

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6083874号
(P6083874)

(45) 発行日 平成29年2月22日 (2017. 2. 22)

(24) 登録日 平成29年2月3日 (2017. 2. 3)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 5/071 (2010. 01)	C 1 2 N 5/071
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
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02
A 6 1 K 35/12 (2015. 01)	A 6 1 K 35/12

請求項の数 14 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-557300 (P2013-557300)	(73) 特許権者	504132272
(86) (22) 出願日	平成24年6月29日 (2012. 6. 29)		国立大学法人京都大学
(65) 公表番号	特表2014-523733 (P2014-523733A)		京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
(43) 公表日	平成26年9月18日 (2014. 9. 18)	(74) 代理人	100080791
(86) 国際出願番号	PCT/JP2012/067256		弁理士 高島 一
(87) 国際公開番号	W02013/002419	(74) 代理人	100125070
(87) 国際公開日	平成25年1月3日 (2013. 1. 3)		弁理士 土井 京子
審査請求日	平成27年6月29日 (2015. 6. 29)	(74) 代理人	100136629
(31) 優先権主張番号	61/503, 283		弁理士 鎌田 光宣
(32) 優先日	平成23年6月30日 (2011. 6. 30)	(74) 代理人	100121212
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田村 弥栄子
		(74) 代理人	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】 ミトコンドリア病特異的人工多能性幹細胞、その製造方法及び使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ミトコンドリア病を引き起こすミトコンドリアDNA変異をヘテロプラスミックに有する患者から採取された体細胞から、該変異の頻度が該体細胞と比較して増大した、又は検出できないレベルまで低下し、かつ該変異頻度が継代後及び分化誘導後も安定に保持されるiPS細胞を製造する方法であって、

(1) 該患者から採取された体細胞を初期化物質と接触させる工程；

(2) 細胞培養物からiPS細胞コロニーを選択する工程；

(3) iPS細胞の該変異の頻度を決定する工程；及び

(4) 該変異の頻度が該体細胞と比較して増大した、又は検出できないレベルまで低下したiPS細胞を選択する工程

を含む、方法。

【請求項 2】

変異が、3243位におけるアデニンからグアニンへの置換 (A3243G) である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ミトコンドリア病が糖尿病を伴う、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

核初期化物質が、Octファミリーメンバー、Soxファミリーメンバー、Klf4ファミリーメンバー、Mycファミリーメンバー、Linファミリーメンバー及び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 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

核初期化物質が、

(a) Oct3/4、Sox2及びKlf4、又はそれらをコードする核酸、あるいは

(b) Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc若しくはL-Myc、又はそれらをコードする核酸を含む、
請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

ミトコンドリア病の治療及び／又は予防剤をスクリーニングする方法であって、

(1) 請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法により、ミトコンドリアDNA変異の頻度が
元の体細胞と比較して増大したiPS細胞を製造する工程；

(2) 該製造されたiPS細胞から分化誘導した体細胞を被検物質と接触させる工程；

(3) 該細胞におけるミトコンドリア病の1以上の表現型を決定する工程；及び

(4) 被検物質不在下と比較して、少なくとも1の表現型を改善した被検物質を、ミトコン
ドリア病の治療及び／又は予防剤の候補として選択する工程を含む、方法。

【請求項 7】

請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の方法により、同一患者の体細胞から製造したミト
コンドリアDNA変異の頻度が検出できないレベルまで低下したiPS細胞から分化誘導した体
細胞を陰性対照として用いることをさらに含む、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

分化誘導した体細胞が、腸管細胞、膵β細胞、神経細胞、心筋細胞又は骨格筋細胞であ
る、請求項 6 又は 7 に記載の方法。

【請求項 9】

体細胞が、腸管細胞又は膵β細胞である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

ミトコンドリア病の表現型が、シトクロムCオキシダーゼサブユニット 1 および/または
シトクロムCオキシダーゼサブユニット 2 のタンパク質量が低下することである、請求項
6 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

ミトコンドリア病を引き起こすミトコンドリアDNA変異を有する患者から採取された体
細胞を初期化して得たiPS細胞のうち、該変異の頻度が検出できないレベルまで低下したi
PS細胞を選択して体細胞に分化誘導することを含む、ミトコンドリア病の治療及び／又は
予防剤の製造方法。

【請求項 12】

分化誘導した体細胞が、腸管細胞、膵β細胞、神経細胞、心筋細胞又は骨格筋細胞であ
る、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

体細胞が、腸管細胞又は膵β細胞である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

ミトコンドリア病を引き起こすミトコンドリアDNA変異をヘテロプラスミックに有する
、糖尿病を伴うミトコンドリア病患者由来の、該変異の頻度が検出できないレベルまで低
下した腸管細胞又は膵β細胞を含有してなる、該患者に対する自家移植療法剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ミトコンドリアDNAに変異を有するミトコンドリア病患者から作製された人工多能性幹（iPS）細胞であって、二峰性の変異ヘテロプラスミーの程度を示す、すなわち、あるクローンは該変異の頻度が増大しており、その他のクローンは実質的に該変異を有さない、iPS細胞に関する。本発明はまた、変異-リッチ（mutation-rich）及び変異-フリー（mutation-free）ミトコンドリア病特異的iPS（Mt-iPS）細胞の製造方法及びその使用にも関する。

10

20

30

40

50

【背景技術】

【0002】

ミトコンドリアDNA (mtDNA) はミトコンドリア内に存在し、細胞のエネルギー産生に必須の構成要素をコードする。mtDNA変異はヒト変性疾患を引き起こし得る。tRNA (Leu) A3243G変異は、最も高頻度に観察されるmtDNA変異の一つであり、糖尿病、難聴、心筋症及びミトコンドリア脳症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作症候群 (MELAS) を含む広範囲の臨床表現型を伴う [1]。

【0003】

ミトコンドリア病の遺伝形式は母系であるが、該疾患の浸透率は可変である [2]。mtDNAの分離は遺伝的浮動パターンに従う傾向にあるため、母親の遺伝子型及び表現型に基づいて子供の表現型を予測することは不可能である [2]。このことは、体細胞及び生殖細胞の両方に当てはまる：変異mtDNAが、発生の間、どの細胞タイプに優先的に移動するかを予測することは不可能である。今日まで、ミトコンドリア病に対する特異的な治療又はケアはなく、支持療法が存在するのみである。ミトコンドリア病の根底にある遺伝学及び病態生理学を理解しようとする取り組みは、疾患モデルの欠如により妨げられている。

【0004】

近年、様々な疾患を有する患者から得られた線維芽細胞からiPS細胞が作製されているが [3-14]、ミトコンドリア病患者から作製されたものはない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】 Finsterer, Int. J. Cardiol., 137: 60-62 (2009)

【非特許文献2】 Shoubridge and Wai, Curr. Top. Dev. Biol., 77: 87-111 (2007)

【非特許文献3】 Dimos et al., Science, 321: 1218-1221 (2008)

【非特許文献4】 Ebert et al., Nature, 457: 277-280 (2009)

【非特許文献5】 Park et al., Cell, 134: 877-886 (2008)

【非特許文献6】 Soldner et al., Cell, 136: 964-977 (2009)

【非特許文献7】 Rowntree and Mcneish, Regen. Med., 5: 557-568 (2010)

【非特許文献8】 Ghodsizadeh et al., Stem Cell Rev., 6: 622-632 (2010)

【非特許文献9】 Meng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107: 7886-7891 (2010)

【非特許文献10】 Liu et al., Stem Cell Rev., 2010 Dec 22. [Epub ahead of print]

【非特許文献11】 Kang, Korean J. Pediatr., 53: 786-789 (2010)

【非特許文献12】 Carvajal-Vergara et al., Nature, 465: 808-812 (2010)

【非特許文献13】 Raya et al., Nature, 460: 53-59 (2009)

【非特許文献14】 Maehr et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 106: 15768-15773 (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、ミトコンドリア病患者から多能性幹細胞を得ること、及びヒトミトコンドリア病のための新薬発見に有用なin vitroヒトミトコンドリア病モデルのための細胞ソース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、mtDNA A3243G変異を有する患者から得られた線維芽細胞を4つの初期化遺伝子 (Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc) でトランスフェクトして、Mt-iPS細胞を樹立した。驚くべきことに、Mt-iPS細胞は、二峰性の変異ヘテロプラスミーの程度を示した。該変異の頻度は、14クローンのうち6クローンでは検出できないレベル (<2%) まで低下した一方、その他のクローンでは、もとの線維芽細胞の変異頻度 (18~24%) と比較して数

10

20

30

40

50

倍増大した変異頻度（51～87％）を示した。幹細胞の特性は、変異-フリー Mt-iPS細胞と変異-リッチ Mt-iPS細胞との間で区別できなかった。細胞の連続継代培養の間、又は自発的分化の後、変異-フリー Mt-iPSクローンでは変異の再発は観察されず、変異-リッチ Mt-iPSクローンでは、ヘテロプラスミーレベルに有意な変化は見られなかった。

【0008】

本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

【0009】

即ち、本発明は以下のとおりのものである。

[1] ミトコンドリア病を引き起こすミトコンドリアDNA変異を有する患者から得られた体細胞から、該変異の頻度が該体細胞と比較して増大した、又は検出できないレベルまで低下したiPS細胞を製造する方法であって、

(1) 該患者から得られた体細胞を初期化物質と接触させる工程；

(2) 細胞培養物からiPS細胞コロニーを選択する工程；及び

(3) iPS細胞の該変異の頻度を決定する工程

を含む、方法。

[2] 変異が、3243位におけるアデニンからグアニンへの置換（A3243G）である、上記 [1] に記載の方法。

[3] ミトコンドリア病が糖尿病を伴う、上記 [1] 又は [2] に記載の方法。

[4] 核初期化物質が、Octファミリーメンバー、Soxファミリーメンバー、Klf4ファミリーメンバー、Mycファミリーメンバー、Linファミリーメンバー及び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 [1] ～ [3] のいずれかーに記載の方法。

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

[6] 核初期化物質が、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc若しくはL-Myc、又はそれらをコードする核酸である、上記 [4] に記載の方法。

[7] ミトコンドリア病を引き起こすミトコンドリアDNA変異を有する患者から得られた体細胞から樹立された、該変異の頻度が該体細胞と比較して増大したiPS細胞。

[8] 変異が、3243位におけるアデニンからグアニンへの置換（A3243G）である、上記 [7] に記載のiPS細胞。

[9] ミトコンドリア病が糖尿病を伴う、上記 [7] 又は [8] に記載のiPS細胞。

[10] 上記 [7] ～ [9] のいずれかーに記載のiPS細胞を体細胞に分化させることを含む、ミトコンドリア病モデル細胞の製造方法。

[11] 体細胞が、膵β細胞、神経細胞、心筋細胞又は骨格筋細胞である、上記 [10] に記載の方法。

[12] 上記 [10] 又は [11] に記載の方法から得られた、ミトコンドリア病モデル細胞。

[13] ミトコンドリア病の治療及び／又は予防剤をスクリーニングする方法であって、

(1) 上記 [12] に記載のミトコンドリア病モデル細胞を被検物質と接触させる工程；

(2) 該細胞におけるミトコンドリア病の1以上の表現型を決定する工程；及び

(3) 被検物質不在下と比較して、少なくとも1の表現型を改善した被検物質を、ミトコンドリア病の治療及び／又は予防剤の候補として選択する工程を含む、方法。

[14] ミトコンドリア病を引き起こすミトコンドリアDNA変異を有する患者から得られた体細胞から樹立された、該変異の頻度が検出できないレベルまで低下したiPS細胞。

[15] 上記 [14] に記載のiPS細胞を体細胞に分化させることを含む、ミトコンドリア病の治療及び／又は予防剤の製造方法。

[16] 体細胞が、膵β細胞、神経細胞、心筋細胞又は骨格筋細胞である、上記 [15] に記載の方法。

[17] 上記 [15] 又は [16] に記載の方法により得られた、体細胞。

10

20

30

40

50

[18] 上記 [17] に記載の体細胞を含む、ミトコンドリア病の治療及び／又は予防剤。

[19] 上記 [17] に記載の体細胞をミトコンドリアDNAに変異を有する患者に移植することを含む、ミトコンドリア病の治療又は予防方法。

[20] ミトコンドリア病の治療及び／又は予防剤の製造のための、上記 [14] に記載のiPS細胞の使用。

[21] ミトコンドリア病の治療及び／又は予防剤のソースとしての、上記 [14] に記載のiPS細胞。

【0010】

変異-リッチ Mt-iPS細胞は、in vitroヒトミトコンドリア病モデルのための好適な細胞ソースを提供し得る。さらに、変異-フリーiPS細胞は、自家移植療法のために、制限のない無病の細胞供給を提供し得る。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、Mt-iPS細胞におけるmtDNA変異頻度を示す。患者由来の血液細胞 (Mt1-blood及びMt2-blood)、線維芽細胞 (Mt1-fibro及びMt2-fibro)、及びMt-iPSクローン (Mt1-1~Mt1-4及びMt2-1~Mt2-10) のmtDNA A3243G変異頻度。Mt-iPS細胞を採取した際の継代数は以下のとおりであった：Mt1-1：継代 (p) 12、Mt1-2：p17、Mt1-3：p17、Mt1-4：p14、Mt2-1：p9、Mt2-2：p8、Mt2-3：p10、Mt2-4：p9、Mt2-5：p10、Mt2-6：p10、Mt2-7：p7、Mt2-8：p7、Mt2-9：p9、Mt2-10：p11。

【図2】図2は、作製したMt-iPS細胞の特性評価を示す。(A) マウス線維芽細胞STO細胞株 (SNL) フィーダー細胞上で増殖させたMt-iPS細胞 (Mt2-3及びMt2-6) コロニーは、ヒトES細胞様の形態を示した。アルカリホスファターゼ活性の検出、及び多能性マーカーSS EA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、NANOG及びSSEA-1の存在についての免疫蛍光分析を示す。スケールバー=200 μ m。(B) 22継代でのMt-iPS細胞 (Mt2-3及びMt2-6) の核型分析。

【図3】図3は、in vitro及びin vivo分化によるMt-iPS細胞の多能性を示す。(A) Mt-iPS細胞 (Mt2-3及びMt2-6) のin vitro分化により、3つの一次胚葉すべての細胞誘導体が生じる可能性が明らかとなる。免疫蛍光分析により、神経外胚葉マーカー (β 3-チューブリン)、中胚葉マーカー (α -SMA) 及び内胚葉マーカー (FOXA2) の発現を示す。核染色 (DAPI) とのオーバーレイを示す。スケールバー=100 μ m。(B) Mt-iPS細胞 (Mt1-2及びMt1-3) をSCIDマウスの精巣に注入した後、テラトーマ形成が生じた。テラトーマ切片のヘマトキシリン・エオジン染色は、外胚葉誘導体 (色素上皮細胞)、中胚葉誘導体 (軟骨) 及び内胚葉誘導体 (腸管様の腺状構造) を示す。スケールバー=100 μ m。

【図4】図4は、Mt-iPS細胞において、培養継代数及び分化がmtDNA変異頻度に及ぼす影響を示す。(A) 様々な培養継代数の未分化Mt-iPSクローンにおけるmtDNA A3243G変異頻度。(B) 未分化 (UD) 及び分化EB (EB) 状態のMt-iPSクローンにおけるmtDNA A3243G変異頻度。培養継代数は括弧に示す。

【図5】図5は、Mt-iPS細胞におけるmtDNA含量を示す。血液細胞 (点線棒グラフ)、線維芽細胞 (斜線棒グラフ)、変異-フリーiPSクローン (白色棒グラフ) 及び変異-リッチiPSクローン (黒色棒グラフ) におけるmtDNA含量 (コピー/細胞)。2つのヒトES細胞株 (H9及びKhES1) 及び2つのヒトiPS細胞株 (B7及びG1) 由来のmtDNAも示す (白色棒グラフ)。およそp30のMt-iPS細胞を胚様体形成のために使用し、mtDNA含量 (Mt2-3 EB及びMt2-6 EB) を分析した。

【図6】図6は、mtDNAにA3243G変異を有する同一患者から樹立された変異-リッチ Mt-iPSクローン (Mt2-5) 及び変異-フリー Mt-iPSクローン (Mt2-4) から胚様体を誘導し、該胚様体における、mtDNAによりコードされる呼吸鎖複合体に關与するタンパク質の産生量を示す。

【図7】図7は、変異-リッチ Mt-iPSクローン (Mt2-5) 及び変異-フリー Mt-iPSクローン (Mt2-4) から腸管及び膵臓内分泌細胞への分化を示す。

【0012】

[発明の詳細な説明]

本発明は、ミトコンドリアDNA (mtDNA) に変異を有する患者由来の体細胞を初期化することを含む、mtDNA変異頻度がもとの体細胞と比較して増大したミトコンドリア病特異的iPS (Mt-iPS) 細胞、又は実質的に該変異を有さない（即ち、該変異の頻度が検出できないレベルまで低下した）Mt-iPS細胞の製造方法を提供する。

【0013】

1. 体細胞の提供者及び体細胞ソース

本発明の方法は、iPS細胞が樹立されているか、樹立可能である、任意の哺乳動物において適用することができ、例えば、ヒト、マウス、サル、ブタ、ラット、イヌ等が挙げられるが、好ましくはヒトである。

【0014】

ミトコンドリア病は、mtDNAの異常に起因する場合と、核ゲノムDNAの異常に起因する場合とがあるが、本発明における体細胞の提供者となる患者は、ミトコンドリア病を引き起こす変異をmtDNA内に有する哺乳動物である。例えば、狭義のミトコンドリア病のうち、ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様発作症候群 (MELAS)、カーンズ・セイヤー (Kearns-Sayre) 症候群 (KSS) 及びリー (Leigh) 脳症が全体の70%を占め、臨床病型分類における三大病型と考えられている。MELAS患者の80%がA3243G変異を有し、100%がT3274変異を有する。KSSについては、欧米ではA3243G変異が最も多いと報告されているが、日本では大規模欠失変異が多いとされている。リー脳症の原因遺伝子異常は多彩であるが、mtDNAのATPaseサブユニット6遺伝子内のT8993G変異が重症型として知られている。狭義のミトコンドリア病患者ではないが、糖尿病や難聴などの臨床像を示す患者の多く（全糖尿病患者の約2%；日本では約13万人）はA3243G変異を有する。A3243G変異はロイシン転移RNA (tRNA) 遺伝子における変異である。この変異は、tRNAの三次元構造に異常をもたらし、翻訳過程でのロイシン付加反応が低下する。結果として、mtDNA上の遺伝子によりコードされるすべてのタンパク質量が減少することによりミトコンドリア機能に異常をきたす。従って、本発明の好ましい一実施態様においては、A3243G変異を挙げることができるが、本発明の方法は、mtDNA上のいかなる変異についても適用可能である。

【0015】

提供者となる患者の臨床病型も特に限定されず、MELAS、KSS、リー脳症や、mtDNA変異を伴う糖尿病などを挙げることができる。mtDNA変異を有している限り、未だ症候の現れていない哺乳動物を体細胞の提供者としてもよい。

【0016】

本発明において使用する「体細胞」としては、mtDNA変異を有する患者から得られた、生殖細胞以外のいかなる細胞も用いることができる。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、例えば神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）が挙げられる。

【0017】

患者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

10

20

30

40

50

えば、約5～20%の胎仔ウシ血清（FCS）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（さらに必要に応じて、下記のiPS細胞の樹立効率改善物質）と体細胞との接触に際し、例えば、カチオニックリポソームなどの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。

【0018】

2. iPS細胞の製造

iPS細胞は、ある特定の核初期化物質を、核酸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である（K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) Cell, 126: 663-676; K. Takahashi et al. (2007) Cell, 131: 861-872; J. Yu et al. (2007) Science, 318: 1917-1920; M. Nakagawa et al. (2008) Nat. Biotechnol., 26: 101-106; WO 2007/069666）。核初期化物質は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子若しくはES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子、又はその遺伝子産物であれば良い。例えば、Octファミリーメンバー（例、Oct3/4）、Klfファミリーメンバー（例、Klf4、Klf1、Klf2、Klf5）、Soxファミリーメンバー（例、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Sox18）、Mycファミリーメンバー（c-Myc、L-Myc、N-Myc）、Linファミリーメンバー（例、Lin28、Lin28b）、GLISファミリーメンバー（例、GLIS1、GLIS2、GLIS3）、TERT、SV40 Large T antigen、HPV16 E6、HPV16 E7、Bmi1、Nanog、Esrrb又はEsrrgが挙げられる。これらの初期化物質は、iPS細胞樹立の際には、組み合わされて使用されてもよい。例えば、これらの初期化物質を、少なくとも1つ、2つ若しくは3つ含む組み合わせであり、好ましくは4つを含む組み合わせである。

【0019】

上記の各核初期化物質のマウス及びヒトcDNAのヌクレオチド配列並びに該cDNAにコードされるアミノ酸配列情報は、WO 2007/069666に記載のNCBI accession numbersを参照することにより取得できる。L-Myc、GLIS1、GLIS2、GLIS3、Lin28、Lin28b、Esrrb及びEsrrgのマウス及びヒトのcDNA配列及びアミノ酸配列情報については、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、当該cDNA配列又はアミノ酸配列情報に基づいて、常法により所望の核初期化物質を調製することができる。

遺伝子名	マウス	ヒト
L-Myc	NM_008506	NM_001033081
GLIS1	NM_147221	NM_147193
GLIS2	NM_031184	NM_032575
GLIS3	NM_175459	NM_001042413
Lin28	NM_145833	NM_024674
Lin28b	NM_001031772	NM_001004317
Esrrb	NM_011934	NM_004452
Esrrg	NM_011935	NM_001438

【0020】

これらの核初期化物質は、タンパク質の形態で、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチドとの結合、マイクロインジェクションなどによって体細胞内に導入してよい。あるいは、DNAの形態で、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、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、体細胞内に導入してよい。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター（以上、Cell, 126, pp.663-676, 2006; Cell, 131, pp.861-872, 2007; Science, 318, pp.1917-1920, 2007）、アデノウイルスベクター（Science, 322, 945-949, 2008）、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター（Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci. 85, 348-62, 2009）などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体

(BAC、PAC) などが含まれる。プラスミドベクターとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用し得る (Science, 322: 949-953, 2008及びWO 2009/032456)。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、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができる。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)、 β -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、上記発現ベクターには、体細胞への導入後、核初期化物質をコードする遺伝子若しくはプロモーターとそれに結合する核初期化物質をコードする遺伝子を共に切除するために、それらの前後にloxP配列を有してもよい。さらに、上記発現ベクターは、エピソームに存在するように (即ち、染色体への取り込みがされなくとも複製されるように)、EBNA-1遺伝子及びoriP配列若しくはLarge T antigen遺伝子及びSV40ori配列を含むこともできる。

【0021】

核初期化に際して、iPS細胞の誘導効率を高めるために、上記の因子の他に、例えば、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 [例えば、バルプロ酸 (VPA) (Nat. Biotechnol., 26 (7): 795-797 (2008))、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及びshRNA (例、HDAC1 siRNA Smartpool^o (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) (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及び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及びshRNA (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、p27S、p53DDなどのp53ドミナントネガティブ体、ピフィスリン (PFT) - α 、- β 、- μ 等の低分子阻害剤 (WO 2009/157593)]、Wnt Signaling stimulator (例えば、soluble Wnt3a) (Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008))、LIF又はbFGFなどのサイトカイン、ALK5阻害剤 (例えば、SB431542) (Nat Methods, 6: 805-8 (2009))、mitogen-activated protein kinase signalling阻害剤、glycogen synthase kinase-3阻害剤 (PloS Biology, 6 (10), 2237-2247 (2008))、miR-291-3p、miR-294、miR-295などのmiRNA (R.L. Judson et al., Nat. Biotech., 27: 459-461 (2009)) 等を使用することができる。

【0022】

iPS細胞誘導のための培養培地としては、例えば (1) 10~15%FBSを含有するDMEM、DME M/F12又はDME培地 (これらの培地はさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを含むことができる。)、(2) bFGF又はSCFを含有するES細胞培養用培地、例えばマウスES細胞培養用培地 (例えば、TX-WES培地、トロンボX社) 又は霊長類ES細胞培養用培地 (例えば、霊長類 (ヒト&サル) ES細胞用培地、リプロセル、京都、日本)、などが含まれる。このとき、iPS細胞の誘導効率を高めるために、低タンパク質培地又は細胞周期停止剤含有培地を用いても良い (WO 2010/004989)。

【0023】

一培養法においては、例えば、10%FBS含有DMEM又はDMEM/F12培地上で体細胞と核初期化物質 (核酸又はタンパク質) を接触させ、約4~約7日間、37°C、5%CO₂存在下にて培養し、その後、細胞をフィーダー細胞 (例えば、マイトマイシンC処理した、STO細胞、SNL細胞及び他の細胞など) 上にまきなおし、体細胞と核初期化物質の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培地で再び培養し、それにより該接触から約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。また、iPS細胞の誘導効率を高めるために、5~10%と低い酸素濃度の条件下で体細胞を培養してもよい (WO 2010/013

10

20

30

40

50

845)。

【0024】

あるいは、フィーダー細胞（例えば、マイトマイシンC処理した、STO細胞、SNL細胞及び他の細胞など）上で10%FBS含有DMEM培地（これはさらに、LIF、ペニシリン／ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを含むことができる）で細胞を培養してもよく、それにより約25～約30日又はそれ以上の後にES様コロニーを生じさせることができる。

【0025】

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

【0026】

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

【0027】

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（又はOct3/4）レポーター陽性（ピューロマイシン耐性、GFP陽性など）及び目視によるES細胞様コロニーの形成によっても行い得る；しかし、より正確を期すために、アルカリホ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。

【0028】

3. Mt-iPS細胞におけるmtDNAの変異頻度の同定

本発明は、mtDNAに変異を有する患者由来の体細胞から樹立されるiPS細胞クローンは、二峰性の変異ヘテロプラスミーの程度を示す、すなわち、あるクローンは、もとの体細胞と比較して該変異の頻度が増大しており（変異-リッチ Mt-iPS細胞）、その他のクローンは実質的に該変異を有さない（変異-フリー Mt-iPS細胞）との発見に基づく。従って、本発明によれば、従来の疾患特異的iPS細胞の樹立と同様の方法により、疾患の原因となる遺伝子異常がより蓄積された疾患モデル細胞のソースと、正常なミトコンドリア機能を有する、もとの体細胞の提供者への自家移植用細胞のソースとが同時に提供され得る。

【0029】

よって、本発明の方法は、変異-リッチ Mt-iPS細胞と変異-フリー Mt-iPS細胞とを決定するために、該細胞におけるmtDNAの変異頻度を測定する工程をさらに含む。

【0030】

mtDNAの変異頻度を測定する方法は公知である。例えば、Nat Biotechnol. 1999; 17: 292-296、Clin Biochem. 2004; 37: 268-276、Jpn J Ophthalmol. 2006; 50: 128-134等に記載のインベーターアッセイ等が好ましく利用されるが、当該分野で公知の他のいかなる方法を用いてもよい。試験Mt-iPS細胞が変異-フリーであることの確認には、例えば、PCR-RFLP法や蛍光相関分光法（FCS）（Biophys J. 2000; 79: 2858-2866、Diabetologia. 1994; 37: 504-510、N Engl J Med. 1994; 330: 962-968などを参照）を用いることができる。

【0031】

4. 他のミトコンドリア病特異的多能性幹細胞の製造方法

本発明のMt-iPS細胞における変異頻度が二峰性を示すのは、mtDNAの変異頻度が世代を経る際に、ヘテロプラスミーからホモプラスミーへと急速に変化する、急調分離現象が*in vitro*で再現されているためと考えられる。急調分離を説明するためのモデルはいくつか提唱されている。体細胞、成熟卵細胞、初期胚では、 $10^3 \sim 10^4$ コピーのmtDNAが存在するが、始原生殖細胞では10~100コピーに一時的に減少する（mtDNA ボトルネック効果）ことが知られている。ES細胞の調製においても、内部細胞塊（ICM）からES細胞へと変化する際に、mtDNAのコピー数が急減することが報告されている。これらの知見から、ミトコンドリア病患者由来の初期胚から樹立したES細胞（Mt-ES細胞）もまた、同様にmtDNAの変異頻度が二峰性を示すと考えられる。

10

【0032】

不妊治療における体外受精では、病原性変異を有する家系に対して着床前診断（PGD）を行い、受精卵が病原性変異を有する場合は余剰胚として処理される場合がある。海外ではこのような病原性変異を有する余剰胚から樹立したヒトES細胞が、疾患特異的ES細胞として医薬研究に利用されている。従って、mtDNA変異が発見され、余剰胚となった初期胚から、Mt-ES細胞を取得することができる。

【0033】

ES細胞の作製方法としては、例えば、哺乳動物の胚盤胞ステージにおける内部細胞塊を培養する方法（例えば、Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1994)を参照）などが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0034】

得られたES細胞の各クローンについて、上記3.と同様にして、Mt-ES細胞におけるmtDNAの変異頻度を測定し、変異-リッチ Mt-ES細胞と変異-フリー Mt-ES細胞とを決定することができる。

【0035】

5. 多能性幹細胞からの体細胞の分化誘導方法

上記のようにして得られたミトコンドリア病特異的多能性幹細胞は、自体公知の分化誘導法を用いて、所望の体細胞・組織に分化させることができる。ミトコンドリア病の罹患臓器は、糖尿病患者における膵β細胞、神経、心筋、骨格筋など多岐に及ぶ。mtDNA変異が蓄積された変異-リッチ Mt-iPS/ES細胞をこれら病態の発現し得る臓器の細胞・組織に分化させることにより、ミトコンドリア病のモデル細胞として、創薬スクリーニングの有用なツールとすることができる。一方、mtDNA変異が消失した変異-フリー Mt-iPS/ES細胞を、該細胞の由来する体細胞の提供者である患者の罹患臓器の細胞・組織に分化させることにより、正常なミトコンドリア機能を有する、自己の細胞・組織を作り出すことができる。従って、これらの細胞・組織を自家移植することにより、ミトコンドリア病の治療を行うことが可能となる。

30

【0036】

Mt-iPS/ES細胞を膵β細胞に分化誘導する方法としては、例えば、特開2004-121165、Cell Res. 2009 Apr ; 19 (4) : 429-38、Sci China C Life Sci, 2009 Jul ; 52 (7) : 615-21等に記載の方法が挙げられる。神経細胞に分化誘導する方法としては、例えば、特開2002-291469、Cell Mol Life Sci. 2010 Nov ; 67 (22) : 3837-47、Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Mar 2 ; 107 (9) : 4335-40、Stem Cells. 2009 Oct ; 27 (10) : 2427-34、Stem Cells. 2009 Apr ; 27 (4) : 806-11、Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Apr 15 ; 105 (15) : 5856-61等に記載の方法が挙げられる。心筋細胞に分化誘導する方法としては、例えば、Nature. 2008 May 22 ; 453 (7194) : 524-8. Epub 2008 Apr 23.、Exp Cell Res. 2010 Oct 1 ; 316 (16) : 2555-9、Circulation. 2009 Oct 13 ; 120 (15) : 1513-23、Cell Biol Int. 2009 Nov ; 33 (11) : 1184-93、Cell Physiol Biochem. 2009 ; 24 (1-2) : 73-86、Circ Res. 2009 Feb 27 ; 104 (4) : e30-41、Circulation. 2008 Jul 29 ; 118 (5) : 498-506、Circulation. 2008 Jul 29 ; 118 (5) : 507-17等に記載の方法が挙げられ

40

50

る。骨格筋細胞に分化誘導する方法としては、例えば、FASEB J. 2010 Jul ; 24 (7) : 22 45-53等に記載の方法が挙げられる。

【0037】

また、上記のようにして得られる体細胞から組織を構築することもできる。例えば、心筋細胞から心筋組織を構築する場合、アスコルビン酸処理した胚様体からPercollグラジエントにて心筋細胞を純化し、I型コラーゲンとマトリゲル存在下で培養して、心筋組織を構築することができる (Circulation 2006 ; 113 : 2237) 。他の組織についても、生体適合性 (生分解性) の適当なスキャフォールド上へ細胞を播種・生着させることにより、適切な三次元構造を有する組織体を作製することができる。スキャフォールドとしては、多孔性の焼結体や、スポンジ、メッシュ、ゲルなどが用いられている。

10

【0038】

6. 変異-リッチ Mt-iPS/ES細胞を用いたミトコンドリア病予防・治療薬のスクリーニング

本発明は、前述のようにして得られた変異-リッチ Mt-iPS/ES細胞由来の体細胞、好ましくは膵β細胞、神経細胞、心筋細胞、骨格筋細胞若しくはそれらにより構築される組織と被検物質とを接触させ、該細胞若しくは組織が発現するミトコンドリア病の病態を改善させる、即ち、正常細胞若しくは組織の形質 (phenotype) に近づけるように該細胞若しくは組織を変化させるか、あるいは当該病態の発現を阻止若しくは遅延させる被検物質を候補物質として選択することを含む、ミトコンドリア病の予防及び／又は治療薬の候補物質をスクリーニングする方法を提供する。

【0039】

本発明における被検物質は、いかなる公知化合物及び新規化合物であってもよく、例えば、核酸、糖質、脂質、蛋白質、ペプチド、有機低分子化合物、コンビナトリアルケミストリー技術を用いて作製された化合物ライブラリー、固相合成やファージディスプレイ法により作製されたランダムペプチドライブラリー、及び微生物、動植物、海洋生物等由来の天然成分等が挙げられる。

20

【0040】

スクリーニングは、例えば、被検物質の存在下及び不在下にて、体細胞におけるATP合成、酸素消費、乳酸／ピルビン酸比、及びミトコンドリアマトリクスの酸化還元電位を測定し、被検物質の存在下で測定した値と被検物質の不在下で測定した値とを比較し、該測定値を改善した (正常値により近づけた) 被検物質をミトコンドリア病の予防及び／又は治療薬の候補物質として選択することにより実施できる。

30

【0041】

特に、体細胞が膵β細胞である場合、インスリン分泌量の改善、インスリン感受性の改善等の膵β細胞機能の改善を指標とすることができる。また、体細胞が神経細胞である場合、脱髄、グリア変性、壊死の程度の改善を指標とすることができる。体細胞組織が心筋組織の場合、ミトコンドリア病の予防及び／又は治療薬の候補物質は、被検物質と接触させない場合の心筋組織と、被検物質と接触させた場合の心筋組織とで、1) 筋収縮力、2) 心筋細胞の脱落、及び3) 線維化を比較し、被検物質存在下の筋収縮力の低下、心筋細胞の脱落、及び線維化の程度が、不在下のそれらよりも軽度である場合に、該被検物質を候補物質として選択することにより得ることができる。体細胞・組織が骨格筋細胞・組織の場合、ミトコンドリア病の予防及び／又は治療薬の候補物質は、赤ボロ線維 (RRF) 染色やコハク酸脱水素酵素 (SDH) 活性染色、シトクロムCオキシダーゼ (COX) 染色により、RRFの減少やSDH活性の低下やCOX活性の増加を指標として、選択することができる。

40

【0042】

7. ミトコンドリア病の予防及び治療剤

上記のスクリーニング法により選択された物質は、ミトコンドリア病の予防及び／又は治療剤として使用し得る。

【0043】

有効成分である選択された物質は、そのまま又は適当な剤形の医薬組成物として経口又は非経口投与のために製剤化できる。投与のために使用される医薬組成物は、選択された

50

物質と、薬理学的に許容される担体、希釈剤又は賦形剤を含んでよい。

【0044】

経口投与のための組成物としては、固体又は液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が挙げられる。注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。これらの製剤は、賦形剤（例えば、乳糖、白糖、葡萄糖、マンニトール、ソルビトールのような糖誘導体；トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、 α 澱粉、デキストリンのような澱粉誘導体；結晶セルロースのようなセルロース誘導体；アラビアゴム；デキストラン；プルランのような有機系賦形剤；及び、軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アルミニウム酸マグネシウムのような珪酸塩誘導体；リン酸水素カルシウムのようなリン酸塩；炭酸カルシウムのような炭酸塩；硫酸カルシウムのような硫酸塩等の無機系賦形剤である）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムのようなステアリン酸金属塩；タルク；コロイドシリカ；ビーズワックス、ゲイ蠟のようなワックス類；硼酸；アジピン酸；硫酸ナトリウムのような硫酸塩；グリコール；フマル酸；安息香酸ナトリウム；DLロイシン；ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウムのようなラウリル硫酸塩；無水珪酸、珪酸水和物のような珪酸類；及び、上記澱粉誘導体である）、結合剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、及び前記賦形剤である）、崩壊剤（例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセルロース、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、内部架橋カルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース誘導体；カルボキシメチルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾されたデンプン・セルロース類である）、乳化剤（例えば、ベントナイト、ビーガムのようなコロイド性粘土；水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウムのような金属水酸化物；ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸カルシウムのような陰イオン界面活性剤；塩化ベンザルコニウムのような陽イオン界面活性剤；及び、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステルのような非イオン界面活性剤である）、安定剤（メチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類；クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール、クレゾールのようなフェノール類；チメロサール；デヒドロ酢酸；及びソルビン酸である）、矯味矯臭剤（例えば、通常使用される、甘味料、酸味料、香料等である）、希釈剤等の添加剤を用いて周知の方法で製造され得る。

【0045】

本発明のミトコンドリア病予防・治療剤の有効成分の投与量は、患者の症状、年齢、体重等の種々の条件により変化するが、例えば、経口投与の場合、有効成分は、通常、1回当たり0.1 mg以上（好適には0.5 mg以上）、1000 mg以下（好適には500 mg以下）を成人に対して1日当たり1乃至6回投与される。非経口的投与の場合には、1回当たり0.01 mg以上（好適には0.05 mg以上）、100 mg以下（好適には50 mg以下）を投与することができる。症状が特に重篤な場合には、症状に応じて投与量を増加させてよい。

【0046】

さらに、本発明のミトコンドリア病予防・治療剤は、他の薬剤、例えば、糖尿病治療薬（例、インスリン等）、L-アルギニン、カルニチン、ウリジン、ビタミンC、ビタミンE、ビタミンK、コエンザイムQ、コハク酸、シトクロムC、ピルビン酸、ジクロロ酢酸などと併用してもよい。本発明のミトコンドリア病予防・治療剤及びこれらの他の薬剤は、同時に、順次又は別個に投与することができる。

【0047】

8. 変異-フリー Mt-iPS/ES細胞を用いた自家移植療法

変異-フリー Mt-iPS/ES細胞から分化誘導された体細胞は、医薬上許容される担体と混

10

20

30

40

50

合することにより、注射剤、懸濁剤、点滴剤等の非経口製剤として製造され得る。当該非経口製剤に含まれ得る医薬上許容される担体としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の等張化剤を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などの注射用の水性液を挙げることができる。本発明の非経口製剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸塩緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤、酸化防止剤などをさらに含んでも良い。本発明の剤を水性懸濁液剤として製剤化する場合、上記水性液の一つに細胞密度が約 1×10^6 ～約 1×10^8 細胞/mLとなるように体細胞を懸濁させる。本発明の剤は、幹細胞の凍結保存に通常使用される条件下で凍結保存し、用時融解できる。その場合、本発明の剤は、血清若しくはその代替物、有機溶剤（例、DMSO）等をさらに含んでもよい。血清若しくはその代替物の濃度は、特に限定されるものではないが、約1～約30%（v/v）、好ましくは約5～約20%（v/v）であり得る。有機溶剤の濃度は、特に限定されるものではないが、0～約50%（v/v）、好ましくは約5～約20%（v/v）であり得る。

【0048】

このようにして得られる製剤は、安定で低毒性であるので、ヒトなどの哺乳動物に対して安全に投与することができる。投与方法は特に限定されないが、好ましくは注射若しくは点滴投与であり、標的臓器内に投与され得る。あるいは、製剤を生体適合性のゲルに包埋して患部に適用することも出来る。例えば、1回につき体細胞量として約 1.0×10^5 ～約 1.0×10^7 細胞量の剤を単回若しくは約1～約2週間隔で2～10回投与すると通常都合がいい。

【0049】

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。

【実施例】

【0050】

[実施例1. mtDNA A3243G変異を有する糖尿病患者由来のiPS細胞の作製]

mtDNA A3243G変異を保因する日本人糖尿病患者2人から皮膚生検を得た。患者1（Mt1）は38歳男性であり、患者2（Mt2）は46歳女性であった。患者の臨床データを表1に示す。

【0051】

【表1】

表1. Mt1-iPS 及び Mt2-iPS 細胞株作製のために用いた患者の情報

患者	年齢/ 性別	家族歴	mtDNA 変異	臨床的異常	ボディマス インデックス	薬物治療	HbA1c
Mt1	38/ 男性	母：糖尿病 及び心筋症	A3243G	糖尿病	18	インスリン 33 単位／日	7.8
Mt2	46/ 女性	母：糖尿病	A3243G	糖尿病、 感音声難聴、 癲癇、 心筋症	22	インスリン 30 単位／日 バルプロ酸 600 mg／日	6.6

【0052】

Mt1は、31歳の時に、のどの渇き、多飲、多尿、疲労感及び体重減少を示した。血糖濃度は692 mg/dl (3.84 mmol/l) であり、ヘモグロビンA1c（HbA1c）レベルは14.3%であった。彼は、糖尿病コントロールを改善するインスリン療法を開始した。Mt2は、24歳の時に妊娠性糖尿病と診断された。同時に、進行性の聴覚障害を呈した。27歳から癲癇に罹患し、バルプロ酸で治療を受けている。31歳の時に糖尿病性ケトアシドーシスを発症し、インスリン療法を開始した。患者はともに、母親の糖尿病家族歴が陽性であった。A3243GミトコンドリアDNA変異は、両方の患者由来の末梢血ゲノムDNAから増幅したポリメラーゼ連鎖反応（PCR）産物をシーケンシングすることにより同定した（データ示さず）。

【0053】

皮膚生検は、京都大学倫理委員会による承認を受けたプロトコルの下、インフォームドコンセント後に実施した。4 mmの皮膚サンプルを外科用メスでさらに小片に切り、組織断片を組織培養ディッシュに入れ、上に滅菌カバーガラスを置いた。培地（10%FBS及びペニシリン／ストレプトマイシンを添加したDMEM；Invitrogen, Carlsbad, CA）を添加してカバーガラスを完全に浸し、加湿インキュベーター（5%CO₂）中、37℃でディッシュをインキュベートした。線維芽細胞が組織断片から伸びて増殖し、十分多くなった時に、細胞をトリプシン処理し、増殖させた。Mt1及びMt2の皮膚生検から、それぞれ2つの線維芽細胞株（Mt1-fibro及びMt2-fibro）を得た。

【0054】

iPS細胞の作製は、Ohnukiらのプロトコルに従って実施した [Curr Protoc Stem Cell Biol. 2009 ; Chapter 4 : Unit 4A 2] 。簡単に述べると、マウスエクトロピックレトロウイルスレセプターSlc7a1遺伝子 (Addgene, www.addgene.org) を、24時間、レンチウイルスを感染させることにより、患者由来の線維芽細胞に導入した。pMXs-hOCT3/4、pMXs-hSOX2、pMXs-hKLF4、pMXs-hc-MYC (Addgene) でのトランスフェクションを介して、Plat-Eパッケージング細胞中、24時間、レトロウイルス産生を行った [Gene Ther. 2000 ; 7 : 1063-1066] 。次いで、マウスSlc7a1遺伝子を発現する線維芽細胞にレトロウイルスカクテルを感染させた。翌日、培地を10%FBS添加DMEMに置換した。形質導入6日後、感染線維芽細胞をSNLフィーダー細胞上にまきなおした [Int J Dev Biol. 1990 ; 48 : 1149-1154] 。翌日、培地を4 ng/ml bFGF (Wako, Osaka, Japan) 添加ヒト胚性幹 (ES) 培地 (ReproCELL ; ReproCELL, Tokyo, Japan) に置換し、2日ごとに培地交換した。感染4週間後から、ヒトES細胞コロニーとの形態的類似性に基づいてコロニーを選別し、6ウェルプレート中、SNLフィーダー細胞上に移した：このステージを1継代と定義した。Mt1-fibro及びMt2-fibroから、それぞれ4 (Mt1-1~1-4) 及び10 (Mt2-1~2-10) の推定iPS (Mt-iPS) クローンを単離できた。SNLフィーダー上で培養を維持し、0.1 mg/ml IV型コラゲナーゼとともに0.25%トリプシンを用いて、5~7日ごとに酵素的に継代した。

【0055】

[実施例2. Mt-iPS細胞におけるmtDNA変異頻度]

患者由来の血液細胞、線維芽細胞 (Mt1-fibro及びMt2-fibro) 及び推定iPSクローン (Mt1-1~1-4及びMt2-1~2-10) におけるヘテロプラスミーの存在及びレベルを評価した。Mt-iPS細胞におけるmtDNA A3242G変異のヘテロプラスミーの程度を定量化するために、インバーダーアッセイを適用した [Nat Biotechnol. 1999 ; 17 : 292-296, Clin Biochem. 2004 ; 37 : 268-276, Jpn J Ophthalmol. 2006 ; 50 : 128-134] 。インバーダーアッセイのためにMt-iPS細胞を採取した際の継代数は以下のとおりであった：Mt1-1：継代 (p) 12；Mt1-2：p17；Mt1-3：p17；Mt1-4：p14；Mt2-1：p9；Mt2-2：p8；Mt2-3：p10；Mt2-4：p9；Mt2-5：p10；Mt2-6：p10；Mt2-7：p7；Mt2-8：p7；Mt2-9：p9；Mt2-10：p11。

【0056】

A3243Gヘテロプラスミーの検出に使用したプライマリープローブ及びインバーダーオリゴは以下のとおりである；

3243Aのプライマリープローブ：

5' -CGCGCCGAGGAGCCCGTAATCGC<アミノ>-3'、

3243Gのプライマリープローブ：

5' -ACGGACGCGGAGGGCCCGTAATCGC<アミノ>-3'、

共通のインバーダーオリゴ：

5' -CCCACCCAAGAACAGGGTTTGTTAAGATGGCAGT-3'。

【0057】

プライマリープローブの下線配列は、インバーダー反応の5'フラップを示す。切断酵素、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) プローブ、シグナルプローブ及びインバーダーオリゴを、プライマリープローブ／インバーダーオリゴ結合領域を含む希釈プラスミドを含むマイクロプレートに添加し、次いで、既報のとおりインバーダーアッセイを実施した [Int J Hematol. 2009 ; 89 : 482-488] 。蛍光マイクロプレートリーダー (FluoDia-T70 ; Ots

uka Electronics, Osaka, Japan) でプレートを63°Cでインキュベートした。3243Aに対するFAM (カルボキシフルオレセイン) 蛍光値 (波長/バンド幅: 励起、485/20 nm; 発光、530/25 nm)、及び3243Gに対するRED (REDmond RED) 蛍光値 (励起、560/20 nm; 発光、620/40 nm) を、2分ごとに4時間測定した。A3243Gヘテロプラスミーの検出のために、3243A及び3243Gのコピー数を、記載されるように、定量的インバーダーアッセイにより検量線を用いて計算した [Int J Hematol. 2009; 89: 482-488; Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97: 8272-8277]。A3243G比率は、全てのコピー (3243A及び3243G) と3243Aコピーとの比率に基づいた。本アッセイにおいて、変異頻度の最低検出限界は2%である。mtDNA A3243G変異は、PCR-制限酵素断片長多型 (PCR-RFLP) 又は蛍光相関分光法 (FCS) によっても分析した [Biophys J. 2000; 79: 2858-2866; Diabetologia. 1994; 37: 504-510; N Engl J Med. 1994; 330: 962-968]。結果を図1に示す。

10

【0058】

両患者由来の末梢血液細胞における変異頻度は24%であった (Mt1-blood: 24%、Mt2-blood: 24%)。両患者由来の皮膚由来線維芽細胞は、同一患者由来の血液細胞と比較して、類似した変異頻度レベルを示した (Mt1-fibro: 18%、Mt2-fibro: 24%)。しかし、4のMt1-iPSクローンのうち2クローン (Mt1-1及びMt1-2) 及び10のMt2-iPSクローンのうち6クローン (Mt2-1、Mt2-2、Mt2-3、Mt2-4、Mt2-7、Mt2-8) は、検出できないレベル (<2%) のA3243G変異を示した。これらの変異の喪失は、PCR-RFLP及びFCSによる遺伝子分析により確認した。さらに、他のiPS株では、もとの線維芽細胞株と比較して、変異頻度の著しい上昇が観察された (Mt1-3: 51%、Mt1-4: 87%、Mt2-5: 83%、Mt2-6: 69%、Mt2-9: 79%、Mt2-10: 74%)。Mt-iPS細胞の培養継代数と変異頻度の間に有意な関連性は見られなかった。

20

【0059】

[実施例3. 作製したMt-iPS細胞の特性評価]

次に、Mt-iPSクローンの幹細胞特性を免疫化学、アルカリホスファターゼ染色及び核型分析により検証した。

【0060】

(1) 免疫細胞化学及びアルカリホスファターゼ染色

免疫細胞化学は既報のとおり実施した [Zygote. 2006; 14: 299-304]。抗ヒト一次抗体は、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81 (全てStemgent, San Diego, CA)、NANOG (R&D Systems, Minneapolis, MN)、 β 3-チューブリン (Millipore, Temecula, CA)、 α -平滑筋アクチン (α SMA) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO)、及びFOXA2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を含んだ。免疫蛍光法のために、Alexa Fluor 488ヤギ抗マウスIgM、Alexa Fluor 488ヤギ抗ラットIgM、Alexa Fluor 488ヤギ抗マウスIgG、Alexa Fluor 546ウサギ抗ヤギIgG、Alexa Fluor 546ヤギ抗マウスIgG (全てMolecular Probes, OR, USA) を二次抗体とした。アルカリホスファターゼ活性は、Alkaline Phosphatase Staining Kit (Stemgent) を用いて検出した。Olympus IX81顕微鏡 (Olympus, Tokyo, Japan) を用いて画像をキャプチャした。

30

【0061】

Mt-iPSクローンはすべて、典型的なヒトES細胞様の形態を示した (図2A)。Mt-iPS細胞は、アルカリホスファターゼ活性陽性であり、免疫細胞化学分析により、14クローンすべてで多能性幹細胞マーカーSSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81及びNANOGが検出された (図2A)。Mt-iPS細胞は、コロニーの端にある数個の細胞を除いて、SSEA-1を発現しなかった (図2A)。変異-フリー Mt-iPS細胞と変異-リッチ Mt-iPS細胞との形態的及び免疫細胞化学的特性は区別できなかった。

40

【0062】

(2) 核型分析

Mt-iPSクローンが細胞遺伝学的に正常であることを検証するために、22継代でのMt-iPS細胞 (Mt2-3及びMt2-6) の核型分析を次に実施した。日本遺伝子研究所 (Sendai, Japan) にて標準的なG分染法 (standard G-banding) 染色体解析を行った。

50

【0063】

変異-フリー Mt-iPS (Mt2-3) クローン及び変異-リッチ Mt-iPS (Mt2-6) クローンはともに正常な女性核型を維持した (図2B)。

【0064】

[実施例4. in vitro及びin vivo分化によるMt-iPS細胞の多能性]

(1) 胚様体 (EB) 形成及びin vitro分化

Mt-iPS細胞のin vitroでの分化能を決定するために、浮遊培養を用いて胚様体 (EB) を形成させた [Mol Med. 2000 ; 6 : 88-95]。Mt-iPS細胞をコラゲナーゼ/トリプシン処理により解離し、ReproCELL培地中、低接着マルチウェルプレートに移した。2日ごとに培地を交換した。浮遊培養8日後に、iPS細胞はボール状の構造を形成した。これらのEBを、0.1%ゼラチンでコートしたプレートに移し、8日間、さらに分化を誘導した。接着した細胞は、神経細胞、敷石様細胞及び上皮細胞に類似した形態を含む、様々な形態タイプを示した (データ示さず)。β3-チューブリン (外胚葉マーカー)、αSMA (中胚葉マーカー) 及びFOXA2 (内胚葉マーカー) などの分化マーカーを免疫細胞化学により分析した。全てのMt-iPSクローンは、in vitroにて三胚葉に分化できることが分かった (図3A)。

10

【0065】

(2) テラトーマ形成

in vivoでの多能性を決定するために、Mt-iPS細胞を重症複合免疫不全 (SCID) マウスの精巣 (testicle) に移植した。およそ 5×10^5 iPS細胞をコラゲナーゼ/トリプシン処理により集め、7~12週齢の免疫不全SCIDマウスの精巣に注入した。注入9~12週間後にテラトーマを集め、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。パラフィン包埋組織を切片化し、ヘマトキシリン・エオジン染色した。動物実験は、本発明者らの研究機関のガイドラインに沿って実施し、京都大学動物実験委員会の承認を受けた。

20

【0066】

組織学的検査により、当該腫瘍が、色素上皮 (外胚葉)、軟骨 (中胚葉) 及び腸管様上皮組織 (内胚葉) を含む、様々な組織を含むことが示された (図3B)。従って、Mt-iPSクローンは、in vivoにて三胚葉すべての誘導体に自発的に分化できることが観察された。

【0067】

[実施例5. Mt-iPS細胞における、培養継代数及び分化がmtDNA変異頻度に及ぼす影響]

次に、Mt-iPSクローンの変異頻度が、細胞培養及び継代の間に固定されるかを検証した。変異頻度は、実施例2で示す方法と同じ方法で測定した。同一クローンを様々な継代数で分析することにより、変異-フリー Mt-iPSクローン (Mt1-2、Mt2-3) では、いずれの変異誘発も観察されないことが明らかとなった (図4A)。変異-リッチ Mt-iPSクローンの変異頻度は、継代間で比較的一定した (Mt1-4、Mt2-6) (図4A)。

30

【0068】

さらに、分化が変異頻度に及ぼす影響を検証した。同一クローンを未分化 (UD) 状態、及び分化 (EB形成の結果として) 16日後に分析すると、変異-フリー Mt-iPSクローン (Mt1-2、Mt2-1、Mt2-3、Mt2-4) では、いずれの変異誘発も示されなかった (図4B)。また、変異-リッチ Mt-iPSクローンの変異頻度も、分化後、比較的一定した (Mt1-3、Mt1-4、Mt2-6) (図4B)。

40

【0069】

[実施例6. Mt-iPS細胞におけるmtDNA含量]

定量的ゲノムPCRにより、血液細胞、線維芽細胞 (Mt1-fibro及びMt2-fibro) 及びiPSクローンにおけるmtDNA含量 (細胞あたりのミトコンドリアゲノムコピー) を測定した。比較のために、2つのヒトES細胞株 (H9及びKhES-1) 及び2つのヒトiPS細胞株 (B7及びG1) を培養し、mtDNA含量分析のために採取した [Science. 1998 ; 282 : 1145-1147 ; Int J Dev Biol. 2004 ; 48 : 1149-1154 ; Cell. 2007 ; 131 : 861-872 ; Nat Biotechnol. 2008 ; 26 : 101-106]。

【0070】

DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA) 又は標準的な確立されたプロトコル [Nuc

50

leic Acids Res. 1991;19:4293] を用いて、血液、線維芽細胞及びMt-iPS細胞からゲノムDNAを抽出した。抽出したDNAサンプルはアッセイまで4℃で保存した。相対的mtDNAコピー数は、リアルタイムPCRにより測定し、核DNAの測定値で補正した [Stem Cells. 2010; 28:721-733]。ミトコンドリアのNADH-ユビキノン酸化還元酵素鎖5 (NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 5; ND5) 遺伝子に対するプライマーは、5'-AGGCGCTATCACCCTCTGTTCG-3' 及び5'-AACCTGTGAGGAAAGGTATTCCTG-3' であった。核の嚢胞性線維症 (cystic fibrosis; CF) 遺伝子に対するプライマーは、5'-AGCAGAGTACCTGAAACAGGAA-3' 及び5'-AGCTTACCCATAGAGGAAACATAA-3' であった。PCRは、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix kit (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて、StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) で実施した。DNA (80 ng) は、6 pmolのフォワード及びリバースプライマーを含む10 µlのSYBR qPCR、並びにROXリファレンス色素と最終体積20 µlで混合した。PCR条件は、95℃、1分の後、変性 (95℃、15秒) とアニーリング及びプライマー伸長 (60℃、60秒) を40サイクルとした。検量線は、pGEM-T Easy (Promega, Madison, WI) にクローニングしたPCRアンプリコンを含むプラスミドDNAの段階希釈を用いて作成した。ミトコンドリアND5遺伝子及びCF遺伝子の閾値サイクル数 (Ct) の値は、2つのDNAデュプリケートサンプルで測定した。増幅産物は、様々な温度ポイントで、変性及び再アニーリングして、その固有の融解温度を検出した。サンプルmtDNA含量 (細胞あたりのmtDNAコピー) は、式 (ND5遺伝子コピー/CF遺伝子コピー) × 2 = 細胞あたりのmtDNAコピー、を用いて計算した。

10

【0071】

20

皮膚線維芽細胞mtDNA含量 (Mt1-fibro: 553コピー/細胞; Mt2-fibro: 4296コピー/細胞) は、末梢血 (Mt1-blood: 196コピー/細胞; Mt2-blood: 60コピー/細胞) よりも高かった。初期継代のMt-iPS細胞のmtDNA含量は、もとの線維芽細胞培養物よりもわずかに低かった (Mt1-1 p12: 454コピー/細胞; Mt1-4 p14: 151コピー/細胞; Mt2-3 p10: 2100コピー/細胞; Mt2-6 p10: 1709コピー/細胞; 図5及びデータ示さず)。Mt-iPS細胞のmtDNA含量は、継代数20により、ヒトES細胞 (H9 p87: 79コピー/細胞; KhES-1 p78: 78コピー/細胞) 及びiPS細胞 (B7 p54: 150コピー/細胞; G1 p40: 94コピー/細胞) 近いレベルまで著しく低下し (Mt1-4 p26: 42コピー/細胞; Mt2-3 p20: 49コピー/細胞; Mt2-6 p20: 45コピー/細胞)、その後維持された (Mt2-3 p30: 68コピー/細胞; Mt2-6 p30: 50コピー/細胞)。

30

【0072】

mtDNAコピー数は、胚様体分化後に7~10倍増加した (Mt2-3 p24由来EB: 384コピー/細胞; Mt2-6 p24由来EB: 484コピー/細胞)。変異-フリーiPS細胞と変異-リッチiPS細胞との間でmtDNA含量に大きな差は見られなかった (図5及びデータ示さず)。

【0073】

[実施例7. 変異-リッチ及び変異-フリー Mt-iPS細胞におけるミトコンドリア機能]

A3243G変異を有する同一患者 (Mt2; mtDNA変異頻度約20%) から得られた変異-リッチ Mt-iPSクローン (Mt2-5; mtDNA変異頻度83%) 及び変異-フリー Mt-iPSクローン (Mt2-4; mtDNA変異頻度<1%) を使用して、mtDNAによりコードされるタンパク質 (シトクロムCオキシダーゼサブユニット1 (COX1) 及びシトクロムCオキシダーゼサブユニット2 (COX2)) の産生量を評価した。胚様体 (EB) は、Mt2-4及びMt2-5クローンから誘導し、各EBにおけるCOX1及びCOX2産生は、ウエスタンブロッティングにより分析した。結果を図6に示す。

40

【0074】

変異-リッチクローンMt2-5では、変異-フリークローンMt2-4と比較して、COX1及びCOX2タンパク質産生が低下した。これらのデータは、変異-リッチ Mt-iPS細胞が、ミトコンドリア病モデル細胞又は組織のソースとして有用であることを示唆する。

【0075】

[実施例8. 変異-リッチ及び変異-フリー Mt-iPS細胞から腸管及び膵臓内分泌細胞への分化]

50

常法に従って、変異-リッチ Mt-iPSクローン (Mt2-5) 及び変異-フリー Mt-iPSクローン (Mt2-4) を腸管及び膵臓内分泌細胞へと分化誘導した。結果を図7に示す。

【0076】

腸管及び膵臓内分泌細胞特異的マーカーに対する抗体を用いた免疫染色により、変異-リッチ iPS細胞及び変異-フリー iPS細胞がともに、腸管及び膵臓内分泌細胞へと分化できることが明らかとなる。これらのデータは、変異-リッチ iPS細胞が、ミトコンドリア病に対する様々な細胞モデルを作製するために使用できることを裏付ける。

【0077】

本発明を好ましい態様を強調して説明してきたが、好ましい態様の変更され得ることは当業者にとって自明であろう。本発明は、本発明が本明細書に詳細に記載された以外の方法で実施され得ることを意図する。従って、本発明は、添付の「請求の範囲」の精神及び範囲に包含されるすべての変更を含むものである。

【0078】

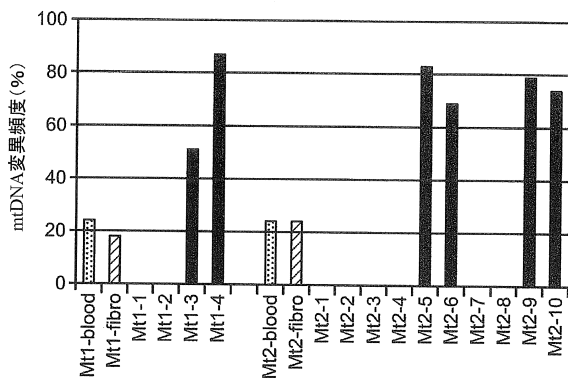
ここで述べられた特許及び特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

【0079】

本願は、2011年6月30日に出願された米国仮特許出願第61/503,283号を基礎としており、その内容は、ここで参照したことにより本明細書に組み込まれる。

10

【図1】



【図4】

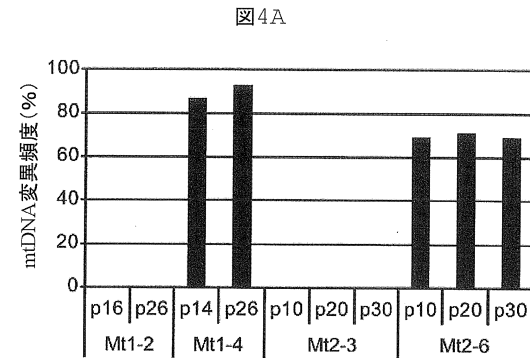
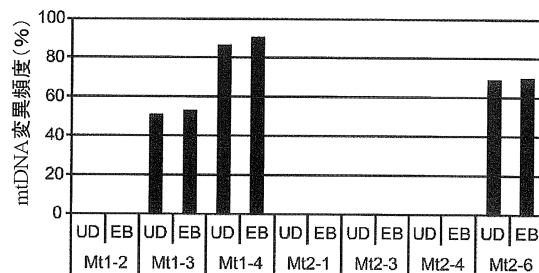
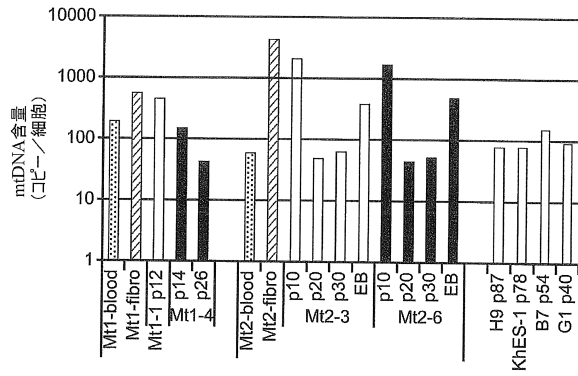


図4B



【図 5】



【図 2】

図 2A

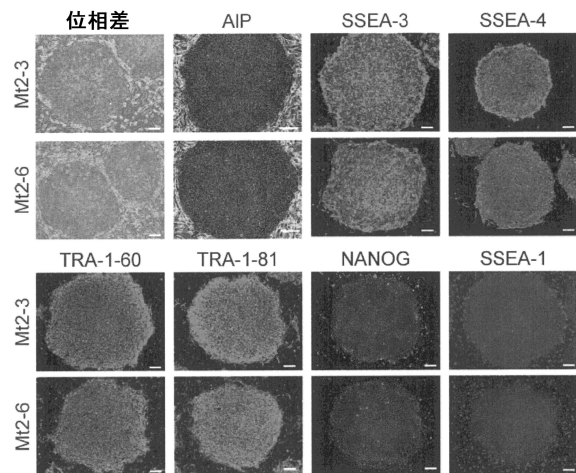
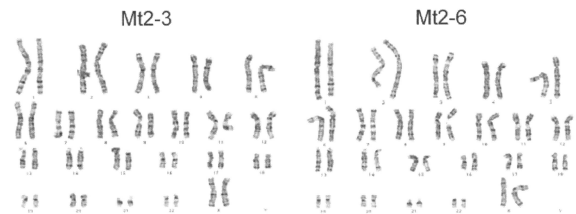


図 2B



【図 3】

図 3A

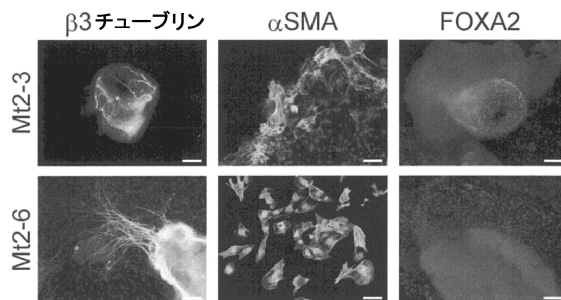
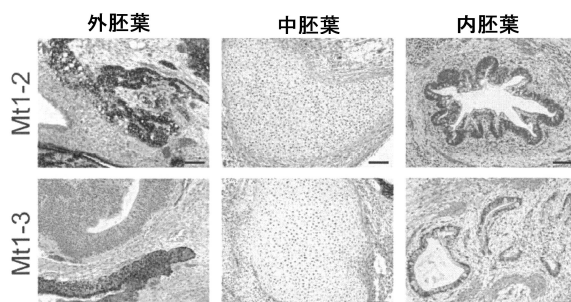
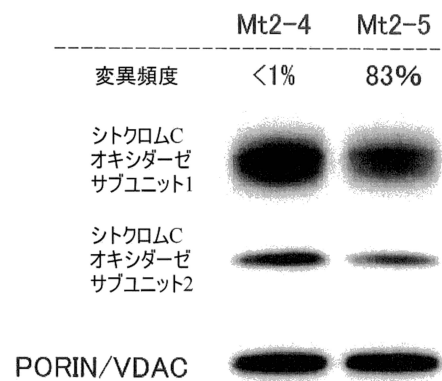


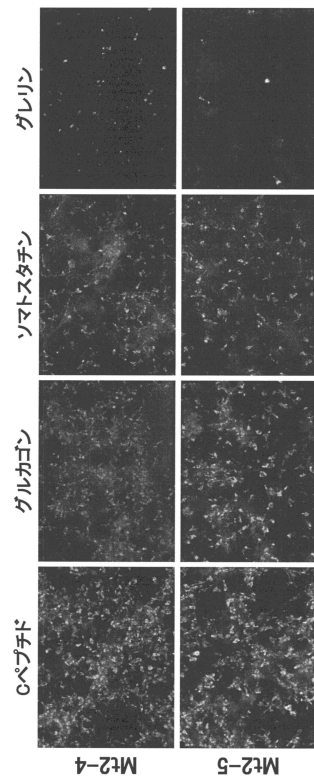
図 3B



【図 6】



【図 7】



【配列表】

0006083874000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 3/10 (2006.01) A 6 1 P 3/10
 A 6 1 P 21/00 (2006.01) A 6 1 P 21/00
 A 6 1 P 9/00 (2006.01) A 6 1 P 9/00

(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 中尾 一和
 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 藤倉 純二
 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 細田 公則
 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 曾根 正勝
 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 中尾 一泰
 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内

審査官 名和 大輔

(56)参考文献 KODAIRA, M., The generation of iPS cells from patients with mitochondrial disorders., Circ. J., 2011年 2月, Vol.75 Suppl.I, p.1397
 MASHIMA, Y. et al., Rapid quantification of the heteroplasmy of mutant mitochondrialDNAs in Leber's hereditary optic neuropathy using theInvader technology., Clin. Biochem., 2004年, Vol.37 No.4, p.268-276
 LIAN, Q. et al., Future perspective of induced pluripotent stem cells for diagnosis, drug screening and treatment of human diseases., Thromb. Haemost., 2010年, Vol.104 No.1, p.39-44
 Fujikura, J. et al., Induced pluripotent stem cells generated from diabetic patients with mitochondrial DNA A3243G mutation., Diabetologia, 2012年 3月 7日, Vol.55 No.6, p.1689-1698

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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