

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2016-500260

(P2016-500260A)

(43) 公表日 平成28年1月12日 (2016. 1. 12)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 5
C 1 2 N 15/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願2015-547149 (P2015-547149)	(71) 出願人	507404514 バブラハム・インスティテュート BABRAHAM INSTITUTE 英国シービー22・3エイティ、ケンブリ ッジシャー ケンブリッジ バブラハム バブラハム・ホール
(86) (22) 出願日	平成25年12月17日 (2013. 12. 17)	(74) 代理人	100097456 弁理士 石川 徹
(85) 翻訳文提出日	平成27年8月13日 (2015. 8. 13)	(72) 発明者	ウォルフ レイク 英国 シービー22 3エーティ ケン ブリッジシャイア ケンブリッジ バブラ ハム ホール シー/オー バブラハム インスティテュート
(86) 国際出願番号	PCT/GB2013/053317		
(87) 国際公開番号	W02014/096800		
(87) 国際公開日	平成26年6月26日 (2014. 6. 26)		
(31) 優先権主張番号	1222693.2		
(32) 優先日	平成24年12月17日 (2012. 12. 17)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

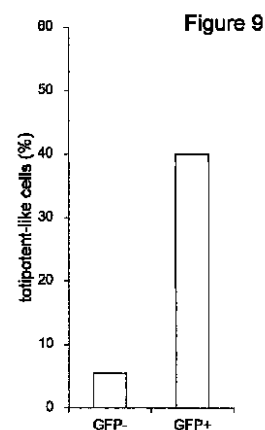
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規方法

(57) 【要約】

本発明は、T E Tファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを細胞内へ導入することにより、細胞の分化能を高める（例えば、全能性状態まで）方法に関する。本発明はまた、高められた分化能を有する細胞を調製するための方法およびキット、ならびに該細胞の使用にも関する。

【選択図】 図 9



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

細胞の分化能を高める方法であって、TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを前記細胞内へ導入するステップを含む、方法。

【請求項 2】

前記細胞が全能性状態まで高められる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記細胞が、真の多能性状態のような、多能性状態まで高められる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記 TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントが、TET2 または TET3 である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記 TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントが、TET3 である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

前記 TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントが、配列番号 11 または 13 の TET3 イソ型である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記細胞が、胚性幹 (ES) 細胞、特に E14 胚性幹 (ES) 細胞、などの多能性細胞である、請求項 1、2、または 4 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記細胞が体細胞である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記導入ステップが、前記 TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを含有するベクターを前記細胞にトランスフェクトすることを含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

前記ベクターがトランスポゾンベクターである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

高められた分化能を有する細胞を調製する方法であって、TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを細胞内へ導入するステップを含む、方法。

【請求項 12】

前記細胞が、胚性幹 (ES) 細胞、特に E14 胚性幹 (ES) 細胞、などの多能性細胞である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

前記細胞が体細胞である、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 14】

Oct3/4 遺伝子、Sox2 遺伝子、Klf4 遺伝子、および c-Myc 遺伝子を前記体細胞内へ導入するステップをさらに含む、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 15】

前記 TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントの導入後、前記細胞を培養するステップをさらに含む、請求項 11 ~ 14 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 16】

前記 TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを過剰発現させる 1 つ以上の細胞を選択するステップをさらに含む、請求項 11 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記 1 つ以上の細胞がフローサイトメトリーを使用して選択される、請求項 16 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 18】

請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に定義される方法によって入手可能な、高められた分化能を有する細胞。

【請求項 19】

配列番号 11 または 13 の TET3 イソ型を含む核酸。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 21】

細胞の分化能を高める方法における、請求項 19 に記載の前記核酸、または請求項 20 に記載の前記ベクターの使用。

10

【請求項 22】

療法に使用するための、請求項 18 に記載の高められた分化能を有する細胞。

【請求項 23】

前記療法が組織再生を含む、請求項 22 に記載の使用のための高められた分化能を有する細胞。

【請求項 24】

TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを含有するベクターと、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に定義される方法に従ってキットを使用するための説明書とを含むキット。

20

【請求項 25】

胚性幹 (ES) 細胞、特に E14 胚性幹 (ES) 細胞などの少なくとも 1 つの多能性細胞をさらに含む、請求項 24 に記載のキット。

【請求項 26】

少なくとも 1 つの体細胞をさらに含む、請求項 24 に記載のキット。

【請求項 27】

前記細胞を培養するための培地と、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に定義される方法に従って、前記高められた分化能を有する細胞を調製するための説明書とをさらに含む、請求項 25 または請求項 26 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】**【0001】**

本発明は、TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを細胞内へ導入することにより、細胞の分化能を高める方法に関する。本発明はまた、高められた分化能を有する細胞を調製するための方法およびキット、ならびに該細胞の使用にも関する。

【背景技術】**【0002】**

幹細胞の使用は、ヒト疾患の治療を急進的に変える可能性があると考えられている。幹細胞は、高レベルの分化能および自己再生を有する、つまり複数の細胞種に分化することができる、ということが知られている。この有利な特性は、臓器および組織の生成または修復に使用できる可能性がある。

40

【0003】

胚性幹 (ES) 細胞の分離が、幹細胞技術および研究に大躍進をもたらしている。ES細胞は多能性であるため、それらを複数の細胞種に分化するように誘導することができる。しかしながら、ES細胞は、疾患の治療において現在直面する大部分の問題に対する解決策としては、未だ期待に届いていない。例えば、ES細胞の移植は、現在の臓器移植と同じように、拒絶の問題に直面することが示されている。さらには、これらの細胞の使用は、ES細胞の採取中に胚が破壊されるという視点で、倫理的問題を提起する。

【0004】

50

近年、科学者は、患者自身の体細胞を多能性状態に脱分化させることを可能にするためにES細胞に伴う倫理的問題を克服する誘導多能性幹(iPS)細胞を生成する(国際公開第2007/069666号に記載されるように)方法を開発している。しかしながら、ヒト、およびげっ歯類系統を除く他の哺乳動物からのiPS細胞およびES細胞は、ほぼ全ての場合において、完全な多分化能の欠如に悩まされている。

【0005】

さらには、いかなる種からの多能性細胞、ES、およびiPS細胞も、胚体外細胞系列の組織を形成することができず、完全な生体を作るためには、ホスト胚盤胞に導入されなければならない。

【0006】

国際公開第2010/037001号は、幹細胞を再プログラムするために、TETタンパク質のファミリーを使用してDNAのシトシンメチル化状態を調節および検出する方法を記載している。

【0007】

したがって、幹細胞技術での使用のために、全能性細胞などのより高い分化能を有する細胞を生成するための方法が必要とされている。

【発明の概要】

【0008】

本発明の第1の態様に従って、細胞の分化能を高める方法が提供され、該方法は、TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを細胞内へ導入するステップを含む。

【0009】

本発明のさらなる態様に従って、TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを細胞内へ導入するステップを含む、高められた分化能を有する細胞を調製する方法が提供される。

【0010】

本発明のさらなる態様に従って、本明細書内で定義される方法により入手可能な高められた分化能を有する細胞が提供される。

【0011】

本発明のさらなる態様に従って、配列番号11または13のTET3イソ型を含む核酸が提供される。

【0012】

本発明のさらなる態様に従って、本明細書内で定義される核酸を含むベクターが提供される。

【0013】

本発明のさらなる態様に従って、細胞の分化能を高める方法において、本明細書内で定義される核酸、または本明細書内で定義されるベクターの使用が提供される。

【0014】

本発明のさらなる態様に従って、療法における使用のための、本明細書内で定義される高められた分化能を有する細胞が提供される。

【0015】

本発明のさらなる態様に従って、TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを含有するベクターと、本明細書内で定義される方法に従ってキットを使用するための説明書とを含むキットが提供される。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】5' Tet3 遺伝子座の概略図。図面は一定の縮尺率ではない。点線は、複数のエクソンおよびイントロンを表す。矢印は、プロモーター使用解析に使用されるqRT-PCRプライマーの位置を示す(実施例の項を参照)。示される開始コドンは、全長TET3タンパク質とインフレームである。「Cat」=触媒ドメイン。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

【図2】プロモーター使用およびC X X Cコーディングエクソンの取り込み。転写レベルは、参照遺伝子A t p 5 bおよびH s p c bの平均と比較して示される。卵母細胞（単一の値を有する）を除き、示される値は、エラーバーとして示される範囲を有する2つの生物学的複製の平均である。E B：胚様体。

【 0 0 1 8 】

【図3】T e t 3変異体1をトランスフェクトされたソート後の細胞におけるq P C Rによる候補遺伝子の発現解析。転写レベルは、参照遺伝子A t p 5 bおよびH s p c bの平均と比較して示される。M u t：触媒的に不活性な突然変異体。

【 0 0 1 9 】

【図4】T e t 3変異体1をトランスフェクトされたソート後の細胞におけるq P C Rによる対照遺伝子の発現解析。転写レベルは、参照遺伝子A t p 5 bおよびH s p c bの平均と比較して示される。M u t：触媒的に不活性な突然変異体。

【 0 0 2 0 】

【図5】T e t 3変異体3をトランスフェクトされたソート後の細胞におけるq P C Rによる候補遺伝子の発現解析。転写レベルは、参照遺伝子A t p 5 bおよびH s p c bの平均と比較して示される。M u t：触媒的に不活性な突然変異体。

【 0 0 2 1 】

【図6】T e t 3変異体1をトランスフェクトされたソート後の細胞における発現レベルの散布図。各点は、単一の遺伝子を表す。q P C Rにより検査される候補遺伝子（実施例4参照）および数個のファミリーメンバーは、黒で示され、いくつかの遺伝子例には矢印が付けられている。

【 0 0 2 2 】

【図7】T e t 3変異体1触媒的突然変異体をトランスフェクトされたソート後の細胞における発現レベルの散布図。各点は、単一の遺伝子を表す。q P C Rにより検査される候補遺伝子（実施例4参照）および数個のファミリーメンバーは、黒で示され、いくつかの遺伝子例には矢印が付けられている。

【 0 0 2 3 】

【図8】T e t 3変異体1を発現している胚性幹細胞における単細胞発現データの結果を示すヒートマップ。

【 0 0 2 4 】

【図9】T E T 3を発現する分集団中の全能性様細胞の割合を示すグラフ。

【 0 0 2 5 】

【図10】T E T 3発現の定量R T - P C R解析。転写レベルは、E 1 4（= 1）と比較して示される。値は、2つの個別の複製の平均であり、エラーバーはその範囲を示す。

【 0 0 2 6 】

【図11】6日間の分化転換分析後のコロニー形態の位相差顕微鏡図。画像は、観察されたコロニー形態の範囲を代表するものである。

【 0 0 2 7 】

【図12】6日間の分化転換分析後のC D 4 0発現のフローサイトメトリー解析。T S細胞培地内で6日間培養後、細胞をヤギ - C D 4 0一次抗体（R & D S y s t e m s）で、次いで抗ヤギA l e x a F l u o r 6 4 7二次抗体（I n v i t r o g e n）で、染色した。A：個々の細胞の、前方散乱幅（F S C - W）の値をY軸上に、および6 4 0 n m蛍光（すなわち、C D 4 0シグナル）をX軸上に示すドットプロット。C D 4 0陽性を判定する閾値、およびこのレベルを超える細胞のパーセンテージが示される。合計細胞集団におけるスチューデントのt検定は、E 1 4 E S細胞と比較して、双方のT E T 3過剰発現細胞株でC D 4 0陽性細胞の非常に著しい増加を示す（どちらのケースもp < 0 . 0 0 0 1）。B：各細胞株内でC D 4 0陽性と判定される細胞のパーセンテージの定量化。

【発明を実施するための形態】

10

20

30

40

50

【 0 0 2 8 】

本発明の第 1 の態様に従って、細胞の分化能を高める方法が提供され、該方法は、TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを細胞内へ導入するステップを含む。

【 0 0 2 9 】

本明細書内での「高められた分化能」への言及は、異なる細胞種へ分化するための増大された能力を有する細胞を指す。全能性細胞は、最も高い分化能を有する細胞であることが知られている。この後に多能性、複能性、少能性、次いで単能性細胞が続く。

【 0 0 3 0 】

一実施形態において、細胞の分化能は、真の多能性状態のような、多能性状態まで高められる。

10

【 0 0 3 1 】

本明細書内での「多能性」への言及は、複数種の細胞へと分化する可能性を有する細胞を指す。多能性細胞は胚体外細胞へ分化できないため、多能性細胞単独では、胎児または成体に発達することはできないという点において、これらの細胞は、全能性細胞よりも制限されている。したがって、完全な生体を作るためには、ドナー胚盤胞細胞を使用しなければならない。

【 0 0 3 2 】

本明細書内に記載される場合、iPS細胞を生成する方法は当該技術分野において既知であるが、これらの細胞は、それらのドナー体細胞のエピジェネティックな記憶を保持するために、完全な多分化能が欠如していることが示されている(Kim et al. (2011) Nature 467, p. 285 - 290)。したがって、これらの細胞は、複数の細胞種へと分化するための、生来の多能性細胞と同一の能力を有しないために、真の多能性であると見なされていない。

20

【 0 0 3 3 】

したがって、本明細書内での「真の多能性状態」への言及は、複数の細胞種へと分化するための、生来の多能性細胞と同一の能力を有する、すなわち、完全な多能性である細胞を指す。特に、真の / 完全な多能性細胞は、胚の 3 つの胚葉、すなわち、内胚葉、中胚葉、または外胚葉のいずれにも分化できる。

【 0 0 3 4 】

一実施形態において、細胞の分化能は、全能性状態に高められる。

30

【 0 0 3 5 】

したがって、本発明のさらなる態様に従って、細胞を全能性状態へ再プログラムする方法が提供され、該方法は、TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを細胞内へ導入するステップを含む。

【 0 0 3 6 】

本明細書内での「全能性」への言及は、胚体外組織を含む細胞をはじめとする、全種類の細胞へと分化する可能性を有する細胞を指す。したがって、全能性細胞は、ホストにより作られる胚盤胞細胞の使用を必要とすることなく、完全な生体へと発達することができるという利点を有する。「全能性」細胞への言及は、「全能性様」細胞、すなわち、全能性細胞との高い類似度、例えば、全能性細胞との高い転写性またはエピジェネティックな類似度を有する細胞を含むことを理解されたい(分化全能性の獲得をもたらす遺伝子発現シフトを記載している、Macfarlane et al. (2012) Nature 487, p. 57 - 63を参照)。さらには、本明細書内で使用される場合の「全能性」または「全能性様」細胞への言及は、多能性細胞よりも高い分化能を有する細胞を指す。

40

【 0 0 3 7 】

本明細書内での「体細胞」への言及は、生殖細胞および未分化幹細胞を除いた、生体の身体を構成するいかなる種類の細胞をも指す。したがって、体細胞は、例えば、皮膚細胞、心臓細胞、筋肉細胞、骨細胞、または血液細胞を含む。

【 0 0 3 8 】

50

細胞が特定の細胞種（例えば、皮膚、筋肉、血液等）へと分化すると、それらは異なる細胞種になる能力（または可能性）を失う。したがって、細胞を所望の細胞種へと操作できるように、多能または全能分化能の状態に戻るよう細胞を再プログラムすることが有利である。

【0039】

本明細書内での「再プログラム」への言及は、細胞が分化の異なる状態へと再変換されるプロセスを指す。本明細書内に記載される発明は、細胞を全能性状態へと再プログラムし、それによってその分化能および複数の細胞種へと分化する能力を増大させる。

【0040】

現在の幹細胞技術は、ES細胞およびiPS細胞の使用に依存する。しかしながら、これらの細胞種はどちらも、いくつかの短所を有する。例えば、iPS細胞は、生来の多能性細胞内には存在しない、それらのドナー体細胞のエピジェネティックな記憶を保持することが示されている（Kim et al. (2011) Nature 467, p. 285 - 290）。さらには、ヒト、およびげっ歯類系統を除く他の哺乳動物からのESおよびiPS細胞は、真の多能性ではないことが示されている。本発明は、細胞の分化能の状態を、例えば全能性状態に増大させて、ヒトESおよびiPS細胞に伴うこれらの問題を克服する方法を提供する。

10

【0041】

本明細書に示されるように、TETファミリー遺伝子（例えば、Tet3遺伝子）の使用は、細胞培養物中の全能性様幹細胞の数を増加させることができる（図9参照）。全能性様幹細胞のこの分集団は、栄養膜様細胞に分化形質転換する能力によって評価されるように、高められた分化能を有することが示されている（実施例7参照）。したがって、これらの細胞は、ドナー胚盤胞細胞を必要とすることなく、栄養膜などの胚体外組織を形成することができる。

20

【0042】

一実施形態において、本細胞は多能性細胞である。別の実施形態において、本細胞は体細胞である。

【0043】

一実施形態において、多能性細胞は哺乳動物からである。さらなる実施形態において、哺乳動物はヒトである。

30

【0044】

多能性細胞は、様々な供与源、例えば、胚性幹（ES）細胞または誘導多能性幹（iPS）細胞から入手することができ、それらは市販されており、または国際公開第2007/069666号に記載される方法を使用して入手してもよい。一実施形態において、多能性細胞は誘導多能性幹（iPS）細胞である。別の実施形態において、多能性細胞は胚性幹（ES）細胞である。さらなる実施形態において、胚性幹（ES）細胞はE14胚性幹（ES）細胞である。

【0045】

哺乳類のテンイレブントランスロケーション（TET）ファミリーは、3つのタンパク質（TET1、TET2、およびTET3）を含有し、それら全てが、それらのC末端触媒ドメイン間で高い相同性を共有する（Iyer et al. (2009) Cell Cycle 8, p. 1698 - 1710）。それらは全て、5-メチルシトシン（5mC）を5-ヒドロキシメチルシトシン（5hmC）として知られるDNAメチル化の別の形態へと変換することが示されている。5hmCの機能は依然として不明であるが、メチル基を除去することにより（すなわち、脱メチル化を介して）、遺伝子発現を調節すると考えられている。この3つのタンパク質は、かなり異なる発現プロファイルを有し、これまでの研究では、胚性幹（ES）細胞におけるTET1、造血発生および癌におけるTET2、および接合体におけるTET3の役割が示されている。特に、TET3は、低レベルのTET1およびTET2と比べて、卵母細胞および受精接体内で高度に発現することが分かっている（Gut et al. (2011) Nature 477, p. 606

40

50

- 610; Wossidlo et al. (2011) Nature 2, p. 241)。
3つのタンパク質ファミリー間の機能の違いは、依然として不明である。

【0046】

細胞を多分化能に再プログラムする主な態様は、それらのエピジェネティックランドスケープ、特にそれらのDNAメチル化プロファイルを変えることである。脱メチル化プロセスの一部として、5-メチルシトシンはTETタンパク質の触媒機能を媒介して酸化される。したがって、TETタンパク質の異所性発現は、DNAメチル化マークを再設定することにより、体細胞から多能性細胞への再プログラムを促進することができる(Costa et al., Nature 495, p. 370-374, 国際公開第2010/037001号)。さらには、TET1およびTET2の発現は、多能性細胞内で高く、DNA中の酸化5-メチルシトシン残留物のレベルも高い。

10

【0047】

しかしながら、本発明者らは、TETタンパク質(例えば、TET3)の発現が細胞の分化能を全能性状態へと高めることができるという驚くべき発見をした。この分化能向上は、再プログラム中に体細胞に影響を与えとも見られている。予想外に、この分化能向上は、TETタンパク質の触媒機能に依存せず、したがって、DNA脱メチル化につながらない。したがって、分化能の分化全能性への拡張は、TETタンパク質のこれまで説明されていなかった機能である。

【0048】

本明細書内での「TETファミリー遺伝子」への言及は、テンイレブントランスロケーション(TET)ファミリーの3つのタンパク質、TET1、TET2、またはTET3のうちの1つをコードする遺伝子を指す。そのような言及は、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、またはそれ以上の、TET1、TET2、またはTET3、特にヒトTET1、TET2、またはTET3との配列同一性を有する遺伝子を含む。

20

【0049】

本発明は、TETファミリー遺伝子のフラグメントを使用する方法も含む。そのようなフラグメントは、通常、少なくとも5アミノ酸長のタンパク質をコードする。好ましい実施形態において、それらは、6~10、11~15、16~25、26~50、51~75、76~100、または101~250または250~500、500~1000、1000~1500または1500~2000のアミノ酸のタンパク質をコードしてもよい。フラグメントは、除去される1つ以上のアミノ酸を有する配列、例えば、C末端短縮タンパク質、を含んでもよい。フラグメントはまた、例えば、CXXC(DNA結合)ドメインまたは触媒ドメインのないフラグメントなど、特定のドメインなしでタンパク質をコードする核酸を含んでもよい。

30

【0050】

「TETファミリー誘導体」への言及は、TETファミリータンパク質のタンパク質変異体をコードする核酸を指し、それは元の遺伝子とは異なる核酸配列を有するが、形状、構造、および/または機能において等価であると見なされるタンパク質を生成する。化学的に類似するアミノ酸配列の生成をもたらす変化は、本発明の範囲内に含まれる。本発明のポリペプチドの変異体は、例えば、突然変異により、自然発生してもよく、または、例えば、アミノ酸の置換で当該技術分野において周知の、部位特異的突然変異誘発などのポリペプチド工学技術を用いて作製してもよい。

40

【0051】

本発明のTETファミリー遺伝子の核酸配列における変化は、アミノ酸配列内に保存的变化または置換をもたらすことができる。したがって、本発明は、保存的变化または置換を有するポリペプチドを含む。本発明は、対象のTETファミリータンパク質の活性を損なわない保存的置換がなされる配列を含む。

【0052】

50

本発明の発明者らは、酵素の T E T ファミリーメンバー（特に T E T 3）の導入が、例えば、全能性状態への、細胞の分化能の増大を引き起こすという驚くべき発見をした。

【 0 0 5 3 】

一実施形態において、T E T ファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントは、T E T 2 もしくは T E T 3 遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントである。さらなる実施形態において、T E T ファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントは、T E T 3 遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントである。依然としてさらなる実施形態において、T E T ファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントは、T E T 3、特にヒト T E T 3 である。

【 0 0 5 4 】

一実施形態において、T E T ファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントは、配列番号 1 1、1 2、または 1 3、特に配列番号 1 1 または 1 3 より選択される T E T 3 イソ型である。一実施形態において、T E T ファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントは、配列番号 1 1 の T E T 3 イソ型である（T e t 3 変異体 1）。別の実施形態において、T E T ファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントは、配列番号 1 3 の T E T 3 イソ型である（T e t 3 変異体 3）。

【 0 0 5 5 】

T E T ファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントは、少なくとも 7 0 %、少なくとも 7 5 %、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 8 %、少なくとも 9 9 %、またはそれ以上の、配列番号 1 1 または 1 3 との配列同一性を含んでもよい。

【 0 0 5 6 】

一実施形態において、導入ステップは、T E T ファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを含有するベクターを細胞にトランスフェクトすることを含む。さらなる実施形態において、ベクターはトランスポゾンベクターである。

【 0 0 5 7 】

当該技術分野において既知の技術を使用して、標的配列酸を宿主細胞内へ導入するためにベクターが使用される（例えば、本明細書に記載される実施例 3 を参照）。ベクターは、標的配列の転写および翻訳を制御する様々な調節配列を含有してもよい。ベクターの例としては、ウィルスベクター、トランスポゾンベクター、プラスミドベクター、またはコスミドベクターが挙げられる。

【 0 0 5 8 】

本発明において使用される可能性のあるベクターは、様々な供給業者から、例えば、I n v i t r o g e n , I n c .（例えば、G a t e w a y（登録商標）C l o n i n g T e c h n o l o g y）、A m e r s h a m B i o s c i e n c e s , I n c .、および P r o m e g a , I n c . から市販されている。

【 0 0 5 9 】

トランスポゾンベクターは、「カットアンドペースト」機構を使用して標的配列をベクターおよび染色体間で移動させるために、トランスポゾンとして知られる可動遺伝因子を利用する。トランスポゾンベクターの例としては、P i g g y B a c ベクター（S y s t e m B i o s c i e n c e s）、または E Z - T n 5（商標）T r a n s p o s o n C o n s t r u c t i o n ベクター（I l l u m i n a , I n c .）が挙げられる。

【 0 0 6 0 】

ウィルスベクターは、遺伝子組換えウィルス内部の D N A または R N A からなる。ウィルスベクターは、標的配列を宿主細胞ゲノムに統合するために使用してもよい（すなわち、統合ウィルスベクター）。ウィルスベクターの例としては、アデノウィルスベクター、アデノウィルス随伴ベクター、レトロウィルスベクター、またはレンチウィルスベクター（例えば、H I V）が挙げられる。

【 0 0 6 1 】

プラスミドベクターは、ほぼ円形の二本鎖 D N A からなる。プラスミドベクターは、大

10

20

30

40

50

部分の組換えベクターのように、対象のDNAフラグメントが容易に挿入されることを可能にする数個の一般的に使用される制限部位を含有する短領域である、マルチクローニングサイト(MCS)を有する。

【0062】

本明細書での「トランスフェクション」への言及は、標的配列を発現できるようにベクターを宿主細胞に導入するプロセスを指す。ベクターを宿主細胞にトランスフェクトする方法としては、当該技術分野において周知の方法であるエレクトロポレーション、ソノポレーション、または光学トランスフェクションが挙げられる。

【0063】

本発明では、他の種類のトランスフェクション、例えば、ナノテクノロジーを使用する粒子に基づく方法、を想定してもよいことに留意すべきである。一実施形態において、TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントは、ナノ粒子に付着される。次いで、ナノ粒子は、例えば、細胞の核に直接ナノ粒子を送達する「遺伝子銃」(または「微粒子銃粒子送達システム」)の使用を介して、細胞にトランスフェクトするために使用することができる。

10

【0064】

ベクターが細胞内にトランスフェクトされると、細胞は標的配列を発現するように誘導され得る。特定のベクター、例えば、トランスポゾンベクターは、ベクターから標的配列を切除して、それを標的配列が発現される宿主細胞のゲノムへと送達するために、切除に基づく方法を使用し得る。切除に基づく方法の例としては、piggyBAC技術、Sleeping Beauty(SB)トランスポゾン、LINE1(L1)レトロトランスポゾン、またはCreloxP組換えが挙げられる。

20

【0065】

切除に基づく方法は、標的配列を宿主ゲノムへ送達するために、トランスポゾンを使用してもよい。piggyBACトランスポゾンは、再プログラムプロセスに影響を与える可能性のあるいかなる外因性DNA残存物をも残さずに、標的配列を切除することができるという特定の利点を有する。

【0066】

本発明のさらなる態様に従って、TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを細胞内へ導入するステップを含む、高められた分化能を有する細胞を調製する方法が提供される。

30

【0067】

本発明のさらなる態様に従って、TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを細胞内へ導入するステップを含む、再プログラムされた全能性細胞を調製する方法が提供される。

【0068】

一実施形態において、本細胞は多能性細胞である。

【0069】

別の実施形態において、本細胞は体細胞である。さらなる実施形態において、本細胞が体細胞であるとき、本方法は、Oct3/4遺伝子、Sox2遺伝子、Klf4遺伝子、およびc-Myc遺伝子を体細胞内へ導入するステップをさらに含む。

40

【0070】

本明細書に定義される方法を、体細胞(例えば、患者から入手した体細胞)を多能性または全能性状態へ誘導するために使用してもよい。これは、1つのステップ内で、または体細胞を多能性状態に誘導してから、次いで全能性状態に誘導することにより、達成してもよいということを理解されたい。例えば、山中因子などの既存の過剰発現システムと共同したTET(例えば、TET3)過剰発現は、本質的に1つの実験ステップ内における体細胞からの全能性細胞の誘導を可能にする。

【0071】

例えば、山中因子を導入することにより(すなわち、国際公開第2007/06966

50

6号に記載されているような、Oct3/4、Sox2、Klf4、およびc-Myc遺伝子)、体細胞を多能性状態に誘導するために、当該技術分野において広く利用される方法がある。これらの因子を、www.addgene.orgより入手可能なプラスミド20959(PB-TET-MKOS)などの4つの因子を含有するベクターを使用して導入してもよい。したがって、本明細書に記載される方法を使用して、TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを含有するベクターおよびOct3/4、Sox2、Klf4、およびc-Myc遺伝子を含有するベクターを体細胞にコトランスフェクトすることにより、体細胞を全能性状態に再プログラムしてもよい。

【0072】

本明細書内での「再プログラムされた全能性細胞」への言及は、TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントの導入を介してその分化能を増大させることにより、全能性状態に誘導された細胞を指す。

10

【0073】

対象の核酸配列を宿主細胞内へ導入する方法は、当該技術分野において周知である。例えば、1つの基本プロトコルは、以下のステップを伴う。

- a) 核酸標的配列(例えば、TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメント)の増幅、
- b) 標的配列のベクター(例えば、ウィルスベクター)への組換え、
- c) 選択可能マーカー(例えば、緑色蛍光タンパク質)を使用した、成功した組換えの識別、
- d) 組換えベクターの宿主細胞(例えば、多能性細胞または体細胞)へのトランスフェクション、
- e) 標的配列の宿主細胞ゲノムへの統合(例えば、piggyBAC技術を使用)、
- f) 選択可能マーカー(例えば、ピューロマイシン)を使用した、成功した統合の識別、
- g) 標的配列の発現の誘導(例えば、ドキシサイクリンを使用)、および
- h) 標的配列の発現に成功した再プログラムされた全能性細胞の選択(例えば、フローサイトメトリーを使用)。

20

【0074】

一実施形態において、本方法は、TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントの導入後に、細胞を培養するステップをさらに含む。

30

【0075】

遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを細胞へと導入した後、細胞が分化全能性を獲得し繁殖するのに十分な時間にわたって細胞を培養する。例えば、培養は、細胞培養用の一皿あたり、1~100千の細胞密度、例えば、約50千で継続することができる。

【0076】

高められた分化能細胞または再プログラムされた全能性細胞を、例えば、12時間以上、例えば1日以上、培養することにより、全能性または多能性細胞を調製するのに適切な培地、例えば、胚性幹細胞のための培地(例えば、ヒトES細胞のための培地)を使用することにより、入手してもよい。本明細書に記載される方法は、2日間以上、例えば5日間以上、7日間以上、および10日間以上、連続した培養を必要とし得る。

40

【0077】

一実施形態において、本方法は、TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを過剰発現させる1つ以上の細胞を選択するステップをさらに含む。

【0078】

一実施形態において、その1つ以上の細胞は、マーカー遺伝子を使用して選択される。

【0079】

一実施形態において、マーカー遺伝子は、薬剤耐性遺伝子、蛍光性タンパク質遺伝子、色素産生酵素遺伝子、またはそれらの組み合わせから選択することができる。さらなる実

50

施形態において、マーカー遺伝子は、薬剤耐性遺伝子、または蛍光性タンパク質遺伝子である。

【0080】

薬剤耐性遺伝子の例としては、ピューロマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、またはクロラムフェニコール耐性遺伝子が挙げられる。細胞は、相応しい薬剤を含有する培地（すなわち、選択培地）上で培養され、薬剤耐性遺伝子を取り込み、かつ発現する細胞のみが生き残る。したがって、選択培地を使用して細胞を培養することにより、薬剤耐性遺伝子を含む細胞を容易に選択することが可能である。

【0081】

蛍光性タンパク質遺伝子の例としては、緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子、黄色蛍光性タンパク質（YFP）遺伝子、赤色蛍光性タンパク質（RFP）遺伝子、またはエクオリン遺伝子が挙げられる。蛍光性タンパク質遺伝子を発現している細胞は、蛍光顕微鏡を使用して検出することができ、かつフローサイトメーターなどの細胞選別機を使用して選択することができる。蛍光活性化細胞選別（FACS）は、蛍光性タンパク質を発現している細胞を選択するために使用することができる、特殊な種類のフローサイトメトリーである。

【0082】

一実施形態において、1つ以上の細胞は、フローサイトメトリーを使用して選択される。

【0083】

色素産生酵素遺伝子の例としては、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、 α -グルクロニダーゼ遺伝子、アルカリホスファターゼ遺伝子、または分泌アルカリホスファターゼSEAP遺伝子が挙げられる。これらの色素産生酵素遺伝子を発現している細胞は、マーカー遺伝子を発現している細胞が検出可能な色（例えば、青白画面試験では青色）を生成するように、相応しい色素産生基質（例えば、 β -ガラクトシダーゼにはX-gal）を適用することにより、検出することができる。

【0084】

本明細書に記載される全てのマーカー遺伝子は、当業者に周知である。例えば、そのようなマーカー遺伝子を含有するベクターは、Invitrogen, Inc.（例えば、Gateway（登録商標）Cloning Technology）、Amersham Biosciences, Inc.、およびPromega, Inc.から市販されている。

【0085】

本発明のさらなる態様に従って、本明細書内で定義される方法により入手可能な高められた分化能を有する細胞が提供される。

【0086】

本発明のさらなる態様に従って、本明細書内で定義される方法により入手可能な再プログラムされた全能性細胞が提供される。

【0087】

本発明のさらなる態様に従って、配列番号11または13のTET3イソ型を含む核酸が提供される。

【0088】

本発明のさらなる態様に従って、本明細書内で定義される核酸を含むベクターが提供される。

【0089】

本発明のさらなる態様に従って、細胞の分化能を高める方法において、本明細書内で定義される核酸、または本明細書内で定義されるベクターの使用が提供される。

【0090】

本発明のさらなる態様に従って、細胞を全能性状態に再プログラムする方法において、

10

20

30

40

50

本明細書内で定義される核酸、または本明細書内で定義されるベクターの使用が提供される。

【0091】

本発明の高められた分化能細胞または再プログラムされた全能性細胞は、例えば、医療産業、化学産業、および農産業において、複数の用途がある。

【0092】

本発明の高められた分化能細胞または再プログラムされた全能性細胞は、細胞または組織再生など、療法に使用することができる。ヒトESおよびiPS細胞は、未感作多分化能のマーカーを示さないため、細胞置換療法においておよび疾患のモデルとしてのそれらの利用には限りがある。本発明は、多能性細胞をこの問題を克服することができるより高いレベルの分化能へと移行することができる。

10

【0093】

本発明の高められた分化能細胞または再プログラムされた全能性細胞は、家畜の生成、および大型動物モデルにおいて使用することができる。大型動物におけるクローニングおよび遺伝子操作のための現方法は、改変された細胞の低い自己再生力により制限される体細胞核移植(SCNT)技術に依存している。大型動物モデルにおけるESおよびiPS細胞の開発は、ヒトESおよびiPS細胞において観察される同じ分化能の欠如(上記のように)に悩まされている。本発明は、極めて重要なこととして繁殖することができ、かつ培養中に操作することができる真の多能性または全能性細胞の生成を提供し、家畜および疾患の大型動物モデルにおける遺伝子操作を能率化する。「大型動物」には、イヌ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、およびウマなどが含まれる。

20

【0094】

本発明の高められた分化能細胞または再プログラムされた全能性細胞は、薬剤スクリーニングに使用できる。例えば、細胞は、分化した細胞に付与して生理活性または毒性を評価するための化合物または薬をテストするために、対象の体細胞、組織、または臓器に分化され得る。

【0095】

本発明のさらなる態様に従って、療法における使用のための、本明細書内で定義される高められた分化能を有する細胞が提供される。

【0096】

本発明のさらなる態様に従って、療法に使用するための、本明細書内で定義される再プログラムされた全能性細胞が提供される。

30

【0097】

一実施形態において、療法は、組織再生を含む。

【0098】

本明細書内での「組織再生」への言及は、病気にかかったおよび損傷した臓器および組織の機能を、失ったまたは損傷した組織を再形成することにより修復する療法を指す。

【0099】

幹細胞は、複数種の組織に発達する能力を有するため、疾患または傷害を治療するためにこれらの細胞を損傷した組織内へ導入することができる。本発明の高められた分化能細胞または再プログラムされた全能性細胞を治療に使用できる疾患または傷害の例としては、貧血症、自己免疫疾患(例えば、関節炎、炎症性腸疾患、クローン病、糖尿病、多発性硬化症)、先天性欠損症、視覚消失、悪性腫瘍、循環器疾患(例えば、うっ血性心不全、心筋梗塞、卒中)、硬変症、聴覚消失、変性疾患(例えば、パーキンソン病)、遺伝障害、移植片対宿主病、免疫不全、不妊症、虚血、リソソーム蓄積症、筋損傷(例えば、心臓損傷)、神経損傷(例えば、脳損傷、脊椎損傷)、神経変性疾患(例えば、アルツハイマー病、痴呆症、ハンチントン病)、視力障害、および創傷治癒が挙げられる。

40

【0100】

本発明のさらなる態様に従って、TETファミリー遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを含有するベクターと、本明細書に定義される方法に従ってキットを使用する

50

ための説明書とを含むキットが提供される。

【0101】

本キットは、本方法の実行のための1つ以上の物品および/または試薬を含み得る。例えば、本明細書内に記載される方法において使用するためのTETファミリー遺伝子、その誘導体、もしくはそのフラグメント、オリゴヌクレオチドプローブおよび/または一対の増幅プライマーは、分離された形態で提供され得、例えば、内容物が外部環境から守られているバイアルのような好適な容器に入った、キットの一部であり得る。本キットは、例えば、PCRでの核酸の使用のための説明書を含み得る。核酸をPCR中で使用することを意図したキットは、ポリメラーゼ、ヌクレオチド、バッファ溶液等などの、反応に必要とされる1つ以上の他の試薬を含み得る。

10

【0102】

一実施形態において、本キットは、少なくとも1つの多能性細胞をさらに含む。別の実施形態において、本キットは、少なくとも1つの体細胞をさらに含む。

【0103】

一実施形態において、本キットは、細胞の培養のための培地と、本明細書に定義される方法に従って高められた分化能細胞または再プログラムされた全能性細胞を調製するための説明書とをさらに含む。

【0104】

本発明のさらなる態様に従って、細胞を多能性状態に再プログラムする方法を提供し、該方法は、TET3遺伝子、その誘導体、またはそのフラグメントを細胞内へ導入するステップを含む。一実施形態において、本細胞は体細胞である。

20

【0105】

本方法は、細胞を全能性状態に再プログラムするための、本明細書内で定義されるのと同じ方法ステップを含み得ることを理解されたい。TET3の細胞への導入は、分化能における変化、例えば、多能性状態をもたらす。したがって、TET3の体細胞への導入は、誘導多能性幹細胞の高められた生成を引き起こす。

【0106】

以下の研究は、本発明を例示する。

【実施例】

【0107】

30

実施例1：Tet3転写変異体の識別

Tet3遺伝子構造の初期のアノテーションは、RefSeq（受託番号：NM_183138）により提供された。しかしながら、このアノテーションからの大きな上流オープンリーディングフレームは、それが恐らく不完全であることを示した。エクソン1および3のコーディングに特化したプライマーを有するGeneRacerキット（Invitrogen）を使用して、cDNA末端の5'増幅を、ES細胞および体細胞組織内で実施した（表1）。この解析は、「カノニカル（Canonical）」および「下流」と名付けられる2つのプロモーターを識別した。

【表1】

表1 cDNA末端の5'増幅のために設計されたプライマー

40

プライマー	配列	配列番号
RACE 順方向1	AACCCACTCACACCAACCCTCAG	1
RACE 順方向2	CTGGACACACCGGCCAAGAAG	2
RACE 逆方向1	AAGCCTGGGAGGTGGAATGAGAAG	3
RACE 逆方向2	GGGCTCTCTAGCACCATTGACC	4
RACE 逆方向3	GCCCTGCGGGAAATCATAAAG	5

【0108】

卵母細胞（Smallwood et al. (2011) Nat. Genet. 43, p. 811-814）、ES細胞（Clonnan et al., 2008）、およ

50

び複数の体細胞組織 (Clonnan et al. (2008) Nat. Methods 5, p. 613 - 619; GenBank からの EST) からの高スループット RNA 配列決定 (RNA-seq) データの検査は、卵母細胞 (所定の「卵母細胞」) に使用が制限されると思われる追加の上流プロモーターの存在を提示した。

【0109】

上流プロモーターは、卵母細胞、ひいては接合体のための機構を提供して、高レベルの TET3 を蓄積し、次いで、他の組織中でのもっと低いレベルの生成へと切り替わることができる。加えて、卵母細胞固有のエクソン内には、残りの TET3 タンパク質とインフレーションである翻訳開始部位が存在する。この小さなペプチドは、卵母細胞中の TET3 の機能を変えることに幾らかの役割を果たし得る。RNA-seq データはまた、卵母細胞内に生成された転写には、CXXC ドメインをコードする Tet3 遺伝子の最初のエクソンが、主として欠如していることも示す。このドメインは、CpG アイランドへの結合を介してタンパク質を目標に定めるのに重要な、DNA シトシン-5-メチルトランスフェラーゼ 1 (DNMT1)、およびメチル-CpG 結合ドメインタンパク質 1 (MBD1) などの、他のエピジェネティックな修飾物質中に相同染色体を保有する。近年の研究では、TET1 CXXC ドメインが、非メチル化シトシンに加えて、5-メチルシトシン (5mC) および 5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) を結合する能力があることを提示している。このように、このドメインの差分取り込みは、卵母細胞と他の組織との間の TET3 タンパク質において機能変異をもたらし得る。「下流」プロモーターから生成された転写は、CXXC コーディングエクソンが欠如し、卵母細胞ではなく細胞におけるタンパク質変異を可能にするということも注目すべきである。

10

20

【0110】

実施例 2：組織固有の転写変異の解析

推定上の卵母細胞プロモーターの特殊性を確認するため、および異なる細胞種内の CXXC コーディングエクソン 1 の包含を調査するため、プライマーを、図 1 に示されるように、3つのプロモーターのそれぞれとエクソン 1 またはエクソン 3 いずれかとの間に (表 2 を参照) 設計した。実際には、前者は CXXC コーディングエクソンを含有する転写を取り込み、後者はこのエクソンが欠如する転写を取り込む。したがって、CXXC (-) 変異体のみを生成できる下流プロモーターの例外はあるが、各プロモーターの、それぞれ CXXC (+) または CXXC (-) 変異体と呼ばれるものが存在する。

30

【表 2】

表 2 プロモーター解析用に設計されたプライマー

プライマー	配列	配列番号
卵母細胞 順方向	GGGGTCGCACATGTTCCCTC	6
カノニカル 順方向	GAAACTTTGCCCTTTGTGC	7
下流 順方向	CTCGGCGGGGATAATGG	8
エクソン 1 逆方向	CTTGGCTGGGTGGGTCT	9
エクソン 3 逆方向	GCTTAGCTGCCTTGAATCTCCA	10

40

【0111】

Trizol (Invitrogen) および DNA-free Kit (Ambion) で処理した DNase を使用して、E14 胚様体、E14 ES 細胞、皮質、小脳、肺、および脾臓から RNA を抽出した。オリゴ (dT) プライマーを使用して、SuperScript II First Strand Synthesis System (Invitrogen) で cDNA を調製した。

【0112】

Stratagene Mx3005リアルタイムシステム (Agilent) 上で、Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix 試薬 (Agilent) を使用して、定量 PCR を実施した。0.5 サイクル未満の較差

50

を確実にするために、技術的複製のCt値を検査した。次いで、これらの複製を平均し、Ct法(Pfafﬀl(2004)Real Time PCR, p. 63 - 82)を使用して、2つの参照遺伝子、At p 5 bおよびH s p c bの平均に対して正規化した。その結果を、図2にまとめる。

【0113】

このデータは、卵母細胞プロモーターの有意義な使用は、検査した組織の中でも卵母細胞に限られることを確証し、専ら卵母細胞のみがこのプロモーターを用いるということをさらに示す。これは、卵母細胞中で観察されるTET3の高発現がプロモーター使用の働きであることを示す。

【0114】

加えて、卵母細胞中の98%を超えるTET3転写は、CXXCコーディングエクソンが欠如している。これは、卵母細胞エクソンのエクソン1との接合が短縮されたタンパク質をもたらすことを示す生物情報学的解析と一致する。対照的に、他の細胞種は、カノニカルおよび下流プロモーターを使用して、CXXCコーディングエクソンを有するおよび有しない双方の転写を生成する。このように、卵母細胞、したがって接合体に存在するTET3タンパク質は、固有のコード配列を含有し、CXXCエクソン包含のほぼ完全な欠如において他の検査された組織とはさらに対照を成す。これらの転写特性は、全能性細胞中のTET3の固有の役割に関連し得る。

【0115】

要するに、本明細書内に提示されるデータは、Tet3遺伝子座から生成される3つの主な転写変異体を識別する(表3参照)。

【表3】

表3 識別されるTet3変異体の概要

変異体	配列番号
変異体1:卵母細胞CXXC(-)	11
変異体2:カノニカルCXXC(-)	12
変異体3:カノニカルCXXC(+)	13

【0116】

実施例3:ES細胞中のTet3変異体のクローニングおよび過剰発現

Tet3変異体配列を、Gatewayシステム(Invitrogen)を使用し、数個の中間ベクターを介して誘導性過剰発現ベクターへクローン化した。クローン化配列に対して、IRES-EGFP 3'をさらに含有したpiggyBACシステム(Ding et al. (2005) Cell 122, p. 473 - 483; Wilson et al. (2007) Mol. Ther. 15, p. 139 - 145)(以後pBACと呼ぶ)を使用してゲノム取り込みを可能にするように設計された過剰発現ベクターを使用した。

【0117】

全能性細胞に対するその制限を仮定し、初期過剰発現解析のために変異体1(配列番号11)を選択した。

【0118】

E14 ES細胞を、15%FBS(Fetal Bovine Serum、ES細胞試験済、Invitrogen)、1xMEM非必須アミノ酸(Gibco)、1xPenicillin-Streptomycin(Gibco)、0.05mMのB-メルカプトエタノール(1:1000、Gibco)、および103ユニット/mlのLIF(Leukemia Inhibitory Factor、ESGRO、Millipore)で補足されたDMEM(L-Glutamine、4500mg/LのD-Glucose、110mg/LのSodium Pyruvate; Gibcoを有する)中、0.1%ゼラチン皮膜プレート内で、5%CO2を有する加湿雰囲気において37

10

20

30

40

50

で培養した。培地は毎日変更され、細胞は、選択下のときを除き、示されるように分割されて準密集 (subconfluence) に達した。

【0119】

FUGENE 6.0 (Roche) を使用して、各 $2 \mu\text{g}$ の pBAC 構成物および piggyBAC システムの他の化合物、つまり、piggyBAC トランスポゼースおよびピューロマイシン選択可能 rtTA トランス活性化因子をコードするプラスミドを 1×10^6 E14 ES 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの翌日、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ のピューロマイシンの培地への添加を介して選択を行い、その後維持した。

【0120】

細胞の選択の前日、TET3 および緑色蛍光タンパク質 (GFP) の同時発現を誘導するため、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ のドキサイクリンを添加して培地を培養した。細胞をトリプシン処理して過剰し、次いで、標準フローサイトメトリー技術を使用して、別々の GFP 陽性 (GFP+) および GFP 陰性 (GFP-) 集団に分類した。

【0121】

実施例 4：予備的な遺伝子発現解析

DNA/RNA AllPrep Micro Kit (Qiagen)、および DNA-free Kit (Ambion) を使用して処理した DNase を使用して、ソート後の細胞から RNA を抽出した。SuperScript III First Strand Synthesis System (Invitrogen) を使用して、 $1 \mu\text{g}$ の RNA から cDNA を調製した。

【0122】

以前の研究は、ES 細胞の小集団 (「二細胞 ES 細胞」と呼ばれる) が、全能性二細胞胚ステージで接合子ゲノム活性化に関連する遺伝子を上方制御し、かつ胚体外系列に寄与する能力などの分化全能性の特徴を示すことを示している (Macfarlane et al. (2012) Nature 487, p. 57-63)。TET3 の発現が卵母細胞および接合体に大きく制限されること、ならびにこのステージで固有のイソ型として存在することを前提として、ES 細胞中の TET3 過剰発現が、この集団を拡大または強化するという仮説を立てた。したがって、以下の候補は、二細胞ステージおよび二細胞 ES 細胞中におけるそれらの観察される上方制御を基に選択した (Macfarlane et al. (2012) Nature 487, p. 57-63) : MuERV-L、Zscan4c、Fgf5、Tbx3、Fbxo15、Pramel17、Mbd5、Calcoco2、Gm4340、Zfp352、Sp110、Tdpoz2、Tcstv3。

【0123】

加えて、ES 細胞中で発現されるが上方制御されることが予期されない数個の遺伝子を、対照群として選択した：Tet1、Tcl1、Ooe p。

【0124】

Tet3 転写を検査し、その過剰発現を検証した。

【0125】

これらの遺伝子それぞれのプライマーは、定量 RT-PCR 用に設計され、可能であればイントロン-エクソン境界に及ぶ (表 4 参照)。

10

20

30

40

【表 4】

表 4 遺伝子発現解析プライマーの概要

プライマー	配列	配列番号
<u>候補遺伝子</u>		
Tet3 順方向	GGTCACAGCCTGCATGGACT	14
Tet3 逆方向	AGCGATTGTCTTCCTTGGTCAG	15
MuERVL pol 順方向	ATCTCCTGGCACCTGGTATG	16
MuERVL pol 逆方向	AGAAGAAGGCATTTGCCAGA	17
Zfp352 順方向	GGTTCACACATCCATCCCTACA	18
Zfp352 逆方向	CCTGGCTGGGAAGCACCT	19
Fgf5 順方向	GGGATTGTAGGAATACGAGGAGTTT	20
Fgf5 逆方向	TCTTGGCTTTCCCTCTCTTGTT	21
Gm4340 順方向	GGACGAAGTTTAGGGACAGCA	22
Gm4340 逆方向	TCCAGAGCCAGGGTTTCTTG	23
Sp110 順方向	CAGAATGAGGCAGGAGATTGG	24
Sp110 逆方向	AGCACATATCAGGTCAGGAGTTCA	25
Zscan4c 順方向	GAAACAACAGCAATCTGCAACAA	26
Zscan4c 逆方向	TTCATTTCCACTACAGCTTTCACC	27
Tdpz2 順方向	ACACTCTCATCGTGGCTGACCT	28
Tdpz2 逆方向	CAGGGAGCGGAATCTTTCATC	29
Tbx3 順方向	TCCACCTCCAACAACACGTTT	30
Tbx3 逆方向	AAGTGCTGCTATCCGGCACT	31
Mbd5 順方向	CGCATCCTTCTCTGGTGCTC	32
Mbd5 逆方向	AGGTCTTGCATGTATAGCCTTCC	33
Tcstv3 順方向	GAATCTTGGACTTTACTTCCTCTCC	34
Tcstv3 逆方向	GTGGCTTTGCTCTTTGCTGA	35
Fbxo15 順方向	GCCTTGAATGGAGAACTGACTGT	36
Fbxo15 逆方向	AGCACACTGGAGAACTCACATACC	37
Pramel7 順方向	CGGCATCTCACTATTGATGATGTC	38
Pramel7 逆方向	CTGACTGAGAGAGCTGGCACAG	39
Calcoco2 順方向	GCAAGGACTGGATTGGCATC	40
Calcoco2 逆方向	CTGCTGTGTGGCTGAATCCTT	41
<u>対照遺伝子</u>		
Tet1 順方向	CCATTCTCACAAGGACATTCACA	42
Tet1 逆方向	GCAGGACGTGGAGTTGTTCA	43
Ooep 順方向	CCACACGGCTGATGCTGA	44
Ooep 逆方向	CTAGGTTCCAGAGTTGACGG	45
Tcl1 順方向	CTCCATGTATTGGCAGATCCTGTA	46
Tcl1 逆方向	CTCCGAGTCTATCAGTTCAAGCAA	47

【0126】

C1000 Touch CFX384 Real Time System (Bio Rad) で Brilliant II SYBR Green qPCR Master Mix 試薬 (Agilent) を使用して、定量 PCR を実施した。0.5 サイクル未満の較差を確実にするために、技術的複製の Ct 値を検査した。次いで、これらの複製を平均し、Ct 法 (Pfaffl (2004) Real-time PCR, p. 63 -

10

20

30

40

50

82)を使用して、2つの参照遺伝子、Atp5bおよびHspcbの平均に対して正規化した。Tet3変異体1の結果を、図3(候補遺伝子)および図4(対照遺伝子)に、Tet3変異体3の結果を、図5(候補遺伝子)にまとめる。

【0127】

Tet3は、所望に応じてGFP陽性細胞で上方制御される。驚くほどに、検査された全ての候補遺伝子は、発現がおよそ10倍上方制御されるものを数個含めたTet3変異体1およびその触媒的に不活性な対を発現している細胞中で、増加した発現を示す一方で、対照遺伝子は比較的安定している。大きな発現変化は、集団全体にわたるより控えめな上方制御というよりも、細胞の分集団内で発生し、包括的発現解析により薄められるものであると思われる。いずれの場合においても、このデータは、TET3過剰発現細胞の高められた分化能をもたらす全能性二細胞ステージの転写プログラムへのシフトを支持している。

10

【0128】

実施例5：mRNA-seqによるゲノムワイド遺伝子発現解析

伝令RNAを、Dynabeads mRNA Purification Kit (Invitrogen)を使用して、合計2μgのRNAから分離し、RNA Fragmentation Reagent (Ambion)でフラグメント化した。SuperScript III First Strand Synthesis Systemおよび3μgμl-1ランダムヘキサマー(Invitrogen)を用いてファーストストランドcDNA合成を行い、その後、DNAポリメラーゼIおよびRNase Hを用いてセカンドストランド合成を行った。精製後、PE2.0上にSangerインデックスを有するペアエンドアダプター、およびNEBNext DNA Library Prep Master Mix Set for Illumina(NEB)を使用して、配列決定ライブラリを二本鎖cDNAから作成した。試料を、Illumina Hi-Seq 2000の1つの列上にシングルエンド50bpプロトコルで配列決定し、インデックスされる各試料のために取得される配列決定リード数を、表5に示す。伝令RNA-Seqデータを、Ensemblリリース61からの遺伝子モデルと併せて、TopHat(v1.4.1, options -g 1)を使用して、マウスゲノム(アセンブリNCBIM37)に配置した。

20

【表5】

30

表5 mRNA-seqデータセットのリード数

試料	リード
変異体1 GFP-	52955484
変異体1 GFP+	47627618
変異体1 Mut GFP-	57632592
変異体1 Mut GFP+	45503316

【0129】

予備的な解析において、上記のqPCRデータ中最大上方制御を示した候補遺伝子は、それらの遺伝子ファミリーの数個のメンバーと一緒に上方制御を検査した：Pramel3、Pramel5、Pramel7、Sp110、Tdpz1、Tdpz3、Tdpz4、Tdpz5、Tet3、Zfp352、Zscan4c、Zscan4d、Zscan4e、Zscan4f、およびZscan4-ps2。

40

【0130】

GFP陽性および陰性細胞を、SeqMonk v0.23.1を使用して、散布図および上記の強調された遺伝子リストで比較した(図6および7)。ここでも、Tet3は、予測通りにGFP陽性細胞中で強く上方制御される。驚くほどに、この解析は、候補遺伝子およびそれらのファミリーメンバーが、不偏的ゲノムワイド配列決定により識別される最も上方制御された遺伝子であることを示す。qPCRデータと一致して、Tet3変異体1またはその触媒的に不活性な対の過剰発現は、遺伝子発現に同様の作用を与え、酸

50

化酵素機能がより「全能性様」の転写プログラムへのシフトを必要としないことを示す。

【 0 1 3 1 】

実施例 6：全能性様分集団の解析

胚性幹細胞培養物は、遺伝子発現および発生能に関して異質である。それらは、異なるマーカー遺伝子の発現を特徴とする分集団に分類することができる。個々の細胞は、異なる発現パターンを繰り返し、異なる分集団間を移動する。分集団の存在量は、同じ胚性幹細胞培養物内で比較的安定している。野生型 E S 細胞においては、細胞の極一部（5%）が、超早期未着床胚の発現プロファイル特徴を示す。これらの細胞は、大部分の E S 細胞と比べて拡大した分化能表現型を有し、および、それらは、凝集実験において E S 細胞が胚体外系列に寄与する非常に珍しいケースの原因であると考えられる。

10

【 0 1 3 2 】

T e t 3 変異体 1 を発現している E S 細胞中の全能性様分集団の存在量を評価した。個々の G F P - および G F P + 細胞からの c D N A を、S M A R T e r c D N A 増幅 (C l o n t e c h) を有する C 1 システム (F l u i d i g m) を使用して、分離した。E v a G r e e n q P C R ケミストリ (B i o - R a d) を使用した B i o m a r k H D マイクロフルイディシステム (F l u i d i g m) を用いて、安定状態の発現レベルを解析した。以下の遺伝子を、全能性様分集団のマーカーとして使用した（表 6 内に太字で強調表示される）：Z s c a n 4 c、Mu E R V - L、A r g 2、D u b 2 a、T c s t v 3、L g a l s 4。

20

【 0 1 3 3 】

これらの遺伝子それぞれのプライマーは、定量 R T - P C R 用に設計され、可能であればイントロン - エクソン境界に及ぶ（表 6 参照）。

【表 6】

表 6 単細胞遺伝子発現解析プライマーの概要

プライマー	配列	配列番号
Mervl_polnew_F	CCAACAGCAGAAACCAACACT	48
Mervl_polnew_R	AAGGCAAATCCATAACCAGAATA	49
Arg2_F	CTGGATCAAACCTTGCCCTCTC	50
Arg2_R	ATCCCAAGTCGATCAATCTCTCTC	51
Dub2a_F	AATGCCTATGTGCTCTTCTATGTG	52
Dub2a_R	AGGTTTCTTTGGTTGCTTTCTTCT	53
Tcstv3_F	GAATCTTGGACTTTACTTCCTCTCC	34 (表 4 参照)
Tcstv3_R	GTGGCTTTGCTCTTTGCTGA	35 (表 4 参照)
Lgals4_F	CAGCTTTATGAATGGCTCTTGG	54
Lgals4_R	ATCTGGACGTAGGACAAGGTGA	55
Stat3_F	CGAGAGCAGCAAAGAAGGAG	56
Stat3_R	GGGTAGAGGTAGACAAGTGGAGAC	57
Serpine2_F	TTCTTTCTTCATCTTGACCACA	58
Serpine2_R	ATCTTCTTCAGCACTTTACCAACTC	59
Stella_F	ATGAAGGACCCTGAAACTCCTC	60
Stella_R	ACTCTTGTTCTCCACAGGTACGG	61
Krt8_F	GACATCGAGATCACCACCTACC	62
Krt8_R	TTTCAATCTTCTTCACAACCACAG	63
Esrrb_F	GTATGCTATGCCTCCCAACGA	64
Esrrb_R	TACACGATGCCCAAGATGAGA	65
Tet2_F	GCCATTCTCAGGAGTCACTGC	66
Tet2_R	ACTTCTCGATTGTCTTCTCTATTGAGG	67
Ascl2_F	AGCCCGATGGAGCAGGAG	68
Ascl2_R	CCGAGCAGAGGTCAGTCAGC	69
Gata3_F	TCTGGAGGAGGAACGCTAATG	70
Gata3_R	GAGAGATGTGGCTCAGGGATG	71
Gata4_F	AGCAGCAGCAGTGAAGAGATG	72

30

40

50

Gata4_R	CGATGTCTGAGTGACAGGAGATG	73
Abcb5_F	GGTAGCACACAGGCTCTCCAC	74
Abcb5_R	ATGTCCTTGATTCCATTTGTTTCAT	75
Tgfb2_F	CCTTCGCCCTCTTTACATTGAT	76
Tgfb2_R	GCTTCGGGATTATGGTGTG	77
Tdrd7_F	CCAATAGCAGGTTTCAGTCCAAAG	78
Tdrd7_R	TAAGAGGCAGGAGGCGTGATA	79
Gata6_F	TCTACACAAGCGACCACCTCA	80
Gata6_R	GCCAGAGCACACCAAGAATC	81
Zfp352_F	GGTTCACACATCCATCCCTACA	18 (表 4 参照)
Zfp352_R	CCTGGCTGGGAAGCACCT	19 (表 4 参照)
Eomes_F	CACTGGATGAGGCAGGAGATTT	82
Eomes_R	GAGAAGGTGAAGGTCTGAGTCTTG	83
Brachyury_F	ATAACGCCAGCCACCTACT	84
Brachyury_R	TCATACATCGGAGAACCAGAAGAC	85
Sox2_F	CAGCTCGCAGACCTACATGAAC	86
Sox2_R	CTGGAGTGGGAGGAAGAGGTAA	87
Tet1_F	CCATTCTCACAAGGACATTCACA	42 (表 4 参照)
Tet1_R	GCAGGACGTGGAGTTGTTCA	43 (表 4 参照)
Oct4_F	GCTGCTGAAGCAGAAGAGGAT	88
Oct4_R	TCCTGAAGGTTCTCATTGTTGTC	89
Nanog_F	TACCTCAGCCTCCAGCAGATG	90
Nanog_R	CCAGATGCGTTCACCAGATAG	91
Atp5b_F	GGCCAAGATGTCCTGCTGTT	92
Atp5b_R	GCTGGTAGCCTACAGCAGAAGG	93
Hsp90_F	GCTGGCTGAGGACAAGGAGA	94
Hsp90_R	CGTCGGTTAGTGGGAATCTTCA	95

10

20

30

40

50

【 0 1 3 4 】

単細胞発現データを、SINGULAR Analysis Toolset 2.0 (Fluidigm) を使用して解析し、無監督クラスタリングの結果を、色が明るいほどより高い発現を示すヒートマップとして示す (図 8)。遺伝子が水平方向にクラスタ化される。全能性様状態のためのマーカー遺伝子は密接に関係しており、太字で強調表示される。個々の細胞は垂直方向にクラスタ化される。密接に関連した細胞の分集団は、全能性様マーカー遺伝子 (水平ボックスにより強調表示される) の非常に高い発現レベルを示すため、「全能性様」分集団と指定された。このカテゴリに入る細胞の割合は、Tet3 変異体 1 の発現時に劇的に上昇する。TET3 の発現がないまたは非常に低い細胞中では、わずか 5 % の細胞がこの分集団の一部である一方で、TET3 を発現している細胞中では、この割合は 40 % まで増加する (図 9)。したがって、この集団にわたって観察される全能性様発現プロファイルへのシフトは、全能性様分集団の劇的な拡大が媒介する。

【 0 1 3 5 】

実施例 7 : 分化転換分析による高められた分化能の論証

ES 細胞は、栄養膜などの胚体外組織ではなく、胚の多くの異なる細胞種を作成することができるため、多能性である。栄養膜幹 (TS) 細胞培養に使用される成長条件において栄養膜様細胞を形成する能力は、こうして、拡大した分化能のインビトロアッセイを提供する (Ng et al. (2008) Nat Cell Biol. 10, 1280 - 1290)。この試験は、野生型 E14 ES 細胞と、Tet3 変異体 1 (Tet3 クローン 2 および Tet3 クローン 7 と呼ばれる) を恒常的に過剰発現している 2 つの ES 細胞株とに適用される。正の対照として、Ras 導入遺伝子 (iRas と呼ばれる) を過剰発現させるか、著しい分化転換を経ることで知られる Oct4 発現 (ZHBTC4 と呼ばれる) が欠如しているか、のいずれかの遺伝子改変細胞株を、並行して試験した (Niwa et al. (2000) Nat. Genet. 24, 372 - 376; Niwa

e t a l . (2 0 0 5) C e l l 1 2 3 , 9 1 7 - 9 2 9) 。

【 0 1 3 6 】

任意の観察される変化をTET3発現のレベルに関連付けるために、qRT-PCR解析を、本明細書内で先に記載した野生型E14 ES細胞および2つのTet3過剰発現ES細胞株で実施した(図10)。Tet3クローン7は、Tet3クローン2よりおよそ2倍多くTET3を発現し、これら双方の細胞株は、E14細胞と比べて著しく増加したTet3転写レベルを有する。

【 0 1 3 7 】

分化転換分析

20% FBSで補足されたRPMI 1640、1 mMのビルビン酸ナトリウム、50 U/mLのペニシリン-ストレプトマイシン、および0.05 mMのB-メルカプトエタノールからなるTSベース培地を、2日間細胞培養皿上で照射を受けたマウス胚繊維芽(MEF)細胞とのインキュベーションにより条件付け、0.22 μmフィルタを通過させた。完全TS細胞培地は、70%条件付け培地、30% TSベース培地、20 ng/mLの-胎児成長因子、および1 μg/mLのヘパリンを組み合わせることにより調製した。

10

【 0 1 3 8 】

完全TS細胞培地での6日間の培養後、形態(図11)、およびTS細胞マーカーCD40のフローサイトメトリー解析により(図12)、分化転換を評価した。

【 0 1 3 9 】

20

代表的な位相差画像の検査は、E14細胞中では主として欠如していたTET3過剰発現細胞株中のZHBTC4細胞の栄養膜様形態への著しいシフトを明らかにしている。この作用は、Tet3クローン7細胞株中でより際立っていた。

【 0 1 4 0 】

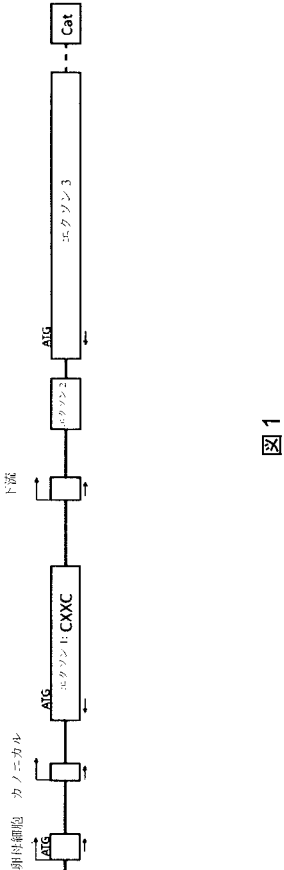
CD40は、TS細胞とES細胞の区別のための確立したマーカーである(Rugg-Gunn et al . (2 0 1 2) C e l l 2 2 , 8 8 7 - 9 0 1)。フローサイトメトリー解析は、TET3過剰発現時のCD40陽性細胞数の明白な増加を示している。細胞集団全体の統計的試験は、E14 ES細胞と比較して双方のTET3過剰発現細胞株の非常に著しい変化を確認している(スチューデントのt検定; 双方のケースで $p < 0.0001$)。ここでも、変化はTet3クローン7細胞株中でより広範にわたり、CD40陽性細胞のレベルは、正の対照iRas細胞株で観察されるものとほぼ同等に達している。

30

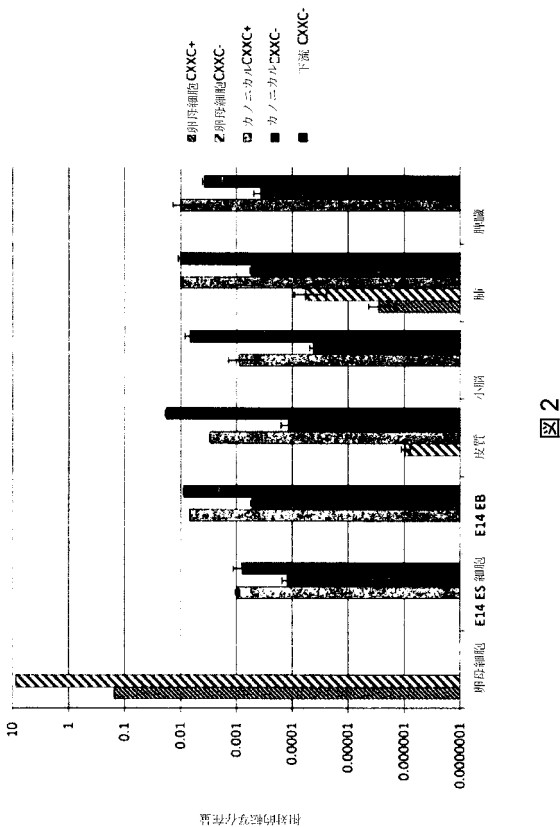
【 0 1 4 1 】

このデータは、ES細胞中のTET3の過剰発現が、栄養膜様状態に分化形質転換する能力の強力な向上をもたらすことを示し、発生能の増進を示す。さらには、この分化能の拡張は、細胞が受け取るTET3量と関連があり、双方の解析において、より高いTET3発現を有する細胞株(クローン7)がより大きな作用を示した。

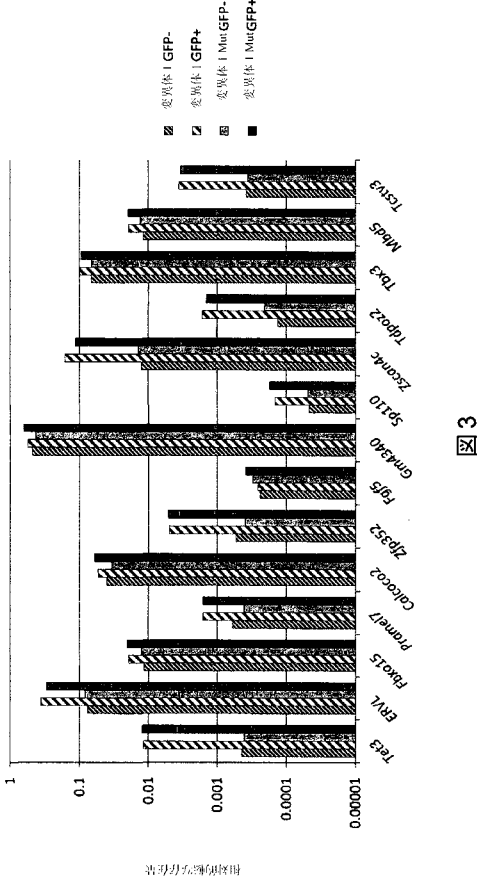
【 図 1 】



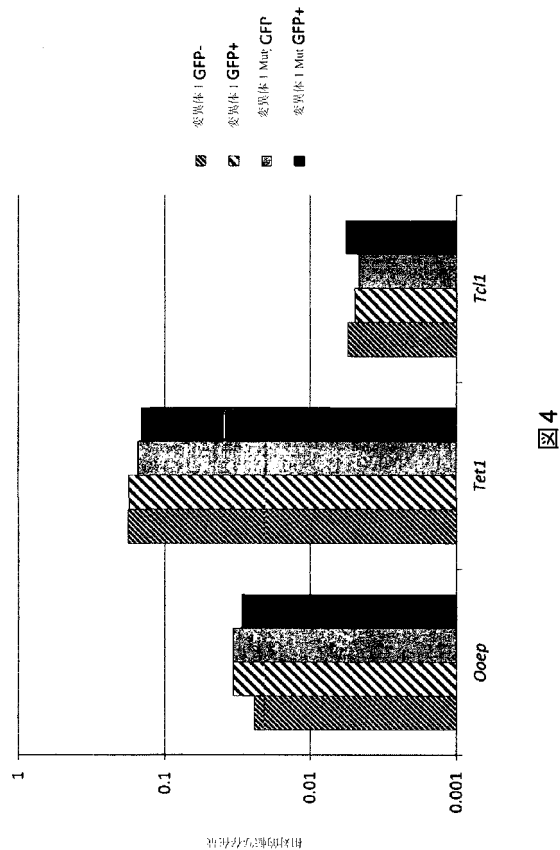
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



【図 9】

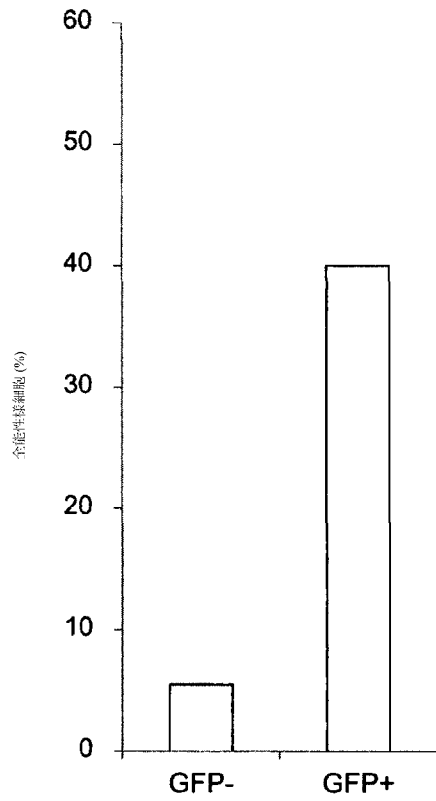


図 9

【図 10】

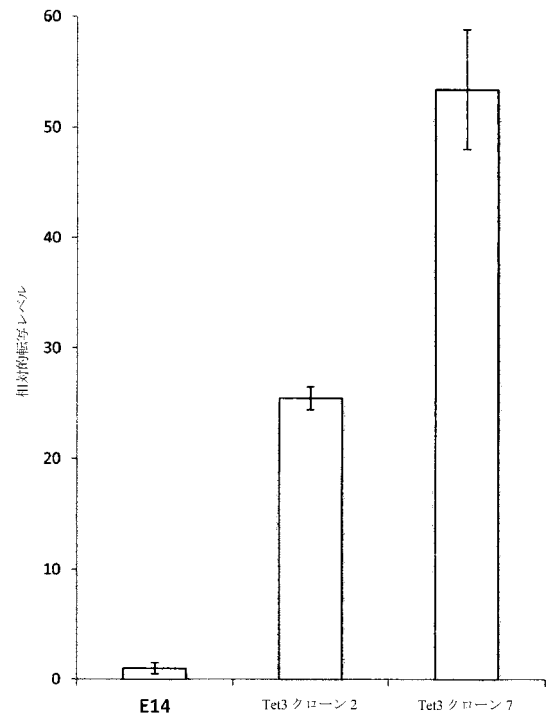


図 10

【図 11】

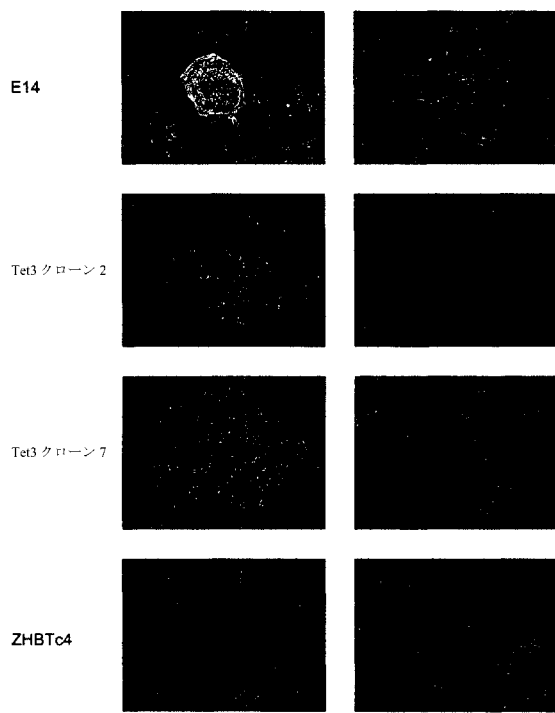


図 11

【図 12】

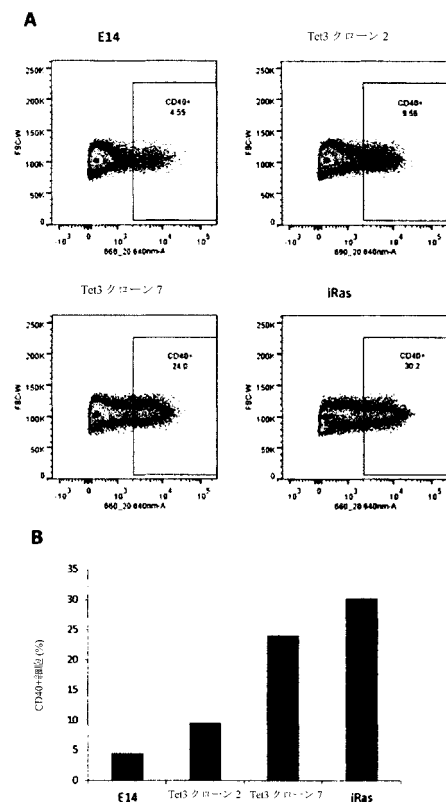


図 12

【手続補正書】

【提出日】平成27年9月14日(2015.9.14)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2016500260000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2013/053317

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N9/02 C12N5/074 C12N5/0735 ADD.		
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) C12N		
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) EPO-Internal, CHEM ABS Data, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011/236894 A1 (RAO ANJANA [US] ET AL) 29 September 2011 (2011-09-29) the whole document paragraph [0087] - paragraph [0116] paragraph [0332] - paragraph [0349] claims 5-11 paragraph [0316] - paragraph [0331] ----- -/--	1,3,4, 8-11, 13-15, 18, 22-24, 26,27
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
27 February 2014		11/03/2014
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Zuber Perez, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2013/053317

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JOLENE OOI ET AL: "Delineating nuclear reprogramming", PROTEIN & CELL, vol. 3, no. 5, 31 March 2012 (2012-03-31), pages 329-345, XP055103898, ISSN: 1674-800X, DOI: 10.1007/s13238-012-2920-x page 334; figure 2 page 336, last paragraph - page 337, paragraph 4	1,3,4,8, 9,11,18, 22-24, 26,27
X	----- YUFEI XU ET AL: "Tet3 CXXC Domain and Dioxygenase Activity Cooperatively Regulate Key Genes for Xenopus Eye and Neural Development", CELL, vol. 151, no. 6, 1 December 2012 (2012-12-01), pages 1200-1213, XP055104478, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2012.11.014 the whole document	19,20
X	-& DATABASE EMBL [Online] 12 December 2012 (2012-12-12), "Mus musculus TET3 isoform 1 mRNA, complete cds, alternatively spliced.", XP002720940, retrieved from EBI accession no. EM_STD:HQ423151 Database accession no. HQ423151 the whole document	19
A	----- TIAN-PENG GU ET AL: "The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes", NATURE, vol. 477, no. 7366, 4 September 2011 (2011-09-04), pages 606-610, XP055104128, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature10443 the whole document	1-27
A	----- H. WU ET AL: "Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation", GENES & DEVELOPMENT, vol. 25, no. 23, 1 December 2011 (2011-12-01), pages 2436-2452, XP055103980, ISSN: 0890-9369, DOI: 10.1101/gad.179184.111 the whole document page 2445 - page 2446 ----- -/--	1-27

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2013/053317

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KEITH E. SZULWACH ET AL: "Integrating 5-Hydroxymethylcytosine into the Epigenomic Landscape of Human Embryonic Stem Cells", PLOS GENETICS, vol. 7, no. 6, 1 June 2011 (2011-06-01), page e1002154, XP055104552, ISSN: 1553-7390, DOI: 10.1371/journal.pgen.1002154 the whole document	1-27
X,P	----- Yawei Gao et al: "Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC Induction Reveals an Important Role of DNA Methylation and Hydroxymethylation in Reprogramming", CELL STEM CELL, vol. 12, no. 4, 1 April 2013 (2013-04-01), pages 453-469, XP055104076, ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/j.stem.2013.02.005 the whole document	1,3, 8-11, 13-18, 22,23
X,P	----- STEVEN A. JACKSON ET AL: "The Nexus of Tet1 and the Pluripotency Network", CELL STEM CELL, vol. 12, no. 4, 1 April 2013 (2013-04-01), pages 387-388, XP055104074, ISSN: 1934-5909, DOI: 10.1016/j.stem.2013.03.007 the whole document	1,3, 8-11, 13-18, 22,23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2013/053317

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2011236894 A1	29-09-2011	US 2011236894 A1	29-09-2011
		US 2013177912 A1	11-07-2013
		WO 2010037001 A2	01-04-2010

フロントページの続き

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

(72)発明者 ジュリアン ピート

英国 シービー 2 2 3 エーティー ケンブリッジシャイア ケンブリッジ バブラハム ホール
シーノオー バブラハム インスティテュート

(72)発明者 ティモシイ ホレ

英国 シービー 2 2 3 エーティー ケンブリッジシャイア ケンブリッジ バブラハム ホール
シーノオー バブラハム インスティテュート

(72)発明者 クリステル クルエゲル

英国 シービー 2 2 3 エーティー ケンブリッジシャイア ケンブリッジ バブラハム ホール
シーノオー バブラハム インスティテュート

F ターム(参考) 4B024 AA01 CA04 CA11 CA12 CA20 EA04 GA11 HA08

4B065 AA90X AB01 AC20 BA02 CA44