

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6028236号
(P6028236)

(45) 発行日 平成28年11月16日(2016.11.16)

(24) 登録日 平成28年10月28日(2016.10.28)

(51) Int. Cl.			F I		
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02	Z N A
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
請求項の数 16 (全 24 頁) 最終頁に続く					

(21) 出願番号 特願2013-533680 (P2013-533680)
 (86) (22) 出願日 平成24年9月12日(2012.9.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2012/073272
 (87) 国際公開番号 W02013/039087
 (87) 国際公開日 平成25年3月21日(2013.3.21)
 審査請求日 平成27年9月8日(2015.9.8)
 (31) 優先権主張番号 特願2011-197931 (P2011-197931)
 (32) 優先日 平成23年9月12日(2011.9.12)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 504159235
 国立大学法人 熊本大学
 熊本県熊本市中央区黒髪二丁目39番1号
 (74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス
 (72) 発明者 江良 択実
 熊本県熊本市中央区本荘2丁目2番1号
 国立大学法人熊本大学内
 審査官 福澤 洋光

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 物質のスクリーニング方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

初期化遺伝子の導入のみでは人工多能性幹細胞を製造できない疾患に罹患した個体に由来する細胞であって初期化遺伝子が導入された細胞を被験物質の存在下で培養し、前記細胞の人工多能性幹細胞への誘導を促進する被験物質を選別することを含む、物質のスクリーニング方法。

【請求項2】

前記疾患がキナーゼの活性の変化に起因する、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記疾患がアクチピン受容体様キナーゼ2の活性の変化に起因する、請求項1又は2に記載の方法。 10

【請求項4】

前記疾患が進行性骨化性線維異形成症、ミトコンドリア病又はライソゾーム病である、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記疾患が進行性骨化性線維異形成症又はライソゾーム病である、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項6】

前記疾患が進行性骨化性線維異形成症又はクラッペ病である、請求項1から5のいずれか1項に記載の方法。 20

【請求項 7】

前記細胞がヒトの細胞である、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記細胞が、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において第 206 番目のアルギニンがヒスチジンに変異したアミノ酸配列をコードする遺伝子を有する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記細胞が、配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において第 356 番目のグリシンがアスパラギン酸に変異したアミノ酸配列をコードする遺伝子を有する、請求項 7 又は 8 に記載の方法。

【請求項 10】

初期化遺伝子が、Oct3/4 遺伝子、Klf4 遺伝子、Sox2 遺伝子、及び c-Myc 遺伝子である、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 11】

前記細胞が線維芽細胞である、請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

さらに、アクチピン受容体様キナーゼ 2 を阻害する被験物質を選別することを含む、請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

上記疾患に対する治療剤をスクリーニングする方法である、請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

進行性骨化性線維異形成症、ミトコンドリア病又はライソゾーム病に対する治療剤をスクリーニングする方法である、請求項 1 から 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 15】

進行性骨化性線維異形成症又はライソゾーム病に対する治療剤をスクリーニングする方法である、請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 16】

進行性骨化性線維異形成症又はクラッペ病に対する治療剤をスクリーニングする方法である、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】

本発明は、初期化遺伝子の導入のみでは人工多能性幹細胞を製造できない疾患に罹患した固体に由来する細胞から人工多能性幹細胞の誘導を促進する物質をスクリーニングする方法に関する。

【背景技術】

【0002】

進行性骨化性線維異形成症 (Fibrodysplasia ossificans progressiva; FOP) は、進行性であり、かつ出生後に広範囲に及ぶ軟組織及び/又は筋肉が骨化する先天的な障害である (非特許文献 1 ~ 3)。重度の衰弱と、関節の癒着による平均余命の低下と、胸部の関与を伴う拘束性換気障害がこの疾患の主な症状である。FOP 患者は、徐々に呼吸機能を悪化させ、最終的には呼吸不全のために 40 歳までに死亡する。FOP に関連した異所性の骨化を防ぐ有効な治療法は存在しない。最近の研究では、BMP 1 型受容体 ALK2 として知られるアクチピン A 受容体 1 型 (ACVR1) における突然変異により、この疾患が生じることが明らかにされている (非特許文献 3 ~ 9)。最も一般的な突然変異は R206H であり、ALK2 のキナーゼ活性を変化させ、その結果、ALK2 のキナーゼ活性が構成的に高まると考えられている。例えば、ALK2 における G356D のような幾つかのほかの突然変異が FOP の表現型変異で報告されており、それらもキナーゼ活性に影響を及ぼして ALK2 の構成的な活性化を引き起こすことが報告されている (非特許文献 10)。ALK2 (G356D) のキナーゼ活性が ALK2 (R206H) よりも弱い

10

20

30

40

50

ことが示されており、臨床上的変化はALK2変異体における生物活性の差異に起因することが示唆されている（非特許文献11）。

【0003】

また、ミトコンドリア病は、ミトコンドリアの機能低下を原因とする疾患の総称であり、代表的なものとして慢性進行性外眼麻痺症候群、赤色ぼろ線維・ミオクローヌスてんかん症候群、及びミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様症候群がある。ミトコンドリア病は、生体内全ての細胞においてミトコンドリアが一様に異常をきたす訳でも無いことからその病態は多彩であり、根本的な治療法の無い難病である。

【0004】

また、ライソゾーム病は、細胞内小器官の一つであるライソゾームに関連する酵素の欠損に起因して生じる疾患であり、本来分解されるべき物質が体内に蓄積してしまう疾患である。ライソゾーム病は、欠損する酵素の種類に応じて病名及び症状が異なり、現在は約30種類の疾患が存在する。ライソゾーム病の治療方法としては、酵素補充療法、臓器移植、骨髄移植等が行われているが、症状によっては殆ど効果も得られず、根本的な治療法は知られていない。

10

【0005】

一方、患者の体細胞に由来する人工多能性幹細胞（iPS細胞）は、生物医学研究のみならず、患者に由来する細胞に対する薬剤の効果の検討について強力なツールとして期待されている。特定の疾患から生成されたiPS細胞が疾患に関連した表現型を再現することが明らかにされている。しかしながら、疾患に特異的な病原性がヒトiPS細胞の生成と維持にどのように影響するのかは未だに不明であり、進行性骨化性線維異形成症、ミトコンドリア病、ライソゾーム病等の難病においてiPS細胞を作製できた例はこれまでに知られていない。

20

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】F. S. Kaplan et al., Methods Enzymol 484, 357 (2010).

【非特許文献2】E. M. Shore, F. S. Kaplan, Bone 43, 427 (2008).

【非特許文献3】T. Fukuda et al., J Biol Chem 284, 7149 (2009).

【非特許文献4】P. C. Billings et al., J bone Miner Res 23, 305 (2008)

30

【非特許文献5】J. L. Fiori, P. C. Billings, L. S. de la Pena, F. S. Kaplan, E. M. Shore, J Bone Miner Res 21, 902 (2006).

【非特許文献6】F. S. Kaplan et al., Hum Mutat 30, 379 (2009).

【非特許文献7】A. B. Shafritz et al., N Engl J Med 335, 555 (1996).

【非特許文献8】Q. Shen et al., J Clin Invest 119, 3462 (2009).

【非特許文献9】E. M. Shore et al., Nat Genet 38, 525 (2006).

【非特許文献10】H. Furuya et al., Am J Med Genet A 146A, 459 (2008).

【非特許文献11】T. Fukuda et al., Biochem Biophys Res Commun 377, 905 (2008).

【非特許文献12】Yu PB et al., Nat Med. 2008 Dec; 14(12): 1363-9

【発明の概要】

40

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

進行性骨化性線維異形成症等の難病に対する薬剤の開発では、一般的な培養細胞株や遺伝子異常を有するトランスジェニック・マウス等を用いた薬剤のスクリーニング系により薬剤の選別及び効能試験が行われているのが現状である。しかしながら、これらの手法は試験操作を煩雑にし、薬剤の効能評価に多大な時間を要する等の問題がある。さらに、このような従来の薬剤スクリーニング系では、患者本人に由来する細胞を用いて薬効を評価していないことから、選別された薬剤が実際に有効な薬剤として機能するかどうかの懸念を排除できないという問題がある。

【0008】

50

本発明の課題は、初期化遺伝子の導入のみでは人工多能性幹細胞を製造できない疾患に罹患した固体に由来する細胞から人工多能性幹細胞の誘導を促進する物質をスクリーニングする方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意検討した結果、特に進行性骨化性線維異形成症の患者由来の線維芽細胞に初期化遺伝子である4因子（Oct4、Sox2、KLF4、及びc Myc）を導入して人工多能性幹細胞の誘導を行っても、人工多能性幹細胞はほとんど樹立できないことを見出したが、同時に、ALK2キナーゼの阻害剤として知られるLDN193189の存在下で人工多能性幹細胞を誘導すると、効率的に人工多能性幹細胞を樹立できることを見出した。BMP I型受容体キナーゼの特異的阻害剤LDN-193189は、進行性骨化性線維異形成症の主要な症状である異所性骨形成と機能障害とを軽減することが知られている（非特許文献12）。さらに、本発明者らは、特にライソゾーム病の一つであるクラッペ病に罹患した患者に由来する線維芽細胞に初期化遺伝子である4因子（Oct4、Sox2、KLF4、及びc Myc）を導入して人工多能性幹細胞の誘導を行っても、人工多能性幹細胞はほとんど樹立できないことを見出したが、それと同時に、酪酸ナトリウムの存在下で人工多能性幹細胞を誘導すると、効率的に人工多能性幹細胞を樹立できることを見出した。

本発明は、係る知見により完成されたものである。

【0010】

すなわち、本発明の態様は以下に関する。

(1) 初期化遺伝子の導入のみでは人工多能性幹細胞を製造できない疾患に罹患した個体に由来する細胞であって初期化遺伝子が導入された細胞を被験物質の存在下で培養し、前記細胞の人工多能性幹細胞への誘導を促進する被験物質を選別することを含む、物質のスクリーニング方法。

(2) 前記疾患がキナーゼの活性の変化に起因する、(1)に記載の方法。

(3) 前記疾患がアクチビン受容体様キナーゼ2の活性の変化に起因する、(1)又は(2)に記載の方法。

(4) 前記疾患が進行性骨化性線維異形成症、ミトコンドリア病又はライソゾーム病である、(1)から(3)のいずれかに記載の方法。

(5) 前記疾患が進行性骨化性線維異形成症又はライソゾーム病である、(1)から(4)のいずれかに記載の方法。

(6) 前記疾患が進行性骨化性線維異形成症又はクラッペ病である、(1)から(5)のいずれかに記載の方法。

(7) 前記細胞がヒトの細胞である、(1)から(6)のいずれかに記載の方法。

(8) 前記細胞が、配列番号2に示されるアミノ酸配列において第206番目のアルギニンがヒスチジンに変異したアミノ酸配列をコードする遺伝子を有する、(7)に記載の方法。

(9) 前記細胞が、配列番号2に示されるアミノ酸配列において第356番目のグリシンがアスパラギン酸に変異したアミノ酸配列をコードする遺伝子を有する、(7)又は(8)に記載の方法。

(10) 初期化遺伝子が、Oct3/4遺伝子、Klf4遺伝子、Sox2遺伝子、及びc-Myc遺伝子である、(1)から(9)のいずれかに記載の方法。

(11) 前記細胞が線維芽細胞である、(1)から(10)のいずれかに記載の方法。

(12) さらに、アクチビン受容体様キナーゼ2を阻害する被験物質を選別することを含む、(1)から(11)のいずれかに記載の方法。

(13) 上記疾患に対する治療剤をスクリーニングする方法である、(1)から(12)のいずれかに記載の方法。

(14) 進行性骨化性線維異形成症、ミトコンドリア病又はライソゾーム病に対する治療剤をスクリーニングする方法である、(1)から(13)のいずれかに記載の方法。

(15) 進行性骨化性線維異形成症又はライソゾーム病に対する治療剤をスクリーニングする方法である、(1)から(14)のいずれかに記載の方法。

(16) 進行性骨化性線維異形成症又はクラッペ病に対する治療剤をスクリーニングする方法である、(1)から(15)のいずれかに記載の方法。

【0011】

(17) 初期化遺伝子の導入のみでは人工多能性幹細胞を製造できない疾患に罹患した個体に由来する細胞であって初期化遺伝子が導入された細胞を、該細胞の人工多能性幹細胞への誘導を促進する物質の存在下で培養することを含む、人工多能性幹細胞の製造方法

(18) 前記疾患がキナーゼの活性の変化に起因する、(17)に記載の方法。

(19) 前記疾患がアクチビン受容体様キナーゼ2の活性の変化に起因する、(17)又は(18)に記載の方法。

10

(20) 前記疾患が進行性骨化性線維異形成症、ミトコンドリア病又はライソゾーム病である、(17)から(19)のいずれかに記載の方法。

(21) 前記疾患が進行性骨化性線維異形成症又はライソゾーム病である、(17)から(20)のいずれかに記載の方法。

(22) 前記疾患が進行性骨化性線維異形成症又はクラッペ病である、(17)から(21)のいずれかに記載の方法。

【0012】

(23) 前記細胞がヒトの細胞である、(17)から(22)のいずれかに記載の方法。

(24) 前記細胞が、配列番号2に示されるアミノ酸配列において第206番目のアルギニンがヒスチジンに変異したアミノ酸配列をコードする遺伝子を有する、(23)に記載の方法。

20

(25) 前記細胞が、配列番号2に示されるアミノ酸配列において第356番目のグリニンがアスパラギン酸に変異したアミノ酸配列をコードする遺伝子を有する、(23)又は(24)に記載の方法。

(26) 初期化遺伝子が、Oct3/4遺伝子、Klf4遺伝子、Sox2遺伝子、及びc-Myc遺伝子である、(17)から(25)のいずれかに記載の方法。

(27) 前記細胞が線維芽細胞である、(17)から(26)のいずれかに記載の方法。

【発明の効果】

【0013】

30

本発明によれば、従来の方法による初期化遺伝子の導入のみでは人工多能性幹細胞を製造できない疾患であっても、人工多能性幹細胞の誘導を促進する物質を効率的にスクリーニングすることができる。さらに、本発明によれば、初期化遺伝子の導入のみでは人工多能性幹細胞を製造できない疾患であっても、信頼性の高い薬剤候補を簡便かつ効率的に取得できる薬剤スクリーニング系として利用可能な物質のスクリーニング方法を提供することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】FOP患者からのiPS細胞の形成を調べた結果を示す。(A)FOP患者及び健常者からのiPS細胞の形成効率(Efficiency(%))を示す。AP陽性とES様の形態(典型的(typical)な形態)によってiPSコロニーを判定した。(B)60mmシャーレにおけるiPS細胞コロニーのAP染色を示す。(C)iPS細胞のコロニーの形態を示す。目盛尺:200µm。(D)FOP及び対照における典型的(typical)な及び異常(atypical)なiPS細胞コロニーの数及び比率を示す。

40

【図2】ALK2キナーゼ阻害剤処理による、FOP線維芽細胞からのiPS細胞の生成と維持を調べた結果を示す図である。(A)ALK2キナーゼ阻害剤であるLDN-193189(LDN)及びドルソモルフィンの処理によるiPS細胞コロニー形成の改善効果を示す。AP陽性とES様の形態によってiPSコロニーを判定した。左と右のパネルはそれぞれ、患者F2と患者F4である。(B)LDNで治療した個々の患者から生成されたFOP由来のiPS細胞の位相差写真を示す。目盛尺:200µm。(C)センダイ

50

ウイルス及びヒトESマーカーのRT-PCR解析の結果を示す。iPSのF1-1、F2-1及びF4-1はそれぞれ患者F1、F2及びF4に由来するiPS細胞株を示す。201B7：対照のヒトiPS細胞株。SeV(+): SeVを感染させた線維芽細胞。(D)多能性マーカーについてのFOP由来のiPS細胞株の免疫蛍光染色及びAP染色を示す。目盛尺：200µm。(E)LDNなしでのFOP由来のiPS細胞株の自発的な分化を調べた結果を示す。未分化(U)は典型的(typical)なiPSコロニーを示す。

部分的分化(P)は部分的に分化したコロニーを示し、分化(D)は完全に分化したコロニーを示す(上段写真)。阻害剤を伴った又は伴わない(真ん中と下のパネル)FOP由来のiPS細胞株における3種のコロニーの数及び比率。目盛尺：200µm。(F)LDNを伴わずに培養したFOP由来のiPS細胞株における分化マーカーの免疫蛍光染色を示す。4種のiPS細胞株を染色し、iPS細胞株F2~6から得た代表的なデータが示されている。目盛尺：200µm。(G)多能性及び分化に関連する遺伝子の発現に関する定量的RT-PCRの結果を示す。データはGAPDHに対して標準化し、LDNを伴わずに培養した201B7ヒトiPS細胞株に対する相対的な発現レベルとして表す。

【図3】FOPに由来する線維芽細胞からのiPS細胞の形成効率と、ALK2キナーゼ阻害の時期との関係を調べた結果を示す。(A)LDNによる処理の実験計画を示す。iPS細胞の誘導培養は、図示される期間、LDNによって処理される。(B)図3Aに示す期間、3種の濃度：0nM、30nM及び200nMのLDNで処理した60mmシャーレにおける患者F2(左)と健常者N1(右)に由来するiPS細胞コロニーのAP染色の結果を示す。d1-d7、d1-d30、及びd8-d30はそれぞれ、1日目~7日目、1日目~30日目及び8日目~30日目のLDNの処理期間を示す。(C)各期間LDNで処理したiPS細胞コロニーの形成効率を示す。典型的(typical)なAP陽性コロニーを30日目で計数した。グラフ横軸において、「1」から「7」は、それぞれのLDN処理期間を表し、「1」は「d1-d30」を、「2」は「d1-d7」を、「3」は「d1-d30」を、「4」は「d8-d30」を、「5」は「d8-d14」を、「6」は「d15-d21」を、「7」は「d22-d30」を表す(図3Aを参照)。

【図4】ALK2キナーゼ阻害剤について調べた結果を示す。(A)正常なiPS細胞及びFOP由来のiPS細胞の全般的遺伝子発現パターンを調べた結果を示す。LDN-193189の存在下及び非存在下における、iPS細胞株N3-1、iPS細胞株F1-1及びF2-1、及びiPS細胞株F4-1についての全般的遺伝子発現パターンの散布図を示す。(B)LDN-193189及びドルソモルフィンの構造を示す。

【図5】ALK2遺伝子における突然変異及びFOP-iPS細胞のALK2活性の阻害を調べた結果を示す。(A)FOP由来のiPS細胞株のALK2遺伝子におけるゲノム塩基配列を決定した結果を示す。617G>A(R206H)及び1067G>A(G356D)の突然変異を矢印で示した。(B)ドルソモルフィン(DM)で処理したFOP由来のiPS細胞の位相差像を示す。左のパネル：患者F2に由来するiPS細胞；右のパネル：患者F4に由来するiPS細胞。目盛尺：200µm。(C)FOP由来のiPS細胞株における3種のコロニーの数及び比率を示す。iPS F2-1及びiPS F4-2の細胞をDMと共に、又はDMを伴わずに培養した。未分化(U)、部分分化(P)及び完全分化(D)のコロニーは図2Eで記載したように定義する。目盛尺：200µm。(D)LDN-193189(LDN)で処理した又は処理しない正常対照(201B7)及びFOP由来のiPS細胞(F2-1及びF4-1)におけるリン酸化Smad1/5/8の免疫プロット解析の結果を示す。BMP-4で処理したiPSのF2-1、F4-1及び201B7におけるSmad1/5/8のリン酸化の相対的レベルは、201B7細胞のみよりは高く、Smad1/5/8のそのようなリン酸化はLDNによる処理によって阻害される。10ng/mLのBMP-4で処理した又は処理しない201B7iPS細胞をそれぞれ、Smad1/5/8リン酸化の陰性対照及び陽性対照として用いた。(E)FOP由来のiPS細胞におけるSmad1/5/8のリン酸化に対するDMの効果調べた結果を示す。FOP由来のiPS細胞(F2-1及びF4-2)におけるSmad1/5/8のリン酸化は、LDNによるもののようDMによる処理によって双

10

20

30

40

50

方とも阻害される。リン酸化されたSmad1/5/8の相対的レベルは総Smad1に対して標準化されている。

【図6】FOP-iPS細胞についての遺伝子発現を解析した結果を示す。(A)LDNの非存在下でiPS F2-1とF2-2の間で共通して2倍以上、上方又は下方調節される発現遺伝子に関するベン図を示す。54,675の遺伝子中、1,417の発現遺伝子が、F2のiPS細胞株間で共通して上方調節され、394の遺伝子が下方調節される。(B)LDNの非存在下で培養されたiPSのF1-1、F2(F2-1とF2-2)及びF4-1の間で2倍以上、共通して上方又は下方調節される遺伝子についてのベン図を示す。これらのiPS細胞株の遺伝子発現プロファイルを互いに比較すると、516の遺伝子の発現が共通して上方調節されることが示され、85の遺伝子の発現が下方調節されることが示された。

10

【図7】乳児型クラッペ病患者由来の線維芽細胞からiPS細胞を誘導した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明は、初期化遺伝子の導入のみでは人工多能性幹細胞を製造できない疾患に罹患した個体に由来する細胞であって初期化遺伝子が導入された細胞を被験物質の存在下で培養し、前記細胞の人工多能性幹細胞への誘導を促進する被験物質を選別することを含む、物質のスクリーニング方法に関する。

【0016】

本発明において、「初期化遺伝子の導入のみでは人工多能性幹細胞を製造できない疾患」とは、患者に由来する細胞(体細胞)に後述の初期化遺伝子を導入し、従来手法により人工多能性幹細胞(iPS細胞)への誘導を行っても、iPS細胞の製造が不可能であるか、或いは低い効率でしか人工多能性幹細胞が出現しない疾患を意味する。より具体的には、疾患に由来する細胞に初期化遺伝子を導入し、各種iPS培地において培養することにより人工多能性幹細胞の誘導を行っても、培地上にiPS細胞コロニーが全く出現しないか、或いは、健全な固体に由来する細胞からiPS細胞の誘導を行った場合と比較して培地上におけるiPS細胞コロニーの形成頻度が低い疾患を意味する。さらにより具体的には、該疾患に由来する細胞に初期化遺伝子(特に、Oct3/4遺伝子、Klf4遺伝子、Sox2遺伝子、及びc-Myc遺伝子)を導入し、100mmシャーレ当たり1~2×10⁵個の細胞を播種してiPS細胞の誘導を行った場合に、健全な固体に由来する細胞からiPS細胞の誘導を行った場合と比較して形成されるコロニー数がより少ない疾患である。例えば、「初期化遺伝子の導入のみでは人工多能性幹細胞を製造できない疾患」とは、健全固体由来の対照と比較してiPS細胞のコロニー形成効率が低く、かつ形成されるiPS細胞のコロニーの数が、50以下、好ましくは10以下、より好ましくは10以下、特に好ましくは5以下、4以下、3以下、2以下、1以下、0である疾患を意味する。

20

30

【0017】

本発明における疾患は、上記定義の範囲内において特に限定されるものではないが、例えば疾患の責任遺伝子の異常(例えば、責任遺伝子の欠失、責任遺伝子がコードするアミノ酸配列におけるアミノ酸の欠失、置換及び/または付加などの変異)又はその発現異常(例えば、発現の消失、低下、過剰発現)に起因して、該疾患に罹患した個体に由来する細胞からiPS細胞を誘導することができない疾患を含む。

40

【0018】

より具体的には、本発明における疾患は、例えば、正常個体と比較してキナーゼの活性異常を示し、かつその活性異常に起因して発症する疾患が挙げられる。キナーゼの種類としては、アクチビン受容体キナーゼ2(activin receptor-like kinase 2; ALK2)が挙げられる。このようなキナーゼの活性異常としては、正常固体と比較して活性が低下又は上昇するか、或いは正常個体ではキナーゼの活性が特定の調節因子により所定の様式で調節(活性の「オン」又は「オフ」)されているのに対し、疾患に罹患した固体ではキナーゼが調節因子により正常に調節されず常に活性化又は不活性化状態にある場合などが挙げられる。

50

【 0 0 1 9 】

本発明における疾患の具体例としては、進行性骨化性線維異形成症（FOP）、ミトコンドリア病[例えば、慢性進行性外眼麻痺症候群、赤色ぼろ線維・ミオクローヌステんかん症候群（福原病；Myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers；MERRF）、ミトコンドリア脳筋症・乳酸アシドーシス・脳卒中様症候群（MELAS）]、造血器腫瘍（例えば、白血病）、ライソゾーム病等が挙げられる。ライソゾーム病の具体例としては、クラッペ病が挙げられ、クラッペ病は病乳児型（3～6ヶ月で発症）、晩期乳児型（6ヶ月～3歳で発症）、若年型（3歳～10歳で発症）、及び成人型（10～35歳で発症）に分類され得る。本発明における疾患は、好ましくは進行性骨化性線維異形成症（FOP）、ミトコンドリア病又はライソゾーム病であり、より好ましくは進行性骨化性線維異形成症（FOP）又はライソゾーム病、特に好ましくは進行性骨化性線維異形成症（FOP）又はクラッペ病であり、クラッペ病は好ましくは乳児型クラッペ病である。

10

【 0 0 2 0 】

FOPの責任遺伝子は、ALK2遺伝子（ACVR1）であることが知られている。ヒトALK2遺伝子のmRNAの塩基配列（Homo sapiens activin A receptor, type I (ACVR1), transcript variant 1, mRNA）はNCBIアクセション番号：NM_001105として公開されている。そのCDS領域の塩基配列を配列番号1に示し、アミノ酸配列を配列番号2に示す。

【 0 0 2 1 】

健常者とFOP患者のALK2遺伝子を比較すると、そのCDS領域の塩基配列において第617番目の塩基がグアニン（G）であるのに対し、FOP患者ではその塩基がアデニン（A）に変異していることが知られており、この塩基の変異により、ALK2遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列において第206番目のアルギニンがヒスチジンに変異（R206H）する。さらに、FOP患者におけるALK2遺伝子の変異の希な事例として、CDS領域の塩基配列において第1067番目の塩基がグアニン（G）からアデニン（A）へと変異し、アミノ酸配列において第356番目のグリシンからアスパラギンへと変異（G356D）するケースが知られている。ALK2キナーゼは、骨組織を誘導する成長因子として知られるBMP（Bone morphogenetic protein）の1回膜貫通型受容体として機能し、細胞外領域でBMPと結合すると活性化して細胞内に骨形成シグナルを伝達する。健常者では、ALK2キナーゼはBMPが結合していない状態では不活性化された「オフ」の状態であるが、FOP患者では、ALK2キナーゼはBMPが結合していない場合でも活性化された「オン」の状態であることが明らかとされており、FOPでは常にALK2キナーゼが活性化状態にあるため、骨形成を促進するシグナルが伝達されて異所性骨形成が進行するものと考えられている。

20

30

【 0 0 2 2 】

本発明において、「個体」は特に限定されるものではないが、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはヒトである。

【 0 0 2 3 】

本発明において、「細胞」の種類は特に限定されるものではないが、具体的には体細胞であり、任意の組織から採取した細胞、あるいは採取した細胞を培養して得られる培養細胞を用いることができる。本発明において体細胞とは、生体を構成する細胞の内生殖細胞以外の全ての細胞を包含し、分化した体細胞でもよいし、未分化の幹細胞でもよい。加えて、本発明において「由来する」とは、個体から採取した細胞をそのまま本発明のスクリーニング方法に用いてもよいし、採取した細胞を培養して樹立した培養細胞株を本発明のスクリーニング方法に用いてもよいことを意味する。本発明における細胞の具体例としては、例えば、疾患に罹患した個体から採取した皮膚を培養することにより得られた線維芽細胞が挙げられる。さらに、本発明における細胞として、上記したR206H及び/又はG356Dの突然変異を有するALK2キナーゼをコードする遺伝子を含む細胞を用いることができる。具体的には、配列番号2に示されるアミノ酸配列においてR206H及び/又はG356Dの突然変異を有するALK2キナーゼをコードする遺伝子を含むヒト

40

50

の細胞を用いることができる。

【 0 0 2 4 】

本発明のスクリーニング方法では、上記疾患に罹患した個体に由来する細胞に初期化遺伝子を導入して得られた細胞を人工多能性幹細胞の誘導及び維持に用いられ得る培地において被験物質の存在下で培養し、該細胞の人工多能性幹細胞への誘導を促進する被験物質を選別する。

【 0 0 2 5 】

本発明の方法では、まず、少なくとも1種類以上の初期化遺伝子を細胞に導入する。初期化遺伝子とは、体細胞を初期化してiPS細胞とする作用を有する初期化因子をコードする遺伝子である。初期化遺伝子の組み合わせの具体例としては、以下の組み合わせをあげることができるが、これらに限定されるものではない。

(i) Oct遺伝子、Klf遺伝子、Sox遺伝子、Myc遺伝子

(ii) Oct遺伝子、Sox遺伝子、NANOG遺伝子、LIN28遺伝子

(iii) Oct遺伝子、Klf遺伝子、Sox遺伝子、Myc遺伝子、hTERT遺伝子、SV40 large T遺伝子

(iv) Oct遺伝子、Klf遺伝子、Sox遺伝子

【 0 0 2 6 】

Oct遺伝子、Klf遺伝子、Sox遺伝子及びMyc遺伝子にはそれぞれ、複数のファミリー遺伝子が含まれている。それぞれのファミリー遺伝子の具体例としては、国際公開WO 2007/069666号公報の明細書の第11頁から第13頁に記載されているものを用いることができる。具体的には、以下の通りである。

【 0 0 2 7 】

Oct遺伝子に属する遺伝子の具体例としては、Oct3/4 (NM_002701)、Oct1A (NM_002697)、及びOct6 (NM_002699)などを挙げることができる (括弧内は、ヒト遺伝子のNCBI accession 番号を示す)。好ましくはOct3/4である。Oct3/4はPOUファミリーに属する転写因子であり、未分化マーカーとして知られており、また多能性維持に関与しているとの報告もある。

【 0 0 2 8 】

Klf遺伝子に属する遺伝子の具体例としては、Klf1 (NM_006563)、Klf2 (NM_016270)、Klf4 (NM_004235)、及びKlf5 (NM_001730)などを挙げることができる (括弧内は、ヒト遺伝子のNCBI accession 番号を示す)。好ましくはKlf4である。Klf4 (Kruppel like factor-4)は腫瘍抑制因子として報告されている。

【 0 0 2 9 】

Sox遺伝子に属する遺伝子の具体例としては、例えば、Sox1 (NM_005986)、Sox2 (NM_003106)、Sox3 (NM_005634)、Sox7 (NM_031439)、Sox15 (NM_006942)、Sox17 (NM_0022454)、及びSox18 (NM_018419)を挙げることができる (括弧内は、ヒト遺伝子のNCBI accession 番号を示す)。好ましくはSox2である。Sox2は初期発生過程で発現し、転写因子をコードする遺伝子である。

【 0 0 3 0 】

Myc遺伝子に属する遺伝子の具体例としては、c-Myc (NM_002467)、N-Myc (NM_005378)、及びL-Myc (NM_005376)などを挙げることができる (括弧内は、ヒト遺伝子のNCBI accession 番号を示す)。好ましくは、c-Mycである。c-Mycは細胞の分化及び増殖に関与する転写制御因子であり、多能性維持に関与しているとの報告がある。

【 0 0 3 1 】

上記した遺伝子は、ヒトを含む哺乳類動物において共通して存在する遺伝子であり、本発明において任意の哺乳類動物由来 (例えばヒト、マウス、ラット、サルなどの哺乳類動物由来) の遺伝子を用いることができる。また、野生型の遺伝子に対して、数個 (例えば1~30個、好ましくは1~20、より好ましくは1~10個、さらに好ましくは1~5個、特に好ましくは1から3個) の塩基が置換、挿入及び/又は欠失した変異遺伝子であって、野生型の遺伝子と同様の機能を有する遺伝子を使用することもできる。

10

20

30

40

50

【0032】

本発明では特に好ましくは、初期化遺伝子として、Oct3/4遺伝子、Klf4遺伝子、Sox2遺伝子、及びc-Myc遺伝子の組合せを用いることができる。

【0033】

初期化遺伝子を細胞に導入する方法は、導入された初期化遺伝子が発現して細胞の初期化を達成できる限り特に限定されない。例えば、少なくとも1種類以上の初期化遺伝子を含む発現ベクターを用いて該初期化遺伝子を細胞に導入することができる。ベクターを用いて2種類以上の初期化遺伝子を細胞に導入する場合には、一つの発現ベクターに2種類以上の初期化遺伝子を組み込んで、該発現ベクターを細胞に導入してもよいし、1種類の初期化遺伝子を組み込んだ発現ベクターを2種類以上用意して、それらを細胞に導入してもよい。

10

【0034】

発現ベクターの種類は特に限定されず、ウイルスベクターでもプラスミドベクターでもよいが、好ましくはウイルスベクターである。本発明で使用できるウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター（レンチウイルスベクターを含む）、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクターなどを挙げることができる。上記の中でも好ましくはセンダイウイルスベクターである。

【0035】

本発明の方法では、初期化遺伝子が導入された細胞を被験物質の存在下で培養するが、この工程では、人工多能性幹細胞の誘導又は維持に用いられ得る任意の培地に被験物質を添加して当該細胞を培養すればよい。具体的には、ES細胞や人工多能性幹細胞の未分化性及び多能性を維持可能な培地は当業界で公知であり、適当な培地を組み合わせることができる。即ち、本発明の方法において初期化遺伝子が導入された細胞を被験物質の存在下で培養するために用いられ得る培地としては、ES培地、ES培地に10ng/ml FGF-2を添加後にマウス胚性線維芽細胞を24時間培養した上清であるMEF馴化ES培地（以下MEF馴化ES培地）、所定量のKnockOut Serum Replacement (KSR)（インビトロジェン社）及び/又はbFGFを添加したDMEM培地などをあげることができる。本発明において初期化遺伝子が導入された細胞を培養するための培地には、各種の成長因子、サイトカイン、ホルモンなど（例えば、FGF-2、TGF β -1、アクチビンA、ノギン（Nanoggin）、BDNF、NGF、NT-1、NT-2、NT-3等のヒトES細胞の増殖・維持に関与する成分）を添加してもよい。

20

30

【0036】

本発明において初期化遺伝子が導入された細胞を被験物質の存在下で培養する際には、適切な支持細胞を用いてもよい。本発明で用いられる支持細胞としては、一般に多能性幹細胞を誘導及び維持できる細胞であれば、特に限定されるものではない。支持細胞の具体例としては、MEF細胞などが挙げられる。また、支持細胞は、マイトマイシンC処理又は放射線照射により細胞増殖を失わせたものを用いることができる。MEF細胞（ICRマウスより）は、ATCCにカタログ番号ATCC#SCRC-1046として登録されている。また、MEF細胞は、文献（Nagy A, et al. Manipulating The Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Third Edition Cold Spring Harbor Press; 2003）の記載に従って入手可能である。

40

【0037】

本発明で用いる被験物質としては任意の物質を使用することができる。被験物質の種類は特に限定されず、低分子化合物であってもよいし、天然物抽出物中に存在する化合物でもよく、合成ペプチドでもよい。あるいは、被験化合物はまた、化合物ライブラリー、ファージディスプレイライブラリーもしくはコンビナトリアルライブラリーでもよい。被験物質は、好ましくは低分子化合物であり、低分子化合物の化合物ライブラリーでもよい。化合物ライブラリーの構築は当業者に公知であり、また市販の化合物ライブラリーを使用することもできる。

【0038】

上述の通り、初期化遺伝子が導入された細胞を被験物質の存在下で培養することにより

50

、当該細胞から人工多能性幹細胞の誘導を促進する被験物質を選別する。人工多能性幹細胞の誘導が促進されたか否かの判断については、例えば、被験物質が添加されていない培地で本発明の細胞を培養した陰性対照群と、被験物質を添加した培地で初期化遺伝子が導入された本発明の細胞を培養した被験試料群とを比較し、被験試料群の培地上に人工多能性幹細胞がより高頻度で出現した場合に、当該被験物質を人工多能性幹細胞の誘導を促進する物質として選別することができる。

【0039】

人工多能性幹細胞が誘導されたか否かの判断については、例えば、培地上におけるiPS細胞のコロニーの形成を目視により判断することができる。より具体的には、被験物質が添加されていない培地で初期化遺伝子が導入された本発明の細胞を培養した陰性対照群と、被験物質を添加した培地で初期化遺伝子が導入された本発明の細胞を培養した被験試料群とを比較し、被験群の培地上に人工多能性幹細胞に典型的なコロニーがより高頻度で出現した場合に、当該被験物質を、人工多能性幹細胞の誘導を促進する物質として選別することができる。iPS細胞のコロニーは、通常、輪郭が明瞭であり、細胞密度が高くなっている。当業者であれば、iPS細胞のコロニーを目視により判別することができる。さらに、被験物質が添加されていない培地で初期化遺伝子が導入された本発明の細胞を培養した陰性対照群、或いは被験物質が人工多能性幹細胞の誘導を促進しない場合において、iPS細胞のコロニーの形態とは異なる異常な形態をしたコロニーが観察されることもある。必要に応じて、顕微鏡による観察を行うことができる。

【0040】

さらに、人工多能性幹細胞が誘導されたか否かの判断の指標として、形成された細胞(コロニー)についてiPS細胞の指標となるアルカリフォスファターゼ活性を検出することもできる。陰性対照群と比較して、アルカリフォスファターゼ活性が検出される細胞(コロニー)が被験試料群において高頻度で出現した場合には、当該被験物質を人工多能性幹細胞の誘導を促進する物質として選別することができる。

【0041】

さらに、人工多能性幹細胞が誘導されたか否かの判断の指標として、形成された細胞(コロニー)についてiPS細胞の指標となる多能性マーカーの発現を検出することもできる。陰性対照群と比較して、被験試料群において多能性マーカーのより高い発現が確認された場合には、当該被験物質を人工多能性幹細胞の誘導を促進する物質として選別することができる。多能性マーカーとしては、例えば、Oct3/4、Sox2、Klf4、C-Myc、Nanog、Gdf3、Sal14f、Rex1、Dnmt3b、SSEA4、TRA-1-60等が挙げられる。一方、細胞の分化を示すマーカーを検出することにより、形成された細胞(コロニー)が人工多能性幹細胞であるか否かを判断することもできる。例えば、分化を示すマーカーの発現が検出された細胞(コロニー)は人工多能性幹細胞ではないと判断してもよい。分化を示すマーカーとしては、例えば、中胚葉マーカーであるブラキユリ(Brachyury)、Mesogenin及びMesp1、内胚葉マーカーであるSox17及びFoxa2、栄養外胚葉マーカーであるCdx2、神経外胚葉マーカーであるネスチン(Nestin)、神経細胞マーカーであるSox1及びNeuroD1などが挙げられる。

【0042】

本発明のスクリーニング方法によれば、上記の通り従来の手法による初期化遺伝子の導入のみでは人工多能性幹細胞を製造できない疾患であっても、その疾患に罹患した個体由来する細胞からiPS細胞を効率的に誘導できる物質をスクリーニングすることが可能である。スクリーニングにより得られた物質は、人工多能性幹細胞の誘導が不可能か又は困難であると言うその疾患に特有の性質を正常化ないし改善することができる物質であるから、対象となる疾患の治療薬のとなる可能性が高い。即ち、本発明の方法は、上記の通り従来の手法による初期化遺伝子の導入のみでは人工多能性幹細胞を製造できない疾患に対する治療薬の開発において、薬剤スクリーニング系として利用することができる。

【0043】

さらに、本発明の方法において、上記の通り、正常個体と比較してキナーゼの活性異常

10

20

30

40

50

(特に、活性の亢進)を示し、かつその活性異常に起因して発症する疾患に罹患した個体に由来する細胞が用いられる場合には、該細胞の人工多能性幹細胞への誘導を促進する物質として選別された被験物質に関し、さらにキナーゼ(例えば、アクチビン受容体キナーゼ2)の活性を阻害する物質を選別してもよい。

【0044】

さらに、本発明の別の態様によれば、

「初期化遺伝子の導入のみでは人工多能性幹細胞を製造できない疾患に罹患した個体に由来する細胞であって初期化遺伝子が導入された細胞を、該細胞の人工多能性幹細胞への誘導を促進する物質の存在下で培養することを含む、人工多能性幹細胞の製造方法」がさらに提供される。

10

【0045】

本発明の人工多能性幹細胞の製造方法において、「初期化遺伝子の導入のみでは人工多能性幹細胞を製造できない疾患」、「個体」、「由来する」、「細胞」、及び「初期化遺伝子」の各用語は、本発明の物質のスクリーニング方法に関し上記に説明した通りであり、人工多能性幹細胞の製造方法は物質のスクリーニング方法に準じて実施することができる。「初期化遺伝子の導入のみでは人工多能性幹細胞を製造できない疾患」は、好ましくは進行性骨化性線維異形成症、ミトコンドリア病又はライソゾーム病であり、特に好ましくは進行性骨化性線維異形成症又はクラッペ病である。クラッペ病については、乳児型クラッペ病であることが好ましい。

【0046】

20

本発明の人工多能性幹細胞の製造方法において、「人工多能性幹細胞への誘導を促進する物質」としては、本発明の物質のスクリーニング方法により選別された物質を用いることができる。例えば、対象となる疾患がキナーゼの活性亢進に起因するものである場合には、キナーゼ阻害剤を用いることができる。対象となる疾患が進行性骨化性線維異形成症である場合には、アクチビン受容体様キナーゼ2阻害剤を用いることが可能であり、例えば、以下の実施例に記載のLDN-193189、及びノ又はドルソモルフィンを用いることができる。また、対象となる疾患がライソゾーム病(例えば、クラッペ病)である場合には、「人工多能性幹細胞への誘導を促進する物質」として、例えば、酪酸及びノ又は酪酸塩(好ましくは酪酸ナトリウム)を用いることができる。

【0047】

30

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例により特に限定されるものではない。

【実施例】

【0048】

〔実施例1〕

(A)材料及び方法

(1)皮膚由来の線維芽細胞の生成

倫理委員会に承認されたプロトコールにより、インフォームドコンセントの下、FOP患者及び健常者の皮膚生検の外植片から線維芽細胞を作出した。患者及び健常者からの皮膚試料を細かく刻み、10%ウシ胎児血清(FBS)を添加したD-MEM培地で培養した。線維芽細胞が出現したことを確認した後、iPS細胞を誘導するために線維芽細胞を増殖させた。

40

【0049】

(2) iPS細胞の維持及び生成

20%のKNOCKOUT(商標)血清置換物(KSR、インビトロゲン)、2mMのL-グルタミン、 1×10^{-4} Mの非必須アミノ酸(NEAA、シグマ)、 1×10^{-4} Mの2-メルカプトエタノール(シグマ)、0.5%のペニシリンとストレプトマイシン(日本、ナカライテスク)、及び5ng/mLの基本線維芽細胞増殖因子(bFGF、和光、日本)を添加したDMEM/F12(シグマ)を含有するヒトiPS培地において、マイトマイシンC(MMC)処理したMEF支持細胞上でヒトiPS細胞を維持した。一部の

50

実験では、LDN - 193189 (STEMGENT; ステムジェント) 及びドルソモルフィン (シグマ) 等のALK2キナーゼ阻害剤をヒトiPS培地に添加した。

【0050】

N. Fusaki, H. Ban, A. Nishiyama, K. Saeki, M. Hasegawa, Proc. Jpn. Acad. Ser., B. Phys. Biol. Eci., 85, 348 (2009)に記載される方法により、ヒト由来の線維芽細胞からiPS細胞を生成した。感染1日前に、6穴プレートにおいてウエル当たり 5×10^5 個のヒト線維芽細胞を播種し、その後、感染多重度 (multiplicity of infection; MOI) 3にて、下記センダイウイルス (SeV) ベクターを細胞に感染させた。感染の7日後、トリプシンによって感染させた線維芽細胞を回収し、60mmのシャーレ当たり 5.4×10^4 個の細胞、或いは100mmのシャーレ当たり $1 \sim 2 \times 10^5$ 個の細胞をMMC 10
処理したMEF支持細胞上に播種した。翌日、ヒトiPS細胞培地に置き換えた。感染の30日後、コロニーを単離し、ヒトiPS細胞培地で再培養した。

【0051】

(3) センダイウイルス (SeV) ベクターの構築及び検出

Oct3/4遺伝子、Sox2遺伝子、Klf4遺伝子及びc-Myc遺伝子を含むSeVベクターは、N. Fusaki, H. Ban, A. Nishiyama, K. Saeki, M. Hasegawa, Proc. Jpn. Acad. Ser., B. Phys. Biol. Eci., 85, 348 (2009)に記載される通り作成した。SeVのゲノムを検出するために、ネストPCRを行った。皮膚線維芽細胞及びiPS細胞から抽出した1マイクログラムのトータルRNAをcDNAに逆転写した。次いで、一对のSeV特異的プライマーを用いてcDNAを増幅し、これらPCR産物の1/10容積をさら
20
に、一对にネストプライマーを用いて増幅させた。プライマーの配列及び増幅条件を表1に示す。

【0052】

【表1】

遺伝子	配列 (F:フォワードプライマー、R:リバースプライマー)	アニーリン グ温度 (°C)	サイク ル数	増幅産 物のサ イズ (bp)
SeV	F: GGATCACTAGGTGATATCGAGC(配列番号3) R: ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATGTATC(配列番号4)	58	30	181
Nested	F: TCGAGCCATATGACAGCTCG(配列番号5) R: GAGATATGTATCCTTTTAAATTTCTTGTCTTCTTG (配列番号6)	58	30	148
Oct3/4	F: GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG(配列番号7) R: CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC(配列番号8)	55	33	144
Sox2	F: GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG(配列番号9) R: TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG(配列番号10)	55	33	151
Klf4	F: GATTACGCGGGCTGCGGCAAAACCTACACA (配列番号11) R: TGATTGTAGTGCTTTCTGGCTGGGCTCC (配列番号12)	56	35	357
c-Myc	F: GCGTCCTGGGAAGGGAGATCCGGAGC(配列番号13) R: TTGAGGGGCATCGTCGCGGGAGGCTG(配列番号14)	56	33	328
Nanog	F: CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC(配列番号15) R: CGGAAGATTCCCAGTCGGGTTCCACC(配列番号16)	60	30	391
Gdf3	F: CTTATGCTACGTAAAGGAGCTGGG(配列番号17) R: GTGCCAACCCAGGTCCCGGAAGTT(配列番号18)	56	35	631
Rex1	F: CAGATCGTAAACAGCTCGCAGAAT(配列番号19) R: GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA(配列番号20)	55	30	306
Sall4f	F: AAACCCAGCACATCAACTC(配列番号21) R: GTCATTCCCTGGGTGGTTC(配列番号22)	58	30	138
Dnmt3b	F: TGCTGCTCACAGGGCCCGATACTTC(配列番号23) R: TCCTTTGAGCTCAGTGCACCACAAAAC (配列番号24)	55	33	242
β -actin	F: CAACCGCGAGAAGATGAC(配列番号25) R: AGGAAGGCTGGAAGAGTG(配列番号26)	60	25	455

【0053】

(4) アルカリフォスファターゼ染色及び免疫組織化学

白血球アルカリフォスファターゼキット(Leukocyte Alkaline Phosphatase kit; シグマ)を用いてアルカリフォスファターゼ染色を行った。免疫細胞化学については、4%パラホルムアルデヒドを含有するPBSで4にて30分間細胞を固定した。核に局在する分子については、室温にて15分間、0.2%トリトンX-100にて試料を処理した。2%FBSを含有するPBSで細胞を3回洗浄し、次いで一次抗体と共に2%FBSを含有するPBSにて4で一晩インキュベートした。一次抗体には、SSEA4(1:500、ミリポア)、TRA-160(1:500、ミリポア)、Nanog(1:1000、R&Dシステムズ)及びOct3/4(1:500、Santa-Cruz)が含まれる。二次抗体には、アレクサ488が結合したヤギ抗マウスIgG(1:1000、インビトロジェン)及びアレクサ488が結合したロバ抗ヤギIgG(1:1000、インビトロジェン

10

20

30

40

50

)を用いた。分化マーカーの染色については、Sox17(1:200、R&Dシステムズ)、Foxa2(1:200、R&Dシステムズ)及びブラキユリ(Brachyury)(1:200、R&Dシステムズ)を用いた。核は1µg/mLのヘキスト33258(インビトロジェン)で染色した。

【0054】

(5) RNAの単離及びPCR

セパゾール・スーパーG試薬(Sepazol Super G reagent)(ナカライテスク、日本)を用いてトータルRNAを精製した。製造元の指示書に従って、Superscript III(インビトロジェン)及びランダムプライマー(インビトロジェン)による逆転写反応に1マイクログラムのトータルRNAを用いた。H. Sakurai et al., Stem Cells, 24, 575 (2006)に記載される通り、QuickTaq(商標)(日本、東洋紡)によってRT-PCRを行った。プライマーの配列及び増幅条件を表1に示す。

10

【0055】

製造元の指示書に従って、THUNDERBIRD(商標)qPCRミックス(東洋紡)によって定量的PCR(qPCR)を行い、StepOnePlusリアルタイムPCRシステム(アプライド・バイオシステムズ)によって解析した。GAPDHの発現に対してデータを標準化した。Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycに使用したプライマーは、導入遺伝子ではなく内在性の遺伝子の発現を検出するように設計した。qPCRに使用したプライマーの配列を表2に列記する。

【0056】

20

【表 2】

遺伝子	配列 (F:フォワードプライマー、R:リバースプライマー)	増幅産物のサイズ (bp)
GAPDH	F: ATGGAATCCGATCACCATCTT (配列番号 27) R: CGCCCCACTTGATTTTGG (配列番号28)	57
Brachyury	F: ACAAAGAGATGATGGAGGAACCCG (配列番号29) R: AGGATGAGGATTTGCAGGTGGACA (配列番号30)	110
Mesogenin	F: AAGCCAGCGAGAGGGAGAAG (配列番号31) R: GAGGGTGTGCAGGGCATCT (配列番号32)	59
Mesp1	F: CTGCCTGAGGAGCCCAAGT (配列番号33) R: AAAAAGCCTCGGTGCTCACA (配列番号34)	64
Foxa2	F: AAAAGCCTCCGGTTTCCACTA (配列番号35) R: TCAGAATCTGCAGGTGCTTGA (配列番号36)	62
Sox17	F: CCAGAGGCTTTTTGGATGTTTT (配列番号37) R: AGGTAACTGAATGTCGAGGAGTGT (配列番号38)	70
Gsc	F: AGAGGAAGGTAAAAGCGATTTGG (配列番号39) R: GAGTTAGGTAAGTAATACGGGCAAGTG (配列番号40)	75
Sox1	F: GCCCTGAGCCGACTGTGA (配列番号41) R: CCGTGAATACGATGAGTG (配列番号42)	58
Nestin	F: AGCCCTGACCACTCCAGTTTAG (配列番号43) R: CCCTCTATGGCTGTTTCTTTCTCT (配列番号44)	128
NeuroD1	F: AAGGTGGTGCCTTGCTATTCTAA (配列番号45) R: CCAAGCGCAGAGTCTCGATT (配列番号46)	61
Cdx2	F: AGGGGGTGGTTATTGGACTC (配列番号47) R: CATTGAGCCAGAGAAGCTC (配列番号48)	92
Oct3/4	F: GGAAGGAATTGGGAACACAAAGG (配列番号49) R: AACTTCACCTTCCCTCCAACCA (配列番号50)	71
Nanog	F: CCAAAGGCAAACAACCCACTT (配列番号51) R: CGGGACCTTGTCTTCCTTTTT (配列番号52)	62

【 0 0 5 7 】

(6) 免疫プロットティング法

T. Fukuda et al., J. Biol. Chem., 284, 7149 (2009)に記載される免疫プロットティング法によって、リン酸化されたSmad1/5/8を検出した。およそ10マイクログラムのタンパク質をSDS-PAGEに供試し、PVDF膜に転写した。抗リン酸化Smad1 (Ser463/465) / Smad5 (Ser436/465) / Smad8 (Ser426/428) 抗体 (セルシグナリング) と抗Smad1抗体 (EPITOMICS及びセルシグナリング) によってリン酸化Smad1/5/8及び総Smad1を検出

10

20

30

40

50

した。総 S m a d 1 の発現に対してデータを標準化する。

【 0 0 5 8 】

(7) マイクロアレイ解析

L D N - 1 9 3 1 8 9 の存在下又は非存在下で培養した i P S 細胞株 (F 1 - 1、F 2 - 1、F 2 - 2、F 4 - 1 及び N 3 - 1) から抽出したトータル R N A 2 5 0 n g をビオチンで標識し、製造元のプロトコール (3 ' I V T 発現キット (3 ' I V T Express kit)、アフメトリクス) に従って断片化した。次いで、GeneChip (登録商標) ヒトゲノム U 1 3 3 プラス 2 . 0 (アフメトリクス) に試料をハイブリダイズさせた。GeneChip (登録商標) スキャナー 3 0 0 (アフメトリクス) によってアレイをスキャンした。GeneSpring GX 1 1 . 5 ソフトウェア (Agilent technologies; アジレント・テクノロジーズ) を用いてデータを解析した。測定値の中央値に対して各チップを標準化した。

10

【 0 0 5 9 】

(8) D N A の単離及び塩基配列決定

D N A の塩基配列決定によって F O P 由来の i P S 細胞株における A L K 2 遺伝子の突然変異 (R 2 0 6 H : 6 1 7 G > A 及び G 3 5 6 D : 1 0 6 7 G > A) を確認した。5 0 m M の トリス - H C l (p H 7 . 5)、2 0 m M の E D T A (p H 8 . 0)、0 . 1 M の N a C l、1 % の S D S 及び 0 . 1 5 m g / m L の プロテイナーゼ K を含有する溶解緩衝液において i P S 細胞株を 5 5 ° で一晩インキュベートした。フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコールによってゲノム D N A を抽出した。次いで P C R によって 1 0 0 n g のゲノム D N A を増幅させた。ABI PRISM (商標) 310 Genetic Analyzer (BigDye (登録商標) ターミネータ v 1 . 1 サイクル・シーケンシング・キット、アプライドバイオシステムズ) によって、得られた P C R 産物の塩基配列の決定を行った。塩基配列の決定に使用したプライマーの配列を表 3 に示す。

20

【 0 0 6 0 】

【表 3】

遺伝子	配列
ALK2_exon 9(R206H)-5'	CGACGTGTCCCGGATTGCTG(配列番号53)
ALK2_exon 9(R206H)-3'	CGAATACCTATGGTAAGGAG(配列番号54)
ALK2_exon 12(G356D)-5'	CCCTTTTCTGCTCTCACCCGGA(配列番号55)
ALK2_exon 12(G356D)-3'	CACCATCCGCCTGGCCACTT(配列番号56)

30

【 0 0 6 1 】

(9) B M P シグナル伝達についての細胞に基づいた阻害アッセイ

化合物の A L K 2 阻害活性を評価するために、Y. Katsuno et al., Oncogene, 27, 632 2 (2008) に記載される通り、ルシフェラーゼリポーターアッセイを行った。B M P 反応性の B R E リポーターの制御下で F l u c (ホタル・ルシフェラーゼ) を発現し、同様に活性のある R l u c (ウミシイタケ・ルシフェラーゼ) を構成的に発現するレンチウイルスによって形質導入された M D A - 2 3 1 - D ヒト乳癌細胞株である、M D A - D - B R E F l u c / R l u c 細胞株を B M P - 4 又は B M P - 6 の存在下で化合物と共に培養した。2 4 時間の培養の後、ルシフェラーゼ活性 (ホタル及びウミシイタケの双方) を測定した。相対的な A L K 2 活性を F l u c / R l u c として表した。化合物の最大半量の阻害濃度 (I C 5 0) を個々の化合物についての用量反応曲線から算出した。

40

【 0 0 6 2 】

(B) 結果

上述の通り、センダイウイルス (S e V) 法によって 4 人の F O P 患者と 3 人の健常者の皮膚由来の線維芽細胞から i P S 細胞を生成することを試みた。患者及び健常者の情報を以下の表 4 に示す。

50

【 0 0 6 3 】

【 表 4 】

No.	患者及び健常者		診断	突然変異
	年齢	性別		
F 1	1 8	男性	F O P	R 2 0 6 H
F 2	5 9	女性	F O P	R 2 0 6 H
F 3	2 2	男性	F O P	R 2 0 6 H
F 4	6 6	男性	F O P	G 3 5 6 D
N 1	4 8	男性	健常	—
N 2	5 4	男性	健常	—
N 3	4 8	男性	健常	—

10

【 0 0 6 4 】

3人の患者(F 1 ~ F 3)はAL K 2の一般的な突然変異R 2 0 6 Hを有し、一人の患者は希な型の突然変異G 3 5 6 Dを有する(図5 A)。F O Pの線維芽細胞からのi P S細胞コロニーの形成頻度は正常対照よりも顕著に低かった(図1 A及びB)。典型的(Typical)なコロニーは対照の培養(図1 C左上)で主として認められた。一部典型的なコロニーが、F O P由来の培養で検出された(図1 C左下)。コロニーの中央だけがA P陽性である(図1 C右上)又はA P陽性のコロニーが周辺にある(図1 C右下)、異常(Atypical)なコロニーが検出された。結果として、形成したコロニーのほぼすべてが正常対照と比べて異常(Atypical)な形態を示した(図1 C及びD)。単離されたコロニーは、平坦な形態となり急速に消失してしまい、数世代の継代にわたって培養し続けることはできなかった。

20

【 0 0 6 5 】

F O Pでは、突然変異AL K 2は、構成的に活性のある形態を介してB M Pのシグナル伝達に機能不全を生じることが知られている(T. Fukuda et al., J Biol Chem 284, 7149 (2009); J. L. Fiori, P. C. Billings, L. S. de la Pena, F. S. Kaplan, E. M. Shore, J Bone Miner Res 21, 902 (2006); E. M. Shore et al., Nat Genet 38, 525 (2006))。本実施例では、i P S細胞の形成及び維持に対するAL K 2キナーゼ阻害剤の効果を調べた。AL K 2キナーゼ阻害剤であるLDN - 1 9 3 1 8 9 (LDN) (P. B. Yue et al., Nat Med 14, 1363 (2008))による処理は、用量依存的に、i P S細胞のコロニー形成の回復を示した(図2 A)。AL K 2の別の阻害剤であるドルソモルフィン(Dorsomorphin) (G. D. Cuny et al., Bioorg Med Chem Lett 18, 4388 (2008))もコロニー形成の効率を改善することができたが、LDNよりも低かった。LDN処理はまた、線維芽細胞F 4 (G 3 5 6 D)からのi P S細胞の生成も改善したが、その効率は、F 2 (R 2 0 6 H)からのものより非常に低かった(図2 A)。

30

【 0 0 6 6 】

同様に、阻害剤は、i P S細胞が自発的に分化するのを妨げるので、i P S細胞は阻害剤の存在下で分化することなく、継続して維持することができる。LDN及びドルソモルフィンの存在下で形成されたコロニーは典型的(typical)な形態を示した(図2 B及び図5 B)。さらに、個々のコロニーを採取し、LDNの存在下で維持し続けた。ネストPCRによる増幅によりSe VのDNA断片は検出されなかった(図2 C)。この結果は、F O P由来の各i P S細胞株からSe Vが完全に除去されていることを示している。さらに、RT - PCR及び免疫染色による解析によってF O P由来のi P S細胞株は、一連の多能性マーカーを発現していることが明らかとなった(図2 C及びD)。しかしながら、培養液から阻害剤を取り除くと、コロニー形成が崩壊し、維持条件下でさえ細胞は直ちに分化し始めた(図2 E及び図5 C)。AL K 2の下流分子であるリン酸化されたSmad 1

40

50

/ 5 / 8 の免疫プロット解析によって、FOP由来のiPS細胞におけるALK2キナーゼ活性が正常なiPS細胞におけるものより高いことが示された(図5D)。ALK2キナーゼ活性の阻害は、Smadの脱リン酸化によって確認された(図5D及びE)。

【0067】

次に、FOP由来のiPS細胞からどんな種類の細胞が自発的に分化されるのかを調べた。対照の培養と比較して、分化を示す一連のマーカーが、ALK2阻害剤無しで培養したFOP-iPS細胞において発現し、発現の上昇が認められた(図2F及びG)。発現が上昇したマーカーは、それぞれ、ブラキユリ(Brachyury)とMesp1、及びSox17とFoxa2のような中胚葉と内胚葉のマーカーの双方を含む(S. Tada et al., Development 132, 4363 (2005); H. Sakurai et al., Stem Cells 24, 575 (2006))。LDNなしで培養したFOP由来のiPS細胞株において栄養外胚葉のマーカーであるCdx2も上方調節された(H. Niwa et al. Cell 123, 917 (2005))。それに対して、ネスチン(Nestin)のような神経外胚葉マーカーの発現レベルは阻害剤の非存在下でさえ変化しなかった(図2G)(Y. Takashima et al., Cell 129, 1377 (2007))。LDNの非存在下で培養したiPS細胞は、LDN存在下で培養したものより低いレベルで、Oct3/4(H. Niwa, J. Miyazaki, A. G. Smith, Nat Genet 24, 372 (2000))及びNanog(K. Mitsui et al., Cell 113, 631 (2003); I. Chambers et al., Cell 113, 643 (2003))のような多能性マーカーを発現した(図2G)。マーカーの発現パターンは、維持条件で培養しても、FOPに由来するiPS細胞は、外胚葉ではなく中胚葉及び内胚葉双方に自発的に分化する傾向があることが示された。

【0068】

iPS細胞の形成に対するALK2キナーゼの構成的な活性化の効果をさらに検討するために、誘導の間、どの時点でALK2変異体がiPS細胞の形成を阻害するのかを決定した(図3A)。8日目~30日目の期間で阻害剤による処理をした場合、最高数のAP⁺コロニーが検出された(図3B及びC)。1日目~30日目の期間での処理は、8日目~30日目の処理よりも低いレベルの効率を示した。加えて、コロニー形成の効率は、1日目~7日目のみ処理することによっては回復しなかった(図3B及びC)。次いで、8日目~30日目の期間を3つの期間、すなわち8~14日目と15~21日目と22~30日目に分け、各処理についてiPSコロニーの数を測定した。意外にも、いずれの期間でもわずかなiPS細胞コロニーしか検出できなかった(図3C)。これらの結果は、FOPからのiPS細胞の形成には、iPS細胞の誘導の最初の期間(7日目まで)ではなく、そのほかの期間(8日目~30日目)において変異ALK2キナーゼの阻害が必要となることが示唆された。

【0069】

DNAマイクロアレイの解析によって、LDNにより処理されたFOP由来のiPS細胞とLDNなしでのそれら細胞との間で全般的な遺伝子発現のパターンが異なることが示された(図4A)。解析した54,675の遺伝子の中で、1,417の遺伝子が、LDNなしで処理したiPS細胞クローンとLDNで処理したiPS細胞クローンとの間で発現に2倍を超える差を示した(図6A及びB)。中胚葉と内胚葉のマーカーの発現レベルがLDNで処理したものよりLDNなしで処理したiPS細胞で高いが、NestinやSox1(Y. Takashima et al., Cell 129, 1377 (2007))のような神経外胚葉マーカーはそうではないことを確認した(図4A)。それに対して、LDNによる処理は、正常のiPS細胞株における分化マーカーの発現に影響しなかった(図4A)。

【0070】

ALK2キナーゼ阻害剤による処理によってiPS細胞がFOP線維芽細胞から生成でき、多能性を持って維持できたという結果により、本発明の方法によればALK2キナーゼの阻害剤の候補をスクリーニングすることが可能となることが示された。

【0071】

本実施例において、ALK2の構成的な活性化がヒトのiPS細胞の形成と維持の双方を阻害することが証明された。キナーゼ活性を構成的な形態に変化させるALK2キナー

10

20

30

40

50

ゼの突然変異はFOPで常に認められ、ALK2キナーゼの突然変異がこの疾患の原因であると考えられている(T. Fukuda et al., J Biol Chem 284, 7149 (2009); P. C. Billings et al., J bone Miner Res 23, 305 (2008); J. L. Fiori, P. C. Billings, L. S. de la Pena, F. S. Kaplan, E. M. Shore, J Bone Miner Res 21, 902 (2006); F. S. Kaplan et al., Hum Mutat 30, 379 (2009), A. B. Shafritz et al., N Engl J Med 335, 555 (1996); Q. Shen et al., J Clin Invest 119, 3462 (2009); E. M. Shore et al., Nat Genet 38, 525 (2006))。本実施例において、BMPシグナルの構成的な活性化が、再プログラミングの初期段階を除いて、iPS細胞の形成を阻害することが示された。1日目～7日目の初期の期間では、BMPシグナル伝達の阻害は、正常対照からのiPS細胞の生成を抑制することが示されている。従って、再プログラミングを制御することに
10

【0072】

今までに、幾つかの研究によって、患者から確立されたiPS細胞が疾患の態様の一部を再現することができるだけでなく、より良い設計に使用し、先端医療からの成績を期待することもできることが報告されている(J. T. Dimos et al., Science 321, 1218 (2008); A. D. Ebert et al., Nature 457, 277 (2009); G. H. Liu et al., Nature 472, 221 (2011); M. C. Marchetto et al., Cell 143, 527 (2010); F. Soldner et al., Cell 136, 964 (2009))。本実施例では、疾患の原因及び細胞内で生じるそれに続く現象がiPS細胞の形成を阻害するが、それらを取り除くことによってiPS細胞のコロニーの形成の効率性を改善することが証明された。従って、何故疾患に由来するiPS細胞の作出が上手く行かないかを検索することは、疾患の原因又は病態形成事象の手掛かりを見つけることに繋がる。
20

【0073】

本実施例では、FOPにおいてiPS細胞の作出及び維持が不可能であることを利用して将来の治療法の新しい候補を見つけることができることも明らかとなった。ここで使用する系が常にFOPの症状に関連するとは限らないが、ALK2キナーゼに対する既知の阻害剤はFOPからのiPS細胞の形成と維持の双方の効率を改善することができた。ALK2阻害剤としての新しい化合物を探索することは、FOPの安定した治療法のための新しい薬剤を開発することに向けた第1段階である。この目的で、ここで提示した患者に
30

【0074】

〔実施例2〕

本実施例は、酪酸ナトリウム(Sodium butyrate; NaB)を用いて、乳児型クラッベ(Krabbe)病患者由来の線維芽細胞からiPS細胞を誘導した例である。

【0075】

実施例1と同様にして、乳児型クラッベ病患者の皮膚試料から線維芽細胞を作製し、該線維芽細胞をセンドイウイルス(SeV)感染前日、6穴プレートに 5×10^5 細胞/ウェルとなるように播種した。該線維芽細胞にOct-3/4, Sox2, Klf4, cMycを発現するSeVを感染させて、翌日、培地(DMEM+10% FBS + 500uM酪酸ナトリウム)を交換し、以後毎日培地を交換した。ウイルス感染7日目に当該線維芽細胞を回収し、 3.5×10^5 細胞をマイトマイシン処理したマウス胎仔由来線維芽細胞(MMC-MEF)上へ播種した。その翌日から、ヒト胚性幹細胞(hES細胞)培養培地 [DMEM/F12 + 20% Knockout serum replacement (KSR) + 2mM Lグルタミン酸 + 100mM非必須アミノ酸 + 100mM 2-メルカプトエタノール + 5ng/mL 塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor; bFGF)]に500μMの酪酸ナトリウム(NaB)を添加した試験群と、NaBが添加されていない該hES細胞培養培地の無添加群とに分けて、それぞれ培地を交換した。以後感染12日目までは1日置きに培地を交換し
40
50

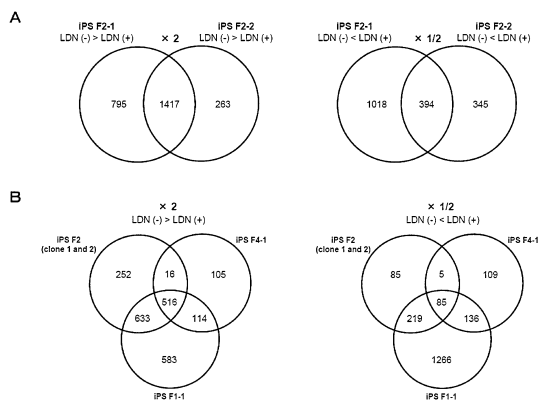
た。感染 13 日目からは、培地を 500 μM 酪酸ナトリウムが未添加の hES 培養培地に変え、培地交換を開始し、以後毎日培地を交換した。感染 28 日目に、実施例 1 に示す通り、アルカリフォスファターゼ染色により iPS 細胞コロニーを染色し、コロニー数を数え、iPS 細胞の誘導効率を測定した。その結果を図 7 に示す。

【 0076 】

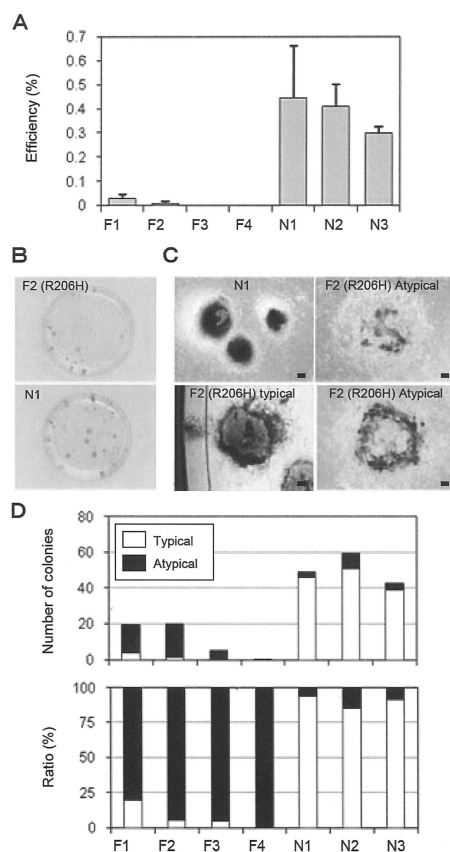
図 7 に示される通り、クラッペ病患者の線維芽細胞は、酪酸ナトリウムが添加されていない通常の iPS 細胞誘導培地では iPS 細胞誘導効率が 0% であるが、500 μM の酪酸ナトリウム (NaB) を添加した場合には iPS 細胞誘導効率の回復 (0.16%) が見られた。即ち、本実施例により、本発明によれば、iPS 細胞の製造が困難であるクラッペ病患者に由来する細胞において iPS 細胞の誘導を促進する物質の選別が可能であることが示された。また、本発明によれば iPS 細胞の製造が困難であるクラッペ病患者に由来する細胞から iPS 細胞を製造することも可能であることが示された。

10

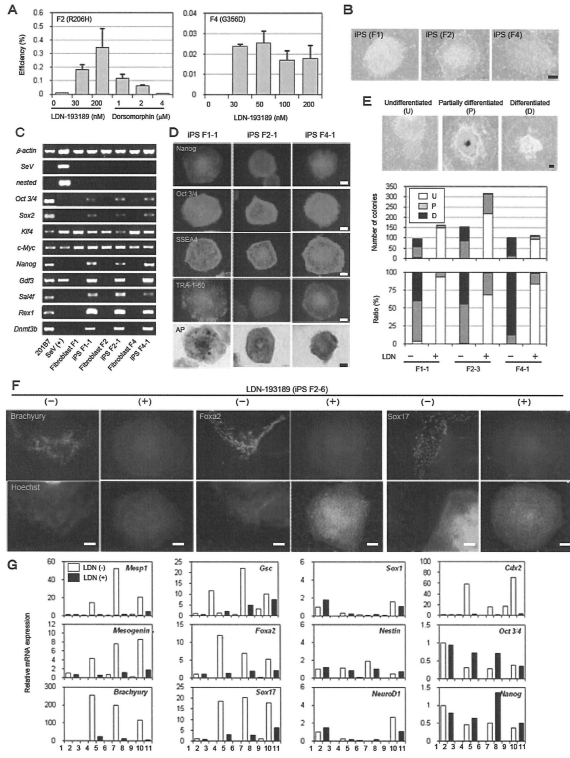
【 図 6 】



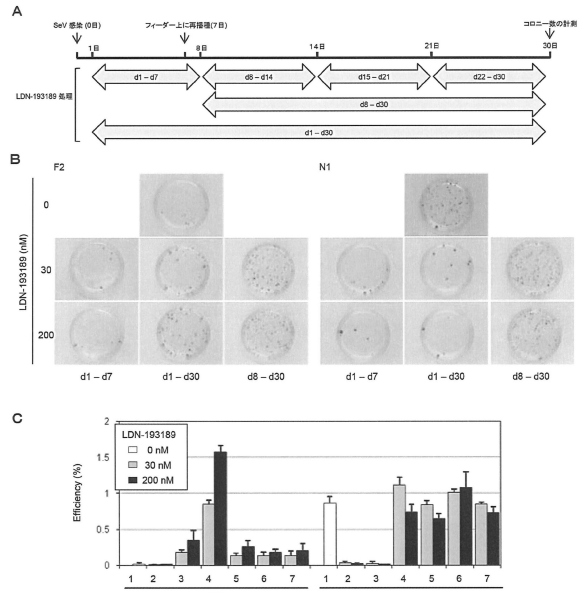
【 図 1 】



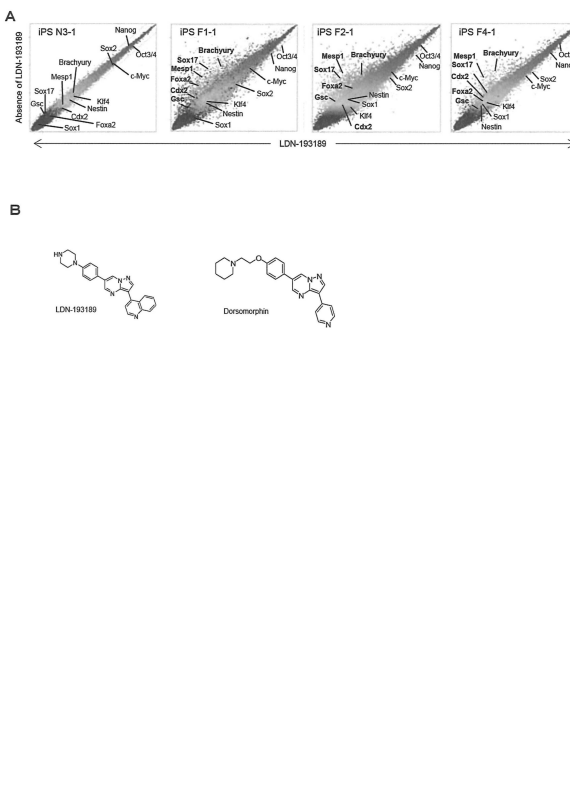
【 2 】



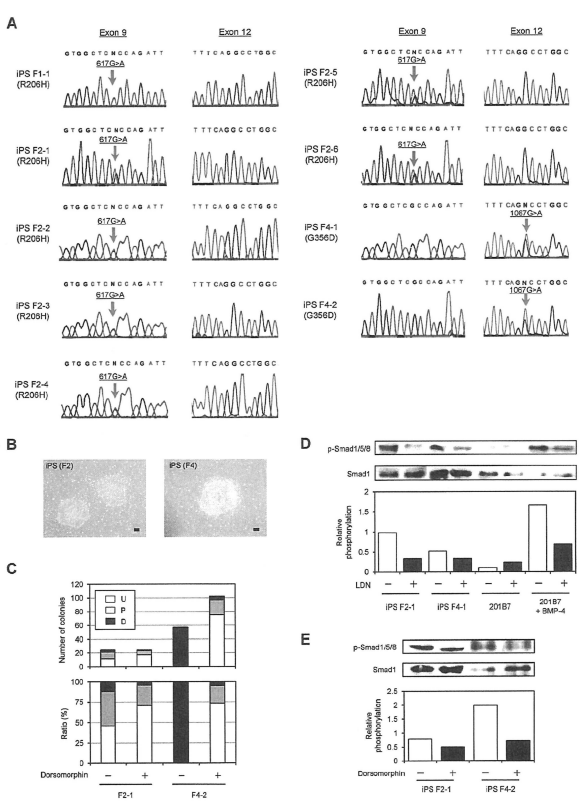
【 3 】



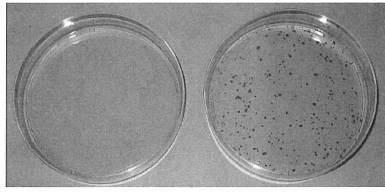
【 4 】



【 5 】



【 図 7 】



NaB 処理	-	+
AP 陽性 iPS 細胞コロニー数	0	562
誘導効率	0%	0.16%

【 配列表 】

0006028236000001 . app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	25/08 (2006.01)	A 6 1 P	25/08
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10
		A 6 1 P	43/00 1 0 5

- (56)参考文献 江良沢実 et al., 難治性疾患由来外来因子フリー人工多能性幹細胞の委託作製とバンク化に関する研究, 難治性疾患由来外来因子フリー人工多能性幹細胞の委託作製とバンク化に関する研究 平成22年度総括・分担, 2011年 3月, p.4-12
 戸口田淳也, 難治性骨軟骨疾患特異的 i P S 細胞作製と病態解明, 疾患特異的 i P S 細胞を用いた難治性疾患の画期的診断・治療法の開発に関する研究 平成22年度総括・分担, 2011年 3月, p.17-18
 房木ノエミ, センダイウイルスベクターを用いた遺伝子挿入のない疾患由来 i P S 細胞株の樹立に関する研究, 難治性疾患由来外来因子フリー人工多能性幹細胞の委託作製とバンク化に関する研究 平成22年度総括・分担, 2011年 3月, p.27-31

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 Q 1 / 0 0 - 1 / 7 0
 C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0
 CA/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus(JDreamIII)
 Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
 UniProt/GeneSeq
 PubMed