

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-307007
(P2008-307007A)

(43) 公開日 平成20年12月25日(2008.12.25)

(51) Int.Cl.

C 12 N 5/06 (2006.01)
C 12 N 15/09 (2006.01)

F 1

C 12 N 5/00
C 12 N 15/00E
A

テーマコード(参考)

4 B 0 2 4
4 B 0 6 5

審査請求 未請求 請求項の数 35 O L (全 34 頁)

(21) 出願番号

特願2007-159382 (P2007-159382)

(22) 出願日

平成19年6月15日 (2007.6.15)

(71) 出願人 300049958

バイエル・シエーリング・ファーマ アク
チエンゲゼルシャフト
ドイツ連邦共和国 テーー 13353 ベ
ルリン ミューラーシュトラーゼ 178

(74) 代理人 100099759

弁理士 青木 篤

(74) 代理人 100077517

弁理士 石田 敬

(74) 代理人 100087871

弁理士 福本 積

(74) 代理人 100087413

弁理士 古賀 哲次

(74) 代理人 100108903

弁理士 中村 和広

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】出生後のヒト組織由来未分化幹細胞から誘導したヒト多能性幹細胞

(57) 【要約】

【課題】移植細胞の免疫拒絶を回避できる患者自身のゲノムからなるヒトのES細胞と近似した性質を有するヒト多能性幹細胞を、出生後のヒト組織に由来する細胞から樹立することにある。

【解決手段】様々な出生後のヒト組織に存在するTert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていない未分化な幹細胞にOct3/4、Sox2、及びKlf4の3つの遺伝子あるいはOct3/4、Sox2、及びKlf4の3つの遺伝子及びc-Myc遺伝子又はヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤を導入することでヒト多能性幹細胞を誘導できる事を見出した。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

Tert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞から誘導した試験管内で長期自己複製能ならびに外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化能を有するヒト多能性幹細胞。

【請求項 2】

前記ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞が初代培養又は第2継代培養されたかあるいは低濃度血清で継代培養されたことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞から誘導した請求項1に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 3】

前記ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞が初代培養又は第2継代培養されたかあるいは低濃度血清で継代培養されたことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞にOct3/4、Sox2及びKlf4の3つの各遺伝子を強制発現することで誘導した請求項1に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 4】

前記ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞が初代培養又は第2継代培養されたかあるいは低濃度血清で継代培養されたことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞にOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4つの各遺伝子を強制発現することで誘導した請求項1に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 5】

前記ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞が初代培養又は第2継代培養されたかあるいは低濃度血清で継代培養されたことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞にOct3/4、Sox2及びKlf4の3つの各遺伝子の強制発現とヒストンデアセチラーゼ阻害剤処理を組み合わせることで誘導した請求項1に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 6】

前記ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞が初代培養又は第2継代培養されたかあるいは低濃度血清で継代培養されたことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞にOct3/4、Sox2及びKlf4の3つの各遺伝子の強制発現とMS-275処理を組み合わせることで誘導した請求項1に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 7】

前記未分化な幹細胞の培養において更にFGF-2を用いることを特徴とする請求項2～6のいずれか1項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 8】

前記未分化な幹細胞の培養において更にPDGFとEGFを用いることを特徴とする請求項2～6のいずれか1項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 9】

前記未分化な幹細胞の培養において更に低密度であることを特徴とする請求項2～8のいずれか1項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 10】

前記ヒト多能性幹細胞がNanog陽性である請求項1～9のいずれか1項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 11】

前記ヒト多能性幹細胞がアルカリフィオスマターゼ染色陽性である請求項1～10のいずれか1項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 12】

前記ヒト多能性幹細胞がTert陽性である請求項1～11のいずれか1項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 13】

前記ヒト多能性幹細胞が試験動物に移植するとテラトーマ形成能を有する請求項1～12のいずれか1項に記載のヒト多能性幹細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 1 4】

前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織である請求項 1 ~ 13のいずれか1項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 1 5】

前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織でかつ新生児組織又は臍帯組織に由来する組織である請求項 1 ~ 13のいずれか1項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 1 6】

前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織でかつ新生児皮膚又は臍帯由来の血管に由来する組織である請求項 1 ~ 13のいずれか1項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 1 7】

前記ヒト多能性幹細胞が更に試験管内で始原生殖細胞への分化能を有する請求項 1 ~ 16のいずれか1項に記載のヒト多能性幹細胞。

【請求項 1 8】

Tert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とし、Oct3/4、Sox2及びKlf4の 3 つの各遺伝子を強制発現することで、試験管内で長期自己複製能ならびに外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化能を有するヒト多能性幹細胞を誘導できるヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

【請求項 1 9】

Tert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とし、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの 4 つの各遺伝子を強制発現することで、試験管内で長期自己複製能ならびに外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化能を有するヒト多能性幹細胞を誘導できるヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

【請求項 2 0】

Tert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とし、Oct3/4、Sox2及びKlf4の 3 つの各遺伝子の強制発現とヒストンデアセチラーゼ阻害剤処理を組み合わせることで、試験管内で長期自己複製能ならびに外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化能を有するヒト多能性幹細胞を誘導できるヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

【請求項 2 1】

Tert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とし、Oct3/4、Sox2及びKlf4の 3 つの各遺伝子の強制発現とMS-275処理を組み合わせることで、試験管内で長期自己複製能ならびに外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化能を有するヒト多能性幹細胞を誘導できるヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

【請求項 2 2】

前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織である、請求項18 ~ 21のいずれか1項に記載のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

【請求項 2 3】

前記ヒト出生後の組織が、出生直後の組織でかつ新生児組織又は臍帯組織に由来する組織である、請求項18 ~ 21のいずれか1項に記載のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

【請求項 2 4】

前記ヒト出生後の組織が、出生直後の組織でかつ新生児皮膚又は臍帯由来の血管に由来する組織である、請求項18 ~ 21のいずれか1項に記載のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

【請求項 2 5】

前記ヒト多能性幹細胞が更に試験管内で始原生殖細胞への分化能を有する、請求項18 ~ 24のいずれか1項に記載の未分化な幹細胞。

【請求項 2 6】

Tert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞を、初代培養又は第2継代培養した

10

20

30

40

50

後にあるいは0から5%の低濃度血清で第3継代培養から第4継代培養した後に、Oct3/4、Sox2及びKlf4の3つの各遺伝子を強制発現することを特徴とするヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【請求項27】

前記強制発現するOct3/4、Sox2及びKlf4の3つの各遺伝子に更にc-Mycを加えた4つの各遺伝子を強制発現することを特徴とする、請求項26に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【請求項28】

前記Oct3/4、Sox2及びKlf4の3つの各遺伝子を強制発現することに加え、更にヒストンデアセチラーゼ阻害剤処理を組み合わせることを特徴とする請求項26に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

10

【請求項29】

前記Oct3/4、Sox2及びKlf4の3つの各遺伝子を強制発現することに加え、更にMS-275処理を組み合わせることを特徴とする、請求項26に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【請求項30】

前記未分化な幹細胞がFGF-2の存在下で培養されていることを特徴とする、請求項26～29のいずれか1項に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【請求項31】

前記未分化な幹細胞がPDGFとEGFの存在下で培養されていることを特徴とする、請求項26～29のいずれか1項に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

20

【請求項32】

前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織である、請求項26～31のいずれか1項に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【請求項33】

前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織でかつ新生児組織又は臍帯組織に由来する組織である、請求項26～31のいずれか1項に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【請求項34】

前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織でかつ新生児皮膚又は臍帯由来の血管に由来する組織である、請求項26～31のいずれか1項に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

30

【請求項35】

Rho associated kinaseの阻害剤を有効成分として含有する培地で請求項1～17のいずれか1項に記載のヒト多能性幹細胞を培養する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト出生後の組織中に存在する幹細胞から誘導したヒト多能性幹細胞ならびに、該誘導法に関する。

【背景技術】

【0002】

高齢化社会の急速な進展に伴い、組織の変性や傷害を原因とする疾患が急激に増加している。該疾患としては、メタボリックシンドロームに伴い加齢依存的に発症する脳梗塞・心筋梗塞・腎不全、加齢に伴う組織の内的変化で惹起されるアルツハイマー病・パーキンソン病・骨粗しょう症などがあげられる。自己免疫疾患により誘導されるI型糖尿病・多発性硬化症・慢性関節リュウマチ、ならびに外傷により惹起されるや熱傷や脊髄損傷も組織の変性や傷害を特徴とする疾患である。このような組織の変性や傷害を原因とする疾患を治療する方法として、現在さまざまな再生医療の開発が進められている。

40

【0003】

再生医療は患者に内在する幹細胞を薬剤などで賦活する再生誘導の方法と、幹細胞や幹細胞から誘導した体細胞や組織を移植する細胞補充療法の大きく二つに分類することができる。特に、慢性炎症を伴う疾患や高齢者の疾患では、患者自身の幹細胞の機能の低下に

50

より再生誘導療法は十分に機能せず、細胞補充療法の開発が不可欠である。細胞補充療法により細胞の変性や傷害を原因とする疾患を治療するには通常大量の幹細胞あるいは幹細胞から誘導した体細胞を移植の材料として準備することが必要となる。そのためには、様々な組織に分化し、かつ長期に渡り自己複製可能な幹細胞が細胞補充療法の開発には不可欠である。

【0004】

このような条件を満たす幹細胞として、受精卵や始原生殖細胞から誘導されるES細胞やEG細胞が報告されている。しかし、細胞補充療法を安全にかつ効率的に実施するには、移植細胞の免疫拒絶を回避できる患者自身のゲノムからなるES細胞やEG細胞を準備することが必要となる。

10

【0005】

患者自身のゲノムからなるES細胞を準備する方法として、卵子の核をレシピエント由来の体細胞の核に入れ替える核移植の方法がマウスなどの動物で検討されている。しかし、核移植に成功する確率は低く、またヒト細胞ではその方法は成功していない。これとは別に、マウスの皮膚由来の纖維芽細胞にOct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycの4つの遺伝子を導入することでES細胞と近似した性質を有するiPS(induced pluripotent stem)細胞の樹立が報告されている(Cell 126, 1-14, August 25, 2006)。しかしiPS誘導の効率は低く、またヒト細胞では成功していない。

【発明の開示】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

従って、本発明が解決しようとする課題は、移植細胞の免疫拒絶を回避できる患者自身のゲノムからなるヒトのES細胞と近似した性質を有するヒト多能性幹細胞を、出生後のヒト組織に由来する細胞から樹立することにある。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、様々な出生後のヒト組織に存在するTert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていない未分化な幹細胞にOct3/4、Sox2、及びKlf4の3つの遺伝子あるいはOct3/4、Sox2、及びKlf4の3つの遺伝子及びc-Myc遺伝子又はヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤を導入することでヒト多能性幹細胞を誘導できる事を見出した。さらに、前記未分化な幹細胞を初代培養、第2継代培養、又は低濃度血清を特徴とする培地内で低密度で低継代培養増幅後にOct3/4、Sox2、及びKlf4の3つの遺伝子あるいはOct3/4、Sox2及びKlf4の3つの遺伝子及びc-Myc遺伝子又はヒストンデアセチラーゼ阻害剤を導入することでヒト多能性幹細胞を効率的に誘導する方法を見出した。

30

【0008】

出生後のヒト組織とは、好ましくは出生直後の組織(新生児の各組織)、臍帯組織(臍帯、臍帯血)、羊膜、胎盤などが挙げられ、さらに好ましくは新生児の各組織又は臍帯組織が挙げられる。また、出生後の組織には個体が生まれてから死亡するまでの様々な時期の組織も含まれる。該未分化な幹細胞とは間葉系幹細胞(Science. 1999 Apr 2;284(5411):143-7.)、MAPCs(Multipotent Adult Progenitor Cells)(Stem Cell Rev. 2005;1(1):53-9.)、MIAMI(Marrow-isolated adult multilineage inducible)細胞(J Cell Sci. 2004 Jun 15;117(Pt 14):2971-81.)などのin vitroで樹立される体性幹細胞の組織中における起源細胞のうち、Nanog, Oct3/4, Sox2, Tertの少なくとも4つの遺伝子がDNAのメチル化やヒストンの修飾などによるヘテロクロマチン形成による後成的な修飾を受けていない幹細胞を示す。

40

【0009】

また、ES細胞様の多能性幹細胞とは、試験管内で長期の自己複製能と三胚葉への分化能を有する細胞を意味し、該多能性幹細胞は、マウスなどの試験動物に移植するとテラトーマを形成する場合もある。本発明は組織変性や傷害を原因とする疾患に対する細胞補充療法に有用な技術になると考えられる。

50

【0010】

本発明者らは、出生後のヒト組織からES細胞様の多能性幹細胞を樹立する方法を鋭意検討を行った結果以下の大きく3つの知見を得た。

(1) 出生後のヒト組織由来細胞のうちでOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4つの遺伝子を導入することでES細胞様の多能性幹細胞に変換が可能なのは、Tert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていない未分化な幹細胞である。

(2) Tert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていない未分化な幹細胞は出生直後の組織（新生児の各組織）、臍帯組織（臍帯、臍帯血）、羊膜、胎盤などに多く存在する。

【0011】

(3) Tert、Nanog、Oct3/4及びSox2遺伝子が後成的な不活性化を受けていない未分化な幹細胞は、高濃度血清中で培養するかあるいは低濃度血清中でも長期継代培養することで、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4つの遺伝子の導入によりES細胞様の多能性幹細胞へ変換する性質が失われる。該知見を応用することで、ヒト組織由来細胞から効率的にES細胞様の多能性幹細胞を樹立する本発明を完成させた。

10

【0012】

次に発明者らはc-Myc遺伝子がガンを誘発する危険性を有することからその代替物を検討し、マウスでは未分化な幹細胞にc-Myc遺伝子の代わりにヒストンデアセチラーゼ阻害剤を添加することで出生後の組織に存在するTert、Nanog、Oct3/4及びSox2遺伝子が後成的な不活性化を受けていない未分化な幹細胞からES細胞様の多能性幹細胞が誘導できることを明らかにし、ヒトの場合にも同様にTert、Nanog、Oct3/4及びSox2遺伝子が後成的な不活性化を受けていない未分化な幹細胞にc-Myc遺伝子の代わりにヒストンデアセチラーゼ阻害剤を添加することでES細胞様の多能性幹細胞に変換が可能であると考えられる。

20

【0013】

更に、マウスでは未分化な幹細胞にc-Myc遺伝子以外のOct3/4、Sox2及びKlf4の3つの遺伝子のみを導入することでES細胞様の多能性幹細胞に変換が可能なことを見出し、ヒトの場合にも同様にTert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていない未分化な幹細胞にOct3/4、Sox2及びKlf4の3つの遺伝子を導入することでもES細胞様の多能性幹細胞への変換が可能であると考えられる。

【0014】

30

すなわち本発明は以下の(1)～(35)を提供するものである。

(1) Tert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞から誘導した試験管内で長期自己複製能ならびに外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化能を有するヒト多能性幹細胞。

(2) 前記ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞が初代培養又は第2継代培養されたかあるいは低濃度血清で継代培養されたことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞から誘導した上記(1)に記載のヒト多能性幹細胞。

【0015】

40

(3) 前記ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞が初代培養又は第2継代培養されたかあるいは低濃度血清で継代培養されたことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞にOct3/4、Sox2及びKlf4の3つの各遺伝子を強制発現することで誘導した上記(1)に記載のヒト多能性幹細胞。

(4) 前記ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞が初代培養又は第2継代培養されたかあるいは低濃度血清で継代培養されたことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞にOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4つの各遺伝子を強制発現することで誘導した上記(1)に記載のヒト多能性幹細胞。

【0016】

50

(5) 前記ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞が初代培養又は第2継代培養されたかあるいは低濃度血清で継代培養されたことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞にOct3/4、Sox2及びKlf4の3つの各遺伝子の強制発現とヒストンデアセ

チラーゼ阻害剤処理を組み合わせることで誘導した上記(1)に記載のヒト多能性幹細胞。

(6) 前記ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞が初代培養又は第2継代培養されたかあるいは低濃度血清で継代培養されたことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞にOct3/4、Sox2及びKlf4の3つの各遺伝子の強制発現とMS-275処理を組み合わせることで誘導した上記(1)に記載のヒト多能性幹細胞。

【0017】

(7) 前記未分化な幹細胞の培養において更にFGF-2を用いることを特徴とする上記(2)～(6)のいずれか1つに記載のヒト多能性幹細胞。

(8) 前記未分化な幹細胞の培養において更にPDGFとEGFを用いることを特徴とする上記(2)～(6)のいずれか1つに記載のヒト多能性幹細胞。 10

(9) 前記未分化な幹細胞の培養において更に低密度であることを特徴とする上記(2)～(8)のいずれか1つに記載のヒト多能性幹細胞。

(10) 前記ヒト多能性幹細胞がNanog陽性である上記(1)～(9)のいずれか1つに記載のヒト多能性幹細胞。

【0018】

(11) 前記ヒト多能性幹細胞がアルカリフィオスファターゼ染色陽性である上記(1)～(10)のいずれか1つに記載のヒト多能性幹細胞。

(12) 前記ヒト多能性幹細胞がTert陽性である上記(1)～(11)のいずれか1つに記載のヒト多能性幹細胞。 20

(13) 前記ヒト多能性幹細胞が試験動物に移植するとテラトーマ形成能を有する上記(1)～(12)のいずれか1つに記載のヒト多能性幹細胞。

(14) 前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織である上記(1)～(13)のいずれか1つに記載のヒト多能性幹細胞。

【0019】

(15) 前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織でかつ新生児組織又は臍帯組織に由来する組織である上記(1)～(13)のいずれか1つに記載のヒト多能性幹細胞。

(16) 前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織でかつ新生児皮膚又は臍帯由来の血管に由来する組織である上記(1)～(13)のいずれか1つに記載のヒト多能性幹細胞。

(17) 前記ヒト多能性幹細胞が更に試験管内で始原生殖細胞への分化能を有する上記(1)～(16)のいずれか1つに記載のヒト多能性幹細胞。 30

【0020】

(18) Tert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とし、Oct3/4、Sox2及びKlf4の3つの各遺伝子を強制発現することで、試験管内で長期自己複製能ならびに外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化能を有するヒト多能性幹細胞を誘導できるヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

(19) Tert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とし、Oct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4つの各遺伝子を強制発現することで、試験管内で長期自己複製能ならびに外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化能を有するヒト多能性幹細胞を誘導できるヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。 40

【0021】

(20) Tert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とし、Oct3/4、Sox2及びKlf4の3つの各遺伝子の強制発現とヒストンデアセチラーゼ阻害剤処理を組み合わせることで、試験管内で長期自己複製能ならびに外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化能を有するヒト多能性幹細胞を誘導できるヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

【0022】

(21) Tert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とし、Oct3/4、Sox2及びKlf4の3つの各遺伝子の強制発現とMS-275処理を組み合わせることで、試験管内で長期自己複製能ならびに外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化 50

能を有するヒト多能性幹細胞を誘導できるヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

(22) 前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織である上記(18)～(21)のいずれか1つに記載のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

(23) 前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織でかつ新生児組織又は臍帯組織に由来する組織である上記(18)～(21)のいずれか1つに記載のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。

【0023】

(24) 前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織でかつ新生児皮膚又は臍帯由来の血管に由来する組織である上記(18)～(21)のいずれか1つに記載のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞。 10

(25) 前記ヒト多能性幹細胞が更に試験管内で始原生殖細胞への分化能を有する上記(18)～(24)のいずれか1つに記載の未分化な幹細胞。

(26) Tert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞を初代培養又は第2継代培養した後にあるいは0から5%の低濃度血清で第3継代培養から第4継代培養した後にOct3/4、Sox2及びKlf4の3つの各遺伝子を強制発現することを特徴とするヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【0024】

(27) 前記強制発現するOct3/4、Sox2及びKlf4の3つの各遺伝子に更にc-Mycを加えた4つの各遺伝子を強制発現することを特徴とする上記(26)に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。 20

(28) 前記Oct3/4、Sox2及びKlf4の3つの各遺伝子を強制発現することに加え、更にヒストンデアセチラーゼ阻害剤処理を組み合わせることを特徴とする上記(26)に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

(29) 前記Oct3/4、Sox2及びKlf4の3つの各遺伝子を強制発現することに加え、更にMS-275処理を組み合わせることを特徴とする上記(26)に記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【0025】

(30) 前記未分化な幹細胞がFGF-2の存在下で培養されていることを特徴とする上記(26)～(29)のいずれか1つに記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。 30

(31) 前記未分化な幹細胞がPDGFとEGFの存在下で培養されていることを特徴とする上記(26)～(29)のいずれか1つに記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

(32) 前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織である上記(26)～(31)のいずれか1つに記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

【0026】

(33) 前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織でかつ新生児組織又は臍帯組織に由来する組織である上記(26)～(31)のいずれか1つに記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

(34) 前記ヒト出生後の組織が出生直後の組織でかつ新生児皮膚又は臍帯由来の血管に由来する組織である上記(26)～(31)のいずれか1つに記載のヒト多能性幹細胞の誘導方法。

(35) Rho associated kinaseの阻害剤を有効成分として含有する培地で上記(1)～(17)のいずれか1つに記載のヒト多能性幹細胞を培養する方法。 40

【0027】

本発明のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞とは、間葉系幹細胞、MAPCs、MIA MI細胞などのin vitroで樹立される様々な体性幹細胞の組織中の起源細胞のうち、Nanog、Oct3/4、Sox2およびTertの少なくとも4つの遺伝子がDNAのメチル化やヒストンの修飾などによるヘテロクロマチン形成による後成的な修飾を受けていない幹細胞を示す。ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞からヒト多能性幹細胞を誘導するとTert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が活性化(発現)する。

【0028】

10

20

30

40

50

間葉系幹細胞とは、骨髓・脂肪・筋肉・皮膚等の組織から高濃度血清（5%以上）を含む培地中で培養した結果、プラスチック培養皿に接着性の非造血細胞として得られる細胞（間質細胞）の内、間葉系細胞（骨、軟骨、脂肪）への分化能を有する細胞である。従つて、間葉系幹細胞は、上記培養の結果得られた細胞であり、ヒト出生後の組織から分離直後の該未分化細胞（間葉系幹細胞、MAPCs、MIAMI細胞などの*in vitro*で樹立される体性幹細胞の組織中における起源細胞のうち、Nanog、Oct3/4、Sox2およびTertの少なくとも4つの遺伝子がDNAのメチル化やヒストンの修飾などによるヘテロクロマチン形成による後成的な修飾を受けていない幹細胞）とは性質を異にする。

【0029】

しかしながら、間葉系幹細胞、MAPCs、MIAMI細胞を培養する条件下でも、短い継代数や低密度培養などの培養条件に応じて、ごく少数の該未分化細胞が維持される。本発明のヒト出生後の組織としては、ヒト個体が生まれてから死亡するまでの様々な時期の各組織（骨髄液、筋肉、脂肪組織、末梢血、皮膚、骨格筋など）及び臍帯組織（臍帯、臍帯血）、羊膜、胎盤などの出産時に付随する組織が挙げられ、好ましくは新生児の各組織のような出生直後の組織（骨髄液、筋肉、脂肪組織、末梢血、皮膚、骨格筋など）及び臍帯組織（臍帯、臍帯血）が挙げられ、更に好ましくは新生児皮膚のような新生児の各組織及び臍帯由来の血管に由来する組織のような臍帯組織（臍帯、臍帯血）が挙げられる。

10

【0030】

本発明のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞は、低濃度血清（望ましくは2%以下）を含有あるいは含有しない、そして細胞成長因子（PDGF、EGF、FGF-2など）を添加あるいは添加しない培地中で初代培養から一定期間培養することが可能であり、血清中（5%を超えた濃度）で長期培養することを特徴とする間葉系幹細胞とは性質を異にするものである。

20

【0031】

前記細胞成長因子としてはFGF-2、PDGF、EGF、IGF、インシュリン、TGFb-1、アクチビンA（Activin A）、ノギン（Noggin）、BDNF、NGF、NT-1、NT-2、NT-3等が挙げられ、FGF-2を単独で添加する場合又はPDGFとEGFの両方を添加する場合が望ましい。前記FGF-2とは塩基性纖維芽細胞増殖因子のことであり、PDGFとは血小板由来増殖因子のことであり、EGFとは上皮細胞増殖因子のことであり、IGFとはインシュリン様増殖(成長)因子のことであり、TGF -1とはトランスフォーミング成長因子 -1 (Transforming growth factor -1)のことであり、BDNFとは脳由来神経栄養因子(Brain-derived neurotrophic factor)のことであり、NGFとは神経成長因子のことであり、NT-1とはニューロトロフィン-1 (Neurotrophin-1)のことであり、NT-2とはニューロトロフィン-2 (Neurotrophin-2)のことであり、NT-3とはニューロトロフィン-3 (Neurotrophin-3)のことである。

30

【0032】

前記初代培養とは採取するヒトから分離された直後を意味し、初代培養細胞を1回継代培養したことが第2継代培養であり、初代培養細胞を2回継代培養したことが第3継代培養であり、初代培養細胞を3回継代培養したことが第4継代培養である。前記初代培養から一定期間培養とは通常初代培養から第4継代培養、望ましくは初代培養から第2継代培養である。

40

【0033】

本発明のヒト出生後の組織に存在するTert、Nanog、Oct3/4、Sox2遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とする未分化な幹細胞から誘導したヒト多能性幹細胞とは、ヒトES細胞を培養する条件下で長期自己複製能を有し、またヒトES細胞を試験管内で分化誘導する条件下で、外胚葉、中胚葉及び内胚葉への多分化能を有する幹細胞を言い、前記ヒト多能性幹細胞は更にヒトES細胞を試験管内で分化誘導する条件下で、始原生殖細胞への分化能を有する場合もある。また本発明のTert、Nanog、Oct3/4、Sox2遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とするヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞から誘導したヒト多能性幹細胞はマウスなどの試験動物に移植することでテラトーマを形成する能力を有する幹細胞であってもよい。

50

【 0 0 3 4 】

本発明に含まれる低濃度血清とは通常 5 % 以下、望ましくは 2 % 以下の濃度の血清であり、本発明に含まれる低密度とは約 10% 以下の集密度である。

また、アルカリフィオスファターゼ染色の方法としては下記の方法が挙げられる。即ち各ウェルから培養液を除いたのち、10% ホルムアルデヒド溶液で室温にて 2 - 5 分細胞を固定し、リン酸緩衝溶液等で洗浄後、アルカリフィオスファターゼの発色其質であるニトロブルーテトラゾリウムクロライド (nitro-blue tetrazolium chloride) / 5 - ブロモ-4-クロロ-3' - インドリルフォスファターゼパラ - トルイジン塩 (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphatase p-Toluidine Salt) 溶液(以下NBT/BCIP溶液と言う)を加え、室温にて 20 ~ 30 分反応させる。

10

【 0 0 3 5 】

ヒストンデアセチラーゼ阻害剤及びMS-275並びにそれらの処理の方法は後述の通りである。

本発明に含まれる強制発現の方法には、ベクター等により遺伝子を導入することで発現させる外的な発現の方法と、薬剤等の刺激により内的な発現を促す内的な発現の方法が含まれる。更に本発明に含まれる強制発現には、細胞外で Oct3/4、Sox2、Klf4 又は c-Myc の遺伝子を発現させ、産生された Oct3/4、Sox2、Klf4 又は c-Myc の蛋白質を蛋白質導入法を用いて直接細胞へ導入することも含まれる。蛋白質導入法としては、市販品のキャリア試薬 (Chariot, BioPorter, GenomONE) を用いる場合、PTD (protein transduction domain) 融合蛋白質法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法などが挙げられる。Oct3/4、Sox2 及び Klf4 と c-Myc の各遺伝子をベクター等により導入することで強制発現させる外的な発現の方法は後述の通りである。

20

以下本発明を詳細に説明する。

【 0 0 3 6 】**1. ヒト出生後の骨髄から未分化な幹細胞を含む細胞画分を分離する方法**

ヒト骨髄中より本発明のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞を取得する方法としては、以下の方法があげられる。

ヒト骨髄中より骨髓液を採取するためには、まずドナーに全身麻酔を行った後に腹ばいの姿勢にし、腸骨の後縁より骨髓採取針という針で直接皮膚を刺し腸骨の表面を通して骨髓に針を入れ、注射器で骨髓の液を吸引する。取得した骨髓液から未分化な幹細胞を取得するためには比重遠心により分離される単核細胞分画を回収する。取得された細胞画分は該未分化な幹細胞を含む粗精製細胞として、以下に示す 6 . の方法により培養を行うことで本発明のヒト多能性幹細胞の誘導に用いることができる。

30

【 0 0 3 7 】**2. ヒト出生後の皮膚から未分化な幹細胞を含む画分を分離する方法**

ヒトの皮膚より本発明のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞を取得する方法としては、以下の方法があげられる。

ヒトのひざの裏や臀部より表皮、真皮を含む皮膚組織を採取する。該皮膚組織を 0.6% トリプシン (Invitrogen社製) / DMEM (ダルベッコ変法イーグル培地) / F-12 (Invitrogen社製) / 1% anti-biotics, anti-mycotics (Invitrogen社製) に皮膚内側を下にして浸し、37 ℃、30 分間処理する。

40

【 0 0 3 8 】

皮膚組織を裏返して内側をピンセットで軽くこすった後、はさみを使って皮膚組織を約 1 mm² に細断し、1200 rpm 10 分間室温で遠心分離する。上清を除去し、組織沈殿に対して 25ml 0.1% トリプシン / DMEM / F-12 / 1% anti-biotics, anti-mycotics を加え、スターラーを用いて 37 ℃ 200-300 rpm 40 分間で攪拌する。組織沈殿が十分消化されたことを確認後、3 ml ウシ胎児血清 (FBS) (JRH社製) を加え、ガーゼ (PIP社製Type I) 、100 μm ナイロンフィルター (FALCON社製) 、40 μm ナイロンフィルター (FALCON社製) の順で濾過する。1200 rpm、室温で 10 分間遠心分離し上清を除去後、DMEM / F-12 / 1% anti-biotics, anti-mycotics を加えて沈殿を洗浄し、1200 rpm 室温で 10 分間遠心分離する。このよう

50

にして取得された細胞画分は該未分化な幹細胞を含む粗精製細胞として、以下に示す6.の方法により培養を行うことで本発明のヒト多能性幹細胞の誘導に用いることができる。

【0039】

3. ヒト出生後の骨格筋から未分化な幹細胞を含む画分を分離する方法

ヒトの骨格筋より本発明のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞を取得する方法としては、以下の方法があげられる。

ヒトの上腕二頭筋の外側頭や下腿の縫工筋などの筋肉を含む結合組織を切皮して摘出後、縫合する。取得した全筋は、はさみあるいはメスを利用してミンチ状にした後、collagenase type IA (SIGMA社製) を0.06%、FBSを10%含むDMEM (high glucose) にけん濁し、37 ° Cで2時間インキュベーションする。

10

【0040】

遠心分離により細胞をミンチ状の筋肉より分離してきた細胞回収し、FBSを10%含むDME (high glucose) にけん濁する。該けん濁液をまず孔径40 μm マイクロフィルターを通過させた後、孔径20 μmのマイクロフィルターを通すことにより得られた細胞画分は、該未分化な幹細胞を含む粗精製細胞として、以下に示す6.の方法により培養を行うことで本発明のヒト多能性幹細胞の誘導に用いることができる。

【0041】

4. ヒト出生後の脂肪組織から未分化な幹細胞を含む細胞画分を分離する方法

ヒトの出生後の脂肪組織より本発明のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞を取得する方法としては、以下の方法があげられる。

20

本発明の方法に有用な脂肪組織由来細胞は、当業者には知られた様々な方法で単離することができる。たとえば、こうした方法は米国特許第6,153,432号に記載されており、その全体が本願に組み込まれる。好ましい脂肪組織源は、大網脂肪細胞である。ヒトでは、脂肪細胞は典型的には脂肪吸引により単離される。

【0042】

脂肪細胞由来細胞を単離する1つの方法においては、脂肪組織を、0.01%～0.5%、好ましくは0.04%～0.2%、最も好ましくは約0.1%のコラーゲナーゼ、0.01%～0.5%、好ましくは0.04%、最も好ましくは約0.2%のトリプシンおよび/または0.5 ng/ml～10 ng/mlのデスパーゼ、または有効量のヒアルロナーゼもしくはDNアーゼ (DNA分解酵素) および約0.01～約2.0 mM、好ましくは約0.1～約1.0 mM、最も好ましくは0.53 mMの濃度のエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) で、25～50、好ましくは33～40、最も好ましくは37で、10分～3時間、好ましくは30分～1時間、最も好ましくは45分間処理する。

30

【0043】

細胞を、20ミクロンから800ミクロン、より好ましくは40ミクロンから400ミクロン、最も好ましくは70ミクロンのナイロンまたはチーズクロスメッシュフィルタに通す。次いで細胞を培地のまま直接、あるいは、FicollまたはPercollもしくは他の顆粒勾配を用い、微分遠心分離にかける。細胞は、100～3000×g、より好ましくは200～1500×g、最も好ましくは500×g、1分～1時間、より好ましくは2～15分間、最も好ましくは5分間、4～50、好ましくは20～40、より好ましくは約25で遠心分離する。

40

【0044】

このようにして取得された脂肪組織由来の細胞画分は、該未分化な幹細胞を含む粗精製細胞として、以下に示す6.の方法により培養を行うことで本発明のヒト多能性幹細胞の誘導に用いることができる。

【0045】

5. ヒト出生後末梢血あるいはヒト臍帯血から未分化な幹細胞を含む細胞画分を分離する方法

ヒトの出生後の末梢血あるいはヒト臍帯血より本発明のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞を取得する方法としては、以下の方法があげられる。

まず静脈中あるいは臍帯血中から血液を50 mlから500 ml程度採取して細胞を回収し、Ficoll-Hypaque法により単核細胞を回収する [Kanof, M.E. and Smith, P. D. 1993 Isolat

50

ion of whole mononuclear cells from peripheral blood. in Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Margulies, E. M. Shevack, and W. Strober, eds.) pp7.1.1-7.1.5, John Wiley & Sons, New York.]。

【0046】

次にヒト末梢血単核細胞 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 程度を 10% 牛胎児血清 (JRH Biosciences社製)、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ストレプトマイシン 100 units/ml ペニシリン (Invitrogen社製) を含む RPMI1640 培地 (Invitrogen社製) (以下末梢血幹細胞培養基本培地と称する) を用いて懸濁し、2 度洗浄して回収する。回収した細胞は末梢血幹細胞培養基本培地で再懸濁し、100mm プラスティックシャーレ当たり 1×10^7 cells になるように播種して 37 インキュベーターにて 8% の CO₂ 条件下で培養し、10 時間後に浮遊細胞を除去して付着細胞のみをピッティングにて取得する。10

【0047】

このようにして取得された末梢血あるいは臍帯血由来の付着性細胞画分は、該未分化な幹細胞を含む粗精製細胞として、以下に示す 6. の方法により培養を行うことで本発明のヒト多能性幹細胞の誘導に用いることができる。

【0048】

6. ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞を培養する方法

本発明のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞を培養するのに有用な培地の例 (但し、これらに限定されない) としては、ES 培地 [40% ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)、40% F12 培地、2mM L-グルタミン、1% non essential amino acid、0.1mM - メルカプトエタノール (以上 SIGMA 社製)、20% Knockout Serum Replacement (Invitrogen 社製)、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシン (Invitrogen 社製)] (以下 ES 培地と言う)、MAPC 培地 [60% ダルベッコ変法イーグル培地-低グルコース (Invitrogen 社製)、40% MCDB 201 (Invitrogen 社製)、1 × ITS 培地サプリメント (SIGMA 社製)、1 × リノレイン酸アルブミン (SIGMA 社製)、1 nM デキサメタゾン (SIGMA 社製)、 10^{-4} M アスコルビン酸 (SIGMA 社製)、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシン (Invitrogen 社製)、2% ウシ胎児血清 (Invitrogen 社製)] (以下 MAPC 培地と言う)、FBM 培地 (Lonza 社製) [MCDB202 改変培地、2% ウシ胎児血清、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ インシュリン、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシン、50ng/ml アンホテリシン - B] (以下 FBM 培地と言う) などが挙げられる。20

【0049】

該培地に添加する「成長因子、サイトカイン、ホルモン」としては、FGF-2、PDGF、EGF、IGF、インシュリン、TGF β -1、アクチビンA (Activin A)、ノギン (Noggin)、BDNF、NGF、NT-1、NT-2、NT-3 等が挙げられる。30

本発明のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞から効率的に本発明のヒト多能性幹細胞を誘導するには、上述した 1. から 5. の方法で取得した細胞画分を上述した添加物を含む培地中で、1 から 12 日間程度、 10^3 cells/cm² から 10^4 cells/cm² 程度の低密度で培養することが望ましい。

【0050】

7. ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞からヒト多能性幹細胞を誘導する方法

6. に記載の方法により培養された本発明のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞から本発明のヒト多能性幹細胞を誘導するためには、Oct3/4、Sox2 および Klf4 の 3 つの遺伝子に加えて、c-Myc 遺伝子あるいはヒストンデアセチラーゼ阻害剤を 6. に記載の方法により培養された本発明のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞に導入することが必要である。40

【0051】

本発明のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞への遺伝子導入の為に使用可能な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等があるが、好ましくはアデノウイルスベクターによりマウス由来カチオニック・アミノ酸・トランスポーター (mCAT) 遺伝子を導入後にレトロウイルスベクターを用いて Oct3/4、Sox2、Klf4 ならびに c-Myc 遺伝子を導入することが望ましい。50

【0052】

ウイルスベクタープラスミドとしては、レトロウイルス系としてpMXs、pMXs-IB、pMXs-puro、pMXs-neo（但し、pMXs-IBはpMXs-puroのピューロマイシン耐性遺伝子の代わりにプラスティジン耐性遺伝子を搭載したベクターである）[Experimental Hematology、2003、31(11)：1007-14]、MFG[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 6733-6737(1995)]、pBabePuro[Nucleic Acids Research, 18, 3587-3596(1990)]、LL-CG、CL-CG、CS-CG、CLG[Journal of Virology, 72, 8150-8157(1998)]等が、アデノウイルス系としてはpAdex1[Nucleic Acids Res., 23, 3816-3821(1995)]等が用いられる。

【0053】

パッケージング細胞としては、ウイルスのパッケージングに必要なタンパク質をコードする遺伝子の少なくとも1つを欠損している組換えウイルスベクタープラスミドの該欠損する蛋白質を補給できる細胞であればいかなるものも用いることができる。例えばヒト腎臓由来のHEK293細胞、マウス纖維芽細胞NIH3T3をベースにしたパッケージング細胞などを用いることができる。10

【0054】

パッケージング細胞で補給する蛋白質としては、レトロウイルスベクターの場合はレトロウイルス由来のgag、pol、envなどの蛋白質、レンチウイルスベクターの場合はHIVウイルス由来のgag、pol、env、vpr、vpu、vif、tat、rev、nefなどの蛋白質、アデノウイルスベクターの場合はアデノウイルス由来のE1A、E1Bなどの蛋白質を用いることができる。

【0055】

上記組換えウイルスベクタープラスミドを上記パッケージング細胞に導入することで組換えウイルスベクターを生産することができる。上記パッケージング細胞への上記ウイルスベクタープラスミドの導入法としては、特に限定されるものではなく、リン酸カルシウム法[特開平2-227075]、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413(1987)]、エレクトロポレーション法、など種々の遺伝子導入方法が知られているので、公知の遺伝子導入方法の中から適切なものを選択すればよい。20

【0056】

ヒストンアセチラーゼ阻害剤としては例えば、以下のAからEに記載のものが挙げられ、中でもMS-275が望ましい。

A. トリコスタチンAおよびそのアナログ、例えば：トリコスタチンA(TSA)；およびトリコスタチンC(Koghe et al. 1998. Biochem. Pharmacol. 56:1359-1364)。30

【0057】

B. ペプチド、例えば：オキサムフラチン(oxamflatin)[(2E)-5-[3-[(フェニルスオニル)アミノフェニル]-ペント-2-エン-4-イノヒドロキサム酸(Kim et al. Oncogene, 18:2461-2470(1999))；トラポキシン(Trapoxin)A(TPX)-環状テトラペプチド(シクロ-(L-フェニルアラニル-L-フェニルアラニル-D-ピペコリニル-L-2-アミノ-8-オキソ-9,10-エポキシ-デカノイル))(Kijima et al., J. Biol. Chem. 268, 22429-22435(1993))；FR901228、デプシペプチド(Nakajima et al., Ex. Cell RES. 241, 126-133(1998))；FR225497、環状テトラペプチド(H. Mori et al., PCT出願国際公開公報第00/08048号(2000年2月17日))；アピシジン(Apicidin)、環状テトラペプチド[シクロ(N-O-メチル-L-トリプトファニル-L-イソロイシニル-D-ピペコリニル-L-2-アミノ-8-オキソデカノイル)](Darkin-Rattray et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 13143-13147(1996))；アピシジン1a、アピシジン1b、アピシジン1c、アピシジン1Ia、およびアピシジン1Ib(P. Dulski et al., PCT出願国際公開公報第97/11366号)；HC-トキシン(HC-Toxin)、環状テトラペプチド(Bosch et al., Plant Cell 7, 1941-1950(1995))；WF27082、環状テトラペプチド(PCT出願国際公開公報第98/48825号)；ならびにクラミドシン(chlamydoxin)(Bosch et al.、前記)。40

【0058】

C. ヒドロキサム酸ベースのハイブリッド極性化合物(HPC)、例えば：サリチルヒドロキサム酸(SBHA)(Andrews et al., International J. Parasitology 30, 761-8(2000))50

)；スペロイルアニリドヒドロキサム酸 (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) (Richon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 3003-7 (1998))；アゼライックビスヒドロキサム酸 (azelaic bishydroxamic acid, ABHA) (Andrews et al.、前記)；アゼライック-1-ヒドロキサメート-9-アニリド (azelaic-1-hydroxamate-9-anilide, AAHA) (Qiu et al., Mol. Biol Cell 11, 2069-83 (2000))；M-カルボキシケイ皮酸ビスヒドロキサミド (CBHA) (Ricon et al.、前記)；6-(3-クロロフェニルウレイド)カーポイックヒドロキサム酸 (6-(3-chlorophenylureido)carnoic hydroxamic acid, 3-Cl-UCHA) (Richon et al.、前記)；MW2796 (Andrews et al.、前記)；およびMW2996 (Andrews et al.、前記)。

【0059】

10

D. 短鎖脂肪酸 (SCFA) 化合物、例えば：酪酸ナトリウム (Cousens et al., J. Biol. Chem. 254, 1716-23 (1979))；イソバレート (McBain et al., Biochem. Pharm. 53:1 357-68 (1997))；バルプロ酸；バレート (McBain et al.、前記)；4-フェニル酪酸 (4-PBA) (Lea and Tulsyan, Anticancer RESEARCH, 15, 879-3 (1995))；フェニル酪酸 (PB) (Wang et al., Cancer RESEARCH, 59, 2766-99 (1999))；プロピオネート (McBain et al.、前記)；ブチルアミド (Lea and Tulsyan、前記)；イソブチルアミド (Lea and Tulsyan、前記)；フェニルアセテート (Lea and Tulsyan、前記)；3-ブロモプロピオネート (Lea and Tulsyan、前記)；トリブチリン (tributyrin) (Guan et al., Cancer RESEARCH, 60, 749-55 (2000))；アルギニンブチレート；イソブチルアミド；およびバルプロエート。

20

【0060】

E. ベンズアミド誘導体、例えば：MS-275 [N-(2-アミノフェニル)-4-[N-(ピリジン-3-イル-メトキシカルボニル)アミノメチル]ベンズアミド] (Saito et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 4592-7 (1999))；およびMS-275の3'-アミノ誘導体 (Saito et al.、前記)；ならびにCI-994。

ヒストンデアセチラーゼ阻害剤としては例えは次のように行なう。

【0061】

使用されるヒストンデアセチラーゼ阻害剤の濃度は具体的な阻害剤によるが、好ましくは約0.001nM～約10mM、より好ましくは約0.01nM～約1000nMである。ヒストンデアセチラーゼ阻害剤の有効量または用量とは、細胞、特に未分化幹細胞の生存率は著しく減少しないようなヒストンデアセチラーゼ阻害剤の量と定義される。細胞は1～5日間、又は1～3日間暴露される。暴露期間が1日未満ということもあり得る。一具体例において、細胞は約1～5日間培養され、その後に有効量のヒストンデアセチラーゼ阻害剤に暴露する。しかしながら、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤を培養開始時に添加しても良い。このような期間枠において、3遺伝子 (Oct3/4、Sox2、Klf4) をコードする核酸配列を含むベクターのような遺伝子運搬ベクターが周知手段で培養細胞に導入される。

30

【0062】

8. ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞から誘導されたヒト多能性幹細胞の培養方法

本発明のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞から誘導されたヒト多能性幹細胞を培養するのに有用な培地の例（但し、これらに限定されない）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纖維芽細胞（以下MEF）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）などのヒトES細胞の培養に適した培地が挙げられる。

40

【0063】

該培地に添加する「成長因子、サイトカイン、ホルモン」としては、FGF-2、TGF β -1、アクチビンA (Activin A)、ノギン (Nanoggin)、BDNF、NGF、NT-1、NT-2、NT-3等のヒトES細胞の増殖・維持に関する成分が挙げられる。またRho associated kinase (Rho関連コイルドコイル含有タンパク質キナーゼ) の阻害剤であるY-27632(Calbiochem; water soluble)あるいはFasudil(HA1077: Calbiochem)を培地中に添加することも、本発明のヒ

50

ト多能性幹細胞の培養に有効である。

【0064】

本発明のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞から誘導されたヒト多能性幹細胞を培養増殖するには、MEFで覆われたプラスチックシャーレ上、もしくはマトリゲルでコートされたプラスチックシャーレ上にて該添加物を含む該培地中で、5～7日毎に継代して1：3～1：6にする、または 10^3 cell/cm²から 3×10^4 cell/cm²で播種することが望ましい。

【0065】

9. ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞から誘導されたヒト多能性幹細胞の長期保存方法

本発明のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞から誘導されたヒト多能性幹細胞を長期間保存するには、以下の方法があげられる。

靈長類ES細胞用凍結保存液（リプロセル社製）に懸濁後、液体窒素にて急速に凍結したのちに、液体窒素保存容器で長期保存する。

【0066】

10. ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞から誘導されたヒト多能性幹細胞の用いた疾患治療の方法

本発明のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞から誘導されたヒト多能性幹細胞を疾患治療に応用するには、以下の方法があげられる。

本発明のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞から誘導されたヒト多能性幹細胞を様々な組織の変性や機能不全を原因とする疾患に応用するためには、将来治療を希望する人から組織を採集し、ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞あるいは該未分化な幹細胞から誘導した本発明のヒト多能性幹細胞を安定に貯蔵する細胞バンクのシステムを構築することが好ましい。

【0067】

ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞は若い個体に高い頻度で検出されることから、細胞バンク用の未分化な幹細胞は臍帯血、臍帯、胎盤、新生児から取得した皮膚などが有効である。また成人でも、ドナーの身体状況に応じて骨髄、脂肪組織、末梢血、皮膚などから細胞バンク用の未分化な幹細胞を採取することが可能である。本発明の各ドナー由来の未分化な幹細胞はそのまま凍結保存するか、あるいは上述した本発明の方法に従い、ヒト多能性幹細胞に変化した後に凍結保存することができる。

【0068】

このようにして保存された本発明の未分化な幹細胞あるいは本発明のヒト多能性幹細胞はドナー自身の治療あるいは、免疫組織適合性の合致したレシピエントための治療にも応用可能である。治療にあたっては、対象となる疾患治療に必要な細胞補充の量に応じて本発明のヒト多能性幹細胞を上述した8の方法に従い継代培養することが必要である継代培養により必要な数の本発明のヒト多能性幹細胞が得られた、以下の示す方法により各疾患の治療に利用することができる。

【0069】

本発明のヒト多能性幹細胞を用いた中枢神経系の疾患としてはパーキンソン病、アルツハイマー病、多発性硬化症、脳梗塞、脊髄損傷などが挙げられる。パーキンソン病の治療のためには、ヒト多能性幹細胞をドーパミン作動性ニューロンへと分化しパーキンソン病患者の線条体に移植する治療法が可能である。ドーパミン作動性ニューロンへの分化はマウスのストローマ細胞株であるPA6細胞と本発明のヒト多能性幹細胞を無血清条件で共培養することで進めることができる。アルツハイマー病、脳梗塞、脊髄損傷の治療においては本発明のヒト多能性幹細胞を神経幹細胞に分化誘導した後に、傷害部位に移植する治療法が有効である。

【0070】

本発明のヒト多能性幹細胞から神経幹細胞に分化誘導するに大きく3つの方法が挙げられる。第1の方法は、本発明のヒト多能性幹細胞を浮遊培養を行うことで胚様体を形成し

10

20

30

40

50

、得られた胚様体を神経幹細胞の培養に用いられるFGF-2を含む無血清培地で培養を行うことで取得する方法である。第2の方法は、本発明のヒト多能性幹細胞をマウスのストローマ細胞株であるPA6細胞と共に培養を行った後に、神経幹細胞の培養に用いられるFGF-2を含む無血清培地で培養を行うことで取得する方法である。

【0071】

第3の方法は本発明のヒト多能性幹細胞をFGF-2を含む無血清培地に移すことで直接分化培養する方法である。多発性硬化症の治療には本発明のヒト多能性幹細胞から誘導した神経幹細胞をさらにオリゴデンドロサイトあるいはオリゴデンドロサイトの前駆細胞に分化誘導した後に傷害部位に移植することで治療が可能である。本発明のヒト多能性幹細胞から誘導した神経幹細胞からオリゴデンドロサイトあるいはオリゴデンドロサイトの前駆細胞に誘導する方法としては、該神経幹細胞を可溶性インターロイキン-6受容体とインターロイキン-6の融合蛋白存在下で培養する方法が挙げられる。
10

【0072】

本発明のヒト多能性幹細胞は肝炎、肝硬変、肝不全などの肝臓疾患の治療に用いることができる。これら疾患を治療するには、本発明のヒト多能性幹細胞を肝細胞あるいは肝幹細胞に分化し移植することが好ましい。本発明のヒト多能性幹細胞をアクチビンA存在下で5日間培養し、その後肝細胞増殖因子(HGF)で1週間程度培養することで肝細胞あるいは肝幹細胞を取得することができる。

【0073】

本発明のヒト多能性幹細胞はI型糖尿病などのすい臓疾患の治療に用いることができる。I型糖尿病の場合には、本発明のヒト多能性幹細胞をすい臓ベータ細胞に分化させすい臓に移植する治療法が好ましい。本発明のヒト多能性幹細胞は以下の6段階の培養によりすい臓ベータ細胞に分化させることができる；(1)無血清、アクチビンAとWnt蛋白存在下で1から2日培養、(2)0.2%FBS、アクチビンA存在下で1から2日間培養、(3)2%FBS, FGF-10, KAAD-cyclopamine(keto-N-aminoethylaminocaproyldihydrocinnamoylcyclopamine)存在下で2から4日間培養、(4)1%B27(invitrogen社製), FGF-10, KAA-D-cyclopamine, レチノイン酸存在下で2から4日間培養、(5)1%B27, ガンマ・セクレターゼ阻害剤、extendin-4存在下で2から3日培養、(6)1%B27, extendin-4, IGF-1, HGF存在下で3日間培養。
20

【0074】

本発明のヒト多能性幹細胞は虚血性心疾患に伴う心不全の治療に用いることができる。心不全の治療には、本発明のヒト多能性幹細胞を心筋細胞に分化させた後に傷害部位に移植することが好ましい。本発明のヒト多能性幹細胞は胚様体を形成させる3日前よりノギンを添加し培地中に添加することで、胚様体形成後2週間程度で心筋細胞を得ることができる。
30

【0075】

発明の効果

本発明はヒト出生後の組織由来の細胞から誘導される長期間の自己複製能を有しかつ外胚葉、中胚葉ならびに内胚葉に分化する能力を有するヒト多能性幹細胞をはじめて提供するものであり、前記ヒト多能性幹細胞は更に始原生殖細胞に分化する能力を有する場合もある。
40

【0076】

患者より採取した未分化な幹細胞を、本発明の誘導方法を用いてヒト多能性細胞に誘導した後に疾患に応じて必要な細胞へと分化誘導させ、患者に移植することで疾患などにより失われた組織中の細胞を補充することが可能である。また本発明のヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞は、ヒト多能性幹細胞への誘導を指示するTert、Nanog、Sox2、Oct3/4、アルカリホスファターゼなどのマーカーを用いることで、該未分化な幹細胞からヒト多能性幹細胞への誘導を促進する薬剤を探査することが可能である。該薬剤は遺伝子導入の代わりに利用することが可能であり、ヒト多能性幹細胞の誘導効率を高めることが可能である。
50

【発明を実施するための最良の形態】

【0077】

ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞とはヒト出生後の皮膚、骨髓、脂肪組織、骨格筋組織、末梢血ならびに出産時に付随する胎盤、臍帯、臍帯血に存在するTert、Nanog、Oct3/4、Sox2遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とする未分化な幹細胞であり、Oct3/4、Sox2及びKlf4の3つの遺伝子の誘導発現とc-Mycの誘導発現あるいはヒストンデアセチラーゼ阻害剤の添加を組み合わせることで長期自己複製能と外胚葉、中胚葉ならびに内胚葉へと分化する性質を有するヒト多能性幹細胞を誘導することができる。前記ヒト多能性幹細胞は更に始原生殖細胞に分化する能力を有する場合もある。

【0078】

ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞はプラスチックシャーレを用いて培養することができる。2%の血清を用いる場合には、PDGFとEGFあるいはFGF-2を培養液に添加し、更にそこにIGFまたはインシュリンを添加してもよい。この場合、血清入り培地で長期培養を行うとヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞の性質が変化することから、血清濃度は2%以下、継代培養数は2回程度に制限することが重要である。2%の低濃度血清を用いる場合には、例えばMAPC培地、FBM培地を培養液として用いる。培養条件としては通常の培養細胞と同じく温度37°C、CO₂濃度は5%のインキュベーターで培養を行う。低酸素、例えば3%酸素濃度にすることも可能である。培養皿はフィブロネクチンなどでコートする事が望ましい。

【0079】

ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞から誘導した本発明のヒト多能性幹細胞はプラスチックシャーレを用いて培養することができる。初代培養ではOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4遺伝子を導入後の細胞を10ng/ml bFGFおよび10ng/ml Activin Aを添加したMEF馴化ヒトES培地で培養し、培地は1~2日毎に交換する。誘導された多能幹細胞をディスパーーゼやコラゲナーゼやトリプシンなどで剥離し、継代する。初代培養以降は、支持層としてMEFを用いる場合、誘導されたヒト多能性幹細胞をMEFで覆われたプラスチックシャーレ上に播種し、10ng/ml bFGFを添加したヒトES培地で培養する。また、支持細胞を用いない場合は、マトリゲルでコートされたプラスチックシャーレ上に誘導されたヒト多能性幹細胞を播種し、10ng/ml bFGFおよび10ng/ml Activin Aを添加したMEF馴化ヒトES培地で培養する。いずれの培養法でも培地は1~2日毎に交換する。

【0080】

ヒト出生後の組織に存在するTert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とする未分化な幹細胞から本発明のヒト多能性幹細胞を誘導するには、以下の方法を用いる。まず、マウス由来のカチオニック・アミノ酸トランスポーター(mCAT)のコード領域の配列を有するcDNAを搭載したアデノウィルスベクターを作製し(実施例2、表1参照)、HEK293細胞をベースとしたパッケージ細胞に導入してアデノウィルスベクターのウィルス液を調製する。このウィルス液をMultiplicity of Infection(m.o.i:細胞数に対するウィルス粒子の比率)が1から20でヒト出生後の組織に存在するTert、Nanog、Oct3/4、Sox2遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とする未分化な幹細胞に添加し、mCATを発現した未分化な幹細胞を調製する。

【0081】

次に、ヒトOct3/4をコードするcDNAを搭載したレトロウイルスベクター、ヒトSox2をコードするcDNAを搭載したレトロウイルスベクター、ヒトKlf4をコードするcDNAを搭載したレトロウイルスベクター、ならびにヒトc-MycをコードするcDNAを搭載したレトロウイルスベクターを作成(表1)し、それぞれを、HEK293細胞ベースに構築されたエコトロピックの組み換えウイルスを産生できるパッケージ細胞に導入してレトロウイルスベクターのウィルス液を調製する。

【0082】

アデノウィルスベクターを用いてmCATを発現させたTert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とする未分化な幹細胞にOct3/4、So

10

20

30

40

50

x2、Klf4及びc-Mycの4つの遺伝子（コード領域）をそれぞれ搭載した4種類のレトロウイルスベクターをm.o.i.が1から200/ウイルスベクターで添加し、本発明のヒト多能性幹細胞の誘導が確立する。

【0083】

アデノウイルスベクターを用いてmCATを発現させたTert、Nanog、Oct3/4及びSox2の各遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とする未分化な幹細胞にOct3/4、Sox2、Klf4の遺伝子（コード領域）をそれぞれ搭載した3種類のウイルスベクターをm.o.i.が1から200/ウイルスベクターで添加するとともに、MS-275を最終濃度が10nM～100μM、好ましくは、100nM～1μMとなるように添加し、本発明のヒト多能性幹細胞の誘導が確立する。

10

【0084】

本発明のヒト多能性幹細胞は、靈長類ES細胞用凍結保存液（リプロセル社製）に懸濁後、液体窒素で急速に凍結し、液体窒素保存容器中で保存することが望ましい。

凍結保存した本発明の多能性幹細胞は、37℃に温めた培地を加えて懸濁することで急速に解凍し、遠心により懸濁液から培地を除き、新しい培地に再懸濁後に培養を開始することが望ましい。

【0085】

本発明を応用して、ヒト出生後の組織に存在するTert、Nanog、Oct3/4、Sox2遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とする未分化な幹細胞からヒト多能性幹細胞への誘導を制御するsiRNAならびに化合物をハイスループットスクリーニング系を用いて探索する方法を以下に説明する。

20

【0086】

siRNAとは、ある遺伝子に対し、その配列の一部約19塩基対のRNA2重鎖で、かつ、RNA干渉作用により、その遺伝子より蛋白への翻訳を阻害する効果のあるものを言う。ある遺伝子に対するsiRNAの細胞への導入の結果、特異的にそのたんぱく質が担う機能のみを欠失させ得ることが可能となる。このことから、全ゲノムsiRNAライブラリを特定の細胞に使用することにより、その細胞における全遺伝子中の一つだけの機能を失わせた状態を、全ての遺伝子に対して個々に観察することができる。

【0087】

よって、上記siRNAライブラリを使用することにより、ヒト出生後の組織に存在するTert、Nanog、Oct3/4、Sox2遺伝子が後成的な不活性化を受けていないことを特徴とする未分化な幹細胞からヒト多能性幹細胞への誘導を抑制している遺伝子を同定可能である。この方法を用いて同遺伝子阻害剤を開発することにより、ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞からヒト多能性幹細胞への誘導が可能である。

30

【0088】

siRNAライブラリとしては、ヒト全遺伝子約25,000に対し、それぞれの遺伝子に各4ずつのsiRNAを合成、等量ずつ混合し、384穴培養プレートに分注したもの使用し、スクリーニングを行う（キアゲン社製）。詳細は以下のとおりである。各遺伝子に対して合成された4つのsiRNAを等量ずつ混合し、384穴培養プレートの各ウエルに、2.5 pmolずつ分注する。全遺伝子約25,000を網羅するためには、73枚の384穴プレートが必要である。各プレートの所定のウエルには、細胞へのsiRNAの導入効率の測定ならびに各プレート間でのその効率の補正のため、陽性、および陰性の参照siRNAを2.5 pmolずつ分注する。siRNAの終濃度は50 nMとなる。

40

【0089】

siRNAの準備が整った後、1次スクリーニングを行う。標的となる細胞中でTert、Nanog、Oct3/4、Sox2などの本発明の多能性幹細胞分化の指標となる遺伝子の活性化を検出する方法においては、目的遺伝子のプロモーターレポーターアッセイ（レポーター遺伝子としては、EGFP（Enhanced Green fluorescence Protein：強化緑色蛍光タンパク質）、ルシフェラーゼなど）や該遺伝子産物に対する細胞免疫染色法などがある。

【0090】

50

siRNAの細胞へのトランスフェクションは、リポフェクション法を用いる。siRNAが分注された全73枚のプレート上の各ウエルに、 $10 \mu\text{l}$ のOpti-MEM (Invitrogen社製) 中に $0.1 \mu\text{L}$ のLipofectAMINE RNAiMax (Invitrogen社製) を加えたものを分注する。10分後、 $40 \mu\text{l}$ までの培地中、20~25個 / μl に調製した標的細胞を、同様に73枚のプレート上の全ウエルに分注し、siRNAを細胞に導入する。細胞の数、培地の量は、スクリーニングに使用する細胞によって、適正な数を決定して用いる。

【0091】

レポーターассеイを行う際には、成体幹細胞のようにリポフェクション法やリン酸カルシウム法では遺伝子導入の難しい細胞に対しては、レトロウィルスベクター（レンチウイルスを含む）で恒常にレポーターシステムを組み込んだ細胞、または、目的のレポーター系を搭載したアデノウィルスベクターに感染後1~7日の細胞を用いる。HEK293、HeLa等の培養株細胞に本発明のレポーター系を応用する際は、それぞれの細胞に適した遺伝子導入方法により、あらかじめ1日前もしくはsiRNAと同時にレポーター系を導入して用いる。

10

【0092】

トランスフェクション試薬、細胞を分注した全73枚のプレートは、 37°C 、 CO_2 濃度5%に保持された培養装置中で、2~7日間培養する。培養時間は、細胞種、検出したい遺伝子の種類などによって適宜、対応する。

20

【0093】

ヒト出生後の組織に存在する未分化な幹細胞からヒト多能性幹細胞への誘導を促進するsiRNAを選別する方法として、アルカリフォスファターゼの染色を用いることができる。アルカリフォスファターゼの染色方法としては下記の方法が挙げられる。各ウェルから培養液を除いたのち、10%ホルムアルデヒド溶液で室温にて2~5分細胞を固定し、リン酸緩衝溶液等で洗浄後、アルカリフォスファターゼの発色其質であるニトロブルーテトラゾリウムクロライド (nitro-blue tetrazolium chloride) / 5-ブロモ-4-クロロ-3'-インドリルフォスファターゼパラ-トルイジン塩 (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphatase p-Toluidine Salt) 溶液(以下NBT/BCIP溶液と言う)を加え、室温にて20~30分反応させる。

20

化合物ライプラリを用いる場合も、上記siRNAを使用したスクリーニングと同様に行う。siRNAの代わりに、各ウエルに化合物をスポットし、細胞を分注し培養、同様に測定を行う。トランスフェクションの作業は不要となる。

30

【実施例】

【0094】

実施例1. レトロウィルスベクターの調製

表1のように作製したOct3/4-pMx、Sox2-pMx、Klf4-pMx、c-Myc-pMxの4遺伝子のレトロウィルスベクタープラスミドをFugene HD (Roche社製) を用いてパッケージング細胞であるPlat-E細胞 [Experimental Hematology、2003、31 (11) : 1007-14] に導入した。レトロウィルスベクター導入後24時間~48時間の間に培地を遺伝子導入する細胞に適した培地に置換した。4時間以上、レトロウィルスベクターを導入したPlat-E細胞を培養後、上清を回収し、 $45 \mu\text{m}$ 径フィルター (Millipore社製) に通した。以上の手順により4遺伝子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc) のレトロウィルスベクター液が調製された。

40

【0095】

また、Oct3/4-pMx、Sox2-pMx、Klf4-pMx、c-Myc-pMxの3遺伝子のレトロウィルスベクタープラスミドをFugene HD (Roche社製) を用いてパッケージング細胞であるPlat-E細胞に導入した。レトロウィルスベクター導入後24時間~48時間の間に培地を遺伝子導入する細胞に適した培地に置換し、4時間以上レトロウィルスベクター導入Plat-E細胞を培養後に上清を回収し、 $45 \mu\text{m}$ 径フィルター (Millipore社製) に通した。以上の行程により3遺伝子 (Oct3/4、Sox2、Klf4) のレトロウィルスベクター液が調製された。

【0096】

実施例2. アデノウィルスベクターの調製

50

本発明では、多能性幹細胞の誘導のためにヒト細胞へのガン遺伝子(c-Myc)を含む遺伝子をレトロウィルスベクターによって導入することが必須であった。この場合、ヒト細胞に感染するアンフォトロピック(amphotropic)レトロウィルスベクターを用いて遺伝子導入すると、目的以外のヒト細胞への感染が懸念される。そこで、実験の安全性を担保するために、げっ歯類の細胞に感染しヒト細胞には感染しないエコトロピック(ecotropic)レトロウィルスベクターとその受容体であるマウス由来カチオニック・アミノ酸・トランスポーター1(mCAT1)遺伝子のアデノウイルスベクターを組み合わせることによって、ヒト細胞への遺伝子導入を実施した。

【0097】

まず、マウス由来カチオニック・アミノ酸・トランスポーター(mCAT1)遺伝子のコード領域の配列を有するcDNAを搭載したアデノウイルスベクターを作成した。具体的には、Adeno-X Expression System 1キット(タカラバイオ・クロントック社製)を使用した。Adeno-X Expression Systemでは、タカラバイオ社よりキットに添付された実験方法に基づき、まずpShuttleと呼ばれるベクターのマルチクローニングサイトに、mCAT1遺伝子をサブクローニングした。

【0098】

次に、pShuttleの発現カセットの両端にある切断サイト、PI-Sce IサイトとI-Ceu Iサイトで発現カセットを切り出し、上記キット中のAdeno-X Viral DNA中のPI-Sce IサイトとI-Ceu Iサイトの間に目的遺伝子を含むDNA断片を挿入したのち、制限酵素Swa Iで処理して、組み込みが不成立だったアデノウイルスDNAを除去した。このプラスミドを大腸菌DH5株にて形質転換後、アデノウイルスDNAに目的の遺伝子導入が正しく行われたかについて、制限酵素処理やPCRなどにより確認した。プラスミドを大量調製し、Pac I制限酵素で切斷した。このようにして得られた組み換えアデノウイルスDNAを用いて6穴に播種したHEK293細胞(MicroBix社)にLipofectamin2000(インビトロジエン社製)を用いて細胞への遺伝子導入を行い、2週間後、細胞が細胞変性効果(Cytopathic effect、CPE)を示した時点で培地ごと回収した。

【0099】

その後、細胞懸濁液を3度、凍結融解して、細胞を破壊し、細胞中に存在するウイルス粒子を液中に放出させた。このようにして調製したウイルス懸濁液を、100mmプラスチックシャーレ一枚分のHEK293細胞(5×10^6 個)に添加して細胞を感染させ、ウイルスを増幅し、さらに150mmプレート4枚のHEK293細胞を用いてウイルスを大量調製後、アデノウイルス精製キット(クロントック社製)を用いてウイルスを精製し、摂氏零下八十度で凍結保存した。

【0100】

mCAT1アデノウイルスベクターの力価(plaques forming unit, PFU)については、Adeno-X Rapid Titer kitを用いて測定した。24穴プレートに、一穴当たり、HEK293low細胞を 5×10^4 個/500μlの濃度で播種した。段階希釈(10^{-2} から 10^{-7})したウイルスベクター50μlを500μlの培地に混合後、細胞に感染させた。CO₂濃度5%、37

度48時間培養後、培地を吸引し、5分間乾燥させ、冷100%メタノール500μlを用いて摂氏零下二十度に10分間静置して固定した。メタノールを吸引除去後、500μlの1%ウシアルブミン含有リン酸緩衝液でウエルを3回洗浄した。マウス抗ヘキソン抗体を1%ウシアルブミン含有リン酸緩衝液で1000倍希釈し、250μlをウェルに添加した。

【0101】

37度1時間静置後、抗体液を除き、500μlの1%ウシアルブミン含有リン酸緩衝液でウエルを3回洗浄した。ホースラディッシュペルオキシダーゼ標識ラット抗マウスイムノグロブリン抗体を1%ウシアルブミン含有リン酸緩衝液で500倍希釈し、250μlをウエルに添加した。摂氏三十七度で1時間静置後、抗体液を除き、500μlの1%ウシアルブミン含有リン酸緩衝液でウエルを3回洗浄した。250μlのDAB(diaminobenzidine)液(10倍DAB濃縮液を安定ペルオキシダーゼ緩衝液で希釈)をウエルに添加し、室温で10分間静置した。DABを吸引除去後、500μlのリン酸緩衝液を添加した。20倍の対物レンズを用いて6

10

20

30

40

50

視野中の茶褐色の陽性細胞を数えた。

【0102】

標準的20倍対物レンズの半径 : 0.5 mm

1視野中の面積 : $7.853 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$

ウェルの面積 : 2 cm²

ウェル中の視野 : $2 \text{ cm}^2 / 7.853 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 = 254.7$ 視野

$(32/6) \times 254.7 / (0.55 \times 10^{-5}) = 2.5 \times 10^8 \text{ ifu (infection unit) / ml}$

【0103】

実施例3. アルカリフィオスファターゼ染色

多能性幹細胞の特徴であるアルカリフィオスファターゼ活性を確認するための染色は以下のように実施した。培地を除去後、10%ホルマリン中性緩衝溶液をウェルに加え、室温で5分間固定した。リン酸緩衝溶液等で洗浄後、アルカリフィオスファターゼの発色其質である1step NBT/BCIP溶液(Pierce社製)を加え、室温にて20~30分反応させた。アルカリフィオスファターゼ活性を有する細胞は青紫に染色された。

10

【0104】

実施例4. 定量PCRによるコロニーの遺伝子発現の測定

アルカリフィオスファターゼ陽性コロニーを含む、各コロニーの標的遺伝子の発現は以下のように定量PCR法を用いて測定した。多能性幹細胞の誘導により出現したコロニーを採取し、Recoverall total nucleic acid isolation kit for FFPE(Ambion社製)を用いてRNAを抽出した。抽出したRNAからcDNAを合成した後、Taqman Preamp mastermix(Applied biosystems社製)を用いて標的となる遺伝子を増幅した。

20

【0105】

定量PCRのプライマーにはTaqman gene expression assay(Applied biosystems社製)を用いた。以下に各プライマーの標的遺伝子名と製品番号を記す。ヒトHprt: Hs99999909_m1、ヒトNanog:Hs02387400_g1、ヒトTert: Hs00162669_m1、マウスHprt: Mm01545399_m1、マウスNanog: Ma02019550_s1。

定量PCRでの陽性コントロールとしては、以下のように樹立した間葉系幹細胞から抽出したcDNAを用いた。

【0106】

ヒト骨髓由来単核細胞(hBMMNCs(Lonza社製) Lot 060175A:女性、21歳、黒人)1バイアル(2.5×10^7 個の細胞)を37℃のウォーターバス中で解凍し、MSCGM培地(間葉系幹細胞増殖培地)(Lonza社製)10mlに懸濁した。凍結溶液中のDMSOを除去するため、4℃、300gで7分間遠心し、上清を除去した。得られた細胞塊を再懸濁し、MSCGM培地10mlを加えた100mmプレートに 10^5 cell/cm^2 の濃度で播種し、37℃にて培養した。7日後に培地を交換した。この際、古い培地中の浮遊細胞を4℃、300gで5分間遠心分離することで回収し、新しい培地と共に細胞に戻した。接着細胞が集密になった13日後に上清を除き、リン酸緩衝液で非接着細胞を洗い流し、0.05%トリプシン-EDTA溶液で接着細胞を剥離して回収し、 3000 cell/cm^2 の濃度で播種した。第3継代培養の細胞からRNAを回収し、cDNAを合成した。

30

【0107】

実施例5. 出生後のヒト成人骨髄組織に存在する未分化な幹細胞からのヒト多能性幹細胞の誘導

出生後のヒト成人骨髄組織に存在する未分化な幹細胞を含むヒト成体骨髄由来細胞(商品名:ヒト骨髓由来単核細胞)から低血清(2%)及び高血清(10%)培養条件下で細胞を樹立し、多能性幹細胞の誘導実験に用いた。すなわち、凍結したヒト骨髓由来単核細胞(hBMMNCs(Lonza社製) Lot 060809B:女性、20歳、白人/及びhBMMNCs(Lonza社製) Lot 060470B:女性、20歳、黒人)各1本(2.5×10^7 個の細胞)を37℃のウォーターバス中で解凍し、低血清培養に用いるMAPC培地10mlに懸濁した。凍結溶液中のDMSOを除去するため、4℃、300gで7分間遠心し、上清を除去した。

40

【0108】

50

得られた細胞塊を再懸濁し、10ng/ml ファイブロネクチンでコートした100 mm プレートに 10^5 cell/cm²の濃度で播種した。成長因子（10 ng/ml PDGF-BB (Peprotech社製)、10 ng/ml EGF (Peprotech社製)、10 ng/ml IGF-1 (Peprotech社製)）を添加した。3日後、成長因子のみを添加した。7日後、接着細胞はそのままで浮遊細胞と培地を回収して4 、300 gで5分間遠心分離し、上清を除き、新しい培地に再懸濁した。細胞懸濁液をもとの10 cm ディッシュに戻し、成長因子を添加した。接着細胞が集密になった10日後に上清を除き、リン酸緩衝液で非接着細胞を洗い流し、0.05%トリプシン - EDTA溶液で接着細胞を剥離して回収し、セルバンカー（十慈フィールド社製）を用いて初代培養細胞を凍結保存した。

【0109】

10

また、同じロットのヒト骨髓由来単核細胞を用いて、10% FBSを含むMSCGM培地（Lonza社製）を用いて高血清条件下で細胞を樹立した。MSCGM培地10 mlを加えた100 mm プレートに 10^5 cell/cm²の濃度でヒト骨髓由来単核細胞を播種し、37 ℃にて培養した。7日後、接着細胞はそのまま浮遊細胞と培地を回収して4 、300 gで5分間遠心分離し、上清を除き、新しい培地に再懸濁した。細胞懸濁液をもとの10 cm ディッシュに戻し、培養を続けた。接着細胞が集密になった13日後に上清を除き、リン酸緩衝液で非接着細胞を洗い流し、0.05%トリプシン - EDTA溶液で接着細胞を剥離して回収し、セルバンカー（十慈フィールド社製）を用いて初代培養細胞を凍結保存した。

【0110】

20

凍結保存していた高血清条件・低血清条件下で樹立されたヒト骨髓由来初代培養細胞各1本を37 ℃の恒温槽中で解凍し、それぞれ20 μg/cm²の濃度のマトリゲル（Becton Dickinson社製）で底面をコーティングされた6ウェルプラスチックシャーレ上に樹立に用いた培地を2 ml加えて 10^4 cell/cm²の濃度で細胞を播種し、14時間培養した（第2継代培養細胞）。14時間後に培地を除き、1ウェルあたり500 μlのハンクス平衡液にm.o.i. 10に相当する量の実施例2で調製したmCAT1アデノウィルスベクターを添加し、室温にて30分間感染させた。

【0111】

30

各ウェルに樹立に用いた培地をそれぞれ2 mlずつ加え、37 ℃で培養した。mCAT-1アデノウィルスベクター導入後48時間、各ウェルの培地を実施例1で調製した4遺伝子（Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc）のレトロウイルスベクター液（終濃度4 μg/mlのポリブレンを添加）2 mlに置換し、37 ℃で14時間培養した。ウィルス上清を除去し、MEF馴化ES培地に置換した。以後2日毎にMEF馴化ES培地の交換を続けた。該4遺伝子導入から14日後に観察したところ、Lot 060809Bの低血清条件下群において1つ、誘導された多能性幹細胞の特徴を示す典型的なコロニーが認められた。該コロニーは周囲の細胞よりも顕著に小型の細胞から構成されていた。この多能性幹細胞様のコロニー以外にも複数のコロニーが低血清群・高血清群とも、認められるが、アルカリフォスファターゼ染色しても、染色されなかった。

【0112】

40

該多能性幹細胞様のコロニーを単離するために、ウェルをハンクス緩衝液で洗浄した後、底面にシリコングリースを塗布したクローニングリング（イワキ社製）によってコロニーを囲み、靈長類ES細胞剥離液（リプロセル社製）をリング中に100 μl加え、37 ℃にて10 - 20分培養した。剥離したコロニーを含むリング中の細胞懸濁液を2 mlのMEF馴化ES培地に加え、MEFでコートした24ウェルプレートの1ウェルに播種した。37 ℃にて8 ~ 14時間培養後に培地を交換し、以後2日毎の培地交換を継続し、8日後に第2継代培養を行った。

【0113】

50

培地を除き、ハンクス緩衝液で洗浄し、靈長類ES細胞剥離液を加え、37 ℃にて10分培養し、2 mlの培地を加え反応を停止させた。細胞懸濁液を遠心チューブに移し、4 ℃にて200 gで5分間遠心し、上清を除いた。細胞をMEF馴化ES培地で再懸濁し、MEFでコートした24ウェルプレートの4ウェルに播種した。2日毎の培地交換を継続し、第2継代培養から7日

後にアルカリフィオスファターゼ染色を行ったところ、クローニングしたコロニー由来の細胞は青紫色に染色された。

【0114】

さらに、定量PCRにより、アルカリフィオスファターゼ活性陽性の該多能性幹細胞のコロニーがNanog、Tertを発現していることが確認された。実施例4で樹立された間葉系幹細胞と比較した場合、Nanogの発現量は約30倍高かった。Tertの発現は、該多能性幹細胞でのみ認められ、間葉系幹細胞では認められなかった。また、該4遺伝子を導入したにもかかわらずコロニーを形成していない細胞ではNanog、Tertとも発現が認められなかった（図1）。

以上より、ヒト成人骨髄由来細胞を用いた場合、低血清培養群からは該多能性幹細胞が得られ、高血清群（Lot 060809B及びLot 060470Bの高血清群）からは全く得られなかつた（表2）。また、該未分化細胞の維持には低血清条件下での培養が適していた。

【0115】

実施例6. ヒト新生児の皮膚に存在する未分化な幹細胞からのヒト多能性幹細胞の誘導

ヒト出生直後の組織であるヒト新生児組織由来の細胞（商品名：新生児正常ヒト皮膚纖維芽細胞、初代培養）を用いて、ヒト新生児の皮膚に存在する未分化な幹細胞からのヒト多能性幹細胞の誘導を試みた。

【0116】

凍結した新生児正常ヒト皮膚纖維芽細胞（初代培養、Lonza社製、lot 5F0438）1本を37の恒温槽中で解凍し、MCDB202改变培地、2%ウシ胎児血清、5 μg/mlインシュリン、50 μg/mlゲンタマイシン、50 ng/mlアンホテリシン-B（FBM培地、Lonza社製）を含む培地に懸濁し、12 mlの細胞懸濁液を得た。20 μg/cm²の濃度のマトリゲル（Becton Dickinson社製）で底面をコーティングされた6ウェルプラスチックシャーレ上に該細胞懸濁液を2 mlずつ加えて細胞を播種した（第2継代培養細胞）。

【0117】

14時間後に培地を除き、1ウェルあたり500 μlのハンクス平衡液にm.o.i. 5に相当する量の実施例2で調製したmCAT1アデノウィルスベクターを添加し、室温にて30分間感染させた。各ウェルにFBM培地を2 mlずつ加え、37℃で培養した。mCAT-1アデノウィルスベクター導入後48時間、各ウェルの培地を実施例1で調製した4遺伝子（Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc）のレトロウイルスベクター液（終濃度4 μg/mlのポリブレンを添加）2 mlに置換し、37℃で4時間培養した。

【0118】

ウィルス上清を除去し、MEF馴化ES培地に置換した。以後2日毎にMEF馴化ES培地の交換を続け、該4遺伝子導入から14日後に6ウェルプレートの1ウェルについてアルカリフィオスファターゼ染色を行った。その結果、6個の該多能性幹細胞様のアルカリフィオスファターゼ陽性コロニーが得られた。アルカリフィオスファターゼ陽性コロニーは、新生児正常ヒト皮膚纖維芽細胞よりも顕著に小型の細胞から構成されていた。

【0119】

次に、Nanog、Tert遺伝子の発現量を定量PCRにより確認した結果、アルカリフィオスファターゼ活性陽性の該多能性幹細胞のコロニーがNanog及びTertを発現していることが確認された。実施例5の高血清（10%）培養条件下で樹立された間葉系幹細胞と比較した場合、該4遺伝子導入前の新生児正常ヒト皮膚纖維芽細胞ではNanogを発現していないが、該4遺伝子導入後の場合、コロニーを形成していない細胞で約9倍、アルカリフィオスファターゼ活性陽性のコロニーでは18倍のNanogの発現が認められた（図2）。一方、Tertの発現が認められたのはアルカリフィオスファターゼ活性陽性のコロニーのみであった。以上から該多能性幹細胞はアルカリフィオスファターゼ活性陽性かつNanog陽性かつTert陽性という特徴により規定される。また、新生児正常ヒト皮膚纖維芽細胞は該多能性幹細胞の誘導効率が相対的に高く、該4遺伝子導入によりNanogを発現しうる細胞であることが示された。

【0120】

10

20

30

40

50

該多能性幹細胞のコロニーの単離は以下のように実施した。遺伝子導入から17日目に残ったウェルから典型的な形状をしたコロニーを6つ選んだ。ウェルをハンクス緩衝液で洗浄した後、底面にシリコングリースを塗布したクローニングリング（イワキ社製）によつてコロニーを囲み、靈長類ES細胞剥離液（リプロセル社製）をリングに100 μl加え、37にて20分培養した。剥離したコロニーを含むリング中の細胞懸濁液を2 mlのMEF馴化ES培地に加え、MEFでコートした24ウェルプレートの1ウェルに播種した。37にて14時間培養後に培地を交換し、以後2日毎の培地交換を継続した。8日後に第2継代培養を行つた。培地を除き、ハンクス緩衝液で洗浄し、靈長類ES細胞剥離液を加え、37にて10分培養し、2 mlの培地を加え反応を停止させた。

【0121】

10

細胞懸濁液を遠心チューブに移し、4にて200 gで5分間遠心し、上清を除いた。細胞をMEF馴化ES培地で再懸濁し、MEFでコートした24ウェルプレートの4ウェルに播種した。後述する継代方法で、第2継代培養から7日後に20 μg/cm²の濃度のマトリゲルで底面をコーティングされた60 mm プラスチックシャーレに播種した。さらに8日後（該4遺伝子導入から37日後）に第3継代培養を行い、マトリゲルコートされた60 mm プラスチックシャーレ二枚に播種し、一部をアルカリフォスファターゼ染色およびRNA抽出に用いた。その結果クローニングしたコロニー由来の細胞はアルカリフォスファターゼ活性陽性でNanog及びTertを高発現していることが確認され、該多能性幹細胞であることが裏付けられた。

【0122】

20

誘導された多能性幹細胞は、維持・増殖させるために、5～7日毎に継代を行つた。継代を行うプラスチックシャーレから培地を除き、ハンクス緩衝液で洗浄し、ディスパーザまたは靈長類ES細胞剥離液を加え、37にて5～10分培養した。半分以上のコロニーが剥離した時点でES培地を加えて反応を停止させ、細胞懸濁液を遠心チューブに移した。コロニーがチューブ底面に沈下したら上清を除き、再度ES培地を加えて洗浄した。洗浄後のコロニーの大きさを確認し、極端に大きなものがあればゆっくりとピペッティングを行い、適度な大きさに分割した。適当な大きさになったコロニーを、継代前の3～6倍の底面積のマトリゲルコートしたプラスチックシャーレ上に播種した。このコロニー由来の多能性幹細胞は現在も増殖・維持が継続されている。

【0123】

30

表2に示すように、新生児正常ヒト皮膚纖維芽細胞は上記lot 5F0438以外のロット（lot 5F0474）において良好な該多能性幹細胞の誘導が見られた。実施例5との比較から、若い個体由来の細胞あるいは培養期間が短い細胞が該多能性幹細胞の誘導に適していると考えられた。

以上の結果から、該未分化な細胞を含むヒト出生直後の組織であるヒト新生児組織由来の細胞を用いて、2%血清を含む培地で第2継代培養した場合には、該多能性幹細胞を誘導する事が可能であった。

【0124】

40

実施例7. ヒト成人の皮膚に存在する未分化な幹細胞からのヒト多能性幹細胞の誘導

次に、ヒト成人の皮膚に存在する未分化な幹細胞を含むヒト成人組織由来の細胞（商品名：成人正常ヒト皮膚纖維芽細胞、初代培養）を用いて本発明の多能性幹細胞の誘導を実施した。

凍結した成人正常ヒト皮膚纖維芽細胞（初代培養、Lonza社製、lot 6F3535：28歳、女性、白人、lot 6F4026：39歳、女性、白人）各1本を37の恒温槽中で解凍し、FBM培地に懸濁し、それぞれ12 mlの細胞懸濁液を得た。20 μg/cm²の濃度のマトリゲルで底面をコーティングされた6ウェルプラスチックシャーレ上に該細胞懸濁液を2 mlずつ加えて細胞を播種した（第2継代培養細胞）。

【0125】

14時間後に培地を除き、1ウェルあたり500 μlのハンクス平衡液にm.o.i. 5に相当する量の実施例2で調製したmCAT1アデノウィルスベクターを添加し、室温にて30分間感染さ

50

せた。各ウェルにFBM培地を2 mlずつ加え、37℃で培養した。mCAT-1アデノウィルスベクター導入後48時間、各ウェルの培地を実施例1で調製した4遺伝子(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc)のレトロウィルスベクター液(終濃度4 μg/mlのポリブレンを添加)2 mlに置換し、37℃で4時間培養した。ウィルス上清を除去し、MEF馴化ES培地に置換した。以後2日毎にMEF馴化ES培地の交換を続け、該4遺伝子導入から13日後にアルカリifikオスファターゼ染色を行った。その結果、lot 6F3535からはウェルあたり2個の該多能性幹細胞様のアルカリifikオスファターゼ陽性コロニーが得られたのに対し、lot 6F4242からはアルカリifikオスファターゼ陽性コロニーは得られなかつた(表2)。

【0126】

実施例6との比較から、同じ皮膚纖維芽細胞でも新生児由来の細胞で該多能性幹細胞の誘導効率が高かつた。また、成人正常ヒト皮膚纖維芽細胞間でも若い提供者由来の細胞の方が変換効率が高かつた。以上から該多能性幹細胞の誘導効率は年齢依存的に低下することが示された。

【0127】

実施例8. 第3継代培養の新生児正常ヒト皮膚纖維芽細胞を用いた検討

凍結した新生児正常ヒト皮膚纖維芽細胞(初代培養、Lonza社製、lot 5F0439)1本を37℃の恒温槽中で解凍し、FBM培地に懸濁し、100 mmプラスチックシャーレ2枚に播種した(第2継代培養)。70~90%集密に達するまで6日間培養し、0.025%トリプシン-EDTA溶液(Lonza社製)を用いて細胞を剥離、4℃にて200 gで5分間遠心して上清を除いた。回収した第2継代培養細胞はセルバンカーを用いて凍結保存した。

【0128】

凍結した第2継代培養の細胞を37℃の恒温槽中で解凍し、FBM培地12 mlに懸濁し、4℃にて200 gで5分間遠心して上清を除いた。細胞を懸濁し、20 μg/cm²の濃度のマトリゲルで底面をコーティングされた100 mm プラスチックシャーレ上に10⁴ cell/cm²の濃度で播種した(第3継代培養細胞)。14時間後に培地を除き、2 mlのハンクス平衡液にm.o.i. 5に相当する量の実施例2で調製したmCAT1アデノウィルスベクターを添加し、室温にて30分間感染させた。各ウェルにFBM培地を10 mlずつ加え、37℃で培養した。

【0129】

mCAT-1アデノウィルスベクター導入後4~8時間に培地を除き、実施例1で調製した4遺伝子(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc)のレトロウィルスベクター液(終濃度4 μg/mlのポリブレンを添加)10 mlに置換し、37℃で4時間培養した。ウィルス上清を除去し、MEF馴化ES培地に置換した。以後2日毎にMEF馴化ES培地の交換を続け、該4遺伝子導入から14日後にアルカリifikオスファターゼ染色を行つた。その結果、5個の該多能性幹細胞様のアルカリifikオスファターゼ陽性コロニーが得られた。底面積から換算すると、6ウェルプレート1ウェルあたり0.83個のコロニーが得られたことになる(表2)。

実施例6との比較から、培養期間が長期になることで該多能性幹細胞の誘導効率が低下することが示された。

【0130】

実施例9. 脇帯に存在する未分化な幹細胞からヒト多能性幹細胞の誘導(1)

ヒト出生直後の組織であるヒト脇帯由来の細胞(商品名:正常ヒト脇帯静脈内皮細胞、初代培養)を用いて、脇帯に存在する未分化な幹細胞から本発明の多能性幹細胞の誘導を実施した。

【0131】

凍結した正常ヒト脇帯静脈内皮細胞(初代培養、Lonza社製)1本を37℃の恒温槽中で解凍し、Lonza社製内皮細胞培地キット-2(2%血清)、以下EBM-2とする、に懸濁し、12 mlの細胞懸濁液を得た。20 μg/cm²の濃度のマトリゲルで底面をコーティングされた6ウェルプラスチックシャーレ上に該細胞懸濁液を約10⁵/2ml/ウェルずつ加えて細胞を播種した(第2継代培養)。6時間後に培地を除き、1ウェルあたり500 μlのハンクス平衡液にm.o.i. 5に相当する量のmCAT1アデノウィルスベクターを添加し、室温にて30分間感染させた。

10

20

30

40

50

【0132】

各ウェルにEBM-2培地を2.5 mlずつ加え、37℃で培養した。mCAT-1アデノウィルスベクター導入後48時間、各ウェルの培地を実施例1で調製した2 mlずつの4遺伝子(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc)のレトロウイルスベクター液(終濃度5 μg/mlのポリブレンを添加)に置換し、37℃で4時間培養した。ウィルス上清を除去し、MEF馴化ES培地に置換した。以後2日毎にMEF馴化ES培地の交換を続けた。該4遺伝子導入後12日後、コロニーが確認された。

【0133】

該4遺伝子導入後13日後、誘導されたコロニーはアルカリフォスファターゼ活性により染色された。10

以上の結果から、該未分化な細胞を含むヒト出生直後の組織であるヒト臍帯由来の細胞を持ちいて、2%血清を含む培地で第2継代培養した場合には、該多能性幹細胞を誘導する事が可能であった。

【0134】

実施例10. 臍帯に存在する未分化な幹細胞からヒト多能性幹細胞の誘導(2)

以下の様に、ヒト出生直後の組織であるヒト臍帯由来の細胞(商品名：正常ヒト臍帯動脈平滑筋細胞、第3継代培養)を用いて、臍帯に存在する未分化な幹細胞から本発明の多能性幹細胞の誘導を実施した。

【0135】

凍結した正常ヒト臍帯動脈平滑筋細胞(第3継代培養、Lonza社製)1本を37℃の恒温槽中で解凍し、Lonza社製平滑筋細胞培地キット-2(5%血清)培地(以下SmGM-2という。)に懸濁し、12 mlの細胞懸濁液を得た。20 μg/cm²の濃度のマトリゲル(Becton Dickinson社製)で底面をコーティングされた6ウェルプラスチックシャーレ(Becton Dickinson社製)上に該細胞懸濁液を10⁵/2ml/ウェルずつ加えて細胞を播種した(第4継代培養)。1日後に培地を除き、1ウェルあたり500 μlのハンクス平衡液にm.o.i. 1.25~5に相当する量のmCAT1アデノウィルスベクターを添加し、室温にて30分間感染させた。各ウェルにSmGM-2培地を2.5 mlずつ加え、37℃で培養した。

【0136】

mCAT-1アデノウィルスベクター導入後48時間、各ウェルの培地を実施例1で調製した2 mlずつの4遺伝子(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc)のレトロウイルスベクター液(終濃度5 μg/mlのポリブレンを添加)に置換し、37℃で4時間培養した。ウィルス上清を除去し、MEF馴化ES培地に置換した。以後2日毎にMEF馴化ES培地の交換を続けた。該4遺伝子導入後13日後、コロニーが確認された。しかし、誘導された該コロニーはアルカリフォスファターゼ活性により染色されなかった。30

以上の結果から、ヒト出生直後の組織であるヒト臍帯由来の細胞は、臍帯に存在する未分化な細胞を含むが、5%血清を含む培地で第4継代培養した場合には該多能性幹細胞の誘導は著しく困難である事が明らかになった。

【0137】

実施例11. マウス出生後の組織に存在する未分化な幹細胞からのマウス多能性幹細胞の誘導

マウス出生後の組織であるマウス骨髄由来の細胞を用いて、マウス出生後の組織に存在する未分化な幹細胞からの本発明の多能性幹細胞の誘導を実施した。40

【0138】

4~6週齢のマウス(C57BL/6N系統、4週齢、メス)から他の組織を極力持ち込まないように大腿骨・脛骨を摘出した。回収した骨を70%エタノールに短時間浸して骨の外側に付着した細胞を死滅させ、骨髄以外の細胞の混入を防ぐようにした。エタノール処理後、骨はただちにIMDM(Iscove's Modified Dulbecco's Medium)(SIGMA社製)に移し、骨髄内部の細胞の影響を防いだ。骨の外側を一本ずつキムワイプでぬぐい、結合組織を除去した。IMDMを入れた乳鉢に処理の終わった骨を全て移し、乳棒で叩き潰した。IMDMにて数回洗浄したのち、骨をハサミで細断した。さらにIMDMで数回洗浄したのち、骨片を遠心チューブ

10

20

30

40

50

に移した。

【 0 1 3 9 】

IMDMを除いたのちに、5匹分あたり10 mlの0.2%コラゲナーゼI (SIGMA社製) 含有IMDMを添加し、37 ℃にて1時間振とうした。振とう後、ピペットマンを用いて懸濁液を数回攪拌したのち、上清を別のチューブに移して等量の冷えた10% FBS含有IMDMを添加して酵素反応を停止させた。酵素処理後の骨片を、冷えた10% FBS含有IMDMを入れた乳鉢に移し、再度乳棒で叩き潰し、数回攪拌したのちに上清を回収した。このようにして回収した細胞懸濁液を、70 μm径・40 μm径のナイロンメッシュに順次通してろ過した。細胞懸濁液を4

下で600 gにて7分間遠心し、マウス骨髄深部由来細胞を回収した。

【 0 1 4 0 】

マウス骨髄深部由来細胞はMAPC培地に懸濁し、 10^5 個/cm²の濃度で播種した。細胞の播種には予め10 ng/ml ファイブロネクチン (Becton Dickinson) 含有リン酸緩衝液でコーティングしたディッシュを用いた。培地には使用時に成長因子 (10 ng/ml PDGF-BB (PeproTech社製)、10 ng/ml EGF (Peprotech社製)、1000 unit/ml LIF (chemicon社製)) を添加した。播種から3日後に、培地は交換せず成長因子のみを添加した。6日後にリン酸緩衝液で非接着細胞を洗い流し、0.05%トリプシン - EDTA溶液 (Invitrogen社製) で接着細胞を剥離して回収し、セルバンカー (十慈フィールド社製) を用いて初代培養細胞として凍結保存した。

【 0 1 4 1 】

凍結保存した初代培養細胞を37 ℃のウォーターバス中で解凍し、2%FBSを含む培地であるMAPC培地10 mlに懸濁した。凍結溶液中のDMSOを除去するため、4 ℃、300 gで7分間遠心し、上清を除去した。得られた細胞塊を再懸濁し、底面を0.1%ゼラチン / リン酸緩衝液でゼラチンコートされた12ウェルプラスチックプレート上に 2.5×10^3 cell/cm²の濃度で播種し、MAPC培地を2 mlずつ加えた (第2継代培養細胞)。

【 0 1 4 2 】

8 ~ 14時間後に培地を除き、実施例1のように作製した4遺伝子レトロウィルスベクター液を2 mlずつ加えて37 ℃で4 ~ 14時間培養後、ウィルス液を除去し、マウスES培地 (ES培地に終濃度0.3% FBS (Invitrogen社製)、1000 unit/ml LIF (Chemicon社製)、0.1 mM 2-メルカプトエタノールを使用時に添加) に置換した。以後3日毎にマウスES培地の交換を続けると、該4遺伝子導入後5 ~ 7日後に該多能性幹細胞は、マウスES細胞様の小型の細胞からなるコロニーを形成した。誘導された多能性幹細胞のコロニーはアルカリフィオスファターゼ活性により青紫色に染色された。

【 0 1 4 3 】

12ウェルプレートの残りのウェルから該マウス多能性幹細胞を継代し、ゼラチンコートした100 mmプレートに継代を続けた。第7継代培養細胞からRNeasy mini kit (QIAGEN社製) を用いてRNAを抽出し、cDNAを合成した。cDNAを用いて定量PCRを行い、Nanogの発現を確認した。

【 0 1 4 4 】

第7継代培養の該マウス多能性幹細胞を、同系統のC57BL/6Nマウス3匹の背皮下に1匹あたり 3×10^5 個移植し、38日後に形成されたテラトーマを摘出した。テラトーマは3匹全てで形成された。摘出したテラトーマから切片を作製し、三胚葉への分化能を免疫染色及び組織染色 (HE染色、アルシアンブルー染色) で解析した。その結果、外胚葉系としては、MAP2陽性の細胞 (神経系)、GFAP陽性の細胞 (神経系)、中胚葉系としては、骨格筋細胞 (筋細胞)、軟骨組織、内胚葉系としては、腸管組織が観察された。

【 0 1 4 5 】

該マウス多能性幹細胞を維持・増殖させるために、3 ~ 4日毎に継代を行った。継代を行うプラスチックシャーレから培地を除き、リン酸緩衝液で洗浄し、0.05%トリプシン - EDTA溶液を加え、37 ℃にて5分培養した。細胞が剥離したらES培地を加えて反応を停止させ、細胞懸濁液を遠心チューブに移した。200gにて5分間遠心し、上清を除き、沈殿をマウスES培地に懸濁後、ゼラチンコートしたプレートに 10^4 cell/cm²の濃度で播種した。同

10

20

30

40

50

継代方法で低血清培養したマウス骨髄由来細胞から誘導した該多能性幹細胞は、長期間にわたって培養を維持できた。

以上のように、出生後のマウス骨髄由来の低血清培養条件下で樹立した細胞から多能性幹細胞が誘導された。

【0146】

実施例12. 3遺伝子導入とヒストンデアセチラーゼ阻害剤処理によるマウス多能性幹細胞の誘導

マウス出生後の組織であるマウス骨髄由来の細胞を用いて3遺伝子導入とヒストンデアセチラーゼ阻害剤処理による多能性幹細胞の誘導を実施した。

実施例11と同様に調製して凍結保存してあった未分化な幹細胞を含むマウス骨髄由来細胞の初代培養細胞を、底面を0.1%ゼラチン／リン酸緩衝溶液でゼラチンコートされた24ウェルプラスチックプレート（Becton Dickinson社製）上に $5. \times 10^3$ cell/cm²の濃度で播種し、MAPC培地を2 mlずつ加えた。 10

【0147】

8時間後に培地を除き、実施例1のように調製した3遺伝子（ヒトOct3/4、Sox2、Klf4）レトロウィルスベクター液を2 mlずつ加えて、さらに終濃度1又は0.1 μMのヒストンデアセチラーゼ阻害剤であるMS-275を添加後、37℃で約14時間培養後、ウィルス液を除去し、終濃度1又は0.1 μMのヒストンデアセチラーゼ阻害剤であるMS-275を含むMAPC培地を2 mlずつ加えた。3日後、マウスES培地（ES培地に終濃度0.3% FBS（Invitrogen社製）、1000 unit/ml LIF（Chemicon社製）、0.1 mM 2-メルカプトエタノールを使用時に添加）に置換した。 20

【0148】

後2～3日毎にマウスES培地の交換を続けた。3遺伝子（ヒトOct3/4、Sox2、Klf4）レトロウィルスベクター導入12日後に、細胞を24ウェルプラスチックプレートの各ウェルから6ウェルプラスチックプレートの各ウェルに継代培養した。一部は、24ウェルプラスチックプレートでも培養した。該3遺伝子導入及びMS-275処理15日後、該多能性幹細胞はマウスES細胞様の小型の細胞からなるコロニーを形成した。該多能性幹細胞のコロニーはアルカリフィオスマーカー活性により青紫色に染色された。

【0149】

次に、Nanog遺伝子の発現量を定量PCRにより確認し、アルカリフィオスマーカー活性を持つ多能性幹細胞のコロニーのマウスNanog発現が確認された（図3）。 30

該3遺伝子導入及びMS-275処理18日後、6ウェルプレート各ウェルから該多能性幹細胞をゼラチンコートした100 mmプレートに継代培養した。同様に継代培養を続けた。

【0150】

該3遺伝子導入及びMS-275処理29日後、該マウス多能性幹細胞を、同系統のC57BL/6Nマウスの背部皮下に1匹あたり 2×10^7 個移植し、34日後に形成されたテラトーマを摘出した。摘出したテラトーマから切片を作製し、三胚葉への分化能を免疫染色及び組織染色（HE染色、アルシアンブルー染色）で解析した。その結果、外胚葉系としては、GFAP陽性の細胞（神経系）、ケラチン産生細胞（皮膚細胞）、中胚葉系としては、平滑筋アクチン陽性の細胞（平滑筋細胞）、骨組織、軟骨組織、内胚葉系としては、腸管組織が観察された。 40

【0151】

実施例13. 3遺伝子導入によるマウス多能性幹細胞の誘導

次に、マウス出生後の組織であるマウス骨髄由来の細胞を用いて3遺伝子導入によるマウス多能性幹細胞の誘導を実施した。

実施例11で調製して凍結保存してあった未分化な幹細胞を含むマウス骨髄由来細胞の初代培養細胞を、底面を0.1%ゼラチン／リン酸緩衝溶液でゼラチンコートされた24ウェルプラスチックプレート（Becton Dickinson社製）上に $1. \times 10^4$ cell/cm²の濃度で播種し、MAPC培地を2 mlずつ加えた。

【0152】

2日後に培地を除き、実施例1のように調製した3遺伝子（ヒトOct3/4、Sox2、Klf4）レ

50

トロウイルスベクター液を2 mlずつ加えて、37℃で1日培養後、ウィルス液を除去し、MAP C培地を2 mlずつ加えた。3日後、マウスES培地（ES培地に終濃度0.3% FBS（Invitrogen社製）、1000 unit/ml LIF（Chemicon社製）、0.1 mM 2-メルカプトエタノールを使用時に添加）に置換した。以後2-3日毎にマウスES培地の交換を続けた。3遺伝子（ヒトOct3/4、Sox2、Klf4）レトロウイルスベクター導入11日後に、細胞を24ウェルプラスチックプレートの各ウエルから6ウェルプラスチックプレートの各ウエルに継代培養した。

【0153】

以後2~3日毎にマウスES培地の交換を続けた。該3遺伝子導入19日後、該多能性幹細胞はマウスES細胞様の小型の細胞からなるコロニーを形成した。アルカリフィオスファターゼ活性を確認するため、培地を除去後、10%ホルマリン中性緩衝溶液をウェルに加え、室温で5分間固定した。リン酸緩衝溶液等で洗浄後、アルカリフィオスファターゼの発色其質を含む1step NBT/BCIP溶液（Pierce社製）を加え、室温にて20-30分反応させた。該多能性幹細胞のコロニーはアルカリフィオスファターゼ活性により青紫色に染色された。10

【0154】

表1は、実施例で用いた該4遺伝子又は該3遺伝子及びマウスエコトロピックレトロウイルスベクターのレセプター（mCAT：マウスカチオニックアミノ酸トランスポーター）の遺伝子名、NCBI番号、該遺伝子を挿入したウィルスベクター、インサートサイズ、5'側制限酵素切断部位、3'側制限酵素切断部位、翻訳領域長、3'側非翻訳領域長、クローンID、提供元を示した。

【0155】

【表1】

遺伝子名	NCB 番号	該遺伝子を 挿入したウイ ルスベクター	インサート サイズ	5' 側制限酵素 切斷部位	3' 側制限酵素 切斷部位	翻訳領域長 度	3' 側非翻訳 領域長	クローンID	提供元
human Oct3/4	BU845310	pMXs-puro	1417	EcoR1	XbaI	1082	278	6578897	Open Biosystems
human Sox2	BC013923	pMXs-neo	1172	EcoR1	XbaI	953	143	2823424	Open Biosystems
human c-Myc	BC058901	pMXs-IB	1876	EcoR1	XbaI	1320	473	6012670	Open Biosystems
human Klf4	BC029923	pMXs-IB	1591	EcoR1	EcoR1	1412	38	5111134	Open Biosystems
mCAT1	NM_007513	Adeno-X	2032	BssS1	BssS1	1868	132	A830015N05	理化学研究所 FANTOMクローン

【0156】

表2は、実施例4～7のアルカリリフォスマターゼ陽性のコロニー数をまとめた。細胞種には培養継代数も付記した。4遺伝子導入日は、レトロウイルベクターの感染日である。ロット番号は、Lonza製品の番号である。提供者年齢は、Lonzaの製品のドナー情報に基づ

づく。コロニー数は、 10cm^2 あたりのアルカリフェオヌクターゼ陽性の小型細胞によって構成されたコロニー数である。

【0157】

【表2】

表2 実施例5-8及び10 遺伝子導入によるアルカリフェオヌクターゼ(ALP)陽性コロニー形成数

実施例	細胞種	ドナーパンクタ番号	血清濃度(%)	遺伝子導入時		遺伝子導入日	ALP染色日	コロニー数*
				の世代数	導入日			
8	新生児皮膚纖維芽細胞	新生児 5F0439	2	3	2007/3/20	2007/4/3	0.8	
6	新生児皮膚纖維芽細胞	新生児 5F0438	2	2	2007/4/15	2007/4/29	6.0	
6	新生児皮膚纖維芽細胞	新生児 5F0438	2	2	2007/5/5	2007/5/16	6.0	
6	新生児皮膚纖維芽細胞	新生児 5F0474	2	2	2007/5/5	2007/5/16	4.0	
6	新生児皮膚纖維芽細胞	新生児 5F0438	2	2	2007/5/12	2007/5/26	7.0	
6	新生児皮膚纖維芽細胞	新生児 5F0474	2	2	2007/5/12	2007/5/26	9.5	
6	成人皮膚纖維芽細胞	28 6F3535	2	2	2007/5/5	2007/5/16	2.0	
7	成人皮膚纖維芽細胞	39 6F4026	2	2	2007/5/5	2007/5/16	0.0	
5	成人骨髓由来細胞(低血清)	20 060470B	2	2	2007/3/20	2007/4/3	0.0	
5	成人骨髓由来細胞(低血清)	20 060809B	2	2	2007/3/26	2007/4/9	0.0	
5	成人骨髓由来細胞(低血清)	20 060809B	2	2	2007/4/15	2007/4/29	0.2	
5	成人骨髓由来細胞(低血清)	20 060809B	2	2	2007/5/5	2007/5/19	0.0	
5	成人骨髓由来細胞(低血清)	20 060809B	10	2	2007/3/20	2007/4/3	0.0	
5	成人骨髓由来間葉系幹細胞(高血清)	20 060470B	10	2	2007/3/26	2007/4/9	0.0	
5	成人骨髓由来間葉系幹細胞(高血清)	20 5F0442	5	4	2007/5/11	2007/5/24	0.0	
10	新生児臍帯動脈平滑筋細胞	新生児 5F0442						

*: 10cm^2 あたりのアルカリフェオヌクターゼ陽性の小型細胞によって構成されたコロニーの数を示す

【図面の簡単な説明】

【0158】

【図1】図1は、ヒト成人骨髓由来の単核細胞から低血清培養条件で樹立した細胞にOct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycの4つの遺伝子を導入し、得られたコロニーからRNAを抽出し、定量的PCRにてヒトNanog及びヒトTert遺伝子の発現量を検証した。4遺伝子を導入していない同纖維芽細胞及び間葉系幹細胞を実験コントロールとして用いた。遺伝子の発現量は、ヒトHPRT遺伝子発現量により標準化し、さらに実施例6で樹立された新生児皮膚纖維芽細胞から誘導されたアルカリリフォスファターゼ陽性コロニーにおける遺伝子発現量を1とした相対値として示した。4遺伝子を導入し、かつアルカリリフォスファターゼ陽性コロニーは、Nanog及びTertの発現が有意に高いことを確認した。

【0159】

【図2】図2は、新生児皮膚に由来する初代培養纖維芽細胞にOct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycの4つの遺伝子を導入し、得られたコロニーからRNAを抽出し、定量的PCRにてヒトNanog及びヒトTert遺伝子の発現量を検証した。4遺伝子を導入していない同纖維芽細胞及び間葉系幹細胞を実験コントロールとして用いた。遺伝子の発現量は、ヒトHPRT遺伝子発現量により標準化し、さらに実施例6で樹立された新生児皮膚纖維芽細胞から誘導されたアルカリリフォスファターゼ陽性コロニーにおける遺伝子発現量を1とした相対値として示した。4遺伝子を導入し、かつアルカリリフォスファターゼ陽性コロニーは、Nanog及びTertの発現が有意に高いことを確認した。

【0160】

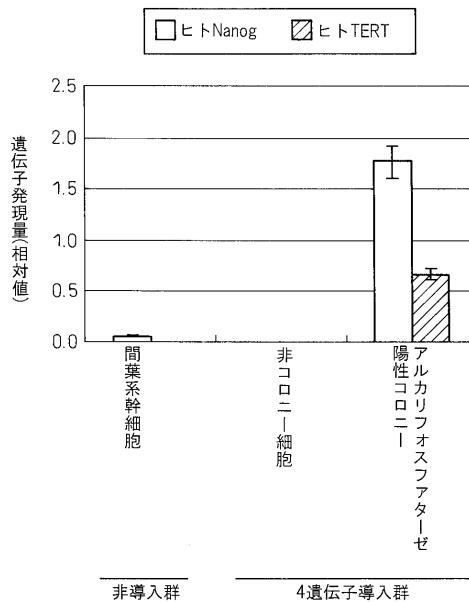
【図3】図3は、低血清条件下で樹立したマウス骨髄に由来する細胞を用い、3遺伝子導入及びヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤であるMS-275(0.1または1.0 μM)で処理後、得られたコロニーからRNAを抽出し、定量的PCRにてNanogの発現量を検証した。3遺伝子導入及びヒストンデアセチラーゼ阻害剤処理した細胞からは、アルカリリフォスファターゼ陽性細胞群(コロニー)が形成し、これらコロニーではNanogの発現がアルカリリフォスファターゼ陰性コロニーより有意に高いことを確認した。尚、図中、W1、W2、W3、W4、W5及びW6は、実施例12中で使用した6ウェルプレートの各ウェル番号を表わす。

10

20

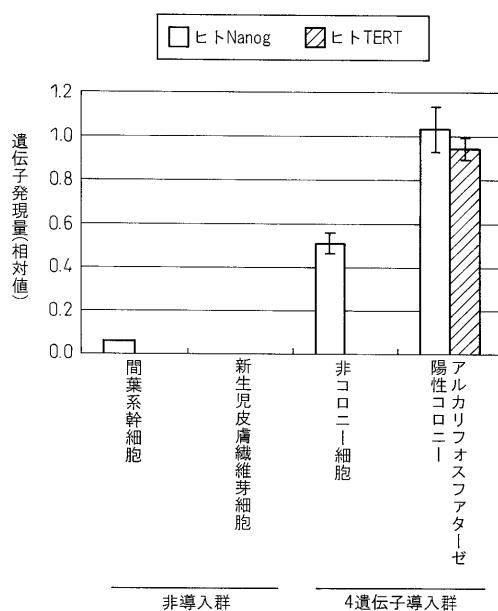
【図1】

図1
ヒト成体骨髓由来細胞



【図2】

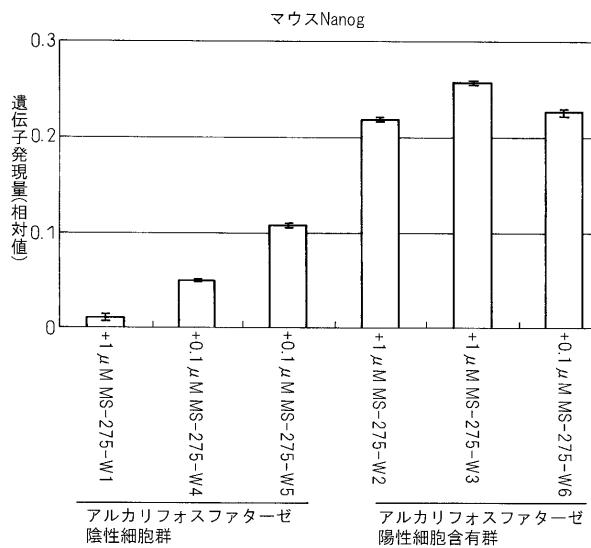
新生児皮膚纖維芽細胞



【図3】

図3

マウス成体骨髓由来細胞における3遺伝子導入及びHDAC阻害剤処理後のNanog発現量



フロントページの続き

(72)発明者 桜田 一洋
神奈川県横浜市青葉区みすゞが丘 9 - 1 6

(72)発明者 石川 哲也
兵庫県神戸市中央区港島中町 6 - 1 4 ポートピアプラザE - 5 1 0

(72)発明者 正木 英樹
兵庫県神戸市灘区篠原南町 1 - 2 - 2 6

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA02 DA02 GA11 HA20
4B065 AA90X AC12 AC20 BA23 BB34 BB40 BC11 CA44