

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5547064号  
(P5547064)

(45) 発行日 平成26年7月9日(2014.7.9)

(24) 登録日 平成26年5月23日(2014.5.23)

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

請求項の数 5 (全 285 頁)

(21) 出願番号	特願2010-511743 (P2010-511743)	(73) 特許権者	504132272
(86) (22) 出願日	平成20年6月13日 (2008. 6. 13)		国立大学法人京都大学
(65) 公表番号	特表2010-529851 (P2010-529851A)		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(43) 公表日	平成22年9月2日 (2010. 9. 2)	(74) 代理人	100081422
(86) 国際出願番号	PCT/IB2008/002540		弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開番号	W02009/007852	(74) 代理人	100084146
(87) 国際公開日	平成21年1月15日 (2009. 1. 15)		弁理士 山崎 宏
審査請求日	平成23年6月13日 (2011. 6. 13)	(74) 代理人	100145964
(31) 優先権主張番号	PCT/EP2007/010019		弁理士 植村 昭三
(32) 優先日	平成19年11月20日 (2007. 11. 20)	(74) 代理人	100122301
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 富田 憲史
(31) 優先権主張番号	61/040, 646	(74) 代理人	100106518
(32) 優先日	平成20年3月28日 (2008. 3. 28)		弁理士 松谷 道子
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	桜田 一洋
			神奈川県横浜市青葉区みずすが丘9-16 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多重分化能性／多能性細胞及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

多能性幹細胞を製造する方法であって、下記の工程：

( a ) Oct3/4、Sox2およびKlf4の3種の遺伝子を含む誘発因子を体細胞に導入する工程、および

( b ) 工程 ( a ) において誘発因子が導入された体細胞をヒストンデアセチラーゼ ( HDAC ) インヒビターおよび / または ROCK インヒビターと接触させる工程を含む方法。

【請求項2】

前記誘発因子が、さらにc-Mycを含む、請求項1に記載の方法。

10

【請求項3】

前記体細胞がヒト由来である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記HDACインヒビターが、MS-275、バルプロエート ( VPA )、酪酸ナトリウムおよびトリコスタチンA ( TSA ) から成る群より選択される少なくとも一つの薬剤を含む、請求項1 ~ 3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記ROCKインヒビターが、Y-27632および / またはHA1077である、請求項1 ~ 4のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

20

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は多重分化能性/多能性細胞及び方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

再生医療の分野は、損傷された細胞、組織又は器官の修復、置換又は再生を助けるために企画された治療を包含する。再生医療の1つのブランチは、種々の範囲の細胞をもたらす能力を有する胚性幹細胞(ES)に依存する細胞治療を包含する。ESに基づく細胞治療は、種々の健康状態、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、発作、脊髄障害、心発作、腎不全、オステオポロシス、I型糖尿病、多発性硬化症、リウマチ様関節炎、熱傷及び創傷の処理の見込みがある。しかしながら、そのような治療の進行は、広範囲の要因、例えば受容体と免疫学的に適合できないドナーに由来するES細胞の免疫拒絶の可能性により妨げられて来た。

10

## 【発明の概要】

## 【0003】

この開示は、ある場合、多能性であり、そしてある場合、多分化能性であるヒト幹細胞を包含する。この開示はさらに、そのようなヒト幹細胞の生成方法、そのような幹細胞の使用法、及び関連する組成物を包含する。

## 【0004】

従って、1つの観点においては、多能性、体性、非胚性であり、そして長期自己再生の性質を有するヒト幹細胞が供給される。いくつかの態様においては、そのようなヒト幹細胞は、外因性遺伝子、例えばOct3/4ポリペプチドをコードする第1外因性遺伝子、Sox2ポリペプチドをコードする第2外因性遺伝子、及びKlf4ポリペプチドをコードする第3外因性遺伝子を含んで成る。1つの態様においては、外因性遺伝子を含んで成るヒト幹細胞は、3及びわずか3種の外因性遺伝子を含んで成り、ここで第1外因性遺伝子はOct3/4ポリペプチドをコードし、第2外因性遺伝子は、Sox2ポリペプチドをコードし、そして第3外因性遺伝子はKlf4ポリペプチドをコードする。

20

## 【0005】

さらなる態様においては、外因性遺伝子は上記第1、2及び3外因性遺伝子から実質的に成る。もう1つの態様においては、外因性遺伝子は、Oct3/4ポリペプチドをコードする第1外因性遺伝子、Sox2ポリペプチドをコードする第2外因性遺伝子、Klf4ポリペプチドをコードする第3外因性遺伝子、及びマウス由来のカチオン性アミノ酸トランスポーター(mCAT)(例えば、mCAT1)のアミノ酸配列をコードする第4外因性遺伝子を含んで成る。もう1つの態様においては、外因性遺伝子を含んで成るヒト幹細胞は、4及びわずか4種の外因性遺伝子を含んで成り、ここで第1外因性遺伝子はOct3/4ポリペプチドをコードし、第2外因性遺伝子はSox2ポリペプチドをコードし、第3外因性遺伝子はKlf4ポリペプチドをコードし、そして第4外因性遺伝子はc-Mycポリペプチドをコードする。

30

## 【0006】

さらなる態様においては、外因性遺伝子は上記第1、第2、第3及び第4外因性遺伝子から実質的に成る。ある態様においては、外因性遺伝子は、c-Mycポリペプチドをコードする遺伝子を包含しない。他の態様においては、外因性遺伝子は、c-Mycポリペプチドをコードする遺伝子を包含する。外因性遺伝子がc-Mycポリペプチドをコードする遺伝子を包含する1つの態様においては、外因性遺伝子はマウス由来のカチオン性アミノ酸トランスポーター(mCAT)のアミノ酸配列をコードする第5外因性遺伝子を包含する。ある態様においては、外因性遺伝子は、TERTポリペプチドをコードする遺伝子を包含しない。

40

## 【0007】

ある態様においては、外因性遺伝子は、HPV16E6ポリペプチド又はHPV16E7ポリペプチドをコードする遺伝子を包含しない。さらなる態様においては、外因性遺伝子は、TERTポリペプチド、SV40大T抗原ポリペプチド、HPV16E6ポリペプチド又はBmi1ポリペプチドのいずれかをコードする遺伝子を包含しない。さらに他の態様においては、外因性遺伝子を含

50

んで成るヒト幹細胞は、癌を誘発できる外因性遺伝子を含まない。さらに他の態様においては、ヒト幹細胞は、次のポリペプチドの3又はそれ以上をコードする外因性遺伝子を含んで成る：Oct3/4ポリペプチド、Sox2ポリペプチド、Klf4ポリペプチド、及びc-Mycポリペプチド。

【0008】

もう一つの観点においては、体性、非胚性、アルカリホスファターゼに対して陽性であり、そして遺伝子TDGF1、Dnmt3b、FoxD3、GDF3、Cyp26a1、TERT、zfp42、Sox2、Oct3/4及びNanogの2又はそれ以上の遺伝子を発現する幹細胞が本明細書において供給される。ある態様においては、そのような幹細胞は多能性である。

【0009】

関連する観点においては、ヒト幹細胞に比較して、1～1000個の遺伝子（例えば、1～700個の遺伝子、1～500個の遺伝子、1～300個の遺伝子、1～200個の遺伝子、1～100個の遺伝子、1～50個の遺伝子、3～20個の遺伝子、5～20個の遺伝子、5～50個の遺伝子、10～50個の遺伝子、20～50個の遺伝子、30～100個の遺伝子、又は50～100個の遺伝子）での高レベルの遺伝子発現を有するヒト幹細胞が本明細書において供給される。ある態様においては、そのようなヒト幹細胞は、アルカリホスファターゼ陽性であり、そしてTDGF1、Dnmt3b、FoxD3、GDF3、Cyp26a1、TERT、zfp42、Sox2、Oct3/4及びNanogから選択された2又はそれ以上（例えば、3、4、5、6、7、8、9又は10）の遺伝子を発現する。

【0010】

もう一つの観点においては、ヒト胚幹細胞に比較して、本明細書に提供される表13、15又は16に列挙される遺伝子の2又はそれ以上（例えば、3又はそれ以上、4又はそれ以上、5又はそれ以上、10又はそれ以上、15又はそれ以上、25又はそれ以上、50又はそれ以上、75又はそれ以上、100又はそれ以上、又は200又はそれ以上）での高レベルの遺伝子発現を有するヒト幹細胞が本明細書において供給される。ある態様においては、そのようなヒト幹細胞は、アルカリホスファターゼ陽性であり、そしてTDGF1、Dnmt3b、FoxD3、GDF3、Cyp26a1、TERT、zfp42、Sox2、Oct3/4及びNanogから選択された2又はそれ以上（例えば、3、4、5、6、7、8、9又は10）の遺伝子を発現する。

【0011】

さらなる観点においては、ヒト胚幹細胞に比較して、本明細書に提供される表14に列挙される遺伝子の2又はそれ以上（例えば、3又はそれ以上、4又はそれ以上、5又はそれ以上、10又はそれ以上、15又はそれ以上、25又はそれ以上、50又はそれ以上、75又はそれ以上、100又はそれ以上、又は200又はそれ以上）での低レベルの遺伝子発現を有するヒト幹細胞が本明細書において供給される。ある態様においては、そのようなヒト幹細胞は、アルカリホスファターゼ陽性であり、そしてTDGF1、Dnmt3b、FoxD3、GDF3、Cyp26a1、TERT、zfp42、Sox2、Oct3/4及びNanogから選択された2又はそれ以上（例えば、3、4、5、6、7、8、9又は10）の遺伝子を発現する。

【0012】

もう一つの観点においては、ヒト胚幹細胞に比較して、1～1000個の遺伝子（例えば、1～300個の遺伝子、又は200又は1～50個の遺伝子）での低レベルの遺伝子発現を有するヒト幹細胞が本明細書において供給される。ある態様においては、そのようなヒト幹細胞は、アルカリホスファターゼ陽性であり、そしてTDGF1、Dnmt3b、FoxD3、GDF3、Cyp26a1、TERT、zfp42、Sox2、Oct3/4及びNanogから選択された2又はそれ以上（例えば、3、4、5、6、7、8、9又は10）の遺伝子を発現する。

【0013】

さらなる観点においては、1～100個の遺伝子の発現レベルが、ヒト胚幹細胞においてよりもヒト線維芽細胞において発現レベルに接近しているヒト幹細胞が本明細書において供給される。ある態様においては、そのようなヒト幹細胞は、アルカリホスファターゼ陽性であり、そしてTDGF1、Dnmt3b、FoxD3、GDF3、Cyp26a1、TERT、zfp42、Sox2、Oct3/4及びNanogから選択された2又はそれ以上（例えば、3、4、5、6、7、8、9又は10）の遺伝子を発現する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 4 】

さらにもう1つの観点においては、ヒト対象からの非胚性生後細胞の培養された集団においてOct3/4ポリペプチド、Sox2ポリペプチド及びKlf4ポリペプチドの発現を誘発することを含んで成る、ヒト対象から自己由来の幹細胞の生成方法が、本明細書において提供される。ある態様においては、この方法により生成される自己由来の幹細胞は奇形腫を形成できる。1つの態様においては、そのような生成された自己由来の幹細胞は多能性である。

## 【 0 0 1 5 】

さらなる観点においては、ヒト生後細胞におけるOct3/4ポリペプチド、Sox2ポリペプチド及びKlf4ポリペプチドの発現を促進し、高い核：細胞質比を有し、そして1又は複数のコロニーを取囲む細胞よりもサイズが小さい1又は複数の細胞コロニーを入手し、そして前記1又は複数のコロニーの少なくとも1つを単離することを含んで成る方法により生成されるヒト幹細胞が本明細書において供給される。ある態様においては、上記方法により生成されるヒト幹細胞は、多能性ヒト幹細胞である。ある態様においては、Oct3/4、Sox2及びKlf4ポリペプチドの誘発された発現は、ヒト生後細胞中に、1又は複数の発現ベクター、例えばレトロウイルス発現ベクター、レンチウイルス発現ベクター、アデノ関連のウイルス発現ベクター、アデノウイルス発現ベクター、組換えレトロウイルス又は核酸発現ベクター、例えばプラスミド発現ベクターを導入することにより達成される。1つの態様においては、上記方法は、ヒト生後細胞におけるc-Mycポリペプチドの発現の誘発を含まない。

## 【 0 0 1 6 】

もう1つの態様においては、前記方法は、ヒト生後細胞におけるc-Mycポリペプチドをコードする外因性遺伝子の発現の誘発を含まない。さらなる態様においては、前記方法は、さらにヒト生後細胞におけるc-Mycポリペプチドの発現の誘発を包含する。ある態様においては、前記方法がc-Mycポリペプチドの発現の誘発を包含する場合、前記方法は、誘発因子をコードする4及びわずか4個の外因性遺伝子の発現の誘発を包含し、ここで前記外因性遺伝子はOct3/4ポリペプチド、Sox2ポリペプチド、Klf4ポリペプチド及びc-Mycポリペプチドをコードする。1つの態様においては、前記方法は、誘発因子をコードする4個の外因性遺伝子の発現の誘発を包含し、ここで前記4個の外因性遺伝子はOct3/4ポリペプチド、Sox2ポリペプチド、Klf4ポリペプチド及びc-Mycポリペプチドをコードする。

## 【 0 0 1 7 】

さらにもう1つの態様においては、前記方法は、Oct3/4ポリペプチド、Sox2ポリペプチド、Klf4ポリペプチド及びc-Mycポリペプチドから実質的に成るポリペプチド組の発現の誘発を包含する。もう1つの態様においては、前記方法は、誘発因子をコードする3及びわずか3個の外因性遺伝子の発現の誘発を包含し、ここで前記外因性遺伝子はOct3/4ポリペプチド、Sox2ポリペプチド及びKlf4ポリペプチドをコードする。もう1つの態様においては、前記方法は、Oct3/4ポリペプチド、Sox2ポリペプチド及びKlf4ポリペプチドから実質的に成るポリペプチド組の発現の誘発を包含する。さらにもう1つの態様においては、ヒト幹細胞を生成するための上記方法はまた、ヒト生後細胞とヒストンデアセチラーゼインヒビターとの接触を包含する。

## 【 0 0 1 8 】

他の態様においては、上記方法は、ヒト生後細胞中に、(i) Oct3/4ポリペプチドのアミノ酸配列を含んで成る第1の精製されるポリペプチドを；(ii) Sox2ポリペプチドのアミノ酸配列を含んで成る第2の精製されたポリペプチドを；及び(iii) Klf4ポリペプチドのアミノ酸配列を含んで成る第3の精製されたポリペプチドを導入することによる、Oct3/4、Sox2及びKlf4ポリペプチドの発現の誘発を包含する。ある態様においては、前記第1、第2及び第3の精製されたポリペプチドの少なくとも1つはさらに、タンパク質トランスダクシヨンドメインを含んで成る。

## 【 0 0 1 9 】

ある態様においては、本明細書に開示されるヒト幹細胞は、1又は複数の次の性質を有

する：多能性；多分化能性；奇形腫を形成する能力；正常な二倍体核型；少なくとも約30回～少なくとも約100回、継代され得る子孫；ヒト胚性幹細胞よりも短いテロマー；大気酸素条件（例えば、5%酸素以上～約21%酸素）下での未分化表現型を伴っての増殖する能力；コロニーでの増殖；生物学的サンプルからの調製の後、4又はそれ以下の回数、継代されたヒト体細胞又は生後細胞の誘発；胎児ヒト体細胞からの誘発；成人体細胞からの誘発；次の細胞のいずれかを含んで成る細胞集団からの誘発：成人皮膚線維芽細胞、成人末梢血単核細胞、成人骨髓由来の単核細胞、新生児ヒト皮膚線維芽細胞、ヒト臍静脈内皮細胞、ヒト臍動脈平滑筋細胞、ヒト生後骨格筋細胞、ヒト生後脂肪細胞、ヒト生後末梢血単核細胞又はヒト臍血液単核細胞；前記細胞集団からの誘発（前記集団は、凍結貯蔵され、そして調製の前、融解された細胞の組成物から調製された）。

10

## 【0020】

本明細書に提供される多くの観点は、上記ヒト幹細胞のいずれかに関する。そのような観点は次のものを包含する：ヒト幹細胞の精製された集団；ヒト幹細胞から分化された細胞（例えば、分化された細胞の精製された集団）。そのような分化された幹細胞は、臍臓細胞、神経幹細胞、皮質ニューロン、ドーパミン作動性ニューロン、希突起膠細胞又はその前駆体細胞、肝細胞又は肝性幹細胞又は心筋細胞。他の関連する観点は、次の方法を包含する：ヒト幹細胞を凍結保存媒体に懸濁し、そして得られる懸濁液を凍結することによる前記細胞の貯蔵方法；ヒト幹細胞を分化することによる分化された細胞（上記分化された細胞のいずれかを含む）の生成方法；ヒト対象中への分化された細胞（例えば、他の細胞型を実質的に有さない分化された細胞）の導入方法（ここで、分化された細胞は対象と同じゲノムを共有するか、又は対象と免疫適合できる）。

20

## 【0021】

さらなる関連する観点は次のものを包含する：ヒト幹細胞及び凍結媒体を含んで成る組成物；ヒト幹細胞、及び精製された成長因子（例えば、約4ng/ml～約100ng/mlの濃度での）を含んで成る媒体を含んで成る組成物。種々の態様においては、そのような成長因子は、1又は複数の次のものを包含する：bFGF、FGF-2、PDGF、EGF、IGF、インスリン、TGFβ-1、アクチビンA、Noggin、BDNF、NGF、NT-1、NT-2、NT-3、IGF、IGF1、IGF1又はFGF-成長因子ファミリーメンバー。

## 【0022】

さらにもう1つの観点においては、次の成分の少なくとも1つを含んで成る組成物が本明細書において供給される：

30

(i) タンパク質トランスダクシヨンドメインのアミノ酸配列を含んで成る精製されたポリペプチド及びOct3/4ポリペプチド；

(ii) キャリヤー試薬及び精製されたOct3/4ポリペプチド；

(iii) タンパク質トランスダクシヨンドメインのアミノ酸配列を含んで成る精製されたポリペプチド及びSox2ポリペプチド；

(iv) キャリヤー試薬及び精製されたSox2ポリペプチド；

(v) タンパク質トランスダクシヨンドメインのアミノ酸配列を含んで成る精製されたポリペプチド及びKlf4ポリペプチド；

(vi) キャリヤー試薬及び精製されたKlf4ポリペプチド；

40

(vii) タンパク質トランスダクシヨンドメインのアミノ酸配列を含んで成る精製されたポリペプチド及びc-Mycポリペプチド；

(viii) キャリヤー試薬及び精製されたc-Mycポリペプチド；又は

(i)～(viii)のいずれかの組合せ。

## 【0023】

ある態様においては、上記組成物は少なくとも2、3又は4個の成分(i)～(viii)を含む。さらなる観点においては、Oct3/4ポリペプチド、Sox2ポリペプチド及びKlf4ポリペプチドを含んで成るポリペプチドのヒト生後細胞における発現を誘発することを含んで成る、ヒト幹細胞の生成方法が提供される。ある態様においては、その方法に使用されるヒト生後細胞は、生物学的サンプルからの調製の後、4又はそれよりも少ない回数、継代

50

される。ある態様においては、ヒト生後細胞は、凍結貯蔵され、そして次に融解されたヒト生後細胞を含んで成る組成物から精製された。1つの態様においては、ヒト生後細胞は成人からである。

【0024】

ある態様においては、前記方法に使用されるべきヒト生後細胞は、成人骨髄由来の単核細胞、生後ヒト皮膚線維芽細胞、臍静脈内皮細胞、臍動脈平滑筋細胞、生後骨格筋細胞、生後脂肪細胞、生後末梢血単核細胞、臍血液単核細胞又は胎盤細胞を含んで成る。ある態様においては、この方法に使用されるヒト生後細胞は、生物学的サンプルからの調製の後、4個又はそれ以下の回数、継代されている。ある態様においては、生後ヒト細胞は、誘発された発現の前、約 $10^3$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>～約 $10^4$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度で培養される。ある態様においては、ヒト生後細胞は、5%又はそれ以下（例えば2%又はそれ以下）の血清濃度で培養される。ある態様においては、前記ヒト生後細胞は、誘発された発現の前、1又は複数のbFGF、FGF-2、PDGF、EGF、IGF、インスリン、TGFb-1、アクチビンA、Noggin、BDNF、NGF、NT-1、NT-2、NT-3又はFGF-成長因子ファミリーメンバーの存在下で培養される。

10

【0025】

ある態様においては、Oct3/4、Sox2及びKlf4ポリペプチドの発現誘発は、ヒト生後細胞中に、Oct3/4、Sox2及びKlf4ポリペプチドをコードする1又は複数の発現ベクターを導入することにより行われる。そのようなベクターは例えば、組換えレトロウィルス、レンチウィルス又はアデノウィルス；レトロウィルス発現ベクター、レンチウィルス発現ベクター、核酸発現ベクター又はプラスミド発現ベクターを包含する。他の態様においては、組換えレトロウィルスが誘発される発現のために使用される場合、前記方法は、培養されたヒト細胞中に、マウス由来のカチオン性アミノ酸トランスポーター（mCAT）ポリペプチドの発現のための発現ベクターを導入し、その後、Oct3/4、Sox2及びKlf4ポリペプチドをコードする1又は複数のレトロウィルスベクターを導入することを包含する。

20

【0026】

ある態様においては、この方法は、c-Mycポリペプチドの発現の誘発を包含しない。他の態様においては、前記方法は、c-Mycポリペプチドの発現の誘発を包含する。1つの態様においては、前記方法は、TERTポリペプチドの発現の誘発を包含しない。

ある態様においては、この方法はまた、生後ヒト細胞とヒストンデアセチラーゼインヒビターとの接触を包含する。

30

【0027】

ある態様においては、Oct3/4、Sox2及びKlf4ポリペプチドの発現の誘発は、ヒト生後細胞中に、1又は複数の発現ベクターを導入することを含んで成る。ある態様においては、ヒト幹細胞を生成するための上記方法はまた、誘発された発現段階の後、周囲細胞よりもサイズが小さい、1又は複数の細胞コロニーを単離し、そしてアルカリホスファターゼ、nanog、TGFβ1、Dnmt3b、FoxD3、GDF3、CYP26A1、TERT及びzfp4を発現する1又は複数のコロニーの少なくとも1つを同定することをさらに含んで成る。

【0028】

ある態様においては、前記方法は、ヒト生後細胞の培養物中に次のものを導入することによる、Oct3/4、Sox2及びKlf4ポリペプチドの発現を誘発することを含んで成る：

40

(i) Oct3/4ポリペプチドのアミノ酸配列を含んで成る第1の精製されるポリペプチドを；  
 (ii) Sox2ポリペプチドのアミノ酸配列を含んで成る第2の精製されたポリペプチドを；  
 及び (iii) Klf4ポリペプチドのアミノ酸配列を含んで成る第3の精製されたポリペプチド。1つの態様においては、少なくとも1つの上記ポリペプチドはさらに、タンパク質トランスダクシヨンドメインを含んで成る。

【0029】

他の態様においては、ヒト生後細胞におけるOct3/4、Sox2及びKlf4ポリペプチドの発現の誘発は、それらと、少なくとも1つの下記のものとを接触することにより実施される：

(i) タンパク質トランスダクシヨンドメインのアミノ酸配列を含んで成る精製された

50

ポリペプチド及びOct3/4ポリペプチド；

(ii) キャリヤー試薬及び精製されたOct3/4ポリペプチド；

(iii) タンパク質トランスダクションドメインのアミノ酸配列を含んで成る精製されたポリペプチド及びSox2ポリペプチド；

(iv) キャリヤー試薬及び精製されたSox2ポリペプチド；

(v) タンパク質トランスダクションドメインのアミノ酸配列を含んで成る精製されたポリペプチド及びKlf4ポリペプチド；

(vi) キャリヤー試薬及び精製されたKlf4ポリペプチド；

(vii) タンパク質トランスダクションドメインのアミノ酸配列を含んで成る精製されたポリペプチド及びc-Mycポリペプチド；又は

(i) ~ (vii) のいずれかの組合せ。

10

#### 【0030】

ある態様においては、この方法により生成されるヒト幹細胞は、奇形腫を形成できる。ある態様においては、この方法により生成されるヒト幹細胞は、多能性であり、そして外胚葉、中胚葉及び内胚葉を形成できる。

#### 【0031】

もう一つの観点においては、

(i) 第1及び第2の培養されたヒト体細胞を供給し；

(ii) 前記第1の培養されたヒト体細胞と試験剤とを接触し；

(iii) 前記第2の培養されたヒト体細胞と負の対照剤とを接触し；

20

(iv) 前記接触された第1及び第2の培養された細胞における胚性幹細胞マーカー遺伝子の発現レベルを決定し；そして

(v) 段階(iii)において決定された発現レベルを比較し、そして前記接触された第1の培養された細胞における胚性幹細胞マーカー遺伝子発現レベルが前記接触された第2の培養された細胞において決定されたその発現レベルよりも高い場合、前記試験剤が多能性又は多分化能性を刺激することを示唆し、そして前記接触された第1の培養された細胞における胚性幹細胞マーカー遺伝子の発現レベルが前記接触された第2の培養された細胞において決定されたそのレベルと同じか又はそれよりも低い場合、前記試験剤が多能性又は多重分化能性を刺激するのを失敗したことを示唆することを含んで成り、ここで前記胚性幹細胞マーカー遺伝子の発現レベルの決定がtert又はCyp26A1の発現レベルを決定することを含んで成る、ヒト体細胞(例えば、生後ヒト体細胞)における多能性又は多重分化能性を刺激する剤の同定方法が本明細書において提供される。

30

#### 【0032】

段階(iii)において決定された発現レベルを比較し、そして前記接触された第1の培養された細胞における胚性幹細胞マーカー遺伝子発現レベルが前記接触された第2の培養された細胞において決定されたその発現レベルよりも高い場合、前記試験剤が多能性又は多分化能性を刺激することを示唆し、そして前記接触された第1の培養された細胞における胚性幹細胞マーカー遺伝子の発現レベルが前記接触された第2の培養された細胞において決定されたそのレベルと同じか又はそれよりも低い場合、前記試験剤が多能性又は多重分化能性を刺激するのを失敗したことを示唆することを含んで成り、ここで前記胚性幹細胞マーカー遺伝子はtert又はCyp26A1を含んで成る。

40

#### 【0033】

さらなる観点においては、

(i) 対象と免疫適合性であるドナーを同定し；

(ii) 健康なドナーの生後細胞から、誘発される多能幹細胞系を生成し；そして

(iii) 前記誘発された多能性幹細胞系から分化された1又は複数の細胞を、対象中に移植することを含んで成る、その必要な対象において細胞移植を実施するための方法が本明細書において提供される。ある態様においては、前記ドナーは、HLA遺伝子型が受容体のHLA遺伝子型に適合する場合、免疫適合性であるものとして同定される。1つの態様においては、前記免疫適合性ドナーは、その免疫適合ドナーからの血液サンプルを遺伝子型

50

決定することにより同定される。又は態様においては、前記誘発された多能性幹細胞系は、単核血液細胞から誘発される。

【0034】

本明細書に記載されるヒト幹細胞、組成物及び方法のいくつかの態様においては、Oct3/4ポリペプチドは、配列番号7に対して少なくとも70% (例えば、75%、80%、85%、90%、95%又は100%) 同一であるアミノ酸配列を含んで成り、前記Sox2ポリペプチドが配列番号9に対して少なくとも70% (例えば、75%、80%、85%、90%、95%又は100%) 同一であるアミノ酸配列を含んで成り、前記Klf4ポリペプチドが配列番号11に対して少なくとも70% (例えば、75%、80%、85%、90%、95%又は100%) 同一であるアミノ酸配列を含んで成り、又は前記c-Mycポリペプチドは配列番号13に対して少なくとも70% (例えば、75%、80%、85%、90%、95%又は100%) 同一であるアミノ酸配列を含んで成る。

10

【0035】

他の態様においては、Oct3/4ポリペプチドは、配列番号6に対して少なくとも70% (例えば、75%、80%、85%、90%、95%又は100%) 同一であるアミノ酸配列を含んで成り、前記Sox2ポリペプチドが配列番号8に対して少なくとも70% (例えば、75%、80%、85%、90%、95%又は100%) 同一であるアミノ酸配列を含んで成り、前記Klf4ポリペプチドが配列番号10に対して少なくとも70% (例えば、75%、80%、85%、90%、95%又は100%) 同一であるアミノ酸配列を含んで成り、又は前記c-Mycポリペプチドは配列番号12に対して少なくとも70% (例えば、75%、80%、85%、90%、95%又は100%) 同一であるアミノ酸配列を含んで成る。

【0036】

ある態様においては、前記Oct3/4ポリペプチドがヒトOct3/4又はマウスOct3/4のアミノ酸配列を含んで成り、前記Sox2ポリペプチドがヒトSox2又はマウスSox2のアミノ酸配列を含んで成り、そして前記Klf4ポリペプチドがヒトKlf4又はマウスKlf4のアミノ酸配列を含んで成る。ある態様においては、Oct3/4ポリペプチドはOct3/4以外のOctファミリーメンバーであり、Sox2ポリペプチドはSox2以外のSox2ファミリーメンバーであり、Klf4ポリペプチドはKlf4以外のKlf4ファミリーメンバーであり、そしてc-Mycポリペプチドはc-Myc以外のc-Mycファミリーメンバーである。1つの態様においては、c-Mycポリペプチドは、c-Myc-c-エストロゲン受容体(c-Myc-ER)融合ポリペプチドである。

20

【0037】

引例による組込み：

本明細書に言及されるすべての出版物、特許及び特許出現は、それぞれの個々の出版物、特許又は特許出願が引例により組み込まれることを特別に及び個々に示されているかのように、同じ程度に引例により、本明細書に組み込まれる。

30

【図面の簡単な説明】

【0038】

本発明の新規特徴が、特許請求の範囲に特別に示されている。本発明の特徴及び利点の良好な理解が、本発明の原理が使用される、例示態様を示す次の詳細な記載により得られ、そして付随する図面は次の通りである：

【図1】図1は、細胞の誘発の程度及びアプローチの概要である。

【0039】

【図2】図2は、4種の遺伝子の導入に続く、成人骨髄由来の細胞におけるNanog及びTert遺伝子の相対的発現を示す。Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycが、低血清条件下で、成人骨髄由来の単核細胞から確立された細胞中に導入された。RNAが得られるコロニーから抽出され、そしてヒトNanog及びヒトTert遺伝子の発現が定量的PCRにより示された。4種の遺伝子が導入されていない線維芽細胞及び間葉幹細胞が実験において対照として使用された。遺伝子発現の量は、発現の量がヒトヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)遺伝子の発現の量により、及び新生児皮膚線維芽細胞から誘発されたアルカリホスファターゼ(ALP) - 陽性コロニーにおけるHPRT遺伝子発現の量を1として設定することにより、標準化された、相対値として提供される。Nanog及びTertの発現が、4種の遺伝子(Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc)が導入され、そしてALPに対して陽性であるコロ

40

50

ニーにおいて有意に高かったことが確かめられた。

【0040】

【図3】図3は、4種の遺伝子の導入に続く新生児線維芽細胞におけるNanog及びTert遺伝子の相対的発現を示す。Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycが、新生児皮膚に由来する一次培養物線維芽細胞中に導入され；RNAが得られるコロニーから抽出され；そしてヒトNanog及びヒトTert遺伝子の発現された量が定量的PCRにより決定された。4種の遺伝子が導入されていない親線維芽細胞及び間葉幹細胞が実験において対照として使用された。遺伝子発現は、図2に概略される同じ方法を用いて標準化された。Nanog及びTertの発現が、4種の遺伝子（Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc）が導入され、そしてALPに対して陽性であるコロニーにおいて有意に高かったことが確かめられた。

10

【0041】

【図4】図4は、3種の遺伝子の導入及びヒストンデアセチラーゼ（HDAC）インヒビターにより処理に続く成熟マウス骨髄由来の細胞におけるNanog及びTert遺伝子の相対的発現を示す。3種の遺伝子（Oct3/4、Sox2及びKlf4）が、低血清条件下で確立されたマウス骨髄由来の細胞中に導入された。細胞はまた、MS-275（0.1又は1.0 $\mu$ M）、すなわちHDACインヒビターにより処理された。RNAが得られるコロニーから抽出され、そしてNanog発現の量が定量的PCRにより決定された。3種の遺伝子が導入され、そしてヒストンデアセチラーゼインヒビターにより処理された細胞から、ALP-陽性群（コロニー）が形成され、そしてそれらのコロニーにおけるNanogの発現が、ALP-陰性コロニーよりも有意に高いことが確認された。この図においては、W1、W2、W3、W4、W5及びW6は、例12に使用される6ウェルプレートの個々のウェルの名称を表す。

20

【0042】

【図5】図5は、ヒトiPSクローン1-8の特徴化を示す。その親線維芽細胞（ロット5F0438）の形態学がパネルaに示され；ネズミ胚性線維芽細胞（MEF）フィーダー細胞上で培養されたヒトiPSクローン1-8細胞の形態学がパネルbに示され；mTeSR1培地におけるヒトiPSクローン1-8の形態学がパネルcに示され；mTeSR1培地におけるクローン2-4がパネルdに示され；そしてmTeSR1培地におけるクローン3-2細胞がパネルeに示される。クローン1-8の成長曲線がパネルf及びgに示される。矢印は試験の日付を示す。四角は細胞増殖速度を評価するために細胞数を計数するための期間を示す。パネルhは、101日でのiPSクローン1-8由来の細胞の正常な核型を示す多色核型像である。

30

【0043】

【図6】図6は、ヒトiPSクローン1-8における転写因子、細胞表面抗原及びALP活性の特徴化を示す。ヒトiPS細胞（クローン1-8）は、Nanog（パネルa）、SSEA-3（パネルb）、SSEA-4（パネルc）、TRA-1-60（パネルd）、TRA-1-81（パネルe）、CD9（パネルf）、CD24（パネルg）、Thy-1（CD90とも呼ばれる）（パネルh）について染色された。緑色蛍光染色は、ヒトiPSクローン1-8がそれらの表面抗原のすべてを発現することを示す。ALP染色は、iPSクローン1-8ALP陽性であることを示す。矢印は、緑色蛍光染色の領域を示す。

【0044】

【図7】図7は、ヒトiPSクローン1-8細胞の遺伝子発現のRT-PCR分析を示す。パネルaは、クローン1-8及びその親線維芽細胞（NeoFB）におけるhESマーカー遺伝子発現のRT-PCR分析を示す。遺伝子は、30サイクルで検出されたが、但しCYP26A1（35サイクル）を除く。パネルbは、クローン1-8における4種のトランスジーンサイレンス化を示す。遺伝子トランスダクションの17日後にえられた粗線維芽細胞が対照として使用された。“エキソ”プライマー組は、外因性遺伝子の発現を選択的に検出し；そして“合計”のプライマー組は、内因性及び外因性遺伝子発現を検出した。

40

【0045】

【図8】図8は、ヒトiPSクローン1-8細胞の全体的遺伝子発現の分散プロット分析を示す。分散プロットは、mTeSR1において培養されたヒトiPSクローン1-8細胞と、MEFと共に培養されたH14hES細胞（公的なデータベースGEOからのGSM151741）との間（パネルa）

50

の、又はクローン 1 - 8 と、それらの親線維芽細胞との間 ( パネル b ) の全体的遺伝子発現の比較を示す。ES細胞特異的遺伝子の記号は、両分散プロットにおいて線により示される。発現強度は、赤 ( 高 ) ~ 緑 ( 低 ) の比色等級で示された。矢印は、代表的色彩領域を示す。

【 0 0 4 6 】

【 図 9 】 図 9 は、異なった細胞系の全体的遺伝子発現、及び全体的遺伝子発現分析に基づく遺伝子系統樹を示す。細胞が、International Stem Cell Initiativeにより同定された遺伝子組に基づく遺伝子系統樹において密集された ( 表21を参照のこと )。サンプルは、mTeSRにおいて培養されたクローン 1 - 8 について " 1-8mTeSR " として示され; MEF - ならし培地において培養されたクローン 1 - 8 について " 1-8CM " として示され; 凍結融解処理の後、TeSRにおいて培養されたクローン 1 - 8 について " 1- 8mTeSR(f&t) " として示され; mTeSR培地において培養されたクローン 2 - 4 について " 2-4mTeSr " として示され; MEF上で培養されたクローン 2 - 4 について " 2-4MEF " として示され; mTeSR培地において培養されたクローン 3 - 2 について " 3-2mTeSR " として示され; 親線維芽細胞について " 5F0438 " 又は " 5F0416 " として示され; MEF上で培養されたSheff4系について " hES1, " " hES2, " " hES3 " (それぞれGSM 194307, GSM 194308, GSM 194309)として示され; マトリゲル上で培養されたSheff4系について " hES4, " 又は " hES5 " (それぞれGSM 194313, GSM 194314)として示され; MEF上で培養されたH14系について " hES6, " 又は " hES7 " (GSM151739, GSMI 51741)として示され; GSM96262について " 線維芽細胞 1 " として示され; GSM96263について " 線維芽細胞 2 " として示され; そしてGSM96264について " 線維芽細胞 3 " として示される。発現強度は、赤 ( 高 ) ~ 緑 ( 低 ) の比色等級で示された。

10

20

【 0 0 4 7 】

【 図 1 0 】 図10は、異なった細胞系の全体的遺伝子発現、及び全体的遺伝子発現分析に基づく遺伝子系統樹を示す。細胞は、線維芽細胞に比較される場合 ( 3 種のGEOデータ )、0.99 ~ 1 の比率でのヒトES細胞 ( 7 種のGEOデータ ) におけるNanog遺伝子発現と相互関係する遺伝子組に基づく遺伝子系統樹において密集された。サンプルは、mTeSRにおいて培養されたクローン 1 - 8 について " 1-8mTeSR " として示され; MEF - ならし培地において培養されたクローン 1 - 8 について " 1-8CM " として示され; 親線維芽細胞について " 4F0438 " として示され; MEF上で培養されたSheff4系について " hES1, " " hES2, " " hES3 " (それぞれGSM 194307, GSM 194308, GSM 194309)として示され; マトリゲル上で培養されたSheff4系について " hES4, " " hES5 " (それぞれGSM194313, GSM194314)として示され; MEF上で培養されたH14系について " hES6 "、" hES7 " (それぞれGSMI 51739, GSM151741)として示され; GSM96262について " 線維芽細胞 1 " として示され; GSM96263について " 線維芽細胞 2 " として示され、そしてGSM96264について " 線維芽細胞 3 " として示される。発現強度は、赤 ( 高 ) ~ 緑 ( 低 ) の比色等級で示された。

30

【 0 0 4 8 】

【 図 1 1 】 図11は、ヒトiPS1-8におけるプロモーターのメチル化分析を示す。Oct3/4プロモーター ( 遠位エンハンサー ( Oct3/4 - Z1 ) 及び近位プロモーター領域 ( Oct3/4 - Z2 ) を包含する ) 及びNanogプロモーター ( 近位プロモーター領域 ( Nanog - Z1, - Z2 ) を包含する ) の一部が、CpGのメチル化について分析された ( パネル a )。パネル b は、%により示される場合、丸により示されるGpGに基づくメチル比率を示す。

40

【 0 0 4 9 】

【 図 1 2 】 図12は、94日間、培養されたヒトiPS - 1 - 8 mTeSR細胞由来の細胞の奇形腫形成能力を示す。ヒトiPS-1-8mTeSR細胞がSCIDマウス精巢中に注入され、そして注入の後56日間、分析された。パネル a はホルマリン固定された奇形腫組織のHE及びアルシアンブルー染色を示す。奇形腫は、次の3種の胚葉の代表的組織を含んだ: ne: 神経上皮、ca: 軟骨、et: 内皮管。移植片由来の組織は、HuNu染色により宿主組織から区別された ( パネル b-d )。ネスチン - 発現神経上皮がパネル b に示され; コラーゲンII発現軟骨細胞がパネル c に示され; - フェトプロテイン発現内皮管がパネル d に示される。矢印は、染色の代表的領域を示す。

50

## 【 0 0 5 0 】

【図 1 3】図13は、種々の条件下で培養された細胞の奇形腫 - 形成能力を示す。奇形腫 1 (パネルT-1) は、94日間、培養されたヒトiPS-1-8mTeSR細胞に由来した。ヒトiPS-1-8mTeSR細胞がSCIDマウス精巢中に注入され、そして注入の後56日間、分析された。奇形腫 2 (パネルT-2) は、102日間、培養されたヒトiPS-1-8mTeSR細胞に由来した。ヒトiPS-1-8mTeSR細胞がSCIDマウス精巢中に注入され、そして注入の後48日間、分析された。奇形腫 - 1 (パネルT-1) において、平滑筋細胞 ( - SMAに対して陽性) 及びセクレタリー内皮 (MUC-1に対して陽性) が、図12において観察される3種の胚葉の他に観察された。矢印は、染色の代表的領域を示す。

## 【 0 0 5 1 】

【図 1 4】図14は、種々の条件下で培養された細胞の奇形腫 - 形成能力を示す。奇形腫 3 (パネルT3) は、114日間、培養されたヒトiPS-1-8mTeSR細胞に由来した。ヒトiPS-1-8mTeSR細胞がSCIDマウス精巢中に注入され、そして注入の後42日間、分析された。図12及び13に類似する3種の胚葉が観察された。T-F1及びF2図は、134日間、培養された (継代19) 、凍結融解されたiPS-1-8mTeSR細胞由来の奇形腫を示す。ヒトiPS-1-8mTeSR細胞がSCIDマウス精巢中に注入され、そして注入の後46日間 (パネルT-F1) 、及び48日間 (パネルT-F2) 分析された。3種の胚葉から成る組織が観察された。メラニン細胞がまた、T-F2実験において観察された。多能性が、凍結及び融解の後でさえ、維持された。矢印は、染色の代表的領域を示す。

## 【 0 0 5 2 】

【図 1 5】図15は、ヒトiPSクローン 1 - 8 において検出されるとトランスジーン のサザンプロット及びPCR分析を示す。Oct3/4、Sox2及びKlf4トランスジーンが、サザンプロット分析により検出された。ヒトiPSクローン 1 - 8 は、Oct3/4トランスジーン及びSox2トランスジーン の約10のコピー及びKlf4トランスジーン の1つのコピーを有することが推定された。C-Mycトランスジーンに関しては、ゲノムPCR分析が行われた。プライマー組は、完全な第2イントロンを含むよう企画された。黒の矢印は、興味あるトランスジーン の位置を示す。白の矢印は内因性c-Mycの位置を示す。

## 【 0 0 5 3 】

【図 1 6】図16は、4種の遺伝子 (Oct4, Sox2, Klf4及びc-Myc) により誘発されたALP陽性コロニーにおけるhESマーカー遺伝子発現プロファイルを示す。コロニーは、4種の遺伝子トランスダクションの後17日で、ALPについて染色された。すべてのALP (+) コロニーは、hESマーカー遺伝子発現について分析され、そして評価された。パネルaは、Nanog、TGFI、Dnmt3b、Zfp42、FoxD3、TERT、CYP26A1及びGDF3を発現するコロニーの数を示す。パネルbは、オクタ - 陽性コロニーの形態学を示す。パネルc-dは、個々の実験により分類されたhES細胞マーカー遺伝子の数を示す。

## 【 0 0 5 4 】

【図 1 7】図17は、ES細胞関連の8種の遺伝子 (Nanog、TGFI、Dnmt3b、Zfp42、FoxD3、TERT、CYP26A1及びGDF3) の遺伝子発現プロファイル及びALP活性により分類される、4種の遺伝子 (Oct4、Sox2、Klf4 及びc-Myc) により誘発されたコロニーの形態を示す。丸は、採取されたコロニーを示す。

【図 1 8】図18は、ES細胞関連の8種の遺伝子 (Nanog、TGFI、Dnmt3b、Zfp42、FoxD3、TERT、CYP26A1及びGDF3) の遺伝子発現プロファイル及びALP活性により分類される、4種の遺伝子 (Oct4、Sox2、Klf4 及びc-Myc) により誘発されたコロニーの形態を示す。丸は、採取されたコロニーを示す。

【図 1 9】図19は、ES細胞関連の8種の遺伝子 (Nanog、TGFI、Dnmt3b、Zfp42、FoxD3、TERT、CYP26A1及びGDF3) の遺伝子発現プロファイル及びALP活性により分類される、4種の遺伝子 (Oct4、Sox2、Klf4 及びc-Myc) により誘発されたコロニーの形態を示す。丸は、採取されたコロニーを示す。

【図 2 0】図20は、ES細胞関連の8種の遺伝子 (Nanog、TGFI、Dnmt3b、Zfp42、FoxD3、TERT、CYP26A1及びGDF3) の遺伝子発現プロファイル及びALP活性により分類される、4

10

20

30

40

50

種の遺伝子 (Oct4、Sox2、Klf4 及びc-Myc) により誘発されたコロニーの形態を示す。丸は、採取されたコロニーを示す。

【図 2 1】図21は、ES細胞関連の 8 種の遺伝子 (Nanog、TGFI、 Dnmt3b、 Zfp42、 FoxD3、 TERT、 CYP26A1及びGDF3) の遺伝子発現プロファイル及びALP活性により分類される、 4 種の遺伝子 (Oct4、 Sox2、 Klf4 及びc-Myc) により誘発されたコロニーの形態を示す。丸は、採取されたコロニーを示す。

【図 2 2】図22は、ES細胞関連の 8 種の遺伝子 (Nanog、TGFI、 Dnmt3b、 Zfp42、 FoxD3、 TERT、 CYP26A1及びGDF3) の遺伝子発現プロファイル及びALP活性により分類される、 4 種の遺伝子 (Oct4、 Sox2、 Klf4 及びc-Myc) により誘発されたコロニーの形態を示す。丸は、採取されたコロニーを示す。

10

【図 2 3】図23は、ES細胞関連の 8 種の遺伝子 (Nanog、TGFI、 Dnmt3b、 Zfp42、 FoxD3、 TERT、 CYP26A1及びGDF3) の遺伝子発現プロファイル及びALP活性により分類される、 4 種の遺伝子 (Oct4、 Sox2、 Klf4 及びc-Myc) により誘発されたコロニーの形態を示す。丸は、採取されたコロニーを示す。

【図 2 4】図24は、ヒトOct3/4予測の突然変異耐性図面のグラフ表示である。

【図 2 5】図25は、ヒトSox2予測の突然変異耐性図面のグラフ表示である。

【図 2 6】図26は、ヒトKlf4予測の突然変異耐性図面のグラフ表示である。

【図 2 7】図27は、ヒトc-Myc予測の突然変異耐性図面のグラフ表示である。

【 0 0 5 5 】

【図 2 8】図28は、マウス胚線維芽細胞からALP陽性コロニーを誘発するためへのトランスジーンの使用を示す。( Sox2、 c-Myc及びKlf4 ) 及び ( Oct4、 Sox2及びc-Myc ) の遺伝子組合せが、 12日目でALPコロニーを誘発することができる。

20

【図 2 9】図29は、成熟マウス神経幹細胞からALP陽性コロニーを誘発するためへのトランスジーンの使用を示す。MEF細胞に比較して、熟成神経幹細胞は、AIPコロニーを誘発するために外因性Sox2の発現を必要としない。

【図 3 0】図30は、マウス骨髄由来の細胞からALP陽性コロニーを誘発するためへの 3 種又は 4 種のトランスジーンの使用を示す。ALPコロニーは、c-Myc又はKlf4なしに誘発され得る。

【図 3 1】図31は、マウス骨髄由来の細胞からALP陽性コロニーを誘発するためへの 2 種又は 4 種のトランスジーンの使用を示す。Sox2及びc-Mycの組合せが、AIPコロニーを誘発できる。

30

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 6 】

目次

- I. 概要 . . . . . 20
- II. 細胞の調製 . . . . . 21
  - A. 誘発され得る細胞の説明 . . . . . 21
  - B. 細胞の採取 . . . . . 24
- III . 誘発 . . . . . 28
  - A. 概要 . . . . . 28
  - B. 細胞培養 . . . . . 28
  - C. 誘発因子 . . . . . 34
  - D. HDACインヒビター . . . . . 36
  - E. IF発現ベクター . . . . . 39
    - 1 . 組換えウィルス . . . . . 41
    - 2 . 核酸ベクター . . . . . 52
    - 3 . タンパク質トランスダクション . . . . . 52
  - F. 誘発因子配列 . . . . . 54
  - G. 誘発された細胞コロニーのサブクロニング . 70
  - H. 誘発された細胞の継代及び維持 . . . . . 71

40

50

- IV. 誘発された細胞の分析 . . . . . 72
  - A. メチル化分析 . . . . . 74
  - B. 自己再生アッセイ . . . . . 75
  - C. 核型分析 . . . . . 76
  - D. 奇形腫分析 . . . . . 76
  - E. 全体的な遺伝子発現 . . . . . 77
- V. 誘発された細胞の説明 . . . . . 78
- VI. 細胞分化 . . . . . 85
- VII. 細胞療法 . . . . . 90
- VIII. 分析方法 . . . . . 92
- IX. 細胞の貯蔵 . . . . . 97
- X. 実施例 . . . . . 97
- XI. 表 . . . . . 154

10

【 0 0 5 7 】

1. 概要：

本発明の開示は、誘発された多分化能及び多能性幹細胞及び関連する方法及び組成物を特徴とする。多能性幹細胞は、すべての3種の胚葉（外胚葉、中胚葉及び内胚葉）の細胞への分化する能力を有し；対照的に、多分化能性幹細胞は、特定の胚葉の1又は複数の細胞型をもたらすが、しかし必ずしもすべての3種の胚葉にはではない。

【 0 0 5 8 】

多分化能性又は多能性になるよう細胞の誘発方法は、ポリペプチド、特にES細胞の自己再生及び/又は多能性の維持又は調節において役割を演じるタンパク質の発現の誘発に基づかれる。そのようなタンパク質の例は、Oct3/4、Sox2、Klf2及びc-Myc転写因子であり、それらのすべてはES細胞において高く発現される。誘発された発現は、興味あるポリペプチドをコードする発現ベクターの細胞中への導入、組換えウイルスによる細胞のトランスダクション、興味ある精製された外因性ポリペプチドの細胞中への導入、興味あるポリペプチド（例えば、Oct3/4、Sox2、Klf4又はc-Myc）をコードする内因性遺伝子の発現を誘発する非天然に存在する試薬と細胞との接触、又は興味あるポリペプチドをコードする遺伝子（内因性遺伝子Oct3/4、Sox2、Klf4又はc-Myc）の発現を誘発するいずれか他の生物学的、化学的又は物理学的手段を包含することができる。

20

30

【 0 0 5 9 】

細胞を誘発するためのいくつかの基本的段階が図1に示されている。それらの段階は、ドナー、例えばヒトドナー又は第三者からの細胞の採取（100）；ポリペプチド、例えばOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの発現の誘発による細胞の誘発（110）；多分化能性又は多能性幹細胞の同定（120）；コロニーの単離（130）；及び任意には、細胞の貯蔵（140）を包含することができる。細胞の培養又は拡張を包含する、細胞を維持するための段階は、それらのすべての段階間で変化する。さらに、細胞の貯蔵は、前記工程において、多くの段階の後、存在することができる。細胞は、多くの状況、例えば治療又は他の用途に使用され得る（150）。

【 0 0 6 0 】

胚性幹（ES）細胞は、自己再生性であり、且つ多能性である。誘発された細胞はまた、自己再生性であり、且つ多能性であり得る。しかしながら、ES細胞と対照的に、誘発された細胞は、広範囲の細胞及び組織、例えば非胚性組織から誘導され得る。

40

【 0 0 6 1 】

誘発された細胞（例えば、誘発された多分化能性又は多能性幹細胞）は、多くの用途を有する。それらは、分化された細胞、例えばニューロン、肝細胞又は心筋細胞への生成を可能にする条件にゆだねられ得る。それらはまた、他のタイプの幹細胞、例えば他の特定の細胞系に分化する能力を有する、神経幹細胞、肝性幹細胞又は心臓幹細胞をもたらすことができる。誘発された細胞及びそれらから分化された細胞はまた、医学療法、例えば細胞置換療法のために有用である。誘発された細胞は非胚細胞から誘発され得るので、細胞

50

療法は、彼又は彼女の組織由来の細胞を対象に供給し、それにより、免疫拒絶の可能性を低めることを包含する。

【 0 0 6 2 】

この開示は、誘発された多分化能性及び多能性幹細胞、それらの調製及びそれらの貯蔵を記載する。この開示はさらに、誘発された多分化能性及び多能性幹細胞から分化された細胞、それらの調製及びそれらの貯蔵を記載する。誘発された細胞、それから分化された細胞の細胞療法のためへの使用がまた記載される。分析方法及び細胞銀行化方法がまた提供される。

【 0 0 6 3 】

II. 細胞の調製 :

A. 誘発され得る細胞の説明 :

多分化能性又は多能性細胞は、広範囲の種類哺乳類細胞から誘発され得る。適切な哺乳類細胞集団の例は、線維芽細胞、骨髄由来の単核細胞、骨格筋細胞、脂肪細胞、末梢血単核細胞、マクロファージ、肝細胞、ケラチン細胞、口腔ケラチン細胞、毛嚢真皮細胞、胃上皮細胞、肺上皮細胞、滑液細胞、腎臓細胞、皮膚上皮細胞又は造骨細胞を包含するが、但しそれらだけには限定されない。

【 0 0 6 4 】

細胞はまた、多くの異なった型の組織、例えば骨髄、皮膚（例えば、真皮、表皮）、筋肉、脂肪組織、末梢血液、包皮、骨格筋又は平滑筋に起因することができる。細胞はまた、新生児組織、例えば次のものから誘発され得るが、但しそれらだけには限定されない：臍帯組織（例えば、臍帯、臍帯血、臍帯血管）、羊膜、胎盤、又は他の種々の新生児組織（例えば、骨髄液、筋肉、脂肪細胞、末梢血液、皮膚、骨格筋、等）。

【 0 0 6 5 】

細胞は、誕生、例えば帝王切開誕生～死亡の期間以内に対象から採取された新生児又は生後組織に由来する。例えば、組織は、誕生後10分以上、1時間以上、1日以上、1ヶ月以上、2ヶ月以上、6ヶ月以上、1年以上、2年以上、5年以上、10年以上、15年以上、18年以上、25年以上、35年以上、45年以上、55年以上、65年以上、80年以上、80年以下、70年以下、60年以下、50年以下、40年以下、30年以下、20年以下、又は10年以下である対象からであり得る。対象は、新生児であり得る。ある場合、対象は子供又は成人である。いくつかの例においては、組織は、誕生後2, 5, 10又は20時間のヒトからである。他の例においては、組織は、誕生後1, 2, 3, 4, 5, 6, 9又は12ヶ月のヒトからである。ある場合、組織は、誕生後1年、2年、3年、4年、5年、18年、20年、21年、23年、24年、25年、28年、29年、31年、33年、34年、35年、37年、38年、40年、41年、42年、43年、44年、47年、51年、55年、61年、63年、65年、70年、77年又は85年のヒトからである。

【 0 0 6 6 】

細胞は、胚段階よりも後の成長の段階で非胚組織からであり得る。他の場合、細胞は胚に由来する。ある場合、細胞は、胎児段階よりも後の成長の段階での組織からであり得る。他の場合、細胞は胎児に由来することができる。

細胞は好ましくは、ヒト対象からであるが、但しまた、非ヒト対象、例えば非ヒト哺乳類に由来され得る。非ヒト哺乳類の例は、非ヒト霊長類（例えば、サル、モンキー、ゴリラ）、齧歯動物（例えば、マウス、ラット）、ウシ、ブタ、羊、ウマ、イヌ、ネコ又はウサギを包含するが、但しそれらだけには限定されない。

【 0 0 6 7 】

細胞は、種々の疾病状態を有する対象から採取され得る。細胞は、悪い健康状態を有さない対象から採取され得る。他の場合、対象は、疾病又は障害、例えば慢性健康状態、例えば心血管疾患、眼の疾患（例えば、網膜黄斑部変性）、聴力疾患（例えば、聴覚障害）、糖尿病、認識障害、うつ病、双極性障害、痴呆、神経変性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、オステオポロシス、肝疾患、腎疾患、自己免疫疾患、炎症性関節腫脹又は増殖性疾患（例えば、癌）を有するか、又はそれらの高い危険性を有す

10

20

30

40

50

る。他の場合、対象は、急性健康状態、例えば発作、脊髄損傷、火傷又は創傷を有するか、又はその高い危険性を有する。ある場合、対象は、彼又は彼女のさらなる使用（例えば、自家療法）、又は処理又は治療を必要とするもう1つの対象の使用（例えば、同種療法）のために細胞を供給する。ある場合、ドナー及び受容体は、免疫学的に適合できるか、又はHLA適合される。

#### 【0068】

誘発されるべき細胞は、単一細胞又は細胞集団から得られる。前記集団は相同又は異種であり得る。細胞は、ヒト細胞サンプル、例えば生検又は血液サンプルに見出される細胞集団であり得る。しばしば、細胞は体細胞である。細胞は細胞系であり得る。ある場合、細胞は他の細胞に見出される細胞に由来する。ある場合、細胞は他の細胞に融合される細胞に由来しない。ある場合、細胞は他の細胞に人工的に融合される細胞に由来しない。ある場合、細胞は、体細胞核トランスファー（SCNT）として知られている工程を受けた細胞、又はSCNTを受けた細胞の子孫である細胞ではない。

10

#### 【0069】

細胞集団は、分化された細胞及び未分化の細胞の両者を包含する。ある場合、前記集団は、分化された細胞を主に含む。他の場合、前記集団は、未分化細胞、例えば未分化幹細胞を主に含む。集団内の未分化細胞は、多能性又は多分化能性になるよう誘発され得る。ある場合、細胞集団内の分化された細胞は、多能性又は多分化能性になるよう誘発される。

#### 【0070】

細胞集団は、未分化幹細胞又は純粋幹細胞を包含する。ある場合、未分化幹細胞は、次の遺伝子：Nanog, Oct3/4, Sox2及びTertの少なくとも4個の遺伝子、少なくとも3個の遺伝子、少なくとも2個の遺伝子、少なくとも1つの遺伝子、又はいずれでもない遺伝子のDNAメチル化又はヒストン修飾のためにヘテロクロマチン形成による後生不活性化修飾を受けていない幹細胞である。そのような遺伝子、例えばTert、Nanog、Oct3/4又はSox2の活性化又は発現は、ヒト多能幹細胞がヒト生後組織に存在する未分化幹細胞から誘発される場合、存在することができる。

20

#### 【0071】

##### B. 細胞の採取：

ヒト体細胞の入手方法は、例えばSchantz and Ng (2004), A Manual for Primary Human Cell Culture, World Scientific Publishing Co., Pte, Ltdに記載されるように、十分に確立されている。ある場合、前記方法は、例えば生検（例えば、皮膚サンプル）、採取された血液、肺胞又は他の肺洗浄により、細胞サンプルの入手を包含する。組織から調製された細胞からの初期プレート化密度は、その特定組織からの細胞の予測される生存性又は粘着性のような変数に基づいて変動され得ることが理解されるべきである。種々の型の体細胞の入手方法は、次の典型的な方法を包含するが、但しそれらだけには限定されない：

30

#### 【0072】

##### 1. 骨髄：

ドナーは、一般的に麻酔され、そして腹位に置かれる。腸骨の後部境界から、採取用注射針が皮膚中に及び腸骨表面から骨髄に、直接的に挿入され、そして骨髄液が注射器中に吸引される。体性幹細胞が、骨髄の骨原性領域から骨髄細胞を単離することにより富化される。次に、単核細胞画分が、密度傾斜遠心分離により吸引物から調製される。次に、集められた粗単核細胞画分が、誘発のために本明細書に記載される方法への使用の前、培養される。

40

#### 【0073】

##### 2. 生後皮膚：

真皮を含む皮膚組織を、例えば膝又は殿部の裏から採取する。次の、皮膚組織が0.6%トリプシン/ダルベッコ変性イーグル培地（DMEM）/F-12、及び1%抗生物質/抗真菌剤において37℃で30分間インキュベートされ、そして皮膚の内側は下方に面している。

50

## 【0074】

皮膚組織がひっくり返された後、ピンセットを用いて、皮膚の内側を軽くこする。皮膚組織をハサミを用いて1mm<sup>2</sup>の切片に切除し、そして次に、1200rpmで室温で10分間、遠心分離する。上清液が除去され、そして25mlの0.1%トリプシン/DMEM/F-12/1%抗生物質を用いて、200 - 300rpmで37℃で40分間、攪拌される。組織沈殿物が十分に消化されたことを確かめた後、3mlのウシ胎児血清（FBS）（JRHにより製造される）が添加され、そしてガーゼ（PIPにより製造されるType I）、100µmのナイロンフィルター（FALCONにより製造される）及び40µmのナイロンフィルター（FALCONにより製造される）により連続的に濾過される。得られる濾液を、1200rpmで及び室温で10分間、遠心分離し、上清液を除去した後、DMEM/F-12/1%抗生物質、すなわち抗真菌剤が添加され、沈殿物が洗浄され、そして次に、1200rpm及び室温で10分間、遠心分離される。このようにして得られた細胞画分が、誘発の前、培養される。

10

## 【0075】

皮膚幹細胞が、頭皮組織から真皮乳頭を単離することにより富化され得る。ヒト頭皮組織（0.2~2cm又はそれ以下）をすすぎ、過剰の脂肪組織を切除し、そして小さな断片に切除する。それらの組織断片を、DMEM中、12.5mg/mlのジスパーゼ（Invitrogen, Carlsbad, CA）において酵素消化する。酵素処理の後、表皮を真皮から剥離し；そして毛嚢が真皮から引抜かれる。毛嚢がリン酸緩衝溶液（PBS）により洗浄され；そして表皮及び真皮が除かれる。顕微鏡がこの方法のために使用され得る。単一の真皮乳頭由来の細胞がDMEM及び10%FCSを含む媒体においてプラスチック組織培養皿上で拡張された乳頭を1週間、培養することにより生成される。単一の真皮乳頭細胞が生成される場合、それらの細胞が除かれ、そしてFGM-2 SingleQuots（Lonza）により補充されたFBMにおいて培養されるか、又は血清なしで、20 ng/mlのEGF、40 ng/mlのFGF-2及びB27の存在下で培養される。

20

## 【0076】

表皮幹細胞がまた、ヒト頭皮組織（0.5~2cm<sup>2</sup>又はそれ以下）から富化され得る。ヒト頭皮組織をすすぎ、過剰の脂肪組織を切除し、そして小さな断片に切除する。それらの組織断片を、DMEM中、12.5mg/mlのジスパーゼ（Invitrogen, Carlsbad, CA）において、4で24時間、酵素消化する。酵素処理の後、表皮を真皮から剥離し；そして毛嚢が真皮から引抜かれる。球芽及び損なわれていない外毛根鞘（ORS）を、顕微鏡下で切除する。洗浄の後、小胞をプラスチック皿中に移す。次に、膨らんだ領域が、細かな針を用いて、上方の小胞から切開される。洗浄の後、その膨らんだ部分を新しい皿に移し、そしてDMEM/F12及び10%FBSを含む培地において培養する。細胞が同定された後、培養培地をEpiLife<sup>TM</sup> Extended-Lifespan血清フリー培地（Sigma）に変える。

30

## 【0077】

3. 生後骨格筋：

筋肉、例えば上腕二頭筋の外側頭又は脚の縫工筋を含む結合組織の表皮が切断され、そして筋肉組織が切除された後、それは縫合される。得られる全筋肉を、ハサミ又はメスにより細かく切り刻み、そして次に0.06%コラゲナーゼタイプLA及び10%FBSを含むDMEM（高グルコース）に懸濁し、そして37℃で2時間インキュベートする。

## 【0078】

細胞を、細かく切り刻まれた筋肉から遠心分離により集め、そして10%FBSを含むDMEM（高グルコース）に懸濁する。その懸濁液を、40µmの孔サイズを有するマイクロフィルター及び次に、20µmの孔サイズを有するマイクロフィルターに通した後、得られる細胞画分を、未分化幹細胞を含む精製された粗細胞として培養し、そして本明細書に記載されるようなヒト多能性幹細胞の誘発のために使用することができる。

40

## 【0079】

4. 生後脂肪組織：

本発明に使用するための脂肪組織に由来する細胞を、当業者に知られている種々の方法により単離することができる。例えば、そのような方法は、アメリカ特許第6,153,432号（引用により本明細書に組み込まれる）に記載されている。脂肪組織の好ましい源は、大

50

網脂肪組織である。ヒトにおいては、脂肪細胞は典型的には、脂肪吸引により単離される。

【0080】

脂肪細胞に由来する細胞の単離の1つの方法においては、脂肪組織を、0.01%~0.5%、例えば0.04%~0.2%、0.1%のコラゲナーゼ；0.01%~0.5%、例えば0.04%又は0.2%のトリプシン；及び/又は0.5ng/ml~10ng/mlのジスパーゼ、又は有効量のヒアルロニダーゼ又はDNアーゼ（DNA消化酵素）、及び約0.01~約2.0mM、例えば約0.1~約1.0mM、又は0.53mMのエチレンジアミン四酢酸（EDTA）により、25~50、例えば33~40、又は37で、10分~3時間、例えば30分~1時間、又は45分間、処理する。

【0081】

細胞を、20µm~800µm、より好ましくは40µm~400µm、及び最も好ましくは70µmのナイロン又はチーズ布メッシュフィルターに通す。次に、培養培地における細胞を、直接的に、又はフィコール又はパーコール又は他の粒子グラジエントを用いて、示差遠心分離にゆだねる。細胞を、100~3000xg、より好ましくは200~150xg、最も好ましくは500xgで、1分~1時間、より好ましくは2~15分及び最も好ましくは5分間、4~50、好ましくは20~40及びより好ましくは約25で遠心分離する。

このようにして得られた脂肪組織の細胞を、未分化幹細胞を含む精製された粗細胞として、本明細書に記載される方法に従って培養し、そしてヒト多能性又は多分化能性幹細胞の誘発のために使用することができる。

【0082】

5. 血液：

約50ml~約500mlの静脈血液又は臍帯血を集め、そして単核細胞画分を、例えばKanof et al., (1993), Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevack, and W. Strober, eds.), ch. 7.1.1.-7.1.5, John Wiley & Sons, New York)に記載のようにして、Ficoll-Hypaque方法により得る。

【0083】

単核細胞画分の単離の後、約 $1 \times 10^7$ ~ $1 \times 10^8$ 個のヒト末梢血液単核細胞を、10%胎児ウシ血清、100µg/mlのストレプトマイシン及び100単位/mlのペニシリンを含むRPMI 1640培地に再懸濁し、そして次に、約 $1 \times 10^7$ 個の細胞/皿の密度で100mmのプラスチックペトリ皿にプレートし、そして8%CO<sub>2</sub>下で37のインキュベーターにおいてインキュベートする。10分後、懸濁液に残る細胞を除去し、そして付着細胞をピペットにより収穫する。次に得られる付着性単核細胞画分を培養し、その後、本明細書に記載のようにして誘発する。ある場合、このように得られた末梢血液由来の又は臍帯血由来の付着細胞画分を未分化幹細胞を含む精製された粗細胞として、本明細書に記載される方法に従って培養し、そして多能性又は多分化能性ヒト幹細胞の誘発のために使用する。

【0084】

末梢血液中のマクロファージを、10%加熱不活性化されたウシ胎児血清（FBS；JRH Biosciences, Lenexa, KS）、2mMのL-グルタミン、500U/mlのペニシリン及び50µg/mlのストレプトマイシンにより補充された低グルコースDMEMにおいて単核細胞画分を培養することにより富化することができる。マクロファージを拡張するために、末梢血液単核細胞を、10µg/mlのFN（Sigma, St. Louis, MO）により4で一晩、処理されたプラスチックプレート上に $2 \times 10^6$ /mlの密度で広げる。次に細胞を、保湿された雰囲気下で、37及び5%CO<sub>2</sub>下で、いずれの追加の成長因子も伴わないで、培養する。浮遊細胞を含む培地を3日ごとに変える。観察される線維芽細胞特徴を有するマクロファージを、誘発実験のために使用することができる。

【0085】

ある場合、末梢血液、臍帯血又は骨髄からの細胞画分を、アメリカ特許出願連続番号11/885,112号に記載のようにして、拡張し、そして次に、本明細書に記載される誘発方法に使用する。

【0086】

10

20

30

40

50

### III . 誘発 :

#### A. 概要 :

誘発工程の間、あるポリペプチドの誘発された発現は、一定期間、培養された細胞において実施され、この後、誘発された細胞は、多分化能性及び多能性幹細胞を特徴づける多くの性質（例えば、形態学的遺伝子発現）についてスクリーンされる。次に、それらのスクリーニング基準を満たす誘発された細胞がサブクローン化され、そして拡張され得る。ある場合、誘発される細胞は、その誘発工程の前、一定期間、培養され得る。他方では、誘発される細胞は、従来の培養期間を伴わないで、誘発工程に直接使用され得る。ある場合、異なった細胞培養培地は、誘発工程の前、間及び後、異なった点で使用される。例えば、1つのタイプの培養培地が、組織採取の後、及び/又は誘発工程の前、直接的に使用され得るが、ところが第2タイプの培地は、誘発工程の間及び/又は後、使用される。時には、第3タイプの培養培地が、誘発工程の間及び/又は後、使用される。

10

【 0 0 8 7 】

#### B. 細胞培養 :

採取の後、組織又は細胞サンプルは、採取された特定細胞又は組織のために適切ないずれかの培地において培養され得る。組織又は細胞が培養され得るいくつかの代表的な培地は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：多分化能性成人前駆体細胞（MAPC）培地；FBM（Lonzaにより製造される）；胚性幹細胞（ES）ES培地；間葉細胞幹細胞増殖培地（MSCGM）（Lonzaにより製造される）；MCDB202変性培地；内皮細胞培地キット - 2（EBM2）（Lonzaにより製造される）；変性ダイベッコ培地（IMDM）（Sigma）；ダルベッコ変性イーグル培地（DMEM）；MEF-ならしES（MC-ES）；及びmTeSR<sup>TM</sup>（StemCell Technologies, Vancouver, Canadaから入手できる）（例えば、Ludwig et al., (2006), Nat Biotechnol., 24(2): 185-187を参照のこと）。他の場合、ヒトES細胞の増殖のための他の培養条件が、Skottman et al, (2006), Reproduction, 132(5):691-698に記載のようにして、使用される。

20

【 0 0 8 8 】

MAPC（2%FBS）培地は次のものを含んで成る：60%ダルベッコ変性イーグル培地 - 低グルコース、40%MCDB201、インスリントランスフェリンセレニウムサプリメント、（0.01mg/mlのインスリン；0.0055mg/トランスフェリン；0.005µg/mlの亜セレン酸ナトリウム）、1Xリノレン酸アルブミン（1mg/mlのアルブミン；2モルのリノレン酸/1モルのアルブミン）、1Mのデキサメタゾン、2%ウシ胎児血清、1nMのデキサメタゾン、 $10^{-4}$ Mのアスコルビン酸及び10µg/mlのゲンタマイシン。

30

【 0 0 8 9 】

FBM（2%FBS）培地は次のものを含んで成る：MCDB202変性培地、2%ウシ胎児血清、5µg/mlのインスリン、50mg/mlのゲンタマイシン及び50ng/mlのアンホテリシン - B。

ES培地は次のものを含んで成る：40%ダルベッコ変性イーグル培地（DMEM）、40%F12培地、2nMのL-グルタミン、1X非必須アミノ酸（Sigma, Inc. St. Louis, MO）、20% Knockout Serum Replacement<sup>TM</sup>（Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA）及び10µg/mlのゲンタマイシン。

40

【 0 0 9 0 】

MC-ES培地は次の通りにして調製され得る：ES培地は、マイトマイシンC - 処理されたネズミ胚線維芽細胞（MEF）に基づいて20~24時間、条件づけられ、収穫され、0.45µMのフィルターを通して濾過され、そして約0.1mMのβ-メルカプトエタノール、約10ng/mlのbFGF又はFGF - 2及び任意には約10ng/mlのアクチピンAにより補充される。ある場合、照射されたMEFが、マイトマイシンC - 処理されたMEFの代わりに使用される。他の場合、STO（ATCC）又はヒト線維芽細胞がMEFの代わりに使用される。

【 0 0 9 1 】

細胞は、特定の血清により補充された培地において培養され得る。ある態様においては、血清はウシ胎児血清（FBS）である。血清はまた、ウシ胎児血清（FCS）である。ある場合、血清はヒト血清（例えば、ヒトAB血清）であり得る。血清の混合物、例えばFBS及び

50

ヒトAB、FBS及びFCS、又はFCS及びヒトABの混合物がまた使用され得る。

【0092】

組織の採取及び細胞の調製の後、適切な培養条件の使用により、調製された細胞間に存在することができる組織幹細胞又は前駆体細胞の拡張を促進することが有用である。ある場合、低血清培養又は血清フリーの培地（本明細書に記載されるような）は、組織幹細胞又は前駆体細胞の拡張を促進することができる。適切な培養培地は、MAPC、FBM又はMSCGMを包含するが、但しそれらだけには限定されない。

【0093】

一次培養は通常、細胞がドナー、例えばヒトから単離された直後、存在する。細胞はまた、一次培養の後、サブ培養され得る。“二次”サブカルチャーは、1度、サブ培養された一次培養細胞を記載し、“三次”サブカルチャーは、2度、サブ培養された一次培養物を記載し、“四次”サブカルチャーは、3度、サブ培養された一次培養細胞を記載し、そして同様である。ある場合、一次細胞は、二次サブカルチャー、又は四次サブカルチャーにゆだねられる。ある場合、一次細胞は、四次以下のサブカルチャーにゆだねられる。本明細書に記載される培養技術は一般的に、一次～四次サブカルチャー間の期間からの培養を包含するが、しかし他の培養期間もまた使用され得る。好ましくは、細胞は、一次培養～二次サブカルチャーまで培養される。

【0094】

ある場合、細胞は、約1～約12日、例えば2日、3日、4.5日、5日、6.5日、7日、8日、9日、10日、又は本明細書に記載される誘発方法を受ける前、約1～約12日のいずれか他の日数、培養され得る。他の場合、細胞は、12日以上、例えば約12～約20日間；約12～約30日間；又は約12～約40日間、培養され得る。ある態様においては、誘発されるべき細胞は、4度又はそれ以下の回数（例えば、3, 2, 1又は0回）、継代される。

【0095】

ある場合、誘発の前、細胞は低密度で、例えば約 $1 \times 10^3$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>～約 $1 \times 10^4$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>で培養される。他の場合、誘発の前（例えば、誘発の直前）、細胞は、 $1 \times 10^3$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>～約 $3 \times 10^4$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>；又は約 $1 \times 10^4$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>～約 $3 \times 10^4$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度で培養される。

【0096】

しばしば、細胞及び/又は組織は、細胞への誘発因子の導入の前及び/又は間、上記のようにして、第1培地において培養され；そして次に、細胞は、細胞への誘発因子の導入の間及び/又は後、第2又は第3培地において培養される。第2又は第3培地は、Skottman et al, (2006), Reproduction, 132(5):691-698に記載されるように、MEF-Conditioned (MC)-ES, mTeSR1™培地又は他のES細胞培地であり得る。

【0097】

多くの例においては、細胞は、細胞における遺伝子又はポリペプチドの誘発された発現の開始の前（例えば、レトロウイルス感染期間の直後）、MAPC、FBM又はMSCGM培地において培養され；そして次に、誘発された発現の開始に続いて、細胞は、MC-ES培地、mTeSR1™培地、又は本明細書に記載されるような他のES細胞場位置において培養される。

【0098】

細部培養は、誘発因子の導入の前、間又は後、低血清培養条件下で実施され得る。“低血清培養条件”とは、次の範囲の濃度の血清を含む細胞培養培地の使用を言及する：0% (v/v)（すなわち、血清フリー）～約5% (v/v)、例えば0%～2%、0%～2.5%、0%～3%、0%～4%、0%～5%、0.1%～2%、0.1%～5%、0%、0.1%、0.5%、1%、1.2%、1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%又は5%。ある場合、低血清濃度は、約0% (v/v)～約2% (v/v)である。ある場合、血清濃度は約2%である。他の態様においては、細胞は、“高血清条件”、すなわち5% (v/v)以上から約20% (v/v)の血清、例えば6%、7%、8%、10%、12%、15%又は20%の血清下で培養される。

【0099】

高血清条件下での培養は、誘発因子の導入の前、間及び/又は後、行われる。低濃度の

10

20

30

40

50

血清を有する培地は、未分化幹細胞の富化において特に有用である。例えば、MSCはしばしば、組織、例えば骨髄、脂肪、筋肉又は皮膚、等が高濃度血清（5%又はそれ以上）を含む培養培地において培養される場合、プラスチックの培養皿に付着する非造血細胞（例えば、間質細胞）を単離することにより得られる。しかしながら、それらの培養条件下でさえ、非常に少数の未分化細胞が、特に細胞が一定の培養条件（例えば、低継代数、低密度培養又は低酸素）下で継代される場合、維持され得る。

#### 【0100】

低又は高血清条件のいずれかが細胞培養のために使用される場合、1又は複数の成長因子、例えば線維芽細胞成長因子（FGF）-2；塩基性FGF（bFGF）；血小板由来の成長因子（PDGF）、表皮成長因子（EGF）；インスリン様の成長因子（IGF）；IGFII；又はインスリンが、培養培地に含まれ得る。細胞培養培地を補充するために使用され得る成長因子は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：形質転換成長因子-1（TGF-1）、アクチビンA、Noggin、脳由来の神経栄養因子（BDNF）、神経成長因子（NGF）、ニューロトロピン（NT）-1、NT-2又はNT-3。ある場合、1又は複数のそのような因子が、MC-ES培地又は他の細胞培養培地において、bFGF又はFGF-2の代わりに使用される。

10

#### 【0101】

本明細書に記載される培養培地（例えば、MAPC、FBM、MC-ES、MSCGM、EMDM、mTeSR1™）における成長因子（例えば、FGF-2、bFGF、PDGF、EGF、IGF、インスリン、IGF EI、TGF-1、アクチビンA、Noggin、BDNF、NGF、NT-1、NT-2、NT-3）の濃度は、約4ng/ml ~ 約50ng/ml、例えば約2 ng/ml、3 ng/ml、4 ng/ml、5 ng/ml、6 ng/ml、7 ng/ml、8 ng/ml、10 ng/ml、12 ng/ml、14 ng/ml、15 ng/ml、17 ng/ml、20 ng/ml、25 ng/ml、30 ng/ml、35 ng/ml、40 ng/ml、45 ng/ml又は50 ng/mlであり得る。成長因子の濃度はまた、約4ng/ml ~ 約10ng/ml；4 ng/ml ~ 約20 ng/ml；約10 ng/ml ~ 約30 ng/ml；約5 ng/ml ~ 約40 ng/ml；又は約10 ng/ml ~ 約50 ng/mlでもあり得る。他の場合、より高い濃度、例えば約500ng/ml ~ 約100ng/ml；又は約50ng/ml ~ 約75ng/mlの濃度の成長因子が使用され得る。

20

#### 【0102】

成長因子は、単独で又は組合して使用され得る。例えば、FGF-2は単独で培地に添加され得；もう1つの例においては、PDGF及びEGFの両者が培養培地に添加される。しばしば、特定の細胞型のために適切な成長因子が使用され得る。例えば、皮膚細胞は、約20ng/mlのEGF及び/又は約40ng/mlのFGF-2の存在下で培養され得るが、ところが表皮細胞は約50ng/mlのEGF及び/又は5µg/mlのインスリンの存在下で培養され得る。

30

#### 【0103】

誘発された細胞は、アポトーシスを低めるために、rho又はrho-関連のタンパク質キナーゼ（ROCK）インヒビターの存在下で維持され得る。ROCKインヒビターは、細胞が厳しい処理、例えば酵素処理にゆだねられる場合、特に有用であり得る。例えば、Y-27632（Calbiochem；水溶性）又はFasudil（HA1077；Calbiochem）、すなわちRho関連のキナーゼ（Rho関連のコイル巻きされたコイル含有タンパク質キナーゼ）の添加が、本発明のヒト多能性及び多分化能性幹細胞を培養するために使用され得る。ある場合、Y-27632又はFasudilの濃度は、約2.5µM ~ 約20µM、例えば約2.5µM、5µM、10µM、15µM又は20µMである。

40

#### 【0104】

誘発された細胞は、好ましくは毎日の培地交換を伴って、37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター（例えば、大気酸素レベル下で）中で、維持培養培地において培養され得る。ある態様においては、ヒト生後組織に存在する本発明の未分化幹細胞から誘発されたヒト多能性幹細胞を培養し、そして増殖するために、細胞は、MEF-被覆されたプラスチック培養皿又はマトリゲル被覆されたプラスチック培養皿上で、本明細書に記載される添加剤を含む培養培地において5~7日ごとにサブ培養されることが好ましい。誘発された細胞のための維持培養培地の例は、いずれかの及びすべての完全ES細胞培地（例えば、MC-ES）を包

50

含する。

【0105】

維持培養培地は、b-FGF又はFGF2により補充され得る。ある場合、維持培養培地は、他の因子、例えばIGF-II、アクチビンA、又は本明細書に記載される他の因子により補充される。例えばBendall et al, (2007), Nature, 30:448(7157): 1015-21を参照のこと。ある態様においては、誘発された細胞は、約14~約40日間、例えば、15、16、17、18、19、20、23、24、27、28、29、30、31、33、34、35、36、37、38日間、又は約14~約40日間の他の期間、培養され、そして観察され、その後、形態学的特徴に基づいて、多分化能性又は多能性候補体幹細胞コロニーが同定され、そして選択される。

【0106】

多分化能性又は多能性候補体幹細胞コロニーを同定するための形態学的特徴は、周囲細胞に対して丸く小さな細胞サイズ及び高い核：細胞質比を包含するが、但しそれらだけには限定されない。誘発された候補体細胞のサイズは、約5 $\mu$ m~約10 $\mu$ m;約5 $\mu$ m~約15 $\mu$ m;約5 $\mu$ m~約30 $\mu$ m;約10 $\mu$ m~約30 $\mu$ m;又は約20 $\mu$ m~約30 $\mu$ mであり得る。高い核：細胞質比は、約1.5:1~約10:1、例えば約1.5:1;約2:1;約3:1;約4:1;約5:1;約7:1;約8:1;約9.5:1;又は約10:1であり得る。ある場合、誘発された細胞コロニーは、マウスES細胞に比較して、平らな形態学を示す。例えば、末梢血液細胞又はフィーダーフリーの培地において培養された細胞に由来する誘発された候補体細胞は、周囲細胞に比較して、平らな形態学を示すことができる。誘発された細胞クローンを同定するためのもう1つの形態学的特徴は、親細胞間(例えば、線維芽細胞間)の空間内での小さな単層コロニーの形成である。

【0107】

誘発された細胞は、組織培養品種のプラスチック上にプレートされ、そして直接、培養される。他方では、細胞は、被覆された支持体、例えばフィブロネクチン、ゼラチン、マトリゲル™(BD Bioscience)、コラーゲン又はラミニンにより被覆された支持体上にプレートされ、そして培養される。ある場合、未処理のペトリ皿が使用され得る。適切な細胞培養容器は、例えば35mm、60mm、100mm及び150mmの細胞培養皿、6ウェルの細胞プレート、及び他のサイズの同等の細胞培養容器を包含する。ある場合、細胞はフィーダー細胞と共に培養される。例えば、細胞は、MET(例えば、照射された又はマイトマイシン処理されたMEF)の層又はカーペット上で培養され得る。

【0108】

典型的には、誘発された細胞は、低密度でプレートされ得(又は培養され得)、これは、細胞を約1:8~約1:3、例えば約1:8;約1:6;約1:5;約1:4;又は約1:3に分割することにより達成され得る。細胞は、約10<sup>3</sup>個の細胞/cm<sup>2</sup>~約10<sup>4</sup>個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度でプレートされ得る。いくつかの例においては、細胞は、約1.5 x 10<sup>3</sup>個の細胞/cm<sup>2</sup>~約10<sup>4</sup>個の細胞/cm<sup>2</sup>;約2 x 10<sup>3</sup>個の細胞/cm<sup>2</sup>~約10<sup>4</sup>個の細胞/cm<sup>2</sup>;約3 x 10<sup>3</sup>個の細胞/cm<sup>2</sup>~約10<sup>4</sup>個の細胞/cm<sup>2</sup>;約4 x 10<sup>3</sup>個の細胞/cm<sup>2</sup>~約10<sup>4</sup>個の細胞/cm<sup>2</sup>;又は約10<sup>3</sup>個の細胞/cm<sup>2</sup>~約9 x 10<sup>3</sup>個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度でプレートされ得る。いくつかの態様においては、細胞は、10<sup>4</sup>個の細胞/cm<sup>2</sup>以上、例えば約1.25 x 10<sup>4</sup>個の細胞/cm<sup>2</sup>~約3 x 10<sup>4</sup>個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度でプレートされ得る。

【0109】

C. 誘発因子:

多分化能性又は多能性に成るためへの細胞の誘発は、多くの手段で達成され得る。ある態様においては、1又は複数の細胞における多能性又は多分化能性の誘発方法は、誘発因子の発現の誘発を包含する。誘発された発現は、興味あるポリペプチドをコードする発現ベクターを細胞中に導入し、興味ある精製された外因性ポリペプチドを細胞中に導入し、又は興味あるポリペプチドをコードする内因性遺伝子の発現を誘発する天然に存在しない試薬と細胞とを接触することを包含する。

【0110】

ある場合、IF組は、1又は複数の次のものを包含する: Oct3/4 ポリペプチド、Sox2 ポ

10

20

30

40

50

リペプチド、Klf4 ポリペプチド又はc-Myc ポリペプチド。ある場合、前記組は、c-Myc ポリペプチドを含まない。例えば、IF組は、1又は複数のOct3/4ポリペプチド、Sox2ポリペプチド及びKlf4ポリペプチドを包含するが、しかしc-Mycポリペプチドを含まない。ある場合、IF組は、細胞形質転換の危険性又は誘発する危険性を高めるポリペプチドを包含しない。細胞形質転換を誘発するc-Mycの能力は記載されている。例えばAdhikary et al., (2005), Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 6(8):635-645を参照のこと。

【0111】

多くの場合、前記組は、c-Mycポリペプチドを包含する。ある場合、そのc-Mycポリペプチドはc-Mycの構成的活性変異体である。ある場合、前記組は、活性を誘発できるc-Mycポリペプチド、例えばc-Myc-ERポリペプチドを包含する。例えば、Littlewood, et al., (1995), Nucleic Acid Res., 23(10): 1686-90を参照のこと。

10

【0112】

他の場合、前記IF組は、Oct3/4ポリペプチド、Sox2ポリペプチド及びKlf4ポリペプチドを包含するが、しかしTERTポリペプチド、SV40大T抗原ポリペプチド、HPV16E6ポリペプチド、HPV16E7ポリペプチド又はBmi1ポリペプチドを包含しない。ある場合、IF組は、TERTポリペプチドを包含しない。ある場合、IF組は、SV40大T抗原を包含しない。他の場合、IF組は、HPV16E6ポリペプチド又はHPV16E7ポリペプチドを包含しない。

【0113】

ある場合、IF組は3種のIFを包含し、ここで3種のIF中の2種はOct3/4ポリペプチド及びSox2ポリペプチドである。他の場合、IF組は2種のIF、例えばc-Mycポリペプチド及びSox2ポリペプチド、又はOct3/4及びKlf4ポリペプチドを包含する。ある場合、IF組は、Oct3/4、Sox2及びKlf4ポリペプチドに制限される。他の場合、IF組は、次の4種のIF組に制限され得る：Oct3/4 ポリペプチド、Sox2 ポリペプチド、Klf4 ポリペプチド及びc-Myc ポリペプチド。

20

【0114】

IF組は、Oct 3/4、Sox2及びKlf4の他に、IFを包含することができる。そのような追加のIFは、Nanog、TERT、LEN28、CYP26A1、GDF3、FoxD3、Zfp42、Dnmt3b、Ecat1及びTcl1ポリペプチドを包含するが、但しそれらだけには限定されない。ある場合、追加のIF組は、c-Mycポリペプチドを包含しない。ある場合、追加のIF組は、細胞形質転換又は癌の誘発の危険性を高めるポリペプチドを包含しない。

30

【0115】

IFの誘発された発現は、少なくとも約7日～少なくとも約40日の期間、例えば8日、9日、10日、11日、12日、13日、14日、15日、16日、17日、18日、19日、20日、21日、25日、30日、33日又は37日間、維持され得る。

ヒト細胞集団中の細胞における多能性の誘発の効率は、最初に培養された親細胞の合計数の少なくとも約0.001%～少なくとも約0.1%、例えば0.002%、0.0034%、0.004%、0.005%、0.0065%、0.007%、0.008%、0.01%、0.04%、0.06%、0.08%又は0.09%である。時には、ドナーの年齢、組織の起源、又は培養条件に依存して、より高い効率が達成され得る。

【0116】

D. HPACインヒビター：

40

細胞の誘発は、IF組の誘発された発現と、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)インヒビターとを組合すことにより達成され得る。誘発されるべき細胞は、ヒト生後組織に存在する未分化幹細胞であり得る。他の場合、誘発されるべき細胞は、分化された細胞であるか、又は分化された及び未分化の細胞の混合物である。

【0117】

HDACは、特定組のIF、例えばOct3/4、Sox2及びKlf4の誘発された発現と組合わされ得る。例えば、ヒト体細胞は、HDACインヒビター処理が、Oct3/4、Sox2及びKlf4の誘発された発現又はOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの誘発された発現と組合された後、多能性になるよう誘発される。ある場合、ヒト多能性幹細胞は、3種の遺伝子(例えば、Oct3/4、Sox2及びKlf4)、又は3種の遺伝子(例えば、Oct3/4、Sox2及びKlf4)+c-Myc遺伝子又はHDA

50

Cインヒビターを、Tert、Nanog、Oct3/4及びSox2の個々の遺伝子が後生不活性化を受けていないヒト生後組織に存在する未分化幹細胞中の導入することにより誘発され得る。さらなる他の場合、ヒト多能性幹細胞は、3種の遺伝子（例えば、Oct3/4、Sox2及びKlf4）、又は3種の遺伝子（例えば、Oct3/4、Sox2及びKlf4）+c-Myc遺伝子又はヒストンデアセチラーゼインヒビターを、未分化幹細胞が一次培養又は二次サブカルチャー、又は低密度でのサブカルチャーにより増幅されている未分化幹細胞中に導入し、そして低濃度血清を含んで成る培養培地においてサブ培養することにより、誘発される。

【0118】

細胞は、1又は複数のHDACにより、約2時間～約5日、例えば3、6、12、14、18時間、1、2、3又は4日間、処理され得る。HDACインヒビターによる処理は、細胞におけるIFの誘発された発現の間又は後、開始する。他の場合、HDACインヒビター処理は、誘発された発現の前、開始し、そして誘発された発現の間、維持される。

10

【0119】

HDACインヒビターの適切な濃度は、使用される特定のHDACインヒビターに依存して、約0.001nM～約10mMの範囲であるが、しかし処理された細胞における細胞生存を有意に低めないよう選択される。HDAC濃度は、0.01nM～1000nMの範囲である。いくつかの態様においては、HDAC濃度は、約0.01nM～約1000nM、例えば約0.05nM、0.1nM、0.5nM、0.75nM、1.0nM、1.5nM、10nM、20nM、40nM、50nM、100nM、200nM、300nM、500nM、600nM、700nM、800nM、又は約0.01nM～約1000nMの他の濃度である。細胞は、1～5日又は1～3日間、暴露される。例えば、細胞は、1、2、3、4又は5日間、暴露される。

20

【0120】

多種類のHDACインヒビターが、誘発実験のために使用され得る。好ましい態様においては、HDACインヒビターMS-275が使用される。適切なHDACインヒビターの例は、次のいずれかを包含するが、但しそれらだけには限定されない：

A. トリコスタチンA及びその類似体、例えば：トリコスタチンA (TSA)；及びトリコスタチンC (Koghe et al, (1998), Biochem. Pharmacol, 56: 1359-1364)。

【0121】

B. ペプチド、例えば：オキサムフラチン[(2E)-5-[3-[(フェニルスルホニル)アミノフェニル]-ペント-2-エン-4-イノヒドロキサム酸 (Kim et al, (1999), Oncogene, 18:2461-2470)；トラボキシンA(シクロ-(L-フェニルアラニル-L-フェニルアラニル-D-ピペコリニル-L-2-アミノ-8-オキソ-9、10-エポキシ-デカノイル) (Kijima et al., (1993), J. Biol. Chem., 268:22429-22435)；FR901228、デプシペプチド (Nakajima et al, (1998). Ex. Cell Res., 241 : 126-133)；FR225497、環状テトラペプチド (H. Mori et al, (2000), PCT国際特許公開WO 00/08048号)；アピシジン、環状テトラペプチド[シクロ-(N-O-メチル-L-トリプトフェニル-L-イソロイシニル-D-ピペコリニル-L-2-アミノ-8-オキソデカノイル)] (Darkin-Rattay et al, (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 93:13143-13147)；アピシジンIa、アピシジンIb、アピシジンIc、アピシジンIIa及びアピシジンIIb (P. Dulski et al, PCT国際特許公開WO 97/11366号)；HC-トキシシン、環状テトラペプチド (Bosch et al, (1995), Plant Cell, 7: 1941-1950)；WF27082、環状テトラペプチド (PCT国際特許公開WO 98/48825号)；及びクラミドシン (Boschなど., 前記)。

30

40

【0122】

C. ヒドロキサム酸に基づくハイブリッド極性化合物 (HPC)、例えば：サリチルヒドロキサム酸 (SBHA) (Andrews et al, (2000), International J. Parasitology, 30:761-8)；スベロイルアニリドヒドロキサム酸 (SAHA) (Richon et al, (1998), Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A., 95: 3003-7)；アゼラインビスヒドロキサム酸 (ABHA) (Andrewsなど., 前記)；アゼライン-1-ヒドロキサメート-9-アニリド (AAHA) (Qiu et al, (2000), Mol Biol. Cell, 11 :2069-83)；M-カルボキシ桂皮酸ビスヒドロキサミド (CBHA) (Riconなど., 前記)；6-(3-クロロフェニルウレイド)カルボンヒドロキサム

50

酸、(3-Cl-UCHA)(Richonなど., 前記); MW2796(Andrewsなど., 前記); 及びMW2996(Andrewsなど., 前記)。

【0123】

D. 短鎖脂肪酸(SCFA)化合物、例えば: 酪酸ナトリウム(Cousens et al., (1979), J. Biol. Chem., 254: 1716-23); イソバレレート(McBain et al., (1997), Biochem. Pharm., 53: 1357-68); バレレート(McBainなど., 前記); 4-フェニル酪酸(4-PBA)(Lea and Tulsyan, (1995), Anticancer Research, 15:879-3); フェニル酪酸(PB)(Wang et al., (1999), Cancer Research 59: 2766-99); プロピネート(McBainなど., 前記); プチルアミド(Lea and Tulsyan, 前記); イソプチルアミド(Lea and Tulsyan, 前記); フェニルアセテート(Lea and Tulsyan, 前記); 3-プロモプロピオネート(Lea and Tulsyan, 前記); トリプチリン(Guan et al., (2000), Cancer Research, 60:749-55); アルギニン プチレート; イソプチルアミド; 及びバルプロエート。

10

【0124】

E. ベンズアミド誘導体、例えば: MS-275[N-(2-アミノフェニル)-4-[N-(ピリジン-3-イル-メトキシカルボニル)アミノメチル]ベンズアミド](Saito et al., (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 96:4592-7); MS-275の3'-アミノ誘導体(Saitoなど., 前記); 及びCI-994。

【0125】

ヒストンデアセチラーゼインヒビター処理は、例えば次の通りに実施され得る。HDACインヒビターの濃度は、特定のインヒビターに依存するが、しかし好ましくは、0.001nM~約10mM、及びより好ましくは、約0.01nM~約1000nMである。ヒストンデアセチラーゼインヒビターの有効量又は用量は、細胞、特に未分化幹細胞の生存率を有意に低めないヒストンデアセチラーゼインヒビターの量として定義される。細胞は、1~5日又は1~3日間、暴露される。暴露期間は、1日以下でもあり得る。特定の態様においては、細胞は、約1~5日間、培養され、そして次に、有効量のヒストンデアセチラーゼインヒビターに暴露される。しかしながら、ヒストンデアセチラーゼインヒビターは、培養の開始で添加され得る。そのような時間枠内で、遺伝子担持のベクター、例えば3種の遺伝子(Oct3/4、Sox2及びKlf4)をコードする核酸を含むベクターが、既知方法により、培養された細胞中に導入される。

20

【0126】

E. IF発現ベクター:

IFの誘発された発現は、Oct3/4、Sox2及びKlf4ポリペプチドをコードする1又は複数の哺乳類発現ベクターを、細胞集団に導入することを含んで成る。IFは外因性遺伝子として細胞中に導入され得る。ある場合、外因性遺伝子は、宿主細胞及びその子孫のゲノム中に組み込まれる。他の場合、外因性遺伝子は、宿主細胞及びその子孫においてエピソーム状態で持続する。外因性遺伝子は、外部源からの細胞中に導入される遺伝子である。本明細書において使用されるような遺伝子は、興味あるポリペプチド、例えばIFをコードする読取り枠を通常包含する核酸である。遺伝子は好ましくは、読取り枠に操作可能に結合されるプロモーターを含む。ある場合、天然バージョンの遺伝子はすでに細胞に存在することができるが、しかし追加の“外因性遺伝子”は、ポリペプチド発現を誘発するために細胞に添加される。

30

40

【0127】

1又は複数の哺乳類発現ベクターは、細胞の合計集団の20%以上、例えば25%、30%、35%、40%、44%、50%、57%、62%、70%、74%、75%、80%、90%、又は細胞の20%以上の他の%の細胞中に導入され得る。単一の哺乳類発現ベクターは、複数の上記IFを含むことができる。他の場合、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycポリペプチドをコードする1又は複数の発現ベクターが使用される。いくつかの態様においては、発現されるべきIFの個々は、別々の哺乳類発現ベクター上にコードされる。

【0128】

ある場合、IFは、輸送タンパク質アミノ酸配列、例えばアメリカ特許第6,773,920号、

50

第6,521,455号、第6,251,398号及び第6,017,735号に記載のようにVP22ポリペプチドのそれと整合して、遺伝的に融合される。特に、VP22ポリペプチドは、W097/05265号の図4に開示される完全なHSV1 VP22配列(1-301)のアミノ酸60-301及び159-301に対応するポリペプチドを包含する。他のヘルペスウイルスからのV22タンパク質相同体の配列に基づく相同タンパク質及びフラグメントが、アメリカ特許第6,017,735号に記載されている。そのようなVP22配列は、トランスフェクトされていないか又はトランスダクトされていない隣接細胞に、VP22融合ポリペプチド発現ベクターによりトランスフェクトされた脂肪からのVP22融合タンパク質の細胞輸送を付与する。例えば、Lemken et al, (2007), *Mol. Ther.*, 15(2):310-319を参照のこと。従って、IF-VP22融合ポリペプチドをコードするベクターの使用は、本明細書に記載される誘発方法におけるトランスフェクトされた哺乳類発現ベクターの機能的効率を有意に高めることができる。

10

#### 【0129】

適切な哺乳類発現ベクターの例は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：組換えベクター、核酸ベクター、例えばプラスミド、人工細菌染色体、人工酵母染色体、人工ヒト染色体、cDNA、cRNA及びPCR生成物発現カセット。IFの発現を駆動するための適切なプロモーターの例は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：レトロウイルスLTR要素；構成プロモーター、例えばCMV、HSV1-TK、SV40、EF-1、 $\alpha$ -アクチン；PGK及び誘発可能プロモーター、例えばTet-オペレーター要素を含むそれら。ある場合、1又は複数の哺乳類発現ベクターは、IFの他に、トランスフェクトされているか又は感染されている細胞の同定又は選択を促進するマーカー遺伝子をコードする。マーカー遺伝子の例は次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：蛍光タンパク質をコードする遺伝子、例えばEGFP、DS-Red、YFP及びDFP；選択剤に対して耐性を付与するタンパク質をコードする遺伝子、例えばneo<sup>R</sup>遺伝子、及びブラストサイジン耐性遺伝子。

20

#### 【0130】

##### 1. 組換えウイルス：

IFの誘発された発現は、IFをコードするDNA又はRNAを担持する組換えベクターを、1又は複数の細胞に導入することにより達成され得る。容易に参照するために、時にはウイルスは、それがコードするIFにより、本明細書に言及されるであろう。例えば、Oct3/4ポリペプチドをコードするウイルスは、“Oct3/4ウイルス”として記載され得る。ある場合、ウイルスは、IFの1つ以上のコピーをコードすることができるか、又は一度に、1つ以上のIF、例えば2つのIFをコードすることができる。

30

#### 【0131】

組換えウイルスの組合せ又は組が、種々のIF組の発現の誘発のために細胞に導入され得る。ある場合、組換えウイルスにより発現されるIF組は、Oct3/4ポリペプチド、Sox2ポリペプチド、Klf4ポリペプチド又はc-Mycポリペプチドの1又は複数のポリペプチドを含む。ある場合、前記組は、c-Mycポリペプチドを含まない。例えば、IF組は、Oct3/4ポリペプチド、Sox2ポリペプチド、及びKlf4ポリペプチドを含むが、しかしc-Mycポリペプチドを含まない。ある場合、IF組は、細胞形質転換の危険性又は癌を誘発する危険性を高めるポリペプチドを含まない。細胞形質転換を誘発するc-Mycの能力は記載されている。例えば、Adhikary et al, (2005), *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 6(8):635-645を参照のこと。

40

#### 【0132】

ある場合、発現されるべきIF組は、c-Mycポリペプチドを包含する。一定の場合、そのc-Mycポリペプチドは、c-Mycの構造的活性変異体である。ある場合、その組は、活性を誘発できるc-Mycポリペプチド、例えばc-Myc-ERポリペプチドを包含する。例えば、Littlewood, et al, (1995), *Nucleic Acid Res.*, 23(10):1686-90を参照のこと。

#### 【0133】

他の場合、前記IF組は、Oct3/4ポリペプチド、Sox2ポリペプチド及びKlf4ポリペプチドを包含するが、しかしTERTポリペプチド、SV40大T抗原ポリペプチド、HPV16E6ポリペプチ

50

ド、HPV16E7ポリペプチド又はBmi1ポリペプチドを包含しない。ある場合、IF組は、TERTポリペプチドを包含しない。ある場合、IF組は、SV40大T抗原を包含しない。他の場合、IF組は、HPV16E6ポリペプチド又はHPV16E7ポリペプチドを包含しない。

【 0 1 3 4 】

ある場合、IF組は3種のIFを包含し、ここで3種のIF中の2種はOct3/4ポリペプチド及びSox2ポリペプチドである。他の場合、IF組は2種のIF、例えばc-Mycポリペプチド及びSox2ポリペプチドを包含する。ある場合、IF組は、Oct3/4、Sox2及びKlf4ポリペプチドに制限される。他の場合、IF組は、次の4種のIF組に制限され得る：Oct3/4 ポリペプチド、Sox2 ポリペプチド、Klf4 ポリペプチド及びc-Myc ポリペプチド。

【 0 1 3 5 】

IF組は、Oct 3/4、Sox2及びKlf4の他に、IFを包含することができる。そのような追加のIFは、Nanog、TERT、LEN28、CYP26A1、GDF3、FoxD3、Zfp42、Dnmt3b、Ecat1及び Te11ポリペプチドを包含するが、但しそれらだけには限定されない。ある場合、追加のIF組は、c-Mycポリペプチドを包含しない。ある場合、追加のIF組は、細胞形質転換又は癌の誘発の危険性を高めるポリペプチドを包含しない。

【 0 1 3 6 】

個々のウィルスは、時間内に又は同時に、連続的に細胞に添加され得る。ある場合、少なくとも1つのウィルス、例えばOct3/4ウィルス、Sox2ウィルス、Klf4ウィルス又はc-Mycウィルスが、1又は複数の他のウィルスが添加される時間とは異なった時間で、細胞に添加される。いくつかの例においては、Oct3/4ウィルス、Sox2ウィルス及びKlf4ウィルスが同時に又は時間内に非常に接近して細胞に添加され、そしてc-Mycウィルスは、他のウィルスが添加される時間とは異なった時間で添加される。

【 0 1 3 7 】

少なくとも2種の組換えウィルスが、同時に又は時間内に非常に接近して細胞に添加され得る。いくつかの例においては、Oct3/4ウィルス及びSox2ウィルスは、同時に又は時間内に非常に接近して添加され、そしてKlf4ウィルス又はc-Mycウィルスは異なった時間で添加される。いくつかの例においては、Oct3/4 ウィルス 及び Sox2 ウィルス； Oct3/4 ウィルス 及び Klf4 ウィルス； Oct3/4 ウィルス 及び c-Myc ウィルス； Sox2 ウィルス 及び Klf4 ウィルス； Sox2 ウィルス 及び c-Myc ウィルス； 又は Klf4 及び c-Myc ウィルスは、同時に又は時間内に非常に接近して添加される。

【 0 1 3 8 】

ある場合、少なくとも3種のウィルス、例えばOct3/4ウィルス、Sox2ウィルス及びKlf4ウィルスが、同時に又は時間内に非常に接近して、細胞に添加される。他の場合、少なくとも4種のウィルス、例えば、Oct3/4ウィルス、Sox2ウィルス及びKlf4ウィルス、及びc-Mycウィルスは、同時に又は時間内に非常に接近して、細胞に添加される。

【 0 1 3 9 】

時には、ウィルス感染の効率は、同じウィルスによる反復処理により改良され得る。ある場合、1又は複数のOct3/4ウィルス、Sox2ウィルス、Klf4ウィルス、又はc-Mycウィルスは、少なくとも2、少なくとも3、又は少なくとも4種の別々の時間で細胞に添加される。

【 0 1 4 0 】

組換えウィルスの例は、レトロウィルス（レンチウィルスを包含する）；アデノウィルス；及びアデノ関連ウィルスを包含するが、但しそれらだけには限定されない。しばしば、組換えレトロウィルスは、ネズミモロニー白血病ウィルス（MMLV）であるが、しかし他の組換えレトロウィルス、例えばニワトリ白血病ウィルス、ウシ白血病ウィルス、マウス白血病ウィルス（MLV）、ミンク細胞フォーカス誘発ウィルス、マウス肉腫ウィルス、細網内皮症ウィルス、テナガザル白血球ウィルス、メイスンファイザーモンキーウィルス又はニワトリ肉腫ウィルスがまた使用され得る。例えば、アメリカ特許第6,333,195号を参照のこと。

【 0 1 4 1 】

他の場合、組換えレトロウイルスは、レンチウイルス（例えば、ヒト免疫不全ウイルス-1 (HIV-1)；サル免疫不全ウイルス(SIV)；又はネコ免疫不全ウイルス(FIV)）である。例えば、Johnston et al., (1999), Journal of Virology, 73(6):4991-5000 (FIV)；Negre D et al., (2002), Current Topics in Microbiology and Immunology, 261 :53-74 (SFV)；.Naldini et al., (1996), Science, 272:263-267 (HIV)を参照のこと。

【 0 1 4 2 】

組換えレトロウイルスは、標的細胞への侵入を助けるためのウイルスポリペプチド（例えば、レトロウイルスenv）を含んで成る。そのようなウイルスポリペプチドは、当業界において良く確立されている。例えば、アメリカ特許第5,449,614号を参照のこと。ウイルスポリペプチドは、両栄養性ウイルスポリペプチド、例えば複数の種に由来する細胞、例えば元の宿主種外の細胞中への侵入を助ける両栄養性envであり得る。例えば、前記を参照のこと。ウイルスポリペプチドは、元の宿主種外の細胞中への侵入を助ける異栄養性ウイルスポリペプチドであり得る。例えば、前記を参照のこと。ある態様においては、ウイルスポリペプチドは、自己指向性ウイルスポリペプチド、例えば、元の宿主種の細胞中への侵入を助ける自己指向性envである。

10

【 0 1 4 3 】

細胞へのレトロウイルスの侵入を助けることができるウイルスポリペプチドの例は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：MMLV両栄養性env, MMLV指向性env, MMLV異栄養性env, 水疱性口内炎ウイルス - gタンパク質 (VSV- g)、HIV - 1 env、テナガザル白血病ウイルス (GALV) env, RDI14、FeLV-C、FeLV-B、MLV 10A1 env遺伝子、及びそれらの変異体、例えばキメラ、例えば、Yee et al., (1994), Methods Cell Biol., Pt A:99-1 12 (VSV-G)；アメリカ特許第5,449,614号を参照のこと。ある場合、ウイルスポリペプチドは、発現、又は受容体への増強された結合を促進するために遺伝子的に修飾される。

20

【 0 1 4 4 】

一般的に、組換えウイルスは、ウイルスDNA又はRNA構造体を生産体細胞中に導入することにより生成される。ある場合、生産体細胞は、外因性遺伝子を発現しない。他の場合、生産体細胞は、1又は複数の外因性遺伝子、例えば1又は複数のgag、pol又はenvポリペプチド、及び/又は1又は複数のレトロウイルスgag、pol又はenvポリペプチドをコードする遺伝子を含んで成る“パッケージング細胞”である。レトロウイルスパッケージング細胞は、ウイルスポリペプチド、例えば標的細胞中への侵入を助けるVSV-gをコードする遺伝子を含んで成ることができる。

30

【 0 1 4 5 】

ある場合、パッケージング細胞は、1又は複数のレンチウイルスタンパク質、例えばgag、pol、env、vpr、vpu、vpx、vif、tat、rev又はnefをコードする遺伝子を含んで成る。ある場合、パッケージング細胞は、アデノウイルスタンパク質、例えばE1A又はE1B、又は他のアデノウイルスタンパク質をコードする遺伝子を含んで成る。例えば、パッケージング細胞により供給されるタンパク質は、レトロウイルス由来のタンパク質、例えばgag、pol、及びenv；及びレンチウイルス由来のタンパク質、例えばgag、pol、env、vpr、vpu、vpx、vif、tat、rev又はnef；及びアデノウイルス由来のタンパク質、例えばE1A及びE1Bであり得る。多くの例においては、パッケージング細胞は、ウイルスベクターが由来するウイルスとは異なるウイルスから由来するタンパク質を供給する。

40

【 0 1 4 6 】

パッケージング細胞系は、いずれかの容易にトランスフェクトできる細胞系を包含するが、但しそれだけには限定されない。パッケージングの細胞系は、293T細胞、NIH3T3、COS又はHeLa細胞系に基づかれる。パッケージング細胞はしばしば、ウイルスパッケージングのために必要とされるタンパク質をコードする少なくとも1つの遺伝子に欠失するウイルスベクタープラスミドをパッケージングするために使用される。そのようなウイルスベクターによりコードされるタンパク質から欠いているタンパク質又はポリペプチドを供給できるいずれかの細胞が、パッケージング細胞として使用され得る。

50

## 【 0 1 4 7 】

パッケージング細胞系の例は、Platinum-E (Plat-E); Platinum-A (Plat-A); BOSC 23 (ATCC CRL 11554); 及び Bing (ATCC CRL 1 1270) を包含するが、但しそれらだけには制限されない。例えば、Morita et al., (2000), *Gene Therapy*, 7: 1063-1066; Onishi et al., (1996), *Experimental Hematology*, 24:324-329; アメリカ特許第6,995,009号を参照のこと。市販のパッケージング系、例えばAmpho-Pak 293 細胞系、Eco-Pak 2-293細胞系、RetroPack PT67細胞系及びRetro-X Universal Packaging System (すべてClontechから入手できる)もまた有用である。

## 【 0 1 4 8 】

レトロウイルス構造体は、広範囲のレトロウイルス、例えばMMLV、HIV-1、SIV、FIV 又は本明細書に記載される他のレトロウイルスから誘導され得る。レトロウイルス構造体は、特定ウイルスの複製の1つよりも多くのサイクルのために必要なすべてのウイルスポリペプチドをコードすることができる。ある場合、ウイルス侵入の効率は、他の因子又は他のウイルスポリペプチドの添加により改良される。他の場合、レトロウイルス構造体によりコードされるウイルスポリペプチドは、複製の1以上のサイクルを支持しない。例えば、アメリカ特許第6,872,528号を参照のこと。そのような環境下で、他の因子又は他のウイルスポリペプチドの添加は、ウイルス侵入の促進を助けることができる。典型的な態様においては、組換えレトロウイルスは、VSV-g ポリペプチドを含むが、しかしHIV-1 envポリペプチドを含まないHIV-1ウイルスである。

## 【 0 1 4 9 】

レトロウイルス構造体は、プロモーター、多 - クローニング部位及び/又は耐性遺伝子を含んで成る。プロモーターの例は、CMV、SV40、EF1、 $\beta$ -アクトチン; レトロウイルスLTRプロモーター、及び誘発できるプロモーターを含んで成るが、但しそれらだけには限定されない。レトロウイルス構造体はまた、パッケージングシグナル(例えば、MFGベクターに由来するパッケージングシグナル; psiパッケージングシグナル)を含んで成る。当業界において知られているいくつかのレトロウイルス構造体の例は、pMX、pBabeX、又はそれらの誘導体を包含するが、但しそれらだけには限定されない。例えば、Onishi et al., (1996), *Experimental Hematology*, 24:324-329を参照のこと。

## 【 0 1 5 0 】

ある場合、レトロウイルス構造体は、自己 - 不活性化するレンチウイルスベクター (SIN) である。例えば、Miyoshi et al., (1998), *J. Virol*, 72(10):8150-8157を参照のこと。ある場合、レトロウイルス構造体は、LL-CG、LS-CG、CL-CG、CS-CG、CLG又はMFGである。Miyoshi et al., (1998), *J. Virol*, 72(10): 8150-8157; Onishi et al., (1996), *Experimental Hematology*, 24:324-329; Riviere et al., (1995), *PNAS*, 92:6733-6737を参照のこと。

## 【 0 1 5 1 】

ウイルスベクタープラスミド(又は構造体)は、pMXs、pMXs-IB、pMXs-puro、pMXs-neo (pMXs-IBは、pMXs-puroのプロマイシン耐性遺伝子の代わりにプラスチシジンを担持するベクターである)(Kimatura et al., (2003), *Experimental Hematology*, 31: 1007-1014); MFG (Riviere et al., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92:6733-6737); pBabePuro (Morgenstern et al., (1990), *Nucleic Acids Research*, 18:3587-3596); LL-CG、CL-CG、CS-CG、CLG (Miyoshi et al., (1998), *Journal of Virology*, 72:8150-8157) 及びレトロウイルスシステムとしての同様のもの、及びpAdex1 (Kanegae et al., (1995), *Nucleic Acids Research*, 23:3816-3821) 及びアデノウイルスシステムとしての同様のものを包含する。典型的な態様においては、レトロウイルス構造体は、プラスチシジン(例えば、pMXs-IB)、プロマイシン(例えば、pMXs-puro、pBabePuro); 又は根尾マイシン(例えば、pMXs-neo)を含んで成る。例えば、Morgenstern et al., (1990), *Nucleic Acids Research*, 18:3587-3596を参照のこと。

## 【 0 1 5 2 】

レトロウイルス構造体は、1又は複数のIFをコードすることができる。典型的な態様に

10

20

30

40

50

においては、Oct3/4、Sox2、Klf4又はc-Mycポリペプチド、又はそれらの変異体をコードするpMXベクターが、生成され、又は得られる。例えば、Oct3/4がpMXs-puro中に挿入され、pMX-Oct3/4が創造され；Sox2がpMXs-neo中に挿入され、pMX-Sox2が創造され；Klf4がpMX2-1B中に挿入され、pMX-Klf4が創造され；そしてc-MycがpMXs-1B中に挿入され、pMX-c-Mycが創造される。

#### 【 0 1 5 3 】

パッケージング細胞から組換えウイルス生成方法及びそれらの使用は、十分に確立されている。例えば、アメリカ特許第5,834,256号；第6,910,434号；第5,591,624号；第5,817,491号；第7070994号；及び第6,995,009号を参照のこと（引用により本明細書に組み込まれる）。多くの方法は、パッケージング細胞系中へのウイルス構造体の導入により開始する。ウイルス構造体は、当業界において知られている次のいずれかの方法により導入され得るが、但しそれらの方法だけに制限されない：リン酸カルシウム方法（例えば、未審査の日本特許公開公報第2-227075号を参照のこと）、リポフェクション方法（Feigner et al., (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84:7413-7417）、エレクトロポレーション方法、マイクロインジェクション、Fugeneトランスフェクション及び同様のもの、並びに本明細書に記載されるいずれかの方法。

#### 【 0 1 5 4 】

1つの例においては、pMX-Oct3/4、pMX-Sox2、pMX-Klf4又はpMX-c-Mycが、Fugene HD (Roche)トランスフェクションにより、PlatE細胞中に導入される。細胞培養培地が、FGM-2 Single Quots (Lonza)により補充されたFBM (Lonza)を含んで成る新鮮な培地により交換され得る。いくつかの態様においては、培地は、ウイルス構造体の導入に続いて、約12～約60時間、例えば生産体細胞へのウイルス構造体の導入に続いて、約12～約18時間；約18～約24；約24～約30；約30～約36；約36～約42；約42～約48；約48～約54；又は約54～約60時間で置換される。

#### 【 0 1 5 5 】

培地は、生産体細胞へのウイルス構造体の導入の後、約24～約48時間で置換され得る。上清液が、新鮮な培地の添加に続いて、約4～約24時間、例えば4時間で回収され得る。ある場合、上清液は、新鮮な培地の添加に続いて約4時間ごとに回収され得る。回収された上清液は、0.45 µMのフィルター（Millipore）に通され得る。ある場合、回収された上清液は、1又は複数の次のもの由来のレトロウイルスを含んで成る：pMX-Oct3/4、pMX-Sox2、pMX-Klf4 又はpMX-c-Myc。

#### 【 0 1 5 6 】

アデノウイルストランスダクションは、IF組の発現を誘発するために使用され得る。アデノウイルスの生成方法及びそれらの使用は、Straus, The Adenovirus, Plenum Press (NY 1984), 451-496; Rosenfeld, et al., (1991), Science, 252:431-434; アメリカ特許第6,203,975号、第5,707,618号及び第5,637,456号に記載のように、十分に確立されている。他の場合、アデノウイルス関連のウイルストランスダクションが、IF組の発現を誘発するために使用される。アデノ関連ウイルスの調製方法及びそれらの使用は、例えばアメリカ特許第6,660,514号及び第6,146,874号に記載のように、十分に確立されている。

#### 【 0 1 5 7 】

典型的な態様においては、アデノウイルス構造体を得られるか又は生成され、ここでアデノウイルス構造体、例えばアデノ-Xは、Oct3/4、Sox2、Klf4又はc-MycをコードするDNAを含んで成る。アデノウイルス構造体、Lipofectamine 2000 (Invitrogen)又はFugene HD (Roche)は、当業界において知られているいずれかの方法により、HEK293細胞中の導入され得る。ある場合、前記方法はさらに、(1)細胞が、トランスフェクションの後、約10～約20日、例えば約11、13、14、15、18又は20日で生じる細胞効果(CPE)を示す場合、それらの細胞を採取し；(2)前記細胞を、約2～約5回、例えば約3回の凍結-融解サイクルにゆだね；(3)得られるウイルス含有液体を集め；(4)アデノウイルス精製キット(Clontech)を用いてウイルスを精製し；そして(5)-80で前記ウイルスを貯蔵することを含んで成る。ある場合、アデノウイルスストックの力価又はブランクの形成

単位 (PFU) は、本明細書に記載のようにして、アデノ-X急速力価キット (Clontech) を用いて決定される。

【0158】

細胞は、異なった細胞型又は異なった宿主に起因する細胞を天然において標的化する組換えレトロウイルスにより感染され得る。感染効率を助けるためには、外因性受容体が最初にヒト細胞中に導入され得る。例えば、外因性マウス受容体が、ネズミモロニー白血病ウイルス (MMLV) の侵入を助けるために、ヒト細胞、例えば生後皮膚線芽細胞に添加され得る。外因性受容体は、特にその受容体がウイルスポリペプチド、例えばMMLVenv又はHIVenvを認識する場合、ウイルス侵入を促進することにより、感染効率を改良することができる。外因性受容体の例は、当業界において知られている特定のレトロウイルス又はレンチウイルスにより認識されるいずれかの受容体を包含するが、但しそれだけには限定されない。ネズミ受容体、mCAT1、GenBank受託番号NM\_007513タンパク質が、ヒト標的細胞のMMLV感染を助けるために使用される。

10

【0159】

外因性受容体は、本明細書に記載される方法により導入され得る。外因性受容体の導入方法は、リン酸カルシウムトランスフェクション、リポフェクタミントランスフェクション、Fugeneトランスフェクション、マイクロインジェクション、又はエレクトロポレーションを包含するが、但しそれらだけには限定されない。典型的な態様においては、ウイルス、例えば組換えアデノウイルス又はレトロウイルス (例えば、レンチウイルス) が、標的細胞に外因性受容体を導入するために使用される。さらなる典型的な態様においては、組換えアデノウイルスが、ヒト細胞にmCAT1を導入するために使用され、そして次に、組換えレトロウイルス、例えばMMLVがIF遺伝子、例えばOct3/4、Sox2、Klf4又はc-Mycを細胞に導入するために使用される。

20

【0160】

ある場合、mCAT1タンパク質をコードするDNAを含んで成るアデノウイルス、例えばpADEX-mCAT1構造体を用いることにより生成されるアデノウイルスの溶液が、生成されるか又は得られる。アデノウイルス溶液は、ハンクス液を含んで成る。典型的な態様においては、細胞の感染は、(1) p-ADEX-mCAT1アデノウイルス溶液と、細胞、例えばヒト非胚性線維芽細胞とを、約1m.o.i. ~ 約50m.o.i.の感染多重度 (ウイルス：脂肪の比)、例えば約1 m.o.i.、約 5 m.o.i.、約 7.5; m.o.i.、約 10 m.o.i.、約 15 m.o.i.、約 20 m.o.i.、約 30 m.o.i.、約 40 m.o.i.又は約 50 m.o.i.で接触し；(2) 前記細胞を、アデノウイルス溶液と共に室温で約15分 ~ 約2時間、例えば約 15 分、約 30 分、約 45 分、約 1時間、約 1.25 時間、約 1.5 時間、約 1.75 時間又は約 2 時間インキュベートし；そして(3) 培養培地における体細胞集団を、約24 ~ 約60時間、例えば約 24 時間、約 30 時間、約 36 時間、約 42 時間、約 48 時間、約 54 時間又は約 60 時間、培養することにより達成される。

30

【0161】

細胞は、広範囲の種類の方法を用いて感染され得る。ある場合、細胞の感染は、

(1) pMX-Oct3/4レトロウイルス、pMX-Sox2レトロウイルス、pMX-Klf4又はpMX-c-Mycの1又は複数、2又はそれ以上、3又はそれ以上、又はすべての4種を組合し、レトロウイルス溶液を得；

40

(2) 前記レトロウイルス溶液を、約 2 µg/ml ~ 約15 µg/mlのポリブレン、例えば約 2 ug/ml、約 3 ug/ml、約 5 ug/ml、約 7 ug/ml、約 10 ug/ml、約 12 ug/ml又は約 15 ug/mlのポリブレンにより補充し；

【0162】

(3) レトロウイルス溶液と体細胞とを、約0.5m.o.i. ~ 約10m.o.i.例えば約 0.5 m.o.i.、約 1 m.o.i.、約 2 m.o.i.、約 5 m.o.i.、約 7.5 m.o.i.又は約 10 m.o.i.のm.o.i (ウイルス；細胞の比)で接触し；

(4) 段階(3)の接触を、37 °Cで、約2 ~ 約24時間、例えば約 2 時間、約 3 時間、約 4 時間、約 5 時間、約 6 時間、約 7 時間、約 9 時間、約 10 時間、約 11 時間、

50

約 12 時間、約 14 時間、約 15 時間、約 16 時間、約 17 時間、約 18 時間、約 19 時間、約 20 時間、約 21 時間、約 22 時間、約 23 時間又は約 24 時間続け；

(5) 段階(4)の後すぐに、本明細書に記載のようにして、培地をMC-ES培地に変え；そして

(6) そのMC-ES培地を、新鮮な培地に1～2日ごとに変えることにより生じる。

#### 【0163】

ある場合、体細胞の感染は、本明細書に記載される段階(1)～(6)を、細胞とレトロウイルス溶液とを接触する前、体細胞を一定時間、例えば約48時間インキュベートによる追加の段階を伴って実施することにより生じる。そのようなプレインキュベーションは、体細胞が、ウィルストランスダクション、トランスフェクション又は他の方法により導入される外因性受容体を発現する場合、必要である。従って、いくつかの態様においては、アデノウイルス又はレンチウイルスが、外因性受容体、例えばmCATを体細胞に導入するために使用される場合、そのような細胞は、少なくとも約30～少なくとも約60時間、例えば約30、約35、約40、約48、約52、約55又は約60時間の一定時間、培養される必要がある。

#### 【0164】

細胞の感染は、当業界において知られているいずれかの方法により達成され得る。Pals son, B., et al., (1995), W095/10619号; Morling, F.J. et al., (1995), Gene Therapy, 2:504-508; Gopp et al., (2006), Methods Enzymol, 420:64-8を参照のこと。例えば、感染は、細胞へのウイルスの添加に続いてすぐの期間、細胞を遠心分離にゆだねることを包含する“回転-感染”又は“スピノキュレーション (spinoculation)”方法により達成され得る。ある場合、ウイルスは、感染の前、例えば超遠心分離により濃縮され得る。ある場合、他の技法が、レトロウイルスの標的細胞中への侵入を助けるか、又は改良するために使用され得る。例えば、レトロウイルスは、特定細胞型への侵入を助けるか又は指図するためにリボソーム又は免疫リボソームと接触され得る。例えば、Tan et al., (2007), Mol. Med., 13(3-4):216-226を参照のこと。

#### 【0165】

本明細書に記載される細胞の感染方法は、外因性受容体、例えばmCAT1又は本明細書に記載される他の外因性受容体を発現する細胞を感染するために使用され得る。外因性受容体がいかにして導入されるかに依存して、感染の前、細胞のプレインキュベーション期間は、変えられる必要がある。ある場合、外因性受容体を発現しない細胞が使用される。いくつかの組換えレトロウイルス、例えばVSV-G偽タイプの組換えレトロウイルスは、細胞を効果的に侵入するために、外因性受容体の助けを必要としない。いくつかの例においては、VSV-G偽型の組換えレトロウイルスは、本明細書に記載される方法(但し、細胞の予備培養のタイミングが異なる)に従って、細胞に導入される。

#### 【0166】

##### 2. 核酸ベクター：

核酸ベクタートランスフェクション(例えば、過渡的トランスフェクション)方法が、IFをヒト細胞中に導入するために使用され得る。トランスフェクション品種の核酸発現ベクターの調製方法及びトランスフェクション方法は十分に確立されている。例えば、Sambrook and Russell (2001), "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3<sup>rd</sup> ed, (CSHL Press); 及びCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (2005), 9.1 -9.14を参照のこと。

#### 【0167】

高い効率のトランスフェクション方法の例は、例えばTrompeter (2003), J Immunol. Methods, 274(1 -2):245-256、及び国際特許出願の公開W02002086134号、W0200200871号及びW02002086129号に記載のような“ヌクレオフェクション”、脂質に基づくトランスフェクション試薬、例えばFugene(商標)6及びFugene(商標)HD(Roche)、DOTAP、及びPLUS<sup>TM</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA)、Dreamfect<sup>TM</sup> (OZ Biosciences, Marseille, France)、GeneJuice<sup>TM</sup> (Novagen, Madison, WI)、ポリエチレンイミン(例えば、Lungwitz et al., (2005), Eur. JPharm. Biopharm., 60(2):247-266を参照のこと)、及びGeneJammer<sup>TM</sup>

(Stratagene, La Jolla, CA)と組合してのリポフェクタミン<sup>TM</sup>LTX, 及び例えばアメリカ特許出願番号11/195,066号に記載のようなナノ粒子のトランスフェクション試薬によるトランスフェクションを包含する。

【0168】

### 3. タンパク質トランスダクション:

誘発方法は、少なくとも1つのIFを細胞中に直接的に導入するためにタンパク質トランスダクションを使用することができる。ある場合、タンパク質トランスダクション方法は、キャリアー剤、及び上記IFの1つのアミノ酸配列を含んで成る、少なくとも1つの精製されたポリペプチドを含む組成物と細胞とを接触することを包含する。適切なキャリアー剤及びそれらの使用方法の例は、市販の試薬、例えばアメリカ特許第6,841,535号に記載されるChariot<sup>TM</sup> (Active Motif, Inc., Carlsbad, CA); Bioport (商標) (Gene Therapy Systems, Inc., San Diego, CA)、GenomeONE (Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan)、及び ProteoJuice<sup>TM</sup> (Novagen, Madison, WI)、又は例えばアメリカ特許出願番号10/138,593号に記載されるようなナノ粒子タンパク質トランスダクション試薬を包含するが、但しそれらだけには限定されない。

10

【0169】

タンパク質トランスダクション方法は、タンパク質トランスダクションドメイン(PTD)配列に融合される上記IF(IF-PTD融合ポリペプチド)の1つのアミノ酸配列を含んで成る少なくとも1つの精製されたポリペプチドと細胞とを接触することを含んで成る。PTDドメインは、IF配列のアミノ末端に融合され得; 又はPTDドメインは、IF配列のカルボキシ末端に融合され得る。ある場合、IF-PTD融合ポリペプチドは、それが復元される細胞へのその輸送を促進することができる、変性されたポリペプチドとして細胞に添加される。

20

【0170】

PTD融合タンパク質の生成及びそれらの使用法は、例えばアメリカ特許第5,674,980号、第5,652,122号及び第6,881,825号に記載のように、当業界においては確立されている。また、Becker-Hapak et al, (2003), Curr Protocols in Cell Biol, John Wiley & Sons, Inc.を参照のこと。典型的なPTDドメインアミノ酸配列は、次のいずれかを包含するが、但しそれらだけには限定されない: YGRKKRRQRRR (配列番号1); RKKRRQRR (配列番号2); YARAAARQARA (配列番号3); THRLPRRRRRR配列番号4); 及びGGRRARRRRR (配列番号5)。

30

【0171】

ある場合、個々の精製されたIFポリペプチドが、異なった時間で、連続的に細胞に添加される。他の態様においては、精製されたc-Mycポリペプチドを除く、少なくとも3種の組の精製されたIFポリペプチド、例えばOct3/4 ポリペプチド、Sox2 ポリペプチド及びKlf4 ポリペプチドが細胞に添加される。いくつかの態様においては、4種の組の精製されたIF-ポリペプチド、例えば精製されたOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycポリペプチドが細胞に添加される。いくつかの態様においては、精製されたIFポリペプチドが、1つの組成物(すなわち、IFポリペプチドの混合物を含む組成物)として細胞に添加される。

【0172】

いくつかの態様においては、細胞は、精製されたIFポリペプチドの存在下で、約30分~約24時間、例えば1時間、1.5時間、2時間、2.5時間、3時間、3.5時間、4時間、5時間、6時間、7時間、8時間、12時間、16時間、18時間、20時間、又は約30分~約24時間のいずれか他の期間インキュベートされる。いくつかの態様においては、細胞のタンパク質トランスダクションは、ほぼ毎日~ほぼ5日ごとの、例えば1.5日ごとの、2日ごとの、3日ごとの頻度で、又はほぼ毎日~ほぼ4日ごとのいずれか他の頻度で、同じか又は異なったIFポリペプチドにより反復される。

40

【0173】

ある場合、本明細書に記載される方法は、タンパク質トランスダクション及び本明細書に記載のようなIF組の発現を誘発するためにいずれかの組合せでの発現ベクタートランスダクション/トランスフェクションを利用する。いくつかの態様においては、レトロウィ

50

ルス発現バクターは、細胞におけるOct3/4、Sox2及びKlf4ポリペプチドの発現を誘発するために使用され、そして精製されたc-Mycポリペプチドは、本明細書に記載されるようにタンパク質トランスダクションにより細胞中に導入される。HDACインヒビター処理が、精製されたIFポリペプチドの他に使用され得る。ある場合、精製されたc-Mycポリペプチドを除く、少なくとも3種の組の精製されたIFポリペプチド、例えばOct3/4ポリペプチド、Sox2ポリペプチド及びKlf4ポリペプチドが、HDACインヒビター処理にまたゆだねられる細胞に添加される。

【0174】

F. 誘発因子配列：

本明細書に記載される誘発方法に使用されるIFのアミノ酸配列を含んで成るポリペプチド、及びそのようなポリペプチドをコードする外因性遺伝子が、本明細書に記載される。いくつかの態様においては、IFアミノ酸配列は、天然に存在するアミノ酸配列、例えばヒト又はマウスOct3/4、ヒト又はマウスSox2、ヒト又はマウスKlf4、又はヒト又はマウスc-Mycポリペプチドのアミノ酸配列である。他の態様においては、IFのアミノ酸配列は、本明細書に記載されるように、IFアミノ酸配列に対して機能的に又は構造的に相同であるIFの天然に存在しないアミノ酸配列変異体である。

【0175】

2種のポリペプチドの構造的及び機能的相同性の評価は一般的に、お互いに対するそれらのアミノ酸配列の%同一性の決定を包含する。複数のアミノ酸配列間の配列同一性は、従来の方法により決定される。例えばAltschul et al, (1997), *Nucleic Acids Research*, 25(17):3389-3402;及びHenikoff and Henikoff (1982), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 10915 (1992)を参照のこと。手短には、2種のアミノ酸配列が、10のギャップ開始ペナルティー、1のギャップ延長ペナルティー、及びHenikoff and Henikoff (前記)の"BLOSUM62" 評点マトリックスを用いて、一列整列評点を最適化するために一列整列される。次に、%同一性が、 $([ \text{同一の適合の合計数} ] / [ \text{2種の配列を一列整列するために、より長い方の配列の長さ} + \text{より長い方の配列中に導入されるギャップの数} ]) (100)$ として記載される。

【0176】

当業者は、2種のアミノ酸配列を一列整列するために利用できる多くの確立されたアルゴリズムが存在することを理解するであろう。Pearson and Lipmanの"FASTA"類似性調査アルゴリズムは、本明細書に開示されるアミノ酸配列及びもう1つのペプチドのアミノ酸配列の同一性のレベルを試験するための適切なタンパク質一列整列方法である。FASTAアルゴリズムはPearson and Lipman (1988), *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA*, 85:2444、及びPearson (1990), *Meth. Enzymol.*, 183:63に記載されている。手短には、FASTAは、保存性アミノ酸置換、挿入又は欠失を考慮しないで、問題の配列(例えば、配列番号6-13のいずれか)、及び最高密度の同一性(k<sub>tup</sub>変数が1である場合)又は同一性対(k<sub>tup</sub>=2)のいずれかを有する試験配列により共有される領域を同定することにより配列類似性を特徴づける。

【0177】

次に、最高密度の同一性を有する10の領域が、アミノ酸置換マトリックスを用いて、すべての対のアミノ酸の類似性を比較することにより再評点が付けられ、そして領域の末端が、最高の評点に寄与するそれらの残りのみを含むよう"整えられる(trimmed)"。"カットオフ"値(配列の長さ及びhtup値に基づいての予定された式により計算される)よりも高い評価を有するいくつかの領域が存在する場合、その整えられた初期領域は、それらの領域がギャップを有するおおよそその一列整列を形成するために連結され得るかどうかを決定するために試験される。最終的に、2種のアミノ酸配列の最高評点領域が、アミノ酸挿入及び欠失を可能にする、Needleman-Wunsch-Sellers algorithm (Needleman and Wunsch (1970), *J. Mol. Biol.*, 48:444-453; Sellers (1974), *SIAMJ. Appl. Math.*, 26: 787)の改良法を用いて一列整列される。

【0178】

10

20

30

40

50

FASTA分析のための例示的パラメーターは、次のものである：ktup = 1、キャップ開始ペナルティー = 10、キャップ延長ペナルティー = 1 及び置換マトリックス = BLOSUM62。これらのパラメーターは、Pearson (1990), Meth. Enzymol., 183:63の添付 2により説明されるように、評点マトリックスファイル (“SMATRIX”) を改変することにより、FASTAプログラム中に導入され得る。

【 0 1 7 9 】

低、中位の又は高い緊張条件下で、配列番号 6 - 13のいずれかのアミノ酸配列をコードする核酸からの少なくとも100個のヌクレオチドのプロープに対して特異的にハイブリダイズする、本明細書記載されるような、Oct3/4、Sox2、Klf4又はc-Mycポリペプチドをコードするアミノ酸（例えば、外因性遺伝子）がまた本明細書に記載される。低い緊縮ハイブリダイゼーション条件は例えば、2 × SSC及び0.1% SDSにおいて42 で、約40% ~ 約70%のGC含有率の100個のヌクレオチドプロープとのハイブリダイゼーションを包含する。

10

【 0 1 8 0 】

中位の緊縮性ハイブリダイゼーション条件は、例えば、0.5 × SSC及び0.1% SDSにおける50 での条件を包含する。高緊縮性ハイブリダイゼーション条件は例えば、0.2 × SSC及び0.1% SDSにおける65 での上記プロープとのハイブリダイゼーションを包含する。それらの条件下で、ハイブリダイゼーション温度が高められる場合、より高い相同性を有する核酸が得られる。Oct3/4、Sox2、Klf4又はc-Mycポリペプチドをコードするそのような核酸は、本明細書に記載されるように、それらのIFの誘発された発現において有用である。

【 0 1 8 1 】

IFの特定のアミノ酸配列変異体が本明細書に記載される方法における使用のために有用であるかどうかの決定における多くの考慮が当業者に有用である。それらの考慮は次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：(1) IFについての既知構造体 - 機能の関係、例えば、多くの場合、機能的に別々であり、そして独立した機能であり得ることが示されている、モジュラードメイン、例えばDNA結合アルゴリズムにより示されるように、IFの天然に存在する相同体（例えば、パラ体及びオルト体）間でのアミノ酸配列保存の存在、著しくは、機能的効果、すなわちタンパク質のその機能に基づくアミノ酸配列における特定のアミノ置換の“耐性”を都合よく予測する多くの生物情報アルゴリズムが当業界において知られている。そのようなアルゴリズムは、例えばpMUT、SEFT、PolyPhen及びSNPs3Dを包含する。再考のためには、Ng and Henikoff (2006), Ann Rev Genomics Hum Genet., 7:61-80を参照のこと。

20

【 0 1 8 2 】

例えば、pMUTは、所定の配列位置での特定のアミノ酸置換が配列相同性に対してタンパク質の機能に影響を及ぼすかどうかを、高い程度の精度（全体的に84%）で予測する。Ferrer-Costa et al, (2005), Bioinformatics, 21(14):3176-3178; Ferrer-Costa et al, (2004), Proteins, 57(4):811-819; 及び Ferrer-Costa et al., (2002), J Mol Biol, 315:771-786を参照のこと。PMUTアルゴリズムサーバーは、WWW://mmb2.pcb.ub.es:8080/PMut/に基づいて公的に入手できる。従って、いずれかのIFポリペプチドアミノ酸配列に関しては、IFポリペプチド機能に基づくいずれかの所定のアミノ酸置換の予測される中性度又は有害性を提供する“アミノ酸置換マトリックス”が生成され得る。

30

40

【 0 1 8 3 】

天然に存在しない配列変異体は、多くの既知方法により生成され得る。そのような方法は、“遺伝子シャフリング”（アメリカ特許第6,521,453号に記載される）；“RNA突然変異誘発”（Kopsidas et al, (2007), BMC Biotechnology, 7: 18- 29に記載される）；及び“エラープロンPCR法”を包含するが、但しそれらだけには限定されない。エラープロンPCR方法は、次の4種の方法に分けられ得る：

【 0 1 8 4 】

(a) ヌクレオチド濃度を不均衡にし、そして/又は化合物、例えば塩化マンガンを追加することにより、ポリメラーゼの適合度を低める方法（例えば、Lin-Goerke et al., (1997), Biotechniques, 23:409-412を参照のこと）、

50

(b)ヌクレオチド類似体を用いる方法(例えば、アメリカ特許第6,153,745号を参照のこと)、

(c)“突然変異誘発性”ポリメラーゼを用いる方法(例えば、Cline, J. and Hogrefe, H.H. (2000), *Strategies* (Stratagene Newsletter), 13: 157-161を参照のこと)、及び

(d)組合された方法(例えば、Xu et al., (1999), *Biotechniques*, 27: 1102-1108を参照のこと)。

#### 【0185】

他のPCRに基づく突然変異誘発方法は、例えば、Osuna et al., (2004), *Nucleic Acids Res.*, 32(17):e136 and Wong et al., (2004), *Nucleic Acids Res.*, 10;32(3):e26、及び当業者において知られている他の文献に記載されるそれらの方法を包含する。

#### 【0186】

IFのアミノ酸配列変異体の機能の維持、欠失又は獲得の確認は、評価されるタンパク質機能に従って、種々のタイプのアッセイにより決定され得る。例えば、IFが転写活性化因子、例えばOct3/4である場合、機能は細胞に基づくプロモーター-レポーターアッセイを用いて容易に評価され、ここで前記レポーター構造体はアッセイされるべき転写活性化因子ポリペプチドについての1又は複数の同系標的要素を含んで成る。プロモーター-レポーター構造体を生成し、それらを細胞中に導入し、そして種々のレポーターポリペプチド活性をアッセイするための方法は、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (2005), 3.16-3.17 and 9.1-9.14において詳細に見出され得る。プロモーター活性は、レポーターポリペプチドの性質(例えば、酵素活性又は蛍光)、レポーターポリペプチド発現(例えば、ELISAアッセイによる)、又はレポーターmRNA発現(例えば、蛍光ハイブリダイゼーション技法による)を測定することにより定量化され得る。適切なレポーターポリペプチドは、例えばホタルルシフェラーゼ、Renillaルシフェラーゼ、蛍光タンパク質(例えば、増強された緑色蛍光タンパク質)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ラクタマーゼ、ALP及びホースラディッシュペルオキシダーゼを包含する。

#### 【0187】

例えば、ルシフェラーゼ活性は、適切な発光源性基質、例えばホタルルシフェラーゼに関しては、ホタルルシフェリン、又はRenillaルシフェラーゼに関しては、コエレンテラジンを供給することにより検出され得る。適切な基質の存在下でのルシフェラーゼ活性は、多くの標準技法、例えば免疫測定法により定量化され得る。例えば、アメリカ特許第5,744,320号を参照のこと。蛍光ポリペプチド(例えば、EGFP)は、当業界において知られている多くの検出方法(例えば、蛍光定量法又は蛍光顕微鏡)により、生存細胞において検出され、そして定量化され得る。蛍光ポリペプチドを用いての生存細胞におけるレポーターアッセイスクリーン、例えば大量処理スクリーニング法がアメリカ特許第6,875,578号に見出され得る。

#### 【0188】

転写活性化因子である多くのIF、すなわち転写活性化因子が、モノマー、マルチマーとして、又は他のポリペプチドと共にヘテロマー複合体として結合する、特定の標的要素を含むプロモーターをトランス活性化するポリペプチドは、本明細書に記載されている。天然に存在する転写活性化因子、例えばKlf4は、次のような2種のドメインから最少構成されるモジュラータンパク質である：標的化されるべき遺伝子を指図するDNA結合ドメイン、及び転写組織との相互作用を通して転写応答の性質及び程度を支配する活性化ドメイン。それらの2種のドメインは典型的には、1つの転写活性化因子のDNA結合ドメイン、例えばDNA結合ドメインSox2が、十分に機能的な“キメラ”転写活性化因子、例えばKamachi et al., (1999), *Mol Cell Biol.*, 19(1): 107-120に記載されるようなキメラSox2転写活性を生成するために、もう1つの転写活性化因子、例えばヘルペスVP16の転写ドメインに結合され得るような独立した態様で作動する。

#### 【0189】

本明細書に提供されるガイドの観点から、本明細書に記載される方法において操作でき

10

20

30

40

50

る広範囲のIF配列変異体（例えば、Oct3/4、Sox2、Klf4又はc-Myc配列変異体）は、過度の努力を伴わないで、当業者により容易に固定され得る。

【0190】

Oct3/4ポリペプチド：

本明細書において言及される場合、“Oct3/4ポリペプチド”は、ヒトOct3/4、マウスOct3/4、又は下記のいずれかのポリペプチドを包含する：

(i) 次のヒトnanog遺伝子オクタマー要素に結合するDNA結合ドメイン（DBD）を包含し：

5' -TTTTGCAT-3'；そして

(ii) 1又は複数のnanogオクタマー要素を含んで成るプロモーターをトランス活性化できる。例えば、Kuroda et al, (2005), Mol and Cell Biol., 25(6):2475-2485を参照のこと。

10

【0191】

いくつかの態様においては、Oct3/4は、上記機能的性質を有し、そしてヒトPOUクラス5ホモボックス1（POU5F1；GenBank受託番号NP\_002692）としても知られている、ヒトOct3/4のアミノ酸配列に対応する配列番号6に対して少なくとも70%、例えば75%、80%、85%、90%、91%、92%、95%、97%、99%同一の、又は配列番号6に対して少なくとも70%~100%同一のいずれか他の%同一であるアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドである。いくつかの態様においては、Oct3/4は、上記機能的性質を有し、そして配列番号6、例えば少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失又は挿入を有する配列番号6に対して少なくとも70%~100%同一（例えば、75%、80%、85%、90%、91%、92%、95%、97%、99%同一）のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドである。

20

【0192】

他の態様においては、Oct3/4は、上記機能的性質を有し、そして合計30個までのアミノ酸置換、欠失、挿入又はそれらのいずれかの組合せを有する配列番号6、例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、15、20、25又はいずれか他の数のアミノ酸置換、欠失、挿入又は0~30のそれらのいずれかの組合せを有する配列番号6のアミノ酸を含んで成るポリペプチドである。

【0193】

配列番号6（ヒトOct3/4）：

MAGHLASDFAFSPPPGGGGDGGGPEPGWVDPRTWLSFQGGPPGGPGIGPGVGGPSEV  
WGI P P C P P P Y E F C G G M A Y C G P Q V G V L P Q G G L E T S Q P E G A G V G V E S N S D G A S P E P  
C T V T P G A V K L E K E K L E Q N P E E S Q D I K A L Q K E L E Q F A K L L K Q K R I T L G Y T Q A D V G L T L  
G V L F G K V F S Q T T I C R F E A L Q L S F K N M C K L R P L L Q K W V E E A D N N E N L Q E I C K A E T L V Q  
A R K R K R T S I E N R V R G N L E N L F L Q C P K P T L Q Q I S H I A Q Q L G L E K D V V R V W F C N R R Q K G  
K R S S S D Y A Q R E D F E A A G S P F S G G P V S F P L A P G P H F G T P G Y G S P H F T A L Y S S V P F P E G E A  
F P P V S V T T L G S P M H S N .

30

【0194】

いくつかの態様においては、Oct3/4は、上記機能的性質を有し、そして配列番号7に対して少なくとも70%同一の、例えば高く保存されたPOU DNA結合ドメインを含んで成るヒトOct3/4のアミノ酸138-290に対応する、配列番号7に対して75%、80%、85%、90%、91%、92%、95%、97%、99%、又は少なくとも70%~100%のいずれか他の%同一のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドである。いくつかの態様においては、Oct3/4は、上記機能的性質を有し、そして配列番号7、例えば少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失又は挿入（例えば、1~10個のアミノ酸置換、欠失又は挿入）を有する配列番号7に対して少なくとも70%~100%同一（例えば、75%、80%、85%、90%、91%、92%、95%、97%、99%同一）のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドである。

40

【0195】

配列番号7（ヒトOct3/4のPOU/DNA結合ドメイン）：

D CALQKELEQFAKLLKQKRITLGYTQADVGLTLGVLFGKVFQSQTTCRFEALQLSFK

50

NMCKLRPLLQKWVEEADNNENLQE I CKAETLVQARKRKRTSEENRVRGNLENLFLQCP  
KPTLQQISHIAQQLGLEKDWVRVWFCNRRRQKGRSSS。

【 0 1 9 6 】

本明細書に記載されるようなOct3/4ポリペプチドは、天然に存在するか又は天然に存在しないヒトOct3/4の相同体を包含することができる。天然に存在するヒトOct3/4の相同体は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：GenBank受託番号：NP\_002692；NP\_001108427；NP\_001093427；NP\_001009178；及びNP\_038661として列挙されるそれら、又は上記構造的及び機能的基準を満たすいずれか他のOctファミリーメンバー。

【 0 1 9 7 】

天然に存在しないヒトOct3/4の相同体の例は、Niwa et al., (2002), Mol Cell Biol, 22(5): 1526-1536;及びLunde et al, (2004), Curr. Biol, 14(1):48-55に記載されるそれらを包含するが、但しそれらだけには限定されない。

10

【 0 1 9 8 】

250の配列を包含するPSI - BLAST多重一列整列に基づいてヒトOct3/4アミノ酸配列（配列番号6）のpMUT分析は、表17に示されるように、アミノ酸置換マトリックス（ASM）を生成する。ヒトOct3/4アミノ酸配列における個々の野生型アミノ酸位置に関して、表17は、アミノ酸置換（20個の可能なアミノ酸の）がタンパク質の機能に対して有害であるか（太文字及び下線が引かれている）又は中性（プレーンテキスト）であることが予測されることを示す。同系nanog遺伝子オクタマー要素（上記）に結合し、そして1又は複数のnanog標的要素を含むプロモーターをトランス活性化するOct3/4ポリペプチドの能力について

20

の機能的アッセイは、例えばKuroda et al., (前記); and Loh et al., (2006), Nat. Genet., 39(4):431-440に記載のように、当業界において知られている。

【 0 1 9 9 】

Sox2ポリペプチド：

本明細書において言及される場合、“Sox2ポリペプチド”は、ヒトSox2、マウスSox2、又は下記のいずれかのポリペプチドを包含する：

(i) 次のヒトnanog遺伝子Sox要素に結合するDNA結合ドメイン（DBD）を包含し：

5'-TACAATG-3'；そして

(ii) 1又は複数のnanog遺伝子プロモーターSox要素を含んで成るプロモーターをトランス活性化できる。例えば、Kuroda et al, (2005), Mol and Cell Biol., 25(6):2475-2485を参照のこと。

30

【 0 2 0 0 】

いくつかの態様においては、Sox2ポリペプチドは、上記機能的性質を有し、そしてヒトSox2、すなわち性 - 決定領域Y-ボックス2タンパク質(GenBank受託番号NP\_003097)のアミノ酸配列に対応する配列番号8に対して少なくとも70%、例えば75%、80%、85%、90%、91%、92%、95%、97%、99%同一の、又は配列番号8に対して少なくとも70%~100%同一のいずれか他の%同一であるアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドである。いくつかの態様においては、Sox2ポリペプチドは、上記機能的性質を有し、そして配列番号8、例えば少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失又は挿入を有する配列番号8に対して少なくとも70%~100%同一（例えば、75%、80%、85%、90%、91%、92%、95%、97%、99%同一）のア

40

ミノ酸配列を含んで成るポリペプチドである。

【 0 2 0 1 】

他の態様においては、Sox2ポリペプチドは、上記機能的性質を有し、そして合計30個までのアミノ酸置換、欠失、挿入又はそれらのいずれかの組合せを有する配列番号8、例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、15、20、25又はいずれか他の数のアミノ酸置換、欠失、挿入又は0~30のそれらのいずれかの組合せを有する配列番号8のアミノ酸を含んで成るポリペプチドである。

【 0 2 0 2 】

配列番号8（ヒトSox2）：

MYNMMETELKPPGPQQTSGGGGNSTAAAAGGNQKNSPDRVKRPMNAFMVWSRG

50

QRRKMAQENPKMHNSEISKRLGAEWKLLSETEKRPFIDEAKRLRALHMKEHPDYKY  
 RPRRKTKTLMKKDKYTLPGGLLAPGGNSMASGVGVGAGLGAGVNRMDSYAHMN  
 GWSNGSYSMMQDQLGYPQHPGLNAHGAAQMMPHRYDVSALQYNSMTSSQTYMN  
 GSPTYMSYSQQGTPGMALGSMGVSVKSEASSPPVVTSSSHSRAPCQAGDLRDMIS  
 MYLPGAIEVPEPAAPSRLHMSQHYQSGPVPGTAINGLPLSHM.

## 【0203】

いくつかの態様においては、Sox2は、上記機能的性質を有し、そして配列番号9に対して少なくとも70%同一の、例えば高く保存されたHigh Mobility Group-Sox-TCF (HMG-Sox-TCF)モチーフ DNA結合ドメイン(DBD)を含んで成るヒトSox2のアミノ酸40 - 115に対応する、配列番号9に対して75%、80%、85%、90%、91%、92%、95%、97%、99%、又は少なくとも

10

70%~100%のいずれか他の%同一のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドである。いくつかの態様においては、Sox2は、上記機能的性質を有し、そして配列番号9、例えば少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失又は挿入(例えば、1~10個のアミノ酸置換、欠失又は挿入)を有する配列番号9に対して少なくとも70%~100%同一(例えば、75%、80%、85%、90%、91%、92%、95%、97%、99%同一)のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドである。

## 【0204】

配列番号9 (HMG-Sox2-TCF DBD) :

RVKRPMNAFMVWSRGQRRKMAQENPKMHNSEISKRLGAEWKLLSETEKRPFIDEAK  
 RLRALHMKEHPDYKYRPRRK.

20

## 【0205】

本明細書に記載されるようなSox2ポリペプチドは、天然に存在するか又は天然に存在しないヒトSox2の相同体を包含することができる。天然に存在するヒトSox2の相同体は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない: GenBank受託番号: NP\_001098933; NP\_035573, ACA58281; BAA09168; NP\_001032751; 及びNP\_648694として列挙されるそれら、又は上記構造的及び機能的基準を満たすいずれか他のOctファミリーメンバー。

## 【0206】

天然に存在しないヒトSox2の相同体の例は、Kamachi et al., (1999), Mol Cell Biol., 19(1): 107-120に記載されるそれらを包含するが、但しそれらだけには限定されない。

## 【0207】

250の配列を包含するPSI - BLAST多重一列整列に基づいてヒトSox2アミノ酸配列(配列番号8)のpMUT分析は、タンパク質の機能に対して有害であるか又は中性であることが予測されるアミノ酸置換を示すASM(表18)を生成する。nanog遺伝子Sox要素に結合し、そして1又は複数のnanog Sox要素を含むプロモーターをトランス活性化するSox2ポリペプチドの能力についての機能的アッセイは、例えばKuroda et al., (前記)に記載のように、当業界において知られている。

30

## 【0208】

Klf4ポリペプチド:

本明細書において言及される場合、“Klf4ポリペプチド”は、ヒトKlf4、マウスKlf4、又は下記のいずれかのポリペプチドを包含する:

40

(i) 次のKlf標的要素に結合する亜鉛-フィンガー DNA結合ドメイン(DBD)を包含し:

5'-GAGGTCC-S' 又は 5'-GGGGTGT-3'; そして

(ii) 1又は複数の上記要素を含んで成るプロモーターをトランス活性化できる。例えば、Nakatake et al., (2006), Mol Cell Biol., 24(20):7772-7782を参照のこと。

## 【0209】

いくつかの態様においては、Klf4ポリペプチドは、上記機能的性質を有し、そしてヒトKlf4、すなわちKruppel-Like Factor 4 (GenBank受託番号NP\_004226)のアミノ酸配列に対応する配列番号10に対して少なくとも70%、例えば75%、80%、85%、90%、91%、92%、95%、97%、99%同一の、又は配列番号10に対して少なくとも70%~100%同一のいずれか他

50

の%同一であるアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドである。いくつかの態様においては、Klf4ポリペプチドは、上記機能的性質を有し、そして配列番号10、例えば少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失又は挿入（例えば、1～10個のアミノ酸置換、欠失又は挿入）を有する配列番号10に対して少なくとも70%～100%同一（例えば、75%、80%、85%、90%、91%、92%、95%、97%、99%同一）のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドである。

【0210】

他の態様においては、Klf4ポリペプチドは、上記機能的性質を有し、そして合計30個までのアミノ酸置換、欠失、挿入又はそれらのいずれかの組合せを有する配列番号10、例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、15、20、25又はいずれか他の数のアミノ酸置換、欠失、挿入又は0～30のそれらのいずれかの組合せを有する配列番号8のアミノ酸を含んで成るポリペプチドである。

10

【0211】

配列番号10（ヒトKlf4）：

MAVSDALLPSFSTFASGPAGREKTLRQAGAPNNRWREELSHMKRLPPVLPGRPYDLA  
AATVATDLESGGAGAACGGSNLAPLPRRETEEFNDLLDLDFILSNLTHPPESVAATV  
SSSASASSSSSSSGPASAPSTCSFTYPIRAGNDPGVAPGGTGGGLLYGRESAPPPTAP  
FNLADINDVSPSGGFVAELLRPELDPVYIPPPQPPGGGLMGKFLKASLSAPGSEY  
GSPSVISVSKGSPDGSHPVVAPYNGGPPRTCPKIKQEAVSSCTHLGAGPPLSNGHRPA  
AHDFFLGRQLPSRTTPTLGLLEEVLSRRDCHPALPLPPGFHPPGPNYPSFLPDQMOPQV  
PPLHYQELMPPGSCMPEEPKPKRGRRSWPRKRTATHTCDYAGCGKTYTKSSHLKAHL  
RTHTGEKPYHCDWDGCGWKFARSDELTRHYRKHTGHRPFQCQKCDRAFSRSDHLAL  
HMKRHF。

20

【0212】

いくつかの態様においては、Klf4は、上記機能的性質を有し、そして配列番号11に対して少なくとも70%同一の、例えば高く保存された亜鉛-フィンガーモチーフDNA結合ドメイン(ZF-DBD)を含んで成るヒトKlf4のアミノ酸382-469に対応する、配列番号11に対して75%、80%、85%、90%、91%、92%、95%、97%、99%、又は少なくとも70%～100%のいずれか他の%同一のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドである。いくつかの態様においては、Klf4は、上記機能的性質を有し、そして配列番号11、例えば少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失又は挿入（例えば、1～5個のアミノ酸置換、欠失又は挿入）を有する配列番号11に対して少なくとも70%～100%同一（例えば、75%、80%、85%、90%、91%、92%、95%、97%、99%同一）のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドである。

30

【0213】

配列番号11（ヒトKM4-ZF-DBD）：

KRTATHTCDYAGCGKTYTKSSHLKAHLRTHHTGEKPYHCDWDGCGWKFARSDELTRHYRKHTGHRPFQCQKCDRAFSRSDHLALHMKRH。

【0214】

本明細書に記載されるようなKlf4ポリペプチドは、天然に存在するか又は天然に存在しないヒトKlf4の相同体を包含することができる。天然に存在するヒトKlf4の相同体は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：GenBank受託番号：NP\_001017280、NP\_057354（Klf2）；AAP36222（Klf5）；NP\_034767；及びNP\_446165として列挙されるそれら、又は上記構造的及び機能的基準を満たすいずれか他のKlfファミリーメンバー。天然に存在しないヒトKlf4ポリペプチドの例は、上記機能的性質を有し、そして配列番号10又は11に対して少なくとも70%、例えば75%、80%、85%、90%又は70%～100%同一であるアミノ酸配列を含んで成るそれらを包含するが、但しそれらだけには限定されない。

40

【0215】

いくつかの態様においては、Klf4ポリペプチドは、記機能的性質を有する天然に存在しないポリペプチドである。

【0216】

136の配列を包含するPSI-BLAST多重一列整列に基づいてヒトKlf4アミノ酸配列（配列

50

番号10)のpMUT分析(上記)は、タンパク質の機能に対して有害であるか又は中性であることが予測されるアミノ酸置換を示すASM(表19)を生成する。上記標的要素に結合し、そして1又は複数の標的要素を含むプロモーターをトランス活性化するKlf4ポリペプチドの能力についての機能的アッセイは、例えばNakatate et al., (前記)に記載のように、当業界において知られている。

【0217】

c-Mycポリペプチド :

本明細書において言及される場合、“c-Mycポリペプチド”は、ヒトc-Myc、マウスc-Myc、又は下記のいずれかのポリペプチドを包含する :

(i) 塩基性ヘルックス - ループ - ヘルックスロイシンジッパードメインを含み、そして次の配列を含んで成る標的要素に結合し :

5'-CACGTG-3';又は5'-C/GACCACGTGGTG/C-3';そして

(ii) 1又は複数の上記標的要素を含んで成るプロモーターをトランス活性化できる。例えば、Cowling et al., (2006), *Seminars in Cane. Biol.*, 16:242-252を参照のこと

【0218】

いくつかの態様においては、c-Mycポリペプチドは、上記機能的性質を有し、そしてヒトc-Myc、すなわち骨髄細胞腫性腫瘍遺伝子相同体(GenBank受託番号NP\_002458)のアミノ酸配列に対応する配列番号12に対して少なくとも70%、例えば75%、80%、85%、90%、91%、92%、95%、97%、99%同一の、又は配列番号12に対して少なくとも70%~100%同一のいずれか他の%同一であるアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドである。いくつかの態様においては、c-Mycポリペプチドは、上記機能的性質を有し、そして配列番号12、例えば少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失又は挿入(例えば、1~10個のアミノ酸置換、欠失又は挿入)を有する配列番号12に対して少なくとも70%~100%同一(例えば、75%、80%、85%、90%、91%、92%、95%、97%、99%同一)のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドである。

【0219】

他の態様においては、c-Mycポリペプチドは、上記機能的性質を有し、そして合計30個までのアミノ酸置換、欠失、挿入又はそれらのいずれかの組合せを有する配列番号12、例えば、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、15、20、25又はいずれか他の数のアミノ酸置換、欠失、挿入又は0~30のそれらのいずれかの組合せを有する配列番号12のアミノ酸を含んで成るポリペプチドである。

【0220】

配列番号12(ヒトc-Myc) :

MDFFRWENQQPPTMPLNVSFTNRNYDLDYDSVQPYFYCDEEENFYQQQQQSELQ  
PPAPSED I WKKFELLPTPPLSPSRRSGLCSPSYVAVTPFSLRGDNDGGGGSFSTADQLE  
MVTELLGGDMVNQSF I CDPDET F CN IQDCMWSGFSAAKLVSEKLASYQAARK  
DSGSPNPARGHSVCSTSSLYLQDLSAAASEC I DPSWFPYPLNDSSSPKSCASQDSSAFS  
PSSDLSLSTESSPQGSPEPLVLHEETPPTTSSDSEEEQEDEEE I DWSVEKRQAPGKRSE  
SGSPSAGHSHKPPHSPPLVLRCHVSTHQHNYAAPPSTRKDYPAKRKLVLDLSDRVLRLQ  
ISNNRKTSPRSSDTEENVKRRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQ I PELENNEKAPKV  
VILKKATAY ILSVQAEEQKL I SEEDLLRKRREQLKHKLEQLRNSCA.

【0221】

いくつかの態様においては、c-Mycは、上記機能的性質を有し、そして配列番号13に対して少なくとも70%同一の、例えば高く保存された塩基性ヘルックス - ループ - ヘルックスロイシンジッパー(LZ) DNA結合ドメインを含んで成るヒトc-Mycのアミノ酸370 - 454に対応する、配列番号13に対して75%、80%、85%、90%、91%、92%、95%、97%、99%、又は少なくとも70%~100%のいずれか他の%同一のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドである。いくつかの態様においては、c-Mycポリペプチドは、上記機能的性質を有し、そして配列番号13、例えば少なくとも1つのアミノ酸置換、欠失又は挿入(例えば、1~5

個のアミノ酸置換、欠失又は挿入)を有する配列番号13に対して少なくとも70%~100%同一(例えば、75%、80%、85%、90%、91%、92%、95%、97%、99%同一)のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドである。

【0222】

配列番号13(ヒトc-Myc bHLH-LZドメイン)：

KRRTHNVLERQRRNELKRSFFALRDQIPELENNEKAPKWI LKKATAYILSVQAEQK  
LISEEDLLRKRREQLKHKLEQLRNSCA。

【0223】

本明細書に記載されるようなc-Mycポリペプチドは、天然に存在するか又は天然に存在しないヒトc-Mycの相同体を包含することができる。天然に存在するヒトc-Mycの相同体は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：GenBank受託番号：NP\_00105154、NP\_036735、NP\_034979、POCON9及びNP\_001026123として列挙されるそれら、又は上記構造的及び機能的基準を満たすいずれか他のOctファミリーメンバー。天然に存在しないヒトc-Mycの相同体の例は、Chang et al., (2000), Mol Cell Biol., 20:4309-4319に記載されるそれらを包含するが、但しそれらだけには限定されない。

10

【0224】

250の配列を包含するPSI - BLAST多重一列整列に基づいてヒトc-Mycアミノ酸配列(配列番号12)のpMUT分析(上記)は、タンパク質の機能に対して有害であるか又は中性であることが予測されるアミノ酸置換を示すASM(表20)を生成する。上記標的要素に結合し、そして1又は複数の標的要素を含むプロモーターをトランス活性化するc-Mycポリペプチドの能力についての機能的アッセイは、例えばGu et al., (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2935-2939に記載のように、当業界において知られている。

20

【0225】

ある場合、Oct3/4、Sox2、Klf4又はc-MycポリペプチドDNA結合ドメインのいずれかが、ヘルペスVP16トランス活性化ドメイン融合され、本明細書に記載される誘発方法において誘発因子として使用され得るキメラ性融合タンパク質が生成される。1つの態様においては、ヘルペスVP16トランス活性化ドメインは、次のアミノ酸配列を含んで成る：

TKTLMKKDKYTLPGLLAPGGNSMASGVGVGAGLGAGVNRMSYAHMNGWSNGSYSM  
MQDQLGYPQHSTTAPITDVSLGDELRLDGEVDMTPADALDDFDLEMLGDVESPSGPMTHD  
PVSYGALDVDDFEFEQMFTDALGIDDFGG。

30

【0226】

いくつかの態様においては、Oct3/4、Sox2、Klf4又はc-Mycポリペプチド、又はそれらの組合せのいずれかが、本明細書に記載される誘発方法への使用のためのペプチドトランスダクション組成物として供給される。そのような組成物は、次の少なくとも1つを含む：

(i) アミノ又はカルボキシ末端でタンパク質トランスダクションドメインを含んで成る精製されたOCT3/4ポリペプチド；

(ii) キャリヤー試薬及び精製されたOCT3/4ポリペプチド；

(iii) タンパク質トランスダクションドメイン及びSox2ポリペプチドのアミノ酸配列を含んで成る精製されたSox2ポリペプチド；

40

【0227】

(iv) キャリヤー試薬及び精製及び精製されたSox2ポリペプチド；

(v) タンパク質トランスダクションドメインを含んで成る精製されたKlf4ポリペプチド；

(vi) キャリヤー試薬及び精製されたKlf4ポリペプチド；

(vii) タンパク質トランスダクションドメインを含んで成る精製されたc-Mycポリペプチド；

(viii) キャリヤー試薬及び精製されたc-Myc - ポリペプチド；

(ix) (i)~(vi)のいずれかの組合せ、ここで前記組成物は、c-Mycポリペプチドのアミノ酸を含んで成る精製されたポリペプチドを実質的に有さない。

50

## 【 0 2 2 8 】

いくつかの態様においては、タンパク質トランスダクションドメインは、IF配列のアミノ末端に融合される。他の態様においては、PTDドメインは、IF配列のカルボキシ末端に融合される。いくつかの態様においては、IF-PTD融合ポリペプチドは、変性ポリペプチドとして細胞に添加され、前記ポリペプチドは、次に変性される細胞中へのその輸送を促進する。PTD融合タンパク質の生成及びそれらの使用方法は、例えばアメリカ特許第5,674,980号、第5,652,122号及び第6,881,825号に記載されるように、当業界において知られている。例えば、Becker-Hapak et al, (2003), Curr. Protocols in Cell Biol, John Wiley & Sons, Inc.を参照のこと。典型的なPTDドメインアミノ酸配列は、次のものを包含するか、但しそれらだけには限定されない：YGRKKRRQRRR (配列番号1)；RKKRRQRR (配列番号2)；YARAAARQARA (配列番号3)；THRLPRRRRRR (配列番号4)；及びGGRRARRRRR (配列番号5)。

10

## 【 0 2 2 9 】

適切なキャリアー剤及びそれらの使用法の例は、アメリカ特許第6,841,535号に記載されるそれらを包含するが、但しそれらだけには限定されない。

## 【 0 2 3 0 】

## G. 誘発された細胞コロニーのサブクローニング：

細胞コロニーは、当業界において知られているいずれかの方法によりサブクローン化され得、精製の前、全細胞集団に見出されるよりも、全細胞集団に対して高い割合の生成されるヒト幹細胞を含む、ヒト幹細胞の純粋な集団が得られる。ある場合、誘発された細胞は、約14日～約40日、例えば15日、16日、17日、18日、19日、20日、23日、24日、27日、28日、29日、30日、31日、33日、34日、35日、36日、37日、38日、又は約14日～約40日の他の期間、培養され、そして観察され、その後、本明細書に記載のように、形態学的特徴に基づいて“誘発された細胞”を含んで成るクローンが同定され、そして選択される。

20

## 【 0 2 3 1 】

誘発された細胞は、ほぼ1～2日ごとに、好ましくは毎日の培地交換を伴って、37℃、5%CO<sub>2</sub>下で維持培養培地において培養され得る。維持培養培地の例は、いずれか及びすべての完全ES培地(例えば、MC-ES)を包含する。その維持培養培地は、b-FGF又はFGF2により補充され得る。ある場合、維持培養培地は、他の因子、例えばIGF-II又はアクチビンAにより補充される。

30

## 【 0 2 3 2 】

細胞培養物を生理学的緩衝液、例えばハンス液により洗浄した後、興味ある生態学的特徴を示すコロニーが、底側にシリコングリースにより被覆されたクローニング環により取囲まれる。約100µl(又は50µl～150µl)の“霊長類ES細胞のための分離培地”(RoproCELL, Tokyou, Japanにより製造される)が、そのクローニング環に添加され、そして37℃で約20分間インキュベートされ、細胞懸濁液が形成される。分離されたコロニーを含む環における細胞懸濁液が、約2mlのMC-ES培地(又は本明細書に記載される他の培地)に添加され、そしてMEF-被覆された24ウェルプレートの1つのウェル、又は同等の表面積の他の細胞培養容器にプレートされる。5%CO<sub>2</sub>(大気O<sub>2</sub>)細胞培養インキュベーターにおいてコロニー由来の細胞を、37℃で約14時間、培養した後、培地を交換する。続いて、培地は、二次サブカルチャーが行われる約8日後まで、ほぼ2日ごとに交換される。

40

## 【 0 2 3 3 】

いくつかの態様においては、第1のサブカルチャーにおいては、培地が除去され、細胞がハンス液により洗浄され、そして霊長類ES細胞のための分離培地(ReproCell, Tokyo, Japan)が前記細胞に添加され、そして37℃で10分間インキュベートされる。インキュベーションの後、MC-ES培地(2ml)が、得られる細胞懸濁液に添加され、分離培地の活性が停止される。次に細胞懸濁液が遠心分離管に移され、そして200xgで4分間、遠心分離される。上清液が除かれ、細胞ペレットがMC-ES培地に再懸濁され、そしてその再懸濁された細胞がMEF-被覆された24ウェルプレートの4つのウェル上にプレートされ、そ

50

して二次サブカルチャーが調製されるまで、約7日間、培養される。

【0234】

上記方法により調製された二次サブカルチャーにおいては、細胞が、マトリゲル™により被覆された60mmの細胞培養皿上に、 $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度でプレートされる。約8日後（IFの誘発された発現の開始の約5週間後）、三次サブカルチャーが調製され、ここで細胞は2つのマトリゲル™ - 被覆された60mmの細胞培養皿上にプレートされ、この1つは続いて、遺伝子発現分析のために使用され、そして他の1つは下記のように連続して継代される。サブカルチャーの1つは、本明細書に記載されるように、遺伝子発現分析のために使用され、そして他の1つは誘発された細胞のクローンに由来する細胞系を維持するために、必要なら継代される。

10

【0235】

H. 誘発された細胞の継代及び維持：

サブクロニングの後、誘発された細胞は、約5～7日ごとに、サブ培養され得る。ある場合、細胞はハンクス液により洗浄され、そしてジスパーゼ又は霊長類ES細胞のための分離培地が添加され、そして37℃で5～10分間インキュベートされる。およそコロニーの半分以上が分離される場合、MC-ES培地が添加され、分離培地の酵素活性が停止され、そして得られる細胞/コロニー懸濁液が遠心分離管に移される。懸濁液中のコロニーは、管の底に沈殿され、上清液が注意して除かれ、そして次に、MC-ES培地が添加され、コロニー再懸濁される。コロニーのサイズを試験したあと、非常に大きなコロニーが、ピペットをゆっくり上下にすることにより、より小さなサイズに分解される。ほぼサイズ分けされたコロニーは、サブカルチャーの前よりも約3～6倍の基本領域を有する、マトリゲル被覆されたプラスチックの培養上にプレートされる。例えば、細胞は、約1:6～約1:3、例えば約1:6、1:5、1:4又は1:3に分けら得る。

20

【0236】

本発明のヒト生後組織に存在する未分化幹細胞から誘発されたヒト多能性幹細胞を培養するために有用な培養培地の例は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：ES培地、及びヒトES細胞を培養するための適切な培養培地、例えばMEF-ならしES培地（MC-ES）、又は本明細書に記載される他の培地、例えばmTeSR1™。いくつかの例においては、細胞は、本明細書に記載されるようにROCKインヒビターの存在下で維持される。

30

【0237】

IV. 誘発された細胞の分析：

形態学的特徴に基づいて最初に同定されたそれらのコロニーからサブ培養された細胞コロニーが、多能性幹細胞に関連する多くの次の性質（但し、それらだけには限定されない）のいずれかについてアッセイされ得る：ALP活性の発現、ES細胞マーカー遺伝子の発現、タンパク質マーカーの発現、親細胞に比較してOct3/4及びNanogプロモーターの低メチル化、長期自己再生、正常な二倍体核型、及び外胚葉、中胚葉及び内胚葉組織を含んで成る奇形腫を形成する能力。

【0238】

細胞（同定された細胞又は生存細胞）にけるALP活性を検出するための多くのアッセイ及び試薬は、当業界において知られている。典型的な態様においては、分析されるべきコロニーは、10%ホルマリン中性緩衝液により、室温で約5分間、例えば2～5分間、固定され、そして次に、PBSにより洗浄される。ALP、1段階BCIP（5-グロモ-4-3'-インドールホスフェート p-トルイジン塩）及びPierce（Rockford IL）により製造されるNB（ニトロ-ブルー塩化テトラゾリウム）の発色性基質が添加され、そして室温で20～30分間、反応される。ALP活性を有する細胞が、ブルー-バイオレット染色される。

40

【0239】

ALP活性について試験された推定上のiPS細胞コロニーが、一連のヒト胚幹細胞マーカー（ESCM）遺伝子、例えばNanog、TGF1、Dnmt3b、Zfp42、FoxD3、GDF3、CYP26A1、TERT、Oct 3/4、Sox2、Sal14及びHPRT（但し、それらだけには限定されない）の発現

50

についてアッセイされ得る。例えば、Assou et al, (2007), Stem Cells, 25:961-973を参照のこと。遺伝子発現分析のための多くの方法は、当業界において知られている。例えば、Lorkowski et al., (2003), Analysing Gene Expression, A Handbook of Methods: Possibilities and Pitfalls, Wiley-VCHを参照のこと。適切な核酸に基づく遺伝子発現アッセイの例は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：定量的RT-PCR (qRT-PCR)、マイクロアレイハイブリダイゼーション、ドットプロット、RNアーゼ保護、及びSAGE。

#### 【 0 2 4 0 】

いくつかの態様においては、推定上のiPS細胞コロニーにおけるESCM遺伝子mRNA発現レベルが、qRT-PCRにより決定される。推定上のiPS細胞コロニーが収穫され、そして全RNAが、“ホルムアミド又はパラホルムアルデヒド固定された、パラフィン埋封された (FFPE) 組織のためのRecoverall全核酸単離キット” (Ambion, Austin, TXにより製造される) を用いて抽出される。ある場合、RNA抽出のために使用されるコロニーは、固定されたコロニー、例えばALP活性について試験されたコロニーである。コロニーは、RNA抽出のために直接、すなわち従来の固定化を伴わないで、使用され得る。

#### 【 0 2 4 1 】

典型的な態様においては、抽出されたRNAからのcDNAの合成の後、標的遺伝子は、TaqMan (商標) PreAmp mastermix (Applied Biosystems, Foster City, CAにより製造される) を用いて増幅される。即時定量的PCRは、上記ESCM遺伝子のmRNAを検出するために、次のPCRプライマー組 (Applied Biosystemsからの) を用いるABI Prism 7900HTを用いて実施される：Nanog、Hs02387400\_g1、Dnmt3b、Hs00171876\_ml、FoxD3、Hs00255287\_sl、Zfp42、Hs01938187\_sl、TDGFI、Hs02339499\_g1、TERT、Hs00162669\_ml、GDF3、Hs00220998\_ml、CYP26A1、Hs00175627\_ml、GAPDH、Hs99999905\_ml)。

#### 【 0 2 4 2 】

推定上のiPS細胞コロニーは、タンパク質マーカー、例えばSSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、CD9、CD24、Thy-1及びNanog (但し、それらだけには限定されない) の発現のための免疫細胞学的方法によりアッセイされ得る。広範囲の免疫細胞学的アッセイ、例えば蛍光免疫細胞学的アッセイは、例えばHarlow et al., (1988), Antibodies: A Laboratory Manual 353-355, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 及びまた、The Handbook -A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies (2004), Molecular Probes, Inc., Eugene, ORに記載のように知られている。

#### 【 0 2 4 3 】

典型的な態様においては、推定上のiPS細胞コロニーにおける1又は複数の上記タンパク質マーカーの発現は次の通りにアッセイされる。培養された細胞が10%ホルムアルデヒドにより10分間、固定され、そして0.1%ゼラチン/PBSにより室温で約1時間、ブロックされる。細胞は、SSEA-3 (MC-631; Chemicon)、SSEA-4 (MC813-70; Chemicon)、TRA-1-60 (abl6288; abeam)、TRA-1-81 (abl6289; abeam)、CD9 (M-L13; R&D systems)、CD24 (ALB9; abeam)、Thy1 (5E10; BD Bioscience)又はNanog (MAB 1997; R&D Systems)に対する一次抗体と共に4℃で一晩インキュベートされる。

#### 【 0 2 4 4 】

Nanog染色のために、細胞は、ブロッキングの前、0.1% TritonX-100/PBSにより透過される。細胞コロニーは、PBSにより3度、洗浄され、次にAlexaFluor 488-接合された二次抗体 (Molecular Probes) 及びHoechst 33258 (Nacalai) と共に室温で1時間インキュベートされる。さらなる洗浄の後、蛍光が蛍光顕微鏡、例えばAxiovert 200M顕微鏡 (Carl Zeiss) により検出される。

#### 【 0 2 4 5 】

##### A. メチル化分析：

いくつかの態様においては、誘発された細胞の特徴は、それらの親細胞に比較してOct3/4及びNanogのゲノムプロモーターの低められたメチル化である。分析されるべき適切なOct3/4プロモーター領域は、保存された領域1 (CR1) を包含するOct3/4近位プロモーター

10

20

30

40

50

、及びCR4を包含するOct3/4プロモーター遠位エンハンサーを包含するが、但しそれらだけには限定されない。分析されるべきNanogプロモーター領域は、Oct3/4及びSox2結合部位を包含するNanog近位プロモーターを包含するが、但しそれらだけには限定されない。例えば、Rodda et al., (2005), J Biol. Chem., 280:24731-24737 及び Yang et al., (2005), J Cell Biochem., 96:821-830を参照のこと。ゲノムDNAの定量的分析のための多くの方法は、例えばBrena et al., (2006), J Mol. Med., 84(5):365-377に記載されるように、知られている。

#### 【 0 2 4 6 】

典型的な態様においては、推定上の誘発された細胞及び比較のために使用される細胞から単離されたゲノムDNAが、単離され、そして亜硫酸水素により処理される。亜硫酸水素処理されたゲノムDNAは次に、T7プロモーター配列を含むプライマーによりPCR - 増幅される。その後、RNA転写体が、T7ポリメラーゼを用いて生成され、そして次にRNアーゼAにより処理され、メチル化 - 特異的分割生成物が生成される。個々のCpG部位のメチル化は、分割生成物のMALDI - TOF質量分光計により評価される。前記方法の詳細な説明は、例えばEhich et al., (2005), Proc. Natl. Acad. Sci USA, 102: 15785-15790に提供される。

#### 【 0 2 4 7 】

##### B. 自己 - 再生アッセイ :

幹細胞の特徴の1つは、老化を受けないで、連続的に増殖するそれらの能力である。従って、誘発された細胞は、インビトロで連続的に継代するそれらの能力について評価される。ある場合、誘発された細胞は、インビトロで少なくとも約30 ~ 少なくとも約100回、例えば約33、35、40、45、51、56、60、68、75、80、90、93、100又は少なくとも約30 ~ 少なくとも約100回のいずれか他の回数、継代されるそれらの能力についてアッセイされる。

#### 【 0 2 4 8 】

もう1つの評価においては、誘発された細胞は、親細胞におけるIFの誘発された発現の開始から約30日 ~ 約500日間、例えば40日、50日、60日、70日、80日、100日、150日、180日、200日、250日、300日、400日、450日、又は親細胞におけるIFの誘発された発現の開始から約30日 ~ 約500日のいずれか他の期間、増殖するそれらの能力についてアッセイされる。いくつかの態様においては、誘発された細胞の長期自己再生が、細胞が所定の培地（例えば、mTeSR1培地）及びフィーダー細胞、例えば本明細書に記載されるようなmTeSR1培地の存在下で継代される場合、決定される。

#### 【 0 2 4 9 】

##### C. 核型分析 :

もう1つの可能な分析として、誘発された細胞は、二倍体及び正常な安定した核型、例えば細胞がインビトロで少なくとも1年間、継代された後、安定しているかについて評価される。多くの核型分析方法は当業界において知られている。いくつかの態様においては、核型分析方法は、例えばBayani et al., (2004), Curr. Protoc. Cell Biol., Chapter 22:Unit 22.5に記載されるように多色FLSHである。

#### 【 0 2 5 0 】

他の態様においては、核型分析は、例えばVermeesch et al., (2007), Eur. J. Hum. Genet., 15(11): 1105-1114に記載されるように、分子核型分析を包含する。典型的な態様においては、誘発された細胞は、0.02 µg/mlのコレセミドにより約2 ~ 約3時間、前処理され、約0.06 ~ 約0.075MのKClと共に約20分間インキュベートされ、そして次に、Curoy定着剤により固定される。その後、多色FLSH分析のために、細胞は多色、FISHプローブ、例えばCambio, Ltd (Cambridge, UK からのStarTISH (商標) Human Multicolour FISH (M-FISH) キットにおけるそれらのプローブによりハイブリダイズされる。

#### 【 0 2 5 1 】

##### D. 奇形腫分析 :

多能性幹細胞は、免疫無防備状態の動物中に注入される場合、外胚葉、中胚葉及び内胚葉組織を含んで成る奇形腫を形成する能力を有すると思われる。誘発された細胞又は誘発

10

20

30

40

50

された多能性幹細胞 (iPS) 又はES細胞様多能性幹細胞は、インビトロでの長期自己再生能力及び3種の胚層に分化する多能性を有する細胞を言及し、そして前記多能性幹細胞は、試験動物、例えばマウス中に移植される場合、奇形腫を形成できる。

#### 【0252】

誘発された細胞は、免疫無防備状態の動物モデルにおける奇形腫形成アッセイにより多能性について評価され得る。免疫無防備状態の動物は、免疫抑制剤、例えばサイクロスポリン又はFK-506を投与されている齧歯動物である。例えば、免疫無防備状態の動物モデルは、SCIDマウスであり得る。約 $0.5 \times 10^6$  ~ 約 $2.0 \times 10^6$ 、例えば $0.6 \times 10^6$ 、 $0.8 \times 10^6$ 、 $1.0 \times 10^6$ 、 $1.2 \times 10^6$ 、 $1.5 \times 10^6$ 、 $1.7 \times 10^6$ 、又は約 $0.5 \times 10^6$  ~ 約 $2.0 \times 10^6$ 個の他の数の誘発された細胞/マウスが、生後7 ~ 8週の免疫無防備状態の動物の精巢の髄質中に注入される。6 ~ 8週後、奇形腫が、PBS、続いて10%緩衝されたホルマリンにより動物を環流した後、切除される。次に、切除された奇形腫が、免疫組織学的分析にゆだねられる。

10

#### 【0253】

ヒト奇形腫と宿主 (例えば、齧歯動物) 組織とを区別する1つの方法は、ヒト特異的核マーカーHuNuについての免疫染色を包含する。免疫組織学的分析は、外胚葉 (例えば、神経外胚葉)、中胚葉組織の存在の決定を包含する。外胚葉組織のためのタンパク質マーカーは、ネスチン、GFAP及びインテグリン 1を包含するが、但しそれらだけには限定されない。中胚葉組織のためのタンパク質マーカーは、コラーゲンII、Brachyury及びオステオカルシンを包含するが、但しそれらだけには限定されない。内胚葉組織のためのタンパク質マーカーは、 $\alpha$ -フェトプロテイン ( $\alpha$ -FP) 及びHNF3 を包含するが、但しそれらだけには限定されない。

20

#### 【0254】

##### E. 遺伝子発現:

いくつかの態様においては、遺伝子発現分析は、推定上のiPS細胞コロニーに対して実施される。そのような遺伝子発現分析は、推定上のiPS細胞コロニーからの遺伝子発現プロフィールと、次の1又は複数の細胞型 (但し、それらだけには限定されない) のそれらのプロフィールとの比較を包含することができる: (i) 親細胞、すなわち推定上のiPS細胞コロニーが誘発される1又は複数の細胞; (ii) ヒトES細胞系; 又は (iii) 確立されたiPS細胞系。当業界において知られているように、ヒトES細胞系についての遺伝子発現データは、公的な源、例えばNCBI "Gene Expression Omnibus" データベースにおけるWWW上で入手できる。

30

#### 【0255】

例えば、Barrett et al, (2007), Nuc. Acids Research, D760-D765を参照のこと。従って、いくつかの態様においては、推定上のiPSコロニーからの遺伝子発現プロフィールをES細胞系のそれらのプロフィールとの比較は、推定上の細胞コロニーからの実験的に得られたデータと、公的データベースを通して入手できる遺伝子発現データとの比較を必要とする。遺伝子発現データが公的に入手できるヒトES細胞系の例は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない: hE14 (GEO データ組受託番号GSM1 51739 及びGSM1 51741)、Sheff4 (GEO寄託番号 GSM 194307、GSM 194308及び GSM 193409)、h\_ES 01 (GEO 受託番号 GSM 194390)、h\_ES H9 (GEO受託GSM194392)、及びh\_ES BG03 (GEO 受託番号GSM194391)。

40

#### 【0256】

核酸マイクロアレイハイブリダイゼーションアッセイにより、1又は複数のiPS細胞系から単離された全RNAを分析することにより、遺伝子発現を達成することがまた可能である。全体的な遺伝子発現分析のための適切なマイクロアレイプラットフォームの例は、Human Genome UI 33 +2.0マイクロアレイ(Affymetrix) 及びthe Whole Human Genome Oligo Microarray (Agilent)を包含するが、但しそれらだけには限定されない。遺伝子発現プロフィールの比較のための多くの分析方法は、例えばSuarez-Farinas et al, (2007), Methods Mol. Biol., 377:139-152, Hardin et al, (2007), BMC Bioinformatics, 8:220-2

50

32, Troyanskaya et al, (2002), Bioinformatics, 18(11): 1454- 1461, 及び Knudsen (2002), A Biologist's Guide to Analysis of DNA Microarray Data, John Wiley & Sonsに記載されるように、知られている。

【 0 2 5 7 】

いくつかの態様においては、本明細書に記載される方法により生成される細胞からの遺伝子発現データが、他の細胞型、例えばヒトES細胞系、親細胞、及び多分化能性幹細胞系（但し、それらだけには限定されない）より得られるそれらのデータと比較される。適切な統計学的分析マトリックス及び方法は、Pearson Correlation, Euclidean Distance, Hierarchical Clustering (例えばEisen et al, (1998), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(25): 14863-14868参照のこと)、及びSelf Organizing Maps (例えばTamayo et al, (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96(6):2907-2912を包含するが、但しそれらだけには限定されない。

10

【 0 2 5 8 】

V. 誘発された細胞の説明：

誘発された細胞は、多能性又は多分化能幹細胞に関連する次の一定の性質を共有することができる：ALP活性の発現、ES細胞マーカー遺伝子の発現、タンパク質マーカーの発現、ES細胞又は親細胞と比較しての遺伝子マーカーの高い又は低い発現、親細胞に対しての一定のプロモーター（例えば、Oct3/4及びNanog）の低メチル化、長期自己再生能力、正常な二倍体核型、形態学的特徴、及び外胚葉、中胚葉及び内胚葉を含んで成る奇形腫を形成する能力（但し、それらだけには限定されない）。誘発された細胞の組織は、細胞及びもう一つの成分、例えば培養培地への補充物を包含する。

20

【 0 2 5 9 】

誘発された細胞は、アルカリホスファターゼ（ALP）活性に対して陽性であり得る。それらは、ALPを発現し、そして2～10個（例えば、3, 4, 5, 6, 7, 8, 9又は10個）の次のES細胞マーカー遺伝子から発現することができる：TDGF1, Dnmt3b, FoxD3, GDF3, Cyp26a1, TERT, zfp42, Sox2, Oct3/4及び Nanog。ある場合、誘発された細胞は、Tert又はCyp26a1を発現する。ある場合、誘発された細胞は、Tert及びCyp26a1の両者を発現する。ある場合、誘発された細胞は、ALP活性に対して陽性であり、そして前述のES - 細胞マーカー遺伝子のすべてを発現する。ある場合、誘発された細胞は、ALP活性に対して陽性であり、そしてNanogを発現する。ある場合、誘発された細胞は、ALP活性に対して陽性であり、そして1又は複数のTERT、CYP26A1又はGPF3を発現する。ある場合、誘発された細胞は、ALP活性に対して陽性であり、そして1又は複数のNanog, TDGF及びDnmt3bを発現する。

30

【 0 2 6 0 】

誘発された細胞は、複数の次のマーカータンパク質を発現することができる：TDGF1、Dnmt3b、FoxD3、GDF3、Cyp26a1、TERT、zfp42、Sox2、Oct3/4及び Nanog SSEA-3、SSEA-4、TRA-1 -60、TRA-1 -81、CD9、CD24又はThy-1。ある場合、誘発された細胞は、前述のマーカータンパク質のすべてを発現する。典型的な対応においては、ヒト多能性幹細胞は、細胞表面抗原SSEA-3、SSEA-4、TRA-1 -60、TRA-1 -81、CD9、CD24及びCD90、及びES細胞マーカー遺伝子Nanog、Oct3/4、TDGF1、Dnmt3b、GABRB3、GDF3、Zfp42、ALP、CD9及びThy-1を発現する。

40

【 0 2 6 1 】

誘発された細胞は、1又は複数の胚幹細胞、例えばヒト胚幹細胞におけるそれらの遺伝子の発現レベルに比較して、1又は複数の遺伝子（例えば、内因性遺伝子）の発現レベル、例えば高いか又は低い発現レベルでの差異を示すことができる。好ましくは、遺伝子発現の差異は、1又は複数の統計学的試験（例えば、スチューデントt - 試験、又は他のパラメトリック又は非パラメトリック試験）によれば、統計学的に有意である。例えば、発現の差異は、0.05以下か又は等しい、0.01以下か又は等しい、又は0.001以下か又は等しいp値を有する。

【 0 2 6 2 】

50

誘発された細胞及び胚幹細胞における異なった発現レベルを示す遺伝子の数は、1 ~ 1000 個の遺伝子、1 ~ 700 個の遺伝子、1 ~ 500 個の遺伝子、1 ~ 300 個の遺伝子、1 ~ 200 個の遺伝子、1 ~ 100 個の遺伝子、1 ~ 50 個の遺伝子、3 ~ 20 個の遺伝子、5 ~ 20 個の遺伝子、5 ~ 50 個の遺伝子、10 ~ 50 個の遺伝子、20 ~ 50 個の遺伝子、30 ~ 100 個の遺伝子、又は50 ~ 100 個の遺伝子、1又は複数個の遺伝子、2 又はそれ以上の遺伝子、3 又は それ以上の遺伝子、5 又は それ以上の遺伝子、10 又は それ以上の遺伝子、15 又は それ以上の遺伝子、20 又は それ以上の遺伝子、50 又は それ以上の遺伝子、70 又は それ以上の遺伝子、又は 100 又は それ以上の遺伝子、500 又は それ以上の遺伝子、1000 又は それ以上の遺伝子、9 個の遺伝子、12 個の遺伝子、42 個の遺伝子、70 個の遺伝子、又は 100 個の遺伝子であり得る。遺伝子発現レベルの差異は、少なくとも2倍、例えば少なくとも3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、10倍、2 ~ 50倍、2 ~ 30倍、2 ~ 20倍、2 ~ 10倍、又は2 ~ 5倍であり得る。

10

## 【0263】

ある場合、誘発された細胞及び胚幹細胞において異なった発現レベルを示す遺伝子は、ヒト胚幹細胞におけるよりも誘発された細胞において、より高いレベルの発現を示す。ある場合、誘発された細胞において、より高いレベルの発現を示す遺伝子は、表13、15又は16に列挙される遺伝子の1 又はそれ以上、2 又はそれ以上、3 又はそれ以上、4 又はそれ以上、5 又はそれ以上、10 又はそれ以上、15 又はそれ以上、25又はそれ以上、50 又はそれ以上、75 又はそれ以上、100 又はそれ以上、又は200 又はそれ以上である。

20

## 【0264】

ある場合、胚幹細胞に比較して、誘発された細胞において異なった発現レベルを示す遺伝子は、誘発された細胞に比較して、ヒト胚幹細胞においてより高いレベルで発現される。ある場合、ヒト胚幹細胞において高いレベルで発現される遺伝子は、表14に列挙される遺伝子の1 又はそれ以上、2 又はそれ以上、3 又はそれ以上、4 又はそれ以上、5 又はそれ以上、10 又はそれ以上、15 又はそれ以上、25 又はそれ以上、50 又はそれ以上、75 又はそれ以上、100 又はそれ以上、又は200 又はそれ以上である。

## 【0265】

ある場合、遺伝子又は遺伝子組は、胚幹細胞に比較される場合、及び親細胞、例えば線維芽細胞に比較される場合、誘発された細胞においてより高い発現レベルを示す。例えば、胚幹細胞及び親細胞の両者においてよりも誘発された細胞においてより高い発現を示す遺伝子は、表15に列挙される遺伝子の1 又はそれ以上、2 又はそれ以上、3 又はそれ以上、4 又はそれ以上、5 又はそれ以上、10 又はそれ以上、15 又はそれ以上、25 又はそれ以上、50 又はそれ以上、75 又はそれ以上、100 又はそれ以上、又は200 又はそれ以上である。

30

## 【0266】

遺伝子又は遺伝子組は、胚幹細胞におけるその発現レベルよりも、親細胞（例えば、線維芽細胞）における発現レベルに近いレベルで誘発された細胞において発現され得る。遺伝子又は遺伝子組は例えば、胚幹細胞に比較される場合、誘発された細胞において高い発現レベルを示すことができるが、しかし親細胞、例えば線維芽細胞に比較される場合、そうでない。親細胞ではなく、胚細胞においてよりも誘発された細胞において、より高い発現レベルを示す遺伝子は、表16に列挙される遺伝子の1 又はそれ以上、2 又はそれ以上、3 又はそれ以上、4 又はそれ以上、5 又はそれ以上、10 又はそれ以上、15 又はそれ以上、25 又はそれ以上、50 又はそれ以上、75 又はそれ以上、100 又はそれ以上、又は200 又はそれ以上であり得る。

40

## 【0267】

誘発された細胞内のテロマーの長さは、胚幹細胞内の染色体の末端でのテロマーの長さよりも短い。ある場合、誘発された細胞におけるテロマーは、胚幹細胞系内のテロマーよりも、少なくとも0.1 kB、少なくとも0.25 kB、少なくとも0.5 kB、少なくとも1 kB、少なくとも2 kB、少なくとも3 kB、少なくとも4 kB、又は少なくとも5 kB短い。ある場合、誘発された細胞は、胚幹細胞系におけるよりも少なくとも1、少なくとも2

50

、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6、少なくとも 8、少なくとも 10又は少なくとも15よりも短いテロマーを有する。

【 0 2 6 8 】

誘発された細胞は、IFをコードするが外因性遺伝子（又はトランスジーン）を含んで成る。誘発された細胞は、本明細書に記載されるいずれかの組のIFをコードする外因性遺伝子を含んで成る。例えば、誘発された細胞は、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycポリペプチドをコードする4種の外因性遺伝子を含んで成る。ある場合、誘発された細胞は、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycポリペプチドをコードする4種の外因性遺伝子を含んで成るが、しかし誘発因子をコードする他の外因性遺伝子は含まない。

【 0 2 6 9 】

他の場合、誘発された細胞は、Oct3/4、Sox2及びKlf4ポリペプチドコードする外因性遺伝子を含んで成るが、しかしc-Mycポリペプチドをコードする外因性遺伝子含まない。ある場合、誘発された細胞は、Oct3/4、Sox2及びKlf4ポリペプチドをコードする3種の遺伝子から実質的に成る外因性遺伝子を含む。ある場合、ヒト多能性幹細胞は、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycをコードする外因性遺伝子の少なくとも1つのコピーを担持する。ある場合、外因性遺伝子を含む誘発された細胞のいずれかがまた、マウス由来のカチオン性トランスポーター1（mCAT-1）、すなわち自己指向性レトロウィルスのための受容体のアミノ酸配列を含んで成るポリペプチドをコードする外因性遺伝子を含む。

【 0 2 7 0 】

外因性遺伝子の導入の後、ある点で、1又は複数の外因性遺伝子がサイレンシングされる。ある場合、Oct3/4外因性遺伝子はサイレンシングされ；Klf4外因性遺伝子はサイレンシングされ；Sox2外因性遺伝子はサイレンシングされ；又はc-Mycトランスジーンはサイレンシングされる。ある場合、すべての4種の外因性遺伝子（例えば、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc）がサイレンシングされる。ある場合、すべての3種の外因性遺伝子（例えば、Oct3/4、Sox2及びKlf4）はサイレンシングされる。

【 0 2 7 1 】

誘発された細胞は、本明細書に記載される誘発された多能性幹（iPS）細胞系：1-8：2-4；又は3-2の同定特性のすべてを共有することができる。細胞系iPS-1-8は、ブダペスト条約に従って国際特許機構寄託機関（IPOD）に寄託される。寄託物のための証明書番号は、FERM BP-10956である。IPODの住所は次の通りである：

International Patent Organism Depository (IPOD)  
AIST Tsukuba Central 6  
1-1, Higashi 1-chome  
Tsukuba-shi, Ibaraki-Ken 305-8566  
Japan

【 0 2 7 2 】

ある場合、ヒト多能性又は多分化能性幹細胞は、Tert、nanog、Oct3/4及びSox2遺伝子が後生不活性化を受けていないヒト生後組織に存在する末分化幹細胞から誘発される。ある場合、細胞は、組織に存在する分化細胞から、又は組織に存在する分化及び末分化細胞の組合せから誘発される。

【 0 2 7 3 】

誘発された細胞におけるNanog及びOct3/4のプロモーター領域は、親線維芽細胞に比較して、低又は脱メチル化され得る。誘発された細胞は、ヒトES細胞 - 培養条件下で培養される場合、長期再生能力を有する幹細胞であり得る。

【 0 2 7 4 】

幹細胞の特徴の1つは、老化をうけないで連続的に増殖するそれらの能力である。従って、誘発された細胞は、インビトロで連続して継代され得る。ある場合、誘発された細胞は、インビトロで少なくとも約30～少なくとも100回、例えば約33、35、40、45、51、56、60、68、75、80、90、93、100回、又は他の回数、継代され得る。誘発された細胞は、親細胞においてIFの誘発された発現の開始から約30日～約500日間、例えば40

10

20

30

40

50

日間、50日間、60日間、70日間、80日間、100日間、150日間、180日間、200日間、250日間、300日間、400日間、450日間、又は約30日～約500日以外の他の日数、増殖することができる。いくつかの態様においては、誘発された細胞は、500日以上の間、増殖する。

【0275】

典型的には、誘発された細胞は、大気酸素条件（例えば、約21%の酸素）下で未分化表現型を伴って増殖することができる。他の場合、誘発された細胞は、5%酸素～約21%酸素の範囲の酸素条件下で未分化細胞として増殖する。一般的、誘発された細胞はコロニー下で増殖する。

【0276】

誘発された細胞は、インビトロ多能性機能、例えばヒトES細胞のインビトロ分化を誘発するための条件下で外胚葉、中胚葉及び内胚葉に分化する能力を有し；そしてそのような細胞はさらに、始原生植細胞（例えば、精子、卵母細胞）に分化する能力を有する。

【0277】

ある場合、誘発されたヒト多能性幹細胞及び親細胞（例えば、ヒト生後組織に存在する未分化幹細胞）は、同一又はほとんど同一のSNP遺伝子型を有する。ある場合、誘発された細胞及び親細胞は、同じHLA型（例えば、HLA-A、B、Cw、DR、DQ、DP及びBw）を有する。

【0278】

本明細書に供給される組成物は、誘発された細胞の他に、又は誘発された細胞から分化された細胞の他に、他の成分を含むことができる。ある場合、組成物は、そのような細胞及び凍結保存剤、例えばアメリカ特許出願番号第10/902,571号；第11/142,651号；又はHa et al., (2005), Hum. Reprod., 20(7): 1779-1785に記載される凍結保存媒体を含んで成る。

【0279】

組成物は、そのような細胞及び培養培地、例えばヒトES培養培地を含んで成る。ある場合、培養培地は、1又は複数の成長因子、例えばFGF-2、bFGF、PDGF、EGF、IGF、又はそれらの誘導体から構成される培地である。いくつかの例においては、組成物は、ヒト誘発された多能性又は多分化能性幹細胞、及びFGF-2又はbFGF、又はそれらの誘導体を含んで成る培地を含んで成る。他の場合、組成物は、ヒト誘発された多能性又は多分化能性幹細胞、及びヒトES培養培地及びFGF-2又はbFGF、又はそれらの誘導体を含んで成る培地を含んで成る。さらにもう1つの例においては、組成物は、本明細書に記載されるヒト誘発された多能性又は多分化能性幹細胞及びMC-ES培地を含んで成る。

【0280】

ある場合、培養培地におけるFGF又はFGF2の濃度はまた、2ng/ml～約50ng/ml、例えば約2 ng/ml、3 ng/ml、4 ng/ml、5 ng/ml、6 ng/ml、7 ng/ml、8 ng/ml、10 ng/ml、12 ng/ml、14 ng/ml、15 ng/ml、17 ng/ml、20 ng/ml、25 ng/ml、30 ng/ml、35 ng/ml、40 ng/ml、45 ng/ml、50 ng/mlである。bFGF又はFGF2の濃度はまた、約4 ng/ml～約10 ng/ml；約4 ng/ml～約20 ng/ml；約10 ng/ml～約30 ng/ml；約5 ng/ml～約40 ng/ml；又は約10 ng/ml～約50 ng/mlであり得る。他の場合、bFGF又はFGF2のより高い濃度、例えば約50 ng/ml～約100 ng/ml；約50 ng/ml～約75 ng/mlの濃度が使用され得る。同様に、培養培地は、本明細書に記載されるように、約2ng/ml～約100ng/mlの濃度である、bFGF又はFGF2以外の成長因子を含むことができる。

【0281】

VI. 細胞分化：

誘発された細胞は、種々の系統の細胞型に分化され得る。分化された細胞の例は、外胚葉（例えば、ニューロン及び線維芽細胞）、中胚葉（例えば、心臓筋細胞）、又は内胚葉（例えば、膵臓細胞）系統からのいずれかの分化された細胞を包含する。分化された細胞は、1又は複数の次のものであり得る：膵臓細胞、神経幹細胞、ニューロン（例えば、ドーパミン作用性ニューロン）、希突起膠細胞、希突起膠細胞子孫細胞、肝細胞、肝幹細胞

10

20

30

40

50

胞、神経膠星状細胞、ミオサイト、造血細胞又は心筋細胞。

【0282】

誘発された細胞に由来する分化された細胞は、最終的に分化された細胞であり得、又はそれらは特定系統の細胞をもたらすことができる。例えば、誘発された細胞は、種々の多分化能細胞型、例えば神経幹細胞型、心臓幹細胞又は肝臓幹細胞に分化され得る。次に、肝細胞は新規細胞型にさらに分化され得、例えば神経幹細胞はニューロンに分化し；心臓幹細胞は心筋細胞に分化され得；そして肝臓幹細胞は肝細胞に分化され得る。

誘発された細胞を、より特殊化された細胞型に分化するための多くの方法が存在する。誘発された細胞を分化するための方法は、幹細胞、特にES細胞、MSCs、MAPCs、MIAMI、造血幹細胞（HSC）を分化するために使用されるそれらの方法に類似する。ある場合、分化はエキスピボで生じ；ある場合、分化はインピボで生じる。

10

【0283】

ES細胞から神経幹細胞を生成するためのいずれかの既知方法が、誘発された細胞から神経幹細胞を生成するために使用され得る。例えば、Reubinoff et al., (2001), Nat. Biotechnol., 19(12): 1 134- 40を参照のこと。例えば、神経幹細胞は、ノギン又は他の骨形態形成タンパク質アンタゴニストの存在下で浮遊する凝集体として誘発された細胞を培養することにより生成され得る。例えば、Itsykson et al., (2005/ Mol. Cell Neurosci., 30(1):24-36を参照のこと。もう1つの例においては、神経幹細胞は、成長因子、例えばFGF-2の存在下で凝集体を形成するために懸濁液において誘発された細胞を培養することにより生成され得る (Zhang et al., (2001), Nat. Biotech., (19): 1 129-1 133)。

20

【0284】

ある場合、凝集体は、FGF-2を含む血清フリー培地において培養される。もう1つの例においては、誘発された細胞は、FGF-2を含んで成る血清フリー培地の存在下で、マウス間質細胞系、例えばPA6と共に同時培養される。さらにもう1つの例においては、誘発された細胞は、分化を直接的に誘発するために、FGF-2を含む血清フリー培地に直接的に移行される。

【0285】

誘発された細胞に由来する神経幹細胞は、ニューロン、乏突起膠細胞又は星状細胞膠腫に分化され得る。しばしば、神経幹細胞を生成するために使用される条件はまた、ニューロン、乏突起膠細胞する星状細胞膠腫を生成するためにも使用され得る。

30

【0286】

ドーパミン作用性ニューロンは、パーキンソン病及び他の神経変性疾患において中心的役割を演じ、そして従って、特に興味あるものである。ドーパミン作用性ニューロンの分化を促進するために、誘発された細胞は、血清フリー条件下でPA6マウス間質細胞系と共に同時培養され得る。例えば、Kawasaki et al., (2000) Neuron, 28(1 ):31-40を参照のこと。他の方法もまた記載されている (例えば、Pomp et al., (2005), Stem Cells 23(7 ):923-30; アメリカ特許第6,395,546号、例えば、Lee et al., (2000), Nature Biotechnology, 18:675-679を参照のこと)。

【0287】

乏突起膠細胞はまた、誘発された細胞からも生成され得る。凝集された細胞の乏突起膠細胞への分化は、ES細胞又は神経幹細胞を乏突起膠細胞に分化するための既知方法により達成され得る。例えば、乏突起膠細胞は、間質細胞と共に誘発された細胞又は神経幹細胞を同時培養することにより生成される (Hermann et al. (2004), J Cell Sci. 117(Pt 19 ):4411-22を参照のこと)。もう1つの例においては、乏突起膠細胞は、インターロイキン (IL) - 6 受容体又は誘導体がIL-6サイトカイン又はその誘導体に結合されている、融合タンパク質の存在下で誘発された細胞又は神経幹細胞を培養することにより生成され得る。乏突起膠細胞はまた、当業界において知られている他の方法により、誘発された細胞から生成され得る。例えば、Kang et al, (2007) Stem Cells 25, 419-424を参照のこと。

40

【0288】

50

星状細胞膠腫はまた、誘発された細胞から生成され得る。星状細胞膠腫は、bFGF及びEGFと共に神経原性培地の存在下で誘発された細胞又は神経幹細胞を培養することにより生成され得る。例えば、Brustle et al, (1999), Science, 285:754-756を参照のこと。

【0289】

誘発された細胞は、当業界において知られている方法により、膵臓細胞に分化され得る。例えば、Lumelsky et al., (2001) Science, 292:1389-1394; Assady et al., (2001), Diabetes, 50: 1691-1697; D'Amour et al., (2006), Nat. Biotechnol., 24: 1392-1401; D'Amour et al., (2005), Nat. Biotechnol. 23: 1534-1541を参照のこと。前記方法は、アクチビンAにより補充された血清フリー培地において誘発された細胞を培養し、続いて、すべてのトランス-レチノン酸により補充された血清フリー培地の存在下で培養し、続いてbFGF及びニコチンアミドにより補充された血清フリー培地の存在下で培養することを含んで成る。例えば、Jiang et al., (2001), Cell Res., 4:333-444を参照のこと。

10

【0290】

他の例においては、前記方法は、血清フリー培地、アクチビンA、及びWntタンパク質の存在下で誘発された細胞を、約0.5～約6日間、例えば約0, 5, 1, 2, 3, 4, 5, 6日間、培養し；続いて、約0.1%～約2%、例えば0.2%FBS及びアクチビンAの存在下で約1～約4日、例えば約1, 2, 3又は4日間、培養し；続いて2%FBS、FGF-10及びKAAD-シクロパミン(ケト-N-アミノエチルアミノカプロイルジヒドロシンナモイルシクロパミン)及びレチノン酸の存在下で約1～約5日、例えば1, 2, 3, 4又は5日間、培養し；続いて、1%B27、セクレターゼインヒビター及びエクステンジン-4と共に約1～約4日は、例えば1, 2, 3又は4日間、培養することを含んで成る。

20

【0291】

肝細胞又は肝幹細胞は、誘発された細胞から分化され得る。例えば、酪酸カリウムの存在下での誘発された細胞の培養は、肝実質細胞を生成できる。例えば、Rambhatla et al., (2003), Cell Transplant, 12:1-11を参照のこと。もう一つの例においては、肝実質細胞は、アクチビンAの存在下で血清フリー培地において誘発された細胞を培養し、続いて線維芽細胞成長因子-4及び骨形態形成タンパク質-2下で前記細胞を培養することにより生成され得る。例えば、Cai et al, (2007), Hepatology, 45(5): 1229-39を参照のこと。典型的な態様においては、誘発された細胞は、アクチビンAの存在下で誘発された細胞を約2～約6日、例えば約2、約3、約4、約5又は約6日間、培養し、そして次に肝実質細胞成長因子(HGF)の存在下で誘発された細胞を約5日～約10日、例えば約5、約6、約7、約8、約9又は約10日間、培養することにより、肝細胞又は肝幹細胞に分化される。

30

【0292】

誘発された細胞はまた、心筋細胞に分化され得る。骨形態形成タンパク質(BMP)シグナル化の阻害は、心筋細胞の生成をもたらす。例えば、Yuasa et al, (2005), Nat. Biotechnol., 23(5):607-11を参照のこと。従って、典型的な態様においては、誘発された細胞は、胚様体の形成、及び胚様体の約1～約4週、例えば約1、約2、約3又は約4週間の培養の前、nogginの存在下で約2～約6日、例えば約2、約3、約4、約5又は約6日間、培養される。

40

【0293】

他の例においては、心筋細胞は、白血病阻害因子(LIF)の存在下で誘発された細胞を培養することにより、又はES細胞から心筋細胞を生成するために当業界において知られている他の方法に、それらをゆだねることにより生成され得る。例えば、Bader et al, (2000), Circ. Res., 86:787-794, Kehat et al, (2001), J Clin. Invest., 108:407-414; Mummery et al, (2003), Circulation, 107:2733-2740を参照のこと。

【0294】

誘発された細胞から他の細胞型を生成するための方法の例は、次のことを包含する：  
(1) 脂肪細胞を生成するために、レチノン酸、白血病阻害因子(LIF)、甲状腺ホル

50

モン (T3)、及びインスリンの存在下で誘発された細胞を培養し (例えば、Dani et al, (1997), J. Cell Sci, 1 10:1279-1285) ;

(2) 軟骨細胞を生成するためにBMP-2又はBMP-4の存在下で誘発された細胞を培養し (Kramer et al, (2000), Mech, Dev., 92:193-205) ;

(3) 平滑筋を生成するための条件下で誘発された細胞を培養し (例えば、Yamashita et al, (2000), Nature, 408:92-96を参照のこと) ;

(4) 角質細胞を生成するために - 1 インテグリンの存在下で誘発された細胞を培養し (例えば、Bagutti et al, (1996), Dev. Biol, 179: 184-196を参照のこと) ;

#### 【0295】

(5) インターロイキン - 3 (IL-3) 及びマクロファージを生成するためのマクロファージコロニー刺激因子の存在下で誘発された細胞を培養し (例えば、Lieschke and Dunn (1995), Exp. Hemat., 23:328-334を参照のこと) ;

(6) 肥満細胞を生成するために、IL-3及び幹細胞因子の存在下で誘発された細胞を培養し (例えば、Tsai et al, (2000), Proc. Natl. Acad. Sci USA, 97:9186-9190を参照のこと) ;

(7) メラニン細胞を生成するために、デキサメタゾン及び間質細胞層、すなわちステロイド因子の存在下で誘発された細胞を培養し (例えば、Yamane et al, (1999), Dev. Dyn., 216:450-458を参照のこと) ;

(8) 造芽細胞を生成するために、デキサメタゾン、レチノン酸、アスコルビン酸、- グリセロホスフェートの存在下で胎児マウス造芽細胞と共に誘発された細胞を同時培養し (例えば、Buttery et al, (2001), Tissue Eng., 7:89-99を参照のこと) ;

#### 【0296】

(9) 骨芽細胞を生成するために骨形成因子の存在下で誘発された細胞を培養し (Sottile et al, (2003), Cloning Stem Cells, 5:149-155を参照のこと) ;

(10) 骨格筋細胞を生成するために、誘発された細胞においてインスリン様成長因子 - 2 を過剰発現し、そしてジメチルスルホキシドの存在下で前記細胞を培養し (例えば、Preille et al, (2000), Biochem. Biophys. Res. Commun., 277:631-638を参照のこと) ;

(11) 白血球を生成するための条件に、誘発された細胞をゆだね ; 又は (12) 造血前駆体細胞を生成するために、BMP4、及び 1 又は複数のSCF, FLT3, IL-3, IL-6及びGCSFの存在下で誘発された細胞を培養すること (Chadwick et al, (2003), Blood, 102:906-915を参照のこと)。

#### 【0297】

ある場合、分化された細胞の亜集団が精製されるか又は単離され得る。ある場合、所望する細胞型に対して特異的な 1 又は複数のモノクローナル抗体が細胞集団と共にインキュベートされ、そしてそれらの結合された細胞が単離される。他の場合、所望する亜集団の細胞が、細胞型特異的プロモーターの制御下にあるレポーター遺伝子を発現する。

#### 【0298】

特定の態様においては、ヒグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ - EGFP融合タンパク質が、細胞型特異的態様で発現される。精製方法は、緑色蛍光細胞を選択するための細胞を分類し、そして必要なら、前記分類を反復し、細胞型依存性態様下 (例えば、ヒグロマイシンBホスホトランスフェラーゼ - EGFP) を発現する細胞のために富化された細胞集団を得ることを含んで成る。所望する亜集団の細胞の選択はまた、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ/ガンシクロビル (HSVtk/GCV) 自殺遺伝子システムによる増殖細胞の負の選択により、又はピシストロン性レポーターを発現する細胞の正の選択により達成され得る (例えば、Anderson et al. (2007) Mol Ther. (1 1):2027-2036を参照のこと)。

#### 【0299】

### VII . 細胞療法 :

誘発された細胞、又はその誘発された細胞から分化された細胞は、疾病 (例えば、遺伝子欠損) を処理するための治療剤として使用され得る。その治療は、疾病の原因に向けられ得 ; 又は他方では、治療は疾病又は病状の効果を処理することであり得る。誘発された

10

20

30

40

50

細胞は、対象における損傷部位に又はそれに接近して移行され得；又は前記細胞は、その細胞の損傷された部位への移動又は標的化を可能にする態様で対象に導入され得る。移行された細胞は好都合には、損傷された外傷を受けた細胞を置換することができ、そして対象の全体的状態の改良を可能にする。ある場合、移行された細胞は、組織再生又は修復を刺激することができる。

【0300】

移行された細胞は、誘発された細胞から分化された細胞であり得る。移行された細胞はまた、誘発された細胞から分化された多分化能性幹細胞であり得る。ある場合、移行された細胞は、分化されない誘発された細胞であり得る。

【0301】

対象への処理の回数は変化することができる。誘発された及び/又は分化された細胞の対象への導入は1回の現象であり得るが、しかし一定の状況下で、そのような処理は限定された時間、改良を誘発し、そして進行する反復された処理を必要とする。他の状況下で、細胞の複数回の投与が、効果が観察される前、必要とされる。正確なプロトコールは、疾病又は病状、処理される個々の対象の疾病の段階及びパラメーターに依存する。

【0302】

細胞は次の経路のいずれかを通して対象に導入され得る：非経口、静脈内、動脈内、筋肉内、皮下、経皮、気管内又は脊髄液。

【0303】

誘発された細胞は、細胞に分化され、そして次に、広範囲の疾病又は障害を有する対象に移行され得る。神経学的疾病又は障害を有する対象は特に、幹細胞に分化され、そして次に、損傷部位に移植され、神経学的病状、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、脳梗塞、脊髄損傷又は他の中枢神経系障害が処理される。例えば、Morizane et al., (2008), *Cell Tissue Res.*, 331(1):323-326; Coutts and Keirstead (2008), *Exp. Neurol.*, 209(2):368- 377; Goswami and Rao (2007), *Drugs*, 10(10):713-719を参照のこと。

【0304】

パーキンソン病の処理に関しては、誘発された細胞は、ドーパミン作用ニューロンに分化され、そして次に、パーキンソン病を有する対象の線状体中に移植され得る。多発性硬化症の処理に関しては、神経幹細胞が乏突起神経膠細胞又はその前駆体に分化され、次に、MSを有する対象に移行される。

【0305】

いずれかの神経学的疾病又は障害の処理に関しては、有用なアプローチは、対象に神経幹細胞を導入することである。例えば、アルツハイマー病、脳梗塞又は脊髄損傷を処理するためには、誘発された細胞は神経幹細胞に分化され、続いて損傷部位に移植される。誘発された細胞はまた、それらの移動を、脳及び脊髄修復のために、損傷部位に向ける役割にตอบสนองして構築され得る。例えば、Chen et al., (2007), *Stem Cell Rev.*, 3(4):280-288を参照のこと。

【0306】

神経学的障害以外の疾病がまた、誘発された細胞、例えば誘発された多分化能性又は多能性幹細胞をから分化される細胞を用いる幹細胞治療により処理され得る。変性心疾患、例えば虚血性心筋障害、伝導病及び先天性欠損が、幹細胞治療から有益である。例えば Janssens et al., (2006), *Lancet*, 367: 113-121を参照のこと。

【0307】

膵臓島細胞（又はランゲルハンス島の一次細胞）が、糖尿病（1型糖尿病）を有する対象中に移植される。例えば、Burns et al., (2006) *Curr. Stem Cell Res. Ther.*, 2:255-266を参照のこと。いくつかの態様においては、誘発された細胞に由来する膵臓細胞が、糖尿病（例えば1型糖尿病）を有する対象に移植され得る。

【0308】

他の例においては、誘発された細胞由来の肝細胞又は肝幹細胞が、肝臓疾患、例えば肝

10

20

30

40

50

炎、肝硬変又は肝不全を有する対象中に移植される。

【0309】

誘発された細胞由来の造血細胞又は造血幹細胞（HSC）が、血液又は他の血液の癌又は免疫障害を有する対象中に移植され得る。造血細胞又はHSCにより実施的に処理される血液の癌の例は、次の癌を包含する：急性リンパ性白血病、急性骨髄芽球白血病、慢性骨髄白血病（CHL）、ホジキン病、多発性骨髄腫及び非ホジキン性リンパ腫。しばしば、そのような疾病を有する対象は、急速に分裂する血液細胞を殺すために、放射線及び/又は化学療法処理を受けるべきである。誘発された細胞由来のHSCのそれらの対象への導入が細胞の消耗されたレザバーの再増殖を助けることができる。

【0310】

ある場合、誘発された細胞由来の造血細胞又はHSCはまた、癌を直接的に攻撃するためにも使用され得る。例えば、異系HSCの移植は、腎臓癌の処理に有望であることが示された。例えば、Childs et al., (2000), N. Engl. J. Med., 343:750-758を参照のこと。いくつかの態様においては、誘発された細胞由来の異種又はさらに自己由来のHSCでさえ、腎臓又は他の癌を処理するために、対象中に導入され得る。

【0311】

誘発された細胞由来の造血細胞又はHSCはまた、血液細胞以外の細胞又は組織、例えば筋肉、血管、又は骨を生成するか又は修復するために対象中に導入され得る。そのような処理は、多くの障害のために有用であり得る。

【0312】

ある場合、誘発された細胞は、免疫無防備状態の動物、例えばSCIDマウス中に導入され、そして分化を可能にされる。移植された細胞は、分化された細胞型及び腫瘍細胞の混合物を形成できる。興味ある特定の分化された細胞型が、系統特異的マーカーの使用により、例えば蛍光活性化された細胞分類（FACS）、又は他の分類方法、例えば磁気活性化された細胞分類（MACS）により、腫瘍細胞から選択され、そして精製され得る。次に、分化された細胞は、病状を処理するために対象（例えば、自己由来の対象、HLA - 適合された対象）中に移植され得る。疾病又は病状は、造血障害、内分泌不全、退化性神経学的障害、毛髪脱落、又は本明細書に記載される他の疾病又は病状であり得る。

【0313】

VIII. 分析方法：

単独で又は他の剤、例えば本明細書に記載される誘発因子と組合して、多能性を、一次体細胞（例えば、皮膚細胞、単核血液細胞又は骨髄細胞）又は細胞系（例えば、HEK293細胞、Hela細胞、多分化能性幹細胞系、又は成熟幹細胞系）において誘発できる剤を同定するためのアッセイ方法がまた、本明細書に記載される。前記方法はまた、多能性を誘発する誘発因子の能力（例えば、多能性を誘発する効率）を高める剤を同定するための方法を包含することができる。いくつかの態様においては、アッセイ方法に使用されるべき細胞は、Tert、Nanog、Oct3/4又はSox2の後生不活性化を受けていない。

【0314】

いくつかの態様においては、多能性又は多分化能性を誘発する試験剤の能力は、1又は複数のアルカリホスファターゼ（ALP）、ESマーカー遺伝子又はタンパク質マーカーの発現を誘発する試験剤の能力を決定することにより、一次スクリーンエンドポイントで評価される。多くの場合、そのような決定は、試験剤の誘発能力と、負の対照剤（例えば、対象遺伝子又はタンパク質マーカーを誘発する制限された又は存在しない能力を有する剤）とを比較することにより実施される。ほとんどの場合、試験剤の対照剤とのインキュベーションの前及び間、細胞は、サンプルを採取し、そしてそれを、従来の培養段階を伴わないでアッセイに直接使用することが可能であるが、培養される特定細胞型に対して適合された細胞培養培地、例えば本明細書に記載されるような細胞培養のためのいずれかの細胞培養培地において培養される。ある場合、試験剤インキュベーション期間の後、細胞は、本明細書に記載されるように、MC-ES培地において培養される。

【0315】

スクリーニングアッセイのために適切なESマーカー遺伝子の例は、Tert、Cyp26A1、Nanog、Oct3/4又はSox2を包含するが、但しそれらだけには限定されない。マーカーの発現は、標準方法、例えば本明細書に記載される方法のいずれか、例えばqPCRにより、mRNFLレベル又はタンパク質レベルを検出するか、又は定量化することにより決定され得る。他の態様においては、ESマーカー遺伝子プロモーターからの1又は複数の要素を含むレポーター構造体が、細胞と試験剤との接触の前、アッセイされるべき細胞中に導入される。プロモーター構造体を生成し、それらを細胞中に導入し、そして種々のレポーターポリペプチド活性をアッセイするための方法は、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (2005), 3.16-3.17 and 9.1- 9.14に、詳細に見出され得る。

【0316】

10

特定細胞型が従来の方法によりトランスフェクトするのに困難である場合、本明細書に記載のように、ウィルストランスダクションが、ウィルスプロモーター-レポーター構造体を導入するために使用され得る。プロモーター活性は、レポーターポリペプチド(例えば、酵素活性又は蛍光)、レポーターポリペプチド発現(例えば、ELISAアッセイによる)、又はレポーターmRNA発現(例えば、蛍光ハイブリダイゼーション技法による)の性質を測定することにより定量化され得る。適切なレポーターポリペプチドは、例えばホタルルシフェラーゼ、Renillaルシフェラーゼ、蛍光タンパク質(例えば、増強された緑色蛍光タンパク質)、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ラクタマーゼ及びホースラディッシュペルオキシダーゼを包含する。

【0317】

20

Nanog、Sox2、Oct3/4、TERT又はCyp26A1プロモーター活性化因子の誘発を検出するための典型的なプロモーターレポーター構造体は、Kuroda et al, (2005), Mol. Cell Biol, 25(6):2475-2485 (Nanogについて); Zhan et al., (2005), Cell Biochem. Biophys., 43(3):379-405 (Oct3/4 及び Sox2について); 及び Tzukerman et al, (2000), Mol. Biol. Cell, 11(12):4381-4391 (hTertについて), 及び Loudig et al, (2005), Biochem. J., 392(Pt1):241-248に記載される。いくつかの態様においては、アッセイされた細胞におけるALP活性の存在は、試験剤の誘発活性のための予備試験として使用される。前述のアッセイのいずれかにおけるこの結果、例えば対照剤に対してよりも試験剤に対して有意に高いレベルの活性が、試験剤が誘発活性を有する予備指示として取られる。

【0318】

30

そのような候補誘発剤は、ESマーカー遺伝子、タンパク質マーカー、長期自己再生、Oct3/4、Sox2及びNanogプロモーターの低メチル化、奇形腫を形成する能力、及び外胚葉、中胚葉又は内胚葉系統の細胞型へのエクスピボでの分化する能力(但し、それらだけには限定されない)の発現の決定を包含する。多能性又は多分化能性を決定するために、本明細書に記載されるいずれかのアッセイにおける一次スクリーンにおける試験剤と接触される細胞を試験することにより、さらにスクリーンされ得る。

【0319】

アッセイのための条件は、変化し、そして使用されるアッセイプロトコールの性質、及び使用される細胞及び剤の性質に依存する。そのようなアッセイに関しては、エンドポイントアッセイの前、細胞培養期間は、少なくとも3日~少なくとも約40日、例えば5、6、9、10、12、14、20、21、25、26、27、30、32、34、36、38日、又は少なくとも約30日~少なくとも約40日以外の他の期間、変化することができる。さらに、ほとんどの場合、試験剤インキュベーションについての時間は、少なくとも約30分~約40日、例えば1時間、2時間、12時間、18時間、1日、3日、5日、7日、14日、21日、25日、30日、34日、又は少なくとも約30分~少なくとも約40日以外のいずれか他の期間である。

40

【0320】

いくつかの態様においては、試験されるべき剤は、siRNA、例えば約19塩基対の標的遺伝子配列を含んで成り、そしてRNAインターフェレンスの標的遺伝子発現を阻害できる二本鎖RNAであるが、但しそれらだけには限定されない。例えばScherr et al, (2007), Cel

50

l Cycle, 6(4):444-449を参照のこと。いくつかの態様においては、アッセイされるべき siRNAは、例えばMiyagishi et al, (2003), *Oligonucleotides*, 13(5):325- 333; 及び Husken et al, (2005), *Nat. Biotechnol.*, 8:995-1001に記載されるように、全ゲノムsiRNAライブラリーを包含するが但しそれらだけには限定されない。

#### 【 0 3 2 1 】

適切な全ゲノムsiRNAライブラリー、例えば市販の整列されたsiRNAライブラリーは、Qiagen (Valencia, CA)からの"Human Whole Genome siRNA Set V4.0"; Dharmacon, Inc. (Lafayette, CO)からの"Human siGENOME siRNA Library - Genome"; 及びAmbion (Austin, TX)Silencer (商標) Human Genome siRNA Libraryを包含する。siRNAを導入するための方法及び試薬は、市販の試薬、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない： Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA)、TransMessenger Transfection Reagent (Qiagen, Valencia, CA)又は Dharma FECT (商標) (Dharmacon, Lafayette, CO)。例えば、Krausz (2007), *Mol. Biosyst.*, 3(4):232-240を参照のこと。いくつかの態様においては、ウィルスRNAiライブラリーが、例えばRoot et al, (2006), *Nat. Methods*, 3(9):715-719に記載されるようにして使用される。

#### 【 0 3 2 2 】

任意には、スクリーンされるべき誘発試験剤は、小分子である。試験分子は、選択される個々の小分子であり得るか、又はある場合、スクリーンされるべき小分子試験剤は、組合せライブラリー、すなわち多くの化学的“構築ブロック”を組合すことにより、化学的合成又は生物学的合成により生成される種々の化合物の収集物からである。例えば、線状組合せ化学ライブラリー、例えばポリペプチドライブラリーは、所定の化合物長(すなわち、ポリペプチド化合物におけるアミノ酸の数)について、あらゆる可能な手段で、アミノ酸と呼ばれる化学構築ブロック組を組合すことにより形成される。

#### 【 0 3 2 3 】

何百万もの化合物は、化学的構築ブロックのそのような組合せ混合を通して合成される。実際、理論的に、100個の相互交換できる化学的構築ブロックの合成組合せ混合が、1億個のテトラマー化合物又は100億個のペンタマー化合物をもたらす。例えば、Gallop et al, (1994), *J. Med. Chem.*, 37(9), 1233-1251参照のこと。組合せ化学ライブラリーの調製及びスクリーニングは、当業界において良く知られている。

#### 【 0 3 2 4 】

組合せ化学ライブラリーは、例えばHobbs et al, (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:6909-6913に記載されるような、ダイパーソマー、例えばヒダントイン、ベンゾジアゼピン及びジペプチド; Chen et al., (1994), *J. Amer. Chem. Soc.*, 116:2661-2662に記載されるような少化合物ライブラリーの類似有機化合物; Cho, et al, (1993), *Science*, 261 : 1303- 1305に記載されるようなオリゴカルバメート; Campbell et al., (1994), *J. Org. Chem.*, 59: 658-660に記載されるようなペプチジルホスホネート; 及びチアゾリジノン及びメタチアザノン(アメリカ特許第5,549,974号)、ピロリジン(アメリカ特許第5,525,735号及び第5,514,134号)、ベンゾジアゼピン(アメリカ特許第5,288,514号)を含む小有機分子ライブラリーを包含するが、但しそれらだけには限定されない。

#### 【 0 3 2 5 】

多くの組合せライブラリー、例えばComGenex(Princeton, NJ); Asinex (Moscow, Russia); Tripos, Inc. (St. Louis, MO); ChemStar, Ltd. (Moscow, Russia); 3D Pharmaceuticals (Exton, PA); 及びMartek Biosciences (Columbia, MD)が市販されている。

ある場合、活性を誘発するためにスクリーンされるべき試験剤は、本明細書に記載される1又は複数の誘発因子(例えば、Oct3/4、Sox2、Klf4又はc-Myc)、例えば本明細書に記載される1, 2, 3又は4個の誘発因子と組合して使用され得る。

#### 【 0 3 2 6 】

ある場合、試験剤は、1つの誘発因子、例えばOct3/4、Sox2、Klf4又はc-Mycと組合してスクリーンされる。他の場合、試験剤は、2種の誘発因子、例えばOct3/4 及び Sox2; Oct3/4 及び Klf4; Oct3/4 及び c-Myc; Sox2 及び Klf4; Sox2 及び c-Myc;又はKlf4-

10

20

30

40

50

及び c-Mycと組合してスクリーンされる。いくつかの態様においては、試験剤は、3種の誘発因子、例えばOct3/4、Sox2、及びKlf4；Oct3/4、Klf4、及びc-Myc；Oct3/4、Sox2、及びc-Myc；or Sox2、Klf4、及びc-Mycと組合してスクリーンされる。試験剤はまた、誘発因子組、例えばOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの組合せにより、多能性誘発の効率を高めるそれらの能力についてアッセイされ得る。

【0327】

#### IX. 細胞の貯蔵：

収穫された組織、細胞、誘発された細胞、誘発された多能性細胞、誘発された多分化能性細胞、収穫された組織から分化された細胞、又は本明細書に記載される他の細胞が貯蔵され得る。従って、前記工程の間のいずれかの点からの細胞又は材料は、前記工程の後での完結又は使用のための改良のために貯蔵され得る。

10

【0328】

貯蔵方法は、凍結保存媒体を用いてのいずれかの方法、例えば本明細書に記載される方法であり得る。いくつかの典型的な凍結保存媒体は、"Cryopreservation Medium For Primate ES Cells" (ReproCELL, Tokyo, Japan)又はmFreSR™ (StemCell Technologies, Vancouver, CA)を包含する。細胞は好ましくは、液体窒素において急速に凍結され、そして液体窒素貯蔵容器に貯蔵される。他の適切な凍結保存媒体、及び本明細書に記載される方法により生成される細胞の凍結保存/融解のための方法は、例えばアメリカ特許出願番号10/902,571号及び11/142,651号に提供される。また、Ha et al, (2005), Hum. Reprod., 20(7): 1779-1785も参照のこと。

20

【実施例】

【0329】

#### X. 例：

次の特定の例は、単なる例示として構成されており、いかなる方法でも、本発明の開示を制限するものではない。さらなる労力を伴わないで、当業者は、本明細書の記載に基づいて、本発明のをその十分な程度まで利用できると思われる。本明細書に引用されるすべての出版物は、引用によりその全体を本明細書に組み込まれる。URL又は他のそのような識別子又はアドレスが言及される場合、そのような識別子は変化することができ、そしてインターネットでの特定の情報が行き来するが、しかし同等の情報がインターネット調査により見出されることが理解されている。それらに対する参照は、そのような情報の利用性及び公的な配布を示す。

30

【0330】

#### 例1. レトロウィルスベクターの調製：

表1におけるようにして構成される4種の遺伝子 (Oct3/4-pMx、Sox2-pMx、Klf4-pMx及びc-Myc-pMx) についてレトロウィルスベクタープラスミドを、Fugene HD (Rocheにより製造される)を用いて、パッケージング細胞系Plat-E [Experimental Hematology, 2003, 31 (1 1): 1007-1014]中に導入した。レトロウィルスベクタープラスミドの導入の約24~48時間後、培地を、遺伝子導入される予定である細胞のために適切な培地により交換した。レトロウィルスベクターが導入されるPlat-E細胞を、4時間以上、培養した後、上清液を回収し、そして45µmの直径のフィルター (Milliporeにより製造される)に通した。4種の遺伝子 (Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc) のレトロウィルスベクター溶液を、上記方法により調製した。

40

【0331】

3種の遺伝子 (Oct3/4-pMx、Sox2-pMx及びKlf4-pMx) のためのレトロウィルスベクタープラスミドを、Fugene HD (Rocheにより製造される)を用いて、パッケージング細胞、すなわちPlat-E細胞中に導入した。レトロウィルスベクター導入後の24~48時間の間、培地は、遺伝子が導入される予定である細胞のために適切な培地により交換された。レトロウィルスが導入されるPlat-E細胞を、4時間以上、培養した後、上清液を回収し、そして45µmの直径のフィルター (Milliporeにより製造される)に通した。3種の遺伝子 (Oct3/4、Sox2及びKlf4) のレトロウィルスベクター溶液を、上記方法により調製した。

50

## 【 0 3 3 2 】

## 例 2 . アデノウィルスベクターの調製 :

両栄養性レトロウィルスの使用は、実験に対して感染の有意な危険性を提供する。この危険性は、レトロウィルスが腫瘍原性タンパク質（例えば、c-myc）をコードする場合、特に関心のことである。従って、我々は、マウス受容体、すなわちマウス由来のカチオン性アミノ酸トランスポーター 1（mCAT1）を選択的に認識する自己指向性レトロウィルスベクターを利用した。我々は、mCAT1をコードする遺伝子を担持し、従って、mCAT1受容体を発現するヒト細胞の自己指向性レトロウィルスによる選択的感染を可能にするアデノウィルスベクターによりヒト細胞を感染した。

## 【 0 3 3 3 】

最初に、マウス由来のカチオン性アミノ酸トランスポーター（mCAT1）遺伝子のコード領域の配列を有するcDNAを担持するアデノウィルスベクターを構成した。特に、Adeno- X Expression System 1キット（TakaraBio Clontechにより製造される）を使用した。Adeno- X Expression System1キットにおいては、TakaraBioによるキットに添付される実験方法に基づいて、mCAT1遺伝子を、pShuttleと呼ばれるベクターのマルチ - クローニング部位中にサブクローン化した。

## 【 0 3 3 4 】

続いて、発現カセットを、PI-Sce I部位及びI-Ceu I部位、すなわちpShuttleの発現カセットの両端上の切断部位により切除し、そして所望する遺伝子を含むDNAフラグメントを、上記キットにおけるAdeno-XウィルスDNA中のPI-Sec I部位とI-Ceu I部位との間に挿入し、これを次に、制限酵素Swa Iにより処理し、組込みが不成功であるアデノウィルスDNAを除去した。プラスミドを用いてE. コリDH5株を形質転換し、所望する遺伝子がアデノウィルスDNA中に正しく導入されたかどうかを、制限酵素処理、PCR、等により確かめた。プラスミドを多量に調製し、そしてPac I制限酵素により切断した。このようにして得られた組換えアデノウィルスDNAを用いて、遺伝子をHEK293細胞（MicroBix）中に導入し、そしてLipofectamin 2000（Invitrogenにより製造される）を用いて、6ウェルにプレートし、そして2週間後、細胞が細胞変性効果（CPE）を示す場合、細胞を、それらが培地に存在する場合、収集した。

## 【 0 3 3 5 】

続いて、細胞懸濁液が凍結及び融解に3度ゆだねられた後、細胞を破壊し、細胞に存在するウィルス粒子を、液体中への開放を可能にした。このようにして調製されたウィルス懸濁液を、HEK293細胞（ $5 \times 10^6$ 個の細胞）の1つの100mmプラスチック培養皿に添加し、細胞を感染し、ウィルスを増殖した。さらに、ウィルスがHEK293細胞の4個の150mmプレートを用いて、多量に調製された後、ウィルスを、Adenovirus Purification キット（Clontechにより製造される）を用いて精製し、そして-80 で凍結貯蔵した。

## 【 0 3 3 6 】

mCAT1アデノウィルスベクターの力価（プラーク形成単位、PFU）を、Adeno-X Rapid Titerキットを用いて決定した。24ウェルプレート上に、HEK293細胞を、 $5 \times 10^4$ 個の細胞/500  $\mu$ l/ウェルの濃度でプレートした。連続的に希釈された（ $10^{-2} \sim 10^{-7}$ ）ウィルスベクター50  $\mu$ lを、500  $\mu$ lの培地と共に混合し、そして次に、それを用いて、細胞を感染した。5%CO<sub>2</sub>及び37 での48時間の培養の後、培地を吸引し、細胞を5分間、乾燥し、そして次に、500  $\mu$ lの冷100%メタノールを用いて、細胞を、-20 で10分間、静置することにより固定した。メタノールの吸引の後、ウェルを、1%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝液500  $\mu$ lにより3度、洗浄した。マウス抗 - ヘキソン抗体を、1%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝液により1000倍に希釈し、そしてその250  $\mu$ lをウェルに添加した。

## 【 0 3 3 7 】

37 での1時間、静置した後、抗体溶液を除き、そしてウェルを、1%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝液500  $\mu$ lにより3度、洗浄した。ホースラディッシュペルオキシダーゼ - ラベルされたラット抗 - マウス免疫グロブリン抗体を、1%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝液により500倍に希釈し、そしてその250  $\mu$ lをウェルに添加した。37 での1時

10

20

30

40

50

間、静置した後、抗体溶液を除き、そして1%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝液500 $\mu$ lにより3度、洗浄した。250 $\mu$ lのDAB(ジアミノベンジジン)溶液(10倍のDAB濃縮物が安定したペルオキシダーゼ緩衝液により希釈されている)を、ウェルに添加し、そして室温で10分間、静置した。DABを吸引した後、500 $\mu$ lのリン酸緩衝液を添加した。20倍の対物レンズを用いて、6種の視聴フィールドにおける褐色の陽性細胞の数を計数した。

【0338】

標準の20倍の対物レンズの半径: 0.5mm

1つの観察フィールドにおける面積:  $7.853 \times 10^{-3} \text{cm}^2$

ウェルの面積:  $2 \text{cm}^2$

ウェルの観察フィールド:  $2 \text{cm}^2 / 7.853 \times 10^{-3} \text{cm}^2 = 254.7$  観察フィールド

$(32/6) \times 254.7 / (0.55 \times 10^{-5}) = 2.5 \times 10^8$  ifu (感染単位)/ml。

10

【0339】

例3. アルカリホスファターゼ染色:

多能性幹細胞の特徴であるアルカリホスファターゼ活性を確かめるための染色を、次の態様で実施した。培養培地の除去の後、10%ホルマリン中性緩衝液をウェルに添加し、そして細胞を室温で5分間、固定した。リン酸緩衝液等による洗浄の後、アルカリホスファターゼの発色性基質、すなわち1段階NBT/BCIP(Pierceにより製造される)を添加し、そして室温で20~30分間、反応せしめた。アルカリホスファターゼ活性を有する細胞はすべて、青紫色に染色された。

【0340】

例4. 定量的PCRによるコロニーの遺伝子発現の決定:

ALP-陽性コロニーを包含する個々のコロニーにおける標的遺伝子の発現を、次の態様での定量的PCRを用いて決定した。多能性又は多分化能性幹細胞の誘発により進行したコロニーを収穫し、そしてRNAを、FFPEについてのRecoverall全核酸単離キット(Ambionにより製造される)を用いて抽出した。その抽出されたRNAからcDNAを合成した後、標的遺伝子を、Taqman Preamp mastermix (Applied Biosystemsにより製造される)を用いて増幅した。

20

【0341】

定量的PCRのためのプライマーとして、Taqman遺伝子exprESsionアッセイ (Applied Biosystemsにより製造される)を使用した。次のものは、標的遺伝子の名称及び個々のプライマーの製品コードを示す。ヒトHprt: Hs9999909\_ml、ヒトNanog: Hs02387400\_gl、ヒトTert: Hs00162669\_ml、マウスHprt: Mm01545399\_ml、マウスNanog: Ma02019550\_sl。

30

定量的PCRのための正の対照として、次の態様により確立された間葉幹細胞から抽出されたcDNAを使用した。

【0342】

ヒト骨髄由来の単核細胞(hBMMNCs(Lonzaにより製造される)、Lot 060175 A: 女性、21歳、黒人)の1つのバイアル( $2.5 \times 10^7$ 個の細胞)を、37 $^{\circ}$ の水浴において融解し、そして10mlのMSCGM培地(間葉細胞のための増殖培地)(Lonzaにより製造される)10mlに懸濁した。凍結溶液におけるDMSOを除去するために、これを300g及び4 $^{\circ}$ で7分間、遠心分離し、そして上清液を除去した。

40

【0343】

このようにして得られた細胞塊状物を10mlのMSCGM培地に再懸濁し、そして100mmのプレート上に $10^5$ 個の細胞/ $\text{cm}^2$ の密度でプレートし、そして37 $^{\circ}$ で培養した。7日後、培地を交換した。この時点で、古い培地における懸濁された細胞を、300g及び4 $^{\circ}$ での5分間の遠心分離により集め、そして新鮮な培地と共に細胞に戻した。13日目、付着細胞が集密性になる場合、上清液を除去し、非付着性細胞をリン酸緩衝液により洗浄し、そして付着細胞を、0.05%トリプシン-EDTA溶液により分離し、そして3000個の細胞/ $\text{cm}^2$ の密度でプレートした。RNAを、三次サブカルチャーの細胞から集め、そしてcDNAを合成した。

【0344】

例5. 生後ヒト成人骨髄細胞に存在する末分化幹細胞からのヒト多能性幹細胞の誘発:

50

生後ヒト成人骨髄組織に存在する未分化幹細胞を含むヒト成人骨髄由来の細胞（商品名：ヒト骨髄 - 由来の単核細胞）から、細胞を低血清（2%）及び高血清（10%）培養条件下で確立し、そして多能性幹細胞を誘発するための実験に使用した。従って、凍結された骨髄由来の単核細胞（hBMMNCs（Lonzaにより製造される）、Lot 060809B：女性、20歳、白人/及びhBMMNCs（Lonzaにより製造される）、Lot 060470B：女性、20歳、黒人）の1つのバイアル（ $2.5 \times 10^7$ 個の細胞）をそれぞれ、37℃の水溶において融解し、そして低血清培養への使用のために、10mlのMAPC培地に懸濁した。凍結溶液におけるDMSOを除去するために、これを300g及び4℃で7分間、遠心分離し、そして上清液を除去した。

【0345】

このようにして得られた細胞塊状物を再懸濁し、そして10ng/mlのフィブロネクチンにより被覆された100mmのプレート上に $10^5$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度でプレートした。成長因子[10 ng/ml PDGF-BB（Peprtechにより製造される）、10 ng/ml EGF（Peprtechにより製造される）、10 ng/ml IGF-II（Peprtechにより製造される）]を添加した。3日後、成長因子のみを添加した。7日後、懸濁された細胞及び培地を集め（但し、付着細胞を除く）、そして300g及び4℃で5分間、遠心分離した。

【0346】

上清液を除いた後、細胞を新鮮な培地に再懸濁した。その細胞懸濁液を、元の10cm皿に戻し、そして成長因子をそれに添加した。10日目、付着細胞が集密性になる場合、上清液を除き、非付着性細胞を、リン酸緩衝液により洗浄し、そして付着細胞を、0.05%トリプシン - EDTA溶液による分離により集め、そして細胞バンカー（Juji Fieldにより製造される）を用いて、一次培養物を凍結貯蔵した。

【0347】

同じロットのヒト骨髄由来の単核細胞を用いて、細胞を、高血清条件下で10%FBSを含むMSCGM培地（Lonzaにより製造される）により確立した。ヒト骨髄由来の単核細胞を、10 mlのMSCGM培地に添加されている100mmプレートに、 $10^5$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度でプレートし、そして37℃で培養した。7日後、懸濁された細胞及び培地を集め（但し、付着細胞を除く）、そして300g及び4℃で5分間、遠心分離し、そして上清液を除去した後、細胞を新鮮な培地に再懸濁した。細胞懸濁液を元の10cm皿に戻し、そして培養を続けた。13日目、付着細胞が集密性になる場合、上清液を除き、非付着性細胞を、リン酸緩衝液により洗浄した。付着細胞を、0.05%トリプシン - EDTA溶液による分離により集め、そして細胞バンカー（Juji Fieldにより製造される）を用いて、一次培養物を凍結貯蔵した。

【0348】

高血清及び低血清条件下で確立され、そして凍結貯蔵されている、ヒト骨髄由来の一次培養の1つのバイアルをそれぞれ、37℃のインキュベーターにおいて融解した。その確立のために使用される培地2mlを、それぞれ細胞に添加し、そして細胞を、6 - ウェルプラスチック培養皿上に $10^4$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度でプレートし（ここで、それらのウェルは、 $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度でマトリゲル（BD Bioscienceにより製造された）により被覆されている）、そして14時間、培養した。（二次サブカルチャー細胞）14時間後、培地を除去し、そしてウェル当たりハンス溶液500  $\mu\text{l}$ 中、10のm.o.i.に等しい量で例2において調製されたmCAT1アデノウイルスベクターを添加し、そして室温で30分間、感染した。

【0349】

確立のために使用される培地それぞれ2mlを、個々のウェルに添加し、そして37℃で培養した。mCAT-1アデノウイルスベクターの導入の48時間後、個々のウェルの培地を、例1において調製された4種の遺伝子（Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc）のレトロウイルスベクター溶液（4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度でのポリブレンが添加されている）2mlにより交換し、そして37℃で14時間、培養した。ウイルス上清液を除き、そしてMEF - ならしES培地により交換した。次に、MEF - ならしES培地による培地交換を、2日ごとに続けた。4種の遺伝子導入の14日後の試験に基づいて、1つの典型的なコロニーが、誘発された多能性幹細胞の特徴を示すロット060809Bの低血清条件グループにおいて見出された。前記コロニーは、周囲の細胞よりも著しく小さな細胞から構成された。多能性幹細胞 - 様コロニーの他に、

10

20

30

40

50

多くのコロニーが、低血清グループ及び高血清グループの両者において観察されたが、しかしそれらはアルカリホスファターゼにより染色されなかった。

【0350】

多能性幹細胞 - 様コロニーを単離するために、ウェルをハンクス溶液により洗浄し、そして次にコロニーを、シリコングリースが適用されている底にクローニング環 (Iwakiにより製造される) により囲んだ。100 µl の Detachment Medium For Primate ES Cells (ReproCELLにより製造される) を環に添加し、そして37 °C で10~20分間、培養した。分離されたコロニーを含む環における細胞懸濁液を、2ml の MEF - ならしES培地に添加し、そしてMEF - 被覆された24ウェルプレートの1つのウェル上にプレートした。37 °C での8~14時間の培養の後、培地を交換し、そして続いて、培地交換を2日ごとに続け、そして8日後、二次サブカルチャーを行った。

10

【0351】

培地を除き、ハンクス溶液により洗浄し、Detachment Medium For Primate ES Cells (ReproCELLにより製造される) を添加し、37 °C で10分間、培養し、そして2ml の培地を添加し、反応を停止した。細胞懸濁液を、遠心分離管に移し、そして4 °C 及び200gで5分間、遠心分離し、上清液を除去した。細胞を、MEF - ならしES培地に再懸濁し、そしてMEF - 被覆された24ウェルプレートの4ウェルにプレートした。培地交換を2日ごとに続け、そして二次サブカルチャーの7日後、細胞をアルカリホスファターゼ染色にゆだね、そしてクローン化されたコロニー由来の細胞を青紫色に染色した。

【0352】

さらに、定量的PCRにより、Nanog及びTertがアルカリホスファターゼ活性 - 陽性多能性幹細胞のコロニーにより発現されたことが確認された。例4において確立された間葉幹細胞と比較して、Nanogの発現された量は、30倍ほど高かった。Tertの発現は前記多能性幹細胞においてのみ示され、そして間葉幹細胞においては示されなかった。図2は、4種の遺伝子の導入後、ヒト成人骨髄由来の細胞におけるNanog及びTert遺伝子の相対的発現を示す。Oct3/4、Sox2、Klf4 及びc-Mycを、低血清条件下で、ヒト成人骨髄に由来する単核細胞から確立された細胞中に導入した。RNAを、得られるコロニーから抽出し、そしてヒトNanog及びヒトTert遺伝子の発現が、定量的PCRにより示された。

20

【0353】

4種の遺伝子が導入されていない、線維芽細胞及び間葉幹細胞を、実験において対照として使用した。遺伝子発現の量を、発現の量がヒトヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子の発現の量により、及び新生皮膚線維芽細胞から誘発されたアルカリホスファターゼ (ALP) - 陽性コロニーにおけるHPRT遺伝子発現の量の1つとして設定することにより、標準化された。Nanog及びTertの発現が、4種の遺伝子 (Oct3/4、Sox2、Klf4 及び c-Myc) が導入され、そしてALPに対して陽性であるコロニーにおいて有意に高いことが確認された。図2に示されるように、Nanog及びTertは、4種の遺伝子の導入にかかわらず、コロニーを形成しなかった細胞においては発現されなかった。

30

【0354】

前述から、ヒト成人骨髄由来の細胞が使用される場合、多能性幹細胞は、低血清培養グループから得られたが、しかし高血清グループからはすべてを得られなかった (Lot 060809B 及び Lot 060470B) (表2)。また、低血清条件下での培養は、未分化細胞の維持のために適切であった。

40

【0355】

例6 . ヒト新生児皮膚に存在する未分化幹細胞からのヒト多能性幹細胞の誘発 :

ヒト新生児組織、すなわち出生直後のヒト組織に由来する細胞 (商品名 : 新生児正常ヒト皮膚線維芽細胞、一次培養物) を用いて、ヒト新生児の皮膚に存在する未分化幹細胞からのヒト多能性幹細胞の誘発が試みられた。

【0356】

凍結された新生児正常ヒト皮膚線維芽細胞 (一次培養物、Lonzaにより製造される、Lot 5F0438) の1つのバイアルを、37 °C のインキュベーターにおいて融解し、そして2%ウ

50

シ胎児血清、5 µg/mlのインスリン、50 µg/mlのゲンタマイシン、50ng/mlのアンホテリシン - B (FBM培地、Lonzaにより製造される) を含むMCDB202変性培地に懸濁し、12mlの細胞懸濁液を得た。2mlの個々の細胞懸濁液を、20 µg/cm<sup>2</sup>の濃度で、その底がマトリゲル (BD Biosciences) により被覆されている6ウェルプラスチック培養皿上にプレートした (二次サブカルチャー細胞)。

#### 【0357】

14時間後、培地を除き、そしてウェル当たり500mlのハンクス溶液中、5のm.o.i.に等しい量での例2において調製されたmCAT1アデノウィルスベクターを添加し、そして室温で30分間、感染した。個々のウェルに、2mlのFBM培地を、それぞれ添加し、そして37 で培養した。mCAT-1アデノウィルスベクターの導入の48時間後、個々のウェルの培地を例1

10

#### 【0358】

ウイルス上清液を除き、そしてMEF - ならしES培地により交換した。次に、MEF - ならしES培地による培地交換を2日ごとに続け、そして4種の遺伝子の導入の14日後、6 - ウェルプレートの1つのウェルを、アルカリホスファターゼ染色にゆだねた。結果として、6個の多能性幹細胞 - 様アルカリホスファターゼ - 陽性コロニーを得た。アルカリホスファターゼ - 陽性コロニーは、新生児正常ヒト皮膚線維芽細胞よりも著しく小さな細胞から構成された。

20

#### 【0359】

続いて、定量的PCRにより、Nanog及びTertがアルカリホスファターゼ活性 - 陽性多能性幹細胞のコロニーにより発現されたことが確認された。図3は、4種の遺伝子の導入に続いて、新生児線維芽細胞においてNanog及びTert遺伝子の相対的発現を示す。Oct3/4、Sox2、Klf4 及びc-Mycを、新生児皮膚由来の一次培養線維芽細胞中に導入し；RNAを得られたコロニーから抽出し；そしてヒトNanog及びヒトTert遺伝子の発現される量を、定量的PCRにより決定した。4種の遺伝子が導入されていない、親線維芽細胞及び間葉幹細胞を、実験において対照として使用した。遺伝子発現を、図2に概略されるのと同じ方法を用いて標準化した。

#### 【0360】

Nanog及びTertの発現が、4種の遺伝子が導入され、そしてALPに対して陽性であるコロニーにおいて有意に高かったことが確認された。図3に示されるように、例5における高血清 (10%) 培養条件下で確立された間葉幹細胞に比較される場合、4種の遺伝子の導入の前新生児正常ヒト皮膚線維芽細胞はNanogを発現せず、ところが、4種の遺伝子の導入の後の細胞の場合、コロニーを形成しない細胞においては9倍ほど、及びアルカリホスファターゼ活性 - 陽性コロニーにおいては18倍ほどのNanogの発現が観察された (図3)。他方では、Tertの発現はアルカリホスファターゼ活性 - 陽性コロニーにおいてのみ示された。これから、多能性幹細胞は、アルカリホスファターゼ活性及びNanog - 陽性及びTert - 陽性の特徴により定義され得る。また、新生児正常ヒト皮膚線維芽細胞は多能性幹細胞を誘発する比較的高い効率を有し、そして4種の遺伝子の導入によりNanogを発現できる

30

40

#### 【0361】

多能性幹細胞のコロニーを、次の態様で単離した。遺伝子導入の17日後、特徴的形状を有する6つのコロニーを、残るウェルから選択した。ハンクス溶液によりウェルを洗浄した後、コロニーを、クローニング環 (Iwakiにより製造されている) (その底は、シリコングリースが適用されている) により囲んだ。100 µlのDetachment Medium For Primate ES Cells (ReproCELLにより製造される) を、前記環に添加し、そして37 で20分間、培養した。分離されたコロニーを含む環における細胞緩衝液を、2mlのMEF - ならしES培地に添加し、そしてMEF - 被覆された24ウェルプレートの1つのウェルにプレートした。37 で14時間の培養の後、培地を交換し、そして続いて、培地交換を2日ごとに続け、そして

50

8日後、二次サブカルチャーを行った。培地を除き、細胞をハンクス溶液により洗浄し、Detachment Medium For Primate ES Cellsを添加し、そして37℃で10分間、培養し、そして2mlの培地を添加し、反応を停止した。

【0362】

細胞懸濁液を、遠心分離管に移し、そして4℃及び200gで5分間、遠心分離し、そして上清液を除いた。細胞をMEF-ならしES培地に再懸濁し、そしてMEF-被覆された24ウェルプレートの4個のウェル上にプレートした。下記サブカルチャー方法での二次サブカルチャーの7日後、細胞を、 $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度で、その底がマトリゲルにより被覆されている60mmのプラスチック培養皿上にプレートした。さらに8日後(4種の遺伝子の導入の37日後)、三次サブカルチャーを行い、そして2つのマトリゲル-被覆された60mmのプラスチック培養皿上にプレートし、そしてその一部をアルカリホスファターゼ染色及びRNA抽出に使用した。その結果は、クローン化されたコロニーに由来する細胞が、アルカリホスファターゼ活性-陽性であり、そしてNanog及びTertを高率で発現することを確認し、それにより、それらが多能性幹細胞であることを保証する。

10

【0363】

誘発された多能性幹細胞を、維持及び増殖のために5~7日ごとにサブカルチャーした。サブカルチャーが行われるプラスチック培養皿から、培地を除き、細胞をハンクス溶液により洗浄し、ジスパーゼ又はDetachment Medium For Primate ES Cellsを添加し、そして37℃で5~10分間、培養した。半分以上のコロニーを分離した場合、ES培地を添加し、反応を停止し、そして細胞懸濁液を遠心分離管に移した。コロニーが管の底上に沈殿した場合、上清液を除去し、そしてES培地を懸濁のために再び添加した。コロニーサイズを試験した後、いずれかの非常に大きなコロニーを、ゆっくりピペットで取ることにより、適切なサイズに分けた。おおよそにサイズ分けされたコロニーを、サブカルチャーの前よりも約3~6倍大きな基本的面積を有する、マトリゲル被覆されたプラスチック培養皿上にプレートした。

20

【0364】

表2に示されるように、上記ロット5F0438以外のロット5F0474における新生児正常ヒト皮膚線維芽細胞が、多能性幹細胞の好ましい誘発を示した。例5への比較から、若い個人に由来する細胞又は培養時間が短い細胞が多能性幹細胞の誘発のために適切であると思われる。

30

【0365】

上記結果から、未分化細胞を含むヒト生後組織であるヒト新生児組織に由来する細胞が2%血清を含む培養培地において二次サブカルチャーにゆだねられ、多能性幹細胞を誘発することが可能であった。

【0366】

例7. ヒト成人皮膚に存在する未分化幹細胞からのヒト多能性幹細胞の誘発:

次に、ヒト成人皮膚に存在する未分化幹細胞を含むヒト成人組織由来の細胞(商品名: Adult Normal Human Skin Fibroblasts、一次培養物)を用いて、本発明の多能性幹細胞の誘発を行った。

【0367】

凍結された成人正常ヒト皮膚線維芽細胞(一次培養物、Lonzaにより製造される、ロット6F3535:28歳、女性、白人、ロット6F4026:39歳、女性、白人)の1つのバイアルをそれぞれ、37℃のインキュベーターにおいて融解し、FBM培地に懸濁し、そして12mlの細胞懸濁液を、それぞれ得た。細胞懸濁液それぞれ2mlを、その底がマトリゲルに被覆されている6-ウェルプラスチック培養皿上に、 $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度でプレートした(二次サブカルチャー細胞)。

40

【0368】

14時間後、培地を除き、そしてウェル当たり500 $\mu\text{l}$ のハンクス溶液中、5のm.o.i.に等しい量での例2において調製されたmCAT1アデノウイルスベクターを添加し、そして室温で30分間、感染せしめた。個々のウェルに、2mlのFBM培地を添加し、そして37℃で培養し

50

た。mCAT-1アデノウィルスベクターの導入の48時間後、個々のウェルの培地を、例1において調製された4種の遺伝子(Oct3/4, Sox2, Klf4 及びc-Myc)のレトロウィルスベクター溶液(4 $\mu$ g/mlの最終濃度でのポリブレンが添加されている)2mlにより交換し、そして37 $^{\circ}$ Cで4時間、培養した。ウィルス上清液を除き、そしてMEF-ならしES培地により交換した。次にMEF-ならしES培地による培地交換を、2日ごとに続け、そして4種の遺伝子の導入の13日後、アルカリホスファターゼ染色を行った。結果として、ウェル当たり2つの多能性幹細胞-様アルカリホスファターゼ-陽性コロニーが、ロット6F3535から得られ、ところがアルカリホスファターゼ-陽性コロニーはロット6F4242から得られなかった(表2)。

【0369】

例6への比較から、皮膚線維芽細胞間の新生児由来の細胞は、多能性幹細胞誘発の高い効率を有した。また、成人正常ヒト皮膚線維芽細胞間で、若いドナー由来の細胞は、より高い形質転換効率を有した。前述から、多能性幹細胞の誘発の効率が年齢-依存性態様で低下することが示された。

【0370】

例8. 三次サブカルチャーの新生児正常ヒト皮膚線維芽細胞を用いての試験:

凍結された新生児正常ヒト皮膚線維芽細胞(一次培養物、Lonzaにより製造される、ロット5F0439)の1つのバイアルを、37 $^{\circ}$ Cのインキュベーターにおいて融解し、FBM培地に懸濁し、そして2つの100mmプラスチックの培養皿上にプレートした(二次サブカルチャー)。70~90%の集密性が得られるまで、6日間、培養した後、細胞を、0.025%トリプシン-EDTA溶液(Lonzaにより製造される)を用いて分離し、4 $\times$ 及び200gで5分間、遠心分離し、そして上清液を除去した。集められた二次サブカルチャーされた細胞を、細胞バンカーを用いて凍結貯蔵した。

【0371】

凍結された二次サブカルチャー細胞を、37 $^{\circ}$ Cのインキュベーターにおいて融解し、12mlのFBM培地に懸濁し、4 $\times$ 及び200gで5分間、遠心分離し、そして上清液を除去した。細胞を懸濁し、そしてその底が20 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>の濃度でマトリゲルにより被覆された100mmのプラスチックの培養皿上に10<sup>4</sup>個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度でプレートした(三次サブカルチャー)。14時間後、培地を除去し、そして2mlのハンクス溶液中、5のm.o.i.に等しい量での例2において調製されたmCAT1アデノウィルスベクターを添加し、そして室温で30分間、感染せしめた。個々のウェルに、10mlのFBM培地を添加し、そして37 $^{\circ}$ Cで培養した。

【0372】

mCAT-1アデノウィルスベクターの導入の48時間後、培地を除き、そして例1において調製された4種の遺伝子(Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc)のレトロウィルスベクター溶液(4 $\mu$ g/mlの最終濃度でのポリブレンが添加された)10mlにより交換し、そして37 $^{\circ}$ Cで4時間、培養した。ウィルス上清液を除き、そしてMEF-ならしES培地により交換した。次にMEF-ならしES培地による培地交換を2日ごとに続け、そして4種の遺伝子の導入の14日後、アルカリホスファターゼ染色を行った。結果として5種の多能性幹細胞-様アルカリホスファターゼ-陽性コロニーを得た。底の面積に基づいて計算することにより、これは、6ウェルプレートのウェル当たり0.83コロニーが得られたことを示す(表2)。

【0373】

例6への比較から、多能性幹細胞の誘発の効率が延長された培養期間と共に低下することが示された。

【0374】

例9. 臍帯に存在する未分化幹細胞からのヒト多能性幹細胞の誘発(1):

ヒト臍帯、すなわち誕生直後のヒト組織由来の細胞(商品名:正常ヒト臍帯静脈内皮細胞、一次培養物)を用いて、臍帯に存在する未分化幹細胞からの本発明のヒト多能性幹細胞の誘発が試みられた。

【0375】

凍結された正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(一次培養物、Lonzaにより製造される)の1つ

10

20

30

40

50

のバイアルを、37 のインキュベーターにおいて融解し、そしてLonzaにより製造される内皮細胞培地キット - 2 ( 2 % 血清 ) ( この後、EBM - 2 として言及される ) に懸濁し、12mlの細胞懸濁液を得た。約 $10^5$ 個の細胞/2ml/ウェルでの個々の細胞懸濁液を、その底が $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度でマトリゲルにより被覆されている、6 - ウェルプラスチック培養皿にプレートした ( 二次サブカルチャー ) 。6時間後、培地を除き、そして、ウェル当たり500  $\mu\text{l}$ のハンクス溶液中、5のm.o.i.に等しい量での例2において調製されたmCAT1アデノウイルスベクターを添加し、そして室温で30分間、感染せしめた。

【 0 3 7 6 】

それぞれ2.5mlのEBM-2培地を個々のウェルに添加し、そして37 で培養した。mCAT-1アデノウイルスベクターの導入の48時間後、個々のウェルの培地を、例1において調製された4種の遺伝子 ( Oct3/4、Sox2、Klf4 及び c-Myc ) のレトロウイルスベクター溶液 ( 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度でのポリブレンが添加されている ) それぞれ2mlにより交換し、そして37 で4時間、培養した。ウイルス上清液を除去し、そしてMEF - ならしES培地により交換した。次に、MEF - ならしES培地による培地交換を2日ごとに続けた。4種の遺伝子の導入の12日後、コロニーが確認された。

10

【 0 3 7 7 】

4種の遺伝子の導入の13日後、誘発されたコロニーを、アルカリホスファターゼ活性により染色した。

上記結果から、未分化細胞を含む、誕生の直後のヒト組織であるヒト臍帯に由来する細胞が2%血清を含む培養培地における二次サブカルチャーにゆだねられる場合、多能性幹細胞を誘発することが可能であった。

20

【 0 3 7 8 】

例10 . 臍帯に存在する未分化幹細胞からのヒト多能性幹細胞の誘発 ( 2 ) :

下記のようにして、ヒト臍帯、すなわち誕生直後のヒト組織由来の細胞 ( 商品名 : 正常ヒト臍帯動脈平滑筋細胞、三次サブカルチャー ) を用いて、臍帯に存在する未分化幹細胞からの本発明のヒト多能性幹細胞の誘発が試みられた。

【 0 3 7 9 】

凍結された正常ヒト臍帯動脈平滑筋細胞 ( 三次培養物、Lonzaにより製造される ) の1つのバイアルを、37 のインキュベーターにおいて融解し、そしてLonzaにより製造される平滑筋細胞培地キット - 2 ( 5 % 血清 ) ( この後、SmGM - 2 として言及される ) に懸濁し、12mlの細胞懸濁液を得た。約 $10^5$ 個の細胞/2ml/ウェルでの個々の細胞懸濁液を、その底が $20\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度でマトリゲル ( Becton Dickinsonにより製造される ) により被覆されている、6 - ウェルプラスチック培養皿 ( Becton Dickinsonにより製造される ) にプレートした ( 四次サブカルチャー ) 。1日後、培地を除き、そして、ウェル当たり500  $\mu\text{l}$ のハンクス溶液中、1.25 ~ 5のm.o.i.に等しい量でのmCAT1アデノウイルスベクターを添加し、そして室温で30分間、感染せしめた。それぞれ2.5mlのSmGM-2培地を個々のウェルに添加し、そして37 で培養した。

30

【 0 3 8 0 】

mCAT-1アデノウイルスベクターの導入の48時間後、個々のウェルの培地を、例1において調製された4種の遺伝子 ( Oct3/4、Sox2、Klf4 及び c-Myc ) のレトロウイルスベクター溶液 ( 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ の最終濃度でのポリブレンが添加されている ) それぞれ2mlにより交換し、そして37 で4時間、培養した。ウイルス上清液を除去し、そしてMEF - ならしES培地により交換した。次に、MEF - ならしES培地による培地交換を2日ごとに続けた。4種の遺伝子の導入の13日後、コロニーが確認された。しかしながら、誘発されたコロニーは、アルカリホスファターゼ活性により染色されなかった。

40

【 0 3 8 1 】

上記結果から、誕生の直後、ヒト組織であるヒト臍帯に由来する細胞は、臍帯に存在する未分化細胞を含むが、細胞が5%血清を含む培養培地における四次サブカルチャーにゆだねられる場合、多能性幹細胞の誘発がより興味あるものであることが示された。

【 0 3 8 2 】

50

例11. マウス生後組織に存在する未分化幹細胞からのマウス多能性幹細胞の誘発：

マウス骨髄由来の細胞、すなわちマウス生後組織を用いて、マウス生後組織に存在する未分化幹細胞からの本発明の多能性幹細胞の誘発を試みた。

【0383】

大腿骨及び頸骨を、生後4～6週のマウス(c57BL/6N系統、生後4週、雌)から、いずれの他の組織を伴わないで注意して抽出した。集められた骨を70%エタノールに短時間ソーキングすることにより、骨の外側に係合した細胞を殺して骨髄以外の細胞の汚染を防止した。エタノール処理の後、骨を、Iscove's Modified Dulbecco's Medium(IMDM)(SIGMA)にすぐに移し、骨髄の内部の細胞の効果を妨げた。個々の骨の外側をKimwipeによりぬぐい、結合組織を除去した。すべての処理された骨を、IMDMを含む乳鉢に移し、そして乳棒により押しつぶした。IMDMにより数日、洗浄した後、骨をハサミにより断片に切断した。IMDMによる数回のさらなる洗浄の後、骨断片を遠心分離管に移した。

10

【0384】

IMDMの除去の後、5匹のマウスの骨断片当たり0.2%コラゲナーゼI(SIGMAにより製造される)を含むIMDM10mlを添加し、そして37℃で1時間、振盪した。振盪の後、その懸濁液をPipetmanを用いて数度、攪拌し、そして次に、上清液をもう1つの管に移し、これに、等量の冷10%FBS含有IMDMを添加し、酵素反応を停止した。酵素処理の後、骨断片を、冷10%FBS含有IMDMを含む乳鉢に移し、そして乳棒により再び押しつぶし、そして数回の攪拌の後、上清液を集めた。このようにして集められた細胞懸濁液を、直径70μm及び40μmのナイロンメッシュに連続的に通すことにより濾過した。細胞懸濁液を4℃及び600g

20

【0385】

マウス深部骨髄に由来する細胞を、MAPC培地に懸濁し、そして $10^5$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度でプレートした。細胞プレートに関して、10ng/mlのフィブロネクチン(Becton Dickinson)を含むリン酸緩衝液により前もって被覆された皿を使用した。培地に、成長因子[10ng/ml PDGF-BB(Peprotechにより製造される)、10ng/ml EGF(Peprotechにより製造される)、1000単位/ml LIF(Chemiconにより製造される)]を、使用の時点で単に添加した。プレート化の3日後、成長因子を、培地を交換しないで添加した。6日後、非付着性細胞をリン酸緩衝液により洗浄し、そして付着細胞を、0.05%トリプシン-EDTA溶液(Invitrogenにより製造される)により分離して集め、そして細胞バンカー(Juji Fieldにより製造される)を用いて細胞を一次培養物のように、凍結貯蔵した。

30

【0386】

凍結貯蔵された一次培養細胞を、37℃の水浴において融解し、そして2%FBSを含む培地であるMAPC培地10mlに懸濁した。凍結溶液におけるDMSOを除去するために、それを4℃及び300gで7分間、遠心分離し、そして上清液を除去した。得られる細胞塊状物を再懸濁し、そして0.1%ゼラチン/リン酸緩衝液によりゼラチン被覆された底を有する12ウェルプラスチックプレート上に $2.5 \times 10^3$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度でプレートし、そしてそれぞれ2mlのMAPC培地を添加した(二次サブカルチャー)。

【0387】

8～14時間後、培地を除き、そして例1におけるようにして調製されたそれぞれの2mlの4種の遺伝子レトロウィルスベクター溶液をそれに添加し、そして37℃で4～14時間、培養した。次に、ウィルス溶液を除去し、そしてマウスES培地[0.3%の最終濃度のFBS(Invitrogenにより製造される)、1000単位/mlのLIF(Chemiconにより製造される)及び0.1mMの2-メルカプトエタノールが添加されているES培地]により交換した。次に、マウスES培地による培地交換を3日ごとに続け、そして4種の遺伝子の導入の5～7日後、前記多能性幹細胞は、マウスES細胞-様小細胞を含んで成るコロニーを形成した。誘発された多能性幹細胞のコロニーをアルカリホスファターゼ活性により青紫色に染色した。

40

【0388】

12ウェルプレートの残りのウェルから、マウス多能性幹細胞をサブカルチャーし、そしてサブカルチャーをゼラチン被覆された100mmプレートに続けた。7番目のサブカルチャー

50

一細胞から、RNAを、RNeasyミニキット（QIAGENにより製造される）を用いて抽出し、そしてcDNAを合成した。cDNAを用いて、定量化PCRを行い、Nanogの発現を確認した。

【0389】

7番目のサブカルチャーの Maus 多能性幹細胞を、 $3 \times 10^5$ 個の細胞/Mausで3匹の同系C57BL/6N Mausの背部に皮下移植し、そして38日後、形成される奇形腫を抽出した。奇形腫はすべての3匹の Maus において形成された。抽出された奇形腫から、スライスを調製し、そして3種の胚層への分化能力を、免疫学的染色及び組織学的染色（HE染色、アルシアンブルー染色）により分析した。結果として、外胚葉系としてのMAP2 - 陽性細胞（神経系）及びGFAP - 陽性細胞（神経系）、中胚葉系としての骨格筋細胞（筋細胞）及び軟骨組織、及び内胚葉系としての腸管組織が観察された。

10

【0390】

Maus 多能性幹細胞を維持し、そして増殖するために、それらを3～4日ごとにサブカルチャーした。培地を、サブカルチャーが行われるプラスチック培養皿から除去し、リン酸緩衝液により洗浄し、0.05%トリプシン - EDTA溶液を添加し、そして37℃で5分間、培養した。細胞が分離した場合、ES培地を添加し、反応を停止し、そして細胞懸濁液を遠心分離管に移した。200gでの5分間の遠心分離の後、上清液を除き、そして Maus ES培地に沈殿物を懸濁した後、細胞を $10^4$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度でゼラチン被覆されたプレートにプレートした。同じサブカルチャー方法により低血清下で培養された Maus 骨髄由来の細胞から誘発された多能性幹細胞を、長時間、培養した。

【0391】

上記のように、多能性幹細胞を、低血清条件下で確立された生後 Maus 骨髄由来の細胞から誘発した。

20

【0392】

例12. 3種の遺伝子の導入及びヒストンデアセチラーゼインヒビター処理による Maus 多能性幹細胞の誘発：

Maus 生後組織である Maus 骨髄由来の細胞を用いて、多能性幹細胞の誘発を、3種の遺伝子の導入及びヒストンデアセチラーゼインヒビター処理により実施した。

【0393】

例11に類似する態様で調製した後、凍結貯蔵された未分化幹細胞を含む Maus 骨髄由来の一次培養細胞を、0.1%、ゼラチン/リン酸緩衝液によりゼラチン被覆された底を有する24 - ウェルプラスチックプレート（Becton Dickinsonにより製造される）上へ $5 \times 10^3$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度でプレートし、そしてそれぞれ2mlのMAPC培地を添加した。

30

【0394】

8時間後、培地を除き、例1におけるようにして調製された、3種の遺伝子（ヒトOct3/4、Sox2及びKlf4）レトロウイルスベクター溶液それぞれ2mlを添加し、そしてさらに、1又は0.1µMの最終濃度でのMS - 275、すなわちヒストンデアセチラーゼインヒビターの添加の後、それらを37℃で14時間、培養した。次に、ウイルス溶液の除去の後、1又は0.1µMの最終濃度でのMS - 275、すなわちヒストンデアセチラーゼインヒビターを含むMAPC培地それぞれ2mlを添加した。3日後、培地を、 Maus ES培地 [0.3%の最終濃度のFBS（Invitrogenにより製造される）、1000単位/mlのLIF（Chemiconにより製造される）及び0.1mMの2 - メルカプトエタノールが使用の時点でES培地に添加された] により交換した。

40

【0395】

Maus ES培地による培地交換を、2～3日ごとに続けた。3種の遺伝子（ヒトOct3/4、Sox2及びKlf4）レトロウイルスベクターの導入の12日後、細胞を、24ウェルプラスチックプレートの個々のウイルスから、6ウェルプラスチックプレートの個々のウェルにサブカルチャーした。その一部をまた、24ウェルプラスチックプレートにおいて培養した。前記3種の遺伝子導入及びMS - 275処理の15日後、多能性幹細胞は、 Maus ES細胞 - 様小細胞から構成されるコロニーを形成した。前記多能性幹細胞のコロニーは、アルカリホスファターゼ活性により青紫色に染色された。

【0396】

50

次に、Nanog遺伝子の発現される量を、定量的PCRにより確認し、そしてアルカリホスファターゼ活性を有する多能性幹細胞のコロニー中のマウスNanogの発現を確認した(図4)。図4は、3種の遺伝子の導入及びヒストンデアセチラーゼ(HDAC)インヒビターによる処理に続くマウス成熟骨髄由来の細胞におけるNanog及びTert遺伝子の相対的発現を示す。3種の遺伝子(Oct3/4, Sox2及びKlf4)を、低血清条件下で確立されたマウス骨髄由来の細胞中に導入した。細胞をまた、MS-275(0.1又は1.0 $\mu$ M)、すなわちHDACインヒビターにより処理した。RNAを得られるコロニーから抽出し、そしてNanog発現の量を、定量的PCRにより決定した。3種の遺伝子が導入され、そしてヒストンデアセチラーゼインヒビターにより処理された細胞から、ALP-陽性細胞グループ(コロニー)が形成され、そしてそれらのコロニーにおけるNanogの発現がALP-陰性コロニーよりも有意に高いことが確認された。図においては、W1、W2、W3、W4、W5及びW6は、例12において使用される6ウェルプレートの個々のウェルの名称を表す。

【0397】

前記3種の遺伝子導入及びMS-275処理の18日後、多能性幹細胞を、6ウェルプレートの個々のウェルから、ゼラチン被覆された100mmプレートにサブカルチャーした。サブカルチャーを同様に続けた。

【0398】

3種の遺伝子導入及びMS-275処理の29日後、マウス多能性幹細胞を、 $2 \times 10^7$ 個の細胞/マウスで同系C57BL/6Nマウスの背部に皮下移植し、そして34日後、形成される奇形腫を抽出した。抽出された奇形腫から、スライスを調製し、そして3種の胚層への分化能力を、免疫学的染色及び組織学的染色(HE染色、アルシアンブルー染色)により分析した。結果として、外胚葉系としてのGFAP-陽性細胞(神経系)及びケラチン生成細胞(皮膚細胞)、中胚葉系としての平滑筋アクチン-陽性細胞(平滑筋細胞)、骨組織及び軟骨組織、及び内胚葉系としての腸管組織(MUC-1に対して陽性の内胚葉上皮)が観察された。

【0399】

例13. 3種の遺伝子の導入によるマウス多能性幹細胞の誘発:

次に、マウス生後組織であるマウス骨髄に由来する細胞を用いて、マウス多能性幹細胞の誘発を、3種の遺伝子の導入により実施した。

例11における調製の後、凍結貯蔵された未分化幹細胞を含むマウス骨髄由来の一次培養細胞を、0.1%ゼラチン/リン酸緩衝溶液によりゼラチン被覆された底を有する24ウェルプラスチックプレート(Becton Dickinsonにより製造される)上に $1 \times 10^4$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度でプレートし、そしてそれぞれ2mlのMAPC培地を添加した。

【0400】

2日後、培地を除き、例1におけるようにして調製された、3種の遺伝子(ヒトOct3/4、Sox2及びKlf4)レトロウィルスベクター溶液それぞれ2mlを添加し、そして37 $^{\circ}$ Cで1日の培養の後、そのウィルス溶液を除き、そしてそれぞれ2mlのMAPC培地を添加した。3日後、培地を、マウスES培地[0.3%の最終濃度のFBS(Invitrogenにより製造される)、1000単位/mlのLIF(Chemiconにより製造される)及び0.1mMの2-メルカプトエタノールが使用の時点でES培地に添加された]により交換した。次に、マウスES培地による培地交換を、2~3日ごとに続けた。3種の遺伝子(ヒトOct3/4、Sox2及びKlf4)レトロウィルスベクターの導入の11日後、細胞を、24ウェルプラスチックプレートの個々のウェルから、6ウェルプラスチックプレートの個々のウェルにサブカルチャーした。

【0401】

次に、マウスES培地による培地交換を、2~3日ごとに続けた。前記3種の遺伝子導入の19日後、多能性幹細胞は、マウスES細胞-様小細胞から構成されるコロニーを形成した。アルカリホスファターゼ活性を確認するために、培地を除き、そして次に、10%ホルマリン中性緩衝溶液をウェルに添加し、そして室温で5分間、固定した。リン酸緩衝液、等による洗浄の後、アルカリホスファターゼの発色性基質を含んで成る1段階NBT/BCIP溶液(Pierceにより製造される)を添加し、そして室温で20~30分間、反応せしめた。前記多能性幹細胞のコロニーを、アルカリホスファターゼ活性により青紫色に染色した。

10

20

30

40

50

【0402】

次に、Nanog遺伝子の発現される量を、定量的PCRにより確認し、そしてアルカリホスファターゼ活性を有する多能性幹細胞のコロニーの Maus Nanog の発現を確認した。

マウス生後組織であるマウス骨髄由来の細胞を用いて、多能性幹細胞の誘発が、3種の遺伝子の導入により行われた。

【0403】

例11において調製した後、凍結貯蔵された未分化肝細胞を含むマウス骨髄由来の一次培養細胞を、底が0.1%ゼラチン/リン酸緩衝溶液によりゼラチン被覆されている、6 - ウェルプラスチックプレート (Becton Dickinsonにより製造される) 上に、 $1 \times 10^4$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度でプレートし、そしてMAPC培地を2mlの部分で添加した。

10

【0404】

2日後、培地を除き、例1におけるようにして調製された3種の遺伝子 (ヒトOct3/4, Sox2及びKlf4) レトロウイルスベクター溶液を2mlの部分で添加し、そして37℃で1日間の培養の後、ウイルス溶液を除き、そしてMAPC培地を2mlの部分で添加した。3日後、培地を、マウスES培地 [0.3%の最終濃度のFBS (Invitrogenにより製造される)、1000単位/mlのLIF (Chemiconにより製造される) 及び0.1mMの2 -メルカプトエタノールが使用の時点でES培地に添加された] により交換した。マウスES培地による培地交換を2~3日ごとに続けた。3種の遺伝子 (ヒトOct3/4, Sox2及びKlf4) レトロウイルスベクターの導入の9日後、細胞を、6ウェルプラスチックプレートの個々のウェルから10cmプラスチック皿の個々のウェルにサブカルチャーした。

20

【0405】

マウスES培地による培地交換を、2~3日ごとに続けた。前記3種の遺伝子導入の7日後、多能性幹細胞は、マウスES細胞 - 様小細胞から構成されるコロニーを形成した。アルカリホスファターゼ活性を確認するために、培地を除き、そして次に、10%ホルマリン中性緩衝溶液をウェルに添加し、そして室温で5分間、固定した。リン酸緩衝液、等による洗浄の後、1段階NBT/BCIP溶液 (Pierceにより製造される)、アルカリホスファターゼの発色原基質を添加し、そして室温で20~30分間、反応せしめた。前記多能性幹細胞のコロニーを、アルカリホスファターゼ活性により青紫色に染色した。

【0406】

次に、Nanog遺伝子の発現される量を、定量的PCRにより確認し、そしてアルカリホスファターゼ活性を有する多能性幹細胞のコロニーの Maus Nanog の発現を確認した。

30

前記3種の遺伝子導入の49日後、マウス多能性幹細胞を、 $2 \times 10^7$ 個の細胞/マウスで同系C57BL/6Nマウスの背部上に皮下移植し、そして13及び17日後、形成される奇形腫を抽出した。スライスを抽出された奇形腫から調製し、そして3種の胚層への分化能を、免疫学的及び組織学的染色 (HE染色、アルシアンブルー染色) により分析した。結果として、外胚葉系としてのGFAP - 陽性細胞 (神経系) 及びケラチン生成細胞、中胚葉系としての平滑筋アクチン - 陽性細胞 (平滑筋細胞)、骨組織及び軟骨組織、及び内胚葉系としての腸管組織 (MUC - 1 に対して陽性の内胚葉上皮) が観察された。

【0407】

同様に、前記3種の遺伝子の導入の後、FACS Ariaにより、GFP及びSSEA - 1陽性に基づいて単一分類されたマウス多能性幹細胞を、 $2 \times 10^7$ 個の細胞/マウスで同系C57BL/6Nマウスの背部に皮下移植し、そして13及び14日後、形成される奇形腫を抽出した。スライスを抽出された奇形腫から調製し、そして3種胚層への分化能力を、免疫学的及び組織学的染色、(HE染色、アルシアンブルー染色) により分析した。結果として、外胚葉系としてGFAP、Nestin又はNeurofilament に対して陽性の細胞由来の神経管、及び中胚葉系としての軟骨組織、及び内胚葉系としての腸管組織 (MUC - 1 及び  $\alpha$  - フェトプロテイン に対して陽性の内胚葉上皮) が観察された。

40

【0408】

上記結果から、多能性幹細胞を、生後組織に存在する未分化幹細胞におけるOct3/4、Sox2及びKlf4の3種の遺伝子の個々の誘発された発現により得た。多能性幹細胞は、インビト

50

口での長期自己再生能力を示し、そして発現されたES細胞マーカー、Nanog発現及びアルカリホスファターゼ活性、及びすべての3種の胚層（外胚葉、中胚葉及び内胚葉）からの組織誘導体の分化能力を示した。

【0409】

例14. ヒト誘発された多能性幹細胞の長期拡張及び特徴づけ：

iPS-1-8と呼ばれる、例6において新生児ヒト皮膚線維芽細胞（ロット#5F0438）から生成されたヒト誘発された多能性幹（iPS）細胞系をさらに、例6に記載のようにして、クロニングシリンダー及び0.25%トリプシン - EDTAによりサブクローン化した。ヒトiPS-1-1、1-2、1-3、1-4、1-5、1-6、1-7、1-8及び1-9と呼ばれる9種のサブクローンを得た。ヒトiPS-1-8クローンと呼ばれる9種のサブクローンの1つを、マトリゲル（BD Bioscience） - 被覆された培養皿上で、0.1mMの2 -メルカプトエタノール及び10ng/mlのbFGFにより補充されたヒトES培地、又はmTeSR1定義の培地（Stem cell Technologies）において、MEFフィーダー細胞上で都合よく拡張した。

【0410】

培地を毎日、ヒトiPS - 1 - 8クローン培養のために交換し、そして通常、5 ~ 20  $\mu$ MのY - 27632（Calbiochem）により処理し、継代工程により誘発される細胞アポトーシスを回避した。培養を続けるための継代のために、ヒト誘発された多能性幹細胞をハンス溶液により洗浄し、0.25%トリプシン - EDTA（Gibco）において37 で3分間インキュベートし、そして次に、培養培地を添加し、トリプシン活性を停止した。ヒト誘発された多能性幹細胞を、300xg及び室温又は4 で5分間、遠心分離し、そして上清液を除去した。沈殿したヒト誘発された多能性幹細胞を、培養培地中に再懸濁した。多能性幹細胞を通常1 : 4 ~ 1 : 6の分割比を用いて新規培養皿中に分けた。ヒトiPS-1-8クローンを、ES細胞のための細胞凍結溶液を用いて、その製造業者のマニュアルに従って凍結した。

【0411】

ヒトiPS-1-8クローンは、マイトマイシン - C処理されたマウス胚線維芽細胞（MEF）上で培養される場合、小さく、丸型で且つコンパクトな細胞から成る一定の端を有する典型的なヒトES細胞コロニーとは形態学的に区別できなかった（図5）。図5は、ヒトiPSクローン1 - 8の特徴化を示す。その親線維芽細胞（ロット5F0438）の形態選択学がパネルaに示され；ネズミ胚線維細胞（MEF）フィーダー細胞上で培養されたヒトiPSクローン1-8細胞の形態学がパネルbに示され；mTeSR1培地におけるヒトiPSクローン1-8細胞の形態学がパネルcに示され；mTeSR1培地におけるクローン2-4細胞がパネルdに示され；そしてmTeSR1培地におけるクローン3-2細胞がパネルeに示される。クローン1-8の成長曲線がパネルf及びgに示される。矢印は、試験の日付を示す。四角は、細胞増殖速度を評価するために細胞数を計数するための期間を示す。パネルhは、101日でiPSクローン1 - 8由来の細胞の正常な核型を示す多色核型イメージである。

【0412】

ヒトiPS-1-8クローンは、mTeSR1培地において活性的に増殖した。mTeSR1培地において培養される細胞由来のヒト：iPS-1-8クローンは、ヒトiPS-1-8mTeSR細胞と呼ばれた。ヒトiPS-1-8クローンは、30回以上、継代され得、そして4種の因子の感染の後、半年以上、培養され得る（図5f,g）。ヒトiPS-1-8mTeSR細胞は、液体窒素において貯蔵され得、そして5 ~ 20  $\mu$ MのY-27632の存在下でmTeSR培地において再培養され得た。ヒトiPS-1-8mTeSR細胞の集団二倍化時間は、4種の因子の感染の後、123 ~ 143日に対応する、継代19 ~ 26間で分析される場合、約48.5時間であった。

【0413】

長期培養されたヒトiPS-1-8クローン（1-8mTeSR）の核型分析を、ギームザ染色及び多色 - FISH分析を用いて実施した。ヒトiPS細胞を、0.02  $\mu$ g/mlのコレセミドにより2時間、前処理し、続いて0.075MのKClと共に20分間インキュベートし、そして次に、Carnoy固定剤により固定した。多色 - FISH分析に関しては、細胞を、多色FISHプローブ（Cambio）によりハイブリダイズし、そしてDMRA2蛍光顕微鏡（Leica）下で分析した。ヒトiPS-1-8mTeSR細胞は、いずれかの染色体トランスロケーション又は欠失も伴わないで、mTeSR(68%)

下での長期培養の後、正常な核型(46XY)を主に維持した(図5h、表3)。

【0414】

アルカリホスファターゼ染色に関しては、細胞を10%ホルマリン中性緩衝溶液(Wako)により室温で5分間、固定し、PBSにより洗浄し、そしてアルカリホスファターゼ基質1段階NBT/BCIP(Pierce)と共に室温で20~30分間インキュベートした。アルカリホスファターゼ活性を有する細胞を、青紫色に染色した。免疫細胞化学に関しては、培養された細胞を10%ホルムアルデヒドにより10分間、固定し、そして0.1%ゼラチン/PBSにより室温で1時間、ブロックした。

【0415】

細胞を、SSEA-3(MC-631; Chemicon)、SSEA-4(MC813-70; Chemicon) TRA-1-60(abcam)、TRA-1-81(abcam)、CD9(M-L13; R&D systems)、CD24(ALB9; abcam)、CD90(5E10; BD bioscience)又はNanog(R&D systems)に対する一次抗体と共に、4で一晩インキュベートした。Nanog染色に関しては、細胞を、ブロッキングの前、0.1%Triton X-100/PBSにより透過した。細胞をPBSにより3度、洗浄し、そして次に、AlexaFluor 488-接合二次抗体(Molecular Probes)及びHoechst 33258と共に室温で1時間インキュベートした。さらなる洗浄の後、蛍光をAxiovert 200M顕微鏡(Carl Zeiss)により検出した。

10

【0416】

ヒトiPS-1-8mTeSR細胞は、アルカリホスファターゼ(この後、“ALP”として言及される)活性、及び炭水化物抗原SSEA-3及びSSEA-4、硫酸ケラチン抗体TRA-1-60及びTRA-1-8、及びタンパク質抗原CD9、CD24、Thy-1(CD90)染色に対して陽性であった(図6)。

20

【0417】

図6は、ヒトiPSクローン1-8における転写因子、細胞表面抗原及びALP活性の特徴づけを示す。ヒトiPS細胞(クローン1-8)を、Nanog(パネルa)、SSEA-3(パネルb)、SSEA-4(パネルc)、TRA-1-60(パネルd)、TRA-1-81(パネルe)、CD9(パネルf)、CD24(パネルg)、Thy-1(CD90とも呼ばれる)(パネルh)のために染色した。緑色蛍光染色は、ヒトiPSクローン1-8がそれらの表面抗原のすべてを発現することを示す。ALP染色は、iPSクローン1-8がALP陽性であることを示す。矢印は、緑色蛍光染色の領域を示す。

【0418】

全RNAを、RNeasy(Qiagen)を用いることにより、遺伝子トランスダクションの17日後に得られる、ヒトiPS-1-8クローン、その親線維芽細胞及び粗線維芽細胞から単離した。cDNAをSuperScript III(Invitrogen)により合成した。遺伝子発現を、Extaq(Takara)を用いて、PCRにより検出した。プライマーの配列は、表4に記載される。“エキソ”プライマー組は、外因性発現を選択的に検出し、そして“全”プライマー組は内因性発現を検出した。

30

【0419】

ヒトiPS-1-8クローンは、ヒトESマーカー遺伝子Nanog、TERT、Sal14、Zfp42、GDF3、Dnmt3b、TDGF1、GABRB3及びCYP26A1を、それらのマーカー遺伝子のいずれも発現しなかった親線維芽細胞を通して発現した(図7a)。粗線維芽細胞とは対照的に、ヒトiPS-1-8クローンは、4種の遺伝子Oct4、Sox2、Klf4及びc-Mycの誘発された発現をダウンレギュレートした(図7b)。図7は、ヒトiPSクローン1-8細胞の遺伝子発現のRT-PCR分析を示す。パネルaは、クローン1-8及びその親線維芽細胞(NeoFB)においてhESマーカー遺伝子発現のRT-PCR分析を示す。遺伝子は、CYP26A1(35サイクル)を除く30のサイクルで検出された。パネルbは、クローン1-8において4種のトランスジーンサイレンシングを示す。遺伝子トランスダクションの17日後に得られる粗線維芽細胞を、対照として使用した。“エキソ”プライマー組は、内因性及び外因性遺伝子発現の両者を検出した。

40

【0420】

マトリゲル上でのmTeSR1(1-8mTeSR)及びマトリゲル上でのMEF-ならし培地において培養されたヒトiPS細胞及びその親線維芽細胞(5F0438)を、全体的遺伝子発現について分析した。マイクロアレイ研究を、Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 遺伝子発現アレイ(Affymetrix, Santa Clara, CA)を用いて行った。GeneChip(商標) Human Genome U

50

133 Plus 2.0 アレイは、単一アレイに基づいて、転写されたヒトゲノムの包括的範囲を提供し、そして38,500の十分に特徴づけられたヒト遺伝子を包含する、47,000以上の転写体及び変異体の発現レベルを分析する。

【0421】

手短には、全RNAを、RNAeasy (Qiagen)により細胞から抽出した。ビオチン - ラベルされたcRNAを、Affymetrix技術的プロトコールに従って、1 µgの全RNAから逆転写した。15 µgのcRNAを断片化し、そしてAffymetrix U133 plus 2 GeneChipアレイに対して、45 で16時間ハイブリダイズし、そして次に、洗浄し、そしてAffymetrix Fluidics (Affymetrix)を用いて染色した。アッセイを、Affymetrix GCS3000スキャナーにおいて走査し、そして得られる像をGCOSソフトウェアを用いて分析した。この実験及びGEOからのデータを、GeneSpring 7.3.1.ソフトウェアにより調査した。

【0422】

拡散プロット分析に関しては、マトリゲル上でのmTeSR1 (1-8mTeSR)において培養された、ヒト誘発された多能性幹細胞クローン1-8及びその親線維芽細胞 (5F0438) を、クローン1-8及びGEO (GSM151741) からのデータであるH14hES系の両者について現在のフラッグコール ( $P < 0.04$ ) 又はマージナルフラッグコール ( $0.04 < P < 0.06$ ) による21,080組の遺伝子に基づいて分析し、比較目的のためにヒトES細胞の代表として使用した。図8は、ヒトiPSクローン1-8細胞の全体的遺伝子発現の分散プロット分析を示す。分散プロットは、mTeSR1において培養されたヒトiPSクローン1-8細胞とMEFによるH14 hES細胞との間 (公的なデータベースGEOからのGSM151741) (パネルa)、又はクローン1-8とその親線維芽細胞との間 (パネルb) の全体的遺伝子発現の比較を示す。ES細胞特異的遺伝子の記号は、両分散プロットにおいて線により示される。発現強度は、赤 (高) ~ 緑 (低) の比色順位で示された。矢印は、色の代表的領域を示す。

【0423】

クラスター分析に関しては、mTeSR1において培養されたクローン1-8 (1-8mTeSR)、MEF - ならし培地において培養されたクローン1-8 (1-8 CM)、及びその親線維芽細胞 (5F0438) についてのDNAマイクロアレイデータを、MEF上で培養されたSheff4系 (hES1: GSM194307、hES2: GSM194308、hES3: GSM194309)、マトリゲル上で培養されたSheff4系 (hES4: GSM194313、hES5: GSM194314)、MEF上で培養されたH14系 (hES6: GSM151739、hES7: GSM151741)、及び3種の線維芽細胞 (線維芽細胞1のためのGSM96262、線維芽細胞2のためのGSM96263及び線維芽細胞3のためのGSM96264) についてのDNAマイクロアレイデータと比較した。

【0424】

ヒトiPS系 (1-8、2-4及び3-2) 及びそれらの親線維芽細胞の全体的遺伝子発現プロフィールを、マイクロアレイ技法を用いて分析した。International Stem Cell Initiativeにより定義される遺伝子組を用いての階層クラスター分析 (表21を参照のこと) は、ヒトiPS系 (1-8、2-4、及び3-2) がヒトES細胞系によりクラスター化されたが、しかしそれらの親皮膚由来の細胞から分離されたことを示した (図9)。図9は、異なった細胞系の全体的遺伝子発現、及び全体的遺伝子発現分析に基づく遺伝子系統樹を示す。細胞は、International Stem Cell Initiativeにより同定された遺伝子組に基づいて遺伝子系統樹においてクラスター化された (表21を参照のこと)。

【0425】

サンプルを、mTeSRにおいて培養されたクローン1-8については“1-8mTeSR”；MEF - ならし培地において培養されたクローン1-8については“1-8CM”；凍結融解処理の後、mTeSRにおいて培養されたクローン1-8については“1-8mTeSR(f&t)”；MEF上で培養されたクローン1-8については“1-8MEF”；mTeSR培地において培養されたクローン2-4については“2-4mTeSR”；MEF上で培養されたクローン2-4については、“2-4MEF”；mTeSR培地において培養されたクローン3-2については、“3-2mTeSR”；親線維芽細胞については“5F0438”又は“5F0416”；MEF上で培養されたSheff4系については、“hES1,” “hES2,” “hES3” (それぞれGSM 194307、GSM 194308、GSM 194309)；マトリゲル上で培養されたSheff4系につ

いては、"hES4," 又は"hES5" (それぞれGSM 194313, GSM 194314); MEF上で培養されたH14系については" hES6," 又は "hES7" (GSM151739, GSM151741); GSM96262については“線維芽細胞1”; GSM96263については“線維芽細胞2”; 及びGSM96264については“線維芽細胞3”としてそれぞれ命名された。発現強度は、赤(高)~緑(低)の比色順位で示された。

#### 【0426】

ヒトES細胞系Sheff4とH14との間、及びヒトiPS細胞系1-8とヒトES細胞系H14との間のピアソン相関係数はそれぞれ0.675及び0.835であった(図9)。iPS系1-8、2-4及び3-2及びhES細胞系の全体的遺伝子発現プロフィール間での類似するピアソン相関係数が観察された。この分析は、ヒトiPS細胞系1-8が、ヒトES細胞系H14と類似する遺伝子発現パターンを有したことを示す。

10

#### 【0427】

ヒトiPS細胞系(クローン1-8)とヒトES細胞系H14との間の分散プロット分析は、ヒトES細胞マーカー遺伝子、Nanog、Oct3/4、TDGF1、Dnmt3b、GABRB3、GDF3、Zfp42、ALP、CD9及びThy-1がヒトiPS細胞系とヒトES細胞系H14との間に高い相関性を示した(図8a)ことを示唆する。対照的に、クローン1-8は、親新生児線維芽細胞とは異なった(図8b)。これは、Nanog-関連遺伝子を用いてクラスター分析により認識された。ヒトiPS細胞系1-8とヒトES細胞系H14との間、及びヒトiPS細胞系1-8とその親線維芽細胞との間のピアソン相関係数はそれぞれ、0.908及び0.100であった(図10)。図10は、異なった細胞系の全体的遺伝子発現、及びその全体的遺伝子発現分析に基づく遺伝子系統樹を示す。

20

#### 【0428】

細胞は、線維芽細胞(3種のGEOデータ)と比較される場合、0.99~1の比率のヒトES細胞(7種のGEOデータ)におけるNanog遺伝子発現と相互関係される遺伝子組に基づいて遺伝子系統樹においてクラスター化された。サンプルは、mTeSRにおいて培養されたクローン1-8について“1-8mTeSR”; MEF-ならし培地において培養されたクローン1-8について“1-8CM”; 親線維芽細胞について“5F0438”; MEF上で培養されたSheff4系について“hES1” “hES2” “hES3”(それぞれGSM194307, GSM194308, GSM194309); マトリゲル上で培養されたSheff4系について“hES4” “hES5”(それぞれGSM194313, GSM194314); MEF上で培養されたH14系について“hES6” “hES7”(それぞれGSM151739, GSM151741); GSM96262について“線維芽細胞1”; GSM96263について“線維芽細胞2”; 及びGSM96264について“線維芽細胞3”としてそれぞれ命名された。

30

#### 【0429】

発現強度は、赤(高)~緑(低)の比色順位で示された。1-8、2-4及び3-2細胞系及びそれらの親線維芽細胞についての全体的遺伝子発現データは、受託番号GSE9709としてGene Expression Omnibus (GEO)データベース寄託された。それらの分析は、ヒトiPS細胞系が遺伝子発現に関して、ヒトES細胞系に類似することを示す。

#### 【0430】

クローン1-8及び2-4におけるNanog及びOct3/4のプロモーター領域を、個々のCpG部位のメチル化について分析した。亜硫酸水素塩-処理されたゲノムDNA10ngを、T7プロモーターを含むプライマーによりPCR-増幅し、そして転写体をRNアーゼAにより処理した。メチル化されたCpG配列に起因するフラグメントはA-塩基の変わりにGを含むので、それらはその対応するメチル化されていないCpGに起因する分子量よりも16Da高い分子量を有した。この質量差異は、MALDI-TOF質量分光計(Autoflex, Bruker Daltonics)を用いて検出された。質量分光計により生成されるスペクトルを、EpiTYPER (Sequenom)を用いて分析した。個々のCpG部位の%メチル化を、メチル化されていないフラグメント及びメチル化されたフラグメントからのシグナルのピーク下の面積を用いて計算した。表9は、メチル化分析のために使用されるアンプリコンに対応するゲノムにおける位置及びサイズを列挙する。表10は、メチル化分析のために使用されるプライマー組を列挙する。

40

#### 【0431】

保存された領域1(CR1)を含むOct3/4近位プロモーター、CR4を含むOct3/4プロモーター

50

ー遠位エンハンサー、及びOct3/4及びSox2結合部位を含むNanog近位プロモーターを試験した(図11a)。図11bに示されるように、それらの領域におけるサイトシン - ホスフェート - グアノシン (CpG) ジヌクレオチドを、親線維芽細胞に比較してクローン1 - 8及び2 - 4由来の細胞において脱メチル化した。

#### 【0432】

ヒトiPS-1-8mTeSR細胞 - 緩衝液(0.5 ~ 2 × 10<sup>6</sup>個の細胞/マウス)を、Hamilton注射器を用いて、生後7 ~ 8週目のSCIDマウス(CB17, Oriental Yeast)の左精巣の髄質中に注射した。6 ~ 8週後、奇形腫を、PBS、続く10%緩衝ホルマリンによる還流下で切除し、そして組織学的分析にゆだねた。ヒトiPS-1-8mTeSR細胞は、SCIDマウスの精巣への移植の4 ~ 8週後、奇形腫をもたらした。

10

#### 【0433】

奇形腫を積層培地に埋め、そして低温装置上で10 μmで切断した。一連の断片を、ヘマトキシリン - エオシン(HE)により染色し、一般的形態学を可視化した。軟骨の検出のために、アルシアンブルー染色を用いるか又はHEと共に組合された。

#### 【0434】

免疫染色に関しては、断片をImmunoblock(Dainippon-Sumitomo)により30分間、処理し、非特異的結合を阻止した。スライドを次の一次抗生物質と共にインキュベートした:抗Nestinポリクローナル抗体(PRB-570C, COVANCE, 1:300)、抗タイプIIコラーゲンポリクローナル抗体(LB-1297, LSL, 1:200)、抗平滑筋アクチンポリクローナル抗体(RB-9010-R7, LAB VISION, 1:1)、抗 - フェトプロテインポリクローナル抗体(A0008, DAKO, 1:500)、抗MUC-1ポリクローナル抗体(RB-9222-P0, LAB VISION, 1:100)、及び抗ヒト核モノクローナル抗体(HuNu)(MAB 1281, CHEMICON, 1:300)。タイプIIコラーゲンに関しては、一次抗体による処理の前、断片をヒアルロニダーゼ(25mg/ml)と共に30分間インキュベートした。抗原の局在化を、適切な二次抗体を用いて可視化した(Alexa fluor 594及び688, Molecular Probes, 1:600)。核をDAPIにより染色した。免疫染色された奇形腫断片を、蛍光顕微鏡(Axio Imager Z1, Zeiss)下で分析した。

20

#### 【0435】

ヒトiPS-1-8mTeSR細胞の奇形腫は、3種の胚層、神経外胚葉、中胚葉、内胚葉を代表する組織を含んだ。図12は、94日間、培養されたヒトiPS-1-8mTeSR細胞に由来する奇形腫を示す(T1)。ヒトiPS-1-8mTeSR細胞をSCIDマウス精巣中に注入し、そして注入後56日で分析した。奇形腫精巣のHE及びアルシアンブルー染色は、奇形腫が神経上皮(ネスチン、に対して陽性)、軟骨(コラーゲンIIに対して陽性)、内胚葉管(-フェトプロテイン)を含んだことを表した。ヒトiPS-1-8mTeSR細胞由来を、HuNu染色により宿主組織から区別した。T1奇形腫においては、平滑筋細胞(-SMAに対して陽性)及び分泌上皮(MUC-1に対して陽性)をまた観察した(図13)。

30

#### 【0436】

102日間及び114日間、培養されたヒトiPS-1-8mTeSR細胞を、SCIDマウス精巣中に注入し、そしてそれぞれ、注入後、48日及び42日(T3)で分析した(T2, 図13、T3, 図14)。3種の胚層、すなわち神経外胚葉、中胚葉及び内胚葉を代表する細胞を観察した。ヒトiPSが低温保存され得るかどうかを確かめるために、ヒトiPS-1-8mTeSR細胞を凍結し、液体窒素に貯蔵し、そして再培養した。それらの細胞をSCIDマウス精巣中に注入し、そして注入後46日(T-F1)及び48日(T-F2)で分析した。3種の胚層、すなわち神経外胚葉、中胚葉及び内胚葉を代表する組織を観察した。メラニン細胞をまた、T-F2奇形腫において観察した(図14)。従って、多能性が凍結及び融解を通して維持された。

40

#### 【0437】

サザンブロット分析及びゲノムPCR分析の両者は、ヒトiPS-1-8クローンが4種のトランスジーンを含むことを示した。サザンブロット分析においては、cDNAフラグメントを、その対応するpMXベクタープラスミドから、制限酵素消化(POU5F1のためのXhoI、Sox2のためのNotI、KIF4のためのPstI)により調製した。それらのフラグメントを、アガロースゲル電気泳動及びQIAquickゲル抽出キット(QIAGEN)により、32P - ラベルされたプロ-

50

ブとして精製した。ゲノムDNAを、ヒトiPSクローン1-8及びその親線維芽細胞から調製した。5µgの個々のゲノムDNAを、KpnI (POU5F1、Sox2及びKlf4)により消化した。

【0438】

フラグメントを、HybondXL膜 (GE Healthcare)上にプロットされた0.8%アガロースゲル上で分離し、そして32P-レベルされたプローブによりハイブリダイズした。ヒトiPSクローン1-8は、Oct3/4トランスジーン及びSox2トランスジーンの両者の約10のコピー及びklf4トランスジーンの1つのコピーを担持することが示された(図15)。ゲノムPCR分析においては、表4においてc-Myc-totalとして示されるプライマー組を命名し、その結果、アンプリコンはc-Mycの全第二イントロンを含んだ。従って、トランスジーンのアンプリコンサイズ(338bp)は、エンドジーンのアンプリコン(1814bp)よりも小さかった。ベクタープラスミド及び親線維芽細胞ゲノム、すなわち感染核17日間の培養物から得られた培養された粗線維芽細胞ゲノムを、対照鑄型として使用した。ゲノムPCRは、クローン1-8細胞がc-Mycトランスジーンを担持することを確かめた(図15)。

【0439】

SNP遺伝子型決定を、GeneChip Human Mapping 500K Array Set (Affymetrix)の使用により、その製造業者のプロトコールに従って実施した。マトリゲル上でのmTeSR1において培養されたヒトiPS-1-8mTeSR細胞、その親線維芽細胞(5F0438)、及び異なったドナー由来の線維芽細胞(5F0416)を、このアッセイのために分析した。アレイ組は、StyI及びNspIチップを含む。2アリコート(250ng)のDNAをそれぞれ、NspI及びStyIにより消化した。個々の酵素調製物を、その対応するSNPアレイに対してハイブリダイズした(それぞれNspI及びStyIアレイに基づいて262,000及び238,000)。Dynamic Modelアルゴリズム138によるP=0.33での93%カールレート閾値(Dynamic Modelアルゴリズム信頼閾値)を、個々のアッセイに使用した。

【0440】

ヒトiPS-1-8mTeSR細胞が線維芽細胞(5F0438)から生成されるかどうかを確かめるために、我々はヒトiPS-1-8mTeSR細胞と使用される線維芽細胞との間のSNP遺伝子型決定を比較した(表5)。ヒトiPS-1-8mTeSR細胞のSNPは、SNPの467,946のうち464,069(99.17%)において親細胞のSNPと一致し、そしてそれらの3,877(0.83%)において親細胞のSNPとは異なる。対照的に、ヒトiPS-1-8mTeSR細胞のSNPは、SNPと呼ばれる470,960のうち284,950(60.50%)においての無関係のドナー細胞(5F0416)のSNPと一致し、そしてそれらの186,010(39.50%)において無関係の細胞のSNPとは異なる。従って、ヒトiPS-1-8クローン(1-8mTeSR)及び親細胞は、お互いほとんど同じSNP遺伝子型を有し、このことは、両細胞が単一のドナーに起因したことを強く示唆する。

【0441】

HLA DNA分類を、配列特異的オリゴヌクレオチドプローブ(SSOP)(Luminex)によるPCR-増幅されたDNAのハイブリダイゼーションを利用することにより実施した。多能性幹細胞誘発の工程に関連するDNA突然変異比率を調べるために、ゲノム全体の単一ヌクレオチド多形現象アレイ分析を、ヒトiPSクローン1-8(n=2)、その親皮膚-由来の細胞(n=2)及びもう1つのドナー由来の皮膚細胞(n=1)に対して実施した。著しい差異は、ヒトiPSクローン1-8とその親細胞との間に観察されなかった(表5)。ヒトiPS細胞系1-8、2-4及び3-2のHLA遺伝子型は、それらのそれぞれの親細胞の遺伝子型と同一であることが、それらの観察と一致する。

【0442】

HLA-A、HLA-B、HLA-Cw、HLA-DR、HLA-DQ、HLA-DP及びBw遺伝子座を決定するために、製造業者の説明書に従って、アッセイを実施した。ヒトiPS細胞は、細胞移植治療においては有望な材料であり、それらは免疫拒絶を克服することができる。なぜならば、ヒトiPS細胞は対象の細胞から直接的に生成され、そして同一のHLA型であるからである。我々は、ヒトiPS-1-8クローン(1-8mTeSR)、親細胞(5F0438)及び無関係の線維細胞(5F0416)のHLA分類を実施した。予測されるように、iPS-1-8クローンのHLA型は、5F0438のHLA型と完全に一致するが、しかし5F0416のそれとは一致しなかった(表6)。

10

20

30

40

50

## 【 0 4 4 3 】

前述から、ヒト多能性幹細胞は、ヒト生後組織に生存する未分化幹細胞におけるOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4種の遺伝子の個々の誘発された発現により得られた。ヒト多能性幹細胞は、インビトロでの長期自己再生能力、及び外胚葉、中胚葉及び内胚葉に分化する多能性を示す。ヒト多能性幹細胞は、発現された細胞表面抗原SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81、CD9、CD24及びCD90及びES細胞マーカー遺伝子Nanog、Oct3/4、TGF $\beta$ 1、Dnmt3b、GABRB3、GDF3、Zfp42、ALP、CD9及びThy-1であった。ヒト多能性幹細胞におけるNanog及びOct3/4のプロモーター領域は、親線維芽細胞に比較して脱メチル化された。ヒト多能性幹細胞は、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycトランスジーンの少なくとも1つのコピーを担持する。誘発されたヒト多能性幹細胞及び親細胞（ヒト生後組織に存在する未分化幹細胞）は、ほとんど同じSNP遺伝子型をお互い有し、そして誘発されたヒト多能性幹細胞のHLA型は親細胞（ヒト生後組織に存在する未分化幹細胞）のそれと完全に同一であった。

10

## 【 0 4 4 4 】

例15. 4種の遺伝子導入された新生児線維芽細胞の一次培養物の遺伝子発現プロフィール：

2種のロットの新生児線維芽細胞（5F0416及び5F0474）を、6ウェルプレートの35mmの直径のウェル中に $10^3$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>又は $10^4$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>で接種し、そして4種の遺伝子のトランスダクションの前、FGM-2 SingleQuots (Lonzaにより製造される)により補充されたFBMにおいて培養した。細胞を、 $2 \times 10^5$ ifu/ウェルでmCAT1 - アデノウィルスベクターにより感染せしめ、そして次に、例6に記載のようにして、4種の遺伝子を担持するレトロウィルスベクターにより感染した。8個のウェルを、この研究のための調製した（二重反復しての2種の異なったロット及び2種の異なった密度）。

20

## 【 0 4 4 5 】

4種の遺伝子の感染の17日後、細胞を固定し、そして例3に記載のようにして、アルカリホスファターゼ（ALP）のために染色した。合計で、163のALP陽性（+）コロニーを、4種の独立した実験において観察した。すべての163のALP（+）コロニー及び18のALP陰性（ALP（-））コロニーを分解し、そしてそれらのコロニーからの全RNAを、RecoverAll Total Nucleic Acid Isolationキット（Ambionにより製造される）を用いて抽出した。cDNA調製の後、興味ある遺伝子を、Taqman preamp（Applied Biosystemsにより製造される）を用いて増幅した。

30

## 【 0 4 4 6 】

即時定量的PCRを、PCRプライマー組（Applied Biosystemsにより製造される、Nanog、Hs02387400\_g1、Dnmt3b、Hs00171876\_m1、FoxD3、Hs00255287\_s1、Zfp42、Hs01938187\_s1、TGF $\beta$ 1、Hs02339499\_g1、TERT、Hs00162669\_m1、GDF3、Hs00220998\_m1、CYP26A1、Hs00175627\_m1、GAPDH、Hs99999905\_m1）を用いて、ABI PRISM 7900HT（Applied Biosystemsにより製造される）により実施し、コロニーにおけるヒトES細胞マーカーの遺伝子発現を決定した。ヒトES細胞において発現することが報告されている8種の遺伝子（Nanog、TGF $\beta$ 1、Dnmt3b、Zfp42、FoxD3、GDF3、CYP26A1及びTERT遺伝子）を、多能性幹細胞マーカー遺伝子として選択した。標準曲線を、個々のプライマー対について生成した。すべての発現値は、GAPDHに対して標準化された。

40

## 【 0 4 4 7 】

マウスES細胞及びマウスiPS細胞が多層化された/凝集されたコロニーを形成することは知られている。従って、我々は最初に、ヒト線維芽細胞において4種の遺伝子の異所性発現により誘発された、マウスES細胞のような凝集されたコロニーを分析した（例えば、図23におけるコロニー#1-2-F及び1-2-B）。しかしながら、それらのコロニーはすべてALP（-）である。次に、我々はコロニーにおけるNanog遺伝子発現を分析した。Nanog遺伝子発現を、163のALP陽性コロニーのうち161、及び18のALP陰性コロニーのうち16において観察された。他方では、TERT及びCYP26A1遺伝子が、それぞれ163のALP陽性コロニーのうち26及び24のコロニーにおいてのみ観察された（図16a）。ヒトES細胞において多

50

能性状態と密接に関連し、そしてそれらの分化に基づいて強くダウンレギュレートされることが良く知られている遺伝子、例えばNanog、TDGF及びDnmt3bは、4種の遺伝子トランスダクションにより誘発される高い傾向を有した。

【0448】

ALP陽性コロニーを、8種のヒトマーカー遺伝子の遺伝子発現パターンに基づいて40のグループに分類することができる(表7及び表8)。コロニーが8種のマーカー遺伝子発現の合計数により分類される場合、コロニー数の分布は正常な分布を従え、このことは、コロニー誘発における確立工程の存在を示唆する(図16c、d)。さらに、ヒト線維芽細胞におけるヒトES細胞マーカー遺伝子発現の効率がドナー差異に影響された。

【0449】

誘発の17日後に形成されるコロニーの定量的遺伝子発現分析は、トランスジーンc-Myc及びOct4がすべての分析されたコロニーにおいて高い発現を示したことを示唆する(表11)。さらに、内因性Nanog発現は、8種のヒトES細胞マーカー遺伝子の1又は複数の遺伝子の発現を欠いている細胞を包含する、ALP陽性コロニーのほとんどにおいて非常に高かった(表11)。それらの結果は、ヒト皮膚線維芽細胞からの多能性幹細胞誘発の工程が、マウスiPS細胞生成について記載される工程よりも遅いことを示唆する。163のALP陽性コロニーのうちわずか4のコロニーが、Nanog、TDGF1、Dnmt3b、Zfp42、FoxD3、GDF3、Cyp26a1及びTERTに対して陽性であった(オクタ-陽性コロニー)。

【0450】

それらのオクタ陽性コロニーにおける細胞は、次の共通する特徴を示した：1)高い核：細胞質比を伴ったの小さなサイズ、及び2)線維芽細胞間の空間内での小さな単層コロニーの形成(図16c)。それらの特徴は、ヒトES細胞の特徴と一致する。しかしながら、それらの3種の特徴はまた、1又は複数のES細胞マーカー発現を欠いているALP(+)コロニーのいくつかにおいても観察された。さらに、それらの3種の特徴を有する大きなコロニーは、ALP発現を欠いている(図23、コロニー#7-1-1)。線維芽細胞特徴を有するALP(+)コロニー(図17-23及び表、7、8、12、13におけるコロニー#5-1-7、#3-1-214、#3-2-233、#3-1-212、#3-1-215、#5-1-4は通常、1又は複数のES細胞マーカー遺伝子発現を欠いていた。

【0451】

それらの結果は、誘発された多能性幹細胞が、高い核：細胞質比を有する小さな細胞を含んでいる小さな単層コロニーから単離され得るが、しかし線維芽細胞コロニー、弱められたコロニー又は多層化されたコロニーからは単離され得ないことを示唆する。表8は、ヒト新生児線維芽細胞を用いてのALP陽性コロニー数に基づく実験及び結果のすべてを要約する。

【0452】

例16. ヒト新生児皮膚線維芽細胞からのヒトiPS-2-4クローンの生成：

mCAT1のためのアデノウイルスベクタープラスミドを、293細胞中にトランスフェクトした。mCAT1-アデノウイルスを、それらの細胞から、3回の凍結-融解サイクルにより単離し、アデノウイルス精製キット(Clontech)を用いて精製し、そして-80で貯蔵した。ベクターストックの力価を、Adeno-X急速力価キット(Clontech)により決定した。

【0453】

複製不完全MMLV由来のレトロウイルスベクターpMxを、ヒトOct3/4、Sox-2、c-Myc及びKlf4の異所性発現のために使用した。組換えレトロウイルスを、Plat-Eパッケージングシステム(Morita et al., (2000), Gene Therapy, 7: 1063-1066)にベクターをトランスフェクトし、続いてFGM-2 SingleQuots (Lonza)により補充されたFBM (Lonza)においてインキュベートすることにより生成した。トランスフェクションの24~48時間後、Plat-E培養物からの上清液を、少なくとも4時間の間隔で数度、集め、そして0.45µmのフィルターに通した。

【0454】

MEF-ならし培地(MEF-CM)調製のために、20%ノックアウト血清置換体(KSR, Invitro

10

20

30

40

50

gen)、2 mM L- グルタミン (Sigma)、1X 非必須アミノ酸(Sigma)、10  $\mu\text{g/ml}$  のゲンタマイシン、10 ng/mlの bFGFにより補充されたヒトES培地 (DMEM/F12) (Gibco) を、マイトマイシン - C処理されたMEF (Reprocell) 上で20 - 24時間ならし、収穫し、0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターに通し、そして0.1mMの 2 -メルカプトエタノール (Sigma) 及び10ng/mlのbFGFにより、使用前、補充した。

【 0 4 5 5 】

ヒト新生児組織、すなわち誕生直後のヒト組織由来の細胞 (商品名：新生児正常ヒト皮膚線維芽細胞、一次培養物) を用いて、ヒト新生児の皮膚に存在する未分化幹細胞からのヒト多能性幹細胞の誘発を試みた。

【 0 4 5 6 】

ヒト新生児皮膚線維芽細胞 (Lonza; ロット5F0416) を、FGM-2 SingleQuotesにより補充されたFBMにおいて培養した。4種の遺伝子の導入の3日間、線維芽細胞を、6ウェルプレートに $10^3$ 個の細胞/ $\text{cm}^2$ で接種した。18時間後、細胞を、500  $\mu\text{l}$ のハンクス溶液中、mCAT1アデノウイルスベクター溶液と共に混合し、そして室温で30分間インキュベートした。次に、細胞を2mlの培地に添加し、そして48時間、培養した。続いて、細胞を、2mlのレトロウイルス/ポリブレン溶液 (5  $\mu\text{g/ml}$ のポリブレンにより補充された、例1において調整された4種の遺伝子 (Oct3/4、Sox2、Klf4 及びc-Mycの個々のための等体積のレトロウイルスベクター懸濁液の混合物) において、37  $^{\circ}\text{C}$  で4時間 ~ 一晩インキュベートした。ウイルス上清液を、MEF - ならしES培地により交換した。次に、培地を毎日、交換した。

【 0 4 5 7 】

遺伝子導入の33日後、特徴的な形状を有するコロニーを、ウェルからピンセットにより採取した。採取されたコロニーを、24ウェルプレート中のマトリゲル被覆されたウェル中に移し、そして10  $\mu\text{M}$ のY - 27632により補充されたmTeSR1定義の培地において維持した。14時間後、培地を交換した。培地交換を毎日続けた。感染の54日後、二次培養を実施した。67日で、ヒトiPS-2-4クローンを、サブクローン化し、そしてヒト、iPS-2-4サブクローンと命名した。

【 0 4 5 8 】

継代のために、培地を除き、そして細胞をハンクス溶液により洗浄し、続いて0.25%のトリプシン - EDTAにより37  $^{\circ}\text{C}$  で3分間、処理した。新鮮な培地を添加し、反応を停止した。細胞懸濁液を4  $\times$  及び200xgで5分間、遠心分離し、そして上清液を除去した。細胞を、10  $\mu\text{M}$ のY - 27632により補充されたmTeSR1定義の培地に再懸濁し、そしてプレートした。

【 0 4 5 9 】

ヒトiPS-2-4サブクローンを、マトリゲル (BD Biosciences) - 被覆された皿上でのmTeSR1定義の培地 (Stem cell Technologies) において都合よく拡張した。我々は、サブクローンiPS-2-4に由来する細胞を命名し、そしてヒトiPS-2-4mTeSR細胞としてmTeSR1培地において培養した。培地を、ヒトiPS-2-4mTeSR細胞培地により毎日交換し、そして通常、Y - 27632 (Calbiochem) により処理し、継代の後の細胞アポトーシスを回避した。継代のために、細胞をハンクス溶液により洗浄し、0.25%トリプシン - EDTA (Gibco) において37  $^{\circ}\text{C}$  で3分間、インキュベートし、そして次に培養培地を添加した。細胞を300  $\times$  g及び室温又は4  $^{\circ}\text{C}$  で5分間、遠心分離し、そして上清液を除去した。細胞を培養培地中に再懸濁した。ヒトiPS-2-4mTeSR細胞は、高い核：細胞質比を有する、小さな丸型の細胞から成る定義された縁を有するコロニー下で増殖する、典型的なヒトES細胞及びヒトiPS-1-8mTeSR細胞とは形態学的に区別できない。

【 0 4 6 0 】

4 - 遺伝子感染の59日後、一部の細胞を固定し、そして例3に記載されるようにして、アルカリホスファターゼ (ALP) のために染色した。細胞から成るコロニーは、ALPに対して陽性であり、そしてコロニーからの全RNAを、RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambionにより製造される) を用いて抽出した。cDNA調製の後、興味ある遺伝子を、Taqman preamp (Applied Biosystemsにより製造される) を用いて増幅した。

【 0 4 6 1 】

10

20

30

40

50

即時定量的PCRを、PCRプライマー組 (Applied Biosystemsにより製造される、Nanog、Hs02387400\_gl、Dnmt3b、Hs00171876\_ml、FoxD3、Hs00255287\_sl、Zfp42、Hs01938187\_sl、TDGF1、Hs02339499\_gl、TERT、Hs00162669\_ml、GDF3、Hs00220998\_ml、CYP26A1、Hs00175627\_ml、GAPDH、Hs99999905\_ml)を用いて、ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystemsにより製造される)により実施し、コロニーにおけるヒトES細胞マーカーの遺伝子発現を決定した。クローン 2 - 4 は、ES細胞マーカー遺伝子の発現を示した (表12)。

#### 【 0 4 6 2 】

iPS1-8系に関して観察されるように、サザンブロット分析及びゲノムPCR分析の両者は、その2-4系が組み込まれたOct 3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycトランスジーンを含んだことを示した。同様に、2-4iPS系は、細胞表面マーカーCD24、CD90、TRA 1-60、TRA- 1-81、SSEA3及びSSEA4を発現し；正常な核型、その親細胞と同一のHLA遺伝子型、1-8系の発現パターンに類似する全体的遺伝子発現パターン、及び1-8系において観察されるようなNanogプロモーター低メチル化を有した。

#### 【 0 4 6 3 】

上記結果から、ヒト多能性幹細胞を、ヒト生後組織に存在する未分化幹細胞におけるOct 3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4種の遺伝子の個々の誘発された発現により得た。ヒト多能性幹細胞は、インビトロ長期自己再生能力を示し、そしてES細胞マーカー遺伝子Nanog、Oct3/4、TDGF1、Dnmt3b、GABRB3、GDF3、Zfp42、ALP、CD9及びThy-1を発現した。

#### 【 0 4 6 4 】

##### 例17. ヒト新生児皮膚線維芽細胞からのヒトiPS-3-2クローンの生成：

例16に従って、ヒト親新生児皮膚線維芽細胞 (Lonza; ロット5F0438) を、FGM-2 Single Cellsにより補充されたFBMにおいて培養した。4種の遺伝子導入の3日前、線維芽細胞を、6ウェルプレート中に $10^3$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>で接種した。18時間後、細胞をハンクス溶液500  $\mu$ l中、mCAT1アデノウィルスベクター溶液と共に混合し、そして室温で30分間インキュベートした。次に細胞を2mlの培地に添加し、そして48時間、培養した。続いて、細胞を、2mlのレトロウィルス/ポリブレン溶液 (5  $\mu$ g/mlのポリブレンにより充填された、例1において調製された4種の遺伝子 (Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc) の個々のための等体積のレトロウィルスベクター懸濁液の混合物) において、37  $^{\circ}$ Cで4時間～一晩インキュベートした。ウィルス上清液を、MEF - ならしES培地により交換した。次に、培地を毎日交換した。

#### 【 0 4 6 5 】

遺伝子導入の21日後、特徴的形狀を有するコロニーを、皿の1つからピンセットにより直接的に採取した。採取されたコロニーを、24ウェルプレートにおけるマトリゲル被覆されたウェルに移し、そして10  $\mu$ MのY - 27632により補充されたmTeSR1定義の培地に維持した。

#### 【 0 4 6 6 】

14時間後、培地を交換した。培地交換を毎日続けた。感染の40日後、二次サブクローニングを行い、そして細胞を、マトリゲル被覆された皿上でのmTeSR1定義の培地 (幹細胞技法) において都合良く拡張した。培地を毎日、交換し、そして通常、Y - 27632 (Calbiochem) により処理し、継代の後の細胞アポトーシスを回避した。継代のために、細胞をハンクス溶液により洗浄し、0.25%トリプシン - EDTA (Gibco) において37  $^{\circ}$ Cで5分間インキュベートし、そして次に、培養培地を添加した。細胞を、300xg及び室温で5分間、遠心分離し、そして上清液を除いた。細胞を、培養培地中に再懸濁した。

#### 【 0 4 6 7 】

細胞は、十分に定義された縁を伴ってコロニーにおいて増殖し、そして高い核：細胞質比を有する、小さく、丸型の細胞から成る、典型的なES細胞、ヒトiPS-1-8mTeSR細胞及びヒトiPS-2-4mTeSR細胞とは形態学的に区別できなかった。従って、我々はこのクローンを、ヒトiPS-3-2クローンと命名した。ヒトiPS-3-2クローンは、mTeSR1培地において積極的に増殖した。我々は、mTeSR1培地において培養するヒトiPS-3-2クローンに起因するそれらの細胞を、ヒトiPS-3-2mTeSR細胞として命名した。

## 【 0 4 6 8 】

4 - 遺伝子感染の48日後、細胞を固定し、そして例3に記載されるようにして、アルカリホスファターゼ (ALP) のために染色した。コロニーからの全RNAを、RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation kit (Ambionにより製造される)を用いて抽出した。cDNA調製の後、興味ある遺伝子を、Taqman preamp (Applied Biosystemsにより製造される)を用いて増幅した。即時定量的PCRを、PCRプライマー組 (Applied Biosystemsにより製造される、Nanog、Hs02387400\_g1、Dnmt3b、Hs00171876\_ml、FoxD3、Hs00255287\_sl、Zfp42、Hs01938187\_sl、TDGFI、Hs02339499\_g1、TERT、Hs00162669\_ml、GDF3、Hs00220998\_ml、CYP26A1、Hs00175627\_ml、GAPDH、Hs99999905\_ml)を用いて、ABI PRISM 7900HT (Applied Biosystemsにより製造される)により実施し、コロニーにおけるヒトES細胞マーカーの遺伝子発現を決定した。クローン3-2は、ES細胞マーカー遺伝子の発現を示した(表14)。ゲノムPCR分析は、その3-2系が組み込まれたOct 3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycトランスジーンを含んだことを示した。同様に、3-2iPS系は、その親細胞と同一のHLA遺伝子型、及び1-8系の発現パターンに類似する全体的遺伝子発現パターンを有した。

10

## 【 0 4 6 9 】

上記結果から、ヒト多能性幹細胞を、ヒト生後組織に存在する未分化幹細胞におけるOct 3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4種の遺伝子の個々の誘発された発現により得た。ヒト多能性幹細胞は、インビトロ長期自己再生能力を示し、そしてES細胞マーカー遺伝子Nanog、Oct3/4、TDGFI、Dnmt3b、GABRB3、GDF3、Zfp42、ALP、CD9及びThy-1を発現した。

20

## 【 0 4 7 0 】

例18. レトロウィルstransダクション及びHDACインヒビター処理による、Oct3/4、Sox2及びKlf4の誘発された発現によるヒト多能性幹細胞の誘発(予測例):

ヒト生後皮膚線維芽細胞を、FGM-2SingleQuotesにより補充されたFBMにおいて培養した。レトロウィルstransダクション及びヒストンデアセチラーゼ処理の3日前、線維芽細胞を、6ウェル細胞培養プレート中に $10^3$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>で接種した。18時間後、細胞を、5のMOIでmCAT1アデノウィルスベクター(例2に記載される)を含むハックス溶液500µlにおいて、時折振盪しながら、室温で30分間インキュベートした。

## 【 0 4 7 1 】

その後、2mlのFBM培地を個々のウェルに添加し、そして細胞を48時間、培養した。続いて、細胞を2mlのレトロウィルス/ポリブレン溶液(5µg/mlのポリブレンにより補充された、調製される個々のウィルスに関して約10のm.o.i.で、Oct3/4、Sox2及びKlf4(例1及び5に記載される)をコードするレトロウィルスベクター等体積の混合物)において、37で4時間~一晩インキュベートした。次に、ウィルス上清液を、1µMの最終濃度でヒストンデアセチラーゼインヒビターMS-275により補充されたMC-ES培地により交換した。次の日、培地を、MC-ES培地により交換し、そしてその後、毎日交換した。

30

## 【 0 4 7 2 】

ウィルstransダクション及びMS-275処理の17~33日後、特徴的形狀(例えば、小さく、丸型で、そして高い核:細胞質比を有する)を有するコロニーを、ピンセットによりウェルから採取した。次に、採取されたコロニーを、24ウェルプレートにおけるマトリゲル被覆されたウェル中に移し、そして10µMのY-27632により補充された、mTeSR1定義の培地において維持した。14時間後、培地を交換した。その後、培地を毎日交換した。ウィルstransダクション及びMS-275処理の38~54日後、二次サブカルチャーを実施した。継代のために、培地を除去し、そして細胞をハックス溶液により洗浄し、続いて0.25%トリプシン-EDTAにより37で3~5分間、処理した。新鮮な培地を添加し、反応を停止した。細胞懸濁液を4及び200xgで5分間、遠心分離し、そして上清液を除いた。細胞を、10µMのY-27632により補充された、mTeSR1定義の培地に再懸濁し、そして6-ウェル培養皿のマトリゲル被覆されたウェルにプレートした。

40

## 【 0 4 7 3 】

得られるヒトiPSクローンを、マトリゲル(BD Bioscience)-被覆された培養皿上でのmTeSR1定義された培地において拡張した。培養培地を、ヒトiPS細胞培養のために毎日、

50

交換した。ヒトiPS細胞系を継代するために、細胞をハンクス溶液により洗浄し、0.25%トリプシン - EDTA (Gibco) において37 °Cで3 ~ 5分間インキュベートし、そして次に、培養培地を添加した。得られる細胞懸濁液を、300xg及び室温又は4 °Cで5分間、遠心分離し、そして上清液を除いた。

【0474】

細胞を、培養培地中に再懸濁し、そして上記のようにしてプレートした。継代の後、培地を10 µMのY - 27632 (Calbiochem) により補充し、細胞アポトーシスを回避した。得られるヒトiPS細胞は、典型的なヒトES細胞、及び定義される縁を有し、そして小さな、丸型の細胞から成り、そして高い核：細胞質比を有するコロニー下で増殖するヒトiPS-1-8mTeSR細胞とは形態学的に区別できない。例14 - 15におけるように記載されるすべての分析によれば、得られるヒトiPS細胞は、インビトロでの長期再生能力を示し、そして多くの特徴において、典型的なヒトES細胞に非常に類似する。

10

【0475】

例19. レトロウィルストランスダクションによる、Oct3/4、Sox2及びKlf4の誘発された発現によるヒト多能性幹細胞の誘発 (予測例) :

ヒト生後皮膚線維芽細胞を、FGM-2SingleQuotsにより補充されたFBMにおいて培養した。レトロウィルストランスダクションの3日前、線維芽細胞を、6ウェル細胞培養プレート中に10<sup>3</sup>個の細胞/cm<sup>2</sup>で接種した。18時間後、細胞を、5のMOIでmCAT1アデノウィルスベクター (例2に記載される) を含むハンクス溶液500 µlにおいて、時折振盪しながら、室温で30分間インキュベートした。その後、2mlのFBM培地を個々のウェルに添加し、そして細胞を48時間、培養した。続いて、細胞を2mlのレトロウィルス/ポリブレン溶液 (5 µg/mlのポリブレンにより補充された、調製される個々のウィルスに関して約10のm.o.i.で、Oct3/4、Sox2及びKlf4 (例1及び5に記載される) をコードするレトロウィルスベクター等体積の混合物) において、37 °Cで4時間 ~ 一晩インキュベートした。次に、ウィルス上清液を、MC-ES培地により交換した。次の日、培地を、MC-ES培地により交換し、そしてその後、毎日交換した。

20

【0476】

ウィルストランスダクションの17 ~ 33日後、特徴的形狀 (例えば、小さく、丸型で、そして高い核：細胞質比を有する) を有するコロニーを、ピンセットによりウェルから採取した。次に、採取されたコロニーを、24ウェルプレートにおけるマトリゲル被覆されたウェル中に移し、そして10 µMのY - 27632により補充された、mTeSR1定義の培地において維持した。14時間後、培地を交換した。その後、培地を毎日交換した。ウィルストランスダクションの38 ~ 54日後、二次サブカルチャーを実施した。継代のために、培地を除去し、そして細胞をハンクス溶液により洗浄し、続いて0.25%トリプシン - EDTAにより37 °Cで3 ~ 5分間、処理した。新鮮な培地を添加し、反応を停止した。細胞懸濁液を4 °C及び200xgで5分間、遠心分離し、そして上清液を除いた。細胞を、10 µMのY - 27632により補充された、mTeSR1定義の培地に再懸濁し、そして6 - ウェル培養皿のマトリゲル被覆されたウェルにプレートした。

30

【0477】

得られるヒトiPSクローンを、マトリゲル (BD Bioscience) - 被覆された培養皿上でのmTeSR1定義された培地において拡張した。培養培地を、ヒトiPS細胞培養のために毎日、交換した。ヒトiPS細胞系を継代するために、細胞をハンクス溶液により洗浄し、0.25%トリプシン - EDTA (Gibco) において37 °Cで3 ~ 5分間インキュベートし、そして次に、培養培地を添加した。得られる細胞懸濁液を、300xg及び室温又は4 °Cで5分間、遠心分離し、そして上清液を除いた。細胞を、培養培地中に再懸濁し、そして上記のようにしてプレートした。

40

【0478】

継代の後、培地を10 µMのY - 27632 (Calbiochem) により補充し、細胞アポトーシスを回避した。得られるヒトiPS細胞は、典型的なヒトES細胞、及び定義される縁を有し、そして小さな、丸型の細胞から成り、そして高い核：細胞質比を有するコロニー下で増殖

50

するヒトiPS-1-8mTeSR細胞とは形態学的に区別できない。例14 - 15におけるように記載されるすべての分析によれば、得られるヒトiPS細胞は、インビトロでの長期再生能力を示し、そして多くの特徴において、典型的なヒトES細胞に非常に類似する。

【0479】

例20. Tert レポーター構造体を用いてサブセットの誘発因子と組合しての多能性を誘発するsiRNA (“誘発siRNA”)を同定するためのアッセイ(予測例) :

完全なヒトゲノムsiRNAライブラリーを、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycから選択された3種の誘発因子のサブセットと組合して使用される場合、ヒト成人線維芽細胞集団において多能性を誘発するか、又は多能性の誘発を高める能力を有するsiRNAを同定するために一次スクリーンに使用される。前記スクリーンは、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycから選

10

択された3種の誘発因子のサブセットの誘発活性を補足することができる候補体siRNAを同定するためにiPS-マーカー遺伝子Tertの活性化についてのレポーターアッセイを使用する。例えば、試験siRNAは、ミッションがSox2活性を補足するsiRNAを同定するためにOct3/4、Klf4及びc-Mycと組合して使用され得る。二次スクリーンにおいては、候補体誘発siRNAを、同じアッセイにおいて再び試験し、そしてもう1つのiPS-マーカー遺伝子Cyp26A1の発現をまた、試験された細胞においてアッセイする。

【0480】

Tertプロモーターレポーターレトロウィルスの生成 :

ヒトtertプロモーターの0.5kbフラグメントを、下記上流プライマー hTERT-475F :

5'-GCAGCCCTGGGTCTCCAGATCTGGCCAGC-S' (配列番号14)

20

及び下記下流プライマー hTERT + 49R :

5'GGTGGCCGGGGCCAGGGCTAGCCACGTGC-3' (配列番号15)

を用いて、ヒトゲノムDNAからPCR増幅する。

【0481】

プライマーを、hTERTエキソン1の開始の上流(+)又は下流(-)の塩基の数により番号づける(染色体5, WWW.genome.ucsc.edu 上での2003年7月でのヒトゲノムアセンブリ上で塩基1306027)。例えば、Padmanabhan et al., (2006), Journal of Nuclear Medicine, 47(2) 270-277を参照のこと。

【0482】

次に、増幅されたフラグメントを、プロモーターを欠くpGL4.11 [luc2P]ベクター (Promega, Madison, WI) においてluc2P ORFに5'側でサブクローン化する。次に、例1に記載されるように、完全なtert-luc2レポーターカセットをPCR増幅し、pMXレトロウィルスベクターにサブクローン化し、配列決定により確認し、そしてPlat-A細胞にパッケージングし (Morita et al, (2000), Gene Therapy, 7(12): 1063-1066を参照のこと)、Tert-lucレポーター (“TLR”) 自己指向性レトロウィルスを生成する。

30

【0483】

細胞培養、ウィルス感染及びsiRNAトランスフェクション :

10mlの培地中、成人又は新生児正常ヒト皮膚線維芽細胞 (Lonza) の  $6 \times 10^5$  個の細胞と、 $10^4$  個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度で、10cmの直径の細胞培養プレートに、FBM培地と共にプレートする。成人又は新生児正常ヒト皮膚線維芽細胞 (Lonza) を、皿当たり10mlの培地において、 $10^4$  個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度で10cmの直径の細胞培養プレートにFBM培地と共にプレートする。ヒト生後皮膚線維芽細胞を、FGM-2 SingleQuotesにより補充されたFBMにおいて培養する。18時間後、細胞を、5のMOIでmCAT1アデノウィルスベクター (例2に記載される) を含む3mlのFBM培地又はハンクス溶液と共に、時折振盪しながら、室温で30分間インキュベートした。その後、12mlの完全FBM培地を個々の皿に添加し、そして細胞を48時間、培養した。

40

【0484】

48時間後、培地を除去し、そしてTLRレトロウィルス、及び上記のようにして調製されたOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycのいずれか3種コードするレトロウィルスの混合物を添加し、3mlの培地中、約10~50のm.o.i.での個々のウィルスを皿当たり添加し、そして感

50

染を室温で30分間、続ける。その後、12mlのFBM培地を添加し、そしてプレートを37 でインキュベートする。TLRレトロウイルス、及びOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycのいずれか3種をコードするレトロウイルスの添加の24時間後、細胞を、ウェル当たり25又は100  $\mu$ lの培地において、 $10^4$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度で、マトリゲル(20g/cm<sup>2</sup>)により被覆された384又は96ウェル細胞培養プレートにおいてFBM培地と共にプレートする。得られる細胞を、FGM-2 SingleQuotesにより補充されたFBMにおいて培養する。

【0485】

24時間後、個々のウェルの培地を、個々のsiRNA(“試験siRNAウェル”)について50nMの最終濃度で、ヒト遺伝子標的物に対する4個のsiRNAと共に、その製造業者のプロトコールに従って混合された、抗生物質フリーのOpti-MEM(商標)I Reduced Serum培地(Invitrogen)、Lipofectamine<sup>TM</sup>-RNAiMax トランスフェクション試薬(Invitrogen)を含む混合物50又は200  $\mu$ l(それぞれ384又は96ウェルのための)により置換する。従って、合計約25,000個の標的物ヒト遺伝子(すなわちすべてではないが、ほとんどの発現された配列)に対するsiRNAを、アッセイにおいて試験する。アッセイにおける“負の対照”として、上記のようなトランスダクションされた細胞の20のウェル(“負の対照ウェル”)を、20組のスクランブルドsiRNA(ベクター又は哺乳類配列に対する相同性の欠乏について調べられている)によりトランスフェクトする。

【0486】

TLR及びsiRNA - 処理された線維芽細胞のルシフェラーゼアッセイ:

48時間後、細胞溶解物を個々のウェルから調製し、そしてルシフェラーゼ活性を、Berthold-Lumat B9501 luminometer (Berthold-Lumat, St Albans, Herts, UK)を用いて、Ad-Nanog-luc-感染された細胞におけるnanogプロモーター活性の尺度として、ルシフェリン及びATP(Sigma, St, Louis, MO)の存在下で測定する。試験siRNAウェルの個々からのルシフェラーゼ活性を、負の対照ウェルについて測定された平均ルシフェラーゼ活性と比較する。siRNAウェルが負の平均対照ウェル値よりも有意に高いルシフェラーゼ活性を有することが決定される場合、その対応するsiRNA配列(“候補体誘発siRNA”)が二次スクリーンにおいて試験される。

【0487】

二次スクリーン:

1つの二次スクリーンにおいては、細胞を、上記と同じ細胞培養条件を用いて、48ウェル形にプレートする。24時間後、ウェルを、一次スクリーンにおいて同定された候補体誘発siRNA(標的遺伝子当たりn=10)によりトランスフェクトするが、しかし48ウェル培養形に関しては体積が調節される。次に、細胞を、さらに72時間、培養する。その後、培地を除き、細胞をハンクス溶液により洗浄し、そしてCyp26a1 mRNAのレベルをqRT-PCRにより決定する。

【0488】

例21. qRT-PCRを用いてサブセットの誘発因子と組合しての多能性を誘発するsiRNA(“誘発siRNA”)を同定するためのアッセイ(予測例):

完全なヒトゲノムsiRNAライブラリーを、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycから選択された3種の誘発因子のサブセットと組合して使用される場合、ヒト成人線維芽細胞集団において多能性を誘発するか、又は多能性の誘発を高める能力を有するsiRNAを同定するために一次スクリーンに使用される。

【0489】

前記スクリーンは、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycから選択された3種の誘発因子のサブセットの誘発活性を補足することができる候補体siRNAを同定するためにiPS-マーカー遺伝子Tertの発現を検出するためのqRT-PCRアッセイを使用する。例えば、試験siRNAは、ミッションがSox2活性を補足するsiRNAを同定するためにOct3/4、Klf4及びc-Mycと組合して使用され得る。二次スクリーンにおいては、候補体誘発siRNAを、同じアッセイにおいて再び試験し、そしてもう1つのiPS-マーカー遺伝子Cyp26A1の発現をまた、試験された細胞においてアッセイする。

10

20

30

40

50

## 【0490】

細胞培養、ウイルス感染及びsiRNAトランスフェクション：

成人又は新生児正常ヒト皮膚線維芽細胞 (Lonza) を、皿当たり10mlの培地中、 $10^4$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度で、10cmの直径の細胞培養プレートに、FBM培地と共にプレートする。ヒト生後皮膚線維芽細胞を、FGM-2 SingleQuotesにより補充されたFBMにおいて培養する。18時間後、細胞を、1～5のMOIでmCAT1アデノウイルスベクター（例2に記載される）を含む3mlのFBM培地又はハンクス溶液と共に、時折振盪しながら、室温で30分間インキュベートした。その後、12mlの完全FBM培地を個々の皿に添加し、そして細胞を48時間、培養した。

## 【0491】

48時間後、培地を除去し、そしてTLRレトロウイルス、及び上記のようにして調製されたOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycのいずれか3種コードするレトロウイルスの混合物に添加し、3mlの培地中、約10～50のm.o.i.での個々のウイルスを皿当たり添加し、そして感染を室温で30分間、続ける。その後、12mlのFBM培地を添加し、そしてプレートを37℃でインキュベートする。TLRレトロウイルス、及びOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycのいずれか3種をコードするレトロウイルスの添加の24時間後、細胞を、ウェル当たり25又は100µlの培地において、 $10^4$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度で、マトリゲル (20g/cm<sup>2</sup>) により被覆された384又は96ウェル細胞培養プレートにおいてFBM培地と共にプレートする。得られる細胞を、FGM-2 SingleQuotesにより補充されたFBMにおいて培養する。

## 【0492】

24時間後、個々のウェルの培地を、個々のsiRNA (“試験siRNAウェル”) について50nMの最終濃度で、ヒト遺伝子標的物に対する4個のsiRNAと共に、その製造業者のプロトコールに従って混合された、抗生物質フリーのOpti-MEM (商標) I Reduced Serum培地 (Invitrogen)、Lipofectamine<sup>TM</sup>-RNAiMax トランスフェクション試薬 (Invitrogen) を含む混合物50又は200µl (それぞれ384又は96ウェルのための) により置換する。従って、合計約25,000個の標的物ヒト遺伝子 (すなわちすべてではないが、ほとんどの発現された配列) に対するsiRNAを、アッセイにおいて試験する。アッセイにおける“負の対照”として、上記のようなトランスダクションされた細胞の20のウェル (“負の対照ウェル”) を、20組のスクランブルドsiRNA (ベクター又は哺乳類配列に対する相同性の欠乏について調べられている) によりトランスフェクトする。

## 【0493】

コロニーからの全RNAを、RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation キット (Ambionにより製造される) を用いて抽出する。逆転写の後、Tertも又CYP26A1を、Taqman preamp (Applied Biosystemsにより製造される) を用いて増幅する。次に、即時定量的PCRを、PCRプライマー組TERT、Hs00162669\_m1及びCYP26A1、Hs00175627\_m1 (Applied Biosystemsにより製造される) を用いて、ABI PRISM 7900HT 装置 (Applied Biosystemsから入手可能) により実施する。

## 【0494】

siRNAウェルが負の対照レベルに対して高レベルのTert mRNA発現を誘発することが決定される場合、その対応するsiRNA配列 (“候補体誘発siRNA”) が二次スクリーンにおいて試験される。

## 【0495】

二次のスクリーン：

1つの二次スクリーンにおいては、細胞を、上記と同じ細胞培養条件を用いて、48ウェル形にプレートする。24時間後、ウェルを、一次スクリーンにおいて同定された候補体誘発siRNA (標的遺伝子当たりn=10) によりトランスフェクトするが、しかし48ウェル培養形に関しては体積が調節される。次に、細胞を、さらに72時間、培養する。その後、培地を除き、細胞をハンクス溶液により洗浄し、そしてCyp26A1 mRNAのレベルを上記に記載のようにqRT-PCRにより決定する。他の誘発因子と組合して使用される場合、Tert及びCyp26A1の両者の誘発発現として同定される候補体誘発siRNAは、一次スクリーンに使用される

10

20

30

40

50

誘発因子のその対応するサブセットと組合して使用される場合、それらが実際、多能性を誘発できるかどうかを決定するために、さらに試験される。

【0496】

例22. 少なくとも1つのキメラ性IF-VP16ポリペプチドを含む線維芽細胞からのヒト多能性幹細胞の誘発(予測例) :

誘発プロトコール及びアッセイを、例7に記載のようにして実施するが、しかしキメラ性ヒトSox2-VP16融合ポリペプチドを発現するレトロウィルスが、4種のIFの1つとして、十分な長さのヒトSox2レトロウィルスの代わりに使用される。Sox2-VP16融合ポリペプチドは、Sox2 DNA結合ドメインを含む、ヒトSox2のアミノ酸1-183、及びヘルペスVP16タンパク質 (GenBank Accession No. AAA45864) のアミノ酸411-490、すなわちヒトSox2フラグメントのC末端に融合される強いトランス活性化因子ドメイン (例えば、Sadowski et al (1988), Nature, 6:335(6190):563-564を参照のこと) を含んで成る。Sox2-VP16融合タンパク質の配列は下記の通りである :

【0497】

MYNMMETELKPPGPQQTSGGGGGNSTAAAAGGNQKNSPDRVKRPMNAFMVWSRG  
 QRRKMAQENPKMHNSEISKRLGAEWKLLSETEKRPFI DEAKRLRALHMKEHPDYKY  
 RPRRKTTLMKDKYTLPGLLAPGGNSMASGVGVGAGLGAGVNRMDSYAHMN  
 GWSNGSYSMMQDLGYPQHSTTAPI TDVSLGDELRLDGEEDMTPADALDDFDLEM  
 LGDVESPSPGMTHDPVSYGALDVEDDFEFEQMFTDALGIDDFGG (配列番号16)。

【0498】

例23. Oct3/4、Sox2及びKlf4のウィルス発現、及びc-Mycのタンパク質トランスダクションの組合せを用いての線維芽細胞からのヒト多能性幹細胞の誘発(予測例) :

Oct3/4、Sox2及びKlf4レトロウィルスによる細胞培養及び感染を、例7に記載のようにして行うが、但し4時間のウィルス感染インキュベーションの後、3種のウィルス含有ポリブレン溶液が、ヒトc-Mycのアミノ酸配列を含んで成る精製されたヒトc-Myc-PTD融合ポリペプチドを含むMC培地により交換される :

【0499】

配列番号12 (ヒトc-Myc) :

MDFFRVVENQQPPATMPLNVSFTNRNYDLDYDSVQPYFYCDEEENFYQQQQSELQPPAPS  
 E  
 DIWKKFELLPTPPLSPRRSGLCSPSYVAVTPFSLRGDNDGGGGSFSTADQLEMVTELLGGDM  
 V  
 NQSFICDPDETIFIKNI IQDCMWSGFSAAAKLVSEKLASYQAARKDSGSPNPARGHSVCSTSS  
 LYLQDLSAAASECIDPSVVFYPLNDSSSPKSCASQDSSAFSPSSDLSLSTESSPQGSPEPLVLH  
 EE  
 TPPTTSSDSEEEQEDEEEDVVSVEKRQAPGKRSESGSPSAGGHSKPPHSPLVLKRCHVSTHQH  
 NYAAPSTRKDYPAAKRVKLDVSRVLRQISNNRCKTSPRSSDTEENVKRRTHNVLERQRRNE  
 LK  
 RSFFALRDQIPELENNEKAPKVVILKKATAYILSVQAEQKLI SEEDLLRKRREQLKHKLEQLR  
 N  
 SCA

【0500】

下記アミノ酸配列を有するタンパク質トランスダクションドメインにより、そのN末端で融合される :

YGRKKRRQRRR (配列番号1); RKKRRQRR (配列番号2); YARAAARQARA (配列番号3); THRLPRRRRRR (配列番号4); GGRRARRRRR (配列番号5); 又は KKKKKKKK (配列番号17)。

c-Myc-PTD融合タンパク質のサブクローニング及び精製を、Becker-Hapak et al., (2003), Curr. Protocols Cell Biol, Unit 20.2, John Wiley & Sonsに記載のようにして実質的に実施する。

【0501】

10

20

30

40

50

レトロウイルス感染期間 (Oct3/4、Sox2及びKlf4レトロウイルスによる) の後、ポリブレン - ウィルス溶液を除き、そして100nMの濃度で精製されたc-Myc-PTD融合ポリペプチドを含むMC-ES培地2mlにより交換し、そして培養物を、37 で約3時間インキュベートする。その後、培地を、MC-ES培地により交換し、そして誘発プロトコール及びアッセイを、例7に記載のように続ける。タンパク質トランスダクションによるc-Mycの誘発された発現は、特に外因性遺伝子がゲノム中に組み込まれる場合、例えば、レトロウィルストランスダクションに続いて、外因性c-Myc遺伝子を導入する可能性ある長期の所望しない効果 (例えば、細胞形質転換、又は癌を誘発する危険性) を回避する。

【0502】

例24 . Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycのタンパク質トランスダクションを用いての線維芽細胞からのヒト多能性幹細胞の誘発 (予測例) :

ヒト生後皮膚線維芽細胞を、FGM-2SingleQuotesにより補充されたFBMにおいて培養する。タンパク質トランスダクションの3日前、線維芽細胞を、6ウェル細胞培養プレート中に、 $10^3$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>で接種する。

【0503】

Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc融合タンパク質のサブクローニング及び精製を、Becker-Hapak et al., (2003), Curr. Protocols Cell Biol, Unit 20.2, John Wiley & Sonsに記載のようにして、実質的に実施する。誘発は、培養培地を、下記アミノ酸配列を有するタンパク質トランスダクションドメインにより、それらのN - 末端で融合される、Oct 3/4配列番号6)、Sox2 (配列番号8)、Klf4 (配列番号10)及びc-Myc (配列番号12)の精製された融合タンパク質 (それぞれ100nM) を含むMC-ES培地2mlにより交換することにより開始される :

【0504】

YGRKKRRQRRR (配列番号1); RKKRRQRR (配列番号2); YARAAARQARA (配列番号3); THRLPRRRRRR (配列番号4); GGRRARRRRR (配列番号5); 又はKXKKKKKK (配列番号17)。

次に細胞を、融合タンパク質と共に37 で約3時間インキュベートする。その後、培地を、10 μMのY - 27632により補充されたMC - ES培地により交換する。誘発期間の間、培地を、100nMの個々の融合タンパク質を含むMC-ES培地により毎日1時間にわたって交換し、そして次に、培地を、次の日まで、融合タンパク質を有さないMC - ES培地により交換する。誘発期間の後、アッセイを例7に記載のように行い、誘発された多能性幹細胞候補体を同定する。

【0505】

例25 . Oct3/4、Sox2及びKlf4のタンパク質トランスダクション及びHDACインヒビター処理を用いての線維芽細胞からのヒト多能性幹細胞の誘発 (予測例) :

ヒト生後皮膚線維芽細胞を、FGM-2SingleQuotesにより補充されたFBMにおいて培養する。タンパク質トランスダクションの3日前、線維芽細胞を、6ウェル細胞培養プレート中に、 $10^3$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>で接種する。

【0506】

Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc融合タンパク質のサブクローニング及び精製を、Becker-Hapak et al., (2003), Curr. Protocols Cell Biol, Unit 20.2, John Wiley & Sonsに記載のようにして、実質的に実施する。誘発は、培養培地を、下記アミノ酸配列を有するタンパク質トランスダクションドメインにより、それらのN - 末端で融合される、Oct 3/4配列番号6)、Sox2 (配列番号8)、及びKlf4 (配列番号10)の精製された融合タンパク質 (それぞれ100nM) を含むMC-ES培地2mlにより交換することにより開始される :

【0507】

YGRKKRRQRRR (配列番号1); RKKRRQRR (配列番号2); YARAAARQARA (配列番号3); THRLPRRRRRR (配列番号4); GGRRARRRRR (配列番号5); 又はKKKKKKKK (配列番号17)。

【0508】

次に細胞を、融合タンパク質と共に37 で約3時間インキュベートする。その後、培地を、10 μMのY - 27632により補充されたMC-ES培地により交換し、次に、1 μMの最終濃度で

10

20

30

40

50

のヒストンデアセチラーゼインヒビターMS-275及び10 µMのY - 27632のRhoキナーゼインヒビターにより補充されたMC-ES培地により交換する。続く誘発期間の間、培地を、それぞれ100nMの融合タンパク質を含むMC-ES培地により、1時間にわたって毎日交換し、そして次に培地を、誘発期間の最後まで（誘発の開始後、約14日）、10 µMのY - 27632を含む、融合タンパク質フリーのMC - ES培地により交換する。誘発期間の後、アッセイを例7に記載のようにして実施し、誘発された多能性幹細胞候補体を同定する。

【0509】

例26. レトロウイルストランスダクションによる3又は4種の外因性遺伝子の誘発された発現によるマウス多能性幹細胞の誘発：

マウス胚線維芽細胞（MEF）を、12ウェルプレートにプレートし、MEF培地（10%FBS及びゲンタマイシンにより補充されたDMEM）に、5000個の細胞/cm<sup>2</sup>の密度で接種し、そして一晩（約16時間）、培養した。次に細胞を、1mlのレトロウイルス/ポリブレン溶液においてインキュベートした。そのレトロウイルス/ポリブレン溶液は、4種の因子（Oct3/4、Sox2、Klf4 又はc-Myc）；3種の因子（前記4種の因子 - Oct3/4、Sox2、Klf4 又はc-Mycのいずれか）；又は2種の因子（Oct3/4及びSox2）のいずれかをコードする個々のレトロウイルスベクター0.25mlの混合物（5 µg/mlのポリブレンにより補充される）を含んだ。2又は3種の遺伝子のトランスダクションに関しては、培養培地をウイルス担持の溶液に1mlまで添加した。細胞を、調製された個々のウイルスにより、37 °Cで感染せしめた。“Oct4a”は、“Oct3/4”に等しい。次の日、マウスES培地により交換した。培地は2～3日ごとに交換された。

【0510】

ウイルストランスダクションの約12日後、コロニーをアルカリホスファターゼ（ALP）染色にゆだね、そしてクローン化されたコロニー由来の細胞を青紫に染色した。ALP陽性コロニーの数を、図28により示されるようにして、記録した。ALP - 陽性コロニーを、4種の因子（Oct3/4、Sox2、Klf4 及びc-Myc）；3種の因子のいずれかの組合せ；及び2種の因子（Oct3/4及びSox2）を受けたサンプルにおいて観察した。

【0511】

例27. マウス由来の神経幹細胞中へのレトロウイルストランスダクションによる、2、3又は4種の外因性遺伝子の誘発された発現によるマウス多能性幹細胞の誘発：

成熟マウス - 由来の神経幹細胞（NSC）を、前記のようにして（Reynolds et al., 1992），生後9週目のC57BL/6マウス（Oriental Yeast, Tokyo, Japan）の副脳室領域から単離した。手短には、成熟マウス脳を、トリプシン消化により単一細胞に解離し、そして細胞を、100 µg/mlのヒトトランスフェリン（Sigma）、20nMのプロゲステロン（Sigma）、100 IU/mlのブトレッシン（Sigma）、30nMの亜セレン酸ナトリウム（Sigma）及び5 µg/mlのインスリン（Sigma）を含むダルベッコ変性イーグル培地/ Ham's F- 12培地（DMEM/F12; Invitrogen）に懸濁した。その懸濁された細胞を、組織培養皿にプレートした。

【0512】

細胞を、NSC培地（100 µg/mlのヒトトランスフェリン、20nMのプロゲステロン、100 IU/mlのブトレッシン、30nMの亜セレン酸ナトリウム、5 µg/mlのインスリン、20ng/mlのヒト塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF; Sigma）、及び20ng/ml表皮成長因子（EGF; Sigma）を含むDMEM/F12）において浮動性神経球体として、それらを培養することにより、未分化増殖状態で維持した。NSCを、感染の1日前、Ornithine/Lamin被覆された12ウェル細胞培養プレート上で単層として、10<sup>4</sup>個の細胞/cm<sup>2</sup>で接種し、そして1mlのNSC培地において培養した。一晩後、細胞を、1mlのレトロウイルス/ポリブレン溶液においてインキュベートした。

【0513】

レトロウイルス/ポリブレン溶液は、4種の因子（Oct3/4、Sox2、Klf4 及び c-Myc）；3種の因子（4種の因子 - Sox2又はc-Myc）；又は5 µg/mlのポリブレンにより補充された2つの因子（Oct3/4及びKlf4）のいずれかをコードする個々のレトロウイルスベクター0.25mlの混合物を含んだ。2又は3種の遺伝子トランスダクションに関しては、培養培地を、ウイルス担持溶液に1mlまで添加した。細胞を37 °Cで感染した。次に、ウイルス上清液

10

20

30

40

50

を、次の日、マウスES培地により交換した。培地を2～3日ごとに交換した。

【0514】

ウィルストランスダクションの約12日後、コロニーをアルカリホスファターゼ (ALP) 染色にゆだね、そしてクローン化されたコロニー由来の細胞を青紫に染色した。ALP陽性コロニーの数を、図28により示されるようにして、記録した。ALP - 陽性コロニーを、4種の因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4 及びc-Myc) ; 3種の因子のいずれかの組合せ ; 及び2種の因子 (Oct3/4及びSox2) (図29に示すような) を受けたサンプルにおいて観察した。

【0515】

例28. レトロウィルストランスダクションによる3又は4種の外因性遺伝子の誘発された発現によるマウス多能性幹細胞の誘発 :

成熟マウス由来の骨髄細胞 (Losac) を、図4に関連する例5に記載されるのと同じ方法を用いて入手した。レトロウィルストランスダクションの1日前、細胞を6ウェル培養プレートに $10^4$ 個の細胞/cm<sup>2</sup>で接種し ; そして2mlの低血清培地において培養した。一晩後、細胞を2mlのレトロウィルス/ポリブレン溶液 (4種の因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4 及びc-Myc) ; 3種の因子 (4種の因子 - Sox2、Oct3/4、Klf4 又はc-Myc) のいずれかをコードする個々のレトロウィルスベクター0.5mlの混合物 (5µg/mlのポリブレンにより補充された) においてインキュベートした。ウィルス上清液を次の日、マウスES培地により交換した。その時点で、いくつかのサンプルをまた、10ng/mlのFGF又は0.1µMのMS - 275のいずれかにより、3日間、処理した。次の日、培地をマウスES培地により交換し、そしてその後、2～3日ごとに交換した。

【0516】

ウィルストランスダクションの約9又は15日後、コロニーをアルカリホスファターゼ (ALP) 染色にゆだね、そしてクローン化されたコロニー由来の細胞を青紫に染色した。ALP陽性コロニーの数を、図30により示されるようにして、記録した。15日目に分析されたサンプルのうち、ALP - 陽性コロニーを、4種の因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4 及びc-Myc) を受けたサンプル及び4種の因子 - c-Myc、Oct3/4又はKlf4のいずれかを受けたサンプルにおいて観察した。

【0517】

ALP - 陽性コロニーはまた、ウィルストランスダクションの9日後に分析された4種 - 遺伝子トランスダクションサンプルにおいて観察されたが、しかしその数は、15日での4種の遺伝子トランスダクションサンプルにおいて観察されたコロニーの数よりも少なかった。9日での4種 - 遺伝子トランスダクションサンプルにおいては、より多くのコロニーが、MS - 275に暴露されなかったサンプルと比較して、MS-275に暴露されたサンプルにおいて観察された。

【0518】

例29. レトロウィルストランスダクションによる2又は4種の外因性遺伝子の誘発された発現によるマウス多能性幹細胞の誘発 :

成熟マウス由来の骨髄細胞 (Losac) を、図4に関連する例5に記載されるのと同じ方法を用いて入手した。レトロウィルストランスダクションを、例30に記載される方法に従って実施した。しかしながら、この実験においては、レトロウィルス/ポリブレン溶液は、4種の因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4 及びc-Myc) ; 又は2種の因子の異なった組合せ (図31に示すような) のいずれかをコードするレトロウィルスベクターの等体積の混合物を含んだ。

【0519】

ウィルストランスダクションの約15日後、コロニーをアルカリホスファターゼ (ALP) 染色にゆだね、そしてクローン化されたコロニー由来の細胞を青紫に染色した。ALP陽性コロニーの数を、図31により示されるようにして、記録した。ALP - 陽性コロニーを、4種の因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4 及びc-Myc) を受けたサンプル及びSox2、及びc-Mycの組み合わせを受けたサンプルにおいて観察した。

【0520】

10

20

30

40

50

例30. iPS細胞対ヒトES細胞系及び親線維細胞における全体的遺伝子発現差異の分析 :

それぞれ、例14、16及び17に記載のようにして、iPS細胞系、1-8、2-4及び3-2について得られた全体的遺伝子発現データ(GEO受託番号GSE9709)を、次のヒトES細胞(hES細胞)系についての全体的遺伝子発現データと比較した:MEF上で培養されたSheff4;マトリゲル上で培養されたSheff4及びMEF上で培養されたH14系;及びiPS系親線維芽細胞。遺伝子発現データを、(1)hES細胞系においてよりもiPS細胞系において有意に高いレベルで発現される;(2)iPS細胞系においてよりもhES細胞系において有意に高レベルで発現される;(3)hES細胞系及び親線維芽細胞においてよりもiPS細胞系において有意に高いレベルで発現される;そして(4)hES細胞系においてよりもiPS細胞系において有意に高いレベルで発現されるが、しかし親線維芽細胞においてよりも有意に高いレベルでは発現されなかった遺伝子を同定するために比較した。データは、p 0.01のカットオフを伴って、スチューデントt-検定により比較された。その結果は、表13-16に示される。

10

【0521】

表13は、hES細胞系においてよりもiPS細胞系において5倍又はそれ以上高いレベルで発現される遺伝子の列挙を示す(p 0.01)。表14は、iPS細胞系においてよりもhES細胞系において2倍又はそれ以上高いレベルで発現される遺伝子の列挙を示す(p 0.01)。表15は、hES細胞系及び親線維芽細胞の両者においてよりもiPS細胞系において5倍又はそれ以上高いレベルで発現される遺伝子の列挙を示す(p 0.01)。表16は、hES細胞系においてよりもiPS細胞系において5倍又はそれ以上高いレベルで発現されるが、親線維芽細胞においてよりも有意に高いレベルでは発現されなかった遺伝子の列挙を示す(p 0.05)

20

【0522】

それらの結果は、例14に記載されるように、iPS細胞系とhES細胞系との間の全体的遺伝子発現における全体的類似性にもかかわらず、iPSはhES細胞系に関して有意な遺伝子発現差異を示すことを示唆した。

【0523】

例31. Oct3/4ポリペプチドアミノ酸配列変異体(予測例) :

表17(ヒトOct3/4のPMUT分析)に基づいて、次のOct3/4アミノ酸配列変異体のいずれかが特定部位の突然変異誘発により生成され、そして前述の例に記載されるように、多分化能性又は多能性幹細胞を誘発するために、Sox2ポリペプチド及びKlf4ポリペプチド、又はSox2、Klf4及びc-Mycポリペプチドに関して使用される。

30

【0524】

次のアミノ酸置換対を伴っての配列番号6のアミノ酸配列:Oct3/4変異体<sup>2AA-1</sup>(H4 N及びF9 I);Oct3/4変異体<sup>2AA-2</sup>(P15 M及びG18 L)及びOct3/4変異体<sup>2AA-3</sup>(I60 F及びL84 V)。

【0525】

次の10のアミノ酸置換組を伴っての配列番号6のアミノ酸配列(Oct3/4変異体<sup>10AA</sup>):H4 N、F9 I、P15 M、G18 L、I60 F、L84 V、P62 S、V101 I、G109 I及びP112 I。

【0526】

次の20のアミノ酸置換組を伴っての配列番号6のアミノ酸配列(Oct3/4変異体<sup>20AA</sup>):H4 N、F9 I、P15 M、G18 L、I60 F、P62 S、Q79 D、L84 V、V101 I、G109 I、P112 I、G161 L、D166 E、L169 I、V173 F、F175 A、E215 D、E219 D、A223 M、V227 F。

40

【0527】

次の25のアミノ酸置換組を伴っての配列番号6のアミノ酸配列(Oct3/4変異体<sup>25AA</sup>):H4 N、F9 I、P15 M、G18 L、V51 I、I60 F、P62 S、C63 S、Y67 F、Q79 D、L84 V、L90 M、Q94 D、V101 I、G109 I、P112 I、G161 L、D166 E、L169 I、V173 F、F175 A、E215 D、E219 D、A223 M、V227 F。

【0528】

50

表1は、遺伝子名称、NCBI番号、前記遺伝子が挿入されたウィルスベクター、挿入体サイズ、5'末端での制限部位、3'末端での制限部位、翻訳された領域の長さ、3'末翻訳領域の長さ、クローンID、及び例に使用される、4種の遺伝子又は3種の遺伝子及びマウス自己指向性レトロウィルスベクター（mCAT：マウス由来のカチオン性アミノ酸トランスポーター）の供給業者を示す。

【0529】

【表1】

表1  
構成日

遺伝子の名称	NCBI番号	遺伝子挿入されたウィルスベクター	挿入体サイズ	5' - 末端制限部位	3' - 末端制限部位	翻訳された領域の長さ	3' - 末翻訳領域	クローンID	供給業者
ヒト Oct3/4	NM_002701	pMXs-puro	1411	EcoRI	XhoI	1083	274	6578897	Open Biosystems
ヒト Sox2	BC013923	pMXs-neo	1172	EcoRI	XhoI	954	143	2823424	Open Biosystems
ヒト c-Myc	BC058901	pMXs-IB	1876	EcoRI	xhoI	1365	473	6012670	Open Biosystems
ヒト Klf4	BC029923	pMXs-IB	1591	EcoRI	EcoRI	1413	38	5111134	Open Biosystems
mCAT1	NM_007513	Adeno-X	2032	BssSI	BssSI	1869	132	A830015 N05	RIKEN FANTOM クローン

10

20

【0530】

表2は、例4～7のアルカリホスファターゼ陽性コロニーの数を要約する。細胞型に関しては、サブカルチャーの数が付随されている。4種の遺伝子導入の日は、レトロウィルスベクターが感染された日である。ロット番号は、Lonza製品のロット番号である。ドナーの年齢は、Lonza製品のドナー情報に基づかれる。コロニーの数は、10cm<sup>2</sup>当たりアルカリホスファターゼ陽性小細胞から構成されるコロニーの数である。

【0531】

30

## 【表 2】

表 2

例 5 ~8 及び 10, 遺伝子導入により形成されるアルカリホスファターゼ (ALP) -陽性コロニーの数

例	細胞		血清濃度 (%)	遺伝子導入の時点で継代の数	コロニー計数*	
	細胞型	ドナー年齢				ロット番号
8	新生児皮膚線維芽細胞	新生児	5F0439	2	3	0.8
6	新生児皮膚線維芽細胞	新生児	5F0438	2	2	6.0
6	新生児皮膚線維芽細胞	新生児	5F0438	2	2	6.0
6	新生児皮膚線維芽細胞	新生児	5F0474	2	2	4.0
6	新生児皮膚線維芽細胞	新生児	5F0438	2	2	7.0
6	新生児皮膚線維芽細胞	新生児	5F0474	2	2	9.5
7	成人皮膚線維芽細胞	28	6F3535	2	2	2.0
7	成人皮膚線維芽細胞	39	6F4026	2	2	0.0
5	成人 BM-由来の細胞 (低血清)	20	060470B	2	2	0.0
5	成人 BM-由来の細胞 (低血清)	20	060809B	2	2	0.0
5	成人 BM-由来の細胞 (低血清)	20	060809B	2	2	0.2
5	成人 BM-由来の細胞 (低血清)	20	060809B	2	2	0.0
5	成人 BM-由来の間葉幹細胞 (高血清)	20	060809B	10	2	0.0
5	成人 BM-由来の間葉幹細胞 (高血清)	20	060809B	10	2	0.0
10	新生児臍帯動脈平滑筋細胞	新生児	5F0442	5	4	0.0

\* : 10cm<sup>2</sup> 当たりアルカリホスファターゼ陽性小細胞から構成されるコロニーの数。表 2 中の "BM" は、"骨髄" を意味する。

## 【 0 5 3 2 】

表 3 は、101日でのクローン 1 - 8 の核型の分布を要約する。ギームザ株、すなわち染色体数が計数された。キエムサ (Giemsa) 染色の後、100の細胞のうち67が正常な核型を示した。

## 【 0 5 3 3 】

10

20

30

## 【表3】

表3  
核型分析

染色体番号	細胞数
44	1
45	22
46	67
47	7
48	1
89	1
136	1

100個の細胞を、ヒトiPS細胞（クローン1-8mTeSR）において分析した。

## 【0534】

表4は、図7及び15で使用するプライマー配列を示す。

## 【0535】

## 【表4】

表4  
RT-PCRのためのプライマー配列

	前方向プライマー配列	逆方向プライマー配列
HPRT	AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG	GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG
Nanog	TACCTCAGCCTCCAGCAGAT	TGCGTCACACCATTGCTATT
TERT	AGCCAGTCTCACCTTCAACCGC	GGAGTAGCAGAGGGAGGCCG
Sall4	AAACCCAGCACATCAACTC	GTCATTCCCTGGGTGGTTC
Zfp42	TTGGAGTGCAATGGTGTGAT	TCTGTTACACAGGCTCCAG
GDF3	GGCGTCCGCGGAATGTACTTC	TGGCTTAGGGTGGTCTGGCC
Dnmt3b	GCAGCGACCAGTCCCTCCGACT	AACGTGGGAAGGCCTGTGC
TDGF1	ACAGAACCTGCTGCCTGAAT	AGAAATGCCTGAGGAAAGCA
GABRB3	CTTGACAATCGAGTGGCTGA	TCATCCGTGGTGTAGCCATA
CYP26A1	AACCTGCAGGACTCCTCGCACA	AGGATGCCGATGGCGATTCC
Oct4-total	GAGAAGGAGAAGCTGGAGCA	AATAGAACCCCCAGGGTGGAG
Oct4-exo	AGTAGACGGCATCGCAGCTTGG	GGAAGCTTAGCCAGGTCGGAGG
Sox2-total	CAGGAGAACCCCAAGATGC	GCAGCCGCTTAGCCTCG
Sox2-exo	ACACTGCCCTCTCACACAT	CGGACTATGTTGCTGACT
Klf4-total	ACCCTGGTCTTGAGGAAGT	ACGATCGTCTTCCCTCTTT
Klf4-exo	CTCACCTTACCGAGTCGGCG	GCAGCTGGGCACCTGAACC
c-Myc-total	TCCAGCTTGTACCTGCAGGATCTGA	CCTCCAGCAGAAGGTGATCCAGACT
c-Myc-exo	AGTAGACGGCATCGCAGCTTGG	CCTCCAGCAGAAGGTGATCCAGACT

## 【0536】

表5は、GeneChip Human Mapping 500K Array Setを用いて分析された、ヒトiPSクローン1-8及び線維芽細胞（5F0438及び5F04156）のSNP遺伝子型決定を要約する。クローン1-8のSNPは、467,946のSNPのうち464,069（99.17%）で親細胞のそれと一致し、そしてそれらの3,877（0.83%）で親細胞のそれとは異なった。対照的に、クローン1-8mTeSRのSNPは、470,960のSNPのうち284,950（60.50%）においてのみ無関係のドナー細胞（5F0416）の

10

20

30

40

50

それと一致し、そしてそれらの186,010 (39.50%) で無関係の細胞のそれとは異なった。

【 0 5 3 7 】

【表 5】

表 5  
SNP 遺伝子型決定

ヒト iPS クローン 1-8 間の一致 SNP (%)、その親皮膚由来の細胞 (5F0438)、及び異なったドナー由来の皮膚細胞 (5F0416)				
	iPS 1-8_01	iPS 1-8_02	5F0438_01	5F0438_02
iPS 1-8_02	99.41			
5F0438_01	99.17	99.26		
5F0438_02	99.44	99.44	99.32	
5F0416	60.50	60.75	60.72	60.47

10

【 0 5 3 8 】

表 6 は、配列特異的オリゴヌクレオチドプローブ (SSOP) (Luminex) との PCR - 増幅された DNA のハイブリダイゼーションを用いて、分類された、ヒト iPS1-8(1-8mTeSR)、iPS2-4(mTeSR) 及び iPS3-2(mTeSR) ; 及び線維芽細胞 (5F0438 及び 5F0436) の HLA-A、HLA-B、HLA-Cw 及び HLA-DR 型を示す。

20

【 0 5 3 9 】

【表6】

表6  
HLA 遺伝子型決定

ID	A 対立遺伝子	B 対立遺伝子	Cw 対立遺伝子	DRB1 対立遺伝子	DQB1 対立遺伝子	DPB1 対立遺伝子
5F0438	*0101/ *0206/	*3801/09 *3905	*0602/ *0702/	*0802 *1104/43/	*0301/ *0402	*0402/ *0501
5F0416	*0201/ -	*1501/ *3801/09	*0303/ *0602/	*0401/33/38 *0802	*0302/ *0402	*0201 *0301/ *0501
iPS 1-8	*0101/ *0206/	*3801/09 *3095	*0602/ *0702/	*0802 *1104/43/	*0301/ *0402	*0402/ *0501
iPS 2-4	*0201/ -	*1501/ *3801/09	*0303/ *0802	*0401/33/38 *0802	*0302/ *0402	*0201 *0301/ *0501
iPS 3-2	*0101/ *0206/	*3801/09 *3905	*0602/ *0702/	*0802 *1104/43/	*0301/ *0402	*0402/ *0501

ID	HLA-A	HLA-B	HLA-Cw	HLA-DR	HLA-DQ	HLA-DP	Bw
5F0438	A1 A2	B38 B39	Cw6 Cw7	DR8.2 DR11	DQ4 DQ7	DP5 DP4	Bw 4/6
5F0416	A2 -	B62 B51	Cw9 Cw4	DR4.1 DR8.1	DQ4 DQ8	DP3 DP2	4/6 4/6
iPS 1-8	A1 A2	B38 B39	Cw6 Cw7	DR8.2 DR11	DQ4 DQ7	DP5 DP4	4/6 4/6
iPS 2-4	A2 -	B62 B51	Cw9 Cw4	DR4.1 DR8.1	DQ4 DQ8	DP2 DP2	4/6 4/6
iPS 3-2	A1 A2	B38 B39	Cw6 Cw7	DR8.2 DR11	DQ4 DQ7	DP5 DP4	4/6 4/6

10

20

30

40

【0540】

表7及び表8は、コロニーにおけるhES細胞マーカー遺伝子発現パターンを要約した。コロニーは、4種の遺伝子トランスダクションの17日後でのアルカリホスファターゼについて染色された。すべてのALP(+)コロニー及び18のALP(-)コロニーが分離され、そしてRT-PCRによるそれらのhESマーカー遺伝子発現を決定された。個々のコロニーが分類され、そして計数された。“+”は遺伝子発現を表し、そして“-”は増幅されたcDNAサ

50

サンプルを用いて40サイクルのRT - PCRにより検出されなかったことを表す。

【 0 5 4 1 】

【表 7】

表 7

ALP (+) 及び ALP (-) コロニーにおける遺伝子発現パターン

ALP (+) コロニーにおける遺伝子発現パターン

グループ番号	発現された遺伝子の数	Nanog	TGDF1	Dnmt3b	Zfp42	FoxD3	GDF3	CYP26A1	TERT	コロニーの数
1	8	+	+	+	+	+	+	+	+	4
2	7	+	+	+	+	+	+	+	-	7
3	7	+	+	+	+	+	+	-	+	11
4	7	+	+	+	+	+	-	+	+	1
5	6	+	+	+	+	+	+	-	-	25
6	6	+	+	+	+	+	-	+	-	4
7	6	+	+	+	+	+	-	-	+	3
8	6	+	+	+	+	-	+	-	+	2
9	6	+	+	+	+	-	+	+	-	3
10	6	+	+	+	-	+	+	+	-	1
11	6	+	+	+	-	-	+	+	+	1
12	5	+	+	+	+	+	-	-	-	22
13	5	+	+	+	+	-	+	-	-	9
14	5	+	+	+	+	-	-	+	-	2
15	5	+	+	+	-	+	+	-	-	4
16	5	+	+	+	-	+	-	+	-	2
17	5	+	+	+	-	-	+	+	-	1
18	5	+	+	-	+	+	+	-	-	2
19	5	+	+	-	+	+	-	-	+	1
20	4	+	+	+	+	-	-	-	-	9
21	4	+	+	+	-	+	-	-	-	3
22	4	+	+	+	-	-	+	-	-	5
23	4	+	+	-	+	+	-	-	-	7
24	4	+	-	+	+	+	-	-	-	1
24	4	+	-	+	-	+	+	-	-	2
26	4	+	-	-	+	+	+	-	-	1
27	3	+	+	+	-	-	-	-	-	1
28	3	+	+	-	+	-	-	-	-	3
29	3	+	+	-	-	+	-	-	-	4
30	3	+	+	-	-	-	-	-	+	1
31	3	+	-	+	+	-	-	-	-	1
32	3	+	-	+	-	+	-	-	-	2
33	3	+	-	+	-	-	+	-	-	1
34	3	+	-	-	+	+	-	-	-	1
35	3	+	-	-	-	+	+	-	-	1

10

20

30

40

【 0 5 4 2 】

【表 8】

表 8  
ALP (+) 及び ALP (-) コロニーにおける遺伝子発現パターン  
ALP (+) コロニーにおける遺伝子発現パターン

グループ番号	発現された遺伝子の数	Nanog	TGDF1	Dnmt3b	Zfp42	FoxD3	GDF3	CYP26A1	TERT	コロニーの数
36	2	+	+	-	-	-	-	-	-	4
37	2	+	-	+	-	-	-	-	-	5
38	2	+	-	-	+	-	-	-	-	2
39	1	+	-	-	-	-	-	-	-	2
40	0	-	-	-	-	-	-	-	-	2
41	6	+	+	+	+	+	-	+	-	1
42	6	+	+	-	+	+	+	-	+	1
43	5	+	+	+	+	+	-	-	-	3
44	5	+	+	-	+	+	-	-	+	6
45	4	+	+	+	-	+	-	-	-	1
46	4	+	+	-	+	+	-	-	-	1
47	4	+	+	+	-	-	-	-	+	1
48	2	+	-	-	-	-	-	-	+	1
49	1	+	-	-	-	-	-	-	-	1
50	1	-	+	-	-	-	-	-	-	1
51	0	-	-	-	-	-	-	-	-	1

10

20

【 0 5 4 3 】

表9は、新生児線維芽細胞を用いての実験のアルカリホスファターゼ陽性コロニーの数を要約する。4種の遺伝子導入の日は、レトロウィルスベクターが感染された日である。ドナーは、Lonza製品のロット番号を示す。コロニーの数は、10cm<sup>2</sup>当たりのアルカリホスファターゼ陽性小細胞から構成されるコロニーの数である。ND：決定されなかった。

30

【 0 5 4 4 】

【表 9】

実験条件 ドナー	ALP 染色		注意
	細胞密度 (細胞/cm <sup>2</sup> )	コロニーの数 (/10cm <sup>2</sup> )	
5F0439	1×10 <sup>4</sup>	0.8	
5F0438	1×10 <sup>4</sup>	6.0	iPS クローン#1-8
5F0438	1×10 <sup>4</sup>	6.0	
5F0474	1×10 <sup>4</sup>	4.0	
5F0438	1×10 <sup>4</sup>	7.0	
5F0474	1×10 <sup>4</sup>	9.5	
5F0474	1×10 <sup>4</sup>	13.3	
5F0416	1×10 <sup>3</sup>	19.0	
5F0416	1×10 <sup>4</sup>	17.5	
5F0474	1×10 <sup>4</sup>	14.0	
5F0416	1×10 <sup>3</sup>	3.0	
5F0416	1×10 <sup>4</sup>	9.0	
5F0416	1×10 <sup>3</sup>	21.0	
5F0416	1×10 <sup>4</sup>	21.5	ALP (+)
5F0474	1×10 <sup>3</sup>	17.0	コロニー
5F0474	1×10 <sup>4</sup>	19.5	分類
5F0416	1×10 <sup>3</sup>	ND	
5F0416	1×10 <sup>4</sup>	ND	iPS クローン #2-4
5F0474	1×10 <sup>3</sup>	ND	
5F0474	1×10 <sup>4</sup>	ND	
5F1195	1×10 <sup>3</sup>	ND	
5F0438	1×10 <sup>3</sup>	ND	iPS クローン #3-2

10

20

30

## 【 0 5 4 5 】

表10は、Nanog及びOct3/4のプロモーター領域のメチル化分析のために使用するアンプリコンに対応するゲノムの位置及びサイズを列挙する。縦列A、B及びCは、それぞれアンプリコン名称、アンプリコンに対するゲノムの位置及びサイズを示す。

## 【 0 5 4 6 】

## 【表 1 0】

アンプリコン 名称	アンプリコンに対応するゲノム における位置	アンプリコンサイズ
Nanog-z1	chr12:7832645-7832959	315
Nanog-z2	chr12:7832877-7833269	393
Oct3/4-z1	chr6:31248581-31249029	449
Oct3/4-z2	chr6_qbl hap2:2388299-2388525	227

40

## 【 0 5 4 7 】

50

表11は、Nanog及びOct3/4のプロモーター領域のメチル化分析のために使用するプライマー組を列挙する。縦列A及びBはそれぞれプライマーの名称及びプライマーの配列（遺伝子特異的配列：大文字、標識配列：小文字）を列挙する。

【 0 5 4 8 】

【 表 1 1 】

表11  
メチル化分析のためのプライマー配列

プライマー名称	プライマー配列 (遺伝子特異的配列についての大文字, 標識配列について的小文字)
Nanog-z1-L	aggaagagagGGAATTTAAGGTGTATGATTTTTTATTTT
Nanog-z1-R	cagtaatacgcactcactatagggagaaggctATAACCCACCCCTATAATCCAATA
Nanog-z2-L	aggaagagagGTTAGGTTGGTTTTAAATTTTGGAT
Nanog-z2-R	cagtaatacgcactcactatagggagaaggctTTTATAATAAAAACTCTATCACCTTAAACC
Oct3/4-z1-L	aggaagagagTAGTAGGATTTTTTGGATTGGTTT
Oct3/4-z1-R	cagtaatacgcactcactatagggagaaggctAAAACCTTTCCCCACTCTTATATTAC
Oct3/4-z2-L	aggaagagagGTAATAAAGTGAGATTTTGTTTTAAAAA
Oct3/4-z2-R	cagtaatacgcactcactatagggagaaggctCCACCCACTAACCTTAACTCTAA

10

20

【 0 5 4 9 】

表12及び表13は、例15のALP陽性コロニーにおける相対的mRNA発現を要約する。コロニーの数は、図16 - 23に対応する。コロニー#5-2-32、 #5-2-49、 #5-2-51、 #7-2-37は、すべての分析されたヒトES細胞マーカーを発現した。対照的に、線維芽細胞コロニー#3-1-12、 #3-1-215、 #5-1-4は、それはトランスジーンを高く発現したが、Nanogのみを発現した。

【 0 5 5 0 】

【表 1 2】

表12  
ALP陽性コロニーにおけるES細胞マーカーの相対的mRNA発現

遺伝子の数	ALP	Nanog		GDF3		CYP26A1		TERT		c-Myc		Oct3/4	
		平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
8	ALP(+)	9.3 ± 1.5		4.8 ± 0.3		27.2 ± 12.5		0.2 ± 0.0		1121.1 ± 25.3		39.3 ± 1.5	
8	ALP(+)	15.9 ± 5.7		242.9 ± 78.8		3.0 ± 0.3		3.7 ± 0.5		1106.3 ± 51.8		770.6 ± 9.3	
8	ALP(+)	27.1 ± 2.2		419.2 ± 24.7		73.5 ± 8.2		2.5 ± 0.1		1329.4 ± 272.1		101.6 ± 5.1	
8	ALP(+)	36.9 ± 7.8		171.3 ± 20.0		110.1 ± 15.4		6.2 ± 1.1		566.9 ± 22.1		30.9 ± 2.4	
7	ALP(+)	21.0 ± 2.4		59.2 ± 10.2		0.0 ± 0.0		0.12 ± 0.09		436 ± 12		25.0 ± 1.2	
7	ALP(+)	127.6 ± 6.0		259.7 ± 3.9		0.0 ± 0.0		0.6 ± 0.3		59.2 ± 1.2		9.1 ± 0.1	
7	ALP(+)	32.6 ± 8.4		34.0 ± 5.0		0.0 ± 0.0		1.1		446.9 ± 15.8		14.9 ± 0.1	
7	ALP(+)	9.5 ± 1.0		3.4 ± 0.9		0.0 ± 0.0		1.6 ± 0.1		1052.8 ± 129.5		17.1 ± 0.3	
7	ALP(+)	141.5 ± 64.3		328.8 ± 54.1		0.0 ± 0.0		7.0 ± 0.7		9796.2 ± 275.5		324.2 ± 29.8	
7	ALP(+)	78.0 ± 16.6		188.2 ± 3.8		0.0 ± 0.0		67.6 ± 7.1		9714.4 ± 15.7		258.7 ± 13.3	
7	ALP(+)	55.5 ± 12.2		151.3 ± 21.2		0.0 ± 0.0		5.2 ± 0.1		285.3 ± 49.6		24.8 ± 3.2	
7	ALP(+)	0.1 ± 0.1		0.1 ± 0.1		0.0 ± 0.0		1.1 ± 0.0		13065.1 ± 769.8		241.8 ± 0.7	
7	ALP(+)	10.9 ± 2.6		67.9 ± 12.3		0.0 ± 0.0		4.4 ± 0.8		171.5 ± 2.3		578.7 ± 13.4	
7	ALP(+)	0.1 ± 0.0		0.4 ± 0.1		0.0 ± 0.0		0.7 ± 0.5		3176.2 ± 751.2		233.4 ± 17.7	
7	ALP(+)	51.5 ± 14.4		126.4 ± 1.1		0.0 ± 0.0		2.5 ± 0.3		1446.0 ± 421.7		33.8 ± 2.6	
7	ALP(+)	0.7 ± 0.1		0.0 ± 0.0		5.0 ±		0.5 ± 0.2		6049.2 ± 396.9		3.8 ± 0.3	
6	ALP(+)	14.6 ± 1.1		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		40.0 ± 5.7		27086.4 ± 3870.8		530.6 ± 84.1	
6	ALP(+)	20.1 ± 5.9		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		1.9 ± 1.0		9125.8 ± 883.7		7.5 ± 0.7	
6	ALP(+)	1.1 ± 0.4		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		20.6 ± 0.6		8344.9 ± 2054.5		6.7 ± 0.5	
6	ALP(+)	103.4 ± 11.7		195.3 ± 17.7		0.0 ± 0.0		18.1 ± 1.8		95692.9 ± 5109.8		2843.9 ± 113.9	
6	ALP(+)	50.8 ± 3.6		291.3 ± 43.9		0.0 ± 0.0		20.2 ± 2.9		29701.1 ± 4821.3		483.1 ± 13.9	
6	ALP(+)	50.3 ± 14.5		34.3 ± 3.6		10.4 ± 2.0		1.3 ± 0.1		533.8 ± 24.8		30.2 ± 1.2	
5	ALP(+)	9.3 ± 0.5		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		16848.2 ± 1742.0		4.7 ± 0.2	
5	ALP(+)	126.4 ± 65.3		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		28.7 ± 4.9		23614.4 ± 388.9		310.9 ± 19.2	
4	ALP(+)	3.7 ± 1.3		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		2927.9 ± 412.5		130.3 ± 10.1	
4	ALP(+)	1.9 ± 0.3		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		19433.2 ± 297.0		4.2 ± 0.5	
4	ALP(+)	17.4 ± 5.1		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		1959.8 ± 379.9		8.5 ± 0.7	
3	ALP(+)	2.2 ± 0.3		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		6065.6 ± 704.9		3.4 ± 0.3	
3	ALP(+)	1.9 ± 0.3		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		4572.6 ± 303.7		7.4 ± 0.1	
3	ALP(+)	1.4 ± 0.2		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		53755.3 ± 10897.7		22.9 ± 3.0	
3	ALP(+)	5.6 ± 2.9		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		807.1 ± 13.4		25595.8 ± 2002.8		414.9 ± 22.6	

10

20

30

【 0 5 5 1】

【表 13】

表13  
ALP陽性コロニーにおけるES細胞マーカーの相対的mRNA発現

遺伝子の数	ALP	Nanog		GDF3		CYP26A1		TERT		c-Myc		Oct3/4	
		平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
6	ALP(-)	0.5 ± 0.1		0.07 ±		0.0 ± 0.0		0.01 ± 0.01		5873.2 ± 156.2		226.3 ± 12.9	
5	ALP(-)	0.8 ± 0.2		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.5 ± 0.2		8698.4 ± 492.3		58.7 ± 2.6	
5	ALP(-)	6.9 ± 1.1		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.7 ± 0.1		9350.1 ± 201.0		2.1 ± 0.1	
5	ALP(-)	7.2 ± 2.0		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		7.3 ± 1.8		26133.6 ± 3528.5		8.0 ± 0.1	
5	ALP(-)	0.2 ± 0.1		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.5 ± 0.1		5211.8 ± 618.7		370.7 ± 7.8	
5	ALP(-)	2.5 ± 0.5		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.5 ± 0.1		8971.8 ± 110.3		266.6 ± 21.4	
5	ALP(-)	3.4 ± 0.9		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		11.8 ± 3.4		9748.3 ± 530.0		7.3 ± 0.1	
4	ALP(-)	0.2 ± 0.1		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		14.6 ± 1.9		7681.0 ± 286.9		261.0 ± 26.0	
2	ALP(-)	0.6 ± 0.3		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		8.2 ± 0.6		53887.9 ± 1343.2		13.3 ± 1.2	
1	ALP(-)	3.4 ± 0.5		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		7721.3 ± 437.0		52.1 ± 2.3	
1	ALP(-)	0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		96049.1 ± 2394.1		23.7 ± 2.1	
0	ALP(-)	0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		0.0 ± 0.0		1454.7 ± 371.7		11.6 ± 0.3	
クローン1-8 (Std)		1.0		1.0		1.0		1.0		1.0		1.0	

10

【0552】

表14は、クローン2-4及び3-2における相対的mRNA発現を要約する。全RNAがクローン2-4及び3-2から抽出された。ES細胞マーカー遺伝子の発現は、例16及び17に記載のようにして、qRT-PCRにより決定された。クローン2-4及び3-2の両者は、ES細胞マーカー遺伝子発現を示した。すべての発現値は、ヒトiPSクローン-1-8(94日)に対して標準化された。

20

【0553】

【表 14】

表14  
クローン2-4及び3-2における相対的mRNA発現

	#3-2_日48		#2-4_日59		#1-8_日82		#1-8_日94	
Nanog	4.21 ±	1.11	2.88 ±	0.43	2.41		1.00 ±	0.24
TERT	1.52 ±	0.50	1.94 ±	0.14	0.69		1.00 ±	0.70
GDF3	6.42 ±	0.16	6.65 ±	0.05	0.92		1.00 ±	0.49
CYP26A1	72.45 ±	14.92	49.12 ±	0.06	62.50		1.00 ±	0.01
TDGF1	2.55 ±	0.10	3.53 ±	0.05	3.53		1.00 ±	0.01
Dnmt3b	2.66 ±	0.04	0.96 ±	0.02	0.91		1.00 ±	0.01
Foxd3	1.16 ±	0.08	0.59 ±	0.17	1.14		1.00 ±	0.18
Zfp42	0.98 ±	0.15	0.76 ±	0.01	2.44		1.00 ±	0.02
Myc	6.14 ±	0.58	4.58 ±	0.16	3.82		1.00 ±	0.05
Oct3/4	2.00 ±	0.07	1.08 ±	0.01	1.33		1.00 ±	0.00

30

40

【0554】

【 表 1 5 】

表15

組織名称	遺伝子銀行	説明
235940_at	AW983691	染色体 9 読取り枠 64
239206_at	BE552138	補体成分 (3b/4b) 受容体 1-様
239205_s_at	BE552138	補体成分 (3b/4b) 受容体 1 (ノッブ血液型) /// 補体成分 (3b/4b) 受容体 1-様 /// 補体成分 (3b/4b) 受容体 1-インフォーム F 前駆体に類似する
215101_s_at	BGI66705	ケモカイン (C-X-C モチーフ) リガンド 5
AFFX-r2-Ec-bioD-3_at	AFFX-ThrX-M	---
AFFX-M27830_5_at	AFFX-M27830_3	---
210697_at	AF070651	亜鉛フィンガータンパク質 257
213122_at	A1096375	TSPY_様 5
223551_at	AF225513	タンパク質キナーゼ (cAMP-依存性, 触媒性) インヒビター-β
214974_x_at	AK026546	ケモカイン (C-X-C モチーフ) リガンド 5
237552_at	BF056473	GDNA クローン IMAGE: 4667929
212575_at	BF966155	染色体 19 読取り枠 6
229328_at	T90358	亜鉛フィンガータンパク質 540
231120_x_at	AL569326	タンパク質キナーゼ (cAMP-依存性, 触媒性) インヒビター-β
235075_at	A1813438	デスマグレイン 3 (尋常性天疱瘡 抗原)
211906_s_at	AB046400	セルピンベンブチダーゼインヒビター, クレド B (オボアルブミン), メンバー 4
225061_at	N45231	DnaJ (Hsp40) 相同体, サブファミリア, メンバー 4
217230_at	AF199015	ピリン 2 (エズリン)
225908_at	A1829927	イソアミルアセテート加水分解エステラーゼ   相同体 (S. セレシシアエ)
232881_at	A1500353	GNAS1 アンチセンス

【 0 5 5 5 】

10

20

30

40

【表 16】

組織名称	遺伝子銀行	説明
239951_at	A1734093	転写された位置
1554333_at	BC031044	DnaJ (Hsp40) 相同体, サブファミリーA, メンバー4
1553276_at	NM_152476	亜鉛フィンガンタンパク質 560
1553970_s_at	BC042510	カルボキシエステリリパーゼ (胆汁酸塩-刺激されたリパーゼ)
219837_s_at	NM_018659	サイトカイン-様 I
228063_s_at	AW025330	ヌクレオソームアセンブリータンパク質 1-様 5
208542_x_at	NM_007153	亜鉛フィンガンタンパク質 208
243110_x_at	A1868441	神経ペプチド W
239319_at	BE542563	仮定タンパク質 LOC 728342
215826_x_at	AK023017	仮定 BC37295_3
1555229_a_at	BC007010	補体成分 I, s 亜成分
235779_at	AW467077	仮定タンパク質 LOC284408
220638_s_at	NM012116	Cas-Br-M (ネズミ) 自己指向性 レトロウイルス形質転換配列 c
232315_at	AU149712	亜鉛フィンガン-様
222546_s_at	AW204755	EPS8-様 2
235913_at	A1285722	亜鉛フィンガン-様
215019_x_at	AW474158	亜鉛フィンガンタンパク質 528
210362_x_at	AF230409	骨髄球白血病
231299_at	A1494590	センタウリン, $\gamma$ 3
214336_s_at	A1621079	コートマー タンパク質複合体, サブユニット $\alpha$
210171_s_at	S68134	cAMP 応答性要素モジュレーター
219807_x_at	NM_016154	RAB4B, メンバー RAS 発癌遺伝子ファミリー
205827_at	NM_000729	コレシトキニン
1559503_a_at	AA350425	亜鉛フィンガンタンパク質 91 に類似する

【 0 5 5 6 】

10

20

30

40

【 表 17 】

表17

組織名称	遺伝子銀行	説明
228062_at	AW025330	ヌクレオソームアセンブリータンパク質 1-様 5
223789_s_at	AF116627	GTP 結合タンパク質 2
215634_at	AF007137	クロン 23618 mRNA 配列
201679_at	BE646076	ARS2 タンパク質
213695_at	L48516	パラオキソナーゼ 3
1553219_a_at	NM_015365	アルポート症候群, 精神障害, 中央顔面形成不全 及び卵形赤血球増加症 染色体領域, 遺伝子 1
1552470_a_at	NM_148914	Abヒドローゼ ドメイン含有 11
216884_at	S69182	タンパク質 チロシンホスファターゼ, 非-受容体型 12
237215_s_at	N76327	トランスフェリン受容体 (p90, CD71)
209040_s_at	U17496	プロテアソーム (プロソーム, 強痛) サブユニット, $\beta$ 型, 8 (大きな多機能ペプチダーゼ 7)
214090_at	BF732462	PRK, アポプトシス, WT1 レギュレーター
223629_at	BC001186	プロトカドヘリン $\beta$ 5
216971_s_at	Z54367	プレクチン 1, 中間フィラメント 結合タンパク質 500kDa
201008_s_at	AA812232	チオレドキシシン 相互作用性 タンパク質
233754_x_at	AC007228	亜鉛フィンガンタンパク質 71
200621_at	NM_004078	システイン及びグリセリン-富化 タンパク質 1
208978_at	U36190	システイン-富化 タンパク質 2
1552914_a_at	NM_025240	CD276 分子
1559051_s_at	AK097148	染色体 6 読取り枠 150
212105_s_at	BF313832	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) ポックスポリペプチド 9
222814_s_at	A1916361	亜鉛フィンガンタンパク質 439
236562_at	N29327	亜鉛フィンガンタンパク質 439
1552245_a_at	AL833487	MRNA; cDNA DKFZp686H1629 (クロン DKFZp686H1629 から)
203872_at	NM_001100	アクチン, $\alpha$ 1, 骨格筋

【 0 5 5 7 】

10

20

30

40

【 表 1 8 】

表18

組織名称	遺伝子銀行	説明
表 18: iPS 細胞系 対 hES 細胞系 において 5 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ )		
222935_x_at	AW139759	溶質キャリアファミリー 39 (亜鉛トランスポーター), メンバー 8
1555695_a_at	AF388368	クラリン 1
207080_s_at	NM_004160	ペプチド YY
243195_s_at	BF438407	亜鉛フィンガンタンパク質 551
220179_at	NM_022357	ジベプチダーゼ 3
207099_s_at	NM_000390	先天性脈絡膜欠如 (Rab エスコート タンパク質 I)
222898_s_at	BE350882	$\delta$ -様 3 (ショウジョウバエ)
226539_s_at	BF436337	---
229332_at	A1653050	4-ヒドロキシフェニルピルベートジオキシゲナーゼ-様
207852_at	NM_002994	ケモカイン (C-X-C モチーフ) リガンド 5
1554334_a_at	BC031044	DnaJ (Hsp40) 相同体, サブファミリー A, メンバー 4
1555731_a_at	AF393369	アダプター-関連の タンパク質複合体 I, $\sigma$ 3 サブユニット
AFX-r2-Ec-bioC-5_at	AFX-ThrX-5	---
215337_at	AK022508	メデイーター複合体 サブユニット 24
211124_s_at	AF119835	KIT リガンド
1553873_at	NM_153270	kelch-様 34 (ショウジョウバエ)
201796_s_at	BE790854	バリンル-tRNA シンターゼ
235942_at	A1272059	LOC401629//LOC401630
202873_at	BF034973	ATPase, H+輸送, リゾノーム 42kDa, VI サブユニット C1
244178_at	AW451792	COMM ドメイン含有 7
215172_at	AL050040	タンパク質 子ロシホスファターゼ, 非-受容体型 20B//タンパク質 子ロシホスファターゼ, 非-受容体型 20A
228251_at	BE467577	UBX ドメイン 含有 I
224463_s_at	BC006128	染色体 II 読取り枠 70

【 0 5 5 8 】

10

20

30

40

【 表 1 9 】

表19

表 19 : iPS 細胞系 対 hES 細胞系 において 5 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 (p ≤ 0.01)		説明
組織名称	遺伝子銀行	
206797_at	NM_000015	N-アセチルトランスフェラーゼ 2 (アリアルミン N-アセチルトランスフェラーゼ)
212278_x_at	BF588511	ユビキチン タンパク質 リガーゼ E3A (ヒト乳頭腫ウイルス E6-関連の タンパク質, Angelman 症候群)
1555766_a_at	AF493870	グアニンヌクレオチド 結合タンパク質 (G タンパク質), $\gamma$ 2
211107_s_at	AB017332	オーロラキナーゼ C
214519_s_at	NM_005059	レラクシン 2
226504_at	AA522720	配列 類似性 109 を有するファミリー, メンバー B
216469_at	AL163202	亜鉛フィンガータンパク質 43 に類似する (HTF6)
221123_x_at	NM_018660	亜鉛フィンガータンパク質 395
1568574_x_at	AB019562	分泌されたリンタンパク質 1 (オステオポンチン, 骨シアロタンパク質 1, 初期 T-リンパ球 活性化 1)
215989_at	BE258133	クロモボックス 相同体 2 (Pc クラス 相同体, ショウジョウバエ)
205195_at	NM_001283	アダプター-関連の タンパク質複合体 1, $\sigma$ 1 サブユニット
223994_s_at	BC000154	溶質キャリアファミリー 12 (カリウム/塩化物 トランスポーター), メンバー 9
205095_s_at	NM_005177	ATPase, H+輸送, リゾノーム V0 サブユニット a1
1554777_at	B1092935	亜鉛フィンガータンパク質 42 相同体 (マウス)
217494_s_at	AF023139	ホスファターゼ及びテンシン 相同体 (複数の進行した癌において突然変異誘発された 1), 偽遺伝子 1
201169_s_at	BG326045	塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス ドメイン含有, クラス B, 2
214123_s_at	AI126492	染色体 4 読取り枠 10
229896_at	H41907	CDNA クローン IMAGE:6106200
211214_s_at	BC003614	死-関連の タンパク質 キナーゼ 1
203402_at	AL520102	カリウム 電位型チャネル, シエイカー-関連の サブファミリー, $\beta$ メンバー 2
205920_at	NM_003043	溶質キャリアファミリー 6 (神経伝達物質トランスポーター, タウリン), メンバー 6
212937_s_at	M20776	コラーゲン, 型 VI, $\alpha$ 1
200796_s_at	BF594446	骨髄系細胞 白血病 配列 1 (BCL2-関連の)
1558697_a_at	B1600341	KIAA0430
232771_at	Z83850	Nik 関連の キナーゼ

【 0 5 5 9 】

10

20

30

40

【 表 2 0 】

表20

組織名称	遺伝子銀行	説明
1559501_at	BC037580	CDNA クローン IMAGE:5262521
238750_at	AW083576	ケモカイン (C-C モチーフ) リガンド 28
239818_x_at	AA576947	tribbles 相同体 1 (シヨウジョウバエ)
1555765_a_at	AF493872	グアニンヌクレオチド 結合タンパク質 (G タンパク質), $\gamma$ 4
233573_s_at	AK001080	WD 反復 ドメイン 6
206220_s_at	NM_007368	RAS p21 タンパク質 活性化因子 3
212113_at	A1927479	仮定 LOC552889
205577_at	NM_005609	ホスホリラゼ, グリコゲン; 筋肉 (McArdle 症候群, グリコゲン 貯蔵疾患 型 V)
201130_s_at	L08599	カドヘリン 1, 型 1, E-カドヘリン (上皮)
219911_s_at	NM_016354	溶質キャリアー 有機アニオン性 トランスポーター ファミリー, メンバー 4A1
227598_at	A1762857	染色体 7 読取り枠 29
226654_at	AF147790	ムチン 12, 細胞表面 関連の
205461_at	NM_006861	RAB35, メンバー RAS 発癌遺伝子ファミリー
221285_at	NM_006011	ST8 $\alpha$ -N-アセチル-ニューラミニド $\alpha$ -2,8-シアリルトランスフェラーゼ 2
203027_s_at	A1189359	メバロナート (ジホスホ) デカルボキシラーゼ
243639_at	R51605	転写された遺伝子座
211162_x_at	AF116616	ステアロイル-CoA デサチュラーゼ (6-9-デサチュラーゼ)
213667_at	AB002307	Snf2-関連の CBP 活性化因子 タンパク質
1559361_at	AF086401	十分な長さの挿入体 cDNA クローン ZD75H06
218000_s_at	NM_007350	プレクストリン 相同体-様 ドメイン, ファミリー-A, メンバー 1
209260_at	BC000329	ストラチフィン
211530_x_at	M90686	HLA-G 組織適合性抗原, クラス I, G
AFFX-r2-Bs-dap-M_at	AFFX-r2-Bs-phe-M	---

【 0 5 6 0 】

10

20

30

40

【表 2 1】

表21

組織名称	遺伝子銀行	説明
表 21 : iPS 細胞系 対 hES 細胞系 において 5 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ )		
239947_at	AI969304	転写された遺伝子座
215955_x_at	Y10388	Rho GTPase 活性化 タンパク質 26
227806_at	BG285710	染色体 16 読取り枠 74
220259_at	NM_024927	ブレクストリン 相同体 ドメイン含有, ファミリー H (MyTH4 ドメインを有する)メンバー 3
1560154_a_at	AK026500	CDNA:FLJ22847 fis, クローン KAI686
AFFX-r2-Bs-dap-5_a	AFFX-r2-Bs-phe-5	---
223708_at	AF329838	C1q 及び腫瘍壊死因子 関連の タンパク質 4
215581_s_at	AK022303	ミニ染色体 維持複合体成分 3 関連の タンパク質
1552399_a_at	NM_145696	BRF 1 相同体, RNA ポリメラーゼ III 転写開始因子 IIIB (S.セレピシアエ) のサブユニット
221310_at	NM_004115	線維芽細胞成長因子 14
234939_s_at	AL161953	PHD フィンガー タンパク質 12
218944_at	NM_023078	ピロリン-5-カルボキシシレートレダクターゼ様
206673_at	NM_07223	G タンパク質 結合された受容体 176
205910_s_at	NM_001807	カルボキシシルエステリリパーゼ (胆汁酸塩-刺激されたリパーゼ)
206232_s_at	NM_004775	UDP-Gal: $\beta$ GlucNAc $\beta$ 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ, ポリペプチド 6
212009_s_at	AL553320	ストレス-誘発されたーリンタンパク質 1 (Hsp70/Hsp90-構成 タンパク質)
204815_s_at	AI924903	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) ボックスポリペプチド 34
234237_s_at	AL137611	仮定 タンパク質 FLJ20294
229502_at	AW242403	コリンデヒドロゲナーゼ
1554776_at	AF450454	垂鉛フィンガータンパク質 42 相同体 (マウス)
242070_at	AI014470	仮定 タンパク質 LOC728485
1554508_at	BC029917	ホスホイノシチド-3-キナーゼ アダプター タンパク質 1
210935_s_at	AF274954	WD 反復 ドメイン 1

【 0 5 6 1 】

10

20

30

40

【 表 2 2 】

表22

組織名称	遺伝子銀行	説明
236741_at	AW299463	WD 反復 ドメイン 72
205081_at	NM_001311	システイン-富化 タンパク質 1 (腸)
1555240_s_at	AF493879	グアニンヌクレオチド 結合タンパク質 (Gタンパク質), $\gamma$ 12
205824_at	NM_001541	ヒートショック 27kDa タンパク質 2
230033_at	BF436398	染色体 19 読取り枠 51
206832_s_at	NM_004186	セマドメイン, 免疫グロブリン ドメイン (Ig), 短い塩基性ドメイン, 分泌された, (セマホリン) 3F
223083_s_at	AW057545	egl nine 相同体 2 (C.エレガンス)
235234_at	AA359612	FLJ36874 タンパク質
206604_at	NM_004561	ovo-様 1 (シヨウジョウバエ)
1555829_at	BC001224	配列 類似性 62 (C2 ドメイン 含有 2) メンバー 8 を有するファミリー
1555434_a_at	BC015770	溶質キャリアー ファミリー 39 (亜鉛トランスポーター), メンバー 14
205196_s_at	NM_001283	アダプター-関連の タンパク質複合体 1, $\sigma$ 1 サブユニット
1564706_s_at	AF110329	グルタミナーゼ 2 (肝臓, ミトコンドリア)
242519_at	BF432331	セレノタンパク質 P, 血漿, 1
205344_at	NM_006574	コンドロイチン硫酸プロテオグリカン 5 (神経グリカン C)
201123_s_at	NM_001970	真核生物翻訳開始因子 5A
220825_s_t	NM_0018240	IRRE 様 (シヨウジョウバエ) の血族
224805_s_at	BF508824	染色体 15 読取り枠 17
224033_at	AF130083	---
1564339_a_at	AF279779	コリン受容体, ムスカリン性 3///コリン受容体に類似する, ムスカリン性 3
216031_x_at	T53900	血液学的及び神経学的な発現された 1-様
202627_s_at	AL574210	セルピンペプチダーゼインヒビター, クレード E (ネキシシ, プラスミノーゲン 活性化因子 インヒビター 型 I), メンバー 1
221628_s_at	AF326966	サイトカイン-様 核因子 n-pac
201432_at	NM_001752	カタラーゼ

【 0 5 6 2 】

10

20

30

40

【表 23】

表23

組織名称	遺伝子銀行	説明
223285_s_at	AW044319	S16 ( $\alpha$ -N-アセチル-ニューラミニル-2,3- $\beta$ -ガラクトシル-1,3)-N-アセチルガラクトサミン ニド $\alpha$ -2,6-シアリルトランスフェラーゼ 4
155580_at	BC038422	亜鉛フィンガータンパク質 533
209261_s_at	BF000629	核受容体 サブファミリー 2, グループ F, メンバー 6
1553055_a_at	NM_14975	シユラフェン ファミリー メンバー 5
233492_s_at	AC005587	嗅覚受容体, ファミリー 2, サブファミリー A, メンバー 4///嗅覚受容体, ファミリー 2, サブファミリー A, メンバー 7/// similar to rho グアニンヌクレオチド 交換 因子 5
205867_at	NM_002834	タンパク質 チロシンホスファターゼ, 非-受容体型 II (ヌーナン 症候群 I)
1554417_s_at	AY113699	前方咽頭部欠陥性 I 相同体 A (C. エレガンス)
223799_at	AF253976	KIAA1826
214040_s_at	BE675337	ゲルゾリン (アミロイド-シス, フィンランド 型)
201045_s_at	BF513857	RAB6A, メンバー RAS 発癌遺伝子ファミリー///RAB6C-様
1557910_at	BG612458	ヒートショック タンパク質 90kDa $\alpha$ (サイトゾル), クラス B メンバー I
204823_at	NM_014903	ニューロンナビゲーター 3
1553852_at	NM_152564	空胞 タンパク質 分類 13 相同体 B (酵母)
1557924_s_at	S76738	アルカリホスファターゼ, 肝臓/骨/肝臓
221807_s_at	BG399562	TraB ドメイン含有
1552995_at	NM_145659	インターロイキン 27
1567013_at	AF323119	核因子 (赤芽球-由来の 2)-様 2
216360_x_at	AK000238	リボソーム RNA プロセッシング 12 相同体 (S. セレビスシアエ)
242676_at	AA401733	転写された遺伝子座
205925_s_at	NM_002867	RAB3B, メンバー RAS 発癌遺伝子ファミリー
232751_at	AL121893	網膜胚腫細胞腫 結合タンパク質 9
1555680_a_at	AY033891	スベルミンオキシダーゼ
231452_at	AW510925	HRAS-様 サブレッサ-ファミリー, メンバー 5

【 0 5 6 3 】

10

20

30

40

【表 2 4】

表24

組織名称	遺伝子銀行	説明
210068_s_at	U63622	アクアポリン 4
205384_at	NM_005031	FXYD ドメイン含有 イオン輸送 レギュレーター 1 (ホスホレマン)
213171_s_at	AL121753	マトリックスメタルプロテナーゼ 24 (膜挿入された)
210732_s_at	AF342816	レクチン、ガラクトシド-結合、溶解性, 8 (ガレクチン8)
203890_s_at	BF686824	死-関連の タンパク質 キナーゼ 3
209756_s_at	A1871354	v-myc 骨髄細胞腫症ウイルス 関連の 腫瘍遺伝子, 神経芽由来の (鳥類)
232506_s_at	AK026504	染色体 15 読取り枠 41
211708_s_at	BC005807	ステアロイル-CoA デサチユラーゼ ( $\delta$ -9-デサチユラーゼ)
1556670_at	AK098715	CDNAFLJ25849 fis, クローン TST08968
1558214_s_at	BG330076	カテニン (カドヘリン-関連の タンパク質), $\alpha$ 1, 102kDa
1555559_s_at	AF419247	ユビキチン 特異的ペプチダーゼ 25
209458_x_at	AF105974	ヘモグロビン, $\alpha$ 1///ヘモグロビン, $\alpha$ 2
222385_x_at	AF346602	Sec61 $\alpha$ 1 サブユニット (S, セレブシアエ)
228102_at	AA127691	ニューロピリン 2
229284_at	R60683	メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ II, $\beta$
227759_at	W92036	プロタンパク質コンバーターセプチリン/ケキシン 型9
208621_s_at	BF663141	ピリン 2(エズリン)
211538_s_at	U56725	ヒートショック 70kDa タンパク質 2
218832_x_at	NM_004041	アレスチン, $\beta$ 1
229289_at	AL517395	仮定 タンパク質 BC004941
1553698_a_at	NM_145257	染色体 1 読取り枠 96
209427_at	AF064238	スムーテリン
214971_s_at	AV695711	ST6 $\beta$ -ガラクトサミド $\alpha$ -2,6-シアリルトランスフェラーゼ I
235854_x_at	AA167669	Rho-関連の, コイルドコイル 含有 タンパク質 キナーゼ I
217601_at	AL523184	ヌクレオポリン 188kDa

【 0 5 6 4】

10

20

30

40

【表 25】

表25

組織名称	遺伝子銀行	説明
205715_at	NM_004834	骨髄間質細胞抗原 I
207532_at	NM_006891	クリスタリン, $\gamma$ D
239852_at	AL532029	メチルマロン酸ウレア (コバラミン欠陥) cblA 型
206997_s_at	NM_004807	ヘパラン硫酸 6-0-スルホトランスフェラーゼ III/ヘパラン硫酸 6-0-スルホトランスフェラーゼ I (HS6ST-I) に類似する
219424_at	NM_005755	エプスタイン-バーウイルス 誘発された 遺伝子 3
225322_s_at	AL514147	染色体 17 読取り枠 70
221414_s_at	NM_030931	デフェンシン, $\beta$ 126
214154_s_at	AA888057	プラコフィリン 2
1562527_at	AF519622	仮定 タンパク質 LOC283027
221213_s_at	NM_017661	毛髪状のウイング 相同体 4 (シヨウジョウバエ) のサブレッサー
214007_s_at	AW665024	ツイオンフィリン, アクチン-結合タンパク質, 相同体 I (シヨウジョウバエ)
1556834_at	BC042986	CDNA クローン IMAGE:5296106
227757_at	AL563297	クリン 4A
236340_at	AI769947	転写された遺伝子座, XP_001146557.1 仮定 タンパク質 [パントログロジット] に強く類似する
204698_at	NM_002201	インターフェロン刺激されたエクソヌクレーアーゼ 遺伝子 20KDa
1554383_a_at	BC028121	トランスロケーション 関連の 膜 タンパク質 2
210978_s_at	BC002616	トランスゲリン 2
234773_x_at	AL442080	MRNA: cDNADKFZp434A0226 (クローン DKFZp434A0226 からの)
208504_x_at	NM_018931	プロトカドヘリン $\beta$ II
214008_at	N25562	ツイオンフィリン, アクチン-結合タンパク質, 相同体 I (シヨウジョウバエ)
209875_s_at	M83248	分泌されたリンタンパク質 I (オステオポンチン, 骨シアロタンパク質 I, 初期 T-リンパ球活性化 I)
1555821_a_at	BC016043	AKT1 基質 I (プロリンに富む)

【 0 5 6 5 】

10

20

30

40

【表 26】

組織名称	遺伝子銀行	説明
216915_s_at	S69182	タンパク質 チロシンホスファターゼ, 非-受容体型 12
1568905_at	BC030750	CDNA クローン IMAGE:4795773
233421_s_at	AU146738	ヌクレオポリン 133kDa
232490_s_at	U67085	ブルーン 相同体 (シヨウジヨウバエ)
227419_x_at	AW964972	胎盤-特異的 9
242948_x_at	T97602	転写された遺伝子座
227175_at	A1806486	骨髄系細胞 白血病 配列 1 (BCL2-関連の)
209213_at	BC002511	カルボニルレダクターゼ 1
208262_x_at	NM_000243	地中海熱
227486_at	A1086864	5'-ヌクレオチダーゼ, エクト (GD73)
239239_at	W58601	転写された遺伝子座
236574_at	A1304870	仮定 タンパク質 LOC284373
219360_s_at	NM_017636	一時的受容体電位カチオンチャンネル, サブファミリー M メンバー 4
1558423_at	BE715671	仮定 LOC349114
221408_x_at	NM_018932	プロトカドヘリン $\beta$ 12
1562234_a_at	AF397731	ニューロンナビゲーター 3///ニューロンナビゲーター 3 に類似する
226632_at	AL513673	細胞グロビン
216831_s_at	AF018283	成長阻害動物-関連の転写因子 1; 転座された, 1 (サイクリン D-関連の)
206932_at	NM_003956	コレステロール 25-ヒドロキシラーゼ
213210_a_t	A1005317	TAF6-様 RNA ポリメラーゼ II, p300/CBP-関連の因子 (PCAF)-関連の因子, 65kDa
201167_x_at	D13989	Rho GDP 解離 イnhピター (GDI) $\alpha$
212016_s_at	AA679988	ポリピリミジン領域 結合タンパク質 1
203324_s_at	NM_001233	カベオリン 2
214828_s_at	AL157851	CGI-96 タンパク質///CGI-96 に類似する
219298_at	NM_024693	エニール補酵素 A ヒドラターゼ ドメイン含有 3
233305_at	AF193756	EF-ハンドカルシウム 結合タンパク質 1

【 0 5 6 6 】

10

20

30

40

【表 27】

表27

組織名称	遺伝子銀行	説明
216985_s_at	AJ002077	シタキシン 3
214738_s_at	BE792298	NIMA (有糸分裂 遺伝子においては存在しない)-関連する キナーゼ 9
231789_at	AV722990	プロトカドヘリン $\beta$ 15
200841_s_at	A1142677	グルタミル-プロリル-tRNA シンターゼ
204570_at	NM_001864	チトクローム c オキシダーゼ サブユニット VIIa ポリペプチド I (筋肉)
226983_at	AA626717	垂鉛フィンガンタンパク質 777
212938_at	M20776	コラーゲン, 型 VI, $\alpha$ 1
230255_at	A1936907	$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) A 受容体, $\delta$
211363_s_at	AF109294	メチルチオアデノシン ホスホリラーゼ
219430_at	NM_020155	G タンパク質-結合された受容体 137
210990_s_at	U77706	ラミニン, $\alpha$ 4
205259_at	NM_00901	核受容体 サブファミリー-3, グループ C, メンバー-2
217294_s_at	U88968	エノラーゼ I, ( $\alpha$ )
211922_s_at	AY028632	カタラーゼ
204018_x_at	NM_000558	ヘモグロビン, $\alpha$ 1///ヘモグロビン, $\alpha$ 2
211823_s_at	D86862	パキシリン
219593_at	NM_016582	溶質キャリアファミリー 15, メンバー 3
223143_s_at	A1742378	染色体 6 読取り枠 166
243347_at	AW003107	---
222896_at	AA196034	トランスメンバレンタンパク質 38A
213767_at	U43586	ras 1 のキナーゼ サブレッサー
206595_at	NM_001323	シスタチン E/M
203508_at	NM_001066	腫瘍壊死因子 受容体 スーパーファミリー, メンバー 1B
238125_at	A1740544	トロンスポンジ型 I モチーフを有する ADAM 金属ペプチダーゼ, 16
209958_s_at	AF095771	Bardet-Biedl 症候群 9
225800_at	A1990891	JAZF 垂鉛フィンガン I
233900_at	U46120	発現された未知の mRNA

【 0 5 6 7 】

10

20

30

40

【表 28】

表28

組織名称	遺伝子銀行	説明
238692_at	AL040935	BTB (POZ)ドメイン含有 11
201048_x_at	NM_002869	RAB6A, メンバー RAS 発癌遺伝子ファミリー
206390_x_at	NM_002619	血小板因子 4 (ケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド 4)
210572_at	BC003126	プロトカドヘリン $\alpha$ 2
231881_at	AU145225	カルデスモン 1
156724_at	Z 36814	---
155034_at	AF482697	クラリン 1
210587_at	BC005161	インヒビン, $\beta$ E
210298_x_at	AF098518	4 及び 1/2 LIM ドメイン 1
209727_at	M76477	GM2 ガングリオシド 活性化因子
213550_s_at	AA993683	トランスメンバレン 及び コイルドコイル ドメイン 6
231013_at	W80446	---
213807_x_at	BE870509	met プロト-腫瘍遺伝子 (肝細胞成長 因子 受容体)
206665_s_at	NM_001191	BCL2-様 1
206882_at	NM_005071	溶質キャリアーファミリー 1 (高親和性 アスパラギン酸塩/グルタメート トランスポーター), メンバー 6
1555716_a_at	AY072911	コクサッキーウイルス 及び アデノウイルス 受容体
244852_at	AU119545	デルマタン硫酸エピメラゼ-様
211082_x_at	Z25427	MAP/微小細管親和性-調節 キナーゼ 2
203726_s_at	NM_000227	ラミニン, $\alpha$ 3
213928_s_at	A1742626	HIV-1 Rev 結合タンパク質
217051_s_at	AF257501	滑膜肉腫 トランスロケーション, 染色体 18
206488_s_at	NM_000072	CD36 分子 (トロンボスポンジン 受容体)
222508_s_at	AU135021	仮定 タンパク質 FLJ10154
211529_x_at	M90684	HLA-G 組織適合性抗原, クラス I, G

【 0 5 6 8 】

10

20

30

40

【表 29】

表29

組織名称	遺伝子銀行	説明
220108_at	NM_004297	グアニンスクレオチド 結合タンパク質 (Gタンパク質), $\alpha$ 14
203676_at	NM_002076	グルコサミン (N-アセチル)-6-スルフアターゼ (サンフィリホ症候群病 IIID)
155875_s_at	AU142380	中性スフィンゴミエリナーゼ (N-SMase) 活性化 関連の 因子
209555_s_at	M98399	CD36 分子 (トロンボスポンジン 受容体)
1561367_a_at	BC035104	CDNA クローン IMAGE:5262438
211272_s_at	AF064771	ジアシルグリセロール キナーゼ, $\alpha$ 80kDa
217248_s_at	AL365343	溶質キャリアーファミリー 7 (カチオン性アミノ酸 トランスポーター, $\gamma$ +システム), メンバー 8
201156_s_at	AF141304	RAB5C, メンバー RAS 発癌遺伝子ファミリー
211022_s_at	BC002521	A 地中海貧血症/精神障害 症候群 X-結合の (RAD54 相同体, S, セレシニアエ)
AFFX- HSAC07/X00351_5_a_t	AFFX- HSAC07/X00351_5	アクチン, $\beta$
218931_at	NM_022449	RAB17, メンバー RAS 発癌遺伝子ファミリー
240407_at	AW450035	ホモ・サピエンス, クローン IMAGE:5171705, mRNA
214505_s_at	AF220153	4及び1/2 LIM ドメイン 1
213363_at	AW170549	ホモ・サピエンス, クローン IMAGE:5244869, mRNA
1555724_s_at	BC010946	トランスゲリン
230112_at	AB037820	膜-関連の リング フィンガー (C3HC4) 4
209136_s_at	BC390445	ユビキチン 特異的ペプチダーゼ 10
203047_at	NM_005990	セリン/トレオニン キナーゼ 10
227137_at	N25937	染色体 10 読取り枠 46
212125_at	NM_002883	Ran GTPase 活性化 タンパク質 1
243409_at	A1005407	フォークヘッドボックス L1
1568646_x_at	BC038199	亜鉛フィンガンタンパク質 208

【 表 3 0 】

表30

組織名称	hES細胞系	対hES細胞系において5倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 (p ≤ 0.01)	説明
			遺伝子銀行
217370_x_at	S75762		融合 (悪性脂肪肉腫における t (12;16) に包含される)
87100_at	A1832249		ab ヒドロラーゼ ドメイン含有 2
211016_x_at	BC002526		ヒートショック 70kDa タンパク質 4
241661_at	AA001021		jumonji ドメイン含有 1C
222611_s_at	AA969958		パラスペックル成分 1
210930_s_at	AF177761		v-erb-b2 赤芽球性白血病 ウィルス性 腫瘍遺伝子 相同体 2, ニューロ/グリア芽腫由来の腫瘍遺伝子 相同体 (鳥類)
213722_at	AW007161		SRY (性別決定領域 Y)-ボックス 2
228901_at	A1040910		サイクリン-依存性 キナーゼ 9 (CDC2-関連の キナーゼ)
208850_s_at	AL558479		Thy-1 細胞表面 抗原
212574_x_at	AC004528		染色体 19 読取り枠 6
204952_at	NM_014400		LY6/PLAUR ドメイン含有 3
204876_at	NM_014699		亜鉛フィンガータンパク質 646
213014_at	BG222394		マイルトジェン-活性化されたタンパク質 キナーゼ 8 相互作用性 タンパク質 1
219928_s_at	NM012189		カルシウム結合チロシン-(Y)-リン酸化調節された (fibrousheathin 2)
204895_x_at	NM_004532		ムチン 4, 細胞表面 関連の
208275_x_at	NM_003577		未分化の胚細胞 転写因子 1
200917_s_at	BG474541		シグナル認識粒子 受容体 ('doc 血族 g タンパク質')
213643_s_at	AK022846		イノシトールポリリン酸-5-ホスファターゼ, 75kDa
232001_at	AW193600		AY007155 により支持された仮定 遺伝子
223828_s_at	AF222694		レクチン、ガラクトシド-結合, 溶解性, 12 (ガレクチン 12)
210654_at	AF021233		腫瘍壊死因子 受容体 スーパーファミリー, メンバー 10d, 先端を切られた 死ドメインを有する偽構築物
208721_s_at	BF967271		後期促進複合体 サブユニット 5
206208_at	NM_000717		炭酸脱水酵素 IV
1553535_a_at	NM_002883		Ran GTPase 活性化 タンパク質 1

【 0 5 7 0 】

10

20

30

40

【表 3 1】

表31

組織名称	遺伝子銀行	説明
206531_at	NM_004647	D4, 亜鉛及び二重 PHD フィンガー ファミリー 1
1563719_a_at	AK024924	CDNA: FLJ21271 fis, クローン COL01751
236731_at	BF223086	ロイシンジッパー タンパク質 偽遺伝子 1
1555337_a_at	AF307097	亜鉛フィンガータンパク質 317
222936_s_at	AF151904	染色体 1 読取り枠 121
209999_x_at	A1056051	サブレッサー of サイトカイン シグナル 1
1555730_a_at	D00682	コフィリン I (非-筋肉)
1566764_at	AL359055	MRNA 十分な長さの挿入体 cDNA クローン EUROIMAGE 2344436
215315_at	AC003682	亜鉛フィンガータンパク質 549
211019_s_at	D63807	ラノステロールシクターゼ (2,3-オキシドスクアレン-ラノステロール-シクターゼ)
226913_s_at	BF527050	SRY (性決定領域 Y)-ボックス 8
217569_x_at	AA017093	---
231146_at	A1300541	配列 類似性 24 を有するファミリー, メンバー B
208478_s_at	NM_004324	BCL2-関連の X タンパク質
210892_s_at	BC004472	遺伝子 ral 転写因子 II, i
206100_at	NM_001874	カルボキシペプチダーゼ M
216926_s_at	AC003030	KIAA0892
222511_x_at	AW140098	Fas (TNFRSF6) 関連の 因子 1
202662_s_at	NM_002223	イノシトール 1,4,5-トリホスフェート受容体, 型 2
1552667_a_at	NM_005489	SH2 ドメイン含有 3C
228851_s_at	AV726322	エンドスルフィアイン $\alpha$
AFFX-r2-Bs-dap-3_at	AFFX-r2-Bs-phe-3	---
206552_s_at	NM_003182	タヒキニン, 前駆体 1 (物質 K, 物質 P, ニューロキニン 1, ニューロキニン 2, ニューロメジン L, ニューロキニン $\alpha$ , 神経ペプチド K, 神経ペプチド $\gamma$ )
233757_x_at	AK026906	CDNA: FLJ23253 fis, クローン COL04706
213943_at	X99268	ネジレ 相対体 1 (塔状頭蓋合指症 3; Saethre-Chotzen 症候群) (ショウジョウバエ)
209198_s_at	BC004291	シナプトタグミン XI
1553138_a_at	NM_152363	アンキリン 回復 ドメイン 41

【 0 5 7 1 】

10

20

30

40

【表 3 2】

表32

組織名称	遺伝子銀行	説明
232915_at	AW571715	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) ポックスポリペプチド 49
1560224_at	BF327463	AT フック 含有 転写因子 1
239959_x_at	A1147520	---
211699_x_at	AF349571	ヘモグロビン, $\alpha$ 1///ヘモグロビン, $\alpha$ 2
228261_at	BE045549	Mindbomb 相同体 2 (シヨウジョウバエ)
206617_s_at	NM_002910	レニン 結合タンパク質
207402_at	NM_003433	亜鉛フィンガータンパク質 132
224539_s_at	AF152474	プロトカドヘリン $\alpha$ subfamily C, 2
240397_x_at	A1801626	転写された遺伝子座
208894_at	M60334	主要組織適合性複合体, クラス II, DR $\alpha$
229566_at	AA149250	WDNM1-様 タンパク質に類似する
238742_x_at	AW302207	転写された遺伝子座
215236_s_at	AV721177	ホスファチジルイノシトール 結合クラスリンアセンブリー タンパク質
210256_s_at	U78576	ホスファチジルイノシトール-4-ホスフェート5-キナーゼ, 型 I, $\alpha$
1555639_a_at	AF315633	RNA 結合 モチーフ タンパク質 14
1566666_at	AK074225	CDNA FLJ23645 fis, クローン COL02691
211899_s_at	AF082185	TNF 受容体-関連の 因子 4
222387_s_at	BG476669	空胞 タンパク質 分類 35 相同体 (S, セレピシアエ)
1553694_a_at	NM_002645	ホスホイノシチド-3-キナーゼ, クラス 2, $\alpha$ ポリペプチド
203348_s_at	BF060791	ets 変異体 遺伝子 5 (ets-関連の 分子)
213548_s_at	BG257762	CDV3 相同体 (マウス)
219656_at	NM_016580	プロトカドヘリン 12
241198_s_at	BE645435	染色体 11 読取り枠 70
219878_s_at	NM_015995	Kruppel-様 因子 13
1556748_x_at	A1476341	CDNA FLJ39784 fis, クローン SPLEN2002314

【 0 5 7 2 】

10

20

30

40

【表 3 3】

表33

組織名称	遺伝子銀行	説明
1554988_at	BC042592	溶質キャリアーファミリー 9、メンバー 11
227071_at	A1762558	亜鉛フィンガータンパク質 414
213926_s_at	A1742626	HIV-1 Rev 結合タンパク質
234971_x_at	A1521584	ホスホリパーゼ C, $\delta 3$
219899_x_at	NM_014434	NADPH 依存性 ジフラビンオキシシドレダクターゼ 1
215774_s_at	AV650470	---
229339_at	A1093327	転写された遺伝子座
238013_at	BF347859	プレクストリン 相同体 ドメイン含有, ファミリー A (ホスホイノシチド 結合 特異的) メンバー 2
214000_s_at	A1744627	レギュレーター of G-タンパク質 シグナル 10
203729_at	NM_001425	上皮膜タンパク質 3
203085_s_at	BC000125	形質転換成長因子, $\beta 1$
155889_a_at	BG701300	BC030123 により支持される仮定 遺伝子
211668_s_at	K03226	プラスミノーゲン活性化因子, uro キナーゼ
205457_at	NM_024294	染色体 6 読取り枠 106
202639_s_at	A1689052	RAN 結合タンパク質 3
211527_x_at	M27281	血管内皮成長因子 A
207118_s_at	NM_004659	マトリックス金属ペプチダーゼ 238///マトリックス金属ペプチダーゼ 23 A (偽遺伝子)
204560_at	NM_004117	FK506 結合タンパク質 5
232591_s_at	AK022883	トランスメンバレンタンパク質 30A
236158_at	R42281	KIAA1875 タンパク質に類似する
230257_s_at	A1264325	染色体 1 読取り枠 19
230629_s_at	A1809582	E1A 結合タンパク質 p400
238969_at	BF512162	染色体 3 読取り枠 55
1569895_at	BC016994	ホモ・サピエンス, クロニン IMAGE: 4401848, mRNA

【 0 5 7 3 】

10

20

30

40

【 表 3 4 】

表34

組織名称	遺伝子銀行	説明
1554544_a_at	L18865	ミエリン基本的 タンパク質
229901_at	A1056483	亜鉛フィンガンタンパク質 488
211051_s_at	BC006363	骨化過剰症 (多重)-様 3
236657_at	AW014647	十分な長さの挿入体 cDNA Y137C01
202017_at	NM_000120	エポキシドヒドロラーゼ 1, ミクロソーム (生体異物)
229746_x_at	BF439451	ホモ・サビエンス, クローン IMAGE:3885733, mRNA
205382_s_at	NM_001928	補体 因子 D (アジプシン)
222458_s_at	A1205764	染色体 1 読取り枠 108
1553565_s_at	NM_012137	ジメチルアルギニンジメチルアミノヒドロラーゼ 1
230809_at	R45446	転写された遺伝子座
222363_at	AW979018	転写された遺伝子座
217767_at	NM_000064	補体 C3 前駆体に類似する
221279_at	NM_018972	ガングリオシド-誘発された 分化-関連の タンパク質 1
211087_x_at	Z25432	マイトジェニン-活性化された タンパク質 キナーゼ 14
204994_at	NM_002463	ミクソウイルス (インフルエンザウイルス) 耐性 2 (マウス)
225245_x_at	BG386566	H2A ヒストン ファミリー, メンバー J
243319_at	A1274981	転写された遺伝子座
216252_x_at	Z70519	Fas (TNF 受容体 スーパーファミリー, メンバー 6)
215891_s_at	X61094	GM2 ガングリオシド 活性化因子
238493_at	A1559570	亜鉛フィンガンタンパク質 506
224169_at	AF257210	神経ペプチド FF 受容体 2
232343_at	AK022200	CDNA FLJ12138f.1s, クローン MAMMA1000331
1569039_s_at	BC029855	亜鉛フィンガンタンパク質 677
201971_s_at	NM_001690	ATPase, H+輸送, リゾソーム 70kDa, VI サブユニット A

【 0 5 7 4 】

10

20

30

40

【 表 3 5 】

表35

組織名称	遺伝子銀行	説明
211564_s_at	BC003096	PDZ及びLIMドメイン4
200869_at	NM_000980	リポソームタンパク質L18a//リポソームタンパク質L18aに類似する.60Sリポソームタンパク質L18a
233297_s_at	AL139377	仮定タンパク質 LOC728591
219058_x_at	NM_022164	尿管間質性腎炎抗原-様1
242762_s_at	AA372349	KIAA1946
1552611_a_at	AL555086	Janus キナーゼ1(a)タンパク質チロシンキナーゼ)
1554660_a_at	BC036200	染色体1読取り枠71
236771_at	AW511485	染色体6読取り枠159
211943_x_at	AW303136	リポソームタンパク質L38
221665_s_at	BC004907	EPS8-様1
205391_x_at	M28880	アンキリン1,赤血球
207678_s_at	NM_007017	SRY(性決定領域Y)-ボックス30
215728_s_at	AL031848	アシル-CoAチオエステラーゼ7
224346_at	AF116671	---
205822_s_at	NM_002130	3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルリル-補酵素Aシンターゼ1(溶解性)
241084_x_at	BF062339	ダイニン,細胞質I,H鎖1
1554757_a_at	AF273055	イノシトールポリリン酸-5-ホスファターゼ,40kDa
222542_x_at	BF724826	チャペロン,ABC1bc1複合体の活性相同体(S・ポンペ)
206749_at	NM_001764	CD1b分子
219558_at	NM_024524	ATPase型13A3
240703_s_at	AW591969	ヘクト[E6-AP(UBE3A)カルボキシル末端に対して相同]ドメイン及びRCC1(CHC1)-様ドメイン(RLD)1
231805_at	AL563031	プロラクチン放出ホルモン受容体
232566_at	AK026258	核小体タンパク質ファミリー6(RNA-関連の)
228683_s_at	A1925361	カリウムチャンネル四量体ドメイン含有15
235271_s_at	BG027325	亜鉛フィンガンタンパク質397
214300_s_at	A1676092	トポインメラゼ(DNA)III $\alpha$
220472_at	NM_014150	亜鉛フィンガン, CCHCドメイン含有4

【 0 5 7 5 】

10

20

30

40

【表 36】

表36

組織名称	遺伝子銀行	説明
214992_s_at	AD000092	デオキシリボヌクレオゼーゼIIリソソーム
236491_at	A1813346	BCL2-様 10 (アポトosis促進剤)
208474_at	NM_021195	クラウジン 6
76897_s_at	AA628140	FK506 結合タンパク質 15, 133 kDa
238461_at	AA228031	真核翻訳開始因子 4E ファミリーメンバー 3
223567_at	AB022433	セマドメイン, トランスメンバレンドメイン (TM), 及び細胞質ドメイン, (セマホリン) 6B
214975_s_at	AK001816	筋細管関連のタンパク質 1
217399_s_at	AF032887	フォークヘッドボックス 03
208879_x_at	BC469030	PRP6 プレ-mRNA プロセッシング因子 6 相同体 (S・セレシニアエ)
1558662_s_at	BG200452	アンキリン反復 1 を有する B-細胞 足場タンパク質
1552367_a_at	AF276507	シンデリン
201367_s_at	A1356398	亜鉛フィンガンタンパク質 36, C3H 型-like2
215719_x_at	X83493	Fas (TNF 受容体スーパーファミリ, メンバー 6)
200601_at	U48734	アクチニン, $\alpha 4$
210620_s_at	BC000212	一般的転写 因子 IIIc, ポリペプチド 2, $\beta 110$ kDa
1554321_a_at	BC018471	NFS1 窒素固定 1 相同体 (S・セレシニアエ)
210932_s_at	AF293342	リングフィンガンタンパク質 (C3H2C3 型) 6
211020_at	L19659	グルコサミニル (N-アセチル) トランスフェラーゼ 2, 1-分枝酵素 (I 血液グループ)
231698_at	AV661152	仮定 LOC647115
216205_s_at	AK021947	mitofusin2
227316_at	A1761798	CSR2 結合タンパク質
1555814_a_at	AF498970	ras 相同体遺伝子ファミリ, メンバー A
235728_at	AA845646	亜鉛フィンガンタンパク質 3 相同体 (マウス)
238542_at	AA831769	UL16 結合タンパク質 2
238795_at	AA424537	染色体 10 読取り枠 18

【 0 5 7 6 】

10

20

30

40

【表 37】

表37

組織名称	遺伝子銀行	説明
213713_s_at	R48779	仮定タンパク質 BC008326
219703_at	NM_018365	減数分裂-特異的核構造体 1
205186_at	NM_003462	ダイニン, 軸糸, 中間体 L 鎖 1
225294_s_at	BG340967	トラフィッキングタンパク質粒子複合体 1
224505_s_at	BC006355	ホスホリパーゼ C, $\delta 4$
203626_s_at	NM_005983	S-相キナーゼ-関連のタンパク質 2 (p45)
217448_s_at	AL117508	TOX 高移動性グルーブボックスファミリーメンバー4///上皮ランゲルハンス細胞に類似するタンパク質 LCP1
237206_at	A1452798	ミオカルジン
210413_x_at	U19557	セルペンパプチダーゼインヒビター, クレド B (オボアルブミン), メンバー 4
214190_x_at	A1799984	ゴルジ関連の, $\gamma$ アダプチン耳含有, ARF 結合タンパク質 2
205924_at	BC005035	RAB3 B, メンバー-RAS 発癌遺伝子ファミリー
242660_at	AA846789	染色体 10 読取り枠 112
1555197_a_at	AY039243	染色体 21 読取り枠 58
225369_at	AL573851	上皮細胞付着 分子
238025_at	AA706818	混合された系統キナーゼドメイン様
235358_at	AW961205	仮定タンパク質 LOC728485
1554628_at	BC028974	亜鉛フィンガータンパク質 57
1565347s_at	AY034078	IGHM エンハンサー-3 に結合する転写因子結合
219168_s_at	NM_017701	プロリン富化 5 (腎)
212154_at	A1380298	シンデカン 2
1569486_at	BC035176	CDNA クローン IMAGE:5266012
206847_s_at	AF026397	ホメオボックス A7

【 0 5 7 7 】

10

20

30

40

【表 38】

表38

表 38: iPS 細胞系 対 hES 細胞系 において 5 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ )		
組織名称	遺伝子銀行	説明
218260_at	NM_024050	染色体 19 読取り枠 58
1554466_a_at	BC007207	染色体 16 読取り枠 13
241611_s_at	BE675600	フィブロネクチン型 III ドメイン含有 3A
215876_at	AK022254	CDNA FLJ12192 fis. クローン MAMMA1000851
200756_x_at	U67280	カルメニン
237211_x_at	AA860341	MORN 反復含有 3
216501_at	U25801	Vac14 相同体 (S・セレシニアエ)
207664_at	NM_001464	ADAM 金属ペプチダーゼドメイン 2 (フェルチリンβ)
217465_at	AK001291	NCK-関連のタンパク質 1
235136_at	BF337528	ORM1-様 3 (S・セレシニアエ)
201171_at	NM_003945	ATPase, H + 輸送, リゾソーム 9kDa, V0 サブユニット e1
203892_at	NM_006103	WAP 4-ジスルフィドコアードメイン 2
218810_at	NM_025079	亜鉛フィンガ-CCCH-型含有 12A
241574_s_at	H93038	インスリン-様成長因子 2mRNA 結合タンパク質 1
211811_s_at	AF152484	プロトカドヘリンα6
210457_x_at	AF176039	高移動性グループAT-フック 1
208430_s_at	NM_001390	ジストロブレピン, α
AFFX- HUMISGF3A/M9793 5_5_at	AFFX- HUMISGF3A/M97935 _5	転写 1 のシグナルトランスデュサー及び活性化因子, 91kDa
223631_s_at	AF213678	染色体 19 読取り枠 33
1555733_s_at	AF393369	アダプター-関連のタンパク質複合体 1, σ3 サブユニット
209208_at	AF059752	マンノース-P-ドリンコール利用欠陥 1
206917_at	NM_006572	グアニンスクレオチド結合タンパク質、(Gタンパク質), α13
213160_at	D86964	細胞質分裂 2 のデディケーター

【 0 5 7 8 】

10

20

30

40

表39

組織名称	遺伝子銀行	説明
236058_at	AA573775	染色体1 読取り枠 172
217270_s_at	AC005393	二重-特異性チロシン-(Y)-リン酸化調節されたキナーゼ 1B
1558015_s_at	BUI75810	ARP2 アクチン-富化タンパク質 2 相同体 (酵母)
227971_at	A1653107	Nik 関連のキナーゼ
204284_at	N26005	タンパク質ホスファターゼ1, 調節(インヒビター)サブユニット 3C
210421_s_at	AB014602	溶質キャリアーファミリー-24(ナトリウム/カリウム/カルシウム交換体), メンバー1
220892_s_at	NM_021154	ホスホセリン アミノトランスフェラーゼ1
221762_s_at	AL162458	染色体 20 読取り枠 67
230926_s_at	AW452022	精子尾の外部防御ファイバー-2-様
210079_x_at	U16953	カリウム電位ゲート型チャネル, シェーカー-関連サブファミリー, $\beta$ メンバー1
202859_x_at	NM_000584	インターロイキン 8
37549_g_at	U87408	Bardet-Biedl 症候群 9
224321_at	AB004064	EGF-様及び2つのフォリスタチン-様ドメイン2を有するトランスメンバレンタンパク質
210828_s_at	AF001307	アリアル炭化水素受容体核トランスロケター
222406_s_at	AV738970	プロリンに富む核受容体補活性化因子 2
222419_x_at	AW205983	ユビキチン-接合酵素 E2H (UBC8 相同体, 酵母)
207686_s_at	NM_001228	カスパーゼ 8, アポトーシス-富化システインペプチダーゼ
213597_s_at	BF002474	CTD(カルボキシ-末端ドメイン, RNA ポリメラーゼ II, ポリペプチド A)小ホスファターゼ様
202226_s_at	NM_016823	v-ctk 肉腫ウィルス CT10 腫瘍遺伝子相同体 (鳥類)
221048_x_at	NM_017941	染色体 17 読取り枠 80
1553191_at	NM_020388	ジストニン
213087_s_at	BF690020	CDNA クローン IMAGE4838699
1554327_a_at	AF328554	カルシウム活性化されたヌクレオチダーゼ 1
233298_at	AL139377	精子形成及び卵子形成特異的塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス 2///仮定タンパク質 LOC728591
223393_s_at	AL136805	T シャツ亜鉛フィンガーホモオボックス 3
240983_s_at	AW292273	システニール-tRNA シンターゼ

【表 40】

表40

組織名称	遺伝子銀行	説明
226905_at	BC036514	配列類似性 101 を有するファミリー, メンバーB
212797_at	BE742268	ソルチリン1
209719_x_at	U19556	セルピンペプチダーゼインヒビター, クレド B (オボアルブミン), メンバー3
221364_at	NM_001510	グルタメート受容体, イオン向性, $\delta 2$
1552641_s_at	NM_031921	ATPase ファミリー, AAA ドメイン含有 3A///ATPase ファミリー, AAA ドメイン含有 3B///ATPase ファミリーに類似する, AAA ドメイン含有 3A///類似する
		AAA-ATPase TOB3
222501_s_at	BE674760	複製インヒビター 1
1552477_a_at	BC014852	インターフェロン調節因子 6
222711_s_at	A1761828	菱形 5 相同体 1 (シヨウジウウバエ)
1552528_at	NM_058189	染色体 21 読取り枠 69
232498_at	AK023386	仮定タンパク質 KIAA1833
226876_at	A1961778	配列類似性 101 を有するファミリー, メンバーB
230747_s_at	AA406435	染色体 18 読取り枠 17
201979_s_at	NM_006247	タンパク質ホスファターゼ 5, 触媒サブユニット
210869_s_at	M29277	メラノーマ細胞付着 分子
237911_at	BF057809	転写された遺伝子座
215037_s_at	U72398	BCL2-様 1
AFFX-DapX-5_at	AFFX-DapX-5	---
217211_at	D50604	細胞質 $\beta$ -アクトチンに類似する
214014_at	W81196	CDC42 エフェクタータンパク質 (Rho GTPase 結合) 2
230517_at	A1416964	GLI-Kruppel ファミリー メンバー-HKR1 に類似する
1563312_at	B1603681	CDNA クローン IMAGE:5302682
206024_at	NM_002150	4-ヒドロキシフェニルピルベートジオキシゲナーゼ

【 0 5 8 0 】

10

20

30

40

【表 4 1】

表41

組織名称	遺伝子銀行	説明
1552610_a_at	NM_002227	Janus キナーゼ 1 (a タンパク質チロシンキナーゼ)
224279_s_at	AF295039	カルシウム結合チロシン-(Y)-リン酸化調節された (fibrousheatin2)
220426_at	NM_024059	染色体 20 読取り枠 195
1553105_s_at	NM_001943	デスモグレイン 2
234688_x_at	AF141344	セントロピン, 中心体 BRCA2 相互作用性タンパク質
210022_at	BC004952	ポリコームグループプリングフィンガー 1
226306_at	BF984592	染色体 6 読取り枠 1
203771_s_at	AA740186	ピリベルジンレダクターゼ A
201465_s_at	BC002646	jun 腫瘍遺伝子
216549_s_at	AL096712	TBC1 ドメインファミリーメンバー 22B
1553229_at	NM_152412	亜鉛フィンガータンパク質 572
205065_at	AU130282	---
224301_x_at	BC003602	H2A ヒストンファミリー, メンバー J
223616_at	BC005368	亜鉛フィンガータンパク質 649
209629_s_at	AF201942	核輸送因子 2-様輸送因子 2
224037_at	AF132198	---
91826_at	A1219073	EPS8-様 1
227841_at	BG260181	セメント質タンパク質 1
216641_s_at	U58994	ラジニン 1
217300_at	U80771	---
1552649_a_at	NM_057178	リングフィンガー及びFYVE-様ドメイン含有 1
221220_s_at	NM_017988	SCY1-様 2 (S, セレブリアエ)
229296_at	A1659477	CDNAFLJ34873 fis. クローン NT2NE2014950

【表 4 2】

表42

組織名称	遺伝子銀行	説明
212003_at	BG171020	染色体 I 読取り枠 144
218922_s_at	NM_024552	LAGI 相同体, セラミドシクターゼ 4
237872_at	A1026919	転写された遺伝子座
209373_at	BC003179	mal, T-細胞分化タンパク質-様
224795_x_at	AW575927	免疫グロブリンカッパ定数///免疫グロブリンカッパ変数 1-5/// 免疫グロブリンカッパ変数 2-24
203065_s_at	NM_001753	カベオリン I, カベオラエタンパク質, 22kDa
239623_at	M93197	AK126569 により支持される仮定遺伝子
231243_s_at	R93946	塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックスドメイン含有, クラス B' 3
234730_s_at	AP001743	受容体-相互作用性セリン-トレオニンキナーゼ 4
228881_at	M30347	プレセニン関連の, 菱形-様
231723_at	NM_013346	分類ネキシン 12
205462_s_at	NM_002149	ヒポカルシン-様 I
200628_s_at	M61715	トリプトファン-tRNA シンターゼ
230404_at	A1418338	---
1563809_a_at	AK094768	MCF, 2 細胞由来の形質転換配列-様
204470_at	NM_001511	ケモカイン (C-X-C モチーフ) リガンド I (メラノーマ成長刺激活性, $\alpha$ )
205210_at	NM_004257	形質転換成長因子, $\beta$ 受容体関連のタンパク質 I
228634_s_at	BF195718	コールドショックドメインタンパク質 A
210971_s_at	AB000815	アリール炭化水素受容体核トランスロケーション-様
243358_at	BF347362	インスリン-様成長因子 I 受容体
1561039_a_at	BC039609	亜鉛フィンガータンパク質 81
222509_s_at	BG490634	亜鉛フィンガータンパク質 672
1552717_s_at	NM_153243	中心体タンパク質 170kDa///中心体タンパク質 170kDa-様
221754_s_at	A1341234	コロン, アクチン結合タンパク質, I B
234920_at	AK022466	亜鉛フィンガータンパク質 7
242571_at	AW962020	RALBP1 関連の Epsドメイン含有 2

【 0 5 8 2 】

10

20

30

40

【表 4 3】

表43

組織名称	遺伝子銀行	説明
222085_at	AW452357	AK075564;BC060873により支持される仮定遺伝子
1553697_at	NM_145257	染色体1読取り枠96
1555830_s_at	BC001224	配列類似性62(C2ドメイン含有)メンバーBを有するファミリー
217010_s_at	AF277724	細胞分裂周期25相同体C(S.ポムベ)
214845_s_at	AF257659	カルメニン
218537_at	NM_017885	宿主細胞因子C1調節体I(XPO1依存性)
202790_at	NM_001307	クラウジン7
1559528_at	BC040652	ポリコームグループリングフィンガー3
1567105_at	AF362887	-----
211772_x_at	BC006114	コリン作動性受容体,ニコチン性, $\alpha 3$
219270_at	NM_024111	ChaC,カチオン性輸送調節体相同体I(E.コリ)
207087_x_at	NM_020478	アンキリンI,赤血球
213714_at	A1040163	カルシウムチャネル,電位-依存性, $\beta 2$ サブユニット
215649_s_at	AF217536	メバロナートキナーゼ(メバロン酸酸性尿)
204638_at	NM_001611	酸ホスファターゼ5,酒石酸塩耐性
228208_x_at	AL134573	仮定LOC645944
239664_at	HI8857	転写された遺伝子座
215585_at	AK024081	KIAA0174
211613_s_at	U79250	グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ2(ミトコンドリア)
214903_at	AF070580	シナプトタグミンII
1566472_s_at	AK098125	レチノールサチユラーゼ(all-トランス-レチノール13,14-レダクターゼ)
234155_at	AK024928	CDNA:FLJ21275fis,クロームCOL01827
243952_at	BF000009	TPTe 偽遺伝子
210994_x_at	AF230398	3分体モチーフ含有23
205810_s_at	NM_003941	Wiskott-Aldrich症候群様
210455_at	AF050198	染色体10読取り枠28

【 0 5 8 3 】

10

20

30

40

【表 4 4】

表44

組織名称	遺伝子銀行	説明
表 44 : iPS 細胞系 対 hES 細胞系 において 5 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ )		
211672_s_at	AF019888	アクチン関連タンパク質 2/3 複合体, サブユニット 4, 20kDa
233827_s_at	AK024072	Ty16 相同体 (S, セレシニアエ) のサブレッサー
201621_at	NM_005380	神経芽細胞腫, 腫瘍形成性 I の抑制
1560020_at	BC043583	DnaJ (Hsp40) 相同体, サブファミリー C, メンバー 13
202290_at	NM_014891	PDGFA 関連のタンパク質 I
216271_x_at	AC004794	シナプス欠陥 1, RhoGTPase, 相同体 I (Cエレガンス)
210933_s_at	BC004908	ファクシン相同体 1, アクチン-束タンパク質 (ストロンジロセントロタス・パープラタス)
1555569_a_at	BC042482	カリウムチャンネル四量体ドメイン含有 7
221889_at	AW026481	カリウムチャンネル四量体ドメイン含有 13
37547_at	U85995	Bardet-Biedl 症候群 9
205117_at	X59065	線維芽細胞成長因子 I (酸性)
201122_x_at	BC000751	真核生物翻訳開始因子 5A
233638_s_at	AK026430	タンパク質 0-結合のマンノース $\beta$ 1, 2-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼ
221035_s_at	NM_031272	精巢発現された 14
223318_s_at	BC004393	alkB, アルキル化修復相同体 7 (E. コリ)
1555609_a_at	AF355465	亜鉛フィンガー, マトリン型 3
232675_s_at	BG149850	ウリジン-シチジンキナーゼ I-様 I
1555220_a_at	AB040820	アルド-ケトレダクターゼファミリー I, メンバー C-様 2
220246_at	NM_020397	カルシウム/カルモジュリン-依存性タンパク質キナーゼ ID
206943_at	NM_004612	形質転換成長因子, $\beta$ 受容体 I (アクチビン A 受容体型 II-様キナーゼ, 53kDa)
202779_s_at	NM_014501	ユビキチン-接合酵素 E2S///ユビキチン-接合酵素 E2S (ユビキチン-接合酵素 E2-24kDa) (ユビキチン-タンパク質リガーゼ) (ユビキチンキャリアータンパク質) (E2-EPF5) に類似する

【 0 5 8 4 】

10

20

30

40

【表 4 5】

表45

組織名称	遺伝子銀行	説明
表 45 : iPS 細胞系 対 hES 細胞系において 5 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ )		
206336_at	NM_002993	ケモカイン (C-X-C モチーフ) リガンド 6 (顆粒球走化性タンパク質 2)
210405_x_at	AF153687	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー 10b
1554339_a_at	BC038953	オリゴマーゴルジ複合体 3 の成分
209062_x_at	AF010227	核受容体補活性化因子 3
234992_x_at	BG170335	上皮細胞形態転換配列 2 腫瘍遺伝子
1557637_at	BC038734	CDNA クローン IMAGE:5267718
217711_at	BF594294	TEK チロシンキナーゼ、内皮 (静脈性奇形、多重皮膚及び粘膜)
155335_l_at	NM_130901	OTU ドメイン含有 7A
61734_at	A1797684	網状カルルピン 3、EF-ハンドカルシウム結合ドメイン
203994_s_at	U84569	染色体 21 読取り枠 2
1565162_s_at	D16947	ミクソームグルタルチオン S-トランスフェラーゼ 1
231011_at	A1339785	La リボヌクレオタンパク質ドメインファミリー、メンバー 2
206209_s_at	NM_000717	炭酸脱水酵素 IV
209722_s_at	L40378	セルピンペプチダーゼインヒビター、クレード B (オボアルブミン)、メンバー 9
214369_s_at	A1688812	RAS グアニル開放性タンパク質 2 (カルシウム及び DAG-調節された)
205390_s_at	NM_000037	アンケリン 1、赤血球
204188_s_at	M57707	レチノン酸受容体、 $\gamma$
232132_at	AB043635	par-6 分割欠損 6 相同体 $\gamma$ (C、エレガンス)
1552389_at	NM_173549	染色体 8 読取り枠 47
211911_x_at	L07950	主要組織適合性複合体、クラス I、B
231402_at	A1830201	転写された遺伝子座、XP531081.2 仮定タンパク質 [コモンチンパンジー] に強く類似する
215913_s_at	AK023668	GULP、封入アダプター-PTB ドメイン含有 1
213426_s_at	AA150110	カベオリン 2

【 0 5 8 5 】

10

20

30

40

【表 46】

表46

組織名称	遺伝子銀行	説明
表 46: iPS 細胞系 対 hES 細胞系 において 5 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ )		
233543_s_at	AK021582	コイルドコイルドメイン含有 98
201559_s_at	AF109196	塩化物細胞間チャネル 4
241168_at	AV651242	転写された遺伝子座
216710_x_at	AL359578	亜鉛フィンガータンパク質 287
1555006_at	BC036233	WD 反復ドメイン 66
207453_s_at	NM_012266	DnaJ (Hsp40) 相同体、サブファミリー-B、メンバー 5
217234_s_at	AF199015	ピリン 2 (エズリン)
214446_at	NM_012081	拡張因子, RNA ポリメラーゼ II, 2
209372_x_at	BF971587	チューブリン, $\beta 2A$ //チューブリン, $\beta 2B$
218261_a	NM_005498	アダプター--富化タンパク質複合体 1, mu2 サブユニット
217445	AF008655	ホスホリボシルグリシンアミドホルミルトランスフェラーゼ, ホスホリボシルグリシンアミドシンターゼ, ホスホリボシルアミノイミダゾールシンターゼ
205595_at	NM_001944	デスマグレイン 3 (天疱瘡抗原)
233669_s_at	AA868267	3 分体 モチーフ含有 54
155928_at	BC037172	染色体 21 誌取り片 15
1561330_at	BC039098	デスマグレイン 4
1562080at	AK057351	CDNAFLJ32789fis, クローン TEST12002326
234976_x_at	BC324504	溶質キャリアファミリー-4, ナトリウム炭酸水素塩補トランスポーター, メンバー 5
234085_at	AL139377	精子形成及び卵子形成特異的塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス 2///仮定タンパク質 LOC728591
208067_x_at	NM_007125	偏在的に転写されたテトラトリコペプチド反復遺伝子, Y-結合の
231957_s_at	AC005594	ジペプチジル-ペプチダーゼ 9
1562244_at	AL833487	MRNA; cDNA DKFZp686H1629 (クローン DKFZp686H1629 からの)
227488_at	AV728999	仮定タンパク質 MGC16121
239407_at	A1793248	CDNA クローン IMAGEg4837199
207540_s_at	NM_003177	脾臓チロシンキナーゼ
1557984_s_at	B1464019	RNA ポリメラーゼ II 関連のタンパク質 3

【表 47】

表47

組織名称	遺伝子銀行	説明
208608_s_at	NM_021021	シントロフィン、 $\beta$ I (ジストロフィン-関連のタンパク質 A1, 59kDa, 基本成分 I)
1554795_a_at	BC019895	フィラミン結合 LIM タンパク質 I
209950_s_at	BC004300	ピリン様
158809_s_at	AK094324	仮定タンパク質 LOC284408
225333_at	A1218383	亜鉛フィンガータンパク質 496
204522_at	NM_005510	dom-3 相同体 Z (C, エレガンス)
218154_at	NM_024736	ガスデルミンドメイン含有 I
201060_x_at	A1537887	ストマチン
201012_at	NM_000700	アネキシン A1
220889_s_at	NM_020178	炭酸脱水酵素 X
217729_s_at	NM_001130	分割のアミノ-末端エンハンサー
211187_at	AF118079	---
231396_s_at	AA776721	配列類似性 126, メンバー A を有するファミリー
AFFX-LysX-M_at	AFFX-LysX-5	---
222678_s_at	BF057821	DCN1, クリンネジレーション I における欠損, ドメイン含有 I (S, セレシニア E)
220234_at	NM_004056	炭酸脱水酵素 VII1
1553962_s_at	B1668074	ras 相同体遺伝子ファミリーラメンバー B
207950_s_at	NM_001149	アンキリン 3, Ranvier の節 (アンキリン G)
221981_s_at	AA702154	WD 反復ドメイン 59
1568593_a_at	CA431328	nudix (ヌクレオシドジホスフェート結合の成分 X) -型モチーフ 16 偽遺伝子
223321_s_at	AF312678	線維芽細胞成長因子受容体様 I
206042_x_at	NM_022804	小核リボヌクレオタンパク質ポリペプチド N///SNRPN 上流読み取り
210334_x_at	AB028869	バキュロウイルス性 IAP 反復体-含有 5 (サービビン)
216591_s_at	AF080579	スクシネートデヒドロゲナーゼ複合体, サブユニット C, 膜内在性タンパク質, 15kDa//hCG1776980
210206_s_at	U33833	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) ボックスポリペプチド II (CHL1-様ヘリカーゼ相同体, S, セレシニア E)

【 0 5 8 7 】

10

20

30

40

【 表 4 8 】

表48

組織名称	遺伝子銀行	説明
226786_at	BF507952	レグレートター因子 X, I (HLAクラス II 発現に影響を及ぼす)
211561_x_at	L35253	マイトジェン-活性化されたタンパク質キナーゼ 14
211796_s_at	AF043179	T細胞受容体β変数 19//T細胞受容体β変数 7-2//T細胞受容体β変数 5-4//T細胞受容体β変数 3-1//T細胞受容体β変数 1
216493_s_at	AL023775	インスリン-様成長因子 2mRNA 結合タンパク質 3//インスリン-様成長因子 2mRNA 結合タンパク質 3 に類似する//IGF-II mRNA-結合タンパク質 3 に類似する
230309_at	BE876610	転写された遺伝子座
204806_x_at	NM_018950	主要組織適合性複合体, クラス 1, F
205369_x_at	J03208	ジヒドロリポアミド枝分れ鎖トランスアシラーゼ E2
1556165_at	AK057525	CDNAFLJ32963fis, クローン TEST12008405
215047_at	AL080170	3 分体 モチーフ含有 58
225454_at	AW248770	コイルドコイルドメイン含有 124
1552480_s_at	NM_080923	タンパク質チロシンホスファターゼ, 受容体型, C
205388_at	NM_003279	トロポニン C 型 2 (早い)
218510_x_at	A1816291	配列類似性 134 を有するファミリー, メンバー B
1553685_s_at	NM_138473	Sp1 転写因子
228672_at	A1971618	成長ファミリーのインヒビター, メンバー 5
205377_s_at	A1190022	アセチルコリンエステラーゼ (Yt 血液グループ)
230633_at	A1285730	トランスメンブリンタンパク質 102
207704_s_at	NM_003644	成長抑制-特異的 7
215668_s_at	AJ011414	plexin B1
212107_s_at	BE561014	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) ボックスポリペプチド 9
237282_s_at	AW137676	A キナーゼ (PKA) アンカータンパク質 14

【 0 5 8 8 】

10

20

30

40

【表 4 9】

表49

組織名称	遺伝子銀行	説明
表 49 : iPS 細胞系 対 hES 細胞系 において 5 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ )		
220285_at	NM_016014	配列類似性 108 を有するファミリー, メンバー B1
207979_s_at	NM_004931	CD8b 分子
226937_at	BF110844	カルジオリピンシクターゼ 1
226051_at	BF973568	セレノタンパク質 M
212272_at	AA813260	リピン 1
229881_at	R41200	Kruppel-様因子 12
217524_x_at	AA018923	転写された遺伝子座
1559409_a_at	BE893129	KIAA1345 タンパク質
238480_at	A1871745	染色体 18 読取り枠 50
1553042_a_at	NM_032721	T-細胞活性化 NFKB-様タンパク質
221418_s_at	NM_005481	メチエーター複合体サブユニット 16
202465_at	NM_002593	プロコラーゲン C-エンドペプチダーゼエンハンサー
231004_s_at	BE219961	HI ヒストンファミリー, メンバー X
242552_x_at	AW274047	亜鉛フィンガー, BED-型含有 5
238699_s_at	A1659225	カルシウム/カルモジュリン-依存性セリンタンパク質キナーゼ (MAGUKファミリー)
242162_at	AA904430	WD 反復ドメイン 69
207379_at	NM_005711	EGF-様受容体及びジスコイジン 1-様ドメイン 3
211513_s_at	AF172449	オピオイド成長因子受容体
216981_x_at	X60502	シアロホリン (ロイコシアリン, CD43)
243938_x_at	A1872645	ダイニン, 軸細糸, H 鎖 5
211027_s_at	BC006231	B-細胞におけるカッパ L 鎖ポリペプチド遺伝子エンハンサーのインヒビター, キナーゼ $\beta$
231354_at	AW510748	仮定 LOC780529
232984_at	AL137259	水頭症誘発性相同体 (マウス)
1554464_a_at	BC008745	軟骨関連のタンパク質

【 0 5 8 9 】

10

20

30

40

【表 50】

表50

組織名称	遺伝子銀行	説明
223661_at	AF130080	---
224282_s_at	AB040138	1-アシルグリセロール-3-ホスフェート 0-アシルトランスフェラーゼ 3
214520_at	NM_005251	フォークヘッドボックス C2 (FH-1, 間葉フォークヘッド 1)
1569076_a_at	BE791720	FLJ16287 タンパク質
210585_s_at	AF007748	トランスポーチン 2 (インポーチン 3, カージオフェリン $\beta$ 2b)
211599_x_at	U19348	met プロト-腫瘍遺伝子 (肝細胞成長因子受容体)
221051_s_at	NM_014446	インテグリン $\beta$ 1 結合タンパク質 3
217246_s_at	L22650	ジアファーマナス相同体 2 (シヨウジョウバエ)
221623_at	AF229053	プレビカン
238420_at	AV721958	CDNA クローン IMAGE:5263531
1558643_s_at	AA297258	EGF-様反復及びジスコインジン I-様ドメイン 3
211266_s_at	U35399	G タンパク質-結合された受容体 4
208851_s_at	AL161958	Thy-1 細胞表面抗原
220102_at	NM_023067	フォークヘッドボックス L2
214878_at	AU118165	亜鉛フィンガンタータンパク質 37A//亜鉛フィンガンタータンパク質 37B
204480_s_at	NM_024112	染色体 9 読取り枠 16
1558247_s_at	BC021210	仮定タンパク質 BC018697
206696_at	NM_000273	G タンパク質-結合された受容体 143
1560316_s_at	N32168	グルココルチコイド誘発された転写体 1
203990_s_at	A1140752	偏在的に転写されたテトラトリコペプチド反復体, X 染色体
221638_s_at	AF008937	シンタキシン 16
230146_s_at	BF111850	フレクエニン相同体 (シヨウジョウバエ)
231151_at	AL122010	デスクリンで、大きな (シヨウジョウバエ) 相同体-関連のタンパク質 3
233767_at	AU148706	CDNAFLJ12557fis. クローン NT2RM4000783
211681_s_at	AF116705	PDZ 及び LIM ドメイン 5
225088_at	BG546917	染色体 16 読取り枠 63
203234_at	NM_003364	ウリジンホスホリラーゼ 1
202028_s_at	BC000603	リボソームタンパク質 L38

【 0 5 9 0 】

10

20

30

40

【表 5 1】

表51

組織名称	遺伝子銀行	説明
200954_at	NM_001694	ATPase, H+ 輸送, リゾノーム 16kDa, V0 サブユニット c
211317_s_at	AF041461	CASP8 及び FADD-様アポト-シスレギュレーター
208729_x_at	D83043	主要組織適合性複合体, クラス I, B
206486_at	NM_002286	リンパ球-活性化遺伝子 3
1558093_s_at	B1832461	マトリン 3//マトリン-3 (核スカフォールドタンパク質 P130/MAT3) に類似する
204149_s_at	NM_000850	グルタチオン S-トランスフェラーゼ M4
155942_a_at	AK091113	NPC-A-5
1555202_a_at	BC010136	仮定タンパク質 FLJ10656
231721_at	AF356518	連結付着分子 3
224127_at	AF116660	---
224241_s_at	BC002350	---
216788_at	AK025564	CDNA: FLJ21911fs, クローン HEP03855
228371_s_at	BF196007	---
221440_s_at	NM_006606	網膜胚種細胞腫結合タンパク質 9
220585_at	NM_025130	ヘキンキナーゼドメイン含有 I
229439_s_at	A1830823	RNA-結合タンパク質
206026_s_at	NM_007115	腫瘍壊死因子, $\alpha$ -誘発されたタンパク質 6
209086_x_at	BE964361	メラノーマ細胞付着 分子
229440_at	A1830823	RNA-結合タンパク質
221875_x_at	AW514210	主要組織適合性複合体, クラス I, F
1557918_s_at	AU131482	溶質キャリアーファミリー 16, メンバー I (モノカルボン酸トランスポーター I)
244735_at	A137758	コイルドコイルドメイン含有 54
227358_at	Z39566	亜鉛フィンガー及び BTB ドメイン含有 46
224252_s_at	AF177940	FXYD ドメイン含有イオン輸送レギュレーター-5

【 0 5 9 1】

10

20

30

40

【表 5 2】

表52

組織名称	遺伝子銀行	説明
206025_s_at	AW188198	腫瘍壊死因子, $\alpha$ -誘発されたタンパク質 6
203953_s_at	BE791251	クラウジン3
231341_at	BE670584	溶質キヤリアーファミリー-35, メンバー-D3
213211_s_at	AI005317	TAF6-様 RNA ポリメラーゼ II, p300/CBP-関連の因子 (PCAF)-関連の因子, 65kDa
226988_s_at	AI709055	ミオシン, H鎖 I4
208677_s_at	AL550657	バシジン (0k 血液グループ)
234625_at	AK025055	CDNA: FLJ21402f.s, クローン COL03734
206769_at	NM_004202	チモシン, $\beta$ 4, Y-結合の
229432_at	AV696264	N-アセチルグルタマートシントナーゼ
242338_at	BG535396	トランスメンブタンタンパク質 64
1554029_a_at	BC030966	KIAA0372
202793_at	NM_005768	膜結合された 0-アシルトランスフェラーゼドメイン含有 5
210449_x_at	AF100544	マイトジェン-活性化されたタンパク質キナーゼ 14
244171_at	AW505004	ムスケリン 1, 細胞間メディエーター含有 kelch モチーフ
238848_at	BF750565	OTUドメイン含有 4
221354_s_at	NM_005297	メラニン濃縮されたホルモン受容体 1
204431_at	NM_003260	分割 2 E (sp1) 相同体, ショジョウバエ) のトランスデュシン-様エンハンサー
206491_s_at	NM_003827	N-エチルマレイミド-感受性因子結合タンパク質, $\alpha$
217371_s_at	Y09908	インターロイキン 15
204891_s_at	NM_005356	リンパ球-特異的タンパク質子ロシキナーゼ
200948_at	NM_005439	骨髄性白血病因子 2
237806_s_at	AI684717	仮定タンパク質 LOC729296
203849_s_at	BG473130	キネシンファミリー-メンバー IA

【 0 5 9 2】

10

20

30

40

【表 5 3】

表53

組織名称	遺伝子銀行	説明
211514_at	AF068286	受容体相互作用タンパク質キナーゼ 5
234724_x_at	AF152528	プロトカドヘリンβ18 偽遺伝子
213665_at	A1989477	SRV (性決定領域 Y)-ボックス 4
1552736_a_at	NM_138966	ニューロピリン (NRP) 及びトロイド (TL) -様 I
211088_s_at	Z25433	p010-様キナーゼ 4 (シヨウジョウバエ)
1554576_a_at	BC007242	ets 変異体遺伝子 4 (EIA エンハンサー結合タンパク質, E I A F)
243323_s_at	A1872979	AT-結合転写因子 1
220354_at	NM_025266	仮定タンパク質 MGC2780
223821_s_at	BC004888	スシドメイン含有 4
200824_at	NM_000852	グルタチオン S-トランスフェラーゼ pi
227619_at	BF195628	Werner ヘリカーゼ相互作用性タンパク質 1
201428_at	NM_001305	クラウジン 4
215984_s_at	AL121845	ADP-リボシル化因子関連のタンパク質 1
206396_at	NM_004170	溶質キャリアーファミリー (神経/上皮高親和性グルタメートトランスポーター, システム Xag), メンバー 1
229406_at	A1674243	仮定タンパク質 LOC146713
243936_x_at	T85061	---
215495_s_at	AL117523	無菌 α モチーフドメイン含有 4A
224003_at	AF332243	精巢-特異的転写体, Y-結合の 14
230102_at	AW206458	Ets 変異体遺伝子 5 (ets-関連の分子)
203267_s_at	BF223206	発生的に調節された GTP 結合タンパク質 2
236940_at	W60647	転写された遺伝子座, NP_066953, 1 イノメラゼ A イノフォーム I [ホモサピエンス] に弱く類似する

【 0 5 9 3】

10

20

30

40

【表 5 4】

表54

組織名称	遺伝子銀行	説明
表 54 : iPS 細胞系 対 hES 細胞系 において 5 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ )		
202002_at	AW072302	アセチル-補酵素Aアシルトランスフェラーゼ2(ミトコンドリア3-オキソアシル-補酵素Aチオラーゼ)
1560228_at	BC041461	カタツムリ相同体3(シヨウジョウバエ)
221317_x_at	NM_018939	プロトカドヘリンβ6
217552_x_at	A1432713	補体成分(3b/4b)受容体I(Knops 血液グループ)
214279_s_at	W74452	NDRG ファミリー メンバー2
208629_s_at	BG472176	ヒドロキシアシル-補酵素Aデヒドロゲナーゼ/3-ケトアシル補酵素Aチオラーゼ/エノイル-補酵素Aヒドロラーゼ(三官能性タンパク質), αサブユニット

【 0 5 9 4】

10

20

30

40

【表 5 5】

表55

組織名称	遺伝子銀行	説明
234626_at	AF137396	嗅覚受容体, ファミリー51, サブファミリー1, メンバー1
211006_s_at	L02840	カリウム電位型チャネル, Shab-関連のサブファミリー、メンバー1
228239_at	AA148789	染色体 21 読取り枠 51
233583_at	AA608889	転写された遺伝子座
205911_at	NM_000316	副甲状腺ホルモン受容体 1
217715_x_at	BE045142	---
1566477_at	AL832530	MRNA; cDNA DKFZp547F1316 (クローン DKFZp547F1316 からの)
205693_at	NM_006757	トロポニン T 型 3 (骨格, 早い)
215406_at	AK024860	CDNA: FLJ21207fis, クローン COL00362
1564121_at	AK026788	CDNA: FL123135fis, クローン LNG08666
220002_at	NM_018012	キネシンファミリー メンバー26B
233939_at	AL117522	REX1, RNA エキソヌクレアーゼ 1 相同体 (S, セレブシエ)
210382_at	U13989	セクレチン受容体
220596_at	NM_015590	Gパッチドメイン含有 4
208448_x_at	NM_002173	インターフェロン, $\alpha 16$
231670_at	AA057519	---
223472_at	AF071594	WolfHirschhorn 症候群及び候補体 1
1554542_at	BC025747	CG4995 遺伝子生成物に類似する
1559623_at	CA446227	染色体 11 読取り枠 54

【 0 5 9 5 】

10

20

30

40

【表 56】

表56

表 56 : hES 細胞系 対 iPS 細胞系において 2 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ )	
組織名称	説明
1562036_at	CDNA クローン IMAGE:5297259
229817_at	亜鉛フィンガンタンパク質 608
234674_at	CDNA:FLJ23374f1s, クローン HEP16126
242628_at	転写された遺伝子座
243081_at	CDNA クローン IMAGE:5296106
1553721_at	リングフィンガンタンパク質 152
239200_at	転写された遺伝子座
226286_at	RNA 結合モチーフ及び ELM0/GED-12 ドメイン I
1558570_at	仮定タンパク質 LOC145783
1566204_at	CDNAFLJ35929f1s, クローン TEST12010833
233608_at	CDNAFLJ11929f1s, クローン HEMBB1000434
217070_at	5, 10-メチレンテトラヒドロプロフォレートレダクターゼ (NADPH)
220577_at	GTPase, 非常に大きなインターフェロン誘発性 I
220491_at	ヘプシジン抗微生物性ペプチド
242398_x_at	転写された遺伝子座
237168_at	転写された遺伝子座
1556638_at	仮定タンパク質 LOC284530
216928_at	T-細胞急性リンパ性白血病 1
209639_s_at	G-タンパク質シグナル 12 のレギュレーター
1561255_at	CDNA クローン I IMAGE:4827712
233164_x_at	菱形ドメイン含有 I
236038_at	転写された遺伝子座
238126_at	CDNA クローン I IMAGE:4791585
243942_at	転写された遺伝子座

【 0 5 9 6 】

10

20

30

40

【表 57】

表57

組織名称	遺伝子銀行	説明
1568978_s_at	BM547346	染色体 II 読取り枠 21
1566672_at	AK093656	CDNAFLJ36337f1s, クローン THYMU2006324
237663_at	A1681941	転写された遺伝子座
237151_s_at	BF433885	仮定タンパク質に類似する
212616_at	BF668950	クロモドメインヘリカーゼ DNA 結合タンパク質 9
231792_at	AF325549	ミオシン I 鎖キナーゼ 2, 骨格筋
1555554_at	AY180924	乳癌及び唾液腺発現遺伝子
1553512_at	NM_173860	ホメオボックス C12
211483_x_at	AF081924	カルシウム/カルモジュリン-依存性タンパク質キナーゼ (CaM キナーゼ) II $\beta$
1565588_at	BG708117	SP140 核体タンパク質
1559240_at	AA811339	---
230802_at	A1761947	RhoGTPase 活性化タンパク質 24
213369_at	A1825832	プロトカドヘリン 21
235724_at	AW513684	アシル-CoA シンターゼ短鎖ファミリー メンバー 1
238279_x_at	BF062155	---
1569167_at	BC013250	ホモ・サピエンズ, クローン IMAGE:3867502, mRNA
208559_at	NM_013311	脾臓及び十二指腸ホメオボックス 1
217122_s_at	AL031282	溶質キャリアファミリー-35, メンバー E2... に類似する溶質キャリアファミリー-35, メンバー E2
234108_at	AF264628	味覚受容体, 型 2, メンバー 45
229480_at	A1341053	MRNA: cDNADKFZp686118116 (クローン DKFZp686118116 からの)
240623_at	BF589421	転写された遺伝子座
224519_at	BC006438	CDNA クローン MGC:13162 IMAGE:3010103
221456_at	NM_016943	味覚受容体, 型 2, メンバー 3

【 0 5 9 7 】

10

20

30

40

【表 58】

表58

組織名称	遺伝子銀行	説明
236728_at	AW070437	ロイル/シスチニルアミノペプチダーゼ
219839_x_at	NM_012468	T-細胞白血病/リンパ腫 6
238894_at	AW665144	転写された遺伝子座
231276_at	BF591245	ホスホジェステラーゼ 3B, cGMP-阻害された
1552732_at	AL832152	アクチン-結合 Rho 活性化タンパク質
210292_s_at	AF332218	プロトカドヘリン II X-結合の"/プロトカドヘリン II Y-結合の
230354_at	BG236273	転写された遺伝子座
1557208_at	AA609739	仮定タンパク質 LOC219731
240305_at	AI291536	CDNA クローン I MAGE:5285563
233075_at	AF071178	ヘクトドメイン及び RLD2 偽遺伝子 7
226134_s_at	AI978754	転写された遺伝子座
235796_at	AI927957	転写された遺伝子座
1567375_at	AJ011596	トランプされた 3' 末端エキソン, クローン B2E8
232140_at	BF056548	CDNAFLJ13474fis, クローン PLACE1003593
216707_at	AL162044	MRNA; cDNADKFZp761L0812 (クローン DKFZp761L0812 からの); 粒子
1557395_at	AW243434	仮定 LOC255130
1554629_at	BC027940	EPH 受容体 A7
215488_at	AF052095	クローン 23911mrRNA 配列
211004_s_at	BC002553	アルデヒドヒドロゲナーゼ 3 ファミリー, メンバー B 1
244847_at	AA988223	転写された遺伝子座
222079_at	BF739971	---
237996_at	AV650867	---
216644_at	AK000185	CDNAFLJ20178fis, クローン COL09390
238588_at	A1623295	CDNA クローン IMAGE:5265193
222061_at	AA700015	CD58 分子
211315_s_at	AB012043	カルシウムチャネル, 電位-依存性, T 型, $\alpha 1G$ サブユニット

【 0 5 9 8 】

10

20

30

40

【表 59】

表59

表 59 : hES 細胞系 対 iPS 細胞系 において 2 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 (p ≤ 0.01)	
組織名称	説明
210037_s_at	遺伝子銀行 L24553 窒素酸化物シタンターゼ 2A (誘発できる, 肝細胞)
209957_s_at	M30262 ナトリウム利尿性ペプチド前駆体 A
206449_s_at	NM_001879 マンナン-結合レクチンセリンペプチダーゼ I (Ra - 反応性因子の CA/C2 活性化成分)
1569064_at	BC027487 仮定 LOC643338
209747_at	J03241 形質転換性成長因子, β3
224220_x_at	AF063824 一時的受容体電位カチオンチャンネル, サブファミリー-C, メンバー-4
244711_at	BF512863 転写された遺伝子座
239452_at	A1088640 転写された遺伝子座
243281_at	AW188311 転写された遺伝子座
1560346_at	AL080057 MRNA; cDNADKFZp564D032 (クローン DKFZp564D032 からの)
1566623_at	AL050263 DKFZP547J0410 タンパク質
222381_at	A1907083 プログラムされた細胞死 6///CDNAFLJ37304f1s, クローン BRAMY2016070
227504_s_at	NG4630 MRNA; cDNADKFZp686F09227 (クローン DKFZp686F09227 からの)
235164_at	BG433539 亜鉛フィンガータンパク質 25
1559159_at	AK094069 中心体タンパク質 68kDa
1570128_at	BC025771 DEAD (Asp-Glu-Ala-As) ボックスポリペプチド 19A
231055_at	BF432941 転写された遺伝子座
1557453_at	BM662646 十分な長さの挿入体 cDNA クローン ZD77B03
1564996_at	AK000024 CDNAFLJ20017f1s, クローン ADSE00552
243107_at	A1910590 ---
204914_s_t	AW157202 SRY (性別決定領域 Y) -ボックス I
1564855_at	AK058056 仮定タンパク質 LOC727924
1564559_at	AL833395 仮定タンパク質 LOC728073
204556_s_at	AL568422 DAZ 相互作用性タンパク質 I

【 0 5 9 9 】

10

20

30

40

【表60】

表60

組織名称	遺伝子銀行	説明
1562372_at	AK094917	シナプス包糖タンパク質 2C
205777_at	NM_001395	二重特異性ホスファターゼ 9
231475_at	BE671790	TBC1 ドメインファミリー, メンバー 21
224239_at	AF301470	デフェンシン, $\beta$ 103B
238228_at	AI732206	---
230763_at	AA905508	精子形成関連の 17
229508_at	BF434828	U2 小核 RNA 補助因子 2
236479_at	BF513986	---
205183_at	NM_002138	異種核リボヌクレオタンパク質 D (AU-に富む要素 tRNA 結合タンパク質 1, 37kDa)
216135_at	AK000122	IQ モチーフ含有 K
1553207_at	NM_173664	ADP-リポシル化因子-様 10
217162_at	M94893	精巢特異的タンパク質, Y-結合の 1
244328_x_at	T86832	---
1566003_x_at	AK096064	CDNAFLJ38745fis, クローン KIDNE2012291
236736_at	AW274301	転写された遺伝子座
238532_at	AI125562	D4, 亜鉛及び二重 PHD フィンガー, ファミリー 3
223781_x_at	M15943	アルコールデヒドロゲナーゼ 4 (クラス II), pi ポリペプチド
222940_at	U55764	スルホトランスフェラーゼファミリー E, エストロゲン-選択的, メンバー 1
213953_at	AI732381	ケラチン 20
241033_at	AI821633	転写された遺伝子座
1569332_at	BC022563	染色体 3 読取り枠 66
214049_x_at	AI829961	CD7 分子

【 0 6 0 0 】

10

20

30

40

【表 6 1】

表61

組織名称	遺伝子銀行	説明
233165_at	AJ242655	SH3 ドメインを有する NCK 相互作用性タンパク質
241555_at	A1032090	転写された遺伝子座
1553405_a_at	NM_033225	CUB 及びスシ 多重ドメイン I
238406_x_at	A1734001	心因性発作関連の 6 相同体 (マウス) -様 2
203084_at	NM_000660	形質転換成長因子, $\beta$ 1
232182_at	A1142853	仮定タンパク質 LOC286272
1559821_at	BC025328	ホモ・サビエンズ, クローン IMAGE:3944699, mRNA
206660_at	NM_020070	免疫グロブリン $\lambda$ -様ポリペプチド I
1564658_at	BC037583	染色体 7 読取り枠 52
220095_at	NM_017738	染色体 9 読取り枠 39
230694_at	A1340341	---
202341_s_at	AA149745	3 分体 モチーフ含有 2
1566577_at	AL831879	MRNA: cDNA DKFZp54711410 (クローン DKFZp54711410 からの)
237587_at	A1733359	転写された遺伝子座, NP_001041360.1 タンパク質 LOC317588 [Rattus norvegicus] に対して弱く類似する
1553868_a_at	NM_173665	染色体 5 読取り枠 36
238731_at	AW977837	SET ドメイン, 分岐 2
235055_x_at	BF913667	ムチン 4, 細胞表面関連の
230189_x_at	BF434897	転写された遺伝子座
1562656_at	BC043591	CDNA クローン IMAGE:5248626
219898_at	NM_018970	G タンパク質-結合された受容体 85
217585_at	BE502910	nebulette
1554147_s_at	AB063297	染色体 3 読取り枠 15
231047_at	R56808	転写された遺伝子座
213525_at	AC002310	CDNA クローン IMAGE:4906981
1553872_at	NM_152914	造血の間発現された転写体 2
1557452_at	AF088024	十分な長さの挿入体 cDNA クローン ZC19A03
211618_s_at	M31008	アルカリホスファターゼ, 腸

【 0 6 0 1】

10

20

30

40

【表 6 2】

表62

組織名称	遺伝子銀行	説明
227121_at	BF476076	MRNA; cDNADKFZp586K1922 (クローン DKFZp586K1922 からの)
244364_at	AA443280	ミオシン 111A
243797_at	AW070323	セリン/トレオニンキナーゼ 17b
1561396_at	AK092565	EPH 受容体 A6
241071_at	BF432757	---
1554739_at	BC032544	囊内 A 粒子-促進されたポリペプチド
237015_at	A1097501	CDNAFLJ37017f1s, クローン BRACE2010642
243825_at	T79768	B-細胞 CLL/リンパ腫 6, メンバー B (亜鉛フィンガータンパク質)
232934_at	AA526468	CDNAF FLJ13422 f1s, クローン PLACE1002213
1561669_at	BC018424	ホモ・サピエンス, クローン IMAGE:4508536, mRNA
244545_at	A1769647	CDNA クローン IMAGE:5296106
1561200_at	BM981856	von Willebrand 因子 A ドメイン含有 3B
244291_x_at	BE348646	転写された遺伝子座
1564854_at	AK058061	CDNAFLJ25332f1s, クローン TST00642
229962_at	W68731	ロイシンに富んでいる反復体含有 37, メンバー A3
225491_at	AL157452	溶質キャリアーファミリー 19 (グリコ高親和性グルタメートトランスポーター) メンバー 2
205713_s_at	NM_000095	軟骨オリゴマー マトリックスタンパク質
240692_at	A1809153	SPR 偽遺伝子
1553894_at	NM_144974	コイルドコイルドメイン含有 122
217530_at	AW295295	溶質キャリアーファミリー 34 (ナトリウムホスフェート), メンバー 1
228376_at	A1972498	糖タンパク質, $\alpha$ -ガラクトシルトランスフェラーゼ 1///糖タンパク質 ガラクトシルトランスフェラーゼ $\alpha$ 1, 3 に類似する
244204_at	W87300	---
206128_at	A1264306	アドレナリン作用性, $\alpha$ -2C-, 受容体
221275_s_at	NM_030896	---

【 0 6 0 2】

10

20

30

40

【表 6 3】

表63

表 63 : hES 細胞系 対 iPS 細胞系において 2 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ )		説明
組織名称	遺伝子銀行	
233701_at	AK024580	CDNA:FLJ20927fis. クローン ADSE01007
240588_at	A1821798	---
217233_at	Z97206	---
236719_at	A1042187	転写された遺伝子座, XP_001086437.1 仮定タンパク質 [Macaca mulatta] に対して適度に類似する
1561205_at	BC036409	CDNA クローン IMAGE:5266702
216129_at	AL117659	ATPase, クラス II, 型 9A
214428_x_at	K02403	補体成分 4A (Rogers 血液グループ) // 補体成分 4B (子供血液グループ)
211579_at	U95204	インテグリン, $\beta 3$ (血小板糖タンパク質 IIIa, 抗原 CD61)
209354_at	BC002794	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー, メンバー14 (ヘルペスウィルス侵入メデイエーター)
207896_s_at	NM_007337	肺及び咽頭部癌における欠失 1
1561319_at	BC041486	CDNA クローン IMAGE:5492202
1569454_a_at	BC475827	仮定タンパク質 LOC283352
240588_at	AW206555	---
1552872_at	NM_025091	染色体 X 及び Y 読取り枠 2
233734_s_at	AW271225	オキシステロール結合タンパク質-様 5
214347_s_at	AW772056	ドーパドカルボキシラーゼ (芳香族 L-アミノ酸デカルボキシラーゼ)
1556803_at	BC033542	ポリメラーゼ (RNA) III (DNA 指図された) ポリペプチド B
236154_at	R41907	Quaking 相同体, KH ドメイン RNA 結合 (マウス)
205623_at	NM_000691	アルデヒドデヒドロゲナーゼ 3 ファミリー, メンバー A1
220818_s_at	NM_016179	一時的受容体電位カチオンチャンネル, サブファミリー C, メンバー 4
1555043_at	BC028630	脂肪腫 HMGIC 融合パートナー-様 5

【 0 6 0 3 】

10

20

30

40

【表 6 4】

表64

組織名称	遺伝子銀行	説明
156897_at	BC019871	リボヌクレアーゼ T2
235600_at	N63890	転写された遺伝子座
220150_s_at	NM_024581	染色体 6 読取り枠 60
210381_s_at	BC000740	コレシストキニン B 受容体
1558397_at	BF976693	CDNAFLJ34100f1s, クローン FC8BF3007597
216214_at	AF070602	クローン 24504mRNA 配列
221990_at	A1948472	対にされたボックス 8
243817_at	A1874267	---
241380_at	BF508325	FLJ41603 タンパク質
237604_at	AA906413	BC038740
243708_at	A1678145	トランスメンブランタンパク質 I32E
233876_at	AK000677	---
240858_at	AA680403	転写された遺伝子座
1560806_at	BC037249	仮定タンパク質 LOC150527
239480_at	AA608964	転写された遺伝子座
1559580_at	AL832694	ロイシンに富んでいる反復体含有 39
230610_at	AW008915	転写された遺伝子座, XP_001087523.1 に対して適度に類似する、Mid-I-関連の塩化物チャネルイオンフォーム 4 [Macaca mulatta] に対して類似する
221022_s_at	NM_031293	ポリアミンモジュレート因子   結合タンパク質 1
239178_at	AL583692	線維芽細胞成長因子 9 (グリッパ-活性化因子)
237365_at	A1798981	CDNA クローン IMAGE:5269899
1568870_at	BC034805	CDNA クローン IMAGE:4818211
214411_x_at	AW584011	キモトリブシノーゲン B2
244035_at	BF003032	十分な長さの挿入体 cDNA クローン YZ11B11

【 0 6 0 4】

10

20

30

40

【表 6 5】

表65

表 65 : hES 細胞系 対 iPS 細胞系において 2 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ )	
組織名称	説明
237094_at	遺伝子銀行
A1953086	配列類似性 19 (ケモカイン (C-C モチーフ様) を有するファミリー, メンバーA5
239312_at	---
AW419032	---
207640_x_at	ネトリン 2-様 (ニワトリ)
242171_at	---
AA693730	---
1553248_at	コイルドコイルドメイン含有 57
234480_at	仮定タンパク質 DKFZp761C1711
1555474at	チューブリンチロシンリガーゼ様ファミリー, メンバー3
234261_at	MRNA: cDNADKFZp761M10121 (クロールン DKFZp761M10121 からの)
243459_x_at	---
AW300077	---
237676_at	転写された遺伝子座
AW274369	---
206819_at	POM121-様タンパク質
NM_014549	---
1556125_at	Gパッチドメイン含有 2
BM668595	---
1556065_at	仮定タンパク質 LOC284926
BG828817	---
232120_at	CDNAFLJ14259f.s, クロールン PLACE1001076
1553562_at	CD8b 分子
NM_172100	---
217016_x_at	仮定 LOC389177
AK026825	---
232807_at	配列類似性 131 を有するファミリー, メンバーA
AU158601	---
227389_x_at	---
AA058858	---
237528_at	転写された遺伝子座
D80212	---
242714_at	---
AW500340	---
205050_s_at	---
NM_012324	---
240159_at	マイトジェン-活性化されたタンパク質キナーゼ 8 相互作用性タンパク質 2
AA836116	---
240887_at	溶質キャリアーファミリー 15 (H+/ペプチドトランスポーター), メンバー2
A1017957	---
1562577_at	転写された遺伝子座
BC025331	---
244715_at	ホモ・サビエンス, クロールン IMAGE4546564, mRNA
R39803	---
1561500_at	転写された遺伝子座
AW575915	---
239627_at	仮定タンパク質 LOC348180
BG034114	---
222901_s_at	トランスメンブラン emp24 タンパク質トランスポートドメイン含有 9
AF153815	---
233351_at	カリウム内部に精留するチャネル, サブファミリー-J, メンバー16
AF339776	---
1566898_at	クロールン IMAGE: 1542282, mRNA 配列
X53943	---
	スキネットデヒドロゲナーゼフラボタンパク質サブユニット

【 0 6 0 5】

10

20

30

40

【表 6 6】

表66

組織名称	遺伝子銀行	説明
228136_s_at	AI280446	染色体 17 読取り枠 70
233387_s_at	AK024009	ペリセントロイン(ケンドリン)
231911_at	AA736604	KIAA1189
240402_at	H05918	IRRE 様 3 の血族 (シヨウジョウハエ)
244840_x_at	AW452588	細胞質分裂 4 のデイクエーター
1556172_at	AL832916	MRNA; cDNADKFZp76210915 (クローン DKFZp76210915 からの)
232833_at	AF070565	クローン 24425mrna 配列
1558797_at	BC017743	ホモ・サビエンス, クローン I MAGE:4391558, mRNA
243542_at	BF445273	プロリルエンドペプチダーゼ-様
223717_s_at	AB051833	アクロシン結合タンパク質
231324_at	AW452134	転写された遺伝子座
1556713_at	AK022031	CDNAFLJ11969fis, クローン HEMBB1001142
232186_at	AK027041	染色体 20 読取り枠 142
231158_x_at	A1380289	ポリピリミジン結合タンパク質 I
228816_at	AK022625	仮定タンパク質 LOC92270
1567390_at	AJ011600	トラップされた 3' 末端エキソン, クローン C2B5
1565732_at	B1254450	MRNA; cDNADKFZp761B0218 (クローン DKFZp761B0218 からの)
230228_at	W94546	仮定 LOC284297
217462_at	AC004770	染色体 11 読取り枠 9
1561759_at	AF085995	セブチンに類似する 7
211225_at	U27329	フコシルトランスフェラーゼ 5 ( $\alpha$ (1,3) フコシルトランスフェラーゼ)
210565_at	U03469	グルカゴン受容体
237523_at	A1939584	転写された遺伝子座
221921_s_at	A1951798	細胞付着 分子 3
234764_x_at	U96394	免疫グロブリン入変数 I-44///免疫グロブリン抗-HBsAg 入鎖 (LM25)///免疫グロブリン入遺伝子座

【 0 6 0 6 】

10

20

30

40

【表67】

表67

組織名称	遺伝子銀行	説明
表67 : iPS細胞系 対 hES細胞系及び親線維芽細胞の両者において5倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ )		
AFFX-r2-Ec-bioD-5_at	BF057809	転写された遺伝子座
239206_at	AF268617	POUクラス5ホメオボックス1偽遺伝子3
239205_s_at	AW003929	クラウジン6
215101_s_at	NM_004360	カドヘリン1, 型1, E-カドヘリン(上皮)
210697_at	NM_017697	RNA結合モチーフタンパク質35A
223551_at	NM_003212	テラトカルシノーマ由来の成長因子1///テラトカルシノーマ由来の成長因子3, 偽遺伝子
214974_x_at	AK022821	発生多能性関連の4
237552_at	AF268615	POUクラス5ホメオボックス1///POUクラス5ホメオボックス1偽遺伝子1///POUクラス5ホメオボックス1偽遺伝子3///POUクラス5ホメオボックス1偽遺伝子4
231120_x_at	A1554075	転写された遺伝子座
235075_at	NM_024674	lin-28 相同体(C, エレガンス)
211906_s_at	AY072911	コクサッキーウイルス及びアデノウイルス受容体
217230_at	NM_005356	リンパ球-特異的タンパク質チロシンキナーゼ
225908_at	BF001941	RNA結合モチーフタンパク質35A
232881_at	BC028721	溶質キャリアファミリー1(高親和性アスパラギン酸塩/グルタメートトランスポーター), メンバー6

【0607】

10

20

30

40

【表 6 8】

表68

組織名称	遺伝子銀行	説明
239951_at	L08599	カドヘリン I, 型1, E-カドヘリン(上皮)
1553276_at	BG166705	ケモカイン(C-X-Cモチーフ) リガンド5
219837_s_at	NM_001100	アクチン, $\alpha 1$ , 骨格筋
208542_x_at	NM_014474	スフィンゴエリンホスホジエステラーゼ, 酸-様 3B
239319_at	B1092935	亜鉛フィンガータンパク質 42 相同体(マウス)
235779_at	AL117612	mal, T-細胞分化タンパク質 2
220638_s_at	M83248	分泌されたリンタンパク質 1(オステオポニン, 骨シアロタンパク質 1, 初期 T-リンパ球活性化 1)
214336_s_at	AU148706	CDNAFLJ12557fis, クローン NT2RM4000783
219807_x_at	NM_003413	Zicファミリーメンバー-3 内臓逆位 1(奇数-対にされた相同体, ショウジョウバエ)
1559503_a_at	AL515381	コロニン, アクチン結合タンパク質, 2A
209040_s_at	AF450454	亜鉛フィンガータンパク質 42 相同体(マウス)
214090_at	BG327863	CD24 分子
223629_at	NM_020436	sal-様 4(ショウジョウバエ)
1559051_s_at	NM_014446	インテグリン $\beta 1$ 結合タンパク質 3
212105_s_at	A1674565	配列類似性 110 を有するファミリー, メンバー C
203872_at	BE974098	腫瘍タンパク質 D52
222935_x_at	AL136825	ユビキチン特異的ペプターゼ 44
243195_s_at	W92748	セマドメイン, トランスメンバレンドメイン(TM), 及び細胞質ドメイン, (セマホリン) 6A
220179_at	AL556409	ガラニン
222898_s_at	AL533416	キネシンファミリーメンバー IA
229332_at	AU143918	AJ002784 により支持された仮定遺伝子

【 0 6 0 8 】

10

20

30

40

【表69】

表69

組織名称	遺伝子銀行	説明
155731_a_at	X69397	CD24 分子
1553873_at	NM_024939	RNA 結合 モチーフタンパク質 35B
235942_at	NM_005755	Epstein-Barr ウィルス誘発された遺伝子 3
244178_at	NM_173553	仮定タンパク質 FLJ25801
224463_s_at	AF493872	グアニヌクレオチド結合タンパク質、(Gタンパク質), $\gamma 4$
206797_at	NM_002196	インシュリノーマ関連の I
212278_x_at	NM_021195	クラウジン 6
211107_s_at	AA594937	青綬相同体 (マウス)
214519_s_at	AD000168	CD24 分子
216469_at	BE552138	補体成分 (3b/4b) 受容体 I-様
221123_x_at	AI963203	溶質キャリアファミリー 7 (カチオン性アミノ酸トランスポーター, $\gamma$ +システム), メンバー 3
1568574_x_at	NM_006892	DNA (シトシン-5')-メチルトランスフェラーゼ 3 $\beta$
1554777_at	AB020630	タンパク質ホスファターゼ I, レギュレーター $\gamma$ (インヒビター) サブユニット 16B
211214_s_at	AF154005	FII 受容体
205920_at	BE542563	仮定タンパク質 LOC728342
232771_at	NM_001943	デスマグレイン 2
1555765_a_at	AB019562	分泌されたホスホタンパク質 I (オステオポンチン, 骨シロタンパク質 I, 初期 T, リンパ球活性化 I)
206220_s_at	AF027205	セリンペプチドインヒビター, Kunitz 型, 2
201130_s_at	AF225513	タンパク質キナーゼ (cAMP-依存性, 触媒性) インヒビター $\beta$
219911_s_at	NM_024749	パソヒピン 2
226654_at	NM_003991	エンドセリン受容体型 B
1559361_at	NM_000273	Gタンパク質 結合された受容体 143
209260_at	AL359055	MRNA 十分な長さの挿入体 cDNA クローン EURO IMAGE 2344436
1552399_a_at	NM_001038	ナトリウムチャネル, 非電位-ゲート型 I $\alpha$

【 0 6 0 9 】

10

20

30

40

【表70】

表70

組織名称	遺伝子銀行	説明
205910_s_at	BE552138	補体成分 (3b/4b) 受容体 I (Knops 血液グロブリン) / " 補体成分 (3b/4b) 受容体 I-様 // 補体成分 (3b/4b) に類似する受容体 I インフォーム F 前駆体
206232_s_at	AK057525	CDNAFLJ32963f.is. クローン TEST12008405
212009_s_at	AB020630	タンパク質ホスファターゼ I, 調節 (インヒビター) サブユニット 16B
204815_s_at	A1935915	SH3-結合ドメインキナーゼ I
1554776_at	BG389015	腫瘍タンパク質 D52
242070_at	NM_005397	ポドカリキシン-様
1554508_at	AK026546	ケモカイン (C-X-C モチーフ) リガンド 5
236741_at	AA761181	CD24 分子
206604_at	NM_003182	タヒキニン, 前駆体 I (物質 K, 物質 P, ニューロキニン 1, ニューロキニン 2, ニューロメジン 1, ニューロキニン $\alpha$ , 神経ペプチド K, 神経ペプチド $\gamma$ )
1555829_at	NM_014392	DNA セグメント染色体 4 上の DNA セグメント (ユニーク) 234 発現された配列上での DNA セグメント
1555434_a_at	AF070651	垂鉛フィンガンタンパク質 257
1564706_s_at	BF056473	CDNA クローン IMAGE:4667929
242519_at	AF225425	セマドメイン, トランスメンブレンドメイン (TM), 及び細胞質ドメイン, (セマホリン) 6A
205344_at	A1653107	Nik 関連のキナーゼ
201123_s_at	AA074145	プロリンデヒドロゲナーゼ (オキシダーゼ) 1
1564339_a_at	AL569326	タンパク質キナーゼ (cAMP-依存性, 触媒) インヒビター $\beta$
216031_x_at	NM_004929	カルピンジン 1, 28kDa
223285_s_at	A1824954	SRV (性決定領域 Y)-ボックス 3
1555800_at	AF110329	グルタミナーゼ 2 (肝臓, ミトコンドリア)
1557910_at	AW014927	カルピンジン 1, 28kDa
204823_at	BC038422	垂鉛フィンガンタンパク質 533
1553852_at	BC028721	溶質キャリアーファミリー I (高親和性アスパラギン酸塩/グルタメートトランスポーター), メンバー 6

【表 7 1】

表71

組織名称	遺伝子銀行	説明
I557924_s_at	NM_006984	クラウジン 10
I552995_at	A1492376	キラー細胞レクチン様受容体サブファミリーG、メンバー2
216360_x_at	A1830823	RNA-結合タンパク質
232751_at	L19659	グルコサミニル (N-アセチル) トランスフェラーゼ2、1-分枝酵素 (1 血液 グループ)
231452_at	NM_031272	精巢発現された 14
213171_s_at	N23258	転写された遺伝子座
209756_s_at	NM_013267	グルタミナーゼ 2 (肝臓、ミトコンドリア)
I556670_at	A1014470	仮定タンパク質 LOC728485
227759_at	NM_003007	セモノゲリン 1
208621_s_at	NM_012116	Cas-Br-M (ネズミ) 自己指向性レトロウィルス性形質転換配列 c
229289_at	NM_004775	UDP-Gal: $\beta$ -GlcNAc $\beta$ 1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ、ポリペプチド 6
I553698_a_at	R61322	コイルドコイルドメイン含有 64
207532_at	NM_004485	グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (Gタンパク質), $\gamma$ 4
219424_at	AW193600	AY007155 により支持される仮定遺伝子
214154_s_at	AW007161	SRY (性決定領域 Y)-ボックス 2
221213_s_at	A1056483	亜鉛フィンガンタンパク質 488
I556834_at	M74921	エンドセリン受容体型 B
227757_at	NM_005498	アダプター - 関連のタンパク質複合体 1, mu2 サブユニット
208504_x_at	Z83838	RhoGTPase 活性化タンパク質 8///PRR5-ARHGAP8 融合
214008_at	AB037776	免疫グロブリンスーパーファミリー、メンバー9
209875_s_at	A1989477	SRY (性決定領域 Y)-ボックス 4
I555821_a_at	NM_000224	クラチン 18

【 0 6 1 1 】

10

20

30

40

【表 7 2】

表72

組織名称	遺伝子銀行	説明
216915_s_at	W58601	転写された遺伝子座
239239_at	NM_152332	タンデム C2 ドメイン, 核
221408_x_at	U07236	リンパ球-特異的タンパク質チロシンキナーゼ
212016_s_at	NM_153270	kelch-様 34 (シヨウジョウバエ)
214828_s_at	AI193252	ロイシンに富んでいる反復及び Ig ドメイン含有 I
233305_at	AF335278	シトクロム P450, ファミリー-2, サブファミリー-S, ポリペプチド I
216985_s_at	BF527050	SRY (性別決定領域 Y)-ボックス 8
231789_at	AA205873	染色体 9 読取り枠 58
211363_s_at	H93038	インスリン-様成長因子 2 mRNA 結合タンパク質 I
217294_s_at	AA573775	染色体 I 読取り枠 172
211922_s_at	AL566906	転写された遺伝子座
204018_x_at	AI669212	タンパク質ホスファターゼ 2 (以前 2A), レギュレーター-y サブユニット B, ェイソフォーム
243347_at	AF191495	F11 受容体
206595_at	BF791631	kelch ドメイン含有 8A
238125_at	NM_003822	核受容体サブファミリー-5, グループ A, メンバー-2
209958_s_at	NM_07267	トランスメンブレンチャネル-様 6
238692_at	BC007230	凝集因子 C 相同体, cochlin (アメリカカバブトガニ)
206390_x_at	NM_024794	ab ヒドロラーゼドメイン含有 9
210572_at	BC479856	配列類似性 60 を有するファミリー, メンバー-A///テラトカルシノーマに類似して発現された, セリンに富んでいる///タンパク質 FAM60A (Tera タンパク質)に類似する
155034_at	NM_003385	ピシニン-様 I
210587_at	AL137763	grainyhead-様 3 (シヨウジョウバエ)
231013_at	AI420156	MARVEL ドメイン含有 3

【 0 6 1 2】

10

20

30

40

【表 7 3】

表73

組織名称	遺伝子銀行	説明
206665_s_at	AW139759	溶質キヤリヤーファミリー-39 (亜鉛トランスポーター), メンバー-8
206882_at	BC041633	染色体 I 読取り枠 210
1555716_a_at	AB046400	セルピンペプチダーゼインヒビター, クレード B (オボアルブミン), メンバー-4
217051_s_at	NM_022449	RAB17, メンバー-RAS 腫瘍遺伝子ファミリー
222508_s_at	AF193756	EF-ハンドカルシウム結合タンパク質 I
211529_x_at	BC039098	デスグレイン 4
220108_at	BC015108	ホモ・サビエンス, オトコニン 90 に類似する, クローン I IMAGE:4044247, mRNA
1561367_a_at	AW299463	WD 反復ドメイン 72
211022_s_at	AL537457	神経フィラメント, L 鎖ポリペプチド 68KDa
218931_at	BE791251	クラウジン 3
213363_at	AF039555	ピンニン-様 I
230112_at	AV706971	多嚢胞性肝臓及び肝疾患 I (常染色体劣性) -様 I
209136_s_at	AA888057	ブラコフィリン 2
212125_at	A1268404	プロトカドヘリン $\alpha$ 9///プロトカドヘリン $\alpha$ サブファミリー-C, 2///プロトカドヘリン $\alpha$ サブファミリー-C, 1///プロトカドヘリン $\alpha$ 13///プロトカドヘリン $\alpha$ 12///プロトカドヘリン $\alpha$ 11///プロトカドヘリン $\alpha$ 10///プロトカドヘリン $\alpha$ 8///プロトカドヘリン $\alpha$ 7///プロトカドヘリン $\alpha$ 6///プロトカドヘリン $\alpha$ 5///プロトカドヘリン $\alpha$ 4///プロトカドヘリン $\alpha$ 3///プロトカドヘリン $\alpha$ 2///プロトカドヘリン $\alpha$ 1
217370_x_at	BC473130	キネシンファミリーメンバー IA
211016_x_at	BC001745	DNA セグメント染色体 4 上の DNA セグメント (ユニーク) 234 発見された配列
241661_at	NM_000814	$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) A 受容体, $\beta$ 3
222611_s_at	A1792670	ホモ・サビエンス (ヒト) の標準化された神経芽細胞腫 Cot25 の十分な長さの cDNA クロニン CS00C002YA18
213722_at	U46745	ジストロブレリン, $\alpha$
212574_x_at	NM_014289	カルバイン 6
219928_s_at	AF152474	プロトカドヘリン $\alpha$ サブファミリー-C, 2
204895_x_at	BC029917	ホスホイノシチド-3-キナーゼアダプタータンパク質 I

【 0 6 1 3 】

10

20

30

40

【表 7 4】

表74

組織名称	遺伝子銀行	説明
208275_x_at	NM_001877	補体成分 (3d/エプスタイン-バーウイルス) 受容体 2
232001_at	BC000181	G タンパク質-結合された受容体 160
223828_s_at	A1871354	v-myc 骨髄細胞腫症ウイルス関連の腫瘍遺伝子, 神経芽由来の (鳥類)
210654_at	NM_006465	AT に富んでいる相互作用性ドメイン 3B (BRIGHT-様)
206208_at	BF905445	プロリンに富んでいる Glu (G-カルボキシグルタミン酸) 4 (トランススメンブリン)
1553535_a_at	BC000329	ストラチフィン
222936_s_at	BC014155	脳様 I に富んでいる Ras 相同体
1566764_at	NM_016354	溶質キャリアー有機アニオン性トランスポーターファミリー、メンバー-4A 1
226913_s_at	NM_001307	クラウジン 7
208478_s_at	AB032179	赤血球 膜 タンパク質 バンド 4 1 様 4B
202662_s_at	AF152528	プロトカドヘリン $\beta$ 18 偽遺伝子
228851_s_at	U53823	オクルジン///オクルジン偽遺伝子
206552_s_at	NM_003389	コロン、アクチン結合タンパク質, 2A
213943_at	AA565499	NLR ファミリー、ピリンドメイン含有 7
209198_s_at	AF232238	YRPW モチーフ 2 と関係する毛髪状エンハンサー-of-分割
211699_x_at	AF213678	染色体 19 読取り枠 33
207402_at	NM_004297	グアニンヌクレオチド結合タンパク質, (G タンパク質), $\alpha 14$
224539_s_at	BF732462	PRKC, アポトーシス, WTI, 調節体
229566_at	AV681807	v-erb-b2 赤芽球性白血病ウイルス性腫瘍遺伝子相同体 3 (鳥類)
238742_x_at	BC007242	ets 変異体遺伝子 4 (EIA エンハンサー結合タンパク質, EIAF)
1555639_a_at	A1768894	シンギュリン
211899_s_at	NM_004968	島細胞自己抗原 1, 69kDa
1553694_a_at	AA565509	転写された遺伝子座, XP_531332.1 仮定タンパク質 XP_531332 [パントログジット] に強く類似する

【表 7 5】

表75

組織名称	遺伝子銀行	説明
213926_s_at	AW961205	仮定タンパク質 LOC728485
214000_s_at	NM_005562	ラミニン, $\gamma 2$
203729_at	BC001186	プロトカドヘリン B5
203085_s_at	BE350882	$\delta$ -様 3(シヨウジョウバエ)
207118_s_at	NM_000015	N-アセチルトランスフェラーゼ 2(アリアルミン N-アセチルトランスフェラーゼ)
232591_s_at	BE080109	エンピギン相同体に類似する
236158_at	AL359055	MRNA 十分な長さの挿入体 cDNA クローン EUROIMAGE2344436
229901_at	BF057784	G タンパク質-結合された受容体 I14
211051_s_at	U58994	ラジニン I
222458_s_at	NM_024306	脂肪酸 2-ヒドロキシラーゼ
230809_at	NM_007153	亜鉛フィンガンタータンパク質 208
221279_at	BC000568	トランスメンバレンタンパク質 I08
224169_at	AB018009	溶質キャリアーファミリー 7(カチオン性アミノ酸トランスポーター, $\gamma$ +システム), メンバー 5
233297_s_at	U53470	イノシトールポリリン酸-5-ホスファターゼ, I 45 k D a
221665_s_at	NM_002773	プロテアーゼ, セリン, 8
205391_x_at	AA702685	有機溶質トランスポーター $\alpha$
215728_s_at	BC004907	EPS8-様 I
208474_at	NM_021209	NLR ファミリー, CARD ドメイン含有 4
223567_at	AA910946	アダプター-関連のタンパク質複合体 I, mu2 サブユニット
158862_s_at	BC011672	神経突起成長の G タンパク質調節されたインディエウサ-2
210620_s_at	U73844	E74-様因子 3(ets ドメイン転写因子, 上皮-特異的)

【 0 6 1 5】

10

20

30

40

【表76】

表76

組織名称	遺伝子銀行	説明
211020_at	AI740544	トロンボスポンジン型Iモチーフを有するADAM金属ペプチダーゼ16
231698_at	AI434443	亜鉛フィンガータンパク質81
227316_at	R99562	フォークヘッドボックスA3
1555814_a_at	AI694320	亜鉛フィンガータンパク質533
235728_at	NM_003121	Spi-B転写因子(Spi-I/PUI 関連の)
213713_s_at	NM_025266	仮定タンパク質 MGC2780
237206_at	BC035960	タンパク質シロシンホスファターゼ, 受容体型, 0
210413_x_at	NM_006467	ポリメラーゼ(RNA) III (DNA 指図された) ポリペプチド G (32kD)
242660_at	NM_003577	未分化された胚細胞転写因子1
225369_at	AV709406	トランスメンブランタンパク質125
235358_at	AI653169	アデニラートキナーゼ3-様2
1554628_at	BC035104	CDNA クローン I MAGE:5262438
212154_at	NM_004659	マトリックス金属ペプチダーゼ23B///マトリックス金属ペプチダーゼ23A(偽遺伝子)
218260_at	AI928513	---
207664_at	NM_005477	高分極活性化された環状ヌクレオチドゲート型カリウムチャネル4
201171_at	NM_004973	Jumonji, AT に富んでいる相互作用性ドメイン2
203892_at	BF739767	Rnd2 のラットプロトタイプ
241574_s_at	AF059274	コンドロイチンサルフェートプロテオグリカン5(神経グリカンC)
210457_x_at	NM_018593	溶質キャリアファミリー16, メンバー10(芳香族アミノ酸トランスポーター)
223631_s_at	AA531023	配列類似性46を有するファミリー, メンバーB
1555733_s_at	AI566130	アデニラートキナーゼ3-様2
206917_at	NM_002045	成長関連のタンパク質43
236058_at	AW173071	UDP グリコシルトランスフェラーゼ3ファミリー, ポリペプチドA1
1558015_s_at	AI885670	セレノホスフェートシクターゼ1

【0616】

10

20

30

40

【表 77】

表 77

組織名称	遺伝子銀行	説明
227971_at	AF257210	神経ペプチド FF 受容体 2
220892_s_at	A1653050	4-ヒドロキシフェニルピロバートジオキシゲナーゼ-様
230926_s_at	AK026966	アデニレートキナーゼ 3-様 2
37549_g_at	NM_003364	ウリジンはホスホリラーゼ 1
210828_s_at	H23979	CD200 分子
222406_s_at	R45446	転写された遺伝子座
1553191_at	NM_022357	ジペプチダーゼ 3
1554327_a_at	AF147790	ムチン 12, 細胞表面関連の
240983_s_at	NM_024645	亜鉛フィンガー, マトリン型 4
212797_at	L40378	セルピンペプチダーゼインヒビター, クレド B (オポアルブミン), メンバー 9
209719_x_at	AL139377	仮定タンパク質 LOC728591
1552641_s_at	NM_001464	ADAM 金属ペプチダーゼドメイン 2 (フェルチリンβ)
222501_s_at	NM_002119	主要組織適合性複合体, クラス II, D0α
1552477_a_at	AB055704	LIM ホメオボックス 4
226876_at	A1936724	転写された遺伝子座, XP_001114804.1 に弱く類似する スペクトリン, β, 非-赤血球   インフォーム 4 [Macaca mulatta]
210869_s_at	NM_002286	リンパ球 活性化遺伝子 3
237911_at	U19557	セルピンペプチダーゼインヒビター, クレド B (オポアルブミン), メンバー 4
215037_s_at	BC000740	コレステロキニン B 受容体
206024_at	AL137145	タンパク質キナーゼ C, theta
224279_s_at	AL080170	3 分体 モチーフ含有 58
1553105_s_at	NM_003177	脾臓チロシンキナーゼ
210022_at	BC005368	亜鉛フィンガー-タンパク質 649
223616_at	AC006539	亜鉛フィンガー-タンパク質 682
209629_s_at	NM_005712	HERV-HLTR-関連する 1
224037_at	NM_001944	デスモグレイン 3 (尋常性天疱瘡抗原)
91826_at	AL832535	仮定タンパク質 LOC157627
216641_s_at	A1807681	SH3 ドメイン含有リングフィンガー 2
218922_s_at	NM_006574	コンドロイチン硫酸プロテオグリカン 5 (神経グリカニン C)

【表78】

表78

組織名称	遺伝子銀行	説明
237872_at	R38389	オルファクトメジン1
203065_s_at	AF279779	コリン作動性受容体、ムスカリン性3///コリン作動性受容体に類似する、ムスカリン性3
228634_s_at	AW242668	仮定 LOC645321
234920_at	AK057525	CDNAFLJ32963fis、クローン TEST12008405
1553697_at	NM_022307	島細胞自己抗原 I, 69kDa
217010_st	AV682679	セレノホスフェートシクターゼ1
202790_at	AB045118	進行したT-細胞リンパ腫2において時折再配列される
211772_x_at	AW302207	転写された遺伝子座
219270_at	AW510925	HRAS-様サブプレッサーファミリーbメンバー5
207087_x_at	BC013944	精子形成及び卵子形成特異的塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス2
213714_at	NM_005242	凝集因子II(トロロニン)受容体-様1
215649_s_at	NM_004615	テトラスパニン7
214903_at	AF052167	MRS2-様、マグネシウム恒常性因子(S、セレシアエ)
210455_at	NM_152476	亜鉛フィンガンタータンパク質560
233827_s_at	AW268880	溶質キャリアファミリー-25、メンバー13(シトリン)
37547_at	NM_018931	プロトカドヘリンβII
233638_s_at	AW166283	タンパク質ホスファターゼ2(以前2A)、レギュレーターサブユニットB、アイソフォーム
221035_s_at	Z39566	亜鉛フィンガンター及びびBTBドメイン含有46
1555609_a_at	R83905	IBRドメイン含有2
202779_s_at	NM_004532	ムチン4、細胞表面関連の
206336_at	AW139719	転写された遺伝子座
1554339_a_at	BF059512	δ/ノッチ-様EGF反復含有
217711_at	AK023446	アミノアジピン酸-セミアルデヒドシクターゼ
231011_at	NM_003027	SH3-ドメイン GRB2-様3
206209_s_at	NM_013410	アデニラートキナーゼ3-様1///アデニラートキナーゼ3-様2///アデニラートキナーゼ イン酵素4に類似する、ミトコンドリア(ATP-AMPトランスホスホリラーゼ)

【0618】

10

20

30

40

【表79】

表79

組織名称	遺伝子銀行	説明
209722_s_at	AK093656	CDNAFLJ36337fis. クローン THYMU2006324
214369_s_at	NM_020662	MRS2-様, マグネシウム恒常性因子 (S. セレピシアエ)
1552389_at	AF086401	十分な長さの挿入体 cDNA クローン Z075H06
215913_s_at	L01087	タンパク質キナーゼ C, theta
201559_s_at	AA868267	3 分体 モチーフ含有 54
217234_s_at	W25881	C D N A : F L J 2 1 0 4 1 f i s . クローン CAE10652
209372_x_at	A1807356	—
218261_at	BF063271	UDP-N-アセチル- $\alpha$ -D-ガラクトサミン:ポリペプチド N-アセチルガラクトサミニルトランスフェラーゼ 3 (GalINac-T3)
217445_s_at	AW006735	CD8a 分子
205595_at	NM_023940	RAS-様, ファミリー II, メンバー B
233669_s_at	AF222694	レクチン、ガラクトシド-結合、溶解性, 12 (ガラクトシン 12)
1561330_at	U92817	—
234976_x_at	AW440392	仮定タンパク質 LOC342892
234085_at	AA824282	C D N A クローン I M A G E : 5296106
207540_s_at	NM_014901	リングフィンガンタンパク質 44
208608_s_at	AF061785	$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) A 受容体, $\alpha 5$ // $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) A 受容体, $\alpha 5$ に類似する
207950_s_at	A7229180	アミノアジピン酸-セミアルテヒドシントナーゼ
221981_s_at	AV723167	シナプトタグミン I
206042_x_at	NM_000366	トロポミオシン I ( $\alpha$ )
210334_x_at	B1825302	トランスメンブレンタンパク質 37
210206_s_at	A1554106	ポリホメオチック相同体 I (シヨウジョウバエ)
226786_at	M61870	亜鉛フィンガンタンパク質 90
211796_s_at	BC027940	EPH 受容体 A7

【0619】

10

20

30

40

【表 80】

表80

組織名称	遺伝子銀行	説明
216493_s_at	AY026481	ガラクトース-3-0-スルホトランスフェラーゼ3
204806_x_at	BF438028	転写された遺伝子座
1556165_at	A1830823	RNA-結合タンパク質
215047_at	AF115765	アルテミン
1552480_s_at	NM_000363	トロポニンI型3(心臓)
205388_at	AB019490	RABGTPase 活性化タンパク質I様
228672_at	BF195936	仮定 LOC342979
205377_s_at	BC005161	インヒピン, $\beta$ E
230633_at	BC014852	インターフェロン調節因子6
207704_s_at	BF060667	ギャップ結合タンパク質, $\beta$ 3, 31kDa
215668_s_at	U26744	ジストロブレピン, $\alpha$
212107_s_at	NM_021978	腫瘍化14(結腸癌)の抑制
237282_s_at	NM_006103	WAP4-ジスルフィドコアードメイン2
220285_at	NM_002993	ケモカイン(C-X-Cモチーフ)リガンド6(顆粒球走化性タンパク質2)
207979_s_at	A1208292	染色体5 読取り枠 35
229881_at	BC003574	T-細胞白血病/リンパ腫 I A
242162_at	NM_005490	SH2ドメイン含有 3A
207379_at	NM_004202	チモシン, $\beta$ 4, Y-結合の
216981_x_at	A1452798	ミオカルジン
224282_s_at	AY116207	NLR ファミリー, ピリンドメイン含有 12
221051_s_at	NM_003260	トランスデュースイン様エンハンサー of 分割 2 (E(sp1) 相同体, ショジョウバエ)
221623_at	NM_000810	$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) A 受容体, $\alpha$ 5
206696_at	T15991	---
203990_s_at	AV731490	シナプトタグミン I

【0620】

10

20

30

40

【表 8 1】

表81

組織名称	遺伝子銀行	説明
233767_at	NM_001902	シスタチオナーゼ (シスタチオチオニンジャーリアーゼ)
211681_s_at	Z83850	Nik 関連のキナーゼ
203234_at	AF243527	カリクレイン-関連のペプチダーゼ 5
208729_x_at	U63824	TEA ドメインファミリーメンバー4
206486_at	AF070580	シナプトタグミン II
1558093_s_at	BC001606	好中性サイトゾル因子 2 (65kDa, コリン性肉芽腫疾患, 常染色体 2)
1555942_a_at	A1857639	ホルホル-12-ミリスチレート-13-アセテート-誘発されたタンパク質 1
1555202_a_at	AB022433	セマドメイン, トランスメンバレンドメイン (TM), 及び細胞質ドメイン, (セマホリン) 6B
229439_s_at	A1862542	CDNA クローン IMAGE: 4837650
209086_x_at	AL517395	仮定タンパク質 BC004941
229440_at	BC002693	精子細胞核周囲 RNA 結合タンパク質
1557918_s_at	U19556	セルピンペプチダーゼインヒビター, クレド B (オポアルブミン), メンバー3
227358_at	NM_052836	カドヘリン-様 23
203953_s_at	NM_003054	溶質キャリアーファミリー18 (囊状モノアミン), メンバー2
206769_at	H58488	転写された遺伝子座
242338_at	AA174083	クローン IMAGE: 609847, mRNA 配列
1554029_a_at	NM_003963	トランスメンブレン 4L6 ファミリー メンバー5
244171_at	AK000794	---
204431_at	AK025747	フィドガチン
204891_s_at	NM_057162	kelch-様 4 (シヨウジョウバエ)
203849_s_at	BC289314	カドヘリン-様 26
234724_x_at	AF060924	ミトコンドリアタンパク質 18kDa
213665_at	AA608964	転写された遺伝子座
1552736_a_at	A1733281	転写された遺伝子座
211088_s_at	AK022644	ジスピンジン (ジストロブレピン結合タンパク質 I) ドメイン含有 I
1554576_a_at	BC001387	HRAS-様サブプレッサー3

【 0 6 2 1】

10

20

30

40

表82

組織名称	遺伝子銀行	説明
220354_at	NM_004426	ポリホオチック相合体1(シヨウジョウバエ)///ポリホオチック1-様に類似する
223821_s_at	NM_016323	ヘクトドメイン及び RLD5
227619_at	A1121753	マトリックスメタルプロテアーゼ 24 (膜-挿入された)
215984_s_at	AA401492	G N A S 複合体遺伝子座
1560228_at	NM_004432	ELAV (胚致死性, 異常視覚, ショウジョウバエ) -様 2 (Hu 抗原 B)
217552_x_at	NM_005071	溶質キャリアーファミリー1 (高親和性アスパラギン酸塩/グルタメートトランススポーター), メンバー6
214279_s_at	NM_018283	nudix (ヌクレオシドホスフェート結合の成分 X) -型モチーフ 15
1554952_s_at	NM_002235	カリウム電位型チャネル, シェーカー-関連サブファミリー, メンバー6
215313_x_at	NM_002090	ケモカイン (C-X-C モチーフ) リガンド 3
237145_at	AF043179	T細胞受容体β変数 19///T細胞受容体β変数 7-2///T細胞受容体β変数 54///T細胞受容体β変数 3-1///T細胞受容体β変数 1
1556348_at	A1613010	F-ボックス及びロイシンに富んでいる反復タンパク質 16
201140_s_at	AA350425	垂鈴フィンガンタンパク質 91 に類似する
1556128_a_at	W48843	スプラウティ相合体 4 (シヨウジョウバエ)
213810_s_at	NM_001149	アンキリン 3, Ranvier の節 (アンキリン G)
226857_at	NM_002583	PRKC, アポトーシス, WT1, レギュレーター
1553257_at	BC009701	ペプチダルアルギニンゼイミンナーゼ, 型 II
1559880_at	NM_001275	クロモグラニン A (副甲状腺分泌タンパク質 1)
1552849_at	NM_014289	カルバイン 6
1552804_a_at	AF279774	成長関連のタンパク質 43
1554689_a_at	NM_016510	セレノステインリナーゼ
1552580_at	AF482697	クラリン 1
237461_at	NM_002744	タンパク質キナーゼ C, ζ
1559954_s_at	NM_173549	染色体 8 読取り枠 47
219367_s_at	AW003107	---

【 表 8 3 】

表83

組織名称	遺伝子銀行	説明
表 83 : iPS 細胞系 対 hES 細胞系 及び 親線維芽細胞の両者において 5 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ )		
207419_s_at	AK023059	CDNAFLJ12997fis, クローン NT2RP3000247
201750_s_at	AU132789	亜鉛フィンガータンパク質 273
206907_at	AL139377	精子形成及び卵子形成特異的塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス 2////仮定タンパク質 LOC728591
220756_s_at	AF097159	UDP-Gal: $\beta$ -GlcNAc $\beta$ 1,4-ガラクトシルトランスフェラーゼ, ポリペプチド 6
223510_at	NM_022552	DNA (シトシン-5)-メチルトランスフェラーゼ 3 $\alpha$
214671_s_at	Au131482	溶質キャリアファミリー-16, メンバー 1 (モノカルボン酸トランスポーター)
208750_s_at	A1738919	numb-タンパク質 XI のリガンド
1554052_at	NM_012282	KCNE1-様
222234_s_at	NM_024037	染色体 I 読取り枠 135
221423_s_at	AF277724	細胞分裂周期 25 相同体 C (S, ポンペ)
205528_s_at	NM_002450	メタ子オネイン IX
205531_s_at	BC037211	仮定タンパク質 LOC283432
221162_at	NM_022154	溶質キャリアファミリー-39 (亜鉛トランスポーター), メンバー 8
203381_s_at	AF307451	ネコ目症候群染色体領域, c 及び候補体 6
210001_s_at	AJ011414	plexinB1
215509_s_at	AA522514	KIAA0746 タンパク質
205174_s_at	NM_003740	カリウムチャネル, サブファミリー-K, メンバー 5
41037_at	NM_015894	スタスミン-様 3
206701_x_at	AA527080	KIAA1727 タンパク質
205121_at	U87408	Bardet-Biedl 症候群 9
1555106_a_at	AV722990	プロトカドヘリン $\beta$ 15
214414_x_at	AK091113	NPC-A-5
214390_s_at	AA894574	FK506 結合タンパク質 4, 59kDa

【 0 6 2 3 】

10

20

30

40

表84

組織名称	遺伝子銀行	説明
237810_at	NM_016365	nebullette
217441_at	BF971587	チューブリン, $\beta$ 2A///チューブリン, $\beta$ 2B
1562022_s_at	NM_000573	補体成分 (3b/4b) 受容体 I (Knops 血液グループ)
207279_s_at	AF096296	ケモカイン (C-C モチーフ) リガンド 26
202400_s_at	AA825563	転写された遺伝子座
203798_s_at	BC006117	L-2-ヒドロキシグルタル酸デヒドロゲナーゼ
230641_at	A1979334	染色体 12 読取り枠 35
221539_at	NM_017894	亜鉛フィンガー及び SCAN ドメイン含有 2
238716_at	NM_005059	レラクシン 2
223402_at	BC023610	CDNA クローン IMAGE:4638753
209619_at	NM_003914	サイクリン AI
209949_at	AA329676	CDNAFLJ45742fis, クローン KIDNE2016327
243354_at	NM_004720	内皮分化, リンホスファアチジン酸 G-タンパク質-結合された受容体, 4
212953_x_at	AW450586	配列類似性 124A を有するファミリー
208949_s_at	NM_005110	グルタミン-フルクトース-6-ホスフェートトランスアミナーゼ 2
212647_at	AF136972	タンパク質ホスファターゼ 1B (以前 2C), マグネシウム-依存性, $\beta$ イソフォーム
231195_at	NM_006334	オルファクトメジン 1
209995_s_at	AF393369	アダプター-関連のタンパク質複合体 I, $\sigma$ 3 サブユニット
242422_at	A1758697	亜鉛フィンガータンパク質 493
209569_x_at	AA524029	染色体 9 読取り枠 61
235235_s_at	NM_012099	CD3e 分子, $\epsilon$ 関連のタンパク質
207043_s_at	AL043927	チューブリンチロシンリガーゼ-様ファミリ-メンバー 4
228530_at	A1272059	LOC401629/X/LOC401630
205184_at	NM_005314	ガストリン-放出ペプチド受容体
222871_at	NM_016089	亜鉛フィンガータンパク質 589

【表 8 5】

表85

組織名称	遺伝子銀行	説明
209772_s_at	R48779	仮定タンパク質 BC008326
228570_at	AF007143	クローム 23738mRNA 配列
1554751_at	AK098715	CDNAFLJ25849f.s. クローム TST08968
211392_s_at	D53659	ミオチューブ関連のタンパク質 7
213869_x_at	NM_000717	炭酸脱水酵素 IV
1555659_a_at	N33009	アポリポタンパク質 E
1553156_at	AW451792	COMM ドメイン含有 7
227429_at	BC010432	CDNA クローム IMAGE:3528357
212720_at	NM_001392	ジストロブレリン, $\alpha$
206442_at	BC328998	グルタミン性ピルビン酸塩トランスミナーゼ (アラニンアミノトランスフェラーゼ) 2
238959_at	AL040935	BTB (POZ) ドメイン含有 11
226281_at	AW292273	システニル-tRNA シンターゼ
223385_at	AF393369	アダプター-関連のタンパク質複合体 1, $\sigma 3$ サブユニット
217996_at	NM_018932	プロトカドヘリン $\beta 12$
220010_at	AI683694	EF-ハンドカルシウム結合ドメイン 4A
237217_at	NM_002915	複製因子 C (活性化因子 I) 3, 38kDa
1556854_at	AW139618	シナプシン 11
239012_at	NM_003213	TEA ドメインファミリーメンバー 4
1555618_s_at	NM_145019	配列類似性 124A を有するファミリー
218707_at	AI971618	成長ファミリーのインヒビター, メンバー 5
1564494_s_at	NM_005958	メラトニン受容体 1A
205262_at	AF095784	$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) B 受容体, 2
208352_x_at	AW268880	溶質キヤリヤーファミリー 25, メンバー 13 (シトリン)
204326_x_at	AB040903	染色体縮合 2 のレギュレーター

【 0 6 2 5 】

10

20

30

40

【 表 8 6 】

表86

組織名称	遺伝子銀行	説明
表 86 : iPS 細胞系 対 hES 細胞系 及び 親線維芽細胞の両者において5倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ )		
201201_at	H90656	ニコチンアミドヌクレオチドアデニルイルトランスフェラーゼ 2
219885_at	NM_004561	ovo-様 1 (シヨウジョウバエ)
236070_at	BF663141	ピリン 2 (エズリン)
212142_at	AW966474	スシドメイン含有 3
204452_s_at	NM_024595	染色体 1 読取り 枠 108
1553328_a_at	NM_022804	小核リボヌクレオタンパク質ポリペプチド N//SNRPN 上流読取り 枠
205899_at	NM_004346	カスパーゼ 3, アポプトosis-関連のシステインペプチダーゼ
234842_at	NM_003236	形質転換成長因子, $\alpha$
1570253_a_at	NM_012168	F-ボックスタンパク質 2
1559057_at	NM_016941	$\delta$ -様 3 (シヨウジョウバエ)
207850_at	A1219073	EPS8-様 1
205204_at	NM_001254	細胞分裂周期 6 相同体 (S, セレシニアエ)
218075_at	BE896137	DCP2 デキヤッピング酵素相同体 (S, セレシニアエ)
213022_s_at	AA928939	トランスメンブレンタンパク質 63C
210039_s_at	NM_004931	CD8b 分子
215758_x_at	A1136179	SRY (性決定領域 Y)-ボックス 4
1554397_s_at	NM_000148	フコシルトランスフェラーゼ 1 (ガラクトシド 2- $\alpha$ -L-フコシルトランスフェラーゼ, H 血液グ ループ)
219165_at	AB012043	カルシウムチャネル, 電位-依存性, I 型, $\alpha$ 1G サブユニット
217110_s_at	AA588400	ovo-様 1 (シヨウジョウバエ)
203879_at	BF438407	亜鉛フィンガンタンパク質 551
221098_x_at	AL163202	亜鉛フィンガンタンパク質 43 (HTF6) に類似する
218533_s_at	M98528	DNA セグメント染色体 4 上の DNA セグメント (ユニーク) 234 発現された配列上での DNA セグメ ント
218178_s_at	NM_012261	染色体 20 読取り 枠 103
208980_s_at	M28880	アンキリン 1, 赤血球
206961_s_at	AF199015	ピリン 2 (エズリン)
202307_s_at	NM_032785	ATP/GTP 結合タンパク質-様 4

【 0 6 2 6 】

10

20

30

40

表87

組織名称	遺伝子銀行	説明
219735_s_at	NM_022006	FXYD ドメイン含有イオン輸送レギュレーター7
228800_x_at	U77949	細胞分裂周期6 相同体 (S. セレビシアエ)
225103_at	NM_173549	染色体8 読取り枠 47
223074_s_at	AF277724	細胞分裂周期25 相同体 C (S. ポンベ)
233348_at	AC003682	K タンパク質 1 相同体 (マウス) を有する亜鉛フィンガンタンパク質相互作用性
220158_at	AF498927	RhoGDP 解離インヒビター (GD1) β
1559701_s_at	BF594294	TEK チロシンキナーゼ, 内皮 (静脈性奇形, 多重皮膚及び粘膜)
223392_s_at	NM_013447	egf-様モジュール含有, ムチン-様, ホルモン受容体-様 2
203331_s_at	AE000659	T-細胞受容体 α-鎖偽遺伝子 mRNA, クロロニン HAP60 (V-α-1.1 ファミリー)
1569022_a_at	NM_018093	WD 反復ドメイン 74
1555467_a_at	AF255647	トランスメンブレンタンパク質 163
225868_at	AA906413	BC038740
240982_at	NM_003097	小核リボヌクレオタンパク質ポリペプチド N///SNRPN 上流読取り枠
238315_s_at	NM_005738	ADP-リボシル化因子-様 4A
215708_s_at	AF231021	NLR ファミリー, ピリンドメイン含有 12
205007_s_at	BF446578	RasGEF ドメインファミリー, メンバー 1A
201742_x_at	NM_017965	溶質キャリアーファミリー7, (中性アミノ酸トランスポーター, y+システム) メンバー 10
1554374_at	BC004940	裸の角質相同体 2 (シヨウジョウバエ)
1560303_at	A1813438	デスマグレイン 3 (尋常性天疱瘡抗原)
219468_s_at	AA496034	BA11-関連のタンパク質 2-様 1
219875_s_at	NM_000558	ヘモグロビン, α 1 ///ヘモグロビン, α 2
225608_at	NM_006426	ジヒドロピリミジンナーゼ-様 4
200806_s_at	AB017332	オーロラキナーゼ C

【 表 8 8 】

表88

組織名称	遺伝子銀行	説明
201309_x_at	AK094809	Ras タンパク質-特異的Guanineヌクレオチド-放出因子 2
241013_at	BG291649	OCIA ドメイン含有 2
1554586_a_at	AF332218	プロトカドヘリン II X 結合の///プロトカドヘリン II Y 結合の
1553430_a_at	AF279900	ミト染色体 維持複合体成分 7
205019_s_at	NM_025243	溶質キャリアファミリー19, メンバー3
226955_at	AB011446	オーロラキナーゼ B
216458_at	AF136381	ソルビン及びSH3 ドメイン含有 1
204347_at	AF229053	プレビカン
214240_at	AF336127	溶質キャリアファミリー4, 磷酸ナトリウムトランススポーター, メンバー11
211656_x_at	BC006114	コリン作動性受容体ニコチン酸, $\alpha 3$
204395_s_at	AI205764	染色体 1 読取り枠 108
1554593_s_at	W92036	プロタンパク質コンバーター-セプテプリシン/ケキシン型 9
224097_s_at	AF199015	ピリン 2 (エズリン)
204890_s_at	NM_006891	クリスタリン, $\gamma D$
219121_s_at	S76738	アルカリホスファターゼ, 肝臓骨/肝臓
225063_at	BC038538	ホモ・サピエンス, クローン I MAGE:5172739, mRNA
202874_s_at	NM_004994	マトリックス金属ペプターゼ 9 (ゲラチナーゼ B, 92kDa ゲラチナーゼ, 92kDa 型 IV コラゲナーゼ)
1554199_at	AC007204	亜鉛フィンガータンパク質 93
208206_s_at	BF509686	染色体 8 読取り枠 42
1554261_at	A1939470	グルタメート受容体, イオン向性, AMPA2
1554752_a_at	BE671925	転写された遺伝子座
208868_s_at	NM_004252	溶質キャリアファミリー9 (ナトリウム/水素交換体), メンバー3 調節体 1
234238_at	D88357	細胞分裂周期 2, G1-S 及び G2-M

【 0 6 2 8 】

10

20

30

40

【 表 8 9 】

表89

組織名称	遺伝子銀行	説明
表 89 : iPS 細胞系 対 hES 細胞系 及び 親線維芽細胞の両者において5倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ )		
235149_at	AC005587	CTAGE ファミリー, メンバー5 に類似する
215362_at	NM_018944	染色体 21 読取り枠 45
212529_at	AI333651	縮れた相合体 7 (シヨウジョウバエ)
1570266_x_at	AI830073	染色体 1 読取り枠 88
202660_at	AI692696	転写された遺伝子座
202284_s_at	AL080057	MRNA: cDNADKFZp564D032 (クローン DKFZp564D032 からの)
209197_at	M29277	メラノーマ細胞付着 分子
219463_at	NM_018891	ラミニン, $\gamma 2$
219513_s_at	AF114817	亜鉛フィンガンタータンパク質 589
202129_s_at	AL573851	内皮細胞付着 分子
223038_s_at	NM_002150	4-ヒドロキシフェニルピルベートジオキシシグナーゼ
229230_at	N64686	染色体 1 読取り枠 96
204281_at	NM_080923	タンパク質チロシンホスファターゼ, 受容体型, C
219869_s_at	AW138134	PHD フィンガンタータンパク質 17
210357_s_at	BG255416	KIAA0114
206119_at	AA921835	仮定タンパク質 LOC283501
206445_s_at	NM_004595	スベルミンシンターゼ
201812_s_at	NM_000041	アポリポタンパク質 E
206946_at	BC042986	CDNA クローン IMAGE:5296106
209774_x_at	NM_018139	染色体 14 読取り枠 104
1554384_at	NM_000238	カリウム電位型チャネル, サブファミリーH(eag-関連の), メンバー2
209346_s_at	NM_024081	プロリンに富むGla (G-カルボキシグルタルミン酸) 4 (トランスメンバレン)
227641_at	NM_016629	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー, メンバー21
205748_s_at	AB020676	WW 及び C2 ドメイン含有 I
208646_at	BF510581	BTB (P0Z) ドメイン含有 II

【 0 6 2 9 】

10

20

30

40

【 表 9 0 】

表90

組織名称	遺伝子銀行	説明
205861_at	BG164358	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) ボックスポリペプチド 21
1557067_s_at	BC000729	A キナーゼ (PKA) アンカータンパク質 1
227171_at	NM_018087	トランスメンバレンタンパク質 48
1558212_at	NM_018182	染色体 17 読取り枠 63
227733_at	AV753544	ホスホグルコムターゼ 2-様 1
231420_at	U85995	Bardet-Biedl 症候群 9
201538_s_at	NM_001444	脂肪酸結合タンパク質 5 (乾燥-関連の) /// 脂肪酸-結合タンパク質に類似する, 表皮 (E-FABP) (乾燥-関連の脂肪酸-結合タンパク質相同体) (PA-FABP)
212457_at	AF095771	Bardet-Biedl 症候群 9
203163_at	NM_001786	細胞分裂周期 2, G1-S 及び G2-M
224334_s_at	AB055703	LIM ホモオボックス 4
201946_s_at	AI829603	染色体 13 読取り枠 3
205845_at	NM_018351	FYVE, RhoGEF 及び PH ドメイン含有 6
210038_at	NM_025151	RAB11 ファミリー相互作用性タンパク質 1 (クラス 1)
213932_x_at	NM_025047	ADP-リボシル化因子-様 14
1562378_s_at	AI140752	偏在的に転写されたテトラトリコペプチド反復, X 染色体
214532_x_at	NM_017791	ネコ白血病ウイルスサブグループ C 細胞受容体ファミリー, メンバー 2
1555788_a_at	NM_007196	カリクレイン-関連のペプチダーゼ 8
242329_at	BE542381	メチオニル-tRNA シンターゼ 2, ミトコンドリア
242387_at	NM_024785	配列類似性 1248 を有するファミリー
222283_at	NM_021154	ホスホセリンアミノトランスフェラーゼ 1
226094_at	BE645821	細胞付着 分子 4
239303_at	AI026919	転写された遺伝子座
227248_at	AI343600	転写された遺伝子座
206116_s_at	AK024583	ケラチン, 髪, 塩基性, 5
209464_at	AF289220	BCL2-様 12 (プロリンに富んでいる)
222701_s_at	BF513674	MRNA: gDNADKFZp779C0742 (クロールン DKFZp779C0742 からの)

【 0 6 3 0 】

10

20

30

40

【表 9 1】

表91

組織名称	遺伝子銀行	説明
表 91 : iPS 細胞系 対 hES 細胞系 及び 親線維芽細胞の両者において 5 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ )		
210091_s_at	BC002652	しわ状相同体 3 (シヨウジョウバエ)
231715_s_at	NM_004741	核小体及びコイル状-体リタンパク質 1
241172_at	NM_006086	チユプリン, $\beta 3$
210008_s_at	NM_002394	溶質キャリアーファミリー-3 (二塩基性及び中性アミノ酸輸送の活性化因子), メンバー-2
217644_s_at	AF426267	染色体 21 読取り枠 88
230675_at	U49396	プリン作動性受容体 P2X, リガンド-ゲート型イオンチャネル, 5
65517_at	NM_005504	枝分れ鎖アミノトランスフェラーゼ 1, サイトソル
222841_s_at	BC000258	チユプリン, $\delta 1$
210291_a_at	NM_014285	エキソソーム成分 2
239492_at	A1476267	亜鉛フィンガンタンパク質 195
200894_s_	A1761824	亜鉛フィンガンタンパク質 398

【 0 6 3 1 】

10

20

30

40

【 表 9 2 】

表92

組織名称	遺伝子銀行	説明
217211_at	D50604	細胞質β-アクチンに類似する
231723_at	NM_013346	分類ネキシン12
228371_s_at	BF196007	—
215172_at	AL050040	タンパク質ロシンホスファターゼ, 非-受容体型 20B///タンパク質チロシンホスファターゼ, 非-受容体型 20A
225088_at	BG546917	染色体16 読取り枠 63
223994_s_at	BC000154	溶質キャリアファミリー12 (カリウム/塩化物トランスポーター), メンバー9
1554660_a_at	BC036200	染色体1 読取り枠 71
1554334_a_at	BC031044	DnaJ (Hsp40) 相同体, サブファミリーA, メンバー4
1555197_a_at	AY039243	染色体21 読取り枠 58
220472_at	NM_014150	亜鉛フィンガー, CCHC ドメイン含有 4
213014_at	BG222394	マイトジェン-活性化されたタンパク質キナーゼ 8 相互作用性タンパク質 I
1554795_a_at	BC019895	フィラミン結合 LIM タンパク質 I
232132_at	AB043635	par-6 区分化欠陥 6 相同体γ (Cエレガンス)
206749_at	NM_001764	CD1b 分子
213426_s_at	AA150110	カベオリン 2
223318_s_at	BC004393	aIkB, アルキル化修復相同体 7 (E. コリ)
221310_at	NM_004115	線維芽細胞成長因子 14
211513_s_at	AF172449	オピオイド成長因子受容体
211527_x_at	M27281	血管内皮成長因子 A
1560154_a_at	AK026500	CDNA: FLJ22847fls. クローン KAI1A686
205196_s_at	NM_001283	アダプター-関連のタンパク質複合体 I, σ1 サブユニット
200954_at	NM_001694	ATPase, H+ 輸送, リゾソーム 16kDa, V0 サブユニット c
208067_x_at	NM_007125	偏在的に転写されたテトラトリコペプチド反復体遺伝子, Y-結合の
224241_s_at	BC002350	—

【 0 6 3 2 】

10

20

30

40

【 表 9 3 】

表93

組織名称	遺伝子銀行	説明
200621_at	NM_004078	システイン及びグリセリン-富化タンパク質 I
205095_s_at	NM_005177	ATPase, H+輸送, リゾソーム, V0サブユニット a1
222546_s_at	AW204755	EPS8-様 2
206832_s_at	NM_004186	セマドメイン, 免疫グロブリンドメイン (19), 短い塩基性ドメイン, 分泌された, (セマホリン)3F
1552470_a_at	NM_148914	ab ヒドロラーゼドメイン含有 II
220259_at	NM_024927	プレクストリン相同体ドメイン含有, ファミリーH (MyrH4ドメインを有する)メンバー3
220426_at	NM_024059	染色体 20 読取り枠 195
213597_s_at	BF002474	CTD (カルボキシ-末端ドメイン, RNA ポリメラーゼ II, ポリペプチド A) 小ホスファターゼ-様
1555220_a_at	AB040820	アルド-ケトレダクターゼファミリー I, メンバーC-様 2
219430_at	NM_020155	G タンパク質-結合された受容体 137
233492_s_at	AC005587	嗅覚受容体, ファミリー2, サブファミリーA, メンバー4///嗅覚受容体, ファミリー2, サブファミリー A, メンバー7///rho グアニンヌクレオチド交換因子 5 に類似する
231146_at	A1300541	配列類似性 24 を有するファミリー, メンバーB
243936_x_at	T85061	—
232498_at	AK023386	仮定タンパク質 KIAA1833
211823_s_at	D86862	パキシリン
231243_s_at	R93946	塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックスドメイン含有, クラス B, 3
235854_x_at	AA167669	Rho-関連の, コイルドコイル含有タンパク質キナーゼ I
215634_at	AF007137	クロ-ン 23618mRNA 配列
226983_at	AA626717	亜鉛フィンガー-タンパク質 777
1569076_a_at	BE791720	FLJ16287 タンパク質

表 93 : iPS 細胞系 対 hES 細胞系において 5 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ ), しかし親線維芽細胞とは有意には異なるらない ( $p \geq 0.05$ )

【 0 6 3 3 】

10

20

30

40

【 表 9 4 】

表94

組織名称	遺伝子銀行	説明
208894_at	M60334	主要組織適合性複合体, クラス II, DR $\alpha$
208430_s_at	NM_001390	ジストロブレリン, $\alpha$
210171_s_at	S68134	cAMP 応答性要素モジュレーター
155228_at	NM_058189	染色体 21 読取り枠 69
1568905_at	BC030750	CDNA クローン IMAGE:4795773
214520_at	NM_005251	フォークヘッドボックス C2 (MFH-1, 間葉フォークヘッド I)
217248_s_at	AL365343	溶質キャリアヤーファミリー7 (カチオン性アミノ酸トランスポーター, y+システム)
1558214_s_at	BG330076	カテニン(カドヘリン-関連のタンパク質), $\alpha 1$ , 102kDa
213160_at	D86964	細胞質分裂2のデディケーター
210978_s_at	BC002616	トランスゲリン2
214878_at	Au118165	亜鉛フィンガンタンパク質 37A//亜鉛フィンガンタンパク質 37B
240703_s_at	AW591969	ヘクト(相同 E6-AP (UBE3A) カルボキシル末端)ドメイン及び RCC1 (CHC1)-様ドメイン (RLD) 1
204698_at	NM_002201	インターフェロン刺激されたエキソヌクレアーゼ遺伝子 20kDa
205822_s_at	NM_002130	3-ヒドロキシ-3-メチルグルタルリル-補酵素 A シンターゼ 1 (溶解性)
1558809_s_at	AK094324	仮定タンパク質 LOC284408
1569486_at	BC035176	CDNA クローン IMAGE:5266012
241168_at	AV651242	転写された遺伝子座
216205_s_at	AK021947	ミトフシン 2
205810_s_at	NM_003941	Wiskott-Aldrich 症候群-様
206396_at	NM_004170	溶質キャリアヤーファミリー1 (神経/上皮高親和性グルタメートトランスポーター, システム Xag), メンバー1

【 0 6 3 4 】

10

20

30

40

【 表 9 5 】

表95

組織名称	遺伝子銀行	説明
216710_x_at	AL359578	垂糸フィンガンタンパク質 287
243323_s_at	A1872979	AT-結合転写因子 I
229284_a_t	R60683	メチオニンアデノシルトランスフェラーゼ II, $\beta$
238699_s_at	A1659225	カルシウム/カルモジュリン-依存性セリンタンパク質キナーゼ (MAGUK ファミリー)
217767_at	NM_000064	補体 C3 前駆体に類似する
205924_at	BC005035	RAB38, メンバー-RAS 発癌遺伝子ファミリー
224301_x_at	BC003602	H2A ヒストンファミリー, メンバー J
206932_at	NM_003956	コレステロール 25-ヒドロキシラーゼ
222419_x_at	AW205983	ユビキチン-接合酵素 E2H (UBC8 相同体, 酵母)
216501_at	U25801	Vac14 相同体 (S・セレシニアエ)
233421_s_at	AUI46738	ヌクレオポリン 133kDa
202627_s_at	AL574210	セルペンペプチダーゼインヒビター, クレード E (ネキシシ, プラスミノゲン活性化因子インヒビター型 I) メンバー I
205867_at	NM_002834	タンパク質チロシンホスファターゼ, 非-受容体型 II (ヌーナン症候群 I)
204480_s_at	NM_024112	染色体 9 読取り枠 16
206026_s_at	NM_007115	腫瘍壊死因子, $\alpha$ -誘発されたタンパク質 6
222678_s_at	BF057821	DCN1, クリンネジレーション I における欠陥, ドメイン含有 I (S, セレシニアエ)
220246_at	NM_020397	カルシウム/カルモジュリン-依存性タンパク質キナーゼ 1D
208677_s_at	AL550657	バシギン (OK 血液群)
206997_s_at	NM_004807	ヘパラン硫酸 6-0-スルホトランスフェラーゼ I///ヘパラン硫酸 6-0. スルホトランスフェラーゼ I (HS6ST-I) に類似する
213807_x_at	BE870509	met プロト-腫瘍遺伝子 (肝細胞成長因子受容体)
211187_at	AF118079	---
236940_at	W60647	転写された遺伝子座, NP_066953.1 イソメララーゼ A イソフォーム I [ホモ・サビエンス] に弱く類似する
224505_s_at	BC006355	ホスホリパーゼ C, $\delta 4$
205210_at	NM_004257	形質転換成長因子, $\beta$ 受容体関連のタンパク質 I
206025_s_at	Aw188198	腫瘍壊死因子, $\alpha$ -誘発されたタンパク質 6

【 0 6 3 5 】

10

20

30

40

【表 96】

組織名称	遺伝子銀行	説明
238461_at	AA228031	真核生物翻訳開始因子4Eファミリーメンバー3
224003_at	AF332243	精巢-特異的転写体,Y-結合の14
1553685_s_at	NM_138473	Sp1転写因子
1561039_a_at	BC039609	亜鉛フィンガータンパク質81
235136_at	BF337528	ORM1様3(S,セレビシアエ)
205117_at	X59065	線維芽細胞成長因子1(酸性)
213643_s_at	AK022846	イノシトールポリリン酸-5-ホスファターゼ,75kDa
225322_s_at	AL514147	染色体17読取り枠70
232506_s_at	AK026504	染色体15読取り枠41
AFX-r2-Pl-cre-3_at	AFX-TrpnX-5	---
221220_s_at	NM_017988	SCY1様2(S,セレビシアエ)
224127_at	AF116660	---
215876_at	AK022254	CDNAFLJ12192f1s,クローンMAMMA1000851
205195_at	NM_001283	アダプター--関連のタンパク質複合体1,σ1サブユニット
1563809_a_at	AK094768	MCF.2細胞系由来の形質転換配列-様
238480_at	A1871745	染色体18読取り枠50
206673_at	NM_007223	Gタンパク質-結合された受容体176
206100_at	NM_001874	カルボキシペプチダーゼM
231299_at	A1494590	センタウリン,γ3
202793_at	NM_005768	膜結合された0-アシルトランスフェラーゼドメイン含有5
205925_s_at	NM_002867	RAB3B,メンバー-RAS発癌遺伝子ファミリー
204522_at	NM_005510	dom-3相同体Z(C,エレガンス)
233543_s_at	AK021582	コイルドコイルドメイン含有98
233573_s_at	AK001080	WD反復ドメイン6
242552_x_at	AW274047	亜鉛フィンガー, BED-型含有5

【0636】

10

20

30

40

【表 97】

表97

組織名称	遺伝子銀行	説明
232566_at	AK026258	核小体タンパク質ファミリー-6 (RNA-関連の)
202859_x_at	NM_000584	インタローキシン8
231396_s_at	AA776721	配列類似性126を有するファミリー、メンバーA
1557637_at	BC038734	CDNA クローン1 MAGE:5267718
232343_at	AK022200	CDNAFLJ12138fis, クローン MAMMA1000331
238025_at	AA706818	混合された系統キナーゼドメイン-様
210256_s_at	U78576	ホスファチジルイノシトール-4-ホスフェート5-キナーゼ, 型I, $\alpha$
239959_x_at	A1147520	---
227175_at	AT806486	骨髄系細胞白血病配列1 (BCL2-富化)
223708_at	AF329838	Clq及び腫瘍壊死因子関連のタンパク質4
154417_s_at	AY113699	上側咽頭部欠陥1相同体A (Cエレガンス)
217300_at	U80771	---
234688_x_at	Af141344	セントロピン, 中心体 BRCA2 相互作用性タンパク質
210935_s_at	AF274954	WD 反復体ドメイン1
201048_x_at	NM_002869	RAB6A, メンバー-RAS 発癌遺伝子ファミリー
209208_at	AF059752	マンノース-P-ドリンコール利用欠陥1
219168_s_at	NM_017701	プロリンに富んでいる5 (腎)
201045_s_t	BF513857	R A B6A, メンバー-RAS 発癌遺伝子ファミリー///RAB6C-様
219878_s_at	NM_015995	Kmppe1-様因子13
223143_s_at	A1742378	染色体6 読取り枠166
212575_at	BF966155	染色体19 読取り枠6

【0637】

10

20

30

40

【 表 9 8 】

表98

組織名称	遺伝子銀行	説明
表 98 : iPS 細胞系 対 hES 細胞系 において 5 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ ), しかし親線維芽細胞とは有意には異なる ( $p \geq 0.05$ )		
210930_s_at	AF177761	v-erb-b2 赤芽球性白血病ウイルス腫瘍遺伝子相同体 2. 神経、/グリオ芽細胞腫由来の腫瘍遺伝子相同体 (鳥類)
212720_s_at	AC005393	二重-特異性チロシン- (Y) -リン酸化調節されたキナーゼ 1B
AFFX-r2-Ec-bioD-3_at	AFFX-ThrX-M	---
210994_x_at	AF230398	3 分体 モチーフ L 含有 23
222511_x_at	AW140098	Fas (TNFRSF6) 関連因子 1
208262_x_at	NM_000243	地中海熱
AFFX - HSAC07/X00351_5_at	AFFX- HSAC07/X00351_5	アクチン, $\beta$
AFFX-hum_alu_at	AFFX-r2-8s-lys-M	---
237806_s_at	A1684717	仮定タンパク質 LOC729296
211599_x_at	U19348	met プロト-腫瘍遺伝子 (肝細胞成長因子受容体)
1554544_a_at	L18865	ミエリン基本的タンパク質
235913_at	A1285722	垂糸フィンガンナー様
231957_s_at	AC005594	ジベプチジル-ペプチダーゼ 9
210421_s_at	AB014602	溶質キャリアーファミリー 24 (ナトリウム/カリウム/カルシウム交換体), メンバー 1
243319_at	A1274981	形質転換された遺伝子座
220825_s_at	NM_018240	IRRE 様 (シヨウジョウバエ) の血族
1563719_s_at	AK024924	CDNA: FLJ21271fis. クロニン COL01751
234155_at	AK024928	CDNA: FLJ21275fis. クロニン COL01827
213210_at	A1005317	TAF6-様 RNA ポリメラーゼ II, p300/CBP-関連の因子 (PCAF)-関連の因子, 65kDa
230257_s_at	A1264325	染色体 I 読取り枠 19

【 0 6 3 8 】

10

20

30

40

【 表 9 9 】

表99

組織名称	遺伝子銀行	説明
表 99 : iPS 細胞系 対 hES 細胞系において 5 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ ), しかし親線維芽細胞とは有意には異なる ( $p \geq 0.05$ )		
236657_at	AW014647	十分な長さの挿入体 cDNAY137C01
236771_at	AW511485	染色体 6 読取り枠 159
1552649_a_at	NM_057178	リングフィンガー及び FYVE-様ドメイン含有 1
225245_x_at	BC386566	H2A ヒストンファミリー, メンバー J
228261_at	BE045549	mindbomb 相同志体 2 (シヨウジョウバエ)
1566666_at	AK074225	CDNAFLJ23645fis, クローン COL02691
207686_s_at	NM_001228	カスパーゼ 8, アポプトーシス-関連のシステインペプターゼ
224321_at	AB004064	EGF-様及び 2 つのホリスチチン-様ドメイン 2 を有するトランスメンブレンタンパク質
201169_s_at	BC326045	塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックスドメイン含有, クラス B, 2
207678_s_at	NM_007017	SRY (性決定領域 Y) -ボックス 30
1555724_s_at	BC010946	トランスゲリン
228901_at	A1040910	サイクリン-依存性キナーゼ 9 (CDC2-関連のキナーゼ)
223083_s_at	AW057545	Egl nine 相同志体 2 (Cエレガンス)
1562080_at	AK057351	CDNAFLJ32789fis, クローン TEST12002326
AFFX-r2-pl-crB-5_at	AFFX-TrpX-M	---
210971_s_at	AB000815	アリール炭化水素受容体核トランスロケイター-様
219298_at	NM_024693	エノイル補酵素 A ヒドラーターゼドメイン含有 3
222814_s_at	A1916361	亜鉛フィンガー-様 Cr, HIT 型 2
217246_s_at	L22650	ジアフアーナス相同志体 2 (シヨウジョウバエ)
1560224_at	BF327463	AT フック含有転写因子 1
217448_s_at	AL117508	TOX 高移動性クループボックスファミリーメンバー-4///表皮に類似するランゲルハンス細胞タンパク質 LCP 1
200841_s_at	A1142677	グルタミル-プロリル-tRNA シンターゼ

【 0 6 3 9 】

10

20

30

40

【 表 1 0 0 】

表100

組織名称	遺伝子銀行	説明
211087_x_at	Z25432	マイトジェン-活性化されたタンパク質キナーゼ14
1552717_s_at	NM_153243	中心体タンパク質170kDa///中心体タンパク質170kDa-様
241084_x_at	BF062339	ダイニン, 細胞質I, H鎖I
1555559_s_at	AF419247	ユビキチン特異的ペプチダーゼ25
203890_s_at	BF686824	死-関連のタンパク質キナーゼ3
223393_s_at	AL136805	Tシヤツ亜鉛フィンガー-ホメオボックス3
224805_s_at	BF508824	染色体15 読取り枠17
AFFX-LysX-M_at	AFFX-LysX-5	---
227071_at	A1762558	亜鉛フィンガー-様Crタンパク質414
216788_at	AK025564	CDNA:FLJ21911fis, クローンHEP03855
205081_at	NM_001311	システイン-富化タンパク質I(腸)
203626_s_at	NM_005983	S-相キナーゼ-関連のタンパク質2(p45)
211613_s_at	U79250	グリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ2(ミトコンドリア)
219703_at	NM_018365	減数分裂-特異的核構造体I
238420_at	AV721958	CDNA クローン IMAGE:5263531
205186_at	NM_003462	ダイニン, 軸細糸, L鎖中間鎖I
214975_s_at	AK001816	ミオチューブラリン関連のタンパク質I
215585_at	AK024081	KIAA0174
204994_at	NM_002463	ミクソウイルス(インフルエンザウイルス)耐性2(マウス)
202017_at	NM_000120	エポキシドヒドロラーゼ, ミクロソーム(生体異物)
222509_s_at	BG490634	亜鉛フィンガー-タンパク質672
228683_s_at	A1925361	カリウムチャンネル四量体ドメイン含有15
208978_at	U36190	システイン-富化タンパク質2
243952_at	BF000009	TPTE 偽遺伝子
235940_at	AW983691	染色体9 読取り枠64
222085_at	AW452357	AK075564:BC060873 により支持される仮定遺伝子
229746_x_at	BF439451	ホモ・サピエンス, クローンI IMAGE:3885733, mRNA

【 0 6 4 0 】

10

20

30

40

【 表 1 0 1 】

表101

組織名称	遺伝子銀行	説明
1553219_a_at	NM_015365	アルポート症候群, 精神障害, 中間顔面低形成症及び卵形赤血球増加症 染色体領域, 遺伝子 1
1559028_at	BC037172	染色体 21 読取り枠 15
205390_s_at	NM_000037	アンキリン 1, 赤血球
1554988_at	BC042592	溶質キャリアーファミリー-9, メンバー 1 1
205065_at	AU130282	---
1555569_a_at	BC042482	カリウムチャンネル四量体ドメイン含有 7
226632_at	AL513673	細胞グロビン
210732_s_at	AF342816	レクチン, ガラクトシド-結合, 溶解性, 8 (ガレクチン 8)
AFFX-r2-Bs-dap-3_at	AFFX-r2-Bs-phe-3	----
213087_s_at	BF690020	CDNA クローン IMAGE:4838699
221638_s_at	AF008937	シタキシン 16
213211_s_at	A1005317	TAF6-様 RNA ポリメラーゼ II, p300/CBP-関連の因子 (PCAF)-関連の 因子, 65kDa
238848_at	BF750565	OTU ドメイン含有 4
229328_at	T90358	亜鉛フィンガンタンパク質 540
1553962_s_at	B1668074	ras 相同体遺伝子ファミリー, メンバー B
238013_at	BF347859	プレクストリン相同体ドメイン含有, ファミリー A (ホスホイノシチド結合 特異的) メンバー 2
205382_s_at	NM_001928	補体因子 D (アジプシン)
222711_s_at	A1761828	菱形 5 相同体 1 (シヨウジョウバエ)
1567274_at	Z36814	---
224346_at	Af116671	---
219058_x_at	NM_022164	尿管間質性腎炎抗原-様 1

【 0 6 4 1 】

10

20

30

40

【 表 1 0 2 】

表102

組織名称	遺伝子銀行	説明
234939_s_at	AL161953	PHD フィンガータンパク質 12
217524_x_at	AA018923	転写された遺伝子座
214190_x_at	AI799984	ゴルジ関連の、 $\gamma$ アダプチン耳含有, ARF 結合タンパク質 2
228208_x_at	AI134573	仮定 LOC645944
239664_at	HI8857	転写された遺伝子座
237211_x_at	AA860341	MORN 反復含有 3
203402_at	AL520102	カリウム電位型チャネル, シェイカー-関連のサブファミリー, $\beta$ メンバー-2
1555766_a_at	AF493870	グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (Gタンパク質), $\gamma$ 2
202873_at	BF034973	ATPase, H+輸送, リゾノーム 42kDa, VI サブユニット C1
205577_at	NM_005609	ホスホリラーゼ, グリコゲン; 筋肉 (McArdle 症候群, グリコゲン貯蔵疾患型 V)
213928_s_at	AI742626	HIV-1 Rev 結合タンパク質
200601_at	U48734	アクチニン, $\alpha$ 4
216549_s_at	AL096712	TBC1ドメインファミリー, メンバー-22B
211564_s_at	BC003096	PDZ 及び LIM ドメイン 4
221418_s_at	N_005481	メディアエーター複合体サブユニット 16
210933_s_at	BC004908	ファシン相同体 1, アクチン-束タンパク質 (Strongylocentrotus purpuratus)
210585_s_at	AF007748	トランスポーチン 2 (インポーチン 3, カリオフェリン $\beta$ 2b)
203726_s_at	NM_000227	ラミニン, $\alpha$ 3
224795_x_at	AW575927	免疫グロブリンカンパ定数///免疫グロブリンカンパ変数 1-5///免疫グロブリン $\kappa$ 変数 2-24
231354_at	AW510748	仮定 LOC780529

【 0 6 4 2 】

10

20

30

40

【表 103】

表103

組織名称	遺伝子銀行	説明
AFFX-r2-Ec-bioC-5_at	AFFX-ThrX-5	---
15S2367_a_at	AF276507	シンデリン
201796_s_at	BE790854	バリル-tRNA シンターゼ
206847_s_at	AF026397	ホメオボックス A7
225333_at	A1218383	亜鉛フィンガンタンパク質 496
211514_at	AF068286	受容体相互作用性タンパク質キナーゼ 5
1560316_s_at	N32168	グルココルチコイド誘発された転写体 I
232315_at	Au149712	亜鉛フィンガン様
221628_s_at	AF326966	サイトカイン様核因子 n-pac
239623_at	N93197	AK126569 により支持される仮定遺伝子
AFFX-DapX-5_at	AFFX-DapX-5	---
238542_at	AA831769	UL16 結合タンパク質 2
200628_s_at	M61715	トリプトファン-tRNA シンターゼ
231881_at	AU145225	カルデスモン I
233754_x_at	AC007228	亜鉛フィンガンタンパク質 71
61734_at	A1797684	網状カルビン 3, EF-ハンドカルシウム結合ドメイン
215955_x_at	Y10388	RhoGTPase 活性化タンパク質 26
201979_s_at	NM_006247	タンパク質ホスファターゼ 5, 触媒サブユニット
213767_at	U43586	ras1 のキナーゼサブレッサー
87100_at	A1832249	ab ヒドロラーゼドメイン含有 2
1562234_a_at	AF397731	ニューロンナビゲーター 3///神経ナビゲーター 3 に類似する
230309_at	BE876610	転写された遺伝子座
1558247_s_at	BC021210	仮定タンパク質 BC018697
205462_s_at	NM_002149	ヒポカルシン様 I

【 0 6 4 3 】

10

20

30

40

【 表 1 0 4 】

表104

組織名称	遺伝子銀行	説明
221440_s_at	NM_006606	網膜胚種細胞腫結合タンパク質 9
206488_s_at	NM_000072	CD36 分子 (トロンボスポンジン受容体)
223661_at	AF130080	---
211019_s_at	D63807	ラノステロールシクターゼ (2,3-オキシドスクアレナーラノステロールシクターゼ)
211811_s_at	AF152484	プロトカドヘリン $\alpha$ 6
1562527_at	AF519622	仮定タンパク質 LOC283027
1569895_at	BC016994	ホモ・サピエンス, クローン IMAGE4401848, mRNA
231402_at	A1830201	転写された遺伝子座, XP_531081.2 仮定タンパク質 [コモンチンパンジー] に強く類似する
1567105_at	AF362887	---
209555_s_at	M98399	CD36 分子 (トロンボスポンジン受容体)
227137_at	N25937	染色体 10 読取り枠 46
212937_s_at	M20776	コラーゲン, 型 VI, $\alpha$ 1
1560020_at	BC043583	DnaJ (Hsp40) 相同体, サブファミリー C, メンバー 13
214040_s_at	BE675337	ゲルゾリン (アミロイドーシス, フィンランド型)
201465_s_at	BC002646	Jun 腫瘍遺伝子
234625_at	AK025055	CDNA: FLJ21402fis, クローン COL03734
1554466_a_at	BC007207	染色体 16 読取り枠 13
208721_s_at	BF967271	後期促進複合体サブユニット 5
213667_at	AB002307	Snf2-関連の CBP 活性化因子タンパク質
231151_at	AL122010	デスク形で、大きな (シヨウジョウバエ) 相同体-関連のタンパク質 3
1552610_a_at	NM_002227	Janus キナーゼ 1 (a タンパク質チロシンキナーゼ)
1565347_s_at	AY034078	IGHM エンハンサー-3 に結合する転写因子結合
209261_s_at	BF000629	核受容体サブファミリー-2, グループ F, メンバー 6
AFFX-r2-Bs-dap - M_at	AFFX-r2-Bs-phe-M	---

【 0 6 4 4 】

10

20

30

40

【 表 1 0 5 】

表105

組織名称	遺伝子銀行	説明
242948_x_at	T97602	転写された遺伝子座
214300_s_at	A1676092	トポイソメラーゼ (DNA) III $\alpha$
1556748_x_at	A1476341	CDNAFLJ39784f1.s, クローン SPLEN2002314
1562244_at	AL833487	MRNA; cDNADKFZp686H1629 (クローン DKFZp686H1629 からの)
244735_at	A1377758	コイルドコイルドメイン含有 54
215581_s_at	AK022303	ミニ染色体 維持複合体成分 3 関連のタンパク質
1555240_s_at	AF493879	グアニンヌクレオチド結合タンパク質 (Gタンパク質), $\gamma$ 1 2
216971_s_at	Z54367	プレチン1, 中間フィラメント結合タンパク質 500kDa
234971_x_at	A1521584	ホスホリパーゼ C, $\delta$ 3
212938_at	M20776	コラーゲン, 型 VI, $\alpha$ 1
230404_at	A1418538	---
210298_x_at	AF098518	4 及び 1/2 LIM ドメイン I
204952_at	NM_014400	LY6/PLAUR ドメイン含有 3
232915_at	AW571715	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) ボックスポリペプチド 49
243358_at	BF347362	インスリン-様成長因子 I 受容体
225061_at	N45231	DnaJ (Hsp40) 相同体, サブファミリー A, メンバー 4
218154_at	NM_024736	ガスデルミンドメイン含有 1
203324_s_at	NM_001233	カベオリン 2
1554757_a_at	AF273055	イノシトールポリリン酸-5-ホスファターゼ, 40kDa
242676_at	AA401733	転写された遺伝子座
1569039_s_at	BC029855	亜鉛フィンガンタンパク質 677
221048_x_at	NM_017941	染色体 17 読取り枠 80

【 0 6 4 5 】

10

20

30

40

【 表 1 0 6 】

表106

組織名称	遺伝子銀行	説明
153042_a_at	NM_032721	T-細胞活性化 NFKB-様タンパク質
218944_at	NM_023078	ピロリン-5-カルボキシシレートレダクターゼ-様
204638_at	NM_001611	酸ホスファターゼ 5, 酒石酸塩耐性
241611_s_at	BE675600	フィブロネクチン型 III ドメイン含有 3A
222363_at	AW979018	転写された遺伝子座
201008_s_at	AA812232	チオレドキシシン相互作用タンパク質
224252_s_at	AF177940	FXVD ドメイン含有イオン輸送レギュレーター-5
225800_at	A1990891	JAZF 亜鉛フィンガー I
240407_at	AW450035	ホモ・サビエンス, クローン I MAGE:5171705, mRNA
200796_s_at	BF594446	骨髄系細胞白血病配列 I (BCL2-関連の)
214992_s_at	AD000092	デオキシリボヌクレアーゼ II, リゾソーム
209373_at	BC003179	mal, T-細胞分化タンパク質-様
212272_at	AA813260	リピン I
242571_at	AW962020	RALBP1 関連の EpS ドメイン含有 2
215019_x_at	AW474158	亜鉛フィンガータンパク質 528
211668_s_at	K03226	プラスミノーゲン活性化因子, ウロキナーゼ
204876_at	NM_014699	亜鉛フィンガータンパク質 646
201167_x_at	D13989	Rho GDP 解離インヒビター (GDI) $\alpha$
211672_s_at	AF019888	アクチン蓄化タンパク質 2/3 複合体, サブユニット 4, 20kDa
212003_at	BG171020	染色体 I 読取り枠 144
217465_at	AK001291	NCK-関連のタンパク質 I
236340_at	A1769947	転写された遺伝子座, XP_001146557, I 仮定タンパク質 [コモンチンパンジー] に強く類似する
226504_at	AA522720	配列類似性 109 を有するファミリー, メンバー B
219899_x_at	NM_014434	NADPH 依存性ジフラビンオキシレダクターゼ I
1567013_at	AF323119	核因子 (赤芽球-由来の 2)-様 2

【 0 6 4 6 】

10

20

30

40

【 表 1 0 7 】

表107

組織名称	遺伝子銀行	説明
203348_s_at	BF060791	ets 変異体遺伝子 5 (ets-富化分子)
215315_at	AC003682	亜鉛フィンガータンパク質 549
209062_x_at	AF010227	核受容体補活性化因子 3
155529_a_at	BC007010	補体成分 1, s 亜成分
203508_at	NM_001066	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー, メンバー 1 B
217494_s_at	AF023139	ホスファターゼ及びテンシン相同体 (複数の進行した癌において突然変異誘発された 1), 偽遺伝子 1
210362_x_at	AF230409	骨髄球白血病
201060_x_at	A1537887	ストマチン
204560_at	NM_004117	FK506 結合タンパク質 5
236574_at	A1304870	仮定タンパク質 LOC284373
222542_x_at	BF724826	チャペロン, bo1 複合体相同体の ABC1 活性 (S, ポンペ)
211162_x_at	AF116616	ステアロイル-CoA デサチユラーゼ ( $\delta$ -9-デサチユラーゼ)
203771_s_at	AA740186	ピリベルジンレダクターゼ A
217569_x_at	AA017093	---
240397_x_at	A1801626	転写された遺伝子座
207080_s_at	NM_004160	ペプチド YY
213695_at	L48516	パラオキソナーゼ 3
216591_s_at	AF080579	スクシネートデヒドロゲナーゼ複合体, サブユニット C, 膜内在性タンパク質, 15 kDa/// hCG1776980
155464_a_at	BC008745	軟骨関連のタンパク質
201971_s_at	NM_001690	ATPase, H+ トランスポートーティング, リゾソーム 70kDa, VI サブユニット A
AFX-r2-Bs-dap-5_at	AFX-r2-Bs-phe-5	---
215337_at	AK022508	メチルエーター複合体サブユニット 24

【 0 6 4 7 】

10

20

30

40

表108

組織名称	遺伝子銀行	説明
227806_at	BG285710	染色体 16 読取り枠 74
216271_x_at	AC004794	シナプス欠損 1, Rho GTPase, 相同体 1 (Cエレガンス)
212113_at	A1927479	仮定 LOC552889
230517_at	A1416964	GLI-Kruppel ファミリー メンバー-HKR 1 に類似する
214123_s_at	A1126492	染色体 4 読取り枠 10
219360_s_at t	NM_017636	一時的受容体置位カチオンチャンネル, サブファミリー M メンバー-4
205715_at	NM_004334	骨髄間質細胞抗原 1
1558775_s_at	AU142380	神経   スフィンゴミエリナーゼ (N-SMase) 活性化関連の因子
1558423at	BE715671	仮定 LOC349114

10

20

30

40

【 表 1 0 9 】

表109

組織名称	遺伝子銀行	説明
218510_x_at	A1816291	配列類似性 134. メンバー-B を有するファミリー
205457_at	NM_024294	染色体 6 読取り枠 106
214446_at	NM_012081	拡張因子, RNA ポリメラーゼ II, 2
210449_x_at	AF100544	マイトジェン-活性化されたタンパク質キナーゼ 14
1552667_a_at	NM_005489	SH2 ドメイン含有 3C
205827_at	NM_000729	コレシストキニン
231004_s_at	BE219961	H1 ヒストンファミリー, メンバー-X
220102_at	NM_023067	フォークヘッドボックス L2
222387_s_at	BG476669	空胞タンパク質分類 35 相同体 (S, セレビシアエ)
211708_s_at	BC005807	ステアロイル-CoA デサチユラーゼ ( $\delta$ -9, デサチユラーゼ)
207453_s_at	NM_012266	DnaJ (Hsp40) 相同体, サブファミリー-B, メンバー-5
1568646_x_at	BC038199	亜鉛フィンガンタータンパク質 208
210932_s_at	AF293342	リングフィンガンタータンパク質 (G3H2G3 型) 6
1559528_at	BC040652	Polycomb グループ環リングフィンガン-3
225454_at	AW248770	コイルドコイルドメイン含有 124
230747_s_at	AA406435	染色体 18 読取り枠 17
202226_s_at	NM_016823	v-crk 肉腫ウイルス CT10 腫瘍遺伝子相同体 (鳥類)
22881_at	N30347	プレセニリン関連の, 菱形-様
238969_at	BF512162	染色体 3 読取り枠 55
235234_at	AA359612	FLJ36874 タンパク質
243409_at	A1005407	フォークヘッドボックス L1
202465_at	NM_002593	プロコラーゲン C-エンドペプチダーゼエンハンサー
211124_s_at	AF119835	KIT リガンド
200948_at	NM_005439	骨髄性白血病因子 2
204149_s_at	NM_000850	グルタチオン S-トランスフェラーゼ M4

【 0 6 4 9 】

10

20

30

40

【表 110】

表110

組織名称	遺伝子銀行	説明
217371_s_at	Y09908	インターロイキン15
218000_s_at	NM_007350	プレクストリン相同体-様ドメイン, ファミリー A メンバー1
211272_s_at	AF064771	ジアシルグリセロールキナーゼ, $\alpha$ 80 kDa
211266_s_at	U35399	G タンパク質-結合された受容体 4
205384_at	NM_005031	FXVD ドメイン含有 R イオン輸送レギュレーター1 (ホスホレマン)
1553970_s_at	BC042510	カルボキシシルエステリリパーゼ (胆汁酸塩-刺激されたリパーゼ)
230146_s_at	BF111850	フレクエニン相同体 (シヨウジョウバエ)
1559409_a_at	BE893129	KIAA1345 タンパク質
211561_x_at	L35253	マイトジェニン-活性化されたタンパク質キナーゼ 14
220585_at	NM_025130	ヘキソキナーゼドメイン含有1
234237_s_at	AL137611	仮定タンパク質 FLJ20294
243110_x_at	A1868441	神経ペプチド W
214014_at	W81196	CDC42 エフェクター-タンパク質 (Rho GTPase 結合) 2
215774_s_at	AV650470	---

【 0 6 5 0 】

10

20

30

40

【 表 1 1 1 】

表111

組織名称	遺伝子銀行	説明
203994_s_at	U84569	染色体 21 読取り枠 2
227419_x_at	AW964972	胎盤 - 特異的 9
206531_at	NM_004647	D4, 亜鉛及び二重 PHD フィンガーファミリー
208851_s_at	AI161958	Thy-1 細胞表面抗原
201621_at	NM_005380	神経芽細胞腫, 腫瘍形成性 I の抑制
231341_at	BE670584	溶質キャリアファミリー-35, メンバー-D3
214505_s_at	AF220153	4 及び 1/2 LIM ドメイン I
211027_s_at	BC006231	B-細胞におけるカッパ L 鎖ポリペプチド遺伝子エンハンサーのインヒビター, キナーゼ $\beta$
201428_at	NM_001305	クラウジン 4
211317_s_at	AF041461	CASP8 及び FADD-様アポトーシスレギュレーター
216926_s_at	AC003030	KIAA0892
221875_x_at	AW514210	主要組織適合性複合体, クラス I, F
209213_at	BC002511	カルボニルレダクターゼ I
1552914_a_at	NM_025240	CD276 分子
211530_x_at	M90686	HLA-G 組織適合性抗原, クラス I, G
1558697_a_at	B1600341	KIAA0430
244852_at	AU119545	デルマタンスルフェートエピメラゼ-様
226306_at	BF984592	染色体 6 読取り枠 1
221943_x_at	AW303136	リボソームタンパク質 L38
204470_at	NM_001511	ケモカイン (C-X-C モチーフ) リガンド I (メラノーマ成長刺激活性, $\alpha$ )
1552611_a_at	AL555086	Janus キナーゼ I (a タンパク質チロシンキナーゼ
208879_x_at	BG469030	PRP6 プレ-mRNA プロセッシング因子 6 相同体 (S・セレシニア E)
209427_at	AF064238	スムーテリン

【 0 6 5 1 】

10

20

30

40

表112

組織名称	遺伝子銀行	説明
1565162_s_at	D16947	ミクソームグルタチオンS-トランスフェラーゼ I
227841_at	BG260181	セメント質タンパク質 I
234773_x_at	AL442080	MRNA; cDNADKFP434A0226 (クローン DKFP434A0226 からの)
238750_at	AW083576	ケモカイン (C-C モチーフ) リガンド 28
228251_at	BE467577	UBX ドメイン含有 I
206943_at	NM_004612	形質転換成長因子, $\beta$ 受容体 I (アクチピン A 受容体型 II-様キナーゼ, 53kDa)
226051_at	BF973568	セレノタンパク質 M
202639_s_at	A1689052	RAN 結合タンパク質 3
200756_x_at	U67280	カルメニン
217399_s_at	AF032887	フォークヘッドボックス 03
1555730_a_at	D00682	コフィリン I (非-筋肉)
216831_s_at	AF018283	成長阻害動物-Related 転写因子 I; トランスロケートされた, I (サイクリン D-関連の)
215719_x_at	X83493	Fas (TNF 受容体スーパーファミリー, メンバー6)
233298_at	AL139377	spengato 遺伝子 sis 及び卵子形成特異的塩基性ヘリックス-ループ-ヘリックス 2///仮定タンパク質 LOC728591
215495_s_at	A1117523	無菌 $\alpha$ モチーフドメイン含有 4A
218537_at	NM_017885	宿主細胞因子 CI レギュレーター I (XP01 依存性)
201367_s_at	A1356398	重鉛フィンガンタータンパク質 36, C3H 型-様 2
223321_s_at	AF312678	線維芽細胞成長因子受容体-様 I
203676_at	NM_002076	グルコサミン (N-アセチル)-6-スルファターゼ (サンフィリポ症候群病 IIID)

【表 1 1 3】

表113

組織名称	遺伝子銀行	説明
表 114 : iPS 細胞系 対 hES 細胞系 において 5 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ ), しかし親線維芽細胞とは有意には異なるらない ( $p \geq 0.05$ )		
HUMISGF3A/M9793 5_5_at	AFFX - HUMISGF3A/M97935_5	シグナルトランスデュサー及び転写 I の活性化因子, 91kD a
232984_at	AL137259	水頭症誘発性相同体 (マウス)
217601_at	AL523184	ヌクレオポリン 188kDa
238795_at	AA424537	染色体 10 読取り枠 18
222385_x_at	AF346602	Sec61 $\alpha$   サブユニット (S, セレベシア E)
214971_s_at	AV695711	ST6 $\beta$ -ガラクトクトサミド $\alpha$ -2,6-シアルトランスフェラーゼ 1
202002_at	AW072302	アセチル-補酵素 A シルトランスフェラーゼ 2 (ミトコンドリア 3-オキソアシル-補酵素 A チオラーゼ)
236491_at	A1813346	BCL2-様 10 (アポトーシス促進剤)
231721_at	AF356518	連結性付着分子 3
220234_at	NM_004056	炭酸脱水酵素 VIII
213548_s_at	BC257762	CDV3 相同体 (マウス)
1554321_a_at	BC018471	NFS1 窒素固定 I 相同体 (S・セレベシア E)
231805_at	AL563031	プロラクチン放出ホルモン受容体
1555006_at	BC036233	WD 反復ドメイン 66

【 0 6 5 3 】

10

20

30

40

【 表 1 1 4 】

表114

組織名称	遺伝子銀行	説明
221889_at	AW026481	カリウムチャンネル四量体ドメイン含有 13
201156_s_at	AF141304	RAB5C, メンバー-RAS 発癌遺伝子ファミリー
1554383_a_at	BC028121	トランスロケーション関連の 膜タンパク質 2
210079_x_at	U16953	カリウム電位型チャネル, シェーカー-高化サブファミリー, $\beta$ メンバー 1
219558_at	NM_024524	ATPase 型 I 3A3
220889_s_at	NM_020178	炭酸脱水酵素 X
227488_at	AV728999	仮定タンパク質 MGC16121
221762_s_at	AL162458	染色体 20 読取り枠 67
209727_at	M76477	GM2 ガングリオシド活性化因子
76897_s_at	AA628140	FK506 結合タンパク質 15, 133 kDa

表 115 : iPS 細胞系 対 hES 細胞系において 5 倍又はそれ以上のレベルで発現される遺伝子 ( $p \leq 0.01$ ), しかし親線維芽細胞とは有意には異なるらない ( $p \geq 0.05$ )

【 0 6 5 4 】

10

20

30

40

【 表 1 1 5 】

表115  
ヒトOct3/4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

WT	位置	予測される 有害な突然 変異の数	予測される 中立的な突 然変異の数
M	1	4	16
A	2	9	11
G	3	7	13
H	4	5	15
L	5	6	14
A	6	15	5
S	7	4	16
D	8	5	15
F	9	15	5
A	10	11	9
F	11	5	15
S	12	7	13
P	13	5	15
P	14	6	14
P	15	2	18
G	16	10	10
G	17	6	14
G	18	15	5
G	19	6	14
D	20	6	14
G	21	14	6
P	22	5	15
G	23	4	16

10

20

30

40

【 0 6 5 5 】

【 表 1 1 6 】

表116  
ヒト0ct3/4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
24	G	13	7
25	P	5	15
26	E	8	12
27	P	6	14
28	G	7	13
29	W	14	6
30	V	6	14
31	D	13	7
32	P	2	18
33	R	15	5
34	T	7	13
35	W	15	5
36	L	5	15
37	S	11	9
38	F	3	17
39	Q	11	9
40	G	12	8
41	P	10	10
42	P	10	10
43	G	10	10
44	G	5	15
45	P	11	9
46	G	8	12
47	I	5	15
48	G	4	16

10

20

30

40

【 0 6 5 6 】

【 表 1 1 7 】

表117  
ヒトOct3/4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

WT	位置	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
P	49	4	16
G	50	10	10
V	51	2	18
G	52	2	18
P	53	5	15
G	54	7	13
S	55	8	12
E	56	8	12
V	57	5	15
W	58	14	6
G	59	14	6
I	60	3	17
P	61	5	15
P	62	3	17
C	63	5	15
P	64	6	14
P	65	4	16
P	66	6	14
Y	67	5	15
E	68	7	13
F	69	4	16
C	70	6	14
G	71	2	18
G	72	15	5
M	73	8	12

10

20

30

40

【 0 6 5 7 】

【 表 1 1 8 】

表118 ヒト0ct3/4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

WT	位置	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
A	74	13	7
Y	75	0	20
C	76	6	14
G	77	8	12
P	78	3	17
Q	79	1	19
V	80	6	14
G	81	5	15
V	82	4	16
G	83	15	5
L	84	1	19
V	85	4	16
P	86	6	14
Q	87	2	18
G	88	11	9
G	89	7	13
L	90	0	20
E	91	5	15
T	92	10	10
S	93	12	8
Q	94	5	15
P	95	5	15
E	96	8	12
G	97	8	12
E	98	10	10

10  
20  
30  
40

【 0 6 5 8 】

【表 1 1 9】

表119 ヒトOct3/4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
99	A	11	9
100	G	7	13
101	V	0	20
102	G	8	12
103	V	6	14
104	E	8	12
105	S	10	10
106	N	6	14
107	S	15	5
108	D	4	16
109	G	1	19
110	A	11	9
111	S	5	15
112	P	2	18
113	E	6	14
114	P	6	14
115	C	9	11
116	T	6	14
117	V	4	16
118	T	7	13
119	P	4	16
120	G	12	8
121	A	14	6
122	V	5	15
123	K	13	7

10  
20  
30  
40

【 0 6 5 9】

【 表 1 2 0 】

表120  
ヒトOct3/4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
124	L	8	12
125	E	4	16
126	K	10	10
127	E	8	12
128	K	12	8
129	L	3	17
130	E	8	12
131	Q	10	10
132	N	5	15
133	P	7	13
134	E	9	11
135	E	10	10
136	S	11	9
137	Q	7	13
138	D	4	16
139	I	4	16
140	K	13	7
141	A	9	11
142	L	2	18
143	Q	9	11
144	K	12	8
145	E	9	11
146	L	2	18
147	E	9	11
148	Q	12	8

10

20

30

40

【 0 6 6 0 】

【 表 1 2 1 】

表121 ヒト0ct3/4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

WT	位置	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
F	149	8	12
A	150	13	7
K	151	16	4
L	152	5	15
L	153	5	15
K	154	17	3
Q	155	9	11
K	156	16	4
R	157	16	4
I	158	7	13
T	159	8	12
L	160	3	17
G	161	3	17
Y	162	9	11
T	163	11	9
Q	164	13	7
A	165	6	14
D	166	6	14
V	167	13	7
G	168	17	3
L	169	1	19
T	170	11	9
L	171	1	19
G	172	8	12
V	173	4	16

10

20

30

40

【 0 6 6 1 】

【 表 1 2 2 】

表122  
ヒトOct3/4了ミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
174	L	2	18
175	F	5	15
176	G	13	7
177	K	15	5
178	V	7	13
179	F	8	12
180	S	12	8
181	Q	14	6
182	T	11	9
183	T	9	11
184	I	9	11
185	C	17	3
186	R	17	3
187	F	13	7
188	E	13	7
189	A	11	9
190	L	2	18
191	Q	13	7
192	L	4	16
193	S	10	10
194	F	7	13
195	K	15	5
196	N	16	4
197	M	12	8
198	C	14	6

10

20

30

40

【 0 6 6 2 】

【 表 1 2 3 】

表123  
ヒト0ct3/4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
199	K	9	11
200	L	12	8
201	R	18	2
202	P	16	4
203	L	8	12
204	L	9	11
205	Q	6	14
206	K	15	5
207	W	18	2
208	V	13	7
209	E	12	8
210	E	16	4
211	A	17	3
212	D	12	8
213	N	15	5
214	N	8	12
215	N	5	15
216	N	18	2
217	L	10	10
218	Q	12	8
219	E	5	15
220	I	12	8
221	C	17	3
222	K	13	7
223	A	6	14

10

20

30

40

【 0 6 6 3 】

【 表 1 2 4 】

表124  
ヒトOct3/4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
224	E	13	7
225	T	11	9
226	L	7	13
227	V	6	14
228	Q	18	2
229	A	15	5
230	R	18	2
231	K	14	6
232	R	18	2
233	K	8	12
234	R	18	2
235	T	11	9
236	S	15	5
237	I	13	7
238	E	9	11
239	N	14	6
240	R	18	2
241	V	11	9
242	R	18	2
243	G	15	5
244	N	19	1
245	L	10	10
246	E	13	7
247	N	16	4
248	L	9	11

10

20

30

40

【 0 6 6 4 】

【 表 1 2 5 】

表125  
ヒト0ct3/4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
249	F	16	4
250	L	16	4
251	Q	18	2
252	C	16	4
253	P	17	3
254	K	11	9
255	P	16	4
256	T	15	5
257	L	9	11
258	Q	18	2
259	Q	15	5
260	I	14	6
261	S	15	5
262	H	18	2
263	I	13	7
264	A	15	5
265	Q	9	11
266	Q	18	2
267	L	14	6
268	G	17	3
269	L	11	9
270	E	16	4
271	K	14	6
272	D	15	5
273	V	15	5

10

20

30

40

【 0 6 6 5 】

【 表 1 2 6 】

表126  
ヒトOct3/4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
274	V	16	4
275	R	18	2
276	V	17	3
277	W	19	1
278	F	18	2
279	C	19	1
280	N	18	2
281	R	18	2
282	R	13	7
283	Q	18	2
284	K	11	9
285	G	18	2
286	K	12	8
287	R	18	2
288	S	15	5
289	S	13	7
290	S	15	5
291	D	13	7
292	Y	17	3
293	A	16	4
294	Q	18	2
295	R	18	2
296	E	17	3
297	D	15	5
298	F	14	6

10

20

30

40

【 0 6 6 6 】

【 表 1 2 7 】

表127 ヒトOct3/4了ミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
299	E	7	13
300	A	16	4
301	A	15	5
302	G	19	1
303	S	15	5
304	P	14	6
305	F	16	4
306	S	7	13
307	G	18	2
308	G	19	1
309	P	17	3
310	V	16	4
311	S	14	6
312	F	18	2
313	P	18	2
314	L	12	8
315	A	17	3
316	P	18	2
317	G	19	1
318	P	18	2
319	H	18	2
320	F	18	2
321	G	18	2
322	T	14	6
323	P	18	2

10

20

30

40

【 0 6 6 7 】

【 表 1 2 8 】

表128  
ヒトOct3/4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
324	G	17	3
325	Y	16	4
326	G	19	1
327	S	15	5
328	P	18	2
329	H	18	2
330	F	16	4
331	T	17	3
332	A	14	6
333	L	14	6
334	Y	16	4
335	S	16	4
336	S	16	4
337	V	15	5
338	P	18	2
339	F	18	2
340	P	18	2
341	E	15	5
342	G	19	1
343	E	7	13
344	A	17	3
345	F	17	3
346	P	17	3
347	P	10	10
348	V	15	5

10

20

30

40

【 0 6 6 8 】

【 表 1 2 9 】

表129  
ヒトOct3/4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
349	S	R	3
350	V	K	4
351	T	E	5
352	T	D	5
353	L	W	6
354	G	Y	1
355	S	H	6
356	P	Q	2
357	M	N	2
358	H	T	2
359	S	C	5
360	N	S	3

10

20

30

40

【 0 6 6 9 】

【 表 1 3 0 】

表130 ヒトSox2アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
1	M	12	8
2	Y	8	12
3	N	15	5
4	M	14	6
5	M	8	12
6	E	13	7
7	T	10	10
8	E	10	10
9	L	0	20
10	K	9	11
11	P	11	9
12	P	11	9
13	G	19	1
14	P	9	11
15	Q	7	13
16	Q	5	15
17	T	7	13
18	S	1	19
19	G	11	9
20	G	17	3
21	G	7	13
22	G	13	7
23	G	15	5
24	N	5	15

10

20

30

40

【 0 6 7 0 】

【 横 1 3 1 】

表131 ヒトSox2アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
25	S	6	14
26	T	5	15
27	A	14	6
28	A	3	17
29	A	10	10
30	A	14	6
31	G	4	16
32	G	6	14
33	N	13	7
34	Q	5	15
35	K	12	8
36	N	11	9
37	S	5	15
38	P	1	19
39	D	12	8
40	R	18	2
41	V	10	10
42	K	18	2
43	R	18	2
44	P	18	2
45	M	15	5
46	N	17	3
47	A	17	3
48	F	16	4
49	M	13	7
50	V	18	2

10

20

30

40

【 0 6 7 1 】

【 横 1 3 2 】

表132  
ヒトSox2アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
51	W	19	1
52	S	16	4
53	R	18	2
54	G	14	6
55	Q	18	2
56	R	17	3
57	R	18	2
58	K	18	2
59	M	15	5
60	A	17	3
61	Q	18	2
62	E	16	4
63	N	17	3
64	P	16	4
65	K	16	4
66	M	13	7
67	H	18	2
68	N	18	2
69	S	13	7
70	E	12	8
71	I	15	5
72	S	16	4
73	K	16	4
74	R	16	4
75	L	12	8
76	G	17	3

10

20

30

40

【 0 6 7 2 】

【 1 3 3 】

表133  
ヒトSox2アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
77	A	18	2
78	E	9	11
79	W	19	1
80	K	16	4
81	L	12	8
82	L	10	10
83	S	2	18
84	E	10	10
85	T	0	20
86	E	11	9
87	K	15	5
88	R	17	3
89	P	17	3
90	F	18	2
91	I	10	10
92	D	11	9
93	E	12	8
94	A	17	3
95	K	15	5
96	R	18	2
97	L	14	6
98	R	18	2
99	A	16	4
100	L	5	15
101	H	18	2
102	M	13	7

10

20

30

40

【 0 6 7 3 】

【 表 1 3 4 】

表134 ヒトSox2アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
103	K	14	6
104	E	11	9
105	H	14	6
106	P	15	5
107	D	12	8
108	Y	17	3
109	K	14	6
110	Y	16	4
111	R	18	2
112	P	17	3
113	R	17	3
114	R	18	2
115	K	14	6
116	T	15	5
117	K	16	4
118	T	11	9
119	L	12	8
120	M	10	10
121	K	14	6
122	K	17	3
123	D	13	7
124	K	16	4
125	Y	14	6
126	T	9	11
127	L	9	11
128	P	15	5

10

20

30

40

【 0 6 7 4 】

【 横 1 3 5 】

表135 ヒトSox2アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
129	G	18	2
130	G	19	1
131	L	8	12
132	L	6	14
133	A	13	7
134	P	10	10
135	G	12	8
136	G	6	14
137	N	12	8
138	S	7	13
139	M	9	11
140	A	9	11
141	S	8	12
142	G	14	6
143	V	7	13
144	G	10	10
145	V	6	14
146	G	7	13
147	A	14	6
148	G	10	10
149	L	3	17
150	G	15	5
151	A	1	19
152	G	17	3
153	V	7	13
154	N	10	10

10

20

30

40

【 0 6 7 5 】

【 横 1 3 6 】

表136 ヒトSox2アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
155	Q	15	5
156	R	18	2
157	M	13	7
158	D	16	4
159	S	14	6
160	Y	13	7
161	A	12	8
162	H	14	6
163	M	11	9
164	N	16	4
165	G	12	8
166	W	16	4
167	S	6	14
168	N	11	9
169	G	15	5
170	S	7	13
171	Y	11	9
172	S	13	7
173	M	11	9
174	M	13	7
175	Q	15	5
176	D	13	7
177	Q	14	6
178	L	7	13
179	G	16	4
180	Y	17	3

10

20

30

40

【 0 6 7 6 】

【 表 1 3 7 】

表137 ヒトSox2アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
181	M	13	7
182	P	16	4
183	Q	14	6
184	H	15	5
185	P	10	10
186	G	4	16
187	L	17	3
188	N	5	15
189	A	11	9
190	H	10	10
191	G	8	12
192	A	9	11
193	A	9	11
194	Q	10	10
195	M	12	8
196	Q	9	11
197	P	14	6
198	M	16	4
199	H	18	2
200	R	14	6
201	Y	15	5
202	D	3	17
203	V	11	9
204	S	13	7
205	A	12	8
206	L	18	2

【 0 6 7 7 】

10

20

30

40

【 0 6 7 8 】

表138 ヒトSox2アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
207	Y	16	4
208	N	10	10
209	S	13	7
210	M	13	7
211	T	8	12
212	S	13	7
213	S	13	7
214	Q	16	4
215	T	14	6
216	Y	17	3
217	M	14	6
218	N	13	7
219	G	18	2
220	S	12	8
221	P	13	7
222	T	10	10
223	Y	14	6
224	S	13	7
225	M	12	8
226	S	11	9
227	Y	15	5
228	S	13	7
229	Q	13	7
230	Q	12	8
231	G	14	6
232	T	3	17

10

20

30

40

【 0 6 7 8 】

【 表 1 3 9 】

表139 ヒトSox2アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
233	M	15	5
234	P	14	6
235	G	14	6
236	M	12	8
237	A	12	8
238	L	19	1
239	G	15	5
240	S	14	6
241	M	19	1
242	G	15	5
243	S	13	7
244	V	13	7
245	V	14	6
246	K	15	5
247	S	12	8
248	E	3	17
249	A	10	10
250	S	10	10
251	S	14	6
252	P	16	4
253	P	18	2
254	V	12	8
255	V	7	13
256	V	13	7
257	T	10	10
258	S	14	6

10

20

30

40

【 0 6 7 9 】

【 表 1 4 0 】

表140 ヒトSox2アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
259	S	12	8
260	H	18	2
261	S	14	6
262	R	18	2
263	A	16	4
264	P	17	3
265	C	17	3
266	Q	18	2
267	A	10	10
268	G	19	1
269	D	17	3
270	L	14	6
271	R	18	2
272	D	16	4
273	M	17	3
274	I	16	4
275	S	16	4
276	M	16	4
277	Y	18	2
278	L	11	9
279	P	18	2
280	G	19	1
281	A	15	5
282	E	16	4
283	V	10	10
284	P	10	10

10

20

30

40

【 0 6 8 0 】

【 横 1 4 1 】

表141 ヒトSox2アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
285	M	10	10
286	E	14	6
287	P	15	5
288	A	16	4
289	A	3	17
290	P	15	5
291	S	18	2
292	R	13	7
293	L	19	1
294	H	13	7
295	M	12	8
296	S	18	2
297	Q	18	2
298	H	17	3
299	Y	17	3
300	Q	16	4
301	S	17	3
302	G	8	12
303	P	16	4
304	V	18	2
305	P	19	1
306	G	15	5
307	T	15	5
308	A	14	6
309	I	18	2
310	N	19	1

10

20

30

40

【 0 6 8 1 】

【 1 4 2 】

表142 ヒトSox2アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

WT	位置	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
T	311	17	3
L	312	11	9
P	313	18	2
L	314	15	5
S	315	12	8
H	316	18	2
M	317	16	4

10

20

30

40

【 0 6 8 2 】

【 表 1 4 3 】

表143 ヒトKlf4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
1	M	3	17
2	A	4	16
3	V	0	20
4	S	3	17
5	D	3	17
6	A	1	19
7	L	0	20
8	L	0	20
9	P	0	20
10	S	1	19
11	F	13	7
12	S	2	18
13	T	3	17
14	F	0	20
15	A	0	20
16	S	1	19
17	G	5	15
18	P	1	19
19	A	3	17
20	G	10	10
21	R	4	16
22	E	1	19
23	K	1	19

10

20

30

40

【 0 6 8 3 】

【 1 4 4 】

表144  
ヒトKlf4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	変異	予測される有害な変異の数	予測される中立的な突然変異の数
24	T	R	0	20
25	L	R	0	20
26	R	R	5	15
27	Q	R	5	15
28	A	R	5	15
29	G	R	1	19
30	A	R	4	16
31	P	R	0	20
32	N	R	2	18
33	N	R	1	19
34	R	R	7	13
35	W	R	3	17
36	R	R	6	14
37	E	R	7	13
38	E	R	0	20
39	L	R	0	20
40	S	R	5	15
41	H	R	10	10
42	M	R	1	19
43	K	R	12	8
44	R	R	12	8
45	L	R	3	17
46	P	R	5	15
47	P	R	0	20
48	V	R	0	20

10

20

30

40

【 0 6 8 4 】

【 1 4 5 】

表145 ヒトKlf4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
49	M	0	20
50	G	4	16
51	A	0	20
52	P	11	9
53	G	2	18
54	A	1	19
55	A	4	16
56	G	0	20
57	G	1	19
58	A	2	18
59	A	0	20
60	G	5	15
61	G	0	20
62	G	0	20
63	M	7	13
64	M	3	17
65	G	0	20
66	A	2	18
67	A	6	14
68	G	6	14
69	G	6	14
70	A	5	15
71	G	14	6
72	A	1	19
73	A	7	13

10

20

30

40

【 0 6 8 5 】

【 表 1 4 6 】

表146  
ヒトKlf4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

WT	位置	予測される有害な変異の数	予測される中立的な突然変異の数
C	74	6	14
G	75	7	13
G	76	9	11
S	77	4	16
N	78	7	13
L	79	0	20
A	80	8	12
P	81	0	20
L	82	0	20
P	83	0	20
R	84	11	9
R	85	17	3
E	86	3	17
T	87	0	20
E	88	9	11
E	89	1	19
F	90	0	20
N	91	2	18
D	92	3	17
L	93	0	20
L	94	0	20
D	95	6	14
L	96	0	20
D	97	2	18
F	98	0	20

10

20

30

40

【 0 6 8 6 】

【 表 1 4 7 】

表147 ヒトKlf4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

WT	位置	変異	予測される有害な変異の数	予測される中立的な突然変異の数
I	99	M	3	17
L	100	M	0	20
S	101	M	13	7
N	102	M	7	13
S	103	M	1	19
L	104	M	1	19
T	105	M	9	11
H	106	M	15	5
P	107	M	2	18
P	108	M	3	17
E	109	M	4	16
S	110	M	1	19
V	111	M	1	19
A	112	M	9	11
A	113	M	6	14
T	114	M	9	11
V	115	M	2	18
S	116	M	11	9
S	117	M	4	16
S	118	M	6	14
A	119	M	8	12
S	120	M	13	7
A	121	M	5	15
S	122	M	10	10
S	123	M	10	10

10

20

30

40

【 0 6 8 7 】

【 表 1 4 8 】

表148 ヒトKlf4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
124	S	2	18
125	S	12	8
126	S	5	15
127	P	6	14
128	S	3	17
129	S	9	11
130	S	11	9
131	G	16	4
132	P	11	9
133	A	4	16
134	S	11	9
135	A	12	8
136	P	14	6
137	S	9	11
138	T	7	13
139	A	14	6
140	S	8	12
141	F	11	9
142	T	1	19
143	Y	13	7
144	P	6	14
145	I	7	13
146	R	7	13
147	A	10	10
148	G	6	14

【 0 6 8 8 】

10

20

30

40

【 表 1 4 9 】

表149 ヒトKlf4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
149	M	3	17
150	G	12	8
151	M	16	4
152	G	5	15
153	V	6	14
154	A	10	10
155	P	11	9
156	G	5	15
157	G	18	2
158	T	4	16
159	G	12	8
160	G	12	8
161	G	8	12
162	L	5	15
163	L	2	18
164	Y	7	13
165	G	17	3
166	R	7	13
167	E	6	14
168	S	8	12
169	A	14	6
170	P	13	7
171	P	5	15
172	P	5	15
173	T	3	17

10

20

30

40

【 0 6 8 9 】

【 表 1 5 0 】

表150  
ヒトKlf4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な変異の数	予測される中立的な変異の数
174	A	14	6
175	P	11	9
176	F	15	5
177	N	11	9
178	L	5	15
179	A	5	15
180	D	13	7
181	I	8	12
182	N	7	13
183	D	8	12
184	V	9	11
185	S	7	13
186	P	8	12
187	S	6	14
188	G	13	7
189	G	14	6
190	F	12	8
191	V	8	12
192	A	13	7
193	E	6	14
194	L	5	15
195	L	6	14
196	R	11	9
197	P	7	13
198	E	4	16

10

20

30

40

【 0 6 9 0 】

【 横 1 5 1 】

表151 ヒトKlf4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

WT	位置	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
L	199	8	12
D	200	12	8
P	201	5	15
V	202	4	16
Y	203	13	7
I	204	12	8
P	205	13	7
P	206	4	16
Q	207	7	13
Q	208	12	8
P	209	4	16
Q	210	4	16
P	211	6	14
P	212	10	10
G	213	16	4
G	214	11	9
G	215	14	6
L	216	3	17
M	217	8	12
G	218	11	9
K	219	13	7
F	220	13	7
V	221	10	10
L	222	8	12
K	223	12	8

10

20

30

40

【 0 6 9 1 】

【 表 1 5 2 】

表152 ヒトKlf4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
224	A	12	8
225	S	3	17
226	L	6	14
227	S	3	17
228	A	11	9
229	P	14	6
230	G	17	3
231	S	13	7
232	E	4	16
233	Y	12	8
234	G	14	6
235	S	6	14
236	P	6	14
237	S	4	16
238	V	6	14
239	I	11	9
240	S	4	16
241	V	10	10
242	S	13	7
243	K	4	16
244	G	13	7
245	S	12	8
246	P	6	14
247	D	10	10
248	G	13	7

10

20

30

40

【 0 6 9 2 】

【 表 1 5 3 】

表153  
ヒトKIF4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
249	S	4	16
250	H	17	3
251	P	11	9
252	V	11	9
253	V	7	13
254	V	12	8
255	A	12	8
256	P	11	9
257	Y	11	9
258	N	2	18
259	G	13	7
260	G	16	4
261	P	13	7
262	P	7	13
263	R	15	5
264	T	5	15
265	C	16	4
266	P	7	13
267	K	5	15
268	I	12	8
269	K	4	16
270	Q	8	12
271	E	10	10
272	A	11	9
273	V	6	14

10

20

30

40

【 0 6 9 3 】

【 1 5 4 】

表154  
ヒトKlf4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
274	S	4	16
275	S	4	16
276	C	13	7
277	T	14	6
278	H	15	5
279	L	1	19
280	G	15	5
281	A	7	13
282	G	13	7
283	P	16	4
284	P	9	11
285	L	3	17
286	S	4	16
287	N	8	12
288	G	12	8
289	H	12	8
290	R	12	8
291	P	11	9
292	A	6	14
293	A	11	9
294	H	15	5
295	D	10	10
296	F	12	8
297	P	7	13
298	L	7	13

10

20

30

40

【 0 6 9 4 】

【 表 1 5 5 】

表155  
ヒトKlf4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
299	G	15	5
300	R	19	1
301	Q	5	15
302	L	5	15
303	P	11	9
304	S	8	12
305	R	14	6
306	T	8	12
307	T	6	14
308	P	13	7
309	T	5	15
310	L	2	18
311	G	17	3
312	L	1	19
313	E	4	16
314	E	4	16
315	V	8	12
316	L	6	14
317	S	10	10
318	S	13	7
319	R	15	5
320	D	9	11
321	C	14	6
322	H	15	5
323	P	10	10

10

20

30

40

【 0 6 9 5 】

【 1 5 6 】

表156 ヒトKlf4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
324	A	10	10
325	L	6	14
326	P	15	5
327	L	6	14
328	P	14	6
329	P	9	11
330	G	17	3
331	F	6	14
332	H	16	4
333	P	18	2
334	H	16	4
335	P	6	14
336	G	16	4
337	P	6	14
338	N	8	12
339	Y	12	8
340	P	8	12
341	S	7	13
342	F	12	8
343	L	5	15
344	P	7	13
345	D	12	8
346	Q	7	13
347	M	12	8
348	Q	12	8

10

20

30

40

【 0 6 9 6 】

【 横 1 5 7 】

表157  
ヒトKlf4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

WT	位置	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
P	349	5	15
Q	350	4	16
V	351	7	13
P	352	11	9
P	353	8	12
L	354	8	12
H	355	13	7
Y	356	14	6
Q	357	5	15
E	358	7	13
L	359	6	14
M	360	7	13
P	361	16	4
P	362	17	3
G	363	12	8
S	364	9	11
C	365	15	5
M	366	10	10
P	367	14	6
E	368	5	15
E	369	9	11
P	370	6	14
K	371	14	6
P	372	10	10
K	373	6	14

10

20

30

40

【 0 6 9 7 】

【 1 5 8 】

表158 ヒトKlf4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
374	R	10	10
375	G	17	3
376	R	11	9
377	R	17	3
378	S	9	11
379	W	2	18
380	P	13	7
381	R	18	2
382	K	6	14
383	R	18	2
384	T	5	15
385	A	14	6
386	T	11	9
387	H	14	6
388	T	10	10
389	C	17	3
390	D	14	6
391	Y	11	9
392	A	14	6
393	G	16	4
394	C	18	2
395	G	16	4
396	K	15	5
397	T	12	8
398	Y	13	7

10

20

30

40

【 0 6 9 8 】



【 160 】

表160 ヒトKlf4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
424	C	18	2
425	G	16	4
426	W	18	2
427	K	14	6
428	F	15	5
429	A	14	6
430	R	18	2
431	S	12	8
432	D	17	3
433	E	16	4
434	L	10	10
435	T	14	6
436	R	18	2
437	H	18	2
438	Y	13	7
439	R	18	2
440	K	16	4
441	H	18	2
442	T	12	8
443	G	16	4
444	H	15	5
445	R	16	4
446	P	16	4
447	F	14	6
448	Q	11	9

10

20

30

40

【 0700 】

【 表 1 6 1 】

表161  
ヒトKlf4アミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
449	C	17	3
450	Q	12	8
451	K	12	8
452	C	17	3
453	D	15	5
454	R	18	2
455	A	14	6
456	F	13	7
457	S	12	8
458	R	18	2
459	S	14	6
460	D	15	5
461	H	18	2
462	L	10	10
463	A	15	5
464	L	10	10
465	H	18	2
466	M	17	3
467	K	16	4
468	R	18	2
469	H	15	5
470	F	11	9

10

20

30

40

【 0 7 0 1 】

【 表 1 6 2 】

表162  
ヒトc-Mycアミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

WT	位置	予測される有害な変異の数	予測される中立的な変異の数
M	1	13	7
P	2	14	6
L	3	12	8
N	4	11	9
V	5	7	13
S	6	10	10
F	7	13	7
T	8	0	20
N	9	8	12
R	10	9	11
N	11	13	7
Y	12	10	10
D	13	16	4
L	14	6	14
D	15	11	9
Y	16	14	6
D	17	15	5
S	18	16	4
V	19	5	15
Q	20	18	2
P	21	17	3
Y	22	14	6
F	23	18	2

10

20

30

40

【 0 7 0 2 】

【 表 1 6 3 】

表163 ヒトc-Mycアミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
24	M	10	10
25	M	7	13
26	M	12	8
27	M	11	9
28	M	8	12
29	M	10	10
30	M	10	10
31	M	6	14
32	M	14	6
33	M	4	16
34	M	15	5
35	M	12	8
36	M	5	15
37	M	11	9
38	M	9	11
39	S	13	7
40	E	10	10
41	L	16	4
42	Q	11	9
43	P	12	8
44	P	16	4
45	A	18	2
46	P	9	11
47	S	11	9
48	E	14	6

10

20

30

40

【 0 7 0 3 】

【 表 1 6 4 】

表164 ヒトc-Mycアミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
49	I	12	8
50	W	18	2
51	K	16	4
52	K	16	4
53	F	18	2
54	E	11	9
55	L	7	13
56	L	11	9
57	P	14	6
58	T	15	5
59	P	16	4
60	P	15	5
61	L	7	13
62	S	17	3
63	P	14	6
64	S	15	5
65	R	17	3
66	R	15	5
67	S	14	6
68	G	13	7
69	L	3	17
70	C	14	6
71	S	13	7
72	P	15	5
73	S	7	13

10

20

30

40

【 0 7 0 4 】

【 表 1 6 5 】

表165 ヒトc-Mycアミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

WT	位置	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
Y	74	8	12
V	75	9	11
A	76	9	11
V	77	2	18
T	78	19	1
P	79	3	17
F	80	8	12
S	81	14	6
L	82	1	19
R	83	12	8
G	84	11	9
D	85	9	11
N	86	3	17
D	87	13	7
G	88	10	10
G	89	8	12
G	90	11	9
S	91	8	12
F	92	13	7
S	93	4	16
T	94	12	8
A	95	16	4
D	96	16	4
Q	97	12	8
	98	16	4

10

20

30

40

【 0 7 0 5 】

【 表 1 6 6 】

表166 ヒトc-Mycアミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
99	L	12	8
100	E	14	6
101	M	14	6
102	V	15	5
103	T	10	10
104	E	15	5
105	L	9	11
106	L	10	10
107	G	17	3
108	G	10	10
109	D	17	3
110	M	13	7
111	V	14	6
112	N	16	4
113	Q	15	5
114	S	15	5
115	F	13	7
116	I	14	6
117	C	16	4
118	D	14	6
119	P	14	6
120	D	13	7
121	D	14	6
122	E	10	10
123	T	12	8
		9	11

10

20

30

40

【 0 7 0 6 】

【 表 1 6 7 】

表167  
ヒトc-Mycアミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

WT	位置	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
F	124	16	4
I	125	9	11
K	126	17	3
N	127	6	14
I	128	14	6
I	129	13	7
I	130	12	8
Q	131	16	4
D	132	17	3
C	133	17	3
M	134	14	6
W	135	19	1
S	136	15	5
G	137	18	2
F	138	17	3
S	139	16	4
A	140	17	3
A	141	16	4
A	142	17	3
K	143	18	2
L	144	12	8
V	145	15	5
S	146	14	6
E	147	14	6
K	148	17	3

10

20

30

40

【 0 7 0 7 】

【 1 6 8 】

表168  
ヒトc-Mycアミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
149	M	14	6
150	L	16	4
151	A	11	9
152	S	15	5
153	Y	17	3
154	Q	17	3
155	A	12	8
156	A	17	3
157	R	11	9
158	K	8	12
159	D	9	11
160	S	10	10
161	G	7	13
162	S	13	7
163	P	2	18
164	N	8	12
165	P	8	12
166	A	16	4
167	R	11	9
168	G	14	6
169	H	4	16
170	S	10	10
171	V	10	10
172	C	10	10
173	S	10	10
	T	10	10

10

20

30

40

【 0 7 0 8 】

【 表 1 6 9 】

表169 ヒトc-Mycアミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
174	S	13	7
175	S	10	10
176	L	6	14
177	Y	11	9
178	L	9	11
179	Q	13	7
180	D	15	5
181	L	10	10
182	S	9	11
183	A	11	9
184	A	14	6
185	A	15	5
186	S	15	5
187	E	9	11
188	C	18	2
189	I	14	6
190	D	16	4
191	P	16	4
192	S	15	5
193	V	17	3
194	V	15	5
195	F	17	3
196	P	18	2
197	Y	17	3
198	P	18	2

10

20

30

40

【 0 7 0 9 】

【 表 1 7 0 】

表170  
ヒトc-Mycアミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
199	L	14	6
200	N	11	9
201	D	12	8
202	S	11	9
203	S	9	11
204	S	13	7
205	P	13	7
206	K	10	10
207	S	6	14
208	C	12	8
209	A	11	9
210	S	11	9
211	Q	1	19
212	D	14	6
213	S	13	7
214	S	7	13
215	A	16	4
216	F	6	14
217	S	16	4
218	P	15	5
219	S	11	9
220	S	10	10
221	D	9	11
222	S	14	6
223	L	6	14

10

20

30

40

【 0 7 1 0 】

【 1 7 1 】

表171  
ヒトc-Mycアミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
224	L	9	11
225	S	10	10
226	S	10	10
227	T	8	12
228	E	10	10
229	S	8	12
230	S	11	9
231	P	14	6
232	Q	2	18
233	G	11	9
234	S	13	7
235	P	15	5
236	E	10	10
237	P	14	6
238	L	5	15
239	V	10	10
240	L	8	12
241	H	14	6
242	E	11	9
243	E	14	6
244	T	12	8
245	P	14	6
246	P	15	5
247	T	11	9
248	Y	11	9

10

20

30

40

【 0 7 1 1 】

【 表 1 7 2 】

表172  
ヒトc-Mycアミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
249	S	10	10
250	S	11	9
251	D	16	4
252	S	10	10
253	E	14	6
254	E	15	5
255	E	15	5
256	Q	15	5
257	E	13	7
258	D	13	7
259	E	13	7
260	E	14	6
261	E	16	4
262	I	16	4
263	D	17	3
264	V	17	3
265	V	17	3
266	S	12	8
267	V	16	4
268	E	16	4
269	K	15	5
270	R	18	2
271	Q	18	2
272	A	8	12
273	P	13	7

10

20

30

40

【 0 7 1 2 】

【 表 1 7 3 】

表173 ヒトc-Mycアミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な変異の数	予測される中立的な変異の数
274	G	7	13
275	K	15	5
276	R	18	2
277	S	12	8
278	E	12	8
279	S	13	7
280	G	15	5
281	S	11	9
282	P	9	11
283	S	14	6
284	A	13	7
285	G	9	11
286	G	15	5
287	H	15	5
288	S	12	8
289	K	17	3
290	P	14	6
291	P	11	9
292	H	15	5
293	S	16	4
294	P	17	3
295	L	15	5
296	V	15	5
297	L	16	4
298	K	18	2

10

20

30

40

【 0 7 1 3 】

【 表 1 7 4 】

表174  
ヒトc-Mycアミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な変異の数	予測される中立的な変異の数
299	R	19	1
300	C	18	2
301	H	17	3
302	V	16	4
303	S	12	8
304	T	11	9
305	H	15	5
306	Q	18	2
307	H	18	2
308	N	18	2
309	Y	17	3
310	A	18	2
311	A	19	1
312	P	17	3
313	P	15	5
314	S	12	8
315	T	17	3
316	R	12	8
317	K	15	5
318	D	16	4
319	Y	17	3
320	P	15	5
321	A	11	9
322	A	11	9

10

20

30

40

【 0 7 1 4 】

【 表 1 7 5 】

表175  
ヒトc-Mycアミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な変異の数	予測される中立的な変異の数
323	K	17	3
324	P	18	2
325	V	4	16
326	K	16	4
327	L	14	6
328	D	14	6
329	S	15	5
330	V	5	15
331	R	18	2
332	V	16	4
333	L	11	9
334	R	15	5
335	Q	14	6
336	I	14	6
337	S	16	4
338	N	13	7
339	N	12	8
340	R	18	2
341	K	18	2
342	C	18	2
343	T	5	15
344	S	14	6
345	P	17	3
346	R	19	1
347	S	16	4

10

20

30

40

【 0 7 1 5 】

【 7 1 6 】

表176  
ヒトc-Mycアミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
348	S	17	3
349	D	16	4
350	T	11	9
351	E	15	5
352	E	15	5
353	N	17	3
354	V	1	19
355	K	16	4
356	R	18	2
357	R	18	2
358	T	16	4
359	H	18	2
360	N	18	2
361	V	16	4
362	L	16	4
363	E	17	3
364	R	18	2
365	Q	18	2
366	R	18	2
367	R	18	2
368	N	15	5
369	E	15	5
370	L	16	4
371	K	18	2
372	R	18	2

10

20

30

40

【 0 7 1 6 】

【 表 1 7 7 】

表177  
ヒトc-Mycアミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
373	S	17	3
374	F	18	2
375	F	18	2
376	A	17	3
377	L	16	4
378	R	19	1
379	D	15	5
380	Q	18	2
381	I	15	5
382	P	18	2
383	E	15	5
384	L	13	7
385	E	13	7
386	N	15	5
387	N	15	5
388	E	14	6
389	K	18	2
390	A	17	3
391	P	17	3
392	K	18	2
393	V	18	2
394	V	18	2
395	I	16	4
396	L	16	4
397	K	18	2

10

20

30

40

【 0 7 1 7 】

【 表 1 7 8 】

表178  
ヒトc-Mycアミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
398	K	18	2
399	A	17	3
400	T	16	4
401	A	13	7
402	Y	16	4
403	I	15	5
404	L	14	6
405	S	16	4
406	V	12	8
407	Q	18	2
408	A	16	4
409	E	10	10
410	E	17	3
411	Q	16	4
412	K	18	2
413	L	16	4
414	I	16	4
415	S	15	5
416	E	17	3
417	E	10	10
418	D	17	3
419	L	13	7
420	L	16	4
421	R	18	2
422	K	15	5

10

20

30

40

【 0 7 1 8 】

【 179 】

表179  
ヒトc-Mycアミノ酸置換マトリックス (PMUT分析に基づく予測)

位置	WT	予測される有害な突然変異の数	予測される中立的な突然変異の数
423	R	18	2
424	R	18	2
425	E	16	4
426	Q	18	2
427	L	17	3
428	K	18	2
429	H	18	2
430	K	18	2
431	L	17	3
432	E	17	3
433	Q	18	2
434	L	17	3
435	R	19	1
436	N	18	2
437	S	16	4
438	C	19	1
439	A	18	2

10

20

30

40

【 0719 】

【 表 180 】

表 180  
階層的クラスタ分析 (国際幹細胞推進) のためのプロープ組 ID、遺伝子名称、及び 遺伝子説明 :

プロープ組 ID	遺伝子名称	遺伝子説明
AFFX- HUMGAPDH/M33197_M_at	GAPDH	グリセルアルデヒド-3-ホスフェートヒドロゲナーゼ
AFFX- HUMGAPDH/M33197_5_at	GAPDH	グリセルアルデヒド-3-ホスフェートヒドロゲナーゼ
AFFX- HUMGAPDH/M33197_3_at	GAPDH	グリセルアルデヒド-3-ホスフェートヒドロゲナーゼ
40284_at	FOXA2	フォークヘッドボックス A2
244849_at	SEMA3A	セマドメイン, 免疫グロブリンドメイン (Ig), 短い塩基性ドメイン, 分泌された, (セマホリン) 3A
244163_at	SEMA3A	セマドメイン, 免疫グロブリンドメイン (Ig), 短い塩基性ドメイン, 分泌された, (セマホリン) 3A
243712_at	XIST	X (不活性) -特異的転写体
243692_at	GATA4	GATA 結合タンパク質 4
243161_x_at	ZFP42	亜鉛フィンガータンパク質 42 相同体 (マウス)
242622_x_at	PTEN	ホスファターゼ及びテンシン相同体 (多重進行した癌   において突然誘発された)
241861_at	SYCP3	シナプトネマル複合体タンパク質 3
241609_at	FOXO3	フォークヘッドボックス D3
237896_at	ノーダル	ノーダル相同体 (マウス)

【 0 7 2 0 】

10

20

30

40

【 表 1 8 1 】

表 181

ブロー組 ID	遺伝子名称	遺伝子説明
236930_at	NUMB	Numb 相同体 (シヨウジョウバエ)
236859_at	RUNX2	成長阻害動物-関連の転写因子 2
235795_at	PAX6	対にされたボックス遺伝子 6 (無虹彩、角膜炎)
234967_at	IL6ST	インターロイキン 6 シグナルトランスデュース (gp130, オンコスタチン M 受容体)
234474_x_at	IL6ST	インターロイキン 6 シグナルトランスデュース (gp130, オンコスタチン M 受容体)
233322_at	CD9	CD9 分子
233317_at	CD9	CD9 分子
233314_at	PTEN	ホスファターゼ及びピテンシン相同体 (多重進行した癌 I において突然誘発された癌 I)
233254_x_at	PTEN	ホスファターゼ及びピテンシン相同体 (多重進行した癌 I において突然誘発された癌 I)
232809_s_at	FLT1	Fms-関連のチロシンキナーゼ I (血管内皮成長因子/血管透過性因子受容体)
232231_at	RUNX2	成長阻害動物-関連の転写因子 2
231798_at	NOG	ノギン
231776_at	EOMES	エオメソデルミン相同体 (アフリカツメガエル)
231592_at	XIST	X (不活性)-特異的転写体
230916_at	NODAL	ノーダル相同体 (マウス)
230855_at	GATA4	GATA 結合タンパク質 4
230462_at	NUMB	numb 相同体 (シヨウジョウバエ)
230318_at	SERPINA1	セルピンパプチダーゼインヒビター、クレード A ( $\alpha$ -1 抗プロテイナーゼ、抗トリプシン)、メンバー 1
229724_at	GABRB3	$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) A 受容体, $\beta$ 3
229346_at	NES	ネスチン
229341_at	TFCP2L1	転写因子 CP2-様 I

【 0 7 2 1 】

10

20

30

40

【 表 1 8 2 】

表 182

ブロープ組 ID	遺伝子名称	遺伝子説明
229282_at	GATA6	GATA 結合タンパク質 6
229259_at	GFAP	グリア原線維酸性タンパク質
228038_at	SOX2	SRY (性決定領域 Y)-ボックス 2
227830_at	GABRB3	γ-アミノ酪酸 (GABA) A 受容体, β3
227771_at	LIFR	白血病インヒビター-y 因子受容体 α
227690_at	GABRB3	γ-アミノ酪酸 (GABA) A 受容体, β3
227671_at	XIST	X (不活性)-特異的転写体
227642_at	TFCP2L1	転写因子 CP2-様 1
227469_at	PTEN	ホスファターゼ及びピテンシン相同体 (多重進行した癌   において突然誘発された癌 1)
227048_at	LAMA1	ラミニン, α 1
225575_at	LIFR	白血病インヒビター-y 因子受容体 α
225571_at	LIFR	白血病インヒビター-y 因子受容体 α
225363_at	PTEN	ホスファターゼ及びピテンシン相同体 (多重進行した癌   において突然誘発された癌 1)
224590_at	XIST	X (不活性)-特異的位転写体
224589_at	XIST	X (不活性)-特異的転写体
224588_at	XIST	X (不活性)-特異的転写体
223963_s_at	IGF2BP2	インスリン-様成長因子 2mRNA 結合タンパク質 2
223679_at	CTNNB1	カテニン (カドヘリン-関連のタンパク質), β 1, 88kDa
223122_s_at	SFRP2	分泌された縮れた-関連のタンパク質 2
223121_s_at	SFRP2	分泌された縮れた-関連のタンパク質 2
222346_at	LAMA1	ラミニン, α 1
222176_at	PTEN	ホスファターゼ及びピテンシン相同体 (多重進行した癌   において突然誘発された癌 1)

【 0 7 2 2 】

10

20

30

40

【 表 1 8 3 】

表 183

ブロー組 ID	遺伝子名称	遺伝子説明
222033_s_at	FLT1	Fms-関連のチロシンキナーゼ1(血管内皮成長因子/血管透過性因子受容体)
221728_x_at	XIST	X(不活性)-特異的転写体
221630_s_at	DDX4	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)ボックスポリペプチド4
221283_at	RUNX2	成長阻害動物-関連の転写因子2
221282_x_at	RUNX2	成長阻害動物-関連の転写因子2
220668_s_at	D 成長阻害動物 3B	DNA(シトシン-5')-メチルトランスフェラーゼ3β
220184_at	NANOG	Nanog ホメオボックス
220053_at	GDF3	成長分化因子3
219993_at	SOX17	SRY(性別決定領域Y)-ボックス17
219823_at	LIN28	lin-28 相同体(Cエレガンス)
219735_s_at	TFCP2L1	転写因子CP2-様1
219177_at	BXDC2	brixドメイン含有2
218847_at	IGF2BP2	インスリン-様成長因子2mRNA結合タンパク質2
218678_at	NES	ネスチン
218048_at	COMM3	COMMドメイン含有3
217430_x_at	COL1A1	コラーゲン,型Iα1
217404_s_at	COL2A1	コラーゲン,型II,α1(一次変形性関節症、脊椎骨異形成、形成異常、先天性)
217398_x_at	GAPDH	グリセルアルデヒド3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ
217246_s_at	DIAPH2	ジアファナーナス相同体2(シヨウジヨウバエ)
217232_x_at	HBB	ヘモグロビン,β
216994_s_at	RUNX2	成長阻害動物-関連の転写因子2
216953_s_at	WT1	Wilms 腫瘍1
216947_at	DES	デスミン
216442_x_at	FN1	フィブロネクチン1
214702_at	FN1	フィブロネクチン1
214701_s_at	FN1	フィブロネクチン1
214614_at	HLXB9	ホメオボックスHB9

【 0 7 2 3 】

10

20

30

40

【 表 1 8 4 】

表 184

ブロー組 ID	遺伝子名称	遺伝子説明
214532_x_at	LOC642559//L0 C645682// POU5F1//	POU ドメイン, クラス 5, 転写因子 1//POU ドメイン, クラス 5, 転写因子偽遺伝子 1//POU ドメイン, クラス 5, 転写因子偽遺伝子 1
214413_at	TAT	チロシナーミノトランスフェラーゼ
214312_at	FOXA2	forkhead ボックス A2
214240_at	GAL	ガラニン
214218_s_at	XIST	X (不活性) -特異的転写体
214178_s_at	SOX2	SRY (性決定領域 Y) -ボックス 2
214022_s_at	IFITM1	インターフェロン誘発されたトランスメンブランタンパク質 1 (9-27)
213921_at	SST	ソマトスタチン
213825_at	OLIG2	乏枝神経こう系統転写因子 2
213824_at	OLIG2	乏枝神経こう系統転写因子 2
213722_at	SOX2	SRY (性決定領域 Y) -ボックス 2
213721_at	SOX2	SRY (性別決定領域 Y) -ボックス 2
213492_at	COL2A1	コラーゲン, 型 II, $\alpha 1$ (一次変形性関節症、脊椎骨異形成 形成異常、先天性)
213453_x_at	GAPDH	グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ
213200_at	SYP	シナプトフィリン
212581_x_at	GAPDH	グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ
212464_s_at	FNI	フィブロネクチン 1
212196_at	IL6ST	インターロイキン 6 シグナルトランスデュサー (gp130, オンコスタチン M 受容体)
212195_at	IL6ST	インターロイキン 6 シグナルトランスデュサー (gp130, オンコスタチン M 受容体)
211719_x_at	FNI	フィブロネクチン 1
211711_s_at	PTEN	ホスファターゼ及びびテンシン相同体 (多重進行した癌   において突然誘発された)
211696_x_at	HBB	ヘモグロビン, $\beta$

【 0 7 2 4 】

10

20

30

40

【 表 1 8 5 】

表 185

ブロー組 ID	遺伝子名称	遺伝子説明
211651_s_at	LAMB1	ラミン, $\beta$ 1
211429_s_at	SERPINA1	セルピンペプチダーゼインヒビター, クレード A ( $\alpha$ -1) 抗プロテイナーゼ, 抗トリプシン, メンバー 1
211428_at	SERPINA1	セルピンペプチダーゼインヒビター, クレード A ( $\alpha$ -1) 抗プロテイナーゼ, 抗トリプシン, メンバー 1
211402_x_at	NR6A1	核受容体サブファミリー 6, グループ A, メンバー 1
211176_s_at	PAX4	対にされたボックス遺伝子 4
211000_s_at	IL6ST	インターロイキン 6 シグナルトランスデュサー (gp130, オンコスタチン M 受容体)
210938_at	PDX1	膵臓及び十二指腸ホメオボックス 1
210937_s_at	PDX1	膵臓及び十二指腸ホメオボックス 1
210761_s_at	GRB7	成長因子受容体-結合されたタンパク質 7
210560_at	GBX2	囊胚形成 脳 ホメオボックス 2
210495_x_at	FN1	フィブロネクチン 1
210392_x_at	NR6A1	核受容体サブファミリー 6, グループ A, メンバー 1
210391_at	NR6A1	核受容体サブファミリー 6, グループ A, メンバー 1
210311_at	FGF5	線維芽細胞成長因子 5
210310_s_at	FGF5	線維芽細胞成長因子 5
210287_s_at	FLT1	fhms-関連チロシンキナーゼ 1 (血管内皮成長因子/血管透過性因子受容体)
210174_at	NR5A2	核受容体サブファミリー 5, グループ A, メンバー 2
210103_s_at	FOXO2	forkhead ボックス A2
210002_at	GATA6	GATA 結合タンパク質 6
209957_s_at	NPPA	ナトリウム利尿性ペプチド前駆体 A
209543_s_at	CD34	CD34 分子
209116_x_at	HBB	ヘモグロビン, $\beta$

【 0 7 2 5 】

10

20

30

40

【表 186】

表 186

ブロー組 ID	遺伝子名称	遺伝子説明
209073_s_at	NUMB	numb 相同体 (シヨウジョウバエ)
208983_s_at	PECAMI	血小板/内皮細胞付着分子 (CD31)
208982_at	PECAMI	血小板/内皮細胞付着分子 (CD31)
208981_at	PECAMI	血小板/内皮細胞付着分子 (CD31)
208559_at	PDX1	膵臓及び十二指腸ホモボックス 1
208500_x_at	FOXO3	forkhead ボックス D3
208378_x_at	FGF5	線維芽細胞成長因子 5
208343_s_at	NR5A2	核受容体サブファミリー-5, グループ A, メンバー-2
208337_s_ar	NR5A2	核受容体サブファミリー-5, グループ A, メンバー-2
208291_s_at	TH	チロシンヒドロキシラーゼ
208286_x_at	LOC642559//L0 C645682// POU5F1//	POU ドメイン, クラス 5, 転写因子 1//POU ドメイン, クラス 5, 転写因子 1 偽遺伝子 1//POU ドメイン, クラス 5, 転写因子 1 偽遺伝子
208275_x_at	UTF1	未分化された胚細胞転写因子 1
207867_at	PAX4	対化されたボックス遺伝子 4
207742_s_at	NR6A1	核受容体サブファミリー-6, グループ環 A, メンバー-1
207545_s_at	NUMB	numb 相同体 (シヨウジョウバエ)
207466_at	GAL	ガラニン
207424_at	MYF5	筋原性因子 5
207199_at	TERT	テロメラーゼ逆転写酵素
207062_at	IAPP	島アミロイドポリペプチド
206916_x_at	TAT	チロシンアミノトランスフェラーゼ
206805_at	SEMA3A	セマドメイン, 免疫グロブリンドメイン (Ig), 短い塩基性ドメイン, 分泌された, (セマホリン) 3A
206783_at	FGF4	線維芽細胞成長因子 4 (ヘパリン分泌転換タンパク質 1, カポシ肉腫腫瘍遺伝子)

【 0 7 2 6 】

10

20

30

40

【表 187】

表 187

グループ組 ID	遺伝子名称	遺伝子説明
206701x_at	EDNRB	エンドセリン受容体型 B
206657_s_at	MYOD1	筋原性分化 1
206647_at	HBZ	ヘモグロビン, ζ
206598_at	INS	インスリン
206524_at	T	T, 短尾奇形相同体 (マウス)
206422_at	GCG	グルカゴン
206387_at	CDX2	尾側型ホメオボックス転写因子 2
206286_s_at	TDGF1///TDGF3	テラトカルシノーマ由来の成長因子 1///テラトカルシノーマ由来の成長因子 3, 偽遺伝子
206282_at	NEURD 1	神経原性分化 1
206269_at	GCM1	グリア細胞ミッシング相同体 1 (シヨウジョウバエ)
206268_at	LEFTY1	左-右決定因子 1
206104_at	ISL1	ISL1 転写因子, LIM/ホメオドメイン, (鳥-1)
206067_s_at	WT1	Wilms 腫瘍 1
206012_at	LEFTY2	左-右決定因子 2
205900_at	KRT1	ケラチン 1 (表皮剥離性角質増殖)
205876_at	LIFR	白血病阻害因子受容体 α
205850_s_at	GABRB3	γ-アミノ酪酸 (GABA) A 受容体, β3
205726_at	DIAPH2	ジアファーマナス相同体 2 (シヨウジョウバエ)
205646_s_at	PAX6	対化されたボックス遺伝子 6 (無虹彩、角膜炎)
205603_s_at	DIAPH2	ジアファーマナス相同体 2 (シヨウジョウバエ)
205517_at	GATA4	GATA 結合タンパク質 4
205387_s_at	CGB///CGB5///CGB7	絨毛性腺刺激ホルモン, β ポリペプチド///絨毛製性腺刺激ホルモン, β ポリペプチド 5///絨毛性腺刺激ホルモン, β ポリペプチド 7
205132_at	ACTC1	アクチン, α, 心臓筋肉 1
205051_s_at	KIT	v-kit Hardy-Zuckerman 4 ネコ肉腫ウィルス性腫瘍遺伝子相同体
204864_s_at	IL6ST	インターロイキン 6 シグナルトランスデュサー (gp130, オンコスタチン M 受容体)
204863_s_at	IL6ST	インターロイキン 6 シグナルトランスデュサー (gp130, オンコスタチン M 受容体)

【 0 7 2 7 】

10

20

30

40

【 表 1 8 8 】

表 188

プローブ組 ID	遺伝子名称	遺伝子説明
204694_at	AFP	$\alpha$ -胎児タンパク質
204677_at	CDH5	カドヘリン5、型2、VE-カドヘリン(血管上皮)
204535_s_at	REST	RE1-サイレンシング転写因子
204406_at	FLT1	fms-関連のチロシンキナーゼ1(血管内皮成長因子/血管透過性因子受容体)
204273_at	EDNRB	エンドセリン受容体型B
204271_s_at	EDNRB	エンドセリン受容体型B
204054_at	PTEN	ホスファターゼ及びテンシン相同体(多重進行した癌1において突然誘発された癌1)
204053_x_at	PTEN	ホスファターゼ及びテンシン相同体(多重進行した癌1において突然誘発された癌1)
203540_at	GFAP	グリア原線維性酸性タンパク質
202833_s_at	SERPINA1	セルピンペンブチダーゼインヒビター、クレードA( $\alpha$ -1抗プロテイナーゼ、抗トリプシン)、メンバー1
202575_at	CRABP2	細胞レチノン酸結合タンパク質2
202312_s_at	COL1A1	コラーゲン、型1, $\alpha$ 1
202311_s_at	COL1A1	コラーゲン、型1, $\alpha$ 1
202310_s_at	COL1A1	コラーゲン、型1, $\alpha$ 1
202222_s_at	DES	デスミン
201601_x_at	IFITM1	インターフェロン誘発されたトランスメンブランタンパク質1(9-27)
201578_at	PODXL	ポドカリキシン様
201533_at	CTNNB1	カテニン(カドヘリン-関連のタンパク質)、 $\beta$ 1、88kDa
201505_at	LAMB1	ラミニン、 $\beta$ 1
201315_x_at	1FITM2	インターフェロン誘発されたトランスメンブランタンパク質2(1-80)
201005_at	CD9	CD9 分子
200771_at	LAMB1	ラミニン、 $\gamma$ 1(以前LAMB2)

【 0 7 2 8 】

10

20

30

40

【表 189】

表 189

プローブ組 ID	遺伝子名称	遺伝子説明
200770_s_at	LAMC1	ラミニン, $\gamma$ 1 (以前 LAMB2)
1570276_a_at	GATA4	GATA 結合タンパク質 4
1562981_at	HBB	ヘモグロビン, $\beta$
1561316_at	GABRB3	$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) A 受容体, $\beta$ 3
1560469_at	NR5A2	核受容体サブファミリー-5、グループ A、メンバー-2
1559921_at	PECAMI	血小板/内皮細胞付着 分子 (CD31)
1558199_at	FNI	フィブロネクチン 1
1556499_s_at	COL1A1	コラーゲン, 型 I, $\alpha$ 1
1556057_s_at	神経 D1	神経原性 分化 1
1555271_a_at	TERT	テロメラーゼ逆転写酵素
1554777_at	ZFP42	亜鉛フィンガータンパク質 42 相同体 (マウス)
1554776_at	ZFP42	亜鉛フィンガータンパク質 42 相同体 (マウス)
1554411_at	CTNNB1	カテニン (カドヘリン-関連のタンパク質), $\beta$ 1, 88kDa
1553599_a_at	SYCP3	シナプトネマル複合体タンパク質 3
1553131_a_at	GATA4	GATA 結合タンパク質 4
1552982_a_at	FGF4	線維芽細胞成長因子 4 (ヘパリン分沁形質転換タンパク質 1、カポジ肉腫瘍遺伝子)

【0729】

好ましい態様が本明細書において記載されてきたが、そのような態様は単なる例により提供される。多くの変動、変更及び置換は可能である。本明細書に記載される方法及び組成物の態様に代わる種々の手段が本発明の実施に使用され得ることは理解されるべきである。次の請求項は本発明の範囲を定義し、そしてそれらの請求項の範囲内の方法及び組成物、及びそれらの同等物はそれにより保護されることが意図される。

10

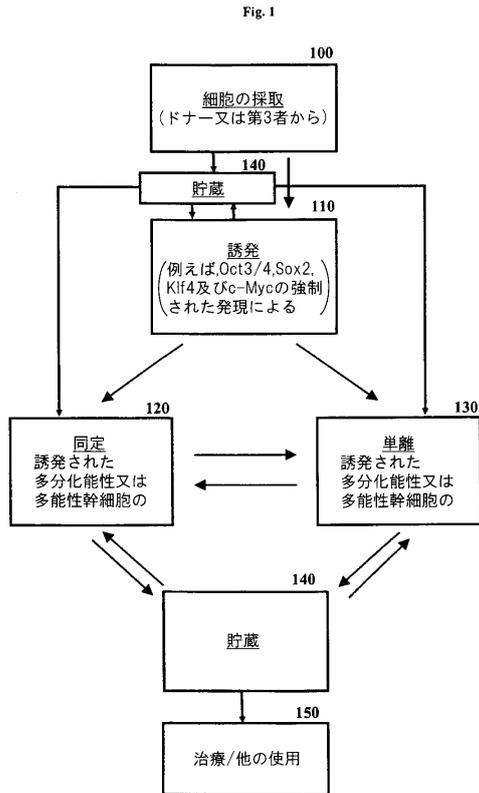
20

30

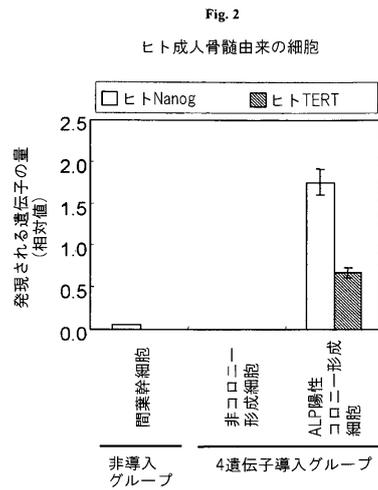
40

50

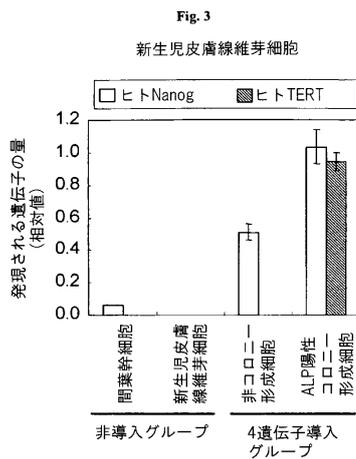
【 図 1 】



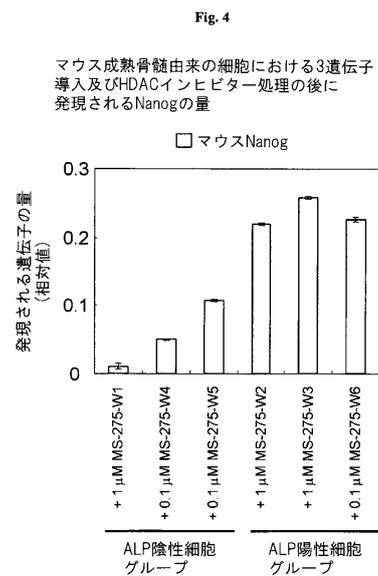
【 図 2 】



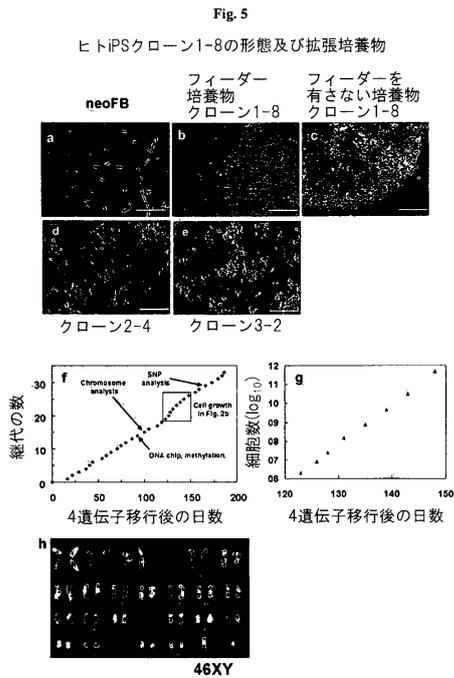
【 図 3 】



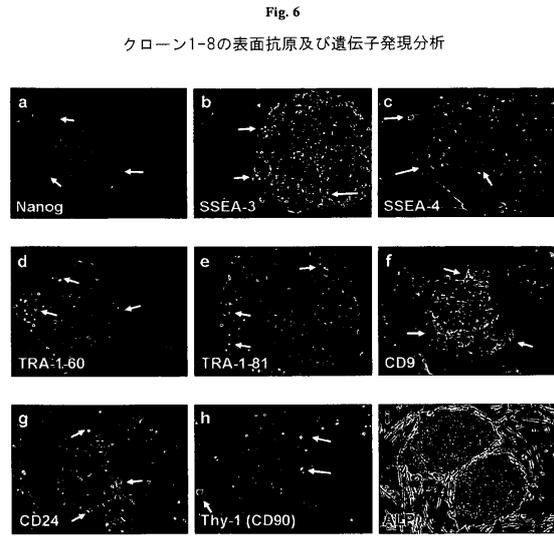
【 図 4 】



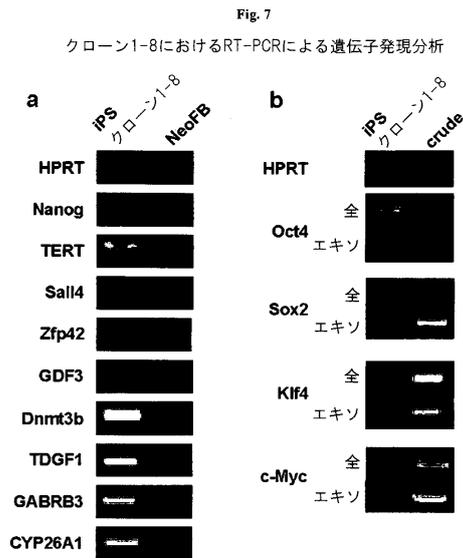
【 図 5 】



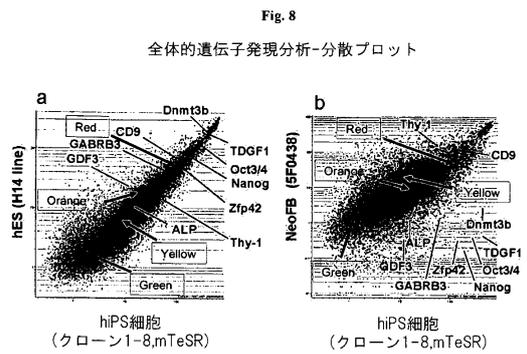
【 図 6 】



【 図 7 】

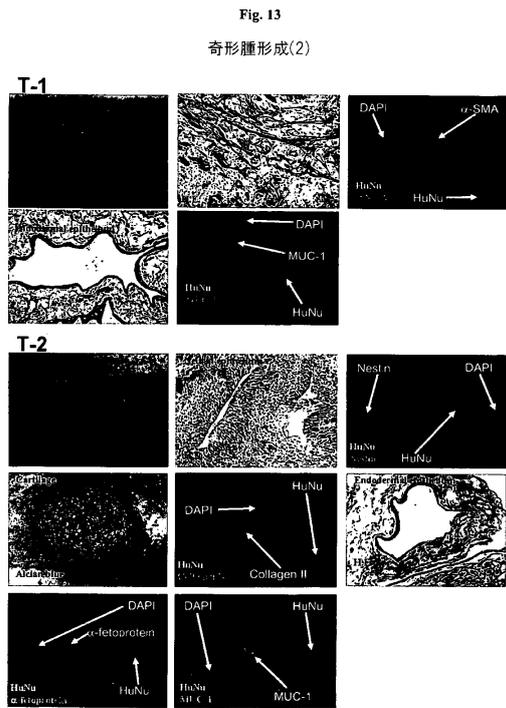


【 図 8 】

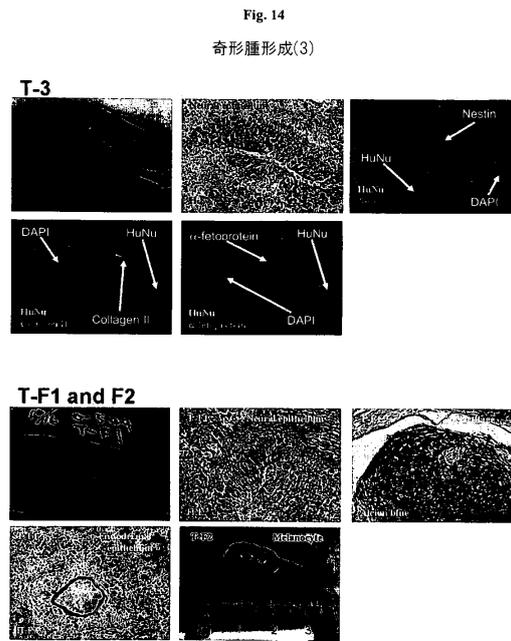




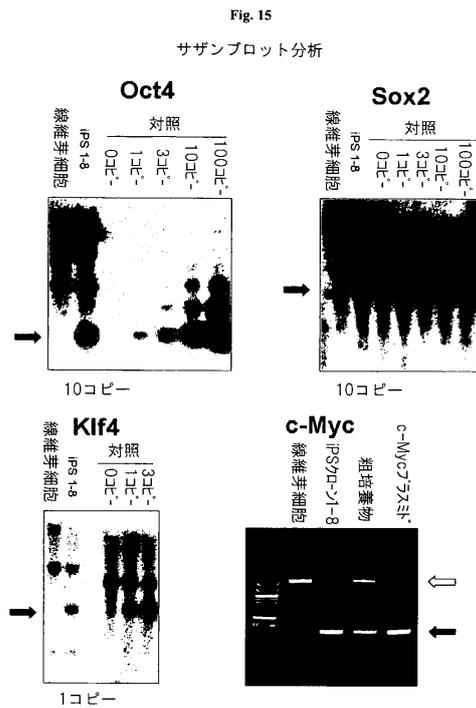
【図13】



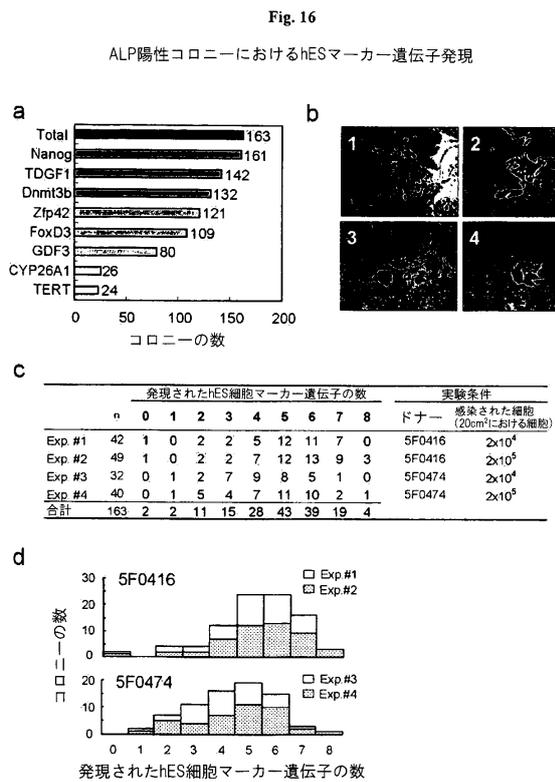
【図14】



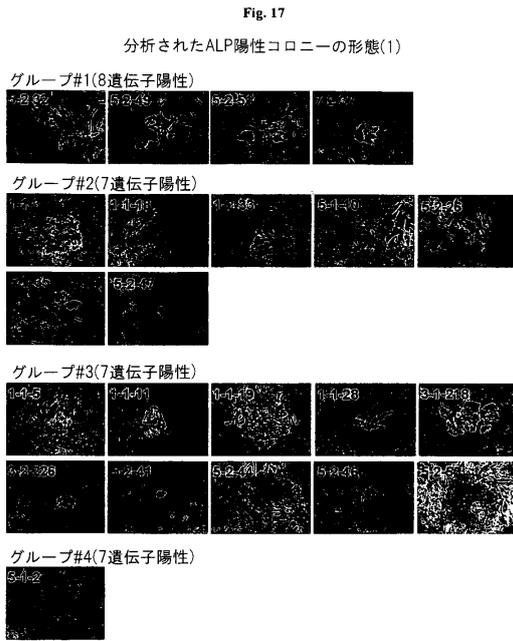
【図15】



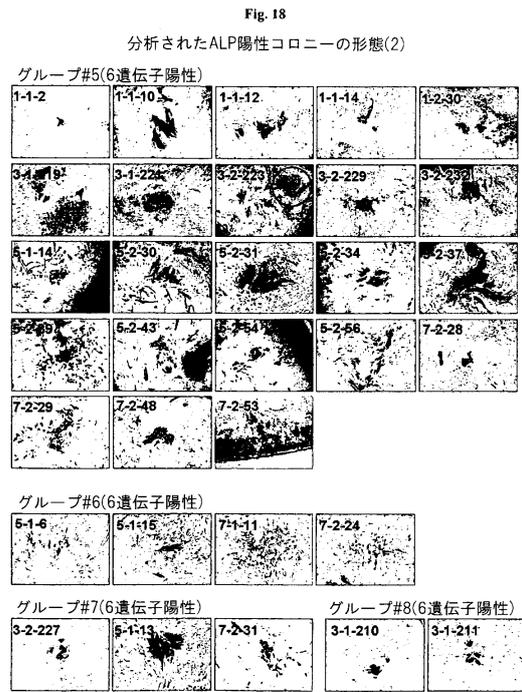
【図16】



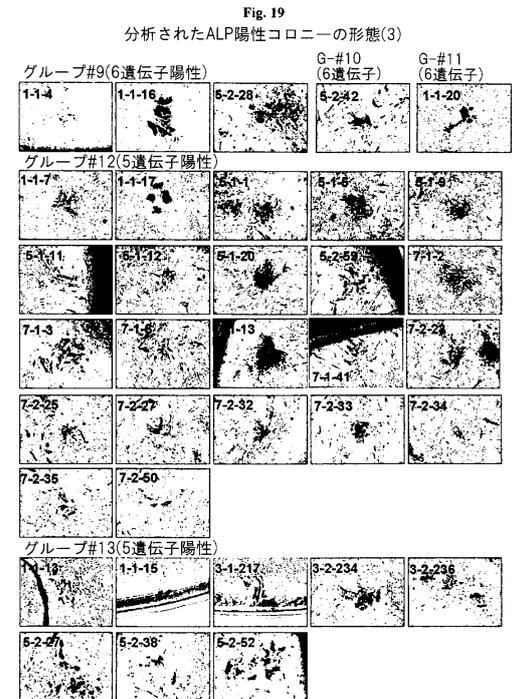
【 図 17 】



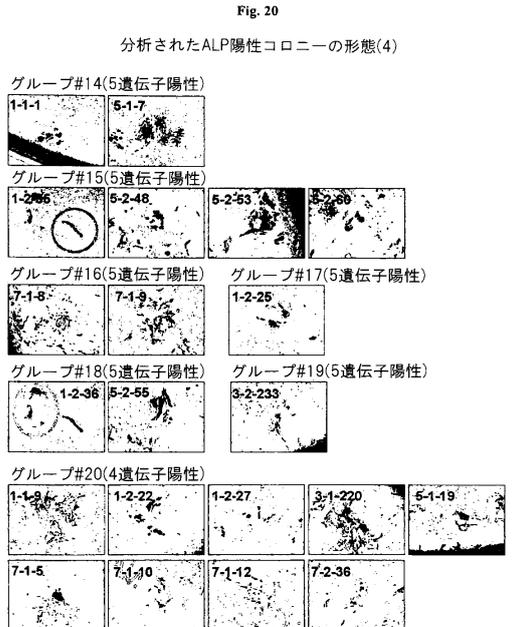
【 図 18 】



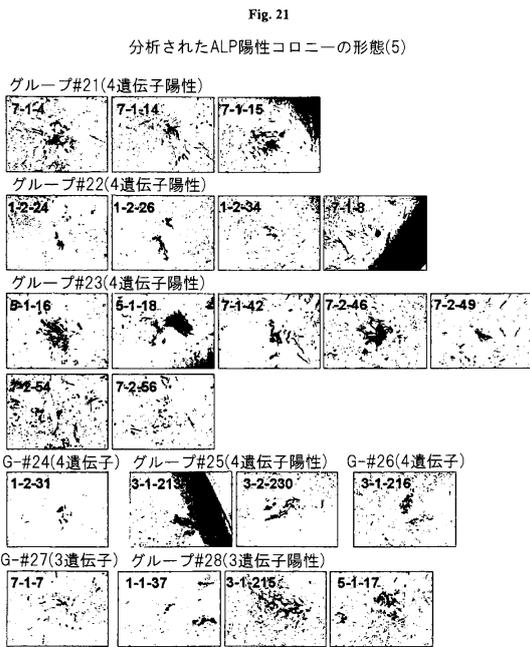
【 図 19 】



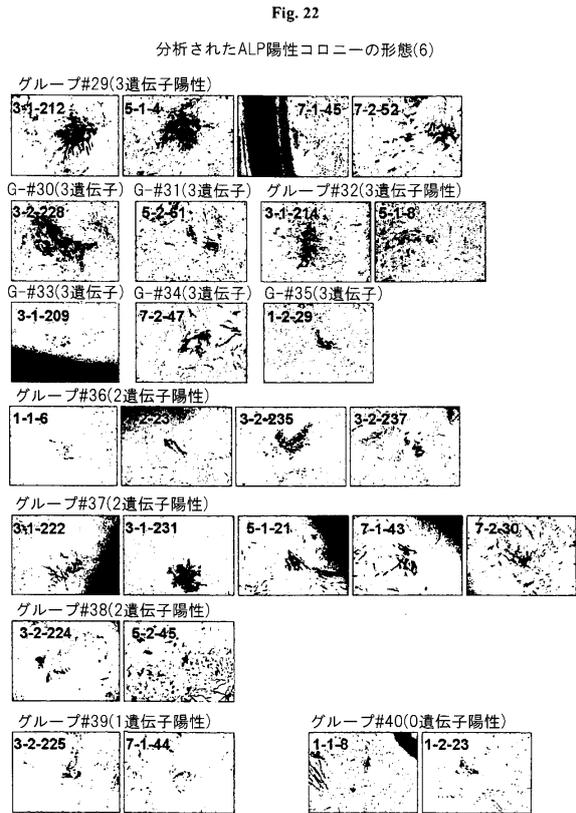
【 図 20 】



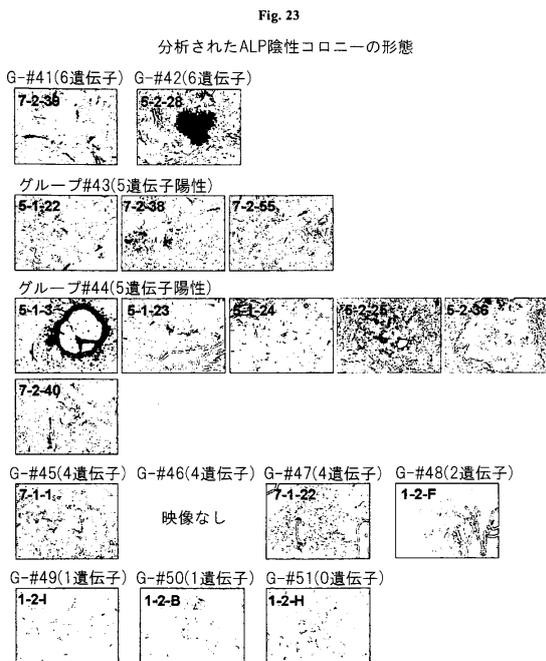
【図 2 1】



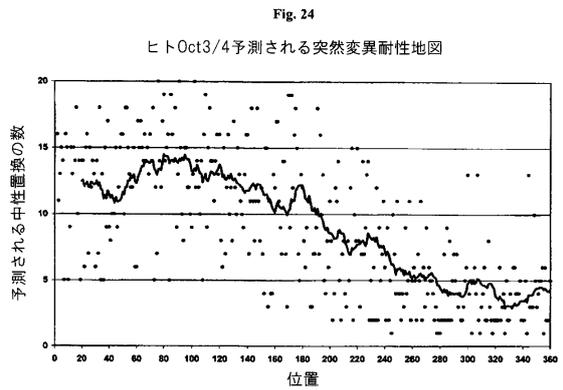
【図 2 2】



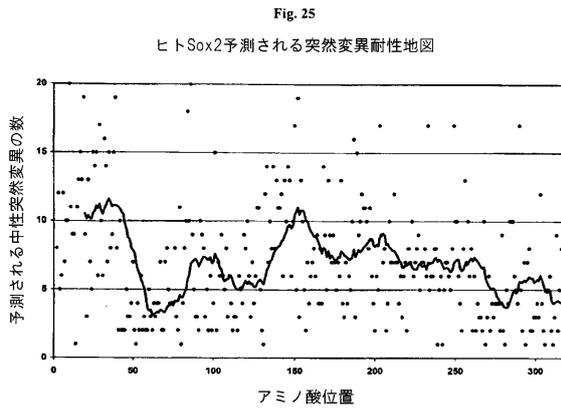
【図 2 3】



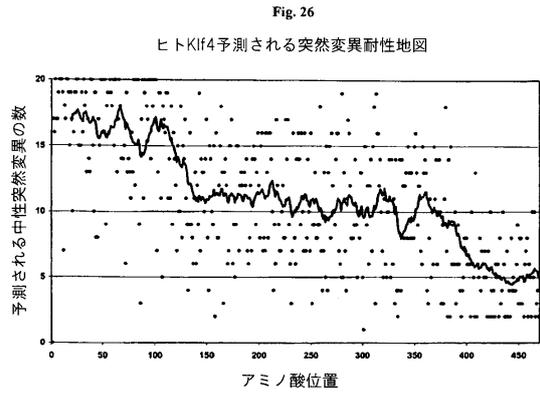
【図 2 4】



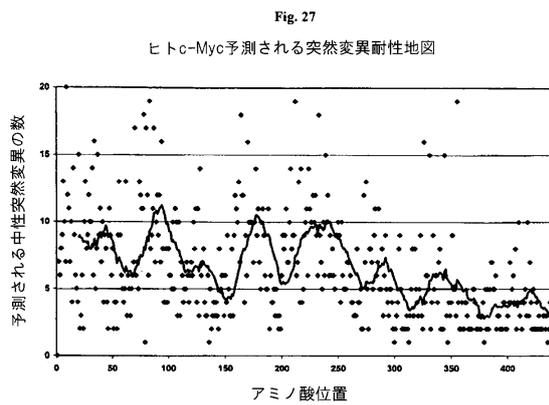
【 図 2 5 】



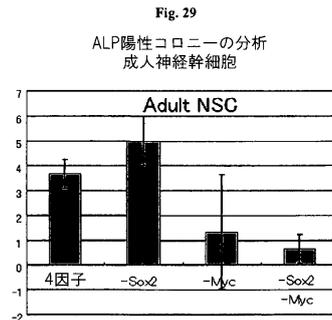
【 図 2 6 】



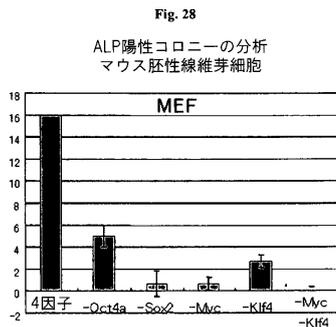
【 図 2 7 】



【 図 2 9 】



【 図 2 8 】





## フロントページの続き

(31)優先権主張番号 特願2007-159382(P2007-159382)

(32)優先日 平成19年6月15日(2007.6.15)

(33)優先権主張国 日本国(JP)

(72)発明者 正木 英樹

秋田県由利本荘市森子116

(72)発明者 石川 哲也

兵庫県神戸市中央区港島中町6-14-E-510

(72)発明者 高橋 俊一

兵庫県神戸市東灘区鴨子ヶ原1-3-8-301

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 特開2007-117081(JP, A)

国際公開第2007/069666(WO, A1)

Cell. 2006 Aug 25;126(4):663-76. Epub 2006 Aug 10.

Nature. 2007 Jul 19;448(7151):318-24. Epub 2007 Jun 6.

Nature. 2007 Jul 19;448(7151):313-7. Epub 2007 Jun 6.

Cell Stem Cell. 2007 Jun 7;1(1):55-70.

Nat Biotechnol. 2007 Jun;25(6):681-6. Epub 2007 May 27.

Biochem Biophys Res Commun. 2006 Feb 3;340(1):183-9. Epub 2005 Dec 9.

Biol Reprod. 2006 Jun;74(6):1083-9. Epub 2006 Feb 15.

Stem Cell Res. Volume 1, Issue 2, June 2008, Pages 105-115, Epub 2008 Jan 31.

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00 - 5/28

C12N 15/00 - 15/90

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

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

W P I D S / W P I X ( S T N )