(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6612736号
(P6612736)
(45)発行日　令和1年11月27日(2019.11.27)　(24)登録日　令和1年11月8日(2019.11.8)

(51)Int.Cl.		F I		
C12N 15/79	(2006.01)	C12N	15/79	ZNAZ
C12Q 1/6897	(2018.01)	C12Q	1/6897	Z
C12N 5/10	(2006.01)	C12N	5/10	

請求項の数 28　(全 56 頁)

(21)出願番号　特願2016-508823(P2016-508823)
(86)(22)出願日　平成27年3月20日(2015.3.20)
(86)国際出願番号　PCT/JP2015/058466
(87)国際公開番号　WO2015/141827
(87)国際公開日　平成27年9月24日(2015.9.24)
審査請求日　平成30年3月19日(2018.3.19)
(31)優先権主張番号　特願2014-58926(P2014-58926)
(32)優先日　平成26年3月20日(2014.3.20)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

(73)特許権者　504132272
国立大学法人京都大学
京都府京都市左京区吉田本町３６番地１
(74)代理人　100099623
弁理士　奥山　尚一
(74)代理人　100096769
弁理士　有原　幸一
(74)代理人　100107319
弁理士　松島　鉄男
(74)代理人　100125380
弁理士　中村　綾子
(72)発明者　吉田　善紀
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】心筋細胞の選別方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

miRNA応答性mRNAを細胞群に導入する工程を含む、心筋細胞の選別方法であって、当該miRNA応答性mRNAが下記：

(i) 心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAによって特異的に認識される核酸、

(ii) 遺伝子のコード領域に対応する核酸、及び

(iii) ポリＡテイル

を含む配列からなり、

ここで、当該(ii)の遺伝子のコード領域に対応する核酸のタンパク質への翻訳が当該(i)の核酸配列により制御されている、方法。

【請求項２】

前記miRNA応答性mRNAが、miRNA応答性オフスイッチmRNAである、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

前記(i)および(ii)の核酸が、5'から3'の方向にこの順序で連結されている、請求項１または２に記載の方法。

【請求項４】

前記(i)の心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAが、miR-1, miR-208a, miR-208bおよびmiR-499a-5pからなる群から選択される１またはそれ以上のmiRNAである、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５】
前記(ii)の遺伝子が、蛍光タンパク質をコードする遺伝子、アポトーシス誘導遺伝子および自殺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る、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
前記蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、青色蛍光タンパク質（BFP）をコードする遺伝子である、請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記アポトーシス誘導遺伝子が、Bimタンパク質をコードする遺伝子である、請求項５に記載の方法。
【請求項８】
薬剤耐性遺伝子のコード領域に対応する核酸を含む配列からなるmRNAを前記細胞群に導入する工程をさらに含む、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
前記薬剤耐性遺伝子が、抗生物質耐性遺伝子である、請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
前記抗生物質耐性遺伝子が、ピューロマイシン耐性遺伝子またはブラストサイジン耐性遺伝子である、請求項９に記載の方法。
【請求項１１】
前記工程(a)の細胞群が、多能性幹細胞から分化誘導させた細胞群である、請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
心筋細胞の製造方法であって、下記：
(a) miRNA応答性mRNAを細胞群に導入する工程、および
(b) 工程(a)のmRNAから翻訳されたタンパク質の量に基づいて当該細胞を選別する工程を含み、
ここで、当該miRNA応答性mRNAが下記：
(i) 心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAによって特異的に認識される核酸、
(ii) 遺伝子のコード領域に対応する核酸、及び
(iii) ポリＡテイル
を含む配列からなり、
上記工程(a)および(b)を行わない場合と比較して、高純度の心筋細胞が得られる、方法。
【請求項１３】
前記miRNA応答性mRNAが、miRNA応答性オフスイッチmRNAである、請求項１２に記載の方法。
【請求項１４】
前記(i)および(ii)の核酸が、5'から3'の方向にこの順序で連結されている、請求項１２または１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記(i)の心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAが、miR-1, miR-208a, miR-208bおよびmiR-499a-5pからなる群から選択される１またはそれ以上のmiRNAである、請求項１２～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
前記(ii)の遺伝子が、蛍光タンパク質をコードする遺伝子である、請求項１２～１５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７】
前記蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、BFPをコードする遺伝子である、請求項１６に記載の方法。
【請求項１８】

前記工程(a)の細胞群が、多能性幹細胞から分化誘導させた細胞群である、請求項１２～１７のいずれか１項に記載の方法。

【請求項１９】

心筋細胞の製造方法であって、下記：

(a) miRNA応答性mRNAおよび薬剤耐性遺伝子のコード領域に対応する核酸を含む配列からなるmRNAを細胞群に導入する工程、および

(b) 工程(a)の薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤の存在下で、工程(a)で得られた細胞群を培養する工程を含み、

ここで、当該miRNA応答性mRNAが下記：

(i) 心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAによって特異的に認識される核酸、

(ii) 遺伝子のコード領域に対応する核酸、及び

(iii) ポリＡテイル

を含む配列からなり、

上記工程(a)および(b)を行わない場合と比較して、高純度の心筋細胞が得られる、方法。

【請求項２０】

前記miRNA応答性mRNAが、miRNA応答性オフスイッチmRNAである、請求項１９に記載の方法。

【請求項２１】

前記(i)および(ii)の核酸が、5'から3'の方向にこの順序で連結されている、請求項１９または２０に記載の方法。

【請求項２２】

前記(i)の心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAが、miR-1, miR-208a, miR-208bおよびmiR-499a-5pからなる群から選択される１またはそれ以上のmiRNAである、請求項１９～２１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２３】

前記(ii)の遺伝子が、アポトーシス誘導遺伝子および／または自殺遺伝子である、請求項１９～２２のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２４】

前記アポトーシス誘導遺伝子が、Bimタンパク質をコードする遺伝子である、請求項２３に記載の方法。

【請求項２５】

前記薬剤耐性遺伝子が、抗生物質耐性遺伝子である、請求項１９～２４のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２６】

前記抗生物質耐性遺伝子が、ピューロマイシン耐性遺伝子またはブラストサイジン耐性遺伝子である、請求項２５に記載の方法。

【請求項２７】

前記工程(a)の細胞群が、多能性幹細胞から分化誘導させた細胞群である、請求項１９～２６のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２８】

miRNA応答性mRNAを含む、心筋細胞純化用キットであって、当該miRNA応答性mRNAが下記：

(i) 心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAによって特異的に認識される核酸、

(ii) 遺伝子のコード領域に対応する核酸、及び

(iii) ポリＡテイル

を含む配列からなる、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、新規な心筋細胞の選別方法に関する。本発明はまた、高純度の心筋細胞を製造する方法およびそのためのキットに関する。

【背景技術】

【０００２】

心筋細胞は出生と同時にその分裂能を喪失し、再生が困難である。したがって、近年、心筋梗塞、心筋炎または老化等を原因とする傷害心組織に対して、胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）など多能性を有する細胞（特許文献１）を分化誘導して得られる心筋細胞を移植する補充療法が注目されている。これら多能性幹細胞からの心筋細胞への分化誘導法が多数報告されている（特許文献２、特許文献３、特許文献４および非特許文献１）。しかし、移植用細胞として用いるためには、ソーティング等により心筋細胞の純度を高める必要がある。

【０００３】

現在、心筋細胞を選別する方法として報告されているものの多くが、心筋細胞もしくは心筋前駆細胞に対する表面マーカーを用いて心筋細胞を選別する方法である（非特許文献２、非特許文献３、特許文献４および特許文献５）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【０００４】

【特許文献１】国際公開第2007/069666号

【特許文献２】国際公開第2007/002136号

【特許文献３】国際公開第2009/118928号

【特許文献４】特開2010-158206号公報

【特許文献５】国際公開第2014/014119号

【非特許文献】

【０００５】

【非特許文献１】Yan P, et al, Biochem Biophys Res Commun. 379:115-20 (2009)

【非特許文献２】Rust W, et al, Regen Med. 4, 225-37 (2009)

【非特許文献３】Honda M, et al, Biochem Biophys Res Commun. 29, 351, 877-82 (2006)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

上記従来技術に鑑みて、心筋細胞の純度を高めるためには別の観点から新たな選別方法が望まれている。すなわち、本発明の課題は、新規な心筋細胞の選別方法を提供することにある。本発明の課題はまた、高純度の心筋細胞を製造する方法およびそのためのキットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

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、miRNA応答性mRNAを用いることにより、心筋細胞を高純度で精製できることを見出した。具体的には、多能性幹細胞から分化誘導させた細胞を心筋細胞群と非心筋細胞群とに選別し、miRNAマイクロアレイ解析にかけたところ、心筋細胞において特異的に発現しているmiRNAが複数存在することを見出した。そこで、これらのmiRNAに対応するmiRNA応答性オフスイッチmRNAを作製して、選別の対象となる細胞へ当該mRNAを導入した後、心筋細胞の選別を行ったところ、極めて高い純度で心筋細胞を精製することに成功した。また、miRNA応答性オフスイッチmRNAと薬剤耐性遺伝子mRNAを組み合わせて用いることで、FACSによる選別工程を経ることなく、高純度で心筋細胞を精製できることを見出した。本発明はそのような知見に基づいて完成されたものである。

【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）miRNA応答性mRNAを細胞群に導入する工程を含む、心筋細胞の選別方法であって、当該miRNA応答性mRNAが下記：
(i) 心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAによって特異的に認識される核酸、および
(ii) 遺伝子のコード領域に対応する核酸
を含む配列からなり、
ここで、当該(ii)の遺伝子のコード領域に対応する核酸のタンパク質への翻訳が当該(i)の核酸配列により制御されている、方法。
（２）前記miRNA応答性mRNAが、miRNA応答性オフスイッチmRNAである、（１）に記載の方法。
（３）前記(i)および(ii)の核酸が、5'から3'の方向にこの順序で連結されている、（１）または（２）に記載の方法。
（４）前記(i)の心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAが、miR-1, miR-208a, miR-208bおよびmiR -499a-5pからなる群から選択される１またはそれ以上のmiRNAである、（１）～（３）のいずれかに記載の方法。
（５）前記(ii)の遺伝子が、蛍光タンパク質をコードする遺伝子、アポトーシス誘導遺伝子および自殺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る、（１）～（４）のいずれかに記載の方法。
（６）前記蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、青色蛍光タンパク質（BFP）をコードする遺伝子である、（５）に記載の方法。
（７）前記アポトーシス誘導遺伝子が、Bimタンパク質をコードする遺伝子である、（５）に記載の方法。
（８）さらに、薬剤耐性遺伝子のコード領域に対応する核酸を含む配列からなるmRNAを細胞群に導入する工程を含む、（１）～（７）のいずれかに記載の方法。
（９）前記薬剤耐性遺伝子が、抗生物質耐性遺伝子である、（８）に記載の方法。
（１０）前記抗生物質耐性遺伝子が、ピューロマイシン耐性遺伝子またはブラストサイジン耐性遺伝子である、（９）に記載の方法。
（１１）前記工程(a)の細胞群が、多能性幹細胞から分化誘導させた細胞である、（１）～（１０）のいずれかに記載の方法。
（１２）心筋細胞の製造方法であって、下記：
(a) miRNA応答性mRNAを細胞群に導入する工程、および
(b) 工程(a)のmRNAから翻訳されたタンパク質の量に基づいて当該細胞を選別する工程を含み、
ここで、当該miRNA応答性mRNAが下記：
(i) 心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAによって特異的に認識される核酸、および
(ii) 遺伝子のコード領域に対応する核酸
を含む配列からなり、
上記工程(a)および(b)を行わない場合と比較して、高純度の心筋細胞が得られる、方法。
（１３）前記miRNA応答性mRNAが、miRNA応答性オフスイッチmRNAである、（１２）に記載の方法。
（１４）前記(i)および(ii)の核酸が、5'から3'の方向にこの順序で連結されている、（１２）または（１３）に記載の方法。
（１５）前記(i)の心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAが、miR-1, miR-208a, miR-208bおよびmiR-499a-5pからなる群から選択される１またはそれ以上のmiRNAである、（１２）～（１４）のいずれかに記載の方法。
（１６）前記(ii)の遺伝子が、蛍光タンパク質をコードする遺伝子である、（１２）～（１５）のいずれかに記載の方法。
（１７）前記蛍光タンパク質をコードする遺伝子が、BFPをコードする遺伝子である、（１６）に記載の方法。
（１８）前記工程(a)の細胞群が、多能性幹細胞から分化誘導させた細胞である、（１２）～（１７）のいずれかに記載の方法。

（１９）心筋細胞の製造方法であって、下記：
(a) miRNA応答性mRNAおよび薬剤耐性遺伝子のコード領域に対応する核酸を含む配列からなるmRNAを細胞群に導入する工程、および
(b) 工程(a)の薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤の存在下で、工程(a)で得られた細胞を培養する工程を含み、
ここで、当該miRNA応答性mRNAが下記：
(i) 心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAによって特異的に認識される核酸、および
(ii) 遺伝子のコード領域に対応する核酸
を含む配列からなり、
上記工程(a)および(b)を行わない場合と比較して、高純度の心筋細胞が得られる、方法。
（２０）前記miRNA応答性mRNAが、miRNA応答性オフスイッチmRNAである、（１９）に記載の方法。
（２１）前記(i)および(ii)の核酸が、5'から3'の方向にこの順序で連結されている、（１９）または（２０）に記載の方法。
（２２）前記(i)の心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAが、miR-1, miR-208a, miR-208bおよびmiR-499a-5pからなる群から選択される１またはそれ以上のmiRNAである、（１９）～（２１）のいずれかに記載の方法。
（２３）前記(ii)の遺伝子が、アポトーシス誘導遺伝子および／または自殺遺伝子である、（１９）～（２１）のいずれか１項に記載の方法。
（２４）前記アポトーシス誘導遺伝子が、Bimタンパク質をコードする遺伝子である、（２３）に記載の方法。
（２５）前記薬剤耐性遺伝子が、抗生物質耐性遺伝子である、（１９）～（２４）のいずれかに記載の方法。
（２６）前記抗生物質耐性遺伝子が、ピューロマイシン耐性遺伝子またはブラストサイジン耐性遺伝子である、（２５）に記載の方法。
（２７）前記工程(a)の細胞群が、多能性幹細胞から分化誘導させた細胞である、（１９）～（２６）のいずれかに記載の方法。
（２８）miRNA応答性mRNAを含む、心筋細胞純化用キットであって、当該miRNA応答性mRNAが下記：
(i) 心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAによって特異的に認識される核酸、および
(ii) 遺伝子のコード領域に対応する核酸
を含む配列からなる、キット。
【発明の効果】
【０００９】
本発明に示す方法により心筋細胞を容易に選別し、高純度にまで純化することができる。本発明の方法により細胞群に導入されたmRNAは一過的にのみ細胞内に存在するため、ゲノム中に組み込まれることなく、安全に心筋細胞を選別することが可能である。また、本発明に示す方法により細胞を固定化することなく、生きた細胞を細胞内の活性化状態にあるmiRNAの発現量に基づいて選別することが可能である。さらには、本発明の心筋細胞の製造方法により得られた、純化された心筋細胞を用いることで、心不全、虚血性心疾患、心筋梗塞、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症、拡張型心筋症などの心疾患の治療が可能となる。
【図面の簡単な説明】
【００１０】
【図１】図１は、GFP陽性細胞（心筋細胞）とGFP陰性細胞（非心筋細胞）のmiRNAマイクロアレイの結果を示す。（A）左図は、分化誘導開始から20日目にFACSにより回収した細胞のmiRNAマイクロアレイの結果であり、右図は、分化誘導開始から8日目にFACSにより回収した細胞のmiRNAマイクロアレイの結果である。（B）分化誘導開始から8日目および20日目において、GFP陽性細胞で有意に発現の高かったmiRNAのベン図を示す。
【図２】図２は、miRNA応答性オフスイッチmRNAを用いた解析の結果を示す。

【図３】図３は、miRNA応答性オフスイッチmRNAの心筋細胞の純化における有効性について調べた結果を示す。心筋細胞で特異的に発現するTNTを指標として、心筋細胞の純化の程度を調べた。
【図４】図４は、様々な種類の多能性幹細胞（PSCs）から心筋細胞へ分化誘導する工程を経た細胞集団において、miRNA応答性オフスイッチmRNAの心筋細胞の純化における有効性について調べた結果を示す。心筋細胞で特異的に発現するTNTを指標として、心筋細胞の純化の程度を調べた。miRNA応答性配列を含まないmRNAをコントロールとして用いた。
【図５】図５は、miR-1応答性オフスイッチmRNAを用いて選別した細胞における心筋特異的遺伝子の発現状態を調べた結果を示す。発現解析は、定量的RT-PCRにより行った。
【図６】図６は、miR-1-, miR-208a-およびmiR-499a-5p-応答性オフスイッチmRNAを用いて選別した細胞における、心筋特異的遺伝子のタンパク質レベルでの発現状態を調べた結果を示す。解析は、TNTに対する免疫染色により行った。
【図７】図７は、miR-1-応答性オフスイッチmRNAを導入した場合と導入しなかった場合における、miR-1標的遺伝子の発現状態について調べた結果を示す。マイクロアレイによる解析を行った後、54個のmiR-1標的遺伝子について評価を行った。
【図８】図８は、複数のmiRNA応答性オフスイッチmRNAを組み合わせた場合の心筋細胞の純化における有効性について調べた結果を示す。心筋細胞で特異的に発現するTNTを指標として、心筋細胞の純化の程度を調べた。
【図９】図９は、miRNA応答性オフスイッチmRNAと薬剤耐性mRNAを細胞に共導入した際の心筋細胞純化効果を調べた結果を示す。（A）KhES1を分化誘導させた場合の結果である。（B）409B2を分化誘導させた場合の結果である。心筋細胞で特異的に発現するTNTを指標として、心筋細胞の純化の程度を調べた。
【図１０】図２は、miR-1-, miR-208a-, miR-208b-およびmiR-499a-5p-応答性オフスイッチmRNAをマウスの心臓由来の細胞へEGFPと共導入した後の解析結果を示す。図中、線にて囲まれた領域が、心筋細胞であることを示す。
【発明を実施するための形態】
【００１１】
以下に本発明を、実施態様を示して詳細に説明する。しかしながら、本発明は以下の実施態様に限定されるものではない。
【００１２】
［心筋細胞の選別方法］
本発明は一つの実施態様によれば、miRNA応答性mRNAを細胞群に導入する工程を含む、心筋細胞を選別する方法を提供する。本実施態様による方法の、導入する工程において、miRNA応答性mRNAが導入され、選別の対象となる細胞群は、心筋細胞を含有しうる任意の細胞であって良い。例えば、多能性幹細胞から分化誘導させた細胞群であってもよく、生体内から取り出した細胞の集団であってもよいが、これらには限定されない。したがって、心筋細胞を含有するか否かが不明な細胞群にmiRNA応答性mRNAを導入することもあり得る。好ましい実施態様において、細胞群は、多能性幹細胞から分化誘導された細胞群であり得る。多能性幹細胞から分化誘導された細胞群とは、後に詳述する方法により、多能性幹細胞から心筋細胞へと分化誘導させる工程を経た細胞群であって、分化誘導されて心筋細胞となった細胞と、心筋細胞にまで分化されなかった細胞とを含有しうる。多能性幹細胞は、特に限定されることはないが、例えば、下記のものが挙げられる。
【００１３】
(A) 胚性幹細胞
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。
【００１４】
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. Ev

ans and M.H. Kaufman (1981), Nature 292:154-156)、その後、ヒト、サルなどの霊長類でもES細胞株が樹立された(J.A. Thomson et al. (1998), Science 282:1145-1147; J.A. Thomson et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7844-7848;J.A. Thomson et al. (1996), Biol. Reprod., 55:254-259; J.A. Thomson and V.S. Marshall (1998), Curr. Top. Dev. Biol., 38:133-165)。

【００１５】

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

【００１６】

ES細胞作製のための培養液として、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および4ng/ml bFGFを補充したDMEM/F-12培養液を使用し、37℃、5% CO_2、湿潤雰囲気下でヒトES細胞を維持することができる(H. Suemori et al. (2006), Biochem. Biophys. Res. Commun., 345:926-932)。また、ES細胞は、3～4日おきに継代する必要があり、このとき、継代は、例えば1mM $CaCl_2$および20% KSRを含有するPBS中の0.25% トリプシンおよび0.1mg/mlコラゲナーゼIVを用いて行うことができる。

【００１７】

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Real-Time PCR法で行うことができる。特に、ヒトES細胞の選択では、OCT-3/4、NANOG、ECADなどの遺伝子マーカーの発現を指標とすることができる(E. Kroon et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26:443-452)。

【００１８】

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

【００１９】

(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)。神経膠細胞系由来神経栄養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF))を含む培養液で自己複製可能であるし、またES細胞と同様の培養条件下で継代を繰り返すことによって、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))。

【００２０】

(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)。

【００２１】

(D) 人工多能性幹細胞

人工多能性幹(iPS)細胞は、特定の初期化因子を、DNA、RNA又はタンパク質の形態で体細胞に導入することによって作製することができる、ES細胞とほぼ同等の特性、例えば分化多能性と自己複製による増殖能、を有する体細胞由来の人工の幹細胞である（K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) Cell, 126:663-676; K. Takahashi et al. (2007), Cell, 131:861-872; J. Yu et al. (2007), Science, 318:1917-1920; Nakagawa, M.ら,Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2008)；国際公開WO 2007/069666）。初期化因子は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-cording RNAまたはES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNA、あるいは低分子化合物によって構成されてもよい。初期化因子に含まれる遺伝子として、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3またはGlis1等が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/007852、WO2009/032194、WO2009/058413、WO2009/057831、WO2009/075119、WO2009/079007、WO2009/091659、WO2009/101084、WO2009/101407、WO2009/102983、WO 2009/114949、WO2009/117439、WO2009/126250、WO2009/126251、WO2009/126655、WO2009/157593、WO2010/009015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO 2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO 2010/111409、WO 2010/111422、WO2010/115050、WO2010/124290、WO2010/147395、WO2010/147612、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells. 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat Biotechnol. 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:475-479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), Nat Cell Biol. 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), Nat. Biotech., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010), Nature. 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28:713-720、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-9.に記載の組み合わせが例示される。

【００２２】

上記初期化因子には、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤［例えば、バルプロ酸(VPA)、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA（例、HDAC1 siRNA Smartpool（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］、MEK阻害剤（例えば、PD184352、PD98059、U0126、SL327およびPD0325901）、Glycogen synthase kinase-3阻害剤（例えば、BioおよびCHIR99021）、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤（例えば、5-azacytidine）、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤（例えば、BIX-01294 等の低分子阻害剤、Suv39hl、Suv39h2、SetDBlおよびG9aに対するsiRNAおよびshRNA等の核酸性発現阻害剤など）、L-channel calcium agonist (例えばBayk8644)、酪酸、TGFβ阻害剤またはALK5阻害剤（例えば、LY364947、SB431542、616453およびA-83-01）、p53阻害剤（例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA）、ARID3A阻害剤（例えば、ARID3Aに対するsiRNAおよびshRNA）、miR-291-3p、miR-294、miR-295およびmir-302などのmiRNA、Wnt Signaling（例えばsoluble Wnt3a）、神経ペプチドY、プロスタグランジン類（例えば、プロスタグランジンE2およびプロスタグランジンJ2）、hTERT、SV40LT、UTF1、IRX6、GLIS1、PITX2、DMRTBl等の樹立効率を高めることを目的として用いられる因子も含まれており、本明細書においては、これらの樹立効率の改善目的にて用いられた因子についても初期化因子と別段の区別をしないものとする。

【００２３】
初期化因子は、タンパク質の形態の場合、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチド（例えば、HIV由来のTATおよびポリアルギニン）との融合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよい。
【００２４】
一方、DNAの形態の場合、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター（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（WO 2010/008054）などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC、PAC)などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる(Science, 322:949-953, 2008)。ベクターには、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができるし、さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子(例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子など）、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質(GFP)、βグルクロニダーゼ(GUS)、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。また、上記ベクターには、体細胞への導入後、初期化因子をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合する初期化因子をコードする遺伝子を共に切除するために、それらの前後にLoxP配列を有してもよい。
【００２５】
また、RNAの形態の場合、例えばリポフェクション、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入しても良く、分解を抑制するため、5-メチルシチジンおよびpseudouridine (TriLink Biotechnologies)を取り込ませたRNAを用いても良い（Warren L, (2010) Cell Stem Cell. 7:618-630）。
【００２６】
iPS細胞誘導のための培養液としては、例えば、10～15%FBSを含有するDMEM、DMEM/F12又はDME培養液（これらの培養液にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、β-メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）または市販の培養液[例えば、マウスES細胞培養用培養液(TX-WES培養液、トロンボＸ社)、霊長類ES細胞培養用培養液（霊長類ES/iPS細胞用培養液、リプロセル社）、無血清培地（mTeSR、Stemcell Technology社）]などが含まれる。
【００２７】
培養法の例としては、たとえば、37℃、5%CO_2存在下にて、10%FBS含有DMEM又はDMEM/F12培養液上で体細胞と初期化因子とを接触させ約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、体細胞と初期化因子の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培養液で培養し、該接触から約30～約45日又はそれ以上ののちにiPS様コロニーを生じさせることができる。
【００２８】
あるいは、37℃、5% CO_2存在下にて、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培養液（これにはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、β-メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）で培養し、約25～約30日又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。望ましくは、フィーダー細胞の代わりに、初期化される体細胞そのものを用いる（Takahashi K, et al. (2009), PLoS One. 4:e8067またはWO2010/137746）、もしくは細胞外基質（例えば、Laminin-5（WO2009/123349）およびマトリゲル（BD社））を用いる方法が例示される。

【００２９】
この他にも、血清を含有しない培地を用いて培養する方法も例示される（Sun N, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:15720-15725）。さらに、樹立効率を上げるため、低酸素条件（0.1%以上、15%以下の酸素濃度）によりiPS細胞を樹立しても良い（Yoshida Y, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:237-241またはWO2010/013845）。
【００３０】
上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培養液と培養液交換を行う。また、核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ100cm^{2}あたり、約５×１０^3～約５×１０^{6}細胞の範囲である。
【００３１】
iPS細胞は、形成したコロニーの形状により選択することが可能である。一方、体細胞が初期化された場合に発現する遺伝子（例えば、Oct3/4、Nanog）と連動して発現する薬剤耐性遺伝子をマーカー遺伝子として導入した場合は、対応する薬剤を含む培養液（選択培養液）で培養を行うことにより樹立したiPS細胞を選択することができる。また、マーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合は蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、また発色酵素遺伝子の場合は発色基質を加えることによって、iPS細胞を選択することができる。
【００３２】
本明細書中で使用する「体細胞」なる用語は、卵子、卵母細胞、ES細胞などの生殖系列細胞または分化全能性細胞を除くあらゆる動物細胞（好ましくは、ヒトを含む哺乳動物細胞）をいう。体細胞には、非限定的に、胎児(仔)の体細胞、新生児(仔)の体細胞、および成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含されるし、また、初代培養細胞、継代細胞、および株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば（1）神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）、（2）組織前駆細胞、（3）リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞（皮膚細胞等）、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞(膵外分泌細胞等)、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分化した細胞などが例示される。
【００３３】
また、iPS細胞を移植用細胞の材料として用いる場合、拒絶反応が起こらないという観点から、移植先の個体のHLA遺伝子型が同一もしくは実質的に同一である体細胞を用いることが望ましい。ここで、「実質的に同一」とは、移植した細胞に対して免疫抑制剤により免疫反応が抑制できる程度にHLA遺伝子型が一致していることであり、例えば、HLA-A、HLA-BおよびHLA-DRの3遺伝子座あるいはHLA-Cを加えた4遺伝子座が一致するHLA型を有する体細胞である。
【００３４】
(E) 核移植により得られたクローン胚由来のES細胞
核移植により得られたクローン胚由来のES細胞（nt ES細胞）は、核移植技術によって作製されたクローン胚由来のES細胞であり、受精卵由来のES細胞とほぼ同じ特性を有している（T. Wakayama et al. (2001), Science, 292:740-743; S. Wakayama et al. (2005), Biol. Reprod., 72:932-936; J. Byrne et al. (2007), Nature, 450:497-502）。すなわち、未受精卵の核を体細胞の核と置換することによって得られたクローン胚由来の胚盤胞の内部細胞塊から樹立されたES細胞がnt ES(nuclear transfer ES)細胞である。nt ES細胞の作製のためには、核移植技術（J.B. Cibelli et al. (1998), Nature Biotechnol., 16:642-646）とES細胞作製技術との組み合わせが利用される(若山清香ら(2008),実験医学,26巻,5号(増刊), 47～52頁)。核移植においては、哺乳動物の除核した未受精卵に、体細胞の核を注入し、数時間培養することで初期化することができる。
【００３５】
(F) Multilineage-differentiating Stress Enduring cells
Multilineage-differentiating Stress Enduring cells （Muse細胞）は、WO2011/007900に記載された方法にて製造された多能性幹細胞であり、詳細には、線維芽細胞または骨

髄間質細胞を長時間トリプシン処理、好ましくは8時間または16時間トリプシン処理した後、浮遊培養することで得られる多能性を有した細胞であり、SSEA-3およびCD105が陽性である。

【００３６】

心筋分化誘導法

本発明において「心筋細胞」とは、少なくとも心筋トロポニン(cTnT)またはαMHCを発現している細胞を意味する。cTnTは、ヒトの場合NCBIのaccession番号NM_000364が例示され、マウスの場合、NM_001130174が例示される。αMHCは、ヒトの場合NCBIのaccession番号NM_002471が例示され、マウスの場合、NM_001164171が例示される。本発明における心筋細胞の由来は特に問われず、例えば、任意の方法で得られた末梢血、心臓、骨髄組織、脂肪組織、骨格筋組織、羊膜組織、胎盤組織、臍帯血などに含まれる細胞であってもよいし、また、多能性幹細胞から分化誘導された細胞であってもよい。

【００３７】

本発明における心筋細胞への分化誘導方法として、例えばLaflamme MAらにより報告された方法により、多能性幹細胞から心筋細胞を製造することができる（Laflamme MA ＆Murry CE, Nature 2011, Review）。この他にも特に特定されないが、例えば、人工多能性幹細胞を浮遊培養により細胞塊（胚様体）を形成させて心筋細胞を製造する方法、BMPシグナル伝達を抑制する物質の存在下で心筋細胞を製造する方法（WO2005/033298）、Activin AとBMPを順に添加させて心筋細胞を製造する方法（WO2007/002136）、カノニカルWntシグナル経路の活性化を促す物質の存在下で心筋細胞を製造する方法（WO2007/126077）および人工多能性幹細胞からFlk/KDR陽性細胞を単離し、シクロスポリンAの存在下で心筋細胞を製造する方法（WO2009/118928）などが例示される。

【００３８】

本発明において、心筋細胞への分化誘導方法は、特に限定されることはないが、例えば、下記の方法が用いられる。

【００３９】

＜多能性幹細胞を解離し、胚様体を形成する工程～工程（１）＞

本発明において、多能性幹細胞を解離させる工程においては、互いに接着して集団を形成している細胞を個々の細胞に解離（分離）させる。多能性幹細胞を解離させる方法としては、例えば、力学的に解離する方法、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する解離溶液（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解離溶液を用いた解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解離溶液（特に好ましくは、Accumax）を用いて多能性幹細胞を解離する方法が用いられる。

【００４０】

本発明において、胚様体を形成する方法として、解離した多能性幹細胞を、培養皿の表面を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、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によるコーティング処理）されていないもの、もしくは、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）したものを用いて浮遊培養させることが例示される。

【００４１】

＜胚様体をアクチビンA、BMP4およびbFGFを含有する培養液中で培養する工程～工程（２）＞

本工程において用いる培養液は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地へアクチビンA、BMP4およびbFGFを添加することにより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、αMEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium（ライフテクノロジーズ）、StemPro34（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、1-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。好ましい基礎培地は、トランスフェリン、1-チオールグリセロール、L-グルタミン、アスコルビン酸を含有するStemPro34である。

【００４２】

本工程において用いられるアクチビンAの濃度は1ng/ml～100ng/mlが好ましく、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/mlおよび100ng/mlが例示される。特に好ましくは、12ng/mlである。

【００４３】

本工程において用いられるBMP4の濃度は1ng/ml～100ng/mlが好ましく、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/mlおよび100ng/mlが例示される。特に好ましくは、18ng/mlである。

【００４４】

本工程において用いられるbFGFの濃度は1ng/ml～100ng/mlが好ましく、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/mlおよび100ng/mlが例示される。特に好ましくは、10ng/mlである。

【００４５】

培養条件について、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、低酸素条件で行われることが望ましい。ここで、低酸素条件とは、大気中の酸素分圧（２０％）より低い酸素分圧の条件であり、例えば、1%から15%の間の酸素分圧が挙げられ、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%および1%が例示される。より好ましくは、5%である。培養は、CO_2およびN_2含有の雰囲気下で行われ、CO_2濃度は、好ましくは約2～5%であり、N_2濃度は、好ましくは約85～95%である。本発明において、最も好ましくは、O_2が5%、CO_2が5%、N_2が90%の条件下で培養され得る。

【００４６】

培養期間は、1日以上7日以下が例示され、心筋細胞の樹立効率を考慮すると1日以上5日以下、2日以上4日以下が例示される。

【００４７】

＜VEGFおよびWnt阻害剤を含有する培養液中で培養する工程～工程（３）＞

本工程において用いる培養液は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地へVEGFおよびWnt阻害剤を添加することにより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、αMEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium（ライフテクノロジーズ）、StemPro34（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、1-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。好ましい基礎培地は、トランスフェリン、1-チオールグリセロール、L-グルタミン、アスコルビン酸を含有するStemPro34である。

【００４８】

本発明において、Wnt阻害剤とは、Wntの受容体への結合からβカテニンの蓄積へと続くシグナル伝達を阻害する物質であり、受容体であるFrizzledファミリーへの結合を阻害する物質、またはβカテニンの分解を促進する物質である限り特に限定されず、例えば、DKK1タンパク質（例えば、ヒトの場合、NCBIのアクセッション番号：NM_012242）、スクレロスチン（例えば、ヒトの場合、NCBIのアクセッション番号：NM_025237）、IWR-1（Merck Millipore）、IWP-2（Sigma-Aldrich）、IWP-3（Sigma-Aldrich）、IWP-4（Sigma-Aldrich）、PNU-74654（Sigma-Aldrich）、XAV939（Sigma-Aldrich）およびこれらの誘導体などが例示される。

【００４９】

本工程で使用されるWnt阻害剤は、好ましくは、IWP-3またはIWP-4であり得る。

【００５０】

培養液中におけるIWP-3またはIWP-4などのWnt阻害剤の濃度は、Wntを阻害する濃度であれば特に限定されないが1nM～50μMが好ましく、例えば、1nM、10nM、50nM、100nM、500nM、750nM、1μM、2μM、3μM、4μM、5μM、6μM、7μM、8μM、9μM、10μM、15μM、20μM、25μM、30μM、40μM、50μMであるがこれらに限定されない。より好ましくは、1μMである。

【００５１】

本工程において用いられるVEGFの濃度は、1～100ng/mlが好ましく、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/mlおよび100ng/mlが例示される。より好ましくは、10ng/mlである。

【００５２】

培養条件について、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、低酸素条件で行われることが望ましい。ここで、低酸素条件とは、大気中の酸素分圧（２０％）より低い酸素分圧の条件であり、例えば、1%から15%の間の酸素分圧が挙げられ、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%および1%が例示される。より好ましくは、5%である。培養は、CO_2およびN_2含有の雰囲気下で行われ、CO_2濃度は、好ましくは約2～5%であり、N2濃度は、好ましくは約85～95%である。本発明において、最も好ましくは、O_2が5%、CO_2が5%、N_2が90%の条件下で培養され得る。

【００５３】

培養期間は、長期間培養することにより心筋細胞の樹立に影響がでないことから、上限は特に設けられないが、４日以上培養することが好ましい。例えば、4日、5日、6日、7日、8日、9日および10日が挙げられる。

【００５４】

＜VEGFおよびbFGFを含有する培養液中で培養する工程～工程（４）＞

本工程において用いる培養液は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地へVEGFおよびbFGFを添加することにより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、αMEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal Medium（ライフテクノロジーズ）、StemPro34（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（In

vitrogen）、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、1-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。好ましい基礎培地は、トランスフェリン、1-チオールグリセロール、L-グルタミン、アスコルビン酸を含有するStemPro34である。

【００５５】

本工程において用いられるVEGFの濃度は1～100ng/mlが好ましく、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/mlおよび100ng/mlが例示される。より好ましくは、10ng/mlである。

【００５６】

本工程において用いられるbFGFの濃度は1～100ng/mlが好ましく、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/mlおよび100ng/mlが例示される。より好ましくは、5ng/mlである。

【００５７】

培養条件について、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℃であり得る。ここで、低酸素条件とは、大気中の酸素分圧（20%）より低い酸素分圧の条件であり、例えば、1%から15%の間の酸素分圧が挙げられ、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%および1%が例示される。より好ましくは、5%である。本工程では、工程の途中で酸素分圧を大気中と同等にて行われていても良い。この場合、特に低酸素条件下で行うことにより心筋細胞の誘導効率に変化がないため上限は特に設けないが、低酸素条件下は、工程の初期の４日以上行われることが好ましい。本発明において、好ましくは、工程の最初の期間が5%O_2、5%CO_2および90%N_2の条件下で培養が行われ、それに続く期間が5%CO_2含有空気の雰囲気下で培養が行われる。

【００５８】

培養期間は、長期間培養することにより心筋細胞の樹立に影響がでないことから、上限は特に設けられないが、１２日以上培養することが好ましい。例えば、８日、９日、１０日、１１日、１２日、１３日、１４日、１５日、１６日、１７日、１８日、１９日、２０日、２１日、２２日またはそれ以上が挙げられる。

【００５９】

本発明において、細胞群に導入されるmiRNA応答性mRNAは、好ましくは、多能性幹細胞から心筋細胞へ分化誘導させる工程を経た細胞群である。多能性幹細胞から分化誘導させる工程を経た細胞群にmiRNA応答性mRNAを導入する時期としては、細胞の選別を行いたい時期であれば別段限定されない。上記心筋分化誘導法の項において詳述した方法を用いて分化誘導させる工程を行った場合、好ましくは、胚様体から起算して10～25日目であり、より好ましくは、18日目である。

【００６０】

細胞群に導入されるmiRNA応答性mRNAは、(i) 心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAによって特異的に認識される核酸、および(ii) 遺伝子のコード領域に対応する核酸を含む配列からなり、当該(ii)の遺伝子のコード領域に対応する核酸のタンパク質への翻訳が当該(i)の核酸配列により制御されているmRNAである。

【００６１】

上記(i)および(ii) を含む配列からなるmiRNA応答性mRNAは、好ましくは、心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAによって特異的に認識される配列（以下、miRNA標的配列という）と機能的に連結した遺伝子のコード領域に対応する核酸を含むmRNAである。当該(ii)

の遺伝子のコード領域に対応する核酸のタンパク質への翻訳が当該(i)の核酸配列により制御されているとは、心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAが存在する場合に、その存在量に応じて遺伝子のコード領域に対応する核酸のタンパク質への翻訳が制御されることを意味する。好ましくは、心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAが存在する場合に、その存在量に応じて(ii)の遺伝子のコード領域に対応する核酸の翻訳が抑制されることで、当該(ii)の遺伝子のコード領域に対応する核酸より翻訳されたタンパク質の量が減少するmRNAである。本発明において、このように、miRNA標的配列に特異的に結合するmiRNA分子の存在量に応じて、タンパク質への翻訳が抑制されるように機能するmiRNA応答性mRNAを、miRNA応答性オフスイッチmRNAと指称する。すなわち、miRNA応答性オフスイッチmRNAを用いる場合、当該mRNAに含有される(ii)の遺伝子の翻訳量がより少ない細胞を心筋細胞として選択できる。

【００６２】

本発明における「miRNA」とは、mRNAからタンパク質への翻訳の阻害やmRNAの分解を通して、遺伝子の発現調節に関与する、細胞内に存在する短鎖（20-25塩基）のノンコーディングRNAである。このmiRNAは、DNAからmiRNAとその相補鎖を含むヘアピンループ構造を取ることが可能な一本差のpri-miRNAとして転写され、核内にあるDroshaと呼ばれる酵素により一部が切断されpre-miRNAとなって核外に輸送された後、さらにDicerによって切断されて機能する。

【００６３】

本発明において使用される前記(i)の「心筋細胞で特異的に発現しているmiRNA」とは、心筋細胞以外の細胞と比較して心筋細胞でより高く発現しているmiRNAであれば特に限定されない。例えば、心筋細胞以外の細胞と比較して心筋細胞において、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上あるいはそれ以上の割合で高く発現しているmiRNAであってよいが、これらには限定されない。このようなmiRNAは、データベースの情報（例えば、http://www.mirbase.org/又はhttp://www.microrna.org/）に登録されたmiRNA、及び／または当該データベースに記載されている文献情報に記載されたmiRNAより適宜選択することができる。例えば、表１に記載されたmiRNAが挙げられるが、これらには限定されない。本発明において、前記(i)の「心筋細胞で特異的に発現しているmiRNA」は、好ましくは、miR-1, miR-143-3p, miR-208a, miR-208bおよびmiR-499a-5pであり得る。

【００６４】

【表１】

心筋細胞で特異的に発現しているmiRNA	miRNAの配列（５′→３′）	配列番号
hsa-miR-1	uggaauguaaagaaguauguau	１
hsa-miR-22-5p	aguucuucaguggcaagcuuua	２
hsa-miR-133a	uuuggucccuucaaccagcug	３
hsa-miR-133b	uuuggucccuucaaccagcua	４
hsa-miR-143-3p	ugagaugaagcacuguagcuc	５
hsa-miR-145-3p	ggauuccuggaaauacuguucu	６
hsa-miR-208a	auaagacgagcaaaaagcuugu	７
hsa-miR-490-3p	caaccuggaggacuccaugcug	８
hsa-miR-490-5p	ccauggaucuccaggugggu	９
hsa-miR-499a-5p	uuaagacuugcagugauguuu	１０
hsa-miR-1271-5p	cuuggcaccuagcaagcacuca	１１
hsa-miR-3907	aggugcuccaggcuggcucaca	１２
hsa-miR-4324	cccugagacccuaaccuuaa	１３
hsa-let-7e-5p	ugagguaggagguuguauaguu	１４
hsa-miR-208b	auaagacgaacaaaagguuugu	６５

表１．心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAおよびその配列

【００６５】

本発明において、前記(i)の「心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAによって特異的に認識される」とは、当該miRNAが、所定の複数のタンパク質と相互作用して、RNA-induced silencing complex（ＲＩＳＣ）を形成した状態にあるmiRNAが存在していることをいうものとする。

【００６６】

本発明において、miRNAの標的配列は、例えば、当該miRNAに完全に相補的な配列であることが好ましい。あるいは、当該miRNA標的配列は、miRNAにおいて認識され得る限り、完全に相補的な配列との不一致（ミスマッチ）を有していても良い。当該miRNAに完全に相補的な配列からの不一致は、所望の細胞において、通常にmiRNAが認識し得る不一致であれば良く、生体内における細胞内の本来の機能では、４０～５０％ 程度の不一致があっても良い。このような不一致は、特に限定されないが、１塩基、２塩基、３塩基、４塩基、５塩基、６塩基、７塩基、８塩基、９塩基、若しくは１０塩基又は全認識配列の１％、５％、１０％、２０％、３０％、若しくは４０％の不一致が例示される。また、特には、細胞が備えているmRNA 上のmiRNA 標的配列のように、特に、シード領域以外の部分に、すなわち miRNA の 3' 側 16 塩基程度に対応する、標的配列内の 5' 側の領域に、多数の不一致を含んでもよく、シード領域の部分は、不一致を含まないか、１塩基、２塩基、若しくは３塩基の不一致を含んでもよい。このような配列は、当該ＲＩＳＣが特異的に結合する塩基数を含む塩基長であればよく、長さは別段限定されないが、好ましくは、１８塩基以上、２４塩基未満の配列、より好ましくは、２０塩基以上、２２塩基未満の配列である。本発明において、miRNAの標的配列は、心筋細胞および心筋細胞以外の細胞へ当該配列を有するmiRNA応答性mRNAを導入し、心筋細胞においてのみ対応するマーカー遺伝子の発現が抑制されることを確認することによって、適宜決定して用いることができる。本発明において、「心筋細胞で特異的に発現しているmiRNA」に対応する、好ましいmiRNAの標的配列を表２に例示する。

【００６７】

表２．心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAおよびその標的配列

【表２】

心筋細胞で特異的に発現しているmiRNA	miRNAの標的配列（５′→３′）	配列番号
hsa-miR-1	auacauacuucuuuacauucca	１５
hsa-miR-22-5p	uaaagcuugccacugaagaacu	１６
hsa-miR-133a	cagcugguugaaggggaccaaa	１７
hsa-miR-133b	uagcugguugaaggggaccaaa	１８
hsa-miR-143-3p	gagcuacagugcuucaucuca	１９
hsa-miR-145-3p	agaacaguauuuccaggaaucc	２０
hsa-miR-208a	acaagcuuuuugcucgucuuau	２１
hsa-miR-490-3p	cagcauggaguccuccagguug	２２
hsa-miR-490-5p	acccaccuggagauccaugg	２３
hsa-miR-499a-5p	aaacaucacugcaagucuuaa	２４
hsa-miR-1271-5p	ugagugcuugcuaggugccaag	２５
hsa-miR-3907	ugugagccagccuggagcaccu	２６
hsa-miR-4324	uuaagguuagggucucaggg	２７
hsa-let-7e-5p	aacuauacaaccuccuaccuca	２８
hsa-miR-208b	acaaaccuuuuguucgucuuau	６６

【００６８】

本発明において使用される前記(ii)の「遺伝子のコード領域に対応する核酸」は、細胞内で翻訳されて、心筋細胞の選別を可能にする任意のタンパク質をコードする核酸遺伝子である。一例として、「遺伝子」はマーカー遺伝子であってよい。「マーカー遺伝子」とは、細胞内で翻訳されて、マーカーとして機能し、心筋細胞の選別を可能にする任意のタンパク質をコードする遺伝子である。細胞内で翻訳されてマーカーとして機能しうるタンパク質としては、一例としては、蛍光、発光、呈色、若しくは蛍光、蛍光タンパク質などの蛍光、発光又は呈色を補助することなどにより、視覚化し、定量化することができるタンパク質をコードする遺伝子、膜タンパク質、または、アポトーシス誘導遺伝子、自殺遺伝子などの、発現することで細胞を死滅させるタンパク質をコードする遺伝子を含むが、これらに限定されない。アポトーシス誘導遺伝子と組み合わせて、アポトーシス抑制遺伝子をマーカー遺伝子として用いることもできる。本明細書において、当該マーカー遺伝子のコード領域に対応する核酸を含むmRNAより翻訳されたタンパク質を、マーカータンパク質と指称する。

【００６９】

本発明において、蛍光タンパク質としては、Sirius、BFP、EBFPなどの青色蛍光タンパク質；mTurquoise、TagCFP、AmCyan、mTFP1、MidoriishiCyan、CFPなどのシアン蛍光タンパク質；TurboGFP、AcGFP、TagGFP、Azami-Green (例えば、hmAG1)、ZsGreen、EmGFP、EGFP、GFP2、HyPerなどの緑色蛍光タンパク質；TagYFP、EYFP、Venus、YFP、PhiYFP、PhiYFP-m、TurboYFP、ZsYellow、mBananaなどの黄色蛍光タンパク質；KusabiraOrange (例えば、hmKO2)、mOrangeなどの橙色蛍光タンパク質；TurboRFP、DsRed-Express、DsRed2、TagRFP、DsRed-Monomer、AsRed2、mStrawberryなどの赤色蛍光タンパク質；TurboFP602、mRFP1、JRed、KillerRed、mCherry、HcRed、KeimaRed（例えば、hdKeimaRed）、mRasberry、mPlumなどの近赤外蛍光タンパク質が挙げられるが、これらには限定されない。

【００７０】

本発明において、発光タンパク質としては、イクオリンを例示することができるが、これに限定されない。また、蛍光、発光又は呈色を補助するタンパク質として、ルシフェラーゼ、ホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、βラクタマーゼなどの蛍光、発光又は呈色前駆物質を分解する酵素を例示することができるが、これらには限定されない。ここで本発

明において、蛍光、発光又は呈色を補助する物質をマーカー遺伝子として使用する場合、心筋細胞の選別において、対応する前駆物質と細胞群を接触させること、又は細胞群内に対応する前駆物質を導入することによって行われ得る。

【００７１】

本発明において、アポトーシス誘導遺伝子とは、細胞に対してアポトーシス誘導活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を意味する。例えば、IκB、Smac/DIABLO、ICE、HtrA2/OMI、AIF、endonuclease G、Bax、Bak、Noxa、Hrk (harakiri)、Mtd、Bim、Bad、Bid、PUMA、activated caspase-3、Fas、Tk等が挙げられるが、これらに限定されない。本発明において、好ましくは、Bimがアポトーシス誘導遺伝子として用いられる。

【００７２】

本発明において自殺遺伝子とは、細胞におけるその発現がその細胞にとって致死的である遺伝子を意味する。本発明において、自殺遺伝子は、それ自体で細胞死をもたらすもの（例えば、ジフテリアＡ毒素）であってもよく、またはこの遺伝子の発現が、特定の薬物に対して細胞を感受性にするもの（例えば、単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子の発現により、抗ウイルス化合物に対して細胞を感受性にする）であってもよい。自殺遺伝子として、例えば、ジフテリアＡ毒素、単純ヘルペスチミジンキナーゼ遺伝子（HSV-TK）、カルボキシペプチダーゼG2（CPG2）、カルボキシルエステラーゼ（CA）、シトシンデアミナーゼ（CD）、チトクロームP450（cyt-450）、デオキシシチジンキナーゼ（dCK）、ニトロレダクターゼ（NR）、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ（PNP）、チミジンホスホリラーゼ（TP）、水痘帯状疱疹ウイルスチミジンキナーゼ（VZV-TK）、キサンチン－グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（XGPRT）をコードする遺伝子等が挙げられるが、これらに限定されない。本発明において、好ましくは、HSV-TKが自殺遺伝子として用いられる。

【００７３】

本発明において、上記マーカー遺伝子は、局在化シグナルをコードする遺伝子を備えていてもよい。局在化シグナルとしては、核局在化シグナル、細胞膜局在化シグナル、ミトコンドリア局在化シグナル、タンパク質分泌シグナル等を挙げることができ、具体的には、古典的核移行配列（NLS）、Ｍ９配列、ミトコンドリア標的配列(MTS)、小胞体移行配列を挙げることができるが、これらには限定されない。このような局在化シグナルは、後述するイメージングサイトメトリー等で、後述する心筋細胞の製造方法における選別工程を、画像上で行うときに特に有利である。

【００７４】

本発明において、miRNAの標的配列とマーカー遺伝子が機能的に連結されるとは、マーカー遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム（ただし、開始コドンを含む。）の５'ＵＴＲ内、３'ＵＴＲ内、及び／または当該オープンリーディングフレーム内に、少なくとも１つのmiRNAの標的配列を備えることを意味する。miRNA応答性mRNAは、好ましくは、５'末端から、５'から３'の向きに、Ｃａｐ構造（７メチルグアノシン５'リン酸）、マーカー遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム並びに、ポリＡテイルを備え、５'ＵＴＲ内、３'ＵＴＲ内、及び／またはオープンリーディングフレーム内に少なくとも１つのmiRNAの標的配列を備える。mRNAにおけるmiRNAの標的配列の位置は、５'ＵＴＲであっても、３'ＵＴＲであってもよく、オープンリーディングフレーム内（開始コドンの３'側）であってもよく、これらのすべてにmiRNAの標的配列を備えていてもよい。したがって、miRNA標的配列の数は、１つ、２つ、３つ、４つ、５つ、６つ、７つ、８つあるいはそれ以上であっても良い。

【００７５】

好ましくは、miRNA応答性mRNAは、(i)および(ii)の核酸が、5'から3'の方向にこの順序で連結されている。したがって、miRNAの標的配列は、５'ＵＴＲに１つ存在すればよい。効率的な翻訳抑制を達成することができるためである。このとき、ｃａｐ構造とmiRNAの標的配列との間の塩基数及び塩基の種類は、ステム構造や立体構造を構成しない限り、任意であってよい。例えば、ｃａｐ構造とmiRNA標的配列との間の塩基数は、０～５０塩

基、好ましくは、１０～３０塩基となるように設計することができる。また、miRNA標的配列と開始コドンとの間の塩基数及び塩基の種類は、ステム構造や立体構造を構成しない限り、任意であってよく、miRNA標的配列と開始コドンと間の塩基数は、０～５０塩基、好ましくは、１０～３０塩基となるような配置にて設計することができる。

【００７６】

本発明において、miRNA応答性mRNA 中のmiRNA標的配列内には、開始コドンとなるAUGが存在しないことが好ましい。例えば、miRNAの標的配列が５'ＵＴＲに存在し、かつ、当該標的配列内にAUGを含む場合には、３'側に連結されるマーカー遺伝子との関係上でインフレームとなるように設計されることが好ましい。あるいは、標的配列内にAUGを含む場合、標的配列内のAUGをGUGに変換して使用することも可能である。また、標的配列内のAUGの影響を最小限に留めるために、５'ＵＴＲ内における標的配列の配置場所を適宜変更することができる。例えば、ｃａｐ構造と標的配列内のAUG配列との間の塩基数が、０～６０塩基、例えば、０～１５塩基、１０～２０塩基、２０～３０塩基、３０～４０塩基、４０～５０塩基、５０～６０塩基となるような配置にて設計され得る。

【００７７】

本発明における、mRNAは、通常のウリジン、シチジンに替えて、シュードウリジン、５－メチルシチジンなどの修飾塩基を含んでいることが好ましい。細胞毒性を低減させるためである。修飾塩基の位置は、ウリジン、シチジンいずれの場合も、独立に、全てあるいは一部とすることができ、一部である場合には、任意の割合でランダムな位置とすることができる。

【００７８】

本発明において、miRNAの標的配列が５'ＵＴＲに存在する場合、例えば、下記のような配列が採用され得る。

【００７９】

【表３】

心筋細胞で特異的に発現しているmiRNA	miRNA応答性mRNA中の５'ＵＴＲの配列（５'→３'）（３'末端のAUGは、開始コドンを示す）	配列番号
hsa-miR-1	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAUACAUACUUCUUUACAUUCCAAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG	２９
hsa-miR-22-5p	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUAAAGCUUGCCACUGAAGAACUAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG	３０
hsa-miR-133a	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCCAGCUGGUUGAAGGGGACCAAAAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG	３１
hsa-miR-133b	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUAGCUGGUUGAAGGGGACCAAAAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG	３２
hsa-miR-143-3p	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCGAGCUACAGUGCUUCAUCUCAAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG	３３
hsa-miR-145-3p	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAGAACAGUAUUUCCAGGAAUCCAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG	３４
hsa-miR-208a	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCACAAGCUUUUUGCUCGUCUUAUAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG	３５
hsa-miR-490-3p	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCACCCACCUGGAGAUCCAUGGAGAUCAAACACCGGUCGCCACCAUG	３６
hsa-miR-490-5p	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCCAGCAUGGAGUCCUCCAGGUUGAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG	３７
hsa-miR-499a-5p	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAAACAUCACUGCAAGUCUUAAAGAUCAACACCGGUCGCCACCAUG	３８
hsa-miR-1271-5p	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUGAGUGCUUGCUAGGUGCCAAGAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG	３９
hsa-miR-3907	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUGUGAGCCAGCCUGGAGCACCUAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG	４０
hsa-miR-4324	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCUUAAGGUUAGGGUCUCAGGGAGAUCAAACACCGGUCGCCACCAUG	４１
hsa-let-7e-5p	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCAACUAUACAACCUCCUACCUCAAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG	４２
hsa-miR-208b	GGUUCCGCGAUCGCGGAUCCACAAACCUUUUGUUCGUCUUAUAGAUCACACCGGUCGCCACCAUG	６７

表３．心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAおよびそれに対応するmiRNA応答性mRNA中の５'ＵＴＲの配列

【００８０】

本発明において、miRNAの標的配列が５'ＵＴＲに存在する場合、それに続くマーカー遺伝子の下流（すなわち、３'ＵＴＲ）は、例えば、下記の配列が採用され得る。この時、５'ＵＴＲと３'ＵＴＲの間に挟まれて配置されるマーカー遺伝子は、上記したような任意の遺伝子が使用され得る。

【００８１】

【表４】

３′ＵＴＲの配列	配列番号
CCUGUGAUGCAGAAGAAAACACUCGGCUGGGAGGCCUUCACCGAGACGCU GUACCCCGCUGACGGCGGCCUGGAAGGCAGAAACGACAUGGCCCUGAAGC UCGUGGGCGGGAGCCAUCUGAUCGCAAACAUCAAGACCACAUAUAGAUCCA AGAAACCCGCUAAGAACCUCAAGAUGCCUGGCGUCUACUAUGUGGACUACA GACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCCAACAACGAGACCUACGUCGAGCAGCACG AGGUGGCAGUGGCCAGAUACUGCGACCUCCCUAGCAAACUGGGGCACAGA UCUCAUAUGCAUCUCGAGUGAUAGUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUU CUGGCCAUGCCCUUCUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGA AUAAAGCCUGAGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	４３

表４．３′ＵＴＲの配列

【００８２】

本発明において、マーカー遺伝子として例えばBFPをコードする遺伝子が使用される場合、本発明におけるmiRNA応答性mRNAの全長は、心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAごとに、例えば、下記の配列が採用され得る。

【００８３】

表５．心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAおよびそれに対応するmiRNA応答性mRNAの全長

【表５－１】

心筋細胞で特異的に発現しているmiRNA	miRNA応答性mRNAの全長	配列番号
hsa-miR-1	GGUUCCUUAAUCGCGGAUCCAUACAUACUUCUUUACAUUCCAAGAU CACACCGGUCGCCACCAUGGGAUCCAGCGAGCUGAUUAAGGAGAAC AUGCACAUGAAGCUGUACAUGGAGGGCACCGUGGACAACCAUCACU UCAAGUGCACAUCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCUACGAGGGCACCCA GACCAUGAGAAUCAAGGUGGUCGAGGGCGGCCCUCUCCCCUUCGCC UUCGACAUCCUGGCUACUAGCUUCCUCUACGGCAGCAAGACCUUCA UCAACCACACCCAGGGCAUCCCCGACUUCUUCAAGCAGUCCUUCCC UGAGGGCUUCACAUGGGAGAGAGUCACCACAUACGAAGACGGGGG CGUGCUGACCGCUACCCAGGACACCAGCCUCCAGGACGGCUGCCUC AUCUACAACGUCAAGAUCAGAGGGGUGAACUUCACAUCCAACGGCC CUGUGAUGCAGAAGAAAACACUCGGCUGGGAGGCCUUCACCGAGAC GCUGUACCCCGCUGACGGCGGCCUGGAAGGCAGAAACGACAUGGCC CUGAAGCUCGUGGGCGGGAGCCAUCUGAUCGCAAACAUCAAGACCA CAUAUAGAUCCAAGAAACCCGCUAAGAACCUCAAGAUGCCUGGCGU CUACUAUGUGGACUACAGACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCCAACAAC GAGACCUACGUCGAGCAGCACGAGGUGGCAGUGGCCAGAUACUGC GACCUCCCUAGCAAACUGGGGCACAGAUCUCAUAUGCAUCUCGAGU GAUAGUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUU CUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUG AGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	４４
hsa-miR-22-5p	GGUUCCUUAAUCGCGGAUCCUAAAGCUUGCCACUGAAGAACUAGAU CACACCGGUCGCCACCAUGGGAUCCAGCGAGCUGAUUAAGGAGAAC AUGCACAUGAAGCUGUACAUGGAGGGCACCGUGGACAACCAUCACU UCAAGUGCACAUCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCUACGAGGGCACCCA GACCAUGAGAAUCAAGGUGGUCGAGGGCGGCCCUCUCCCCUUCGCC UUCGACAUCCUGGCUACUAGCUUCCUCUACGGCAGCAAGACCUUCA UCAACCACACCCAGGGCAUCCCCGACUUCUUCAAGCAGUCCUUCCC UGAGGGCUUCACAUGGGAGAGAGUCACCACAUACGAAGACGGGGG CGUGCUGACCGCUACCCAGGACACCAGCCUCCAGGACGGCUGCCUC AUCUACAACGUCAAGAUCAGAGGGGUGAACUUCACAUCCAACGGCC CUGUGAUGCAGAAGAAAACACUCGGCUGGGAGGCCUUCACCGAGAC GCUGUACCCCGCUGACGGCGGCCUGGAAGGCAGAAACGACAUGGCC CUGAAGCUCGUGGGCGGGAGCCAUCUGAUCGCAAACAUCAAGACCA CAUAUAGAUCCAAGAAACCCGCUAAGAACCUCAAGAUGCCUGGCGU CUACUAUGUGGACUACAGACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCCAACAAC GAGACCUACGUCGAGCAGCACGAGGUGGCAGUGGCCAGAUACUGC GACCUCCCUAGCAAACUGGGGCACAGAUCUCAUAUGCAUCUCGAGU GAUAGUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUU CUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUG AGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	４５

【表５－２】

心筋細胞で特異的に発現しているmiRNA	miRNA応答性mRNAの全長	配列番号
hsa-miR-133a-3p	GGUUCCUUAAUCGCGGAUCCCAGCUGGUUGAAGGGGACCAAAAGA UCACACCGGUCGCCACCAUGGGAUCCAGCGAGCUGAUUAAGGAGAA CAUGCACAUGAAGCUGUACAUGGAGGGCACCGUGGACAACCAUCAC UUCAAGUGCACAUCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCUACGAGGGCACCC AGACCAUGAGAAUCAAGGUGGUCGAGGGCGGCCCUCUCCCCUUCGC CUUCGACAUCCUGGCUACUAGCUUCCUCUACGGCAGCAAGACCUUC AUCAACCACACCCAGGGCAUCCCCGACUUCUUCAAGCAGUCCUUCC CUGAGGGCUUCACAUGGGAGAGAGUCACCACAUACGAAGACGGGG GCGUGCUGACCGCUACCCAGGACACCAGCCUCCAGGACGGCUGCCU CAUCUACAACGUCAAGAUCAGAGGGGUGAACUUCACAUCCAACGGC CCUGUGAUGCAGAAGAAAACACUCGGCUGGGAGGCCUUCACCGAGA CGCUGUACCCCGCUGACGGCGGCCUGGAAGGCAGAAACGACAUGGC CCUGAAGCUCGUGGGCGGGAGCCAUCUGAUCGCAAACAUCAAGACC ACAUAUAGAUCCAAGAAACCCGCUAAGAACCUCAAGAUGCCUGGCG UCUACUAUGUGGACUACAGACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCCAACAA CGAGACCUACGUCGAGCAGCACGAGGUGGCAGUGGCCAGAUACUGC GACCUCCCUAGCAAACUGGGGCACAGAUCUCAUAUGCAUCUCGAGU GAUAGUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUU CUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUG AGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	４６
hsa-miR-133b	GGUUCCUUAAUCGCGGAUCCUAGCUGGUUGAAGGGGACCAAAAGA UCACACCGGUCGCCACCAUGGGAUCCAGCGAGCUGAUUAAGGAGAA CAUGCACAUGAAGCUGUACAUGGAGGGCACCGUGGACAACCAUCAC UUCAAGUGCACAUCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCUACGAGGGCACCC AGACCAUGAGAAUCAAGGUGGUCGAGGGCGGCCCUCUCCCCUUCGC CUUCGACAUCCUGGCUACUAGCUUCCUCUACGGCAGCAAGACCUUC AUCAACCACACCCAGGGCAUCCCCGACUUCUUCAAGCAGUCCUUCC CUGAGGGCUUCACAUGGGAGAGAGUCACCACAUACGAAGACGGGG GCGUGCUGACCGCUACCCAGGACACCAGCCUCCAGGACGGCUGCCU CAUCUACAACGUCAAGAUCAGAGGGGUGAACUUCACAUCCAACGGC CCUGUGAUGCAGAAGAAAACACUCGGCUGGGAGGCCUUCACCGAGA CGCUGUACCCCGCUGACGGCGGCCUGGAAGGCAGAAACGACAUGGC CCUGAAGCUCGUGGGCGGGAGCCAUCUGAUCGCAAACAUCAAGACC ACAUAUAGAUCCAAGAAACCCGCUAAGAACCUCAAGAUGCCUGGCG UCUACUAUGUGGACUACAGACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCCAACAA CGAGACCUACGUCGAGCAGCACGAGGUGGCAGUGGCCAGAUACUGC GACCUCCCUAGCAAACUGGGGCACAGAUCUCAUAUGCAUCUCGAGU GAUAGUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUU CUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUG AGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	４７

【表５－３】

心筋細胞で特異的に発現しているmiRNA	miRNA応答性mRNAの全長	配列番号
hsa-miR-143-3p	GGUUCCUUAAUCGCGGAUCCGAGCUACAGUGCUUCAUCUCAAGAUC AACACCGGUCGCCACCAUGGGAUCCAGCGAGCUGAUUAAGGAGAAC AUGCACAUGAAGCUGUACAUGGAGGGCACCGUGGACAACCAUCACU UCAAGUGCACAUCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCUACGAGGGCACCCA GACCAUGAGAAUCAAGGUGGUCGAGGGCGGCCCUCUCCCCUUCGCC UUCGACAUCCUGGCUACUAGCUUCCUCUACGGCAGCAAGACCUUCA UCAACCACACCCAGGGCAUCCCCGACUUCUUCAAGCAGUCCUUCCC UGAGGGCUUCACAUGGGAGAGAGUCACCACAUACGAAGACGGGGG CGUGCUGACCGCUACCCAGGACACCAGCCUCCAGGACGGCUGCCUC AUCUACAACGUCAAGAUCAGAGGGGUGAACUUCACAUCCAACGGCC CUGUGAUGCAGAAGAAAACACUCGGCUGGGAGGCCUUCACCGAGAC GCUGUACCCCGCUGACGGCGGCCUGGAAGGCAGAAACGACAUGGCC CUGAAGCUCGUGGGCGGGAGCCAUCUGAUCGCAAACAUCAAGACCA CAUAUAGAUCCAAGAAACCCGCUAAGAACCUCAAGAUGCCUGGCGU CUACUAUGUGGACUACAGACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCCAACAAC GAGACCUACGUCGAGCAGCACGAGGUGGCAGUGGCCAGAUACUGC GACCUCCCUAGCAAACUGGGGCACAGAUCUCAUAUGCAUCUCGAGU GAUAGUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUU CUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUG AGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	４８
hsa-miR-145-3p	GGUUCCUUAAUCGCGGAUCCAGAACAGUAUUUCCAGGAAUCCAGAU CACACCGGUCGCCACCAUGGGAUCCAGCGAGCUGAUUAAGGAGAAC AUGCACAUGAAGCUGUACAUGGAGGGCACCGUGGACAACCAUCACU UCAAGUGCACAUCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCUACGAGGGCACCCA GACCAUGAGAAUCAAGGUGGUCGAGGGCGGCCCUCUCCCCUUCGCC UUCGACAUCCUGGCUACUAGCUUCCUCUACGGCAGCAAGACCUUCA UCAACCACACCCAGGGCAUCCCCGACUUCUUCAAGCAGUCCUUCCC UGAGGGCUUCACAUGGGAGAGAGUCACCACAUACGAAGACGGGGG CGUGCUGACCGCUACCCAGGACACCAGCCUCCAGGACGGCUGCCUC AUCUACAACGUCAAGAUCAGAGGGGUGAACUUCACAUCCAACGGCC CUGUGAUGCAGAAGAAAACACUCGGCUGGGAGGCCUUCACCGAGAC GCUGUACCCCGCUGACGGCGGCCUGGAAGGCAGAAACGACAUGGCC CUGAAGCUCGUGGGCGGGAGCCAUCUGAUCGCAAACAUCAAGACCA CAUAUAGAUCCAAGAAACCCGCUAAGAACCUCAAGAUGCCUGGCGU CUACUAUGUGGACUACAGACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCCAACAAC GAGACCUACGUCGAGCAGCACGAGGUGGCAGUGGCCAGAUACUGC GACCUCCCUAGCAAACUGGGGCACAGAUCUCAUAUGCAUCUCGAGU GAUAGUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUU CUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUG AGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	４９

【表５－４】

心筋細胞で特異的に発現しているmiRNA	miRNA応答性mRNAの全長	配列番号
hsa-miR-208a-3p	GGUUCCUUAAUCGCGGAUCCACAAGCUUUUUGCUCGUCUUAUAGA UCACACCGGUCGCCACCAUGGGAUCCAGCGAGCUGAUUAAGGAGAA CAUGCACAUGAAGCUGUACAUGGAGGGCACCGUGGACAACCAUCAC UUCAAGUGCACAUCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCUACGAGGGCACCC AGACCAUGAGAAUCAAGGUGGUCGAGGGCGGCCCUCUCCCCUUCGC CUUCGACAUCCUGGCUACUAGCUUCCUCUACGGCAGCAAGACCUUC AUCAACCACACCCAGGGCAUCCCCGACUUCUUCAAGCAGUCCUUCC CUGAGGGCUUCACAUGGGAGAGAGUCACCACAUACGAAGACGGGG GCGUGCUGACCGCUACCCAGGACACCAGCCUCCAGGACGGCUGCCU CAUCUACAACGUCAAGAUCAGAGGGGUGAACUUCACAUCCAACGGC CCUGUGAUGCAGAAGAAAACACUCGGCUGGGAGGCCUUCACCGAGA CGCUGUACCCCGCUGACGGCGGCCUGGAAGGCAGAAACGACAUGGC CCUGAAGCUCGUGGGCGGGAGCCAUCUGAUCGCAAACAUCAAGACC ACAUAUAGAUCCAAGAAACCCGCUAAGAACCUCAAGAUGCCUGGCG UCUACUAUGUGGACUACAGACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCCAACAA CGAGACCUACGUCGAGCAGCACGAGGUGGCAGUGGCCAGAUACUGC GACCUCCCUAGCAAACUGGGGCACAGAUCUCAUAUGCAUCUCGAGU GAUAGUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUU CUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUG AGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	５０
hsa-miR-490-3p	GGUUCCUUAAUCGCGGAUCCCAGCAUGGAGUCCUCCAGGUUGAGA UCACACCGGUCGCCACCAUGGGAUCCAGCGAGCUGAUUAAGGAGAA CAUGCACAUGAAGCUGUACAUGGAGGGCACCGUGGACAACCAUCAC UUCAAGUGCACAUCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCUACGAGGGCACCC AGACCAUGAGAAUCAAGGUGGUCGAGGGCGGCCCUCUCCCCUUCGC CUUCGACAUCCUGGCUACUAGCUUCCUCUACGGCAGCAAGACCUUC AUCAACCACACCCAGGGCAUCCCCGACUUCUUCAAGCAGUCCUUCC CUGAGGGCUUCACAUGGGAGAGAGUCACCACAUACGAAGACGGGG GCGUGCUGACCGCUACCCAGGACACCAGCCUCCAGGACGGCUGCCU CAUCUACAACGUCAAGAUCAGAGGGGUGAACUUCACAUCCAACGGC CCUGUGAUGCAGAAGAAAACACUCGGCUGGGAGGCCUUCACCGAGA CGCUGUACCCCGCUGACGGCGGCCUGGAAGGCAGAAACGACAUGGC CCUGAAGCUCGUGGGCGGGAGCCAUCUGAUCGCAAACAUCAAGACC ACAUAUAGAUCCAAGAAACCCGCUAAGAACCUCAAGAUGCCUGGCG UCUACUAUGUGGACUACAGACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCCAACAA CGAGACCUACGUCGAGCAGCACGAGGUGGCAGUGGCCAGAUACUGC GACCUCCCUAGCAAACUGGGGCACAGAUCUCAUAUGCAUCUCGAGU GAUAGUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUU CUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUG AGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	５１

【表５－５】

心筋細胞で特異的に発現しているmiRNA	miRNA応答性mRNAの全長	配列番号
hsa-miR-490-5p	GGUUCCUUAAUCGCGGAUCCACCCACCUGGAGAUCCAUGGAGAUCA AACACCGGUCGCCACCAUGGGAUCCAGCGAGCUGAUUAAGGAGAAC AUGCACAUGAAGCUGUACAUGGAGGGCACCGUGGACAACCAUCACU UCAAGUGCACAUCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCUACGAGGGCACCCA GACCAUGAGAAUCAAGGUGGUCGAGGGCGGCCCUCUCCCCUUCGCC UUCGACAUCCUGGCUACUAGCUUCCUCUACGGCAGCAAGACCUUCA UCAACCACACCCAGGGCAUCCCCGACUUCUUCAAGCAGUCCUUCCC UGAGGGCUUCACAUGGGAGAGAGUCACCACAUACGAAGACGGGGG CGUGCUGACCGCUACCCAGGACACCAGCCUCCAGGACGGCUGCCUC AUCUACAACGUCAAGAUCAGAGGGGUGAACUUCACAUCCAACGGCC CUGUGAUGCAGAAGAAAACACUCGGCUGGGAGGCCUUCACCGAGAC GCUGUACCCCGCUGACGGCGGCCUGGAAGGCAGAAACGACAUGGCC CUGAAGCUCGUGGGCGGGAGCCAUCUGAUCGCAAACAUCAAGACCA CAUAUAGAUCCAAGAAACCCGCUAAGAACCUCAAGAUGCCUGGCGU CUACUAUGUGGACUACAGACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCCAACAAC GAGACCUACGUCGAGCAGCACGAGGUGGCAGUGGCCAGAUACUGC GACCUCCCUAGCAAACUGGGGCACAGAUCUCAUAUGCAUCUCGAGU GAUAGUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUU CUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUG AGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	５２
hsa-miR-499a-5p	GGUUCCUUAAUCGCGGAUCCAAACAUCACUGCAAGUCUUAAAGAUC AACACCGGUCGCCACCAUGGGAUCCAGCGAGCUGAUUAAGGAGAAC AUGCACAUGAAGCUGUACAUGGAGGGCACCGUGGACAACCAUCACU UCAAGUGCACAUCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCUACGAGGGCACCCA GACCAUGAGAAUCAAGGUGGUCGAGGGCGGCCCUCUCCCCUUCGCC UUCGACAUCCUGGCUACUAGCUUCCUCUACGGCAGCAAGACCUUCA UCAACCACACCCAGGGCAUCCCCGACUUCUUCAAGCAGUCCUUCCC UGAGGGCUUCACAUGGGAGAGAGUCACCACAUACGAAGACGGGGG CGUGCUGACCGCUACCCAGGACACCAGCCUCCAGGACGGCUGCCUC AUCUACAACGUCAAGAUCAGAGGGGUGAACUUCACAUCCAACGGCC CUGUGAUGCAGAAGAAAACACUCGGCUGGGAGGCCUUCACCGAGAC GCUGUACCCCGCUGACGGCGGCCUGGAAGGCAGAAACGACAUGGCC CUGAAGCUCGUGGGCGGGAGCCAUCUGAUCGCAAACAUCAAGACCA CAUAUAGAUCCAAGAAACCCGCUAAGAACCUCAAGAUGCCUGGCGU CUACUAUGUGGACUACAGACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCCAACAAC GAGACCUACGUCGAGCAGCACGAGGUGGCAGUGGCCAGAUACUGC GACCUCCCUAGCAAACUGGGGCACAGAUCUCAUAUGCAUCUCGAGU GAUAGUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUU CUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUG AGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	５３

【表５－６】

心筋細胞で特異的に発現しているmiRNA	miRNA応答性mRNAの全長	配列番号
hsa-miR-1271-5p	GGUUCCUUAAUCGCGGAUCCUGAGUGCUUGCUAGGUGCCAAGAGA UCACACCGGUCGCCACCAUGGGAUCCAGCGAGCUGAUUAAGGAGAA CAUGCACAUGAAGCUGUACAUGGAGGGCACCGUGGACAACCAUCAC UUCAAGUGCACAUCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCUACGAGGGCACCC AGACCAUGAGAAUCAAGGUGGUCGAGGGCGGCCCUCUCCCCUUCGC CUUCGACAUCCUGGCUACUAGCUUCCUCUACGGCAGCAAGACCUUC AUCAACCACACCCAGGGCAUCCCCGACUUCUUCAAGCAGUCCUUCC CUGAGGGCUUCACAUGGGAGAGAGUCACCACAUACGAAGACGGGG GCGUGCUGACCGCUACCCAGGACACCAGCCUCCAGGACGGCUGCCU CAUCUACAACGUCAAGAUCAGAGGGGUGAACUUCACAUCCAACGGC CCUGUGAUGCAGAAGAAAACACUCGGCUGGGAGGCCUUCACCGAGA CGCUGUACCCCGCUGACGGCGGCCUGGAAGGCAGAAACGACAUGGC CCUGAAGCUCGUGGGCGGGAGCCAUCUGAUCGCAAACAUCAAGACC ACAUAUAGAUCCAAGAAACCCGCUAAGAACCUCAAGAUGCCUGGCG UCUACUAUGUGGACUACAGACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCCAACAA CGAGACCUACGUCGAGCAGCACGAGGUGGCAGUGGCCAGAUACUGC GACCUCCCUAGCAAACUGGGGCACAGAUCUCAUAUGCAUCUCGAGU GAUAGUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUU CUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUG AGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	５４
hsa-miR-3907	GGUUCCUUAAUCGCGGAUCCUGUGAGCCAGCCUGGAGCACCUAGA UCACACCGGUCGCCACCAUGGGAUCCAGCGAGCUGAUUAAGGAGAA CAUGCACAUGAAGCUGUACAUGGAGGGCACCGUGGACAACCAUCAC UUCAAGUGCACAUCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCUACGAGGGCACCC AGACCAUGAGAAUCAAGGUGGUCGAGGGCGGCCCUCUCCCCUUCGC CUUCGACAUCCUGGCUACUAGCUUCCUCUACGGCAGCAAGACCUUC AUCAACCACACCCAGGGCAUCCCCGACUUCUUCAAGCAGUCCUUCC CUGAGGGCUUCACAUGGGAGAGAGUCACCACAUACGAAGACGGGG GCGUGCUGACCGCUACCCAGGACACCAGCCUCCAGGACGGCUGCCU CAUCUACAACGUCAAGAUCAGAGGGGUGAACUUCACAUCCAACGGC CCUGUGAUGCAGAAGAAAACACUCGGCUGGGAGGCCUUCACCGAGA CGCUGUACCCCGCUGACGGCGGCCUGGAAGGCAGAAACGACAUGGC CCUGAAGCUCGUGGGCGGGAGCCAUCUGAUCGCAAACAUCAAGACC ACAUAUAGAUCCAAGAAACCCGCUAAGAACCUCAAGAUGCCUGGCG UCUACUAUGUGGACUACAGACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCCAACAA CGAGACCUACGUCGAGCAGCACGAGGUGGCAGUGGCCAGAUACUGC GACCUCCCUAGCAAACUGGGGCACAGAUCUCAUAUGCAUCUCGAGU GAUAGUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUU CUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUG AGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	５５

【表５－７】

心筋細胞で特異的に発現しているmiRNA	miRNA応答性mRNAの全長	配列番号
hsa-miR-4324	GGUUCCUUAAUCGCGGAUCCUUAAGGUUAGGGUCUCAGGGAGAUC AAACACCGGUCGCCACCAUGGGAUCCAGCGAGCUGAUUAAGGAGAA CAUGCACAUGAAGCUGUACAUGGAGGGCACCGUGGACAACCAUCAC UUCAAGUGCACAUCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCUACGAGGGCACCC AGACCAUGAGAAUCAAGGUGGUCGAGGGCGGCCCUCUCCCCUUCGC CUUCGACAUCCUGGCUACUAGCUUCCUCUACGGCAGCAAGACCUUC AUCAACCACACCCAGGGCAUCCCCGACUUCUUCAAGCAGUCCUUCC CUGAGGGCUUCACAUGGGAGAGAGUCACCACAUACGAAGACGGGG GCGUGCUGACCGCUACCCAGGACACCAGCCUCCAGGACGGCUGCCU CAUCUACAACGUCAAGAUCAGAGGGGUGAACUUCACAUCCAACGGC CCUGUGAUGCAGAAGAAAACACUCGGCUGGGAGGCCUUCACCGAGA CGCUGUACCCCGCUGACGGCGGCCUGGAAGGCAGAAACGACAUGGC CCUGAAGCUCGUGGGCGGGAGCCAUCUGAUCGCAAACAUCAAGACC ACAUAUAGAUCCAAGAAACCCGCUAAGAACCUCAAGAUGCCUGGCG UCUACUAUGUGGACUACAGACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCCAACAA CGAGACCUACGUCGAGCAGCACGAGGUGGCAGUGGCCAGAUACUGC GACCUCCCUAGCAAACUGGGGCACAGAUCUCAUAUGCAUCUCGAGU GAUAGUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUU CUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUG AGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	５６
hsa-let-7e-5p	GGUUCCUUAAUCGCGGAUCCAACUAUACAACCUCCUACCUCAAGAU CACACCGGUCGCCACCAUGGGAUCCAGCGAGCUGAUUAAGGAGAAC AUGCACAUGAAGCUGUACAUGGAGGGCACCGUGGACAACCAUCACU UCAAGUGCACAUCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCUACGAGGGCACCCA GACCAUGAGAAUCAAGGUGGUCGAGGGCGGCCCUCUCCCCUUCGCC UUCGACAUCCUGGCUACUAGCUUCCUCUACGGCAGCAAGACCUUCA UCAACCACACCCAGGGCAUCCCCGACUUCUUCAAGCAGUCCUUCCC UGAGGGCUUCACAUGGGAGAGAGUCACCACAUACGAAGACGGGGG CGUGCUGACCGCUACCCAGGACACCAGCCUCCAGGACGGCUGCCUC AUCUACAACGUCAAGAUCAGAGGGGUGAACUUCACAUCCAACGGCC CUGUGAUGCAGAAGAAAACACUCGGCUGGGAGGCCUUCACCGAGAC GCUGUACCCCGCUGACGGCGGCCUGGAAGGCAGAAACGACAUGGCC CUGAAGCUCGUGGGCGGGAGCCAUCUGAUCGCAAACAUCAAGACCA CAUAUAGAUCCAAGAAACCCGCUAAGAACCUCAAGAUGCCUGGCGU CUACUAUGUGGACUACAGACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCCAACAAC GAGACCUACGUCGAGCAGCACGAGGUGGCAGUGGCCAGAUACUGC GACCUCCCUAGCAAACUGGGGCACAGAUCUCAUAUGCAUCUCGAGU GAUAGUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUU CUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUG AGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	５７

【表５－８】

心筋細胞で特異的に発現しているmiRNA	miRNA応答性mRNAの全長	配列番号
hsa-miR-208b	GGUUCCUUAAUCGCGGAUCCACAAACCUUUUGUUCGUCUUAUAGAU CACACCGGUCGCCACCAUGGGAUCCAGCGAGCUGAUUAAGGAGAAC AUGCACAUGAAGCUGUACAUGGAGGGCACCGUGGACAACCAUCACU UCAAGUGCACAUCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCUACGAGGGCACCCA GACCAUGAGAAUCAAGGUGGUCGAGGGCGGCCCUCUCCCCUUCGCC UUCGACAUCCUGGCUACUAGCUUCCUCUACGGCAGCAAGACCUUCA UCAACCACACCCAGGGCAUCCCCGACUUCUUCAAGCAGUCCUUCCC UGAGGGCUUCACAUGGGAGAGAGUCACCACAUACGAAGACGGGGG CGUGCUGACCGCUACCCAGGACACCAGCCUCCAGGACGGCUGCCUC AUCUACAACGUCAAGAUCAGAGGGGUGAACUUCACAUCCAACGGCC CUGUGAUGCAGAAGAAAACACUCGGCUGGGAGGCCUUCACCGAGAC GCUGUACCCCGCUGACGGCGGCCUGGAAGGCAGAAACGACAUGGCC CUGAAGCUCGUGGGCGGGAGCCAUCUGAUCGCAAACAUCAAGACCA CAUAUAGAUCCAAGAAACCCGCUAAGAACCUCAAGAUGCCUGGCGU CUACUAUGUGGACUACAGACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCCAACAAC GAGACCUACGUCGAGCAGCACGAGGUGGCAGUGGCCAGAUACUGC GACCUCCCUAGCAAACUGGGGCACAGAUCUCAUAUGCAUCUCGAGU GAUAGUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUU CUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUG AGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	６８

【００８４】

本発明において、マーカー遺伝子として自殺遺伝子（例えば、Bim）が用いられる場合、本発明におけるmiRNA応答性mRNAは、例えば、下記の配列が採用され得る。

【００８５】

表６．mRNA_miR-1-HsBimEL

【表６】

miRNA応答性mRNA	配列	配列番号
mRNA_miR-1-HsBimEL	GGUUCCUUAAUCGCGGAUCCAUACAUACUUCUUUACAUUCCAAGAUCACACCGGUCGCCACCAUGGCAAAGCAACCUUCUGAUGUAAGUUCUGAGUGUGACCGAGAAGGUAGACAAUUGCAGCCUGCGGAGAGGCCUCCCCAGCUCAGACCUGGGGCCCCUACCUCCCUACAGACAGAGCCACAAGGUAAUCCUGAAGGCAAUCACGGAGGUGAAGGGGACAGCUGCCCCCACGGCAGCCCUCAGGGCCCGCUGGCCCCACCUGCCAGCCCUGGCCCUUUUGCUACCAGAUCCCCGCUUUUCAUCUUUAUGAGAAGAUCCUCCCUGCUGUCUCGAUCCUCCAGUGGGUAUUUCUCUUUUGACACAGACAGGAGCCCAGCACCCAUGAGUUGUGACAAAUCAACACAAACCCCAAGUCCUCCUUGCCAGGCCUUCAACCACUAUCUCAGUGCAAUGGCUUCCAUGAGGCAGGCUGAACCUGCAGAUAUGCGCCCAGAGAUAUGGAUCGCCCAAGAGUUGCGGCGUAUCGGAGACGAGUUUAACGCUUACUAUGCAAGGAGGGUAUUUUUGAAUAAUUACCAAGCAGCCGAAGACCACCCACGAAUGGUUAUCUUACGACUGUUACGUUACAUUGUCCGCCUGGUGUGGAGAAUGCAUUGAUUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUUCUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	５８

【００８６】

miRNA応答性mRNAは、上記に従って配列が決定されれば、遺伝子工学的に既知の任意の方法により当業者が合成することができる。特には、プロモーター配列を含むテンプレートDNAを鋳型として用いたin vitro合成法により、得ることができる。

【００８７】

なお、本実施態様による選別方法を実施する前に、その選別における有効性を検討するスクリーニング工程を実施してもよい。具体的には、上記に例示したような５'UTRを有する、候補となる複数種のmiRNA応答性mRNAを作製して、それぞれを純度が既知の心筋細胞群に導入し、選別の有効性が高いmiRNAの標的配列並びにmiRNA応答性mRNAを決定することができる。このような工程は、実施例３においても詳述している。

【００８８】

miRNA応答性mRNAは、１種のみ用いる場合もあり、２種以上、例えば、３種、４種、５種、６種、７種、または８種以上用いる場合もある。例えば、２種以上のmiRNA応答性mRNAを用いる場合、それぞれのmiRNA応答性mRNAは、miRNA標的配列、マーカー遺伝子ともに、異なることが望ましい。また、２種以上のmiRNA応答性mRNAを用いる場合、miRNA応答性mRNAに含まれるmiRNA標的配列の数、miRNA標的配列の５'末端からの距離、並びにmiRNA応答性mRNAにおけるその他の構造的特徴は、各miRNA応答性mRNAにおいて同一であっても良く、異なっていても良い。あるいは、miRNA標的配列は同一であるが、マーカー遺伝子は異なるmiRNA応答性mRNAを用いることも可能である。例えば、異なる経路でシグナル伝達するアポトーシス誘導遺伝子、例えば、FasとBimなどを同一のmiRNA標的配列と組み合わせたmiRNA応答性mRNAを用いることも可能であり、この場合には、目的としない細胞（心筋細胞以外の細胞）の除去を効率よく行うことが期待できる。

【００８９】

本発明において、複数のmiRNA応答性mRNAを用いる場合、例えば、上記表５において例示したようなBFPをマーカー遺伝子として含むmRNAと下記表７において例示したようなKeima-Redをマーカー遺伝子として含むmRNAを組み合わせて使用することができる。

【００９０】

表７．mRNA_miR-208a-3p_hdKeima-RedおよびmRNA_miR-499a-5p_hdKeima-Red

【表７】

miRNA 応答性 mRNA	配列	配列番号
mRNA_miR-208a-3p_hdKeima-Red	GGUUCCUUAAUCGCGGAUCCACAAGCUUUUUGCUCGUCUUAUAGA UCACACCGGUCGCCACCAUGGUGAGCGUGAUCGCCAAGCAGAUGAC CUACAAGGUGUACAUGUCCGGCACCGUGAACGGCCACUACUUCGAG GUGGAGGGCGACGGCAAGGGCAAGCCCUACGAGGGCGAGCAGACC GUGAAGCUGACCGUGACCAAGGGCGGCCCCCUGCCCUUCGCCUGG GACAUCCUGUCCCCCCUGUUCCAGUACGGCAGCAUCCCCUUCACCA AGUACCCCGAGGACAUCCCCGACUACGUGAAGCAGAGCUUCCCCGA GGGCUACACCUGGGAGAGGACCAUGAACUUCGAGGACGGCGCCGU GUGCACCGUGAGCAACGACUCCAGCAUCCAGGGCAACUGCUUCAUC UACAACGUGAAGAUCAGCGGCACCAACUUCCCCCCCAACGGCCCCG UGAUGCAGAAGAAGACCCAGGGCUGGGAGCCCAGCACCGAGAGGCU GUUCGCCAGGGACGGAAUGCUGAUCGGCAACGACUACAUGGCCCUG AAGCUGGAGGGCGGCGGCCACUACCUGUGCGAGUUCAAGUCCACCU ACAAGGCCAAGAAGCCCGUGAGGAUGCCCGGCUACCACUACAUCGA CAGGAAGCUGGACGUGACCAGCCACAACAGGGACUACACCUCCGUG GAGCAGUGCGAGAUCGCCAUCGCCAGGCACAGCCUGCUGGGCGGCA GCAGCGGCGGAUCCGGUGAUGAAGUCGAAGGAGUGGAAGAAGUAG CUAAGAAGAAGAGUAAAAAGGAAAAGGAUAAAAAGUAAUAGUCUAG ACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUUCUUCUCUCCC UUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	５９
mRNA_miR-499a-5p_hdKeima-Red	GGUUCCUUAAUCGCGGAUCCAAACAUCACUGCAAGUCUUAAAGAUC AACACCGGUCGCCACCAUGGUGAGCGUGAUCGCCAAGCAGAUGACC UACAAGGUGUACAUGUCCGGCACCGUGAACGGCCACUACUUCGAGG UGGAGGGCGACGGCAAGGGCAAGCCCUACGAGGGCGAGCAGACCG UGAAGCUGACCGUGACCAAGGGCGGCCCCCUGCCCUUCGCCUGGGA CAUCCUGUCCCCCCUGUUCCAGUACGGCAGCAUCCCCUUCACCAAG UACCCCGAGGACAUCCCCGACUACGUGAAGCAGAGCUUCCCCGAGG GCUACACCUGGGAGAGGACCAUGAACUUCGAGGACGGCGCCGUGU GCACCGUGAGCAACGACUCCAGCAUCCAGGGCAACUGCUUCAUCUA CAACGUGAAGAUCAGCGGCACCAACUUCCCCCCCAACGGCCCCGUG AUGCAGAAGAAGACCCAGGGCUGGGAGCCCAGCACCGAGAGGCUGU UCGCCAGGGACGGAAUGCUGAUCGGCAACGACUACAUGGCCCUGAA GCUGGAGGGCGGCGGCCACUACCUGUGCGAGUUCAAGUCCACCUAC AAGGCCAAGAAGCCCGUGAGGAUGCCCGGCUACCACUACAUCGACA GGAAGCUGGACGUGACCAGCCACAACAGGGACUACACCUCCGUGGA GCAGUGCGAGAUCGCCAUCGCCAGGCACAGCCUGCUGGGCGGCAGC AGCGGCGGAUCCGGUGAUGAAGUCGAAGGAGUGGAAGAAGUAGCU AAGAAGAAGAGUAAAAAGGAAAAGGAUAAAAAGUAAUAGUCUAGAC CUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUUCUUCUCUCCCUU GCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAA	６０

【００９１】

本発明において、miRNA応答性mRNAを細胞群に導入する工程は、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、１種以上のmiRNA応答性mRNAを直接、細胞群に含まれる細胞に導入する。異なる２種以上のmiRNA応答性mRNAを導入する場合、あるいはmiRNA応答性mRNAと、後述するコントロールとなるmRNA（以下、コントロールmRNAとも指称する）とを用いる場合には、複数のmRNAを細胞群に共導入することが好ましい。共導入した２種以上のmRNAの細胞内での割合は個々の細胞で維持されるため、これらのmRNAから発現するタンパク質の活性比は、細胞集団内において一定となるためである。この時の導入量は、導入される細胞群、導入するmRNA、導入方法および導入試薬の種類により異なり、所望の翻訳量を得るために当業者は適宜これらを選択することができる。

【００９２】

本発明において、コントロールmRNAとは、マーカー遺伝子のコード領域に対応する核酸を含む配列または薬剤耐性遺伝子のコード領域に対応する核酸を含む配列からなるmRNAであって、miRNAの標的部位を有さないmRNAが例示される。コントロールmRNAは、好ましい態様においては、miRNA応答性mRNAとともに細胞群に導入されて、miRNA応答性mRNAが導入された細胞を確認し、識別するためのコントロールとして機能し得る。また、miRNA応答性mRNAからの蛍光や発光などの信号強度の定量化の際のコントロールとして機能し得る。コントロールmRNAの導入量もまた、所望の翻訳量を得るために当業者は適宜これらを選択することができる。

【００９３】

本発明において使用される「薬剤耐性遺伝子」は、対応する薬剤に対して抵抗性を有するタンパク質を発現する遺伝子であれば何でもよい。例えば、抗生物質耐性遺伝子を含むが、これらに限定されない。抗生物質耐性遺伝子としては、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、ブラストサイジン耐性遺伝子、ゲンタマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子等が挙げられる。本発明において、好ましくは、ピューロマイシン耐性遺伝子またはブラストサイジン耐性遺伝子が抗生物質耐性遺伝子として用いられる。

【００９４】

本発明の一実施態様による選別方法において、より好ましくは、miRNA応答性mRNAとコントロールmRNAを同時に、心筋細胞を含む細胞群へ導入する工程を含む。かかる工程は、好ましくは、miRNA応答性mRNAとコントロールmRNAとの共導入により実施することができる。コントロールmRNAを用いることで、miRNA応答性mRNAの細胞への導入効率が低い場合においても、miRNA応答性mRNAから翻訳されるマーカータンパク質が低いまたは翻訳されない細胞を心筋細胞として選別することが可能となる。

【００９５】

本発明において、コントロールmRNAを用いる場合、当該コントロールmRNAに含まれるマーカー遺伝子は、miRNA応答性mRNAに含まれるマーカー遺伝子と異なることが好ましい。例えば、miRNA応答性mRNAに含まれるマーカー遺伝子がアポトーシス誘導遺伝子または自殺遺伝子である場合、コントロールmRNAに含まれるマーカー遺伝子は、蛍光タンパク質をコードする遺伝子であり得る。この場合、蛍光が確認される細胞を、例えばFACSを用いてソートすることにより、選択的に分離した後、アポトーシス誘導遺伝子または自殺遺伝子の発現が抑制された細胞を心筋細胞として選別することにより、選別の精度向上を図ることができる。

また、薬剤耐性遺伝子のコード領域に対応する核酸を含む配列からなるコントロールmRNAは、任意のマーカー遺伝子のコード領域に対応する核酸を含む配列からなるmiRNA応答性mRNAとともに用いることができる。この場合、マーカー遺伝子の種類に関わらず、miRNA応答性mRNAが導入された細胞が選択的に薬剤耐性を有することになり、選別の精度向上を図ることができる。

一方、miRNA応答性mRNAに含まれるマーカー遺伝子およびコントロールmRNAに含まれるマーカー遺伝子は、その両者に同種の遺伝子が用いられることもあり得る。例えば、miRNA応答性mRNAに含まれるマーカー遺伝子とコントロールmRNAに含まれるマーカー遺伝子の両者に蛍光タンパク質をコードする遺伝子が用いられることがあり得て、この場合には、両蛍光タンパク質の蛍光波長が異なることが望ましい。

なお、蛍光タンパク質をコードする遺伝子に替えて、発光タンパク質あるいは、蛍光、発光又は呈色を補助するタンパク質をコードする遺伝子を同様の組み合わせで用いることも可能である。

【００９６】

本発明におけるコントロールmRNAは、別段限定されることはないが、例えば、下記に示すmRNAなどが使用され得る。

【００９７】

表８．コントロールmRNA

【表８－１】

コントロール mRNA	配列	配列番号
mRNA_tagBFP	GGGCGAAUUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGACAC CGGUCGCCACCAUGGGAUCCAGCGAGCUGAUUAAGGAGAACAUGCA CAUGAAGCUGUACAUGGAGGGCACCGUGGACAACCAUCACUUCAAG UGCACAUCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCUACGAGGGCACCCAGACCA UGAGAAUCAAGGUGGUCGAGGGCGGCCCUCUCCCCUUCGCCUUCG ACAUCCUGGCUACUAGCUUCCUCUACGGCAGCAAGACCUUCAUCAA CCACACCCAGGGCAUCCCCGACUUCUUCAAGCAGUCCUUCCCUGAG GGCUUCACAUGGGAGAGAGUCACCACAUACGAAGACGGGGGCGUG CUGACCGCUACCCAGGACACCAGCCUCCAGGACGGCUGCCUCAUCU ACAACGUCAAGAUCAGAGGGGUGAACUUCACAUCCAACGGCCCUGU GAUGCAGAAGAAAACACUCGGCUGGGAGGCCUUCACCGAGACGCUG UACCCCGCUGACGGCGGCCUGGAAGGCAGAAACGACAUGGCCCUGA AGCUCGUGGGCGGGAGCCAUCUGAUCGCAAACAUCAAGACCACAUA UAGAUCCAAGAAACCCGCUAAGAACCUCAAGAUGCCUGGCGUCUAC UAUGUGGACUACAGACUGGAAAGAAUCAAGGAGGCCAACAACGAGA CCUACGUCGAGCAGCACGAGGUGGCAGUGGCCAGAUACUGCGACCU CCCUAGCAAACUGGGGCACAGAUCUCAUAUGCAUCUCGAGUGAUAG UCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUUCUUCU CUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUGAGUAG GAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	６１
mRNA_EGFP	GGGCGAAUUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGACAC CGGUCGCCACCAUGGGAUCCGUGAGCAAGGGCGAGGAGCUGUUCA CCGGGGUGGUGCCCAUCCUGGUCGAGCUGGACGGCGACGUAAACG GCCACAAGUUCAGCGUGUCCGGCGAGGGCGAGGGCGAUGCCACCU ACGGCAAGCUGACCCUGAAGUUCAUCUGCACCACCGGCAAGCUGCC CGUGCCCUGGCCCACCCUCGUGACCACCCUGACCUACGGCGUGCAG UGCUUCAGCCGCUACCCCGACCACAUGAAGCAGCACGACUUCUUCA AGUCCGCCAUGCCCGAAGGCUACGUCCAGGAGCGCACCAUCUUCUU CAAGGACGACGGCAACUACAAGACCCGCGCCGAGGUGAAGUUCGAG GGCGACACCCUGGUGAACCGCAUCGAGCUGAAGGGCAUCGACUUCA AGGAGGACGGCAACAUCCUGGGGCACAAGCUGGAGUACAACUACAA CAGCCACAACGUCUAUAUCAUGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCAUC AAGGUGAACUUCAAGAUCCGCCACAACAUCGAGGACGGCAGCGUGC AGCUCGCCGACCACUACCAGCAGAACACCCCCAUCGGCGACGGCCC CGUGCUGCUGCCCGACAACCACUACCUGAGCACCCAGUCCGCCCUG AGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGAUCACAUGGUCCUGCUGGAGU UCGUGACCGCCGCCGGGAUCACUCUCGGCAUGGACGAGCUGUACAA GAGAUCUCAUAUGCAUCUCGAGUGAUAGUCUAGACCUUCUGCGGG GCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUUCUUCUCUCCCUUGCACCUGUACC UCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAA	６２

【表８－２】

コントロール mRNA	配列	配列番号
mRNA_Blastcidin	GGGCGAAUUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGACAC CGGUCGCCACCAUGGCCAAGCCUUUGUCUCAAGAAGAAUCCACCCU CAUUGAAAGAGCAACGGCUACAAUCAACAGCAUCCCCAUCUCUGAA GACUACAGCGUCGCCAGCGCAGCUCUCUCUAGCGACGGCCGCAUCU UCACUGGUGUCAAUGUAUAUCAUUUUACUGGGGGACCUUGUGCAG AACUCGUGGUGCUGGGCACUGCUGCUGCUGCGGCAGCUGGCAACC UGACUUGUAUCGUCGCGAUCGGAAAUGAGAACAGGGGCAUCUUGA GCCCCUGCGGACGGUGCCGACAGGUGCUUCUCGAUCUGCAUCCUG GGAUCAAAGCCAUAGUGAAGGACAGUGAUGGACAGCCGACGGCAGU UGGGAUUCGUGAAUUGCUGCCCUCUGGUUAUGUGUGGGAGGGCUA AUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUCUGGCCAUGCCCUUCUUC UCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCUUUGAAUAAAGCCUGAGUA GGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	６３
mRNA_Puromycin	GGGCGAAUUAAGAGAGAAAAGAAGAGUAAGAAGAAAUAUAAGACAC CGGUCGCCACCAUGACCGAGUACAAGCCCACGGUGCGCCUCGCCAC CCGCGACGACGUCCCCCGGGCCGUACGCACCCUCGCCGCCGCGUUC GCCGACUACCCCGCCACGCGCCACACCGUCGAUCCGGACCGCCACA UCGAGCGGGUCACCGAGCUGCAAGAACUCUUCCUCACGCGCGUCGG GCUCGACAUCGGCAAGGUGUGGGUCGCGGACGACGGCGCCGCGGU GGCGGUCUGGACCACGCCGGAGAGCGUCGAAGCGGGGGCGGUGUU CGCCGAGAUCGGCCCGCGCAUGGCCGAGUUGAGCGGUUCCCGGCU GGCCGCGCAGCAACAGAUGGAAGGCCUCCUGGCGCCGCACCGGCCC AAGGAGCCCGCGUGGUUCCUGGCCACCGUCGGCGUCUCGCCCGACC ACCAGGGCAAGGGUCUGGGCAGCGCCGUCGUGCUCCCCGGAGUGG AGGCGGCCGAGCGCGCCGGGGUGCCCGCCUUCCUGGAGACCUCCG CGCCCCGCAACCUCCCCUUCUACGAGCGGCUCGGCUUCACCGUCAC CGCCGACGUCGAGGUGCCCGAAGGACCGCGCACCUGGUGCAUGACC CGCAAGCCCGGUGCCUGAUCUAGACCUUCUGCGGGGCUUGCCUUC UGGCCAUGCCCUUCUUCUCUCCCUUGCACCUGUACCUCUUGGUCU UUGAAUAAAGCCUGAGUAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	６４

【００９８】

本発明の一実施態様による選別方法によれば、miRNA応答性mRNAと、任意選択的にコントロールmRNAとを、細胞群に導入する工程を実施することで、心筋細胞を含有しうる細胞群から心筋細胞を選別可能な状態にすることができる。すなわち、心筋細胞を含有しうる２種以上の細胞を含む細胞群の中から、所望の、心筋細胞について、他の細胞種と異なる検出可能な信号情報を提示した状態とすることができる。後述する製造方法によって、選別工程をさらに実施することで、心筋細胞を選択的に分離することができるようになる。

【００９９】

［心筋細胞の製造方法（１）］

本発明の一つの態様として、FACSによる選別を用いた方法を提供する。すなわち、本発明は、心筋細胞の製造方法であって、下記：

(a) miRNA応答性mRNAを細胞群に導入する工程、および

(b) 工程(a)のmiRNA応答性mRNAから翻訳されたタンパク質の量に基づいて当該心筋細胞を選別する工程を含み、

ここで、当該miRNA応答性mRNAが下記：

(i) 心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAによって特異的に認識される核酸、および

(ii) 遺伝子のコード領域に対応する核酸

を含む配列からなり、

上記工程(a)および(b)を行わない場合と比較して、高純度の心筋細胞を回収できる、方法を提供する。なお、当該miRNA応答性mRNAに含有される(ii)の遺伝子の翻訳量がより少ない細胞を選択することによって心筋細胞を回収できる。

【０１００】

本発明において、工程(a)は、上記心筋細胞の選別方法において説明した、導入工程と同様に実施することができる。したがって、miRNA応答性mRNAの構成における、(i)のmiRNAの標的配列等についても、上記と同様である。本工程においては、好ましくは、蛍光タンパク質をコードする遺伝子をマーカー遺伝子とするコントロールmRNAを、miRNA応答性mRNAと共導入するか、あるいは、蛍光波長の異なる蛍光タンパク質をコードする遺伝子をマーカー遺伝子とする２種類以上のmiRNA応答性mRNAを共導入する。これにより、miRNA応答性mRNAから翻訳されたタンパク質の量をより正確に得ることができる。

【０１０１】

本発明において使用される前記(ii)の「遺伝子」は、上記と同様のマーカー遺伝子であってよい。好ましくは、蛍光タンパク質をコードする遺伝子が用いられる。蛍光タンパク質についても上記したとおりであるが、好ましくは、BFPをコードする遺伝子が蛍光タンパク質をコードする遺伝子として用いられる。

【０１０２】

本発明において使用される工程(a)の細胞群は、任意の細胞群であってよく、例えば、多能性幹細胞から分化誘導させた細胞群であってもよく、生体内から取り出した細胞の集団であってもよい。本発明において、好ましくは、多能性幹細胞から心筋細胞へ分化誘導させる工程を経た細胞群である。多能性幹細胞から分化誘導させる工程を経た細胞群へmiRNA応答性mRNAを導入する時期としては、細胞の選別を行いたい時期であれば別段限定されない。上記心筋分化誘導法の項において詳述した方法を用いて分化誘導させる工程を行った場合、好ましくは、胚様体から起算して10～25日目であり、より好ましくは、18日目である。

【０１０３】

工程(b)において、miRNA応答性mRNAから翻訳されるマーカータンパク質の翻訳量を指標として、心筋細胞を選別することができる。すなわち、miRNA応答性mRNAから翻訳されるマーカータンパク質の翻訳量が少ないまたは検出できない細胞を選別する工程とすることができる。このような指標となるmiRNAの発現量が少ない細胞は、心筋細胞以外の細胞とマーカータンパク質の翻訳量の比較することにより決定することができる。

【０１０４】

具体的には、選別工程は、所定の検出装置を用いて、マーカー遺伝子からの翻訳物であるマーカータンパク質からの信号を検出することにより実施することができる。検出装置としては、フローサイトメーター、イメージングサイトメーター、蛍光顕微鏡、発光顕微鏡、CCDカメラ等が挙げられるが、これらには限定されない。このような検出装置は、マーカータンパク質により、当業者が適したものを用いることができる。例えば、マーカーが、蛍光タンパク質又は発光タンパク質の場合には、フローサイトメーターを用いて選別が可能であり、マーカーが、蛍光、発光又は呈色を補助するタンパク質の場合には、顕微鏡を用いて、光応答性細胞培養器材をコーティングした培養皿を用いて、呈色等された細胞へ光照射し、照射されなかった細胞が培養皿から剥離されることを利用して選別することができ、マーカータンパク質が、膜局在タンパク質の場合には、抗体などの細胞表面タンパク質特異的な検出試薬と、上記の検出装置を用いたマーカータンパク質の定量方法が可能である他、磁気細胞分離装置(MACS)といった、マーカータンパク質の定量過程を経な

い細胞の単離方法が可能であり、マーカータンパク質が薬剤耐性遺伝子の場合、薬剤投与によりマーカー遺伝子の発現を検出して、生細胞を単離する方法が可能である。

【０１０５】

本発明の製造方法において得られる心筋細胞は、miRNA応答性mRNAを用いて選別する工程を経ていない通常の分化誘導法により得られる純度よりも高い純度で得られる。本発明において、心筋細胞の純度は、miRNA応答性mRNAを用いて選別する工程を経ていない場合と比較して高純度であれば別段限定されないが、60%以上であることが好ましく、60%、70%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%および100%が例示される。この場合の純度とは、心筋細胞で特異的に発現するTNTを指標として求めた値である。具体的には、選別対象となる細胞群に対して、フローサイトメトリーなどの選別装置により検出が可能な物質によって、TNTを標識することにより行うことができる。選別装置により検出が可能な物質は、別段限定されることはないが、例えば、一次抗体および二次抗体の組み合わせが挙げられる。本発明において、TNTを指標とした純度の確認は、選別対象となる細胞群をパラホルムアルデヒドで固定した後、TNTに対する一次抗体を付与し、次いで、選別装置により検出が可能な物質を含む二次抗体を付与することで行われる。好ましくは、TNTに対する一次抗体として、clone 13-11（Thermo）が、二次抗体として、APC goat anti-mouse Ig (BD pharmingen)が用いられる。抗体を付与した後、フローサイトメトリーなどの選別装置に適用することにより、純度を得ることができる。

【０１０６】

［心筋細胞の製造方法（２）］

本発明の別の態様として、FACSによる選別を必要としない方法を提供する。すなわち、本発明は、心筋細胞の製造方法であって、下記：

(a) miRNA応答性mRNAおよび薬剤耐性遺伝子のコード領域に対応する核酸を含む配列からなるmRNAを細胞群に導入する工程、および

(b) 工程(a)の薬剤耐性遺伝子に対応する薬剤の存在下で、工程(a)で得られた細胞群を培養する工程を含み、

ここで、当該miRNA応答性mRNAが下記：

(i) 心筋細胞で特異的に発現しているmiRNAによって特異的に認識される核酸、および

(ii) 遺伝子のコード領域に対応する核酸

を含む配列からなり、

上記工程(a)および(b)を行わない場合と比較して、高純度の心筋細胞を回収できる、方法を提供する。

【０１０７】

本発明において、工程(a)は、上記心筋細胞の選別方法において説明した、導入工程と同様に実施することができる。したがって、miRNA応答性mRNAの構成における、(i)のmiRNAの標的配列等についても、上記と同様とすることができる。

【０１０８】

本実施態様において使用される前記(ii)の「遺伝子」は、上記と同様のマーカー遺伝子であってよく、好ましくは、アポトーシス誘導遺伝子または自殺遺伝子が用いられる。アポトーシス誘導遺伝子および自殺遺伝子についても上記したとおりであるが、好ましくは、アポトーシス誘導遺伝子としてはBim、自殺遺伝子としてHSV-TKが用いられる。

【０１０９】

本発明において使用される「薬剤耐性遺伝子」は、上記と同様であり、好ましくは、ピューロマイシン耐性遺伝子またはブラストサイジン耐性遺伝子が用いられる。薬剤耐性遺伝子のコード領域に対応する核酸を含む配列からなるmRNAは、miRNAの標的配列を有さない、コントロールmRNAである。工程(a)において、miRNA応答性mRNAおよび薬剤耐性遺伝子のコード領域に対応する核酸を含む配列からなるmRNAは、好ましくは、細胞群に共導入される。

【０１１０】

本実施態様において使用される工程(a)の細胞群は、心筋細胞の製造方法（１）における工程(a)の細胞群と同様であって良い。

【０１１１】

本発明において使用される工程(a)の薬剤耐性遺伝子およびそれに対応する工程(b)の薬剤の濃度は、薬剤耐性遺伝子を有していない細胞が対応する薬剤の存在下で培養した場合に生存できない濃度であれば任意の濃度が採用され得る。例えば、薬剤耐性遺伝子がピューロマイシン耐性遺伝子である場合、共導入されるコントロールmRNAの濃度は、1～40ng/mlが好ましく、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/mlおよび40ng/mlが例示される。より好ましくは、4ng/mlである。またこの場合において、培地に添加されるピューロマイシンの濃度は、1～40μg/mlが好ましく、1μg/ml、2μg/ml、3μg/ml、4μg/ml、5μg/ml、6μg/ml、7μg/ml、8μg/ml、9μg/ml、10μg/ml、11μg/ml、12μg/ml、13μg/ml、14μg/ml、15μg/ml、16μg/ml、17μg/ml、18μg/ml、19μg/ml、20μg/ml、30μg/ml lおよび40μg/mlが例示される。より好ましくは、4μg/mlである。

【０１１２】

［心筋細胞純化用キット］

本発明の別の態様として、心筋細胞を高純度で選別し、あるいは製造するためのキットを提供する。本発明における心筋細胞純化用キットは、miRNA応答性mRNAを含むキットであり得る。本発明のキットに包含されるmiRNA応答性mRNAは特に限定されないが、好ましくは、miRNA応答性オフスイッチmRNAが用いられる。具体的なmiRNA応答性mRNAの構成については、上記心筋細胞の選別方法、心筋細胞の製造方法に記載したとおりである。本発明のキットは、これらの方法において説明したmiRNA応答性mRNA、ならびに複数のmiRNA応答性mRNAの全ての組み合わせを含み得る。

【０１１３】

本発明のキットはさらに、コントロールmRNAを含んでもよい。コントロールmRNAを含む場合に、好ましいmiRNA応答性mRNAとコントロールmRNAとの組み合わせは、上記心筋細胞の選別方法において説明したとおりである。本発明のキットは、記心筋細胞の選別方法、心筋細胞の製造方法に記載した、miRNA応答性mRNA、ならびに複数のmiRNA応答性mRNAと、コントロールmRNAの全ての組み合わせを含み得る。特に、心筋細胞の製造方法（２）を実施するためのキットにおいては、薬剤耐性遺伝子のコード領域に対応する核酸を含む配列からなるコントロールmRNAを含んでなる。

【０１１４】

本発明におけるキットは、miRNA応答性mRNAと共に、当該mRNAを導入するための試薬を含んでいてもよい。その他、心筋細胞純化のために必要な試薬や、本発明の選別方法あるいは製造方法を実施するための説明書などを適宜含むことができる。

【０１１５】

本発明におけるキットの使用対象となる細胞群は、上記心筋細胞の選別方法、心筋細胞の製造方法に記載した細胞群と同様であってよく、多能性幹細胞から分化誘導させた細胞であってもよく、生体内から取り出した細胞の集団であってもよい。本発明におけるキットは、複数の細胞が混在した集団の中から心筋細胞を選別するために使用することもできるし、ある細胞集団における心筋細胞の純度を確認するために使用することもできる。キットに含まれるmiRNA応答性mRNA、及び任意選択的にコントロールmRNAの製造方法、及び使用方法については、上記心筋細胞の選別方法、心筋細胞の製造方法に記載したとおりである。

【０１１６】

［心疾患治療剤］

本発明で得られた心筋細胞は、選別工程で得られた心筋細胞をそのままで、あるいは、任意選択的に、通常行われている方法で、選別工程で得られた心筋細胞を含む細胞群から死細胞や混入物を除去する工程を経て、動物（好ましくはヒト）の心疾患の治療剤として

用いることができる。心疾患の治療方法として、例えば、得られた心筋細胞を生理食塩水等に懸濁させ、直接心臓の心筋層へ投与してもよく、あるいは得られた心筋細胞をシート化して、患者の心臓に貼付することによって行われてもよい。前者の場合、細胞単体で投与してもよく、好ましくは、生着を促すような足場材と共に投与され得る。ここで足場材とは、コラーゲンなどの生体由来の成分やこれに代替するポリ乳酸などの合成ポリマーが例示されるが、これらに限定されない。心筋シートを投与する場合、所望の部分を覆うように配置することによって達成される。ここで、所望の部分を覆うように配置することは、当該分野において周知技術を用いて行うことができる。配置に際し、所望の部分が大きい場合は、組織を取り巻くように配置してもよい。また、投与は、所望の効果を得るため、同部分へ数回の配置を行うこともできる。数回の配置を行う場合、所望の細胞が組織へ生着し、血管新生を行うために十分な時間をおいて行うことが望ましい。このような心疾患の治療の機序は、心筋シートの生着により生じる効果であってもよく、あるいは細胞の生着によらない間接的な作用（例えば、誘引物質を分泌することによるレシピエント由来細胞の損傷部位への動員による効果）であってもよい。心疾患の治療において、心筋シートを用いる場合には、心筋細胞に加えて、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン等の細胞足場材料（スキャホールド）を含んでいてもよい。あるいは、心筋細胞の他に、任意の細胞種（複数も可）を含んでいることも可能である。本発明において治療され得る心疾患は、心不全、虚血性心疾患、心筋梗塞、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症、拡張型心筋症などの疾患または障害による欠損等が挙げられるがこれらに限定されない。

【０１１７】

本発明において、心疾患の治療に用いられる心筋細胞の細胞数は、投与される心筋細胞もしくは心筋シートが心疾患の治療において効果を発揮するような量であれば特に限定されるものではなく、患部の大きさや体躯の大きさに合わせて適宜増減して調製されてもよい。

【実施例】

【０１１８】

本発明を以下の実施例により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。

【０１１９】

［実施例１］

<u>多能性幹細胞</u>

201B7株(Takahashi K, et al. Cell. 131: 861-72, 2007)、409B2株、947A2株およびKhES1株として以下の株を用いた。

（１）201B7株は、Takahashi K, et al. Cell. 131: 861-72, 2007に記載の方法で作製された。

（２）409B2株

Okita. K, et al., Stem Cells. 2012 Nov 29.に記載の方法に基づき、ヒト皮膚細胞にエピソーマルベクター（pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL)を電気穿孔法で遺伝子導入し、マイトマイシン処理したマウス胎仔線維芽細胞フィーダー上で培養することにより、iPS細胞株を作製した。培養は、従来の方法で行った(Takahashi K, et al. Cell. 131: 861-72, 2007およびNakagawa M, et al. Nat Biotechnol. 26: 101-6, 2008)。

（３）947A2株

上記409B2株と同様の方法を用いて、ヒト末梢血細胞からiPS細胞株を作製した。培養についても、上記409B2株と同様の方法で行った。

（４）KhES1株

ヒトES細胞は、京都大学再生医科学研究所附属幹細胞医学研究センターによって樹立されたKhES1株を用い、従来の方法で培養した（Suemori H, et al. Biochem Biophys Res Commun. 345:926-32, 2006）。

【０１２０】

心筋細胞誘導法

201B7細胞株、409B2株、947A2株またはKhES1株をCTK solution（ReproCELL）で2分処理後、溶液を除去し、続いてAccumax（Innovative Cell Technologies）で5分処理後、ピペッティングによりシングルセルへと解離した。遠心分離により細胞を回収し、低接着6 wellディッシュ（Corning）へ移し、2mM L-Glutamine、150μg/mL Transferrin、50μg/mL Ascorbic Acid（sigma）、4×10^{-4}M monothioglycerol (MTG)および2ng/mL BMP4（R&D）を添加した1.5 ml/well STEMPRO 34（Invitrogen）中、37℃、5%酸素条件下にて培養して、EBを形成させた（day0）。

【０１２１】

翌日（day1）、1% L-Glutamine、150μg/mL Transferrin、50μg/mL Ascorbic Acid、4×10^{-4}M MTG 、18ng/mL BMP4、10ng/mL bFGFおよび12ng/mL Activin Aを添加したSTEMPRO 34を等量、EBの培養を行っている6 wellプレート中に加え、37℃、5%酸素条件にて３日間培養した。

【０１２２】

続いて（day4）、得られたEBをIMDM（Invitrogen）にて洗浄し、1%L-Glutamine、150μg/mL Transferrin、50μg/mL Ascorbic Acid、4×10^{-4}M MTG 、10ng/mL VEGFおよび1μM IWP-3を添加したSTEMPRO 34をディッシュに加えて、37℃、5%酸素条件下で、４日間培養した。

【０１２３】

続いて（day8）、培地を、1% L-Glutamine、150μg/mL Transferrin、50μg/mL Ascorbic Acid、4×10^{-4}M MTG 、10ng/mL VEGFおよび5ng/mL bFGFを添加したSTEMPRO 34に交換し、4日間、37℃、5%酸素条件下で培養した。この時、2 日に1度同じ条件の培地に交換した。

【０１２４】

続いて（day12）、通常の酸素濃度のインキュベーターに移し、8日間培養した。この時、2 日に1度同じ条件の培地に交換した。

【０１２５】

［実施例２］

心筋細胞特異的miRNA候補物質のスクリーニング

（１）MYH6-EIP4による心筋細胞の選別

最初に、MYH6プロモーターに作動可能に結合したEGFPのカセット（MYH6-EIP4）を導入したiPS細胞株を作製した。MYH6-EIP4導入iPS細胞株の作製は、PiggyBacトランスポゾンシステムを用いて、MYH(myosin heavy chain)-promoterの下流にEGFPカセットを作動可能に連結したベクターを201B7に導入することにより行われた。心筋細胞への分化を誘導するために、得られたMYH6-EIP4導入iPS細胞株を、1% L-Glutamine、150μg/mL Transferrin、50μg/mL Ascorbic Acid（sigma）、4×10^{-4}M monothioglycerol (MTG)、10uM Rock inhibitor、0.5% Matrigelおよび2ng/mL BMP4（R&D）を添加したSTEMPRO 34（Invitrogen）中、37℃、5%酸素条件下にて培養して、EBを形成させた（day0）。その後、実施例１の心筋細胞誘導法と同様の方法で、心筋細胞への分化誘導を行った。培養開始から8日目の細胞を解析したところ、EGFP陽性細胞が観察されたことから、この段階で心筋細胞へ分化している細胞が存在することが示唆された（データは示していない）。

【０１２６】

培養開始から8日目と20日目の細胞を回収し、FACSを用いて、それぞれEGFP陽性細胞とEGFP陰性細胞に分けた。簡潔には、回収した8日目と20日目の細胞集団（EB）をcollagenase type Iで１時間、次いでトリプシンで5-10分間処理した。そこに50%FBS/IMDMを加えてトリプシンを中和し、EBを穏やかにピペッティングして、細胞を解離した。その後、細胞を1000 rpmで５分間遠心分離し、2%FBSを添加したPBSに再懸濁した。FACS Arial II cell sorter (BD Biosciences)を用いて細胞を選別し、その後、Troponin T（TNT）の発現について解析を行った。

【０１２７】

その結果、8日目および20日目でソーティングされたEGFP陽性細胞の多くは、心筋特異的マーカーであるTNTを発現していることが見出された（データは示していない）。

【０１２８】

（２）miRNAマイクロアレイ解析

続いて、8日目と20日目のそれぞれでソーティングされたEGFP陽性細胞とEGFP陰性細胞間のmiRNAの発現プロファイルを比較するために、miRNAマイクロアレイ解析を行った。簡潔には、8日目と20日目のそれぞれでソーティングされたEGFP陽性細胞とEGFP陰性細胞を、製造者の指示に従って、QlAzol lysis reagent (Qiagen)を用いて溶解し、miRNA Mini Kitにより全RNAを精製した。Nanodrop instrument (Thermo Scienticfic)を用いてA260/280比率を測定することにより、全RNA濃度および純度を決定した。マイクロアレイのために、2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies)を用いてRNA量の確認を行った。続いて、Agilent Technologies human miRNA microarray release 19.0を用いて、製造者のプロトコールに従い、miRNA発現プロファイリングを行った。GeneSpring GX 12.6 software programを用いてデータを解析し、46064 technology versionを選択した。

【０１２９】

その結果、EGFP陰性細胞と比較してEGFP陽性細胞でより発現の高いmiRNAとして、8日目に28個を、20日目に81個を見出し、さらに両日で共通して発現の高いmiRNAとして、14個を同定した（図１および表２）。

【０１３０】

（３）miRNA応答性オフスイッチmRNAの作製

miRNA応答性オフスイッチmRNAの各構成要素を構築するためのプライマー配列について、一覧を下記の表に示す。fwdはフォワードプライマーであり、revはリバースプライマーを示す。

【表９】

プライマー名	配列（５'→３'）
tagBFP fwd	CACCGGTCGCCACCATGGGATCCAGCGAG
TAPEGFP_IVTfwd	CACCGGTCGCCACCATGGGATCCGTGAGCAAGGGC
TAP_IVTrev	GCCCCGCAGAAGGTCTAGACTATCACTCGAGATGCATATGAGATC
hdKeimaRed_IVTfwd	CACCGGTCGCCACCATGGTGAGCGTGATCGCCAAG
pNP-hdKeima-Red rev	GCCCCGCAGAAGGTCTAGACTATTACTTTTTATCCTTTTCCTTTTTACTCTTCTTC
TAP_T7_G3C fwd primer	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGC
Rev5UTR primer	CATGGTGGCGACCGGTGTCTTATATTTCTTCTTACTC
IVT_5prime_UTR	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACACCGGTCGCCACCATG
Fwd3UTR primer	TCTAGACCTTCTGCGGGGC
Rev3UTR2T20	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCAAG
3UTR120A rev primer	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCCTACTCAGGCTTTATTCA
IVT_3prime_UTR	TCTAGACCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCTCTCCCTTGCACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGG
GCT7pro_5UTR2	GCTAATACGACTCACTATAGGTTCCTTAATCGCGGATCC
ORF Blastcidin Fwd	CACCGGTCGCCACCATGGCCAAGCCTTTGTC
ORF Blastcidin Rev	GCCCCGCAGAAGGTCTAGATTAGCCCTCCCACACATAACCAG
ORF Puromycin Fwd	CACCGGTCGCCACCATGACCGAGTACAAGCCCACG
ORF Puromycin Rev	GCCCCGCAGAAGGTCTAGATCAGGCACCGGGCTTGC
Clontech_IVTfwd	CACCGGTCGCCACCATG
BimEL_IVTrev	GCCCCGCAGAAGGTCTAGAATCAATGCATTCTCCACACCAG

【０１３１】

miRNA応答性オフスイッチmRNAの作製に際して、鋳型として用いられる各々のプラスミドDNAは、下記のとおり、入手もしくは作製することが可能である。

（ａ）pTAP-tagBFP

pTagBFP-Tubulin (evrogen) を鋳型にして、プライマーとして、TagBFP_Tfwd (5 ' -GCCACCATGGGATCCAGCGAGCTGATTAAGGAGAAC-3 ') およびTagBFP_Trev (5 ' -ACTCGAGATCTGTGCCCCAGTTTGCTAG-3 ') を用いて、PCR 法により断片を増幅した。得られた断片を、自作のクローニングベクターであるpGEM-TAP に挿入した。pGEM-TAPは、pGEM-Teasy (Promega) を鋳型にして、プライマーとして、pGEMTAP_MCS_Rev (5 ' -GGGATCCCATGGTGTCGACCTGCAGCATATGAGCTCCTGAATTCGCCCTATAGTGAGTCG-3 ') およびpGEMTAP_MCS_Fwd (5 ' -GGGAGATCTCATATGCATCTCGAGTGATAGTCTAGACAAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCACC-3 ') を用いて、PCR mutagenesisにより作製した。

（ｂ）pNP-hdKeima-Red

株式会社医学生物学研究所（MBL）より購入した（#AM-V0274）。

（ｃ）pCTp-EGFP

pEGFP-N1 (Clontech) を鋳型にして、プライマーとして、YF128_EXFP_Tfwd (5 ' -GAACCATGGGATCCGTGAGCAAGGGCGAGG-3 ')およびYF129_EXFP_Trev (5 ' -TATGAGATCTCTTGTACAGCTCGTCCATG-3 ')を用いて、PCR 法により断片を増幅した。得られた断片を、自作のクローニングベクターであるpCM-TAPに挿入した。pCM-TAPは、上記pGEM-TAPのDraI 断片と pLysSR

ARE2 (Novagen) のNheI, AgeI 平滑末端化断片をライゲーションすることにより作製した。

（d）pLenti6/Ubc/V5-DEST（Blastcidin vector）

pLenti6/Ubc/V5-DESTは、Life Technologies社より購入した（#V499-10）。

（e）pPyCAG-Nanog-IP（Puromycin vector）

pPyCAG-Nanog-IPは、AddgeneのPlasmid #13838を使用した。

（f）pcDNA3.1-HsBimEL

Saito H, et al., Nat Commun. 18;2:160 (2011)に記載の方法により入手した。

【０１３２】

（３－１）蛍光タンパク質をコードする遺伝子、アポトーシス誘導遺伝子および薬剤耐性遺伝子のタンパク質コード領域に対応する核酸を含む配列の構築

蛍光タンパク質をコードする遺伝子、アポトーシス誘導遺伝子および薬剤耐性遺伝子のタンパク質コード領域に対応する核酸を含む配列の構築は、それぞれの鋳型プラスミドから表６のプライマーを用いてPCR増幅を行った。

（a）tagBFP

KOD-Plus-Neo(KOD-401,TOYOBO)を用いて、製造者の指示に従って、下記の溶液を調整した。

【０１３３】

【表１０】

構成成分	最終濃度
10×kod-plus-Neo buffer	1×
2mM dNTPs	200μM
25mM $MgSO_4$ aq	1.5mM
tagBFP fwd	0.3μM
TAP_IVTrev	0.3μM
pTAP-tagBFP	1.0 ng/μL
1U/μL Kod+ polymerase	0.02U/μL
D2W	
最終容量	50 μL

調製された溶液を下記の反応条件下で、PCR増幅を行った。

【表１１】

94℃	2分	
98℃	10秒	20サイクル
68℃	30秒	
15℃	∞	

【０１３４】

増幅されたPCR産物をDpn Ⅰ(TOYOBO)を用いて37°Cで30分処理した後、MiniElute PCR purification Kit (QIAGEN)を用いて、製造者の指示に従って精製を行った。

（b）EGFP

上記（a）と同様の方法により、PCR増幅を行った。PCR用のプライマーとして、tagBFP fwdの代わりに、TAPEGFP_IVTfwdを用いた。また、鋳型として、pTAP-tagBFPの代わりにpCTp-EGFPを用いた。

（c）hdKeima-Red

上記（a）と同様の方法により、PCR増幅を行った。PCR用のプライマーとして、tagBFP

fwdおよびTAP_IVTrevの代わりに、hdKeimaRed_IVTfwdおよびpNP-hdKeima-Red revを用いた。また、鋳型として、pTAP-tagBFPの代わりにpNP-hdKeima-Redを用いた。

（d）Bim

上記（a）と同様の方法により、PCR増幅を行った。PCR用のプライマーとして、tagBFP fwdおよびTAP_IVTrevの代わりに、Clontech_IVTfwdおよびBimEL_IVTrevを用いた。また、鋳型として、pTAP-tagBFPの代わりにpcDNA3.1-HsBimEL humanを用いた。

（e）Puromycin

上記（a）と同様の方法により、PCR増幅を行った。PCR用のプライマーとして、tagBFP fwdおよびTAP_IVTrevの代わりに、ORF Puromycin FwdおよびORF Puromycin Revを用いた。また、鋳型として、pTAP-tagBFPの代わりにpPyCAG-Nanog-IPを用いた。

（f）Blastcidin

上記（a）と同様の方法により、PCR増幅を行った。PCR用のプライマーとして、tagBFP fwdおよびTAP_IVTrevの代わりに、ORF Blastcidin FwdおよびORF Blastcidin Revを用いた。また、鋳型として、pTAP-tagBFPの代わりにpLenti6/Ubc/V5-DESTを用いた。

【０１３５】

（３－２）５'UTRおよび3'UTR配列の構築

５'UTRおよび3'UTR配列の構築は、それぞれの鋳型から表６のプライマーを用いてPCR増幅を行った。

（a）５'UTR

KOD-Plus-Neo(KOD-401,TOYOBO)を用いて、製造者の指示に従って、下記の溶液を調整した。

【表１２】

構成成分	最終濃度
10×kod-plus-Neo buffer	1×
2mM dNTPs	200μM
25mM $MgSO_4$ aq	1.5mM
TAP_T7_G3C fwd primer	0.3μM
Rev5UTR primer	0.3μM
IVT_5prime_UTR	1.0 ng/μL
1U/μL Kod+ polymerase	0.02U/μL
D2W	
最終容量	50 μL

【０１３６】

調製された溶液を下記の反応条件下で、PCR増幅を行った。

【表１３】

94℃	2分	
98℃	10秒	20サイクル
68℃	10秒	
15℃	∞	

増幅されたPCR産物を、MiniElute PCR purification Kit (QIAGEN)を用いて、製造者の指示に従って精製を行った。

（d）3'UTR

上記（a）と同様の方法により、PCR増幅を行った。PCR用のプライマーとして、TAP_T7_G3C fwd primerおよびRev5UTR primerの代わりに、Fwd3UTR primerおよびRev3UTR2T20を用いた。また、鋳型として、IVT_5prime_UTRの代わりにIVT_3prime_UTRを用いた。

【０１３７】
（３－３）コントロールmRNAのIVTテンプレートDNAの構築
コントロールmRNAのIVTテンプレートの構築は、表６のプライマー及び上記で増幅されたPCR産物を用いてPCR増幅を行った。
（a）IVT_tagBFP
KOD-Plus-Neo(KOD-401,TOYOBO)を用いて、製造者の指示に従って、下記の溶液を調整した。
【表１４】

構成成分	最終濃度
10×kod-plus-Neo buffer	1×
2mM dNTPs	200μM
25mM $MgSO_4$ aq	1.5mM
TAP_T7_G3C fwd primer	0.3μM
3UTR120A rev primer	0.3μM
tagBFP PCR 産物	0.2 ng/μL
5'UTR PCR 産物	10 nM
3'UTR PCR 産物	10 nM
1U/μL Kod+ polymerase	0.02U/μL
D2W	
最終容量	50 μL

調製された溶液を下記の反応条件下で、PCR増幅を行った。
【表１５】

94℃	2 分	
98℃	10 秒	20 サイクル
68℃	45 秒	
15℃	∞	

【０１３８】
増幅されたPCR産物をDpn Ⅰ(TOYOBO)を用いて37°Cで30分処理した後、MiniElute PCR purification Kit (QIAGEN)を用いて、製造者の指示に従って精製を行った。
（b）IVT_EGFP
上記（a）と同様の方法により、PCR増幅を行った。鋳型として、tagBFP PCR産物の代わりにEGFP PCR産物を用いた。
（c）IVT Puromycin
上記（a）と同様の方法により、PCR増幅を行った。鋳型として、tagBFP PCR産物の代わりにPuromycin PCR産物を用いた。
（d）IVT_ Blastcidin
上記（a）と同様の方法により、PCR増幅を行った。鋳型として、tagBFP PCR産物の代わりにBlastcidin PCR産物を用いた。
【０１３９】
（３－４）miRNA応答性mRNAのIVTテンプレートの構築
miRNA応答性mRNAのIVTテンプレートの構築は、表６のプライマー及び上記で増幅されたPCR産物を用いてPCR増幅を行った。また、上記で用いた5'UTR PCR産物の代わりに、下記の表１６で示したmiRNAに応答する5'UTRプライマーを用いた。

【表１６】

プライマー名	５'UTR プライマー配列
5UTRtemp_let-7e-5p	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCAACTATACAACCTCCTACCTCAAGATCACACCGGTCGCCACCATG
5UTRtemp_T1	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCATACATACTTCTTTACATTCCAAGATCACACCGGTCGCCACCATG
5UTRtemp_T22-5p	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCTAAAGCTTGCCACTGAAGAACTAGATCACACCGGTCGCCACCATG
5UTRtemp_T133a-3p	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCCAGCTGGTTGAAGGGGACCAAAAGATCACACCGGTCGCCACCATG
5UTRtemp_T133b	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCTAGCTGGTTGAAGGGGACCAAAAGATCACACCGGTCGCCACCATG
5UTRtemp_T143-3p	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCGAGCTACAGTGCTTCATCTCAAGATCAACACCGGTCGCCACCATG
5UTRtemp_T145-3p	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCAGAACAGTATTTCCAGGAATCCAGATCACACCGGTCGCCACCATG
5UTRtemp_T208a-3p	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCACAAGCTTTTTGCTCGTCTTATAGATCACACCGGTCGCCACCATG
5UTRtemp_T490-5p	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCACCCACCTGGAGATCCATGGAGATCAAACACCGGTCGCCACCATG
5UTRtemp_T490-3p	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCCAGCATGGAGTCCTCCAGGTTGAGATCACACCGGTCGCCACCATG
5UTRtemp_T499a-5p	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCAAACATCACTGCAAGTCTTAAAGATCAACACCGGTCGCCACCATG
5UTRtemp_T1271-5p	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCTGAGTGCTTGCTAGGTGCCAAGAGATCACACCGGTCGCCACCATG
5UTRtemp_T3907	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCTGTGAGCCAGCCTGGAGCACCTAGATCACACCGGTCGCCACCATG
5UTRtemp_T4324	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCTTAAGGTTAGGGTCTCAGGGAGATCAAACACCGGTCGCCACCATG
5UTRtemp_T208b	CGACTCACTATAGGTTCCGCGATCGCGGATCCACAAACCTTTTGTTCGTCTTATAGATCACACCGGTCGCCACCATG

【０１４０】

（a）IVT_tagBFP

KOD-Plus-Neo(KOD-401,TOYOBO)を用いて、製造者の指示に従って、下記の溶液を調整した。

【表１７】

構成成分	最終濃度
10×kod-plus-Neo buffer	1×
2mM dNTPs	200μM
25mM $MgSO_4$ aq	1.5mM
TAP_T7_G3C fwd primer	0.3μM
3UTR120A rev primer	0.3μM
tagBFP PCR 産物	0.2 ng/μL
miRNA 応答性 5'UTR PCR 産物	10 nM
3'UTR PCR 産物	10 nM
1U/μL Kod+ polymerase	0.02U/μL
D2W	
最終容量	50 μL

調製された溶液を下記の反応条件下で、PCR増幅を行った。

【表１８】

94℃	2 分	
98℃	10 秒	20 サイクル
68℃	45 秒	
15℃	∞	

【０１４１】

増幅されたPCR産物をDpn I(TOYOBO)を用いて37°Cで30分処理した後、MiniElute PCR purification Kit (QIAGEN)を用いて、製造者の指示に従って精製を行った。

(b) IVT_hdKeima-Red

上記（a）と同様の方法により、PCR増幅を行った。鋳型として、tagBFP PCR産物の代わりにhdKeima-Red PCR産物を用いた。

(c) IVT_Bim

上記（a）と同様の方法により、PCR増幅を行った。鋳型として、tagBFP PCR産物の代わりにBim PCR産物を用いた。

【０１４２】

（３－５）mRNAの合成及び生成

Warren L, et al., Cell Stem Cell. 7(5):618-30 (2010) に記載のプロトコールを用いて、MEGAscript T7 kit (Ambion)により、miRNA応答性オフスイッチmRNAを作製した。この反応において、ウリジン三リン酸及びシチジン三リン酸に替えて、シュードウリジン－5' －三リン酸及びメチルシチジン－5'－三リン酸(TriLink BioTechnologies)をそれぞれ用いた。IVT(mRNA合成)反応の前に、グアニジン－5'－三リン酸は、Anti Reverse cap Analog (New England Biolabs)で5倍希釈した。反応混合液を37°Cで5時間インキュベートして、TURBO DNase (Amibion)を加えた後、37°Cでさらに30分インキュベートした。得られたmRNAは、FavorPrep Blood ／ Cultured Cells total RNA extraction column (Favorgen Biotech)で精製し、Antarctic phosphatase (New England Biolabs)を用いて37C°で30分インキュベートした。その後、RNeasy Mini Elute Cleanup Kit (QIAGEN)により、さらに精製した。

【０１４３】

（４）miRNA応答性オフスイッチmRNAを用いた解析

作製したmiRNA応答性オフスイッチmRNAを評価するために、それらをEGFP mRNAと共にhiPSC（201B7株）由来の心筋細胞に導入した。簡潔には、培養開始後16日目の細胞集団（EB

）をcollagenase type Iで１時間、次いでTrypsinで5-10分間処理した。そこに50%FBS/IMDMを加えてトリプシンを中和し、EBを穏やかにピペッティングして、細胞を解離した。その後、細胞を1000 rpmで５分間遠心分離し、10ng/ml VEGFおよび5 ng/ml bFGFを添加したStemPro-34に再懸濁した。その後、細胞をフィブロネクチンでコートした24ウェルプレートに2×10^5細胞／ウェルで播種し、37℃、5%CO_2下で2日間インキュベートした。次いで、Stemfect RNA transfection kitを用いて、製造者（Stemgent）の指示に従って、miRNA応答性オフスイッチmRNAを細胞に導入した。具体的には、12.5μl / tube Stemfect Transfection Buffer を2つの滅菌した1.5ml tubeへ入れた。次いで、一方のtubeに、1.0μlのStemfect RNA Transfection Reagentを加えてバッファーと混合した。もう一方のtubeには、100 ng/ μl miRNA応答性オフスイッチmRNAを1.0 μlと100 ng/ μl EGFP mRNAを1.0 μl加えて、バッファーと混合した。希釈したTransfection Reagent溶液を希釈したmRNA溶液に加えて混合した。混合物を室温で15分間インキュベートして、mRNA complexを完成させた。その間に、培養培地を500μlのfreshな培地（10ng/ml VEGFおよび5 ng/ml bFGFを添加したStemPro-34（抗生物質不含））に交換しておき、15分経った時点で、mRNA complexをwellに加えて、37℃、5%CO_2下で4時間インキュベートした。その後、培地を除き、細胞をIMDMで一度洗浄してから、500μlのfreshな培地（10ng/ml VEGFおよび5 ng/ml bFGFを添加したStemPro-34（抗生物質含））をウェルに加えた。2日間培養し、その後、BFPの蛍光強度についてFACSによる解析を行った。FACS解析は、簡潔には、回収した細胞集団（EB）をトリプシンで2分間処理し、次いで、50%FBS/IMDMを加えてトリプシンを中和した。その後、細胞を1000 rpmで５分間遠心分離し、2%FBSを添加したPBSに再懸濁した。その後、細胞をFACSにかけて解析を行った。

【０１４４】

その結果、miR-1-, miR-143-3p-, miR-208a-およびmiR-499a-5p-応答性オフスイッチmRNAを導入した細胞は、TagBFP mRNA（コントロール）と比較して一部の細胞においてTagBFPの蛍光強度を減じていた（図２）。一方、miR-490-3pおよび-490-5p-応答性オフスイッチmRNAを導入した細胞は、TagBFP mRNA（コントロール）と比較して大部分の細胞においてTagBFPの蛍光強度を減じており、他の8個のmiRNA応答性オフスイッチmRNA導入細胞は反応を示さなかった（図２）。したがって、miR-1-, miR-143-3p-, miR-208a-およびmiR-499a-5p-応答性オフスイッチmRNAが、心筋細胞の純化のための候補物質として同定された。

【０１４５】

［実施例３］

心筋細胞の純化（１－１）

心筋細胞の純化におけるmiR-1-, miR-143-3p-, miR-208a-およびmiR-499a-5p-応答性オフスイッチmRNAの有効性について調べるために、引き続き実験を行った。実施例１の心筋細胞誘導法により201B7株を心筋細胞へ誘導し、20日目に、TagBFPシグナルが減少した細胞をFACSによりソーティングし、TNTの発現について解析を行った。TNT発現の解析は、簡潔には、下記の通り行った。ソーティングした細胞群を、PBS中、4% paraformaldehydeで固定し、2% FBSおよび0.5% saponin (Sigma)を含有するPBS中、抗心筋TNTアイソフォーム(clone 13-11; Thermo; 1:200)で染色した。二次抗体としては、APC goat anti-mouse Ig (BD pharmingen; 1:100)を用いた。応答性オフスイッチmRNAの細胞への導入については、実施例２（４）と同様の方法で行った。

【０１４６】

その結果、フローサイトメトリー解析はmiR-1-, miR-208a-およびmiR-499a-5p-応答性オフスイッチmRNAがTNT陽性心筋細胞についての高い精製度を示した一方で、miR-143-3pおよびmiR-490-3p-応答性オフスイッチmRNAでは、ソーティングを行わなかった場合と同レベルの精製度であった（図３）。

【０１４７】

続いて、miR-1-, miR-208a-およびmiR-499a-5p-応答性オフスイッチmRNAが201B7株以外の他のhPSC株においても同様に機能することを確認するために、2種の異なるhiPSC株（409B2および947A2）ならびに1種のhESC株（KhES1）を用いて解析を行った。その結果、201B

7株を用いた場合と同様に、TNT陽性心筋細胞集団を高純度で選別することができた（図４）。

【０１４８】

得られたTNT陽性心筋細胞について心筋特異的発現遺伝子の発現状態を調べた結果、mRNAレベルおよびタンパク質レベルの両方で、心筋特異的遺伝子が高く発現していることが確認された（図５および６）。

【０１４９】

さらに、導入したmiRNA応答性オフスイッチmRNAが、内在性のmiRNAとの作用を介して、当該内在性のmiRNAの細胞内での機能を阻害していないかを確かめるために実験を行った。簡潔には、実施例２と同様の方法により作製したMYH6-EIP6導入細胞株を実施例１の方法で心筋細胞へ分化させ、１６日目にGFPにてソーティングを行い、その２日後（１８日目）にmiR-1-応答性オフスイッチmRNAを導入した。ここで、miR-1-応答性オフスイッチmRNAを導入していない細胞群も同時に調製した。１９日目と２５日目に全RNAを抽出し、マイクロアレイにより解析を行った。その結果、miRNA応答性mRNAの導入の有無に関わらず、miR-1標的遺伝子について同様の発現傾向が観察されたことから、miRNA応答性mRNAは、導入された心筋細胞に対して負の影響を与えないことが示唆された（図７）。

【０１５０】

［実施例４］

心筋細胞の純化（１－２）

複数のmiRNA応答性オフスイッチmRNAを組み合わせた場合の心筋細胞の純化における有効性について調べるために、下記の実験を行った。すなわち、201B7株を心筋細胞へ誘導して、miRNA応答性オフスイッチmRNAを導入し、FACSでのソーティングにより心筋細胞を高純度で精製できるかを確かめた。心筋細胞への誘導については、実施例１と同様の方法により、miRNA応答性オフスイッチmRNA の細胞への導入については、実施例２（４）と同様の方法により行った。

【０１５１】

その結果、miR-1- + miR-208a-、miR-1- + miR-499a-5p-およびmiR-208a- + miR-499a-5p-の組み合わせで導入した場合、miR-1-, miR-208a-およびmiR-499a-5p-単独の場合と同様の、あるいは若干優れた精製効率を示した（図８）。

【０１５２】

［実施例５］

心筋細胞の純化（２）

miRNA応答性オフスイッチmRNAと薬剤耐性mRNAを細胞に共導入した際の心筋細胞純化効果を調べるために、実験を行った。実施例１の心筋細胞誘導法によりKhES1株を心筋細胞へ誘導した。miRNA応答性オフスイッチmRNAと薬剤耐性mRNAの細胞への導入については、下記の通り行った。簡潔には、培養開始後16日目の細胞集団（EB）をcollagenase type Iで１時間、次いで0.25%Trypsinで5-10分間処理した。そこに50%FBS/IMDMを加えてトリプシンを中和し、EBを穏やかにピペッティングして、細胞を解離した。その後、細胞を1000 rpmで５分間遠心分離し、10ng/ml VEGFおよび5 ng/ml bFGFを添加したStemPro-34に再懸濁した。その後、細胞をフィブロネクチンでコートした12ウェルプレートに5×10^5細胞／ウェルで播種し、37℃、5%CO_2下で2日間インキュベートした。次いで、Stemfect RNA transfection kitを用いて、製造者（Stemgent）の指示に従って、miRNA応答性オフスイッチmRNAを細胞に導入した。具体的には、25μl / tube Stemfect Transfection Buffer を2つの滅菌した1.5ml tubeへ入れた。次いで、一方のtubeに、2μlのStemfect RNA Transfection Reagentを加えてバッファーと混合した。もう一方のtubeには、0.5 μlもしくは1.0 μl の100 ng/ μl ピューロマイシンmRNA（Puromycin）と0.5 μl～2.0 μlの100 ng/ μl miR-1応答性Bim mRNA（miR-1-HsBimEL）を加えて、バッファーと混合した。希釈したTransfection Reagent溶液を希釈したmRNA溶液に加えて混合した。混合物を室温で15分間インキュベートして、mRNA complexを完成させた。その間に、培養培地を500μlのfreshな培地（10ng/ml VEGFおよび5 ng/ml bFGFを添加したStemPro-34（抗生物質不含））に交

換しておき、15分経った時点で、mRNA complexをwellに加えて、37℃、5%CO_2下で4時間インキュベートした。その後、培地を除き、細胞をIMDMで一度洗浄してから、ピューロマイシンを添加した500μlのfreshな培地（10ng/ml VEGFおよび5 ng/ml bFGFを添加したStemPro-34）をウェルに加えた。2日間培養し、その後、TNTの発現について解析を行った。

【０１５３】

その結果、ピューロマイシンmRNA（Puromycin）とmiR-1-HsBimELを細胞に共導入した場合、ソーティング操作を行うことなく、極めて高純度（本実施例では92.2%）で心筋細胞を精製することが可能であることが示された（図９）。

【０１５４】

［実施例６］

マウスの新生仔より単離した心臓をneonatal Heart dissociation Kit (Miltenyi Biotech)を用いて、製造者の指示に従って単一細胞へと分離後、 24ウェルプレートに2×10^5細胞／ウェルで播種し、37℃でインキュベートした。翌日、 100 ngのmiR-1-, miR-143-3p-, miR-208a-, miR-208b-およびmiR-499a-5p-応答性オフスイッチ（BFP）を100 ng EGFP mRNAと共にStemfect RNA transfection kit （Stemgent）を用いて、製造者の指示に従って導入した。4時間後、細胞を洗浄後、DMEM+10%FBSを添加し、 1日間培養した。得られた細胞を、 0.25%Trypsinで2分間処理し、BFPおよびEGFPの蛍光強度についてFACSによる解析を行った。

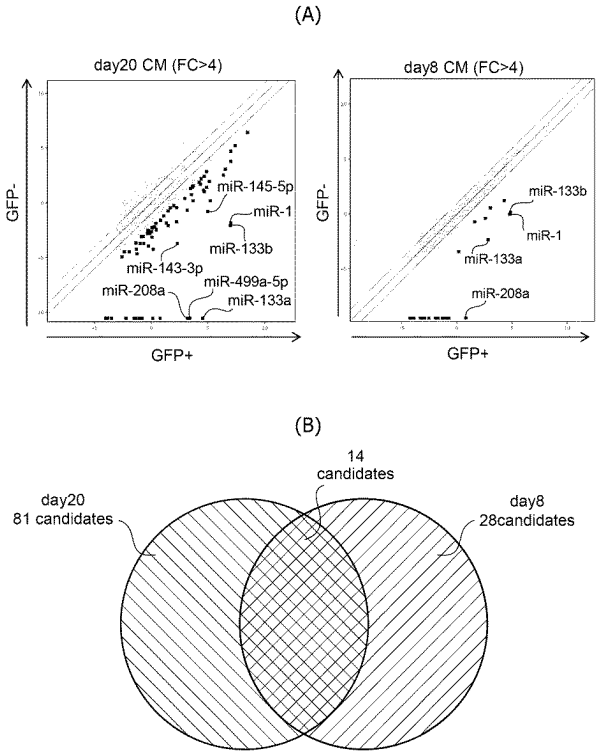
その結果、 miR-1-, miR-143-3p-, miR-208a-, miR-208b-およびmiR-499a-5p-応答性オフスイッチを導入した細胞では、EGFPの蛍光強度が高い細胞において、BFPの蛍光強度が低下する細胞が見られた（図１０）。従って、 miR-1-BFP, miR-208b-BFP, miR-208a-BFPおよびmiR-499a-5p-BFPは、心筋細胞を含む心臓に含有される細胞を特異的に認識できることが示唆された。

【産業上の利用可能性】

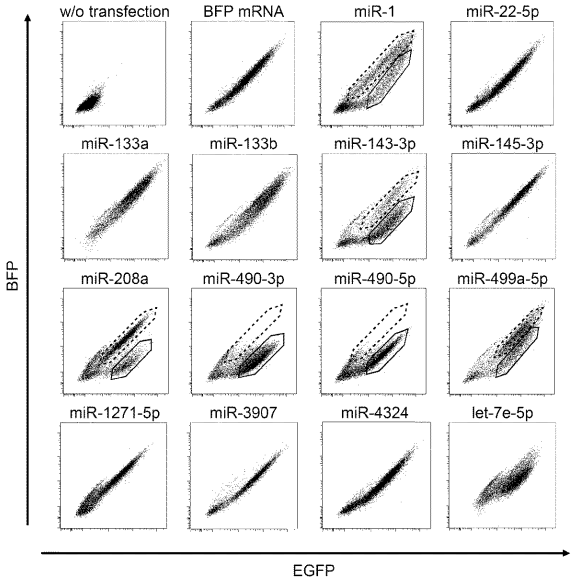
【０１５５】

本発明は、心筋細胞を容易に純化することができる心筋細胞の選別及び製造方法を提供するものである。したがって、心不全、虚血性心疾患、心筋梗塞、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症、拡張型心筋症などの心疾患の治療のための、純度の高い心筋細胞の提供が可能となる。

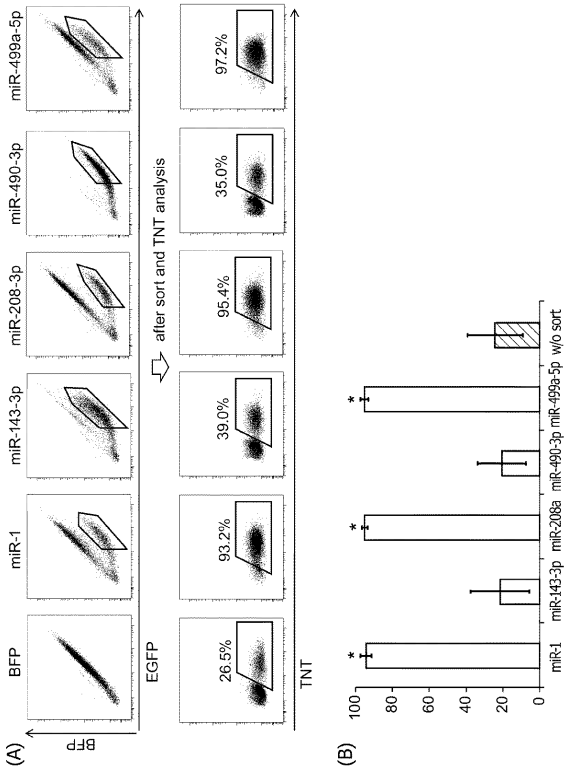
【図１】


(A)
day20 CM (FC>4)
day8 CM (FC>4)
GFP-
GFP+
miR-145-5p
miR-1
miR-133b
miR-143-3p
miR-208a
miR-499a-5p
miR-133a
(B)
day20
81 candidates
14
candidates
day8
28candidates

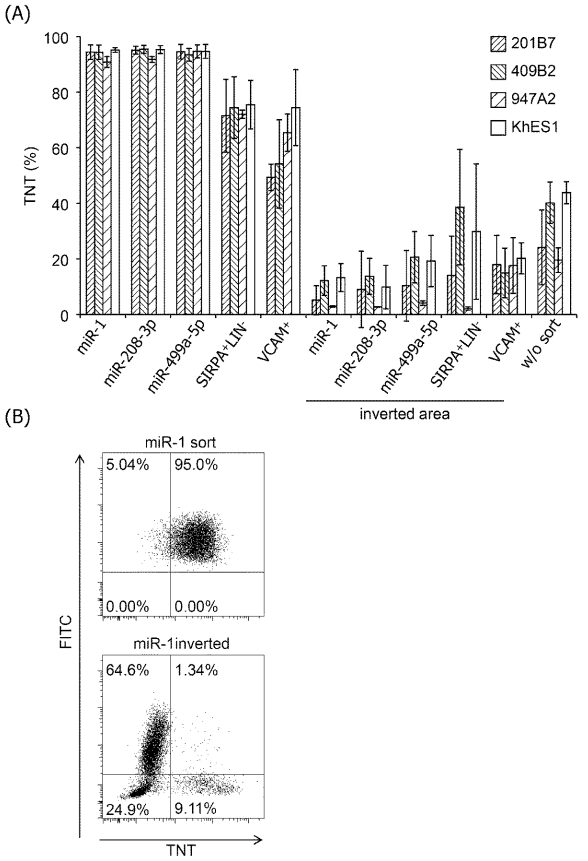
【図２】


w/o transfection
BFP mRNA
miR-1
miR-22-5p
miR-133a
miR-133b
miR-143-3p
miR-145-3p
miR-208a
miR-490-3p
miR-490-5p
miR-499a-5p
miR-1271-5p
miR-3907
miR-4324
let-7e-5p
BFP
EGFP

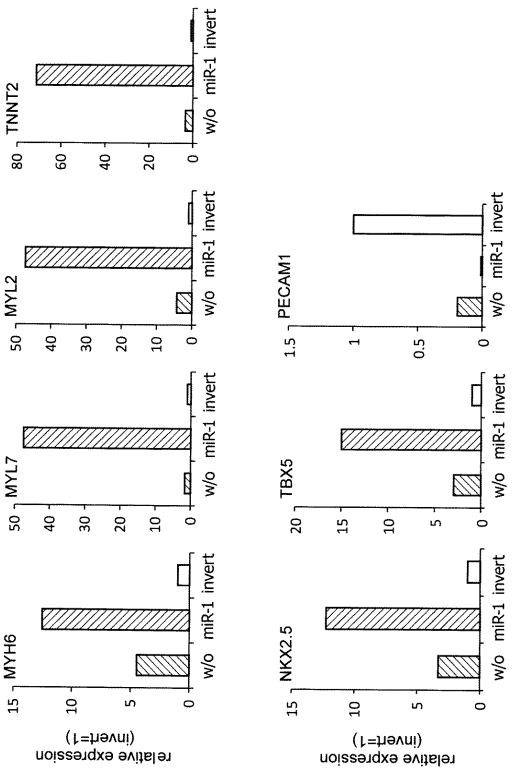
【図３】


(A)
BFP
EGFP
miR-499a-5p
miR-490-3p
miR-208-3p
miR-143-3p
miR-1
after sort and TNT analysis
97.2%
35.0%
95.4%
39.0%
93.2%
26.5%
TNT
(B)
100
80
60
40
20
0
miR-1
miR-143-3p
miR-208a
miR-490-3p
miR-499a-5p
w/o sort

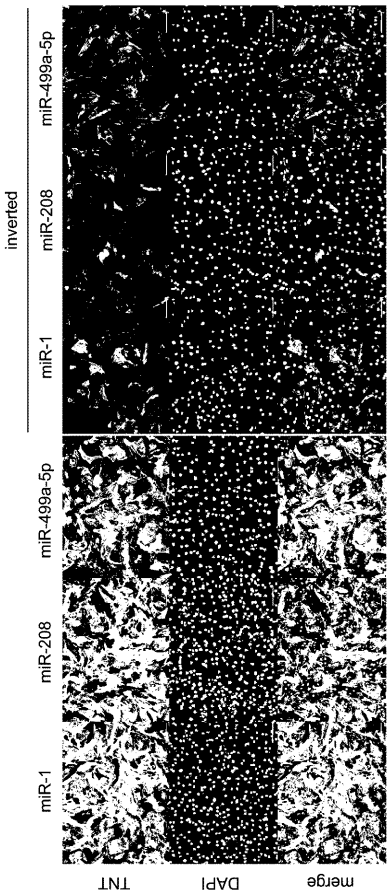
【図４】


(A)
201B7
409B2
947A2
KhES1
TNT (%)
100
80
60
40
20
0
miR-1
miR-208-3p
miR-499a-5p
SIRPA+LIN-
VCAM+
miR-1
miR-208-3p
miR-499a-5p
SIRPA+LIN-
VCAM+
w/o sort
inverted area
(B)
miR-1 sort
5.04%
95.0%
0.00%
0.00%
miR-1inverted
64.6%
1.34%
24.9%
9.11%
FITC
TNT

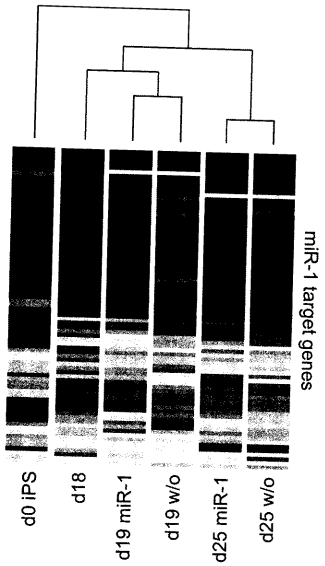
【図 5】


relative expression
(invert=1)
MYH6
MYL7
MYL2
TNNT2
NKX2.5
TBX5
PECAM1
w/o
miR-1
invert

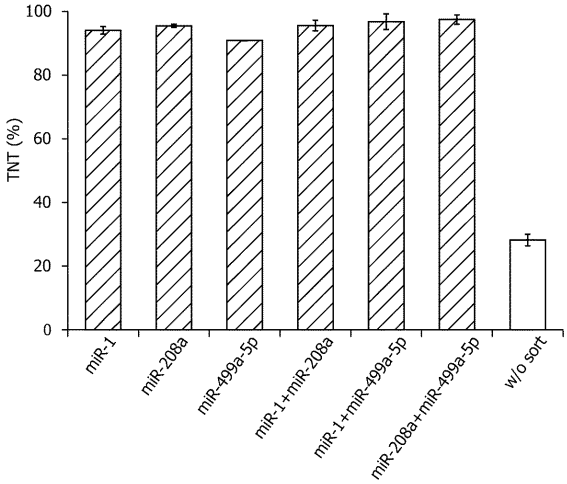
【図 6】


miR-1
miR-208
miR-499a-5p
inverted
TNT
DAPI
merge

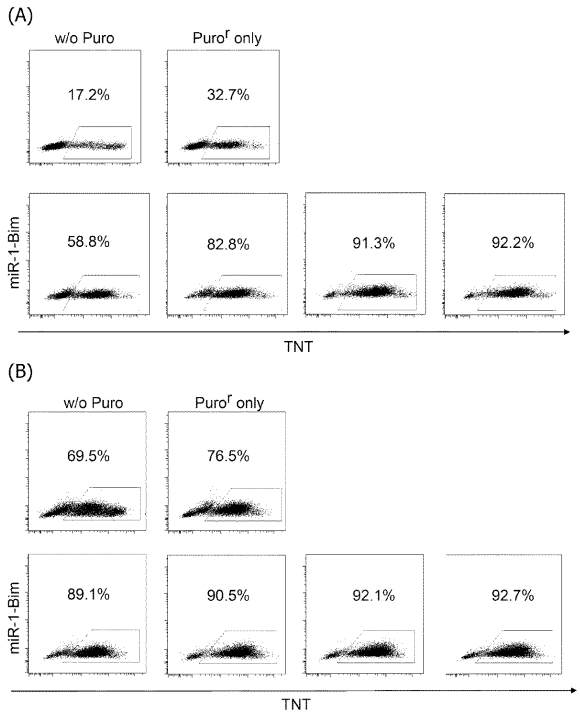
【図 7】


d0 iPS
d18
d19 miR-1
d19 w/o
d25 miR-1
d25 w/o
miR-1 target genes

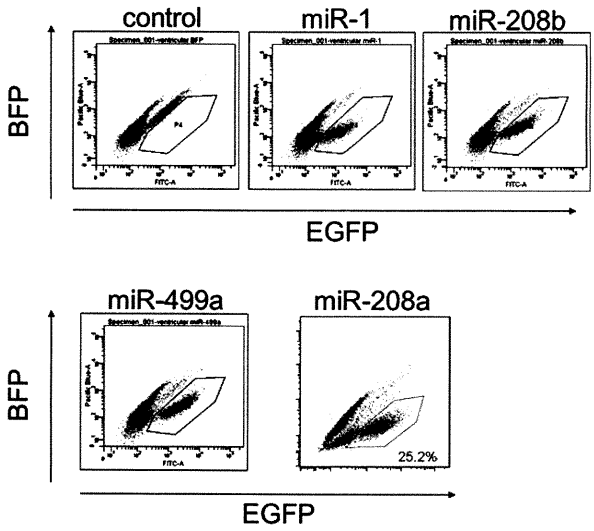
【図 8】


TNT (%)
miR-1
miR-208a
miR-499a-5p
miR-1+miR-208a
miR-1+miR-499a-5p
miR-208a+miR-499a-5p
w/o sort

【図９】



【図１０】



【配列表】
0006612736000001.app

フロントページの続き

(72)発明者　齊藤　博英
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　三木　健嗣
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　遠藤　慧
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　高橋　誠弥
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

審査官　戸来　幸男

(56)参考文献　国際公開第２０１１／１５４５５３（WO，Ａ２）
国際公開第２００９／０６６７５８（WO，Ａ１）
Physiol. Genomics，２０１１年，vol.43, no.10，pp.581-594
Stem Cells Dev.，２０１２年，vol.21, no.11，pp.1956-1965
生化学，２００７年，p.4P-1322
Nat. Commun.，２０１３年，vol.4, no.2393，pp.1-9

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ　１５／００－１５／９０
Ｃ１２Ｑ　１／００－１／７０
Ｃ１２Ｎ　５／００－５／２８
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ／
ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＰｕｂＭｅｄ