

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6029137号  
(P6029137)

(45) 発行日 平成28年11月24日(2016.11.24)

(24) 登録日 平成28年10月28日(2016.10.28)

(51) Int.Cl. F I  
**C 1 2 N 5/10 (2006.01)** C 1 2 N 5/10  
**C 1 2 N 15/09 (2006.01)** C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 9 (全 42 頁)

(21) 出願番号	特願2012-546966 (P2012-546966)	(73) 特許権者	504132272
(86) (22) 出願日	平成23年12月2日 (2011.12.2)		国立大学法人京都大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/077992		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(87) 国際公開番号	W02012/074117	(74) 代理人	100080791
(87) 国際公開日	平成24年6月7日 (2012.6.7)		弁理士 高島 一
審査請求日	平成26年11月27日 (2014.11.27)	(74) 代理人	100125070
(31) 優先権主張番号	61/419,320		弁理士 土井 京子
(32) 優先日	平成22年12月3日 (2010.12.3)	(74) 代理人	100136629
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 鎌田 光宜
		(74) 代理人	100121212
			弁理士 田村 弥栄子
		(74) 代理人	100122688
			弁理士 山本 健二
		(74) 代理人	100117743
			弁理士 村田 美由紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 効率的な人工多能性幹細胞の樹立方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

体細胞に核初期化物質と、(a) Ras-PI3キナーゼ-AKT-Rheb-mTOR-S6K1と続くシグナル伝達経路を活性化する因子、(b) Ras-Ral経路を活性化する因子及び(c) Ras-Raf経路を活性化する因子からなる群より選択される1種もしくは2種の因子とを接触させることを含む、人工多能性幹細胞の製造方法であって、前記(a)の経路を活性化する因子が、下記(a1)~(a6)：

(a1) HRas、NRas及びKRasのG12VY40C変異体

(a2) 末端に膜局在化シグナルが付加されたPI3キナーゼの恒常的活性化変異体

(a3) 末端に膜局在化シグナルが付加されたAKT1、AKT2及びAKT3の恒常的活性化変異体

(a4) Rheb及びS6K1 T389E

(a5) PTEN shRNA

(a6) (a1)~(a5)の各因子をコードする核酸

からなる群より選択され、前記(b)の経路を活性化する因子が、下記(b1)~(b3)：

(b1) HRas、NRas及びKRasのG12VE37G変異体

(b2) 末端に膜局在化シグナルが付加されたRalGDS

(b3) (b1)及び(b2)の各因子をコードする核酸

からなる群より選択され、前記(c)の経路を活性化する因子が、下記(c1)及び(c2)：

(c1) HRas、NRas及びKRasのG12VT35S変異体

(c2) (c1)の各因子をコードする核酸

からなる群より選択される、方法。

【請求項 2】

体細胞の核初期化工程において、(a) Ras-PI3キナーゼ-AKT-Rheb-mTOR-S6K1と続くシグナル伝達経路を活性化する因子、(b) Ras-Ral経路を活性化する因子及び(c) Ras-Raf経路を活性化する因子からなる群より選択される1種もしくは2種の因子を体細胞に接触させることを含む、人工多能性幹細胞の樹立効率の改善方法であって、前記(a)の経路を活性化する因子が、下記(a1)～(a6)：

(a1) HRas、NRas及びKRasのG12VY40C変異体

(a2) 末端に膜局在化シグナルが付加されたPI3キナーゼの恒常的活性化変異体

(a3) 末端に膜局在化シグナルが付加されたAKT1、AKT2及びAKT3の恒常的活性化変異体

(a4) Rheb及びS6K1 T389E

(a5) PTEN shRNA

(a6) (a1)～(a5)の各因子をコードする核酸

からなる群より選択され、前記(b)の経路を活性化する因子が、下記(b1)～(b3)：

(b1) HRas、NRas及びKRasのG12VE37G変異体

(b2) 末端に膜局在化シグナルが付加されたRalGDS

(b3) (b1)及び(b2)の各因子をコードする核酸

からなる群より選択され、前記(c)の経路を活性化する因子が、下記(c1)及び(c2)：

(c1) HRas、NRas及びKRasのG12VT35S変異体

(c2) (c1)の各因子をコードする核酸

からなる群より選択される、方法。

【請求項 3】

核初期化物質が、Octファミリーのメンバー、Soxファミリーのメンバー、Klf4ファミリーのメンバー、Mycファミリーのメンバー、Linファミリーのメンバー及びNanog、並びにそれらをコードする核酸からなる群より選択される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

核初期化物質がOct3/4、Klf4及びSox2、又はそれらをコードする核酸である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

核初期化物質がOct3/4、Klf4、Sox2並びにc-Myc若しくはL-Myc及び / 又はNanog及び / 又はLin28若しくはLin28B、或いはそれらをコードする核酸である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 6】

核初期化物質がOct3/4、Klf4、Sox2及びc-Myc、又はそれらをコードする核酸である、請求項 3 記載の方法。

【請求項 7】

(a) Ras-PI3キナーゼ-AKT-Rheb-mTOR-S6K1と続くシグナル伝達経路を活性化する因子、(b) Ras-Ral経路を活性化する因子及び(c) Ras-Raf経路を活性化する因子からなる群より選択される1種もしくは2種の因子と、核初期化物質とを含有してなる、人工多能性幹細胞の誘導剤であって、前記(a)の経路を活性化する因子が、下記(a1)～(a6)：

(a1) HRas、NRas及びKRasのG12VY40C変異体

(a2) 末端に膜局在化シグナルが付加されたPI3キナーゼの恒常的活性化変異体

(a3) 末端に膜局在化シグナルが付加されたAKT1、AKT2及びAKT3の恒常的活性化変異体

(a4) Rheb及びS6K1 T389E

(a5) PTEN shRNA

(a6) (a1)～(a5)の各因子をコードする核酸

からなる群より選択され、前記(b)の経路を活性化する因子が、下記(b1)～(b3)：

(b1) HRas、NRas及びKRasのG12VE37G変異体

(b2) 末端に膜局在化シグナルが付加されたRalGDS

(b3) (b1)及び(b2)の各因子をコードする核酸

10

20

30

40

50

からなる群より選択され、前記(c)の経路を活性化する因子が、下記(c1)及び(c2)：

(c1) HRas、NRas及びKRasのG12VT35S変異体

(c2) (c1)の各因子をコードする核酸

からなる群より選択される、剤。

【請求項 8】

(a) Ras-PI3キナーゼ-AKT-Rheb-mTOR-S6K1と続くシグナル伝達経路を活性化する因子、  
(b) Ras-Ral経路を活性化する因子及び(c) Ras-Raf経路を活性化する因子からなる群より  
選択される1種もしくは2種の因子を含有してなる、人工多能性幹細胞の樹立効率改善剤で  
あって、前記(a)の経路を活性化する因子が、下記(a1)～(a6)：

(a1) HRas、NRas及びKRasのG12VY40C変異体

(a2) 末端に膜局在化シグナルが付加されたPI3キナーゼの恒常的活性化変異体

(a3) 末端に膜局在化シグナルが付加されたAKT1、AKT2及びAKT3の恒常的活性化変異体

(a4) Rheb及びS6K1 T389E

(a5) PTEN shRNA

(a6) (a1)～(a5)の各因子をコードする核酸

からなる群より選択され、前記(b)の経路を活性化する因子が、下記(b1)～(b3)：

(b1) HRas、NRas及びKRasのG12VE37G変異体

(b2) 末端に膜局在化シグナルが付加されたRalGDS

(b3) (b1)及び(b2)の各因子をコードする核酸

からなる群より選択され、前記(c)の経路を活性化する因子が、下記(c1)及び(c2)：

(c1) HRas、NRas及びKRasのG12VT35S変異体

(c2) (c1)の各因子をコードする核酸

からなる群より選択される、剤。

【請求項 9】

下記の工程：

(1) 請求項 1 または 3 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法により人工多能性幹細胞を製造する工程、及び

(2) 上記工程(1)で得られた人工多能性幹細胞に分化誘導処理を行い、体細胞に分化させる工程、

を含む、体細胞の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、人工多能性幹（以下、iPSともいう）細胞の樹立効率の改善方法及びそのための薬剤に関する。より詳細には、本発明は、Rasファミリーのメンバーを用いたiPS細胞の樹立効率の改善方法、並びにRasファミリーのメンバーを有効成分とするiPS細胞の樹立効率改善剤に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、マウス及びヒトのiPS細胞が相次いで樹立された。Takahashi及びYamanaka（非特許文献1）は、Fbx15遺伝子座にネオマイシン耐性遺伝子をノックインしたレポーターマウス由来の線維芽細胞に、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc遺伝子を導入し強制発現させることによって、iPS細胞を誘導した。Okitaら（非特許文献2）は、Fbx15よりも多能性細胞に発現が限局しているNanogの遺伝子座に緑色蛍光タンパク質（GFP）及びピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを作製し、該マウス由来の線維芽細胞で上記4遺伝子を強制発現させ、ピューロマイシン耐性かつGFP陽性の細胞を選別することにより、遺伝子発現やエピジェネティック修飾が胚性幹（ES）細胞とほぼ同等のiPS細胞（Nanog iPS細胞）を樹立することに成功した。その後、c-Myc遺伝子を除いた3因子によってもiPS細胞を作製できることが明らかとなった（非特許文献3）。

さらに、Takahashiら（非特許文献4）は、ヒトの皮膚由来線維芽細胞にマウスと同様の

10

20

30

40

50

4遺伝子を導入することにより、iPS細胞を樹立することに成功した。一方、Yuら（非特許文献5）は、Klf4とc-Mycの代わりにNanogとLin28を使用してヒトiPS細胞を作製した。このように、体細胞に特定因子を導入することにより、ヒト及びマウスで、分化多能性においてES細胞と遜色のないiPS細胞を作製できることが示された。

【0003】

しかし、iPS細胞の樹立効率は依然として低く、特に、iPS細胞から分化した組織や個体において腫瘍化が懸念されるc-Mycを除く3因子（Oct3/4, Sox2, Klf4）を体細胞に導入してヒトiPS細胞を作製する場合、その樹立効率が極めて低いという問題点がある。

【0004】

ところで、低分子量GTPaseであるRasは多くの細胞において増殖と分化を制御している。Rasは通常GDPに結合した不活性化型として存在するが、増殖因子などの刺激によりGDPを解離し、GTPと結合して活性化型に変化し、標的因子を介して下流にシグナルを伝達する。Rasの標的因子として、Raf、phosphatidylinositol 3-kinase（PI3キナーゼ）、Ral Guanine nucleotide Exchanging Factor（RalGEF）等が知られている。様々なヒトがん細胞においてRasの恒常的活性化型点変異が報告されており、これらの標的因子の下流シグナルの異常によるRasタンパク質の機能破綻が、細胞がん化の重要なステップの1つと推測されている。

10

【0005】

Takahashiら（非特許文献6）は、胚性幹細胞（ES細胞）で特異的に発現する、他のRas遺伝子と相同性を有する遺伝子を同定し、ERasと命名した。ERasは他のRasと全体では約40%程度の相同性しかないが、Rasの機能に必須の5つのグアニンヌクレオチド結合ドメイン（G1-G5）は高度に保存され、膜局在に必要なC末端のCaaxモチーフ（C: システイン、a: 脂肪族アミノ酸、x: 任意のアミノ酸）も有している。

20

【0006】

しかしながら、Rasファミリーと体細胞の初期化との関連については、未だ十分に説明されていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Takahashi, K. and Yamanaka, S., Cell, 126: 663-676 (2006)

30

【非特許文献2】Okita, K. et al., Nature, 448: 313-317 (2007)

【非特許文献3】Nakagawa, M. et al., Nat. Biotechnol., 26: 101-106 (2008)

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

【非特許文献5】Yu, J. et al., Science, 318: 1917-1920 (2007)

【非特許文献6】Takahashi, K. et al., Nature, 423: 541-545 (2003)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、iPS細胞の樹立効率を改善する手段を提供することであり、それを用いた効率的なiPS細胞の製造方法を提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、体細胞の核初期化工程において、活性化型のRasファミリーメンバー、その標的因子又はその関連因子であるPI3キナーゼ、RalGEF、Raf、AKTファミリーメンバー、Rheb、TCL1若しくはS6Kの活性化型分子のレベルを増大させることにより、iPS細胞の樹立効率を顕著に増大させ得ることを明らかにした。また、種々の活性化型変異体を用いた実験から、Rasタンパク質による、PI3キナーゼを介するシグナル伝達経路（PI3キナーゼ経路）、RalGEFを介するシグナル伝達経路（Ral経路）及びAKT経路の活性化が、iPS樹立効率の改善に大きく寄与していることを明らかにし、本発明を完成するに至った。

50

## 【 0 0 1 0 】

すなわち、本発明は以下の通りのものである。

- [1] 人工多能性幹細胞の樹立効率の改善方法であって、体細胞の核初期化工程において、Rasファミリーメンバー、PI3キナーゼ、RalGEF、Raf、AKTファミリーメンバー、Rheb、TCL1及びS6Kからなる群より選択される1以上のタンパク質の活性化型のレベルを増大させることを含む、方法。
- [2] Rasファミリーメンバー、PI3キナーゼ、RalGEF、Raf、AKTファミリーメンバー、Rheb、TCL1およびS6K、並びにそれらをコードする核酸からなる群より選択される1以上の因子を体細胞に接触させることを含む、上記[1]記載の方法。
- [3] Rasファミリーメンバー、PI3キナーゼ、RalGEF、Raf、AKTファミリーメンバー及びS6Kが恒常的活性化型である、上記[2]記載の方法。 10
- [4] RasファミリーメンバーがERas、HRas、NRas及びKRasからなる群より選択される、上記[2]又は[3]記載の方法。
- [5] RasファミリーメンバーがPI3キナーゼ経路、Ral経路及びMAPキナーゼ経路から選択される1以上のシグナル伝達経路を恒常的に活性化する、上記[3]又は[4]記載の方法。
- [6] RasファミリーメンバーがPI3キナーゼ経路及び/又はRal経路を恒常的に活性化する、上記[3]又は[4]記載の方法。
- [7] PI3キナーゼがAKT経路のシグナル伝達経路を恒常的に活性化することを特徴とする上記[3]記載の方法。
- [8] AKTファミリーメンバーがAKT1、AKT2及びAKT3からなる群より選択される、上記[2]又は[3]記載の方法。 20
- [9] AKTファミリーメンバーがmTOR経路のシグナル伝達経路を恒常的に活性化する、上記[3]又は[8]記載の方法。
- [10] p53阻害薬、GLISファミリーメンバー、並びにそれらをコードする核酸からなる群より選択される1以上の因子を体細胞に接触させることを更に含む、上記[2]記載の方法。
- [11] Rasファミリーメンバー、PI3キナーゼ、RalGEF、Raf、AKTファミリーメンバー、Rheb、TCL1及びS6K、並びにそれらをコードする核酸からなる群より選択される因子を含有してなる、人工多能性幹細胞の樹立効率改善剤。
- [12] Rasファミリーメンバー、PI3キナーゼ、RalGEF、Raf、AKTファミリーメンバー及びS6Kが恒常的活性化型である、上記[11]記載の剤。 30
- [13] RasファミリーメンバーがERas、HRas、NRas及びKRasからなる群より選択される、上記[11]又は[12]記載の剤。
- [14] RasファミリーメンバーがPI3キナーゼ経路、Ral経路及びMAPキナーゼ経路から選択される1以上のシグナル伝達経路を恒常的に活性化する、上記[12]又は[13]記載の剤。
- [15] RasファミリーメンバーがPI3キナーゼ経路及び/又はRal経路を恒常的に活性化する、上記[12]又は[13]記載の剤。
- [16] PI3キナーゼがAKT経路のシグナル伝達経路を恒常的に活性化することを特徴とする上記[12]記載の剤。
- [17] AKTファミリーメンバーがAKT1、AKT2及びAKT3からなる群より選択される、上記[11]又は[12]記載の剤。 40
- [18] AKTファミリーメンバーがmTOR経路のシグナル伝達経路を恒常的に活性化する、上記[12]又は[17]記載の剤。
- [19] p53阻害薬、GLISファミリーメンバー、並びにそれらをコードする核酸からなる群より選択される1以上の因子を更に含有する、上記[11]記載の剤。
- [20] 体細胞に核初期化物質と、Rasファミリーメンバー、PI3キナーゼ、RalGEF、Raf、AKTファミリーメンバー、Rheb、TCL1及びS6K、並びにそれらをコードする核酸からなる群より選択される1以上の因子とを接触させることを含む、人工多能性幹細胞の製造方法。
- [21] Rasファミリーメンバー、PI3キナーゼ、RalGEF、Raf、AKTファミリーメンバー及びS6Kが恒常的活性化型である、上記[20]記載の方法。
- [22] RasファミリーメンバーがERas、HRas、NRas及びKRasからなる群より選択される、上 50

記[20]又は[21]記載の方法。

[23] RasファミリーメンバーがPI3キナーゼ経路、Ral経路及びMAPキナーゼ経路から選択される1以上のシグナル伝達経路を恒常的に活性化する、上記[21]又は[22]記載の方法。

[24] RasファミリーメンバーがPI3キナーゼ経路及び/又はRal経路を恒常的に活性化する、上記[21]又は[22]記載の方法。

[25] PI3キナーゼがAKT経路のシグナル伝達経路を恒常的に活性化することを特徴とする上記[21]記載の方法。

[26] AKTファミリーメンバーがAKT1, AKT2及びAKT3からなる群より選択される、上記[20]又は[21]記載の方法。

[27] AKTファミリーメンバーがmTOR経路のシグナル伝達経路を恒常的に活性化する、上記[21]又は[26]記載の方法。

[28] p53阻害薬、GLISファミリーメンバー、並びにそれらをコードする核酸からなる群より選択される1以上の因子を体細胞に接触させることを更に含む、上記[20]記載の方法。

[29] 核初期化物質が、Octファミリーのメンバー、Soxファミリーのメンバー、Klf4ファミリーのメンバー、Mycファミリーのメンバー、Linファミリーのメンバー及びNanog、並びにそれらをコードする核酸からなる群より選択される、上記[20]記載の方法。

[30] 核初期化物質がOct3/4、Klf4及びSox2、又はそれらをコードする核酸である、上記[20]記載の方法。

[31] 核初期化物質がOct3/4、Klf4、Sox2並びにc-Myc若しくはL-Myc及び/又はNanog及び/又はLin28若しくはLin28B、或いはそれらをコードする核酸である、上記[20]記載の方法。

[32] Rasファミリーメンバー、PI3キナーゼ、RalGEF、Raf、AKTファミリーメンバー、Rheb、TCL1及びS6K、並びにそれらをコードする核酸からなる群より選択される因子と、核初期化物質とを含有してなる、人工多能性幹細胞の誘導剤。

[33] Rasファミリーメンバー、PI3キナーゼ、RalGEF、Raf、AKTファミリーメンバー及びS6Kが恒常的活性化型である、上記[32]記載の剤。

[34] RasファミリーメンバーがERas、HRas、NRas及びKRasからなる群より選択される、上記[32]又は[33]記載の剤。

[35] RasファミリーメンバーがPI3キナーゼ経路、Ral経路及びMAPキナーゼ経路から選択される1以上のシグナル伝達経路を恒常的に活性化する、上記[33]又は[34]記載の剤。

[36] RasファミリーメンバーがPI3キナーゼ経路及び/又はRal経路を恒常的に活性化する、上記[33]又は[34]記載の剤。

[37] 核初期化物質が、Octファミリーのメンバー、Soxファミリーのメンバー、Klf4ファミリーのメンバー、Mycファミリーのメンバー、Linファミリーのメンバー及びNanog、並びにそれらをコードする核酸からなる群より選択される、上記[32]記載の剤。

[38] PI3キナーゼがAKT経路のシグナル伝達経路を恒常的に活性化することを特徴とする上記[33]記載の剤。

[39] AKTファミリーメンバーがAKT1, AKT2及びAKT3からなる群より選択される、上記[32]又は[33]記載の剤。

[40] AKTファミリーメンバーがmTOR経路のシグナル伝達経路を恒常的に活性化する、上記[33]又は[39]記載の剤。

[41] p53阻害薬、GLISファミリーメンバー、並びにそれらをコードする核酸からなる群より選択される1以上の因子を更に含有する、上記[32]記載の剤。

[42] 核初期化物質がOct3/4、Klf4及びSox2、又はそれらをコードする核酸である、上記[32]記載の剤。

[43] 核初期化物質がOct3/4、Klf4、Sox2並びにc-Myc若しくはL-Myc及び/又はNanog及び/又はLin28若しくはLin28B、或いはそれらをコードする核酸である、上記[32]記載の剤。

[44] Rasファミリーメンバー、PI3キナーゼ、RalGEF、Raf、AKTファミリーメンバー、Rheb、TCL1又はS6Kをコードする外来性核酸を含む、人工多能性幹細胞。

10

20

30

40

50

[45] 前記外来性核酸がゲノムに組み込まれている、上記[44]記載の細胞。

[46] 下記の工程：

(1) 上記[20]～[31]のいずれかに記載の方法により人工多能性幹細胞を製造する工程、及び

(2) 上記工程(1)で得られた人工多能性幹細胞に分化誘導処理を行い、体細胞に分化させる工程、

を含む、体細胞の製造方法。

[47] 人工多能性幹細胞の樹立効率改善のための、Rasファミリーメンバー、PI3キナーゼ、RalGEF、Raf、AKTファミリーメンバー、Rheb、TCL1及びS6K、並びにそれらをコードする核酸からなる群より選択される1以上の因子の使用。

10

[48] 人工多能性幹細胞の製造のための、Rasファミリーメンバー、PI3キナーゼ、RalGEF、Raf、AKTファミリーメンバー、Rheb、TCL1及びS6K、並びにそれらをコードする核酸からなる群より選択される1以上の因子の使用であって、該因子を核初期化物質とともに体細胞に接触させることを特徴とする、使用。

[49] 体細胞の製造における、上記[44]又は[45]記載の人工多能性幹細胞の使用。

[50] 体細胞の製造における細胞ソースとしての、上記[44]又は[45]記載の人工多能性幹細胞。

#### 【発明の効果】

##### 【0011】

核初期化の際にRasタンパク質、その標的因子であるPI3キナーゼ、RalGEF若しくはRaf、又はその関連因子であるAKTファミリーメンバー、Rheb、TCL1若しくはS6Kの活性化型分子のレベルを増大させると、iPS細胞の樹立効率を顕著に向上させることができるので、従来樹立効率の低かったc-Mycを除く3因子によるiPS細胞誘導などに特に有用である。

20

##### 【図面の簡単な説明】

##### 【0012】

【図1】図1は、実施例1の結果を示すグラフである。図中、縦軸はOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4遺伝子導入により得られたコロニー数を1とした場合（図中Red）のiPSコロニー数の倍率変化（Fold change）を示す。また横軸は、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc遺伝子と横軸に示す各遺伝子との組み合わせを示す。

【図2】図2は、実施例2の結果を示すグラフである。図中、縦軸はOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4遺伝子導入により得られたコロニー数を1とした場合（図中Red）のiPSコロニー数の倍率変化（Fold change）を示す。また横軸は、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc遺伝子と横軸に示す各遺伝子との組み合わせを示す。

30

【図3】図3は、実施例3の結果を示すグラフである。左図はTig-120細胞を用いた結果であり、右図は1616細胞を用いた結果である。図中、縦軸はiPS細胞コロニー数を示す。また横軸は、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc遺伝子と横軸に示す各遺伝子との組み合わせを示す。

【図4】図4は、実施例4の結果を示すグラフである。図中、縦軸はOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4遺伝子導入により得られたコロニー数を1とした場合（図中Red）のiPSコロニー数の倍率変化（Fold change）を示す。また横軸は、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc遺伝子と横軸に示す各遺伝子との組み合わせを示す。

40

【図5】図5は、実施例5の結果を示すグラフである。図中、縦軸はiPS細胞コロニー数を示す。また横軸は、Oct3/4、Sox2、Klf4およびc-Myc遺伝子と横軸に示す各遺伝子との組み合わせを示す。

【図6】図6は、実施例6の結果を示すグラフである。図中、縦軸はiPS細胞コロニー数を示す。また横軸は、Oct3/4、Sox2、Klf4およびc-Myc遺伝子と横軸に示す各遺伝子との組み合わせを示す。

【図7】図7は、実施例7の結果を示すiPS細胞コロニーのアルカリフォスファターゼ染色像である。各数値はiPS細胞コロニー数を示す。

【図8】図8は、実施例8の結果を示すグラフである。図8A中、縦軸はiPS細胞コロニー数

50

を示す。また横軸は、Oct3/4, Sox2およびKlf4遺伝子とMockの2倍量, Mock およびMyr-AKT1, Mock およびc-MYC shRNA, Myr-AKT1およびc-MYC shRNA, またはMyr-AKT1およびGSK3 S9Aとの組み合わせを示す。図8B中、縦軸はiPS細胞コロニー数を示す。また横軸は、Oct3/4, Sox2およびKlf4遺伝子と横軸に示す各遺伝子との組み合わせを示す。

【図9】図9は、実施例9の結果を示すグラフである。図中、縦軸はiPS細胞コロニー数を示す。また横軸は、Oct3/4, Sox2およびKlf4遺伝子と横軸に示す各遺伝子との組み合わせを示す。

【図10】図10は、実施例10の結果を示すグラフである。図中、縦軸はiPS細胞コロニー数を示す。また横軸は、Oct3/4, Sox2およびKlf4遺伝子と横軸に示す各遺伝子との組み合わせを示す。

【図11】図11は、実施例11の結果を示すグラフおよび写真である。図11Aにおいて、縦軸はiPS細胞コロニー数を示し、横軸は、c-Myc shRNA存在下あるいは非存在下におけるOct3/4, Sox2およびKlf4遺伝子と横軸に示す各遺伝子との組み合わせを示す。一方、図11Bは、ヒト由来の皮膚線維芽細胞にMock, Myr-AKT1, Rheb, S6K1 T389Eまたはp53 shRNAをそれぞれ導入した際の細胞内のc-Myc, p-AKT (リン酸化AKT), AKT, p-S6K1 (リン酸化S6K1), S6K1, p-TSC2 (リン酸化TSC2) およびTSC2のタンパク質の発現をWestern blot法で測定した結果を示す。

【図12】図12は、実施例12の結果を示すグラフである。図12Aは、ヒト由来の皮膚線維芽細胞に導入した結果を示し、図中、縦軸はiPS細胞コロニー数を示す。横軸は、p53 shRNA存在下あるいは非存在下におけるOct3/4, Sox2およびKlf4遺伝子と横軸に示す各遺伝子との組み合わせを示す。図12Bは、ヒト由来の皮膚線維芽細胞に導入した結果を示し、図中、縦軸はiPS細胞コロニー数を示す。横軸は、GLIS1存在下あるいは非存在下におけるOct3/4, Sox2およびKlf4遺伝子と横軸に示す各遺伝子との組み合わせを示す。図12Cは、ヒト由来の歯髄細胞に導入した結果を示し、図中、縦軸はiPS細胞コロニー数を示す。横軸は、p53 shRNA存在下あるいは非存在下におけるOct3/4, Sox2およびKlf4遺伝子と横軸に示す各遺伝子との組み合わせを示すと共に、GLIS1存在下あるいは非存在下におけるOct3/4, Sox2およびKlf4遺伝子と横軸に示す各遺伝子との組み合わせを示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明は、体細胞の核初期化工程において、活性化型のRasタンパク質、活性化型のその標的因子、活性化型のRasの標的因子の下流シグナル因子又はそのシグナルの活性化因子の細胞内レベルを増大させることによる、iPS細胞の樹立効率の改善方法を提供する。活性化型のRasタンパク質、活性化型のその標的因子、活性化型のRasの標的因子の下流シグナル因子又はそのシグナルの活性化因子の細胞内レベルを増大させる手段は特に制限されないが、例えば、Rasファミリーのメンバーであるタンパク質、その標的因子であるPI3キナーゼ、RalGEF若しくはRaf、Rasの標的因子の下流シグナル因子又はそのシグナルの活性化因子であるAKTファミリーメンバー、Rheb、TCL1若しくはS6K、又はそれらをコードする核酸、或いはRasタンパク質を活性化型に変換させる反応を促進する物質又はRasタンパク質を不活性化型に変換させる反応を阻害する物質を、体細胞に接触させる方法などが挙げられる。

【0014】

ここで体細胞の核初期化は、体細胞に核初期化物質を導入することにより行われるので、本発明はまた、体細胞に上記物質と核初期化物質とを接触させることによる、iPS細胞の製造方法を提供する。尚、本明細書では、核初期化物質のみではiPS細胞が樹立できず、活性化型のRasタンパク質レベル等を増大させることによりiPS細胞が樹立される場合も、「樹立効率の改善」に該当するものとして取り扱う。

【0015】

(a) 体細胞ソース

本発明においてiPS細胞作製のための出発材料として用いることのできる体細胞は、哺乳動物(例えば、ヒト、マウス、サル、ウシ、ブタ、ラット、イヌ等)由来の生殖細胞以

10

20

30

40

50



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）、及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。

10

## 【0016】

体細胞を採取するソースとなる哺乳動物個体は特に制限されないが、得られるiPS細胞がヒトの再生医療用途に使用される場合には、拒絶反応が起こらないという観点から、患者本人又はHLAの遺伝子型が同一若しくは実質的に同一である他人から体細胞を採取することが特に好ましい。ここでHLAの遺伝子型が「実質的に同一」とは、免疫抑制剤などの使用により、該体細胞由来のiPS細胞から分化誘導することにより得られた細胞を患者に移植した場合に移植細胞が生着可能な程度にHLAの遺伝子型が一致していることをいう。たとえば主たるHLA（例えばHLA-A、HLA-B及びHLA-DRの3遺伝子座、或いはさらにHLA-Cを加えた4遺伝子座）の遺伝子型がすべて同一である場合などが挙げられる（以下同じ）。また、ヒトに投与（移植）しない場合、例えば、患者の薬剤感受性や副作用の有無を評価するためのスクリーニング用の細胞のソースとしてiPS細胞を使用する場合には、同様に患者本人又は薬剤感受性や副作用と相関する遺伝子多型が同一である他人から体細胞を採取することが望ましい。

20

## 【0017】

哺乳動物から分離した体細胞は、核初期化工程に供するに先立って、細胞の種類に応じてその培養に適した自体公知の培地で前培養することができる。そのような培地としては、例えば、約5～20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、RPMI1640培地、199培地、F12培地などが挙げられるが、それらに限定されない。核初期化物質及び活性化型Rasタンパク質のレベルを増大させる物質（さらに必要に応じて、後述する他のiPS細胞の樹立効率改善物質）との接触に際し、例えば、カチオニックリポソームなど導入試薬を用いる場合には、導入効率の低下を防ぐため、無血清培地に交換しておくことが好ましい場合がある。

30

## 【0018】

(b) Rasタンパク質、その標的因子の活性化型分子、Ras標的因子の下流シグナル因子又はそのシグナルの活性化因子のレベルを増大させる物質

本明細書において「活性化型Rasタンパク質のレベルを増大させる物質」とは、Rasファミリーに属する1以上のタンパク質において、活性化型（GTP結合型）として存在するタンパク質レベルを増大させることができるものであれば、いかなる物質であってもよい。すなわち、Rasタンパク質やそれをコードする核酸自体や、Rasタンパク質を不活性化型（GDP結合型）から活性化型に変換させる反応（GDP-GTP交換反応）を促進するか、或いはRasタンパク質を活性化型から不活性化型に変換させる反応（GTP加水分解反応）を阻害することにより、結果的に活性化型のRasタンパク質レベルを増大させる物質も、本明細書における「活性化型Rasタンパク質のレベルを増大させる物質」に含まれる。

40

## 【0019】

本明細書において「活性化型のRasタンパク質標的因子のレベルを増大させる物質」とは、PI3キナーゼ、RalGEF及びRafの3つのRasタンパク質標的因子のうちの1以上の因子、

50

好ましくは1若しくは2因子、より好ましくはPI3キナーゼ及び/又はRalGEFの活性化型の細胞内レベルを増大させることができるものであれば、いかなる物質であってもよい。すなわち、PI3キナーゼ、RalGEF若しくはRaf又はそれをコードする核酸自体や、細胞内のこれら標的因子を細胞膜にリクルートする局在化因子、例えば活性化型のRasタンパク質も、本明細書における「活性化型のRasタンパク質標的因子のレベルを増大させる物質」に含まれる。

【0020】

本明細書において「Ras標的因子の下流シグナル因子又はそのシグナルの活性化因子のレベルを増大させる物質」とは、Rasタンパク質標的因子のさらに下流シグナルの因子もしくはこのシグナルの活性化因子であるAKTファミリーメンバー、Rheb、TCL1若しくはS6Kであり、好ましくはAKTファミリーメンバーの活性化型、Rheb、TCL1若しくはS6Kの活性化型の細胞内レベルを増大させることができるものであれば、いかなる物質であってもよい。すなわち、AKTファミリーメンバー、Rheb、TCL1若しくはS6K又はそれをコードする核酸自体や、細胞内のAKTファミリーメンバーを細胞膜にリクルートする局在化因子、例えば活性化型のPI3キナーゼも、本明細書における「活性化型のRasタンパク質関連因子のレベルを増大させる物質」に含まれる。

10

【0021】

以下、Rasタンパク質、その標的因子又はRas標的因子の下流シグナル因子の活性化型因子およびそのシグナルの活性化因子のレベルを増大させる物質を包括して、「本発明の樹立効率改善因子」という場合がある。

20

【0022】

(b1) Rasファミリーメンバー

本明細書における「Rasファミリーメンバー」とは、癌原遺伝子として同定されたHRas、KRas、NRasとの一次構造上の相同性により同定されたRasサブファミリータンパク質のうち、Raf、PI3キナーゼ及びRalGEFから選ばれる1以上の分子、好ましくはPI3キナーゼ及び/又はRalGEFを標的因子とし、活性化型Rasタンパク質の作用により上記因子の下流のシグナル伝達経路（即ち、Raf/MAPキナーゼ経路（MAPキナーゼ経路）、PI3キナーゼ経路、Ral経路）を活性化しうるタンパク質を意味する。好ましいRasファミリーメンバーの例としては、HRas、KRas、NRas、ERas等が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0023】

HRasタンパク質の好ましい例としては、例えば、配列番号：2で表されるアミノ酸配列からなるマウスHRas（RefSeq Accession No. NP\_032310）、配列番号：4で表されるアミノ酸配列からなるヒトHRas（RefSeq Accession No. NP\_001123914）、或いは他の哺乳動物におけるそのオルソログ、さらにはそれらの天然のアレル変異体や多型バリエーション、スプライシングバリエーション、天然及び人工の活性化型変異体などがあげられる。導入対象である体細胞の動物種に応じて、これと同種のHRasを用いることが望ましいが、異種HRasを用いることもできる。

【0024】

KRasタンパク質の好ましい例としては、例えば、配列番号：6で表されるアミノ酸配列からなるマウスKRas（RefSeq Accession No. NP\_067259）、配列番号：8で表されるアミノ酸配列からなるヒトKRas（RefSeq Accession No. NP\_203524）、或いは他の哺乳動物におけるそのオルソログ、さらにはそれらの天然のアレル変異体や多型バリエーション、スプライシングバリエーション、天然及び人工の活性化型変異体などがあげられる。導入対象である体細胞の動物種に応じて、これと同種のKRasを用いることが望ましいが、異種KRasを用いることもできる。

40

【0025】

NRasタンパク質の好ましい例としては、例えば、配列番号：10で表されるアミノ酸配列からなるマウスNRas（RefSeq Accession No. NP\_035067）、配列番号：12で表されるアミノ酸配列からなるヒトNRas（RefSeq Accession No. NP\_002515）、或いは他の哺乳動物におけるそのオルソログ、さらにはそれらの天然のアレル変異体や多型バリエーション、スプラ

50

イシングバリエント、天然及び人工の活性化型変異体などがあげられる。導入対象である体細胞の動物種に応じて、これと同種のNRasを用いることが望ましいが、異種NRasを用いることもできる。

【0026】

ERasタンパク質の好ましい例としては、例えば、配列番号：14で表されるアミノ酸配列からなるマウスERas (RefSeq Accession No. NP\_853526)、配列番号：16で表されるアミノ酸配列からなるヒトERas (RefSeq Accession No. NP\_853510)、或いは他の哺乳動物におけるそのオルソログ、さらにはそれらの天然のアレル変異体や多型バリエント、スプライシングバリエントなどがあげられる。導入対象である体細胞の動物種に応じて、これと同種のERasを用いることが望ましいが、異種ERasを用いることもできる。

10

【0027】

Rasタンパク質のアミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) のblastpプログラムを用い、以下の条件(期待値=10;ギャップを許す;マトリクス=BLOSUM62;フィルタリング=OFF)にて計算することができる。上記条件下でヒトHRasとマウスHRasとは100%、ヒトKRasとマウスKRasとは約89%、ヒトNRasとマウスNRasとは約99%のアミノ酸同一性を示す。Rasタンパク質はN末端から164アミノ酸の領域が極めて高度に保存されており、当該領域ではヒトKRasとマウスKRasとは約98%、ヒトNRasとマウスNRasとは100%のアミノ酸同一性を示す。また、当該領域におけるヒトHRasとヒトKRasとのアミノ酸同一性は約95%、ヒトHRasとヒトNRasとのアミノ酸同一性は約92%である。当該領域の中でも、グアニンヌクレオチドとの結合に關与する5つのドメイン(G1~G5)、標的因子との結合に關与するエフェクタードメインは特によく保存されている。さらに、多様性に富むC末端側配列の中でも、C末端の4アミノ酸残基はCaaxモチーフ(C: シスチン、a: 脂肪族アミノ酸、x: 任意のアミノ酸; 配列番号:17)と呼ばれて高度に保存されており、翻訳後修飾を受けてシスチン残基にファルネシル基が付加され、続いて末端3アミノ酸の切断、新たに露出したC末端シスチンのメチルエステル化が起こる。かかる脂質修飾によりRasタンパク質は細胞膜の内表面と強く結合する。

20

【0028】

HRas、KRas、NRasなどの多くのRasタンパク質は、通常GDPが結合した不活性化型として存在し、上流からのシグナルを受けるとGTPが結合した活性化型に変換されるが、種々のがん細胞から恒常的に活性化されたRas変異体が単離されており、恒常的な活性化に寄与する数多くのアミノ酸置換が報告されている。このようなRasタンパク質の恒常的活性化変異体を体細胞へ導入すれば、効率よく活性化型のRasタンパク質レベルを増大させることができる。例えば、H-、K-及びN-Rasの12番目のグリシンがバリンに置換された変異体は、Rasの下流の3つのシグナル伝達経路(PI3キナーゼ経路、Ral経路、MAPキナーゼ経路)のすべてを活性化する恒常的活性化型変異体である。また、上記変異に加えてさらに35番目のスレオニンがセリンに置換された二重変異体、37番目のグルタミン酸がグリシンに置換された二重変異体及び40番目のチロシンがシスチンに置換された二重変異体は、それぞれMAPキナーゼ経路、Ral経路及びPI3キナーゼ経路を選択的に活性化する恒常的活性化型変異体である。

30

40

【0029】

ヒト及びマウスERasは、HRasと全体では40%程度の相同性であるが、Rasの機能に必須なG1~G5及びエフェクタードメイン、膜局在化に必要なCaaxモチーフは保存されている。H-、K-及びN-Rasの12番目のグリシン、59番目のアラニン及び63番目のグルタミン酸のうち、1つでも他のアミノ酸に置換されると恒常的活性化型となるが、ヒトERasでは2つ、マウスERasでは3つのアミノ酸が他のRasとは異なっており、Rasの下流の3つのシグナル伝達経路のうちPI3キナーゼ経路を恒常的に活性化することが知られている。

【0030】

本発明で用いられる恒常的活性化型のRasタンパク質は、Rasの下流の3つのシグナル伝達経路(PI3キナーゼ経路、Ral経路、MAPキナーゼ経路)の少なくとも1つを恒常的に活性

50

化し得るものであれば特に制限はないが、好ましくはPI3キナーゼ経路、Ral経路及びMAPキナーゼ経路のうちの一つもしくは2つのシグナル伝達経路を恒常的に活性化するものであり、より好ましくはPI3キナーゼ経路及び/又はRal経路を恒常的に活性化するものである。PI3キナーゼ経路及び/又はRal経路を恒常的に活性化するRasタンパク質の具体例として、ERasや、H-、K-又はN-Rasの12番目のグリシンがバリンに置換され、かつ37番目のグルタミン酸がグリシンに置換されるか、40番目のチロシンがシステインに置換された二重変異体などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0031】

また、本発明で用いられるRasタンパク質は、Rasの下流の3つのシグナル伝達経路のいずれもが恒常的に不活性化されない限り、好ましくはPI3キナーゼ経路及びRal経路のいずれもが恒常的に不活性化されない限り、上記のいずれかのRasタンパク質のアミノ酸配列において、1又は2以上、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~数(5, 4, 3, 2)個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を含むタンパク質であってもよい。或いは、上記のいずれかのRasタンパク質のアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質であってもよい。好ましくは、膜局在化に必要なCaaxモチーフが保存され、かつRasの機能に必須なG1(10~17番目のアミノ酸)、G2(32~36番目のアミノ酸)、G3(57~60番目のアミノ酸)、G4(116~119番目のアミノ酸)、G5(145~147番目のアミノ酸)ドメイン、及びエフェクタードメイン(26~45番目のアミノ酸)が保存されているか、或いは恒常的な活性化をもたらすように変異されているものが挙げられる。

【0032】

(b2) Rasの標的因子(エフェクター)

本発明で用いられる「Rasの標的因子(エフェクター)」としては、PI3キナーゼ、RalGEF及びRafが挙げられる。

【0033】

本発明におけるPI3キナーゼは、Rasの標的因子となるクラスIA PI3キナーゼであり、p110触媒サブユニット(、及びの3つのアイソフォームがある)と調節サブユニット(p85、p85、p55及びそれらのスプライシングバリエーションがある)とからなる。このうち、Rasとの結合に關与するドメイン及びホスファチジルイノシトール-4,5-三リン酸(PIP<sub>2</sub>)からホスファチジルイノシトール-3,4,5-三リン酸(PIP<sub>3</sub>)へのリン酸化反応を触媒するキナーゼドメインを有するp110を、本発明の樹立効率改善因子として好ましく用いることができる。

【0034】

p110タンパク質の好ましい例としては、例えば、配列番号:19で表されるアミノ酸配列からなるマウスp110(RefSeq Accession No. NP\_032865)、配列番号:21で表されるアミノ酸配列からなるヒトp110(RefSeq Accession No. NP\_006209)、マウスp110(RefSeq Accession No. NP\_083370)、ヒトp110(RefSeq Accession No. NP\_006210)、マウスp110(RefSeq Accession No. NP\_0010250058)、ヒトp110(RefSeq Accession No. NP\_005017)、或いは他の哺乳動物におけるそれらのオルソログ、さらにはそれらの天然のアレル変異体や多型バリエーション、スプライシングバリエーション、天然及び人工の活性化型変異体などがあげられる。導入対象である体細胞の動物種に応じて、これと同種のp110を用いることが望ましいが、異種p110を用いることもできる。

【0035】

RalGEFタンパク質の好ましい例としては、例えば、配列番号:23で表されるアミノ酸配列からなるマウスRalGDS(RefSeq Accession No. NP\_033084)、配列番号:25で表されるアミノ酸配列からなるヒトRalGDS(RefSeq Accession No. NP\_006266)、マウスRgl(RefSeq Accession No. NP\_058542)、ヒトRgl(RefSeq Accession No. NP\_055964)、マウスRlf/Rgl2(RefSeq Accession No. NP\_033085)、ヒトRlf/Rgl2(RefSeq Accession No. NP\_004752)、或いは他の哺乳動物におけるそれらのオルソログ、さらにはそれらの天然の

アレル変異体や多型バリエーション、スプライシングバリエーション、天然及び人工の活性化型変異体などがあげられる。導入対象である体細胞の動物種に応じて、これと同種のRalGEFを用いることが望ましいが、異種RalGEFを用いることもできる。

【0036】

Rafタンパク質の好ましい例としては、例えば、配列番号：27で表されるアミノ酸配列からなるマウスc-Raf (RefSeq Accession No. NP\_084056)、配列番号：29で表されるアミノ酸配列からなるヒトc-Raf (RefSeq Accession No. NP\_002871)、マウスA-Raf (RefSeq Accession No. NP\_033833)、ヒトA-Raf (RefSeq Accession No. NP\_001645)、マウスB-Raf (RefSeq Accession No. NP\_647455)、ヒトB-Raf (RefSeq Accession No. NP\_004324)、或いは他の哺乳動物におけるそれらのオルソログ、さらにはそれらの天然のアレル変異体や多型バリエーション、スプライシングバリエーション、天然及び人工の活性化型変異体などがあげられる。導入対象である体細胞の動物種に応じて、これと同種のRafを用いることが望ましいが、異種Rafを用いることもできる。

【0037】

PI3キナーゼ、RalGEF、RafなどのRas標的因子は、活性化型Rasとの結合を介して細胞膜の内表面に局在化することにより活性化され、下流のシグナル伝達経路を活性化する。従って、これら標的因子の恒常的活性化型変異体を体細胞へ導入すれば、効率よく活性化型の該Ras標的因子のレベルを増大させることができる。例えば、Ras標的因子は膜に局在化することにより活性化されるので、該標的因子のN末端若しくはC末端に膜局在化シグナル配列を付加することにより、該標的因子の恒常的活性化型変異体を作製することができる。例えば、該標的因子のN末端にミリスチル化シグナル配列（例えば、c-Src由来のミリスチル化シグナル配列 (MGSSKSKPKDPSQRRIRI; 配列番号：30)）を付加するか（例、実施例3のMyr-PI3K等）、或いはC末端にCaaxモチーフを付加することにより（例、実施例3のPI3K-CaaX、実施例4のRalGDS-CaaX、Raf-CaaX等）、膜局在性の恒常的活性化型変異体とすることができる。その他の恒常的活性化型変異体として、例えば、p110 の1047番目のヒスチジンがアルギニンに置換されたPI3キナーゼ変異体、p110 の545番目のグルタミン酸がリジンに置換されたPI3キナーゼ変異体、p110 の227番目のリジンがグルタミン酸に置換されたPI3キナーゼ変異体、p110のN末端側の108アミノ酸（調節サブユニット結合ドメイン）を欠失したPI3キナーゼ変異体、c-RafのN末端側の305アミノ酸（Ras結合ドメインを含む）を欠失したRaf変異体、B-Rafの600番目のバリンがグルタミン酸に置換されたRaf変異体、c-Rafの340番目のチロシンがアスパラギン酸に置換されたRaf変異体などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0038】

本発明で用いられる恒常的活性化型のRas標的因子は、好ましくはPI3キナーゼ（p110）又はRalGEFの恒常的活性化型変異体であり、具体的には、後記実施例で用いられるMyr-PI3K、PI3K-CaaX、RalGDS-CaaX等が挙げられる。

【0039】

本発明で用いられる恒常的活性化型のPI3キナーゼは、AKT経路のシグナル伝達経路を恒常的に活性化するものである。

【0040】

また、本発明で用いられるRas標的因子は、該標的因子の下流のシグナル伝達経路が恒常的に不活性化されない限り、上記のいずれかのRas標的因子のアミノ酸配列において、1又は2以上、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~数（5, 4, 3, 2）個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を含むタンパク質であってもよい。或いは、上記のいずれかのRasタンパク質のアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質であってもよい。

【0041】

(b3) Rasの標的因子（エフェクター）の下流シグナル因子およびそのシグナルの活性化因子

10

20

30

40

50

本発明で用いられる「Rasの標的因子（エフェクター）の下流シグナル因子」としては、AKTファミリーメンバー、Rheb及びS6Kが挙げられ、「Rasの標的因子（エフェクター）の下流シグナルの活性化因子」としては、TCL1が挙げられる。

【 0 0 4 2 】

本明細書における「AKTファミリーメンバー」とは、ウイルス性癌遺伝子であるv-Aktの相同遺伝子として同定され、その下流にあるmTORの活性化へとシグナルを伝達し得るタンパク質である。好ましいAKTファミリーメンバーの例としては、AKT1、AKT2、AKT3等が挙げられるが、これには限定されない。AKTタンパク質の好ましい例としては、例えば配列番号：35で表わされるアミノ酸配列からなるマウスAkt1 (RefSeq Accession No. NP\_001159366)、配列番号：37で表わされるアミノ酸配列からなるヒトAKT1 (RefSeq Accession No. NP\_001014432)、或いは他の哺乳動物におけるそれらのオルソログ、さらにはそれらの天然のアレル変異体や多型バリエーション、スプライシングバリエーション（例えば、RefSeq Accession No. NP\_033782、RefSeq Accession No. NP\_001014431、RefSeq Accession No. NP\_005154など）、天然及び人工の活性化型変異体などがあげられる。導入対象である体細胞の動物種に応じて、これと同種のAKTファミリーメンバーを用いることが望ましいが、異種AKTファミリーメンバーを用いることもできる。

10

【 0 0 4 3 】

Rhebタンパク質の好ましい例としては、例えば配列番号：39で表わされるアミノ酸配列からなるマウスRheb (RefSeq Accession No. NP\_444305)、配列番号：41で表わされるアミノ酸配列からなるヒトRHEB (RefSeq Accession No. NP\_005605)、或いは他の哺乳動物におけるそれらのオルソログ、さらにはそれらの天然のアレル変異体や多型バリエーション、スプライシングバリエーション、天然及び人工の活性化型変異体などがあげられる。導入対象である体細胞の動物種に応じて、これと同種のRhebを用いることが望ましいが、異種Rhebを用いることもできる。

20

【 0 0 4 4 】

TCL1タンパク質の好ましい例としては、例えば配列番号：43で表わされるアミノ酸配列からなるマウスTcl1 (RefSeq Accession No. NP\_033363)、配列番号：45で表わされるアミノ酸配列からなるヒトTCL1A (RefSeq Accession No. NP\_001092195)、或いは他の哺乳動物におけるそれらのオルソログ、さらにはそれらの天然のアレル変異体や多型バリエーション、スプライシングバリエーション（例えば、RefSeq Accession No. NP\_068801など）、天然及び人工の活性化型変異体などがあげられる。導入対象である体細胞の動物種に応じて、これと同種のTCL1を用いることが望ましいが、異種TCL1を用いることもできる。

30

【 0 0 4 5 】

S6Kタンパク質の好ましい例としては、例えば配列番号：47で表わされるアミノ酸配列からなるS6K (RefSeq Accession No. NP\_001107806)、配列番号：49で表わされるアミノ酸配列からなるヒトS6K1 (RefSeq Accession No. NP\_003152)、或いは他の哺乳動物におけるそれらのオルソログ、さらにはそれらの天然のアレル変異体や多型バリエーション、スプライシングバリエーション（例えば、RefSeq Accession No. NP\_082535など）、天然及び人工の活性化型変異体などがあげられる。導入対象である体細胞の動物種に応じて、これと同種のS6Kを用いることが望ましいが、異種S6Kを用いることもできる。

40

【 0 0 4 6 】

AKTファミリーメンバーは、活性化型RasやPI3キナーゼ等との結合を介して細胞膜の内表面に局在化することにより活性化され、下流のシグナル伝達経路を活性化する。従って、AKTファミリーメンバーの恒常的活性化型変異体を体細胞へ導入すれば、効率よく下流シグナル因子のレベルを増大させることができる。例えば、AKTファミリーメンバーは膜に局在化することにより活性化されるので、該標的因子のN末端若しくはC末端に膜局在化シグナル配列を付加することにより、該標的因子の恒常的活性化型変異体を作製することができる。例えば、該標的因子のN末端にミリスチル化シグナル配列（例えば、c-Src由来のミリスチル化シグナル配列 (MGSSKSKPKDPSQRRRIRI; 配列番号：30)）を付加することにより（例、実施例8のMyr-AKT1等）、膜局在性の恒常的活性化型変異体とすること

50

ができる。その他の恒常的活性化型変異体として、例えば、AKT1の40番目のグルタミン酸がリジンに置換されたPI3キナーゼ変異体 (E40K-AKT1)、AKT1の17番目のグルタミン酸がリジンに置換されたPI3キナーゼ変異体 (E17K-AKT1) などが挙げられるが、これらに限定されない。

【 0 0 4 7 】

また、S6Kタンパク質は、通常389番目のトレオニンがリン酸化されることで活性化型に変換されるが、この389番目をグルタミン酸へ変換することで、恒常的に活性化することが報告されている。このようなS6Kタンパク質の恒常的活性化変異体を体細胞へ導入すれば、効率よく活性化型のS6Kタンパク質レベルを増大させることができる。

【 0 0 4 8 】

また、本発明で用いられるRasの標的因子 (エフェクター) の下流シグナル因子およびこのシグナルの活性化因子は、さらなる下流のシグナル伝達経路が恒常的に不活性化されない限り、上記のいずれかのRasの標的因子 (エフェクター) の下流シグナル因子およびこのシグナルの活性化因子のアミノ酸配列において、1又は2以上、好ましくは1~20個、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~数 (5, 4, 3, 2) 個のアミノ酸が置換、欠失、挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を含むタンパク質であってもよい。或いは、上記のいずれかのAKTファミリーメンバー、Rheb、S6K及びTCL1タンパク質のアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上、特に好ましくは98%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質であってもよい。

【 0 0 4 9 】

本発明で用いられる恒常的活性化型のRasの標的因子 (エフェクター) の下流シグナル因子およびこのシグナルの活性化因子は、好ましくはAKTファミリーメンバー又はS6Kの恒常的活性化変異体であり、具体的には、後記実施例で用いられるMyr-AKT1、Myr-AKT2、Myr-AKT3、S6K1 T389E等が挙げられる。

【 0 0 5 0 】

(b4) Ras活性化因子

受容体チロシンキナーゼが増殖因子などの細胞外シグナルの刺激を受けて活性化されると自己リン酸化を起こし、これを認識するGrb2やShcなどのアダプタータンパク質を介してRasGEFであるSos、RasGRF、RasGRF2、RasGRP、SmgGDS、Vav、C3G等が細胞膜にリクルートされ、それによって細胞膜に局在するRasタンパク質が活性化される。従って、RasGEFやアダプタータンパク質を体細胞に導入することによっても、Rasタンパク質の活性化を介してiPS細胞の樹立効率を改善することができる。

【 0 0 5 1 】

Sosタンパク質の好ましい例としては、マウスSos1 (RefSeq Accession No. NP\_033257)、ヒトSos1 (RefSeq Accession No. NP\_005624)、マウスSos2 (RefSeq Accession No. XP\_127051)、ヒトSos2 (RefSeq Accession No. NP\_008870)、或いは他の哺乳動物におけるそれらのオルソログ、さらにはそれらの天然のアレル変異体や多型バリエーション、スプライシングバリエーション、天然及び人工の活性化型変異体などがあげられる。導入対象である体細胞の動物種に応じて、これと同種のSosを用いることが望ましいが、異種Sosを用いることもできる。人工の活性化型変異体の例としては、前記したC末端にCaaxモチーフを付加するか、N末端にミリスチル化シグナルを付加した膜局在性変異体が挙げられる。

【 0 0 5 2 】

RasGRF、RasGRF2、RasGRP、SmgGDS、Vav、C3G等の他のRasGEFタンパク質のアミノ酸配列は公知であり、それらの多型バリエーション、スプライシングバリエーションも知られている。また、これらのタンパク質の活性化型変異体の例としては、前記したC末端にCaaxモチーフを付加するか、N末端にミリスチル化シグナルを付加した膜局在性変異体が挙げられる。

【 0 0 5 3 】

Grb2タンパク質の好ましい例としては、マウスGrb2 (RefSeq Accession No. NP\_032189)、ヒトGrb2 (RefSeq Accession No. NP\_002077)、或いは他の哺乳動物におけるそれら

10

20

30

40

50

のオルソログ、さらにはそれらの天然のアレル変異体や多型バリエーション、スプライシングバリエーション、天然及び人工の活性化型変異体などがあげられる。導入対象である体細胞の動物種に応じて、これと同種のGrb2を用いることが望ましいが、異種Grb2を用いることもできる。人工の活性化型変異体の例としては、前記したC末端にCaaxモチーフを付加するか、N末端にミリスチル化シグナルを付加した膜局在性変異体が挙げられる。

#### 【 0 0 5 4 】

(b1) ~ (b4)のタンパク質(「本発明のタンパク性樹立効率改善因子」という場合もある)は、例えば、ヒトもしくは他の哺乳動物(例えば、マウス、ラット、サル、ブタ、イヌなど)の細胞・組織[例えば、胸腺、骨髄、脾臓、脳、脊髄、心臓、骨格筋、腎臓、肺、肝臓、膵臓もしくは前立腺の細胞・組織、これら細胞の前駆細胞、幹細胞または癌細胞など]から自体公知のタンパク質分離精製技術を用いて単離することもできるが、好ましくは、上記細胞・組織から常法に従ってcDNAをクローニングし、適当な宿主細胞で発現させて組換えタンパク質として調製される。上記の種々の活性化型変異体は、自体公知の遺伝子組換え技術により、点変異を導入したり、あるいは末端に膜局在化シグナル配列を付加することにより作製することができる。

10

#### 【 0 0 5 5 】

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

20

30

#### 【 0 0 5 6 】

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

40

#### 【 0 0 5 7 】

本発明のタンパク性樹立効率改善因子をコードするcDNAとPTD配列もしくはCPP配列とを組み込んだ融合タンパク質発現ベクターを作製して組換え発現させ、融合タンパク質を回

50



収して導入に用いる。導入は、タンパク質導入試薬を添加しない以外は上記と同様にして行うことができる。

【0058】

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

【0059】

その他、エレクトロポレーション法、セミンタクトセル法 (Kano, F. et al. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 322, 357-365(2006))、Wr-t ペプチドによる導入法 (Kondo, E. et al., *Mol. Cancer Ther.* 3(12), 1623-1630(2004))などのタンパク質導入法も用いることができる。

10

【0060】

タンパク質導入操作は1回以上の任意の回数 (例えば、1回以上10回以下、または1回以上5回以下等) 行うことができ、好ましくは導入操作を2回以上 (たとえば3回または4回) 繰り返して行うことができる。導入操作を繰り返し行う場合の間隔としては、例えば6~48時間、好ましくは12~24時間が挙げられる。

【0061】

(b5) 本発明のタンパク質樹立効率改善因子をコードする核酸

本発明のタンパク質樹立効率改善因子 (Rasファミリーメンバー、Rasの標的因子 (エフェクター)、Rasの標的因子 (エフェクター) の下流シグナル因子、そのシグナルの活性化因子及びRas活性化因子) をコードする核酸 (「本発明の核酸性樹立効率改善因子」という場合もある) は、上記した本発明におけるRasファミリーメンバー (例、HRas、KRas、NRas、ERas等)、Rasの標的因子 (エフェクター) (例、PI3キナーゼ、RalGEF、Raf等)、Rasの標的因子 (エフェクター) の下流シグナル因子 (例、AKT1、AKT2、AKT3、Rheb、S6K等)、Rasの標的因子 (エフェクター) の下流シグナルの活性化因子 (例、TCL1等) 又はRas活性化因子 (例、RasGEF、受容体チロシンキナーゼアダプタータンパク質等) をコードするものであれば特に制限はない。該核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。好ましくはDNAが挙げられる。また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。

20

【0062】

本発明の核酸性樹立効率改善因子は、例えば、ヒトもしくは他の哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、サル、ブタ、イヌなど) の細胞・組織 [例えば、胸腺、骨髄、脾臓、脳、脊髄、心臓、骨格筋、腎臓、肺、肝臓、膵臓もしくは前立腺の細胞・組織、これら細胞の前駆細胞、幹細胞または癌細胞など] 由来のcDNAから、常法に従ってクローニングすることができる。

30

【0063】

HRasをコードする核酸としては、例えば、配列番号: 1もしくは3で表される塩基配列を含有する核酸、または配列番号: 1もしくは3で表される塩基配列の相補鎖配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含有し、かつRasの下流の3つのシグナル伝達経路の少なくとも1つ、好ましくはPI3キナーゼ経路及び/又はRal経路を活性化し得るタンパク質をコードする核酸が挙げられる。

40

【0064】

KRasをコードする核酸としては、例えば、配列番号: 5もしくは7で表される塩基配列を含有する核酸、または配列番号: 5もしくは7で表される塩基配列の相補鎖配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含有し、かつRasの下流の3つのシグナル伝達経路の少なくとも1つ、好ましくはPI3キナーゼ経路及び/又はRal経路を活性化し得るタンパク質をコードする核酸が挙げられる。

【0065】

NRasをコードする核酸としては、例えば、配列番号: 9もしくは11で表される塩基配列を含有する核酸、または配列番号: 9もしくは11で表される塩基配列の相補鎖配列とスト

50

リンジエントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含有し、かつRasの下流の3つのシグナル伝達経路の少なくとも1つ、好ましくはPI3キナーゼ経路及び/又はRal経路を活性化し得るタンパク質をコードする核酸が挙げられる。

【0066】

ERasをコードする核酸としては、例えば、配列番号：13もしくは15で表される塩基配列を含有する核酸、または配列番号：13もしくは15で表される塩基配列の相補鎖配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含有し、かつRasの下流の3つのシグナル伝達経路の少なくとも1つ、好ましくはPI3キナーゼ経路及び/又はRal経路を活性化し得るタンパク質をコードする核酸が挙げられる。

【0067】

PI3キナーゼの触媒サブユニット (p110) をコードする核酸としては、例えば、配列番号：18もしくは20で表される塩基配列を含有するp110 をコードする核酸、または配列番号：18もしくは20で表される塩基配列の相補鎖配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含有し、PI3キナーゼ経路を活性化し得るタンパク質をコードする核酸が挙げられる。あるいは、マウスp110 (RefSeq Accession No. NM\_029094)、ヒトp110 (RefSeq Accession No. NM\_006219)、マウスp110 (RefSeq Accession No. NM\_001029837)、ヒトp110 (RefSeq Accession No. NM\_005026) のcDNA配列を含有する核酸、または該cDNA配列の相補鎖配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含有し、PI3キナーゼ経路を活性化し得るタンパク質をコードする核酸が挙げられる。

【0068】

RalGEFをコードする核酸としては、例えば、配列番号：22もしくは24で表される塩基配列を含有するRalGDSをコードする核酸、または配列番号：22もしくは24で表される塩基配列の相補鎖配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含有し、Ral経路を活性化し得るタンパク質をコードする核酸が挙げられる。あるいは、マウスRgl (RefSeq Accession No. NM\_016846)、ヒトRgl (RefSeq Accession No. NM\_015149)、マウスRlf/Rgl2 (RefSeq Accession No. NM\_009059)、ヒトRlf/Rgl2 (RefSeq Accession No. NM\_004761) のcDNA配列を含有する核酸、または該cDNA配列の相補鎖配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含有し、Ral経路を活性化し得るタンパク質をコードする核酸が挙げられる。

【0069】

Rafをコードする核酸としては、例えば、配列番号：26もしくは28で表される塩基配列を含有するc-Rafをコードする核酸、または配列番号：26もしくは28で表される塩基配列の相補鎖配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含有し、MAPキナーゼ経路を活性化し得るタンパク質をコードする核酸が挙げられる。あるいは、マウスA-Raf (RefSeq Accession No. NM\_009703)、ヒトA-Raf (RefSeq Accession No. NM\_001654)、マウスB-Raf (RefSeq Accession No. NM\_139294)、ヒトB-Raf (RefSeq Accession No. NM\_004333) のcDNA配列を含有する核酸、または該cDNA配列の相補鎖配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含有し、MAPキナーゼ経路を活性化し得るタンパク質をコードする核酸が挙げられる。

【0070】

Sosをコードする核酸としては、例えば、マウスSos1 (RefSeq Accession No. NM\_009231)、ヒトSos1 (RefSeq Accession No. NM\_005633)、マウスSos2 (RefSeq Accession No. XM\_127051)、ヒトSos2 (RefSeq Accession No. NM\_006939) のcDNA配列を含有する核酸、または該cDNA配列の相補鎖配列とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含有し、Rasタンパク質を活性化し得るタンパク質をコードする核酸が挙げられる。

【0071】

RasGRF、RasGRF2、RasGRP、SmgGDS、Vav、C3G等の他のRasGEFのcDNA配列は公知であり、それらの多型バリエーション、スプライシングバリエーションも知られている。

10

20

30

40

50

## 【0072】

Grb2をコードする核酸としては、例えば、マウスGrb2 (RefSeq Accession No. NM\_008163)、ヒトGrb2 (RefSeq Accession No. NM\_002086) のcDNA配列を含有する核酸、または該cDNA配列の相補鎖配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含有し、かつ受容体チロシンキナーゼを認識して結合し、RasGEFを細胞膜にリクルートしてRasタンパク質を活性化し得るタンパク質をコードする核酸が挙げられる。

## 【0073】

AKTファミリーメンバーの一例としてAKT1をコードする核酸としては、例えば、配列番号：34もしくは36で表される塩基配列を含有する核酸、または配列番号：34もしくは36で表される塩基配列の相補鎖配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含有し、かつAKT経路を活性化し得るタンパク質をコードする核酸が挙げられる。

10

## 【0074】

Rhebをコードする核酸としては、例えば、配列番号：38もしくは40で表される塩基配列を含有する核酸、または配列番号：38もしくは40で表される塩基配列の相補鎖配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含有し、かつ下流のmTOR経路を活性化し得るタンパク質をコードする核酸が挙げられる。

## 【0075】

TCL1をコードする核酸としては、例えば、配列番号：42もしくは44で表される塩基配列を含有する核酸、または配列番号：42もしくは44で表される塩基配列の相補鎖配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含有し、かつAKT1タンパク質を活性化し得るタンパク質をコードする核酸が挙げられる。

20

## 【0076】

S6Kをコードする核酸としては、例えば、配列番号：46もしくは48で表される塩基配列を含有する核酸、または配列番号：46もしくは48で表される塩基配列の相補鎖配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る塩基配列を含有し、かつS6Kタンパク質を活性化し得るタンパク質をコードする核酸が挙げられる。

## 【0077】

各配列番号で表される塩基配列の相補鎖配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし得る核酸としては、各配列番号で表される塩基配列と約80%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上の同一性を有する塩基配列を含有する核酸が用いられる。ストリンジェントな条件としては、例えば、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 6.3.1-6.3.6, 1999に記載される条件、例えば、 $6 \times \text{SSC}$  (sodium chloride/sodium citrate) / 45 でのハイブリダイゼーション、次いで  $0.2 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{SDS} / 50 \sim 65$  での一回以上の洗浄等が挙げられるが、当業者であれば、これと同等のストリンジェンシーを与えるハイブリダイゼーションの条件を適宜選択することができる。

30

## 【0078】

本発明のタンパク性樹立効率改善因子は、好ましくは、Rasタンパク質の恒常的活性化型分子、Rasの標的因子(エフェクター)の恒常的活性化型分子、Rasの標的因子の下流シグナル因子の恒常的活性化型分子、Rasの標的因子の下流シグナルの活性化分子並びにRas活性化因子の恒常的活性化型分子である。従って、本発明の核酸性樹立効率改善因子は、好ましくは、上記の恒常的活性化型分子をコードする核酸である。当該核酸は、上述のようにして得られる野生型分子をコードする核酸に、部位特異的変異誘発により目的のアミノ酸置換を導入したり、あるいは、膜局在化シグナル配列をコードするオリゴヌクレオチドを、リガーゼやPCRを用いて、その末端に付加することにより調製することができる。

40

## 【0079】

本発明の核酸性樹立効率改善因子の体細胞への導入は、自体公知の細胞への遺伝子導入方法を用いて実施することができる。Rasタンパク質、Ras標的因子、Rasの標的因子の下流シグナル因子、そのシグナルの活性化因子またはRas活性化因子をコードする核酸は、宿主となる体細胞で機能し得るプロモーターを含む適当な発現ベクターに挿入される。発現ベクターとしては、例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデ

50

ノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクター、動物細胞発現プラスミド（例、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo）などが用いられ得る。

【0080】

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

【0081】

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

10

【0082】

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

20

【0083】

Rasタンパク質、Ras標的因子、Rasの標的因子の下流シグナル因子、そのシグナルの活性化因子またはRas活性化因子をコードする核酸は、単独で発現ベクター上に組み込んでよいし、1以上の初期化遺伝子とともに1つの発現ベクターに組み込んでよい。遺伝子導入効率の高いレトロウイルスやレンチウイルスベクターを用いる場合は前者が、プラスミド、アデノウイルス、エピソーマルベクターなどを用いる場合は後者を選択することが好ましい場合があるが、特に制限はない。

【0084】

上記において、Rasタンパク質、Ras標的因子、Rasの標的因子の下流シグナル因子、そのシグナルの活性化因子またはRas活性化因子をコードする核酸と、1以上の初期化遺伝子とを、1つの発現ベクターに組み込む場合、これら複数の遺伝子は、好ましくはポリシストロニック発現を可能にする配列を介して発現ベクターに組み込むことができる。ポリシストロニック発現を可能にする配列を用いることにより、1種類の発現ベクターに組み込まれている複数の遺伝子をより効率的に発現させることが可能になる。ポリシストロニック発現を可能にする配列としては、例えば、口蹄疫ウイルスの2A配列（PLoS ONE3, e2532, 2008、Stem Cells 25, 1707, 2007）、IRES配列（U.S. Patent No. 4,937,190）など、好ましくは2A配列を用いることができる。

30

【0085】

Rasタンパク質、Ras標的因子、Rasの標的因子の下流シグナル因子、そのシグナルの活性化因子またはRas活性化因子をコードする核酸を含む発現ベクターは、ベクターの種類に応じて、自体公知の手法により細胞に導入することができる。例えば、ウイルスベクターの場合、該核酸を含むプラスミドを適当なパッケージング細胞（例、Plat-E細胞）や相補細胞株（例、293細胞）に導入して、培養上清中に産生されるウイルスベクターを回収し、各ウイルスベクターに応じた適切な方法により、該ベクターを細胞に感染させる。例えば、ベクターとしてレトロウイルスベクターを用いる具体的手段が WO2007/69666、Cell, 126, 663-676 (2006) および Cell, 131, 861-872 (2007) に開示されており、ベクターとしてレンチウイルスベクターを用いる場合については、Science, 318, 1917-1920 (2007) に開示がある。iPS細胞を再生医療のための細胞ソースとして利用する場合、Rasタンパク質、Ras標的因子、Rasの標的因子の下流シグナル因子、そのシグナルの活性化因子またはRas活性化因子の発現（再活性化）またはそれらの外来性核酸が組み込まれた近傍

40

50

に存在する内因性遺伝子の活性化は、iPS細胞由来の分化細胞から再生された組織における発癌リスクを高める可能性があるため、Rasタンパク質、Ras標的因子またはRas活性化因子をコードする核酸は細胞の染色体に組み込まれず、一過的に発現することが好ましい。かかる観点からは、染色体への組み込みが稀なアデノウイルスベクターの使用が好ましい。アデノウイルスベクターを用いる具体的手段は、*Science*, 322, 945-949 (2008)に記載されている。また、アデノ随伴ウイルスも染色体への組み込み頻度が低く、アデノウイルスベクターと比べて細胞毒性や炎症惹起作用が低いので、別の好ましいベクターとして挙げられる。センダイウイルスベクターは染色体外で安定に存在することができ、必要に応じてsiRNAにより分解除去することができるので、同様に好ましく利用され得る。センダイウイルスベクターについては、*J. Biol. Chem.*, 282, 27383-27391 (2007) や特許第3602058号に記載のものを用いることができる。

10

## 【0086】

レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターを用いる場合は、いったん導入遺伝子のサイレンシングが起こったとしても、後に再活性化される可能性があるため、例えば、Cre/loxPシステムを用いて、不要となった時点でRasタンパク質、Ras標的因子またはRas活性化因子をコードする核酸を切り出す方法が好ましく用いられ得る。即ち、該核酸の両端にloxP配列を配置しておき、iPS細胞が誘導された後で、プラスミドベクターもしくはアデノウイルスベクターを用いて細胞にCreリコンビナーゼを作用させ、loxP配列に挟まれた領域を切り出すことができる。また、LTR U3領域のエンハンサー - プロモーター配列は、挿入突然変異によって近傍の宿主遺伝子を上方制御する可能性があるため、当該配列を欠失、もしくはSV40などのポリアデニル化配列で置換した3'-自己不活性化(SIN)LTRを使用して、切り出されずゲノム中に残存するloxP配列より外側のLTRによる内因性遺伝子の発現制御を回避することがより好ましい。Cre-loxPシステムおよびSIN LTRを用いる具体的手段は、*Soldner et al.*, *Cell*, 136: 964-977 (2009)、*Chang et al.*, *Stem Cells*, 27: 1042-1049 (2009) などに開示されている。

20

## 【0087】

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

30

## 【0088】

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

## 【0089】

40

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

50

。

## 【0090】

別の好ましい非組込み型ベクターとして、染色体外で自律複製可能なエピゾーマルベクターが挙げられる。エピゾーマルベクターを用いる具体的手段は、Yu et al., Science, 324, 797-801 (2009)に開示されている。必要に応じて、エピゾーマルベクターの複製に必要なベクター要素の5'側および3'側にloxP配列を同方向に配置したエピゾーマルベクターに、Rasタンパク質、Ras標的因子またはRas活性化因子をコードする核酸を挿入した発現ベクターを構築し、これを体細胞に導入することもできる。

## 【0091】

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

10

## 【0092】

また、エピゾーマル発現ベクターは、Rasタンパク質、Ras標的因子、Rasの標的因子の下流シグナル因子、そのシグナルの活性化因子またはRas活性化因子をコードする核酸の転写を制御するプロモーターを含む。該プロモーターとしては、前記と同様のプロモーターが用いられ得る。また、エピゾーマル発現ベクターは、前記と同様に、所望によりエンハンサー、ポリA付加シグナル、選択マーカー遺伝子などをさらに含有してもよい。選択マーカー遺伝子としては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

20

## 【0093】

本発明で使用されるloxP配列としては、バクテリオファージP1由来の野生型loxP配列(配列番号:31)の他、導入遺伝子の複製に必要なベクター要素を挟む位置に同方向で配置された場合に、組換えを起こしてloxP配列間の配列を欠失させ得る任意の変異loxP配列が挙げられる。変異loxP配列としては、例えば、5'側反復配列に変異のあるlox71(配列番号:32)、3'側反復配列に変異のあるlox66(配列番号:33)、スペーサー部分に変異のあるlox2272やlox511などが挙げられる。該ベクター要素の5'側および3'側に配置される2つのloxP配列は、同一であっても異なってもよいが、スペーサー部分に変異のある変異loxP配列の場合は同一のもの(例、lox2272同士、lox511同士)が用いられる。好ましくは、5'側反復配列に変異のある変異loxP配列(例、lox71)と3'側反復配列に変異のある変異loxP配列(例、lox66)との組合せが挙げられる。この場合、組換えの結果染色体上に残るloxP配列は5'側および3'側の反復配列に二重変異を有するため、Creリコンビナーゼに認識されにくく、不必要な組換えにより染色体の欠失変異を起こすリスクが低減される。lox71とlox66とを用いる場合、前記ベクター要素の5'側および3'側にいずれの変異loxP配列を配置してもよいが、変異部位がloxP配列の外端に配置されるような向きで変異loxP配列を挿入する必要がある。

30

## 【0094】

2つのloxP配列は、導入遺伝子の複製に必要なベクター要素(即ち、複製開始点、または複製開始点に結合して複製を制御するタンパク質をコードする遺伝子配列)の5'側および3'側に、同方向に配置される。loxP配列が挟むベクター要素は、複製開始点、または複製開始点に結合して複製を制御するタンパク質をコードする遺伝子配列のいずれか一方だけであってもよいし、両方であってもよい。

40

## 【0095】

エピゾーマルベクターは、例えばリポフェクション法、リポソーム法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃法などを用いて該ベクターを細胞に導入することができる。具体的には、例えばScience, 324: 797-801 (2009)等に記載される方法を用いることができる。

## 【0096】

50

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

【0097】

(c) 核初期化物質

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

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

(2) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2(ここで、Sox2はSox1, Sox3, Sox15, Sox17またはSox18で置換可能である。また、Klf4はKlf1, Klf2またはKlf5で置換可能である。さらに、c-MycはT58A(活性型変異体), L-Mycで置換可能である。)

(3) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Fbx15, Nanog, ERas, TcII

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(21) Oct3/4, Klf4, L-Myc (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 107, 14152-14157 (2010)を参照)

10

20

30

40

50

(22) Oct3/4, Nanog

(23) Oct3/4 (Cell 136: 411-419 (2009)、Nature, 08436, doi:10.1038 published online(2009))

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

【0098】

上記(1)-(24)において、Oct3/4に代えて他のOctファミリーのメンバー、例えばOct1A、Oct6などを用いることもできる。また、Sox2(またはSox1、Sox3、Sox15、Sox17、Sox18)に代えて他のSoxファミリーのメンバー、例えばSox7などを用いることもできる。さらに上記(1)-(24)においてc-MycまたはLin28を核初期化物質として含む場合、c-MycまたはLin28に代えてそれぞれL-MycまたはLin28Bを用いることもできる。

10

【0099】

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

【0100】

これらの組み合わせの中で、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-MycもしくはL-Myc, Nanog, Lin28もしくはLin28BおよびSV40LTから選択される少なくとも1つ、好ましくは2つ以上、より好ましくは3つ以上が、好ましい核初期化物質の例として挙げられる。

20

【0101】

とりわけ、得られるiPS細胞を治療用途に用いることを念頭においた場合、c-Mycを用いない初期化因子の組み合わせが好ましい。例えばOct3/4, Sox2およびKlf4の3因子の組み合わせ(即ち、上記(9))、Oct3/4, Sox2, Klf4およびL-Mycの4因子の組み合わせ(即ち、上記(2))、またはこれらの組み合わせを含みかつc-Mycを含まない組み合わせを例示することができる。一方、iPS細胞を治療用途に用いることを念頭に置かない場合(例えば、創薬スクリーニング等の研究ツールとして用いる場合など)は、Oct3/4, Sox2およびKlf4の3因子、Oct3/4, Sox2, Klf4およびL-Mycの4因子のほか、Oct3/4, Sox2, Klf4およびc-Mycの4因子、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc/L-Mycおよび/またはNanogおよび/またはLin28/Lin28Bの5または6因子、さらにSV40 Large Tを加えた6または7因子などを例示することができる。

30

【0102】

上記の各タンパク性因子のマウス及びヒトcDNA配列情報は、WO 2007/069666に記載のNCBI accession numbersを参照することにより取得することができ(Nanogは当該公報中では「ECAT4」との名称で記載されている。尚、Lin28、Lin28B、Esrrb、Esrrg、L-Mycのマウス及びヒトcDNA配列情報は、それぞれ下記NCBI accession numbersを参照することにより取得できる。)、当業者は容易にこれらのcDNAを単離することができる。

【0103】

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

40

【0104】

核初期化物質としてタンパク性因子自体を用いる場合には、得られたcDNAを適当な発現ベクターに挿入して宿主細胞に導入し、該細胞を培養して得られる培養物から組換えタンパク性因子を回収することにより調製することができる。一方、核初期化物質としてタン

50



パク性因子をコードする核酸を用いる場合、得られたcDNAを、上記本発明の核酸性樹立効率改善因子の場合と同様にして、ウイルスベクター、エピゾーマルベクターもしくはプラスミドベクターに挿入して発現ベクターを構築し、核初期化工程に供される。必要に応じて、上記Cre-loxPシステムやpiggyBacトランスポゾンシステムを利用することもできる。尚、核初期化物質として2以上のタンパク性因子をコードする核酸を細胞に導入する場合、各核酸を別個のベクターに担持させてもよいし、複数の核酸をタンデムに繋いでポリシストロニックベクターとすることもできる。後者の場合、効率的なポリシストロニック発現を可能にするために、口蹄疫ウイルスの2A self-cleaving peptideを各核酸の間に連結することが望ましい(Science, 322, 949-953, 2008など参照)。

【0105】

核初期化物質の体細胞への接触は、(a) 該物質がタンパク性因子である場合、上記本発明のタンパク性樹立効率改善因子と同様にして、(b) 該物質が(a)のタンパク性因子をコードする核酸である場合、上記本発明の核酸性樹立効率改善因子と同様にして、それぞれ実施することができる。

【0106】

(d) 他のiPS細胞の樹立効率改善物質

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

【0107】

他のiPS細胞の樹立効率改善物質としては、例えば、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤[例えば、バルプロ酸(VPA)、トリコスタチンA(TSA)、酪酸ナトリウム(Cell Stem Cell, 7: 651-655 (2010))、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA(例、HDAC1 siRNA Smartpool(登録商標)(Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等)等の核酸性発現阻害剤など]、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤(例えば5'-azacytidine (5'azaC))(Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、G9aヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤[例えば、BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2: 525-528 (2008))等の低分子阻害剤、G9aに対するsiRNAおよびshRNA(例、G9a siRNA(human) (Santa Cruz Biotechnology)等)等の核酸性発現阻害剤など]、L-channel calcium agonist(例えばBayk8644)(Cell Stem Cell, 3, 568-574 (2008))、p53阻害剤(例えばp53に対するsiRNA、shRNA、ドミナントネガティブ体など(Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008); Nature 460, 1132-1135 (2009)))、Wnt Signaling(例えばsoluble Wnt3a)(Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008))、2i/LIF(2iはmitogen-activated protein kinase signallingおよびglycogen synthase kinase-3の阻害剤; PLoS Biology, 6(10), 2237-2247 (2008))、ES細胞特異的miRNA(例えば、miR-302-367クラスター(Mol. Cell. Biol. doi:10.1128/MCB.00398-08)、miR-302 (RNA (2008) 14: 1-10)、miR-291-3p、miR-294およびmiR-295(以上、Nat. Biotechnol. 27: 459-461 (2009)))、3'-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PKD1) activator(例、PS48 (Cell Stem Cell, 7: 651-655 (2010))など)、GLISファミリーメンバー(例、GLIS1 (Nature, 474: 225-229 (2011))、W02010/098419など)等が挙げられるが、それらに限定されない。前記で核酸性の発現阻害剤はsiRNAもしくはshRNAをコードするDNAを含む発現ベクターの形態であってもよい。

【0108】

尚、前記核初期化物質の構成要素のうち、例えばSV40 large T等は、体細胞の核初期化のために必須ではなく補助的な因子であるという点において、iPS細胞の樹立効率改善物質の範疇にも含まれ得る。核初期化の機序が明らかでない現状においては、核初期化に必須の因子以外の補助的な因子について、それらを核初期化物質として位置づけるか、あるいはiPS細胞の樹立効率改善物質として位置づけるかは便宜的であってもよい。即ち、体細胞の核初期化プロセスは、体細胞への核初期化物質およびiPS細胞の樹立効率改善物質の接触によって生じる全体的事象として捉えられるので、当業者にとって両者を必ずしも

10

20

30

40

50

明確に区別する必要はないであろう。

【0109】

iPS細胞の樹立効率改善物質の体細胞への接触は、該物質が(a) タンパク性因子である場合、(b) 該タンパク性因子をコードする核酸である場合に依りて、本発明の樹立効率改善因子についてそれぞれ上記したと同様の方法により、実施することができる。一方、該物質が(c) 低分子化合物である場合、該物質の体細胞への接触は、該因子を適当な濃度で水性もしくは非水性溶媒に溶解し、ヒトまたは他の哺乳動物より単離した体細胞の培養に適した培地（例えば、最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、RPMI1640培地、199培地、F12培地（改善因子としてKSRを用いない場合は、約5～20%の胎仔ウシ血清を含んでもよい）など）中に、該溶液を因子濃度が上記の範囲となるように添加して、細胞を一定期間培養することにより実施することができる。接触期間は体細胞の核初期化が達成されるのに十分な時間であれば特に制限はないが、例えば、陽性コロニーが出現するまで培地に共存させておくこともできる。

10

【0110】

本発明の樹立効率改善因子を含む、iPS細胞の樹立効率改善物質は、該物質の非存在下と比較して体細胞からのiPS細胞樹立効率が有意に改善される限り、核初期化物質と同時に体細胞に接触させてもよいし、また、どちらかを先に接触させてもよい。一実施態様において、例えば、核初期化物質がタンパク性因子をコードする核酸であり、iPS細胞の樹立効率改善物質が化学的阻害物質である場合には、前者は遺伝子導入処理からタンパク性因子を大量発現するまでに一定期間のラグがあるのに対し、後者は速やかに細胞に作用し、

20

【0111】

(e) 培養条件による樹立効率の改善

体細胞の核初期化工程において低酸素条件下で細胞を培養することにより、iPS細胞の樹立効率をさらに改善することができる（Cell Stem Cell., 5(3): 237-241 (2009); WO2010/013845を参照）。本明細書において「低酸素条件」とは、細胞を培養する際の雰囲気中の酸素濃度が、大気中のそれよりも有意に低いことを意味する。具体的には、通常の細胞培養で一般的に使用される5-10% CO<sub>2</sub>/95-90%大気雰囲気中の酸素濃度よりも低い酸素濃度の条件が挙げられ、例えば雰囲気中の酸素濃度が18%以下の条件が該当する。好ましくは、雰囲気中の酸素濃度は15%以下（例、14%以下、13%以下、12%以下、11%以下など）、10%以下（例、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下など）、または5%以下（例、4%以下、3%以下、2%以下など）である。また、雰囲気中の酸素濃度は、好ましくは0.1%以上（例、0.2%以上、0.3%以上、0.4%以上など）、0.5%以上（例、0.6%以上、0.7%以上、0.8%以上、0.95%以上など）、または1%以上（例、1.1%以上、1.2%以上、1.3%以上、1.4%以上など）である。

30

【0112】

細胞の環境において低酸素状態を創出する手法は特に制限されないが、酸素濃度の調節可能なCO<sub>2</sub>インキュベーター内で細胞を培養する方法が最も容易であり、好適な例として挙げられる。酸素濃度の調節可能なCO<sub>2</sub>インキュベーターは、種々の機器メーカーから販売されている（例えば、Thermo scientific社、池本理化学工業、十慈フィールド、和研薬株式会社などのメーカー製の低酸素培養用CO<sub>2</sub>インキュベーターを用いることができる）。

40

【0113】

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

50

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

【0114】

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

10

【0115】

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

【0116】

(f) iPS細胞の選択および確認

本発明の樹立効率改善因子と核初期化物質（および他のiPS細胞の樹立効率改善物質）とを接触させた後、細胞を、例えばES細胞の培養に適した条件下で培養することができる。マウス細胞の場合、通常の培地に分化抑制因子としてLeukemia Inhibitory Factor (LIF) を添加して培養を行う。一方、ヒト細胞の場合には、通常、LIFの代わりに塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）および/または幹細胞因子（SCF）を添加することが望ましい。しかしながら、本発明の樹立効率改善因子を体細胞に接触させた場合、bFGFの非存在下でもbFGF存在下と同程度のヒトiPS細胞コロニーを得ることができる。

20

【0117】

また通常、細胞は、フィーダー細胞として、放射線や抗生物質で処理して細胞分裂を停止させたマウス胎仔由来の線維芽細胞（MEF）の共存下で培養される。MEFとしては、通常STO細胞等がよく使われるが、iPS細胞の誘導には、SNL細胞（McMahon, A. P. & Bradley, A. Cell 62, 1073-1085 (1990)）等がよく使われている。フィーダー細胞との共培養は、本発明の樹立効率改善因子および核初期化物質の接触より前から開始してもよいし、該接触時から、あるいは該接触より後（例えば1-10日後）から開始してもよい。

30

【0118】

iPS細胞の候補コロニーの選択は、薬剤耐性とレポーター活性を指標とする方法と目視による形態観察による方法とが挙げられる。前者としては、例えば、分化多能性細胞において特異的に高発現する遺伝子（例えば、Fbx15、Nanog、Oct3/4など、好ましくはNanogまたはOct3/4）の遺伝子座に、薬剤耐性遺伝子および/またはレポーター遺伝子をターゲットした組換え体細胞を用い、薬剤耐性および/またはレポーター活性陽性のコロニーを選択するというものである。そのような組換え体細胞としては、例えばFbx15遺伝子座に geo（-ガラクトシダーゼとネオマイシンホスホトランスフェラーゼとの融合タンパク質をコードする）遺伝子をノックインしたマウス（Takahashi & Yamanaka, Cell, 126, 663-676 (2006)）由来のMEFやTTF、あるいはNanog遺伝子座に緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子とピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス（Okita et al., Nature, 448, 313-317 (2007)）由来のMEFやTTF等が挙げられる。一方、目視による形態観察で候補コロニーを選択する方法としては、例えばTakahashi et al., Cell, 131, 861-872 (2007)に記載の方法が挙げられる。レポーター細胞を用いる方法は簡便で効率的ではあるが、iPS細胞がヒトの治療用途を目的として作製される場合、安全性の観点から目視によるコロニー選択が望ましい。

40

【0119】

選択されたコロニーの細胞がiPS細胞であることの確認は、上記したNanog（もしくはOct3/4）レポーター陽性（ピューロマイシン耐性、GFP陽性など）および目視によるES細胞

50

様コロニーの形成によっても行い得るが、より正確を期すために、アルカリフォスファターゼ染色や、各種ES細胞特異的遺伝子の発現を解析したり、選択された細胞をマウスに移植してテラトーマ形成を確認する等の試験を実施することもできる。

【 0 1 2 0 】

Rasタンパク質、Ras標的因子またはRas活性化因子をコードする核酸を体細胞に導入した場合、得られるiPS細胞は、当該外来性核酸を含む点で、従来公知のiPS細胞とは異なる新規細胞である。特に、当該外来性核酸がレトロウイルスやレンチウイルス等を用いて体細胞に導入された場合、当該外来性核酸は通常、得られるiPS細胞のゲノム中に組み込まれているので、外来性核酸を含むという形質は安定に保持される。

【 0 1 2 1 】

(g) iPS細胞の用途

このようにして樹立されたiPS細胞は、種々の目的で使用することができる。例えば、ES細胞などの多能性幹細胞で報告されている分化誘導法（例えば、神経幹細胞への分化誘導法としては、特開2002-291469、膀胱様細胞への分化誘導法としては、特開2004-121165、造血細胞への分化誘導法としては、特表2003-505006に記載される方法などがそれぞれ例示される。この他にも、胚葉体の形成による分化誘導法としては、特表2003-523766に記載の方法などが例示される。）を利用して、iPS細胞から種々の細胞（例、心筋細胞、血液細胞、神経細胞、血管内皮細胞、インスリン分泌細胞等）への分化を誘導することができる。したがって、患者本人やHLAの型が同一もしくは実質的に同一である他人から採取した体細胞を用いてiPS細胞を誘導すれば、そこから所望の細胞（即ち、該患者が罹病している臓器の細胞や疾患に対する治療効果を発揮する細胞など）に分化させて該患者に移植するという、自家移植による幹細胞療法が可能となる。さらに、iPS細胞から分化させた機能細胞（例、肝細胞）は、対応する既存の細胞株よりも実際の生体内での該機能細胞の状態をより反映していると考えられるので、医薬候補化合物の薬効や毒性のin vitroスクリーニング等にも好適に用いることができる。

【実施例】

【 0 1 2 2 】

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

【 0 1 2 3 】

実施例 1 : RasファミリーがヒトiPS細胞樹立に及ぼす効果の検討

Rasファミリー（Nras、Hras、Kras及びEras）がiPS細胞の樹立に効果を及ぼすか否かを検討した。

【 0 1 2 4 】

成人（白人女性、73歳）の皮膚由来線維芽細胞（HDF：細胞名1503）に対して、Takahashi, K.ら, Cell, 131:861-872 (2007)に記載の方法に従い、レンチウイルス(pLenti6/Ubc-SIc7a1)を用いて、マウスエコトロピックウイルスレセプターSIc7a1遺伝子を発現させた。この細胞（ $1 \times 10^5$ 個/well, 6 well plate）に対して、Takahashi, K.ら, Cell, 131:861-872 (2007)に記載の方法に従い、以下の遺伝子をレトロウイルスで導入し、生じたiPS細胞コロニー数を4遺伝子（Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc）導入の場合と比較した。

【 0 1 2 5 】

- 1) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nras
- 2) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Hras
- 3) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Kras
- 4) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Eras
- 5) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, V12
- 6) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, SVLS
- 7) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, SSVA
- 8) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, N17

【 0 1 2 6 】

ここで「V12」とはHRasの12番目のグリシンをバリンに置換したHRasの恒常的活性型変異体を指す。V12はRasの3つのシグナル伝達経路であるMAPキナーゼ経路、PI3キナーゼ経路、及びRal経路(RalGEF経路)のいずれの経路も活性化することが知られている。

【0127】

また「SVLS」とはH-RasのC末端4アミノ酸CVLSをSVLSに置換したことにより細胞膜への局在が不能となった不活性型変異体であり、「SSVA」とはE-RasのC末端4アミノ酸CSVAをSVAに置換したことにより細胞膜への局在が不能となった不活性型変異体である。

【0128】

また「N17」とはH-Rasの17番目のセリンをアスパラギンに置換した不活性型変異体(ドミナントネガティブ変異体)である。

【0129】

ウイルス感染から7日後に細胞を回収し、フィーダー細胞上への蒔き直しを行った(2.5 × 10<sup>5</sup>個/100 mmディッシュ)。フィーダー細胞にはマイトマイシンCで処理して、細胞分裂を止めたSNL細胞(McMahon, A. P. & Bradley, A. Cell 62, 1073-1085 (1990))を用いた。感染10日後から霊長類ES細胞培養用培地(ReproCELL)に4 ng/mlの組換えヒトbFGF(WAKO)を加えた培地で培養を行った。感染から24日目にiPS細胞コロニー数を測定し、4遺伝子導入により得られたコロニー数を1とした場合(図中Red)の倍率変化(Fold change)を図1に示す。図1は3回の実験の平均値である。4遺伝子にErasを加えることにより、ヒトiPS細胞コロニー数が劇的に増加した。ErasはPI3キナーゼ経路を活性化することが知られていることから、Rasのシグナル伝達経路の中でも特にPI3キナーゼ経路の活性化がiPS細胞の樹立促進に寄与していることが示唆された。また他のRas(Nras、Hras、Kras)を加えた場合も、ErasほどではないがヒトiPS細胞コロニー数の増加が認められた。

【0130】

#### 実施例2: Rasのシグナル伝達経路がヒトiPS細胞樹立に及ぼす効果の検討(1)

Rasのシグナル伝達経路であるMAPキナーゼ経路、PI3キナーゼ経路、及びRal経路(RalGEF経路)の3つの経路のうち、いずれのシグナル伝達経路の活性化がiPS細胞樹立に効果を及ぼすのか検討を行った。実験は以下の組み合わせを用い、実施例1と同様の手法で行った。

【0131】

- 1) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nras
- 2) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Hras
- 3) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Kras
- 4) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Eras
- 5) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, V12
- 6) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, V12T35S
- 7) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, V12E37G
- 8) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, V12Y40C

【0132】

ここで「V12T35S」とはHRasの12番目のグリシンをバリンに置換し、かつ35番目のスレオニンをセリンに置換することにより、MAPキナーゼ経路が選択的に恒常的活性化された変異体である。

【0133】

また「V12E37G」とはHRasの12番目のグリシンをバリンに置換し、かつ37番目のグルタミン酸をグリシンに置換することにより、Ral経路が選択的に恒常的活性化された変異体である。

【0134】

また「V12Y40C」とはHRasの12番目のグリシンをバリンに置換し、かつ40番目のチロシンをシステインに置換することにより、PI3キナーゼ経路が選択的に恒常的活性化された変異体である。

【0135】

10

20

30

40

50

ウイルス感染から7日後に細胞を回収し、フィーダー細胞上への蒔き直しを行った(2.5 × 10<sup>5</sup>個/100 mmディッシュ)。感染10日後から霊長類ES細胞培養用培地(ReproCELL)に4 ng/mlの組換えヒトbFGF(WAKO)を加えた培地で培養を行った。感染から24日目にiPS細胞コロニー数を測定し、4遺伝子導入により得られたコロニー数を1とした場合(図中Red)の倍率変化(Fold change)を図2に示す。図2は3回の実験の平均値である。実施例1と同様に4遺伝子にErasを加えることにより、ヒトiPS細胞コロニー数が劇的に増加した。またV12E37G又はV12Y40Cを加えた場合も、同様にヒトiPS細胞コロニー数の劇的な増加が認められた。V12T35Sを加えた場合は効果は低かった。以上の結果より、PI3キナーゼ経路及びRal経路の活性化がiPS細胞の樹立促進に寄与していることが示された。

【0136】

10

#### 実施例3: 異なる細胞に対する効果の検討

6歳の日本人女性の皮膚由来線維芽細胞(細胞名:TIG120)及び68歳の日本人女性の皮膚由来線維芽細胞(細胞名:1616)を用いて、前記実施例と同様の実験を以下の組み合わせで行った。

【0137】

- 1) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Eras
- 2) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, V12Y40C (図3では単に「Y40C」と表記)
- 3) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Myr-PI3K (図3では単に「M-PI3K」と表記)
- 4) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, PI3K-CaaX (図3では単に「C-PI3K」と表記)
- 5) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, V12E37G (図3では単に「E37G」と表記)

20

【0138】

ここで「Myr-PI3K(M-PI3K)」とは、N末端にミリスチル化シグナル配列を付加したことにより膜に局在する恒常的活性型のPI3キナーゼである。

【0139】

また「PI3K-CaaX(C-PI3K)」とは、C末端にCaaxモチーフ配列を付加したことにより膜に局在する恒常的活性型のPI3キナーゼ触媒サブユニットである。

【0140】

ウイルス感染から7日後に細胞を回収し、フィーダー細胞上への蒔き直しを行った(0.5 × 10<sup>5</sup>個/100 mmディッシュ)。感染10日後から霊長類ES細胞培養用培地(ReproCELL)に4 ng/mlの組換えヒトbFGF(WAKO)を加えた培地で培養を行った。感染から24日目のiPS細胞コロニー数を図3に示す。図3は3回の実験の平均値である。実施例2と同様に4遺伝子にEras、V12Y40C(Y40C)又はV12E37G(E37G)を加えることにより、ヒトiPS細胞コロニー数の増加が認められた。またPI3キナーゼの恒常的活性体を加えた場合も、同様にコロニー数の増加が認められた。以上の結果より、PI3キナーゼ経路及びRal経路の活性化がiPS細胞の樹立促進に寄与することが確認され、またHDF1503以外の細胞にも同様の効果を示すことが確認された。

30

【0141】

#### 実施例4: Rasのシグナル伝達経路がヒトiPS細胞樹立に及ぼす効果の検討(2)

Rasの各シグナル伝達経路の活性化がiPS細胞樹立に及ぼす効果につき、前記実施例と同様の実験を以下の組み合わせで検討した。

40

【0142】

- 1) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nras
- 2) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Hras
- 3) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Kras
- 4) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Eras
- 5) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, V12T35S
- 6) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, V12E37G
- 7) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Raf-CaaX
- 8) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, RalGDS-CaaX

【0143】

50

ここで「Raf-CaaX」とはMAPキナーゼ経路に存在するMAPキナーゼキナーゼキナーゼ(MAPKKK)のC末端にCaaXモチーフ配列を付加したことにより膜局在性となった恒常的活性化体である。

【0144】

また「RalGDS-CaaX」とはRasサブファミリーに属するG蛋白であるRalを活性化する、Rasの標的タンパク質のC末端にCaaXモチーフ配列を付加したことにより膜局在性となった恒常的活性化体である。

【0145】

ウイルス感染から7日後に細胞を回収し、フィーダー細胞上への蒔き直しを行った(2.5 × 10<sup>5</sup>個/100 mmディッシュ)。感染10日後から霊長類ES細胞培養用培地(ReproCELL)に4 ng/mlの組換えヒトbFGF(WAKO)を加えた培地で培養を行った。感染から24日目にiPS細胞コロニー数を測定し、4遺伝子導入により得られたコロニー数を1とした場合(図中Red)の倍率変化(Fold change)を図4に示す。図4は3回の実験の平均値である。

10

【0146】

実施例2及び3と同様に4遺伝子にV12E37Gを加えることにより、ヒトiPS細胞コロニー数が劇的に増加し、またRal活性化因子であるRalGDSの恒常的活性化体を加えた場合も同様の効果が認められたことから、Ral経路の活性化がiPS細胞の樹立促進に寄与することが確認された。一方、V12T35SやRafの恒常的活性化体を加えた場合は効果が低かったことから、MAPキナーゼ経路はiPS細胞の樹立にあまり寄与していないことが示唆された。

20

【0147】

#### 実施例5: Rasのシグナル伝達経路がヒトiPS細胞樹立に及ぼす効果の検討(3)

Rasの各シグナル伝達経路の活性化がiPS細胞樹立に及ぼす効果につき、前記実施例と同様の実験を以下の組み合わせで検討した。

【0148】

- 1) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, V12 (図5では「HRasV12」と表記)
- 2) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, N17 (図5では「HRasN17」と表記)
- 3) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, V12T35S (図5では「HRasV12/S35」と表記)
- 4) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, V12E37G (図5では「HRasV12/G37」と表記)
- 5) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, V12Y40C (図5では「HRasV12/C40」と表記)
- 6) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Raf-CaaX
- 7) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, RalGDS-CaaX
- 8) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, PI3K-CaaX (図5では「p110-CaaX」と表記)

30

【0149】

ウイルス感染から7日後に細胞を回収し、フィーダー細胞上への蒔き直しを行った(2.5 × 10<sup>5</sup>個/100 mmディッシュ)。感染8日後から霊長類ES細胞培養用培地(ReproCELL)に4 ng/mlの組換えヒトbFGF(WAKO)を加えた培地で培養を行った。感染から24日目のiPS細胞コロニー数を図5に示す。図5は3回の実験の平均値である。実施例1~4と同様に、4遺伝子にV12E37G、V12Y40C、RalGDS-CaaXまたはPI3K-CaaXを加えることにより、ヒトiPS細胞コロニー数の顕著な増加が認められた。以上の結果より、PI3キナーゼ経路およびRal経路の活性化がiPS細胞の樹立促進に寄与することが確認され、一方MAPキナーゼ経路はiPS細胞の樹立にあまり寄与していないことが示唆された。

40

【0150】

#### 実施例6: Rasの各シグナル伝達経路の関連性の検討

iPS細胞の樹立において、PI3キナーゼ経路、Ral経路およびMAPキナーゼ経路がそれぞれ相互に関連しているのか、それとも独立した経路であるのかを検討した。

【0151】

実験は実施例5と同様の方法で行った。結果を図6に示す。図6は3回の実験の平均値である。ERasにV12Y40Cを加えた場合(図6中ERas+HRasV12/C40)は、いずれもPI3キナーゼ経路を活性化する因子であることから相加効果(増強効果)は認められなかった。一方、ERasにV12E37Gを加えた場合(図6中ERas+HRasV12/G37)、およびV12E37GにV12Y40Cを加えた

50

場合（図6中HrasV12/G37+C40）は、いずれも相加効果（増強効果）が認められたことから、Raf経路とPI3キナーゼ経路は、別々の独立した作用によりiPS細胞樹立促進に関与していることが示された。

【0152】

#### 実施例7：bFGF非存在下での効果の検討

bFGF非存在下でのRaf-CaaX、RalGDS-CaaXおよびPI3K-CaaXの効果を検討した。実験は実施例5や6と同様にして行った。結果を図7に示す。4遺伝子にRalGDS-CaaXを加えた場合に、bFGF非存在下でもbFGF存在下と同程度のコロニー数が観察された。

【0153】

#### 実施例8：AKTがヒトiPS細胞樹立に及ぼす効果の検討

PI3Kの下流シグナルとしてのAKTがiPS細胞の樹立に効果を及ぼすか否か、およびAKTによるiPS細胞の樹立にc-MYCまたはGSK3 が影響を及ぼすか否かを検討した。

【0154】

前記実施例1と同様にヒト皮膚細胞由来線維芽細胞（HDF：細胞名1616、Cell applications社から購入）へ以下の遺伝子を導入した。

【0155】

- 1) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Mock
- 2) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1
- 3) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-MYC shRNA
- 4) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1, c-MYC shRNA
- 5) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1, GSK3 S9A

【0156】

ここで「Myr-AKT1」とは、N末端にミリスチル化シグナル配列を付加したことにより膜に局在する恒常的活性型のAKT1である。

【0157】

また「c-MYC shRNA」とは、c-MYCを標的としたshRNAであり、ここでは、Addgene社より購入したpRetroSuper Myc shRNA（Plasmid 15662）を用いた。

【0158】

また「GSK3 S9A」とは、GSK3 の9番目のセリンをアラニンに置換することにより、プロテアーゼにより分解されない恒常活性型の変異体である。

【0159】

感染から32日目に、iPS細胞コロニー数を測定した結果を図8Aに示す。

【0160】

Myr-AKT1を加えることにより、ヒトiPS細胞コロニー数が有意に増加した。また、この効果は、c-MYCのshRNAを加えることでなくなったことから、AKT1の活性化によるiPS細胞の樹立促進にはc-MYCが必須であることが示された。一方、GSK3 S9Aでは影響を受けていないことから、AKT1の下流シグナルとしてGSK3 のリン酸化は関与していないことが示された。

【0161】

また、培養条件を変え（ $5 \times 10^5$ 個/well）、同じくヒト皮膚細胞由来線維芽細胞（HDF：細胞名1616、Cell applications社から購入）へ以下の遺伝子を導入した。

【0162】

- 1) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Mock
- 2) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, p110-Caax
- 3) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, p110-KD
- 4) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1
- 5) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, AKT1-KD
- 6) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, PTEN shRNA
- 7) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, TCL1

【0163】

10

20

30

40

50



ここで「p110-Caax」とは、前述した「PI3K-CaaX」と同等物である。

【0164】

また「p110-KD」とは、キナーゼドメインを欠損させた変異体である不活性化型PI3Kである。

【0165】

また「AKT1-KD」とは、キナーゼドメインを欠損させた変異体である不活性化型AKT1である。

【0166】

また「PTEN shRNA」とは、PI3K経路を抑制するPTEN (phosphatase and tensin homolog) に対するshRNAであり、ここでは、Addgene社より購入したpMKO.1 puro PTEN shRNA (PI 10  
asmid 10669) を用いた。

【0167】

感染から7日目に、iPS細胞コロニー数を測定した結果を図8Bに示す。

【0168】

先の実験と同様に、Myr-AKT1を加えることにより、ヒトiPS細胞コロニー数が有意に増加した。また、AKT1の活性化因子であるTCL1を加えることでも同様の効果が認められたことから、iPS細胞の樹立促進にはAKT1の活性化が関与していることが示唆された。

【0169】

#### 実施例9：AKT関連のシグナルがヒトiPS細胞樹立に及ぼす効果の検討

AKT関連のシグナル (PDK1、GSK3、Wnt) がiPS細胞の樹立効率に及ぼす影響を検討し 20  
た。

【0170】

前記実施例1と同様に皮膚細胞由来線維芽細胞 (HDF：細胞名1616) へ以下の遺伝子を各低分子化合物の存在下で導入した。

【0171】

- 1) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, PS48
- 2) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, CHIR99021
- 3) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Wnt3a

【0172】

ここで「PS48」とは、PDK1のPIF結合ポケット部位に選択的に結合し、PDK1を活性化す 30  
る薬剤である。本実験では、10  $\mu$ Mを培地へ添加した。Sigma社から購入し使用した。

【0173】

また「CHIR99021」とは、GSK3 に対する高度な選択性を示す阻害剤である。本実験では、1  $\mu$ Mを培地へ添加したStemgent社から購入し使用した。

【0174】

また「Wnt3a」は、R&D systems社より購入し、10 ng/mlを培地へ添加した。

【0175】

感染から32日目に、iPS細胞コロニー数を測定した結果を図9に示す。

【0176】

PS48およびWnt3aを加えることにより、ヒトiPS細胞コロニー数が有意に増加した。一方 40  
、CHIR99021を加えた場合は、iPS細胞コロニー数が減少傾向であった。以上より、PI3Kシグナルの下流であるPDK1およびWntシグナルは、iPS細胞の樹立促進へ関与するが、GSK3のリン酸化の阻害はiPS細胞の樹立へ関与していないことが示された。

【0177】

#### 実施例10：AKTファミリーおよびmTORシグナルがヒトiPS細胞樹立に及ぼす効果の検討

前記実施例1と同様に皮膚細胞由来線維芽細胞 (HDF：細胞名1616) へ以下の遺伝子を導入した。

【0178】

- 1) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Mock
- 2) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, p110-Caax

- 3) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, PTEN shRNA
- 4) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1
- 5) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, AKT1 K179M
- 6) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1#2
- 7) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT2
- 8) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT3
- 9) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-SGK1
- 10) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, SGK1 K127M
- 11) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-ILK
- 12) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, ILK E359K
- 13) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-PDK1
- 14) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, GSK3 S9A
- 15) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Rheb
- 16) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, S6K1 T389E
- 17) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, FKBP12

【 0 1 7 9 】

ここで「p110-Caax」とは、前述した「PI3K-CaaX」と同等物である。

【 0 1 8 0 】

また「PTEN shRNA」とは、PI3K経路を抑制するPTEN (phosphatase and tensin homolog) に対するshRNAであり、ここでは、Addgene社より購入したpMKO.1 puro PTEN shRNA (PI 20  
asmid 10669)を用いた。

【 0 1 8 1 】

また「Myr-AKT1#2」とは、Myr-AKT1とは基本骨格のプラスミドが異なる恒常活性化型のAKT1である。

【 0 1 8 2 】

また「AKT1 K179M」とは、キナーゼ領域が変異した不活性型のドミナントネガティブAKT1のことである。

【 0 1 8 3 】

また「Myr-AKT2」とは、N末端にミリスチル化シグナル配列を付加したことにより膜に局在する恒常的活性型のAKT2である。

【 0 1 8 4 】

また「Myr-AKT3」とは、N末端にミリスチル化シグナル配列を付加したことにより膜に局在する恒常的活性型のAKT3である。

【 0 1 8 5 】

また「Myr-SGK1」とは、mTORC2/SGK1経路において重要な制御因子でありインスリン情報伝達系におけるプロテインキナーゼであるSGK1 (Serum/glucocorticoid regulated kinase) のN末端にミリスチル化シグナル配列を付加したことにより膜に局在する恒常的活性型のSGK1である。

【 0 1 8 6 】

また「SGK1 K127M」とは、SGK1の127番目のリジンをメチオニンに置換することにより、キナーゼ領域が変異したドミナントネガティブ型のSGK1である。

【 0 1 8 7 】

また「Myr-ILK」とは、PI3KシグナルにおいてAKTの上流に位置するセリン/スレオニンキナーゼであるILK (Integrin Linked Kinase: インテグリン結合キナーゼ) のN末端にミリスチル化シグナル配列を付加したことにより膜に局在する恒常的活性型のILKである。ILKはAKTの上流にあるPDKと結合することで、PI3K/AKT経路を阻害する。

【 0 1 8 8 】

また「ILK E359K」とは、ILKの359番目のグルタミン酸をリジンに置換することにより、キナーゼ領域が変異したドミナントネガティブ型のILKである。

【 0 1 8 9 】

10

20

30

40

50

また「Myr-PDK1」とは、PDKサブファミリー内に含まれるPDK1のN末端にミリストイル化シグナル配列を付加したことにより膜に局在する恒常的活性型のPDK1である。

【0190】

また「S6K1 T389E」とは、S6K1の389番目のスレオニンをグルタミン酸に置換することにより、恒常活性型のS6K1変異体である。

【0191】

感染から32日目に、iPS細胞コロニー数を測定した結果を図10に示す。

【0192】

実施例3と同様に、p110-Caaxを加えることでiPS細胞コロニー数の増加が認められた。同様に、PTEN shRNAでもiPS細胞コロニー数の増加が認められたことから、PI3KはiPS細胞の樹立促進に重要であることが示された。実施例8と同様に、Myr-AKT1ではiPS細胞コロニー数の増加が認められ、AKTファミリーである、AKT2およびAKT3でも同様の結果が得られた。

10

【0193】

また、Rheb、S6K1 T389Eを加えることにより、ヒトiPS細胞コロニー数が劇的に増大した。Rhebは、mTORを活性化する因子であり、一方でS6K1はmTORの下流因子であることから、mTORシグナル経路の活性化が、iPS細胞の樹立促進に寄与していることが示唆された。

【0194】

#### 実施例11： mTORシグナル関連遺伝子のヒトiPS細胞樹立に及ぼすc-MYCの検討

前記実施例1と同様に皮膚細胞由来線維芽細胞（HDF：細胞名1616）へ以下の遺伝子を導入した。

20

【0195】

- 1) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Mock
- 2) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Mock, c-MYC shRNA
- 3) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1
- 4) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1, c-MYC shRNA
- 5) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Rheb
- 6) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Rheb, c-MYC shRNA
- 7) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, S6K1 T389E
- 8) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, S6K1 T389E, c-MYC shRNA

30

【0196】

感染から32日目に、iPS細胞コロニー数を測定した結果を図11Aに示す。いずれの場合でも、c-MYC shRNAを加えることでiPS細胞の樹立促進効果がなくなることから、これらの遺伝子によるiPS細胞の樹立促進にはc-MYCが必須であることが示された。

【0197】

さらに、皮膚細胞由来線維芽細胞（HDF：細胞名1616）へMock、Myr-AKT1、Rheb、S6K1 T389Eおよびp53 shRNA導入して7日後の細胞内タンパク質を定法により回収し、Western blotによりc-MYC、p-AKT、AKT、p-S6K1、S6K1、p-TSC2およびTSC2の発現量を確認した。

【0198】

ここで「p53 shRNA」は、p53に対するshRNAであり、Hong H, et al., Nature. 460:1132-1135 (2009)に記載の配列を用いた。

40

【0199】

結果を図11Bに示す。

Myr-AKT1、RhebおよびS6K1 T389Eの導入によりc-MYCの発現量が上昇したことが確認された。このことより、Myr-AKT1、RhebおよびS6K1 T389Eはc-MYCの発現上昇を介してiPS細胞の樹立促進を行っている機序が示唆された。

【0200】

また、p53 shRNAの導入によりリン酸化型のAKTが増加している。Hong Hらはp53の阻害によりiPS細胞の樹立促進をすることを示していることから、p53の阻害はAKTのリン酸化を介してiPS細胞の樹立を促進していることが示唆された。

50

## 【 0 2 0 1 】

実施例12： p53の阻害およびGLIS1の導入によるヒトiPS細胞樹立促進に及ぼすAKT1の効果の検討

前記実施例1と同様にヒト皮膚細胞由来線維芽細胞（HDF：細胞名1616）へ以下の遺伝子を導入した。

## 【 0 2 0 2 】

- 1) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Mock
- 2) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Mock, p53 shRNA
- 3) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1
- 4) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1, p53 shRNA
- 5) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-MYC shRNA
- 6) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-MYC shRNA, p53 shRNA
- 7) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1, c-MYC shRNA
- 8) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1, c-MYC shRNA, p53 shRNA

10

## 【 0 2 0 3 】

感染から32日目に、iPS細胞コロニー数を測定した結果を図12Aに示す。

## 【 0 2 0 4 】

Myr-AKT1およびp53 shRNAを同時に加えることで、iPS細胞コロニー数の増加が認められた。従って、p53shRNAとAKT1の導入はiPS細胞の樹立促進の相乗効果を有することが示された。また、c-MYC shRNAによりいずれの場合でも、iPS細胞コロニー数が減少したことから、これらの効果はc-MYCを介した作用であることが示唆された。

20

## 【 0 2 0 5 】

さらに、ヒト皮膚細胞由来線維芽細胞（HDF：細胞名1616）へ以下の遺伝子を導入した。

## 【 0 2 0 6 】

- 1) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Mock
- 2) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Mock, GLIS1
- 3) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1
- 4) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1, GLIS1
- 5) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-MYC shRNA
- 6) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-MYC shRNA, GLIS1
- 7) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1, c-MYC shRNA
- 8) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1, c-MYC shRNA, GLIS1

30

## 【 0 2 0 7 】

感染から32日目に、iPS細胞コロニー数を測定した結果を図12Bに示す。Myr-AKT1およびGLIS1を同時に加えることで、iPS細胞コロニー数の増加が認められた。従って、GLIS1とAKT1の導入はiPS細胞の樹立促進の相乗効果を有することが示された。また、c-MYC shRNAによりいずれの場合でも、iPS細胞コロニー数が減少したことから、これらの効果はc-MYCを介した作用であることが示唆された。

40

## 【 0 2 0 8 】

さらに、他の細胞株において、同様の効果を調べるため、ヒト歯髄細胞（DP：細胞名DP31）へ以下の遺伝子を導入した。

## 【 0 2 0 9 】

- 1) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Mock, Mock
- 2) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Mock, p53 shRNA
- 3) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Mock, GLIS1
- 4) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1, Mock
- 5) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1, p53 shRNA
- 6) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1, GLIS1
- 7) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-MYC shRNA, Mock

50

- 8) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-MYC shRNA, p53 shRNA
- 9) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, c-MYC shRNA, GLIS1
- 10) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1, c-MYC shRNA, Mock
- 11) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1, c-MYC shRNA, p53 shRNA
- 12) ヒト由来のOct3/4, Sox2, Klf4, Myr-AKT1, c-MYC shRNA, GLIS1

【 0 2 1 0 】

感染から32日目に、iPS細胞コロニー数を測定した結果を図12Cに示す。

【 0 2 1 1 】

上記の結果と同様に、Myr-AKT1およびp53 shRNA又はMyr-AKT1およびGLIS1を同時に加えることで、iPS細胞コロニー数の増加が認められた。これより、体細胞種に関わらずAKT1の導入およびp53の阻害又はAKT1およびGLIS1の導入によるiPS細胞の樹立促進の相乗効果を有することが示された。

10

【産業上の利用可能性】

【 0 2 1 2 】

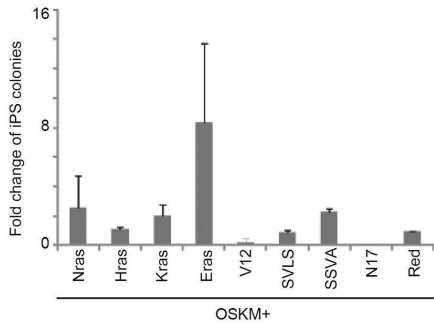
ここで述べられた特許及び特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

【 0 2 1 3 】

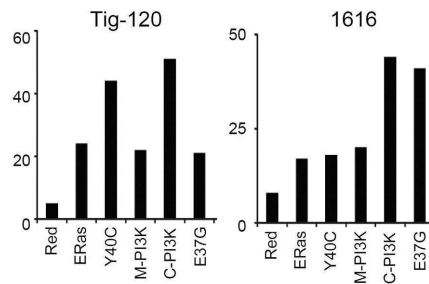
本出願は米国仮特許出願No. 61/419,320を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含される。

20

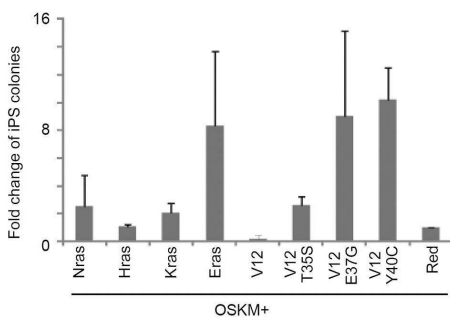
【 図 1 】



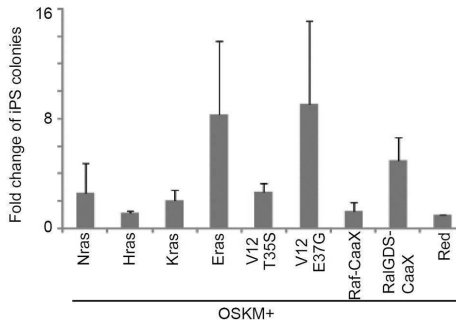
【 図 3 】



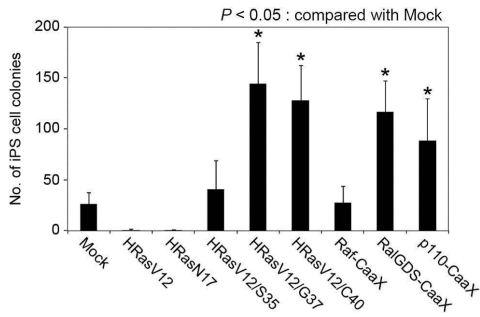
【 図 2 】



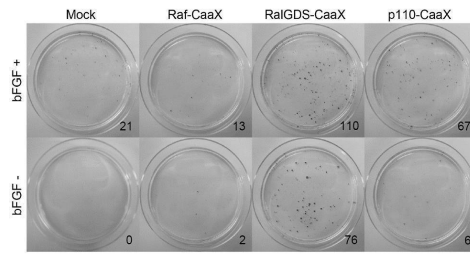
【 図 4 】



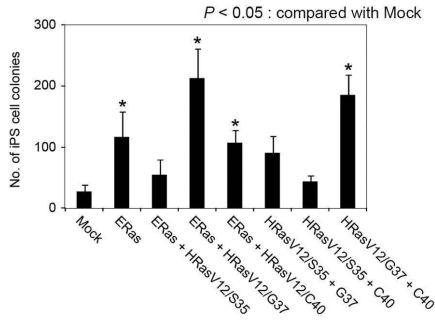
【 5 】



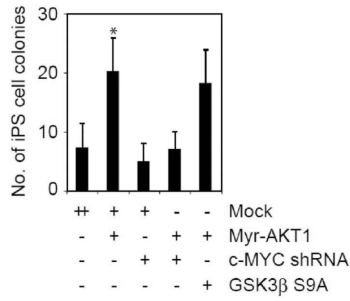
【 7 】



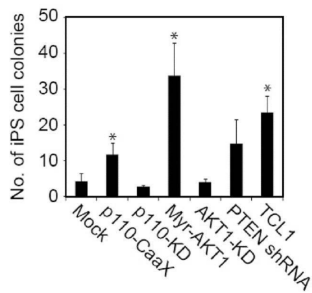
【 6 】



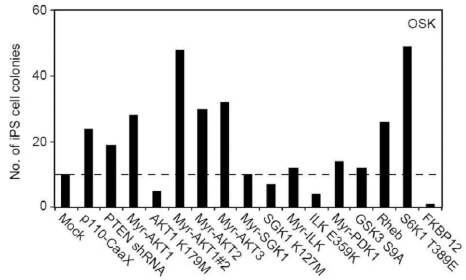
【 8 A 】



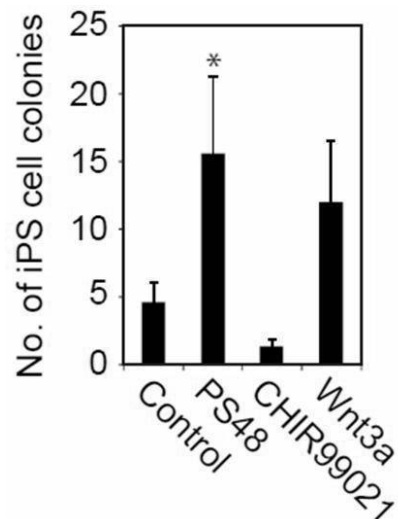
【 8 B 】



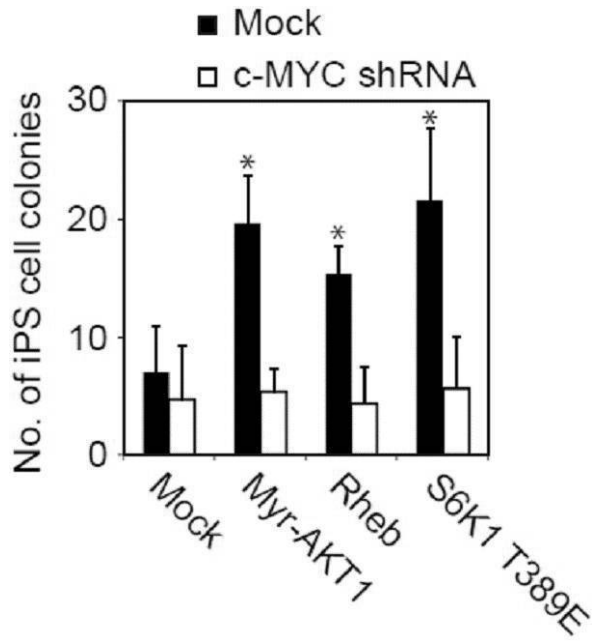
【 10 】



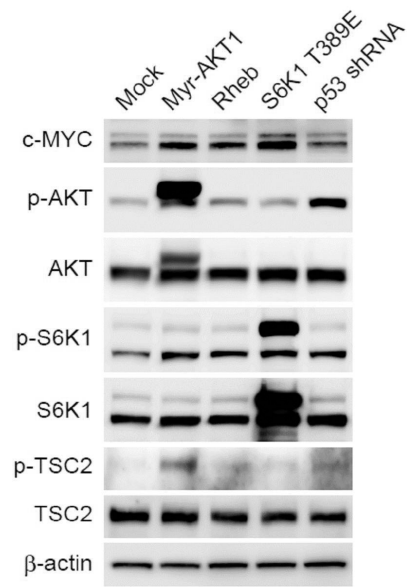
【 9 】



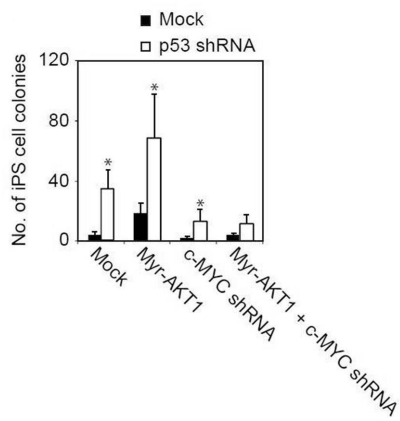
【 図 1 1 A 】



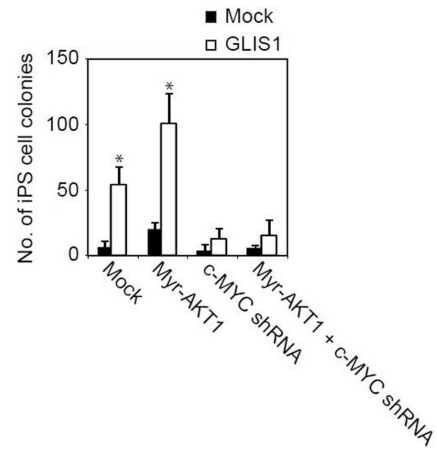
【 図 1 1 B 】



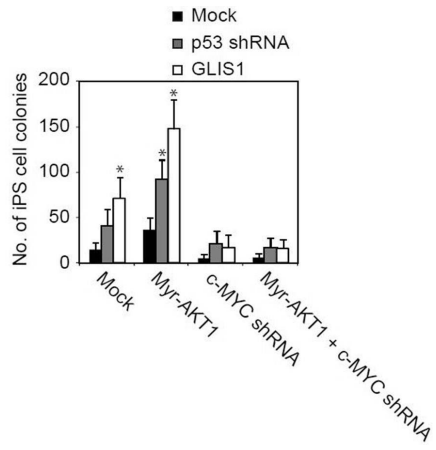
【 図 1 2 A 】



【 図 1 2 B 】



【 1 2 C】



【配列表】

0006029137000001.app



## フロントページの続き

- (74)代理人 100163658  
弁理士 小池 順造
- (74)代理人 100174296  
弁理士 當麻 博文
- (72)発明者 山中 伸弥  
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 高橋 和利  
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 田邊 剛士  
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 荒木 英則

- (56)参考文献 国際公開第2007/069666(WO, A1)  
米国特許出願公開第2010/0093090(US, A1)  
国際公開第2010/098419(WO, A1)  
国際公開第2009/157593(WO, A1)  
国際公開第2009/133971(WO, A1)  
TAKAHASHI, K., et al., Cell, 2006年 8月25日, 126, pp.663-676  
ZHU, S., et al., Cell Stem Cell, 2010年12月 2日, 7, pp.651-655  
MARSON, A., et al., Cell Stem Cell, 2008年 8月 7日, 3, pp.132-135  
REBOLLO, A., et al., Blood, 1999年, 94(9), pp.2971-2980  
YAMNIK, R.L., et al., FEBS Letters, 2009年11月16日, 584, pp.124-128  
NOGUCHI, M., et al., FASEB J., 2007年, 21(10), pp.2273-2284  
ALTOMARE, D.A., et al., Oncogene, 2005年, 24, pp.7455-7464  
QIU, Q., et al., Reproduction, 2004年, 128, pp.355-363  
LIU, X., et al., ANTICANCER RESEARCH, 2004年, 24, pp.2697-2704  
HOLZ, M.K., et al., Cell, 2005年11月18日, 123, pp.569-580  
SATO, T., et al., Methods in Enzymology, 2008年, 438, pp.307-320  
LONG, X., et al., Current Biology, 2005年 4月26日, 15, pp.702-713  
TAKAHASHI, K., et al., J. Biol. Chem., 2005年 9月23日, 280(38), pp.32768-32774  
KIM, J.H., et al., Blood, 2005年, 105, pp.1717-1723  
HOWLETT, E., et al., PLoS Genet., 2008年11月28日, 4(11), e1000277, URL, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000277>  
LIM, K.-H., et al., CANCER CELL, 2005年11月, 8, pp.381-392  
MATSUBARA, K., et al., Oncogene, 1999年, 18, pp.1303-1312  
ROKUTANDA, S., et al., Developmental Biology, 2009年 1月14日, 328, pp.78-93  
CAJANEK, L., et al., Journal of Cellular Biochemistry, 2010年 7月21日, 111, pp.1077-1079  
HONG, K., et al., J. Biol. Chem., 2008年 8月22日, 283(34), pp.23129-23138  
OINUMA, I., et al., J. Biol. Chem., 2007年 1月 5日, 282(1), pp.303-318  
MITIN, N., et al., Oncogene, 2001年, 20, pp.1276-1286

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00 - 5/10

C12N 15/00 - 15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

Caplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

Google  
PubMed