

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6143265号
(P6143265)

(45) 発行日 平成29年6月7日(2017.6.7)

(24) 登録日 平成29年5月19日(2017.5.19)

(51) Int. Cl.		F 1	
C 1 2 Q	1/68	(2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z
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 A
C 1 2 N	15/00	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A
C 1 2 Q	1/06	(2006.01)	C 1 2 Q 1/06

請求項の数 6 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-503890 (P2014-503890)	(73) 特許権者	504132272
(86) (22) 出願日	平成24年7月25日 (2012.7.25)		国立大学法人京都大学
(65) 公表番号	特表2014-523735 (P2014-523735A)		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(43) 公表日	平成26年9月18日 (2014.9.18)	(74) 代理人	100091096
(86) 国際出願番号	PCT/JP2012/004747		弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開番号	W02013/014929	(74) 代理人	100118773
(87) 国際公開日	平成25年1月31日 (2013.1.31)		弁理士 藤田 節
審査請求日	平成27年7月13日 (2015.7.13)	(74) 代理人	100120905
(31) 優先権主張番号	61/511, 156		弁理士 深見 伸子
(32) 優先日	平成23年7月25日 (2011.7.25)	(72) 発明者	山中 伸弥
(33) 優先権主張国	米国 (US)		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
	(出願人による申告)平成24年度、文部科学省、「科学技術試験研究委託事業」、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願	(72) 発明者	高橋 和利
			京都府京都市左京区吉田本町36番地1
			国立大学法人京都大学内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 人工多能性幹細胞の選別方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

分化抵抗性を示さないヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)株を選別する方法であって、
下記の工程：
 (i) C4orf51 mRNA、HHLA1 mRNA、およびABHD12B mRNAから成る群から選択される少なくとも一つのmRNAの発現を測定する工程；および
 (ii) C4orf51 mRNA、HHLA1 mRNA、およびABHD12B mRNAから成る群から選択されるmRNAの発現量が、対照であるES細胞株または分化抵抗性を示さないことが既知であるiPS細胞株と比較して同程度であるか、または分化抵抗性を示すことが既知であるiPS細胞株と比較して低いヒトiPS細胞株を選択する工程；
 を含む、上記方法。

【請求項2】

分化抵抗性を示さないヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)株を選別する方法であって、
下記の工程：
 (i) C4orf51、HHLA1、およびABHD12Bから成る群から選択される少なくとも一つの遺伝子内に位置するLTR領域またはその近傍のメチル化度を測定する工程；および
 (ii) LTR7領域のメチル化度が、対照である分化抵抗性を示さないことが既知であるiPS細胞株と比較して高いヒトiPS細胞株を選択する工程；
 を含む、上記方法。

【請求項3】

C4orf51 mRNA、HHLA1 mRNA、およびABHD12B mRNAから成る群から選択される少なくとも1つのmRNAの塩基配列において連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドまたはそれに相補的なポリヌクレオチドを含む、分化抵抗性を示さないヒト人工多能性幹細胞株選別用試薬。

【請求項4】

C4orf51 mRNA、HHLA1 mRNA、およびABHD12B mRNAから成る群から選択される少なくとも1つのmRNAの塩基配列において連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドをプローブとして固定化したマイクロアレイである、請求項3に記載の試薬。

【請求項5】

C4orf51 mRNA、HHLA1 mRNA、およびABHD12B mRNAから成る群から選択される少なくとも1つのmRNAにコードされるタンパク質を認識する抗体を含む、分化抵抗性を示さないヒト人工多能性幹細胞株選別用試薬。

【請求項6】

請求項3～5のいずれかに記載の試薬を含む、分化抵抗性を示さないヒト人工多能性幹細胞株選別用キット。

【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選別方法に関する。より詳細には、本発明は、人工多能性幹細胞においてlarge intergenic non-coding RNA (lincRNA) またはmRNAの発現を確認することにより、分化抵抗性を示さない人工多能性幹細胞の選別方法に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、マウスおよびヒトの人工多能性幹細胞(iPS細胞)が相次いで樹立された。Yamanakaらは、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(特許文献1; 非特許文献1)。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2)。さらに、Yamanakaらは、ヒトの皮膚由来線維芽細胞にマウスと同様の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(特許文献1; 非特許文献3)。一方、Thomsonらのグループは、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(特許文献2; 非特許文献4)。iPS細胞は、胚を破壊するなど生命倫理問題を解決し、尚且つ多能性を維持させた状態で、増殖させることが可能であることから、再生医療用の移植材料として期待されている。

【0003】

一方、樹立されたiPS細胞は、特定の組織細胞へと分化誘導を行ったとしても、その一部に十分に分化していない増殖能を持った未分化な細胞を含有する場合がある(非特許文献5)。このような場合、移植後に腫瘍を発生する恐れがあることから、樹立したiPS細胞株の中から、分化誘導に対して抵抗性を示す細胞を含有しないiPS細胞株を選別する方法が望まれている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】WO 2007/069666 A1

【特許文献2】WO 2008/118820 A2

【非特許文献】

【0005】

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

【非特許文献2】Nakagawa, M. et al., Nat. Biotechnol., 26: 101-106 (2008)

【非特許文献3】Takahashi, K. et al., Cell, 131: 861-872 (2007)

10

20

30

40

50

【非特許文献4】Yu, J. et al., Science, 318: 1917-1920 (2007)

【非特許文献5】Miura K. et al., Nat Biotechnol., 27: 743-745 (2009)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明の目的は、臨床応用に適した安全な人工多能性幹細胞(iPS細胞)を効率よく選択することである。つまり、分化抵抗性を示さない細胞株を選別する手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記の課題を解決すべく、分化抵抗性を示すiPS細胞株と分化抵抗性を示さないiPS細胞株を用いて、分化抵抗性を示すiPS細胞株において特異的に発現するRNAまたは分化抵抗性を示さないiPS細胞株において特異的に発現するRNAを調べた。すると特定のゲノム領域にコードされたlarge intergenic non-coding RNA(lincRNA)またはmRNAが、分化抵抗性を示すiPS細胞株または分化抵抗性を示さないiPS細胞株で特異的に発現していることが確認された。

【0008】

以上の結果から、本発明者らは、特定のゲノム領域にコードされたlarge intergenic non-coding RNA(lincRNA)またはmRNAを指標(マーカー)として用いることで、分化抵抗性を示すiPS細胞を選別できることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は以下の[1]~[9]の発明を包含する。

【0009】

[1] 下記の工程：

(i) A群および/またはB群から選択される少なくとも一つのlarge intergenic non-coding RNA(lincRNA)またはmRNAの発現を測定する工程；および

(ii) A群から選択されるlincRNAまたはmRNAを発現するヒト人工多能性幹細胞株、あるいは、B群から選択されるlincRNAまたはmRNAを発現しないヒト人工多能性幹細胞株を選択する工程；

を含む、分化抵抗性を示さないヒト人工多能性幹細胞株を選別する方法であって、

A群は、

(A1) lincRNA:chr1:852245-854050 reverse strand,

(A2) GPR177,

(A3) VTCN1,

(A4) lincRNA:chr1:142803013-142804254 reverse strand,

(A5) APOA2,

(A6) WNT6,

(A7) EPAS1,

(A8) COL3A1,

(A9) SLC40A1,

(A10) S100P,

(A11) HOPX,

(A12) GUCY1A3,

(A13) CDH10,

(A14) HAPLN1,

(A15) PITX1,

(A16) HAND1,

(A17) CGA,

(A18) AQP1,

(A19) DLX6,

(A20) DLX5,

10

20

30

40

50

(A21) SOX17,	
(A22) FLJ45983,	
(A23) PLCE1,	
(A24) H19,	
(A25) lincRNA:chr11:2016408-2017024 reverse strand,	
(A26) lincRNA:chr11:2017517-2017651 forward strand,	
(A27) IGF2,	
(A28) P2RY6,	
(A29) SLN,	
(A30) NNMT,	10
(A31) APOA1,	
(A32) ERP27,	
(A33) LUM,	
(A34) CCDC92,	
(A35) CDX2,	
(A36) FLJ41170,	
(A37) MEG3,	
(A38) lincRNA:chr14:101292469-101299626 forward strand,	
(A39) lincRNA:chr14:101295637-101302637 forward strand,	
(A40) lincRNA:chr14:101296681-101298460 forward strand,	20
(A41) lincRNA:chr14:101298129-101300147 forward strand,	
(A42) lincRNA:chr14:101324825-101327247 forward strand,	
(A43) MEG8,	
(A44) lincRNA:chr14:101365673-101366049 forward strand,	
(A45) lincRNA:chr14:101396955-101397357 forward strand,	
(A46) lincRNA:chr14:101430757-101433381 forward strand,	
(A47) lincRNA:chr14:101434059-101436282 forward strand,	
(A48) lincRNA:chr14:101472355-101473369 forward strand,	
(A49) DIO3,	
(A50) MEIS2,	30
(A51) PRTG,	
(A52) C17orf51,	
(A53) lincRNA:chr17:21434064-21435857 reverse strand,	
(A54) lincRNA:chr17:21435180-21454915 reverse strand,	
(A55) lincRNA:chr17:21435959-21436405 reverse strand,	
(A56) CCR7,	
(A57) KRT23,	
(A58) GREB1L,	
(A59) GATA6,	
(A60) TTR,	40
(A61) UCA1,	
(A62) FLRT3,	
(A63) lincRNA:chrX:73040495-73047819 reverse strand,	
(A64) VGLL1,	
(A65) RPS4Y1,	
(A66) DDX3Y, および	
(A67) RPS4Y2	
から成り、	
B群は、	
(B1) DMRTB1,	50

- (B2) lincRNA:chr1:73430887-73446112 reverse strand,
 (B3) lincRNA:chr1:73444697-73444997 reverse strand,
 (B4) C4orf51,
 (B5) PCDHA1,
 (B6) lincRNA:chr6:95250854-95263604 reverse strand,
 (B7) lincRNA:chr6:14280358-14285376 reverse strand,
 (B8) lincRNA:chr6:14283301-14285685 reverse strand,
 (B9) C7orf57,
 (B10) lincRNA:chr7:124873114-124899839 reverse strand,
 (B11) lincRNA:chr8:129599518-129624118 reverse strand, 10
 (B12) OC90,
 (B13) lincRNA:chr8:133071643-133092468 reverse strand,
 (B14) lincRNA:chr8:133073732-133075753 reverse strand,
 (B15) HHLA1,
 (B16) lincRNA:chr8:133076031-133093351 reverse strand,
 (B17) lincRNA:chr8:133090096-133097869 reverse strand,
 (B18) lincRNA:chr8:138387843-138421643 reverse strand,
 (B19) lincRNA:chr8:138418343-138425831 reverse strand,
 (B20) NDUFA4L2,
 (B21) lincRNA:chr13:54698462-54707001 reverse strand, 20
 (B22) ABHD12B,
 (B23) lincRNA:chr18:54721302-54731677 reverse strand,
 (B24) ZNF208,
 (B25) ZNF257,
 (B26) ZNF676,
 (B27) ZNF541,
 (B28) TBX1,
 (B29) CXorf61, および
 (B30) DB090170 TEST14 Homo sapiens cDNA clone TEST14038997 5', mRNA sequence [DB 090170]から成るものである、上記方法。 30
- 【 0 0 1 0 】
- [2] A群から選択されるlincRNAまたはmRNAが、
 (A20) DLX5,
 (A50) MEIS2,
 (A53) lincRNA:chr17:21434064-21435857 reverse strand, および
 (A58) GREB1Lから成る群より選択される、[1]に記載の方法。
- [3] B群から選択されるlincRNAまたはmRNAが、
 (B4) C4orf51,
 (B9) C7orf57,
 (B10) lincRNA:chr7:124873114-124899839 reverse strand, 40
 (B12) OC90,
 (B13) lincRNA:chr8:133071643-133092468 reverse strand,
 (B14) lincRNA:chr8:133073732-133075753 reverse strand,
 (B15) HHLA1,
 (B16) lincRNA:chr8:133076031-133093351 reverse strand,
 (B17) lincRNA:chr8:133090096-133097869 reverse strand,
 (B22) ABHD12B,
 (B23) lincRNA:chr18:54721302-54731677 reverse strand,
 (B27) ZNF541,
 (B28) TBX1, 50

(B29) CXorf61, および

(B30) DB090170 TESTI4 Homo sapiens cDNA clone TESTI4038997 5', mRNA sequence [DB090170]から成る群より選択される、[1]に記載の方法。

[4] B群から選択されるlincRNAまたはmRNAが、

(B4) C4orf51,

(B15) HHLA1, および

(B22) ABHD12Bから成る群より選択される、[1]に記載の方法。

[5] 下記の工程：

(i) (B4) C4orf51、(B15) HHLA1、 および(B22) ABHD12Bから成る群より選択される少なくとも一つの遺伝子内に位置するLTR領域またはその近傍のDNA - メチル化状態を測定する工程；および

(ii) LTR7領域がDNA - メチル化状態にあるヒト人工多能性幹細胞株を選択する工程；を含む、分化抵抗性を示さないヒト人工多能性幹細胞株を選別する方法。

[6] 前記A群または前記B群に示す少なくとも一つのmRNAまたはLincRNAの塩基配列において連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドまたはそれに相補的なポリヌクレオチドを含む、分化抵抗性を示さないヒト人工多能性幹細胞株選別用試薬。

[7] 前記A群または前記B群に示す少なくとも一つのmRNAまたはLincRNAの塩基配列において連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドに相補的なポリヌクレオチドをプローブとして固定化したマイクロアレイである、[6]に記載の試薬。

[8] 前記A群または前記B群に示す少なくとも一つのmRNAまたはLincRNAにコードされるタンパク質を認識する抗体を含む、分化抵抗性を示さないヒト人工多能性幹細胞株選別用試薬。

[9] 前記[6]~[8]のいずれかに記載の試薬を含む、分化抵抗性を示さないヒト人工多能性幹細胞株選別用キット。

本願は、2011年7月25日に出願された米国出願No. 61/511,156号の優先権を主張するものであり、該特許出願の明細書に記載される内容を包含する。

【発明の効果】

【0011】

本発明によれば、分化抵抗性を示さないヒトiPS細胞を効率よく選別できる。従って、本発明は、iPS細胞の再生医療への応用において極めて有用である。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1は、分化抵抗性を示す細胞株(「differentiation resistance」と表記)：FB-RV3F-4、CB-RV4F-2、DP-EP6F-1、FB-RV3F-4 sub2、CB-RV4F-2 sub2およびDP-EP6F-1、ならびに分化抵抗性を示さない細胞株(「normal」と表記)：H1、FB-RV4F-2、FB-RV3F-1、FB-RV3F-4 sub6、CB-RV4F-2 sub1およびDP-EP6F-1 sub5におけるHHLA1、ABHD12B およびC4orf51の発現量の定量PCRによる測定結果を示す。

【図2】図2は、C4orf51、HHLA1 およびABHD12B内のLTR領域の位置を示す模式図である。

【図3】図3は、分化抵抗性を示す6細胞株(「differentiation resistance」と表記)：FB-RV3F-4、CB-RV4F-2、DP-EP6F-1、FB-RV3F-4 sub2、CB-RV4F-2 sub2 およびDP-EP6F-1、ならびに分化抵抗性を示さない6細胞株(「normal」と表記)：H1、FB-RV4F-2、FB-RV3F-1、FB-RV3F-4 sub6、CB-RV4F-2 sub1 およびDP-EP6F-1 sub5のC4orf51、HHLA1、またはABHD12Bに位置するLTR7領域のCG ジヌクレオチドの平均メチル化状態をバイサルファイト(Bisulfite)法により測定した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

1. ヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)の選別方法

本発明のヒト人工多能性幹細胞(iPS細胞)を選別する方法は、下記の表1(A群)または表2(B群)に示す少なくとも一つのlincRNAまたはmRNAを、分化抵抗性を示さないiPS

10

20

30

40

50

細胞株を選別するためのマーカーとして使用する。

【 0 0 1 4 】

【表 1】

A群

Marker name	Genbank Accession
lincRNA:chr1:852245-854050 reverse strand	
GPR177	NM_001002292
VTCN1	NM_024626
lincRNA:chr1:142803013-142804254 reverse strand	
APOA2	NM_001643
WNT6	NM_006522
EPAS1	NM_001430
COL3A1	NM_000090
SLC40A1	NM_014585
S100P	NM_005980
HOPX	NM_139211
GUCY1A3	NM_000856
CDH10	NM_006727
HAPLN1	NM_001884
PITX1	NM_002653
HAND1	NM_004821
CGA	NM_000735
AQP1	NM_198098
DLX6	NM_005222
DLX5	NM_005221
SOX17	NM_022454
FLJ45983	NR_024256
PLCE1	NM_016341
H19	NR_002196
lincRNA:chr11:2016408-2017024 reverse strand	
lincRNA:chr11:2017517-2017651 forward strand	
IGF2	NM_000612
P2RY6	NM_176798
SLN	NM_003063
NNMT	NM_006169
APOA1	NM_000039
ERP27	NM_152321
LUM	NM_002345
CCDC92	NM_025140

10

20

30

40

CDX2	NM_001265	
FLJ41170	AK021542	
MEG3	NR_003530	
lincRNA:chr14:101292469-101299626 forward strand		
lincRNA:chr14:101295637-101302637 forward strand		
lincRNA:chr14:101296681-101298460 forward strand		10
lincRNA:chr14:101298129-101300147 forward strand		
lincRNA:chr14:101324825-101327247 forward strand		
MEG8	NR_024149	
lincRNA:chr14:101365673-101366049 forward strand		
lincRNA:chr14:101396955-101397357 forward strand		20
lincRNA:chr14:101430757-101433381 forward strand		
lincRNA:chr14:101434059-101436282 forward strand		
lincRNA:chr14:101472355-101473369 forward strand		
DIO3	NM_001362	
MEIS2	NM_170677	30
PRTG	NM_173814	
C17orf51	NM_001113434	
lincRNA:chr17:21434064-21435857 reverse strand		
lincRNA:chr17:21435180-21454915 reverse strand		
lincRNA:chr17:21435959-21436405 reverse strand		
CCR7	NM_001838	40
KRT23	NM_015515	
GREB1L	NM_001142966	
GATA6	NM_005257	
TTR	NM_000371	
UCA1	NR_015379	
FLRT3	NM_198391	

lincRNA:chrX:73040495-73047819 reverse strand	
VGLL1	NM_016267
RPS4Y1	NM_001008
DDX3Y	NM_001122665
RPS4Y2	NM_001039567

【 0 0 1 5 】

【表 2】

10

B群

Marker name	Genbank Accession
DMRTB1	NM_033067
lincRNA:chr1:73430887-73446112 reverse strand	
lincRNA:chr1:73444697-73444997 reverse strand	
C4orf51	NM_001080531
PCDHA1	NM_031410
lincRNA:chr6:95250854-95263604 reverse strand	
lincRNA:chr6:14280358-14285376 reverse strand	
lincRNA:chr6:14283301-14285685 reverse strand	
C7orf57	NM_001100159
lincRNA:chr7:124873114-124899839 reverse strand	
lincRNA:chr8:129599518-129624118 reverse strand	
OC90	NM_001080399
lincRNA:chr8:133071643-133092468 reverse strand	
lincRNA:chr8:133073732-133075753 reverse strand	
HHLA1	NM_001145095
lincRNA:chr8:133076031-133093351 reverse strand	
lincRNA:chr8:133090096-133097869 reverse strand	
lincRNA:chr8:138387843-138421643 reverse strand	
lincRNA:chr8:138418343-138425831 reverse strand	

20

30

40

NDUFA4L2	NM_020142
lincRNA:chr13:54698462-54707001 reverse strand	
ABHD12B	NM_181533
lincRNA:chr18:54721302-54731677 reverse strand	
ZNF208	NM_007153
ZNF257	NM_033468
ZNF676	NM_001001411
ZNF541	NM_001101419
TBX1	NM_080647
CXorf61	NM_001017978
DB090170 TESTI4 Homo sapiens cDNA clone TESTI4038997 5', mRNA sequence	DB090170

10

【 0 0 1 6 】

20

本発明において、「lincRNA」とは、ゲノムから転写されたRNAであって、遺伝子をコードしない長鎖の一本鎖RNAを意味する。lincRNAは、染色体の番号、GenBankのデータベースに記載された塩基番号で示されたゲノム領域および転写の方向によって表記され、例えば、"chr1:852245-854050 reverse strand"の場合、1番染色体のGenBankのデータベースの852245から854050に相補的な配列に一致する一本鎖RNAを意味する。

【 0 0 1 7 】

本発明において、「mRNA」とはスプライシングを受ける前の前駆体であってもよく、スプライシングを受けた成熟mRNAであってもよい。また、成熟mRNAの配列は表1または表2に記載されたGenBankのAccession番号に対応する配列を有するmRNAに限定されず、選択的スプライシングによって作られるアイソフォームも含まれる。本発明ではまた、該mRNAに由来するポリヌクレオチド（例えば、cDNA）または該RNAがコードするタンパク質もマーカーとして利用され得る。

30

【 0 0 1 8 】

また、本発明において、「iPS細胞」は、特定の初期化因子を、DNA又はタンパク質の形態で体細胞に導入することによって作製することができる、ES細胞とほぼ同等の特性、例えば分化多能性と自己複製による増殖能、を有する体細胞由来の人工の幹細胞をいう（K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) Cell, 126:663-676; K. Takahashi et al. (2007), Cell, 131:861-872; J. Yu et al. (2007), Science, 318:1917-1920; Nakagawa, M.ら, Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2008); 国際公開WO 2007/069666)。

【 0 0 1 9 】

40

本発明において、マーカーとして認識され得るlincRNAまたはmRNAは、当該lincRNAまたはmRNAの塩基配列の全長配列からなるポリヌクレオチドもしくはその相補配列からなるポリヌクレオチドであってもよく、また、それらの断片であってもよい。ポリヌクレオチド断片の場合、当該lincRNAまたはmRNAの配列中の連続する少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドを有していることが好ましい。少なくとも15塩基を有するポリヌクレオチドとして、具体的には、少なくとも18塩基、少なくとも19塩基、少なくとも20塩基、少なくとも30塩基、少なくとも40塩基、少なくとも50塩基、少なくとも60塩基、少なくとも70塩基、または少なくとも100塩基の連続した塩基長を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

【 0 0 2 0 】

50

本発明では、上述したマーカーの発現の程度を測定することによって分化抵抗性を示さないiPS細胞株を検出することができ、これによって該iPS細胞株を選別することができる。より詳細には、表1に記載されたA群のマーカーを発現するiPS細胞株を、分化抵抗性を示さない細胞株として選別する、または表2に記載されたB群のマーカーを発現しないiPS細胞株を、分化抵抗性を示さない細胞株として選別することができる。

【0021】

ここで、マーカーを発現するとは、任意の測定方法によりマーカーが検出されることを意味し、より好ましくは、得られた検出値を対照の検出値と比較して同等もしくはより高い検出値であることを意味する。同様に、マーカーを発現しないとは、任意の測定方法によりマーカーが検出されないことを意味し、より好ましくは、得られた検出値を対照の検出値と比較して同等もしくはより低い検出値であることを意味する。より詳細には、A群のマーカーを用いる場合、対照としてのES細胞株または分化抵抗性を示さないことが既知であるiPS細胞株と比較して検出値が同程度である場合、または分化抵抗性を示すことが既知であるiPS細胞株と比較して検出値が高い場合においてA群のマーカーを発現することを意味する。一方、B群のマーカーを用いる場合、対照としてのES細胞株または分化抵抗性を示さないことが既知であるiPS細胞株と比較して検出値が同程度である場合、または分化抵抗性を示すことが既知であるiPS細胞株と比較して検出値が低い場合においてB群のマーカーを発現しないことを意味する。ここで、検出値が高いとは、例えば、1.5倍、2倍、3倍、4倍または5倍以上高いことが例示され、より好ましくは5倍以上であり、検出値が低いとは、例えば、2/3、1/2、1/3、1/4または1/5以下であることが例示され、より好ましくは1/5以下である。

【0022】

本発明において、マーカーの測定方法として、特に限定されないが、ノーザンブロット法、in situハイブリダイゼーション法、RNaseプロテクションアッセイ、マイクロアレイ法、PCR法、リアルタイムPCR法、ウェスタンブロット法およびフローサイトメトリーなどが例示される。

【0023】

ノーザンブロット法などハイブリダイゼーションを利用した測定方法の場合、プローブとして前記マーカーの塩基配列の全長配列またはその部分配列に相補的なポリヌクレオチドを用いることができる。ここで相補的なポリヌクレオチド(相補鎖、逆鎖)とは、対象の配列に対して、A:T(U)およびG:Cといった塩基対関係に基づいて、塩基的に相補的な関係にあるポリヌクレオチドを意味するものである。ただし、このような相補鎖は、対象とする正鎖の塩基配列に対して完全な相補配列である場合に限らず、対象とする正鎖とストリンジェントな条件でハイブリダイズすることができる程度の相補関係を有するものであってもよい。なお、ここでストリンジェントな条件は、Berger and Kimmel(1987, Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol.152, Academic Press, San Diego CA)に教示されるように、プローブを結合する核酸の融解温度(T_m)に基づいて決定することができる。例えばハイブリダイズ後の洗浄条件として、通常「1×SSC、0.1% SDS、37」程度の条件を挙げることができる。相補鎖はかかる条件で洗浄しても対象とする正鎖とハイブリダイズ状態を維持するものであることが好ましい。特に制限されないが、よりストリンジェントなハイブリダイズ条件として「0.5×SSC、0.1% SDS、42」程度の洗浄条件、さらにストリンジェントなハイブリダイズ条件として「0.1×SSC、0.1% SDS、65」程度の洗浄条件で洗浄しても正鎖と相補鎖とがハイブリダイズ状態を維持する条件を挙げることができる。具体的には、このような相補鎖として、対象の正鎖の塩基配列と完全に相補的な関係にある塩基配列からなる鎖、並びに該鎖と少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する塩基配列からなる鎖を例示することができる。プローブのサイズは、少なくとも15塩基、少なくとも18塩基、少なくとも19塩基、少なくとも20塩基、少なくとも30塩基、少なくとも40塩基、少なくとも50塩基、少なくとも60塩基、少なくとも70塩基、少なくとも100塩基、または全長の連続した塩基長である。該プローブは、放射性同位元素(³²P、³³Pなど)、蛍光物質(

10

20

30

40

50

フルオレサミン、ローダミン、テキサスレッド、ダンシル、それらの誘導体など)、化学発光物質、または酵素などで標識されていてもよい。

【0024】

また、上記プローブとなるポリ(オリゴ)ヌクレオチドは、固相担体(基板)に固定化されたマイクロアレイの形態で提供されることが好ましい。マイクロアレイの固相担体としては、例えば、ガラス基板、シリコン基板、メンブレン、ビーズなどが挙げられ、その材質、大きさ、形状は特に限定されない。マイクロアレイの形成方法は特に限定されず、当業者が利用可能ないかなる方法を用いてもよく、例えば、固相担体表面で直接プローブを合成する方法(オン・チップ法)、又は予め調製したプローブを固相担体表面に結合する方法などがある。固相担体表面で直接プローブを合成する場合には、光照射で選択的に除去される保護基を用い、半導体製造に利用されるフォトリソグラフィ技術及び固相合成技術を組み合わせて所定の微少なマトリックス領域でのオリゴヌクレオチドの選択的な合成を行う方法が一般的である。一方、予めプローブを調製して固相担体表面に結合する方法では、プローブ核酸の種類や固相担体の種類に応じて、スポット装置によりポリ陽イオン化合物やアミノ基、アルデヒド基、エポキシ基等を有するシランカップリング剤などで表面処理した固相担体の表面に点着する方法、反応活性基を導入したプローブを合成し、予め反応性基を形成させるように表面処理した固相担体表面に該プローブを点着して該プローブを固相担体表面に共有結合により結合固定させる方法などが利用できる。

10

【0025】

他の態様として、前記マーカースを特異的に認識し増幅する場合、該マーカースの塩基配列または該塩基配列の相補配列を含むオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いることができる。プライマーは、前記マーカースの各塩基配列に基に、例えばprimer 3(<http://primer3.sourceforge.net/>)またはベクターNTI(Infomax社製)を利用して設計し、合成・精製することにより調製することができる。プライマーの設計は、センス鎖(5'末端側)とアンチセンス鎖(3'末端側)からなる1組あるいは1対(2本)のプライマーが互いにアニールしないよう、両プライマー間の相補的配列を避けると共に、プライマー内のヘアピン構造の形成を防止するため自己相補配列をも避けるようにする。プライマーのサイズは、前記マーカースの増幅及び検出が可能である限り特に限定されないが、少なくとも15塩基長以上、好ましくは15~50塩基長、より好ましくは20~35塩基長である。プライマーは、オリゴヌクレオチドの合成法として当技術分野で公知の方法、例えば、ホスホトリエチル法、ホスホジエステル法等により、通常用いられるDNA自動合成装置を利用して合成することが可能である。また、増幅産物の検出を容易にするために、該プライマーには上記と同様の標識物質をつけてもよい。

20

30

【0026】

さらなる他の態様として、前記マーカースをタンパク質として認識する場合、抗体を用いることができる。

【0027】

本発明の抗体は、その形態に特に制限はなく、表1または表2に記載のmRNAがコードするタンパク質を免疫抗原とするポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であってもよいし、あるいは、キメラ抗体(例えば、ヒト/マウスキメラ抗体)、ヒト抗体などであってもよいし、あるいは、これらの抗体のフラグメント(例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fc、Fv、scFvなど)であってもよいし、あるいは、該タンパク質のアミノ酸配列のうち、連続する少なくとも8アミノ酸、たとえば10~20アミノ酸、からなるポリペプチドに対して抗原結合性を有する抗体も包含する。

40

前記抗体の製造方法は、すでに周知であり、本発明の抗体もこれらの常法に従って製造することができる(Current protocols in Molecular Biology edit.Ausubel et al.(1987) Publish.John Wiley and Sons.Section 11.12-11.13)。

【0028】

具体的には、本発明の抗体がポリクローナル抗体の場合には、常法に従って大腸菌等で発現し精製した表1または表2に記載のmRNAがコードするタンパク質、あるいはその部分

50

アミノ酸配列を有するオリゴペプチドを合成して、家兎等の非ヒト動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体の場合には、上述の免疫された非ヒト動物から得られた脾臓細胞と骨髄腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞の中から例えばHAT選択と標的ポリペプチドとの親和性アッセイによって得ることができる (Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley and Sons. Section 11.4-11.11)。このように得られた抗体は、蛍光物質 (フルオレサミン、ローダミン、テキサスレッド、ダンシル、それらの誘導体など)、化学発光物質、または酵素などで標識されていてもよい。

【 0 0 2 9 】

また、抗体の作製に使用されるタンパク質は、Genebankのデータベースより遺伝子の配列情報に基づいて、DNAクローニング、各プラスミドの構築、宿主へのトランスフェクション、形質転換体の培養および培養物からのタンパク質の回収の操作により得ることができる。これらの操作は、当業者に既知の方法、あるいは文献記載の方法 (Molecular Cloning, T. Maniatis et al., CSH Laboratory (1983), DNA Cloning, D.M. Glover, IRL PRESS (1985)) などに準じて行うことができる。具体的には遺伝子が所望の宿主細胞中で発現できる組み換えDNA (発現ベクター) を作成し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、該形質転換体を培養して得られる培養物から、目的タンパク質を回収することによって実施することができる。

【 0 0 3 0 】

さらに、本発明においては、イントロンおよびエクソンを含む候補遺伝子本体 (gene body) に位置するLTR領域またはその近傍のDNA - メチル化状態を測定することによって、分化抵抗性を示さないiPS細胞を選別する方法を実施することもできる。ここで、LTRは、レトロウイルス由来のリピータ配列を意味する。例えば、LTR サブファミリーとして、LTR1、LTR1B、LTR5、LTR7、LTR8、LTR16A1、LTR16C、LTR26、LTR26E、MER48、およびMLT2CBなどが知られている。本発明において好ましいLTR サブファミリーは、ヒト内在性レトロウイルス (HERV)-H ファミリーのLTR7である。LTR7は、全ヒトゲノムの遺伝子本体 (gene body) の658 遺伝子座に位置している。LTR7の配列は、配列番号1に示される。本発明において、LTR7の当該配列は、その鎖と少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、96%、97%、98%、または 99% の配列同一性を有する配列を含む。

【 0 0 3 1 】

候補遺伝子の例は表2に挙げたB群のマーカである。そのような遺伝子の好ましい例は、C4orf51、HHLA1、およびABHD12Bの群から選択される。C4orf51、HHLA1、および ABHD12B内のLTR領域の例は、配列番号2、3、4、5、6および7に示される。

【 0 0 3 2 】

DNA-メチル化状態を測定する方法の例は、バイサルファイトを用いて非メチル化シトシンを加水分解することを包含する。具体的には、バイサルファイト処理、PCR、およびそれに続いて配列決定を行うことを含む方法、メチル化 - 特異的オリゴヌクレオチド (MSO) マイクロアレイ、またはバイサルファイト処理前の配列とバイサルファイト処理後の配列との違いを認識するPCRプライマーを用い、PCR産物の有無に基づいてメチル化DNAの有無を決定することを含むメチル化 - 特異的PCRを用いることを含む方法などがある。これらの方法のほか、DNAメチル化 - 特異的抗体を用いる染色体免疫沈降によってDNA-メチル化領域内のDNA配列を抽出し、PCRを行い、そして配列決定をすることによって特異的領域からDNA - メチル化領域が検出できる。

【 0 0 3 3 】

分化抵抗性を示さないiPS細胞を選別する際には、候補遺伝子本体 (gene body) に位置する上記LTR内のDNA - メチル化状態がDNA - メチル化状態にある対象iPS細胞を、分化抵抗性を示さないiPS細胞として選択する。ここで、「DNA - メチル化状態」という語は、例えば、対象領域内に検出されたメチル化CpGが、検出された全CpGの50%、60%、70%、80%、90%以上、好ましくは100%である状態をいう。

【 0 0 3 4 】

10

20

30

40

50

任意に選択した一つの細胞内のメチル化CpGの割合（パーセンテージ）を検出する方法の一例には、配列決定がある。ここで、その割合（パーセンテージ）は、PCR産物を複数回、例えば2回以上、好ましくは5回以上、より好ましくは10回以上クローン化した鋳型を繰り返し配列決定し、そして、配列決定したクローンの数とDNAメチル化が検出されたクローンの数とを比較することによって算出できる。パイロシーケンス（pyrosequencing）法を用いるとき、その割合はシトシンまたはチミンの量を測定することによって直接に決定することもできる（シトシンの量はメチル化DNAの量を意味し、チミンの量は非メチル化DNAの量を意味する）。

【 0 0 3 5 】

前記マーカーを用いて分化抵抗性を示さないiPS細胞を選別するにあたり、選別の対象となるiPS細胞は、既に確立された方法に従い、特定の初期化因子を、DNA又はタンパク質の形態で体細胞に導入することによって作製すればよい。

【 0 0 3 6 】

初期化因子は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNA、またはES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNA、あるいは低分子化合物によって構成されてもよい。初期化因子に含まれる遺伝子として、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sa111、Sa114、Esrrb、Nr5a2、Tbx3、Glis1等が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いてもよく、組み合わせて用いてもよい。

【 0 0 3 7 】

初期化因子の組み合わせとしては、WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/007852、WO2009/032194、WO2009/058413、WO2009/057831、WO2009/075119、WO2009/079007、WO2009/091659、WO2009/101084、WO2009/101407、WO2009/102983、WO2009/114949、WO2009/117439、WO2009/126250、WO2009/126251、WO2009/126655、WO2009/157593、WO2010/009015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO2010/111409、WO2010/111422、WO2010/115050、WO2010/124290、WO2010/147395、WO2010/147612、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells. 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol. 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:475-479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), Nat Cell Biol. 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), Nat. Biotech., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010), Nature. 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28:713-720、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-9に記載の組み合わせが例示される。

上記初期化因子には、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、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA（例、HDAC1 siRNA SmartpoolTM（Millipore）、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1（OriGene）等）等の核酸性発現阻害剤など]、MEK阻害剤（例えば、PD184352、PD98059、U0126、SL327およびPD0325901）、Glycogen synthase kinase-3阻害剤（例えば、BioおよびCHIR99021）、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤（例えば、5-azacytidine）、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤（例えば、BIX-01294等の低分子阻害剤、Suv39h1、Suv39h2、SetDB1およびG9aに対するsiRNAおよびshRNA等の核酸性発現阻害剤など）、L-channel calcium agonist（例えばBayk8644）、酪酸、TGF阻害剤またはALK5阻害剤（例えば、LY364947、SB431542、616453およびA-83-01）、p53阻害剤（例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA）、ARID3A阻害剤（例えば、ARID3Aに対するsiR

10

20

30

40

50

NAおよびshRNA)、miR-291-3p、miR-294、miR-295およびmir-302などのmiRNA、Wnt Signaling(例えばsoluble Wnt3a)、神経ペプチドY、プロスタグランジン類(例えば、プロスタグランジンE2およびプロスタグランジンJ2)、hTERT、SV40LT、UTF1、IRX6、GLIS1、PI TX2、DMRTB1等の樹立効率を高めることを目的として用いられる因子も含まれており、本明細書においては、これらの樹立効率の改善目的にて用いられた因子についても初期化因子と別段の区別をしないものとする。

【0038】

初期化因子は、タンパク質の形態の場合、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチド(例えば、HIV由来のTATおよびポリアルギニン)との融合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよい。

10

【0039】

一方、DNAの形態の場合、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター(以上、Cell, 126, pp.663-676, 2006; Cell, 131, pp.861-872, 2007; Science, 318, pp.1917-1920, 2007)、アデノウイルスベクター(Science, 322, 945-949, 2008)、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター(WO 2010/008054)などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC、PAC)などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる(Science, 322:949-953, 2008)。ベクターには、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リポソーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができるし、さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子(例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子など)、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質(GFP)、グルクロニダーゼ(GUS)、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。また、上記ベクターには、体細胞への導入後、初期化因子をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合する初期化因子をコードする遺伝子を共に切除するために、それらの遺伝子の5'または3'末端にLoxP配列を有してもよい。

20

【0040】

また、RNAの形態の場合、例えばリポフェクション、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよく、分解を抑制するため、5-メチルシチジンおよびpseudouridine (TriLink Biotechnologies)を取り込ませたRNAを用いてもよい(Warren L, (2010) Cell Stem Cell, 7:618-630)。

30

【0041】

iPS細胞誘導のための培養液としては、例えば、10~15%FBSを含有するDMEM、DMEM/F12又はDME培養液(これらの培養液にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、puromycin、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。)または市販の培養液[例えば、マウスES細胞培養用培養液(TX-WES培養液、トロンボX社)、霊長類ES細胞培養用培養液(霊長類ES/iPS細胞培養液、リプロセル社)、無血清培地(mTeSR、Stemcell Technology社)]などが含まれる。

40

【0042】

培養法の例としては、たとえば、37℃、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DMEM又はDMEM/F12培養液上で体細胞と初期化因子とを接触させ約4~7日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞(たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等)上にまきなおし、体細胞と初期化因子の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培養液で培養し、該接触から約30~約45日又はそれ以上ののちにiPS様コロニーを生じさせることができる。

【0043】

あるいは、37℃、5%CO₂存在下にて、フィーダー細胞(たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等)上で10%FBS含有DMEM培養液(これにはさらに、LIF、ペニシリン/ス

50

トレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。)で培養し、約25～約30日又はそれ以上のうちにES様コロニーを生じさせることができる。望ましくは、フィーダー細胞の代わりに、初期化される体細胞そのものを用いる (Takahashi K, et al. (2009), PLoS One. 4:e8067またはWO2010/137746)、もしくは細胞外基質 (例えば、Laminin-5 (WO2009/123349) およびマトリゲル (BD社)) を用いる方法が例示される。

この他にも、血清を含有しない培地を用いて培養する方法も例示される (Sun N, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:15720-15725)。さらに、樹立効率を上げるため、低酸素条件 (0.1%以上、15%以下の酸素濃度) によりiPS細胞を樹立してもよい (Yoshida Y, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:237-241またはWO2010/013845)。

10

【0044】

上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培養液と培養液交換を行う。また、核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ100cm²あたり約 5×10^3 ～約 5×10^6 細胞の範囲である。

【0045】

iPS細胞は、形成したコロニーの形状により選択することが可能である。一方、体細胞が初期化された場合に発現する遺伝子 (例えば、Oct3/4、Nanog) と連動して発現する薬剤耐性遺伝子をマーカー遺伝子として導入した場合は、対応する薬剤を含む培養液 (選択培養液) で培養を行うことにより樹立したiPS細胞を選択することができる。また、マーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合は蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、また発色酵素遺伝子の場合は発色基質を加えることによって、iPS細胞を選択することができる。

20

【0046】

本明細書中で使用する「体細胞」なる用語は、卵子、卵母細胞、ES細胞などの生殖系列細胞または分化全能性細胞を除くあらゆる動物細胞 (好ましくは、ヒトを含む哺乳動物細胞) をいう。体細胞には、非限定的に、胎児(仔)の体細胞、新生児(仔)の体細胞、および成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含されるし、また、初代培養細胞、継代細胞、および株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば(1) 神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞 (体性幹細胞)、(2) 組織前駆細胞、(3) リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞 (皮膚細胞等)、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞 (膵外分泌細胞等)、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分化した細胞などが例示される。

30

【0047】

2. ヒト人工多能性幹細胞株選別用試薬およびキット

本発明はまた、ヒト人工多能性幹細胞株選別用試薬を提供する。本発明の選別用試薬は前述のマーカーを認識するためのプローブ、プライマーまたは抗体の少なくとも1種を含む。上記当該試薬は他の試薬や装置と組み合わせてキット化することもできる。本発明のキットは、RNAの抽出用試薬、遺伝子抽出用試薬または染色体抽出試薬などを含んでもよい。また、本発明のキットは、分化抵抗性を示す細胞株と分化抵抗性を示さない株の判別分析手段、例えば、判別分析の手順を記載した書面や説明書、判別分析の手順をコンピューターに実行させるためのプログラム、当該プログラムリスト、当該プログラムを記録した、コンピューターに読み取り可能な記録媒体 (例えば、フレキシブルディスク、光ディスク、CD-ROM、CD-R、及びCD-RWなど)、判別分析を実行する装置又はシステム (コンピューターなど) を含んでもよい。

40

【実施例】

【0048】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0049】

(実施例1)

50

1. 細胞

ヒトES細胞として、KhES1、KhES3 (Suemori H, et al. Biochem Biophys Res Commun. 345:926-32, 2006) およびH9 (Thomson, J.A., et al., Science 282: 1145-1147, 1998) を用いた。

【0050】

ヒトiPS細胞は、次の方法で作製された9ファミリー、39クローンを用いた。

(i) 6因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、L-Myc、LIN28およびp53shRNA) をエピソーマルベクター (Okita K, et al. Nat Methods. 8:409-12, 2011) を用いて、臍帯血から抽出したCD34陽性細胞 (WO2010/131747) へ導入することで4つのCB-EP6Fクローンを作製した。

(ii) 4因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4およびc-MYC) をレトロウイルスを用いて、臍帯血から抽出したCD34陽性細胞へ導入することで3つのCB-RV4Fクローンを作製した (WO2010/131747)。

(iii) 4因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4およびc-MYC) をセンダイウイルス (Seki T, et al. Cell Stem Cell. 7:11-4, 2010) を用いて臍帯血から抽出したCD34陽性細胞 (WO2010/131747) へ導入することで5つのCB-SV4Fクローンを作製した。

(iv) 6因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、L-Myc、LIN28およびp53shRNA) をエピソーマルベクターを用いて、歯髄幹細胞へ導入することで2つのDP-EP6Fクローンを作製した (Okita K, et al. Nat Methods. 8:409-12, 2011)。

(v) 6因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、L-Myc、LIN28およびp53shRNA) をエピソーマルベクターを用いて、線維芽細胞へ導入することで3つのFB-EP6Fクローンを作製した (Okita K, et al. Nat Methods. 8:409-12, 2011)。

(vi) 3因子 (OCT3/4、SOX2およびKLF4) をレトロウイルスを用いて、線維芽細胞へ導入することで4つのFB-RV3Fクローンを作製した (Okita K, et al. Nat Methods. 8:409-12, 2011)。

(vii) 4因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4およびc-MYC) をレトロウイルスを用いて、線維芽細胞へ導入することで11個のFB-RV4Fクローンを作製した (Okita K, et al. Nat Methods. 8:409-12, 2011)。

(viii) 6因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、L-Myc、LIN28およびp53shRNA) をエピソーマルベクターを用いて、末梢血単核球 (PBMC) に含有するT細胞 (Seki T, et al. Cell Stem Cell. 7:11-4, 2010) へ導入することで4つのPM-EP6Fクローンを作製した (Okita K, et al. Nat Methods. 8:409-12, 2011)。

(ix) 4因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4およびc-MYC) をセンダイウイルスを用いて、末梢血単核球 (PBMC) に含有するT細胞へ導入することで4つのPM-SV4Fクローンを作製した (Seki T, et al. Cell Stem Cell. 7:11-4, 2010)。

【0051】

2. 分化抵抗性の確認

ES細胞およびiPS細胞の分化抵抗性を確認するため、次の工程を含む改変SFEBq法を用いて神経系細胞へ分化誘導した。

(1) ES細胞またはiPS細胞の培養液へ10 μMのY27632 (WAKO) を添加し3時間静置した。

(2) CTK溶液 (collagenase-trypsin-KSR) 溶液によってフィーダー細胞を除去し、Accumax (Innovate cell technologies) で処理し、single cellへ遊離させ、96well plate (Lipidure-coat U96w, NOF Corporation) に9,000 cells/150uL/wellで播種した。

(3) 10 μM Y-27632、2 μM Dorsomorphin (Sigma)、10 μM SB431542 (Sigma)、5%KSR (Invitrogen)、MEM-Non essential amino acid solution (Invitrogen)、L-glutamine (Invitrogen)、2-Mercaptoethanol (Invitrogen) を含有したDMEM/F12 (Invitrogen) 中で培養し、3または4日おきにY-27632、DorsomorphinおよびSB431542を含まない培地に半量ずつ交換し14日間培養した。続いて、得られた神経系細胞を分離し、37%ホルマリンで固定後、Alexa Fluor 488 Mouse anti-Oct3/4 (BD Pharmingen) で染色後、フローサイトメーターを用いて分析したところ、CB-RV4F-2、DP-EP6F-1、FB-RV3F-3、FB-RV3F-4、FB-RV4F-5およびFB-RV4F-11において、分化誘導後にも関わらずOct3/4陽性細胞が5%以上含

10

20

30

40

50

有していた。これらのiPS細胞は分化抵抗性を示す株として用いた。これらの結果を表3に示す。

【 0 0 5 2 】

【表 3】

各 iPS 細胞株の Oct3/4 陽性細胞の含有率

patent cell name	Souce	Factor	method	Oct3/4 positive cells (%)										deter mi nation
				1st	2nd	3rd	4th	5th	6th	7th	8th	9th	Max rate	
KhES1				0	0.8	0.08	0.13	0.07	0.01	1.7	0.59	0	1.7	
KhES3				0.2									0.2	o
H1				0.13	0.09								0.13	o
H9				0	0.05	0.1	0.05	0	0.3				0.3	o
CB- EP6F-1	CB	OSKUL+ shp53	Episomal plasmid	0.3	0.01								0.3	o
CB- EP6F-2	CB	OSKUL+ shp53	Episomal plasmid	0.3	0.07								0.3	o
CB- EP6F-3	CB	OSKUL+ shp53	Episomal plasmid	0.1	0.03								0.1	o
CB- EP6F-4	CB	OSKUL+ shp53	Episomal plasmid	4.7	0.1								4.7	
CB- RV4F-1	CB	OSKM	Retro virus	0	0.35	0.49							0.49	o
CB- RV4F-2	CB	OSKM	Retro virus	10.74	8.69	19.01	9.6	14.44	12.78				19.01	x
CB- RV4F-3	CB	OSKM	Retro virus	0	0.39	0.04							0.39	o
CB- SV4F-1	CB	OSKM	Sendai virus	0.9	0.7	0.7							0.9	o

10

20

30

40

CB-SV4F-2	CB	OSKM	Sendai virus	0	0.1	0.1									0.1	o
CB-SV4F-3	CB	OSKM	Sendai virus	0.3	0.1										0.3	o
CB-SV4F-4	CB	OSKM	Sendai virus	0.2	0.3										0.3	o
CB-SV4F-5	CB	OSKM	Sendai virus	0.1	0										0.1	o
DP-EP6F-1	dental pulp	OSKUL+shp53	Episomal plasmid	13.61	13.91	2.42	6.1	2.18	1.3	1.96					13.91	x
DP-EP6F-2	dental pulp	OSKUL+shp53	Episomal plasmid	0.01	0.06	0.08									0.08	o
FB-EP6F-1	Fibro	OSKUL+shp53	Episomal plasmid	0	0.02										0.02	o
FB-EP6F-2	Fibro	OSKUL+shp53	Episomal plasmid	0.16	0.02										0.16	o
FB-EP6F-3	Fibro	OSKUL+shp53	Episomal plasmid	0.11	0.05	0.1									0.11	o
FB-RV3F-1	Fibro	OSK	Retro virus	0	0	0.1									0.1	o
FB-RV3F-2	Fibro	OSK	Retro virus	0.28	0.1										0.28	o
FB-RV3F-3	Fibro	OSK	Retro virus	0	7.64	14.25	1.19								14.25	x
FB-RV3F-4	Fibro	OSK(M)	Retro virus	1.24	12.41	8.4	8.9	14.9	14.16	4					14.9	x

10

20

30

40

FB-RV4F-1	Fibro	OSKM	Retro virus	0.05	0.4									0.4	o
FB-RV4F-2	Fibro	OSKM	Retro virus	0.15	0.26	0	0	0	0.01	0.04				0.26	o
FB-RV4F-3	Fibro	OSKM	Retro virus	0.92	3.62	11.2								11.2	x
FB-RV4F-4	Fibro	OSKM	Retro virus	0.04	0.04									0.04	o
FB-RV4F-5	Fibro	OSKM	Retro virus	17.47	5.19	12.6	8.3	6.94	17.1					17.47	x
FB-RV4F-6	Fibro	OSKM	Retro virus	0	3.64									3.64	
FB-RV4F-7	Fibro	OSKM	Retro virus	0.01	0.07									0.07	o
FB-RV4F-8	Fibro	OSKM	Retro virus	0	0.09									0.09	o
FB-RV4F-9	Fibro	OSKM	Retro virus	0	0.05									0.05	o
FB-RV4F-10	Fibro	OSKM	Retro virus	0.03	0.02									0.03	o
FB-RV4F-11	Fibro	OSKM	Retro virus	1.11	13.06	14.39								14.39	x
PB-EP6F-1	PBMN	OSKUL+ shp53	Episomal plasmid	0.1	0.04	0.13								0.13	o
PB-EP6F-2	PBMN	OSKUL+ shp53	Episomal plasmid	4.7	0.02									4.7	

10

20

30

40

PB-EP6F-3	PBMN	OSKUL+ shp53	Episomal plasmid	0.2	0.02									0.2	o
PB-EP6F-4	PBMN	OSKUL+ shp53	Episomal plasmid	0.1	0.94									0.94	o
PB-SEP4F-1	PBMN	OSKM	Sendai virus	0.1	0.1									0.1	o
PB-SV4F-2	PBMN	OSKM	Sendai virus	0.1	0.2									0.2	o
PB-SV4F-3	PBMN	OSKM	Sendai virus	0.1	1.3	1.3								1.3	
PB-SV4F-4	PBMN	OSKM	Sendai virus	0.1	0.2	0.4								0.4	o

10

20

「o」は、分化抵抗性を示さないクローンを意味する。

「x」は、分化抵抗性を示すクローンを意味する。

【 0 0 5 3 】

3. 分化抵抗性マーカーの同定

分化抵抗性を示すiPS細胞5株（CB-RV4F-2、DP-EP6F-1、FB-RV3F-3、FB-RV3F-4およびFB-RV4F-5）と、ES細胞を含む分化抵抗性を示さないiPS細胞27株からRNAを採取し、マイクロアレイ（Human GE G3 8x60k、Agilent）を用いてRNAの発現を測定した。分化抵抗性を示す細胞株と比べて分化抵抗性を示さない細胞株において5倍以上高い発現を示すマーカー群を表4に示す。同様に、分化抵抗性を示す細胞株と比べて分化抵抗性を示さない細胞株において5倍以上低い発現を示すマーカー群を表5に示す。ここで、t検定によりP値が0.05以下であったマーカーは、表4より4個（DLX5、MEIS2、lincRNA:chr17:21434064-21435857 reverse strand、GREB1L）および表5より12個（C4orf51、C7orf57、lincRNA:chr7:124873114-124899839 reverse strand、OC90、lincRNA:chr8:133071643-133092468 reverse strand、lincRNA:chr8:133076031-133093351 reverse strand、ABHD12B、lincRNA:chr18:54721302-54731677 reverse strand、ZNF541、TBX1、CXorf61、DB090170 TEST14 Homo sapiens cDNA clone TEST14038997 5', mRNA sequence [DB090170]）確認された。

30

【 0 0 5 4 】

【表 4 - 1】

分化抵抗性を示さない細胞株のマーカー

Marker name	Genbank Accession	Chromosome Number	Strand Direction	Region	P<0.05
lincRNA:chr1:852245-854050 reverse strand		chr1	-	852,245- 854,050	
GPR177	NM_001002292	chr1	-	29,518,977- 29,543,121	
VTCN1	NM_024626	chr1	-	117,686,209- 117,753,549	
lincRNA:chr1:142803013-142804254 reverse strand		chr1	-	142,803,013- 142,804,254	
APOA2	NM_001643	chr1	-	161,192,083- 161,193,418	
WNT6	NM_006522	chr2	+	23,961,932- 23,965,019	
EPAS1	NM_001430	chr2	+	46,524,541- 46,613,842	
COL3A1	NM_000090	chr2	+	189,839,099- 189,877,472	
SLC40A1	NM_014585	chr2	-	190,425,316- 190,445,537	
S100P	NM_005980	chr4	+	6,695,566- 6,698,897	
HOPX	NM_139211	chr4	-	57,514,154- 57,547,872	
GUCY1A3	NM_000856	chr4	+	156,587,862- 156,658,214	
CDH10	NM_006727	chr5	-	24,487,209- 24,645,085	
HAPLN1	NM_001884	chr5	-	82,934,017- 83,016,896	
PITX1	NM_002653	chr5	-	134,363,424- 134,369,964	
HAND1	NM_004821	chr5	-	153,854,532- 153,857,824	
CGA	NM_000735	chr6	-	87,795,222- 87,804,824	
AQP1	NM_198098	chr7	+	30,951,415- 30,965,131	

10

20

30

40

【 0 0 5 5 】

【表 4 - 2】

Marker name	Genbank Accession	Chromosome Number	Strand Direction	Region	P<0.05
DLX6	NM_005222	chr7	+	96,635,290-96,640,352	
DLX5	NM_005221	chr7	-	96,649,702-96,654,143	○
SOX17	NM_022454	chr8	+	55,370,495-55,373,456	
FLJ45983	NR_024256	chr10	-	8,092,413-8,095,447	
PLCE1	NM_016341	chr10	+	95,753,746-96,088,149	
H19	NR_002196	chr11	-	2,016,406-2,019,065	
lincRNA:chr11:2016408-2017024 reverse strand		chr11	-	2,016,408-2,017,024	
lincRNA:chr11:2017517-2017651 forward strand		chr11	+	2,017,517-2,017,651	
IGF2	NM_000612	chr11	-	2,150,350-2,182,439	
P2RY6	NM_176798	chr11	+	72,975,570-73,009,664	
SLN	NM_003063	chr11	-	107,578,101-107,582,787	
NNMT	NM_006169	chr11	+	114,166,535-114,183,238	
APOA1	NM_000039	chr11	-	116,706,469-116,708,338	
ERP27	NM_152321	chr12	-	15,066,976-15,091,463	
LUM	NM_002345	chr12	-	91,497,232-91,505,542	
CCDC92	NM_025140	chr12	-	124,420,955-124,457,163	
CDX2	NM_001265	chr13	-	28,536,278-28,543,317	
FLJ41170	AK021542	chr14	+	81,527,645-81,529,369	
MEG3	NR_003530	chr14	+	101,292,445-101,327,363	

10

20

30

40

【 0 0 5 6 】

【表 4 - 3】

Marker name	Genbank Accession	Chromosome Number	Strand Direction	Region	P<0.05
lincRNA:chr14:101292469-101299626 forward strand		chr14	+	101,292,469- 101,299,626	
lincRNA:chr14:101295637-101302637 forward strand		chr14	+	101,295,637- 101,302,637	
lincRNA:chr14:101296681-101298460 forward strand		chr14	+	101,296,681- 101,298,460	
lincRNA:chr14:101298129-101300147 forward strand		chr14	+	101,298,129- 101,300,147	
lincRNA:chr14:101324825-101327247 forward strand		chr14	+	101,324,825- 101,327,247	
MEG8	NR_024149	chr14	+	101,361,107- 101,373,305	
lincRNA:chr14:101365673-101366049 forward strand		chr14	+	101,365,673- 101,366,049	
lincRNA:chr14:101396955-101397357 forward strand		chr14	+	101,396,955- 101,397,357	
lincRNA:chr14:101430757-101433381 forward strand		chr14	+	101,430,757- 101,433,381	
lincRNA:chr14:101434059-101436282 forward strand		chr14	+	101,434,059- 101,436,282	
lincRNA:chr14:101472355-101473369 forward strand		chr14	+	101,472,355- 101,473,369	
DIO3	NM_001362	chr14	+	102,027,688- 102,029,789	
MEIS2	NM_170677	chr15	-	37,183,232- 37,393,500	○
PRTG	NM_173814	chr15	-	55,903,738- 56,035,177	
C17orf51	NM_001113434	chr17	-	21,431,571- 21,454,941	
lincRNA:chr17:21434064-21435857 reverse strand		chr17	-	21,434,064- 21,435,857	○
lincRNA:chr17:21435180-21454915 reverse strand		chr17	-	21,435,180- 21,454,915	
lincRNA:chr17:21435959-21436405 reverse strand		chr17	-	21,435,959- 21,436,405	
CCR7	NM_001838	chr17	-	38,710,021- 38,721,736	

10

20

30

40

【 0 0 5 7 】

【表 4 - 4】

Marker name	Genbank Accession	Chromosome Number	Strand Direction	Region	P<0.05
KRT23	NM_015515	chr17	-	39,078,952-39,093,836	
GREB1L	NM_001142966	chr18	+	18,822,203-19,102,791	○
GATA6	NM_005257	chr18	+	19,749,416-19,782,227	
TTR	NM_000371	chr18	+	29,171,730-29,178,987	
UCA1	NR_015379	chr19	+	15,939,757-15,946,230	
FLRT3	NM_198391	chr20	-	14,304,639-14,318,313	
lincRNA:chrX:73040495-73047819 reverse strand		chrX	-	73,040,495-73,047,819	
VGLL1	NM_016267	chrX	+	135,614,311-135,638,966	
RPS4Y1	NM_001008	chrY	+	2,709,623-2,734,997	
DDX3Y	NM_001122665	chrY	+	15,016,019-15,032,390	
RPS4Y2	NM_001039567	chrY	+	22,917,954-22,942,918	

10

20

【 0 0 5 8 】

【表 5 - 1】

分化抵抗性を示す細胞株のマーカー

Marker name	Genbank Accession	Chromosome Number	Strand Direction	Region	P<0.05
DMRTB1	NM_033067	chr1	+	53,925,072-53,933,158	
lincRNA:chr1:73430887-73446112 reverse strand		chr1	-	73,430,887-73,446,112	
lincRNA:chr1:73444697-73444997 reverse strand		chr1	-	73,444,697-73,444,997	
C4orf51	NM_001080531	chr4	+	146,601,356-146,653,949	○
PCDHA1	NM_031410	chr5	+	140,165,876-140,391,929	
lincRNA:chr6:95250854-95263604 reverse strand		chr6	-	95,250,854-95,263,604	
lincRNA:chr6:14280358-14285376 reverse strand		chr6	-	14,280,358-14,285,376	
lincRNA:chr6:14283301-14285685 reverse strand		chr6	-	14,283,301-14,285,685	
C7orf57	NM_001100159	chr7	+	48,075,117-48,100,894	○
lincRNA:chr7:124873114-124899839 reverse strand		chr7	-	124,873,114-124,899,839	○
lincRNA:chr8:129599518-129624118 reverse strand		chr8	-	129,599,518-129,624,118	
OC90	NM_001080399	chr8	-	133,036,467-133,071,627	○
lincRNA:chr8:133071643-133092468 reverse strand		chr8	-	133,071,643-133,092,468	○
lincRNA:chr8:133073732-133075753 reverse strand		chr8	-	133,073,732-133,075,753	
HHLA1	NM_001145095	chr8	-	133,073,733-133,117,512	
lincRNA:chr8:133076031-133093351 reverse strand		chr8	-	133,076,031-133,093,351	○
lincRNA:chr8:138387843-138421643 reverse strand		chr8	-	138,387,843-138,421,643	
lincRNA:chr8:138418343-138425831 reverse strand		chr8	-	138,418,343-138,425,831	

10

20

30

40

【 0 0 5 9 】

【表 5 - 2】

Marker name	Genbank Accession	Chromosome Number	Strand Direction	Region	P<0.05
NDUFA4L2	NM_020142	chr12	-	57,628,686-57,634,545	
lincRNA:chr13:54698462-54707001 reverse strand		chr13	-	54,698,462-54,707,001	
ABHD12B	NM_181533	chr14	+	51,338,878-51,371,688	○
lincRNA:chr18:54721302-54731677 reverse strand		chr18	-	54,721,302-54,731,677	○
ZNF208	NM_007153	chr19	-	22,148,897-22,193,745	
ZNF257	NM_033468	chr19	+	22,235,266-22,273,905	
ZNF676	NM_001001411	chr19	-	22,361,903-22,379,753	
ZNF541	NM_001101419	chr19	-	48,023,947-48,059,113	○
TBX1	NM_080647	chr22	+	19,744,226-19,771,116	○
CXorf61	NM_001017978	chrX	-	115,592,852-115,594,137	○
DB090170 TESTI4 Homo sapiens cDNA clone TESTI4038997 5', mRNA sequence [DB090170]	DB090170	chrX	-		○

10

20

【 0 0 6 0 】

(実施例 2)

(1) 細胞

上述した分化抵抗性を示す 4 つの iPS 細胞株 (CB-RV4F-2、DP-EP6F-1、FB-RV3F-4 および FB-RV4F-5) を播種し、得られたコロニーをピックアップすることで、CB-RV4F-2 より 15 個のサブクローン、DP-EP6F-1 より 15 個のサブクローン、FB-RV3F-4 より 10 個のサブクローン および FB-RV4F-5 より 11 個のサブクローンが得られた。

【 0 0 6 1 】

(2) 分化抵抗性の確認

ES 細胞および iPS 細胞の分化抵抗性を確認するため、上述した改変 SFEBq 法を用いて神経系細胞へ分化誘導した後、フローサイトメーターを用いて TRA-1-60 陽性細胞の含有率を調べた。すると、CB-RV4F-2 の 15 個中 12 個のサブクローンでは、神経系細胞へ分化誘導した後 TRA-1-60 陽性細胞を 1% 以上含有していた (表 6)。同様に、DP-EP6F-1 では 15 個中 12 個 (表 7)、FB-RV3F-4 では 10 個中 8 個 (表 8) および FB-RV4F-5 では 11 個中 3 個 (表 9) のサブクローンにおいて 1% 以上の TRA-1-60 陽性細胞を含有していた。これら 1% 以上の TRA-1-60 陽性細胞を含有していた 35 個のサブクローンを分化抵抗性を示す iPS 細胞株として選別した。

【 0 0 6 2 】

30

40

【表 6】

CB-RV4F-2 のサブクローンの TRA-1-60 陽性細胞含有率

subclone name	TRA-1-60 positive cells (%)			
	1st try	2nd try	3rd try	Average
CB-RV4F-2 sub1	0.1	0.1	0.1	0.1
CB-RV4F-2 sub2	24.6	10.1	11.5	15.4
CB-RV4F-2 sub3	17.2	14.7	4.2	12.03333
CB-RV4F-2 sub4	8.4	20	41.8	23.4
CB-RV4F-2 sub5	12	13.8	11	12.26667
CB-RV4F-2 sub6	20.7	15	14	16.56667
CB-RV4F-2 sub7	25.1	21.8	24.1	23.66667
CB-RV4F-2 sub8	10	4.6	2	5.533333
CB-RV4F-2 sub9	9.6	3.5	1.9	5
CB-RV4F-2 sub10	17.5	11.8	15.5	14.93333
CB-RV4F-2 sub11	0.1	0.3	0.1	0.166667
CB-RV4F-2 sub12	28.8	23.8	15.7	22.76667
CB-RV4F-2 sub13	23.1	21.5	12.1	18.9
CB-RV4F-2 sub14	14.2	7.3	11.8	11.1
CB-RV4F-2 sub15	0	0.5	0.1	0.2
CB-RV4F-2	27.3	26	8	20.43333
H9	0.2	0.1	0.2	0.166667
khES1	0	0	0.3	0.1
khES3	0.1	0	0.1	0.066667

10

20

【 0 0 6 3 】

【表 7】

DP-EP6F-1 のサブクローンの TRA-1-60 陽性細胞含有率

subclone name	TRA-1-60 positive cells (%)
DP-EP6F-1 sub1	8.8
DP-EP6F-1 sub2	21
DP-EP6F-1 sub3	48.3
DP-EP6F-1 sub4	11.4
DP-EP6F-1 sub5	0.6
DP-EP6F-1 sub6	8.1
DP-EP6F-1 sub7	43.9
DP-EP6F-1 sub8	9.5
DP-EP6F-1 sub9	0.2
DP-EP6F-1 sub10	22
DP-EP6F-1 sub11	0.1
DP-EP6F-1 sub12	44.1
DP-EP6F-1 sub13	41.3
DP-EP6F-1 sub14	10.9
DP-EP6F-1 sub15	16.9
DP-EP6F-1	53.5
H9	0.1
khES3	0.1

10

20

【 0 0 6 4 】

【表 8】

FB-RV3F-4 のサブクローンの TRA-1-60 陽性細胞含有率

subclone name	TRA-1-60(%)			
	1st try	2nd try	3rd try	Average
FB-RV3F-4 sub1	10.9	29.1	9.9	16.63333
FB-RV3F-4 sub2	9.4	28.3	8.5	15.4
FB-RV3F-4 sub3	7.7	26	6.7	13.46667
FB-RV3F-4 sub4	0	0.1	0	0.033333
FB-RV3F-4 sub5	0.1	0	0	0.033333
FB-RV3F-4 sub6	6.7	12.9	7.5	9.033333
FB-RV3F-4 sub7	14	12.5	6.6	11.03333
FB-RV3F-4 sub8	12.9	25.9	24.8	21.2
FB-RV3F-4 sub9	7.5	9.5	5.2	7.4
FB-RV3F-4 sub10	21.4	32	21	24.8
FB-RV3F-4	30.8	41.4	19.9	30.7
H9	0.1	0	0.1	0.066667
khES1	0.1	0.1	0	0.066667
khES3	0	0.1	0	0.033333

30

40

【 0 0 6 5 】

【表 9】

FB-RV4F-5 のサブクローンの TRA-1-60 陽性細胞含有率

subclone name	TRA-1-60 positive cells (%)		
	1st try	2nd try	Average
FB-RV4F-5 sub1	0.1	0.8	0.45
FB-RV4F-5 sub2	3.8	13.1	8.45
FB-RV4F-5 sub3	0.3	0.5	0.4
FB-RV4F-5 sub4	0.1	0.1	0.1
FB-RV4F-5 sub5	14.8	20.9	17.85
FB-RV4F-5 sub6	38.9	19.6	29.25
FB-RV4F-5 sub7	0.1	0	0.05
FB-RV4F-5 sub8	0.1	0.2	0.15
FB-RV4F-5 sub9	0.4	0.1	0.25
FB-RV4F-5 sub10	0.2	0.7	0.45
FB-RV4F-5 sub11	0.1	0.8	0.45
FB-RV4F-5	2.8	7.7	5.25
H9	0.2	0.1	0.15
khES1	0.1	0.3	0.2
khES3	0.1	0.3	0.2

10

20

【 0 0 6 6 】

分化抵抗性マーカーの同定

上記の方法で選別された分化抵抗性を示す35個のサブクローンおよび分化抵抗性を示さない16個のサブクローンから抽出したRNAより、マイクロアレイを用いて各RNAの発現量を調べたところ、分化抵抗性を示すサブクローンにおいて表 1 0 に示す lincRNA および mRNA が有意に高く発現していた。

【 0 0 6 7 】

【表 1 0】

30

Marker name	Genbank Accession	Chromosome Number	Strand Direction	Region	P<0.05
OC90	NM_001080399	chr8	-	133,036,467-133,071,627	○
lincRNA:chr8:133071643-133092468 reverse strand		chr8	-	133,071,643-133,092,468	○
lincRNA:chr8:133073732-133075753 reverse strand		chr8	-	133,073,732-133,075,753	○
HHLA1	NM_001145095	chr8	-	133,073,733-133,117,512	○
lincRNA:chr8:133076031-133093351 reverse strand		chr8	-	133,076,031-133,093,351	○
lincRNA:chr8:133090096-133097869 reverse strand		chr8	-	133,090,096-133,097,869	○
ABHD12B	NM_181533	chr14	+	51,338,878-51,371,688	○

40

【 0 0 6 8 】

50

(実施例3)

分化抵抗性を示す細胞株用マーカーとして表5(実施例1)および表10(実施例2)に含まれるC4orf51、HHLA1 およびABHD12Bの分化抵抗性を示す6クローンおよび分化抵抗性を示さない6クローンにおけるRNA発現を定量PCR法にて測定した(図1)。これらのマーカー遺伝子は前記結果と同様に分化抵抗性を示すクローンで発現していることが確認された。さらに、これらの遺伝子とその遺伝子本体(gene body)内にLTR7領域を有することが知られていた(図2)。その結果、LTR7領域またはその近傍のCpGジヌクレオチド中のメチル化シトシンの割合(パーセンテージ)を、パイロシーケンス(Pyrosequencing)法にて測定した(図3)。簡単に説明すると、パイロシーケンス(Pyrosequencing)法をPyromark Assay Design Software 2.0 (Qiagen)で設計したプライマーを用いて行った。プライマー配列およびLTR7領域内のCpGジヌクレオチドを表11および表12に示す。PCRを25ng bisulfite-converted DNA、1X Pyromark PCR Master Mix (Qiagen)、1X Coral Load Concentrate (Qiagen)、ならびに0.3 μM フォワードプライマー(forward primer)および5' ビオチニル化リバースプライマー(reverse primer)を含む25 μLの反応混合物中で実施した。PCR条件は、1サイクル95 30秒、50 30秒、および72 30秒を45サイクルとした。PCR産物はストレプトアビジンセファロースビーズ(Amersham Biosciences)に結合させた後、精製し、洗浄し、変性させ、再び洗浄した。その後、0.3 μM/Lのpyrosequencingプライマーを精製PCR産物にアニールさせたPyrosequencing反応はPSQ HS 96 Pyrosequencing System内で行った。メチル化度は、メチル化シトシンおよび非メチル化シトシンの合計で除したパーセンテージで表わした(5mCのパーセンテージ)。PCR pyrosequencing assayを有効化するために、各CpGジヌクレオチド位を3回アッセイし、それらの平均を最終分析に用いた。その結果、C4orf51、HHLA1およびABHD12B遺伝子本体(gene body)に位置するLTR7領域またはその近傍のCpGジヌクレオチド位のメチル化状態が顕著に高レベルであった。

【0069】

10

20

【表 1 1】

領域	プライマー	配列	配列番号
HHLA1 3'LTR-1 (pos.1,2)	forward primer	TGTGAAAGTTTTTTTTTTGGTTTATTTTG	8
	reverse primer	CCTCTCCAAAACCTCTAATACATATCTT	9
	pyrosequencing primer	ACAATAAAACTATTTATTTACCT	10
HHLA1 3'LTR-2 (pos.3,4)	forward primer	AAAGTTTGTTTGGTGGTTTTTT	11
	reverse primer	AAAAAATTAATCTCCTCCATATACCTT	12
	pyrosequencing primer	TTGTTTGGTGGTTTTTTTA	13
ABHD12B before 5'LTR (pos.1,2,3)	forward primer	TGTGTATTAATGTATGGTTAATTTTGGTAA	14
	reverse primer	CAAACCATCTAAACAAATACCTACAA	15
	pyrosequencing primer	GTTGTTTTTTATGTAGTGTTT	16
ABHD12B 5'LTR (pos.4)	forward primer	TGTGTATTAATGTATGGTTAATTTTGGTAA	14
	reverse primer	CAAACCATCTAAACAAATACCTACAA	15
	pyrosequencing primer	TTAGGTTTTTGAGTTTAAGTTAA	17
ABHD12B 3'LTR (pos.1,2)	forward primer	AAGTTTGTTTGGTGGTTTTTTTATATAGA	18
	reverse primer	ACCATCCACAATCATAATAAAATACTTT	19
	pyrosequencing primer	ACCAATAACAATAAACAAAATTT	20

10

20

30

ABHD12B after 3'LTR-1 (pos.3)	forward primer	GTTGTGGAGTTATTTAGATTTGGGTTTA	21
	reverse primer	CTTTCCTACCATACATAAACACTTTAAC	22
	pyrosequencing primer	TTTTTTATTAAGGGTTGG	23
ABHD12B after 3'LTR-2 (pos.4)	forward primer	TTTTTTTTTTGAAGGTGAGGGAAAGTAGTT	24
	reverse primer	AACCTATAAATCTCCATTTCTCTCATCTC	25
	pyrosequencing primer	TGGTAGGAATGGGGT	26
C4orf51 5'LTR (pos.1,2)	forward primer	GGATAATTTGAAAATGTTTTTGGTTAAGG	27
	reverse primer	ATAATTCTTCAATTACTTCAAACCATCTA	28
	pyrosequencing primer	GGTTTTGAGTTTAAGTTAAG	29
C4orf51 3'LTR (pos.1,2,3)	forward primer	TTTTTTTTTTGGTTTATTTTGGTTTAAAAG	30
	reverse primer	ACAAACCATATCTCAAATAAAAAATTCAT	31
	pyrosequencing primer	ATATAAAATTTGTTTGGTGG	32

10

20

【 0 0 7 0 】

【表 1 2】

領域	配列	配列 番号
HHLA1 3'LTR-1	TGTGAAAGTCCTCTTCCTGGCTCATCCTGGCTCAAAAAGC ACCCCCACTGAGCACCTTGAGACCCCCACTCCTGCCCGCC AGAGAACAAACCCCTTTGACTGTAATTTTCCTTTACCTA CCCAAATCCTATAAAACGGCCCCACCCTTATCTCCCTTCA CTGACTCTCTTTTCGGACTCAGCCCGCCTGCACCCAGGTG AAATAAACAGCTTTATTGCTCACACAAAGCCTGTTTGGTG GTCTCTTCACACGGACGCACATGAAATTTAGTTGTATCCA TAAGGCATATGGAGGAGACTAATTCCTCTTCCAAAGACAT GTACCAGAGTCCTGGAGAGG	33
HHLA1 3'LTR-2	AAAGCCTGTTTGGTGGTCTCTTCACACGGACGCACATGAA ATTTAGTTGTATCCATAAGGCATATGGAGGAGACTAATTC CTCT	34
ABHD12B before 5'LTR and 5'LTR	TGTGTACCAATGTATGGTCAATTTTGGCAAATTTTCCATAT GCTTGAAAAGAATGTGTTCTGCTGTTTTTTCATGCAGTGTTT TATGTACGTCGATTGAATCGGGATTATTAACCATGCTTAA ATTTGTCAGGCCTCTGAGCCCAAGCCAAGCCATCGCATCC CCTGTGACTTGCAGGTATCTGCCCAGATGGCCTG	35
ABHD12B 3'LTR	AAGCCTGTTTGGTGGTCTCTTCACACAGACGCGCATGAAA AAATTTTGTCTATTGTTACTGGTTTTTTGGACTGCTTGCTT TTTCAGTTACTCAAAGAGGATTATTAAGTACCTCATCAT GATTGTGGAATGGT	36
ABHD12B after 3'LTR-1	GCTGTGGAGCCACTCAGACTTGGGTTCAAATCTGTCCTTG GCCACATACCCTTTGTGACCTTGGTAAATTGTTTCTCCCTA AGTTTTCCCATTTTTTTACCAAGGGTTGGCGAAGACCAC TGCACAGGGTTGTTGTGAAGACTGAATTAAGTAAGATAAT GTATGTAAAGTACCCAGCTGCTAGTAAGCACTAGACAAA TACTTGTTCCCTTCCGTCCCTCTTCTGTTACAAATTAGGC TAAAGTGTTATGTATGGCAGGAAAAG	37

10

20

30

ABHD12B after 3'LTR-2	CTTCTTTCTTGAAGGTGAGGGAAAGCAGTTAGGAAACAG AGCGAGGAACAGGTGAATGTAACTCAGACCCCTGGCAG GAATGGGGCTGTTCTAC <u>CG</u> TTATAAACTGCCTGAGAGTTAA TAGAGGACTTCCACACAAGTCTTTCGCACTCGTTATTCTTT TAAATCCTCACAGCAACTCTCTGAGTTTGTGCATCATTGCTT CCACTTAGAGATGAGAGAAATGGAGACCTATAGGTT	38
C4orf51 5'LTR	GGATAATTTGAAAATGCCCTTGGCCAAGGGGAAGCTCCA CCAGTCAGTTGGGGGAGCTTAGAATTTTATTTTTGGTTTA CAAGTTCATTATATATTTTTGGATATTAACCTTGTCAGGC CTCTGAGCCCAAGCCAAGCCAT <u>CG</u> CATCCCCTGTGACTTG CACATATA <u>CG</u> CCCAGATGGCCTGAAGTAACTGAAGAATC AC	39
C4orf51 3'LTR	TCCTTTTCCTGGCTCATCCTGGCTCAAAGCACCCCCACT GAGCACCTTGCAGCCCCACTCCTGCCCGCCAGAGAACA AACCCCTTTGACTGTAATTTTCCTTTACCTACCCAAATCC TATAAAACGGCCCCACCCTTAACTCCCTTCACTGACTCTC TTTTCGGACTCAGCCCACCTGTACCCAGGTGATTA AAA AGC TTTATTGCTCACAAAAACCTGTTTGGTGGTCTCTTCACAC <u>GGACGC</u> GCATGAAACTCCTTATCTGAGATATGGTTTGC	40

10

20

「下線を引いたCG 配列」についてDNA-メチル化状態を分析した。

【0071】

上記結果から、分化抵抗性を示すクローンをC4orf51、HLA1およびABHD12Bの発現の認識によって分類することができる。同様に、分化抵抗性を示すクローンをC4orf51、HLA1およびABHD12B遺伝子本体（gene body）に位置するLTR7領域またはその近傍におけるDNA-メチル化状態の認識によって分類することができる。

30

【0072】

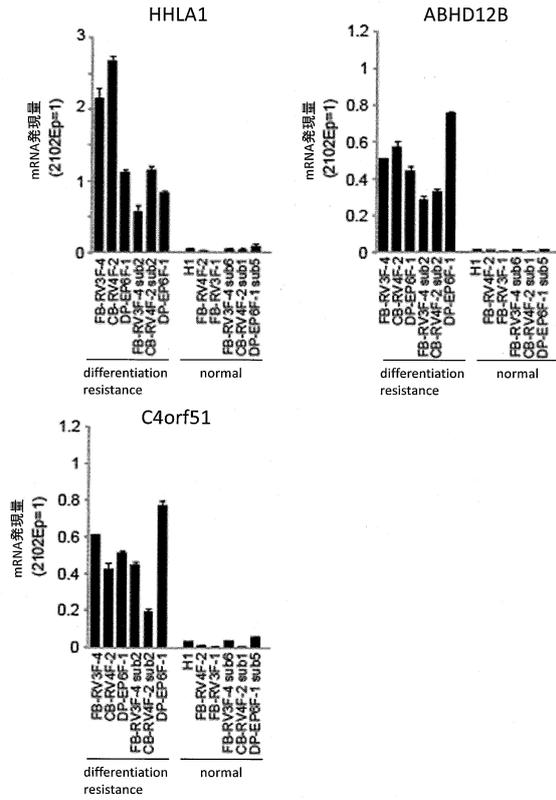
本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書に組み入れるものとする。

【産業上の利用可能性】

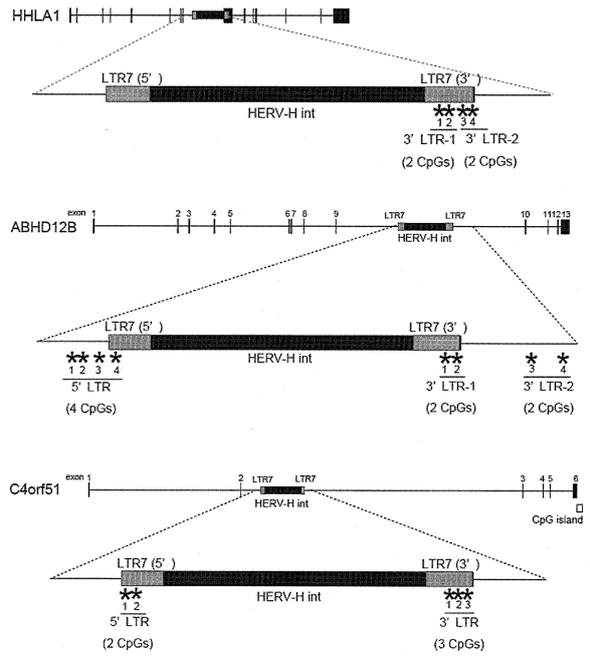
【0073】

本願発明は、再生医療材料の製造分野において利用できる。

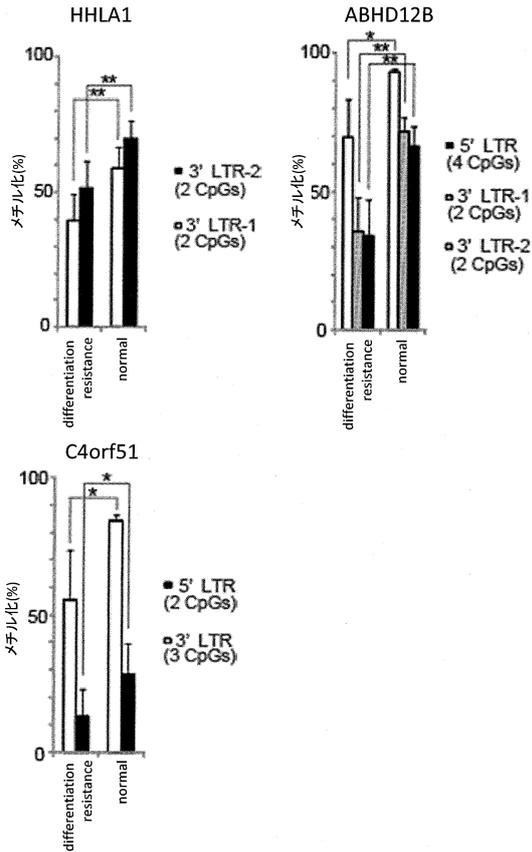
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【配列表】

0006143265000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
G 0 1 N 37/00	(2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2	
G 0 1 N 33/50	(2006.01)	G 0 1 N 33/50		P
G 0 1 N 33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53		D

(72)発明者 小柳 三千代
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 大貫 茉里
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 川口 裕美子

(56)参考文献 国際公開第2011/087154(WO, A1)
国際公開第2011/158960(WO, A1)
Sabine Loewer et al., Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells, Nature Genetics, VOLUME 42, NUMBER 12, 1113-1117

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C 1 2 N 5 / 0 0
C 1 2 N 1 5 / 0 0
C 1 2 Q 1 / 6 8
G 0 1 N 3 3 / 5 0