

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5945385号
(P5945385)

(45) 発行日 平成28年7月5日(2016.7.5)

(24) 登録日 平成28年6月3日(2016.6.3)

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

請求項の数 15 (全 58 頁)

(21) 出願番号	特願2010-527261 (P2010-527261)	(73) 特許権者	510087807 リン、シーラン LIN, Shi-Lung アメリカ合衆国 91007 カリフォル ニア州 アーケーディア ビクトリア ド ライブ 920
(86) (22) 出願日	平成21年1月8日(2009.1.8)	(73) 特許権者	510087793 ウー、デイビッド ティーエス WU, David TS 台湾 タイペイ シティー 104 ジフ ロード レーン 157 ナンバー 1 5 11エフ.
(65) 公表番号	特表2010-539953 (P2010-539953A)	(74) 代理人	100105957 弁理士 恩田 誠
(43) 公表日	平成22年12月24日(2010.12.24)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2009/030432		
(87) 国際公開番号	W02009/091659		
(87) 国際公開日	平成21年7月23日(2009.7.23)		
審査請求日	平成22年3月30日(2010.3.30)		
審判番号	不服2014-8475 (P2014-8475/J1)		
審判請求日	平成26年5月7日(2014.5.7)		
(31) 優先権主張番号	61/011, 333		
(32) 優先日	平成20年1月16日(2008.1.16)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	12/149, 725		
(32) 優先日	平成20年5月7日(2008.5.7)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 誘導性組換えRNA因子を用いた腫瘍のない多能性胚性幹様細胞の生成

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

少なくとも1つの非インビボ細胞を少なくとも1つの腫瘍のない多能性幹細胞に再プログラムする方法であって、

(a) mir-302の標的となる複数の細胞遺伝子に干渉する少なくとも1つの遺伝子サイレンシングエフェクターに送達及びプロセッシングできる組換え核酸成分を構成する工程であって、前記細胞遺伝子にはCDK2、サイクリンD、MECP1-p66及びMECP2遺伝子が含まれ、前記遺伝子サイレンシングエフェクターはSEQ.ID.NO.9、SEQ.ID.NO.10、SEQ.ID.NO.11、SEQ.ID.NO.12、及びSEQ.ID.NO.13から選ばれる配列を少なくとも含んでいることと、

(b) 少なくとも1つの非インビボ細胞を腫瘍のない多能性幹細胞に再プログラミングするために、薬剤誘導性ベクターを介して非インビボ細胞基質に前記組換え核酸成分を導入し、前記組換え核酸成分で非インビボ細胞基質を処理してゲノムDNAの全体の脱メチル化及び細胞周期のレートの低下を誘導する工程とを含む方法。

【請求項2】

前記細胞は、ほ乳類細胞、ヒト細胞、正常体細胞、病的体細胞、腫瘍細胞、癌細胞、ヒト毛嚢、ヒト皮膚細胞、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれる請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記細胞基質は、mir-302の標的となる複数の細胞遺伝子を発現する請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記組換え核酸成分は、薬剤誘導性遺伝子発現プロモーターを含む請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記薬剤誘導性遺伝子発現プロモーターは、テトラサイクリン、ドキシサイクリン又はその他のテトラサイクリン誘導体により制御される請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記組換え核酸成分は、5' 供与スプライス部位、イントロン挿入部位、分岐点モチーフ、ポリピリミジントラクト、及び3' 受容スプライス部位を含む請求項1に記載の方法。

10

【請求項7】

前記組換え核酸成分は更に、蛍光タンパク質マーカー遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、lac-Zレポーター遺伝子、胚性幹細胞マーカー遺伝子、ウイルス遺伝子、細菌遺伝子、細胞マーカー遺伝子、ジャンピング遺伝子、トランスポゾン、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれる複数のエクソンを含む請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記遺伝子サイレンシングエフェクターは医薬又は治療用途に有用である請求項1に記載の方法。

20

【請求項9】

前記遺伝子サイレンシングエフェクターは、SEQ. ID. NO. 9の配列を含む組換えヘアピン様RNAである請求項1に記載の方法。

【請求項10】

前記組換え核酸成分は、テトラサイクリン応答要素、ウイルス又はII型RNAポリメラーゼ(Pol-III)プロモーターもしくはその両者、Kozak翻訳開始共通配列、ポリアデニル化シグナル、複数の制限/クロニング部位、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれるものを含む請求項1に記載の方法。

【請求項11】

前記組換え核酸成分は、pUC複製起点、複製可能な原核細胞で抗生物質耐性遺伝子を少なくとも1つ発現するSV40初期プロモーター、ほ乳類細胞の選択的SV40複製起点、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれるものを含む請求項1に記載の方法。

30

【請求項12】

前記組換え核酸成分は、リボソーム形質移入、化学的形質移入、DNA組換えによる遺伝子導入、ウイルス感染、トランスポゾン挿入、ジャンピング遺伝子挿入、マイクロインジェクション、電気穿孔法、遺伝子銃による貫入、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれる遺伝子送達法によって、前記細胞に導入される請求項1に記載の方法。

【請求項13】

前記多能性幹細胞は、生殖系列様細胞に分化される請求項1に記載の方法。

【請求項14】

前記多能性幹細胞は、正常体細胞に分化される請求項1に記載の方法。

40

【請求項15】

前記多能性幹細胞は、mir-302マイクロRNAとOct3/4をマーカーとして用いて選択的に単離される請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本特許出願は、2008年11月28日に提出された「誘導性組換えRNA因子を用いた腫瘍のない多能性胚性幹様細胞の生成(Generation of Tumor-Free Embryonic Stem-Like Pluripotent Cell

50

s Using Inducible Recombinant RNA Agents)」という米国仮特許出願第61/193,438号に基づく優先権を主張する。本願はまた、2008年1月16日に提出された「イントロンRNAを用いたヒト多能性胚性幹細胞の生成 (Generation of Human Embryonic Stem-Like Pluripotent Cells Using Intronic RNA)」という米国仮特許出願第61/011,333号に基づく優先権を主張する。本願はさらに、2008年9月8日に提出された「誘導性組換えRNA因子を用いた腫瘍のない多能性胚性幹細胞の生成 (Generation of Tumor-Free Embryonic Stem-Like Pluripotent Cells Using Inducible Recombinant RNA Agents)」という米国仮特許出願第61/191,327号に基づく優先権を主張する。なお、本願は、2003年5月15日に提出された「RNAスプライシング及びプロセッシング誘導性の遺伝子サイレンシング及びその関連適用 (RNA-Splicing and Processing-Directed Gene Silencing and the Relative Applications Thereof)」という米国特許出願第10/439,262号、2006年3月31日に提出された「イントロンRNAを用いる新規遺伝子導入法 (Novel Transgenic Methods Using Intronic RNA)」という米国特許出願第11/278,143号、及び2008年5月7日に提出された「イントロンRNAを用いたヒト胚性幹細胞の生成 (Generation of Human Embryonic Stem-Like Cells Using Intronic RNA)」という米国特許出願第12/149,725号の一部継続出願であり、本明細書に完全に記載されているかのように、これらの出願を引用として本願に組み込まれる。

【0002】

本発明は一般に、組換え腫瘍抑制因子マイクロRNA (miRNA) 又はshRNA因子の関連細胞における導入遺伝子発現を用いた腫瘍のない多能性胚性幹様 (ES) 細胞の発生、生成、及び選別の手段及び方法に関する。より詳細には、本発明は、スプライスされてほ乳類細胞内の短鎖RNA遺伝子サイレンシングエフェクター (pre-miRNA及び/又はshRNA) にプロセッシングできる非天然組換えイントロン及びその構成要素を生成し、発生及び細胞分化関連遺伝子及び癌遺伝子に対して特定の特異的遺伝子サイレンシング効果を誘導し、その結果、細胞を多能性ES様状態に再プログラムする遺伝子導入法及び誘導性核酸成分に関する。短鎖RNA遺伝子サイレンシングエフェクターは、例えばmir-302a、mir-302b、mir-302c、mir-302d、これらの手動再設計したshRNA相同体、及びこれらの組み合わせのような、腫瘍抑制因子様miRNAを含むことが好ましい。すなわち、このように形成される多能性幹細胞は、無フィーダー細胞培養条件で培養できる。関連細胞は、インビトロ、エクスピボ及び/又はインピボで単離された体細胞又は癌細胞を含む。

【背景技術】

【0003】

ヒト幹細胞における最近の研究は、移植療法において極めて有望な可能性を示してきた。にもかかわらず、ヒト幹細胞のクローニング用供給源は限られ、その純度及び質の管理は極めて難しい。1998年、James Thomsonら (例えば米国特許第5,843,780号、第6,200,806号、第7,029,913号及び第7,220,584号) は、ヒト胚の後期胚盤胞から初めてヒト胚性幹 (ES) 細胞株を単離した (Thomsonら, (1998) Science 282: 1145-1147)。H1及びH9細胞は、これらの単離ヒトES様細胞由来の2つの代表的な細胞株である。2年後、Gearhartら (例えば米国特許第6,090,622号、第6,245,566号及び第6,331,406号) も、胚盤胞後のヒト胚からES様始原生殖細胞を単離する方法を開発した。これらのES細胞単離法のやり方では、元の胚を破壊しなければならないので、このように得られるES細胞株を臨床療法に用いることの正当性を議論する多くの

倫理的、人道的な懸念が生じてきた。

【0004】

近年、治療安全性やのインフォームドコンセントの使用に関する問題も指摘されている。例えば、ES細胞の発生は、「フィーダー細胞」と言われる周囲の線維芽細胞が放出する未同定因子が必要なので、全てのヒトES様細胞は、マウス又はヒト線維芽細胞層で培養されることが好ましい(Reubinoffらによる米国特許第6,875,607号)。しかし、これらの線維芽細胞フィーダー細胞はまったく異なる表面抗原を持ち、これらがES細胞抗原の純度を汚染し、患者で免疫拒絶を引き起こすおそれがある。一方、いくつかの無フィーダー細胞培養条件も開発されてきたが、これらの無フィーダー細胞法は、いずれも長期に未分化ES細胞状態に維持することができない。残念ながら、現在利用可能なhES細胞株はいずれも培養条件において純度100%の細胞集団を達成できない。最良のフィーダー細胞培養条件下でさえ、不定の割合(約5%~10%又は10%以上)のES細胞が他の組織細胞種に分化し、またその幹細胞性質を失う傾向がある。ES細胞から分化した最もよく観測される細胞種の1つは奇形腫である。奇形腫は、ヒト生殖系列細胞由来の腫瘍で、胚の内胚葉や中胚葉、外胚葉の組織に類似した複数の癌のように見える細胞種を含むことが多い。従って、フィーダー細胞の混入を阻止する方法、幹細胞の純度を上げる方法、腫瘍形成のリスクを低減する方法は、現在幹細胞研究における3つの主要な課題となっている。

10

【0005】

2006年に、高橋と山中は人工多能性幹(iPS)細胞を新たに導入した(Cell 126:663-676)。マウス線維芽細胞への4つの転写因子遺伝子(Oct3/4(Oct4)、Sox2、c-Myc、Klf4)の遺伝子導入による送達を用いて、インビトロで体細胞性線維芽細胞をES様のiPS細胞株に再プログラムして形質転換させることに成功した。このような方法は、被験細胞集団全体における成功率が0.002%~2%よりも小さいと見込まれた。2007年には、これらのiPS細胞の行動特性に関する特性がマウスES細胞と同様なことが確認されている(Okitaら,(2007) Nature 448:313-317;Wernigら,(2007) Nature 448:318-324)。一方、Yuらは、Oct4、Sox2、Nanog、及びLIN28という他の転写因子を用いて、同様な方法でヒト線維芽細胞からより新しいiPS細胞株を開発している(Yuら,(2007) Science 318:1917-1920)。しかし、Yuの方法は高橋の方法に比べて効率がずっと低くなる。これらのiPS細胞の適用は、従来のES細胞の倫理的問題を解決するだけでなく、体細胞核移植(SCNT)技術と併用すれば、患者に優しい療法を提供する可能性もある利点を示した(Meissnerら,(2006) Nature 439:212-215)。このようなiPSに基づくSCNT療法は、遺伝子導入マウスモデルにおける鎌状赤血球貧血の治療の成功で証明された(Hannaら,(2007) Science 318:1920-1923)。しかし、まだ2つの問題が解決されていない。その1つはレトロウイルス導入遺伝子の使用であり、もう1つは癌遺伝子(例えばc-MycとKlf4)の使用である。レトロウイルス感染は、遺伝子導入法で4つの転写因子遺伝子を標的宿主細胞に送達できる唯一の有効な手段であるが、標的細胞ゲノム内への複数のレトロウイルスベクターのランダムな挿入は、他の非標的遺伝子に影響を与える可能性がある。このように、不定のレトロウイルス挿入が常に細胞突然変異を引き起こすため、1つ以上の導入遺伝子が癌遺伝子の場合に特に危険である。これらの転写因子が誘発するiPS細胞からの腫瘍形成を防止する方法は、今にも明らかではない。

20

30

40

【0006】

iPS細胞のもう1つの欠点はその混在性である。iPS細胞を生成するために、3つ以上の異なる転写因子をレトロウイルス感染によって単細胞ゲノムに挿入する必要がある。しかし、異なるレトロウイルス導入遺伝子は異なる送達効率と挿入突然変異率を持つため、複数のレトロウイルス挿入は宿主細胞ゲノムにおいて導入遺伝子の種々の組み合わせを引き起こすことが多い。適当な比率や数の4つの転写因子遺伝子を有する細胞だけが、

50

優れた多能性を有する i P S 細胞になり得る。それは、レトロウイルス挿入後、i P S 細胞はただ細胞集団全体の 0 . 0 0 2 % ~ 2 % に相当し、他の 9 8 % 以上の細胞は、導入遺伝子の複雑で不定の組み合わせによって形質転換するわけである。導入遺伝子の正しい組み合わせを有する純粋な i P S 細胞を採取するために、一連の長たらしい細胞選択手順が必要である (Shinya Yamanaka による米国特許第 7 , 2 5 0 , 2 5 5 号) 。 i P S 細胞の形成メカニズムはまだ不明であるが、この技術は、胚性遺伝子の再活性化と発生シグナルの不活性化との間の変換を調整するための複数の転写調節因子が必要である。Oct 4 - Sox 2 - c - Myc - Klf 4 又は Oct 4 - Sox 2 - Nanog - LIN 2 8 による組み合わせ遺伝子の効果は、ある胚性遺伝子を直接に活性化させるようであるが、これらの作用は体細胞分化に必要な発生シグナル全体をどのように中止させるかは、まだ不明確である。Oct 4 にもかかわらず、i P S 方法に用いる他の全ての導入遺伝子は実質的に特定の組織細胞の発生に関与している。これらの導入遺伝子をまとめて配置すると、これらの発生シグナルの調整又は障害によって、なぜか細胞分化が停止し、その後細胞を形質転換させて E S 様状態に引き留める。これは自然なメカニズムではなく、例えば細胞突然変異や腫瘍形成のような不定のリスクを生じる可能性がある。

10

【 0 0 0 7 】

体細胞核移植 (S C N T) 試験から、体細胞核と卵母細胞の細胞質との混成物は多能性幹様細胞を形成できることが明らかになり、細胞核内の転写因子よりもむしろ卵母細胞の細胞質内のいくつかの母性物質が細胞核の再プログラムにおいて重要な役割を果たすことを示した (Simonsson と Gurdon , (2 0 0 4) Nat Cell Bio 1 . 6 : 9 8 4 - 9 9 0) 。桑実期前の自然の受精卵と初期の接合体では、母性物質が正常幹細胞の更新と多能性の調節・維持という機能を果たし、腫瘍形成のリスクは全くない。これは、3 2 ~ 6 4 細胞 (桑実胚) 期より前の胚細胞が全て同じでかつ全能性である理由となる。母性物質は卵形成中に生じ、成熟卵母細胞に貯えられて初期胚発生に使用される。(マイクロRNAの生合成に必要な保存RNA分解酵素であるDicerを欠如するマウス卵母細胞は、第1減数分裂において停止するが、これはマイクロRNAが卵母細胞内の主な母性物質の1つであることを示唆している (Murchison ら , (2 0 0 7) Genes Dev . 2 1 : 6 8 2 - 6 9 3) 。マウス卵母細胞では、母性物質の多くがRNAで占められ、これはゲノムのトランスクリプトーム全体の約 4 5 % に匹敵する (Stitzel ら , (2 0 0 7) Science 3 1 6 : 4 0 7 - 4 0 8) 。母性から胚性への転移中に、これらの母性RNAは急速に分解され、2 ~ 4 細胞期という初期から胚性遺伝子の転写が開始され、さらなる胚発生のシグナルを作る (O ' Farrell ら , (2 0 0 4) Curr . Biol . 1 4 : R 3 5 - 4 5) 。これらの母性RNAの多くは、発生シグナルを同期化させるとともに全能 / 多能性 E S 細胞の胚発生初期段階における更新を維持するために、胚性遺伝子産物の阻害因子であると考えられる。従って、母性RNAは、E S 細胞の維持と更新に必須な鍵となる母性物質の1つでありうる。

20

30

【 0 0 0 8 】

要するに、E S 細胞の維持と更新の天然方式は、i P S 技術に用いられる活性化因子である 4 つの転写因子よりも、むしろ抑制因子である特定の母性RNAによって決められる。E S 細胞の維持と更新の天然メカニズムを模倣した多能性 E S 様細胞を生成するために、これらの母性RNAの機能を同定して評価する新たな方策が高く望まれている。同定された母性RNAはヒト成体幹細胞又は体細胞に送達し、幹細胞性質を維持するか、又は / 及び、体細胞を E S 様細胞状態に再プログラムすることができる。従って、母性RNAを好適に用いて多能性 E S 様細胞を生成する有効で簡単、しかも安全な方法及び因子の成分がまだ求められている。

40

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 9 】

【 特許文献 1 】 米国特許第 5 , 8 4 3 , 7 8 0 号

50

【特許文献2】米国特許第6,200,806号
 【特許文献3】米国特許第7,029,913号
 【特許文献4】米国特許第7,220,584号
 【特許文献5】米国特許第6,090,622号
 【特許文献6】米国特許第6,245,566号
 【特許文献7】米国特許第6,331,406号
 【特許文献8】米国特許第6,875,607号
 【特許文献9】米国特許第7,250,255号
 【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Thomsonら, (1998) Science 282:1145-1147

【非特許文献2】高橋と山中, (2006) Cell 126:663-676

【非特許文献3】Okitaら, (2007) Nature 448:313-317

【非特許文献4】Wernigら, (2007) Nature 448:318-324

【非特許文献5】Yuら, (2007) Science 318:1917-1920

【非特許文献6】Meissnerら, (2006) Nature 439:212-215

【非特許文献7】Hannaら, (2007) Science 318:1920-1923

【非特許文献8】SimonssonとGurdon, (2004) Nat Cell Biol. 6:984-990

【非特許文献9】Murchisonら, (2007) Genes Dev. 21:682-693

【非特許文献10】Stitzelら, (2007) Science 316:407-408

【非特許文献11】O'Farrellら, (2004) Curr. Biol. 14:R35-45

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明は、少なくとも1つのほ乳類細胞を少なくとも1つの多能性幹様細胞に再プログラムする方法を提供する。この方法は、mir-302の標的となる複数の細胞遺伝子を発現する少なくとも1つの細胞基質を提供する工程と、上記細胞基質内のmir-302と相同な少なくとも1つの遺伝子サイレンシングエフェクターになるように、送達、転写、プロセッシングできる少なくとも1つの組換え核酸成分を提供する工程と、mir-302の標的となる細胞遺伝子が抑制された条件で上記組換え核酸成分で細胞基質を処理する工程とを含む。すなわち、本発明は、多能性胚性幹様(ES)細胞を発生、生成、選別する方法であり、例えばmir-302a、mir-302b、mir-302c、mir-302dなどのようなヘアピン様組換えマイクロRNA(miRNA)因子、これらの手動再設計したmiRNA前駆体(pre-miRNA)及び/又は短鎖ヘアピンRNA(shRNA)相同体、及びこれらの組み合わせの異所性発現を利用する。非天然/人造/人工mir-302因子の設計は、短鎖ヘアピンRNA及び/又は短鎖干渉RNA(siRNA)相同体又はクラスターのミスマッチや完全にマッチした構造体を含み、全ての構造体は、標的特異性を改良するとともに、導入遺伝子の送達及び遺伝子サイレンシングに必要なmir-302のコピー数を低減する可能性がある。

【0012】

天然マイクロRNAは、一般に約18~27ヌクレオチド(nt)の長さであり、miRNAとその標的との相補性に依存して、そのメッセンジャーRNA(mRNA)標的を直接

10

20

30

40

50

分解するか、又は標的mRNAの翻訳を抑制することができる。mir-302ファミリー(mir-302s)は、極めて高い相同性を有する遺伝子間miRNA群であり、89%以上の相同性を有し、ほぼ全てのほ乳類において保存されている。mir-302sは、5'から3'方向にmir-302b、mir-302c、mir-302a、mir-302d及びmir-367を含む非コードRNAクラスターとして同時転写される4つの要素からなる(Suhら、(2004)Dev. Biol. 270:488-498)。mir-367とmir-302は同時発現するが、これらの異なる標的遺伝子群に対する独特なシードモチーフから見ると、その機能が実際にお互いに異なっている。mir-302sはまた、多くのほ乳類の初期接合体と胚性幹(ES)細胞において極めて高く発現していることも分かっている(Tangら、(2007)Genes Dev. 21:644-648;Suhら、(2004)Dev. Biol. 270:488-498)。上記発現は、生長が遅いES細胞内に認められることが最も多く、細胞分化及び/又は増殖後、速やかに減少した。miRNAの生合成に必要な保存RNA分解酵素であるDicerを欠如するマウス卵母細胞は第1減数分裂において停止するが、これはmiRNAが卵形成で重要な役割を担うことを示唆している(Murchisonら、(2007)Genes Dev. 21:682-693)。miRNAは、短鎖抑制性RNAが高度に相補的な標的遺伝子の翻訳を抑制できるという特徴を有するとすれば(Bartel, D. P. (2004)Cell 116:281-297)、mir-302sは、ES細胞の初期胚発生におけるあらゆる発生可能な早期分化を防止するための主な母性抑制因子である可能性がある。これらの発見は、mir-302ファミリーが正常ES細胞の維持と更新において重要な役割を果たすことを示している。

【0013】

mir-302の各要素は、シードモチーフ全体を含み、その5'末端配列の最初に同じ(100%)17ヌクレオチドがあり、これらの23ヌクレオチドの成熟miRNA配列において全部で83%~96%の相同性を有する。上記シードモチーフは、成熟miRNA配列の5'末端の最初の8ヌクレオチドに位置し、miRNAとその標的遺伝子との間の結合特異性や効率を決める。ウェブサイトSanger miRBase: Sequences(<http://microrna.sanger.ac.uk/>)にリンクされた「TARGETSCAN」(http://www.targetscan.org/vert_42/)及び「PICTAR-VERT」(http://pictar.bio.nyu.edu/cgi-bin/Pictar_vert_vertebrate.cgi?)プログラムによる予測に基づいて、ヒトとマウス内の445以上の保存遺伝子を含むほぼ同じの細胞遺伝子を標的とする。なお、mir-302とmir-93、mir-367、mir-371、mir-372、mir-373及びmir-520ファミリーの各要素も、重なったいくつかの標的遺伝子を共有している。これらの標的遺伝子の多くは、胚発生段階の初期細胞分化の開始又は促進に関与する発生シグナルや転写因子である(Linら、(2008b)RNA 14:2115-2124)。これらの標的遺伝子の一部はよく知られている癌遺伝子でもある。従って、mir-302sの機能は、従来のiPS法のように特定の胚シグナル伝達経路に転写の刺激を与えるよりも、むしろ発生シグナル及び分化関連転写因子の全体的発生を抑制する可能性がさらに高い。また、ターゲットされるこれらの発生シグナル及び分化関連転写因子の一部が癌遺伝子であるから、mir-302sは腫瘍抑制因子として機能し、正常ES細胞が更新を外して腫瘍を形成することを防止するもできる。すなわち、本発明は、腫瘍のない多能性ES様細胞を生成する方法を提供する。例えば、インスリン様成長因子(IGF)は、Ras/Raf/分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)又はホスファチジルイノシトール3-キナーゼ(PI3K)/Aktシグナル送達経路のいずれかを經由した神経細胞特異的幹細胞及び始原細胞系譜に対する強力な発生シグナルである。例えば、脳腫瘍や乳癌、肺癌、前立腺癌、皮膚悪性黒色腫のような多くの腫瘍/癌変換も同じ経路に関与する。本発明者らは、IGF受容体(IGFR)-Ras/PI3Kシグナル経路の18以上ある要素がmir-302sの強力な標的であることを見出したが、これはほ乳類卵

10

20

30

40

50

母細胞とES細胞において、神経細胞の細胞分化が極めて厳格に遮断されることを示唆する。異なる組織細胞系譜に関与する多くの他の発生遺伝子において、mir-302sによる同様な阻害効果が観察されている。これらの証拠から、本発明者は、mir-302sが正常ES細胞の維持や更新において主な調節因子であり、分化している体細胞を相同なES状態に再プログラムすることができることを認めている。

【0014】

mir-302sの機能を調べるために、本発明者らはPol-II誘導性の天然イントロンmiRNAの生合成メカニズム(図1A)に基づくmiRNA発現系を開発し、この系を用いてインピトロ及びインピボで天然miRNA及び人工shRNAを生成することに成功した(図1B)。広義において、当該イントロンは、インフレーション内イントロン、5'非翻訳領域(5'-UTR)、及び3'-UTRを含む遺伝子の非コード配列である。従来の研究では、有効な成熟miRNAが、ほ乳類遺伝子のこれらのイントロン領域、すなわち、イントロンmiRNAに由来できることを証明している(Linら(2003) Biochem Biophys Res Commun. 310: 754-760; Linら(2005) Gene 356: 32-38)。イントロンmiRNA発現は、ほ乳類において一般的であり、これは、約50%のほ乳類miRNAがタンパク質をコードする遺伝子のイントロン内にコードするからである(Rodriguezら、(2004) Genome Res. 14: 1902-1910)。図1Aに示すように、イントロンmiRNAの生合成は、初期Pol-II媒介pre-mRNA転写とイントロンのスプライシング/切り出しとの共役相互作用に依存するが、これはゲノムのクロマチン周辺線維に近い特定の核領域内で生じる(Ghoshら、(2000) RNA 6: 1325-1334; Linら(2008a) Frontiers in Bioscience 13: 2216-2230)。これらのmiRNAは、II型RNAポリメラーゼ(Pol-II)によってその宿主遺伝子の一次転写産物(pre-mRNA)において転写され、スプライソソーム及び他のRNase IIIエンドヌクレアーゼによってスプライスされ、成熟miRNAを形成する(Linら、2003; Danin-Kreiselmanら、(2003) Mol Cell 11: 1-1289)が、しかし、この過程においてDroshaは必ずしも必要ではない(Rubyら、(2007) Nature 448: 83-86)。従って、イントロンmiRNAの生合成は、Pol-II転写、RNAスプライシング、エキソソームプロセッシング、及びナンセンス変異依存RNA分解(NMD)を含む複数の細胞内モニターシステムによって厳しく調整される。すなわち、miRNA様遺伝子サイレンシングエフェクターは、RNAスプライシング、エキソソームプロセッシング、ナンセンス変異依存分解、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれる細胞内メカニズムによって放出される。このような高度の細胞内モニターにより、他のshRNA/siRNA発現系において認められるRNA過飽和の問題を予防でき、より有効性、標的特異性、かつ安全性を有する遺伝子サイレンシング効果を標的遺伝子に与えることができる(Linら、2008a)。

【0015】

本発明者らは、天然イントロンmiRNAの経路を模倣することによって(図1A)、イントロンmiRNA及び/又はshRNA様の遺伝子サイレンシングエフェクターを生成できる人造/人工スプライシング可能なイントロン(SpRNAi)を含む、赤方偏移蛍光タンパク質(RGFP)の組換え導入遺伝子であるSpRNAi-RGFPを転写する新規なイントロンmiRNA発現系を設計した。SpRNAiは、Pol-IIによってSpRNAi-RGFP遺伝子のpre-mRNAにおいて同時転写され、RNAスプライシングによって切断される。その後、スプライス済みSpRNAiは、標的遺伝子に対する特異的転写後の遺伝子サイレンシング(PTGS)効果を引き起こすために、更に、例えば天然miRNAと人工shRNAのような成熟遺伝子サイレンシングエフェクターにプロセッシングされる。一方、イントロンのスプライシング後、miRNA/shRNA発現の同定に用いられるRGFPマーカータンパク質の翻訳のために、SpRNAi-RGFP遺伝子転写産物であるエクソンが連結して成熟mRNAを形成する。又は、例え

ば供与細胞再プログラム用の胚性幹細胞 (ES) 遺伝子マーカーのような他の遺伝子機能を備えるために、RGFPの代わりに、機能性タンパク質エクソンを用いてもよい。すなわち、遺伝子サイレンシングエフェクターは、転写後遺伝子サイレンシング、翻訳抑制、RNA干渉、及び/又はナンセンス変異依存分解によって細胞内遺伝子サイレンシング効果を誘導することができる。若し現在、脊椎動物において発現された機能不明の天然miRNA物質が1000種類以上もあり、また新しいmiRNAがさらに多く同定されると、このイントロンmiRNA発現系は、インビトロ及びインビボでこれらのmiRNAの機能を測定する有効な手段として用いることができる。

【0016】

SpRNAiイントロンは、5'スプライス部位 (SEQ. ID. NO. 4)、分岐点モチーフ (BrP; SEQ. ID. NO. 6)、ポリピリミジントラクト (PPT; SEQ. ID. NO. 7とSEQ. ID. NO. 8)、及び3'スプライス部位からなるいくつかの共通ヌクレオチド配列を含む。また、ヘアピンmiRNA又はshRNA前駆体が、5'スプライス部位とBrPモチーフとの間に挿入される。イントロンのこの部分は、一般にRNAスプライシングとプロセシング中に投げ縄構造を形成する。さらに、SpRNAiの3'末端は、イントロンRNAスプライシング及びNMDプロセシングの正確性を増すために、複数の翻訳終止コドン領域 (Tコドン) を含む。このTコドンは細胞質mRNAにある場合、NMDシステムの活性化シグナルを生じさせ、細胞内に蓄積したあらゆるRNA非構造体を分解する。しかしながら、高度な構造をもつshRNA及びmiRNA前駆体は、さらなるDicerによる開裂でそれぞれ成熟siRNA及びmiRNAになるために、保存される。本発明者らは、導入遺伝子の発現のために、SpRNAiを手動でRGFP遺伝子のDraII制限部位 (208番目のヌクレオチド) (SEQ. ID. NO. 22) に組み込んだ。それで、組換えSpRNAi-RGFP導入遺伝子を形成した。DraIIによるRGFPの開裂によって、各末端に3つの陥凹ヌクレオチドをもつAG-GNヌクレオチド切断が生じ、SpRNAi挿入後にそれぞれ5'及び3'スプライス部位を形成する。このイントロン挿入は、機能性RGFPタンパク質の構造を破壊するが、これはイントロンのスプライシングによって回復できるので、作用を受けた細胞周囲に現れる赤色RGFPによって、イントロンmiRNA/shRNAの放出及びRGFP mRNAの成熟を測定することができる。RGFP遺伝子は、複数のエクソン内スプライシングエンハンサー (ESE) も備え、RNAスプライシングの正確性と効率を向上させる。

【課題を解決するための手段】

【0017】

1つの好ましい実施形態において、本発明は、インビトロ及びインビボでのmiRNA/shRNA発現量に対する制御を改良する誘導性miRNA/shRNA発現系である (図2A及び2B)。この改良は、腫瘍感受性レトロウイルス感染の代わりに、より安全な電気穿孔法/マイクロインジェクション法によって導入遺伝子を送達するだけでなく、形質移入細胞において発生し得るRNAの過剰蓄積を予防する。本発明者はこの改良に基づいて、正常表皮皮膚細胞 (mirPS-hpESC)、正常毛嚢細胞 (mirPS-hHFC)、癌性乳癌MCF7 (mirPS-MCF7)、前立腺癌PC3 (mirPS-PC3) 及び皮膚悪性黒色腫Colo829 (mirPS-Colo) 細胞のヒト初代培養細胞に由来する、mir-302により形質移入する種々の多能性幹 (mirPS) 細胞株の生成に成功した。図2A及び2Bに示すように、本発明者らは、まず人工mir-302spre-miRNA/shRNA構造体 (図3B) をSpRNAi-RGFP導入遺伝子のイントロン挿入部位 (すなわち、MluI-PvuI制限/クローニング部位) に組み込み、そしてSpRNAi-RGFP導入遺伝子をドキシサイクリン (Dox) 誘導性pTet-On-tTSベクターのマルチクローニング部位 (すなわちXhoI-Clai制限部位) に挿入し、pTet-On-tTS-mir302s導入遺伝子ベクターを形成した (図3A)。すなわち、例えばSpRNAi、SpRNAi-RGFPなどの組換え核酸成分は、薬剤誘導性遺伝子発現ベクターを含む。また、SpRNAi-R

10

20

30

40

50

GFPは、プラスミド、ウィルスベクター、レトロトランスポゾン、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれる遺伝子発現ベクターに組み込むこともできる。SpRNAi-RGFP導入遺伝子は、370の塩基対(bp)の相同領域に並び、宿主細胞ゲノムの標的部位に組換えて挿入する。導入遺伝子を送達するために、低浸透圧性PH緩衝液(400 μ l; Eppendorf)にpTet-On-tTS-mir302sベクター(10~30 μ g)と宿主細胞(200~2000個)を混合し、400~450Vで100 μ sec電気穿孔して、導入遺伝子を宿主細胞ゲノムに送達した。72時間後、FACSフローサイトメトリーによる選択及び抗RGFPと抗Oct3/4モノクローナル抗体を用いることによって、陽性導入遺伝子mirPS細胞を単離して収集した(図3C)。このような新規なmir-302s遺伝子導入法の成功率は、91%を超えていると測定され、従来のiPS方法に認められた成功率0.002%~2%よりずっと高くなる。人工mir-302sの配列の全ては、Sanger miRBase: Sequence sプログラムの配列データベースに基づいて化学的に合成される。pTet-On-tTSベクターはCMF誘導性のtTS抑制遺伝子をコードし、導入遺伝子のTRE-CMVプロモーターを不活性化させる。ドキシサイクリン(Dox)の存在により、tTSの抑制機能はDoxにより中和されるので、SpRNAi-RGFP導入遺伝子とそのコードするmir-302sが発現される。

【0018】

別の好ましい実施形態において、本発明は、mir-302s又はmir-302様miRNA、shRNA及び/又はアンチセンスRNA遺伝子サイレンシングエフェクターの作製に望ましい少なくとも1つの挿入配列を含む、人工/人造SpRNAiイントロンを形成する遺伝子工学手法を提供する。例えば、5'スプライス部位、BrP、PPT、3'スプライス部位及びいくつかのリンカーオリゴヌクレオチドのような、RNAスプライシングに必要な合成オリゴヌクレオチド要素を連結することによって、SpRNAiを形成する。オリゴヌクレオチド合成装置によって、これらの要素を化学的に作製、連結できる。すなわち、SpRNAiのようなイントロンは、化学的合成法によって合成される。また、これらの要素の連結は、酵素による制限切断とライゲーションによって行ってもよい。すなわち、SpRNAiのようなイントロンは、ヌクレオチド組換え法によっても形成される。このように得られたSpRNAiのようなイントロンは、関連細胞に形質移入するのに直接使用するか、又はさらに、遺伝子転写産物(すなわちpre-mRNA)と結合して同時発現させるために宿主遺伝子に組み込むことが可能である。従って、本発明の組換え核酸成分はさらに、少なくとも1つのmir-302のようなRNA遺伝子サイレンシングエフェクターをコードする組換えイントロンを含む。一般に、イントロンの挿入法は、酵素制限/クローニング、相同DNA組換え、トランスポゾンの送達、ジャンピング遺伝子の組み込み、レトロウイルス感染、及びこれらの組み合わせを含む。宿主遺伝子は、蛍光タンパク質(GFP)マーカー遺伝子、胚性幹細胞(ES)マーカー遺伝子、ルシフェラーゼ、lac-Zレポーター遺伝子、ウィルス遺伝子、トランスポゾン、ジャンピング遺伝子、人工組換え遺伝子、及び天然細胞遺伝子の群から選ばれる。すなわち、組換え核酸成分は更に、蛍光タンパク質マーカー遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、lac-Zレポーター遺伝子、胚性幹細胞マーカー遺伝子、ウィルス遺伝子、細菌遺伝子、細胞マーカー遺伝子、ジャンピング遺伝子、トランスポゾン、及びこれらの組み合わせの群から選ばれる複数のエクソンを含む。本発明は、修正された赤色蛍光タンパク質(RGFP)遺伝子を用いてmir-302sの発現を示すことが好ましいが、これに制限されない。

【0019】

一方、SpRNAiイントロンは、5'GTAAGAGK-3'(SEQ.ID.NO.4)又はGU(A/G)AGUモチーフ(SEQ.ID.NO.38)(すなわち、5'GTAAGAGGAT-3'(SEQ.ID.NO.37)、5'GTAAGAGT-3'(SEQ.ID.NO.39)、5'GTAGAGT-3'(SEQ.ID.NO.40)、及び5'GTAAGT-3'(SEQ.ID.NO.41))のいずれかと同様な5'スプライス部位を含むが、その3'末端は、GWKSCYRCAG(SEQ.ID

10

20

30

40

50

. NO . 5) 又は CT (A / G) A (C / T) NGモチーフ (すなわち、 5 ' G A T A T C C T G C A G - 3 ' (SEQ . I D . NO . 4 2)、 5 ' G G C T G C A G - 3 '、及び 5 ' C C A C A G - 3 ') のいずれかと相同な 3 ' 受容スプライス部位である。すなわち、組換え核酸成分のイントロンは、 5 ' 供与スプライス部位、イントロン挿入部位、分岐点モチーフ、ポリピリミジントラクト、及び 3 ' 受容スプライス部位を含む。さらに、分岐点配列は、 5 ' と 3 ' のスプライス部位間に位置し、 5 ' - T A C T A A C - 3 ' 及び 5 ' - T A C T T A T - 3 ' のような 5 ' - T A C T W A Y - 3 ' (SEQ . I D . NO . 6) モチーフと相同な配列を含む。すなわち、分岐点モチーフは、 SEQ . I D . NO . 6 配列又はそれと相同な配列を含む。分岐点配列のアデノシン「A」ヌクレオチドは、ほぼ全てのスプライセオソームイントロンにおいて細胞の (2 ' 5 ') - オリゴアデニル酸合成酵素とスプライセオソームによって、 (2 ' 5 ') 結合型の投げ縄イントロン RNA の一部を形成する。さらに、ポリピリミジントラクトが分岐点と 3 ' スプライス部位との間に近接して位置し、 5 ' - (T Y) m (C / -) (T) n S (C / -) - 3 ' (SEQ . I D . NO . 7) 又は 5 ' - (T C) n N C T A G (G / -) - 3 ' (SEQ . I D . NO . 8) モチーフのいずれかと相同な T 又は C 高含量の配列を含む。シンボル「m」及び「n」は 1 以上の複数の反復数を示し、最も好ましくは、m は 1 ~ 3、n は 7 ~ 1 2 である。シンボル「-」は、配列内に 1 つの空ヌクレオチドがあることを示す。また、これらの全てのイントロン構成要素を連結するために、いくつかのリンカーヌクレオチド配列もある。米国特許法施行規則 (37 CFR) 第 1.822 条のヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列データに使用するシンボル及び書式に関するガイドラインに基づき、シンボル W はアデニン (A) 又はチミン (T) / ウラシル (U)、シンボル K はグアニン (g u a n i n e) (G) 又はチミン (T) / ウラシル (U)、シンボル S はシトシン (C) 又はグアニン (G)、シンボル Y はシトシン (C) 又はチミン (T) / ウラシル (U)、シンボル R はアデニン (A) 又はグアニン (G)、シンボル N はアデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G) 又はチミン (T) / ウラシル (U) を示す。

【 0 0 2 0 】

一方、種々のイントロン遺伝子サイレンシングエフェクターを発現する複数の導入遺伝子及び/又はベクターを用いて複数の標的遺伝子での遺伝子サイレンシングを実現してもよい。又は、複数の遺伝子サイレンシングエフェクターは、 1 回のイントロン挿入によって生成することができる。すなわち、イントロン挿入部位は、少なくとも 1 つの m i r - 3 0 2 と相同な遺伝子サイレンシングエフェクターを含む。例えば、ゼブラフィッシュにおける 1 つの抗 EGFP pre-miRNA を挿入したイントロンの異所性発現は、 m i R - E G F P (2 8 2 / 3 0 0) 及び m i R - E G F P (2 8 0 - 3 0 2) のようなサイズが異なる 2 種類の m i R N A を生成することが報告されているが、これは、 1 回の S p R N A i 挿入が複数の遺伝子サイレンシングエフェクターを生成できることを示している (L i n ら、 2 0 0 5)。特定の場合では、イントロン遺伝子サイレンシングエフェクターは標的遺伝子転写産物 (すなわち m R N A) とハイブリダイゼーションして、 2 本鎖 s i R N A を形成して RNA 干渉 (R N A i) 二次効果を引き起こす。これらの遺伝子サイレンシングエフェクターは導入遺伝子ベクターによって絶えずに生成されるので、インビボでの応用において、RNA の素早い分解の懸念が軽減される。この方策の利点は、導入遺伝子のベクターによる形質移入及びウイルス感染の使用によってその送達が安定していることで、特異的遺伝子サイレンシング効果を安定して比較的長期に提供することにある。1 つの局面では、本発明は、 I I 型 RNA ポリメラーゼ (P o l - I I)、ウィルスポリメラーゼ、 I I I 型 RNA ポリメラーゼ (P o l - I I I)、及びテトラサイクリン応答要素に制御される RNA ポリメラーゼ (T R E) プロモーターからなる群から選ばれる特定の RNA プロモーター (R N A p r o m o t e r) の制御下で、 m i R N A、 s h R N A、及び s i R N A を含む R N A i 関連遺伝子サイレンシングエフェクターを作製することができる。ウィルスプロモーターは、サイトメガロウィルス (C M V)、レトロウィルス末端反復配列 (L T R)、B 型肝炎ウィルス (H B V)、アデノウィルス (A M V)、及びアデノ随伴ウィルス (A A V) から単離された P o l - I I 様 RNA プロモーターである。例え

10

20

30

40

50

ば、レンチウイルスLTRプロモーターは、1細胞当たりpre-mRNA転写産物を 5×10^5 コピーまで提供するのに十分である。薬剤感受性抑制体であるtTSをウイルスポリメラーゼプロモーターの前に挿入して遺伝子サイレンシングエフェクターの転写速度を制御することも実行可能である。上記抑制体は、G418、テトラサイクリン、ドキシサイクリン、ネオマイシン、アンピシリン、カナマイシン、及びこれらの誘導体からなる群から選ばれる化学薬剤又は抗生物質により抑制されてもよい。つまり、本発明の組換え核酸成分の発現は、テトラサイクリン誘導体のような、薬らしい抗生物質誘導体によって調節されてもよい。例えば、ドキシサイクリンはテトラサイクリン誘導体の1つである。

【0021】

本発明によれば、細胞内機構によって所望のイントロンRNA挿入配列を切り出して放出し、上記RNA挿入配列と高度に相補的な特定の遺伝子標的に対して所望の遺伝子サイレンシング効果を引き起こすとともに、特に赤色/緑色蛍光タンパク質(RGFP/EGFP)、胚性遺伝子マーカー、ルシフェラーゼ、lac-Z、及びこれらの誘導体の群から選ばれるレポーター又はマーカータンパク質の翻訳など、所望のタンパク質機能の発生のために、宿主遺伝子転写産物のエクソンは連結して成熟mRNAを形成する。レポーター/マーカータンパク質の存在は、作用を受けた細胞において発現するイントロン遺伝子サイレンシングエフェクターのレベルと位置の同定に用いられ、生じた遺伝子サイレンシング効果を確認することができる。エクソンの連結で形成された成熟mRNAはまた、損傷又は欠損した遺伝子機能の置換、もしくは特定の遺伝子発現の亢進のための従来型の遺伝子療法においても有用な可能性がある。一方、mir-302と相同な遺伝子サイレンシングエフェクターは、アンチセンスRNA、リボザイム、短鎖一時的RNA(stRNA)、短鎖非コードRNA(tncRNA)、Piwi相互作用のRNA(piRNA)、2本鎖RNA(dsRNA)、siRNA、shRNA、miRNA、及びこれらの前駆体(すなわちpri-miRNA/pre-miRNA)を含んでもよい。これらのイントロン遺伝子サイレンシングエフェクターの使用は、外来遺伝子、病原性導入遺伝子、ウイルス遺伝子、突然変異遺伝子、癌遺伝子、疾患に関連する非コードRNA遺伝子、タンパク質をコードする多くの他のタイプの細胞遺伝子、及び非コード細胞遺伝子からなる群から選ばれる不要な標的遺伝子をサイレンシングさせる強力な道具として機能することができる。

【0022】

一部の天然pre-miRNAのステムループ構造が過大及び/又は複雑でSpRNAi-RGFP導入遺伝子に適合しないため、本発明者は、天然pre-miRNAループの代わりに、手動再設計したtRNA^{met}ループ(すなわち5'(A/U)UCCAA GGGGG-3')(SEQ.ID.NO.43)を用いることが多い。tRNA^{met}ループは、天然miRNAと同じなRan-GTP及びエキスポーチン-5の輸送メカニズムによって、細胞核から細胞質への手動再設計したmiRNAの輸送を効率的に促進することを示している(Linら(2005)Gene 356:32-38)。有利なのは、現在、本発明では、5'GCTAAGCCAGGC-3'(SEQ.ID.NO.1)と5'GCCCTGGCTTAGC-3'(SEQ.ID.NO.2)を含む、手動改良した1対のpre-mir-302ループを使用しており、これらは天然pre-miRNAと同じ核外への輸送効率を備えるが、tRNA輸送には干渉しない。この改良は更に、mir-302sの全体的機能及び安定性を向上させる可能性があるmir-302a-mir-302a*とmir-302c-mir-302c*のデュプレックスの形成を促進する。これらの新しいpre-miRNAループの設計はtRNA^{met}ループをmir-302b/mir-302aの短鎖ステムループと組み合わせることによって改善され、mir-302b/mir-302aは胚性幹細胞では高度に発現しているが、他の分化組織細胞ではそうでない。従って、mir-302sにおけるこれらの組換え/人造/人工pre-miRNA/shRNAループの使用は、インビボでの天然miRNA経路に干渉せず、非常に小さい細胞毒性しか生じなく、さらに安全的である。

【0023】

mir - 302 pre - miRNAファミリークラスターは、合成mir - 302 相
 同体のハイブリダイゼーション及び連結/ライゲーションによって形成され、5' から 3'
 ' 方向にmir - 302 a、mir - 302 b、mir - 302 c、及びmir - 302
 d pre - miRNAという4つの部分からなる(図3B)。これらの手動再設計したm
 ir - 302 miRNA/shRNA分子は、全てその5' 末端配列の最初に、5' U
 AAGUGCUUC CAUGUUU - 3' (SEQ. ID. NO. 3) のような同じ1
 7ヌクレオチドがある。mir - 302 pre - miRNAクラスターのDNA組換え
 のための合成オリゴヌクレオチドとしては、mir - 302 a - センス: 5' GTCCG
 ATCGTCCCACCACTT AAACGTGGAT G TACTTGCTT TGA
 AACTAAA GAAGTAAGTG CTTCCATGTT TTGGTGATGG A 10
 TCTCGAGCT C - 3' (SEQ. ID. NO. 29)、mir - 302 a - アン
 チセンス: 5' GAGCTCGAGA TCCATCACCA AAACATGGAA G
 CACTTACTT CTTTAGTTTC AAAGCAAGTA CATCCACGT
 T TAAGTGGTGG GACGATCGGA C - 3' (SEQ. ID. NO. 30
)、mir - 302 b - センス: 5' ATCTCGAGCT CGCTCCCTTC AA
 CTTTAACA TGGAAGTGCT TTCTGTGACT TTGAAAGTAA
 GTGCTTCCAT GTTTTAGTAG GAGTCGCTAG CGCTA - 3'
 (SEQ. ID. NO. 31)、mir - 302 b - アンチセンス: 5' TAGCGCT
 AGC GACTCCTACT AAAACATGGA AGCACTTACT TTCAA
 AGTCA CAGAAAGCAC TTCCATGTTA AAGTTGAAGG GAG 20
 CGAGCTC GAGAT - 3' (SEQ. ID. NO. 32)、mir - 302 c -
 センス: 5' CGCTAGCGCT ACCTTTGCTT TAACATGGAG GT
 ACCTGCTG TGTGAAACAG AAGTAAGTGC TTCCATGTTT
 CAGTGGAGGC GTCTAGACAT - 3' (SEQ. ID. NO. 33)、m
 ir - 302 c - アンチセンス: 5' ATGTCTAGACGCCTCCACTG AA
 ACATGGAA GCACTTACTT CTGTTTCACA CAGCAGGTAC
 CTCCATGTTA AAGCAAAGGT AGCGCTAGCG - 3' (SEQ. I
 D. NO. 34)、mir - 302 d - センス: 5' CGTCTAGACATAACAC
 TCAA ACATGGAAAGC ACTTAGCTAA GCCAGGCTAA GTGC
 TTCCAT GTTTGAGTGT TCGACGCGTC AT - 3' (SEQ. ID 30
 . NO. 35)、及びmir - 302 d - アンチセンス: 5' ATGACGCGTCGA
 ACACTCAA ACATGGAAAGC ACTTAGCCTG GCTTAGCTAA
 GTGCTTCCAT GTTTGAGTGT TATGTCTAGA CG - 3' (SE
 Q. ID. NO. 36) が挙げられる(Signa - Genosys, St. Lou
 is, MO)。また、イントロンを挿入しやすいために、mir - 302 pre - mi
 RNAクラスターの代わりに、合成mir - 302 s - センス5' GTCCGATCGT
 CATAAGTGCT TCCATGTTTT AGTGTGCTAA GCCAGGCA
 CA CTAAAACATG GAAGCACTTA TCGACGCGTC AT - 3' (S
 EQ. ID. NO. 27) とmir - 302 s - アンチセンス5' ATGACGCGT
 CGATAAGTGCT TCCATGTTTT AGTGTGCCTG GCTTAGC 40
 ACA CTAAAACATG GAAGCACTTA TGACGATCGG AC - 3'
 (SEQ. ID. NO. 28) の雑種によって形成される、手動再設計したshRNAを
 用いてもよい。すなわち、好ましい遺伝子サイレンシングエフェクターは、SEQ. ID
 . NO. 27とSEQ. ID. NO. 28との雑種によって形成される組換え核酸配列で
 ある。mir - 302 shRNAは、全ての天然mir - 302 要素と91%以上の相同
 性を有し、ヒトにおける同じ細胞遺伝子を標的とする。

【0024】

mir - 302 pre - miRNA/shRNAのイントロン挿入では、組換えSp
 RNAi - RGF P導入遺伝子の挿入部位はその5' 及び3' 末端にそれぞれPvuI及
 びMluI制限/クローニング部位と並んでいると、最初の挿入配列は簡単に除去可能で 50

、*mir-302 pre-miRNA/shRNA*のようなPvuI及びMluI制限部位と一致する付着末端をもつ様々な*pre-miRNA/shRNA*挿入配列によって置換可能である。異なる遺伝子転写産物に対してイントロン挿入配列を変化させることで、本発明のイントロン*mir-302s*発現系は、インビトロ及びインビボで標的遺伝子サイレンシングを誘導する強力な道具として機能することができる。サイズの確認と導入遺伝子の精製のために、*mir-302*を挿入したSpRNAi-RGFP構造体(10ng)は、1対のオリゴヌクレオチドプライマー、すなわち、5'CTCGAGCATGGTGAGCGGCC TGCTGAA-3'(SEQ.ID.NO.23)及び5'TCTAGAAGTTGGCCTTCTCG GGCAGGT-3'(SEQ.ID.NO.24)を用いて、94℃、52~57℃、そして68℃で各1分間の25~30サイクルによるポリメラーゼの連鎖反応(PCR)によって増幅される。単離して得られたPCR産物(約900~1100bp)を2%のアガロースゲル上にて分画し、ゲル抽出キット(Qiagen, CA)によって抽出して精製する。DNA配列を確認した後、精製された*mir-302*を挿入したSpRNAi-RGFP導入遺伝子を更にpTet-On-tTSベクターの制限/クローニング部位(すなわちXhoI-ClaiI部位)に挿入し、pTet-On-tTS-mir302s導入遺伝子発現ベクターを形成して細胞内で発現させる(図3A)。

【0025】

pTet-On-tTS-mir302s導入遺伝子ベクターは、リポソームによる/化学的形質移入、電気穿孔法、遺伝子銃による貫入、トランスポゾン/レトロトランスポゾン挿入、ジャンピング遺伝子組み込み、マイクロインジェクション及びレトロウイルス/レンチウイルス感染の群から選ばれる方法によって、ほ乳類細胞に送達できる。ランダムな導入遺伝子挿入及び細胞の突然変異のリスクを防ぐために、本発明者は、電気穿孔法と相同組換えの組み合わせを用いて、pTet-On-tTS-mir302s導入遺伝子ベクターを関連する宿主細胞に送達することが好ましい。例えば、SpRNAi-RGFP導入遺伝子は、既知遺伝子をコードしないLOC727977遺伝子座領域の3'近接端に近接するヒト染色体6に組換えて挿入するように、370-bp相同領域に並んでいる。SpRNAi-RGFPはこの単一位置に正確に挿入されたことが検出された(図4A)。従って、SpRNAi-RGFP導入遺伝子とそのコードする*mir-302s*の発現は、完全にDox存在下でのpTet-On-tTSベクターのTRE-CMVプロモーターの活性化によって決められる。本発明者は既に、正常表皮皮膚細胞、正常毛嚢細胞、癌性の乳癌MCF7、前立腺癌PC3、及び皮膚悪性黒色腫Colo細胞を含むヒトの正常と癌性細胞における誘導性*mir-302s*発現についてこのような新規方法を試験した。つまり、多能性幹細胞状態に再コードすべきほ乳類細胞は、ヒト細胞、正常体細胞、病的体細胞、腫瘍又は癌細胞、ヒト毛嚢細胞、ヒト皮膚細胞、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれるものである。このように得られた*mir-302*により形質移入した多能性幹(*mirPS*)細胞は、いずれも同じゲノム位置でしかSpRNAi-RGFP導入遺伝子の1つ又は2つの付随コピーをもたず(図4A)、これは、*mir-302*の合計濃度がこれらの*mirPS*細胞の生存に影響を与え得ることを示した。また、*mir-302s*とそのマーカーRGFPmRNAの発現量は、Dox濃度の向上とともに増えていることも留意した(図4B)。体細胞の多能性ES様幹細胞への再プログラムを引き起こすために、*mir-302*の全体濃度は30倍を超えて50倍未満で発現すべきである。現在用いられるPol-III又はCMVプロモーター誘導性の直接(エクソン)*siRNA/shRNA*発現系は、毛嚢と皮膚細胞において発現率が低いため機能していない(約16倍しか増えない)。これは可能性があるというのは、天然*mir-302*クラスターの鋳型が短か過ぎて構造化され、Pol-III又はCMVプロモーターにより直接に転写できないからである。従って、本発明は、細胞内モニターシステム以外の第2の保護手段として用いられる、所定の薬剤であるDoxによって*mir-302s*のインビトロ及びインビボでの発現量を制御する誘導性メカニズムを提供する。本発明にかかると*mirPS*細胞においては、RNA蓄積又は過飽和による細胞毒性が検出されて

10

20

30

40

50

いない。

【0026】

本発明は、誘導性導入遺伝子発現系の新規設計及び方策、すなわち、上述した pTet-On-tTS-mir302s を採用し、これにより遺伝子導入法によってヒト体細胞/癌細胞において mir-302 ファミリー (mir-302s) の要素又は相同体を発現させることで、これらの体細胞/癌細胞を多能性胚性幹細胞状態に再プログラムした。1つの好ましい実施形態において、本発明は、ヒト細胞における mir-302 様 miRNA/shRNA 分子/相同体となるように送達、転写、プロセシングできるので、細胞において mir-302 の標的となる発生及び分化関連遺伝子の特定の遺伝子サイレンシング効果を誘導する薬剤誘導性組換え核酸成分を用いた方法であって、a) : i) mir-302s の標的となる複数の発生及び分化関連遺伝子を発現させる細胞基質、及び ii) 複数の非コード mir-302 miRNA/shRNA 又はその相同体をコードする単離 RNA を転写し、またそれを細胞内メカニズムによって成熟 mir-302 miRNA/shRNA 又はその相同体にプロセシングできるので、細胞基質における標的遺伝子の機能を抑制できる組換え核酸成分を提供する工程と、b) 細胞基質における標的遺伝子の機能が抑制された条件で、組換え核酸成分によって細胞基質を処理する工程とを含む方法を提供する。薬剤誘導性組換え核酸成分としては、組換え mir-302 ファミリークラスター (mir-302s ; SEQ. ID. NO. 29-36 の雑種) 又は手動再設計した mir-302 shRNA 相同体 (すなわち SEQ. ID. NO. 27 と 28 の雑種) を挿入した SpRNAi-RGFP 導入遺伝子の Tet-On ベクターを含むことが最も好ましい。細胞基質は、インビトロ、エクスピボ又はインピボで mir-302 miRNA/shRNA 及びその標的遺伝子を発現させることができる。その後、細胞基質は、Oct3/4、SSEA3、SSEA4、Sox2、Nanog、及び LIN-28 のような標準 ES 細胞マーカーを示すだけでなく、高度に脱メチル化されたゲノムを含み、幹細胞が再プログラムされた接合体ゲノムに類似する ES 様状態に再プログラム又は形質転換される。

【0027】

本発明者は本発明により、7つの分野で mir-302 誘導性の多能性幹 (mirPS) 細胞の生成が成功したことを証明する証拠を収集した。第1に、ヒト正常毛嚢細胞由来 (hHFC)、及び癌性黒色腫 Colo 細胞由来という同じ細胞種由来の2種類の同胞 mirPS 細胞株が生成され、ともにインビトロで胚様体を形成できた (図5A~C)。第2に、mirPS トランスクリプトームのマイクロRNA (miRNA) マイクロアレイ及びノーザンプロット分析を用いて、mir-302s の発現増加を確認した (図6A~B)。第3に、Oct3/4、SSEA-3、SSEA-4、Sox2、及びNanog を含む標準胚性幹 (ES) 細胞マーカーの発現増加を検出した (図6B、8B~C及び9B)。第4に、ゲノムDNA全体は脱メチル化し、再プログラムイベントを経た接合体ゲノムの状態に類似することを観測した (図7A~C)。第5に、これらの mirPS 細胞の全ゲノムの遺伝子発現パターンは、ヒト ES WA01 (H1) 及び WA09 (H9) 細胞と86%以上の高度の相似性を有することを示した (図8A及び9A)。第6に、mirPS 細胞由来の胚様体 (EB) をインピボで免疫不全 SCID ベージュマウスに移植すると、3つの胚葉 (外胚葉、中胚葉、及び定形内胚葉) 全体を含む奇形腫様組織嚢腫を形成できる (図10)。しかし、これらの組織嚢腫は奇形腫と異なり、その周辺組織と非常に良くて明らかな境界が形成される。また、マウスにおけるこれらの嚢腫は、移植後約2.5週間にその発生が停止した。これらの mirPS 由来 EB 細胞のインピボランダムでの発生を制限する自動調節のメカニズムがあるようである。最後に、種々のホルモン及び/又は成長因子のインビトロでの処理を用いて mirPS 細胞分化を引き起こし、神経細胞の前駆細胞、軟骨細胞、線維芽細胞、及び精原細胞様始原細胞のような、種々の体細胞及び生殖系組織細胞種を形成することができる (図11A~O)。なお、本発明者は、電気穿孔に基づく導入遺伝子の送達によってこれらの mir-302 誘導性の mirPS 細胞株を形成し、レトロウイルス感染及び細胞突然変異というリスクを予防することに成

10

20

30

40

50

功した(図2A及び2B)。これらの研究の結果、mir-302sの異所性発現はヒト体細胞及び癌細胞を多能性ES様状態に再プログラムすることができるだけでなく、無フィーダー細胞培養条件でこれらのES様のmirPS細胞の更新と多能性を維持することができるので、マイクロRNA(miRNA)誘導性の幹細胞の生成に強力な証拠を提供した。mir-302sは、91%~93%の高い成功率で正常組織細胞と癌性の組織細胞を多能性ES様幹細胞に再プログラムするように機能できるとすれば、この新発明の研究結果は、幹細胞と癌治療に有利な適用を提供できる。

【0028】

以上の研究結果から、本発明者は、mir-302はサイクリン依存性キナーゼ2、サイクリンD1、D2の発現を顕著に抑制し、細胞増殖と移動速度を低減できるだけでなく、MECP2及びMECP1-p66の活性を抑制し、ゲノムDNA全体の脱メチル化を誘導できることを知った(図8B~C及び9B)。周知のように、サイクリンE依存性CDK2はS期の細胞周期に入るのに必要で、CDK2を抑制すると、G1期チェックポイントが停止してしまうが、サイクリンD1はDNAの損傷に応じてG1期停止を乗り越えることができる。この原則に基づいて、mir-302がCDK2及びサイクリンD1を抑制することによって、mirPS細胞は極めて遅い分裂速度を有することを示した。図5A及び5Cに示すように、mirPS細胞の平均細胞周期は約20~24時間で、その体細胞/癌性対応細胞の平均細胞周期(1細胞周期あたりは約4~6時間)より大幅に遅くなる。腫瘍/癌細胞は細胞増殖速度がそれほど遅い場合には生存できない。細胞周期のレートを制御することによって、mir-302は細胞の生存にも影響を与える。従って、この癌性-幹細胞周期の変換結果は、癌治療に顕著に有利である。また、MECP2及びMECP1-p66活性が抑制されたことは、図7A~Cの結果に合致し、悪性の癌細胞が良性のmirPS細胞に後成的再プログラムされたことを示唆している。このように患者から得られたmirPS細胞は、更に癌組織損傷の修復を促進できると考えられる。mir-302sは、ゲノムインプリンティング及び細胞運命の確認に必要な細胞遺伝子を抑制することによって、分化体細胞/癌細胞を多能性ES様状態に再プログラムできるだけでなく、無フィーダー細胞培養条件下でこのようなES様状態を維持できる。さらに、CDK2、サイクリンD1、D2を抑制すると、細胞増殖及び腫瘍/癌細胞の移動速度を低減できるため、mir-302sは、腫瘍細胞の発生と形成に対する強い腫瘍抑制因子として機能することが見出された(Linら, 2008b)。このmir-302sの腫瘍抑制因子という特徴は、臨床移植、幹細胞及び癌治療のために、腫瘍のない誘導性多能性幹細胞の生成を促進することができる。本発明の研究結果によれば、mir-302誘導性のmirPS細胞は、転写因子誘導性のiPS細胞よりも再プログラムのメカニズムがより安全、鮮明で理解しやすいである。

【0029】

要するに、本発明者らが新たに発明したmir-302s発現系は、取得しやすいため、特に体細胞毛嚢細胞の一次培養細胞による新規な多能性ES様幹細胞の生成に安全で強力な道具を提供する。イントロンmiRNA経路は、例えばmRNA転写、RNAスプライシング、エキソソームプロセッシング、及びNMDのような複数の細胞内モニターシステムに厳しく調節されるため、通常のsiRNA/shRNA経路よりさらに有効かつ安全であると考えられている(Linら, 2008a)。有利なのは、本発明には少なくとも5つの突破がある。第1に、従来のiPS方法に用いられる全ての4つの大きい転写因子遺伝子の代わりに、mir-302を発現させる1つの導入遺伝子を用いることができ、ただ患者の幾つかの体細胞だけによってより多くの相同な多能性ES様幹細胞を生成でき、幹細胞の純度及び患者の免疫システムとの適合性が改良される。第2に、mir-302を発現させる導入遺伝子は全サイズが比較的小さい(約1000塩基)ので、その導入遺伝子の送達がいPS方法における最大2%に対して極めて高い(成功率91%以上)。第3に、mirPS細胞の生成と培養は、完全に無フィーダー条件で行われるので、フィーダー抗原による汚染のリスクはない。第4に、癌遺伝子を使用しないから、細胞の突然変異と腫瘍形成のリスクが予防される。最後に、本発明者は、レトロウイルス感染の代わ

10

20

30

40

50

りに電気穿孔法を用いて *mir-302* を発現させる単一の導入遺伝子を送達するため、挿入突然変異を常に誘発する宿主細胞ゲノムへのレトロウイルスのランダムな挿入によるリスクが予防される。実際には、*mir-302* は、強い腫瘍抑制因子として示しており、ひいては種々の腫瘍/癌細胞を多能性ES様幹細胞に再プログラムすることができる(Linらによる米国特許案第12/149,725号の優先権)。とにかく、これらの利点により、レトロウイルス感染、癌突然変異、及び不定の腫瘍発生能力のリスクの予防というiPS方法の3つの問題を解決した。

【0030】

多能性ES様細胞株を生成する本発明の一般的機能の他に、本発明の潜在的適用は、このように得られた多能性ES様幹細胞を用いて無フィーダー及び腫瘍のないES細胞の培養条件を維持すること、癌細胞分化及び形質転換を予防すること、純粋又は相同な幹細胞集団を単離すること、インビトロで体幹細胞株にクローニング及び精製すること、インビトロで幹細胞を純粋な体細胞組織に分化させるように誘導すること、移植と幹細胞治療の方法を発展することを更に含む。本発明はまた、幹細胞機能及びメカニズムを検討するための道具、又は、特定の用途に応じて幹細胞の特徴を変更する成分及び方法の道具として用いることができる。他の実施形態において、本発明の多能性ES様幹細胞は、ヒト、サル、イヌ、ネコ、ラット、場合によってはマウスのようなほ乳類の正常及び癌性体細胞、並びに成体幹細胞の群から生成することができる。

10

【0031】

例証の目的で図面を特に参照するが、この目的だけに限らない。

20

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1A】図1Aは、イントロンmiRNA生合成とその関連する遺伝子サイレンシング効果のメカニズムを示す。イントロンmiRNAは、タンパク質をコードするエクソン及び非コードイントロンを含む前駆体メッセンジャーRNAの一部に転写される。pre-mRNAからイントロンをスプライスし、その二次構造の一部を、標的遺伝子サイレンシングを引き起こすことができる小さなmiRNA様分子に更にスプライスするとともに、マーカータンパク質の合成のために、エクソンが共に連結して成熟mRNAを形成する。

【図1B】図1Bは、イントロンmiRNA生合成とその関連する遺伝子サイレンシング効果のメカニズムを示す。予め設計されたイントロンmiRNAを導入遺伝子によってTg(アクチン-GAL4:UAS-gfp)種のゼブラフィッシュに形質移入された実施例は、標的となる緑色EGFP発現に対する強い遺伝子サイレンシング効果(>80%抑制、左から4番目のレーン)を示し、(レーン1~5)miRNAを有しない空イントロン(1)、HIV-p24(2)又はインテグリン1(3)に対するpre-miRNA挿入配列を有するイントロン、及び抗EGFPpre-miRNA挿入配列があるが機能性5'スプライス部位がないイントロン(5)を含む、他の的外れの挿入配列は機能しない。抗EGFPpre-miRNAは、赤方偏移蛍光マーカー(RGFP)遺伝子の5'近接端イントロン領域に挿入される。ノーザンブロット分析(右)は、成熟miRNAが空RGFP(-)又は欠損RGFP()ではなく、pre-miRNAを挿入したRGFPスプライシング産物だけより生成されることを示している。これは、イントロンmiRNA生合成においてRNAスプライシングが必要であることを表明している。

30

40

【図2A】図2A及び2Bは、SpRNAi-RGFP導入遺伝子を含む修飾されたTet-Onベクター(すなわち、pTet-On-tTS-mir302s)を用いて、*mir-302* spre-miRNAクラスター又はshRNAを発現させる構造体及び方法を示す。電気穿孔に基づく導入遺伝子導入法を用いて、*mir-302* を発現させるSpRNAi-RGFP導入遺伝子を、標的となる体細胞/癌細胞に形質移入する。

【図2B】図2A及び2Bは、SpRNAi-RGFP導入遺伝子を含む修飾されたTet-Onベクター(すなわち、pTet-On-tTS-mir302s)を用いて、*mir-302* spre-miRNAクラスター又はshRNAを発現させる構造体及び方法を示す。電気穿孔に基づく導入遺伝子導入法を用いて、*mir-302* を発現させるS

50

pRNAi-RGFP導入遺伝子を、標的となる体細胞/癌細胞に形質移入する。

【図3A】図3Aは、電気穿孔形質移入に基づいて予め設計されたTet-On発現mir-302の導入遺伝子により、ヒト正常毛嚢hHFC及び癌性の黒色腫Colo細胞を多能性ES様干(mirPS)細胞に再プログラムしたことを示す。Tet-On誘導性ベクター(すなわち、pTet-On-tTS-mir302s)において組換えられたmir-302を発現させる導入遺伝子(すなわちSpRNAi-RGFP)の構造。SpRNAi-RGFP導入遺伝子は、ヒト細胞ゲノムの標的部位に組換え挿入するために、370塩基対(bp)の相同領域に並んでいる。

【図3B】図3Bは、電気穿孔形質移入に基づいて予め設計されたTet-On発現mir-302の導入遺伝子により、ヒト正常毛嚢hHFC及び癌性の黒色腫Colo細胞を多能性ES様干(mirPS)細胞に再プログラムしたことを示す。SpRNAi-RGFP導入遺伝子のイントロンの一部として組み込まれた、mir-302pre-miRNAクラスター(mir-302s)の構造体。

【図3C】図3Cは、電気穿孔形質移入に基づいて予め設計されたTet-On発現mir-302の導入遺伝子により、ヒト正常毛嚢hHFC及び癌性の黒色腫Colo細胞を多能性ES様干(mirPS)細胞に再プログラムしたことを示す。FACSフローサイトメトリー選別及びRGFPマーカに対する抗体による、陽性mir-302により形質移入したmirPS細胞の選択。本発明の導入遺伝子送達の成功率は、約91%~93%と測定された。

【図4A】図4Aは、種々のドキシサイクリン(Dox)濃度の制御下でTet-Onでmir-302を発現させるSpRNAi-RGFP導入遺伝子のmirPS細胞ゲノムにおける組み込み、及びmir-302ファミリー要素(mir-302s)の誘導型発現の引き起しを示す。すべてのmirPS細胞が導入遺伝子の1つ又は2つの付随コピーだけを持つのに対し、始原hHFC及びColo細胞(対照)は、導入遺伝子が検出されていないことを示す、異なるmirPS細胞株から単離されたゲノムDNAの定量PCR(qPCR;左)分析。蛍光インサイツハイブリダイゼーション(FISH;右)測定は、導入遺伝子がヒトゲノムの特定部位に挿入されることを更に示している。上記制限された導入遺伝子挿入は、mir-302発現の全体濃度がmirPS細胞の生存に影響を与え得ることを示している。

【図4B】図4Bは、種々のドキシサイクリン(Dox)濃度の制御下でTet-Onでmir-302を発現させるSpRNAi-RGFP導入遺伝子のmirPS細胞ゲノムにおける組み込み、及びmir-302ファミリー要素(mir-302s)の誘導型発現の引き起しを示す。Dox濃度に応じる誘導性mir-302s発現を示すノーザンブロット及びバーチャート。

【図5A】図5Aは、ヒト正常毛嚢(hHFC)及び癌性の黒色腫Colo細胞から多能性ES様幹(mirPS)細胞へ再プログラムする変化を示す。mir-302により形質移入した細胞(すなわち、mirPS-hHFC及びmirPS-Colo)における、形態及び細胞増殖速度の変化。ドキシサイクリン(Dox)によって誘導されたmir-302により形質移入した細胞において、ES様円形細胞形状及び大幅に遅い細胞更新速度が発現された。

【図5B】図5Bは、ヒト正常毛嚢(hHFC)及び癌性の黒色腫Colo細胞から多能性ES様幹(mirPS)細胞へ再プログラムする変化を示す。mirPS細胞由来の胚様体(EB)の形成、及び陽性Tuj1及び/又はABCA2マーカによる神経前駆細胞への誘導分化。

【図5C】図5Cは、ヒト正常毛嚢(hHFC)及び癌性の黒色腫Colo細胞から多能性ES様幹(mirPS)細胞へ再プログラムする変化を示す。限界希釈後、単一のmirPS細胞からEBを形成する時間的経過。細胞周期は、約20~24時間と推定される。

【図6A】図6Aは、mir-302s形質移入とESマーカ発現との間の関連性を示す。Dox誘導下で、全てのmir-302ファミリー要素(mir-302s)はmi

10

20

30

40

50

r P S細胞においては高度に発現されるが、始原体細胞においては発現されない ($n = 3$, $p < 0.01$) ことを示す全miRNA発現のマイクロアレイ分析である。

【図6B】図6Bは、mir-302s形質移入とESマーカー発現との間の関連性を示す。ヒトES様WA01-H1及びWA09-H9細胞において観測されたものと非常に類似するような、Dox誘導下でmir P S細胞によるOct3/4 (Oct4)、SSEA-3、SSEA-4、Sox2、Nanogを含む大量のES細胞マーカーの発現は多いが、Klf4発現は少ない ($n = 4$, $p < 0.01$) ことを示すノーザンブロット及びウェスタンブロット分析である。

【図7A】図7Aは、種々のmir P S細胞株におけるゲノムのDNA脱メチル化のパターンを示す。mir P S細胞におけるゲノム全体範囲内の全CpGメチル化の喪失を示すHpaII分解である。

10

【図7B】図7Bは、種々のmir P S細胞株におけるゲノムのDNA脱メチル化のパターンを示す。Oct3/4プロモーターの9,400bp調節領域において、非メチル化のACGTが重亜硫酸塩修飾によってAUGT部位になるが、これはすべてのmir P S細胞において非メチル化のACTG (又はAUCT) 部位が顕著に増えたことを示す。

【図7C】図7Cは、種々のmir P S細胞株におけるゲノムのDNA脱メチル化のパターンを示す。Oct3/4プロモーターに並んだ起点の詳細なメチル化図を示す重亜硫酸塩DNA配列決定である。黒い円いと白い円は、それぞれメチル化と非メチル化のシトシン部位を示す。

【図7D】図7Dは、種々のmir P S細胞株におけるゲノムのDNA脱メチル化のパターンを示す。その始原転移癌性PC3細胞に比べて、mir P S-PC3細胞は移動能が低減されることを示す。

20

【図8A】図8Aは、Colo、mir P S-Colo、ヒトES様WA01-H1 (H1) 及びWA09-H9 (H9) 細胞における全ゲノム遺伝子発現の分析を示す。ヒトゲノムGeneChipU133A&B及びplus2.0アフィメトリクス (Affymetrix) を用いて変わった遺伝子発現パターンを比較し、mir P S-Colo細胞がH1細胞 (89%) 及びH9細胞 (86%) と高度に相似性を有するが、癌性のColo細胞とは相似性 (53%) が低いことを示す。白い点は、安定発現の遺伝子 (緑点) に比べて高度に変化した遺伝子を指す。

【図8B】図8Bは、Colo、mir P S-Colo、ヒトES様WA01-H1 (H1) 及びWA09-H9 (H9) 細胞における全ゲノム遺伝子発現の分析を示す。ES細胞マーカーが顕著に増え、黒色腫の癌遺伝子、発生シグナル及びmir-302の標的となる細胞増殖が顕著に低減し、またmir P S細胞においてDNAメチル化遺伝子が検出され、H1及びH9細胞と非常に類似する ($n = 4$, $p < 0.01$) ことを示す、マイクロアレイ同定された特異的発現の遺伝子の機能クラスタリングである。

30

【図8C】図8Cは、ノーザンブロット及びウェスタンブロット分析を示し、mir P S-Colo細胞におけるmir-302s、ヒトES様細胞マーカーと予知したmir-302標的遺伝子の発現パターンとの間の関連性が立証され、Klf4の発現を除いてヒトES様H1及びH9細胞と類似する ($n = 3$, $p < 0.01$) ことを示している。

【図9A】図9Aは、hHFC、mir P S-hHFC、ヒトES様WA01-H1 (H1) 及びWA09-H9 (H9) 細胞における全ゲノム遺伝子発現の分析を示す。ヒトゲノムGeneChipU133 plus 2.0アフィメトリクスを用いて変わった遺伝子発現パターンを比較し、mir P S-hHFC細胞はH1細胞 (96%) 及びH9細胞 (91%) と高度に相似性を有するが、hHFC体細胞との相似性 (47% - 56%) が低いことを示している。

40

【図9B】図9Bは、hHFC、mir P S-hHFC、ヒトES様WA01-H1 (H1) 及びWA09-H9 (H9) 細胞における全ゲノム遺伝子発現の分析を示す。mir P S-hHFC細胞におけるmir-302s、ヒトES様細胞マーカーと予知したmir-302標的遺伝子の発現パターンとの間の関連性が立証され、Klf4及びKlf5の発現を除いてヒトES様H1及びH9細胞と類似するウェスタンブロット分析である。

50

挙げられた *mir-302* 標的遺伝子は、17種類の転写調節因子、1種類のヒストンデアセチラーゼ (HDA4)、メチル CpG 結合した2種類のタンパク質 (MECP1-p66及びMECP2)、及び3種類の細胞周期チェックポイントタンパク質 (CDK2、サイクリンD1、D2) を含む。

【図10】図10は、雌性の偽妊娠の免疫不全SCIDベージュマウスの子宮又は腹腔腔における *mirPS* 移植体由来する奇形腫様原基組織を示す。これらの分化された組織は、外胚葉、中胚葉及び内胚葉という3つの胚葉の全てを含み、これらの異なる細胞形態は、例えばヘマトキシリン及びエオシン (eosin) (H & E) によって染色された後確認された。Nikon TE2000システムによって200x倍率で顕微写真を撮った。

【図11-1】図11A~Oは、誘導された *mirPS* 細胞の多能性を示す。免疫不全マウスにおいて、エクスピボで上から下にそれぞれDHT、TGF- β 1及びBMP4に対する処理は、*mirPS* 細胞を精原細胞様細胞 (A~E)、線維芽細胞 (F~J) 及び軟骨細胞 (K~O) 組織細胞に分化させるように誘導する。免疫不全の裸マウスは、移植療法のインピボ環境を模倣するために用いられる。左から右に示された顕微写真は、微分干渉コントラストによるヘマトキシリン染色 (A、F、K)、導入遺伝子 *mir-302* マーカーRGFP (赤色) で標記された明視野 (B、G、L)、4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドールで標記された第1の組織マーカー (青色DAPI) に対する免疫染色 (C、H、M)、フルオレセインで標記された第2の組織マーカー (緑色EGFP) に対する免疫染色 (D、I、N)、及び全部の3種類の蛍光マーカーの組合せ (E、J、O) を示す。RGFP-明視野において、小さい窓は、高倍率 (600x) で *mirPS* 細胞を分化させる形態を示す。

【図11-2】図11A~Oは、誘導された *mirPS* 細胞の多能性を示す。免疫不全マウスにおいて、エクスピボで上から下にそれぞれDHT、TGF- β 1及びBMP4に対する処理は、*mirPS* 細胞を精原細胞様細胞 (A~E)、線維芽細胞 (F~J) 及び軟骨細胞 (K~O) 組織細胞に分化させるように誘導する。免疫不全の裸マウスは、移植療法のインピボ環境を模倣するために用いられる。左から右に示された顕微写真は、微分干渉コントラストによるヘマトキシリン染色 (A、F、K)、導入遺伝子 *mir-302* マーカーRGFP (赤色) で標記された明視野 (B、G、L)、4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドールで標記された第1の組織マーカー (青色DAPI) に対する免疫染色 (C、H、M)、フルオレセインで標記された第2の組織マーカー (緑色EGFP) に対する免疫染色 (D、I、N)、及び全部の3種類の蛍光マーカーの組合せ (E、J、O) を示す。RGFP-明視野において、小さい窓は、高倍率 (600x) で *mirPS* 細胞を分化させる形態を示す。

【図11-3】図11A~Oは、誘導された *mirPS* 細胞の多能性を示す。免疫不全マウスにおいて、エクスピボで上から下にそれぞれDHT、TGF- β 1及びBMP4に対する処理は、*mirPS* 細胞を精原細胞様細胞 (A~E)、線維芽細胞 (F~J) 及び軟骨細胞 (K~O) 組織細胞に分化させるように誘導する。免疫不全の裸マウスは、移植療法のインピボ環境を模倣するために用いられる。左から右に示された顕微写真は、微分干渉コントラストによるヘマトキシリン染色 (A、F、K)、導入遺伝子 *mir-302* マーカーRGFP (赤色) で標記された明視野 (B、G、L)、4,6-ジアミジノ-2-フェニルインドールで標記された第1の組織マーカー (青色DAPI) に対する免疫染色 (C、H、M)、フルオレセインで標記された第2の組織マーカー (緑色EGFP) に対する免疫染色 (D、I、N)、及び全部の3種類の蛍光マーカーの組合せ (E、J、O) を示す。RGFP-明視野において、小さい窓は、高倍率 (600x) で *mirPS* 細胞を分化させる形態を示す。

【発明を実施するための形態】

【0033】

以下、図面を参照して本発明の特定の実施形態を説明するが、これらの実施形態は例示のために過ぎず、多くの可能性のある特定の実施形態のうち、本発明の原理の応用を代表

10

20

30

40

50

できるほんの少し例証しか説明していないことを理解すべきである。当業者にとって明らかな各種の変更や修飾は、付随する特許請求の範囲でさらに定義されるような本発明の精神、範囲や企図の範ちゅうに含まれるとみなされる。

【0034】

本発明は、誘導性組換えマイクロRNA (miRNA) 様短鎖ヘアピンRNA (shRNA) を用いてほ乳類体細胞/癌細胞の遺伝及び行動特性を多能性胚性幹様細胞 (ES) 状態に再プログラムする、新規な核酸成分と遺伝子導入法を提供する。すなわち、本発明は、少なくとも1つのほ乳類細胞を少なくとも1つの多能性幹様細胞に再プログラムする方法を提供する。この方法は、例えば、mir-302の標的となる複数の細胞遺伝子を発現する少なくとも1つの細胞基質を提供する工程と、細胞基質の中のmir-302と相異なる少なくとも1つの遺伝子サイレンシングエフェクターに送達、転写及びプロセシングできる少なくとも1つの組換え核酸成分を提供する工程と、mir-302の標的となる細胞遺伝子が抑制された条件で上記組換え核酸成分を用いて細胞基質を処理する工程とを含む。従来のshRNA設計と異なり、本発明にかかるshRNAは、天然mir-302sの前駆体 (pre-mir-302s) に類似する mismatch stem arm を含んでもよい。さらに、本発明にかかるshRNAは、例えば5' GCTAAGCCAGGC-3' (SEQ. ID. NO. 1) 及び5' GCCTGGCTTAGC-3' (SEQ. ID. NO. 2) のような、tRNA輸送に干渉せずに天然pre-miRNAと同じ核外への輸送効率を提供できる、改良されたpre-mir-302 stem loop を更にも含んでもよい。すなわち、遺伝子サイレンシングエフェクターは、SEQ. ID. NO. 1又はSEQ. ID. NO. 2と相異なる配列を含む。いずれの特定の理論に制限せずに、上記再プログラムは、新たに発現されたmir-302媒介性の遺伝子サイレンシングメカニズムに関与し、このメカニズムは、mir-302ファミリークラスター (mir-302s) 又はmir-302と相異なるshRNAを発現できる組換え導入遺伝子を形質移入することによって引き起こされる。

【0035】

1つの好ましい実施形態において、本発明にかかる導入遺伝子発現の設計は、天然イントロンmiRNA生合成の経路に基づく (図1A)。本発明者は、赤方偏移蛍光タンパク質 (RGFP) をコードする組換え導入遺伝子であるSpRNAi-RGFPを発現させる新規な核酸成分を設計した。上記導入遺伝子は、細胞内RNAスプライシング及びプロセシング機構によってイントロンmiRNA及び/又はshRNA様遺伝子サイレンシングエフェクターを生成することができる人造/人工スプライシング可能なイントロン (SpRNAi) を含む (Linら, 2003, 2006a, b)。実施例1は、SpRNAiイントロン及びSpRNAi-RGFP導入遺伝子を設計・構築するプロトコルについて説明する。SpRNAiは、ほ乳類II型RNAポリメラーゼ (Pol-II) によってSpRNAi-RGFP遺伝子の一次転写産物 (pre-mRNA) において共同転写され、RNAスプライシング/プロセシングによって切断される。その後、スプライス済みSpRNAiは、標的遺伝子に対する特異的転写後の遺伝子サイレンシング (PTGS) 作用を引き起こすように、例えば天然miRNA及び人工shRNAのような成熟な遺伝子サイレンシングエフェクターに更にプロセシングされる。この場合、本発明は、組換えmir-302s及び/又はmir-302sと相異なるshRNAを生成させる。一方、所望のmiRNA/shRNA発現の同定に用いることができる赤色蛍光マーカータンパク質に翻訳するために、イントロンスプライシング後、SpRNAi-RGFP遺伝子転写産物のエクソンが連結して、成熟RGFP mRNAを形成する。又は、RGFPの代わりに機能性タンパク質エクソンを使用し、例えばES細胞マーカー遺伝子Oct4、Sox2、Nanog、LIN-28、SSEA3及びSSEA4のような他の遺伝子機能を提供してもよい。

【0036】

別の好ましい実施形態において、本発明は、ほ乳類細胞におけるmir-302様miRNA/shRNA分子/相同体に送達、転写及びプロセシングできるから、細胞におい

10

20

30

40

50

て *mir-302* の標的となる発生及び分化関連の遺伝子に対する特異的遺伝子サイレンシング効果を誘導する単離された薬剤誘導性核酸成分を用いる、ほ乳類体細胞/癌細胞を多能性ES様幹細胞に再プログラムする新規方法であって(図2A及び2B)、a) *mir-302* の標的となる発生及び分化に関連する複数の遺伝子を発現させる細胞基質を提供する工程と、b) 細胞内メカニズムによって成熟 *mir-302 miRNA/shRNA* 又はその相同体にプロセシングされるから、細胞基質における標的遺伝子の機能を抑制できる複数の非コード *mir-302 miRNA/shRNA* 又はその相同体をコードする単離RNAを、転写できる組換え核酸成分を提供する工程と、c) 細胞基質において標的遺伝子の機能が抑制された条件で組換え核酸成分によって細胞基質を処理する工程とを含む方法を提供する。薬剤誘導性組換え核酸成分は、組換え *mir-302* ファミリークラスター (*mir-302s*; SEQ. ID. NO. 29-36 の雑種) 又は手動再設計した *mir-302 shRNA* 相同体 (すなわち、SEQ. ID. NO. 27 と 28 の雑種) を挿入した SpRNAi-RGFP 導入遺伝子を含む Tet-On ベクターであることが最も好ましい。つまり、組換え核酸成分は、薬剤誘導性遺伝子の発現ベクターを含む。また、組換え核酸成分は、プラスミド、ウィルスベクター、レトロトランスポゾン、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれる遺伝子発現ベクターを含んでもよい。また、組換え核酸成分は、Tet-On 又は Tet-Off 遺伝子発現ベクターを含む。細胞基質は、インビトロ、エクスピボ、又はインピボで *mir-302 miRNA/shRNA* 及びその標的遺伝子を発現させることができる。実施例 2、3 は、*mir-302 miRNA/shRNA* の構築及び導入遺伝子の送達についてのプロトコルを説明する。

10

20

【0037】

本発明者は、細胞内スプライセオソーム、エキソソーム及びNMDシステムによって、イントロン *mir-302 miRNA/shRNA* 因子を SpRNAi-RGFP 導入遺伝子から放出させるように触媒する。実施例 1 や図 2A、2B は、細胞内スプライセオソーム構成要素を SpRNAi のいくつかの snRNP 認識部位 [例えば snRNPU1、U2、U4/U6、U5 トリ snRNP に必要な、5' スプライス部位 (SEQ. ID. NO. 4)、分岐点モチーフ (BRP; SEQ. ID. NO. 6)、ポリピリミジントラクト (PPT; SEQ. ID. NO. 7 又は 8) 及び 3' スプライス部位 (SEQ. ID. NO. 5) を含む結合モチーフ] において順に DNA 組換えを行わせることによって、合成 snRNP 認識要素を SpRNAi イントロンに組み込み、このような人工組換え型 SpRNAi を単離された誘導性 RGFP 遺伝子に組み込んで SpRNAi-RGFP 導入遺伝子を形成する方法についてそれぞれ説明する。さらに、SpRNAi は、組換え *mir-302 miRNA/shRNA* 因子をクローニングして発現させるように、5' スプライス部位と BRP モチーフとの間に位置するイントロン挿入部位を更に含む。実施例 2 及び図 3B は、組換え *mir-302* ファミリークラスター (*mir-302s*) 又は手動再設計した *mir-302 shRNA* 相同体の構築について説明する。実施例 3 及び図 3C は、組換え *mir-302s miRNA/shRNA* の関連細胞への形質移入及び陽性導入遺伝子細胞の選択について説明する。すなわち、*mir-302* マイクロRNA 又は Oct3/4 をマーカーとして用いて多能性幹細胞を選択的に単離する。実施例 4 ~ 12 は、ほ乳類体細胞/癌細胞の多能性ES様細胞への再プログラムを評価するための測定について説明する。測定の結果を図 4 ~ 11 に示す。

30

40

【0038】

mir-302 様 *miRNA* 又は *shRNA* を発現できる誘導性 SpRNAi-RGFP 導入遺伝子発現系の設計及び構築

本発明は、誘導性 Tet-On/Off イントロン *miRNA/shRNA* 発現系である pTet-On-tTS-*miR302s* (図 3A) を用いて、ドキシサイクリン誘導制御下で、細胞内イントロン *miRNA* 生合成のメカニズムによって、*mir-302* 様遺伝子サイレンシングエフェクターの導入遺伝子発現を引き起こす(図 1A)。実施例 1、2 は、pTet-On-tTS-*miR302s* の構築について説明する。pTet-On-tTS-*miR302s* 発現ベクターは、関連細胞に形質移入した後、TRE-P

50

ol - II 誘導性の組換え導入遺伝子、すなわち、ヘアピン様 miRNA、shRNA のようなイントロン遺伝子サイレンシングエフェクターを生成できる人工スプライシング可能なイントロン (SpRNAi) を含む SpRNAi - RGFP を転写する (図 3A、3B)。実施例 1 に示すように、若干の合成 DNA 配列を順にライゲーションすることで、遺伝子工学的に SpRNAi を赤方偏移蛍光タンパク質遺伝子 (RGFP) に組み込む。SpRNAi は、スプライセオソーム、エキソソーム、及び NMD システムの構成要素のような細胞内 RNA のスプライシング及びプロセッシングメカニズムによって放出され、その後イントロン RNA 媒介性の遺伝子サイレンシングを引き起こせる前駆体 miRNA 又は shRNA 挿入配列 (部位) を含む。SpRNAi の運搬及び生成に使用できる他の RNA 転写産物は、hnRNA、mRNA、rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA、smnRNA、ウイルス RNA、pre - マイクロ RNA、及びこれらの前駆体と誘導体を含む。

10

【0039】

実施例 1 に示すように、SpRNAi を合成し、シライトイソギンチャクの HcRed 1 色素タンパク質から突然変異して得たイントロン不含の赤方偏移蛍光タンパク質遺伝子 (RGFP 又は rGFP) に組み込み、SpRNAi - RGFP 導入遺伝子を形成した。挿入された SpRNAi は RGFP の機能的な蛍光タンパク質構造を破壊するので、形質移入に成功した細胞又は生体における 570 nm の波長の赤色蛍光放射の再出現によって、イントロンの除去及び RGFP - mRNA への成熟を確認することができる (図 1B)。この組換え SpRNAi - RGFP 導入遺伝子の構築は、メッセンジャー RNA 前駆体 (pre - mRNA) での天然構造のスプライセオソームイントロンに基づくものである。SpRNAi の主な構成要素は、例えば正確な開裂のための末端の 5' 及び 3' スプライス部位、スプライシング認識用の分岐点モチーフ (BrP)、スプライセオソーム相互作用のためのポリピリミジントラクト (PPT)、これらの各構成要素を連結するリンカー、及び所望のイントロン挿入用のいくつかの制限部位のような、複数の snRNP 認識部位及びリンカーを含む。本発明の SpRNAi の 5' 末端から 3' 末端への構造は、5' スプライス部位、mir - 302 様遺伝子サイレンシングエフェクターと相同なイントロン挿入配列、分岐点モチーフ (BrP)、ポリピリミジントラクト (PPT)、及び 3' スプライス部位を含む。加えて、いくつかの翻訳終止コドン (Tコドン) は、SpRNAi の 3' スプライス部位の近くのリンカー配列に配置してもよい。

20

【0040】

遺伝学において、5' スプライス部位は、5' GTAAGAGK - 3' (SEQ. ID. NO. 4) 又は GU(A/G)AGU モチーフ (例えば 5' GTAAGAGGAT - 3' (SEQ. ID. NO. 37)、5' GTAAGAGT - 3'、5' GTAGAGT - 3'、5' GTAAGT - 3') のいずれかを含むか、又はそのいずれかと相同なヌクレオチド配列であるが、3' スプライス部位は、GWKSCYRCAG (SEQ. ID. NO. 5) 又は CT(A/G)A(C/T)NG モチーフ (例えば 5' GATATCCTGCAG - 3' (SEQ. ID. NO. 42)、5' GGCTGCAG - 3'、5' CCA CAG - 3') のいずれかを含むか、又はそのいずれかと相同なヌクレオチド配列である。さらに、分岐点配列は、5' と 3' スプライス部位間に位置し、5' TACTAAC - 3' 及び 5' TACTTAT - 3' のような 5' TACTWAY - 3' (SEQ. ID. NO. 6) モチーフと相同な配列を含む。分岐点配列のアデノシン「A」ヌクレオチドは、ほぼ全てのスプライセオソームイントロンにある細胞 (2' 5') オリゴアデニル酸合成酵素及びスプライセオソームによって、(2' 5') 結合型の投げ縄イントロン RNA の一部を形成する。さらに、ポリピリミジントラクトは、分岐点と 3' スプライス部位の間に近接して位置し、5' (TY)m(C/-)(T)nS(C/-) - 3' (SEQ. ID. NO. 7) 又は 5' (TC)nNCTAG(G/-) - 3' (SEQ. ID. NO. 8) モチーフのいずれかと相同な T 又は C 高含量のオリゴヌクレオチド配列を含む。ここで、シンボル「m」、「n」は、1 以上の () の複数の反復配列を示し、最も好ましくは、数 m は 1 ~ 3、数 n は 7 ~ 12 である。シンボル「-」は、配列内に 1 つの空ヌクレオチドがあることを示す。また、これらの全イントロン構成要素をつなげるために、い

30

40

50

くつかのリンカーヌクレオチド配列もある。米国特許法施行規則(37 CFR)第1.822条のヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列データに使用するシンボル及び書式に関するガイドラインに基づき、シンボルWはアデニン(A)又はチミン(T)/ウラシル(U)、シンボルKはグアニン(G)又はチミン(T)/ウラシル(U)、シンボルSはシトシン(C)又はグアニン(G)、シンボルYはシトシン(C)又はチミン(T)/ウラシル(U)、シンボルRはアデニン(A)又はグアニン(G)、シンボルNはアデニン(A)、シトシン(C)、グアニン(G)又はチミン(T)/ウラシル(U)を意味する。上記全てのスプライセオソーム認識構成要素について、デオキシチミジン(T)ヌクレオチドをウリジン(U)で置き換え可能である。

【0041】

スプライス済みSpRNAi挿入配列の機能を試験するために、様々な遺伝子サイレンシングエフェクター構造体を組換えSpRNAi-RGFP遺伝子導入のイントロン挿入部位に入れてクローニングすることができる。イントロン挿入部位は、エンドヌクレアーゼAatII、AccI、AflII/III、AgeI、ApaI/LI、AseI、Asp718I、BamHI、BbeI、BclI/II、BglII、BsmI、Bsp120I、BspHI/LUIII/120I、BsrI/BI/GI、BssHII/SI、BstBI/U1/XI、ClaI、Csp6I、DpnI、DraI/II、EagI、Ecl136II、EcoRI/RII/47III、EheI、FspI、HaeIII、HhaI、HinfI、HindIII、HinfI、HpaI/II、KasI、KpnI、MaeII/III、MfeI、MluI、MscI、MseI、NaeI、NarI、NcoI、NdeI、NgoMI、NotI、NruI、NsiI、PmlI、Ppu10I、PstI、PvuI/II、RsaI、SacI/II、SalI、Sau3AI、SmaI、SnaBI、SphI、SspI、StuI、TaiI、TaqI、XbaI、XhoI、XmaI及びこれらの組み合わせの群から選ばれる制限酵素によって認識される複数の制限・クローニング部位を含む。これらのイントロン挿入配列は、投げ縄型RNA、短鎖一時的RNA(stRNA)、アンチセンスRNA、短鎖干渉RNA(siRNA)、2本鎖RNA(dsRNA)、短鎖ヘアピンRNA(shRNA)、マイクロRNA(miRNA)、Pwi相互作用RNA(piRNA)、リボザイム、及びこれらの前駆体、さらにセンス又はアンチセンス構造、もしくはその両者のいずれかの誘導体、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれる高度二次構造として転写

【0042】

関連細胞又は生体での導入遺伝子の送達を簡便にするために、本発明のSpRNAi-RGFP導入遺伝子は、DNA導入遺伝子、プラスミド、レトロトランスポゾン、トランスポゾン、ジャンピング遺伝子、ウィルスベクター、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれる発現可能ベクターに組み込むことが好ましい。このように得られた導入遺伝子発現ベクター類は、化学的/リボソーム形質移入、電気穿孔法、トランスポゾン媒介DNA組換え、ジャンピング遺伝子挿入、ウィルス感染、マイクロインジェクション、遺伝子銃による貫入、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれる高効率の遺伝子送達法によって細胞又は生体に導入することが好ましい。すなわち、組換え核酸成分は、リボソーム形質移入、化学的形質移入、導入遺伝子DNA組換え、ウィルス感染、トランスポゾン挿入、ジャンピング遺伝子挿入、マイクロインジェクション、電気穿孔法、遺伝子銃による貫入、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれる遺伝子送達法によって上記ほ乳類細胞に導入する。上記ベクターは、SpRNAi-RGFP導入遺伝子の発現のために、少なくとも1つのウィルス、Pol-I又はPol-IIIプロモーター、又はこれらの組み合わせを更に含んでもよい。実施例3に示すように、導入遺伝子はTet-On/Offベクターに組み込まれ、電気穿孔法によってこの導入遺伝子を標的細胞に送達することが最も好ましい。また、ベクターは更に、真核細胞における翻訳効率を上げるKozak翻訳開始共通配列、SpRNAi-RGFP導入遺伝子の下流に位置する複数のSV40ポリアデニル化シグナル、原核細胞増殖のためのpUC複製起点、SpRNAi

10

20

30

40

50

- R G F P 構造体をベクターに組み込むための少なくとも2箇所の制限部位、S V 4 0 T 抗原を発現するほ乳類細胞の選択的S V 4 0 複製起点、及び複製可能な原核細胞で抗生物質耐性遺伝子を発現させるための選択的S V 4 0 初期プロモーターを含んでもよい。すなわち、組換え核酸成分は、テトラサイクリン応答要素、ウィルス又はI I 型R N A ポリメラーゼ (P o l - I I) プロモーター又はその両者、K o z a k 翻訳開始共通配列、ポリアデニル化シグナル、複数の制限ノクローニング部位及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれるものである。また、組換え核酸成分は、p U C 複製起点、複製可能な原核細胞において抗生物質耐性遺伝子を少なくとも1つ発現させるS V 4 0 初期プロモーター、ほ乳類細胞における選択的S V 4 0 複製起点、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれるものである。抗生物質耐性遺伝子の発現は、導入遺伝子発現で陽性クローニングを単離する選択的マーカーとして用いられる。抗生物質は、ペニシリンG、アンピシリン、ネオマイシン、パロマイシン、カナマイシン、ストレプトマイシン、エリスロマイシン、スペクトロマイシン、フォスホマイシン、テトラサイクリン、リファピシン、アムホテリシンB、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール、セファロチン、チロシン、及びこれらの組み合わせからなる群から選ばれるものである。

10

【0043】

S p R N A i - R G F P 導入遺伝子発現イントロンm i R N A / s h R N A を用いた方が、その緑色EGFP遺伝子発現を標的にするために、Tg (アクチン-GAL4:USA-gfp) 系統ゼブラフィッシュにおいてインビボで試験した。実施例6及び図1Bに示すように、人工組換え型抗E G F P p r e - m i R N A 挿入配列を発現するS p R N A i - R G F P プラスミドのリボソームの形質移入 (第4レーン) は、極めて強力なE G F P 遺伝子サイレンシング効果 (遺伝子ノックダウン率 > 80%) を示しているが、下記のレーンによって示された挿入配列ではサイレンシング効果が全く検出できなかった。上記レーンは、左から右に、1: 空ベクター対照 (C t l)、2: H I V - p 2 4 を標的にするp r e - m i R N A 挿入配列 (偽)、3: ヘアピンループ構造を備えていないアンチセンスE G F P 挿入配列 (アンチ)、及び5: 抗E G F P p r e - m i R N A と完全に相補的な逆位p r e - m i R N A 配列 (m i R *) である。マーカーR G F P とハウスキーピング - アクチンなどのような標的外遺伝子ではこのような効果は検知されなかった。上記イントロンm i R N A 媒介性の遺伝子サイレンシングは極めて標的特異的であることを示唆している。さらに、ノーザンブロット分析 (図1B、右) によって、本発明者らは設計されたSpRNAi-RGFP遺伝子転写産物からのみ有効なイントロン短鎖RNAの生成を観察できたが (中央レーン)、イントロン不含のRGFPの天然転写産物 (左レーン) 又は機能的な5' スプライス部位のない欠損SpRNAi-RGFPの転写産物では、これらは観察されなかった。一方、スプライズ済みRGFPエクソンは連結し、マーカー赤色蛍光タンパク質の翻訳のために成熟RNAを形成することができる。

20

30

【0044】

組換えm i r - 3 0 2 ファミリークラスター及びm i r - 3 0 2 様s h R N A 相同体の設計及び構築

一部の天然p r e - m i R N A のヘアピンループ構造は過大及び/又は複雑でS p R N A i - R G F P 導入遺伝子に適しないため、本発明者は、天然p r e - m i R N A ループの代わりに、修飾されたt R N A ^{m e t} ループ (すなわち5' (A/U) U C C A A G G G G G - 3') (S E Q . I D . N O . 4 3) を設計した。t R N A ^{m e t} ループは、天然m i R N A と同じなR a n - G T P 及びエキスポーチン - 5 の輸送メカニズムによって、手動再設計したm i R N A の細胞核から細胞質への輸送を効率的に促進することが示されている (L i n ら, 2 0 0 5)。有利なのは、現在、本発明は、5' G C T A A G C C A G G C - 3' (S E Q . I D . N O . 1) 及び5' G C C T G G C T T A G C - 3' (S E Q . I D . N O . 2) を含む、手動改良した1対のp r e - m i r - 3 0 2 ループを使用し、これらは天然p r e - m i R N A と同様な核外への輸送効率を備えるが、t R N A 輸送には干渉しない。この改良はさらに、m i r - 3 0 2 s 全体の機能を安定化できるm i r - 3 0 2 a - m i r - 3 0 2 a* と m i r - 3 0 2 c - m i r - 3 0 2 c* のデュ

40

50

プレックスの形成を促進する。tRNA^{met}ループをmir-302b/mir-302aの短鎖ステムループと組み合わせることによって、これらの新しいpre-miRNAループについての設計が改善され、mir-302b/mir-302aは胚性幹細胞では高度に発現しているが、他の分化組織細胞ではそうでない。従って、mir-302sにおけるこれらの人造/人工pre-miRNAループの使用は、インビボでの天然miRNA経路に干渉せず、非常に小さい毒性しか生じなく、さらに安全的である。

【0045】

mir-302a、mir-302b、mir-302c及びmir-302dの成熟配列は、それぞれ5'UAAGUGCUUCCAUGUUUUGGUGA-3'(SEQ.ID.NO.10)、5'UAAGUGCUUCCAUGUUUAGUAG-3'(SEQ.ID.NO.11)、5'UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGG-3'(SEQ.ID.NO.12)、及び5'UAAGUGCUUC CAUGUUUGAGUGU-3'(SEQ.ID.NO.13)である。これらのmir-302ファミリー遺伝子サイレンシングエフェクターは、最初の17ヌクレオチドにおいて5'末端領域の高度な保存を共有しており(100%相同性)、5'UAAGUGCUUC CAUGUUU-3'(SEQ.ID.NO.3)と同じである。すなわち、遺伝子サイレンシングエフェクターは、SEQ.ID.NO.3と配列相同性又は/及び相補性を有する。これらのmir-302配列と相同な配列についての設計において、ウラシル(U)の代わりにチミン(T)を用いてもよい。

【0046】

実施例2に述べるように、家族性mir-302 pre-miRNAクラスターは、合成mir-302相同体のハイブリダイゼーション及び連結/ライゲーションによって形成され、5'から3'方向にmir-302a、mir-302b、mir-302c及びmir-302d pre-miRNAである4つの部分からなる(図3B)。これらの手動再設計した全てのmir-302 miRNA/shRNA相同体は、最初の17ヌクレオチドにおいて同じ5'末端[例えば、5'UAAGUGCUUC CAUGUUU-3'(SEQ.ID.NO.3)]を有する。又は、イントロンを容易に挿入するために、mir-302 pre-miRNAクラスターの代わりに手動再設計したmir-302 shRNAを用いてもよい。合成mir-302s-センス5'GTCCGATCGTCATAAGTGCT TCCATGTTTT AGTGTGCTAA GCCA GGCACA CTAAAACATG GAAGCACTTA TCGACGCGTC AT-3'(SEQ.ID.NO.27)及びmir-302s-アンチセンス5'ATGACGCGTCGATAGTGTGCT TCCATGTTTT AGTGTGCCTG GC TTAGCACA CTAAAACATG GAAGCACTTA TGACGATCGGAC-3'(SEQ.ID.NO.28)とをハイブリダイゼーションさせることによって、再設計されたmir-302 shRNAを形成する。この再設計されたmir-302 shRNAは、全ての天然mir-302要素と91%以上の相同性を有し、ヒト体内の同様なmir-302 標的遺伝子を標的とする。

【0047】

mir-302を誘導的発現させるSpRNAi-RGFP導入遺伝子の、ヒト正常毛嚢の一次培養細胞(hHFC)及び癌性の黒色腫Colo細胞への送達

組換えSpRNAi-RGFP導入遺伝子のイントロン挿入部位は、その5'末端と3'末端にそれぞれPvuIとMluI制限/クローニング部位に並んでいるとすれば、最初の挿入配列は、例えばmir-302 pre-miRNA/shRNAのようなPvuIとMluI制限部位と適合した付着末端を有する種々のpre-miRNA/shRNA挿入配列により簡単に除去及び置換可能である。異なる遺伝子転写産物に対してイントロン挿入配列を変化させることで、イントロンmiRNA/shRNA発現系は、インビトロ及びインビボにおいて標的遺伝子サイレンシングを誘導する強力な道具として機能することができる。実験において、まずSpRNAi-RGFP導入遺伝子においてmir-302 pre-miRNA/shRNAを挿入し、次に、pTet-On-tTS-m

i R 3 0 2 s 導入遺伝子発現ベクターを形成するために、導入遺伝子を p T e t - O n - t T S ベクターのクローニング部位（すなわち X h o I - C l a I 部位）に組み込んだ（図 3 A）。その後、導入遺伝子を宿主細胞ゲノムに送達するように、低浸透圧性の PH 緩衝液（400 μ l; E p p e n d o r f）において p T e t - O n - t T S - m i r 3 0 2 s ベクター（10 ~ 30 μ g）と宿主細胞（200 ~ 2000 個）を混合し、400 ~ 450 V で 100 μ s e c 電気穿孔した。72 時間後、F A C S フローサイトメトリー選別及び抗 R G F P と抗 O c t 3 / 4 モノクローナル抗体を用いることによって、陽性導入遺伝子細胞を単離して収集した（図 3 C）。このような新規な m i r - 3 0 2 s 遺伝子導入法は成功率が 91% を越えると測定された。S p R N A i - R G F P 導入遺伝子は、遺伝子を含まない特定のゲノム部位に組換えて挿入するように相同領域に並んでいるので（図 4 A）、そのコード化した m i r - 3 0 2 m i R N A / s h R N A エフェクターの発現は、完全に D o x 誘導性の p T e t - O n - t T S ベクターの T R E - C M V プロモーターの活性化によって決められる。p T e t - O n - t T S ベクターは既に C M V 誘導性の t T S 抑制遺伝子を含み、導入遺伝子の T R E - C M V プロモーターを不活性化させる。ドキシサイクリン（D o x）の存在下、t T S の機能が D o x に抑制されるため、S p R N A i - R G F P 導入遺伝子及びそのコードした m i r - 3 0 2 s が発現され得る（図 4 B）。

【0048】

無フィーダー培養条件下でヒト正常と癌性体細胞を E S 様状態に再プログラムする

実施例 1 ~ 2 及び図 3 A ~ 3 B に述べるように、本発明者らは、既に人工連結の m i r - 3 0 2 a - m i r - 3 0 2 b - m i r - 3 0 2 c - m i r - 3 0 2 d (m i r - 3 0 2 s) p r e - m i R N A 又は再設計した m i r - 3 0 2 様 s h R N A [例えば、5' U A A G U G C U U C C A U G U U U U A G U G U - 3' (S E Q . I D . N O . 9) を含むヘアピン様配列] をコードする誘導性 S p R N A i - R G F P 導入遺伝子を設計、構築し、次に、その種々の体細胞及び癌細胞（例えばヒト正常毛嚢細胞（h H F C）、及び癌性黒色腫 C o l o 細胞）内の発生及び分化関連の標的遺伝子サイレンシングの作用について試験した。

【0049】

図 2 A 及び 2 B に示された工程によって、本発明者は、それぞれ遺伝子導入法によって組換え m i r - 3 0 2 s p r e - m i R N A を h H F C 細胞に送達し、また再設計された m i r - 3 0 2 s h R N A 相同体（S E Q . I D . N O . 9）を C o l o 細胞に送達した。すなわち、遺伝子サイレンシングエフェクターは、S E Q . I D . N O . 9 と相同な配列を含む組換えヘアピン様 RNA である。D o x 誘導性 m i r - 3 0 2 異所性発現後、m i r - 3 0 2 により形質移入 / 誘導した上記多能性幹（m i r P S）細胞株の全てはその形態が紡錘状から円形状へと変わった（下の図）。これは、E S 細胞の発生に類似するように、移動能を失ったばかりでなく、非常に遅い細胞更新速度を有する可能性があることを示している（図 5 A）。フローサイトメトリー分析（上の図；実施例 7）では、各細胞周期段階の DNA 含量を比較し、m i r P S 細胞の有糸分裂細胞集団が 67% 以上減少したことを更に示し、細胞増殖速度がその体細胞 / 癌性複製起点より大幅に遅いことを表明している。上記分裂は、37%、5% の C O₂ で、D M E M / F 1 2 又は R P M I 1 6 4 0 / B 2 7 培地を含む無フィーダーの培養条件下で 20 ~ 24 時間あたり 1 回起こした。上記培地は、10% の木炭除去済み F B S、4 m M の L - グルタミン、1 m M のピルビン酸ナトリウム、5 n g / m l のアクチビン、5 n g / m l のノギン、3 n g / m l の b F G F、及び 0.5 μ M の Y - 2 7 6 3 2 と 0.5 μ M の G S K - 3 抑制因子 X V の等量混合物を補充した m i r P S 細胞培地である。すなわち、多能性幹様細胞は、10% の木炭除去済み F B S、4 m M の L - グルタミン、1 m M のピルビン酸ナトリウム、5 n g / m l のアクチビン、3 n g / m l の b F G F、及び 0.5 μ M の Y - 2 7 6 3 2 と 0.5 μ M の G S K - 3 抑制因子 X V の等量混合物を補充した D M E M / F 1 2 又は R P M I 1 6 4 0 / B 2 7 培地において無フィーダー培養できる。フローサイトメトリーグラフの 1 番目（左）と 2 番目（右）のピークは、被験細胞集団全体における休止期 G 0 / G 1 及び

10

20

30

40

50

有糸分裂期Mの細胞集団のレベルを示している。mir-302s形質移入後、有糸分裂細胞集団(M期)はhHFCでは41%から11%に、Colo細胞では36%から11%に減少したが、空SpRNAi-RGF Pベクター及びDox(+Dox)を用いたか、又はDoxを備えていないmir-302を発現させるSpRNAi-RGF Pベクター(+mir-302s-Dox)を用いた形質移入後、細胞形態又は細胞増殖速度においては顕著な変化はない。これらの検討結果によって、本発明者らは、mir-302s異所性発現が正常や癌性のヒト体細胞をES様細胞形態と細胞分裂速度に再プログラムできることを立証した。

【0050】

種々のmirPS細胞由来の胚様体の形成

すべてのmirPS細胞は、ヒト胚性幹(ES)細胞由来の胚様体(EB)を思わせる密集したコロニーを形成できる(図5B)。すなわち、これは、本発明にかかる再プログラムされた多能性幹様細胞によって胚様体が形成できることを確認した。トリプシン-EDTAとコラゲナーゼIVの混合物で解離させて10%のFBSのみが補充されたRPMI1640培地において培養する場合に、これらのEB様細胞は神経前駆細胞に分化し、その中、多くの前駆細胞が神経細胞マーカーTuj1及び/又はABCA2を発現する。限界希釈して10%の木炭除去済みのFBS、4mMのL-グルタミン、1mMのピルビン酸ナトリウム、5ng/mlのアクチビン、3ng/mlのbFGF、及び0.5μMのY-27632と0.5μMのGSK-3抑制因子XVの等量混合物が補充された無フィーダーDMEM/F12培地において更に培養された後、各mirPS細胞は、引き続き継代培養及び/又は移植/植入測定のための純粋なEBを形成できる(図5C)。これらのES様幹細胞の性質を考えると、本発明者らは続いてこれらのmirPS細胞内のmir-302s及びES細胞マーカーの発現を調べ、ヒトES様WA01-H1及びWA09-H9細胞と比較した。

【0051】

mirPS細胞内のmir-302s発現のマイクロRNA(miRNA)マイクロアレイ分析

mirPS細胞内の導入遺伝子mir-302の発現を確認するために、実施例9に述べられたマイクロRNA(miRNA)マイクロアレイ分析を行う。図6Aに示すように、miRNAマイクロアレイ分析は、Dox処理(100μM)後、始原体細胞(対照)に比べて、mirPS-hHFC細胞において、全てのmir-302要素(最右下、白楕円)はいずれも発現率が顕著に増加したことを示している。ノーザンプロットで測定されたように、mirPS細胞内のmir-302sの発現量は、Dox誘導の濃度に比例的に対応する(図4B)。mirPS-Colo細胞においても同様な結果が認められた(Linら, 2008b)。初期EB段階において、mirVana(登録商標)miRNA単離キット(Ambion, Inc., Austin, TX)によって各細胞株から短鎖RNAを単離した。3.5%ホルムアルデヒド・アガロースゲル電気泳動及び分光光度計の計測(Bio-Rad, Hercules, CA)によって、単離した短鎖RNAの純度及び量を評価し、ついでマイクロアレイ分析のためにLCSciences社(San Diego, CA)に送付した。Cy3及びCy5強度画像(青いバックグラウンド)において、シグナル強度がレベル1からレベル65, 535に増えた場合、対応色は青色から緑色、黄色及び赤色に変わった。Cy5/Cy3比率画像(黒いバックグラウンド)において、Cy3レベルがCy5レベルより高い場合、色は緑色であり、Cy3レベルがCy5レベルに等しい場合、色は黄色であり、Cy5レベルがCy3レベルより高い場合、色は赤色である。成熟RNA配列は、天然mir-302ファミリー要素と手動再設計したmir-302pre-miRNA/shRNA因子との間に極めた高い相同性(>91%)を有するから、その結果、再設計したmir-302因子は天然mir-302sの代わりに機能できる。

【0052】

この結果より、本発明者らは、mir-302発現上昇が更に、mir-92、mir

10

20

30

40

50

- 93、mir - 200c、mir - 367、mir - 371、mir - 372、mir - 373、mir - 374及びmir - 520ファミリーの全要素のような、いくつかの他のmiRNAの発現を増加させる可能性があることを見出した。Sanger miRBase: Sequencesウェブサイト (<http://microrna.sanger.ac.uk/>) にリンクされた「TARGETSCAN」 (http://www.targetscan.org/vert_42/) 及び「PICTAR-VERT」 (http://pictar.bio.nyu.edu/cgi-bin/Pictar_vertibrate.cgi?) プログラムを用いたこれらのmiRNAの予知標的遺伝子の分析によって、mir - 302sは400個以上の標的遺伝子をこれらのmiRNAと共有していることが証明され、これらのmiRNAが幹細胞の多能性及び更新の維持に重要な役割を担っていることが示唆された。これらの保存標的遺伝子は、RAB/RAS関連癌遺伝子、ECT関連癌遺伝子、多形腺腫遺伝子、E2F転写因子、サイクリンD結合Myb様転写因子、HMGボックス転写因子、Sp3転写因子、転写因子CP2様タンパク質、NFkB活性化タンパク質遺伝子、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)、MAPK関連キナーゼ、SNF関連キナーゼ、ミオシン軽鎖キナーゼ、TNF - 誘導タンパク質遺伝子、DAZ関連タンパク質遺伝子、LIM関連ホメオボックス遺伝子、DEAD/Hボックスタンパク質遺伝子、フォークヘッドボックスタンパク質遺伝子、BMP調節因子、Rho/Racグアニンヌクレオチド交換因子、IGF受容体、エンドセリン受容体、左右決定因子、サイクリン、p53誘導性核タンパク質遺伝子、RB様1、RB結合タンパク質遺伝子、Max結合タンパク質遺伝子、c-MIR免疫認識調節因子、Bcl2様アポトーシス促進因子、プロトカドヘリン、インテグリン 4 / 8、インヒピン、アンキリン、SENP1、NUFIP2、FGF9 / 19、SMAD2、CXCR4、EIF2C、PCAF、MECP2、ヒストンアセチルトランスフェラーゼMYST3、核RNPH3、及び多くの核受容体や因子を含むが、これらの要素に制限されない。これらの遺伝子の大部分は、胚の発生及び/又は腫瘍/癌の腫瘍形成能と高度に関連している。

10

20

【0053】

標準なヒトES様マーカーの発現、すなわち、Oct3/4、SSEA-3、SSEA-4、Sox2及びNanogの同定

図6B及び9Bに示すように、mirPS細胞は、例えばOct3/4、SSEA-3、SSEA-4、Sox2及びNanogのような、多くの標準なヒトES様細胞マーカーを強く発現するが、始原体細胞(hHFC対照)や、空SpRNAi-RGFPベクターとドキシサイクリンによって形質移入する体細胞(hHFC+Dox)、又はドキシサイクリンを備えていないmir-302sベクターによって形質移入する体細胞(mirPS-Dox)においては、これらのマーカーが検出されていない。ノーザンブロット及びウェスタンブロット分析によりmRNA及びタンパク質含量について測定したように、これらのESマーカーの発現パターンは、ヒトES様WA01-H1及びWA09-H9細胞に非常に類似している。これらの結果は、mir-302sの異所性発現が成体体細胞/癌細胞を、多くの標準なヒトES様マーカーを呈する多能性ES様幹細胞に再プログラムできることを表明している。mirPS-Colo細胞においても同様な結果が観察された(図8C)。

30

40

【0054】

Oct3/4 (Oct-3又はOct-4ともいう)は、主に全能性胚性幹細胞及び生殖細胞において高度に発現するPOU転写因子の1つである(Scholerら, (1989) EMBO J. 8: 2543-2550; Rosnerら, (1990) Nature 345: 686-692)。臨界レベルのOct3/4発現が幹細胞の自己更新及び多能性の維持に必要である。Oct3/4の下方制御は結果的に発生プログラムを分岐させ、胚性幹細胞の分化につながる。SSEAタンパク質であるSSEA-1、SSEA-3及びSSEA-4は、元々その分化誘導体ではなく着床前段階のネズミ胚及び奇形癌幹細胞の表面にあるラクト系及びグロボ系糖脂質を認識するモノクローナル抗体に

50

よって同定される (Solterら, (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 5565 - 5569)。霊長類の未分化胚性幹 (ES) 細胞であるヒト胚性癌 (EC) 及び ES 細胞は、いずれも SSEA - 3 及び SSEA - 4 を発現するが、SSEA - 1 を発現しない (Thomsonら, (1998) Science 282: 1145 - 1147)。SSEA - 3 及び SSEA - 4 は、卵形成中に合成され、主に卵母細胞、接合体及び初期卵割期の胚芽において出現した (Shevinskyら, (1982) Cell 30: 697 - 705)。Sox2 は多能性を維持するコア転写因子として機能するが、この機能は、胚性幹細胞に独特なものではない (Boyerら, (2005) Cell 122: 947 - 956)。従って、上記の知見より、mirPS 細胞はこれらのヒト ES 様マーカーの特徴を表す可能性がある。

10

【0055】

ゲノム DNA 脱メチル化 (再プログラム) の評価

後成的修飾の変化、特にゲノムの脱メチル化は、ES 細胞のもう一つの独特な特徴である (Hochedlingerら, (2006) Nature 441: 1061 - 1067)。細胞をその ES 状態に再プログラムするために、Oct3 / 4 のような多くの胚性遺伝子を DNA 脱メチル化によって再活性化させる必要がある。mirPS 細胞内の上記後成的作用を評価するために、まず、CpG メチル化に対して感度が高く、メチル化の CCGG 部位を分解せずに、非メチル化の CCGG だけを分解する制限酵素である HpaII によってゲノム全体の消化をした。図 7A は、体細胞対照からの消化された DNA 断片が mirPS 細胞からの消化された DNA 断片より 2 倍以上も大きいことを示し、mirPS 細胞ゲノム全体が高度に脱メチル化されたことを表明した。重亜硫酸塩 - ゲノム PCR 及び配列決定によって、更に Oct3 / 4 遺伝子プロモーター領域を評価した (Takahashi and Yamanaka, 2006)。重亜硫酸塩が全ての非メチル化のシトシンをウラシルに変換させた。非メチル化の ACGT 部位が AUGT 部位になったから、ACGT を切断する制限酵素の消化は、mirPS 細胞ゲノム内のこれらの単離領域を分解できない (図 7B)。重亜硫酸塩 DNA 配列決定に示した詳細な脱メチル化マップにより、ヒト ES 様 WA09 - H9 細胞において認められたように、mirPS 細胞中の Oct3 / 4 遺伝子プロモーター領域が 90% 以上のメチル化部位を失ってしまうことを更に証明し (図 7C)、全ゲノム再プログラムのイベントが発生し、Oct3 / 4 遺伝子発現が再活性化されたことを示唆している。実施例 8 は、上記 CpG 脱メチル化測定を示す。

20

30

【0056】

Oct3 / 4 遺伝子プロモーター内の脱メチル化部位を測定する実験において、まず全ての非メチル化のシトシンをウラシルに変換させる重亜硫酸塩 (CpG Genome DNA 修飾キット, Chemicon, CA) によって、単離ゲノム DNA を処理し、そして、ポリメラーゼ連鎖反応 (長鋳型 PCR 延長キット, Roche, IN) によって Oct3 / 4 の 5' 上流プロモーター領域を単離した。その後、PCR 産物を収集し、AclI (AACGTT)、BmgBI (CACGTC)、PmlI (CACGTG)、SnaBI (TACGTA) 及び HpyCH4IV (ACGT) を含む、ACGT を切断する複数の制限酵素の等量混合物 (各 5 U) で消化した。この領域内の非メチル化の ACGT 部位が重亜硫酸塩によって AUGT 部位になったが、ACGT を切断する制限酵素によって AUGT 部位を分解することはできないので、図 7B の結果より、対照 hHFC、PC3 及び Colo 細胞内の 4 つ以上のメチル化 ACGT 部位が対応する mirPS 細胞内の脱メチル化部位になったことを示している。従って、Oct3 / 4 遺伝子プロモーターの上記 mir - 302 媒介性脱メチル化は、mirPS 細胞内の Oct3 / 4 遺伝子発現の再活性化を促進できる。

40

【0057】

転移性癌に由来する mirPS 細胞の移動能の失い

ヒト ES 様細胞は移動しない。高速転移の癌細胞株に由来する mirPS 細胞 (例えば mirPS - PC3 細胞) において細胞移動の失いがよく観察される。ES 細胞がある所

50

に静止してその場で胚様体を形成する傾向があると、転移性ヒト前立腺癌PC3細胞はなぜ異所的mir-302の形質移入後でその移動力を失うかを解釈できる。又は、mir-302は、マイクロチューブ結合タンパク質1B(MAP1B)、アクチン様タンパク質(ACTL6A)、アンキリン2(ANK2)、アミロイド前駆体タンパク質A4(APP)、ミオシン軽鎖ポリペプチドキナーゼ(MYLK)の遺伝子のような、細胞移動に関連する若干の遺伝子をサイレンシングさせ、正常細胞の移動や癌細胞の侵入を防止することができる。図7D及び実施例12に示すように、転移性PC3細胞は、経時に速やかに移動しているが、mirPS-PC3細胞は静止している。他の全ての対照物においても形態変化が観察されていない。従って、本発明の導入遺伝子mir-302sは、ヒト癌細胞のさらなるES様細胞形態への形質転換及び細胞分裂速度に十分で、癌治療において非常に好適に用いられることを表明した。この結果より、悪性癌症/腫瘍細胞を有用なES様幹細胞に再プログラムできるだけでなく、癌症転移の可能性を低減できる、mir-302sを癌症/腫瘍細胞へ送達する潜在的な治療応用を示している。もっと有利なのは、これらのmirPS細胞は患者自身の細胞から生成されるから患者免疫に適合できるため、これらのmirPS細胞によって新規な移植療法を進展し、免疫拒絶反応のリスクがなくて癌症/腫瘍損傷の組織を修復することができる。

【0058】

遺伝子マイクロアレイ分析によるESマーカー発現全体の同定

mir-302媒介性再プログラムイベントによる遺伝子変異は、ゲノム全体の遺伝子発現パターンによって了解される。標準ES細胞マーカーと遺伝子導入mir-302sの同時発現を確かめた後、本発明者らは、異所的mir-302発現前後の細胞内ゲノム全体遺伝子発現パターンの変化、及びmirPSと他のヒトES様細胞(例えばWA01-H1及びWA09-H9)との間のゲノム全体遺伝子発現パターンの変化を調べるために、ヒトゲノムマイクロアレイ分析を行った。実施例10は、詳細なプロトコルを示す。Affymetrix社の遺伝子マイクロアレイ(GeneChipU133A&B及びU133plus2.0アレイ)を用いて、47,000種以上のヒト遺伝子発現パターンの変化を評価した。まず、同じmirPS試料を用いて2回マイクロアレイ分析を実施し、一方の分析から最も変異しやすい遺伝子(白いドット)を200個選択して、さらに比較した。図8A(mirPS-Colo)及び9A(mirPS-hHFC)に示すように、もう一方の分析よりもすべての変化が1倍未満であり(最左)、バックグラウンドの変動が極めて限られていることを表明している。その後、マイクロアレイ同定された全ての遺伝子の分散パターンに基づいて、比較された2つのトランスクリプトームライブラリー間の相関係数(CC)を算出した。CC比を求め、閾値が1倍の変化であるゲノム全体遺伝子発現パターンの類似率を示す。上記厳しいCC比の定義下、mirPS細胞の遺伝子発現パターンはヒトES様WA01-H1(>89%)及びWA09-H9(>86%)細胞の遺伝子発現パターンと非常に類似しているが、mirPS細胞とその元としての体細胞/癌細胞では、47%~53%の低いCC比しか示されていないことが見出された。このようなヒトES様細胞とmirPS細胞との間の強い遺伝関連性は、mir-302sが体細胞/癌細胞をES様のmirPS細胞に再プログラムする肯定に関する数千種類の細胞遺伝子発現を変更する必要があることを表明している。例えば、図8Bに示すように、mirPSとヒトES様細胞の結果においては、多くのES遺伝子の発現上昇、及び癌性、発生、mir-302の標的となる細胞周期に関連する大量の遺伝子の閉鎖は一貫して同時に観察された。図9Bを参照すれば、mirPS細胞の遺伝子発現パターンについては、SSEA-1はmirPS細胞において適度に発現するが、Klf4はそうではないことも注意された。

【0059】

図8Bは、Colo細胞とmirPS-Colo細胞との間のいくつかの主な差異発現遺伝子のリストを示す。図8Bにおいて、細胞周期チェックポイント遺伝子であるCDK2、サイクリンD1、D2、及びDNAメチル化促進因子であるMECP2、MECP1-p66は、mir-302sの強い標的として確認されたことが注意された。すなわち

10

20

30

40

50

、多能性幹細胞は、*mir-302*マイクロRNA及び*Oct4*を多量に発現する一方、*CDK2*、サイクリン*D1*、*MECP1-p66*及び*MECP2*を制限的に発現する。図8C及び9Bにおいても同様な結果が観察された。周知のように、サイクリンE依存性*CDK2*は、S期細胞周期への進入に必要なものであり、*CDK2*を抑制すると、G1期チェックポイントが停止することになるが、サイクリン*D1*はDNAの損傷に応じてG1期停止を乗り越えることができる。この原理に基づいて、図5Aに示すように、*mirPS*細胞内の*CDK2*及びサイクリン*D1*の抑制は、*mir-302*により形質移入した癌細胞の細胞周期が非常に遅い細胞分裂速度に達成することを開示した。従って、上記癌性幹細胞周期変換の結果、癌治療に顕著な利点を提供できる。また、*MECP2*及び*MECP1-p66*が抑制されたことは、図7A~Cの結果と一致し、悪性の癌細胞が良性の*mirPS*細胞に後生的再プログラムされたことを表明した。このように患者から得られた*mirPS*細胞は、更に腫瘍/癌組織損傷の修復を促進できると考えられる。要するに、これらの全ての検討結果は、本発明の*mir-302*遺伝子導入法が、ヒト体細胞/癌細胞の遺伝状況を、ヒトES様細胞の発現パターンに類似する高度のES様の発現パターンに再プログラムするように用いることができることを示唆している。

10

【0060】

*mirPS*細胞の多分化能

多能性は、ES細胞の最も重要な特徴を定義する。異なる因子及び/又はホルモンでインビトロ処理を行うことによって、ヒトES様細胞は、全ての成体組織の創始者、すなわち外胚葉、中胚葉及び定形内胚葉という3つの胚葉に分化されることができる。どんな処理もない場合、*mirPS*に由来する胚様体を異種移植によって雌性の偽妊娠の免疫不全SCIDベージュマウスの子宮又は腹腔腔に移植することは、奇形腫様組織嚢腫を形成できる(図10)。他の組織位置においてはこのような嚢腫が観察されていない。しかし、これらの組織嚢腫は奇形腫と異なり、その周辺の組織と非常によく明らかな境界が形成された。また、マウスにおけるこれらの嚢腫構造は、移植後約2.5週間にその発生が遅くなってきた。これらの*mirPS*細胞内のインビボでのランダム発生を制限する自動調節のメカニズムがあるかのようなのである。この自動調節のメカニズムは、これらの*mirPS*細胞による腫瘍形成を予防し、腫瘍のない多能性幹細胞を設計して発生させる手段を臨床試験や治療に提供することができる。

20

【0061】

*mirPS*細胞分化のインビトロ分子誘導

定義で、多能性幹細胞は、胚性の外胚葉、中胚葉及び/又は内胚葉に由来する組織細胞と同様な様々な細胞種に分化できる。例えば、種々の成長因子及び/又はホルモンによるインビトロでの処理を用いて、本発明者らは、ES様の*mirPS*細胞を、神経前駆細胞(図5B)、精原細胞様の細胞(図11A-E)、線維芽細胞(図11F-J)、及び軟骨細胞(図11K-O)を含む、若干の体細胞及び/又は生殖系組織細胞種に分化誘導することに成功した。免疫組織化学(IHC)検査によってこれらの特定の組織系統のマーカーを同定したが、それぞれ神経細胞の特異的*Tuj1*と*ABCA2*、生殖系の特異的*Dazl*と*EE2*、線維芽細胞の特異的*atlastin1*とI型プロコラーゲン(*COL1A1*)、及び軟骨細胞の特異的トロポエラスチン及びI型プロコラーゲン(*COL2A1*)を示した。すなわち、本発明による多能性幹細胞は、生殖系列様細胞、精原細胞様細胞、正常体細胞、線維芽細胞、軟骨細胞、及びこれらの組み合わせに分化できる。これらの分化された*mirPS*細胞においては腫瘍形成の兆しが観察されていない。Sangerウェブサイトで「TARGETSCAN」及び「PICTAR-VERT」というプログラムの予測に基づいて、実際には、多くの癌遺伝子は*mir-302s*の標的であることが知られた。それに、*mir-302s*は、サイクリン依存性キナーゼ2(*CDK2*)、サイクリン*D1*、*D2*を抑制し、腫瘍細胞の速やかな発生を防止することができる(Linら, 2008b)。これらの検討結果は、*mirPS*細胞の腫瘍のない多能性と意味する。種々の分子処理によって*mirPS*細胞からより多くの組織細胞種を誘導することができると考えられる。

30

40

50

【0062】

無フィーダー培養条件下でインビトロにて実験を行ったが、mirPS細胞を相対的に
 相同な3種類の体細胞種に分化させるための誘導に成功したことを示した(図11A~O
 及び実施例11)。まず、無フィーダー培養皿において、天然アンドロゲンであるジヒド
 ロテストステロン(DHT50 ng/ml)によってmirPS細胞を6時間処理し、
 ついで処理された細胞(10^5)を6週齢の雌性の免疫不全SCIDベージュマウスの子
 宮にインビボ移植したところ、1週間後、移植部位に精原細胞様の細胞の嚢腫が生成され
 た(図11A~E)。次に、形質転換成長因子1(TGF- β 1100 ng/ml)
 で12時間処理し、同じような移植工程を行うと、mirPS細胞は線維芽細胞に分化し
 、ただ1週間内でコラーゲンを分泌し始めた(図11F~J)。最後に、骨形成タンパク
 質4(BMP4100 ng/ml)で12時間処理し、これらの細胞を6週齢の免疫不
 全SCIDベージュマウスの肝臓に異種移植すると、mirPS細胞は石灰化沈殿で囲む
 軟骨細胞に分化した(図11K~O)。免疫不全の裸マウスの使用は、移植療法を模倣す
 るインビボ環境を提供する。これらの検討結果は強力な証拠を提示し、本発明のmir-
 302遺伝子導入法によって、インビトロ及びインビボの無フィーダー細胞培養条件で多
 種の組織細胞種に誘導できる新しい多能性ES様幹細胞株の生成に成功したことを示して
 いる。従って、本発明は、分化した体細胞/癌細胞をES様状態に再プログラムすること
 ができるだけでなく、無フィーダー培養条件下でES様の更新と多能性を維持することが
 できる。

10

【0063】

従って、mir-302を誘導的発現させる導入遺伝子を用いることによって、本発明
 は特に、ヒト体細胞及び癌細胞の一次培養細胞からmir-302誘導型多能性ES様幹
 (mirPS)細胞を生成する強力な新しい道具と方策を提供する。ヒト正常毛嚢が取得
 しやすいため、mirPS細胞はヒト正常毛嚢に由来することが最も好ましい。mRNA
 転写、RNAスプライシング、エキソソームプロセッシング及びNMDメカニズムの各構成
 要素を含む複数の細胞内モニターシステムが、イントロンmiRNAの生合成経路を十分
 に調節するので、本発明のイントロンmir-302発現は、従来のPol-III(U
 6/H1)誘導性のsiRNA/shRNA発現系に比べてずっと安全であると考えられ
 る。実際には、本発明者は、Pol-III誘導性の発現系が、mir-302を過度発
 現させ、G1期の細胞周期停止及び死滅を引き起こす傾向があると注意した。本発明は、
 薬剤誘導性(Tet-On/Off)ベクターと結合し、ほ乳類体細胞/癌細胞をES様
 のmirPS細胞に再プログラムし、有用な正常組織細胞を形成するように誘導する制御
 可能な手段をさらに提供できる。mir-302は強い腫瘍抑制因子であることが発見さ
 れたので、本発明によるmirPS細胞は腫瘍形成のリスクがない。

20

30

【0064】

有利なことは、本発明においては少なくとも5つの突破がある。第1に、従来のiPS
 方法に用いられる4種類の大きい転写因子遺伝子に代わって、mir-302を発現させ
 る1つの導入遺伝子を用いることができ、患者の幾つかの体細胞だけからより多くの相同
 な多能性ES様幹細胞を生成でき、幹細胞の純度及び患者の免疫システムとの適合性が改
 良される。第2に、mir-302を発現させる導入遺伝子は全サイズが比較的小さい(
 約1000塩基)から、その導入遺伝子の送達はいPS方法における最大2%に比べて極
 めて高いである(91%以上の成功率)。第3に、mirPS細胞の生成及び培養は、完
 全に無フィーダー条件下で行われ、フィーダー抗原汚染のリスクはない。第4に、癌遺伝
 子を使用しないから、細胞の突然変異と腫瘍形成のリスクが予防される。最後に、レトロ
 ウイルス感染の代わりに電気穿孔を用いてmir-302を発現させる単一の導入遺伝子
 を送達し、宿主細胞ゲノムへのレトロウイルスランダム挿入による、挿入突然変異の誘発
 をよく引き起こすリスクが予防される。とにかく、これらの利点により、レトロウイルス
 感染、癌突然変異、及び不定の腫瘍発生能力のリスクの予防というiPS方法の3つの問
 題を解決した。

40

【0065】

50

A. 定義

本発明の理解を深めるために、次のように多くの用語を定義する。

ヌクレオチド：糖部分（五炭糖）、リン酸及び窒素系複素環塩基からなるDNA又はRNAの単量体単位である。その塩基は、グリコシド結合した炭素（五炭糖の1'炭素）によって糖部分と結合するが、この塩基と糖の組み合わせはヌクレオシドである。五炭糖の3'又は5'の位置に少なくとも1つのリン酸基が結合しているヌクレオシドがヌクレオチドである。

【0066】

オリゴヌクレオチド：2個以上の、好ましくは3個以上の、そして通常は10個以上のデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドで構成される分子である。正確なサイズは多くの要因によって決まり、さらにこれらの要因はそのオリゴヌクレオチドの最終的な機能又は使用法によって決まる。オリゴヌクレオチドは、化学合成、DNA複製、逆転写、又はこれらの組み合わせを含むいずれかの方法で生成してもよい。

10

【0067】

核酸：1本鎖又は2本鎖のヌクレオチドのポリマーである。

ヌクレオチド類似体：A、T、G、C又はUとは構造的に異なるが、核酸分子中で通常のヌクレオチドと十分に置換できるほど類似しているプリンやピリミジンヌクレオチドである。

【0068】

核酸成分：1本鎖又は者2本鎖分子構造のデオキシリボ核酸（DNA）及びリボ核酸（RNA）のようなポリヌクレオチドである。

20

遺伝子：RNA及び/又はポリペプチド（タンパク質）のためのヌクレオチド配列コードをもつ核酸である。遺伝子はRNA又はDNAのいずれかである。

【0069】

塩基対（bp）：2本鎖DNA分子中のアデニン（A）とチミン（T）、又はシトシン（C）とグアニン（G）の組合である。RNAでは、チミンの代わりウラシル（U）となる。一般に、その組合は水素結合を介して実現される。

【0070】

メッセンジャーRNA前駆体（pre-mRNA）：真核細胞においてII型RNAポリメラーゼ（Pol-II）機構による転写と呼ばれる細胞内メカニズムによって作られる遺伝子のリボヌクレオチド一次転写産物である。pre-mRNA配列は、5'末端非翻訳領域、3'末端非翻訳領域、エクソン、及びイントロンを含む。

30

【0071】

イントロン：インフレーム内イントロン、5'非翻訳領域（5'-UTR）及び3'-UTRのような、タンパク質読み枠ではない遺伝子転写配列の一部分又は複数の部分である。

【0072】

エクソン：タンパク質読み枠をコードする遺伝子転写配列の一部分又は複数の部分である。

メッセンジャーRNA（mRNA）：核内スプライセオソーム機構によるイントロン除去後に形成され、タンパク質合成のためタンパク質をコードするRNAとして機能するpre-mRNAのエクソン集合体である。

40

【0073】

cDNA：、mRNA配列と相補的で、イントロン配列がまったく含まれていない1本鎖DNAである。

センス：相同なmRNAと配列順及び組成が同じ核酸分子である。センス構造は「+」、「s」、又は「センス」シンボルで示す。

【0074】

アンチセンス：各mRNA分子と相補的な核酸分子。アンチセンス構造は、例えば「aDNA」又は「aRNA」のように、DNA又はRNAの前に「-」シンボル、又は「a」もしくは「アンチセ

50

ンス」を付けて示す。

【0075】

5'末端：1つのヌクレオチドの5'ヒドロキシル基が次のヌクレオチドの3'ヒドロキシル基とリン酸ジエステル結合によって連結している連続したヌクレオチドにおいて、5'位置でヌクレオチドが欠損している末端。1つ以上のリン酸のような他の基は、この末端に存在することがある。

【0076】

3'末端：1つのヌクレオチドの5'ヒドロキシル基が次のヌクレオチドの3'ヒドロキシル基とリン酸ジエステル結合によって連結している連続したヌクレオチドにおいて、3'位置でヌクレオチドが欠損している末端。最もよく見られるのはヒドロキシル基であるが、他の基がこの末端に存在することもある。

10

【0077】

鋳型：核酸ポリメラーゼによってコピーされる核酸分子。鋳型はポリメラーゼによって決まり、1本鎖、2本鎖、又は部分的に2本鎖である。合成されたコピーはこの鋳型又は2本鎖もしくは部分的に2本鎖の鋳型の少なくとも1本の鎖と相補的である。RNA及びDNAの両者が5'から3'方向に合成される。核酸デュプレックスの2本の鎖は常にアラインメントしているので、2本鎖の5'末端はデュプレックスの反対側の末端に位置する（従って必然的に3'末端も同様）。

【0078】

核酸鋳型：2本鎖DNA分子、2本鎖RNA分子、DNA-RNAもしくはRNA-DNA雑種等の雑種分子、又は1本鎖のDNAもしくはRNA分子である。

20

保存：ヌクレオチド配列を非無作為に予め選択した（参照した）配列と正確に相補的な配列にハイブリダイゼーションする場合、このヌクレオチド配列はこの予め選択した配列に関して保存されていることになる。

【0079】

相補的、相補性、又は相補作用：塩基対規則によって関連し合うポリヌクレオチド（すなわちヌクレオチド配列）を指す場合に用いる。例えば、配列「A-G-T」は配列「T-C-A」と相補的であり、また、「T-C-U」とも相補的である。相補性は、2本のDNA鎖間、1本のDNA鎖と1本のRNA鎖間、又は2本のRNA鎖間で生じる可能性がある。相補性には「部分的」又は「完全」な場合がある。部分相補性は、核酸塩基のいくつかだけが塩基対規則に従って適合する場合である。完全相補性は、核酸鎖間で塩基が完全に適合する場合である。核酸鎖間の相補性の程度は核酸鎖間のハイブリダイゼーションにおける効率と強度に大きく影響する。これは、増幅反応、さらに核酸間の結合に依存した検出方法において特に重要である。相補性率（%）とは、核酸の1本鎖における全塩基に対してミスマッチを示した塩基数のことである。従って、50%の相補性とは、塩基の半分がミスマッチで、半分が適合していることを意味する。核酸の2本鎖は、この2本鎖の塩基数が異なっている場合でさえも相補的となり得る。この場合、長い方の鎖の一部の塩基が、相当する短い方の鎖の塩基と対を成した時に相補性が生じる。

30

【0080】

相同又は相同性：遺伝子又はmRNA配列と類似したポリヌクレオチド配列。核酸配列は例えば、特定の遺伝子又はmRNAと部分的又は完全に相同である可能性がある。相同性はまた、全ヌクレオチド数のうちの同じヌクレオチドの数で決定する比率（%）として表すことができる。

40

【0081】

相補的塩基：DNA又はRNAが2本鎖の形状となる場合に、通常対を形成するヌクレオチドである。

相補的ヌクレオチド配列：1本鎖のDNA又はRNA分子におけるヌクレオチド配列で、もう一方の1本鎖の配列と十分に相補的なために、結果的に水素結合によって、2本鎖間で特異的にハイブリダイゼーションする。

【0082】

50

ハイブリダイゼーション：塩基対形成によって複合体を形成するのに十分相補的なヌクレオチド配列間のデュプレックスの形成。プライマー（又はスプライス鑄型）が標的（鑄型）と「ハイブリダイゼーション」する場合、このような複合体（又は雑種）は十分に安定しているので、DNA合成を開始するDNAポリメラーゼが求める開始機能を提供する。競争的に阻害できる2つの相補的ヌクレオチド間には特異的、すなわち非無作為な相互作用がある。

【0083】

転写後遺伝子サイレンシング：一般に外来ノウイルスDNA導入遺伝子又は短鎖抑制RNAによって引き起こされる、mRNA分解又は翻訳抑制レベル下での標的遺伝子除去又はロックダウン作用である。

10

【0084】

RNA干渉 (RNAi)：真核細胞において、マイクロRNA及び短鎖干渉RNAのような短鎖RNA分子によって引き起こされる翻訳後の遺伝子サイレンシングメカニズムのこと。これらの短鎖RNA分子は遺伝子サイレンサーとして通常機能し、この短鎖RNAに対して完全又は部分的に相補的な配列を含む細胞内遺伝子の発現に干渉する。

【0085】

非コードRNA：細胞内翻訳機構によってペプチド又はタンパク質の合成に用いることができないRNA転写産物である。

マイクロRNA (miRNA)：このmiRNAに部分的に相補的な標的遺伝子転写産物に結合できる1本鎖RNAである。miRNAは通常長さが約17~27個のオリゴヌクレオチドで、miRNAとその標的mRNAとの相補性によって、細胞内のmRNA標的を直接分解するか、又はその標的mRNAのタンパク質翻訳を抑制できる。天然のmiRNAはほぼ全ての真核細胞で見つかり、ウイルス感染に対する防御、及び動植物の発生における遺伝子発現を制御するものとして機能している。

20

【0086】

Pre-miRNA：細胞内RNaseIIIエンドRNA分解酵素と相互作用するステムアーム及びステムループを含むヘアピン状の1本鎖RNAで、1つ又は複数のマイクロRNAを産生し、標的遺伝子又はこのマイクロRNA配列と相補的な遺伝子をサイレンシングできる。pre-miRNAのステムアームは完全（100%）又は部分的（ミスマッチ）にハイブリダイゼーションしたデュプレックス構造を形成できるが、ステムループはステムアームの1端と結合し、円形又はヘアピンループ構造を形成する。

30

【0087】

短鎖干渉RNA (siRNA)：ほぼ完全な相補性の標的遺伝子転写産物を分解できる、リボヌクレオチドデュプレックスが完全に塩基対形成しているサイズが約18~25個の短鎖2本鎖RNAである。

【0088】

小又は短鎖ヘアピンRNA (shRNA)：不適合ループ状オリゴヌクレオチドによって分けられた部分的又は完全に適合したステムアームヌクレオチド配列を含み、ヘアピン状構造を形成する1本鎖RNAである。多くの天然miRNAはヘアピン状RNA前駆体、すなわちマイクロRNA前駆体 (pre-miRNA) に由来する。

40

【0089】

ベクター：異なる遺伝子環境において移動及び定着が可能な組換えDNA (rDNA) 等の組換え核酸分子である。一般に、別の核酸の中に操作によって連結させる。ベクターは細胞内で自律増殖可能で、この場合、ベクターとその連結した部位が複製される。好ましいベクターの1種類はエピソーム、すなわち染色体外で複製可能な核酸分子である。好ましいベクターは自律複製及び/又はこれらに連結した核酸の発現が可能なベクターである。1つ以上のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を誘導できるベクターを、本明細書では「発現ベクター」と呼ぶ。特に重要なベクターは、逆転写酵素を用いて作製したmRNAからcDNAをクローニングできる。

【0090】

50

シストロン：DNA分子内においてアミノ酸残基配列をコードし、上流及び下流にDNA発現調節配列を含むヌクレオチド配列である。

プロモーター：ポリメラーゼ分子により認識され、おそらく結合することで合成を開始させる核酸である。本発明用のプロモーターには、既知のポリメラーゼ結合部位、エンハンサー、及び所望のポリメラーゼによって合成を開始できるこれらに類似したあらゆる配列が可能である。

【0091】

抗体：予め選択したリガンドと結合できる受容体をコードする予め選択した保存領域構造をもつペプチド又はタンパク質分子である。

B. 成分

ほ乳類細胞において単離されたmir-302因子を発現させ、mir-302媒介性遺伝子サイレンシングを誘導する組換え核酸成分は、

a) mir-302ファミリー要素と相同な組換え非コードRNAをコードする組換え導入遺伝子と、

b) ほ乳類細胞において組換え導入遺伝子を送達して発現させることに用いることができる発現可能なベクターと、を含む。

【0092】

上記組換え導入遺伝子は、

a) 所望の機能をもつ遺伝子転写産物を形成するように結合できる複数のエクソンと、
b) 組換えmir-302相同体を含み、細胞内RNAスプライシング及びプロセッシング機構によってエクソンから切断できる少なくとも1つイントロンとを更に含む。

【0093】

上記組換え導入遺伝子のイントロンは、

a) スプライセオソーム結合のための5' 供与スプライス部位と、
b) mir-302ファミリー要素と相同な遺伝子サイレンシングエフェクター挿入配列と、
c) スプライセオソーム認識のための分岐点モチーフと、
d) スプライセオソーム相互作用のためのポリピリミジントラクトと、
e) スプライセオソーム結合のための3' 受容スプライス部位と、
f) 5' から3' 方向に上記構成要素のそれぞれを連結する複数のリンカーとを更に含む。

【0094】

遺伝子サイレンシングエフェクターは、5' UAAGUGCUUC CAUGUUU - 3' (SEQ. ID. NO. 3) と相同な核酸成分をコードすることが好ましい。5' 供与スプライス部位は、5' GTAAGAGK - 3' (SEQ. ID. NO. 4) 又はGU(A/G)AGUモチーフ(例えば5' GTAAGAGGAT - 3' (SEQ. ID. NO. 37)、5' GTAAGAGT - 3'、5' GTAGAGT - 3' 及び5' GTAAGT - 3') を含むか、又はこれらと相同なヌクレオチド配列であり、3' 受容スプライス部位は、GWKSCYRCAG (SEQ. ID. NO. 5) 又はCT(A/G)A(C/T)NGモチーフ(例えば5' GATATCCTGCAG - 3' (SEQ. ID. NO. 42)、5' GGCTGCAG - 3' 及び5' CCACAG - 3') を含むか、又はそれと相同なヌクレオチド配列である。また、分岐点配列は、5' スプライス部位と3' スプライス部位との間に位置しており、5' TACTAAC - 3' 及び5' TACTTAT - 3' のような、5' TACTWAY - 3' (SEQ. ID. NO. 6) と相同なモチーフを含む。更に、ポリピリミジントラクトは、分岐点と3' スプライス部位との間に近接して位置しており、5' (TY)m(C/-)(T)nS(C/-) - 3' (SEQ. ID. NO. 7) 又は5' (TC)nNCTAG(G/-) - 3' (SEQ. ID. NO. 8) と相同なT又はC高含量の配列を含む。シンボル「m」及び「n」は、1以上(1)

10

20

30

40

50

の複数の反復配列を示しており、好ましくは、数 m は 1 ~ 3、数 n は 7 ~ 12 である。シンボル「-」は、配列内に1つの空ヌクレオチドがあることを示す。米国特許法施行規則 (37 CFR) 第1.822条のヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列データに使用するシンボル及び書式に関するガイドラインに基づき、シンボル W は、アデニン (A) 又はチミン (T) / ウラシル (U)、シンボル K はグアニン (G) 又はチミン (T) / ウラシル (U)、シンボル S はシトシン (C) 又はグアニン (G)、シンボル Y はシトシン (C) 又はチミン (T) / ウラシル (U)、シンボル R はアデニン (A) 又はグアニン (G)、シンボル N はアデニン (A)、シトシン (C)、グアニン (G) 又はチミン (T) / ウラシル (U) を意味する。上記のスプライセオソーム認識構成要素の全てにおいて、デオキシチミジン (T) ヌクレオチドはウリジン (U) に置換可能である。

10

【0095】

C. 方法

mir-302 の標的となる遺伝子に対する特定の遺伝子サイレンシング効果を誘導できる組換え核酸成分によって、ほ乳類細胞を多能性幹細胞に再プログラムする方法であって、

a) i) mir-302 の標的となる複数の発生及び細胞分化関連遺伝子を発現させる細胞基質、及び ii) 細胞基質内の mir-302 と相同な非コード RNA に送達、転写及びプロセシングできる組換え核酸成分を提供する工程と、

b) 細胞基質における mir-302 の標的となる遺伝子の機能が抑制された条件で組換え核酸成分によって細胞基質を処理する工程と

20

を含む方法である。

【0096】

組換え核酸成分は、組換え mir-302 ファミリークラスター (pre-mir-302s; SEQ. ID. NO. 29-36 の連結雑種) 又は手動再設計した mir-302 shRNA 相同体 (SEQ. ID. NO. 27 と 28 の雑種) をコードする組換え導入遺伝子を発現させることのできる薬剤誘導性 Tet-On 又は Tet-Off ベクターであることが好ましい。細胞基質は、インビトロ、エクスピボ又はインピボで pre-mir-302s / mir-302 shRNA 及びその標的遺伝子を発現させることができる。

【0097】

実施例

以下の実施例は、本発明の特定の好ましい実施形態を例示するものであるが、本発明の範囲を制限するものではない。

30

【0098】

以下の実験に関する開示において、次の略語を適用する。M (モル濃度)、mM (ミリモル濃度)、 μ m (マイクロモル濃度)、mol (モル)、pmol (ピコモル濃度)、gm (グラム)、mg (ミリグラム)、 μ g (マイクログラム)、ng (ナノグラム)、L (リットル)、ml (ミリリットル)、 μ l (マイクロリットル)、(摂氏温度)、cDNA (コピー又は相補的 DNA)、DNA (デオキシリボ核酸)、ssDNA (1本鎖 DNA)、dsDNA (2本鎖 DNA)、dNTP (デオキシリボヌクレオチド-3リン酸)、RNA (リボ核酸)、PBS (リン酸緩衝液食塩水)、NaCl (塩化ナトリウム)、HEPES (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-2-エタンサルホン酸)、HBS (HEPES 緩衝液食塩水)、SDS (ドデシル硫酸ナトリウム)、Tris-HCl (トリス-ヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩)、ATCC (アメリカ培養細胞系統保存機関: Rockville, MD)。

40

【0099】

実施例 1

SpRNAi 含有組換え RGF P 遺伝子 (SpKNAi-RGFF) の構築

センス、アンチセンス-、又はヘアピン状の EGF P 挿入配列を含む SpRNAi イントロンの生成に用いられる合成オリゴヌクレオチドとしては、N1-センス: 5' GTAAGAGGATCCGATCGCAGGAGCGCACCA TCTTCTTCAAG

50

A - 3' (SEQ. ID. NO. 14)、N1 - アンチセンス: 5' CGCGTCTTG
 AAGAAGATGGT GCGCTCCTGC GATCGGATCC TCTTAC -
 3' (SEQ. ID. NO. 15)、N2 - センス: 5' GTAAGAGGATCCGA
 TCGCTT GAAGAAGATG GTGCGCTCCT GA - 3' (SEQ. ID
 . NO. 16)、N2 - アンチセンス: 5' CGCGTCAAGGAGCGCACCATC
 TTCTTCAAGC GATCGGATCC TCTTAC - 3' (SEQ. ID. N
 O. 17)、N3 - センス: 5' GTAAGAGGATCCGATCGCAG GAGC
 GCACCA TCTTCTTCAA GTTAACTTGA AGAAGATGGT GC
 GCTCCTGA - 3' (SEQ. ID. NO. 18)、N3 - アンチセンス: 5' CG
 CGTCAAGGAGCGCACCATC TTCTTCAAGT TAACTTGAAG
 AAGATGGTGC GCTCCTGCGA TCGGATCCTC TTAC - 3' (10
 SEQ. ID. NO. 19)、N4 - センス: 5' CGCGT TACTA ACTGGT
 ACCT CTTCTTTTTT TTTTTGATAT CCTGCAG - 3' (SEQ
 . ID. NO. 20)、N4 - アンチセンス: 5' GTCCTGCAGGATATCAA
 AAA AAAAAGAAGA GGTACCAGTT AGTAA - 3' (SEQ. ID
 . NO. 21) が挙げられる。SEQ. ID. NO. 14 から SEQ ID NO. 21 ま
 で挙げられた全配列は、その5'末端がリン酸化されている。

【0100】

それに加え、赤色蛍光RGFP遺伝子 (SEQ. ID. NO. 22) における208番目のヌクレオチド (n
 t) 部位で、制限酵素DraIIによる開裂によって2つのエクソン断片が生成した。そして、 20
 5' RGFPエクソンはさらにT4 DNAポリメラーゼによって平滑終端化された。上記RGFPは新たな赤色偏移蛍光色素タンパク質遺伝子で、シライトイソギンチャク (B
 D Biosciences, CA) からのHcRed1色素タンパク質の69番目のア
 ミノ酸 (a. a.) 部位に追加のアスパラギン酸塩を挿入することによって生成され、そ
 のタンパク質は凝集が少なく、570nmの波長でほぼ2倍の強度の遠赤色蛍光を放射する。

【0101】

センス及びアンチセンス配列の相補的混合物 (1:1) を1×PCR緩衝液 (例えば、50 mM
 Tris-HCl (25 でpH 9.2)、16 mM (NH₄)₂SO₄、1.75 mM MgCl₂) において、94 で2分間
 、その後70 で10分間加熱することで、N1アンチセンスに対するN1センス、N2アンチセン
 スに対するN2センス、N3アンチセンスに対するN3センス、及びN4アンチセンスに対するN4
 センスのハイブリダイゼーションを別々に行った。その直後、N1+N4、N2+N4、又はN3+N4
 (1:1) 雑種混合物をそれぞれ50 から10 に1時間かけて冷却して、N1、N2、又はN3の
 いずれかをN4雑種へ順次ライゲーションし、T4 DNAリガーゼと緩衝液 (Roche
 , IN) をこの混合物に添加し、12 で12時間反応させた。こうして、SpRNAiイ
 ントロンを得た。次に、2つのRGFPエクソンを反応物 (1:1:1) に加えた後、T4
 DNAリガーゼ及び緩衝液で適宜調整しながら、さらに12 で12時間ライゲーション反応を
 行った。 30

【0102】

組換えSpRNAi挿入RGFP遺伝子を正しくクローニングするために、1対のRGFP特異的
 プライマーである5' CTCGAGCATG GTGAGCGGCC TGCTGAA - 3
 ' (SEQ. ID. NO. 23) 及び5' TCTAGAAGTTGGCCTTCTCG
 GGCAAGGT - 3' (SEQ. ID. NO. 24) を用いて、94 で1分間、52 ~
 57 で1分間、そして68 で2分間、25 ~ 30サイクルのPCRを行い、連結した
 ヌクレオチド配列10 ngを増幅させた。単離されて得たPCR産物を2%のアガロースゲ
 ル上で分画し、900 ~ 1100 bpヌクレオチド配列をゲル抽出キット (Qiagen
 , CA) で抽出、精製した。この約1 kbのSpRNAi - RGFP遺伝子の組成を、
 更に配列決定によって確認した。好ましくは、イントロンを挿入しない状態で、SpRN
 Aiイントロン配列のセンス鎖は5' GTAAGTGGTCCGATCGTTCGC GA
 CGCGTCAT TACTA ACTAT CAATATCTTA ATCCTGTCCC
 TTTTTTTTTCC ACAGTAGGAC CTTCGTGCA - 3' (SEQ. ID 50

. NO . 25) である一方、S p R N A i イントロン配列のアンチセンス鎖は 5 ' T G C A C G A A G G T C C T A C T G T G G A A A A A A A A G G G A C A G G A T T A A G A T A T T G A T A G T T A G T A A T G A C G C G T C G C G A C G A T C G G A C C A C T T A C - 3 ' (S E Q . I D . N O . 26) である。

【 0 1 0 3 】

又は、上記に示したのと同じプロトコルに従い、直接に S E Q . I D . N O . 25 及び S E Q . I D . N O . 26 の雑種 (S p R N A i) を D r a I I 切断型 R G F P エクソンの制限切断部位に組み込むことによって、組換え S p R N A i - R G F P 導入遺伝子を作製してもよい。手動再設計した m i r - 302 s h R N A 挿入配列 (S E Q . I D . N O . 9 をコード) を試験するための S p R N A i - R G F P 導入遺伝子をこのように形成した。

10

【 0 1 0 4 】

組換え S p R N A i - R G F P 導入遺伝子はその 5 ' 末端及び 3 ' 末端にそれぞれ X h o I 及び X b a I 制限部位を有するので、X h o I 及び X b a I クローニング部位に付着できる末端を有するベクターに挿入して簡単にクローニングできる。ベクターは、DNA 導入遺伝子、プラスミド、ジャンピング遺伝子、トランスポゾン及びウィルスベクターからなる群から選ばれる発現可能有機体又は下位有機体でなければならない。さらに、イントロン内の挿入部位は、その 5 ' 末端及び 3 ' 末端にそれぞれ P v u I 及び M l u I 制限部位も並んでいるので、上記イントロン挿入配列を除去したり、別の P v u I 及び M l u I クローニング部位に付着する末端を有する異なる挿入配列と置換したりすることが可能である。挿入した配列は、蛍光タンパク質 (G F P) 遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、l a c - Z 遺伝子、ウィルス遺伝子、細菌遺伝子、植物遺伝子、動物遺伝子、及びヒト遺伝子からなる群から選ばれる標的遺伝子に対して高度に相補的なヘアピン状遺伝子サイレンシングエフェクターであることが好ましい。遺伝子サイレンシングエフェクターとその標的遺伝子との相補率及び / 又は相同率は、ヘアピン shRNA 挿入配列で約 30 ~ 100% の範囲で、より好ましくは 35 ~ 49%、センス RNA 及びアンチセンス RNA 挿入配列の両方で 90 ~ 100% である。

20

【 0 1 0 5 】

実施例 2

発現可能ベクターへの S p R N A i - R G F P 遺伝子のクローニング及び S p R N A i - R G F P 遺伝子への組換え m i r - 302 相同体の挿入

30

組換え S p R N A i - R G F P 遺伝子にはその 5 ' 及び 3 ' 末端にそれぞれ X h o I 及び X b a I 制限部位があるので、X h o I 及び X b a I 制限部位に比較的付着できる末端をもつベクターに挿入して簡単にクローニングできる。図 3 A に示すように、S p R N A i - R G F P 導入遺伝子を X h o I / X b a I 直線化した約 6 , 900 b p の p T e t - O n - t T S プラスミドと 1 : 1 (w / w) の比で混合し、得られた混合物を 65 から 15 に 50 分間かけて冷却し、次に T₄ リガーゼ及び緩衝液を混合物に添加し、12 にて 12 時間ライゲーションさせた。これによって、誘導性 S p R N A i - R G F P 発現ベクターが形成された。1 対の R G F P 特異的プライマーである S E Q . I D . N O . 23 及び S E Q . I D . N O . 24 を用いて、94 1 分間、そして 68 2 分間による 30 サイクルの P C R でベクターの組成を確認し、さらに配列を決定した。レトロウィルスベクターでのクローニングは、X h o I / X b a I 直線化 p L N C X 2 レトロウィルスベクター (B D C l o n t e c h) を代わりに用いる以外、同じライゲーション手順で実施できた。S p R N A i イントロン内の挿入部位は、その 5 ' 末端及び 3 ' 末端にそれぞれ P v u I 及び M l u I 制限部位が並んでいるので、本発明者らは抗 E G F P s h R N A 挿入配列を除去し、別の P v u I 及び M l u I クローニング部位に付着する末端をもつ手動再設計した m i r - 302 s h R N A 挿入配列と置換することができる。再設計した m i r - 302 s h R N A 挿入配列は、5 ' U A A G U G C U U C C A U G U U U U A G U G U - 3 ' (S E Q . I D . N O . 9)、5 ' U A A G U G C U U C C A U G U U U U G G U G A - 3 ' (S E Q . I D . N O . 10)、5 ' U A A G U G C U U C C A U G U U U U A G U A G - 3 ' (S E Q . I D . N O . 11) である。

40

50

(SEQ. ID. NO. 11)、5' UAAGUGCUUCCAUGUUUCAG UG G-3' (SEQ. ID. NO. 12)又は5' UAAGUGCUUCCAUGUUUG AG UGU-3' (SEQ. ID. NO. 13)と類似した、5' UAAGUGCUU CCAUGUUU-3' (SEQ. ID. NO. 3)相同配列を含む。再設計されるmir-302 shRNA挿入配列は、5' UAAGUGCUUC CAUGUUUUAG UGU-3' (SEQ. ID. NO. 9)を含むことが最も好ましい。すなわち、遺伝子サイレンシングエフェクターは、SEQ. ID. NO. 9、SEQ. ID. NO. 10、SEQ. ID. NO. 11、SEQ. ID. NO. 12、SEQ. ID. NO. 13、及びこれらの組み合わせからなる群と相同な少なくとも1つの組換えRNA配列を含む。

【0106】

組換えmir-302ファミリーpre-miRNA又は手動再設計したmir-302 shRNA挿入配列のDNA組換えのための合成オリゴヌクレオチドとしては、mir-302a-センス：5' GTCCGATCGT CCCACCACTT AAACGTG GAT G TACTT GCTT TGAAACTAAA GAAGTAAGTG CTTCC ATGTT TTGGTGATGG ATCTCGAGCT C-3' (SEQ. ID. NO. 29)、mir-302a-アンチセンス：5' GAGCTCGAGA TCCAT CACCA AAACATGGAA GCACTTACTT CTTTAGTTTC AAA GCAAGTA CATCCACGTT TAAGTGGTGG GACGATCGGA C-3' (SEQ. ID. NO. 30)、mir-302b-センス：5' ATCTCGA GCT CGCTCCCTTC AACTTTAACA TGGAAGTGCT TTCTG TGACT TTGAAAGTAA GTGCTTCCAT GTTTTAGTAG GAG TCGCTAG CGCTA-3' (SEQ. ID. NO. 31)、mir-302b-アンチセンス：5' TAGCGCTAGC GACTCCTACT AAAACATGGA AGCACTTACT TTCAAAGTCA CAGAAAGCAC TTCCATGT TA AAGTTGAAGG GAGCGAGCTC GAGAT-3' (SEQ. ID. NO. 32)、mir-302c-センス：5' CGCTAGCGCT ACCTTTG CTT TAACATGGAG GTACCTGCTG TGTGAAACAG AAGTA AGTGC TTCCATGTTT CAGTGGAGGC GTCTAGACAT-3' (SEQ. ID. NO. 33)、mir-302c-アンチセンス：5' ATGTCTA GACGCCTCCACTG AAACATGGAA GCACTTACTT CTGTT TCACA CAGCAGGTAC CTCCATGTTA AAGCAAAGGT AGC GCTAGCG-3' (SEQ. ID. NO. 34)、mir-302d-センス：5' CGTCTAGACATAACACTCAA ACATGGAAGC ACTTAGCTA A GCCAGGCTAA GTGCTTCCAT GTTTGAGTGT TCGACGC GTC AT-3' (SEQ. ID. NO. 35)、mir-302d-アンチセンス：5' ATGACGCGTCGAACACTCAA ACATGGAAGC ACTTAGC CTG GCTTAGCTAA GTGCTTCCAT GTTTGAGTGT TATGT CTAGA CG-3' (SEQ. ID. NO. 36)、mir-302s-センス：5' GTCCGATCGTCATAAGTGCT TCCATGTTTT AGTGTGCT AA GCCAGGCACA CTAAAACATG GAAGCACTTA TCGACG CGTC AT-3' (SEQ. ID. NO. 27)、mir-302s-アンチセンス：5' ATGACGCGTCGATAAGTGCT TCCATGTTTT AGTGTG CCTG GCTTAGCACA CTAAAACATG GAAGCACTTA TGAC GATCGG AC-3' (SEQ. ID. NO. 28) (Sigma-Genosys, MO)が挙げられる。これらの全ての合成配列は、ライゲーションの前にPAGEゲル抽出法によって精製された。すなわち、遺伝子サイレンシングエフェクターは、SEQ. ID. NO. 29、SEQ. ID. NO. 30、SEQ. ID. NO. 31、SEQ. ID. NO. 32、SEQ. ID. NO. 33、SEQ. ID. NO. 34、SEQ. ID. NO. 35、SEQ. ID. NO. 36、及びこれらの組み合わせの雑種のライゲーション連結によって形成された。

10

20

30

40

50

【0107】

mir-302a-アンチセンスに対するmir-302a-センス、mir-302b-アンチセンスに対するmir-302b-センス、mir-302c-アンチセンスに対するmir-302c-センス、及びmir-302d-アンチセンスに対するmir-302d-センスを含む4種類のmir-302a-d雑種のハイブリダイゼーションによって、組換えmir-302ファミリーpre-miRNAクラスターが形成された。mir-302a、mir-302b、mir-302c、及びmir-302dの雑種をそれぞれ制限酵素PvuI/XhoI、XhoI/NheI、NheI/XbaI、及びXbaI/MluIで消化し、ゲル抽出フィルターカラムによって高圧滅菌のddH₂O (Qiagen, CA) 35 µlで収集した。その直後に、T4 DNAリガーゼ (Roche, 20U)で混合雑種を連結し、mir-302ファミリーpre-miRNA挿入配列クラスターを形成させ、更にPvuI/MluI直線化SprNAi-RGFP発現ベクターに挿入した。又は、SEQ.ID.NO.27及びSEQ.ID.NO.28の2つの合成配列をハイブリダイゼーションさせることによって、手動再設計したmir-302shRNAを製作し、PvuI/MluI直線化SprNAi-RGFP発現ベクターに挿入するように、PvuI/MluI制限酵素で分解した。図2A及び2Bに挙げられた工程に基づいて、組換えmir-302ファミリーpre-miRNAを含む誘導性SprNAi-RGFP発現ベクター(すなわちpTet-On-tTS-mir302s)は遺伝子導入法によってhHFC細胞に送達されるが、再設計されるmir-302shRNAを含むベクターはColo 829細胞に導入された。

10

20

【0108】

SprNAi-RGFP発現ベクターは、100 µg/mlのアンピシリン (Sigma Chemical, St. Louis, MO)を含む大腸菌DH5 LB培養細胞において増殖できた。増殖したSprNAi-RGFP発現ベクターは、ミニプレップ又はマキシプレッププラスミド抽出キット (Qiagen, CA)によって単離して精製された。pLNCX2レトロウイルスベクターに関しては、感染能はあるが複製能がないウイルスを作製するために、パッケージング細胞株GP2-293 (Clontech, CA)を用いてもよい。4 mM L-グルタミン、1 mMピルビン酸ナトリウム、100 µg/ml硫酸ストレプトマイシン、及び50 µg/mlネオマイシン (Sigma Chemical, MO)を添加し、さらに活性炭処理済み10%ウシ胎児血清 (FBS)を追加した1×DMEM培地において、形質移入したGP2-293細胞を5% CO₂、37 °Cで増殖させた。retro-XqRT-PCR滴定キット (Clontech, CA)によって、形質移入前のウイルス力価は、感染多重度 (MOI) 30以上であることを測定した。

30

【0109】

実施例3

mir-302sの細胞の培養及び導入遺伝子の送達

ヒト癌PC3及びColo 829細胞株は、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関 (ATCC, Rockville, MD)から入手したが、hHFC及びhpESC細胞は、コラゲナーゼ/トリプシン (4:1)によってそれぞれ本発明者のヘア又はアームからの2~10個の毛嚢ルート又は2mm³皮膚外植体から解離して得た。これらの細胞は、37 °C、5% CO₂で、10%胎児ウシ血清 (FBS)、4 mMのL-グルタミン、1 mMのピルビン酸ナトリウム、及び100 µg/mlのゲンタマイシン (Sigma Chemical, MO)を追加したRPMI 1640培地において培養された。細胞をトリプシン-EDTA溶液に1分間曝させてRPMIで1回洗浄することによって、培養細胞を70%~80%コンフルエントになるように継代させ、剥き離れた細胞を新鮮な培地で1:10で希釈して更新させた。電気穿孔法による導入遺伝子mir-302sの送達を行うために、低浸透圧性のPH緩衝液 (400 µl; Eppendorf)にpTet-On-tTS-mir302sベクター (10~30 µg)と宿主細胞 (200~2000)を混合し、400~450 Vで100 µsec電気穿孔し、ベクターを宿主細胞ゲノムに送達した。72時間後、FACSフローサイトメトリー選択及び抗RGFPモノク

40

50

ローナル抗体によって、陽性の導入遺伝子mirPS細胞を単離して収集した(図3C)。このような新規なmir-302s遺伝子導入法の成功率は91%以上と測定された。

【0110】

又は、レトロウイルスベクター送達については、まず、pVSV-Gが共に形質移入したGP2-293細胞(Clontech, CA)を、組換えmir-302ファミリーpre-miRNA挿入配列を含むSpRNAi-RGFPが挿入されたpLNCX2レトロウイルスベクターによって培養した。37、5%CO₂で36時間培養した後、37、5%CO₂で、12時間かけてGP2-293細胞の培地(それぞれ10ml)をろ過(0.25µm)し、直接に被験細胞培養細胞に移した。その後、ウイルス培地の代わりに新鮮なmirPS細胞培地を加え、3日ごとに1回取り替えた。培地は極めて高い力価の設計されたレトロウイルスベクターを含むため、24時間内、ほぼ全ての被験細胞(99.4%~99.8%)は遺伝子導方法によってベクター感染されてイントロン挿入配列及びRGFPを発現し始めた。感染後24時間に、FACSフローサイトメトリーによる選別及び抗RGFPモノクローナル抗体(Clontech, CA)によって陽性の導入遺伝子mirPS細胞を単離して収集した。

10

【0111】

実施例4

ノーザンブロット分析

全てのRNA(20µg)を1%のホルムアルデヒド・アガロースゲル上で分画して単離し、ナイロンメンブラン(Schleicher & Schuell, Keene, NH)上に移した。RGFPの5'エクソンと設計されるpre-miRNA/shRNA挿入配列との間に並んだ75bpの接合配列、又は標的遺伝子転写産物に相補的な合成LNA-DNAプローブ(Sigma-Genosys, MO)を、[³²P]-dATP(>3000 Ci/mM, Amersham International, Arlington Heights, IL)の存在下にて、ランダムプライマーによって増幅させ、Prime-It IIキット(Stratagene, La Jolla, CA)を用いて標識し、10bpカットオフのMicro Bio-Spinクロマトグラフィカラム(Bio-Rad, Hercules, CA)で精製した。50%の新鮮な脱イオンホルムアミド(pH7.0)、5×デンハート液、0.5%SDS、4×のSSPE、及び250mg/mLのサケ精子変性DNA断片の混合液中にてハイブリダイゼーションを実施した(42℃で18時間)。メンブランを2×SSC、0.1%SDS(25℃で15分間)で2回、0.2×のSSC、0.1%のSDS(37℃で45分間)で1回、連続的に洗浄し、オートラジオグラフィーを実施した。その結果を、図4B及び6Bに示す。

20

30

【0112】

実施例5

SDS-PAGE及びウェスタンブロット分析

標的タンパク質の免疫ブロット(図8C及び9B)のために、発生培地を除去した後、約70%コンフルエントの単離された細胞を氷冷したPBSですすぎ、ついでプロテアーゼ阻害剤、ロイペプチン、TLCK、TAME及びPMSFを追加したCellytic-M溶解/抽出試薬(Sigma-Aldrich, MO)で溶解した。細胞を室温で振盪器を用いて15分間インキュベーションし、マイクロチューブに剥がし入れ、細胞片塊を得るために12,000×gで5分間遠心分離した。タンパク質を含む細胞ライセートを回収し、使用まで-70℃で保存した。E-maxマイクロプレートリーダー(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)のSOFTmaxソフトウェアパッケージを用いてタンパク質を定量した。各30µgの細胞ライセートを、還元された(+50mM DTT)、及び還元されていない(DTTがない)SDS-PAGE試料用緩衝液に添加し、沸騰水浴中で3分間加熱してから、6%~8%ポリアクリルアミドゲルに添加し、標準タンパク質(Bio-Rad, Hercules, CA)と比較して分子量を測定した。SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動は、標準プロトコルに

40

50

従って実施した。PAGE分解タンパク質をニトロセルロース膜上に電気ブロットし、室温で2時間Odysseyブロッキング試薬(Li-Cor Biosciences, Lincoln, NB)で培養した。次に、Oct3/4(1:500, Santa Cruz)、SSEA-3(1:500, Santa Cruz)、SSEA-4(1:500, Santa Cruz)、Sox2(1:500, Santa Cruz)、Nanog(1:500, Santa Cruz)、Klf4(1:200, Santa Cruz)、 α -アクチン(1:2000, Chemicon, Temecula, CA)、及びRGFP(1:1000, Clontech)を含む一次抗体を、試薬に加えて4で混合物を培養した。翌日、TBS-Tを用いて膜を3回すすぎ、ヤギ抗マウスIgGコンジュゲートした二次抗体である、AlexaFluor 680反応性染料(1:2, 000; Invitrogen-Molecular Probes)に、室温で1時間暴露した。TBS-Tで更に3回すすいだ後、Li-Cor Odyssey Infrared Imager及びOdyssey Software v. 1.0を用いて免疫ブロット及び画像解析の蛍光スキャニングを行った。

10

【0113】

実施例6

ゼブラフィッシュにおけるイントロンRNA媒介性の遺伝子サイレンシング

形質移入中、Tg(アクチン-GAL4:UAS-gfp)系統のゼブラフィッシュの幼生を、魚箱で10mlの0.2x血清無添加RPMI1640培地で飼育した。1mlの1x血清無添加RPMI1640培地中に、60 μ lのFuGeneリポソームの形質移入試薬(Roche Biochemicals, Indianapolis, IN)を緩やかに溶解して、形質移入用事前混合液を調製した。実施例1~2に記載したように、抗EGFP pre-miRNA挿入配列を含むSpRNAi-RGFPベクター(20 μ g)を事前混合液と混合し、氷上にて30分間静置してから、箱中のTg(アクチン-GAL4:UAS-gfp)幼生魚に直接適用した。12時間の間隔で、合わせて3回(総量60 μ g)投与した。最初の形質移入から60時間後に試料を採取した。結果を図1Bに示す。

20

【0114】

実施例7

フローサイトメトリー分析

必要な実験をした後、細胞が予め冷却した70%メタノールPBS溶液1ml中に20で1時間再浮遊されることで、トリプシン処理されて細胞塊を集めて固定された。細胞塊を得た後、1mlのPBSで1回洗浄した。再び細胞塊を得た後、37で、PBS内の1mg/mlのヨウ化プロピジウム1ml、0.5mg/mlのRNaseにおいて30分間再浮遊させた。次に、BDFACSCaliburフローサイトメトリー(San Jose, CA)で約15,000個の細胞を分析した。細胞ダブレットは、パルス面積に対するパルス幅の曲線を描いて単一細胞をゲーティングすることによって除外された。収集したデータを「Watson Pragmatic」アルゴリズムを用いたソフトウェアパッケージFlowjoを使用して解析した。図5Aに示すように、フローサイトメトリーチャートの1番目(左)及び2番目(右)のピークは、それぞれ被験細胞集団全体における休止期G0/G1及び有糸分裂期Mの細胞集団のレベルを示している。

30

40

【0115】

実施例8

DNA脱メチル化の測定

DNA単離キット(Roche)を用いて200,000個の細胞からゲノムDNAを単離し、2つのアリコートに分けられた。ゲノム全体脱メチル化を測定するために、一方のDNAアリコート(2 μ g)を、CCGG切断制限酵素HpaIIで消化し、1%アガロースゲル電気泳動で評価した(図7A)。他方のアリコート(2 μ g)を用いてPCRを行い、重亜硫酸塩修飾の前後、Oct3/4プロモーターの完全な9,400個の塩基対(bp)の5'調節領域(NT_007592ヌクレオチド21992184-22

50

001688) をクローニングした。CpGenomeDNA修飾キット(Chemicon, CA)を用いて重亜硫酸塩修飾を行われた。DNAに対する重亜硫酸塩処理では、非メチル化の全てのシトシンはウラシルに変換される一方、メチル化のシトシンはシトシンのままである。例えば、非メチル化のACGT部位がAUGT部位に変わったが、メチル化のACGTは変わっていない。重亜硫酸塩修飾の前後で標的Oct3/45'プロモーター領域に対して特異性をもつ、2つの順方向プライマー5'GAGGAGTTGAGGGTACTGTG-3'(SEQ.ID.NO.44)(重亜硫酸塩修飾したDNA用)や5'GAGGAGCTGAGGGCACTGTG-3'(SEQ.ID.NO.45)(修飾されていないDNA用)、及び1つの逆方向プライマー5'GTAGAGTGCCTCTGCCTTC-3'(SEQ.ID.NO.46)を含むPCRプライマーは、既に設計して試験した。PCRクローニングについては、まず1xのPCR緩衝液に、重亜硫酸塩で処理された、又は処理されていないゲノムDNA(50ng)をプライマー(合計150ピコモル)と混合し、4分間かけて94に加熱した直後、氷上にて冷却した。その後、長鋳型PCR延長キット(Roche)を用いて、92で1分間、55で1分間、そして70で5分間、25サイクルでPCRを行った。PCR精製キット(Qiagen)で得られた産物を収集し、AclI(AACGTT)、BmgBI(CACGTC)、PmlI(CACGTG)、SnaBI(TACGTA)、及びHpyCH4IV(ACGT)を等量(各5U)ずつ含む、複数種類のACGT切断制限酵素で2µgのDNAを消化した。ついで、3%アガロースゲル電気泳動で消化された断片を評価した(図7B)。

【0116】

重亜硫酸塩DNA配列決定分析(図7C)については、定量的PCR(qPCR)を用いて更にOct3/4転写起点に並ぶ467bp標的領域(NT_007592ヌクレオチド21996577-21997043)を増幅した。使用したプライマーは1つの順方向プライマーである5'GAGGCTGGAGTAGAAGGATTGCTTTGG-3'(SEQ.ID.NO.47)、及び1つの逆方向プライマーである5'CCCTCCTGACCCATCACCTCCACCCACC-3'(SEQ.ID.NO.48)である。以上のようにクローニングされた9,400bp Oct3/45'プロモーター領域(50ng)とqPCRプライマー(合計100ピコモル)を、1xのPCR緩衝液において混合し、2分間かけて94に加熱した直後、氷上にて冷却した。次に、高感度のPCR延長キット(Roche)を用いて、94で30秒間、68で1分間、20サイクルでPCRを行った。正確な467bpのサイズの増幅DNA産物を、3%アガロースゲル電気泳動によって更に分画し、ゲル抽出キット(Qiagen)によって精製し、DNA配列決定に用いられる。重亜硫酸塩で修飾されたDNA内及び修飾されていないDNA配列内の変わっていないシトシンを比較することによって、DNAメチル化部位の詳細な状況が得られた。

【0117】

実施例9

マイクロRNA(miRNA)のマイクロアレイ分析

細胞飽和密度70%で、各細胞株からの短鎖RNAをmirVana(登録商標)miRNA単離キット(Ambion)を用いて単離した。単離した短鎖RNAの純度及び量を1%ホルムアルデヒド-アガロースゲル電気泳動及び分光光度計の測定(Bio-Rad)によって評価した直後、ドライアイス中にて凍結し、RNAマイクロアレイ分析のためにLCS Sciences社(San Diego, CA)に送付した。各マイクロアレイチップを、それぞれCy3又はCy5で標識した単一の試料、又はCy3及びCy5で標識した試料とハイブリダイゼーションさせる。バックグラウンドを差し引き、正規化した。二重分析用にp値を算出し、3倍より大きい差で発現した転写産物の一覧を作成した。図6AのCy3及びCy5強度画像(青色バックグラウンド)において、シグナル強度がレベル1からレベル65,535に増えた場合、対応色が青色から緑色、黄色及び赤色になった。23,000以上のレベルは、遺伝子発現の陽性シグナル(positive call in

10

20

30

40

50

gene expression) であると考えられた。Cy5 / Cy3 の比の画像 (黒色バックグラウンド) において、Cy3 レベルが Cy5 レベルより高い場合、色は緑色であり、Cy3 レベルが Cy5 レベルに等しい場合、色は黄色であり、Cy5 レベルが Cy3 レベルより高い場合、色は赤色である。

【0118】

実施例 10

細胞全体遺伝子発現パターンのゲノム全体のマイクロアレイ分析

54,000 を超えたオリゴヌクレオチドプローブを含むヒトゲノム GeneChip U133A&B 及び plus 2.0 アフィメトリクス (Affymetrix, Santa Clara, CA) を用いて、図 8A 及び 9A に示すように、mirPS 細胞内のゲノム全体の 47,000 のヒト遺伝子転写産物の発現パターンを検出した。試料毎に測定を 3 回繰り返し、同じ実験を 4 回繰り返した。RNeasy スピンカラム (RNeasy spin column) (Qiagen) を用いて、各試験試料から全 RNA を単離した。マイクロアレイ・ハイブリダイゼーション用の標識プローブの調製のために、Superscript Choice システム (Invitrogen)、5' GGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATA GGGAGGCGG - (dT)₂₄ - 3' (SEQ. ID. NO. 49) のような修飾オリゴ (dT)₂₄ - T7 プロモータープライマーを用いて、抽出した全 RNA (2 µg) を 2 本鎖 cDNA に変換した。得られた cDNA をフェノール/クロロホルム抽出法で精製し、エタノールで沈殿させ、ジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理済み ddH₂O に 0.5 µg / µl の濃度で再浮遊させた。1 µg の dsDNA、7.5 mM の非標識 ATP と GTP、5 mM の非標識 UTP と CTP、さらに 2 mM のビオチン標識 CTP と UTP (ビオチン - 11 - CTP、ビオチン - 16 - UTP: Enzo Diagnostics)、及び 20 U T7 RNA ポリメラーゼを用いて、インビトロ転写し、37 °C で 4 時間反応させてから、RNeasy スピンカラム (Qiagen) によって得られた cRNA を精製した。cRNA 試料の一部を 1% アガロースゲル上で単離してサイズ範囲を調べた後、40 mM の Tris - 酢酸塩 (pH 8.0)、100 mM の KOAc / 30 mM の MgOAc 中で、94 °C で、35 分間加熱し、10 µg の cRNA を 50 個塩基の平均サイズに無作為に断片化した。ハイブリダイゼーションは、200 µl の AFFY 緩衝液 (Affymetrix) 中において 40 °C で 16 時間、一定の攪拌を加えて完了させた。ハイブリダイゼーション後、アレイを 200 µl の 6xSSPE - T 緩衝液 (1x0.25 M 塩化ナトリウム / 15 mM リン酸ナトリウム (pH 7.6) / 1 mM EDTA / 0.005% トリトン) で 3 回すすぎ、ついで 200 µl の 6xSSPE - T において 50 °C で 1 時間洗浄した。アレイをさらに 0.5xSSPE - T で 2 回すすぎ、0.5xSSPE - T において 50 °C で 15 分間洗浄した。その後、6xSSPE - T (pH 7.6) に溶解した 2 µg / ml のストレプトアビジン - フィコエリトリン (Invitrogen - Molecular Probes) と 1 mg / ml のアセチル化 BSA (Sigma) で染色した。アレイを 7.5 µm において共焦点スキャナー (Molecular Dynamics) で読み取った。

【0119】

バックグラウンドの変化を決定するために、同様な試料で 2 回のマイクロアレイ分析を実施し、200 の遺伝子 (図 8A における白点) を選択し、一方の分析でわずかに差が示されたこれらの遺伝子を選択して、さらに比較した。完全に適合したプローブ及びミスマッチプローブとの全体的平均差を用いて、試料シグナルを正規化した。ついで、Affymetrix Microarray Suite 5.0 版、Expression Console (登録商標) 1.1.1 版 (Affymetrix)、及び Genespring (Silicon Genetics) ソフトウェアを用いて、ゲノム全体の遺伝子発現パターンの変化を分析した (図 8A における緑点)。遺伝子発現率の変化が 1 倍より大きい場合は、陽性差異遺伝子と見なされた。遺伝子クラスター測定において、プラグインプログラム Genetrix (Epicenter Software) と Affyme

trixソフトウェアを結合して使用した。各マイクロアレイ内の内部ハウスキーピング対照平均値を用いて、試料シグナルを正規化した。正規化の後、シグナル強度がレベル1からレベル65, 535に増えた場合、対応色は緑色から黒色と赤色になった。23, 000以上のレベル(赤色)の場合は、ノーザンブロット測定において陽性検出できるので、陽性シグナルと見なされる。

【0120】

実施例11

細胞分化及び免疫検出分析

無フィーダーのmirPS培地の他にいずれの処理もない場合、mirPS由来の胚様体を異種移植で6週齢の雌性の偽妊娠の免疫不全SCIDベージュマウスの子宮又は腹腔腔に移植すると、奇形腫様嚢腫が形成される(図10)。免疫不全の裸マウスの利用は、移植療法に模倣するインビボ環境を提供している。1IUのヒト閉経期ゴナドトロピン(HMG)を2日間腹腔内注射し、またヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)を1日間注射することによって、偽妊娠マウスを作成した。インビトロで幹細胞を生殖系列様細胞に分化させるように分子誘導するために、37、5%CO₂で、ポリオルニチン/ラミニンに塗布された皿内のDMEM/F12(1:1;高グルコース)培地にmirPS細胞を12時間維持し、上記培地には、10%の木炭除去済みFBS、4mMのL-グルタミン、1mMのピルビン酸ナトリウム、5ng/mlのアクチビン、及び50ng/mlのジヒドロテストステロン(DHT)が追加された。ついで、細胞をトリプシン処理し、1xPBSで洗浄して、冷却マトリゲルの4つのアリコート(それぞれ100µl)及び100µlの1xPBSの1つのアリコート中に分注した。その後、すぐに6週齢の免疫不全SCIDベージュ色裸マウスの後肢筋肉、腹腔、子宮、皮下の頸部皮膚(マトリゲルと共に)、及び尾部静脈(PBSと共に)に細胞を移植した。実験処理中、ジエチルエーテルでマウスを麻酔した。1週間後、精原細胞様の細胞は子宮領域のみにおいて認められた。線維芽細胞分化については、10%のFBS、4mMのL-グルタミン、1mMのピルビン酸ナトリウム、5ng/mlのノギン及び100ng/mlの形質転換成長因子-1(TGF-1)を追加した通常のフェノールレッド不含DMEM培地を用いて6時間経てから、異種移植を行うこと以外、以上に示す方法と同様に処理した。1週間後、線維芽細胞は子宮において認められた。軟骨細胞分化については、10%のFBS、4mMのL-グルタミン、1mMのピルビン酸ナトリウム及び100ng/mlの骨形成タンパク質4(BMP4)を追加した通常のRPMI 1640培地を用いて6時間経ること以外、以上に示す方法と同様に処理した。軟骨細胞は肝臓領域のみにおいて認められた。

【0121】

特定の組織マーカーの免疫検出のため、4で、組織試料を4%パラホルムアルデヒドに一晩取り付けた。試料を順に1xPBS、メタノール、イソプロパノール、及びテトラヒドロナフタレンで洗浄し、次にパラフィンワックスに包んだ。マイクロトームで7~10µmの厚さで包まれた試料を切断し、清潔なTESPA塗布スライドガラス上に取り付けた。ついで、キシレンを用いてスライドガラスを脱ろうし、取付け媒体(RichardAllanScientific, Kalamazoo, MI)によってカバーガラスの下に取り付け、ヘマトキシリン及びエオシン(H&E, Sigma)で染色して形態を観察した。免疫組織化学(IHC)染色キットは、Imgenex(SanDiego, CA)から購入した。製造元のプロトコルに従い、抗体の希釈及び免疫染色工程を行った。用いられた一次抗体は、Tuj1(1:500, Abcam Inc., Cambridge, MA)、ABCA2(1:100, SantaCruzBiotechnology, SantaCruz, CA)、Dazla(1:100, Abeam)、EE2(1:100, SantaCruz)、atlastin1(1:200, SantaCruz)、COL1A1(1:500, SantaCruz)、COL2A1(1:500, SantaCruz)、トロポエラスチン(1:200, Abeam)、及びRGFP(1:500, Clontech)を含む。二次抗体としては、蛍光染料標記ヤギ抗ウサギ又はウマ抗マウス抗体(1:2,000, Invitrog

en - Molecular Probes) を用いた。100×顕微鏡で全視野スキャンニングし、陽性結果が観察された。定量分析のために、Metamorphイメージングプログラム(Nikon 80i 及びTE2000 微視的定量システム)によって200×、又は400×倍率で計測した。

【0122】

実施例12

細胞移動の測定

96ウェルの培養板において、ウェルごとに1つのPC3細胞と1つのmirPS-PC3細胞を入れ、その移動及び相互作用を記録した。2つの細胞はいずれも、37℃、5%CO₂で10%の木炭除去済みFBS、4mMのL-グルタミン、1mMのピルビン酸ナトリウム、5ng/mlのアクチビン、5ng/mlのノギン、3ng/mlのbFGF及び0.5µMのGSK-3抑制因子XVを追加したRPMI1640培地において発生した。セルホルダーを有する1対のMO-188NE 3D油圧ファインマイクロマニピュレータを用いて、TE2000倒立型顕微鏡システム(Nikon)で細胞を個別的に単離して採取した。マイクロマニピュレータ及び顕微鏡システム全体を防振ステージに位置した。400×、及び600×倍率で、6時間かけて、15秒おきに写真を撮った。写真における細胞運動及び細胞形態を追いかけることによって、細胞移動を確認した。図7Dに示すように、転移癌PC3細胞は、ATCCのような速やかな軸形状移動になったが、mirPS-PC3細胞は円形状静止表現型を示して、放置された位置に保持されている。

【0123】

実施例13

統計解析

結果は平均±SEで示した。一元配置分散分析(one-way ANOVA)によってデータを統計解析した。主効果が有意な場合、Dunnett'sポストホック検定を用いて、対照群と有意に異なる群を同定した。2処理群間の一对比較には、両側スチューデントt検定を用いた。2群以上の処理群に関する実験では、ANOVAを行った後ポストホック多重範囲検定を行った。確率P<0.05を有意とみなした。両側検定から全p値を決定した。

【0124】

参考文献

以下の参考文献は、本明細書に完全に記載されているかのように、参照によって本明細書に組み込まれる。

1. Thomsonら(1998) Science 282: 1145-1147。
2. Takahashi及びYamanaka.(2006) Cell 126: 663-676。
3. Okitaら(2007) Nature 448: 313-317。
4. Wernigら(2007) Nature 448: 318-324。
5. Yuら(2007) Science 318: 1917-1920。
6. Meissnerら(2006) Nature 439: 212-215。
7. Hannaら(2007) Science 318: 1920-1923。
8. Suhら(2004) Dev. Biol. 270: 488-498。
9. Tangら(2007) Genes Dev. 21: 644-648。
10. Bartel, D.P.(2004) Cell 116: 281-297。
11. Simonsson及びGurdon.(2004) Nat Cell Biol. 6: 984-990。
12. Murchisonら(2007) Genes Dev. 21: 682-693。
13. Ghoshら(2000) RNA 6: 1325-1334。
14. Linら(2004) Novel RNAi therapy - Intron-

10

20

30

40

50

- derived microRNA drugs. Drug Design Reviews 1: 247 - 255.
15. Lin⁵ (2003) A novel RNA splicing-mediated gene silencing mechanism potential for genome evolution. Biochem Biophys Res Commun. 310: 754 - 760.
16. Lin⁵ (2005) Asymmetry of intronic pre-microRNA structures in functional RISC assembly. Gene 356: 32 - 38.
17. Lin⁵ (2006a) Gene silencing in vitro and in vivo using intronic microRNAs. Methods Mol Biol. 342: 295 - 312. 10
18. Lin⁵ (2006b) Transgene-like animal model using intronic microRNAs. Methods Mol Biol. 342: 321 - 334.
19. Lin⁵ (2008a) Intron-mediated RNA interference and microRNA (miRNA). Frontiers in Bioscience 13: 2216 - 2230.
20. Lin⁵ (2008b) Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell - Hk state. RNA 14: 2115 - 2124. 20
21. Rodriguez⁵ (2004) Genome Res. 14: 1902 - 1910.
22. Ghosh⁵ (2000) RNA 6: 1325 - 1334.
23. Danin-Kreisel⁵ (2003) Mol Cell 11: 1279 - 1289.
24. Ruby⁵ (2007) Nature 448: 83 - 86.
25. Tang, G. (2005) Trends Biochem Sci. 30: 106 - 114.
26. Lee⁵ (2003) Nature 425: 415 - 419. 30
27. Lewin B. (2000) Genes, 第7版, オックスフォード大学出版社, ページ688 - 690.
28. Scholer⁵ (1989) EMBO J. 8: 2543 - 2550.
29. Rosner⁵ (1990) Nature 345: 686 - 692.
30. Solter⁵ (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 75: 5565 - 5569.
31. Shevinsky⁵ (1982) Cell 30: 697 - 705.
32. Boyer⁵ (2005) Cell 122: 947 - 956.
33. Hochedlinger⁵ (2006) Nature 441: 1061 - 1067. 40
34. Stitzel⁵ (2007) Science 316: 407 - 408.
35. O'Farrell⁵ (2004) Curr. Biol. 14: R35 - 45.
36. Thomsonによる米国特許第5, 843, 780号、第6, 200, 806号、第7, 029, 913号及び第7, 220, 584号。
37. Gearhartによる米国特許第6, 090, 622号、第6, 245, 566号及び第6, 331, 406号。
38. Reubinoffによる米国特許第6, 875, 607号。
39. Shinya Yamanakaによる米国特許第7, 250, 255号。
- 【0125】 50

本明細書に記載された実施例及び実施形態は単に例証目的のためであり、これらの範囲内での様々な改良又は変更が当業者によって提示され、これらは添付の請求項に記載される本発明の精神及び範囲内に含まれることが当然である。本明細書で引用した全ての刊行物及び特許は、全ての目的に関してその全体の参照によって本明細書に組み込まれる。

【 図 3 B 】

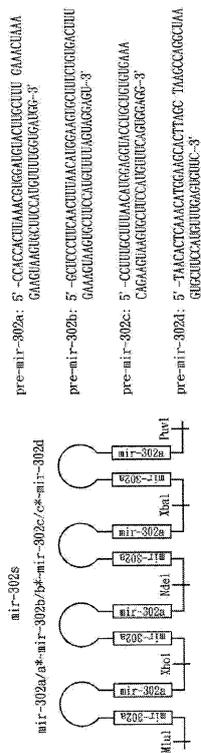


Fig. 3B

【 図 3 C 】

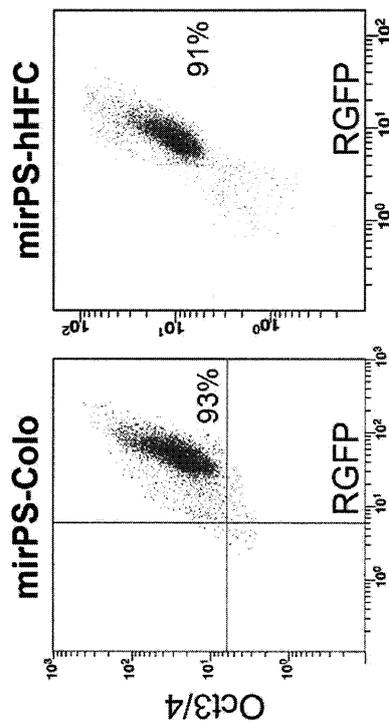


Fig. 3C

【 図 8 A 】

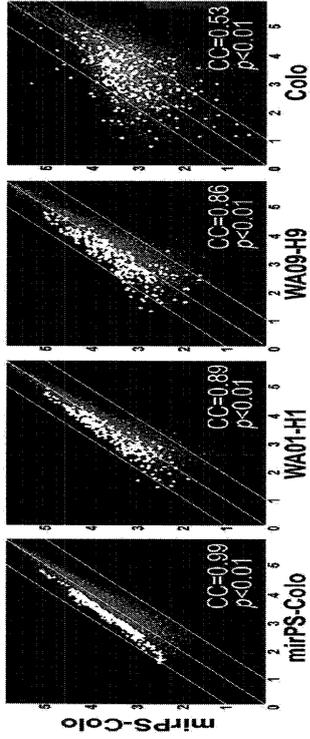
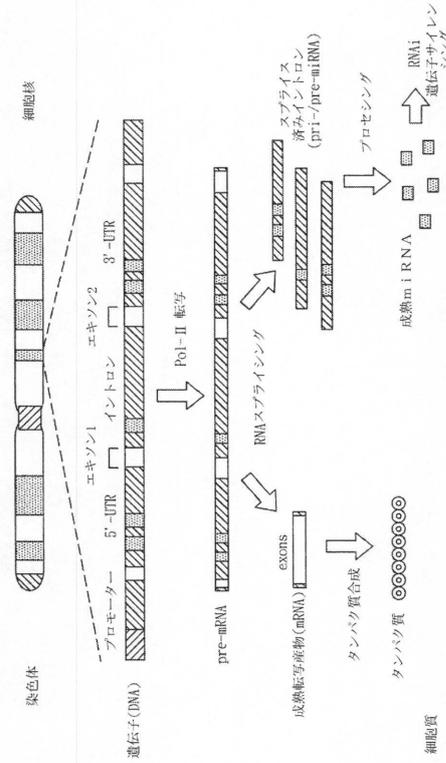
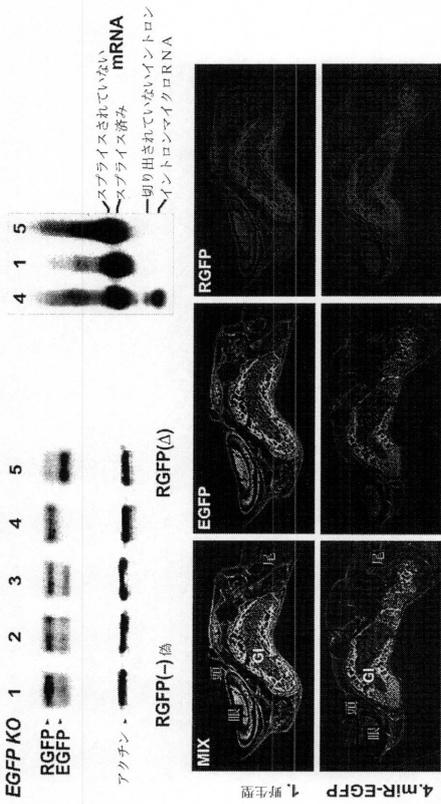


Fig. 8A

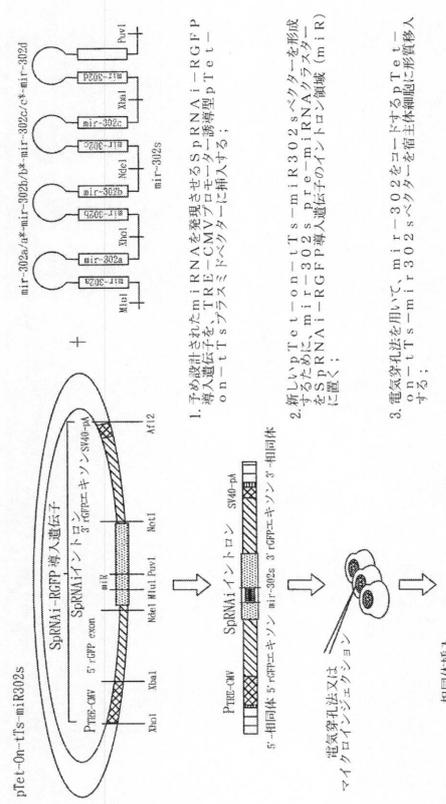
【 図 1 A 】



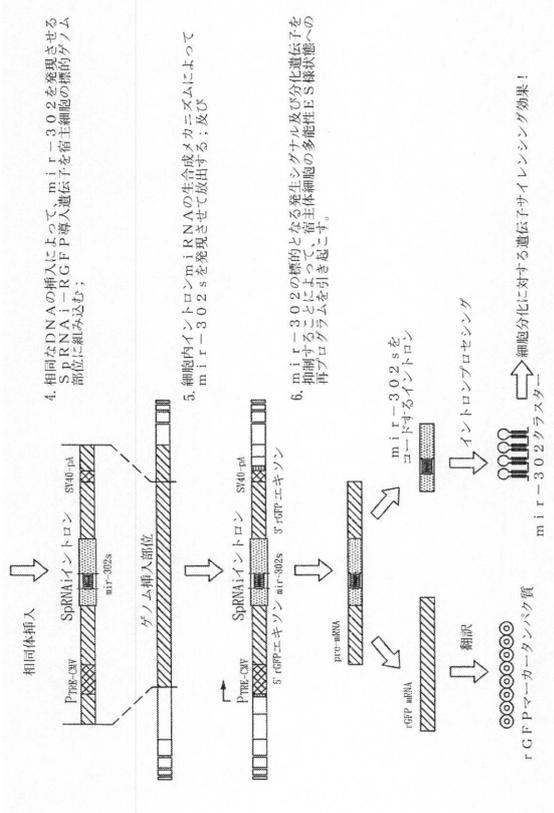
【 図 1 B 】



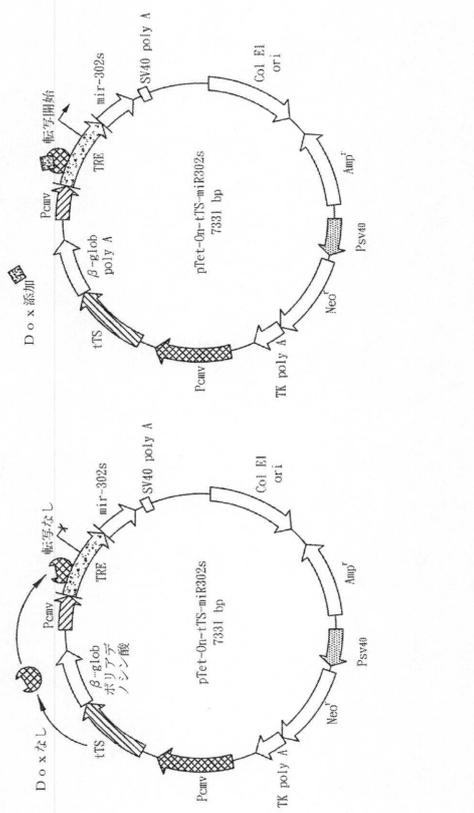
【 図 2 A 】



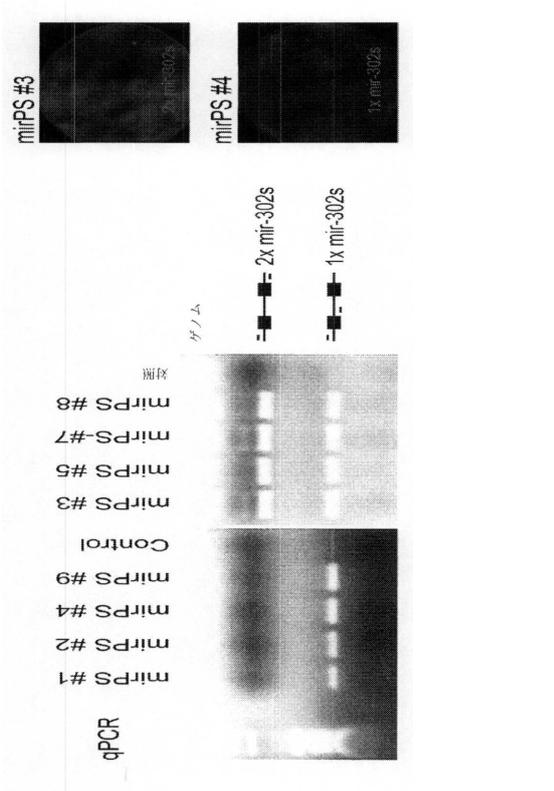
【図2B】



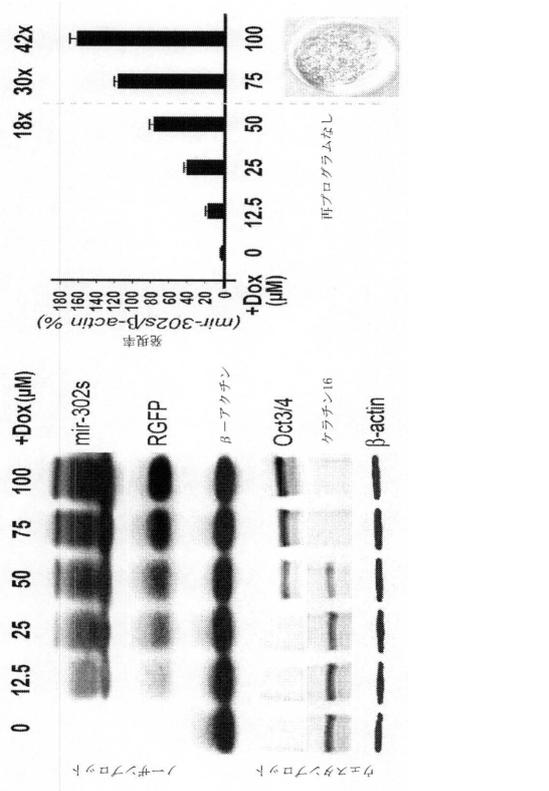
【図3A】



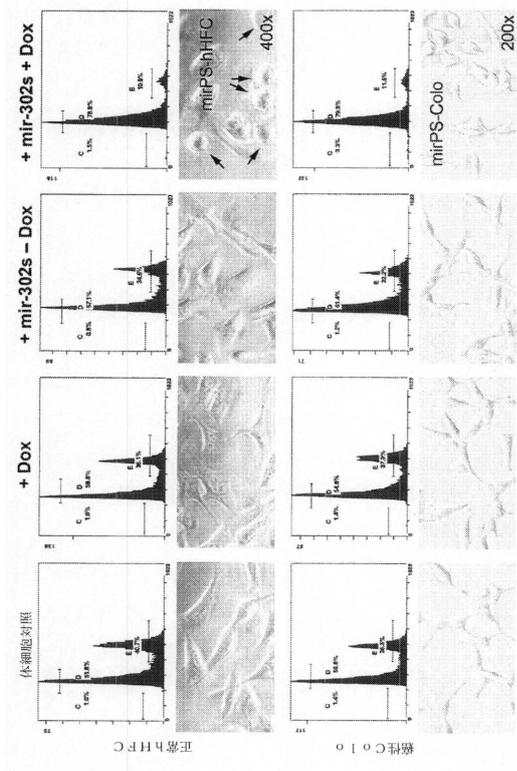
【図4A】



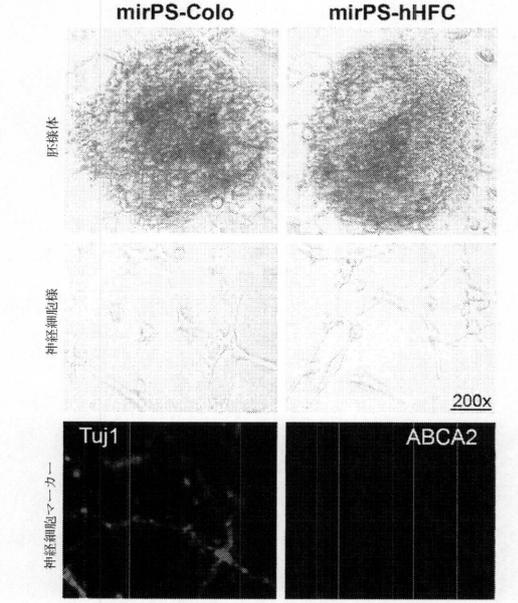
【図4B】



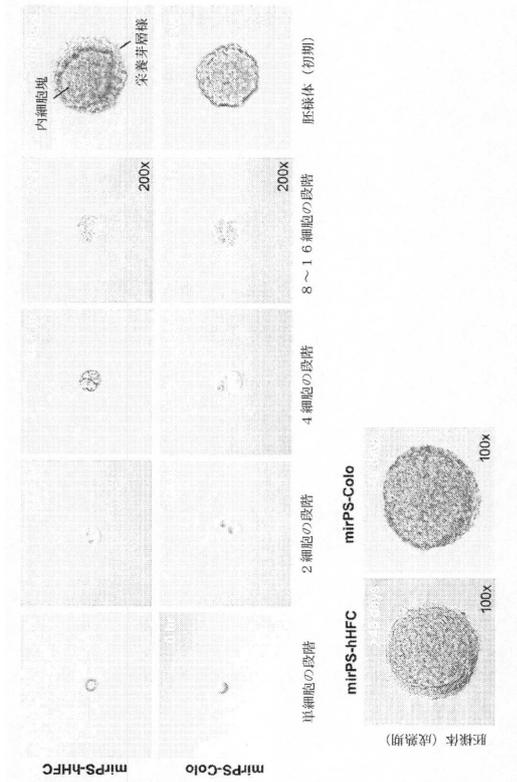
【図 5 A】



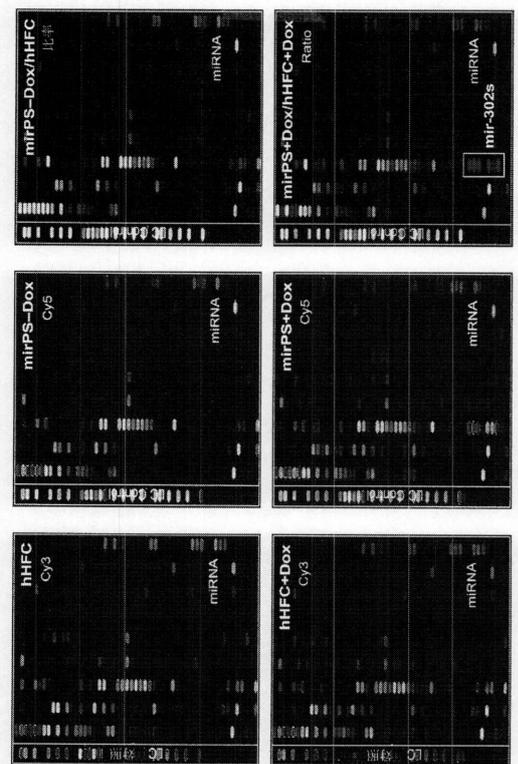
【図 5 B】



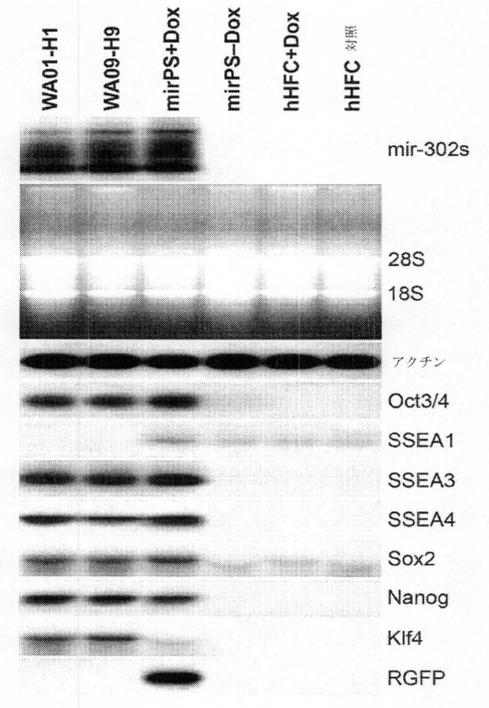
【図 5 C】



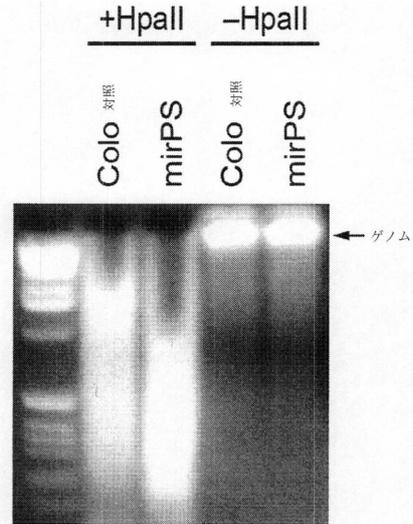
【図 6 A】



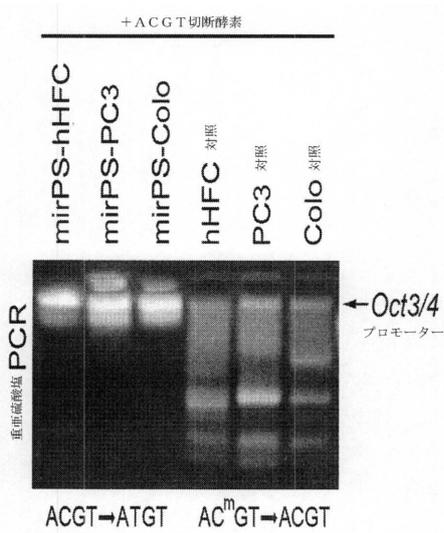
【 図 6 B 】



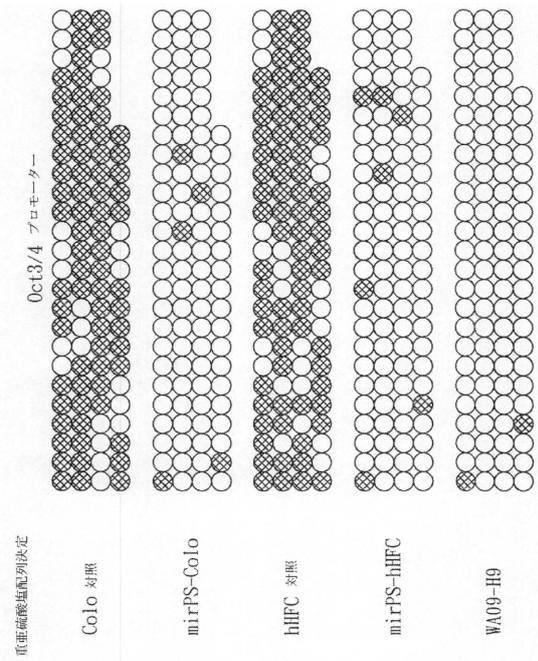
【 図 7 A 】



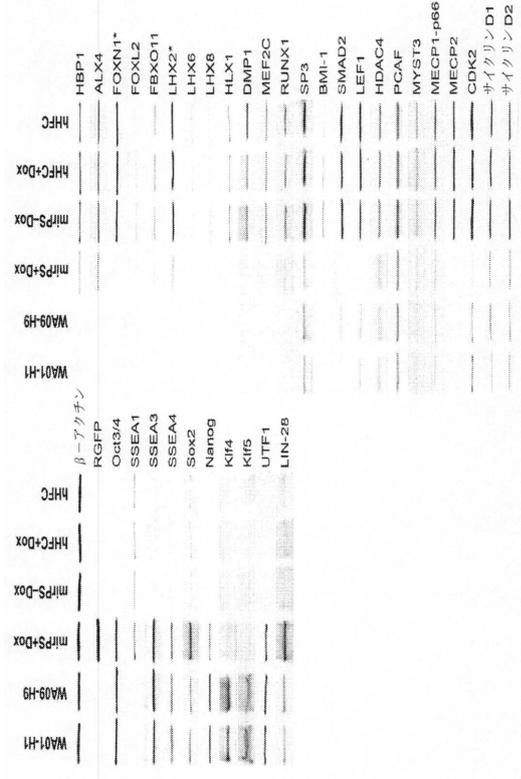
【 図 7 B 】



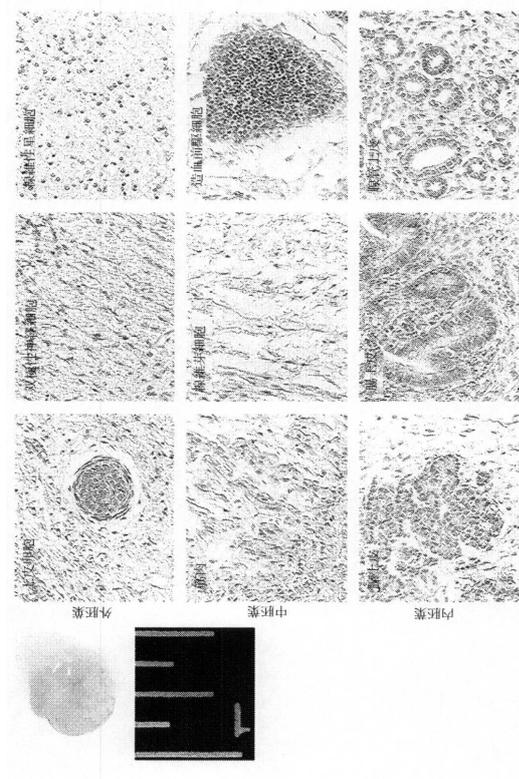
【 図 7 C 】



【 図 9 B 】



【 図 10 】



【 図 11 - 1 】

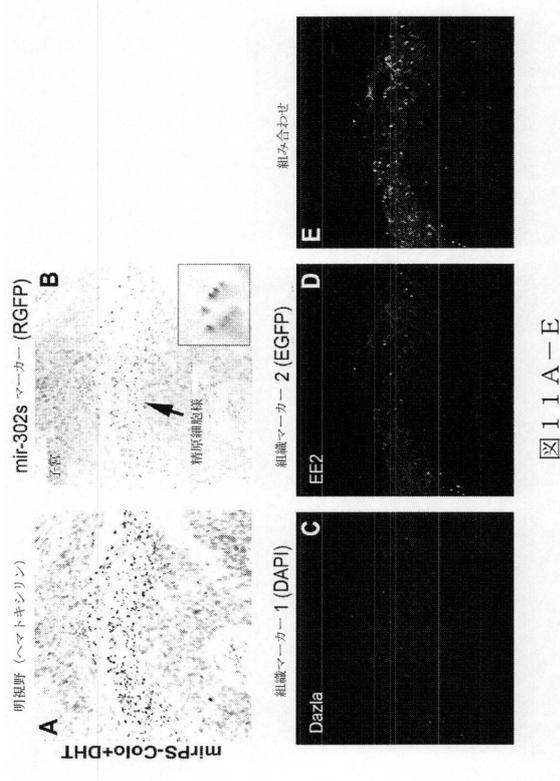


図 11 A - E

【 図 11 - 2 】

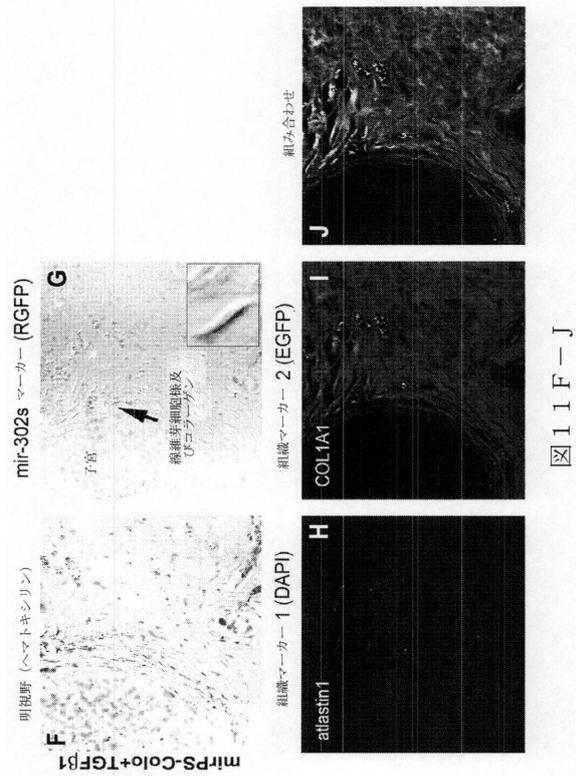
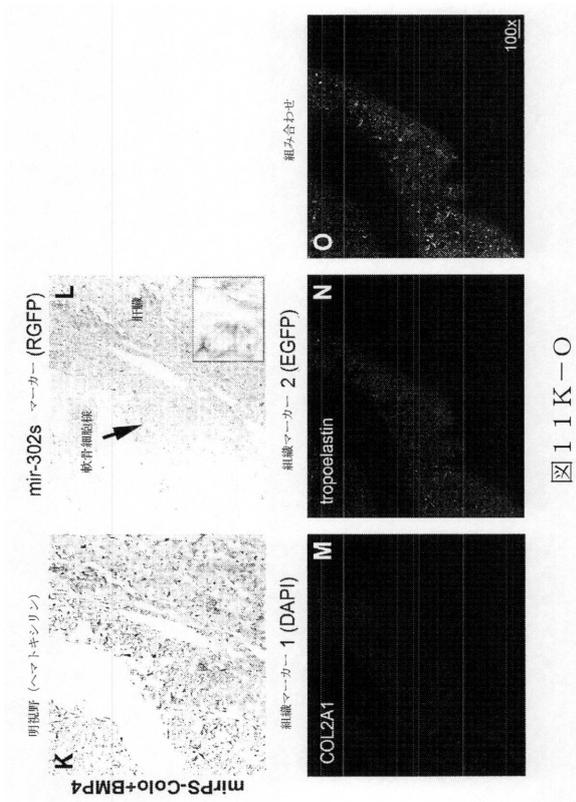


図 11 F - J

【 図 1 1 - 3 】



【 配列表 】

[0005945385000001.app](#)

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 61/191,327
(32)優先日 平成20年9月8日(2008.9.8)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (31)優先権主張番号 61/193,438
(32)優先日 平成20年11月28日(2008.11.28)
(33)優先権主張国 米国(US)
- (74)代理人 100068755
弁理士 恩田 博宣
- (74)代理人 100142907
弁理士 本田 淳
- (72)発明者 リン、シー - ラン
アメリカ合衆国 9 1 0 0 7 カリフォルニア州 アーケーディア ビクトリア ドライブ 9 2
0
- (72)発明者 ウー、デイビッド ティーエス
台湾 タイペイ シティー 1 0 4 ジフ ロード レーン 1 5 7 ナンバー 1 5 1 1 エフ
.
- (72)発明者 イン、シャオ ヤオ
アメリカ合衆国 9 1 1 0 8 カリフォルニア州 サン マリノ ウェルスレイ ロード 1 9 5
3

合議体

審判長 中島 庸子
審判官 長井 啓子
審判官 飯室 里美

- (56)参考文献 国際公開第2009/058413(WO, A1)
特表2007-518402(JP, A)
国際公開第2004/024940(WO, A1)
国際公開第2006/025802(WO, A1)
国際公開第2009/075119(WO, A1)
BMB 2007(第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会)講演要
旨集, 2007/11/25, p. 504
Methods in Molecular Biology 342 MicroRNA P
rotocols, USA, Humana Press Inc., 2006, p. 295-3
12

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/00 - 5/28
C12N 15/85 - 15/90
PubMed
BIOSIS(DIALOG)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)