【 図 4 】



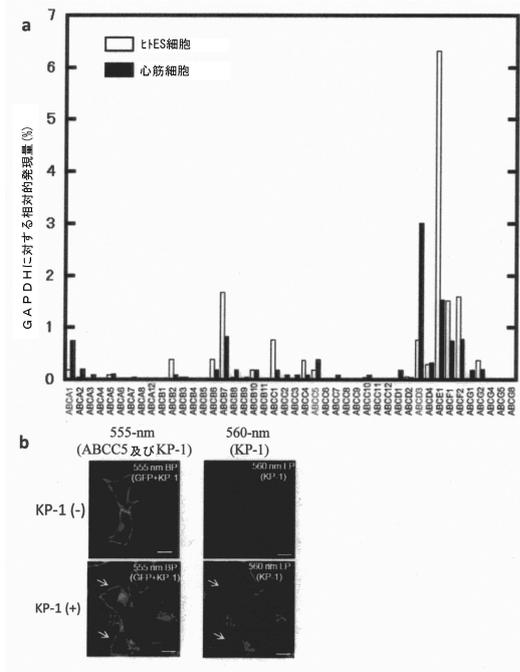
【 図 5 】



【 図 6 】



【 7 】



フロントページの続き

- (72)発明者 チャン ヨンテ
日本国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 中辻 憲夫
日本国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 末盛 博文
日本国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 川瀬 栄八郎
日本国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 山内 香織
日本国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 植田 和光
日本国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 藤林 悠人
日本国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 山中 伸弥
日本国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 中川 誠人
日本国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 太田 雄三

- (56)参考文献 blood, 1993年, Vol. 82, No. 3, p. 762-770
NATURE METHODS, 2010年 1月, Vol. 7, No. 1, p. 61-66
Journal of American Chemical Society, 2007年, Vol. 129, p. 4510, 4511

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00

C12N 5/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPIDS/WPIX(STN)

PubMed