

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6595468号
(P6595468)

(45) 発行日 令和1年10月23日 (2019. 10. 23)

(24) 登録日 令和1年10月4日 (2019. 10. 4)

(51) Int. Cl. F I
C 1 2 N 5/071 (2010. 01) C 1 2 N 5/071
C 1 2 N 5/10 (2006. 01) C 1 2 N 5/10

請求項の数 5 (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2016-531516 (P2016-531516)	(73) 特許権者	510273880
(86) (22) 出願日	平成26年7月22日 (2014. 7. 22)		コリア ユニバーシティ リサーチ アン
(65) 公表番号	特表2016-525370 (P2016-525370A)		ド ビジネス ファウンデーション
(43) 公表日	平成28年8月25日 (2016. 8. 25)		KOREA UNIVERSITY RE
(86) 国際出願番号	PCT/KR2014/006642		SEARCH AND BUSINESS
(87) 国際公開番号	W02015/016523		FOUNDATION
(87) 国際公開日	平成27年2月5日 (2015. 2. 5)		大韓民国、02841 ソウル、ソンプク
審査請求日	平成29年7月18日 (2017. 7. 18)		ーグ、アナムーロ 145
(31) 優先権主張番号	10-2013-0089205	(74) 代理人	100090251
(32) 優先日	平成25年7月27日 (2013. 7. 27)		弁理士 森田 憲一
(33) 優先権主張国・地域又は機関	韓国 (KR)	(74) 代理人	100139594
			弁理士 山口 健次郎
		(74) 代理人	100185915
			弁理士 長山 弘典

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 小分子化合物を含む多能性幹細胞の染色体安定性維持用組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

O c t 4、K l f 4、S o x 2 及び c M y c からなる遺伝子の導入によって産生される人工多能性幹細胞の染色体安定性維持用組成物であって、活性成分として、S B 4 3 1 5 4 2、P D 0 3 2 5 9 0 1、チアゾピビン、及びL-アスコルビン酸を含む染色体安定性維持用組成物。

【請求項 2】

染色体の構造的、数的突然変異抑制またはDNA損傷抑制を介して染色体の安定性を維持させることを特徴とする請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

O c t 4、K l f 4、S o x 2 及び c M y c からなる遺伝子の導入によって産生される人工多能性幹細胞の染色体安定性維持方法であって、請求項 1 又は 2 に記載の組成物で人工多能性幹細胞を処理することを含む、人工多能性幹細胞の染色体安定性維持方法。

【請求項 4】

前記組成物は、体細胞のリプログラミングを誘導する工程に添加されることを特徴とする請求項 3 に記載の人工多能性幹細胞の染色体安定性維持方法。

【請求項 5】

前記組成物は、リプログラミング誘導後に添加されることを特徴とする請求項 3 に記載の人工多能性幹細胞の染色体安定性維持方法。

【発明の詳細な説明】

10

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、小分子化合物を含む多能性幹細胞の染色体安定性維持用組成物に関し、より詳細には人工多能性幹細胞（*induced pluripotent stem cell*）の誘導工程及び誘導工程後の培養の間、染色体の構造的、数的突然変異またはDNA損傷を抑制できるROCK抑制剤、MEK抑制剤、ALK5抑制剤または抗酸化剤を含む人工多能性幹細胞の染色体安定性維持用組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

人工多能性幹細胞作製技術は、動物の体細胞を利用して胚性幹細胞と類似の状態の細胞を作る技術で、周知の4種類のリプログラミング因子（Oct4、Klf4、Sox2、cMy c）を細胞内に導入して特定培養条件で培養することで進行される。このような方式で作られた人工多能性幹細胞は、すべての組織特異的細胞に分化できる可能性があつて、倫理的問題がない細胞治療剤の材料として用いることができる長所があるが、その作製効率が非常に低く、作られた人工多能性幹細胞の安全性も保障が困難で、胚性幹細胞と比べには類似しない短所がある。

【0003】

人工多能性幹細胞技術が確立された2006年以後、多くの研究を介して人工多能性幹細胞の作製効率を向上させるのに様々な組成物が用いられた。その結果、23本の論文で特定組成物を利用して人工多能性幹細胞の作製効率を向上させることに成功して、6本の論文では、一つ以上の初期化因子がない条件でも人工多能性幹細胞を作製することに成功した。

【0004】

現在までの研究は、主に人工多能性幹細胞の効率を高めることを中心に行われてきた。しかし、安全性に対する検証が足りない状況で作製効率だけ高めるといっても人工多能性幹細胞を臨床適用が可能な水準で用いることは難しい。したがって、人工多能性幹細胞を利用した臨床適用の可能性を高めるためには、その安全性を高める研究が必ず必要で、より胚性幹細胞と類似した人工多能性幹細胞を作る方法が確立されなければならない。

【0005】

本発明の背景になる技術として、大韓民国登録特許10-1211610（2012.12.06）にはBmi1、MEK抑制剤とGSK抑制剤を利用して体細胞から胚性幹細胞様細胞への脱分化を誘導する組成物及びこれを利用した胚性幹細胞様細胞の製造方法が開示されて、大韓民国登録特許10-1211624（2012.12.06）にはShh、FGFRチロシンキナーゼ抑制剤、MEK抑制剤とGSK抑制剤を利用して、体細胞から胚性幹細胞様細胞への脱分化を誘導する組成物及びこれを利用した胚性幹細胞様細胞の製造方法が開示されている。また、大韓民国公開特許公報10-2010-0101764号（2010.09.20）、大韓民国公開特許公報10-2011-0094348号（2011.08.23）、大韓民国公開特許公報10-2012-0094488号（2012.08.24）、大韓民国公開特許公報10-2012-0121084号（2012.11.05）等には多能性細胞を生成及び維持させる有用な培養方法及び培地などが開示されている。

【0006】

本発明の背景になる技術として、いくつかの論文で組成物処理が人工多能性幹細胞の効率を向上させるとの発表はあるが、このような組成物処理が人工多能性幹細胞の突然変異を抑制できるか否かについては殆ど知らされていない。特に、MEK抑制剤、ALK5抑制剤、ROCK抑制剤、抗酸化剤を含む組成物を利用して人工多能性幹細胞作製の問題点の一つである突然変異またはDNA損傷を抑制できて安定した人工多能性幹細胞を提供することについては開示されたことはない。

【0007】

そこで、本発明者等は、ROCK抑制剤チアゾビビン（Thiazovivin）、M

10

20

30

40

50

E K抑制剤PD0325901、ALK5抑制剤SB431542または抗酸化剤L-アスコルビン酸を含有する組成物が人工多能性幹細胞の構造的、数的突然変異またはDNA損傷を抑制することによって染色体安定性が維持されることを確認して、本発明を完成することになった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

特許文献1：大韓民国登録特許10-1211610（2012.12.06）

特許文献2：大韓民国登録特許10-1211624（2012.12.06）

特許文献3：大韓民国公開特許公報10-2010-0101764号（2010.09.20） 10

特許文献4：大韓民国公開特許公報10-2011-0094348号（2011.08.23）

特許文献5：大韓民国公開特許公報10-2012-0094488号（2012.08.24）

特許文献6：大韓民国公開特許公報10-2012-0121084号（2012.11.05）

【非特許文献】

【0009】

非特許文献1：Li, W., Wei, W., Zhu, S., Zhu, J., Shi, Y., Lin, T., Hao, E., Hayek, A., Deng, H., and Ding, S. (2009a). Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 4, 16-19. 20

非特許文献2：Li, W., Zhou, H., Abujarour, R., Zhu, S., Young Joo, J., Lin, T., Hao, E., Scholer, H.R., Hayek, A., and Ding, S. (2009b). Generation of human-induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2. *Stem Cells* 27, 2992-3000.

非特許文献3：Lin, T., Ambasudhan, R., Yuan, X., Li, W., Hilcove, S., Abujarour, R., Lin, X., Hahm, H.S., Hao, E., Hayek, A., et al. (2009). A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods* 6, 805-808. 30

非特許文献4：Yuan, X., Wan, H., Zhao, X., Zhu, S., Zhou, Q., and Ding, S. (2011). Combined Chemical Treatment Enables Oct4-Induced Reprogramming from Mouse Embryonic Fibroblasts. *Stem Cells*.

非特許文献5：Zhu, S., Li, W., Zhou, H., Wei, W., Ambasudhan, R., Lin, T., Kim, J., Zhang, K., and Ding, S. (2010). Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell* 7, 651-655.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明の目的は、ROCK抑制剤、MEK抑制剤、ALK5抑制剤及び抗酸化剤で構成された群から選択された一つ以上の小分子化合物を有効成分として含有する人工多能性幹細胞の染色体安定性維持用組成物を提供するところにある。 40

【0011】

本発明の他の目的は、前記組成物で人工多能性幹細胞を処理することを特徴とする人工多能性幹細胞の染色体安定性維持方法及び培養方法を提供するところにある。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1A】人工多能性幹細胞作製方法において全体的な実験計画を概略的に示した図面である。

【図1B】小分子化合物を含む組成物を処理した場合、及び組成物を処理しなかった場合 50

に典型的な形態の人工多能性幹細胞が形成された写真である。

【図 1 C】小分子化合物を含む組成物を処理しなかった人工多能性幹細胞及び組成物を処理した人工多能性幹細胞の作製効率と速度を比較して分析したグラフである。

【図 2 A－2 B】小分子化合物を含む組成物を用いた人工多能性幹細胞及び組成物を用い
なかった人工多能性幹細胞の多能性遺伝子及びタンパク質の発現を R T－P C R と蛍光染色を用いて比較分析した写真である。

【図 3 A】小分子化合物を含む組成物を用いた人工多能性幹細胞及び組成物を用い
なかった人工多能性幹細胞の三胚葉性分化能力を細胞を分化させた後、蛍光染色を介して示す写真である。

【図 3 B】小分子化合物を含む組成物を用いた人工多能性幹細胞及び組成物を用い
なかった人工多能性幹細胞の生体内で分化能力を免疫不全マウスを利用した奇形種（テラトーマ）形成実験を介して腫瘍を形成させた後、組織学的検査を介して三胚葉性分化能力を確認した写真である。

【図 4 A】小分子化合物を含む組成物を用いた人工多能性幹細胞を支持細胞なしに培養した時、意図しなかった分化を起こさずより安定的に維持できることを確認した写真である。

【図 4 B－4 C】小分子化合物を含む組成物を用いた人工多能性幹細胞の増殖能力及び多能性遺伝子の発現程度が増加したことを細胞数測定と P C R を介して確認したグラフである。

【図 5 A－5 D】小分子化合物を含む組成物を用いた人工多能性幹細胞及び組成物を用い
なかった人工多能性幹細胞の蛍光染色を介した細胞数測定、免疫不全マウスの生体内で形成される腫瘍の大きさを比較、E B（e m b r y o n i c b o d y）を形成する能力を比較して分化能力が向上することを確認したものである。

【図 6 A】小分子化合物を含む組成物で長期間培養した人工多能性幹細胞（m i P S C（+））、リプログラミングを誘導させた後、初期培養工程に組成物を添加した後、継代培養過程で組成物を用い
なかった人工多能性幹細胞（m i P S C（±））及び組成物を全く用い
なかった人工多能性幹細胞（m i P S C（－））で染色体の異常が発生した頻度を比較して、小分子化合物を含む組成物が染色体の構造的異常を防止することを確認した表である。

【図 6 B－6 C】小分子化合物を含む組成物で長期間培養した人工多能性幹細胞（m i P S C（+））、リプログラミングを誘導させた後、初期培養工程に組成物を添加した後、継代培養過程で組成物を用い
なかった人工多能性幹細胞（m i P S C（±））及び組成物を全く用い
なかった人工多能性幹細胞（m i P S C（－））で染色体の数的異常及び構造的異常を示した代表核型を分析して、小分子化合物を含む組成物が染色体の数的異常及び構造的異常を防止することを確認した結果である。

【図 6 D】小分子化合物を含む組成物で長期間培養した人工多能性幹細胞（m i P S C（+））、リプログラミングを誘導させた後、初期培養工程に組成物を添加した後、継代培養過程で組成物を用い
なかった人工多能性幹細胞（m i P S C（±））及び組成物を全く用い
なかった人工多能性幹細胞（m i P S C（－））で全体核型を比較分析して、小分子化合物を含む組成物が染色体の異常を防止することを確認した結果である。

【図 7 A－7 B】小分子化合物を含む組成物を利用して作製した人工多能性幹細胞（m i P S C（+））の p 1 及び p 3 0 と組成物を全く用い
なかった人工多能性幹細胞（m i P S C（－））の p 1 及び p 3 0 で D N A 損傷程度のマーカーである γ H 2 A X タンパク質を分析して D N A 損傷防止を比較した結果である。

【図 7 C－7 D】小分子化合物を含む組成物を利用して作製した人工多能性幹細胞（m i P S C（+））及び組成物を全く用い
なかった人工多能性幹細胞（m i P S C（－））のリプログラミング誘導後、初期 7 日間 D N A 損傷程度のマーカーである γ H 2 A X タンパク質を分析して培地組成物が初期リプログラミング工程で発生する D N A 損傷を防止することを確認した結果である。

【図 7 E－7 F】本発明の全ての小分子化合物の組み合わせを用いた条件（S P T A）、

10

20

30

40

50

小分子化合物各々を処理した条件及びリプログラミング効率を向上させると知られている他の小分子化合物を処理した条件でリプログラミング誘導後初期5日目にDNA損傷程度のマーカーである γ H2AXタンパク質を検出して比較分析した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

他の方式で定義されない限り、本明細書において使用されたあらゆる技術的・科学的用語は、本発明が属する技術分野に熟練した専門家によって通常理解されるものと同じ意味を有する。通常、本明細書において使用された命名法及び以下で詳述する実験方法は、本技術分野において周知であり、しかも汎用されるものである。

【0014】

一観点において、本発明は、ROCK抑制剤、MEK抑制剤、ALK5抑制剤及び抗酸化剤で構成された群から選択された一つ以上の小分子化合物を有効成分として含有する人工多能性幹細胞の染色体安定性維持用組成物に関する。

【0015】

本発明で、前記ROCK (Rho-associated kinase) 抑制剤は、染色体の安定性を向上させる役割を果たし、チアゾビビン (Thiazovivin)、Y-27632、ファスジル (HA-1077)、(ヒドロキシファスジル (HA-1100)、H-1152、3-(4-ピリジル)-1H-インドール、N-(4-ピリジル)-N'-(2,4,6-トリクロロフェニル)ウレア、オーロチオグルコース及びLY294002等から選択されることが好ましく、これに限定されるのではないが、前記ROCK抑制剤は、チアゾビビンであることが最も好ましい。

【0016】

本発明で、前記MEK (mitogen-activated protein kinase) 抑制剤は、迅速なリプログラミングを誘導して染色体安定性を向上させる役割を果たし、PD0325901またはU0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene)であることが好ましく、PD0325901であることがさらに好ましい。しかし、これに限定されず、前記化合物の他にもいずれのMEKの代謝過程を抑制したり、発現を抑制する信号伝達抑制剤が用いられる。

【0017】

本発明で、前記ALK5 (Activin Receptor-Like Kinase-5) 抑制剤は、迅速なリプログラミングを誘導して染色体安定性を向上させる役割を果たして、好ましくはA-83-01またはSB431542であってもよく、さらに好ましくはSB431542である。しかし、これに限定されず、前記化合物の他にもいずれのALK5の代謝過程を抑制したり、発現を抑制する信号伝達抑制剤が用いられる。

【0018】

本発明で、前記抗酸化剤は、その種類において特に限定されるのではないが、好ましくはビタミンE、ビタミンA、ビタミンC等、オキソチアゾリジン (Oxothiazolidine)、N-アセチルシステイン (N-acetylcysteine)、TEMPO、SOD (superoxide dismutase)、グルタチオンペルオキシダーゼ、酸素スカベンジャー、過酸化水素、リポオキシドラジカル、ヒドロキシルラジカル、金属結合タンパク質、セレン、還元型グルタチオン、ベータカロチン、フラボノイド (flavonoids)、セサモール (sesamol)、没食子酸 (gallic acid)、アジョワン (Ajowan)、オリザノール (oryzanol)、レズベラトロール (resveratrol)、カテキン (catechin)、レシチン (lecithin)、セファリン (cephalin)、sulphydryls (SRH)、クエン酸、アスコルビン酸、カタラーゼ (catalase)、BHA、BHT、PG、NDGA、ヒドロキノン (hydroquinone)、カテコール (catechol) 及びDPPD (N,N-diphenyl-pp-phenylene-diamine) であってもよく、さらに好ましくはL-アスコルビン酸である。特に、抗酸化作用を

10

20

30

40

50

介して細胞の生存率を向上させて染色体安定性を向上させることができる。

【0019】

本発明の組成物の小分子化合物は、人為的に合成して製造することができ、商業的に製造された製品を用いてもよい。商業的に製造される製品の使用は、DMSOに溶かして培地に添加して用いることが好ましく、本発明の具体的な実施例ではDMEM培地に添加して用いた。

【0020】

本発明において、前記幹細胞は、Oct 4、Klf 4、Sox 2及びcMy cで構成された群から選択された一つ以上の遺伝子の導入によって誘導される人工多能性幹細胞であることが好ましい。

10

【0021】

本発明において、染色体の構造的、数的突然変異抑制またはDNA損傷抑制を介して染色体の安定性を維持させることを特徴とする。

【0022】

本発明の用語、「多能」または「多能性」とは、自然的な分化を誘導する条件下で三つの胚葉（内胚葉、中胚葉、及び外胚葉）全てに属する細胞系統に関する特徴を総括的に示す細胞類型に分化することができる能力を意味する。多能性幹細胞または人工多能性幹細胞は、成体動物の組織の多数または全ての組織を生成することができる。例えば、5～10週齢のSCIDマウスで奇形種（teratoma）を形成できる能力に関するテストのような、当業界で一般的に認められる標準テストが細胞コロニーの多能性を証明するのに用いられるが、多能性細胞を検出するのに種々の多能性幹細胞特異的な遺伝子発現を確認するものも用いることができる。細胞多能性は、胚芽の全細胞を適切に形成できる完全に多能性である細胞、例えば、胚性幹細胞及び人工多能性幹細胞から、3種類の胚葉層全ての細胞を形成することができる。例えば、生殖腺伝達または全体有機体を生成できる能力のような、完全に多能性である細胞の特徴全てを示すことはできない、不完全にまたは部分的に多能性である細胞までの範囲にまで至る連続体である。実施例で、本願の全体にわたって議論されるような多能性遺伝子または多能性マーカーの発現は、細胞の多能性を評価するのに用いられる。

20

【0023】

本発明において、「多能性幹細胞」とは、多能性幹細胞の特徴を持つ細胞をいい、多能性リプログラミング幹細胞、人工多能性幹細胞、または胚性幹細胞などを意味して、好ましくは人工多能性幹細胞である。

30

【0024】

本発明において、「多能性幹細胞の特徴」とは、多能性幹細胞を他の細胞と区別する細胞の特徴を意味する。分化を誘導する条件下で3種類の胚葉層（内胚葉、中胚葉、及び外胚葉）全てに該当する細胞系統に関連した特徴を総括的に示す細胞類型に分化できる能力が多能性幹細胞の特徴となる。マウス多能性幹細胞は、SSEA1、Oct 4、Klf 4、Sox 2、Rex 1、及びNanogなどのマーカーのうち少なくとも一部、及び任意にはそれら全てを発現する。多能性幹細胞と関連した細胞形態も多能性幹細胞の特徴となる。

40

【0025】

本発明の具体的な実施例では、小分子化合物を含む組成物が人工多能性幹細胞のリプログラミング速度と効率を向上させるかを確認するために、マウスの尻尾から抽出した線維芽細胞（tail tip fibroblast）にリプログラミング因子（Oct 4、Klf 4、Sox 2、cMy c）を含有したレトロウイルスを利用して人工多能性幹細胞を作製した。この時、小分子化合物を含む組成物を添加して培養した細胞集団（miPSC（+））と小分子化合物を含む組成物がない条件で培養した細胞集団（miPSC（-））との間に人工多能性幹細胞のコロニー（colony）が生成される時点とその数字を比較してリプログラミング速度と効率を確認した。その結果、本発明によって小分子化合物を含む組成物を用いた条件でリプログラミングの速度が向上して、生成された人工

50

多能性幹細胞のコロニーの数を集計した結果、その作製効率も向上したことを確認した。

【0026】

本発明に係る小分子化合物を含む組成物を利用して作製された人工多能性幹細胞は、増殖能力と多能性維持能力が胚性幹細胞により近づくことを特徴とする。本発明の組成物を利用した人工多能性幹細胞では、意図しなかった分化が殆どなかっただけでなく、胚性幹細胞から発現する多能性遺伝子 (pluripotency gene) である Nanog、Klf4、Zfp296 のような遺伝子の発現水準が向上したことを確認した。

【0027】

また、本発明に係る小分子化合物を含む組成物を利用して作製された人工多能性幹細胞は、分化能力も胚性幹細胞により近づくことを確認して、神経細胞特異発現タンパク質である Tuj1 で外胚葉性分化能力を、筋肉細胞特異発現タンパク質である Desmin で中胚葉性分化能力を、遠視間細胞特異発現タンパク質である AFP で内胚葉性分化能力を各々確認した。最終的に機能性神経細胞への分化を誘導するに当たっても本発明の組成物を用いた人工多能性幹細胞がより高効率で機能性神経細胞を形成することを確認した。

【0028】

本発明の小分子化合物を含む組成物は、人工多能性幹細胞作製時の急激な細胞状態変化による細胞染色体の数的、構造的突然変異を抑制できることを特徴とする。染色体核型分析を介して組成物を用いなかった人工多能性幹細胞では duplication、deletion、translocation といった種々の構造的染色体変異が起きたが、小分子化合物を含む組成物を用いた人工多能性幹細胞では染色体の構造的変異が発見されないことを確認した。

【0029】

また、本発明の小分子化合物を含む組成物は、人工多能性幹細胞作製時の急激な細胞状態変化による細胞 DNA の損傷を抑制できることを特徴とする。γH2AX タンパク質の免疫蛍光染色を介して組成物を用いなかった人工多能性幹細胞では最大 20% 程度の細胞で DNA 損傷が起きたが、小分子化合物を含む組成物を用いた人工多能性幹細胞では正常細胞と類似する水準である 5% 未満の細胞だけで DNA 損傷が現れた。特に、本発明で用いた小分子化合物は、単独で用いる時も DNA 損傷を抑制することができて、リプログラミング効率を高めると知られた他の小分子化合物ではこのような DNA 損傷抑制効果が現れなかった。

【0030】

前記のような染色体突然変異または DNA 損傷は、細胞の維持及び分化過程の効率を低下して異常な分化を誘導して、癌細胞に発展する潜在危険を有しているので、本発明の組成物は、安全な細胞治療のための人工多能性幹細胞作製の目的にも合致しているといえる。

【0031】

以上をまとめると、本発明に係る小分子化合物を含む組成物は、リプログラミング過程の急激な細胞状態変化による細胞染色体の突然変異または DNA 損傷を予防することができる。また、体細胞のリプログラミング過程をより早く起きるように誘導してリプログラミングの効率を向上させて、胚性幹細胞特異的に発現する遺伝子の発現水準を向上させる。従って、本発明によると、増殖能力及び分化能力においてより胚性幹細胞と類似する性質を持つ人工多能性幹細胞を提供することができる。

【0032】

従って、従来技術でリプログラミング効率を向上させることだけ言及したのと違って、本発明の染色体の安定性も高めることができる小分子化合物を含む組成物は、人工多能性幹細胞を臨床施術に利用する時、効率増大効果以外にも安全性を向上させる効果があって、細胞治療剤の原料だけでなく染色体突然変異研究用素材として利用価値も高いといえる。

【0033】

他の観点において、本発明は、ROCK 抑制剤、MEK 抑制剤、ALK5 抑制剤及び抗

10

20

30

40

50

酸化剤で構成された群から選択された一つ以上の小分子化合物を有効成分として含有する人工多能性幹細胞の染色体安定性維持用組成物で人工多能性幹細胞を処理することを特徴とする人工多能性幹細胞の染色体安定性維持方法に関する。

【0034】

本発明において、前記組成物は、体細胞のリプログラミングを誘導する初期工程に添加されることが好ましく、前記初期工程は、Oct 4、Klf 4、Sox 2 及び cMy c で構成された群から選択された一つ以上の遺伝子の導入後から培養してコロニーが形成される時までを意味するので、前記組成物は、リプログラミングを誘導する初期工程である遺伝子導入後4日以内に添加されることが最も好ましい。また、前記組成物は、リプログラミング誘導後形成された人工多能性幹細胞を維持する長期培養工程に添加されることが好ましい。

10

【0035】

本発明において、前記組成物は、MEK抑制剤、ALK 5 抑制剤、ROCK抑制剤、抗酸化剤を各々用いることもでき、好ましくは組み合わせて用いて、最も好ましくは全てを組み合わせて用いる。

【0036】

さらに他の観点において、本発明は、ROCK抑制剤、MEK抑制剤、ALK 5 抑制剤及び抗酸化剤で構成された群から選択された一つ以上の小分子化合物を有効成分として含有する人工多能性幹細胞の染色体安定性維持用組成物で人工多能性幹細胞を培養することを特徴とする人工多能性幹細胞の培養方法に関する。

20

【0037】

本発明において、支持細胞 (feeder cell-free) 無しの条件下で培養する工程をさらに含んでもよい。人工多能性幹細胞が安定化されると、支持細胞なしにゼラチンだけコーティングしたシャーレの上でも培養が可能である。支持細胞がない条件下で培養する場合、本発明の組成物を用いなかった条件では不要な分裂が起きて細胞が均一な形態を示し難い反面、本発明の組成物を用いた条件では組成物が不要な分化を抑制して、より安定的でかつ効果的な人工多能性幹細胞の維持が可能である。

【0038】

本発明の人工多能性幹細胞の培養のための培地は、当業界に知られた基本培地を制限なしに用いることができる。基本培地は人為的に合成して製造することができ、商業的に製造された培地を用いることもできる。商業的に製造される培地としては、例えば、DME M (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)、ME M (Minimal Essential Medium)、BME (Basal Medium Eagle)、RPMI 1640、F-10、F-12、a-MEM (a-Minimal essential Medium)、G-MEM (Glasgow's Minimal Essential Medium) 及び Isocove's Modified Dulbecco's Mediumなどが挙げられるが、これらに限定されず、DME M培地であってもよい。また、前記基本培地は、10% (v/v) の horse serumを含むことが好ましく、本発明の具体的な実施例ではDME M培地に培養させた。

30

40

【0039】

本発明は、小分子化合物を含む組成物を利用して増殖能力と分化能力においてより胚性幹細胞と類似した性質を持つ人工多能性幹細胞の作製方法を提供することができる。

【0040】

上述した通り、本発明は、小分子化合物を含む組成物を利用して人工多能性幹細胞の染色体の安定性維持方法及び培養する方法に関する。

【0041】

より詳細には、本発明は、人工多能性幹細胞の作製効率を向上させる小分子化合物を有効成分として含む組成物の新しい用途に関し、マウスの尻尾から抽出された線維芽細胞 (Tail tip fibroblast) に四つのリプログラミング因子 (Oct 4、

50

Sox 2、Klf 4、c-Myc)を導入した後、小分子化合物(ROCK抑制剤、MEK抑制剤、ALK5抑制剤、抗酸化剤)を有効成分として含む培地及び条件で作製された人工多能性幹細胞株は、速くてかつ効率的に作製されるだけでなく染色体の突然変異及びDNA損傷を抑制することができる。このような結果は、今後臨床適用に利用できる安全な人工多能性幹細胞の作製とこれを利用した様々な機能性細胞への分化後、様々な疾病治療のための細胞治療剤開発に非常に有用に利用できる。すなわち、本発明は、種々の難治性疾患を治療できる細胞治療用幹細胞株の開発のための固有技術として有用に用いることができる。

【0042】

前記では人工多能性幹細胞の培養を中心に説明したが、本発明は、小分子化合物を有効成分とする多能性維持及び染色体突然変異またはDNA損傷抑制効果がある組成物として公示の技術を利用して活用できることは、本発明が属する技術分野の当業者には自明である。

【実施例】

【0043】

以下、本発明を実施例を挙げて詳述する。これらの実施例は単に本発明をより具体的に説明するためのものであり、本発明の範囲がこれらの実施例に制限されないことは当業者において通常の知識を有する者にとって自明である。

【0044】

《実施例1：リプログラミング誘導のためのリプログラミング因子を含むレトロウイルス作製》

4種類のリプログラミング因子Oct 4、Klf 4、Sox 2、cMycの遺伝子を伝達できるレトロウイルスを作製するために、Addgene社のpMXsベクタープラスミドを購入して用いた。レトロウイルス作製用細胞株である293GP細胞を100mm細胞シャーレに80%程度の密度で育つように培養して、invitrogen社のLipofectamin 2000製品を利用して同封された説明書を参考に293GP細胞に該当プラスミドを導入した。48時間後から毎日5mLずつ細胞培養液の上澄み液として分泌されたレトロウイルスを2週間集めて-80℃で保管して用いた。レトロウイルスは、2~4µg/mLのpolybreneが含まれた培地と混合して4~5時間細胞と培養することで細胞を感染させて該当遺伝子を細胞内に伝達した。

【0045】

《実施例2：小分子化合物を含む組成物を利用した人工多能性幹細胞作製》

2-1：小分子化合物の組み合わせ及び添加

小分子化合物を利用して人工多能性幹細胞を作製する場合、培地組成物にMEK抑制剤、ALK5抑制剤、ROCK抑制剤、抗酸化剤を添加して細胞を培養した。具体的には、小分子化合物は、MEK抑制剤PD0325901、ALK5抑制剤SB431542、ROCK抑制剤チアゾピビン(Thiazovivin)、抗酸化剤L-アスコルビン酸を組み合わせるか単独で用いた。各小分子化合物は、stemgent、cayman、sigmaのようなメーカーで粉末形態で販売される製品を購入して用いた。この時、MEK抑制剤PD0325901は、該当試薬粉末をDimethyl sulfoxide(DMSO)に0.5mMの濃度で溶かして1000倍濃縮液で-20℃の温度で保管して、ALK5抑制剤SB431542は、該当試薬粉末をDimethyl sulfoxide(DMSO)に2mMの濃度で溶かして1000倍濃縮液で-20℃の温度で保管した。ROCK抑制剤チアゾピビンは、該当試薬粉末をDimethyl sulfoxide(DMSO)に0.5mMの濃度で溶かして1000倍濃縮液で-20℃の温度で保管して、抗酸化剤L-アスコルビン酸は、該当試薬粉末を3次蒸留水に200mMの濃度で溶かして1000倍濃縮液で-20℃の温度で保管した。各小分子化合物は、人工多能性幹細胞作製または維持培養時、培養液の添加成分として利用された。この時、培養液に含まれる小分子化合物の終濃度は、PD0325901の場合、0.5µM、SB431542の場合、2µM、チアゾピビンの場合、0.5µM、L-アスコルビン酸の

10

20

30

40

50

場合、200 μ Mにした。

【0046】

2-2：人工多能性幹細胞の作製

マウス尻尾から抽出した線維芽細胞 (mouse tail tip fibroblast) にレトロウイルスを利用してリプログラミング因子を注入して人工多能性幹細胞を得た。具体的には、passage 2～3程度のマウス線維芽細胞を100mm細胞シャーレに50,000個～100,000個程度の細胞を培養しながら4種類のリプログラミング因子Oct 4、Klf 4、Sox 2、cMycのプラスミドをそれぞれ含んでいるレトロウイルスをMOI 2以上に感染させた。

【0047】

ウイルスに感染した細胞をさらに二日程度培養した後、0.05%のTrypsin-EDTAで2～3分処理してsingle cellsに分離した後、0.1%ゼラチンでコーティングされた6well細胞シャーレに支持細胞を育つようにした後、その上で培養した。支持細胞としては、mitomycinで分裂を抑制させたマウス線維芽細胞を利用して、リプログラミング因子が導入された線維芽細胞をマウス胚性幹細胞培養用培地に前記実施例2-1の小分子化合物を含む組成物を添加して二酸化炭素5%の条件で37℃の温度で培養させた。マウス幹細胞培養用基本培地の組成は、GIBCO社のDMEM high glucose培地に2mM L-グルタミン、10mMベータ-メルカプトエタノール、0.1mM MEM NEAA、500unit/mL ESGRO (LIF)、10%馬血清 (horse serum)、抗生剤であるPen/strep

10

20

【0048】

2-3：人工多能性幹細胞培養

約1週間の培養以後、支持細胞の上に胚性幹細胞と類似する形態の人工多能性幹細胞colonyが形成されるのを確認して(図1B)、形成された人工多能性幹細胞のcolonyが胚性幹細胞と類似する特徴を持つ細胞であるかを確認するために実施したAP染色で赤色に染色されて陽性反応を示す人工多能性幹細胞のcolonyを確認した(図1B)。AP染色のためには、stemgent社の実験キットと添付された説明書を利用してAP染色を実施した。また、本発明の小分子化合物を含む組成物が、リプログラミングの速度と効率を向上させることを確認した(図1C)。

30

【0049】

生成された人工多能性幹細胞colonyをガラスピペットを利用して物理的に引き離して新しい支持細胞の上で培養した。この人工多能性幹細胞は安定化されると、支持細胞なしにゼラチンだけコーティングしたシャーレの上でも培養が可能であることを確認した。

【0050】

《実施例3：RT-PCRと免疫蛍光染色を利用した人工多能性幹細胞の多能性確認—作製された人工多能性幹細胞の検証》

RT-PCRのための人工多能性幹細胞を0.05%のTrypsin-EDTAで2～3分処理してsingle cellsに分離した後、遠心分離機を利用してその沈殿物だけ1.5mLチューブに移して入れてRNAを抽出した。細胞のRNAは、TRI reagentを利用して分離した。3 μ gのRNAを逆転写酵素とoligo(dT)を利用してcDNAに変換して、該当cDNAを利用してそれぞれのprimerを利用してPCRで増幅させて電気泳動を介して該当遺伝子の発現程度を調べた。PCRを介して作製された人工多能性幹細胞株はいずれも、Oct 4、Klf 4、Sox 2、Nanog、Rex 1等の多能性遺伝子を発現することが確認された(図2A)。免疫蛍光染色のために、マルチウェルシャーレに培養中の細胞をPBSで洗浄した後、4%パラホルムアルデヒド溶液を利用して常温で1時間または4℃で一夜の間固定した。固定された細胞は、0.1%トリトン-X溶液を5分間処理して細胞膜に穴をあけて、10%正常ロバ血清でブロッキングをさせた後、1次抗体と反応させた。免疫蛍光染色結果、全ての人工多能

40

50

性幹細胞株でOct 4、Klf 4、Sox 2、cMy c、SSEA 1等の多能性マーカーが発現することを確認した(図2B)。

【0051】

《実施例4：人工多能性幹細胞の分化能力確認—作製された人工多能性幹細胞の検証》

4-1：人工多能性幹細胞の分化

作製された人工多能性幹細胞の分化能力を確認するために、全ての細胞株はTrypsin-EDTAを処理してsingle cellsに分離した後、embryonic body (EB) 形成を誘導した。人工多能性幹細胞をembryonic body (EB) に分化させるために人工多能性幹細胞の分化を抑制させるLIFがない培養条件で浮遊状態で培養させる方法が利用された。具体的には、培養中の人工多能性幹細胞をPBSを利用して洗浄した後、0.05%のTrypsin-EDTAで2~3分処理してsingle cellに分離した後、GIBCO社のDMEM high glucose培地に2mM L-グルタミン、10mMベーターメルカプトエタノール、0.1mM MEM NEAA、10%牛胎児血清(FBS)、抗生剤であるPen/strepを添加した培地で細胞が付着しないバクテリア培養用シャーレを利用して浮遊状態で4日間培養して、浮遊状態のEBを確保した。

【0052】

このように確保されたEBは、再び細胞培養用シャーレに移されて付着状態で培養されて、この時形成される外胚葉性、内胚葉性、中胚葉性の分化した細胞を免疫蛍光染色を介して確認した。免疫蛍光染色結果、作製された全ての人工多能性幹細胞株は、正常な分化能力を持ち三胚葉性分化が全て可能な細胞であることが確認された(図3A)。

【0053】

4-2：奇形種生成

人工多能性幹細胞の生体内分化能力を確認するためには、免疫不全マウスを利用した奇形種生成法が利用された。すなわち、人工多能性幹細胞の移植を介して奇形種が生成されるかを確認するために、免疫不全SCIDマウス(BALB/c nu)の皮下に人工多能性幹細胞を移植する方法が利用された。具体的には、培養中の人工多能性幹細胞をPBSを利用して洗浄した後、Trypsin-EDTAを利用してsingle cellに分離した後、1,000,000個の細胞を0.1mLの培養液で希釈してBD Matrigel matrix 0.1mLと均等に混合した後、5~10週齢のSCIDマウスのわき腹の皮下に注射して移植した。注射した後8~10週ほどマウスを飼育して奇形種の形成の有無を観察して、生成された奇形種を摘出して、H&E染色を利用した組織学的分析法を介して三胚葉性の分化を顕微鏡で確認した。奇形種の組織学的分析結果、全ての人工多能性幹細胞株は正常に奇形種を生成して腫瘍の内部で外胚葉、内胚葉、中胚葉に該当する構造がいずれも発見された(図3B)。

【0054】

《実施例5：小分子化合物を含む組成物による人工多能性幹細胞の安定した維持効果確認》

実施例2で作製され培養された人工多能性幹細胞で小分子化合物を含む組成物の影響を確認するために、形態的な分析、増殖速度分析、遺伝子発現程度の分析が行われた。小分子化合物を含む組成物が人工多能性幹細胞の形態と目視的变化に及ぼす影響を確認するために組成物を用いなかった人工多能性幹細胞(miPSC(-))と、組成物を用いて作製された人工多能性幹細胞(miPSC(+))を支持細胞がある条件とない条件とで互いに比較した。

【0055】

支持細胞がある条件では、小分子化合物を含む組成物を用いなくても細胞の形態と特性を維持するのに大きな問題がなかったが、支持細胞がない条件で培養する場合、小分子化合物を含む組成物を用いなかった条件では不要な分裂が起きて、細胞が均一な形態を示し難かった。それに対して、小分子化合物を含む組成物を用いた条件では組成物が不要な分化を抑制して、より安定的でかつ効果的な人工多能性幹細胞の維持が可能であることを確

認した（図 4 A）。

【0056】

小分子化合物を含む組成物が人工多能性幹細胞の増殖速度に及ぼす影響を確認するために、前記組成物を用いなかった人工多能性幹細胞と組成物を用いて作製された人工多能性幹細胞の増殖程度を比較した。同じ数字の細胞を同じ時間の間培養して細胞数を測定して比較した結果、1 回分裂するのに必要な時間は、小分子化合物を含む組成物を処理した人工多能性幹細胞がより短いことが示され、これは胚性幹細胞とほぼ類似する結果を示す（図 4 B）。

【0057】

最後に小分子化合物を含む組成物が、人工多能性幹細胞の維持過程で多能性遺伝子の発現程度に及ぼす影響を調べるために、実施例 2 で確認した多能性遺伝子の発現を定量的に分析した。その結果、小分子化合物を含む組成物を用いた人工多能性幹細胞株は殆どの多能性遺伝子の発現程度が僅かに高いことを確認した（図 4 C）。

【0058】

《実施例 6：小分子化合物を含む組成物による人工多能性幹細胞の分化能力向上効果確認》

実施例 2 で作製され培養された人工多能性幹細胞の分化過程中、小分子化合物を含む組成物が人工多能性幹細胞の分化能力に及ぼす影響を調べるために、前記組成物を用いなかった人工多能性幹細胞と組成物を用いて作製された人工多能性幹細胞との間に三胚葉性分化の効率と、生成された奇形種の大きさ、及び EB の形成効率を各々比較した。

【0059】

外胚葉、内胚葉、中胚葉に分化された細胞を免疫蛍光染色で確認しながら各々のマーカーを発現する細胞の数字を測定して、三胚葉性分化の効率を測定した。その結果、小分子化合物を含む組成物を用いた細胞株が、そうではない細胞株と比較した時外胚葉性分化の効率が優れることを確認した。これにより、小分子化合物を含む組成物が人工多能性幹細胞の分化能力を向上させることを確認した（図 5 A 及び 5 B）。

【0060】

生体内で生成された奇形種の大きさを比較した結果、小分子化合物を含む組成物を用いなかった細胞株から生成された奇形種はその大きさが小さいが、前記組成物を用いた細胞株から生成された奇形種の大きさは胚性幹細胞で生成された奇形種とその大きさが類似することを確認して、本発明の組成物が生体内での分化力も向上させることを確認した（図 5 C）。

【0061】

小分子化合物を含む組成物を用いなかった人工多能性幹細胞と前記組成物を用いて作製した人工多能性幹細胞から形成された EB の数字を測定して比較した結果、小分子化合物を含む組成物が EB の形成効率も向上させることを確認した（図 5 D）。

【0062】

《実施例 7：小分子化合物を含む組成物による人工多能性幹細胞の染色体突然変異抑制効果確認》

小分子化合物を含む組成物が人工多能性幹細胞誘導過程と、その後初期培養過程、長期間維持培養過程中にも遺伝的安定性を向上させるかを調べるために、前記組成物を用いなかった人工多能性幹細胞と組成物を用いた人工多能性幹細胞の核型分析を介して染色体突然変異有無と頻度を調べた。全ての細胞は自然に突然変異が生じることができるよう長期間培養されて、一般的な核型分析の過程を介して染色体を分析した。

【0063】

小分子化合物を含む組成物の効果を確認するために、組成物を用いなかった細胞株と組成物を用いて作製した細胞株を比較した。その結果、前記小分子化合物を含む組成物を用いなかった人工多能性幹細胞では、染色体の構造的、数的突然変異が起きたのに対して、前記組成物を用いた人工多能性幹細胞株では染色体上の突然変異は起きないことを確認した。また、前記組成物を利用してリプログラミングを誘導する初期培養工程以後長期培養

10

20

30

40

50

過程では、組成物を用いなかった人工多能性幹細胞株の場合（m i P S C（±））染色体の構造的な突然変異は発生しなかったが、染色体数字に突然変異が発生したのを確認することができた。これにより、小分子化合物を含む組成物が人工多能性幹細胞の染色体の突然変異を抑制できることを確認して、リプログラミング誘導過程と初期工程の培養だけでなくその後の長期間細胞を維持培養する工程に発生し得る突然変異に対してもその抑制力が有効であることを確認した（図6A～図6D）。

【0064】

《実施例8：小分子化合物を含む組成物によるDNA損傷抑制効果確認》

小分子化合物を含む組成物が人工多能性幹細胞誘導過程と、その後初期培養過程、長期間維持培養過程中でも遺伝的安定性を向上させるのか調べるためのさらに他の分析でDNA損傷程度を分析した。

10

【0065】

リプログラミングを起こす前の線維芽細胞とマウス胚性幹細胞を基準に、前記組成物を用いなかった人工多能性幹細胞株の初期継代培養（－、p1）細胞、長期継代培養（－、p30）細胞と組成物を用いた人工多能性幹細胞株の初期継代培養（＋、p1）細胞、長期継代培養（＋、p30）細胞の間にDNA損傷程度の差を調べた。DNAが損傷されたら、生成されるγH2AXタンパク質の存在有無を介してDNA損傷程度を確認して、該当タンパク質は、免疫蛍光染色法で緑色蛍光で標識された抗体を利用して染色して分析した（図7A）。

【0066】

20

小分子化合物を含む組成物の効果をより詳しく分析するために、前記組成物を用いなかった細胞株と組成物を用いて作製した細胞株との間にγH2AXタンパク質の発生比率を分析した。

【0067】

その結果、組成物を用いなかった人工多能性幹細胞では初期継代培養（p1）で約13%、長期継代培養（p30）で約5%程度の細胞がDNA損傷を起こしたのに対して、小分子化合物を含む組成物を用いた人工多能性幹細胞株では初期継代培養（p1）で約5%、長期継代培養（p30）で1%未満の細胞だけDNA損傷を起こしたことを確認した。これは、リプログラミング過程の間またはリプログラミング後長期培養の間、小分子化合物を用いると、リプログラミングを起こす前の正常線維芽細胞または正常胚性幹細胞と類似する水準のDNA状態を示すことによって、本発明の組成物が人工多能性幹細胞のDNA損傷を正常細胞と類似する水準で抑制できることを示す（図7B）。

30

【産業上の利用可能性】

【0068】

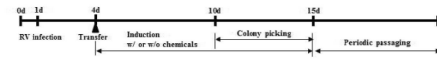
本発明に係る小分子化合物を含む人工多能性幹細胞の染色体安定性維持用組成物は、人工多能性幹細胞作製時リプログラミングの速度と効率を高め、染色体の構造的、数的突然変異抑制またはDNA損傷抑制効果が優れて、染色体安定性が優れた人工多能性幹細胞治療剤開発に非常に有用である。

【0069】

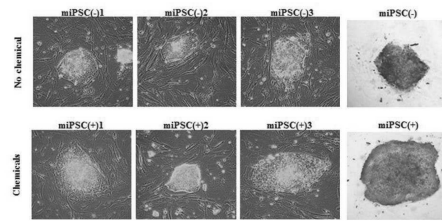
以上、本発明の内容の特定の部分を詳述したが、当業界における通常の知識を持った者にとって、このような具体的な記述は単なる好適な実施態様に過ぎず、これにより本発明の範囲が制限されることはないという点は明らかである。よって、本発明の実質的な範囲は特許請求の範囲とこれらの等価物により定義されると言える。

40

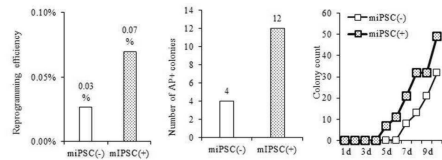
【図 1 A】



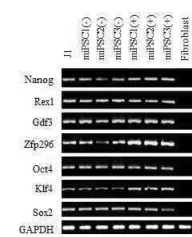
【図 1 B】



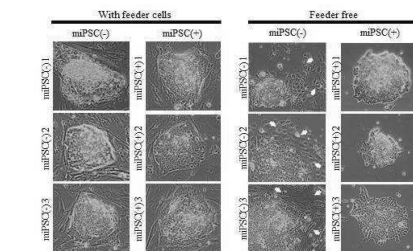
【図 1 C】



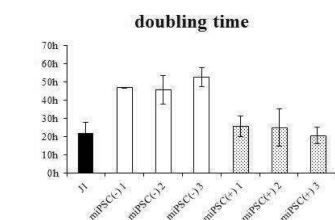
【図 2 A】



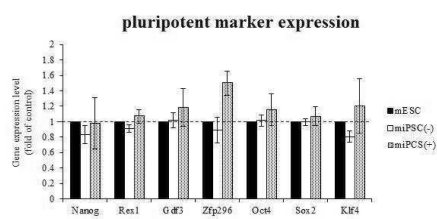
【図 4 A】



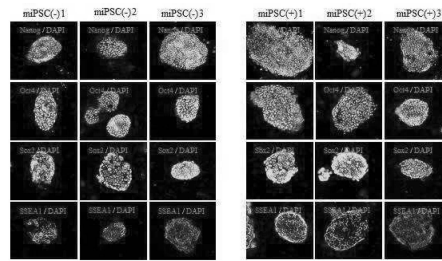
【図 4 B】



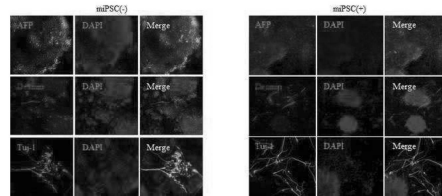
【図 4 C】



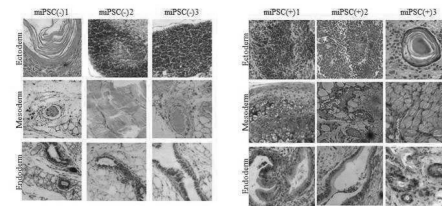
【図 2 B】



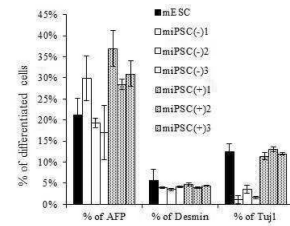
【図 3 A】



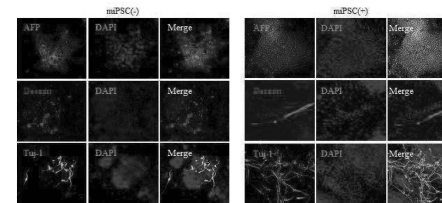
【図 3 B】



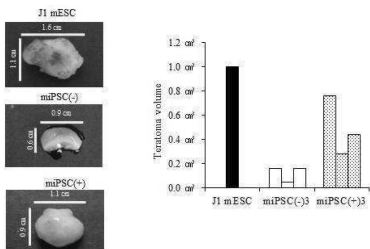
【図 5 A】



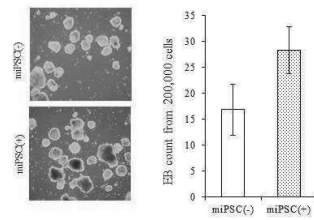
【図 5 B】



【図 5 C】



【図 5 D】



【図 6 A】

Table 1. The chromosomal mutation observed in 60 analyzed cells in chemical free and chemical treated mouse iPSCs

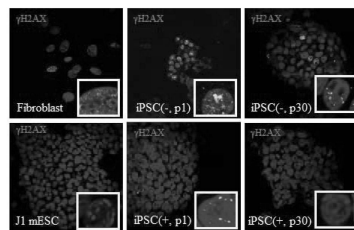
	chromosome																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	X	Y	
miPSC(-)																					20	
loss of 1 copy																					20	
gain of 1 copy																						
deletion				1					6	1	1			4								
duplication														20								
translocation							22												20	20		
miPSC(+)																						
loss of 1 copy																						
gain of 1 copy																					38	
deletion																						
duplication																						
translocation																						
miPSC(±)																						
loss of 1 copy																						
gain of 1 copy																						
deletion																						
duplication																						
translocation																						

【図 6 B】

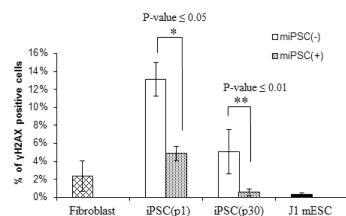
Table 2. The chromosomal aneuploidy mutation observed in chemical free and chemical treated mouse iPSC lines

	Ch.2	Ch.8	Ch.10	Ch.11	Ch.14	Ch.Y	Mutation
miPSC(-)	2	8	10	11	14	Y	O
miPSC(+)	2	8	10	11	14	Y	O
miPSC(±)	2	8	10	11	14	Y	X

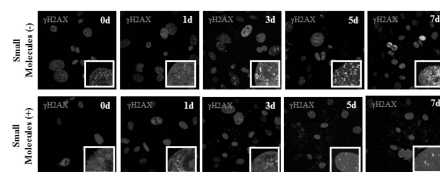
【図 7 A】



【図 7 B】



【図 7 C】

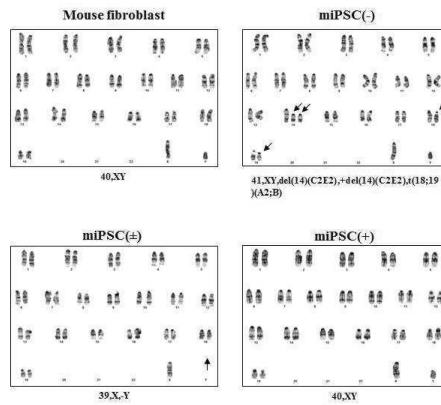


【図 6 C】

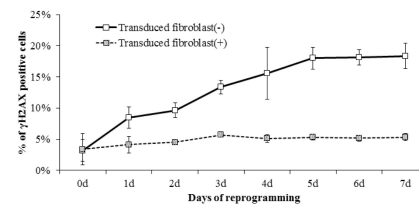
Table 3. The chromosomal structure mutation observed in chemical free and chemical treated mouse iPSC lines

	Ch.6	Ch.14	Ch.18	Ch.19	Mutation
miPSC(-)	Duplication	Deletion	t(18;19)	t(18;19)	O
miPSC(+)	6	14	18	19	X
miPSC(±)	6	14	18	19	X

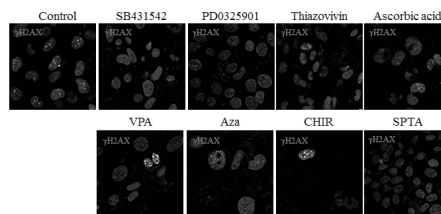
【図 6 D】



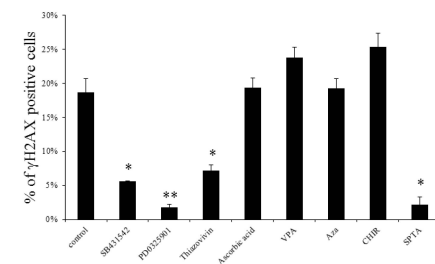
【図 7 D】



【図 7 E】



【図 7 F】



フロントページの続き

(74)代理人 100194973

弁理士 尾崎 祐朗

(72)発明者 ホン ソンホイ

大韓民国, 100-734, ソウル, チュング, ワンシムニョロ 39-ギル, 30, ハンジン
グランビル アpartment, 102-508

(72)発明者 パク ハンス

大韓民国, 136-073, ソウル, ソンブクーク, インチョン-ロ 10-ギル, 19-6

(72)発明者 ファン インシク

大韓民国, 133-020, ソウル, ソンドング, ワンシムニョロ 33-ギル, 12-1

(72)発明者 チョイ キョンア

大韓民国, 269-911, カンウォン-ド, チョルォン-グン, トンソン-ウプ, イピョン 1
-リ 6バン 275-24 ボンジ

審査官 堂畑 厚志

(56)参考文献 国際公開第2012/087965 (WO, A1)

特開2012-143229 (JP, A)

米国特許出願公開第2012/0301962 (US, A1)

Current Molecular Medicine, 2013年 6月 1日, vol. 13, no. 5, p. 765-776, SUPPLEMENTARY MATERIAL p. i-iii

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 1/00-7/08

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)