

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)公開番号
特開2024-38024
(P2024-38024A)

(43)公開日 令和6年3月19日(2024.3.19)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	1/00 (2006.01)	C 1 2 N	1/00	F Z N A
		C 1 2 N	1/00	G
審査請求 有 請求項の数 1 O L 外国語出願 (全98頁)				
(21)出願番号	特願2023-216113(P2023-216113)	(71)出願人	507081094	
(22)出願日	令和5年12月21日(2023.12.21)		ミネルバ バイオテクノロジーズ コーポ	
(62)分割の表示	特願2021-211485(P2021-211485)		レーション	
	)の分割		米国, エムエー 0 2 4 5 1, ウォルサ	
原出願日	平成24年10月17日(2012.10.17)		ム, 4 0 ベアー ヒル ロード	
(31)優先権主張番号	61/679,021	(74)代理人	110003797	
(32)優先日	平成24年8月2日(2012.8.2)		弁理士法人清原国際特許事務所	
(33)優先権主張国・地域又は機関		(72)発明者	バンダッド, シンシア	
	米国(US)		米国, エムエー 0 2 4 5 1, ウォルサ	
(31)優先権主張番号	61/675,264		ム, 4 0 ベアー ヒル ロード	
(32)優先日	平成24年7月24日(2012.7.24)	(72)発明者	スマッジ, ブノワ	
(33)優先権主張国・地域又は機関			米国, エムエー 0 2 4 5 1, ウォルサ	
	米国(US)		ム, 4 0 ベアー ヒル ロード	
(31)優先権主張番号	61/622,422			
(32)優先日	平成24年4月10日(2012.4.10)			
	最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 幹細胞の増殖及び誘導用の培地

(57)【要約】 (修正有)

【課題】 幹細胞の細胞培養培地を提供する。

【解決手段】 本出願は、M U C 1 *活性化リガンドを含む、細胞の成長、維持及びより未熟な状態への復帰の誘導用の細胞培養培地を開示する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

M U C 1 * 活性化リガンドを含む、細胞の成長、維持及びより未熟な状態への復帰の誘導用の細胞培養培地。

【請求項 2】

前記細胞が幹細胞又は前駆体細胞である、請求項 1 に記載の細胞培養培地。

【請求項 3】

前記細胞が成熟細胞、体細胞又は前駆体細胞である、請求項 1 に記載の細胞培養培地。

【請求項 4】

前記細胞がヒトである、請求項 1 に記載の細胞培養培地。

10

【請求項 5】

b F G F、T G F - ベータ又はこれらの両方を含まない、請求項 1 に記載の細胞培養培地。

【請求項 6】

血清を含まない、請求項 1 に記載の細胞培養培地。

【請求項 7】

インスリン、セレン、トランスフェリン、L - アスコルビン酸又は非必須アミノ酸を更に含む、請求項 1 に記載の細胞培養培地。

【請求項 8】

前記 M U C 1 * リガンドが N M E ファミリータンパク質である、請求項 1 に記載の細胞培養培地。

20

【請求項 9】

前記 N M E ファミリータンパク質が N M E 1 である、請求項 8 に記載の細胞培養培地。

【請求項 10】

前記 N M E 1 が二量体化された 2 つの単量体として、又は 2 つのサブユニットを有する 1 本鎖として設計された 2 つの単量体として存在する、請求項 1 に記載の細胞培養培地。

【請求項 11】

前記 N M E ファミリータンパク質が N M E 7 である、請求項 8 に記載の細胞培養培地。

【請求項 12】

前記 N M E 7 がおよそ 25 k D a 又はおよそ 30 k D a の分子量を有する、請求項 11 に記載の細胞培養培地。

30

【請求項 13】

前記 N M E ファミリータンパク質が N M E 7 - A B である、請求項 8 に記載の細胞培養培地。

【請求項 14】

前記 N M E ファミリータンパク質が N M E 6 である、請求項 8 に記載の細胞培養培地。

【請求項 15】

r h o 関連キナーゼの阻害剤を更に含む、請求項 1 に記載の細胞培養培地。

【請求項 16】

P I 3 K 又は R A C 経路におけるシグナル伝達タンパク質の活性化剤を更に含み、かつ r h o キナーゼ阻害剤を含まない、請求項 1 に記載の細胞培養培地。

40

【請求項 17】

N M E 1 又は N M E 2 の発現を抑制する核酸を更に含む、請求項 1 に記載の細胞培養培地。

【請求項 18】

他の成長因子を更に含む、請求項 1 に記載の細胞培養培地。

【請求項 19】

前記他の成長因子が F G F - 2 及び／又は T G F - ベータである、請求項 18 に記載の細胞培養培地。

【請求項 20】

50

NMEファミリータンパク質を含む細胞培養培地と細胞を接触させることを含み、幹細胞若しくは前駆体細胞の成長を刺激するか、又はより未熟な状態への細胞の復帰を誘導する方法。

【請求項 2 1】

前記細胞が幹細胞又は前駆体細胞である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

前記細胞が体細胞である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 3】

前記細胞がヒトである、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 4】

前記培地が b F G F、T G F - ベータ又はこれらの両方を含まない、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記培地が血清を含まない、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記培地が、インスリン、セレン、トランスフェリン、L - アスコルビン酸又は非必須アミノ酸を更に含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 7】

前記 NME ファミリータンパク質が NME 1 である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 8】

前記 NME 1 が二量体化された 2 つの単量体として、又は 2 つのサブユニットを有する 1 本鎖として設計された 2 つの単量体として存在する、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記 NME ファミリータンパク質が NME 7 である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記 NME 7 がおよそ 2 5 k D a 又はおよそ 3 0 k D a の分子量を有する、請求項 2 9 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記 NME ファミリータンパク質が NME 7 - A B である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 2】

前記 NME ファミリータンパク質が NME 6 である、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 3】

インスリン、セレン、トランスフェリン、L - アスコルビン酸を更に含み、N a H C O₃ を使用して p H が調整されている、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 4】

前記培地が r h o キナーゼの阻害剤を更に含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記培地が P I 3 K 又は R A C 経路におけるシグナル伝達タンパク質の活性化剤を更に含み、かつ r h o キナーゼ阻害剤を含まない、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記培地が NME 1 又は NME 2 の発現を抑制する核酸を更に含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記培地がグアニン交換因子の阻害剤を更に含む、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記グアニン交換因子の阻害剤が六量体形態の NME 1 である、請求項 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記グアニン交換因子の阻害剤が NME 1 由来のペプチドである、請求項 3 7 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 40】

前記培地が他の成長因子を更に含む、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 41】

前記他の成長因子が FGF-2 及び／又は TGF-β である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

基礎培地及び幹細胞を成長又は維持する非必須アミノ酸を加えた NME ファミリータンパク質が本質的になる、細胞培養培地。

【請求項 43】

NME ファミリータンパク質から本質的になる細胞培養培地と細胞を接触させることを含み、幹細胞若しくは前駆体細胞の成長を刺激するか、又はより未熟な状態への細胞の復帰を誘導する方法。

10

【請求項 44】

幹細胞集団を含む組成物であって、NME ファミリータンパク質を含む無血清培養培地を更に含む、組成物。

【請求項 45】

前駆体細胞又は幹細胞に結合するリガンドの表面で幹細胞又は前駆体細胞を増殖する方法であって、NME ファミリーのタンパク質を含む培地と細胞を接触させることを含む、方法。

【請求項 46】

20

ナープ幹細胞の純集団を作製する方法であって、

(i) ナープ幹細胞の単一コロニーを得るように NME ファミリータンパク質を含む細胞培養培地と細胞を接触させることと、

(ii) ナープ幹細胞の前記単一コロニーを単離することと、

(iii) ナープ幹細胞の純集団を得るように NME ファミリータンパク質を含む細胞培養培地と前記コロニーを接触させることと、を含む、方法。

【請求項 47】

工程 (i) において、約 25%～60% のナープ状態の細胞が得られる、請求項 46 に記載の方法。

30

【請求項 48】

約 30%～50% のナープ状態の細胞が得られる、請求項 47 に記載の方法。

【請求項 49】

工程 (iii) において、ナープ幹細胞集団の純度が少なくとも約 80% である、請求項 46 に記載の方法。

【請求項 50】

ナープ幹細胞集団の純度が少なくとも約 90% である、請求項 49 に記載の方法。

【請求項 51】

ナープ幹細胞集団の純度が少なくとも約 95% である、請求項 50 に記載の方法。

【請求項 52】

40

ナープ幹細胞集団の純度が少なくとも約 99% である、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

人工多能性幹細胞からナープ幹細胞の純集団を作製する方法であって、

(i) ナープ幹細胞の単一コロニーを得るように NME ファミリータンパク質を含む細胞培養培地と成熟細胞又は前駆体細胞を接触させることと、

(ii) ナープ幹細胞の前記単一コロニーを単離することと、

(iii) ナープ幹細胞の純集団を得るように NME ファミリータンパク質を含む細胞培養培地と前記コロニーを接触させることと、を含む、方法。

【請求項 54】

50

工程 (i) において前記成熟細胞に多能性遺伝子を形質移入する、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 5】

前記成熟細胞又は前駆体細胞が体細胞、皮膚芽細胞又は線維芽細胞である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 6】

工程 (i) において、約 2 5 % ~ 6 0 % のナীব状態の細胞が得られる、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 7】

約 3 0 % ~ 5 0 % のナীব状態の細胞が得られる、請求項 5 6 に記載の方法。

10

【請求項 5 8】

工程 (i i i) において、ナীব幹細胞集団の純度が少なくとも約 8 0 % である、請求項 5 3 に記載の方法。

【請求項 5 9】

ナীব幹細胞集団の純度が少なくとも約 9 0 % である、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

ナীব幹細胞集団の純度が少なくとも約 9 5 % である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

ナীব幹細胞集団の純度が少なくとも約 9 9 % である、請求項 6 0 に記載の方法。

【請求項 6 2】

20

ヒト胚性幹細胞株を作出する方法であって、

(i) N M E ファミリータンパク質を含む細胞培養培地と胚盤胞由来の細胞を接触させることと、

(i i) 幹様形態を有する増殖物を単離することと、

(i i i) N M E ファミリータンパク質を含む細胞培養培地と単離された増殖物を接触させることと、

(i v) 所望の核型を有し、多能性のレベル及びその細胞が多能性であることを示すナীব遺伝子を発現するクローンを単離することと、

を含む、方法。

【請求項 6 3】

30

前記 N M E ファミリーメンバーが N M E 7 である、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記 N M E 7 が N M E 7 - A B である、請求項 6 3 に記載の方法。

【請求項 6 5】

前記 N M E ファミリーメンバーを含有する培地が F G F を含有しない、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 6】

細胞内で N M E 1 及び N M E 2 を抑制することを含む、請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 7】

ヒト人工多能性幹細胞株を作出する方法であって、

40

(i) N M E ファミリータンパク質を含む細胞培養培地とドナー又は患者由来の細胞を接触させることと、

(i i) 多能性遺伝子 O C T 4 、 S O X 2 、 N A N O G 、 K L F 4 、 c - M y c 又は L I N 2 8 の発現を誘導する物質と前記細胞を接触させることと、

(i i i) 幹細胞様形態を有する細胞を単離することと、

(i v) N M E ファミリータンパク質を含む細胞培養培地と単離された細胞を接触させることと、

(v) 所望の核型を有し、その細胞が多能性であることを示す多能性遺伝子レベルを発現するクローンを単離することと、

(v i) N M E ファミリーメンバーを含む培地中でクローンを増やすことと、

50

を含む、方法。

【請求項 68】

前記 NME ファミリーメンバーが NME 7 である、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 69】

前記 NME 7 が NME 7-AB である、請求項 68 に記載の方法。

【請求項 70】

前記 NME ファミリーメンバーを含有する培地が FGF を含有しない、請求項 67 に記載の方法。

【請求項 71】

細胞内で NME 1 及び NME 2 を抑制することを含む、請求項 67 に記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、幹細胞成長培地に関する。また、本出願は、成熟細胞又は体細胞を誘導してより未熟な状態へと復帰させるのに使用される培地に関する。

【背景技術】

【0002】

幹細胞療法には、多くの後天性疾患、遺伝性の症状及び外傷の結果の治療のみならず、治癒の可能性が期待されている。しかしながら、現在の科学的知見における数多くの隔たり、並びに幹細胞療法に対する期待が現実のものとなる前に克服されるべき技術面及び規制面の制限が存在する。1つ目の問題として、規制面での問題が挙げられる。FDA は、患者の安全性及び製品の再現性を保証するため、従来の薬品に求められるものを規範とすることが予想されるガイドラインを課すであろう。これは、幹細胞として始まるいかなる治療用細胞も、1日目から規定された定量可能な試薬を使用して、再現可能な条件下で作出される必要があることを意味する。治療用の幹細胞由来細胞の場合、これは不可能であった。ヒト胚性幹 (ES) 細胞及びヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞は、両方とも慣例上、大部分が未確定の成分の複合混合物を使用して *in vitro* で増やされてきた。現在の慣例によれば、今もなお線維芽細胞フィーダー細胞層上で ES 細胞及び iPS 細胞を培養しており、通常、フィーダー細胞はマウス起源 (マウス胚線維芽細胞: MEF) であるが、ヒトフィーダー細胞も使用されている。別の種由来の細胞を使用することは、多くの人が危険であるとしている。異なる動物種という問題に加え、フィーダー細胞層の要求は、そのシステムに再現不可能な別の層を導入することである、すなわち、幹細胞の成長には線維芽細胞フィーダー細胞により分泌される因子が必要である。これらの必要とされる因子は、同定も定量もされていない。フィーダー細胞の使用を避けるという試みにおいて、マウス肉腫細胞由来の未確定の定量不可能な因子の混合物であるマドリゲル層上で幹細胞を成長している。しかしながら、フィーダー細胞由来の馴化培地が添加された場合のみ、幹細胞はマドリゲル層上で成長することができる。したがって、マドリゲル法は細胞を作出する明確な条件を提供しない。

20

30

【0003】

ヒト幹細胞の成長を可能とする従来既知の成長因子は、塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF、FGF-2 又は単に FGF と呼ばれる) である。ヒト幹細胞療法に関して予想される FDA 規則に適合し得る幹細胞成長条件を開発する試みにおいて、最近の研究論文により、動物成分を含有しないが、非常に高レベルの bFGF (標準 4 ng/mL に比して 100 ng/mL) に加えて TGF-β を含有する、「E8」と呼ばれる規定培地を使用してヒト胚性幹細胞及び iPS 細胞を成長し得たことが報告された。この培地及び他の全ての FGF 系培地の主な問題は、「グラウンド (ground)」状態又は「ナイーブ (naive)」状態の細胞と呼ばれる真の多能性幹細胞が FGF 中で不安定なことである (非特許文献 1、非特許文献 2、非特許文献 3)。これらの報告は、FGF 又は bFGF の使用は、ヒト幹細胞をナイーブ状態から「プライムド (primed)」状態にすると結論付けている。「プライムド」は、誤った名称である。プライムド幹細胞が既に或る程度の方

40

50

化を経たとしても、これは細胞を「プライムした」わけでも、又は機能的なヒト細胞への分化まで細胞を設定したわけでもない。その逆の場合もある。現在、科学研究により、全ての治療適用でないにしてもほとんどの場合、幹細胞の使用に必要とされるプライムド幹細胞は、ヒト体内においていかなる細胞へも分化することができないことが示されている（非特許文献4）。例えば、FGFにより成長された幹細胞は、パーキンソン病若しくはアルツハイマー病、又は外傷による脊髄損傷のような神経変性疾患の治療に必要とされる全てのタイプの神経細胞へと分化することができない。さらに、研究者らは、ヒト幹細胞を同調的な方法で分化させることができず、そのため、治療にはその治療法に必要とされる単一種の細胞型が欲せられるのに反して、無作為に多数の細胞型へと分化する。マウス幹細胞はナープ状態にあることから、研究者らがマウス幹細胞を用いて作業しているときはこのような問題はなかった。E8培地による別の問題としては、異常に高レベルのbFGF及びTGF-βが挙げられ、これは生理学的に適切でないとされていることから、これらの異常に高レベルの成長因子が予期しない別の問題を引き起こすか否かという疑問が投げ掛けられている。

10

20

30

40

50

【0004】

要約すると、プライムド状態の幹細胞とナープ状態又はグラウンド状態の幹細胞との相違に関心を持つ最近の研究の主体は、FGFは、真の多能性ヒト幹細胞を成長させる天然の成長因子ではないと結論づけている。真の多能性状態（グラウンド状態又はナープ状態）にあるヒト幹細胞がFGFの存在下で維持され得ないという事実は、ヒトの治療法用のヒト幹細胞を作出又は維持する真に多能性のヒトナープ幹細胞の成長を支持する本物の成長因子を同定及び使用する必要性が当該技術分野において存在することを示している。ナープ幹細胞に対する真の成長因子は、薬剤規制機関によって要求されることが予想されるものを含む、様々な培地及び培養条件において正常に機能できなければならない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】J. Hanna, A. W. Cheng, K. Saha et al., Proc Natl Acad Sci U S A 107 (20), 9222 (2010)

【非特許文献2】Jacob H. Hanna, Krishanu Saha, and Rudolf Jaenisch, Cell 143 (4), 508 (2010)

【非特許文献3】J. Nichols and A. Smith, Cell Stem Cell 4 (6), 487 (2009)

【非特許文献4】FGF signaling inhibits neural induction in human embryonic stem cells. Boris Greber, Philippe Coulon, Miao Zhang, Soren Moritz, Stefan Frank, Arnoldo Jose, Muller-Molina, Marcos J Arauzo-Bravo, Dong Wook Han, Hans-Christian Pape and Hans R Scholer. The EMBO Journal (2011) 30, 4874-4884

【発明の概要】

【0006】

1つの態様では、本発明は、MUC1*活性化リガンドを含む、細胞の成長、維持及びより未熟な状態への復帰を誘導する細胞培養培地に関する。細胞が分化を起こすことなく増殖することが望まれる場合、細胞は幹細胞又は前駆体細胞であってもよく、又は成熟細胞若しくは前駆体細胞が多能性細胞へと誘導されることが望まれる場合、細胞は体細胞、成熟細胞若しくは前駆体細胞であってもよい。好ましくは、細胞はヒト細胞であってもよい。培地は、bFGF、TGF-β又はこれらの両方を含まないことが好ましい。さらに、別の態様では、培地は血清を含まないことがある。培地は、インスリン、セレン、トランスフェリン、L-アスコルビン酸又は非必須アミノ酸を更に含んでもよい。

【0007】

別の態様では、MUC1*リガンドは、NMEファミリータンパク質であってもよい。好ましくは、NMEファミリータンパク質はNME1であってもよい。NME1は二量体

化された2つの単量体として、又は2つのサブユニットを有する1本鎖として設計された2つの単量体として存在してもよい。代替的にはNMEファミリータンパク質はNME7又はNME6であってもよい。

【0008】

別の態様では、細胞培養培地は、rho関連キナーゼの阻害剤を含んでもよい。細胞培養培地は、グアニン交換因子の阻害剤を含んでもよい。グアニン交換因子の阻害剤は、六量体形態のNME1であってもよく、又はNME1由来のペプチドであってもよい。

【0009】

更なる他の態様では、細胞培養培地は、FGF-2又はTGF-ベータ等であるが、これらに限定されない他の成長因子を更に含んでもよい。

【0010】

別の態様では、本発明は、NMEファミリータンパク質の細胞培養培地と細胞を接触させることを含み、幹細胞若しくは前駆体細胞の成長を刺激するか、又はより未熟な状態への細胞の復帰を誘導する方法に関する。

【0011】

本方法では、細胞が分化を起こすことなく増殖することが望まれる場合、細胞は幹細胞又は前駆体細胞とすることができ、又は成熟細胞若しくは前駆体細胞が誘導されて多能性となることが望まれる場合、細胞は体細胞、成熟細胞若しくは前駆体細胞とすることができる。好ましくは、細胞はヒト細胞とすることができる。培地は、bFGF、TGF-ベータ又はこれらの両方を含まないことが好ましい。さらに、別の態様では、培地は血清を含まないことがある。培地は、インスリン、セレン、トランスフェリン、L-アスコルビン酸又は非必須アミノ酸を更に含むことができる。

【0012】

好ましくは、NMEファミリータンパク質はNME1とすることができる。NME1は二量体化された2つの単量体として、又は2つのサブユニットを有する1本鎖として設計された2つの単量体として存在することができる。代替的には、NMEファミリータンパク質はNME7又はNME6とすることができる。

【0013】

本方法の別の態様では、細胞培養培地はrho関連キナーゼの阻害剤を含む。細胞培養培地はグアニン交換因子の阻害剤を含むことができる。グアニン交換因子の阻害剤は六量体形態のNME1、又はNME1由来のペプチドとすることができる。更に他の態様では、細胞培養培地はFGF-2又はTGF-ベータ等であるが、これらに限定されない他の成長因子を更に含むことができる。

【0014】

更に別の態様では、本発明は、基礎培地及び幹細胞を成長若しくは維持する又は成熟細胞の多能性を誘導する非必須アミノ酸を加えたNMEファミリータンパク質の細胞培養培地に関する。

【0015】

別の態様では、本発明は、無血清最小培地中でNMEファミリータンパク質の細胞培養培地と細胞を接触させることを含み、幹細胞若しくは前駆体細胞の成長を刺激するか、又はより未熟な状態への細胞の復帰を誘導する方法に関する。

【0016】

更に別の態様では、本発明は、幹細胞集団を含む組成物であって、NMEファミリータンパク質を含む無血清培養培地を更に含む、組成物に関する。

【0017】

更に別の態様では、本発明は、前駆体細胞又は幹細胞に結合するリガンドの表面で幹細胞を成長する方法であって、NMEファミリーのタンパク質を含む培地と細胞を接触させることを含む、方法に関する。

【0018】

別の態様では、本発明は、ナイーブ幹細胞の純集団を作製する方法であって、(i)ナ

10

20

30

40

50

イーブ幹細胞の単一コロニーを得るようにNMEファミリータンパク質を含む細胞培養培地と細胞を接触させることと、(ii) ナイーブ幹細胞の単一コロニーを単離することと、(iii) ナイーブ幹細胞の純集団を得るようにNMEファミリータンパク質を含む細胞培養培地とコロニーを接触させることと、を含む、方法に関する。上記工程(i)において、約25%~60%、又は約30%~50%のナイーブ状態の細胞を得ることができる。上記方法の工程(iii)において、ナイーブ幹細胞集団の純度は少なくとも約80%、90%、95%、99%、又は100%であり得る。

【0019】

別の態様では、本発明は、人工多能性幹細胞からナイーブ幹細胞の純集団を作製する方法であって、(i) ナイーブ幹細胞の単一コロニーを得るようにNMEファミリータンパク質を含む細胞培養培地と成熟細胞又は前駆体細胞を接触させることと、(ii) ナイーブ幹細胞の単一コロニーを単離することと、(iii) ナイーブ幹細胞の純集団を得るようにNMEファミリータンパク質を含む細胞培養培地とコロニーを接触させることと、を含む、方法に関する。工程(i)において成熟細胞に多能性遺伝子を形質移入することができる。成熟細胞又は前駆体細胞は体細胞、皮膚芽細胞又は線維芽細胞であり得る。上記工程(i)において、約25%~60%、又は約30%~50%のナイーブ状態の細胞を得ることができる。工程(iii)において、ナイーブ幹細胞集団の純度が少なくとも約80%、90%、95%、99%、又は100%である。

【0020】

一態様では、細胞培地及び上記細胞培地の使用方法は、およそ25kDa又はおよそ30kDaの分子量を有するNME7を含む細胞培養培地を含むことができる。NME7タンパク質はNME7-ABとすることができる。細胞培養培地はrho関連キナーゼ阻害剤又は好ましくはrhoキナーゼ阻害剤の非存在下でPI3K又はRAC経路におけるシグナル伝達タンパク質の活性化剤を含むことができる。或いは、細胞培養培地はNME1又はNME2の発現を抑制する核酸を更に含むことができる。

【0021】

更に別の態様では、本発明は、ヒト胚性幹細胞株を作出する方法であって、(i) NMEファミリータンパク質を含む細胞培養培地と胚盤胞由来の細胞を接触させることと、(ii) 幹様形態を有する増殖物を単離することと、(iii) NMEファミリータンパク質を含む細胞培養培地と単離された増殖物を接触させることと、(iv) 所望の核型を有し、多能性のレベル及びその細胞が多能性であることを示すナイーブ遺伝子を発現するクローンを単離することと、を含む、方法に関する。この方法では、NMEファミリーメンバーはNME7とすることができる。NME7はNME7-ABとすることができる。NMEファミリーメンバーを含有する培地はFGFを含有し得ないのが好ましい。上記細胞は細胞内でNME1及びNME2を抑制する工程を含むことができる。

【0022】

別の態様では、本発明は、ヒト人工多能性幹細胞株を作出する方法であって、(i) NMEファミリータンパク質を含む細胞培養培地とドナー又は患者由来の細胞を接触させることと、(ii) 多能性遺伝子OCT4、SOX2、NANOG、KLF4、c-Myc又はLIN28の発現を誘導する物質と細胞を接触させることと、(iii) 幹細胞様形態を有する細胞を単離することと、(iv) NMEファミリータンパク質を含む細胞培養培地と単離された細胞を接触させることと、(v) 所望の核型を有し、その細胞が多能性であることを示す多能性遺伝子レベルを発現するクローンを単離することと、(vi) NMEファミリーメンバーを含む培地中でクローンを増やすことと、を含む、方法に関する。この方法では、NMEファミリーメンバーはNME7とすることができる。NME7はNME7-ABとすることができる。NMEファミリーメンバーを含有する培地はFGFを含有し得ないのが好ましい。上記方法は細胞内でNME1及びNME2を抑制する工程を含むことができる。

【0023】

本発明は、本明細書中に与えられる以下の詳細な記載、及び単に説明として提示される

ものであって本発明を限定するものでなはい、添付の図面からより完全に理解される。

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】記載されるビトロネクチン表面上において、唯一の成長因子としてのNM23に加えてRhokinase阻害剤Y27632を含む最小幹細胞培地「MM」中で培養された完全にコンフルエントな未分化ヒト幹細胞の拡大写真画像を示す。

【図2】記載されるビトロネクチン表面上において、唯一の成長因子としてのNM23を含み、Rhokinase阻害剤Y27632を含まない最小幹細胞培地「MM」中で培養された部分的にコンフルエントな未分化ヒト幹細胞の拡大写真画像を示す。

【図3】記載されるビトロネクチン表面上において、bFGF、ヒトフィーダー細胞由来の50%馴化培地、HS27に加えてRhokinase阻害剤Y27632を含む最小幹細胞培地中で培養された完全にコンフルエントな未分化ヒト幹細胞の拡大写真画像を示す。

【図4】記載されるビトロネクチン表面上において、bFGF、ヒトフィーダー細胞由来の50%馴化培地、HS27を含み、Rhokinase阻害剤Y27632を含まない最小幹細胞培地中で培養された部分的にコンフルエントな未分化ヒト幹細胞の拡大写真画像を示す。

【図5】記載されるビトロネクチン表面上において、唯一の成長因子としてのNM23に加えRhokinase阻害剤Y27632を含む完全規定幹細胞培地「MN6」中で培養されたコンフルエントな未分化ヒト幹細胞の拡大写真画像を示す。

【図6】記載されるビトロネクチン表面上において、唯一の成長因子としてのNM23を含み、Rhokinase阻害剤Y27632を含まない完全規定幹細胞培地「MN6」中で培養された部分的にコンフルエントな未分化ヒト幹細胞の拡大写真画像を示す。

【図7】記載されるビトロネクチン表面上において、唯一の成長因子としてのNM23に加えRhokinase阻害剤Y27632を含む最小完全規定幹細胞培地「MN2」中で培養された部分的にコンフルエントな未分化ヒト幹細胞の拡大写真画像を示す。

【図8】記載されるビトロネクチン表面上において、唯一の成長因子としてのNM23を含み、Rhokinase阻害剤Y27632を含まない最小完全規定幹細胞培地「MN2」中で培養された付着が乏しい、分化しているヒト幹細胞の拡大写真画像を示す。

【図9】記載されるビトロネクチン表面上において、100ng/mLでbFGF及びTGF- β を含み、更にRhokinase阻害剤Y27632を含むMN6である、完全規定幹細胞培地「E8」中で培養された部分的にコンフルエントな未分化ヒト幹細胞の拡大写真画像を示す。

【図10】記載されるビトロネクチン表面上において、更に100ng/mLでbFGF及びTGF- β を含み、Rhokinase阻害剤Y27632を含まないMN6である、完全規定幹細胞培地「E8」中で培養された付着に乏しい分化しているヒト幹細胞の拡大写真画像を示す。

【図11】A～Dは、抗MUC1*抗体表面上において、いずれも唯一の成長因子としてのNM23に加えRhokinase阻害剤Y27632を含む最小幹細胞培地「MM」（A、C）又はMN6培地（B、D）中で培養された完全にコンフルエントな未分化ヒト幹細胞の拡大写真画像を示す。

【図12】A～Dは、抗MUC1*抗体表面上において、いずれもRhokinase阻害剤Y27632を含む、mTESR（A、C）中又はNM23を含むMN6培地（B、D）中で培養された完全にコンフルエントな未分化ヒト幹細胞の拡大写真画像を示す。

【図13】A～Dは、フィーダー細胞、マドリゲル、ビトロネクチン又は抗MUC1*でコーティングされた表面上のNME系培地と比較した、FGF系培地中で培養された幹細胞に関する多能性遺伝子、並びにナイーブ遺伝子及びプライムド遺伝子のRT-PCR測定グラフを示す。

【図14】A～Dは、ヒト幹細胞及びがん細胞由来のNME7がPSMGFRペプチドの配列を有する合成ペプチドに結合した、プルダウンアッセイのウェスタンブロットを示す。

10

20

30

40

50

【図15】成長を刺激するMUC1*受容体の二量体化であることを示す、二価又は一価の抗体濃度の関数として測定されたがん細胞成長のグラフである。MUC1陽性乳がん細胞ZR-75-30の成長を、二価(Ab)抗MUC1*の添加により刺激し、一価のFabの添加により阻害した。二価の抗体の添加により成長因子受容体の二量体化の指標である特徴的な釣鐘状の成長曲線を生じる。MUC1陰性HEK293細胞の成長は、二価又は一価のFab抗MUC1*のいずれによっても影響を受けなかった。二価の抗体が過剰に添加された場合には、2つの受容体ごとに二量体化する1つの二価抗体ではなく、各受容体に結合する1つの二価抗体が存在し、そのようにして成長を阻害する。

【図16】野生型NM23(WT)又は変異体NM23-S120Gの3つの異なる製剤のいずれかの異なる多量体化状態の特性を明らかにするFPLCトレースのオーバーレイを示す。野生型NM23は六量体の分子量に対応する単一のピーク及びより高次の多量体に対応するショルダーを示す。リフォールディングされていない或る1つのNM23-S120G製剤(「混合」と標識される)は、二量体に対応するドミナントピーク及び四量体のより低いピークを有する。これもリフォールディングされていない別のNM23-S120G製剤(「六量体」)は、より高次の多量体のショルダーを伴う六量体の主なピークを有する。リフォールディングされたNM23-S120G製剤(二量体)は大部分が二量体を含んだ。

【図17】Aは、野生型タンパク質及びS120G変異体の3つの異なる製剤の多量体化状態を示す、NM23-WT、NM23-S120G-混合、NM23-S120G-六量体及びNM23-S120G-二量体の非還元ゲルの写真を示す。Bは、SPRチップ表面に付着したMUC1*細胞外ドメインペプチド(PSMGFR)に結合する種々のNM23多量体の表面プラズモン共鳴(SPR)測定結果を示す。Cは、NM23二量体のみが同起源の受容体MUC1*に結合することを示すナノ粒子実験の写真を示す。MUC1*細胞外ドメインペプチドを金ナノ粒子上に固定化した。D~Gは多能性幹細胞の成長を支持する能力について試験された種々のNM23-H1多量体を示す。

【図18】組換えNM23-S120Gの3つの異なる製剤に対するNM23-WTの多量体化状態を示す非変性ネイティブゲルを示す。

【図19】A) NM23野生型(WT)及びB) 60%の二量体を産生したNM23-S120G-「混合」製剤のSPR測定結果を示す。

【図20】マドリゲル上における最小幹細胞培地中の8nMのNM23バリエーション中において(a、b、d、e)、及び抗MUC1*抗体MN-C3でコーティングされた細胞培養プレート上(c、f)で培養されたヒトES細胞BGO1v/hOG株の写真を示す。(a~c)バリエーションはP96SDC2である。(d~f)バリエーションはP96SDC6である。これらのバリエーションは、リフォールディングも精製もされておらず、使用前にリフォールディング又は精製を必要としないことを示す。

【図21】FPLCトレースにおいて示されるようにNM23-S120G(リフォールディングされた、「RS」)の大きな集団が二量体として存在し(a)、非還元PAGEにより確認された(b)ことを示す。FPLCにより精製された二量体のみの画分をプールし、ヒトES細胞BGO1v/hOG株を成長するために最小幹細胞培地において8nMで使用した。(c~e)マドリゲル上(c、d)又は抗MUC1*抗体MN-C3でコーティングされた細胞培養プレート上(e)のいずれかにかかわらず、8nMのNM23バリエーション中で培養されると、多能性幹細胞を産生することを示すヒト幹細胞の写真である。

【図22】mLIF又はNM23-S120G-RSのいずれかが添加されたマウスES細胞最小培地において2日間に亘り不活性化MEFフィーダー細胞層上において培養されたマウス胚性幹(ES)細胞の写真を示す。画像は、基本的な成長因子としてmLIFを含む標準マウス幹細胞培地におけるのと同様に、唯一の成長因子としてNM23二量体を使用してマウスES細胞が成長することを示す。

【図23】NM23-S120G二量体中、MEF上におけるbFGF中若しくはヒト乳がん細胞中で培養されたヒト幹細胞におけるNME1(A、D)、NME6(B、E)又

10

20

30

40

50

はNME7 (C、F) の存在、又はMUC1*プルダウンアッセイにけるNMEアイソフォームの存在を検出するウェスタンブロットの写真を示す。

【図24】NME7に特異的な抗体によりプローブされたヒト胚性幹細胞溶解物のウェスタンブロットの写真である。

【図25-0】(図25)大腸菌(E. Coli)において発現されたNME7-1(A)及びNME7-2(B)のSDS-PAGEの写真を示す。

【図25-1】(図25.1)NME7-1及びNME7-2発現、並びにNTA-Niカラム上での精製による非還元SDS-PAGEゲルであり、約40kDaの予想された分子量で僅かなタンパク質発現を示すか、又はタンパク質を発現しないことを示す。

【図25-2】(図25.2)NTA-Niカラム上でのNME7-1及びNME7-2精製の溶出物のウェスタンブロットであり、約40kDaの予想された分子量でNME7-1及びNME7-2のいくつかの発現を示す。

【図26】NME7-AB及びNME7-A発現、並びにNTA-Niカラム上での精製による非還元SDS-PAGEゲルであり、NME7-ABについて約30kDaの予想された分子量での良好な発現を示したが(A)、NME7-Aについては約14kDaの予想された分子量で発現を示さなかった(B)。

【図27】(A)はNME7-ABのサイズ排除クロマトグラフィー精製の溶出プロファイルである。(B)はNME7-ABピーク画分由来の非還元SDS-PAGEゲルである。(C)は精製NME-ABのサイズ排除クロマトグラフィーの溶出プロファイルである。

【図28】A~Dは、プレーティング1日後における組換えNME7-AB又は組換えNM23(NME1)精製二量体のいずれかにおいて培養されたヒトiPS幹細胞の拡大写真である。

【図29】A~Dは、プレーティング2日後における組換えNME7-AB又は組換えNM23(NME1)精製二量体のいずれかにおいて培養されたヒトiPS幹細胞の拡大写真である。

【図30】A~Dは、プレーティング3日後における組換えNME7-AB又は組換えNM23(NME1)精製二量体のいずれかにおいて培養されたヒトiPS幹細胞の拡大写真である。

【図31-1】A~Gは、FGF系培地又はNME系培地のいずれかにおいて多能性の誘導を経ている体細胞のグラフ及び写真を示す。A~Cは、多能性誘導過程の4日目及び20日目での多能性マーカーのRT-PCR測定結果を示すグラフである。D~Gは、標準FGF培地を使用する標準的方法を使用するか、又は1つの多能性遺伝子を除外してNME1二量体培地中で細胞を培養することにより多能性が誘導された代表的な細胞の共焦点顕微鏡画像の写真を示す。

【図31-2】同上

【図32】A~Eは、MUC1*抗体によってプルダウンされた種をNME1、NME6及びNME7に対する抗体でプローブする、がん細胞及び幹細胞のMUC1*プルダウンアッセイの結果得られたウェスタンブロットを示す。

【図33】A~Cは、MUC1*細胞外ドメインペプチドがSAMコーティングされたナノ粒子上に固定化されており、NMEタンパク質が溶液中に遊離した状態で添加される(added free in solution)ナノ粒子結合アッセイの写真を示す。ピンク色から青色への変色は、溶液中に遊離しているタンパク質が2つの異なるナノ粒子上の2つのペプチドに同時に結合し得ることを示す。

【図34】A~Fは、標準FGF培地又はNME7培地中で成長され、その後、細胞がX染色体を不活性化している場合に核(赤色の点)内に凝縮されるヒストン-3を染色し、その細胞がもはや完全にナイーブではないことを示す、DAPI、OCT4及びH3K27me3について染色されたヒト胚性幹(ES)細胞の写真を示す。

【図35】NME1(NM23-S120G二量体)培地中で成長され、その後、細胞がX染色体を不活性化している場合に核(赤色の点)内に凝縮されるヒストン-3を染色し

10

20

30

40

50

、その細胞がもはや完全にナীবではないことを示す、D A P I、O C T 4 及び H 3 K 2 7 m e 3 について染色されたヒト胚性幹 (E S) 細胞の写真を示す。

【図 3 6】A ~ H は、N M E 1 (N M 2 3 - S 1 2 0 G 二量体) 培地中で成長され、その後、細胞が X 染色体を不活性化している場合に核 (赤色の点) 内に凝縮されるヒストン 3 を染色し、その細胞がもはや完全にナীবではないことを示す、D A P I、O C T 4 及び H 3 K 2 7 m e 3 について染色されたヒト胚性幹 (E S) 細胞の写真を示す。

【図 3 7】A ~ D は、N M E 1 (N M 2 3 - S 1 2 0 G 二量体) 培地中で成長され、その後、細胞が X 染色体を不活性化している場合に核 (赤色の点) 内に凝縮されるヒストン 3 を染色し、その細胞がもはや完全にナীবではないことを示す、D A P I、O C T 4 及び H 3 K 2 7 m e 3 について染色されたヒト胚性幹 (E S) 細胞の写真を示す。

10

【図 3 8】A ~ H は、N M E 1 (N M 2 3 - S 1 2 0 G 二量体) 培地中で成長され、その後、細胞が X 染色体を不活性化している場合に核 (赤色の点) 内に凝縮されるヒストン 3 を染色し、その細胞がもはや完全にナীবではないことを示す、D A P I、O C T 4 及び H 3 K 2 7 m e 3 について染色されたヒト胚性幹 (E S) 細胞の写真を示す。

【図 3 9】A ~ H は、N M E 1 (N M 2 3 - S 1 2 0 G 二量体) 培地中で成長され、その後、細胞が X 染色体を不活性化している場合に核 (赤色の点) 内に凝縮されるヒストン 3 を染色し、その細胞がもはや完全にナীবではないことを示す、D A P I、O C T 4 及び H 3 K 2 7 m e 3 について染色されたヒト胚性幹 (E S) 細胞の写真を示す。

【図 4 0】継代数の関数としての X 染色体不活性化前の細胞の割合、及び細胞が N M E 1 又は N M E 7 のいずれで培養されたかの自動計測の棒グラフを示す。

20

【図 4 1 A】N M E 系培地中で培養された幹細胞が約 2 0 % のクローニング効率を有することを示した、1 0 0 0 個、3 0 0 0 個又は 5 0 0 0 個のプレーティングされた単一細胞に起因する個別のコロニーがアルカリホスファターゼによって染色されるクローニング効率アッセイに由来するヒト胚性幹細胞の写真を示す。

【図 4 1 B】F G F 系培地中で培養された幹細胞が約 1 % のクローニング効率を有することを示した、1 0 0 0 個、3 0 0 0 個又は 5 0 0 0 個のプレーティングされた単一細胞に起因する個別のコロニーがアルカリホスファターゼによって染色されるクローニング効率アッセイに由来するヒト胚性幹細胞の写真を示す。

【図 4 1 C】クローニング効率アッセイに関する細胞数の表を示す。

【図 4 2】抗 M U C 1 * 抗体 (M N - C 3 又は M N - C 8) でコーティングされた 6 ウェル組織培養プレート上にプレーティングされ、その後、r h o キナーゼ阻害剤 (R O C i) の存在下又は不在下で、最小幹細胞培地 (M M) 又は M N 6 と呼ばれる更なる最小培地のいずれかにおける N M E 1 二量体 (「 N M 2 3 - R S 」) 中で培養されたヒト i P S 細胞の 2 日目の写真 (4 倍) を示す。

30

【図 4 3】抗 M U C 1 * 抗体 (M N - C 3 又は M N - C 8) でコーティングされた 6 ウェル組織培養プレート上にプレーティングされ、その後、r h o キナーゼ阻害剤 (R O C i) の存在下又は不在下で、最小幹細胞培地 (M M) 又は M N 6 と呼ばれる更なる最小培地のいずれかにおける N M E 1 二量体 (「 N M 2 3 - R S 」) 中で培養されたヒト i P S 細胞の 2 日目の写真 (1 0 倍) を示す。

【図 4 4】抗 M U C 1 * 抗体 (M N - C 3 又は M N - C 8) でコーティングされた 6 ウェル組織培養プレート上にプレーティングされ、その後、r h o キナーゼ阻害剤 (R O C i) の存在下又は不在下で、最小幹細胞培地 (M M) 又は M N 6 と呼ばれる更なる最小培地のいずれかにおける N M E 7 中で培養されたヒト i P S 細胞の 2 日目の写真 (4 倍) を示す。

40

【図 4 5】抗 M U C 1 * 抗体 (M N - C 3 又は M N - C 8) でコーティングされた 6 ウェル組織培養プレート上にプレーティングされ、その後、r h o キナーゼ阻害剤 (R O C i) の存在下又は不在下で、最小幹細胞培地 (M M) 又は M N 6 と呼ばれる更なる最小培地のいずれかにおける N M E 7 中で培養されたヒト i P S 細胞の 2 日目の写真 (1 0 倍) を示す。

【図 4 6】マドリゲルでコーティングされた 6 ウェル組織培養プレート上にプレーティン

50

グされ、その後、*rho*キナーゼ阻害剤（*ROCK*）の存在下又は不在下で、最小幹細胞培地（*MM*）又は*MN6*と呼ばれる更なる最小培地のいずれかにおける*NME7*中で培養されたヒト*iPS*細胞の2日目の写真（4倍）を示す。

【図47】マドリゲルでコーティングされた6ウェル組織培養プレート上にプレーティングされ、その後、*rho*キナーゼ阻害剤（*ROCK*）の存在下又は不在下で、最小幹細胞培地（*MM*）又は*MN6*と呼ばれる更なる最小培地のいずれかにおける*NME7*中で培養されたヒト*iPS*細胞の2日目の写真（10倍）を示す。

【図48】マドリゲルでコーティングされた6ウェル組織培養プレート上にプレーティングされ、その後、*rho*キナーゼ阻害剤（*ROCK*）の存在下又は不在下で、最小幹細胞培地（*MM*）又は*MN6*と呼ばれる更なる最小培地のいずれかにおける*NME7*中で培養されたヒト*iPS*細胞の4日目の写真（10倍）を示す。

【図49】マドリゲルでコーティングされた6ウェル組織培養プレート上にプレーティングされ、その後、*rho*キナーゼ阻害剤（*ROCK*）の存在下又は不在下で、最小幹細胞培地（*MM*）又は*MN6*と呼ばれる更なる最小培地のいずれかにおける*NME7*中で培養されたヒト胚性幹（*ES*）細胞の3日目の写真（10倍）を示す。

【図50】マドリゲルでコーティングされた6ウェル組織培養プレート上にプレーティングされ、その後、*rho*キナーゼ阻害剤（*ROCK*）の存在下又は不在下で、最小幹細胞培地（*MM*）又は*MN6*と呼ばれる更なる最小培地のいずれかにおける*NME1*二量体（「*NM23-RS*」）中で培養されたヒト胚性幹（*ES*）細胞の3日目の写真（10倍）を示す。

【図51】*rho*キナーゼ阻害剤（*ROCK*）の存在下又は不在下での*FGF*系培地（*MM*又は*E8*中の標準*bFGF*）、又は*MM*培地若しくは*MN6*培地に添加された*NME7*中で培養されたマドリゲル上にプレーティングされた幹細胞に関する多能性遺伝子、並びにナイーブ遺伝子及びプライムド遺伝子の*RT-PCR*測定結果のグラフを示す。

【図52】*MUC1**細胞外ドメイン（*MN-C3*）を認識する抗体でコーティングされたプラスチックウェア上にプレーティングされ、*NM23*二量体（*NME1 S120G*二量体）又は*NME7*のいずれかが添加された*MM*最小培地中で培養されたヒト胚性幹細胞に関するナイーブ遺伝子及びプライムド遺伝子の*RT-PCR*測定結果のグラフを示す。

【図53】抗*MUC1**抗体（*C3*）でコーティングされたプラスチックウェア、*MEF*フィーダー細胞、又はマドリゲルのいずれかにプレーティングされたヒト*ES*細胞に関する多能性遺伝子、並びにナイーブ遺伝子及びプライムド遺伝子の*RT-PCR*測定結果のグラフを示す。*VITA/C3*抗体表面上の細胞を、*NM23*（*NME1*二量体）含む最小培地（*MM*）又は*NME7-AB*中のいずれかで培養した。*MEF*上にプレーティングされた細胞を、*FGF*を含む*MM*で培養した。マドリゲル上の細胞を*MM*培地中又は*MN6*培地中の*NME7*において、*rho*キナーゼ阻害剤（*ROCK*）の存在下又は不在下で1回継代培養した。

【図54】抗*MUC1**抗体（*C3*）でコーティングされたプラスチックウェア、*MEF*フィーダー細胞、又はマドリゲルのいずれかにプレーティングされたヒト*ES*細胞に関する多能性遺伝子、並びにナイーブ遺伝子及びプライムド遺伝子の*RT-PCR*測定結果のグラフを示す。*VITA/C3*抗体表面上の細胞を、*NM23*（*NME1*二量体）を含む最小培地（*MM*）又は*NME7-AB*のいずれかで培養した。*MEF*上にプレーティングされた細胞を、*FGF*を含む*MM*で培養した。マドリゲル上の細胞を*MM*培地中又は*MN6*培地中の*NM23*（*NME1*二量体）において、*rho*キナーゼ阻害剤（*ROCK*）の存在下又は不在下で1回継代培養した。

【図55】*A*～*C*は、幹細胞溶解物（*A*、*C*）及び幹細胞馴化培地（*B*）中での*NME7*種の発現を示すウェスタンブロットの写真を示す。

【図56】ヒト幹細胞における*NME7*種に対してプローブするウェスタンブロットの写真を示し、その一部においては*OCT4*、*NME1*、*NME6*又は*NME7*のいずれかが抑制されていたが、*NME7*含有培地中で細胞を培養した。

10

20

30

40

50

【図57】NME7プルダウンアッセイから得られたタンパク質をゲル上で分離し、バンドを切り出し、質量分析法で分析した、SDS-PAGEゲルの写真を示す。質量分析により、NME7抗体によってプルダウンされたより低分子量種（約23kDa）もまたNME7であったが、そのNME7種におけるペプチド配列は全て、NME7のNDPK Aドメインに対してマッピングされていた。

【図58】NME7-ABがMUC1*細胞外ドメインペプチドを二量体化することを示すELISAサンドイッチアッセイによるHRPシグナルのグラフを示す。

【図59】A及びBは、大腸菌におけるNME6の発現及び精製を示すSDS-PAGEゲルの写真を示す。

【発明を実施するための形態】

【0025】

定義

MUC1*細胞外ドメインは、主にPSMGFR配列（GTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPFPFSAQSGA（配列番号6））により規定される。MUC1開裂の正確な部位はそれを切り取る酵素に依存し、開裂酵素は細胞型、組織型又は細胞の発生時期に応じて変化するため、MUC1*細胞外ドメインの正確な配列はN末端において変化する場合がある。

【0026】

1～10の番号が付されたNMEファミリータンパク質は、それら全てが少なくとも1つのNDPK（ヌクレオチド二リン酸キナーゼ）ドメインを有することから、一緒のグループに分類されるタンパク質である。場合によっては、NDPKドメインは、ATPからADPへの転換を触媒し得るという点で機能的ではない。NMEタンパク質は、正式には、H1、H2のように番号が付されたNM23タンパク質として知られていた。本明細書において、NM23及びNMEの用語は置き換え可能である。本明細書において、NME1、NME2、NME6及びNME7の用語は、天然タンパク質及びNMEバリエーションを指すのに使用される。場合によっては、これらのバリエーションは、より可溶性であるか、大腸菌においてより良好に発現するか、又は天然配列のタンパク質よりも可溶性である。例えば、本明細書で使用されるNME7は、天然タンパク質、又はバリエーションが大腸菌において可溶性で適切に折り畳まれたタンパク質の高収率の発現を可能とすることから、優れた商業上の適用を有するNME7-AB等のバリエーションを意味し得る。本明細書で言及される「NME1」は、「NM23-H1」と置き換え可能である。また、本発明がNMEタンパク質の正確な配列によって限定されないことが意図される。NM23-S120Gとも呼ばれる変異体NME1-S120Gは、本出願を通して置き換え可能に使用される。二量体形成の選好性のためS120G変異体及びP96S変異体が好ましいが、本明細書においてNM23二量体又はNME1二量体と呼ばれる場合がある。

【0027】

本明細書で言及されるNME7は、天然NME7、又は収率、溶解性、若しくはNME7をより効果的若しくは商業的により価値のあるものとする別の特徴を高めるバリエーションを意味することが意図される。

【0028】

本明細書で使用される場合、FGF、FGF-2又はbFGFは、線維芽細胞成長因子を指す。

【0029】

本明細書で使用される場合、Rho関連キナーゼ阻害剤は、小分子、ペプチド又はタンパク質であってもよい（Rath N, Olson MF. Rho-associated kinases intumorigenesis: re-considering ROCK inhibition for cancer therapy. EMBO Rep.2012;13(10):900-8）。rhoキナーゼ阻害剤の例として、Y27632、ファスジルとも呼ばれるHA-1077、H-1152及びチアゾピビンが挙げられる（Olson MF. Applications for ROCK kinase inhibition. Curr Opin Cell Biol.2008;20(2):242-8; Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, et al. A ROCK inhibitor permi

10

20

30

40

50

tssurvival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2007;25(6):681-6; Breitenlechner C, Gassel M, Hidaka H, et al. Protein kinase A in complex with Rho-kinase inhibitors Y-27632, Fasudil, and H-1152P: structural basis of selectivity. *Structure.* 2003;11(12):1595-607; Lin T, Ambasudhan R, Yuan X, et al. A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods.* 2009;6(11):805-8)。Rhoキナーゼ阻害剤に加え、本発明は、Rhoキナーゼ阻害剤に代えて関連する経路の阻害剤の使用を想定する。例えば、同じ経路において、グアニン交換因子（GEF）はRhoキナーゼの上流である。GEFはRhoキナーゼを活性化する。したがって、Rhoキナーゼ阻害剤を使用する代わりに、本発明は、GEF阻害剤の使用を想定する。RhoキナーゼはGDPに結合されている場合に不活性状態にあることから、RAD、GEM及びRhoE等の細胞中に存在するGDPの量を増加する任意の物質をRhoキナーゼ阻害剤の代わりに使用して、幹細胞の成長、生存及び表面への付着を補助することができる（Riento K, Guasch RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ (2003) RhoE binds to ROCK1 and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol* 23: 4219-4229; Komander D, Garg R, Wan PT, Ridley AJ, Barford D (2008) Mechanism of multi-site phosphorylation from a ROCK-RhoE complex structure. *EMBO J* 27:3175-3185; Ward Y, Yap SF, Ravichandran V, Matsumura F, Ito M, Spinelli B, Kelly K (2002) The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho kinase pathway. *J Cell Biol* 157: 291-302)。また、ミオシンもRhoキナーゼと同じ経路に存在する。ミオシンは間接的にRhoキナーゼによって活性化され、それ自身が同じ経路におけるRhoキナーゼの下流である。したがって、本発明の方法によれば、ミオシン阻害剤をRhoキナーゼ阻害剤に代えて使用し、幹細胞の生存を補助し、及び／又は表面への幹細胞の付着を補助することもできる。プレバスタチンはミオシン阻害剤であり、本発明の方法に従って使用される任意のRhoキナーゼ阻害剤に代えて使用することができる（Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, Murakami K, Aramaki T, Nishiyama A, et al. Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010;7:225-39; Ohata H, Ishiguro T, Aihara Y, et al. Induction of the Stem-like Cell Regulator CD44 by Rho Kinase Inhibition Contributes to the Maintenance of Colon Cancer-Initiating Cells. *Cancer Res.* 2012;72(19):5101-10)。

【0030】

Rhoキナーゼ阻害剤は、本明細書及び他の文献においてROCKi又はROCKKiと略記される。具体的なRhoキナーゼ阻害剤の使用は例示的なものであり、任意の他のRhoキナーゼ阻害剤で置き換えることができる。

【0031】

配列表フリーテキスト

a、g、c、t以外のヌクレオチド記号の使用に関しては、kがt又はgを表し、nがa、c、t又はgを表し、mがa又はcを表し、rがa又はgを表し、sがc又はgを表し、wがa又はtを表し、yがc又はtを表す、WIPO規格ST. 25、付属書2、表1に示される規約に従った。

【0032】

mtpgtqspff lllltvltv vtgsghasst pggeketsat qrssvpsste knavsmtssvlsshsp
gsgs sttqgqdvltl apatepasgs aatwgqdvts vpvtrpalgs ttpahdvts apdnkpap
gstappahgvts apdtrpapgs tappahgvts apdtrpapgs tappahgvts apdtrpapgs
tappahgvts apdtrpapgs tappahgvts apdtrpapgs tappahgvts apdtrpapgs ta
ppahgvts apdtrpapgstappahgvts apdtrpapgs tappahgvts apdtrpapgs tapp
ahgvts apdtrpapgs tappahgvts apdtrpapgs tappahgvts apdtrpapgs tappah
gvts apdtrpapgs tappahgvts apdtrpagstappahgvts apdtrpapgs tappahgv

ts apdtrpapgs tappahgvts apdtrpapgs tappahgvtsapdtrpapgs tappahgvts
apdtrpapgs tappahgvts apdtrpapgs tappahgvts apdtrpapgstappahgvts ap
dtrpapgs tappahgvts apdtrpapgs tappahgvts apdtrpapgs tappahgvts apd
trpapgstappahgvts apdtrpapgs tappahgvts apdtrpapgs tappahgvts apdtr
papgs tappahgvtsapdtrpapgs tappahgvts apdtrpapgs tappahgvts apdtrpa
pgs tappahgvts apdtrpapgstappahgvts apdtrpapgs tappahgvts apdtrpapgs
tappahgvts apdtrpapgs tappahgvtsapdtrpapgs tappahgvts apdtrpapgs ta
ppahgvts apdtrpapgs tappahgvts apdtrpapgs tappahgvtsapdtrpapgs tapp
ahgvts apdnrpalgs tappvhnvts asgsasgsas tlvhngtsar atttpaskstpfsipshh
sd tpttlashst ktdassthhs svppltssnh stspqlstgv sffflsfhis nlqfnssledpstd
yyqelq rdisemflqi ykqggflgls nikfrpgsvv vqltlafreg tinvhdivetq fnqyktea
asrynltsdvs vsdvpfpfsa qsgagvpgwg iallvlcvl valaivylia lavcqcrrkn ygg
ldifpardtyhpmseyp tyhthgryvp psstdrspye kvsagnggss lsytnpavaa

10

【0033】

asanl (配列番号1) は、全長MUC1受容体を記載する (ムチン1前駆体、Genbankアクセッション番号:P15941)。

【0034】

MTPGTQSPFFLLLLLTVL (配列番号2)

【0035】

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVTA (配列番号3)

20

【0036】

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTVTG (配列番号4)

【0037】

配列番号2、配列番号3及び配列番号4は、MUC1受容体及び切断アイソフォームを細胞膜表面に向けるためのN末端MUC-1シグナル伝達配列を記載する。配列番号2、配列番号3及び配列番号4におけるバリエーションにより示されるようにC末端において3つまでのアミノ酸残基が欠けていてもよい。

【0038】

gtinvhdivetqfnqykteaasrynltsdvs vsdvpfpfsa qsgagvpgwgiallvlcvlvalaiv
ylialavcqr

30

rknvgldifpardtyhpmseyptyhthgryvp psstdrspyekvsagnggsslsytnpavaa
nl (配列番号5) は、そのN末端にnat-PSMGFRを有し、全長MUC1受容体の膜貫通配列及び細胞質配列を含む切断されたMUC1受容体アイソフォームを記載する。

【0039】

GTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTSDVSVSDVPFPFSAQSGA (配列番号6) は、MUC1成長因子受容体 (nat-PSMGFR-「PSMGFR」の例) の天然の一次配列を記載する。

【0040】

TINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTSDVSVSDVPFPFSAQSGA (配列番号7) は、配列番号6のN末端の1アミノ酸欠失を有する)、MUC1成長因子受容体 (nat-PSMGFR-「PSMGFR」の例) の天然の一次配列を記載する。

40

【0041】

GTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTSDVSVSDVPFPFSAQSGA (配列番号8) は、安定性が高められたMUC1成長因子受容体 (var-PSMGFR-「PSMGFR」の例) の天然の一次配列の「SPY」機能性バリエーションを記載する。

【0042】

TINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTSDVSVSDVPFPFSAQSGA (配列番号9) は、配列番号8のC末端の1アミノ酸欠失を有し)、安定性が高められたMUC1成長因子受容体 (var-PSMGFR-「PSMGFR」の例) の天然の一次配列の「SPY」

50

機能性バリエーションを記載する。

【0043】

tgtcagtgccgccgaaagaactacgggagcgtggacatctttccagcccggtacacatcct
atgagcgagtag
cccacctaccacacccatgggagcgtatgtgccccctagcagtagccgatcgtagccccctatgagaaggt
ttctgcaggtaacgggtggcagcagcctctcttacacaaaccagcagtgaggagccgcttctgccaact
tg（配列番号10）は、MUC1細胞質ドメインのヌクレオチド配列を記載する。

【0044】

CQCRKKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDRSPYEKVSAGNGG
SSLSYTNPAVAAASANL（配列番号11）は、MUC1細胞質ドメインのアミノ酸配列
を記載する。

10

【0045】

gagatcctgagacaatgaatcatagtgaagattcgttttcattgcagagtggtatgatccaaatgc
ttcacttcttc
gacgttatgagcttttattttaccaggggatggatctgttgaaatgcatgatgtaaagaatcatcgca
cctttttaagcggaacaaatatgataacctgcacttggaagatttatttataggcaacaaagtgaatg
tcttttctcgacaactgggtattaattgactatggggatcaatatacagctcgccagctgggcagtagga
aagaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataattgaaataata
aacaagctggatttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggatttt
catgtagatcaccagtcaagacccttttcaatgagctgatccagtttattacaactggctctattattg
ccatggagattttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctgga
gtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttggaacagatggcataagaaatgcagc
gcatggccctgattcttttgccttctgcggccagagaaatggagttgtttttccttcaagtggaggtgt
gggcccggcaaacactgctaaattactaattgtacctgttgcatgtttaaaccctcatgctgtcagtga
ggatgttgtaatacactatattcagtagcatatttgttaataggagagcaatgtttattttcttgatgtactt
atgtatagaaaataa（配列番号12）は、NME7ヌクレオチド配列を記載する（NME
7：GENBANKアクセッションAB209049）。

20

【0046】

DPETMNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTK
YDNLHLEDLFIGNKVNVFSRQLV
LIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEA
LDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASES
IRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHA
VSEGMLNTLYSVHFVNRRAMFIFLMYFMYRK（配列番号13）は、NME7アミノ
酸配列を記載する（NME7：GENBANKアクセッションAB209049）。

30

【0047】

atggtgctactgtctacttttagggatcgtctttcaaggcgaggggcctcctatctcaagctgtgatac
aggaacctg
gccaactgtgagcgtaccttcattgcgatcaaaccagatgggggtccagcgggggtcttgtgggagagat
tatcaagcgttttgagcagaaaggattccgccttgttggtctgaaattcatgcaagcttccgaagatctt
ctcaaggaacactacgttgacctgaaggaccgtccattctttgccggcctgggtgaaatacatgcactca
gggcccggtagttgccatggctctgggagggggctgaatgtggtgaagacgggcccagtcagctcgggg
agaccaaccctgcagactccaagcctgggacctccgtggagacttctgcatacaagttggcaggaa
cattatacatggcagtgattctgtggagagtgagagaaaggagatcggcttgtggtttcaccttgagg
aactggttagattacacgagctgtgctcagaactggatctatgaatga（配列番号14）はNM2
3-H1ヌクレオチド配列を記載する（NM23-H1：GENBANKアクセッション
AF487339）。

40

【0048】

MVLLSTLGIVFQGGPPISSCDTGTMANCERTFIAIKPDGVQRGLVGEIIKRFEQKG
FRLVGLKFMQASEDLLKEHYV

50

DLKDRPFFAGLVKYMHS GPVVAMVW EGLNVVKTGRV MLGETNPADSKPGTIRGDF
CIQVGRNIIHGSDSVESA EKEIGLWFHPEELVDYTSCAQNWIYE (配列番号 15) は
NM23-H1 アミノ酸配列を記載する (NM23-H1: GENBANK アクセション AF487339)。

【0049】

atggtgctactgtctacttttagggatcgtctttcaaggcgaggggcctcctatctcaagctgtgatac
aggaacatg
gccaactgtgagcgtaccttcattgcatcaaaccagatgggggtccagcggggcttctgtgggagagat
tatcaagcgttttgagcagaaaggattccgccttggtggtctgaaattcatgcaagcttcgaagatctt
ctcaaggaacactacgttgacctgaaggaccgtccattctttgccggcctggtgaaatacatgcactca
gggcccgttagttgccatggtctgggaggggctgaatgtggtgaagacgggcccagtcgtctcgggg
agaccaaccctgcagactccaagcctgggacctccgtggagacttctgcatacaagttggcaggaa
cattatacatggcgggtgattctgtggagagtgcagagaaggagatcggcttggtgtttcacctgagg
aactggttagattacagagctgtgctcagaactggatctatgaatga (配列番号 16) は、NM
23-H1 S120G 変異体のヌクレオチド配列を記載する (NM23-H1: GEN
BANK アクセション AF487339)。

【0050】

MVLLSTLGIVFQGEGPPISSCDTGTMANCERTFIAIKPDGVQRGLVGEIIKRFEQKG
FRLVGLKFMQASEDLLKEHYV

DLKDRPFFAGLVKYMHS GPVVAMVW EGLNVVKTGRV MLGETNPADSKPGTIRGDF
CIQVGRNIIHGSDSVESA EKEIGLWFHPEELVDYTSCAQNWIYE (配列番号 17) は
、NM23-H1 S120G 変異体のアミノ酸配列を記載する (NM23-H1: GEN
BANK アクセション AF487339)。

【0051】

atggccaacctggagcgcaccttcctcgcctcaagccggacggcgtgcagcgcggcctggtggg
cgagatcatcaag
cgcttcgagcagaagggttcctcgtggccatgaagttcctccgggcctctgaagaacacctgaa
gcagcactacattgacctgaaagaccgaccttcttccctgggctggtgaagtacatgaactcagggc
cggttggtggccatggtctgggaggggctgaacgtggtgaagacaggccgagtgatgcttggggagac
caatccagcagattcaaagccaggcaccattcgtggggacttctgcattcaggttggcaggaaacatca
ttcatggcagtgattcagtaaaaagtgtgaaaaagaaatcagcctatggtttaagcctgaagaactg
gttgactacaagtcttggtctcatgactgggtctatgaataa (配列番号 18) は NM23-H2
ヌクレオチド配列を記載する (NM23-H2: GENBANK アクセション AK313448)。

【0052】

MANLERTFIAIKPDGVQRGLVGEIIKRFEQKGFRLVAMKFLRASEEHLKQHYIDLK
DRPFFPGLVKYMNSGPVVAMVW
EGLNVVKTGRV MLGETNPADSKPGTIRGDFCIQVGRNIIHGSDSVKSAEKEISLWFKP
EELVDYKSCAHDWVYE (配列番号 19) は NM23-H2 アミノ酸配列を記載する (NM23-H2: GENBANK アクセション AK313448)。

【0053】

大腸菌発現用に最適化されたヒト NM23-H7-2 配列：

(DNA)

atgcatgacgttaaaaatcacctacctttctgaaacgcacgaaatatgataatctgcatctggaagac
ctgtttattggcaacaaagtcaatgtgttctctcgtcagctggtgctgatcgattatggcgaccagtaca
ccgcgcgtcaactgggtagtcgaaagaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaa
agctggcgaaattatcgaaattatcaacaaagcgggtttcacctacacgaaactgaaaatgatgatgc
tgagccgtaagaagccctggattttcatgtcgaccaccagtcctcgcccgtttttcaatgaactgattc
aattcatcaccacgggtccgattatcgcaatggaaattctgcgtgatgacgctatctgcgaatggaaac
gcctgctgggcccggcaaacctcaggtgttgcgcgtaaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgttt

ggcaccgatggatatccgtaatgcagcacatgggtccggactcattcgcatcggcagctcgtgaaatgga
actgtttttcccgagctctggcggttgccggcgaacaccgccaatttaccgaattgtacgtgctg
tattgtcaaaccgcacgcagtggtcagaaggcctgctgggtaaaattctgatggcaatccgtgatgctg
gctttgaaatctcggccatgcagatgttcaacatggaccggttaacgtcgaagaattctacgaagttt
acaaaggcggtggttaccgaatatcacgatatgggttacggaaatgtactccgggtccgtgcgtcgcgatg
gaaattcagcaaaacaatgccaccaaacgtttcgtgaattctgtggtccggcagatccggaaatcgc
acgtcatctgcgtccgggtaccctgcgcgcaatttttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgcact
gtaccgatctgccggaagacgggtctgctggaagtccaatacttttcaaaattctggataattga (配
列番号 2 0)

【0054】

(アミノ酸)

MHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFIGNKVNVFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKE
KTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQ
FITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD
SFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGGLGKILMAIRDAGFE
ISAMQMFNMDRVNVVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFR
EFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (配
列番号 2 1)

【0055】

ヒトNME7-A:

(DNA)

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataattgaaataat
aaacaaagctggatttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattt
tcatgtagatcaccagtcaagaccctttttcaatgagctgatccagtttattacaactggtcctattattg
ccatggagatttttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctgga
gtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttggaacagatggcataagaaatgcagc
gcatggccctgattcttttgcttctgcggccagagaaatggagttgtttttttga (配列番号 2 2)

【0056】

(アミノ酸)

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNE
LIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHG
PDSFASAAREMELFF- (配列番号 2 3)

【0057】

ヒトNME7-A1:

(DNA)

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataattgaaataat
aaacaaagctggatttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattt
tcatgtagatcaccagtcaagaccctttttcaatgagctgatccagtttattacaactggtcctattattg
ccatggagatttttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctgga
gtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttggaacagatggcataagaaatgcagc
gcatggccctgattcttttgcttctgcggccagagaaatggagttgttttttccctcaagtggaggttgt
gggccggcgaacactgctaaatttacttga (配列番号 2 4)

【0058】

(アミノ酸)

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNE
LIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHG
PDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFT- (配列番号 2 5)

【0059】

ヒトNME7-A2:

(DNA)

10

20

30

40

50

atgaatcatagtgaaagattcgttttcattgcagagtggtatgatccaaatgcttcacttcttcgacgtt
atgagctttttattttaccaggggatggatctgttgaaatgcatgatgtaaagaatcatcgcaccttttt
aaagcggaccaaataatgataacctgcacttggaaagattttatttataggcaacaaagtgaatgtcttttc
tcgacaactgggtattaattgactatggggatcaatatacagctcgcagctggggcagtaggaaagaaa
aaacgctagccctaattaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataattgaaataataaaca
gctggatttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattttcatgta
gatcaccagtcaagaccctttttcaatgagctgatccagtttattacaactggtcctattattgccatgg
agattttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtgga
cgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttggaacagatggcataagaaatgcagcgcattg
ccctgattcttttgcttctgcggccagagaaatggagttgttttttga (配列番号 26)

10

【0060】

(アミノ酸)

MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLH
LEDLFIGNKVNVFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINK
AGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWK
RLLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFF- (配列番号
27)

【0061】

ヒトNME7-A3:

(DNA)

20

atgaatcatagtgaaagattcgttttcattgcagagtggtatgatccaaatgcttcacttcttcgacgtt
atgagctttttattttaccaggggatggatctgttgaaatgcatgatgtaaagaatcatcgcaccttttt
aaagcggaccaaataatgataacctgcacttggaaagattttatttataggcaacaaagtgaatgtcttttc
tcgacaactgggtattaattgactatggggatcaatatacagctcgcagctggggcagtaggaaagaaa
aaacgctagccctaattaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataattgaaataataaaca
gctggatttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattttcatgta
gatcaccagtcaagaccctttttcaatgagctgatccagtttattacaactggtcctattattgccatgg
agattttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtgga
cgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttggaacagatggcataagaaatgcagcgcattg
ccctgattcttttgcttctgcggccagagaaatggagttgttttttcttcaagtggaggttgtgggccc
gcaaacactgctaatttacttga (配列番号 28)

30

【0062】

(アミノ酸)

MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLH
LEDLFIGNKVNVFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINK
AGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWK
RLLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPA
NTAKFT- (配列番号 29)

【0063】

ヒトNME7-B:

(DNA)

40

atgaattgtacctgttgcatgtttaaaccccatgctgtcagtgaaggactgttgggaaagatcctgatg
gctatccgagatgcaggttttgaaatctcagctatgcagatgttcaatatggatcggttgaatgttgag
gaattctatgaagtttataaaggagtagtgaccgaatatcatgacatggtgacagaaatgtattctggc
ccttgtgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgct
gatcctgaaattgcccggcatttacgccctggaactctcagagcaatctttggtaaaactaagatccag
aatgctgttcactgtactgatctgccagaggatggcctattagagggttcaatacttcttctga (配列番
号 30)

【0064】

(アミノ酸)

50

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFMNMDRVNVEEFYEVYKGVV
TEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTK
IQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (配列番号 3 1)

【0065】

ヒトNME7-B1:

(DNA)

atgaattgtacctgttgcatgtttaaaccccatgctgtcagtgaaggactgttgggaaagatcctgatg
gctatccgagatgcagggtttgaaatctcagctatgcagatgttcaatatggatcgggttaatgttgag
gaattctatgaagtttataaaggagtagtgaccgaatatcatgacatgggtgacagaaatgtattctggc
ccttgtgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgct
gatcctgaaattgcccggcatttacgacctggaactctcagagcaatcttggtaaaactaagatccag
aatgctgttcactgtactgatctgccagaggatggcctattagagggttcaatacttcttcaagatcttgg
ataattagtga (配列番号 3 2)

【0066】

(アミノ酸)

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFMNMDRVNVEEFYEVYKGVV
TEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTK
IQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (配列番号 3 3)

【0067】

ヒトNME7-B2:

(DNA)

atgccttcaagtggaggttgtgggccggcaaacactgctaaatttactaattgtacctgttgcatgttta
aaccccatgctgtcagtgaaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcagggtttgaa
atctcagctatgcagatgttcaatatggatcgggttaatgttgagggaattctatgaagtttataaagga
gtagtgaccgaatatcatgacatgggtgacagaaatgtattctggcccttgtgtagcaatggagattcaa
cagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatcctgaaattgcccggcattta
cgccctggaactctcagagcaatcttggtaaaactaagatccagaatgctgttcactgtactgatctg
ccagaggatggcctattagagggttcaatacttcttctga (配列番号 3 4)

【0068】

(アミノ酸)

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFMND
RVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIA
RHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (配列番号 3 5)

【0069】

ヒトNME7-B3:

(DNA)

atgccttcaagtggaggttgtgggccggcaaacactgctaaatttactaattgtacctgttgcatgttta
aaccccatgctgtcagtgaaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcagggtttgaa
atctcagctatgcagatgttcaatatggatcgggttaatgttgagggaattctatgaagtttataaagga
gtagtgaccgaatatcatgacatgggtgacagaaatgtattctggcccttgtgtagcaatggagattcaa
cagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatcctgaaattgcccggcattta
cgccctggaactctcagagcaatcttggtaaaactaagatccagaatgctgttcactgtactgatctg
ccagaggatggcctattagagggttcaatacttcttcaagatcttggataattagtga (配列番号 3 6)

【0070】

(アミノ酸)

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFMND
RVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIA
RHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN-- (配列番号 3 7)

【0071】

10

20

30

40

50

ヒト NME7-AB :

(DNA)

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataattgaaataat
aaacaaagctggatttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattt
tcatgtagatcaccagtcaagaccctttttcaatgagctgatccagtttattacaactggctcctattattg
ccatggagatttttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctgga
gtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttggaacagatggcataaagaatgcagc
gcatggccctgattcttttgcttctgcggccagagaaatggagttgtttttccttcaagtggaggttgt
gggccggcacaactgctaaatttactaattgtacctgttgcatgtttaaaccccatgctgtcagtga
ggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcagggttttgaaatctcagctatgcagatgttc
aatatggatcgggttaatgttgaggaaattctatgaagtttataaaggagtagtgaccgaatatcatgac
atggtgacagaaatgtattctggcccttgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagac
atttcgagaattttgtggacctgctgacatcctgaaattgccggcatttacgccctggaactctcagagc
aatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttcaactgtactgatctgccagaggatggcctattaga
ggttcaatacttcttcaagatcttggataattagtaga (配列番号 38)

【0072】

(アミノ酸)

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNE
LIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHG
PDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAG
FEISAMQMFMNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKT
FREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN--

(配列番号 39)

【0073】

ヒト NME7-AB1 :

(DNA)

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataattgaaataat
aaacaaagctggatttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattt
tcatgtagatcaccagtcaagaccctttttcaatgagctgatccagtttattacaactggctcctattattg
ccatggagatttttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctgga
gtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttggaacagatggcataaagaatgcagc
gcatggccctgattcttttgcttctgcggccagagaaatggagttgtttttccttcaagtggaggttgt
gggccggcacaactgctaaatttactaattgtacctgttgcatgtttaaaccccatgctgtcagtga
ggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcagggttttgaaatctcagctatgcagatgttc
aatatggatcgggttaatgttgaggaaattctatgaagtttataaaggagtagtgaccgaatatcatgac
atggtgacagaaatgtattctggcccttgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagac
atttcgagaattttgtggacctgctgacatcctgaaattgccggcatttacgccctggaactctcagagc
aatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttcaactgtactgatctgccagaggatggcctattaga
ggttcaatacttcttctga (配列番号 40)

【0074】

(アミノ酸)

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNE
LIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHG
PDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAG
FEISAMQMFMNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKT
FREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (配列番
号 41)

【0075】

大腸菌発現用に最適化されたヒト NME7-A 配列 :

(DNA)

10

20

30

40

50

atggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattat
caacaaagcgggtttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggatt
ttcatgtcgaccaccagtctcgcccgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattat
cgcaatggaaattctgcgtgatgacgctatctgcgaatggaaacgcctgctgggcccggcaaactcag
gtgttgcgcgtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttggcaccgatggatatccgtaatgcag
cacatgggtccggactcattcgcacatcggcagctcgtgaaatggaactgtttttctga (配列番号 4 2)

【0076】

(アミノ酸)

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNE
LIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHG
PDSFASAAREMELFF- (配列番号 4 3)

【0077】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-A1配列:

(DNA)

atggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattat
caacaaagcgggtttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggatt
ttcatgtcgaccaccagtctcgcccgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattat
cgcaatggaaattctgcgtgatgacgctatctgcgaatggaaacgcctgctgggcccggcaaactcag
gtgttgcgcgtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttggcaccgatggatatccgtaatgcag
cacatgggtccggactcattcgcacatcggcagctcgtgaaatggaactgtttttcccgagctctggcggtt
gcggtccggcaaacaccgccaaatttacctga (配列番号 4 4)

【0078】

(アミノ酸)

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNE
LIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHG
PDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFT- (配列番号 4 5)

【0079】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-A2配列:

(DNA)

atgaatcactccgaacgctttgtttttatcgccgaatggatgacccgaatgcttccctgctgcgccgct
acgaactgctgtttttatccgggcatggttagcgtggaaatgcatgacgttaaaaaatcacctacctttc
tgaaacgcacgaaatatgataatctgcatctggaagacctgtttattggcaacaaagtcaatgtgttct
ctcgtcagctgggtgctgatcgattatggcgaccagtacaccgcgcgtcaactgggtagtcgcaaagaa
aaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaa
agcgggtttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggattttcatg
tcgaccaccagtctcgcccgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgcaat
ggaaattctgcgtgatgacgctatctgcgaatggaaacgcctgctgggcccggcaaactcaggtgttg
cgcgtaaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttggcaccgatggatatccgtaatgcagcacatg
gtccggactcattcgcacatcggcagctcgtgaaatggaactgtttttctga (配列番号 4 6)

【0080】

(アミノ酸)

MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLH
LEDLFIGNKVNVFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINK
AGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWK
RLLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSPFASAAREMELFF- (配列番号
4 7)

【0081】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-A3配列:

(DNA)

atgaatcactccgaacgctttgtttttatcgccgaatggatgacccgaatgcttccctgctgcgccgct

10

20

30

40

50

acgaactgctgttttatccgggcgatggtagcgtggaaatgcatgacgttaaaaaatcacccgtacctttc
tgaaacgcacgaaatatgataatctgcatctggaagacctgtttattggcaacaaagtcaatgtgttct
ctcgtcagctgggtgctgattatggcgaccagtaacccgcgcgtcaactgggtagtcgcaaagaa
aaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaa
agcggggtttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggattttcatg
tcgaccaccagtctcgcccggttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgcaat
ggaaattctgctgatgacgctatctgcgaatggaaacgcctgctggggcccggaactcagggtgttg
cgcgtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttggcaccgatggatccgtaatgcagcacatg
gtccggactcattcgcatcggcagctcgtgaaatggaaactgttttcccagctctggcgggttgcggtc
cggcaaacaccgccaaatttacctga (配列番号 48)

10

【0082】

(アミノ酸)

MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLH
LEDLFIGNKVNVFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEINK
AGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWK
RLLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD SFASAAREMELFFPSSGGCGPA
NTAKFT- (配列番号 49)

【0083】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-B配列：

(DNA)

20

atgaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgcagtgctcagaaggcctgctgggtaaaattctgatg
gcaatccgtgatgctggctttgaaatctcgcccatgcagatgttcaacatggaccgcgttaacgtcga
agaattctacgaagtttacaaggcgtgggtaccgaatatcagatatggttacggaaatgtactccgg
tccgtgcgtcgcgatggaaattcagcaaaaacaatgccaccaaaaacgtttcgtgaattctgtgggtccgg
cagatccggaaatcgcacgtcatctgcgtccgggtaccctgcgcgcaatttttggtaaaacgaaaatc
cagaacgctgtgcactgtaccgatctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatactttttctga (

配列番号 50)

【0084】

(アミノ酸)

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQM FNMDRVNV EEFYEVYKGVV
TEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTK
IQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (配列番号 51)

30

【0085】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-B1配列：

(DNA)

atgaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgcagtgctcagaaggcctgctgggtaaaattctgatg
gcaatccgtgatgctggctttgaaatctcgcccatgcagatgttcaacatggaccgcgttaacgtcga
agaattctacgaagtttacaaggcgtgggtaccgaatatcagatatggttacggaaatgtactccgg
tccgtgcgtcgcgatggaaattcagcaaaaacaatgccaccaaaaacgtttcgtgaattctgtgggtccgg
cagatccggaaatcgcacgtcatctgcgtccgggtaccctgcgcgcaatttttggtaaaacgaaaatc
cagaacgctgtgcactgtaccgatctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatactttttcaaaatt
ctggataattga (配列番号 52)

40

【0086】

(アミノ酸)

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQM FNMDRVNV EEFYEVYKGVV
TEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTK
IQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (配列番号 53)

【0087】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-B2配列：

(DNA)

50

atgccgagctctggcgggttgcggtccggcaaacaccgccaaatttaccaattgtacgtgctgtattgtc
aaaccgcacgcagtggtcagaaggcctgctgggtaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttga
aatctcggccatgcagatgttcaacatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaag
gcggtggttacccaatatcacgatatggttacggaaatgtactccgggtccgtgctgcgatggaaattc
agcaaaaacaatgccacccaaaacgtttcgtgaattctgtggtccggcagatccggaaatcgcacgtcat
ctgctgctccgggtaccctgcgcgcaatttttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgcaactgtaccga
tctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatactttttctga (配列番号 5 4)

【0088】

(アミノ酸)

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFMND
RVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIA
RHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (配列番号 5 5)

【0089】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-B3配列:

(DNA)

atgccgagctctggcgggttgcggtccggcaaacaccgccaaatttaccaattgtacgtgctgtattgtc
aaaccgcacgcagtggtcagaaggcctgctgggtaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttga
aatctcggccatgcagatgttcaacatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaag
gcggtggttacccaatatcacgatatggttacggaaatgtactccgggtccgtgctgcgatggaaattc
agcaaaaacaatgccacccaaaacgtttcgtgaattctgtggtccggcagatccggaaatcgcacgtcat
ctgctgctccgggtaccctgcgcgcaatttttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgcaactgtaccga
tctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatactttttcaaaattctggataattga (配列番号 5
6)

【0090】

(アミノ酸)

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFMND
RVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIA
RHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (配列番号 5 7)

【0091】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-AB配列:

(DNA)

atggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattat
caacaaagcgggtttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggatt
ttcatgtcgaccaccagctctcgcccggtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattat
cgcaatggaaattctgctgatgacgctatctgcgaatggaaacgcctgctggggcccgcaaaactcag
gtgttgcgcggtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttggcaccgatgggtatccgtaatgcag
cacatgggtccggactcattcgcacgagctcgtgaaatggaaactgtttttcccgagctctggcggtt
gcggtccggcaaacaccgccaaatttaccaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgcagtggtca
gaaggcctgctgggtaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttgaaatctcggccatgcagat
gttcaacatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaagcggtggttacccaatatc
acgatatggttacggaaatgtactccgggtccgtgctgcgatggaaattcagcaaaaacaatgccacc
aaaacgtttcgtgaattctgtggtccggcagatccggaaatcgcacgtcatctgctccgggtaccctg
cgcgcaatttttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgcaactgtaccgatctgccggaagacgggtct
gctggaagttcaatactttttcaaaattctggataattga (配列番号 5 8)

【0092】

(アミノ酸)

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNE
LIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHG
PDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAG
FEISAMQMFMNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKT

10

20

30

40

50

FREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (配列番号 59)

【0093】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-AB1配列:

(DNA)

Atggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattat
caacaaagcgggtttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggatt
ttcatgtcgaccaccagtctcgcccggttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattat
cgcaatggaaattctgctgatgacgctatctgcgaatggaaacgcctgctgggcccggcaaactcag
gtgttgcgctaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttggcaccgatggatatccgtaatgcag
cacatgggtccggactcattcgcatcggcagctcgtgaaatggaaactgtttttcccgagctctggcggtt
gcggtccggcaaacaccgccaaatttaccaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgcagtggtca
gaaggcctgctgggtaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttgaaatctcggccatgcagat
gttcaacatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaaaggcgtggttaccgaatatac
acgatatggttacggaaatgtactccgggtccgtgcgtcgcgatggaaattcagcaaaaacaatgccacc
aaaacgtttcgtgaattctgtggtccggcagatccggaaatcgcacgtcatctgcgtccgggtaccctg
cgcgcaatttttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgcactgtaccgatctgccggaagacgggtct
gttggaagttcaatactttttctga (配列番号 60)

10

【0094】

(アミノ酸)

20

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNE
LIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHG
PDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAG
FEISAMQMFMNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKT
FREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (配列番
号 61)

【0095】

マウスNME6

(DNA)

Atgacctccatcttgcaagtccccaagctcttcagctcacactagccctgatcaagcctgatgcagtt
gcccaccactgatcctggaggctgttcacagcagattctgagcaacaagttcctcattgtacgaacg
agggaactgcagtggaaagctggaggactgccggagggtttaccgagagcatgaaggcggtttttcta
tcagcggctggtggagttcatgacaagtgggccaatccgagcctatatccttgcccacaaagatgcc
tccaactttggaggacactgatgggaccaccagagtatttcgagcacgctatatagcccagattca
attcgtggaagtttgggcctcactgacaccgaaatactaccatggctcagactccgtggtttccgcc
agcagagagattgcagccttcttccctgacttcagtgaacagcgctgggtatgaggaggagggaacccc
agctgcggtgtggtcctgtgcactacagtccagagggaaggtatccactgtgcagctgaaacaggagg
ccacaaacaacctaacaaaacctag (配列番号 62)

30

【0096】

(アミノ酸)

40

MTSILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQIILSNKFLIVRTRELQWKLEDCRR
FYREHEGRFFYQRLVEFMTSGPIRAYILAHKDAIQLWRTL MGPTRVFRARYIAPDSIR
GSLGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEPQLRCGPVHYSPEEGI
HCAAETGGHKQPNKT- (配列番号 63)

【0097】

ヒトNME6:

(DNA)

Atgaccagaatctggggagtgagatggcctcaatcttgcaagccctcaggctctccagctcactct
agccctgatcaagcctgacgcagtcgcccatccactgattctggaggctgttcacagcagattctaag
caacaagttcctgattgtacgaatgagagaactactgtggagaaaggaagattgccagagggttttacc

50

gagagcatgaagggcggttttttctatcagaggctggagggttcatggccagcgggccaatccgagcc
tacatccttgcccacaaggatgccatccagctctggaggacgctcatgggacccaccagagtgttcg
agcacgccatgtggccccagattctatccgtgggagtttcggcctcactgacacccgcaacaccaccc
atggttcggactctgtggtttcagccagcagagagattgcagccttcttcctgacttcagtgaacagc
gctggtatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtgctatagcccagagggaggtgt
ccactatgtagctggaacaggaggccctaggaccagcctga (配列番号 6 4)

【0098】

(アミノ酸)

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELL
WRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTL MG PTRVFR
ARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRC
GPVCYSPEGGVHYVAGTGGLGPA- (配列番号 6 5)

10

【0099】

ヒトNME6 1 :

(DNA)

Atgaccagaatctggggagtgagatggcctcaatcttgcaagccctcaggctctccagctcactct
agccctgatcaagcctgacgcagtcgcccattccactgattctggaggctgttcattcagcagattctaag
caacaagttcctgattgtacgaatgagagaactactgtggagaaaggaagattgccagaggttttacc
gagagcatgaagggcggttttttctatcagaggctggagggttcatggccagcgggccaatccgagcc
tacatccttgcccacaaggatgccatccagctctggaggacgctcatgggacccaccagagtgttcg
agcacgccatgtggccccagattctatccgtgggagtttcggcctcactgacacccgcaacaccaccc
atggttcggactctgtggtttcagccagcagagagattgcagccttcttcctgacttcagtgaacagc
gctggtatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtga (配列番号 6 6)

20

【0100】

(アミノ酸)

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELL
WRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTL MG PTRVFR
ARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRC
GPV- (配列番号 6 7)

【0101】

30

ヒトNME6 2 :

(DNA)

Atgctcactctagccctgatcaagcctgacgcagtcgcccattccactgattctggaggctgttcattcag
cagattctaagcaacaagttcctgattgtacgaatgagagaactactgtggagaaaggaagattgcca
gaggttttaccgagagcatgaagggcggttttttctatcagaggctggagggttcatggccagcgggc
caatccgagcctacatccttgcccacaaggatgccatccagctctggaggacgctcatgggacccacc
agagtgttcgagcagcgcctgtggccccagattctatccgtgggagtttcggcctcactgacacccg
caacaccacccatggttcggactctgtggtttcagccagcagagagattgcagccttcttcctgactt
cagtgaacagcgcctggtatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtga (配列番号
6 8)

40

【0102】

(アミノ酸)

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFF
YQRLVEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTL MG PTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTR
NTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRCGPV- (配列番号 6 9)

【0103】

ヒトNME6 3 :

(DNA)

Atgctcactctagccctgatcaagcctgacgcagtcgcccattccactgattctggaggctgttcattcag
cagattctaagcaacaagttcctgattgtacgaatgagagaactactgtggagaaaggaagattgcca

50

gaggttttaccgagagcatgaaggcggttttttctatcagaggctggtggagttcatggccagcgggc
caatccgagcctacatccttgcccacaaggatgccatccagctctggaggacgctcatgggacccacc
agagtgttccgagcacgccatgtggccccagattctatccgtgggagtttcggcctcactgacacccg
caacaccacccatggttcggactctgtggtttcagccagcagagagattgcagccttcttcctgactt
cagtgaacagcgcgtggtatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtgctatagccca
gagggaggtgtccactatgtagctggaacaggaggcctaggaccagcctga (配列番号 7 0)

【0104】

(アミノ酸)

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFF
YQRLVEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTL MGPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTR
NTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRCGPVCYSPEGGVHYVAGTGG
LGPA- (配列番号 7 1)

10

【0105】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME6配列:

(DNA)

Atgacgcaaaatctgggctcggaatggcaagtatcctgcgctccccgcaagcactgcaactgacct
ggctctgatcaaaccggacgctgttgctcatccgctgattctggaagcgggtccaccagcaaattctga
gcaacaaatttctgatcgtgcgtatgcgcgaactgctgtggcgtaaagaagattgccagcgtttttatc
gcgaacatgaaggccgtttcttttatcaacgcctggttgaattcatggcctctggtccgattcgcgcat
atatcctggctcacaagatgcgattcagctgtggcgtaacctgatgggtccgacgcgcgtctttcgtg
cacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctcggtcgtgaccgatacgcgcaataccacgcac
ggtagcgactctgttgtagtgcgctcccgtaaatcgcgccctttttcccggaacttctccgaacagcgt
tggtacgaagaagaagaaccgcaactgcgctgtggcccgggtctgttattctccggaagggtggtgtcca
ttatgtggcgggcacgggtggtctgggtccggcatga (配列番号 7 2)

20

【0106】

(アミノ酸)

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELL
WRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTL MGPTRVFR
ARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRC
GPVCYSPEGGVHYVAGTGGLGPA- (配列番号 7 3)

30

【0107】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME6 1配列:

(DNA)

Atgacgcaaaatctgggctcggaatggcaagtatcctgcgctccccgcaagcactgcaactgacct
ggctctgatcaaaccggacgctgttgctcatccgctgattctggaagcgggtccaccagcaaattctga
gcaacaaatttctgatcgtgcgtatgcgcgaactgctgtggcgtaaagaagattgccagcgtttttatc
gcgaacatgaaggccgtttcttttatcaacgcctggttgaattcatggcctctggtccgattcgcgcat
atatcctggctcacaagatgcgattcagctgtggcgtaacctgatgggtccgacgcgcgtctttcgtg
cacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctcggtcgtgaccgatacgcgcaataccacgcac
ggtagcgactctgttgtagtgcgctcccgtaaatcgcgccctttttcccggaacttctccgaacagcgt
tggtacgaagaagaagaaccgcaactgcgctgtggcccgggtctga (配列番号 7 4)

40

【0108】

(アミノ酸)

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELL
WRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTL MGPTRVFR
ARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRC
GPV- (配列番号 7 5)

【0109】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME6 2配列:

(DNA)

50

Atgctgaccctggctctgatcaaacggacgctgttgctcatccgctgattctggaagcgggtccacca
gcaaattctgagcaacaaatttctgatcgtgctatgcgcgaaactgctgtggcgtaaagaagattgcc
agcgtttttatcgcgaacatgaaggccgtttcttttatcaacgcctggttgattcatggcctctggtcc
gattcgcgcataatatcctggctcacaagatgcgattcagctgtggcgtaacctgatgggtccgacgc
gctgtttctgtgcacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctcgttcgggtctgaccgatacgcgca
ataccacgcacggtagcgactctgttgtagtgctcccgtgaaatcgcggccttttccggacttct
ccgaacagcgttggtacgaagaagaaccgcaactgctgctgtggcccgggtctga (配列番号 7
6)

【0110】

(アミノ酸)

10

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFF
YQRLVEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTR
NTTHGSDSVVSASREIAAFPDFSEQRWYEEEEEPQLRCGPV- (配列番号 77)

【0111】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME6 3配列:

(DNA)

Atgctgaccctggctctgatcaaacggacgctgttgctcatccgctgattctggaagcgggtccacca
gcaaattctgagcaacaaatttctgatcgtgctatgcgcgaaactgctgtggcgtaaagaagattgcc
agcgtttttatcgcgaacatgaaggccgtttcttttatcaacgcctggttgattcatggcctctggtcc
gattcgcgcataatatcctggctcacaagatgcgattcagctgtggcgtaacctgatgggtccgacgc
gctgtttctgtgcacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctcgttcgggtctgaccgatacgcgca
ataccacgcacggtagcgactctgttgtagtgctcccgtgaaatcgcggccttttccggacttct
ccgaacagcgttggtacgaagaagaaccgcaactgctgctgtggcccgggtctgttattctccggaa
gggtggtgtccattatgtggcggggcacgggtggtctgggtccggcatga (配列番号 78)

20

【0112】

(アミノ酸)

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFF
YQRLVEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTR
NTTHGSDSVVSASREIAAFPDFSEQRWYEEEEEPQLRCGPVCYSPEGGVHYVAGTGG
LGPA- (配列番号 79)

30

【0113】

Or i Gene - NME7 - 1完全長:

(DNA)

gacgttgatatacgactcctataggcgccgggaattcgtcgactggatccggtagcaggagatctg
ccgccgcgatcgccatgaatcatagtgaagattcgttttcattgcagagtggatgatccaaatgctt
cacttcttcgacgttatgagcttttattttaccaggggatggatctgttgaaatgcatgatgtaaagaa
tcatcgacacctttttaagcggaccaaaatatgataacctgcacttggaagatttatttataggcaacaa
agtgaatgtcttctctcgacaactgggtattaattgactatggggatcaatatacagctcgccagctggg
cagtaggaaagaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataatt
gaaataataaacaaagctggatttactataacaaaactcaaatgatgatgctttcaaggaaagaagc
attggattttcatgtagatcaccagtcaagaccctttttcaatgagctgatccagtttattacaactggt
cctattattgccatggagattttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgca
aactctggagtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttggaacagatggcataag
aatgcagcgcgatggccctgattctttgcttctgcggccagagaaatggagtgttttttcttcaagt
ggaggttggtggccggcaaacactgctaaatttactaattgtacctgttgcatgttaaaccctatgct
gtcagtgaaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcagggttttgaaatctcagctatg
cagatgttcaatatggatcgggttaattgttgaggaaattctatgaagttataaaggagtagtgaccgaa
tatcatgacatggtgacagaaatgtattctggcccttggtgtagcaatggagattcaacagaataatgct
acaaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatcctgaaattgcccggcatttacgccctggaact
ctcagagcaatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttcaactgtactgatctgccagaggatggc

40

50

ctattagagggttcaatacttcttcaagatcttggataatacgcgtacgcggccgctcgagcagaaactc
atctcagaagaggatctggcagcaaatgatatcctggattacaaggatgacgacgataagggttaa (

配列番号 8 0)

【0114】

(アミノ酸)

MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLH
LEDLFIGNKVNVFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINK
AGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPPIAMEILRDDAICEWK
RLLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD SFASAAREMELFFPSSGGCGPA
NTAKFTNCTCCIVKPHAVSEG L LGKILMAIRDAGFEISAMQMFMNMDRVNV EEFYEVY
KGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAI
FGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDNTRTRRLEQKLISEEDLAANDILDYKD
DDDKV (配列番号 8 1)

10

【0115】

Abnova NME7-1 完全長 (アミノ酸) :

MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLH
LEDLFIGNKVNVFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINK
AGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPPIAMEILRDDAICEWK
RLLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD SFASAAREMELFFPSSGGCGPA
NTAKFTNCTCCIVKPHAVSEG L LGKILMAIRDAGFEISAMQMFMNMDRVNV EEFYEVY
KGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAI
FGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN (配列番号 8 2)

20

【0116】

Abnova 部分 NME7-B :

【0117】

(アミノ酸)

DRVNV EEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEI
ARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKIL (配列番号 8 3)

【0118】

ヒスチジンタグ :

30

(ctcgag)caccaccaccaccactga (配列番号 8 4)

【0119】

Strept II タグ :

(accggt)tggagccatcctcagttcgaaaagtaatga (配列番号 8 5)

【0120】

MUC1* のリガンド

本発明者らは、以前、MUC1* 受容体のリガンドが成長因子として機能することができ、具体的には幹細胞及び前駆体細胞の成長因子であることを開示した。NMEファミリータンパク質 (以前はNM23と呼ばれた) は、MUC1* のリガンドである。NMEタンパク質は、それらが全てNDPK (ヌクレオチドニリン酸キナーゼ) ドメインを有することから、一緒にグループに分類される。発現されるか、又は集団の大部分が二量体として存在するように精製されたNME1又はNME2は、フィーダー細胞、それらの抽出物、血清、又は任意の他のサイトカインの不在下で胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞の成長を支持する。本明細書において、本発明者らは、NME7もまたMUC1* のリガンドであり、これもまたフィーダー細胞、それらの抽出物、血清、又は任意の他のサイトカインの不在下で胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞の成長を支持することを報告する。NME6、NME1及びNME2は全て単一のNDPKドメインを有し、同様の分子量である。NME7はそれらの分子量の2倍であり、2つのNDPKドメインを含有する。NME6は、NME1のように二量体として存在し得る。したがって、二量体形態のNME1、NME2及びNME6、並びにNME7は、間葉系幹細胞、造血幹細胞、多能性幹細胞及びナ

40

50

イーブ状態幹細胞を含むがこれらに限定されない、幹細胞又は前駆体細胞の成長、並びに多能性の維持又は誘導に好ましいNMEファミリータンパク質である。NME1及びNME7が特に好まし。二量体形態のNME1及びNME7がより一層好ましい。本発明はタンパク質の天然形態に限定することを意図するものではない。商業上、変異、切断又は付加配列を有し得る組換えタンパク質としてタンパク質を作製してもよい。本明細書において、本発明が、発現された組換えタンパク質の収率、可溶性等を高め得る特定のバリエーションに限定されることを意味するものではないことから、このNME7バリエーションを単にNME7と呼ぶ。さらに、本発明は、1本鎖タンパク質が2つの接続された単量体を含み、各単量体が単一のNDPK Aドメイン又はBドメインからなり得る、NME1又はNME6の1本鎖バリエーションの使用を想定する。

10

【0121】

誘導された多能性

転写因子Oct4、Sox2、Klf4及びc-Myc、又はOct4、Sox2、Nanog及びLin28の組合せの強制発現により、成熟細胞の多能性状態への復帰が引き起こされることが示された(Takahashi and Yamanaka, 2006)。多能性を誘導する各転写因子は、約12の遺伝子の転写を調節する。本発明者がMUC1関連因子であるとして同定したのは、これらのうちの一部であった。OCT4及びSOX2はMUC1プロモーター自身に結合する。多能性タンパク質SOX2及びNANOGはNME7プロモーターに結合し、幹細胞の多能性に対する重要性を強調する。NM23 (NMEとしても知られる) は以前、本発明者によって、MUC1*の活性化リガンドとして同定された(Mahanta et al., 2008)。NME7はMUC1*の活性化リガンドである。OCT4及びSOX2はいずれも、本明細書において本発明者らがMUC1の開裂酵素であると開示する、MMP16のプロモーターに結合する。OCT4、SOX2又はNANOGもまた、開裂酵素MMP2、MMP9、MMP10、ADAMTSL-1、ADAMTS-4、ADAM-17 (MUC1開裂酵素)、ADAM-TS16、ADAM-19及びADAM-28に対するプロモーター部位に結合する。これらの開裂酵素の一部又は全部を上方調節し、MUC1*形態へのMUC1の開裂を亢進して多能性を誘導するか、又はそれを維持することができる(Boyer et al., 2005)。総合すると、主要な多能性タンパク質SOX2及びNANOGがNME7プロモーターに結合し、OCT4及びSOX2がMUC1プロモーターに結合してこれらの遺伝子の発現が始まることから、MUC1* (開裂形態) 及びそのリガンドNME7は多能性の活性化因子であることが明らかである。

20

30

【0122】

MUC1の開裂形態であるMUC1*のみを発現する胚性幹細胞を用いた本発明者らによる以前の研究成果より、その細胞外ドメインの二量体化が成長を刺激し、分化を阻害することが示された(Hikita et al., 2008)。これらの効果は、二価の抗MUC1*抗体(図15)、組換えNM23、又は二量体を選好的に形成する変異体NM23 (S120G) のいずれかを使用してMUC1*細胞外ドメインを二量体化することによって達成された(Kim et al., 2003)。一価の抗MUC1* Fabを使用することによるMUC1*細胞外ドメインの阻害は、数時間以内でも致死的であった。

40

【0123】

NME1二量体のみがMUC1*細胞外ドメインペプチドに結合することを示す、表面プラズモン共鳴(SPR)実験を行った。図17Aは、野生型タンパク質の多量体化状態及び3つの異なるS120G変異体の製剤を示す、NM23-WT、NM23-S120G-混合、NM23-S120G-六量体及びNM23-S120G-二量体の非還元ゲルの写真を示す。図17Bは、SPRチップ表面に付着したMUC1*細胞外ドメインペプチド(PSMGFR)への4つの異なるNM23の結合能力を示す、表面プラズモン共鳴(SPR)測定のオーバーレイを示す。結果からは、NM23のその同起源の受容体MUC1*への結合量は、試料中にどれ位の二量体が存在するかの関数であることが示される。SPRは、チップ-溶液インターフェースでのタンパク質質量を測定し、MUC1*

50

ペプチド表面に六量体が結合すると、二量体が結合した場合より3倍強いSPRシグナルを生じる。図17Cは、NM23二量体のみが同起源の受容体MUC1*に結合することを示す、ナノ粒子実験の写真を示す。MUC1*細胞外ドメインペプチドを金ナノ粒子上に固定化した。ナノ粒子の各アリコートにNM23-WT、NM23-S120G-二量体又はNM23-S120G-六量体のいずれかを添加した。NM23がナノ粒子固定化MUC1*ペプチドに結合すると、ナノ粒子が互いに接近して溶液をピンク色から青色へと変化させる。この実験から、NM23-S120G-二量体のみがMUC1*ペプチドに結合したことが示される。抗MUC1*Fabの添加は、溶液中のNM23-S120G-二量体と、ナノ粒子上のMUC1*ペプチドとの結合を競合的に阻害した。図17D~図17Gは、多能性幹細胞の成長を支持する能力について試験された種々のNM23多量体を示す。ヒトES（胚性幹）細胞を図17DのNM23-S120G-二量体、図17EのNM23-S120G-六量体、図17FのNM23-WT、又は図17GのNM23-S120G-二量体に加えてMUC1*細胞外ドメインペプチド（PSMGFR）のいずれかにおいて培養され、幹細胞表面上のMUC1*受容体へのNM23二量体の結合を競合的に阻害した。（G）（E）及び（F）の順に分化の誘導（コロニーの肥厚、暗色化）が容易に観察され、NM23-二量体-MUC1*相互作用の阻害が、MUC1*に結合しないNM23六量体中で細胞を培養した場合と同様に、分化を誘導することを示している。NM23-S120G（D）の二量体制剤のみが、未分化幹細胞の成長を支持することが可能であった。

10

20

30

40

50

【0124】

図18は、3つの異なる組換えNM23-S120G製剤に対するNM23-WTの多量体化状態を示す、非変性ネイティブゲルを示す。

【0125】

図19は、A) NM23野生型（WT）及びB) 60%の二量体を産生したNM23-S120G-「混合」製剤のSPR測定結果を示す。タンパク質を5つの異なる濃度で注入した。結果から、NM23-WTよりもNM23-S120G-混合タンパク質はMUC1*細胞外ドメインペプチド表面に8倍多く結合したことが示される。野生型タンパク質は六量体であることから、結合した二量体の量を比較するためには、RUの数値を3で割る必要がある。野生型及びS120G-二量体はいずれも結合において濃度依存性を示すが、結合した野生型六量体の量はこのシステムのノイズの範囲内に留まるほど小さい。

【0126】

これらの知見は、MUC1*が顕著な「幹細胞性」因子であることを示す。さらに、OCT4及びSOX2はMUC1遺伝子プロモーターに結合し、またその開裂酵素のプロモーターにも結合する。SOX2及びNANOGはNM23（NME7）プロモーターに結合する。MUC1*の細胞外ドメインを遮断することはhES細胞にとって致死的事であることから、多能性遺伝子OCT4、SOX2及びNANOGはMUC1のプロモーター部位、その開裂酵素及びその活性リガンドNME7に結合し、それらのMUC1発現を誘導するということになる。既に多能性を誘導することが示している1又は複数の遺伝子又は遺伝子産物を、MUC1*に対して遺伝子を形質移入すること若しくは遺伝子産物を導入すること単独で、又はその開裂酵素及び／又は活性化リガンドNME7、NME-H1、NME-H2、又はMUC1若しくはMUC1*のPSMGFRエピトープを二量体化する抗体に加えて、置き換えることができる。

【0127】

FGF系培地を使用する標準プロトコル又はNME系培地を使用する変更されたプロトコルを使用して、体細胞において多能性の誘導効率を試験する実験を行った。

【0128】

従来使用される標準プロトコルは、まずプラスチック上に皮膚芽細胞又は線維芽細胞（ヒト包皮線維芽細胞-新生児、「hFFn」：#PC501A-hFF、System Biosciences、マウンテンビュー、カナダ）をプレーティングし、線維芽細胞培地（FM）中で培養し、24時間ごとに交換する。5日後、細胞を不活性化線維芽細胞フィーダー細胞

胞（マウス（M E F）又はヒト（H S 2 7）であってもよい）でコーティングされた表面に移入する。次の2日間に亘り、細胞をF M中で保持する。7日目、培地をb F G F系培地に交換し、培地を24時間ごとに交換する。最初のプレーティングから約2週間～4週間後、胚性幹（E S）細胞様形態を有するコロニー（クローン）を選択し、不活性化フィーダー細胞（M E F又はH S 2 7）でコーティングされた新しいウェルに個別にプレーティングし、3日～4日ごとに順次継代する。E S様細胞として成長を続けるウェルを増やし、多能性マーカーの存在を試験する。

【0129】

従来使用されている標準プロトコルに反し、本発明者らは、常にN M E培地（N M E 1二量体：「N M 2 3－M M－A」）中で体細胞を培養した。さらに、本発明者らは、線維芽細胞フィーダー細胞層上、又は抗M U C 1＊抗体（N－1 0 P S M G F Rペプチドを認識するC 3又はC 8）層上のいずれかに細胞をプレーティングした。R T－P C R測定を行って、4日目（図3 1 A）又は20日目（図3 1 B）まで、様々な条件下で発現されたO c t 4の量を定量化した。4日目までにO c t 4の発現レベルによって測定される多能性の誘導をもたらした唯一の条件は、O C T 4、S O X 2及びK L F 4（「O S K」）（c－M y cなし）で形質移入され、最小培地（「M M」）中のN M E 1二量体中において培養された線維芽細胞に対するものであった。これらの細胞について、O c t 4の発現は出発細胞よりも119倍大きく、線維芽細胞培地中で代わりに培養された同一の細胞よりも200倍近く大きかった。20日目まで、3つの遺伝子O S Kのみにより形質移入され、N M 2 3－M M－A中で培養された細胞は、コントロールよりも109倍大きくO c t 4を発現した。O S K Mにより形質移入され、常にN M 2 3－M M中で培養された細胞は、線維芽細胞培地（F M）中からb F G F培地（標準）中へと切り替えられて培養された同一の細胞よりもO c t 4発現が3倍大きい一方で、F Mの後にN M 2 3－M Mへと切り替えられて培養された細胞は、F Mの後にb F G F－M中で培養された細胞よりもO c t 4発現が1.3倍大きいに過ぎなかった（図3 1 C）。多能性マーカーT r a 1－6 0に対する20日目の細胞の免疫細胞化学染色は、N M E系培地を使用する細胞において多能性誘導の主な利点を示す。O C T 4、S O X 2及びK L F 4により形質移入され、F G Fが添加されていない最小培地中のN M E 1二量体中で培養された細胞は、4つ全ての多能性遺伝子O C T 4、S O X 2、K L F 4及びc－M y cにより形質移入され、F G F培地中で標準プロトコルに従って培養された細胞（図3 1 D、図3 1 E）と比較して、多能性の誘導効率が大きい高められていた（図3 1 F、図3 1 G）。3つの多能性遺伝子O C T 4、S O X 2及びK L F 4により形質移入された細胞は、検出可能な多能性マーカーを有さず、幹様形態を欠いていた。

【0130】

好ましい実施形態では、細胞への侵入を容易にするため、多能性の誘導若しくは維持を補助するために、N M 2 3（N M 2 3－H 1、N M 2 3－H 2又はN M E 7）が、それをコードする遺伝子として、タンパク質自体として、又はポリアルギニン配列（poly-argininetract）等のリーダー配列を持つタンパク質として細胞へと導入される。最近、本発明者らは、N M 2 3が多能性幹細胞（及びがん細胞）により分泌される場合、それはM U C 1－M U C 1＊の開裂形態の活性化リガンドであり、M A Pキナーゼ増殖経路を誘発することを示した。M U C 1＊のN M 2 3刺激は、多能性h E S Cの成長を促進し、それらの分化を阻害したことが示された（Hikita et al., 2008）。また、N M 2 3はc－M Y Cの転写も誘導し（Dexheimer et al., 2009）、c－M Y Cは必要ではなくなった。N M 2 3は、M U C 1＊成長因子受容体を活性化するためにその天然状態で添加されるか、又はc－M Y C発現が誘導される細胞及び核への侵入を容易にするためポリアルギニン配列と共に外因的に添加されるかのいずれかである。N M 2 3（N M E）はコードする核酸として、又は細胞への侵入を容易にする修飾を伴う若しくは伴わない発現されたタンパク質として添加され得る。N M E 1又はN M E 2は、天然状態で、又はS 1 2 0 G変異若しくはN M E 7等の二量体状態を選好する変異形態で使用され得る。

【0131】

本発明の別の態様では、MUC1*の細胞外ドメイン（PSMGFR）若しくはNM23等の二量体MUC1*リガンドに結合する二価の抗体、又はそれらをコードする遺伝子を、多能性の誘導、多能性の誘導効率の向上、多能性の維持又は分化の阻害のためにMUC1*発現細胞に添加する。これらのMUC1又はMUC1*相互作用タンパク質が添加される細胞は、自然発生的な細胞又は幹細胞様の特徴を誘導する遺伝子が添加されたもの、若しくは既に分化の過程に入ったものであってもよく、又は幹細胞であってもよい。

【0132】

多能性を誘導する遺伝子は同一又は異なるプラスミド上に導入されてもよく、プラスミドは、誘導されるレンチウイルスベクター若しくはアデノウイルスベクター、又は任意の組み込み若しくは非組み込みウイルス若しくは非ウイルスベクター、又はこれらの遺伝子の所望の細胞への導入を容易にする任意の他の系であってもよい。

10

【0133】

多くの場合、多能性誘導タンパク質の効果を、それらをコードする核酸又は遺伝子よりも、タンパク質そのものを導入することにより達成することが優先される。本発明は、天然状態又は細胞への侵入を可能とするためにポリアルギニン配列等のリーダー配列で修飾された遺伝子産物、タンパク質により置換され得る、幹様の特徴又は多能性の誘導に関して本明細書に開示される遺伝子を包含する。これらの遺伝子産物、すなわちタンパク質、又は1若しくは複数の形質移入された遺伝子の産物と相互作用する他のタンパク質を細胞に導入して、多能性又は他の幹細胞様特性を誘導又は維持する。

20

【0134】

NME-H1、NME-H2、NME6又はNME-7等であるがこれらに限定されないNM23タンパク質は、多能性の誘導又は維持を亢進する。NM23は、OCT4、SOX2、KLF4及び本明細書に開示される別のものを含むがこれらに限定されない、1又は複数の以前に同定された多能性因子と共に導入される。

【0135】

NM23ファミリータンパク質

NM23は、ATPからADPへの転換を触媒するヌクレオシド二リン酸キナーゼ（NDPK）ドメインの存在をこれらのタンパク質の共通性とする、タンパク質ファミリーとして存在する。NM23は、以前は腫瘍転移因子として知られていた。最近の10個のNM23ファミリーメンバーの同定により、現在、それらはNMEタンパク質1~10として知られている（Boissan et al., Mol Cell Biochem (2009) 329:51-62, "The mammalian Nm23/NDPK family: from metastasis control to cilia movement,"）。

30

【0136】

科学者らは、最初にヒト白血病細胞から分化阻害因子を単離し、この因子の添加により或る特定のタイプの白血病細胞及び骨髄細胞の化学的に誘導された分化が妨げられることを示した（Okabe-Kado, 1985, Cancer Research 45, 4848-4852, "Characterization of a Differentiation-inhibitory Activity from Nondifferentiating Mouse Myeloid Leukemia Cells"）。この阻害因子は、後にNME1（NM23-H1）として同定された（Okabe-Kado, 1992, "Identity of a differentiation inhibiting factor for mouse myeloid leukemia cells with NM23/nucleoside diphosphate kinase", Biochem Biophys Res Comm, 182 No.3 987-994）。白血病細胞は、最終分化が妨げられた血液細胞である。興味深いことに、白血病細胞の分化を阻害する能力は、その触媒ドメインとは無関係であることが示された。その酵素活性を無効にしたNDPKドメインにおける変異は、或る種の白血病細胞の分化を妨げるタンパク質の能力に影響を及ぼさなかった。しかしながら、その後数十年の科学文献により、NM23が分化を阻害するのか、分化を促進するのか、又は全く影響を及ぼさないのかについての状況は混乱している。

40

【0137】

多くの研究論文により、NM23が分化を誘導することを示す証拠が提供された。Ros

50

engardet al, 1989、Dearolf et al 1993、及び Timmons et al 1993により、*in vivo*においてショウジョウバエ NM23 ホモログ、awd は適切な分化に必要であることが報告された。Lakso et al 1992 は、NM23 (マウス *in vivo*) が組織分化の開始と共に増加し、それが分化を誘導することを暗示した。Yamashiro et al 1994 は、*in vitro*での NM23 レベルがヒト赤白血病細胞の分化の間増加することを報告した。Lombardi et al 1995 は、NM23 (マウス *in vitro*) が細胞分化の開始と共に増加し、ここでも NM23 が分化を誘導することを示していると結論付けた。Gervasi 1996 は、NM23 の過剰発現 (ラット *in vitro*) により神経分化が誘導され、アンチセンス DNA による NM23 の下方調節により分化が阻害されたことを報告した。Amendola et al 1997 は、ヒト神経芽細胞腫細胞における NM23 の形質移入が分化を高めることを示した。

10

【0138】

NM23 が分化を誘導することを報告した多くの研究論文との完全な矛盾において、同じ時間枠で公開された同じ数の文献が、NM23 が分化を阻害したという正反対の事柄を報告した。Munoz-Dorado et al 1990 は、ndk (ミクソコッカス属 (*Myxococcus*) NM23 ホモログ、*in vivo*) が成長に必須であるが、発生の間下方調節することを見出し、その存在が分化を阻害するであろうことを暗示した。Okabe-Kado 1992 は、*in vitro*において分化阻害因子 (後に NM23 と同じグループにより同定された) がマウス白血病の分化を阻害したことを示した。Yamashiro et al 1994 は、ヒト巨核芽球の分化の間、NM23 レベルが低下し、NM23 の分化の阻害と一致することを報告した。Okabe-Kado 1995 は、組換え NM23 が白血病細胞株 HEL、KU812 及び K562 の赤血球分化を阻害するが、前駆体 HL60 細胞、U937 細胞又は HEL/S 細胞の単球又は顆粒球分化は阻害しないことを示した。Venturelli et al 1995 は、NM23 の過剰発現は、ヒト造血前駆体細胞の G-CSF 依存性顆粒球分化を阻害したことを報告した。Willems et al 1998 は、NM23 発現が骨髓細胞由来のヒト CD34+ 造血前駆体細胞が分化するにつれて減少することを見出した。2002 年において、Willems et al は、NM23 は細胞増殖に影響を及ぼさず、分化の誘導も阻害もしなかったが、CD34+ 細胞の赤血球系統への分化を歪めた (skewed) ことを示した。

20

【0139】

2000 年の総説において、Lombardi は、分化における NM23 の役割に関連するこれら及び他の相反する結果を要約し、「細胞分化の制御における NM23 遺伝子の役割は幅広く調査されているが、NM23 発現レベルとかかるプロセスとの機能的なつながりについては、完全に明らかにされることが待たれる。」と結論付けた。換言すれば、NM23 と分化との機能的なつながりは理解されていなかった。

30

【0140】

本発明者らは、以前、MUC1 開裂産物 MUC1* の成長因子受容体機能が、その細胞外ドメインのリガンド誘導性二量体化により活性化され、MUC1* のリガンドが NM23 であることを発見した。本発明者らは、それは分化を阻害し、幹細胞及び前駆体細胞の成長を支持する NM23 の二量体形態であったことを更に実証した。さらに、本発明者らは、NM23 種は多能性を誘導することを発見した。本発明者らは、現在、いくつかの NM23 ファミリーメンバーがこの幹細胞関連機能 (stem-related function) を有することを発見した。NME1 (NM23-H1) は、二量体である場合のみ、幹細胞の成長を促進し、分化を阻害する。NME6 は、NME1 と大体同じ分子量であり、海綿 (スブリテス・ドムンクラ (*Suberites domuncula*)) 中で二量体として存在すると報告されている (Perina et al, 2011, "Characterization of Nme6-like gene/protein from marine sponge *Suberites domuncula*" *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 384:451-460)。NME7 (NM23-H7) は単量体タンパク質であるが、本発明者らは、NME7 が二量体のように機能することを発見した。NME7 は 2 つの NDPK 触媒ドメインを含有し、NME1 又は NME6 単量体のおよそ 2 倍の分子量であり、ヒト胚性幹 (ES) 細胞及び人工多能性幹 (iPS) 細胞によって発現及び分泌さ

40

50

れる（図 23 及び図 24 を参照）。幹細胞からの NME7 及び NME1 の枯渇は、細胞の分化を引き起こした（データは示されていない）。サンドイッチ ELISA アッセイにおいて、組換え NME7（NME7-AB）は、2 つの MUC1*細胞外ドメインペプチドと同時に結合し、ここでいずれのペプチドも完全な PSMGFR 配列であった。第 1 ペプチドは C 末端システインを介してオポアルブミンに連結され、ELISA プレート上にコーティングされた。組換え NME7 の添加は、僅かなバックグラウンドを伴って、又はバックグラウンドなしに顕著に特異的な結合を生じた。その後、NME7 を飽和するまでペプチド表面に添加した。第 2 PSMGFR ペプチドは、ヒスチジンタグ又はビオチン分子のいずれかを有していた。その後、HRP 標識化抗 His タグ抗体又はストレプトアビジンのいずれかを添加し、これは第 2 MUC1*ペプチドの NME7 へのロバストで濃度依存的な結合を示した。この結果は、単量体 NME7 は細胞表面上の MUC1*を二量体化し得ることを示す。

10

【0141】

NME7 は、分子量が約 25 kDa より小さなタンパク質としても存在し得る。幹細胞溶解物及び上清のブルダウンアッセイに続いて、質量分析を行った。より小さな分子量形態の NME7 は全て、その NDPK A ドメインに由来するペプチド配列を含有したが、B ドメイン由来のものは含有しなかった。これは、選択的スプライシングアイソフォームであるか、又は開裂産物である可能性がある。NME1 のように、このより小さい A ドメイン NME7 は二量体化し得る。

20

【0142】

NME ファミリータンパク質は、細胞及び組織発生の異なる時間に差次的に発現される。本発明者らが胚性幹細胞において NME6、NME7 及び NME1 を検出したのに対し、NME1 及び NME2 のみが成体細胞及び成体幹細胞において常に発現される。NME1 は幹細胞の分化を阻害するよりむしろ誘導する六量体を形成することから、NME6 及び NME7 はそれらが六量体を形成し得ないことから胚発生の初期及び真に多能性の幹細胞において発現されるということになる。

【0143】

幹細胞の所定密度に達した際に分化を開始したい場合、六量体の調節機能が後期段階において重要であるため、胚発生の初期段階においては成長及び分化の阻害はデフォルトであろう。本発明者らの知見を支持して、Boyer et al (Boyer et al, 2005, "Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells", Cell, Vol. 122, 947-956) は、多能性誘導タンパク質 SOX2 及び NANOG は NME7 のプロモーターに結合するが、他の NME ファミリーメンバーには結合せず、それが最初に発現される NME タンパク質であり、多能性を誘導又は維持し得るが、それを止める六量体を形成し得ないという考えと一致することを示していると報告した。また、Boyer et al は、多能性誘導タンパク質 SOX2 及び OCT4 が MUC1 のプロモーター（NME7 の標的受容体であり後に MUC1*へと開裂する）に結合することも報告した。また、SOX2 及び OCT4 もまた MUC1 開裂酵素 MMP-16 のプロモーターに結合する。これらの多能性誘導タンパク質が重複して MUC1 のプロモーター、その開裂酵素及びそのリガンド NME7 に結合するという事実は、このタンパク質のサブセットが多能性に重要であり、NME7 は発生中の胚において最初に発現される多能性タンパク質であることを示している。NME7 は、二量体形成を好む NM23 バリエーション中で培養された場合に、ヒト幹細胞により高発現される。

30

40

【0144】

実施例 7 は、BGO1v ヒト胚性幹細胞が NM23-S120G 中か（リフォールディングされ主に二量体として存在するように精製されている）（図 16～図 17）、抗 MUC1*モノクローナル抗体 MN-C3 のコーティング上か、又はマウス線維芽細胞フィーダー細胞上において bFGF 中で培養されるかのいずれかで成長される実験を記載する。得られた細胞のウェスタンブロットは、NME7 が NM23-S120G 二量体中で培養された幹細胞において高発現されるが（図 23 第 I 部 C-レーン 1）、bFGF 中で培養

50

された幹細胞においては弱く発現されるに過ぎない（レーン2）ことを示す。これらの結果は、NM23二量体中で培養された幹細胞は、ナイーブ状態とも呼ばれるより多能性の状態へと復帰するのに対し、bFGF中の培養幹細胞は「プライムド」状態と呼ばれるより分化した状態へと幹細胞を導くことを暗示する。研究は、プライムド状態の幹細胞は、真の多能性幹細胞が可能であるはずの全ての細胞型への分化は不可能であることを示す。
【0145】

Jaenisch及び同僚達は、ナイーブ状態のマーカーセット、及びプライムド状態に特徴的な第2マーカーセットを報告した（J. Hanna, A. W. Cheng, K. Saha et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(20), 9222 (2010), Jacob H. Hanna, Krishanu Saha, and Rudolf Jaenisch, *Cell* 143(4), 508 (2010)）。ヒト胚性幹（ES）細胞又は人工多能性幹（iPS）細胞が様々な最小培地中のNME1二量体又はNME7中で培養されるか、又はそれらがFGF系培地中で培養される実験を行った。幹細胞がプレーティングされる表面も変えた。その後、FGF系培地と比べ、NME系培地中で培養された細胞に関してナイーブ遺伝子対プライムド遺伝子の発現レベルを測定するため、RT-PCR測定を行った。全ての場合において、NME系培地はFGF系培地中で培養された細胞よりも、よりナイーブな状態の幹細胞を作出した。例えば、MEFフィーダー細胞上において最小培地（MM）中のFGF中で成長された細胞は、最小培地（MM）中のNME1二量体中で成長された同起源の細胞（ここで、細胞を抗MUC1*抗体でコーティングされたプラスチックウェア上にプレーティングした）よりもプライムドマーカーがより高発現であり、ナイーブマーカーがより低発現であった。mTESRと呼ばれる別のFGF系培地は、非常に高いレベルのプライムド遺伝子及びより低いレベルのナイーブ遺伝子を伴い、更に悪かった（図13）。FGF中で予め培養された幹細胞をNME系培地へと移行すると、連続的な継代数に伴い、より高発現レベルのナイーブ遺伝子及びより低発現レベルのプライムド遺伝子の傾向があった。この傾向の一例については、実施例13Cを参照されたい。これらの結果は、ナイーブ状態のよりストリンジェントな決定因子である核内のヒストン-3の測定結果と一致する。ヒストン-3は、プライムド幹細胞の核内において凝縮した点として検出されるが、ナイーブ幹細胞の核には検出されない。FGFで成長された細胞は100%がプライムド状態にあり、それらの核内に凝縮したヒストン-3を有する。NME1二量体又はNME7における6回目の継代までに、予めFGF中で成長された約25%~30%の幹細胞がX染色体不活性化前である完全なナイーブ状態へと移行した。10回目の継代までに、真にナイーブ状態にある割合が50%~60%まで増加した。このいくつかの実施例については図34~図40を参照されたい。これらの結果は、図23第I部Cに示される知見と一致する。レーン1とレーン2を比較すると、ヒト体内で任意の細胞型へと分化可能な所望のナイーブ幹細胞においてNME7がより多く発現されている。したがって、細胞内でのNME7の発現を増加する戦略は、例えば、NME7の発現を引き起こすことが可能な核酸の導入、又はNME7タンパク質を添加する方法であり、又は二量体形成を好むNME1変異体若しくはバリエーションは多能性を維持し、胚性幹細胞若しくは人工多能性幹細胞においてナイーブ幹細胞状態を維持し、及び／又は体細胞、皮膚芽細胞及び線維芽細胞を含むより成熟した細胞型において多能性を誘導する戦略である。これらの戦略は、NME7若しくはNME1二量体形成又は二量体を模倣するバリエーションに加え、1又は複数の多能性遺伝子Oct4、Sox2、Nanog、Klf4又はc-mycの異所性の発現を含んでもよい。

【0146】

NME7は単一のタンパク質として存在するが、構造的には2つの単量体が含まれ、そのため二量体として機能する。NME7は2つのNDPKドメインを含有し、その一部分がMUC1*成長因子受容体に結合する。また、実施例7はプルダウンアッセイと呼ばれる結合実験を記載する。この実験において、MUC1*細胞外ドメインペプチドは、その後BGO1vヒト胚性幹細胞由来の溶解物とインキュベートされるビーズに付着された。洗浄工程そしてビーズから解放された後、MUC1*ペプチドとの相互作用により捕捉された種をSDS-PAGEゲル上で分離し、その後抗NME7抗体によりプローブした。

図 2 3 第 I I 部 F) - レーン 1 は N M E 7 が M U C 1 * 細胞外ドメインに結合することを示す。N M E 7 中の二重の N D P K ドメイン部分が M U C 1 * 成長因子受容体に結合してそれを二量体化し、これが幹細胞及び前駆体細胞の多能性を維持し、多能性を誘導し、また分化を阻害する経路を活性化する。

【 0 1 4 7 】

N M E 6 は二量体として存在し、より高次の多量体の形成に抵抗を示す。N M E 6 二量体は M U C 1 * 成長因子受容体に結合してそれを二量体化し、これが幹細胞及び前駆体細胞の多能性を維持し、多能性を誘導し、また分化を阻害する経路を活性化する。二量体形成を好む N M E 1 変異体及びバリエーションのように、N M E 6 及び N M E 7 はいずれも i P S 細胞を含む幹細胞及び前駆体細胞の多能性の維持及び誘導、並びに分化の阻害が可能である。

10

【 0 1 4 8 】

二量体形成を好む N M E 1 変異体及びバリエーションのように、N M E 6 及び N M E 7 を幹細胞（胚性又は人工多能性）又は前駆体細胞に外因的に添加して、成長を誘導するか、未分化状態に維持するか、又は分化を阻害することができる。N M E 6 及び N M E 7 を、幹細胞又は前駆体細胞に外因的に添加して多能性を誘導することができる。さらに、二量体形成を好む N M E 1 変異体及びバリエーション、N M E 6 及び / 又は N M E 7、又は二量体として振る舞う 1 本鎖バリエーションを含むそれらのバリエーションをコードする核酸を細胞に導入し、より分化していない状態への細胞の復帰を誘導するか、又はより未熟な状態に細胞を維持することができる。

20

【 0 1 4 9 】

N M E が全ての種間で高度に保存されていることから、本明細書に記載される方法はヒト N M E 種に限定されることを意図するものでも、ヒト細胞による使用に限定されることを意図するものでもない。

【 0 1 5 0 】

本発明の別の態様では、本発明者らは、外因性 N M E 7 の添加により幹細胞の成長及び多能性が完全に維持され、分化が阻害され、また多能性を誘導し得ることを発見した。N M E 7 は、2 つの N D P K ドメイン A 及び B を有する単量体タンパク質である。これまで、その機能は明らかにされていなかった。N M E 7 は、睾丸、卵巣及び脳において発現されることのみが知られていた。N M E 7 は、鞭毛の運動性に関与するであろうと考えられ、或る特定の主要な残基を欠くことから N D P K 活性は有してないと考えられていた。

30

【 0 1 5 1 】

任意の他の成長因子、フィーダー細胞又はそれらの馴化培地を欠く最小幹細胞培地中での培養物中のヒト幹細胞に、大腸菌において発現され、可溶性タンパク質として分泌された N M E 7 を添加した。幹細胞を、幹細胞表面抗原を認識する抗体層への接着により、細胞培養プレート上に吸着した。この方法では、マドリゲル等の表面コーティング中に存在する成長因子及び他のサイトカインによる干渉が回避される。

【 0 1 5 2 】

比較として、外因性組換え N M E 7 を添加する代わりに、リフォールディングされ二量体集団として精製された組換え N M 2 3 - H 1 (N M E 1 としても知られる) を添加して同じ起源由来の幹細胞を並べて培養した (実施例 9 及び実施例 1 0、並びに図 2 5 ~ 図 3 0 を参照)。N M E 7 及び N M 2 3 - H 1 二量体のいずれにおいても、幹細胞は分化することなく増殖した。図 2 7 ~ 図 3 0 は、高い核細胞質比を有する単一の細胞層として成長するという点で細胞が幹細胞形態を有していることを示す。さらに、免疫細胞化学及び定量的 P C R は、得られた細胞のいずれもが多能性マーカーを発現したが、F O X a 2 及び m i R - 1 4 5 等の分化マーカーを発現しなかったことを示した。細胞数は、N M E 7 中で培養された幹細胞が N M 2 3 - H 1 二量体中で培養されたものよりも 1 . 4 倍多く細胞を産生したことを示した。これは、N M 2 3 - H 1 アイソフォームが、二量体、四量体又は六量体 (二量体のみが活性型であり六量体は分化を誘導する) として存在し得ることから、現行の技術水準に対する著しい改善である。したがって、N M E 7 等の活性化するだ

40

50

けの N M E 形態を添加することが有利である。商業上、単量体として活性であり、大腸菌において発現され、可溶性タンパク質として分泌されることから、N M E 7 を産生することがより費用効率が高い。これは、変性、リフォールディング、二量体形成の誘導、及び二量体の安定な集団として単離する問題及び労力を排除する。また、*in vitro* 若しくは *in vivo* においてより未熟な状態への細胞の復帰を誘導するため、又は体細胞において多能性を誘導するために N M E 7 を外因的に添加することもできる。場合によっては、外因性 N M E 7 を添加しつつ、*s i R N A*、アンチセンス核酸、又は遺伝子発現を抑制するための任意の他の方法を使用して N M 2 3 - H 1 (N M E 1) の発現を抑制することが有利な場合がある。本発明者らが実証したように、N M 2 3 - H 1 (N M E 1) はその濃度が増加するにつれ四量体及び六量体を形成し、その後分化を誘導する。したがって、より成熟した状態へと細胞を分化させることが望ましい場合に、N M E 1 六量体を外因的に添加するか、又は N M E 1 を幹細胞内で発現されるように遺伝的に誘導することは、本発明の更なる別の態様である。

10

【0153】

タンパク質発現及び精製を補助するため、いくつかの N M E 7 コンストラクトを作製し、試験した。コムギ胚芽細胞抽出物（分子量 36.52 kDa）を使用する *in vitro* 発現系及びヒト H E K 2 9 3 細胞（分子量 38 kDa）において N M E 7 が発現され得ることが以前に報告されているが、本発明者らは、N D P K A ドメイン及び B ドメインのみを本質的に含有するより小さなコンストラクトを、高収率の可溶性タンパク質として大腸菌において発現し得ることを見出した。本発明者らは、ヒスチジntag 又は *s t r e p* タグのいずれかを有する N M E 7 - A B を作製したが、親和性タグなしで又は任意の他の親和性タグと共に作製することができる。N M E 7 - A B は、以前に幹細胞の成長、多能性の維持、多能性の誘導可能性及び分化の阻害を完全に支持することが本発明者らによって示されている N M E 1 (N M 2 3 - H 1) 二量体と同じ又はそれよりも良好に、ヒト幹細胞の多能性を促進し、分化を阻害した。本発明者らの実験は、N M E 7 は経時的な六量体の形成の危険を伴うことなく、より費用効率の高い、商業的に適用可能な方法で、N M E 1 二量体の代わりとなり得ることを示す。

20

【0154】

N M E ファミリータンパク質は、植物を含む全ての種に亘って高度に保存されている。したがって、本発明の N M E ファミリーメンバー、アイソフォーム及びバリエーション、特に N M E 1、N M E 6 及び N M E 7 コンストラクトの配列は、任意の種由来の配列又は異なる種由来の配列の組合せに含まれ得る（哺乳類種が好ましく、マウス種がより一層好ましく、ヒト種が最も好ましい）。かかる N M E ファミリーメンバー、アイソフォーム及びバリエーションは、任意の種（哺乳類種が好ましく、マウス種がより一層好ましく、ヒト種が最も好ましい）における増殖（*propagation*）、自己複製、多能性の維持、多能性の誘導又は分化の阻害に使用され得る。

30

【0155】

二量体形態の N M E 1 又は N M E 7 もまた、ナীবヒト幹細胞の維持のため、又はプライムド状態の幹細胞からのナীব幹細胞の誘導のため、又は *i P S* 細胞の作出過程における体細胞からのナীব幹細胞の作製のために使用され得る。ナীব状態にある幹細胞は、*b F G F* 含有培地中で成長された幹細胞と比べて、高発現レベルの多能性遺伝子 *O C T 4*、*K L F 2* 及び *N A N O G* 又は *K L F 4*、並びに低発現レベルの *F O X a 2*、*O T X*、*L H X* 及び *X I S T* を特徴とする。ナীব状態のより一層ストリンジェントな指標は、細胞がまだ X 染色体不活性化を経ていないことである。高レベルの *X I S T* は、X 染色体の 1 つの不活性化の指標であるが、よりの確な決定因子はヒストン 3 の免疫細胞化学染色である。X 染色体の不活性化が起きた場合、ヒストン 3 は凝縮され、細胞の核内において個別の集団として可視化され得る。X 染色体が不活性化されていない場合、ヒストン 3 は検出されないか、又は核全体から消失し、時に「くもり」と呼ばれる。

40

【0156】

N M E 1 二量体又は N M E 7 中で培養された胚性幹（*E S*）細胞及び人工多能性幹（*i*

50

P S) 細胞のいずれもが、F G F 中で培養された細胞と比べて F O X a 2、O T X、L H X 及び X I S T レベルが減少し、また N M E 系培地中で少なくとも 8 ~ 10 継代の後に約 50 % の細胞の核においてヒストン 3 が検出されないか又は凝縮したヒストン 3 を有さない幹細胞をもたらした。N M E 系培地中で 6 継代に亘って培養された細胞は、ナイーブ状態の特徴である、X 染色体不活性化前の細胞を僅か 25 % 有していた。異所的な発現遺伝子に加えて、様々な生化学物質及び阻害剤で細胞を処理することによって、プライムド幹細胞をナイーブ状態へと一時的に復帰させることができた研究者ら (J. Hanna, A. W. Cheng, K. Saha et al., Proc Natl Acad Sci U S A 107 (20), 9222 (2010), Jacob H. Hanna, Krishanu Saha, and Rudolf Jaenisch, Cell 143 (4), 508 (2010)) は、10000 細胞のうち約 1 個がナイーブ状態であったと報告した。単一細胞クローニング技法を使用することにより、彼らはナイーブヒト幹細胞の純集団を単離することができたが、それらは不安定であり、数継代 (ほとんどの場合 5 継代未満) しかナイーブ状態に維持することができなかった。ナイーブ状態にある幹細胞の別の指標は、高いコロニー効率を有する細胞であり、コロニー効率はプレーティングされた細胞の特定された数当たりに計測され得る個別のコロニー数として算出される。ヒト幹細胞とは異なり、m L I F (マウス白血病誘発因子 (murine leukemia inducing factor)) を含有する培地中で培養することにより容易にナイーブ状態に維持され得るマウス幹細胞のクローニング効率は約 30 % である。全く対照的に、F G F 系培地中で培養されたヒト幹細胞のクローニング効率は約 1 % である。N M E 1 二量体中で培養された E S 細胞は、18 % のクローニング効率を有し、N M E 7 中で培養された同じ細胞は 23 % のクローニング効率を有した。しかしながら、これらはヒストン 3 染色により約 50 % のナイーブ状態にある細胞を有するに過ぎない細胞集団であった。したがって、その集団におけるナイーブ細胞の実際のクローニング効率は、測定された 20 % の少なくとも 2 倍であり、マウスナイーブ幹細胞のそれを上回る、約 40 % のクローニング効率である。総合すれば、これらのデータは、N M E 1 又は N M E 7 中で培養された細胞は、プライムド状態からナイーブ状態へと復帰し、ナイーブ状態で維持されることを示している。

【0157】

また、本発明は、本質的に 100 % 多能性でありナイーブ状態にある幹細胞集団の作出への N M E 1 又は N M E 7 の使用も想定する。単に N M E 1 二量体又は N M E 7 を含有する培地中で現在商業的に入手可能な E S 細胞又は i P S 細胞を培養することによって、約 50 % が完全にナイーブ状態にある細胞集団が作出される。ナイーブ幹細胞及びプライムド幹細胞の混合集団に対して、限界希釈法等の当業者に既知のクローニング技法を使用し、全てがナイーブ状態にある幹細胞集団が作出される。本発明の更に他の態様では、新たな幹細胞株が作出される。E S 細胞株は、本来ナイーブな細胞をプライムド状態へと導く、F G F 中で細胞を培養することに代えて、細胞を N M E 7 又は N M E 1 を含有し、ここで N M E 1 タンパク質の少なくとも一部は二量体状態であり、より好ましくは少なくとも 25 % のタンパク質が二量体状態であり、より一層好ましくは少なくとも 50 % のタンパク質が二量体である、培地中で培養すること以外は、以前に記載された技法を使用して作出される (Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. James A. Thomson, Joseph Itskovitz-Eldor, Sander S. Shapiro, Michelle A. Waknitz, Jennifer J. Swiergiel, Vivienne S. Marshall, Jeffrey M. Jones et al. Science 282, 1145 (1998); DOI:10.1126/science.282.5391.1145; Isolation of Embryonic Stem (ES) Cells in Media Supplemented with Recombinant Leukemia Inhibitory Factor (LIF). Shirley Pease, Paola Braghetta, J David Gearing, Dianne Grail, and R. Lindsay Williams Developmental Biology 141, 344-352 (1990))。1つの態様では、細胞はヒト胚盤胞の内部細胞塊に由来し、N M E 7 又は N M E 1 二量体を含有する培地中で培養される。本発明の別の態様では、皮膚芽細胞又は線維芽細胞等の体細胞は、N M E 7 又は N M E 1 二量体を含有する培地中で培養することによって、より未熟な状態への復帰が誘導される。本発明の更なる別の実施形態では、i P S 細胞株は、1 若しくは複数の多能性遺伝子 O c t 4、S o x

10

20

30

40

50

2、Klf4、Nanog、c-Myc若しくはLIN28により体細胞、皮膚芽細胞又は線維芽細胞を形質移入することによるか、又はそれらの遺伝子産物、すなわちタンパク質、若しくはタンパク質の生成を引き起こす物質により細胞を処理すること、及びNME1二量体若しくはNME7を含有する培地の存在下でそのようにすることによって作出される。より一般的には、本発明は、NME1二量体又はNME7の存在下で細胞を培養することにより、多能性状態を含むより未熟な状態へと細胞の復帰を誘導する任意の方法を使用して、より高い効率で産生されるか、FGFの使用を含む従来の方法により作出されたiPS細胞よりナীব状態である、新たなiPS細胞株を作出することを想定する。好ましい実施形態では、FGFの使用は除外される。別の好ましい実施形態では、iPS細胞の作出過程を経ている細胞は線維芽細胞フィーダー細胞上に移入されない。

10

【0158】

幹細胞を成長するための表面

幹細胞又は多能性の誘導を経ている細胞が成長される表面の特性により本発明が限定されることを意図するものではない。幹細胞の成長又は多能性の誘導のため任意の好適な表面を、NME1、NME6又はNME7を含有する培地と共に使用することができる。かかる表面としては、フィーダー細胞、マドリゲル、ハイドロゲル、インテグリン及びインテグリン誘導体、E-カドヘリン及びE-カドヘリン誘導体、ビトロネクチン、細胞表面受容体に対する抗体、MUC1*細胞外ドメインを認識する抗体、PSMGFR配列を認識する抗体、VITA（商標）ブランドのプレート（ThermoFisher）、抗MUC1*抗体でコーティングされたVita（商標）等が挙げられるが、これらに限定されない。安定な二量体を形成し得るNME1変異体及びバリエーション（P96S、S120G変異体及び1本鎖コンストラクト）を最小幹細胞培地（MM）に添加し、マドリゲル表面又は抗MUC1*抗体コーティング表面上で成長している幹細胞を増やすために使用した。幹細胞の成長及びそれらの自発的な分化に抵抗する能力は、3つ全ての培地及び両方の表面において本質的に同等であった（図20、図21）。一部の表面は、その上での幹細胞の成長の等価性に悪影響を及ぼす。フィーダー細胞は、プライムド状態の幹細胞を生じる未知の因子を分泌する。ビトロネクチン等のインテグリンは、細胞表面上の同起源の受容体に結合し、ナীব状態の幹細胞の維持に望ましい又は望ましくない、生物学的シグナルを発生する。ナীব状態及びプライムド状態のマーカーの測定により、ビトロネクチンの接着層に付着した幹細胞は、NME1二量体中で培養された場合であっても、プライムドマーカーを増加し、ナীবマーカーの発現を減少した。好ましい実施形態では、プラスチック、生分解性、メッシュ又は固形、平坦又は粒子様であってもよい表面は、主にPSMGFR配列からなるMUC1*細胞外ドメインを認識する抗体でコーティングされる。更に好ましい実施形態では、表面はPSMGFRペプチドを認識する抗体でコーティングされたVITA（商標）ブランドのプレートである。より一層好ましい実施形態では、抗MUC1*抗体は、N末端の15アミノ酸を含むPSMGFRペプチドのN末端部分を認識する。

20

30

【0159】

場合によっては、細胞の表面への付着を亢進するためにrhoキナーゼ阻害剤を使用する。HA100、Y27632及びチアゾビビン（thiazovivin）を含むがこれらに限定されない多くのrhoキナーゼ阻害剤を、幹細胞の表面、特にMUC1*抗体でコーティングされたプラスチックである表面への接着の亢進を補助するために使用することができる。現在利用可能なほとんどの幹細胞株に対して、rhoキナーゼ阻害剤を最初の24時間～48時間のみ添加する。

40

【0160】

或いは、マドリゲル等の細胞ではない又は複合細胞混合物を含まない表面への接着を亢進するため、少なくとも一部の培養期間にグアニン交換因子（GEF）の阻害剤をrhoキナーゼ阻害剤に代えて培地に添加する。GEFの阻害剤は、場合によっては、抗MUC1*抗体でコーティングされた表面への幹細胞の付着を亢進するためにrhoキナーゼ阻害剤に代えて使用される。本発明の1つの態様では、グアニン交換因子阻害剤は六量体形

50

態の N M E 1 である。本発明の別の態様では、グアニン交換因子阻害剤は、N M E 1 に由来するペプチドである。

【0161】

抗 M U C 1 * 抗体でコーティングされたプレート等の或る特定の表面へのプライムド幹細胞又はプライムド幹細胞とナイーブ幹細胞の混合集団の接着を最大にするため、r h o キナーゼの阻害剤又はグアニン交換因子の阻害剤が必要とされる場合がある。しかしながら、ナイーブ幹細胞の純集団は、r h o キナーゼ阻害剤又はグアニン交換因子阻害剤の使用を必要としない。本発明の1つの態様では、ナイーブ幹細胞の純集団は、F G F 又は r h o キナーゼ阻害剤の不在下で培養される。

【0162】

R h o キナーゼ阻害剤は、r h o キナーゼ I 又は I I を阻害する物質である。R h o キナーゼ阻害剤は、小分子、ペプチド又はタンパク質であってもよい (Rath N, Olson M F. Rho-associated kinases in tumorigenesis:re-considering ROCK inhibition for cancer therapy. EMBO Rep. 2012;13(10):900-8.)。r h o キナーゼ阻害剤の例として、Y 2 7 6 3 2、ファスジルとも呼ばれる H A - 1 0 7 7、H - 1 1 5 2 及びチアゾピビンが挙げられる (Olson M F. Applications for ROCK kinase inhibition. Curr Opin Cell Biol. 2008;20(2):242-8; Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. Nat Biotechnol. 2007;25(6):681-6; Breitenlechner C, Gassel M, Hidaka H, et al. Protein kinase A in complex with Rho-kinase inhibitors Y-27632, Fasudil, and H-1152P: structural basis of selectivity. Structure. 2003;11(12):1595-607; Lin T, Ambasudhan R, Yuan X, et al. A chemical platform for improved induction of human iPSCs. Nat Methods. 2009;6(11):805-8)。R h o キナーゼ阻害剤に加え、本発明は、R h o キナーゼ阻害剤に代えて関連する経路の阻害剤を使用することを想定する。例えば、同じ経路では、グアニン交換因子 (G E F) は R h o キナーゼの上流である。G E F は R h o キナーゼを活性化する。したがって、r h o キナーゼ阻害剤を使用する代わりに、本発明は G E F 阻害剤を使用することを想定する。r h o キナーゼは G D P に結合された場合、不活性状態にあることから、R A D、G E M 及び R h o E 並びに別の物質等の細胞内に存在する G D P の量を増加する任意の物質を、r h o キナーゼ阻害剤に代えて使用し、幹細胞の成長、生存及び表面への付着を補助することができる (Riento K, Guasch RM, Garg R, Jin B, Ridley AJ (2003) RhoE binds to ROCKI and inhibits downstream signaling. Mol Cell Biol 23: 4219-4229; Komander D, Garg R, Wan PT, Ridley AJ, Barford D (2008) Mechanism of multi-site phosphorylation from a ROCK-I:RhoE complex structure. EMBO J 27: 3175-3185; Ward Y, Yap SF, Ravichandran V, Matsumura F, Ito M, Spinelli B, Kelly K (2002) The GTP binding proteins Gem and Rad are negative regulators of the Rho-Rho kinase pathway. J Cell Biol 157: 291-302)。また、ミオシンも R h o キナーゼと同じ経路にある。ミオシンは、間接的に R h o キナーゼによって活性化され、それ自身が同じ経路の r h o キナーゼの下流である。したがって、本発明の方法により、ミオシン阻害剤もまた r h o キナーゼ阻害剤に代えて幹細胞の生存の補助及び／又は幹細胞の表面への付着の補助に使用することができる。プレビスタチンはミオシン阻害剤であり、本発明の方法により使用される任意の r h o キナーゼ阻害剤に代えて使用することができる (Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, Murakami K, Aramaki T, Nishiyama A, et al. Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 2010; 7:225-39; Ohata H, Ishiguro T, Aihara Y, et al. Induction of the Stem-like Cell Regulator CD44 by Rho Kinase Inhibition Contributes to the Maintenance of Colon Cancer-Initiating Cells. Cancer Res. 2012;72(19):5101-10)。r h o 関連キナーゼ阻害剤の使用に対する他の代替法としては、細胞の遊走の

10

20

30

40

50

増大を生じる任意の標的を活性化又は阻害することである。細胞の遊走を増大する R A C 経路の調節因子の活性化は、P I 3 K、C D C 4 2、P A K、N - W A S P 及び R A C 1、並びに膜状仮足を含む。細胞内でのそれらの発現レベルを亢進する又はそれらの活性を増大する物質を、幹細胞の生存及び表面への付着を亢進するために使用する。R A C 1 G T P アーゼ発現は、幹細胞が解離されるにつれて減少し、逆に R h o 関連キナーゼは増加して細胞遊走の喪失及びアポトーシスをもたらす (Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, et al. Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2010;7(2):225-39.)。したがって、P I 3 k 又は R A C 経路の阻害剤は抑制されるべきであるか、又は R A C 経路の活性化因子は、幹細胞の生存及び M U C 1 * 等の幹細胞表面タンパク質に抗体が結合する抗体コーティング等の表面への付着を亢進するために増加されるべきである。六量体形態の N M E 1 及び N M E 2 (これもおそらくは六量体形態である) は、G E F T i a m 1 及び D b l - 1 に結合して G T P アーゼ R A C 1 及び C D C 4 2 G T P アーゼをそれぞれ阻害する (Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, et al. Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2010;7(2):225-39; Murakami M, Meneses PI, Knight JS, Lan K, Kaul R, Verma SC, Robertson ES. Nm23-H1 modulates the activity of the guanine exchange factor Dbl-1. Int J Cancer. 2008; 123:500-10; Miyamoto M, Iwashita S, Yamaguchi S, Ono Y. Role of nm23 in the regulation of cell shape and migration via Rho family GTPase signals. Mol Cell Biochem. 2009; 329:175-9)。

したがって、N M E 1 六量体及び N M E 2 六量体によって調節される R A C 及び C D C 4 2 の阻害は、細胞遊走を減少させ、幹細胞付着及び生存を制限する。本発明者らは、N M E 7 培地中での培養物中の胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞において N M E 1 及び N M E 2 を抑制し、病的影響がないことを確認した。N M E 6 又は N M E 7 含有培地中で培養された幹細胞及び前駆体細胞における N M E 1 及び N M E 2 の抑制は、幹細胞及び前駆体細胞の生存、及び i n v i t r o 培養用表面への付着の亢進に好ましい方法である。好ましい実施形態では、胚性幹細胞又は i P S 細胞は、N M E 1 及び N M E 2 を抑制するため N M E 7 及び s i R N A を含有する培地中で培養される。好ましい実施形態では、N M E 1 及び N M E 2 を抑制する核酸は、コレステロール部分によって誘導体化されて細胞内へと入ることが可能された s i R N A (Darmicon) である。より好ましい実施形態では、幹細胞を Y 2 7 6 3 2 等の r h o キナーゼ (R O C K 1) 阻害剤と接触させない。

【0163】

或いは、N M E 1、N M E 6 又は N M E 7 を含有する培地中で培養された幹細胞は、懸濁物中で成長される。懸濁物中での細胞の成長に関する多くの技術が当業者に既知である。幹細胞の成長用又は体細胞、皮膚芽細胞若しくは線維芽細胞等のより成熟した細胞における多能性の誘導用の N M E 含有培地と関連して、ウェーブバッグ、ローラーボトル等を使用することができる。好ましい実施形態では、N M E タンパク質は二量体形態の N M E 1 である。より一層好ましい実施形態では、N M E タンパク質は N M E 7 である。

【0164】

N M E 1、N M E 6 又は N M E 7 が添加される培地の特性により、本発明が限定されることを意図するものではない。N M E ファミリータンパク質は、幹細胞若しくは前駆体細胞の成長に好適な任意の培地、又は多能性の誘導に好適な任意の培地に添加され得る。D M E M、D M E M / F 1 2 等の基礎培地、又はノックアウト血清代替物若しくは類似物及び非必須アミノ酸を更に含む類似物が好ましい。好ましい実施形態では、基礎培地は 60 % ~ 80 % の D M E M 様ベース及び 20 % ~ 40 % のノックアウト血清代替物又は類似物、更に濃縮非必須アミノ酸を含有する。他の場合には、基礎培地は D M E M 様ベースに加えてインスリン、セレン及びトランスフェリンを含有する。得られる細胞がヒトにおける用途に運命づけられている場合、タンパク質成分の好ましい種はヒトである。

【0165】

MUC1*成長因子受容体のリガンド、具体的にはNMEファミリータンパク質は、幹細胞及び前駆体細胞の成長及び多能性の維持を促進する。また、培地中のMUC1*リガンドも人工多能性幹(iPS)細胞の作製過程を支持し、より未熟な状態への細胞の復帰の誘導過程を支持する。さらに、MUC1*リガンド自体は、トランスフェリン等の他の因子の不在下でのより未熟な状態への細胞の復帰、又はOCT4、SOX2、KLF4、NANOG若しくはc-Mycを含む多能性遺伝子の形質導入を誘導する。

【0166】

本発明者らは、以前にMUC1*受容体のリガンドが成長因子として機能し得ることを開示した。MUC1*細胞外ドメインを二量体化するリガンドは、MUC1陽性がん細胞の成長、並びにMUC1*を発現する幹細胞及び前駆体細胞の成長をも高めることが示された。本出願は、NME7もまたMUC1*成長因子受容体のリガンドであることを開示する。NME7は幹細胞によって分泌される。他のいかなるサイトカインも欠く基礎培地中のNME7は、胚性幹細胞又は人工多能性幹細胞の成長を完全に支持する。NME7は、NME1二量体に非常によく似た方法で幹細胞の成長を促進し、多能性を維持するように機能する。集団の大部分が二量体として存在するように発現され精製されたNME1は、胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞の成長を完全に支持し、血清又は他のいかなるサイトカインも必要としない。二量体形態のNME1及びNME7もまた、ナイーブ状態又はグラウンド状態の幹細胞よりも更に成熟した状態の細胞において多能性を誘導する。FGF含有培地中のヒト幹細胞の成長が「プライムド」状態の幹細胞を産生するのに対し、NME1二量体又はNME7中のヒト幹細胞の成長は「ナイーブ」状態又は「グラウンド」状態と呼ばれるより初期の状態へのそれらの細胞の復帰を誘導する。最近の研究により、プライムド状態の幹細胞は、ヒト体内において、ナイーブ幹細胞のように全ての細胞型へと発生し得ないという証拠が提供されている。したがって、ナイーブ状態はヒト幹細胞の本来の状態であり、ヒト体内において任意の細胞へと発達し得るのはナイーブ幹細胞であることから、よりナイーブ状態にあるNME1又はNME7中で培養された幹細胞は、ヒトの治療法における用途に理想的に好適である。好ましい実施形態では、NME1又はNME7中で培養された幹細胞は、あらゆるヒト幹細胞療法に使用される。

【0167】

本出願は、規定された異種成分不含培地の成分としてのNM23が、胚性及び人工多能性の両方を含む幹細胞の成長を支持し、更に体細胞、前駆体細胞又は幾分成熟した細胞をリプログラムして多能性幹細胞(iPS細胞とも呼ばれる)とする培地として使用され得ることを開示する。

【0168】

インスリン(好ましくはヒト)、セレン、トランスフェリン、l-アスコルビン酸を含み、NaHCO₃を使用してpHが調整された基礎培地DMEM/F12(又はその類似物)へのNM23の添加は、ビトロネクチンでコーティングされた表面、又は抗MUC1*でコーティングされた表面に細胞を付着させた場合に、ES細胞及びiPS細胞の成長を完全に支持する。Rhokinase阻害剤HA100又はY27632の少なくとも最初の24時間に亘る使用により、幹細胞の表面付着を著しく改善する。二量体として発現及び/又は単離され得るNM23及びNM23バリエーションが特に好ましい。FGF-2又はTGF-β等の他の成長因子は、この培地中のNM23に任意に添加され得る。さらに、性能改善のため低酸素条件下で細胞を成長させてもよい。

【0169】

インスリン(好ましくはヒト)、セレン、トランスフェリン、l-アスコルビン酸を含み、NaHCO₃を使用してpHが調整された基礎培地DMEM/F12(又はその類似物)へのNM23の添加は、ビトロネクチンでコーティングされた表面、抗MUC1*でコーティングされた表面、マドリゲル及び幹細胞が付着する他の表面に細胞を付着させた場合に、ES細胞及びiPS細胞の成長を完全に支持する。Rhokinase阻害剤HA100又はY27632の少なくとも最初の24時間に亘る使用は、幹細胞の表面付着を著しく改善する。任意のRhokinase阻害剤(ROCKi)の添加は細胞の形状及び付着

特性を変化させ、NM23を含有する培地において使用して幹細胞、前駆細胞及び他の非付着性細胞の表面への付着を亢進することができる。rhoキナーゼ阻害剤が存在下において、細胞は、24時間～48時間以内に弱い表面付着を伴う丸みを帯びた形状から多くの表面付着を伴うより扁平な形状へと移行する。以前に、生存を亢進するための幹細胞との併用についてrhoキナーゼ阻害剤の使用が記載されているが、rhoキナーゼ阻害剤はNME系培地において生存を高めるのではない。この理由より、rhoキナーゼ阻害剤は細胞を平坦化し、表面へのより大きな付着を形成するために使用される。

【0170】

bFGF系培地と併用のため、また生存を高めるためのrhoキナーゼ阻害剤の使用が以前にも記載されている。本明細書において、本発明者らは、培地中にNME1、NME6又はNME7が使用される場合に、表面に対する付着を補助するためのrhoキナーゼ阻害剤の使用を記載する。2つのNDPKドメインを有する単量体であるNME7と同様に、二量体として発現及び／又は単離され得る、NM23及びNM23バリエーションが特に好ましい。これらのNDPKドメインは、これまで酵素活性を有することのみが知られていたが、本発明者らは、NDPKドメイン部分がMUC1*細胞外ドメインに結合するモチーフを含有することを発見した。

10

【0171】

図14は、プルダウンアッセイにおいて、ヒト幹細胞由来のNME7がPSMGFRペプチドの配列を有する合成ペプチドに結合したことを示す。本発明者らは、1) NME1二量体（六量体ではない）のみが多能性幹細胞の成長を支持する、2) NME1二量体（六量体ではない）はナノ粒子アッセイにおいて2以上のMUC1*細胞外ドメインペプチドに結合する、及び3) MUC1*の多能性活性及び成長因子受容体活性はその細胞外ドメインのリガンド誘導性二量体化の後に生じることを示し、すなわち、二価の抗MUC1*抗体は結果的に成長因子受容体機能を生じる細胞外ドメインの二量体化であることを示す抗体濃度の関数として釣鐘型の成長曲線をもたらすことを示した。

20

【0172】

また、本発明者らは、NME7が、多能性幹細胞の成長を支持し、分化を阻害するそれらの能力においてNME1二量体と同様に機能することを示した。NME7は、NDPKドメインを介してMUC1*受容体の細胞外ドメインに結合し、多能性のナイーブ幹細胞の成長を促進し、分化を阻害する。具体的には、NME7はMUC1*細胞外ドメインの一部であるPSMGFRペプチドに結合する。

30

【0173】

NME1としても知られるNM23-H1は、二量体形態の場合のみ、幹細胞又は前駆体細胞の成長因子として活性である。NME1は、濃度の関数に応じてその順に、二量体、四量体又は六量体として存在し得る。C末端欠損を伴う又は伴わないS120G又はP96S等の変異は二量体形成を好み、六量体形成に幾分抵抗性であるため、幹細胞又は前駆体細胞の成長因子として好ましい。また、NME6は二量体として存在し、NME1二量体のように多能性の維持及び誘導並びに分化の阻害のための成長因子としての使用に好ましい。NME7は単量体であるが、その2つのNDPKドメインにより二量体のように結合し得る。プルダウンアッセイにおいて、NME7はMUC1*細胞外ドメインペプチドに結合し、少なくとも1つのNDPKドメインの一部がMUC1*受容体に結合し、NME1二量体のように、結果的に分化を阻害しながら多能性の維持又は誘導を生じることを示した。サンドイッチアッセイにおいて、NME7は2つのMUC1*細胞外ドメインペプチド（PSMGFR）に同時に結合することが示され、NME7-ABタンパク質は細胞表面上のMUC1*を二量体化し得ることを示している。また、NME1はMUC1*細胞外ドメインペプチド及び細胞上のMUC1*受容体にも結合する。NME1六量体はMUC1*受容体には結合せず、多能性を維持又は誘導しない。成長、維持、多能性の誘導及び分化の阻害のためNME1二量体、NME6二量体又はNME7を、幹細胞又は前駆体細胞の培養に好適な多くの異なる基礎培地において使用することができる。適合性の基礎培地の組成は変化し得る。場合によっては、他の成長因子又はサイトカインをNM

40

50

Eタンパク質と共に培地に添加してもよい。任意に、FGF-2又はTGF-β等の他の成長因子をこの培地中のNME23に加えてもよい。最も好ましい実施形態では、NME1二量体、NME6二量体又はNME7は他の成長因子又はサイトカインを含有しない基礎培地に添加される。性能改善のため、細胞を低酸素条件下で成長させてもよい。

【0174】

本発明の方法は、遺伝子変異又は遺伝子補正を保有し得る細胞の特定集団の増殖を刺激する成長因子と共に細胞を提供するために作用し得る。1つの実施形態では、NMEファミリータンパク質は細胞内へと導入されるプラスミド内に含有され得る核酸配列にコードされる。NMEファミリータンパク質をコードする核酸配列は、プラスミドの一部であってもよく、又はその発現が望ましい遺伝子の配列も保有する発現ベクターであってもよい。遺伝子は補正された遺伝子であってもよく、発現される遺伝子であってもよい。また、本発明は、成長に最小の溶液のみを必要とすることから、細胞が構成的にそれ自身の成長因子を発現し、培養を単純化するように幹細胞内へとNMEファミリーメンバーをコードする核酸を導入することも想定する。好ましい実施形態では、核酸は、誘導可能な又は制御可能なプロモーターを有し得る発現プラスミドである。好ましい実施形態では、NMEファミリーメンバーはNME1、NME6又はNME7である。より一層好ましい実施形態では、NMEファミリーメンバーはNME7である。最も好ましい実施形態では、NMEファミリーはNME7-ABである。また、本発明は、患者における、患者への移植が運命づけられた細胞における、胚盤胞及び胚における、並びに体外受精に使用され得る受精卵又は未受精卵における、これらの方法の使用も包含する。

【0175】

本発明は、更に、その起源において胚性であっても又はより成熟した細胞から誘導されてもよい、新たな幹細胞株の作製のためのNME系培地の使用を想定する。好ましい実施形態では、NME系培地は組換えNME7を含有する最小培地である。更に好ましくは、NME7-ABを含有する培地である。

【0176】

新たな幹細胞株は以下の通り樹立される：胚盤胞の内部細胞塊（inner mass）からヒト細胞を回収するか、又は胚盤胞全体を使用することができる。胚盤胞の細胞を維持し、NME7を含有する培地中で培養する。好ましい実施形態では、培地は他の成長因子又はサイトカインを含まない。回収された細胞を、線維芽細胞又はMUC1陽性がん細胞であってもよいフィーダー細胞層上、又は抗体層上にプレーティングしてもよい。好ましい実施形態では、抗体は抗MUC1抗体である。より一層好ましくは、N-10 PSMGFRペプチドに結合する抗体である。或いは、細胞はNME7含有培地中の懸濁液中で培養又は維持されてもよい。その後、当業者に既知の様々な技法を使用して、その後にクローニングされて望ましい核型及び望ましい遺伝子発現を有するクローンを得ることが可能な幹細胞を単離することができる。好ましい実施形態では、ナীব状態であってプライム状態ではない指標である遺伝子発現を有し、更にその細胞が雌性である場合にはX染色体の不活性化を経ていないクローンを単離し、増殖させる。典型的な幹細胞導出法では、胚盤胞又は胚盤胞由来の細胞を表面上にプレーティングし、幹細胞を現すブラストの発育が観察されるまでの或る一定期間に亘り培養する。これらを回収し、成長し、望ましい特性を有するクローンを単離し、維持する。多能性マーカー並びにナীবマーカーについて陽性であり、FOXA2、OTX、LHX若しくは時にはXIST等のプライムドマーカーの発現が低い若しくは発現しない、又は核内に凝縮したヒストン-3を欠くクローンを単離するのに標準的なクローニング技法を実施する。NME7を含有する最小培地中でクローンを維持し、増やし、任意に抗MUC1抗体層上で細胞を成長させることによってナীব状態を維持する。代替法では、細胞を懸濁液中で培養する。Rhokinase阻害剤をNME7含有培地に添加してもよい。好ましい実施形態では、培地はFGFを含まない。

【0177】

マウス及びヒトにおいて、体細胞は転写因子の異所性の発現によってリプログラムされ

て多能性となり得ることが実証されている (Lowry et al., 2008; Maherali et al., 2007; Nakagawa et al., 2008; Okita et al., 2007; Park et al., 2008; Takahashi et al., 2006; Takahashi and Yamanaka, 2006; Wernig et al., 2007; Yu et al., 2006)。人工多能性幹 (iPS) 細胞の作出は、患者自身の皮膚細胞由来の幹細胞を使用して疾患又は加齢により生じた損傷を修復する細胞及び組織を作出するために使用され得ることから、真に個別化された再生医学の実現が大いに期待される (Yamanaka, 2007; Jaenish and Young, 2008)。転写因子、Oct 4、Sox 2、Klf 4 及び c-Myc、又は Oct 4、Sox 2、Nanog 及び Lin 28 の組合せの強制発現により、成熟細胞の多能性状態への復帰を引き起こすことが示されている。しかしながら、これらの方法は処理過程を通して FGF 系培地を使用し、これは iPS 作出過程を遅延するか又は改悪する可能性がある。

10

【0178】

既知の技術に対する改良は、以下の通り iPS 細胞株を作出することである：ドナー又は患者に由来し得る体細胞、皮膚芽細胞又は線維芽細胞を、NME ファミリータンパク質を含有する培地中で培養する。好ましい実施形態では、NME ファミリータンパク質は NME 1 二量体、NME 6 又は NME 7 である。より好ましい実施形態では、NME ファミリーメンバーは NME 7 であり、NME 7-AB が特に好ましい。細胞を核酸、小分子又はタンパク質で処理して、細胞内での多能性遺伝子又は多能性タンパク質のレベルを高めることができ、ここで多能性遺伝子又は遺伝子産物は OCT 4、NANOG、KLF 4、c-Myc、LIN 28 及び NME 7 から選択される。好ましい実施形態では、出発細胞を Oct 4、SOX 2 及び Klf 4 で形質移入する。体細胞、皮膚芽細胞、線維芽細胞又は他の細胞である出発細胞を、NME 7 を大体 2 nM ~ 50 nM、より好ましくは 8 nM ~ 16 nM 含有する最小培地中のプラスチックマルチウェルプレート上に最初にプレATINGする。通常通り、培地を 24 時間 ~ 27 時間ごとに交換する。細胞がプラスチックへの接着を失い始めるに従い、不活性化線維芽細胞の表面、不活性化がん細胞又は幹細胞表面タンパク質に対する抗体 (抗 MUC 1 * 抗体が好ましい) によりコーティングされた表面等の細胞が接着する表面へと細胞を移動し得る。NME ファミリーメンバーに加え、rho キナーゼ阻害剤を培地に添加してもよい。およそ 2 週間 ~ 3 週間後、幹様細胞が出現し、単離及びクローニングすることができる。望ましい核型及び遺伝子発現プロファイルを有するクローンを選択し、安定的な自己複製細胞株として増殖させる。好ましい実施形態では、ナイーブであるクローンを選択する。新たな幹細胞株を作出するこれらの方法についてはヒト細胞が好ましい。

20

30

【0179】

本発明の方法が有用である幹細胞又は前駆体細胞の種類により、本発明を限定することを意図するものではない。本質的には MUC 1 の開裂形態 (form)、すなわち MUC 1 * を発現する任意の幹細胞又は前駆体細胞を本発明の培地及び方法と共に使用することができる。

【0180】

FDA の承諾を含む様々な理由により、治療用途に運命づけられたヒト幹細胞の成長については、完全に規定された異種成分不含培地が望ましい。本明細書における実施例及び図面により、NME 1 二量体及び NME 7 は、完全に多能性のナイーブ幹細胞の成長を支持し、分化を阻害することが実証されており、これらの機能は基礎培地の成分と無関係である。実質的には、幹細胞成長に好適な任意の基礎培地で事足りるであろう。他の成長因子又はサイトカインを含有しない基礎培地が好ましい。

40

【0181】

最近、研究者らは、ヒト (human) 幹細胞の成長用の規定された異種成分不含培地である、DMEM / F12、インスリン、セレン、トランスフェリン、レシアスコルビン酸及び pH 調整用 NaHCO₃ に加えて成長因子として bFGF 及び TGF-β を含む E8 と呼ばれる基礎培地を報告した (Chen G, Gulbranson D, Hou Z et al, "Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture" Natur

50

e Methods, Vol. 8, No. 5, 2011 pgs 424-431)。bFGF及びTGF- β を欠くがNME1二量体若しくはNME6二量体又はNME7を含み、本発明者らが「MN6」と呼ぶこの基礎培地は、iPS作出の間、完全にヒト及びマウス多能性幹細胞の成長を支持し、分化を阻害し、また多能性の誘導を支持することが示された。基礎培地及び非必須アミノ酸のみであるMN2培地（実施例1を参照）中のNME1二量体若しくはNME6二量体、又はNME7は、多能性幹細胞の成長を或る程度支持した。これらの知見より、NME1二量体及びNME7はヒト幹細胞の天然の成長因子であり、幹細胞又は前駆体細胞の成長に好適な様々な培地に使用され得るという事実が強調される。E8培地と同様、NME1二量体及びNME7との併用に好適な培地には、DME/F12又はDME/F12/Glutamax I等の基礎培地、L-アスコルビン酸、セレン酸ナトリウム、インスリン、トランスフェリン及び重炭酸ナトリウム等のpH調整剤が含まれる。本発明の別の態様では、NME1二量体又はNME7が添加される基礎培地には、DME/F12/Glutamax I、ノックアウト血清代替物（LifeTechnologies/Invitrogen）等の血清代替物、非必須アミノ酸溶液（LifeTechnologies/Invitrogen）等のアミノ酸、及び任意にベーターメルカプトエタノールが含まれる。これらの各基礎培地に由来する成分を含有する培地も想定される。実際、幹細胞又は前駆体細胞の成長に好適な任意の基礎培地を、幹細胞又は前駆体細胞の成長のため、プライムド状態への分化をも阻害するため、またより成熟した細胞（体細胞、皮膚芽細胞、線維芽細胞又は前駆体細胞であってもよい）における多能性の誘導のためNME1二量体及びNME7と共に使用することができる。

10

20

【0182】

様々な培地が、NME1二量体又はNME7と混合された場合に、幹細胞の成長及び分化の阻害を支持した。NME1二量体、NME6二量体又はNME7の濃度は変化し得る。1つの態様では、NME濃度は1nM～100nM（単量体の分子量ベース）。好ましい実施形態では、NME1二量体、NME6二量体又はNME7の濃度は、2nM～64nMである。より一層好ましい実施形態では、NME1二量体、NME6二量体又はNME7の濃度は4nM～32nMである。

【0183】

NME1二量体又はNME7と8nM～16nMで混合された場合にヒト幹細胞の成長及びマウス幹細胞の成長を完全に支持し、ヒトプライムド幹細胞をナイーブ状態へと復帰させた最小培地「MM」と呼ばれる1つの培地には、

30

DME/F12/Glutamax I（Invitrogen# 10565-018）400ml、

ノックアウト血清代替物（KO-SR、Invitrogen# 10828-028）100ml、

100×MEM非必須アミノ酸溶液（Invitrogen# 11140-050）5ml、及び、

β -メルカプトエタノール（55mMストック、Invitrogen# 21985-023）0.9ml（0.1mM）、

が含まれた。

40

【0184】

NME1二量体又はNME7が8nM～16nMで添加された場合に同様に働く別の培地は「MN6」であり、

DME/F12、

L-アスコルビン酸64mg/L、

セレン酸ナトリウム14ug/L、

インスリン19.4mg/L、

重炭酸ナトリウム543mg/L、及び、

トランスフェリン10.7mg/L、

を含んだ。

50

【0185】

8 nM～16 nMで添加されたNME1二量体又はNME7により試験された別の培地は「MN2」であり、

DME/F12/Glutamax I (Invitrogen#10565-018) 400 ml、及び、

100×MEM非必須アミノ酸溶液 (Invitrogen#11140-050) 5 ml、を含んだ。

【0186】

「MM」又は「MN6」中のNME1二量体及びNME7は、FGF含有培地「E8」又はmTeSRと同等又はより良好にヒト幹細胞の成長を支持する。図1～図10に示される実験をビトロネクチンの層上に幹細胞をプレーティングすることにより実施したのに対し、図11及び図12の実験を抗MUC1*抗体の層上に幹細胞をプレーティングすることにより実施した。任意の最小培地又は規定培地中のNME1二量体又はNME7は、多能性を促進し、分化を阻害する。幹細胞の成長に好適な任意の表面又は基礎培地は、NME1、NME6又はNME7における成長と適合するものであった。本発明の方法は、胚性幹細胞による使用に限定されない。NME1二量体又はNME7は、マウスES細胞及びiPS細胞と同様に、ヒトES細胞及びiPS細胞の成長も完全に支持した。さらに、NME1二量体又はNME7は、体細胞における多能性の誘導を支持し、実際にiPS作出の効率を高めた。

【0187】

ES細胞及びiPS細胞の成長及び維持のためのこの規定異種成分不含培地においてNM23を使用することに加え、前駆体細胞又は皮膚芽細胞等の成熟体細胞由来のiPS細胞を作製する過程においても使用した。

【0188】

細胞培養培地

MUC1*リガンドが培地に添加されるか、又は細胞により発現されるかのいずれかである限り、任意の細胞培養物を使用してもよい。具体的には、培地に添加されるか、細胞により発現されるNM23ファミリーのタンパク質等のMUC1*リガンドを含む最小培地が好ましい。DMEM/F12、インスリン（好ましくはヒト）、セレン、トランスフェリン、レーアスコルビン酸のみを含み、NaHCO₃を使用してpHを調整した最小培地を作製し、本発明者らはこの培地を「MN6」と呼んだ（以下の詳細な処方を参照）。DME/F12/Glutamax I (Invitrogen#10565-018) 400 ml及び100×MEM非必須アミノ酸溶液 (Invitrogen#11140-050) 5 mlのみを含む別の最小培地を作製し、本発明者らはこの培地をMN2と呼んだ（以下の詳細な処方を参照）。最小幹細胞培地又は「MM」と呼ばれる別の基礎培地中のNME7、NME6又はNME1 (NM23-S120G) を、MN2培地並びにノックアウト血清代替物 (KO-SR、Invitrogen#10828-028) 100 ml及びβ-メルカプトエタノール (55 mMストック、Invitrogen#21985-023) 0.9 ml (0.1 mM) に含めた。これら3つの基礎培地にNME7、NME6又はNME1 (NM23-S120G) 8 nM～16 nMを添加した（ここで、NME1はリフォールディングされ、この集団が本質的に全て二量体であるように精製された）。場合によっては、Y27632等のRhoキナーゼ阻害剤 (ROCKi) を添加した。これらの培地のいずれかにおけるNME1、NME6又はNME7の存在が多能性幹細胞の成長を促進し、分化を阻害する。

【0189】

Y27632を含む／含まない、以前に報告されているFGF-2及びTGF-βを含むMN6の培地「E8」 (G. Chen, D. R. Gulbranson, Z. Hou et al., Nat Methods 8 (5), 424 (2011)) をNME系培地と比較した。さらに、別のコントロールとして、50%MEFを含むFGF-2 (bFGFとも呼ばれる) 馴化培地を培地として使用した。

10

20

30

40

50

【0190】

本発明は、本明細書に記載される具体的な実施形態による範囲に限定されない。実際、本明細書に記載される実施形態に加えて本発明の様々な修飾形態が、上記説明及び付随する図面より当業者に明らかとなるであろう。かかる修飾形態は添付の特許請求の範囲内となることが意図される。以下の実施例は、本発明を例示する目的で提示されるものであって、本発明を限定する目的で提示されるものではない。

【実施例】

【0191】

実施例1－培地

実施例1．1－最小幹細胞培地（「MM」）の成分（500ml）

DME／F12／GlutaMAX I（Invitrogen# 10565－018）400ml

ノックアウト血清代替物（KO－SR、Invitrogen# 10828－028）100ml

100×MEM非必須アミノ酸溶液（Invitrogen# 11140－050）5ml

β－メルカプトエタノール（55mMストック、Invitrogen# 21985－023）0.9ml（0.1mM）

【0192】

実施例1．2－E8培地の成分

DMEM／F12

Ｌ－アスコルビン酸64mg／L

セレン酸ナトリウム14ug／L

インスリン19.4mg／L

重炭酸ナトリウム543mg／L

トランスフェリン10.7mg／L

TGFβ1 2ug／L

FGF2 100ug／L

【0193】

実施例1．3－MN7の成分はE8培地からbFGFを除いたものである。

【0194】

実施例1．4－MN6培地の成分

DMEM／F12

Ｌ－アスコルビン酸64mg／L

セレン酸ナトリウム14ug／L

インスリン19.4mg／L

重炭酸ナトリウム543mg／L

トランスフェリン10.7mg／L

【0195】

実施例1．5－MN2培地の成分

DME／F12／GlutaMAX I（Invitrogen# 10565－018）400ml

100×MEM非必須アミノ酸溶液（Invitrogen# 11140－050）5ml

【0196】

実施例1～実施例3及び図1～図14は70124によるものである。

【0197】

実施例1．6

ヒトES細胞（H9）を6ウェル細胞培養プレート上のビトロネクチン層、又は抗MUC1＊抗体（MN－C3）層のいずれかの上にプレーティングした。各条件について、Rhokinase阻害剤Y27632が存在するか、又は不在であった。少なくとも最初の24時間でのRhokinase阻害剤の存在が、細胞付着及び性能を改善したが、未分化幹細胞

10

20

30

40

50

胞の成長には必ずしも必須ではなかった。

【0198】

結果より、二量体形態のNM23は、コントロールと同様、またFGF-2及びTGF- β の組合せと同様か又はより良好に、6成分規定の異種成分不含培地における多能性幹細胞の成長を完全に支持した。図1～図10はプレーティング後4日目の培養物中の幹細胞の写真画像である。

【0199】

図11及び図12は、抗MUC1*抗体(MN-C3)層上にプレーティングされたヒトES細胞(H9)を示す。起源細胞を標準プロトコルに従ってbFGF4ng/mLにてマウスフィーダー細胞(MEF)上で55継代に亘り予め培養した。図11はプレーティング後4日目(D4)における抗MUC1*抗体表面上への第1継代(P1)の幹細胞を示し、A、Cは最小幹細胞培地「MM」中でNM23二量体8nMにて培養され、B、DはMN6完全規定異種成分不含培地中でNM23二量体8nMにて培養された。明らかなように、異なる基礎培地に基づいて得られた幹細胞の培養密度又は多能性には何らの相違もない。図12は、プレーティング後2日目(D2)における2継代(P2)後の同じ起源細胞を示し、A、CはmTESR培地中で培養され、B、Dは二量体NM23を8nM含むMN6培地中で培養された。明らかなように、MN6培地中のNM23は、異なる基礎培地に基づいて得られた幹細胞の培養密度及び多能性に関してmTESRと同様か又はより良好に働いた。各継代について最初の48時間のみ、全ての培地を10uMのRhokinase阻害剤Y27632で補填した。図13は、抗MUC1*抗体表面上又はビトロネクチン上での同じ細胞であるが異なる培地中で培養された成長率を比較する。

【0200】

リフォールディングされ、二量体として精製されたNM23-S120Gに加え、G4S1を二回反復するフレキシブルリンカーにより連結された2つのNM23単量体サブユニットを含む1本鎖NM23コンストラクト(NM23-GS2)、及びより長いリンカーにより連結された2つのNM23単量体を含む1本鎖NM23コンストラクト(NM23-X4)を、天然に二量体化されたNM23-S120Gと同様に検査し実施した。

【0201】

実施例2-FGFの不在下でNME系培地を使用する多能性の誘導

従来使用されている標準プロトコルは、まずプラスチック上に皮膚芽細胞又は線維芽細胞(ヒト包皮線維芽細胞-新生児、「hFFn」:#PC501A-hFF、System Biosciences、マウンテンビュー、カナダ)をプレーティングし、線維芽細胞培地(FM)中で培養し、24時間ごとに交換する。5日後、細胞を不活性化線維芽細胞フィーダー細胞(マウス(MEF)又はヒト(HS27)であってもよい)でコーティングされた表面に移す。次の2日間に亘り、細胞をFM中で保持する。7日目、培地をbFGF系培地に交換し、培地を24時間ごとに交換する。最初のプレーティングから約2週間～4週間後、胚性幹(ES)細胞様形態を有するコロニー(クローン)を選択し、不活性化フィーダー細胞(MEF又はHS27)でコーティングされた新しいウェルに個別にプレーティングし、3日～4日ごとに順次継代する。ES様細胞として成長を続けるウェルを増やし、多能性マーカーの存在を試験する。

【0202】

従来使用されている標準プロトコルに反し、本発明者らは、常にNME培地(NME1二量体:「NM23-MM-A」)中で体細胞を培養した。さらに、本発明者らは、線維芽細胞フィーダー細胞層上、又は抗MUC1*抗体(N-10 PSMGFRペプチドを認識するC3又はC8)層上に細胞をプレーティングした。RT-PCR測定を行って、4日目(図31A)又は20日目(図31B)まで、様々な条件下で発現されたOct4の量を定量した。4日目までにOct4の発現レベルによって測定される多能性の誘導をもたらした唯一の条件は、OCT4、SOX2及びKLF4(「OSK」)(c-Mycなし)で形質移入され、最小培地(「MM」)中のNME1二量体において培養された線維芽細胞に対するものであった。これらの細胞について、Oct4は出発細胞よりも11

9倍大きく、線維芽細胞培地中で代わりに培養された同一の細胞よりも200倍近く大きかった。20日目までに3つの遺伝子OSKのみにより形質移入され、NM23-MM-A中で培養された細胞は、コントロールよりも109倍大きくOct4を発現した。OSKMにより形質移入され、常にNM23-MM中で培養された細胞は、線維芽細胞(FM)中からbFGF培地(標準)中へと切り替えられて培養された同一の細胞よりもOct4発現が3倍大きい一方で、FM中の後にNM23-MM中へと切り替えられて培養された細胞は、FM中の後にbFGF-M中で培養された細胞よりもOct4発現が1.3倍大きいに過ぎなかった(図31C)。多能性マーカーTra1-60に対する20日目の細胞の免疫細胞化学染色により、NME系培地を使用した細胞における多能性誘導の主な利点が見られる。OCT4、SOX2及びKLF4により形質移入され、FGFが添加されていない最小培地中のNME1二量体において培養された細胞は、4つ全ての多能性遺伝子OCT4、SOX2、KLF4及びc-Mycにより形質移入され、FGF培地中で標準プロトコルに従って培養されたもの(図31D、図31E)と比較して、多能性の誘導効率が大きい高められていた(図31F、図31G)。3つの多能性遺伝子OCT4、SOX2及びKLF4により形質移入された細胞は、検出可能な多能性マーカーを有さず、幹様形態を欠いていた。

10

【0203】

実施例3

この一連の実験において、本発明者らは、幹細胞及びがん細胞におけるNME6及びNME7の発現をプローブした。さらに、本発明者らは、NME7の標的としてMUC1*を同定した。本発明者らは、まず細胞溶解物に対してウェスタンブロット分析を行い、NME1及びNME7の存在又は不在を判定した。図14Aでは、抗MUC1*抗体でコーティングされた表面上においてNME1二量体中で培養された(レーン1)、若しくはMEF上においてbFGF中で培養された(レーン2)BGO1vヒト胚性幹細胞に由来する溶解物、又はT47Dヒト乳がん細胞溶解物(レーン3)、又は陽性コントロールとしてのNME1-wtをSDS-PAGEにより分離し、その後抗NME1特異的抗体によりプローブした。結果は、NME1が、NME1二量体中又はbFGF中のいずれで培養されるかにかかわらず、ヒトES細胞、及びT47Dがん細胞において強く発現されることを示す。図14Bにおいて、同じ細胞溶解物をSDS-PAGEにより分離し、その後抗NME7特異的抗体によってプローブした。結果は、NME7は、抗MUC1*抗体表面上においてNME1二量体中で培養されたヒトES細胞において強く発現され(レーン1)、MEF上においてbFGF中で培養された同じES細胞において弱く発現され(レーン2)、乳がん細胞において強く発現された(レーン3)ことを示す。NME1が添加されたレーン4はブランクであり、NME7抗体がNME1と交差反応をしないことを示している。NME1二量体中で培養された幹細胞においてNME7がより大きく発現されるという事実は、本発明者らがbFGF中で培養された細胞よりも更にナイーブ状態にあることを示す発現マーカーを示しており、プライムド細胞におけるその発現と比較してナイーブ細胞においてNME7がより高いレベルで発現されることを意味する。

20

30

【0204】

NME7がその標的受容体としてのMUC1*と共に成長因子として機能するかどうかを判定するため、本発明者らはプルダウンアッセイを行った。これらの実験では、合成MUC1*細胞外ドメインペプチド(ヒスチジンでタグ付けされたPSMGFR配列)をNTA-Ni磁気ビーズ上に固定化した。これらのビーズを、抗MUC1*抗体でコーティングされた表面上においてNME1二量体中で培養された(レーン1)、若しくはMEF上においてbFGF中で培養された(レーン2)BGO1vヒト胚性幹細胞の細胞溶解物、又はT47Dヒト乳がん細胞溶解物(レーン3)と共にインキュベートした。ビーズをすすぎ、イミダゾールの添加により捕捉されたタンパク質を解放した。タンパク質をSDS-PAGEにより分離し、その後、抗NME1抗体(図14C)又はNME7抗体(図14D)のいずれかによりプローブした。結果は、NME7がMUC1*細胞外ドメインペプチドに結合することを示す。これは、幹細胞及びがん細胞において、NME7はその

40

50

2つのNDPKドメイン部分を介して、MUC1*細胞外ドメインを二量体化することによって多能性経路を活性化することを意味する。

【0205】

実施例4－タンパク質コンストラクトの作出

実施例4.1－NM23－WT

NM23wtを以下のプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により増幅した。

フォワード5'-atcgatcatatggccaactgtgagcggtacctt-3'（配列番号86）

リバース5'-gtgggtgctcgagttcatagatccagttctga-3'（配列番号87）

【0206】

その後、フラグメントを精製し、消化し（NdeI及びXhoI）、発現ベクターpET21bのNdeI及びXhoI制限酵素部位の間にクローニングした。

【0207】

実施例4.2－NM23－S120G

GeneTailor（商標）部位特異的突然変異誘発システム（Life Technologies）を使用し、製造業者の指示書に従って以下のプライマー：5'-gcaggaacattatacatggcggtgattctg-3'（配列番号88）及び5'-gccatgtataatgttcctgccaacttgat-3'（配列番号89）を使用してNM23－H1変異体S120G（第120セリンがグリシンに変異）を作製した。図16は、リフォールディングされていないS120G変異体及びリフォールディングされたS120Gと野生型タンパク質の多量体化状態とを比較するFPLCトレースのオーバーレイを示す。図17～図19は、二量体形態のタンパク質のみがMUC1*（六量体ではない）に結合し、二量体のみが多能性幹細胞の成長を支持し得ることを示す。図21は、発現されリフォールディングされたタンパク質に関する非還元SDS-PAGEによる特性評価及び対応するFPLCトレース、並びにヒト幹細胞の写真を示し、多能性幹細胞の成長を支持するNM23－S120Gの能力を示している。

【0208】

実施例4.3－NM23 P96Sコンストラクト及び欠失コンストラクト

本発明者らは、QuickChange部位特異的突然変異誘発キット（Agilent）を使用し、製造業者の指示書に従って以下のプライマー：5'-tcggggagaccaactctgcagactccaag-3'（配列番号90）及び5'-cttgagagctgcagagttggtctccccga-3'（配列番号91）を使用してNM23－H1変異体P96S（第96プロリンがセリンに変異）を作出した。PCR反応に使用したテンプレートは、NdeI及びXhoI制限酵素部位間にクローニングされたNM23野生型であった。配列確認の後、欠失コンストラクトをPCRにより作出した。NM23 P96S ΔC1を以下のプライマー：5'-atcgatcatatggccaactgtgagcggtaccttc-3'（配列番号92）及び5'-gtgggtgaccggtatagatccagttctgagcaca-3'（配列番号93）を使用して増幅した。NM23 P96S ΔC2を以下のプライマー：5'-atcgatcatatggccaactgtgagcggtaccttc-3'（配列番号94）及び5'-gtgggtgaccggtgatccagttctgagcacagct-3'（配列番号95）を使用して増幅した。NM23 P96S ΔC6を以下のプライマー：5'-atcgatcatatggccaactgtgagcggtaccttc-3'（配列番号96）及び5'-gtgggtgaccggtgacacagctcgtgtaattctacca-3'（配列番号97）を使用して増幅した。得られたフラグメントを精製し、消化し（NdeI、AgeI）、発現ベクターpET21bのNdeI及びAgeI制限酵素部位の間にクローニングした。オーバーラップPCR法を使用してXhoI制限酵素部位をAgeIで置換することによって予めpET21bを修飾した。NM23－P96SをNdeI及びXhoI間にクローニングした場合に最適な二量体形成を観察した。全ての欠失変異体について、NdeI及びAgeI間にクローニングした場合に最適な二量体形成を観察した。図20は、多能性幹細胞の成長を支持するそれらの能力を示す。

【0209】

実施例5－変異体及びバリエーションNME1種の発現及びリフォールディング

実施例5.1－タンパク質発現及び任意のリフォールディング／精製

10

20

30

40

50

LBブロス（ルリアベルターニブロス）を1／10の終夜培養物と共に接種し、37℃にてOD600が約0.5に達するまで培養した。この時点で、イソプロピル-β-D-チオガラクトシド（IPTG、GoldBiotechnology）0.4mMにより組換えタンパク質発現を誘導し、5時間後に培養を停止した。遠心分離（6000rpmで4℃にて10分間）により細胞を回収した後、細胞ペレットをランニングバッファー：PBS（pH7.4）、NaCl 360mM、及びイミダゾール80mMで再懸濁した。その後、リゾチーム（1mg/mL、Sigma）、MgCl₂（0.5mM）及びDNase（0.5ug/mL、Sigma）を添加した。37℃にて30分間、細胞懸濁物を回転プラットフォーム（275rpm）上でインキュベートし、5分間氷上で超音波処理した。不溶性細胞片を遠心分離（20000rpmで4℃にて30分間）により除去した。その後、清澄な溶解物をランニングバッファーで平衡化したNi-NTAカラム（Qiagen）に加えた。イミダゾール420mMで補填されたランニングバッファー（6CV）でカラムからタンパク質を溶出する前に、カラムを洗浄した（8CV）。

10

【0210】

実施例5. 2-後のリフォールディングのための任意のタンパク質変性

タンパク質変性のため、溶出画分をプールし、1容量のTris（pH8.0）100mM及び尿素8Mを添加することによって変性し、この溶液を半分まで濃縮し、更に1容量のTris（pH8.0）100mM及び尿素8Mを添加した。このサイクルを、最終尿素濃度が約7Mとなるまで繰り返した。その後、タンパク質を透析によってリフォールディングした。

20

【0211】

実施例6-異種間機能（Cross species function）

NM23は、多能性コロニー形態を有するマウスES細胞の増殖を支持する。

【0212】

マウスES細胞（129/S6、EMD Millipore、ビルリカ、マサチューセッツ州）を不活性化MEFフィーダー細胞層上において組換えmLIF（EMD Millipore）1000U/mL（a、c）又はNM23-S120G-RS 16nM（b、d）のいずれかで補填されたマウスES細胞最小培地（mESC-MM）中で2日間培養し、位相差照射（phase-contrast illumination）下にて低倍率で写真撮影した。サイズバーは500ミクロンを示す。いずれの場合も、1日目において単一細胞及び少数の細胞のみからなるコロニーは、多能性マウスES細胞に特有の明るい、明確な縁を有するより大きな多細胞の楕円形コロニーを生じさせる。mESC-MMは、ノックアウトD-MEM基礎培地、15%ノックアウト血清代替物、1×GlutaMAX I、1×OptiMEM非必須アミノ酸、B-ME 0.1mM（Life Technologies、カールズバッド、カリフォルニア州）及び1×ペニシリン/ストレプトマイシン（Lonza、アレンデル、ニュージャージー州）からなる。

30

【0213】

結果は図22に示され、マウス幹細胞は、成長因子としてマウスLIFを含むマウス幹細胞培地の場合と同様に、NM23（ヒト）においても同じく良好に成長することを実証している。したがって、本明細書に記載されるNM23バリエントをマウス細胞系において使用することができ、またマウスNM23及びNM23バリエントをヒト細胞系において使用することもできる。

40

【0214】

実施例7

ヒト幹細胞がNME1（H1）及びNME2（H2）に加えてNME6又はNME7を発現するか否かを判定するため、本発明者らは様々なヒト幹細胞株に由来する溶解物及び上清に対してウェスタンブロット分析を行った。ヒト胚性幹細胞株BGO1v細胞を、a）抗MUC1*モノクローナル抗体MN-C3によりコーティングされた細胞培養プレート上の二量体形態のみのNM23-S120G、又はb）マウスフィーダー細胞（MEF）上の4ng/mLのbFGFのいずれかにおいて培養した。培養3日後、幹細胞を回収

50

して溶解し、その後NME 1、NME 6及びNME 7の存在をプローブするための抗体を使用してウェスタンブロットにより分析した。比較のため、T47D MUC 1*陽性乳がん細胞について並行して同じ分析を行った。コントロールとして、組換えNM23-H1野生型(NM23-wt)タンパク質をゲルにロードし、これも3つの異なるNMEを認識する抗体によりプローブした。留意すべきは、NM23-S120G二量体及び野生型六量体の見かけの分子量がいずれも単量体の重量として現れるように、ゲルは変性ゲルであるということである。ゲルをプローブするために使用された抗体は、NME 1に対してnm23-H1(C-20)、NME 6に対してnm23-H6(C-17)、及びNME 7に対してnm23-H7(B9)であった(いずれもSanta Cruz Biotechnology, Incより購入)。

10

【0215】

図23は、6つのウェスタンブロットゲルの写真を示す。第I部、A～Cはゲル電気泳動により細胞溶解物が分離され、その後A) NME 1、B) NME 6及びC) NME 7に対する抗体でプローブされたウェスタンブロットを示す。各欄において、レーン1は、抗MUC 1*モノクローナル抗体MN-C3でコーティングされた細胞培養プレート上においてNM23-S120G(二量体形態)中で培養されたBGO1v幹細胞に対応する。レーン2は、MEF上においてbFGF中で培養されたBGO1v幹細胞に対応する。レーン3は、T47D乳がん細胞に対応する。レーン4は、精製された組換えNM23-H1野生型(NM23-wt)に対応する。

【0216】

図23(A)は、抗MUC 1*抗体表面上において二量体形態のNM23中で培養されるか(レーン1)、又はマウスフィーダー細胞(MEF)表面上においてbFGF中で培養されるか(レーン2)にかかわらず、NME 1がBGO1vヒト胚性幹細胞に存在することを示している。また、NME 1はヒト乳がん細胞にも存在する(レーン3)。そして、陽性コントロールであるレーン4によれば、使用された抗体は、実際にNME 1精製タンパク質を認識することが示されている。

20

【0217】

図23(B)は、これらの抗体を使用して試験されたどの試料にもNME 6が存在しないことを示している。

【0218】

図23(C)は、抗MUC 1*表面上においてNM23(二量体)中で培養された場合(レーン1)、NME 7はヒト幹細胞において強く発現されるが、MEFフィーダー細胞上においてbFGF中で培養された幹細胞(レーン2)においては弱く発現されるに過ぎないことを示している。また、NME 7はヒト乳がん細胞において強く発現されるが(レーン3)、H1アイソフォームに特異的とされているC-20抗体によって認識されない。

30

【0219】

この実験の結論の1つは、NME 7がよりナイーブな幹細胞で発現されるNM23のより初期の形態であるということである。本発明者らは、二量体形態のNM23が、しばしばナイーブ状態と呼ばれる、より多能性の状態へと幹細胞の復帰を誘導することを既に示している。本発明者ら及び他者が行った実験により、bFGF中での幹細胞の培養又はマウス線維芽細胞フィーダー細胞(MEF)層上での幹細胞の培養は幹細胞を「プライムド」状態と呼ばれるより多能性の低い状態にするか、又は維持することが示された。図23(C)を参照すれば、これらのプライムド幹細胞はより低くNME 7を発現し、NME 7がよりナイーブな、したがって真に多能性の幹細胞状態と関連するという見解と一致する。ナイーブ状態のヒト幹細胞がより良好に機能的な成体細胞へと分化し得ることが予想されることから、ナイーブ幹細胞は研究及び治療用途に望ましい細胞である。したがって、NME 7の発現誘導を含む戦略は、治療用途の細胞を得るために望ましい。逆に、がんにおいてNME 7の発現を低減する戦略は、抗がん療法となる。

40

【0220】

50

図 2 3 (D ~ F) は、どの NME が MUC 1 * 細胞外ドメインペプチドに結合したのかを判定するためのプルダウンアッセイのウェスタンブロットの写真を示す。ここで、ヒスチジンでタグ付けされた MUC 1 * 細胞外ドメインペプチド (GTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA-HHHHHH (配列番号 98)) を NTA-Ni アガロースビーズに付着し、その後、図 2 3 の第 I 部と同じように細胞溶解液と共にインキュベートした。4℃での 1 時間のインキュベーションの後、ビーズを 15000 RPM で 5 分間遠心分離した。上清を捨て、ビーズを PBS で洗浄して非特異的結合により結合した種を除去した。イミダゾールを添加してビーズから複合体を解放した。遠心分離の後、上清をゲル電気泳動により分離し、図 2 3 第 I 部のように NME 1 (D)、NME 6 (E) 及び NME 7 (F) に対する抗体で分析した。図 2 3 (D) は、NM 23 (二量体) 中 (レーン 1) 又は bFGF 中 (レーン 2) のいずれで培養されたかにかかわらず、以前本発明者らが示したように、幹細胞中の NME 1 は MUC 1 * 細胞外ドメインペプチドに結合することを示す。レーン 3 は、乳がん細胞溶解物中の NME 1 も MUC 1 * 細胞外ドメインペプチドに結合することを示し、レーン 4 は C-20 NME 1 特異的抗体が精製された組換え野生型 NME 1 に結合することを示す。E) このゲルは、図 2 3 の第 I 部においてはこれらの細胞溶解物中になくことが示された NME 6 が、ここでも MUC 1 * ペプチドによってプルダウンされなかったことを示す。重要なことに、図 2 3 (F) は、NME 7 は MUC 1 * 細胞外ドメインペプチドに結合することを示している。NM 23 二量体中及び MUC 1 * 抗体表面上で培養された幹細胞由来の NME 7 は、MEF 上において bFGF 中で培養された幹細胞よりも多量の NME 7 を発現した。図 2 3 の第 I 部と一致して、NME 7 は MUC 1 * ペプチドに結合し、その相互作用によってアッセイにおいてプルダウンされたことが示された (レーン 1)。しかしながら、NME 7 はレーン 2 には現れず、これは bFGF 中で培養された細胞における発現の減少による可能性がある。レーン 3 は、乳がん細胞において発現された NME 7 が MUC 1 * に結合することを示し、レーン 4 は、NME 7 抗体が NME 1 アイソタイプを認識しないことからタンパク質を示さない。NME 7 は 2 つの MUC 1 * ペプチドに結合して細胞上の MUC 1 * 受容体を二量体化し、それにより多能性を刺激、成長し、分化を阻害する可能性がある。

10

20

【0221】

実施例 8

ヒト幹細胞株 BGO1v 細胞及び HES-3 細胞のウェスタンブロット分析は、NME 7 に特異的であるとされている NME 抗体は、NME 7 (Santa Cruz Biotechnology, Inc による nm23-H7 B9) 及び NME 6 (Abnova による抗 NME 6) と同じ分子量である別の種を認識したことを示す (図 2 4)。

30

【0222】

実施例 9

組換え NME 7 の作出 - 第 1 コンストラクトを作製して、効率的に可溶性形態で発現され得る組換え NME 7 を作製した。最初のアプローチは、天然 NME 7 (-1)、又は N 末端欠損を有する選択的スプライシングバリエーション NME 7 (-2) をコードするコンストラクトを作製することであった。場合によってコンストラクトは、精製を補助するためにヒスチジンタグ又は strep タグを有した。NME 7-1 は大腸菌中での発現が乏しく (図 2 5 A、図 2 5. 1 A、図 2 5. 2 A)、NME 7-2 は大腸菌において全く発現しなかった (図 2 5 B、図 2 5. 1 B、図 2 5. 2 B)。しかしながら、標的配列が欠失した新規なコンストラクトを作製し、NME 7 は算出された分子量 31 kDa を有する NDPK A ドメイン及び B ドメインを本質的に含んでいた。この新規な NME 7-AB は大腸菌において非常に良好に発現し、可溶性タンパク質として存在した (図 2 6 A)。単一の NDPK ドメインが発現されるコンストラクト NME-A は、大腸菌において発現しなかった (図 2 6 B)。NME 7-AB を NTA-Ni カラム上で最初に精製し (図 2 7 A)、その後、Sephadex 200 カラム上でのサイズ排除クロマトグラフィー (FPLC) によって更に精製した (図 2 7 B)。その後、精製された NME 7-AB タンパク質を、幹細胞の多能性の促進能力及び分化阻害能力について試験した。

40

50

【0223】

実施例10

多能性を維持し、分化を阻害する能力に関する組換えNME7の試験。NME7の可溶性バリエーションNME7-ABを作出し、実施例9に記載されるように精製した。ヒト幹細胞(iPS cat# SC101a-1, System Biosciences)を、製造業者の指示書によりマウス線維芽細胞フィーダー細胞層上においてbFGF 4 ng/mL中で4継代に亘って成長した。その後、12.5 µg/ウェルのモノクローナル抗MUC1*抗体MN-C3でコーティングされた6ウェル細胞培養プレート(Vita (商標)、Thermo Fisher)へとこれらの起源幹細胞をプレーティングした。細胞を、1ウェル当たり30000細胞の密度でプレーティングした。基礎培地は、DME/F12/Glutamax I (Invitrogen# 10565-018) 400 mL、ノックアウト血清代替物(KO-SR、Invitrogen# 10828-028) 100 mL、100×MEM非必須アミノ酸溶液(Invitrogen# 11140-050) 5 mL及びβ-メルカプトエタノール(55 mMストック、Invitrogen# 21985-023) 0.9 mL (0.1 mM) からなる最小幹細胞培地であった。基礎培地は任意の培地であってもよい。好ましい実施形態では、基礎培地は他の成長因子及びサイトカインを含まない。基礎培地にリフォールディングされ安定な二量体として精製されたNME7-AB 8 nM又はNM23-H1 8 nMのいずれかを添加した。培地を48時間毎に交換し、加速された成長のため、プレーティング後3日目に回収して継代しなければならなかった。図27~図30は、NM23-H1二量体中での成長とNME7単量体中での成長との毎日の比較を記録する。NME7及びNM23-H1 (NME1) 二量体は両方とも多能性を伴って成長し、100%コンフルエントの時であっても分化しなかった。写真から明らかなように、NME7細胞は、NM23-H1二量体中で成長された細胞よりも早く成長した。最初の回収での細胞数により、NME7中での培養がNM23-H1二量体中での培養よりも1.4倍多い細胞を産生したことが確認された。

10

20

【0224】

実施例11

以下の新規なNME6バリエーション及びNME7バリエーションを設計し、作出した。

【0225】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNM23-H7-2配列：

30

(DNA)

```
atgcatgacgttaaaaatcacccgtacctttctgaaacgcacgaaatatgataatctgcatctggaagac
ctgtttattggcaacaaagtcaatgtgttctctcgtcagctggtgctgatcgattatggcgaccagtaca
ccgcgcgtcaactgggtagtcgaaagaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaa
agctggcgaaattatcgaaattatcaacaaagcgggtttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgc
tgagccgtaaagaagccctggattttcatgtcgaccaccagctctcgcccggttttcaatgaactgattc
aattcatcaccacgggtccgattatcgcaatggaaattctgctgatgacgctatctgcgaatggaaac
gcctgctgggcccggcaaacctcaggtgttgccgcgtaccgatgccagtgaaatccattcgcgctctgttt
ggcaccgatgggtatccgtaatgcagcacatgggtccggactcattcgcatcggcagctcgtgaaatgga
actgtttttcccgagctctggcggttgccggcgaacaccgcaaatattaccaattgtacgtgctg
tattgtcaaaccgcacgcagtggtcagaaggcctgctgggttaaattctgatggcaatccgtgatgctg
gctttgaaatctcggccatgcagatgttcaacatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagttt
acaaaggcgtggttaccgaatatcacgatatgggttacggaaatgtactccgggtccgtgcgtcgcgatg
gaaattcagcaaaacaatgccacaaaaacgtttcgtgaattctgtggtccggcagatccggaaatcgc
acgtcatctgcgtccgggtaccctgcgcgcaatttttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgcact
gtaccgatctgccgggaagacgggtctgctggaagttcaatacttttcaaaattctggataattga (配
```

40

列番号20)

【0226】

(アミノ酸)

MHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFIGNKVNVFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKE

50

KTALALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQ
FITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD
SFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFE
ISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFR
EFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (配
列番号 2 1)

【0 2 2 7】

ヒト NME 7 - A :

(DNA)

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataattgaaataat
aaacaaagctggatttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattt
tcatgtagatcaccagtcaagaccctttttcaatgagctgatccagtttattacaactggtcctattattg
ccatggagatttttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctgga
gtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttggaacagatggcataagaaatgcagc
gcatggccctgattcttttgcttctgcggccagagaaatggagttgttttttga (配列番号 2 2)

【0 2 2 8】

(アミノ酸)

MEKTALALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNE
LIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHG
PDSFASAAREMELFF- (配列番号 2 3)

【0 2 2 9】

ヒト NME 7 - A 1 :

(DNA)

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataattgaaataat
aaacaaagctggatttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattt
tcatgtagatcaccagtcaagaccctttttcaatgagctgatccagtttattacaactggtcctattattg
ccatggagatttttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctgga
gtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttggaacagatggcataagaaatgcagc
gcatggccctgattcttttgcttctgcggccagagaaatggagttgttttttccctcaagtggaggttgt
gggcccggcaaacactgctaaatttacttga (配列番号 2 4)

【0 2 3 0】

(アミノ酸)

MEKTALALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNE
LIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHG
PDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFT- (配列番号 2 5)

【0 2 3 1】

ヒト NME 7 - A 2 :

(DNA)

atgaatcatagtgaagattcggtttcattgcagagtggtatgatccaaatgcttcacttcttcgacgtt
atgagctttttattttaccaggggatggatctgttgaaatgcatgatgtaaagaatcatcgacacctttt
aaagcggaccacaaatatgataacctgcacttggaagattttattataggcaacaaagtgaatgtcttttc
tcgacaactggatttaattgactatggggatcaatatacagctcgccagctgggcagtaggaaagaaa
aaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataattgaaataataaaacaaa
gctggatttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattttcatgta
gatcaccagtcaagaccctttttcaatgagctgatccagtttattacaactggtcctattattgccatgg
agatttttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtggca
cgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttggaacagatggcataagaaatgcagcgcagtg
ccctgattcttttgcttctgcggccagagaaatggagttgttttttga (配列番号 2 6)

【0 2 3 2】

(アミノ酸)

10

20

30

40

50

MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLH
LEDLFIGNKVNVFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINK
AGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWK
RLLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD SFASAAREMELFF- (配列番号
27)

【0233】

ヒトNME7-A3:

(DNA)

atgaatcatagtgaagattcggtttcattgcagagtggtatgatccaaatgcttcacttcttcgacgtt
atgagctttttattttaccagggggatggatctgttgaaatgcatgatgtaaagaatcatcgcaccttttt
aaagcggaccaaatatgataacctgcacttggaagattttatagggcaacaaagtgaatgtcttttc
tcgacaactgggtattaattgactatggggatcaatatacagctcgccagctgggcagtaggaaagaaa
aaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataattgaaataataaaciaa
gctggatttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattttcatgta
gatcaccagtgcaagaccctttttcaatgagctgatccagtttattacaactggtcctattattgccatgg
agattttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtgga
cgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttggaacagatggcataagaaatgcagcgcatgg
ccctgattcttttgcttctgcggccagagaaatggagttgtttttccttcaagtggaggttggtggccg
gcaaacactgctaaatttacttga (配列番号28)

【0234】

(アミノ酸)

MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLH
LEDLFIGNKVNVFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINK
AGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWK
RLLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD SFASAAREMELFFPSSGGCGPA
NTAKFT- (配列番号29)

【0235】

ヒトNME7-B:

(DNA)

atgaattgtacctgttgcatgtttaaaccccatgctgtcagtgaaggactgttgggaaagatcctgatg
gctatccgagatgcagggttttgaaatctcagctatgcagatgttcaatatggatcgggttaatgttgag
gaattctatgaagtttataaaggagtagtgaccgaatatcatgacatggtgacagaaatgtattctggc
ccttggtgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgct
gatcctgaaattgcccggcatttacgccctggaactctcagagcaatctttggtaaaactaagatccag
aatgctgttcactgtactgatctgccagaggatggcctattagagggttcaatacttcttctga (配列番
号30)

【0236】

(アミノ酸)

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFMNMDRVNVVEEFYEVYKGVV
TEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTK
IQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (配列番号31)

【0237】

ヒトNME7-B1:

(DNA)

atgaattgtacctgttgcatgtttaaaccccatgctgtcagtgaaggactgttgggaaagatcctgatg
gctatccgagatgcagggttttgaaatctcagctatgcagatgttcaatatggatcgggttaatgttgag
gaattctatgaagtttataaaggagtagtgaccgaatatcatgacatggtgacagaaatgtattctggc
ccttggtgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgct
gatcctgaaattgcccggcatttacgccctggaactctcagagcaatctttggtaaaactaagatccag
aatgctgttcactgtactgatctgccagaggatggcctattagagggttcaatacttcttcaagatcttgg

ataattagtg (配列番号 3 2)

【0 2 3 8】

(アミノ酸)

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFMNMDRVNVVEEFYEVYKGVV
TEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTK
IQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN (配列番号 3 3)

【0 2 3 9】

ヒト NME 7 - B 2 :

(DNA)

atgccttcaagtggaggttgtgggcccggcaaacactgctaaatttactaattgtacctgttgcatgttta
aaccatgctgtcagtgaaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcaggttttgaa
atctcagctatgcagatgttcaatatggatcgggttaatgttgagggaattctatgaagtttataaagga
gtagtgaaccgaatatcatgacatggtgacagaaatgtattctggcccttgtgtagcaatggagattcaa
cagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatcctgaaattgcccggcattta
cgccctggaactctcagagcaatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttcaactgtactgatctg
ccagaggatggcctattagaggttcaatacttcttctga (配列番号 3 4)

【0 2 4 0】

(アミノ酸)

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFMND
RVNVVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIA
RHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (配列番号 3 5)

【0 2 4 1】

ヒト NME 7 - B 3 :

(DNA)

atgccttcaagtggaggttgtgggcccggcaaacactgctaaatttactaattgtacctgttgcatgttta
aaccatgctgtcagtgaaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcaggttttgaa
atctcagctatgcagatgttcaatatggatcgggttaatgttgagggaattctatgaagtttataaagga
gtagtgaaccgaatatcatgacatggtgacagaaatgtattctggcccttgtgtagcaatggagattcaa
cagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatcctgaaattgcccggcattta
cgccctggaactctcagagcaatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttcaactgtactgatctg
ccagaggatggcctattagaggttcaatacttcttcaagatcttgataattagtg (配列番号 3 6)

【0 2 4 2】

(アミノ酸)

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFMND
RVNVVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIA
RHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN-- (配列番号 3 7)

【0 2 4 3】

ヒト NME 7 - A B :

(DNA)

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataattgaaataat
aaacaaagctggatttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggatt
tcatgtagatcaccagtcaagaccctttttcaatgagctgatccagtttattacaactggtcctattattg
ccatggagatttttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctgga
gtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttggaacagatggcataagaaatgcagc
gcatggccctgattcttttgcttctgcggccagagaaatggagttgtttttccttcaagtgagggttgt
gggcccggcaaacactgctaaatttactaattgtacctgttgcatgtttaaacccatgctgtcagtga
ggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcaggttttgaaatctcagctatgcagatgttc
aatatggatcgggttaatgttgagggaattctatgaagtttataaaggagtagtgaccgaatatcatgac
atggtgacagaaatgtattctggcccttgtgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagac

10

20

30

40

50

atttcgagaattttgtggacctgctgacatcctgaaattgcccggcatttacgccctggaactctcagagc
aatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttcactgtactgatctgccagaggatggcctattaga
ggttcaatacttcttcaagatcttggataattagtg (配列番号 38)

【0244】

(アミノ酸)

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNE
LIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHG
PDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAG
FEISAMQMFMMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKT
FREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN--

10

(配列番号 39)

【0245】

ヒトNME7-A B1:

(DNA)

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataattgaaataat
aaacaaagctggatttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattt
tcatgtagatcaccagtcaagaccctttttcaatgagctgatccagtttattacaactggtcctattattg
ccatggagatttttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctgga
gtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttggaacagatggcataagaaatgcagc
gcatggccctgattcctttgcttctgcggccagagaaatggagttgtttttccttcaagtggaggttgt
gggcccggcaaacactgctaaatttactaattgtacctgttgctttaaaccctcatgctgtcagtga
ggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcagggttttgaaatctcagctatgcagatgttc
aatatggatcgggttaatgttgaggaattctatgaagtttataaaggagtagtgaccgaatatcatgac
atggtgacagaaatgtattctggcccttgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagac
atttcgagaattttgtggacctgctgacatcctgaaattgcccggcatttacgccctggaactctcagagc
aatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttcactgtactgatctgccagaggatggcctattaga
ggttcaatacttcttctga (配列番号 40)

20

【0246】

(アミノ酸)

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNE
LIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHG
PDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAG
FEISAMQMFMMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKT
FREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (配列番
号 41)

30

【0247】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-A配列:

(DNA)

atggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattat
caacaaagcggtttaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggatt
ttcatgtcgaccaccagtctcgcccgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattat
cgcaatggaaattctgcgtgatgacgctatctgcgaatggaaacgcctgctggggcccgcaaacctcag
gtgttgcgcgtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttggcaccgatggatatccgtaatgcag
cacatgggtccggactcattcgcacgcggcagctcgtgaaatggaactgtttttctga (配列番号 42)

40

【0248】

(アミノ酸)

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNE
LIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHG
PDSFASAAREMELFF- (配列番号 43)

【0249】

50

大腸菌発現用に最適化されたヒト NME 7 - A 1 配列 :

(DNA)

atggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattat
caacaaagcgggtttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggatt
ttcatgtcgaccaccagtctcgcccggttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattat
cgcaatggaaattctgcgtgatgacgctatctgcgaatggaaacgcctgctggggcccgcaaaactcag
gtgttgcgcgtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttggcaccgatggatatccgtaatgcag
cacatgggtccggactcattcgcacatggcagctcgtgaaatggaactgtttttcccgagctctggcggtt
gcggtccggcaaacaccgccaatttacctga (配列番号 4 4)

【0250】

(アミノ酸)

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNE
LIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHG
PDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFT- (配列番号 4 5)

【0251】

大腸菌発現用に最適化されたヒト NME 7 - A 2 配列 :

(DNA)

atgaatcactccgaacgctttgtttttatcgccgaatggtagacccgaatgcttccctgctgcgccgct
acgaactgctgtttttatccggggcgatggtagcgtggaaatgcatgacgttaaaaatcaccgtacctttc
tgaaacgcacgaaatatgataatctgcatctggaagacctgtttattggcaacaaagtcaatgtgttct
ctcgtcagctgggtgctgatcgattatggcgaccagtacaccgcgctcaactgggtagtcgcaaagaa
aaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaa
agcgggtttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggattttcatg
tcgaccaccagtctcgcccggttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgcaat
ggaaattctgcgtgatgacgctatctgcgaatggaaacgcctgctggggcccgcaaaactcagggtgttg
cgcgtagcgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttggcaccgatggatatccgtaatgcagcacatg
gtccggactcattcgcacatggcagctcgtgaaatggaactgtttttctga (配列番号 4 6)

【0252】

(アミノ酸)

MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLH
LEDLFIGNKVNVFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINK
AGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWK
RLLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFF- (配列番号
4 7)

【0253】

大腸菌発現用に最適化されたヒト NME 7 - A 3 配列 :

(DNA)

atgaatcactccgaacgctttgtttttatcgccgaatggtagacccgaatgcttccctgctgcgccgct
acgaactgctgtttttatccggggcgatggtagcgtggaaatgcatgacgttaaaaatcaccgtacctttc
tgaaacgcacgaaatatgataatctgcatctggaagacctgtttattggcaacaaagtcaatgtgttct
ctcgtcagctgggtgctgatcgattatggcgaccagtacaccgcgctcaactgggtagtcgcaaagaa
aaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaa
agcgggtttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggattttcatg
tcgaccaccagtctcgcccggttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgcaat
ggaaattctgcgtgatgacgctatctgcgaatggaaacgcctgctggggcccgcaaaactcagggtgttg
cgcgtagcgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttggcaccgatggatatccgtaatgcagcacatg
gtccggactcattcgcacatggcagctcgtgaaatggaactgtttttcccgagctctggcggttgcggtc
cggcaaacaccgccaatttacctga (配列番号 4 8)

【0254】

(アミノ酸)

10

20

30

40

50

MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLH
LEDLFIGNKVNVFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINK
AGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWK
RLLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD SFASAA REMELFFPSSGGCGPA
NTAKFT- (配列番号 4 9)

【0 2 5 5】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-B配列:

(DNA)

atgaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgcagtgctcagaaggcctgctgggtaaaattctgatg
gcaatccgtgatgctggctttgaaatctcgccatgcagatgttcaacatggaccgcgttaacgtcga
agaattctacgaagtttacaaggcgtggttacgaatatcagatatggttacggaaatgtactccgg
tccgtgctgcgatggaaattcagcaaaacaatgccacaaaacgtttcgtgaattctgtggtccgg
cagatccggaaatcgcacgtcatctgcgtccgggtaccctgcgcgcaattttggtaaaacgaaaatc
cagaacgctgtgcactgtaccgatctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatactttttctga (配列番号 5 0)

【0 2 5 6】

(アミノ酸)

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQM FNMDRVNV EEFYEVYKGVV
TEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTK
IQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (配列番号 5 1)

【0 2 5 7】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-B1配列:

(DNA)

atgaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgcagtgctcagaaggcctgctgggtaaaattctgatg
gcaatccgtgatgctggctttgaaatctcgccatgcagatgttcaacatggaccgcgttaacgtcga
agaattctacgaagtttacaaggcgtggttacgaatatcagatatggttacggaaatgtactccgg
tccgtgctgcgatggaaattcagcaaaacaatgccacaaaacgtttcgtgaattctgtggtccgg
cagatccggaaatcgcacgtcatctgcgtccgggtaccctgcgcgcaattttggtaaaacgaaaatc
cagaacgctgtgcactgtaccgatctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatactttttcaaaatt
ctggataattga (配列番号 5 2)

【0 2 5 8】

(アミノ酸)

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQM FNMDRVNV EEFYEVYKGVV
TEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTK
IQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (配列番号 5 3)

【0 2 5 9】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-B2配列:

(DNA)

atgccgagctctggcgggttgcgggtccggcaaaccgcgcaaatttaccaattgtacgtgctgtattgtc
aaaccgcacgcagtgctcagaaggcctgctgggtaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttga
aatctcgccatgcagatgttcaacatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaag
gctgtggttacgaatatcagatatggttacggaaatgtactccgggtccgtgcgtgcgatggaaattc
agcaaaacaatgccacaaaacgtttcgtgaattctgtggtccggcagatccggaaatcgcacgtcat
ctgcgtccgggtaccctgcgcgcaattttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgcactgtaccga
tctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatactttttctga (配列番号 5 4)

【0 2 6 0】

(アミノ酸)

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQM FNMD
RVNV EEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIA
RHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (配列番号 5 5)

【0261】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-B3配列：

(DNA)

atgccgagctctggcgggttgcgggtccggcacaacaccgccaaatttaccaattgtacgtgctgtattgtc
aaaccgcacgcagtgctcagaaggcctgctgggtaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttga
aatctcggccatgcagatgttcaacatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaag
gcgtggttacccaatatcacgatatggttacggaaatgtactccgggtccgtgcgtcgcgatggaaattc
agcaaaaacaatgccacaaaaacgtttcgtgaattctgtgggtccggcagatccggaaatcgcacgtcat
ctgcgtccgggtaccctgcgcgcaatttttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgcactgtaccga
tctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatactttttcaaaattctggataattga (配列番号 5
6)

10

【0262】

(アミノ酸)

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFMND
RVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIA
RHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (配列番号 57)

【0263】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-AB配列：

(DNA)

atggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattat
caacaaagcgggtttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggatt
ttcatgtcgaccaccagtctcgcccgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattat
cgcaatggaaattctgcgtgatgacgctatctgcgaatggaaacgcctgctggggcccgcaaacctcag
gtgttgcgcgtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttggcaccgatggatatccgtaatgcag
cacatgggtccggactcattcgcacatcggcagctcgtgaaatggaactgtttttcccgagctctggcgggtt
gcgggtccggcacaacaccgccaaatttaccaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgcagtgctca
gaaggcctgctgggtaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttgaaatctcggccatgcagat
gttcaacatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaaggcgtggttacccaatatc
acgatatggttacggaaatgtactccgggtccgtgcgtcgcgatggaaattcagcaaaaacaatgccacc
aaaacgtttcgtgaattctgtgggtccggcagatccggaaatcgcacgtcatctgcgtccgggtaccctg
cgcgcaatttttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgcactgtaccgatctgccggaagacgggtct
gctggaagttcaatactttttcaaaattctggataattga (配列番号 58)

20

30

【0264】

(アミノ酸)

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNE
LIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHG
PDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAG
FEISAMQMFMNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKT
FREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (配列番号 59)

40

【0265】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-AB1配列：

(DNA)

Atggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattat
caacaaagcgggtttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggatt
ttcatgtcgaccaccagtctcgcccgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattat
cgcaatggaaattctgcgtgatgacgctatctgcgaatggaaacgcctgctggggcccgcaaacctcag
gtgttgcgcgtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttggcaccgatggatatccgtaatgcag
cacatgggtccggactcattcgcacatcggcagctcgtgaaatggaactgtttttcccgagctctggcgggtt
gcgggtccggcacaacaccgccaaatttaccaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgcagtgctca

50

gaaggcctgctgggtaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttgaaatctcggccatgcagat
gttcaacatggaccgcggttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaaggcgtggttaccgaatatac
acgatatggttacggaaatgtactccgggtccgtgcgtcgcgatggaaattcagcaaaaacaatgccacc
aaaacgtttcgtgaattctgtgggtccggcagatccggaaatcgcacgtcatctgcgtccgggtaccctg
cgcgcaatttttggtaaaacgaaaatccagaacgtgtgcactgtaccgatctgccggaagacgggtct
gctggaagttcaataactttttctga (配列番号 6 0)

【0266】

(アミノ酸)

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNE
LIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHG
PDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAG
FEISAMQMFMNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKT
FREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (配列番
号 6 1)

【0267】

マウスNME6

(DNA)

Atgacctccatcttgcaaggtccccaagctcttcagctcacactagccctgatcaagcctgatgcagtt
gcccaccactgatcctggaggctgttcacagcagattctgagcaacaagttcctcattgtacgaacg
agggaaactgcagtggagctggaggactgccggagggtttaccgagagcatgaaggcggttttttcta
tcagcggctgggtggagttcatgacaagtgggccaatccgagcctatatccttgcccacaaagatgcca
tccaactttggaggacactgatgggacccaccagagtatttcgagcacgctatatagccccagattca
attcgtggaagtttgggcctcactgacacccgaaatactacccatggctcagactccgtggtttccgcc
agcagagagattgcagccttcttcctgacttcagtgaacagcgtggtatgaggaggaggaacccc
agctgcggtgtggtcctgtgcactacagtccagaggaaggtatccactgtgcagctgaaacaggagg
ccacaaacaacctaacaaaacctag (配列番号 6 2)

【0268】

(アミノ酸)

MTSILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQIILSNKFLIVRTRELQWKLEDCRR
FYREHEGRFFYQRLVEFMTSGPIRAYILAHKDAIQLWRTL MGPTRVFRARYIAPDSIR
GSLGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRCGPVHYSPEEGI
HCAAETGGHKQPNKT- (配列番号 6 3)

【0269】

ヒトNME6:

(DNA)

Atgaccagaatctggggagtgagatggcctcaatcttgcaagccctcaggctctccagctcactct
agccctgatcaagcctgacgcagtcgccatccactgattctggaggctgttcacagcagattctaag
caacaagttcctgattgtacgaatgagagaactactgtggagaaaggaagattgccagaggttttacc
gagagcatgaaggcggttttttctatcagaggctggtggagttcatggccagcgggccaatccgagcc
tacatccttgcccacaaggatgccatccagctctggaggacgctcatgggacccaccagagtgttcg
agcacgccatgtggccccagattctatccgtgggagtttcggcctcactgacacccgcaacaccacc
atggttcggactctgtggtttcagccagcagagagattgcagccttcttcctgacttcagtgaacagc
gctggtatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtgctatagcccagaggagggtgt
ccactatgtagctggaacaggaggcctagaccagcctga (配列番号 6 4)

【0270】

(アミノ酸)

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQIILSNKFLIVRMRELL
WRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTL MGPTRVFR
ARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRC
GPVCYSPEGGVHYVAGTGGLGPA- (配列番号 6 5)

10

20

30

40

50

【0271】

ヒトNME6 1:

(DNA)

Atgaccagaatctggggagtgagatggcctcaatcttgcgaaagccctcaggctctccagctcactct
agccctgatcaagcctgacgcagtcgcccattccactgattctggaggctgttcatcagcagattctaag
caacaagttcctgattgtacgaatgagagaactactgtggagaaaggaagattgccagaggttttacc
gagagcatgaagggcggttttttctatcagaggctggaggagttcatggccagcgggccaatccgagcc
tacatccttgcccacaaggatgccatccagctctggaggacgctcatgggacccaccagagtggtccg
agcacgcatgtggccccagattctatccgtgggagtttcggcctcactgacacccgcaacaccaccc
atggttcggactctgtggtttcagccagcagagagattgcagccttcttccctgacttcagtgaacagc
gctggtatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtga (配列番号66)

10

【0272】

(アミノ酸)

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQILSNKFLIVRMRELL
WRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTL MGPTRVFR
ARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRC
GPV- (配列番号67)

【0273】

ヒトNME6 2:

(DNA)

Atgctcactctagccctgatcaagcctgacgcagtcgcccattccactgattctggaggctgttcatcag
cagattctaagcaacaagttcctgattgtacgaatgagagaactactgtggagaaaggaagattgcc
gaggttttaccgagagcatgaagggcggttttttctatcagaggctggaggagttcatggccagcgggc
caatccgagcctacatccttgcccacaaggatgccatccagctctggaggacgctcatgggacccacc
agagtgttccgagcacgccatgtggccccagattctatccgtgggagtttcggcctcactgacacccg
caacaccacccatggttcggactctgtggtttcagccagcagagagattgcagccttcttccctgactt
cagtgaacagcgctggtatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtga (配列番号
68)

20

【0274】

(アミノ酸)

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFF
YQRLVEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTL MGPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTR
NTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRCGPV- (配列番号69)

30

【0275】

ヒトNME6 3:

(DNA)

Atgctcactctagccctgatcaagcctgacgcagtcgcccattccactgattctggaggctgttcatcag
cagattctaagcaacaagttcctgattgtacgaatgagagaactactgtggagaaaggaagattgcc
gaggttttaccgagagcatgaagggcggttttttctatcagaggctggaggagttcatggccagcgggc
caatccgagcctacatccttgcccacaaggatgccatccagctctggaggacgctcatgggacccacc
agagtgttccgagcacgccatgtggccccagattctatccgtgggagtttcggcctcactgacacccg
caacaccacccatggttcggactctgtggtttcagccagcagagagattgcagccttcttccctgactt
cagtgaacagcgctggtatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtgctatagccca
gagggaggtgtccactatgtagctggaacaggaggccctaggaccagcctga (配列番号70)

40

【0276】

(アミノ酸)

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFF
YQRLVEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTL MGPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTR
NTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRCGPVCYSPEGGVHYVAGTGG
LGPA- (配列番号71)

50

【0277】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME6配列：

(DNA)

Atgacgcaaaatctgggctcggaaatggcaagtatcctgcgctccccgcaagcactgcaactgaccct
ggctctgatcaaacggacgctgttgctcatccgctgattctggaagcgggtccaccagcaaattctga
gcaacaaatttctgatcgtgcgtatgcgcgaactgctgtggcgtaaagaagattgccagcggtttttatc
gcgaacatgaaggccgtttcttttatcaacgcctggttgaattcatggcctctgggtccgattcgcgc
atatcctggctcacaagatgcgattcagctgtggcggtaccctgatgggtccgacgcgcgtctttcgtg
cacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctcgttcggtctgaccgatacgcgcaataccacgcac
ggtagcgactctgttgtagtgcgctcccgtaaatcgcgccctttttcccgacttctccgaacagcgt
tggtacgaagaagaagaaccgcaactgcgctgtggcccgggtctgttattctccggaagggtggtgtcca
ttatgtggcgggcacgggtggtctgggtccggcatga (配列番号72)

10

【0278】

(アミノ酸)

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELL
WRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTL MGPTRVFR
ARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRC
GPVCYSPEGGVHYVAGTGGLGPA- (配列番号73)

【0279】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME6 1配列：

20

(DNA)

Atgacgcaaaatctgggctcggaaatggcaagtatcctgcgctccccgcaagcactgcaactgaccct
ggctctgatcaaacggacgctgttgctcatccgctgattctggaagcgggtccaccagcaaattctga
gcaacaaatttctgatcgtgcgtatgcgcgaactgctgtggcgtaaagaagattgccagcggtttttatc
gcgaacatgaaggccgtttcttttatcaacgcctggttgaattcatggcctctgggtccgattcgcgc
atatcctggctcacaagatgcgattcagctgtggcggtaccctgatgggtccgacgcgcgtctttcgtg
cacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctcgttcggtctgaccgatacgcgcaataccacgcac
ggtagcgactctgttgtagtgcgctcccgtaaatcgcgccctttttcccgacttctccgaacagcgt
tggtacgaagaagaagaaccgcaactgcgctgtggcccgggtctga (配列番号74)

【0280】

30

(アミノ酸)

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELL
WRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTL MGPTRVFR
ARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRC
GPV- (配列番号75)

【0281】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME6 2配列：

(DNA)

Atgctgaccctggctctgatcaaacggacgctgttgctcatccgctgattctggaagcgggtccacca
gcaaattctgagcaacaaatttctgatcgtgcgtatgcgcgaactgctgtggcgtaaagaagattgcc
agcggtttttatcgcaacatgaaggccgtttcttttatcaacgcctggttgaattcatggcctctgggtcc
gattcgcgcataatcctggctcacaagatgcgattcagctgtggcggtaccctgatgggtccgacgc
gcgtctttcgtgcacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctcgttcggtctgaccgatacgcgca
ataccacgcacggtagcgactctgttgtagtgcgctcccgtaaatcgcgccctttttcccgacttct
ccgaacagcgttggtacgaagaagaagaaccgcaactgcgctgtggcccgggtctga (配列番号76)

40

【0282】

(アミノ酸)

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFF
YQRLVEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTL MGPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTR

50

NTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRCGPV- (配列番号 77)

【0283】

大腸菌発現用に最適化されたヒトNME6 3配列:

(DNA)

Atgctgaccctggctctgatcaaaccggacgctgttgctcatccgctgattctggaagcgggtccacca
gcaaattctgagcaacaaatttctgatcgtgcgtatgcgcgaactgctgtggcgtaaagaagattgcc
agcgtttttatcgcgaacatgaaggccgtttcttttatcaacgcctgggtgaattcatggcctctgggtcc
gattcgcgcataatcttggtcacaagatgcgattcagctgtggcggtaccctgatgggtccgacgc
gctgtttctgtgcacgtcatgtggcaccggactcaatccgtgggtcgttcgggtctgaccgatacgcgca
ataccacgcacggtagcgaactctgttggttagtgctgccgtgaaatcgcggcctttttcccgacttct
ccgaacagcgttggtacgaagaagaaccgcaactgcgctgtggcccggtctgttattctccggaa
gggtgggtgtccattatgtggcgggcacgggtgggtctgggtccggcatga (配列番号 78)

10

【0284】

(アミノ酸)

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFF
YQRLVEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTR
NTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRCGPVCYSPEGGVHYVAGTGG
LGPA- (配列番号 79)

【0285】

NME6及びNME7並びに新規バリエーションは、任意の親和性タグと共に発現され得るが、以下のタグと共に発現された:

20

ヒスチジンタグ

(ctcgag)caccaccaccaccactga (配列番号 84)

Strept IIタグ

(accggt)tgagccatcctcagttcgaaaagtaatga (配列番号 85)

【0286】

実施例12-NME6及びNME7コンストラクト作出

実施例12.1-大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-1配列

NME7 w t-cDNA (大腸菌における発現用に最適化されたコドン)を本発明者らの要求に応じてGenscript (ニュージャージー州)により作出した。NME7-1を以下のプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅した:

30

フォワード5'-atcgatcatatgaatcactccgaacgc-3' (配列番号 98)

リバース5'-agagcctcgagattatccagaattttgaaaaagtattg-3' (配列番号 99)

【0287】

その後、フラグメントを精製し、消化し(NdeI、XhoI)、発現ベクターpET21bのNdeI及びXhoI制限酵素部位の間にクローニングした。

【0288】

実施例12.2-大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-2配列

NME7-2を以下のプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅した:

40

フォワード5'-atcgatcatatgcatgacgttaaaaatcac-3' (配列番号 100)

リバース5'-agagcctcgagattatccagaattttgaaaaagtattg-3' (配列番号 101)

【0289】

その後、フラグメントを精製し、消化し(NdeI、XhoI)、発現ベクターpET21bのNdeI及びXhoI制限酵素部位の間にクローニングした。

【0290】

実施例12.3-大腸菌発現用に最適化されたヒトNME7-A配列

NME7-Aを以下のプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅した:

フォワード5'-atcgacatattgaaaaaacgctggccctgattaaaccggatg-3' (配列番号 10

50

2)

リバーズ5'-actgcctcgaggaaaaacagttccatttcacgagctgccgatg-3' (配列番号 103)

【0291】

その後、フラグメントを精製し、消化し (Nde I、Xho I)、発現ベクター pET21b の Nde I 及び Xho I 制限酵素部位の間にクローニングした。

【0292】

実施例 12. 4 - 大腸菌発現用に最適化されたヒト NME7 - AB 配列

NME7 - AB を以下のプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により増幅した：

フォワード5'-atcgacatatggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatg-3' (配列番号 104)

リバーズ5'-agagcctcgagattatccagaattttgaaaaagtattg-3' (配列番号 105)

【0293】

その後、フラグメントを精製し、消化し (Nde I、Xho I)、発現ベクター pET21b の Nde I 及び Xho I 制限酵素部位の間にクローニングした。タンパク質を C 末端ヒスチンタグと共に発現させる。

【0294】

NME7 - AB を以下のプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により増幅した：

フォワード5'-atcgacatatggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatg-3' (配列番号 106)

リバーズ5'-agagcaccgggtattatccagaattttgaaaaagtattg-3' (配列番号 107)

【0295】

その後、フラグメントを精製し、消化し (Nde I、Age I)、Age I に続くヒスチンタグの前の Strept Tag II 及び 2 つの停止コドンで Xho I を置換した、発現ベクター pET21b の Nde I 及び Age I 制限酵素部位の間にクローニングした。タンパク質を C 末端 Strept Tag II と共に発現させる。

【0296】

実施例 12. 5 - 大腸菌発現用に最適化されたヒト NME6 配列

NME6 を以下のプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により増幅した：

フォワード5'-atcgacatatgacgcaaaaatctgggctcggaatg-3' (配列番号 108)

リバーズ5'-actgcctcgagtgccggacccagaccacccgtgc-3' (配列番号 109)

【0297】

その後、フラグメントを精製し、消化し (Nde I、Xho I)、発現ベクター pET21b の Nde I 及び Xho I 制限酵素部位の間にクローニングした。タンパク質を C 末端ヒスチンタグと共に発現させる。

【0298】

NME6 を以下のプライマーを使用してポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) により増幅した：

フォワード5'-atcgacatatgacgcaaaaatctgggctcggaatg-3' (配列番号 110)

リバーズ5'-actgcaccgggttgccggacccagaccacccgtgcg-3' (配列番号 111)

【0299】

その後、フラグメントを精製し、消化し (Nde I、Age I)、Age I に続くヒスチンタグの前の Strept Tag II 及び 2 つの停止コドンで Xho I を置換した、発現ベクター pET21b の Nde I 及び Age I 制限酵素部位の間にクローニングした。タンパク質を C 末端 Strept Tag II と共に発現させる。

【0300】

実施例 12. 6 - 組換え NME7 - AB の作出

10

20

30

40

50

LBブロス（ルリアベルターニブロス）を1／10の終夜培養物と共に接種し、37℃にてOD600が約0.5に達するまで培養する。この時点で、イソプロピル-β-D-チオ-ガラクトシド（IPTG、GoldBiotechnology）0.4mMにより組換えタンパク質発現を誘導し、5時間後に培養を停止する。遠心分離（6000rpmで4℃にて10分間）により細胞を回収した後、細胞ペレットをランニングバッファー：PBS（pH7.4）、NaCl 360mM、及びイミダゾール80mMで再懸濁する。その後、リゾチーム（1mg/mL、Sigma）、MgCl₂（0.5mM）及びDNase（0.5ug/mL、Sigma）を添加する。37℃にて30分間、細胞懸濁液を回転プラットフォーム（275rpm）上でインキュベートし、5分間氷上で超音波処理する。不溶性細胞片を遠心分離（20000rpmで4℃にて30分間）により除去する。その後、清澄な溶解物をランニングバッファーで平衡化したNi-NTAカラム（Qiagen）に加える。カラムを4CVのランニングバッファーで洗浄し、その後イミダゾール70mMで補填されたランニングバッファー（6CV）によりカラムからタンパク質を溶出する前に、イミダゾール30mMで補填された4CVのランニングバッファーで洗浄し、続いてイミダゾール490mMで補填されたランニングバッファー（4CV）で二次溶出した。NME7-ABをサイズ排除クロマトグラフィー（Superdex 200）「FPLC」により更に精製する。

10

【0301】

実施例12. 7-組換えNME6の作出

LBブロス（ルリアベルターニブロス）を1／10の終夜培養物と共に接種し、37℃にてOD600が約0.5に達するまで培養する。この時点で、イソプロピル-β-D-チオ-ガラクトシド（IPTG、GoldBiotechnology）により組換えタンパク質発現を誘導し、5時間後に培養を停止する。遠心分離（6000rpmで4℃にて10分間）により細胞を回収した後、細胞ペレットをランニングバッファー：PBS（pH7.4）、NaCl 360mM、及びイミダゾール80mMで再懸濁する。その後、リゾチーム（1mg/mL、Sigma）、MgCl₂（0.5mM）及びDNase（0.5ug/mL、Sigma）を添加する。37℃にて30分間、細胞懸濁液を回転プラットフォーム（275rpm）上でインキュベートし、5分間氷上で超音波処理する。不溶性細胞片を遠心分離（20000rpmで4℃にて30分間）により除去する。その後、清澄な溶解物をランニングバッファーで平衡化したNi-NTAカラム（Qiagen）に加える。イミダゾール420mMで補填したランニングバッファー（6CV）でカラムからタンパク質を溶出する前に、カラムを洗浄（8CV）する。NME6をサイズ排除クロマトグラフィー（Superdex 200）「FPLC」により更に精製する。

20

30

【0302】

実施例13-bFGF系培地と比較したNME系培地中で培養された幹細胞におけるナイーブ遺伝子及びプライムド遺伝子の定量的PCR分析

MEFフィーダー細胞上でbFGF（Peprotech）4ng/mL中、又はマドリゲル上でmTeSR（Stem Cell Technologies）中、又は最小培地「MM」中のNM23（NME1 S120G二量体）8nM中のいずれかにおいて、指示された継代数に亘ってヒトES H9細胞（WICELL）を培養した。ここで、細胞はC3抗MUC1*ma b 12.5ug/mLでコーティングされたVITA（商標）プレート（ThermoFisher）上にプレーティングされ、図13において「NM23/MUC1*Ab」と略記される。Trizol（商標）Reagent（Invitrogen）を使用してRNAを単離し、Super Script II（Invitrogen）を使用してRandom Hexamers（Invitrogen）によりcDNAを逆転写し、その後、Applied Biosystems 7500リアルタイム機器上でApplied Biosystems遺伝子発見アッセイ（OCT4 P/N Hs00999634_gH、Nanog P/N Hs02387400_g1、KLF2 P/N Hs00360439_g1、KLF4 P/N Hs00358836_m1、FOXa2 P/N Hs00232764_m1、OTX2 P/N Hs00222238_m1、LHX2

40

50

P/N Hs00180351_m1、XIST P/N Hs01079824_m1
及びGAPDH P/N 4310884E)を使用して、FOXA2、XIST、KLF2、KLF4、NANOG及びOCT4遺伝子についてアッセイを行った。A)MEF上においてbFGF中、マドリゲル上においてmTESR中、又は抗MUC1* C3抗体上においてNM23中で細胞を培養した。各試料3連で行った。遺伝子発現をGAPDHに対して正規化した。データをbFGF/MEFコントロールに対する倍数変化として表す。B)H9細胞を指示された継代数に亘りマドリゲル上においてmTESR中で培養し、上述のように遺伝子発現を測定する。データをbFGF/MEFコントロールに対する倍数変化として表す。C)H9細胞を指示された継代数に亘り抗MUC1* C3 mab層上においてNM23 (H1 S120G二量体) 8nM中で培養し、上述のように遺伝子発現を測定する。データをbFGF/MEFコントロールに対する倍数変化として表す。D)MEF上においてbFGF中で予め培養されたH9細胞を、ヒトビトロネクチン層上に細胞をプレーティングしたこと以外は上述のNM23、bFGF又はmTESRのいずれかにおいて1継代の間培養した。比較のため、抗MUC1*抗体上においてNM23中で細胞を培養した。遺伝子発現を上述のように測定する。データをbFGF/MEFコントロールに対する倍数変化として表す。A欄は、標準FGF系培地中か、又は別のFGF系培地mTESR中のいずれかにおける培養と比較して、MUC1*抗体の層上においてNM23中で細胞が培養された場合に、ほとんどの多能性遺伝子(OCT4、NANOG、KLF4及びKLF2)がより高いレベルで発現されることを示す。最も著しくは、幹細胞をFGF系培地(標準又はmTESR)中で培養すると、プライドマーカーであるFOXA2及びXISTが顕著に高いことである。B欄は、継代数の関数として、mTESR中での成長が既に高められたプライド遺伝子の発現レベルを増加する傾向がある可能性を示す。C欄は、反対に、継代数の関数として、MUC1*抗体上におけるNM23中の成長がプライド(望ましくない)遺伝子の発現を減少する傾向があることを示す。D欄は、ビトロネクチン表面上での成長は、OCT4、NANOG、KLF4及びKLF2の高発現と共に、FOXA2及びXISTの低発現が望ましく、これがナイーブ状態の特徴とされている、遺伝子発現シグネチャに悪い影響を与えることを示す。

10

20

30

40

50

【0303】

実施例14-MUC1プルダウンアッセイはNME1、NME6及びNME7がMUC1種タンパク質に結合することを示す

MUC1*細胞質側末端(Ab-5)に対する抗体を使用するプルダウンアッセイを細胞パネルについて行った。MUC1抗体によりプルダウンされたタンパク質をSDS-PAGEにより分離した後、ウェスタンブロット技法を使用してNME1、NME6及びNME7に特異的な抗体によってプローブした。MUC1*陽性乳がん細胞株T47D細胞(ATCC)、ヒト胚性幹細胞株BGO1v(LifeTechnologies)、ヒトES細胞(HES-3、BioTime Inc.)及びヒトiPS細胞(SC101A-1、SystemBiosciences Inc.) T47Dがん細胞をATCCプロトコルに従って、10%FBS(VWR)を含むRPMI-1640(ATCC)中で成長した。全ての幹細胞を、NM23-RS(組換えNME1 S120G二量体) 8nMを含む最小幹細胞培地「MM」中で培養した。幹細胞を、抗MUC1* C3 mab 12.5 µg/mLでコーティングされたプラスチックウェア上で成長した。細胞を、RIPA緩衝液200 µLを用いて氷上で10分間溶解した。遠心分離による細胞片の除去の後、上清を免疫共沈降アッセイに使用した。DynabeadsプロテインG(Life Technologies)に連結された、MUC1細胞質側末端を認識するAb-5抗体(抗MUC-1 Ab-5、Thermo Scientific)を使用して、MUC1*をプルダウンした。ビーズをRIPA緩衝液で2回洗浄し、還元緩衝液に再懸濁した。上清試料を還元SDS-PAGEの後、PVDF膜へのタンパク質の転写に供した。図32は、その後、A)抗NM23-H1(NME1)抗体(C-20、Santa CruzBiotechnology)、B)抗NME6(Abnova)、又はC)抗NM23-H7抗体(B-9、Santa CruzBiotechnology)によりメンブレンをプローブし、D)NME6の染色をSupersignal(Pierce)を使用して増強させ、E)N

M E 7 の染色を S u p e r s i g n a l を使用して増強させたことを示す。各々の H R P に連結された二次抗体とのインキュベーションの後、タンパク質を化学発光により検出した（図 3 2、A ～ E を参照）。写真は、天然 N M E 1、N M E 6 及び N M E 7 が M U C 1 * 陽性乳がん細胞、ヒト E S 細胞及びヒト i P S 細胞に存在し、それらが M U C 1 * に結合することを示す。留意すべきは、H E S - 3 ペレットに存在する細胞数は他の試料に存在する細胞数よりも少なかったことである。

【 0 3 0 4 】

実施例 1 5 - 組換え N M 2 3 (S 1 2 0 G 変異体 H 1 二量体)、N M E 7 - A B、及び天然 N M E 7 は、M U C 1 * 細胞外ドメインペプチドに結合し、受容体の二量体化を誘導し得る

直径 3 0 . 0 n m の金ナノ粒子を、Thompson et al. (ACS Appl. Mater. Interfaces, 2011, 3 (8), pp 2979-2987) に従って N T A - S A M 表面でコーティングした。その後、N T A - S A M コーティング金ナノ粒子を、等容量の N i S O 4 1 8 0 u M で活性化し、室温で 1 0 分間インキュベートし、洗浄し、リン酸緩衝液 (p H 7 . 4) 1 0 m M に再懸濁した。その後、最終濃度 0 . 5 u M で金ナノ粒子を P S M G F R N - 1 0 ペプチド (Q F N Q Y K T E A A S R Y N L T I S D V S V S D V P F P F S A Q S G A H H H H H H (配列番号 1 1 2)) で充填し、室温で 1 0 分間インキュベートした。大腸菌により発現され、精製された組換え N M E 7 - A B タンパク質を指示される濃度で溶液に遊離した状態で添加した。粒子固定化タンパク質が互いに結合するか、又は同時に 2 つの異なる粒子上の 2 つの異なるタンパク質に結合すると、粒子溶液がピンク色／赤色から紫色／青色に変色する。単一のペプチドへの結合は 2 以上の粒子を互いに近接させないため、溶液に遊離した状態で添加されたタンパク質が粒子の凝縮を生じれば、それは遊離タンパク質が同起源のペプチドを二量体化するという強力な証拠である。

【 0 3 0 5 】

図 3 3 (A) は、P S M G F R N - 1 0 ペプチドで充填された N T A - N i - S A M コーティングナノ粒子を示す。N M E 7 - A B を指示される濃度で溶液に遊離した状態で添加した。粒子の凝縮によるピンク色から紫色／青色への溶液の変色は、粒子上の M U C 1 * ペプチドと溶液中の遊離 N M E 7 との結合を示す。この結果は、溶液中の N M E 7 は M U C 1 * ペプチドに対して 2 つの結合部位を有することを示す。抗 M U C 1 * 抗体の F a b は完全に結合を阻害し、粒子の凝縮が M U C 1 * ペプチドと N M E 7 との特異的相互作用によるものであることを示している。(B) はより広い濃度範囲に亘り溶液に遊離した状態で添加された N M E 7 - A B を示す。N M E 7 が同時に 2 つのペプチドに結合し得ることを示す粒子の凝縮が観察される。(C) は、溶液に添加された全てのタンパク質を示す。N M E 7 - A B はほとんど直ちに紫色に変色した。また、N M 2 3 - R S (H 1 二量体) もほとんど直ちに紫色に変色し始めた。ナীব N M E 7 を含有する T 4 7 D 乳がん細胞株溶解物もまた、著しく紫色に変色する。

【 0 3 0 6 】

実施例 1 6 - プライムド状態の特徴である X 染色体不活性化を示した核内でのヒストン 3 の凝縮の欠如から明らかなように、N M E 1 二量体又は N M E 7 中で培養されたヒト E S 細胞及び i P S 細胞はナীব状態である

ヒト E S (H E S - 3 幹細胞、BioTime Inc) 細胞及び i P S (S C 1 0 1 A - I p s c、System Biosciences) 細胞を、N M E 1 二量体 (N M 2 3 - R S) 又は N M E 7 (N M E 7 - A B コンストラクト) のいずれかを含む最小培地 (「M M」) 中で 8 継代～10 継代に亘って培養した。細胞を、M U C 1 * 受容体の P S M G F R 配列の遠位部に結合する抗 M U C 1 * モノクローナル抗体 (M N - C 3) 1 2 . 5 u g / m L でコーティングされた V I T A (商標) プレート (ThermoFisher) 上にプレーティングした。10 継代の間定期的に幹細胞試料を免疫細胞化学 (I C C) によってアッセイし、共焦点顕微鏡 (Z e i s s L S M 5 1 0 共焦点顕微鏡) 上で分析してヒストン 3 の細胞内局在を判定した。ヒストン 3 が核内に凝縮すると (単一の点として現れる)、X 染色体のコピーが不活性化され、その細胞はもはや純粋にグラウンド状態でもナীব状態でもな

10

20

30

40

50

い。幹細胞がプライムド状態からナイーブ状態へと復帰すると（全ての商業的に入手可能な幹細胞はFGF中で培養することによりプライムド状態になる）、ヒストン-3は「くもり（cloud）」や全体に亘って斑点として見られるか、検出されない。図34Fは標準プロトコルに従ってMEF上においてFGF中で成長されたこと以外は同じ起源細胞に由来するコントロール細胞を示し、これらの全てが核内に凝縮したヒストン-3（H3K27me3）を示し、それらの100%全てがプライムド状態にあり、ナイーブ状態にはないことを裏付けている。逆に、NME7において10継代に亘り培養された同じ起源の細胞は、凝縮したヒストン-3を有さない幹細胞のいくつかの領域を有し、それらがX染色体不活性化前であり、真のナイーブ状態にあることを示している（図34D、図34Eを参照、白色矢印は凝縮したヒストン-3について陰性の細胞を指す）。核内の凝縮したヒストン-3の欠如から明らかなように、これらの細胞のおよそ50%以上がナイーブ状態にある。図36A～図36Hは、NM23-S120G二量体中で培養された同じ細胞が、6継代目において僅か約25%～30%のみナイーブであったことを示す。ヒストン-3染色の「くもり」が図36B、図36Fにおいてみられる一方、図36C、図36Gは凝縮したヒストン-3を欠く細胞を指す白色矢印を示す。抗MUC1*抗体表面上においてNM23-S120G二量体中で8継代に亘り培養されたHES-3細胞の共焦点ICC画像（図37～図39）は、約50%がナイーブ状態にあり、核内においてヒストン-3染色を欠いていた。

10

【0307】

実施例17－実施例16で得られたヒストン-3染色の共焦点画像を定量した

20

共焦点顕微鏡（Zeiss LSM 510）で採取された免疫蛍光画像を使用し、FGF 4 ng/ml（p72）対NME1 8 nM（p6、p8、p10）対NME7 8 nM（p10）を含むMEF上で成長した細胞と比較して、HES-3幹細胞（BioTime Inc）のX染色体活性化状態の半定量的分析を行った。倍率20倍での無作為の視野のうち5～6の画像を、各成長因子について採取した。Oct3/4（#sc-5279、Santa Cruz）染色及び／又はNanog（#D73G4、Cell Signaling）染色を使用して多能性幹細胞を同定した。H3K27me3抗体（Xistのマーカ；#C36B11、Cell Signaling）に陽性の多能性幹細胞を、核内の明収束点（bright focused spot）により同定した。H3K27me3染色に陰性の細胞は、僅かに拡散した収束していない染色を有するか、又は存在していないかのいずれかであった。画像当たりの総細胞数（H3K27me3染色に対して陽性及び陰性）をImage JにおけるCell Counterマクロを使用して計測し、データをH3K27me3抗体に対して陰性の細胞（すなわち、X染色体活性化細胞）の割合として表す。

30

【0308】

実施例18－MEFフィーダー細胞上でのFGF培地中における従来の培養と比較したNME1二量体（8 nM）又はNME7（8 nM）のいずれかにおいて培養されたヒトES細胞及びiPS細胞のクローニング効率の測定

ヒトES細胞（HES-3、BioTime Inc.）及びヒトiPS細胞（SC101A-1、System Biosciences Inc.）を、NME1二量体（8 nM）又はNME7（8 nM）のいずれかを含む最小培地「MM」中で少なくとも10継代に亘り培養した。12.5 µg/mlの「C3」又は「MN-C3」と呼ばれるモノクローナル抗MUC1*抗体でコーティングされたVITA（商標）6ウェルプレート（ThermoFisher）上に細胞をプレーティングした。細胞を以下の密度でプレーティングした：1ウェル当たり1000細胞、3000細胞、及び5000細胞。コントロールとして、同数の同じ親細胞株由来の細胞をMEFフィーダー細胞層上にプレーティングし、bFGF 4 ng/ml中で培養した。4日～6日後、細胞を添付の指示書に従ってアルカリホスファターゼ（Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit、Sigma-Aldrich）で染色し、各条件に対して生じた個別のコロニーの数を計測した。図41Aを参照。プレーティングした細胞数当たりのコロニー数及び算出されたパーセント効率を図41Bに示す。ES細胞又はiPS細胞にかかわらず、NME1又はNME7中で培養された幹細胞の

40

50

クローニング効率は約20%であった。しかしながら、これらの細胞集団のヒストン-3 ICC分析により、10継代まで、僅か約50%の細胞がX染色体不活性化前の状態、すなわち真のナイーブ状態であることが示された。したがって、ナイーブ細胞の実際のクローニング効率は、少なくとも二倍であり約40%である。マウスナイーブ幹細胞のクローニング効率は約30%である。この実験において、コントロールのクローニング効率実験を、同じ細胞をMEFフィーダー細胞上においてbFGF 4 ng/mL中で培養して行い、1%のクローニング効率を得た。

【0309】

実施例19-FGF及びTGF-βを含まない最小培地(MM)若しくはE8培地、組換えヒトNM23-RS(NME1 S120G二量体)若しくはNME7-ABのいずれかを含有する「MN6」のいずれかにおいて培養されたヒトiPS細胞及びES細胞

ヒトiPS細胞(SC101A-1、System Biosciences Inc.)を12.5 µg/mLの抗MUC1*ma b、C3でコーティングされたCOSTARプレート上にプレATINGし、最小培地(「MM」)又は8 nMのNM23-RS(NME1 S120G二量体)若しくはNME7(NME7-AB)で補填されたFGF及びTGF-βを含まないE8培地(「MN6」)中で培養した。ここで、rhoキナーゼ阻害剤(ROCKi)も(常に)培地に添加されるか、最初の48時間のみ添加されるか、又は添加されることがない(図42~図45を参照)。図は、ROCKiの存在下において、細胞は付着し、培地交換後、より多くの付着細胞を残す延展開態(spreading morphology)を有することを示す。ROCKiの不在下でNM23-RS又はNME7のいずれかと共に培養された細胞は、基礎培地がMM最小培地ではなくMN6である場合により多くの細胞付着を有する。マドリゲル上に細胞をプレATINGする以外は同じ実験を行った場合、ROCKiが存在するか否かは問題ではない(図46~図48を参照)。ヒトES細胞(HES-3、BioTime Inc.)を使用して同じ実験を行ったところ、本質的に同じ結果が得られた(図49~図50)。

【0310】

実施例20-FGF及びTGF-βを含まない最小培地(MM)又はE8培地、組換えヒトNM23-RS(NME1 S120G二量体)又はNME7-ABのいずれかを含有する「MN6」のいずれかにおいて培養されたマドリゲル上のヒトiPS細胞及びES細胞に関するRT-PCRにより定量化されたナイーブ遺伝子及びプライムド遺伝子の発現

マドリゲル上にプレATINGされたヒトES細胞(HES-3、BioTime Inc.)を、rhoキナーゼ阻害剤(ROCKi)を含む/含まないMN6培地中又はNME7 8 nMで補填されたMM培地中のいずれかで培養した。比較のため、細胞をbFGF含有E8培地中でも培養した。上記実施例13に記載されるようにRT-PCRを行い、E8コントロールに対して正規化した。望ましくないプライムド状態のマーカーはFOXA2、OTX、LHX及びXISTである。望ましいナイーブ状態のマーカーは、OCT4、NANOG、KLF4及びKLF2である。図51は、MN6/NME7中で培養された細胞がE8と比較して一部の多能性遺伝子の発現が増加し、プライムド遺伝子FOXA2の発現が減少していることを示す。

【0311】

実施例21

ヒトES細胞(HES-3、BioTime Inc.)を抗MUC1*抗体(C3)でコーティングされたVITA(商標)プレート(ThermoFisher)上にプレATINGし、最小培地(MM)中の組換えヒトNM23(NME1 S120G二量体)中又はNME7-AB中のいずれかで培養した。実施例13に記載されるようにRT-PCRを行った。望ましくないプライムド状態のマーカーはFOXA2、OTX、LHX及びXISTである。望ましいナイーブ状態のマーカーは、OCT4、NANOG、KLF4及びKLF2である。図52に示されるように、NM23で培養された細胞とNME7で培養された細胞との間に本質的な相違はない。

【0312】

実施例 22. NME タンパク質中対 FGF 中において、rho キナーゼ阻害剤の存在下又は不在下における様々な表面上で培養されたヒト ES 細胞の RT-PCR 分析

ヒト ES 細胞 (HES-3、BioTime Inc.) を、抗 MUC1 * 抗体 (C3) でコーティングされた VITA (商標) プレート (ThermoFisher)、MEF フィーダー細胞、又はマドリゲル上のいずれかにプレATINGした。VITA/C3 抗体表面上の細胞を、NM23-H1 S120G 二量体 (NME1 二量体) を含む最小培地 (MM) 中又は NME7-AB 中で 3 継代に亘り培養した。MEF 上にプレATINGされた細胞を、標準的な技法に従って FGF を含む MM 中で 23 継代に亘り培養した。マドリゲル上の細胞を MM 培地中又は MN6 培地中の NME7 中で、また rho キナーゼ阻害剤 (ROCI) の存在下又は不在下で 1 継代培養した。望ましくないプライムド状態のマーカーは、FOX A2、OTX、LHX 及び XIST である。望ましいナープ状態のマーカーは、OCT4、NANOG、KLF4 及び KLF2 である。図 53 に示されるように、NME7-AB 及び NM23-H1 二量体に関する遺伝子発現プロファイルは、本質的に同等である。留意すべきは、NME タンパク質中における僅か 3 回の継代の後、FGF 成長に起因して、細胞はまだ完全にナープではなく、X 染色体不活性化の指標である XIST がなお高い。実施例 17 を参照すると、6 継代目において、僅か 25%~30% の細胞が 2 つの活性な X 染色体を有し、10 継代目においては 50% を超える細胞が真にナープ状態にあり、X 染色体不活性化前である。図 53 は、NME で成長された細胞と比較して、一部のナープマーカーがより低く (KLF2/4)、一部のプライムドマーカーがより高い (FOX A2) ことを示す。マドリゲル上における NME7 中での成長は、MUC1 * 抗体表面上での成長と比較して、ナープ遺伝子の減少及びプライムド遺伝子の増加を伴う遺伝子発現のシグネチャに悪影響を及ぼす。同じ実験において、マドリゲル上にプレATINGされた細胞を、ROCI (rho キナーゼ阻害剤) を含む若しくは含まない、MM 培地中若しくは MN6 培地中の NM23-S120G 二量体中でも培養した (図 54)。ここでも、マドリゲル表面は遺伝子発現プロファイルにマイナスの影響を及ぼし、細胞をよりナープでないものにしていてと考えられる。

10

20

【0313】

実施例 23 - NME7 の検出

実施例 23. 1-胚性幹細胞及び iPS 細胞における NME7 の検出

ヒト ES 細胞 (BGO1v 及び HES-3)、並びに iPS 細胞 (SC101-A1) を NME 系培地中で培養した。ここで、細胞を抗 MUC1 * 抗体の層上にプレATINGした。NME7 種を同定するため、細胞を回収し、プロテアーゼ阻害剤 (Pierce) で補填した RIPA 緩衝液 (Pierce) で溶解した。細胞溶解物 (20 uL) を 12% SDS-PAGE 還元ゲル上で電気泳動により分離し、PVD F 膜 (GE Healthcare) に転写した。3% ミルクを含有する PBS-T でプロットをブロックし、その後一次抗体 (抗 NM23-H7 クローン B-9、Santa Cruz Biotechnology) と共に 4°C にて終夜インキュベートした。PBS-T で洗浄した後、メンブレンをセイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) 共役二次抗体 (ヤギ抗マウス、Pierce) と共に室温にて 1 時間インキュベートした。シグナルを Immun-Star Chemiluminescence キット (Bio-Rad) で検出した。図 55 A、図 C のウェスタンプロットは、NME7 が約 40 kDa の種として存在し、同様に約 25 kDa~30 kDa のより低分子量の NME7 種 (選択的スプライシングアイソフォームであるか、又は開裂等の翻訳後修飾である場合がある) としても存在することを示している。

30

40

【0314】

さらに、ヒト iPS 細胞 (SC101-A1) を上述のように培養するか、OCT4、NME1、NME6 又は NME7 を抑制する siRNA の存在下で培養した。図 56 のウェスタンプロットは、OCT4、NME6 又は NME7 が抑制された場合、高分子量のバンド (約 40 kDa) が消滅することを示す。しかしながら、NME1 が抑制された場合には、そのバンドは消滅しなかった。この結果は、NME6、NME7 及び OCT4 が極めて重要な多能性遺伝子であるという見解と一致する。また、この結果は、高分子量形態

50

が、その発現を調節する関連遺伝子の抑制に反応して発現される形態（開裂生成物の前に消滅する）であるという見解とも一致する。

【0315】

実施例23. 2-iPS馴化培地におけるNME7の検出

iPS馴化培地（20uL）を12%SDS-PAGE還元ゲルのいずれかで電気泳動により分離し、PVDF膜（GEHealthcare）へ転写した。3%ミルクを含有するPBS-Tでブロットをブロックし、その後一次抗体（抗NM23-H7クローンB-9、Santa CruzBiotechnology）と共に4℃にて終夜インキュベートした。PBS-Tで洗浄した後、メンブレンをセイヨウワサビペルオキシダーゼ（HRP）共役二次抗体（ヤギ抗マウス、Pierce）と共に室温にて1時間インキュベートした。シグナルをImmuno-Star Chemiluminescenceキット（Bio-Rad）で検出した。図55Bのウェスタンブロットは、およそ30kDaの分子量を有する分泌されたNME7種を示す。留意すべきは、組換え（recombinant）NME7-ABは33kDaの分子量を有し、それ自身が同時に2つのMUC1*ペプチドに結合することができ、また多能性幹細胞の成長を完全に支持し、多能性を誘導し、分化を阻害することである。約25kDa~30kDaのNME7種は、選択的スプライシングアイソフォームであるか、又は細胞からの分泌を可能とし得る開裂等の翻訳後修飾である場合がある。

10

【0316】

実施例23. 3-NME7免疫沈降法及び質量分析法による分析

ブルダウンアッセイをMUC1*陽性細胞のパネルに対してNME7特異的抗体（NM23 H7 B9、Santa Cruz）を使用して行った。乳がん細胞（T47D）並びにヒトES（BGO1v及びHES-3）細胞及びiPS（SC101-A1）細胞を標準プロトコル（T47D）により培養するか、又は抗MUC1*抗体の表面上においてNME系培地中で培養した。細胞を、プロテアーゼ阻害剤（Pierce）で補填したRIPA緩衝液（Pierce）で溶解した。細胞溶解物を10ugの組換えNME7-ABで補填し、4℃にて2時間インキュベートした。その後、DynabeadsプロテインG（Life technologies）に連結された抗NM23-H7（B-9、Santa CruzBiotechnology）により、4℃にて終夜、NME7を免疫沈降した。ビーズをPBSで2回洗浄し、免疫沈降されたタンパク質を12%SDS-PAGE還元ゲル上の電気泳動により分離した。タンパク質を銀染色（Pierce）により検出した。T47D試料及びBGO1v細胞からNME7と共に共免疫沈降された約23kDaのタンパク質バンドを切り出し、質量分析により分析した（Taplin MassSpectrometry Facility, Harvard Medical School）。以下に示されるように、質量分析によって、切り出されたタンパク質バンドは全てNME7 NDPK Aドメインに由来する配列を含有することが示された。NME7のAドメイン中の下線で示される配列が質量分析により同定された。

20

30

40

MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLH
LEDLFIGNKVNVFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINK
AGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPPIAMEILRDDAICEWK
RLLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPA
NTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFMMDRVNVVEEFYEVY
KGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAI
FGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN（配列番号113）

【0317】

NME7によって免疫沈降される約30kDaのより高分子量のタンパク質バンドは、質量分析によって分析されず、開裂産物若しくは選択的スプライシングアイソフォームであり得る内因性NME7タンパク質か、又は細胞溶解物に添加された約33kDaのNME7-ABの可能性がある。

【0318】

実施例24-NME7-ABが同時に2つのMUC1*細胞外ドメインペプチドに結合することを示すELISAアッセイ

50

C末端システインを有するPSMGFRペプチド(PSMGFR-Cys)を、Imjectマレイミド活性化BSAキット(Thermo Fisher)を使用してBSAに共有結合により連結した。PSMGFR-Cys連結BSAを炭酸塩/重炭酸塩緩衝液(pH 9.6) 0.1 M中に10 µg/mLまで希釈し、50 µLを96ウェルプレートの各ウェルに添加した。4℃での終夜インキュベーションの後、プレートをPBS-Tで2回洗浄し、3%BSA溶液を添加してウェル上の残りの結合部位をブロックした。室温にて1時間後、プレートをPBS-Tで2回洗浄し、PBS-T+1%BSA中に希釈したNME7を種々の濃度で添加した。室温にて1時間後、プレートをPBS-Tで3回洗浄し、PBS-T+1%BSA中に希釈した抗NM23-H7(B-9, Santa Cruz Biotechnology)を1/500希釈で添加した。室温で1時間後、プレートをPBS-Tで3回洗浄し、PBS-T+1%BSA中に希釈したヤギ抗マウス-HRPを1/3333希釈で添加した。室温にて1時間後、プレートをPBS-Tで3回洗浄し、ABTS溶液(Pierce)を使用して415 nmでNME7の結合を測定した。

10

【0319】

ELISA MUC1*二量体化: NME7結合用プロトコルを使用し、NME7を11.6 µg/mLで使用した。

【0320】

室温にて1時間後、プレートをPBS-Tで3回洗浄し、PBS-T+1%BSA中に希釈された、ヒスチジンでタグ付けされたPSMGFRペプチド(PSMGFR-His)又はビオチン化PSMGFRペプチド(PSMGFR-ビオチン)を種々の濃度で添加した。室温にて1時間後、プレートをPBS-Tで3回洗浄し、PBS-T+1%BSA中に希釈された抗ヒスチジントグ-HRP(Abcam)又はストレプトアビジン-HRP(Pierce)を1/5000の濃度で添加した。室温にて1時間後、プレートをPBS-Tで3回洗浄し、既に他のPSMGFRペプチド連結BSAに結合されているNME7へのPSMGFRペプチドの結合(抗His抗体又はストレプトアビジンによりシグナル伝達(signal)し得なかった)を、ABTS溶液(Pierce)を使用して415 nmで測定した。

20

【0321】

実施例25-NME6クローニング、発現及び精製

WT NME6 cDNA(大腸菌での発現用に最適化されたコドン)を、本発明者らの要求に応じGenscript(ニュージャージー州)により合成した。その後、WT NME6 cDNAを以下のプライマー: 5'-atcgacatatgacgcaaaatctgggctcggaaatg-3'(配列番号114)及び5'-actgcctcgagtgccggaccagaccacccgtgc-3'(配列番号115)を使用してポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅した。NdeI及びXhoI制限酵素(New England Biolabs)による消化の後、精製されたフラグメントを同じ制限酵素で消化されたpET21bベクター(Novagen)にクローニングした。

30

【0322】

実施例26-NME6タンパク質発現/精製

LBブロス(ルリアベルターニブロス)を1/10の終夜培養物と共に接種し、37℃にてOD600が約0.5に達するまで培養した。この時点で、イソプロピル-β-D-チオ-ガラクトシド(IPTG, Gold Biotechnology) 0.4 mMにより組換えタンパク質発現を誘導し、5時間後に培養を停止した。遠心分離(6000 rpmで4℃にて10分間)により細胞を回収した後、細胞ペレットをランニングバッファー: PBS(pH 7.4)、NaCl 360 mM、イミダゾール10 mM及び尿素8 Mで再懸濁した。37℃にて30分間、細胞懸濁液を回転プラットフォーム(275 rpm)上でインキュベートし、5分間氷上で超音波処理した。不溶性細胞片を遠心分離(20000 rpmで4℃にて30分間)により除去した。その後、清澄な溶解物をランニングバッファーで平衡化したNi-NTAカラム(Qiagen)に加えた。イミダゾール420 mMで補填されたランニングバッファー(8 CV)によりカラムからタンパク質を溶出する前に、カラムを4 CVのランニングバッファーで洗浄した後、イミダゾール30 mMで補填された4 C

40

50

Vのランニングバッファーで洗浄した。その後、タンパク質を透析によりリフォールディングした（図59）。

【0323】

実施例27ーリフォールディングプロトコル

1. Tris (pH 8.0) 100 mM、尿素 4 M、イミダゾール 0.2 mM、L-アルギニン 0.4 M、EDTA 1 mM及び5 %グリセロールに対して終夜透析する。
2. Tris (pH 8.0) 100 mM、尿素 2 M、イミダゾール 0.2 mM、L-アルギニン 0.4 M、EDTA 1 mM及び5 %グリセロールに対して24時間透析する。
3. Tris (pH 8.0) 100 mM、尿素 1 M、イミダゾール 0.2 mM、L-アルギニン 0.4 M、EDTA 1 mM及び5 %グリセロールに対して24時間透析する。
4. Tris (pH 8.0) 100 mM、イミダゾール 0.2 mM、L-アルギニン 0.4 M、EDTA 1 mM及び5 %グリセロールに対して8時間透析する。
5. Tris (pH 8.0) 25 mM、イミダゾール 0.2 mM、L-アルギニン 0.1 M、EDTA 1 mM及び5 %グリセロールに対して終夜透析する。
6. PBS (pH 7.4)、イミダゾール 0.2 mM、EDTA 1 mM及び5 %グリセロールに対して3時間の透析を3回行う。
7. PBS (pH 7.4)、イミダゾール 0.2 mM、EDTA 1 mM及び5 %グリセロールに対して終夜透析する。
8. 4℃にて30分間リフォールディングされたタンパク質を遠心分離し（18500 rpm）、更なる精製のため上清を採取する。

10

20

【0324】

タンパク質をサイズ排除クロマトグラフィー（Superdex 200）により更に精製した。

【0325】

本明細書における全ての参考文献はその全体が引用することにより本明細書の一部とする参照によりそれら全体が援用される。

【0326】

部分的に引用される参考文献の一覧

【0327】

参考文献

30

- Boyer L. A. et al. Cell 122, 947-956 (2005)
 Dexheimer et al. Mol Cancer Ther 8(5):1363-1377 (2009)
 Hikita et al. PLoS ONE 3(10), e3312 (2008)
 Jaenisch, R. and Young, R. Cell 132, 567-582 (2008)
 Kim, et al. Biochem Biophys Res Commun 307:281-289 (2003)
 Lowry, W.E. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105(8):2883-2888 (2008)
 Mahanta et al. PLoS ONE 3(4):e2054 (2008)
 Maherali, N. et al. Cell Stem Cell 1:55-70 (2007)
 Nakagawa, M. et al. Nature Biotechnol 26(1):101-106 (2008)
 Okabe-Kado, et al. FEBS Letters 1995 363: 311-315
 Okita, K. et al. Nature 448:313-317 (2007)
 Park, I.H. et al. Nature 451:141-146 (2008)
 Takahashi, K. & Yamanaka, S. Cell 126, 663-676 (2006)
 Takahashi, K. et al. Cell 131:861-872 (2007)
 Wernig, M. et al. Nature 448, 318-324 (2007)
 Wernig, M. et al. Cell Stem Cell 2, 10-12 (2008)
 Woltjen, K. et al. Nature 458, 766-770 (2009)
 Yamanaka, S. Cell stem Cell 1, 39-49 (2007)
 Yu, J. et al. Science 324, 797-801 (2009)

40

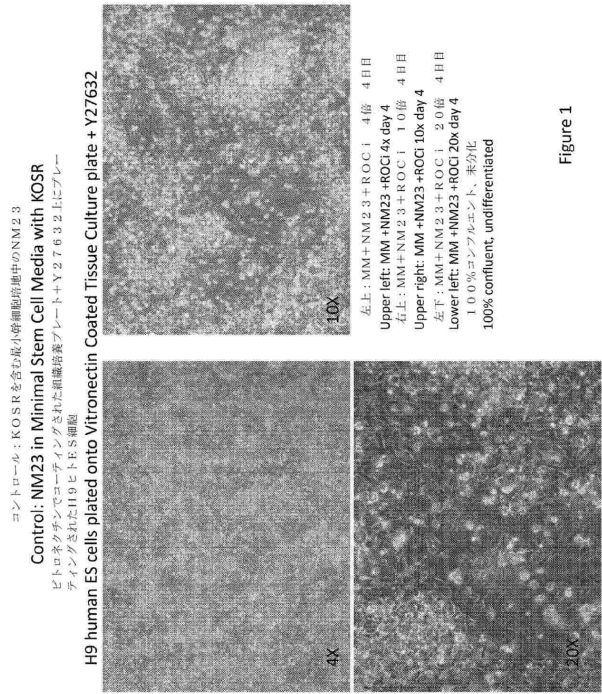
50

Yu, J. et al. *Science* 318, 1917-1920 (2007)
Zou et al. *MCB*, 20(2):628-633 (2000)
Zhou et al. *Cell Stem Cell* 4:381-384 (2009)
【0328】

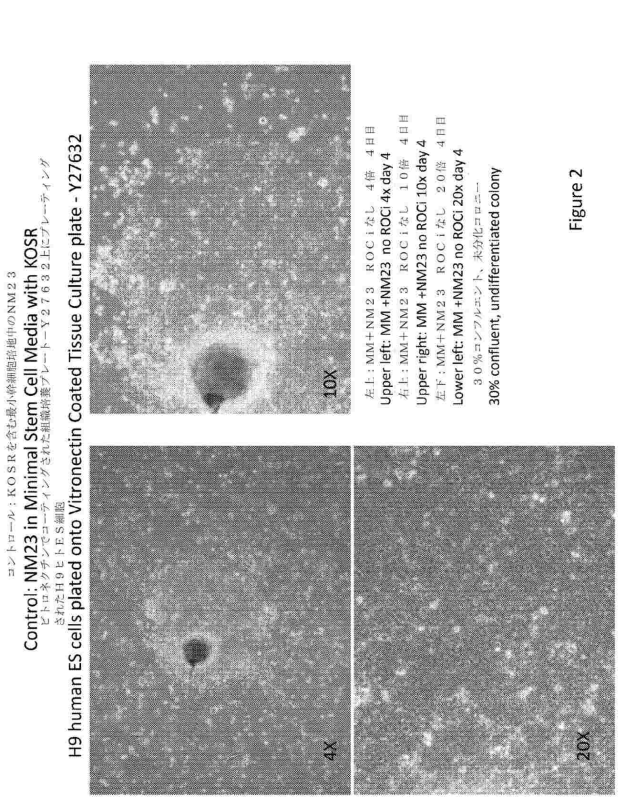
当業者であれば、日常的な実験を使用するだけで、本明細書において具体的に記載される本発明の特定の実施形態に対する多くの均等物を認識し、又は確認することができるであろう。かかる均等物は特許請求の範囲に包含されることが意図される。

【図面】

【図1】



【図2】



10

20

30

40

50

【図 3】

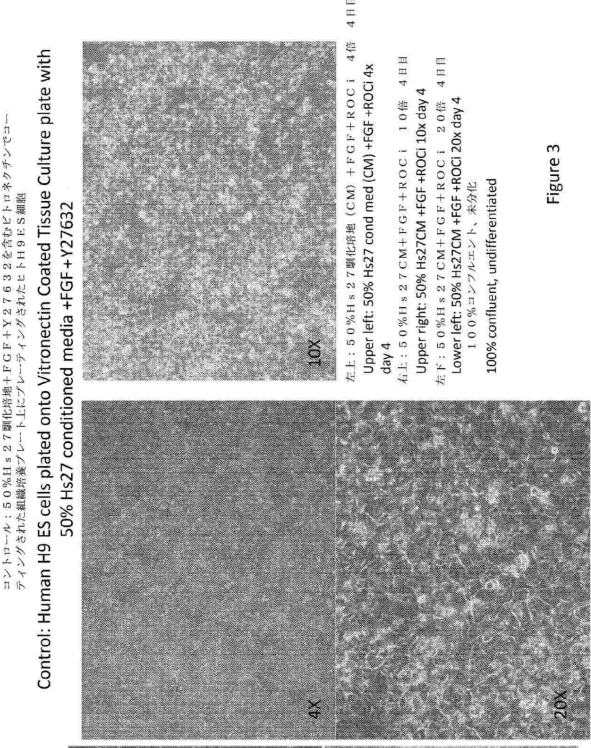


Figure 3

【図 4】

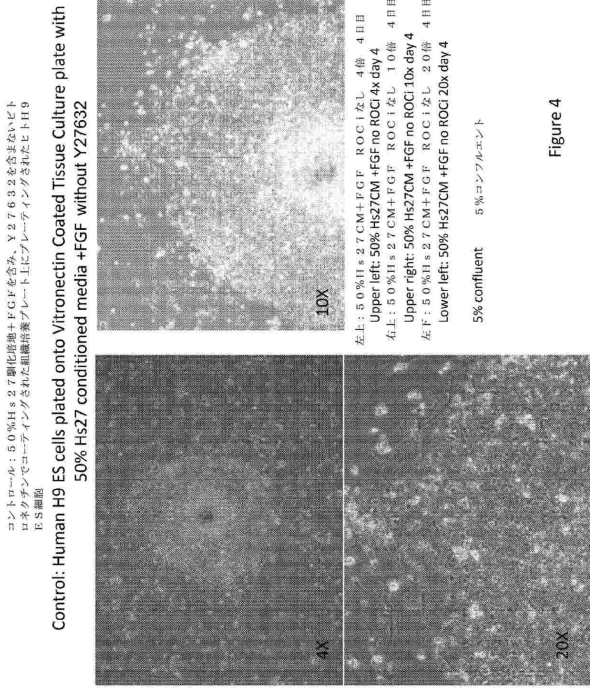


Figure 4

【図 5】

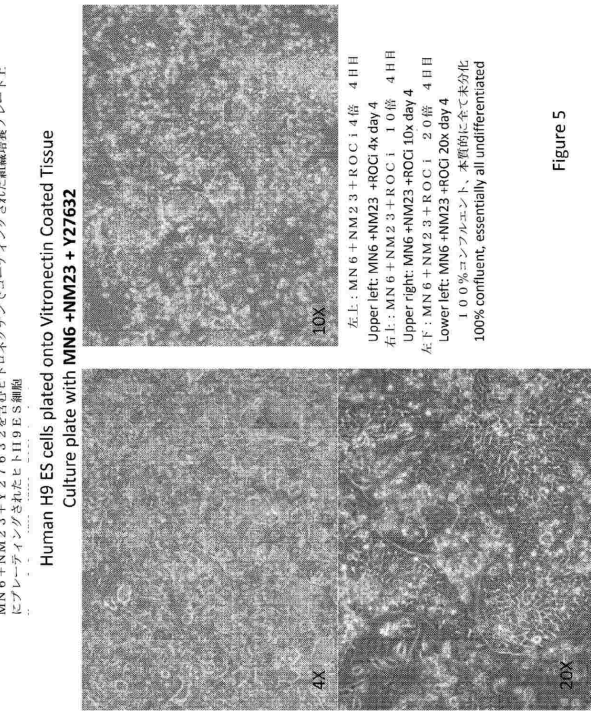


Figure 5

【図 6】

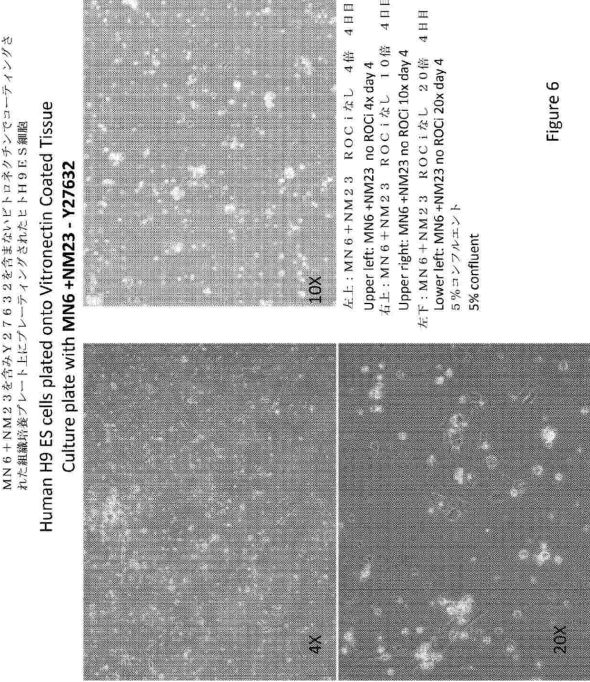


Figure 6

10

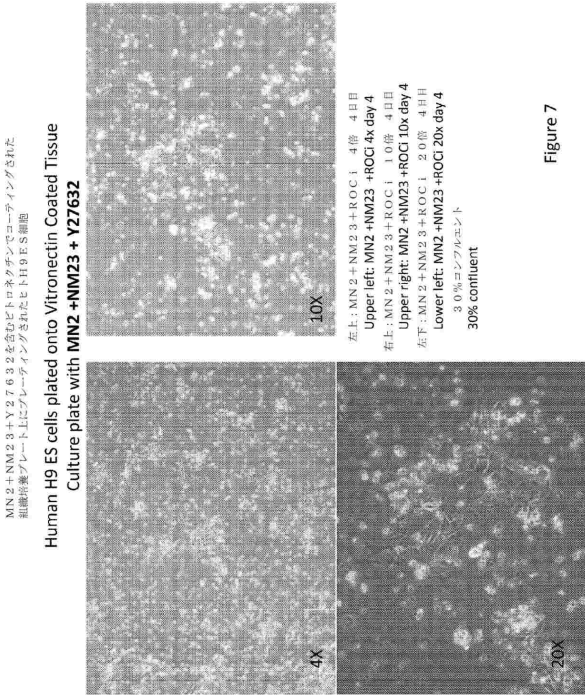
20

30

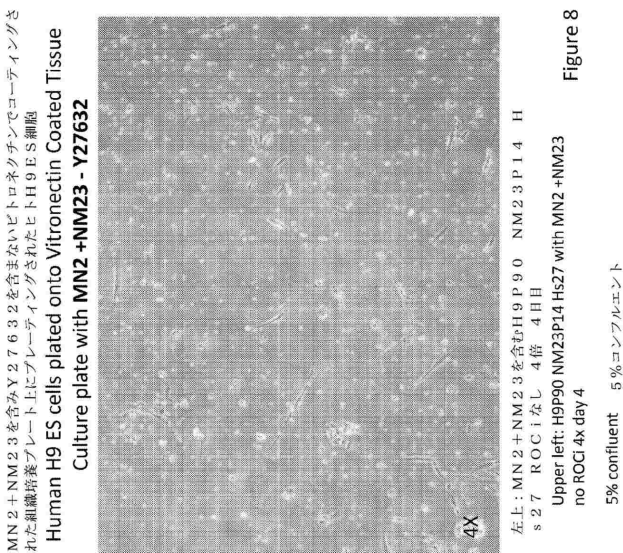
40

50

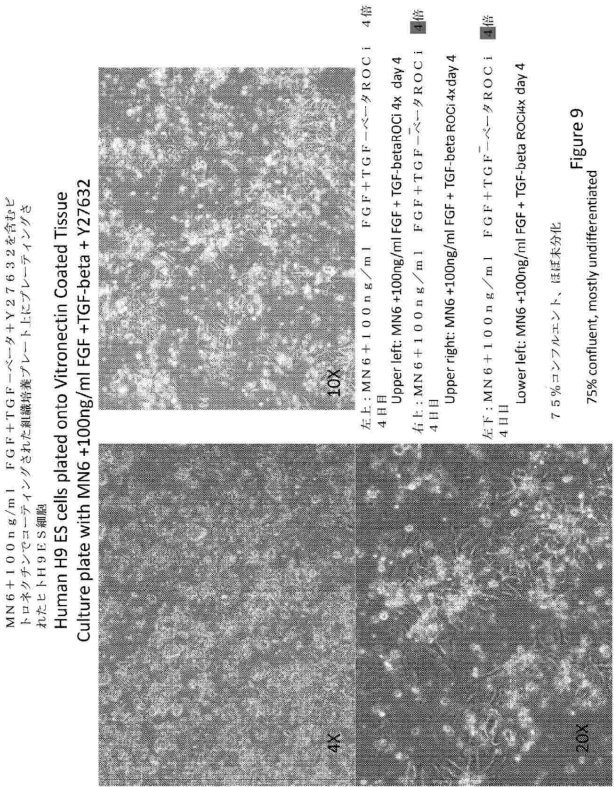
【図 7】



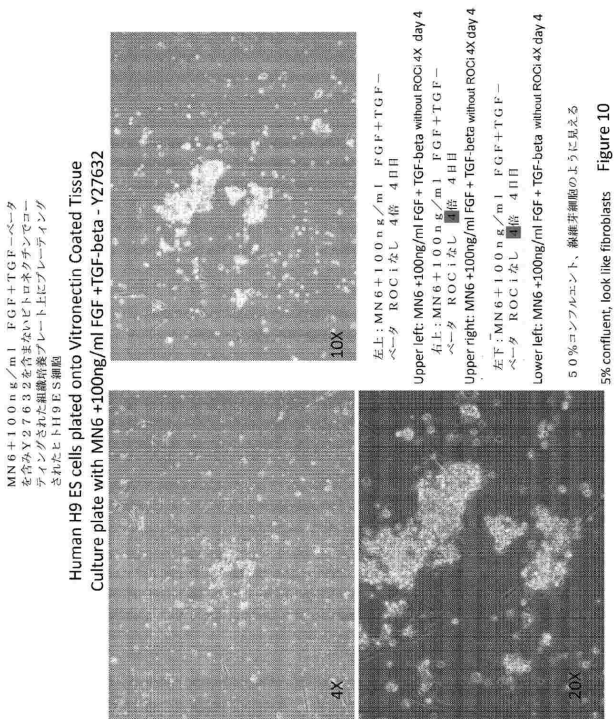
【図 8】



【図 9】



【図 10】



10

20

30

40

50

【図 1 1】

いずれも Y27632 を含む、MM+NM23 と MN6+NM23 とを比較する 4 日目における H9 P57 [FGF-MEF P55 前] MUC1*抗体表面 P1 H9 P57 [previous FGF-MEFs P55] MUC1* Antibody surface P1 Day 4 Comparing MM + NM23 to MN6 + NM23 all with Y27632

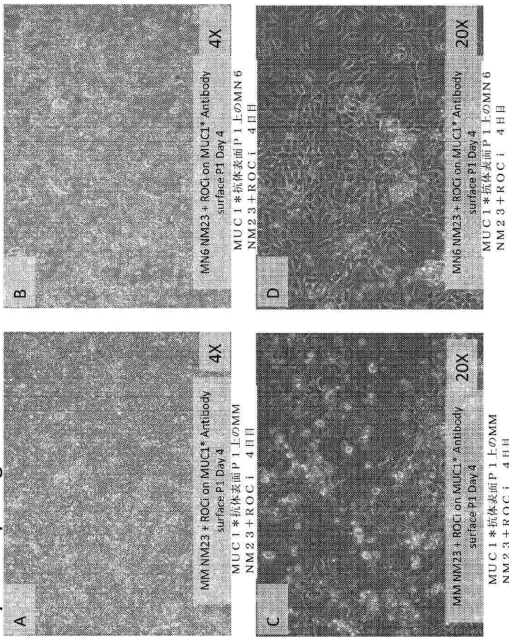


Fig. 11

【図 1 2】

H9 P57 [previous FGF-MEFs P55] MUC1* Antibody surface P2 Day 2 Comparing mTeSR to MN6 + NM23 all with Y27632

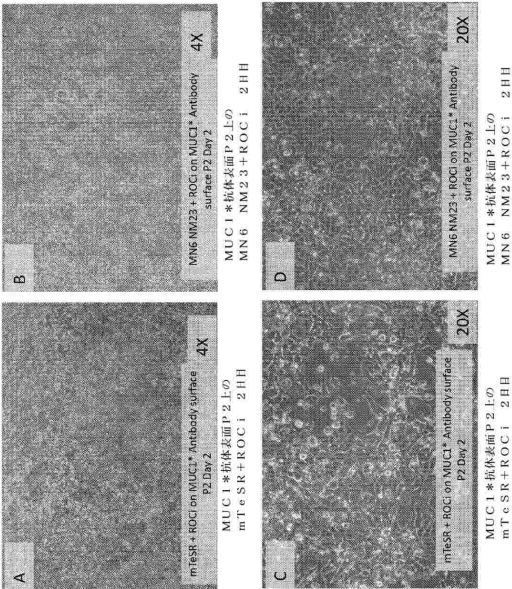


Fig. 12

【図 1 3】

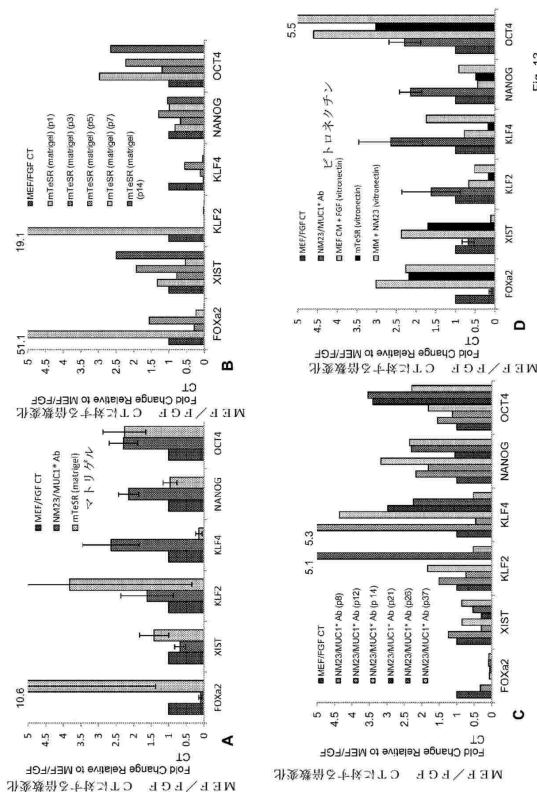


Fig. 13

【図 1 4】

All NMEs have NDPK Domains, but Enzyme Function is Not Required for its Role in Pluripotency; NME7 has 2 NDPK Domains & is a "Natural" Dimer; NME7 is Expressed at Higher Levels in More Naïve Stem Cells; Pull-Down Assay Shows it Binds to MUC1*

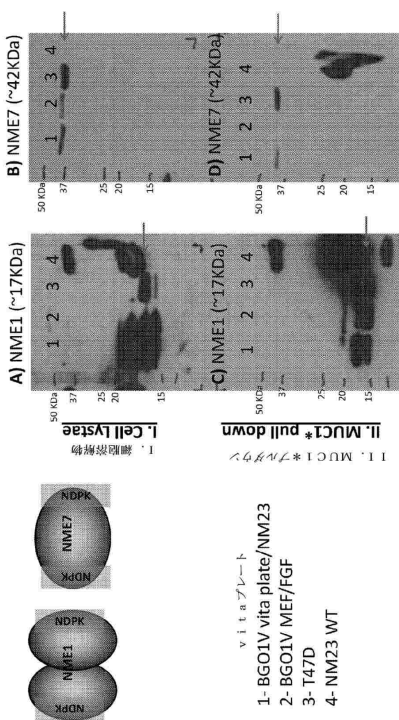


Fig. 14

【図 15】

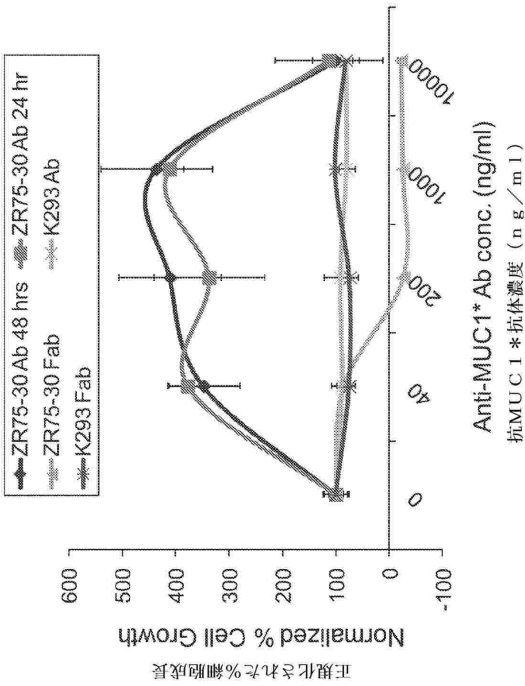


Figure 15

【図 16】

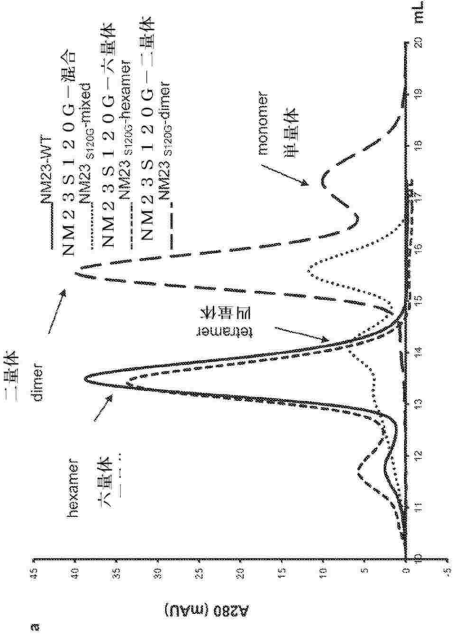


Figure 16

【図 17】

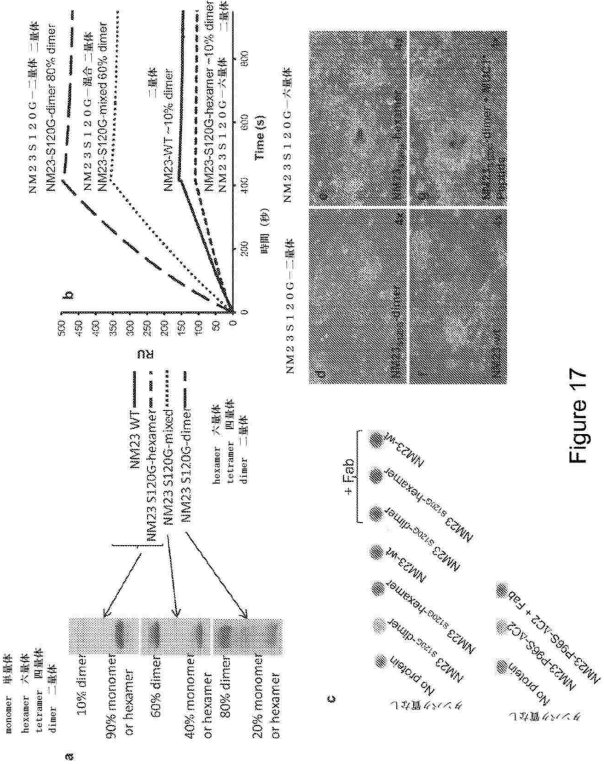


Figure 17

【図 18】

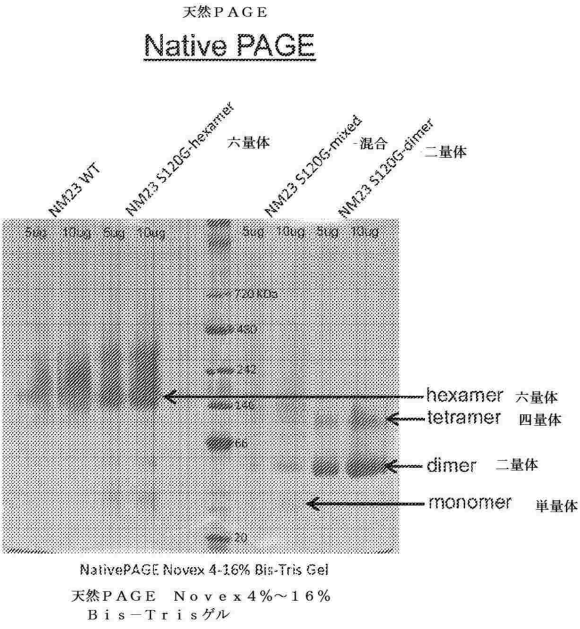


Figure 18

10

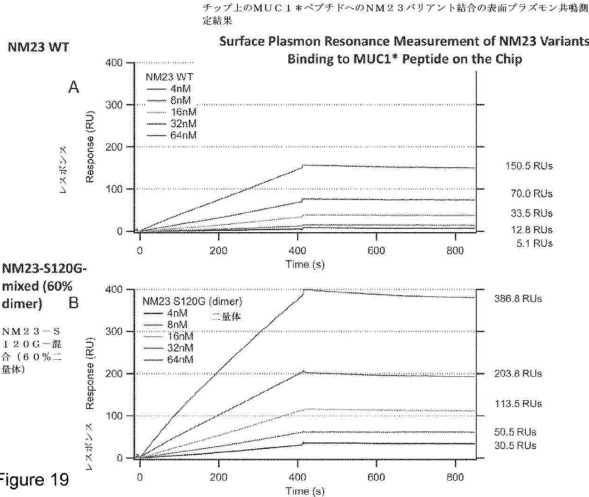
20

30

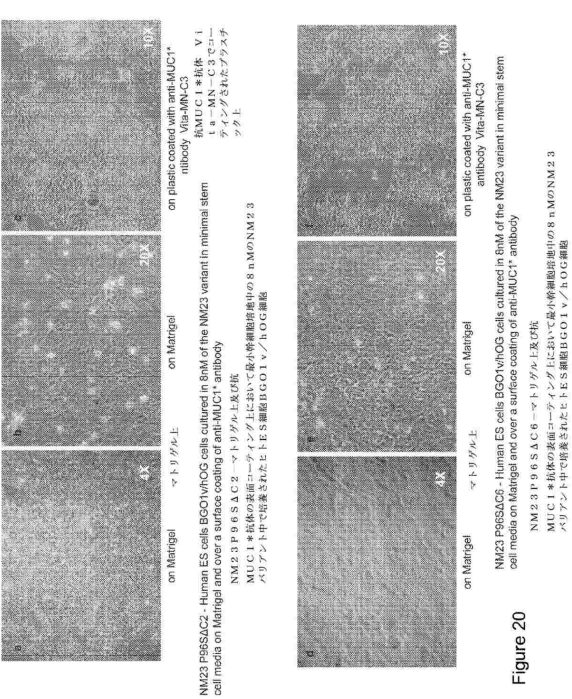
40

50

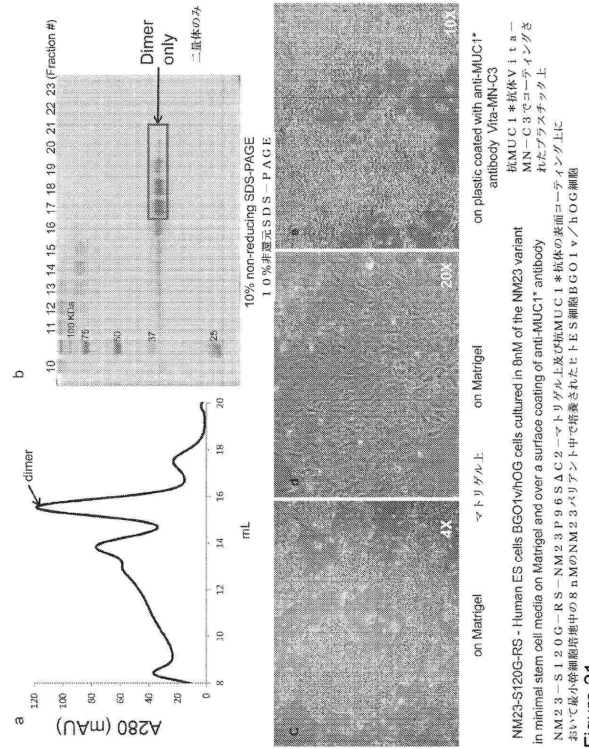
【図 19】



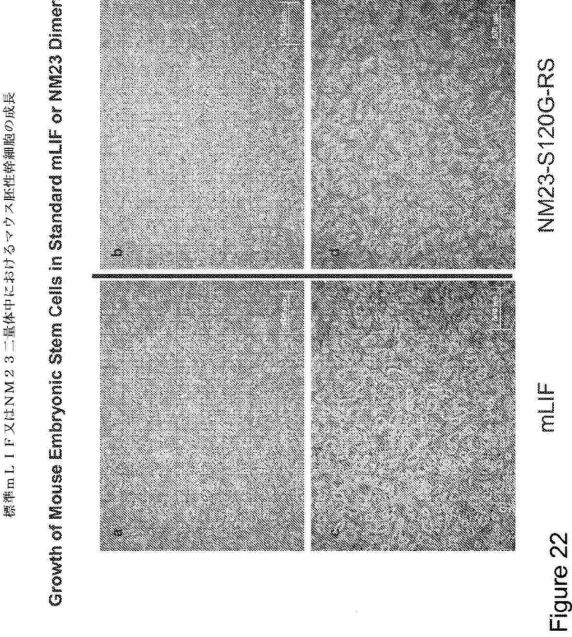
【図 20】



【図 21】



【図 22】



【図 2 3】

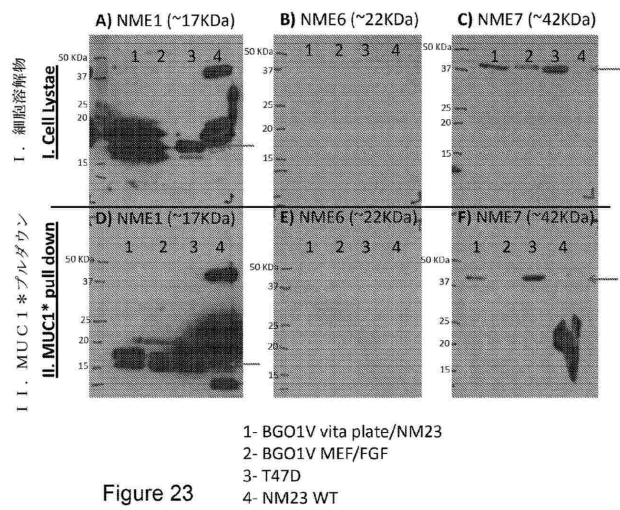


Figure 23

【図 2 4】

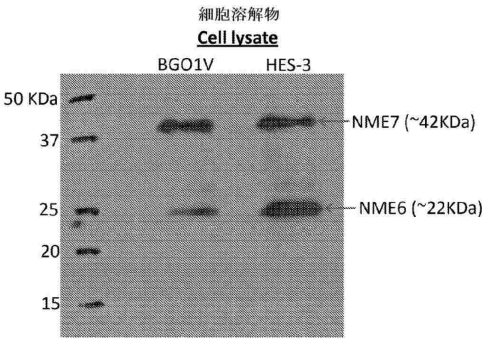


Figure 24

【図 2 5 - 0】

Recombinant native NME7-1 (NME7-1X) or NME7-2 (NME7-2X), an alternative splice isoform with an N-terminal deletion, expressed poorly or not at all in *E. coli*

端欠失を伴う選択的スプライスアイソフォームである、組換え天然NME 7-1 (NME 7-1 X) 又はNME 7-2 (NME 7-2 X) は大腸菌において発現が乏しいか、又は全く発現しなかった

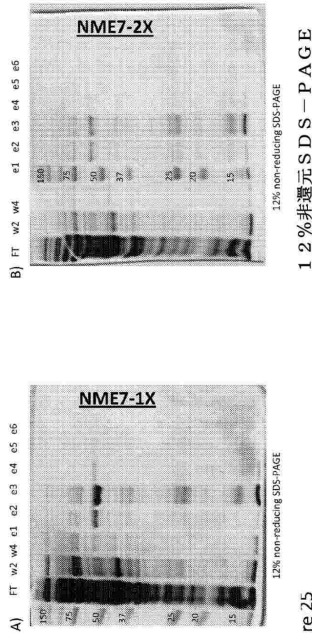


Figure 25

【図 2 5 - 1】

Recombinant native NME7-1 or NME7-2, an alternative splice isoform with an N-terminal deletion, expressed poorly or not at all in *E. coli*

N末端欠失を伴う選択的スプライスアイソフォームである、組換え天然NME 7-1又はNME 7-2は大腸菌において発現が乏しいか、又は全く発現しなかった

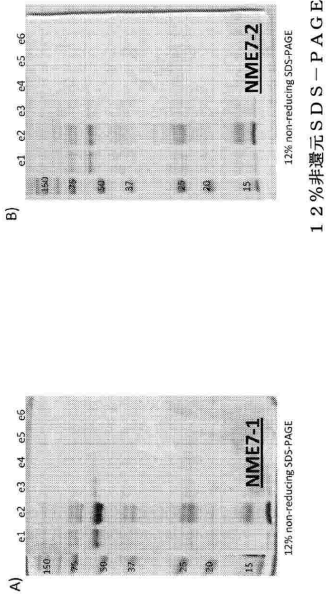


Figure 25.1

10

20

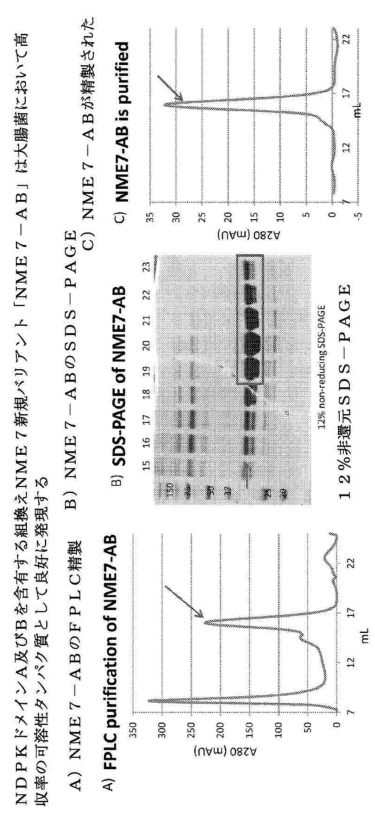
30

40

50

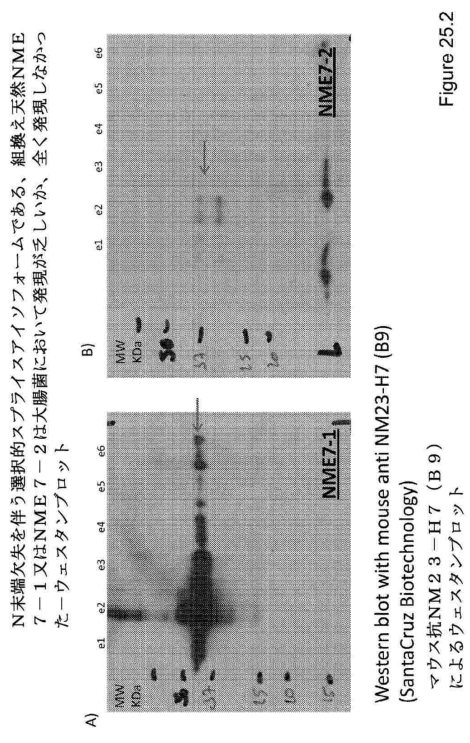
【図 2 7】

Recombinant NME7 novel variant containing NDPK domains A and B, “NME7-AB”, expresses well with high yield in *E. coli* and as the soluble protein

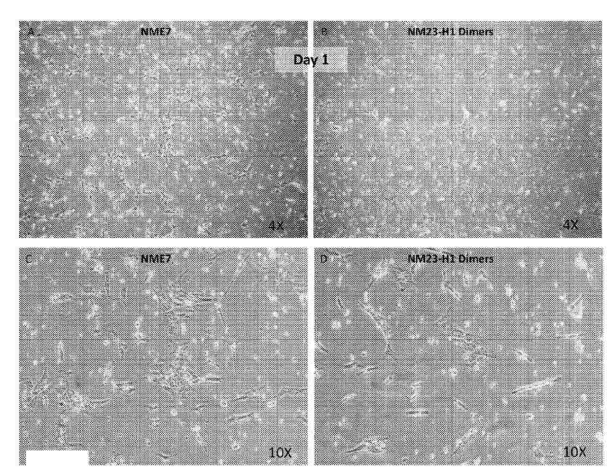


【図 2 5 - 1 - 2】

Recombinant native NME7-1 or NME7-2, an alternative splice isoform with an N-terminal deletion, expressed poorly or not at all in *E. coli* – Western blot

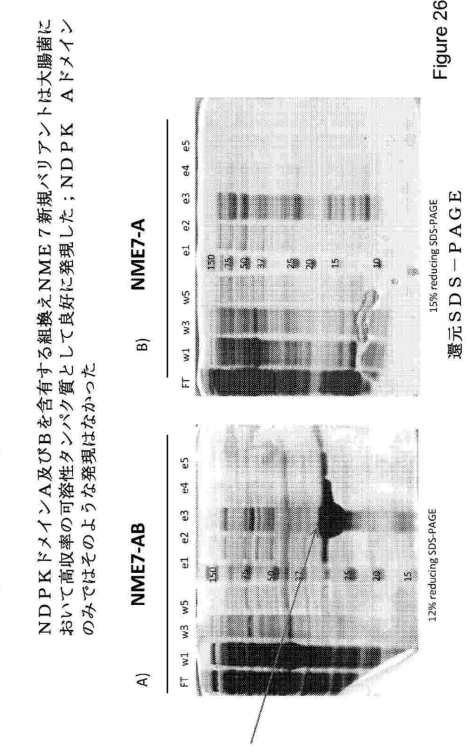


【図 2 8】



【図 2 6】

Recombinant NME7 novel variant containing NDPK domains A and B expresses well with high yield in *E. coli* and as the soluble protein; single NDPK A domain did not



【図 29】

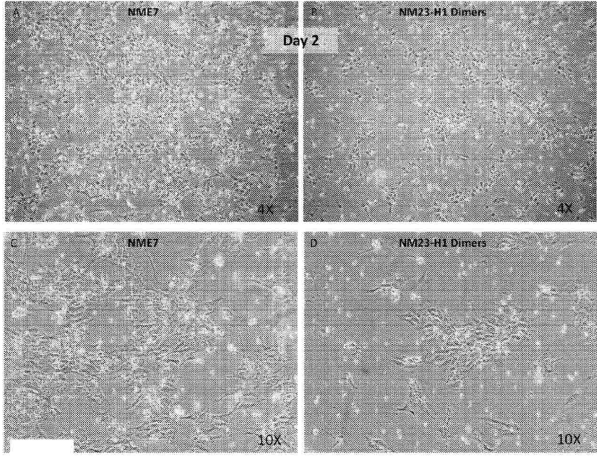


Figure 29

【図 30】

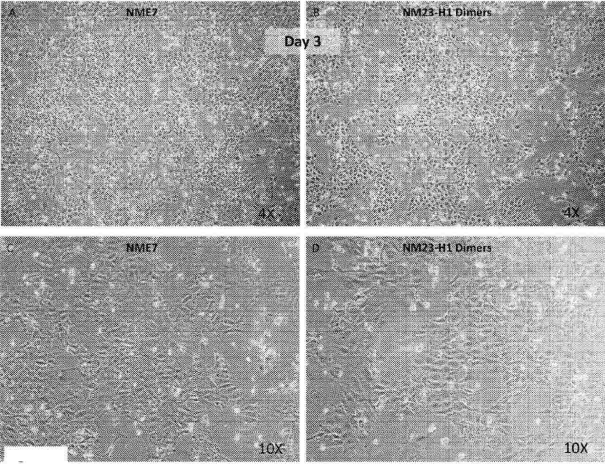
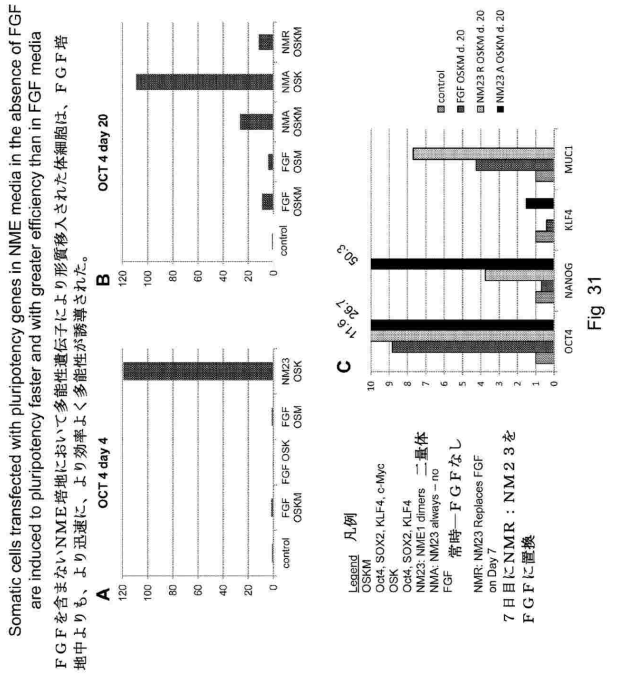
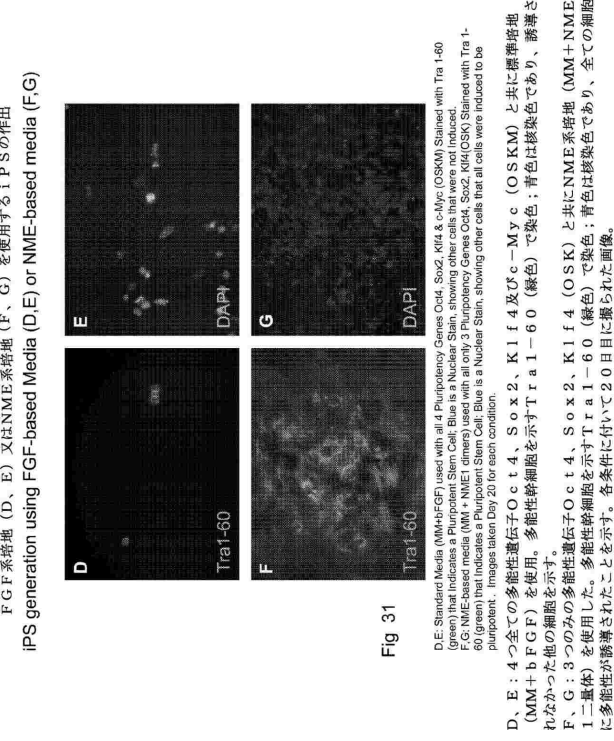


Figure 30

【図 31 - 1】



【図 31 - 2】



10

20

30

40

50

日比S-3細胞のX染色体の活性化状態：NME7-ABにおいて10継代後に約50%の活性化X染色体を有し、それらがライオン化細胞であることを示している

X-activation state of HES-3 cells: ~50% have active X after 10 passages in NME7-AB, indicating that they are naive stem cells

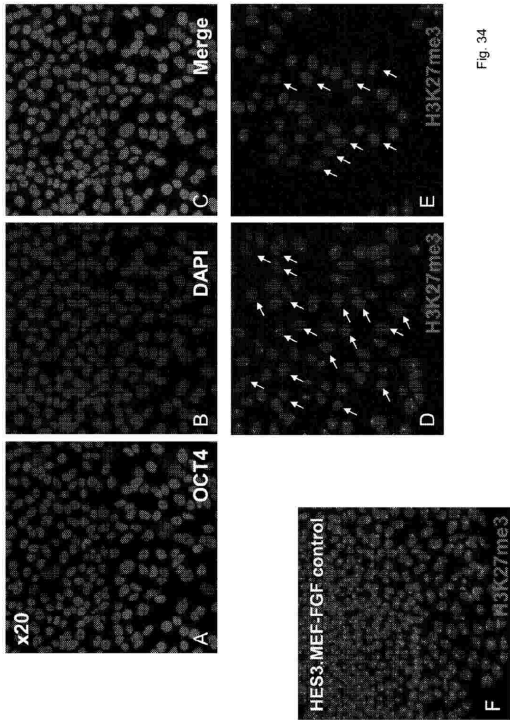


Fig. 34

NME7-AB P10におけるhES細胞に関する多能性マーカーに対するICC染色

ICC staining for pluripotency markers for hES cells in NME7-AB P10

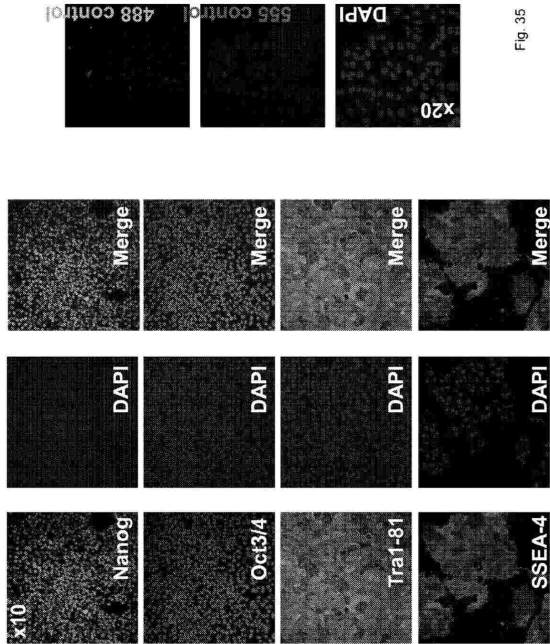


Fig. 35

【図 3 4】

【図 3 5】

【図 3 2】

NME1、NME6及びNME7がMUC1*に結合することを示す、MUC1*細胞質側末端に対する抗体を使用するプルダウンアッセイ
Pull Down Assay using antibody to MUC1* cytoplasmic tail, shows NME1, NME6 and NME7 Bind to MUC1*

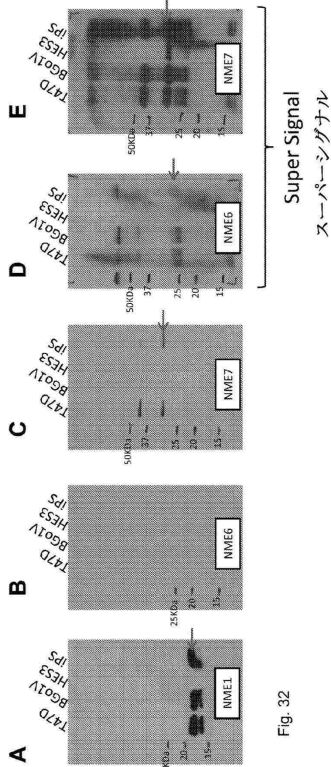


Fig. 32

【図 3 3】

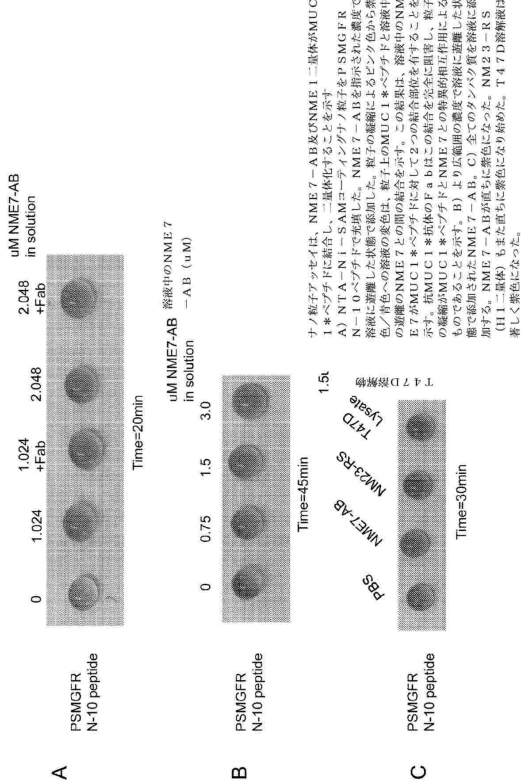


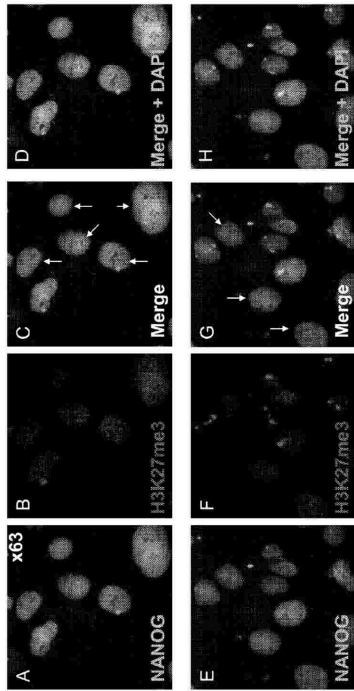
Fig. 33

ナノ抗体アッセイは、NME7-AB及びNME1二抗体がMUC1*ペプチドに結合し、二重化することを示す。A) NME7-ABとNME1-ABの両方をPSMGFR N-10ペプチドで共免疫した。NME7-ABとNME1-ABを指示する抗体は、抗体の結合によるピンク色から紫/青色への色の変化を示す。この結果は、溶液中のNME7がMUC1*ペプチドに対して2つの結合部位を有することを示す。抗MUC1*抗体のFabは、この結合を完全に阻害し、抗体の結合がMUC1*ペプチドとNME7との特異的相互作用によるものであることを示す。B) より広範囲の濃度で抗体を溶液に添加する。NME7-ABが完全に紫になった。NME7-ABは、NME1-ABよりもまた直ちに紫色になり始めた。T47D溶解液は、著しく紫色になった。

【図 3 6】

HES-3 細胞株の X 染色体活性化状態: NM23-S120G 二倍体中において 6 離代後には 5%~30% の活性な X 染色体を持つ、25%~30% の細胞がナイーブ幹細胞であることを示す。

X-activation state of HES-3 cell lines: ~ 25-30% have active X after 6 passages in NM23-S120G dimers, indicating 25-30% of the cells are naive stem cells by passage 6



Histone-3 staining as discrete dot in nucleus indicates cells are NOT in naive state and have undergone X-inactivation. White arrows indicate cells that are naive and have no condensed Histone-3. Cells are 100% positive for NANOG, indicating that they are all pluripotent stem cells.

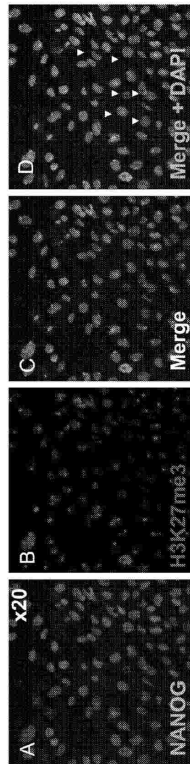
Fig. 36

核内の散在的な点としてのヒストン-3染色は、細胞がナイーブ状態ではなく、X染色体不活性化を解いたことを示す。白色矢印はナイーブであり、凝縮したヒストン-3を有さない細胞を示す。細胞はNANOGに100%陽性であり、それらが全て多能性幹細胞であることを示す。

【図 3 7】

HES-3 細胞株の X 染色体活性化状態: NM23-S120G 二倍体中において 8 離代後には 50%~60% が活性な X 染色体を持つ

X-activation state of HES-3 cell lines: ~ 50-60% have active X after 8 passages in NM23-S120G dimers



Histone-3 staining as discrete dot in nucleus indicates cells are NOT in naive state and have undergone X-inactivation. White arrows indicate cells that are naive and have no condensed Histone-3. Cells are 100% positive for NANOG, indicating that they are all pluripotent stem cells.

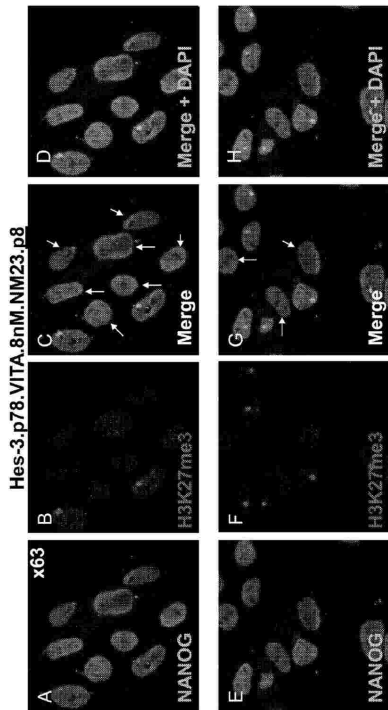
Fig. 37

核内の散在的な点としてのヒストン-3染色は、細胞がナイーブ状態ではなく、X染色体不活性化を解いたことを示す。白色矢印はナイーブであり、凝縮したヒストン-3を有さない細胞を示す。細胞はNANOGに100%陽性であり、それらが全て多能性幹細胞であることを示す。

【図 3 8】

HES-3 細胞株の X 染色体活性化状態: NM23-S120G 二倍体中において 8 離代後に約 50% が活性な X 染色体を持つ

X-activation state of HES-3 cell lines: ~ 50% have active X after 8 passages in NM23-S120G dimers



Histone-3 staining as discrete dot in nucleus indicates cells are NOT in naive state and have undergone X-inactivation. White arrows indicate cells that are naive and have no condensed Histone-3. Cells are 100% positive for NANOG, indicating that they are all pluripotent stem cells.

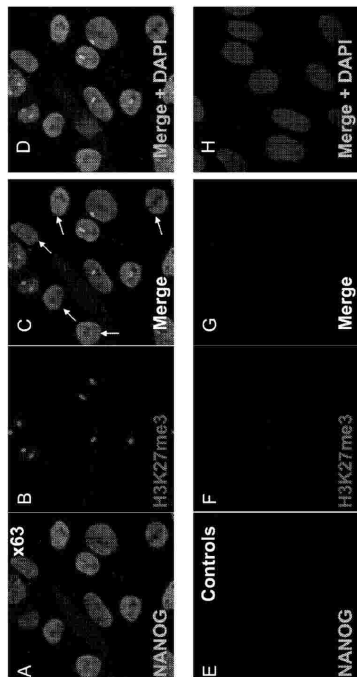
Fig. 38

核内の散在的な点としてのヒストン-3染色は、細胞がナイーブ状態ではなく、X染色体不活性化を解いたことを示す。白色矢印はナイーブであり、凝縮したヒストン-3を有さない細胞を示す。細胞はNANOGに100%陽性であり、それらが全て多能性幹細胞であることを示す。

【図 3 9】

HES-3 細胞株の X 染色体活性化状態: NM23-S120G 二倍体中において 8 離代後には 50% が活性な X 染色体を持つ

X-activation state of HES-3 cell lines: ~ 50% have active X after 8 passages in NM23-S120G dimers



Histone-3 staining as discrete dot in nucleus indicates cells are NOT in naive state and have undergone X-inactivation. White arrows indicate cells that are naive and have no condensed Histone-3. Cells are 100% positive for NANOG, indicating that they are all pluripotent stem cells.

Fig. 39

核内の散在的な点としてのヒストン-3染色は、細胞がナイーブ状態ではなく、X染色体不活性化を解いたことを示す。白色矢印はナイーブであり、凝縮したヒストン-3を有さない細胞を示す。細胞はNANOGに100%陽性であり、それらが全て多能性幹細胞であることを示す。

10

20

30

40

50

【図 4 0】

継代数の関数としてのNME系培養中におけるナイーブな細胞の割合
Percentage of cells that are naïve as a function of passage number
in NME-based media

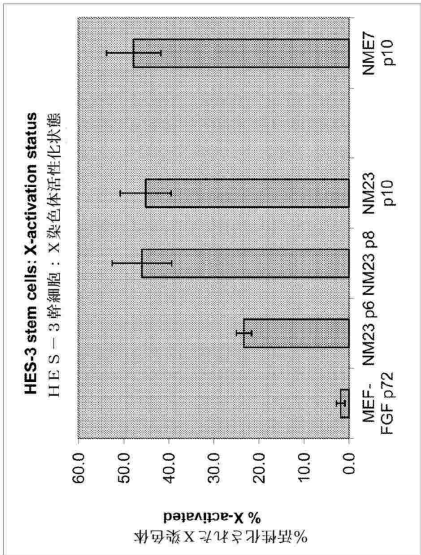


Fig. 40

【図 4 1 A】

クローニング効率アッセイ
Cloning Efficiency Assay

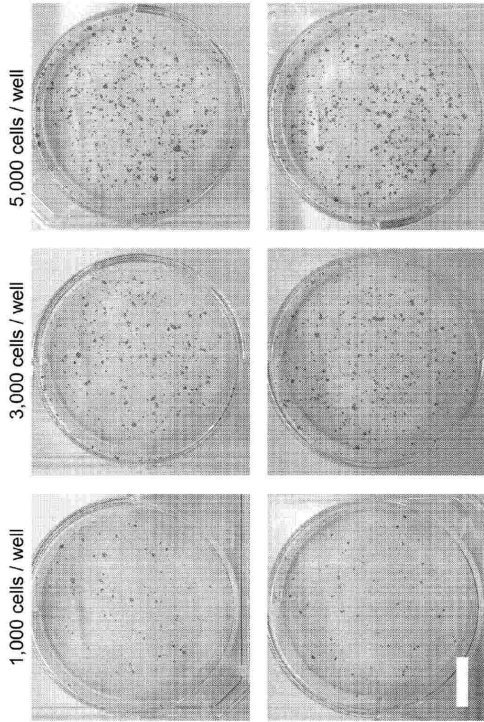


Figure 41A

【図 4 1 B】

クローニング効率アッセイ

Cloning Efficiency Assay

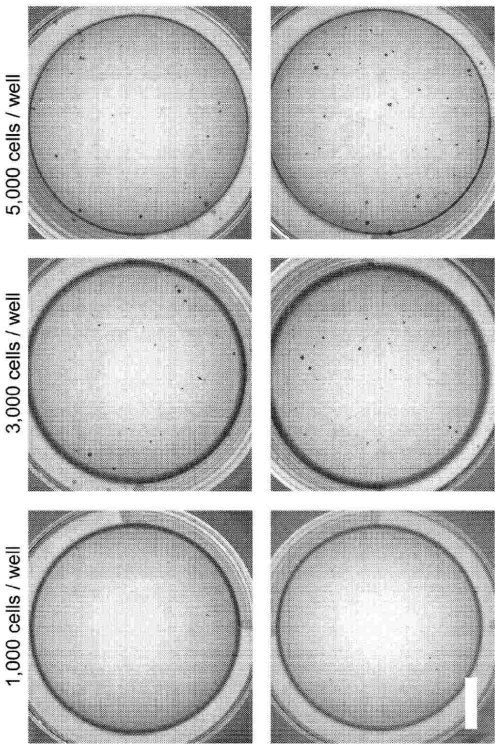


Figure 41B

Figure 41A

【図 4 1 C】

単一細胞クローニング効率: HES-3 MEF-FGF v. VITA/C3-NM23
Single-Cell Cloning Efficiency:
HES-3 MEF-FGF v. VITA/C3-NM23

Fig. 41 C

Cells Plated per well	HES-3.MEF-FGF Alkphos+ colonies	HES-3.MEF-FGF cloning efficiency	HES-3.VITA.C3.NM23 Alkphos+ colonies	HES-3.VITA.C3.NM23 Cloning efficiency
1,000	11, 13	1.2%	184, 176 (D4)	18.0%
3,000	37, 48	1.4%	596, 675 (D4)	21.2%
5,000	68, 74	1.4%	TNTC* (D4)	

* Too numerous to count.
* 多量のため計測不可

10

20

30

40

50

【図 4 2】

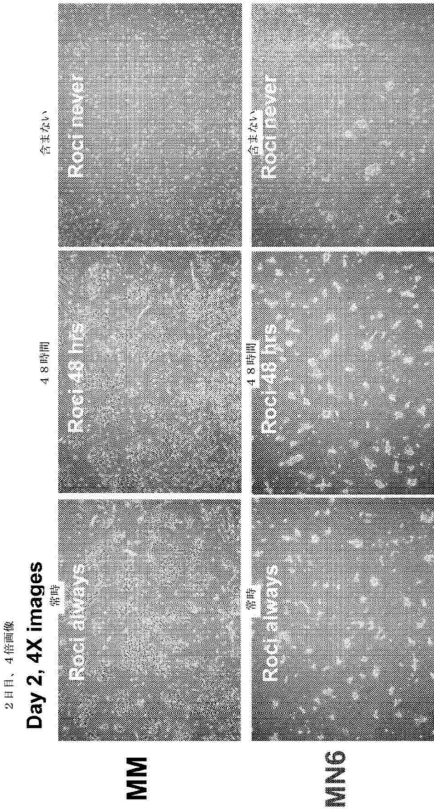


Fig. 42

【図 4 3】

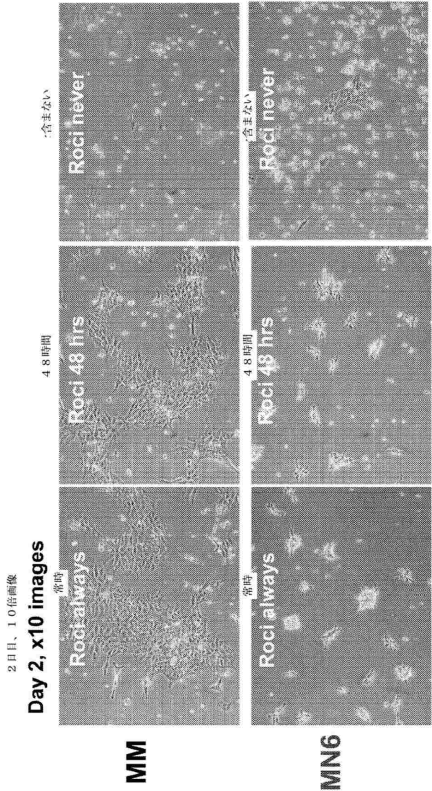


Fig. 43

【図 4 4】

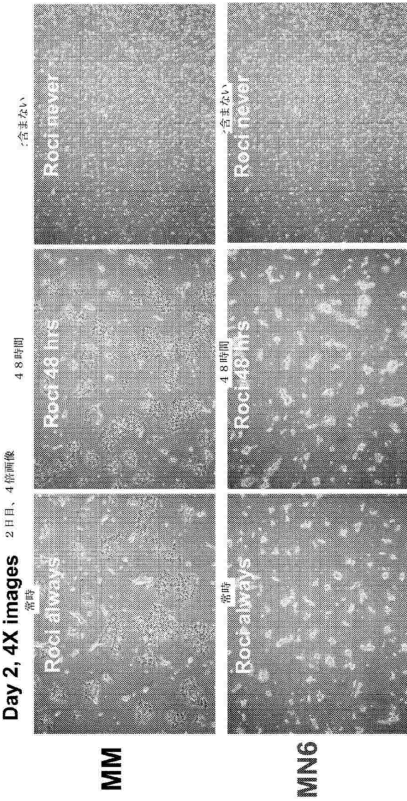


Fig. 44

【図 4 5】

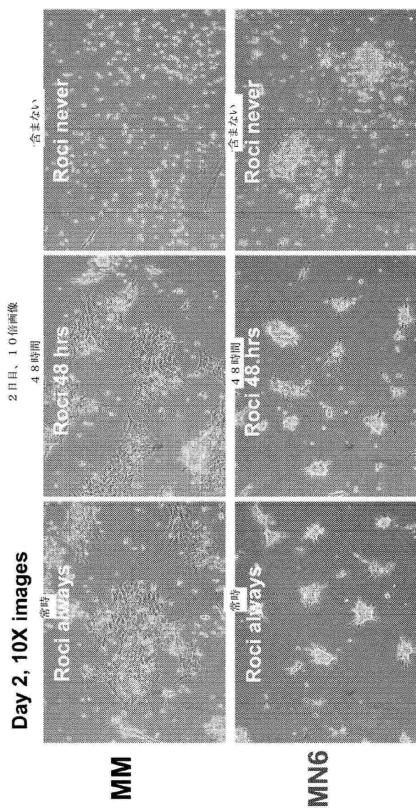


Fig. 45

10

20

30

40

50

【 図 4 6 】

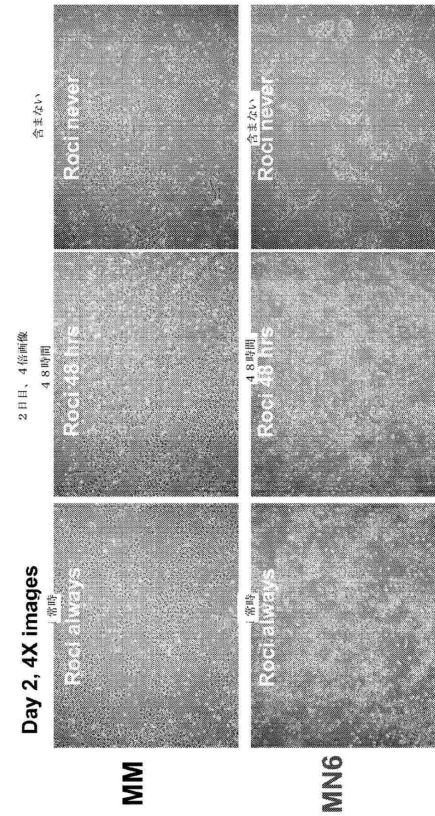


Fig. 46

【 図 4 7 】

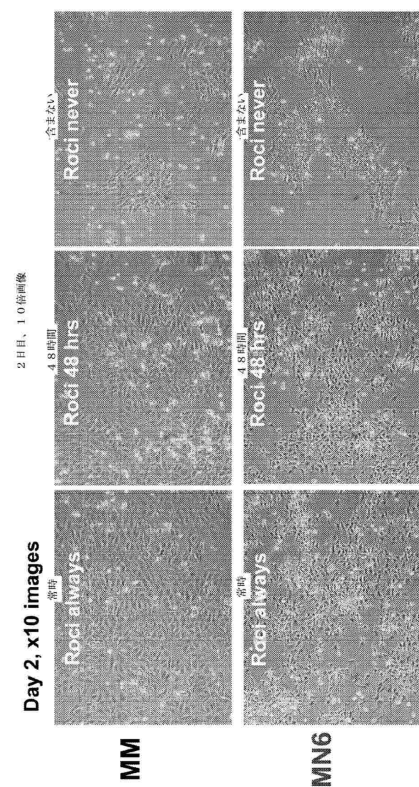


Fig. 47

【 図 4 8 】

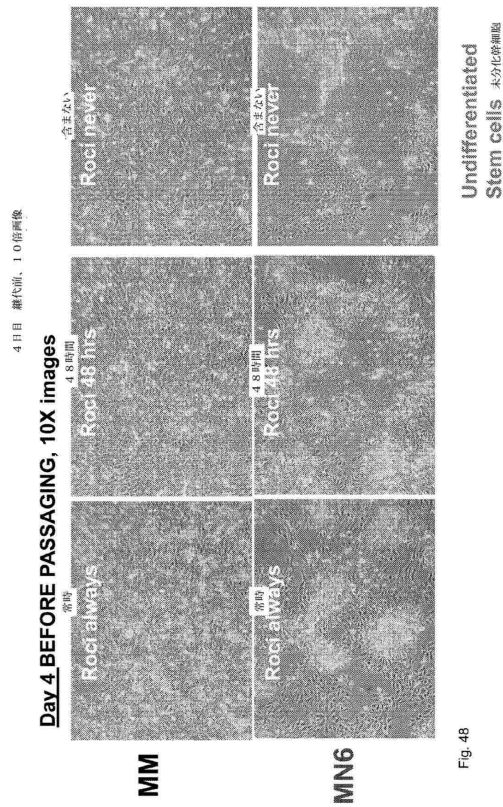


Fig. 48

【 図 4 9 】

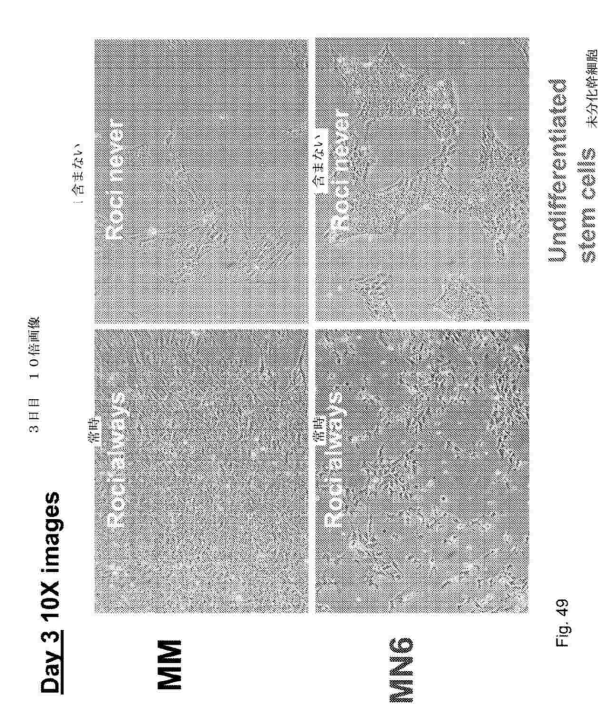


Fig. 49

10

20

30

40

50

NME 7がMUC1*を二量体化することを示すELISA

ELISA shows NME7 Dimerizes MUC1*

MUC1* extra cellular domain peptide immobilized on plate was bound by NME7 to saturation; a second MUC1* peptide with a C-terminal His-tag or Biotin tag was added and visualized by HRP labeled antibody to either His-tag or HRP labeled streptavidin

プレート上に固定化されたMUC1*細胞外ドメインペプチドを飽和するまでNME 7により結合した。C末端にヒスチジンタグまたはビオチンタグを有する第2MUC1*ペプチドを加え、HRP標識抗体もしくはHRP標識化ストレプトアビジンのいずれかに対するHRP標識化抗体により可視化した。

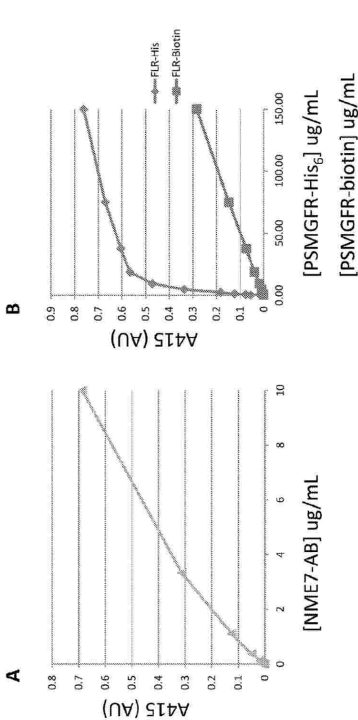


Fig. 58

大腸菌における組換えNME 6の作製及び精製

Generation and Purification of Recombinant NME6 in E coli

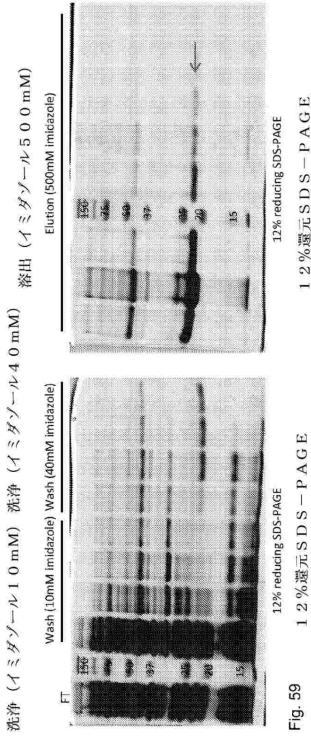


Fig. 59

2024038024000001.xml

【手続補正書】

【提出日】令和6年1月19日(2024.1.19)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

MUC1*活性化リガンドを含む、細胞の成長、維持及びより未熟な状態への復帰の誘導用の細胞培養培地。 10

【外国語明細書】

2024038024000065.pdf

20

30

40

50

フロントページの続き

- (33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 PCT/US2012/036975
(32)優先日 平成24年5月8日(2012.5.8)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/671,588
(32)優先日 平成24年7月13日(2012.7.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/618,578
(32)優先日 平成24年3月30日(2012.3.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/677,442
(32)優先日 平成24年7月30日(2012.7.30)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/548,199
(32)優先日 平成23年10月17日(2011.10.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/673,617
(32)優先日 平成24年7月19日(2012.7.19)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/671,558
(32)優先日 平成24年7月13日(2012.7.13)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/683,155
(32)優先日 平成24年8月14日(2012.8.14)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/693,712
(32)優先日 平成24年8月27日(2012.8.27)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/684,654
(32)優先日 平成24年8月17日(2012.8.17)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/675,292
(32)優先日 平成24年7月24日(2012.7.24)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)