

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6083877号
(P6083877)

(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 15/09 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/10
C 1 2 N 5/0735 (2010. 01)	C 1 2 N 5/0735
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68 A

請求項の数 9 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2014-521869 (P2014-521869)	(73) 特許権者	504132272
(86) (22) 出願日	平成24年8月17日 (2012. 8. 17)		国立大学法人京都大学
(65) 公表番号	特表2014-533491 (P2014-533491A)		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12月15日 (2014. 12. 15)	(74) 代理人	100080791
(86) 国際出願番号	PCT/JP2012/071373		弁理士 高島 一
(87) 国際公開番号	W02013/073246	(74) 代理人	100125070
(87) 国際公開日	平成25年5月23日 (2013. 5. 23)		弁理士 土井 京子
審査請求日	平成27年8月13日 (2015. 8. 13)	(74) 代理人	100136629
(31) 優先権主張番号	61/561, 586		弁理士 鎌田 光宣
(32) 優先日	平成23年11月18日 (2011. 11. 18)	(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】 多能性幹細胞から骨格筋細胞への分化誘導方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

多能性幹細胞から骨格筋細胞を製造する方法であって、以下の工程：

(1) 多能性幹細胞を、胚様体を形成せず、bFGFを含有しない基本培地で3日間以内培養する工程、および

(2) 工程 (1) で得られた細胞において、MyoD、Myf5およびそれらをコードする核酸から選ばれる1以上の外因性因子を、5日間以上10日間以下発現させる工程を含む方法。

【請求項 2】

多能性幹細胞がヒト多能性幹細胞である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記工程 (1) の培養が1日以内である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記工程 (2) の後、ウマ血清を含む培養液でさらに培養する工程を含む、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記多能性幹細胞が、MyoDまたはMyf5をコードする核酸を含む薬剤応答性誘導ベクターを導入した多能性幹細胞であり、前記工程 (2) が、該ベクターと対応する薬剤の存在下で培養することにより行われる、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

20

前記工程（２）の１以上の外因性因子の発現を維持する期間が６日間である、請求項１から５のいずれか１項に記載の方法。

【請求項７】

（１）請求項１から５のいずれか１項に記載の方法で製造された、スクリーニングを行うのに十分な量の、骨格筋細胞を提供する工程、

（２）該骨格筋細胞に被験物質を接触させる工程、及び

（３）被験物質を接触させなかった場合と比較して、該骨格筋細胞の病態が緩和された場合に、該被験物質をミオパチーの治療又は予防の候補物質として選別する工程を含む、ミオパチー治療または予防剤のスクリーニング方法。

【請求項８】

前記ミオパチーが、筋ジストロフィー又は遠位型ミオパチーである、請求項７に記載の方法。

【請求項９】

前記遠位型ミオパチーが三好型ミオパチーである、請求項８に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

発明の技術分野

本発明は、多能性幹細胞、特に人工多能性幹細胞から、骨格筋細胞への分化誘導方法、当該方法に用いるための試薬キット、並びに当該方法により得られる骨格筋細胞に関する。本発明はまた、前記骨格筋細胞を用いたミオパチーの治療剤のスクリーニング方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

発明の背景

筋疾患は非常に多くの病気を含んでいるが、その症状の大半は筋肉の萎縮とそれに伴う筋力の低下である。筋肉の萎縮の原因には、筋肉自体に異常がある場合と筋肉を動かす神経に異常がある場合とがあり、前者を筋原性疾患（ミオパチー）、後者を神経原性疾患という。ミオパチーの代表的なものとして筋ジストロフィーおよび筋萎縮症などがある。筋ジストロフィーのうち最も患者数の多いデュシェンヌ型筋ジストロフィーは、点突然変異により１つのコドンがタンパク質の合成終了を意味するストップコドンに変化し、ジストロフィンタンパク質が合成されない病気である。性染色体劣性遺伝で男子だけに発症する疾患であり、人口１０万人あたり３～５人、出生男児２０００～３０００人あたり１人といわれている。筋ジストロフィー症に対する良好な治療手段は未だなく、治療法の開発が望まれている。三好型ミオパチー（ＭＭ）は、先天性の遠位型ミオパチーの一種であり（Miyoshi, K. et al. Brain 109 (Pt 1), 31-54, 1986）、ジスフェリンの変異に起因する筋肉の膜修復異常（defective）によって引き起こされる（Liu, J. et al. Nat Genet 20, 31-36, 1998, and Bansal, D., et al. Nature 423, 168-172, 2003）。

【０００３】

治療薬を開発する上では、in vitroでのヒトでの病態を反映したモデルが必要となる。近年、体細胞を初期化することによる人工多能性幹細胞が開発されたことで、患者自身の細胞から作製された細胞を病態モデルとして利用することに期待が抱かれている。一方、ヒト多能性幹細胞から骨格筋細胞を誘導する方法は、いくつか報告があるが（Zheng, J.K. et al., Cell Res., 16:713-22, 2006、Barberi, T. et al., Nat. Med., 13:642-8, 2007）、治療薬を開発するために必要な細胞数を効率よく誘導する方法は未だに報告がない。

【０００４】

１９８８年、成体体細胞からマスター転写因子MyoD1を作動させることにより分化を方向付けることが、筋肉分化について最初に確立された（Tapscott, S.J., et al. Science 242, 405-411, 1988）。MyoD1の強制発現を引き金として、様々なタイプの細胞が筋細胞を生

10

20

30

40

50

じ得る (Mizuno, H., et al. Plastic and reconstructive surgery 109, 199-209, 2002, and Gianakopoulos, P.J., et al. The Journal of biological chemistry 286, 2517-2525, 2011)。多能性幹細胞では、マウス胚性幹細胞が、テトラサイクリン (Tet) 誘導性MyoD1発現により筋細胞へと分化し得て (Ozasa, S., et al. Biochemical and biophysical research communications 357, 957-963, 2007)、hiPSCに由来する線維芽細胞も、4週間、FGF不含条件下で分化後にMyoD1 mRNA処理を行うことにより、筋細胞へと分化し得る (Warren, L., et al. Cell stem cell 7, 618-630, 2010)。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

10

発明の要約

本発明の目的は、iPS細胞を含む多能性幹細胞から骨格筋細胞への分化を誘導する方法を提供することであり、当該方法において一過性に導入される遺伝子を含む分化誘導試薬キットを提供することである。本発明のさらなる目的は、当該方法により得られる多能性幹細胞由来の骨格筋細胞を用いた、筋ジストロフィー、三好型ミオパチーなどを含むミオパチーなどの筋疾患の治療剤をスクリーニング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】

【0006】

これまで、胚様体を形成するなど多能性幹細胞をある程度分化誘導し、内在遺伝子を適切に発現している細胞へ外来遺伝子を導入することにより骨格筋細胞を誘導することが試みられていた (Darabi, R. et al., Nat. Med., 14, 134-143, 2008)。

20

【0007】

そこで、本発明者らはこれまでの発想を転換し、骨格筋細胞を特異的に誘導しない条件で培養した多能性幹細胞において、外因性のMyoDを発現させ、その発現期間を調節することにより、意外にも多能性幹細胞から効率よく短期間で骨格筋細胞へ分化誘導できることを初めて見出した。さらに、同様の手法でMyf5を導入することによっても同様の効果が得られることを見出した。

【0008】

そこで、ミオパチー患者由来の人工多能性幹細胞を用いてこれらの方法により骨格筋細胞を誘導することで、十分な数の疾患特異的骨格筋細胞を取得することができ、同病態の治療薬のスクリーニングに用いることが可能と考え、本発明を完成するに至った。

30

【0009】

すなわち、本発明は以下の通りのものである。

[1]多能性幹細胞から骨格筋細胞を製造する方法であって、MyoD、Myf5およびそれらをコードする核酸から選ばれる1以上の外因性因子を、多能性幹細胞において発現させる工程を含む方法。

[2]多能性幹細胞がヒト多能性幹細胞である、[1]に記載の方法。

[3]分化誘導条件での培養開始から3日以内に、外因性因子を多能性幹細胞において発現させる、[1]または[2]に記載の方法。

[4]分化誘導条件での培養開始から1日以内に、外因性因子を多能性幹細胞において発現させる、[3]に記載の方法。

40

[5]分化誘導条件が、胚様体を形成する工程を伴わない、[3]に記載の方法。

[6]分化誘導条件が、血清または血清代替物を含有し、bFGFを含有しない基本培地で培養することを含む、[3]に記載の方法。

[7]外因性因子を発現させた後、ウマ血清を含む培養液 (culture medium) でさらに培養する工程を含む、[1]から[6]のいずれかに記載の方法。

[8]外因性因子の発現が、5日間以上10日間以下維持される、[1]から[7]のいずれかに記載の方法。

[9]多能性幹細胞における外因性因子の発現が、MyoDまたはMyf5をコードする核酸を含む薬剤応答性誘導ベクターを導入した多能性幹細胞を、該薬剤の存在下で培養することによ

50

り行われる、[1]から[8]のいずれかに記載の方法。

[10]MyoD、Myf5およびそれらをコードする核酸から選ばれる1以上の因子を含有してなる、多能性幹細胞から骨格筋細胞への分化誘導組成物。

[11]前記因子が、MyoDまたはMyf5をコードする核酸を含む薬剤応答性誘導ベクターである、[10]に記載の組成物。

[12]多能性幹細胞がヒト多能性幹細胞である、[10]に記載の組成物。

[13]多能性幹細胞から骨格筋細胞を誘導するキットであって、MyoD、Myf5およびそれらをコードする核酸から選ばれる1以上の因子を含むキット。

[14]MyoDまたはMyf5をコードする核酸を含む薬剤応答性誘導ベクターを含む、[13]に記載のキット。

[15][1]から[9]のいずれかに記載の方法により製造された骨格筋細胞を用いることを含む、ミオパチー治療または予防剤のスクリーニング方法。

[16]MyoDまたはMyf5をコードする核酸を含む薬剤応答性誘導ベクターを有する多能性幹細胞。

【0010】

本発明によれば、多能性幹細胞において一過的に外因性のMyoDまたはMyf5を発現させることにより、効率良く多能性幹細胞から骨格筋細胞に分化誘導することができる。また、本発明によれば、iPS細胞から骨格筋細胞に分化誘導することができるため、ES細胞のような倫理上の制約なしに骨格筋細胞を安定に供給することが可能となる。さらに、対象となる疾患を有する患者より樹立されたiPS細胞から誘導された骨格筋細胞を用いることで、疾患モデル細胞を容易に得ることが可能となり、当該疾患の治療または予防剤のスクリーニング用途への適用も可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1aは、テトラサイクリン応答性MyoD発現piggyBacベクターの構造を示す。図1bは、iPS細胞の形質転換プロトコルを示す。図中、D1は継代培養後1日目を意味する。D1においてリポフェクションにより、トランスポゼース発現ベクターとテトラサイクリン応答性MyoD発現piggyBacベクターとを細胞に導入した。D8において、拡大培養またはクロニングを行った。図1cは、ネオマイシン耐性細胞ヘドキシサイクリン(Doxycyclin(Dox))を添加して48時間後の添加群(Dox(+))および非添加群(Dox(-))の細胞の、(左から)位相差顕微鏡像、DAPI染色後の蛍光顕微鏡像、mCherry発現を示す蛍光顕微鏡像および抗MyoD抗体による蛍光免疫染色後の蛍光顕微鏡像を示す。図1dは、Dox添加48時間後の添加群(レーン1)および非添加群(レーン2)の細胞における外因性MyoD(MyoD(Tg))および内因性MyoD(MyoD(Endo))の発現量を、PCRを用いて確認した結果を示す。図1eは、Dox添加後、トランスフェクトされたヒトiPS細胞クローンにおけるMHCおよびミオゲニン(Myogenin)の免疫染色像を示す。矢印は核を示す。スケールバーは100 μmを示す。

【図2】図2aは、SB outgrowth法およびMyoD誘導発現を組み合わせた骨格筋細胞誘導のプロトコルを示す。図中、丸付き数字1は、SB outgrowth細胞(SB-OG)を、Dox添加または非添加のSB outgrowth培地中で4日間培養後、2%ウマ血清、IGF-1含有DMEM培地中で3日間培養すること、丸付き数字2は、Dox添加または非添加のSB outgrowth培地中で5日間培養後、2%ウマ血清、IGF-1含有DMEM培地中で2日間培養すること、丸付き数字3は、Dox添加または非添加のSB outgrowth培地中で6日間培養後、2%ウマ血清、IGF-1含有DMEM培地中で1日間培養すること、および丸付き数字4は、Dox添加または非添加のSB outgrowth培地中で7日間培養することを意味する。図2bは、丸付き数字3の培養プロトコルを用いた場合のDox添加群(Dox(+))および非添加群(Dox(-))の細胞の抗MHC抗体による免疫染色像を示す。図中、矢印は成熟した骨格筋細胞を示す。図2cは、図2aに示す各培養条件でのMHC陽性細胞数を表したグラフである。図2dは、沿軸中胚葉誘導法およびMyoD誘導発現を組み合わせた骨格筋細胞誘導のプロトコルを示す。図2eは、沿軸中胚葉誘導法を用いた場合のDox添加群(Dox(+))および非添加群(Dox(-))の細胞の蛍光顕微鏡像お

10

20

30

40

50

よび抗MHC抗体での染色像を示す。

【図3】図3aは、テトラサイクリン応答性MyoD発現piggyBacベクターを導入した各iPS細胞株（#9、#16および#20）におけるDox添加後のmCherryの発現強度を、フローサイトメーターを用いて測定した結果を示す。図中に各細胞株におけるmCherry陽性細胞率を示す。図3bは、Doxを添加して48時間後の各細胞株での外因性MyoD（MyoD（Tg））および内因性MyoD（MyoD（Endo））の発現量をPCRを用いて確認した結果を示す。

【図4】図4aは、沿軸中胚葉誘導法およびMyoD誘導発現を組み合わせた、クローン化したヒトiPS細胞からの骨格筋細胞誘導のプロトコルを示す。図4bは、クローン#16を分化誘導した場合の添加群（Dox（+））および非添加群（Dox（-））細胞の抗MHC抗体での染色像を示す。図4cは、骨格筋細胞誘導のためのDoxの添加時期を検討するためのプロトコルを示す。図中、丸付き数字1は、分化誘導開始後3日目から15日目までDoxを添加して培養すること、丸付き数字2は分化誘導開始後3日目から7日目までDoxを添加して培養すること、丸付き数字3は分化誘導開始後7日目から15日目までDoxを添加して培養すること、および丸付き数字4はDoxを添加しないで培養することを示す。図4dは、クローンB7 #9における各培養条件でのミオゲニン（Myogenin）およびMHCの陽性細胞数を表したグラフである。図4eは、クローンB7 #20における各培養条件でのミオゲニン（Myogenin）およびMHCの陽性細胞数を表したグラフである。

【図5】図5aは、ネガティブコントロール（NC）としての親iPS細胞クローン、およびトランスフェクトされた各ヒトiPS細胞クローン（MyoD-hiPSCクローン；G4#31、G4#35、B7#9、B7#20、G1#17およびG1#23）における、1日間Doxで処理することにより駆動される外因性MyoD1と同義のmCherryの発現を測定した結果を示す。図5bは、各MyoD-hiPSCクローンのRT-PCR解析結果を示す。クローン化したMyoD-hiPSCは、Dox非添加では外因性MyoD1の発現をリークしなかった一方、Dox添加後24時間（d2）では外因性MyoD1を発現し得た。外因性MyoD1は、Dox添加後96時間（d5）において促進され得た。

【図6】図6aは、異なる開始時点にて24時間（d1）Dox処理したMyoD-hiPSCのフローサイトメトリ解析結果を示す。分化1日目でDox添加すると、分化4日目にDox添加するよりも、MyoD-hiPSCにおけるmCherry発現のパーセンテージがより高く促進された。図6bは、分化4日目にDoxを投与した分化したMyoD-hiPSCの位相差像とmCherry像とのマージ像を示す。mCherry発現領域が存在しない（矢頭）ことは、Dox非応答性のMyoD-hiPSCであることを示す。図6cは、様々なDox投与期間にて11日間分化させた間の、MyoD-hiPSCに由来するMHC陽性筋原細胞数のグラフを示す。

【図7】図7aは、MyoD-hiPSCの筋分化について定義したプロトコルのスキームを示す。図7bは、B7 #9 MyoD-hiPSCクローンにおける、未分化および筋原性マーカー遺伝子の相対的発現を示すグラフである（n=3）。データは、平均 ± SDとして記載する。図7cは、B7 #9 MyoD-hiPSCクローンにおける、前筋原性（premyogenic）の中胚葉マーカー遺伝子の相対的発現を示すグラフである（n=3）。データは、平均 ± SDとして示す。

【図8】図8aは、siRNAによる抑制後3日目における、B7 #9 MyoD-hiPSCクローンのTおよびTbx6の相対的発現を示すグラフである（n=3）。TおよびTbx6に対するsiRNAは、MyoD-hiPSCの分化培養物に、0日目および3日目の2回添加した。*：p<0.05。図8bは、siRNAによるTおよびTbx6の抑制後5日目における、B7 #9 MyoD-hiPSCクローンのT、Tbx6およびPax3の相対的発現を示すグラフである（n=3）。TおよびTbx6に対するsiRNAは、MyoD-hiPSCの分化培養物に、0日目および3日目の2回添加した。*：p<0.05。図8cは、siRNAで処理または非処理の分化したB7 #9 MyoD-hiPSCの抗MHC抗体染色像を示す。図8cは、B7 #9 MyoD-hiPSCクローンにおいて、siRNAで処理または非処理にて分化後9日目におけるMHC陽性細胞のパーセンテージのグラフを示す（n=3）。

【図9】図9aは、分化したMyoD-hiPSCまたは未分化のMyoD-hiPSCの抗MHC抗体染色像（赤）を示す。スケールバーは100 μmを示す。図9bは、MyoD-hiPSCクローンの全細胞あたりのMHC陽性細胞のパーセンテージのグラフを示す（各クローンについてn=3）。データは、平均 ± SDとして記載する。図9cは、未分化および分化したMyoD-hiPSCの両方におけるミトコンドリアの蛍光顕微鏡像を示す。スケールバーは20 μmを示す。図9dは、成熟筋原

10

20

30

40

50

性マーカー（骨格筋アクチンおよびCK-M）に対する分化したMyoD-hiPSCの免疫組織化学像を示す。スケールバーは20 μm を示す。

【図10】図10aは、グローバルmRNA発現のヒートマップを、未分化のhiPSCと分化した筋原細胞とを比較して示す。赤色は上方制御された遺伝子を示し、青色は下方制御された遺伝子を示す。図10bは、筋線維と関連する選択マーカーに対するmRNA発現のヒートマップを、未分化のhiPSCと分化した筋原細胞とを比較して示す。赤色は上方制御された遺伝子を示し、青色は下方制御された遺伝子を示す。「1」、「2」、「3」、「4」および「5」は、それぞれ、未分化細胞、G1 #23 MyoD-hiPSC、B7 #9 MyoD-hiPSC、G4 #35 MyoD-hiPSC およびHu5/E18を意味する。

【図11】図11aおよび11bは、分化したMyoD-hiPSC (a) および不死化ヒト筋芽細胞Hu5/E18細胞 (b) の電子顕微鏡像を示す。各左パネルにおいて、赤色矢印は筋線維を示し、矢頭は将来のZ帯を示す。各右パネルにおいて、矢印はミオシン線維を示す。スケールバーは500 nmを示す。図11cは、C2C12細胞と共培養した分化したMyoD-hiPSCの連続写真を示す。ヒト由来の赤色細胞（白色矢印）はマウス由来の緑色細胞（白色矢頭）と融合し、黄色細胞（赤色矢印）となった。スケールバーは100 μm を示す。図11dは、C2C12細胞と共培養したMyoD-hiPSCの免疫組織化学像を示す。矢印は、マウス筋線維におけるヒトの核を示す。スケールバーは100 μm を示す。図11eおよび11fは、d6 MyoD-hiPSCの移植後28日目における、NOD-DMDマウスのTA筋の免疫組織化学像を示す。図11eにおいて、ヒトスペクトリン (human Spectrin) 発現 (赤色) をラミニン (Laminin) (緑色) とともに検出した。スケールバーは20 μm を示す。図11fにおいて、ヒトジストロフィン (human Dystrophin) 発現 (緑色) をラミニン (Laminin) (白色) とともに検出した。スケールバーは20 μm を示す。

【図12】図12aは、Tet-MyoD1ベクターをトランスフェクトした、三好型ミオパチー (MM) 患者由来のhiPSCクローン (MyoD-MM #5およびMyoD-MM #6) 像を示す。スケールバーは200 μm を示す。図12bは、MyoD-MM hiPSCにおける、内因性多能性幹細胞マーカーの評価結果を示す。図12cは、定義したプロトコールに従って分化したMyoD-MM hiPSC像を示す。MH C陽性 (左) またはミオゲニン (Myogenin) 陽性 (右) 細胞が優勢に観察された。スケールバーは100 μm を示す。図12dは、各MyoD-MM hiPSC (レーン1、2)、EF1 α プロモーターにより駆動される全長ジスフェリンcDNAを発現するレスキューされたMyoD-MM hiPSC (レーン3、4) およびコントロールの非疾患性MyoD-hiPSC (レーン5) 由来の筋線維のジスフェリン (Dysferlin) 発現を確認するためのウェスタンブロッティングの結果を示す。

【図13】図13aは、筋線維膜に二光子レーザー誘導性の損傷 (矢印) を与える前 (0 sec) および損傷後20秒 (20 sec) での、MyoD-MM #5 (左)、ジスフェリンを発現するレスキューされたMyoD-MM #5 (中央) またはコントロールMyoD-hiPSCクローンB7 #9 (右) 由来の分化した筋線維におけるFM1-43蛍光色素 (緑色) の侵入像を示す。スケールバーは20 μm を示す。図13bは、B7 #9 (黒丸)、MyoD-MM hiPSC (赤または青三角) およびジスフェリンを発現するレスキューされたMyoD-hiPSC (赤または青丸) 由来のレーザー損傷筋線維におけるFM1-43色素の蓄積の経時変化のデータを示す (各クローンについてn=5)。データは、平均 $\pm$ S.E. (エラーバー) として記載する。

【図14】図14aは、テトラサイクリン応答性Myf5発現piggyBacベクターの構造を示す。図14bは、iPS細胞の形質転換プロトコールを示す。図中、D1は継代培養後1日目を意味する。D1においてリポフェクションにより、トランスポゼース発現ベクターとテトラサイクリン応答性Myf5発現piggyBacベクターとを細胞に導入した。D8においてクローニングを行った。図14cは、テトラサイクリン応答性Myf5発現piggyBacベクターを導入した各iPS細胞株 (#2、#18および#21) における、Dox添加48時間後 (Dox (+) 48h) または非添加 (Dox (-)) でのmCherryの発現強度を、フローサイトメーターを用いて測定した結果を示す。図14dは、Doxを添加して48時間後の各細胞株における外因性Myf5 (Myf5 (Tg))、内因性Myf5 (Myf5 (Endo))、内因性MyoD (MyoD (Endo)) およびミオゲニン (Myogenin) の発現量をPCRを用いて確認した結果を示す。

【図15】図15aは、テトラサイクリン応答性Myf5発現piggyBacベクターを導入した各iPS

10

20

30

40

50

細胞株（#2、#18および#21）からの骨格筋細胞誘導のプロトコールを示す。図15bは、Myf5誘導発現細胞株における、Dox添加48時間後（Dox（+）48h）または非添加（Dox（-））でのmCherry発現の蛍光顕微鏡像および細胞形態の変化を示す位相差顕微鏡像を示す。図15cは、クローン#2における骨格筋細胞誘導後の抗ミオゲニン（Myogenin）抗体および抗MHC抗体による染色像を示す。

【0012】

発明の詳細な説明

本発明は、多能性幹細胞から骨格筋細胞を製造する方法を提供する。当該方法は、MyoD、Myf5およびそれらをコードする核酸から選ばれる1以上の外因性因子（以下、「本発明の骨格筋細胞誘導因子」ともいう）を多能性幹細胞において発現させる工程を含む。

10

【0013】

本発明において、骨格筋細胞を製造するとは、骨格筋細胞を含有する細胞集団を得ることにより、好ましくは、骨格筋細胞を50%、60%、70%、80%または90%以上含有する細胞集団を得ることである。また骨格筋細胞とは、ミオゲニンまたはミオシン重鎖（MHC）等の骨格筋細胞のマーカー遺伝子を発現している細胞と定義され、多核細胞であっても単核細胞であってもよい。

【0014】

本発明の骨格筋細胞誘導因子としては、例えば、任意の哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、サル、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ等）由来のMyoDもしくはMyf5タンパク質またはそれをコードする核酸等を用いることができる。対象となる多能性幹細胞の由来と同一種のものが好ましい。

20

【0015】

本発明で用いられるMyoDとしては、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるヒトmyogenic differentiation 1（MYOD1）（NCBIにアクセッション番号：NP_002469として登録されている）、および他の哺乳動物におけるそのオルソログ、並びにそれらの転写変異体、スプライシング変異体などが挙げられる。あるいは、上記いずれかのタンパク質と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上のアミノ酸同一性を有し、且つ該タンパク質と同等の機能（例、筋特異的プロモーターの転写活性化など）を有するタンパク質であってもよい。ここでアミノ酸配列の同一性は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。

30

【0016】

本発明で用いられるMyf5としては、配列番号4で表されるアミノ酸配列からなるヒトmyogenic factor 5（MYF5）（NCBIにアクセッション番号：NP_005584として登録されている）、および他の哺乳動物におけるそのオルソログ、並びにそれらの転写変異体、スプライシング変異体などが挙げられる。あるいは、上記のタンパク質と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上のアミノ酸同一性を有し、且つ該タンパク質と同等の機能（例、筋特異的プロモーターの転写活性化など）を有するタンパク質であってもよい。ここでアミノ酸配列の同一性は上記と同様にして計算することができる。

40

【0017】

MyoDおよびMyf5は、上記いずれかのタンパク質と、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）との融合タンパク質であってもよい。

【0018】

MyoDをコードする核酸としては、配列番号1で表されるヌクレオチド配列からなるヒトmyogenic differentiation 1（MYOD1）cDNA（NCBIにアクセッション番号：NP_002478として登録されている）、および他の哺乳動物におけるそのオルソログ、並びにそれらの転写変異体、スプライシング変異体などが挙げられる。あるいは、上記いずれかの核酸と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上のヌクレオチド同一性を有し、且つ該核酸にコードされるタンパク質と同等の機能（例、筋特異的プロモーターの転写活性

50

化など)を有するタンパク質をコードする核酸であってもよい。ここでヌクレオチド配列の同一性はNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) のblastnプログラムを用い、以下の条件(期待値=10;ギャップを許す;フィルタリング=ON;マッチスコア=1;ミスマッチスコア=-3)にて計算することができる。あるいは、上記いずれかの核酸の相補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正鎖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、複合体或いは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「 $1\times$ SSC、0.1%SDS、 37°C 」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、より厳しいハイブリダイズ条件として「 $0.5\times$ SSC、0.1%SDS、 42°C 」程度の洗浄条件、さらに厳しくは「 $0.1\times$ SSC、0.1%SDS、 65°C 」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。

【0019】

Myf5をコードする核酸としては、配列番号3で表されるヌクレオチド配列からなるヒト myogenic factor 5 (MYF5) cDNA (NCBIにアクセッション番号:NM_005593として登録されている)、および他の哺乳動物におけるそのオルソログ、並びにそれらの転写変異体、スプライシング変異体などが挙げられる。あるいは、上記いずれかの核酸と90%以上、好ましくは95%以上、より好ましくは97%以上のヌクレオチド同一性を有し、且つ該核酸にコードされるタンパク質と同等の機能(例、筋特異的プロモーターの転写活性化など)を有するタンパク質をコードする核酸であってもよい。ここでヌクレオチド配列の同一性は上記と同様にして計算することができる。あるいは、上記いずれかの核酸の相補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正鎖を有するものであってもよい。ここでストリンジェントな条件は上記と同義である。

【0020】

MyoDもしくはMyf5をコードする核酸は、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。また、該核酸は、一本鎖であっても、二本鎖DNA、二本鎖RNAもしくはDNA:RNAハイブリッドであってもよい。好ましくは二本鎖DNAもしくは一本鎖RNAである。当該RNAは、分解を抑制するため、5-メチルシチジンおよびシュードウリジン(pseudouridine) (TriLink Biotechnologies) を取り込ませたRNAを用いても良く、フォスファターゼ処理による修飾RNAであってもよい。

【0021】

MyoDおよびMyf5並びにそれらをコードする核酸は、例えば、上記ヒトMYOD1およびヒトMyf5のcDNA配列情報に基づいて容易に各タンパク質をコードする核酸を単離し、また必要に応じて、組換えタンパク質を製造することができ、あるいは化学的に合成することもできる。

【0022】

<多能性幹細胞>

多能性幹細胞を分化させることによって骨格筋細胞を含有する細胞集団を用意する場合、使用可能な多能性幹細胞は、生体に存在するすべての細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ幹細胞である。それには、特に限定されないが、例えば胚性幹(ES)細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹(ntES)細胞、生殖幹細胞(germline stem cell) (「GS細胞」)、胚性生殖細胞(「EG細胞」)、人工多能性幹(iPS)細胞、培養線維芽細胞や骨髓幹細胞由来の多能性細胞(Muse細胞)などが含まれる。好ましい多能性幹細胞は、ES細胞、ntES細胞、およびiPS細胞である。

【0023】

(A) 胚性幹細胞

ES細胞は、ヒトやマウスなどの哺乳動物の初期胚(例えば胚盤胞)の内部細胞塊から樹

10

20

30

40

50

立された、多能性と自己複製による増殖能を有する幹細胞である。

【0024】

ES細胞は、受精卵の8細胞期、桑実胚後の胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚由来の幹細胞であり、成体を構成するあらゆる細胞に分化する能力、いわゆる分化多能性と、自己複製による増殖能とを有している。ES細胞は、マウスで1981年に発見され (M.J. Evans and M.H. Kaufman (1981), *Nature* 292:154-156)、その後、ヒト、サルなどの霊長類でもES細胞株が樹立された (J.A. Thomson et al. (1998), *Science* 282:1145-1147; J.A. Thomson et al. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7844-7848; J.A. Thomson et al. (1996), *Biol. Reprod.*, 55:254-259; J.A. Thomson and V.S. Marshall (1998), *Curr. Top. Dev. Biol.*, 38:133-165)。

10

【0025】

ES細胞は、対象動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取出し、内部細胞塊を線維芽細胞のフィーダー上で培養することによって樹立することができる。また、継代培養による細胞の維持は、白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor (LIF))、塩基性線維芽細胞成長因子 (basic fibroblast growth factor (bFGF)) などの物質を添加した培養液を用いて行うことができる。ヒトおよびサルのES細胞の樹立と維持の方法については、例えば USP5,843,780; Thomson JA, et al. (1995), *Proc Natl. Acad. Sci. U S A*. 92:7844-7848; Thomson JA, et al. (1998), *Science*. 282:1145-1147; H. Suemori et al. (2006), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345:926-932; M. Ueno et al. (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:9554-9559; H. Suemori et al. (2001), *Dev. Dyn.*, 222:273-279; H. Kawasaki et al. (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:1580-1585; Klimanskaya I, et al. (2006), *Nature*. 444:481-485などに記載されている。

20

【0026】

ES細胞作製のための培養液として、例えば0.1 mM 2-メルカプトエタノール、0.1 mM 非必須アミノ酸、2 mM L-グルタミン酸、20%KSRおよび4 ng/ml bFGFを補充したDMEM/F-12培養液を使用し、37℃、2%CO₂/98%空気の湿潤雰囲気下でヒトES細胞を維持することができる (O. Fumitaka et al. (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26:215-224)。また、ES細胞は、3~4日おきに継代する必要がある、このとき、継代は、例えば1 mM CaCl₂および20% KSRを含有するPBS中の0.25%トリプシンおよび0.1 mg/ml コラゲナーゼIVを用いて行うことができる。

30

【0027】

ES細胞の選択は、一般に、アルカリホスファターゼ、Oct-3/4、Nanogなどの遺伝子マーカーの発現を指標にしてリアルタイム (Real-Time) PCR法で行うことができる。特に、ヒトES細胞の選択では、OCT-3/4、NANOG、ECADなどの遺伝子マーカーの発現を指標とすることができる (E. Kroon et al. (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26:443-452)。

【0028】

ヒトES細胞株は、例えばWA01 (H1) およびWA09 (H9) は、WiCell Research Institute から、KhES-1、KhES-2およびKhES-3は、京都大学再生医科学研究所 (京都、日本) から入手可能である。

【0029】

40

(B) 生殖幹細胞

生殖幹細胞は、精巣由来の多能性幹細胞であり、精子形成のための起源となる細胞である。この細胞は、ES細胞と同様に、種々の系列の細胞に分化誘導可能であり、例えばマウス胚盤胞に移植するとキメラマウスを作出できるなどの性質をもつ (M. Kanatsu-Shinohara et al. (2003) *Biol. Reprod.*, 69:612-616; K. Shinohara et al. (2004), *Cell*, 119:1001-1012)。神経膠細胞系由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)) を含む培養液で自己複製可能であるし、またES細胞と同様の培養条件下で継代を繰り返すことによって、生殖幹細胞を得ることができる (竹林正則ら (2008), 実験医学, 26巻, 5号 (増刊), 41~46頁, 羊土社 (東京、日本))。

【0030】

50

(C) 胚性生殖細胞

胚性生殖細胞は、胎生期の始原生殖細胞から樹立される、ES細胞と同様な多能性をもつ細胞である。LIF、bFGF、幹細胞因子 (stem cell factor) などの物質の存在下で始原生殖細胞を培養することによって樹立しうる (Y. Matsui et al. (1992), Cell, 70:841-847; J.L. Resnick et al. (1992), Nature, 359:550-551)。

【0031】

(D) 人工多能性幹細胞

人工多能性幹 (iPS) 細胞は、特定の初期化因子を、DNAまた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; Nakagawa, M. et al., Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2008); WO 2007/069666)。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ノンコーディング (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ノンコーディング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、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3またはGlis1等が例示される。これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、WO 2007/069666、WO 2008/118820、WO 2009/007852、WO 2009/032194、WO 2009/058413、WO 2009/057831、WO 2009/075119、WO 2009/079007、WO 2009/091659、WO 2009/101084、WO 2009/101407、WO 2009/102983、WO 2009/114949、WO 2009/117439、WO 2009/126250、WO 2009/126251、WO 2009/126655、WO 2009/157593、WO 2010/009015、WO 2010/033906、WO 2010/033920、WO 2010/042800、WO 2010/050626、WO 2010/056831、WO 2010/068955、WO 2010/098419、WO 2010/102267、WO 2010/111409、WO 2010/111422、WO 2010/115050、WO 2010/124290、WO 2010/147395、WO 2010/147612、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、Zhang 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。

【0032】

上記初期化因子には、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、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 Smartpool^o (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)、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-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-アザシチジン)、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-チャネルカルシウムアゴニスト (例えばBayk8644)、酪酸、TGFβ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siRNAおよびshRNA)、miR-291-3p、miR-294、miR-295およびmir-302などのmiRNA、Wntシグナリング(例えば可溶性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、PITX2、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るが、それらに限定されない。本明細書においては、これらの樹立効率を高めることを目的として用いられる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。

【0033】

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

【0034】

一方、初期化因子が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(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(Hemagglutinating Virus of Japanのベクター)(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)、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、それらの前後にLoxP配列を有してもよい。

20

30

【0035】

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良く、分解を抑制するため、5-メチルシチジンおよびシュードウリジン(pseudouridine)(TriLink Biotechnologies)を取り込ませたRNAを用いても良い(Warren L, (2010) Cell Stem Cell. 7:618-630)。

【0036】

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またはDME培養液(これらの培養液にはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、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-WE S培養液、トロンボX社)、霊長類ES細胞用培養液(霊長類ES/iPS細胞用培養液、リプロセル社)、無血清培地(mTeSR、Stemcell Technology社)]などが含まれる。

40

【0037】

培養法の例としては、例えば、37℃、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DMEMまたはDMEM/F12培養液上で体細胞と初期化因子とを接触させ約2~7日間培養し、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細胞用培養液で培養し、該接触から約30~約45日またはそれ以上ののちにiPS様コロニーを生じさせることができる。

【0038】

あるいは、37℃、5%CO₂存在下にて、フィーダー細胞(例えば、マイトマイシンC処理S

50

TO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日また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WO 2010/137746）、もしくは細胞外基質（例えば、ラミニン-5（WO 2009/123349）およびマトリゲル（Matrigel）（BD社））を用いる方法が例示される。

【0039】

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細胞を樹立しても良い（Yoshida Y, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:237-241またはWO 2010/013845）。

【0040】

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100 cm²あたり約 5×10^3 ～約 5×10^6 細胞の範囲である。

【0041】

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。

【0042】

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。

【0043】

また、iPS細胞を移植用細胞の材料として用いる場合、拒絶反応が起こらないという観点から、移植先の個体のHLA遺伝子型が同一もしくは実質的に同一である体細胞を用いることが望ましい。ここで、「実質的に同一」とは、移植した細胞に対して免疫抑制剤により免疫反応が抑制できる程度にHLA遺伝子型が一致していることであり、例えば、HLA-A、HLA-BおよびHLA-DRの3遺伝子座あるいはHLA-Cを加えた4遺伝子座が一致するHLA型を有する体細胞である。

【0044】

(E) 核移植により得られたクローン胚由来のES細胞

nt ES細胞は、核移植技術によって作製されたクローン胚由来のES細胞であり、受精卵由来のES細胞とほぼ同じ特性を有している（T. Wakayama et al. (2001), Science, 292:740-743; S. Wakayama et al. (2005), Biol. Reprod., 72:932-936; J. Byrne et al. (2007), Nature, 450:497-502）。すなわち、未受精卵の核を体細胞の核と置換することによって得られたクローン胚由来の胚盤胞の内部細胞塊から樹立されたES細胞がnt ES（nuclear transfer ES）細胞である。nt ES細胞の作製のためには、核移植技術（J.B. Cibelli et al. (1998), Nature Biotechnol., 16:642-646）とES細胞作製技術（上記）

10

20

30

40

50

との組み合わせが利用される（若山清香ら（2008），実験医学，26巻，5号（増刊），47～52頁）。核移植においては、哺乳動物の除核した未受精卵に、体細胞の核を注入し、数時間培養することで初期化することができる。

【0045】

(F) 多種系統に分化できる、ストレス耐性のある細胞 (Multilineage-differentiating Stress Enduring cells) (Muse細胞)

Muse細胞は、WO 2011/007900に記載された方法にて製造された多能性幹細胞である。詳細には、線維芽細胞または骨髄間質細胞を長時間トリプシン処理、好ましくは8時間または16時間トリプシン処理した後、浮遊培養することで得られる多能性を有した細胞であり、SSEA-3およびCD105が陽性である。

10

【0046】

<多能性幹細胞から骨格筋細胞を製造する方法>

本発明の骨格筋細胞誘導因子を多能性幹細胞において発現させる方法は特に限定されないが、例えば、以下の方法を用いることができる。尚、ここで「発現」とは、骨格筋細胞誘導因子がMyoDもしくはMyf5をコードする核酸である場合には、細胞内で、該核酸からMyoDもしくはMyf5タンパク質が（転写および）翻訳され生成することを意味し、骨格筋細胞誘導因子がMyoDもしくはMyf5タンパク質である場合には、該タンパク質が細胞内に導入されることと同義である。

【0047】

前記骨格筋細胞誘導因子が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をリポフェクション、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多能性幹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、アデノウイルスベクター、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などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、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) などが例示される。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドが例示される。ベクターには、MyoDまたはMyf5をコードするDNA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、蛍光タンパク質、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。プロモーターとして、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV (cytomegalovirus) プロモーター、RSV (Rous sarcoma virus) プロモーター、MoMuLV (Moloney mouse leukemia virus) LTR、HSV-TK (herpes simplex virus thymidine kinase) プロモーター、EF-αプロモーター、CAGプロモーターおよびTREプロモーター (tetO配列が7回連続したTet応答配列をもつCMV最小プロモーター) が例示される。TREプロモーターを用いた場合、同一の細胞において、tetRおよびVP16ADとの融合タンパク質またはリバーサ (reverse) tetR (rtetR) およびVP16ADとの融合タンパク質を同時に発現させることが望ましい。ここで、TREプロモーターを有しリバーサtetR (rtetR) およびVP16ADとの融合タンパク質を発現させることが可能なベクターを薬剤応答性誘導ベクターと称する。また、上記ベクターには、多能性幹細胞の染色体へ、プロモーターとそれに結合するMyoDまたはMyf5をコードするDNAからなる発現カセットを取り込み、さらに必要に応じて切除するために、この発現カセットの前後にトランスポゾン配列を有していてもよい。トランスポゾン配列として特に限定されないが、piggyBacが例示される。他の態様として、発現カセットを除去する目的のため、発現カセットの前後にLoxP配列を有してもよい。

20

30

40

【0048】

また、前記骨格筋細胞誘導因子がRNAの形態の場合、例えばエレクトロポレーション、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多能性幹細胞内に導入しても良い。該誘導因子が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

50

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多能性幹細胞内に導入してもよい。

【0049】

外因性の骨格筋細胞誘導因子を多能性幹細胞内で発現させるのは、多能性幹細胞を分化誘導条件で培養開始した直後でもよく、少なくとも、該培養開始から3日以内に行うことが望ましく、該培養開始から1日以内に行うことがより望ましい。分化誘導条件での培養開始から3日より後、例えば、4ないし7日後に骨格筋細胞誘導因子を発現させた場合には、骨格筋細胞への分化効率が低下する場合がある。また、外因性の骨格筋細胞誘導因子の発現を維持する期間は特に限定されないが、5日間以上であることが望ましく、好ましくは10日間以下（例、5、6、7、8、9、10日間）、より好ましくは6日間である。発現を維持する方法としては、特に限定されないが、骨格筋細胞誘導因子がRNAまたはタンパク質の場合、所望の期間において、導入を複数回行うことで実施可能である。他の態様として、薬剤応答性誘導ベクターを用いる場合、所望の期間において、ドキシサイクリンを培地中へ添加することで発現を維持する方法、トランスポゾン配列を有するベクターを用いる場合、所望の期間経過後、トランスポゼースを細胞内に導入することで発現を停止する方法およびLoxP配列を有するベクターを用いる場合、所望の期間経過後、Creを細胞内に導入することで発現を停止する方法などが例示される。

10

【0050】

本発明において、多能性幹細胞の分化誘導条件とは、胚様体を形成させず、特定の細胞種への誘導条件ではない接着培養条件であって、例えば、マトリゲル（BD）、I型コラーゲン、IV型コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせを用いてコーティング処理された培養皿へ接着させ、動物細胞の培養に用いられる培地を基本培地として血清または血清代替物を添加した培地で培養する条件である。この時、bFGFを含有していない培地であることが望ましい。ここで、基本培地としては、例えば、GMEM（グラスゴー最小必須培地：Glasgow Minimum Essential Medium）、IMDM（イスコフ改変ダルベッコ培地：Iscove's Modified Dulbecco's Medium）、199培地、イーグル最小必須培地（Eagle's Minimum Essential Medium）（EMEM）、 α MEM培地、ダルベッコ改変イーグル培地（Dulbecco's modified Eagle's Medium）（DMEM）、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、フィッシャー培地（Fischer's medium）、およびこれらの混合培地などが包含される。また、血清代替物として、アルブミン、トランスフェリン、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、Knockout Serum Replacement（KSR）（ES細胞培養時のFBSの血清代替物）、ITS-サプリメントおよびこれらの混合物などが包含される。

20

30

【0051】

本発明の分化誘導条件は、骨格筋細胞誘導因子の導入がなかった場合、骨格筋細胞が誘導されない条件であってもよい。

【0052】

好ましい分化誘導条件は、マトリゲルでコーティングされた培養皿に接着させた多能性幹細胞を20%KSRを含有するDMEMおよびF12等量混合培地で培養後、I型コラーゲンでコーティングされた培養皿に移し、5%KSRを含有する α MEM培地で培養する条件である。

40

【0053】

他の態様として、好ましい分化誘導条件は、マトリゲルまたはI型コラーゲンでコーティングされた培養皿に接着させた多能性幹細胞を20%KSRを含有するDMEMおよびF12等量混合培地で培養する条件である。骨格筋細胞誘導因子の導入から1日後、培養液を5%Knockout Serum Replacement（KSR）および100 μ M 2-メルカプトエタノール（2-ME）を有する α 最小必須培地（ α MEM）と交換した。

【0054】

作製した骨格筋細胞をより成熟させるため、上記分化誘導条件において骨格筋細胞誘導因子の発現に続いて、5%ウマ血清（HS）を添加したDMEM培地中で1日、2日または3日間、好ましくは2日間培養を継続することが好ましい。この時、IGF-1を含有していても良い。

50

【0055】

培養温度は、特に限定されないが、約30～40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは約2～5%である。

【0056】

このように製造された骨格筋細胞を含む細胞集団は、単一の細胞集団ではなく、他の種類の細胞が含有された細胞集団であってもよい。

【0057】

<多能性幹細胞からの骨格筋細胞製造用キット>

本発明は、多能性幹細胞からの骨格筋細胞の製造用キットを提供する。本キットには、上述した本発明の骨格筋細胞誘導因子、即ちMyoD、Myf5およびそれらをコードする核酸から選ばれる1以上の因子を含む骨格筋細胞誘導因子（例えば、核酸であればアルコール沈殿物、凍結TE溶液、凍結乾燥物など；タンパク質であれば凍結乾燥物、適当な緩衝液に溶解した凍結液剤など）、当該因子を導入する上記ベクター、細胞、試薬および培養液を含み得る。本キットには、さらに分化誘導の手順を記載した書面や説明書を含んでもよい。

10

【0058】

<骨格筋疾患治療または予防剤のスクリーニング方法>

本発明は、骨格筋疾患の治療または予防に有用な薬剤である候補薬剤のスクリーニング方法を提供する。

【0059】

本発明において、骨格筋疾患の治療または予防剤のスクリーニング方法として、以下の工程を含み得る：

20

(1) 候補物質を、骨格筋疾患に罹患した患者由来のiPS細胞から分化誘導した骨格筋細胞と接触させる工程、

(2) 候補物質と接触させなかった場合と比較して、当該骨格筋細胞の病態が緩和された場合、骨格筋疾患の治療剤または予防剤として選別する工程。

【0060】

本発明において、骨格筋疾患はミオパチーであってよい。例えば、ミオパチーは、筋ジストロフィー、遠位型ミオパチー（例えば、三好型ミオパチー）などである。筋ジストロフィーとは、ジストロフィンタンパク質の欠損または変異と関連する病態である。三好型ミオパチーとは、ジスフェリンの変異と関連する病態である。

30

【0061】

骨格筋疾患が筋ジストロフィーである場合、骨格筋細胞の病態は、当該骨格筋細胞におけるジストロフィンタンパク質の欠損もしくは変異または炎症マーカーの陽性として観察することができる。ここで、炎症マーカーとはプロスタグランジンD2またはNFκBの活性が例示される。病態の緩和は、例えば、ジストロフィンタンパク質もしくはエクソン・スキッピングによる短ジストロフィンタンパク質の発現または炎症マーカーの低下で確認することができる。

【0062】

骨格筋疾患が三好型ミオパチーである場合、骨格筋細胞の病態は、当該骨格筋細胞における筋肉の膜修復異常として観察することができる。ここで、筋肉の膜修復異常は、細胞質損傷部位全体（all cytoplasmic lesion）におけるFM1-43の取り込みにより観察することができる。病態の緩和は、例えば、FM1-43の取り込みの低下で確認することができる。

40

【0063】

本発明において、候補物質は、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、微生物発酵産物、海洋生物由来の抽出物、植物抽出物、精製タンパク質または粗タンパク質、ペプチド、非ペプチド化合物、合成低分子化合物、および天然化合物が例示される。

【0064】

本発明において、候補物質はまた、(1) 生物学的ライブラリー、(2) デコンヴォリューションを用いる合成ライブラリー法、(3) 「1ビーズ1化合物（one-bead one-compound）」ライブラリー法、および(4) アフィニティクロマトグラフィー選別を使用する合成ラ

50

イブラリー法を含む当技術分野で公知のコンビナトリアルライブラリー法における多くのアプローチのいずれかを使用して得ることができる。アフィニティークロマトグラフィー選別を使用する生物学的ライブラリー法はペプチドライブラリーに限定されるが、その他の4つのアプローチはペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の低分子化合物ライブラリーに適用できる (Lam (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145-67)。分子ライブラリーの合成方法の例は、当技術分野において見出され得る (DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909-13; Erb et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422-6; Zuckermann et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678-85; Cho et al. (1993) *Science* 261:1303-5; Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; Gallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233-51)。化合物ライブラリーは、溶液 (Houghten (1992) *Bio/Techniques* 13:412-21を参照のこと) またはビーズ (Lam (1991) *Nature* 354:82-4)、チップ (Fodor (1993) *Nature* 364:555-6)、細菌 (米国特許第5,223,409号)、孢子 (米国特許第5,571,698号、同第5,403,484号、および同第5,223,409号)、プラスミド (Cull et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-9) もしくはファージ (Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-90; Devlin (1990) *Science* 249:404-6; Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-82; Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-10; 米国特許出願第2002103360号) として作製され得る。

【実施例】

【0065】

<方法>

細胞の培養

ヒトiPS細胞株 (201B7、253G1および253G4) の維持培養は高橋らの方法と同様に行った (K. Takahashi et al., *Cell* 131, 861, 2007)。すなわち、ヒトiPS細胞はフィーダー細胞を用いて維持した。フィーダー細胞は、SNLを10 cm組織培養ディッシュあたり100万个播種して作製した。維持培地は、DMEM Glutamax F12 (Invitrogen) 500 mlに2 mM L-グルタミン (ナカライテスク)、1×非必須アミノ酸 (Non-essential amino acid) (Invitrogen)、50 mU/L ペニシリン/50 μg/L ストレプトマイシン (Invitrogen)、および100 μM 2-メルカプトエタノール (2-ME; ナカライテスク) を加えたものを基本培地とし、これに20%になるようにKnockout Serum Replacement (KSR; Invitrogen) を加え、4 ng/ml bFGF (Wako) を添加したものをを用いた。Tetベクター導入後のヒトiPS細胞では、さらに100 μg/mlのネオマイシン (ナカライテスク) を添加した培地にて維持培養した。

【0066】

継代については、ヒトiPS細胞のコロニーが80~90%コンフレントになった時点で行った。細胞解離液 [0.25%トリプシン (Invitrogen) /100 μg/ml コラゲナーゼIV (Invitrogen) /1 mM CaCl₂ (ナカライテスク) /20%KSR] でフィーダー細胞を剥がし、その後スクレイパーで掻扱した。数十個の細胞が一塊となった状態で全体を約3倍に希釈し、次のフィーダー細胞の上に播種して、37°C、5%CO₂、100%湿度環境のインキュベータで培養した。

【0067】

RIKEN BRCから提供を受けた不死化ヒト筋芽細胞株Hu5/E18は、橋本らに記載されるように維持および分化させた (Hashimoto, N., et al. *Mechanisms of development* 125, 257-269, 2008)。

【0068】

三好型ミオパチー (MM) 患者由来のiPS細胞株の作製

本実施例は、施設内倫理委員会の承認を受け、ヘルシンキ宣言の下に実施した。守秘義務を保護するためにMM患者をコード化し、書面によるインフォームドコンセントを得た。MM患者は、ジスフェリン遺伝子に2つの変異を有することが分かっていた。患者由来のiPS細胞は、房木らに記載されるように線維芽細胞から作製した (Fusaki, N. et al., *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85, 348-362, 2009)。

【0069】

cDNAのクローニング

MyoDは、MGCクローンよりcDNAを購入（MGC: 71135, GenBank: BC064493.1）した。これに対して下記のプライマーを用い、PCR反応で増幅しcDNAフラグメントを得た。Myf5は、分化したヒトiPS細胞からのcDNAよりKOD plus Neoを酵素としてPCR反応にて増幅しcDNAフラグメントを得た。これらのcDNAフラグメントをpENTR Directional TOPO Cloning Kits（Invitrogen）を用いて添付文書通りにエントリーベクターに組み込んだ。具体的には、PCR産物4 ng、Salt Solution 1 μ l、蒸留水3.5 μ l、およびTOPOベクターpENTR/D 1 μ lを反応させた。その後、大腸菌にベクターを組み込み、大腸菌を増幅させ、エントリーベクターを獲得した。使用したプライマーの配列は以下のとおりである。

10

MyoD-クローニングFw：CACCATGGAGCTACTGTCGCCA（配列番号5）

MyoD-クローニングRv：TCAGAGCACCTGGTATATCGGGT（配列番号6）

Myf5-クローニングFw：CACCATGGACGTGATGGATGGCTG（配列番号7）

Myf5-クローニングRv：TCATAGCACATGATAGATAA（配列番号8）

【0070】

テトラサイクリン応答性遺伝子強制発現ベクターの作製

テトラサイクリン応答性遺伝子強制発現piggyBacベクターはWoltjenらが開発したKW111を用いた（K. Woltjen et al., Nature 458, 766, 2009）。このベクターはリバーステトラサイクリントランスアクチベーター（reverse tetracycline transactivator）（rtTA）とテトラサイクリン応答性領域（TRE）を両方組み込んだものであり、またターゲット遺伝子と同調してmCherryが発現するようデザインされている（図1aおよび14a）。またネオマイシン耐性遺伝子により薬剤による選別が可能である。このベクターとpENTR/D-TOPOにMyoDもしくはMyf5のcDNAを組み込んだエントリーベクターとを混合し、LRクロナーゼ（Invitrogen）を用いた組換え反応によりテトラサイクリン応答性MyoD（またはMyf5）強制発現piggyBacベクターTet-MyoD（図1a）またはTet-Myf5（図14a）を作製した。

20

【0071】

Tet-ベクターのiPS細胞への導入

ヒトiPS細胞株は10 cmディッシュ1枚分の細胞数を準備した。前日に、SNLフィーダー細胞をゼラチンコートした6ウェルプレート（IWAKI）に 3.3×10^5 細胞/ウェルの密度で培養した。SNLフィーダー細胞がコンフレントになった状態の6ウェルプレートに、維持培養時と同様の方法で回収したヒトiPS細胞株を播種した。翌日、ベクターのトランスフェクションを行った。Tetベクターと、CAGプロモーター下流にトランスポゼースを組み込んだベクター（CAG-PBase）とをそれぞれ1 μ g準備し、100 μ lのOpti-MEM（Invitrogen）に溶解した。そこに3~8 μ lのFugeneHD（Roche）を添加し、2秒間ボルテックスにて混和した。15分室温で反応させた後、6ウェルプレートの培養液中に混合物を添加し、37°Cで培養した。24時間後に培地交換を行い、さらに24時間後に100 μ g/mlのネオマイシン（ナカライテスク）含有培地に交換した。その後は毎日ネオマイシン含有培地での培地交換を行い、ネオマイシン耐性に形質転換した細胞を選別した。

30

【0072】

Tet-MyoDおよびTet-Myf5 iPS細胞のクローンの選別

40

得られたクローンは、培地にて50倍に希釈したマトリゲル（Invitrogen）にてコートした6ウェルプレートに播種した。翌日よりドキシサイクリン（Dox; LKT Laboratories）を1 μ g/mlの濃度となるように培地に添加した。Dox添加後48時間で細胞を回収し、LSR Fortessa（BD）にてmCherryの発現強度を解析し、強発現のクローンを選別した（図3a、5a、12aおよび14c）。

【0073】

MM患者由来のiPSCにおけるジスフェリンの過剰発現

ジスフェリンcDNAは、EF1 α プロモーターによって対象遺伝子を駆動し、ピューロマイシン耐性遺伝子を共発現するデスティネーションpiggyBac（PB）ベクターに挿入した（PB-ジスフェリンベクター）。Tet-MyoDをトランスフェクトしたMM hiPSC（MyoD-MM hiPSC）

50

を、マイトマイシンC処理SNL-PHフィーダー細胞（ネオマイシン、ピューロマイシンおよびハイグロマイシン耐性である）上に播種した。翌日、1 μ g PB-ジスフェリンベクターと1 μ g PBトランスポゼースプラスミド16の両方をFuGENE HD (Roche) により製造者のプロトコールに従って、MyoD-MM hiPSCにトランスフェクトした。トランスフェクションから48時間後、Tet-MyoDベクターとPB-ジスフェリンベクターの両方を保持する細胞を選別するために、100 μ g/mLのG418（ナカライテスク）および1 μ g/mLのピューロマイシン（ナカライテスク）を添加した。選別後、ウェスタンブロッティングにより、ジスフェリンを適正に発現する適切なMyoD-MM+ジスフェリンhiPSCクローンを選別した。

【0074】

蛍光免疫染色によるMyoD発現確認

Dox添加によりMyoDを強制発現させた細胞を、4%パラホルムアルデヒド（ナカライテスク）/PBSを用いて室温で20分間固定し、PBSで各5分間、3回洗浄した後、1%ヤギ血清（Sigma）、0.1%ウシ血清アルブミン（Sigma）および0.2%トライトンX-100（ナカライテスク）添加PBSにてブロッキングを室温で1時間行った。一次抗体は、上記ブロッキング液中に抗MyoD（ウサギポリクローナル；Santacruz）を添加し、1:400の濃度で希釈した。4℃で16～18時間抗体を反応させ、0.2%トライトンX-100添加PBS（PBST）で3回洗浄した。二次抗体として抗ラットIgG-Alexa488（Molecular Probes）を1:500でPBSTに希釈し、4℃で16～18時間反応させた。その後、細胞の核を染色するため、5 μ g/mlのDAPI（Sigma）をPBSTで5000倍希釈したものと細胞を室温で5分間反応させ、PBSにて3回洗浄した後、倒立蛍光顕微鏡システム（キーエンス）にて観察した。

【0075】

PCRによる遺伝子発現解析

細胞からのmRNAをSepasol(R)-RNA I Super G（ナカライテスク）で抽出し、SuperScript III逆転写キット（Invitrogen）を用いてプロトコールに従いcDNA合成した。その産物に対して下記のプライマーとEx Taq（タカラバイオ）を用いたコンベンショナルPCR反応を行い、アガロースゲル電気泳動で遺伝子発現のバンドを確認した。PCR反応はサーマルサイクラー-Veriti (ABI) にて行い、アニーリング温度60℃、25～30サイクルで反応させた。定量PCRは、プローブセット、SYBR Green (Applied Biosystems) およびStep Oneサーマルサイクラー (Applied Biosystems) を用いて実施した。 β -アクチンをインバリアントコントロールとして使用した。標準化のために、7日目のサンプルの値をコントロール値（=1.0）として使用した。（図7bおよびc）。

【0076】

コンベンショナルRT-PCRのためのプライマー

トランスジェニック-MyoD (Tg) Fw: CACCATGGAGCTACTGTGCGCA (配列番号9)

トランスジェニック-MyoD (Tg) Rv: TCAGAGCACCTGGTATATCGGGT (配列番号10)

内因性-MyoD (Endo) Fw: GACTGCCAGCACTTTGCTATCT (配列番号11)

内因性-MyoD (Endo) Rv: CCTCAGAGCACCTGGTATATCG (配列番号12)

トランスジェニック-Myf5 (Tg) Fw: CACCATGGACGTGATGGATGGCTG (配列番号13)

トランスジェニック-Myf5 (Tg) Rv: TCATAGCACATGATAGATAA (配列番号14)

内因性-Myf5 (Endo) Fw: GCCTGAAGAAGGTCAACCAG (配列番号15)

内因性-Myf5 (Endo) Rv: ATTAGGCCCTCCTGGAAGAA (配列番号16)

ミオゲニンFw: TGGGCGTGTAAGGTGTGTAA (配列番号17)

ミオゲニンRv: CATGGTTTCATCTGGGAAGG (配列番号18)

CK-M Fw: GCATCTGGCACAATGACAAC (配列番号21)

CK-M Rv: CACCAGCTGCACCTGTTCTA (配列番号22)

ジストロフィンFw: AACAAAGCTCAGGTCGGATT (配列番号23)

ジストロフィンRv: ACTGGCATCTGTTTTTGGAG (配列番号24)

Oct3/4 Fw: GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG (配列番号25)

Oct3/4 Rv: CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC (配列番号26)

Nanog Fw: CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC (配列番号27)

Nanog Rv : CGGAAGATTCCAGTCGGGTTCCACC (配列番号 28)
 Sox2 Fw : GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG (配列番号 29)
 Sox2 Rv : TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG (配列番号 30)
 SeV Fw : GGATCACTAGGTGATATCGAGC (配列番号 31)
 SeV Rv : ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC (配列番号 32)
 β -アクチンFw : CTCTCCAGCCTTCCTTCCT (配列番号 19)
 β -アクチンRv : CACCTTCACCGTTCCAGTTT (配列番号 20)

【0077】

リアルタイム定量RT-PCRのためのプライマー

mCherry Fw : CATCCCCGACTACTTGAAGC (配列番号 33)
 mCherry Rv : CCCATGGTCTTCTTCTGCAT (配列番号 34)
 内因性-MyoD (Endo) Fw : CACTCCGGTCCCAAATGTAG (配列番号 35)
 内因性-MyoD (Endo) Rv : TTCCCTGTAGCACCACACAC (配列番号 36)
 CK-M Fw : ACATGGCCAAGGTACTGACC (配列番号 37)
 CK-M Rv : TGATGGGGTCAAAGAGTTCC (配列番号 38)
 ジストロフィンFw : GATGCACGAATGGATGACAC (配列番号 39)
 ジストロフィンRv : TGTGCTACAGGTGGAGCTTG (配列番号 40)
 β -アクチンFw : CACCATTTGGCAATGAGCGGTTC (配列番号 41)
 β -アクチンRv : AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT (配列番号 42)

【0078】

Tet-MyoD iPS細胞の骨格筋細胞への分化誘導

はじめにクローニングされていないTet-MyoDヒトiPS細胞で、骨格筋分化誘導を行った(図2a)。Mahmoodら(A. Mahmood, et al., J Bone Miner Res 25, 1216, 2010)の骨格筋前駆細胞誘導法に従い、SB outgrowth細胞まで誘導し、その後SB outgrowth培地にDoxを4日間加えた。SB outgrowth培地は、SF-03(三光純薬)、0.2%ウシ血清アルブミン(Sigma)、0.1%脂質(lipid)(Invitrogen)、100 μ M 2-ME、および1 μ M SB431542(Milteny Bio)を加えたものであった。4日経過後に、培地をDMEM(ナカライテスク)に2%ウマ血清(Sigma)、IGF-1(Peprotech)10 ng/mlおよび100 μ M 2-MEとなるように加えたもの(2%ウマ血清DMEM)に変更した。培地を変更して4日間経過した後、免疫染色を行い、骨格筋への分化誘導がなされているか確認した。

【0079】

第二の分化誘導法(図2d)として、桜井らの行った沿軸中胚葉誘導法を一部改変して行った。具体的には、継代時にI型コラーゲンコートディッシュ(IWAKI)に播種し、培地も α MEM(ナカライテスク)に5%KSRおよび100 μ M 2-MEを加えた培地とした。ここに播種後7日目よりドキシサイクリン(Doxycycline (Dox))を加え、10日目に上記の誘導法と同様の2%ウマ血清DMEM培地に変更した。ここでもDoxを加え続けた。17日目に免疫染色を行い、骨格筋への分化誘導がなされているか確認した。

【0080】

第三の分化誘導法として、培養ディッシュのコーティング、培地、およびDoxを入れる期間を様々に改変して適切な条件検討を行った。使用したコーティング基質は、I型コラーゲン、マトリゲル(Invitrogen)および0.1%ゼラチン(ナカライテスク)であった。使用した培地は、(1) α MEMに5%KSRおよび100 μ M 2-MEを添加したもの(5%KSR α MEM)、(2) DMEM(ナカライテスク)に5%ウマ血清、IGF-1 10 ng/mlおよび100 μ M 2-MEを添加したもの(5%HS DMEM)ならびに(3) DMEMに5%FBS、100 μ M 2-MEおよび1%Ultros er G(PALL Life Sciences)を添加したもの(5%FBS DMEM)の3種類であった(図4cおよび図6)。いずれの条件でも初期7日間はマトリゲルコート10 cmディッシュを使用し、その時点で細胞を0.25%トリプシン/1 mM EDTAにて解離し、24ウェルプレートの1ウェルあたり 1×10^5 細胞を播種し培養を継続した。

【0081】

最終的な分化誘導法(図7)として、MyoD-hiPSCを、フィーダー細胞の不在下、I型コラ

10

20

30

40

50

ーゲンコートディッシュ (IWAKI) 又はマトリゲル (BD) コートディッシュに播種した。マトリゲルは、霊長類ES培地で1:50に希釈した。MyoD-hiPSCをトリプシン処理し、単一の細胞に解離した。6ウェル培養プレート1ウェルに対する細胞数は $2.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ の範囲であった。培養液を、bFGFを有さず、10 μ M Y-27632 (ナカライテスク) を有するヒトiPS培地に変更した。24時間後、1 μ g/mLのドキシサイクリン (LKT Laboratories) を培養液に添加した。さらに24時間後、培養液を、 α 最小必須培地 (α MEM) (ナカライテスク) に5% Knockout Serum Replacement (KSR) (Invitrogen)、50 mU/L ペニシリン/50 μ g/L ストレプトマイシン (Invitrogen) および100 μ M 2-メルカプトエタノール (2-ME) を添加したものに变更した。さらに5日後、培養液をDMEMに5% ウマ血清 (Sigma)、50 mU/L ペニシリン/50 μ g/L ストレプトマイシン、10 ng/mL 組換えヒトインスリン様成長因子1 (Peprotech)、2 mM L-グルタミンおよび100 μ M 2-MEを添加したものに变更した。約2日後、筋原性の産物 (myogenic products) を評価した。

【0082】

siRNAトランスフェクション

T、Tbx6およびネガティブコントロールに対するsiRNAを購入した (Sigma, SASI_Hs01_00221962, SASI_Hs01_00166068およびSIC-001-10)。6ウェルのプレート中、 $2.0 \sim 3.0 \times 10^5$ 細胞密度で播種したhiPS細胞に50 nMのsiRNAを、それぞれ0日目および3日目にトランスフェクトした。siRNAは、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いて、製造者のプロトコールに従ってトランスフェクトした。

【0083】

Tet-Myf5 iPS細胞の骨格筋細胞への分化誘導

Tet-Myf5 iPS細胞クローンは6 cmディッシュ1枚分の細胞数を用意し、培地にて50倍に希釈したマトリゲルにてコートした10 cmディッシュに維持培養と同じ方法で播種した。翌日DoxをヒトiPS細胞用培地に添加し、播種後7日目まで毎日培地交換を行った。播種後7日目に、0.25%トリプシン/1 mM EDTAにて細胞を解離し、I型コラーゲンコート24ウェルプレート (IWAKI) に1ウェルあたり 1×10^5 細胞密度で播種した。使用した培地は α MEMに100 μ M 2-MEおよび50 mU/L ペニシリン/50 μ g/L ストレプトマイシンを添加したものに、さらに5% KSRを加えた培地であった。この培地で48時間培養した後、DMEM/F12 (Invitrogen) に2 mM L-グルタミン (ナカライテスク)、1 $\times$ 非必須アミノ酸 (Non-essential amino acid) (Invitrogen)、100 μ M 2-ME、および50 mU/L ペニシリン/50 μ g/L ストレプトマイシンを加えたものに、さらに2% ウマ血清を加えた培地に交換し、さらに48時間培養した。

【0084】

分化骨格筋の免疫染色

分化した細胞を、2% パラフォルムアルデヒド (ナカライテスク) /PBSを用いて4°Cで10分間固定し、PBSで各5分間、3回洗浄した後、メタノール (ナカライテスク) に1% 過酸化水素 (Wako) を加えたもので脱色を15分間行った。混合物を再度PBSで4°C、5分間、3回洗浄し、2% スキムミルク (BD) /PBST (PBSMT) にてブロッキングを4°Cで15分間行った。一次抗体は、上記PBSMTブロッキング液中に、ラットモノクローナル抗体 (mAb) ラミニン (1:15; ALEXIS)、マウスmAb抗ヒトミオシン重鎖 (MF20) (1:400; R&D)、マウスmAbミオゲニン (F5D) (1:400; SANTA CRUZ)、ウサギポリクローナル抗体 (pAb) MyoD (M-318) (1:400; SANTA CRUZ)、マウスmAbヒトスペクトリン (1:100; Leica)、マウスmAb抗ヒト核 (1:200; MILLIPORE)、マウスmAb α 骨格筋アクチン (1:200; Acris)、ウサギpAbクレアチンキナーゼM (Y14) (1:100; Bioworld Technology) およびマウスmAb抗ジスフェリン (NCL-Hamlet) (1:25; Leica) をそれぞれ希釈して使用した。室温で1時間細胞を反応させ、PBSMTで3回洗浄した。二次抗体として、Alexa fluor488結合ヤギ抗ウサギまたはマウスIgG、Alexa fluor568結合ヤギ抗ウサギまたはマウスIgG (すべて1:500; すべてInvitrogen)、およびHRP結合ヤギ抗マウスIgG (IHCでは1:200、ウェスタンブロッティングでは1:2000; Vector) をPBSMTで希釈したものを添加し、室温で1時間混合物を反応させた。室温でPBSMTにて10分間2回、PBSTにて10分間1回洗浄した後、DAB発色キット (ナカラ

10

20

30

40

50

イテスク)を用いて発色させた。適切な発色後に細胞をPBSTで洗浄し、反応を停止させた。サンプルは、LMS710共焦点顕微鏡(Carl Zeiss)または倒立顕微鏡(オリンパス)で観察した。

【0085】

移植研究

非肥満糖尿病/重症複合免疫不全(NOD/SCID)マウスはCharles River Laboratoriesから購入し、ジストロフィンを発現しないDMD-ヌルマウスと交配させた。NOD-DMDマウスを作出し、in vivo移植研究のために使用した。筋肉内細胞移植の前に、マウスをジエチルエーテルで麻酔後、カルジオトキシンで損傷させた。カルジオトキシン損傷後24時間にて、6日目のMyoD-hiPSC($1.0 \times 10^6 \sim 9.5 \times 10^6$ 細胞/50 ml 10%マトリゲル(aMEM中))を左TA筋に注入した。本研究で使用したマウスはすべて移植後28日目に人道的に犠死させ、組織サンプルを回収した。

10

【0086】

C2C12細胞との共培養

分化したMyoD-hiPSCを、GFPが組み込まれた(integrated)C2C12細胞株と共培養した。はじめにMyoD-hiPSCを7日間分化させた。7日目に、培地をDMEMに5%ウマ血清を添加したものに交換し、 1.0×10^5 C2C12細胞をMyoD-hiPSC上に播種した。Bio Station CT(ニコン)を共培養サンプルのタイムラプス観察に使用した。撮影間隔は1時間であった。

【0087】

ミトコンドリア染色

MitoTracker Red CMXRos(Invitrogen)を添付のプロトコールに従って使用した。サンプルは、BZ-9000E(キーエンス)で観察した。

20

【0088】

<結果>

Tet-MyoD hiPSCの作製および評価

上述したTet-MyoDベクターをヒトiPS細胞にトランスフェクションし、ネオマイシン耐性を獲得した細胞群をドキシサイクリン(Doxycyclin)(Dox)添加群とDox非添加群に分け、24時間後にmCherryの発現およびMyoDの発現を観察した。Dox添加群においてのみMyoDタンパク質がmCherryと一致して発現していることが確認された(図1c)。また、同様の実験において、mRNAレベルでの発現解析も行った。その結果、Dox添加群では外因性MyoD(Tg)は強く誘導され、内因性MyoD(Endo)も誘導されていた(図1d)。Dox非添加群においても弱く外因性MyoDの発現が認められることから、Dox非添加状態でも発現がリークする細胞が存在すると考えられ、クローンの選別を行う必要性が示唆された(図1d)。Dox投与後7日目には、多核を有する、ミオシン重鎖(MHC)陽性またはミオゲニン陽性筋線維が検出された(図1e)。

30

【0089】

次にTet-MyoD hiPSCの分化能力について検討した。まずはこれまで報告されている骨格筋細胞誘導法であるSB-outgrowth(SB-OG)細胞誘導法(A. Mahmood, et al., J Bone Miner Res 25, 1216, 2010)にて検証した。図2aに示すように、得られたSB-OG細胞をDox添加期間および2%ウマ血清DMEM(図中「DMEM 2%HS 10ng/ml IGF-1」)培地での誘導期間を変えて分化誘導し、ミオシン重鎖(Myosin Heavy Chain)(MHC)陽性細胞数を計測して評価した。染色の代表的な像を図2bに示す。Dox添加群では褐色に染色されたMHC陽性細胞が数多く認められ、一部は多核になっていることから成熟した骨格筋細胞であることが分かる(図2b、矢印)。一方、Dox非添加群ではごく小さなMHC陽性細胞が散見されるのみであった(図2b、下図)。細胞数を計測すると、いずれの条件においても、Dox添加群において非添加群に比べて5~10倍多いMHC陽性骨格筋細胞が認められた。また、Dox添加群間で比較すると、Doxを6日間添加し、2%ウマ血清DMEM培地で1日間培養した時にもっとも効率よくMHC陽性骨格筋細胞に分化した(図2c)。また、別の分化誘導法にても骨格筋への分化が示された。図2dに示すように、未分化hiPS細胞をI型コラーゲンディッシュ上で7日間分化させ、さらに3日間Dox添加群とDox非添加群とに分け培養し、その後2%ウマ血清

40

50

DMEM培地で7日間分化誘導し、MHCの発現を観察した。分化10日目でDox添加群でのみmCherryの発現を認め、分化17日目ではやはりDox添加群でのみ、MHC陽性骨格筋細胞を認めた（図2e）。この誘導法では、Dox非添加群では全くMHC陽性骨格筋細胞が分化しなかったことを考えると、テトラサイクリンによるMyoD強制発現は、骨格筋分化を支持しない培養条件でも十分に骨格筋を分化誘導できることが分かった。

【0090】

Tet-MyoD hiPSCのクローン選別

上述したようにクローンの選別を行った。ネガティブコントロールである遺伝子改変していない201B7とmCherryの発現強度を比較した。24クローンのうち比較的高度なmCherryの発現を示すクローンNo. 9、16および20（B7 #9、B7 #16、B7 #20）を選択した（図3a）。また、それぞれのクローンをDox添加群および非添加群に分け、48時間後にmRNAを回収し、PCRにて遺伝子発現を解析した（図3b）。Dox非添加群では外因性MyoD（Tg）のリークした発現は認めず、内因性MyoD（Endo）の発現も認めなかった（図3b）。Dox添加群ではいずれのクローンもMyoD（Tg）、MyoD（Endo）両方の発現を認めた。Doxにより外来遺伝子発現が誘導され、内因性のMyoDも発現することが確認された（図3b）。

【0091】

Tet-MyoD hiPSCクローンからの骨格筋細胞誘導

まずB7 #16を用いて、骨格筋分化能を定性的に評価した。図4aに示すように分化誘導を行い、14日後にMHCの発現を観察した。Dox添加群では褐色に染色されたMHC陽性骨格筋細胞が多数確認された（図4b、左）。高倍率での観察では、多核になり成熟していると考えられる骨格筋細胞も認めた（図4b、中央）。一方、Dox非添加群ではMHC陽性細胞は全く認められなかった（図4b、右）。このことから、選別をしたTet-MyoDクローンにおいても、Doxにより成熟した骨格筋細胞への分化誘導が可能であることが分かった。

【0092】

次にB7 #9およびB7 #20を使用し、MHC陽性細胞の計測により至適条件を検討した。図4cに示すようにDox添加期間を変え、さらに培地の組成も変えて、B7 #9では16条件（図4d）、#20では12条件（図4e）を比較した。B7 #9においては、Dox添加期間の検討において、分化3日目～7日目の期間にDoxを添加することが重要であることが分かった（図4d丸付き数字1および丸付き数字2）。また培地の比較においては、5%KSR α MEMが最も適しており、培養ディッシュのコートニングはI型コラーゲンでもゼラチンでも差は認めなかった（図4d）。B7 #20においては、培地の組成やコートニングには影響を受けず（図4e）、Dox添加期間が長い条件ではMHC陽性骨格筋細胞が多く認められた（図4e丸付き数字1および丸付き数字3）。以上の結果から、Tet-MyoD hiPSCは分化誘導3日目くらいからのある程度分化初期段階にDoxを添加し、その後4日以上Doxを添加し続けることによって、約2週間後には成熟した骨格筋細胞が誘導できることが分かった。

【0093】

Tet-MyoD hiPSCのさらなるクローン選別

比較的高度なmCherryの発現を示すクローンG4 #31、G1 #17およびG1 #23をさらに選択した（図5a）。外因性MyoD1のリークのない内因性MyoD1の発現は、3種の別個のhiPS細胞株201B7、253G1および254G41由来のMyoD-hiPSCクローン間で確認した（図5b）。

【0094】

分化用プロトコール

まず、Dox投与の開始時点を、mCherry陽性細胞が高度に出現することから、1日目と決定した（図6a）。さらに分化したMyoD-hiPSCは、Dox存在下であっても4日目で非応答性であった（図6b、矢頭）。次に、Dox投与期間について、MyoD-hiPSCを筋原性系列にコミットさせるのに十分であったことから、5日間超と決定した（図6c）。最後に、MyoD-hiPSCの筋原性分化のためのプロトコールを確立した（図7a）。

【0095】

分化プロトコールに従って（図7a）、未分化マーカーおよび筋原性マーカー両方の経時的遺伝子発現を解析した（図7f）。外因性MyoD1発現と同義であるmCherryの発現は、2日

10

20

30

40

50

目に最初に検出された。Oct3/4、Sox2、Nanogなどの未分化マーカーの発現は、分化が進むにつれて漸減した（図7b）。MyoD1により正に制御される、内因性MyoD1およびミオゲニンの両方の発現は、3日目に現れ、7日目に発現ピークに達した（図7b）。さらに、クレアチンキナーゼの筋肉型アイソフォーム（creatine kinase muscle isoform）（CK-M）やジストロフィンなどの成熟筋線維マーカーも、外因性MyoD1の発現後に検出された（図7b）。このような発現パターンにより、外因性MyoD1は、未成熟細胞においても、発生と同じ機構における筋形成のための主要な制御因子（dominant regulator）として作用し得ることが示される。

【0096】

Doxによって誘導される筋肉分化が、中胚葉分化を介して進行したかどうかをさらに評価するために、中胚葉マーカー遺伝子の発現を解析した。予想外にも、汎中胚葉マーカー（pan-mesodermal marker）ブラキユリ（brachyury）（T）、沿軸中胚葉マーカー（Mesp2、Tbx6など）、皮筋節マーカーPax3が、分化の間に一時的に発現した（図7c）。

【0097】

中胚葉遺伝子発現の役割についての解析

このような中胚葉遺伝子の発現が、本プロトコールにおける筋原性分化に必須であるかどうかに取り組むために、中胚葉遺伝子発現を分化初期の間にTまたはTbx6に対するsiRNAで抑制した。TまたはTbx6の発現は、該siRNAにより、3日目および5日目においてそれぞれ強力に抑制された（図8aおよび8b）。さらに、MyoD1の上流遺伝子であるPax3の発現も、TおよびTbx6の両方のsiRNAによって抑制された。中胚葉遺伝子の発現を抑制したにも関わらず、筋原性分化の効率は影響を受けなかった（図8cおよび8d）。このことから、未分化hiPSCにおける外因性のMyoD1の発現は、該細胞において前筋原性（premyogenic）の中胚葉遺伝子の発現を促進し得るが、未分化hiPSC集団の大部分は、成熟筋細胞へと直接分化することが示唆された。

【0098】

クローン間差異（clonal variation）

本分化系において、3種の別個のhiPSCクローンはいずれもMHC陽性筋線維へと促進され得て（図9a）、MHC陽性細胞の効率は、オリジナルクローンとは無関係に、70～90%の範囲であった（図9b）。分化したMyoD-hiPSCは、紡錘状に均一に形を変えた。従って、本分化系は、クローン間の差異を克服し、外因性MyoD1の優勢な発現によって効率的かつ均一な筋原性分化を実現する。

【0099】

筋原性の特性評価

筋原性の特性を評価するために、組織学的分析を実施した。未分化hiPSCはほとんどミトコンドリアを有さなかったが、分化したMyoD-hiPSCは核周囲に多くのミトコンドリアを有した（図9c）。さらに、分化したMyoD-hiPSCは、成熟筋細胞マーカーである骨格筋アクチン及びCK-Mを発現した（図9d）。これらの特性はすべて、MyoD-hiPSC由来の、Doxによって誘導される筋原細胞が成熟筋細胞の特徴を有することを示唆する。分化したMyoD-hiPSCのグローバルな遺伝子プロファイルは、分化Hu5/E18のものと非常に近似しており、未分化hiPSCのものとはかなり異なっていた（図10e）。さらに、筋系統に着目し、筋肉分化に関連する特定の遺伝子を選択し、そのmRNA発現プロファイルを解析した。分化したMyoD-hiPSCは、MyoD1の上流転写因子であるMyf5を除いて、分化したHu5/E18と同様に、選択した遺伝子の高発現を示した（図10f）。まとめると、MyoD-hiPSCから作製される、Doxによって誘導される筋原細胞は、分化したヒト筋芽細胞と類似した成熟筋細胞を示す。しかし、その分化プロセスは、MyoD-hiPSCがヒト筋芽細胞とは異なってMyf5を発現しないこと、および未分化細胞からMyoD1陽性筋原細胞へと飛び越え得ることから、全く異なるものである。

【0100】

次に、Doxによって誘導される筋原細胞の機能的特性を評価した。電子顕微鏡法による

10

20

30

40

50

構造解析により、分化したMyoD-hiPSCが、分化したHu5/E18（図11b）と類似する、将来のZ線様構造（図11a、矢頭）を含む筋原線維（図11a、赤矢印）、およびミオシン線維（図11a、矢印）を有することが明らかとなった。このような構造特性が収縮に十分であるかどうかを評価するために、Doxによって誘導される筋原細胞に電気刺激を負荷した。実際のところ、誘導された筋線維は、電気パルスと一致して収縮し得た。筋原細胞が互いに融合し多核筋線維を形成できることは区別可能な特徴である。融合能に取り組むために、分化したMyoD-hiPSCをマウス筋芽細胞株C2C1229と共培養した。共培養後2日目に、mCherry陽性ヒト筋原細胞が、GFP陽性マウス筋原細胞と融合した（図11c）。複数のヒト核が、マウス筋線維において検出され、in vitroでの細胞融合が実証された（図11d、矢印）。

【0101】

最後に、分化したMyoD-hiPSCを非肥満糖尿病/重症複合免疫不全-デュシェンヌ型筋ジストロフィーヌル30（NOD/scid-DMD）マウス（Online Method）の前脛骨筋（TA筋）に移植した。移植後28日目に、シグナルは少ないものの、マウスTA筋において、抗ヒトスペクトリン（図11e）および抗ヒトジストロフィン（図11f）の特異的染色が検出された。これらの結果は、MyoD-hiPSC由来の筋細胞が、in vitroおよびin vivoにて融合能を有することを示す。まとめると、MyoD-hiPSC由来の、Doxによって誘導される筋原細胞は、分化したヒト筋芽細胞と同様に、筋肉としての複数の機能的特性を獲得する。

【0102】

三好型ミオパチー（MM）hiPSC由来の分化細胞の解析

Tet-MyoD1ベクターを導入した、2つのMM患者由来hiPSCクローン（MyoD-MM #5およびMyoD-MM #6）は、他のhiPSCと形態学的に同一であり（図12a）、SeVベクターの発現が残存することなく、内因性の未分化マーカー遺伝子を発現した（図12b）。MyoD-MM hiPSCは、MHCまたはミオゲニン陽性成熟筋細胞に分化し得た（図12c）。

【0103】

次に、2つのレスキュークローン（+Dysfにより示されるもの）をジスフェリンの過剰発現によりMyoD-MM hiPSCから樹立した。MyoD-MM #5および#6はジスフェリンを発現しなかった一方、2つのレスキュークローンおよびコントロールMyoD-B7 #9において、ジスフェリンの発現が確認された（図12d）。

【0104】

最後に、病態を再現するために、そのままの（intact）、およびレスキューされたMM患者由来iPSCの両方における膜修復機能をコントロールMyoD-hiPSCとともに評価した（図12eおよび12f）。MyoD-MM #5由来の筋線維は、細胞質損傷部位全体における全体的なFM1-43の取り込みを示し、二光子レーザーによって誘導される筋線維鞘損傷後の膜修復異常を示す一方（図13a、左）、MyoD-MM #5 +DysfおよびMyoD-B7 #9由来の筋線維は、ダメージ領域での局所的なFM1-43の取り込みを示す（図13a、中央および右）。実際に、MM患者由来の筋線維で観察されたFM1-43の取り込みは外見上妨げられていないが、ジスフェリンの過剰発現によって、コントロールレベルと同様に、効率的な膜の再封鎖が促進された（図13b）。従って、MMの病態は、患者由来のiPSCを用いて首尾よく再現された。これは、この系が、その再現性、高効率および短い誘導期間のために、MMのための薬物スクリーニング系を確立するのに有用であることを示唆する。

【0105】

Tet-Myf5 hiPSCの作製およびクローンの選別

上述したTet-Myf5ベクターをヒトiPS細胞にトランスフェクションし、ネオマイシン耐性を獲得した細胞群から単一コロニーをピックアップし、24個のクローンを得た。それぞれのクローンをDox添加群および非添加群に分け、48時間後にmCherryの発現解析にてクローンの選別を行った（図14aおよび14b）。24クローンのうち比較的mCherryの発現の高度なクローンである、クローンNo. 2、18および21（#2、#18、#21）を選択した（図14c）。また、Dox添加群および非添加群のそれぞれにつき、48時間後にmRNAを回収しPCRにて遺伝子発現を解析した（図14d）。Dox非添加群では外因性Myf5（Tg）のリークした発現は認めず、内因性Myf5（Endo）をはじめ、Myf5で誘導されるMyoDやミオゲニンの発現も認めな

10

20

30

40

50

った（図14d）。Dox添加群ではいずれのクローンもMyoD（Tg）およびMyoD（Endo）両方の発現を認め、Doxにより外因性遺伝子発現が誘導され、内因性の骨格筋分化遺伝子も発現することが確認された（図14d）。

【0106】

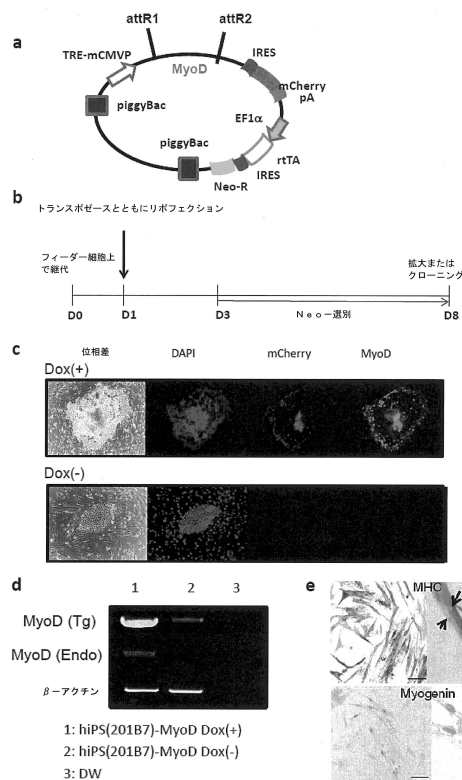
Tet-Myf5 hiPSCクローンからの骨格筋細胞誘導

図15aに示すように、Tet-Myf5 hiPSCからの分化誘導を行った。Dox添加群では48時間後に非常に均一なmCherryの発現を認め（図15b、上段）、同時に、Dox非添加群と比べ紡錘形の細胞形態に変化していることが分かった（図15b、下段）。分化11日後にミオゲニンおよびMHCの発現を観察した。#2、#18および#21の3クローンともミオゲニン陽性、MHC陽性の骨格筋細胞への分化を認めた。#2におけるミオゲニンおよびMHCの発現を図15cに示す。上段はミオゲニンの発現であり、一本の筋線維に多核のミオゲニン陽性細胞が観察される（図15c、矢印）。また下段はMHCの発現であり、非常に多くの骨格筋細胞が均一に分化している様子が観察される。以上の結果より、テトラサイクリン応答性ベクターによるMyf5の強制発現においても、iPS細胞を骨格筋細胞へと効率よく分化させることができることが分かった。

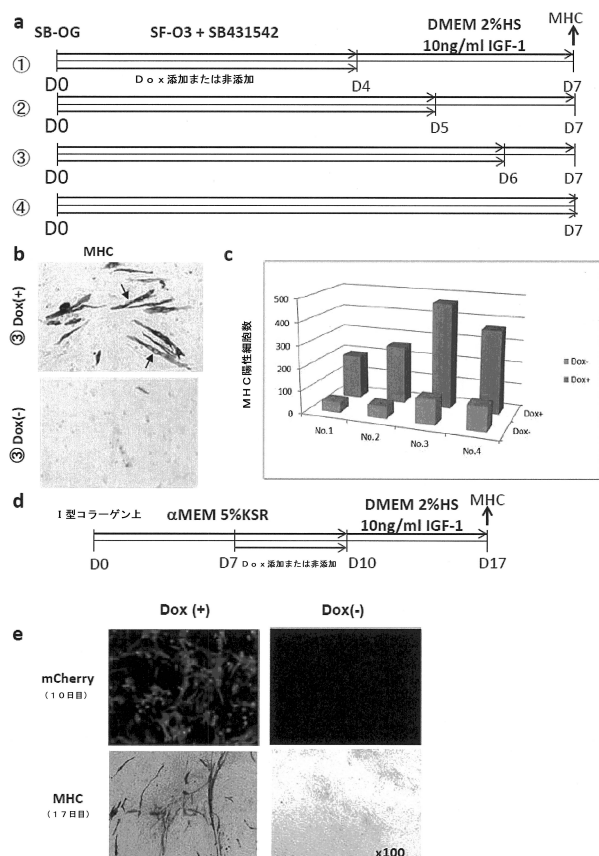
【0107】

本願は、米国仮特許出願第61/561,586号を基礎としており、その内容はすべて本明細書に組み込まれる。

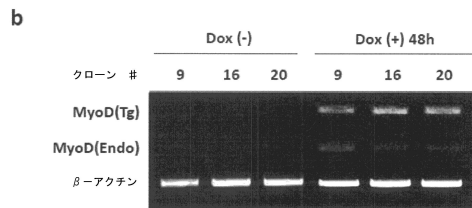
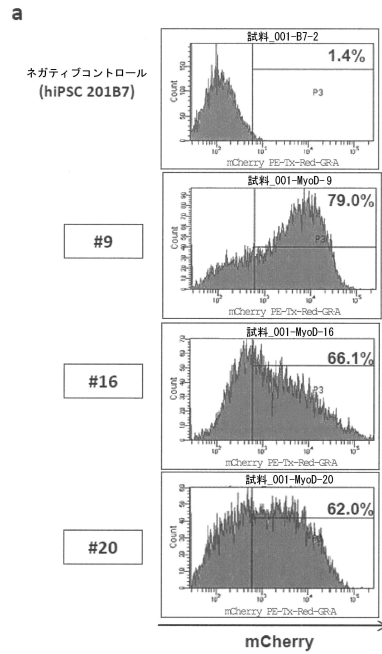
【図1】



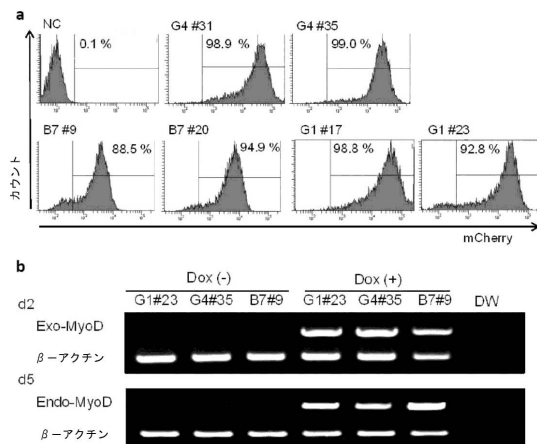
【図2】



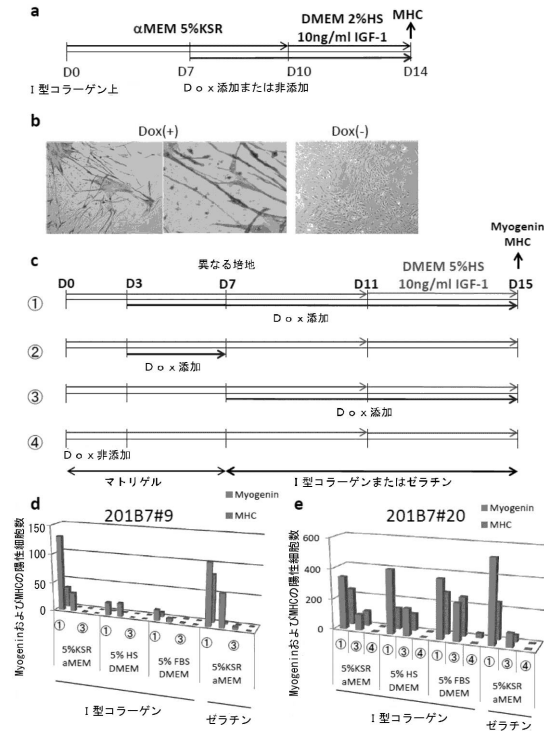
【図 3】



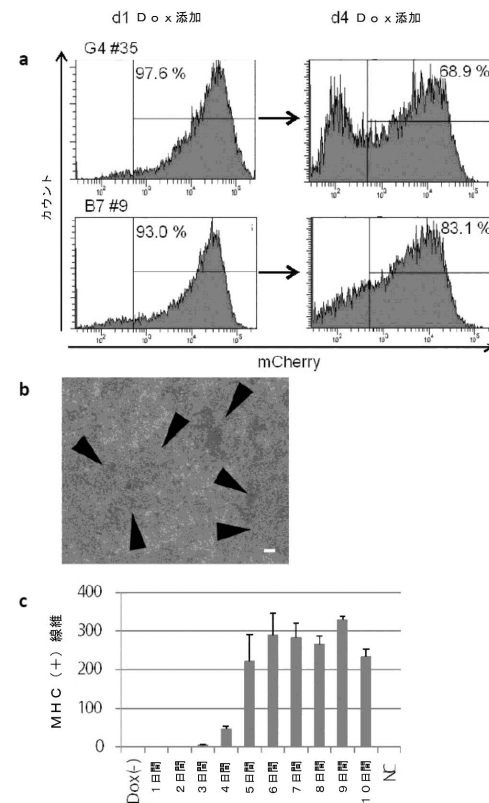
【図 5】



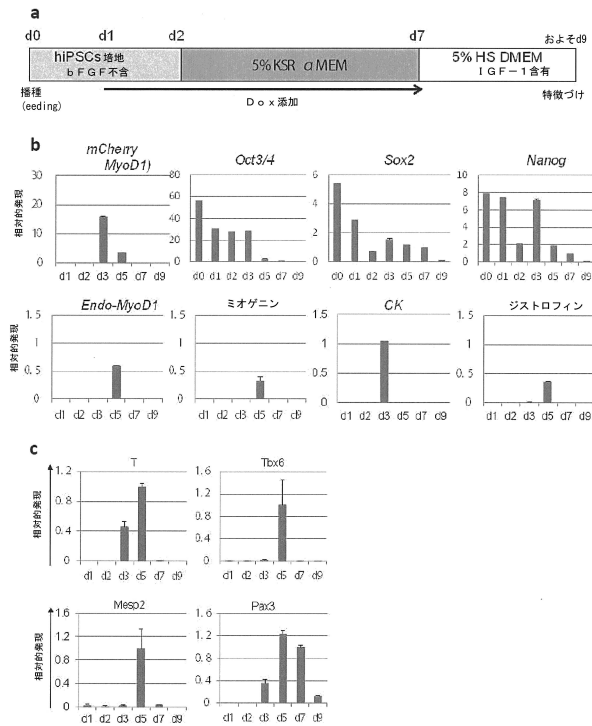
【図 4】



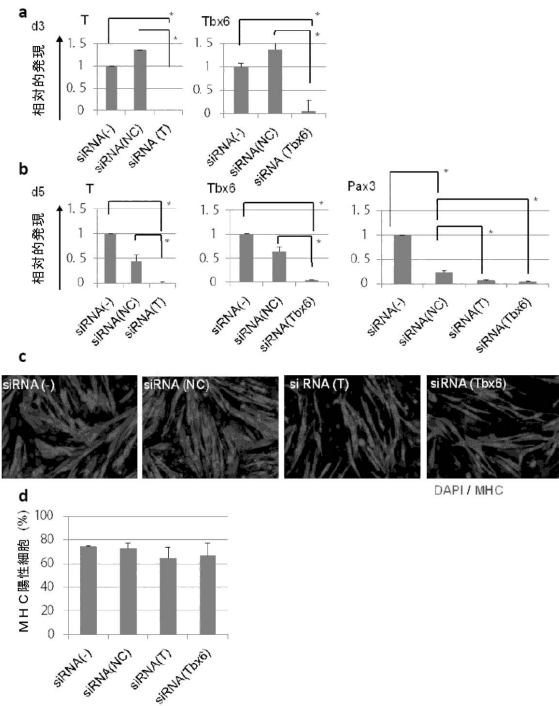
【図 6】



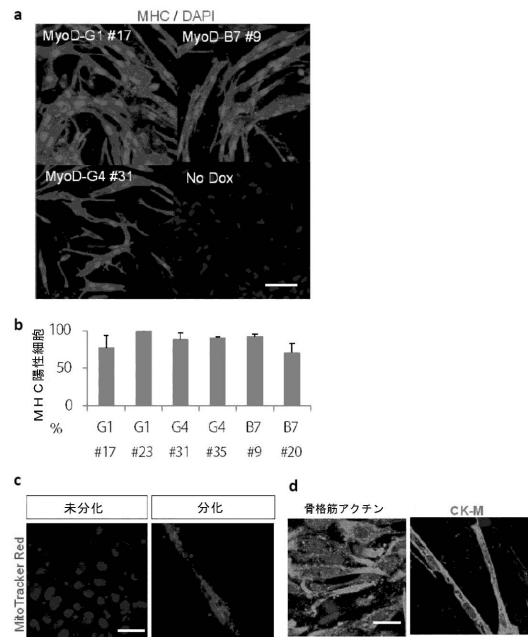
【図 7】



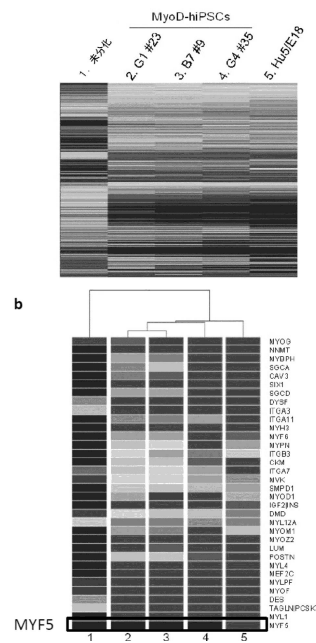
【図 8】



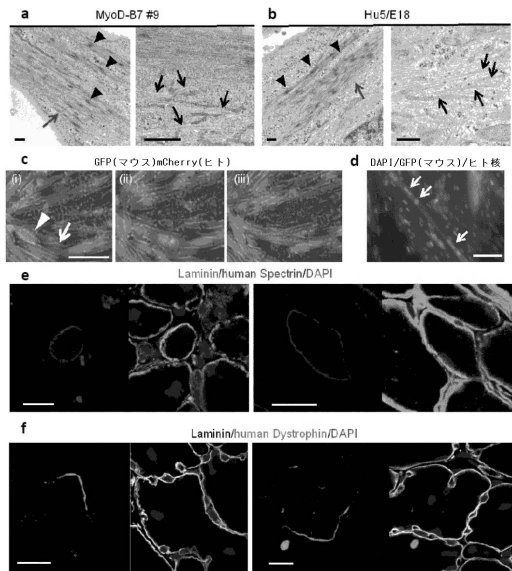
【図 9】



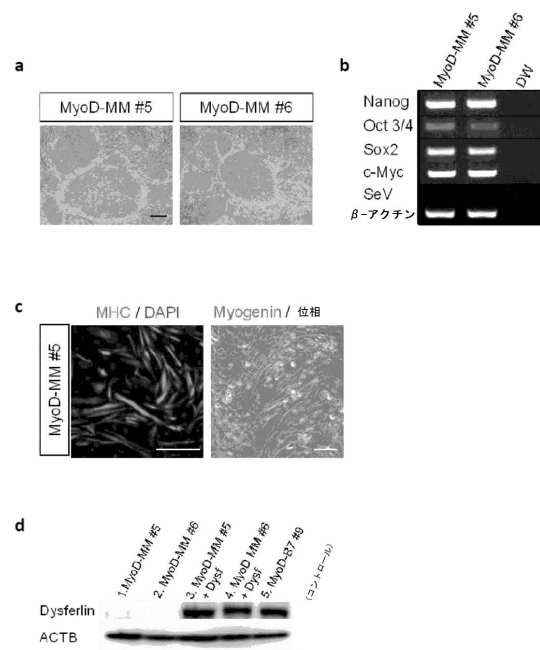
【図 10】



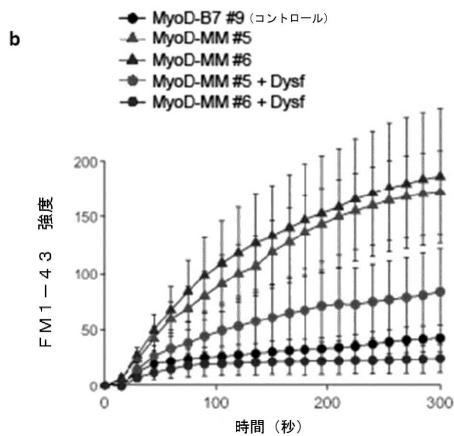
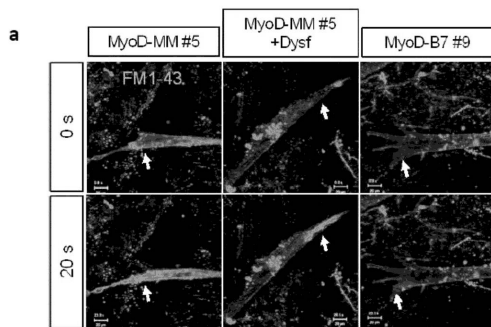
【図 1 1】



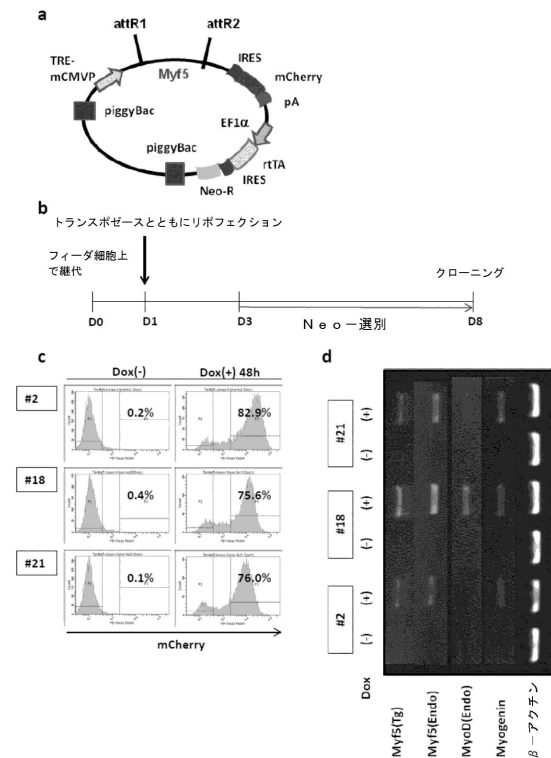
【図 1 2】



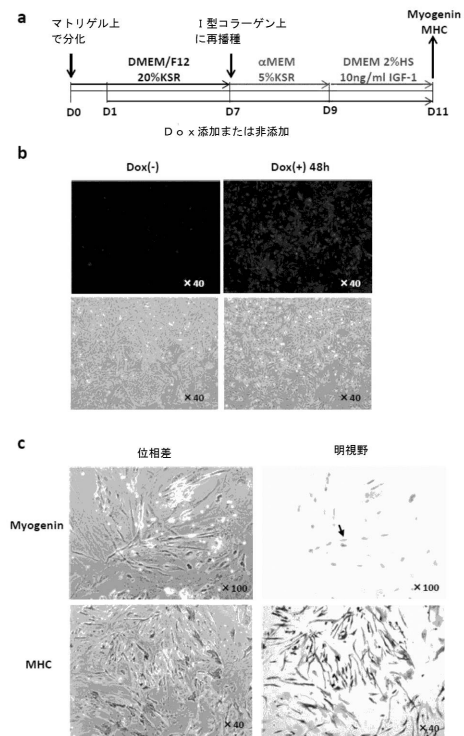
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 15】



【配列表】

0006083877000001.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 櫻井 英俊
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 田中 章仁
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 ウォルツェン、クヌート
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 池谷 真
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 名和 大輔

- (56)参考文献 米国特許第06432711 (US, B1)
国際公開第2010/008100 (WO, A1)
New Biol.,1992,4(3),p.217-24.
Biochem.Biophys.Res.Comm.,2007,357(4),p.957-63
Stem Cell Res.,2009,3(2-3),p.157-69
Development,2007,134(6),p.1171-80
- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
C12N 15/
C12N 5/
Caplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)