

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5896360号
(P5896360)

(45) 発行日 平成28年4月13日(2016.4.13)

(24) 登録日 平成28年3月11日(2016.3.11)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	5/077 (2010.01)	C 1 2 N	5/077
C 1 2 N	5/074 (2010.01)	C 1 2 N	5/074
C 1 2 N	5/0735 (2010.01)	C 1 2 N	5/0735
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
請求項の数 13 (全 19 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2013-502936 (P2013-502936)	(73) 特許権者	504132272
(86) (22) 出願日	平成23年7月21日(2011.7.21)		国立大学法人京都大学
(65) 公表番号	特表2013-530680 (P2013-530680A)		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(43) 公表日	平成25年8月1日(2013.8.1)	(74) 代理人	100091096
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/067181		弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開番号	W02012/011610	(74) 代理人	100118773
(87) 国際公開日	平成24年1月26日(2012.1.26)		弁理士 藤田 節
審査請求日	平成26年7月17日(2014.7.17)	(72) 発明者	長船 健二
(31) 優先権主張番号	61/451,825		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(32) 優先日	平成23年3月11日(2011.3.11)		国立大学法人京都大学内
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	前 伸一
(31) 優先権主張番号	61/366,379		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(32) 優先日	平成22年7月21日(2010.7.21)		国立大学法人京都大学内
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト多能性幹細胞から中間中胚葉細胞への分化誘導方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の工程(i)および(ii)：

(i) Activin AおよびWntもしくはGSK3 阻害剤を含む培地中でヒト多能性幹細胞を培養する工程、および

(ii) BMPおよびWntもしくはGSK3 阻害剤を含む培地中で、工程(i)で得られた細胞を培養する工程

を含む、ヒト多能性幹細胞から中間中胚葉細胞の製造方法であって、前記中間中胚葉細胞がOSR1陽性細胞である、上記方法。

【請求項2】

前記工程(i)での培養においてヒト多能性幹細胞を浮遊培養して細胞集合体または細胞塊を形成させ、前記工程(ii)での培養において該細胞集合体または細胞塊を接着培養する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記工程(i)での培養において、ヒト多能性幹細胞の細胞集合体または細胞塊を実質的に個々の細胞に分離することをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記工程(i)が、分離した細胞を、Matigel™でコーティングした培養ディッシュまたはコラーゲンでコーティングした培養ディッシュに接着し、次いで、該細胞を培養することをさらに含む、請求項3に記載の方法。

10

20

【請求項 5】

前記工程 (i) において、培地が、牛胎児血清(FBS)をさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記工程 (ii) において、培地が、ノックアウト血清代替物(KSR)をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記WntがWnt3aである、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記GSK3 阻害剤がCHIR99021である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。 10

【請求項 9】

前記BMPがBMP7である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

前記工程 (i) での培養が2~5日間の培養期間行われる、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記ヒト多能性幹細胞が、ヒトiPS細胞またはヒトES細胞である、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記ヒト多能性幹細胞が、内在性OSR1の発現に連動して発現する外来レポーター遺伝子を染色体内に有する、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 13】

前記レポーター遺伝子が、蛍光タンパク質、発光タンパク質、GUSまたはLacZをコードするDNAである、請求項 12 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、多能性幹細胞から中間中胚葉細胞を分化誘導する方法に関する。

本発明はまた、内在性OSR1の発現に連動して発現するレポーター遺伝子を染色体内に有するヒト多能性幹細胞ならびに本細胞を用いた分化誘導剤のスクリーニング方法にも関する。 30

【背景技術】

【0002】

腎臓は、生物体内における代謝活動の結果生じる有害物質などの老廃物を血中から濾過することで除去し、身体の健康維持を図るべく機能する重要な臓器の一つである。

【0003】

腎臓の疾患として、腎不全等が挙げられ、治療方法としては人工透析を挙げることができる。しかし、この治療法に要する医療費負担が大きいことから、医学面のみならず医療経済面からも依然として世界的な問題である。また、他の治療として腎移植が挙げられるが、深刻なドナー臓器不足の状態である。 40

【0004】

一方、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細胞(iPS細胞)など多能性を有する細胞がこれまでに報告されている(特許文献1または特許文献2)。そこで、腎不全の治療方法として、これらの多能性幹細胞から分化誘導して得られた腎細胞を移植する治療法が検討されている。さらに、これらの多能性幹細胞由来の均一な腎細胞を用いて治療薬の開発を行うことも視野に入れられている。

【0005】

哺乳類の腎臓は前腎、中腎、後腎の3段階を経て形成される。これらの段階のうち、後腎は、中間中胚葉の後方領域に生じることが知られている。 50

【 0 0 0 6 】

そこで、マウス多能性幹細胞から腎形成のため中間中胚葉への分化誘導方法が検討されているが（非特許文献1）、これまでのところ、ヒト多能性幹細胞から中間中胚葉の効率的な分化誘導は報告されていない。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 7 】

【 特許文献 1 】 USP 5,843,780

【 特許文献 2 】 WO 2007/069666

【 非特許文献 】

10

【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 Mae S, et al. (2010), Biochem Biophys Res Commun. 393:877-82

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

本発明は、内在性OSR1の発現に連動して発現するレポーター遺伝子を染色体内に有するヒト多能性幹細胞を提供すること、および、ヒト多能性幹細胞からActivin AおよびWntを含む培地を用いて培養する工程ならびにBMPおよびWntを含む培地を用いて培養する工程を含む、ヒト多能性幹細胞から中間中胚葉細胞を分化誘導する方法を提供することを目的とする。

20

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 0 】

本発明は以下の特徴を有する。

[1]以下の工程(i)および(ii) :

(i) Activin AおよびWntを含む培地中でヒト多能性幹細胞を培養する工程、および
(ii) BMPおよびWntもしくはWntの機能等価物を含む培地中で、工程(i)で得られた細胞を培養する工程

を含む、ヒト多能性幹細胞から中間中胚葉細胞の製造方法。

[2]前記中間中胚葉細胞がOSR1陽性細胞である、[1]に記載の方法。

[3]前記工程 (i) での培養においてヒト多能性幹細胞を浮遊培養して細胞集合体または細胞塊を形成させ、前記工程 (ii) での培養において該細胞集合体または細胞塊を接着培養する、[1]または[2]に記載の方法。

30

[4]前記工程(i)での培養において、ヒト多能性幹細胞の細胞集合体または細胞塊を実質的に個々の細胞に分離することをさらに含む、[1]または[2]に記載の方法。

[5]前記工程(i)が、分離した細胞を、MatigelTMでコーティングした培養ディッシュまたはコラーゲンでコーティングした培養ディッシュに接着し、次いで、該細胞を培養することをさらに含む、[4]に記載の方法。

[6]前記工程 (i) において、培地が、牛胎児血清(FBS)をさらに含む、[1]~[5]のいずれかに記載の方法。

[7]前記工程 (ii) において、培地が、ノックアウト血清代替物(KSR)をさらに含む、[1]~[5]のいずれかに記載の方法。

40

[8]前記WntがWnt3aである、[1]~[7]のいずれかに記載の方法。

[9]前記Wntの機能等価物がGSK3 阻害剤である、[1]~[7]のいずれかに記載の方法。

[1 0]前記GSK3 阻害剤がCHIR99021である、[9]に記載の方法。

[1 1]前記BMPがBMP7である、[1] ~ [1 0]のいずれかに記載の方法。

[1 2]前記工程 (i) での培養が2~5日間、好ましくは2日間の培養期間行われる、および、前記工程 (ii) での培養が14~18日間、好ましくは16日間の培養期間行われる、[3]に記載の方法。

[1 3]前記工程 (i) での培養が2~5日間、好ましくは2日間の培養期間行われる、および、前記工程 (ii) での培養が7~10日間、好ましくは8日間の培養期間行われる、[4]に記

50

載の方法。

[14]前記ヒト多能性幹細胞が、ヒトiPS細胞またはヒトES細胞である、[1]~[13]のいずれかに記載の方法。

[15]前記ヒト多能性幹細胞が、内在性OSR1の発現に連動して発現する外来レポーター遺伝子を染色体内に有する、[1]~[14]のいずれかに記載の方法。

[16]前記レポーター遺伝子が、蛍光タンパク質、発光タンパク質、GUSまたはLacZをコードするDNAである、[15]に記載の方法。

[17]前記多能性幹細胞がヒトiPS細胞である、[15]または[16]に記載の方法。

[18]前記[1]~[17]のいずれかに記載の工程(i)および(ii)を含む方法によってヒト多能性幹細胞から中間中胚葉を誘導し、さらに該工程(ii)を継続して実施して後腎細胞を製造することを含む、後腎細胞の製造方法。

10

[19]内在性OSR1の発現に連動して発現する外来レポーター遺伝子を染色体内に有するヒト多能性幹細胞。

[20]前記レポーター遺伝子が、蛍光タンパク質、発光タンパク質、GUSまたはLacZをコードするDNAである、[19]に記載のヒト多能性幹細胞。

[21]前記多能性幹細胞がヒトiPS細胞である、[19]または[20]に記載のヒト多能性幹細胞。

[22]中間中胚葉の分化誘導剤をスクリーニングする方法であって、候補物質の存在下で前記[19]~[21]のいずれかに記載のヒト多能性幹細胞を培養し、該候補物質が中間中胚葉への分化誘導能を有するか否かを調べることを含む、前記方法。

20

[23]Activin A、Wntもしくはその機能等価物、およびBMPをそれぞれ異なる容器に含む、中間中胚葉へ分化誘導するためのキット。

[24]前記Activin Aおよび前記Wntもしくはその機能等価物が培養培地中に含まれている、[23]に記載のキット。

[25]前記BMPおよび前記Wntもしくはその機能等価物が培養培地中に含まれている、[23]に記載のキット。

[26]ヒト多能性幹細胞をさらに含む、[23]~[25]のいずれかに記載のキット。

[27]前記ヒト多能性幹細胞が、[19]~[21]のいずれかに定義される細胞である、[26]に記載のキット。

【0011】

30

本発明の上記方法により、内在性OSR1の発現に連動して発現するレポーター遺伝子を染色体内に有するヒト多能性幹細胞、およびヒト多能性幹細胞由来の人工のヒト中間中胚葉細胞を作製することができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】図1aは、BACクローン(RP11-458J18)のOSR1遺伝子座へのGFP-PGK-Neoカセットのノックインを示す模式図を示す。図中、OSR1は「odde-skipped related 1」であり、ATGは、開始コドンであり、GFPは、緑色蛍光タンパク質をコードするDNAであり、pAは、ポリアデニル化シグナルであり、PGKは、3-ホスホグリセレートキナーゼであり、Neoは、ネオマイシン耐性遺伝子である。図1bは、改変BACクローン(すなわち、3D5、3D36、3D45および対照201B7)を導入して組換えを行った後の各iPS細胞株におけるOSR1の開始コドン付近を検出するための、ゲノムDNAの定量PCR解析の結果を表すグラフを示す。縦軸の値「1」は、2つの無傷のOSR1遺伝子座を示し、一方、「0.5」は、1つの無傷のOSR1遺伝子座と1つの標的にされたOSR1遺伝子座を示す。

40

【図2】図2aは、浮遊培養により分化誘導された後のGFP陽性iPS細胞株3D36の評価のためのフローサイトメトリーの結果を示す。図中、縦軸はPEの強度を示し、横軸はGFPの強度を示す。PEは、フィコエリスリンである。図2bは、iPS細胞由来のOSR1-GFP陽性細胞およびOSR1-GFP陰性細胞(対照細胞)における中間中胚葉マーカー遺伝子の発現量をRT-PCR法を用いて測定した結果を示す。

【図3】図3aは、分離培養により分化誘導した後のGFP陽性細胞株3D45の評価のためのフ

50

ローサイトメトリーの結果を示す。図3a中、縦軸はPE強度を示し、横軸はGFP強度を示す。図3bは、GFPとDAPI(4',6-ジアミノ-2-フェニルインドール)で核染色することによって得られた蛍光顕微鏡像を示す。図3cは、OSR1に対するin situハイブリダイゼーション(ISH)の染色像(左図)、および、この染色像とDAPIで核染色した像とのマージ(右図)を示す。

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明を以下に詳細に説明する。

本発明は、内在性OSR1の発現に連動して発現するレポーター遺伝子を染色体内に有するヒト多能性幹細胞、および、増殖因子を加えた培地を用いてヒト多能性幹細胞から中間中胚葉細胞を分化誘導する方法に関する。

10

【0014】

<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る。それらの多能性幹細胞の具体例は、以下のものに限定されないが、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。

【0015】

20

(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とを有する幹細胞である。

【0016】

ES細胞は、受精卵の8細胞期または桑実胚段階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)。

30

【0017】

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ES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。

40

【0018】

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/F-12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(リン酸緩衝生理食塩水)中の0.25% トリプシン及び0.1mg/ml コラゲナーゼI Vを用いて行うことができる。

【0019】

50

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、および/または、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)。

【 0 0 2 0 】

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 1 】

(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-Shinohara et al. (2003) Biol. Reprod., 69:612-616; K. Shinohara et al. (2004), Cell, 119:1001-1012)。精子幹細胞は、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、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(竹林正則ら(2008), 実験医学, 26巻, 5号(増刊), 41~46頁, 羊土社(東京、日本))。

【 0 0 2 2 】

(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 3 】

(D) 人工多能性幹細胞

人工多能性幹(iPS)細胞は、ある特定の1種もしくは複数種の核初期化物質を、DNAまたはタンパク質の形態で体細胞に導入することによるか、または、ある特定の1種もしくは複数種の薬剤の使用により該核初期化物質の内在性のmRNAおよびタンパク質の発現量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もしくはES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子、またはそれら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、EsrrgおよびGlis1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。そのような組合せは、上記初期化物質を、少なくとも1種、2種もしくは3種含む組み合わせ、好ましくは3種もしくは4種を含む組み合わせとすることができる。

【 0 0 2 4 】

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情報、並びに、該cDNAによって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GenBank(米国NCBI)またはEMBL(ドイツ国)のaccession numbersにアクセスすることによって入手可能である。また、L-Myc、Lin28、Lin28b、Esrrb、EsrrgおよびGlis1のマウスおよびヒトのcDNA配列情報およびアミノ酸配列情報については、表1に示したNCBI accession numbersにアクセスすることにより取得できる。当業者は、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。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 5 】

【表 1】

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

10

【 0 0 2 6 】

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、リポソームの使用、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（これらのベクターは、Cell, 126, pp.663-676, 2006; Cell, 131, pp.861-872, 2007; Science, 318, pp.1917-1920, 2007に準ずる。）、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およびPAC)などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる (Science, 322:949-953, 2008)。ベクターには、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リポソーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトもしくはポリアデニル化シグナル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好ましい例として挙げられる。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またはピューロマイシン耐性遺伝子)、チミジンキナーゼ遺伝子、およびジフテリアトキシン遺伝子もしくはその断片などの選択マーカー配列、並びに、緑色蛍光タンパク質(GFP)、グルクロニダーゼ(GUS)または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ウイルス (Bovine papillomavirus) の起点とその複製に関わる配列を含んでいてもよい。例えば、EBNA-1およびoriP、または、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、2種またはそれ以上の核初期化物質を同時に導入するために、ポリシス

20

30

40

50

トロニックに発現させることができ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と配列の間は、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 2009/0920422009/152529)。

【0027】

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'-アザシチジン(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-チャンネルカルシウムアゴニスト(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シグナル伝達活性化因子(例えば可溶性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))、有糸分裂活性化プロテインキナーゼシグナル伝達(mitogen-activated protein kinase signaling)阻害剤、グリコーゲンシンターゼキナーゼ(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。

【0028】

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量を上昇させる方法に使用される、そのような薬剤としては、6-プロモインジルピン-3'-オキシム、インジルピン-5-ニトロ-3'-オキシム、バルプロ酸、2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5-ナフチリジン、1-(4-メチルフェニル)-2-(4,5,6,7-テトラヒドロ-2-イミノ-3(2H)-ベンゾチアゾリル)エタノンHBr(pifithrin-alpha)、プロスタグランジンJ2およびプロスタグランジンE2等が例示される(WO 2010/068955)。

【0029】

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、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、β-メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。)、(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(ヒトまたはサル)ES細胞用培地(販売先: リプロセル、京都、日本)、mTeSR-1)、などが含まれる。

【0030】

培養法の例としては、例えば、37℃、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DMEMまたはDMEM/F12培地中で体細胞と核初期化物質(DNA、RNA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(例えば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等)上にまきなおし、体細胞と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。

【0031】

あるいは、前記細胞を、フィーダー細胞(例えば、マイトマイシンC処理STO細胞またはSNL細胞)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

10

20

30

40

50

シン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、b-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様コロニーを形成させることができる。

【0032】

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。

【0033】

マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含むDNAを用いた場合は、対応する薬剤を含む培地(すなわち、選択培地)で細胞の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、または、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。

10

【0034】

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、ブタおよびラット)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。

20

30

【0035】

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

【0036】

(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)。具体的には、nt ES(nuclear transfer ES)細胞は、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。

40

【0037】

(F) 融合幹細胞

融合幹細胞は、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作製され、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

50

;309(5739):1369-73)。

【0038】

<中間中胚葉細胞の分化誘導法>

本発明によれば、ES細胞、iPS細胞などの多能性幹細胞から中間中胚葉細胞への分化誘導に際して、以下の工程(A)および(B)を含む方法を用いることができる。

【0039】

さらにまた、本発明の方法で使用される試薬類は、市販品や文献記載の物質などの入手可能な物質である。

【0040】

本明細書で使用される「中間中胚葉細胞」とは、前腎、中腎、中腎管、後腎、副腎皮質および生殖腺へ分化し得る細胞を意味し、好ましくは、OSR1を発現する細胞を意味する。

【0041】

本発明において、分化誘導により得られる中間中胚葉細胞は、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、純化された細胞集団であってもよい。

【0042】

(A) Activin AおよびWntもしくはWntの機能等価物を含む培地で細胞を培養する工程

本工程は、2種類の培養方法のいずれかを使用して実施されうる。すなわち、第1の方法は、培養の間に、ヒト多能性幹細胞の細胞集合体(すなわち、細胞凝集体)または細胞塊を形成することを含む方法であり、あるいは、第2の方法は、培養の間に、互いに実質的に分離されるヒト多能性幹細胞を培養することを含む方法である。

【0043】

第1の方法では、ヒト多能性幹細胞を、Activin Aと、WntもしくはWntの機能等価物とを含有する培地中で浮遊培養により培養し、それにより細胞集合体または細胞塊を形成する。細胞集合体または細胞塊の形成のために、すでに細胞集合体を形成しているヒト多能性幹細胞を、一旦、複数の小細胞塊に分離し、その後再び凝集させることも可能である。このとき、小細胞塊に分離するために、分離溶液を用いるか、あるいは機械的に、微細になるまで細胞塊を分離する。好適な方法は、最初に分離溶液を使用し、その後細胞塊を複数の小塊に機械的に分離することを含む。ここで使用される分離溶液の具体例には、プロテアーゼ活性およびコラゲナーゼ活性を有する分離溶液(例えば、Accutase™やAccumax™(その各々は、例えばフナコシ(日本)から入手しうる)などの、トリプシンとコラゲナーゼを含有する溶液)、ならびに、コラゲナーゼ活性のみを有する分離溶液が挙げられる。この方法では、上記の分離溶液として、コラゲナーゼ活性のみを有する分離溶液を使用することが好ましい。

【0044】

第2の方法では、上記の適切な方法によって細胞集合体(すなわち、凝集体)または細胞塊から、ヒト多能性幹細胞を実質的に分離(もしくは解離)し、その後Activin AとWntもしくはWntの機能等価物とを含有する培地を用いて接着培養により該細胞を培養する。このとき、ヒト多能性幹細胞を、多能性幹細胞培養用培地を用いて80%コンフルエントとなるまで培養してコロニーを形成したあとか、あるいは、ヒト多能性幹細胞を分離(もしくは解離)した直後に、Activin AとWntもしくはWntの機能等価物とを含有する培地を用いて接着培養により該細胞を培養してもよい。ここで使用される分離法の具体例には、機械的方法、ならびに、プロテアーゼ活性およびコラゲナーゼ活性を有する分離溶液(例えば、Accutase™やAccumax™などの、トリプシンとコラゲナーゼを含有する溶液)を使用するか、または、コラゲナーゼ活性のみを有する分離溶液を使用する方法が包含される。そのような方法の好適例として、プロテアーゼ活性およびコラゲナーゼ活性を有する分離溶液を用いて細胞を解離することを含む方法、ならびに、プロテアーゼ活性およびコラゲナーゼ活性を有する分離溶液を用いて細胞を解離し、その後機械的に微細になるまで細胞を分離することを含む方法が挙げられる。

【0045】

上記の第1の方法および第2の方法をさらに以下に説明する。

10

20

30

40

50

浮遊培養では、細胞は、培養ディッシュに接着させずに培養される。浮遊培養は、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等によるコーティング処理）されていない培養ディッシュ、あるいは、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）した培養ディッシュを使用して行うことができるが、これらの具体例に特に限定されない。第1の方法では、ヒト多能性幹細胞を浮遊培養することによって細胞集合体（もしくは細胞塊）を形成する。

【0046】

また、接着培養においては、コーティング剤で処理された培養ディッシュを用いて細胞を培養する。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル(Matrigel™) (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、およびエンタクチン(entactin)、またはこれらの組み合わせが挙げられる。好ましいコーティング剤は、マトリゲル(Matrigel™)またはコラーゲンである。ここで、コラーゲンは、I型、II型、III型およびV型コラーゲンからなる群から選択される。

10

【0047】

本工程における培地は、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、Doulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地などが包含される。好ましくは、混合培地はDMEM/F12(1:1)である。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、例えば、アルブミン、トランスフェリン、ノックアウト血清代替物(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、3'-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、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、それらと同類の物質の1つ以上の物質も含有しうる。好ましい増殖因子の例としては、Wnt1、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt7a、TGF- β 、Activin A、Nodal、BMP2、BMP4、BMP6、BMP7およびGDFが挙げられる。少なくとも、本工程ではWnt3aおよびActivin Aを増殖因子として用いることが望ましい。

20

30

【0048】

本発明では、Wntに代えてWntの機能等価物を使用することができる。「Wntの機能等価物」という用語は、FzレセプターとLRP5/6膜タンパク質のリガンドとの複合体の形成、あるいは、カテニンと、Axin、GSK3、APC(adenomatous polyposis coli)などの分子との複合体の形成を抑制する物質を指す。そのような物質の例は、WntアゴニストまたはGSK3阻害剤である。

【0049】

本明細書で使用する「GSK3阻害剤」という用語は、GSK(glycogen synthase kinase)-3タンパク質のキナーゼ活性（例えば、 β -カテニンをリン酸化する能力）を阻害する物質として定義され、多くの阻害剤がすでに知られている。その具体例として、BIO(別称: GSK-3インヒビターIX; 6-プロモインジルビン-3'-オキシム)などのインジルビン(indirubin)誘導体、SB216763(すなわち、3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン)などのマレイイミド誘導体、GSK-3インヒビターVII(すなわち、4-ジプロモ-アセトフェノン)などの β -プロモメチルケトン化合物、CHIR99021(すなわち、6-[(2-{[4-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(4-メチルイミダゾール-2-イル)ピリミジン-2-イル]アミノ}エチル)アミノ]ピリジン-3-カルボニトリル)(WO1999/65897; CAS番号 252917-06-9)、L803-mts(別称: GSK-3ペプチドインヒビター; Myr-N-GKE APPAPPQSpP-NH2)などの細胞膜透過性リン酸化ペプチド、およびそれらの誘導体が挙げられる。これらの化合物は、Calbiochem, Biomol, Stemgenなどによって上市されており、容易に使用可能なものである。しかし、上記の化合物の例には特に限定されない。さらに

40

50

また、Wntアゴニストの例は、2-アミノ-4-(3,4-(メチレンジオキシ)ベンジルアミノ)-6-(3-メトキシフェニル)ピリミジンである。

【0050】

培地中のActivin AまたはWntの濃度は、特に限定されないが、好ましくは、約100 ng/mlまたはそれ以上、さらに好ましくは、100 ng/mlである。

【0051】

好ましい培地として、2%FBS、GlutaMAXTM、ペニシリン、ストレプトマイシン、Wnt3aもしくはGSK3 インヒビター（例えばCHIR99021）、およびActivin Aを含有するDMEM/Ham's F12混合培地が例示される。

【0052】

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、空気/CO₂含有雰囲気下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは約2~5%である。培養時間は、例えば2日から5日間の培養であり、より好ましくは2日である。

【0053】

(B) BMPおよびWntもしくはWntの機能等価物を含む培地を用いて細胞を培養する工程

本工程では、前述の工程で得られた浮遊培養後の細胞集合体をそのまま、コーティング処理された培養ディッシュを用いて適当な培地中で培養してもよい。

【0054】

コーティング剤としては、例えば、MatrigelTM、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、エンタクチン、またはこれらの組み合わせが挙げられる。好ましいコーティング剤の例は、MatrigelTM、コラーゲンまたはゼラチンである。ここで、コラーゲンは、I型、II型、III型およびV型コラーゲンからなる群から選択される。

【0055】

または、本工程では、前述の工程で接着培養により得られた細胞を、培地を新鮮な培地と交換しながら培養を続けてもよい。

【0056】

本工程で使用可能な培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として用い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、およびこれらの混合培地などが包含される。好ましくは、DMEMである。培地には、血清が含まれていないことが望ましい。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、亜セレン酸ナトリウム、ITS-X (Invitrogen) (インスリン、トランスフェリンおよび亜セレン酸ナトリウム含有)、ノックアウト血清代替物 (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、3'-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、また、例えば、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、GlutaMAXTM、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、およびGSK3 インヒビターから選択される1つ以上の物質も含有しうる。好ましい増殖因子としては、例えば、Wnt1 (例: NM_005430, NM_001204869)、Wnt3 (例: NM_030753)、Wnt3a (例: NM_033131 (SEQ ID NOs: 3 および4)、Wnt4 (例: NM_030761)、Wnt7a (例: NM_004625)、TGF-β (例: NM_000660, NM_001135599, NM_003238, NM_003239)、Activin A (インヒビテン A (NM_002192) のジスルフィド結合二量体タンパク質; 例えば ヒトActivin A 組換えタンパク質 (eBio science, Cat. No. 14-8993-62など)、Nodal (例: NM_018055)、BMP2 (例: NM_001200)、BMP4 (例: NM_001202, NM_130850, NM_130851)、BMP6 (例: NM_001718)、BMP7 (例: NM_001719 (SEQ ID NOs: 1および2)、ならびに GDF (例: NM_001492, NM_016204, NM_020634, NM_000557, NM_001001557, NM_182828, NM_005259, NM_005260, NM_004962, NM_005811, NM_004864)などが挙げられる。本工程では、少なくともWnt3aおよびBMP7を増殖因子として用いることが好ましい。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 7 】

培地中のBMPの濃度は、特に限定されないが、好ましくは約100 ng/mlまたはそれ以上、さらに好ましくは100 ng/mlである。

【 0 0 5 8 】

好ましい培地として、10%KSR、GlutaMAX™、2-メルカプトエタノール、非必須アミノ酸、ペニシリン、ストレプトマイシン、Wnt3aおよびBMP7を含有するDMEM/Ham's F12混合培地が例示される。

【 0 0 5 9 】

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、CO₂濃度は、好ましくは約2~5%である。培養時間は、例えば4日から21日間の培養である。工程(A)の第1方法のあとの工程(B)の培養時間は、例えば、14~18日、好ましくは16日であり、一方、工程(A)の第2方法のあとの工程(B)の培養時間は、例えば、7~10日、好ましくは8日である。培地は、3日ごとに交換することが望ましい。この接着培養によって中間中胚葉細胞が誘導される。

10

本発明において、さらに接着培養を継続することで、後腎細胞へ分化誘導させてもよい。

【 0 0 6 0 】

< 中間中胚葉細胞の分化誘導用キット >

本発明は、さらに多能性幹細胞から中間中胚葉細胞を分化誘導するためのキットを提供する。

20

【 0 0 6 1 】

本キットは、異なる容器に、Activin Aと、Wntもしくはその機能等価物と、BMPとを含むことができる。本キットはさらに、上記工程(i)の培養培地および上記工程(ii)の培養培地を含んでもよい。あるいは、Activin AおよびWntもしくはWntの機能等価物は、培養培地に含まれていてもよいし、ならびに/あるいは、BMPおよびWntもしくはWntの機能等価物は、培養培地に含まれていてもよい。

【 0 0 6 2 】

本キットには、ヒト多能性幹細胞がさらに含まれていてもよい。この幹細胞は、内在性OSR1の発現に連動して発現する外来レポーター遺伝子を染色体内に有するヒト多能性幹細胞であってよい。このレポーター遺伝子は、例えば、蛍光タンパク質、発光タンパク質、GUS、またはLacZをコードするDNAであってよい。また、該多能性幹細胞は、ヒト人工多能性(iPS)細胞であってよい。

30

【 0 0 6 3 】

本キットはさらに、上記の成分またはエレメントの他に、細胞解離用培地や、培養ディッシュをコーティングするためのコーティング剤、さらに場合により、分化誘導の手順を記載した書面や説明書を含んでもよい。

【 0 0 6 4 】

< 中間中胚葉細胞 >

本発明は、上述した分化誘導法によって作製された中間中胚葉細胞を提供する。

中間中胚葉細胞は、OSR1、PAX2、WT1、EYA1およびSIX2などの中間中胚葉細胞のマーカーを用いて同定されうる。

40

【 0 0 6 5 】

< レポーター遺伝子を染色体内に有するヒト多能性幹細胞 >

OSR1の発現に連動して発現するレポーター遺伝子を染色体内に有するヒト多能性幹細胞は、ターゲティングベクターを用いて相同組換え方法により製造することができる。その典型例は、次の通りである。

【 0 0 6 6 】

NCBIアクセッション番号NM_145260として特定されるヒトOSR1遺伝子の塩基配列情報を基に、相同組換え用ターゲティングベクターを構築することができる。該ターゲティングベクターは、染色体上のOSR1遺伝子そのものの塩基配列、もしくは染色体上のOSR1遺伝子

50

の一部を欠いた塩基配列を含む核酸を有するように、あるいは、OSR1遺伝子とは異なる異種遺伝子の5'側及び3'側が染色体上のOSR1遺伝子の上流及び下流の塩基配列によって隣接された塩基配列を含む核酸を有するように、ベクター上に塩基配列を設計することによって構築されうる。

【0067】

上記のターゲティングベクターは、ベクターが取り込まれた細胞や、目的とする相同組換え細胞を選択するための適当なマーカー遺伝子を含むことが好ましい。このようなマーカー遺伝子としては、例えばネオマイシン耐性遺伝子(neo)、ジフテリアトキシンAフラグメント遺伝子(DT-A)、ハイグロマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、ストレプトマイシン耐性遺伝子、ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子(HSV-tk)等の、薬剤耐性選択に通常用いられる公知の薬剤耐性遺伝子を用いることができる。

10

【0068】

また、上記のターゲティングベクターは、相同的組み換えによって染色体上に組み込まれる位置にレポーター遺伝子を有していてもよい。この場合、例えばOSR1遺伝子の翻訳領域の配列を一部もしくは全部欠失させるかまたは非相同な別の塩基配列に置き換える、もしくは欠失を伴わず挿入させるようレポーター遺伝子の翻訳フレームがOSR1遺伝子の翻訳フレームと一致するように設計することが好ましい。レポーター遺伝子は、例えば大腸菌の - ガラクトシダーゼ(LacZ)、 - グルコニダーゼ(GUS)、ルシフェラーゼ(Luc)などの発光タンパク質、緑色蛍光タンパク質(GFP)、エクオリン子、タウマリンなどの

20

【0069】

相同組換え用ターゲティングベクターの構築には、一般的な遺伝子工学的手法を用いて、上記の核酸、マーカー遺伝子、レポーター遺伝子等をPCRや合成リンカーDNA等のために適宜用いて、通常のDNA組換え技術により容易に行うことができる。

【0070】

本発明の態様において、ターゲティングベクターはBACクローンであってもよく、好ましいBACクローンは、RP11-458J18、RP11-203M1およびRP11-802J2などが挙げられる。BACクローンを用いる場合、例えば、Red/ET相同組換え法を用いて、所望の場所へマーカー遺伝子等を導入することができる。

30

【0071】

続いて、相同組換え用ターゲティングベクターをヒト多能性幹細胞へ導入する。この細胞へのターゲティングベクターの導入は、当業者に周知の方法を用いて行うことができ、例えば、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法などを挙げることができる。

【0072】

ターゲティングベクターが取り込まれた細胞では、染色体の標的遺伝子、すなわちOSR1遺伝子が、ターゲティングベクターと1つのアレルとの間で組換えを起こしてもよく、2つのアレルで組換えられていてもよい。とりわけ、相同な領域に囲まれたベクター上の核酸領域が染色体中に取り込まれることでレポーター遺伝子等が導入される。こうして変異が導入された細胞は、ベクター由来のマーカー遺伝子の発現に基づいて選択することができる。さらに、選択された細胞のうち、所望の位置に変異が導入された細胞は、PCR法やサザンブロッティング法等により確認し、選択することができる。

40

【0073】

<後腎細胞の作製方法>

本発明はさらに、工程(A)および工程(B)を含む上記の方法によってヒト多能性幹細胞から中間中胚葉を誘導し、その後、工程(B)を継続して、後腎細胞を生成することを含んでなる、後腎細胞の作製方法を提供する。

【0074】

50

この方法で使用可能なヒト多能性幹細胞から中間中胚葉を誘導するための培養条件等は、上記の条件等と同じである。また、上記後続の工程(B)を継続するための培養条件等も上記の条件等と同じである。間葉系細胞である後腎細胞を得ることができるまで培養を継続することができる。

【0075】

< 中間中胚葉細胞への分化誘導剤のスクリーニングへの利用 >

OSR1の発現に連動して発現するレポーター遺伝子を染色体内に有するヒト多能性幹細胞は、中間中胚葉細胞への分化誘導剤（例えば医薬化合物、溶媒、低分子量物質、ペプチド、またはポリヌクレオチド）のスクリーニングに用いることもできる。例えば、候補分化誘導剤を単独でまたは他の薬剤と組み合わせて、上述のOSR1の発現に連動して発現するレポーター遺伝子を染色体内に有するヒト多能性幹細胞に接触させ、その際のレポーター遺伝子の発現量の変化により、評価を行うことができる。本発明では、レポーター遺伝子の発現を上昇させる薬剤を中間中胚葉の分化誘導剤として同定することができる。好ましくは、ディッシュへ接着させた当該レポーター遺伝子を染色体内に有するヒト多能性幹細胞の培地に候補薬剤を添加して、当該レポーター遺伝子の発現を上昇可能にする物質を選択する。

10

【実施例】

【0076】

本発明を以下の実施例でさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はそれら実施例に限定されないものとする。

20

【0077】

実施例1：OSR1-GFPをノックインしたヒトiPS細胞株の樹立

ヒトiPS細胞（201B7）は、京都大学（京都、日本）の山中博士より受領し、従来の方
法で培養した（Takahashi K, et al. Cell. 131:861-72）。続いて、BACクローン（RP11-45
8J18）（BACPAC RESOURCES）のOSR1の開始コドンの下流へpRed/ET（Gene Bridges GmbH）
を用いてGFP-PGK-Neoカセットを挿入し、OSR1-GFP BAC トランスジーンを作製した（図1a）
。作製した改変BACクローンを導入した約130個のiPS細胞株の各染色体をテンプレートと
して用いて、開始コドンを挟むように設計されたプライマー（正方向プライマー：5'-GGA
TTGAGAAGCCACTGCAACT-3'（配列番号5）および逆方向プライマー：5'-CCGTTCACTGCCTGAAGG
A-3'（配列番号6）により定量PCRを行った。4つのiPS細胞株において対照としての201B7
と比較して増幅産物量が1/2であることが確認された。この4つの株のうち、図1bに3D36お
よび3D45の結果を示す。以上より、内在性のOSR1の発現と連動してGFPを発現するOSR1-GF
PレポーターiPS細胞株の樹立に成功した。

30

【0078】

実施例2：浮遊培養法による中間中胚葉への分化誘導

上記のように作製したOSR1-GFPレポーターiPS細胞（3D36）を、MEFをフィーダー細胞と
して用いてコンフルエントになるまで培養した。DMEMで希釈したコラゲナーゼ溶液（1mg/
ml）を加えて解離させた。コラゲナーゼ溶液を除去後、Gluta MAXTM（Invitrogen）、ペニ
シリン、ストレプトマイシンおよび2%のFBS（Hyclone社製）を含有したDMEM/F12を加えて
ピペティングした。続いて、培地を除去したのち、100 ng/ml Wnt3a、100 ng/ml Act
ivinA、Gluta MAXTM（Invitrogen）、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび2%のFBS（Hycl
one社製）を含有したDMEM/F12中にて浮遊培養により胚様体（EB）を形成させた。浮遊培養2
日後、EBを回収し、100 ng/ml Wnt3a、100 ng/ml BMP7、0.055mM 2-メルカプトエタノー
ル、0.1mM 非必須アミノ酸、GlutaMAXTM、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび10% KS
R（Invitrogen）を含むDMEM/F12を用いてゼラチンコートディッシュにて接着培養を16日間
行った。この時、3日に1度培地交換を行った。

40

分化誘導後の細胞をフローサイトメトリーによりGFP陽性細胞数を測定して得られた結
果を図2aに示す。これより、上記の分化誘導によりGFP陽性細胞（つまりOSR1陽性細胞）
への誘導が成功したことが確認された。

【0079】

50

続いて、分化誘導後のGFP陽性細胞およびGFP陰性細胞における各種分化マーカー遺伝子の発現をPCRにより解析を行った（図2b）。この結果より、GFP陽性細胞において、中間中胚葉（Intermediate mesoderm）のマーカー遺伝子であるOSR1、WT1、EYA1、PAX2およびSIX2が発現していることが確認された。

以上より、本方法を用いることでヒトiPS細胞よりOSR1陽性細胞を作製することができた。

【0080】

実施例3：付着培養法による中間中胚葉への分化誘導

実施例1で得られたOSR1-GFPレポーターiPS細胞（3D36）をSNL細胞（McMahon, A.P. およびBradley, A. (1990) Cell 62; 1073-1085）をフィーダー細胞として有する10cmディッシュ上でコンフルエントになるまで培養し、CTK溶液（0.25%トリプシン、0.1%コラゲナーゼIV、20% KSRおよび1 mM CaCl₂含有PBS）を加えて解離させた。続いて、Matrigel™（BD）でコーティングした24ウエルディッシュの各ウエルに、回収した全細胞に対して1/24量になるよう細胞を添加し付着させた。細胞をさらに、bFGFを含有した霊長類ES細胞用培地（リプロセル、日本）にて、コンフルエントになるまで培養し、100 ng/ml Wnt3a、100 ng/ml ActivinA、GlutaMAX™(Invitrogen)、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび2%FBS(Hyclone社製)を含有したDMEM/F12に交換し2日間培養した。さらに、培地を100 ng/ml Wnt3a、100 ng/ml BMP7、0.055mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM 非必須アミノ酸、GlutaMAX™、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび10% KSR(Invitrogen)を含むDMEM/F12へ交換し、細胞を16日間培養した。培養の間、3日に1度培地交換を行った。培養後、GFPの発現を指標として細胞をFACSにより解析したところ、GFP陽性細胞の存在が確認された。

【0081】

実施例4；解離および接着培養による中間中胚葉への分化誘導

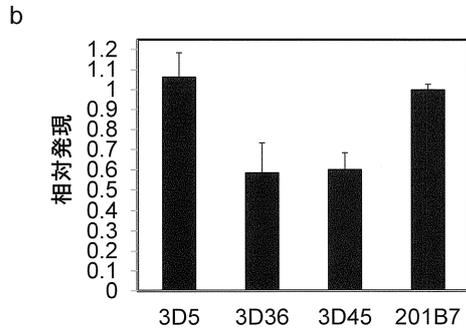
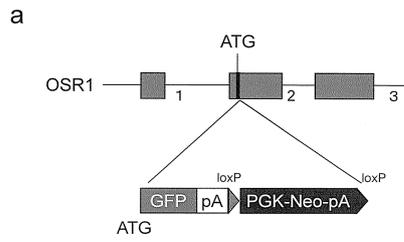
実施例1で取得したOSR1-GFPレポーターiPS(3D45)を、MEFをフィーダー細胞として有する10cmディッシュにて、コンフルエントになるまで培養した。解離のために、CTK溶液を添加し、さらに、Accutase™を添加したのち、ピペッティングにより細胞を解離した。GlutaMAX™、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび2%FBSを含有したDMEM/F12を加えて酵素反応を止め、それに続いて、ピペッティングを行った。遠心分離により培地を除いた後、10 μM Y27632、100 ng/ml Activin A、3 μM CHIR99021、GlutaMAX™、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび2%FBSを含有するDMEM/F12を有する、コラーゲンIでコーティングした24ウエルのプレートにて、細胞を2日間培養した。その後、100 ng/ml BMP7、3 μM CHIR99021、0.055mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM 非必須アミノ酸、GlutaMAX™、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび10% KSRを含有するDMEM/F12に培地を交換し、細胞を8日間培養した。培養の間、3日に1度培地交換を行った。培養後、GFPの発現を指標として用いて、細胞をFACSにより解析し、抗GFP抗体で免疫染色した後、蛍光顕微鏡によって細胞を評価し、これにより、GFP陽性細胞が確認された（図3aおよび図3b）。さらに、OSR1についてin situハイブリダイゼーションにより細胞を評価した結果、分化誘導後の多くの細胞においてOSR1の発現が確認された（図3c）。

【産業上の利用可能性】

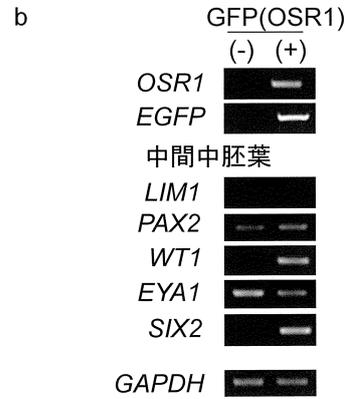
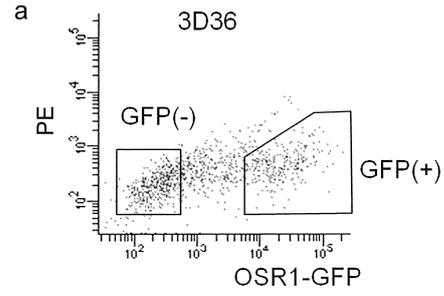
【0082】

本発明により、ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞から、中間中胚葉細胞を作製することが可能になる。中間中胚葉は、腎疾患の治療を目的とした再生医療の分野で使用することができる細胞へ多能性幹細胞を分化誘導することができるために大変有用である。

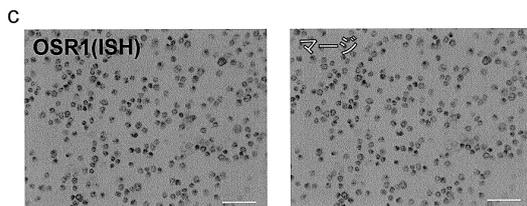
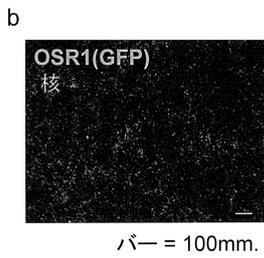
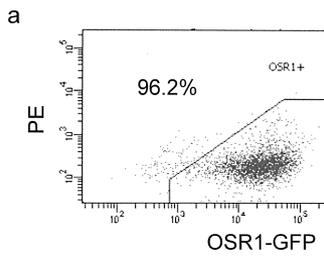
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



【配列表】

0005896360000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

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

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 Cell Stem Cell, 2008, Vol.2, pp.60-71

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 5 / 0 0 - 5 / 2 8

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 1 / 7 0

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)

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)

W P I D S / W P I X (S T N)