

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-532088

(P2015-532088A)

(43) 公表日 平成27年11月9日(2015.11.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/873 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 K	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/074 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 D	4 H O 4 5
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 69 頁)

(21) 出願番号	特願2015-521172 (P2015-521172)	(71) 出願人	504132272 国立大学法人京都大学
(86) (22) 出願日	平成25年10月23日 (2013.10.23)		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(85) 翻訳文提出日	平成27年4月23日 (2015.4.23)	(74) 代理人	100080791 弁理士 高島 一
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/079474	(74) 代理人	100125070 弁理士 土井 京子
(87) 国際公開番号	W02014/065435	(74) 代理人	100136629 弁理士 鎌田 光宣
(87) 国際公開日	平成26年5月1日 (2014.5.1)	(74) 代理人	100121212 弁理士 田村 弥栄子
(31) 優先権主張番号	61/717,250	(74) 代理人	100117743 弁理士 村田 美由紀
(32) 優先日	平成24年10月23日 (2012.10.23)	(74) 代理人	100163658 弁理士 小池 順造
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 効率的に人工多能性幹細胞を樹立する方法

(57) 【要約】

本発明は、原始線条 (PrS) 形成に関与するタンパク質、好ましくはFoxh1、又はそれをコードする核酸を核初期化工程において体細胞と接触させることを含む、i P S 細胞の樹立効率を改善する方法を提供する。。また、PrS形成に関与するタンパク質又はそれをコードする核酸、及び核初期化物質を体細胞に接触させることを含む、i P S 細胞を製造する方法を提供する。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

核の初期化ステップにおいて、原始線条 (PrS) 形成に関与するタンパク質又はそれをコードする核酸と、体細胞とを接触させることを含む、i P S 細胞の樹立効率を改善する方法。

【請求項 2】

タンパク質が、Foxh1、brachyury、gooseoid、Foxa2、eomesodermin、LHX1、Sox17、MIXL1、Lefty2、Nodal、Hand1、Wnt3、noggin、CER1、Foxf1、GATA4、GATA6、GSC、HESX1、HNF1A、HNF4A、OTX2、RNF111、Sox7、SP5、TBX6、Foxb1、Foxf2及びFoxg1からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

タンパク質が、Foxh1、brachyury、Foxa2、LHX1、Foxf1、Foxb1、Foxf2及びFoxg1からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

タンパク質がFoxh1である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

体細胞が、核初期化ステップにおいてGlis1、それをコードする核酸及び / 又はp53抑制因子によって更に接触させられる、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

原始線条 (PrS) 形成に関与するタンパク質又はそれをコードする核酸を含む、i P S 細胞の樹立効率を改善するための剤。

20

【請求項 7】

タンパク質が、Foxh1、brachyury、gooseoid、Foxa2、eomesodermin、LHX1、Sox17、MIXL1、GDF3、Lefty2、Nodal、Hand1、Wnt3、noggin、CER1、Foxf1、GATA4、GATA6、HESX1、HNF1A、HNF4A、OTX2、RNF111、Sox7、SP5、TBX6、Foxb1、Foxf2及びFoxg1からなる群から選択される、請求項 6 に記載の剤。

【請求項 8】

タンパク質が、Foxh1、brachyury、Foxa2、LHX1、Foxf1、Foxb1、Foxf2及びFoxg1からなる群から選択される、請求項 6 に記載の剤。

【請求項 9】

タンパク質がFoxh1である、請求項 6 に記載の剤。

30

【請求項 10】

Glis1又はそれをコードする核酸及び / 又はp53抑制因子を更に含む、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の剤。

【請求項 11】

原始線条 (PrS) 形成に関与するタンパク質又はそれをコードする核酸、及び核初期化物質と、体細胞とを接触させることを含む、i P S 細胞の製造方法。

【請求項 12】

核初期化物質が、Octファミリーメンバー、Soxファミリーメンバー、Klfファミリーメンバー、Mycファミリーメンバー、Lin ファミリーメンバー及びNanogと、それをコードする核酸とからなる群から選択される、請求項 11 に記載の方法。

40

【請求項 13】

核初期化物質が、Oct3/4、Sox2及びKlf4、又はそれをコードする核酸である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

核初期化物質が、Oct3/4、Sox2、Klf4、L-Mycもしくはc-Myc、又はそれをコードする核酸である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 15】

原始線条 (PrS) 形成に関与するタンパク質が、Foxファミリーメンバー、brachyury、gooseoid、eomesodermin、LHX1、Sox17、MIXL1、Lefty2、Nodal、Hand1、Wnt3、noggin、

50

CER1、GATA4、GATA6、GSC、HESX1、HNF1A、HNF4A、OTX2、RNF111、Sox7、SP5及びTBX6からなる群から選択される、請求項11～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

Foxファミリーメンバーが、Foxa1、Foxa2、Foxa3、Foxb1、Foxc1、Foxc2、Foxd1、Foxd3、Foxd5、Foxe3、Foxf1、Foxf2、Foxg1、Foxh1、Foxi1、Foxi2、Foxj1、Foxj2、Foxj3、Foxk1、Foxk2、Foxl2、Foxm1、Foxn1、Foxan2、Foxn3、Foxn4、Foxo3、Foxo4、Foxp1、Foxp3、Foxp4、Foxr1、Foxr2及びFoxs1からなる群から選択される、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

タンパク質が、Foxh1、brachyury、Foxa2、LHX1、Foxf1、Foxb1、Foxf2及びFoxg1からなる群から選択される、請求項11～14のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項18】

原始線条(PrS)形成に關与するタンパク質がFoxh1である、請求項11～14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

体細胞が、Glis1又はそれをコードする核酸及び/又はp53抑制因子によって更に接触させられる、請求項11～18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

原始線条(PrS)形成に關与するタンパク質又はそれをコードする核酸、及び核初期化物質を含む、体細胞からiPS細胞を誘導するための剤。

20

【請求項21】

核初期化物質が、Octファミリーメンバー、Soxファミリーメンバー、Klfファミリーメンバー、Mycファミリーメンバー、Linファミリーメンバー及びNanogと、それらをコードする核酸とからなる群から選択される、請求項20に記載の剤。

【請求項22】

核初期化物質が、Oct3/4、Sox2及びKlf4、又はそれらをコードする核酸である、請求項20の剤。

【請求項23】

核初期化物質が、Oct3/4、Soxと、Klf4、L-Myc若しくはc-Myc、又はそれらをコードする核酸である、請求項20の剤。

30

【請求項24】

原始線条(PrS)形成に關与するタンパク質が、Foxファミリーメンバー、brachyury、gooseoid、eomesodermin、LHX1、Sox17、MIXL1、GDF3、Lefty2、Nodal、Hand1、Wnt3、noggin、CER1、GATA4、GATA6、GSC、HESX1、HNF1A、HNF4A、OTX2、RNF111、Sox7、SP5及びTBX6からなる群から選択される、請求項20～23のいずれか1項に記載の剤。

【請求項25】

Foxファミリーメンバーが、Foxa1、Foxa2、Foxa3、Foxb1、Foxc1、Foxc2、Foxd1、Foxd3、Foxd5、Foxe3、Foxf1、Foxf2、Foxg1、Foxh1、Foxi1、Foxi2、Foxj1、Foxj2、Foxj3、Foxk1、Foxk2、Foxl2、Foxm1、Foxn1、Foxan2、Foxn3、Foxn4、Foxo3、Foxo4、Foxp1、Foxp3、Foxp4、Foxr1、Foxr2及びFoxs1からなる群から選択される、請求項24の方法。

40

【請求項26】

タンパク質が、Foxh1、brachyury、Foxa2、LHX1、Foxf1、Foxb1、Foxf2及びFoxg1からなる群から選択される、請求項20～23のいずれか1項に記載の剤。

【請求項27】

原始線条(PrS)形成に關与するタンパク質がFoxh1である、請求項20～23のいずれか1項に記載の剤。

【請求項28】

Glis1又はそれをコードする核酸及び/又はp53抑制因子を更に含む、請求項20～27のいずれか1項に記載の剤。

【請求項29】

50

Foxh1をコードする外因性の核酸を含む、i P S 細胞。

【請求項 3 0】

外因性の核酸がゲノムに組み込まれている、請求項 2 9 に記載の i P S 細胞。

【請求項 3 1】

請求項 2 9 又は 3 0 に記載の i P S 細胞に対し、上記 i P S 細胞を体細胞に分化させるための分化誘導処理を行うことを含む、体細胞の製造方法。

【請求項 3 2】

体細胞を製造する方法であって、工程：

(1) 請求項 1 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法によって、i P S 細胞を製造する工程、及び

(2) 工程(1)によって得られた i P S 細胞に対し、当該 i P S 細胞を体細胞に分化させるための分化誘導処理を行う工程、を含む方法。

【請求項 3 3】

i P S 細胞の樹立効率を改善するための、原始線条 (PrS) 形成に關与するタンパク質又はそれをコードする核酸の使用。

【請求項 3 4】

タンパク質が、Foxh1、brachyury、gooseoid、Foxa2、eomesodermin、LHX1、Sox17、MIXL1、Lefty2、Nodal、Hand1、Wnt3、noggin、CER1、GATA4、GATA6、GSC、HESX1、HNF1A、HNF4A、OTX2、RNF111、Sox7、SP5及びTBX6、Foxb1、Foxf2及びFoxg1からなる群から選択される、請求項 3 3 に記載の使用。

【請求項 3 5】

タンパク質が、Foxh1、brachyury、Foxa2、LHX1、Foxf1、Foxb1、Foxf2及びFoxg1からなるグループから選択される、請求項 3 3 に記載の使用。

【請求項 3 6】

タンパク質が、Foxh1である、請求項 3 3 の使用。

【請求項 3 7】

i P S 細胞を製造するための核初期化物質と組み合わせた、原始線条 (PrS) 形成に關与するタンパク質又はそれをコードする核酸の使用。

【請求項 3 8】

核初期化物質が、Octファミリーメンバー、Soxファミリーメンバー、Klfファミリーメンバー、Mycファミリーメンバー、Lin28ファミリーメンバー、及びNanogと、それらをコードする核酸とからなる群から選択される、請求項 3 7 に記載の使用。

【請求項 3 9】

核初期化物質が、Oct3/4、Sox2及びKlf4、又はそれらをコードする核酸である、請求項 3 7 の使用。

【請求項 4 0】

核初期化剤が、Oct3/4、Sox2、Klf4、L-Myc若しくはc-Myc、又はそれらをコードする核酸である、請求項 3 7 に記載の使用。

【請求項 4 1】

原始線条 (PrS) 形成に關与するタンパク質が、Foxファミリーメンバー、brachyury、gooseoid、eomesodermin、LHX1、Sox17、MIXL1、Lefty2、Nodal、Hand1、Wnt3、noggin、CER1、GATA4、GATA6、GSC、HESX1、HNF1A、HNF4A、OTX2、RNF111、Sox7、SP5及びTBX6からなる群から選択される、請求項 3 7 ~ 4 0 のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 4 2】

Foxファミリーメンバーが、Foxa1、Foxa2、Foxa3、Foxb1、Foxc1、Foxc2、Foxd1、Foxd3、Foxd5、Foxe3、Foxf1、Foxf2、Foxg1、Foxh1、Foxi1、Foxi2、Foxj1、Foxj2、Foxj3、Foxk1、Foxk2、Foxl2、Foxm1、Foxn1、Foxan2、Foxn3、Foxn4、Foxo3、Foxo4、Foxp1、Foxp3、Foxp4、Foxr1、Foxr2及びFoxs1からなる群から選択される、請求項 4 1 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 3】

タンパク質が、Foxh1、brachyury、Foxa2、LHX1、Foxf1、Foxb1、Foxf2及びFoxg1からなる群から選択される、請求項 3 7 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 4 4】

タンパク質がFoxh1である、請求項 3 7 ~ 4 0 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 4 5】

体細胞の製造における、請求項 2 9 又は 3 0 に記載の i P S 細胞の使用。

【請求項 4 6】

体細胞を製造する細胞のソースとしての、請求項 2 9 又は 3 0 に記載の i P S 細胞。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0 0 0 1】

発明の技術分野

本発明は、人工多能性幹細胞（以下、i P S 細胞という）の樹立効率を改善する方法及びそのための試薬に関し、より詳しくは、体細胞から i P S 細胞を樹立する効率を改善する因子（遺伝子又はタンパク質）及び上記因子を用いて i P S 細胞の樹立効率を改善する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

発明の背景

20

近年、マウス及びヒトの i P S 細胞が、相次いで樹立されている。Y a m a n a k a r a は、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc遺伝子をマウス及びヒトの線維芽細胞に導入し、それらの遺伝子を強制発現させることにより、i P S 細胞を誘導した[1-3]。T h o m s o n r a は、Klf4及びc-Mycの代わりに、Nanog及びLin28を用いてヒト i P S 細胞を作製した[4, 5]。しかしながら、i P S 細胞樹立の効率は 1 % 未満と低かった。

【0 0 0 3】

i P S 細胞樹立の効率を改善するための様々な取り組みがなされてきた。例えば、本発明者らは、p 5 3 - p 2 1 経路の抑制が、i P S 細胞の樹立効率を顕著に上昇させることを報告した[6, 7]。M a e k a w a r a は、Oct3/4、Sox2及びKlf4とともにGlis1を体細胞に導入することにより、i P S 細胞樹立の効率が顕著に改善することを報告した[8, 9]。また、Glis1は、不完全に初期化された細胞の増殖を抑制するが、完全に初期化された細胞を増殖させることが分かった。彼らは、初期化に関与すると報告されているいくつかの遺伝子発現をGlis1が増大させることにより、初期化を促進し得るということを発見した。

30

【先行技術文献】

【特許文献】

【0 0 0 4】

【特許文献 1】国際公開 2 0 0 7 / 0 6 9 6 6 6

【特許文献 4】国際公開 2 0 0 8 / 1 1 8 8 2 0

【特許文献 6】国際公開 2 0 0 9 / 1 5 7 5 9 3

40

【特許文献 8】国際公開 2 0 1 1 / 1 0 2 5 3 1

【非特許文献】

【0 0 0 5】

【非特許文献 2】Takahashi, K. and Yamanaka, S., Cell, 126: 663-676 (2006)

【非特許文献 3】Takahashi, K. et al., Cell, 131: 861-872 (2007)

【非特許文献 5】Yu, J. et al., Science, 318: 1917-1920 (2007)

【非特許文献 7】Hong, H. et al., Nature, 460: 1132-1135 (2009)

【非特許文献 9】Maekawa, M. et al., Nature, 474: 225-229 (2011)

【発明の概要】

【0 0 0 6】

50

本発明の目的は、iPS細胞樹立の効率を改善する方法、及びその方法を用いてiPS細胞を効率的に作製する方法を提供することである。

多能性の誘導を促進するための直接的な初期化過程を理解することは重要である。しかしながら、iPS細胞作製中の多数の非初期化細胞が、初期化過程の正確な分析を妨げる。この問題を克服するため、本発明者らは、多能性細胞に特異的な表面抗原である、発生しようとしている初期化細胞を捕捉するためのTRA-1-60を用いた。広範囲の遺伝子発現解析により、発生しようとしているTRA-1-60(+)のヒト初期化細胞は、原始線条(PrS)と一般的な遺伝子発現の特徴を共有することが明らかになった。

【0007】

初期化及びPrSを結び付ける別の証拠は、iPSC形成を促進する母系(maternal)転写因子として本発明者らが先に報告したGlis1から生じた。本発明者らは、Glis1が、ヒトES/iPS細胞に由来するPrS及び内胚葉系中胚葉において高度に発現しているが、未分化のヒト多能性幹細胞においてほとんど発現していないことを発見した。また、本発明者らは、ヒトES細胞におけるGlis1の強制発現は、多能性関連遺伝子だけでなく、PrS関連遺伝子の発現を顕著に増加させることも発見した。

10

【0008】

これらの発見から、本発明者らは、発生の間、PrS形成において重要な役割を果たす遺伝子がiPSC形成を促進し得るという仮説を立てた。ノックアウトマウス実験により、フォークヘッドボックスH1(Foxh1)という転写因子がPrS形成に不可欠であることが示されたため、本発明者らは、この仮説を確認するためにその転写因子に注目した。

20

【0009】

Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-MycとともにFoxh1を導入することにより、iPSCコロニーの数が顕著に増加した。Foxh1の効果は、2つの最も強力な既知の初期化エンハンサーであるp53のshRNA及びGlis1よりも強かった。Foxh1及びp53のshRNAは、相乗的な効果を示し、このことは、Foxh1がp53の抑制とは独立に初期化を促進することを示唆する。段階依存的なFoxh1の活性化により、より早い時期における初期化を確立するGlis1と対照的に、Foxh1が後期において初期化の効率性を向上させることが明らかになった。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、これらの調査結果に基づいて更なる調査を行い、本発明を完成させた。従って、本発明は以下

30

[1]核の初期化ステップにおいて、原始線条(PrS)形成に関与するタンパク質又はそれをコードする核酸と、体細胞とを接触させることを含む、iPS細胞の樹立効率を改善する方法。

[2]タンパク質が、Foxh1、brachyury、gooseoid、Foxa2、eomesodermin、LHX1、Sox17、MIXL1、Lefty2、Nodal、Hand1、Wnt3、noggin、CER1、Foxf1、GATA4、GATA6、GSC、HESX1、HNF1A、HNF4A、OTX2、RNF111、Sox7、SP5、TBX6、Foxb1、Foxf2及びFoxg1からなる群から選択される、[1]に記載の方法。

[3]タンパク質が、Foxh1、brachyury、Foxa2、LHX1、Foxf1、Foxb1、Foxf2及びFoxg1からなる群から選択される、[1]に記載の方法。

40

[4]タンパク質がFoxh1である、[1]に記載の方法。

[5]体細胞が、核初期化ステップにおいてGlis1、それをコードする核酸及び/又はp53抑制因子によって更に接触させられる、[1]~[4]のいずれかに記載の方法。

[6]原始線条(PrS)形成に関与するタンパク質又はそれをコードする核酸を含む、iPS細胞の樹立効率を改善するための剤。

[7]タンパク質が、Foxh1、brachyury、gooseoid、Foxa2、eomesodermin、LHX1、Sox17、MIXL1、GDF3、Lefty2、Nodal、Hand1、Wnt3、noggin、CER1、Foxf1、GATA4、GATA6、HESX1、HNF1A、HNF4A、OTX2、RNF111、Sox7、SP5、TBX6、Foxb1、Foxf2及びFoxg1からなる群から選択される、[6]に記載の剤。

[8]タンパク質が、Foxh1、brachyury、Foxa2、LHX1、Foxf1、Foxb1、Foxf2及びFoxg1か

50

らなる群から選択される、[6]に記載の剤。

[9]タンパク質がFoxh1である、[6]に記載の剤。

[10]Glis1又はそれをコードする核酸及び/又はp53抑制因子を更に含む、[6]～[9]のいずれかに記載の剤。

[11] 原始線条(PrS)形成に關与するタンパク質又はそれをコードする核酸、及び核初期化物質と、体細胞とを接触させることを含む、iPS細胞の製造方法。

[12] 核初期化物質が、Octファミリーメンバー、Soxファミリーメンバー、Klfファミリーメンバー、Mycファミリーメンバー、Linファミリーメンバー及びNanogと、それをコードする核酸とからなる群から選択される、[11]に記載の方法。

[13]核初期化物質が、Oct3/4、Sox2及びKlf4、又はそれをコードする核酸である、[11]に記載の方法。

[14] 核初期化物質が、Oct3/4、Sox2、Klf4、L-Mycもしくはc-Myc、又はそれをコードする核酸である、[11]に記載の方法。

[15] 原始線条(PrS)形成に關与するタンパク質が、Foxファミリーメンバー、brachyury、goosecoid、eomesodermin、LHX1、Sox17、MIXL1、Lefty2、Nodal、Hand1、Wnt3、noggin、CER1、GATA4、GATA6、GSC、HESX1、HNF1A、HNF4A、OTX2、RNF111、Sox7、SP5及びTBX6からなる群から選択される、[11]～[14]のいずれかに記載の方法。

[16] Foxファミリーメンバーが、Foxa1、Foxa2、Foxa3、Foxb1、Foxc1、Foxc2、Foxd1、Foxd3、Foxd5、Foxe3、Foxf1、Foxf2、Foxg1、Foxh1、Foxi1、Foxi2、Foxj1、Foxj2、Foxj3、Foxk1、Foxk2、Foxl2、Foxm1、Foxn1、Foxan2、Foxn3、Foxn4、Foxo3、Foxo4、Foxp1、Foxp3、Foxp4、Foxr1、Foxr2及びFoxs1からなる群から選択される、[15]に記載の方法。

[17]タンパク質が、Foxh1、brachyury、Foxa2、LHX1、Foxf1、Foxb1、Foxf2及びFoxg1からなる群から選択される、[11]～[14]のいずれかに記載の方法。

[18]原始線条(PrS)形成に關与するタンパク質がFoxh1である、[11]～[14]のいずれかに記載の方法。

[19] 体細胞が、Glis1又はそれをコードする核酸及び/又はp53抑制因子によって更に接触させられる、[11]～[18]のいずれかに記載の方法。

[20] 原始線条(PrS)形成に關与するタンパク質又はそれをコードする核酸、及び核初期化物質を含む、体細胞からiPS細胞を誘導するための剤。

[21] 核初期化物質が、Octファミリーメンバー、Soxファミリーメンバー、Klfファミリーメンバー、Mycファミリーメンバー、Linファミリーメンバー及びNanogと、それらをコードする核酸とからなる群から選択される、[20]に記載の剤。

[22]核初期化物質が、Oct3/4、Sox2及びKlf4、又はそれらをコードする核酸である、[20]の剤。

[23] 核初期化物質が、Oct3/4、Soxと、Klf4、L-Myc若しくはc-Myc、又はそれらをコードする核酸である、[20]の剤。

[24] 原始線条(PrS)形成に關与するタンパク質が、Foxファミリーメンバー、brachyury、goosecoid、eomesodermin、LHX1、Sox17、MIXL1、GDF3、Lefty2、Nodal、Hand1、Wnt3、noggin、CER1、GATA4、GATA6、GSC、HESX1、HNF1A、HNF4A、OTX2、RNF111、Sox7、SP5及びTBX6からなる群から選択される、[20]～[23]のいずれかに記載の剤。

[25] Foxファミリーメンバーが、Foxa1、Foxa2、Foxa3、Foxb1、Foxc1、Foxc2、Foxd1、Foxd3、Foxd5、Foxe3、Foxf1、Foxf2、Foxg1、Foxh1、Foxi1、Foxi2、Foxj1、Foxj2、Foxj3、Foxk1、Foxk2、Foxl2、Foxm1、Foxn1、Foxan2、Foxn3、Foxn4、Foxo3、Foxo4、Foxp1、Foxp3、Foxp4、Foxr1、Foxr2及びFoxs1からなる群から選択される、[24]の方法。

[26] タンパク質が、Foxh1、brachyury、Foxa2、LHX1、Foxf1、Foxb1、Foxf2及びFoxg1からなる群から選択される、[20]～[23]のいずれかに記載の剤。

[27]原始線条(PrS)形成に關与するタンパク質がFoxh1である、[20]～[23]のいずれかに記載の剤。

[28]Glis1又はそれをコードする核酸及び/又はp53抑制因子を更に含む、[20]～[27]

10

20

30

40

50

のいずれかに記載の剤。

[29]Foxh1をコードする外因性の核酸を含む、i P S 細胞。

[30]外因性の核酸がゲノムに組み込まれている、[29]に記載のi P S 細胞。

[31][29]又は[30]に記載のi P S 細胞に対し、上記i P S 細胞を体細胞に分化させるための分化誘導処理を行うことを含む、体細胞の製造方法。

[32] 体細胞を製造する方法であって、工程：

(1) [11] ~ [19] のいずれかに記載の方法によって、i P S 細胞を製造する工程、及び

(2) 工程(1)によって得られたi P S 細胞に対し、当該i P S 細胞を体細胞に分化させるための分化誘導処理を行う工程、

を含む方法。

[33] i P S 細胞の樹立効率を改善するための、原始線条 (PrS) 形成に關与するタンパク質又はそれをコードする核酸の使用。

[34] タンパク質が、Foxh1、brachyury、gooseoid、Foxa2、eomesodermin、LHX1、Sox17、MIXL1、Lefty2、Nodal、Hand1、Wnt3、noggin、CER1、GATA4、GATA6、GSC、HESX1、HNF1A、HNF4A、OTX2、RNF111、Sox7、SP5及びTBX6、Foxb1、Foxf2及びFoxg1からなる群から選択される、[33]に記載の使用。

[35] タンパク質が、Foxh1、brachyury、Foxa2、LHX1、Foxf1、Foxb1、Foxf2及びFoxg1からなるグループから選択される、[33]に記載の使用。

[36] タンパク質が、Foxh1である、[33]に記載の使用。

[37] i P S 細胞を製造するための核初期化物質と組み合わせた、原始線条 (PrS) 形成に關与するタンパク質又はそれをコードする核酸の使用。

[38] 核初期化物質が、Octファミリーメンバー、Soxファミリーメンバー、Klfファミリーメンバー、Mycファミリーメンバー、Lin28ファミリーメンバー、及びNanogと、それらをコードする核酸とからなる群から選択される、[37]に記載の使用。

[39] 核初期化物質が、Oct3/4、Sox2及びKlf4、又はそれらをコードする核酸である、[37]に記載の使用。

[40] 核初期化剤が、Oct3/4、Sox2、Klf4、L-Myc若しくはc-Myc、又はそれらをコードする核酸である、[37]に記載の使用。

[41] 原始線条 (PrS) 形成に關与するタンパク質が、Foxファミリーメンバー、brachyury、gooseoid、eomesodermin、LHX1、Sox17、MIXL1、Lefty2、Nodal、Hand1、Wnt3、noggin、CER1、GATA4、GATA6、GSC、HESX1、HNF1A、HNF4A、OTX2、RNF111、Sox7、SP5及びTBX6からなる群から選択される、[37] ~ [40]のいずれかに記載の使用。

[42] Foxファミリーメンバーが、Foxa1、Foxa2、Foxa3、Foxb1、Foxc1、Foxc2、Foxd1、Foxd3、Foxd5、Foxe3、Foxf1、Foxf2、Foxg1、Foxh1、Foxi1、Foxi2、Foxj1、Foxj2、Foxj3、Foxk1、Foxk2、Foxl2、Foxm1、Foxn1、Foxan2、Foxn3、Foxn4、Foxo3、Foxo4、Foxp1、Foxp3、Foxp4、Foxr1、Foxr2及びFoxs1からなる群から選択される、[41]に記載の方法。

[43] タンパク質が、Foxh1、brachyury、Foxa2、LHX1、Foxf1、Foxb1、Foxf2及びFoxg1からなる群から選択される、[37] ~ [40]のいずれかに記載の使用。

[44] タンパク質がFoxh1である、[37] ~ [40]のいずれかに記載の使用。

[45] 体細胞の製造における、[29]又は[30]に記載のi P S 細胞の使用。

[46] 体細胞を製造する細胞のソースとしての、[29]又は[30]に記載のi P S 細胞を提供する。

本発明のi P S 細胞の樹立効率の改善因子は、上述したように、既知の最も強力な初期化エンハンサーであるp53のshRNA及びGli3に比べて、c-Mycを除く3因子を用いてより効率的にi P S 細胞を樹立することができるため、例えば、i P S 細胞の再生医療への適用において有用である(例えば、移植のためのヒト分化細胞の安全な作成)。

【図面の簡単な説明】

【0011】

10

20

30

40

50

【図1】図1は、TRA-1-60 (+) 細胞が、ヒトiPSCの起源であることを示す。a. ヒト細胞初期化の期間中のTRA-1-60 (+) 中間体細胞の概略図。b. ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) へのOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc (OSKM) 導入後のTRA-1-60 (+) 細胞の割合。c. 各時点における単一のTRA-1-60 (+) 細胞からのiPSCの生成効率。コロニー形成効率が、単一のTRA-1-60 (+) 細胞がソートされた96ウェルプレートにおいてiPSCコロニーの形成されたウェルの数によって推定された。N=3であり、エラーバーは標準偏差を示す。d. 導入後7日目の 1×10^5 個のTRA-1-60 (+) 及び (-) 細胞に由来する28日目のiPSCコロニーの数。N=3。e. TRA-1-60 (+) 細胞における多能性関連遺伝子の発現。ESC発現によって正規化された各時点の3つのマイクロアレイデータの平均の発現が示される。

【図2】図2は、TRA-1-60 (+) 中間体細胞の特徴を示す。a. 生成途中の初期化細胞、親のHDF及びESC/iPSC細胞 (ESC/iPSC) のPCA (主成分分析)。全てのマイクロアレイデータを第1及び第2主成分で展開した。矢印は、初期化進行の向きを示す。b. ヒト細胞の初期化中に変動する遺伝子の分類。一方向性の (緑) 及び一過的に変動した (赤) 遺伝子クラスターの遺伝子オントロジー分析。本発明者らは、統計的な有意性で上位10番の生物学的用語を選択する。c. 初期化中の2つのカテゴリーの遺伝子発現の変化。第1主成分 (一方向性) 及び第2主成分 (一過的に変動) に含まれる遺伝子発現を、PrS、ME、NE及びEN等の3胚葉系列と比較した。d. 生成途中の初期化細胞、親のHDF、ESC/iPSC及び3系譜の細胞のPCA。マイクロアレイデータの全内容を、第2主成分と第3主成分とで展開した。矢印は、初期化の進行方向を示す。e. 各時点のTRA-1-60 (+) 細胞 (d3-49)、親のHDF及びESC/iPSCからのマイクロアレイ発現データのPCA。3つのマイクロアレイデータが各サンプルとして示される。緑の矢印は、推定上の初期化の進行方向を示す。PCA及び階層的クラスタ解析のいずれも、細胞サンプルについて3回分の平均データから作成した。f. ヒト細胞の初期化の間の変動遺伝子の分類。第1主成分に高度に寄与する遺伝子 (絶対寄与率 >0.6) が遺伝子オントロジー分析によって分類された。緑及び赤のバーは、一過的に抑制され、また活性化された上位10カテゴリーをそれぞれ示す。g. TRA-1-60 (+) 細胞及び様々なヒト組織の網羅的な遺伝子発現の比較。親のHDFと、指定された時点におけるTRA-1-60 (+) 細胞と、ESC/iPSCと、神経外胚葉 (NE)、内胚葉 (EN)、中胚葉 (ME) 及び原始線条 (PrS) 等のESC/iPSC由来の分化細胞と、末梢血単核細胞 (PBMC)、神経前駆細胞 (NPC)、上皮 (EDM)、前立腺上皮細胞 (PrEC)、正常気管支上皮組織 (NHBE) 脂肪組織由来幹細胞 (ASC)、星状膠細胞 (HA) 及び真皮線維芽細胞 (HDF) 等のヒト組織及び組織由来細胞との網羅的な遺伝子発現の階層的なクラスタ化が示される。h. 間葉及び上皮マーカーの発現。マイクロアレイデータからの代表的な間葉及び上皮マーカーの発現が示される。

【図3】図3は、初期化の後期段階における生成途中の初期化細胞の一過的なPrS様の状態を示す。a. TRA-1-60 (+) 細胞及び胚葉の間の網羅的な遺伝子発現の比較。親HDF、表示された時点のTRA-1-60 (+) 細胞、ESC/iPSCや、EDM、PrS、EN、ME及びNE等の分化細胞における網羅的な遺伝子発現の階層的なクラスタ化及びヒートマップが示される。b. TRA-1-60 (+) 細胞において一過的に上方制御されるPrSに豊富な遺伝子。内胚葉 (EN)、中胚葉 (ME)、神経外胚葉 (NE) 又は原始線条 (PrS) に豊富な遺伝子における常に上方制御され (黒)、常に下方制御され (青)、一過的に上方制御され (赤)、また、一過的に下方制御された (緑) 遺伝子の割合を示す。c. ヒト細胞の初期化の間における代表的な原始線条マーカー遺伝子の発現。親HDFと比較したTRA-1-60 (+) 細胞における選択された原始線条マーカー遺伝子の相対的発現を示す。これらの分析において各サンプルの3つのマイクロアレイデータの平均が使用された。d. 初期化中のT遺伝子の発現及び活性化ヒストンマーク。青い丸は、HDFと比較したTの相対的発現を示す。赤いひし形は、T遺伝子のプロモーター領域のH3K4me3の占有率を示す。N=3。エラーバーは標準偏差を示す。e. Tの単一細胞での発現。単一のHDF、導入後20日目のTRA-1-60 (+) 細胞及びESCにおけるNANOG及びTの発現。各点は、単一細胞サンプルを示す。相対的発現がqPCRのCtとして示された。f. T遺伝子の免疫組織化学。HDF、20日目のTRA-1-60 (+) 細胞、ESC及びESC由来PrSにおけるNANOG (赤) 及びT (緑) の発現が免疫組織化学によって分析された。核 (Nuc

10

20

30

40

50

leuses) は、Hoechst33342染色 (青) によって可視化された。バーは、100 μ mを示す。g. 各時点のTRA-1-60 (+) 細胞、親細胞株 (HDF、HA、ASC、NHBE及びPrEC)、ESC/iPSC及び、EN、NE、PrS及びME等の分化細胞からのマイクロアレイ発現データのPCA。各矢印は、想定される初期化の進行の方向を示す。HA、星状膠細胞; NHBE、気管支上皮; PrEC、前立腺上皮細胞; HDF、ヒト真皮線維芽細胞; NE、神経外肺葉; ME、中胚葉; PrS、原始線条; EN、内胚葉。

【図4】図4は、生成途中の初期化細胞が一過的にPrS関連遺伝子を発現することを示す。a. 初期化中のTRA-1-60 (+) 細胞の初期応答PrS関連遺伝子。b. 初期化中のTRA-1-60 (+) 細胞の後期応答遺伝子。c. 多様な起源に由来するTRA-1-60 (+) 細胞の特徴がPrSにシフトした。起源細胞 (黒丸)、TRA-1-60 (+) 細胞 (白丸) 及びヒトESC/iPSCに由来するPrSのPCA (四角)。マイクロアレイデータの全内容が、コンポーネント 1及び2とともに提示された。矢印は、初期化の進行方向を示す。

【図5】図5は、GLIS1がPrS及び中胚葉への細胞運命の変更を伴う初期化を加速することを示す。a. E5.5-6.5の野生型胚が解剖され、先に記載された通り、Glis1 cDNAプローブを用いたホールマウントインシチュハイブリダイゼーションが行われた (genes Dev 15, 1242-1256, doi:10.1101/gad. 883901 (2001); J Biol Chem 277, 30901-30913, doi:10.1074/jbc.M203563200 [pii] (2002))。b. ヒトESC/iPSCから分化したPrSにおけるT及びGLIS1の発現。本発明者らは、正規化のためにG3PDH発現の結果を用いてESCを1に調整した。c. 未分化のヒトESC/iPSC及びPrSの位相差画像。d. GLIS1トランスジェニックESCにおける初期化関連遺伝子の発現。空ベクター (Mock)、GLIS1又はNANOGを導入されたESCは、Matrigelでコートされたプレート上のmTeSR1培地において維持された。初期化関連遺伝子の発現は、qRT-PCRによって定量化された。本発明者らは、正規化のためにG3PDH発現の結果を用いてMockを1に調整した。e. GLIS1トランスジェニックESCにおける内胚葉系中胚葉遺伝子の発現。図3dに示される細胞のPrS及び中胚葉関連遺伝子の発現は、qRT-PCRによって定量化された。本発明者らは、正規化のためにG3PDH発現の結果を用いてMockを1に調整した。f. マイクロアレイ遺伝子発現データの散布図。染色された点は、表示された細胞タイプに高く (赤) 又は低く (青) 発現された遺伝子を示す。g. GLIS1は、ESCの分化可能性の偏りを誘導する。空ベクター (Mock)、GLIS1又はNANOGを導入され、表示された細胞系列へ分化させられたESCの相対的な細胞数。N=3。

【図6】図6は、FOXH1が初期化効率を向上させることを示す。a. FOXH1は、ESC/iPSCのPrSへの分化に必須である。本発明者らは、標的のないsiRNA (nc) 又はFOXH1のsiRNA (F) を導入されたESC/iPSCのPrSへの分化を行い、その後、多能性幹細胞マーカー及びPrSマーカーをqRT-PCRによって定量化した。本発明者らは、正規化のためにG3PDH発現の結果を用い、導入されていないESC (-) に由来するPrSを1に調整した。b. FOXH1は、iPSC生成を促進する。本発明者らは、OSKMとともに、各PrS関連遺伝子をHDFに導入した。導入後24日目にiPSCコロニーの数が計数された。N=3。エラーバーは、標準偏差を示す。アスタリスクは、Mockと比較してP<0.05であることを示す。c. FOXH1の作用は、p53とは独立している。本発明者らは、+及び-で示されるように、OSKMとともにp53のshRNA、FOXH1及びGLIS1の多様な組み合わせをHDFへ導入した。導入後24日目のiPSCコロニーの相対的な数が示される。N=3。エラーバーは、標準偏差を示す。アスタリスクは、P<0.05であることを示す。d. TRA-1-60 (+) 細胞における内在性FOXH1の発現。qRT-PCRによって評価された内在性FOXH1の相対的発現が示される (vs. iPSC (左) 又はHDF (右))。N=3。エラーバーは、標準偏差を示す。e. FOXH1は、後期段階において初期化の効率に影響を与える。本発明者らは、OSKMのみ (Mock)、又はFOXH1とともに、HDFへ導入した。その後、本発明者らは、白丸で示されたタイミングから黒丸で示されたタイミングまで100nMのDexを培地に加えた。OSKMのみと比較した、導入後24日目のiPSCコロニーの相対的な数が示される。N=3。エラーバーは、標準偏差を示す。アスタリスクは、P<0.05であることを示す。f. GLIS1は、初期段階において初期化の効率に影響を与える。本発明者らは、OSKMのみを、又はGLIS1とともにHDFへ導入した。その後、本発明者らは、白丸で示されるタイミングから黒丸で示されるタイミングまで、100 nMのDexを培地に加えた。OSKMのみと比較

10

20

30

40

50

した、導入後24日目のiPSCコロニーの相対的な数を示す。N=3。エラーバーは、標準偏差を示す。アスタリスクは、 $P < 0.05$ であることを示す。g. FOXH1は、後期段階におけるTRA-1-60 (+) 細胞の割合を増加させる。GLIS1 (黒棒) 又はFOXH1 (白棒) とともにOSKMによって誘導されたTRA-1-60 (+) 細胞の導入後7、11及び15日目の、各時点のOSKMのみと比較した、相対的な割合が示される。N=3。エラーバーは、標準偏差を示す。h. FOXH1は、7日目のTRA-1-60 (+) 細胞の割合を増加させない。本発明者らは、FOXH1、p53のshRNA又はGLIS1とともにOSKMを導入した。導入後7日目のTRA-1-60 (+) 細胞の相対的な細胞数が示された。Mock=1。N=3。アスタリスクは、 $p < 0.05$ であることを示す。i. FOXH1は、TRA-1-60 (+) 細胞の上皮化を促進する。FOXH1とともに (白抜きバー)、又はFOXH1を含むことなく (黒塗りバー)、OSKMを含むTRA-1-60 (+) 細胞におけるCD13 (+) 又はEpCAM (+) 細胞の割合が導入後7、11及び15日目のフローサイトメトリーによって分析された。N=3。エラーバーは、標準偏差を示す。アスタリスクは、 $P < 0.05$ であることを示す。j. FOXH1は、後期の初期化マーカーの発現を促進する。OSKMFによって誘導されたTRA-1-60 (+) 細胞において表示された遺伝子をOSKMと比較した、7、11及び15日目における相対的発現が示される。N=3。エラーバーは、標準偏差を示す。k. FOXH1は、ESC/iPSCからの正常なPrS分化に必須である。本発明者らは、ネガティブコントロール (nc) 又はFOXH1のsiRNAを導入されたSC/iPSCのPrSへの分化を行った。qPCRによって評価されたマーカー遺伝子発現は、各サンプルのG3PDH発現によって正規化された。導入されていないESC/iPSCに由来するPrSと比較した相対的発現が示される。N=3。エラーバーは、標準偏差を示す。l. 内在性FOXH1は、iPSC生成に必須である。本発明者らは、まず、スクランブルshRNA (Scr) 又はヒトFOXH1 遺伝子 (FOXH1のshRNA1、3及び6) に対する3つの異なるshRNA配列をコードするshRNA 発現ベクターをOSKMとともにヒトESCに導入した。翌日、導入されたESCにおけるノックダウン効率がqRT-PCRによって評価された (黒塗りバー)。次に、本発明者らは、スクランブルshRNA (Scr)、FOXH1のshRNA1、3又は6をコードするpMKO.1-puroとともにOSKMをHDFに導入した。Mock (白抜きバー) と比較した24日目のiPSCコロニーの相対数が示される。N=3。エラーバーは、標準偏差を示す。アスタリスクは、 $P < 0.05$ であることを示す。m. 内在性FOXH1は、HDF増殖に影響を与えない。スクランブル shRNA (Scr)、FOXH1のshRNA1、3又は6をコードするpMKO.1-puroとともにOSKMを導入されたHDFの相対的な細胞数が示される。N=3。エラーバーは、標準偏差を示す。

10

20

【図7】図7は、OSKMF-iPSC細胞株の特性評価を示す。a. SNLフィーダー上の継代数5のOSKMF-iPSC (1082A1) の位相差画像。バーは、 $100 \mu\text{m}$ を示す。b. OSKMF-iPSC、H1 (ESC)、201B7 (OSKM-iPSC) 及びHDFにおけるOCT3/4、SOX2及びNANOGの発現解析。本発明者らは、正規化のために、G3PDH発現の結果を用い、ES細胞を1に調整した。c. OCT3/4プロモーター (CR1、CR2、5' UTR) 及びNANOGプロモーター (CR1) のDNAメチル化状態。白色及び黒色は、非メチル化及びメチル化CpGの割合をそれぞれ示す。d. OSKMF-iPSCの核型分析。e. OSKMF-iPSCにおけるSSEA-4、TRA-1-60及びTRA-2-49/6E等の表面マーカーの発現。1万の染色細胞 (黒塗りのヒストグラム) がフローサイトメトリーによって分析された。白抜きのヒストグラムは、染色されていないコントロールを示す。f. OSKMF-iPSCのインビトロ (in vitro) の分化可能性。OSKMF-iPSCは、胚様体を介するプロトコルによって自然に分化する。左上図は、浮遊培養された8日目の細胞の位相差画像を示す。16日間の分化の後に、細胞は、表示された抗体 (緑又は赤) 及びHoechst33342 (青) によって染色された。バーは、 $100 \mu\text{m}$ を示す。g. OSKMF-iPSCのインビボ (In vivo) の分化可能性。OSKMF-iPSCに由来する奇形腫 (teratoma) の切片が、ヘマトキシリン及びエオシンで染色された。

30

40

【図8】図8は、初期化におけるFOXファミリー遺伝子の効果を示す。本発明者らは、表示されたように、レトロウイルス導入法によって各FOXファミリー遺伝子とともにOSKMをHDFに導入した。iPSCコロニーの数は、導入後24日目に計数された。N=3。エラーバーは、標準偏差を示す。アスタリスクは、Mockと比較して $P < 0.05$ であることを示す。図の左部は、多数のタンパク質配列アライメントの結果を有根系統樹として示す。

【図9】図9は、初期化におけるFOX 遺伝子の重複効果を示す。本発明者らは、Mock、FOX

50

A2、FOXB1、FOXF1、FOYG1とともにOSKM又はOSKMFをレトロウイルス導入法によってHDFに導入した。1 x 10⁵の導入されたHDFからの24日目のiPSCコロニー数が示される。N=3。エラーバーは、標準偏差を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明の詳細な説明

本発明は、体細胞の核初期化段階において体細胞にPrS形成に関与するタンパク質又はそれをコードする核酸（以下、本発明の樹立効率改善因子ともいう。）を接触させることにより、iPS細胞の樹立効率を改善する方法を提供する。ここでは、体細胞の核初期化は、核初期化物質を体細胞へ導入することによって達成される。このため、本発明は、また、樹立効率改善因子及び核初期化物質を体細胞に接触させることにより、iPS細胞を作製する方法を提供する。また、本文では、iPS細胞が、核初期化物質のみを体細胞へ導入するだけでは樹立することができず、核初期化物質を本発明の樹立効率改善因子とともに体細胞に接触させることによって樹立することができる場合も、「樹立効率の改善」に該当するものとして取り扱う。

【0013】

(a) 体細胞ソース

発明においてiPS細胞作製のための出発材料として用いることのできる細胞は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、サル、ブタ、ラット等）由来の生殖細胞以外のいかなる細胞であってもよく、例えば、角質化する上皮細胞（例、角質化表皮細胞）、粘膜上皮細胞（例、舌表層の上皮細胞）、外分泌腺上皮細胞（例、乳腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例、副腎髄質細胞）、代謝・貯蔵用の細胞（例、肝細胞）、境界面を構成する内腔上皮細胞（例、I型肺胞細胞）、内鎖管の内腔上皮細胞（例、血管内皮細胞）、運搬能をもつ繊毛のある細胞（例、気道上皮細胞）、細胞外マトリックス分泌用細胞（例、線維芽細胞）、収縮性細胞（例、平滑筋細胞）、血液と免疫系の細胞（例、Tリンパ球）、感覚に関する細胞（例、桿細胞）、自律神経系ニューロン（例、コリン作動性ニューロン）、感覚器と末梢ニューロンの支持細胞（例、随伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、及びそれらの前駆細胞（組織前駆細胞）等が挙げられる。細胞の分化の程度や細胞を採取する動物の齢等に特に制限はなく、未分化な前駆細胞（体性幹細胞も含む）であっても、最終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における体細胞の起源として使用することができる。ここで未分化な前駆細胞としては、例えば神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）が挙げられる。体細胞を採取するソースとなる哺乳動物個体は特に制限されないが、得られるiPS細胞がヒトの再生医療用途に使用される場合には、拒絶反応が起こらないという観点から、患者本人又はHLAの型が同一若しくは実質的に同一である他人から体細胞を採取することが好ましい。ここでHLAの型が「実質的に同一」とは、免疫抑制剤等の使用により、該体細胞由来のiPS細胞から分化誘導することにより得られた細胞を患者に移植した場合に移植細胞が生着可能な程度にHLAの型が一致していることをいう。例えば主たるHLA（例えばHLA-A、HLA-B及びHLA-DRの3遺伝子座）が同一である場合等が挙げられる（以下同じ）。また、ヒトに投与（移植）しない場合、例えば、患者の薬剤感受性や副作用の有無を評価するためのスクリーニング用の細胞のソースとしてiPS細胞を使用する場合には、同様に患者本人又は薬剤感受性や副作用と関連する遺伝子多型が同一である他人から体細胞を採取することが望ましい。

哺乳動物から分離した体細胞は、核初期化ステップに供するに先立って、細胞の種類に応じてその培養に適した自体公知の培地で前培養することができる。そのような培地としては、例えば、約5~20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、RPMI1640培地、199培地、F12培地等が挙げられるが、それらに限定されない。本発明の樹立効率改善因子及び核初期化物質（さらに必要に応じて、他のiPS細胞の樹立効率改善物質）に細胞を接触させるに際し、例えば、カチオニックリポソーム等の導入試薬を用いる場合には、導入効率の低下を防ぐため、無血清培地に交換しておく

10

20

30

40

50

ことが好ましい場合がある。

【0014】

(b) 本発明の樹立効率改善因子

本発明の樹立効率改善因子は、PrS形成に關与するタンパク質、又はそれをコードする核酸である。PrS形成に關与するタンパク質は、限定されることなく、Foxh1、brachyury (T)、goosecoid (GSC)、Foxa2、eomesodermin (EOMES)、LHX1、Sox17、MIXL1、GDF3、Lefty2、Nodal、Hand1、Wnt3、noggin (NOG)、CER1、Foxf1、GATA4、GATA6、HESX1、HNF1A、HNF4A、OTX2、RNF111、Sox7、SP5及びTBX6を含む。好ましくは、PrS形成に關与するタンパク質は、Foxh1、brachyury (T)、Foxa2、LHX1又はFoxf1であり、より好ましくはFoxh1である。

10

【0015】

別の方法として、各上記因子は、その属するファミリーの別のメンバーによって置き換えられ得る。例えば、Foxh1又はFoxa2は、Foxa1、Foxa3、Foxb1、Foxc1、Foxc2、Foxd1、Foxd3、Foxd5、Foxe3、Foxf1、Foxf2、Foxg1、Foxi1、Foxi2、Foxj1、Foxj2、Foxj3、Foxk1、Foxk2、Foxl2、Foxm1、Foxn1、Foxan2、Foxn3、Foxn4、Foxo3、Foxo4、Foxp1、Foxp3、Foxp4、Foxr1、Foxr2及びFoxs1を限定されることなく含む、他のFoxファミリーのメンバーによって置き換えられ得る。好ましくは、本発明の樹立効率改善因子として使用されるFoxファミリーメンバーは、Foxh1、Foxa2、Foxb1、Foxf1、Foxf2又はFoxg1であり、より好ましくは、Foxh1である。

【0016】

本発明の樹立効率改善因子は、任意の哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、サル、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ等）由来のタンパク質又はそれらをコードする核酸であってよいが、ヒト又はマウス起源のタンパク質又は核酸が好ましい。ヒト又はマウス起源のFoxh1、brachyury (T)、goosecoid (GSC)、Foxa2、eomesodermin (EOMES)、LHX1、Sox17、MIXL1、GDF3、Lefty2、Nodal、Hand1、Wnt3、noggin (NOG)、CER1、Foxf1、GATA4、GATA6、HESX1、HNF1A、HNF4A、OTX2、RNF111、Sox7、SP5及びTBX6のアミノ酸配列及びcDNA配列に関する情報は、表1に示されたNCBI取得番号を参照することによって入手することができる。また、ヒト又はマウス起源のFoxa1、Foxa2、Foxa3、Foxb1、Foxc1、Foxc2、Foxd1、Foxd3、Foxd5、Foxe3、Foxf1、Foxf2、Foxg1、Foxh1、Foxi1、Foxi2、Foxj1、Foxj2、Foxj3、Foxk1、Foxk2、Foxl2、Foxm1、Foxn1、Foxan2、Foxn3、Foxn4、Foxo3、Foxo4、Foxp1、Foxp3、Foxp4、Foxr1、Foxr2及びFoxs1のアミノ酸配列及びcDNA配列に関する情報は、表2に示されたNCBI取得番号を参照することによって入手することができる。その技術分野の当業者は、cDNA配列情報に基いて、代表的なタンパク質をコードする核酸を容易に単離することができ、必要に応じて組み換えタンパク質を生成することができる。

20

30

【0017】

【表 1 a】

タンパク質名 (遺伝子名)	ヒト		マウス	
	cDNA	タンパク質	cDNA	タンパク質
Foxh1	NM_003923	NP_003914	NM_007989	NP_032015
brachyury (T)	NM_003181	NP_003172	NM_009309	NP_033335
goosecoid (GSC)	NM_173849	NP_776248	NM_010351	NP_034481
Foxa2	NM_021784	NP_068556	NM_010446	NP_034576
eomesodermin (EOMES)	NM_005442	NP_005433	NM_010136	NP_034266
LHX1	NM_005568	NP_005559	NM_008498	NP_032524
Sox17	NM_022454	NP_071899	NM_011441	NP_035571
MIXL1	NM_031944	NP_114150	NM_013729	NP_038757
GDF3	NM_020634	NP_065685	NM_008108	NP_032134
Lefty2	NM_003240	NP_003231	NM_177099	NP_796073
Nodal	NM_018055	NP_060525	NM_013611	NP_038639
Hand1	NM_004821	NP_004812	NM_008213	NP_032239
Wnt3	NM_030753	NP_110380	NM_009521	NP_033547
noggin (NOG)	NM_005450	NP_005441	NM_008711	NP_032737
CER1	NM_005454	NP_005445	NM_009887	NP_034017
Foxf1	NM_001451	NP_001442	NM_010426	NP_034556
GATA4	NM_002052	NP_002043	NM_008092	NP_032118

10

20

30

【 0 0 1 8 】

【表 1 b】

GATA6	NM_005257	NP_005248	NM_010258	NP_034388
GSC	NM_173849	NP_776248	NM_010351	NP_034481
HESX1	NM_003865	NP_003856	NM_010420	NP_034550
HNF1A	NM_000545	NP_000536	NM_009327	NP_033353
HNF4A	NM_178849	NP_000448	NM_008261	NP_032287
OTX2	NM_021728	NP_068374	NM_144841	NP_659090
RNF111	NM_001270528	NP_060080	NM_033604	NP_291082
Sox7	NM_031439	NP_113627	NM_011446	NP_035576
SP5	NM_001003845	NP_001003845	NM_022435	NP_071880
TBX6	NM_004608	NP_004599	NM_011538	NP_035668

【 0 0 1 9 】

【表 2 a】

タンパク質名 (遺伝子名)	ヒト		マウス	
	cDNA	タンパク質	cDNA	タンパク質
Foxa1	NM_004496	NP_004487	NM_008259	NP_032285
Foxa2	NM_021784	NP_068556	NM_010446	NP_034576
Foxa3	NM_004497	NP_004488	NM_008260	NP_032286
Foxb1	NM_012182	NP_036314	NM_022378	NP_071773
Foxc1	NM_001453	NP_001444	NM_008592	NP_032618
Foxc2	NM_005251	NP_005242	NM_013519	NP_038547
Foxd1	NM_205192	NP_004463	NM_008242	NP_004463
Foxd3	NM_012183	NP_036315	NM_010425	NP_034555
Foxd5	NM_012184	NP_036316	NM_008022	NP_032048
Foxe3	NM_012186	NP_036318	NM_015758	NP_056573
Foxf1	NM_001451	NP_001442	NM_010426	NP_034556
Foxf2	NM_001452	NP_001443	NM_010225	NP_034355
Foxg1	NM_005249	NP_005240	NM_008241	NP_001153584
Foxh1	NM_003923	NP_003914	NM_007989	NP_032015
Foxi1	NM_012188	NP_036320	NM_023907	NP_076396
Foxi2	NM_207426	NP_997309	NM_183193	NP_899016
Foxj1	NM_001454	NP_001445	NM_008240	NP_032266
Foxj2	NM_018416	NP_060886	NM_021899	NP_068699

10

20

30

【 0 0 2 0 】

【表 2 b】

Foxj3	NM_014947	NP_001185781	NM_172699	NP_766287
Foxk1	NM_001037165	NP_001032242	NM_199068	NP_951031
Foxk2	NM_004514	NP_004505	NM_001080932	NP_001074401
Foxl2	NM_023067	NP_075555	NM_012020	NP_036150
Foxm1	NM_202002	NP_973732	NM_008021	NP_032047
Foxn1	NM_003593	NP_003584	NM_008238	NP_032264
Foxn2	NM_002158	NP_002149	NM_180974	NP_851305
Foxn3	NM_001085471	NP_001078940	NM_183186	NP_899009
Foxn4	NM_213596	NP_998761	NM_148935	NP_683737
Foxo3	NM_001455	NP_001446	NM_019740	NP_062714
Foxo4	NM_005938	NP_005929	NM_018789	NP_061259
Foxp1	NM_032682	NP_116071	NM_053202	NP_444432
Foxp3	NM_014009	NP_054728	NM_001199347	NP_001186276
Foxp4	NM_001012426	NP_001012426	NM_001110824	NP_001104294
Foxr1	NM_181721	NP_859072	NM_001033469	NP_001028641
Foxr2	NM_198451	NP_940853	NM_001034894	NP_001030066
Foxs1	NM_004118	NP_004109	NM_010226	NP_034356

10

20

【0021】

また、上記の各アミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上の同一性を有し、且つ野生型タンパク質と同等以上のiPS細胞樹立効率改善能力を有する天然若しくは人工の変異タンパク質及びそれをコードする核酸も、本発明の樹立効率改善因子として利用することができる。

30

【0022】

PrS形成に関与するタンパク質以外に（それをコードする核酸を含む）、任意の1種類を単独で使用し得、また、2種類以上を組み合わせ使用し得る。

【0023】

本発明の樹立効率改善因子は、iPS細胞の作製における他の核初期化物質との組み合わせにおいて後述する「核初期化物質」としても使用し得る。

【0024】

PrS形成に関与するタンパク質の体細胞への導入は、該物質がタンパク性因子である場合、自体公知の細胞へのタンパク質導入方法を用いて実施することができる。そのような方法としては、例えば、タンパク質導入試薬を用いる方法、タンパク質導入ドメイン（PTD）若しくは細胞透過性ペプチド（CPP）融合タンパク質を用いる方法、マイクロインジェクション法等が挙げられる。タンパク質導入試薬としては、カチオン性脂質をベースとしたBioPOTER Protein Delivery Reagent（Gene Therapy Systems）、Pro-Ject™ Protein Transfection Reagent（PIERCE）及びProVectin（IMGEX）、脂質をベースとしたProfect-1（Targeting Systems）、膜透過性ペプチドをベースとしたPenetrain Peptide（Q bio gene）及びChariot Kit（Active Motif）、HVJエンベロープ（不活化センダイウイルス）を利用したGenomONE（石原産業）等が市販されている。導入はこれらの試薬に添付のプロ

40

50

トコルに従って行うことができるが、一般的な手順は以下の通りである。PrS形成に關与するタンパク質を適当な溶媒（例えば、PBS、HEPES等の緩衝液）に希釈し、導入試薬を加えて室温で5～15分程度インキュベートして複合体を形成させ、これを無血清培地に交換した細胞に添加して37℃で1ないし数時間インキュベートする。その後培地を除去して血清含有培地に交換する。

【0025】

別の方法としては、タンパク質がウェルプレート、培養皿等の固相に固定され、続いて体細胞が固相へ加えられるリバーストランスフェクションが使用し得る。

【0026】

PTDとしては、ショウジョウバエ由来のAntP、HIV由来のTAT (Frankel, A. et al, Cell 55, 1189-93 (1988); Green, M. & Loewenstein, P.M. Cell 55, 1179-88 (1988))、Penetratin (Derossi, D. et al, J. Biol. Chem. 269, 10444-50 (1994))、Buforin II (Park, C. B. et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 97, 8245-50 (2000))、Transportan (Pooga, M. et al. FASEB J. 12, 67-77 (1998))、MAP (model amphipathic peptide) (Oehlke, J. et al. Biochim. Biophys. Acta. 1414, 127-39 (1998))、K-FGF (Lin, Y. Z. et al. J. Biol. Chem. 270, 14255-14258 (1995))、Ku70 (Sawada, M. et al. Nature Cell Biol. 5, 352-7 (2003))、Prion (Lundberg, P. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 299, 85-90 (2002))、pVEC (Elmqvist, A. et al. Exp. Cell Res. 269, 237-44 (2001))、Pep-1 (Morris, M. C. et al. Nature Biotechnol. 19, 1173-6 (2001))、Pep-7 (Gao, C. et al. Bioorg. Med. Chem. 10, 4057-65 (2002))、SynBI (Rousseille, C. et al. Mol. Pharmacol. 57, 679-86 (2000))、HN-1 (Hong, F. D. & Clayman, G L. Cancer Res. 60, 6551-6 (2000))、HSV由来のVP22等のタンパク質の細胞通過ドメインを用いたものが開発されている。PTD由来のCPPとしては、11R (Cell Stem Cell, 4:381-384 (2009)) や9R (Cell Stem Cell, 4:472-476 (2009)) 等のポリアルギニンが挙げられる。

【0027】

PrS形成に關与するタンパク質をコードするcDNAとPTD若しくはCPP配列とを組み込んだ融合タンパク質発現ベクターを作製して組換え発現させ、融合タンパク質を回収して導入に用いる。導入は、タンパク質導入試薬を添加しない以外は上記と同様に行うことができる。

【0028】

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

【0029】

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

【0030】

タンパク質導入操作は1回以上の任意の回数（例えば、1回以上10回以下、又は1回以上5回以下等）行うことができ、好ましくは導入操作を2回以上（例えば3回又は4回）繰り返して行うことができる。導入操作を繰り返し行う場合の間隔としては、例えば6～48時間、好ましくは12～24時間が挙げられる。

【0031】

PrS形成に關与するタンパク質をコードする核酸の選択は、特に制限されない。該核酸はDNAであってもRNAであってもよく、或いはDNA/RNAキメラであってもよいが、好ましくはDNAである。また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNA又はDNA：RNAのハイブリッドでもよい。

【0032】

PrS形成に關与するタンパク質をコードする核酸は、例えば、ヒト若しくは他の哺乳動

物（例えば、マウス、ラット、サル、ブタ、イヌ等）の細胞又は組織〔例えば、胸腺、骨髄、脾臓、脳、脊髄、心臓、骨格筋、腎臓、肺、肝臓、膵臓若しくは前立腺の細胞及び組織、これら細胞の前駆細胞、幹細胞又は癌細胞等〕から、常法に従ってクローニングすることができる。

【0033】

PrS形成に關与するタンパク質をコードする核酸の体細胞への導入は、自体公知の細胞への遺伝子導入方法を用いて実施することができる。PrS形成に關与するタンパク質をコードする核酸は、宿主となる体細胞で機能し得るプロモーターを含む適当な発現ベクターに挿入される。発現ベクターとしては、例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、センダイウイルス等のウイルスベクター、動物細胞発現プラスミド（例えば、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neo）等が用いられ得る。

10

【0034】

そのためのベクターは、得られるiPS細胞の用途に応じて適宜選択することができる。例えば、アデノウイルスベクター、プラスミドベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクター、エピソーマルベクター等が使用され得る。

【0035】

発現ベクターにおいて使用されるプロモーターとしては、例えば、EF1 プロモーター、CAGプロモーター、SR プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーター等が用いられる。なかでも、EF1 プロモーター、CAGプロモーター、MoMuLV LTR、CMVプロモーター、SR プロモーター等が好ましい。

20

【0036】

発現ベクターは、プロモーターの他に、所望によりエンハンサー、ポリA付加シグナル（polyadenylation signal）、選択マーカー遺伝子、SV40複製起点等を含んでいる。選択マーカー遺伝子としては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

【0037】

PrS形成に關与するタンパク質をコードする核酸は、単独で発現ベクター上に組み込んでもよいし、1以上の初期化遺伝子とともに1つの発現ベクターに組み込んでもよい。遺伝子導入効率の高いレトロウイルスやレンチウイルスベクターを用いる場合は前者が、プラスミド、アデノウイルス、エピソーマルベクター等を用いる場合は後者を選択することが好ましい場合があるが、特に制限はない。

30

【0038】

上記においてPrS形成に關与するタンパク質をコードする核酸と、1以上の初期化遺伝子とを、1つの発現ベクターに組み込む場合、これら複数の遺伝子は、好ましくはポリシストロニック発現を可能にする配列を介して発現ベクターに組み込むことができる。ポリシストロニック発現を可能にする配列を用いることにより、1種類の発現ベクターに組み込まれている複数の遺伝子をより効率的に発現させることが可能になる。ポリシストロニック発現を可能にする配列としては、例えば、口蹄疫ウイルスの2A配列（PLoS ONE3, e2532, 2008, Stem Cells 25, 1707, 2007）、IRES配列（U.S. Patent No. 4,937,190）等、好ましくは2A配列を用いることができる。

40

【0039】

PrS形成に關与するタンパク質をコードする核酸を含む発現ベクターは、ベクターの選択に応じて、自体公知の手法により細胞に導入することができる。例えば、ウイルスベクターの場合、該核酸を含むプラスミドを適当なパッケージング細胞（例、Plat-E細胞）や相補細胞株（例、293細胞）に導入して、培養上清中に産生されるウイルスベクターを回収し、各ウイルスベクターに応じた適切な方法により、該ベクターを細胞に感染させる。

50

例えば、ベクターとしてレトロウイルスベクターを用いる具体的手段がWO2007/69666、Cell, 126, 663-676 (2006)及びCell, 131, 861-872 (2007)に開示されており、レンチウイルスベクターを用いる場合については、Science, 318, 1917-1920 (2007)に開示がある。iPS細胞を再生医療のための細胞ソースとして利用する場合、Prs形成に關与するタンパク質の発現(再活性化)又はその外来性核酸が組み込まれた近傍に存在する内因性遺伝子の活性化は、iPS細胞由来の分化細胞から再生された組織における発癌リスクを高める可能性があるため、Prs形成に關与するタンパク質をコードする核酸は細胞の染色体に組み込まれず、一過的に発現することが好ましい。かかる観点からは、染色体への組み込みが稀なアデノウイルスベクターの使用が好ましい。アデノウイルスベクターを用いる具体的手段は、Science, 322, 945-949 (2008)に記載されている。また、アデノ随伴ウイルスベクターも染色体への組み込み頻度が低く、アデノウイルスベクターと比べて細胞毒性や炎症惹起作用が低いので、別の好ましいベクターとして挙げられる。センダイウイルスベクターは染色体外で安定に存在することができ、必要に応じてsiRNAにより分解除去することができるので、同様に好ましく利用され得る。センダイウイルスベクターについては、J. Biol. Chem., 282, 27383-27391 (2007)や特許第3602058号に記載のものを用いることができる。

10

20

30

40

50

【0040】

レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターを用いる場合は、いったん導入遺伝子のサイレンシングが起こったとしても、後に再活性化される可能性があるため、例えば、Cre/loxPシステムを用いて、不要となった時点でPrs形成に關与するタンパク質をコードする核酸を切り出す方法が好ましく用いられ得る。即ち、該核酸の両端にloxP配列を配置しておき、iPS細胞が誘導された後で、プラスミドベクター若しくはアデノウイルスベクターを用いて細胞にCreリコンビナーゼを作用させ、loxP配列に挟まれた領域を切り出すことができる。また、LTR U3領域のエンハンサー-プロモーター配列は、挿入突然変異によってその近傍の宿主遺伝子を上方制御する可能性があるため、当該配列を欠失、若しくはSV40等のポリアデニル化配列で置換した3'-自己不活性化(SIN)LTRを使用して、切り出されずゲノム中に残存するloxP配列より外側のLTRによる内因性遺伝子の発現制御を回避することがより好ましい。Cre-loxPシステム及びSIN LTRを用いる具体的手段は、Soldner et al., Cell, 136: 964-977 (2009)、Chang et al., Stem Cells, 27: 1042-1049 (2009)等に開示されている。

【0041】

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

【0042】

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

【0043】

尚、アデノウイルスやプラスミドを用いる場合でも、導入遺伝子が染色体に組み込まれることがあるため、結局はサザンブロットやPCRにより染色体への遺伝子挿入がないことを確認する必要がある。そのため、上記Cre-loxPシステムのように、いったん染色体に導入遺伝子を組み込んだ後に、該遺伝子を除去する手段を用いることは好都合であり得る。別の好ましい実施態様においては、トランスポゾンを用いて染色体に導入遺伝子を組み込んだ後に、プラスミドベクター若しくはアデノウイルスベクターを用いて細胞に転移酵

素を作用させ、導入遺伝子を完全に染色体から除去する方法が用いられ得る。好ましいトランスポゾンとしては、例えば、鱗翅目昆虫由来のトランスポゾンであるpiggyBac等が挙げられる。piggyBacトランスポゾンを用いる具体的手段は、Kaji, K. et al., Nature, 458: 771-775 (2009)、Woltjen et al., Nature, 458: 766-770 (2009)に開示されている。

【0044】

別の好ましい非組込み型ベクターとして、染色体外で自律複製可能なエピソーマルベクターが挙げられる。エピソーマルベクターを用いる具体的手段は、Yu et al., Science, 324, 797-801 (2009)に開示されている。必要に応じて、エピソーマルベクターの複製に必要なベクター要素の5'側及び3'側にloxP配列を同方向に配置したエピソーマルベクターにPrS形成に関与するタンパク質をコードする核酸を挿入した発現ベクターを構築し、これを体細胞に導入することもできる。

10

【0045】

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

【0046】

エピソーマル発現ベクターは、PrS形成に関与するタンパク質をコードする核酸の転写を制御するプロモーターを含む。有用なプロモーターには、前記と同様のプロモーターが含まれる。また、エピソーマル発現ベクターは、前記と同様に、所望によりエンハンサー、ポリA付加シグナル、選択マーカー遺伝子等をさらに含有していてもよい。選択マーカー遺伝子としては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

20

【0047】

本発明において有用なloxP配列としては、バクテリオファージP1由来の野生型loxP配列の他、導入遺伝子の複製に必要なベクター要素を挟む位置に同方向で配置された場合に、組換えを起こしてloxP配列間の配列を欠失させ得る任意の変異loxP配列が挙げられる。変異loxP配列としては、例えば、5'側反復配列に変異のあるlox71、3'側反復配列に変異のあるlox66、スペーサー部分に変異のあるlox2272やlox511等が挙げられる。該ベクター要素の5'側及び3'側に配置される2つのloxP配列は、同一であっても異なってもよいが、スペーサー部分に変異のある変異loxP配列の場合は同一のもの(例、lox2272配列同士、lox511配列同士)が用いられる。好ましくは、5'側反復配列に変異のある変異loxP配列(例、lox71)と3'側反復配列に変異のある変異loxP配列(例、lox66)との組合せが挙げられる。この場合、組換えの結果染色体上に残るloxP配列は5'側及び3'側の反復配列に二重変異を有するため、Creリコンビナーゼに認識されにくく、不必要な組換えにより染色体の欠失変異を起こすリスクが低減される。組み換えにおいて変異loxP配列であるlox71とlox66とを用いる場合、前記ベクター要素の5'側及び3'側に各変異loxP配列を配置してもよいが、変異部位がそれぞれのloxP配列の外端に配置されるような向きで変異loxP配列を挿入する必要がある。本発明の好ましいエピソーマルベクターはCreリコンビナーゼを作用させなくても、早期に細胞から脱落する自己消失型ベクターであるが、例外的に細胞からの脱落に時間がかかる場合も想定されるので、Creリコンビナーゼ処理による不必要な組換え等のリスクに備えてloxP配列を設計しておくことが好ましい場合もある。

30

40

【0048】

2つのloxP配列は、導入遺伝子の複製に必要なベクター要素(即ち、複製開始点、又は複製開始点に結合して複製を制御するタンパク質をコードする遺伝子配列)の5'側及び3'側に、同方向に配置される。loxP配列が挟むベクター要素は、複製開始点、又は複製開始点に結合して複製を制御するタンパク質をコードする遺伝子配列のいずれか一方だけで

50

あってもよいし、両方であってもよい。

【 0 0 4 9 】

エピソームベクターは、例えばリポフェクション法、リボソーム法、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、遺伝子銃法等を用いて該ベクターを細胞に導入することができる。具体的には、例えばScience, 324: 797-801 (2009)等に記載される方法を用いることができる。

【 0 0 5 0 】

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

10

【 0 0 5 1 】

(c) 核初期化物質

本明細書において、「核初期化物質」には、本発明のiPS細胞樹立効率改善因子とともに体細胞に接触させると該体細胞からiPS細胞を誘導できる限り、タンパク性因子、それをコードする核酸(ベクターに組み込まれた形態を含む)、又は低分子化合物が含まれる。核初期化物質がタンパク性因子又はそれをコードする核酸の場合、好ましくは以下の組み合わせが例示される(以下においては、タンパク性因子の名称のみを記載する)。

20

【 0 0 5 2 】

(1) Oct3/4、Klf4、c-Myc

(2) Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2 (Sox2は、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17又はSox18と入れ替え可能である。Klf4は、Klf1、Klf2又はKlf5と入れ替え可能である。c-Mycは、T58A(活性変異)、N-Myc、又はL-Mycと入れ替え可能である。)

(3) Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2、Fbx15、Nanog、Eras、ECAT15-2、Tc11、b-catenin (活性変異S33Y)

(4) Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2、TERT、SV40 Large T抗原 (以下、SV40LTとする)

(5) Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2、TERT、HPV16 E6

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

30

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

(8) Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2、TERT、Bmi1

【 0 0 5 3 】

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

40

【 0 0 5 4 】

(9) Oct3/4、Klf4、Sox2 (Nature Biotechnology, 26, 101-106 (2008)を参照)

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

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

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

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

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

50

(2008)を参照)

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

(16) Oct3/4、 Sox2 (Nature, 451, 141-146 (2008), WO2008/118820を参照)

(17) Oct3/4、 Sox2、 Nanog (WO2008/118820を参照)

(18) Oct3/4、 Sox2、 Lin28 (WO2008/118820を参照)

(19) Oct3/4、 Sox2、 c-Myc、 Esrrb (ここでは、 EssrrbはEsrrgに置き換え得る、 Nat. Cell Biol., 11, 197-203 (2009)を参照)

(20) Oct3/4、 Sox2、 Esrrb (Nat.Cell Biol., 11, 197-203 (2009)を参照)

(21) Oct3/4、 Klf4、 L-Myc (Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 107, 14152-14157 (2010)を参照)

(22) Oct3/4、 Nanog

(23) Oct3/4 (Cell 136: 411-419 (2009); Nature, 08436, doi:10.1038 published online (2009)を参照)

(24) Oct3/4、 Klf4、 c-Myc、 Sox2、 Nanog、 Lin28、 SV40LT (Science, 324: 797-801 (2009)を参照)

(25) Oct3/4、 Sox2、 Klf4、 L-Myc、 Lin28、 Glis1

【0055】

上記(1)-(25)において、Oct3/4に代えて他のOctファミリーのメンバー、例えばOct1A、Oct6等を用いることもできる。また、Sox2(又はSox1、Sox3、Sox15、Sox17、Sox18)に代えて他のSoxファミリーのメンバー、例えばSox7等を用いることもできる。さらに、上記(1)-(25)において、c-Myc又はLin28を核初期化物質として含む場合、c-Myc又はLin28に代えてそれぞれL-Myc又はLin28Bを用いることもできる。

【0056】

また、上記(1)-(25)には該当しないが、それらのいずれかにおける構成要素をすべて含み、且つ任意の他の物質をさらに含む組み合わせも、本発明における「核初期化物質」の範疇に含まれ得る。また、核初期化の対象となる体細胞が上記(1)-(25)のいずれかにおける構成要素の一部を、核初期化のために十分なレベルで内在的に発現している条件下にある場合は、当該構成要素を除いた残りの構成要素のみの組み合わせもまた、本発明における「核初期化物質」の範疇に含まれ得る。

【0057】

これらの組み合わせの中で、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc若しくはL-Myc、Nanog、Lin28若しくはLin28B、及びSV40LTから選択される少なくとも1つ、好ましくは2つ以上、より好ましくは3つ以上が、好ましい核初期化物質の例として挙げられる。

【0058】

とりわけ、得られるiPS細胞を治療用途に用いることを念頭においた場合、Oct3/4、Sox2及びKlf4の3因子の組み合わせ(即ち、上記(9))、又はOct3/4、Sox2、Klf4及びL-Mycの4因子の組み合わせ(即ち、上記(2))が好ましく使用される。得られたiPS細胞が治療用途に用いられない場合(例えば、ドラッグディスカバリースクリーニング等のための調査ツールとして用いられる)、Oct3/4、Sox2及びKlf4からなる3因子に加えて、Oct3/4、Sox2、Klf4及びL-Mycからなる4因子、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycからなる4因子、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc/L-Mycと、Nanog及び/又はLin28/Lin28b及び/又はGlis1とからなる5~7因子、又は、上記5~7因子及び追加のSV40 Large T抗原からなる6~8因子が例示される。

【0059】

上記の核初期化物質のマウス及びヒトcDNA配列情報は、WO 2007/069666に記載のNCBI取得番号を参照することにより取得することができ(Nanogは当該公報中では「ECAT4」との名称で記載されている。尚、Lin28、Lin28b、Esrrb、Esrrg、L-Mycのマウス及びヒトcDNA配列情報は、それぞれ下記NCBI取得番号を参照することにより取得できる。)、当業者は容易にこれらのcDNAを単離することができる。

【0060】

10

20

30

40

50

遺伝子名	マウス	ヒト
Lin28	NM_145833	NM_024674
Lin28b	NM_001031772	NM_001004317
Esrrb	NM_011934	NM_004452
Esrrg	NM_011935	NM_001438
L-Myc	NM_008506	NM_001033081
Glis1	NM_147221	NM_147193

【 0 0 6 1 】

核初期化物質として使用されるタンパク性因子は、得られたcDNAを適当な発現ベクターに挿入して宿主細胞に導入し、該培養細胞又はその馴化培地 (conditioned medium) から組換えタンパク性因子を回収することにより調製することができる。一方、核初期化物質としてタンパク性因子をコードする核酸を用いる場合、得られたcDNAを、ウイルスベクター、エピソームベクター又はプラスミドベクターに挿入して発現ベクターを構築し、核初期化ステップに供される。必要に応じて、上記Cre-loxPシステムやpiggyBacトランスポゾンシステムを利用することもできる。尚、タンパク性因子をコードする2以上の核酸を細胞に導入する場合、各核酸を別個のベクターに担持させてもよい。別の方法としては、複数の核酸をタンデムに繋いでポリシストロニックベクターとすることもできる。後者の場合、効率的なポリシストロニック発現を可能にするために、口蹄疫ウイルスの2A自己切断ペプチド (2A self-cleaving peptide) を各核酸の間に連結することが望ましい (Science, 322, 949-953, 2008)。

10

20

【 0 0 6 2 】

核初期化物質の体細胞との接触は、(a) その物質がタンパク質因子である場合、PrS形成に参与するタンパク質とともに達成され得る。(b) その物質が(a)のタンパク質因子をコードする核酸である場合、PrS形成に参与するタンパク質をコードする前記核酸とともに達成され得る。

【 0 0 6 3 】

(d) 他のiPS細胞の樹立効率改善物質

従来iPS細胞の樹立効率が低いために、近年、その効率を改善する物質が種々提案されている。これら他の樹立効率改善物質は、本発明の上記iPS細胞の樹立効率改善因子とともに体細胞に接触させた場合、iPS細胞の樹立効率をより高めることが期待できる。

30

【 0 0 6 4 】

iPS細胞の樹立効率改善物質としては、例えば、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 [例えば、バルプロ酸 (VPA) (Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNA及びshRNA (例えば、HDAC1 siRNA Smartpool (登録商標、Millipore)、HDAC1に対するHuSH 29mer shRNAコンストラクト (OriGene) 等) 等の核酸性発現阻害剤等]、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば5'-アザシチジン) (Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、G9aヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 [例えば、BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2: 525-528 (2008)) 等の低分子阻害剤、G9aに対するsiRNA及びshRNA (例、G9a siRNA (ヒト) (Santa Cruz Biotechnology)) 等の核酸性発現阻害剤等]、L-チャンネルカルシウムアゴニスト (例えばBayk8644) (Cell Stem Cell, 3, 568-574 (2008))、p53阻害剤 (例えばp53に対するsiRNA、shRNA、ドミナントネガティブ変異体等 (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008)、Nature 460, 1132-1135 (2009)))、UTF1 (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、Wntシグナリング (例えば可溶性Wnt3a) (Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008))、2i/LIF (2iはマイトジェン活性化プロテインキナーゼシグナリング及びグリコーゲンシンターゼキナーゼ-3の阻害剤、PLoS Biology, 6(10), 2237-2247 (2008))、ES細胞特異的miRNA (例えば、miR-302-367クラスター (Mol. Cell. Biol. doi:10.1128/MCB.00398-08)、miR-302 (RNA (2008) 14: 1-10)、miR-291-3p、miR-294及びmiR-295 (以上、Nat. Biotechnol. 27: 459-461 (2009))) 等が挙げられるが、それらに限定されない。前記で核酸性の発現阻害剤はsiRNA若しくはshRNAをコードするDNAを含む発現ベクターの形態であっても

40

50

よい。

【0065】

PrS形成に關与するタンパク質及びp53抑制因子は、互いに独立して初期化を促進し、組み合わせにおいて相乗効果を発揮し得るため、好ましくは、p53のshRNA、p53のsiRNA又はp53のドミナントネガティブ変異等のp53抑制因子、又はそれをコードする核酸が追加的なiPS細胞樹立効率改善物質として使用される。

【0066】

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

【0067】

iPS細胞樹立効率改善物質の体細胞への接触は、(a)該改善物質がタンパク性因子である場合、PrS形成に關与するタンパク質と同様にして、(b)該改善物質が(a)のタンパク性因子をコードする核酸である場合、上記Prs形成に關与するタンパク質をコードするタンパク質をコードすると同様にして、実施することができる。

【0068】

PrS形成に關与するタンパク質又はそれをコードする核酸を含むiPS細胞の樹立効率改善物質は、該物質の非存在下と比較して体細胞からのiPS細胞樹立効率が有意に改善される限り、核初期化物質と同時に体細胞に接触させてもよいし、また、どちらかを先に接触させてもよい。一実施態様において、例えば、核初期化物質がタンパク性因子をコードする核酸であり、iPS細胞の樹立効率改善物質が化学的阻害物質である場合には、前者は遺伝子導入処理からタンパク性因子を大量発現するまでに一定期間のラグがあるのに対し、後者は速やかに細胞に作用しうることから、遺伝子導入処理から一定期間細胞を培養した後に、iPS細胞の樹立効率改善物質を培地に添加することができる。別の実施態様において、例えば、核初期化物質とiPS細胞の樹立効率改善物質とがいずれもウイルスベクターやプラスミドベクターの形態で用いられる場合には、両者を同時に細胞に導入してもよい。

【0069】

(e) 培養条件による樹立効率の改善

体細胞の核初期化工程において低酸素条件下で細胞を培養することにより、iPS細胞の樹立効率をさらに改善することができる(Cell Stem Cell., 5(3): 237-241 (2009)、WO2010/013845)。本文に言及されたように、「低酸素条件」とは、細胞を培養する際の雰囲気中の酸素濃度が、大気中のそれよりも有意に低いことを意味する。具体的には、通常の細胞培養で一般的に使用される5-10% CO₂/95-90%大気の雰囲気中の酸素濃度よりも低い酸素濃度の条件が挙げられ、例えば雰囲気中の酸素濃度が18%以下の条件が該当する。好ましくは、雰囲気中の酸素濃度は15%以下(例、14%以下、13%以下、12%以下、11%以下等)、10%以下(例、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下等)、又は5%以下(例、4%以下、3%以下、2%以下等)である。また、雰囲気中の酸素濃度は、好ましくは0.1%以上(例、0.2%以上、0.3%以上、0.4%以上等)、0.5%以上(例、0.6%以上、0.7%以上、0.8%以上、0.9%以上等)、又は1%以上(例、1.1%以上、1.2%以上、1.3%以上、1.4%以上等)である。

【0070】

細胞の環境において低酸素状態を創出する手法は特に制限されないが、酸素濃度の調節可能なCO₂インキュベーター内で細胞を培養する方法が最も容易であり、好適な例として挙げられる。酸素濃度の調節可能なCO₂インキュベーターは、種々の機器メーカーから販売されている(例えば、Thermo scientific社、池本理化学工業、十慈フィールド、和研薬株式会社等のメーカー製の低酸素培養用CO₂インキュベーター等)。

【0071】

低酸素条件下で細胞培養を開始する時期は、iPS細胞の樹立効率が正常酸素濃度（20%）の場合に比して改善されることを妨げない限り特に限定されず、体細胞へのPrS形成に
関与するタンパク質又はそれ（ら）をコードする核酸、及び核初期化物質の接触より前
であっても、該接触と同時であっても、該接触より後であってもよいが、例えば、体細胞に
PrS形成に関与するタンパク質又はそれ（ら）をコードする核酸、及び核初期化物質を接
触させた直後から、或いは接触後一定期間（例えば、1ないし10（例、2、3、4、5、6、7
、8又は9）日）おいた後に低酸素条件下で培養することが好ましい。

【0072】

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

さらに、低酸素条件下で細胞培養を開始する好ましい時期及び好ましい培養期間は、用
いられる核初期化物質の選択、正常酸素濃度条件下でのiPS細胞樹立効率等によっても変
動する。

【0073】

(f) iPS細胞の選択及び確認

細胞を核初期化物質及び本発明のiPS細胞樹立効率改善因子（及び他のiPS細胞樹立効率
改善因子）と接触させた後、例えばES細胞の培養に適した条件下で細胞を培養することが
できる。マウス細胞の場合、通常の培地に分化抑制因子として白血病抑制因子（Leukemia
Inhibitory Factor, LIF）を添加して培養を行う。一方、ヒト細胞の場合には、LIFの代
わりに塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）及び/又は幹細胞因子（SCF）を添加するこ
とが望ましい。通常、細胞は、フィーダー細胞として、放射線や抗生物質で処理して細胞分
裂を停止させたマウス胎仔由来の線維芽細胞（MEF）の共存下で培養される。フィーダー
としてよく使用されるMEFには、通常STO細胞等があるが、iPS細胞の誘導には、SNL細胞（
McMahon, A. P. & Bradley, A. Cell 62, 1073-1085 (1990)）等がよく使われている。フ
ィーダー細胞との共培養は、核初期化物質及び本発明のiPS細胞樹立効率改善因子との接
触より前から開始してもよいし、該接触時から、或いは該接触より後（例えば1～10日後
）から開始してもよい。

【0074】

iPS細胞の候補コロニーの選択は、薬剤耐性とレポーター活性を指標とする方法と目視
による形態観察による方法とが挙げられる。前者としては、例えば、分化多能性細胞にお
いて特異的に高発現する遺伝子（例えば、Fbx15、Nanog、Oct3/4等、好ましくはNanog又
はOct3/4）の遺伝子座に、薬剤耐性遺伝子及び/又はレポーター遺伝子をターゲッティ
ングした組換え体細胞を用い、薬剤耐性及び/又はレポーター活性陽性のコロニーを選
択するというものである。そのような組換え体細胞としては、例えばFbx15遺伝子座に geo（
-ガラクトシダーゼとネオマイシンホスホトランスフェラーゼとの融合タンパク質をコ
ードする）遺伝子をノックインしたマウス（Takahashi & Yamanaka, Cell, 126, 663-676
（2006））由来のMEFやTTF、或いはNanog遺伝子座に緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子と
ピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス（Okita et al., Na
ture, 448, 313-317 (2007)）由来のMEFやTTF等が挙げられる。一方、目視による形態観
察で候補コロニーを選択する方法としては、例えばTakahashi et al., Cell, 131, 861-8
72 (2007)に記載の方法が挙げられる。レポーター細胞を用いる方法は簡便で効率的では
あるが、iPS細胞がヒトの治療用途を目的として作製される場合、安全性の観点から目視
によるコロニー選択が望ましい。

10

20

30

40

50

【0075】

選択されたコロニーの細胞がiPS細胞であることの確認は、上記したNanog（若しくはOct3/4）レポーター陽性（ピューロマイシン耐性、GFP陽性等）及び目視によるES細胞様コロニーの形成によっても行い得るが、より正確を期すために、アルカリフォスファターゼ染色や、各種ES細胞特異的遺伝子の発現を解析したり、選択された細胞をマウスに移植してテラトーマ形成を確認する等の試験を実施することもできる。

【0076】

Foxh1等のPrS形成に関与するタンパク質をコードする核酸を体細胞に導入した場合、得られるiPS細胞は、当該外来性核酸を含む点で、従来公知のiPS細胞とは異なる新規細胞である。特に、当該外来性核酸がレトロウイルスやレンチウイルス等を用いて体細胞に導入された場合、当該外来性核酸は通常、得られるiPS細胞のゲノム中に組み込まれているので、外来性核酸を含むという形質は安定に保持される。

10

【0077】

(g) iPS細胞の用途

このようにして樹立されたiPS細胞は、種々の目的で使用することができる。例えば、ES細胞で報告されている分化誘導法（例えば、神経幹細胞への分化誘導法としては、特開2002-291469、臍幹様細胞への分化誘導法としては、特開2004-121165、造血細胞への分化誘導法としては、特表2003-505006、胚葉体の形成による分化誘導法としては、特表2003-523766に記載の方法等を参照されたい）を利用して、iPS細胞から種々の細胞（例、心筋細胞、血液細胞、神経細胞、血管内皮細胞、インスリン分泌細胞等）への分化を誘導することができる。従って、患者本人やHLAの型が同一若しくは実質的に同一である他人から採取した体細胞を用いてiPS細胞を誘導すれば、そこから所望の細胞（即ち、該患者が罹病している臓器の細胞や疾患に対する治療効果を発揮する細胞等）に分化させて該患者に移植するという、自家移植又は同種移植による幹細胞療法が可能となる。さらに、iPS細胞から分化させた機能細胞（例、肝細胞）は、対応する既存の細胞株よりも実際の生体内での該機能細胞の状態をより反映していると考えられるので、医薬候補化合物の薬効や毒性インビトロスクリーニング等にも好適に用いることができる。

20

【0078】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれに決して限定されない。

30

【実施例】

【0079】

材料及び方法統計的分析の指針

全定量的調査は、少なくとも生物学的に3重に行われた。本発明者らは、Kaleidaグラフソフトウェアを用いた対応T検定によってデータを評価し、アスタリスクとして示されるように、0.05未満のP値が有意であるとみなされた。エラーバーは、標準偏差を示す。

【0080】

細胞培養

本発明者らは、Japanese Collection of Reserch Bioresources(JCRB)からHDFを得た。HDF、PLAT-E及びPLAT-GPIは、10%のウシ胎仔血清（FBS、Thermo）、0.5%ペニシリン及びストレプトマイシン（Pen/Strep、Invitrogen）を含むダルベッコ改変イーグル培地（DMEM、Nacalai tesque）において維持された。

40

【0081】

H1及びH9のESCは、WiCELLから入手され、先に記載されたように、マイトマイシンC（MMC）によって不活性化されたSNLフィーダー上の4ng/mlの組み換えヒト塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF、Wako）を添加された霊長類のESC培地（ReproCELL）、又はマトリゲルで被覆されたプレート（BD biosciences）上のmTeSR1（Veritas）において維持された。正常ヒト表皮ケラチノサイト（NHEK、Lonza）、ヒト星状膠細胞（HA、Cell applications）、正常ヒト気管支上皮（NHBE、Lonza）、脂肪組織由来幹細胞（ASC、Invitrogen）及

50

び前立腺上皮 (PrE、 Lonza) はメーカーの推奨する条件において維持された。

【 0 0 8 2 】

初期化

初期化実験は、先に記載されたように行われた (Cell 131、 861-872 (2007))。レトロウイルス粒子を作製するために、本発明者らは、FuGENE6導入試薬 (Roche) を用いてメーカーのプロトコル通りにレトロウイルスベクターをPLAT-E又はPLAT-GPに導入した。翌日、培地は、新鮮なものに取り換えられ、もう24時間インキュベートされた。ウイルスを含有する上澄み液は、回収され、0.45 µmの細孔径セルロースアセテートフィルター (Whatman) を通して濾過され、4 µg/mlのポリブレン (Nacalai Tesque) を加えられた。その後、本発明者らは適切な組み合わせを混合し、マウスSlc7a1遺伝子を含むHDFに一晩さらした。この時点をも0日目と指定した。HDFを除く細胞株へのレトロウイルスの導入のために、本発明者らは、PLAT-GPを用いて生成されたVSVG偽型汎親和性ウイルスとともに、700 x gで1時間のスピんフェクション (spinfection) を行った。本発明者らは、導入後7日目に細胞を採取し、iPSC生成のためにMMCによって不活化されたSNLフィーダーに再度塗布した。翌日、培地は、4 ng/mlのbFGFを添加された霊長類ESC培地に取り換えられ、1日おきに交換された。

10

【 0 0 8 3 】

遺伝子サイレンシング

短期間の遺伝子サイレンシングのために、FOXH1に対するステルスsiRNA (Stealth siRNA) (HSS189664、HSS113216及びHSS113217の等量の混合物) 又はネガティブコントロール Mid GC (Invitrogen) が、PrS分化プロトコルの0日目にメーカーのプロトコルに従って、Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen) を用いてヒトESC/iPSCへ導入された。初期化中の安定したロックダウンのために、本発明者らは、OSKM導入と同時に、関心のある遺伝子に対するshRNAをコードするpMKO.1-puroレトロウイルスベクター (#8452、Addgene) を導入した。FOXH1 shRNA 1、3及び6の標的配列は、順に5' -CACCTCCTACTTGCCTATCTA-3' (SEQ ID NO:1)、5' -GCCTATCTACTCCCAATGT-3' (SEQ ID NO:2) 及び5' -TGCAGCCTGTGAGGCTCTTAA-3' (SEQ ID NO:3) である。

20

【 0 0 8 4 】

フローサイトメトリー及び蛍光活性化細胞ソーティング (FACS)

本発明者らは、示された時点に0.25%トリプシン/1mM EDTA (Invitrogen) 又はAccutase (Invitrogen) を用いた処理によって細胞を回収した。4%パラフォルムアルデヒド及び0.2%TritonX-100を順に用いる抗体染色の前に固定及び透過化 (permeabilization) が行われた。少なくとも、5 x 10⁴細胞が、FACS Aria II (BD biosciences) を用いる全ての実験において定量化のために分析された。また、細胞ソーティングもFACS Aria IIを用いて行われた。本発明者らは、以下の抗体を用いた。Alexa488結合TRA-1-60 (1:20、560173、BD biosciences)、Alexa488結合SSEA-4 (1:20、506348、BD biosciences)、フルオレセインイソチアシネート (FITC) 結合TRA-1-2-49/6E (1:5、FCMAB133、Millipore)、アロフィコシアニン (APC) 標識TRA-1-85 (1:5、FAB3195A、R&D systems)、APC標識抗C-X-Cケモカイン受容体4型 (CXCR4) マウスモノクローナル抗体 (1:5、FAB170A、R&D systems)、PE標識抗血小板由来成長因子受容体アルファ (PDGFRA) マウスモノクローナル抗体 (1:5、556002、BD Pharmingen)、APC結合抗BRACHYURY (1:5、IC20851A、R&D systems)、抗ポリシアル酸神経細胞接着分子 (PSA-NCAM) 抗体 (MAB5324、Millipore) 及びAlexa 647結合抗マウスIgM抗体 (1:500、A-21238、Invitrogen)。

30

40

【 0 0 8 5 】

磁気活性化細胞ソーティング (MACS)

0.25%トリプシン/1 mM EDTAを用いて回収された細胞は、細胞デブリを除去するために、40 µm細孔径の細胞濾過器 (BD biosciences) で濾過された。細胞は、PE結合TRA-1-60 (1:5、560193、BD Pharmingen) 又はSSEA-1 (1:5、560866、BD Pharmingen) でインキュベートされ、その後、抗PEマイクロビーズとともにインキュベートされた (130-048-801、Miltenyibiotec)。細胞の分離は、AutoMACS (Miltenyibiotec) の一連の2つ

50

のカラムモードで行われた。分離後、本発明者らは、フローサイトメトリーによって純度を確認した。

【 0 0 8 6 】

プラスミド作製

本研究に用いられる遺伝子のオープンリーディングフレーム (ORF) は、PCRによって増幅され、pENTR-D-TOPO (Invitrogen) へサブクローニングされ、配列決定によって確認された。ORFは、Gateway LR反応システム (Invitrogen) を用いて、メーカーのプロトコルに従ってpMXs-gw、pMXs-gw-IG、PB/CAG-gw-IP又はPB/CAG-gw-IB等の発現ベクターに移された。cGR 融合コンストラクト (cGR-fused construct) を生成するために、ストップコドン欠損GLIS1及びFOXH1が、PCRを用いて増幅され、pCR2.1-TOPO (Invitrogen) へクローニングされた。pCR2.1においてクローニングされた各遺伝子のEcoRI/SpeI断片と、pPyCAG-cGR-IPのSpeI/NotI断片とが、pMXsのEcoRI/NotI部位に挿入された。ヒトp53遺伝子のためのノックダウンベクター (pMKO.1-puro p53 shRNA2、 #10672) が、Addgeneから購入された。

10

【 0 0 8 7 】

定量的逆転写ポリメラーゼ鎖反応

全RNAが、Qiazol試薬 (Qiagen) を用いて処理された細胞溶解物から精製され、ゲノムDNA除去するべく、Turbo DNA free kit (Ambion) を用いてインキュベートされた。逆転写反応は、1 µgのDNase処理RNAとともにRever tra ace - - kit (Toyobo) 及びオリゴdT₂₀プライマーを用いて行われた。各遺伝子のプライマー配列 は、表 3 に提示される。

20

【 0 0 8 8 】

【表 3 a】

SEQ ID NO	Primer	Sequence (5' to 3')	Purpose
4	hOCT3/4-S1165	GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AGG	qRT-PCR for endogenous OCT3/4
5	hOCT3/4-AS1283	CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC	
6	hOCT3/4-S8944	CCC CAG GGC CCC ATT TTG GTA CC	qRT-PCR for total OCT3/4
7	hOCT3/4-AS	ACC TCA GTT TGA ATG CAT GGG AGA GC	
8	hSOX2-S1430	GGG AAA TGG GAG GGG TGC AAA AGA GG	qRT-PCR for endogenous SOX2
9	hSOX2-AS1555	TTG CGT GAG TGT GGA TGG GAT TGG TG	
10	hSOX2-S875	TTC ACA TGT CCC AGC ACT ACC AGA	qRT-PCR for total SOX2
11	hSOX2-AS	TCA CAT GTG TGA GAG GGG CAG TGT GC	
12	hNANOG-S1678	TGG CTG CCG TCT CTG GCT ATA GAT	qRT-PCR for NANOG
13	hNANOG-AS1797	AAG CCT CCC AAT CCC AAA CAA TAC	
14	hKLF2-S811	ACT CAC ACC TGC AGC TAC GC	qRT-PCR for KLF2
15	hKLF2-AS951	GTC TGA GCG CGC AAA CTT CC	
16	hKLF4-S1094	CAT GCC AGA GGA GCC CAA GCC AAA GAG GGG	qRT-PCR for KLF4
17	hKLF4-AS1225	CGC AGG TGT GCC TTG AGA TGG GAA CTC TTT	
18	hKLF5-S1344	TCC AAA TTT ACC CAC CAC CCT GCC AG	qRT-PCR for KLF5
19	hKLF5-AS1536	TCC AGT GCG AGC CTT CCC AGG TAC AC	
20	hMYC-S547	GCC GCC GCC TCA GAG TGC ATC GAC	qRT-PCR for c-MYC
21	hMYC-AS947	CGA GTG GAG GGA GGC GCT GCG TAG	
22	hMYCN-S835	GTG GTC ACT GTG GAG AAG CGG CGT TC	qRT-PCR for MYCN
23	hMYCN-AS1047	GAC GTG GGG ACG CCT CGC TCT TTA TC	
24	hMYCL-S581	ACC CCC TGG ATC CCT GCA TGA AGC	qRT-PCR for MYCL1
25	hMYCL-AS724	TCC TCA TCT TCC TTT TCC CCT GCA GC	
26	hLIN28A-S229	AGT AAG CTG CAC ATG GAA GG	qRT-PCR for LIN28A
27	hLIN28A-AS414	CCT GTC TCC TTT TGA TCT GC	
28	hLIN28B-S477	AAA GGC CTT GAG TCA ATA CGG GTA AC	qRT-PCR for LIN28B
29	hLIN28B-AS581	GGC CAC CAC AGT TGT AGC ATC TAT CT	
30	hGDF3-S248	GCT ACG TAA AGG AGC TGG GCG TC	qRT-PCR for GDF3
31	hGDF3-AS372	CCC TTT CTT TGA TGG CAG ACA GG	
32	hLEFTY2-S715	AAC CGC ACC TCC CTC ATC GAC TC	qRT-PCR for LEFTY2
33	hLEFTY2-AS840	GCT CCC TCT GCA CCG ACA CCT GT	
34	hGSC-S721	CAG CTG GCC CGG AAA GTG CAC CTC	qRT-PCR for GSC
35	hGSC-AS855	TTC TCC GGT GAC GCC TTC GAC GAC	
36	hHEX-S623	ATC GAC GCG CTA AAT GGA GGA GAC	qRT-PCR for HEX
37	hHEX-AS757	GGA GGG CGA ACA TTG AGA GCT ATC	
38	hSFRP5-S698	ACC AAG ATC TGC GCC CAG TGT GAG	qRT-PCR for SFRP5
39	hSFRP5-AS806	AAT CAG CTT CCG GTC CCC ATT CTC	
40	hDKK1-S593	CGA GGA GAA ATT GAG GAA ACC ATC	qRT-PCR for DKK1
41	hDKK1-AS707	TGA CCG GAG ACA AAC AGA ACC TTC	
42	hGATA4-S2044	CGG GTG TTG GAT TTT CTC AGA TGC	qRT-PCR for GATA4
43	hGATA4-AS2179	AAA CCC ACG GTC TAG GCC ACA GTG	
44	hTBX6-S771	CTC CTT CCG CTT CCC CGA GAC CAC	qRT-PCR for TBX6
45	hTBX6-AS913	GCC CCG CAG TTT CCT CTT CAC ACG	
46	hHNF3β-qS	GGA GCG GTG AAG ATG GAA	qRT-PCR for HNF3β
47	hHNF3β-qAS	TAC GTG TTC ATG CCG TTC AT	
48	hSox17-S423	CGC TTT CAT GGT GTG GGC TAA GGA CG	qRT-PCR for SOX17
49	hSox17-AS583	TAG TTG GGG TGG TCC TGC ATG TGC TG	
50	hBrachyury-S1807	CAA GGC CCA GGT CCC GAA AGA TGC	qRT-PCR for T
51	hBrachyury-AS1939	GGT GCC GTG TGC TCC TCC ACT GC	
52	hFLK1-qS	TGA TCG GAA ATG ACA CTG GA	qRT-PCR for KDR
53	hFLK1-qAS	CAC GAC TCC ATG TTG GTC AC	
54	hPAX6-S1206	ACC CAT TAT CCA GAT GTG TTT GCC CGA G	qRT-PCR for PAX6
55	hPAX6-AS1497	ATG GTG AAG CTG GGC ATA GGC GGC AG	
56	hMIXL1-S350	CGC GCT CAC CCT GCT CCC CGA GTC	qRT-PCR for MIXL1
57	hMIXL1-AS538	TTG GTT CCG GCA GGC AGT TCA CAT C	
58	hGLIS1-S2434	CAC CTC GCC CAC CTG CTG TCG CTC	qRT-PCR for endogenous GLIS1
59	hGLIS1-AS2604	GTG CGC CCA GCT CAA GCT CGG ATG	
60	hGLIS1-S1421	TGC CCC CAT CCT CTC AGA GCC ATT C	qRT-PCR for total GLIS1
61	hGLIS1-AS1578	CAG CCA TCC GGT AGC AGT CGC CAT AG	
62	G3PDH-S	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	qRT-PCR for G3PDH
63	G3PDH-AS	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	
64	hFOXH1-S709	TTG GTG ATT CAG GCC GCT CCC TC	qRT-PCR for FOXH1
65	hFOXH1-AS848	GTC CTT GGG CAC CTT GCG GAA GC	
66	hLHX1-S1957	CGG TCT GCG GAG TTC GTG GTT GT	qRT-PCR for LHX1
67	hLHX1-AS2139	GAC AGC CAG TGC GCG GAT CCC AG	
68	hCER1-S553	GGA CAG TGC CCT TCA GCC AGA CTA	qRT-PCR for CER1
69	hCER1-AS659	TGG CAG GCA AAC AGT GAG AGC AGG	
70	hFOXF1-S1230	ACC CTG GAC CGG CAC AAG AAA CTG	qRT-PCR for FOXF1
71	hFOXF1-AS1338	GCC AAC CGC AGC GCT GTG TCT TTG	

10

20

30

40

【 0 0 8 9 】

【表 3 b】

SEQ ID NO	Primer	Sequence (5' to 3')	Purpose
72	hID3-S871	ACT TCG CCC TGC CCA CTT GAC TTC	qRT-PCR for ID3
73	hID3-AS1045	CAG CCA CTC CTT CCA CAC CTC CAC	
74	hEVX1-S1049	CCG CCT TCA CCC GAG AGC AGA TTG	
75	hEVX1-AS1179	TTG TCC TTC ATG CGC CGG TTC TGG	qRT-PCR for EVX1
76	hBMP4-S678	TAC CGG CTT CAG TCT GGG GAG GAG	qRT-PCR for BMP4
77	hBMP4-AS798	TTC ACT GGT CCC TGG GAT GTT CTC	
78	hOCT3-CR1-F1	TTT TTT GGA TGG GTG GAG GAG A	Methylome of OCT3/4 CR1
79	hOCT3-CR1-R1 (Biotinated)	CAC CAT TAC CAC CAC CAT TAA AC	
80	hOCT3-CR1-S1	ATG GGT GGA GGA GAG	
81	hOCT3-CR2-F1	GGG TGT GGA GAA AAA ATA TTT GAT TTT AGG	Methylome of OCT3/4 CR2
82	hOCT3-CR2-R1 (Biotinated)	CCA AAC CCA TTC AAA AAT TAA ACA CTT A	
83	hOCT3-CR2-S1	GGG GGT AGG ATA ATG	
84	hNANOG-CR1-F1	TTT GTA TTA TAA TGG TTT TGG TGA GAT TG	Methylome of NANOG CR1
85	hNANOG-CR1-R1 (Biotinated)	CCT ACT AAC CCA CCC TTA TAA ATT	
86	hNANOG-CR1-S1	GTT TTG GTG AGA TTG G	
87	h-OCT3/4-DMR pyro-F1	GTG GGA TTG GGG AGG GAG A	Methylome of OCT3/4 5' UTR
88	h-OCT3/4-DMR pyro-R1 (Biotinated)	CCC CTA ACC CAT CAC CTC C	
89	h-OCT3/4-DMR pyro-S1	GTA AGT TTT TAT TTT ATT AGG TTT	
90	hGLIS1 ChIP S1	ACA CAG AAC GTT GCA GGA GGG TAT C	ChIP-PCR for GLIS1 locus
91	hGLIS1 ChIP AS1	AAA TGC CTG CTG AGT GTT ATT GCT G	
92	hGLIS1 ChIP S2	AGG GCC TGA GAC AGA ACA GCA CTG G	
93	hGLIS1 ChIP AS2	GAC TTC ACC ACC TAC CGT GCA CCA G	
94	hGLIS1 ChIP S3	TTG AGT AAT TTC TGG TGC GAG GCT G	
95	hGLIS1 ChIP AS3	GCT TTA TGG TGG TGT GCG TGT GTG C	

10

【 0 0 9 0 】

マイクロアレイ及び遺伝子オントロジー分析

20

50ナノグラムの全RNAがCyanine 3-CTPを用いて標識され、ハイブリダイゼーションのためにSurePrint G3ヒトGE 8x60K (G4112F、Agilent technologies)又はSurePrint G3マウスGE 8x60K (G4852A)とともに単色のプロトコルを用いて使用された。アレイは、マイクロアレイスキャナーシステム (G2565BA, Agilent technologies)を用いてスキャンされ、抽出されたシグナルは、Genes pringバージョン11ソフトウェア (Agilent technologies)を用いて分析された。遺伝子の発現値は、75%の百分率シフトを用いて正規化された。図2c,d及びeにおけるコンポーネント1及び2の遺伝子は、その寄与の割合が、マイクロアレイデータセットであるGSE28024の-0.6よりも小さい場合に切り捨て (cutting off)によって絞り込まれ、National Institute for biotechnology Information (NCBI)のウェブサイトの遺伝子発現オムニバス (GEO) からダウンロードされた。遺伝子オントロジー分析は、DAVIDバイオインフォマティクスデータベースウェブサイト (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>)上のEASEプログラムを用いて行われた。

30

【 0 0 9 1 】

胚様体形成

ヒトESC/iPSCの小クランプ (Small clamps) がDMEM/F12含有20% KSR、1% Glutamax、1% NEAA、100 nM 2-ME、及び0.5% Pen/Strepにおける低結合性プレート (Nunc)に移された。培地は、一日おきに交換された。8日の浮遊培養後、凝集物は、ゼラチン化プレートに移され、更に8日間、培養された。培地は、一日おきに交換された。

【 0 0 9 2 】

原始線条分化

40

ヒトESC/iPSCの原始線条への分化は、先に記載された通りに行われた (Nat Biotechnol 28, 1187-1194, doi:nbt.1683 [pii])。簡潔に説明すると、ヒトESC/iPSCの単一細胞懸濁液 (single cell suspension) が、1% インスリン-トランスフェリン-セレナイト (ITS、Invitrogen)、1% Glutamax、1% NEAA、2% B27 (Invitrogen)、100 nM 2-ME、及び0.5% Pen/Strepを添加されたDMEM/F12においてフィブロネクチンを塗布されたプレート (BD biosciences)に移された。本発明者らは、1日目に3µMのCHIR99021 (Stemgent)及び50 ng/mlのActivin A、2日目に3µMのCHIR99021、25ng/mlのActivin A及び20 ng/mlのbFGF、3日目に3µMのCHIR99021、10ng/mlのActivin A、20ng/mlのbFGF及び40ng/mlのBMP4 (R&D systems)を加えた。

【 0 0 9 3 】

50

内胚葉分化

内胚葉分化は、先に記載されたものにわずかな修正を加えて行われた (Proc Natl Acad Sci U S A 109, 12538-12543, doi:10.1073/pnas.1209979109 (2012))。ヒト多能性幹細胞の単一細胞懸濁液が、2%のB27、100 ng/mlのActivin A、3 μ MのCHIR99021及び0.5%Pen/Strepを含有するRPMI1640 (Invitrogen)においてマトリゲルで被覆されたプレートに移された。本発明者らは、1日目から3日目に0.5 mM 酪酸ナトリウム (Sigma)を加え、その後、酪酸ナトリウムがない状態において7日目まで培養した。

【0094】

中胚葉分化

ヒト多能性幹細胞の単一細胞懸濁液は、2%のB27、100ng/mlのActivin A、3 μ MのCHIR99021及び0.5%Pen/Strepを含有するDMEM/F12においてコラーゲンIで被覆されたプレート (BD biosciences)に移された。48時間後、培地は、2%のB27、25ng/mlのBMP4、及び0.5% Pen/Strepを添加されたDMEM/F12に取り換えられた。培地は、8日目まで1日おきに交換された。

【0095】

神経分化

二重SMAD抑制を用いる神経分化プロトコルは、先の報告に従った (Nat Biotechnol 27, 275-280 (2009); J Neurosci Res 89 (2), 117-126. doi: 10.1002/jnr.22547. Epub 2010 Dec 8)。多能性幹細胞の単一細胞懸濁液が、5%KSR、1%NEAA、1%Glutamax、100nMの2-ME、2 μ MのDorsomorphin (Stemgent)及び10 μ MのSB431542 (Stemgent)を含有するDMEM/F12においてLipidureで被覆された低結合性96ウェルプレート (NOF corporation)に移された。培地は、5、8及び11日目に交換された。分化期間は14日間であった。

【0096】

免疫組織化学

細胞は、4%パラフォルムアルデヒドで固定され、5%ヤギ又はロバ正常血清 (Chemicon)、1%牛血清アルブミン (BSA; Nacalai Tesque)及び0.2% TritonX-100 (Nacalai Tesque)を含有するPBSで透過化された。試料は、染色溶液 (PBS containing 1% BSA)において希釈された、SOX17 (1:200、AF1924、R&D systems)、平滑筋アクチン (1:600、M085101、DAKO)及びNESTIN (1:1000、ab5968、Abcam)のための一次抗体とともに4°Cで一晩インキュベートされた。PBSを用いて洗浄した後、試料は、Alexa488結合抗ヤギIgG (1:500、A-11055、Invitrogen)、Alexa546結合抗マウスIgG (1:500、A-11030、Invitrogen)又はAlexa 488結合抗ウサギIgG (1:500、A-11034、Invitrogen)、及びHoechst33342 (1 μ g/ml、H3570、Invitrogen)等の蛍光体結合二次抗体を含有する染色溶液にさらされた。画像は、BZ9000 (KEYENCE)を用いて撮影された。

【0097】

Pyro配列解読

500 μ gの精製されたゲノムDNAが、亜硫酸CT変換のためにEZ DNAメチル化キット (Zymo research)とともにメーカーの推奨案に従って用いられた。結果として得られたDNAサンプルは、鋳型としてのビオチン化プライマーとともにPCRのために用いられ、増幅された産物は、Pyromark (Qiagen)によって分析された。Primer配列は表3に提示された。

【0098】

奇形種形成及び組織学的分析

10 μ M Y-27632を含有するDMEM/F12において懸濁された約3 \times 10⁵の回収された細胞は、数種の複合免疫不全マウス (生後6週間)の精巣 (testes)にHamilton注射器を用いて導入された。8~10週間後に腫瘍は切断され、順に4%パラフォルムアルデヒド及び70%エタノールとともに固定された。パラフィンを埋め込まれた切片は、ヘマトキシリン及びエオシンを用いて染色された。画像は、BZ9000を用いて撮影された。

【0099】

結果

生成途中の初期化細胞は、遺伝子発現においてPrSと同様である

10

20

30

40

50

人工多能性幹細胞 (iPSC) の誘導中の多数の非初期化細胞は、初期化処理の正確な分析を妨げる。この問題を克服するべく、本発明者らは生成途中の初期化細胞を捕捉するための多能性細胞特異的抗原である、TRA-1-60を用いた(図1a)。TRA-1-60陽性(+)細胞は、ヒト真皮線維芽細胞(HDF)培養においてOSKMの移植後4日目に最初に現れた(図1b)。本発明者らは、大部分の人工多能性幹細胞(iPSC)コロニーが移植後7日目に磁気活性化細胞ソーティングにより精製されたTRA-1-60(+)細胞に由来することを確認した(図1d)。TRA-1-60(+)細胞のiPSCコロニー形成能は、徐々に増加し、20日目又は28日目にESC/iPSCと同様の効率に達した(図1c)。TRA-1-60(+)細胞では、NANOG等の多能性幹細胞マーカーは、次第に増加し(図1e)、OSKM導入遺伝子は抑制された(silence)。

10

【0100】

本発明者らは、DNAマイクロアレイを用いて、精製されたTRA-1-60(+)細胞の網羅的及び経時的な遺伝子発現パターンを調べた。本発明者らは、TRA-1-60(+)細胞における大部分の遺伝子が、HDFと、樹立されたiPSCとの間の発現パターンを何らかの形で示すだろうと予測した。予備的主成分分析(PCA)は、予想通り、ESC/iPSCに豊富な遺伝子において徐々に増加し、線維芽細胞に豊富な遺伝子において減少することを特徴とするコンポーネント1を特定した(図2a)。しかしながら、コンポーネント2は、相当数の遺伝子がiPSC生成の間に一過的に変動することを明らかにし、線維芽細胞からiPSCへの道筋は、単純又はまっすぐに進むものではないということを示唆した(図2a)。遺伝子オントロジー分析は、コンポーネント2に含まれる遺伝子が、主に「発生」に関する過程に分類されることを示した(図2b下欄)。本発明者らは、TRA-1-60(+)細胞の遺伝子発現と、いずれもESC/iPSCから分化する、中胚葉(ME)、内胚葉(EN)、神経外胚葉(NE)、及びPrSを含む3つの胚葉系譜とを比較した(図2c)。PCA分析により、生成途中の初期化細胞は、遺伝子発現においてPrSと大部分で一致することが明らかになった(図2d)。

20

【0101】

更なるPCA分析により、TRA-1-60(+)細胞におけるかなりの数の遺伝子の発現レベルは、HDF及びiPSCの間にはないが、iPSC生成の間に一過的に活性化又は抑制されることが明らかになった(図2e)。遺伝子オントロジー分析は、一過的に下方制御された遺伝子は、主に代謝の用語に分類されることを示した(図2f上欄)。一方、一過的に活性化された遺伝子は、発生関連用語に結び付けられる(図2f下欄)。階層的なクラスター化により、初期化の前半(d3-15)においてTRA-1-60(+)細胞の運命は、上皮(EDM)を含む上皮細胞の発現(図2gの緑ボックス)へ向かうことが示唆された。実際には、EDMと3~15日目の生成途中の初期化細胞との間の相関係数は、0.9082~0.9105であるが、いくつかのEDM関連遺伝子が、この段階において、一過的に増加する。更に、間葉の遺伝子の大幅な抑制及び上皮遺伝子の活性化が観察された(図2h)。これらのデータは、上皮化が、TRA-1-60(+)中間細胞の初期化の前半において一つの優勢な事象であることを示唆する。

30

【0102】

生成途中のヒト初期化細胞は、PrS様の状態を一過的に獲得する

本発明者らは、TRA-1-60(+)細胞が、初期化(d20-49)の後半においてESC/iPSCのクラスターだけでなく、中胚葉(ME)、内胚葉(EN)、初期内胚葉系中胚葉の特徴を有する原始線条(PrS)等の分化系譜のクラスターに参与することを発見した(図2gの赤ボックス)。TRA-1-60(+)細胞をEDM及びPrSを含む分化系譜と比較するためのPCA及び階層的なクラスター化により、初期化の道筋は、初期化の前半においてPrSに近接することが明らかになった(図3a)。

40

【0103】

本発明者らは、次に、多様な発生系譜のマーカー遺伝子の発現レベルを確認した。BRACHYURY(T)、GDF3、LEFTY2、MIXL1、LHX1、及びNODAL等のPrSのためのマーカー遺伝子は、TRA-1-60(+)細胞(図3c)においてiPSC生成の間、一過的な活性化を示した。約40%のPrSに豊富な遺伝子は、TRA-1-60(+)細胞において一過的に上方制御される遺伝子に含ま

50

れる（図3b）。GDF3、LEFTY2、NODAL、HAND1、WNT3及びNOG等の遺伝子は、早ければ3日目に誘導される（図4a）。一方、T、FOXA2、EOMES、LHX1、SOX17及びMIXL1等の遺伝子は、比較的後期段階において15日目以降に上昇した（図4b）。対照的に、多能性幹細胞、ME、EN及び神経外胚葉（NE）を含む他の系譜のマーカー遺伝子は、そのような一過的な変化を示さなかった。

【0104】

PCA及び階層的なクラスター化により、移植後20日目のTRA-1-60(+)細胞が、NE、EN、ME又はESC/iPSCではなく、PrSに類似するが、同一ではないことが明らかになった（図3a）。20日目のTRA-1-60(+)細胞及びPrSの間の全体的な遺伝子発現の相関係数は、0.9718であり、ESC/iPSCのクローン変異(0.9634-0.9862)とよく似たレベルであった。また、活性化されたプロモーターの目印である、ヒストンH3(H3K4me3)のトリメチル化された(tri-methylated)リジン4の占有率も、初期化の間、PrS関連遺伝子座において一過的に増加した（図3d）。単一細胞qRT-PCR及び免疫組織化学により、20日目の全てのTRA-1-60(+)細胞が、垂直的にTを発現し、HDF及びESCは発現しないことが明らかになった（図3e及び3f）。これらのデータは、初期化の後期段階のTRA-1-60(+)細胞が部分的にPrSに類似する遺伝子発現プロファイルを有することを示唆する。また、脂肪由来幹細胞(ASC)と、星状膠細胞(HA、外胚葉)、気管支上皮(NHBE、内胚葉)、及び前立腺上皮細胞(PrEC、内胚葉)等の非中胚葉系譜とに由来するTRA-1-60(+)細胞も、網羅的な遺伝子発現においてPrSとの類似性を示した（図3g及び4c）。

10

20

【0105】

GLIS1はPrS誘導活性を有する

初期化とPrSを結び付ける別の一組の証拠が、本発明者らが最近、iPSC生成を促進する母系(maternal)転写因子として報告したGLIS1から生じた。本発明者らは、この研究においてGLIS1が胎生期(E)5.5の胚盤葉上層(epiblast)の隣接部位及び中胚葉、胚体外の外胚葉、及びE6.5のノード(node)を含むPrSにおいても発現することを発見した（図5a）。また、本発明者らは、ヒトESC/iPSCに由来するPrS及び内胚葉系中胚葉においてGLIS1が高度に発現することも発見した（図5b）。対照的に、分化していないヒト多能性幹細胞にGlis1はほとんど発現されない。

30

40

【0106】

GLIS1の機能を更に調査するため、本発明者らは、GLIS1の発現ベクターをヒトESCへ導入した。本発明者らは、ヒトESCにおけるGLIS1の強制発現により、より緩やかな細胞間相互作用、及びより遅い増殖速度（図5c）を特徴とする形態学的変化が生じることが分かった。本発明者らの先の報告と合致して、GLIS1は、OCT3/4、NANOG、LIN28A及びc-MYCを含む多能性関連遺伝子の発現を促進した（図5d）。一方、GLIS1は、T、GSC、FOXH1、及びNODAL等のPrS関連遺伝子の発現を顕著に増加させた（図5e）。マイクロアレイを用いた全体的な遺伝子発現分析により、GLIS1は、中胚葉関連及びPrS関連遺伝子の発現を有意に活性化することが明らかになった（196遺伝子のうち106、 $P < 0.05$ ）（図5f）。更に、GLIS1は、ヒトESCのPrS分化可能性を顕著に促進し、一方、神経分化を減少させた（図5g）。これらのデータは、初期化エンハンサーであるGLIS1がPrS誘導活性も有することを示唆する。

【0107】

FOXH1は、ヒトiPSC生成を顕著に促進する

本発明者らの発見は、生成途中のPrS形成において重要な役割を果たす遺伝子がiPSC生成を促進し得るという仮説に我々を導いた。ノックアウトマウス実験により、FOXH1がPrS形成に必須であることが示されたため、本発明者らは当初、その転写因子に着目した。本発明者らは、FOXH1の抑制が、ヒトESC/iPSCのPrSへの分化を抑制することを確認した（図6a）。

【0108】

次に、本発明者らは、内胚葉系中胚葉に高度に発現する23個の転写因子を選択し、それらをOSKMとともにHDFに導入した（図6b）。本発明者らは、FOXA2、FOXF1、FOXH1、LHX1、

50

及びTを含む5つの因子が、iPSCコロニー数を有意に増加させることを発見した。それらの中で、FOXH1は最も強い効果を示した(図6b)。FOXH1は、Nodalシグナルの下流の標的として機能し、前方PrSの指定(specification)に必須である。

【0109】

FOXH1をOSKM(OSKMF)とともに導入することによってiPSCコロニー数を顕著に増加させる効果のより詳細な解析では、その効果は、2つの最も強力な既知の初期化エンハンサーである、小ヘアピンRNA(short-hairpin RNA)に媒介されるp53(p53 shRNA)の枯渇、及びGlis1よりも強力であった(図6c)。FOXH1及びp53 shRNAは、相乗的な効果を示し、FOXH1がp53活性とは独立に初期化を促進することを示唆した。本発明者らは、FOXH1とともに作成されたヒトiPSCが、OSKMのみを用いて作製されたものと区別できないことを確認した(図7)。総合すると、これらのデータは、FOXH1がヒトiPSC生成を促進する強い活性を有することを示唆する。

10

【0110】

ヒトiPSC生成の間、内在性FOXH1は後期段階において増加した(図6d)。FOXH1の段階特異的活性化により、FOXH1が後期段階において明らかに初期化効率を向上させることが証明された(図6e及び6g)。これらの結果は、より初期段階の初期化を促進し、TRA-1-60(+)細胞の割合を増加させる、GLIS1を用いた結果と対照的である(図6f及び6g)。このことは、GLIS1がPrS様の状態の誘導を促進するのに対し、FOXH1がその成熟を促進することを示唆し得る。実際には、TRA-1-60(+)細胞の割合は、FOXH1によって7日目に再現性良く減少したが、OSKMをGLIS1とともに加えたものと比較すると、11及び15日目に元に戻った(図6g)。また、FOXH1は、7日目のTRA-1-60(+)細胞の割合を増加させなかった(図6h)。本発明者らは、FOXH1が、線維芽細胞マーカーであるCD13の下方制御を促進し、11及び15日目のTRA-1-60(+)細胞において上皮マーカーである、EpCAMの上方制御を促進することを発見した(図6i)。また、DPPA4、DNMT3B、LIN28A、ZFP42及び内在性SOX2等の後期初期化マーカーの発現は、FOXH1活性によって有意に促進された(図6j)。これらの結果は、GLIS1がPrS様の状態の誘導を促進し、FOXH1がその成熟を促進するという本発明者らの仮説を更に支持する。

20

【0111】

次に、本発明者らは、内在性FOXH1がヒトiPSC生成及びPrS分化に必須であるか否かをより詳細に再度調べた。ESCにおけるFOXH1のノックダウンは、PrSへの分化を有意に阻害した(図6k)。内在性FOXH1の発現は、TRA-1-60(+)細胞においてiPSCへの初期化の間、常に増加した(図6d)。6のshRNAsのうち、3つが(#1、3 and 6)、ESC又はOSKMを導入されたHDFにおいてそれぞれ~90%、70%及び50%の効率で内在性FOXH1の発現を抑制した(図6l)。OSKMと共導入された場合、shRNA#1は、iPSCコロニー形成をほぼ消失させた(図6l)。また、shRNA#3は、iPSCコロニー形成を50%減少させた。これに対し、FOXH1の抑制は、導入されたHDFの増殖を向上させなかった(図6m)。これらのデータは、FOXH1がiPSCへの初期化過程において重要な役割を果たすことを示唆する。

30

【0112】

Foxファミリーメンバーは、ヒトiPSC生成を促進する。

最後に、本発明者らは、ヒトiPSC生成における他のFOXファミリー転写因子の効果を調べた。本発明者らは、36のFOX遺伝子のうち、FOXA2、FOXB1、FOXF1(FOXF2と同じ)、FOXG1、及びFOXH1の5つの因子が有意にiPSCコロニーの数を有意に増加させることを発見した(図8)。SOX、KLF及びMYCファミリーと同様に、いくつかのFOXファミリー転写因子は、ヒトiPSC生成に重複する効果を有する(図9)。

40

【0113】

要約すると、本発明者らの精製された生成途中の初期化細胞の解析により、ヒトにおける誘導された多能性への道筋が、PrS様の状態を経由することが明らかになった。このことは、PrSを特定するための主要なファクターであるFOXH1が顕著にヒトiPSC生成を促進することを証明することに我々を案内した。

【0114】

50

本発明は、好ましい実施の形態に重点を置いて記載されているが、好ましい実施の形態が修正し得ることは当業者にとって自明である。本発明は、本明細書において詳細に記載された方法以外の方法によって本発明が具体化し得ることを意図している。従って、本発明は、添付された「特許請求の範囲」の主旨及び範囲において包含される全ての修正を含み得る。

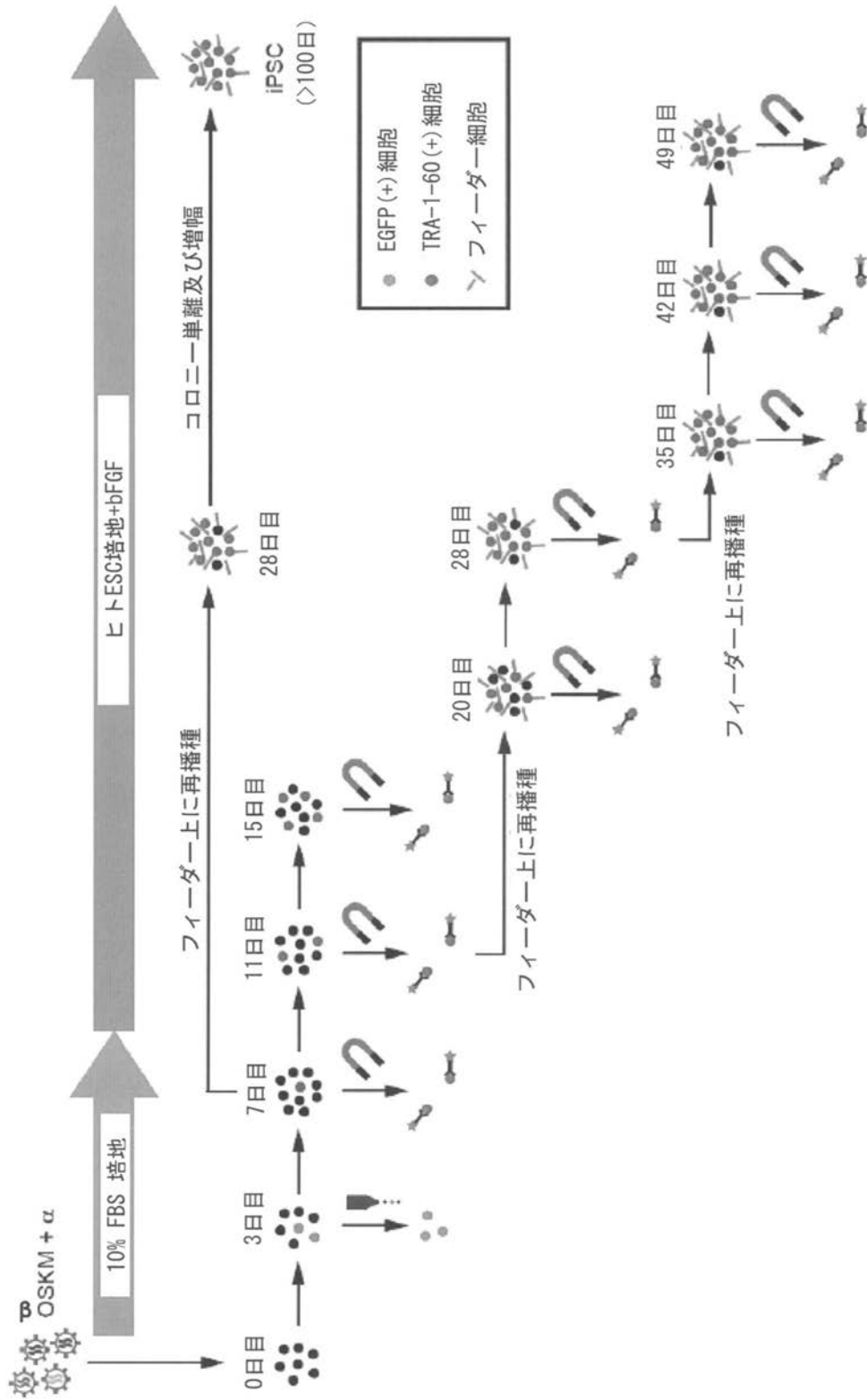
【 0 1 1 5 】

特許及び特許出願を含む本文に引用された刊行物に開示された内容は、本文に開示された程度において参照されることによってその全体が本明細書に組み込まれる。

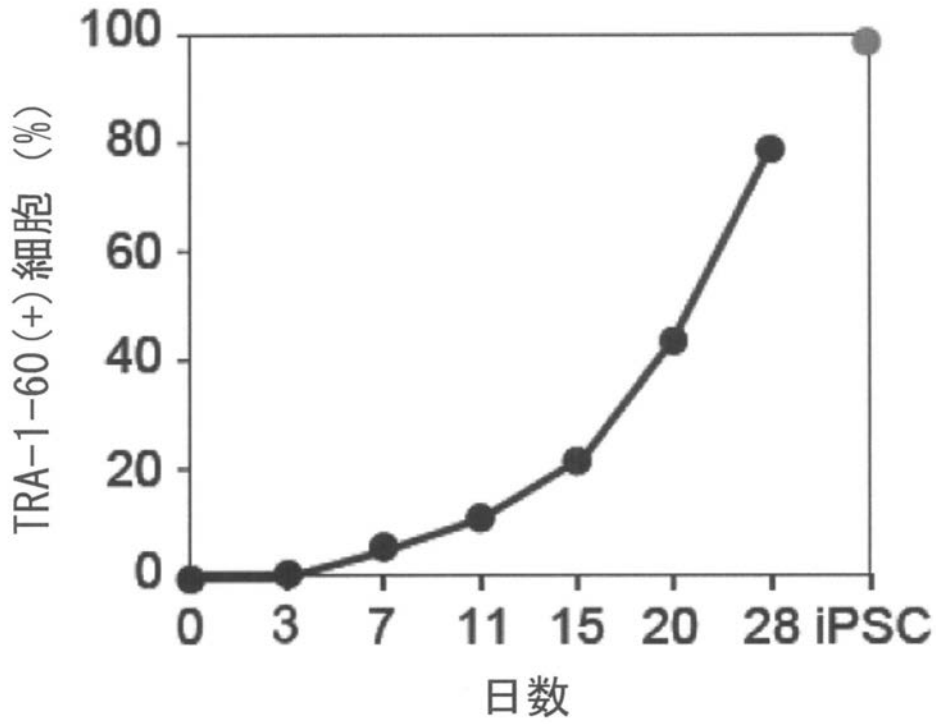
【 0 1 1 6 】

この出願は、2012年10月23日に出願された米国仮特許出願第61/717,250号を基礎としており、その内容は全て本明細書に組み込まれる。

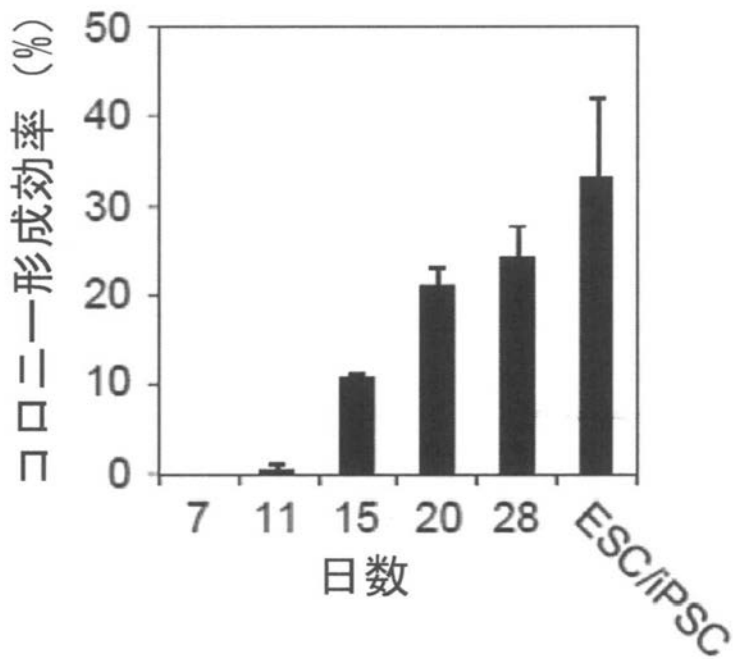
【 図 1 a 】



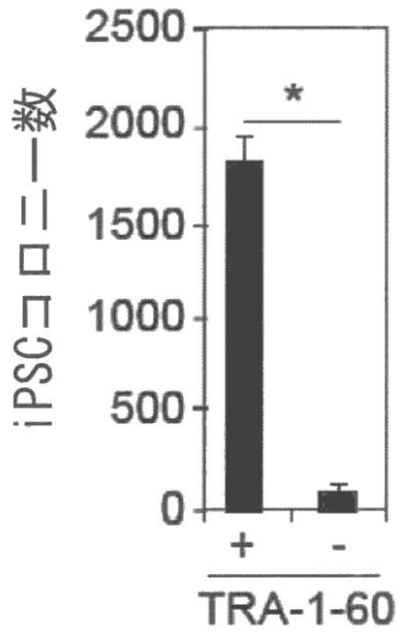
【図 1 b】



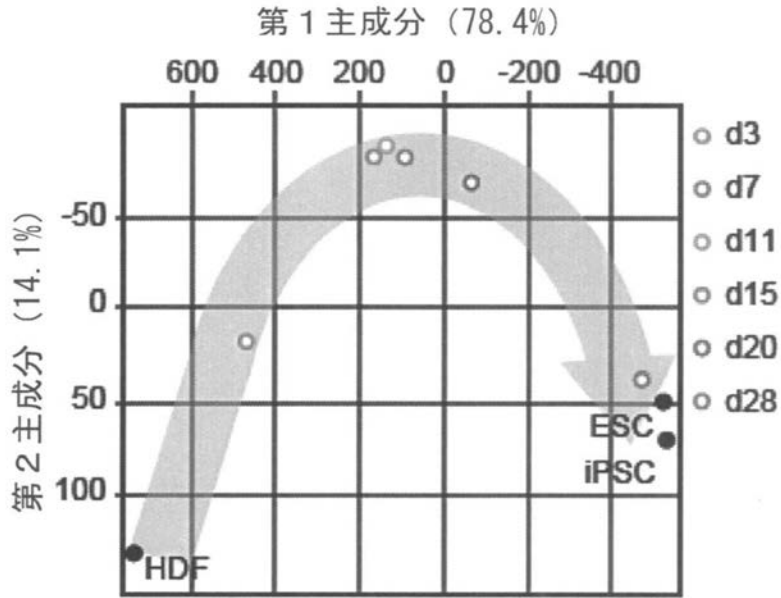
【図 1 c】



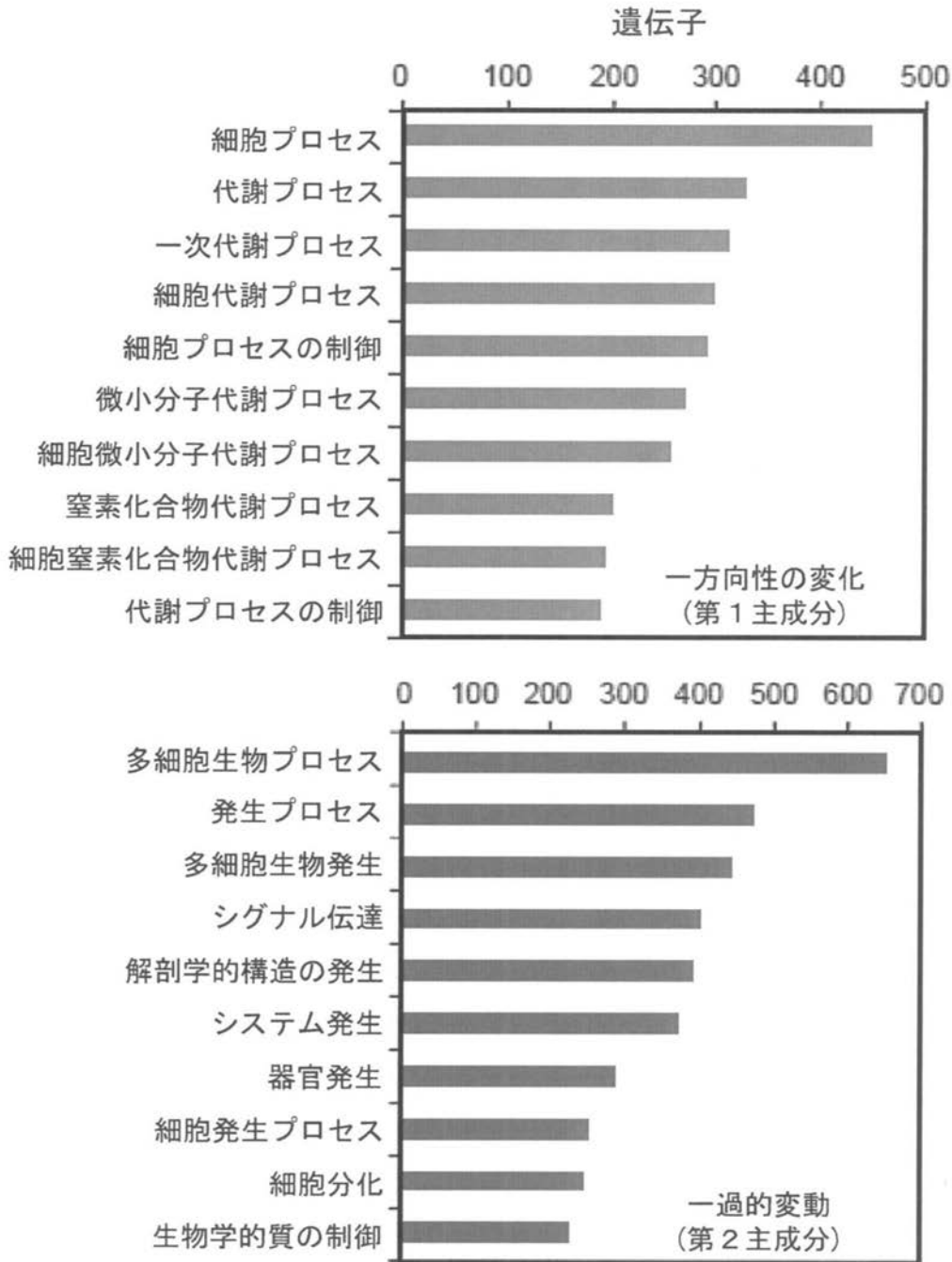
【 図 1 d 】



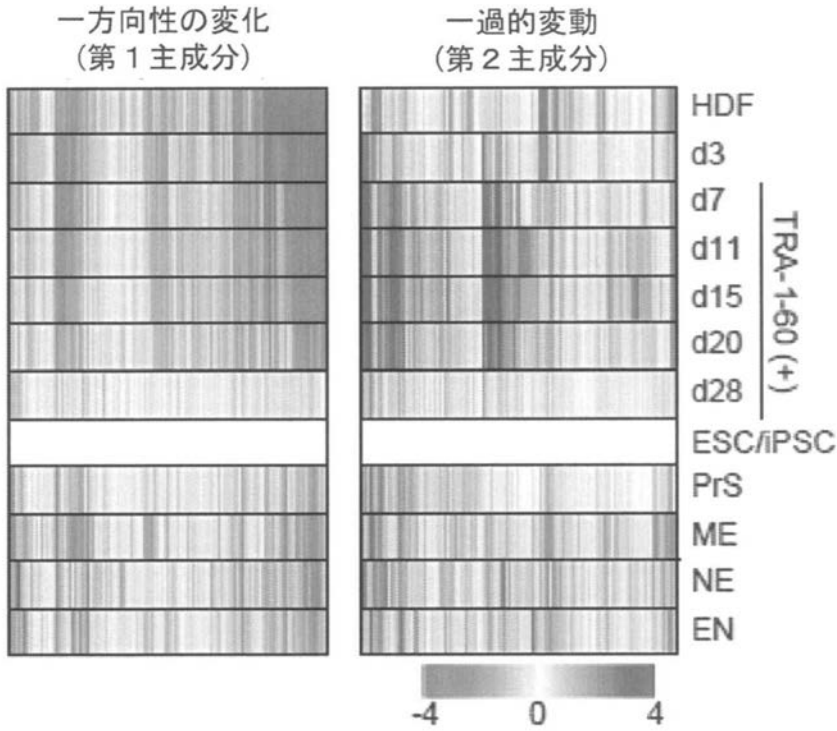
【图 2 a】



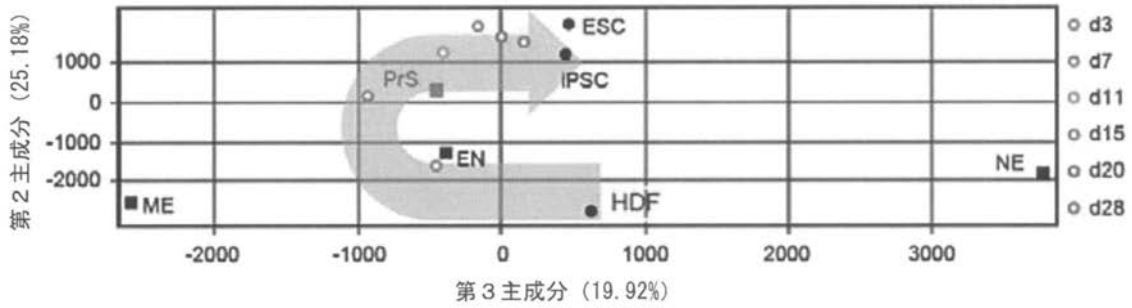
【図 2 b】



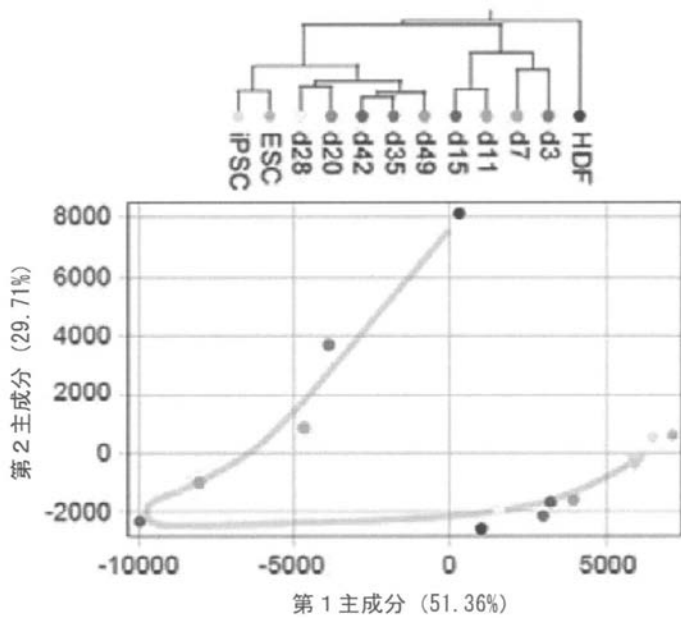
【 図 2 c 】



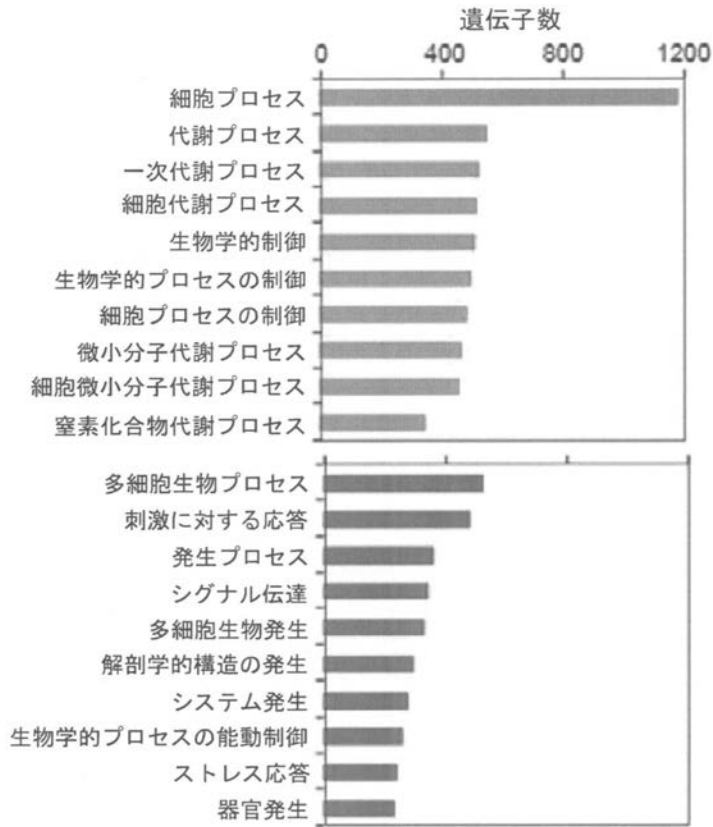
【 図 2 d 】



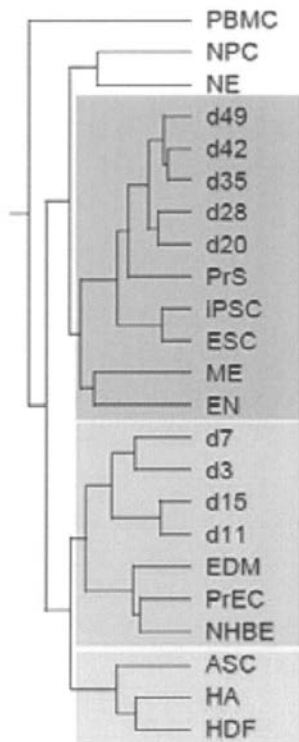
【 図 2 e 】



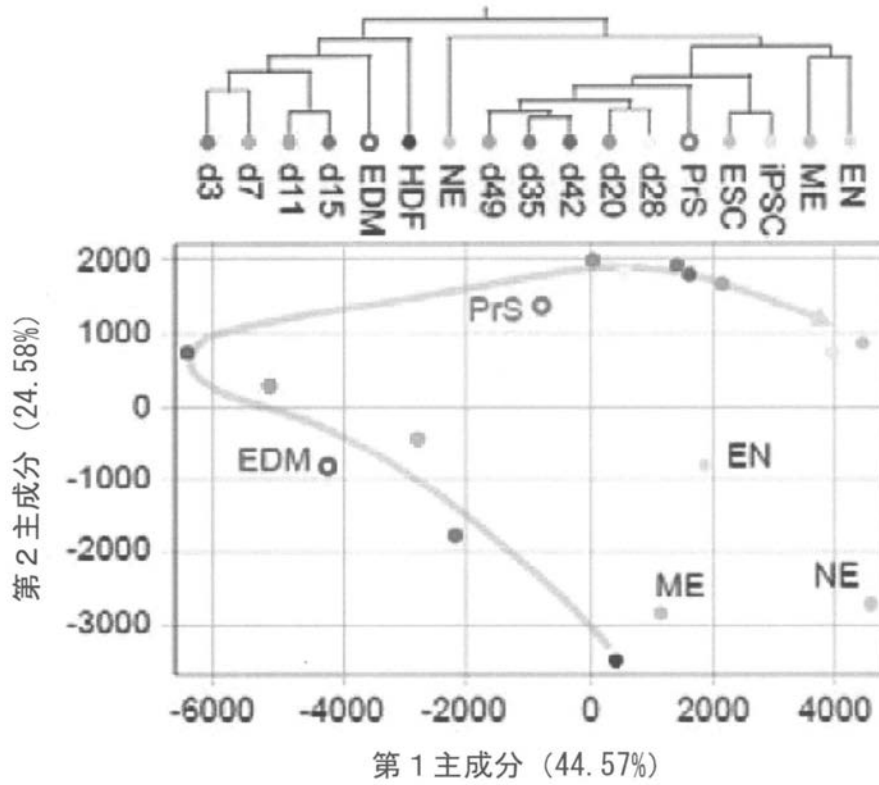
【 図 2 f 】



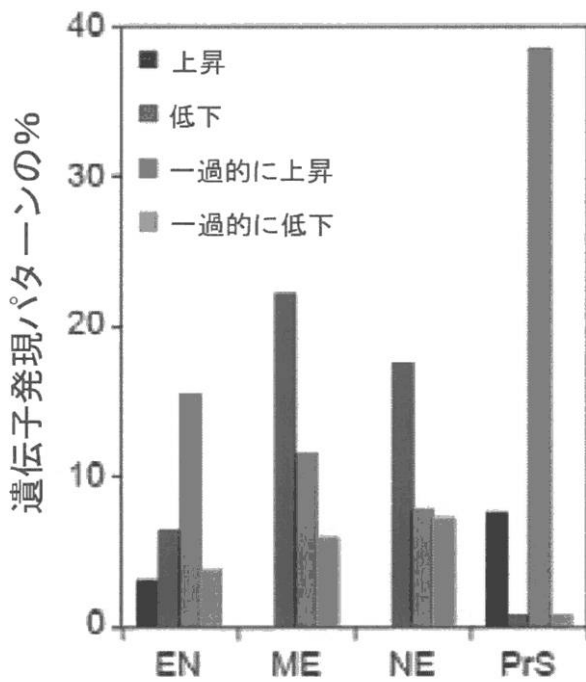
【 図 2 g 】



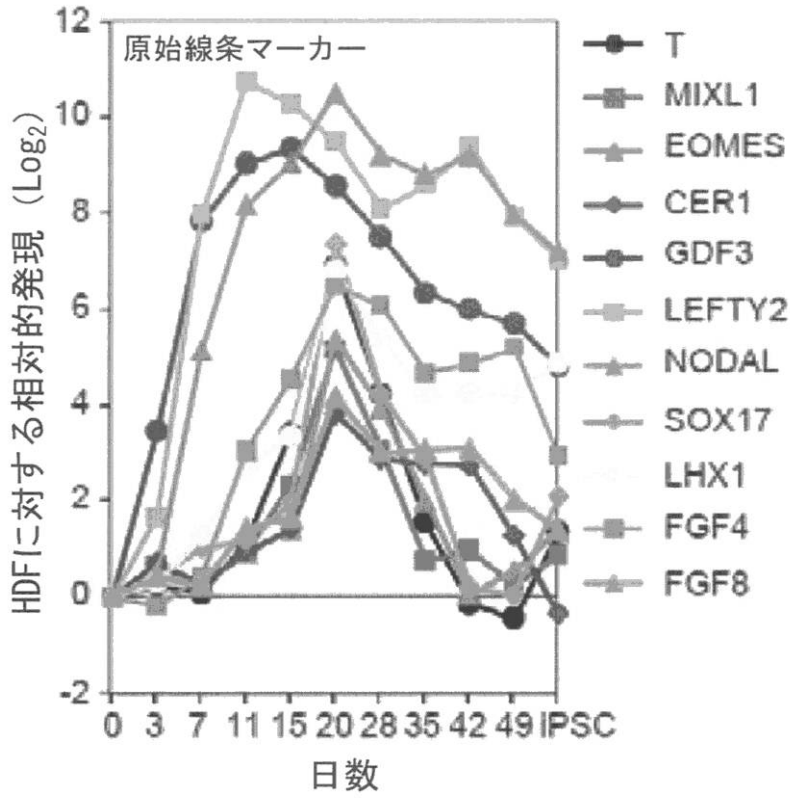
【図 3 a】



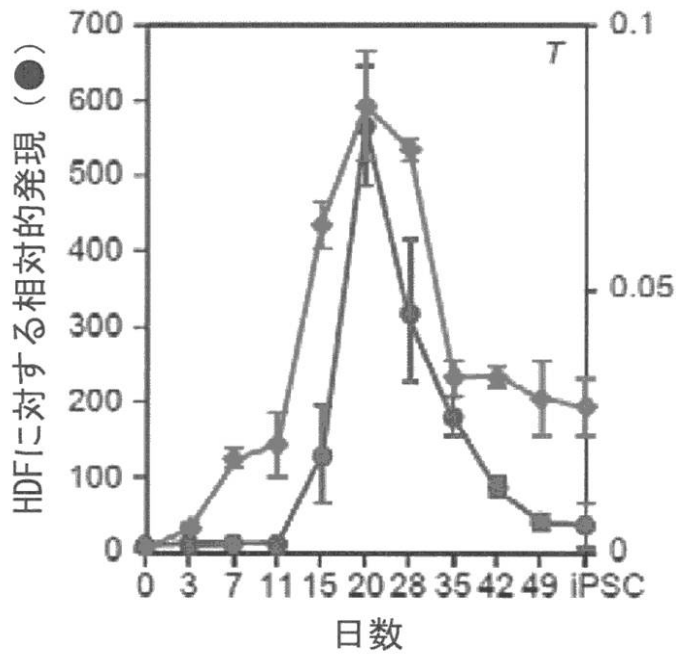
【図 3 b】



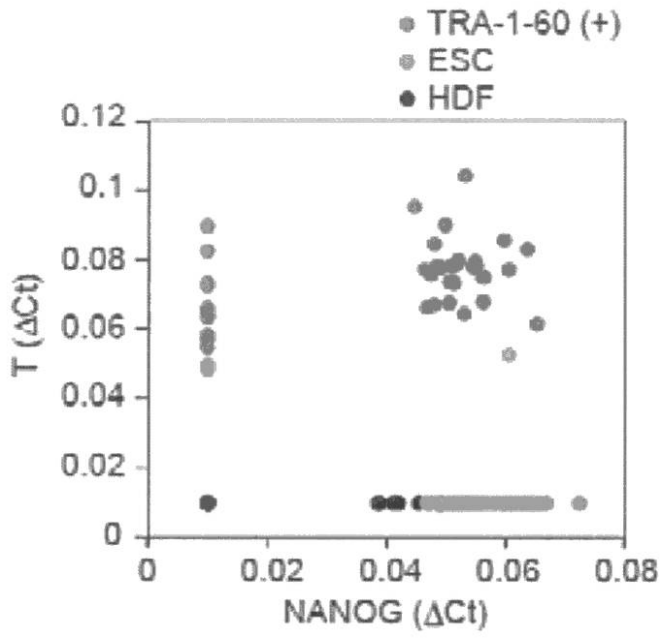
【 図 3 c 】



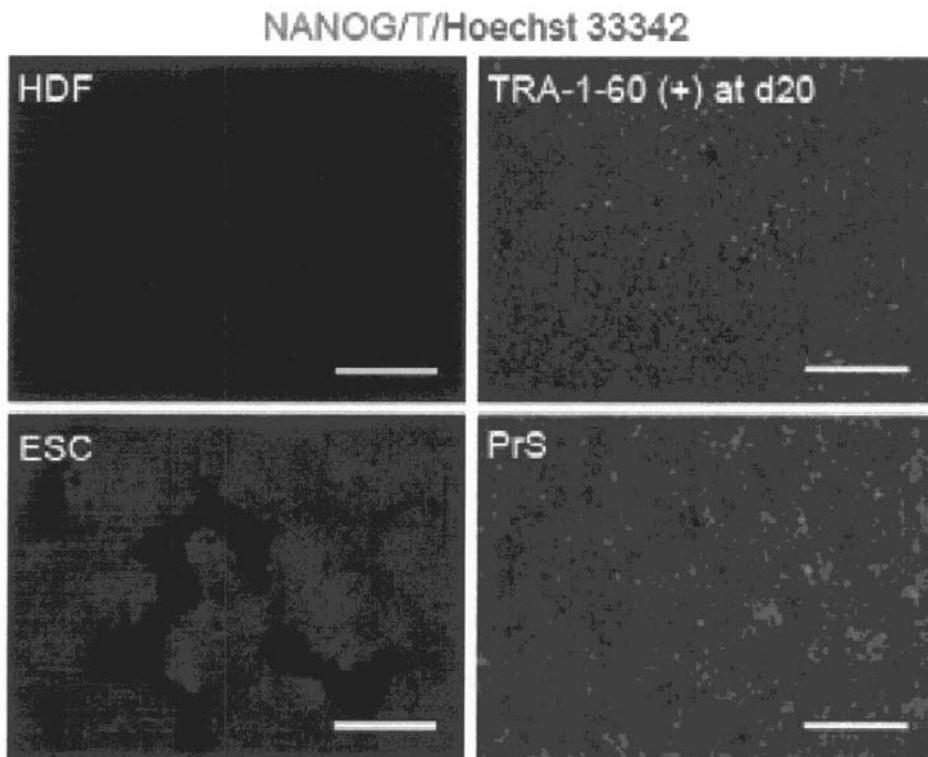
【 図 3 d 】



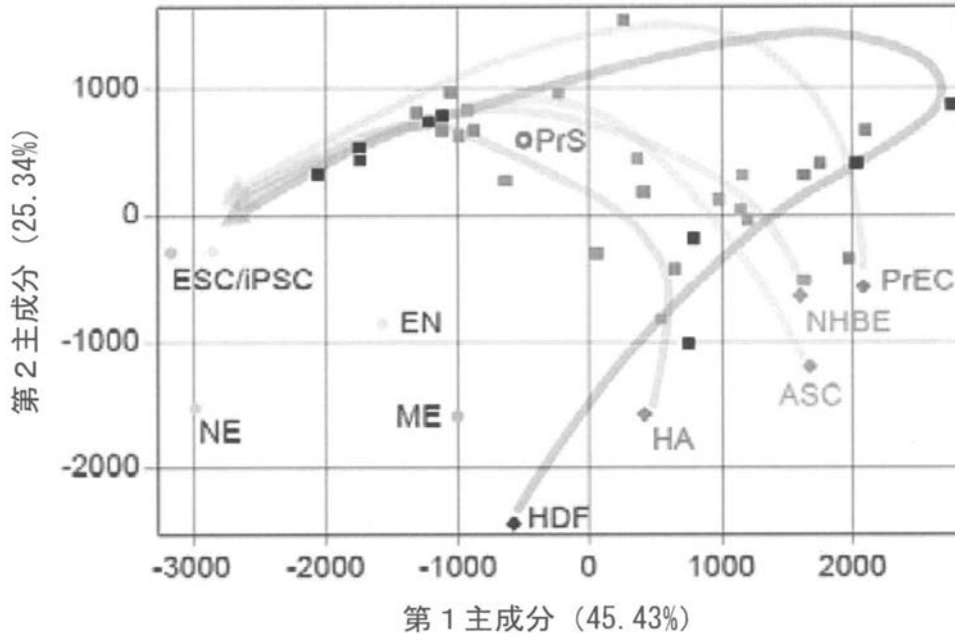
【 図 3 e 】



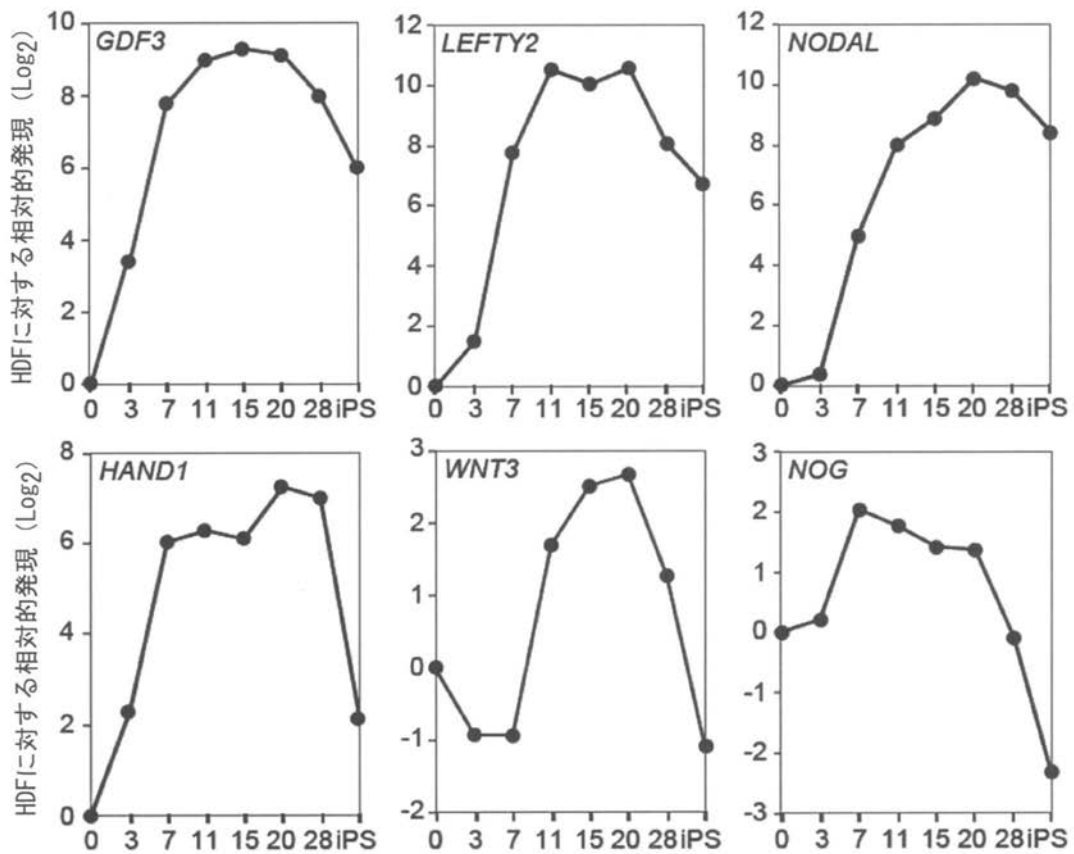
【 図 3 f 】



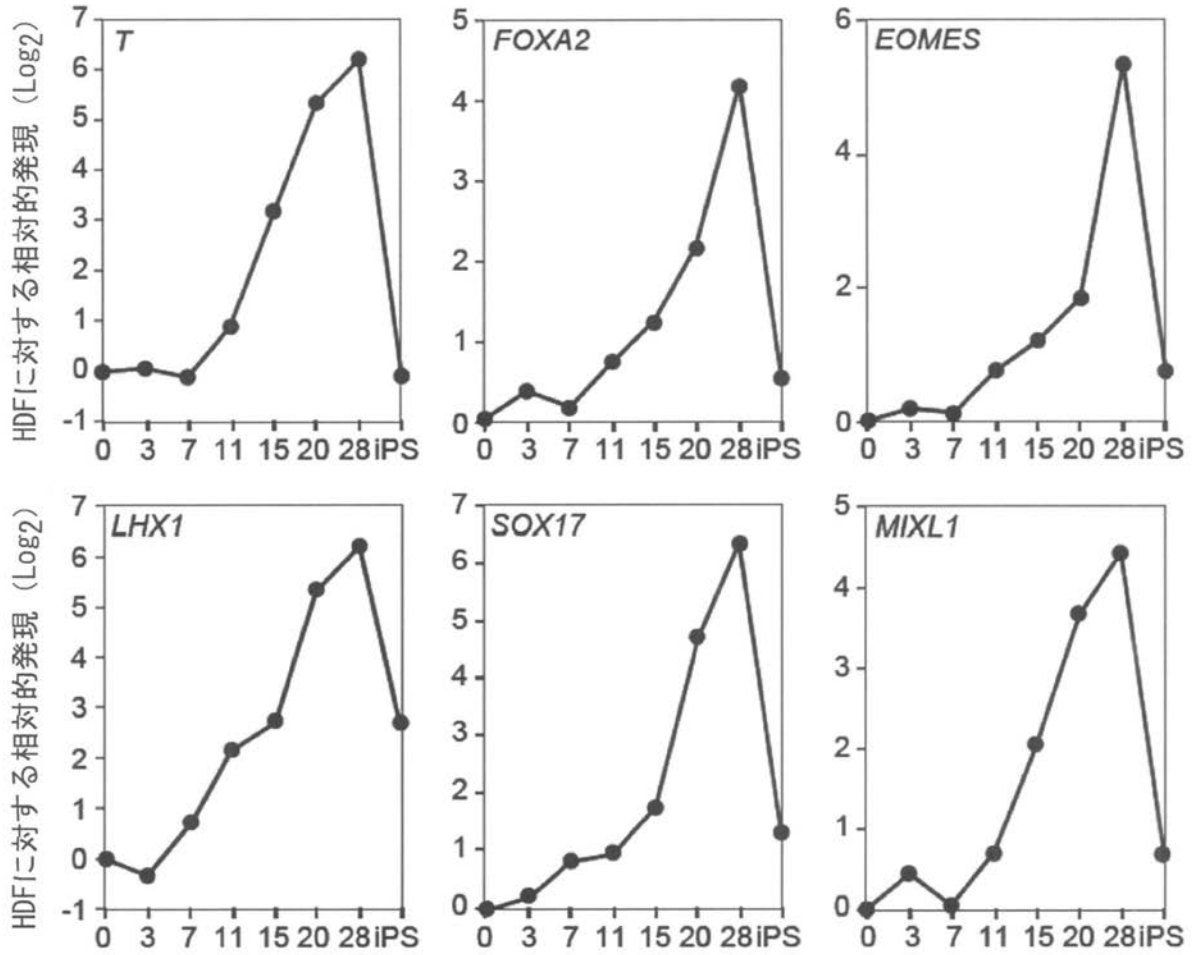
【 図 3 g 】



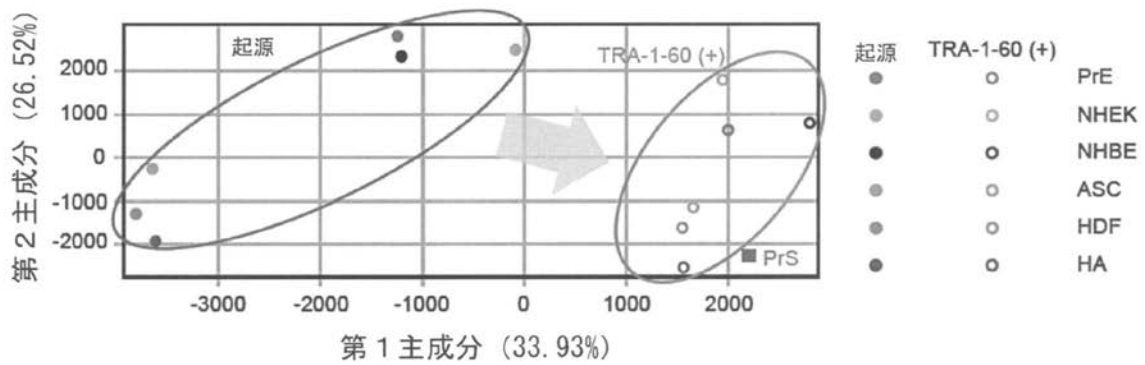
【 図 4 a 】



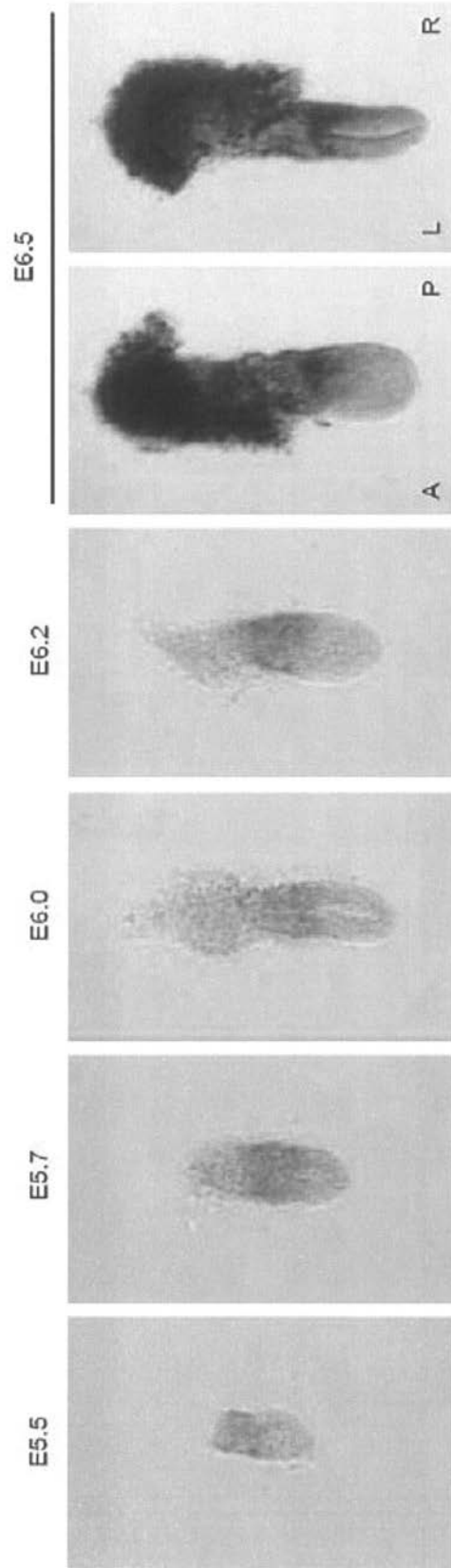
【 図 4 b 】



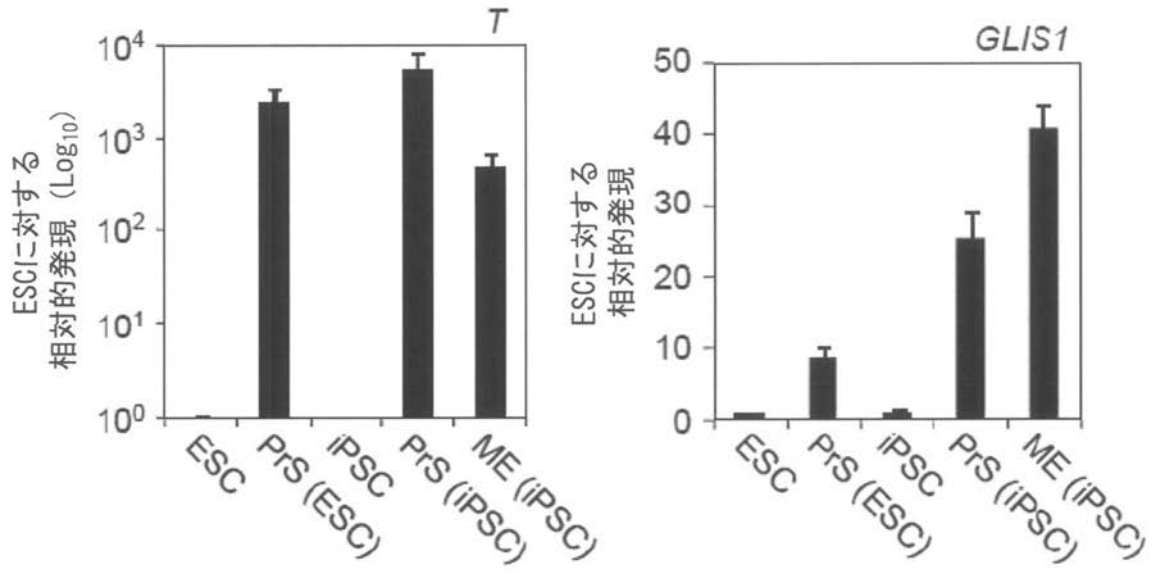
【 図 4 c 】



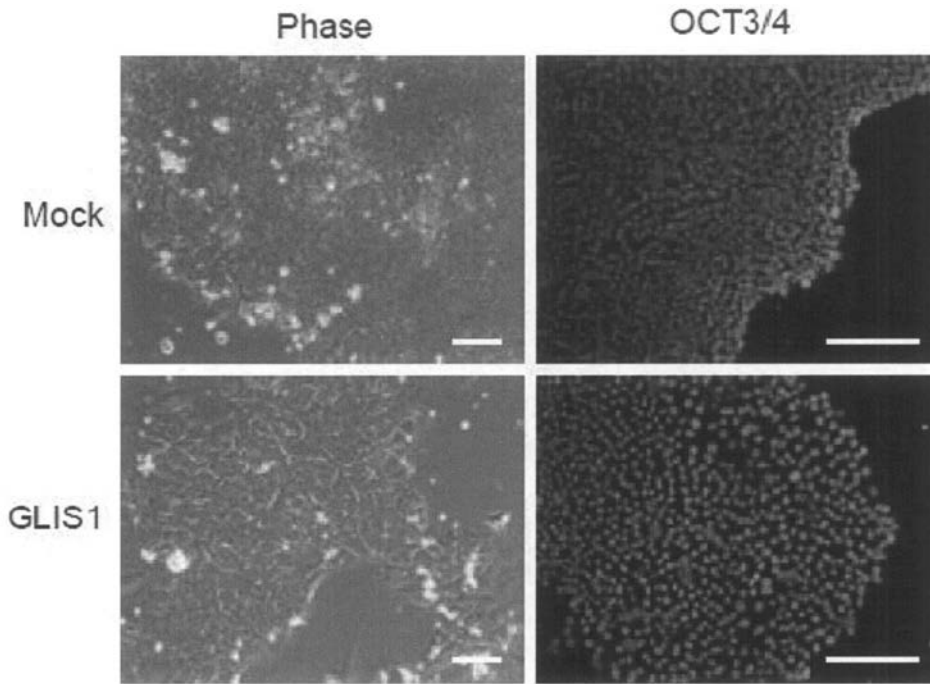
【 図 5 a 】



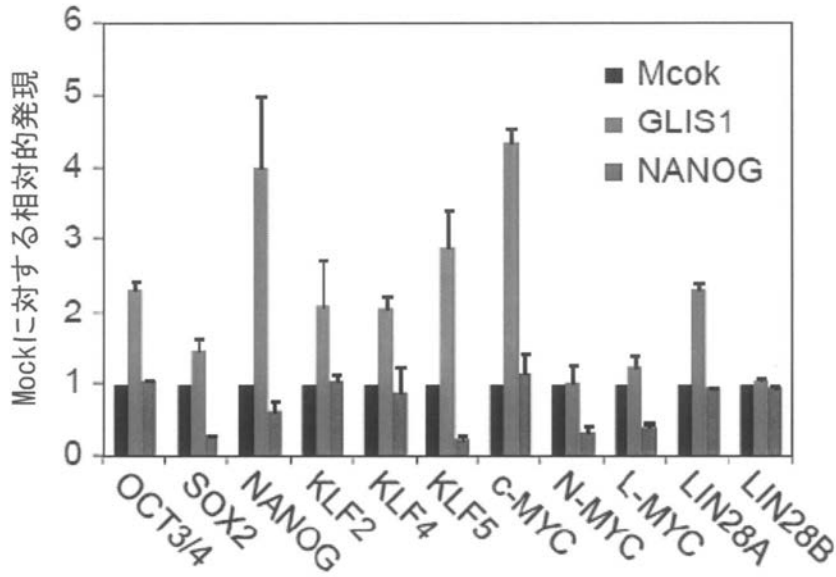
【 図 5 b 】



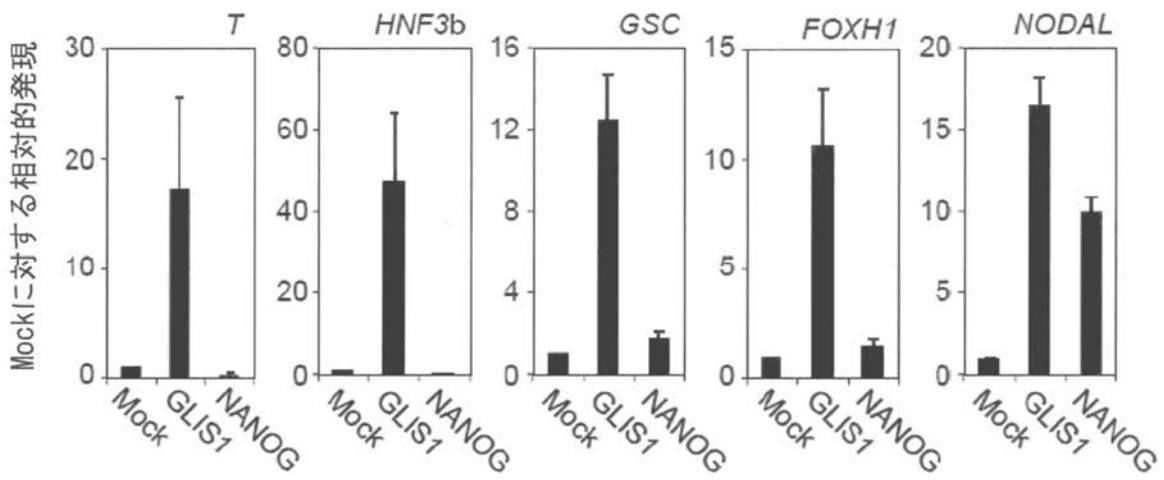
【 図 5 c 】



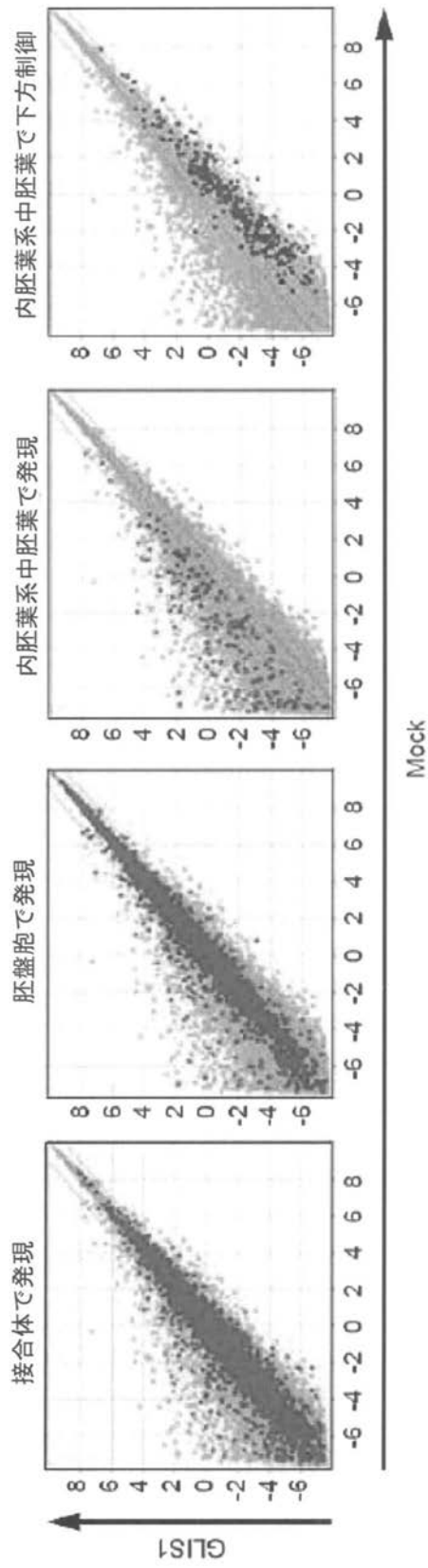
【 図 5 d 】



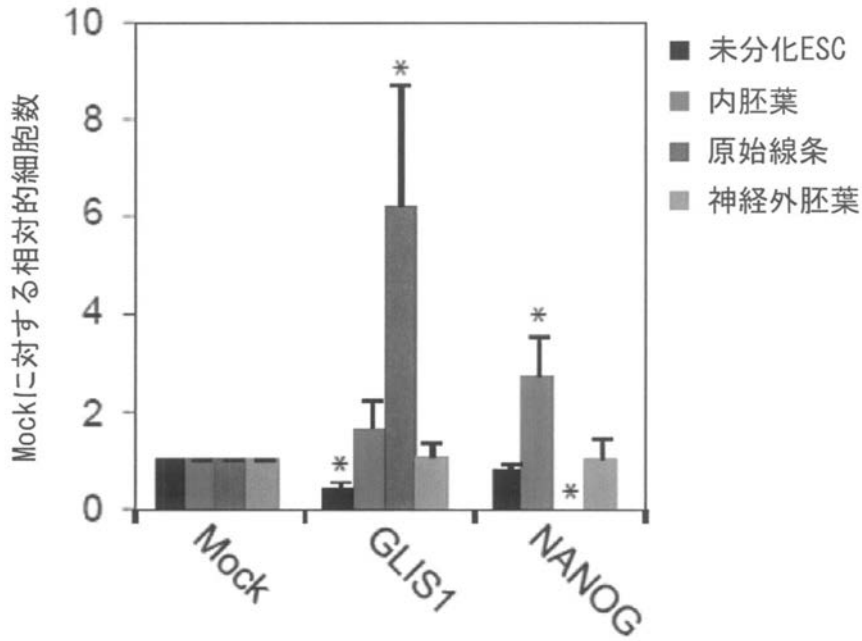
【 図 5 e 】



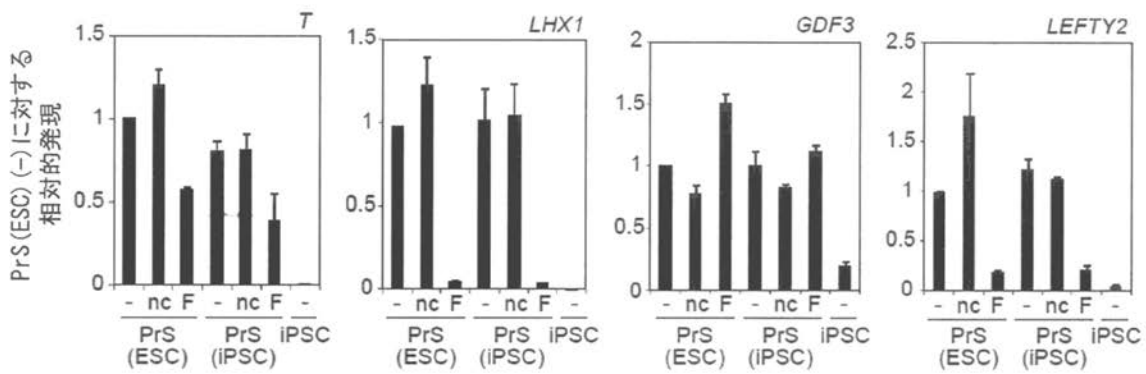
【図 5 f】



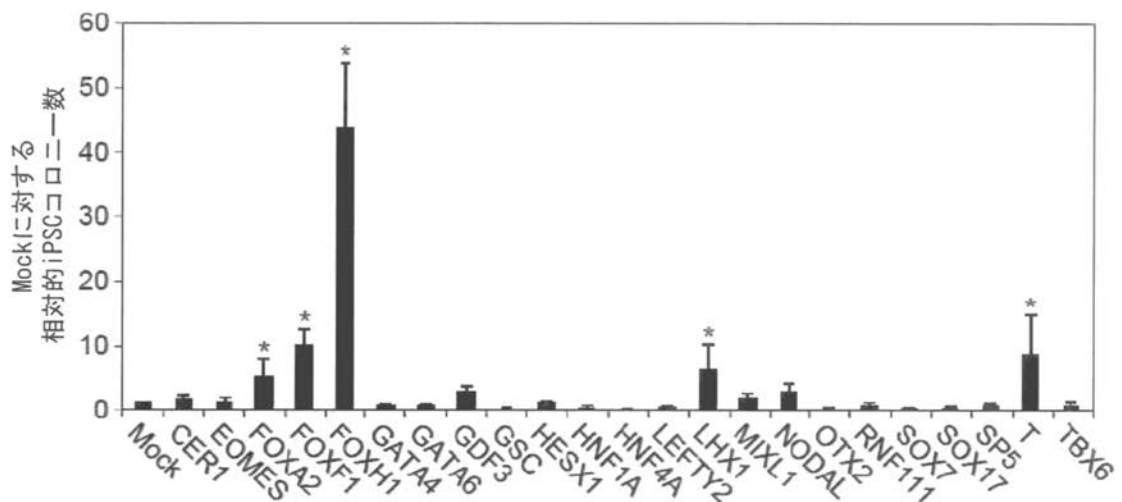
【 図 5 g 】



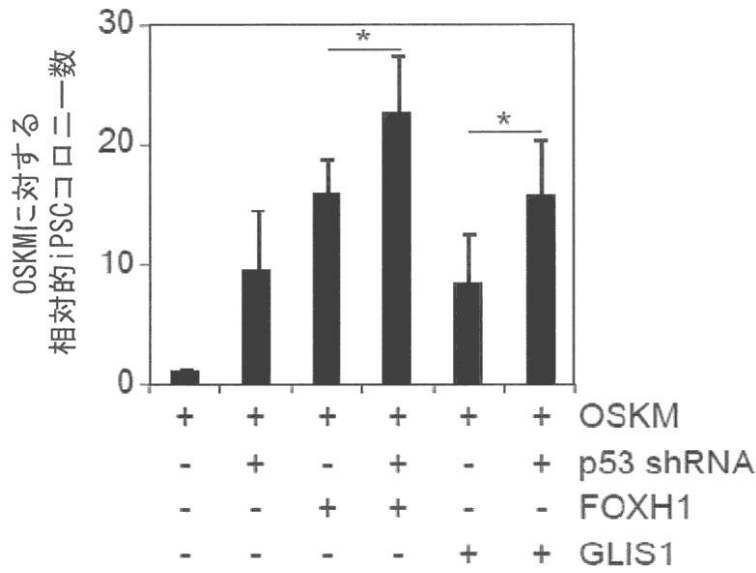
【 図 6 a 】



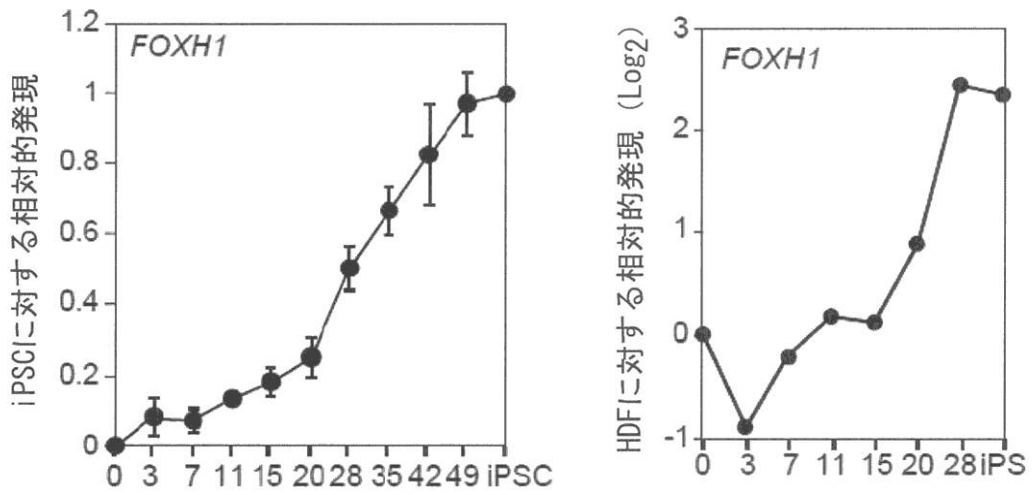
【 図 6 b 】



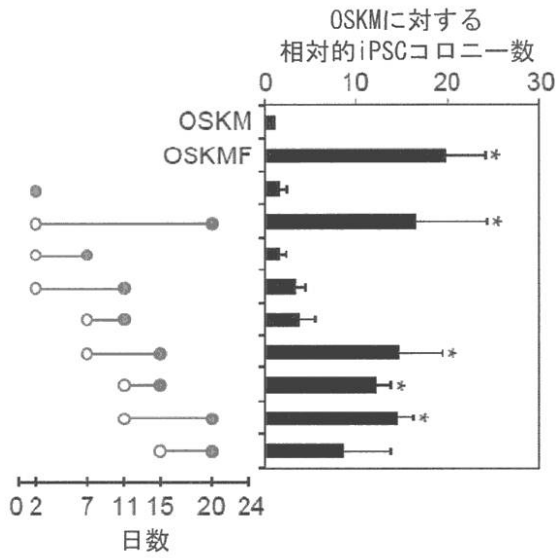
【 図 6 c 】



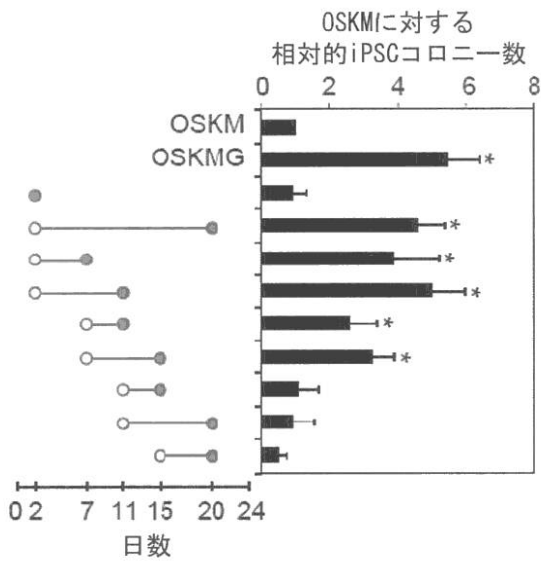
【 図 6 d 】



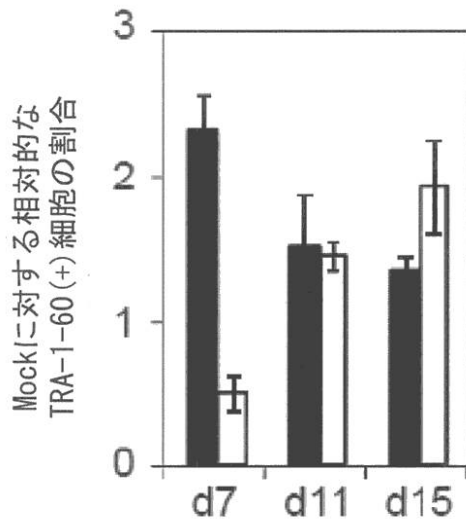
【 図 6 e 】



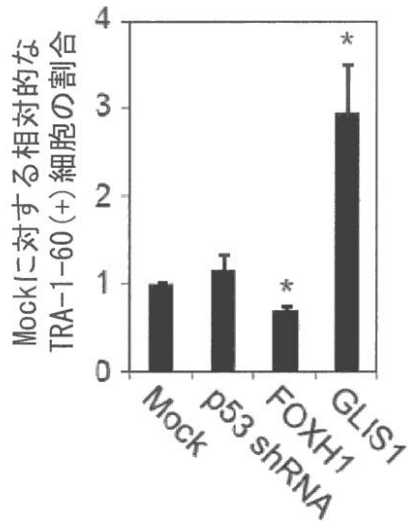
【 図 6 f 】



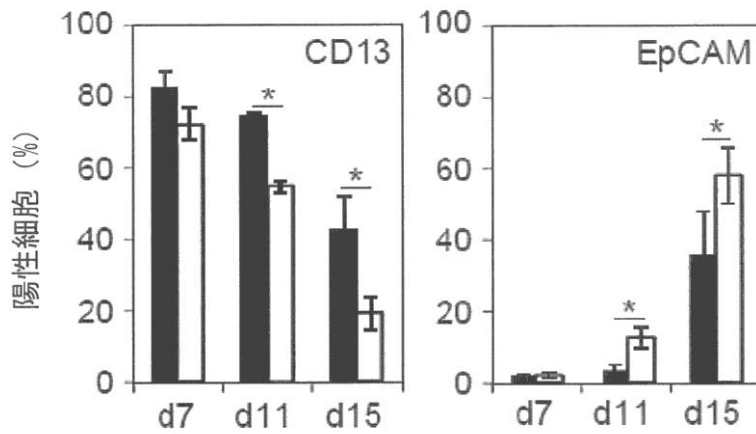
【 図 6 g 】



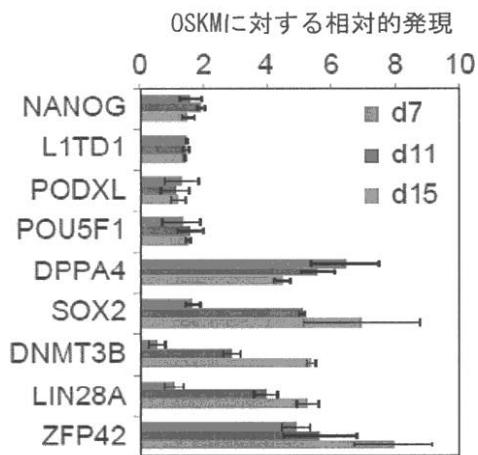
【図 6 h】



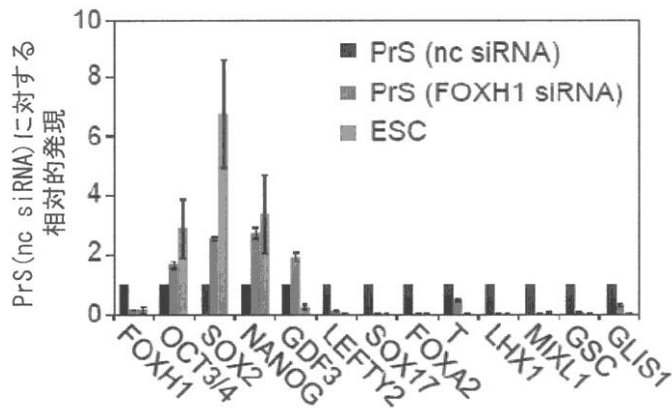
【図 6 i】



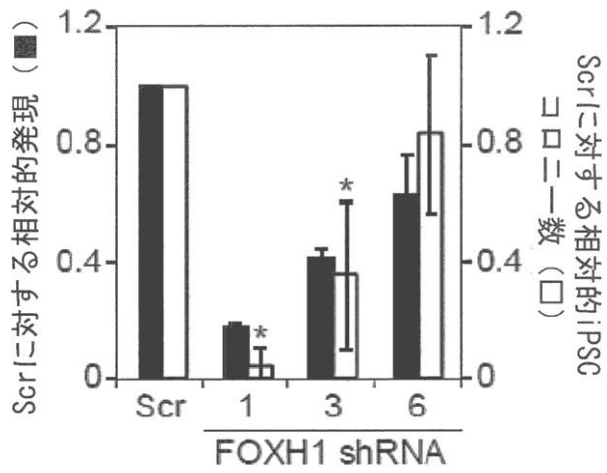
【図 6 j】



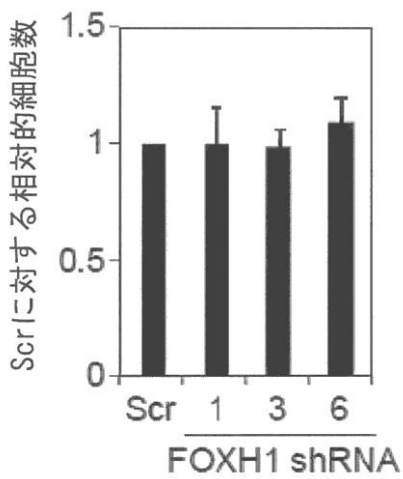
【 図 6 k 】



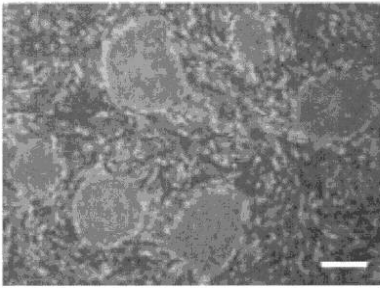
【 図 6 l 】



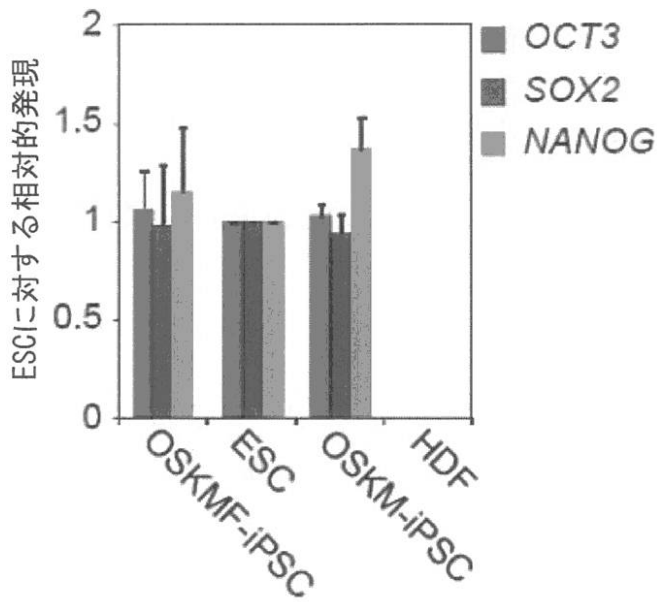
【 図 6 m 】



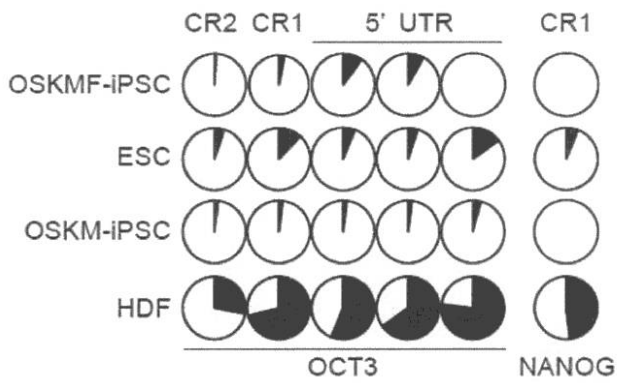
【 図 7 a 】



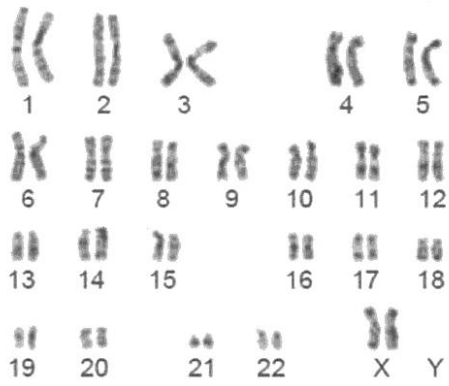
【 図 7 b 】



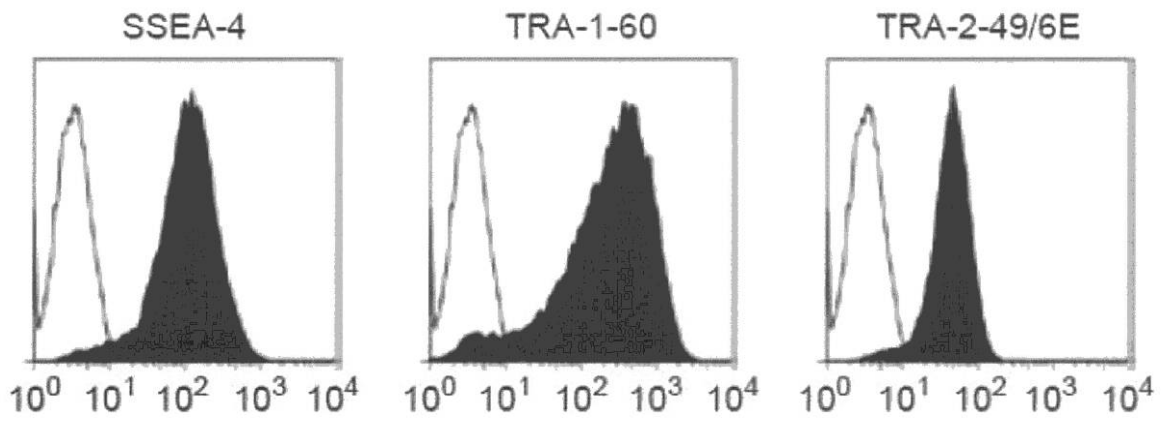
【 図 7 c 】



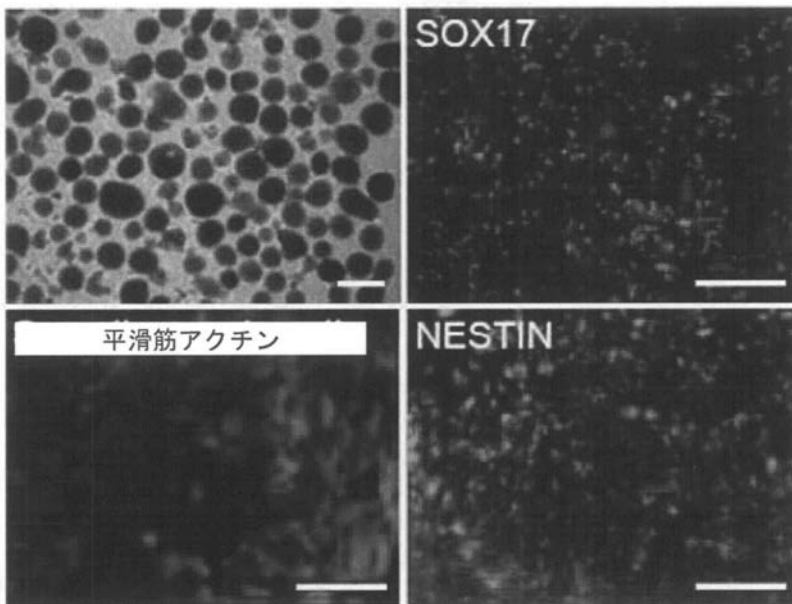
【図 7 d】



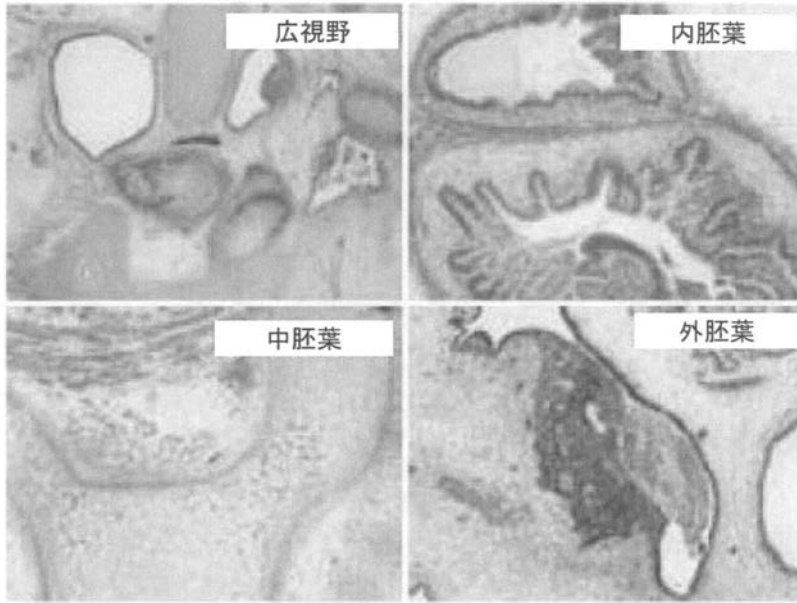
【図 7 e】



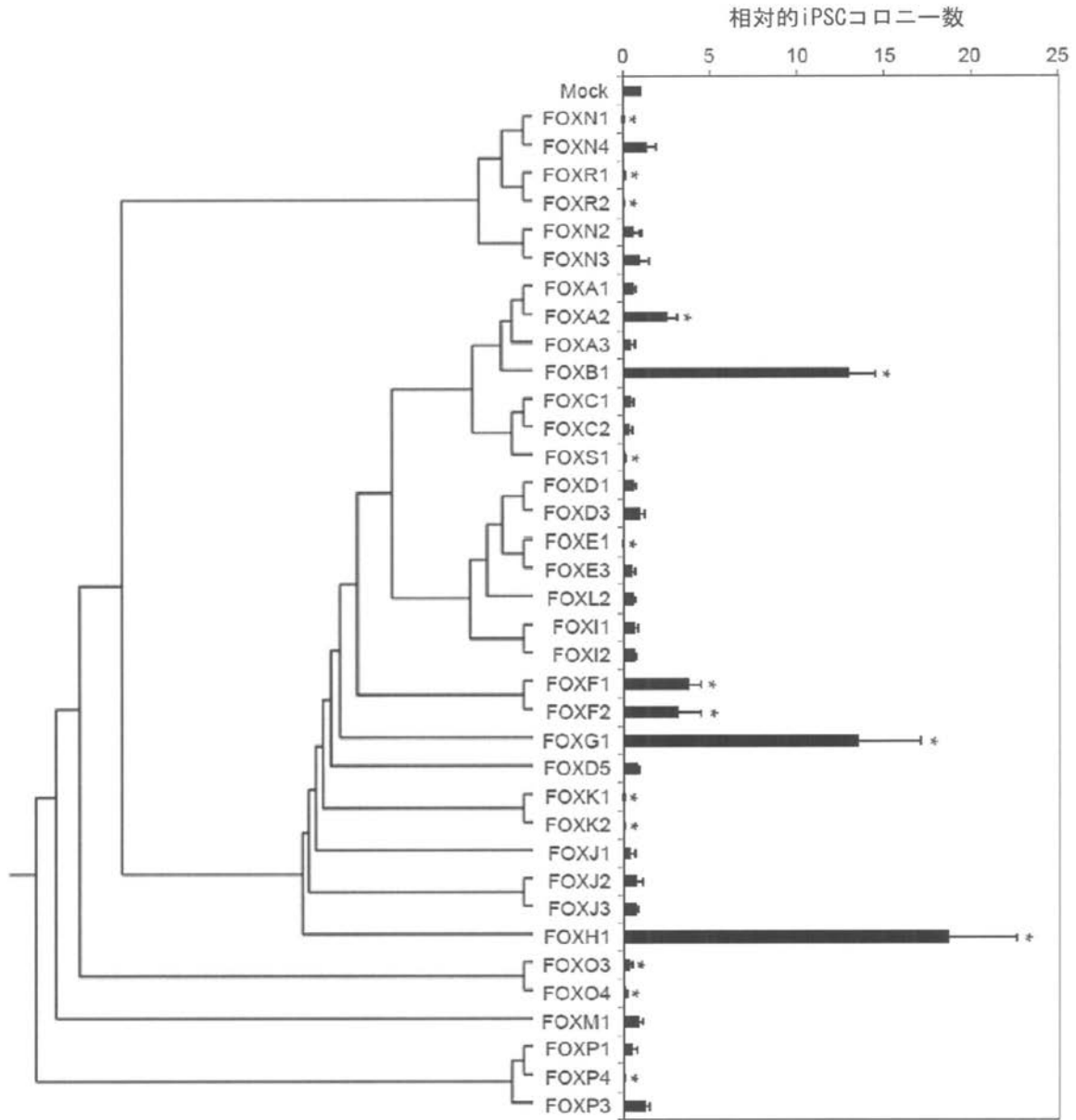
【図 7 f】



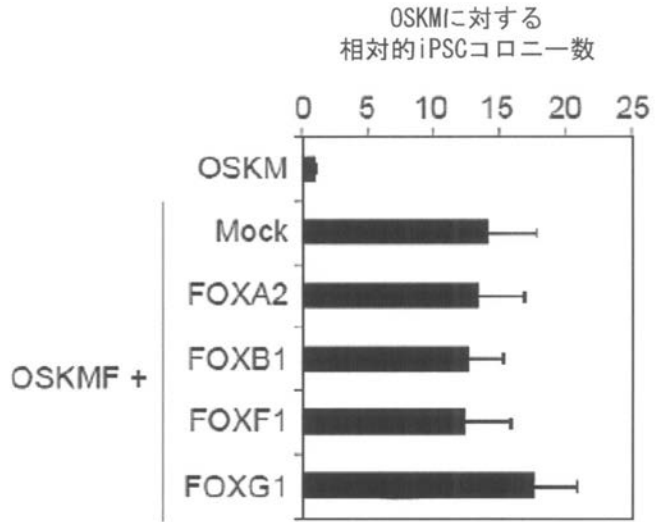
【 図 7 g 】



【 图 8 】



【 図 9 】



【 配 列 表 】

[2015532088000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/079474

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. C12N15/00-15/90, C12N5/00-5/28 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2013 Registered utility model specifications of Japan 1996-2013 Published registered utility model applications of Japan 1994-2013 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST/580(JDreamIII), GeneCards		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X — Y	JP 2010-537634 A (WHITEHEAD INSTITUTE FOR BIOMEDICAL RESEARCH) 2010.12.09 & US 2010/0310525 A1 & EP 2198011 A1 & WO 2009/032194 A1 & CN 101855338 A	1-2, 6-7, 11-15, 20-24, 32-34, 37-41 1-46
Y — A	WO 2010/007031 A2 (NOVARTIS AG) 2010.01.21 (no family)	1-3, 5-8, 10-17, 19-26, 28, 32-35, 37-43 4, 9, 18, 27, 29-31, 36, 44-46
Y	WO 2012/141181 A1 (Kyoto University) 2012.10.18 (no family)	1-46
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 14.11.2013		Date of mailing of the international search report 03.12.2013
Name and mailing address of the ISA/IP Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Kenji MIHARA Telephone No. +81-3-3581-1101 Ext. 3448
		4B 2937

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2013/079474
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2007/069666 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 2007.06.21 & JP 2008-283972 A & JP 2009-165478 A & JP 2009-165479 A & JP 2009-165480 A & JP 2009-165481 A & JP 2011-188860 A & JP 5098028 B & US 2009/0047263 A1 & US 2009/0068742 A1 & US 2009/0227032 A1 & US 2010/0062533 A1 & US 2010/0210014 A1 & US 2010/0216236 A1 & US 2013/0059386 A1 & EP 1970446 A1 & EP 2206724 A1 & EP 2206778 A1 & EP 2208786 A1 & EP 2096169 A1 & WO 2009/057831 A1 & KR 10-2008-0095852 A & CN 101356270 A & CN 101864392 A & CN 103113463 A & CN 101617043 A & KR 10-2010-0075771 A	1-46
Y	TAKAHASHI, K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. Cell, 2006, Vol. 126, p. 663-676	1-46
Y	TAKAHASHI, K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell, 2007, Vol. 131, p. 861-872	1-46
Y	WO 2010/117879 A1 (LDBIOPHARMA, INC.) 2010.10.14 & US 2012/0142094 A1	1-46
Y	RAO, R. R. et al. Gene Expression Profiling of Embryonic Stem Cells Leads to Greater Understanding of Pluripotency and Early Developmental Events. Biol. Reprod., 2004, Vol. 71, p. 1772-1778	1-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2013/079474
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WANG,G.et al. Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. Biochem.Biophys.Res.Commun., 2005,Vol.330,p.934-942	1-46
Y	KATOH,M.et al. CER1 is a common target of WNT and NODAL signaling pathways in human embryonic stem cells. Int.J.Mol.Med.,2006,Vol.17,p.795-799	1-46
Y	RICHARDS,M.et al. The Transcriptome Profile of Human Embryonic Stem Cells as Defined by SAGE. Stem Cells,2004,Vol.22,p.51-64	1-46
Y	CHANG,R.et al. Systematic Search for Recipes to Generate Induced Pluripotent Stem Cells. PLoS Comp.Biol.,2011,Vol.7,No.12,e1002300	1-46
Y	WANG,Y.X.et al. Foxo3a Is Involved in the Proper Generation of Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC). J.Neuroimmune Pharmacol., Apr.2012,Vol.7,Suppl.1,p.S58-S59	1-46
<u>Y</u> A	WO 2012/074117 A1 (Kyoto University) 2012.06.07 (no family)	<u>5, 10, 19, 28</u> 1-4, 6-9, 11-18, 20-27, 29-46
<u>Y</u> A	WO 2011/102531 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 2011.08.25 & JP 2013-519371 A & US 2013/0029423 A1 & EP 2536828 A & CN 102782122 A & KR 10-2012-0131180 A	<u>5, 10, 19, 28</u> 1-4, 6-9, 11-18, 20-27, 29-46

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/JP2013/079474
--

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Hong, H, et al. Suppression of iPS cell generation by p53 pathway. Jikken-igaku, 2010, Vol. 28, No. 3, p. 378-382	1-3, 5-8, 10-17, 19-26, 28, 32-35, 37-43
- A	(Article in Japanese)	4, 9, 18, 27, 29-31, 36, 44-46
Y	WO 2011/091270 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MICHIGAN) 2011.07.28 & US 2011/0250589 A1	1-3, 5-8, 10-17, 19-26, 28, 32-35, 37-43
- A		4, 9, 18, 27, 29-31, 36, 44-46

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(74)代理人 100174296

弁理士 富麻 博文

(72)発明者 高橋 和利

京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 田邊 剛士

京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内

(72)発明者 山中 伸弥

京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内

Fターム(参考) 4B024 AA20 BA80 CA01 CA12 DA02 EA04 GA11

4B065 AA90X AB01 AC20 BA02 BA06

4H045 AA10 AA30 CA40 EA60 FA74