

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 7 月 5 日(05.07.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/090997 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/080182
- (22) 国際出願日: 2011 年 12 月 27 日(27.12.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
61/427,354 2010 年 12 月 27 日(27.12.2010) US
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 京都府公立大学法人(KYOTO PREFECTURAL PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒6028566 京都府京都市上京区河原町通広小路 4 6 5 番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高松 哲郎 (TAKAMATSU, Tetsuro) [JP/JP]; 〒6020841 京都府京都市上京区河原町通広小路 4 6 5 番地 京都府立医科大学内 Kyoto (JP). 戴 平 (DAI, Ping) [CN/JP]; 〒6020841 京都府京都市上京区河原町通広小路 4 6 5 番地 京都府立医科大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所 (Sae-gusa & Partners); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町 1-7-1 北浜 T N K ビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: iPS CELLS AND METHOD FOR GENERATING SAME

(54) 発明の名称: iPS 細胞とその製造法

(57) Abstract: The present invention provides: a method for generating iPS cells, which is characterized by having at least one kind of connexin inhibitor factor and at least one kind of TGFβ signaling inhibitor factor act on cells; iPS cells which contain at least one kind of connexin inhibitor factor; an iPS cell inducing agent which contains at least one kind of inhibitor factor that is selected from the group consisting of connexin inhibitor factors and TGFβ signaling inhibitor factors; a culture medium for iPS cell induction, which contains at least one kind of inhibitor factor that is selected from the group consisting of connexin inhibitor factors and TGFβ signaling inhibitor factors; and a kit for iPS cell induction, which contains at least one kind of inhibitor factor that is selected from the group consisting of connexin inhibitor factors and TGFβ signaling inhibitor factors.

(57) 要約: 本発明は、少なくとも 1 種のコネキシン抑制因子と少なくとも 1 種の TGFβ シグナリング抑制因子を細胞に作用させることを特徴とする iPS 細胞を作製する方法、少なくとも 1 種のコネキシン抑制因子を含む iPS 細胞、コネキシン抑制因子及び TGFβ シグナリング抑制因子からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の抑制因子を含む iPS 細胞誘導剤、コネキシン抑制因子及び TGFβ シグナリング抑制因子からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の抑制因子を含む iPS 細胞誘導用培地、コネキシン抑制因子及び TGFβ シグナリング抑制因子からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の抑制因子を含む iPS 細胞誘導用キットを提供するものである。

WO 2012/090997 A1

明 細 書

発明の名称 : i P S細胞とその製造法

技術分野

[0001] 本発明は、i P S細胞(induced pluripotent stem cells)とその作製方法に関する。また、本発明は、i P S細胞誘導剤、i P S細胞誘導用培地及びi P S細胞誘導用キットに関する。

背景技術

[0002] i P S細胞は、人工多能性幹細胞若しくは誘導多能性幹細胞とも称され、E S細胞と同等の分化多能性を獲得した細胞である。

[0003] E S細胞、i P S細胞などの分化多能性を有する細胞は、生体を構成する全ての臓器や組織へ分化する能力を保持していることから、何らかの疾患で損傷した臓器、血液、骨髄、組織などを再生する上で極めて有効な手段として期待されている。

[0004] しかしながら、E S細胞から得られた血液、骨髄、組織、臓器などの生体材料は、移植の段階で拒絶反応を引き起こすおそれがあり、このような免疫的な問題を克服する必要がある、さらに倫理上の問題も指摘されている。一方、i P S細胞は本人の体細胞を用いて作製できることから免疫拒絶の問題はなく、倫理上の問題もない。

[0005] 山中伸弥教授らのグループは、いわゆるYamanaka factorsである4種類のリプログラミング因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)の遺伝子をマウスの線維芽細胞に導入しiPS細胞を作製したが(非特許文献1、2)、医療に応用するには以下の課題がある。

1. バクテリアDNAなどの外来遺伝子が宿主細胞のゲノムに組み込まれる恐れがある。
2. 従来によりできたiPS細胞は、一定の頻度で癌化し、安全面での問題がある。
3. 外来遺伝子の過剰発現でできたiPS細胞では、多能性以外の影響が予想で

きない。

先行技術文献

非特許文献

[0006] 非特許文献1: Takahashiら, Cell 2006, 126: 663-676.

非特許文献2: Okitaら, Nature 2007, 448: 313-317.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明は、癌化のおそれがなく、安全なiPS細胞を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題に鑑み、研究を行ったところ、驚くべきことにコネキシン抑制因子とTGF β シグナリング抑制因子を細胞に作用させることで、遺伝子の導入を行うことなくiPS細胞が樹立できることを見出した。

[0009] 本発明は、以下のiPS細胞およびその製造方法、iPS細胞誘導剤、iPS細胞誘導用培地、iPS細胞誘導用キットを提供するものである。

項1. 少なくとも1種のコネキシン抑制因子と少なくとも1種のTGF β シグナリング抑制因子を細胞に作用させることを特徴とするiPS細胞を作製する方法。

項2. コネキシン抑制因子がコネキシン43抑制因子である項1に記載の方法。

項3. 前記コネキシン抑制因子が、コネキシンに対するsiRNA、shRNA、miRNA、アンチセンスRNA、ペプチド、抗体もしくはリボザイム、又は細胞内でこれらのRNA分子を放出できる発現ベクターであることを特徴とする、項1または2に記載の方法。

項4. 前記TGF β シグナリング抑制因子がTGF- β レセプターI阻害剤で

ある項 1 ～ 3 のいずれかに記載の方法。

項 5. 前記 TGF- β レセプター阻害剤が SB-431542、A-83-01 または ALK5 Inhibitor である項 1 ～ 4 のいずれかに記載の方法。

項 6. 少なくとも 1 種のコネキシン抑制因子を含む iPS 細胞。

項 7. コネキシン抑制因子がコネキシン 43 抑制因子である項 6 に記載の iPS 細胞。

項 8. 前記コネキシン抑制因子が、コネキシンに対する siRNA、shRNA、miRNA、アンチセンス RNA、ペプチド、抗体もしくはリボザイム、又は細胞内でこれらの RNA 分子を放出できる発現ベクターであることを特徴とする、項 6 または 7 に記載の iPS 細胞。

項 9. コネキシン抑制因子及び TGF β シグナリング抑制因子からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の抑制因子を含む iPS 細胞誘導剤。

項 10. コネキシン抑制因子及び TGF β シグナリング抑制因子からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の抑制因子を含む iPS 細胞誘導用培地。

項 11. コネキシン抑制因子及び TGF β シグナリング抑制因子からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の抑制因子を含む iPS 細胞誘導用キット。

発明の効果

[0010] 本発明の方法によれば、外来遺伝子(特に癌遺伝子)の導入の必要がなく、ウイルスを使わないので iPS 細胞以外の形質を改変せず、癌化や感染の恐れが極めて低く安全であり、ヒトへの実用化にとって非常に大きな利点を持つ iPS 細胞を作製することができる。

[0011] 本発明による iPS 細胞は、以下の 4 点を確認している。

1. 多能性細胞マーカー因子の発現が遺伝子レベル、タンパク質レベルで保たれている。
2. マウス皮下へ移植することにより、テラトーマが形成され、腺管、軟骨、神経など三胚葉全ての細胞が分化誘導できる。
3. 胚葉体を形成し、分化誘導条件により、内皮細胞、神経細胞、心筋細胞へとそれぞれ分化可能で、分化誘導できた心筋細胞が生理的に機能する。

4. キメラマウスの作製が可能である。

[0012] また、本発明のiPS細胞は、Germ Lineの作製が可能である。

[0013] 従って、本発明により提供されるiPS細胞は、再生医療などに使用する生体材料を作製するために非常に優れたものである。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]本発明の実施例で得られた細胞についての結果を示す。a. siPSCsの形態がマウスESに類似している。b. siPSCsのALP活性が認められた。c. 各種抗多能性マーカー抗体(Nanog, Oct4, Sox2, SSEA1)による免疫染色により、発現をタンパク質レベルで確認できた。d. RT-PCRにより、各種抗多能性マーカー遺伝子の発現が遺伝子レベルで確認された。e. SCIDマウスの皮下に移植することにより、Teratomaが形成され、腺、軟骨・筋肉、神経・上皮が確認できた。

[図2]EGFPマウス心筋由来のsiPSCsの形態

[図3]siPSCs細胞のキメラマウス作製。a. siPSCs-#1からできたキメラマウス。b. siPSCs-#2からできたキメラマウス。

[図4]TGF-シグナリングの伝達を示す概略図である。

発明を実施するための形態

[0015] 本明細書において、「iPS細胞」とは、人工多能性幹細胞若しくは誘導多能性幹細胞とも称される分化多能性を獲得した細胞のことである。本発明で得られたiPS細胞は、内胚葉、外胚葉、中胚葉の全てに分化することができ(図1参照)、キメラマウス(図3)及びGerm Lineを作製可能である。

[0016] 「コネキシン(Cx)」は、ギャップ結合に關与するタンパク質の総称であり、分子量によりCx43(43kDa)などと命名されている。コネキシンの具体例としては、Cx26、Cx30、Cx31、Cx32、Cx36、Cx37、Cx40、Cx43、Cx45、Cx50などが挙げられる。現在20種を超えるコネキシンが知られており、今後発見されるコネキシン類も本発明で抑制対象のコネキシンに含まれる。コネキシンの種類と発現に関しては、総説(Oyamadaら, BBA, 2005, 1719:6-23)に詳述されており、

その記載は本明細書に参考として援用される。コネクシンの種類と発現部位を以下の表にまとめる。

[0017] [表1]

組織又は細胞タイプ	発現するコネクシン	
	ヒト	マウス
—	hCx23	mCx23
—	hCx25	—
Breast, cochlea, placenta, hepatocyte, skin, Pancreas, kidney, intestine	hCx26	mCx26
Brain, cochlea, skin	hCx30	mCx30
Brain, spinal cord, Schwann cells	hCx30.2	mCx29
Skin, kidney,	hCx30.3	mCx30.3
Cochlea, placenta, skin	hCx31	mCx31
Skin	hCx31.1	mCx31.1
—	hCx31.9	mCx30.2
hepatocyte, secretory acinar cells, Schwann cells	hCx32	mCx32
Sertoli cells	—	mCx33
Neurons, pancreatic β -cells	hCx36	mCx36
Endothelium, granulosa cells, lung, skin	hCx37	mCx37
Cardiac conduction system, endothelium, lung	hCx40	mCx40
—	hCx40.1	mCx39
Many cell types	hCx43	mCx43
Cardiac conduction system, smooth muscle cells, Neurons	hCx45	mCx45
Lens	hCx46	mCx46
Brain, spinal cord	hCx47	mCx47
Lens	hCx50	mCx50
—	hCx59	—
Retinal horizontal cells	hCx62	mCx57

上記表は、各組織で主に発現されるコネクシンであり、本発明では、対象細胞で主に発現されるコネクシンを抑制することが好ましい。例えば心室筋では、Cx43が多量に発現されており、Cx43を抑制するのが好ましい。一方、心室筋ではCx45も発現されており、Cx45を抑制してもよく、Cx43とCx45を同時に抑制してもよい。好ましい抑制対象のコネクシンは、多くの細胞タイプで発現されているコネクシン26、32、43、45などであり、特にコネクシン43が好ましい。コネクシン43のアミノ酸配列は公

知であり、以下に例示される。

[0018] [表2]

Cx43の由来	遺伝子／アミノ酸配列のデータベースのアクセッション番号
ヒト	NM_000165
ラット	NM_000567
マウス	NM_010288
サル	AB169817

iPS細胞の動物種によって、対応するコネキシン抑制因子を使用することができる。

[0019] コネキシンの抑制因子としては、細胞内でのコネキシン遺伝子の発現抑制(転写又は翻訳の抑制)、細胞内のコネキシン(タンパク質)との複合体形成による機能抑制などが挙げられ、具体的にはコネキシンに対する s i R N A、s h R N A、m i R N A、アンチセンス R N A、ペプチド、抗体、もしくはリボザイム、又は細胞内でこれらの R N A 分子を放出できる発現ベクターが挙げられ、s i R N A、s h R N A、m i R N A、アンチセンス R N A、もしくはリボザイムが好ましく、s i R N A、s h R N A、m i R N A がより好ましい。これらは、コネキシンの種類、細胞の由来などにより配列が相違するので、適切な配列を選択する。適切な配列の s i R N A、s h R N A、m i R N A、アンチセンス R N A、ペプチドもしくはリボザイム、又は細胞内でこれらの R N A 分子を放出できる発現ベクターは、当業者により容易に設計もしくは選択できる。例えばヒト(サルも同じ配列)に対するコネキシン 43 の好ましい s i R N A は、以下のものである。

センス： 5' -CAA UUC UUC UUG CCG CAA TT-3' (配列番号 1)

アンチセンス： 5' -UUG CGG CAA GAA GAA UUG TT-3' (配列番号 2)

[0020] コネキシンの抑制因子としては、硫酸基を有するグリコサミノグリカン (特開2003-119146、その記載は本明細書に参考として援用する)を使用することもできる。

- [0021] 1つの実施形態において、「コネキシンの抑制因子」は、コネキシン、コネキシンヘミチャネル（コネクソン）、またはコネキシンの細胞増殖活性に影響を及ぼすか調整する化合物である。コネキシンの抑制因子には、アンチセンス化合物（例えば、アンチセンスポリヌクレオチド）、RNAiおよびsiRNA化合物、抗体およびその結合フラグメント、ならびにペプチドおよびポリペプチド（「ペプチド模倣物」およびペプチドアナログが含まれる）が含まれるが、これらに限定されない。好ましいコネキシンの抑制因子はコネキシン43の抑制因子である。例示的コネキシンの抑制因子を、本明細書中でさらに説明する。
- [0022] 1つの実施形態において、本発明のコネキシンの抑制因子は、細胞内および細胞外への分子の輸送を調整するか影響を及ぼすことができる（例えば、遮断、阻害、または下方制御）。
- [0023] 一部のコネキシンの抑制因子は、例えば、mRNAの転写または翻訳の下方制御によってコネキシン発現を下方制御するか、コネキシンタンパク質、コネキシンヘミチャネル、または細胞増殖活性を減少または阻害することができる（Asazuma-Nakamuraら, *Exp Cell Res.*, 2009, 315:1190-1199; Nakan oら, *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 2007, 49:93-104; Zhangら, *Oncogene*, 2001, 20:4138-4149.）。
- [0024] コネキシンの抑制因子の例には、コネキシンmRNAおよび／またはタンパク質の発現または機能を減少または阻害するか、コネキシン、コネキシンヘミチャネル、または細胞増殖活性を減少させる薬剤が含まれる。コネキシンの抑制因子には、抗コネキシンポリヌクレオチド（アンチセンスポリヌクレオチドおよび他のポリヌクレオチド（siRNAまたはリボザイム機能性を有するポリヌクレオチドなど）など）、抗体およびその結合フラグメント、ならびにペプチドおよびポリペプチド（ヘミチャネルまたは細胞増殖活性を調整するペプチド模倣物およびペプチドアナログが含まれる）が含まれる。
- [0025] 抗コネキシンポリヌクレオチド

抗コネキシンポリヌクレオチドには、コネキシンアンチセンスポリヌクレオチドおよびコネキシン発現を下方制御させることができる機能を有するポリヌクレオチドが含まれる。他の適切な抗コネキシンポリヌクレオチドには、RNAiポリヌクレオチドおよびsiRNAポリヌクレオチド、shRNAポリヌクレオチドが含まれる。

[0026] アンチセンスポリヌクレオチドおよび他の抗コネキシンポリヌクレオチドの合成（RNAi、siRNA、およびリボザイムポリヌクレオチドならびに修飾骨格および混合骨格を有するポリヌクレオチドなど）は、当業者に公知である。例えば、Stein C. A. およびKrieg A. M.（編）、Applied Antisense Oligonucleotide Technology, 1998（Wiley-Liss）を参照のこと。抗体および結合部位ならびにペプチドおよびポリペプチド（ペプチド模倣物およびペプチドアナログが含まれる）の合成方法は、当業者に公知である。例えば、Lihu Yangら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1998（18）：10836-10841（Sept 1 1998）；HarlowおよびLane（1988）”Antibodies：A Laboratory Manual” Cold Spring Harbor Publications, New York；HarlowおよびLane（1999）”Using Antibodies” A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New Yorkを参照のこと。

[0027] 1つの態様によれば、コネキシン発現の下方制御は、一般に、アンチセンスポリヌクレオチド（DNAまたはRNAポリヌクレオチドなど）、より詳細には、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）の使用に基づく。これらのポリヌクレオチド（例えば、ODN）は、下方制御すべきコネキシンタンパク質をターゲティングする。典型的には、ポリヌクレオチドは一本鎖であるが、二本鎖でもよい。

[0028] アンチセンスポリヌクレオチドは、コネキシンの転写および／または翻訳

を阻害することができる。好ましくは、ポリヌクレオチドは、コネキシン遺伝子またはmRNA由来の転写および／または翻訳の特異的インヒビターであり、他の遺伝子またはmRNA由来の転写および／または翻訳を阻害しない。本産物は、(i) コーディング配列に対して5' 側および／または(ii) コーディング領域、および／または(iii) コーディング配列に対して3' 側のいずれかで、コネキシン遺伝子またはmRNAに結合することができる。

[0029] アンチセンスポリヌクレオチドは、一般に、コネキシンmRNAに対してアンチセンスである。かかるポリヌクレオチドは、コネキシンmRNAとハイブリッド形成することができ、それにより、コネキシンmRNA代謝の1つまたは複数の態様（転写、mRNAプロセッシング、核からのmRNA輸送、翻訳、またはmRNA分解が含まれる）の干渉によってコネキシン発現を阻害することができる。アンチセンスポリヌクレオチドは、典型的には、コネキシンmRNAとハイブリッド形成して二重鎖を形成し、それにより、mRNAの翻訳の直接的阻害および／または不安定化を生じ得る。かかる二重鎖は、ヌクレアーゼによる分解に感受性を示し得る。

[0030] アンチセンスポリヌクレオチドは、コネキシンmRNAの全部または一部とハイブリッド形成することができる。典型的には、アンチセンスポリヌクレオチドは、コネキシンmRNAのリボゾーム結合領域またはコーディング領域とハイブリッド形成する。ポリヌクレオチドは、コネキシンmRNAの全部またはある領域と相補的であり得る。例えば、ポリヌクレオチドは、コネキシンmRNAの全部または一部の正確な相補物であり得る。しかし、絶対的に相補的である必要はなく、生理学的条件下で約20℃、30℃、または40℃を超える融点を有する二重鎖を形成するのに十分に相補的であるポリヌクレオチドは、本発明で用いるのに特に有用である。

[0031] したがって、ポリヌクレオチドは、典型的には、mRNAと配列が相補的なホモログである。ポリヌクレオチドは、中～高ストリンジェンシー条件下（約50℃～約60℃で0.03M塩化ナトリウムおよび0.03Mクエン

酸ナトリウムなど)でコネキシンmRNAとハイブリッド形成するポリヌクレオチドであり得る。

[0032] 一定の態様のために、適切なポリヌクレオチドは、典型的には、約6～40ヌクレオチド長である。好ましくは、ポリヌクレオチドは、約12～約35ヌクレオチド長、より好ましくは、約18～約32ヌクレオチド長であり得る。別の態様によれば、ポリヌクレオチドは、少なくとも約40、例えば、少なくとも約60または少なくとも約80ヌクレオチド長、約100、約200、約300、約400、約500、約1000、約2000、または約3000までまたはそれを超えるヌクレオチド長であり得る。

[0033] ポリヌクレオチドによってターゲティングされるコネキシンタンパク質は、下方制御されるべき部位に依存するであろう。コネキシンは、ある局面ではヒトまたは動物中に天然に存在するか、コネキシンの発現または活性が減少されるべき組織中に天然に存在するコネキシンである。コネキシン遺伝子(コーディング配列が含まれる)は、一般に、1つまたは複数の本明細書中に記載の特定のコネキシンのコーディング配列と相同性(コネキシン43コーディング配列との相同性など)を有する。コネキシンは、典型的には、 α または β コネキシンである。好ましくは、コネキシンは α コネキシンであり、iPSの原料となる細胞中で発現する。

[0034] しかし、いくつかのコネキシンタンパク質は、組織中の分布に関して、他よりも遍在する。最も広範囲なものの1つは、コネキシン43である。コネキシン43をターゲティングするポリヌクレオチドは、特に、本発明での使用に適切である。他の態様では、他のコネキシンをターゲティングする。

[0035] 抗コネキシンポリヌクレオチドには、コネキシンアンチセンスポリヌクレオチドおよびコネキシン発現を下方制御させることができる機能を有するポリヌクレオチドが含まれる。他の適切な抗コネキシンポリヌクレオチドには、RNAiポリヌクレオチド、shRNAポリヌクレオチドおよびsiRNAポリヌクレオチドが含まれる。

[0036] 1つの好ましい態様では、アンチセンスポリヌクレオチドは、1つのコネ

キシントタンパク質のみのmRNAをターゲティングする。最も好ましくは、このコネキシントタンパク質はコネキシン43である。別の態様では、コネキシントタンパク質は、コネキシン26、30、31.1、32、36、37、40、または45である。他の態様では、コネキシントタンパク質は、コネキシン30.3、31、40.1、47である。これらはヒトのコネキシントタンパク質の例示であるが、他の動物種の場合には、対応するコネキシンのmRNAをターゲティングする。

[0037] 個別のコネキシントタンパク質をターゲティングするポリヌクレオチドを組み合わせて使用することも意図される（例えば、1、2、3、4、またはそれを超える異なるコネキシンをターゲティングすることができる）。例えば、コネキシン43および1つまたは複数のコネキシンファミリーの他のメンバー（コネキシン26、30、30.3、31.1、32、36、37、40、40.1、45、47）をターゲティングするポリヌクレオチドを、組み合わせて使用することができる。

[0038] あるいは、アンチセンスポリヌクレオチドは、1つを超えるコネキシントタンパク質に対するポリヌクレオチドを含むことができる組成物の一部であり得る。好ましくは、ポリヌクレオチドが指向されるコネキシントタンパク質の1つはコネキシン43である。オリゴデオキシヌクレオチドが指向される他のコネキシントタンパク質には、例えば、コネキシン26、30、30.3、31.1、32、36、37、40、40.1、45、および47が含まれ得る。種々のコネキシンに指向する適切な例示的ポリヌクレオチド（およびODN）を、配列番号3～14に示す。

[0039] 各アンチセンスポリヌクレオチド特定のコネキシンに特異的あり得るか、1、2、3、またはそれを超える異なるコネキシンをターゲティングすることができる。特異的ポリヌクレオチドは、一般に、コネキシン間で保存されないコネキシン遺伝子またはmRNA中の配列をターゲティングするのに対して、非特異的ヌクレオチドは種々のコネキシンの保存配列をターゲティングするであろう。

- [0040] 本発明で用いるポリヌクレオチドは、適切には、非修飾ホスホジエステルオリゴマーであり得る。かかるオリゴデオキシヌクレオチドは、長さが変化する。30量体のポリヌクレオチドが特に適切であることが見出されている。
- [0041] 本発明の多数の態様は、オリゴデオキシヌクレオチドを参照して記載されている。しかし、他の適切なポリヌクレオチド（RNAポリヌクレオチドなど）をこれらの態様で 사용할 ことができる ことが理解される。
- [0042] アンチセンスポリヌクレオチドを、化学修飾することができる。これにより、ヌクレアーゼ耐性を増強することができ、その細胞侵入能力を増強することができる。例えば、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを使用することができる。他のデオキシヌクレオチドアナログには、メチルホスホナート、ホスホルアミデート、ホスホロジチオエート、N3' P5' -ホスホルアミデート、およびオリゴリボヌクレオチドホスホロチオエート、ならびにその2' -O-アルキルアナログおよび2' -O-メチルリボヌクレオチドメチルホスホネートが含まれる。あるいは、混合骨格オリゴヌクレオチド（「MBO」）を使用することができる。MBOは、ホスホロチオエートオリゴデオキシヌクレオチドのセグメントおよび修飾オリゴデオキシーまたはオリゴリボヌクレオチドの適切に配置されたセグメントを含む。MBOは、ホスホロチオアート結合のセグメントおよび他の修飾オリゴヌクレオチドのセグメント（非イオン性で、ヌクレアーゼまたは2' -O-アルキルオリゴリボヌクレオチドに非常に高い耐性を示すメチルホスホネートなど）を有する。修飾骨格および混合骨格オリゴヌクレオチドの調製方法は、当該分野で公知である。
- [0043] 本発明で使用されるアンチセンスポリヌクレオチドの正確な配列は、標的コネキシンタンパク質に依存するであろう。1つの実施形態では、適切なコネキシンアンチセンスポリヌクレオチドには、ポリヌクレオチド（配列番号3～14）が含まれ得る。
- [0044] 本明細書中に記載の組み合わせポリヌクレオチドの調製に適切なポリヌク

レオチドには、例えば、コネキシンC x 4 3に対するポリヌクレオチドならびにコネキシン2 6、3 0、3 1. 1、3 2、および3 7のポリヌクレオチドが含まれる。

[0045] 本発明で使用するアンチセンスポリヌクレオチドの正確な配列は標的コネキシンタンパク質に依存するにもかかわらず、コネキシン4 3について、以下の配列を有するアンチセンスポリヌクレオチドが特に適切であることが見出された：

GTA ATT GCG GCA AGA AGA ATT GTT TCT GTC (配列番号3);

GTA ATT GCG GCA GGA GGA ATT GTT TCT GTC (配列番号4);

GGC AAG AGA CAC CAA AGA CAC TAC CAG CAT (配列番号5).

[0046] 例えば、コネキシン2 6、3 1. 1、および3 2の適切なアンチセンスポリヌクレオチドは、以下の配列を有する。

5' TCC TGA GCA ATA CCT AAC GAA CAA ATA (connexin 26) (配列番号6);

5' CGT CCG AGC CCA GAA AGA TGA GGT C (connexin 31.1) (配列番号11);

5' TTT CTT TTC TAT GTG CTG TTG GTG A (connexin 32) (配列番号14).

[0047] 本発明の方法で有用な他のコネキシアンチセンスポリヌクレオチド配列には、以下が含まれる。

5' CAT CTC CTT GGT GCT CAA CC 3' (connexin 37) (配列番号 7);

5' CTG AAG TCG ACT TGG CTT GG 3' (connexin 37) (配列番号 8);

5' CTC AGA TAG TGG CCA GAA TGC 3' (connexin 30) (配列番号 9);

5' TTG TCC AGG TGA CTC CAA GG 3' (connexin 30) (配列番号 10);

5' AGA GGC GCA CGT GAG ACA C 3' (connexin 31.1) (配列番号 12);

5' TGA AGA CAA TGA AGA TGT T 3' (connexin 31.1) (配列番号 13).

[0048] コネキシンタンパク質に対するポリヌクレオチド (ODNが含まれる) を、任意の都合のよい従来のアプローチによって、そのヌクレオチド配列に関して選択することができる。例えば、コンピュータプログラムMac Vec t o rおよびO l i g o T e c h (O l i g o s e t c. E u g e n e, O r e g o n, U S A)を使用することができる。一旦選択されると、ODN

を、DNA合成機を使用して合成することができる。

[0049] ポリヌクレオチドホモログ

例えば、ポリヌクレオチドは、コネキシンmRNA中の配列の相補物のホモログであり得る。かかるポリヌクレオチドは、典型的には、（相同配列の）例えば少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約40、少なくとも約100を超える連続ヌクレオチドの領域にわたって、関連配列と少なくとも約70%相同、好ましくは少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%相同である。

[0050] 当該分野の任意の方法に基づいて相同性を計算することができる。例えば、UWCGCパッケージは、相同性を計算するために使用することができるBESTFITプログラムを提供する（例えば、そのデフォルト設定で使用する）（Devereuxら（1984）Nucleic Acids Research 12, p387-395）。例えば、Altschul S. F.（1993）J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S, Fら（1990）J Mol Biol 215:403-10に記載のように、PILEUPおよびBLASTアルゴリズムを使用して、相同性を計算するか、配列を整列させることができる（典型的には、そのデフォルト設定に関して）。

[0051] BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) から公的に利用可能である。このアルゴリズムは、データベース配列中の同一の長さのワードと整列させた場合にいくつかの正の数の閾値スコアTに適合するか満たすクエリー配列中の長さWの短いワードの同定によって高スコアリング配列対（HSP）を最初に同定する工程を含む。Tは、隣接ワードスコア閾値（neighbourhood word score threshold）と呼ばれる（Altschulら、上記参照）。これらの最初の隣接ワードヒ

ットは、これらを含むHSPを見出すための検索開始のシード (seed) として作用する。ワードヒットを、累積アラインメントスコアを増加させることができる限り、各配列に沿って両方の方向に伸長する。各方向でのワードヒットの伸長を、以下の場合に停止する：累積アラインメントスコアが、量Xによってその達成された最大値から低下した場合、1つまたは複数の負のスコアの残基アラインメントの累積によって累積スコアが0以下になる場合、またはいずれかの配列の末端に到達する場合。

[0052] BLASTアルゴリズムパラメータW、T、およびXは、アラインメントの感度および速度を決定づける。BLASTプログラムは、デフォルトとして、ワードレングス (W)、BLOSUM62スコアリング行列 (HenikoffおよびHenikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919)、50のアラインメント (B)、10の期待値 (E)、M=5、N=4、および両鎖の比較を使用する。

[0053] BLASTアルゴリズムは、2配列間の類似性の統計分析を行う。例えば、KarlinおよびAltschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787を参照のこと。BLASTアルゴリズムによって得られる類似性の1つの基準は、最小和確率 (smallest sum probability) (P(N)) である。これにより、2つのヌクレオチド間またはアミノ酸配列間の適合が偶然に起こる確率の指標が得られる。例えば、第1の配列と第2の配列と比較した最小和確率が約1未満、好ましくは約0.1未満、より好ましくは約0.01未満、最も好ましくは約0.001未満である場合、一方の配列は別の配列に類似すると見なされる。

[0054] 相同配列は、典型的には、少なくとも約2、5、10、15、20、またはそれを超える変異（置換、欠失、または挿入であり得る）によって関連配列と異なる。これらの変異を、相同性計算に関する上記のいずれかの領域にわたって測定することができる。

[0055] 相同配列は、典型的には、バックグラウンドを有意に超えるレベルで元の配列と選択的にハイブリッド形成する。選択的ハイブリッド形成を、典型的には、中～高ストリンジエンシー条件（例えば、約50℃～約60℃で0.03M塩化ナトリウムおよび0.03Mクエン酸ナトリウム）を使用して行う。しかし、かかるハイブリッド形成を、当該分野で公知の任意の適切な条件下で行うことができる（Sambrookら（1989）、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*を参照のこと）。例えば、高ストリンジエンシーが必要である場合、適切な条件には、60℃で0.2×SSCが含まれる。より低いストリンジエンシーが必要である場合、適切な条件には、60℃で2×SSCが含まれる。

[0056] ペプチドおよびポリペプチドコネクションの抑制因子

結合タンパク質（ペプチド、ペプチド模倣物、抗体、および抗体フラグメントなどが含まれる）はまた、適切な抑制因子である。

[0057] 結合タンパク質には、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体フラグメント（例えば、Fab、F(ab')₂、およびFvフラグメントが含まれる）；単鎖抗体；単鎖Fvs；および単鎖結合分子（例えば、結合ドメイン、ヒンジ、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを含むもの）、特定の抗体または他の結合分子と接触する抗原決定基（すなわち、一般にエピトープと呼ばれる分子の一部）に結合することができる組換え抗体および抗体フラグメントが含まれる。これらの結合タンパク質（抗体および抗体フラグメントなどが含まれる）は、キメラまたはヒト化することができるか、投与される被験体で免疫原性が低くなるように作製することができるか、合成することができるか、組換え的に産生することができるか、発現ライブラリー中で産生することができる。当該分野で公知であるか後に発見される任意の結合分子（本明細書中で参照され、そして／または当該分野でより詳細に記載される結合分子など）が想定される。例えば、結合タンパク質には、抗体などだけでなく、標的（例えば、コネクションまたは関連分子）に結合するリガンド、受容体、ペプチド模倣物、または他の結合フラグメントも

しくは分子（例えば、ファージディスプレイによって産生される）が含まれる。

[0058] 結合分子は、一般に、所望の特異性（結合特異性が含まれるが、これに限定されない）および所望の親和性を有するであろう。親和性は、例えば、約 10^4M^{-1} 以上、約 10^6M^{-1} 以上、約 10^7M^{-1} 以上、約 10^8M^{-1} 以上の K_a であり得る。さらに約 10^8M^{-1} を超える親和性（約 10^9M^{-1} 以上、約 10^{10}M^{-1} 、約 10^{11}M^{-1} 、および約 10^{12}M^{-1} の親和性など）が適切である。本発明の結合タンパク質の親和性を、従来技術（例えば、S c a t c h a r d ら、1949 A n n . N Y . A c a d . S c i . 51 : 660 に記載の技術）を使用して容易に決定することができる。

[0059] ハイドロパシープロットから得たデータの使用により、コネキシンが4つの膜貫通領域および2つの短い細胞外ループを含むことが提案されている。コネキシンの第1および第2の細胞外領域の配置を、スプリットギャップ結合上の対応するエピトープの免疫局在性のために使用される抗ペプチド抗体産生の報告によってさらに特徴づけた。G o o d e n o u g h D . A . J C e l l B i o l 107 : 1817-1824 (1988) ; M e y e r R . A . , J C e l l B i o l 119 : 179-189 (1992) 。

[0060] コネキシンの抑制因子には、コネキシン（例えば、コネキシン45、43、26、30、31、1、および37）の膜貫通領域（例えば、第1～第4）に対応するアミノ酸配列を含むペプチドが含まれる。コネキシンの抑制因子は、コネキシン45の膜貫通領域の一部に対応するアミノ酸配列を含むペプチドを含むことができる。コネキシンの抑制因子には、アクセッション番号 : AAA60458 の約5～20個の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するペプチド、アクセッション番号 : AAA60458 の約8～15個の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するペプチド、またはアクセッション番号 : AAA60458 の約11～13個の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するペプチドが含まれる。他の実施形態は、アクセッション番号 : AAA60458 の少なくとも約5、少なくとも約6、少なくとも約7、少なくとも約8、少なくとも約9、少な

くとも約10、少なくとも約11、少なくとも約12、少なくとも約13、少なくとも約14、少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約25、または少なくとも約30個の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するペプチドであるコネキシンの抑制因子に関する。本明細書中に提供した一部のコネキシンの抑制因子では、アクセッション番号：AAA60458の46～75位および199～228位のアミノ酸に対応するコネキシン45の細胞外ドメインを使用して、特定のペプチド配列を構築することができる。本明細書中に記載の一部のペプチドは、アクセッション番号：AAA60458の46～75位および199～228位の領域に対応するアミノ酸配列を有する。ペプチドは、アクセッション番号：AAA60458の一部と同一のアミノ酸配列を有する必要はなく、ペプチドが結合活性または機能活性を保持するように保存的にアミノ酸を変化させることができる。あるいは、ペプチドは、細胞外ドメイン以外のコネキシンタンパク質領域（例えば、46～75位および199～228位に対応しないアクセッション番号：AAA60458の一部）をターゲティングすることができる。

[0061] また、適切なコネキシンの抑制因子は、コネキシン43の膜貫通領域の一部に対応するアミノ酸配列を含むペプチドを含む。コネキシンの抑制因子には、アクセッション番号：NP_034418の約5～20個の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するペプチド、アクセッション番号：NP_034418の約8～15個の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するペプチド、またはアクセッション番号：NP_034418の約11～13個の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するペプチドが含まれる。他のコネキシンの抑制因子には、アクセッション番号：NP_034418の少なくとも約5、少なくとも約6、少なくとも約7、少なくとも約8、少なくとも約9、少なくとも約10、少なくとも約11、少なくとも約12、少なくとも約13、少なくとも約14、少なくとも約15、少なくとも約20、少なくとも約25、または少なくとも約30個の連続アミノ酸を含むアミノ酸配列を有するペプチドが含まれる。他のコネキシンの抑制因子は、アクセッション番号：NP_034418の37～76位および178

～208位のアミノ酸に対応するコネキシン43の細胞外ドメインを含む。
コネキシンの抑制因子には、アクセッション番号：NP_034418の37～76位
および178～208位の領域に対応するアミノ酸配列を有する本明細書中
に記載のペプチドが含まれる。ペプチドは、アクセッション番号：NP_034418
の一部と同一のアミノ酸配列を有する必要はなく、ペプチドが結合活性また
は機能活性を保持するように保存的にアミノ酸を変化させることができる。
あるいは、ペプチドは、細胞外ドメイン以外のコネキシンタンパク質領域（
例えば、37～76位および178～208位に対応しないアクセッション
番号：NP_034418の一部）をターゲティングすることができる。

[0062] 抗コネキシンペプチドは、ペプチドが機能的に活性なコネキシンの抑制因
子であるような保存的アミノ酸置換を有するコネキシン細胞外ドメインの一
部に対応する配列を含むことができる。例示的な保存的アミノ酸置換には、
例えば、非極性アミノ酸の別の非極性アミノ酸との置換、芳香族アミノ酸の
別の芳香族アミノ酸との置換、脂肪族アミノ酸の別の脂肪族アミノ酸との置
換、極性アミノ酸の別の極性アミノ酸との置換、酸性アミノ酸の別の酸性ア
ミノ酸との置換、塩基性アミノ酸の別の塩基性アミノ酸との置換、イオン性
アミノ酸の別のイオン性アミノ酸との置換が含まれる。

[0063] コネキシン43にターゲティングされるペプチドの例を、以下の配列番号1
5～23に示す。

FEVAFLLIQWI（配列番号15）

LLIQWYIGFSL（配列番号16）

SLSAVYTCKRDPCPHQ（配列番号17）

VDCFLSRPTEKT（配列番号18）

SRPTEKTIFII（配列番号19）

LGTAVESAWGDEQ（配列番号20）

QSAFRCNTQQPG（配列番号21）

QQPGCENVCYDK（配列番号22）

VCYDKSFPISHVR（配列番号23）

[0064] Cx32、Cx40、Cx43にターゲティングされるペプチドの例を、以下の配列番号24～37に示す。

Cx32にターゲティングされるペプチド(配列番号34は、Cx32/Cx43)

ESVWGDEKSSFI (配列番号 24)

ICNTLQPGCNSV (配列番号 25)

SVCYDHFFPISH (配列番号 26)

RLVKCEAFPCPNTVDCFVSRPTEKT (配列番号 27)

VKCEAFPCPNTV (配列番号 28)

VDCFVSRPTEKT (配列番号 29)

VCYDHFFPISHVR (配列番号 30)

WVGDEKSSFICNTLQPGY (配列番号 31)

DEKSSFICNTLQPGY (配列番号 32)

SRPTEKTVFTV (配列番号 33)

SRPTEKT (配列番号 34)

ICNTLQPGCNSV (配列番号 35)

Cx40にターゲティングされるペプチド

FLDTLHVCRRSPCPHP (配列番号 36)

Cx43にターゲティングされるペプチド

KRDPCHQVDCFLSRPTEK (配列番号 37)

[0065] 配列番号38～65は、本明細書中に記載の使用のためのヒトコネキシン(huCx)26, 30, 30.3, 31.1, 32, 36, 37, 40, 40.1, 43, 45, 46, 46.6に対する抑制因子を示す。

huCx26 KEVWGDEQADFVCNTLQPGCKNVCYDHYFPISHIR (配列番号38)

huCx30 QEVWGDEQEDFVCNTLQPGCKNVCYDHFFPVSHIR (配列番号 39)

huCx30.3 EEVWDDEQKDFVCNTKQPGCPNVCYDEFFPVSHVR (配列番号 40)

huCx31 ERVWGDEQKDFDCNTKQPGCTNVCYDNYFPISNIR (配列番号 41)

huCx31.1 ERVWSDDHKDFDCNTRQPGCSNVCFDEFFPVSHVR (配列番号 42)

huCx32 ESVWGDEKSSFICNTLQPGCNSVCYDQFFPISHVR (配列番号 43)

huCx36 ESWVGDEQSDFECDNTAQPGCTNVCYDQAFPISHIR (配列番号 44)
 huCx37 ESWVGDEQSDFECDNTAQPGCTNVCYDQAFPISHIR (配列番号 45)
 huCx40.1 RPVYQDEQERFVCNTLQPGCANVCYDVFS PVSHLR (配列番号 46)
 huCx43 ESAWGDEQSAFRCNTQQPGCENVCYDKSFPISHVR (配列番号 47)
 huCx46 EDVVGDEQSDFTCNTQQPGCBNVCYBRAFPISHIR (配列番号 48)
 huCx46.6 EAIYSDEQAKFTCNTRQPGCDNVCYDAFAPLSHVR (配列番号 49)
 huCx40 ESSWGDEQADFRCDTIQPGCQNVCTDQAFPISHIR (配列番号 50)
 huCx45 GESIYYDEQSKFVCNTEQPGCENVCYDAFAPLSHVR (配列番号 51)
 huCx26 MYVFYVMYDGFMSQRLVKCNAWPCPNTVDCFVSRPTEKT (配列番号 52)
 huCx30 MYVFYFLYNGYHLPWVLKCGIDPCPNLVDCFISRPTTEKT (配列番号 53)
 huCx30.3 LYIFHRLYKDYDMPRVVACSVPEPCPHTVDCYISRPTTEKK (配列番号 54)
 huCx31 LYLHLLHWGFMNPRVLQCANVAPCPNIVDCYIARPTTEKK (配列番号 55)
 huCx31.1 LYVFHSFYPKYILPPVVKCHADPCPNIVDCFISKPSEKN (配列番号 56)
 huCx32 MYVFYLLYPGYAMVRLVKCDVYPCPNTVDCFVSRPTEKT (配列番号 57)
 huCx36 LYGWTMEPVFVCQRAPCPYLVDVCFVSRPTEKT (配列番号 58)
 huCx37 LYGWTMEPVFVCQRAPCPYLVDVCFVSRPTEKT (配列番号 59)
 huCx40.1 GALHYFLFGFLAPKKFPCTRPCTGVVDCYVSRPTSKE (配列番号 60)
 huCx43 LLIQWYIYGFSLSAVYTCKRDPCPHQVDCFISRPTTEKT (配列番号 61)
 huCx46 IAGQYFL YGFELKPLYRCRWPCPNTVDCFISRPTTEKT (配列番号 62)
 huCx46.6 LVGQYLLYGFVVRPFPCSRQPCPHVVDVCFVSRPTEKT (配列番号 63)
 huCx40 IVGQYFIYGIFLTTLHVCRRSPCPHPVNCYVSRPTEKN (配列番号 64)
 huCx45 LIGQYFLYGFQVHPFYVCSRLPCHPKIDCFISRPTTEKT (配列番号 65)

[0066] 配列番号18～19、66～79は、コネキシン抑制因子(ペプチド)を構成するコネキシンファミリーメンバー (ヒトコネキシン(huCx)26, 30, 30.3, 31.1, 32, 36, 37, 40, 40.1, 43, 45, 46, 46.6) の細胞外ドメインを提供する。かかるコネキシン抑制因子は、この配列番号18～19、66～79中のペプチド配列の約8～約15または約11～約13アミノ個の連続アミノ酸を含むことができる。ペプチドまたはそのフラグメントに対して保存的にアミノ酸を変化

させることができる。

huCx43 LLIQWYIYGFSLSAVYTCKRDPCPHQVDCFLSRPTEKTIFII(配列番号66)

huCx26 MYVFYVMYDGFMSQRLVKCNAWPCPNTVDCFVSRPTEKTVFTV(配列番号 67)

huCx30 YVFYFLYNGYHLPWVLKCGIDPCPNLVDCFISRPTKTVFTI(配列番号 68)

huCx30.3 LYIFHRLYKDYDMPRVVACSVPCPHTVDCYISRPTKTKVFTY(配列番号 69)

huCx31 LYLLHTLWHGFNMPRLVQCANVAPCPNIVDCYIARPTEKKTY(配列番号70)

huCx31.1 LYVFHSFYPKYILPPVVKCHADPCPNrVDCFISKPSEKNIFTL(配列番号 71)

huCx32 MYVFYLLYPGYAMVRLVKCDVYPCPNTVDCFVSRPTEKTVFTV(配列番号 72)

huCx36 LYGWTMEPVFVCQRAPCPYLVDCHFVSRPTEKTIFII(配列番号 73)

huCx37 LYGWTMEPVFVCQRAPCPYLVDCHFVSRPTEKTIFII(配列番号 74)

huCx40.1 GALHYFLGFLAPKKFPCTRPCTGVVDCYVSRPTEKSLML(配列番号 75)

huCx46 IAGQYFLYGFELKPLYRCDRWPCPNTVDCFISRPTKTIFFII(配列番号 76)

huCx46.6 LVGQYLLYGFVVRPFPCSRQPCPHVVDCHFVSRPTEKTVFLL(配列番号 77)

huCx40 IVGQYFIYGIFLTTLHVCRRSPCPHPVNCYSRPTEKNVFIV(配列番号 78)

huCx45 LIGQYFLYGFVHPFYVCSRLPCHPKIDCFISRPTKTIFFLLC配列番号 79)

[0067] 下記の配列番号80～92とその部分ペプチドは、コネキシン40の細胞外ループ（E1およびE2）に関して示したコネキシン40のペプチドインヒビターを提供する。

[0068] E1

LGTAAESSWGDEQADFRCDTIQPGCQNVCTDQAFPISHIRFWVLQ（配列番号80）

LGTAAESSWGDEQA（配列番号81）

DEQADFRCDTIQP（配列番号82）

TIQPGCQNVCTDQ（配列番号83）

VCTDQAFPISHIR（配列番号84）

AFPISHIRFWVLQ（配列番号85）

[0069] E2

MEVGFIVGQYFIYGIFLTTLHVCRRSPCPHPVNCYVSRPTEKNVFIV（配列番号86）

MEVGFIVGQYF（配列番号87）

IVGQYFIYGIFL (配列番号88)

GIFLTTLHVCRRSP (配列番号89)

RRSPCPHPVNCY (配列番号90)

VNCYVSRPTEKN (配列番号91)

SRPTEKNVFIV (配列番号92)

[0070] 配列番号93～105は、コネキシン45の細胞外ループ(E1およびE2)に関して示したコネキシン45のペプチドインヒビターを提供する。

[0071] E1

LTAVGGESIYYDEQSKFVCNTEQPGCENVCYDAFAPLSHVRFWVFQ (配列番号93)

LTAVGGESIYYDEQS (配列番号 94)

DEQSKFVCNTEQP (配列番号 95)

TEQPGCENVCYDA (配列番号 96)

VCYDAFAPLSHVR (配列番号 97)

APLSHVRFWVFQ (配列番号 98)

[0072] E2

FEVGFLIGQYFLYGQVHPFYVCSRLPCHPKIDCFISRPTEKTIFLL (配列番号 99)

FEVGFLIGQYF (配列番号 100)

LIGQYFLYGQV (配列番号 101)

GFQVHPFYVCSRLP (配列番号 102)

SRLPCHPKIDCF (配列番号 103)

IDCFISRPTEKT (配列番号 104)

SRPTEKTIFLL (配列番号 105)

[0073] コネキシン45の抑制因子(ペプチド)の例は以下である：

YVCSRLPCHP (配列番号 106),

QVHPFYVCSRL (配列番号 107),

FEVGFLIGQYFLY (配列番号 108),

GQYFLYGQVHP (配列番号109),

GFQVHPFYVCSR (配列番号 110),

AVGGESIYYDEQ (配列番号111),
YDEQSKFVCNTE (配列番号 112),
NTEQPGCENVCY (配列番号 113),
CYDAFAPLSHVR (配列番号 114),
FAPLSHVRFWVF (配列番号 115)
LIGQY (配列番号 116),
QVHPF (配列番号 117),
YVCSR (配列番号 118),
SRLPC (配列番号 119),
LPCHP (配列番号 120)
GESIY (配列番号 121),
YDEQSK (配列番号122),
SKFVCN (配列番号 123),
TEQPGCEN (配列番号 124),
VCYDAFAP (配列番号125),
LSHVRFWVFQ (配列番号126)

[0074] コネキシン抑制因子としての抗体、ペプチドは市販品を用いることができる。例えばCx43抗体としては、Cat. No : Sigma, C-6219; Zymed, 13-8300; Santa Cruz, sc-6560が挙げられ、Cx43を抑制するペプチドとしては、Cat. No : Santa Cruz, sc-6560 P; BD Transduction Laboratories, 610063; Abcam, ab56616が挙げられる。

[0075] TGF β シグナリング抑制因子は、当該分野で知られているTGF β アンタゴニストを含め、TGF β シグナル伝達を阻害する薬剤として定義される。例えば、TGF β receptor Iに結合して、TGF β がTGF β 受容体に結合するのを防ぐ薬剤は、TGF β シグナリング抑制因子として作用する。

[0076] 他の非限定的な例には、Daschら (J. Immunol. (1989) 142:1536) およびLucasら (J. Immunol. (1990) 145:1415) により記載されたものといったよう

な、ヒト TGF- β に特異的な遮断（中和）抗体（NAb）、可溶性 TGF- β 受容体、膜結合性 TGF- β 受容体、前駆体 TGF- β を成熟 TGF- β へと活性化することを担うプロテアーゼを不活性化するプロテアーゼ阻害剤、TGF- β 受容体（I 型、II 型または III 型）に特異的であって、その受容体への TGF- β 結合を予防する抗体、およびそれらの組み合わせが含まれる。

[0077] TGF- β シグナリングの伝達を図 4 を参照して説明する。

[0078] リガンド TGF- β が TGF- β リセプター II（T β RII）に結合することにより、T β RII が活性化される。活性化された T β RII が TGF- β リセプター I（T β RI）と重合し、2 つの T β RI と 2 つの T β RII からなる四量体を形成し、T β RI の C 末端のリン酸化が起こる。リン酸化された T β RI が活性型となり、その C 末端に TGF- β シグナリングのメディエーターである Smad2 及び Smad3 が供給されリン酸化される。リン酸化された Smad2 及び Smad3 が細胞質に局在する Smad4 と結合し、核内移行が起こり、標的遺伝子に結合し、標的遺伝子の発現を制御する。

[0079] 本発明の TGF- β シグナリング抑制因子は、このシグナル伝達のいずれかを抑制するものである。従って、TGF- β シグナリング抑制因子は、TGF- β の発現抑制、T β RI 若しくは T β RII の発現抑制、TGF- β の T β RII への結合阻害、2 つの T β RI と 2 つの T β RII からなる四量体の形成抑制、T β RI の C 末端のリン酸化阻害、T β RI の C 末端の脱リン酸化、T β RI のユビキチン化、Smad2 及び Smad3 のリン酸化阻害、Smad2 及び Smad3 の発現抑制、Smad2 及び Smad3 のユビキチン化、リン酸化された Smad2 及び Smad3 の脱リン酸化、リン酸化された Smad2 及び Smad3 と Smad4 との結合阻害などの機能を有する物質は本発明において、TGF- β シグナリング抑制因子として機能し得る。

[0080] TGF- β シグナリング抑制因子は、市販品を使用することができる。市販品は、（１）レセプターの抑制と（２）レセプター以降の signal transduction の抑制に分けられる。

（１）Receptor I (ALK 5) inhibitor:

SB425342; A-83-01; ALK5 inhibitor.

(2) Signal transduction inhibitor:

Inhibitor Smad: Smad7が $T\beta R$ Iに結合し、Smad2及びSmad3の $T\beta R$ Iへの結合を妨害する。

[0081] Signaling mediator inhibition: siRNAかantisense oligo DNAによって、Smad2、Smad3及びSmad4の発現を抑制する。

[0082] $TGF-\beta$ シグナリング抑制因子は、市販のReceptor I (ALK 5) inhibitor (SB425342、A-83-01、ALK5 inhibitorなど)、Signal transduction inhibitorの機能を模倣する物質を広く包含する。

[0083] $TGF-\beta$ シグナリング抑制因子は、 $TGF-\beta$ 、 $T\beta RI$ 、 $T\beta RII$ に対する抗体を包含する。抗体は、コネキシン抑制因子について説明したように、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体フラグメント（例えば、Fab、 $F(a b')_2$ 、およびFvフラグメントが含まれる）；単鎖抗体；単鎖Fvs；および単鎖結合分子（例えば、結合ドメイン、ヒンジ、CH2ドメイン、およびCH3ドメインを含むもの）、特定の抗体または他の結合分子と接触する抗原決定基（すなわち、一般にエピトープと呼ばれる分子の一部）に結合することができる組換え抗体および抗体フラグメントが含まれる。

[0084] $TGF-\beta$ シグナリング抑制因子は、 $TGF-\beta$ 前駆体の成熟型 $TGF-\beta$ への変換を抑制する物質、可溶型の $TGF-\beta$ 受容体を包含する。

[0085] $TGF-\beta$ は、一般的には、潜伏関連タンパク質と呼ばれるタンパク質と非共有結合した $TGF-\beta$ から成る潜伏前駆体として分泌される（LAP；Harpelら（1992）Prog. Growth Factor Res. 4: 321）。この潜伏複合体は、活性サイトカインを放出するために、炭水化物基の酵素的切断および一時的酸性化を必要とする。精製LAPはそれ自体で、活性 $TGF-\beta$ を高親和性で結合して、潜伏複合体を形成する。プレープロ $TGF-\beta$ に対応し、成熟型の $TGF-\beta$ の直前で終わって、Ser33置換のためのCys33を含む、278のアミノ酸ペプチドをコードするDNAが述べられており（Derynckら（1985）Nature 316: 701）、また $TGF-\beta$ を結合して、それを潜伏した状態にすることが見い出されている。

- [0086] 可溶型のTGF- β 受容体もまたTGF- β を結合して、膜結合性TGF- β 受容体への結合を防ぐ。TGF- β 受容体は、Wangら (Cell (1991) 67: 797) およびLinら (Cell (1992) 68: 775) により記載されている。可溶型のTGF- β 受容体は、当業界で知られている方法により調製され得る。例えば、TGF- β 受容体の膜貫通ドメインを欠く欠失突然変異体を調製することができ、これは、可溶性TGF- β 結合タンパク質を発現するであろう (Miyazonoら (Adv. Immunol. (1994) 55: 181))。
- [0087] TGF- β シグナリング抑制因子として機能する他の型のTGF- β アンタゴニストもまた当業界で知られている。例えば、Yamaguchiら (Nature (1990) 346: 281) は、TGF- β を結合して、この増殖因子の活性を調整する、小さなコンドロイチン-デルマタン硫酸プロテオグリカンであるデコリンを論じている。OhtsukiおよびMassague (Mol. Cell. Biol. 12:261-265, 1992) は、TGF- β の幾つかの生物活性を遮断するプロテインキナーゼ阻害剤を開示している。プロテアーゼ阻害剤の薬物としての設計および使用は、当業界で十分知られている (Design of Enzyme Inhibitors as Drugs; SandlerおよびSmith編; 1989, Oxford University Press; Proteinase Inhibitors Medical and Biological Aspects; Katunuma, UmezawaおよびHolzer編, 1983, Springer-Verlag) ; このように、クルザインヴァン(cruzaïnvàn)の阻害剤を製造すると、TGF- β アンタゴニストとして有用である。
- [0088] またさらなる他のTGF- β アンタゴニストおよびそれらの製造方法は、現在開発中のより多くのものと共に、当該分野で十分知られている。有効なTGF- β アンタゴニストはいずれも、本発明において有用であり得ることから、使用する特異的TGF- β アンタゴニストは、限定的なものではない。そのようなアンタゴニストの例には、1つまたはそれ以上のイソ型のTGF- β に対するモノクローナルおよびポリクローナル抗体 (米国特許第5,571,714号およびWO 97/13844)、TGF- β 受容体、そのフラグメント、その誘導体、およびTGF- β 受容体に対する抗体 (米国特許第5,693,607号、同第6,008,011号、同第6,001,969号お

よび同第6,010,872号、並びにWO92/00330、WO93/09228、WO95/10610およびWO98/48024)；潜伏関連ペプチド(WO91/08291)、大きな潜伏TGF- β (WO94/09812)、フェチュイン(米国特許第5,821,227号)、デコリン、並びにバイグリカン、フィブロモジュリン、ルミカンおよびエンドグリンといったような他のプロテオグリカン(米国特許第5,583,103号、同第5,654,270号、同第5,705,609号、同第5,726,149号、同第5,824,655号、同第5,830,847号、同第6,015,693号、並びにWO91/04748、WO91/10727、WO93/09800およびWO94/10187)が含まれる。

[0089] そのようなアンタゴニストのさらなる例には、ソマトスタチン(WO98/08529)、マンノースー6ーリン酸またはマンノースー1ーリン酸(米国特許第5,520,926号)、プロラクチン(WO97/40848)、インスリン様増殖因子II(WO98/17304)、IP-10(WO97/00691)、アルギニン(arg)-グリシン(gly)-アスパラギン酸(asp)含有ペプチド(米国特許第5,958,411号およびWO93/10808)、植物、真菌類および細菌類の抽出物(欧州特許出願第813875号、特開平8-119984号および米国特許第5,693,610号)、アンチセンスオレゴヌクレオチド(米国特許第5,683,988号、同第5,772,995号、同第5,821,234号および同第5,869,462号、並びにWO94/25588)、並びにSMADおよびMAD(欧州特許出願EP874046、WO97/31020、WO97/38729、WO98/03663、WO98/07735、WO98/07849、WO98/45467、WO98/53068、WO98/55512、WO98/56913、WO98/53830およびWO99/50296、並びに米国特許第5,834,248号、同第5,807,708号および同第5,948,639号)、並びにSkiおよびSno(G. Vogel, Science, 286:665 (1999)およびStroscheinら, Science, 286:771-74 (1999))、並びにTGF- β の活性

を阻害する能力を保持する上記分子のいずれかのフラグメントおよび誘導体を含め、TGF- β シグナル伝達に関与する他のタンパク質が含まれる。

[0090] TGF- β 受容体およびTGF- β 受容体のTGF- β 結合フラグメント、とりわけ、可溶性フラグメントは、本発明の方法において有用なTGF- β アンタゴニストである。TGF- β 受容体およびそれらをコードする核酸は、当業界で十分知られている。TGF- β 1型受容体をコードする核酸配列は、GenBankのアクセス番号L 1 5 4 3 6およびDonahoeらの米国特許第5, 5 3 8, 8 9 2号に開示されている。TGF- β 2型受容体の核酸配列は、GenBankのアクセス番号AW 2 3 6 0 0 1 ; A 1 3 5 7 9 0 ; A 1 2 7 9 8 7 2 ; A 1 0 7 4 7 0 6 ; およびA A 8 0 8 2 5 5の下、公的に入手可能である。TGF- β 3型受容体の核酸配列もまた、GenBankのアクセス番号NM 0 0 3 2 4 3 ; A 1 8 8 7 8 5 2 ; A 1 8 1 7 2 9 5 ; およびA 1 6 8 1 5 9 9の下、公的に入手可能である。好ましい態様において、TGF- β アンタゴニストは、その受容体、またはF(ab)₂フラグメント、Fvフラグメント、一本鎖抗体、およびTGF- β に結合する能力を保持する他の“抗体”型といったようなそのフラグメントへのTGF- β 結合を遮断する抗体である。その抗体は、キメラ化またはヒト化され得る。

[0091] さらに、TGF- β 1レセプターII型に対するRNAiとして作用するRNA配列（特開2005-253344）、TGF- β II型受容体発現のサイレンシングのためのsiRNA（特表2007-502284）、TGF- β インヒビターとしてのピリミジニルイミダゾール（特表2008-511631）およびピリミジニルピラゾール（特表2008-511630）などが挙げられる。

[0092] 好ましいTGF- β シグナリング抑制因子は、SB-431542、A-83-01、ALK5 Inhibitorである。

[0093] TGF- β シグナリング抑制因子は、細胞の培養液中に添加することができる。濃度としてはTGF- β シグナリング抑制因子の有効量が例示され、例えばSB-431542の場合には、1~100 μ M、好ましくは10 μ M程度である。

[0094] コネキシン抑制因子は、有効量以上を培養液中に添加することにより細胞

に取り込ませることができる。例えばsiRNAの場合、10～1000nM、好ましくは100nM程度を培養液中に添加することができる。上記以外のTGFβシグナリング抑制因子、コネキシン抑制因子の使用量は、当業者であれば容易に決定できる。

[0095] iPS細胞の原料となる細胞としては、全ての体細胞が挙げられ、例えば心筋細胞、繊維芽細胞、皮膚細胞、筋肉細胞、脂肪細胞などが挙げられる。この体細胞はコネキシンを発現している細胞がよく、コネキシンを高発現している細胞がさらに好ましい。

[0096] iPS細胞は、哺乳動物細胞（ヒト、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ブタ、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、サル、イヌ、ネコ）あるいはトリ、アヒル、アフリカツメガエルなどの動物細胞から得ることができる。

[0097] コネキシン抑制因子とTGFβシグナリング抑制因子は、同時に作用させてもよく、逐次的に作用させてもよい。好ましくはこれらは同時に作用させる。

[0098] コネキシン抑制因子とTGFβシグナリング抑制因子を作用させて得られたiPS細胞は、常法に従い非iPS細胞を除去することで、iPS細胞の集団を分離精製することができる。

[0099] 本発明のiPS細胞は、コネキシン抑制因子とTGFβシグナリング抑制因子を作用させて誘導された時点ではコネキシン抑制因子とTGFβシグナリング抑制因子の一方又は両方が細胞内に存在すると考えられる。特に、これらの抑制因子が細胞内での遺伝子発現を抑制する分子である場合には、iPSになった瞬間には細胞内に存在するものと考えられる。特に、コネキシン抑制因子は、従来iPSの作製及び培養時に用いられていなかったものであり、コネキシン抑制因子を細胞内に含むiPS細胞は新規な細胞である。

[0100] コネキシン抑制因子及びTGFβシグナリング抑制因子は、いずれもiPS細胞に誘導するために使用することができ、これらはiPS細胞誘導剤として有用である。

[0101] コネキシン抑制因子及びTGFβシグナリング抑制因子からなる群から選

ばれる少なくとも1種の抑制因子を含む培地は、iPS細胞を誘導することができるため、iPS細胞誘導用培地として有用である。

- [0102] さらに、コネキシン抑制因子及びTGF β シグナリング抑制因子からなる群から選ばれる少なくとも1種の抑制因子は、iPS細胞を誘導することができるので、これらはiPS細胞誘導用キットとして有用である。

実施例

- [0103] 以下、本発明を実施例に従いより詳細に説明する。

実施例1：新生仔マウスの心室に由来する心筋細胞の初期化

対象と方法

1) 心筋細胞の単離

生後二日後マウス胎仔 (C57/BL6及びC57BL/6-Tg (CAG-EGFP)) から従来法により心室部分を残した心臓を約2mm×2mmの大きさに解剖用ハサミで細切した。それらを0.2% コラゲナーゼ (Collagenase Type I I, Worthington, アメリカ, PBSに溶解) にて、心筋細胞を解離した。解離した心筋細胞を遠心分離し、10% FBS を添加したDMEM培養液で、37℃、5% CO₂の条件で45分間インキュベートした後、上清を再度、同条件でインキュベートしこれを4回行い、線維芽細胞を除去し、心筋細胞を分離した。

- [0104] 2) 心筋細胞の初期化

6 cm dishに2×10⁵心筋細胞を撒き、上述したDMEM培地で一週間培養した後、10 μ M TGF- β レセプター阻害剤であるSB-431542 (Tocris, アメリカ) か100nM siRNA Cx43またはその両方を含んだ15% FBS、マウスES培地でそれぞれ心筋細胞の初期化選択を行った。

使用したマウスCx43 siRNA配列は、次の通りである。

- [0105] sense: 5' -CAA UUC CUC CUG CCG CAA TT-3'
antisense: 5' -UUG CGG CAG GAG GAA UUG TT-3'

- [0106] 3) 多能性の評価

(i). ES細胞初期マーカーの細胞免疫染色

10 μ M SB-431542 と100nM siRNA Cx43両方添加したES培地条件で選択培養

した心筋細胞から約2週間で2個のiPS細胞コロニーが得られた。フィーダー細胞上でマウスES細胞培養条件と同様の条件で培養して増殖したiPS様細胞を免疫染色など及びTeratoma形成確認に用いた。

[0107] Alkaline phosphatase (ALP) の測定はAlkaline Phosphatase Detection Kit (Millipore, アメリカ)により行った。

[0108] 細胞免疫染色で使用した抗体は、次の通りである。

[0109] ウサギ抗Nanog抗体 (200倍希釈、Cosmo Bio, REC-RAB004PF)、ウサギ抗Oct4抗体 (500倍希釈、sc-9081)、ヤギ抗Sox2抗体 (200倍希釈、sc-17320)、マウス抗SSEA1抗体 (200倍希釈、sc-21702)。

(ii). Teratoma作製

2×10^5 のiPS様細胞をSCIDマウスの皮下に移植し、5週間後、腫瘍を摘出し、HE染色により、奇形腫を形成するかを組織学的に確認した。

(iii). キメラマウスの作成

iPS様細胞をICRマウス由来の8細胞期の受精卵に移植した後、ICRマウスに戻し、キメラマウスができるかを確認した。

[0110] 結果

1. ES初期マーカー遺伝子の発現

本発明で作製したマウス心筋細胞由来の2個のiPS細胞、siPSCs (silencing-induced pluripotent stem cells) が形態的にマウスES細胞コロニーに類似し (図 1a)、ALP活性が確認でき (図 1b)、多能性マーカー因子、Nanog, Oct4, Sox2, SSEA1の発現がタンパク質レベルで確認できた (図 1c)。また、各種多能性マーカー遺伝子の発現が遺伝子レベルでも確認できた (図 1d)。更にEGFPマウス心筋細胞からのiPS様細胞の誘導も確認できた (図 2)。

[0111] 2. siPSCsの分化能検証

iPSCsをSCIDマウスの皮下に移植すると5週間後、外胚葉である上皮と神経、中胚葉である筋肉と軟骨、内胚葉である腺管などの三胚葉系の様々な組織からなるTeratomaを形成した (図 1e)。なお、データは示さないが、siPSCsが胚葉体を形成し、分化誘導条件により神経細胞、心筋細胞、内皮細胞へと

それぞれ分化可能なことが確認できた。心筋細胞では拍動と伝導も認められた。また、免疫抗体法、RT-PCRにより、分化誘導を行った細胞では三胚葉マーカー遺伝子に発現がタンパク質レベルと遺伝子レベルで共に確認できた。

[0112] 3. キメラマウスの作製

本発明で作製したマウス心筋細胞由来の2個のiPS細胞を胚盤胞への注入により、iPS細胞由来の細胞が混在した成体キメラマウスを得ることができたことから、ES細胞と同様の分化万能性を持つと言える（図3）。

[0113] 本明細書に記載された特許文献および論文は、その全体が本明細書に参考として援用される。

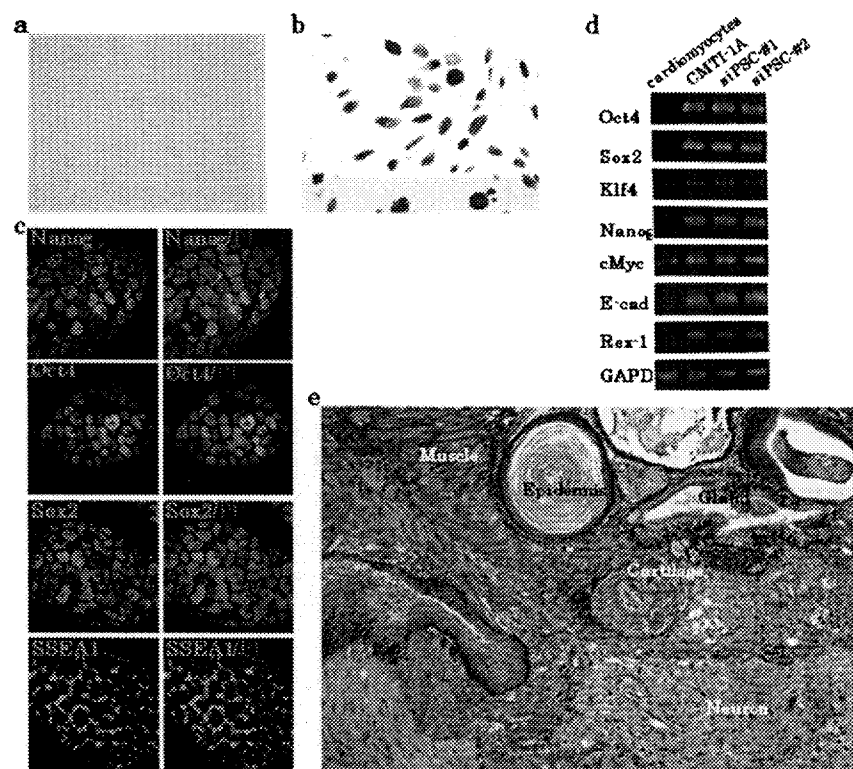
産業上の利用可能性

[0114] 本発明は、iPS細胞を安全かつ迅速に調製する方法であるため、今後、iPS細胞を臨床上利用する上で、極めて有効な手段を提供するものである。

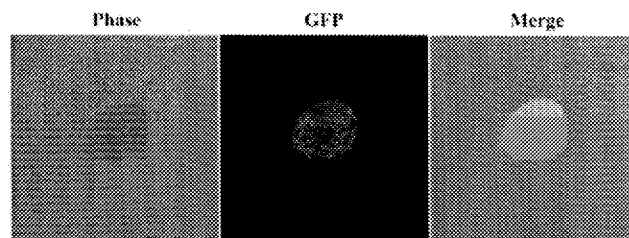
請求の範囲

- [請求項1] 少なくとも1種のコネキシン抑制因子と少なくとも1種のTGF- β シグナリング抑制因子を細胞に作用させることを特徴とするiPS細胞を作製する方法。
- [請求項2] コネキシン抑制因子がコネキシン43抑制因子である請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記コネキシン抑制因子が、コネキシンに対するsiRNA、shRNA、miRNA、アンチセンスRNA、ペプチド、抗体もしくはリボザイム、又は細胞内でこれらのRNA分子を放出できる発現ベクターであることを特徴とする、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 前記TGF- β シグナリング抑制因子がTGF- β レセプターI阻害剤である請求項1に記載の方法。
- [請求項5] 前記TGF- β レセプター阻害剤がSB-431542、A-83-01またはALK5 Inhibitorである請求項1に記載の方法。
- [請求項6] 少なくとも1種のコネキシン抑制因子を含むiPS細胞。
- [請求項7] コネキシン抑制因子がコネキシン43抑制因子である請求項6に記載のiPS細胞。
- [請求項8] 前記コネキシン抑制因子が、コネキシンに対するsiRNA、shRNA、miRNA、アンチセンスRNA、ペプチド、抗体もしくはリボザイム、又は細胞内でこれらのRNA分子を放出できる発現ベクターであることを特徴とする、請求項6に記載のiPS細胞。
- [請求項9] コネキシン抑制因子及びTGF- β シグナリング抑制因子からなる群から選ばれる少なくとも1種の抑制因子を含むiPS細胞誘導剤。
- [請求項10] コネキシン抑制因子及びTGF- β シグナリング抑制因子からなる群から選ばれる少なくとも1種の抑制因子を含むiPS細胞誘導用培地。
- [請求項11] コネキシン抑制因子及びTGF- β シグナリング抑制因子からなる群から選ばれる少なくとも1種の抑制因子を含むiPS細胞誘導用キット。

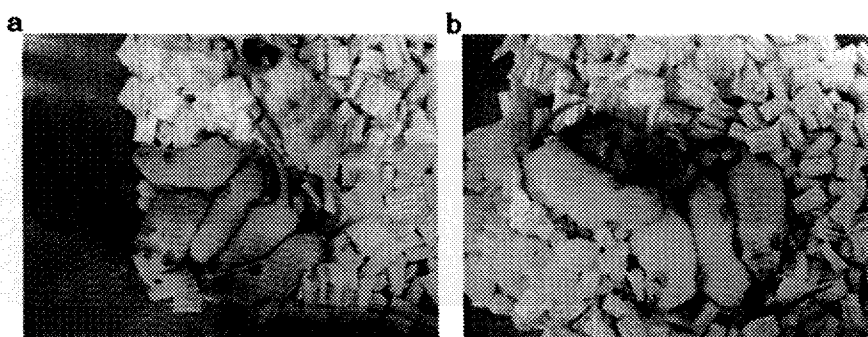
[図1]



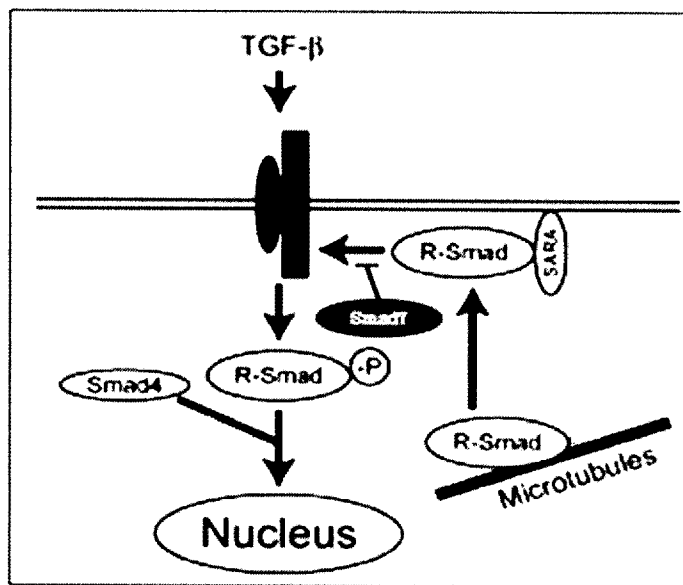
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/080182

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/00 (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)

C12N5/00

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2012

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2012 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2012

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	LIN, T et al., A chemical platform for improved induction of human iPSCs. Nat Methods. 2009 Nov, vol.6(11), pp.805-808	9-11/1-8
X/A	MAHERALI, N et al., Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. Curr Biol. 2009 Nov 3, vol.19(20), pp.1718-1723	9-11/1-8
X/A	ICHIDA, JK et al., A small-molecule inhibitor of tgfbeta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. Cell Stem Cell. 2009 Nov 6, vol.5(5), pp.491-503	9-11/1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 February, 2012 (22.02.12)Date of mailing of the international search report
06 March, 2012 (06.03.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/080182

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ASAZUMA-NAKAMURA,Y et al., Cx43 contributes to TGF-beta signaling to regulate differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. Exp Cell Res. 2009 Apr 15, vol.315(7), pp.1190-1199	1-11
A	RHETT,JM et al., Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds. Trends Biotechnol. 2008 Apr, vol.26(4), pp.173-180	1-11
P,A	PASHA,Z et al., Efficient non-viral reprogramming of myoblasts to stemness with a single small molecule to generate cardiac progenitor cells. PLoS One. 2011, vol.6(8), e23667	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N5/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ A	LIN, T et al., A chemical platform for improved induction of human iPSCs. Nat Methods. 2009 Nov, vol.6(11), pp.805-808	9-11/ 1-8
X/ A	MAHERALI, N et al., Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. Curr Biol. 2009 Nov 3, vol.19(20), pp.1718-1723	9-11/ 1-8

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

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

2 2 . 0 2 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

0 6 . 0 3 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

長井 啓子

4 N

9 1 2 3

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ A	ICHIDA, JK et al., A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. Cell Stem Cell. 2009 Nov 6, vol.5(5), pp.491-503	9-11/ 1-8
A	ASAZUMA-NAKAMURA, Y et al., Cx43 contributes to TGF-beta signaling to regulate differentiation of cardiac fibroblasts into myofibroblasts. Exp Cell Res. 2009 Apr 15, vol.315(7), pp.1190-1199	1-11
A	RHETT, JM et al., Novel therapies for scar reduction and regenerative healing of skin wounds. Trends Biotechnol. 2008 Apr, vol.26(4), pp.173-180	1-11
P, A	PASHA, Z et al., Efficient non-viral reprogramming of myoblasts to stemness with a single small molecule to generate cardiac progenitor cells. PLoS One. 2011, vol.6(8), e23667	1-11