

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6493881号
(P6493881)

(45) 発行日 平成31年4月3日(2019.4.3)

(24) 登録日 平成31年3月15日(2019.3.15)

(51) Int. Cl.		F I			
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	Z N A
C 1 2 N	5/078	(2010.01)	C 1 2 N	5/078	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/09	Z

請求項の数 9 (全 30 頁)

(21) 出願番号	特願2015-522837 (P2015-522837)	(73) 特許権者	504132272
(86) (22) 出願日	平成26年6月11日 (2014.6.11)		国立大学法人京都大学
(86) 国際出願番号	PCT/JP2014/065497		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(87) 国際公開番号	W02014/200030	(74) 代理人	100100549
(87) 国際公開日	平成26年12月18日 (2014.12.18)		弁理士 川口 嘉之
審査請求日	平成29年6月9日 (2017.6.9)	(74) 代理人	100126505
(31) 優先権主張番号	特願2013-123485 (P2013-123485)		弁理士 佐貫 伸一
(32) 優先日	平成25年6月12日 (2013.6.12)	(74) 代理人	100131392
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		弁理士 丹羽 武司
		(72) 発明者	山中 伸弥
			日本国京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内
		(72) 発明者	吉田 善紀
			日本国京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 人工多能性幹細胞の選別方法および血球への分化誘導方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

血球への高い分化能を有する人工多能性幹(iPS)細胞を選別する方法であって、以下の工程：

(i) サンプルとしての人工多能性幹細胞において、TRIM58、CTSF、FAM19A5およびTCERG1L遺伝子からなる群から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現のレベルを測定する工程、および

(ii) 血球への高い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくは胚性幹(ES)細胞と比較して上記で測定した遺伝子の発現のレベルが同等もしくはそれ以上の人工多能性幹細胞を選択する工程、および/または血球への低い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくはES細胞と比較して上記で測定した遺伝子の発現のレベルが高い人工多能性幹細胞を選択する工程、

を含む、方法。

【請求項2】

血球への高い分化能を有する人工多能性幹細胞を選別する方法であって、以下の工程：

(i) サンプルとしての人工多能性幹細胞において、TRIM58、CSMD1および/またはFAM19A5遺伝子のDNAメチル化状態を測定する工程、および

(ii) 血球への高い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくはES細胞と比較して上記で測定したDNAメチル化のレベルが同等もしくはそれ以下の人工多能性幹細胞を選択する工程、および/または血球への低い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくは

はES細胞と比較して上記で測定したDNAメチル化のレベルが低い人工多能性幹細胞を選択する工程、
を含む、方法。

【請求項3】

前記血球が、赤血球、血小板、単球、T細胞、B細胞、NK細胞、好中球、好酸球、好塩基球、顆粒球およびマクロファージからなる群から選択される1またはそれ以上の細胞である、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記サンプルとしての人工多能性幹細胞が、ヒトiPS細胞である、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項5】

以下の工程により人工多能性幹(iPS)細胞を選択する工程：

(1) 候補iPS細胞において、TRIM58、CTSF、FAM19A5およびTCERG1L遺伝子からなる群から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現のレベルを測定する工程、および

(2) 血球への高い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくは胚性幹(ES)細胞と比較して上記で測定した遺伝子の発現のレベルが同等もしくはそれ以上のiPS細胞を選択する工程、および/または血球への低い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくはES細胞と比較して上記で測定した遺伝子の発現のレベルが高いiPS細胞を選択する工程；並びに、

インスリン様成長因子2(IGF2)の存在下で、前記選択されたiPS細胞を培養する工程、
を含む、iPS細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞を製造する方法。

20

【請求項6】

以下の工程により人工多能性幹(iPS)細胞を選択する工程：

(1) 候補iPS細胞において、TRIM58、CSMD1および/またはFAM19A5遺伝子のDNAメチル化状態を測定する工程、および

(2) 血球への高い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくはES細胞と比較して上記で測定したDNAメチル化のレベルが同等もしくはそれ以下のiPS細胞を選択する工程、および/または血球への低い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくはES細胞と比較して上記で測定したDNAメチル化のレベルが低いiPS細胞を選択する工程；並びに、

インスリン様成長因子2(IGF2)の存在下で、前記選択されたiPS細胞を培養する工程、
を含む、iPS細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞を製造する方法。

30

【請求項7】

前記IGF2の存在下でiPS細胞を培養する工程が下記の工程：

(i) iPS細胞をBMP4およびIGF2を含有する培地中で培養する工程、

(ii) 工程(i)で得られた細胞をBMP4、bFGFおよびIGF2を含有する培地中で培養する工程、

(iii) 工程(ii)で得られた細胞をVEGF、bFGF、IL6、IL3、IL11、SCF、Flt3LおよびIGF2を含有する培地中で培養する工程、ならびに

(iv) 工程(iii)で得られた細胞をVEGF、IL6、IL3、IL11、SCF、Flt3L、EPO、TPOおよびIGF2を含有する培地中で培養する工程を含む、請求項5または6に記載の方法。

【請求項8】

前記iPS細胞をIGF2の存在下で培養する工程において、iPS細胞を胚様体の形態で培養する、請求項5～7のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項9】

前記iPS細胞がヒトiPS細胞である、請求項5～8のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規の造血幹細胞および/または造血前駆細胞の製造方法、ならびに造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導促進方法および分化誘導促進剤に関する。また本発明は、造血幹細胞および/または造血前駆細胞への高い分化効率を示す人工多能

50

性幹細胞を選別する方法、ならびにそのための試薬、マイクロアレイおよびキットに関する。さらに本発明は、血球への高い分化能を有する人工多能性幹細胞を選別する方法、ならびにそのための試薬、マイクロアレイおよびキットに関する。

【背景技術】

【0002】

白血病に代表される血液関連疾患の治療や外科的な治療においては、その治療に必要な量の血液細胞を安定に増幅し、供給することは極めて重要なことである。そのため、これまでに多くの医療関係者によって、血液細胞を確保するための種々の手段が講じられてきた。例えば、ドナーからの献血により採取したり、臍帯血または骨髄細胞から分化誘導させることが従来から行われてきた。

10

最近では、胚性幹細胞（ES細胞）や体細胞へ未分化細胞特異的遺伝子を導入することで得られる人工多能性幹（iPS）細胞（特許文献1および2）など多能性を有する細胞を用いて、血球を産生する元となる造血幹細胞または造血前駆細胞を効率的に増幅することが試みられている。

ES細胞やiPS細胞からの造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導法としては、これまでに、胚様体の形成とサイトカインの添加による方法（非特許文献1）、異種由来のストローマ細胞との共培養法（非特許文献2）、無血清培地を用いる方法（特許文献3）などが報告されている。

しかしながら、医療応用を可能にするためにはさらなる改善の必要があり、より効率の高い分化誘導方法の確立や新たな分化誘導因子の同定、分化誘導処理を施す前の段階で生産性が高い細胞を選択する方法などの開発が求められている。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】USP 5,843,780

【特許文献2】WO 2007/069666

【特許文献3】WO 2011/115308

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Chadwick et al. Blood 2003, 102:906 15

30

【非特許文献2】Niwa A et al. J Cell Physiol. 2009 Nov;221(2):367 77

【発明の概要】

【0005】

本発明の目的は、新規造血幹細胞および/または造血前駆細胞の製造方法、および造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導を促進する新規因子を提供することにある。本発明の目的はまた、造血幹細胞および/または造血前駆細胞への高い分化効率を示す人工多能性幹細胞を選別する方法を提供することにある。さらには、本発明の目的は、血球への高い分化能を有する人工多能性幹細胞を選別する方法を提供することにある。

【0006】

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、IGF2（インスリン様成長因子2）を添加することで、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導が促進することを見出した。

40

また、本発明者らは、血球への高い分化能を有するiPS/ES細胞株（Good line）と、血球への低い分化能を有するiPS/ES細胞株（Bad line）から採取したRNAを比較することにより、CTSF, FAM19A5, TRIM58, TCERG1Lなどの遺伝子がGood lineと正の相関を示すことを見出された。続いて、Good lineとBad lineのゲノムのメチル化状態を比較することにより、Mixed colony 数が多いこと（すなわち、iPS/ES細胞株が血球への高い分化能を有すること）とTRIM58、CSMD1およびFAM19A5の低メチル化状態が正の相関を示すことを見出された。

本発明は、以上のような知見を基にして完成されたものである。

50

【 0 0 0 7 】

すなわち、本発明は、次に記載の事項を提供するものである。

[1] 血球への高い分化能を有するiPS細胞を選別する方法であって、以下の工程：(i) サンプルとしての人工多能性幹細胞において、TRIM58、CTSF、FAM19A5およびTCERG1L遺伝子からなる群から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現のレベルを測定する工程、および

(ii) 血球への高い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくはES細胞と比較して上記で測定した遺伝子の発現のレベルが同等もしくはそれ以上の人工多能性幹細胞を選択する工程、および/または血球への低い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくはES細胞と比較して上記で測定した遺伝子の発現のレベルが高い人工多能性幹細胞を選択する工程、
を含む、方法。 10

[2] 血球への高い分化能を有する人工多能性幹細胞を選別する方法であって、以下の工程：(i) サンプルとしての人工多能性幹細胞において、TRIM58、CSMD1および/またはFAM19A5遺伝子のDNAメチル化状態を測定する工程、および

(ii) 血球への高い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくはES細胞と比較して上記で測定したDNAメチル化のレベルが同等もしくはそれ以下の人工多能性幹細胞を選択する工程、および/または血球への低い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくはES細胞と比較して上記で測定したDNAメチル化のレベルが低い人工多能性幹細胞を選択する工程、
を含む、方法。 20

[3] 前記血球が、赤血球、血小板、単球、T細胞、B細胞、NK細胞、好中球、好酸球、好塩基球、顆粒球およびマクロファージからなる群から選択される1またはそれ以上の細胞である、[1]または[2]に記載の方法。

[4] 前記サンプルとしての人工多能性幹細胞がヒト iPS細胞である、[1]から[3]のいずれかに記載の方法。

[5] 前記血球への高い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくはES細胞が、751A3、783F1、751B4、692D2、783A2、744A2、744B9、609A2、585B1、784D1、609A1、648B1、665A7、451F3、610B1、606A1、648A1およびkhES3からなる群から選択される1またはそれ以上の細胞である、[1]から[4]のいずれかに記載の方法。 30

[6] 前記血球への低い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくはES細胞が、427F1、khES1、TIG1204F1、H9、Kep1、454E2、253G1、KRV 1、457C1、7 KE2、201B7、TIG1074F1、246G1、409B2、201B6、253G4、404C2および588A4からなる群から選択される1またはそれ以上の細胞である、[1]から[5]のいずれかに記載の方法。

[7] TRIM58、CTSF、FAM19A5および/またはTCERG1Lの遺伝子配列に相補的な核酸または人工核酸を含む、血球への高い分化能を有する人工多能性幹細胞の選別用キット。

[8] 前記相補的な核酸が、マイクロアレイとして提供される、[7]に記載のキット。

[9] インスリン様成長因子2 (IGF2) の存在下で多能性幹細胞を培養する工程を含む、多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞を製造する方法。

[1 0] 前記IGF2の存在下で多能性幹細胞を培養する工程が下記の工程： 40

(i) 多能性幹細胞をBMP4およびIGF2を含有する培地中で培養する工程、
(ii) 工程(i)で得られた細胞をBMP4、bFGFおよびIGF2を含有する培地中で培養する工程、
(iii) 工程(ii)で得られた細胞をVEGF、bFGF、IL 6、IL 3、IL 11、SCF、Flt3LおよびIGF2を含有する培地中で培養する工程、ならびに
(iv) 工程(iii)で得られた細胞をVEGF、IL 6、IL 3、IL 11、SCF、Flt3L、EPO、TPOおよびIGF2を含有する培地中で培養する工程
を含む、[9]に記載の方法。

[1 1] 前記多能性幹細胞を培養する工程において、多能性幹細胞を胚様体の形態で培養する、[9]または[1 0]に記載の方法。

[1 2] 前記多能性幹細胞がiPS細胞である、[9]から[1 1]のいずれかに記載の方法。 50

[1 3] 前記iPS細胞がヒト iPS細胞である、[1 2]に記載の方法。

[1 4] 前記iPS細胞が、以下の工程により選択されたiPS細胞である、[1 2]または[1 3]に記載の方法：

(1) 候補iPS細胞において、TRIM58、CTSF、FAM19A5およびTCERG1L遺伝子からなる群から選択される 1 またはそれ以上の遺伝子の発現のレベルを測定する工程、および

(2) 工程 (1) において測定した発現のレベルに基づいてiPS細胞を選択する工程。

[1 5] 前記iPS細胞が、以下の工程により選択されたiPS細胞である、[1 2]または[1 3]に記載の方法：

(1) 候補iPS細胞において、TRIM58、CSMD1および / またはFAM19A5遺伝子のDNAメチル状態を測定する工程、および

(2) 工程 (1) において測定したDNAメチル化状態に基づいてiPS細胞を選択する工程。

[1 6] 有効成分としてIGF2を含有する、多能性幹細胞から造血幹細胞および / または造血前駆細胞への分化誘導促進剤。

【発明の効果】

【 0 0 0 8 】

本発明により、より効率よく多能性幹細胞から造血幹細胞および / または造血前駆細胞を分化誘導することが可能となる。また、分化誘導させる前の未分化なiPS細胞の段階でその細胞の血液分化における能力 (造血幹細胞および / または造血前駆細胞への分化効率や血球への分化能) を評価することが可能となる。したがって、本発明の提供により、効率的に、かつ、大量の血液系細胞の供給が可能となり、産業応用上、極めて有用である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 0 9 】

【図 1】図 1 は、ヒトiPS細胞から造血前駆細胞への分化誘導におけるIGF2の効果を示す。(A) IGF2の濃度を、0 ng/ml (加えない)、20 ng/ml、50 ng/ml、100 ng/mlの 4 群に振り分けて比較した。(B) IGF2 (50 ng/ml) と共に抗IGF1R抗体を添加し、造血前駆細胞への分化誘導がIGF2の効果によるものであることを確認した。

【図 2】図 2 は、IGF2と相関して発現が変動する遺伝子の探索の結果を示す。解析は、SPSS statistics (IBM) により行い、 $p < 0.05$ (unpaired t test) の遺伝子を有意とした。遺伝子間の発現の相関については、Pearsonの相関係数を用いることにより行った (相関係数を r として示す) 。

【図 3】図 3 は、血球への分化能の違いにおける遺伝子発現のマイクロアレイ比較の解析結果を示す。ヒトiPS細胞株およびヒトES細胞株を血球への高い分化能を示す細胞群と低い分化能を示す細胞群に分け、群間での遺伝子発現パターンについて比較したスクアタープロットを示す。直線は、遺伝子発現レベルが5倍以上変化していることを示す。図中、Goodは、血球への高い分化能を示す細胞、badは、血球への低い分化能を示す細胞を示す。

【図 4】図 4 は、血球への分化能の違いにおけるゲノムのメチル化状態比較の解析結果を示す。TRIM58、CSMD1およびFAM19A5の低メチル化状態がMixed colony 数の多さと正に相関していることが見出された。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 1 0 】

本発明を以下に詳細に説明する。

【 0 0 1 1 】

本発明は、IGF2の存在下で多能性幹細胞を培養する工程を含む、多能性幹細胞から造血幹細胞および / または造血前駆細胞を製造する方法を提供する。

【 0 0 1 2 】

本発明において、IGF2とは、ヒトIGF2が好ましく、例えば、NCBIのアクセッション番号NP_000603で示される配列を有するタンパク質のうち、プロセッシングにより67アミノ酸に処理された塩基性ペプチドが例示される。IGF2は、Sigma Aldrich社またはPeproTech社等から入手可能である。

【 0 0 1 3 】

10

20

30

40

50

< 多能性幹細胞 >

本発明で使用可能な多能性幹細胞は、生体に存在するすべての細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ幹細胞であり、それには、以下のものに限定されないが、例えば胚性幹(ES)細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹(ntES)細胞、精子幹細胞(「GS細胞」)、胚性生殖細胞(「EG細胞」)、人工多能性幹(iPS)細胞などが含まれる。好ましい多能性幹細胞は、ES細胞、ntES細胞、およびiPS細胞である。

【 0 0 1 4 】

(A) 胚性幹細胞

ES細胞は、ヒトやマウスなどの哺乳動物の初期胚(例えば胚盤胞)の内部細胞塊から樹立された、多能性と自己複製による増殖能を有する幹細胞である。

10

【 0 0 1 5 】

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

【 0 0 1 6 】

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

20

【 0 0 1 7 】

ES細胞作製のための培地として、例えば0.1mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM 非必須アミノ酸、2mM L-グルタミン酸、20% KSR及び4ng/ml bFGFを補充したDMEM/F12培地を使用し、37℃、5% CO₂湿潤雰囲気下でヒトES細胞を維持することができる。また、ES細胞は、3~4日おきに継代する必要があるが、このとき、継代は、例えば1mM CaCl₂及び20% KSRを含有するPBS中の0.25% トリプシン及び0.1mg/mlコラゲナーゼIVを用いて行うことができる。

30

【 0 0 1 8 】

ES細胞の選択は、一般に、アルカリホスファターゼ、Oct 3/4、Nanogなどの遺伝子マーカーの発現を指標にして行うことができる。特に、ヒトES細胞の選択では、OCT 3/4、NANOG、などの遺伝子マーカーの発現をReal Time PCR法で検出したり、細胞表面抗原であるSSEA 3、SSEA 4、TRA 1 60、TRA 1 81を免疫染色法にて検出することで行うことができる(Klimanskaya I, et al. (2006), *Nature*. 444:481-485)。

40

【 0 0 1 9 】

ヒトES細胞株である例えばKhES 1、KhES 2及びKhES 3は、京都大学再生医科学研究所(京都、日本)から入手可能である。

【 0 0 2 0 】

(B) 精子幹細胞

精子幹細胞は、精巣由来の多能性幹細胞であり、精子形成のための起源となる細胞である。この細胞は、ES細胞と同様に、種々の系列の細胞に分化誘導可能であり、例えばマウス胚盤胞に移植するとキメラマウスを作出できるなどの性質をもつ(M. Kanatsu Shinohar

50

a et al. (2003) *Biol. Reprod.*, 69:612 616; K. Shinohara et al. (2004), *Cell*, 119:1001 1012)。神経膠細胞系由来神経栄養因子(glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF))を含む培地で自己複製可能であるし、またES細胞と同様の培養条件下で継代を繰り返すことによって、精子幹細胞を得ることができる(竹橋正則ら(2008),*実験医学*,26巻,5号(増刊),41~46頁,羊土社(東京、日本))。

【 0 0 2 1 】

(C) 胚性生殖細胞

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

【 0 0 2 2 】

(D) 人工多能性幹細胞

人工多能性幹(iPS)細胞は、ある特定の核初期化物質を、DNAまたはタンパク質の形態で体細胞に導入することまたは薬剤によって当該核初期化物質の内在性のmRNAおよびタンパク質の発現を上昇させることによって作製することができる、ES細胞とほぼ同等の特性、例えば分化多能性と自己複製による増殖能、を有する体細胞由来の人工の幹細胞である(K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) *Cell*, 126: 663 676、K. Takahashi et al. (2007) *Cell*, 131: 861 872、J. Yu et al. (2007) *Science*, 318: 1917 1920、M. Nakagawa et al. (2008) *Nat. Biotechnol.*, 26: 101 106、国際公開WO 2007/069666および国際公開WO 2010/068955)。核初期化物質は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子またはES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子もしくはその遺伝子産物であればよく、特に限定されないが、例えば、Oct3/4, Klf4, Klf1, Klf2, Klf5, Sox2, Sox1, Sox3, Sox15, Sox17, Sox18, c Myc, L Myc, N Myc, TERT, SV40 Large T antigen, HPV16 E6, HPV16 E7, Bmi1, Lin28, Lin28b, Nanog, EsrrbまたはEsrrgが例示される。これらの初期化物質は、iPS細胞樹立の際には、組み合わせられて使用されてもよい。例えば、上記初期化物質を、少なくとも1つ、2つもしくは3つ含む組み合わせであり、好ましくは4つを含む組み合わせである。

【 0 0 2 3 】

上記の各核初期化物質のマウスおよびヒトcDNAのヌクレオチド配列並びに当該cDNAにコードされるタンパク質のアミノ酸配列情報は、WO 2007/069666に記載のNCBI accession numbersを参照すること、またL Myc、Lin28、Lin28b、Esrrb、EsrrgおよびGlis1のマウスおよびヒトのcDNA配列およびアミノ酸配列情報については、それぞれ下記NCBI accession numbersを参照することにより取得できる。当業者は、当該cDNA配列またはアミノ酸配列情報に基づいて、常法により所望の核初期化物質を調製することができる。

遺伝子名	マウス	ヒト
L Myc	NM 008506	NM 001033081
Lin28	NM 145833	NM 024674
Lin28b	NM 001031772	NM 001004317
Esrrb	NM 011934	NM 004452
Esrrg	NM 011935	NM 001438
Glis1	NM 147221	NM 147193

【 0 0 2 4 】

これらの核初期化物質は、タンパク質の形態で、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチドとの結合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよいし、あるいは、DNAの形態で、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター(以上、*Cell*, 126, pp.663 676, 2006; *Cell*, 131, pp.861 872, 2007; *Science*, 318, pp.1917 1920, 2007)、アデノウイルスベクター(*Science*,

322, 945 949, 2008)、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター (Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 85, 348 62, 2009) などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC、PAC)などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる(Science, 322:949 953, 2008)。ベクターには、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができる。使用されるプロモーターとしては、例えばEF1 プロモーター、CAGプロモーター、SR プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV (サイトメガロウイルス) プロモーター、RSV (ラウス肉腫ウイルス) プロモーター、MoMuLV (モロニーマウス白血病ウイルス) LTR、HSV TK (単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ) プロモーターなどが用いられる。なかでも、EF1 プロモーター、CAGプロモーター、MoMuLV LTR、CMVプロモーター、SR プロモーターなどが挙げられる。さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子(例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子など)、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質(GFP)、 グルクロニダーゼ(GUS)、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。また、上記ベクターには、体細胞への導入後、核初期化物質をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合する核初期化物質をコードする遺伝子を共に切除するために、それらの前後にLoxP配列を有してもよい。別の好ましい一実施態様においては、トランスポゾンを用いて染色体に導入遺伝子を組み込んだ後に、プラスミドベクターもしくはアデノウイルスベクターを用いて細胞に転移酵素を作用させ、導入遺伝子を完全に染色体から除去する方法が用いられ得る。好ましいトランスポゾンとしては、例えば、鱗翅目昆虫由来のトランスポゾンであるpiggyBac等が挙げられる (Kaji, K. et al., (2009), Nature, 458: 771 775、Woltjen et al., (2009), Nature, 458: 766 770、WO 2010/012077)。さらに、ベクターには、染色体への組み込みがなくとも複製されて、エピソームに存在するように、リンパ指向性ヘルペスウイルス (lymphotrophic herpes virus)、BKウイルスおよび牛乳頭腫 (Bovine papillomavirus) の起点とその複製に係る配列を含んでいてもよい。例えば、EBNA 1 およびoriPもしくはLarge TおよびSV40ori配列を含むことが挙げられる (WO 2009/115295、WO 2009/157201およびWO 2009/149233)。また、複数の核初期化物質を同時に導入するために、ポリシストロニックに発現させる発現ベクターを用いてもよい。ポリシストロニックに発現させるためには、遺伝子をコードする配列の間は、IRESまたは口蹄病ウイルス (FMDV) 2Aコード領域により結合されていてもよい (Science, 322:949 953, 2008およびWO 2009/092042、WO 2009/152529)。

【 0 0 2 5 】

核初期化に際して、iPS細胞の誘導効率を高めるために、上記の因子の他に、例えば、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤[例えば、バルプロ酸 (VPA)(Nat. Biotechnol., 26(7): 795 797 (2008))、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA (例、HDAC1 siRNA Smartpool(登録商標) (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等) 等の核酸性発現阻害剤など]、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば5' azacytidine) (Nat. Biotechnol., 26(7): 795 797 (2008))、G9aヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 [例えば、BIX 01294 (Cell Stem Cell, 2: 525 528 (2008))等の低分子阻害剤、G9aに対するsiRNA AおよびshRNA (例、G9a siRNA(human) (Santa Cruz Biotechnology)等) 等の核酸性発現阻害剤など]、L channel calcium agonist (例えばBayk8644) (Cell Stem Cell, 3, 568 574 (2008))、p53阻害剤 (例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA) (Cell Stem Cell, 3, 475 479 (2008))、Wnt Signaling activator (例えばsoluble Wnt3a) (Cell Stem Cell, 3, 132 135 (2008))、LIFまたはbFGFなどの増殖因子、ALK5阻害剤 (例えば、SB431542) (Nat. Methods, 6: 805 8 (2009))、mitogen activated protein kinase signalling 阻害剤、glycogen synthase kinase 3阻害剤 (PloS Biology, 6(10), 2237 2247 (2008))、miR 291 3p、miR 294、miR 295などのmiRNA (R.L. Judson et al., Nat. Biotech., 27

:459 461 (2009))、等を使用することができる。

【 0 0 2 6 】

薬剤によって核初期化物質の内在性のタンパク質の発現を上昇させる方法における薬剤としては、6 bromoindirubin 3' oxime、indirubin 5 nitro 3' oxime、valproic acid、2 (3 (6 methylpyridin 2 yl) 1H pyrazol 4 yl) 1,5 naphthyridine、1 (4 methylphenyl) 2 (4,5,6,7 tetrahydro 2 imino 3(2H) benzothiazolyl)ethanone HBr(pifithrin alpha)、prostaglandin J2および prostaglandin E2等が例示される (WO 2010/068955)。

【 0 0 2 7 】

iPS細胞誘導のための培養培地としては、例えば(1) 10~15%FBSを含有するDMEM、DMEM/F12またはDME培地 (これらの培地にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、puromycin、L グルタミン、非必須アミノ酸類、メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。)、(2) bFGFまたはSCFを含有するES細胞培養用培地、例えばマウスES細胞培養用培地(例えばTX WES培地、トロンボX社)または霊長類ES細胞培養用培地 (例えば霊長類(ヒト&サル)ES細胞用培地(リプロセル、京都、日本)、mTeSR 1)、などが含まれる。

【 0 0 2 8 】

培養法の例としては、たとえば、37℃、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DMEMまたはDMEM/F12培地中で体細胞と核初期化物質 (DNAまたはタンパク質) を接触させ約4~7日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞 (たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等) 上にまきなおし、体細胞と核初期化物質の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培地で培養し、該接触から約30~約45日またはそれ以上ののちにES細胞様コロニーを生じさせることができる。また、iPS細胞の誘導効率を高めるために、5~10%と低い酸素濃度の条件下で培養してもよい。

【 0 0 2 9 】

あるいは、その代替培養法として、フィーダー細胞 (たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等) 上で10%FBS含有DMEM培地 (これにはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L グルタミン、非必須アミノ酸類、メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。) で培養し、約25~約30日またはそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。

【 0 0 3 0 】

上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培地と培地交換を行う。また、核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ100cm²あたり約5×10³~約5×10⁶細胞の範囲である。

【 0 0 3 1 】

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

【 0 0 3 2 】

本明細書中で使用する「体細胞」は、哺乳動物 (例えば、ヒト、マウス、サル、ブタ、ラット等) 由来の生殖細胞以外のいかなる細胞であってもよく、例えば、角質化する上皮細胞 (例、角質化表皮細胞)、粘膜上皮細胞 (例、舌表層の上皮細胞)、外分泌腺上皮細胞 (例、乳腺細胞)、ホルモン分泌細胞 (例、副腎髄質細胞)、代謝・貯蔵用の細胞 (例、肝細胞)、境界面を構成する内腔上皮細胞 (例、I型肺胞細胞)、内鎖管の内腔上皮細胞 (例、血管内皮細胞)、運搬能をもつ繊毛のある細胞 (例、気道上皮細胞)、細胞外マトリックス分泌用細胞 (例、線維芽細胞)、収縮性細胞 (例、平滑筋細胞)、血液と免疫系の細胞 (例、Tリンパ球)、感覚に関する細胞 (例、桿細胞)、自律神経系ニューロン (例、コリン作動性ニューロン)、感覚器と末梢ニューロンの支持細胞 (例、随伴細胞)

、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、およびそれらの前駆細胞（組織前駆細胞）等が挙げられる。細胞の分化の程度や細胞を採取する動物の年齢などに特に制限はなく、未分化な前駆細胞（体性幹細胞も含む）であっても、最終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における体細胞の起源として使用することができる。ここで未分化な前駆細胞としては、たとえば神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）が挙げられる。

【0033】

本発明において、体細胞を採取する由来となる哺乳動物個体は特に制限されないが、好ましくはヒトである。

【0034】

(E) 核移植により得られたクローン胚由来のES細胞

nt ES細胞は、核移植技術によって作製されたクローン胚由来のES細胞であり、受精卵由来のES細胞とほぼ同じ特性を有している（T. Wakayama et al. (2001), Science, 292: 740 743; S. Wakayama et al. (2005), Biol. Reprod., 72:932 936; J. Byrne et al. (2007), Nature, 450:497 502）。すなわち、未受精卵の核を体細胞の核と置換することによって得られたクローン胚由来の胚盤胞の内部細胞塊から樹立されたES細胞がnt ES(nuclear transfer ES)細胞である。nt ES細胞の作製のためには、核移植技術（J.B. Cibelli et al. (1998), Nat. Biotechnol., 16:642 646）とES細胞作製技術(上記)との組み合わせが利用される(若山清香ら(2008),実験医学,26巻,5号(増刊), 47～52頁)。核移植においては、哺乳動物の除核した未受精卵に、体細胞の核を注入し、数時間培養することで再プログラム化することができる。

【0035】

(F) 融合幹細胞

体細胞と卵子もしくはES細胞とを融合させることにより、融合させたES細胞と同様な多能性を有し、さらに体細胞に特有の遺伝子も有する幹細胞である（Tada M et al. Curr Biol. 11:1553 8, 2001; Cowan CA et al. Science. 2005 Aug 26;309(5739):1369 73）。

【0036】

造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化誘導法

多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞を分化誘導する方法としては、例えば、胚様体の形成とサイトカインの添加による方法（Chadwick et al. Blood 2003, 102:906 15、Vijayaragavan et al. Cell Stem Cell 2009, 4:248 62およびSaeki et al. Stem Cells 2009, 27:59 67）、異種由来のストローマ細胞との共培養法（Niwa A et al. J Cell Physiol. 2009 Nov;221(2):367 77）、無血清培地を用いる方法（WO2011/115 308）などが挙げられるがこれらに限定されない。

【0037】

本発明において「造血幹細胞」および「造血前駆細胞」は、血液系列にコミットした細胞のうち、CD43に陽性の細胞を意味する。

【0038】

本発明において「造血前駆細胞」は、「造血幹細胞」より分化が進み、細胞の分化の方向が決定した細胞を意味する。これらの細胞は、KDR、CD34、CD90およびCD117のようなマーカーの発現により検出され得るが、マーカーはこれらに限定されない。一方、「造血幹細胞」は、T細胞、B細胞、赤血球、血小板、好酸球、単球、好中球、好塩基球などの成熟血液細胞を作り出す能力を有し、かつ自己複製能を有する細胞を意味する。本明細書における「造血前駆細胞」は、特に断りがない限り、「造血幹細胞」と区別するものではない。

【0039】

本発明において分化誘導された造血幹細胞および/または造血前駆細胞は、他の細胞種が含まれる細胞集団として提供されてもよく、あるいは純化された集団であってもよい。

【0040】

本発明の造血前駆細胞の誘導において、ES細胞、iPS細胞などの多能性幹細胞を任意の

10

20

30

40

50

方法で分離し、浮遊培養により誘導してもよく、あるいはコーティング処理された培養皿を用いて接着培養により誘導してもよい。ここで、ヒト多能性幹細胞の分離方法としては、例えば、力学的に分離する方法、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液（例えば、Accutase(TM)およびAccumax(TM)など）またはコラゲナーゼ活性のみを有する分離溶液を用いた分離方法が挙げられる。好ましくは、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液（特に好ましくは、Accutase(TM)）を用いてヒト多能性幹細胞を解離し、力学的に細かく単一細胞へ分散する方法が用いられる。ここで、使用されるヒト多能性幹細胞は、使用したディッシュに対して80%コンフルエントになるまで培養されたコロニーであることが好ましい。一方、マウス多能性幹細胞の分離方法としては、例えば、0.25% trypsin/EDTAを用いた分離方法が挙げられる。

10

【0041】

ここで、浮遊培養とは、細胞を培養皿へ非接着の状態に培養することで胚様体を形成させることであり、特に限定はされないが、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリックスなどによるコーティング処理）されていない培養皿、若しくは、人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸（poly HEMA）によるコーティング処理）した培養皿を使用して行うことができる。

【0042】

本発明において、接着培養を用いる場合、フィーダー細胞上で、またはコーティング処理された培養皿にて任意の培地中で培養してもよい。ここで、フィーダー細胞とは、目的の細胞の培養条件を整えるために用いる補助的役割を果たす他の細胞を意味するものであり、例えば、哺乳類胎仔のAGM領域から得られた細胞（例えば、AGM S3細胞株：特開2001-37471）、マウス間葉系細胞（例えば、C3H10T1/2細胞株：理研BioResource Centerより入手可能）、または骨髄に由来する間質細胞（ストローマ細胞）（例えば、OP9細胞株）が用いられ得る。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル（BD）、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられる。

20

【0043】

本発明において、造血前駆細胞を誘導する培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えば、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Stem Pro34 (Invitrogen)、およびこれらの混合培地などが包含される。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清でもよい。必要に応じて、培地は、例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement(KSR)(ES細胞培養時のFBSの血清代替物)、N2サプリメント (Invitrogen)、B27サプリメント (Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2メルカプトエタノール(2ME)、チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、Lグルタミン、Glutamax (Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有し得る。

30

40

【0044】

本発明において、接着培養を用いる場合、造血前駆細胞への分化における培地は、好ましくは、vascular endothelial growth factor (VEGF)を含んでいる。培地におけるVEGFの濃度は、例えば、1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、75ng/ml、100ng/ml、200ng/ml、300ng/ml、400ng/ml、500ng/ml、1μg/mlであるがこれらに限定されない。好ましくは、20ng/mlである。

【0045】

本発明において、接着培養を用いる場合、さらに好ましい培地は、10%FBS、VEGF、トランスフェリン、Lグルタミン、monothioglycerol(MTG)およびアスコルビン酸を含有するMEM培地（HPC分化培地ともいう）であり得る。

50

【 0 0 4 6 】

本発明において、接着培養を用いる場合、培養日数は、例えば20日以下の培養であり、好ましくは、12 14日、特に好ましくは、13日である。

【 0 0 4 7 】

本発明において、接着培養を用いる場合、フィーダー細胞を除去して造血前駆細胞を濃縮・精製する工程を含むことができる。当該工程は、造血前駆細胞をフィーダー細胞と共に培養皿から引き剥がした後にフィーダー細胞のみを回収および除去することにより達成され得る。培養皿から引き剥がす方法としては、例えば、力学的に分離する方法、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液またはコラゲナーゼ活性のみを有する分離溶液を用いた分離方法が挙げられるがこれらに限定されない。例えば、collagenase Type IVおよび/またはTrypsin/EDTAを用いた方法が使用される。造血前駆細胞の分離方法として、好ましくは、0.05%trypsin/EDTAが用いられる。

【 0 0 4 8 】

本発明において、浮遊培養を用いる場合、造血前駆細胞への分化誘導は、例えば、下記の工程により行われてもよい：

- (i) EBを形成する工程、
- (ii) 原条(primitive streak) / 中胚葉を形成する工程、
- (iii) 造血前駆細胞へ特化させる工程、および
- (iv)造血前駆細胞を増殖および拡大させる工程。

【 0 0 4 9 】

上記各工程において、目的の細胞を誘導するため、あるいは各工程における目的を達成するために基本培地へ必要な任意の物質を添加した培地を用いることができる。例えば、各工程において下記の物質を添加した培地が用いられる：

- (i) BMP 4、
- (ii) BMP4およびbFGF、
- (iii) VEGF、bFGF、IL 6、IL 3、IL 11、SCFおよびFlt3L、ならびに
- (iv) VEGF、IL 6、IL 3、IL 11、SCF、Flt3L、EPOおよびTPO。

【 0 0 5 0 】

前記工程(i)から(iv)において用いられる基礎培地は、好ましくは、L グルタミン酸、チオグリセロールおよびアスコルビン酸を補充したStemPro 34である。

【 0 0 5 1 】

前記工程(i)および(ii)の培地におけるBMP 4の濃度は、EBを形成できる濃度であればいくらかでもよいが、好ましくは1ng/ml ~ 100ng/ml、例えば、1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、75ng/ml、100ng/mlであり、特に好ましくは、10ng/mlである。

【 0 0 5 2 】

前記工程(ii)および(iii)の培地におけるbFGFの濃度は、好ましくは100pg/ml ~ 20ng/ml、例えば、100pg/ml、250pg/ml、500pg/ml、750pg/ml、1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/mlであるがこれらに限定されない。特に好ましくは、各工程で1ng/mlまたは5ng/mlである。

【 0 0 5 3 】

前記工程(iii)および(iv)の培地におけるVEGFの濃度は、好ましくは1ng/ml ~ 100ng/ml、例えば、1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、75ng/ml、100ng/mlであるがこれらに限定されない。特に好ましくは、10ng/mlである。

【 0 0 5 4 】

前記工程(iii)および(iv)の培地におけるIL 6の濃度は、好ましくは1ng/ml ~ 100ng/ml、例えば、1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、75ng/ml、100ng/mlであるがこれらに限定されない。特に好ましくは、10ng/mlである。

【 0 0 5 5 】

前記工程(iii)および(iv)の培地におけるIL 3の濃度は、好ましくは1ng/ml ~ 100ng/ml

、例えば、1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、75ng/ml、100ng/mlであるがこれらに限定されない。特に好ましくは、40ng/mlである。

【0056】

前記工程(iii)および(iv)の培地におけるIL 11の濃度は、好ましくは500pg/ml～50ng/ml、例えば、500pg/ml、750pg/ml、1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/mlであるがこれらに限定されない。特に好ましくは、5ng/mlである。

【0057】

前記工程(iii)および(iv)の培地におけるSCFの濃度は、好ましくは1ng/ml～500ng/ml、例えば、1ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、75ng/ml、100ng/ml、200ng/ml、300ng/ml、400ng/ml、500ng/mlであるがこれらに限定されない。特に好ましくは、100ng/mlである。

10

【0058】

前記工程(iii)および(iv)の培地におけるFLT3Lの濃度は、好ましくは1ng/ml～500ng/ml、例えば、1ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、75ng/ml、100ng/ml、200ng/ml、300ng/ml、400ng/ml、500ng/mlであるがこれらに限定されない。特に好ましくは、100ng/mlである。

【0059】

前記工程(iv)の培地におけるEPOの濃度は、好ましくは1U/ml～10U/ml、例えば、1U/ml、2U/ml、3U/ml、4U/ml、5U/ml、6U/ml、7U/ml、8U/ml、9U/ml、10U/mlであるがこれらに限定されない。特に好ましくは、4U/mlである。

【0060】

前記工程(iv)の培地におけるTPOの濃度は、好ましくは1ng/ml～100ng/ml、例えば、1ng/ml、5ng/ml、10ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、75ng/ml、100ng/mlであるがこれらに限定されない。特に好ましくは、50ng/mlである。

20

【0061】

前記工程(i)の培養時間は、例えば5日以下の培養であり、好ましくは、1～3日であり、特に好ましくは1日である。

【0062】

前記工程(ii)の培養時間は、例えば10日以下の培養であり、好ましくは、1～5日であり、特に好ましくは3日である。

【0063】

前記工程(iii)の培養時間は、例えば10日以下の培養であり、好ましくは、2～6日であり、特に好ましくは4日である。

30

【0064】

前記工程(iv)の培養時間は、例えば20日以下の培養であり、好ましくは、5～15日であり、特に好ましくは12日である。

【0065】

本発明において、造血幹細胞および/または造血前駆細胞の分化誘導を促進するために、培養培地中にIGF2を添加する。前記工程(i)から(iv)において、IGF2は、全工程にわたって添加されてもよく、特定の工程において添加されてもよい。例えば、IGF2の添加は、下記の工程において行われる：

- (1) 工程(i)、
- (2) 工程(i)および工程(ii)、
- (3) 工程(i)～工程(iii)、
- (4) 工程(i)～工程(iv)、
- (5) 工程(i)および工程(iii)、
- (6) 工程(i)、工程(iii)および工程(iv)、
- (7) 工程(i)および工程(iv)、
- (8) 工程(i)、工程(ii)および工程(iv)、
- (9) 工程(ii)、
- (10) 工程(ii)および工程(iii)、
- (11) 工程(ii)～工程(iv)、

40

50

- (1 2) 工程(ii)および工程(iv)、
 (1 3) 工程(iii)、または
 (1 4) 工程(iii)および工程(iv)。

【 0 0 6 6 】

前記工程(i)から(iv)において添加されるIGF2の濃度は、全工程にわたって同一の濃度であってもよく、工程毎に異なる濃度であってもよい。前記工程(i)から(iv)において添加されるIGF2の濃度は、好ましくは1ng/ml~500ng/ml、例えば、1ng/ml、25ng/ml、50ng/ml、75ng/ml、100ng/ml、200ng/ml、300ng/ml、400ng/ml、500ng/mlであるがこれらに限定されない。

【 0 0 6 7 】

上記製造工程(ii)の終了後において中胚葉の細胞群を純化・精製する工程を含むことができる。中胚葉の細胞群の純化・精製は、中胚葉の細胞群を含む細胞の集団から中胚葉の細胞群を高い純度で分離できる方法であれば何を用いてもよく、例えば、フローサイトメトリーによる純化・精製が挙げられる。本発明においては、純化・精製された中胚葉の集団に未分化な細胞が含まれないよう、さらにSSEA 1陰性(すなわち、SSEA 1-)であることを指標として細胞を選択し得る。Flk1陽性(すなわち、Flk1+)およびSSEA 1-の細胞を選択する工程は同時に行われてもよく、別々の工程として行われてもよい。例えば、Flk1+/SSEA 1-である細胞の選択は、フローサイトメトリーを用いて同時に行うことができる。

【 0 0 6 8 】

本工程において、培養温度は、以下に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われる。CO₂濃度は、約2~5%、好ましくは5%である。本工程は、低酸素条件下で行うことも可能であり、その場合における酸素濃度は、特に限定されないが、1~10%であり、好ましくは、5%である。

【 0 0 6 9 】

本工程において、培地はさらに、ROCK阻害剤を含んでいてもよい。特に、本工程がヒト多能性幹細胞を単一細胞へ分散させる工程を含む場合には、培地にROCK阻害剤が含まれていることが好ましい。ROCK阻害剤は、Rhoキナーゼ(ROCK)の機能を抑制できるものである限り特に限定されないが、例えば、Y 27632が本発明において使用され得る。

【 0 0 7 0 】

造血幹細胞および/または造血前駆細胞への高い分化効率を示す細胞の選別方法

本発明は前述のように樹立したiPS細胞の、IGF2、T、HOXB4、GATA2、CEBPA、MESP1、CD34、BMP4、EOMES、SOX17、GATA6、GATA4およびSNAI2からなる群から選択される1またはそれ以上の遺伝子の高発現もしくは低発現を指標として、造血幹細胞および/または造血前駆細胞への高い分化効率を示す細胞のみを選別することができる。

【 0 0 7 1 】

本明細書において使用される「造血幹細胞および/または造血前駆細胞への高い分化効率を示す細胞」なる用語は、造血幹細胞および/または造血前駆細胞への指向性が相対的に高い細胞であって、中胚葉分化に重要である遺伝子および/または造血幹細胞分化に重要である遺伝子の発現が高い細胞を意味する。「造血幹細胞および/または造血前駆細胞への高い分化効率を示す細胞」は、例えば、当分野における通常の方法により造血細胞系列への分化誘導を行った際に、585A1、H9、TIG1204F1、KRV 1、khES3、7 KE2、TIG1074F1、201B6、454E2、610B1、665A7または253G4と同等もしくはそれよりも多くの数の造血幹細胞および/または造血前駆細胞が誘導される細胞であり得る。一方、本明細書において使用される「造血幹細胞および/または造血前駆細胞への低い分化効率を示す細胞」なる用語は、造血幹細胞および/または造血前駆細胞への指向性が相対的に低い細胞であって、中胚葉分化に重要である遺伝子および/または造血幹細胞分化に重要である遺伝子の発現が低い細胞を意味する。「造血幹細胞および/または造血前駆細胞への低い分化効率を示す細胞」は、例えば、当分野における通常の方法により造血細胞系列への分化誘導を行った際に、589B1、648B1、751A3、451F3、427F1、609A1、744A2、751B4、783F1、784D1、

10

20

30

40

50

246G1または588A4と同等もしくはそれよりも少ない数の造血幹細胞および/または造血前駆細胞が誘導される細胞であり得る。

【0072】

中胚葉分化に重要である遺伝子としては、例えば、IGF2、GATA6、GATA4、SNAI2、MESP1、EOMES、SOX17、BMP4、CDX2、MESP2、SNAILが挙げられるが、これらに限定されない。造血幹細胞分化に重要である遺伝子としては、例えば、GATA2、HOXB4、CEBPA、SOX17が挙げられるが、これらに限定されない。

【0073】

各遺伝子に関するヒト及びマウス由来の遺伝子の配列情報は、表1に記載されるNCBI(米国) accession numbersを参照することにより取得することができる。

10

【表1】

表1：指標となる遺伝子

遺伝子名	NCBI Accession NO.	
	マウス	ヒト
IGF2	NM_010514	NM_000612
T (Brachyury)	NM_009309	NM_003181
HOXB4	NM_010459	NM_024015
GATA2	NM_008090	NM_001145661
CEBPA	NM_007678	NM_004364
MESP1	NM_008588	NM_018670
CDX2	NM_007673	NM_001265
BMP4	NM_007554	NM_001202
EOMES	NM_010136	NM_005442
SOX17	NM_011441	NM_022454
GATA6	NM_010258	NM_005257
GATA4	NM_008092	NM_002052
SNAI2	NM_011415	NM_003068

【0074】

前記遺伝子を検出する方法は、特に限定されないが、例えば、ノーザンブロットティング、*in situ*ハイブリダイゼーションなどのハイブリダイゼーション、RNAaseプロテクションアッセイ、PCR法、リアルタイムPCR法、及びマイクロアレイ法などが挙げられる。

【0075】

好ましい検出方法は、生物学的試料からmRNAを含む全RNAを抽出し、ポリTカラムを用いてmRNAを取得し、逆転写反応によりcDNAを合成し、ファージもしくはPCRクローニング法で増幅し、標的DNAに相補的な約20 mer~70 mer又はそれ以上のサイズのプローブとのハイブリダイゼーション、或いは、約20 mer~30 merのサイズのプライマーを用いる定量PCR、などによって行うことができる。ハイブリダイゼーションやPCRでの標識としては、蛍光標識を使用することができる。蛍光標識は、シアン、フルオレサミン、ローダミン、それらの誘導体、例えばCy3、Cy5、FITC、TRITCなどを用いることができる。

【0076】

造血幹細胞および/または造血前駆細胞への高い分化効率を示すiPS細胞を選別するに際し、造血幹細胞および/または造血前駆細胞への高い分化効率を示すことが既知であるiPS細胞もしくは胚性幹細胞(ES細胞)について上記の方法で検出したIGF2、T、HOXB4、GATA2、CEBPA、MESP1、CDX2、BMP4、EOMES、SOX17、GATA6、GATA4およびSNAI2からなる50群

から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現レベルの値を基準値（陽性基準値）として設定し、この基準値と同等もしくはそれ以上である対象iPS細胞を、造血幹細胞および/または造血前駆細胞への高い分化効率を示すiPS細胞として選別してもよい。

【0077】

同様に、造血幹細胞および/または造血前駆細胞への低い分化効率を示すことが既知であるiPS細胞もしくは胚性幹細胞（ES細胞）について上記の方法で検出したIGF2、T、HOXB4、GATA2、CEBPA、MESP1、CDX2、BMP4、EOMES、SOX17、GATA6、GATA4およびSNAI2からなる群から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現レベルの値を基準値（陰性基準値）として設定し、この基準値より高い対象iPS細胞を、造血幹細胞および/または造血前駆細胞への高い分化効率を示すiPS細胞として選別してもよい。

10

【0078】

また、造血幹細胞および/または造血前駆細胞への高い分化効率を示すことが既知であるiPS細胞もしくは胚性幹細胞（ES細胞）について上記の方法で検出したIGF2、T、HOXB4、GATA2、CEBPA、MESP1、CDX2、BMP4、EOMES、SOX17、GATA6、GATA4およびSNAI2からなる群から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現レベルの値を基準値（陰性基準値）として設定し、この基準値未満である対象iPS細胞を、造血幹細胞および/または造血前駆細胞への低い分化効率を示すiPS細胞として除外することにより、造血幹細胞および/または造血前駆細胞への高い分化効率を示すiPS細胞を選別してもよい。

【0079】

また、造血幹細胞および/または造血前駆細胞への低い分化効率を示すことが既知であるiPS細胞もしくは胚性幹細胞（ES細胞）について上記の方法で検出したIGF2、T、HOXB4、GATA2、CEBPA、MESP1、CDX2、BMP4、EOMES、SOX17、GATA6、GATA4およびSNAI2からなる群から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現レベルの値を基準値（陽性基準値）として設定し、この基準値と同等もしくはそれ以下である対象iPS細胞を、造血幹細胞および/または造血前駆細胞への低い分化効率を示すiPS細胞として除外することにより、造血幹細胞および/または造血前駆細胞への高い分化効率を示すiPS細胞を選別してもよい。

20

【0080】

血球への高い分化能を有する細胞の選別方法

本発明は前述のように樹立したiPS細胞の、TRIM58、CTSF、FAM19A5およびTCERG1L遺伝子からなる群から選択される1またはそれ以上の遺伝子の高発現もしくは低発現、或いは、TRIM58、CSMD1および/またはFAM19A5遺伝子のDNAの低メチル化もしくは高メチル化を指標として、血球への高い分化能を有する細胞のみを選別することができる。

30

【0081】

本明細書において使用される「血球への高い分化能を有する細胞」なる用語は、血球への指向性が相対的に高い細胞を意味する。「血球への高い分化能を有する」とは、例えば、コロニー形成アッセイにおいて少なくとも1つ以上のコロニーを形成することができることを意味する。「血球への高い分化能を有する細胞」は、例えば、コロニー形成アッセイにおいて、751A3、783F1、751B4、692D2、783A2、744A2、744B9、609A2、585B1、784D1、609A1、648B1、665A7、451F3、610B1、606A1、648A1またはkhES3と同等もしくはそれよりも多くの数のコロニーを形成することができる細胞であり得る。「血球への高い分化能を有することが既知である細胞」としては、例えば、751A3、783F1、751B4、692D2、783A2、744A2、744B9、609A2、585B1、784D1、609A1、648B1、665A7、451F3、610B1、606A1、648A1および/またはkhES3等が挙げられるが、これらに限定されない。一方、本明細書において使用される「血球への低い分化能を有する細胞」なる用語は、血球への指向性が相対的に低い細胞を意味する。「血球への低い分化能を有する」とは、例えば、コロニー形成アッセイにおいて全くコロニーを形成することができないか、あるいは実質的にそれと同一であることを意味する。「血球への低い分化能を有する細胞」は、例えば、コロニー形成アッセイにおいて、427F1、khES1、TIG1204F1、H9、Kep1、454E2、253G1、KRV 1、457C1、7 KE2、201B7、TIG1074F1、246G1、409B2、201B6、253G4、404C2または588A4と同等

40

50

もしくはそれよりも少ない数のコロニーを形成する細胞であり得る。「血球への低い分化能を有することが既知である細胞」としては、例えば、427F1、khES1、TIG1204F1、H9、K ep1、454E2、253G1、KRV 1、457C1、7 KE2、201B7、TIG1074F1、246G1、409B2、201B6、2 53G4、404C2および/または588A4等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0082】

本発明において「血球」は、血液中に存在する細胞成分を意味し、例えば、赤血球、血小板、単球、T細胞、B細胞、NK細胞、好中球、好酸球、好塩基球、顆粒球およびマクロファージからなる群から選択される1またはそれ以上の細胞であり得るが、これらに限定されない。好ましくは、「血球」は、コロニーアッセイにより発生する細胞、例えば、赤血球、顆粒球および/またはマクロファージであり得る。

10

【0083】

各遺伝子に関するヒト及びマウス由来の遺伝子の配列情報は、表2に記載されるNCBI(米国) accession numbersを参照することにより取得することができる。ただし、遺伝子配列は種差等により変化(variation)が存在するため、これらの配列には限定されない。

【表2】

表2：指標となる遺伝子

遺伝子名	NCBI Accession NO.	
	マウス	ヒト
TRIM58	NM_001039047	NM_015431 (配列番号1)
CTSF	NM_019861	NM_003793 (配列番号2)
FAM19A5	NM_134096	NM_001082967 (配列番号3)
TCERG1L	NM_183289	NM_174937 (配列番号4)
CSMD1	NM_053171	NM_033225 (配列番号5)

【0084】

前記遺伝子を検出する方法は、特に限定されないが、例えば、ノーザンブロットティング、*in situ*ハイブリダイゼーションなどのハイブリダイゼーション、RNAaseプロテクションアッセイ、PCR法、リアルタイムPCR法、及びマイクロアレイ法などが挙げられる。

30

【0085】

好ましい検出方法は、生物学的試料からmRNAを含む全RNAを抽出し、ポリTカラムを用いてmRNAを取得し、逆転写反応によりcDNAを合成し、ファージもしくはPCRクローニング法で増幅し、標的DNAに相補的な約20 mer~70 mer又はそれ以上のサイズのプロープとのハイブリダイゼーション、或いは、約20 mer~30 merのサイズのプライマーを用いる定量PCR、などによって行うことができる。ハイブリダイゼーションやPCRでの標識としては、蛍光標識を使用することができる。蛍光標識は、シアン、フルオレサミン、ローダミン、それらの誘導体、例えばCy3、Cy5、FITC、TRITCなどを用いることができる。

40

【0086】

血球への高い分化能を有するiPS細胞を選別するに際し、血球への高い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくは胚性幹細胞(ES細胞)について上記の方法で検出したTRIM58、CTSF、FAM19A5およびTCERG1Lからなる群から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現レベルの値を基準値として設定し、この基準値(陽性基準値)と同等もしくはそれ以上である対象iPS細胞を、血球への高い分化能を有するiPS細胞として選別してもよい。

【0087】

同様に、血球への低い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくは胚性幹細胞(E

50

S細胞)について上記の方法で検出したTRIM58、CTSF、FAM19A5およびTCERG1Lからなる群から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現レベルの値を基準値(陰性基準値)として設定し、この基準値より高い対象iPS細胞を、血球への高い分化能を有するiPS細胞として選別してもよい。

【0088】

また、血球への高い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくは胚性幹細胞(ES細胞)について上記の方法で検出したTRIM58、CTSF、FAM19A5およびTCERG1Lからなる群から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現レベルの値を基準値(陰性基準値)として設定し、この基準値未満である対象iPS細胞を、血球への低い分化能を有するiPS細胞として除外することにより、血球への高い分化能を有するiPS細胞を選別してもよい。

10

【0089】

また、血球への低い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくは胚性幹細胞(ES細胞)について上記の方法で検出したTRIM58、CTSF、FAM19A5およびTCERG1Lからなる群から選択される1またはそれ以上の遺伝子の発現レベルの値を基準値(陽性基準値)として設定し、この基準値と同等もしくはそれ以下である対象iPS細胞を、血球への低い分化能を有するiPS細胞として除外することにより、血球への高い分化能を有するiPS細胞を選別してもよい。

【0090】

さらに本発明において、TRIM58、CSMD1および/またはFAM19A5遺伝子領域の遺伝子発現制御に関するDNAのメチル化状態を測定することで、血球への高い分化能を有するiPS細胞を選別してもよい。

20

【0091】

DNAメチル化状態の測定方法としては、公知のメチル化解析方法を用いることができる。例えば、制限酵素を用いて非メチル化認識配列を切断して調べる方法が知られている。DNAをメチル化感受性制限酵素で処理すると、メチル化されていない認識部位は切断され、生じたDNAを電気泳動後、サザンブロッティング等を行い、検出したバンドの長さの違いから、対象となる領域のメチル化の有無を判定することができる。

【0092】

メチル化感受性制限酵素は、SmaI及びHpaIIを例示することができ、好ましくはSmaIである。メチル化感受性酵素と同じ認識配列を認識する非メチル化感受性酵素は当業者が容易に知ることができ、これをメチル化感受性酵素と組み合わせることができる。

30

【0093】

また、DNAメチル化状態の測定方法として、亜硫酸水素塩(バイサルファイト)を用いることができる。DNAをバイサルファイト処理すると、非メチル化シトシンのみがウラシルに変換され、メチル化シトシンは変換されずシトシンのままとなる。バイサルファイトシーケンシング法では、バイサルファイト処理したゲノム領域をPCR増幅してクローニング後、シーケンシングを行うことにより、DNAメチル化の有無を知ることができる。また、COBRA(Combined bisulfite restriction analysis)法を用いてバイサルファイト処理後のDNAを、制限酵素で切断して制限酵素認識部位の残存の有無を調べることにより、DNAメチル化の有無を検出してもよい。さらに、バイサルファイト処理前後の配列の違いをPCRプライマーに認識させ、PCR産物の有無によって、メチル化DNA及び非メチル化DNAの有無を判別するメチル化特異的PCRを用いることができる。この他にも、メチル化特異的オリゴヌクレオチド(MSO)マイクロアレイ、もしくはDNAメチル化特異的抗体を用いてDNAメチル化されている領域のDNA配列を抽出し、PCRを行いシーケンシングする方法により特定の領域のDNAのメチル化状態を検出する染色体免疫沈降法(ChIP:Chromatin Immuno Precipitation)を用いてもよい。

40

【0094】

血球への高い分化能を有するiPS細胞を選別するに際し、血球への高い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくは胚性幹細胞(ES細胞)について上記の方法で検出したTRIM58、CSMD1および/またはFAM19A5遺伝子領域について両染色体のDNAのメチル化の値を

50

基準値（陽性基準値）として設定し、この基準値と同等もしくはそれ以下である対象iPS細胞を、血球への高い分化能を有するiPS細胞として選別してもよい。

【0095】

同様に、血球への低い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくは胚性幹細胞（ES細胞）について上記の方法で検出したTRIM58、CSMD1および/またはFAM19A5遺伝子領域について両染色体のDNAのメチル化の値を基準値（陰性基準値）として設定し、この基準値より低い対象iPS細胞を、血球への高い分化能を有するiPS細胞として選別してもよい。

【0096】

また、血球への高い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくは胚性幹細胞（ES細胞）について上記の方法で検出したTRIM58、CSMD1および/またはFAM19A5遺伝子領域について両染色体のDNAのメチル化の値を基準値（陰性基準値）として設定し、この基準値より高い対象iPS細胞を、血球への低い分化能を有するiPS細胞として除外することにより、血球への高い分化能を有するiPS細胞を選別してもよい。

【0097】

また、血球への低い分化能を有することが既知であるiPS細胞もしくは胚性幹細胞（ES細胞）について上記の方法で検出したTRIM58、CSMD1および/またはFAM19A5遺伝子領域について両染色体のDNAのメチル化の値を基準値（陽性基準値）として設定し、この基準値と同等もしくはそれ以上である対象iPS細胞を、血球への低い分化能を有するiPS細胞として除外することにより、血球への高い分化能を有するiPS細胞を選別してもよい。

【0098】

メチル化されたDNAの割合を検出する方法としては、例えば、制限酵素を用いて非メチル化認識配列を切断して調べる方法の場合、DNAを断片化した後、サザンブロッティング法により定量し、断片化されなかったDNAと断片化されたDNAの量を比較することで算出することができる。一方、パイサルファイトシーケンス法の場合、任意に選択された染色体がシーケンシングされるため、PCR産物をクローニングしたテンプレートを、複数回、例えば2回以上、好ましくは5回以上、より好ましくは10回以上、繰り返しシーケンシングし、シーケンシングしたクローン数に対するDNAのメチル化が検出されたクローン数を比較することで割合を算出することができる。ここで、パイロシーケンス法を用いた場合では、シトシンとチミンの割合により直接測定することもできる。また、DNAメチル化特異的抗体を用いた染色体免疫沈降法（ChIP：Chromatin Immuno Precipitation）の場合は、沈降した目的のDNAの量と沈降前の該DNA量とをPCRで検出し、比較することで、DNAのメチル化の割合を検出することができる。

【0099】

造血幹細胞および/または造血前駆細胞への高い分化効率を示す細胞の選別用キット

本発明は、造血幹細胞および/または造血前駆細胞への高い分化効率を示す多能性幹細胞、好ましくは人工多能性幹細胞を選別するために有用なキットを提供する。本発明に係る造血幹細胞および/または造血前駆細胞への高い分化効率を示す細胞の選別用キットは、前述の測定方法による遺伝子測定用キット、マイクロアレイ、またはDNAメチル化測定用キットを含むがこれらに限定されない。

【0100】

本発明において、測定の標的とされる遺伝子は、例えば、IGF2、T、HOXB4、GATA2、~~CEB~~^{CEB}、MESP1、CDX2、BMP4、EOMES、SOX17、GATA6、GATA4およびSNAI2からなる群から選ばれる1またはそれ以上の遺伝子であり得る。好ましくは、IGF2遺伝子が測定の対象となる。

【0101】

遺伝子測定用キットは、遺伝子の標的DNAまたはmRNAに相補的な約20 mer～70 mer又はそれ以上のサイズの核酸或いは人工核酸プローブ、または約20 mer～30 merのサイズのプライマーを含むことができる。

【0102】

人工核酸プローブは、修飾塩基（例えばアデニン、シトシン、グアニンまたはチミンの

、イノシン、5メチルシトシン、2アミノプリン、2アミノ6クロロプリン、2,6ジアミノプリンなどの修飾塩基への変換)、ホスホジエステル結合のホスホロチオエート結合への変換、リボースの2'ヒドロキシル基の2' Oメチル基または2' Oメトキシエチル基への変換、リボースの2'位と4'位がメチレン基を介して架橋された構造のLNA(Locked Nucleic Acid)もしくはBNA(Bridged Nucleic Acid)、主鎖がN(2アミノエチル)グリシンのペプチド結合からなるPNA(Peptide Nucleic Acid)などを含むことができる(例えば、A.A. Koshikin et al., Tetrahedron 54:3607 (1998)、S. Obika et al., Tetrahedron Lett. 39:5401 (1998)、P.E. Nielson et al., Science 254:1497 (1991)、特開2010 150280、特開2010 090159など)。

【0103】

本発明に係るiPS細胞選別用キットには、これらのプローブを担体に結合して作製されたマイクロアレイを含めることができる。

【0104】

また、このキットは、IGF2、T、HOXB4、GATA2、CEBPA、MESP1、CDX2、BMP4、EOMES、SOX17、GATA6、GATA4およびSNAI2からなる群から選択される1またはそれ以上の遺伝子の抽出用試薬、遺伝子抽出用試薬または染色体抽出試薬などを含んでもよい。

【0105】

本発明のキットは、診断用としても使用することができる。本発明の診断用キットは、判別分析手段、例えば、判別分析の手順を記載した書面や説明書、判別分析の手順をコンピューターに実行させるためのプログラム、当該プログラムリスト、当該プログラムを記録した、コンピューターに読み取り可能な記録媒体(例えば、フレキシブルディスク、光ディスク、CD ROM、CD R、及びCD RWなど)、判別分析を実行する装置又はシステム(コンピューターなど)を含んでもよい。

【0106】

血球への高い分化能を有する細胞の選別用キット

本発明は、血球への高い分化能を有する人工多能性幹細胞を選別するために有用なキットを提供する。本発明に係る血球への高い分化能を有する細胞の選別用キットは、前述の測定方法による遺伝子測定用キット、マイクロアレイ、またはDNAメチル化測定用キットを含むがこれらに限定されない。

【0107】

本発明において、測定の標的とされる遺伝子は、例えば、TRIM58、CTSF、FAM19A5およびTCERG1L遺伝子からなる群から選択される1またはそれ以上の遺伝子であり得る。好ましくは、TRIM58遺伝子が測定の対象となる。

【0108】

遺伝子測定用キットは、遺伝子の標的DNAまたはmRNAに相補的な約20 mer ~ 70 mer又はそれ以上のサイズの核酸或いは人工核酸プローブ、または約20 mer ~ 30 merのサイズのプライマーを含むことができる。

【0109】

人工核酸プローブは、修飾塩基(例えばアデニン、シトシン、グアニンまたはチミンの、イノシン、5メチルシトシン、2アミノプリン、2アミノ6クロロプリン、2,6ジアミノプリンなどの修飾塩基への変換)、ホスホジエステル結合のホスホロチオエート結合への変換、リボースの2'ヒドロキシル基の2' Oメチル基または2' Oメトキシエチル基への変換、リボースの2'位と4'位がメチレン基を介して架橋された構造のLNA(Locked Nucleic Acid)もしくはBNA(Bridged Nucleic Acid)、主鎖がN(2アミノエチル)グリシンのペプチド結合からなるPNA(Peptide Nucleic Acid)などを含むことができる(例えば、A.A. Koshikin et al., Tetrahedron 54:3607 (1998)、S. Obika et al., Tetrahedron Lett. 39:5401 (1998)、P.E. Nielson et al., Science 254:1497 (1991)、特開2010 150280、特開2010 090159など)。

【0110】

本発明に係るiPS細胞選別用キットには、これらのプローブを担体に結合して作製され

10

20

30

40

50

たマイクロアレイを含めることができる。

【0111】

DNAメチル化測定用キットはメチル化感受性もしくは非感受性の制限酵素を含むことができる。DNAをメチル化感受性制限酵素で処理すると、メチル化されていない認識部位は切断され、生じたDNAを電気泳動後、サザンブロッティング等を行い、検出したバンドの長さの違いから、対象となる領域のメチル化の有無を判定することができる。

【0112】

また、バイサルファイト反応を利用してシトシン塩基のメチル化を検出するためのバイサルファイト試薬を含むことができる。また、バイサルファイト反応を利用したMSO(methylation specific oligonucleotide)マイクロアレイ法に使用するための試薬やマイクロアレイを含んでもよい(畑田出穂,実験医学,24巻8号(増刊), pp.212-219 (2006))。

【0113】

また、キットにはバイサルファイト処理の有無に関わらず、標的領域(例えば、TRIM58、CSMD1および/またはFAM19A5遺伝子の発現制御領域など)に特異的なプローブまたはプライマーを含むことができる。メチル化特異的オリゴヌクレオチド(MSO)マイクロアレイ法では、バイサルファイト処理されたDNAをメチル化に関係なく変化のない(CpG配列を含まない)配列をプライマーに選んでPCRを行う。その結果、メチル化されていないシトシンはチミンとして、またメチル化されているシトシンはシトシンとして増幅する。

【0114】

また、DNAメチル化測定用キットは、遺伝子の発現制御領域などの標的領域を増幅させるための試薬を含むことができ、DNAポリメラーゼ、適当な緩衝液、マグネシウム塩、dNTP等のPCRに必要な成分を適宜含むことができる。

【0115】

さらに、本発明の血球への高い分化能を有する細胞の選別用キットは、陰性対照として血球への低い分化能を有する細胞のTRIM58、CSMD1および/またはFAM19A5遺伝子の発現制御領域などの標的領域のメチル化DNAを含有することができる。また、陽性対照として、血球への高い分化能を有する細胞のTRIM58、CSMD1および/またはFAM19A5遺伝子の発現制御領域などの標的領域の非メチル化DNAを含有することができる。

【0116】

また、このキットは、TRIM58、CTSF、FAM19A5およびTCERG1L遺伝子からなる群から選ばれる1またはそれ以上の遺伝子の抽出用試薬、遺伝子抽出用試薬または染色体抽出試薬などを含んでもよい。あるいは、このキットはTRIM58、CSMD1および/またはFAM19A5遺伝子の抽出用試薬、遺伝子抽出用試薬または染色体抽出試薬などを含んでもよい。

【0117】

本発明のキットは、診断用としても使用することができる。本発明の診断用キットは、判別分析手段、例えば、判別分析の手順を記載した書面や説明書、判別分析の手順をコンピューターに実行させるためのプログラム、当該プログラムリスト、当該プログラムを記録した、コンピューターに読み取り可能な記録媒体(例えば、フレキシブルディスク、光ディスク、CD ROM、CD R、及びCD RWなど)、判別分析を実行する装置又はシステム(コンピューターなど)を含んでもよい。

【0118】

[実施例]

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

【実施例1】

【0119】

細胞

ヒトES細胞として、KhES1、KhES3(Suemori H, et al. Biochem Biophys Res Commun. 345:926-32, 2006)およびH1、H9(Thomson, J.A., et al., Science 282:1145-1147, 1998)を用いた。また、iPS細胞として、下記の表3に示す細胞を用いた。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 0 】

【表 3】

表 3 : 使用された iPS 細胞

Clone Name	Method	feeder	Origin	Factors	Reference
585A1	Episomal plasmid	SNL	PBMN #1 abT	OSKUL+shp53	Okita et al., Stem Cells. 31(3):458-66 (2013)
TIG1204F1	Retrovirus	SNL	TIG120	OSKM	Takahashi et al., unpublished
KRV-1	Retrovirus	SNL	Keratinocyte#1	OSKM	Yokota et al., unpublished
7-KE2	Retrovirus	SNL	Keratinocyte#2	OSKM	Tanabe et al., unpublished
TIG1074F1	Retrovirus	SNL	TIG107	OSKM	Takahashi et al., unpublished
201B6	Retrovirus	SNL	HDF1388	OSKM	Takahashi et al., Cell 131, 861-72.(2007)
454 E2	Episomal plasmid	SNL	DP74	OSKUL+shp53	Okita et al., Nat Methods. 8(5):409-12.(2011)
610B1	Episomal plasmid	SNL	CB CD34#2	OSKUL+shp53	Okita et al., Stem Cells. 31(3):458-66 (2013)
665A7	Sendai virus	SNL	CB CD34#2	OSKM	Okita et al., unpublished
253G4	Retrovirus	SNL	HDF1388	OSK	Nakagawa et al., Nat Biotechnol. 26(1):101-6. (2008)
457C1	Episomal plasmid	SNL	DP74	OSKUL+shp53	Okita et al., Nat Methods. 8(5):409-12.(2011)
692D2	Episomal plasmid	SNL	PBMN #1 abT	OSKUL+shp53	Okita et al., Stem Cells. 31(3):458-66 (2013)
201B7	Retrovirus	SNL	HDF1388	OSKM	Takahashi et al., Cell 131, 861-72.(2007)
585B1	Episomal plasmid	SNL	PBMN #1 abT	OSKUL+shp53	Okita et al., Stem Cells. 31(3):458-66 (2013)
744B9	Episomal plasmid	SNL	SF91-PBMN, abT	OSKUL+shp53	Kajiwarra et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 109(31):12538-43 (2012)
404C2	Episomal plasmid	SNL	HDF1388	OSKUL+shp53	Okita et al., Nat Methods. 8(5):409-12.(2011)
409B2	Episomal plasmid	SNL	HDF1388	OSKUL+shp53	Okita et al., Nat Methods. 8(5):409-12.(2011)
609A2	Episomal plasmid	SNL	HDF-PD12	OSKUL+shp53	Kajiwarra et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 109(31):12538-43 (2012)
606A1	Episomal plasmid	SNL	CB CD34#1	OSKUL+shp53	Okita et al., Stem Cells. 31(3):458-66 (2013)
253G1	Retrovirus	SNL	HDF1388	OSK	Nakagawa et al., Nat Biotechnol. 26(1):101-6. (2008)
648A1	Episomal plasmid	SNL	PBMN #2 non-T, non-B	OSKUL+shp53	Okita et al., Stem Cells. 31(3):458-66 (2013)
783A2	Episomal plasmid	SNL	PD12 PBMN non-T, non-B	OSKUL+shp53	Kajiwarra et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 109(31):12538-43 (2012)
Kep1	Episomal plasmid	SNL	Keratinocyte#1	OSKUL+shp53	Yokota et al., unpublished
589B1	Episomal plasmid	SNL	HDF-PD12	OSKUL+shp53	Okita et al., unpublished
648B1	Episomal plasmid	SNL	PBMN#2 non-T, non-B	OSKUL+shp53	Okita et al., Stem Cells. 31(3):458-66 (2013)
751A3	Episomal plasmid	SNL	HDF-SF91	OSKUL+shp53	Kajiwarra et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 109(31):12538-43 (2012)
451F3	Episomal plasmid	SNL	DP74	OSKUL+shp53	Okita et al., Nat Methods. 8(5):409-12.(2011)
427F1	Episomal plasmid	SNL	HDF-1437	OSKUL+shp53	Okita et al., unpublished
609A1	Episomal plasmid	SNL	HDF-PD12	OSKUL+shp53	Kajiwarra et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 109(31):12538-43 (2012)
744A2	Episomal plasmid	SNL	SF91-PBMN, abT	OSKUL+shp53	Kajiwarra et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 109(31):12538-43 (2012)
751B4	Episomal plasmid	SNL	HDF-SF91	OSKUL+shp53	Kajiwarra et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 109(31):12538-43 (2012)
783F1	Episomal plasmid	SNL	PD12 PBMN, abT	OSKUL+shp53	Okita et al., unpublished
784D1	Episomal plasmid	SNL	PD15 PBMN, abT	OSKUL+shp53	Kajiwarra et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 109(31):12538-43 (2012)
246G1	Retrovirus	SNL	BJ	OSKM	Takahashi et al., Cell 131, 861-72.(2007)
588A4	Episomal plasmid	SNL	HDF-PD15	OSKUL+shp53	Kajiwarra et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 109(31):12538-43 (2012)

【 0 1 2 1 】

ES細胞の培養およびiPS細胞の樹立および培養は、従来の方で行った (Takahashi K and Yamanaka S, Cell 126 (4), 663, 2006、Okita K, et al., Nature 448 (7151), 313, 2007、Nakagawa M, et al., Nat Biotechnol 26 (1), 101, 2008、Aoi, T. et al., Science 321, 699 702, 2008およびOkita K, et al., Science 322, 949, 2008)。

30

【実施例 2】

【 0 1 2 2 】

造血前駆細胞分化におけるIGF2の効果

ヒトiPS細胞から造血前駆細胞への分化誘導におけるIGF2の効果を知るために、造血前駆細胞分化誘導実験を行った。造血前駆細胞への分化誘導は、簡潔には、下記の手順により行った。

【 0 1 2 3 】

(day0 day1) 得られたiPS細胞を6ウェル低クラスタープレート (Corning Incorporated) を用いて、37℃, 5% CO₂, 5% O₂, および90% N₂の環境で、human bone morphogenetic protein 4 (BMP 4; 10 ng/mL), Y27632 (10 μM), 2mM glutamine, penicillin/streptomycin, 4 × 10⁻⁴ M monothioglycerol (Sigma Aldrich), および50 μg/mL ascorbic acid (Sigma Aldrich) を補充したStemPro 34 (Invitrogen) からなる凝集培地中、フィーダー細胞を含まないiPS細胞の小塊(10 20細胞)を24時間培養することにより胚様体(EBs)を作製した。

40

【 0 1 2 4 】

(day1 day4) 得られたEBsを回収、洗浄し、5 ng/mL bFGF, 10 ng/mL BMP 4, 2mM glutamine, penicillin/streptomycin, 4 × 10⁻⁴ M monothioglycerol, および50 μg/mL ascorbic acidを補充したStemPro 34でさらに3日間培養して、原条(primitive streak)/中胚葉形成を誘導した。

50

【 0 1 2 5 】

(day4 day8) 4日目に、EBsを再び回収し、vascular endothelial growth factor (VEGF; 10 ng/mL), bFGF (1 ng/mL), interleukin 6 (IL 6; 10 ng/mL), IL 3 (40 ng/mL), IL 1 1 (5 ng/mL), stem cell factor (SCF; 100 ng/mL), およびhuman FLT3 ligand (FLT3L; 100ng/ml)を補充したStemPro 34中で、造血前駆細胞への特化および発生のために4日間再培養した。

【 0 1 2 6 】

(day8 day15) 8日目に、EBsを5% CO₂/air環境に移し、VEGF (10 ng/mL), erythropoietin (EPO; 4 U/mL), thrombopoietin (TPO; 50 ng/mL), SCF (100 ng/mL) , FLT3L (100 ng/mL) , IL 6 (10 ng/mL) , IL 11 (5 ng/mL) , およびIL 3 (40 ng/mL) を補充したStemPro 34中で、造血前駆細胞成熟 (赤芽球および巨核芽球系前駆細胞への成熟) および拡張のためにさらに7日間培養した。0.25% Trypsin EDTAを用いて37 °Cで5 10分間のインキュベーション後、1000 mlピペットにより細胞を単一細胞懸濁液にまで解離させ、次いで、解離させた細胞を70 μmフィルターに通過させて、回収した細胞をフローサイトメトリーにより評価した。

【 0 1 2 7 】

上記 (day0 day1) 、 (day1 day4) 、 (day4 day8) および (day8 day15) の工程を通して、種々の濃度 (20 ng/mL、50 ng/mLおよび100 ng/mL) のIGF2を加えて、IGF2の効果を調べた。また、IGF2と共に、抗IGF1R抗体を添加することにより、造血前駆細胞への分化誘導効果がIGF2特異的に起こっているか否かを調べた。

その結果、IGF2は、濃度依存的にヒトiPS細胞の血液分化誘導効率を高めることが分かった (図 1 (A)) 。また、その効果は、IGF2の効果によるものであることが確認された (図 1 (B)) 。

【 実施例 3 】

【 0 1 2 8 】

造血幹細胞および / または造血前駆細胞への分化効率の確認

造血幹細胞および / または造血前駆細胞への分化効率を確認するため、次の工程を含むEB法を用いて、4株のES細胞および35株のiPS細胞をCD43陽性細胞へ分化誘導した。

【 0 1 2 9 】

(day0 day1) 得られたiPS細胞を6ウェル低クラスタープレート (Corning Incorporated) を用いて、37 °C, 5% CO₂, 5% O₂, および90% N₂の環境で、human bone morphogenetic protein 4 (BMP 4; 10 ng/mL), Y27632 (10 μ M) , 2mM glutamine, penicillin/streptomycin, 4 × 10⁻⁴ M monothioglycerol (Sigma Aldrich) , および50 μ g/mL ascorbic acid (Sigma Aldrich) を補充したStemPro 34 (Invitrogen) からなる凝集培地中、フィーダー細胞を含まないiPS細胞の小塊 (10 20細胞)を24時間培養することにより胚様体(EBs)を作製した。

【 0 1 3 0 】

(day1 day4) 得られたEBsを回収、洗浄し、5 ng/mL bFGF, 10 ng/mL BMP 4, 2mM glutamine, penicillin/streptomycin, 4 × 10⁻⁴ M monothioglycerol, および50 μ g/mL ascorbic acidを補充したStemPro 34でさらに3日間培養して、原条(primitive streak)/中胚葉形成を誘導した。

【 0 1 3 1 】

(day4 day8) 4日目に、EBsを再び回収し、vascular endothelial growth factor (VEGF; 10 ng/mL), bFGF (1 ng/mL), interleukin 6 (IL 6; 10 ng/mL), IL 3 (40 ng/mL), IL 1 1 (5 ng/mL), stem cell factor (SCF; 100 ng/mL), およびhuman FLT3 ligand (FLT3L; 100ng/ml)を補充したStemPro 34中で、造血前駆細胞への特化および発生のために4日間再培養した。

【 0 1 3 2 】

(day8 day15) 8日目に、EBsを5% CO₂/air環境に移し、VEGF (10 ng/mL), erythropoietin (EPO; 4 U/mL), thrombopoietin (TPO; 50 ng/mL), SCF (100 ng/mL) , FLT3L (100 ng

10

20

30

40

50

/mL), IL 6 (10 ng/mL), IL 11 (5 ng/mL), および IL 3 (40 ng/mL) を補充した StemPro 34 中で、造血前駆細胞成熟 (赤芽球および巨核芽球系前駆細胞への成熟) および拡張のためにさらに7日間培養した。0.25% Trypsin EDTA を用いて 37 °C で 5 10 分間のインキュベーション後、1000 ml ピペットにより細胞を単一細胞懸濁液にまで解離させ、次いで、解離させた細胞を 70 μm フィルターに通過させて、回収した細胞をフローサイトメトリーにより評価した。

得られた細胞のうち、CD43 陽性細胞への分化効率が高い 1 2 株を High productive line とし、CD43 陽性細胞への分化効率が低い 1 2 株を Nonproductive line と名付けて、以下のアッセイに使用した。High productive line および Nonproductive line を下記の表 4 に示す。それぞれ、CD43 陽性細胞への分化効率が高い順に上から示す。

10

【 0 1 3 3 】

【表 4】

表 4 : High productive line および Nonproductive line

High productive line (1 2 株)	Nonproductive line (1 2 株)
585A1	589B1
H9	648B1
TIG1204F1	751A3
KRV-1	451F3
khES3	427F1
7-KE2	609A1
TIG1074F1	744A2
201B6	751B4
454E2	783F1
610B1	784D1
665A7	246G1
253G4	588A4

【実施例 4】

【 0 1 3 4 】

造血幹細胞および / または造血前駆細胞への高い分化効率を示すマーカー遺伝子の同定

造血幹細胞および / または造血前駆細胞への高い分化効率を示す 1 2 株の High productive line と、造血幹細胞および / または造血前駆細胞への低い分化効率を示す 1 2 株の Nonproductive line から RNA を採取し、マクロアレイ (Agilent technology) を用いて RNA の発現を測定し、解析を行った。統計解析による有意検定は、Gene spring 12.1 (Agilent technology) を用いて行い、 $p < 0.05$ (unpaired t test)、False discovery ratio (FDR: Benjamini Hochberg 法による) < 0.05 、Fold change > 2 を基準として、それらの基準に該当する遺伝子およびプローブを有意とした。

40

その結果、High productive line と Nonproductive line の比較において最も 2 群間で遺伝子発現の差が大きく、かつ、High productive line と正の相関を示す遺伝子は IGF2 であった。

【実施例 5】

【 0 1 3 5 】

IGF2 と相関を示すマーカー遺伝子の同定

実施例 4 により、IGF2 の発現量が iPS/ES 細胞の造血幹細胞および / または造血前駆細胞への高い分化効率と正に相関することが分かったので、造血幹細胞および / または造血前駆細胞への高い分化効率と正に相関する他の遺伝子を同定するために、同じマイクロアレ

50

このデータを用いてIGF2と相関して発現が変動する遺伝子を調べた。

解析は、SPSS statistics (IBM) により行い、 $p < 0.05$ (unpaired t test) の遺伝子を有意とした。遺伝子間の発現の相関については、Pearsonの相関係数を用いることにより行った。

その結果、IGF2を高発現しているiPS/ES細胞株は、T、HOXB4、GATA2、CEBPA、MESP1、CDX2、BMP4、EOMES、SOX17、GATA6、GATA4、SNAI2などを高く発現していることが見出された(図2)。

【実施例6】

【0136】

血球への分化能の確認

血球への分化能を確認するため、4株のES細胞および35株のiPS細胞から分化誘導した造血前駆細胞を用いてコロニー形成アッセイを行った。ES細胞およびiPS細胞から造血前駆細胞への分化誘導は、下記の工程により行った。

【0137】

(day0 day1) 得られたiPS細胞を6ウェル低クラスタープレート (Corning Incorporated) を用いて、37℃, 5% CO₂, 5% O₂, および90% N₂の環境で、human bone morphogenetic protein 4 (BMP 4; 10 ng/mL), Y27632 (10 μM), 2mM glutamine, penicillin/streptomycin, 4 × 10⁻⁴ M monothioglycerol (Sigma Aldrich), および50 μg/mL ascorbic acid (Sigma Aldrich) を補充したStemPro 34 (Invitrogen) からなる凝集培地中、フィーダー細胞を含まないiPS細胞の小塊(10-20細胞)を24時間培養することにより胚様体(EBs)を作製した。

【0138】

(day1 day4) 得られたEBsを回収、洗浄し、5 ng/mL bFGF, 10 ng/mL BMP 4, 2mM glutamine, penicillin/streptomycin, 4 × 10⁻⁴ M monothioglycerol, および50 μg/mL ascorbic acidを補充したStemPro 34でさらに3日間培養して、原条(primitive streak)/中胚葉形成を誘導した。

【0139】

(day4 day8) 4日目に、EBsを再び回収し、vascular endothelial growth factor (VEGF; 10 ng/mL), bFGF (1 ng/mL), interleukin 6 (IL 6; 10 ng/mL), IL 3 (40 ng/mL), IL 11 (5 ng/mL), stem cell factor (SCF; 100 ng/mL), およびhuman FLT3 ligand (FLT3L; 100 ng/ml)を補充したStemPro 34中で、造血前駆細胞への特化および発生のために4日間再培養した。

【0140】

(day8 day15) 8日目に、EBsを5% CO₂/air環境に移し、VEGF (10 ng/mL), erythropoietin (EPO; 4 U/mL), thrombopoietin (TPO; 50 ng/mL), SCF (100 ng/mL), FLT3L (100 ng/mL), IL 6 (10 ng/mL), IL 11 (5 ng/mL), およびIL 3 (40 ng/mL) を補充したStemPro 34中で、造血前駆細胞成熟(赤芽球および巨核芽球系前駆細胞への成熟)および拡張のためにさらに7日間培養した。0.25% Trypsin EDTAを用いて37℃で5-10分間のインキュベーション後、1000 mlピペットにより細胞を単一細胞懸濁液にまで解離させた。その後、解離させた細胞を70 μmフィルターに通過させて、フローサイトメトリー AriaII(Beckton Dickinson社)によりCD43+CD34+CD38 lineage marker 画分の細胞(造血前駆細胞)を回収した。

【0141】

次いで、コロニー形成アッセイを行うために、35 mm培養皿を用いて、stem cell factor (SCF), G-CSF, GM-CSF, interleukin 3 (IL 3), IL 6, erythropoietin (MethoCult H4435)を含む2 mlのメチルセルロース培地中に、CD43+CD34+CD38 lineage marker 画分の細胞を播種した。15日後、顕微鏡下でMixed colony 数を計測することで、iPS/ES細胞由来造血前駆細胞の多分化能の評価を行った。

Mixed colony 数が多い18株を血球への高い分化能を有する Good line とし、Mixed colony 数が少ない18株を血球への低い分化能を有する "Bad line" と名付けて、以下

10

20

30

40

50

のアッセイに使用した。 Good line および "Bad line" を下記の表5に示す。それぞれ、Mixed colony 数が多い順に上から示す。

【 0 1 4 2 】

【表 5】

表 5 : Good line および Bad line

Good line (18株)	Bad line (18株)
751A3	427F1
783F1	khES1
751B4	TIG1204F1
692D2	H9
783A2	Kep1
744A2	454E2
744B9	253G1
609A2	KRV-1
585B1	457C1
784D1	7-KE2
609A1	201B7
648B1	TIG1074F1
665A7	246G1
451F3	409B2
610B1	201B6
606A1	253G4
648A1	404C2
khES3	588A4

【 0 1 4 3 】

また、Mixed colony 数は、血小板への分化能や赤血球分化能とも相関していることが見出された(すなわち、Good lineでは血小板や赤血球への高い分化能を示し、Bad lineでは血小板や赤血球への低い分化能を示した)。

【実施例 7】

【 0 1 4 4 】

血球への高い分化能を示すマーカー遺伝子の同定

血球への高い分化能を有する18株のGood lineと、血球への低い分化能を有する18株のBad lineからRNAを採取し、マクロアレイ(Agilent technology)を用いてRNAの発現を測定し、解析を行った。統計解析による有意検定は、Gene spring 12.1 (Agilent technology)を用いて行い、 $p < 0.05$ (unpaired t test)、False discovery ratio (FDR: Benjamini Hochberg法による) < 0.05 、Fold change > 2 を基準として、それらの基準に該当する遺伝子およびプローブを有意とした。

40

その結果、Good line がBad lineと比べて有意に発現が上昇している遺伝子として、CTSF, FAM19A5, TRIM58, TCERG1Lなどが見出された(図3)。

【実施例 8】

【 0 1 4 5 】

血球への分化能に関連するメチル化の同定

血球への高い分化能を有する18株のGood lineと、血球への低い分化能を有する18株のBad lineのゲノムのメチル化状態を、Infinium methylation beads array 450k (I

50

lumina) を用いて調べた。統計解析による有意検定は、Gene spring 12.1 (Agilent technology) を用いて行い、 $p < 0.05$ (Mann Whitney u test)、False discovery ratio (FDR: Benjamini Hochberg法による) < 0.05 、両群間のメチル化 (値: mini 0 - max 1) の差が 0.2 以上を基準として、それらの基準に該当する遺伝子およびプロンプを有意とした。

その結果、Mixed colony 数が多いことと TRIM58、CSMD1 および FAM19A5 の低メチル化状態が有意に正相関していることが見出された。

また、表 3 の 35 株の iPS 細胞株から HDF 由来の Good line (good HDF iPS (4 株)) および Bad line (bad HDF iPS (12 株)) をそれぞれ選択し、ゲノムのメチル化状態を Infinium methylation beads array 450k (Illumina) を用いて調べた。good HDF iPS および bad HDF iPS については、下記の表 6 において示す。それぞれ、Mixed colony 数が多い順に上から示す。

10

【0146】

【表 6】

表 6 : good-HDF-iPS および bad-HDF-iPS

good-HDF-iPS (4 株)	bad-HDF-iPS (12 株)
751A3	589B1
751B4	427F1
609A2	TIG1204F1
609A1	253G1
-	201B7
-	TIG1074F1
-	246G1
-	409B2
-	201B6
-	253G4
-	404C2
-	588A4

【0147】

その結果、HDF 由来の iPS 細胞株においても、Mixed colony 数が多いことと TRIM58、CSMD1 および FAM19A5 の低メチル化状態が有意に正相関していることが見出された (図 4)

【産業上の利用可能性】

【0148】

本発明の方法により、より効率よく多能性幹細胞から造血幹細胞および/または造血前駆細胞を分化誘導することが可能となる。また、分化誘導させる前の未分化な iPS 細胞の段階でその細胞の血液分化における能力 (造血幹細胞および/または造血前駆細胞への分化効率や血球への分化能) を評価することが可能となる。選択された造血幹細胞、造血前駆細胞または血球への高い分化能を有する人工多能性幹細胞を培養して造血幹細胞、造血前駆細胞または血球に分化誘導することで、効率的、かつ、大量の血液系細胞の供給を効率よく行うことが可能となり、血液系の種々の疾患の移植治療などにおいて利用することができる。

40

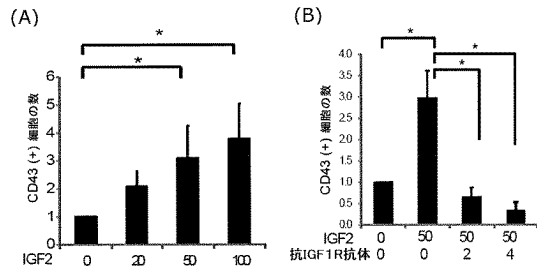
【0149】

本発明は、好ましい実施形態に重点をおいて記載されたが、好ましい実施形態が改変され得ることは当業者に明らかである。本発明は、本発明が本明細書中に詳細に記載されたもの以外の方法により実施され得ることを意図する。従って、本発明は、要約及び添付の「特許請求の範囲」の範囲に包含される全ての改変を包含する。

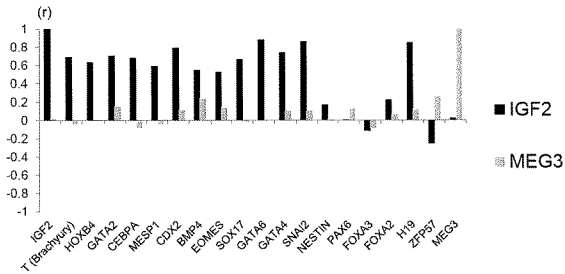
50

本明細書中に引用される任意の刊行物（特許および特許出願を含む）中に開示される内容は、それらが本明細書中で開示された程度まで、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

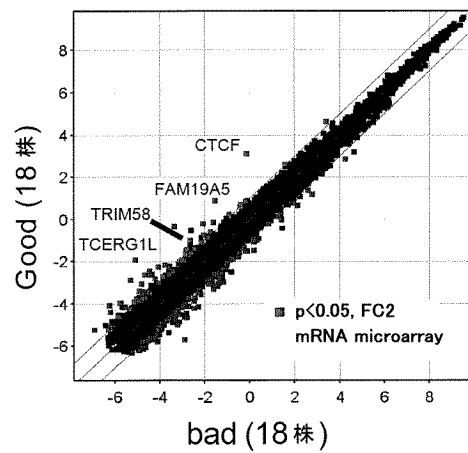
【図1】



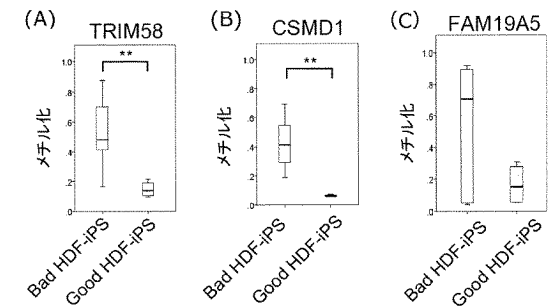
【図2】



【図3】



【図4】



【配列表】

0006493881000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 西澤 正俊

日本国京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内

審査官 小金井 悟

(56)参考文献 国際公開第2008/151390(WO, A1)

国際公開第2012/037456(WO, A1)

Exp. Hematol., 2006年6月, Vol.34, No.6, p.760 769

Blood, 2008年6月1日, Vol.111, No.11, p.5298 5306

Blood, 2007年4月1日, Vol.109, No.7, p.2679 2687

Agilent Technologiesカタログ, 2012年6月1日, p.1 17

Cell, 2011年2月4日, Vol.144, No.3, p.439 452

Mol. Ther., 2010年12月, Vol.18, No.12, p.2173 2181

Nature, 2010年9月16日, Vol.467, No.7313, p.285 290

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00 - 15/90

C12N 1/00 - 7/08

C12Q 1/00 - 3/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)