

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5340265号
(P5340265)

(45) 発行日 平成25年11月13日 (2013.11.13)

(24) 登録日 平成25年8月16日 (2013.8.16)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/00 G

請求項の数 16 (全 52 頁)

(21) 出願番号	特願2010-506749 (P2010-506749)	(73) 特許権者	504132272
(86) (22) 出願日	平成21年6月26日 (2009.6.26)		国立大学法人京都大学
(65) 公表番号	特表2011-525793 (P2011-525793A)		京都府京都市左京区吉田本町36番地1
(43) 公表日	平成23年9月29日 (2011.9.29)	(74) 代理人	100080791
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/062173		弁理士 高島 一
(87) 国際公開番号	W02009/157593	(74) 代理人	100125070
(87) 国際公開日	平成21年12月30日 (2009.12.30)		弁理士 土井 京子
審査請求日	平成24年6月26日 (2012.6.26)	(74) 代理人	100136629
(31) 優先権主張番号	61/076,487		弁理士 鎌田 光宣
(32) 優先日	平成20年6月27日 (2008.6.27)	(74) 代理人	100121212
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 田村 弥栄子
(31) 優先権主張番号	61/095,573	(74) 代理人	100122688
(32) 優先日	平成20年9月9日 (2008.9.9)		弁理士 山本 健二
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100117743
			弁理士 村田 美由紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 効率的な人工多能性幹細胞の樹立方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

体細胞の核初期化工程においてp53の機能を阻害することを含む、iPS細胞の樹立効率の改善方法であって、p53の機能の阻害が下記：

(i) Pifithrin- およびその類縁体、Pifithrin- およびその類縁体、ならびにPifithrin- μ ；

(ii) p53のドミナントネガティブ変異体およびそれをコードする核酸；

(iii) p53に対するsiRNA、shRNAおよびそれらをコードするDNA；

(iv) MDM2およびそれをコードする核酸；ならびに

(v) p21に対するsiRNA、shRNA、アンチセンス核酸およびリボザイム

からなる群から選択される1またはそれ以上の物質により行われる、方法。

【請求項 2】

p53のドミナントネガティブ変異体またはそれをコードする核酸を体細胞に接触させることによりp53の機能を阻害する、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記p53のドミナントネガティブ変異体が、p53DD、p53P275Sまたはp53D278Nである、請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

前記p53のドミナントネガティブ変異体が、p53DDである、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】

p53に対するsiRNA、shRNAおよびそれらをコードするDNAからなる群より選択される核酸を体細胞に接触させることによりp53の機能を阻害する、請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

p53の機能阻害物質を含有してなる、iPS細胞の樹立効率改善剤であって、p53の機能阻害物質が下記：

- (i) Pifithrin- およびその類縁体、Pifithrin- およびその類縁体、ならびにPifithrin- μ ；
- (ii) p53のドミナントネガティブ変異体およびそれをコードする核酸；
- (iii) p53に対するsiRNA、shRNAおよびそれらをコードするDNA；
- (iv) MDM2およびそれをコードする核酸；ならびに
- (v) p21に対するsiRNA、shRNA、アンチセンス核酸およびリボザイム
からなる群から選択される 1 またはそれ以上の物質である、剤。

10

【請求項 7】

前記阻害物質が、p53のドミナントネガティブ変異体またはそれをコードする核酸である、請求項 6 記載の剤。

【請求項 8】

前記p53のドミナントネガティブ変異体が、p53DD、p53P275Sまたはp53D278Nである、請求項 6 または 7 に記載の剤。

20

【請求項 9】

前記p53のドミナントネガティブ変異体が、p53DDである、請求項 6 から 8 のいずれか 1 項に記載の剤。

【請求項 10】

前記阻害物質が、p53に対するsiRNA、shRNAおよびそれらをコードするDNAからなる群より選択される核酸である、請求項 6 記載の剤。

【請求項 11】

体細胞に核初期化物質およびp53の機能阻害物質を接触させることを含む、iPS細胞の製造方法であって、核初期化物質が、Oct3/4およびSox2、またはそれらをコードする核酸、Oct3/4、Sox2およびKlf4、またはそれらをコードする核酸、またはOct3/4、Sox2、Klf4およびc-Myc、またはそれらをコードする核酸を含み、p53の機能阻害物質が下記：

30

- (i) Pifithrin- およびその類縁体、Pifithrin- およびその類縁体、ならびにPifithrin- μ ；
- (ii) p53のドミナントネガティブ変異体およびそれをコードする核酸；
- (iii) p53に対するsiRNA、shRNAおよびそれらをコードするDNA；
- (iv) MDM2およびそれをコードする核酸；ならびに
- (v) p21に対するsiRNA、shRNA、アンチセンス核酸およびリボザイム
からなる群から選択される 1 またはそれ以上の物質である、方法。

【請求項 12】

前記阻害物質が、p53のドミナントネガティブ変異体またはそれをコードする核酸である、請求項 11 記載の方法。

40

【請求項 13】

前記p53のドミナントネガティブ変異体が、p53DD、p53P275Sまたはp53D278Nである、請求項 11 または 12 に記載の方法。

【請求項 14】

前記p53のドミナントネガティブ変異体が、p53DDである、請求項 11 から 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

前記阻害物質が、p53に対するsiRNA、shRNAおよびそれらをコードするDNAからなる群より選択される核酸である、請求項 11 記載の方法。

【請求項 16】

50

体細胞がT細胞である、請求項 1 から 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の技術分野

本発明は、人工多能性幹（以下、iPSという）細胞の樹立効率の改善方法およびそのための薬剤に関する。より詳細には、本発明は、体細胞の核初期化工程においてp53の機能を阻害することによる、iPS細胞の樹立効率の改善方法、並びにp53の機能阻害物質を有効成分とするiPS細胞の樹立効率改善剤に関する。

【背景技術】

10

【0002】

発明の背景

近年、マウスおよびヒトのiPS細胞が相次いで樹立された。Yamanakaらは、Fbx15遺伝子座にネオマイシン耐性遺伝子をノックインしたレポーターマウス由来の線維芽細胞に、Oct3/4, Sox2, Klf4及びc-Myc遺伝子を導入し強制発現させることによって、iPS細胞を誘導した（1, 2）。Okitaら（3）は、Fbx15よりも多能性細胞に発現が限局しているNanogの遺伝子座に緑色蛍光タンパク質（GFP）及びピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウスを作製し、該マウス由来の線維芽細胞で上記4遺伝子を強制発現させ、ピューロマイシン耐性かつGFP陽性の細胞を選別することにより、遺伝子発現やエピジェネティック修飾が胚性幹（ES）細胞とほぼ同等のiPS細胞（Nanog iPS細胞）を樹立することに成功した。同様の結果が他のグループによっても再現された（4, 5）。その後、c-Myc遺伝子を除いた3因子によってもiPS細胞を作製できることが明らかとなった（6）。

20

【0003】

さらに、Yamanakaらは、ヒトの皮膚由来線維芽細胞にマウスと同様の4遺伝子を導入することにより、iPS細胞を樹立することに成功した（1, 7）。一方、Thomsonらのグループは、Klf4とc-Mycの代わりにNanogとLin28を使用してヒトiPS細胞を作製した（8, 9）。また、Parkら（10）は、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Mycの4因子に加えて、ヒト細胞不死化遺伝子として知られるTERTとSV40ラージT抗原を用いて、ヒトiPS細胞を作製した。このように、体細胞に特定因子を導入することにより、ヒト及びマウスで、分化多能性においてES細胞と遜色のないiPS細胞を作製できることが示された。

30

【0004】

しかし、iPS細胞の樹立効率は1%以下と低く、特に、iPS細胞から分化した組織や個体において腫瘍化が懸念されるc-Mycを除く3因子（Oct3/4, Sox2, Klf4）を体細胞に導入してiPS細胞を作製した場合、その樹立効率が極めて低いという問題点がある。

【0005】

引用文献：

1. WO 2007/069666 A1
2. Takahashi, K. and Yamanaka, S., Cell, 126: 663-676 (2006)
3. Okita, K. et al., Nature, 448: 313-317 (2007)
4. Wernig, M. et al., Nature, 448: 318-324 (2007)
5. Maherali, N. et al., Cell Stem Cell, 1: 55-70 (2007)
6. Nakagawa, M. et al., Nat. Biotechnol., 26: 101-106 (2008)
7. Takahashi, K. et al., Cell, 131: 861-872 (2007)
8. WO 2008/118820 A2
9. Yu, J. et al., Science, 318: 1917-1920 (2007)
10. Park, I.H. et al., Nature, 451: 141-146 (2008)

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

発明の要約

50

本発明の目的は、iPS細胞の樹立効率を改善する手段を提供することであり、それを用いた効率的なiPS細胞の製造方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、体細胞の核初期化工程においてp53の機能を阻害することにより、iPS細胞の樹立効率を顕著に増大させ得ることを見出した。特にヒト細胞において、その効果は顕著であった。また、従来に比してp53の機能を阻害することにより、3因子でも4因子の場合により近い樹立効率を得られた。さらに、従来iPS細胞を樹立するのが困難であるとされていたTリンパ球においても、p53の機能を欠損させることにより容易にiPS細胞を樹立することに成功して、本発明を完成するに至った。

10

【0008】

すなわち、本発明は以下の通りのものである。

[1] iPS細胞の樹立効率の改善方法であって、体細胞の核初期化工程においてp53の機能を阻害することを含む、方法。

[2] p53の化学的阻害物質を体細胞に接触させることによりp53の機能を阻害する、上記[1]記載の方法。

[3] p53のドミナントネガティブ変異体またはそれをコードする核酸を体細胞に接触させることによりp53の機能を阻害する、上記[1]記載の方法。

[4] p53に対するsiRNA、shRNAおよびそれらをコードするDNAからなる群より選択される核酸を体細胞に接触させることによりp53の機能を阻害する、上記[1]記載の方法。

20

[5] p53経路阻害物質を体細胞に接触させることによりp53の機能を阻害する、上記[1]記載の方法。

[6] p53の機能阻害物質を含有してなる、iPS細胞の樹立効率改善剤。

[7] 前記阻害物質が化学的阻害物質である、上記[6]記載の剤。

[8] 前記阻害物質がp53のドミナントネガティブ変異体またはそれをコードする核酸である、上記[6]記載の剤。

[9] 前記阻害物質がp53に対するsiRNA、shRNAおよびそれらをコードするDNAからなる群より選択される核酸である、上記[6]記載の剤。

[10] 前記阻害物質がp53経路阻害物質である、上記[6]記載の剤。

30

[11] 体細胞に核初期化物質およびp53の機能阻害物質を接触させることを含む、iPS細胞の製造方法。

[12] 前記阻害物質が化学的阻害物質である、上記[11]記載の方法。

[13] 前記阻害物質がp53のドミナントネガティブ変異体またはそれをコードする核酸である、上記[11]記載の方法。

[14] 前記阻害物質がp53に対するsiRNA、shRNAおよびそれらをコードするDNAからなる群より選択される核酸である、上記[11]記載の方法。

[15] 前記阻害物質がp53経路阻害物質である、上記[11]記載の方法。

[16] 核初期化物質がOct3/4、Klf4およびSox2、またはそれらをコードする核酸である、上記[11]記載の方法。

40

[17] 核初期化物質がOct3/4、Klf4、Sox2およびc-Myc、またはそれらをコードする核酸である、上記[11]記載の方法。

[18] 体細胞がT細胞である、上記[11]記載の方法。

[19] T細胞を初期化して得られる、T細胞抗原受容体（TCR）遺伝子が再構成されているiPS細胞。

[20] p53のドミナントネガティブ変異体またはp53に対するsiRNAもしくはshRNAをコードする外来性核酸を含む、iPS細胞。

【発明の効果】

【0009】

p53の機能阻害物質はiPS細胞の樹立効率を顕著に増大させることができるので、従来き

50

わめて樹立効率の低かったc-Mycを除く3因子によるiPS細胞誘導に特に有用である。c-Mycは再活性化による腫瘍発生が危惧されることから、3因子によるiPS樹立効率の改善を実現したことは、iPS細胞の再生医療への応用において極めて有用である。

【 0 0 1 0 】

また、最終分化したT細胞由来のiPS細胞はTCRが既に再構成されているので、特定の抗原を提示する細胞（例、癌細胞、感染細胞など）を認識するT細胞から誘導したiPS細胞を大量増幅して細胞傷害性T細胞（CTL）に再分化させれば、T細胞免疫療法剤として有用である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 1 1 】

10

図面の簡単な説明

【図1】図1は、p53欠損がiPS細胞の樹立に及ぼす影響について調べた結果を示す。図1(A)は4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc)を導入してiPS細胞を誘導した結果を、また図1(B)は3因子(Oct3/4, Sox2, Klf4)を導入してiPS細胞を誘導した結果を、それぞれ示す。図中「p53 + / -」はp53ヘテロ欠損細胞(コントロール)の結果を、また「p53 - / -」はp53ホモ欠損細胞の結果を示す。図中、縦軸はGFP陽性コロニー数を示す。グラフは3回の実験の合計を示した。

【図2】図2は、4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc)を感染させたp53ホモ欠損細胞から生じたGFP陽性コロニーを免疫不全マウスの皮下に注射し、テラトーマが形成されたことを示す写真である。

20

【図3】図3の(A)-(D)は、p53ドミナントネガティブ変異体(p53P275S)の導入がiPS細胞の樹立に及ぼす影響について調べた結果を示す。図3(A)は実験手順の概略を示す。図3(B)は4因子導入の結果を、また図3(C)は3因子導入の結果をそれぞれ示す。図中「P275S」はp53 P275Sを導入した結果を示す。また図中「DsRed」はDsRedExpressを、「p53」は変異を有さないワイルドタイプのp53を、それぞれp53P275Sの代わりに導入した結果を示す。縦軸はGFP陽性コロニー数を示す。図3(D)は各結果に対応するコロニーの写真を示す。図3の(E)-(G)は、p53ホモ欠損マウスに対するp53の導入がiPS細胞の樹立に及ぼす影響について調べた結果を示す。図3(E)は4因子導入の結果を、また図3(F)は3因子導入の結果をそれぞれ示す。図中「DsRed」はDsRedExpressを、「p53」はワイルドタイプのp53を導入した結果を示す。縦軸はGFP陽性コロニー数を示す。図3(G)は各結果に対応するコロニーの写真を示す。

30

【図4】図4は、p53阻害剤であるPifithrinによる処理が、iPS細胞の樹立に及ぼす影響について調べた結果を示す。図4(A)は実験手順の概略を、また図4(B)は実験結果を示す。図4(B)中「DMSO」はDMSO処理した結果(コントロール)を、また「Pifithrin, p-cyclic, nitro」はPifithrin処理した結果を示す。縦軸はGFP陽性コロニー数を示す。

【図5】図5は、4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc)を感染させたNanog-GFP/Trp53^{-/-}マウス由来のT細胞から生じたES様細胞が、GFP陽性であることを示す写真である。左図：位相差像、右図：GFP陽性コロニー像。図中、408E2、408E7、408E8はクローンの番号を示す。

【図6】図6は、4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc)を感染させたNanog-GFP/Trp53^{-/-}マウス由来のT細胞から生じたES様細胞が、ES細胞特異的遺伝子を発現していることを示すRT-PCRの写真である。図中、Oct3/4からZfp296まではES細胞マーカーであり、FasLからIfngまではT細胞のマーカーである。Nat1、Trim28はポジティブコントロールであり、Oct3/4 Tgからc-Myc Tgまでは導入した4因子の発現を確認したものである。また図中、「CD90+T」、「Spleen」は、それぞれiPS細胞誘導のソースとなったT細胞および脾臓を、7B3はFbx15 iPS細胞(Nature 448, 313-317(2007))を、38D2はNanog iPS細胞(Nature 448, 313-317(2007))を、それぞれ示す。

40

【図7】図7は、4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc)を感染させたNanog-GFP/Trp53^{-/-}マウス由来のT細胞から生じたES様細胞が、ES細胞のマーカーであるSSEA1陽性、Alkaline phosphatase陽性であることを示す写真である。

50

【図 8】図8は、4因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc) を感染させたNanog-GFP/Trp53^{-/-}マウス由来のT細胞から生じたES様細胞が、三胚葉系への分化能を有することを、AFP、GATA 4、 α -SMA、Desmin、 β -tubulinおよびGFAP抗体を用いた染色により確認した結果を示す写真である。

【図 9】図9は、p53ホモ欠損マウスより単離したMEFと、p53を欠損していない通常のマウスより単離したMEFとで、発現パターンに違いがあるかどうかを調べるために、DNAマイクロアレイ解析を行った結果を示すグラフである。(A) すべての遺伝子を検出、(B) ES細胞特異的発現遺伝子のみを検出、(C) 線維芽細胞(MEF)特異的発現遺伝子のみを検出。

【図 10】図10は、4因子 (Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc) を感染させたNanog-GFP/Trp53^{-/-}マウスのT細胞由来のES様細胞から生じたアダルトキメラマウスである。

【図 11】図11は、Tcr 遺伝子のV-(D)-J DNAの再構成をゲノムPCRにより確認した結果を示す写真である。図中「GL」はジャームラインのバンドを示す。

【図 12】図12は、4因子もしくは3因子によるp53-null MEFからのiPS作出を示す。(a) 3因子によって、p53ワイルドタイプ、ヘテロ接合性、又はホモ接合性のNanog-GFPレポーターMEFからiPS細胞が作出された。レトロウイルスの遺伝子導入後、5000個の生細胞をフローサイトメーターにより採取した。遺伝子導入後28日目にGFP陽性コロニーを数え、グラフの上部に示した。3回の独立した実験のデータを示す。(b) 96 wellプレートのウェル中にソーティングした単一の細胞から、3因子によってiPS細胞が作出された。遺伝子導入後28日目にGFP陽性コロニーを数えた。3回の独立した実験のデータを示す。(c) 96 wellプレートのウェル中にソーティングした単一の細胞から、c-Mycを含む4因子によってiPS細胞が作出された。遺伝子導入後21日目にGFP陽性コロニーを数えた。3回の独立した実験のデータを示す。

【図 13】図13は、3因子をワイルドタイプまたは変異体のp53と共遺伝子導入することによりp53ヘテロ接合性またはホモ接合性MEFから発生したiPSを示す。(a) ドミナントネガティブp53変異体 (P275S) またはワイルドタイプを発現するレトロウイルスを3因子と共に、Oct3/4-GFP、p53ヘテロ接合性MEFに遺伝子導入した。レトロウイルスの遺伝子導入後、5000個の細胞を採取し、遺伝子導入後28日目にGFP陽性コロニーを数えた。3回の独立した実験のデータを示す。(b) ワイルドタイプまたは変異体のp53を発現するレトロウイルスを3因子と共に、Nanog-GFP、p53ホモ接合性MEFに遺伝子導入した。レトロウイルスの遺伝子導入後、5000個の生細胞を採取し、遺伝子導入後28日目にGFP陽性コロニーを数えた。2回の独立した実験のデータを示す。

【図 14】図14~16は、p53ヘテロ接合性またはホモ接合性MEFに由来するiPS細胞の特徴を示す。図14は、3因子または4因子によるNanog-GFP、p53-null MEF由来のiPS細胞の位相差像 (上) および蛍光像 (下) を示す。バーは100 μ mを示す。

【図 15】図15は、ES細胞マーカー遺伝子、p53および4因子の発現のRT-PCR解析を示す。特異的プライマー対を用いることにより、4因子の総発現量、内在性発現量および導入遺伝子発現量が区別された。

【図 16】図16は、3因子(a)または4因子(b)でのp53-null iPS細胞由来のテラトーマの組織学的検査を示す。(a) 神経組織 (左上)、軟骨 (右上)、筋肉 (左下)、腸管様上皮組織 (右下) のヘマトキシリン - エオシン染色を示す。(b) 未分化細胞 (上) および神経組織 (下) のヘマトキシリン - エオシン染色を示す。

【図 17】図17~20は、p53抑制により促進されたヒトiPS細胞の発生効率を示す。図17は、4因子または3因子によりHDFから発生したiPSに対する変異体p53の共遺伝子導入の効果を示す。P275SまたはDDを発現するレトロウイルスベクターを、4初期化因子または3初期化因子と共にHDFに遺伝子導入した。4因子によるiPS細胞コロニーの数 (a)、 5×10^3 HDFから) および3因子によるiPS細胞コロニーの数 (b)、 4×10^4 HDFから) を示す。図17cは、3初期化因子およびp53 DD変異体で発生したヒトiPS細胞由来のテラトーマを示す。神経組織 (左上)、軟骨 (右上)、筋肉 (左下)、腸管様上皮組織 (右下) のヘマトキシリン - エオシン染色を示す。

【図 18】図18は、p53 shRNAによるp53生成抑制を示す。P53 shRNAまたはコントロールR

10

20

30

40

50

NAのレトロウイルスベクターをHDFに遺伝子導入した。遺伝子導入後6日目に、ウェスタンブロッティング解析によりp53タンパク質レベルを調べた。

【図19】図19は、4因子によりHDFから発生したiPSに対するp53 shRNA共遺伝子導入の効果を示す。p53 shRNAまたはコントロールRNAを発現するレトロウイルスベクターを、4初期化因子と共にHDFに遺伝子導入した。RNAi介在性ノックダウンをレスキューするため、マウスp53のレトロウイルスベクターを共導入した。4回の実験におけるiPSコロニーの数を示す。

【図20】図20は、3因子によりHDFから発生したiPSに対するp53 shRNA共遺伝子導入の効果を示す。p53 shRNAまたはコントロールRNAを発現するレトロウイルスベクターを、3初期化因子と共にHDFに遺伝子導入した。RNAi介在性ノックダウンをレスキューするため、マウスp53のレトロウイルスベクターを共導入した。2回の実験における、 5×10^4 HDF(a) または 5×10^5 HDF(b) からのiPSコロニーの数を示す。

【図21】図21は、4初期化因子または3初期化因子によりHDFから発生したiPSに対するMDM2共遺伝子導入の効果を示す。MDM2、p53 shRNAもしくはRB shRNAを発現するレトロウイルスベクターまたはコントロールベクターを、4因子(a)もしくは3因子(b)と共にHDFに遺伝子導入した。 5×10^4 細胞のHDFからのiPSコロニーの数を示す。

【図22】図22は、iPSクローンから分化した細胞における内胚葉-(AFP)、中胚葉-(α -SMA)および外胚葉-(β -tubulin)分化マーカーの発現を示した写真を示す。

【図23】図23は、未分化細胞(U)および胚様体形成後の分化細胞(D)におけるマーカー遺伝子の発現を示す。「Mock」は、空のベクター(pMK0.1-puro)と3初期化因子との共遺伝子導入を示す。「p53 shRNA-2」は、p53 shRNA-2と3初期化因子との共遺伝子導入を示す。

【図24】図24は、p21およびMycに対するp53抑制の効果を示す。p53抑制により制御された遺伝子(増加した4遺伝子および減少した7遺伝子)を、4初期化因子(a)または4初期化因子およびp53 shRNA(b)と共にHDFに導入した。遺伝子導入後24日目(a)または28日目(b)に、iPS細胞コロニーの数を数えた。*; DsRedコントロールと比較して $p < 0.01$ ($n=3$)。p53もしくはMycの反応性エレメントを含むルシフェラーゼレポーター、またはポリメラーゼIIプロモーターにより駆動されるルシフェラーゼレポーターを、mockレトロウイルスベクター、p53 shRNA、4初期化因子、またはMycを除いた3因子と共に、HDFに導入した。2日後、ルシフェラーゼ活性を調べた(c)。*; mockコントロールと比較して $p < 0.01$ 、*; mockコントロールと比較して $p < 0.05$ ($n=3$)。

【図25】図25aは、実験手順の概要を示す。図25bは、4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を導入した結果を示す。図中、「+/+」はワイルドタイプ細胞(コントロール)の結果を示し、「-/-」はp53ホモ欠損細胞の結果を示す。図における縦軸は、GFP陽性コロニーの数を示す。図25cは、プラスミドDNAのゲノム中への組込みを調べた結果を示す(上図:ゲノムPCR、下図:サザンブロッティング解析)。図25dは、得られた細胞の写真(左上:位相差像、右上:GFP陽性コロニー像、左下:位相差像とGFP陽性コロニー像とのマージ)と、得られたES様細胞から生じたキメラマウス(右下図)とを示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

発明の詳細な説明

本発明は、体細胞の核初期化工程においてp53の機能を阻害することによる、iPS細胞の樹立効率の改善方法を提供する。p53の機能を阻害する手段は特に制限されないが、好ましくは、体細胞にp53の機能阻害物質を接触させる方法が挙げられる。

【0013】

本明細書において「p53の機能阻害物質」とは、(a)p53タンパク質の機能もしくは(b)p53遺伝子の発現を阻害し得る限り、いかなる物質であってもよい。すなわち、p53タンパク質に直接作用してその機能を阻害する物質や、p53遺伝子に直接作用してその発現を阻害する物質のみならず、p53のシグナル伝達に関与する因子に作用することにより、結果的にp53タンパク質の機能やp53遺伝子の発現を阻害する物質も、本明細書における「p53の

機能阻害物質」に含まれる。

【 0 0 1 4 】

p53タンパク質の機能を阻害する物質としては、例えば、p53の化学的阻害物質、p53のドミナントネガティブ変異体もしくはそれをコードする核酸、抗p53アンタゴニスト抗体もしくはそれをコードする核酸、p53応答エレメントのコンセンサス配列を含むデコイ核酸、p53経路を阻害する物質などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、p53の化学的阻害物質、p53のドミナントネガティブ変異体もしくはそれをコードする核酸、p53経路阻害物質が挙げられる。

【 0 0 1 5 】

(a1) p53の化学的阻害物質

p53の化学的阻害物質としては、例えば、WO 00/44364に開示されるpifithrin (PFT) - 及び- に代表されるp53阻害剤、Stormら (Nat. Chem. Biol. 2, 474 (2006)) に開示されるPFT- μ 、それらの類縁体及びそれらの塩 (例えば、塩酸塩、臭素酸塩等の酸付加塩など) 等が挙げられるが、これらに限定されない。これらのうち、PFT- 及びその類縁体 [2-(2-Imino-4,5,6,7-tetrahydrobenzothiazol-3-yl)-1-p-tolyloethanone, HBr (製品名: Pifithrin-)] 及び1-(4-Nitrophenyl)-2-(4,5,6,7-tetrahydro-2-imino-3(2H)-benzothiazolyl)ethanone, HBr (製品名: Pifithrin-, p-Nitro)]、PFT- 及びその類縁体 [2-(4-Methylphenyl)imidazo[2,1-b]-5,6,7,8-tetrahydrobenzothiazole, HBr (製品名: Pifithrin-, Cyclic)] 及び2-(4-Nitrophenyl)imidazo[2,1-b]-5,6,7,8-tetrahydrobenzothiazole (製品名: Pifithrin-, p-Nitro, Cyclic)]、PFT- μ [Phenylacetylenylsulfonamide (製品名: Pifithrin- μ)] は、Merck社より市販されている。

【 0 0 1 6 】

体細胞へのp53の化学的阻害物質の接触は、該阻害物質を適当な濃度で水性もしくは非水性溶媒に溶解し、ヒトまたはマウスより単離した体細胞の培養に適した培地 (例えば、約5~20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地 (MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、RPMI1640培地、199培地、F12培地など) 中に、阻害物質濃度がp53の機能阻害に十分で且つ細胞毒性がみられない範囲となるように該阻害物質溶液を添加して、細胞を一定期間培養することにより実施することができる。阻害物質濃度は用いる阻害物質の種類によって異なるが、約0.1nM~約100nMの範囲で適宜選択される。接触期間は細胞の核初期化が達成されるのに十分な時間であれば特に制限はないが、通常は、多能性マーカー陽性コロニーが出現するまで培地に共存させておけばよい。

【 0 0 1 7 】

p53遺伝子は癌抑制遺伝子として知られており、p53の恒常的な機能阻害は発癌のリスクを高める可能性がある。p53の化学的阻害物質は、培地に添加するだけで細胞への導入が可能であるという利点に加えて、iPS細胞の誘導後に該阻害物質を含む培地を除去することにより、容易かつ迅速にp53の機能阻害を解除できる点でも極めて有用である。

【 0 0 1 8 】

(a2) p53のドミナントネガティブ変異体

p53のドミナントネガティブ変異体としては、体細胞に内在的に発現する野生型p53タンパク質と競合的に作用して、その機能を阻害し得る限り特に制限はないが、例えば、マウスp53のDNA結合領域に位置する275位 (ヒトの場合は278位) のプロリンをセリンに点変異させたp53P275S (de Vries, A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 2948-2953 (2002))、マウスp53の14-301位 (ヒトp53では11-304位に対応) のアミノ酸を欠失させたp53DD (Bowman, T., Genes Develop., 10, 826-835 (1996)) などが挙げられる。その他にも、例えば、マウスp53の58位 (ヒトの場合は61位) のセリンをアラニンに点変異させたp53S58A、ヒトp53の135位 (マウスの場合は132位) のシステインをチロシンに点変異させたp53C135Y、マウスp53の135位 (ヒトの場合は138位) のアラニンをパリンに点変異させたp53A135V、172位 (ヒトの場合は175位) のアルギニンをヒスチジンに点変異させたp53R172H、270位 (ヒトの場合は273位) のアルギニンをヒスチジンに点変異させたp53R270H、マウスp53の278位 (ヒトの場合は281位) のアスパラギン酸をアスパラギンに点変異させたp53D278

10

20

30

40

50

Nなどが知られており、同様に使用することができる。

【0019】

p53のドミナントネガティブ変異体は、例えば、以下の手法により得ることができる。まず、配列番号1または3に示されるマウスまたはヒトのp53 cDNA配列情報に基づいて適当なオリゴヌクレオチドをプローブもしくはプライマーとして合成し、マウスまたはヒトの細胞・組織由来のmRNA、cDNAもしくはcDNAライブラリーから、ハイブリダイゼーション法や(RT-)PCR法を用いてマウスまたはヒトp53 cDNAをクローニングし、適当なプラスミドにサブクローニングする。変異を導入しようとする部位のコードン(例えば、p53P275Sの場合、配列番号1に示される塩基配列中塩基番号951-953で示されるcct)を所望の他のアミノ酸をコードするコードン(例えば、p53P275Sの場合、tct)に置換した形で、当該部位を含むプライマーを合成し、これを用いてp53 cDNAを挿入したプラスミドを鋳型とするインバースPCRを行うことにより、目的のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸を取得する。p53DDのような欠失変異体の場合には、欠失させる部位の外側にプライマーを設計して、同様にインバースPCRを行えばよい。このようにして得られたドミナントネガティブ変異体をコードする核酸を宿主細胞に導入し、培養した細胞又はその馴化培地から組換えタンパク質を回収することにより、所望のドミナントネガティブ変異体を取得することができる。

10

【0020】

体細胞へのドミナントネガティブ変異体の接触は、自体公知の細胞へのタンパク質導入方法を用いて実施することができる。そのような方法としては、例えば、タンパク質導入試薬を用いる方法、タンパク質導入ドメイン(PTD)-又は細胞膜透過ペプチド(CPP)-融合タンパク質を用いる方法、マイクロインジェクション法などが挙げられる。タンパク質導入試薬としては、カチオン性脂質をベースとしたBioPOTER Protein Delivery Reagent (Gene Therapy Systems)、Pro-Ject™ Protein Transfection Reagent (PIERCE)及びProVectin (IMGENEX)、脂質をベースとしたProfect-1 (Targeting Systems)、膜透過性ペプチドをベースとしたPenetratin Peptide (Q biogene)及びChariot Kit (Active Motif)、HVJエンベロープ(不活化センダイウイルス)を利用したGenomONE(石原産業)等が市販されている。導入はこれらの試薬に添付のプロトコルに従って行うことができるが、一般的な手順は以下の通りである。p53のドミナントネガティブ変異体を適当な溶媒(例えば、PBS、HEPES等の緩衝液)に希釈し、導入試薬を加えて室温で5-15分程度インキュベートして複合体を形成させ、これを無血清培地に交換した細胞に添加して37℃で1ないし数時間インキュベートする。その後培地を除去して血清含有培地に交換する。

20

30

【0021】

PTDとしては、ショウジョウバエ由来のAntP、HIV由来のTAT (Frankel, A. et al, Cell 55,1189-93 (1988)又はGreen, M. & Loewenstein, P. M. Cell 55, 1179-88 (1988))、Penetratin (Derossi, D. et al, J. Biol. Chem. 269, 10444-50 (1994))、Buforin I (Park, C. B. et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA 97, 8245-50 (2000))、Transportan (Pooga, M. et al. FASEB J. 12, 67-77 (1998))、MAP (model amphipathic peptide) (Oehlke, J. et al. Biochim. Biophys. Acta. 1414, 127-39 (1998))、K-FGF (Lin, Y. Z. et al. J. Biol. Chem. 270, 14255-14258 (1995))、Ku70 (Sawada, M. et al. Nature Cell Biol. 5, 352-7 (2003))、Prion (Lundberg, P. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 299, 85-90 (2002))、pVEC (Elmqvist, A. et al. Exp. Cell Res. 269, 237-44 (2001))、Pep-1 (Morris, M. C. et al. Nature Biotechnol. 19, 1173-6 (2001))、Pep-7 (Gao, C. et al. Bioorg. Med. Chem. 10, 4057-65 (2002))、SynBI (Rouselle, C. et al. Mol. Pharmacol. 57, 679-86 (2000))、HN-1 (Hong, F. D. & Clayman, G L. Cancer Res. 60, 6551-6 (2000))、及びHSV由来のVP22等のタンパク質の細胞通過ドメインを用いたものが開発されている。PTD由来のCPPとしては、11R (Cell Stem Cell, 4:381-384 (2009))及び9R (Cell Stem Cell, doi:10.1016/j.stem.2009.05.005 (2009))のようなポリアルギニンが挙げられる。p53のドミナントネガティブ変異体のcDNAとPTD又はCPP配列とを組み込んだ融合タンパク質発現ベクターを作製して組換え発現させ、融合タンパク

40

50

質を回収して導入に用いる。導入は、タンパク質導入試薬を添加しない以外は上記と同様にして行うことができる。

【0022】

マイクロインジェクションは、先端径1 μ m程度のガラス針にタンパク質溶液を入れ、細胞に穿刺導入する方法であり、確実に細胞内にタンパク質を導入することができる。

【0023】

上述のように、p53の恒常的な機能阻害は発癌のリスクを高める可能性があるが、p53のドミナントネガティブ変異体は、導入された細胞内でプロテアーゼによる分解を受けて徐々に消失し、それに応じて細胞に内在するp53の機能が回復することから、該変異体タンパク質の使用は、得られるiPS細胞を治療用途で利用する場合のように、高度な安全性を要求される場合に好適であり得る。

【0024】

(a3) p53のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸

しかしながら、体細胞への導入の容易さを考慮すると、p53のドミナントネガティブ変異体は、タンパク質自体としてよりも、それをコードする核酸の形態で用いることがむしろ好ましい。したがって、本発明の別の好ましい実施態様において、p53機能阻害物質は、p53のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸である。該核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよいが、好ましくはDNAである。また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。p53のドミナントネガティブ変異体をコードするcDNAは、該変異体タンパク質の作製について上記した手法によりクローニングすることができる。

【0025】

単離されたcDNAは、目的の体細胞で機能し得るプロモーターを含む適当な発現ベクターに挿入される。発現ベクターとしては、例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクター、動物細胞発現プラスミド（例、pA1-11, pXT1, pRc/CMV, pRc/RSV, pcDNA1/Neo）などが用いられ得る。用いるベクターの種類は、得られるiPS細胞の用途に応じて適宜選択することができる。

【0026】

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

【0027】

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

【0028】

p53のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸を含む発現ベクターは、ベクターの種類に応じて、自体公知の手法により細胞に導入することができる。例えば、ウイルスベクターの場合、p53のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸を含むプラスミドを適当なパッケージング細胞（例、Plat-E細胞）や相補細胞株（例、293細胞）に導入して、培養上清中に産生されるウイルスベクターを回収し、各ウイルスベクターに応じた適切な方法により、該ベクターを細胞に感染させる。例えば、ベクターとしてレトロウイルスベクターを用いる具体的手段が WO2007/69666、Cell, 126, 663-676 (2006) 及び Cell, 131, 861-872 (2007) に開示されており、ベクターとしてレンチウイルスベクターを用いる場合については、Science, 318, 1917-1920 (2007) に開示がある。iPS細胞を治療用

10

20

30

40

50

途に利用する場合、p53の恒常的な機能障害は、iPS細胞から分化させた組織や臓器における発癌リスクを高める可能性があるので、p53のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸は細胞の染色体に組み込まれず、一過的に発現することが好ましい。かかる観点からは、染色体への組込みが稀なアデノウイルスベクターの使用が好ましい。アデノウイルスベクターを用いる具体的手段は、Science, 322, 945-949 (2008) に開示されている。また、アデノ随伴ウイルスも染色体への組込み頻度が低く、アデノウイルスベクターと比べて細胞毒性や炎症惹起作用が低いので、別の好ましいベクターとして挙げられる。持続発現型センダイウイルスベクターは染色体外で安定に存在することができ、必要に応じてsiRNAにより分解除去することができるので、同様に好ましく利用され得る。持続発現型センダイウイルスベクターについては、J. Biol. Chem., 282, 27383-27391 (2007) に記載のものをを用いることができる。

10

【0029】

レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターを用いる場合は、いったん導入遺伝子のサイレンシングが起こったとしても、後に再活性化される可能性があるので、例えば、Cre/loxPシステムを用いて、不要となった時点でp53のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸を切り出す方法が好ましく用いられ得る。即ち、該核酸の両端にloxP配列を配置しておき、iPS細胞が誘導された後で、プラスミドベクターもしくはアデノウイルスベクターを用いて細胞にCreリコンビナーゼを作用させ、loxP配列に挟まれた領域を切り出すことができる。また、LTR U3領域のエンハンサー - プロモーター配列は、挿入突然変異によって近傍の宿主遺伝子を上方制御する可能性があるので、当該配列を欠失、もしくはSV40などのポリアデニル化配列で置換した3' - 自己不活性化 (SIN) LTRを使用して、切り出されずゲノム中に残存するloxP配列より外側のLTRによる内因性遺伝子の発現制御を回避することがより好ましい。Cre-loxPシステムおよびSIN LTRを用いる具体的手段は、Chang et al., Stem Cells, 27: 1042-1049 (2009) に開示されている。

20

【0030】

一方、非ウイルスベクターであるプラスミドベクターの場合には、リポフェクション法、リポソーム法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃法などを用いて該ベクターを細胞に導入することができる。プラスミドベクターを用いる場合も染色体への組込みは稀であり、導入遺伝子は細胞内のDNaseにより分解除去されることから、iPS細胞を治療用途に利用する場合には、好ましい実施態様の1つとなり得る。ベクターとしてプラスミドを用いる具体的手段は、例えばScience, 322, 949-953 (2008) 等に記載されている。

30

【0031】

別の好ましい非組込み型ベクターは、染色体外で自己複製するエピソーマルベクターである。エピソーマルベクターを用いる具体的手段は、Science, 324, 797-801 (2009) に開示されている。

【0032】

尚、アデノウイルスやプラスミドを用いる場合でも、導入遺伝子が染色体に組み込まれることがあるので、結局はサザンブロットやPCRにより染色体への遺伝子挿入がないことを確認する必要がある。そのため、上記Cre-loxPシステムのように、いったん染色体に導入遺伝子を組み込んだ後に、該遺伝子を除去する手段を用いることは好都合であり得る。別の好ましい一実施態様においては、トランスポゾンを用いて染色体に導入遺伝子を組み込んだ後に、プラスミドベクターもしくはアデノウイルスベクターを用いて細胞に転移酵素を作用させ、導入遺伝子を完全に染色体から除去する方法が用いられ得る。好ましいトランスポゾンとしては、例えば、鱗翅目昆虫由来のトランスポゾンであるpiggyBac等が挙げられる。piggyBacトランスポゾンを用いる具体的手段は、Kaji et al., Nature advance online publication 1 March 2009 (doi:10.1038/nature07864)、Woltjen et al., Nature advance online publication 1 March 2009 (doi:10.1038/nature07863) に開示されている。別の一実施態様においては、プロモーター領域内のテトラサイクリン応答エレメント (Tet-OnR & Tet-Off R Gene Expression system, Clontech) が導入遺伝子の除去に

40

50

用いられ得る。

【 0 0 3 3 】

(a4) p53経路阻害物質

ここでp53経路とは、p53を活性化し得るあらゆる上流のシグナルカスケードおよび活性化p53によって媒介されるあらゆる下流のシグナルカスケードを包含する意味で用いられる。したがって、p53経路阻害物質には、上記シグナル伝達経路のいずれかを阻害するいかなる物質も含まれるが、好ましい一実施態様においては、p53経路阻害物質はp53によりその転写が活性化されるp21の発現もしくは機能（Myc阻害活性）を阻害する物質であり、例えば、p21に対するsiRNA、shRNA、アンチセンス核酸、リボザイム等が挙げられる。p21の発現を阻害するこれらの核酸は、後記p53に対するsiRNA、shRNA、アンチセンス核酸、リボザイムと同様の方法により設計・合成し、体細胞に導入することができる。当該核酸は、それらを発現するベクターの形態で提供されてもよく、該ベクターは、後記p53に対するsiRNA、shRNA、アンチセンス核酸、リボザイムを発現するベクターと同様の方法により構築し、体細胞に導入することができる。

10

【 0 0 3 4 】

別の好ましい一実施態様においては、p53経路阻害物質はARF-MDM2-p53経路を阻害する物質であり、例えば、ARF-MDM2-p53経路阻害物質として、p53に直接結合してその核外輸送やユビキチン化を促進するMDM2もしくはそれをコードする核酸、p53へのMDM2の作用を阻害するp19^{ARF}やATM (ataxia-telangiectasia mutated) の発現もしくは機能を阻害する物質（例えば、これらの因子に対するsiRNAやshRNA）等が挙げられる。

20

【 0 0 3 5 】

(a5) その他の物質

p53タンパク質の機能を阻害するその他の物質として、例えば、抗p53アンタゴニスト抗体もしくはそれをコードする核酸が挙げられる。抗p53アンタゴニスト抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。抗体のアイソタイプは特に限定されないが、好ましくはIgG、IgMまたはIgA、特に好ましくはIgGが挙げられる。また、該抗体は、完全抗体分子の他、例えばFab、Fab'、F(ab')₂等のフラグメント、scFv、scFv-Fc、ミニボディー、ダイアボディー等の遺伝子工学的に作製されたコンジュゲート分子、あるいはポリエチレングリコール（PEG）等の蛋白質安定化作用を有する分子等で修飾されたそれらの誘導体などであってもよい。抗p53アンタゴニスト抗体は、p53またはその部分ペプチドを抗原として用い、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。また、公知の抗p53アンタゴニスト抗体として、例えば、PAb1801 (Oncogene Science Ab-2) 及びDO-1 (Oncogene Science Ab-6) (Gire and Wynford-Thomas, Mol. Cell. Biol., 18, 1611-1621 (1998)) 等が挙げられる。抗p53アンタゴニスト抗体をコードする核酸は、抗p53モノクローナル抗体産生ハイブリドーマから常法により単離することができる。得られるH鎖及びL鎖遺伝子を連結して単鎖抗体をコードする核酸を作製することもできる。好ましくは、これらの抗体は上記PTD又はCPPに結合する。

30

【 0 0 3 6 】

p53タンパク質の機能を阻害する別の物質として、抗p21アンタゴニスト抗体もしくはそれをコードする核酸が挙げられる。抗p21アンタゴニスト抗体及びそれをコードする核酸も、上記抗p53アンタゴニスト抗体及びそれをコードする核酸と同様にして作製することができる。

40

【 0 0 3 7 】

p53タンパク質の機能を阻害するさらに別の物質は、p53応答エレメントのコンセンサス配列（例、Pu-Pu-Pu-G-A/T-T/A-C-Py-Py-Py (Pu: プリン塩基, Py: ピリミジン塩基); 配列番号27) を含むデコイ核酸である。このような核酸は上記塩基配列情報に基づいてDNA/RNA自動合成機で合成することができる。あるいはそのようなデコイ核酸は市販されている（例、p53 transcription factor decoy (GeneDetect.com)）。

【 0 0 3 8 】

抗p53アンタゴニスト抗体及び抗p21アンタゴニスト抗体はp53のドミナントネガティブ

50

変異体と同様に、また、該抗体をコードする核酸は該変異体をコードする核酸と同様にし、それぞれ細胞に導入することができる。また、上記デコイ核酸は、リポフェクション法などにより細胞に導入することができる。

【 0 0 3 9 】

一方、p53遺伝子の発現を阻害する物質としては、例えば、p53に対するsiRNAもしくはshRNA、p53に対するsiRNAもしくはshRNAを発現するベクター、p53に対するアンチセンス核酸及びp53に対するリボザイム等が挙げられるが、好ましくはp53に対するsiRNA、shRNA及びsiRNA、shRNAを発現するベクターである。

【 0 0 4 0 】

(b1) p53に対するsiRNA及びshRNA

p53に対するsiRNAは、配列番号1または3に示されるマウスまたはヒトのp53 cDNA配列情報に基づいて、例えば、Elbashirら (Genes Dev., 15, 188-200 (2001)) の提唱する規則に従って設計することができる。siRNAの標的配列としては、原則的にはAA+(N)19であるが、AA+(N)21もしくはNA+(N)21であってもよい。また、センス鎖の5'末端がAAである必要はない。標的配列の位置は特に制限されるわけではないが、5'-UTR及び開始コドンから約50塩基まで、並びに3'-UTR以外の領域から標的配列を選択することが望ましい。標的配列のGC含量も特に制限はないが、約30-約50%が好ましく、GC分布に偏りがなく繰り返しが少ない配列が望ましい。尚、下記(b2)のsiRNAもしくはshRNAを発現するベクターの設計において、プロモーターとしてpolIII系プロモーターを使用する場合、ポリメラーゼの転写が停止しないように、4塩基以上TまたはAが連続する配列は選択しないようにすべきである。

【 0 0 4 1 】

上述の規則に基づいて選択された標的配列の候補群について、標的以外のmRNAにおいて16-17塩基の連続した配列に相同性がないかどうかを、BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 等のホモロジー検索ソフトを用いて調べ、選択した標的配列の特異性を確認する。特異性の確認された標的配列について、AA (もしくはNA) 以降の19-21塩基にTTもしくはUUの3'末端オーバーハングを有するセンス鎖と、該19-21塩基に相補的な配列及びTTもしくはUUの3'末端オーバーハングを有するアンチセンス鎖とからなる2本鎖RNAをsiRNAとして設計する。また、shRNAは、ループ構造を形成しうる任意のリンカー配列 (例えば、8-25塩基程度) を適宜選択し、上記センス鎖とアンチセンス鎖とを該リンカー配列を介して連結することにより設計することができる。

【 0 0 4 2 】

siRNA及び/又はshRNAの配列は、種々のwebサイト上に無料で提供される検索ソフトを用いて検索が可能である。このようなサイトとしては、例えば、いずれもAmbionが提供するsiRNA Target Finder (http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/siRNA_finder.html) 及びpSilencer™ Expression Vector用 インサート デザインツール (http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/pSilencer_converter.html)、RNAi Codexが提供するGeneSeer (<http://codex.cshl.edu/scripts/newsearchhairpin.cgi>) が挙げられるがこれらに限定されず、QIAGEN、タカラバイオ、SiSearch、Dharmacon、Whitehead Institute、Invitrogen、Promega等のwebサイト上でも同様に検索が可能である。

【 0 0 4 3 】

以下に、Ambion (配列番号5-24) およびRNAi Codex (配列番号25及び26) のwebサイト上で提供されるソフトウェアを用いて設計した、マウスp53に対するshRNA配列を示す。下線で示した配列がdicerで切断された後に生じるdsRNAのセンス鎖 (太字) 及びアンチセンス鎖である (3'-オーバーハング「TT」を含まない)。小文字はミスマッチまたはループを示す。

[配列番号5]

5' -TTTGACTGGATGACTGCCATGGttcaagagaCCATGGCAGTCATCCAGTCTTTTTT-3'

[配列番号6]

5' -TTTGATATCCTGCCATCACCTCttcaagagaGAGGTGATGGCAGGATATCTTTTTT-3'

[配列番号7]

5' - TTTGGCCCAAGTGAAGCCCTCCttcaagagaGGAGGGCTTCACTTGGGCCTTTTTT-3'

[配列番号8]

5' - TTTGTGAAGCCCTCCGAGTGTCttcaagagaGACACTCGGAGGGCTTCACTTTTTT-3'

[配列番号9]

5' - TTTGCCCTCCGAGTGTCAGGAGttcaagagaCTCCTGACACTCGGAGGGCTTTTTT-3'

[配列番号10]

5' - TTTGTCTGTTATGTGCACGTACttcaagagaGTACGTGCACATAACAGACTTTTTT-3'

[配列番号11]

5' - TTTGTACTCTCCTCCCTCAATttcaagagaATTGAGGGGAGGAGAGTACTTTTTT-3'

10

[配列番号12]

5' - TTTGCTATTCTGCCAGCTGGCGttcaagagaCGCCAGCTGGCAGAATAGCTTTTTT-3'

[配列番号13]

5' - TTTGACGTGCCCTGTGCAGTTGttcaagagaCAACTGCACAGGGCACGTCTTTTTT-3'

[配列番号14]

5' - TTTGAAGTCACAGCACATGACGttcaagagaCGTCATGTGCTGTGACTTCTTTTTT-3'

[配列番号15]

5' - TTTGTCACAGCACATGACGGAGttcaagagaCTCCGTCATGTGCTGTGACTTTTTT-3'

[配列番号16]

5' - TTTGGAAATTTGTATCCCGAGTttcaagagaACTCGGGATACAAATTTCTTTTTT-3'

20

[配列番号17]

5' - TTTGTACATGTGTAATAGCTCCttcaagagaGGAGCTATTACACATGTACTTTTTT-3'

[配列番号18]

5' - TTTGACTCCAGTGGGAACCTTCttcaagagaGAAGGTTCCCACTGGAGTCTTTTTT-3'

[配列番号19]

5' - TTTGTCTTTGCCCTGAACTGCttcaagagaGCAGTTCAGGGCAAAGGACTTTTTT-3'

[配列番号20]

5' - TTTGATCCGCGGGCGTAAACGCttcaagagaGCGTTTACGCCCCGCGGATCTTTTTT-3'

[配列番号21]

5' - TTTGACCAAGAAGGGCCAGTCTttcaagagaAGACTGGCCCTTCTTGGTCTTTTTT-3'

30

[配列番号22]

5' - TTTGAAAGTGGGGCCTGACTCAttcaagagaTGAGTCAGGCCCCACTTTCTTTTTT-3'

[配列番号23]

5' - TTTGTTGGGGAATAGTTGATAttcaagagaTATCAACCTATTCCCCAACTTTTTT-3'

[配列番号24]

5' - TTTGATTCTATCTTGGGCCCTCttcaagagaGAGGGCCCAAGATAGAATCTTTTTT-3'

[配列番号25]

5' - TTTGCAuTACAgGTACgTGTGTAggtgtgctgtccTACACATGTACTTGTAGTGTTTTTT-3'

[配列番号26]

5' - TTTGCAGTuTACTTuCCGCCgTAggtgtgctgtccTATGGCGGGAAGTAGACTGTTTTT-3'

40

【 0 0 4 4 】

p53に対するsiRNAは、上記のようにして設計されたセンス鎖及びアンチセンス鎖オリゴヌクレオチドをDNA/RNA自動合成機でそれぞれ合成し、例えば、適当なアニーリング緩衝液中、約90～約95 で約1分程度変性させた後、約30～約70 で約1～約8時間アニーリングさせることにより調製することができる。また、p53に対するshRNAは、上記のようにして設計されたshRNA配列を有するオリゴヌクレオチドをDNA/RNA自動合成機で合成し、上記と同様にしてセルフアニーリングさせることによって調製することができる。

【 0 0 4 5 】

siRNA及びshRNAを構成するヌクレオチド分子は、天然型のRNAでもよいが、安定性（化学的および/または対酵素）や比活性（mRNAとの親和性）を向上させるために、種々の化

50

学修飾を含むことができる。例えば、ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、siRNAもしくはshRNAを構成する各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）を、例えば、ホスホロチオエート（PS）、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾リン酸残基に置換することができる。また、各ヌクレオチドの糖（リボース）の2'位の水酸基を、-H又は-OR（Rは、例えばCH₃（2'-O-Me）、CH₂CH₂OCH₃（2'-O-MOE）、CH₂CH₂NHC(NH)NH₂、CH₂CONHCH₃、CH₂CH₂CN等を示す）に置換してもよい。さらに、塩基部分（ピリミジン、プリン）に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基やカチオン性官能基の導入、あるいは2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換などが挙げられる。

【0046】

10

RNAの糖部のコンフォーメーションはC2'-endo（S型）とC3'-endo（N型）の2つが支配的であり、一本鎖RNAではこの両者の平衡として存在するが、二本鎖を形成するとN型に固定される。したがって、標的RNAに対して強い結合能を付与するために、2'酸素と4'炭素を架橋することにより、糖部のコンフォーメーションをN型に固定したRNA誘導体であるBNA（LNA）（Imanishi, T. et al., Chem. Commun., 1653-9, 2002; Jepsen, J.S. et al., Oligonucleotides, 14, 130-46, 2004）やENA（Morita, K. et al., Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 22, 1619-21, 2003）もまた、好ましく用いられ得る。

【0047】

但し、天然型RNA中のすべてのリボヌクレオシド分子を修飾型で置換すると、RNAi活性が失われる場合があるので、RISC複合体が機能できる最小限の修飾ヌクレオシドの導入が必要である。

20

【0048】

p53に対するsiRNAは、例えば、Ambion（例、Ambion Cat# AM16708, siRNA ID# 69659, 69753, 69843, 187424, 187425, 187426）やSanta Cruz（例、Santa Cruz Cat# sc-29436, 44219）等から購入することもできる。

【0049】

また、ヒトp53に対するsiRNAおよびshRNAも、上記のいずれかの検索ソフトを用いて、配列番号3に示されるヒトp53 cDNAの配列もしくはRefseq. No.（NM_000546）等をクエリーとして入力することにより設計し、合成することができ、あるいはAmbion等から購入することもできる。具体的には、配列5'-GACTCCAGTGGTAATCTACTGCTCGAGCAGTAGATTACCACTGGAGTC-3'（配列番号28；太字がp53のターゲット配列。下線部がdsRNAを形成する部分）を有するヒトp53に対するshRNA、Science, 296, 550-553（2002）に記載されるp53に対するshRNAなどが例示される。

30

【0050】

p53に対するsiRNAもしくはshRNAの体細胞への接触は、プラスミドDNAの場合と同様に、リポソーム法、ポリアミン法、エレクトロポレーション法、ビーズ法等を用いて、該核酸を細胞内へ導入することにより実施することができる。カチオニックリポソームを用いた方法が最も一般的で、導入効率も高い。Lipofectamine2000やOligofectamine（Invitrogen）などの一般的な遺伝子導入試薬の他、例えば、GeneEraserTM siRNA transfection reagent（Stratagene）等のsiRNA導入に適した導入試薬も市販されている。

40

【0051】

(b2) p53に対するsiRNAもしくはshRNAを発現するベクター

siRNAを発現するベクターには、タンデムタイプとステムループ（ヘアピン）タイプとがある。前者はsiRNAのセンス鎖の発現カセットとアンチセンス鎖の発現カセットをタンデムに連結したもので、細胞内で各鎖が発現してアニーリングすることにより2本鎖のsiRNA（dsRNA）を形成するというものである。一方、後者はshRNAの発現カセットをベクターに挿入したもので、細胞内でshRNAが発現しdicerによるプロセッシングを受けてdsRNAを形成するというものである。プロモーターとしては、pol III系プロモーター（例えば、CMV前初期プロモーター）を使用することもできるが、短いRNAの転写を正確に行わせるために、pol III系プロモーターを使用するのが一般的である。pol III系プロモーターとしては、

50

マウスおよびヒトのU6-siRNAプロモーター、ヒトH1-RNase P RNAプロモーター、ヒトバリン-tRNAプロモーターなどが挙げられる。また、転写終結シグナルとして4個以上Tが連続した配列が用いられる。

【0052】

このようにして構築したsiRNAもしくはshRNA発現カセットを、次いでプラスミドベクターやウイルスベクターに挿入する。このようなベクターとしては、p53のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸について上記したと同様のものが、好ましく利用され得る（レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクターや、動物細胞発現プラスミドなど）。使用するベクターは、ドミナントネガティブ変異体の場合と同様、得られるiPS細胞の用途に応じて適宜選択され得る。あるいは、p53に対するshRNAをコードする発現ベクターとして、市販のプラスミド（例えば、Addgene社から市販されるpMKO.1-puro p53 shRNA2: #10672等）をもとに作製したレトロウイルス等のウイルスベクターなどを使用することもできる。必要に応じて、上記Cre-loxPシステムやpiggyBacトランスポゾンシステムを利用することもできる。

10

【0053】

p53に対するsiRNAもしくはshRNAを発現するベクターの体細胞への接触は、上記のようにして調製されるプラスミドベクターもしくはウイルスベクターを細胞に導入することにより行われる。これらの遺伝子導入は、p53のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸について上記したと同様の手法で行うことができる。

20

【0054】

(b3) その他の物質

p53遺伝子の発現を阻害する他の物質として、p53に対するアンチセンス核酸やリボザイムが挙げられる。

【0055】

アンチセンス核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよい。アンチセンス核酸がDNAの場合、標的RNAとアンチセンスDNAとによって形成されるRNA:DNAハイブリッドは、内在性RNase Hに認識されて標的RNAの選択的な分解を引き起こすことができる。したがって、RNase Hによる分解を指向するアンチセンスDNAの場合、標的配列は、p53 mRNA中の配列だけでなく、p53遺伝子の初期転写産物におけるイントロン領域の配列であってもよい。アンチセンス核酸の標的領域は、該アンチセンス核酸がハイブリダイズすることにより、結果としてp53蛋白質への翻訳が阻害されるものであればその長さに特に制限はなく、p53 mRNAの全配列であっても部分配列であってもよく、短いもので約15塩基程度、長いものでmRNAもしくは初期転写産物の全配列が挙げられる。合成の容易さや抗原性、細胞内移行性の問題等を考慮すれば、約15～約40塩基、特に約18～約30塩基からなるオリゴヌクレオチドが好ましい。標的配列の位置としては、5'-及び3'-UTR、開始コドン近傍などが挙げられるが、それらに限定されない。

30

【0056】

リボザイムとは、狭義には、核酸を切断する酵素活性を有するRNAをいうが、本明細書では配列特異的な核酸切断活性を有する限りDNAをも包含する概念として用いるものとする。リボザイムとして最も汎用性の高いものとしては、ウイロイドやウイルソイド等の感染性RNAに見られるセルフスプライシングRNAがあり、ハンマーヘッド型やヘアピン型等が知られている。ハンマーヘッド型は約40塩基程度で酵素活性を発揮し、ハンマーヘッド構造をとる部分に隣接する両端の数塩基ずつ（合わせて約10塩基程度）をmRNAの所望の切断部位と相補的な配列にすることにより、標的mRNAのみを特異的に切断することが可能である。

40

【0057】

アンチセンス核酸やリボザイムはDNA/RNA自動合成機を用いて合成することができる。これらを構成するヌクレオチド分子もまた、安定性、比活性などを向上させるために、上記のsiRNAの場合と同様の修飾を受けていてもよい。

50

【 0 0 5 8 】

あるいは、アンチセンス核酸やリボザイムは、siRNAの場合と同様に、それらをコードする核酸の形態で使用することもできる。

【 0 0 5 9 】

上記p53の機能阻害物質は、体細胞の核初期化工程においてp53の機能を阻害するのに十分な様式で体細胞に接触させる必要がある。ここで体細胞の核初期化は、核初期化物質を体細胞に接触させることにより実施することができる。

【 0 0 6 0 】

(c) 核初期化物質

本発明において「核初期化物質」とは、体細胞からiPS細胞を誘導することができる物質であれば、タンパク性因子またはそれをコードする核酸（ベクターに組み込まれた形態を含む）、あるいは低分子化合物等のいかなる物質であってもよい。核初期化物質がタンパク性因子またはそれをコードする核酸の場合、好ましくは以下の組み合わせが例示される（以下においては、タンパク性因子の名称のみを記載する）。

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

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

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

(4) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, TERT, SV40 Large T

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

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

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

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

（以上、WO 2007/069666を参照（但し、上記(2)の組み合わせにおいて、Sox2からSox18への置換、Klf4からKlf1もしくはKlf5への置換については、Nature Biotechnology, 26, 101-106 (2008)を参照）。「Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2」の組み合わせについては、Cell, 126, 663-676 (2006)、Cell, 131, 861-872 (2007)等も参照。「Oct3/4, Klf2（またはKlf5）、c-Myc, Sox2」の組み合わせについては、Nat. Cell Biol., 11, 197-203 (2009)も参照。「Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, hTERT, SV40 Large T」の組み合わせについては、Nature, 451, 141-146 (2008)も参照。）

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

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

(11) Oct3/4, Sox2, Nanog, Lin28, hTERT, SV40 Large T (Stem Cells, 26, 1998-2005 (2008)を参照)

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

(13) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, SV40 Large T (Stem Cells, 26, 1998-2005 (2008)も参照)

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

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

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

(17) Oct3/4, Sox2, Nanog (WO 2008/118820を参照)

(18) Oct3/4, Sox2, Lin28 (WO 2008/118820を参照)

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

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

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

10

20

30

40

50

(22) Oct3/4, Nanog

(23) Oct3/4

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

【 0 0 6 1 】

上記(1)-(24)において、Oct3/4に代えて他のOctファミリーのメンバー、例えばOct1A、Oct6などを用いることもできる。また、Sox2(またはSox1、Sox3、Sox15、Sox17、Sox18)に代えて他のSoxファミリーのメンバー、例えばSox7などを用いることもできる。c-Mycに代えて他のMycファミリー、例えばL-Mycなどを用いることもできる。さらにLin28に代えて他のLinファミリーのメンバー、例えばLin28bなどを用いることもできる。

10

【 0 0 6 2 】

また、上記(1)-(24)には該当しないが、それらのいずれかにおける構成要素をすべて含み、且つ任意の他の物質をさらに含む組み合わせも、本発明における「核初期化物質」の範疇に含まれ得る。また、核初期化の対象となる体細胞が上記(1)-(24)のいずれかにおける一以上の構成要素を、核初期化のために十分なレベルで内在的に発現している条件下にあっては、当該一以上の構成要素を除いた残りの構成要素のみの組み合わせもまた、本発明における「核初期化物質」の範疇に含まれ得る。

【 0 0 6 3 】

これらの組み合わせの中で、好ましい核初期化物質としては、Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Lin28及びSV40LTから選択される少なくとも1つ、好ましくは2つ以上、より好ましくは3つ以上が挙げられる。

20

【 0 0 6 4 】

これらの組み合わせの中で、得られるiPS細胞を治療用途に用いることを念頭においた場合、Oct3/4, Sox2及びKlf4の3因子の組み合わせ(即ち、上記(9))が好ましい。本発明の方法においては、上記3因子のみでも十分に高い効率でiPS細胞を得ることができる。すなわち3因子のみであっても、4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4及びc-Myc)の場合により近い効率でiPS細胞を樹立することができる。一方、iPS細胞を治療用途に用いることを念頭に置かない場合(例えば、創薬スクリーニング等の研究ツールとして用いる場合など)は、上記4因子のほか、Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2及びLin28の5因子か、それにNanogを加えた6因子(即ち、上記(12))が好ましい。これらの好ましい組み合わせにおいては、c-Mycの代わりにL-Mycも用いることができる。

30

【 0 0 6 5 】

上記の各タンパク性因子のマウス及びヒトcDNA配列情報は、WO 2007/069666に記載のNCBI accession numbersを参照することにより取得することができ(Nanogは当該公報中では「ECAT4」との名称で記載されている。尚、Lin28、Lin28b、Esrrb、Esrrgのマウス及びヒトcDNA配列情報は、それぞれ下記NCBI accession numbersを参照することにより取得できる。)、当業者は容易にこれらのcDNAを単離することができる。

遺伝子名	マウス	ヒト
Lin28	NM_145833	NM_024674
Lin28b	NM_001031772	NM_001004317
Esrrb	NM_011934	NM_004452
Esrrg	NM_011935	NM_001438

40

【 0 0 6 6 】

核初期化物質としてタンパク性因子自体を用いる場合には、得られたcDNAを適当な発現ベクターに挿入して宿主細胞に導入し、該細胞を培養して得られる培養物から組換えタンパク性因子を回収することにより調製することができる。一方、核初期化物質としてタンパク性因子をコードする核酸を用いる場合、得られたcDNAを、上記p53のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸の場合と同様にして、ウイルスペクターもしくはプラスミドベクターに挿入して発現ベクターを構築し、核初期化工程に供される。必要に応じて、上記Cre-loxPシステムやpiggyBacトランスポゾンシステムを利用することもできる。尚、

50

核初期化物質として2以上のタンパク性因子をコードする核酸を細胞に導入する場合、各核酸を別個のベクターに担持させてもよいし、複数の核酸をタンデムに繋いでポリシストロニックベクターとすることもできる。後者の場合、効率的なポリシストロニック発現を可能にするために、口蹄疫ウイルスの2A self-cleaving peptide (Science, 322, 949-953, 2008など参照)、IRES配列など、好ましくは該2A配列を各核酸の間に連結することが望ましい。

【0067】

p53の機能が阻害される場合、レトロウイルスベクター又はレンチウイルスベクターを介して染色体に組み込まれた導入遺伝子は、遺伝子サイレンシングに耐性を示す傾向がある。したがって、外来性核初期化物質の不必要な持続発現を防ぐためには、プラスミドベクターを使用することが有利である。

10

【0068】

核初期化物質の体細胞への接触は、(a) 該物質がタンパク性因子である場合、上記p53のドミナントネガティブ変異体と同様にして、(b) 該物質が(a)のタンパク性因子をコードする核酸である場合、上記p53のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸と同様にして、(c) 該物質が低分子化合物である場合、上記p53の化学的阻害物質と同様にして、実施することができる。

【0069】

上述のように、p53の機能阻害物質は、体細胞の核初期化工程においてp53の機能を阻害するのに十分な様式で体細胞に接触させる必要がある。この条件が満たされる限り、核初期化物質とp53の機能阻害物質とは、同時に体細胞に接触させてもよいし、また、どちらかを先に接触させてもよい。一実施態様において、例えば、核初期化物質がタンパク性因子をコードする核酸であり、p53の機能阻害物質が化学的阻害物質である場合には、前者は遺伝子導入処理からタンパク性因子を大量発現するまでに一定期間のラグがあるのに対し、後者は速やかにp53の機能を阻害しうることから、遺伝子導入処理から一定期間細胞を培養した後に、p53の化学的阻害物質を培地に添加することができる。別の実施態様において、例えば、核初期化物質とp53の機能阻害物質とがいずれもウイルスベクターやプラスミドベクターの形態で用いられる場合には、両者を同時に細胞に導入してもよい。

20

【0070】

アデノウイルスベクター又は非ウイルス性発現ベクターを体細胞に導入する操作を繰り返し行う回数は特に制限されることはなく、遺伝子導入は一以上の任意の回数(例、1~10回、1~5回など)で行うことができる。二種以上のアデノウイルスベクター又は非ウイルス性発現ベクターを体細胞に導入する場合、全種のアデノウイルスベクター又は非ウイルス性発現ベクターを同時に体細胞に導入することが好ましいが、この場合であっても、遺伝子導入は一以上の任意の回数(例、1~10回、1~5回など)で行うことができ、好ましくは2回以上(例、3回又は4回)で繰り返して行うことができる。

30

【0071】

(d) iPS細胞の樹立効率改善物質

p53の機能阻害物質に加え、公知の他のiPS細胞樹立効率改善物質を体細胞に接触させることにより、iPS細胞の樹立効率をさらに高めることが期待できる。そのようなiPS細胞の樹立効率改善物質としては、例えば、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤[例えば、バルプロ酸(VPA)(Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA(例、HDA C1 siRNA Smartpool[®] (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (Origene)等)等の核酸性発現阻害剤など]、G9aヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤[例えば、BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2: 525-528 (2008))等の低分子阻害剤、G9aに対するsiRNAおよびshRNA(例、G9a siRNA(human) (Santa Cruz Biotechnology)等)等の核酸性発現阻害剤など]、L-channel calcium agonist(例えばBayk8644) (Cell Stem Cell, 3, 568-574 (2008))、UTF1(Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、Wnt Signaling(例えばsoluble Wnt3a) (Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008))、2i/LIF (2iはmitogen-acti

40

50

vated protein kinase signallingおよびglycogen synthase kinase-3の阻害剤、PloS Biology, 6(10), 2237-2247 (2008))等が挙げられるが、それらに限定されない。前記において核酸性の発現阻害剤はsiRNAもしくはshRNAをコードするDNAを含む発現ベクターの形態であってもよい。

【0072】

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

10

【0073】

これら他のiPS細胞樹立効率改善物質の体細胞への接触は、該物質が(a) タンパク性因子である場合、(b) 該タンパク性因子をコードする核酸である場合、あるいは(c) 低分子化合物である場合に依じて、p53の機能阻害物質についてそれぞれ上記したと同様の方法により、実施することができる。

【0074】

(e) 体細胞ソース

20

本発明においてiPS細胞作製のための出発材料として用いることのできる体細胞は、哺乳動物（例えば、マウスまたはヒト）由来の生殖細胞以外のいかなる細胞であってもよく、例えば、角質化する上皮細胞（例、角質化表皮細胞）、粘膜上皮細胞（例、舌表層の上皮細胞）、外分泌腺上皮細胞（例、乳腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例、副腎髄質細胞）、代謝・貯蔵用の細胞（例、肝細胞）、境界面を構成する内腔上皮細胞（例、I型肺胞細胞）、内鎖管の内腔上皮細胞（例、血管内皮細胞）、運搬能をもつ繊毛のある細胞（例、気道上皮細胞）、細胞外マトリックス分泌用細胞（例、線維芽細胞）、収縮性細胞（例、平滑筋細胞）、血液と免疫系の細胞（例、Tリンパ球）、感覚に関する細胞（例、桿細胞）自律神経系ニューロン（例、コリン作動性ニューロン）、感覚器と末梢ニューロンの支持細胞（例、随伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、およびそれらの前駆細胞（組織前駆細胞）等が挙げられる。細胞の分化の程度に特に制限はなく、未分化な前駆細胞（体性幹細胞も含む）であっても、最終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における体細胞の起源として使用することができる。ここで未分化な前駆細胞としては、たとえば神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）が挙げられる。

30

【0075】

本発明の方法によれば、一般にiPS細胞の樹立が困難とされている最終分化した体細胞からも、効率よくiPS細胞を得ることができる。本発明の好ましい実施態様において、体細胞としてT細胞が用いられる。T細胞はCD4ポジティブ、CD8ポジティブのいずれであってもよく、あるいはCD4/CD8ダブルポジティブな分化ステージの細胞であってもよい。T細胞は脾臓、リンパ節、末梢血、臍帯血などから、自体公知の方法、例えば、CD4、CD8、CD3などの細胞表面マーカーに対する抗体とセルソーターとを用いてフローサイトメトリーにより、単離することができる。マウスの場合、T細胞の存在割合が高い脾臓やリンパ節から採取することが好ましいが、ヒトの場合、侵襲性が少なく調製が容易との観点から、末梢血、臍帯血などからT細胞を調製することが望ましい。

40

【0076】

体細胞を採取するソースとなる哺乳動物は特に制限されないが、得られるiPS細胞がヒトの再生医療用途に使用される場合には、拒絶反応が起こらないという観点から、患者本人またはHLAの型が同一である他人から体細胞を採取することが特に好ましい。また、ヒトに投与（移植）しない場合でも、例えば、患者の薬剤感受性や副作用の有無を評価する

50

ためのスクリーニング用の細胞のソースとしてiPS細胞を使用する場合には、同様に患者本人または薬剤感受性や副作用と相関する遺伝子多型が同一である他人から体細胞を採取する必要がある。

【0077】

マウスまたはヒトから分離した体細胞は、細胞の種類に応じてその培養に適した自体公知の培地で前培養することができる。そのような培地としては、例えば、約5~20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地(MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)、RPMI1640培地、199培地、F12培地などが挙げられるが、それらに限定されない。5%以下の低血清濃度下で前培養することにより、iPS細胞の樹立効率が改善されたとの報告もある(例えば、WO 2009/006997)。体細胞としてT細胞を用いる場合、インターロイキン(IL)-2、IL-7、幹細胞因子(SCF)、Flt3リガンドなどのサイトカイン類を含む培地で前培養することが望ましい。核初期化物質及びp53の機能阻害物質(及び他のiPS細胞樹立効率改善物質)との接触に際し、例えば、カチオニックリポソームなど導入試薬を用いる場合には、導入効率の低下を防ぐため、無血清培地に交換しておくことが好ましい場合がある。核初期化物質を接触させた後、細胞を、例えばES細胞の培養に適した条件下で培養することができる。マウス細胞の場合、通常の培地に分化抑制因子としてLeukemia Inhibitory Factor(LIF)を添加して培養を行うことが好ましい。一方、ヒト細胞の場合には、LIFの代わりに塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)および/または幹細胞因子(SCF)を添加することが望ましい。また通常、細胞は、フィーダー細胞として、放射線や抗生物質で処理して細胞分裂を停止させたマウス胎仔由来の線維芽細胞(MEF)の共存下で培養される。MEFとしては、通常STO細胞等がよく使われるが、iPS細胞の誘導には、SNL細胞(McMahon, A. P. & Bradley, A. Cell 62, 1073-1085 (1990))等がよく使われている。フィーダー細胞との共培養は、核初期化物質の接触より前から開始してもよいし、該接触時から、あるいは該接触より後(例えば1-10日後)から開始してもよい。

【0078】

iPS細胞の候補コロニーの選択は、薬剤耐性とレポーター活性を指標とする方法と目視による形態観察による方法とが挙げられる。前者としては、例えば、分化多能性細胞において特異的に高発現する遺伝子(例えば、Fbx15、Nanog、Oct3/4など、好ましくはNanog又はOct3/4)の遺伝子座に、薬剤耐性遺伝子及び/又はレポーター遺伝子をターゲッティングした組換え体細胞を用い、薬剤耐性及び/又はレポーター活性陽性のコロニーを選択するというものである。そのような組換え体細胞としては、例えばFbx15遺伝子座にgeo(-ガラクトシダーゼとネオマイシンホスホトランスフェラーゼとの融合タンパク質をコードする)遺伝子をノックインしたマウス由来のMEF(Takahashi & Yamanaka, Cell, 126, 663-676 (2006))、あるいはNanog遺伝子座に緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子とピュロマイシン耐性遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス由来のMEF(Okita et al., Nature, 448, 313-317 (2007))等が挙げられる。一方、目視による形態観察で候補コロニーを選択する方法としては、例えばTakahashi et al., Cell, 131, 861-872 (2007)に記載の方法が挙げられる。レポーター細胞を用いる方法は簡便で効率的ではあるが、iPS細胞がヒトの治療用途を目的として作製される場合、安全性の観点から目視によるコロニー選択が望ましい。核初期化物質としてOct3/4、Klf4及びSox2の3因子を用いた場合、樹立クローン数は減少する場合があるものの生じるコロニーのほとんどがES細胞と比較して遜色のない高品質のiPS細胞であることから、レポーター細胞を用いなくとも効率よくiPS細胞を樹立することが可能である。

【0079】

選択されたコロニーの細胞がiPS細胞であることの確認は、上記したNanog(もしくはOct3/4、Fbx15)レポーター陽性(GFP陽性、-ガラクトシダーゼ陽性等)および選択マーカー陽性(ピュロマイシン耐性、G418耐性等)、並びに目視によるES細胞様コロニーの形成によっても行い得るが、より正確を期すために、各種ES細胞特異的遺伝子の発現を解析したり、選択された細胞をマウスに移植してテラトーマ形成を確認する等の試験を実施することもできる。これらの試験方法は周知であり、代表的な確認試験は後述の実施例に

記載されている。

【0080】

このようにして樹立されたiPS細胞は、種々の目的で利用することができる。例えば、ES細胞で報告されている分化誘導法を利用して、iPS細胞から種々の細胞（例、心筋細胞、血液細胞、神経細胞、血管内皮細胞、インスリン分泌細胞等）への分化を誘導することができる。したがって、患者本人やHLAの型が同一である他人から採取した体細胞を用いてiPS細胞を誘導すれば、そこから所望の細胞（即ち、該患者が罹病している臓器の細胞や疾患に対する治療効果を発揮する細胞など）に分化させて該患者に移植するという、自家もしくは同種異系移植による幹細胞療法が可能となる。さらに、iPS細胞から分化させた機能細胞（例、肝細胞）は、対応する既存の細胞株よりも実際の生体内での該機能細胞の状態をより反映していると考えられるので、医薬候補化合物の薬効や毒性のin vitroスクリーニング等にも好適に用いることができる。

10

【0081】

p53の阻害が、p53のドミナントネガティブ変異体や、p53に対するsiRNAもしくはshRNAなどをコードする核酸を体細胞に導入し、強制発現させる態様で達成される場合、得られるiPS細胞は、当該外来性核酸を含む点で、従来公知のiPS細胞とは異なる新規細胞である。特に、当該外来性核酸がレトロウイルスやレンチウイルス等を用いて体細胞に導入された場合、当該外来性核酸は通常、得られるiPS細胞のゲノム中に組み込まれているので、外来性核酸を含むという形質は安定に保持される。また、外来性核酸が持続性センダイウイルスベクターを用いて体細胞に導入された場合、当該外来性核酸は、得られるiPS細胞の細胞質中で安定的に存在し得るので、同様に外来性核酸を含むという形質は安定に保持される。

20

【0082】

本発明はまた、T細胞を初期化して得られる、TCR遺伝子が再構成されているiPS細胞を提供する。T細胞の初期化方法としては、上記したように、T細胞をp53の機能が阻害される条件下で核初期化物質と接触させる方法が挙げられる。T細胞から誘導されたiPS細胞（T-iPS細胞）では、それが由来するT細胞におけるTCRの再構成が保存されている。これまでにB細胞からiPS細胞を誘導した例はあるが、T細胞由来のiPS細胞の樹立については未だ報告されていない。TCRの再構成は、T-iPS細胞から分化させた細胞でも保存されていることから、例えば、癌抗原ペプチドやウイルス等の病原体の細胞表面抗原由来のペプチドでパルスした抗原提示細胞（例、マクロファージ、樹状細胞等）を特異的に認識し得るT細胞クローンから、本発明の方法を用いてT-iPS細胞を樹立し、該iPS細胞をインビトロで大量増幅させた後、T細胞への分化を誘導することにより、上記のペプチドを提示する細胞（例、癌細胞、感染細胞等）を特異的に傷害しうるT細胞を大量に調製することができ、従来のT細胞免疫療法に用いられているのと同様にして、T細胞免疫療法剤として製剤化することができる。

30

【0083】

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

【実施例】

40

【0084】

実施例

[実施例1：p53欠損の効果]

実験系としてNanogレポーターを持つp53ホモ欠損マウスまたはヘテロ欠損マウスを使用した。p53はほぼすべての細胞で発現し、細胞の損傷による修復の際、細胞周期の停止あるいはアポトーシスの誘導を制御する遺伝子である。このマウスではp53遺伝子のexon 5をneomycin耐性遺伝子に置換し、機能を欠損させてある (Lawrence A. Donehower (1992). Nature 356, 215-221)。p53ホモ欠損マウスは正常に生まれるが、高頻度に腫瘍を形成することが報告されている。NanogレポーターはBACPAC Resourcesより購入したBAC(bacterial artificial chromosome)のNanog遺伝子座に緑色蛍光蛋白質(EGFP)とピューロマイシ

50

ン耐性遺伝子を組み込んで作成した (Okita K. et al., Nature 448, 313-317(2007))。マウスNanog遺伝子はES細胞や初期胚といった分化多能性細胞において特異的に発現する遺伝子である。また、このレポーターが陽性となったマウスiPS細胞はES細胞とほぼ同等の分化能力を持つことがわかっている。このNanogレポーターを有するNanogレポーターマウスを作製し(Okita K. et al., Nature 448, 313-317(2007))、これとp53欠損マウスを交配することによって、Nanogレポーターを持つp53ホモ欠損マウス、ヘテロ欠損マウスを作製した。

【 0 0 8 5 】

初期化に使用するレトロウイルスは、前日に6 well培養プレート(Falcon)の1well当たり 0.6×10^6 で播種したPlat-E細胞(Morita, S. et al., Gene Ther. 7, 1063-1066)にレトロウイルス発現ベクター(pMXs-Oct3/4, pMXs-Sox2, pMXs-Klf4, pMXs-cMyc: Cell, 126, 663-676 (2006))を個々に導入して作製した。培養液はDMEM/10% FCS (DMEM(Nacalai tesque)にウシ胎仔血清を10%加えたもの)を使用し、37℃、5% CO₂で培養した。ベクターの導入のためにFuGene6 transfection reagent (Roche) 4.5 µLをOpti-MEM I Reduced-Serum Medium (Invitrogen) 100 µLに入れ、室温で5分間静置した。その後、各発現ベクターを1.5 µg加え、さらに室温で15分静置してからPlat-Eの培養液に加えた。2日目にPlat-Eの上清を新しい培地に換え、3日目に培養上清を回収して0.45 µm sterile filter (Whatman)で濾過し、polybrene (Nacalai)を4 µg/mLとなるように加えてウイルス液とした。

【 0 0 8 6 】

Nanogレポーターを持つp53ホモ欠損マウスの胎仔(受精後13.5日)から、線維芽細胞(MEF)を単離した。MEFはNanog遺伝子を発現しないため、EGFPを発現せず、緑色蛍光を示さない。また、ピューロマイシン耐性遺伝子も発現しないため、抗生物質であるピューロマイシンに感受性である。このMEFを0.1%ゼラチン(Sigma)でコートした6 well培養プレート(Falcon)の1well当たり 1×10^5 で播種した。培養液はDMEM/10% FCSを使用し、37℃、5% CO₂で培養した。翌日、レトロウイルス液を加え、一晚感染させて遺伝子を導入した。

【 0 0 8 7 】

ウイルス感染後3日目からはLIFを加えたES細胞用培地(DMEM(Nacalai tesque)に15%牛胎仔血清、2 mM L-グルタミン(Invitrogen)、100 µM 非必須アミノ酸(Invitrogen)、100 µM 2-メルカプトエタノール(Invitrogen)、50 U/mL ペニシリン(Invitrogen)と50 mg/mL ストレプトマイシン(Invitrogen)を加えたもの)を用いて培養した。感染後5日目にMEFの培地を除き、PBS 1 mLを加えて細胞を洗浄した。PBSを除いた後、0.25% Trypsin/ 1 mM EDTA(Invitrogen)を加えて、37℃で5分間程度反応させた。細胞が浮き上がったES細胞用培地を加えて懸濁し、あらかじめフィーダー細胞を播種しておいた100 mm dishに 5×10^3 の細胞を播種した。フィーダー細胞にはマイトマイシンCで処理して、細胞分裂を止めたSNL細胞(McMahon, A. P. & Bradley, A. Cell 62, 1073-1085 (1990))を用いた。以後コロニーが観察できるようになるまで2日ごとにES細胞用培地の交換を行った。4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc)を感染させた細胞は13日目から、3因子(Oct3/4, Sox2, Klf4)を感染させた細胞は19日目からピューロマイシン(1.5 µg/mL)で選択を行った。コロニーは4因子では10日目、3因子では20日目ごろから見え始め、徐々にGFP陽性となった。

【 0 0 8 8 】

4因子では21日目、3因子では28日目にGFP陽性コロニーを数えた。3回の実験の合計結果を図1に示す。対照群であるp53ヘテロ欠損細胞と比較すると、p53ホモ欠損細胞ではGFP陽性コロニーが4因子の場合は約2倍、3因子の場合は約9倍に増加した。

【 0 0 8 9 】

次に、4因子では21日目に、3因子では28日目にGFP陽性コロニーを採取し、トリプシン処理後フィーダー細胞上で培養を続けた(この時点を継代数1とする)。 1×10^6 の細胞を免疫不全マウスの皮下に注射したところ、2週間後にテラトーマの形成が確認できたことから、3因子、4因子いずれを導入した場合にも、生じたGFP陽性コロニーはiPS細胞であることが確認された。4因子の結果を図2に示す。

【 0 0 9 0 】

以上の結果より、p53を欠損（ノックアウト）することで、iPS細胞の樹立効率が上昇することが明らかとなった。

【0091】

[実施例2：ドミナントネガティブ変異体による検討]

p53のドミナントネガティブ変異体を用いて内在性p53の機能を阻害し、iPS細胞の樹立効率への影響を検討した。ドミナントネガティブ変異体としてp53のゲノム結合領域に位置する第275位のプロリンをセリンに点変異させたp53P275Sを使用した(Annemieke de Vries (2002). PNAS 99, 2948-2953)。

【0092】

初期化に使用するレトロウイルスは、前日に6 well培養プレート(Falcon)の1well当り 0.6×10^6 で播種したPlat-E細胞にレトロウイルス発現ベクター(pMXs-Oct3/4, pMXs-Sox2, pMXs-Klf4, pMXs-cMyc, pMXs-p53P275S)を導入して作製した(pMXs-p53P275Sの作製法については後述の実施例6を参照)。培養液はDMEM/10% FCS (DMEM(Nacalai tesque)にウシ胎仔血清を10%加えたもの)を使用し、37℃、5% CO₂で培養した。ベクターの導入のためにFuGene6 transfection reagent (Roche) 4.5 µLをOpti-MEM I Reduced-Serum Medium (Invitrogen) 100 µLに入れ、室温で5分間静置した。その後、各発現ベクターを1.5 µg加え、さらに室温で15分静置してからPlat-Eの培養液に加えた。2日目にPlat-Eの上清を新しい培地に換え、3日目に培養上清を回収して0.45 µm sterile filter (Whatman)で濾過し、polybrene (Nacalai)を4 µg/mLとなるように加えてウイルス液とした。

【0093】

Nanogレポーターを持つp53ヘテロ欠損マウスの胎仔(受精後13.5日)から線維芽細胞(MEF)を単離した。あらかじめフィーダー細胞を播種した6 well培養プレートを準備しておき、4因子の場合は 4×10^3 、3因子の場合は 2×10^4 のMEFを1 wellに播種した。フィーダー細胞には、マイトマイシンCで処理をして細胞分裂を止めたSNL細胞を用いた。培養液はDMEM/10% FCSを使用し、37℃、5% CO₂で培養した。翌日、Plat-Eから回収したウイルス液で一晩培養し、遺伝子を導入した。感染後3日目からLIFを加えたES細胞用培地を用いて培養した。以後コロニーが観察できるようになるまで2日ごとにES細胞用培地の交換を行った。4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc)とP275Sとを感染させた細胞は13日後から、3因子(Oct3/4, Sox2, Klf4)とP275Sとを感染させた細胞は19日後からピューロマイシン(1.5 µg/mL)で選択を行った。コロニーは4因子では10日目、3因子では20日目ごろから見え始め、徐々にGFP陽性となった。

【0094】

4因子では21日目、3因子では28日目にGFP陽性コロニーを数えた。実験手順の概略を図3(A)に、また実験結果を図3(B)～(D)に示す。p53P275Sの代わりに変異を持たないp53あるいは赤色蛍光蛋白質(DsRedExpress)を導入した細胞と比較して、P275Sを導入した細胞ではGFP陽性コロニーの数が4因子の場合は約4倍、3因子の場合は約3倍に増加した。

【0095】

また、p53ホモ欠損マウスの胎仔から単離したMEFに対して前記3因子または4因子と共にp53あるいはDsRedExpressを導入した結果を、図3(E)～(G)に示す。コントロールであるDsRedExpressを導入した細胞と比較して、p53を導入した細胞では、GFP陽性コロニーの数が減少した。

【0096】

以上の結果より、内在性p53の機能を阻害することにより、iPS細胞の樹立効率が上昇することが明らかとなった。

【0097】

[実施例3：p53阻害剤を用いた検討]

iPS細胞の樹立効率に対するp53阻害剤の効果を調べた。初期化に使用するレトロウイルスは、前日に6 well培養プレート(Falcon)の1well当り 0.6×10^6 で播種したPlat-E細胞にレトロウイルス発現ベクター(pMXs-Oct3/4, pMXs-Sox2, pMXs-Klf4, pMXs-cMyc)を導入して作製した。培養液はDMEM/10% FCS (DMEM(Nacalai tesque)にウシ胎仔血清を10%加え

たもの)を使用し、37℃、5% CO₂で培養した。ベクターの導入のためにFuGene6 transfection reagent (Roche) 4.5 µLをOpti-MEM 1 Reduced-Serum Medium (Invitrogen) 100 µLに入れ、室温で5分間静置した。その後、各発現ベクターを1.5 µg加え、さらに室温で15分静置してからPlat-Eの培養液に加えた。2日目にPlat-Eの上清を新しい培地に換え、3日目に培養上清を回収して0.45 µm sterile filter (Whatman)で濾過し、polybrene (Nacalai)を4 µg/mLとなるように加えてウイルス液とした。

【0098】

Nanogレポーターを持つp53ヘテロ欠損マウスの胎仔(受精後13.5日)から線維芽細胞(MEF)を単離した。このMEFを、0.1%ゼラチン(Sigma)でコートした6 well培養プレート(Falcon)に1 well当り1 x 10⁵で播種した。培養液はDMEM/10% FCSを使用し、37℃、5% CO₂で培養した。翌日、Plat-Eから回収したウイルス液を一晩感染させ、遺伝子の導入を行った。感染後3日目からLIFを加えたES細胞用培地を用いて培養を行った。感染後5日目にMEFの培地を除き、PBS 1 mLを加えて細胞を洗浄した。PBSを除いた後、0.25% Trypsin/ 1 mM EDTA (Invitrogen)を加えて、37℃で5分間程度反応させた。細胞が浮き上がったらES細胞用培地を加えて懸濁し、あらかじめフィーダー細胞を播種しておいた6 well培養プレートに8 x 10²の細胞を播種した。6日目から培地にPifithrin, p-Nitro, Cyclic (MERCK) 6 nMを加えて培養を続けた。PifithrinはDMSOに溶解して使用した。感染後16日目からピューロマイシン(1.5 µg/mL)で選択を行った。コロニーは10日目に見え始め、徐々にGFP陽性となった。20日目にGFP陽性コロニーを数えた。結果を図4に示す。DMSOで処理した細胞と比較して、Pifithrinで処理した細胞ではGFP陽性コロニーの数が約4倍に増加した。以上の結果より、p53の機能を阻害することによりiPS細胞の樹立効率が上昇することが明らかとなった。

【0099】

[実施例4: T細胞からのiPS樹立におけるp53欠損の効果]

Nanogレポーターマウス(以下、Nanog-GFP Tgマウス: 17週齢オス)およびNanogレポーターを持つp53ホモ欠損マウス(以下、Nanog-GFP/Trp53^{-/-}マウス: 24週齢メス)を安楽死させた後、脾臓を摘出した。組織を機械的にすりつぶした後、CD90マイクロビーズ(Miltenyi biotec)およびMACSシステムを用いてCD90陽性細胞を得た。1 x 10⁶個の細胞をT細胞培地(DMEM, 10% FBS, 10 µl/1x10⁶個 CD3/CD28 T cell expander (Invitrogen), 10 units/ml IL-2)に懸濁し、レトロネクチン(50 µg/ml, Takara)でコートした24-wellプレートに播種した(1x10⁶個/well)。

【0100】

翌日、4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)のレトロウイルス(実施例1と同様にして調製し、ウイルス含有上清に8 µg/mlポリブレン、10 units/ml IL-2を加えたもの)を含む培地1 mlに置き換え、3000 rpmで30分間の遠心を行い(スピンインフェクション法)、37°Cで一晩培養した。翌日、T細胞培地へと交換し、以降二日に一度培地交換を行った。

【0101】

T細胞樹立から12日目に、マイトマイシン処理したSNL-PH細胞上に細胞を播種しなおした(5 x 10⁴個/100 mmディッシュ)。翌日から、1.5 µg/mlのピューロマイシンを加えたES培地で培養した。

【0102】

T細胞樹立から17日目に11個のGFP陽性コロニーが観察されたので、ピックアップし、24-well SNL-PHプレートに播種した。その結果、3クローンのES様細胞を得た(408E2, E7, E8)。これらのクローンはマウスES細胞様の形態を示し、Nanog-GFP陽性であった(図5)。またES細胞特異的遺伝子(Oct3/4, Sox2, Nanog, Cripto, Dax1, ERas, Fgf4, Esg1, Rex1)を発現していることをRT-PCRで確認した(図6)。導入した外来遺伝子のサイレンシングは不完全であった(図6)。なお、これらのクローンはT細胞のマーカー(FasL, GzmA, GzmB, Ifng)を発現していなかった(Rever Tra Ace kit, Takaraを使用)。抗SSEA1抗体(Santacruz)による染色でその発現が確認され、Alkaline phosphatase活性も陽性であった(図7)。さらに、胚様体形成による試験管内分化誘導により、AFP(R&D systems), GATA4(Santacruz)

z), a-SMA(DAKO), Desmin(Neomarker), bIII-tubulin(Chemicon), GFAP(DAKO)抗体を用いた染色によりそれらの発現が確認され、三胚葉系への分化能を有することがわかった(図8)。また、キメラマウスの発生にも寄与することが確認できた(データは示さず)。よって、生じたGFP陽性コロニーはiPS細胞であることが確認された。

【0103】

なお、Nanog-GFP Tgマウス由来のT細胞で同様の実験を行った場合は、GFP陽性のコロニーは一つも生じなかった。以上の実験結果より、p53を欠損(不活化)させることにより、iPS細胞の樹立が促進されること、またp53を不活化させることにより終分化したT細胞から、iPS細胞が樹立できることが明らかとなった。

【0104】

前記T細胞から樹立されたiPS細胞をICRマウス由来の胚盤胞にマイクロインジェクションすることにより、アダルトキメラマウスを作出した(図10)。しかしながら、いずれのキメラマウスも7週以内に腫瘍を生じていた。

【0105】

次に、これらの樹立したiPS細胞、キメラの種々の組織、およびキメラの腫瘍におけるT細胞受容体遺伝子(Tcr 遺伝子のV-(D)-J DNA)の再構成(rearrangement)を、PCRにより検討した。具体的には、Curr Biol 11(19), 1553 (2001)に記載の方法に準じて実験を行った。簡単に述べると、Tcr 遺伝子のD₂-J₂再構成を、プライマーセット:D₂(GTAGGCACCTGTGGGAAGAACT; 配列番号29)およびJ₂(TGAGAGCTGTCTCTACTATCGATT; 配列番号30)を用いたゲノムDNAに対するPCR増幅を行い、生じたPCR産物を1.2%アガロースゲルで電気泳動して検出した。その結果、再構成されたT細胞受容体のバンドが検出され、iPS細胞はT細胞由来であることが確認された。また、キメラの腫瘍における再構成されたバンドの濃さが、iPS細胞のそれと同じくらい濃かったことから、腫瘍はiPS細胞由来であることが示唆された(図11)。

【0106】

[実施例5: マイクロアレイ解析]

p53ホモ欠損マウスより単離したMEFと、p53を欠損していない通常のマウスより単離したMEFとで、発現パターンに違いがあるかどうかを調べるために、DNAマイクロアレイ解析を行った。解析は、各マウスより単離したMEF由来のtotal RNAを用いて、Cell, 131, 861-872 (2007)に記載の手法にて行った。結果を図9に示す。ES細胞において特異的に発現している遺伝子(線維芽細胞に比して、ES細胞で10倍以上発現している遺伝子)を検出したところ、p53欠損マウス由来のMEFでは、ワイルドタイプのMEFに比べて、これらES細胞特異的発現遺伝子が、格段に多く発現していた(図9(B))。逆に、線維芽細胞で特異的に発現している遺伝子(ES細胞に比して、線維芽細胞で10倍以上発現している遺伝子群)を検出したところ、p53欠損マウス由来のMEFでは、ワイルドタイプのMEFに比べて、これら線維芽細胞特異的発現遺伝子の発現が極端に少なかった(図9(C))。以上の結果より、p53を欠損させることで、ES細胞に近い状態となっていることが示された。

【0107】

[実施例6: p53欠損およびドミナントネガティブ変異体導入の効果]

Nanog-GFPまたはOct3/4-GFPレポーターシステムを、iPS細胞の感受的且つ特異的な同定に用いた(Okita K. et al. Nature 448, 313 (2007))。Nanog-GFPレポーターも含む、ワイルドタイプ、p53^{+/-}、またはp53^{-/-}のMEFを、6 wellプレートに1 well当り1 x 10⁵個で播種した。翌日(0日)、Plat-Eから作製したレトロウイルスを各細胞に感染させた。5日目に、セルソーター(FACS Aria, Beckton Dickinson)により1 well当り1細胞ずつ96プレートに播種しなおし、または100mm dish当り5000細胞を播種しなおした。4因子のプロトコルでは13日目に、3因子のプロトコルでは19日目にピューロマイシン(1.5 μg/mL)選択を開始した。GFP陽性コロニーの数は、4因子のプロトコルでは21日目に、3因子のプロトコルでは28日目に測定した。その結果を図12に示す。

【0108】

Mycを除いた3因子を、Nanog-GFP、p53ワイルドタイプMEFに導入した場合、遺伝子導入

10

20

30

40

50

した5000個の線維芽細胞から1~18個のGFP陽性コロニーが得られた(図12a)。Nanog-GFP、p53ヘテロ接合性変異体MEFからは、7~81個のGFP陽性コロニーが観察された。対照的に、Nanog-GFP、p53-null線維芽細胞からは、38~478個のGFP陽性コロニーが出現した。

【0109】

次に、単一の線維芽細胞からiPS細胞を発生させることを試みた。フローサイトメーターを用いて、播種しなおす5日前に3因子を遺伝子導入したNanog-GFP細胞(p53ワイルドタイプ、ヘテロ接合性変異体、又はホモ接合性変異体)を96 wellプレートのウェルに1個ずつ播種した。播種しなおしてから23日後、p53ワイルドタイプ線維芽細胞について96 wellプレート当たり0又は1ウェルにGFP陽性コロニーが観察された(図12b)。全く対照的に、p53ヘテロ接合性線維芽細胞については96 wellプレート当たり~2ウェルにGFP陽性コロニーが、p53-null線維芽細胞については96 wellプレート当たり~10ウェルにGFP陽性コロニーが、それぞれ観察された。これらのデータから、p53機能を欠損させることにより直接的な初期化効率が著しく促進され、Mycを除いた3因子を遺伝子導入した細胞の最大10%までがiPS細胞になり得ることが示された。

【0110】

c-Mycを含む4因子について同様の実験を行った。p53ワイルドタイプ線維芽細胞については、96 wellプレート当たり0又は1ウェルにGFP陽性コロニーが観察された(図12c)。全く対照的に、p53ヘテロ接合性線維芽細胞については96 wellプレート当たり~9ウェルにGFP陽性コロニーが、p53-null線維芽細胞については96 wellプレート当たり~25ウェルにGFP陽性コロニーが、それぞれ観察された。これらのデータから、Mycレトロウイルスを追加することにより、さらに最大20%まで直接的な初期化効率が促進されることを示した。

【0111】

iPS細胞の発生におけるp53の抑制的な役割を確認するため、二つの実験を行った。一つ目は、iPS細胞の発生に対するp53ドミナントネガティブ変異体の効果を調べた。マウスp53遺伝子の相補DNAを、p53-1S(CAC CAG GAT GAC TGC CAT GGA GGA GTC; 配列番号31)及びp53-1223AS(gtg tct cag ccc tga agt cat aa; 配列番号32)を用いてRT-PCRにより増幅し、pENTER-D-TOPO(Invitrogen)にサブクローニングした。配列を確認した後、cDNAをGateway cloning technology(Invitrogen)によりpMXs-gwに移した。p53変異体についてのレトロウイルスベクターは、2ステップPCRにより作製した。P275S変異体(Annemieke de Vries (2002), supra)については、p53-P275S-S(tgt ttg tgc ctg ctc tgg gag aga ccg c; 配列番号33)及びp53-1223AS、並びにp53-P275S-AS(gcg gtc tct ccc aga gca ggc aca aac a; 配列番号34)及びp53-1Sの2つのプライマーセットを用いて1回目のPCRを行った。D278N変異体(Shinmura K. et al. Oncogene 26(20), 2939 (2007))については、p53-D278N-S(tgc cct ggg aga aac cgc cgt aca gaa; 配列番号35)及びp53-1223AS、並びにp53-D278N-AS(ttc tgt acg gcg gtt tct ccc agg gca; 配列番号36)及びp53-1Sの2つのプライマーセットを用いて1回目のPCRを行った。S58A変異体(Cecchinelli B. et al. Cell Death Differ 13(11), 1994 (2006))については、p53-S58A-S(ttt gaa ggc cca GCt gaa gcc ctc cga; 配列番号37)及びp53-1223AS、並びにp53-S58A-AS(tcg gag ggc ttc aGC tgg gcc ttc aaa; 配列番号38)及びp53-1Sの2つのプライマーセットを用いて1回目のPCRを行った。各種1回目のPCRで得られた2つのPCR生成物を混ぜて、p53-1S及びp53-1223ASをプライマーセットとして用いた2回目のPCRの鋳型として用いた。これらの変異体はpENTER-D-TOPOにクローニングし、次いでGateway cloning technologyによりpMXs-gwに移した。得られたp53変異体を発現するレトロウイルスは、Oct4-GFP、p53^{+/+}又はp53^{-/-}MEFに3因子と共に遺伝子導入した。その結果を図13に示す。

【0112】

ドミナントネガティブ変異体P275SをOct4-GFP、p53ヘテロ接合性MEFに導入した場合、GFP陽性コロニー数のかなりの増加が見られた(図13a)。対照的に、ワイルドタイプp53ではiPS細胞の発生効率が低下した。

【0113】

二つ目は、ワイルドタイプp53又は転写促進ネガティブ変異体(D278N又はS58A)をコー

ドするcDNAをpMXsレトロウイルスベクター (Morita S. et al. Gene Ther 7(12), 1063 (2000)) に入れ、それを3つの初期化因子のレトロウイルスと共にNanog-GFP、p53-null MEFに導入した。ワイルドタイプp53では、GFP陽性コロニーの数が著しく減少することがわかった (図13b)。対照的に転写促進ネガティブp53変異体では、ワイルドタイプタンパク質が示す効果よりも低いことが示された。これらのデータにより、p53の欠損は直接的な初期化効率の促進が見られる原因となることが確認された。

【0114】

次に、3因子によってp53-null細胞から得られた10個のGFP陽性クローンをランダムに展開した。全てのクローンは、マウスES細胞に類似した形態であることが示された (図14左)。3因子により発生したiPS細胞は、ES細胞と同程度にES細胞マーカー遺伝子を発現した (図15左)。3つの導入遺伝子の発現は効果的にサイレンシングを受けた。ヌードマウスに移植すると、種々の組織を含むテラトーマを形成した (図16a)。これらのデータから、3因子によってp53ヌルMEFから発生したiPS細胞の多能性が確認された。

【0115】

c-Mycを含む4因子により発生したiPS細胞も、ES細胞と区別できない形態を示すことがわかった (図14右)。しかしながら、これらの細胞におけるES細胞マーカーの発現は、ES細胞よりも低下していた (図15右)。また、これらの細胞における4因子の導入遺伝子の発現活性は維持されていた。この結果と一致して、ヌードマウスにおけるこれらの細胞に由来する腫瘍は、分化した組織をごく小さな範囲で有するが、大部分が未分化細胞で構成されている (図16b)。したがって、p53-nullの背景においては、c-Mycはレトロウイルスのサイレンシングを抑制し、分化を阻害する。

【0116】

[実施例7: ヒトiPS細胞樹立に及ぼすp53抑制の効果]

(A) 次いで、p53欠損がヒトiPS細胞の発生効率を促進するかどうかを調べた。この目的を達成するために、p53のドミナントネガティブ変異体 (p275S又はDD (Bowman T. et al. Genes Dev 10(7), 826 (1996))) を3初期化因子又は4初期化因子と共にヒト成人皮膚線維芽細胞 (HDF) に導入した。P275S変異体のレトロウイルスベクターは実施例6の記載と同様に作製した。DD変異体のレトロウイルスベクターは2ステップPCRにより作製した。1回目のPCRは、p53-DD-S (cgg ata tca gcc tca aga gag cgc tgc c; 配列番号39) 及びp53-1223AS、並びにp53-DD-AS (ggc agc gct ctc ttg agg ctg ata tcc g; 配列番号40) 及びp53-1Sの2つのプライマーセットを用いて行った。ドミナントネガティブ変異体、及び4初期化因子又は3初期化因子のレトロウイルスは、PLAT-E細胞において作製した。iPS細胞の発生については、各種レトロウイルスを含むPLAT-E上清を等量混ぜ合わせ、HDFに遺伝子導入した。

【0117】

iPS細胞コロニーの数は、2つの独立したp53ドミナントネガティブ変異体について著しく増加することがわかった (図17a、b)。3因子及びp53 DD変異体により発生したヒトiPS細胞をSCIDマウスの精巢に移植すると、三胚葉の種々の組織を含むテラトーマが形成された (図17c)。

【0118】

(B) 別の実験では、ヒトp53に対するshRNAの効果を調べた (shRNA2; Stewart S.A. et al. RNA 9(4), 493 (2003))。shRNA発現のレトロウイルスベクターである、pMK0.1-puro (Addgene #8452)、pMK0.1-puro p53 shRNA1 (Addgene #10671) 及びpMK0.1-puro p53 shRNA2 (Addgene #10672; shRNA配列は配列番号28に示される) はAddgeneから入手した。shRNA、及び4初期化因子又は3初期化因子のレトロウイルスはPLAT-Eにおいて作製した。iPS細胞の発生については、各種レトロウイルスを含むPLAT-E上清を等量混ぜ合わせ、HDFに遺伝子導入した。

【0119】

HDFにおいて、p53 shRNA2は効果的にp53タンパク質レベルを抑制することが確認された (図18)。p53 shRNAを4初期化因子と共導入した場合、ヒトiPS細胞のコロニー数は著し

10

20

30

40

50

く増加した(図19)。アンチセンスRNA配列に1ヌクレオチド欠損を含むコントロールshRNA(shRAN1)はそのような効果を示さなかった(図18及び図19)。マウスp53を共導入すると、shRNA2の効果が抑制された。3初期化因子と共導入した場合、同様な結果が得られた(図20)。これらのデータにより、マウスだけでなくヒトにおいても、p53は直接的な初期化を抑制することが示された。

【0120】

[実施例8:MDM2によるp53の機能阻害]

p53に結合し、p53を阻害するMDM2の効果を調べた。具体的には、レトロウイルスベクターを用いてヒトMDM2遺伝子(配列番号41)を4初期化因子又は3初期化因子とHDFに共導入し、実施例7と同様の方法でiPSコロニーを形成させた(n=4)。

10

【0121】

その結果、MDM2遺伝子の共導入によりiPS細胞の樹立効率が改善された(図21)。MDM2は別の腫瘍抑制分子であるレチノブラストーマ(Rb)とも相互作用して阻害するが、shRNAによりRbを抑制してもiPS細胞の発効率は促進されなかった。これらのデータにより、MDM2の効果はp53の機能抑制に起因することが示唆された。

【0122】

[実施例9:in vitro分化誘導および免疫染色]

次に、本発明者らは、実施例7(B)において3初期化因子及びp53 shRNAで作製した細胞が、in vitroの分化させた際に多能性であるかどうかを確認した。胚様体を形成させるため、細胞を採取し、ポリヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)でコートされたdishに移して8日間インキュベートした。浮遊培養をした後、形成された胚様体をゼラチンでコートされたプレート上に置き、別に6日間インキュベートした。インキュベート後、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定化し、透過処理をして、5%正常ヤギ血清、1%BSA及び0.2%TritonX-100を含有するPBSでブロッキングした。免疫細胞化学により、分化マーカー(AF P, α -SMA, β -tublin)の発現を調べた。一次抗体として、anti- α -fetoprotein(AFP)(1:100, R&D systems)、anti- α -smooth muscle actin(α -SMA)(1:500, DAKO)及びanti- β -tublin(1:100, Chemicon)を用いた。Cy3標識抗マウスIgG(1:500, Chemicon)を二次抗体として用いた。核はHoechst 33342(Invitrogen)で染色した。その結果を図22に示す。iPS細胞は、内胚葉(AFP)、中胚葉(α -SMA)及び外胚葉(β -tublin)の三胚葉に分化した。iPSクローン間に分化能の有意差は見られなかった。

20

30

【0123】

[実施例10:未分化マーカーおよび分化マーカーのRT-PCR解析]

実施例7(B)で得られたヒトiPS細胞及び実施例9で得られた分化細胞における幹細胞マーカー(Oct3/4, Sox2, Nanog)及び分化マーカー(FoxA2及びSox17(内胚葉)、Msx1(中胚葉)、Map2及びPax6(外胚葉))を、Rever Tra Ace Kit(Takara)を用いてRT-PCRにより解析した。マーカーの増幅に用いたプライマー対は表1に示す。

【0124】

【表 1】

幹細胞マーカー

遺伝子	配列(5' - 3')	配列番号
Oct3/4	GAC AGG GGG AGG GGA GGA GCT AGG	43
	CTT CCC TCC AAC CAG TTG CCC CAA AC	44
Sox2	GGG AAA TGG GAG GGG TGC AAA AGA GG	45
	TTG CGT GAG TGT GGA TGG GAT TGG TG	46
Nanog	CAG CCC CGA TTC TTC CAC CAG TCC C	47
	CGG AAG ATT CCC AGT CGG GTT CAC C	48

10

分化マーカー

FoxA2	TGG GAG CGG TGA AGA TGG AAG GGC AC	49
	TCA TGC CAG CGC CCA CGT ACG ACG AC	50
Sox17	CGC TTT CAT GGT GTG GGC TAA GGA CG	51
	TAG TTG GGG TGG TCC TGC ATG TGC TG	52
Msx1	CGA GAG GAC CCC GTG GAT GCA GAG	53
	GGC GGC CAT CTT CAG CTT CTC CAG	54
Pax6	ACC CAT TAT CCA GAT GTG TTT GCC CGA G	55
	ATG GTG AAG CTG GGC ATA GGC GGC AG	56
Map2	CAG GTG GCG GAC GTG TGA AAA TTG AGA GTG	57
	CAC GCT GGA TCT GCC TGG GGA CTG TG	58

20

内部標準

Nat1	ATT CTT CGT TGT CAA GCC GCC AAA GTG GAG	59
	AGT TGT TTG CTG CGG AGT TGT CAT CTC GTC	60

30

【 0 1 2 5 】

その結果、3初期化因子及びp53 shRNAで作製した細胞は、ES細胞と同程度にNanog、内在性Oct3/4、及び内在性Sox2を発現した（図23、レーンU）。胚様体を介した分化の後、これらの細胞は3つの胚葉のマーカー遺伝子を発現した（図23、レーンD）。これらの結果により、マウスだけでなくヒトにおいても、p53は直接的な初期化を抑制することが示された。

【 0 1 2 6 】

[実施例11：p53抑制によるiPS細胞樹立効率改善におけるp21の役割]

iPS細胞発生の促進が見られる原因となるp53標的遺伝子を解明するため、p53ワイルドタイプMEFとp53-null MEFとの間、及びコントロールHDFとp53ノックダウンHDFとの間の遺伝子発現をDNAマイクロアレイにより比較した。MEFでは、p53-null MEFにおいて1590遺伝子が5倍超で増加し、1485遺伝子が5倍超で減少した。HDFでは、p53 shRNAにより290遺伝子が5倍超で増加し、430遺伝子が5倍超で減少した。マウスとヒトの間では、v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (MYB) とRAS oncogenes familyであるRAB39Bとを含む、増加した8遺伝子が共通である（表2）。2種の間では、p53、cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)、BTG family, member 2 (BTG2)、zinc finger, matrin type 3 (ZMAT3)、及びMDM2を含む、減少した27遺伝子が共通である。

40

【 0 1 2 7 】

【表 2】

増加遺伝子	
Accession No.	Gene Name
NM 000809	Homo sapiens gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 4 (GABRA4)
NM 182767	Homo sapiens solute carrier family 6 (neutral amino acid transporter), member 15 (SLC6A15), transcript variant 1
NM 014264	Homo sapiens polo-like kinase 4 (Drosophila) (PLK4)
NM 198391	Homo sapiens fibronectin leucine rich transmembrane protein 3 (FLRT3), transcript variant 2
NM 171998	Homo sapiens RAB39B, member RAS oncogene family (RAB39B)
NM 001482	Homo sapiens glycine amidinotransferase (L-arginine:glycine amidinotransferase) (GATM), nuclear gene encoding
NM 001130173	Homo sapiens v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian) (MYB), transcript variant 1
NM 004004	Homo sapiens gap junction protein, beta 2, 26kDa (GJB2)
減少遺伝子	
Accession No.	Gene Name
NM 000546	Homo sapiens tumor protein p53 (TP53), transcript variant 1
NM 000389	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1) (CDKN1A)
NM 001461	Homo sapiens flavin containing monooxygenase 5 (FMO5)
NM 002474	Homo sapiens myosin, heavy chain 11, smooth muscle (MYH11), transcript variant SM1A
NM 006763	Homo sapiens BTG family, member 2 (BTG2)
NM 004455	Homo sapiens exostosin (multiple)-like 1 (EXTL1)
NM 022470	Homo sapiens zinc finger, matrix type 3 (ZMAT3), transcript variant 1
NM 006536	Homo sapiens CLCA family member 2, chloride channel regulator (CLCA2)
NM 001017915	Homo sapiens inositol polyphosphate-5-phosphatase, 145kDa (INPP5D), transcript variant 1
NM 006879	Homo sapiens Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse) (MDM2), transcript variant
NM 004469	Homo sapiens c-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D) (FIGF)
NM 016352	Homo sapiens carboxypeptidase A4 (CPA4)
NM 024817	Homo sapiens thrombospondin, type 1, domain containing 4 (THSD4)
NM 000526	Homo sapiens keratin 14 (KRT14)
NM 000846	Homo sapiens glutathione S-transferase A2 (GSTA2)
NM 000198	Homo sapiens hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 2 (HSD3B2)
NM 032866	Homo sapiens cingulin-like 1 (CGNL1)
NM 000230	Homo sapiens leptin (LEP)
NM 020405	Homo sapiens plexin domain containing 1 (PLXDC1)
NM 004975	Homo sapiens potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 1 (KCNB1)
NM 001128310	Homo sapiens SPARC-like 1 (hevin) (SPARCL1), transcript variant 1
NM 032588	Homo sapiens tripartite motif-containing 63 (TRIM63)
NM 022047	Homo sapiens differentially expressed in FDCP 6 homolog (mouse) (DEF6)
NM 003322	Homo sapiens tubby like protein 1 (TULP1)
NM 003012	Homo sapiens secreted frizzled-related protein 1 (SFRP1)
NM 002164	Homo sapiens indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase (INDO)
NM 004060	Homo sapiens cyclin G1 (CCNG1), transcript variant 1

【 0 1 2 8 】

これらの中で、増加した4遺伝子及び減少した7遺伝子を4初期化因子のみと共に、或いは4因子とp53 shRNAと共にレトロウイルスによりHDFに遺伝子導入した。もしこれらの標的遺伝子のいくつかがいPS細胞発生の促進が見られる原因であるとすれば、減少した遺伝子及びp53 shRNAの共発現がp53抑制の効果に反対に作用するとしても、増加した遺伝子をワイルドタイプ線維芽細胞に強制発現させることによりp53抑制の効果が模倣されると推論された。増加した4遺伝子の中で、p53タンパク質に結合して分解するMDM2の強制発現によるp53抑制の効果を模倣するものはなかった（図24a）。減少した7遺伝子の中では、マウス由来のp53、及びp21のみが効果的にp53 shRNAの効果に対抗した（図24b）。また、p2

10

20

30

40

50

1を強制発現させることにより、p53-null MEFから発生するiPS細胞が著しく減少した。これらのデータにより、マウス及びヒトの両方においてp21がiPS細胞発生の際のp53標的として重要であることが強調された。

【0129】

p53-p21の抑制は、Rbを不活性化をもたらす。しかしながら、shRNAによるRbの抑制はiPS細胞の発生効率を促進しなかった(図21)。これらのデータにより、p53-p21抑制のiPS細胞発生に対する効果は、少なくとも部分的には、Rbの制御以外のメカニズムに起因することが示唆された。

【0130】

p21タンパク質はMycに結合し、その転写活性を抑制する(Kitaura, H. et al., J Biol Chem., 275(14), 10477-10483 (2000))。これが、p53-p21抑制によってiPS細胞の発生効率が促進される原因となっているのかもしれない。p53反応性エレメント又はMyc反応性エレメントによって駆動されるルシフェラーゼレポーターを導入することにより、HDFにおけるMyc活性を評価した(図24c)。p53活性がshRNAにより低減することを確認した。これらのノックダウン細胞においては、Myc活性は著しく上昇した。その効果は、c-Mycを含む4因子の導入により見られた場合よりも高かった。これらのデータにより、Mycの活性はp53-p21抑制によるiPS細胞発生の促進に寄与することが示唆された。

【0131】

[実施例12: プラスミド導入によるiPS細胞の樹立]

マウスOct3/4、Klf4およびSox2を発現する発現ベクター pCX-2A-Ms-OKS、及び、マウス c-Mycを発現する発現ベクター pCX-Ms-cMycは、いずれもScience, 322, pp.949-953 (2008)に従い作製した。

【0132】

マウスNanogレポーターを持つp53ホモ欠損マウスの胎仔(受精後13.5日)、および野生型マウスの胎仔(受精後13.5日)から、線維芽細胞(MEF)を単離した。このMEFを、0.1%ゼラチン(Sigma)でコートした6well培養プレート(Falcon)に1well当たり 1.3×10^5 個の割合で播種した。培養液はDMEM/10% FBS (DMEM(Nacalai tesque)にウシ胎児血清を10%加えたもの)を使用し、該細胞を37℃、5% CO₂で培養した。翌日、FuGene6 transfection reagent (Roche) またはLipofectamin LTX (Invitrogen)を用いて、試薬添付のプロトコールに従い、pCX-2A-Ms-OKS及びpCX-Ms-cMycと一緒に導入した(day 0)。導入から7日目まで、毎日導入を繰り返した。導入から4日目に、培地を、LIFを加えたES細胞用培地(DMEM (Nacalai tesque)に15%牛胎児血清、2 mM L-グルタミン(Invitrogen)、100 µM 非必須アミノ酸(Invitrogen)、100 µM 2-メルカプトエタノール(Invitrogen)、50 U/mL ペニシリン(Invitrogen)と50 µg/mL ストレプトマイシン(Invitrogen)を加えたもの)に交換した。以後、コロニーが観察できるようになるまで、2日ごとに、LIFを加えたES細胞用培地を新鮮なものと交換した。導入後21日目からピューロマイシン(1.5 µg/mL)で選択を行い、導入後33日目にGFP陽性コロニーを数えた。タイムスケジュールをまとめたものを図25aに、また得られたGFP陽性コロニー数を図25bに示す。野生型のMEFにプラスミドで4遺伝子を導入した場合(図25b中+/+)はGFP陽性コロニーが一つも生じなかった。p53ホモ欠損のMEFにプラスミドで4遺伝子を導入した場合(図25b中-/-)は、多数のGFP陽性コロニーが得られた。

【0133】

プラスミドDNAのゲノムへの組み込みを調べるために、プラスミドの各部分を増幅し得る16種類のPCRプライマーを設計し(Science, 322, pp.949-953 (2008)のFig.2A参照)、そのうちの11種類のプライマーを用いてGenomic PCRを行った。結果を図25cに示す。得られた12個のGFP陽性クローンのうちの6クローンでは、外来性DNAの増幅は観察されなかった(図25c: 上図)。さらに、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycをプローブに用いたサザンブロット解析では、これらのクローンでは外来遺伝子の組み込みは検出されなかった(図25c: 下図)。以上の結果から、これらのiPS細胞は、宿主ゲノム内へのpCX-2A-Ms-OKS及びpCX-Ms-cMycプラスミドの組み込みを有していないことが示された。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 4 】

得られた細胞の写真を図25dに示す（左上：位相差像、右上：GFP陽性コロニー像、左下：位相差像とGFP陽性コロニー像とを重ね合わせた像）。該細胞は形態的にマウスES細胞と区別がつかない形態を示し、またGFP陽性であったことから、iPS細胞の樹立が確認された。さらに、ICRマウスの胚盤胞に、プラスミドの組み込みのないiPSクローンを注入した。結果を図25dの右下図に示す。毛色から判断される通り、iPSクローンからアダルトキメラを生じさせることができた。この結果から、プラスミドの組み込みのないiPS細胞が多分化能を有することが確認された。

【 0 1 3 5 】

本発明を好ましい態様を強調して説明してきたが、好ましい態様の変更され得ることは当業者にとって自明であろう。本発明は、本発明が本明細書に詳細に記載された以外の方法で実施され得ることを意図する。したがって、本発明は添付の「請求の範囲」の精神および範囲に包含されるすべての変更を含むものである。

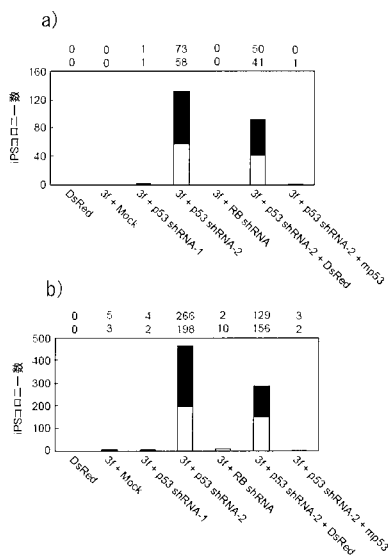
【 0 1 3 6 】

ここで述べられた特許および特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

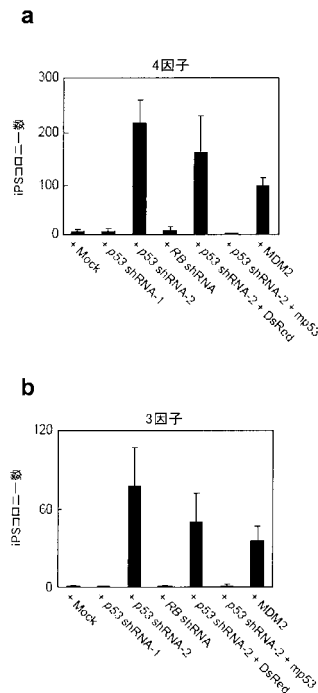
【 0 1 3 7 】

本出願は、米国仮特許出願No. 61/076,487、No. 61/095,573、No. 61/194,700、No. 61/200,307及びNo. 61/209,686を基礎としており、ここに引用されたことによって、その内容は本明細書に組み込まれるものである。

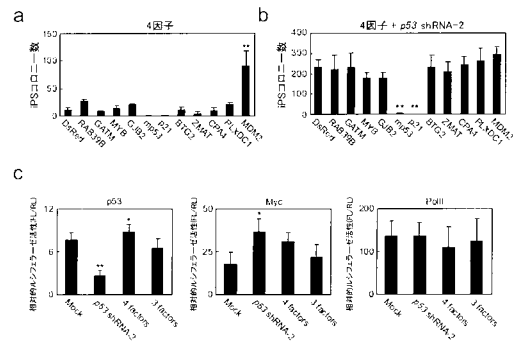
【 図 2 0 】



【 図 2 1 】

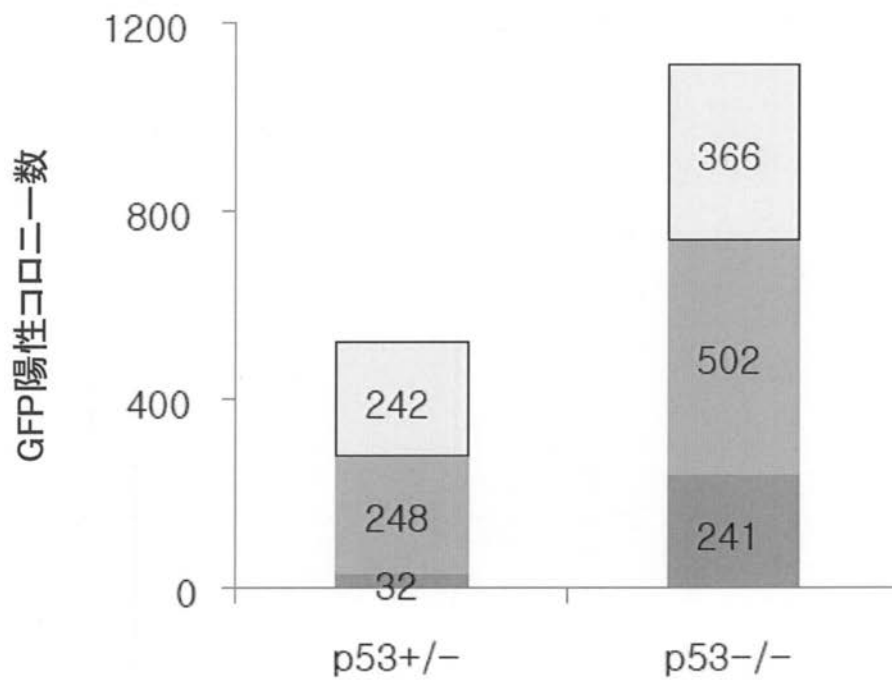


【図 24】

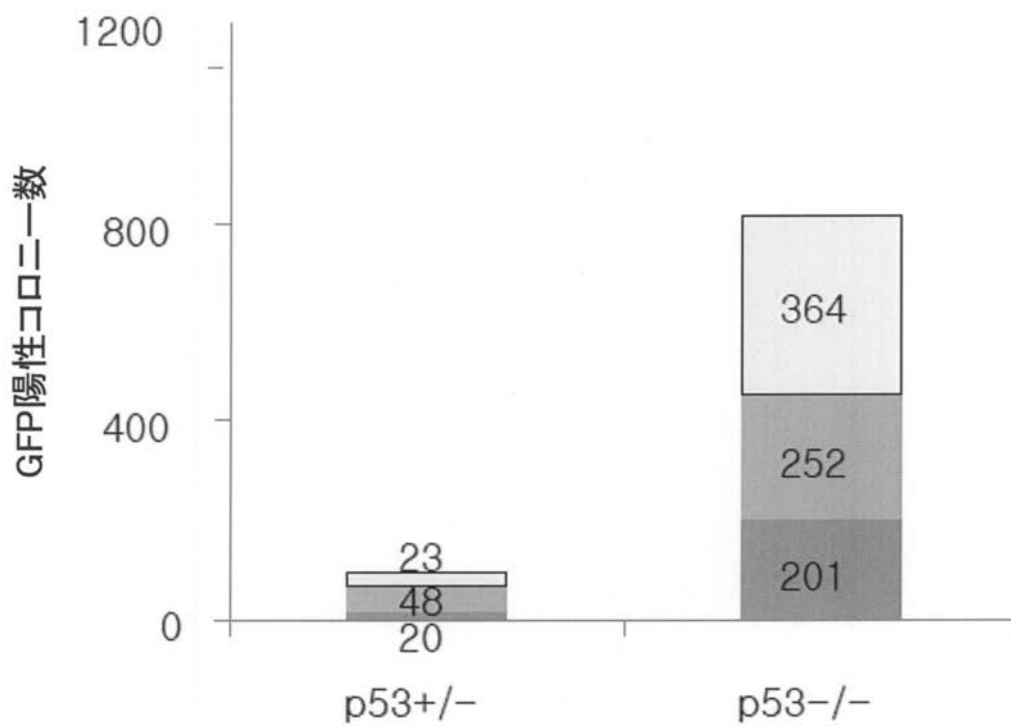


【図1】

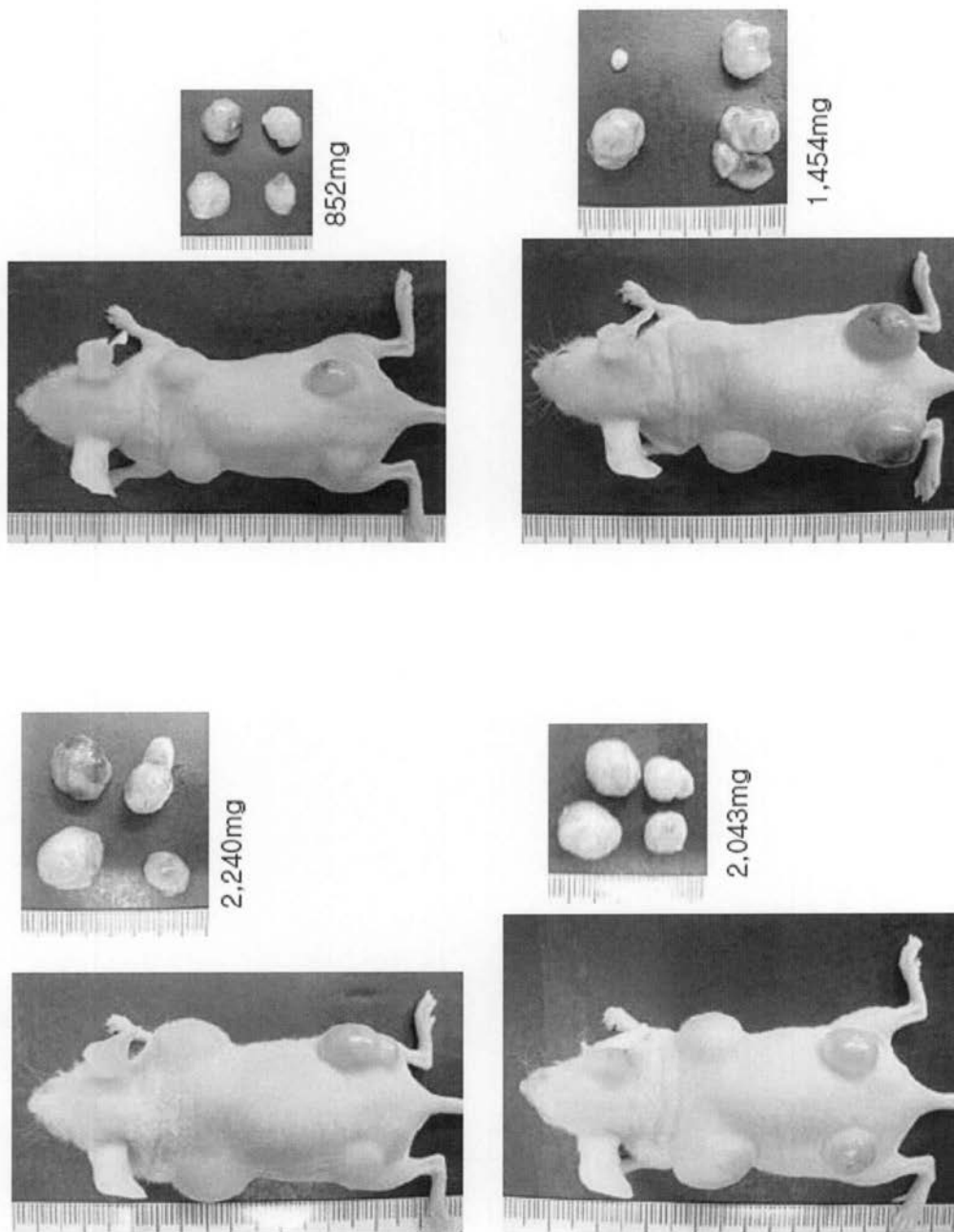
(A)



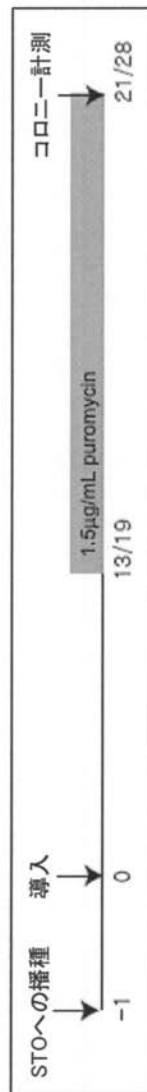
(B)



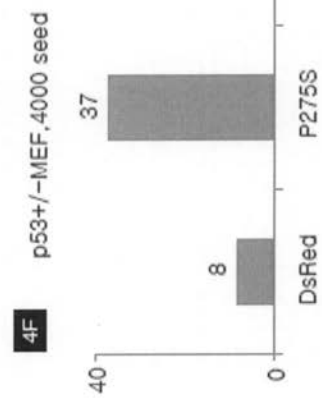
【図2】



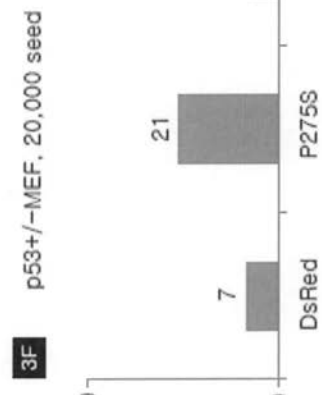
(A)



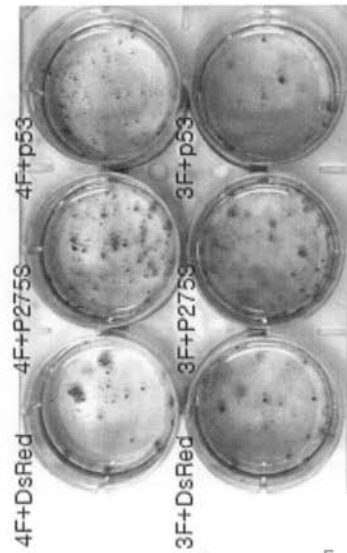
(B)



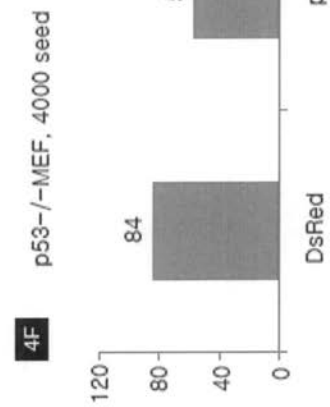
(C)



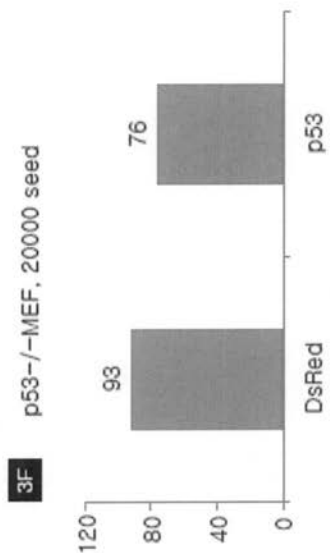
(D)



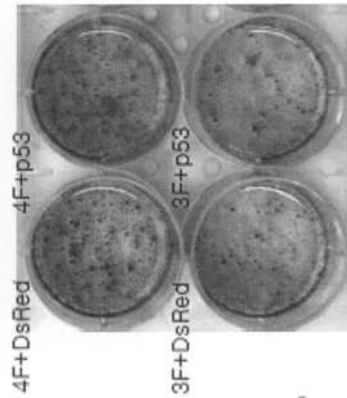
(E)



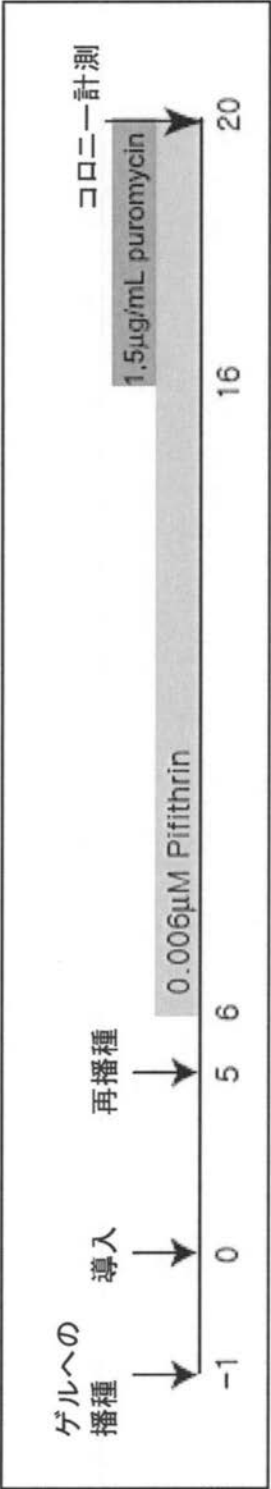
(F)



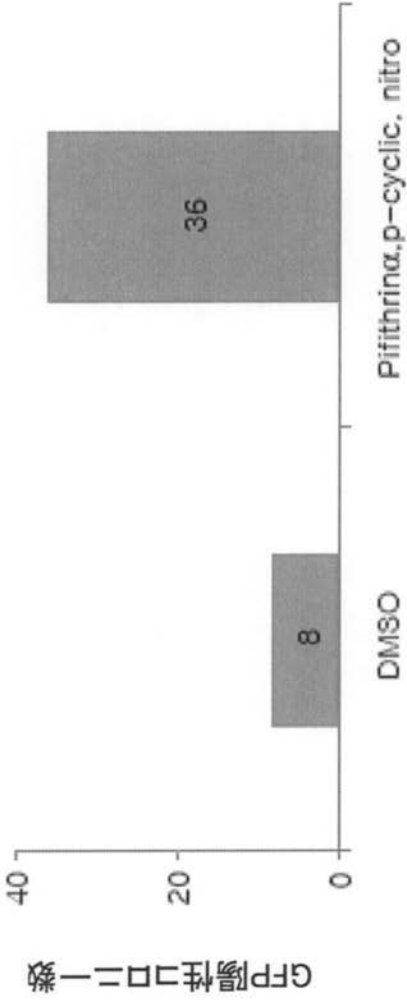
(G)



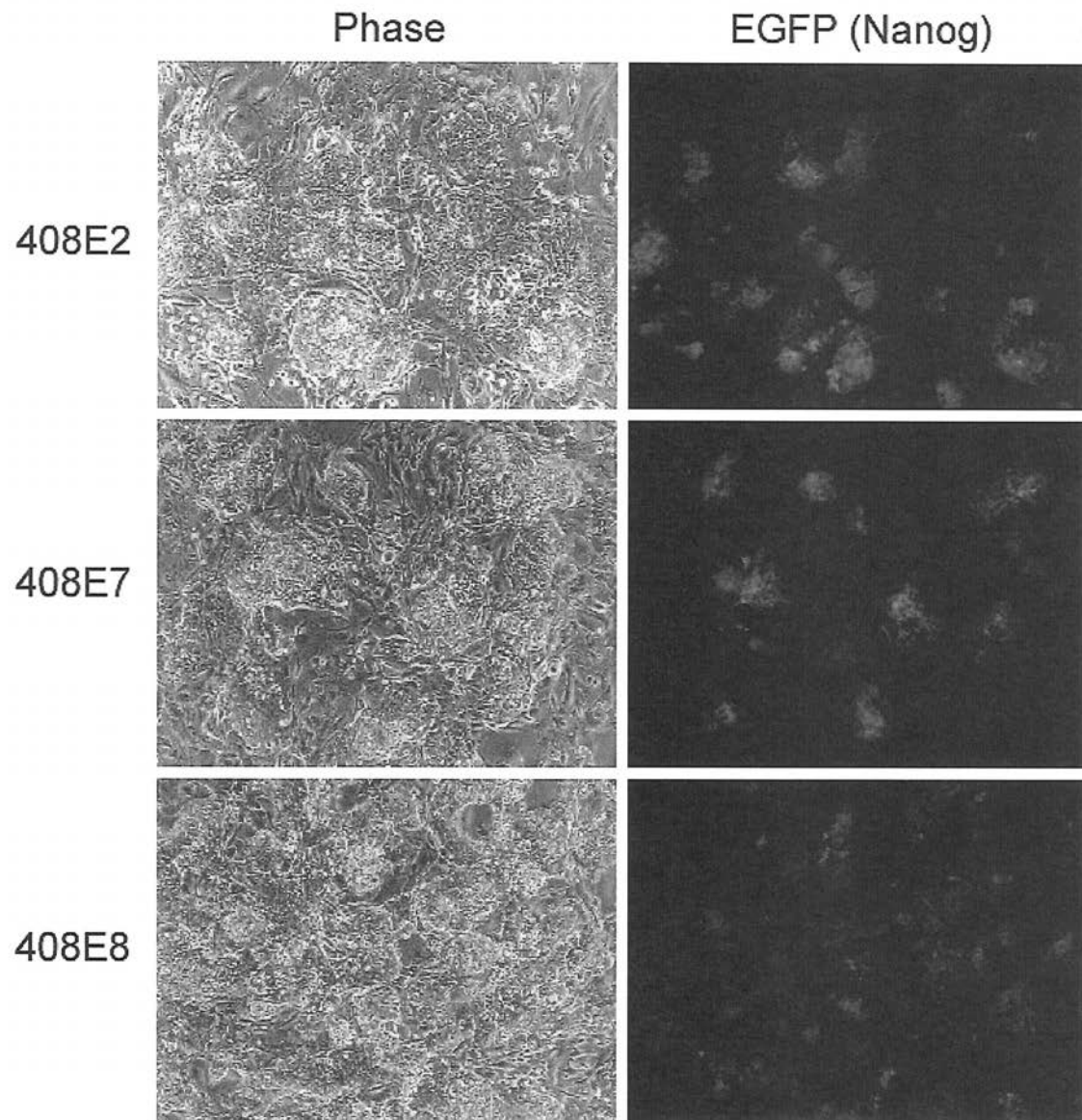
(A) 【図 4】



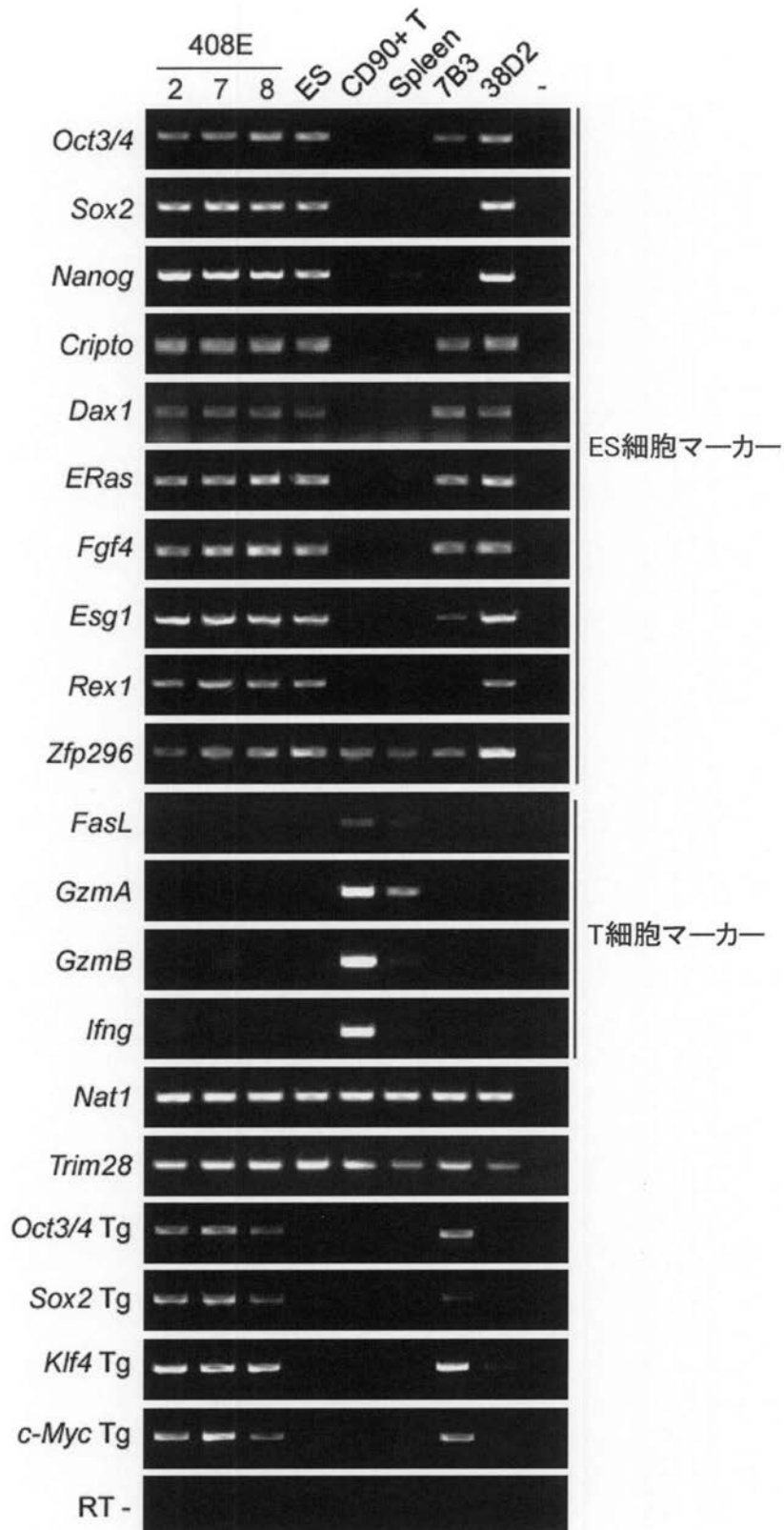
(B)



【図5】

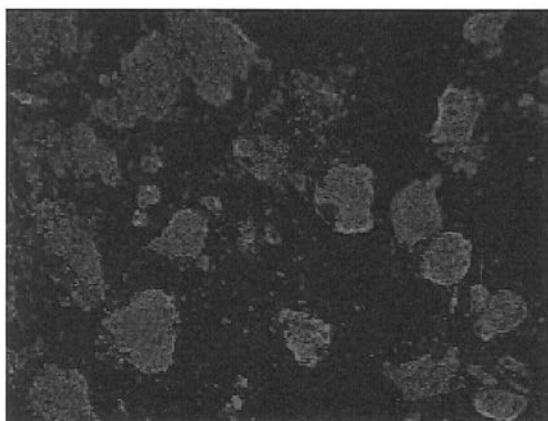


【 図 6 】

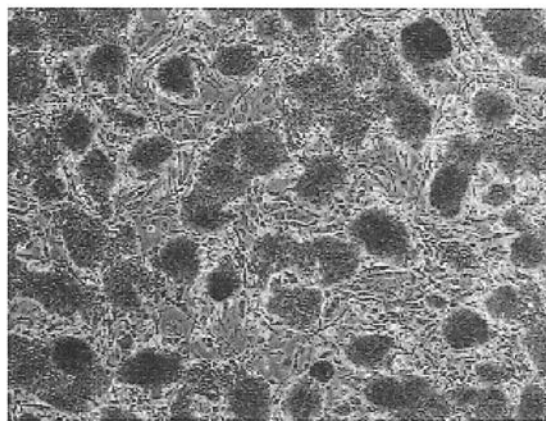


【図 7】

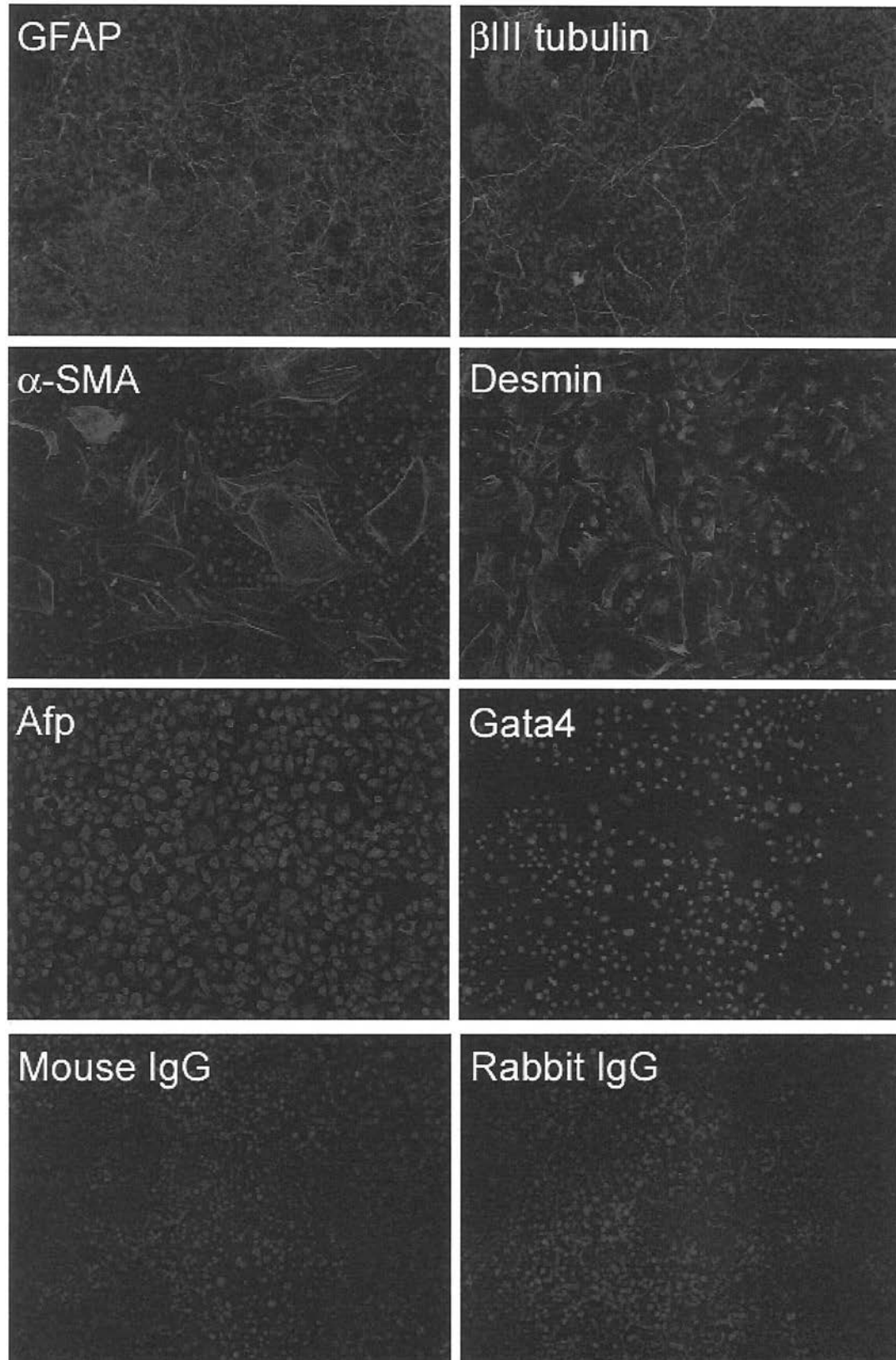
SSEA1



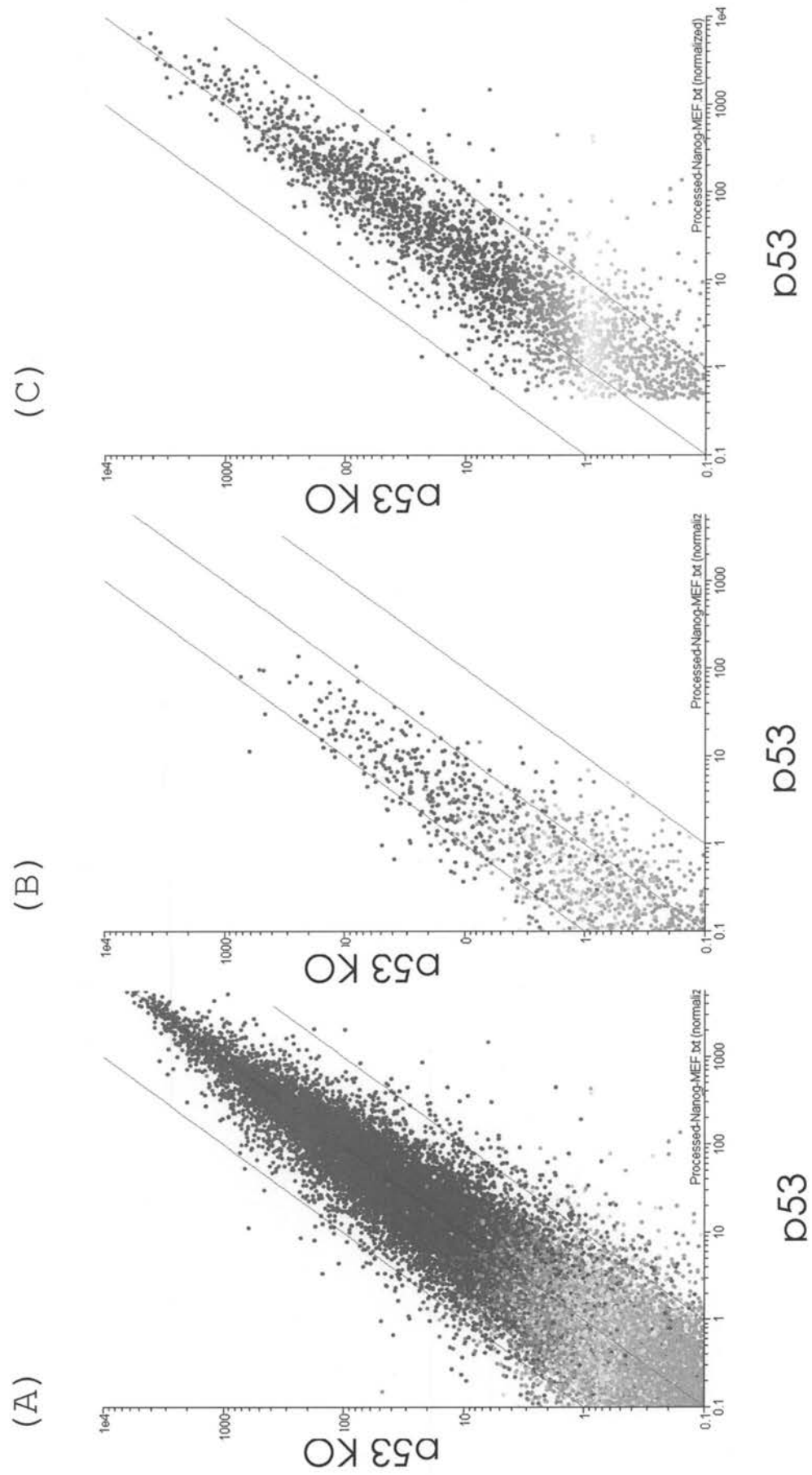
AP



【図 8】



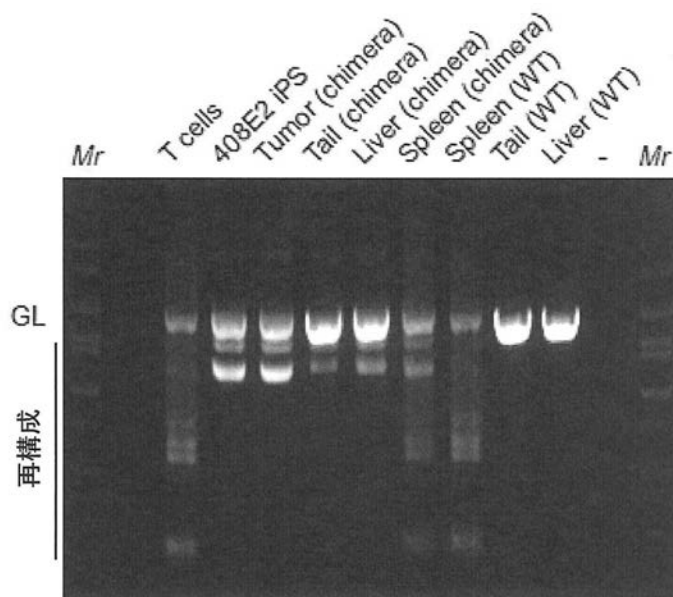
【 図 9 】



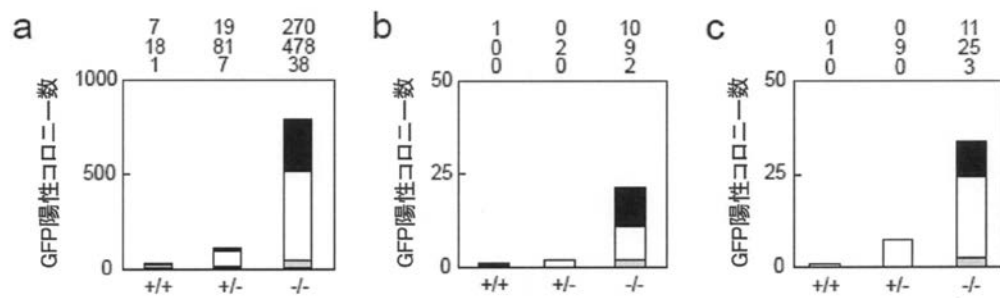
【図 10】



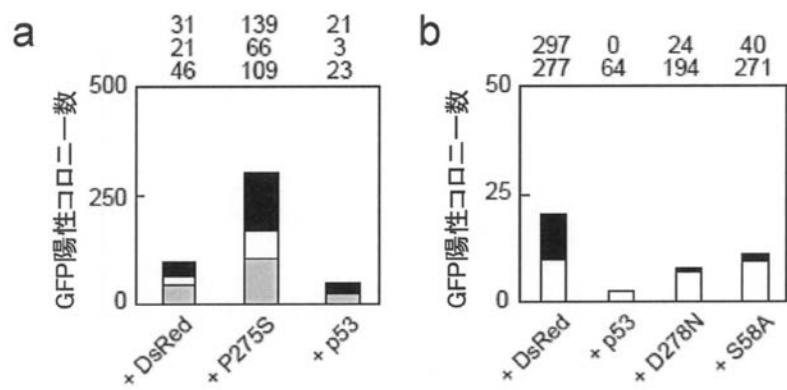
【図 11】



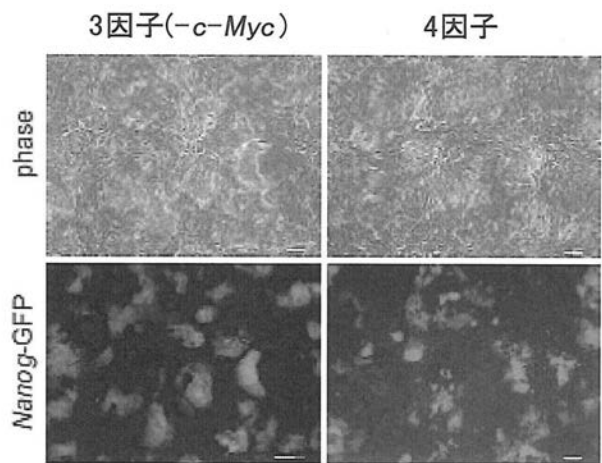
【図 12】



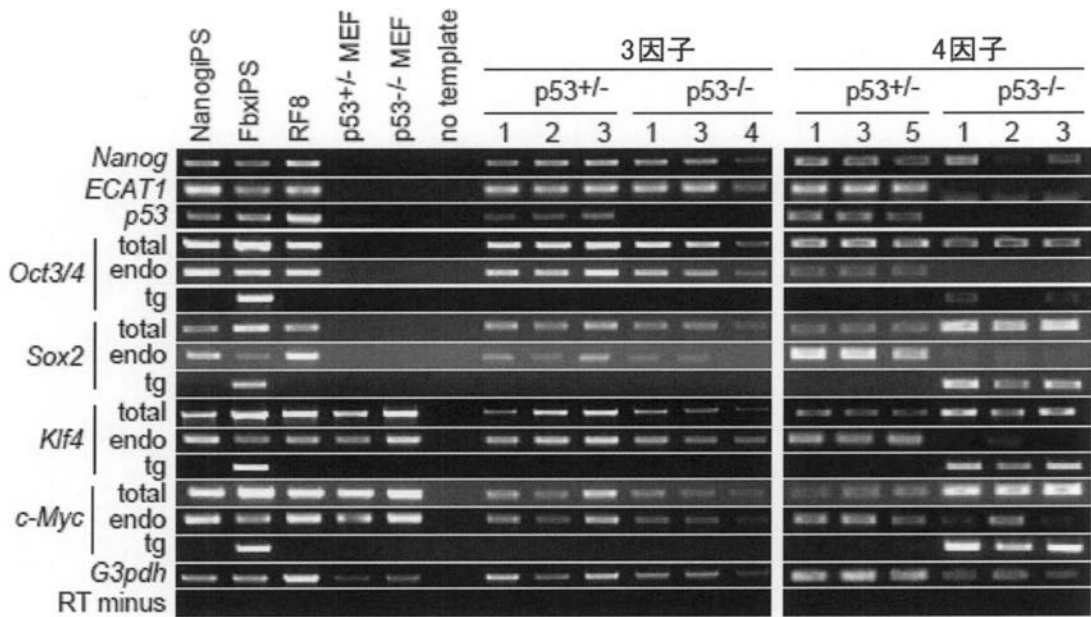
【 図 1 3 】



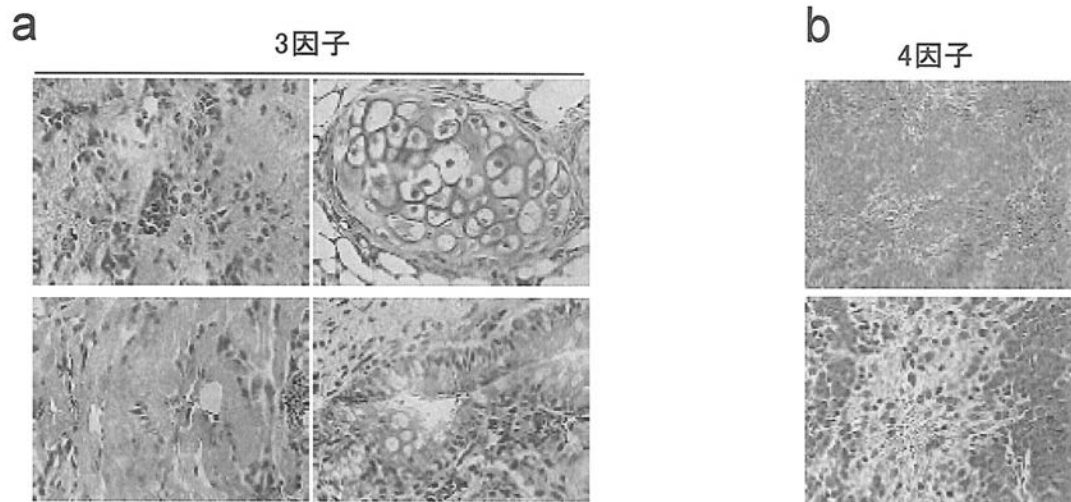
【 図 1 4 】



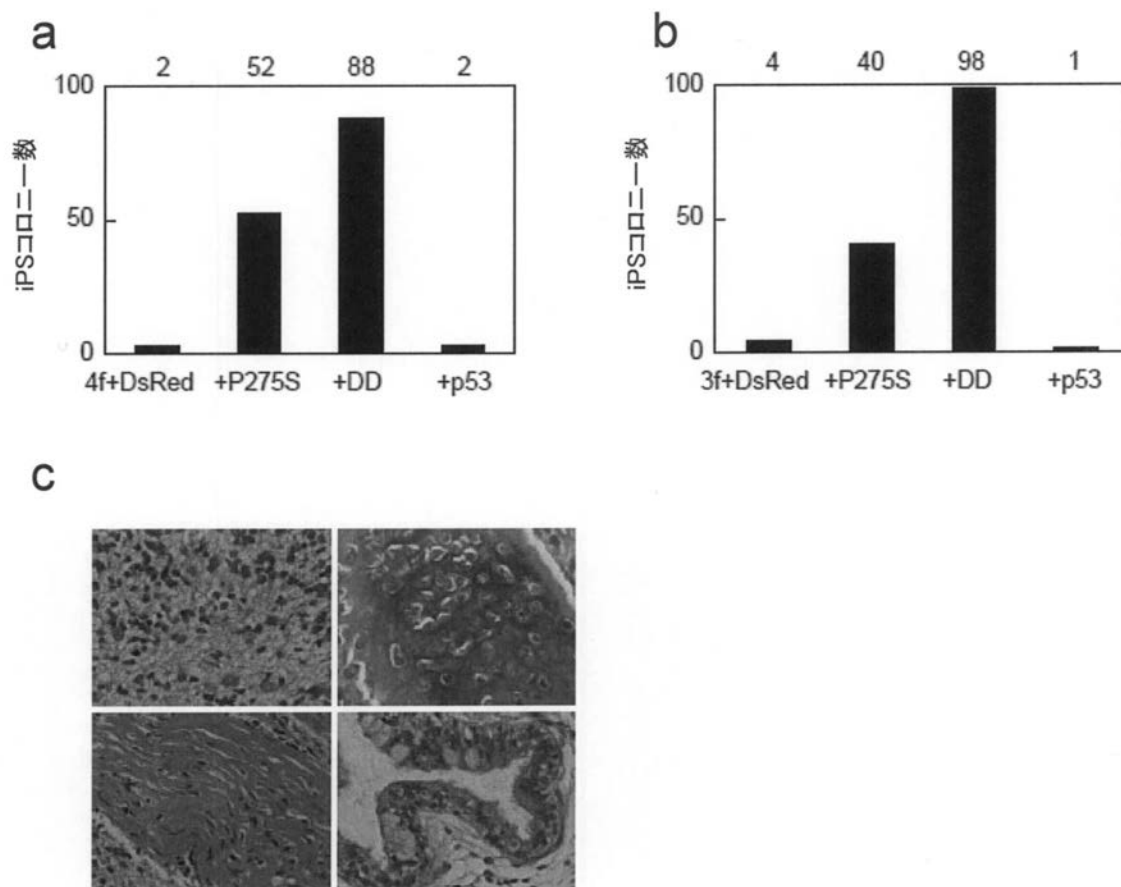
【 図 1 5 】



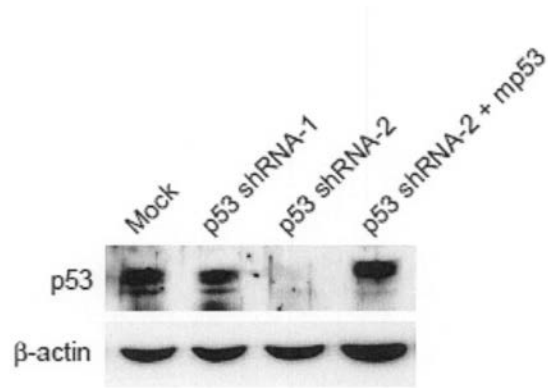
【図16】



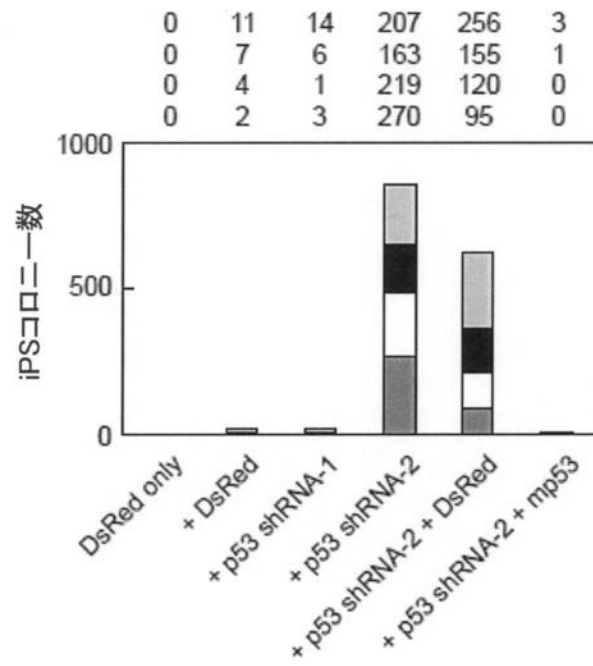
【図17】



【図 18】



【図 19】



【図 22】

β III-TUBULIN



SMA

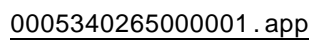


AFP



[illegible]

【配列表】



フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 61/194,700
 (32)優先日 平成20年9月30日(2008.9.30)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/200,307
 (32)優先日 平成20年11月25日(2008.11.25)
 (33)優先権主張国 米国(US)
 (31)優先権主張番号 61/209,686
 (32)優先日 平成21年3月10日(2009.3.10)
 (33)優先権主張国 米国(US)

(出願人による申告)平成20年度文部科学省、「科学技術試験研究委託事業」、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

- (72)発明者 山中 伸弥
 京都府京都市左京区聖護院川原町53 国立大学法人京都大学 物質・細胞統合システム拠点 iPS細胞研究センター内
 (72)発明者 高橋 和利
 京都府京都市左京区聖護院川原町53 国立大学法人京都大学 物質・細胞統合システム拠点 iPS細胞研究センター内
 (72)発明者 沖田 圭介
 京都府京都市左京区聖護院川原町53 国立大学法人京都大学 物質・細胞統合システム拠点 iPS細胞研究センター内

審査官 幸田 俊希

- (56)参考文献 国際公開第2007/069666(WO, A1)
 LEE, M.K. AND SABAPATHY, K., The R246S hot-spot p53 mutant exerts dominant-negative effects in embryonic stem cells in vitro and in vivo., J. Cell Sci., 2008年6月1日, Vol.121, No.11, pp.1899-906
 HE, Z. et al., Knockdown of p53 by RNAi in ES cells facilitates RA-induced differentiation into muscle cells., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2005年9月30日, Vol.335, No.3, pp.676-83
 INOUE, K. et al., Generation of cloned mice by direct nuclear transfer from natural killer T cells., Curr. Biol., 2005年6月21日, Vol.15, No.12, pp.1114-8
 MALLI, P. et al., Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts., Stem Cells, 2008年8月, Vol.26, No.8, pp.1998-2005
 ZHAO, Y. et al., Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation., Cell Stem Cell, 2008年11月6日, Vol.3, No.5, pp.475-9
 JIN, X. et al., Human telomerase catalytic subunit (hTERT) suppresses p53-mediated anti-apoptotic response via induction of basic fibroblast growth factor., Exp. Mol. Med., 2010年8月31日, Vol.42, No.8, pp.574-82
 ZHAO, R. AND DALEY, G.Q., From fibroblasts to iPS cells: induced pluripotency by defined factors., J. Cell. Biochem., 2008年11月1日, Vol.105, No.4, pp.949-55
 MARION, R.M. et al., A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity., Nature, 2009年8月27日, Vol.460, No.7259, pp.1149-53
 KAWAMURA, T. et al., Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprograming

mming. , Nature , 2 0 0 9 年 8 月 2 7 日 , Vol.460, Vol.7259 , pp.1140-4
HONG,H. et al. , Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21
pathway. , Nature , 2 0 0 9 年 8 月 2 7 日 , Vol.460, No.7259 , pp.1132-5
XU,F. et al. , Overexpression of BMI1 confers clonal cells resistance to apoptosis and
contributes to adverse prognosis in myelodysplastic syndrome. , Cancer Lett. , 2 0 1 2
年 4 月 1 日 , Vol.317, No.1 , pp.33-40
RIES,S. et al. , Opposing effects of Ras on p53: transcriptional activation of mdm2 and
induction of p19ARF. , Cell , 2 0 0 0 年 1 0 月 1 3 日 , Vol.103, No.2 , pp.321-30

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 N 1 5 / 0 9

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

T h o m s o n I n n o v a t i o n

P u b M e d