

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5827220号
(P5827220)

(45) 発行日 平成27年12月2日(2015. 12. 2)

(24) 登録日 平成27年10月23日(2015. 10. 23)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 5 (全 29 頁)

(21) 出願番号	特願2012-513400 (P2012-513400)	(73) 特許権者	504132272
(86) (22) 出願日	平成23年1月21日 (2011. 1. 21)		国立大学法人京都大学
(65) 公表番号	特表2013-517758 (P2013-517758A)		京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
(43) 公表日	平成25年5月20日 (2013. 5. 20)	(74) 代理人	100062144
(86) 国際出願番号	PCT/JP2011/051685		弁理士 青山 篠
(87) 国際公開番号	W02011/090221	(74) 代理人	100101454
(87) 国際公開日	平成23年7月28日 (2011. 7. 28)		弁理士 山田 卓二
審査請求日	平成26年1月17日 (2014. 1. 17)	(74) 代理人	100106518
(31) 優先権主張番号	61/282, 320		弁理士 松谷 道子
(32) 優先日	平成22年1月22日 (2010. 1. 22)	(72) 発明者	山中 伸弥
(33) 優先権主張国	米国 (US)		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 i P S 細胞研究セン ター内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 人工多能性幹細胞の樹立効率改善方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

M y c 変異体または該変異体をコードする核酸と核初期化物質とを体細胞に導入する工程を含み、下記特徴を有する i P S 細胞の製造方法：

核初期化物質は、O c tファミリーのメンバー、S o xファミリーのメンバー、および K l fファミリーのメンバー、またはそれらをコードする核酸を含む、

O c tファミリーのメンバーは、O c t 1 A、O c t 3 / 4 または O c t 6 である、

S o xファミリーのメンバーは、S o x 1、S o x 2、S o x 3、S o x 7、S o x 1 5、S o x 1 7 または S o x 1 8 である、

K l fファミリーのメンバーは、K l f 1、K l f 2、K l f 4 または K l f 5 である

10

M y c 変異体は、以下の (1) ~ (4) のいずれかである：

(1) 配列番号：2 に記載のヒト c - M y c のアミノ酸配列の第 1 位 ~ 第 4 1 位を欠失し、かつ第 6 5 位以降を有している c - M y c 変異体、

(2) 配列番号：2 に記載のヒト c - M y c のアミノ酸配列の第 1 位 ~ 第 1 0 7 位を欠失し、かつ第 1 2 7 位以降を有している c - M y c 変異体、

(3) 配列番号：2 に記載のヒト c - M y c のアミノ酸配列の第 1 位 ~ 第 1 3 位を欠失し、第 1 4 位以降を有しており、かつ第 1 3 5 位の T r p が G l u または G l y に置換されている c - M y c 変異体、および

(4) 配列番号：6 に記載のヒト L - M y c のアミノ酸配列の第 1 ~ 第 2 1 位を欠失し、

20

かつ第45位以降を有しているL-Myc変異体。

【請求項2】

Myc変異体が、以下の(a)～(f)のいずれかである請求項1記載の方法：

(a) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第41位を欠失し、かつ第42位以降を有しているc-Myc変異体、

(b) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第64位を欠失し、かつ第65位以降を有しているc-Myc変異体、

(c) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第107位を欠失し、かつ第108位以降を有しているc-Myc変異体、

(d) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第13位を欠失し、第14位以降を有しており、かつ第135位のTrpがGluまたはGlyに置換されているc-Myc変異体、

(e) 配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第1～第21位を欠失し、かつ第22位以降を有しているL-Myc変異体、および

(f) 配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第1～第44位を欠失し、かつ第45位以降を有しているL-Myc変異体。

【請求項3】

Myc変異体が請求項1の(1)または(2)いずれかの変異に加えて配列番号2の第135位のTrpがGluまたはGlyに置換されているc-Myc変異体である、請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

Myc変異体が請求項2の(a)、(b)および(c)のいずれかの変異に加えて配列番号2の第135位のTrpがGluまたはGlyに置換されているc-Myc変異体である、請求項3記載の方法。

【請求項5】

核初期化物質が、Oct3/4、Sox2およびKlf4、またはそれらをコードする核酸を含む、請求項1～4いずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、人工多能性幹細胞（以下、iPS細胞という）の樹立効率の改善方法およびそのための物質に関する。

【背景技術】

【0002】

近年、マウスおよびヒトのiPS細胞が樹立された。Takahashi及びYamanaka（非特許文献1）は、Fbx15遺伝子座にネオマイシン耐性遺伝子をノックインしたレポーターマウス由来の線維芽細胞に、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Myc遺伝子を導入し強制発現させることによって、iPS細胞を誘導した。Okitaら（非特許文献2）は、Nanogの遺伝子座に緑色蛍光タンパク質（GFP）及びピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを作製し、該マウス由来の線維芽細胞で上記4遺伝子を強制発現させ、ピューロマイシン耐性かつGFP陽性の細胞を選別することにより、遺伝子発現やエピジェネティック修飾が胚性幹（ES）細胞とほぼ同等のiPS細胞（Nanog iPS細胞）を樹立することに成功した。なお、Nanogは多能性細胞に特異的に発現し、Fbx15よりも多能性細胞に発現が限局している。同様の結果が他のグループによっても再現された（非特許文献3および4）。その後、c-Myc遺伝子を除いた3遺伝子によってもiPS細胞を作製できることが明らかとなった（非特許文献5）。

【0003】

さらに、Takahashiら（非特許文献6）は、ヒトの皮膚由来線維芽細胞にマウスと同様の4遺伝子を導入することにより、iPS細胞を樹立することに成功した。一方、Yuら（非特許文献7）は、Klf4とc-Mycの代わりにNanogとLin28を使用してヒトiPS細胞を作製した。ま

10

20

30

40

50

た、Parkら（非特許文献8）は、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Mycの4因子に加えて、ヒト細胞不死化遺伝子として知られるTERTとSV40ラージT抗原を用いて、ヒトiPS細胞を作製した。このように、体細胞に特定因子を導入することにより、ヒト及びマウスで、分化多能性においてES細胞と遜色のないiPS細胞を作製できることが示された。

【0004】

c-Myc遺伝子は腫瘍発生のリスクを伴うため、治療に用いられるiPS細胞を誘導する際には使用しないことが望ましい。しかしながらc-Mycを除いた3遺伝子ではiPS細胞の樹立効率が極めて低い（非特許文献5）、c-Mycと同等またはそれ以上のiPS細胞樹立効率改善効果を有し、かつ腫瘍発生のリスクが低減化された、c-Mycに代わる因子の探索が重要であると考えられている。

10

【0005】

これに関して本発明者らは以前に、ヒトiPS細胞の樹立において、c-Mycの代わりにL-Mycを用いることによりiPS細胞の樹立効率が向上すること、および、キメラマウスの生存日数が増加し、腫瘍形成が減少することを明らかにしている（特許文献1および2）。

引用文献（下記文献は引用により本願の一部を構成する）：

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】米国特許出願公開第2009-0227032号

【特許文献2】国際公開第2009/057831号

20

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Takahashi, K. and Yamanaka, S., Cell, 126: 663-676 (2006)

【非特許文献2】Okita, K. et al., Nature, 448: 313-317 (2007)

【非特許文献3】Wernig, M. et al., Nature, 448: 318-324 (2007)

【非特許文献4】Maherali, N. et al., Cell Stem Cell, 1: 55-70 (2007)

【非特許文献5】Nakagawa, M. et al., Nat. Biotechnol., 26: 101-106 (2008)

【非特許文献6】Takahashi, K. et al., Cell, 131: 861-872 (2007)

【非特許文献7】Yu, J. et al., Science, 318: 1917-1920 (2007)

【非特許文献8】Park, I.H. et al., Nature, 451: 141-146 (2008)

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

本発明の目的は、iPS細胞の新規な樹立効率改善方法、iPS細胞の樹立効率改善剤を提供することである。

c-Mycは形質転換活性を有しており、一方L-Mycは形質転換活性がc-Mycに比べて非常に低い（c-Mycの1～10%程度）ことが報告されている（Birrer et al. Molecular and Cellular Biology 8:2668-2673, 1988、Barrett et al. Molecular and Cellular Biology 12: 3130-3137, 1992）（これらの文献は引用により本願の一部を構成する）。

【課題を解決するための手段】

40

【0009】

本発明者らは、c-Mycと同等またはそれ以上のiPS細胞の樹立効率改善効果を有するMyc変異体について鋭意検討を行った。その結果、c-Mycが有する形質転換活性（NIH3T3細胞に対する形質転換活性）を低減させることにより、c-Mycに比してiPS細胞誘導活性が上昇し、また全コロニー数に対するiPSコロニー数の割合も上昇することを明らかにした。また前述のようにL-Mycは形質転換活性をほとんど有していないが、当該L-Mycおよびその変異体についてもc-Mycに比してiPS細胞誘導活性が上昇しており、全コロニー数に対するiPSコロニー数の割合も上昇していることを明らかにした。

【0010】

以上のように、c-Mycの有する形質転換活性はヒトiPS細胞誘導にむしろマイナスに働い

50

ていたことから、形質転換活性を低減させたMyc変異体がiPS細胞誘導において有用であることが示された。

【0011】

なお、c-Mycの有する形質転換活性は腫瘍形成に關与している可能性があるため（Lutz, W. et al Biochim Biophys Acta 1602:61-71, 2002; Eilers, M. and Eisenman, RN Genes Dev 22:2755-2766, 2008）（これらの文献は引用により本願の一部を構成する）、本発明における形質転換活性を低減したMyc変異体をiPS細胞誘導に用いることにより、c-Mycを用いる場合に比して腫瘍化リスクの低減化にもつながることが期待される。

【0012】

すなわち、本発明は以下に掲げるものである。

10

[1] 以下の(1)および(2)：

(1)c-Mycと同等またはそれ以上のiPS細胞樹立効率改善効果を有し、かつ

(2)c-Mycに比して形質転換活性が低減している、

という特徴を有するMyc変異体または該変異体をコードする核酸を、核初期化工程において体細胞に導入する工程を含む、iPS細胞の樹立効率改善方法。

[2] 体細胞がヒト由来の体細胞である、[1]記載の方法。

[3] Myc変異体のNIH3T3細胞に対する形質転換活性がc-Mycに比して低下している、[1]または[2]記載の方法。

[4] Myc変異体がc-Myc変異体、N-Myc変異体またはL-Myc変異体のいずれかである、[1]～[3]いずれか記載の方法。

20

[5] c-Myc変異体が、配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第41位の全部または一部を欠失している、[4]記載の方法。

[6] c-Myc変異体が以下の(1)～(4)のいずれかである、[5]記載の方法：

(1) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第41位を欠失した変異体、

(2) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第64位を欠失した変異体、

(3) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第107位を欠失した変異体、

(4) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第13位を欠失し、かつ第135位が変異した変異体。

[7] c-Myc変異体が、配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第135位を変異している、[4]記載の方法。

30

[8] 配列番号：2の第135位の変異が置換または欠失である、[6]または[7]記載の方法。

[9] 配列番号：2の第135位のTrpがGluまたはGlyに置換されている、[8]記載の方法。

[10] L-Myc変異体が、配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第70位以降を少なくとも有している、[4]記載の方法。

[11] L-Myc変異体が以下の(1)または(2)のいずれかである、[10]記載の方法：

(1) 配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第45位以降を少なくとも有している変異体、

(2) 配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第22位以降を少なくとも有している変異体。

40

[12] L-Myc変異体が、配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第321位を変異している、[4]記載の方法。

[13] 配列番号：6の第321位の変異が置換または欠失である、[12]記載の方法。

[14] 配列番号：6の第321位のValがAspに置換されている、[13]記載の方法。

[15] 以下の(1)および(2)：

(1)c-Mycと同等またはそれ以上のiPS細胞樹立効率改善効果を有し、かつ

(2)c-Mycに比して形質転換活性が低減している、

という特徴を有するMyc変異体または該変異体をコードする核酸を含有してなる、iPS細胞の樹立効率改善剤。

[16] Myc変異体のNIH3T3細胞に対する形質転換活性がc-Mycに比して低下している、[15]

50

記載の剤。

[17] Myc変異体がc-Myc変異体、N-Myc変異体またはL-Myc変異体のいずれかである、[15]または[16]記載の剤。

[18] c-Myc変異体が、配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第41位の全部または一部を欠失している、[17]記載の剤。

[19] c-Myc変異体が以下の(1)～(4)のいずれかである、[18]記載の剤：

(1) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第41位を欠失した変異体、

(2) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第64位を欠失した変異体、

(3) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第107位を欠失した変異体

、
(4) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第13位を欠失し、かつ第135位が変異した変異体。

[20] c-Myc変異体が、配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第135位を変異している、[17]記載の剤。

[21] 配列番号：2の第135位の変異が置換または欠失である、[19]または[20]記載の剤。

[22] 配列番号：2の第135位のTrpがGluまたはGlyに置換されている、[21]記載の剤。

[23] L-Myc変異体が、配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第70位以降を少なくとも有している、[17]記載の剤。

[24] L-Myc変異体が以下の(1)または(2)のいずれかである、[23]記載の剤：

(1) 配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第45位以降を少なくとも有している変異体、

(2) 配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第22位以降を少なくとも有している変異体。

[25] L-Myc変異体が、配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第321位を変異している、[17]記載の剤。

[26] 配列番号：6の第321位の変異が置換または欠失である、[25]記載の剤。

[27] 配列番号：6の第321位のValがAspに置換されている、[26]記載の剤。

[28]以下の(1)および(2)：

(1)c-Mycと同等またはそれ以上のiPS細胞樹立効率改善効果を有し、かつ

(2)c-Mycに比して形質転換活性が低減している、

という特徴を有するMyc変異体または該変異体をコードする核酸と核初期化物質とを体細胞に導入する工程を含む、iPS細胞の製造方法。

[29]体細胞がヒト由来の体細胞である、[28]記載の方法。

[30]形質転換活性がNIH3T3細胞に対する形質転換活性である、[28]または[29]記載の方法。

[31] Myc変異体がc-Myc変異体、N-Myc変異体またはL-Myc変異体のいずれかである、[28]～[30]いずれか記載の方法。

[32] c-Myc変異体が、配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第41位の全部または一部を欠失している、[31]記載の方法。

[33] c-Myc変異体が以下の(1)～(4)のいずれかである、[32]記載の方法：

(1) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第41位を欠失した変異体、

(2) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第64位を欠失した変異体、

(3) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第107位を欠失した変異体

、
(4) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第13位を欠失し、かつ第135位が変異した変異体。

[34] c-Myc変異体が、配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第135位を変異している、[31]記載の方法。

[35] 配列番号：2の第135位の変異が置換または欠失である、[33]または[34]記載の方法。

10

20

30

40

50

- [36] 配列番号：2の第135位のTrpがGluまたはGlyに置換されている、[35]記載の方法。
- [37] L-Myc変異体が、配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第70位以降を少なくとも有している、[31]記載の方法。
- [38] L-Myc変異体が以下の(1)または(2)のいずれかである、[37]記載の方法：
(1) 配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第45位以降を少なくとも有している変異体、
(2) 配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第22位以降を少なくとも有している変異体。
- [39] L-Myc変異体が、配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第321位を変異している、[31]記載の方法。 10
- [40] 配列番号：6の第321位の変異が置換または欠失である、[39]記載の方法。
- [41] 配列番号：6の第321位のValがAspに置換されている、[40]記載の方法。
- [42] 核初期化物質が、Octファミリーのメンバー、Soxファミリーのメンバー、Klfファミリーのメンバー、Lin28ファミリーのメンバーおよびNanog、並びにそれらをコードする核酸からなる群より選択される一以上を含む、[28]～[41]いずれか記載の方法。
- [43] 核初期化物質が、Oct3/4、Sox2およびKlf4、またはそれらをコードする核酸を含む、[42]記載の方法。
- [44] 以下の(1)および(2)：
(1)c-Mycと同等またはそれ以上のiPS細胞樹立効率改善効果を有し、かつ
(2)c-Mycに比して形質転換活性が低減している、 20
という特徴を有するMyc変異体または該変異体をコードする核酸と核初期化物質とを含有してなる、体細胞からのiPS細胞の誘導剤。
- [45] 体細胞がヒト由来の体細胞である、[44]記載の剤。
- [46] Myc変異体のNIH3T3細胞に対する形質転換活性がc-Mycに比して低下している、[44]または[45]記載の剤。
- [47] Myc変異体がc-Myc変異体、N-Myc変異体またはL-Myc変異体のいずれかである、[44]～[46]いずれか記載の剤。
- [48] c-Myc変異体が、配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第41位の全部または一部を欠失している、[47]記載の剤。
- [49] c-Myc変異体が以下の(1)～(4)のいずれかである、[48]記載の剤： 30
(1) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第41位を欠失した変異体、
(2) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第64位を欠失した変異体、
(3) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第107位を欠失した変異体、
(4) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第13位を欠失し、かつ第135位が変異した変異体。
- [50] c-Myc変異体が、配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第135位を変異している、[47]記載の剤。
- [51] 配列番号：2の第135位の変異が置換または欠失である、[49]または[50]記載の剤。
- [52] 配列番号：2の第135位のTrpがGluまたはGlyに置換されている、[51]記載の剤。 40
- [53] L-Myc変異体が、配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第70位以降を少なくとも有している、[47]記載の剤。
- [54] L-Myc変異体が以下の(1)または(2)のいずれかである、[53]記載の剤：
(1) 配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第45位以降を少なくとも有している変異体、
(2) 配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第22位以降を少なくとも有している変異体。
- [55] L-Myc変異体が、配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第321位を変異している、[47]記載の剤。
- [56] 配列番号：6の第321位の変異が置換または欠失である、[55]記載の剤。 50

[57] 配列番号：6の第321位のValがAspに置換されている、[56]記載の剤。

[58] 核初期化物質が、Octファミリーのメンバー、Soxファミリーのメンバー、Klfファミリーのメンバー、Lin28ファミリーのメンバーおよびNanog、並びにそれらをコードする核酸からなる群より選択される一以上を含む、[44]～[57]いずれか記載の剤。

[59] 核初期化物質が、Oct3/4、Sox2およびKlf4、またはそれらをコードする核酸を含む、[58]記載の剤。

[60] 以下の(1)および(2)：

(1)c-Mycと同等またはそれ以上のiPS細胞樹立効率改善効果を有し、かつ

(2)c-Mycに比して形質転換活性が低減している、

という特徴を有するMyc変異体をコードする外来性核酸を含む、iPS細胞。

10

[61] Myc変異体をコードする外来性核酸がゲノムに組み込まれている、[60]記載のiPS細胞。

[62] [60]または[61]記載のiPS細胞に分化誘導処理を行い、体細胞に分化させることを含む、体細胞の製造方法。

[63] 下記の工程：

(1) [28]～[43]のいずれかに記載の方法によりiPS細胞を製造する工程、および

(2) 上記工程(1)で得られたiPS細胞に分化誘導処理を行い、体細胞に分化させる工程、を含む、体細胞の製造方法。

【図面の簡単な説明】

【0013】

20

【図1】図1は、ヒトc-MYCとヒトL-MYC(L-MYC1)のアミノ酸配列のアライメントを示した図である。図中「dN1」、「dN2」、「dN3」、「dN4」、「dN5」、「dN6」、「dN7」は、それぞれの欠失型変異体のN末端開始部位を示す。また「transformation」は、c-Mycにおける細胞の形質転換に関与する部位を、「bind to Miz-1」はc-MycにおけるMiz-1タンパクへの結合に関与する部位を、また「bind to Max」はc-MycにおけるMaxタンパクへの結合に関与する部位を、それぞれを示す。

【0014】

【図2】図2は、c-Mycタンパク(内在性、外来性)をウエスタンブロットで検出した結果を示す写真である。実施例1-2)に示す各サンプルを用いた。各レーンの下に、用いた各因子名を記載した。図中「201B7」はiPS細胞(Cell, 131, 861-872 (2007)(本文献は引用により本願の一部を構成する))を示す。

30

【0015】

【図3】図3は、各グラフ下に示す因子(実施例1-3)に記載した各因子)の遺伝子をレトロウイルスでaHDF-Slc7a1に導入して樹立したヒトiPS細胞のコロニー数をカウントした結果を示したグラフである。黒棒は全コロニー数を、白棒はiPS細胞コロニー数を示す。各グラフ上の数値はトータルコロニー数に対するiPS細胞のコロニー数の割合(%)を示す。

【0016】

【図4】図4は、c-Mycタンパク(内在性、外来性)をウエスタンブロットで検出した結果を示す写真である。実施例2-2)に示す各サンプルを用いた。各レーンの下に、用いた各因子名を記載した。図中、6xHis-c-MYCはHisタグのついたc-MYCを、6xHis-L-MYC1はHisタグのついたL-MYCを、また「201B7」はiPS細胞(Cell, 131, 861-872 (2007))を示す。

40

【0017】

【図5】図5は、各グラフ下に示す因子の遺伝子をレトロウイルスでaHDF-Slc7a1に導入して樹立したヒトiPS細胞のコロニー数をカウントした結果を示したグラフである。黒棒は全コロニー数を、白棒はiPS細胞コロニー数を示す。

【0018】

【図6】図6は、各グラフ下に示す因子の遺伝子をレトロウイルスでaHDF-Slc7a1に導入して樹立したヒトiPS細胞のコロニー数をカウントした結果を示したグラフである。黒棒は全コロニー数を、白棒はiPS細胞コロニー数を示す。

【0019】

50

【図7】図7は、実施例4に示す各遺伝子をレトロウイルスでマウスNIH3T3細胞に導入し、形質転換活性の有無を観察した結果を示す写真である。

【0020】

【図8】図8は、実施例4に示す各遺伝子をレトロウイルスでマウスNIH3T3細胞に導入し、形質転換活性の有無を観察した結果を示す写真である。

【0021】

【図9】図9は、実施例4に示す各遺伝子をレトロウイルスでマウスNIH3T3細胞に導入し、形質転換活性の有無を観察した結果を示す写真である。

【0022】

【図10】図10は、ヒトc-MycとN-Mycのアミノ酸配列のアライメントを示した図である。

10

【発明を実施するための形態】

【0023】

本発明は、(1)c-Mycと同等またはそれ以上のiPS細胞樹立効率改善効果を有し、かつ(2)c-Mycに比して形質転換活性が低減している、という特徴を有するMyc変異体（以下、本発明のMyc変異体）または該変異体をコードする核酸を核初期化工程において体細胞に導入する工程を含む、iPS細胞の樹立効率改善方法を提供する。ここで体細胞の核初期化は、体細胞に核初期化物質を導入することにより行われるので、本発明はまた、本発明のMyc変異体または該変異体をコードする核酸と核初期化物質とを体細胞に導入する工程を含む、iPS細胞の製造方法を提供する。尚、本明細書では、核初期化物質のみではiPS細胞が樹立できず、本発明のMyc変異体または該変異体をコードする核酸とともに体細胞に導入することによりiPS細胞が樹立される場合も、「樹立効率の改善」に該当するものとして取り扱う。

20

【0024】

(a) 本発明のMyc変異体

本発明のMyc変異体は、(1)c-Mycと同等またはそれ以上のiPS細胞樹立効率改善効果を有し、かつ(2)c-Mycに比して形質転換活性が低減している、という特徴を有するものである。

【0025】

ここで「Myc変異体」とは、c-Myc、N-MycまたはL-Mycのいずれかのアミノ酸配列が変異した変異体であり、好ましくはヒトc-Myc、N-MycまたはL-Mycのいずれかのアミノ酸配列が変異した変異体である。ヒトc-Mycの塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号：1及び2に、ヒトN-Mycの塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号：3及び4に、またヒトL-Mycの塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号：5及び6に、それぞれ示す。

30

【0026】

前記において「変異」とは1以上のアミノ酸の置換、欠失および/または挿入を意味する。本発明のMyc変異体におけるアミノ酸の置換、欠失、挿入の数および位置は、(1)c-Mycと同等またはそれ以上のiPS細胞樹立効率改善効果を有し、かつ(2)c-Mycに比して形質転換活性が低減している、という特徴が保持される限り、特に限定されない。

【0027】

本発明のMyc変異体は、例えば、ヒトもしくは他の哺乳動物（例えば、マウス、ラット、サル、ブタ、イヌなど）の細胞・組織〔例えば、胸腺、骨髄、脾臓、脳、脊髄、心臓、骨格筋、腎臓、肺、肝臓、膵臓もしくは前立腺の細胞・組織、これら細胞の前駆細胞、幹細胞または癌細胞など〕由来のcDNAから、常法に従ってクローニングすることにより得られたc-Myc、N-Myc、およびL-Mycの核酸（ヒトの場合、それぞれ配列番号1、3、5）に対して所望の変異を施して得られた本発明のMyc変異体をコードする核酸を用いて、自体公知の遺伝子組換え技術により組換えタンパク質として製造することができる。

40

【0028】

前記において(1)c-Mycと同等またはそれ以上のiPS細胞樹立効率改善効果を有するか否かは、所定の初期化因子（例えば、Oct3/4、Sox2およびKlf4の3因子）およびc-Mycを体細胞に接触させた場合と、c-Mycの代わりに本発明のMyc変異体を体細胞に接触させた場合（

50

すなわち、所定の初期化因子と本発明のMyc変異体とを接触させた場合)とで、出現するiPS細胞のコロニー数を比較することにより検証することができる。iPS細胞の誘導に関しては数多くの論文が出されているが、例えばマウスiPS細胞の誘導であれば、Cell, 126: 663-676 (2006)を参考にして行うことができ、ヒトiPS細胞の誘導であれば、Cell, 131: 861-872 (2007)を参考にして行うことができる。

【0029】

前記において(2)c-Mycに比して形質転換活性が低減しているか否かは、体細胞にc-Mycを接触させた場合と、c-Mycの代わりに本発明のMyc変異体を体細胞に接触させた場合とで、該体細胞が形質転換する程度を比較することにより検証することができる。ここで体細胞としては、例えばマウスNIH3T3細胞が挙げられる。形質転換の程度は、細胞の形態を顕微鏡下で観察することにより調べることができる。

10

【0030】

本発明のc-Myc変異体として具体的には、例えば配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第41位の全部または一部を欠失しているc-Myc変異体が挙げられる。ここで(第1位～第41位の)「一部」とは、当該一部の欠失を有するc-Myc変異体が、(1)c-Mycと同等またはそれ以上のiPS細胞樹立効率改善効果を有し、かつ(2)c-Mycに比して形質転換活性が低減している、という特徴が保持される限り特に限定されないが、例えば配列番号：2の第1位～第13位、第1位～第15位、第1位～第20位、第1位～第25位、第1位～第30位、第1位～第35位、第1位～第40位などが例示される。

【0031】

20

また(第1位～第41位の)「全部」を欠失したMyc変異体は、同様に前記(1)および(2)の特徴が保持される限り特に限定されないが、配列番号：2の第125位以降、好ましくは第120位以降は欠失しないことが望ましい。

【0032】

より具体的には、例えば以下の(1)～(4)のc-Myc変異体が挙げられる：

- (1) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第41位を欠失した変異体、
- (2) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第64位を欠失した変異体、
- (3) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第107位を欠失した変異体、
- (4) 配列番号：2に記載のヒトc-Mycのアミノ酸配列の第1位～第13位を欠失し、かつ第135位が変異した変異体。

30

【0033】

ここで配列番号：2の第135位(マウスでは第136位)は、c-Mycの形質転換活性に重要な働きをする核酸因子とc-Mycとの相互作用に必須の領域中に位置している(Brough et al. Molecular and Cellular Biology 15(3):1536-1544, 1995)(本文献は引用により本願の一部を構成する)。135位の変異としては置換または欠失が挙げられ、置換として具体的には第135位(マウスでは第136位)のTrpからGluまたはGlyへの置換が例示される(前記Brough et al.を参照)。また欠失として具体的には第128位～第144位の欠失(マウスでは第129位～第145位の欠失)が例示される(前記Brough et al.を参照)。

【0034】

40

N-Mycはc-Mycと同様に形質転換活性を有しており、c-Mycと機能的に置き換わることができる(Genes & Dev., 14(11):1390-1399(2000))(本文献は引用により本願の一部を構成する)。また135位のアミノ酸も同一である(以上、図10のアライメント参照)。従って前述した本発明の各c-Myc変異体に相当するN-Myc変異体(すなわち、c-Mycとのアライメントにより対応する位置に変異を有するN-Myc変異体)も、同様に本発明のMyc変異体の範疇に含まれる。

【0035】

本発明のL-Myc変異体として具体的には、例えば配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第70位以降を少なくとも有しているL-Myc変異体が挙げられる。当該L-Myc変異体は、(1)c-Mycと同等またはそれ以上のiPS細胞樹立効率改善効果を有し、かつ(2)c-Myc

50

に比して形質転換活性が低減している、という特徴が保持される限り特に限定されないが、具体的には、例えば以下の(1)または(2)のL-Myc変異体が挙げられる：

(1) 配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第45位以降を少なくとも有している変異体、

(2) 配列番号：6に記載のヒトL-Mycのアミノ酸配列の第22位以降を少なくとも有している変異体。

【0036】

以上述べた本発明のMyc変異体に、さらなる変異(例えば1～数個のアミノ酸の置換、欠失および/または挿入)を加えた変異体も、(1)c-Mycと同等またはそれ以上のiPS細胞樹立効率改善効果を有し、かつ(2)c-Mycに比して形質転換活性が低減している、という特徴が保持されるものであれば、「本発明のMyc変異体」の範疇に含まれる。

【0037】

本発明のMyc変異体(タンパク質)の体細胞への導入は、自体公知の細胞へのタンパク質導入方法を用いて実施することができる。そのような方法としては、例えば、タンパク質導入試薬を用いる方法、タンパク質導入ドメイン(PTD)もしくは細胞透過性ペプチド(CPP)融合タンパク質を用いる方法、マイクロインジェクション法などが挙げられる。タンパク質導入試薬としては、カチオン性脂質をベースとしたBioPOTER Protein Delivery Reagent (Gene Therapy Systems)、Pro-Ject™ Protein Transfection Reagent (PIERCE) およびProVectin (IMGENEX)、脂質をベースとしたProfect-1 (Targeting Systems)、膜透過性ペプチドをベースとしたPenetratin Peptide (Q biogene) およびChariot Kit (Active Motif)、HVJエンベロープ(不活化センダイウイルス)を利用したGenomONE(石原産業)等が市販されている。導入はこれらの試薬に添付のプロトコルに従って行うことができるが、一般的な手順は以下の通りである。本発明のタンパク質樹立効率改善因子を適当な溶媒(例えば、PBS、HEPES等の緩衝液)に希釈し、導入試薬を加えて室温で5-15分程度インキュベートして複合体を形成させ、これを無血清培地に交換した細胞に添加して37℃で1ないし数時間インキュベートする。その後培地を除去して血清含有培地に交換する。

【0038】

PTDとしては、ショウジョウバエ由来のAntP、HIV由来のTAT(Frankel, A. et al, Cell 55, 1189-93 (1988); Green, M. & Loewenstein, P.M. Cell 55, 1179-88 (1988)), Penetratin (Derossi, D. et al, J. Biol. Chem. 269, 10444-50 (1994)), Buforin II (Park, C. B. et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 97, 8245-50 (2000)), Transportan (Pooga, M. et al. FASEB J. 12, 67-77 (1998)), MAP (model amphipathic peptide) (Oehlke, J. et al. Biochim. Biophys. Acta. 1414, 127-39 (1998)), K-FGF (Lin, Y. Z. et al. J. Biol. Chem. 270, 14255-14258 (1995)), Ku70 (Sawada, M. et al. Nature Cell Biol. 5, 352-7 (2003)), Prion (Lundberg, P. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 299, 85-90 (2002)), pVEC (Elmqvist, A. et al. Exp. Cell Res. 269, 237-44 (2001)), Pep-1 (Morris, M. C. et al. Nature Biotechnol. 19, 1173-6 (2001)), Pep-7 (Gao, C. et al. Bioorg. Med. Chem. 10, 4057-65 (2002)), SynBI (Rousselle, C. et al. Mol. Pharmacol. 57, 679-86 (2000)), HN-1 (Hong, F. D. & Clayman, G L. Cancer Res. 60, 6551-6 (2000)), HSV由来のVP22等のタンパク質の細胞通過ドメインを用いたものが開発されている。PTD由来のCPPとしては、11R (Cell Stem Cell, 4:381-384(2009))や9R (Cell Stem Cell, 4:472-476(2009))等のポリアルギニンが挙げられる(本パラグラフで挙げた文献はいずれも引用により本願の一部を構成する)。

【0039】

本発明のMyc変異体のcDNAとPTD配列もしくはCPP配列とを組み込んだ融合タンパク質発現ベクターを作製して組換え発現させ、融合タンパク質を回収して導入に用いる。導入は、タンパク質導入試薬を添加しない以外は上記と同様にして行うことができる。

【0040】

マイクロインジェクションは、先端径1μm程度のガラス針にタンパク質溶液を入れ、細

10

20

30

40

50

胞に穿刺導入する方法であり、確実に細胞内にタンパク質を導入することができる。

【0041】

その他、エレクトロポレーション法、セミンタクトセル法 (Kano, F. et al. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 322, 357-365(2006))、Wr-t ペプチドによる導入法 (Kondo, E. et al., *Mol. Cancer Ther.* 3(12), 1623-1630(2004))などのタンパク質導入法も用いることができる (本パラグラフで挙げた文献はいずれも引用により本願の一部を構成する)。

【0042】

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

10

【0043】

本発明のMyc変異体をコードする核酸は、上記した本発明のMyc変異体 (タンパク質) をコードするものであれば特に制限はない。該核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。好ましくはDNAが挙げられる。また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNA、二本鎖RNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。

【0044】

本発明のMyc変異体をコードする核酸は、例えば、ヒトもしくは他の哺乳動物 (例えば、マウス、ラット、サル、ブタ、イヌなど) の細胞・組織 [例えば、胸腺、骨髄、脾臓、脳、脊髄、心臓、骨格筋、腎臓、肺、肝臓、膵臓もしくは前立腺の細胞・組織、これら細胞の前駆細胞、幹細胞または癌細胞など] 由来のcDNAから、常法に従ってクローニングすることにより得られたc-Myc、N-Myc、およびL-Mycの核酸 (ヒトの場合、それぞれ配列番号1、3、5) に対して所望の変異を施すことにより、得ることができる。

20

【0045】

本発明のMyc変異体をコードする核酸の体細胞への導入は、自体公知の細胞への遺伝子導入方法を用いて実施することができる。本発明のMyc変異体をコードする核酸は、宿主となる体細胞で機能し得るプロモーターを含む適当な発現ベクターに挿入される。発現ベクターとしては、例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随

30

。

【0046】

用いるベクターの種類は、得られるiPS細胞の用途に応じて適宜選択することができる。例えば、アデノウイルスベクター、プラスミドベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどが使用され得る。

【0047】

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

40

【0048】

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

50

【 0 0 4 9 】

本発明のMyc変異体をコードする核酸は、単独で発現ベクター上に組み込んでもよいし、1以上の初期化遺伝子とともに1つの発現ベクターに組み込んでもよい。遺伝子導入効率の高いレトロウイルスやレンチウイルスベクターを用いる場合は前者が、プラスミド、アデノウイルス、エピソードベクターなどを用いる場合は後者を選択することが好ましい場合があるが、特に制限はない。

【 0 0 5 0 】

上記において、本発明のMyc変異体をコードする核酸と、1以上の初期化遺伝子とを、1つの発現ベクターに組み込む場合、これら複数の遺伝子は、好ましくはポリシストロニック発現を可能にする配列を介して発現ベクターに組み込むことができる。ポリシストロニック発現を可能にする配列を用いることにより、1種類の発現ベクターに組み込まれている複数の遺伝子をより効率的に発現させることが可能になる。ポリシストロニック発現を可能にする配列としては、例えば、口蹄疫ウイルスの2A配列（配列番号：7；PLoS ONE3, e2532, 2008、Stem Cells 25, 1707, 2007）、IRES配列（U.S. Patent No. 4,937,190）など、好ましくは2A配列を用いることができる（これらの文献は引用により本願の一部を構成する）。

【 0 0 5 1 】

本発明のMyc変異体をコードする核酸を含む発現ベクターは、ベクターの種類に応じて、自体公知の手法により細胞に導入することができる。例えば、ウイルスベクターの場合、該核酸を含むプラスミドを適当なパッケージング細胞（例、Plat-E細胞）や相補細胞株（例、293細胞）に導入して、培養上清中に産生されるウイルスベクターを回収し、各ウイルスベクターに応じた適切な方法により、該ベクターを細胞に感染させる。例えば、ベクターとしてレトロウイルスベクターを用いる具体的手段が WO2007/69666、Cell, 126, 663-676 (2006) および Cell, 131, 861-872 (2007) に開示されており、ベクターとしてレンチウイルスベクターを用いる場合については、Science, 318, 1917-1920 (2007) に開示がある。iPS細胞を再生医療のための細胞ソースとして利用する場合、本発明のMyc変異体の発現（再活性化）またはそれらの外来性核酸が組み込まれた近傍に存在する内因性遺伝子の活性化は、iPS細胞由来の分化細胞から再生された組織における発癌リスクを高める可能性があるので、本発明のMyc変異体をコードする核酸は細胞の染色体に組み込まれず、一過的に発現することが好ましい。かかる観点からは、染色体への組込みが稀なアデノウイルスベクターの使用が好ましい。アデノウイルスベクターを用いる具体的手段は、Science, 322, 945-949 (2008) に記載されている。また、アデノ随伴ウイルスも染色体への組込み頻度が低く、アデノウイルスベクターと比べて細胞毒性や炎症惹起作用が低いので、別の好ましいベクターとして挙げられる。センダイウイルスベクターは染色体外で安定に存在することができ、必要に応じてsiRNAにより分解除去することができるので、同様に好ましく利用され得る。センダイウイルスベクターについては、J. Biol. Chem., 282, 27383-27391 (2007)、Proc. Jpn. Acad., Ser. B 85, 348-362(2009)、または日本国特許第3602058号に記載のものをを用いることができる。（本パラグラフで挙げた文献はいずれも引用により本願の一部を構成する）

【 0 0 5 2 】

レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターを用いる場合は、いったん導入遺伝子のサイレンシングが起こったとしても、後に再活性化される可能性があるので、例えば、Cre/loxPシステムを用いて、不要となった時点で本発明のMyc変異体をコードする核酸を切り出す方法が好ましく用いられ得る。即ち、該核酸の両端にloxP配列を配置しておき、iPS細胞が誘導された後で、プラスミドベクターもしくはアデノウイルスベクターを用いて細胞にCreリコンビナーゼを作用させ、loxP配列に挟まれた領域を切り出すことができる。また、LTR U3領域のエンハンサー - プロモーター配列は、挿入突然変異によって近傍の宿主遺伝子を上方制御する可能性があるので、当該配列を欠失、もしくはSV40などのポリアデニル化配列で置換した3' - 自己不活性化（SIN）LTRを使用して、切り出されずゲノム中に残存するloxP配列より外側のLTRによる内因性遺伝子の発現制御を回避すること

がより好ましい。Cre-loxPシステムおよびSIN LTRを用いる具体的手段は、Soldner et al., Cell, 136: 964-977 (2009)、Chang et al., Stem Cells, 27: 1042-1049 (2009) などに開示されている（本パラグラフで挙げた文献はいずれも引用により本願の一部を構成する）。

【0053】

一方、非ウイルスベクターであるプラスミドベクターの場合には、リポフェクション法、リポソーム法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃法などを用いて該ベクターを細胞に導入することができる。ベクターとしてプラスミドを用いる具体的手段は、例えばScience, 322, 949-953 (2008)（本文献は引用により本願の一部を構成する）等に記載されている。

10

【0054】

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

【0055】

20

尚、アデノウイルスやプラスミドを用いる場合でも、導入遺伝子が染色体に組み込まれることがあるので、結局はサザンブロットやPCRにより染色体への遺伝子挿入がないことを確認する必要がある。そのため、上記Cre-loxPシステムのように、いったん染色体に導入遺伝子を組み込んだ後に、該遺伝子を除去する手段を用いることは好都合であり得る。別の好ましい実施態様においては、トランスポゾンを用いて染色体に導入遺伝子を組み込んだ後に、プラスミドベクターもしくはアデノウイルスベクターを用いて細胞に転移酵素を作用させ、導入遺伝子を完全に染色体から除去する方法が用いられ得る。好ましいトランスポゾンとしては、例えば、鱗翅目昆虫由来のトランスポゾンであるpiggyBac等が挙げられる。piggyBacトランスポゾンを用いる具体的手段は、Kaji, K. et al., Nature, 458: 771-775 (2009)、Woltjen et al., Nature, 458: 766-770 (2009)（これらの文献は引用により本願の一部を構成する）に開示されている。

30

【0056】

別の好ましい非組込み型ベクターとして、染色体外で自律複製可能なエピゾーマルベクターが挙げられる。エピゾーマルベクターを用いる具体的手段は、Yu et al., Science, 324, 797-801 (2009)（本文献は引用により本願の一部を構成する）に開示されている。必要に応じて、エピゾーマルベクターの複製に必要なベクター要素の5'側および3'側にloxP配列を同方向に配置したエピゾーマルベクターに、本発明のMyc変異体をコードする核酸を挿入した発現ベクターを構築し、これを体細胞に導入することもできる。

【0057】

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

40

【0058】

また、エピゾーマル発現ベクターは、本発明のMyc変異体をコードする核酸の転写を制御するプロモーターを含む。該プロモーターとしては、前記と同様のプロモーターが用いられ得る。また、エピゾーマル発現ベクターは、前記と同様に、所望によりエンハンサー、ポリA付加シグナル、選択マーカー遺伝子などをさらに含有していてもよい。選択マーカー遺伝子としては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等

50

が挙げられる。

【0059】

本発明で使用されるloxP配列としては、バクテリオファージP1由来の野生型loxP配列（配列番号：8）の他、導入遺伝子の複製に必要なベクター要素を挟む位置に同方向で配置された場合に、組換えを起こしてloxP配列間の配列を欠失させ得る任意の変異loxP配列が挙げられる。変異loxP配列としては、例えば、5'側反復配列に変異のあるlox71（配列番号：9）、3'側反復配列に変異のあるlox66（配列番号：10）、スパーサー部分に変異のあるlox2272やlox511などが挙げられる。該ベクター要素の5'側および3'側に配置される2つのloxP配列は、同一であっても異なってもよいが、スパーサー部分に変異のある変異loxP配列の場合は同一のもの（例、lox2272同士、lox511同士）が用いられる。好ましくは、5'側反復配列に変異のある変異loxP配列（例、lox71）と3'側反復配列に変異のある変異loxP配列（例、lox66）との組合せが挙げられる。この場合、組換えの結果染色体上に残るloxP配列は5'側および3'側の反復配列に二重変異を有するため、Creリコンビナーゼに認識されにくく、不必要な組換えにより染色体の欠失変異を起こすリスクが低減される。lox71とlox66とを用いる場合、前記ベクター要素の5'側および3'側にいずれの変異loxP配列を配置してもよいが、変異部位がloxP配列の外端に配置されるような向きで変異loxP配列を挿入する必要がある。

10

【0060】

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

20

【0061】

エピソードベクターは、例えばリポフェクション法、リポソーム法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃法などを用いて該ベクターを細胞に導入することができる。具体的には、例えばScience, 324: 797-801 (2009)等に記載される方法を用いることができる。

【0062】

iPS細胞から導入遺伝子の複製に必要なベクター要素が除去されたか否かの確認は、該ベクター要素内部および/またはloxP配列近傍の塩基配列を含む核酸をプローブまたはプライマーとして用い、該iPS細胞から単離したエピソード画分を鋳型としてサザンブロット分析またはPCR分析を行い、バンドの有無または検出バンドの長さを調べることで実施することができる。エピソード画分の調製は当該分野で周知の方法と用いて行えばよく、例えば、Science, 324: 797-801 (2009)等に記載される方法を用いることができる。

30

【0063】

(b) 体細胞ソース

本発明においてiPS細胞作製のための出発材料として用いることのできる体細胞は、哺乳動物由来の生殖細胞以外の細胞である。哺乳動物としては、例えばヒト、マウス、サル、ウシ、ブタ、ラット、イヌ等が例示される。ヒト由来の体細胞が特に好ましい。具体的には、例えば、角質化する上皮細胞（例、角質化表皮細胞）、粘膜上皮細胞（例、舌表層の上皮細胞）、外分泌腺上皮細胞（例、乳腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例、副腎髄質細胞）、代謝・貯蔵用の細胞（例、肝細胞）、境界面を構成する内腔上皮細胞（例、I型肺胞細胞）、内鎖管の内腔上皮細胞（例、血管内皮細胞）、運搬能をもつ繊毛のある細胞（例、気道上皮細胞）、細胞外マトリックス分泌用細胞（例、線維芽細胞）、収縮性細胞（例、平滑筋細胞）、血液と免疫系の細胞（例、Tリンパ球）、感覚に関する細胞（例、桿細胞）、自律神経系ニューロン（例、コリン作動性ニューロン）、感覚器と末梢ニューロンの支持細胞（例、随伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、およびそれらの前駆細胞（組織前駆細胞）等が挙げられる。細胞の分化の程度や細胞を採取する動物の齢などに特に制限はなく、未分化

40

50

な前駆細胞(体性幹細胞も含む)であっても、最終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における体細胞の起源として使用することができる。ここで未分化な前駆細胞としては、たとえば神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞(体性幹細胞)が挙げられる。

【0064】

体細胞を採取するソースとなる哺乳動物個体は特に制限されないが、得られるiPS細胞がヒトの再生医療用途に使用される場合には、拒絶反応が起こらないという観点から、患者本人またはHLAの型が同一もしくは実質的に同一である他人から体細胞を採取することが特に好ましい。ここでHLAの型が「実質的に同一」とは、免疫抑制剤などの使用により、該体細胞由来のiPS細胞から分化誘導することにより得られた細胞を患者に移植した場合に移植細胞が生着可能な程度にHLAの型が一致していることをいう。たとえば主たるHLA(例えばHLA-A、HLA-BおよびHLA-DRの3遺伝子座)が同一である場合などが挙げられる(以下同じ)。また、ヒトに投与(移植)しない場合、例えば、患者の薬剤感受性や副作用の有無を評価するためのスクリーニング用の細胞のソースとしてiPS細胞を使用する場合には、同様に患者本人または薬剤感受性や副作用と関連する遺伝子多型が同一である他人から体細胞を採取することが望ましい。

【0065】

哺乳動物から分離した体細胞は、核初期化工程に供するに先立って、細胞の種類に応じてその培養に適した自体公知の培地で前培養することができる。そのような培地としては、例えば、約5~20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地(MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、RPMI1640培地、199培地、F12培地などが挙げられるが、それらに限定されない。本発明のMyc変異体および核初期化物質(さらに必要に応じて、後述するiPS細胞の樹立効率改善物質)との接触に際し、例えば、カチオニックリポソームなど導入試薬を用いる場合には、導入効率の低下を防ぐため、無血清培地に交換しておくことが好ましい場合がある。

【0066】

(c) 核初期化物質

本発明において「核初期化物質」とは、体細胞に導入することにより、あるいは本発明のMyc変異体またはMyc変異体をコードする核酸と共に体細胞に導入することにより、該体細胞からiPS細胞を誘導することができる物質(群)であれば、タンパク性因子またはそれをコードする核酸(ベクターに組み込まれた形態を含む)、あるいは低分子化合物等のいかなる物質から構成されてもよい。タンパク性因子またはそれをコードする核酸である公知の核初期化物質としては、好ましくは以下の組み合わせが例示される(以下においては、タンパク性因子の名称のみを記載するが、該タンパク性因子をコードする核酸もまた好適に用いられる)。なお、以下のリストに記載の引用文献は引用により本願の一部を構成する。

【0067】

(1) Oct3/4, Klf4, c-Myc

(2) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2(ここで、Sox2はSox1, Sox3, Sox15, Sox17またはSox18で置換可能である。また、Klf4はKlf1, Klf2またはKlf5で置換可能である。さらに、c-MycはT58A(活性型変異体), N-Myc, L-Mycで置換可能である。)

(3) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Fbx15, Nanog, Eras, ECAT15-2, Tc11, -catenin(活性型変異体S33Y)

(4) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, TERT, SV40 Large T antigen(以下、SV40LT)

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

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

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

(8) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, TERT, Bmi1

(以上、WO 2007/069666を参照(但し、上記(2)の組み合わせにおいて、Sox2からSox18への置換、Klf4からKlf1もしくはKlf5への置換については、Nature Biotechnology, 26, 10

10

20

30

40

50

1-106 (2008)を参照)。 「Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2」の組み合わせについては、Cell, 126, 663-676 (2006)、Cell, 131, 861-872 (2007) 等も参照。 「Oct3/4, Klf2 (または Klf5), c-Myc, Sox2」の組み合わせについては、Nat. Cell Biol., 11, 197-203 (2009) も参照。 「Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, hTERT, SV40LT」の組み合わせについては、Nature, 451, 141-146 (2008)も参照。)

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

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

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

(12) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, Nanog, Lin28 (Cell Research (2008) 600-603を参照) 10

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

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

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

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

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

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

(19) Oct3/4, Sox2, c-Myc, Esrrb (ここで、EsrrbはEsrrgで置換可能である。Nat. Cell Biol., 11, 197-203 (2009) を参照) 20

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

(21) Oct3/4, Klf4, L-Myc

(22) Oct3/4, Nanog

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

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

【0068】

上記(1)-(24)において、Oct3/4に代えて他のOctファミリーのメンバー、例えばOct1A、Oct6などを用いることもできる。また、Sox2 (またはSox1、Sox3、Sox15、Sox17、Sox18) に代えて他のSoxファミリーのメンバー、例えばSox7などを用いることもできる。 30

【0069】

本発明のMyc変異体と組み合わせて用いられる核初期化物質としては、上記(1)-(24)の因子の組合せにおいて野生型c-MycまたはN-Mycが含まれる場合にはこれらを除いた残りの因子を含むものが好適に用いられる。上記(1)-(24)の因子の組合せにおいてc-MycまたはN-Myc以外のMycファミリーのメンバーが含まれる場合、核初期化物質としては該Mycファミリーメンバーを含んだものであっても、除いたものであってもよい。好適には、該Mycファミリーメンバーを除く残りの因子を本発明の核初期化物質として用いる。上記(1)-(24)の組合せにMycファミリーメンバーが含まれていない場合には、本発明のMyc変異体と組み合わせて用いられる核初期化物質として、該因子の組み合わせを用いればよい。 40

【0070】

また、上記の核初期化物質に加えて任意の他の物質をさらに含む組み合わせも、本発明における「Myc変異体と組み合わせて用いられる核初期化物質」として好適に用いられる。核初期化の対象となる体細胞が上記(1)-(24)のいずれかにおける構成要素の一部を、核初期化のために十分なレベルで内在的に発現している条件下にあっては、当該構成要素を除いた残りの構成要素のみの組み合わせもまた、本発明における「核初期化物質」として好適に用いられる。

【0071】

これらの組み合わせの中で、Octファミリーのメンバー、Soxファミリーのメンバー、Klfファミリーのメンバー、Lin28ファミリーのメンバーおよびNanogから選択される一以上 50

の物質が、好ましい核初期化物質の例として挙げられる。

【0072】

とりわけ、得られるiPS細胞を治療用途に用いることを念頭においた場合、Oct3/4、Sox2およびKlf4の3因子の組み合わせ（即ち、上記(9)）が好ましい。

【0073】

上記の各タンパク性因子のマウス及びヒトcDNA配列情報は、WO 2007/069666に記載のNCBI accession numbersを参照することにより取得することができ（Nanogは当該公報中では「ECAT4」との名称で記載されている。尚、Lin28、Lin28B、Esrrb、Esrrg、L-Mycのマウス及びヒトcDNA配列情報は、それぞれ下記NCBI accession numbersを参照することにより取得できる。）、当業者は容易にこれらのcDNAを単離することができる。

10

【0074】

【表1】

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

20

【0075】

核初期化物質としてタンパク性因子自体を用いる場合には、得られたcDNAを適当な発現ベクターに挿入して宿主細胞に導入し、該細胞を培養して得られる培養物から組換えタンパク性因子を回収することにより調製することができる。一方、核初期化物質としてタンパク性因子をコードする核酸を用いる場合、得られたcDNAを、上記本発明のc-Myc変異体をコードする核酸の場合と同様にして、ウイルスベクター、エピソードベクターもしくはプラスミドベクターに挿入して発現ベクターを構築し、核初期化工程に供される。必要に応じて、上記Cre-loxPシステムやpiggyBacトランスポゾンシステムを利用することもできる。尚、核初期化物質として2以上のタンパク性因子をコードする核酸を細胞に導入する場合、各核酸を別個のベクターに担持させてもよいし、複数の核酸をタンデムに繋いでポリシストロニックベクターとすることもできる。後者の場合、効率的なポリシストロニック発現を可能にするために、口蹄疫ウイルスの2A self-cleaving peptideを各核酸の間に連結することが望ましい（Science, 322, 949-953, 2008など参照）（本文献は引用により本願の一部を構成する）。

30

【0076】

核初期化物質の体細胞への接触は、(a) 該物質がタンパク性因子である場合、上記本発明のMyc変異体と同様にして、(b) 該物質が(a)のタンパク性因子をコードする核酸である場合、上記本発明のMyc変異体をコードする核酸と同様にして、実施することができる。一方、(c) 核初期化物質が低分子化合物である場合、該物質を適当な濃度で水性もしくは非水性溶媒に溶解し、ヒトまたは他の哺乳動物より単離した体細胞の培養に適した培地（例えば、約5～20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、RPMI1640培地、199培地、F12培地など）中に、核初期化物質濃度が核初期化に十分で且つ細胞毒性がみられない範囲となるように該物質溶液を添加して、細胞を一定期間培養することにより実施することができる。核初期化物質濃度は用いる核初期化物質の種類によって異なるが、約0.1nM～約100nMの範囲で適宜選択される。接触期間は細胞の核初期化が達成されるのに十分な時間であれば特に制限はないが、通常は陽性コロニーが出現するまで培地に共存させておけばよい。

40

【0077】

(d) 他のiPS細胞の樹立効率改善物質

従来報告されているiPS細胞の樹立効率が低いために、近年、その効率を改善する物質

50

が種々提案されている。よって前記本発明のMyc変異体に加え、iPS細胞の樹立効率改善物質を体細胞に接触させることにより、iPS細胞の樹立効率をより高めることが期待できる。

【0078】

本発明のMyc変異体以外のiPS細胞の樹立効率改善物質としては、例えば、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 [例えば、バルプロ酸 (VPA) (Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDA Cに対するsiRNAおよびshRNA (例、HDAC1 siRNA Smartpool (登録商標) Millipore)、HuS H 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等) 等の核酸性発現阻害剤など]、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば5'-azacytidine) (Nat. Biotechnol., 26 (7): 795-797 (2008))、G9aヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 [例えば、BIX-012 94 (Cell Stem Cell, 2: 525-528 (2008))等の低分子阻害剤、G9aに対するsiRNAおよびsh RNA (例、G9a siRNA(human) (Santa Cruz Biotechnology)等) 等の核酸性発現阻害剤など]、L-channel calcium agonist (例えばBayk8644) (Cell Stem Cell, 3, 568-574 (2008))、p53阻害剤 (例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (20 08))、UTF1(Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、Wnt Signaling (例えばsoluble Wnt3 a) (Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008))、2i/LIF (2iはmitogen-activated protein kinase signallingおよびglycogen synthase kinase-3の阻害剤、PloS Biology, 6(10), 2237-2247 (2008))、ES細胞特異的miRNA (例えば、miR-302-367クラスター (Mol. Cell. Biol. doi:10.1128/MCB.00398-08)、miR-302 (RNA (2008) 14: 1 - 10)、miR-291-3p, miR -294およびmiR-295 (以上、Nat. Biotechnol. 27: 459-461 (2009))) 等が挙げられるが、それらに限定されない。前記で核酸性の発現阻害剤はsiRNAもしくはshRNAをコードする DNAを含む発現ベクターの形態であってもよい。(本パラグラフで挙げた文献はいずれも引用により本願の一部を構成する)

【0079】

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

【0080】

iPS細胞の樹立効率改善物質の体細胞への接触は、該物質が(a)タンパク性因子である場合、(b) 該タンパク性因子をコードする核酸である場合、あるいは(c) 低分子化合物である場合に依じて、本発明のMyc変異体および核初期化物質についてそれぞれ上記したと同様の方法により、実施することができる。

【0081】

本発明のMyc変異体および/またはMyc変異体以外の1以上のiPS樹立効率改善物質をコードする核酸を含む、iPS細胞の樹立効率改善物質は、該物質の非存在下と比較して体細胞からのiPS細胞樹立効率が有意に改善される限り、核初期化物質の組み合わせと同時に体細胞に接触させてもよいし、また、どちらかを先に接触させてもよい。一実施態様において、例えば、核初期化物質がタンパク性因子をコードする核酸であり、iPS細胞の樹立効率改善物質が化学的阻害物質である場合には、前者は遺伝子導入処理からタンパク性因子を大量発現するまでに一定期間のラグがあるのに対し、後者は速やかに細胞に作用しうることから、遺伝子導入処理から一定期間細胞を培養した後に、iPS細胞の樹立効率改善物質を培地に添加することができる。別の実施態様において、例えば、核初期化物質とiPS細胞の樹立効率改善物質とがいずれもウイルスベクターやプラスミドベクターの形態で用いられる場合には、両者を同時に細胞に導入してもよい。

【0082】

(e) 培養条件による樹立効率の改善

体細胞の核初期化工程において低酸素条件下で細胞を培養することにより、iPS細胞の樹立効率をさらに改善することができる。本明細書において「低酸素条件」とは、細胞を培養する際の雰囲気中の酸素濃度が、大気中のそれよりも有意に低いことを意味する。具体的には、通常の細胞培養で一般的に使用される5-10% CO₂/95-90%大気の雰囲気中の酸素濃度よりも低い酸素濃度の条件が挙げられ、例えば雰囲気中の酸素濃度が18%以下の条件が該当する。好ましくは、雰囲気中の酸素濃度は15%以下（例、14%以下、13%以下、12%以下、11%以下など）、10%以下（例、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下など）、または5%以下（例、4%以下、3%以下、2%以下など）である。また、雰囲気中の酸素濃度は、好ましくは0.1%以上（例、0.2%以上、0.3%以上、0.4%以上など）、0.5%以上（例、0.6%以上、0.7%以上、0.8%以上、0.95以上など）、または1%以上（例、1.1%以上、1.2%以上、1.3%以上、1.4%以上など）である。

10

【0083】

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

20

【0084】

低酸素条件下で細胞培養を開始する時期は、iPS細胞の樹立効率が正常酸素濃度（20%）の場合に比して改善されることを妨げない限り特に限定されず、体細胞への本発明のMyc変異体および核初期化物質の接触より前であっても、該接触と同時であっても、該接触より後であってもよいが、例えば、体細胞に本発明のMyc変異体および核初期化物質を接触させた直後から、あるいは接触後一定期間（例えば、1ないし10（例、2,3,4,5,6,7,8または9）日）おいた後に低酸素条件下で培養することが好ましい。

【0085】

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

30

【0086】

さらに、低酸素条件下で細胞培養を開始する好ましい時期および好ましい培養期間は、用いられる核初期化物質の種類、正常酸素濃度条件下でのiPS細胞樹立効率などによっても変動する。

40

【0087】

(f) iPS細胞の選択および確認

本発明のMyc変異体と、核初期化物質および他のiPS細胞の樹立効率改善物質の組み合わせとを体細胞に接触させた後、細胞を、例えばES細胞の培養に適した条件下で培養することができる。マウス細胞の場合、通常の培地に分化抑制因子としてLeukemia Inhibitory Factor (LIF) を添加して培養を行う。一方、ヒト細胞の場合には、LIFの代わりに塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) および/または幹細胞因子 (SCF) を添加することが望ましい。また通常、細胞は、フィーダー細胞として、放射線や抗生物質で処理して細胞分裂を停止させたマウス胎仔由来の線維芽細胞 (MEF) の共存下で培養される。MEFとしては、通常STO細胞等がよく使われるが、iPS細胞の誘導には、SNL細胞 (McMahon, A. P. & Bradle

50

y, A. Cell 62, 1073-1085 (1990) (本文献は引用により本願の一部を構成する)) 等がよく使われている。フィーダー細胞との共培養は、本発明のMyc変異体および核初期化物質の接触より前から開始してもよいし、該接触時から、あるいは該接触より後(例えば1-10日後)から開始してもよい。

【0088】

iPS細胞の候補コロニーの選択は、薬剤耐性とレポーター活性を指標とする方法と目視による形態観察による方法とが挙げられる。前者としては、例えば、分化多能性細胞において特異的に高発現する遺伝子(例えば、Fbx15、Nanog、Oct3/4など、好ましくはNanogまたはOct3/4)の遺伝子座に、薬剤耐性遺伝子および/またはレポーター遺伝子をターゲットティングした組換え体細胞を用い、薬剤耐性および/またはレポーター活性陽性のコロニーを選択するというものである。そのような組換え体細胞としては、例えばFbx15遺伝子座に geo (-ガラクトシダーゼとネオマイシンホスホトランスフェラーゼとの融合タンパク質をコードする) 遺伝子をノックインしたマウス(Takahashi & Yamanaka, Cell, 126, 663-676 (2006)) (本文献は引用により本願の一部を構成する) 由来のMEFやTTF、あるいはNanog遺伝子座に緑色蛍光タンパク質(GFP) 遺伝子とピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス(Okita et al., Nature, 448, 313-317 (2007)) (本文献は引用により本願の一部を構成する)) 由来のMEFやTTF等が挙げられる。一方、目視による形態観察で候補コロニーを選択する方法としては、例えばTakahashi et al., Cell, 131, 861-872 (2007) (本文献は引用により本願の一部を構成する) に記載の方法が挙げられる。レポーター細胞を用いる方法は簡便で効率的ではあるが、iPS細胞がヒトの治療用途を目的として作製される場合、安全性の観点から目視によるコロニー選択が望ましい。

【0089】

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

【0090】

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

【0091】

(g) iPS細胞の用途

このようにして樹立されたiPS細胞は、種々の目的で使用することができる。例えば、ES細胞などの多能性幹細胞で報告されている分化誘導法(例えば、神経幹細胞への分化誘導法としては、日本特開2002-291469、脾幹様細胞への分化誘導法としては、日本特開2004-121165、造血細胞への分化誘導法としては、国際公開公報WO99/064565に記載される方法などがそれぞれ例示される。この他にも、胚葉体の形成による分化誘導法としては、国際公開公報WO01/062899に記載の方法などが例示される。(これらの文献は引用により本願の一部を構成する)を利用して、iPS細胞から種々の細胞(例、心筋細胞、血液細胞、神経細胞、血管内皮細胞、インスリン分泌細胞等)への分化を誘導することができる。したがって、患者本人やHLAの型が同一もしくは実質的に同一である他人から採取した体細胞を用いてiPS細胞を誘導すれば、そこから所望の細胞(即ち、該患者が罹病している臓器の細胞や疾患に対する治療効果を発揮する細胞など)に分化させて該患者に移植するという、自家移植による幹細胞療法が可能となる。さらに、iPS細胞から分化させた機能細胞(例、肝細胞)は、対応する既存の細胞株よりも実際の生体内での該機能細胞の状態をより反映していると考えられるので、医薬候補化合物の薬効や毒性のin vitroスクリーニ

ング等にも好適に用いることができる。

【 0 0 9 2 】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

【 0 0 9 3 】

本実施例および図面において用いられるc-Myc、L-Myc、およびこれらの変異体は下記を示す

(c-Myc、 L-Myc)

- ・ ヒトc-MYC : c-MYC、またはc
- ・ ヒトL-MYC : L-MYC、L-MYC1、またはL
- ・ マウスc-Myc : c-Myc、またはMs-c
- ・ マウスL-Myc : L-Myc、またはMs-L

10

【 0 0 9 4 】

(c-Myc、 L-Mycの点変異体)

- ・ マウスc-Mycの第136位のTrpをGluに置換した点変異体 : Ms-c-W136E、またはMs-c136 (ヒトc-Mycの第135位のTrpをGluに置換した点変異体 : c-W135E、またはc135)
- ・ マウスc-Mycの第394位のValをAspに置換した点変異体 : Ms-c-V394D、またはMs-c394
- ・ マウスc-Mycの第420位のLeuをProに置換した点変異体 : Ms-c-L420P、またはMs-c420
- ・ マウスL-Mycの第96位のTrpをGluに置換した点変異体 : Ms-L-W96E、またはMs-L96
- ・ マウスL-Mycの第325位のValをAspに置換した点変異体 : Ms-L-V325D、またはMs-L325
- ・ マウスL-Mycの第351位のLeuをProに置換した点変異体 : Ms-L-L351P、またはMs-L351

20

【 0 0 9 5 】

上記6種の点変異体はいずれも、国際公開公報W02009/057831の例27および米国公開公報US2009/0227032のexample 29に記載された6種の点変異体と同一因子 (同一遺伝子) である。

【 0 0 9 6 】

c-Mycの点変異に関して、US2009/0227032に記載したように、Ms-c-W136E (前記公報中c-MycW135E) はc-Mycの形質転換活性に重要な働きをする核酸因子との相互作用に必須の領域中に変異を有する変異体である (Brough et al. Molecular and Cellular Biology 15(3):1536-1544, 1995)。Ms-c-V394DはMiz-1タンパクへの結合能を消失した変異体である (Herold et al. Mol. Cell. 10(3):509-21, 2002)。またMs-c-L420Pは、Maxタンパクへの結合能を消失した変異体である (Blackwood et al. Science 251(4998):1211-17, 1991)。 Ms-L-W96E、Ms-L-V325D、および Ms-L-L351Pは、それぞれ Ms-c-W136E、Ms-c-V394Dおよび Ms-c-L420Pに対応する部位の点変異体である。 (本パラグラフで挙げた文献はいずれも引用により本願の一部を構成する)

30

【 0 0 9 7 】

前記公報に記載されたように、c-MycおよびL-Mycは、いずれもヒトとマウスで、アミノ酸レベルで100%近いidentityを有しており、またマウスc-Myc、マウスL-Mycを用いた場合もヒトc-MYC、ヒトL-MYCと同様にヒトiPSコロニーが生じたことから、ヒト遺伝子の代替としてマウスの遺伝子を実験に用いている。なお、マウス点変異に対応するヒトc-Mycと L-Mycの点変異については以下の表のとおりである。また、これら点変異体のヒトアミノ酸配列上の変異部位は図1に示したとおりである。

40

【 0 0 9 8 】

【表 2】

Type	Mouse	Human
c-Myc	W136E	W135E
c-Myc	V394D	V394D
c-Myc	L420P	L420P
L-Myc	W96E	W96E
L-Myc	V325D	V321D
L-Myc	L351P	L347P

10

【0099】

(ヒトc-MYCのN末欠失型変異体)

- ・ヒトc-MYCアミノ酸配列の第14位以降を有する変異体：cdN1
- ・ヒトc-MYCアミノ酸配列の第42位以降を有する変異体：cdN2
- ・ヒトc-MYCアミノ酸配列の第65位以降を有する変異体：cdN3
- ・ヒトc-MYCアミノ酸配列の第83位以降を有する変異体：cdN4
- ・ヒトc-MYCアミノ酸配列の第108位以降を有する変異体：cdN5
- ・ヒトc-MYCアミノ酸配列の第128位以降を有する変異体：cdN6
- ・ヒトc-MYCアミノ酸配列の第141位以降を有する変異体：cdN7

これら欠失型変異体のN末端開始部位は図1に示したとおりである。

20

【0100】

(ヒトc-W135EのN末欠失型変異体)

- ・ヒトc-W135EとcdN1との組み合わせ変異体：c135dN1
- ・ヒトc-W135EとcdN2との組み合わせ変異体：c135dN2
- ・ヒトc-W135EとcdN3との組み合わせ変異体：c135dN3
- ・ヒトc-W135EとcdN4との組み合わせ変異体：c135dN4
- ・ヒトc-W135EとcdN5との組み合わせ変異体：c135dN5
- ・ヒトc-W135EとcdN6との組み合わせ変異体：c135dN6

【0101】

(ヒトL-MYCのN末欠失型変異体)

- ・ヒトL-MYCアミノ酸配列の第22位以降を有する変異体：LdN2
- ・ヒトL-MYCアミノ酸配列の第45位以降を有する変異体：LdN4
- ・ヒトL-MYCアミノ酸配列の第70位以降を有する変異体：LdN5
- ・ヒトL-MYCアミノ酸配列の第89位以降を有する変異体：LdN6
- ・ヒトL-MYCアミノ酸配列の第102位以降を有する変異体：LdN7

これら欠失型変異体のN末端開始部位は図1に示したとおりである。

30

【0102】

(3因子)

- ・ヒト由来の3因子(OCT3/4, KLF4, SOX2)を「3F」と称する。

【0103】

実施例1：c-MYCのN末欠失型変異体によるiPS細胞誘導の検討

1) ヒトc-MYCのN末欠失型変異体をコードするレトロウイルスベクターの作製

ヒトc-MYCのN末欠失型変異体cdN1～cdN7をコードするレトロウイルスベクターを作製した。まず、ヒトc-MYC cDNAを鋳型とし、以下のプライマーセットを用いて、PCRにて各フラグメントを増幅した。

【0104】

<Forward primers>

- dN1-s CACCATGCTCGACTACGACTCGGTGCAGCC (配列番号：11)
- dN2-s CACCATGCCCCGGCGCCAGCGAGGATAT (配列番号：12)
- dN3-s CACCATGCGCCGCTCCGGGCTCTGCTCGCC (配列番号：13)

50

dN4-s CACCATGCGGGGAGACAACGACGGCGGTGG (配列番号: 14)
dN5-s CACCATGGGAGACATGGTGAACCAGAGTTT (配列番号: 15)
dN6-s CACCATGATCATCATCCAGGACTGTATGTG (配列番号: 16)
dN7-s CACCATGGCCGCCAAGCTCGTCTCAGAGAA (配列番号: 17)

【0105】

<Reverse primers (全てのフラグメントに共通)>

HsMyc-AS TCACGCACAAGAGTTCCGTAGCTGTTCAAG (配列番号: 18)

【0106】

これらの各フラグメントをpENTR-D-TOPO (Invitrogen) にクローニングして得られたpENTR-D-TOPO-cdN1 ~ cdN7とレトロウイルスベクターpMXs-gw (東京大学 北村俊夫先生より入手、Exp. Hematol. 31; 1007-1014, 2003) (本文献は引用により本願の一部を構成する) との間でLR反応を行うことにより、pMXs-cdN1 ~ cdN7を作製した。

【0107】

2) ウエスタンブロッティングによる発現確認

Cell, 131:861-872 (2007) (本文献は引用により本願の一部を構成する) の記載に従い、Plat-E細胞 (Morita, S. et al., Gene Ther. 7, 1063-1066) にレトロウイルスベクターpMXs-cdN1 ~ cdN7を個々に導入した。2日間培養後の各Plat-E細胞を1×SDSサンプルバッファで処理し、その後10分間ボイルして、これを泳動用サンプルとした。一次抗体として抗c-Myc抗体 (Santa Cruz社製)、また二次抗体としてHRP付加抗ウサギIgG抗体 (CST製) を用いて、常法によりウエスタンブロッティングを行った。結果を図2に示す。各サンプルにおいて、内在性c-MYCのバンド (cdN1 ~ cdN7の各レーンにおける上側のバンド) の他、各変異体に相当する大きさのバンドが検出されたことから、各変異体の発現が確認された。

【0108】

3) iPS細胞の誘導

マウスエコトロピックウイルスレセプターSlc7a1遺伝子を発現させた成人皮膚由来線維芽細胞 (aHDF-Slc7a1) を、Cell, 131, 861-872 (2007) に記載の方法に従い作製した。このaHDF-Slc7a1を6ウェルプレートの1ウェルあたり1×10⁵個の割合で蒔き、翌日、Cell, 131, 861-872 (2007) に記載の方法に従い、ヒト由来の3遺伝子 (OCT3/4, KLF4, SOX2) に、前記1) で作製した各N末欠失型変異体を加えた計4遺伝子をレトロウイルスで導入した (図3中、3F-cdN1 ~ 3F-cdN7)。その際、前記ヒト由来の3遺伝子 (OCT3/4, KLF4, SOX2) に、各種点変異体の遺伝子を加えた計4遺伝子のレトロウイルスによる導入も、併せて行った (図3中、3F-Ms-c136、3F-Ms-c394、3F-Ms-c420、3F-Ms-L96、3F-Ms-L325、3F-Ms-L351)。

【0109】

上記の各レトロウイルスをaHDF-Slc7a1に感染させ、6日後に細胞を回収し、MSTO細胞上への蒔き直しを行った (5×10⁵個/100 mmディッシュ)。翌日から霊長類ES細胞培養用培地 (ReproCELL) に4 ng/mlのリコンビナントヒトbFGF (WAKO) を加えた培地で培養を行った。

【0110】

レトロウイルス感染後、31日目に出現したヒトiPSコロニー (ES-likeコロニー) の数をカウントした。結果を図3に示す。図3に示されるように、OCT3/4, KLF4, SOX2、c-MYCの4遺伝子 (3Fc) に比べて、3F-cdN2、3F-cdN3、および3F-cdN5はヒトiPSコロニー数が顕著に上昇 (iPS誘導活性が上昇) しており、また全コロニー数に対するiPSコロニー数の割合も上昇していた。なお3F-cdN1ではiPSコロニー数が極めて低かったことからc-MYCのアミノ酸配列のdN2開始部位よりN末側の領域 (ヒトc-MYCの第1位 ~ 第41位の領域) 中に、iPS細胞の誘導に対してネガティブに作用する領域が存在していることが推測された。

【0111】

また、3F-cdN4でコロニーがほとんどできなかったことからヒトc-MYCの65 ~ 82位にiPS細胞の誘導にポジティブに作用する領域があることも推測された。しかしながら、この領

10

20

30

40

50

域を欠失することでc-MYCの高次構造が大幅に変化してしまい効果が見れなかった可能性も示唆された。

【 0 1 1 2 】

なお、3FL、3F-Ms-L、3F-Ms-c136、および3F-Ms-L325についても、3Fcに比べてヒトiPSコロニー数が顕著に上昇（iPS誘導活性が上昇）しており、また全コロニー数に対するiPSコロニー数の割合も上昇していた。

【 0 1 1 3 】

実施例2：ヒトc-W135EのN末欠失型変異体によるiPS細胞誘導の検討

1) ヒトc-W135EのN末欠失型変異体をコードするレトロウイルスベクターの作製

実施例1-1)で構築したpENTR-D-TOPO-cdN1～cdN6を鋳型とし、プライマー（OLIGO1：CAG GACTGTATGGAGAGCGGTTTCT（配列番号：19）、OLIGO2：AGAAACCGCTCTCCATACAGTCCTG（配列番号：20））を用いたPCRを行うことにより、ヒトW135Eの点変異を導入した。シーケンスを行い点変異を確認した後、レトロウイルスベクターpMXs-gwとの間でLR反応を行うことにより、pMXs-c135dN1～c135dN6を作製した。

【 0 1 1 4 】

2) ウエスタンブロッティングによる発現確認

実施例1-2)と同様にして、Plat-E細胞にレトロウイルスベクターpMXs-c135dN1～c135dN6を個々に導入したPlat-E細胞の溶解物を用いて、常法によりウエスタンブロッティングを行った。結果を図4に示す。各サンプルにおいて、内在性c-MYCのバンド（c135dN1～c135dN6の各レーンにおける上側のバンド）の他、各変異体に相当する大きさのバンドが検出されたことから、各変異体の発現が確認された。

【 0 1 1 5 】

3) iPS細胞の誘導

実施例1と同様にしてヒト由来の3遺伝子（OCT3/4、KLF4、SOX2）に、前記1)で作製したc135dN1～c135dN6のいずれかを加えた計4遺伝子をレトロウイルスで導入した。レトロウイルス感染後、30日目に出現したヒトiPSコロニー（ES-likeコロニー）の数をカウントした。結果を図5に示す。実施例1同様に3F-cdN1ではiPSコロニー数が極めて低かったのに対し、細胞の形質転換に関与することが推測されているc-MYCの135位点変異を導入することにより、iPSコロニー数は劇的に増加し、また全コロニー数に対するiPSコロニー数の割合も上昇していた（図5中の3F-c135dN1）。なお3F-c135dN2～3F-c135dN6は、今回の実験では顕著なiPS誘導活性は認められなかった。

【 0 1 1 6 】

実施例3：L-MYCのN末欠失型変異体によるiPS細胞誘導の検討

1) ヒトL-MYCのN末欠失型変異体をコードするレトロウイルスベクターの作製

ヒトL-MYCのN末欠失型変異体LdN2、LdN4、LdN5、LdN6およびLdN7をコードするレトロウイルスベクターを作製した（cdN1およびcdN3に対応するL-MYC変異体は無し、図1参照）。まず、ヒトL-MYC cDNAを鋳型とし、以下のプライマーセットを用いて、PCRにて各フラグメントを増幅した。

【 0 1 1 7 】

<Forward primers>

LMyc-dN2-s CACCATGTCCACGGCGCCCAGCGAGGACAT（配列番号：21）
LMyc-dN4-s CACCATGTGGGGCTTGGGTCCCGGCGCAGG（配列番号：22）
LMyc-dN5-s CACCATGGGAGACGAAGCGGAATCCCGGGG（配列番号：23）
LMyc-dN6-s CACCATGATCATACGCCGTGACTGCATGTG（配列番号：24）
LMyc-dN7-s CACCATGCGGGAACGGCTGGAGAGAGCTGT（配列番号：25）

【 0 1 1 8 】

<Reverse primers（全てのフラグメントに共通）>

Hu-L-Myc-as2 TTAGTAGCCAGTGAGGTATGCAATTC（配列番号：26）

【 0 1 1 9 】

これらの各フラグメントをpENTR-D-TOPO（Invitrogen）にクローニングして得られたpE

10

20

30

40

50

NTR-D-TOPO-LdN2、-LdN4、-LdN5、-LdN6および-LdN7とレトロウイルスベクターpMXs-gwとの間でLR反応を行うことにより、pMXs-LdN2、-LdN4、-LdN5、-LdN6および-LdN7を作製した。

【0120】

2) iPS細胞の誘導

実施例1と同様にしてヒト由来の3遺伝子(OCT3/4, KLF4, SOX2)に、前記1)で作製したLdN2、LdN4、LdN5、LdN6、LdN7を加えた計4遺伝子をレトロウイルスで導入した。レトロウイルス感染後、39日目に出現したヒトiPSコロニー(ES-likeコロニー)の数をカウントした。結果を図6に示す。L-MYC1のN末を削っていくことにより、iPSコロニー数が減少していくことが分かった。3F-LdN2および3F-LdN4は3Fcに比べてヒトiPSコロニー数が上昇(iPS誘導活性が上昇)しており、また全コロニー数に対するiPSコロニー数の割合も上昇していた。

10

【0121】

今回の実験では、LdN5以降の欠失においてiPS誘導活性が特に減少していたことから、dN2～dN5間に活性に重要な領域が存在することが示唆された。

【0122】

実施例4：形質転換(transformation)活性の検討

c-Mycは形質転換活性を有しており、一方L-Mycは形質転換活性がc-Mycに比べて非常に低い(c-Mycの1～10%程度)ことが報告されている(Birrer et al. Molecular and Cellular Biology 8:2668-2673, 1988, Barrett et al. Molecular and Cellular Biology 12: 3130-3137, 1992)。またc-Mycの第136位は細胞の形質転換に関与することが推測されている(Brough et al. Molecular and Cellular Biology 15(3):1536-1544, 1995)。(本パラグラフに挙げた文献はいずれも引用により本願の一部を構成する)

20

【0123】

そこで作製した各変異体が形質転換活性を有するかどうかを検討した。

【0124】

マウスNIH3T3細胞を6ウェルプレート(1ウェルあたり 1×10^5 個)の割合で蒔き、翌日、Cell, 126, 663-676 (2006)(本文献は引用により本願の一部を構成する)に記載の方法に従い、ヒト由来の以下の遺伝子:c-MYC、c-W135E、L-MYC、cdN1～cdN7、c135dN1～c135dN6、またマウス由来の以下の遺伝子:c-Myc、L-Myc、Ms-c-W136E、Ms-c-V394D、Ms-c-L420P、Ms-L-W96E、Ms-L-V325D、Ms-L-L351Pをレトロウイルスで導入した。導入から2日目に細胞の形態を観察した。結果を図7～図9に示す。c-MYC(c-Myc)はNIH3T3細胞に対する形質転換活性を有していたが、c-W135E(図7)、Ms-c-W136E、Ms-c-L420P(図8)では形質転換活性が消失していた。またL-MYC(L-MYC1、L-Myc)(図7、図8)およびその点変異体(図8中、Ms-L-W96E、Ms-L-V325D、Ms-L-L351P)も形質転換活性を有していなかった。c-MYCのN末欠失型変異体においては、cdN1は形質転換活性を有していたが、135位を変異させることにより(図9中c135dN1)形質転換活性は消失した。またcdN2～cdN7およびc135dN2～c135dN6のいずれも形質転換活性を有していなかった(図9)。

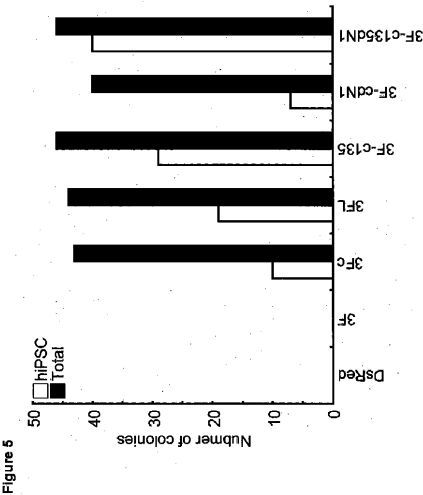
30

【0125】

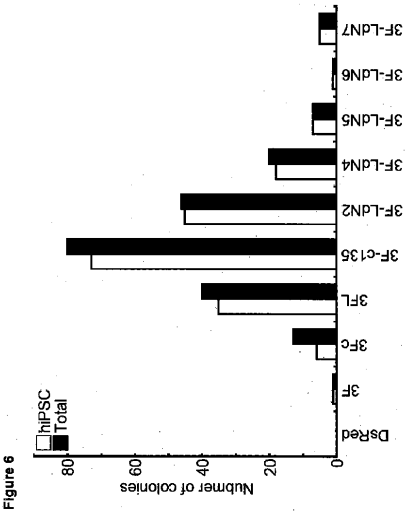
以上の実施例1～4により、形質転換活性の低い(ほとんど無い)L-MYCおよびその変異体であるV325D(V321D)、LdN2、LdN4や、形質転換活性を失ったc-MYC変異体(W135E(W136E)、cdN2、cdN3、cdN5、c135dN1)は、形質転換活性を有するc-MycよりもiPS誘導活性が上昇する傾向にあることが明らかとなったことから、Mycの形質転換活性はヒトiPS細胞誘導にむしろマイナスに働いていることが示された。

40

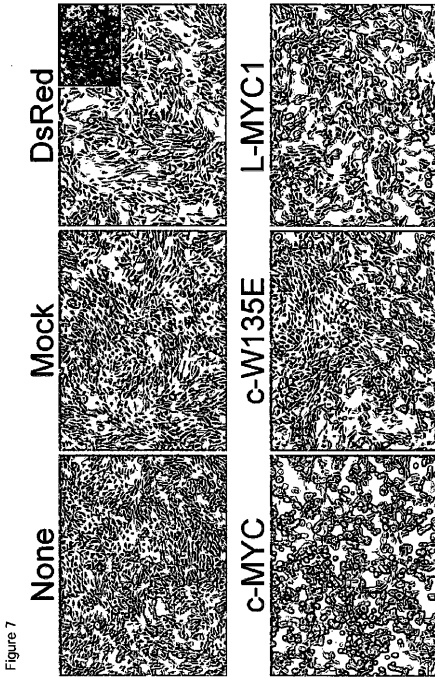
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】

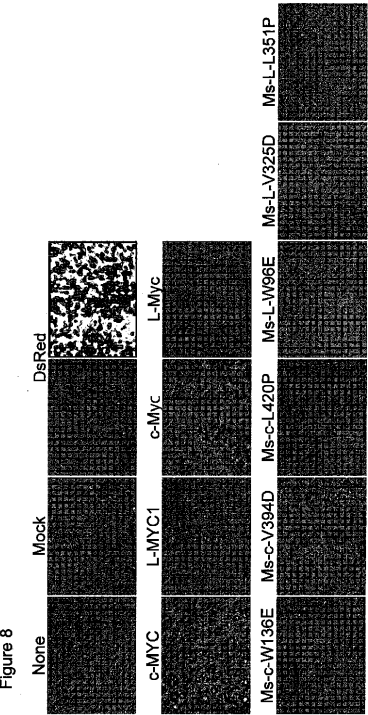


Figure 9

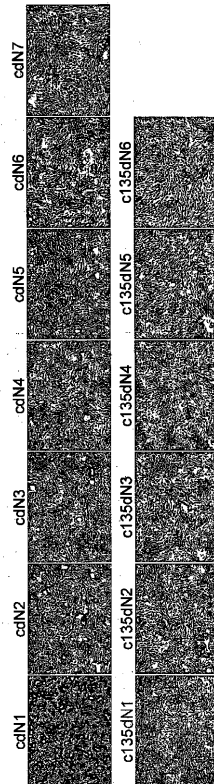


Figure 10

[illegible]

0005827220000001 . app

フロントページの続き

(72)発明者 中川 誠人

京都府京都市左京区聖護院川原町53 国立大学法人京都大学 iPS細胞研究センター内

審査官 鳥居 敬司

(56)参考文献 国際公開第2009/057831(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

C12N 5/00-5/28

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

WPIDS/WPIX(STN)