

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2007 年 6 月 21 日 (21.06.2007)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2007/069666 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 5/06 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/324881
- (22) 国際出願日: 2006 年 12 月 6 日 (06.12.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2005-359537
2005 年 12 月 13 日 (13.12.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立
大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP];
〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 山中伸弥 (YAMA-
MANAKA, Shinya) [JP/JP]; 〒6068507 京都府京都市
左京区聖護院川原町 5 3 国立大学法人京都大学再生
医科学研究所内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS &
CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号
京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, 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, LV, LY, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, 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 (AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE,
IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受
領の際には再公開される。
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NUCLEAR REPROGRAMMING FACTOR

(54) 発明の名称: 核初期化因子

(57) Abstract: Disclosed is a means for inducing the reprogramming of a differentiated cell without using any embryo or ES cell and establish an inducible pluripotent stem cell having similar pluripotency and growing ability to those of an ES cell in a simple manner and with good reproductivity. As the means, a nuclear reprogramming factor for a somatic cell is provided, which comprise products of the following three genes: an Oct family gene; a Klf family gene; and an Myc family gene.

(57) 要約: 胚やES細胞を利用せずに分化細胞の初期化を誘導し、ES細胞と同様な多能性や増殖能を有する誘導多能性幹細胞を簡便かつ再現性よく樹立するための手段として、下記の3種の遺伝子: Octファミリー遺伝子、Klfファミリー遺伝子、及びMycファミリー遺伝子の各遺伝子産物を含む体細胞の核初期化因子が提供される。



WO 2007/069666 A1

明 細 書

核初期化因子

技術分野

本発明は、分化した体細胞を初期化して誘導多能性幹細胞を誘導する作用を有する核初期化因子に関するものである。

背景技術

胚性幹細胞（ES 細胞）はヒトやマウスの初期胚から樹立された幹細胞であり、生体に存在する全ての細胞へと分化できる多能性を維持したまま長期にわたって培養することができるという特徴を有している。この性質を利用してヒト ES 細胞はパーキンソン病、若年性糖尿病、白血病など多くの疾患に対する細胞移植療法の資源として期待されている。しかしながら、ES 細胞の移植は臓器移植と同様に拒絶反応を惹起してしまうという問題がある。また、ヒト胚を破壊して樹立される ES 細胞の利用に対しては倫理的見地から反対意見も多い。患者自身の分化体細胞を利用して脱分化を誘導し、ES 細胞に近い多能性や増殖能を有する細胞（この細胞を本明細書において「誘導多能性幹細胞」（iPS 細胞）と言うが、「胚性幹細胞様細胞」又は「ES 様細胞」と呼ばれる場合もある）を樹立することができれば、拒絶反応や倫理的問題のない理想的な多能性細胞として利用できるものと期待される。

体細胞核を初期化する方法として、例えば、体細胞の核を卵子に移植し作製したクローン胚から ES 細胞を樹立する技術が報告されている（W. S. Hwang et al., Science, 303, pp.1669-74, 2004; W. S. Hwang et al., Science, 308, pp.1777-83, 2005:ただし、これらの論文はいずれも捏造されたものであることが判明し、後日取り下げられた）。しかしながら、この技術は ES 細胞を樹立する目的のためだけにクローン胚を作製することから、不妊治療で生じる余剰胚を用いる通常の ES

細胞に比して倫理的問題がかえって大きい。また、体細胞と ES 細胞とを融合させることにより体細胞核を初期化する技術が報告されている (M. Tada et al., Curr. Biol., 11, pp.1553-1558, 2001; C. A. Cowan et al., Science, 309, pp.1369-73, 2005)。しかしながら、この方法においても結局ヒト ES 細胞を用いることになり倫理的問題の解決とはならないという問題がある。さらに、ヒトに発生した生殖細胞腫瘍由来細胞株の抽出液と分化細胞とを反応させることにより細胞核を初期化する技術が報告されている (C. K. Taranger et al., Mol. Biol. Cell, 16, pp. 5719-35, 2005)。この方法は抽出液中のどの成分が初期化を誘導しているかが全く不明であり、技術の確実性や安全性に問題がある。

一方、分化した体細胞を初期化して誘導多能性幹細胞を誘導する作用を有する核初期化因子をスクリーニングする方法が提案されている (国際公開 WO 2005/80598)。この方法は ECAT 遺伝子 (ES 細胞で特異的に発現する遺伝子群: ES cell associated transcript) の発現調節領域により発現調節を受ける位置にマーカー遺伝子を存在させた遺伝子を含有する体細胞と被検物質とを接触させ、マーカー遺伝子発現細胞の出現の有無を調べて該細胞を出現させた被検物質を体細胞の核初期化因子の候補として選択する工程を含んでいる。また、この刊行物の実施例 6 などには体細胞を初期化する方法が示されている。しかしながら、上記刊行物には、核初期化因子を実際に同定したとの報告はない。

特許文献 1 国際公開 WO 2005/80598

発明の開示

本発明の課題は核初期化因子を提供することにある。より具体的には、本発明の課題は、卵子、胚や ES 細胞を利用せずに分化細胞の初期化を誘導し、ES 細胞と同様な多能性や増殖能を有する誘導多能性幹細胞を簡便かつ再現性よく樹立するための手段を提供することにある。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行い、国際公開 WO 2005/80598 に記載された核初期化因子のスクリーニング方法を用いて核初期化因子の同定を

試みた。その結果、核初期化に関連する遺伝子として 24 種類の候補遺伝子を見出し、それらのうち 3 種類の遺伝子が核初期化に必須の遺伝子であることを確認した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

すなわち、本発明により、体細胞の核初期化因子であって、下記の 3 種類の遺伝子：Oct ファミリー遺伝子、Klf ファミリー遺伝子、及び Myc ファミリー遺伝子の各遺伝子産物を含む因子が提供される。この発明の好ましい態様によれば、下記の 3 種の遺伝子：Oct3/4、Klf4、及び c-Myc の各遺伝子産物を含む上記の因子が提供される。

また、別の好ましい態様によれば、下記の遺伝子：Sox ファミリー遺伝子の遺伝子産物をさらに含む上記の因子も提供され、より好ましい態様として Sox2 の遺伝子産物を含む上記の因子が提供される。

さらに別の好ましい態様によれば、Myc ファミリー遺伝子の遺伝子産物とともに、あるいは Myc ファミリー遺伝子の遺伝子産物に換えてサイトカインを含む上記の因子が提供され、より好ましい態様としてサイトカインが basic fibroblast growth factor (bFGF) 及び／又は Stem Cell Factor (SCF) である上記の因子が提供される。

特に好ましい態様によれば、Oct ファミリー遺伝子、Klf ファミリー遺伝子、Myc ファミリー遺伝子、及び Sox ファミリー遺伝子の各遺伝子産物に加えて、TERT 遺伝子の遺伝子産物を含む体細胞の核初期化因子、並びに Oct ファミリー遺伝子、Klf ファミリー遺伝子、Myc ファミリー遺伝子、Sox ファミリー遺伝子、及び TERT 遺伝子の各遺伝子産物に加えて、下記の遺伝子：SV40 Large T antigen、HPV16 E6、HPV16 E7、及び Bmi1 からなる群から選ばれる 1 種以上の遺伝子の遺伝子産物を含む因子が提供される。

これらの因子に加えて、下記の群：Fbx15、Nanog、ERas、ECAT15-2、Tcl1、及び β -catenin からなる群から選ばれる 1 種以上の遺伝子の遺伝子産物をさらに含む上記の因子が提供される。

また、上記発明の別の好ましい態様によれば、下記の群：ECAT1、Esg1、Dnmt3L、

ECAT8、Gdf3、Sox15、ECAT15-1、Fthl17、Sall4、Rex1、UTF1、Stella、Stat3、及び Grb2 からなる群から選ばれる 1 種以上の遺伝子の遺伝子産物をさらに含む上記の因子も提供される。

別の観点からは、本発明により、体細胞の核初期化により誘導多能性幹細胞を製造する方法であって、体細胞に上記の核初期化因子を接触させる工程を含む方法が提供される。

この発明の好ましい態様によれば、体細胞の培養物中に上記の核初期化因子を添加する工程を含む上記の方法；体細胞に上記の核初期化因子をコードする遺伝子を導入する工程を含む上記の方法；上記の核初期化因子をコードする遺伝子を少なくとも 1 種以上含む組換えベクターを用いて体細胞に該遺伝子を導入する工程を含む上記の方法；及び体細胞として患者から採取した体細胞を用いる上記の方法が提供される。

さらに別の観点からは、本発明により、上記の方法により得られた誘導多能性幹細胞が提供される。また、上記の誘導多能性幹細胞から分化誘導された体細胞も本発明により提供される。

さらに本発明により、幹細胞療法であって、患者から分離採取した体細胞を用いて上記の方法により得られた誘導多能性幹細胞を分化誘導して得られる体細胞を該患者に移植する工程を含む療法が提供される。

さらに本発明により、上記の方法により得られた誘導多能性幹細胞を分化誘導して得られる各種細胞を用いて、化合物、薬剤、毒物などの生理作用や毒性を評価する方法が提供される。

また、本発明により、細胞の分化能及び／又は増殖能を改善する方法であって、細胞に対して上記の核初期化因子を接触させる工程を含む方法、並びに上記方法により得られた細胞及び上記方法により得られた細胞から分化誘導された体細胞が提供される。

本発明により提供された核初期化因子を用いることにより、胚や ES 細胞を利用せずに簡便かつ再現性よく分化細胞核の初期化を誘導することができ、ES 細胞と

同様の分化及び多能性や増殖能を有する未分化細胞である誘導多能性幹細胞を樹立することができる。例えば、本発明の核初期化因子を用いて患者自身の体細胞から高い増殖能及び分化多能性を有する誘導多能性幹細胞を作製することができ、この細胞を分化させることにより得られる細胞（例えば心筋細胞、インスリン産生細胞、又は神経細胞など）は、心不全、インスリン依存性糖尿病、パーキンソン病や脊髄損傷など多様な疾患に対する幹細胞移植療法に利用することができ、ヒト胚を用いる倫理的問題や移植後の拒絶反応を回避できるので極めて有用である。また誘導多能性幹細胞を分化させてできる各種細胞（例えば心筋細胞、肝細胞など）は化合物、薬剤、毒物などの薬効や毒性を評価するためのシステムとして極めて有用である。

図面の簡単な説明

図 1 は、Fbx15 遺伝子に β geo をノックインしたマウスの胎児線維芽細胞（MEF）を用いた初期化因子のスクリーニング方法を示した図である。

図 2 は、表 1 に示す 24 遺伝子の導入により得られた iPS 細胞の形態を示した写真である。対照として分化細胞（MEF）及び正常な胚性幹細胞（ES）の形態も示した。

図 3 は、iPS 細胞におけるマーカー遺伝子の発現を示した図である。iPS 細胞、ES 細胞、及び MEF 細胞から抽出したトータル RNA を鋳型にして RT-PCR を行った結果を示した。

図 4 は、iPS 細胞における DNA メチル化状態を示した図である。iPS 細胞、ES 細胞、及び MEF 細胞から抽出したゲノム DNA をバイサルファイト処理し、目的 DNA を PCR 増幅後、プラスミドに挿入した。各遺伝子ごとに 10 クローンのプラスミドを単離し、シーケンスを決定した。メチル化 CpG は黒丸で、非メチル化 CpG は白丸で示した。

図 5 は、24 遺伝子群、及び 24 遺伝子群から 1 遺伝子ずつ除外した 23 遺伝子群の導入により得られた G418 細胞のコロニー数を示した図である。グラフ下側は

G418 選択後 1 週間で得られたコロニー数を示し、グラフ上側は 3 週間で得られたクローン数を示す。四角で囲んだ遺伝子（遺伝子の番号は表 1 に示したものと同一である）を除外した場合、コロニーは全く得られないか、3 週間後に少数のみ認められた。

図 6 は、10 遺伝子群、及び 10 遺伝子群から 1 遺伝子ずつ除外した 9 遺伝子群の導入により得られた G418 細胞のコロニー数を示した図である。#14、#15、又は#20 の各遺伝子を除外した場合にはコロニーは一つも得られなかった。#22 の遺伝子を除外した場合には少数の G418 耐性コロニーが得られたが、細胞は分化した形態を示しており明らかに iPS 細胞とは異なっていた。

図 7 は、10 遺伝子群、4 遺伝子群、3 遺伝子群、又は 2 遺伝子群による G418 耐性コロニー（初期化コロニー）の出現数を示した図である。各コロニーの代表的な形態を大きさを示す。

図 8 は、MEF 由来の iPS 細胞をヌードマウス皮下に移植し形成された腫瘍をヘマトキシリンエオジン（H & E）染色した結果を示した写真である。三胚葉系の各種組織への分化が認められる。

図 9 は、成体皮膚線維芽細胞に由来する iPS 細胞をマウス胚盤胞に移植し、偽妊娠マウスの子宮に移植することにより作製した胎児を示した写真である。上図、左側の胎児において、iPS 細胞に由来する細胞（緑色蛍光を発する）が、全身に分布していることがわかる。下図では、同胎児の心臓、肝臓、脊髄のほぼすべての細胞が GFP 陽性であり、iPS 細胞に由来することがわかる。

図 10 は、ES 細胞マーカー遺伝子の発現を RT-PCR で確認した結果を示した写真である。図中、Sox2 minus は MEF に 3 遺伝子を導入し樹立された iPS 細胞を、4ECAT は MEF に 4 遺伝子を導入し樹立した iPS 細胞を、10ECAT は MEF に 10 遺伝子を導入し樹立した iPS 細胞を、10ECAT Skin fibroblast は、皮膚線維芽細胞に 10 遺伝子を導入し樹立した iPS 細胞を、ES 細胞はマウス ES 細胞を、そして MEF は遺伝子導入を行っていない MEF 細胞を示す。その下の番号はクローン番号を示す。

図 11 は、MEF からの iPS 細胞樹立における bFGF の効果を示した図である。通

常のフィーダー細胞 (STO 細胞) (左) 及び bFGF 発現ベクターを導入した STO 細胞 (右) 上で培養した Fbx15 ^{β geo/ β geo} マウス由来の MEF に、4 因子 (上段) 又は c-Myc 以外の 3 因子 (下段) をレトロウイルスにて導入した。2 週間、G418 による選択を行い、クリスタルブルーで染色後、写真撮影を行った。数字はコロニー数を表す。

図 1 2 は、Nanog-EGFP-IRES-Puro マウスを用いた実験について説明した図である。A. マウス Nanog 遺伝子を中央に含む大腸菌人工染色体 (BAC) を単離し、Nanog のコードリング領域の上流に EGFP-IRES-Puro カセットをリコンビニアリングにより挿入した。B. 改変 BAC からトランスジェニックマウスを作製した。GFP の発現は胚盤胞の内部細胞塊や、生殖腺に限局して認められた。

図 1 3 は、Nanog-EGFP-IRES-Puro マウスを用いた実験について説明した図である。Nanog-EGFP-IRES-Puro マウスの胎児 (受精後 13.5 日) から、頭部、内臓、及び生殖腺を除去し、MEF を樹立した。セルソーターによる解析の結果、Nanog-EGFP-IRES-Puro マウス由来の MEF (Nanog) においても、Fbx15 ^{β geo/ β geo} マウス由来の MEF (Fbx15) や野生型マウス由来の MEF (Wild) と同様に、GFP 陽性細胞はほとんど存在しなかった。

図 1 4 は、Nanog-EGFP-IRES-Puro マウス MEF (左) 及び Fbx15 ^{β geo/ β geo} マウス MEF (右) から樹立した iPS 細胞の写真である。それぞれピューロマイシン及び G418 で選択した。

図 1 5 は、iPS 細胞の増殖の結果を示した図である。ES 細胞、Nanog-EGFP-IRES-Puro マウス MEF (左) 由来の iPS 細胞 (Nanog iPS) 及び Fbx15 ^{β geo/ β geo} マウス MEF 由来の iPS 細胞 (Fbx iPS) をそれぞれ 10 万個ずつ 24 ウェルプレートにまき、3 日ごとに継代し、細胞数を測定した結果を示した。数字は倍加時間の平均を表す。

図 1 6 は、iPS 細胞の遺伝子発現を示した図である。MEF、ES 細胞、Nanog-EGFP-IRES-Puro マウス MEF (左) 由来の iPS 細胞 (Nanog iPS) 及び Fbx15 ^{β geo/ β geo} マウス MEF 由来の iPS 細胞 (Fbx iPS) におけるマーカー遺伝子の発現を

RT-PCR にて解析した。下の数字は、継代数を表す。

図 1 7 は、Nanog iPS 細胞からの奇形腫形成を示した図である。100 万個の ES 細胞又は Nanog iPS 細胞をヌードマウスの背部に皮下注射し、3 週間後にできた腫瘍の外観（左）及び組織像（右、H&E 染色）を示す。

図 1 8 は、Nanog iPS 細胞からのキメラマウスの作成を示した図である。Nanog iPS 細胞（クローン NPMF4EK-24、継代数 6）を胚盤胞に移植し、誕生したキメラマウス。90 個の移植胚から 4 匹のキメラマウスが誕生した。

図 1 9 は、Nanog iPS 細胞からのジャームライントランスミッションを示した図である。図 1 8 に示すキメラマウスと C57BL/6 マウスの交配により誕生したマウスをゲノム DNA を PCR 解析したところ、すべてのマウスにおいて Oct3/4 と Klf4 のトランスジーンが存在していたことから、ジャームライントランスミッションが確認された。

図 2 0 は、iPS 細胞からの神経細胞分化誘導を示した図である。皮膚線維芽細胞由来 iPS 細胞から *in vitro* で分化させた神経細胞（上、 β III チュブリン陽性）、オリゴデンドロサイト（左、O4 陽性）、アストロサイト（右、GFAP 陽性）を示す。

図 2 1 は、薬剤選択を用いない iPS 細胞の樹立について説明した図である。MEF を 10cm ディッシュあたり 1 万から 10 万個まき、4 因子をレトロウイルスで導入した。コントロール（Mock）ではコロニーは生じなかったが（左）、4 因子を導入したディッシュでは扁平な形質転換コロニーに加えて、盛り上がった iPS 細胞に類似したコロニーが得られた（中央）。これらを継代培養すると、iPS 細胞に類似した細胞が得られた（右）。

図 2 2 は、薬剤選択無しで樹立した細胞の遺伝子発現を示した図である。図 2 1 に示す樹立した細胞から RNA を抽出し、ES 細胞マーカー遺伝子の発現を、RT-PCR にて解析した。

図 2 3 は、ヒト線維芽細胞由来の iPS 細胞様細胞を示した図である。ヒト胎児由来線維芽細胞に 4 因子のヒト相同遺伝子をレトロウイルスで導入し、得られたコロニー（左）、及び 2 回継代後の細胞（右）を示す。

図 2 4 は、ヒト成体皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞の樹立を示した図である。マウスレトロウイルス受容体をレンチウイルスで感染させたヒト成体皮膚線維芽細胞に、左段に示した因子をレトロウイルスで導入した。写真はウイルス感染後 8 日目の位相差像（対物 x 1 0）を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の核初期化因子は、下記の 3 種類の遺伝子：Oct ファミリー遺伝子、Klf ファミリー遺伝子、及び Myc ファミリー遺伝子の各遺伝子産物を含むことを特徴としており、好ましい態様では、上記の 3 種の遺伝子に加えて Sox ファミリー遺伝子の遺伝子産物を含むことを特徴としている。

本発明の核初期化因子を確認する手段としては、例えば、国際公開 WO 2005/80598 に記載された核初期化因子のスクリーニング方法を利用することができる。上記刊行物の全ての開示を参照により本明細書の開示に含める。当業者は上記刊行物を参照することにより核初期化因子をスクリーニングし、本発明の初期化因子の存在及び作用を確認することができる。

例えば、初期化現象を容易に観察する実験系として Fbx15 遺伝子座に β geo（ベータガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子）をノックインしたマウスを利用することができる。その詳細を本明細書の実施例に示した。マウス Fbx15 遺伝子は ES 細胞や初期胚などの分化多能性細胞において特異的に発現する遺伝子である。マウス Fbx15 遺伝子に β geo をノックインし、Fbx15 の機能を欠失したホモ変異マウスでは、通常、分化多能性や発生を含めて異常な表現型は観察されない。このマウスにおいては、 β geo が Fbx15 遺伝子のエンハンサーやプロモーターにより発現制御されており、分化した体細胞では β geo は発現せず、G418 に感受性を示す。一方、 β geo をノックインしたホモ変異 ES 細胞は極めて高濃度（12 mg/ml 以上）の G418 に耐性を示す。この現象を利用し、体細胞の初期化を可視化するため実験系を構築することができる。

上記実験系を利用して、まず β geo をノックインしたホモ変異マウスの胎児（受

精後 13.5 日) から線維芽細胞 (Fbx15 ^{β geo/ β geo} の MEF) を単離することができる。MEF は Fbx15 遺伝子を発現しないため、 β geo も発現せず、G418 に感受性を示す。ところが、この MEF と遺伝子操作を加えていない ES 細胞 (やはり G418 に感受性を示す) を融合させると、MEF の核が初期化する結果、 β geo が発現して G418 耐性となる。従って、この実験系を利用することにより、初期化現象を G418 耐性に置き換えて可視化できる。

上記の実験系を用いて核初期化因子を選択することができる。核初期化因子に関連する遺伝子の候補として、ES 細胞で特異的な発現を示す遺伝子及び ES 細胞の分化多能性維持における重要な役割が示唆される遺伝子を複数選択し、それらの候補遺伝子が単独で、あるいは適宜組み合わせることにより核初期を惹起するか否かを確認することができる。例えば、選択された 1 次候補遺伝子を全て組み合わせることにより分化細胞を ES 細胞に近い状態に初期化誘導できることを確認した後、その組み合わせのなかから 1 個ずつの遺伝子を除いた組み合わせを用意して同様の作用を確認し、その遺伝子が存在しない場合に初期化誘導能が減弱し、あるいは初期化誘導能が失われる 2 次候補遺伝子を選択することができる。そのようにして選択された 2 次候補遺伝子について同様のステップを繰り返すことにより、必須の核初期化遺伝子の組み合わせを選択することができ、Oct ファミリー遺伝子、Klf ファミリー遺伝子、及び Myc ファミリー遺伝子の 3 種の遺伝子の遺伝子産物の組み合わせが核初期化因子として作用することを確認することができ、さらにこれらの 3 種類の遺伝子の遺伝子産物に加えて Sox ファミリー遺伝子の遺伝子産物を組み合わせが核初期化因子として極めて優れた性質を有することを確認することができる。核初期化因子の選択方法の具体例は本明細書の実施例に具体的に示されており、当業者は上記の一般的説明及び実施例の具体的説明を参照することにより、これら 3 種の遺伝子の組み合わせが体細胞の初期化を誘導すること、及びこれら 3 種の遺伝子産物の組み合わせが核初期化に必須であることを容易に確認することができる。

本発明により提供される核初期化因子は、少なくとも Oct ファミリー遺伝子、Klf

ファミリー遺伝子、及び Myc ファミリー遺伝子の遺伝子産物の組合せを含み、例えば Oct3/4、Klf4、及び c-Myc の 3 種の遺伝子の遺伝子産物の組み合わせを含む。Oct ファミリー遺伝子としては、例えば、Oct3/4、Oct1A、及び Oct6などを挙げる
ことができる。Oct3/4 は POU ファミリーに属する転写因子であり、未分化マーカーとして報告されている (K. Okamoto et al., Cell, 60, pp461-72, 1990)。また、Oct3/4 は多能性維持に関与しているとの報告もある (J. Nichols et al., Cell, 95, pp379-91, 1998)。Klf ファミリー遺伝子としては、Klf1、Klf2、Klf4、及び Klf5
などを挙げる
ことができる。Klf4 (Kruppel like factor-4) は腫瘍抑制因子として報告されている (A. M. Ghaleb et al., Cell Res., 15, pp92-6, 2005)。Myc
ファミリー遺伝子としては、c-Myc、N-Myc、及び L-Mycなどを挙げる
ことができる。c-Myc は細胞の分化及び増殖に関与する転写制御因子であり (S. Adhikary, M. Eilers, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 6, pp635-45, 2005)、多能性維持に関与し
ているとの報告がある (P. Cartwright et al., Development, 132, pp885-96, 2005)。Oct3/4、Klf4、及び c-Myc 以外の各ファミリー遺伝子の NCBI アセッション番号は
以下のとおりである。

表 1

		マウス	ヒト
Klf1	Kruppel-like factor 1 (erythroid)	NM_010635	NM_006563
Klf2	Kruppel-like factor 2 (lung)	NM_008452	NM_016270
Klf5	Kruppel-like factor 5	NM_009769	NM_001730
c-Myc	myelocytomatosis oncogene	NM_010849	NM_002467
N-Myc	v-Myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	NM_008709	NM_005378
L-Myc	v-Myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived (avian)	NM_008506	NM_005376
Oct1A	POU domain, class 2, transcription factor 1	NM_198934	NM_002697
Oct6	POU domain, class 3, transcription factor 1	NM_011141	NM_002699

これらの遺伝子はいずれもヒトを含む哺乳類動物において共通して存在する遺伝子であり、本発明において上記遺伝子産物を利用するためには、任意の哺乳類動物由来（例えばマウス、ラット、ウシ、ヒツジ、ウマ、サルなどの哺乳類動物由来）の遺伝子を用いることが可能である。また、野生型の遺伝子産物のほか、数個（例えば1～10個、好ましくは1～6個、より好ましくは1～4個、さらに好ましくは1～3個、特に好ましくは1又は2個）のアミノ酸が置換、挿入、及び／又は欠失した変異遺伝子産物であって、野生型の遺伝子産物と同様の機能を有する遺伝子産物も利用可能である。例えば、c-Myc の遺伝子産物としては野生型のほか安定型 (T58A) などを用いてもよい。他の遺伝子産物についても同様である。

本発明の核初期化因子は、上記の 3 種の遺伝子産物のほか、他の遺伝子産物を含むことができる。そのような遺伝子産物として、Sox ファミリー遺伝子の遺伝子産物を挙げるることができる。Sox ファミリー遺伝子としては、例えば、Sox1、Sox3、Sox7、Sox15、Sox17、及び Sox18、好ましくは Sox2 を挙げるることができる。少なくとも Oct ファミリー遺伝子(例えば Oct3/4)、Klf ファミリー遺伝子(例えば Klf4)、Myc ファミリー遺伝子(例えば c-Myc)、及び Sox ファミリー遺伝子(例えば Sox2)の 4 種の遺伝子の遺伝子産物の組み合わせを含む核初期化因子は初期化の効率の観点から本発明の好ましい態様であり、特に万能性の獲得のために Sox ファミリー遺伝子の遺伝子産物を組み合わせることが好ましい場合がある。Sox2 は初期発生過程で発現し、転写因子をコードする遺伝子である (A. A. Avilion et al., Genes Dev., 17, pp126-40, 2003)。Sox2 以外の Sox ファミリー遺伝子の NCBI アセッション番号は以下のとおりである。

表 2

		マウス	ヒト
Sox1	SRY-box containing gene 1	NM_009233	NM_005986
Sox3	SRY-box containing gene 3	NM_009237	NM_005634
Sox7	SRY-box containing gene 7	NM_011446	NM_031439
Sox15	SRY-box containing gene 15	NM_009235	NM_006942
Sox17	SRY-box containing gene 17	NM_011441	NM_022454
Sox18	SRY-box containing gene 18	NM_009236	NM_018419

また、Myc ファミリー遺伝子の遺伝子産物はサイトカインで置き換えることができる場合がある。サイトカインとしては、例えば、SCF 又は bFGF などが好ましいが、これらに限定されることはない。

さらに好ましい態様として、上記の 3 種類の遺伝子産物、好ましくは上記の 4 種類の遺伝子産物に加えて、細胞の不死化を誘導する因子をあげることができる。

たとえば、TERT 遺伝子の遺伝子産物を含む因子と、下記の遺伝子：SV40 Large T antigen、HPV16 E6、HPV16 E7、及び Bmil からなる群から選ばれる 1 種以上の遺伝子の遺伝子産物を含む因子を、組み合わせることを挙げることができる。TERT は DNA 複製時における染色体末端テロメア構造維持のために必須であり、ヒトでは幹細胞や腫瘍細胞では発現するが、多くの体細胞においては発現が認められない (I. Horikawa, et al., Proc Natl Acad Sci USA. 102, pp18437-442, 2005)。SV40 Large T antigen、HPV16 E6、HPV16 E7、または Bmil は、Large T antigen と組み合わせることにより、ヒト体細胞の不死化をもたらすことが報告されている (S. Akimov et al., Stem Cells, 23, pp1423-1433, 2005; P. Salmon et al., Mol. Ther., 2, pp404-414, 2000)。これらの因子は、特にヒト細胞から iPS 細胞を誘導する場合において極めて有用である。TERT および Bmil 遺伝子の NCBI アセッション番号は以下のとおりである。

表 3

		マウス	ヒト
TERT	telomerase reverse transcriptase	NM_009354	NM_198253
Bmil	B lymphoma Mo-MLV insertion region 1	NM_007552	NM_005180

さらに、下記の群：Fbx15、Nanog、ERas、ECAT15-2、Tcl1、及び β -catenin からなる群から選ばれる遺伝子のうちの 1 種又は 2 種以上を遺伝子産物を組み合わせてもよい。初期化の効率の観点から特に好ましい態様として、Fbx15、Nanog、ERas、ECAT15-2、Tcl1、及び β -catenin の遺伝子産物を上記 4 種類の遺伝子産物と組み合わせた合計 10 種類の遺伝子産物を含む核初期化因子を挙げることができる。Fbx15 (Y. Tokuzawa et al., Mol Cell Biol., 23, pp2699-708, 2003)、Nanog (K. Mitsui et al., Cell, 113, pp631-42, 2003)、ERas (K. Takahashi, K. Mitsui, S. Yamanaka, Nature, 423, pp541-5, 2003)、及び ECAT15-2 (A. Bortvin et al.,

Development, 130, pp1673-80, 2003) は ES 細胞特異的発現遺伝子であり、Tcl1 は Akt の活性化に関与しており (A. Bortvin et al., Development, 130, pp1673-80, 2003)、 β -catenin は Wnt シグナル伝達経路の重要な構成因子であり、多能性維持に関与しているとの報告もある (N. Sato et al, Nat. Med., 10, pp55-63, 2004)。

さらに、本発明の核初期化因子は、例えば、下記の群：ECAT1、Esg1、Dnmt3L、ECAT8、Gdf3、Sox15、ECAT15-1、Fthl17、Sall4、Rex1、UTF1、Stella、Stat3、及び Grb2 からなる群から選ばれる 1 種以上の遺伝子の遺伝子産物を含んでいてもよい。ECAT1、Esg1、ECAT8、Gdf3、及び ECAT15-1 は ES 細胞特異的発現遺伝子であり (K. Mitsui et al., Cell, 113, pp631-42, 2003)、Dnmt3L は DNA メチル化酵素関連因子であり、Sox15 は初期発生過程で発現し転写因子をコードする一群の遺伝子である (M. Maruyama et al., J Biol Chem., 280, pp24371-9, 2005)。Fthl17 は Ferritin heavy polypeptide-like 17 をコードしており (A. colloriot, T. Boon, C. De Smet, Int J Cancer, 105, pp371-6, 2003)、Sall4 は胚性幹細胞で高発現する Zn フィンガータンパク質をコードしており (J. Kohlhase et al., Cytogenet Genome Res., 98, pp274-7, 2002)、Rex1 は Oct3/4 の下流にある転写因子をコードしており (E. Ben-Shushan, J. R. Thompson, L. J. Gudas, Y. Bergman, Mol Cell Biol., 18, pp1866-78, 1998)。UTF1 は Oct3/4 の下流に位置する転写補助因子であり、これを抑制すると ES 細胞の増殖を抑制するとの報告がある (A. Okuda et al., EMBO J., 17, pp2019-32, 1998)。Stat3 は細胞増殖・分化のシグナル因子であり、Stat3 の活性化により LIF が働き、多能性維持に重要な役割を果たしている (H. Niwa, T. Burdon, I. Chambers, A. Smith, Genes Dev., 12, pp2048-60, 1998)。Grb2 は細胞膜に存在するさまざまな成長因子受容体と Ras/MAPK カスケードとの間を仲介するタンパク質をコードしている (A. M. Cheng et al., Cell, 95, pp 793-803, 1998)。

もっとも、本発明の核初期化因子に含むことができる遺伝子産物は上記に具体的に説明した遺伝子の遺伝子産物に限定されることはない。本発明の核初期化因子には、核初期化因子として機能することができる他の遺伝子産物のほか、分化、発生、

又は増殖などに関係する因子あるいはその他の生理活性を有する因子を 1 又は 2 以上含むことができ、そのような態様も本発明の範囲に包含されることは言うまでもない。核初期化因子として機能することができる他の遺伝子産物は、例えば、Oct3/4、Klf4、及び c-Myc の 3 種の遺伝子のうち 1 種又は 2 種のみを発現させた体細胞を用い、この細胞に対して核初期化を誘導することができる遺伝子産物をスクリーニングすることによって特定することができる。本発明により、新たな核初期化因子のスクリーニング方法として上記のスクリーニング方法も提供される。

また、本発明の核初期化因子に含まれる遺伝子産物は、例えば上記遺伝子から産生されるタンパク質自体のほか、該タンパク質とその他のタンパク質又はペプチドなどとの融合遺伝子産物の形態であってもよい。例えば、緑色蛍光タンパク質 (GFP) との融合タンパク質やヒスチジインタグなどのペプチドとの融合遺伝子産物を用いることもできる。また、HIV ウイルスに由来する TAT ペプチドとの融合タンパク質を調製して用いることにより、細胞膜からの核初期化因子の細胞内取り込みを促進させることができ、遺伝子導入などの煩雑な操作を回避して、融合タンパク質を培地に添加するだけで初期化を誘導することが可能になる。このような融合遺伝子産物の調製方法は当業者によく知られているので、当業者は目的に応じて適宜の融合遺伝子産物を容易に設計して調製することが可能である。

本発明の核初期化因子を用いて体細胞の核を初期化して誘導多能性幹細胞を得ることができる。本明細書において「誘導多能性幹細胞」とは ES 細胞に近い性質を有する細胞のことであり、より具体的には、未分化細胞であって多能性及び増殖能を有する細胞を包含するが、この用語をいかなる意味においても限定的に解釈してはならず、最も広義に解釈する必要がある。核初期化因子を用いて誘導多能性幹細胞を調製する方法については国際公開 W02005/80598 に説明されており（上記公報においては ES 様細胞という用語が用いられている）、誘導多能性幹細胞の分離手段についても具体的に説明されている。従って、当業者は上記刊行物を参照することにより、本発明の核初期化因子を用いて誘導多能性幹細胞を容易に調製することが可能である。

本発明の核初期化因子を用いて体細胞から誘導多能性幹細胞を調製する方法は特に限定されず、体細胞及び誘導多能性幹細胞が増殖可能な環境において核初期化因子が体細胞と接触可能であれば、いかなる方法を採用してもよい。例えば、本発明の核初期化因子に含まれる遺伝子産物を培地中に添加してもよく、あるいは本発明の核初期化因子を発現可能な遺伝子を含むベクターを用いて該遺伝子を体細胞に導入するなどの手段を採用してもよい。このようなベクターを用いる場合には、ベクターに 2 種以上の遺伝子を組み込んでそれぞれの遺伝子産物を体細胞において同時に発現させてもよい。初期化すべき体細胞において本発明の核初期化因子に含まれる遺伝子産物の 1 種又は 2 種以上がすでに発現されている場合には、本発明の核初期化因子から該遺伝子産物を除くこともできるが、このような態様も本発明の範囲に包含されることは言うまでもない。

本発明の核初期化因子を用いて誘導多能性幹細胞を調製するにあたり、初期化すべき体細胞の種類は特に限定されず、任意の体細胞を利用することができる。例えば、胎児期の体細胞のほか、成熟した体細胞を用いてもよい。誘導多能性幹細胞を疾病の治療に用いる場合には、患者から分離した体細胞を用いることが望ましく、例えば、疾病に関与する体細胞や疾病治療に関与する体細胞などを用いることができる。本発明の方法により培地中に出現した誘導多能性幹細胞を選択する方法も特に限定されず、例えば、マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子などを用いて薬剤耐性を指標として誘導多能性幹細胞を分離するなどの周知の手段を適宜採用できる。ES 細胞の未分化性及び多能性を維持可能な培地又はその性質を維持することができない培地は当業界で種々知られており、適宜の培地を組み合わせることで、誘導多能性幹細胞を効率よく分離することができる。分離された誘導多能性幹細胞の分化能及び増殖能は ES 細胞について汎用されている確認手段を利用することにより当業者が容易に確認可能である。

本発明の方法により調製される誘導多能性幹細胞の用途は特に限定されず、ES 細胞を利用して行われているあらゆる試験・研究や ES 細胞を用いた疾病の治療などに使用することができる。例えば、本発明の方法により得られた誘導多能性幹細胞

胞をレチノイン酸、EGF などの増殖因子、又はグルコルチコイドなどで処理することにより、所望の分化細胞（例えば神経細胞、心筋細胞、血球細胞など）を誘導することができ、そのようにして得られた分化細胞を患者に戻すことにより自家細胞移植による幹細胞療法を達成することができる。もっとも、本発明の誘導多能性幹細胞の用途は上記の特定の態様に限定されることはない。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例 1：初期化因子の選択

初期化因子を同定するためには初期化現象を容易に観察する実験系が必要である。実験系として Fbx15 遺伝子座に β geo（ベータガラクトシダーゼとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子）をノックインしたマウスを利用した。マウス Fbx15 遺伝子は ES 細胞や初期胚といった分化多能性細胞において特異的に発現する遺伝子である。しかしマウス Fbx15 遺伝子に β geo をノックインし、Fbx15 の機能を欠失したホモ変異マウスにおいては、分化多能性や発生を含めて異常な表現型は観察されなかった。このマウスにおいては、 β geo が Fbx15 遺伝子のエンハンサーやプロモーターにより発現制御される。すなわち、分化した体細胞では β geo は発現せず、G418 に感受性を示す。一方、 β geo をノックインしたホモ変異 ES 細胞は極めて高濃度（12 mg/ml 以上）の G418 に耐性を示す。この現象を利用し、体細胞の初期化を可視化する実験系を構築した。

上記実験系において、まず β geo をノックインしたホモ変異マウスの胎児（受精後 13.5 日）から線維芽細胞（Fbx15 ^{β geo/ β geo} の MEF）を単離した。MEF は Fbx15 遺伝子を発現しないため、 β geo も発現せず、G418 に感受性を示す。一方、この MEF と遺伝子操作を加えていない ES 細胞（やはり G418 に感受性を示す）を融合させると、MEF の核が初期化する結果、 β geo が発現して G418 耐性となる。すなわち、この実験系により初期化現象を G418 耐性に置き換えて可視化できる（国際公開 WO

2005/80598)。上記実験系を用いて初期化因子の探索を行ない (図 1)、初期化因子の候補として ES 細胞で特異的な発現を示す遺伝子、及び ES 細胞の分化多能性維持における重要な役割が示唆される遺伝子を合計 24 種類選択した。これらの遺伝子を下記の表 4 及び表 5 に示す。なお#21 の β -catenin 及び#22 の c-Myc に関しては活性型の変異体 (catenin: S33Y, c-Myc: T58A) を用いた。

表 4

番号	遺伝子名	遺伝子の説明
1	ECAT1	ES cell associated transript 1 (ECAT1)
2	ECAT2	developmental pluripotency associated 5 (DPPA5), ES cell specific gene 1 (ESG1)
3	ECAT3	F-box protein 15 (Fbx15),
4	ECAT4	homeobox transcription factor Nanog
5	ECAT5	ES cell expressed Ras (ERas),
6	ECAT7	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-like (Dnmt3l), valiant 1
7	ECAT8	ES cell associated transcript 8 (ECAT8)
8	ECAT9	growth differentiation factor 3 (Gdf3),
9	ECAT10	SRY-box containing gene 15 (Sox15),
10	ECAT15-1	developmental pluripotency associated 4 (Dppa4), variant 1
11	ECAT15-2	developmental pluripotency associated 2 (Dppa2),
12	Fthl17	ferritin, heavy polypeptide-like 17 (Fthl17),
13	Sall4	sal-like 4 (Drosophila) (Sall4), transcript variant a

表 4 (続き)

14	Oct3/4	POU domain, class 5, transcription factor 1 (Pou5f1),
15	Sox2	SRY-box containing gene 2 (Sox2),
16	Rex1	zinc finger protein 42 (Zfp42),
17	Utf1	undifferentiated embryonic cell transcription factor 1 (Utf1)
18	Tcl1	T-cell lymphoma breakpoint 1 (Tcl1),
19	Stella	developmental pluripotency-associated 3 (Dppa3),
20	Klf4	Kruppel-like factor 4 (gut) (Klf4),
21	β -catenin	catenin (cadherin associated protein), beta 1, 88kDa (Ctnnb1)
22	c-Myc	myelocytomatosis oncogene (Myc),
23	Stat3	signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3), transcript variant 1
24	Grb2	growth factor receptor bound protein 2 (Grb2),

表 5

NCBI accession number

番号	遺伝子名	特徴	Mouse	Human
1	ECAT1	ES 細胞特異的発現遺伝子	AB211060	AB211062
2	ECAT2	ES 細胞特異的発現遺伝子	NM_025274	NM_001025290
3	ECAT3	ES 細胞特異的発現遺伝子	NM_015798	NM_152676
4	ECAT4	ホメオドメインを有する転写因子、 分化多能性維持の必須因子	AB093574	NM_024865

表 5 (続き)

5	ECAT5	Ras ファミリー蛋白質、ES 細胞の増殖促進因子	NM_181548	NM_181532
6	ECAT7	DNA メチル化酵素関連因子 インプリンテイングに必須	NM_019448	NM_013369
7	ECAT8	ES 細胞特異的発現遺伝子、Tudor ドメインを有する	AB211061	AB211063
8	ECAT9	ES 細胞特異的発現遺伝子、TGF β ファミリーに属する	NM_008108	NM_020634
9	ECAT10	ES 細胞特異的発現遺伝子、SRY ファミリー転写因子	NM_009235	NM_006942
10	ECAT15-1	ES 細胞特異的発現遺伝子	NM_028610	NM_018189
11	ECAT15-2	ES 細胞特異的発現遺伝子	NM_028615	NM_138815
12	Fthl17	ES 細胞特異的発現遺伝子、フェリチン重鎖に類似する	NM_031261	NM_031894
13	Sall4	ES 細胞特異的発現遺伝子、Zn フィンガー蛋白質	NM_175303	NM_020436
14	Oct3/4	POU ファミリー転写因子、多能性維持に必須	NM_013633	NM_002701
15	Sox2	SRY ファミリー転写因子、多能性維持に必須	NM_011443	NM_003106
16	Rex1	ES 細胞特異的発現遺伝子、Zn フィンガー蛋白質	NM_009556	NM_174900
17	Utf1	ES 細胞で高発現する転写調節因子、ES 細胞の増殖を促進する	NM_009482	NM_003577

表 5 (続き)

18	Tcl1	AKT を活性化する癌遺伝子。ES 細胞で高発現する	NM_009337	NM_021966
19	Stella	ES 細胞特異的発現遺伝子	NM_139218	NM_199286
20	Klf4	ES 細胞で高発現する。癌抑制遺伝子及び癌遺伝子の両方の作用が報告されている	NM_010637	NM_004235
21	β -catenin	Wnt シグナルで活性化される転写因子。多能性維持への関与が報告されている。	NM_007614	NM_001904
22	c-Myc	細胞の増殖、分化に関与する転写制御因子及び癌遺伝子。多能性維持への関与が報告されている	NM_010849	NM_002467
23	Stat3	LIF シグナルで活性化される転写因子。マウス ES 細胞の多能性維持に必須とされる	NM_213659	NM_139276
24	Grb2	成長因子受容体と Ras/MAPK カスケードを仲介するアダプター蛋白質。	NM_008163	NM_002086

これらの遺伝子の cDNA をレトロウイルスベクター pMX-gw に Gateway テクノロジーにより挿入した。まず 24 遺伝子の一つずつ Fbx15 ^{β geo/ β geo} の MEF に感染させ、その後、ES 細胞培養条件で G418 選択を行った。しかし G418 耐性コロニーは一つも得られなかった。次に、全 24 遺伝子のレトロウイルスを同時に Fbx15 ^{β geo/ β geo} の MEF に感染させた。ES 細胞培養条件で G418 選択を行ったところ、複数の薬剤耐性コロニーが得られた。これらのコロニーを単離し培養を継続した。これらの細胞は長期間にわたって培養が可能であり、また ES 細胞に類似した形態を示すことが分かった (図 2)。図中、iPS 細胞は誘導多能性幹細胞 (ES 様細胞、ES-like 細胞、ESL

細胞とも呼ぶ)、ES は胚性幹細胞を示し、MEF は分化細胞 (胎児線維芽細胞) を示す。

マーカー遺伝子の発現を RT-PCR により検討したが、Nanog、Oct3/4 などの未分化マーカーが発現していた (図 3)。Nanog の発現は ES 細胞に近いが、Oct3/4 の発現は ES 細胞より低いことがわかった。また、DNA メチル化状態をバイサルファイトシーケンス法で確認したが、Nanog 遺伝子や Fbx15 遺伝子は MEF において高メチル化状態にあるが、iPS 細胞においては脱メチル化されていることがわかった (図 4)。インプリンティング遺伝子である IGF2 遺伝子は MEF と iPS 細胞の両方で約 50% がメチル化されていた。Fbx15^{βgeo/βgeo} の MEF を採取した受精後 13.5 日の始原生殖細胞においてはインプリンティング記憶が消去され IGF2 遺伝子はほぼ完全に脱メチル化されていることが知られているので、iPS 細胞は Fbx15^{βgeo/βgeo} の MEF に混入していた始原生殖細胞に由来するものではないと結論された。以上の結果より、24 種類の因子の組み合わせにより、分化細胞 (MEF) を ES 細胞に近い状態に初期化誘導できることが示された。

次に、24 種類の遺伝子の全てが初期化のために必要であるか否かを検討した。1 遺伝子ずつ除外した 23 遺伝子を Fbx15^{βgeo/βgeo} の MEF に感染させた。その結果、10 遺伝子については、それを除外した時に、コロニーの形成が阻害されることがわかった (図 5 : 遺伝子の番号は表 4 に示した遺伝子の番号に対応しており、#3、#4、#5、#11、#14、#15、#18、#20、#21、及び#22 の 10 種類の遺伝子である)。これらの 10 遺伝子を同時に Fbx15^{βgeo/βgeo} の MEF に感染させたところ、24 遺伝子を同時に感染させた場合に比して有意に効率よく G418 耐性コロニーが得られた。

さらに、この 10 遺伝子から 1 遺伝子ずつ除外した 9 遺伝子を Fbx15^{βgeo/βgeo} の MEF に感染させた。その結果、4 種の遺伝子 (#14、#15、#20、又は#22) をそれぞれ除外した場合には G418 耐性の iPS 細胞コロニーが形成されないことがわかった (図 6)。従って、10 遺伝子のうち、これら 4 種の遺伝子が初期化誘導にとって特に重要な役割を果たすことが示唆された。

例 2 : 4 種類の遺伝子群の組合せによる初期化誘導

10種類の遺伝子群のなかで特に重要性が示唆された4遺伝子により体細胞の初期化の誘導が可能であるか否かを検討した。Fbx15 遺伝子に β geo をノックインした MEF 細胞に上記 10 種類の遺伝子の組み合わせ、上記 4 種類の遺伝子の組み合わせ、上記 4 種類のうち 3 種類のみ遺伝子の組み合わせ、及び上記 4 種類のうち 2 種類のみ遺伝子の組み合わせを用いて、これらの遺伝子群をレトロウイルスにより体細胞に導入した。その結果、4 種類の遺伝子を導入した場合には 160 個の G418 耐性コロニーが得られた。この結果は、10 種類の遺伝子を導入した場合の結果（179 コロニー）とほぼ同数であったが、4 遺伝子導入の場合には 10 遺伝子導入の場合に比べてコロニーが小さかった。また、これらのコロニーを継代培養した場合、iPS 細胞の形態を示したコロニーは 10 遺伝子導入の場合に 12 クローン中 9 クローンであったのに対して、4 遺伝子導入の場合には 12 クローン中 7 クローンと若干少ない傾向にあった。4 遺伝子としては、マウス由来のもの、ヒト由来のもの、どちらでもほぼ同じ数の iPS 細胞が得られた。

上記 4 遺伝子の中から選択された 3 遺伝子を導入した場合、ある組合せ（#14、#15 及び #20）では 36 個の扁平なコロニーが得られたが、継代培養しても iPS 細胞は観察されなかった。別の組合せ（#14、#20、及び #22）では 54 個の小さいコロニーが得られた。これらのうち、比較的大きいコロニーを 6 つ継代培養したところ、6 クローンのすべてで ES 細胞に類似した細胞が得られた。しかしながら、ES 細胞に比べると細胞同士や培養シャーレへの接着が弱いと思われた。また細胞増殖の速度も 4 遺伝子を導入した場合に比べて遅かった。また 4 遺伝子 3 遺伝子の他の 2 通りの組み合わせではそれぞれ 1 つずつコロニーが形成されたが、継代培養しても細胞の増殖は認められなかった。4 遺伝子のなかから選択された 2 遺伝子の組み合わせ（6 通り）では、いずれの場合にも G418 耐性コロニーが 1 つも形成されなかった。以上の結果を図 7 に示す。

また、図 10 には ES 細胞マーカー遺伝子の発現を RT-PCR で確認した結果を示した。方法の詳細は以下のとおりである。Fbx15 ^{β geo/ β geo} の MEF に 3 遺伝子 (Oct3/4、Klf4 及び c-Myc、Sox2 minus と表記)、4 遺伝子（3 遺伝子に Sox2 を加えたも

の、4ECAT と表記)、10 遺伝子 (4 遺伝子に表 1 の#3、#4、#5、#11、#18、#21 を加えたもの、10ECAT と表記) を導入し樹立した iPS 細胞、Fbx15 遺伝子に β geo をノックインした成体マウスの尾部皮膚より樹立した線維芽細胞に 10 遺伝子を導入して樹立した iPS 細胞 (10ECAT Skin fibroblast と表記)、マウス ES 細胞及び遺伝子導入していない MEF 細胞より Total RNA を精製し、DNaseI 処理によりゲノム DNA の混入を除去した。逆転写反応により First strand cDNA を作成し、PCR により ES 細胞マーカー遺伝子の発現を検討した。なお Oct3/4、Nanog、ERas に関しては導入したレトロウイルスからではなく、内在性遺伝子からの転写産物のみを増幅するプライマーを用いて PCR を行った。プライマー配列を表 6 に示す。

表 6

ECAT1	ECAT1-RT-S	TGT GGG GCC CTG AAA GGC GAG CTG AGA T
	ECAT1-RT-AS	ATG GGC CGC CAT ACG ACG ACG CTC AAC T
Esg1	pH34-U38	GAA GTC TGG TTC CTT GGC AGG ATG
	pH34-L394	ACT CGA TAC ACT GGC CTA GC
Nanog	6047-S1	CAG GTG TTT GAG GGT AGC TC
	6047-AS1	CGG TTC ATC ATG GTA CAG TC
ERas	45328-S118	ACT GCC CCT CAT CAG ACT GCT ACT
	ERas-AS304	CAC TGC CTT GTA CTC GGG TAG CTG
Gdf3	Gdf3-U253	GTT CCA ACC TGT GCC TCG CGT CTT
	GDF3 L16914	AGC GAG GCA TGG AGA GAG CGG AGC AG

表 6 (続き)

Fgf4	Fgf4-RT-S	CGT GGT GAG CAT CTT CGG AGT GG
	Fgf4-RT-AS	CCT TCT TGG TCC GCC CGT TCT TA
Cripto	Cripto-S	ATG GAC GCA ACT GTG AAC ATG ATG TTC GCA
	Cripto-AS	CTT TGA GGT CCT GGT CCA TCA CGT GAC CAT
Zfp296	Zfp296-S67	CCA TTA GGG GCC ATC ATC GCT TTC
	Zfp296-AS350	CAC TGC TCA CTG GAG GGG GCT TGC
Dax1	Dax1-S1096	TGC TGC GGT CCA GGC CAT CAA GAG
	Dax1-AS1305	GGG CAC TGT TCA GTT CAG CGG ATC
Oct3/4	Oct3/4-S9	TCT TTC CAC CAG GCC CCC GGC TC
	Oct3/4-AS210	TGC GGG CGG ACA TGG GGA GAT CC
NAT1	NAT1 U283	ATT CTT CGT TGT CAA GCC GCC AAA GTG GAG
	NAT1 L476	AGT TGT TTG CTG CGG AGT TGT CAT CTC GTC

この図に示された結果から、3 遺伝子を導入した場合、ERas や Fgf4 は効率よく発現誘導されるが、多能性維持に必須の因子である Oct3/4 と Nanog の誘導は起こらないか、おこっても非常に弱いことがわかった。一方、4 遺伝子を導入した場合、Oct3/4 と Nanog が比較的強く誘導されているクローンが調べた 4 クローン中で 1 クローン (#7) が存在した。さらに 10 遺伝子を導入した場合は、調べた 5 クローン中、3 クローンにおいて、Oct3/4 と Nanog の強い誘導が認められた。

これらの結果から、初期化のためには少なくとも 3 遺伝子の組合せ (#14、#20、

及び#22) が必須であり、それらの 3 種の遺伝子を含む 4 遺伝子群及び 10 遺伝子群では遺伝子の数を増やすにつれて初期化の効率が上昇することが明らかとなった。

例 3：初期化した細胞の多分化能の解析

樹立した iPS 細胞の分化多能性を評価するため、24 因子、10 因子、および 4 因子で樹立された iPS 細胞をヌードマウスの皮下に移植した。その結果、ES 細胞と同様の大きさの腫瘍が全例で形成された。組織学的に見ると腫瘍は複数の種類の細胞から構成されており、軟骨組織、神経組織、筋肉組織、脂肪組織、および腸管様組織（図 8）が認められたことから、iPS 細胞の多能性が証明された。一方、3 因子で樹立した細胞をヌードマウスに移植すると腫瘍は形成されたが、組織学的には未分化細胞からのみ形成されていた。したがって、分化多能性の誘導のためには、Sox ファミリーが必須であることがわかった。

例 4：成体マウスの尾部に由来する線維芽細胞の初期化

マウス胎児線維芽細胞 (MEF) で同定した 4 因子を Fbx15 遺伝子に β geo をノックインし、さらに全身で緑色蛍光蛋白質 (GFP) を発現する成体マウスの尾部に由来する線維芽細胞に導入した。その後、フィーダー細胞上で ES 細胞培養条件と同様の条件で培養して G418 による選択を行った。薬剤選択開始後約 2 週間で複数の iPS 細胞コロニーが得られた。これらの細胞をヌードマウスの皮下に移植すると三胚葉系の様々な組織からなる奇形腫を形成した。また成体皮膚線維芽細胞に由来する iPS 細胞を胚盤胞に移植し、偽妊娠マウスの子宮に移植したところ、受精後 13.5 日目の胚において、全身で GFP 陽性細胞の分布しているものが認められた（図 9）。これは iPS 細胞が多能性を有しており、マウス胚発生に寄与できることを示している。この結果は、同定した因子群が胎児期の体細胞だけではなく成熟したマウスの体細胞に対しても初期化を誘導する能力のあることを示している。成体皮膚由来の細胞で初期化誘導できることは実用上極めて重要である。

例 5

iPS 細胞樹立におけるサイトカインの影響を検討した。フィーダー細胞 (STO

細胞)に塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)又は幹細胞因子(SCF)の発現ベクター(pMX レトロウイルスベクター)を導入し、これらのサイトカインを恒常的に発現する細胞を樹立した。Fbx15 ^{β geo/ β geo} マウス由来 MEF (50 万個/100mm ディッシュ)をこれらの STO 細胞上で培養し、4 因子を導入後 G418 による選択を行ったところ、通常の STO 細胞上で培養した時と比べて、コロニー形成数が bFGF(図 11)、SCF (data not shown) を産生する STO 細胞上では 20 倍以上上昇した。また c-Myc 以外の 3 因子を導入しても通常の STO 細胞上では iPS 細胞コロニーは精製されなかったが、bFGF (図 11)、SCF (data not shown) を産生する STO 細胞上では、コロニーの形成が認められた。これらの結果から、サイトカインの刺激により、MEF からの iPS 細胞の樹立効率が上昇すること、及び c-Myc に換えてサイトカインを用いることにより核初期化が可能になることが明らかとなった。

例 6

Oct3/4、Klf4、c-Myc、及び Sox2 遺伝子にはすべてファミリー遺伝子(表 1 及び 2)が存在する。そこで 4 遺伝子に換えてファミリー遺伝子によっても iPS 細胞が樹立できるかを検討した。表 7 に 2 回の実験の結果を合わせたものを示す。Sox ファミリーについては、Sox1 は G418 耐性コロニー数及び iPS 細胞樹立効率とともに Sox2 と同程度であった。Sox3 は G418 耐性コロニー数は Sox2 の 10 分の 1 程度であったが、ひろったコロニーからの iPS 細胞樹立効率は Sox2 よりむしろ高かった。Sox15 は G418 耐性コロニー数及び iPS 細胞樹立効率とともに Sox2 より低かった。Sox17 は G418 耐性コロニーは Sox2 と同程度であったが、iPS 細胞樹立効率は低かった。Klf ファミリーについては、Klf2 は Klf4 より少ない G418 耐性コロニーが生じたが、iPS 細胞の樹立効率は同程度であった。Myc ファミリーについては、まず野生型の c-Myc が T58A 変異体と G418 耐性コロニー数、iPS 細胞樹立効率の両者において同程度であることを確認した。さらに N-Myc 及び L-Myc (ともに野生型)は、ともに c-Myc と G418 耐性コロニー数、iPS 細胞樹立効率の両者において同程度であった。

表 7

導入遺伝子	生じたコロニ 一数	ひろったコロニ 一数	樹立された iPS 細胞株数 iPS 細胞株数	樹立効 率 (%)
4 因子 (cMycT58A)	85	12	5	42
Sox1	84	12	7	58
Sox3	8	8	7	92
Sox15	11	11	1	8
Sox17	78	12	2	17
Klf2	11	10	5	50
c-MycWT	53	11	8	72
N-MycWT	40	12	7	58
L-MycWT	50	12	11	92
3 因子 (-Sox2)	6	6	2	17

例 7

Fbx15- β geo 以外のレポーターで iPS 細胞が樹立できるかを検討した。まず Nanog 遺伝子を中央部に含む大腸菌人工染色体 (BAC) を単離し、大腸菌内の組み換えにより、GFP 遺伝子及びピューロマイシン耐性遺伝子をノックインした (図 12A)。ついで同改変 BAC を ES 細胞に導入し、未分化状態特異的に GFP 陽性となることを確認した (data not shown)。ついで同 ES 細胞のマウス胚盤胞に移植することによりキメラマウスを経てトランスジェニックマウスを作出した。このマウスにおいては GFP 陽性細胞は胚盤胞の内部細胞塊や受精後 13.5 日胚の生殖腺において特異的に認められた (図 12B)。受精後 13.5 日胚 (DBA、129 及び C57BL/6 マウスの雑種) から生殖腺を除去し、MEF を単離した。フローサイトメトリーにより、単離した MEF は GFP 陰性であることを確認した (図 13)。この MEF に 4 因子をレトロウイルスで導入し、ピューロマイシンによる選択を行ったところ、複

数の耐性コロニーが得られた。その中の約10～20%のみがGFP陽性であった。GFP陽性コロニーを継代培養するとES細胞に類似した形態(図14)や増殖(図15)を示した。また遺伝子発現を見るとFbx15^{βgeo/βgeo}のMEFからG418選択により単離したiPS細胞より、さらにES細胞に近い発現パターンであることがわかった(図16)。この細胞をヌードマウスに移植すると奇形腫が形成されたことからiPS細胞であることが確認された(図17)。さらにNanog-GFP選択によるiPS細胞をC57BL/6マウスの胚盤胞に移植することによりキメラマウスが誕生した(図18)。さらにこのキメラマウス同士を交配させることによりジャームライントランスミッションが確認された(図19)。このNanog-GFP選択により樹立されたよりES細胞に近いiPS細胞においては、レトロウイルスからの4因子の発現はほぼ完全にサイレンシングを受けており、内在性のOct3/4やSox2により自己複製が維持されていることが示唆された。

例8

10cmコンフルエントのiPS細胞を、トリプシン処理し、ES細胞用培地に懸濁した(STO細胞は懸濁後10～20分ゼラチンコートしたディッシュに接着させることによって除去した)。2×10⁶の細胞を、HEMA(2-hydroxyethyl methacrylate)でコーティングした大腸菌培養用ディッシュで4日間浮遊培養し、Embryoid body(EB)を形成させた(day1-4)。EB形成4日目(day4)に、EBを全量10cm組織培養用ディッシュに移しES細胞用培地で24時間培養して接着させた。24時間後(day5)にITS/fibronectin含有培地に交換した。7日間培養し(2日毎に培地交換を行う)、nestin陽性細胞を選択した(無血清下で培養すると、他の系譜の細胞がある程度死んでいく)(day5-12)。次にA2B5陽性細胞の誘導を行った。7日後(day12)にトリプシン処理して細胞をばらばらにし、残存するEBは除去した。1×10⁵個の細胞をpoly-L-ornithine/fibronectinがコーティングされている24ウェルプレートに撒き、N2/bFGF含有培地で四日間培養した(二日毎に培地交換)(day12-16)。四日後(day16)にN2/bFGF/EGF含有培地へ交換し、四日間培養した(二日毎に培地交換)(day16-20)。四日後(day20)にN2/bFGF/PDGF含有培地に交

換して、四日間培養した(二日毎に培地交換)(day20-24)。この期間(day12-24)に細胞が増えすぎてコンフルエントになった場合は随時継代し、 $1 \sim 2 \times 10^5$ 個の細胞を撒いた。(継代時期によって数は変更する)。四日後(day 24)に N2/T3 培地に交換して、7 日間培養し(day24-31)し、2 日毎に培地交換を行った。day 31 に固定し、免疫染色した。その結果、iPS 細胞から、 β III チュブリン陽性の神経細胞、O4 陽性のオリゴデンドロサイト、GFAP 陽性のアストロサイトへの分化が確認された(図 20)。

例 9

Fbx15- β geo ノックインマウス以外の任意のマウス体細胞から iPS 細胞を樹立するために、薬剤選択を用いない樹立方法を開発した。10cm ディッシュ(STO フィーダー細胞上)にマウス胎児線維芽細胞(MEF)を、これまでより少数(1 万、5 万又は 10 万個)培養し、レトロウイルスによりコントロール DNA 又は 4 因子を導入した。ES 細胞培地にて 2 週間培養(G418 選択無し)行ったら、コントロール DNA を導入したディッシュではコロニー形成が認められなかったが、4 因子を導入したディッシュにおいては形質転換したと思われる扁平なコロニー加えて、複数のコンパクトなコロニーが形成された(図 21)。これらから 24 コロニーをピックアップし培養を続けたところ、ES 細胞様の形態が認められた。その遺伝子発現を RT-PCR にて検討したところ、7 クローンにおいて ES 細胞マーカーである Esg1 の発現が認められた。またクローン 4 においては Nanog、ERas、GDF3、Oct3/4、Sox2 などの多くの ES 細胞マーカーの誘導が認められたことから iPS 細胞であると考えられた(図 22)。以上の結果より、iPS 細胞樹立には Fbx15- β geo ノックインなどを用いた薬剤選択は必須でなく、任意のマウス由来体細胞から iPS 細胞を樹立できることが示された。本技術により疾患モデルマウスの体細胞からも iPS 細胞が樹立できる可能性が示された。

例 10

iPS 細胞を誘導する細胞として、線維芽細胞以外の細胞である、肝細胞及び胃粘膜細胞を検討した。Fbx15 ^{β geo/ β geo} マウスの肝臓から肝細胞を還流により単離し

た。この肝細胞に4因子をレトロウイルスで投与し、G418による選択を行ったところ複数のiPS細胞コロニーが得られた。DNAマイクロアレイによる遺伝子発現パターン解析の結果、肝臓由来のiPS細胞は皮膚線維芽細胞や胎児線維芽細胞由来のiPS細胞より、さらにES細胞に類似していることが明らかとなった。胃粘膜細胞からも、肝細胞からと同様にiPS細胞が得られた。

例1 1

PD98059はMAPキナーゼの阻害薬であり、多くの分化細胞においては増殖を抑制するが、ES細胞においては、未分化状態維持と増殖を促進することが知られている。そこでiPS細胞樹立におけるPD98059の効果を検討した。Nanog-EGFP-IRES-Puroの選択マーカーをもつマウスから樹立したMEFに4因子をレトロウイルスで投与し、ピューロマイシンによる選択を行った。PD98059を投与しない場合、得られたiPS細胞コロニーの中で、GFP陽性の割合は8%であった。一方、PD98059（最終濃度25 μ M）をレトロウイルス感染の翌日から持続的に投与した群では、得られたコロニーの45%がGFP陽性であった。これはPD98059がGFP陽性の、よりES細胞に近いiPS細胞の増殖を促進するが、GFP陰性のiPS細胞や、分化細胞の増殖は抑制するためであると考えられた。このことからPD98059は、よりES細胞に近いiPS細胞の樹立や、薬剤選択を用いないiPS細胞の樹立に利用できることが示された。

例1 2

胎児由来のHuman dermal fibroblast (HDF) にマウスエコトロピックウイルスレセプターであるsolute carrier family 7 (Slc7a1、NCBIアクセッション番号NM_007513) をレンチウイルスで発現させた細胞に、マウスOct3/4遺伝子プロモーター下流に赤色蛍光蛋白質遺伝子を、およびPGKプロモーター下流にハイグロマイシン耐性遺伝子を組み込んだプラスミドをヌクレオフェクションで導入した。ハイグロマイシンによる選択を行い、安定発現株を樹立した。800000個の細胞をマイトマイシン処理したSTO細胞の上にまき、翌日レトロウイルスによりOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc（いずれもヒト由来）を導入した。3週間後に得られたコロニ

一（図 23 左）を 24 個拾い、STO 細胞を播種した 24-well plate に移して培養した。2 週間後に増えてきた 1 クローンを STO 細胞を播種した 6-well plate に継代して培養した結果、ES 細胞に形態上において類似した細胞が得られ（図 23 右）、iPS 細胞であることが示唆された。培地は常にマウス ES 細胞用培地を用いた。

例 1 3

ヒト成体皮膚線維芽細胞（adult HDF）にレンチウイルスで Slc7a1（マウスレトロウイルス受容体）を導入した細胞を 800000 個のフィーダー細胞（マイトマイシン処理 STO 細胞）上にまき、以下の組み合わせでレトロウイルスにより遺伝子を導入した。

1. Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, TERT, SV40 Large T antigen
2. Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, TERT, HPV16 E6
3. Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, TERT, HPV16 E7
4. Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, TERT, HPV16 E6, HPV16 E7
5. Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, TERT, Bmi1

（Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, TERT はヒト由来、Bmi1 はマウス由来）

マウス ES 細胞の培養条件下で、薬剤選択無しで培養を続けたところ、1 の組み合わせで因子を導入したディッシュにおいて、ウイルス感染 8 日後において、iPS 細胞と思われるコロニーが出現した（図 24）。他の組み合わせ（2 から 5）においても、1 の組み合わせの場合ほどは明瞭ではないが、iPS 細胞様のコロニーが出現した。4 因子のみを導入しても、全くコロニーは出現しなかった。

産業上の利用可能性

本発明により提供された核初期化因子を用いることにより、胚や ES 細胞を利用せずに簡便かつ再現性よく分化細胞核の初期化を誘導することができ、ES 細胞と同様の分化及び多能性や増殖能を有する未分化細胞である誘導多能性幹細胞を樹立することができる。

請 求 の 範 囲

1. 体細胞の核初期化因子であって、下記の 3 種類の遺伝子：Oct ファミリー遺伝子、Klf ファミリー遺伝子、及び Myc ファミリー遺伝子の各遺伝子産物を含む因子。
2. 下記の 3 種の遺伝子：Oct3/4、Klf4、及び c-Myc の各遺伝子産物を含む請求項 1 に記載の因子。
3. 下記の遺伝子：Sox ファミリー遺伝子の遺伝子産物をさらに含む請求項 1 又は 2 に記載の因子。
4. Sox2 の遺伝子産物を含む請求項 3 に記載の因子。
5. Myc ファミリー遺伝子の遺伝子産物とともに、あるいは Myc ファミリー遺伝子の遺伝子産物に換えてサイトカインを含む請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の因子。
6. サイトカインが bFGF 及び／又は SCF である請求項 5 に記載の因子。
7. 下記の遺伝子：TERT 遺伝子の遺伝子産物をさらに含む請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載の因子。
8. 下記の遺伝子：SV40 Large T antigen、HPV16 E6、HPV16 E7、及び Bmi1 からなる群から選ばれる 1 種以上の遺伝子の遺伝子産物をさらに含む請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載の因子。
9. Fbx15、Nanog、ERas、ECAT15-2、Tcl1、及び β -catenin からなる群から選ばれる 1 種以上の遺伝子の遺伝子産物をさらに含む請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載の因子。
10. ECAT1、Esg1、Dnmt3L、ECAT8、Gdf3、Sox15、ECAT15-1、Fthl17、Sall4、Rex1、UTF1、Stella、Stat3、及び Grb2 からなる群から選ばれる 1 種以上の遺伝子の遺伝子産物をさらに含む請求項 1 ないし 9 のいずれか 1 項に記載の因子。
11. 体細胞の核初期化により誘導多能性幹細胞を製造する方法であって、体細胞に対して請求項 1 ないし 10 のいずれか 1 項に記載の核初期化因子を接触させ

る工程を含む方法。

12. 体細胞がヒト細胞である請求項11に記載の方法。

13. 請求項11又は12に記載の方法により得られた誘導多能性幹細胞。

14. 請求項13に記載の誘導多能性幹細胞から分化誘導された体細胞。

15. 細胞の分化能及び／又は増殖能を改善する方法であって、細胞に対して請求項1ないし10のいずれか1項に記載の核初期化因子を接触させる工程を含む方法。

16. 細胞がヒト細胞である請求項15に記載の方法。

17. 請求項15又は16に記載の方法により得られた細胞。

18. 請求項17に記載の細胞から分化誘導された体細胞。

図 1

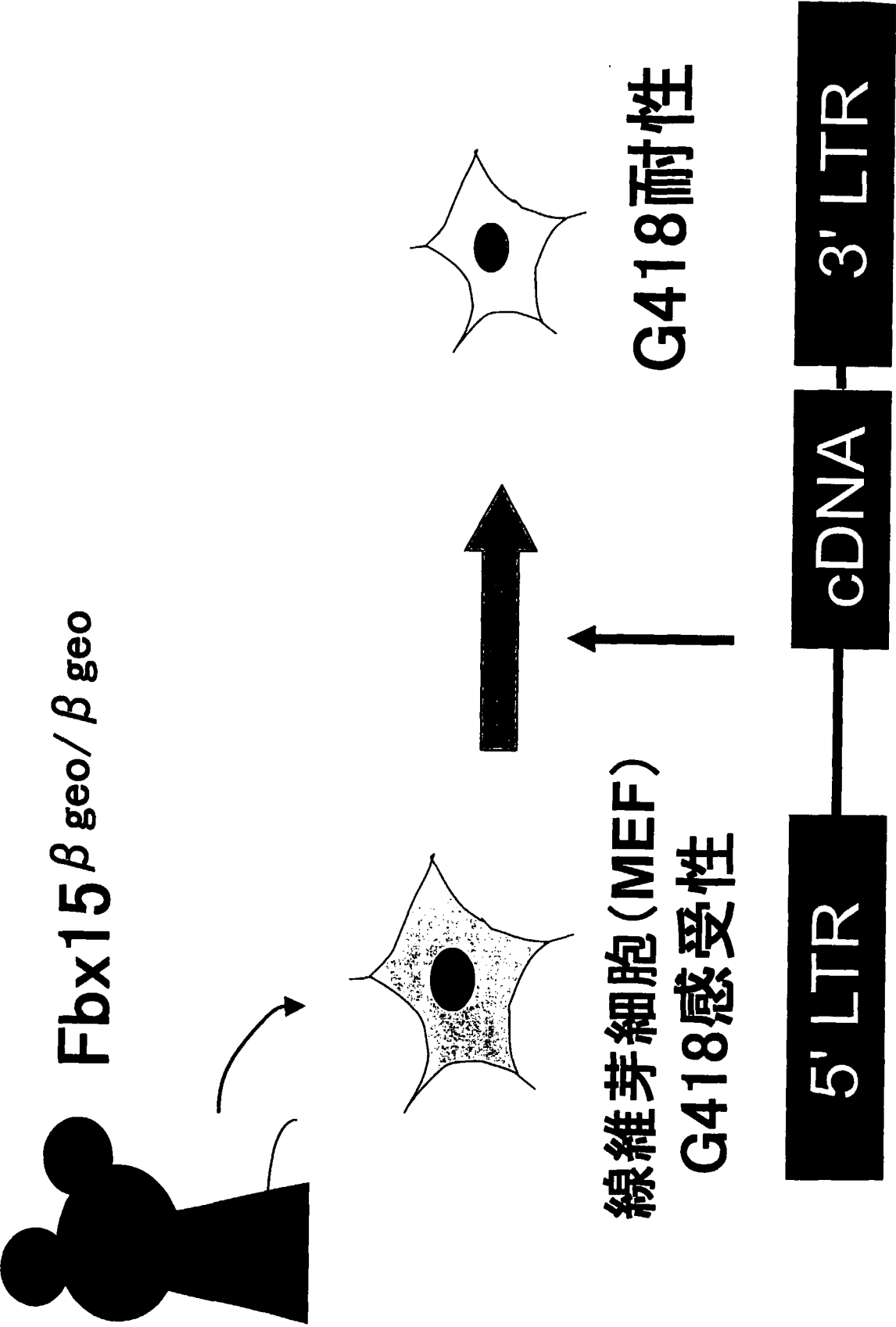
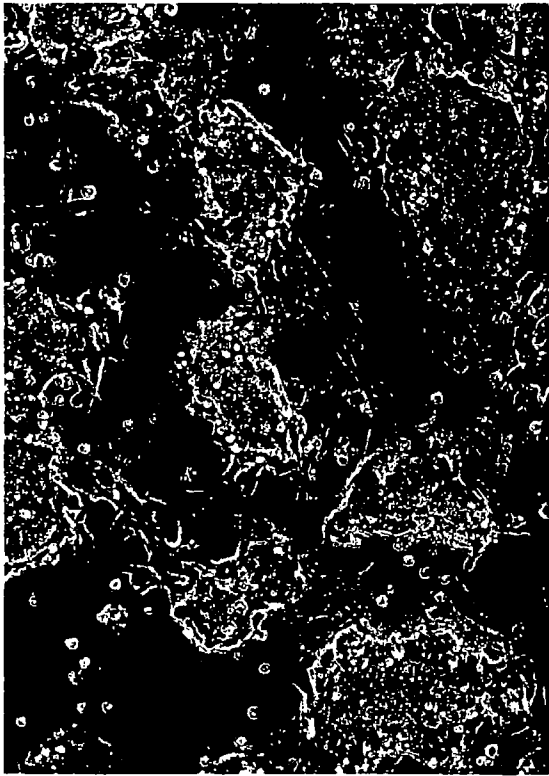
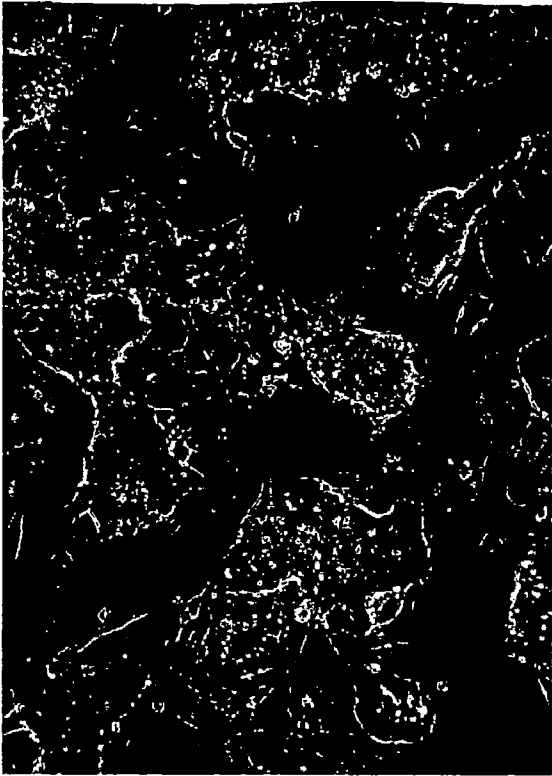


図 2

IPS



ES



MEF



図 3

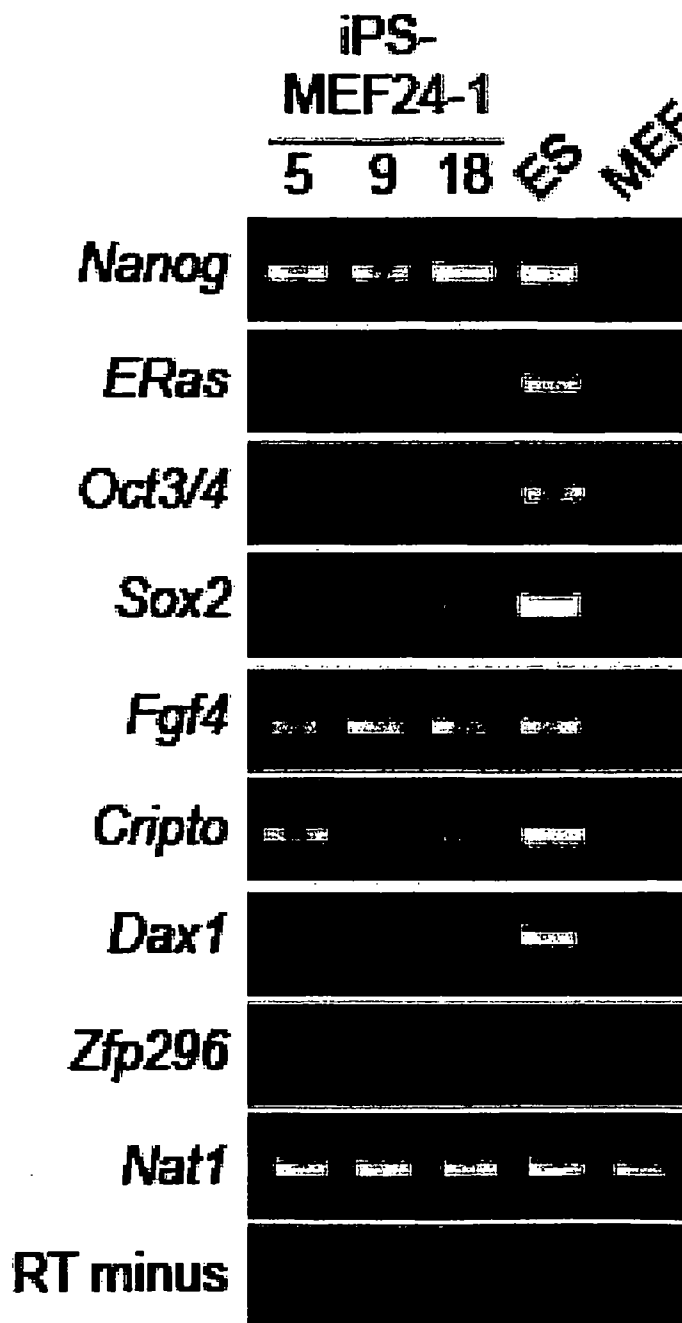


図 4

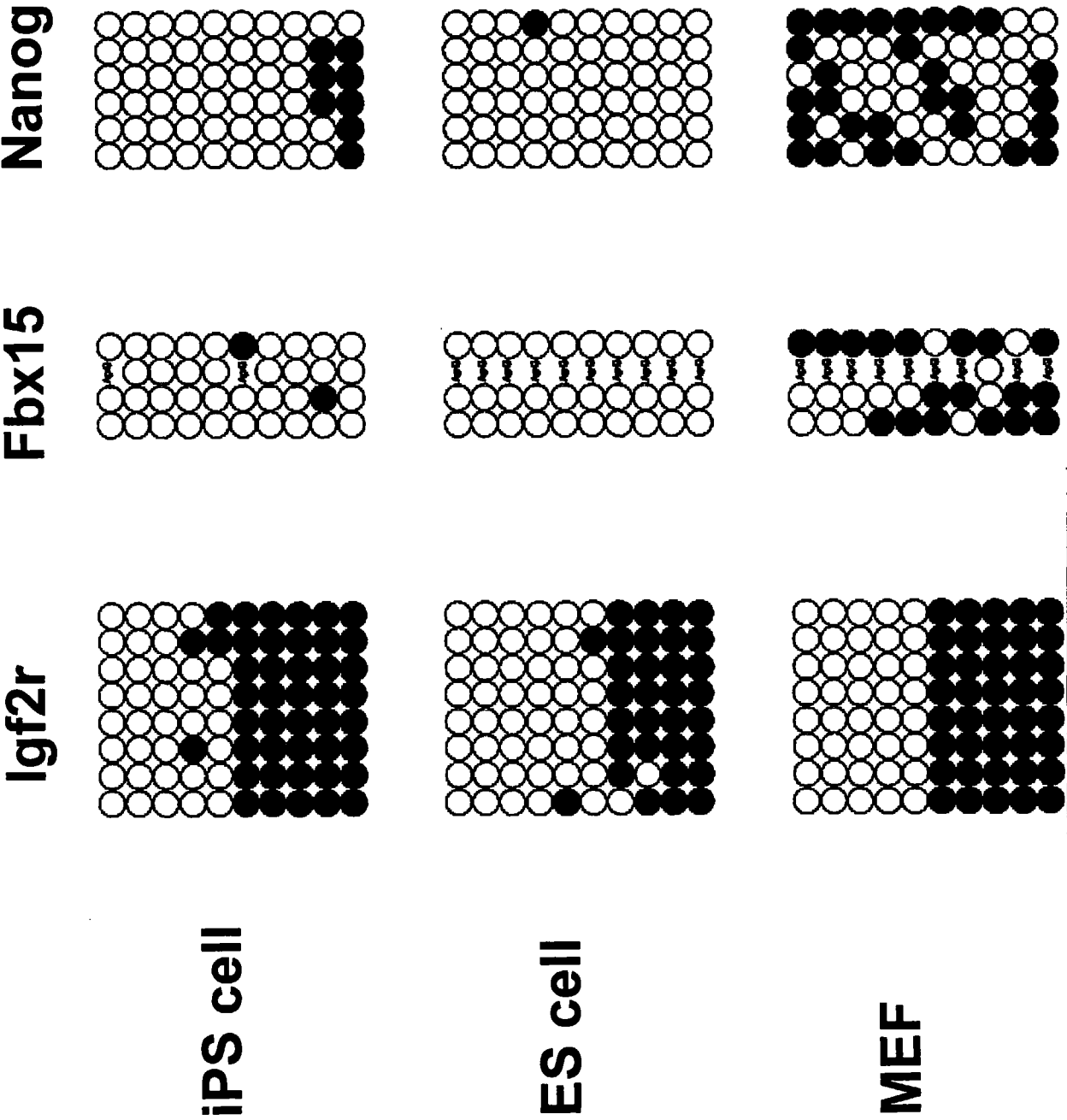


図 5

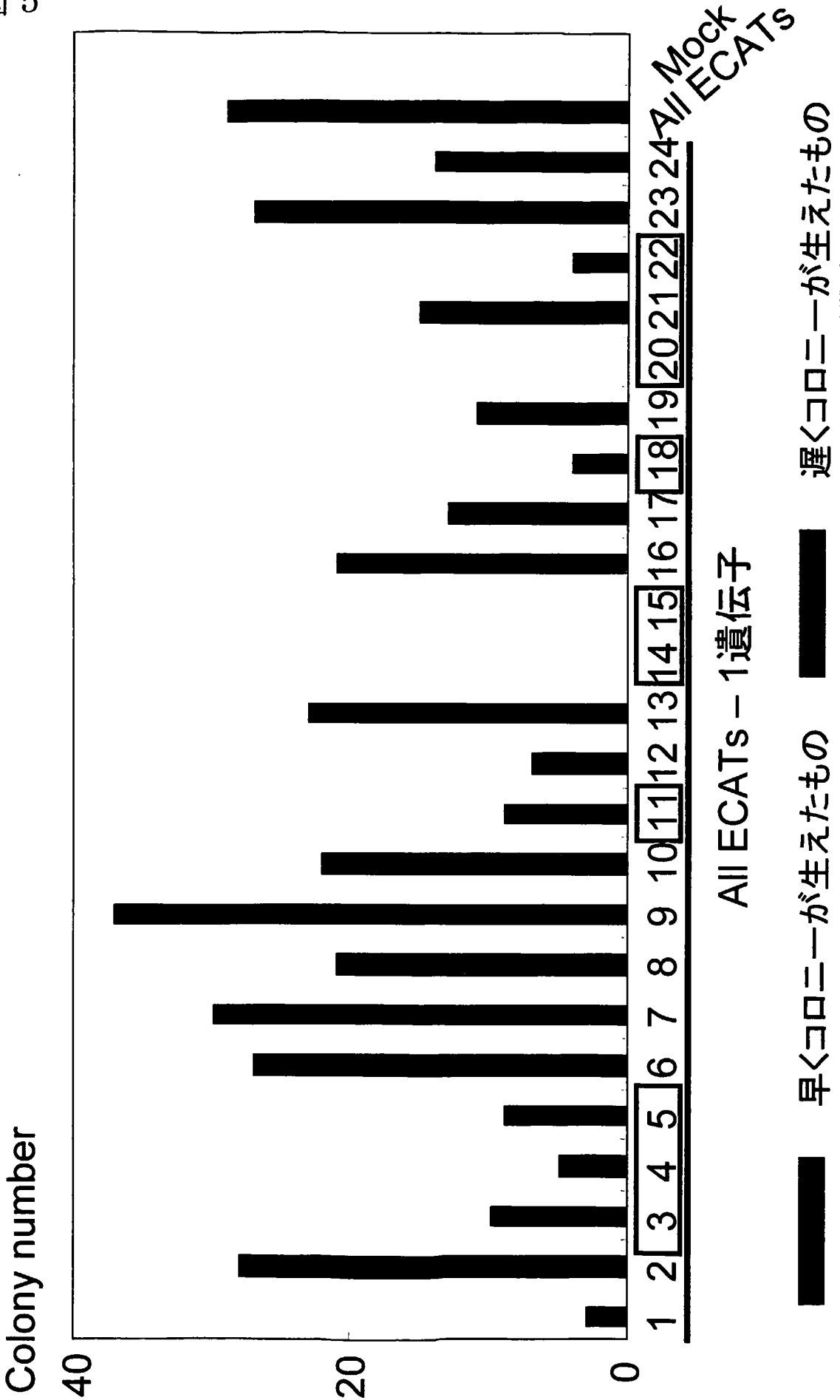


図 6

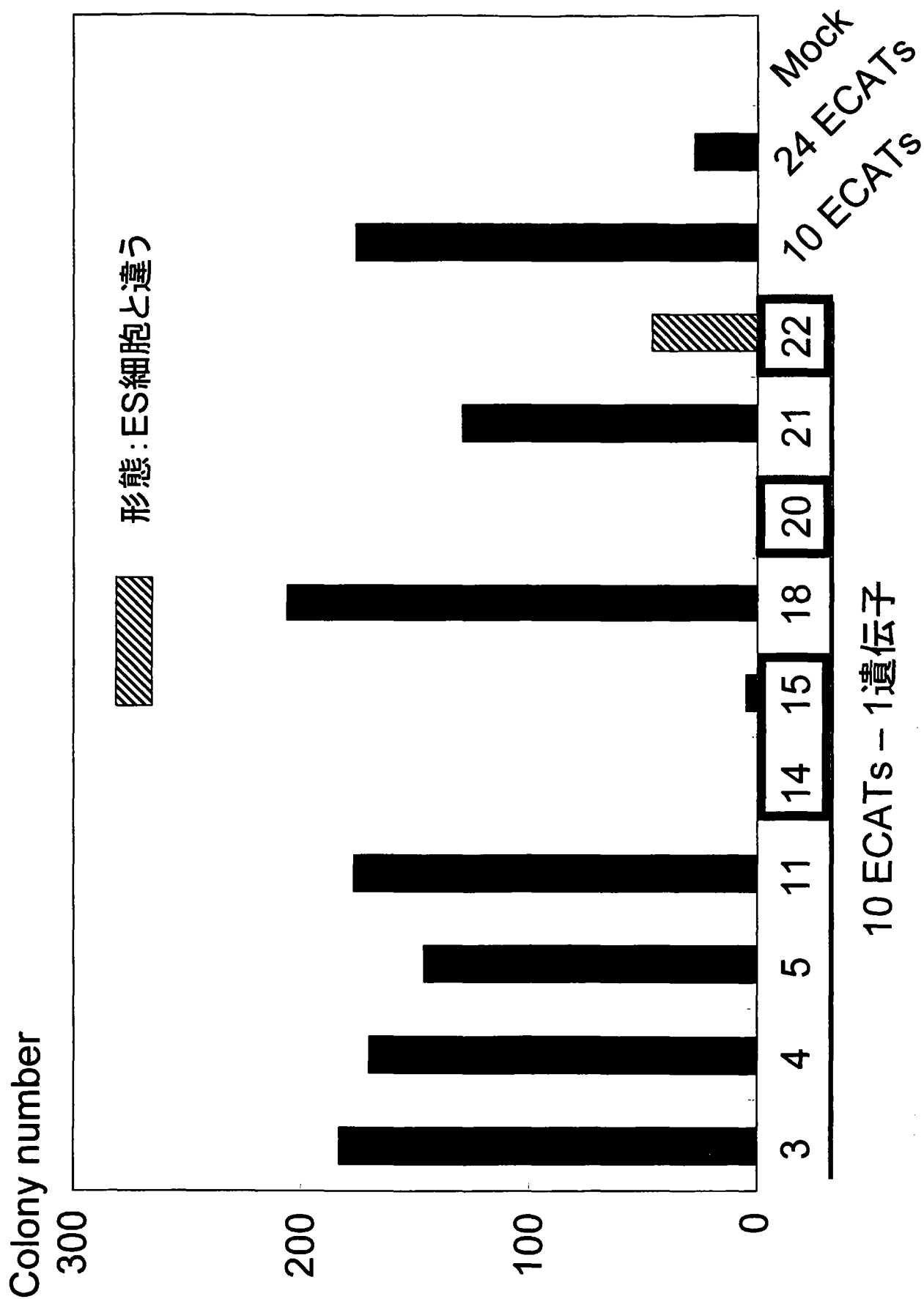


図 7

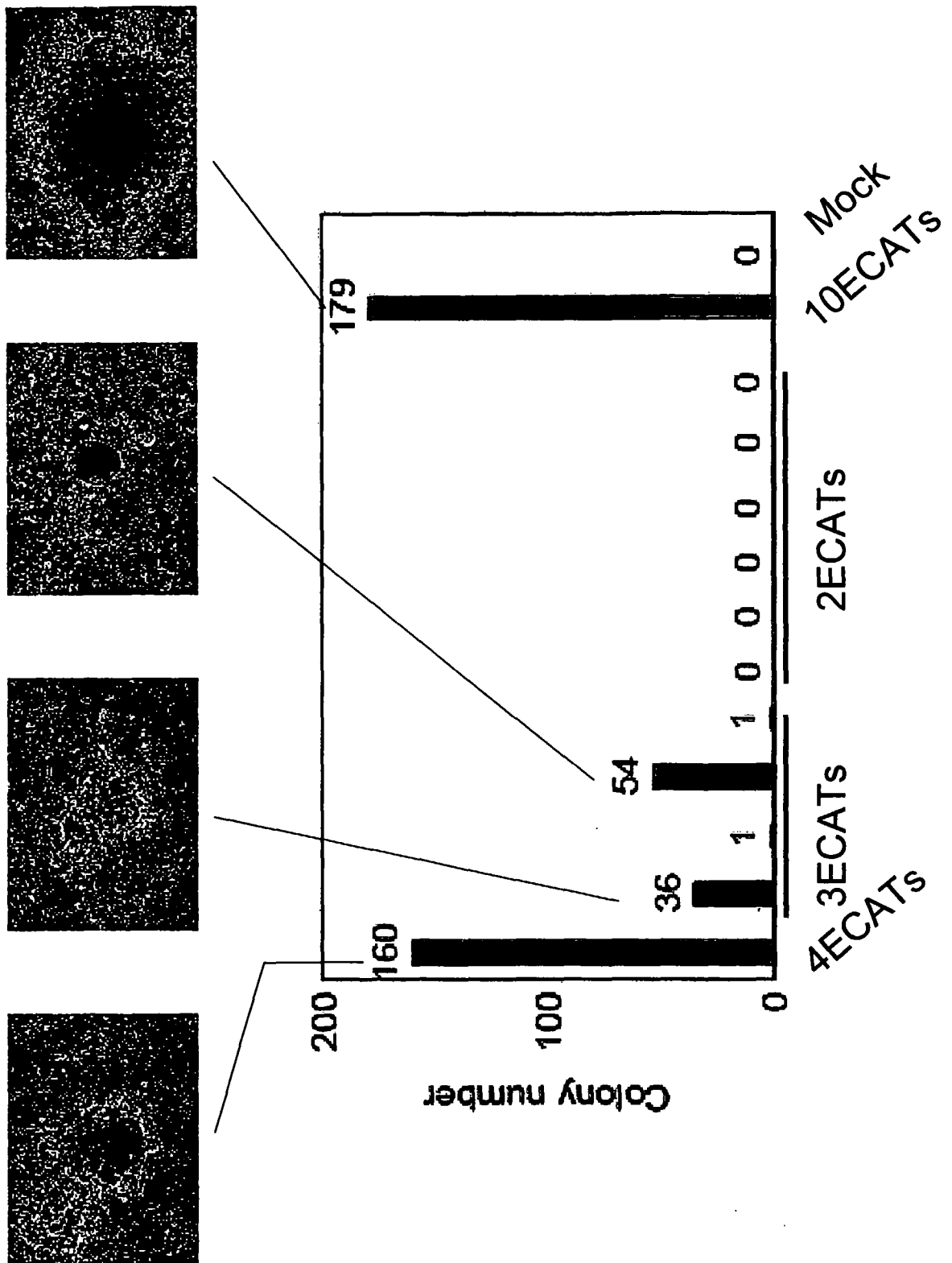
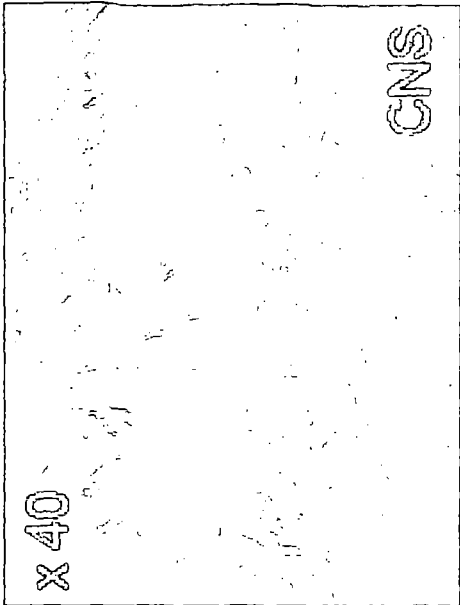


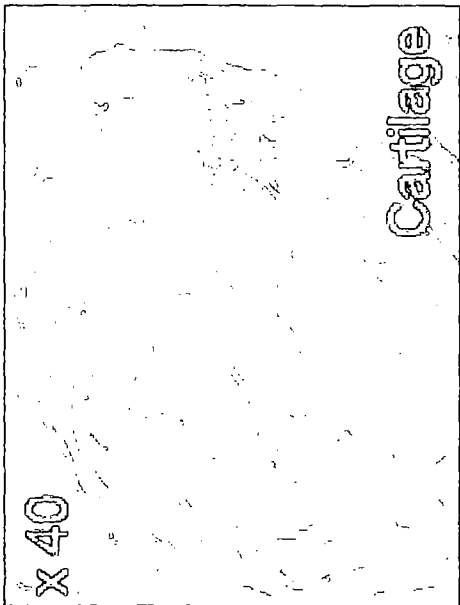
図 8

神経組織

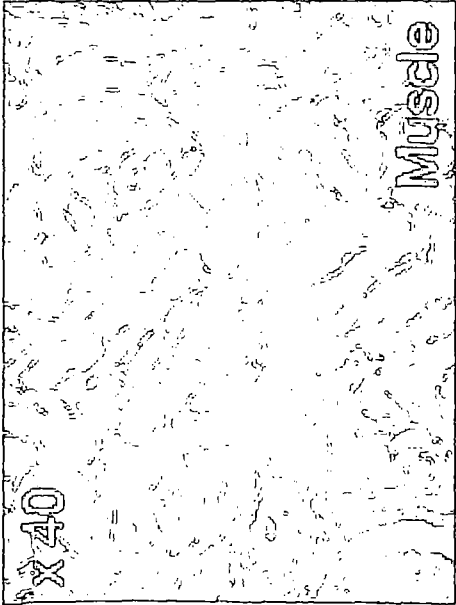
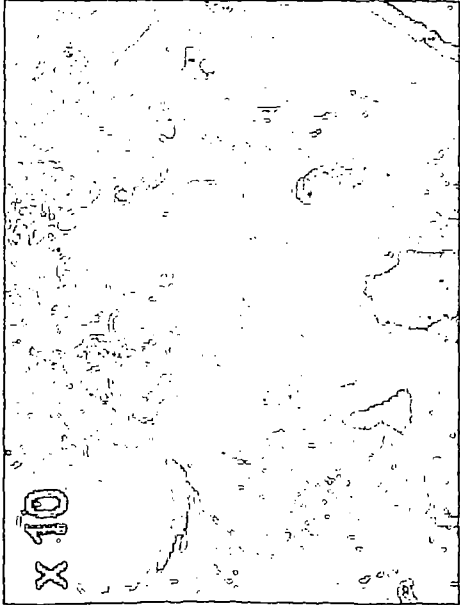


腸管様組織

軟骨組織



脂肪組織



筋肉組織

図 9

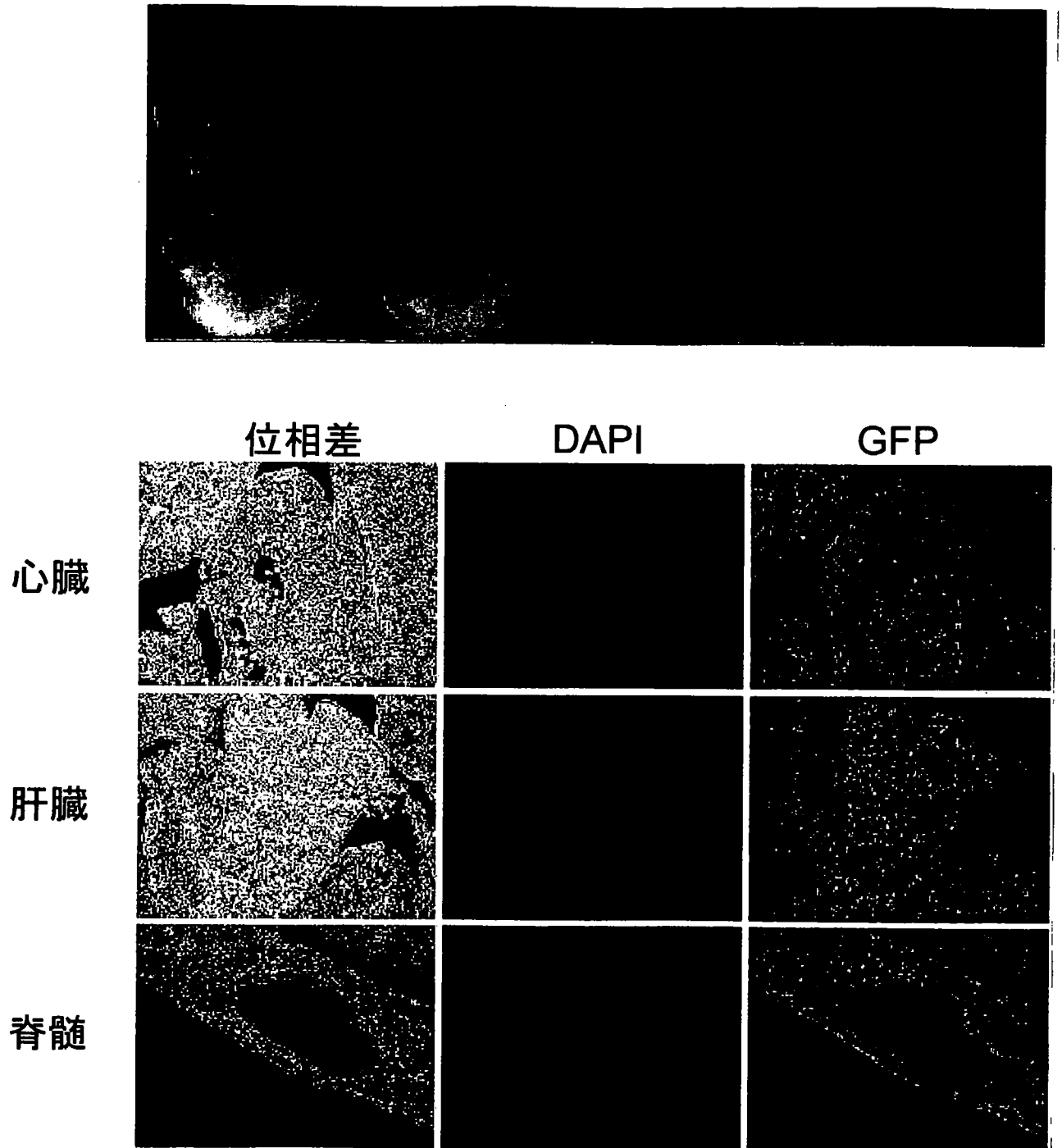


図 10

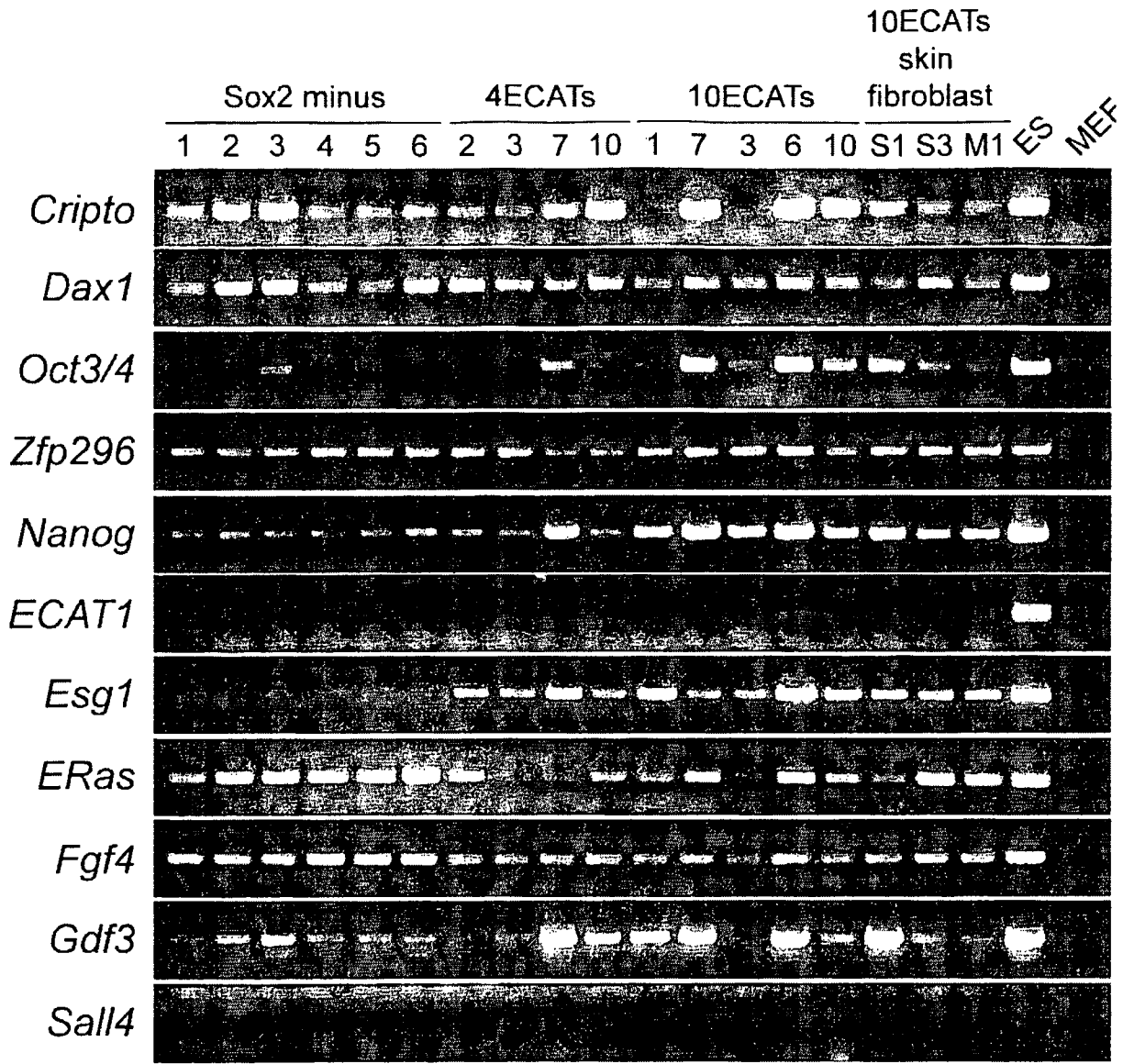
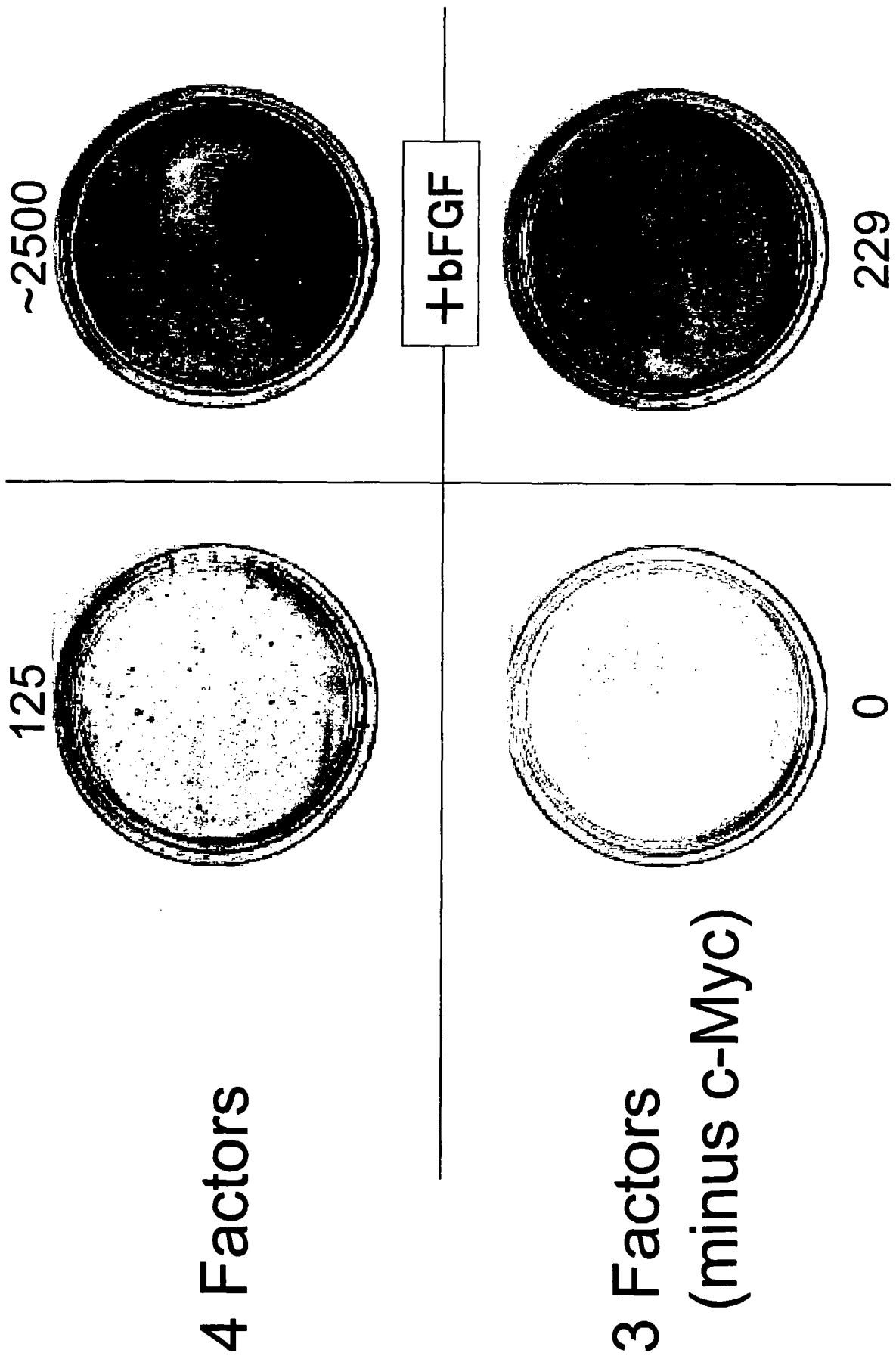
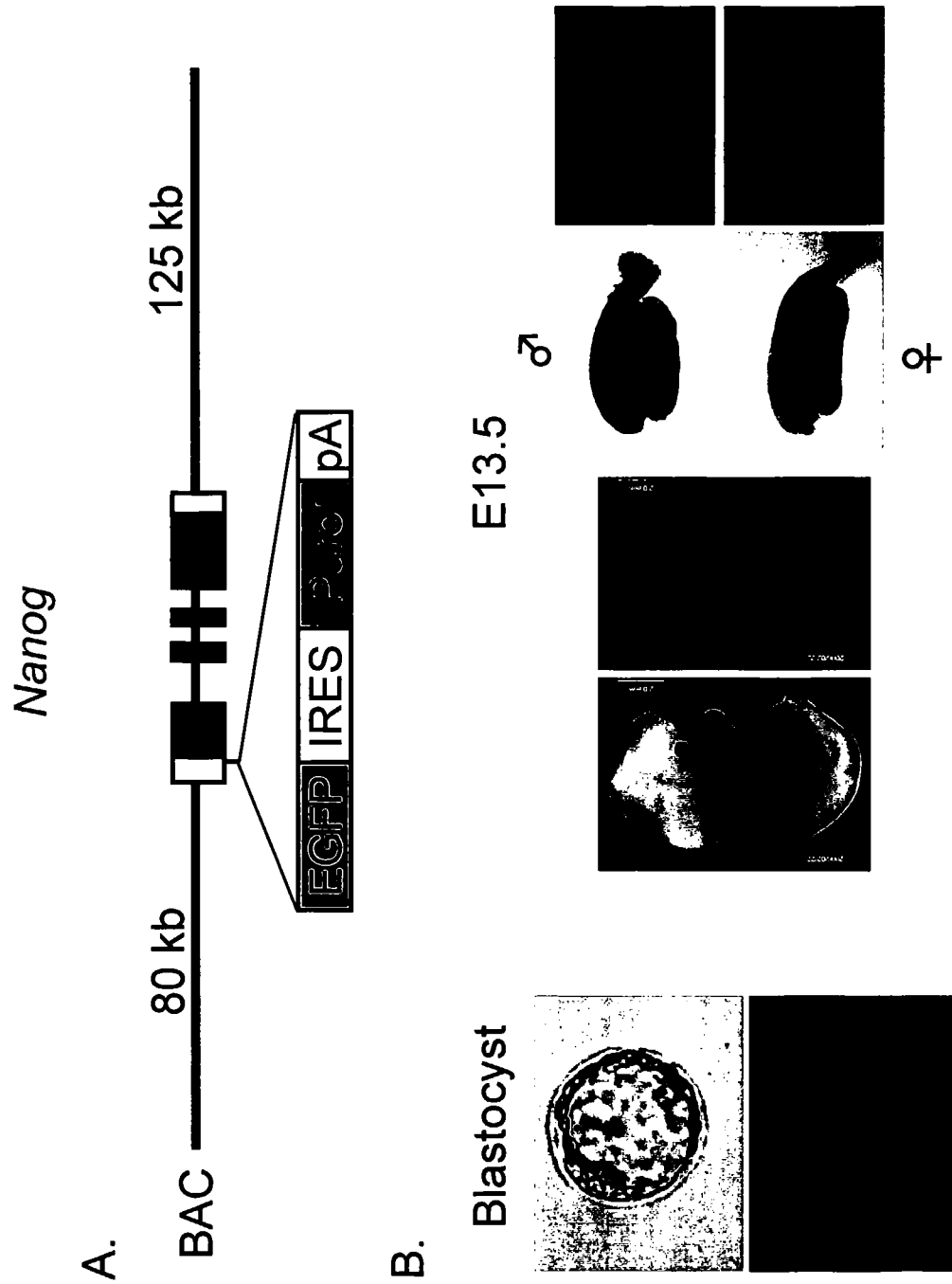


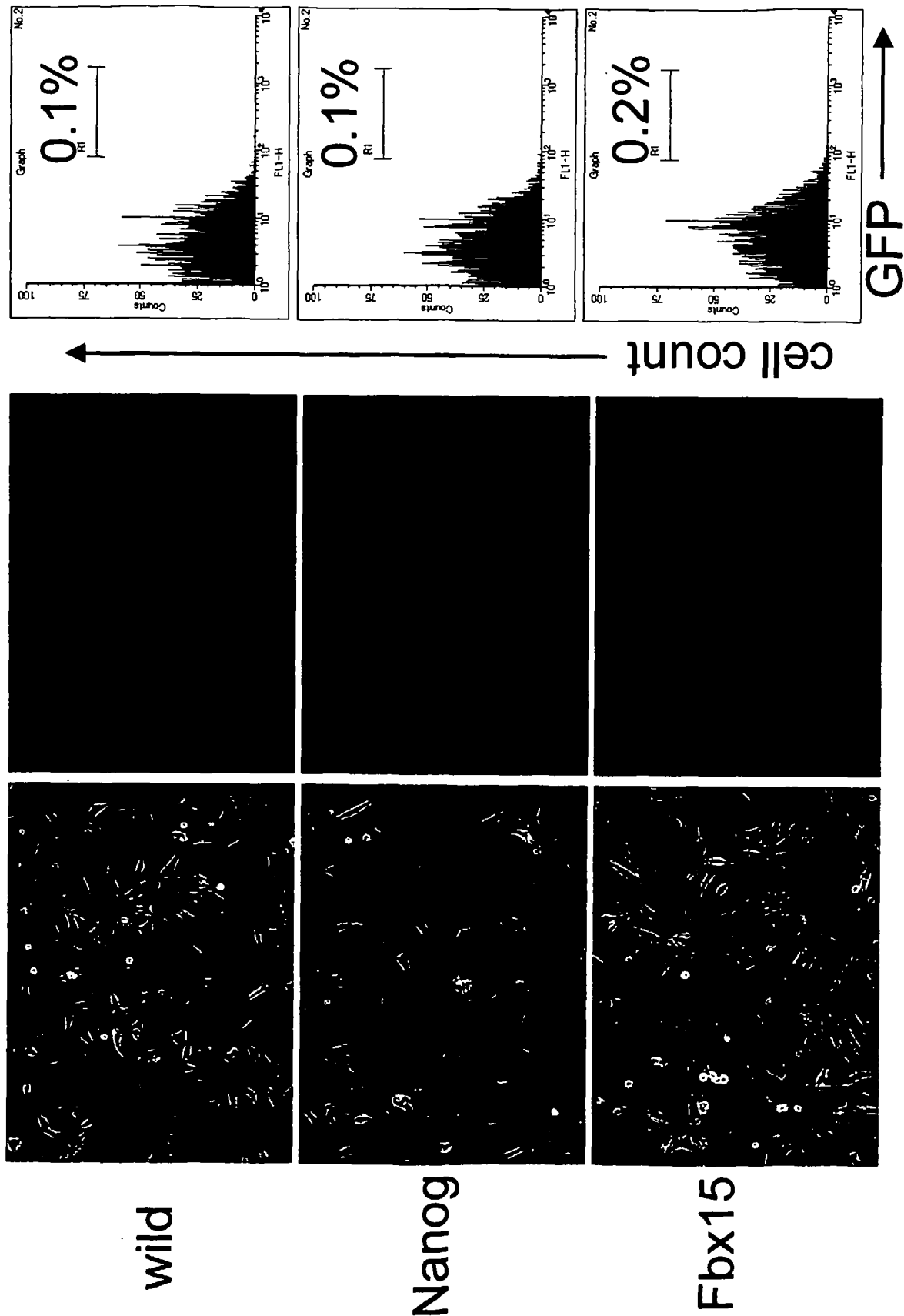
図 11



12



13



14

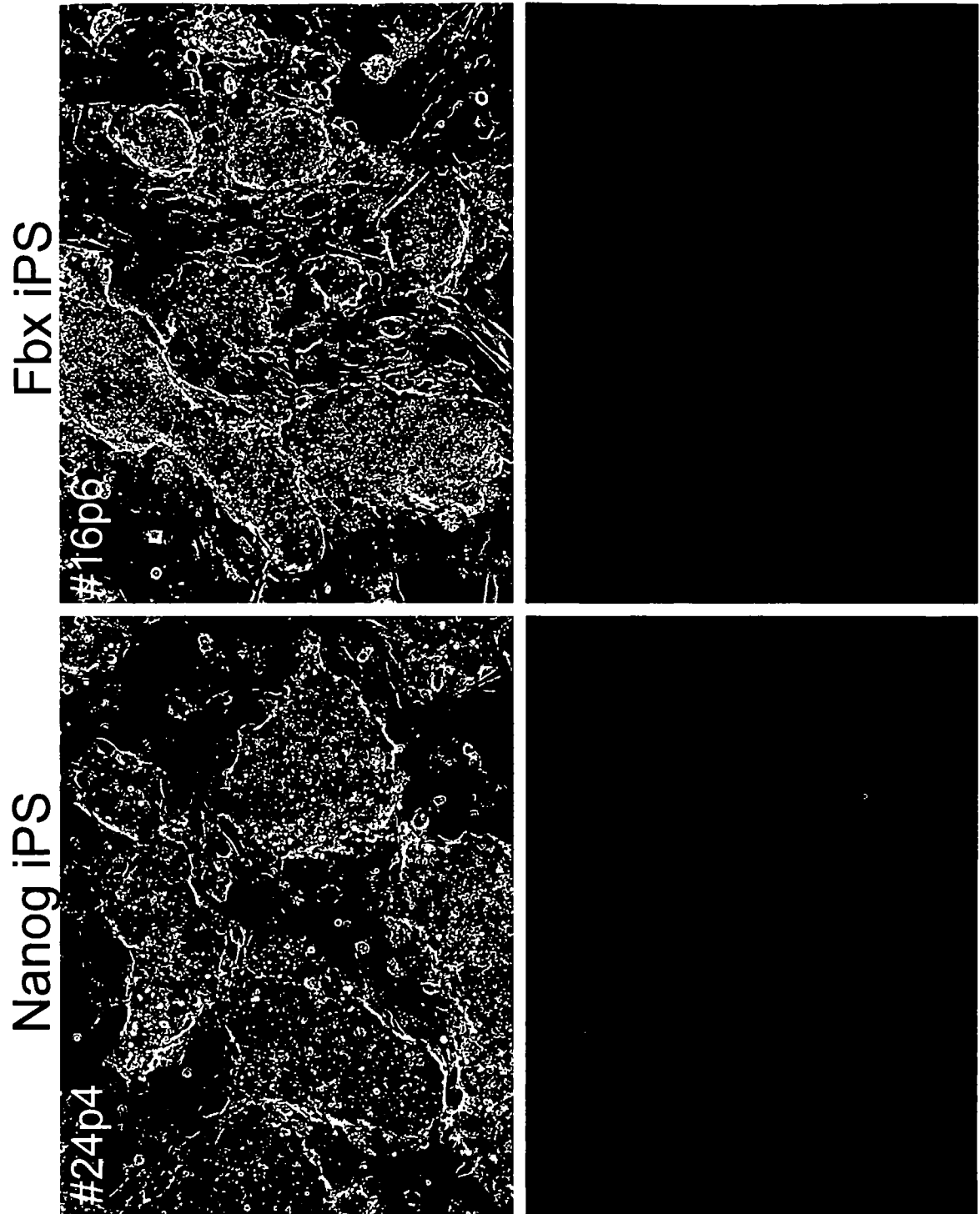


図 15

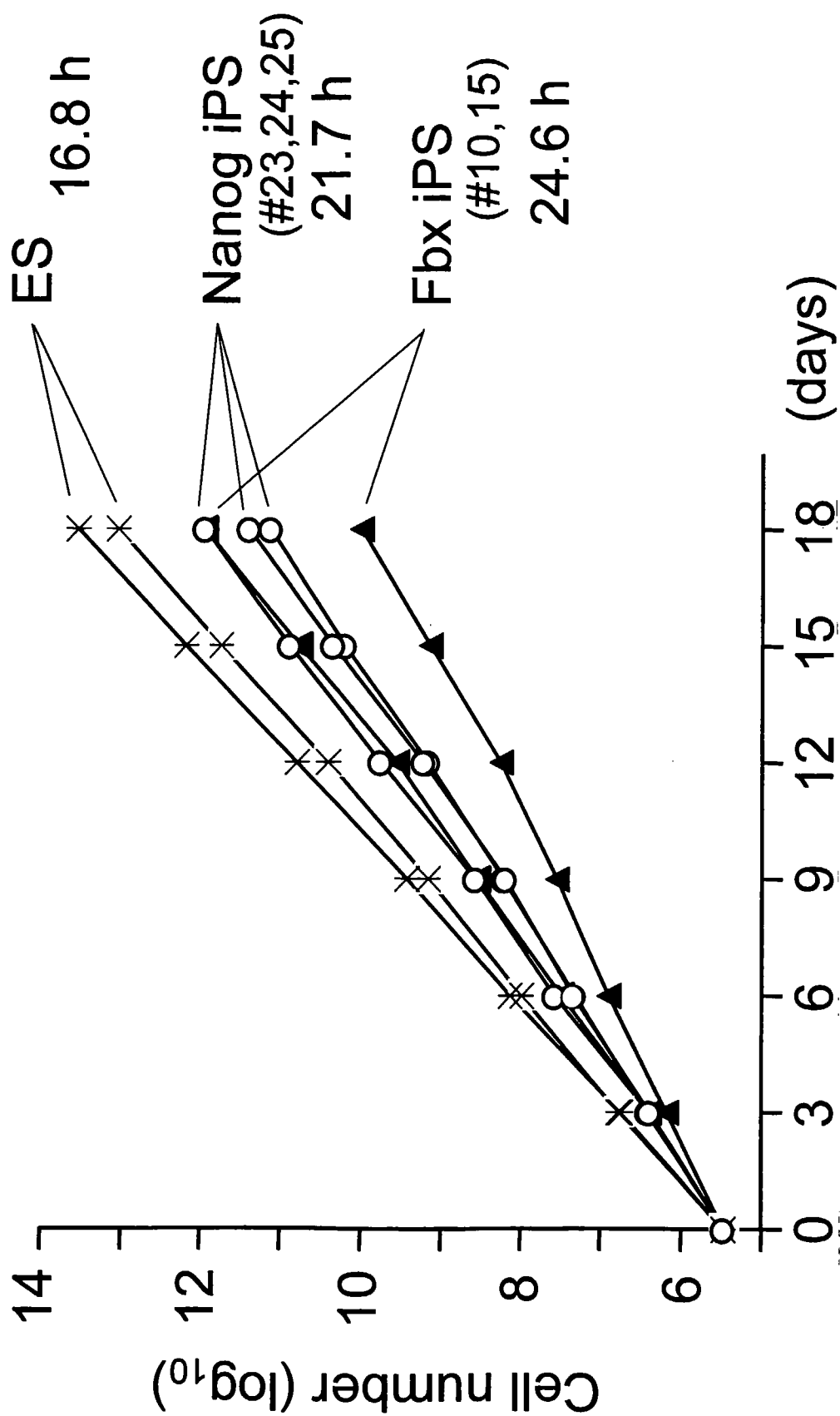


図 16

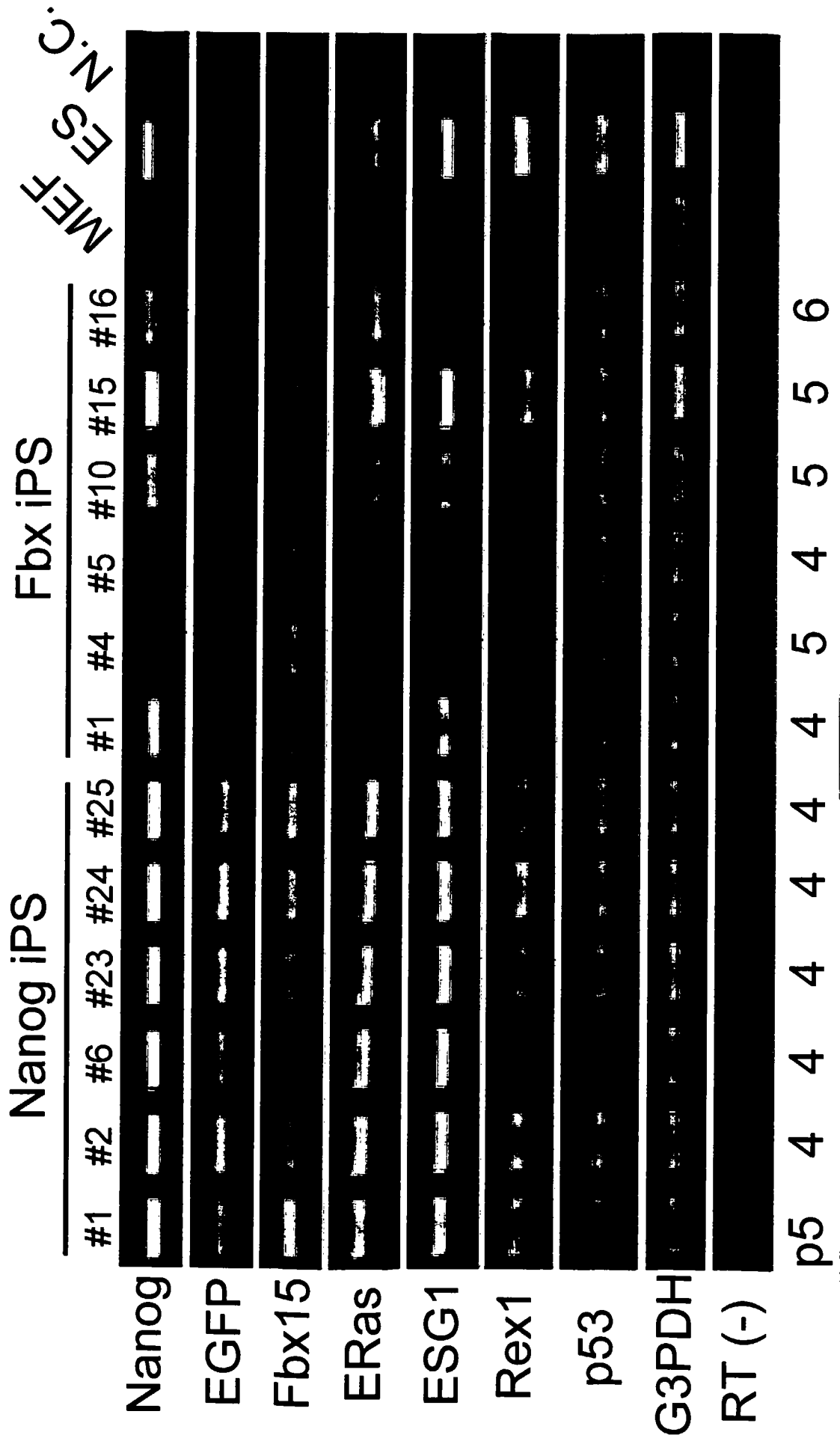
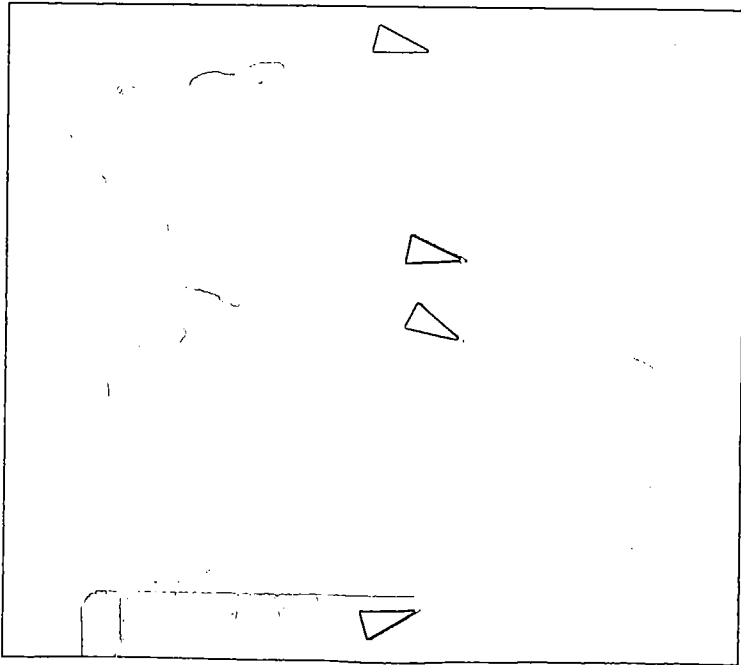
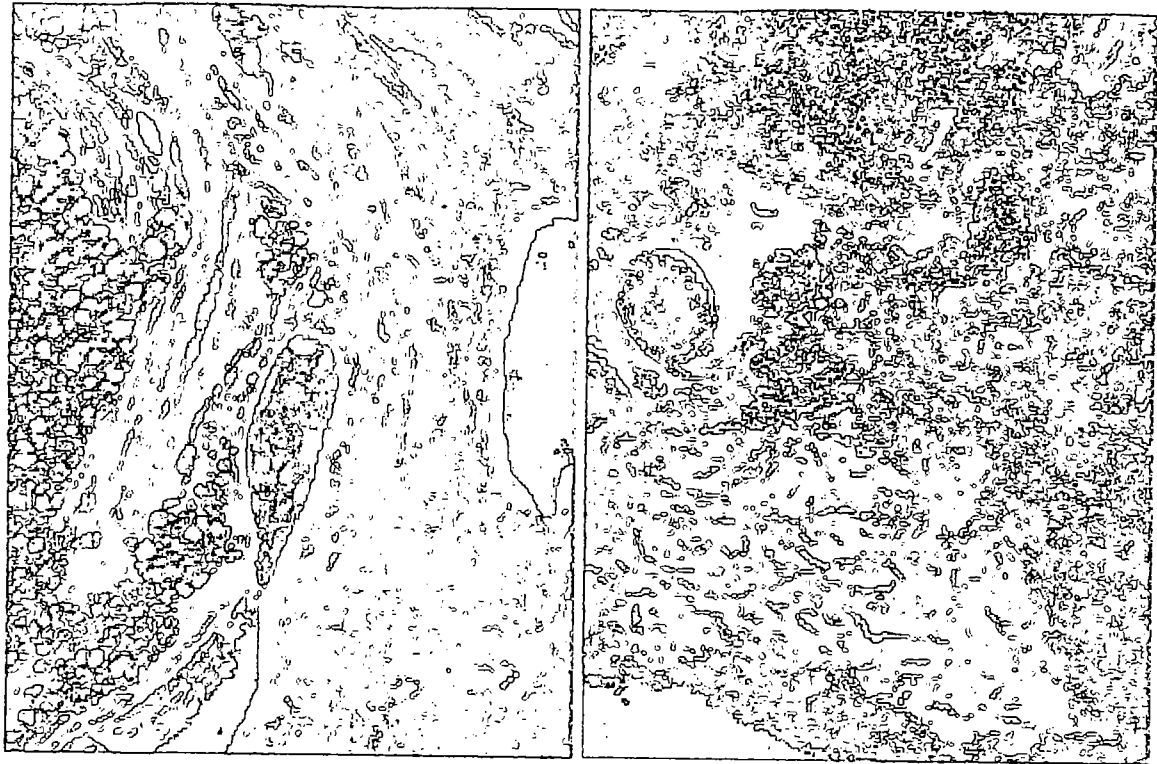


図 17



ES Nanog iPS
#24(p8)

18

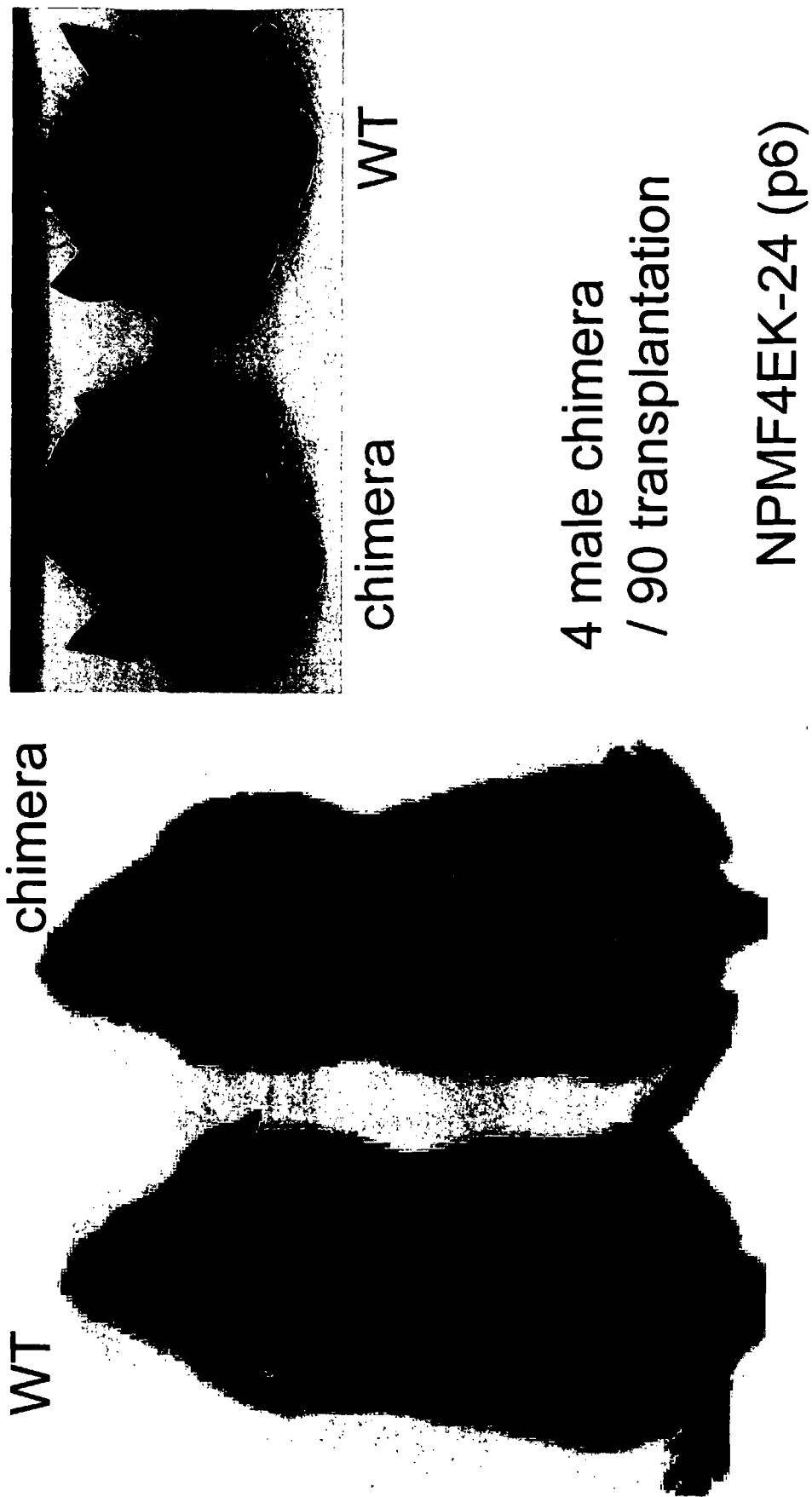


図 20

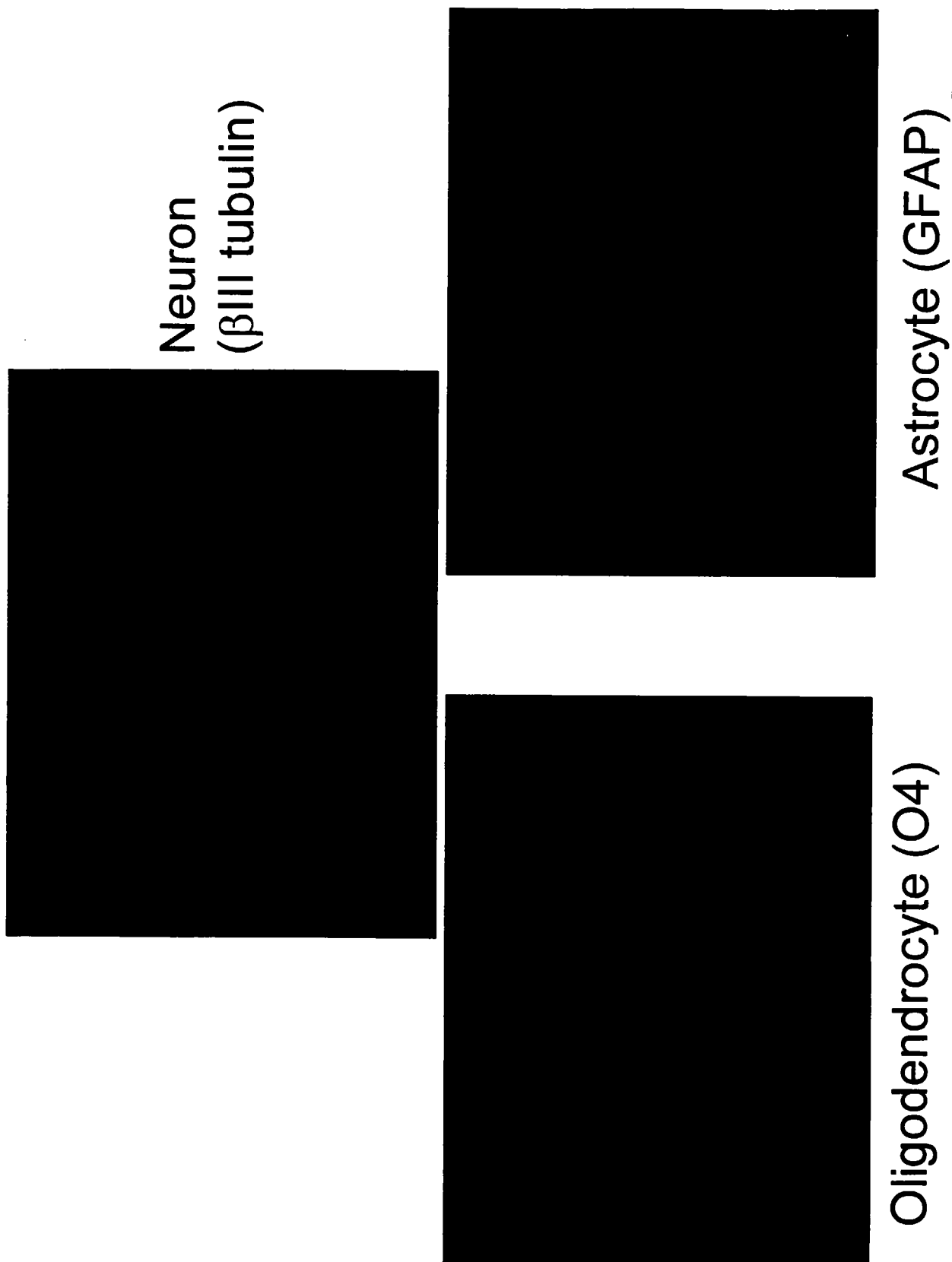


図 21

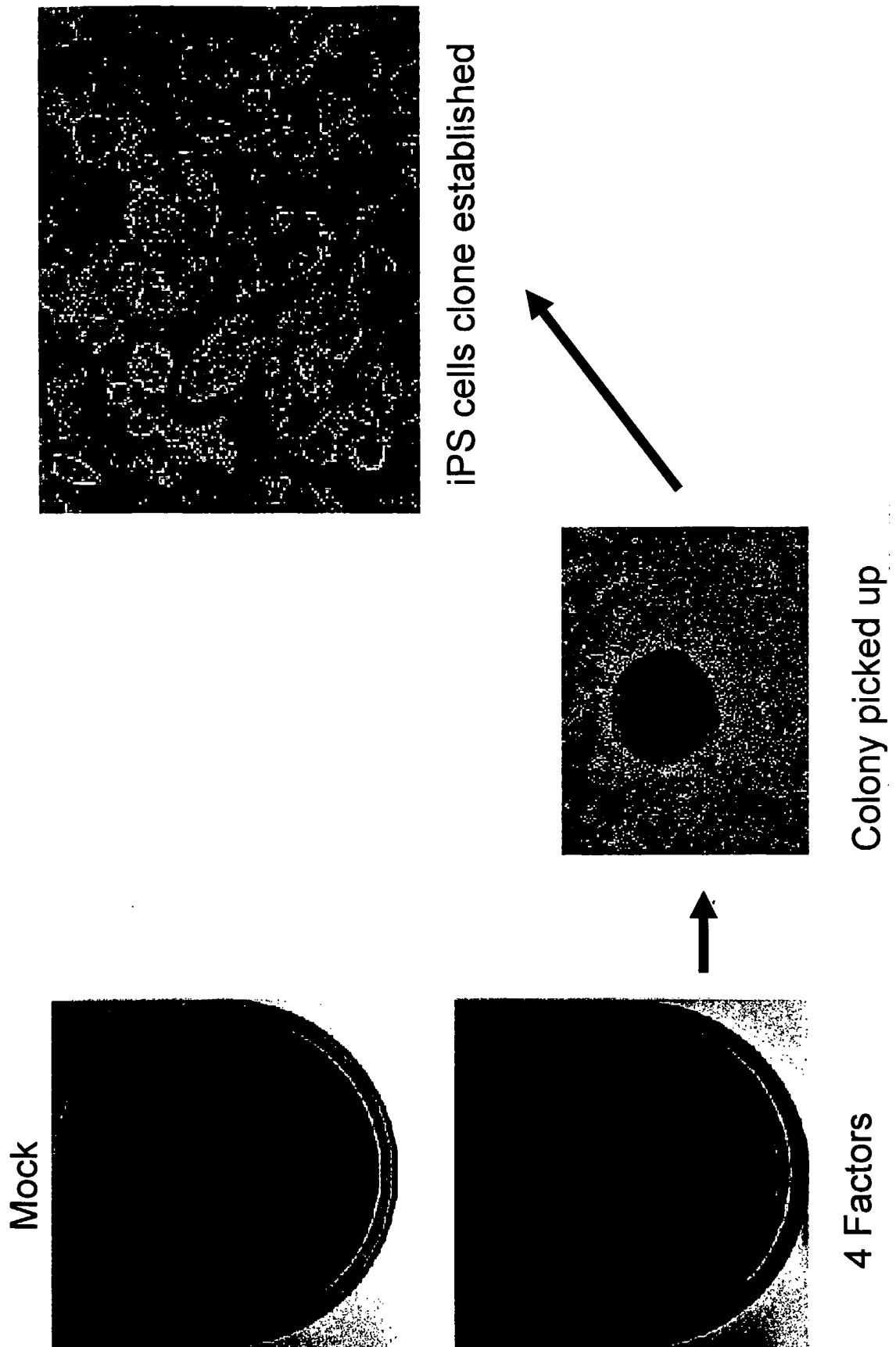


図 22

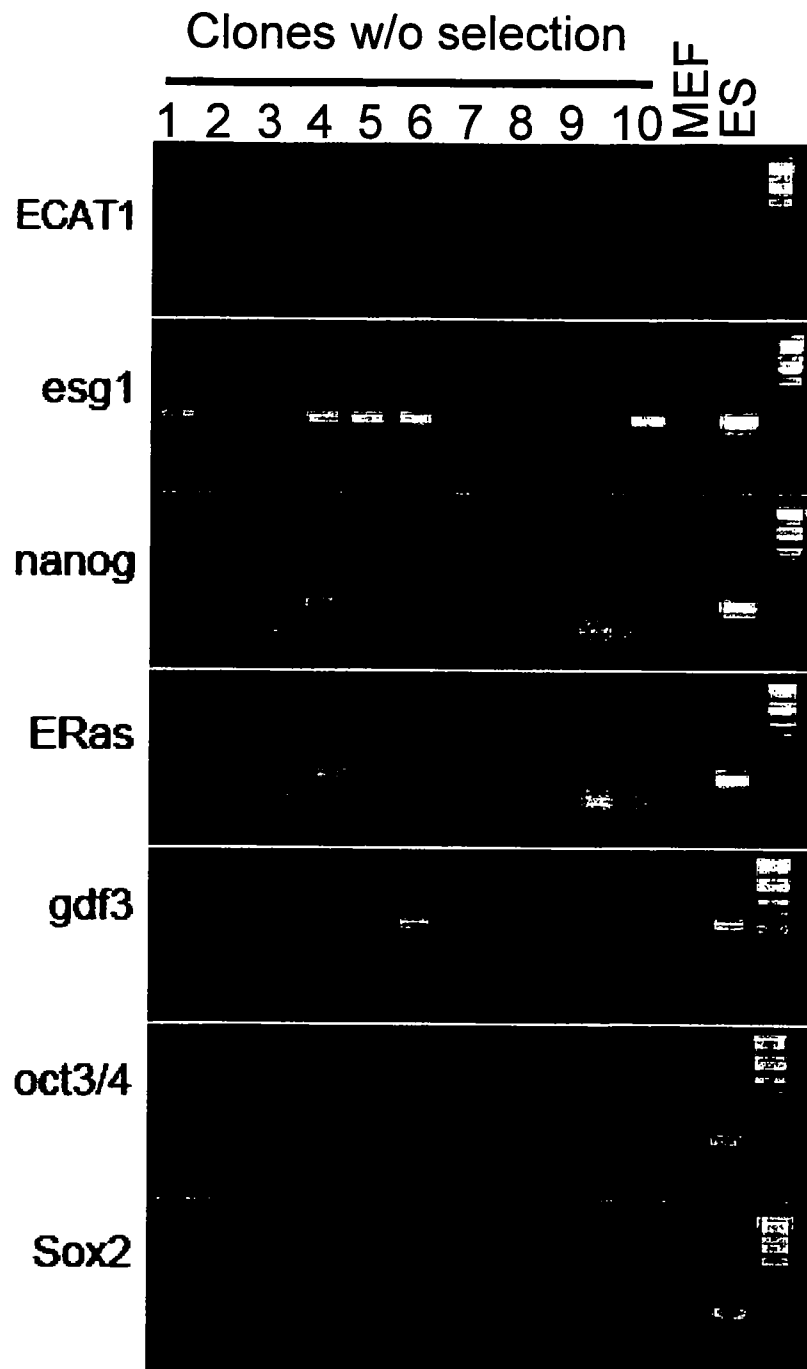


図 23

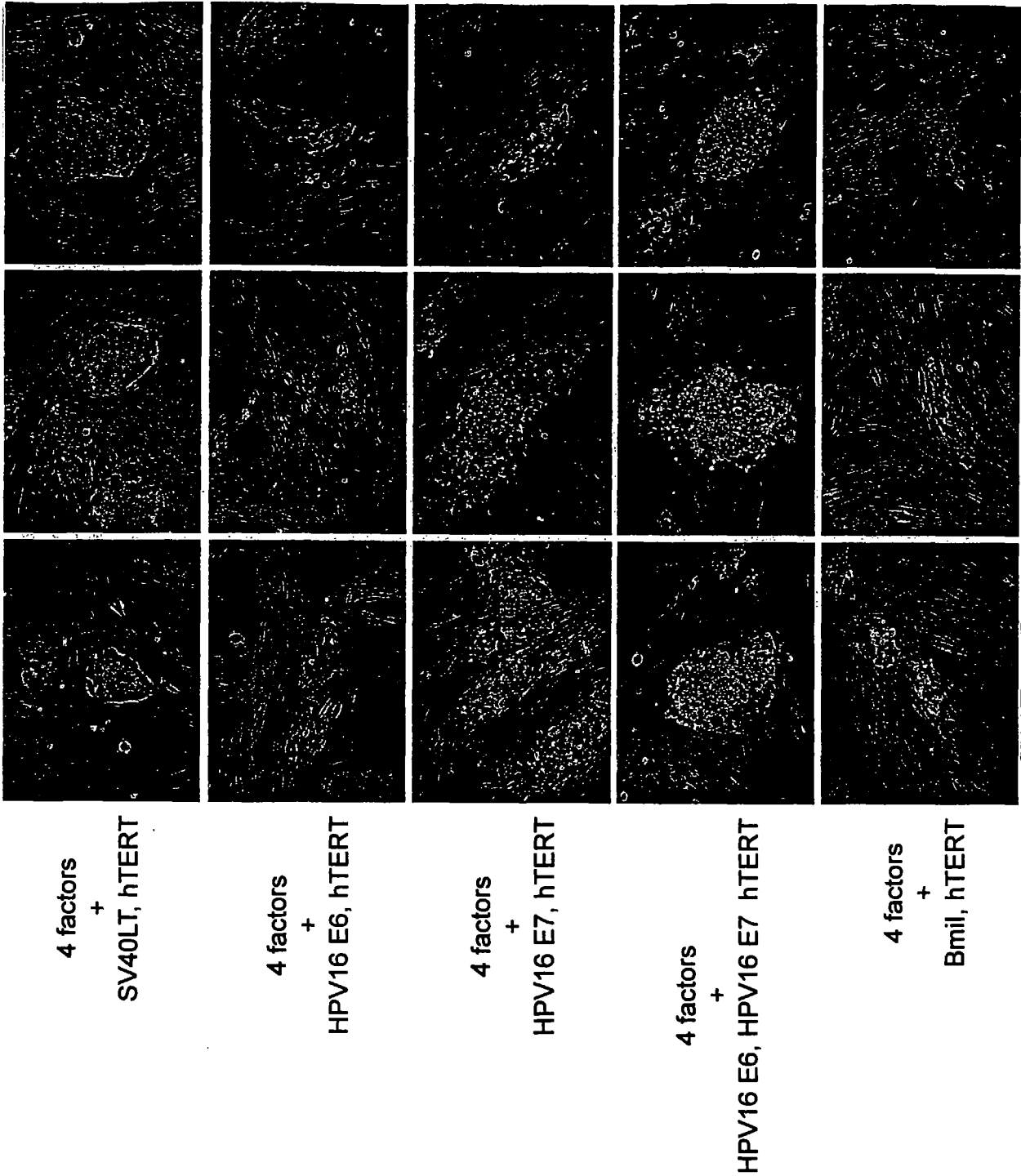


継代後 (Passage 2)



コロニー

図 24



Sequence Listing

<110> Kyoto University

<120> Factor that induces nuclear reprogramming

<130> A61682M

<160> 25

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial

<400> 1

tgtggggccc tgaaaggcga gctgagat 28

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> artificial

<400> 2

atgggccgcc atacgacgac gctcaact 28

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> artificial

<400> 3

gaagtctggg tccttggcag gatg 24

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<400> 4

actcgataca ctggcctagc 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<400> 5

caggtgtttg agggtagctc 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<400> 6
cggttcatca tggtagctc 20
<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial
<400> 7
actgccctc atcagactgc tact 24
<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial
<400> 8
cactgccttg tactcgggta gctg 24
<210> 9
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial
<400> 9
gttccaacct gtgcctcgcg tctt 24
<210> 10
<211> 26
<212> DNA
<213> artificial
<400> 10
agcgaggcat ggagagagcg gagcag 26
<210> 11
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial
<400> 11
cgtggtgagc atcttcggag tgg 23
<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial
<400> 12
ccttcttggt ccgcccgttc tta 23
<210> 13

<211> 30
<212> DNA
<213> artificial
<400> 13
atggacgcaa ctgtgaacat gatgttcgca 30
<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> artificial
<400> 14
ctttgaggtc ctggtccatc acgtgaccat 30
<210> 15
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial
<400> 15
ccattagggg ccatcatcgc tttc 24
<210> 16
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial
<400> 16
cactgctcac tggagggggc ttgc 24
<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial
<400> 17
tgctgcggtc caggccatca agag 24
<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> artificial
<400> 18
gggcactgtt cagttcagcg gatc 24
<210> 19
<211> 23
<212> DNA
<213> artificial

<400> 19

tctttccacc aggcccccg ctc 23

<210> 20

<211> 23

<212> DNA

<213> artificial

<400> 20

tgcgggcgga catggggaga tcc 23

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial

<400> 21

attcttcgtt gtcaagccgc caaagtggag 30

<210> 22

<211> 30

<212> DNA

<213> artificial

<400> 22

agttgtttgc tgcggagtgc tcattctcgtc 30

<210> 23

<211> 2127

<212> DNA

<213> virus SV40 LT (SV40 gp6)

<400> 23

atggataaag ttttaaacag agaggaatct ttgcagctaa tggaccttct aggtcttgaa 60

aggagtgcct gggggaatat tcctctgatg agaaaggcat atttaaaaa atgcaaggag 120

tttcatcctg ataaaggagg agatgaagaa aaaatgaaga aaatgaatac tctgtacaag 180

aaaatggaag atggagtaaa atatgctcat caacctgact ttggaggctt ctgggatgca 240

actgagattc caacctatgg aactgatgaa tgggagcagt ggtggaatgc ctttaatgag 300

gaaaacctgt ttgtctcaga agaaatgcca tctagtgatg atgaggctac tgcctgactct 360

caacattcta ctctccaaa aaagaagaga aaggtagaag accccaagga ctttccttca 420

gaattgctaa gttttttgag tcattgctgtg tttagtaata gaactcttgc ttgctttgct 480

atttacacca caaaggaaaa agctgcactg ctatacaaga aaattatgga aaaatattct 540

gtaaccttta taagtaggca taacagttat aatcataaca tactgttttt tcttactcca 600

cacaggcata gagtgtctgc tattaataac tatgctcaaa aattgtgtac ctttagcttt 660

ttaatttgta aaggggttaa taaggaatat ttgatgtata gtgccttgac tagagatcca 720

ttttctgtta ttgaggaaag ttgcccaggt gggttaaagg agcatgattt taatccagaa 780

gaagcagagg aaactaaaca agtgtcctgg aagcttgtaa cagagtatgc aatggaaaca 840
 aaatgtgatg atgtgttggt attgcttggg atgtacttgg aatttcagta cagttttgaa 900
 atgtgtttta aatgtattaa aaaagaacag cccagccact ataagtacca tgaaaagcat 960
 tatgcaaatg ctgctatatt tgctgacagc aaaaacaaaa aaaccatatg ccaacaggct 1020
 gttgatactg ttttagctaa aaagcgggtt gatagcctac aattaactag agaacaaatg 1080
 ttaacaaaca gatttaatga tcttttggat aggatggata taatgtttgg ttctacaggc 1140
 tctgtgaca tagaagaatg gatggctgga gttgcttggc tacactgttt gttgccccaa 1200
 atggattcag tgggtgatga ctttttaaaa tgcattggtg acaacattcc taaaaaaga 1260
 tactggctgt ttaaaggacc aattgatagt ggtaaaacta cattagcagc tgctttgctt 1320
 gaattatgtg gggggaaagc tttaaatgtt aatttgcctt tggacaggct gaactttgag 1380
 ctaggagtag ctattgacca gtttttagta gtttttgagg atgtaaaggg cactggaggg 1440
 gagtccagag atttgccttc aggtcaggga attaataacc tggacaattt aagggtattat 1500
 ttggatggca gtgttaaggt aaacttagaa aagaaacacc taaataaaag aactcaaata 1560
 tttccccctg gaatagtcac catgaatgag tacagtgtgc ctaaaacact gcaggccaga 1620
 tttgtaaaac aaatagattt taggccccaa gattatttaa agcattgcct ggaacgcagt 1680
 gagtttttgt tagaaaagag aataattcaa agtggcattg ctttgcttct tatgttaatt 1740
 tggtagacac ctgtggctga gtttgcctaa agtattcaga gcagaattgt ggagtggaaa 1800
 gagagattgg acaaagagtt tagtttgtca gtgtatcaaa aatgaagtt taatgtggct 1860
 atgggaattg gagttttaga ttggctaaga aacagtgatg atgatgatga agacagccag 1920
 gaaaatgctg ataaaaatga agatgggtggg gagaagaaca tggaagactc agggcatgaa 1980
 acaggcattg attcacagtc ccaaggctca tttcaggccc ctgagtcctc acagtctgtt 2040
 catgatcata atcagccata ccacatttgt agaggtttta cttgctttta aaaacctccc 2100
 acacctccc ctgaacctga aacataa 2127

<210> 24

<211> 456

<212> DNA

<213> virus HPV16 E6

<400> 24

atgtttcagg acccacagga gcgaccaga aagttaccac agttatgcac agagctgcaa 60
 acaactatac atgatataat attagaatgt gtgtactgca agcaacagtt actgcgacgt 120
 gaggtatatg actttgcttt tcgggattta tgcatagtat atagagatgg gaatccatat 180
 gctgtatgtg ataaatgttt aaagttttat tctaaaatta gtgagtatag acattattgt 240
 tatagtttgt atggaacaac attagaacag caatacaaca aaccgttgtg tgatttgta 300
 attaggtgta ttaactgtca aaagccactg tgtcctgaag aaaagcaaag acatctggac 360
 aaaaagcaaa gattccataa tataagggtt cggtggaccg gtcgatgtat gtcttggtgc 420
 agatcatcaa gaacacgtag agaaaccag ctgtaa 456

<210> 25

<211> 297

<212> DNA

<213> virus HPV16 E7

<400> 25

atgcatggag atacacctac attgcatgaa tatatgtag atttgcaacc agagacaact	60
gatctctact gttatgagca attaaatgac agctcagagg aggaggatga aatagatggt	120
ccagctggac aagcagaacc ggacagagcc cattacaata ttgtaacctt ttgttgcaag	180
tgtgactcta cgcttcggtt gtgcgtacaa agcacacacg tagacattcg tactttggaa	240
gacctgttaa tgggcacact aggaattgtg tgccccatct gttctcagaa accataa	297

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/324881

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01) i, C07K14/47(2006.01) i, C12N5/06(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)

C12N15/09, C07K14/47, C12N5/06

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

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

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2), Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database, Science Direct

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/080598 A1 (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 01 September, 2005 (01.09.05), Full text (Family: none)	1-18
A	TOKUZAWA, Y. et al, Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development, Mol Cell Biol, 2003, Vol.23, No.8, p.2699-708	1-18
A	WO 2002/97090 A1 (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 05 December, 2002 (05.12.02), Full text & EP 1403366 A1 & US 2004/137460 A1 & AU 2002306374 A1 & JP 2003-500255 A	1-18

☒ 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
26 March, 2007 (26.03.07)

Date of mailing of the international search report
17 April, 2007 (17.04.07)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/324881

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2004-161682 A (Kinki University), 10 June, 2004 (10.06.04), Full text (Family: none)	1-18
P,X	TAKAHASHI,K. et al, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, Cell, 2006, Vol.126, No.4, p.663-76	1-18
P,X	Shin'ya YAMANAKA et al., "Mouse Sen'i Gasaibo Kara Yudo Tanosei Kansaibo o Tsukuru Tanpakushitsu Kakusan Koso", 01 December, 2006 (01.12.06), Vol.51, No.15, pages 2346 to 2351	1-18

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C07K14/47(2006.01)i, C12N5/06(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. C12N15/09, C07K14/47, C12N5/06

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

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), JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2), 医学・薬学予稿集全文データベース, Science Direct

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 請求の範囲の番号
X	WO 2005/080598 A1 (住友製薬株式会社) 2005.09.01, 全文 (ファミリーなし)	1-18
A	TOKUZAWA, Y. et al, Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development, Mol Cell Biol, 2003, Vol.23, No.8, p.2699-708	1-18

☒ 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 6 . 0 3 . 2 0 0 7

国際調査報告の発送日

1 7 . 0 4 . 2 0 0 7

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)

4 N

3 0 3 8

左海 匡子

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 請求の範囲の番号
A	WO 2002/97090 A1 (住友製薬株式会社) 2002. 12. 05, 全文 & EP 1403366 A1 & US 2004/137460 A1 & AU 2002306374 A1 & JP 2003-500255 A	1-18
A	JP 2004-161682 A (学校法人近畿大学) 2004. 06. 10, 全文 (ファミリーなし)	1-18
P, X	TAKAHASHI, K. et al, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, Cell, 2006, Vol.126, No.4, p.663-76	1-18
P, X	山中伸弥ら、マウス線維芽細胞から誘導多能性幹細胞をつくる 蛋白質核酸酵素 (2006. 12. 01) 第51巻第15号第23 46-2351頁	1-18