(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第6161261号
(P6161261)

(45)発行日　平成29年7月12日(2017.7.12)　(24)登録日　平成29年6月23日(2017.6.23)

(51)Int.Cl.　F I
C12N 15/09 (2006.01)　C12N 15/00 ZNAA
C12N 5/10 (2006.01)　C12N 5/10

請求項の数 9　(全 38 頁)

(21)出願番号　特願2012-252371(P2012-252371)
(22)出願日　平成24年11月16日(2012.11.16)
(65)公開番号　特開2013-126412(P2013-126412A)
(43)公開日　平成25年6月27日(2013.6.27)
審査請求日　平成27年10月23日(2015.10.23)
(31)優先権主張番号　特願2011-251004(P2011-251004)
(32)優先日　平成23年11月16日(2011.11.16)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者　503092180
学校法人関西学院
兵庫県西宮市上ヶ原一番町１番１５５号
(74)代理人　110000796
特許業務法人三枝国際特許事務所
(72)発明者　関　由行
兵庫県三田市学園二丁目一番地　関西学院大学理工学部内

審査官　小倉　梢

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＤＮＡ脱メチル化誘導法及びその用途

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
培養細胞内においてＤＮＡ脱メチル化を誘導する方法であって、
（１）配列番号１～３のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は該アミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列からなり、かつＴＥＴ１活性を有するポリペプチド、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び
配列番号１０～１２のいずれかで表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチド
をコードするポリヌクレオチドをそれぞれ細胞内に導入することにより過剰発現させることによって、前記二種のポリペプチドの細胞内含量をいずれも増加させる工程
を含む、方法。
【請求項２】
核初期化物質を用いて体細胞からｉＰＳ細胞を製造する方法であって、
（１）配列番号１～３のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は該アミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列からなり、かつＴＥＴ１活性を有するポリペプチド、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び
配列番号１０～１２のいずれかで表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチド
をコードするポリヌクレオチドをそれぞれ細胞内に導入することにより過剰発現させることによって、前記二種のポリペプチドの細胞内含量をいずれも増加させる工程
を含む方法。
【請求項３】

（α－１）配列番号１～３のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は該アミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列からなり、かつＴＥＴ１活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又は該ポリペプチドを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び
（α－２）配列番号１０～１２のいずれかで表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチド
を含有する、ＤＮＡ脱メチル化誘導剤として用いられる組成物。
【請求項４】
（ａ－１）配列番号１～３のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は該アミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列からなり、かつＴＥＴ１活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又は該ポリペプチドを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター；及び
（ａ－２）配列番号１０～１２のいずれかで表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター
を含有する、組成物。
【請求項５】
（ｂ）配列番号１～３のいずれかで表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド、又は該アミノ酸配列と同一性が９０％以上のアミノ酸配列からなり、かつＴＥＴ１活性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、又は該ポリペプチドを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び
配列番号１０～１２のいずれかで表わされるアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
を含む共発現ベクター。
【請求項６】
ｉＰＳ細胞の品質改善剤として用いられる、請求項３又は４に記載の組成物。
【請求項７】
ｉＰＳ細胞の品質改善剤として用いられる、請求項５に記載の共発現ベクター。
【請求項８】
ｉＰＳ細胞の初期化完成度向上剤として用いられる、請求項３又は４に記載の組成物。
【請求項９】
ｉＰＳ細胞の初期化完成度向上剤として用いられる、請求項５に記載の共発現ベクター。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、ＤＮＡ脱メチル化誘導法及びその用途に関する。
【背景技術】
【０００２】
ＣｐＧ配列のシトシンのメチル化は、遺伝子発現制御において極めて重要な役割を担っており、異常なＤＮＡメチル化が癌などの様々な疾患の要因になっていることが分かっている。精子又は卵の起源である始原生殖細胞は、分化全能性の獲得や異常メチル化の蓄積を防ぐために、ゲノム全体のＤＮＡのメチル化を脱メチル化する活性を持っている。このようなゲノム全体の脱メチル化は、生殖系列の細胞のみで起こる極めてユニークな現象であり、生殖系列特異的なＤＮＡ脱メチル化機構の存在が示唆されている。しかしながら、そのようなＤＮＡ脱メチル化機構の詳細は明らかになっていない（非特許文献１）。
【０００３】
また、核初期化物質を用いて体細胞からｉＰＳ細胞を製造する方法が知られている。ｉＰＳ細胞は再生医療への応用等が期待されているが、未分化性維持の不安定さや、分化能の不均一性等の様々な問題が指摘されている。具体的には、ｉＰＳ細胞はメチル化の状態が正常なＥＳ細胞とは大きく異なっており（非特許文献２）、さらにこのＤＮＡメチル化

の異常が、ｉＰＳ細胞の品質に悪影響を与えることが知られている。例えば、多くのｉＰＳ細胞において異常なメチル化が原因でＤｌｋ１－Ｄｉｏ３遺伝子クラスターの発現が抑制されていることが知られている。そして、かかる発現抑制に起因して、これらのｉＰＳ細胞はキメラを作成したり、ｉＰＳ細胞だけに由来する動物を作成しようとする際に十分に機能しないことが指摘されている（非特許文献３）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００４】

【非特許文献１】Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｖｏｌ．３２４，１５ Ｍａｙ，２００９，ｐｐ．９３０－９３５

【非特許文献２】Ｎａｔｕｒｅ Ｖｏｌ ４７１，３ Ｍａｒｃｈ，２０１１，ｐｐ．６８－７３

【非特許文献３】Ｎａｔｕｒｅ Ｖｏｌ ４６５，１３ Ｍａｙ，２０１０，ｐｐ．１７５－１８３

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００５】

本発明の課題は以下の通りである。

（１）細胞内においてＤＮＡ脱メチル化を誘導する方法を提供すること。

（２）より品質の向上したｉＰＳ細胞を提供すること。

【課題を解決するための手段】

【０００６】

本発明者は、鋭意検討を重ね、ＴＥＴ１活性を介したＤＮＡ脱メチル化が、ＰＲＤＭ１４活性により促進されることを見出した。本発明者は、さらに、ＴＥＴ１活性単独では脱メチル化できない領域であっても、ＰＲＤＭ１４活性を併用することで脱メチル化できることを見出した。かかる新しい知見に基づいて本発明者は、ＴＥＴ１及びＰＲＤＭ１４の細胞内含量を増加させる工程を用いることにより、細胞内においてＤＮＡ脱メチル化を誘導できることを見出した。

【０００７】

これに加えて、本発明者は、分化させたＥＳ細胞にＰＲＤＭ１４を発現させることで、ＥＳ細胞への脱分化を誘導できることを見出した。

【０００８】

さらに、本発明者は、ｉＰＳ細胞の品質に悪影響を与えることが知られているＤＮＡメチル化の異常を、本発明のＤＮＡ脱メチル化誘導方法によって正常化できることを見出した。かかる新しい知見に基づいて本発明者は、ＤＮＡ脱メチル化誘導方法を、核初期化物質を用いて体細胞からｉＰＳ細胞を製造する方法に適用することにより、より品質の向上したｉＰＳ細胞を提供できることを見出した。

【０００９】

本発明はかかる知見に基づきさらに検討を重ねた結果完成されたものであり、下記に掲げるものである。

［１．ＤＮＡ脱メチル化誘導方法］

［１．］　細胞内においてＤＮＡ脱メチル化を誘導する方法であって、

（１）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び

ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド

の細胞内含量を増加させる工程

を含む、方法。

［１．１．１］　前記細胞がヒト細胞である、１．に記載の方法。

［１．１．２］　前記細胞がマウス細胞である、１．に記載の方法。

［１．１．３］　前記細胞が培養細胞である、１．～１．１．２のいずれかに記載の方法

。
［１．１．３．１］　前記培養細胞が体細胞である、１．１．３に記載の方法。
［１．１．４］　前記細胞が生体内の細胞である、１．～１．１．２のいずれかに記載の方法。
［１．１．４．１］　前記生体内の細胞がエピゲノム変異を修復するＤＮＡメチル化の異常を有する細胞である、１．１．４　に記載の方法。
［１．１．４．２］　前記生体内の細胞ががん細胞である、１．１．４　に記載の方法。
［１．２．１］　前記工程（１）が、
ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び
ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド
を細胞内に導入する工程である、１．～１．１．４．２のいずれかに記載の方法。
［１．２．２］　前記工程（１）が、
ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び
ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
を細胞内に導入する工程である、１．～１．１．４．２のいずれかに記載の方法。
［１．２．２．１］　前記工程（１）が、
ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び
ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
を細胞内で過剰発現させる工程である、１．２．２に記載の方法。
［１．３．１］　ＴＥＴ１活性ドメインの改変体、並びにＴＥＴ１活性ドメインを含む融合ポリペプチド及びＴＥＴ１活性ドメインの改変体を含む融合ポリペプチドが、ＴＥＴ１活性を有する、１．～１．２．２．１のいずれかに記載の方法。
［１．３．１．１］　ＴＥＴ１活性が、５－メチルシトシン（５ｍＣ）を５－ヒドロキシメチルシトシン（ｈｍＣ）へと変換する活性である、１．３．１に記載の方法。
［１．４．１］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体、並びにＰＲＤＭ１４活性ドメインを含む融合ポリペプチド及びＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体を含む融合ポリペプチドが、ＰＲＤＭ１４活性を有する、１．～１．３．１．１のいずれかに記載の方法。
［１．４．１．１］　ＰＲＤＭ１４活性が、ＴＥＴ１活性を促進する活性である、１．４．１に記載の方法。
［１．５］　ＴＥＴ１活性ドメイン又はその改変体を含む融合ポリペプチドが、
（ｉ）メチル化シトシン結合ドメイン；及び
（ｉｉ）ＴＥＴ１活性ドメイン又はその改変体からなる活性ドメイン
を含む、１．～１．４．１．１のいずれかに記載の方法。
［１．６］　ＰＲＤＭ１４又はその改変体を含む融合ポリペプチドが、
（ｉ）標的遺伝子領域に結合するＤＮＡ結合ドメイン；及び
（ｉｉ）ＰＲＤＭ１４又はその改変体からなる活性ドメイン
を含む、１．～１．５のいずれかに記載の方法。
［１．６．１］　標的遺伝子領域が標的遺伝子のプロモーター領域である、１．６に記載の方法。
［１．６．１．１］標的遺伝子ががん抑制遺伝子である、１．６．１に記載の方法。
［１．６．１．１．１］　がん抑制遺伝子がｐ１６、ｐ５３又はＥ－ｃａｄｈｅｒｉｎである、１．６．１．１に記載の方法。
［１．７．１］　ＴＥＴ１活性ドメインが、配列番号１で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、１．～１．６．１．１．１のいずれかに記載の方法。
［１．７．１．１］　ＴＥＴ１活性ドメインの改変体が、１．７．１に記載のポリペプチドと同一性が８０％以上のポリペプチドからなる、１．７．１に記載の方法。

［１．７．１．２］　ＴＥＴ１活性ドメインの改変体が、１．７．１に記載のポリペプチドと同一性が８５％以上のポリペプチドからなる、１．７．１に記載の方法。
［１．７．１．３］　ＴＥＴ１活性ドメインの改変体が、１．７．１に記載のポリペプチドと同一性が９０％以上のポリペプチドからなる、１．７．１に記載の方法。
［１．７．１．４］　ＴＥＴ１活性ドメインの改変体が、１．７．１に記載のポリペプチドと同一性が９５％以上のポリペプチドからなる、１．７．１に記載の方法。
［１．７．１．５］　ＴＥＴ１活性ドメインの改変体が、１．７．１に記載のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、１．７．１に記載の方法。
［１．７．２］　ＴＥＴ１活性ドメインが、配列番号２で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、１．～１．６．１．１．１のいずれかに記載の方法。
［１．７．２．１］　ＴＥＴ１活性ドメインの改変体が、１．７．２に記載のポリペプチドと同一性が８０％以上のポリペプチドからなる、１．７．２に記載の方法。
［１．７．２．２］　ＴＥＴ１活性ドメインの改変体が、１．７．２に記載のポリペプチドと同一性が８５％以上のポリペプチドからなる、１．７．２に記載の方法。
［１．７．２．３］　ＴＥＴ１活性ドメインの改変体が、１．７．２に記載のポリペプチドと同一性が９０％以上のポリペプチドからなる、１．７．２に記載の方法。
［１．７．２．４］　ＴＥＴ１活性ドメインの改変体が、１．７．２に記載のポリペプチドと同一性が９５％以上のポリペプチドからなる、１．７．２に記載の方法。
［１．７．２．５］　ＴＥＴ１活性ドメインの改変体が、１．７．２に記載のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、１．７．２に記載の方法。
［１．７．３］　ＴＥＴ１活性ドメインが、配列番号３で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、１．～１．６．１．１．１のいずれかに記載の方法。
［１．７．３．１］　ＴＥＴ１活性ドメインの改変体が、１．７．３に記載のポリペプチドと同一性が８０％以上のポリペプチドからなる、１．７．３に記載の方法。
［１．７．３．２］　ＴＥＴ１活性ドメインの改変体が、１．７．３に記載のポリペプチドと同一性が８５％以上のポリペプチドからなる、１．７．３に記載の方法。
［１．７．３．３］　ＴＥＴ１活性ドメインの改変体が、１．７．３に記載のポリペプチドと同一性が９０％以上のポリペプチドからなる、１．７．３に記載の方法。
［１．７．３．４］　ＴＥＴ１活性ドメインの改変体が、１．７．３に記載のポリペプチドと同一性が９５％以上のポリペプチドからなる、１．７．３に記載の方法。
［１．７．３．５］　ＴＥＴ１活性ドメインの改変体が、１．７．３に記載のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、１．７．３に記載の方法。
［１．８．１］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインが、配列番号４で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、１．～１．７．３．５のいずれかに記載の方法。
［１．８．１．１］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体が、１．８．１に記載のポリペプチドと同一性が８０％以上のポリペプチドからなる、１．８．１に記載の方法。
［１．８．１．２］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体が、１．８．１に記載のポリペプチドと同一性が８５％以上のポリペプチドからなる、１．８．１に記載の方法。
［１．８．１．３］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体が、１．８．１に記載のポリペプチドと同一性が９０％以上のポリペプチドからなる、１．８．１に記載の方法。
［１．８．１．４］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体が、１．８．１に記載のポリペプチドと同一性が９５％以上のポリペプチドからなる、１．８．１に記載の方法。
［１．８．１．５］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体が、１．８．１に記載のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、１．８．１に記載の方法。
［１．８．２］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインが、配列番号５で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、１．～１．７．３．５のいずれかに記載の方法。

［１．８．２．１］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体が、１．８．２に記載のポリペプチドと同一性が８０％以上のポリペプチドからなる、１．８．２に記載の方法。
［１．８．２．２］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体が、１．８．２に記載のポリペプチドと同一性が８５％以上のポリペプチドからなる、１．８．２に記載の方法。
［１．８．２．３］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体が、１．８．２に記載のポリペプチドと同一性が９０％以上のポリペプチドからなる、１．８．２に記載の方法。
［１．８．２．４］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体が、１．８．２に記載のポリペプチドと同一性が９５％以上のポリペプチドからなる、１．８．２に記載の方法。
［１．８．２．５］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体が、１．８．２に記載のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、１．８．２に記載の方法。
［１．８．３］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインが、配列番号６で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、１．～１．７．３．５のいずれかに記載の方法。
［１．８．３．１］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体が、１．８．３に記載のポリペプチドと同一性が８０％以上のポリペプチドからなる、１．８．３に記載の方法。
［１．８．３．２］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体が、１．８．３に記載のポリペプチドと同一性が８５％以上のポリペプチドからなる、１．８．３に記載の方法。
［１．８．３．３］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体が、１．８．３に記載のポリペプチドと同一性が９０％以上のポリペプチドからなる、１．８．３に記載の方法。
［１．８．３．４］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体が、１．８．３に記載のポリペプチドと同一性が９５％以上のポリペプチドからなる、１．８．３に記載の方法。
［１．８．３．５］　ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体が、１．８．３に記載のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、１．８．３に記載の方法。
［１．９］　ＴＥＴ１活性ドメイン又はその改変体を含む融合ポリペプチドが、それぞれＴＥＴ１及びその改変体である、１．～１．６．１．１．１、及び１．８．１～１．８．３．５のいずれかに記載の方法。
［１．９．１］　ＴＥＴ１が、配列番号７で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、１．９に記載の方法。
［１．９．１．１］　ＴＥＴ１の改変体が、１．９．１に記載のポリペプチドと同一性が８０％以上のポリペプチドからなる、１．９．１に記載の方法。
［１．９．１．２］　ＴＥＴ１の改変体が、１．９．１に記載のポリペプチドと同一性が８５％以上のポリペプチドからなる、１．９．１に記載の方法。
［１．９．１．３］　ＴＥＴ１の改変体が、１．９．１に記載のポリペプチドと同一性が９０％以上のポリペプチドからなる、１．９．１に記載の方法。
［１．９．１．４］　ＴＥＴ１の改変体が、１．９．１に記載のポリペプチドと同一性が９５％以上のポリペプチドからなる、１．９．１に記載の方法。
［１．９．１．５］　ＴＥＴ１の改変体が、１．９．１に記載のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、１．９．１に記載の方法。
［１．９．２］　ＴＥＴ１が、配列番号８で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、１．９に記載の方法。
［１．９．２．１］　ＴＥＴ１の改変体が、１．９．２に記載のポリペプチドと同一性が８０％以上のポリペプチドからなる、１．９．２に記載の方法。
［１．９．２．２］　ＴＥＴ１の改変体が、１．９．２に記載のポリペプチドと同一性が８５％以上のポリペプチドからなる、１．９．２に記載の方法。
［１．９．２．３］　ＴＥＴ１の改変体が、１．９．２に記載のポリペプチドと同一性が９０％以上のポリペプチドからなる、１．９．２に記載の方法。
［１．９．２．４］　ＴＥＴ１の改変体が、１．９．２に記載のポリペプチドと同一性が９５％以上のポリペプチドからなる、１．９．２に記載の方法。

［１．９．２．５］　ＴＥＴ１の改変体が、１．９．２に記載のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、１．９．２に記載の方法。
［１．９．３］　ＴＥＴ１が、配列番号９で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、１．９に記載の方法。
［１．９．３．１］　ＴＥＴ１の改変体が、１．９．３に記載のポリペプチドと同一性が８０％以上のポリペプチドからなる、１．９．３に記載の方法。
［１．９．３．２］　ＴＥＴ１の改変体が、１．９．３に記載のポリペプチドと同一性が８５％以上のポリペプチドからなる、１．９．３に記載の方法。
［１．９．３．３］　ＴＥＴ１の改変体が、１．９．３に記載のポリペプチドと同一性が９０％以上のポリペプチドからなる、１．９．３に記載の方法。
［１．９．３．４］　ＴＥＴ１の改変体が、１．９．３に記載のポリペプチドと同一性が９５％以上のポリペプチドからなる、１．９．３に記載の方法。
［１．９．３．５］　ＴＥＴ１の改変体が、１．９．３に記載のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、１．９．３に記載の方法。
［１．１０］　ＰＲＤＭ１４活性ドメイン又はその改変体を含む融合ポリペプチドが、それぞれＰＲＤＭ１４及びその改変体である、１．～１．７．３．５、及び１．９～１．９．３．５のいずれかに記載の方法。
［１．１０．１］　ＰＲＤＭ１４が、配列番号１０で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、１．１０に記載の方法。
［１．１０．１．１］　ＰＲＤＭ１４の改変体が、１．１０．１に記載のポリペプチドと同一性が８０％以上のポリペプチドからなる、１．１０．１に記載の方法。
［１．１０．１．２］　ＰＲＤＭ１４の改変体が、１．１０．１に記載のポリペプチドと同一性が８５％以上のポリペプチドからなる、１．１０．１に記載の方法。
［１．１０．１．３］　ＰＲＤＭ１４の改変体が、１．１０．１に記載のポリペプチドと同一性が９０％以上のポリペプチドからなる、１．１０．１に記載の方法。
［１．１０．１．４］　ＰＲＤＭ１４の改変体が、１．１０．１に記載のポリペプチドと同一性が９５％以上のポリペプチドからなる、１．１０．１に記載の方法。
［１．１０．１．５］　ＰＲＤＭ１４の改変体が、１．１０．１に記載のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、１．１０．１に記載の方法。
［１．１０．２］　ＰＲＤＭ１４が、配列番号１１で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、１．１０に記載の方法。
［１．１０．２．１］　ＰＲＤＭ１４の改変体が、１．１０．２に記載のポリペプチドと同一性が８０％以上のポリペプチドからなる、１．１０．２に記載の方法。
［１．１０．２．２］　ＰＲＤＭ１４の改変体が、１．１０．２に記載のポリペプチドと同一性が８５％以上のポリペプチドからなる、１．１０．２に記載の方法。
［１．１０．２．３］　ＰＲＤＭ１４の改変体が、１．１０．２に記載のポリペプチドと同一性が９０％以上のポリペプチドからなる、１．１０．２に記載の方法。
［１．１０．２．４］　ＰＲＤＭ１４の改変体が、１．１０．２に記載のポリペプチドと同一性が９５％以上のポリペプチドからなる、１．１０．２に記載の方法。
［１．１０．２．５］　ＰＲＤＭ１４の改変体が、１．１０．２に記載のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、１．１０．２に記載の方法。
［１．１０．３］　ＰＲＤＭ１４が、配列番号１２で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、１．１０に記載の方法。
［１．１０．３．１］　ＰＲＤＭ１４の改変体が、１．１０．３に記載のポリペプチドと同一性が８０％以上のポリペプチドからなる、１．１０．３に記載の方法。
［１．１０．３．２］　ＰＲＤＭ１４の改変体が、１．１０．３に記載のポリペプチドと

同一性が８５％以上のポリペプチドからなる、１．１０．３に記載の方法。
［１．１０．３．３］　ＰＲＤＭ１４の改変体が、１．１０．３に記載のポリペプチドと同一性が９０％以上のポリペプチドからなる、１．１０．３に記載の方法。
［１．１０．３．４］　ＰＲＤＭ１４の改変体が、１．１０．３に記載のポリペプチドと同一性が９５％以上のポリペプチドからなる、１．１０．３に記載の方法。
［１．１０．３．５］　ＰＲＤＭ１４の改変体が、１．１０．３に記載のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、１．１０．３に記載の方法。
【００１０】
［２．治療方法］
［２．］　ヒトを治療する方法であって、
（１）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び
ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド
の細胞内含量を増加させる工程
を含む方法。
［２．１．１］　エピゲノム変異を修復するＤＮＡメチル化の異常に起因する疾患を治療する方法である、２．に記載の方法。
［２．１．１．１］　がんを治療する方法である、２．１．１に記載の方法。
［２．１．１．２］　神経精神疾患を治療する方法である、２．１．１に記載の方法。
［２．１．１．２．１］　神経精神疾患が、躁うつ病又は反復うつ病である、２．１．１．２に記載の方法。
［２．２］　前記工程（１）が、１．１．１～１．１０．３．５のいずれかに記載の工程（１）である、２．～２．１．１．２．１のいずれかに記載の方法。
【００１１】
［３．ｉＰＳ細胞製造方法］
［３Ａ．］　核初期化物質を用いて体細胞からｉＰＳ細胞を製造する方法であって、
（１）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び
ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド
の細胞内含量を増加させる工程
を含む方法。
［３Ａ．１．１］　前記体細胞がヒト細胞である、３Ａ．に記載の方法。
［３Ａ．１．２］　前記体細胞がマウス細胞である、３Ａ．に記載の方法。
［３Ａ．１．３］　前記体細胞がイヌ細胞である、３Ａ．に記載の方法。
［３Ａ．２］　前記工程（１）が、１．１．１～１．１０．３．５のいずれかに記載の工程（１）である、３Ａ．～３Ａ．１．３のいずれかに記載の方法。
［３Ａ．３］　前記工程（１）を体細胞に対して行う、３Ａ～３Ａ．２のいずれかに記載の方法。
［３Ａ．３．１］　前記工程（１）が、
（１Ａ－１）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び
ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド
の体細胞内含量を増加させ、かつ
核初期化物質を体細胞に接触させることにより体細胞をｉＰＳ細胞に変換する工程
である、３Ａ．３に記載の方法。
［３Ａ．３．２］　前記工程（１）が、
（１Ａ－１）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び
ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド

の体細胞内含量を増加させ、かつ
核初期化物質を体細胞に接触させることにより体細胞を初期化完成度の高いｉＰＳ細胞に変換する工程である、３Ａ．３に記載の方法。
［３Ａ．４］　（Ｉ）核初期化物質を体細胞に接触させることにより体細胞を高品質ｉＰＳ細胞、低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に変換する工程；
（ＩＩ）工程（Ｉ）で得られた細胞の評価を行い、高品質ｉＰＳ細胞、低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に選別する工程；及び
（ＩＩＩ）工程（ＩＩ）で選別された低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に対して、工程（１）を行う工程
を含む、３Ａ．～３Ａ．２のいずれかに記載の方法。
［３Ａ．４．１］　前記工程（１）が、
（１Ａ－２）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び
ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド
の低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞における細胞内含量を増加させ、かつ
核初期化物質を低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に接触させる工程
である、３Ａ．４に記載の方法。
［３Ａ．４．２］　前記工程（Ｉ）が、３Ａ．３．１に記載の工程（１Ａ－１）である、３Ａ．４に記載の方法。
［３Ａ．４．３］　工程（ＩＩＩ）における細胞の評価を、ＧＴＬ２遺伝子のＤＮＡ発現又はＤＮＡメチル化をＥＳ細胞との間で比較することにより低品質ｉＰＳ細胞を選別する工程、及び内在性のＮＡＮＯＧ遺伝子の発現をＥＳ細胞との間で比較することによりｐｒｅ－ｉＰＳ細胞を選別する工程を含む方法により行う、３Ａ．４～３Ａ．４．２のいずれかに記載の方法。
［３Ｂ．］　ｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に対して工程（１）を行うことにより、ｉＰＳ細胞を得る方法。
［３Ｂ．１］　前記工程（１）が、
（１Ｂ）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び
ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド
のｐｒｅ－ｉＰＳ細胞内含量を増加させ、かつ
核初期化物質をｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に接触させる工程
である、３Ｂ．に記載の方法。
［３Ｃ．］　低品質ｉＰＳ細胞に対して工程（１）を行うことにより、高品質ｉＰＳ細胞を得る方法。
［３Ｃ．１］　前記工程（１）が、
（１Ｃ）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び
ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド
の低品質ｉＰＳ細胞内含量を増加させ、かつ
核初期化物質を低品質ｉＰＳ細胞に接触させる工程
である、３Ｃ．に記載の方法。
［３．１］核初期化物質が、ＯＣＴ４、ＳＯＸ２、ＫＬＦ４及びＭＹＣからなる群より選択される少なくとも１種である、３Ａ．～３Ｃ．１のいずれかに記載の方法。
［３．２］核初期化物質が、ＯＣＴ４、ＳＯＸ２及びＫＬＦ４からなる群より選択される少なくとも１種である、３Ａ．～３Ｃ．１のいずれかに記載の方法。
［３．３］核初期化物質が、ＯＣＴ４及びＳＯＸ２からなる群より選択される少なくとも１種である、３Ａ．～３Ｃ．１のいずれかに記載の方法。
［３．４］核初期化物質が、ＯＣＴ４である、３Ａ．～３Ｃ．１のいずれかに記載の方法。

【００１２】
［４．ポリペプチド含有組成物］
［４．］　（Ａ－１）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び
（Ａ－２）ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド
を含有する、組成物。
［４．１］　ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドが、１．３．１～１．１０．３．５のいずれかに記載のポリペプチドである、４．に記載の組成物。
［４．２］　ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドが、１．３．１～１．１０．３．５のいずれかに記載のポリペプチドである、４．又は４．１に記載の組成物。
［４．３．１］　ＤＮＡ脱メチル化誘導剤として用いられる、４～４．２のいずれかに記載の組成物。
［４．３．２］　医薬として用いられる、４～４．２のいずれかに記載の組成物。
［４．３．２．１］　エピゲノム変異を修復するＤＮＡメチル化の異常に起因する疾患に対する治療剤として用いられる、４．３．２に記載の組成物。
［４．３．２．２］　抗がん剤として用いられる、４．３．２に記載の組成物。
［４．３．２．３］　神経精神疾患治療剤として用いられる、４．３．２に記載の組成物。
［４．３．２．４］　躁うつ病治療剤又は反復うつ病治療剤として用いられる、４．３．２に記載の組成物。
［４．３．３］　ｉＰＳ細胞の品質改善剤として用いられる、４～４．２のいずれかに記載の組成物。
［４．３．４］　ｉＰＳ細胞の初期化完成度向上剤として用いられる、４～４．２のいずれかに記載の組成物。
【００１３】
［５．ポリヌクレオチド含有組成物］
［５．］　（α－１）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び
（α－２）ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
を含有する、組成物。
［５．１］　ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドが、１．３．１～１．１０．３．５のいずれかに記載のポリペプチドである、５．に記載の組成物。
［５．２］　ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドが、１．３．１～１．１０．３．５のいずれかに記載のポリペプチドである、５．又は５．１に記載の組成物。
［５．３．１］　ポリヌクレオチドがＤＮＡである、５～５．２のいずれかに記載の組成物。
［５．３．２］　ポリヌクレオチドがＲＮＡである、５～５．２のいずれかに記載の組成物。
［５．４．１］　ＤＮＡ脱メチル化誘導剤として用いられる、５～５．３．２のいずれかに記載の組成物。
［５．４．２］　医薬として用いられる、５～５．３．２のいずれかに記載の組成物。
［５．４．２．１］　エピゲノム変異を修復するＤＮＡメチル化の異常に起因する疾患に対する治療剤として用いられる、５．４．２に記載の組成物。
［５．４．２．２］　抗がん剤として用いられる、５．４．２に記載の組成物。

［５．４．２．３］　神経精神疾患治療剤として用いられる、５．４．２に記載の組成物。
［５．４．２．４］　躁うつ病治療剤又は反復うつ病治療剤として用いられる、５．４．２に記載の組成物。
［５．４．３］　ｉＰＳ細胞の品質改善剤として用いられる、５～５．３．２のいずれかに記載の組成物。
［５．４．４］　ｉＰＳ細胞の初期化完成度向上剤として用いられる、５～５．３．２のいずれかに記載の組成物。
【００１４】
［６．発現ベクター含有組成物］
［６．］　（ａ－１）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター；及び
（ａ－２）ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター
を含有する、組成物。
［６．１］　ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドが、１．３．１～１．１０．３．５のいずれかに記載のポリペプチドである、６．に記載の組成物。
［６．２］　ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドが、１．３．１～１．１０．２．５のいずれかに記載のポリペプチドである、６．又は６．１に記載の組成物。
［６．３．１］　ポリヌクレオチドがＤＮＡである、６～６．２のいずれかに記載の組成物。
［６．３．２］　ポリヌクレオチドがＲＮＡである、６～６．２のいずれかに記載の組成物。
［６．４．１］　ＤＮＡ脱メチル化誘導剤として用いられる、６～６．３．２のいずれかに記載の組成物。
［６．４．２］　医薬として用いられる、６～６．３．２のいずれかに記載の組成物。
［６．４．２．１］　エピゲノム変異を修復するＤＮＡメチル化の異常に起因する疾患に対する治療剤として用いられる、６．４．２に記載の組成物。
［６．４．２．２］　抗がん剤として用いられる、６．４．２に記載の組成物。
［６．４．２．３］　神経精神疾患治療剤として用いられる、６．４．２に記載の組成物。
［６．４．２．４］　双極性障害（躁うつ病）治療剤、反復うつ病治療剤、統合失調症として用いられる、６．４．２に記載の組成物。
［６．４．３］　ｉＰＳ細胞の品質改善剤として用いられる、６～６．３．２のいずれかに記載の組成物。
［６．４．４］　ｉＰＳ細胞の初期化完成度向上剤として用いられる、６～６．３．２のいずれかに記載の組成物。
【００１５】
［７．共発現ベクター］
［７．］　（ｂ）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び
ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
を含む共発現ベクター。
［７．１］　ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドが、１．３．１～１．１０．３．５のいずれかに記載のポリペプチドである、７．に記載の共発現ベクター。
［７．２］　ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペ

プチドが、１．３．１～１．１０．３．５のいずれかに記載のポリペプチドである、７．又は７．１に記載の共発現ベクター。
［７．３．１］　ポリヌクレオチドがＤＮＡである、７～７．２のいずれかに記載の共発現ベクター。
［７．３．２］　ポリヌクレオチドがＲＮＡである、７～７．２のいずれかに記載の共発現ベクター。
［７．４．１］　ＤＮＡ脱メチル化誘導剤として用いられる、７～７．３．２のいずれかに記載の共発現ベクター。
［７．４．２］　医薬として用いられる、７～７．３．２のいずれかに記載の共発現ベクター。
［７．４．２．１］　エピゲノム変異を修復するＤＮＡメチル化の異常に起因する疾患に対する治療剤として用いられる、７．４．２に記載の共発現ベクター。
［７．４．２．２］　抗がん剤として用いられる、７．４．２に記載の共発現ベクター。
［７．４．２．３］　神経精神疾患治療剤として用いられる、７．４．２に記載の共発現ベクター。
［７．４．２．４］　躁うつ病治療剤又は反復うつ病治療剤として用いられる、７．４．２に記載の共発現ベクター。
［７．４．３］　ｉＰＳ細胞の品質改善剤として用いられる、７～７．３．２のいずれかに記載の共発現ベクター。
［７．４．４］　ｉＰＳ細胞の初期化完成度向上剤として用いられる、７～７．３．２のいずれかに記載の共発現ベクター。

【発明の効果】

【００１６】

本発明のＤＮＡ脱メチル化誘導方法を利用することにより、人為的にＤＮＡ脱メチル化を行うことができる。また、このＤＮＡ脱メチル化誘導方法をｉＰＳ細胞の製造方法に適用することにより、品質の向上したｉＰＳ細胞を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【００１７】

【図１】実施例１．の結果を示す図面である。なお、上図はＬＩＮＥ－１を示している。
【図２】実施例２．の結果を示す、ＰＲＤＭ１４高発現ＥＳ細胞及びＤｎｍｔｓ　ＴＫＯ　ＥＳ細胞で遺伝子発現上昇が観察された遺伝子のＶｅｎｎ　ｄｉａｇｒａｍである。
【図３】メチル化シトシンのヒドロキシル化を引き金としたDNA脱メチル化経路を示した図面である。
【図４】実施例３．の結果を示す図面である。
【図５】実施例４．の結果を示す図面である。
【図６】山中ファクター（ＯＣＴ４、ＳＯＸ２、ＫＬＦ４、ＭＹＣ：ＯＳＫＭ）を繊維芽細胞に導入することでｉＰＳ細胞を樹立する過程において、リプログラミングが不完全なｐｒｅ－ｉＰＳ細胞や低品質ｉＰＳ細胞が出現する経路を示した図面である。
【図７】実施例５．の結果を示す図面である。
【図８】実施例６．の結果を示す図面である。縦軸はＬＩＮＥ－１領域内ＣＣＧＧ配列のメチル化量を、横軸はそれぞれの細胞名を表している。
【図９】実施例７．の結果を示す図面である。
【図１０】実施例７．の結果を示す図面である。
【図１１】実施例７．の結果を示す図面である。
【図１２】実施例８．の結果を示す図面である。
【図１３】実施例９．の結果を示す図面である。
【図１４】実施例９．の結果を示す図面である。
【図１５】実施例９．の結果を示す図面である。

【発明を実施するための形態】

【００１８】

［１．ＤＮＡ脱メチル化誘導方法］
本発明のＤＮＡ脱メチル化誘導方法は、細胞内においてＤＮＡ脱メチル化を誘導する方法であって、
（１）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド（以下、「ＴＥＴ１活性ドメイン等」ということがある。）；及び
ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド（以下、「ＰＲＤＭ１４活性ドメイン等」ということがある。）
の細胞内含量を増加させる工程
を含む、方法である。

【００１９】
細胞の由来は特に限定されないが、例えばヒト細胞、マウス細胞、イヌ細胞、等が挙げられる。

【００２０】
細胞は培養細胞であってもよく、生体内の細胞であってもよい。

【００２１】
培養細胞は、体細胞であってもよく、幹細胞等の未分化の細胞であってもよい。

【００２２】
体細胞としては、特に限定されないが、例えば、角質化する上皮細胞、湿潤かつ多層構造をとり境界面を構成する上皮細胞（粘膜上皮細胞）、外分泌腺に専門化した上皮細胞、ホルモン分泌用に専門化した細胞、消化管、外分泌腺及び尿生殖路の吸収上皮細胞、代謝と貯蔵用に専門化した細胞、主に境界面を構成し、肺、消化管、外分泌腺及び尿生殖路の内腔に面する上皮細胞、体内で閉じた管腔の内面を形成している上皮細胞、運搬機能をもつ繊毛のある細胞、細胞外マトリックスの分泌用に特化した細胞、収縮性細胞、血液細胞、免疫細胞、感覚に関与する細胞、自律神経系のニューロン、感覚器官及び抹消ニューロンの支持細胞、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞、レンズ（水晶体）細胞、色素細胞、並びに哺育細胞等が挙げられる。

【００２３】
角質化する上皮細胞としては、特に限定されないが、例えば、表皮の角化細胞、爪の角化細胞、毛幹の細胞、毛根鞘細胞等が挙げられる。

【００２４】
湿潤かつ多層構造をとり境界面を構成する上皮細胞（粘膜上皮細胞）としては、特に限定されないが、例えば、表面が重層扁平上皮である上皮細胞（角膜、舌、口腔、食道、肛門、遠位尿道及び膣等の上皮細胞）等が挙げられる。

【００２５】
外分泌腺に専門化した上皮細胞としては、特に限定されないが、例えば、だ液腺細胞、舌のフォンエブナー腺細胞、乳腺細胞、涙腺細胞、耳動腺細胞、エクリン汗腺細胞、アポクリン汗腺細胞等が挙げられる。

【００２６】
ホルモン分泌用に専門化した細胞としては、特に限定されないが、例えば、脳下垂体前葉細胞、脳下垂体中葉細胞、脳下垂体後葉細胞、消化管及び気道の細胞、甲状腺の細胞、副甲状腺（上皮小体）細胞、副腎の細胞、生殖腺細胞、腎臓の傍糸球体装置の細胞等が挙げられる。

【００２７】
消化管、外分泌腺及び尿生殖路の吸収上皮細胞としては、特に限定されないが、例えば、腸の刷子縁細胞、外分泌腺の線条管細胞、胆嚢上皮細胞等が挙げられる。

【００２８】
代謝と貯蔵用に専門化した細胞としては、特に限定されないが、例えば、肝細胞、脂肪細胞等が挙げられる。

【００２９】
主に境界面を構成し、肺、消化管、外分泌腺及び尿生殖路の内腔に面する上皮細胞とし

ては、特に限定されないが、例えば、Ｉ型肺胞細胞、膵臓導管細胞、腺房中心細胞、汗腺、だ液腺、乳腺等の導管細胞、腎糸球体の壁細胞、腎糸球体のタコ足細胞等が挙げられる。

【００３０】

体内で閉じた管腔の内面を形成している上皮細胞としては、特に限定されないが、例えば、血管とリンパ管の内皮細胞、滑液細胞、漿膜細胞等が挙げられる。

【００３１】

運搬機能をもつ繊毛のある細胞としては、特に限定されないが、例えば、気道の上皮細胞、卵管と子宮内膜の上皮細胞、中枢神経系の細胞等が挙げられる。

【００３２】

細胞外マトリックスの分泌用に特化した細胞としては、特に限定されないが、例えば、造エナメル細胞、繊維芽細胞、毛細血管の周細胞、椎間板の髄核細胞、セメント芽細胞、象牙芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、目のガラス体の形成細胞等が挙げられる。

【００３３】

収縮性細胞としては、特に限定されないが、例えば、骨格筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、筋上皮細胞等が挙げられる。

【００３４】

血液細胞としては、特に限定されないが、例えば、赤血球、巨核球、マクロファージと類縁細胞、好中球、好酸球、好塩基球等が挙げられる。

【００３５】

免疫細胞としては、特に限定されないが、例えば、肥満細胞（マスト細胞）、Ｔリンパ球（Ｔ細胞）、Ｂリンパ球、Ｋ（キラー）細胞等が挙げられる。

【００３６】

感覚に関与する細胞としては、特に限定されないが、例えば、桿体細胞、錐体細胞、コルチ器官の内側有毛細胞、コルチ器官の外側有毛細胞、ＩＩ型味蕾細胞、嗅覚神経細胞、嗅上皮の基底細胞、頚動脈小体の細胞、表皮のメルケル細胞、触覚用に特殊化した一次感覚ニューロン、温度感覚用に専門化した一次感覚ニューロン、痛覚用に特殊化した一次感覚ニューロン、深部一次感覚ニューロン等が挙げられる。

【００３７】

感覚器官及び抹消ニューロンの支持細胞としては、特に限定されないが、例えば、コルチ器官の支持細胞、前庭の支持細胞、味蕾の支持細胞、嗅上皮の支持細胞、シュワン細胞、随伴細胞、腸管のグリア細胞等が挙げられる。

【００３８】

体細胞として、好ましくはＴ細胞が用いられる。Ｔ細胞はＣＤ４陽性若しくはＣＤ８陽性、又はＣＤ４／ＣＤ８両陽性であってもよい。Ｔ細胞は、特に限定されないが、例えば、脾臓、リンパ節、末梢血又は臍帯血等から、公知の方法により単離できる。公知の単離方法としては、特に限定されないが、例えば、セルソーターを用い、ＣＤ４、ＣＤ８及びＣＤ３等の細胞表面マーカーに対する抗体を利用してフローサイトメトリーにより単離する方法等が挙げられる。

【００３９】

体細胞には通常ＴＥＴ１が発現していない。本発明者は、ＴＥＴ１活性を介したＤＮＡ脱メチル化が、ＰＲＤＭ１４活性により促進されることを見出した。かかる新規の知見に基づいて本発明者は、体細胞においてはＴＥＴ１活性ドメイン等及びＰＲＤＭ１４活性ドメイン等の細胞内含量を同時に増加させることによりＤＮＡ脱メチル化が顕著に促進されることを見出した。

【００４０】

生体内の細胞は、正常な細胞であってもよく、異常な細胞であってもよい。異常な細胞は特に限定されないが、例えば、ＤＮＡメチル化の異常を有する細胞等が挙げられる。そのような細胞に本発明を適用してＤＮＡ脱メチル化を誘導することによって、ＤＮＡメチル化を正常な状態に近づけることができる。ＤＮＡメチル化の異常を有する細胞としては

、特に限定されないが、例えば、がん細胞、精神神経疾患の細胞、エピゲノム変異を修復するＤＮＡメチル化の異常を有する細胞等が挙げられる。

【００４１】

工程（１）の具体例としては、例えば、次のような工程が挙げられる。

（１Ａ）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び

ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド

を細胞内に導入する工程。

（１Ｂ）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び

ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

を細胞内に導入する工程。

【００４２】

工程（１Ｂ）の具体例としては、例えば、

（１ｂ）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び

ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

を細胞内で過剰発現させる工程が挙げられる。

【００４３】

工程（１Ａ）において、後述する４．ポリペプチド含有組成物を用いることができる。工程（１Ｂ）において、５．ポリヌクレオチド含有組成物、６．発現ベクター含有組成物、及び７．共発現ベクターを用いることができる。また、工程（１ｂ）において、６．発現ベクター含有組成物、及び７．共発現ベクターを用いることができる。

【００４４】

ポリヌクレオチドの過剰発現は、一過的であってもよいし、恒常的であってもよい。一過的に過剰発現させる場合は、特に限定されないが、発現系として、ＣＭＶプロモーター及びＣＡＧＧＳプロモーターを用いることができる。恒常的に過剰発現させる場合は、特に限定されないが、発現系として、ＣＭＶプロモーター及びＣＡＧＧＳプロモーターを用いることができる。

【００４５】

ＴＥＴ１は、急性骨髄性白血病（ａｃｕｔｅ　ｍｙｅｌｏｉｄ　ｌｅｕｋｅｍｉａ）において、Ｈ３Ｋ４メチル化酵素ＭＬＬ（ｍｉｘｅｄ　ｌｉｎｅａｇｅ　ｌｅｕｋｅｍｉａ）の融合パートナーとして発見されたタンパク質である。ＴＥＴ１は、特に限定されないが、ヒト由来、マウス由来、イヌ、ラット由来のものが挙げられる。ヒト由来のＴＥＴ１としては、例えば、配列番号７で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。マウス由来のＴＥＴ１としては、例えば、配列番号８で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。イヌ由来のＴＥＴ１としては、例えば、配列番号９で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。ラット由来のＴＥＴ１としては、例えば、配列番号１３で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。

【００４６】

ＴＥＴ１活性ドメインとは、ＴＥＴ１を構成するポリペプチドのうち、ＴＥＴ１活性を担う領域を含む部分ポリペプチドをいう。例えば、ヒト由来のＴＥＴ１の場合、ＴＥＴ１活性を担う領域とは、配列番号７において１４１８～２１３６番目のアミノ酸配列からなる領域をいう。マウス由来のＴＥＴ１の場合、ＴＥＴ１活性を担う領域とは、配列番号８において１３６７～２０３９番目のアミノ酸配列からなる領域をいう。イヌ由来のＴＥＴ１の場合、ＴＥＴ１活性を担う領域とは、配列番号９において１４１９～２１３７番目のアミノ酸配列からなる領域をいう。

【００４７】

ＴＥＴ１活性ドメインは、ＴＥＴ１の中でＴＥＴ１活性を担う領域を取り囲んでいるアミノ酸又はポリペプチドであって、ＴＥＴ１活性とは無関係なものが付加したものであってもよい。そのようなＴＥＴ１活性ドメインは、例えばＴＥＴ１からＴＥＴ１活性を担う領域を含んだ部分ポリペプチドを切り出すこと等によって得ることができる。ＴＥＴ１活性ドメインは、好ましくはＣｐＧ　ｉｓｌａｎｄを認識するＣｘｘＣモチーフを欠いたＴＥＴ１の部分ポリペプチドである。ヒト由来ＴＥＴ１活性ドメインは、好ましくは、配列番号１で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである。マウス由来ＴＥＴ１活性ドメインは、好ましくは、配列番号２で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである。イヌ由来ＴＥＴ１活性ドメインは、好ましくは、配列番号３で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである。

【００４８】

ＴＥＴ１活性は、５－メチルシトシン（５ｍＣ）を５－ヒドロキシメチルシトシン（ｈｍＣ）へと変換する活性である。細胞としてＨＥＫ２９３細胞を用い、被検体を細胞内に導入することにより５ｍＣからｈｍＣへの変換が促進される場合は、かかる被検体がＴＥＴ１活性を有すると判定する。５ｍＣから５ｈｍｃへの変換は、５ｈｍＣに対する特異的抗体を用いたＤｏｔ－ｂｌｏｔ法により検出する。

【００４９】

ＴＥＴ１活性ドメインの改変体、並びにＴＥＴ１活性ドメインを含む融合ポリペプチド及びＴＥＴ１活性ドメインの改変体を含む融合ポリペプチド（以下、「ＴＥＴ１活性ドメイン改変体等」ということがある。）は、ＴＥＴ１活性を有する。

【００５０】

ＴＥＴ１活性ドメインの改変体は、特に限定されないが、ＴＥＴ１活性ドメインとアミノ酸の同一性が好ましくは８０％以上、８５％以上、９０％以上、又は９５％以上のポリペプチドからなる。左記においてアミノ酸の同一性は高ければ高いほど好ましい。あるいは、ＴＥＴ１活性ドメインの改変体は、ＴＥＴ１活性ドメインのアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加（以下、「改変等」ということがある。）されたアミノ酸配列からなる。

【００５１】

ＴＥＴ１活性ドメインにおいて、改変等を加えることによってＴＥＴ１活性が消失してしまうアミノ酸としては、１６７１番目、１６７３番目のもの等が知られている。ＴＥＴ１活性を有するＴＥＴ１活性ドメインの改変体は、例えば上記のようなアミノ酸への改変等を避けながら他のアミノ酸への改変等を加えることによって得ることができる。

【００５２】

ＴＥＴ１活性ドメイン又はその改変体を含む融合ポリペプチド（以下、「ＴＥＴ１活性ドメイン等融合ポリペプチド」ということがある。）は、ＴＥＴ１活性ドメイン等のＣ末端、Ｎ末端又は両端にアミノ酸又はポリペプチドがそれぞれ付加されてなるものである。特に限定されないが、例えばＴＥＴ１活性ドメイン等に、ＴＥＴ１活性とは無関係な機能を有するか、あるいは特にそれ自体何ら機能を有さず、かつＴＥＴ１活性ドメイン等のＴＥＴ１活性を阻害しないか、あるいは阻害したとしても著しく阻害しないアミノ酸又はポリペプチドが融合されてなるものである。ＴＥＴ１活性とは無関係な機能としては、特定の塩基配列又は核酸の三次構造に結合する機能等が挙げられる。そのような機能を有するポリペプチドとしては、特に限定されないが、例えば、メチル化シトシン結合ドメイン（ＭＢＤ）等が挙げられる。ＭＢＤとしては、特に限定されないが、例えば、ＭＥＣＰ２の部分配列が挙げられる。ヒト由来ＭＥＣＰ２の場合は、例えば、配列番号１４で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド等を挙げることができる。配列番号１４で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、ヒトＭＥＣＰ２の６２～１６９番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。そのような機能を有するポリペプチドが融合されてなるＴＥＴ１活性ドメイン等融合ポリペプチドを用いることによって、特定の塩基配列又は核酸の三次構造を有するポリヌクレオチド領域のみに選択的にＴＥＴ１活性を発現させることができる。ＴＥＴ１活性とは無関係な機能を有するか、あるいは特にそれ自体何ら機能を

有さず、かつＴＥＴ１活性ドメイン等のＴＥＴ１活性を阻害しないか、あるいは阻害したとしても著しく阻害しないポリペプチドの長さとしては、特に限定されないが、ＴＥＴ１活性ドメイン等の２０％以下、好ましくは１０％以下、より好ましくは５％以下等が挙げられる。

【００５３】

ＴＥＴ１活性ドメイン等融合ポリペプチドは、ＴＥＴ１そのものであってもよいし、ＴＥＴ１の改変体であってもよい。あるいは、ＴＥＴ１活性ドメイン等融合ポリペプチドは、ＴＥＴファミリーに属するタンパク質そのものであってもよいし、ＴＥＴファミリーに属するタンパク質の改変体であってもよい。ＴＥＴファミリーに属するタンパク質としては、ＴＥＴ１のほかにＴＥＴ２、ＴＥＴ３が挙げられる。ここでいう改変体とは、特に限定されないが、例えば、元となるポリペプチドとアミノ酸の同一性が好ましくは８０％以上、８５％以上、９０％以上、又は９５％以上のポリペプチドからなるものであってもよい。左記においてアミノ酸の同一性は高ければ高いほど好ましい。あるいは、ここでいう改変体は、元となるポリペプチドのアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が改変等されたアミノ酸配列からなるものであってもよい。

【００５４】

ＰＲＤＭ１４は、始原生殖細胞の形成及び初期分化に必須である転写制御因子として本発明者により発見されたタンパク質である。ＰＲＤＭ１４は、特に限定されないが、ヒト由来、マウス由来、イヌ由来、ラット由来のものが挙げられる。ヒト由来のＰＲＤＭ１４としては、例えば、配列番号１０で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。マウス由来のＰＲＤＭ１４としては、例えば、配列番号１１で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。イヌ由来のＰＲＤＭ１４としては、例えば、配列番号１２で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。

【００５５】

ＰＲＤＭ１４活性ドメインとは、ＰＲＤＭ１４を構成するポリペプチドのうち、ＰＲＤＭ１４活性を担う領域を含む部分ポリペプチドをいう。例えば、ヒト由来のＰＲＤＭ１４の場合、ＰＲＤＭ１４活性を担う領域とは、配列番号１０において２５４～５７１番目のアミノ酸配列からなる領域をいう。マウス由来のＰＲＤＭ１４の場合、ＰＲＤＭ１４活性を担う領域とは、配列番号１１において２４４～５６１番目のアミノ酸配列からなる領域をいう。イヌ由来のＰＲＤＭ１４の場合、ＰＲＤＭ１４活性を担う領域とは、配列番号１２において２５４～５７１番目のアミノ酸配列からなる領域をいう。

【００５６】

ＰＲＤＭ１４活性ドメインは、ＰＲＤＭ１４の中でＰＲＤＭ１４活性を担う領域を取り囲んでいるアミノ酸又はポリペプチドであって、ＰＲＤＭ１４活性とは無関係なものが付加したものであってもよい。そのようなＰＲＤＭ１４活性ドメインは、例えばＰＲＤＭ１４からＰＲＤＭ１４活性を担う領域を含んだ部分ポリペプチドを切り出すこと等によって得ることができる。ＰＲＤＭ１４活性ドメインは、例えば、Ｃ末端に存在するＺｉｎｇ ｆｉｎｇｅｒドメインを欠いたＰＲＤＭ１４の部分ポリペプチドである。Ｚｉｎｇ ｆｉｎｇｅｒドメインを欠く場合、ヒトＰＲＤＭ１４活性ドメインは、好ましくは、配列番号１０において２５４～４８８番目、より好ましくは２５４～３７３番目のアミノ酸配列からなる領域をいう。Ｚｉｎｇ ｆｉｎｇｅｒドメインを欠く場合、マウスＰＲＤＭ１４活性ドメインは、好ましくは、配列番号１１において２４４～４７８番目、より好ましくは２４４～３６３番目のアミノ酸配列からなる領域をいう。

【００５７】

ＰＲＤＭ１４活性は、ＴＥＴ１と相互作用し、ＴＥＴ１活性を促進する活性である。細胞としてＨＥＫ２９３細胞を用い、被検体をＴＥＴ１と共に細胞に導入した場合にＴＥＴ１活性を介したＤＮＡ脱メチル化が促進される場合は、かかる被検体がＰＲＤＭ１４活性を有すると判定する。

【００５８】

ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体、並びにＰＲＤＭ１４活性ドメインを含む融合ポリ

ペプチド及びＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体を含む融合ポリペプチド（以下、「ＰＲＤＭ１４活性ドメイン改変体等」ということがある。）は、ＰＲＤＭ１４活性を有する。

【００５９】

ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体は、特に限定されないが、ＰＲＤＭ１４活性ドメインとアミノ酸の同一性が好ましくは８０％以上、８５％以上、９０％以上、又は９５％以上のポリペプチドからなる。左記においてアミノ酸の同一性は高ければ高いほど好ましい。あるいは、ＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体は、ＰＲＤＭ１４活性ドメインのアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が改変等されたアミノ酸配列からなる。

【００６０】

ＰＲＤＭ１４活性を有するＰＲＤＭ１４活性ドメインの改変体は、ＰＲＤＭ１４活性ドメインにおいて、改変等を加えることによってＰＲＤＭ１４活性が消失してしまうアミノ酸への改変等を避けながら他のアミノ酸への改変等を加えることによって得ることができる。

【００６１】

ＰＲＤＭ１４活性ドメイン又はその改変体を含む融合ポリペプチド（以下、「ＰＲＤＭ１４活性ドメイン等融合ポリペプチド」ということがある。）は、ＰＲＤＭ１４活性ドメイン等のＣ末端、Ｎ末端又は両端にアミノ酸又はポリペプチドがそれぞれ付加されてなるものである。特に限定されないが、例えばＰＲＤＭ１４活性ドメイン等に、ＰＲＤＭ１４活性とは無関係な機能を有するか、あるいは特にそれ自体何ら機能を有さず、かつＰＲＤＭ１４活性ドメイン等のＰＲＤＭ１４活性を阻害しないか、あるいは阻害したとしても著しく阻害しないアミノ酸又はポリペプチドが融合されてなるものである。ＰＲＤＭ１４活性とは無関係な機能としては、特定の塩基配列又は核酸の三次構造に結合する機能等が挙げられる。そのような機能を有するポリペプチドとしては、特に限定されないが、例えば、標的遺伝子領域に結合するＤＮＡ結合ドメイン等が挙げられる。そのような機能を有するポリペプチドが融合されてなるＰＲＤＭ１４活性ドメイン等融合ポリペプチドを用いることによって、特定の塩基配列又は核酸の三次構造を有するポリヌクレオチド領域のみにおいて選択的にＴＥＴ１活性を促進させることができる。ＰＲＤＭ１４活性とは無関係な機能を有するか、あるいは特にそれ自体何ら機能を有さず、かつＰＲＤＭ１４活性ドメイン等のＰＲＤＭ１４活性を阻害しないか、あるいは阻害したとしても著しく阻害しないポリペプチドの長さとしては、特に限定されないが、ＰＲＤＭ１４活性ドメイン等の２０％以下、好ましくは１０％以下、より好ましくは５％以下等が挙げられる。

【００６２】

標的遺伝子領域は、標的遺伝子のプロモーター領域であってもよい。標的遺伝子は特に限定されないが、例えば、がん抑制遺伝子等が挙げられる。がん抑制遺伝子としては、特に限定されないが、例えば、ｐ１６、ｐ５３、Ｅ－ｃａｄｈｅｒｉｎ等が挙げられる。

【００６３】

標的遺伝子領域に結合するＤＮＡ結合ドメインとしては、特に限定されないが、例えば、転写因子のＤＮＡ結合ドメイン、又はそれを改変したものを用いることができる。そのような転写因子のＤＮＡ結合ドメインとしては、例えば、ｐ１６のプロモーター領域に結合することが知られているＣＴＣＦｓ等が挙げられる。

【００６４】

ＰＲＤＭ１４活性ドメイン等融合ポリペプチドは、ＰＲＤＭ１４そのものであってもよいし、ＰＲＤＭ１４の改変体であってもよい。ここでいうＰＲＤＭ１４の改変体とは、特に限定されないが、例えば、ＰＲＤＭ１４とアミノ酸の同一性が好ましくは８０％以上、８５％以上、９０％以上、又は９５％以上のポリペプチドからなるものであってもよい。左記においてアミノ酸の同一性は高ければ高いほど好ましい。あるいは、ここでいうＰＲＤＭ１４の改変体は、ＰＲＤＭ１４のアミノ酸配列において１若しくは数個のアミノ酸が改変等されたアミノ酸配列からなるものであってもよい。

【００６５】

［２．治療方法］

本発明の治療方法は、ヒトを治療する方法であって、
（１）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び
ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド
の細胞内含量を増加させる工程
を含む方法である。
【００６６】
工程（１）は、１．において説明したのと同様である。
【００６７】
本発明の治療方法は、好ましくは、エピゲノム変異を修復するＤＮＡメチル化の異常に起因する疾患を治療する方法である。より好ましくは、がん、又は神経精神疾患を治療する方法である。神経精神疾患としては、エピゲノム変異を修復するＤＮＡメチル化の異常に起因するものであれば特に限定されないが、例えば、双極性障害（躁うつ病）、反復うつ病、統合失調症等が挙げられる。
【００６８】
本発明の治療方法においては、後述する４．ポリペプチド含有組成物、５．ポリヌクレオチド含有組成物、６．発現ベクター含有組成物及び７．共発現ベクターを用いることができる。本発明の治療方法においては、４．～７．のそれぞれを、医薬目的での使用方法として後述されるところに従って使用することができる。
【００６９】
［３．ｉＰＳ細胞の製造方法］
本発明のｉＰＳ細胞の製造方法としては、
［３Ａ－１．］　核初期化物質を用いて体細胞からｉＰＳ細胞を製造する方法であって、
（１）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び
ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド
の細胞内含量を増加させる工程
を含む方法が挙げられる。
【００７０】
工程（１）は、１．において説明したのと同様である。
【００７１】
本発明のｉＰＳ細胞の製造方法は、
（ｉ）核初期化物質を体細胞に接触させることにより体細胞をｉＰＳ細胞に変換する工程を含む。かかる変換工程としては、公知のものを用いることができる。公知の変換工程としては、特に限定されないが、例えば、レトロウイルスを用いた感染、リポソーム法によるエピソーマルベクターの遺伝子導入等が挙げられる。
【００７２】
核初期化物質を用いて体細胞からｉＰＳ細胞を製造する工程においては、高品質ｉＰＳ細胞、低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞からなる群より選択される少なくとも１種の細胞が得られることが知られている。ここで、高品質ｉＰＳ細胞とはＤＮＡメチル化の異常がみられないｉＰＳ細胞であると定義される。ｐｒｅ－ｉＰＳ細胞とはリプログラミングが不完全な細胞であると定義される。ｐｒｅ－ｉＰＳ細胞におけるリプログラミング不全は、ドナー細胞のエピゲノム情報が未だ維持されていることが原因であると考えられている。ｐｒｅ－ｉＰＳ細胞とは、より詳細には、ｉＰＳ細胞作成過程で出現するｉＰＳ細胞様細胞であって、形態的にはｉＰＳ細胞に似ているが、外来遺伝子の発現抑制は起きておらず、また内在性の多能性関連遺伝子（Ｎａｎｏｇ、Ｏｃｔ３／４、Ｒｅｘ－１等）の発現上昇も観察されない細胞である。また、低品質ｉＰＳ細胞とはＤＮＡメチル化に異常がみられるｉＰＳ細胞であると定義される。低品質ｉＰＳ細胞とは、より詳細には、ＧＴＬ２遺伝子領域に異常なメチル化が付加されており、テトラプロイドキメラ胚の作製を行うことができないｉＰＳ細胞である。本発明者は、ｉＰＳ細胞の品質に悪影響を与え

ることが知られているＤＮＡメチル化の異常を、本発明のＤＮＡ脱メチル化誘導方法によって正常化できることを見出した。具体的には、低品質ｉＰＳ細胞にみられるＤＮＡメチル化の異常を、本発明のＤＮＡ脱メチル化誘導方法によって正常化でき、低品質ｉＰＳ細胞を高品質ｉＰＳ細胞に改良できることを見出した。さらに本発明者は、本発明のＤＮＡ脱メチル化誘導方法によってｐｒｅ－ｉＰＳ細胞におけるリプログラミングを完全なものとできることを見出した。具体的には、ｐｒｅ－ｉＰＳ細胞において維持されているドナー細胞のエピゲノム情報を本発明のＤＮＡ脱メチル化誘導方法によって消失せしめ、ｐｒｅ－ｉＰＳ細胞をｉＰＳ細胞へと変換できることを見出した。したがって、低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に対して工程（１）を行うことによって、それぞれを高品質ｉＰＳ細胞及びｉＰＳ細胞に変換できる。また、同様の効果を得るためには必ずしも低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に直接工程（１）を行う必要はない。例えば、体細胞に対して工程（１）を工程（ｉ）と併せて行うことによっても同様の効果が得られる。

【００７３】

以上の通り、工程（１）では、体細胞、低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞からなる群より選択される少なくとも１種の細胞において、ＴＥＴ１活性ドメイン等融合ポリペプチド及びＰＲＤＭ１４活性ドメイン等融合ポリペプチドの細胞内含量を増加させる。

【００７４】

したがって、変換工程（ｉ）は、工程（１）の前に行ってもよいし、工程（１）と同時に行ってもよいし、あるいは工程（１）の後に行ってもよい。工程（ｉ）を工程（１）の前に行う場合は、工程（１）を少なくとも低品質ｉＰＳ細胞又はｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に対して行うことになる。工程（ｉ）を工程（１）と同時に、又は後に行う場合は、工程（１）を少なくとも体細胞に対して行うことになる。工程（ｉ）を工程（１）と同時に行う場合、工程（１）は、言い換えれば、

（１Ａ－１）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び

ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド

の体細胞内含量を増加させ、かつ

核初期化物質を体細胞に接触させることにより体細胞をｉＰＳ細胞に変換する工程

である。

【００７５】

本発明のｉＰＳ細胞の製造方法としては、

［３Ａ－２．］　（Ｉ）核初期化物質を体細胞に接触させることにより体細胞を高品質ｉＰＳ細胞、低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に変換する工程；

（ＩＩ）工程（Ｉ）で得られた細胞の評価を行い、高品質ｉＰＳ細胞、低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に選別する工程；及び

（ＩＩＩ）工程（ＩＩ）で選別された低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に対して、工程（１）を行う工程

を含む方法が挙げられる。

【００７６】

ＧＴＬ２遺伝子領域はゲノム刷り込み領域であり、通常父由来のゲノムのみがメチル化受けている。しかしながら、低品質ｉＰＳ細胞では母由来・父由来の両ゲノム共にメチル化を受けており、この異常なメチル化がｉＰＳ細胞の品質低下の原因となっていると考えられている。また、本発明者はＰＲＤＭ１４が、ＧＴＬ２遺伝子領域の異常なメチル化を消去する活性を持つことを見出した。本発明においては、ＧＴＬ２遺伝子領域に８０％以上メチル化が付加されているｉＰＳ細胞を低品質と定義し、ＰＲＤＭ１４を導入することで６０％以下に減少した場合品質が改善したと判断する。また、ＧＴＬ２に異常なメチル化があると、ＧＴＬ２の遺伝子発現が抑制される。そこで、低品質ｉＰＳ細胞にＰＲＤＭ１４を導入することで、野生型ＥＳ細胞と同レベルまでＧＴＬ２の発現が回復したかどうかで、ＰＲＤＭ１４による品質改善効果を迅速に検証できる。

【００７７】

したがって、工程（ＩＩ）においては、工程（Ｉ）で得られた細胞についてＧＴＬ２遺伝子領域のメチル化の程度を調べ、８０％以上メチル化が付加されているｉＰＳ細胞を低品質と判定することにより、低品質ｉＰＳ細胞を選別することができる。

【００７８】

別の方法として、工程（ＩＩ）においては、工程（Ｉ）で得られた細胞についてＧＴＬ２遺伝子の発現の程度を調べ、野生型ＥＳ細胞における同遺伝子の発現の程度との比較を行い、発現の程度がより低いｉＰＳ細胞を低品質と判定することにより、低品質ｉＰＳ細胞を選別することができる。

【００７９】

また、工程（ＩＩ）においては、工程（Ｉ）で得られた細胞について内在性のＮＡＮＯＧ遺伝子の発現の程度を調べ、発現が観察されないｉＰＳ細胞をｐｒｅ－ｉＰＳ細胞と判定することにより、ｐｒｅ－ｉＰＳ細胞を選別することができる。

これらｐｒｅ－ｉＰＳ細胞及び低品質ｉＰＳ細胞、並びにそれらの中間的な細胞、例えば、Ｎａｎｏｇが弱陽性であり、かつＧｔｌ２が高メチル化されている細胞等、はいずれも初期化が不完全なｉＰＳ細胞といえ、再生医療などに適用する際には、排除すべきｉＰＳ細胞である。工程（ＩＩ）において、高品質ｉＰＳ細胞、低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に加えて、さらに上記のような中間的な細胞を選別してもよい。このように選別された中間的な細胞は、さらに工程（ＩＩＩ）において低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に対するのと同様の処理を受ける。これにより、ｉＰＳ細胞群の中からこのような初期化が不完全なｉＰＳ細胞の数を低減することができ、高品質なｉＰＳ細胞など初期化の完成度の高いｉＰＳ細胞を樹立することが可能となる。

【００８０】

工程（ＩＩ）における細胞の評価及び選別は、特に限定されないが、例えば、細胞をコロニー化した上で行うことができる。具体的には、単一の細胞からそれぞれ派生した個々のコロニーから一部の細胞をサンプリングし、その細胞を評価することによってその細胞が属するコロニーの評価を行い、かかる評価結果に基づいてコロニー単位での選別を行うことができる。

【００８１】

工程（ＩＩＩ）においては、工程（ＩＩ）で選別されたｐｒｅ－ｉＰＳ細胞及び低品質ｉＰＳ細胞に対して、工程（１）を行う。工程（ＩＩ）で選別された低品質ｉＰＳ細胞はＤＮＡメチル化に異常がみられ、同様に選別されたｐｒｅ－ｉＰＳ細胞はリプログラミングが不完全である。工程（ＩＩＩ）においてこれらの低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に対して工程（１）を行うことにより、低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞をそれぞれ高品質ｉＰＳ細胞及びｉＰＳ細胞へと変換することができる。工程（ＩＩ）及び（ＩＩＩ）は、必要な数の高品質ｉＰＳ細胞が得られるまで、繰り返し行うことができる。繰り返し行う場合、工程（ＩＩ）における「工程（Ｉ）で得られた細胞」なる記載は「工程（ＩＩＩ）で得られた細胞」に読み替える。繰り返し行うことにより、より多くの低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞をそれぞれ高品質ｉＰＳ細胞及びｉＰＳ細胞へと変換することができ、ひいてはより多くの高品質ｉＰＳ細胞を得ることができる。

【００８２】

工程３Ａ－２．においては、工程（ＩＩＩ）における工程（１）を工程（ｉ）と同時に行ってもよい。この場合は、工程（ＩＩＩ）における工程（１）を、

（１Ａ－２）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び

ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド

の低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞における細胞内含量を増加させ、かつ

核初期化物質を低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に接触させる工程

であると言い換えることができる。

【００８３】

工程３Ａ－２．においては、工程（１）をまず体細胞に対して行い、続いて工程（ＩＩ

）で選別された低品質ｉＰＳ細胞及びｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に対して工程（１）を行ってもよい。この場合は、最初の工程（１）を工程（ｉ）と同時に行ってもよい。この場合も、工程（Ｉ）を前記工程（１Ａ－１）であると言い換えることができる。

【００８４】

本発明のｉＰＳ細胞の製造方法としては、

［３Ｂ．］　ｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に対して工程（１）を行うことにより、ｉＰＳ細胞を得る方法が挙げられる。この場合、工程（１）は核初期化物質の存在下で行ってもよく、工程（１）を、

（１Ｂ）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び

ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド

のｐｒｅ－ｉＰＳ細胞内含量を増加させ、かつ

核初期化物質をｐｒｅ－ｉＰＳ細胞に接触させる工程

であると言い換えることができる。

【００８５】

本発明のｉＰＳ細胞の製造方法としては、

［３Ｃ．］　低品質ｉＰＳ細胞に対して工程（１）を行うことにより、高品質ｉＰＳ細胞を得る方法が挙げられる。この場合、工程（１）は核初期化物質の存在下で行ってもよく、工程（１）を、

（１Ｃ）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び

ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド

の低品質ｉＰＳ細胞内含量を増加させ、かつ

核初期化物質を低品質ｉＰＳ細胞に接触させる工程

であると言い換えることができる。

【００８６】

本発明のｉＰＳ細胞の製造方法において、体細胞としては、特に限定されないが、例えば、ヒト細胞、マウス細胞、サル等が挙げられる。

【００８７】

本発明のｉＰＳ細胞の製造方法において、核初期化物質は、公知のものを用いることができる。核初期化物質としては、特に限定されないが、例えば、ＯＣＴ４、ＳＯＸ２、ＫＬＦ４、ＭＹＣ等が挙げられる。

【００８８】

［４．ポリペプチド含有組成物］

本発明のポリペプチド含有組成物は、

（Ａ－１）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び

（Ａ－２）ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド

を含有する、組成物である。

【００８９】

ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドは、１．において説明したのと同様である。

【００９０】

ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドは、１．において説明したのと同様である。

【００９１】

本発明のポリペプチド含有組成物は、例えば、１．で説明した通り、細胞内においてＤＮＡ脱メチル化を誘導するという用途に用いることができる。

【００９２】

本発明のポリペプチド含有組成物は、具体的には、例えば、ＤＮＡメチル化の異常を有する細胞等に対して適用することによって、ＤＮＡメチル化を正常化するという用途に用いることができる。ＤＮＡメチル化の異常が何らかの疾患に関連しており、その正常化がかかる疾患の治療に結びつく場合は、本発明のポリペプチド含有組成物は、医薬として用いることができる。本発明のポリペプチド含有組成物は、より具体的には、例えば、エピゲノム変異を修復するＤＮＡメチル化の異常に起因する疾患に対する治療剤として用いることができる。

なお、現在、抗癌剤として臨床試験されているアザシチジン（ビダーザ（登録商標））のようなＤＮＡ脱メチル化剤は、ＤＮＭＴ１によるメチル化の維持を阻害することで、ＤＮＡ複製依存的（受動的）に脱メチル化を誘導するものであり、ＤＮＭＴ１はゲノム全体のメチル化を維持しているので、領域の選択性がなく、ゲノム全体を脱メチル化する結果、副作用が避けられない。これに対し、本発明のポリペプチド含有組成物を治療剤として用いる場合は、塩基除去修復を介して領域選択的にＤＮＡ脱メチル化を誘導することができるので、副作用の少ない治療剤を提供し得る。また上記既知ＤＮＡ脱メチル化剤は分裂細胞に対して効果を有するに止まるが、本発明のポリペプチド含有組成物を治療剤として用いる場合は、非分裂細胞に対しても有効であるという優位性もある。

上記の治療剤としては、特に限定されないが、例えば、抗がん剤、神経精神疾患治療剤等が挙げられる。神経精神疾患治療剤としては、特に限定されないが、例えば、躁うつ病（双極性障害）治療剤、反復うつ病治療剤、統合性失調症等を挙げることができる。

【００９３】

医薬として用いられる場合、本発明のポリペプチド含有組成物（この場合、以下「医薬用途ポリペプチド含有組成物」ということがある。）は、ポリペプチド（Ａ－１）及び（Ａ－２）をそれぞれ有効成分として含有する。本発明のポリペプチド含有組成物は、さらにこれら有効成分に加えて必要に応じてさらに他の成分を含んでいてもよい。そのような成分としては例えば、剤型に応じて製剤化のために必要となる製剤成分、保存安定のために必要となる保存安定成分、及びその他の有効成分等が挙げられる。その他の有効成分としては、例えば、抗炎症剤及び抗菌剤等が挙げられる。

【００９４】

本発明の医薬用途ポリペプチド含有組成物におけるポリペプチド（Ａ－１）及び（Ａ－２）の含有割合は、投与形態、剤型、投与量及び投与頻度等に応じて決められる。

【００９５】

本発明の医薬用途ポリペプチド含有組成物の投与形態は、適用対象患部等に応じて適宜設定される。全身的投与であってもよいし、局所的投与であってもよい。全身的投与としては、経口投与又は非経口投与が挙げられる。さらに非経口投与としては、静脈内注射、皮下注射及び筋肉内注射等が挙げられる。局所的投与としては、皮膚、粘膜、鼻内又は眼内等に対する投与を挙げることができる。

【００９６】

本発明の医薬用途ポリペプチド含有組成物の剤型は、投与形態等に応じて適宜設定される。例えば、経口投与する場合、錠剤、顆粒、散剤、坐剤及びカプセル剤等の固形製剤や液状等が挙げられる。非経口投与する場合、クリーム剤、ゲル剤及び軟膏剤等の半固形状、並びに液剤及びローション剤等の液剤等が挙げられる。通常注射剤として投与するのが好ましい場合が多い。

【００９７】

本発明の医薬用途ポリペプチド含有組成物の投与量及び投与頻度は、投与形態、投与方法及び剤型の他、被投与者の状態、並びにポリペプチド（Ａ－１）及び（Ａ－２）のＤＮＡ脱メチル化活性の程度等に応じて適宜設定される。適切な投与量及び投薬法は、当業者に公知の通常の投与量決定技術に従い決定することができる。

【００９８】

一回あたりの投与量は治療有効量であればよい。

【００９９】

本発明のポリペプチド含有組成物は、３．で説明した通り、ｉＰＳ細胞を製造するという用途に用いることができる。言い換えれば、本発明のポリペプチド含有組成物は、ｉＰＳ細胞の初期化完成度の向上剤又は品質改善剤として用いることができる。この場合、本発明のポリペプチド含有組成物は、ポリペプチド（Ａ－１）及び（Ａ－２）をそれぞれ有効成分として含有する。本発明のポリペプチド含有組成物は、さらにこれら有効成分に加えて必要に応じてさらに他の成分を含んでいてもよい。そのような成分としては例えば、剤型に応じて製剤化のために必要となる製剤成分、保存安定のために必要となる保存安定成分、及びその他の有効成分等が挙げられる。その他の有効成分としては、例えば、核初期化物質等が挙げられる。
核初期化物質としては、公知のものを用いることができる。

【０１００】
［５．ポリヌクレオチド含有組成物］
本発明のポリヌクレオチド含有組成物は、
（α－１）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び
（α－２）ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド
を含有する、組成物である。

【０１０１】
ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドは、１．において説明したのと同様である。

【０１０２】
ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドは、１．において説明したのと同様である。

【０１０３】
ポリヌクレオチドは、ＤＮＡ又はＲＮＡである。ポリヌクレオチドは、好ましくはＤＮＡである。

【０１０４】
本発明のポリヌクレオチド含有組成物は、４．で説明した本発明のポリペプチド含有組成物と同じ用途に用いることができる。

【０１０５】
医薬として用いられる場合、本発明のポリヌクレオチド含有組成物（この場合、以下「医薬用途ポリヌクレオチド含有組成物」ということがある。）は、ポリヌクレオチド（α－１）及び（α－２）をそれぞれ有効成分として含有する。本発明のポリヌクレオチド含有組成物は、さらにこれら有効成分に加えて必要に応じてさらに他の成分を含んでいてもよい。そのような成分としては例えば、剤型に応じて製剤化のために必要となる製剤成分、保存安定のために必要となる保存安定成分、及びその他の有効成分等が挙げられる。その他の有効成分としては、例えば、抗炎症剤及び抗菌剤等が挙げられる。

【０１０６】
本発明の医薬用途ポリヌクレオチド含有組成物におけるポリヌクレオチド（α－１）及び（α－２）の含有割合は、投与形態、剤型、投与量及び投与頻度等に応じて決められる。

【０１０７】
本発明の医薬用途ポリヌクレオチド含有組成物の投与形態は、適用対象患部等に応じて適宜設定される。全身的投与であってもよいし、局所的投与であってもよい。全身的投与としては、経口投与又は非経口投与が挙げられる。さらに非経口投与としては、静脈内注射、皮下注射及び筋肉内注射等が挙げられる。局所的投与としては、皮膚、粘膜、鼻内又は眼内等に対する投与を挙げることができる。

【０１０８】
本発明の医薬用途ポリヌクレオチド含有組成物の剤型は、投与形態等に応じて適宜設定

される。例えば、経口投与する場合、錠剤、顆粒、散剤、坐剤及びカプセル剤等の固形製剤や液状等が挙げられる。非経口投与する場合、クリーム剤、ゲル剤及び軟膏剤等の半固形状、並びに液剤及びローション剤等の液剤等が挙げられる。通常注射剤として投与するのが好ましい場合が多い。

【０１０９】

本発明の医薬用途ポリヌクレオチド含有組成物の投与量及び投与頻度は、投与形態、投与方法及び剤型の他、被投与者の状態、並びにポリヌクレオチド（α－１）及び（α－２）のＤＮＡ脱メチル化活性の程度等に応じて適宜設定される。適切な投与量及び投薬法は、当業者に公知の通常の投与量決定技術に従い決定することができる。

【０１１０】

一回あたりの投与量は治療有効量であればよい。

【０１１１】

本発明のポリヌクレオチド含有組成物は、３．で説明した通り、初期化の完成度がより向上したｉＰＳ細胞、とりわけ高品質のｉＰＳ細胞を製造するという用途に用いることができる。言い換えれば、本発明のポリヌクレオチド含有組成物は、ｉＰＳ細胞の初期化完成度の向上剤又は品質改善剤として用いることができる。より具体的には、実施例で示されるように、ｐｒｅ－ｉＰＳ細胞、低品質ｉＰＳ細胞及びそれらの中間的な細胞などの、初期化が不完全なｉＰＳ細胞にＰＲＤＭ１４を発現させることでＮａｎｏｇ領域の脱メチル化や異常メチル化の低減といったｉＰＳ細胞の初期化の完成度を高め、品質改善が達成される。この場合、本発明のポリペプチド含有組成物は、ポリヌクレオチド（α－１）及び（α－２）をそれぞれ有効成分として含有する。本発明のポリヌクレオチド含有組成物は、さらにこれら有効成分に加えて必要に応じてさらに他の成分を含んでいてもよい。そのような成分としては例えば、剤型に応じて製剤化のために必要となる製剤成分、保存安定のために必要となる保存安定成分、及びその他の有効成分等が挙げられる。その他の有効成分としては、例えば、核初期化物質等が挙げられる。核初期化物質としては、公知のものを用いることができる。

【０１１２】

［６．発現ベクター含有組成物］

本発明の発現ベクター含有組成物は、

（ａ－１）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター；及び

（ａ－２）ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター

を含有する、組成物である。

【０１１３】

ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドは、１．において説明したのと同様である。

【０１１４】

ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドは、１．において説明したのと同様である。

【０１１５】

ポリヌクレオチドは、ＤＮＡ又はＲＮＡである。ポリヌクレオチドは、好ましくはＤＮＡである。

【０１１６】

本発明の発現ベクター含有組成物は、例えば、１．で説明した通り、細胞内においてＤＮＡ脱メチル化を誘導するという用途に用いることができる。この場合、発現ベクター（ａ－１）及び（ａ－２）は、それぞれ併用したときにＤＮＡ脱メチル化を誘導するという作用を有していればよい。言い換えると、発現ベクター（ａ－１）は、ＴＥＴ１活性ドメイン等融合ポリペプチドに、ＴＥＴ１活性及びＰＲＤＭ１４活性を阻害しないか、あるいは著しく阻害しないアミノ酸又はポリペプチドがさらに付加されてなるポリペプチドを発

現するベクターであってもよい。このような発現ベクターは、発現ベクター（ａ－２）と併用した際にＴＥＴ１活性を発現し得、かつ発現ベクター（ａ－２）が発現するＰＲＤＭ１４活性を阻害しないので、本発明の効果を奏しうる。同様に、発現ベクター（ａ－２）は、ＰＲＤＭ１４活性ドメイン等融合ポリペプチドに、ＴＥＴ１活性及びＰＲＤＭ１４活性を阻害しないか、あるいは著しく阻害しないアミノ酸又はポリペプチドがさらに付加されてなるポリペプチドを発現するベクターであってもよい。このような発現ベクターは、発現ベクター（ａ－１）と併用した際にＰＲＤＭ１４活性を発現し得、かつ発現ベクター（ａ－１）が発現するＴＥＴ１活性を阻害しないので、本発明の効果を奏しうる。上述のように、ＴＥＴ１活性ドメイン等融合ポリペプチドに付加されていてもよいポリペプチドとしては、例えば、シグナルペプチド等が挙げられる。ＴＥＴ１活性ドメイン等融合ポリペプチドに付加されていてもよいポリペプチドの長さとしては、特に限定されないが、例えば、２～３０個のアミノ酸、好ましくは２～１０個のアミノ酸、より好ましくは２～７個のアミノ酸が挙げられる。また、上述のように、ＰＲＤＭ１４活性ドメイン等融合ポリペプチドに付加されていてもよいポリペプチドとしては、例えば、シグナルペプチド等が挙げられる。ＰＲＤＭ１４活性ドメイン等融合ポリペプチドに付加されていてもよいポリペプチドの長さとしては、特に限定されないが、例えば、２～３０個のアミノ酸、好ましくは２～１０個のアミノ酸、より好ましくは２～７個のアミノ酸が挙げられる。

【０１１７】

発現ベクターとしては、特に限定されず、公知のものを適宜用いることができる。例えば、ｐＣＡＧＧＳ－１　ｖｅｃｔｏｒ、ｐＣＤＮＡ３．１　ｖｅｃｔｏｒ等が挙げられる。

【０１１８】

プロモーターとしては、特に限定されないが、一過的発現を企図する場合には例えばＣＭＶ、ＣＡＧＧＳ等が挙げられる。また、恒常的発現を企図する場合にはｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒ　Ｖｉｒｕｓ（ＥＢＶ）由来の複製起点ＯｒｉＰを持ち、かつＥＢＶ　Ｎｕｃｌｅａｒ　Ａｎｔｉｇｅｎ　１（ＥＢＮＡ１）遺伝子を発現するエピソーマルベクターが挙げられる。

【０１１９】

本発明の発現ベクター含有組成物は、４．で説明した本発明のポリペプチド含有組成物と同じ用途に用いることができる。

【０１２０】

医薬として用いられる場合、本発明の発現ベクター含有組成物（この場合、以下「医薬用途発現ベクター含有組成物」ということがある。）は、発現ベクター（ａ－１）及び（ａ－２）をそれぞれ有効成分として含有する。本発明の発現ベクター含有組成物は、さらにこれら有効成分に加えて必要に応じてさらに他の成分を含んでいてもよい。そのような成分としては例えば、剤型に応じて製剤化のために必要となる製剤成分、保存安定のために必要となる保存安定成分、及びその他の有効成分等が挙げられる。その他の有効成分としては、例えば、抗炎症剤及び抗菌剤等が挙げられる。

【０１２１】

本発明の医薬用途発現ベクター含有組成物における発現ベクター（ａ－１）及び（ａ－２）の含有割合は、投与形態、剤型、投与量及び投与頻度等に応じて決められる。

【０１２２】

本発明の医薬用途発現ベクター含有組成物の投与形態は、適用対象患部等に応じて適宜設定される。全身的投与であってもよいし、局所的投与であってもよい。全身的投与としては、経口投与又は非経口投与が挙げられる。さらに非経口投与としては、静脈内注射、皮下注射及び筋肉内注射等が挙げられる。局所的投与としては、皮膚、粘膜、鼻内又は眼内等に対する投与を挙げることができる。

【０１２３】

本発明の医薬用途発現ベクター含有組成物の剤型は、投与形態等に応じて適宜設定される。例えば、経口投与する場合、錠剤、顆粒、散剤、坐剤及びカプセル剤等の固形製剤や

液状等が挙げられる。非経口投与する場合、クリーム剤、ゲル剤及び軟膏剤等の半固形状、並びに液剤及びローション剤等の液剤等が挙げられる。通常注射剤として投与するのが好ましい場合が多い。

【０１２４】

本発明の医薬用途発現ベクター含有組成物の投与量及び投与頻度は、投与形態、投与方法及び剤型の他、被投与者の状態、並びに発現ベクター（ａ－１）及び（ａ－２）のＤＮＡ脱メチル化活性の程度等に応じて適宜設定される。適切な投与量及び投薬法は、当業者に公知の通常の投与量決定技術に従い決定することができる。

【０１２５】

一回あたりの投与量は治療有効量であればよい。

【０１２６】

本発明の発現ベクター含有組成物は、３．で説明した通り、ｉＰＳ細胞を製造するという用途に用いることができる。言い換えれば、本発明の発現ベクター含有組成物は、ｉＰＳ細胞の初期化完成度の向上剤又は品質改善剤として用いることができる。この場合、本発明の発現ベクター含有組成物は、発現ベクター（ａ－１）及び（ａ－２）をそれぞれ有効成分として含有する。本発明の発現ベクター含有組成物は、さらにこれら有効成分に加えて必要に応じてさらに他の成分を含んでいてもよい。そのような成分としては例えば、剤型に応じて製剤化のために必要となる製剤成分、保存安定のために必要となる保存安定成分、及びその他の有効成分等が挙げられる。その他の有効成分としては、例えば、核初期化物質等が挙げられる。

核初期化物質としては、公知のものを用いることができる。

【０１２７】

［７．共発現ベクター］

本発明の共発現ベクターは、

（ｂ）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び

ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

を含む共発現ベクターである。

【０１２８】

ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドは、１．において説明したのと同様である。

【０１２９】

ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドは、１．において説明したのと同様である。

【０１３０】

ポリヌクレオチドは、ＤＮＡ又はＲＮＡである。ポリヌクレオチドは、好ましくはＤＮＡである。

【０１３１】

本発明の共発現ベクター含有組成物は、例えば、１．で説明した通り、細胞内においてＤＮＡ脱メチル化を誘導するという用途に用いることができる。この場合、共発現ベクター（ｂ）は、ＤＮＡ脱メチル化を誘導するという作用を有していればよい。言い換えると、共発現ベクター（ｂ）は、ＴＥＴ１活性ドメイン等融合ポリペプチドに、ＴＥＴ１活性及びＰＲＤＭ１４活性を阻害しないか、あるいは著しく阻害しないアミノ酸又はポリペプチドがさらに付加されてなるポリペプチドを発現し、かつ、ＰＲＤＭ１４活性ドメイン等融合ポリペプチドに、ＴＥＴ１活性及びＰＲＤＭ１４活性を阻害しないか、あるいは著しく阻害しないアミノ酸又はポリペプチドがさらに付加されてなるポリペプチドを発現するベクターであってもよい。このような共発現ベクターは、ＴＥＴ１活性及びＰＲＤＭ１４活性を発現しうるので、本発明の効果を奏しうる。上述のように、ＴＥＴ１活性ドメイン等融合ポリペプチドに付加されていてもよいポリペプチドとしては、例えば、シグナルペ

プチド等が挙げられる。ＴＥＴ１活性ドメイン等融合ポリペプチドに付加されていてもよいポリペプチドの長さとしては、特に限定されないが、例えば、２～３０個のアミノ酸、好ましくは２～１０個のアミノ酸、より好ましくは２～７個のアミノ酸が挙げられる。また、上述のように、ＰＲＤＭ１４活性ドメイン等融合ポリペプチドに付加されていてもよいポリペプチドとしては、例えば、シグナルペプチド等が挙げられる。ＰＲＤＭ１４活性ドメイン等融合ポリペプチドに付加されていてもよいポリペプチドの長さとしては、特に限定されないが、例えば、２～３０個のアミノ酸、好ましくは２～１０個のアミノ酸、より好ましくは２～７個のアミノ酸が挙げられる。

【０１３２】

発現ベクターとしては、特に限定されず、公知のものを適宜用いることができる。例えば、ｐＣＡＧＧＳ－１　ｖｅｃｔｏｒ、ｐＣＤＮＡ３．１　ｖｅｃｔｏｒ等が挙げられる。

【０１３３】

プロモーターとしては、特に限定されないが、一過的発現を企図する場合には例えばＣＭＶ、ＣＡＧＧＳ等が挙げられる。また、恒常的発現を企図する場合にはｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒ　Ｖｉｒｕｓ（ＥＢＶ）由来の複製起点ＯｒｉＰを持ち、かつＥＢＶ　Ｎｕｃｌｅａｒ　Ａｎｔｉｇｅｎ　１（ＥＢＮＡ１）遺伝子を発現するエピソーマルベクターが挙げられる。

【０１３４】

本発明の共発現ベクター含有組成物は、４．で説明した本発明のポリペプチド含有組成物と同じ用途に用いることができる。

【０１３５】

医薬として用いられる場合、本発明の共発現ベクター含有組成物（この場合、以下「医薬用途共発現ベクター含有組成物」ということがある。）は、共発現ベクター（ｂ）を有効成分として含有する。本発明の共発現ベクター含有組成物は、さらにこの有効成分に加えて必要に応じてさらに他の成分を含んでいてもよい。そのような成分としては例えば、剤型に応じて製剤化のために必要となる製剤成分、保存安定のために必要となる保存安定成分、及びその他の有効成分等が挙げられる。その他の有効成分としては、例えば、抗炎症剤及び抗菌剤等が挙げられる。

【０１３６】

本発明の医薬用途共発現ベクター含有組成物における共発現ベクター（ｂ）の含有割合は、投与形態、剤型、投与量及び投与頻度等に応じて決められる。

【０１３７】

本発明の医薬用途共発現ベクター含有組成物の投与形態は、適用対象患部等に応じて適宜設定される。全身的投与であってもよいし、局所的投与であってもよい。全身的投与としては、経口投与又は非経口投与が挙げられる。さらに非経口投与としては、静脈内注射、皮下注射及び筋肉内注射等が挙げられる。局所的投与としては、皮膚、粘膜、鼻内又は眼内等に対する投与を挙げることができる。

【０１３８】

本発明の医薬用途共発現ベクター含有組成物の剤型は、投与形態等に応じて適宜設定される。例えば、経口投与する場合、錠剤、顆粒、散剤、坐剤及びカプセル剤等の固形製剤や液状等が挙げられる。非経口投与する場合、クリーム剤、ゲル剤及び軟膏剤等の半固形状、並びに液剤及びローション剤等の液剤等が挙げられる。通常注射剤として投与するのが好ましい場合が多い。

【０１３９】

本発明の医薬用途共発現ベクター含有組成物の投与量及び投与頻度は、投与形態、投与方法及び剤型の他、被投与者の状態、並びに共発現ベクター（ｂ）のＤＮＡ脱メチル化活性の程度等に応じて適宜設定される。適切な投与量及び投薬法は、当業者に公知の通常の投与量決定技術に従い決定することができる。

【０１４０】

一回あたりの投与量は治療有効量であればよい。

【０１４１】

本発明の共発現ベクター含有組成物は、３．で説明した通り、ｉＰＳ細胞を製造するという用途に用いることができる。言い換えれば、本発明の共発現ベクター含有組成物は、ｉＰＳ細胞の初期化完成度の向上剤又は品質改善剤として用いることができる。この場合、本発明の共発現ベクター含有組成物は、共発現ベクター（ｂ）を有効成分として含有する。本発明の共発現ベクター含有組成物は、さらにこの有効成分に加えて必要に応じてさらに他の成分を含んでいてもよい。そのような成分としては例えば、剤型に応じて製剤化のために必要となる製剤成分、保存安定のために必要となる保存安定成分、及びその他の有効成分等が挙げられる。

その他の有効成分としては、例えば、核初期化物質等が挙げられる。核初期化物質としては、公知のものを用いることができる。

【実施例】

【０１４２】

１．ＰＲＤＭ１４によるＬＩＮＥ－１領域のＤＮＡ脱メチル化

ＰＲＤＭ１４をＥＳ細胞に高発現させることで、ゲノム全体の脱メチル化を誘導できるかどうか検証するために、ＰＲＤＭ１４高発現ＥＳ細胞におけるＬＩＮＥ－１のメチル化解析を行った。

【０１４３】

ＬＩＮＥ－１とはトランスポゾン配列（外来性配列）であり、マウスのゲノムの約２割を占めているが（図１）、通常ＤＮＡのメチル化により発現が抑制されている。

【０１４４】

ＤＮＡのメチル化解析は、Ｂｉｓｕｌｆｉｔｅ－Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ法により行った。ゲノムをＢｉｓｕｌｆｉｔｅ処理するとシトシンはウラシルへ変換されるが、メチル化シトシンは、メチル化シトシンとして残るため、シークエンスで配列を確認することで、ゲノム中のメチル化シトシンレベルを定量することができる。本実験では、ＬＩＮＥ－１の５‘ＵＴＲに存在する９つのＣｐＧ　ｓｉｔｅのメチル化状態を解析した。図１において、青の棒グラフはそれぞれのＣｐＧ　ｓｉｔｅのメチル化量を、赤の棒グラフはＣｐＧ　ｓｉｔｅ全体のメチル化率を表している。

【０１４５】

実験方法、並びに結果及び考察は以下の通りである。

［実験方法］

（１）ＰＲＤＭ１４高発現ＥＳ細胞の作製

ＣＡＧＧＳプロモーターの下流にＰｒｄｍ１４－ｉｒｅｓ－ｐｕｒｏの遺伝子を挿入したプラスミドをリポフェクション法によりＥＳ細胞に遺伝子導入を行った。遺伝子導入４８時間後ピューロマイシンで選別を行い、単一コロニーをピックアップし継代・培養を行った。ピックアップ細胞からＲＮＡを抽出し、定量的ＲＴ－ＰＣＲ法によりＰｒｄｍ１４の発現を確認し、コントロール（空ベクター導入）ＥＳ細胞と比較し５０倍以上発現している細胞をＰｒｄｍ１４高発現ＥＳ細胞とした。

（２）ＤＮＡのメチル化解析

コントロールＥＳ細胞及びＰＲＤＭ１４高発現ＥＳ細胞からゲノムＤＮＡを単離し、亜硫酸処理により非メチル化シトシンのウラシルへの変換を行った。このＤＮＡを鋳型としてＬＩＮＥ－１の配列に対するプライマーを用いてＰＣＲを行い、増幅産物をＴＡベクターにクローニングした後に、シーケンスで配列を確認した。非メチル化シトシンは最終的にはＴへと置換されるがメチル化シトシンはシトシンとして残るため、ＣＧ部位がＴＧの場合非メチル化、ＣＧの場合メチル化と判定した。

［結果及び考察］

野生型ＥＳ細胞で約８割程度のＣｐＧ　ｓｉｔｅがメチル化されていたのに対して、ＰＲＤＭ１４高発現ＥＳ細胞（ＰＲＤＭ１４　Ｏ．Ｅ．）では、約３割程度しかメチル化されておらず、ＰＲＤＭ１４をＥＳ細胞に高発現させることで、ＬＩＮＥ－１領域の顕著な

脱メチル化を誘導できることが明らかとなった。

２．ＰＲＤＭ１４による広範囲にわたる遺伝子領域のＤＮＡ脱メチル化

ＰＲＤＭ１４によるＤＮＡ脱メチル化でどの程度の遺伝子領域が影響を受けるのか検証するために、ゲノムにＤＮＡのメチル化をほとんど持たない、ＤＮＡメチル化酵素の欠損ＥＳ細胞（Ｄｎｍｔｓ ＴＫＯ）と遺伝子発現プロファイルの比較をマイクロアレイにより解析した。

【０１４６】

実験方法、並びに結果及び考察は以下の通りである。

［実験方法］

（１）マイクロアレイによる解析

コントロールＥＳ細胞、ＰＲＤＭ１４高発現ＥＳ細胞及びＤｎｍｔｓ ＴＫ ＥＳ細胞よりＲＮＡを抽出して、Ａｇｉｌｅｎｔ社のマウスｗｈｏｌｅ ｇｅｎｏｍｅ マイクロアレイプラットフォームを用いて解析を行った。ＰＲＤＭ１４高発現ＥＳ細胞及びＤｎｍｔｓ ＴＫＯ ＥＳ細胞において、野生型ＥＳ細胞より２倍以上発現している遺伝子群を抽出し、Ｂｉｏｖｅｎｎを用いてＶｅｎｎ ｄｉａｇｒａｍを作製した。

［結果及び考察］

Ｄｎｍｔｓ ＴＫＯＥＳ細胞で発現が上昇した遺伝子の約３５％が、ＰＲＤＭ１４ Ｏ．Ｅ． ＥＳ細胞でも発現が上昇しており（図２）、この結果は、ＰＲＤＭ１４が約３５％の遺伝子領域のＤＮＡ脱メチル化を誘導していることを示唆している。

３．ＰＲＤＭ１４とヒドロキシメチル化を介したＤＮＡ脱メチル化

メチル化シトシンのヒドロキシル化を引き金としたＤＮＡ脱メチル化経路を図３に示す。ＤＮＡメチル化酵素の働きによって生じたメチル化シトシンは、ＴＥＴタンパク質によりヒドロキシル化を受けヒドロキシメチル化シトシンへ変換される。ヒドロキシメチル化シトシンは、脱アミノ化酵素によってヒドロキシメチル化ウラシルへと変換され、最終的には塩基除去修復経路によりシトシンへと脱メチル化される。ＰＲＤＭ１４が、この経路を促進することでＤＮＡ脱メチル化を誘導している可能性を検証するために、ＰＲＤＭ１４高発現ＥＳ細胞におけるゲノム全体のメチル化シトシン、及びヒドロキシメチル化シトシンの量を定量した。

【０１４７】

それぞれのゲノムをニトロセルロース膜に吸着させ、その後抗メチル化シトシン抗体もしくは抗ヒドロキシメチル化シトシン抗体を用いてＤｏｔ ｂｌｏｔを行った。

【０１４８】

実験方法、並びに結果及び考察は以下の通りである。

［実験方法］

（１）ゲノムの調製

ゲノムＤＮＡは、Ｐｒｏｍｅｇａ社のＷｉｚａｒｄ ＳＶ Ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡ ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｓｙｓｔｅｍを用いてプロトコールに従って調製した。

（２）Ｄｏｔ ｂｌｏｔ

ゲノムＤＮＡを９５℃で変性させた後に、ニトロセルロース膜に吸着させ、その後抗メチル化シトシン抗体もしくは抗ヒドロキシメチル化シトシン抗体を用いてＤｏｔ ｂｌｏｔを行った。検出にはＨＲＰ標識した２次抗体を用いた。

［結果及び考察］

Ｄｎｍｔｓ ＫＯ ＥＳ細胞では、メチル化シトシン、ヒドロキシメチル化シトシン共にゲノム中の量が減少していたのに対して、ＰＲＤＭ１４ Ｏ．Ｅ． ＥＳ細胞では、メチル化シトシンは減少していたが、ヒドロキシメチル化シトシンの量は反対に上昇していた（図４）。したがってＰＲＤＭ１４はメチル化シトシンのヒドロキシメチル化を促進することで、ＤＮＡ脱メチル化を誘導している可能性が考えられる。

４．ＰＲＤＭ１４によるＤＮＡ脱メチル化における塩基除去修復

ＰＲＤＭ１４が、図３の経路を促進することでＤＮＡ脱メチル化を誘導しているならば、ＰＲＤＭ１４によるＤＮＡ脱メチル化は塩基除去修復阻害剤でキャンセルされるはずで

ある。そこで、ＰＲＤＭ１４によるＤＮＡ脱メチル化による遺伝子発現上昇が、塩基除去修復阻害投与により阻害されるか否か検証した。塩基除去修復阻害剤には、塩基除去修復の主要な因子であるＰＡＲＰ１及びＡＰＥ１の阻害剤を用いた（それぞれ３ＡＢ及びＣＲＴ）。

【０１４９】

実験方法、並びに結果及び考察は以下の通りである。

［実験方法］

Ｅｍｐｔｙ　ｖｅｃｔｏｒ及びＰｒｄｍ１４発現ＶｅｃｔｏｒをＥＳ細胞に導入し、薬剤選別によりＰｒｄｍ１４陽性細胞濃縮させ、６日間培養する。６日間培養したＥＳ細胞からＲＮＡを回収し、定量的ＲＴ－ＰＣＲ法を用いて標的遺伝子の発現変化を、Ｅｍｐｔｙ　ｖｅｃｔｏｒ導入細胞とＰｒｄｍ１４　ｖｅｃｔｏｒ導入細胞間で比較した。

［結果及び考察］

３ＡＢ及びＣＲＴをそれぞれ投与することにより、ＰＲＤＭ１４により発現誘導を受ける遺伝子の大部分の発現誘導が抑制されることが明らかになった（図５）。本実験の結果から、ＰＲＤＭ１４が、図３の経路を促進することでＤＮＡ脱メチル化を誘導していることが示された。一方、体細胞は本来ＴＥＴ１を有しないことが知られているが、ＴＥＴ１を体細胞において過剰発現させることによって、５－メチルシトシン（５－ｍＣ）から５－ヒドロキシメチルシトシンへの変換が起こることが報告されている（Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｖｏｌ．　３２４，　１５　Ｍａｙ，　２００９，　ｐｐ．９３０－９３５）。３．の実験結果と考え合わせると、体細胞においてＴＥＴ１とＰＲＤＭ１４の細胞内含量を増加させることによって、ＴＥＴ１だけの細胞内含量を増加させた場合に比べて５－ヒドロキシメチルシトシンへの変換がより促進され、ひいてはＤＮＡ脱メチル化がより促進されることが示された。

５．ＰＲＤＭ１４によるＤＮＡ脱メチル化を介した多能性幹細胞の誘導

ｉＰＳ細胞は山中ファクター（ＯＣＴ４、ＳＯＸ２、ＫＬＦ４及びＭＹＣ；総称して「ＯＳＫＭ」ということがある。）を繊維芽細胞に導入することで樹立することができる。樹立の過程でリプログラミングが不完全なｐｒｅ－ｉＰＳ細胞や、低品質ｉＰＳ細胞が出現するが、これらの細胞におけるリプログラミング不全は、ドナー細胞（繊維芽細胞等）のエピゲノム情報の維持が原因であると考えられている（図６）。

【０１５０】

本実験では、ＥＳ細胞を分化させて作製するエピブラスト様細胞（ＥｐｉＬＣ）にＰＲＤＭ１４を発現させることによる、ＥＳ細胞への影響を調べた。ＥＳ細胞は、サイトカインであるＬＩＦ存在下では自己複製を行うことができるが、０．１％ＫＳＲ、ｂＦＧＦ及びＡＣＴＩＶＩＮ　Ａ存在下で培養することで、ｉｎ　ｖｉｔｒｏのエピブラスト（胎生６．５日胚）に性質の近いＥｐｉＬＣｓへ分化誘導することができる。ＥｐｉＬＣｓを再びＥＳ細胞培養液で培養すると細胞はさらに分化するが、本実験では、ＥｐｉＬＣｓにＰＲＤＭ１４を発現させた後にＥＳ細胞培養液で培養するとＥｐｉＬＣｓにどのような変化が観察されるかを確認した。

【０１５１】

実験方法、並びに結果及び考察は以下の通りである。

［実験方法］

テトラサイクリン非存在下でＰＲＤＭ１４を発現するＰＲＤＭ１４誘導性ＥＳ細胞を用いた。ＥＳ細胞をフィブロネクチンコートシャーレ上で、０．１％ＫＳＲ、ｂＦＧＦ及びＡＣＴＩＶＩＮ　Ａ存在下で２日間培養する。その後、テトラサイクリン存在下・非存在下でさらに２日間培養し、ＥＳ細胞培養液（ＬＩＦ存在下）に懸濁し継代した。培養開始０、２、４日後にＲＮＡを回収し、Ｏｃｔ３／４，　Ｓｏｘ２，Ｋｌｆ２の遺伝子発現変化を定量的ＲＴ－ＰＣＲにて定量した。また、ＥＳ細胞培地で継代した細胞を３日間培養し、４％　ＰＦＡで固定後アルカリフォスファターゼ染色によりＥＳ細胞を判定した。

［結果及び考察］

ＥｐｉＬＣｓにＰＲＤＭ１４を発現させた後にＥＳ細胞培養液で培養するとＥＳ細胞様コ

ロニー（アルカリフォスファターゼ陽性：ＡＰ陽性）が出現した。また多能性関連遺伝子であるＫｌｆ２の発現量が増加することが確認された。（図７）。したがって、ＰＲＤＭ１４には多能性を消失した細胞に多能性を付与する活性があることが示された。
また、ＥｐｉＬＣｓからＥＳ細胞に脱分化する過程において、Ｋｌｆ２領域の５ｈｍＣが上昇し、５ｍＣが減少していた。これらの結果から、ＰＲＤＭ１４がＴＥＴ１と協調して５ｈｍＣを介したＤＮＡ脱メチル化を行うことで、ＥｐｉＬＣｓからＥＳ細胞への脱分化を誘導していることが示唆された。

６．体細胞におけるＴＥＴ１・ＰＥＲＤＭ１４共発現によるＤＮＡ脱メチルの誘導

［実験方法］

Ｅｍｐｔｙ　ｖｅｃｔｏｒ、Ｔｅｔ１発現Ｖｅｃｔｏｒ、Ｐｒｄｍ１４発現ＶｅｃｔｏｒをＨＥＫ２９３細胞に導入し、薬剤選別によりＰｒｄｍ１４陽性細胞を濃縮させ、４日間培養した。４日間培養したＨＥＫ２９３細胞からゲノムＤＮＡを回収し、その後メチル化感受性酵素ＨｐａＩＩの処理を行った。ＨｐａＩＩは、ＣＣＧＧ部位を認識して切断する制限酵素であるが、メチル化されていると切断することができない。ＨｐａＩＩ未処理、処理のゲノムＤＮＡを鋳型として、ＬＩＮＥ－１領域に対するプライマーを設計して定量的ＰＣＲを行った。ＨｐａＩＩ未処理のＰＣＲ増幅曲線からＨｐａＩＩ処理の増幅曲線のＴｈｒｅｓｈｏｌｄ　Ｃｙｃｌｅ　（Ｃｔ）を引くことで、それぞれの細胞におけるＬＩＮＥ－１領域のメチル化状態を定量した。

［結果及び考察］

ＴＥＴ１単独及びＰＲＤＭ１４単独ではＬＩＮＥ－１領域の脱メチル化は誘導できなかったが、ＴＥＴ１とＰＲＤＭ１４を共に発現させることで、有意な脱メチル化が観察された（図８）。

７．ＰＲＤＭ１４とＴＥＴ１の共発現によるＤＮＡ脱メチル化誘導

ＥＳ細胞にＰＲＤＭ１４を発現させることで、ＬＩＮＥ-１領域の脱メチル化が観察された。ＥＳ細胞は内在性のＴＥＴ１を高発現しているが、ヒト胎児腎臓由来の細胞株であるＨＥＫ２９３細胞はＴＥＴ１の発現がほとんど観察されない。そこで、ＨＥＫ２９３細胞において、ＰＲＤＭ１４又はＴＥＴ１をそれぞれ単独で発現させ、あるいはＰＲＤＭ１４とＴＥＴ１を共発現させ、それぞれの細胞においてＬＩＮＥ-１領域のメチル化変動を調べることにより、ＰＲＤＭ１４とＴＥＴ１の併用効果を検証した。

［実験方法］

（１）ＤＮＡのメチル化解析

コントロール細胞、ＰＲＤＭ１４を高発現する細胞、ＴＥＴ１を高発現する細胞、ＰＲＤＭ１４及びＴＥＴ１を高発現する細胞（全てＨＥ２９３細胞）からゲノムＤＮＡを単離し、亜硫酸処理により非メチル化シトシンのウラシルへの変換を行った。このＤＮＡを鋳型としてＬＩＮＥ－１の配列に対するプライマーを用いてＰＣＲを行い、増幅産物をＴＡベクターにクローニングした後に、シーケンスで配列を確認した。非メチル化シトシンは最終的にはＴへと置換されるがメチル化シトシンはシトシンとして残るため、ＣＧ部位がＴＧの場合非メチル化、ＣＧの場合メチル化と判定した。また、上記の亜硫酸処理によるＤＮＡメチル化解析では、５－メチルシトシンと５－ヒドロキシメチルシトシンを区別することができない。そこで、グルコース転移酵素を用いた検出方法で５－メチルシトシンと５－ヒドロキシメチルシトシンの識別を行った。

それぞれの細胞からゲノムＤＮＡを回収した後に、ゲノムＤＮＡをグルコシルトランスフェラーゼと基質のグルコースと反応させる。５－メチルシトシンにはグルコースは転移しないが、５－ヒドロキシメチルシトシンにはグルコースが転移される。グルコースが転移された５－ヒドロキシメチルシトシンを含むＣＣＧＧ配列は制限酵素であるＭｓｐ　Ｉで切断することができない。ＨｐａＩＩとＭｓｐＩで切断後、ＣＣＧＧ配列を挟んで増幅するプライマーを用いて定量的ＰＣＲを行い、５－メチルシトシンおよび５－ヒドロキシメチルシトシンの量を定量した（この定量的ＰＣＲのことを以下、「ＧｌｕｃＭＳ-ｑＰＣＲ」と呼ぶ。）。

（２）定量的ＲＴ-ＰＣＲ

コントロール細胞、ＰＲＤＭ１４を高発現する細胞、ＴＥＴ１を高発現する細胞、ＰＲＤＭ１４及びＴＥＴ１を高発現する細胞（全てＨＥ２９３細胞）から、ｍＲＮＡを抽出し逆転写反応によりｃＤＮＡを作製した。このｃＤＮＡを鋳型としてＬＩＮＥ-１に対するプライマー用いて定量的ＰＣＲを行い、それぞれの細胞におけるＬＩＮＥ-１の転写量を測定した。

［結果及び考察］

コントロール細胞、ＰＲＤＭ１４を高発現する細胞、ＴＥＴ１を高発現する細胞、ＰＲＤＭ１４及びＴＥＴ１を高発現する細胞のＬＩＮＥ-１領域のメチル化状態を解析した結果、ＰＲＤＭ１４を高発現する細胞、ＴＥＴ１を高発現する細胞と比較して、ＰＲＤＭ１４及びＴＥＴ１を高発現する細胞において顕著な脱メチル化が観察された（図９）。また、５－メチルシトシンと５－ヒドロキシメチルシトシンの量を比較したところ、ＰＲＤＭ１４及びＴＥＴ１を高発現する細胞では５－メチルシトシンのみの脱メチル化が観察された（図１０）。さらに、ＰＲＤＭ１４及びＴＥＴ１を高発現する細胞ではＬＩＮＥ-１の顕著な発現誘導も観察された（図１１）。これらの結果から、ＰＲＤＭ１４とＴＥＴ１を組み合わせることで、ＬＩＮＥ-１領域の脱メチル化を誘導できることが明らかとなった。

８．ＰＲＤＭ１４によるＤＮＡ脱メチル化おけるＴｅｔ１及びＴｅｔ２（以下Ｔｅｔ１/２と記載する）の機能解析

ＥＳ細胞には内在的なＴｅｔ１/２が高発現している。ＰＲＤＭ１４によるＤＮＡ脱メチル化にＴｅｔ１/２が機能的に必要か否か検証するために、Ｔｅｔ１/２ダブルノックダウンＥＳ細胞にＰＲＤＭ１４を発現させ、脱メチル化によって発現上昇する遺伝子の発現と、プロモーター領域のメチル化変化を解析した。

［実験方法］

（１）Ｐｒｄｍ１４誘導的発現ＥＳ細胞の樹立

ＥＳ細胞にドキシサイクリン存在下で活性を持つｔＴＡをコードしたプラスミドと、ｔＴＡの制御領域の下流にＰｒｄｍ１４の遺伝子を挿入したプラスミドをトランスフェクションし、薬剤選別を行うことでドキシサイクリン誘導性Ｐｒｄｍ１４発現ＥＳ細胞の樹立を行った。

（２）Ｔｅｔ１/２ノックダウン／ドキシサイクリン誘導性Ｐｒｄｍ１４発現ES細胞の樹立

（１）で作製したドキシサイクリン誘導性Ｐｒｄｍ１４発現ＥＳ細胞に、Ｔｅｔ１/２に対するｓｈＲＮＡを発現するレンチウイルスを感染させ、Ｔｅｔ１/２ノックダウン／ドキシサイクリン誘導性Ｐｒｄｍ１４発現ＥＳ細胞を樹立した。

［結果及び考察］

結果を図１２に示す。コントロールＥＳ細胞及びＴｅｔ１/２ノックダウンＥＳ細胞にＰｒｄｍ１４を誘導的に発現させ、Ｓｌｃ２５ａ３１およびＰｉｗｉｌ２の発現変化を定量的ＲＴ-ＰＣＲで解析した。その結果、コントロール細胞ではＳｌｃ２５ａ３１およびＰｉｗｉｌ２ともに顕著な発現上昇が観察されたのに対して、Ｔｅｔ１/２ノックダウン細胞では発現上昇の抑制が観察された。また、Ｓｌｃ２５ａ３１およびＰｉｗｉｌ２のプロモーター領域の５－メチルシトシン、５－ヒドロキシメチルシトシンの量を解析したところ、コントロール細胞では５－メチルシトシンの減少が観察されたが、Ｔｅｔ１/２ノックダウンＥＳ細胞では脱メチル化が不完全であった。これらの結果から、ＰＲＤＭ１４によるＤＮＡ脱メチル化誘導にはＴＥＴ１/２の機能が必須であり、ＰＲＤＭ１４とＴＥＴの組み合わせが効率的な脱メチル化誘導に必要であることが示された。

９．ＰＲＤＭ１４による低品質ｉＰＳ細胞の品質改善

ＰＲＤＭ１４によるＤＮＡ脱メチル化誘導活性をｉＰＳ細胞の品質改善への応用の可能性を検証した。ｉＰＳ細胞は株間ごとに性質が大きく異なり、分化の方向性の偏りや分化抵抗性などの問題が報告されている。今回、多能性誘導因子であるＮａｎｏｇ遺伝子の発現が低い低品質ｉＰＳ細胞にＰｒｄｍ１４を発現させることで、品質改善の可能性を検証した。

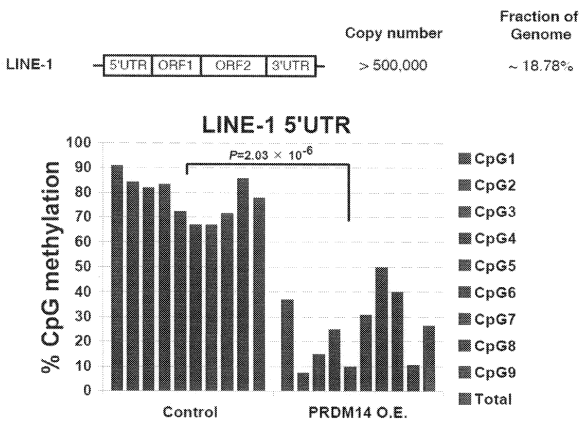
［実験方法］

Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４及びｃ-ｍｙｃをレトロウイルスを用いて、Ｎａｎｏｇの発現をＧＦＰで可視化することができる、Ｎａｎｏｇ-ＥＧＦＰ-Ｉｒｅｓ-Ｐｕｒｏトランスジェニックマウスから樹立した胎児繊維芽細胞に発現させた。培養後、ＥＳ細胞と形態が酷似しているが、ＥＧＦＰの発現が低い細胞（低品質ｉＰＳ細胞）を樹立した。その後、ドキシサイクリン誘導性Ｐｒｄｍ１４高発現低品質ｉＰＳ細胞を作製し、Ｐｒｄｍ１４の発現誘導に伴うＥＧＦＰの発現変動、遺伝子発現変動を解析した。また、Ｎａｎｏｇ遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態は、ＧｌｕｃＭＳ-ｑＰＣＲで定量した。

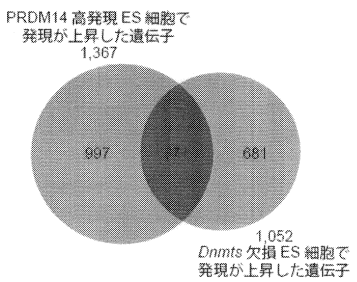
［結果及び考察］

結果を図１３～１５に示す。Ｐｒｄｍ１４の発現誘導に伴い、多能性誘導因子ＮａｎｏｇおよびＫｌｆ２の発現上昇が観察された（図１４）。また、低品質ｉＰＳ細胞ではＴｅｔ１/２の高発現が観察されたため、Ｐｒｄｍ１４がＴｅｔ１/２と協調してＤＮＡ脱メチル化誘導を行っている可能性が考えられた。そこで、Ｎａｎｏｇプロモーター領域のメチル化解析を行った結果、Ｐｒｄｍ１４の発現誘導に伴いＤＮＡメチル化の減少が観察された（図１５）。これらの結果は、ＰＲＤＭ１４とＴＥＴを組み合わせることで、低品質ｉＰＳ細胞の異常メチル化を修復できることを示している。

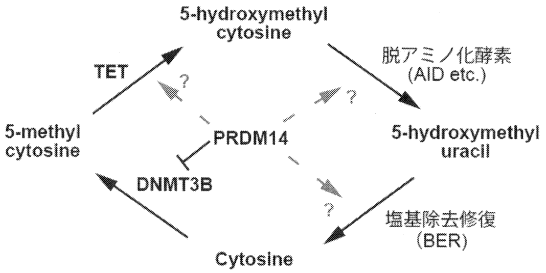
【図１】



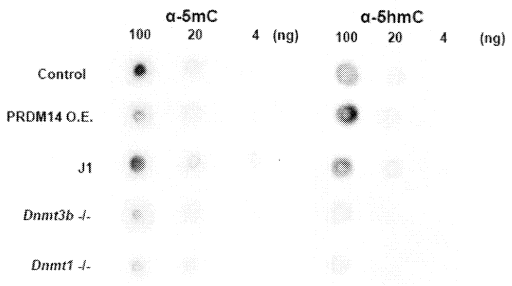
【図２】



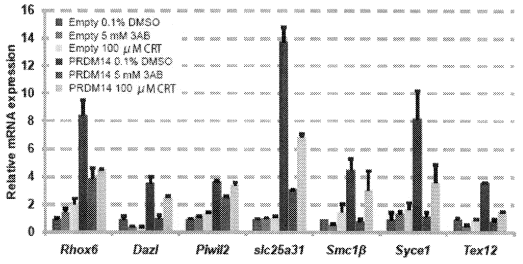
【図３】



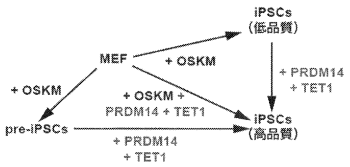
【図４】



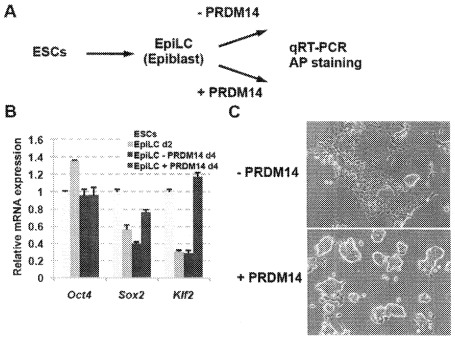
【図５】



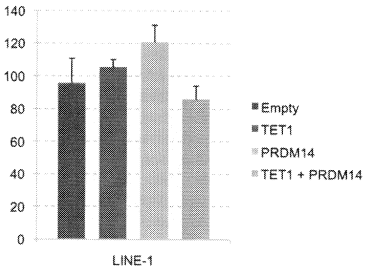
【図６】



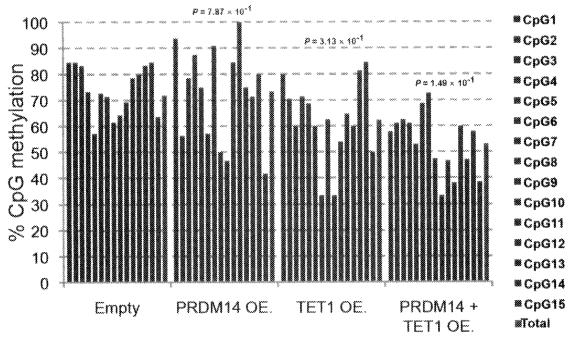
【図７】



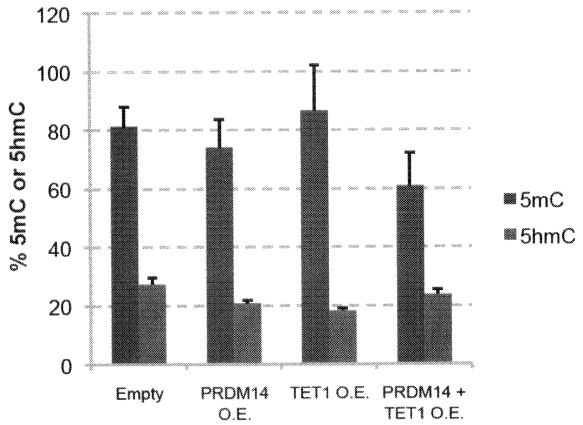
【図８】



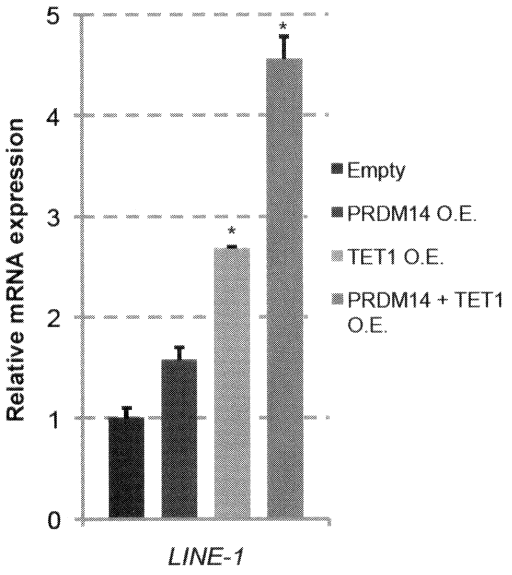
【図９】



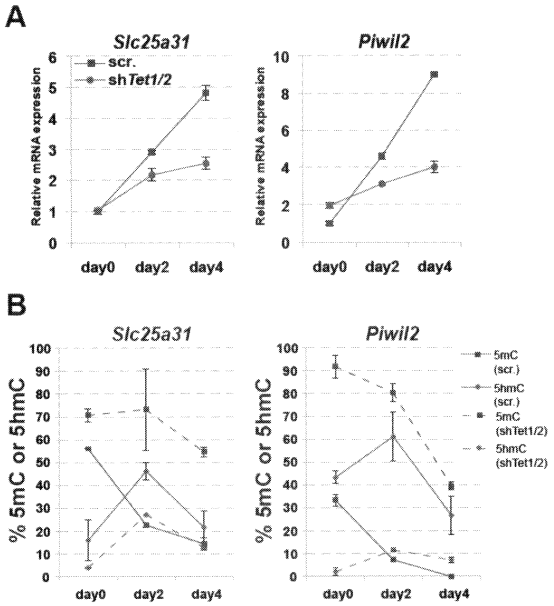
【図１０】



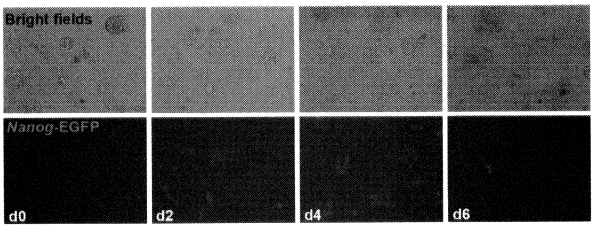
【図１１】



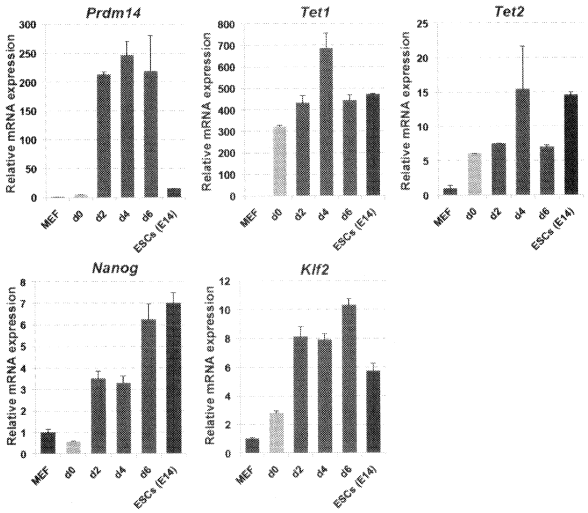
【図１２】



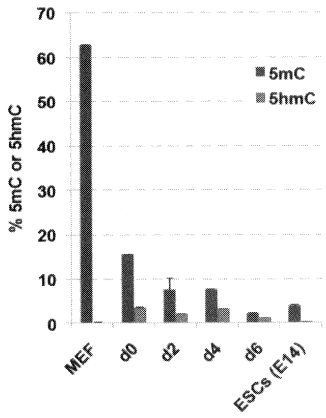
【図１３】



【図１４】



【図１５】



【配列表】
0006161261000001.app

フロントページの続き

(56)参考文献 国際公開第２０１０／０３７００１（WO，Ａ１）
Biochem. Biophys. Res. Commun., ２００８年, Vol. 367, p. 899-905
生化学, ２００９年 9月２５日, 2T5a-18
Nature, ２０１１年 5月１９日, Vol. 473, p. 398-402

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １５／００ － １５／９０
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＲＥＧＩＳＴＲＹ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＰｕｂＭｅｄ
ＷＰＩＤＳ／ＷＰＩＸ（ＳＴＮ）