

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5765714号  
(P5765714)

(45) 発行日 平成27年8月19日 (2015. 8. 19)

(24) 登録日 平成27年6月26日 (2015. 6. 26)

(51) Int. Cl.		F I			
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/10</b>	<b>(2006. 01)</b>	C 1 2 N	5/00	1 O 2
<b>C 1 2 N</b>	<b>5/00</b>	<b>(2006. 01)</b>	C 1 2 N	5/00	Z N A
C 1 2 N	15/09	(2006. 01)	C 1 2 N	15/00	A

請求項の数 10 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2012-512619 (P2012-512619)	(73) 特許権者	504132272
(86) (22) 出願日	平成22年5月28日 (2010. 5. 28)		国立大学法人京都大学
(65) 公表番号	特表2012-527888 (P2012-527888A)		京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
(43) 公表日	平成24年11月12日 (2012. 11. 12)	(74) 代理人	100100549
(86) 国際出願番号	PCT/JP2010/059493		弁理士 川口 嘉之
(87) 国際公開番号	W02010/137746	(74) 代理人	100090516
(87) 国際公開日	平成22年12月2日 (2010. 12. 2)		弁理士 松倉 秀実
審査請求日	平成25年5月28日 (2013. 5. 28)	(74) 代理人	100126505
(31) 優先権主張番号	61/182, 542		弁理士 佐貫 伸一
(32) 優先日	平成21年5月29日 (2009. 5. 29)	(74) 代理人	100131392
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 丹羽 武司
		(72) 発明者	山中 伸弥
			日本国京都府京都市左京区聖護院川原町 5 3 国立大学法人京都大学 i P S 細胞研 究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 人工多能性幹細胞の製造方法および培養方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次の工程を含む、人工多能性幹細胞の製造方法。

a) 第一の体細胞へ核初期化因子を導入する工程；

b) 前記核初期化因子が導入された第一の体細胞を、第一の体細胞と由来が同じであって、核の初期化を経していない第二の体細胞をフィーダー細胞に用いて培養する工程。

【請求項 2】

前記第一の体細胞および第二の体細胞が、ヒト体細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記核初期化因子が、Oct 遺伝子群、Sox 遺伝子群、Klf 遺伝子群、Myc 遺伝子群、Nanog 遺伝子、Sal1 遺伝子群およびLin 遺伝子群からなる群より選択される少なくとも一つである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記核初期化因子が、Oct3/4 遺伝子、Sox2 遺伝子、Klf4 遺伝子、c-Myc 遺伝子、L-Myc 遺伝子、Nanog 遺伝子、Sal14 遺伝子およびLin28 遺伝子からなる群より選択される少なくとも一つである、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 5】

前記核初期化因子が、Oct3/4 遺伝子、Sox2 遺伝子、Klf4 遺伝子およびc-Myc 遺伝子である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 6】

前記体細胞が線維芽細胞である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記フィーダー細胞が、マイトマイシンCまたは 線照射処理された細胞である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

人工多能性幹細胞の培養方法であって、当該人工多能性幹細胞の誘導に用いたヒト体細胞と同一個体に由来し、核の初期化を経ていないヒト体細胞をフィーダー細胞として用いて培養する工程を含む、方法。

【請求項 9】

前記ヒト体細胞が線維芽細胞である、請求項 8 に記載の方法。

10

【請求項 10】

前記体細胞にマイトマイシンCまたは 線照射処理をする工程を含む、請求項 8 または 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、人工多能性幹細胞の製造方法に関する。本発明はまた、人工多能性幹細胞の培養方法および人工多能性幹細胞培養のための培養液に関する。

【背景技術】

【0002】

人工多能性幹細胞（iPS細胞）は、体細胞へ核初期化因子を導入することで調製することができる（非特許文献 1、特許文献 1）。このiPS細胞は、通常、マイトマイシンCや線照射により増殖不活性化されたマウス胚性線維芽細胞（MEF）をフィーダー細胞として用いて、樹立され、培養される。しかし、異種由来の細胞を用いるため、得られたiPS細胞は未知のウイルスや病原体を保有する可能性がある。従って、従来の方法で樹立・培養されたiPS細胞をヒトの治療用に使用することは、好ましくない場合がある。実際に、MEFをフィーダー細胞として用いて培養したヒト胚性幹細胞（ES細胞）の表面上に、ヒト細胞では産生しないシアル酸を検出したことが報告されている（非特許文献 2）。

20

【0003】

これまでに、新生児の包皮由来のヒト線維芽細胞またはES細胞由来の線維芽細胞様細胞をフィーダー細胞として用いた培養により、ヒトES細胞の自己複製を保持したとの報告があるが（非特許文献 3、4、5、6 および 7）、iPS細胞における成功例の報告はない。

30

【0004】

また、フィーダー細胞と共に培養したiPS細胞から完全にフィーダー細胞を除去することは困難である。したがって、iPS細胞を用いた治療においては、異種細胞及び他者細胞の混入リスクを低減させる必要がある。以上より、iPS細胞の樹立・培養の工程において全て同種または自家の細胞を用いる技術が望まれている。

【先行技術文献】

【特許文献】

40

【0005】

【特許文献 1】 W02007/069666

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献 1】 K. Takahashi and S. Yamanaka, Cell 126 (4), p663, 2006

【非特許文献 2】 Martin, MJ. et al. Nat. Med. 11, p228, 2005

【非特許文献 3】 Richards, S. et al. 20, p933, 2002

【非特許文献 4】 Park, JH. et al. Bio. Reprod. 69, p2007, 2003

【非特許文献 5】 Park, SP. et al. 19, 676, 2004

【非特許文献 6】 Richards, M. et al. Stem Cells 21, p546, 2003

50

【非特許文献7】Xu, C. et al. Stem Cells 22, p972, 2004

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、より安全性の高いiPS細胞を製造するための技術を提供することを課題とする。本発明はまた、より効率的なiPS細胞の培養技術を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討を行った。その結果、核初期化因子が導入されたヒト体細胞を、ヒト細胞をフィーダー細胞として用いて培養を行うことにより、ヒト体細胞からiPS細胞を製造することに成功した。また、核初期化因子が導入された体細胞を自家の細胞をフィーダー細胞として用いることにより、体細胞からiPS細胞を製造することに成功した。さらに、体細胞の培養上清を用いることにより、iPS細胞を効率よく培養できることを見出し、本発明を完成させた。

10

【0009】

本発明の一態様は、体細胞からの人工多能性幹細胞の製造方法であって、核が初期化された体細胞を、自家の細胞をフィーダー細胞として用いて培養する工程を含む方法を提供することである。

本発明の他の態様は、下記の工程を含む前記方法を提供することである。

a) 第一の体細胞へ核初期化因子を導入する工程；

20

b) 前記核初期化因子が導入された第一の体細胞を、該第一の体細胞と由来が同じであって、核初期化因子が導入されていない第二の体細胞をフィーダー細胞に用いて培養する工程。

本発明の他の態様は、ヒト体細胞からの人工多能性幹細胞の製造方法であって、核が初期化されたヒト体細胞を、ヒト細胞をフィーダー細胞として用いて培養する工程を含む方法を提供することである。

本発明の他の態様は、下記の工程を含む、前記方法を提供することである。

c) 第一のヒト体細胞へ核初期化因子を導入する工程；

d) 前記核初期化因子が導入された第一のヒト体細胞を、ヒト由来の体細胞であって、核初期化因子が導入されていない第二の体細胞をフィーダー細胞に用いて培養する工程

30

。本発明の他の態様は、前記核初期化因子が、Oct遺伝子群、Sox遺伝子群、Klf遺伝子群、Myc遺伝子群、Nanog遺伝子、Sa11遺伝子群およびLin遺伝子群からなる群より選択される少なくとも一つである、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記核初期化因子が、Oct3/4遺伝子、Sox2遺伝子、Klf4遺伝子、c-Myc遺伝子、L-Myc遺伝子、Nanog遺伝子、Sa114遺伝子およびLin28遺伝子からなる群より選択される少なくとも一つである、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記核初期化因子が、Oct3/4遺伝子、Sox2遺伝子、Klf4遺伝子およびc-Myc遺伝子である、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記体細胞が線維芽細胞である、前記方法を提供することである

40

。本発明の他の態様は、前記フィーダー細胞が、マイトマイシンCまたは線照射処理された細胞である、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、人工多能性幹細胞の培養方法であって、人工多能性幹細胞をヒト体細胞をフィーダー細胞として用いて培養する工程を含む方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記ヒト体細胞が、前記人工多能性幹細胞と由来が同じヒト体細胞である、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記ヒト体細胞が線維芽細胞である、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記体細胞にマイトマイシンCまたは線照射処理をする工程を

50

含む、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、人工多能性幹細胞の培養方法であって、体細胞の培養上清を用いて人工多能性幹細胞を培養する工程を含む方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記体細胞がヒト体細胞である、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記ヒト体細胞が、前記人工多能性幹細胞と由来が同じヒト体細胞である、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記体細胞が線維芽細胞である、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記人工多能性幹細胞がヒト人工多能性幹細胞である、前記方法を提供することである。

10

本発明の他の態様は、ヒト体細胞の培養上清を含む人工多能性幹細胞培養のための培養液を提供することである。

本発明の他の態様は、前記ヒト体細胞がヒト線維芽細胞である、前記培養液を提供することである。

#### 【発明の効果】

#### 【0010】

本発明の製造方法によれば、安全性の高いiPS細胞を製造することができる。また、本発明の培養方法によれば、iPS細胞を効率よく培養することができる。

#### 【図面の簡単な説明】

20

#### 【0011】

【図1】マイトマイシンC処理したヒト真皮線維芽細胞（HDF：NHDF、1388、1392および1503）およびSTO細胞由来細胞（SNL）の顕微鏡写真。バーは200 μmを示す。

【図2A】1388由来のiPS細胞（201B7）をHDFまたはSNLをフィーダー細胞として培養したときのTRA-1-60陽性コロニーの含有率を示したグラフ。分析は3度行い、グラフはその平均値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す。

【図2B】フィーダー細胞としてSNL細胞を用いた場合のコロニー数と各ヒト線維芽細胞を用いた場合のコロニー数の比較を示したグラフ。分析は3度行い、グラフはその平均値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す。

【図2C】各線維芽細胞の培養上清を用いて培養したときのiPS細胞の顕微鏡写真。バーは200 μmを示す。

30

【図2D】iPS細胞を、フィーダー上（F）または培養上清（CM）で培養したときの未分化マーカーに対するRT-PCR分析結果を示す写真。コントロールとして、HDFおよびフィーダー細胞としてSNLを用いて培養したH9（ES細胞）および201B7（non CM）を示した。

【図3】iPS細胞（201B7）を、フィーダー細胞上（F）または該フィーダー細胞の培養上清（CM）で培養したときの未分化マーカー（A:Oct3/4、B:Sox2、C:Nanog）に対する定量PCR分析。データはG3PDHを用いて標準化した。グラフは三度の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。コントロールとして、HDFおよびフィーダー細胞としてSNLを用いて培養した201B7（non CM）を示した。

【図4A】初期iPS細胞コロニーの顕微鏡写真。1388、1392、1503、またはNHDFへ4因子を導入した。写真は、導入後25日目のコロニーである。

40

【図4B】樹立した各iPS細胞クローンの顕微鏡写真。各iPS細胞クローンは、それぞれ由来する線維芽細胞上で培養した。写真は、3継代目の細胞。バーは200 μmを示す。

【図4C】樹立した各iPS細胞クローンの未分化ES細胞マーカーに対するRT-PCR分析結果を示す写真。各iPS細胞クローンは、それぞれ由来する線維芽細胞上で培養した。コントロールとして、HDFおよび、フィーダー細胞としてSNLを用いて培養したH9および201B7を示した。

【図5】自家の細胞をフィーダー細胞として用いて樹立したiPS細胞、ES細胞（H9）、およびHDFの未分化マーカー（A:Oct3/4、B:Sox2、C:Nanog）に対する定量PCR分析。黒塗りは、全遺伝子発現量を示し、白塗りは、内在性の発現量のみを示す。データはG3PDHを用

50

いて標準化し、H9を基準に算出した。グラフは三度の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

【図6】自家の細胞をフィーダー細胞として用いて樹立したiPS細胞、ES細胞(H9)、およびHDFの未分化マーカー(A:Oct3/4、B:Sox2、C:Nanog)のプロモーター領域におけるメチル化量の分析。縦軸は、H9を基準に算出したメチル化DNAの相対値である。グラフは三度の実験の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

【図7】各iPS細胞から形成させた胚葉体の顕微鏡写真とin vitroでiPS細胞から分化させた細胞の免疫染色の写真。赤色は、Sox17、 $\alpha$ -SMA陽性細胞を、緑色は、NESTINを示す。核は、Hoechst 33342により染色し青色で示した。バーは100  $\mu$ mを示す。

【図8】樹立した各iPS細胞を、フィーダー上で培養し、未分化維持(U)または胚葉体形成により分化させたとき(D)の未分化マーカーおよび分化マーカーに対するRT-PCR分析結果を示す写真。コントロールとして、HDFおよびH9を示した。

【図9】各ヒト線維芽細胞またはSNLをフィーダー細胞として用いて培養した各iPS細胞(201B7、1388、1392、1503、およびNHDF)の顕微鏡写真。赤色は、TRA-1-60陽性細胞を示し、中央のHoechst 33342染色は核を示す。バーは200  $\mu$ mを示す。Phaseは両画像の重ね合わせを示す。

【図10】各ヒト線維芽細胞をフィーダー細胞として用いて培養した各iPS細胞(1388、1392、1503、およびNHDF)の核型分析結果(顕微鏡写真)。

【発明を実施するための形態】

【0012】

以下、本発明の実施形態を説明する。

【0013】

実施の形態及び実施例に本項にて特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), *Molecular cloning, a laboratory manual* (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J.G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Ltd.などの標準的なプロトコル集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いることができる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いている場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロトコルを用いることができる。

【0014】

なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的に実施例などは、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図並びに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々な改変並びに修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

【0015】

#### 人工多能性幹細胞の製造方法

本発明は、核が初期化された体細胞を、自家の細胞をフィーダー細胞として用いて培養する工程を含む、体細胞から人工多能性幹細胞(iPS細胞)を製造する方法を提供する。

好ましくは、上記製造方法は、以下の工程を含む。

a) 第一の体細胞へ核初期化因子を導入する工程；

b) 前記核初期化因子が導入された第一の体細胞を、第一の体細胞と由来が同じであって、核初期化因子が導入されていない第二の体細胞をフィーダー細胞に用いて培養する工程。

【0016】

本発明はまた、核が初期化されたヒト体細胞を、ヒト細胞をフィーダー細胞として用いて培養する工程を含む、ヒト体細胞からiPS細胞を製造する方法を提供する。

好ましくは、上記製造方法は、以下の工程を含む。

c) 第一のヒト体細胞へ核初期化因子を導入する工程；

d) 前記核初期化因子が導入された第一のヒト体細胞を、ヒト由来の体細胞であって、核初期化因子が導入されていない第二の体細胞をフィーダー細胞に用いて培養する工程。

#### 【0017】

本明細書において、iPS細胞とは、生殖系列にある細胞（例えば、卵細胞、精子細胞、卵原細胞や精原細胞等それらの前駆細胞）または発生初期胚由来の未分化細胞（例えば、胚性幹細胞）以外の細胞（以下、体細胞と称す）を初期化することにより、人工的に誘導された多分化能及び自己増殖能を有する細胞のことである。

10

体細胞は、胚由来であっても胎児由来であっても成体由来であってもよく、また、マウス、ヒト等のような動物種に由来しても構わないが、好ましくはヒトである。その性状としては、本来、受精細胞が有する全分化能を一部でも失った細胞であれば特に限定されず、例えば、線維芽細胞、上皮細胞、肝細胞などが例示できる。

#### 【0018】

フィーダー細胞とは、目的の細胞の培養条件を整えるために用いる、補助的役割を果たす他の細胞を意味する。本発明における、フィーダー細胞は、iPS細胞の自己複製を補助する目的に使用される。

#### 【0019】

自家の細胞とは、目的の細胞と由来を同一とする細胞を意味し、iPS細胞を誘導した体細胞と同じ個体由来の細胞であり、組織の種類は問わない。例えば、iPS細胞を誘導する際に用いた体細胞である。

20

#### 【0020】

核初期化因子は、例えば国際公開W02005/080598、W02007/069666、W02008/118820およびW02009/057831に記載された初期化因子が例示される。詳細には、Oct遺伝子群、Klf遺伝子群、Sox遺伝子群、Myc遺伝子群、Sa11遺伝子群、Nanog遺伝子及びLin遺伝子群のそれぞれの遺伝子群から選択された遺伝子の遺伝子産物を含む。

ここで、Oct遺伝子群に属する遺伝子としては、Oct3/4（マウスNM\_013633、ヒトNM\_002701）、Oct1A（マウスNM\_198934、ヒトNM\_002697）、Oct6（マウスNM\_011141、ヒトNM\_002699）などがあり、Klf遺伝子群に属する遺伝子としては、Klf1（マウスNM\_010635、ヒトNM\_006563）、Klf2（マウスNM\_008452、ヒトNM\_016270）、Klf4（マウスNM\_010637、ヒトNM\_004235）、Klf5（マウスNM\_009769、ヒトNM\_001730）などがあり、Sox遺伝子群に属する遺伝子としては、Sox1（マウスNM\_009233、ヒトNM\_005986）、Sox2（マウスNM\_011443、ヒトNM\_003106）、Sox3（マウスNM\_009237、ヒトNM\_005634）、Sox7（マウスNM\_011446、ヒトNM\_031439）、Sox15（マウスNM\_009235、ヒトNM\_006942）、Sox17（マウスNM\_011441、ヒトNM\_022454）、Sox18（マウスNM\_009236、ヒトNM\_018419）などがあり、Myc遺伝子群に属する遺伝子としては、c-Myc（マウスNM\_010849、ヒトNM\_002467）、N-Myc（マウスNM\_008709、ヒトNM\_005378）、L-Myc（マウスNM\_008506、ヒトNM\_005376）などがあり、Sa11遺伝子群に属する遺伝子としては、Sa111（マウスNM\_021390、ヒトNM\_002968）、Sa114（マウスNM\_175303、ヒトNM\_020436）などがあり、Lin遺伝子群に属する遺伝子としては、Lin28（マウスNM\_145833、ヒトNM\_024674）、Lin28b（マウスNM\_001031772、ヒトNM\_001004317）がある。

30

40

より好ましい核初期化因子は、Oct3/4遺伝子、Klf4遺伝子、Sox2遺伝子、c-Myc遺伝子、L-Myc 遺伝子、Sa114遺伝子、Nanog遺伝子（特開2005-110565）およびLin28遺伝子である。核初期化因子としては、他にも遺伝子産物を導入してもよく、例えば、不死化誘導因子などが挙げられる。

#### 【0021】

これらの遺伝子は、マウスおよびヒトの配列をNational Center for Biotechnology Informationのアクセション番号で例示したが、いずれも、脊椎動物で高度に保存されている遺伝子であることから、他の動物由来の遺伝子であってもよく、また、ホモログを含め

50

た遺伝子を表すものとする。また、ポリモルフィズムを含め、変異を有する遺伝子であっても、野生型の遺伝子産物と同等の機能を有する遺伝子であれば、核初期化因子遺伝子に含まれるものとする。

【0022】

初期化の方法は、上記初期化因子を少なくとも1つを体細胞へ導入することによって行われてもよく、前記初期化因子を複数個組み合わせ用いてもよい。含有する初期化因子の数は、2個、3個、好ましくは4個、もしくは4個以上である。より好ましい組み合わせとして、Oct3/4遺伝子、Sox2遺伝子およびKlf4遺伝子からなる組み合わせ、もしくは、Oct3/4遺伝子、Sox2遺伝子、Klf4遺伝子およびc-Myc遺伝子からなる組み合わせがある。

【0023】

初期化因子導入の方法として、核初期化因子が細胞内で機能する蛋白質である場合は、その蛋白質をコードする遺伝子を発現ベクターに組み込み、対象とする体細胞などの分化細胞に発現ベクターを導入し、細胞内で発現させることが好ましい（遺伝子導入法）。発現ベクターは特に限定されないが、当業者によって適宜選択されたプラスミドベクター、ウイルスベクターまたは人工染色体ベクター（Suzuki N et al., J Biol Chem. 281(36): 26615, 2006）が例示され、ウイルスベクターには、アデノウイルスベクター、センダイウイルスベクター、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターが例示される。また、Protein Transduction Domain (PTD) と呼ばれるペプチドを蛋白質に結合させ、培地に添加することにより、核初期化因子を細胞内に導入してもよい（Protein Transduction 法）。この他にも、精製した蛋白質を、各種のタンパク質導入試薬（例えば、Char 20  
i o t<sup>TM</sup>、またはBi o p o r t e r<sup>TM</sup>等）を用いて核初期化因子を細胞内に導入する方法が例示される。細胞外に分泌される蛋白質の場合は、人工多能性幹細胞の調製段階で、分化細胞の培地にその因子を添加すればよい。なお、初期化すべき体細胞で、核初期化因子の一部が発現している場合は、その蛋白質に関しては外部から導入する必要が無い。

【0024】

前記核初期化因子を置換する目的もしくは導入効率を上げる目的で、サイトカインおよび化合物を添加する場合があります。サイトカインとして、例えば、SCF (stem cell factor)、bFGF、WNT遺伝子群またはLIF (leukemia inhibitory factor) などが挙げられ、化合物として、例えば、Histone Deacetylase阻害剤、DNAメチル化阻害剤、MEK阻害剤、GSK3 30  
阻害剤またはROCK阻害剤などが挙げられる。

【0025】

体細胞へ初期化因子を導入した後、ヒトES細胞用の培養液中で培養することが好ましい。ここで、ヒトES細胞用の培養液は、特に限定されないが、20%代替血清、2mM L-グルタミン、 $1 \times 10^{-4}$  M非必須アミノ酸、 $1 \times 10^{-4}$  M 2-メルカプトエタノール、0.5%ペニシリンおよびストレプトマイシン、4ng/ml組み換えヒトbasic fibroblast growth factor (bFGF) を含むDMEM/F12培地であることが好ましい。ヒトES細胞用の培養液で培養する際に、初期化因子導入後の細胞は、培養液を交換して培養してもよいし、もしくは細胞を分離して適切な細胞密度で再培養してもよい。細胞密度は、特に限定されないが、 $1 \times 10^4$ 個/cm<sup>2</sup>程度が望ましい。 40

【0026】

次に、核初期化因子を導入した体細胞を分離し、核初期化因子を導入していない体細胞（以下、フィーダー用体細胞）と共に培養する。ここで、予め培養したフィーダー用体細胞へ、核初期化因子を導入した体細胞を後から加えて培養することが好ましい。このとき核初期化因子を導入した体細胞に対してフィーダー用体細胞が過剰量であることが好ましい。その割合は、好ましくは1:4以上、より好ましくは1:5以上である。

フィーダー用体細胞は、例えば、マイトマイシンCもしくは線照射により、その増殖能を不活性化しておくことが好ましい。

また、フィーダー細胞は、iPS細胞の自己複製を補助するために、SCF、bFGF、WNT遺伝子群またはLIFなどの外来性サイトカインを分泌するように遺伝子導入されてもよい。 50

## 【0027】

核初期化因子を導入した体細胞を分離し、フィーダー用体細胞と共培養する際に、ES細胞様のコロニーを適宜選択して共培養に用いることが好ましい。選択方法の他の態様として、未分化マーカー遺伝子を発現している細胞を選択する方法もしくは細胞の形態を指標にする方法がある。未分化マーカー遺伝子を発現している細胞を選択する方法は特に限定されないが、例えば、未分化マーカー遺伝子のプロモーターの下流にレポーター遺伝子をノックインし、それらマーカー遺伝子を発現している細胞を選択すればよい。このほかにも、PCR法、LAMP法、ノザンハイブリダイゼーション法などによって、転写産物を検出してもよく、RIA法、IRMA法、EIA法、ELISA法、LPIA法、CLIA法、あるいはイムノプロット法などによって、翻訳産物を検出してもよい。ここで、未分化マーカー遺伝子とは、特に限定されないが、ES細胞に特異的に発現している遺伝子であり、例えば国際公開WO2005/080598、WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/057831およびNat Biotechnol. 25, 803, 2007に記載されたES細胞に特異的に発現している遺伝子である。好ましくは、Oct3/4、Sox2、Nanog、Lin28、Rex1、UTF1、Eras、Fgf4、TGF $\beta$ 1、Cripto、Dax1、ESG1、GDF3、Sall4、Fbx15 SSEA-1、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81またはアルカリフォスファターゼ（例えば、TRA-2-54またはTRA-2-49）から成る群より動物種を考慮して選択される（例えば、SSEA-1はマウスに特異的であり、SSEA-4、TRA-1-60およびTRA-1-81はヒトに特異的である）。また、レポーター遺伝子として、緑色蛍光タンパク質（GFP）、黄色蛍光タンパク質（YFP）、青色蛍光タンパク質（BFP）のような蛍光タンパク質、イクオリンのような発光タンパク質またはガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、ルシフェラーゼのような酵素をコードする遺伝子がある。

このようにして製造されたiPS細胞は、細胞補充療法のための材料として利用することができる。

## 【0028】

人工多能性幹細胞の培養方法

本発明は、ヒト体細胞をフィーダー細胞として用いた、iPS細胞の培養方法も提供する。ここで、ヒト体細胞は、iPS細胞の自己複製を補助できれば特にその種類を問わないが、ヒト線維芽細胞株であることが好ましい。また、ヒト体細胞は、iPS細胞の由来である個体から取得された細胞であることが好ましい。より好ましくは、iPS細胞を樹立する際に用いたのと同じ体細胞である。フィーダー細胞として用いるヒト体細胞は、例えば、マイトマイシンCもしくは線照射により、その増殖能を不活性化しておくことが好ましい。

## 【0029】

前記フィーダー細胞として用いる体細胞は、iPS細胞の自己複製を補助するために、外来性サイトカインを分泌するように遺伝子導入されてもよい。サイトカインとしては、例えば、SCF、bFGF、WNT遺伝子群またはLIFなどが挙げられる。

## 【0030】

他の態様として、本発明は、ヒト体細胞の培養上清を含む培養液を用いた、iPS細胞の培養方法も提供する。培養液は、ヒトES細胞用の培養液中で培養したヒト体細胞の培養上清であることが好ましい。ここで、ヒトES細胞用の培養液は、特に限定されないが、代替血清（例えば、KSR、Invitrogen）、L-グルタミン、非必須アミノ酸、2-メルカプトエタノール、ペニシリンおよびストレプトマイシンを含む哺乳動物細胞培養用培地（例えば、DMEM/F12培地）であることが好ましい。上記培養液の各成分の濃度や添加物は、当業者によって適宜調節されてもよく、好ましくは、組み換えヒトbasic fibroblast growth factor (bFGF)を使用直前に添加する。培養上清を作製する際に使用するヒト体細胞は、iPS細胞の自己複製を補助できれば特にその種類を問わないが、ヒト線維芽細胞株であることが好ましい。また、ヒト体細胞は、iPS細胞の由来である個体から取得した細胞であることが好ましい。より好ましくは、iPS細胞を樹立する際に用いた体細胞である。

## 【0031】

培養上清は、例えば、前記体細胞を適当な細胞濃度で1日以上培養した培養液から細胞



を除去したものである。好ましくは、1日培養後、培養液を交換しさらに1日培養し、細胞除去して得られた培養上清である。培養上清を得るために用いる培養液中の細胞濃度は、 $1 \times 10^5$  個/ml以上であることが好ましい。

#### 【0032】

培養液は、iPS細胞の自己複製を補助することができる容量の前記培養上清を含有していればよく、少なくとも10%以上含むことが好ましい。より好ましくは、前記培養上清を50%以上、80%以上、90%以上含む培養液である。さらに好ましくは、培養液は、培養上清そのものである。なお、本発明のiPS細胞用培養液中の上記培養上清以外の成分はiPS細胞の増殖を阻害するものでない限り特に制限されないが、通常の哺乳動物細胞培養用培地などを使用することができる。

10

#### 【実施例】

#### 【0033】

以下に、本発明の実施例と比較例について説明するが、本実施例は本発明の再現を補助する目的でその一実施態様を示すものであって、本実施例から本発明の限界や制限事項は示唆されない。

#### 【0034】

方法

細胞培養

ヒト真皮線維芽細胞(HDF)はCell application Incから購入した。HDF、293T、およびPLAT-Eは、10%牛胎児血清(FBS、Invitrogen)、0.5%ペニシリンおよびストレプトマイシン含有ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM、ナカライテスク)を用いて培養した。ヒトiPS細胞は、DMEM/F12(Invitrogen)、20%代替血清(KSR、Invitrogen)、2mM L-glutamine(Invitrogen)、 $1 \times 10^{-4}$  M非必須アミノ酸(Invitrogen)、 $1 \times 10^{-4}$  M 2-メルカプトエタノール、0.5%ペニシリンおよびストレプトマイシン、4ng/ml組み換えヒトbasic fibroblast growth factor(bFGF、和光純薬)からなる培地(hES細胞用培地)を用いて培養した。

20

#### 【0035】

iPS細胞の調製

iPS細胞は、従来の方法(Takahashi, K. et al. Cell 131, 861, 2007)へ少し修正を加えた方法でHDFより樹立した。簡潔には、エコトロピックレトロウイルスレセプターをコードするマウスsolute carrier family 7(cationic amino acid transporter, y+ system), member 1(Slc7a1)遺伝子をレンチウイルスにより導入したHDFを、 $2 \times 10^5$ 個/60mmディッシュで蒔き、一晚インキュベートした。次の日、Oct3/4、Sox2、Klf4、およびc-Mycをレトロウイルスで導入した。6日後、細胞をトリプシン処理により回収し、 $5 \times 10^5$ 個/100mmディッシュで蒔き直した。翌日、hES細胞用培地へ培地交換し、20日間培養した。遺伝子導入後25日目にES細胞様コロニーを取り上げ、由来の線維芽細胞上へ蒔き直した。この蒔き直しを、1継代とした。

30

#### 【0036】

フィーダー細胞

12  $\mu$ g/mlのマイトマイシンCを含有するリン酸緩衝溶液(PBS、ナカライテスク)をほぼコンフルエントの線維芽細胞へ加え、37 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートした。処理後、細胞は、PBSで2度洗浄し、トリプシン処理により回収した。細胞は、24穴プレート、6穴プレート、60mmディッシュ3枚、または100mmディッシュ毎に $1 \times 10^6$ 個を蒔いた。

40

#### 【0037】

培養上清

60mmディッシュ毎に $3 \times 10^5$ 個の線維芽細胞を蒔き、一晚インキュベートした。翌日、3mlのhES細胞用培地に取り換え、24時間インキュベートした。その後、線維芽細胞の培養上清を回収し、フィルター処理した。これに4ng/mlのbFGFを使用直前に加えて用いた。

#### 【0038】

分化誘導

50

iPS細胞を0.1mg/mlのコラーゲナーゼIV (Invitrogen)、0.25%のトリプシン、0.1mM CaCl<sub>2</sub> (ナカライテスク)、および20%KSRからなる溶液 (CTK溶液) で処理して回収し、細胞クランプを10 μM Y-27632 (ROCK阻害剤: 和光純薬) を添加したbFGFを含まないhES細胞用培地中で懸濁させた。懸濁された細胞は、Ultra low binding plate (Corning) へ移した。浮遊培養8日後、胚葉体はゼラチンコートしたプレートへ移し、さらに8日間培養した。インキュベーション後、細胞は、4%パラホルムアルデヒドを含有するPBSで固定し、5%正常ヤギ抗体またはロバ血清 (Chemicon)、1%ウシ血清アルブミン (ナカライテスク)、および0.2% TritonX-100を含有するPBSでインキュベートした。一次抗体を以下に示す; anti-SOX17 (1:300, R & D systems)、anti- $\alpha$ -smooth muscle actin (1:500,  $\alpha$ -SMA, DAKO)、およびanti- $\beta$ -tubulin (1:1000, Sigma)。二次抗体を以下に示す; Cyanine 3-labeled anti-goat IgG (1:500, Zymed)、およびAlexa 546-labeled anti-mouse IgG (1:500, Invitrogen)。核は、1 μg/ml Hoechst 33342 (Invitrogen) で染色した。

10

**【 0 0 3 9 】**

## 発現解析

RT-PCRは従来の方法で行った。簡潔には、細胞をTrizol試薬 (Invitrogen) で溶解させ、全RNAを抽出した。RNAサンプルは、ゲノムDNAを除去するためTurbo DNA free (Ambion) で処理した。DNase処理したRNAの1 μgをReverse transcriptase (東洋紡) およびOligo dT 20プライマーを用いた逆転写に用いた。定量PCRは、SYBR Premix Ex Taq II (Takara) を用いて行った。プライマー配列は表 1 に示す。

**【 0 0 4 0 】**

20

【表1】

表1

遺伝子	配列 (5' to 3')
<i>OCT3/4</i> (内在性)	GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AGG (配列番号1)
	CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC (配列番号2)
<i>SOX2</i> (内在性)	GGG AAA TGG GAG GGG TGC AAA AGA GG (配列番号3)
	TTG CGT GAG TGT GGA TGG GAT TGG TG (配列番号4)
<i>OCT3/4</i> (トータル)	CCC TGG TGC CGT GAA GCT GGA GAA GG (配列番号5)
	TAC TGG TTC GCT TTC TCT TTC GGG CCT G (配列番号6)
<i>SOX2</i> (トータル)	ACG ACG TGA GCG CCC TGC AGT ACA A (配列番号7)
	GCT GGA GCT GGC CTC GGA CTT GAC C (配列番号8)
<i>NANOG</i>	TCT CTC CTC TTC CTT CCT CCA TG (配列番号9)
	CTG TTT GTA GCT GAG GTT CAG GAT G (配列番号10)
<i>TERT</i>	CCT GCT CAA GCT GAC TCG ACA CCG TG (配列番号11)
	GGA AAA GCT GGC CCT GGG GTG GAG C (配列番号12)
<i>AFP</i>	AAA TGC GTT TCT CGT TGC TT (配列番号13)
	GCC ACA GGC CAA TAG TTT GT (配列番号14)
<i>PDGFR<math>\alpha</math></i>	ACA GGT TGG TGT GGG TTC AT (配列番号15)
	CTG CAT CTT CCA AAG CAT CA (配列番号16)
<i>PAX6</i>	ACC CAT TAT CCA GAT GTG TTT GCC CGA G (配列番号17)
	ATG GTG AAG CTG GGC ATA GGC GGC AG (配列番号18)
<i>NAT1</i>	ATT CTT CGT TGT CAA GCC GCC AAA GTG GAG (配列番号19)
	AGT TGT TTG CTG CGG AGT TGT CAT CTC GTC (配列番号20)
<i>G3PDH</i>	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC (配列番号21)
	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA (配列番号22)
<i>ACTB</i>	CAA TGT GGC CGA GGA CTT TG (配列番号23)
	CAT TCT CCT TAG AGA GAA GTG G (配列番号24)

10

20

30

## 【0041】

## メチル化分析

4  $\mu$ gのゲノムDNAは、ソニケーションにより分断し、95  $^{\circ}$ Cで10分間ボイルした。分断されたゲノムDNAは、5  $\mu$ g/ml BSA および25  $\mu$ g/ml yeast tRNA (Ambion)を添加したpan-mouse IgG magnetic beads-conjugated anti-5-methyl cytosine antibody (Eurogentec)と4  $^{\circ}$ Cで一晩インキュベートした。ビーズは0.05% TritonX-100を含有するPBSで三度洗浄し、65  $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートした。0.15mlの1% SDS/TEを加えて溶出を繰り返した。溶出液は、2時間50  $^{\circ}$ Cの条件下でプロテアーゼKにより処理し、フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールで抽出し、エタノール沈殿で精製した。プライマーを表2に示す。

40

## 【0042】

【表 2】

表 2

OCT3/4-ChIP	TTG CCA GCC ATT ATC ATT CA (配列番号 2 5)
	TAT AGA GCT GCT GCG GGA TT (配列番号 2 6)
SOX2-ChIP	GAG AAG GGC GTG AGA GAG TG (配列番号 2 7)
	AAA CAG CCA GTG CAG GAG TT (配列番号 2 8)
NANOG-ChIP	GAT TTG TGG GCC TGA AGA AA (配列番号 2 9)
	GGA AAA AGG GGT TTC CAG AG (配列番号 3 0)
NAT1-ChIP	AGG GTT CGG GGG AGG TAA GGG TGC (配列番号 3 1)
	AGG GTT GCG TGC GTA AAG CCG GAG (配列番号 3 2)

10

## 【 0 0 4 3 】

## フローサイトメトリー

細胞は、2mM EDTA含有PBSで回収し、PBSを用いて洗浄した。1 × 10<sup>5</sup>個の細胞は、chicken anti-Neu5Gc (1.5 μg/100 μl) antibody と染色用のDylight 488-conjugated donkey anti-chicken IgY antibody (1:100, Jackson ImmunoResearch)とインキュベートさせた。FACS Aria (Beckton Dickinson)を用いて測定した。

20

## 【 0 0 4 4 】

## 実施例 1

4つのヒト線維芽細胞株 (NHDF、1388、1392および1503：それぞれ新生児、36歳の女性、56歳の男性および73歳の女性) およびSNL (STO細胞由来細胞) をマイトマシNCで処理し、培養プレートに播種した (図 1)。続いて、1388由来のiPS細胞株 (201B7: W02009/057831) を標準の濃度 (iPS細胞:線維芽細胞 = 1:5) で上記の各線維芽細胞上に蒔いた。その結果、5つの線維芽細胞は、フィーダー細胞として、iPS細胞の未分化維持培養を補助した。TRA-1-60陽性細胞コロニーの含有率は、いずれの線維芽細胞およびSNLを用いた場合でも同等であった (図 2A)。各線維芽細胞上のiPS細胞間で接着効率に違いは見られなかった (図 2B)。

30

## 【 0 0 4 5 】

次に、線維芽細胞の培養上清を用いて培養してもiPS細胞の自己複製が可能であることを検討するために、マトリゲルをコーティングしたプレートを用いて、iPS細胞 (201B7) を、各線維芽細胞もしくはSNLの培養上清、またはbFGF添加した対照培地 (non CM) 中で培養した。その結果、対照培地では、密着したコロニーを形成しなかったが、各培養上清では、未分化なES細胞様の形態を示した (図 2C)。RT-PCRにより、培養後の各iPS細胞における未分化ES細胞の特異的マーカー遺伝子 (Oct3/4、Sox2、NANOG、およびTERT) の発現を確認した (図 2D)。定量PCRにおいても、上記未分化特異的マーカー遺伝子の発現量に変化は見られなかった (図 3)。以上のデータより、新生児ならびに成人線維芽細胞がiPS細胞のフィーダー細胞として適していることを示した。

40

## 【 0 0 4 6 】

## 実施例 2

ヒトiPS細胞が、ヒト線維芽細胞上で樹立できるか否かについて検討するため、4つの核初期化因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、およびc-Myc) をレトロウイルスによってヒト線維芽細胞 (NHDF、1388、1392および1503) に導入した。導入6日後、5 × 10<sup>5</sup>個の上記細胞を、フィーダー細胞なしのディッシュ (100mm) へ移し、ヒトES細胞の培養条件で培養した。培養中、細胞はコンフルエントになり、フィーダー細胞様の形態を示した。導入2週間後、ES細胞様のコロニーが、線維芽細胞様の形態を示す細胞の上に現われた。導入25日後、ES細胞様コロニー (図 4A) をピックアップし、マイトマイシNC処理をした親線維芽細胞をフィーダー細胞として用いて培養した。

50

本発明で用いた4つの線維芽細胞株由来のiPS細胞は、自己をフィーダー細胞として用いることで未分化状態を維持したまま培養できた(図4B)。

【0047】

【表3】

表3

	SNL		Isogenic		feeder-free	
	ES-like	トータル	ES-like	トータル	ES-like	トータル
1388	5	79	4	62	2	3
1392	8	629	16	269	8	334
1503	70	408	76	359	58	264
NHDF	26	44	18	39	7	24

10

【0048】

実施例3

RT-PCRにより、実施例2で樹立したiPS細胞クローンのOct3/4、Sox2、Nanog、およびTE RTの転写量を確認したところ、フィーダー細胞としてSNLを用いて培養したH9(ES細胞)および201B7(iPS細胞)と同等であった(図4C)。

Oct3/4およびSox2の全発現量および内在性の発現量を定量PCRにより調べた結果、レトロウイルスベクターからの転写はサイレンシングされていることが確認された(図5)。

20

また、自家の細胞をフィーダー細胞として用いて維持および樹立したiPS細胞のOct3/4およびNanogといった多能性関連遺伝子のプロモーター領域のメチル化を抗メチル化シトシン抗体を用いた免疫沈降法により調べたところ、メチル化はH9(ES細胞)と同等であることが確認された(図6)。一方、上記iPS細胞のWnt5A、IGF2、およびSlc5A4の上流では、高くメチル化されていた。これらのデータは、由来となった線維芽細胞上で樹立したiPS細胞は、従来のマウス線維芽細胞上で樹立したiPS細胞またはES細胞と同じような特性があることが示唆された。

【0049】

実施例2で樹立したiPS細胞クローンの多能性を調べるため、in vitro分化を行った。由来となった線維芽細胞上で樹立したiPS細胞クローンから浮遊培養により胚葉体を形成させた。分化16日目に、Sox17(内胚葉)、 $\alpha$ -smooth muscle actin( $\alpha$ -SMA、中胚葉)およびNESTIN(外胚葉)陽性細胞が確認された(図7)。

30

【0050】

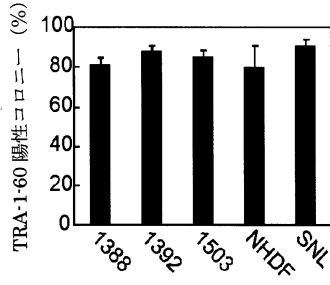
次に、樹立した各iPS細胞を、フィーダー上で培養し、未分化維持(U)または胚葉体形成により分化させたとき(D)の未分化マーカーおよび分化マーカーに対する各分化マーカー及び未分化マーカーの発現をRT-PCRで調べた。その結果、分化誘導後のOct3/4、Sox2、およびNanogといった未分化マーカーの減少およびAFP、PDGFR $\alpha$ およびPax6といった他の分化マーカーの増加を確認した(図8)。なお、これに加えて、iPS細胞を精巢へ投与し、テラトーマの形成を確認してもよい。

40

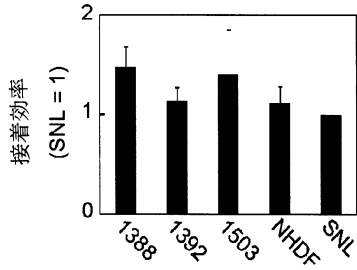
【0051】

また、互いに別(他人)由来のヒト線維芽細胞上でも各iPS細胞が培養できることを確認するため、各iPS細胞を、各ヒト線維芽細胞またはSNLをフィーダー細胞として用いて培養した。培養開始6日後のiPS細胞をTRA-1-60抗体で染色し、陽性細胞の数を計測した結果、別由来のヒト線維芽細胞を用いて培養した場合でもコロニーの80%以上が、未分化細胞であった(図9)。さらに、このようにして培養したiPS細胞の核型を分析したところ、染色体異常は確認できなかった(図10)。以上より、ヒト線維芽細胞は、iPS細胞の培養の際に、フィーダー細胞として有用であることが確認された。

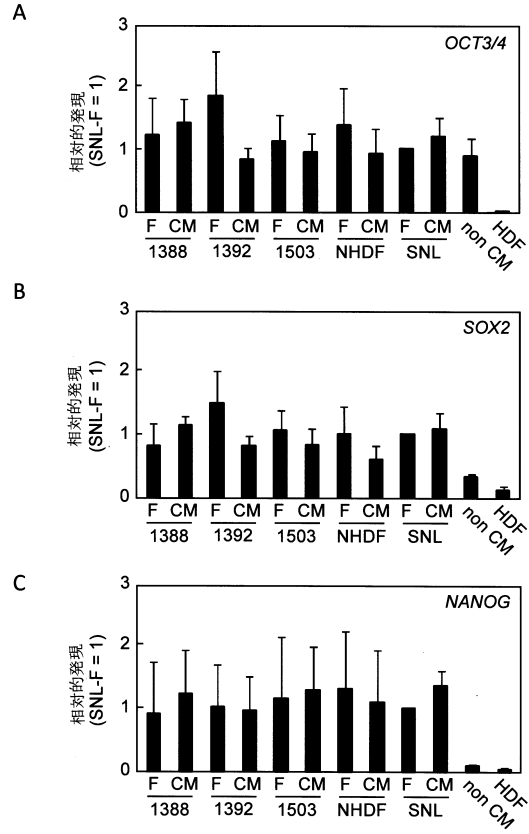
【 図 2 A 】



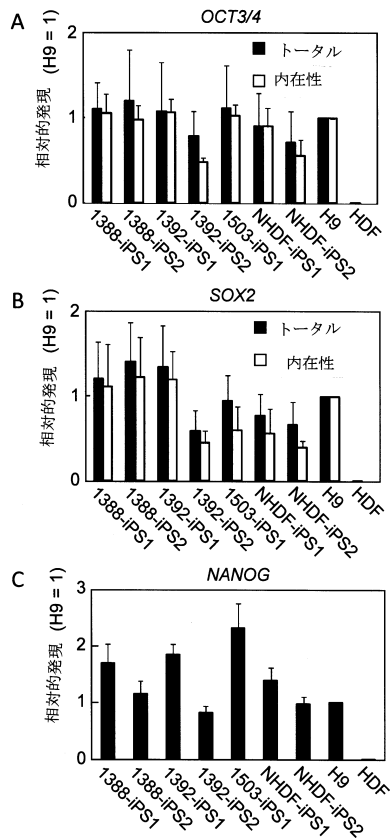
【 図 2 B 】



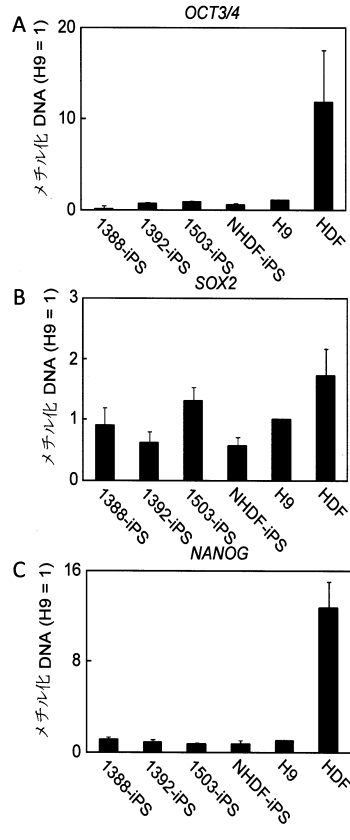
【 図 3 】



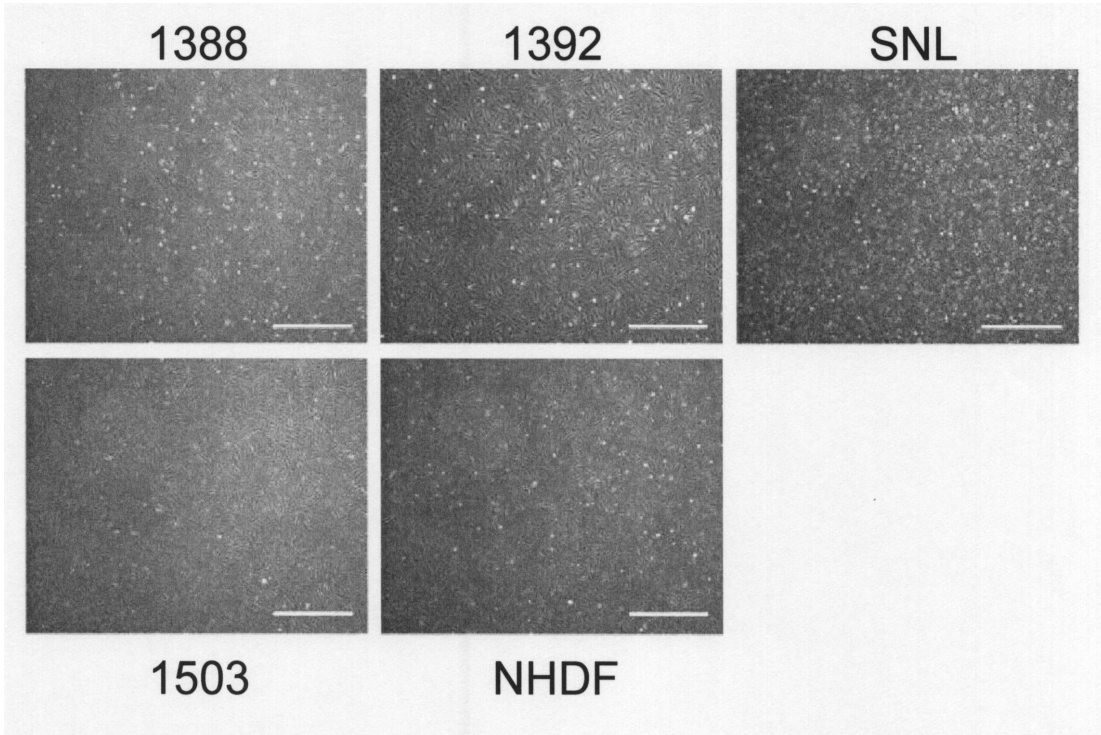
【 図 5 】



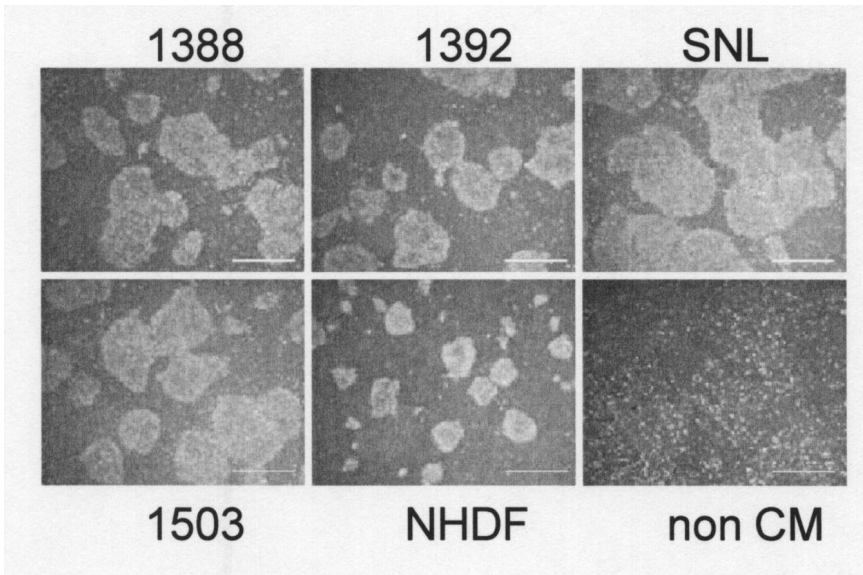
【 図 6 】



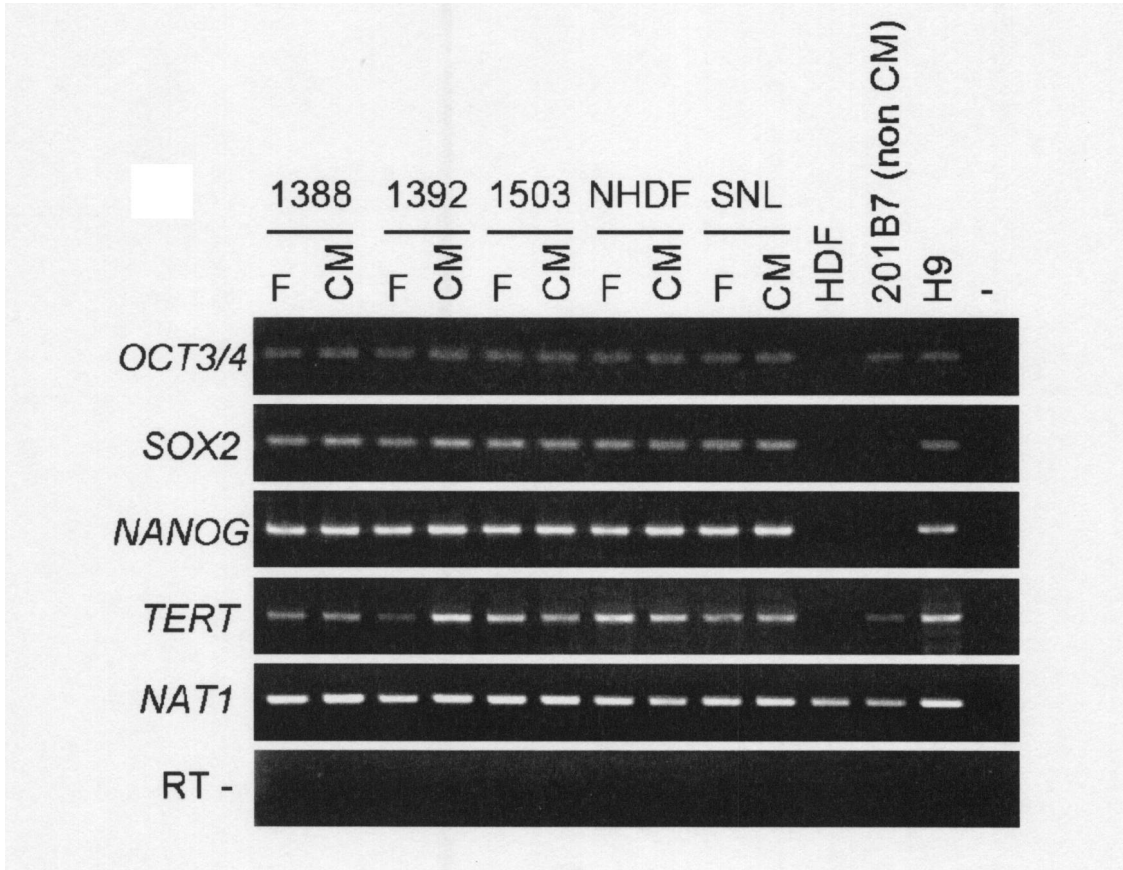
【 図 1 】



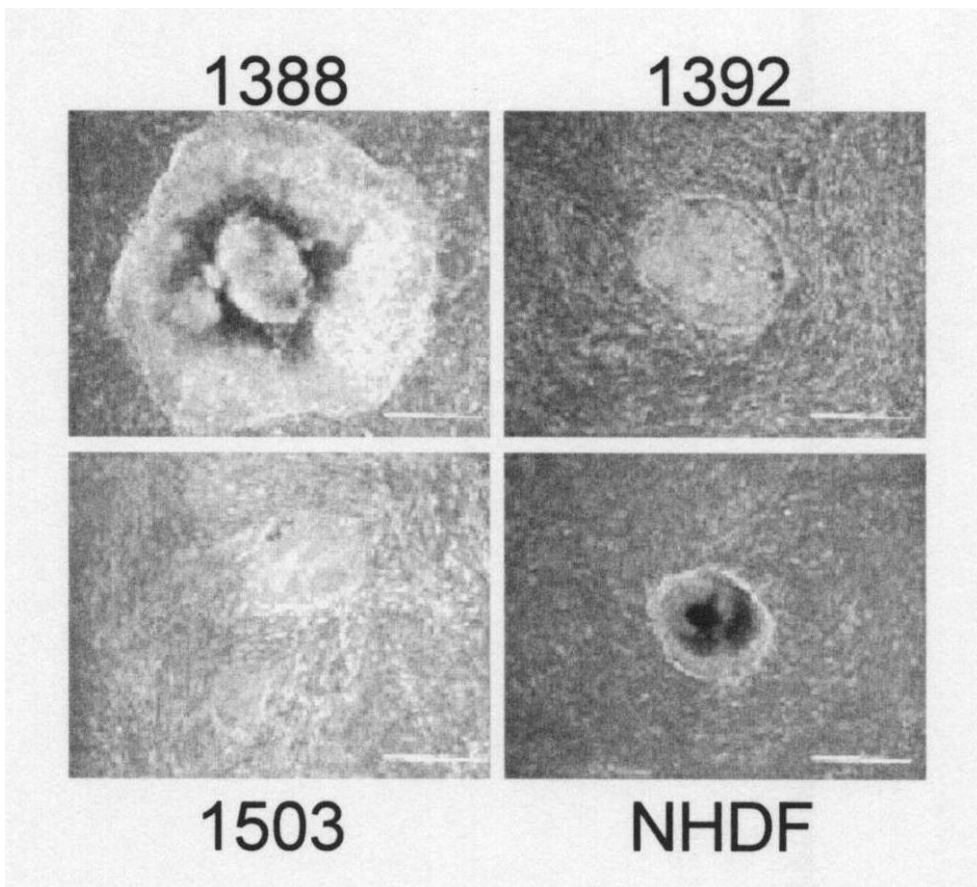
【 図 2 C 】



【 2 D 】

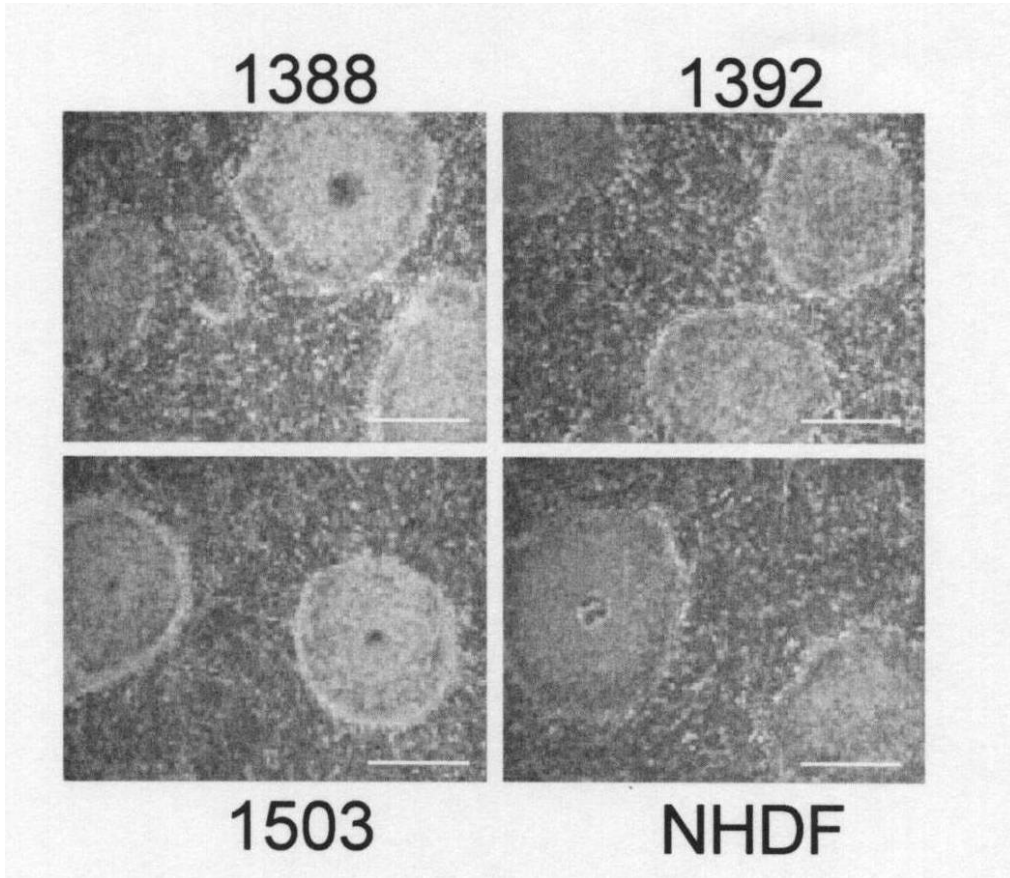


【 4 A 】

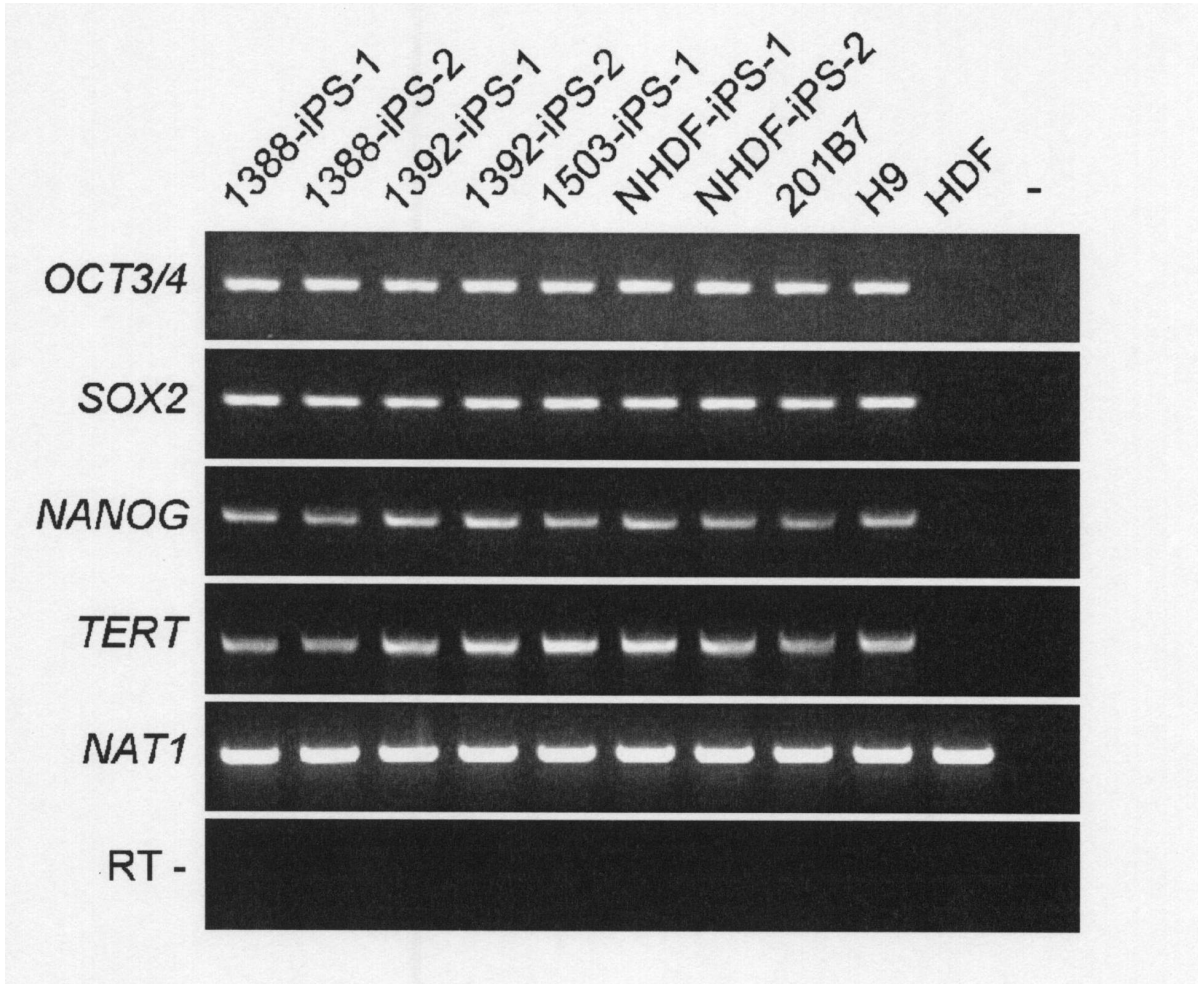




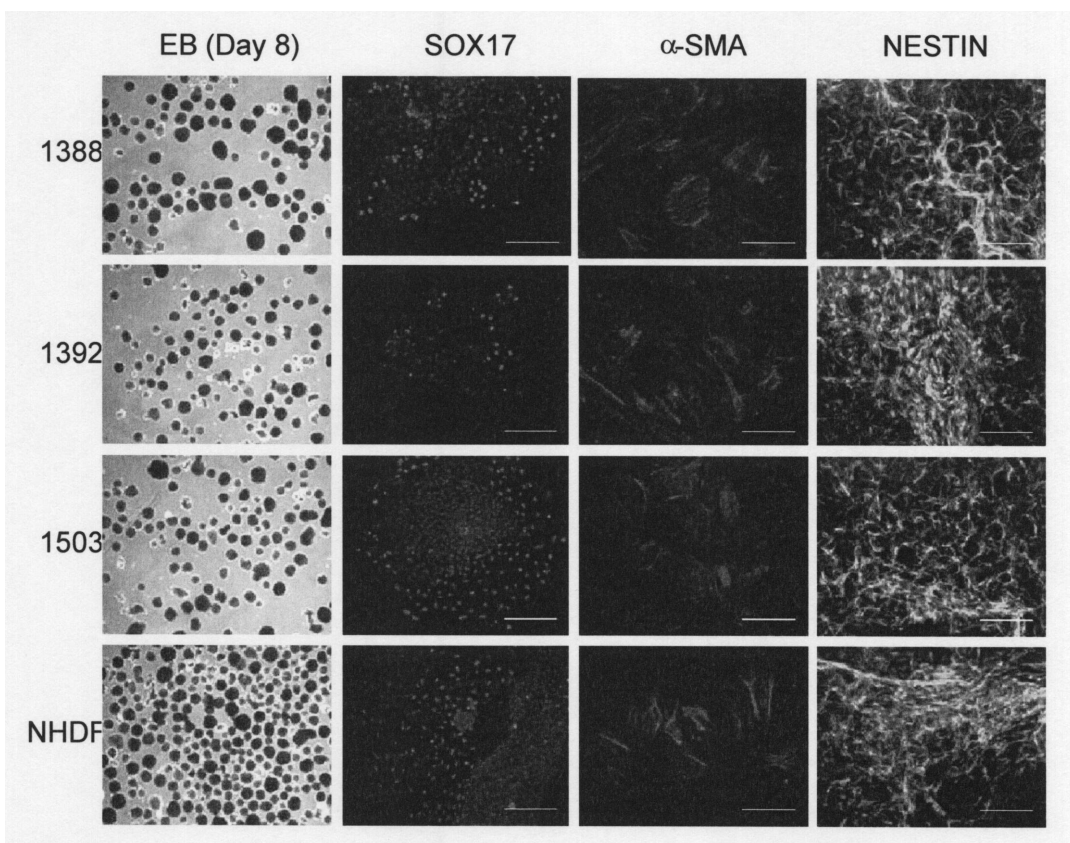
【 図 4 B 】



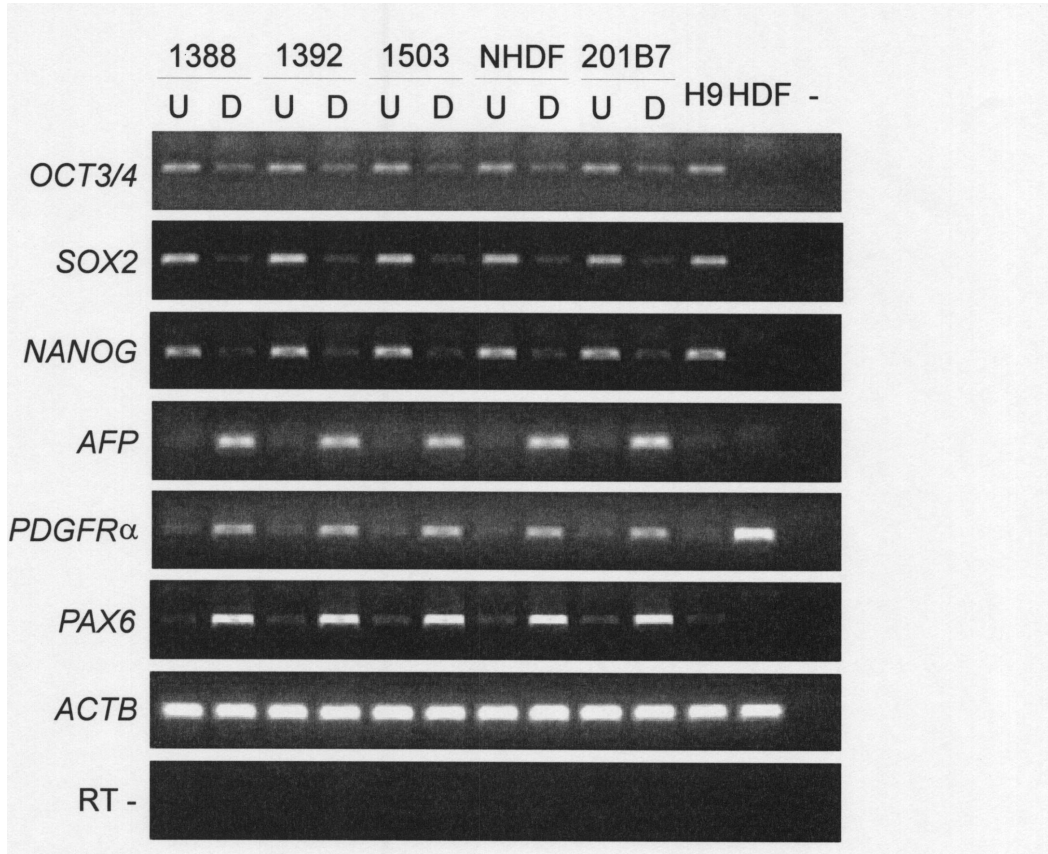
【 図 4 C 】



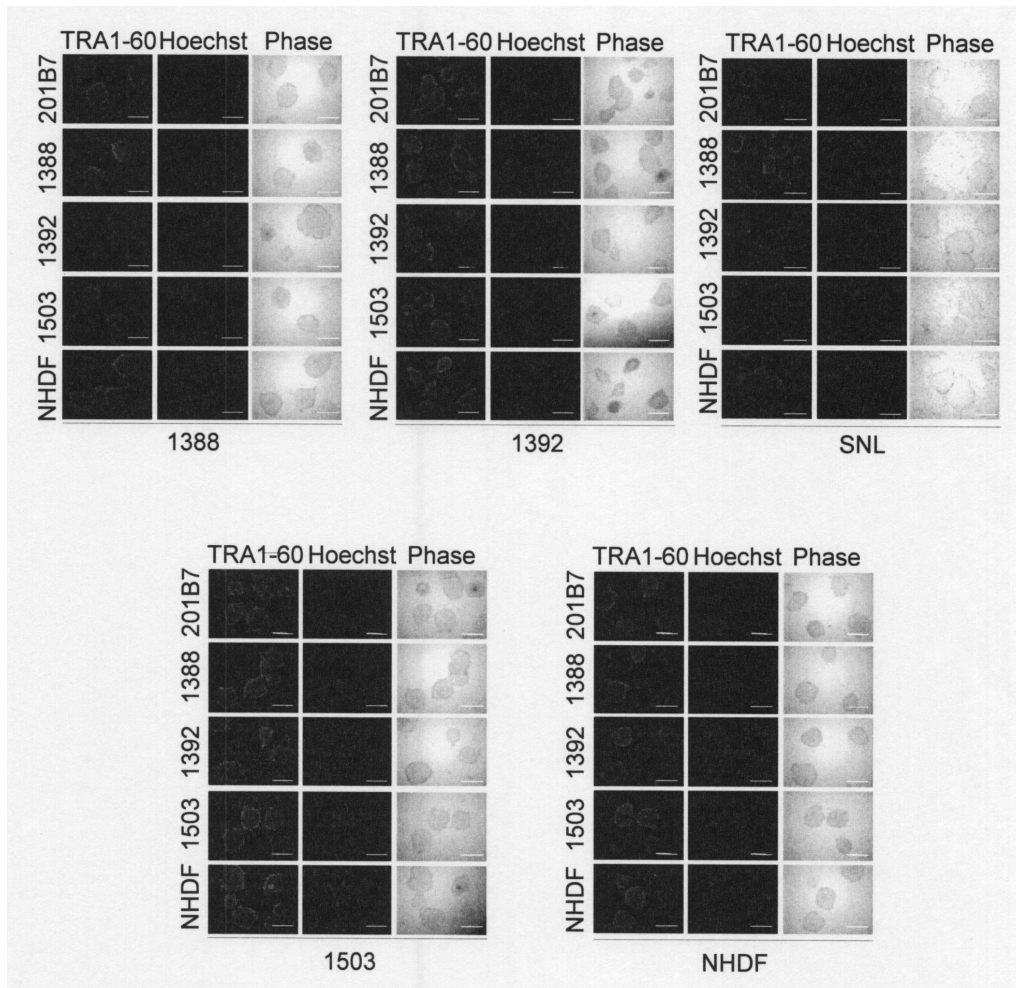
【 図 7 】



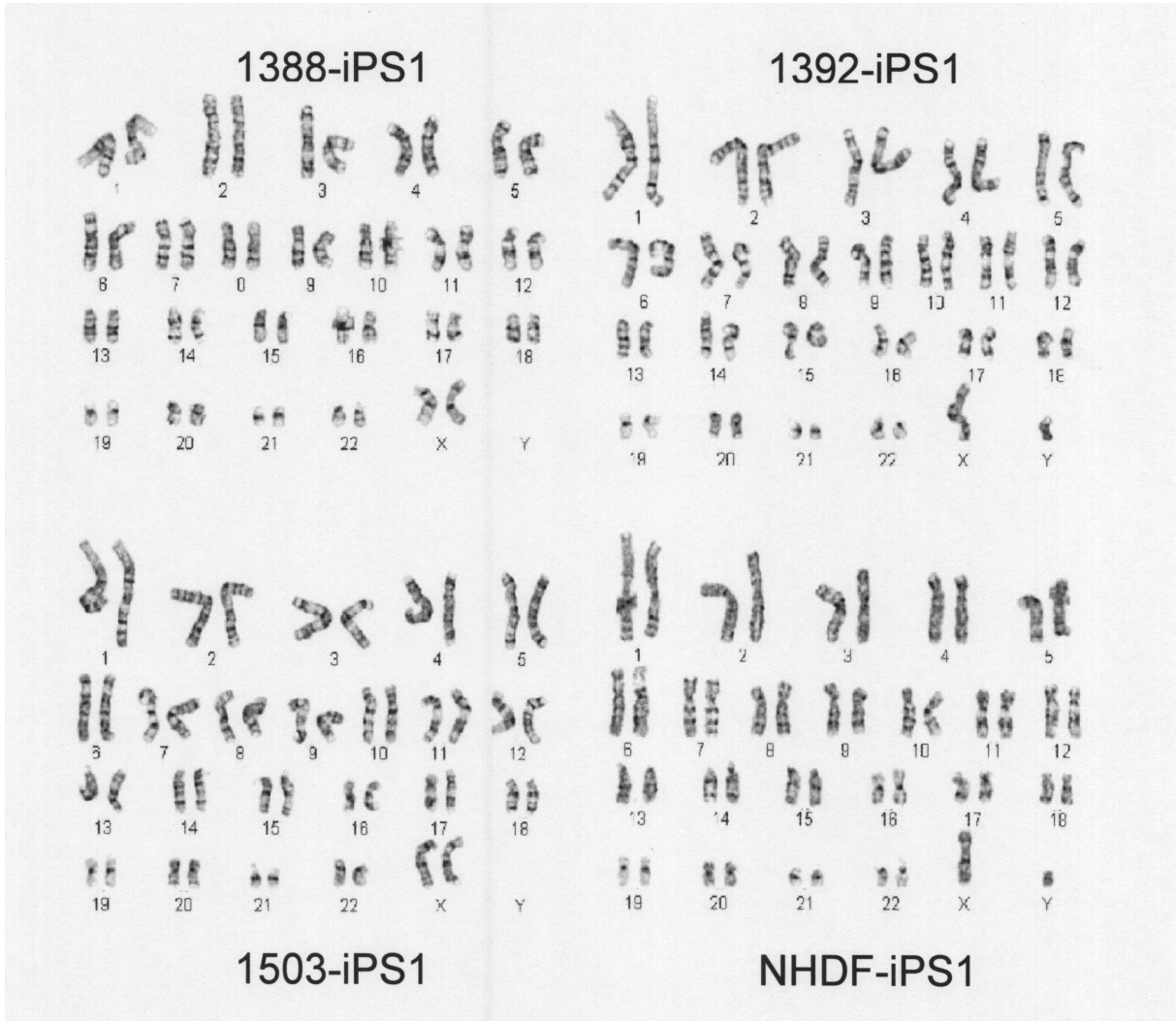
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



---

フロントページの続き

(72)発明者 高橋 和利

日本国京都府京都市左京区聖護院川原町53 国立大学法人京都大学 iPS細胞研究所内

審査官 鶴 剛史

(56)参考文献 特開2009-225675(JP,A)

TAKAHASHI,K. et al., Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors., Cell, 2007年11月30日, Vol.131, No.5, pp.861-72

STOJKOVIC,P. et al., An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells., Stem Cells, 2005年3月, Vol.23, No.3, pp.306-14

TAKAHASHI,K. et al., Human induced pluripotent stem cells on autologous feeders., PLoS One, 2009年12月2日, Vol.4, No.12, e8067

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/10

C12N 5/00

C12N 15/09

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

P u b M e d

T h o m s o n I n n o v a t i o n