

## (12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2015年4月23日(23.04.2015)

(10) 国際公開番号

WO 2015/056804 A1

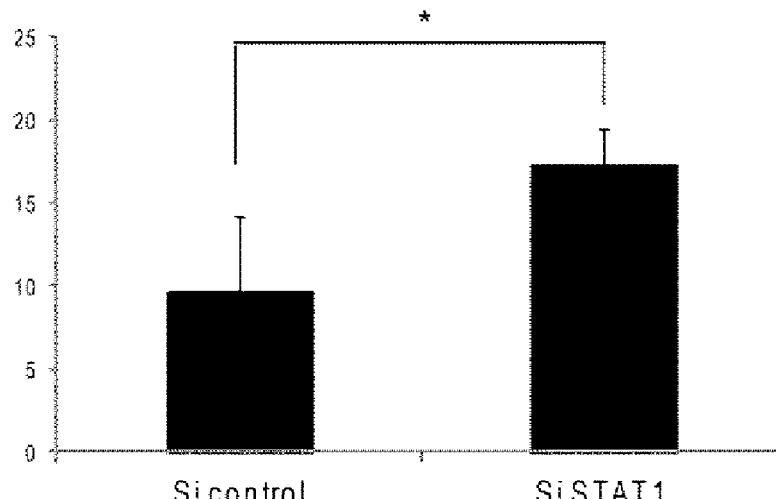
- (51) 国際特許分類:  
*C12N 5/10* (2006.01)      *C12N 15/113* (2010.01)  
*C12N 15/09* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/077757
- (22) 国際出願日: 2014年10月17日(17.10.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
 特願 2013-216817 2013年10月17日(17.10.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町36番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 山中伸弥(YAMANAKA, Shinya); 〒6068501 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 Kyoto (JP). 吉田善紀(YOSHIDA, Yoshinori); 〒6068501 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 Kyoto (JP). 横田日高(YOKOTA, Hidaka); 〒6068501 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 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 高島一(TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), エロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## 添付公開書類:

- 国際調査報告(条約第21条(3))

(54) Title: EFFICIENT METHOD FOR ESTABLISHING INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

(54) 発明の名称: 効率的な人工多能性幹細胞の樹立方法



(57) Abstract: The present invention provides a method for improving the efficiency of establishing induced pluripotent stem cells, the method including inhibiting the functioning of STAT1 in a nuclear reprogramming process of a somatic cell.

(57) 要約: 本発明は、人工多能性幹細胞の樹立効率の改善方法であって、体細胞の核初期化工程においてSTAT1の機能を阻害することを含む、方法を提供する。

## 明 細 書

### 発明の名称：効率的な人工多能性幹細胞の樹立方法

#### 技術分野

[0001] 本発明は、人工多能性幹（以下、iPSともいう）細胞の樹立効率の改善方法およびそのための薬剤に関する。より詳細には、本発明は、体細胞の核初期化工程においてSignal Transducer and Activator for Transcription 1（以下、STAT1と記す）の機能を阻害することによる、iPS細胞の樹立効率の改善方法、並びにSTAT1の機能阻害物質を有効成分とするiPS細胞の樹立効率改善剤に関する。

#### 背景技術

[0002] 核初期化技術は、患者特異的もしくは疾患特異的な多能性幹細胞を作製する機会を提供する。iPS細胞は、体細胞にOct3/4、Sox2、Klf4およびc-Mycの4因子を導入することにより作製され、胚性幹細胞と同様の多能性を有する細胞である（非特許文献1-3）。当初の核初期化技術は、樹立効率が極めて低く、十分なiPS細胞量を確保することができていなかったため、効率的な樹立方法を探索すべく、現在に至るまで多くの研究がなされてきた（非特許文献4-7）。これらの成果として、例えば、p53のノックダウン、TGF- $\beta$ シグナル伝達経路の阻害、DNAメチルトランスフェラーゼの阻害およびp38の阻害などのようないくつかの種類の干渉が、iPS細胞の樹立効率を促進することが明らかとなってきた（特許文献1ならびに非特許文献4および8-14）。

しかしながら、iPS細胞の樹立効率は未だに十分とは言えず、また、多くの初期化細胞が十分な初期化を達成できない理由も明らかとなっていない。

[0003] ところで、STAT1は、インターフェロン- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ )、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、上皮細胞増殖因子 (EGF)、血小板由来増殖因子 (PDGF) およびインターロイキン-6 (IL-6) を含む種々の増殖因子やサイトカインにより活性化される転写アクチベーターであり、細胞の生存において重要な役割を果たすことが知られている（非特許文献15および16）。しかしながら、核初

期化との関連については知られていない。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0004] 特許文献1 : WO2012/036299

### 非特許文献

[0005] 非特許文献1 : Takahashi, K. and Yamanaka, S., Cell, 126: 663-676 (2006)

非特許文献2 : Takahashi, K. et al., Cell, 131: 861-872 (2007)

非特許文献3 : Yu, J. et al., Science, 318: 1917-1920 (2007)

非特許文献4 : Huangfu, D. et al., Nat. Biotechnol., 26: 795-797 (2008)

非特許文献5 : Huangfu, D. et al., Nat. Biotechnol., 26: 1269-1275 (2008)

非特許文献6 : Esteban, MA. et al., Cell Stem Cell, 6: 71-79 (2010)

非特許文献7 : Yoshida, Y. et al., Cell Stem Cell, 5: 237-241 (2009)

非特許文献8 : Hong, H. et al., Nature, 460: 1132-1135 (2009)

非特許文献9 : Kawamura, T. et al., Nature, 460: 1140-1144 (2009)

非特許文献10 : Li, H. et al., Nature, 460: 1136-1139 (2009)

非特許文献11 : Marion, R.M. et al., Nature, 460: 1149-1153 (2009)

非特許文献12 : Utikal, J. et al., Nature, 460: 1145-1148 (2009)

非特許文献13 : Maherali, N. et al., Curr. Biol., 19: 1718-1723 (2009)

非特許文献14 : Millelsen, T.S. et al., Nature, 454: 794 (2008)

非特許文献15 : Stark, G.R. et al., Immunity, 36(4): 503-14 (2012)

非特許文献16 : Ivashkiv, L.B. et al., Arthritis Res. Ther., 6: 159-168 (2004)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の目的は、iPS細胞の樹立効率を改善する手段を提供することであり

、それを用いた効率的なiPS細胞の製造方法を提供することである。

### 課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、体細胞の核初期化工程においてSTAT1の機能を阻害することにより、iPS細胞の樹立効率を顕著に増大させ得ることを明らかにした。本発明は、そのような知見を基にして完成に至ったものである。

[0008] 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) 人工多能性幹細胞の樹立効率の改善方法であって、体細胞の核初期化工程においてSTAT1の機能を阻害することを含む、方法、
- (2) STAT1の化学的阻害物質を体細胞に接触させることによりSTAT1の機能を阻害する、(1)に記載の方法、
- (3) 前記阻害物質がEGC(epigallocatechin)である、(2)に記載の方法、
- (4) STAT1に対するsiRNA、shRNAおよびそれらをコードするDNAからなる群より選択される核酸を体細胞に接触させることによりSTAT1の機能を阻害する、(1)に記載の方法、
- (5) STAT1の機能阻害物質を含有してなる、人工多能性幹細胞の樹立効率改善剤、
- (6) 前記阻害物質がSTAT1の化学的阻害物質である、(5)に記載の剤、
- (7) 前記阻害物質がEGC(epigallocatechin)である、(6)に記載の剤、
- (8) 前記阻害物質がSTAT1に対するsiRNA、shRNAおよびそれらをコードするDNAからなる群より選択される核酸である、(5)に記載の剤、
- (9) 体細胞に核初期化物質およびSTAT1の機能阻害物質を接触させることを含む、人工多能性幹細胞の製造方法、
- (10) 前記阻害物質が化学的阻害物質である、(9)に記載の方法、
- (11) 前記阻害物質がEGC(epigallocatechin)である、(10)に記載の方法、
- (12) 前記阻害物質がSTAT1に対するsiRNA、shRNAおよびそれらをコードするDNAからなる群より選択される核酸である、(9)に記載の方法、

(13) 核初期化物質がOct3/4、KlfファミリーメンバーおよびSoxファミリーメンバー、またはそれらをコードする核酸を含み、当該Klfファミリーメンバーが、Klf1、Klf2、Klf4またはKlf5、好ましくはKlf2またはKlf4であり、当該Soxファミリーメンバーが、Sox1、Sox2、Sox3、Sox15、Sox17またはSox18、好ましくはSox1、Sox2、Sox3、Sox15またはSox17である、(9)～(12)のいずれかに記載の方法、および

(14) 核初期化物質がさらにMycファミリーメンバー、またはそれをコードする核酸を含み、当該Mycファミリーメンバーが、c-Myc、c-MycT58A（活性型変異体）、N-MycまたはL-Mycである、(13)に記載の方法。

## 発明の効果

[0009] STAT1の機能阻害物質はiPS細胞の樹立効率を顕著に増大させることができるので、従来の樹立効率の低かったiPS細胞誘導法において有用である。

## 図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、ヒト皮膚由来線維芽細胞(HDF)に4遺伝子(Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc)を導入し、その2日後にSTAT1に対するsiRNAを導入し、感染16日目(4遺伝子の導入から16日目)に得られたヒトES細胞様コロニーの数を示すグラフである。図中、Sicontrolは対照群を示し、SiSTAT1(HSS110273、Invitrogen社)はSTAT1に対するsiRNAを示す。\*はp<0.05示す。

[図2]図2は、ヒト皮膚由来線維芽細胞(HDF)に4遺伝子(Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc)を導入し、その2日後にSTAT1に対するsiRNAを導入し、感染16日目(4遺伝子の導入から16日目)に得られたヒトES細胞様コロニーの数を示すグラフである。図中、SiControlは対照群を示し、SiSTAT1-1(HSS110273、Invitrogen社)およびSiSTAT1-2(HSS186128、Invitrogen社)は、それぞれSTAT1の異なる配列を標的としたSTAT1に対するsiRNAを示す。

[図3]図3は、ヒト皮膚由来線維芽細胞(HDF)に4遺伝子(Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc)を導入し、EGC(epigallocatechin)を感染5日目から24日目まで添加し、感染24日目(4遺伝子の導入から24日目)に得られたヒトES細胞様コロニーの数を示すグラフである。\*はp<0.05示す。

## 発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、体細胞の核初期化工程においてSTAT1の機能を阻害することによる、iPS細胞の樹立効率の改善方法を提供する。体細胞の核初期化は、該体細胞を後述する核初期化物質と接触させる、好ましくは該体細胞に核初期化物質を導入することにより行われる。ここで「核初期化工程」とは、体細胞と核初期化物質との接触から、初代の胚性幹細胞（ES細胞）様コロニーを生じる前までの期間を意味する。

STAT1の機能を阻害する手段は特に制限されないが、好ましくは、体細胞にSTAT1の機能阻害物質を接触させる方法が挙げられる。

### [0012] (a) 体細胞ソース

本発明においてiPS細胞作製のための出発材料として用いることのできる体細胞は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、サル、ウシ、ブタ、ラット、イヌ等）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（例えば、角質化表皮細胞）、粘膜上皮細胞（例えば、舌表層の上皮細胞）、外分泌腺上皮細胞（例えば、乳腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例えば、副腎髓質細胞）、代謝・貯蔵用の細胞（例えば、肝細胞）、境界面を構成する内腔上皮細胞（例えば、I型肺胞細胞）、内鎖管の内腔上皮細胞（例えば、血管内皮細胞）、運搬能をもつ纖毛のある細胞（例えば、気道上皮細胞）、細胞外マトリックス分泌用細胞（例えば、線維芽細胞）、収縮性細胞（例えば、平滑筋細胞）、血液と免疫系の細胞（例えば、Tリンパ球）、感覚に関する細胞（例えば、桿細胞）、自律神経系ニューロン（例えば、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（例えば、隨伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例えば、星状グリア細胞）、色素細胞（例えば、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、例えば、神経幹細胞

、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）が挙げられる。

[0013] 体細胞を採取するソースとなる哺乳動物個体は特に制限されないが、得られるiPS細胞がヒトの再生医療用途に使用される場合には、拒絶反応が起こらないという観点から、患者本人またはHLAの型が同一もしくは実質的に同一である他人から体細胞を採取することが特に好ましい。ここでHLAの型が「実質的に同一」とは、免疫抑制剤などの使用により、該体細胞由来のiPS細胞から分化誘導することにより得られた細胞を患者に移植した場合に移植細胞が生着可能な程度にHLAの型が一致していることをいう。たとえば主たるHLA（例えばHLA-A、HLA-BおよびHLA-DRの3遺伝子座、あるいはさらにHLA-Cを加えた4遺伝子座）が同一である場合などが挙げられる（以下同じ）。また、ヒトに投与（移植）しない場合、例えば、患者の薬剤感受性や副作用の有無を評価するためのスクリーニング用の細胞のソースとしてiPS細胞を使用する場合には、同様に患者本人または薬剤感受性や副作用と相関する遺伝子多型が同一である他人から体細胞を採取することが望ましい。

[0014] 哺乳動物から分離した体細胞は、核初期化工程に供するに先立って、細胞の種類に応じてその培養に適した自体公知の培地で前培養することができる。そのような培地としては、例えば、約5~20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、RPMI1640培地、199培地、F12培地などが挙げられるが、それらに限定されない。核初期化物質及びSTAT1の機能阻害物質（さらに必要に応じて、後述する他のiPS細胞の樹立効率改善物質）との接触に際し、例えば、カチオニックリポソームなど導入試薬を用いる場合には、導入効率の低下を防ぐため、無血清培地に交換しておくことが好ましい場合がある。

[0015] (b) STAT1の機能阻害物質

本明細書において「STAT1の機能阻害物質」とは、(1)STAT1タンパク質の機能もしくは(2)STAT1遺伝子の発現を阻害し得る限り、いかなる物質であってもよい。すなわち、STAT1タンパク質に直接作用してその機能を阻害する物質

や、STAT1遺伝子に直接作用してその発現を阻害する物質のみならず、STAT1のシグナル伝達に関与する因子に作用することにより、結果的にSTAT1タンパク質の機能やSTAT1遺伝子の発現を阻害する物質も、本明細書における「STAT1の機能阻害物質」に含まれる。

[0016] STAT1タンパク質の機能を阻害する物質としては、例えば、STAT1の化学的阻害物質、STAT1のドミナントネガティブ変異体もしくはそれをコードする核酸、抗STAT1アンタゴニスト抗体もしくはそれをコードする核酸、STAT1経路を阻害する物質などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、STAT1の化学的阻害物質が挙げられる。

[0017] (1-1) STAT1の化学的阻害物質

本明細書において「化学的阻害物質」とは、アンチセンス効果、RNA干渉、リボザイム作用などによる発現阻害や、抗原抗体反応、ドミナントネガティブ効果などによる機能阻害を含む、生物学的作用を介して阻害効果を発揮する物質以外の阻害物質を意味し、典型的には、非タンパク性かつ非核酸性の低分子阻害物質である。本発明で使用しうる「STAT1の化学的阻害物質」としては、(2R, 3S, 4S, 5R)-2-(6-amino-2-fluoro-9H-purin-9-yl)-5-(hydroxymethyl)-tetrahydrofuran-3, 4-diol(別名、Fludarabine) ; peptidomimetics (Gunning PT, et al., Bioorg Med Chem Lett, 17(7):1875-8 (2007)) ; 4-(3'-bromo-4' -hydroxyphenyl)-amino-6, 7-dimethoxyquinazoline (WHI-P154) (Sareila O et al., Int Immunopharmacol., 8(1):100-8 (2008) ; Outi Sareila, et al., Mediators Inflamm., (2):16161 (2006)) ;  $\alpha$ -Cyano-(3, 4-dihydroxy)-N-benzylcinnamide (AG-490 (別名、Tyrphostin B42))(Outi Sareila, et al., Mediators Inflamm., (2):16161 (2006)) ; カテキン類 [例えば、epigallocatechin (EGC) (本明細書においては、特にことわらない限り、フリーオールドおよびエステル体 (例えば、epigallocatechin gallate (EGCG)) を包含する意味で用いる。) (Paul A. Townsend, et al., FASEB J., 18(13):1621-3 (2004); Menegazzi M. et al., FASEB J., 15(7):1309-11(2001)) ] などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、EGCである。これらは

市販されており、例えば、EGCは、Sigma - aldrich (E4143) などから入手可能である。

[0018] 体細胞へのSTAT1の化学的阻害物質の接触は、該阻害物質を適当な濃度で水性もしくは非水性溶媒に溶解し、ヒトまたはマウスより単離した体細胞の培養に適した培地（例えば、約5～20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改变イーグル培地（DMEM）、RPMI1640培地、199培地、F12培地など）中に、阻害物質濃度がSTAT1の機能阻害に十分で且つ細胞毒性がみられない範囲となるように該阻害物質溶液を添加して、細胞を一定期間培養することにより実施することができる。阻害物質濃度は用いる阻害物質の種類によって異なるが、約0.1nM～約100nMの範囲で適宜選択される。接触期間は細胞の核初期化が達成されるのに十分な時間であれば特に制限はないが、通常は陽性コロニーが出現するまで培地に共存させておけばよい。

[0019] (1-2) STAT1のドミナントネガティブ変異体

STAT1は通常転写アクチベーター活性を有するが、本明細書において「STAT1のドミナントネガティブ変異体」は、体細胞に内在する野生型STAT1タンパク質と競合的に作用して、その機能を阻害する限り、いかなる物質であってもよい。例えば、ヒトおよびマウスにおけるSTAT1のリン酸化部位である727位のセリンをアラニンに点変異させたSTAT1S727Aなどが挙げられる (Zilong Wen, et al., Cell, 82(2):241-50 (1995))。

[0020] STAT1のドミナントネガティブ変異体は、例えば、以下の手法により得ることができる。まず、マウスSTAT1については、例えば、NM\_001205313.1の配列、NM\_001205314.1の配列、NM\_009283.4の配列、ヒトSTAT1については、例えば、NM\_007315.3の配列、NM\_139266.2の配列に基づいて適当なオリゴヌクレオチドをプローブもしくはプライマーとして合成し、マウスまたはヒトの細胞・組織由来のmRNA、cDNAもしくはcDNAライブラリーから、ハイブリダイゼーション法や(RT-)PCR法を用いてマウスまたはヒトSTAT1 cDNAをクローニングし、適当なプラスミドにサブクローニングする。変異を導入しようとする部位のコドンを所望の他のアミノ酸をコードするコドンに置換した形で、当

該部位を含むプライマーを合成し、これを用いてSTAT1 cDNAを挿入したプラスミドを鑄型とするインバースPCRを行うことにより、目的のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸を取得する。欠失変異体の場合には、欠失させる部位の外側にプライマーを設計して、同様にインバースPCRを行えばよい。このようにして得られたドミナントネガティブ変異体をコードする核酸を宿主細胞に導入し、該細胞を培養して得られる培養物から組換えタンパク質を回収することにより、所望のドミナントネガティブ変異体を取得することができる。

[0021] 体細胞へのドミナントネガティブ変異体の接触は、自体公知の細胞へのタンパク質導入方法を用いて実施することができる。そのような方法としては、例えば、タンパク質導入試薬を用いる方法、タンパク質導入ドメイン（PTD）融合タンパク質を用いる方法、マイクロインジェクション法などが挙げられる。タンパク質導入試薬としては、カチオン性脂質をベースとしたBioPOTER Protein Delivery Reagent (Gene Therapy Systems)、Pro-Ject<sup>TM</sup> Protein Transfection Reagent (PIERCE) 及びProVectin (IMGENEX)、脂質をベースとしたProfect-1 (Targeting Systems)、膜透過性ペプチドをベースとしたPenetratin Peptide (Q biogene) 及びChariot Kit (Active Motif)、HVJエンベロープ（不活化センダイウイルス）を利用したGenomONE（石原産業）等が市販されている。導入はこれらの試薬に添付のプロトコルに従って行うことができるが、一般的な手順は以下の通りである。STAT1のドミナントネガティブ変異体を適当な溶媒（例えば、PBS、HEPES等の緩衝液）に希釈し、導入試薬を加えて室温で5-15分程度インキュベートして複合体を形成させ、これを無血清培地に交換した細胞に添加して37°Cで1ないし数時間インキュベートする。その後培地を除去して血清含有培地に交換する。

[0022] PTDとしては、ショウジョウバエ由来のAntP、HIV由来のTAT(Frankel, A. et al, Cell 55, 1189-93 (1988); Green, M. & Loewenstein, P.M. Cell 55, 1179-88 (1988))、Penetratin (Derossi, D. et al, J. Biol. Chem. 269, 10444-50 (1994))、Buforin II (Park, C. B. et al. Proc. Natl Acad. Sci

. USA 97, 8245-50 (2000))、Transportan (Pooga, M. et al. FASEB J. 12, 67-77 (1998))、MAP (model amphipathic peptide) (Oehlke, J. et al. Biochim. Biophys. Acta. 1414, 127-39 (1998))、K-FGF (Lin, Y. Z. et al. J. Biol. Chem. 270, 14255-14258 (1995))、Ku70 (Sawada, M. et al. Nature Cell Biol. 5, 352-7 (2003))、Prion (Lundberg, P. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 299, 85-90 (2002))、pVEC (Elmquist, A. et al. Ex p. Cell Res. 269, 237-44 (2001))、Pep-1 (Morris, M. C. et al. Nature Biotechnol. 19, 1173-6 (2001))、Pep-7 (Gao, C. et al. Bioorg. Med. Chem. 10, 4057-65 (2002))、SynBl (Rousselle, C. et al. Mol. Pharmacol. 57, 679-86 (2000))、HN-I (Hong, F. D. & Clayman, G L. Cancer Res. 60, 6551-6 (2000))、HSV由来のVP22等のタンパク質の細胞通過ドメインを用いたものが開発されている。PTD由来のCPPとしては、11R (Cell Stem Cell, 4: 381-384(2009)) や9R (Cell Stem Cell, 4:472-476(2009))等のポリアルギニンが挙げられる。STAT1のドミナントネガティブ変異体のcDNAとPTD配列もしくはCPP配列とを組み込んだ融合タンパク質発現ベクターを作製して組換え発現させ、融合タンパク質を回収して導入に用いる。導入は、タンパク質導入試薬を添加しない以外は上記と同様にして行うことができる。比較的分子量の小さい欠失変異体の導入などに好適である。

[0023] マイクロインジェクションは、先端径 $1\mu\text{m}$ 程度のガラス針にタンパク質溶液を入れ、細胞に穿刺導入する方法であり、確実に細胞内にタンパク質を導入することができる。

その他、エレクトロポレーション法、セミインタクセル法 (Kano, F. et al. Methods in Molecular Biology, Vol. 322, 357-365(2006))、Wr-t ペプチドによる導入法 (Kondo, E. et al., Mol. Cancer Ther. 3(12), 1623-1630(2004))などのタンパク質導入法も用いることができる。

[0024] タンパク質導入操作は1回以上の任意の回数（例えば、1回以上10回以下、又は1回以上5回以下等）行うことができ、好ましくは導入操作を2回以上（たとえば3回又は4回）繰り返して行うことができる。導入操作を繰り返し行う

場合の間隔としては、例えば6時間～7日間、好ましくは12～48時間もしくは7日間が挙げられる。

[0025] (1-3) STAT1のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸

しかしながら、体細胞への導入の容易さを考慮すると、STAT1のドミナントネガティブ変異体は、タンパク質自体としてよりも、それをコードする核酸の形態で用いることがむしろ好ましい。したがって、本発明の別の好ましい実施態様において、STAT1機能阻害物質は、STAT1のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸である。該核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよいが、好ましくはDNAである。また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。STAT1のドミナントネガティブ変異体をコードするcDNAは、該変異体タンパク質の作製について上記した手法によりクローニングすることができる。

[0026] 単離されたcDNAは、目的の体細胞で機能し得るプロモーターを含む適当な発現ベクターに挿入される。発現ベクターとしては、例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスなどのウイルスベクター、動物細胞発現プラスミド（例、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNAI/Neo）などが用いられ得る。用いるベクターの種類は、得られるiPS細胞の用途に応じて適宜選択することができる。

[0027] 発現ベクターにおいて使用されるプロモーターとしては、例えばEF1 $\alpha$ プロモーター、CAGプロモーター、SR $\alpha$ 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 $\alpha$ プロモーター、CAGプロモーター、MoMuLV LTR、CMVプロモーター、SR $\alpha$ プロモーターなどが好ましい。

[0028] 発現ベクターは、プロモーターの他に、所望によりエンハンサー、ポリA付加シグナル、選択マーカー遺伝子、SV40複製起点などを含有していてよい。選択マーカー遺伝子としては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、

ネオマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

[0029] STAT1のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸を含む発現ベクターは、ベクターの種類に応じて、自体公知の手法により細胞に導入することができる。例えば、ウイルスベクターの場合、ドミナントネガティブ変異体をコードする核酸を含むプラスミドを適当なパッケージング細胞（例、Plat-E 細胞）や相補細胞株（例、293細胞）に導入して、培養上清中に產生されるウイルスベクターを回収し、各ウイルスベクターに応じた適切な方法により、該ベクターを細胞に感染させる。例えば、ベクターとしてレトロウイルスベクターを用いる具体的手段が WO2007/69666、Cell, 126, 663-676 (2006) 及び Cell, 131, 861-872 (2007) に開示されており、ベクターとしてレンチウイルスベクターを用いる場合については、Science, 318, 1917-1920 (2007) に開示がある。iPS細胞を再生医療のための細胞ソースとして利用する場合、導入遺伝子の発現（再活性化）は、iPS細胞由来の分化細胞から再生された組織における発癌リスクを高める可能性があるので、導入遺伝子は細胞の染色体に組み込まれず、一過的に発現することが好ましい。かかる観点からは、染色体への組込みが稀なアデノウイルスベクターの使用が好ましい。アデノウイルスベクターを用いる具体的手段は、Science, 322, 945-949 (2008) に記載されている。また、アデノ随伴ウイルスも染色体への組込み頻度が低く、アデノウイルスベクターと比べて細胞毒性や炎症惹起作用が低いので、別の好ましいベクターとして挙げられる。センダイウイルスベクターは染色体外で安定に存在することができ、必要に応じてsiRNAにより分解除去することができるので、同様に好ましく利用され得る。センダイウイルスベクターについては、J. Biol. Chem., 282, 27383-27391 (2007) や特許第3602058号に記載のものを用いることができる

[0030] レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターを用いる場合は、いっただん導入遺伝子のサイレンシングが起こったとしても、後に再活性化される可能性があるので、例えば、Cre/loxPシステムを用いて、不要となった時点でSTAT1ドミナントネガティブ変異体をコードする核酸を切り出す方法が好ま

しく用いられ得る。即ち、該核酸の両端に loxP配列を配置しておき、iPS細胞が誘導された後で、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Creリコンビナーゼを作用させ、loxP配列に挟まれた領域を切り出すことができる。また、LTR U3領域のエンハンサーープロモーター配列は、挿入突然変異によって近傍の宿主遺伝子を上方制御する可能性があるので、当該配列を欠失、もしくはSV40などのポリアデニル化配列で置換した3' -自己不活性化 (SIN) LTRを使用して、切り出されずゲノム中に残存するloxP配列より外側のLTRによる内因性遺伝子の発現制御を回避することがより好ましい。Cre-loxPシステムおよびSIN LTRを用いる具体的手段は、Chang et al., *Stem Cells*, 27: 1042-1049 (2009)に開示されている。

[0031] 一方、非ウイルスベクターであるプラスミドベクターの場合には、リポフェクション法、リポソーム法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃法などを用いて該ベクターを細胞に導入することができる。ベクターとしてプラスミドを用いる具体的手段は、例えばScience, 322, 949-953 (2008) 等に記載されている。

[0032] プラスミドベクターやアデノウイルスベクター等を用いる場合、遺伝子導入は1回以上の任意の回数（例えば、1回以上10回以下、又は1回以上5回以下など）行うことができる。2種以上の発現ベクターを体細胞に導入する場合には、これらの全ての種類の発現ベクターを同時に体細胞に導入することが好ましいが、この場合においても、導入操作は1回以上の任意の回数（例えば、1回以上10回以下、又は1回以上5回以下など）行うことができ、好ましくは導入操作を2回以上(たとえば3回又は4回)繰り返して行うことができる。

尚、アデノウイルスやプラスミドを用いる場合でも、導入遺伝子が染色体に組み込まれるので、結局はサザンプロットやPCRにより染色体への遺伝子挿入がないことを確認する必要がある。そのため、上記Cre-loxPシステムのように、いったん染色体に導入遺伝子を組み込んだ後に、該遺伝子を除去する手段を用いることは好都合であり得る。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。piggyBacトランスポゾンを用いる具体的手段は、Kaji, K. et al., *Nature*, 458: 771-775 (2009)、Woltjen et al., *Nature*, 458: 766-770 (2009) に開示されている。

[0033] 別の好ましい非組込み型ベクターとして、染色体外で自律複製可能なエピソーマルベクターが挙げられる。エピソーマルベクターを用いる具体的手段は、Yu et al., *Science*, 324, 797-801 (2009)に開示されている。必要に応じて、エピソーマルベクターの複製に必要なベクター要素の5'側および3'側に loxP配列を同方向に配置したエピソーマルベクターにSTAT1ドミナントネガティブ変異体をコードする核酸を挿入した発現ベクターを構築し、これを体細胞に導入することもできる。

該エピソーマルベクターとしては、例えば、EBV、SV40等に由来する自律複製に必要な配列をベクター要素として含むベクターが挙げられる。自律複製に必要なベクター要素としては、具体的には、複製開始点と、複製開始点に結合して複製を制御するタンパク質をコードする遺伝子であり、例えば、EBVにあっては複製開始点oriPとEBNA-1遺伝子、SV40にあっては複製開始点oriとSV40 Large T antigen遺伝子が挙げられる。

また、エピソーマル発現ベクターは、STAT1ドミナントネガティブ変異体をコードする核酸の転写を制御するプロモーターを含む。該プロモーターとしては、前記と同様のプロモーターが用いられ得る。また、エピソーマル発現ベクターは、前記と同様に、所望によりエンハンサー、ポリA付加シグナル、選択マーカー遺伝子などをさらに含有していてもよい。選択マーカー遺伝子としては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

エピソーマルベクターは、例えばリポフェクション法、リポソーム法、エ

レクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃法などを用いて該ベクターを細胞に導入することができる。具体的には、例えばScience, 324: 797-801 (2009)等に記載される方法を用いることができる。

iPS細胞から導入遺伝子の複製に必要なベクター要素が除去されたか否かの確認は、該ベクター要素内部および／またはloxP配列近傍の塩基配列を含む核酸をプローブまたはプライマーとして用い、該iPS細胞から単離したエピソーム画分を鑄型としてサザンブロット分析またはPCR分析を行い、バンドの有無または検出バンドの長さを調べることにより実施することができる。エピソーム画分の調製は当該分野で周知の方法と用いて行えばよく、例えば、Science, 324: 797-801 (2009)等に記載される方法を用いることができる。

#### [0034] (1-4) STAT1経路阻害物質

ここでSTAT1経路とは、STAT1を活性化し得るあらゆる上流のシグナル伝達パスウェイおよび活性化STAT1によって媒介されるあらゆる下流のシグナル伝達パスウェイを包含する意味で用いられる。したがって、STAT1経路阻害物質には、上記シグナル伝達パスウェイのいずれかまたは両方を阻害するいかなる物質も含まれる。

#### [0035] STAT1シグナル伝達経路においては、増殖因子やサイトカインなどのリガンドが細胞膜における受容体に結合すると受容体の複合化が起こり、続いてJakキナーゼが活性化され、次いでSTAT1が活性化されていることが知られている。活性化されたSTAT1は核内に移行し、標的遺伝子の転写を活性化する。STAT1シグナル伝達経路の阻害剤としては、例えば、PIAS1タンパク質 (Liu B, et al., Proc Natl Acad Sci, 95(18):10626-31(1998)) ; histone acetyltransferase (HAT) CBP (Kramer OH, et al., Genes Dev., 23(2):223-35 (2009)) ; cAMP、カルシウムイオノフォアおよびGM-CSF (Sengupta TK, et al., Proc Natl Acad Sci, 93:9499-9504 (1996) ; Yoshimura, et al., Cytokine Growth Factor Rev, 9(3-4):197-204 (1998)) ; peptidomimetics (Gunning PT, et al., Bioorg Med Chem Lett, 17(7):1875-8 (2007)) ; (2R,3S,4S,5R)-2-(6-

amino-2-fluoro-9H-purin-9-yl)-5-(hydroxymethyl)-tetrahydrofuran-3,4-diol(別名、Fludarabine) ; CP-690,550 (tofacitinib) (Rosengren S, et al., Ann Rheum Dis, 71(3):440-7 (2012)) ; 4-(3'-bromo-4'-hydroxyphenyl)-amino-6,7-dimethoxyquinazoline (WHI-P154) (Sareila O et al., Int Immunopharmacol., 8(1):100-8 (2008) ; Outi Sareila, et al., Mediators Inflamm., (2):16161 (2006)) ;  $\alpha$ -Cyano-(3,4-dihydroxy)-N-benzylcinnamide (AG-490 (別名、Tyrphostin B42))(Outi Sareila, et al., Mediators Inflamm., (2):16161 (2006)) ; カテキン類 (例えば、epigallocatechin (EGC) (例えば、epigallocatechin gallate (EGCG) 等) (Paul A. Townsend, et al., FASEB J., 18(13):1621-3 (2004); Menegazzi M. et al., FASEB J., 15(7):1309-11(2001))) などが挙げられる。

#### [0036] (1-5) その他の物質

STAT1タンパク質の機能を阻害するその他の物質として、例えば、抗STAT1アンタゴニスト抗体もしくはそれをコードする核酸が挙げられる。抗STAT1アンタゴニスト抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。抗体のアイソタイプは特に限定されないが、好ましくはIgG、IgMまたはIgA、特に好ましくはIgGが挙げられる。また、該抗体は、完全抗体分子の他、例えばFab、Fab'、 $F(ab')等のフラグメント、scFv、scFv-Fc、ミニボディー、ダイアボディー等の遺伝子工学的に作製されたコンジュゲート分子、あるいはポリエチレン glycole (PEG) 等の蛋白質安定化作用を有する分子等で修飾されたそれらの誘導体などであってもよい。抗STAT1アンタゴニスト抗体は、STAT1またはその部分ペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。また、公知の抗STAT1アンタゴニスト抗体として、例えば、sc-464、sc-346 (Santa Cruz Biotechnology)、#9172 (Cell Signaling Technology) 等が挙げられる。抗STAT1アンタゴニスト抗体をコードする核酸は、抗STAT1モノクローナル抗体産生ハイブリドーマから常法により単離することができる。得られるH鎖及びL鎖遺伝子を連結して单鎖抗体をコードする核酸を作製することもできる。$

[0037] 抗STAT1アンタゴニスト抗体はSTAT1のドミナントネガティブ変異体と同様に、また、該抗体をコードする核酸は該変異体をコードする核酸と同様にして、それぞれ細胞に導入することができる。

[0038] 一方、STAT1遺伝子の発現を阻害する物質としては、例えば、STAT1に対するsiRNAもしくはshRNA、STAT1に対するsiRNAもしくはshRNAを発現するベクター、STAT1に対するアンチセンス核酸及びSTAT1に対するリボザイム等が挙げられる。

[0039] (2-1) STAT1に対するsiRNA及びshRNA

STAT1に対するsiRNAは、下記のNCBI accession numbersで示されたマウスまたはヒトの各STAT1 cDNA配列情報に基づいて、例えば、Elbashirら (Genes Dev., 15, 188-200 (2001)) の提唱する規則に従って設計することができる。

マウス ヒト

NM\_001205313.1 NM\_007315.3

NM\_001205314.1 NM\_139266.2

NM\_009283.4

[0040] siRNAの標的配列としては、原則的にはAA+(N)19であるが、AA+(N)21もしくはNA+(N)21であってもよい。また、センス鎖の5'末端がAAである必要はない。標的配列の位置は特に制限されるわけではないが、5' -UTR及び開始コドンから約50塩基まで、並びに3' -UTR以外の領域から標的配列を選択することが望ましい。標的配列のGC含量も特に制限はないが、約30-約50%が好ましく、GC分布に偏りがなく繰り返しが少ない配列が望ましい。尚、下記(2-2)のsiRNAもしくはshRNAを発現するベクターの設計において、プロモーターとしてpolII系プロモーターを使用する場合、ポリメラーゼの転写が停止しないように、4塩基以上TまたはAが連續する配列は選択しないようにすべきである。

[0041] 上述の規則に基づいて選択された標的配列の候補群について、標的以外のmRNAにおいて16-17塩基の連続した配列に相同意がないかどうかを、BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 等のホモロジー検索ソフトを用いて調

べ、選択した標的配列の特異性を確認する。特異性の確認された標的配列について、AA（もしくはNA）以降の19-21塩基にTTもしくはUUの3'末端オーバーハングを有するセンス鎖と、該19-21塩基に相補的な配列及びTTもしくはUUの3'末端オーバーハングを有するアンチセンス鎖とからなる2本鎖RNAをsiRNAとして設計する。また、shRNAは、ループ構造を形成しうる任意のリンカー配列（例えば、8-25塩基程度）を適宜選択し、上記センス鎖とアンチセンス鎖とを該リンカー配列を介して連結することにより設計することができる。

[0042] siRNA及び／又はshRNAの配列は、種々のwebサイト上に無料で提供される検索ソフトを用いて検索が可能である。このようなサイトとしては、例えば、Ambionが提供するsiRNA Target Finder ([http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/siRNA_finder.html)) 及びpSilencer™ Expression Vector用 インサートデザインツール ([http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/psilencer\\_converter.html](http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/psilencer_converter.html)) 、RNAi Codexが提供するGeneSeer (<http://codex.cshl.edu/scripts/newsearchhairpin.cgi>) がこれらに限定されず、QIAGEN、タカラバイオ、SiSearch、Dharmacon、Whitehead Institute、Invitrogen、Promega等のwebサイト上でも同様に検索が可能である。

[0043] STAT1に対するsiRNAは、上記のようにして設計されたセンス鎖及びアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドをDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、例えば、適当なアニーリング緩衝液中、約90～約95°Cで約1分程度変性させた後、約30～約70°Cで約1～約8時間アニーリングさせることにより調製することができる。また、STAT1に対するshRNAは、上記のようにして設計されたshRNA配列を有するオリゴヌクレオチドをDNA/RNA自動合成機で合成し、上記と同様にしてセルフアニーリングさせることによって調製することができる。

[0044] siRNA及びshRNAを構成するヌクレオチド分子は、天然型のRNAでもよいが、安定性（化学的および／または対酵素）や比活性（mRNAとの親和性）向上させるために、種々の化学修飾を含むことができる。例えば、ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンス核酸を構成する各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）を、例えば、ホスホロチオエ

ート (PS)、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾リン酸残基に置換することができる。また、各ヌクレオチドの糖（リボース）の2'位の水酸基を、-OR (Rは、例えばCH<sub>3</sub> (2'-O-Me)、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub> (2'-O-MOE)、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(NH)NH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>CONHCH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN等を示す) に置換してもよい。さらに、塩基部分（ピリミジン、プリン）に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基やカチオン性官能基の導入、あるいは2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換などが挙げられる。

- [0045] RNAの糖部のコンフォーメーションはC2'-endo (S型) とC3'-endo (N型) の2つが支配的であり、一本鎖RNAではこの両者の平衡として存在するが、二本鎖を形成するとN型に固定される。したがって、標的RNAに対して強い結合能を付与するために、2'酸素と4'炭素を架橋することにより、糖部のコンフォーメーションをN型に固定したRNA誘導体であるBNA(LNA) (Imanishi, T. et al., Chem. Commun., 1653-9, 2002; Jepsen, J.S. et al., Oligonucleotides, 14, 130-46, 2004) やENA (Morita, K. et al., Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 22, 1619-21, 2003) もまた、好ましく用いられ得る。
- [0046] 但し、天然型RNA中のすべてのリボヌクレオシド分子を修飾型で置換すると、RNAi活性が失われる場合があるので、RISC複合体が機能できる最小限の修飾ヌクレオシドの導入が必要である。
- [0047] STAT1に対するsiRNAは、例えば、Santa Cruz Biotechnology (例えば、Cat # sc-44123)、Invitrogen (例えば、Invitrogen Stealth RNAi™ siRNA、oligo ID: HSS110273) 等から購入することもできる。
- [0048] STAT1に対するsiRNAもしくはshRNAの体細胞への接触は、プラスミドDNAの場合と同様に、リポソーム法、ポリアミン法、エレクトロポレーション法、ビーズ法等を用いて、該核酸を細胞内へ導入することにより実施することができる。カチオニックリポソームを用いた方法が最も一般的で、導入効率も高い。Lipofectamine2000やOligofectamine (Invitrogen) などの一般的な遺伝子導入試薬の他、例えば、GeneEraser™ siRNA transfection reagent (Stratagene) 等のsiRNA導入に適した導入試薬も市販されている。導入されるsiRN

AもしくはshRNAは1種以上同時に導入することもできる。

[0049] (2-2) STAT1に対するsiRNAもしくはshRNAを発現するベクター

siRNAを発現するベクターには、タンデムタイプとステムループ（ヘアピン）タイプとがある。前者はsiRNAのセンス鎖の発現力セットとアンチセンス鎖の発現力セットをタンデムに連結したもので、細胞内で各鎖が発現してアニーリングすることにより2本鎖のsiRNA (dsRNA) を形成するというものである。一方、後者はshRNAの発現力セットをベクターに挿入したもので、細胞内でshRNAが発現しdicerによるプロセシングを受けてdsRNAを形成するというものである。プロモーターとしては、polII系プロモーター（例えば、CMV前初期プロモーター）を使用することもできるが、短いRNAの転写を正確に行わせるために、polIII系プロモーターを使用するのが一般的である。polIII系プロモーターとしては、マウスおよびヒトのU6-snRNAプロモーター、ヒトH1-RNase P RNAプロモーター、ヒトバリン-tRNAプロモーターなどが挙げられる。また、転写終結シグナルとして4個以上Tが連続した配列が用いられる。

[0050] このようにして構築したsiRNAもしくはshRNA発現力セットを、次いでプラスミドベクターやウイルスベクターに挿入する。このようなベクターとしては、STAT1のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸について上記したと同様のものが、好ましく利用され得る（レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスなどのウイルスベクターや、動物細胞発現プラスミドなど）。使用するベクターは、ドミナントネガティブ変異体の場合と同様、得られるiPS細胞の用途に応じて適宜選択され得る。あるいは、STAT1に対するshRNAをコードする発現ベクターとして、市販のプラスミド（例えば、Invitrogen社から市販されているCat. Code : psirna42-hstat1等）をもとに作製したレトロウイルス等のウイルスベクターなどを使用することもできる。

[0051] STAT1に対するsiRNAもしくはshRNAを発現するベクターの体細胞への接触は、上記のようにして調製されるプラスミドベクターもしくはウイルスベクターを細胞に導入することにより行われる。これらの遺伝子導入は、STAT1のド

ミナントネガティブ変異体をコードする核酸について上記したと同様の手法で行うことができる。

[0052] (2-3) その他の物質

STAT1遺伝子の発現を阻害する他の物質として、STAT1に対するアンチセンス核酸やリボザイムが挙げられる。

[0053] アンチセンス核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。アンチセンス核酸がDNAの場合、標的RNAとアンチセンスDNAとによって形成されるRNA:DNAハイブリッドは、内在性RNase Hに認識されて標的RNAの選択的な分解を引き起こすことができる。したがって、RNase Hによる分解を指向するアンチセンスDNAの場合、標的配列は、STAT1 mRNA中の配列だけでなく、STAT1遺伝子の初期転写産物におけるイントロン領域の配列であってもよい。アンチセンス核酸の標的領域は、該アンチセンス核酸がハイブリダイズすることにより、結果としてSTAT1蛋白質への翻訳が阻害されるものであればその長さに特に制限はなく、STAT1 mRNAの全配列であっても部分配列であってもよく、短いもので約15塩基程度、長いものでmRNAもしくは初期転写産物の全配列が挙げられる。合成の容易さや抗原性、細胞内移行性の問題等を考慮すれば、約15～約40塩基、特に約18～約30塩基からなるオリゴヌクレオチドが好ましい。標的配列の位置としては、5' -及び3' -UTR、開始コドン近傍などが挙げられるが、それらに限定されない。

[0054] リボザイムとは、狭義には、核酸を切断する酵素活性を有するRNAをいうが、本明細書では配列特異的な核酸切断活性を有する限りDNAをも包含する概念として用いるものとする。リボザイムとして最も汎用性の高いものとしては、ウイロイドやウイルソイド等の感染性RNAに見られるセルフスプライシングRNAがあり、ハンマーヘッド型やヘアピン型等が知られている。ハンマーヘッド型は約40塩基程度で酵素活性を発揮し、ハンマーヘッド構造をとる部分に隣接する両端の数塩基ずつ（合わせて約10塩基程度）をmRNAの所望の切断部位と相補的な配列にすることにより、標的mRNAのみを特異的に切断することが可能である。

[0055] アンチセンス核酸やリボザイムはDNA/RNA自動合成機を用いて合成することができる。これらを構成するヌクレオチド分子もまた、安定性、比活性などを向上させるために、上記のsiRNAの場合と同様の修飾を受けていてもよい。

[0056] あるいは、アンチセンス核酸やリボザイムは、siRNAの場合と同様に、それらをコードする核酸の形態で使用することもできる。

[0057] 上記STAT1の機能阻害物質は、体細胞の核初期化工程においてSTAT1の機能を阻害するのに十分な様式で体細胞に接触させる必要がある。ここで体細胞の核初期化は、核初期化物質を体細胞に接触させることにより実施することができる。

[0058] (c) 核初期化物質

本発明において「核初期化物質」とは、体細胞に導入することにより該体細胞からiPS細胞を誘導することができる物質（群）であれば、タンパク性因子またはそれをコードする核酸（ベクターに組み込まれた形態を含む）、あるいは低分子化合物等のいかなる物質から構成されてもよい。核初期化物質がタンパク性因子またはそれをコードする核酸の場合、好ましくは以下の組み合わせが例示される（以下においては、タンパク性因子の名称のみを記載する）。

- (1) Oct3/4, Klf4, c-Myc
- (2) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2（ここで、Sox2はSox1, Sox3, Sox15, Sox17またはSox18、好ましくはSox1, Sox3, Sox15またはSox17、より好ましくはSox1またはSox3で置換可能である。また、Klf4はKlf1, Klf2またはKlf5、好ましくはKlf2で置換可能である。さらに、c-MycはT58A（活性型変異体），N-Myc, L-Mycで置換可能である。）
- (3) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Fbx15, Nanog, Eras, ECAT15-2, TcfI,  $\beta$ -catenin（活性型変異体S33Y）
- (4) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, TERT, SV40 Large T antigen（以下、SV40 LT）
- (5) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, TERT, HPV16 E6

(6) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, TERT, HPV16 E7

(7) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, TERT, HPV6 E6, HPV16 E7

(8) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, TERT, Bmil

(以上、W0 2007/069666を参照（但し、上記(2)の組み合わせにおいて、Sox2からSox18への置換、Klf4からKlf1もしくはKlf5への置換については、Nature Biotechnology, 26, 101-106 (2008)を参照）。「Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2」の組み合わせについては、Cell, 126, 663-676 (2006)、Cell, 131, 861-872 (2007) 等も参照。「Oct3/4, Klf2（またはKlf5）, c-Myc, Sox2」の組み合わせについては、Nat. Cell Biol., 11, 197-203 (2009)も参照。「Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, hTERT, SV40LT」の組み合わせについては、Nature, 451, 141-146 (2008)も参照。）

(9) Oct3/4, Klf4, Sox2 (Nature Biotechnology, 26, 101-106 (2008)を参照)（ここで、Sox2はSox1, Sox3, Sox15, Sox17またはSox18で置換可能である。また、Klf4はKlf1, Klf2またはKlf5で置換可能である。）

(10) Oct3/4, Sox2, Nanog, Lin28 (Science, 318, 1917-1920 (2007)を参照)

(11) Oct3/4, Sox2, Nanog, Lin28, hTERT, SV40LT (Stem Cells, 26, 1998-2005 (2008)を参照)

(12) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Nanog, Lin28 (Cell Research (2008) 600-603を参照)

(13) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, SV40LT (Stem Cells, 26, 1998-2005 (2008)も参照)

(14) Oct3/4, Klf4 (Nature 454:646-650 (2008)、Cell Stem Cell, 2:525-528(2008)を参照)

(15) Oct3/4, c-Myc (Nature 454:646-650 (2008)を参照)

(16) Oct3/4, Sox2 (Nature, 451, 141-146 (2008), W02008/118820を参照)

(17) Oct3/4, Sox2, Nanog (W02008/118820を参照)

(18) Oct3/4, Sox2, Lin28 (W02008/118820を参照)

- (19) Oct3/4, Sox2, c-Myc, Esrrb (ここで、EsrrbはEsrrgで置換可能である。Nat. Cell Biol., 11, 197-203 (2009) を参照)
- (20) Oct3/4, Sox2, Esrrb (Nat. Cell Biol., 11, 197-203 (2009) を参照)
- (21) Oct3/4, Klf4, L-Myc
- (22) Oct3/4, Nanog
- (23) Oct3/4 (Cell 136: 411-419 (2009)、Nature, 08436, doi:10.1038 published online(2009))
- (24) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Nanog, Lin28, SV40LT (Science, 324: 797-801 (2009)を参照)
- (25) Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28
- (26) Oct3/4, Sox2, Klf4, L-Myc, Lin28, Glis1

[0059] 上記(1)-(26)において、Oct3/4に代えて他のOctファミリーのメンバー、例えばOct1A、Oct6などを用いることもできる。また、Sox2 (またはSox1、Sox3、Sox15、Sox17、Sox18) に代えて他のSoxファミリーのメンバー、例えばSox7などを用いることもできる。また、上記(1)-(26)には該当しないが、それらのいずれかにおける構成要素をすべて含み、且つ任意の他の物質をさらに含む組み合わせも、本発明における「核初期化物質」の範疇に含まれ得る。また、核初期化の対象となる体細胞が上記(1)-(26)のいずれかにおける構成要素の一部を、核初期化のために十分なレベルで内在的に発現している条件下にあっては、当該構成要素を除いた残りの構成要素のみの組み合わせもまた、本発明における「核初期化物質」の範疇に含まれ得る。

[0060] これらの組み合わせの中で、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-MycもしくはL-Myc, Nanog, Lin28およびSV40LTから選択される少なくとも1つ、好ましくは2つ以上、より好ましくは3つ以上が、好ましい核初期化物質の例として挙げられる。

[0061] とりわけ、得られるiPS細胞を治療用途に用いることを念頭においた場合、Oct3/4, Sox2およびKlf4の3因子の組み合わせ（即ち、上記(9)）が好ましい。一方、iPS細胞を治療用途に用いることを念頭に置かない場合（例えば、創薬スクリーニング等の研究ツールとして用いる場合など）は、Oct3/4, Sox2お

よりKlf4の3因子のほか、それにc-Mycを加えた4因子を例示することができる。あるいは、iPS細胞の使用態様にかかわらず、Oct3/4、Sox2およびKlf4の3因子にL-MycとLin28を加えた5因子（即ち、上記(25)）、さらにGlis1（即ち、上記(26)）やSV40 Large Tを加えた6因子などを例示することができる。

[0062] さらに、上記におけるc-MycをL-Mycに変更した組み合わせも、好ましい核初期化物質の例として挙げられる。

[0063] 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

[0064] 核初期化物質としてタンパク性因子自体を用いる場合には、得られたcDNAを適当な発現ベクターに挿入して宿主細胞に導入し、該細胞を培養して得られる培養物から組換えタンパク性因子を回収することにより調製することができる。一方、核初期化物質としてタンパク性因子をコードする核酸を用いる場合、得られたcDNAを、上記STAT1のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸の場合と同様にして、ウイルスベクター、エピソーマルベクターもしくはプラスミドベクターに挿入して発現ベクターを構築し、核初期化工程に供される。必要に応じて、上記Cre-loxPシステムやpiggyBacトランスポゾン

ンシステムを利用することもできる。尚、核初期化物質として2以上のタンパク性因子をコードする核酸を細胞に導入する場合、各核酸を別個のベクターに担持させてもよいし、複数の核酸をタンデムに繋いでポリリストロニックベクターとすることもできる。後者の場合、効率的なポリリストロニック発現を可能にするために、例えば、口蹄疫ウイルスの2A配列 (PLoS ONE 3, e2532, 2008, Stem Cells 25, 1707, 2007) 、IRES配列 (U.S. Patent No. 4,937,190) など、好ましくは2A配列を用いることができる。

[0065] 核初期化物質の体細胞への接触は、(a) 該物質がタンパク性因子である場合、上記STAT1のドミナントネガティブ変異体と同様にして、(b) 該物質が(a)のタンパク性因子をコードする核酸である場合、上記STAT1のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸と同様にして、実施することができる。一方、(c) 核初期化物質が低分子化合物である場合、上記STAT1の化学的阻害物質と同様にして実施することができる。

[0066] (d) iPS細胞の樹立効率改善物質

上記STAT1の機能阻害物質に加え、公知の他の樹立効率改善物質を体細胞に接触させることにより、iPS細胞の樹立効率をより高めることが期待できる。

[0067] iPS細胞の樹立効率改善物質としては、例えば、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 [例えば、バルプロ酸 (VPA) (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 (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 (Ce

ll Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、UTF1(Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、Wnt Signaling活性化剤（例えばsoluble Wnt3a）(Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008))、2i/LIF (2iはmitogen-activated protein kinase signallingおよびglycogen synthase kinase-3の阻害剤、PloS Biology, 6(10), 2237-2247 (2008))、ES細胞特異的miRNA（例えば、miR-302-367クラスター (Mol. Cell. Biol. doi:10.1128/MCB.00398-08)、miR-302 (RNA (2008) 14: 1-10)、miR-291-3p, miR-294およびmiR-295(以上、Nat. Biotechnol. 27: 459-461 (2009)))、3' -phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) activator (例、PS48 (Cell Stem Cell, 7: 651-655 (2010)) など)、神経ペプチドY (WO 2010/147395)、プロスタグラニン類（例えば、プロスタグラニンE2およびプロスタグラニンJ2）(WO 2010/068955) 等が挙げられるが、それらに限定されない。好ましい一実施態様においては、p53の機能阻害物質が使用される。p53の機能阻害物質の具体例、それらの取得方法および体細胞との接触方法については、WO 2009/157593に詳細に記載されている。

前記で核酸性の発現阻害剤はsiRNAもしくはshRNAをコードするDNAを含む発現ベクターの形態であってもよい。

[0068] 尚、前記核初期化物質の構成要素のうち、例えばSV40 large T等は、体細胞の核初期化のために必須ではなく補助的な因子であるという点において、iPS細胞の樹立効率改善物質の範疇にも含まれ得る。核初期化の機序が明らかでない現状においては、核初期化に必須の因子以外の補助的な因子について、それらを核初期化物質として位置づけるか、あるいはiPS細胞の樹立効率改善物質として位置づけるかは便宜的であってもよい。即ち、体細胞の核初期化プロセスは、体細胞への核初期化物質およびiPS細胞の樹立効率改善物質の接触によって生じる全体的事象として捉えられるので、当業者にとって両者を必ずしも明確に区別する必要性はないであろう。

[0069] これら他のiPS細胞の樹立効率改善物質の体細胞への接触は、該物質が(a)タンパク性因子である場合、(b) 該タンパク性因子をコードする核酸である場合、あるいは(c) 低分子化合物である場合に応じて、STAT1の機能阻害物質

についてそれぞれ上記したと同様の方法により、実施することができる。

[0070] (e) 培養条件による樹立効率の改善

体細胞の核初期化工程において低酸素条件下で細胞を培養することにより、iPS細胞の樹立効率をさらに改善することができる。本明細書において「低酸素条件」とは、細胞を培養する際の雰囲気中の酸素濃度が、大気中のそれよりも有意に低いことを意味する。具体的には、通常の細胞培養で一般的に使用される5-10% CO<sub>2</sub>/95-90%大気の雰囲気中の酸素濃度よりも低い酸素濃度の条件が挙げられ、例えば雰囲気中の酸素濃度が18%以下の条件が該当する。好ましくは、雰囲気中の酸素濃度は15%以下（例、14%以下、13%以下、12%以下、11%以下など）、10%以下（例、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下など）、または5%以下（例、4%以下、3%以下、2%以下など）である。また、雰囲気中の酸素濃度は、好ましくは0.1%以上（例、0.2%以上、0.3%以上、0.4%以上など）、0.5%以上（例、0.6%以上、0.7%以上、0.8%以上、0.95%以上など）、または1%以上（例、1.1%以上、1.2%以上、1.3%以上、1.4%以上など）である。

[0071] 細胞の環境において低酸素状態を創出する手法は特に制限されないが、酸素濃度の調節可能なCO<sub>2</sub>インキュベーター内で細胞を培養する方法が最も容易であり、好適な例として挙げられる。酸素濃度の調節可能なCO<sub>2</sub>インキュベーターは、種々の機器メーカーから販売されている（例えば、Thermo scientific社、池本理化学工業、十慈フィールド、和研薬株式会社などのメーカー製の低酸素培養用CO<sub>2</sub>インキュベーターを用いることができる）。

[0072] 低酸素条件下で細胞培養を開始する時期は、iPS細胞の樹立効率が正常酸素濃度（20%）の場合に比して改善されることを妨げない限り特に限定されず、体細胞への核初期化物質およびSTAT1の機能阻害物質の接触より前であっても、該接触と同時であっても、該接触より後であってもよいが、例えば、体細胞に核初期化物質およびSTAT1の機能阻害物質を接触させた直後から、あるいは接触後一定期間（例えば、1ないし10（例、2, 3, 4, 5, 6, 7, 8または9）日）おいた後に低酸素条件下で培養することが好ましい。

[0073] 低酸素条件下で細胞を培養する期間も、iPS細胞の樹立効率が正常酸素濃度

(20%) の場合に比して改善されることを妨げない限り特に限定されず、例えば3日以上、5日以上、7日以上または10日以上で、50日以下、40日以下、35日以下または30日以下の期間等が挙げられるが、それらに限定されない。低酸素条件下での好ましい培養期間は、雰囲気中の酸素濃度によっても変動し、当業者は用いる酸素濃度に応じて適宜当該培養期間を調整することができる。また、一実施態様において、iPS細胞の候補コロニーの選択を、薬剤耐性を指標にして行う場合には、薬剤選択を開始する迄に低酸素条件から正常酸素濃度に戻すことが好ましい。

[0074] さらに、低酸素条件下で細胞培養を開始する好ましい時期および好ましい培養期間は、用いられる核初期化物質の種類、正常酸素濃度条件下でのiPS細胞樹立効率などによっても変動する。

[0075] 核初期化物質およびSTAT1の機能阻害物質を接触させた後、細胞を、例えばES細胞の培養に適した条件下で培養することができる。マウス細胞の場合、通常の培地に分化抑制因子としてLeukemia Inhibitory Factor (LIF) を添加して培養を行う。一方、ヒト細胞の場合には、LIFの代わりに塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) および／または幹細胞因子 (SCF) を添加することが望ましい。また通常、細胞は、フィーダー細胞として、放射線や抗生物質で処理して細胞分裂を停止させたマウス胎仔由来の線維芽細胞 (MEF) の共存下で培養される。MEFとしては、通常STO細胞等がよく使われるが、iPS細胞の誘導には、SNL細胞 (McMahon, A. P. & Bradley, A. Cell 62, 1073-1085 (1990)) 等がよく使われている。フィーダー細胞との共培養は、核初期化物質およびSTAT1の機能阻害物質の接触より前から開始してもよいし、該接触時から、あるいは該接触より後（例えば1-10日後）から開始してもよい。

[0076] iPS細胞の候補コロニーの選択は、薬剤耐性とレポーター活性を指標とする方法と目視による形態観察による方法とが挙げられる。前者としては、例えば、分化多能性細胞において特異的に高発現する遺伝子（例えば、*Fbx15*、*Nanog*、*Oct3/4*など、好ましくは*Nanog*または*Oct3/4*）の遺伝子座に、薬剤耐性遺伝子および／またはレポーター遺伝子をターゲッティングした組換え細

胞を用い、薬剤耐性および／またはレポーター活性陽性のコロニーを選択するというものである。そのような組換え細胞としては、例えばFbx15遺伝子座に $\beta$ geo（ $\beta$ -ガラクトシダーゼとネオマイシンホスホランスフェラーゼとの融合タンパク質をコードする）遺伝子をノックインしたマウス由来のMEF (Takahashi & Yamanaka, Cell, 126, 663-676 (2006))、あるいはNanog遺伝子座に緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子とピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス由来のMEF (Okita et al., Nature, 448, 313-317 (2007)) 等が挙げられる。一方、目視による形態観察で候補コロニーを選択する方法としては、例えばTakahashi et al., Cell, 131, 861-872 (2007)に記載の方法が挙げられる。レポーター細胞を用いる方法は簡便で効率的ではあるが、iPS細胞がヒトの治療用途を目的として作製される場合、安全性の観点から目視によるコロニー選択が望ましい。

- [0077] 選択されたコロニーの細胞がiPS細胞であることの確認は、上記したNanog (もしくはOct3/4) レポーター陽性 (ピューロマイシン耐性、GFP陽性など) および目視によるES細胞様コロニーの形成によっても行い得るが、より正確を期すために、アルカリフィオスマーカー染色や、各種ES細胞特異的遺伝子の発現を解析したり、選択された細胞をマウスに移植してテラトーマ形成を確認する等の試験を実施することもできる。
- [0078] このようにして樹立されたiPS細胞は、種々の目的で使用することができる。例えば、ES細胞で報告されている分化誘導法を利用して、iPS細胞から種々の細胞 (例えば、心筋細胞、血液細胞、神経細胞、血管内皮細胞、インスリン分泌細胞等) への分化を誘導することができる。したがって、患者本人やHLAの型が同一もしくは実質的に同一である他人から採取した体細胞を用いてiPS細胞を誘導すれば、そこから所望の細胞 (即ち、該患者が罹病している臓器の細胞や疾患に対する治療効果を発揮する細胞など) に分化させて該患者に移植するという、自家移植による幹細胞療法が可能となる。さらに、iPS細胞から分化させた機能細胞 (例えば、肝細胞) は、対応する既存の細胞株よりも実際の生体内での該機能細胞の状態をより反映していると考えられるの

で、医薬候補化合物の薬効や毒性のin vitroスクリーニング等にも好適に用いることができる。

[0079] 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ることは言うまでもない。

## 実施例

### [0080] 実施例1：siRNAによるSTAT1阻害の効果

ヒトの皮膚由来線維芽細胞（HDF 1616株）に対して、Takahashi, K. ら, Cell, 131: 861-872 (2007) に記載の方法に従い、レンチウイルス（pLenti6/U bC-*Slc7a1*）を用いて、マウスエコトロピックウイルスレセプター*Slc7a1*遺伝子を発現させた。この細胞を0.1%ゼラチン（Sigma）でコートした6 well培養プレート（Falcon）の各wellに、1 well当たり $1.0 \times 10^5$ 細胞で播種した。翌日、Takahashi, K. ら, Cell, 131: 861-872 (2007) に記載の方法に従い、ヒト由来の4遺伝子（Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc）をレトロウイルスで導入した。続いて、感染2日目に、Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen)を用いて、STAT1に対するsiRNAを導入した。STAT1に対するsiRNAとしては、Invitrogen社から購入した、Invitrogen Stealth RNAi™ siRNA、oligo ID: HSS110273またはHSS186128を用いた。陰性対照として、非特異的siRNA (Sicontrol; Stealth RNAi™ siRNA Negative Control, Med GC、製品番号12935-300 (Invitrogen)より購入) を導入した。得られた細胞を感染4日目に、あらかじめフィーダー細胞を播いておいた100 mmディッシュに $2.0 \times 10^5$ 細胞で播種した。

感染16日目（4遺伝子の導入から16日目）にiPS細胞コロニー数を測定した結果を図1および2に示す。4遺伝子の導入において、それぞれのsiRNAによりSTAT1を阻害することで、Sicontrol（対照）群と比較して有意にヒトiPS細胞コロニー数が増大することが確認された。

### [0081] 実施例2：EGC(epigallocatechin)によるSTAT1阻害の効果

ヒトの皮膚由来線維芽細胞（HDF 1616株）に対して、Takahashi, K. ら, Cell, 131: 861-872 (2007) に記載の方法に従い、レンチウイルス（pLenti6/U bC-*Slc7a1*）を用いて、マウスエコトロピックウイルスレセプター*Slc7a1*遺伝

子を発現させた。この細胞を0.1% ゼラチン (Sigma) でコートした6 well培養プレート (Falcon) の各wellに、1 well当たり $1.0 \times 10^5$ 細胞で播種した。翌日、Takahashi, K. ら, Cell, 131: 861-872 (2007) に記載の方法に従い、ヒト由来の4遺伝子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc) をレトロウイルスで導入し、感染4日目に、あらかじめフィーダー細胞を播いておいた100 mmディッシュに $2.0 \times 10^5$ 細胞で播種した。STAT1阻害剤の作用効果を検討するため、感染5日目から24日目まで、EGC(epigallocatechin) (Sigma - aldrich, E4143) のDMSO溶液をEGC濃度が $10 \mu\text{M}$ となるように添加した培地の中で細胞を培養し、DMSOのみを添加した場合と樹立効率の比較検討を行った。

感染24日目（4遺伝子の導入から24日目）にiPS細胞コロニー数を測定した結果を図3に示す。4遺伝子の導入において、EGC(epigallocatechin)を添加することで、DMSO（対照）群と比較して有意にヒトiPS細胞コロニー数が増大することが確認された。

[0082] 本発明を好ましい態様を強調して説明してきたが、好ましい態様が変更され得ることは当業者にとって自明であろう。本発明は、本発明が本明細書に詳細に記載された以外の方法で実施され得ることを意図する。したがって、本発明は添付の「請求の範囲」の精神および範囲に包含されるすべての変更を含むものである。

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

[0083] 本出願は、2013年10月17日付で日本国に出願された特願2013-216817を基礎としており、ここで言及することによりその内容は全て本明細書に包含される。

## 産業上の利用可能性

[0084] STAT1の機能阻害物質はiPS細胞の樹立効率を顕著に増大させることができるので、従来樹立効率の低かったiPS細胞誘導法において、効率よくiPS細胞を樹立するのに有用である。

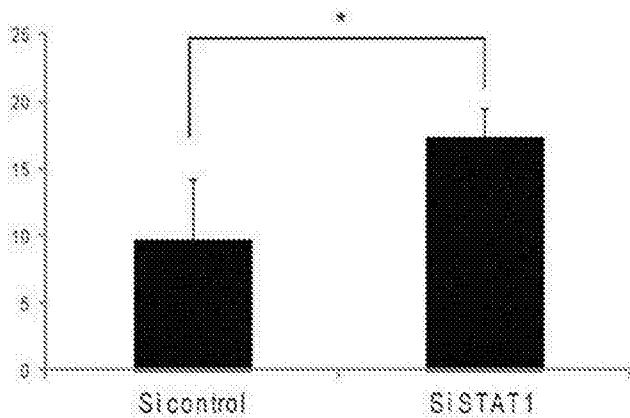
## 請求の範囲

- [請求項1] 人工多能性幹細胞の樹立効率の改善方法であって、体細胞の核初期化工程においてSTAT1の機能を阻害することを含む、方法。
- [請求項2] STAT1の化学的阻害物質を体細胞に接触させることによりSTAT1の機能を阻害する、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記阻害物質がEGC(epigallocatechin)である、請求項2に記載の方法。
- [請求項4] STAT1に対するsiRNA、shRNAおよびそれらをコードするDNAからなる群より選択される核酸を体細胞に接触させることによりSTAT1の機能を阻害する、請求項1に記載の方法。
- [請求項5] STAT1の機能阻害物質を含有してなる、人工多能性幹細胞の樹立効率改善剤。
- [請求項6] 前記阻害物質がSTAT1の化学的阻害物質である、請求項5に記載の剤。
- [請求項7] 前記阻害物質がEGC(epigallocatechin)である、請求項6に記載の剤。
- [請求項8] 前記阻害物質がSTAT1に対するsiRNA、shRNAおよびそれらをコードするDNAからなる群より選択される核酸である、請求項5に記載の剤。
- [請求項9] 体細胞に核初期化物質およびSTAT1の機能阻害物質を接触させることを含む、人工多能性幹細胞の製造方法。
- [請求項10] 前記阻害物質が化学的阻害物質である、請求項9に記載の方法。
- [請求項11] 前記阻害物質がEGC(epigallocatechin)である、請求項10に記載の方法。
- [請求項12] 前記阻害物質がSTAT1に対するsiRNA、shRNAおよびそれらをコードするDNAからなる群より選択される核酸である、請求項9に記載の方法。
- [請求項13] 核初期化物質がOct3/4、KlfファミリーメンバーおよびSoxファミリ

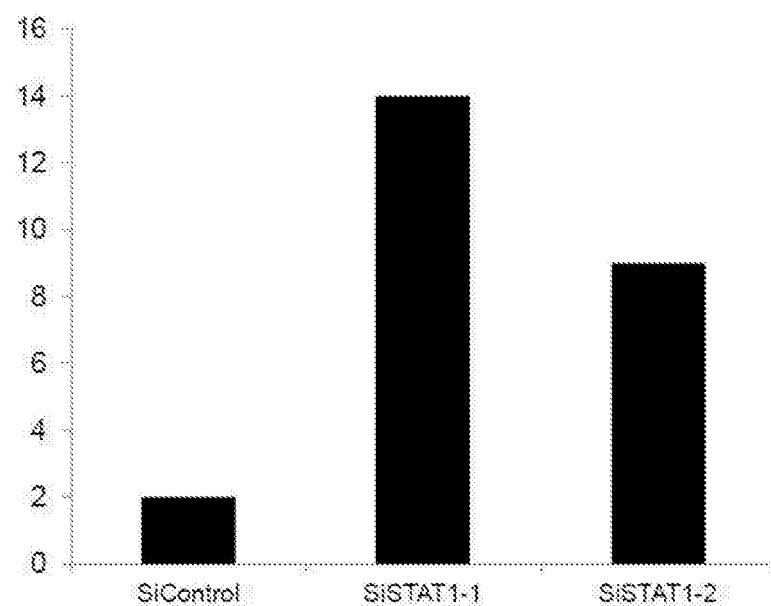
ーメンバー、またはそれらをコードする核酸を含み、当該Klfファミリーメンバーが、Klf1、Klf2、Klf4またはKlf5であり、当該Soxファミリーメンバーが、Sox1、Sox2、Sox3、Sox15、Sox17またはSox18である、請求項9～12のいずれか1項に記載の方法。

[請求項14] 核初期化物質がさらにMycファミリーメンバー、またはそれをコードする核酸を含み、当該Mycファミリーメンバーが、c-Myc、c-MycT58A（活性型変異体）、N-MycまたはL-Mycである、請求項13に記載の方法。

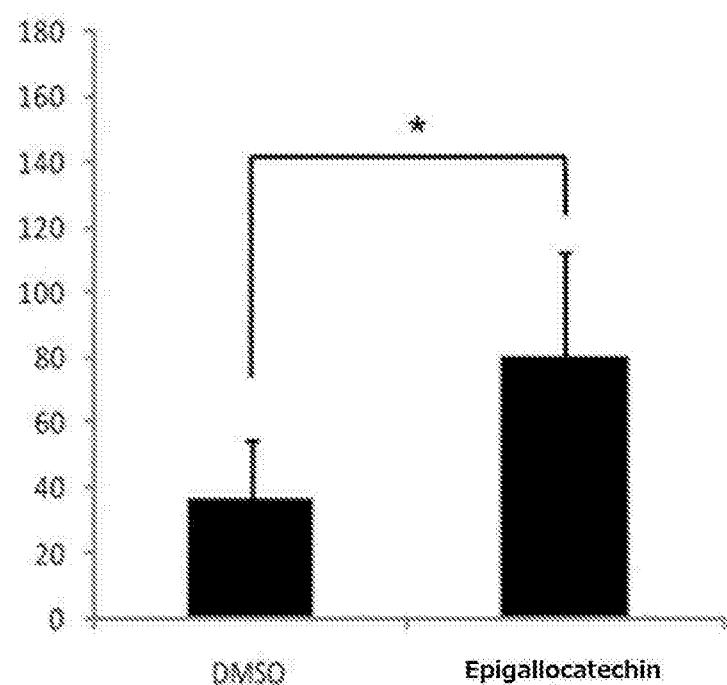
[図1]



[図2]



[図3]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/077757

### A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

### B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/10, C12N15/09, C12N15/113

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN),  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

### C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2012-509072 A (Fraunhofer-Gesellschaft zur Foerderung der angewandten Forschung e.V.), 19 April 2012 (19.04.2012), claims; examples; paragraphs [0008], [0040], [0109], [0110], [0112] & US 2011/0236978 A1 & EP 2192174 A1 & WO 2010/057614 A1	1-3, 5-7, 9-11, 13 1-14
Y	Hyenjong HONG et al., "iPS Saibo Juritsu o Seigyo suru p53 Keiro", Experimental Medicine, 2010, vol.28, no.3, pages 378 to 382	1-14
Y	KIM Hun Sik et al., STAT1 as a key modulator of cell death, Cellular Signalling, 2007, Vol.19, p.454-465	1-14

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 January 2015 (07.01.15)

Date of mailing of the international search report

20 January 2015 (20.01.15)

Name and mailing address of the ISA/  
Japan Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**International application No.  
PCT/JP2014/077757

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCHMITT Nicole C. et al., Cisplatin-Induced Hair Cell Death Requires STAT1 and Is Attenuated by Epigallocatechin Gallate, <i>The Journal of Neuroscience</i> , 2009, Vol.29, No.12, p.3843-3851	1-14
A	OKITA Yasutaka et al., Increased efficiency in the generation of induced pluripotent stem cells by Fbxw7 ablation, <i>Genes to Cells</i> , 2012, Vol.17, p.768-777	1-14

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, C12N15/113(2010.01)i

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int.Cl. C12N5/10, C12N15/09, C12N15/113

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2015年
日本国実用新案登録公報	1996-2015年
日本国登録実用新案公報	1994-2015年

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X - Y	JP 2012-509072 A (フランホファー ゲセルシャフト ツール フ エールデルンク ダー アンゲヴァンテン フォルシュンク エ ー. フアオ.) 2012.04.19, 【特許請求の範囲】【実施例】【0008】【0040】【0109】【0110】【0112】 & US 2011/0236978 A1 & EP 2192174 A1 & WO 2010/057614 A1	1-3, 5-7, 9-11, 13 1-14
Y	洪炫禎他, iPS 細胞樹立を制御する p53 経路, 実験医学, 2010, Vol. 28, No. 3, p. 378-382	1-14

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願目前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 07.01.2015	国際調査報告の発送日 20.01.2015
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 坂崎 恵美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448 4B 5278

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	KIM Hun Sik et al., STAT1 as a key modulator of cell death, Cellular Signalling, 2007, Vol. 19, p. 454-465	1-14
Y	SCHMITT Nicole C. et al., Cisplatin-Induced Hair Cell Death Requires STAT1 and Is Attenuated by Epigallocatechin Gallate, The Journal of Neuroscience, 2009, Vol. 29, No. 12, p. 3843-3851	1-14
A	OKITA Yasutaka et al., Increased efficiency in the generation of induced pluripotent stem cells by Fbxw7 ablation, Genes to Cells, 2012, Vol. 17, p. 768-777	1-14