



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101848994 A

(43) 申请公布日 2010.09.29

(21) 申请号 200980100065.0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009.07.30

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

(30) 优先权数据

61/084842 2008.07.30 US

61/141177 2008.12.29 US

61/203931 2008.12.30 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.02.02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2009/063906 2009.07.30

(87) PCT申请的公布数据

W02010/013845 EN 2010.02.04

(71) 申请人 国立大学法人京都大学

地址 日本京都府

(72) 发明人 山中伸弥 吉田善纪

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李波 郭文洁

权利要求书 1 页 说明书 25 页 序列表 8 页

附图 17 页

(54) 发明名称

有效建立诱导的多能干细胞的方法

(57) 摘要

提供的是改善诱导的多能干细胞建立效率的方法,其包括在其核重编程步骤中在低氧条件下培养体细胞。

1. 改善诱导的多能干细胞建立效率的方法,其包括在其核重编程步骤中在低氧条件下培养体细胞。

2. 权利要求 1 的方法,其中在环境大气中的氧浓度为 1% -10%。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述在环境大气中的氧浓度为 1% -5%。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项的方法,其中核重编程物质是下述物质,或编码它们的核酸:

(i) Oct3/4 和 Klf4, 或

(ii) Oct3/4 和 c-Myc, 或

(iii) Oct3/4、Klf4 和 Sox2, 或

(iv) Oct3/4、Klf4 和 c-Myc, 或

(v) Oct3/4、Klf4、Sox2 和 c-Myc。

5. 根据权利要求 1-4 中任一项的方法,其包括将丙戊酸在所述核重编程步骤中用作效率改进剂的进一步步骤。

6. 根据权利要求 1-5 中任一项的方法,其中在接触核重编程物质后,在低氧条件下执行培养体细胞超过 3 天。

有效建立诱导的多能干细胞的方法

[0001] 发明技术领域

[0002] 本发明涉及改善诱导的多能干细胞（下文称为 iPS）建立效率的方法。更具体而言，本发明涉及改善 iPS 细胞建立效率的方法，其包括在其核重编程（nuclear reprogramming）步骤中在低氧条件下培养体细胞。

[0003] 发明背景

[0004] 近年来，小鼠和人 iPS 细胞已相继建立。Yamanaka 等人通过下列诱导 iPS 细胞：将 Oct3/4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 基因引入来自报道小鼠（reporter mouse）的成纤维细胞内，其中将新霉素抗性基因敲入 Fbx 15 基因座内，并且迫使细胞表达该基因（1,2）。Okita 等人（3）通过下列成功地建立了 iPS 细胞（Nanog iPS 细胞），所述 iPS 细胞显示与胚胎干（ES）细胞中的那些几乎相同的基因表达和后生修饰：产生转基因小鼠，其中绿色荧光蛋白（GFP）和嘌呤霉素抗性基因整合到 Nanog 的基因座内，它们的表达比 Fbx15 表达更集中于多能细胞中，迫使得自小鼠的成纤维细胞表达上述 4 种基因，以及选择嘌呤霉素抗性和 GFP 阳性的细胞。相似结果也由其他小组获得（4,5）。其后，揭示 iPS 细胞也可以利用除 c-Myc 基因之外的 3 种因子来产生（6）。

[0005] 此外，Yamanaka 等人通过将小鼠中所使用的那些相同的 4 种基因引入人皮肤成纤维细胞内成功建立了 iPS 细胞（1,7）。另一方面，Thomson 等人的小组使用 Nanog 和 Lin28 代替 Klf4 和 c-Myc 产生了人 iPS 细胞（8,9）。Park 等人（10）使用 TERT 和 SV40 大 T 抗原加上 4 种因子 Oct3/4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 产生了人 iPS 细胞，其中所述 TERT 被认为是人细胞无限增殖基因。因此，已证实就通过将所限定的因子引入到体细胞内在人和小鼠二者中所能产生的多能性而言，iPS 细胞与 ES 细胞相当。

[0006] 然而，iPS 细胞建立效率低至小于 1%。特别地，当通过引入除 c-Myc 外的 3 种因子（Oct3/4、Sox2、Klf4）而产生它们时，会出现极低效率的 iPS 细胞建立的问题，其中，担心 c-Myc 在组织中会引起肿瘤发生和由 iPS 细胞分化的个体成为体细胞。

[0007] 顺便提及，可获得关于细胞的未分化状态和多能性的维持与低氧条件之间的关联的某些报告。Ezashi 等人（11）观察到在低氧条件下培养的人 ES（hES）细胞的分化被抑制，暗示在低氧条件下培养以维持关于 hES 细胞的足够多能性的必要性。Covello 等人（12）显示在低氧条件下早期被诱导的转录调节因子（HIF-2 α ）能够诱导 Oct3/4 的表达，并且调节干细胞的功能和分化。此外，Grayson 等人（13,14）显示低氧条件参与人间质干细胞（hMSCs）的未分化状态和多能性的维持。然而，没有关于已经分化的体细胞中的核重编程过程和低氧条件之间的关系的报告。

[0008] 提及的参考文献：

[0009] 1. WO 2007/069666 A1

[0010] 2. Takahashi, K. 和 Yamanaka, S., Cell, 126 :663-676 (2006)

[0011] 3. Okita, K. 等人, Nature, 448 :313-317 (2007)

[0012] 4. Wernig, M. 等人, Nature, 448 :318-324 (2007)

[0013] 5. Maherali, N. 等人, Cell Stem Cell, 1 :55-70 (2007)

- [0014] 6. Nakagawa, M. 等人, Nat. Biotechnol., 26 :101-106 (2008)
- [0015] 7. Takahashi, K. 等人, Cell, 131 :861-872 (2007)
- [0016] 8. WO 2008/118820 A2
- [0017] 9. Yu, J. 等人, Science, 318 :1917-1920 (2007)
- [0018] 10. Park, I. H. 等人, Nature, 451 :141-146 (2008)
- [0019] 11. Ezashi, T. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102 :4783-4788 (2005)
- [0020] 12. Covello, K. L. 等人, Genes & Dev., 20 :557-570 (2006)
- [0021] 13. Grayson, W. L. 等人, J. Cell. Physiol., 207 :331-339 (2006)
- [0022] 14. Grayson, W. L. 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun., 358 :948-953 (2007)

[0023] 发明概述

[0024] 本发明的目的是提供改善 iPS 细胞建立效率的手段和提供使用该手段有效产生 iPS 细胞的方法。

[0025] 本发明人以实现上述目的为目标进行了广泛研究,并且成功地显著改善了 iPS 细胞建立效率,并且已开发了本发明。

[0026] 因此,本发明提供了:

[0027] [1] 改善 iPS 细胞建立效率的方法,其包括在其核重编程步骤中在低氧条件下培养体细胞。

[0028] [2] 上述 [1] 的方法,其中在环境大气 (ambient atmosphere) 中的氧浓度为 1% -10%。

[0029] [3] 上述 [2] 的方法,其中在环境大气中的氧浓度为 1% -5%。

[0030] [4] 根据上述 [1]-[3] 中任一项的方法,其中核重编程物质是下述物质,或编码它们的核酸;

[0031] (i) Oct3/4 和 Klf4, 或

[0032] (ii) Oct3/4 和 c-Myc, 或

[0033] (iii) Oct3/4、Klf4 和 Sox2, 或

[0034] (iv) Oct3/4、Klf4 和 c-Myc, 或

[0035] (v) Oct3/4、Klf4、Sox2 和 c-Myc。

[0036] [5] 根据上述 [1]-[4] 中任一项的方法,其包括将丙戊酸在核重编程步骤中用作效率改进剂的进一步步骤。

[0037] [6] 根据上述 [1]-[5] 中任一项的方法,其中在接触核重编程物质后,在低氧条件下执行培养体细胞超过 3 天。

[0038] 因为在核重编程步骤中的低氧条件使得能够显著增加 iPS 细胞建立效率,所以这在借助于除 c-Myc 或 Sox2 外的 3 种因子诱导 iPS 细胞中特别有用,所述除 c-Myc 或 Sox2 外的 3 种因子已通常与极低的 iPS 细胞建立效率相关。这在借助于 2 种因子 (例如, Oct3/4 和 Klf4 ;Oct3/4 和 c-Myc) 诱导 iPS 细胞中也是有用的。因为当被再活化时,尤其担心 c-Myc 引起肿瘤产生,所以使用 2 或 3 种因子的改善 iPS 细胞建立效率,在将 iPS 细胞应用于再生药物中具有首要效用。因为可以使用广泛使用的允许控制氧浓度的 CO₂ 培养箱非常容易地产生此种低氧条件,所以无需辛苦步骤或技术技能即可有效地制备 iPS 细胞。

[0039] 附图简述

[0040] 图 1 是比较在正常氧浓度 (20%) 和低氧浓度 (5%) 下通过将 2 种基因 Oct3/4 和 Klf4 引入 MEF 内建立的 iPS 细胞集落 (GFP 阳性集落) 数目的图示 (* $p < 0.05$)。

[0041] 图 2 显示通过将 2 种基因 Oct3/4 和 c-Myc 引入 MEF 内建立的 iPS 细胞集落 (GFP 阳性集落) 的图像 [a) 相差图像 ;b)GFP 阳性集落的图像]。

[0042] 图 3 是使用来自在低氧浓度下建立的 iPS 细胞的 RNA 执行的 RT-PCR 结果的照片示意图。检查了关于未分化状态的标记 Oct3/4(末端)、Sox2(末端)、Klf4(末端)、c-Myc(末端)、Nanog、Rex1 和 ECAT1 的表达,和引入的外源 Oct3/4(Tg) 的表达。对应于各个泳道的样品如下:

[0043] • 521AH5-1 和 535AH5-2 :引入 4 种基因 (Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Myc);细胞在 5% 氧浓度下培养

[0044] • 535AH1-1 :引入 4 种基因 ;细胞在 1% 氧浓度下培养

[0045] • 535BH5-1 和 521BH5-3 :引入 3 种基因 (Oct3/4、Klf4、Sox2);细胞在 5% 氧浓度下培养

[0046] • 527CH5-1、527CH5-2 和 547CH5-1 :引入 2 种基因 (Oct3/4、Klf4);细胞在 5% 氧浓度下培养

[0047] • RF8 :对照 ES 细胞

[0048] • 20D17 :对照 Nanog-iPS 细胞 [Nature, 448, 313-317(2007)]

[0049] 在每个小图右侧上的数字表示 PCR 循环数目。

[0050] 图 4 中的上图显示通过将在低氧浓度 (5%) 下用 Oct3/4 和 Klf4 建立的小鼠 iPS 细胞 (527CH5-2) 皮下注射到免疫缺陷小鼠内而形成的畸胎瘤照片。图 4 中的下图显示所获得的畸胎瘤的组织学染色图像 (苏木精 - 伊红染色) [a):软骨组织, b):内胚层上皮组织, c):肌肉组织, d):角质化上皮组织]。

[0051] 图 5 显示通过将在低氧浓度 (5%) 下由引入 2、3 或 4 种细胞建立的 iPS 细胞显微注射到来自 ICR 小鼠的胚泡内而产生的成年嵌合体照片,在 2 周龄时获取。

[0052] a):得自通过引入 4 种基因建立的 iPS 细胞的嵌合小鼠 (雄性) (521AH5-1)

[0053] b):得自通过引入 3 种基因建立的 iPS 细胞的嵌合小鼠 (雄性) (535BH5-1)

[0054] c):得自通过引入 3 种基因建立的 iPS 细胞的嵌合小鼠 (雌性) (535BH5-1)

[0055] d):得自通过引入 2 种基因建立的 iPS 细胞的嵌合小鼠 (雄性) (527CH5-1)

[0056] e):得自通过引入 2 种基因建立的 iPS 细胞的嵌合小鼠 (雄性) (527CH5-2)

[0057] 图 6 显示关于实施例 7 的时间表。

[0058] 图 7 是在实施例 7 中在各种培养条件下建立的 iPS 细胞集落数目的图示。“预先 (Pre)”显示在低氧条件下具有预培养获得的结果。“4F”、“3F”和“模拟”分别显示由引入 4 种基因 (Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Myc)、3 种基因 (Oct3/4、Klf4、Sox2) 和空载体获得的结果。

[0059] 图 8 是在实施例 7 中由引入 4 种基因获得的 iPS 细胞集落形态的照片示意图,在感染后第 40 天时获取。上和下图分别显示不具有预培养在低氧条件下获得的集落和具有预培养在低氧条件下获得的那些集落的图像。

[0060] 图 9 是比较通过下列获得的 iPS 细胞集落数目与在正常氧浓度 (20%) 下获得的那些的图示:引入 4 种基因 (Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Myc),并且在 5% 氧浓度下从感染后第

7 天开始培养细胞 1、2 或 3 周,或直至感染后第 40 天。3 次独立实验的结果显示在一起。

[0061] 图 10 是使用来自在低氧浓度下建立的 iPS 细胞的 RNA 执行的 RT-PCR 结果的照片示意图。检查了关于未分化状态的标记 Oct3/4(末端)、Sox2(末端)、Klf4(末端)、c-Myc(末端)、Nanog、Rex1、GDF1 和 ESG1 的表达。对应于各个泳道的样品如下:

[0062] • 96AH5-2 和 96AH5-3 :引入 4 种基因 (Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Myc) ;细胞在感染后第 7 天到第 40 天之间在 5%氧浓度下培养

[0063] • 96AH5W3-4、96AH5W3-5、96AH5W3-6 :引入 4 种基因 ;细胞在感染后第 7 天开始在 5%氧浓度下培养 3 周

[0064] • 96BH5-1 :引入 3 种基因 (Oct3/4、Klf4、Sox2) ;细胞在 5%氧浓度下预培养

[0065] • 201B2 :对照 iPS 细胞 (Cell, 131, 861-872 (2007))

[0066] 在每个小图右侧上的数字表示 PCR 循环数目。

[0067] 图 11 显示在 5%氧浓度下产生的人 ES 样集落 (a) 和所建立 iPS 集落的碱性磷酸酶染色 (b) 的代表性相差图像。在 5%氧浓度下所产生未分化的人 iPS 细胞的免疫组织化学染色。Nanog(c)、SSEA3(d)、SSEA4(e)。

[0068] 图 12 是证实通过引入 4 种基因 (Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Myc) 且在 5%氧浓度下培养起始细胞 (70AH5-2、70AH5-6) 建立的人 iPS 细胞具有三胚层分化潜力的结果的照片示意图,通过用针对甲胎蛋白、平滑肌肌动蛋白、 β III- 微管蛋白、GFAP、结蛋白和波形蛋白的抗体进行染色而获得。[左:相差图像;右:免疫荧光图像]。

[0069] 图 13 显示通过将人 iPS 细胞注射到 SCID 小鼠的睾丸内获得的畸胎瘤的组织学染色图像(苏木精-伊红染色),所述人 iPS 细胞通过引入 4 种基因 (Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Myc) 且在 5%氧浓度下培养起始细胞而建立 (70AH5-2) [a) 神经上皮组织, b) 视网膜上皮组织, c) 骨样组织, d) 平滑肌组织, e) 内胚层上皮组织]。

[0070] 图 14(a) 至 (d) 是比较在第 21 天时 (a) 和在第 28 天时 (b) 来自 4 因子转导的 MEF、在第 21 天时 (c) 和在第 28 天时 (d) 来自 3 因子转导的 MEF 的 Nanog-GFP- 阳性集落计数的图示。图 14(e) 和 (f) 是比较在第 21 天时来自 4 因子转导的 MEF(e) 和 3 因子转导的 MEF(f) 的总集落中的 GFP 阳性集落百分比的图示。

[0071] 图 15(a) 显示在第 9 天时,在低氧和正常氧条件下含和不含丙戊酸 (VPA) 培养的来自 4 因子转导的 MEF 的 GFP- 阳性细胞百分比的图示。图 15(b) 至 (e) 显示在 20%氧 (b) 和 5%氧 (c) 不含 VPA、以及在 20%氧 (d) 和 5%氧 (e) 含 VPA 的 4 因子转导的 MEF 的代表性流式细胞术分析。

[0072] 图 16 显示在转导后第 21 天时,在 20%氧 ((a) ;相差, (b) ;GFP) 和 5%氧 ((c) ;相差, (d) ;GFP) 下的 GFP- 阳性集落的代表性图像。比例条表示 200 μ m。

[0073] 图 17 显示在第 21 天时,在 20%氧 (a) 和 5%氧 (b) 下 4 因子感染的 MEF、在第 28 天时,在 20%氧 (c) 和 5%氧 (d) 下 3 因子感染的 MEF 的代表性图像。

[0074] 图 18 显示 527CH5-1 的核型分析。

[0075] 图 19 显示比较凋亡细胞 ES 细胞 (RF8) (a) 和 4 因子转导的 MEF (b) 百分比的图示。将 ES 细胞以 1×10^5 细胞 / 孔的密度接种到 STO 细胞的饲养层上,并且从第 1 到 3 天在正常氧或低氧下培养。在第 3 天时,细胞用膜联蛋白 V-FITC 进行处理,并且进行流式细胞术分析。条形图表示凋亡细胞 (膜联蛋白 V-FITC 阳性) 的百分比。在转导后第 4 天时,将 4 因

子转导的 MEF 接种到 STO 细胞上,并且从第 5 天到第 9 天在正常氧或低氧下培养,并且对细胞实施膜联蛋白-V 亲和力测定法。条形图表示凋亡细胞百分比。显示了 3 次实验的平均值和标准差。

[0076] 图 20 显示比较 ES 细胞 (RF8) (a) 以及 4 因子和模拟转导的 MEF (b) 的细胞数目的图示。将 ES 细胞以 1×10^5 细胞/孔的密度接种到 STO 细胞的饲养层上,并且从第 1 到 3 天在正常氧或低氧下培养。在第 3 天时,计数细胞数目。条形图显示 ES 细胞的细胞计数。显示了 3 次实验的平均值和标准差。从第 1 到 4 天 4 因子和模拟转导的 MEF 分别在低氧或正常氧条件下培养,并且计数细胞数目。条形图显示细胞计数。显示了 4 次实验的平均值和标准差。* $p > 0.05$

[0077] 图 21 显示比较在 5%氧下的 4 因子转导的 MEF 与在 20%氧下的那些的 ES 细胞特异性基因 (a) 和 MEF 特异性基因 (b) 的表达模式的散布图。选择在 ES 细胞和 MEF 中特异性表达的基因 (超过 10 倍差异)。在用低氧处理的 4 因子转导的 MEF 中上调和下调的基因分别以红色和蓝色显示。绿色线表示基因表达水平中的 5 倍改变。

[0078] 图 22 显示通过定量实时 RT-PCR 的内源 Oct3/4 和 Nanog 的相对表达。

[0079] 图 23(a) 显示在第 21 天时比较 Nanog-GFP- 阳性集落计数的图示。显示了 3 次实验的平均值和标准差。比例条, $200 \mu\text{m}$ 。* 表示 $p > 0.05$ 。图 23(b) 至 (e) 显示在 20%氧 ((b); 相差, (c); GFP) 和 5%氧 ((d); 相差, (e); GFP) 下获得的 GFP- 阳性集落的代表性图像。

[0080] 图 24(a) 显示在第 21 天时比较来自通过 piggybac 转座重编程的 MEF 的 Nanog-GFP- 阳性集落的每种计数的图示。显示了 3 次实验的平均值和标准差。* 和 ** 分别表示 $p > 0.01$ 和 $p > 0.001$ 。图 24(b) 至 (e) 显示在 20%氧 ((b); 相差, (c); GFP) 和 5%氧 ((d); 相差, (e); GFP) 下获得的 GFP- 阳性集落的代表性图像。

[0081] 发明详述

[0082] 本发明提供了改善 iPS 细胞建立效率的方法,其包括在其核重编程步骤中在低氧条件下培养体细胞。

[0083] (a) 低氧条件

[0084] 如本文所使用的,术语低氧条件表示在细胞培养过程中在环境大气中的氧浓度显著低于在空气中的氧浓度。特别地,此种条件包括比通常用于普通细胞培养的 5-10% CO_2 /95-90% 空气的环境大气中的氧浓度更低的氧浓度;例如,在环境大气中 18% 或更少的氧浓度是可应用的。优选地,在环境大气中的氧浓度是 15% 或更少 (例如,14% 或更少、13% 或更少、12% 或更少、11% 或更少等)、10% 或更少 (例如,9% 或更少、8% 或更少、7% 或更少、6% 或更少等)、或 5% 或更少 (例如,4% 或更少、3% 或更少、2% 或更少等)。在环境大气中的氧浓度优选是 0.1% 或更多 (例如,0.2% 或更多、0.3% 或更多、0.4% 或更多等)、0.5% 或更多 (例如,0.6% 或更多、0.7% 或更多、0.8% 或更多、0.9% 或更多等)、或 1% 或更多 (例如,1.1% 或更多、1.2% 或更多、1.3% 或更多、1.4% 或更多等)。

[0085] 关于在细胞环境中如何创造低氧条件没有限制;最容易的合适方法是在允许控制氧浓度的 CO_2 培养箱中培养细胞。此种 CO_2 培养箱可从许多设备制造厂家商购获得 (例如,可以使用由 Thermo Scientific、Ikemoto Scientific Technology、Juji Field Inc. 和 Wakenyaku Co., Ltd. 制造的用于低氧培养的 CO_2 培养箱)。

[0086] 在低氧条件下开始细胞培养的时机选择并无具体限制,只要与在正常氧浓度(20%)下所获得的比较,它不干扰改善 iPS 细胞建立效率。起始时间可以在核重编程物质与体细胞接触之前或之后,并且可以在接触的同时。例如,优选在低氧条件下的细胞培养紧接在使核重编程物质与体细胞接触后开始,或在接触后的给定时间后(例如,1-10(例如,2、3、4、5、6、7、8 或 9)天)开始。

[0087] 在低氧条件下的细胞培养持续时间并无具体限制,只要与在正常氧浓度(20%)下所获得的比较,它不干扰改善 iPS 细胞建立效率;例子包括但不限于,3 天或更多、5 天或更多、7 天或更多或 10 天或更多至 50 天或更少、40 天或更少、35 天或更少或 30 天或更少。在低氧条件下的细胞培养的优选持续时间还依赖环境大气中的氧浓度而变;适当时,本领域技术人员可以根据所使用的氧浓度来调整细胞培养持续时间。例如,通过使在低氧条件下与在正常氧浓度下重编程细胞中的 ES 细胞特异性基因表达比较来决定优选持续时间。在本发明的一个实施方案中,当用药物抗性作为指示物选择 iPS 细胞候选集落时,优选到药物选择开始时从低氧条件恢复正常氧浓度。

[0088] 此外,优选的起始时间和在低氧条件下的细胞培养持续时间还依赖所使用核重编程物质的选择、在涉及正常氧浓度的条件下的 iPS 细胞建立效率和其他因素而变。例如,当 3 种因子 Oct3/4、Klf4 和 Sox2 被引入人体细胞内时,优选在与核重编程物质接触后相对较早开始(例如,在 0-3(例如,1、2)天后),细胞在低氧条件下培养 3-10(例如,4、5、6、7、8、9)天。

[0089] (b) 体细胞来源

[0090] 哺乳动物起源(例如小鼠、人)的任何细胞但除生殖细胞外都可以用作原材料用于在本发明中产生 iPS 细胞。例子包括角质化上皮细胞(例如,角质化的表皮细胞)、粘膜上皮细胞(例如,舌浅层的上皮细胞)、外分泌腺上皮细胞(例如,乳腺细胞)、激素分泌细胞(例如,肾上腺髓质细胞)、用于代谢或贮藏的细胞(例如,肝细胞)、构成界面的内膜上皮细胞(例如,I 型肺泡细胞)、闭膜管的内膜上皮细胞(例如,血管内皮细胞)、含具有运输能力的纤毛的细胞(例如,气道上皮细胞)、用于细胞外基质分泌的细胞(例如,成纤维细胞)、收缩细胞(例如,平滑肌细胞)、血液和免疫系统细胞(例如,T 淋巴细胞)、感觉相关细胞(例如,杆状细胞)、自主神经系统神经元(例如,胆碱能神经元)、感觉器官和外周神经元的支持细胞(例如,卫星细胞)、中枢神经系统的神经细胞和神经胶质细胞(例如,星形胶质细胞)、色素细胞(例如,视网膜色素上皮细胞)、其祖细胞(组织祖细胞)等。关于细胞分化程度并无限制;即使未分化的祖细胞(包括体干细胞)和终末分化的成熟细胞也同样可以在本发明中作为体细胞来源。未分化的祖细胞的例子包括组织干细胞(体干细胞)例如神经干细胞、造血干细胞、间质干细胞和骨髓干细胞。

[0091] 作为体细胞来源的哺乳动物选择并无具体限制;然而,当获得的 iPS 细胞将用于在人中的再生医学时,从预防移植物排斥的观点来看,特别优选的是体细胞是患者自己的细胞或从与患者具有相同或基本上相同的 HLA 类型的其他人(供体)收集。如本文所使用的,“基本上相同的 HLA 类型”表示供体的 HLA 类型与患者的 HLA 类型匹配,其程度达到当它们借助于免疫抑制剂等移植给患者时,可以移入已通过诱导得自供体的体细胞的 iPS 细胞分化获得的移植细胞。例如,基本上相同的 HLA 类型包括这样的 HLA 类型,其中 3 种主要的 HLAHLA-A、HLA-B 和 HLA-DR 与受体相同(在下文中将应用相同含义)。当获得的 iPS 细胞

并非施用于（移植给）人，而是用作例如用于筛选用于评估患者的药物敏感性或不良反应的细胞来源时，可能必须收集来自患者或具有相同的与药物敏感性或不良反应相关遗传多态性的其他人的体细胞，。

[0092] (c) 核重编程物质

[0093] 在本发明中，“核重编程物质”指能够由体细胞诱导 iPS 细胞的任何一种或多种物质，其可以由任何物质例如蛋白质性质因子或编码它们的核酸（包括掺入载体中的形式）或低分子化合物组成。当核重编程物质是蛋白质性质因子或编码其的核酸时，例如下述组合是优选的（在下文中，仅显示关于蛋白质性质因子的名称）。

[0094] (1) Oct3/4、Klf4、c-Myc

[0095] (2) Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2 (Sox2 可由 Sox1、Sox3、Sox15、Sox17 或 Sox18 代替；Klf4 可由 Klf1、Klf2 或 Klf5 代替；c-Myc 可由 T58A（活性突变体）、N-Myc 或 L-Myc 代替）

[0096] (3) Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2、Fbx15、Nanog、Eras、ECAT15-2、Tcl1、 β -连环蛋白（活性突变体 S33Y）

[0097] (4) Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2、TERT、SV40 大 T

[0098] (5) Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2、TERT、HPV16E6

[0099] (6) Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2、TERT、HPV16E7

[0100] (7) Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2、TERT、HPV6E6、HPV16E7

[0101] (8) Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2、TERT、Bmi1

[0102] [关于上述显示因子的更多信息，参见 WO 2007/069666（关于在上述组合（2）中用 Sox18 代替 Sox2 和用 Klf1 或 Klf5 代替 Klf4 的信息，参见 Nature Biotechnology, 26, 101-106 (2008)）；关于组合“Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2”，还参见 Cell, 126, 663-676 (2006), Cell, 131, 861-872 (2007) 等，关于组合“Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2、hTERT、SV40 大 T”，还参见 Nature, 451, 141-146 (2008).]

[0103] (9) Oct3/4、Klf4、Sox2 [参见 Nature Biotechnology, 26, 101-106 (2008)]

[0104] (10) Oct3/4、Sox2、Nanog、Lin28 [参见 Science, 318, 1917-1920 (2007)]

[0105] (11) Oct3/4、Sox2、Nanog、Lin28、hTERT、SV40 大 T（参见 Stem Cells, 26, 1998-2005 (2008)）

[0106] (12) Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2、Nanog、Lin28 [参见 Cell Research (2008) 600-603]

[0107] (13) Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2、SV40 大 T（还参见 Stem Cells, 26, 1998-2005 (2008)）

[0108] (14) Oct3/4、Klf4 [还参见 Nature, 454, 646-650 (2008) ; Cell Stem Cell, 2 : 525-528 (2008)]

[0109] (15) Oct3/4、c-Myc [参见 Nature, 454, 646-650 (2008)]

[0110] (16) Oct3/4、Sox2 [参见 Nature, 451, 141-146 (2008)、W02008/118820]

[0111] (17) Oct3/4、Sox2、Nanog（参见 W02008/118820）

[0112] (18) Oct3/4、Sox2、Lin28（参见 W02008/118820）

[0113] (19) Oct3/4、Sox2、c-Myc、Esrrb（此处，Esrrb 可由 Esrrg 代替；参见 Nat. Cell Biol., 11, 197-203 (2009)）

[0114] (20) Oct3/4、Sox2、Esrrb(参见 Nat. Cell Biol., 11, 197-203 (2009))

[0115] (21) Oct3/4、Klf4、L-Myc

[0116] (22) Oct3/4、Nanog

[0117] (23) Oct3/4

[0118] (24) Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2、Nanog、Lin28、SV40LT(参见 Science, 324: 797-801 (2009))

[0119] 在上述 (1)-(24) 中, 代替 Oct3/4, 还可以使用 Oct 家族的其他成员, 例如, Oct1A、Oct6 等。代替 Sox2(或 Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Sox18), 还可以使用 Sox 家族的其他成员, 例如, Sox7 等。代替 c-Myc, 还可以使用 Myc 家族的其他成员, 例如, L-Myc 等。代替 Lin28, 还可以使用 Lin 家族的其他成员, 例如, Lin28b 等。

[0120] 未落入上述 (1)-(24) 中, 但包含上述 (1)-(24) 中任一项的所有组成成分, 并且进一步包含任选选择的其他物质的任何组合也可以包括在本发明中的“核重编程物质”范围中。前提是经历核重编程的体细胞以足以引起核重编程的水平内源表达上述 (1)-(24) 中任一项的一种或多种组成成分, 除去一种或多种组成成分仅其余组成成分的组合也可以包括在本发明中的“核重编程物质”范围中。

[0121] 在这些组合中, 作为优选核重编程物质的例子, 可以提及选自 Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanog、Lin28 和 SV40 大 T 的至少一种、优选 2 种或更多、更优选 3 种或更多。

[0122] 如果获得的 iPS 细胞将用于治疗目的, 则优选使用 3 种因子 Oct3/4、Sox2 和 Klf4[上述的组合 (9)]。如果获得的 iPS 细胞并非用于治疗目的(例如, 用作研究工具用于药物开发筛选等), 那么 5 种因子 Oct3/4、Klf4、c-Myc、Sox2 和 Lin28, 或由 5 种因子和 Nanog 组成的 6 种因子[上述的组合 (12)] 是优选的。在这些优选组合中, 也可以代替 c-Myc 使用 L-Myc。

[0123] 参考 WO 2007/069666(在该出版物中, Nanog 描述为 ECAT4) 中提及的 NCBI 登记号可获得关于上述蛋白质性质因子的小鼠和人 cDNA 序列的信息。关于 Lin28、Lin28b、Esrrb 和 Esrrgd 的小鼠和人 cDNA 序列信息可以分别通过提及下述 NCBI 登记号获得); 本领域技术人员能够容易地分离这些 cDNA。

[0124]	基因名称	小鼠	人
[0125]	Lin28	NM_145833	NM_024674
[0126]	Lin28b	NM_001031772	NM_001004317
[0127]	Esrrb	NM_011934	NM_004452
[0128]	Esrrg	NM_011935	NM_001438

[0129] 用于用作核重编程物质的蛋白质性质因子可以通过下列制备: 将获得的 cDNA 插入合适的表达载体内, 将载体引入宿主细胞内, 并且从培养细胞或其条件培养基中回收重组蛋白质性质因子。同时, 当所使用的核重编程物质是编码蛋白质性质因子的核酸时, 将获得的 cDNA 插入病毒或质粒载体内, 以构建表达载体, 并且对载体实施核重编程步骤。

[0130] 当物质是蛋白质性质因子时, 核重编程物质与体细胞的接触可以使用本身已知的用于将蛋白质转移到细胞内的方法来达到。此种方法包括例如, 使用蛋白质转移试剂的方法, 使用蛋白质转移结构域 (PTD)- 或细胞穿透肽 (CPP)- 融合蛋白的方法, 显微注射法等。蛋白质转移试剂是商购可得的, 包括基于阳离子脂质的那些, 例如 BioPOTERProtein

Delivery Reagent(Genlantis)、Pro-Ject™Protein Transfection Reagent(PIERCE)、PULSin™ 递送试剂 (Polyplus- 转染) 和 ProVectin(IMGEX); 基于脂质的那些, 例如 Profect-1(Targeting Systems); 基于可透过膜的肽的那些, 例如 Penetrain Peptide(Q biogene) 和 Chariot Kit(Active Motif) 等。转移可以根据这些试剂所附的方案——如下所述的通用操作来达到。在合适溶剂(例如, 缓冲溶液例如 PBS 或 HEPES) 中稀释一种或多种核重编程物质, 加入转移试剂, 使混合物在室温下温育 5-15 分钟, 以形成复合物, 在将培养基更换成无血清培养基后, 将这种复合物加入细胞中, 并且在 37°C 下温育细胞 1 至数小时。其后, 去除培养基, 并且替换成含血清培养基。使用蛋白质转移试剂的具体方法公开于 2009/073523 或 WO 2009/032456 中。

[0131] 开发的 PTD 包括使用蛋白质的跨细胞结构域的那些, 例如果蝇衍生的 AntP、HIV 衍生的 TAT(Frankel, A. 等人, Cell 55, 1189-93(1988) 或 Green, M. & Loewenstein, P. M. Cell 55, 1179-88(1988))、穿膜肽 (Penetratin)(Derossi, D. 等人, J. Biol. Chem. 269, 10444-50(1994))、Buforin II(Park, C. B. 等人 Proc. Natl Acad. Sci. USA 97, 8245-50(2000))、Transportan(Pooga, M. 等人 FASEB J. 12, 67-77(1998))、MAP(模型兼性肽)(Oehlke, J. 等人 Biochim. Biophys. Acta. 1414, 127-39(1998))、K-FGF(Lin, Y. Z. 等人 J. Biol. Chem. 270, 14255-14258(1995))、Ku70(Sawada, M. 等人 Nature Cell Biol. 5, 352-7(2003))、朊病毒(Lundberg, P. 等人 Biochem. Biophys. Res. Commun. 299, 85-90(2002))、pVEC(Elmqvist, A. 等人 Exp. Cell Res. 269, 237-44(2001))、Pep-1(Morris, M. C. 等人 Nature Biotechnol. 19, 1173-6(2001))、Pep-7(Gao, C. 等人 Bioorg. Med. Chem. 10, 4057-65(2002))、SynBl(Rousselle, C. 等人 Mol. Pharmacol. 57, 679-86(2000))、HN-I(Hong, F. D. & Clayman, G. L. Cancer Res. 60, 6551-6(2000))、和 HSV 衍生的 VP22。得自 PTDs 的 CPPs 包括聚精氨酸例如 11R(Cell Stem Cell, 4, 381-384(2009)) 和 9R(Cell Stem Cell, 4, 472-476(2009))。制备掺入核重编程物质的 cDNA 和 PTD 或 CPP 序列的融合蛋白表达载体, 以允许融合蛋白的重组表达, 并且回收融合蛋白用于在转移中使用。这种转移可以如上所述达到, 除不添加蛋白质转移试剂外。使用 CPP 的具体方法公开于 Cell Stem Cell, 4: 472-6(2009) 或 Cell Stem Cell, 4: 381-4(2009) 中。

[0132] 显微注射(在具有约 1 μm 的尖端直径的玻璃针中放置蛋白质溶液并且将溶液注射到细胞内的方法)确保将蛋白质转移到细胞内。

[0133] 核重编程基因的持续过表达增加了癌发生的风险; 然而, 因为蛋白质性质的重编程因子在转染的细胞中经历由蛋白酶的降解并且逐渐消失, 所以蛋白质性质因子的使用在其中需要高安全性的情况下可以是合适的, 如在其中获得的 iPS 细胞用于治疗目的的情况下。

[0134] 然而, 考虑到易于转移到体细胞内, 核重编程物质还可以优选以编码蛋白质性质因子的核酸, 而不是实际因子的形式使用。核酸可以是 DNA 或 RNA、或 DNA/RNA 嵌合体, 并且可以是双链或单链的。优选地, 核酸是双链 DNA, 特别是 cDNA。

[0135] 将核重编程物质的 cDNA 插入合适的表达载体内, 所述表达载体包含能够在宿主体细胞中起作用的启动子。可以使用的表达载体包括例如病毒载体, 例如逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺伴随病毒、疱疹病毒和仙台病毒, 用于在动物细胞中表达的质粒(例如, pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、pcDNA1/Neo) 等。适当时, 可以根据获得的 iPS 细胞的预

期用途进行选择所使用的一类载体。

[0136] 在表达载体中所使用的启动子的例子包括 EF- α 启动子、CAG 启动子、SR α 启动子、SV40 启动子、LTR 启动子、CMV (巨细胞病毒) 启动子、RSV (劳斯 (Rous) 肉瘤病毒) 启动子、MoMuLV (莫洛尼 (Moloney) 小鼠白血病病毒) LTR、HSV-TK (单纯疱疹病毒胸苷激酶) 启动子等, 优先考虑 EF- α 启动子、CAG 启动子、MoMuLV LTR、CMV 启动子、SR α 启动子等。

[0137] 需要时, 除启动子外, 表达载体还可以包含增强子、多腺苷酸化信号、可选标记基因、SV40 复制起点等。可以使用的可选标记基因的例子包括二氢叶酸还原酶基因、新霉素抗性基因、嘌呤霉素抗性基因等。

[0138] 当 2 种或更多核酸被引入细胞内作为核重编程物质时, 核酸可以由分别的载体携带, 并且多个核酸可以串联连接, 以获得多顺反子载体。在后面的情况下, 为了实现有效的多顺反子表达, 希望口蹄疫病毒的 2A 自身切割肽 (参见 Science, 322, 949-953, 2008 等)、IRES 序列等, 优选 2A 序列连接在各个核酸之间。

[0139] 具有核酸作为核重编程物质的表达载体可以通过本身已知的技术根据选择的载体引入细胞内。在病毒载体的情况下, 例如将包含核酸的质粒引入合适的包装细胞 (例如, Plat-E 细胞) 或互补细胞系 (例如, 293 细胞) 内, 回收在培养上清液中产生的病毒载体, 并且通过适合于病毒载体的方法使细胞感染载体。例如, 使用逆转录病毒载体的具体方法公开于 W02007/69666、Cell, 126, 663-676 (2006) 和 Cell, 131, 861-872 (2007) 中。使用慢病毒载体的具体方法公开于 Science, 318, 1917-1920 (2007) 中。使用腺病毒载体的具体方法公开于 Science, 322, 945-949 (2008) 中。

[0140] 如上所述, 当 iPS 细胞用于治疗目的时, 核重编程基因的持续过表达潜在增加了在由 iPS 细胞分化的组织和器官中的癌发生风险; 因此, 作为核重编程物质的核酸优选瞬时表达, 而不整合到细胞的染色体内。根据这个观点, 优选使用罕见其整合到染色体内的腺病毒载体。使用腺病毒载体的具体方法公开于 Science, 322, 945-949 (2008) 中。因为腺伴随病毒载体整合到染色体内的频率也很低, 并且就细胞毒性和炎症诱导性而言低于腺病毒载体, 所以它可以作为另一种优选载体提及。因为仙台病毒载体能够稳定存在于染色体外, 并且需要时可以使用 siRNA 进行降解且去除, 所以它也是优选利用的。关于仙台病毒载体, 可以使用 J. Biol. Chem., 282, 27383-27391 (2007) 和 JP-3602058B 中描述的那种。

[0141] 当使用逆转录病毒载体或慢病毒载体时, 即使转基因的沉默已发生, 它也可以变得再活化; 因此, 例如, 优选可以使用其中作为核重编程物质的核酸当变得不需要时使用 Cre-loxP 系统切掉的方法。即, 用预先排列在核酸的 2 个末端处的 loxP 序列, 诱导 iPS 细胞, 其后使用质粒载体或腺病毒载体允许 Cre 重组酶作用于细胞, 并且可以切掉由 loxP 序列夹在中间的区域。因为 LTR U3 区域的增强子-启动子序列可能通过插入突变上调在其附近的宿主基因, 所以更优选避免内源基因通过保留在基因组中的未切掉 loxP 序列外的 LTR 的表达调节, 使用通过如下制备的 3' 自身灭活的 (SIN) LTR: 缺失序列, 或用例如 SV40 的多腺苷酸化序列置换序列。使用 Cre-loxP 系统和 SIN LTR 的具体方法公开于 Chang 等人, Stem Cells, 27:1042-1049 (2009) 中。

[0142] 同时, 作为非病毒载体, 可以使用脂转染法、脂质体法、电穿孔法、磷酸钙共沉淀法、DEAE 葡聚糖法、显微注射法、基因枪法等将质粒载体转移到细胞内。此外, 当使用质粒载体时, 它整合到染色体内是罕见的, 转基因通过细胞中的 DNA 酶得到降解且去除; 因此,

当 iPS 细胞用于治疗目的时,质粒载体的使用可以是另一种优选的实施方案的模式。使用质粒作为载体的具体方法在例如 Science,322,949-953(2008) 等中描述。

[0143] 另一种优选的非整合型载体是附加型载体,它可在染色体外自主复制。使用附加型载体的具体方法公开于 Science,324,797-801(2009) 中。

[0144] 此外,当使用腺病毒或质粒时,转基因可以被整合到染色体内;因此,最终需要通过 Southern 印迹或 PCR 证实不存在基因插入染色体内。为此,如同上述 Cre-loxP 系统,使用其中转基因整合到染色体内其后去除基因的方法可以是有利的。在另一种优选的实施方案的模式中,可以使用一种方法,其中转基因使用转座子被整合到染色体内,其后使用质粒载体或腺病毒载体允许转座酶作用于细胞,以便从染色体中完全消除转基因。作为优选转座子的例子,可以提及 piggyBac,得自鳞翅目昆虫的转座子等。使用 piggyBac 转座子的具体方法公开于 Kaji, K. 等人, Nature,458:771-775(2009)、Woltjen 等人, Nature, 458:766-770(2009) 中。在另一个实施方案中,在启动子区中的四环素应答元件 (Tet-OnR & Tet-Off R Gene Expression Systems, Clontech) 可以用于切除转基因。

[0145] 将腺病毒或非病毒表达载体引入体细胞内的操作重复次数并无具体限制,转染可以执行一次或更多任选选择的次数(例如,1-10 次、1-5 次等)。当 2 个或更多种类的腺病毒或非病毒表达载体被引入体细胞内时,所有这些种类的腺病毒或非病毒表达载体被同时引入体细胞内是优选的;然而,即使在这种情况下,转染也可以执行一次或更多任选选择的次数(例如,1-10 次、1-5 次等),优选地转染可以重复执行 2 次或更多次(例如,3 次或 4 次)。

[0146] 当核重编程物质是低分子化合物时,它与体细胞的接触可以这样达到:将所述物质以合适的浓度溶解于含水或非含水溶剂中,将溶液加入适合于培养从哺乳动物例如人或小鼠中分离的体细胞的培养基中[例如,包含约 5-20% 胎牛血清的最小必需培养基 (MEM)、达尔贝科改良伊格尔培养基 (DMEM)、RPMI1640 培养基、199 培养基、F12 培养基及其组合等],从而使得核重编程物质浓度将落入到足以引起体细胞中的核重编程并且不引起细胞毒性的范围中,并且培养细胞给定的时间段。核重编程物质浓度依赖所使用的核重编程物质种类而变,并且适当时选择为在约 0.1nM- 约 100nM 的范围内。接触的持续时间并无具体限制,只要它足以引起细胞的核重编程;通常,可以允许核重编程物质在培养基中共存直至出现阳性集落。

[0147] (d) iPS 细胞建立效率改进剂

[0148] 近年来,改善通常很低的 iPS 细胞建立效率的各种物质已相继提出。当与体细胞连同上述核重编程物质一起接触时,这些建立效率改进剂预期进一步提高 iPS 细胞建立效率。

[0149] iPS 细胞建立效率改进剂的例子包括但不限于,组蛋白脱乙酰基酶 (HDAC) 抑制剂[例如,丙戊酸 (VPA) (Nat. Biotechnol., 26(7):795-797(2008)],低分子抑制剂例如曲古抑菌素 A、丁酸钠、MC 1293 和 M344,基于核酸的表达抑制剂例如针对 HDAC 的 siRNA 和 shRNA(例如,HDAC1 siRNA Smartpool® (Millipore)、针对 HDAC1 的 HuSH29 聚体 shRNA 构建体 (OriGene) 等),等]、DNA 甲基转移酶抑制剂(例如,5' - 氮杂胞苷) [Nat. Biotechnol., 26(7):795-797(2008)],G9a 组蛋白甲基转移酶抑制剂[例如,低分子抑制剂例如 BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2:525-528(2008)],基于核酸的表达抑制剂例

如针对 G9a 的 siRNA 和 shRNA [例如, G9a siRNA (人) (Santa Cruz Biotechnology) 等], L-通道钙激动剂 (例如, Bayk8644) [Cell Stem Cell, 3, 568-574 (2008)], p53 抑制剂 [例如, 针对 p53 的 siRNA 和 shRNA (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、UTF1 [Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008)], Wnt 信号诱导物 (例如, 可溶性 Wnt3a) [Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008)], 2i/LIF [2i 是丝裂原活化蛋白激酶信号和糖原合酶激酶-3 的抑制剂, PloS Biology, 6 (10), 2237-2247 (2008)] 等。如上所述, 基于核酸的表达抑制剂可以为具有编码 siRNA 或 shRNA 的 DNA 的表达载体形式。

[0150] 在上述核重编程物质的组成成分中, 例如 SV40 大 T 等也可以包括在 iPS 细胞建立效率改进剂的范围中, 因为它们被视为体细胞核重编程的非必需的但是辅助的因子。在关于核重编程的机制仍不明的情况下, 并非核重编程必需的辅助因子可以方便地被视为核重编程物质或 iPS 细胞建立效率改进剂。因此, 因为体细胞核重编程过程被理解为起因于一种或多种核重编程物质和一种或多种 iPS 细胞建立效率改进剂与体细胞接触的总事件, 所以似乎本领域技术人员无需总是区分重编程物质和 iPS 细胞建立效率改进剂。

[0151] 如上所述对于下列 3 种情况的每一种都可以达到 iPS 细胞建立效率改进剂与体细胞的接触: (a) 改进剂是蛋白质性质因子, (b) 改进剂是编码蛋白质性质因子的核酸, 和 (c) 改进剂是低分子化合物。

[0152] iPS 细胞建立效率改进剂可以和核重编程物质同时与体细胞接触, 或任何一种可以预先接触, 只要与不存在改进剂的情况下比较, iPS 细胞由体细胞的建立效率得到显著改善。在一个实施方案中, 例如, 当核重编程物质是编码蛋白质性质因子的核酸和 iPS 细胞建立效率改进剂是化学抑制剂时, iPS 细胞建立效率改进剂可以在基因转移处理后细胞培养给定时间长度后被加入培养基中, 因为核重编程物质涉及从基因转移处理到蛋白质性质因子的大量表达的给定延时长度, 而 iPS 细胞建立效率改进剂能够快速作用于细胞。在另一个实施方案中, 当核重编程物质和 iPS 细胞建立效率改进剂都以病毒或非病毒载体形式使用时, 例如, 2 种可以被同时引入细胞内。

[0153] 从哺乳动物例如小鼠或人中分离的体细胞可以使用本身已知适合于其培养的培养基进行预培养, 这依赖于细胞的种类。此种培养基的例子包括但不限于包含约 5-20% 胎牛血清的最小必需培养基 (MEM)、达尔贝科改良伊格尔培养基 (DMEM)、RPMI 1640 培养基、199 培养基、F12 培养基及其组合等。可获得通过在 5% 或更少的低血清浓度下进行预培养, 改善 iPS 细胞建立效率的报告 (例如, WO2009/006997)。当在使细胞与一种或多种核重编程物质和一种或多种 iPS 细胞建立效率改进剂的接触中使用例如转染试剂, 例如阳离子脂质体时, 有时优选先用无血清培养基替换培养基, 以防止转染效率中的减少。在一种或多种核重编程物质 (和一种或多种 iPS 细胞建立效率改进剂) 与细胞接触后, 可以在适合于培养例如 ES 细胞的条件下培养细胞。在小鼠细胞的情况下, 通过向普通培养基中添加作为分化抑制剂的白血病抑制因子 (LIF) 进行培养。同时, 在人细胞的情况下, 希望加入碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 和 / 或干细胞因子 (SCF) 代替 LIF。通常, 在作为饲养细胞的小鼠胚胎衍生的成纤维细胞 (MEF) 的共存在下培养细胞, 所述 MEF 用辐射或抗生素处理, 以终止其细胞分裂。通常, STO 细胞等通常用作 MEF, 但对于诱导 iPS 细胞, 通常使用 SNL 细胞 [McMahon, A. P. & Bradley, A. Cell 62, 1073-1085 (1990)] 等。与饲养细胞的共培养可以在核重编程物质接触前、接触时或接触后 (例如, 10 天后) 开始。

[0154] iPS 细胞的候选集落可以通过用药物抗性和报道物活性作为指示剂的方法,以及通过基于形态目测的方法进行选择。作为前者的例子,使用重组体细胞选择对于药物抗性和 / 或报道物活性阳性的集落,在所述重组体细胞中药物抗性基因和 / 或报道基因靶向在多能细胞中高度特异性表达的基因的基因座(例如, Fbx15、Nanog、Oct3/4 等,优选 Nanog 或 Oct3/4)。此种重组体细胞的例子包括来自具有敲入 Fbx15 基因座中的 β geo(其编码 β -半乳糖苷酶和新霉素磷酸转移酶的融合蛋白)基因的小鼠的 MEF[Takahashi & Yamanaka, Cell, 126, 663-676 (2006)]、来自具有整合在 Nanog 基因座中的绿色荧光蛋白 (GFP) 基因和嘌呤霉素抗性基因的转基因小鼠的 MEF[Okita 等人, Nature, 448, 313-317 (2007)] 等。同时,基于形态目测的后面一种方法的例子包括由 Takahashi 等人在 Cell, 131, 861-872 (2007) 中描述的方法。尽管使用报道细胞的该方法是方便和有效的,但从安全性的观点来看,当 iPS 细胞制备用于人治疗目的时,希望通过目测选择集落。当 3 种因子 Oct3/4、Klf4 和 Sox2 用作核重编程物质时,建立的集落数目减少,但所得到的集落大多数是与 ES 细胞相当的高质量的 iPS 细胞,从而使得甚至无需使用报道细胞也可以有效建立 iPS 细胞。

[0155] 选择的集落细胞作为 iPS 细胞的同一性可以这样加以证实:通过对 Nanog(或 Oct3/4、Fbx15) 报道物 (GFP 阳性、 β -半乳糖苷酶阳性等) 的阳性应答和对选择标记(嘌呤霉素抗性、G418 抗性等) 的阳性应答,以及通过可见 ES 细胞样集落的形成,如上所述。然而,为了确保更高的准确度,可以执行诸如分析各种 ES 细胞特异性基因的表达且将选择的细胞移植给小鼠且证实畸胎瘤形成的测试。

[0156] 因此建立的 iPS 细胞可以用于各种目的。例如,通过利用用于 ES 细胞的分化诱导的报道方法,可以诱导 iPS 细胞分化成各种细胞(例如,心肌细胞、血细胞、神经细胞、血管内皮细胞、胰岛素分泌细胞等)。因此,使用从患者收集的体细胞诱导 iPS 细胞将使得基于自体移植的干细胞治疗成为可能,其中 iPS 细胞分化成所需细胞(患者的受影响器官的细胞、对疾病具有疗效的细胞等),并且将分化细胞移植给患者。不是从患者而是从具有与患者具有相同或基本上相同的 HLA 类型的其他人收集的体细胞可以用于诱导 iPS 细胞,这分化成所需细胞用于在给患者的移植中使用。此外,因为由 iPS 细胞分化的功能细胞(例如,肝细胞)被认为比相应的现有细胞系更好地反映功能细胞在体内的实际状态,所以它们还可以适合于用于就药物候选化合物的有效性和毒性的体外筛选等。

[0157] 本发明在下文借助于下述实施例进一步详细描述,然而,本发明决不限制于所述实施例。

实施例

[0158] 实施例 1:低氧培养法对 iPS 细胞建立的作用 (1)

[0159] 具有 Nanog 报道物的小鼠用作实验系统。通过将增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 和嘌呤霉素抗性基因插入购自 BACPAC Resources 的 BAC(细菌人工染色体) 的 Nanog 基因座内制备所使用的 Nanog 报道物 [Okita K. 等人, Nature 448, 313-317 (2007)]。小鼠 Nanog 基因在多能细胞例如 ES 细胞和早期胚胎中特异性表达。已变得对这种报道物阳性的小鼠 iPS 细胞已知就分化潜能而言几乎等价于 ES 细胞。对得自具有这种 Nanog 报道物的 Nanog 报道小鼠的小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 和尾尖成纤维细胞 (TTF) 借助于逆转录病毒进行转

染,以建立 iPS 细胞,并且计算表达来自 Nanog 报道物的 EGFP 的集落,以评估 iPS 细胞建立效率。

[0160] 通过将每种逆转录病毒表达载体 [pMXs-Oct3/4、pMXs-Sox2、pMXs-Klf4、pMXs-cMyc ;Cell,126,663-676(2006)] 引入在前一天以 2×10^6 细胞 /100mm 培养皿 (Falcon) 接种的 Plat-E 细胞 (Morita,S. 等人,Gene Ther. 7,1063-1066) 内,制备用于重编程的逆转录病毒。所使用的培养基是 DMEM/10% FCS [补充有 10% 胎牛血清的 DMEM (Nacalai Tesque)],并且细胞在 5% CO₂ 的存在下于 37℃ 进行培养。对于载体引入,将 27 μ L FuGene6 转染试剂 (Roche) 置于 300 μ l Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (Invitrogen) 中,并且允许培养基在室温下静置 5 分钟。其后,加入 9 μ g 每种表达载体,并且允许培养基在室温下静置 15 分钟,并且随后加入 Plat-E 培养肉汤。在第 2 天时,用新鲜培养基替换 Plat-E 培养上清液。在第 3 天时,回收培养上清液并且过滤通过 0.45 μ m 无菌滤器 (Whatman),加入聚凝胺 (Nacalai Tesque) 以获得 4 μ g/mL 的浓度,并且将其用作病毒液体。

[0161] 从在 Nanog 报道小鼠受精后 13.5 天时的胎儿分离小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF),并且用培养基 (DMEM/10% FCS) 进行培养。所使用的尾尖成纤维细胞 (TTF) 是如下获得的:将 Nanog 报道小鼠的尾尖切碎,将组织小片静置在明胶包被的 6 孔皿上,将它们在原代培养细胞起始培养基 (Toyobo Life Science Department) 中培养 5 天,并且用 DMEM/10% FCS 培养基进一步培养从尾尖组织移动到皿上的成纤维细胞。

[0162] 不表达 Nanog 基因,则 MEF 和 TTF 不表达 EGFP,并且不发出绿色荧光。不表达嘌呤霉素抗性基因,则 MEF 和 TTF 对抗生素嘌呤霉素敏感。像这样,将 MEF 和 TTF 以 1×10^5 细胞 / 孔接种至用 0.1% 明胶 (Sigma) 包被的 6 孔培养板 (Falcon)。所使用的培养基是 DMEM/10% FCS,并且细胞在 37℃ 和 5% CO₂ 下进行培养。第二天,加入每种逆转录病毒液体以通过过夜感染引入基因。

[0163] 在病毒感染后第 3 天开始,使用补充 LIF 的 ES 细胞培养基 [通过向 DMEM (Nacalai Tesque) 中加入 15% 胎牛血清、2mM L- 谷氨酰胺 (Invitrogen)、100 μ M 非必需氨基酸 (Invitrogen)、100 μ M 2- 巯基乙醇 (Invitrogen)、50U/mL 青霉素 (Invitrogen) 和 50mg/mL 链霉素 (Invitrogen) 制备] 培养细胞。在感染后第 4 天时,回收 MEF 和 TTF 的培养基,并且通过加入 1mL PBS 洗涤细胞。在去除 PBS 后,加入 0.25% 胰蛋白酶 /1mM EDTA (Invitrogen),并且允许反应在 37℃ 下进行约 5 分钟。细胞浮起后,通过加入 ES 细胞培养基使它们悬浮;将 1×10^4 MEF 细胞 (当引入 4 种因子 Oct3/4、Sox2、Klf4 和 c-Myc 时) 或 1×10^5 MEF 细胞 (当引入 3 种因子 Oct3/4、Sox2 和 Klf4 时) 接种至具有先前接种在其上的饲养细胞的 100-mm 皿。对于 TTF 细胞,以相同方式接种 2×10^4 TTF 细胞 (当引入上述 4 种因子时)、 1×10^5 TTF 细胞 (当引入上述 3 种因子时)、或 1.5×10^5 TTF 细胞 (当引入 3 种因子 Oct3/4、Klf4 和 c-Myc 时)。所使用的饲养细胞是用丝裂霉素 C 处理以终止其细胞分裂的 SNL 细胞 [McMahon, A. P. & Bradley, A. Cell 62,1073-1085(1990)]。随后,每 2 天用新鲜供应更换 ES 细胞培养基,直至集落变得可被观察到。

[0164] 在感染后第 5 至 14 天之间,在设为正常氧浓度 (20%) 或低氧浓度 (5%、1%) 的培养箱 (Thermo Scientific) 中培养细胞。对于用 4 种因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc) 感染的细胞,用嘌呤霉素 (1.5 μ g/mL) 的选择在第 14 天时开始,并且对于用 3 种因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4 或 Oct3/4、Klf4、c-Myc) 感染的细胞在第 21 天时开始。对于 4 种因子

集落在约第 10 天时出现,并且对于 3 种因子在约第 20 天时出现,并且逐渐变得 GFP 阳性。

[0165] 在感染后第 21 和 28 天时,计数 GFP 阳性集落;在正常氧浓度(20%)下培养的细胞和在低氧浓度(5%、1%)下培养的那些之间进行比较。关于 MEF 的结果显示于表 1 中;关于 TTF 的结果显示于表 2 和 3 中。这些结果证实 iPS 细胞建立效率由于在低氧条件下的细胞培养而增加。特别地,当氧浓度为 5%时,获得良好结果(表 1-3)。在引入 3 种因子的情况下,发现不仅可以用 Oct3/4、Sox2 和 Klf4,还可以用 Oct3/4、Klf4 和 c-Myc 建立 iPS 细胞(表 2)。

[0166] 表 1

[0167]

c-Myc (mL)	Oct3/4 (mL)	Sox2 (mL)	Klf4 (mL)	模拟 (mL)	再接种 的细胞数目	氧浓度 (%)	感染后21天		感染后28天	
							puro ^r	GFP(+)	puro ^r	GFP(+)
0.5	0.5	0.5	0.5		1x10 ⁴	20.0	209	12	许多	94
					1x10 ⁴	5.0	1354	290	许多	423
					1x10 ⁴	1.0	171	64	许多	199
	0.5	0.5	0.5	0.5	1x10 ⁵	20.0	34	9	57	45
					1x10 ⁵	5.0	200	144	300	298
					1x10 ⁵	1.0	120	38	90	84
				2	1x10 ⁴	20.0	0	0	0	0
					1x10 ⁴	5.0	0	0	0	0
					1x10 ⁴	1.0	0	0	0	0

[0168] 表 2

[0169]

c-Myc (mL)	Oct3/4 (mL)	Sox2 (mL)	Klf4 (mL)	模拟 (mL)	再接种 的细胞数目	氧浓度 (%)	感染后21天			感染后28天		
							puro ^r	GFP(+)	puro ^r	GFP(+)	puro ^r	GFP(+)
0.5	0.5	0.5	0.5		2x10 ⁴	20.0	84	2	102	13		
					2x10 ⁴	5.0	140	19	210	38		
					2x10 ⁴	1.0	51	10	59	25		
					1x10 ⁵	20.0	0	0	0	0		
					1x10 ⁵	5.0	2	2	3	3		
					1.5x10 ⁵	20.0	许多	0	许多	0		
0.5	0.5		0.5	0.5	1.5x10 ⁵	5.0	许多	0	许多	4		
					2x10 ⁴	20.0	0	0	0	0		
					2x10 ⁴	5.0	0	0	0	0		
				2	2x10 ⁴	1.0	0	0	0	0		

[0170] 表 3

[0171]

c-Myc (mL)	Oct3/4 (mL)	Sox2 (mL)	Klf4 (mL)	模拟 (mL)	再接种 的细胞数目	氧浓度 (%)	感染后21天			感染后28天		
							puro ^r	GFP(+)		puro ^r	GFP(+)	
0.5	0.5	0.5	0.5		2x10 ⁴	20.0	646	75		许多	209	
					2x10 ⁴	5.0	566	261		许多	404	
					2x10 ⁴	1.0	464	142		许多	251	
0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1x10 ⁵	20.0	26	2		15	12	
					1x10 ⁵	5.0	64	29		52	51	
					1.5x10 ⁵	20.0	28	0		许多	0	
0.5	0.5		0.5	0.5	1.5x10 ⁵	5.0	84	0		许多	0	
					2x10 ⁴	20.0	0	0		0	0	
					2x10 ⁴	5.0	0	0		0	0	
				2	2x10 ⁴	1.0	0	0		0	0	

[0172] 总之,在5%氧下,与在正常氧浓度下的那些比较,得自4因子转导的MEF的GFP阳性集落在第21天时增加7.4倍,并且在第28天时增加3.1倍,并且相似地)来自3因子转导的MEF的那些在5%氧下在第21天时增加20倍,并且在第28天时增加7.6倍(图14a)、

b)、c) 和 d))。此外,低氧处理增加在来自 4 或 3 因子转导的 MEF 的总集落中的 GFP 阳性集落百分比(图 14e) 和 f))。在低氧处理后获得的 GFP 阳性集落在形态和大小方面与在正常氧浓度条件下获得的那些相当(图 16)。碱性磷酸酶染色显示在 5%氧下的培养增加具有阳性碱性磷酸酶活性的集落数目(图 17)。

[0173] 为了研究 GFP 阳性细胞是否较早检测出,从转导后第 5 天到第 9 天,在 20%氧下或在 5%氧下含或不含 2mM 丙戊酸(VPA) 培养 4 因子转导的 MEF,并且在第 9 天时实施流式细胞术分析。在转导后第 9 天时,4 种因子的逆转录病毒表达诱导 0.01%的细胞成为 GFP 阳性。用低氧或用 VPA 处理 4 因子转导的 MEF 4 天分别使 GFP 阳性细胞百分比增至 0.40%和 0.48%。此外,用低氧和 VPA 的共处理使 GFP 阳性细胞百分比增至 2.28%。这些数据暗示 GFP 阳性细胞可以较早被检测出,并且低氧培养与 VPA 具有协同作用(图 15a)、b)、c)、d) 和 e))。

[0174] 随后,使用成人表皮成纤维细胞(HDF) 检查低氧培养的作用。借助于逆转录病毒引入全都得自人的 4 种因子(OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC) 或 3 种因子(OCT3/4、SOX2、KLF4), 如 Cell, 131, 861-872(2007) 中所述。病毒感染后 6 天,回收细胞并且再接种到饲养细胞上。所使用的饲养细胞是用丝裂霉素 C 处理以终止其细胞分裂的 SNL 细胞 [McMahon, A. P. & Bradley, A. Cell 62, 1073-1085(1990)]。第二天,用通过将 4ng/ml 重组人 bFGF(WAKO) 加入灵长类动物 ES 细胞培养(ReproCELL) 中制备的培养基使细胞开始细胞培养。

[0175] 在感染后第 7 天和集落计数日(感染后第 24 和 32 天)之间,在设为正常氧浓度(20%) 或低氧浓度(5%、1%) 的培养箱中培养细胞。结果显示于表 4 中。当引入 4 种因子时,与正常氧浓度比较,iPS 细胞建立效率在 5%的氧浓度下升高。同时,当氧浓度为 1% 时或当引入 3 种因子时,在这个实验中检查的培养条件下未获得 iPS 细胞,这涉及细胞在低氧条件中的长期维持。这暗示用更极端的低氧条件,例如 1%的氧浓度,或利用 3 种因子的引入,这基本上产生比 4 种因子更低的 iPS 细胞建立效率,可能必须使在低氧条件下的细胞培养具有较短的持续时间。

[0176] 表 4

[0177]

c-Myc (mL)	Oct3/4 (mL)	Sox2 (mL)	Klf4 (mL)	模拟 (mL)	再接种 的细胞数目	氧浓度 (%)	感染后24天		感染后32天	
							所有集落	ES样细胞集落	所有集落	ES样细胞集落
1	1	1	1		1x10 ⁵	20.0	32	4	68	9
					1x10 ⁵	5.0	31	10	56	16
					1x10 ⁵	1.0	0	0	3	0
	1	1	1	1	4x10 ⁵	20.0	0	0	1	0
					4x10 ⁵	5.0	0	0	3	0
					1x10 ⁵	20.0	0	0	0	0
				4	1x10 ⁵	5.0	0	0	0	0
					1x10 ⁵	5.0	0	0	0	0
					1x10 ⁵	1.0	0	0	0	0

[0178] 实施例2:低氧培养法对 iPS 细胞建立的作用 (2)

[0179] 进行实验以测定低氧培养法对于仅引入2种基因 Oct3/4 和 Klf4 是否有效。实验使用来自与实施例1中相同的 Nanog 报道小鼠的 MEF。以与实施例1相同的方式,使 MEF 感

染逆转录病毒表达载体 (pMXs-Oct3/4、pMXs-Klf4)。在感染后第 4 天时,将 1×10^5 MEF 细胞接种至具有预先接种的饲养细胞的 100mm 皿。其后每 2 天,用新鲜供应替换 ES 细胞培养基。

[0180] 在感染后第 5 至 14 天之间,在设为正常氧浓度 (20%) 或低氧浓度 (5%) 的培养箱 (Thermo Scientific) 中培养细胞。无需药物选择继续培养,直至第 28 天计数 GFP 阳性集落时。结果显示于图 1 中。执行 4 次独立实验。当氧浓度为 20% 时,集落仅在 4 次实验之一中出现,而当氧浓度为 5% 时,集落在所有 4 次实验中都出现。如图 1 中所示,与 20% 氧浓度比较,GFP 阳性集落的数目对于在 5% 氧浓度下的细胞培养显著增加 (* $p < 0.05$);发现低氧培养在提高 iPS 细胞建立效率方面有效。

[0181] 执行进一步的实验以测定低氧培养法是否对于 2 种基因 Oct3/4 和 c-Myc 的转移也有效。以与上述用 Oct3/4 和 Klf4 描述相同的方式使用 Nanog-MEF 执行实验。在感染后第 5 至 14 天之间,在设为正常氧浓度 (20%) 和低氧浓度 (5%) 的培养箱 (Thermo Scientific) 中培养细胞。无需药物选择继续培养,直至第 42 天检查 GFP 阳性集落时。因此,当培养在正常氧浓度 (20%) 下进行,未出现 GFP 阳性集落,而当培养在低氧浓度 (5%) 下进行,集落出现 (图 2)。这些发现显示 iPS 细胞建立效率可以通过在低氧条件下培养起始细胞得到改善,即使引入 2 种基因 Oct3/4 和 c-Myc。

[0182] 实施例 3:在小鼠 iPS 细胞中关于未分化状态标记的表达

[0183] 使用 Rever Tra Ace 试剂盒 (Takara) 通过 RT-PCR 分析检查在实施例 1 和 2 中建立的 MEF 衍生的 iPS 细胞中关于未分化状态标记的表达。所使用的引物序列由 SEQ ID NO: 1-18 显示。RT-PCR 结果显示于图 3 中。通过在低氧浓度 (5%、1%) 下的细胞培养由引入 4 种基因 (Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Myc)、3 种基因 (Oct3/4、Klf4、Sox2) 或 2 种基因 (Oct3/4、Klf4) 建立的 iPS 细胞全都表达在 ES 细胞中特异性表达的基因,即 Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanog、Rex1 和 ECAT1,表达的量等价于在小鼠 ES 细胞 (RF8) 和过去用 4 种基因建立的 iPS 细胞 [20D17; Nature, 448, 313-317 (2007)] 中的那些。因为未观察到引入的 Oct3/4 基因 (Oct3/4(Tg)) 的表达,所以证实沉默发生。基于这些结果,在低氧条件下建立的细胞被鉴定为 iPS 细胞。

[0184] 实施例 4:建立的 iPS 细胞用于畸胎瘤形成的潜力

[0185] 在低氧浓度 (5%) 下用 Oct3/4 和 Klf4 建立的小鼠 iPS 细胞 (527CH5-2) 允许形成畸胎瘤,如 Cell, 126, 663-676 (2006) 中所述。具体地,将 1×10^6 iPS 细胞皮下注射到免疫缺陷小鼠内;4 周后,分离呈现的畸胎瘤 (图 4 中的上图)。将每个畸胎瘤切碎,并且在含 4% 甲醛的 PBS(-) 中固定。石蜡包膜的组织进行切片并且用苏木精-伊红进行染色。结果显示于图 4 中的下图中。在组织学上,肿瘤由多种细胞组成,其中观察到软骨组织、内胚层上皮组织、肌肉组织和角质化上皮组织。因此,证实了 iPS 细胞的多能性。

[0186] 实施例 5:嵌合小鼠的产生

[0187] 将在实施例 1 和 2 中在低氧浓度 (5%) 下由引入 2、3 或 4 种基因建立的 iPS 细胞显微注射到来自 ICR 小鼠的胚泡内。因此,产生成年嵌合体。结果显示于图 5 中。

[0188] 实施例 6:iPS 细胞系的核型

[0189] 在实施例 1 和 2 中在低氧处理后获得的 iPS 细胞系 (521AH5-1 和 527CH5-1) 的核型,并且这些细胞系显示正常核型 (图 18)。

[0190] 实施例 7 :低氧培养的持续时间对人 iPS 细胞建立的作用

[0191] 检查了在低氧条件 (5%) 下的细胞培养起始时间和持续时间对人 iPS 细胞建立效率的作用。所使用的体细胞是成人表皮成纤维细胞 (成人 HDF)。关于低氧培养的时间表显示于图 6 中。首先,如 Cell1,131,861-872(2007) 中所述,使用慢病毒允许 HDF 表达小鼠同向性病毒受体 Slc7a1 基因。借助于逆转录病毒将全都得自人的 4 种因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc) 或 3 种因子 (Oct3/4、Sox2、Klf4) 引入这些细胞 (8×10^5 细胞) 内,如 Cell1,131,861-872(2007) 中所述。病毒感染后 6 天,回收细胞并且再接种到饲养细胞上 (在引入 4 种基因的情况下, 1×10^5 细胞 /100mm 皿;在引入 3 种基因的情况下, 5×10^5 细胞 /100mm 皿)。所使用的饲养细胞是用丝裂霉素 C 处理以终止其细胞分裂的 SNL 细胞 [McMahon, A. P. & Bradley, A. Cell62,1073-1085(1990)]。第二天,使用通过将 4ng/ml 重组人 bFGF (WAKO) 加入灵长类动物 ES 细胞培养 (ReproCELL) 中制备的培养基开始细胞培养。

[0192] 细胞培养在 6 种条件下继续:(1) 在正常氧浓度 (20%) 下直至感染后第 40 天时,或在低氧浓度 (5%) 下从感染后第 7 天开始 1 周 (2)、1.5 周 (3)、2 周 (4)、或 3 周 (5),并且随后在正常氧浓度 (20%) 下直至感染后第 40 天时,和 (6) 在低氧浓度 (5%) 下在感染后第 7 到 40 天之间。还检查的是通过在低氧浓度 (5%) 下在感染后当天到再其接种到饲养细胞上之间预培养细胞,并且在上述的条件 (1) 至 (6) 中的任何下进一步培养它们获得的结果。计数到感染后第 24、32 和 40 天时出现的 iPS 细胞集落。这 3 种计数的结果一起显示于图 7 中。

[0193] 利用 4 种基因的引入,与正常氧浓度 (20%) 比较,当细胞在上述的低氧浓度条件 (2) 至 (6) 的任何下培养时,iPS 细胞建立效率较高。此外,即使利用在低氧浓度下的预培养,也观察到在增加 iPS 细胞建立效率中的作用。利用 4 种基因的引入在感染后第 40 天时获得的集落图像显示于图 8 中。

[0194] 利用 3 种基因的转移,与正常氧浓度比较,当在低氧浓度下执行预培养时建立更大数目的 iPS 细胞 (图 7)。

[0195] 利用 4 种基因 (Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Myc) 的引入,在上述的条件 (1)、(2)、(4)、(5) 和 (6) 下执行 3 次独立实验。结果一起显示于图 9 中。在所有情况下,与正常氧浓度 (20%) 比较,当培养在低氧浓度 (5%) 下进行,iPS 细胞建立效率提高。特别地,通过在低氧浓度下从感染后第 7 天开始 2 周或更久的细胞培养获得显著作用。

[0196] 实施例 8 :在人 iPS 细胞中关于未分化状态标记的表达

[0197] 使用 Rever Tra Ace 试剂盒 (Takara) 通过 RT-PCR 分析检查在实施例 7 中建立的成人 HDF 衍生的 iPS 细胞中关于未分化状态标记的表达。所使用的引物序列由 SEQ ID NO : 19-36 显示;RT-PCR 结果显示于图 10 中。通过在低氧浓度 (5%) 下的细胞培养由引入 4 种基因 (Oct3/4、Klf4、Sox2、c-Myc) 或 3 种基因 (Oct3/4、Klf4、Sox2) 建立的 iPS 细胞全都表达在 ES 细胞中特异性表达的基因,即 Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanog、Rex1、GDF3 和 ESG1,表达的量等价于过去用 4 种基因建立的 iPS 细胞 [201B2 :Cell1,131,861-872(2007)] 中的那些。基于这些结果,在低氧浓度下建立的细胞被鉴定为 iPS 细胞。

[0198] 此外,这些 iPS 细胞对于碱性磷酸酶都是强阳性的,并且免疫细胞化学染色显示所有 iPS 细胞都表达 Nanog、SSEA3 和 SSEA4 (图 11)。

[0199] 实施例 9 :体外分化诱导

[0200] 将人 iPS 细胞接种至低结合皿,并且如 Cell,131,861-872(2007) 中所述培养 8 天以形成胚状体 (EB) (100mm 皿),其中,通过引入 4 种基因 Oct3/4、Klf4、Sox2 和 c-Myc,并且在 5%氧浓度下在感染后第 7 天到第 40 天之间培养起始细胞建立所述人 iPS 细胞 (70AH5-2、70AH5-6)。培养 8 天后,使用抗体使胚状体染色,所述抗体针对内胚层细胞分化标记甲胎蛋白 (R&D systems),中胚层细胞分化标记平滑肌肌动蛋白 (DAKO)、结蛋白 (NeoMarkers) 和波形蛋白 (Santa Cruz),以及外胚层分化标记 β III- 微管蛋白 (Chemicon) 和 GFAP (DAKO)。结果显示于图 12 中。这种染色证实这些标记的表达,证实建立的人 iPS 细胞具有用于三胚层分化的潜力。

[0201] 实施例 10 :关于建立的 iPS 细胞的畸胎瘤形成的潜力

[0202] 就畸胎瘤形成的潜力检查人 iPS 细胞,其中,通过引入 4 种基因并且在 5%氧浓度下培养起始细胞建立所述人 iPS 细胞 (70AH5-2)。在补充有重组人 bFGF (4ng/ml) 和 Rho 激酶抑制剂 Y-27632 (10 μ M) 的灵长类动物 ES 细胞培养基 (ReproCELL) 中培养人 iPS 细胞 (70AH5-2)。1 小时后,用胶原 IV 处理并且收集细胞,这之后经由离心回收它们,并且悬浮于补充有 Y-27632 (10 μ M) 的 DMEM/F12 中。将已变得汇合 (100mm 皿) 的四分之一细胞量注射到 SCID 小鼠的睾丸内。9 周后,将所得到的肿瘤切碎,并且在含 4% 甲醛的 PBS (-) 中固定。对石蜡包埋的组织进行切片并且用苏木精 - 伊红进行染色。结果显示于图 13 中。在组织学上,肿瘤由多种细胞组成,其中观察到神经上皮组织、视网膜上皮组织、骨样组织、平滑肌组织和内胚层上皮组织。因此,证实了 iPS 细胞的多能性。

[0203] 实施例 11 :低氧培养对增殖、存活和基因表达的作用

[0204] 使用膜联蛋白 V 的流式细胞术分析证实低氧培养对小鼠 ES 细胞或 4 因子转导的 MEF 无保护作用 (图 19)。此外,低氧培养显示对小鼠 ES 细胞的增殖没有作用 (图 20a))。尽管从转导后第 1 天到第 4 天的低氧温育对模拟转导的 MEF 的增殖没有显著作用,但它对 4 因子转导的 MEF 有显著作用 (图 20b))。为了研究细胞在重编程过程中的表达谱,执行微阵列分析和定量实时 RT-PCR。从第 1 天到第 4 天,在低氧和正常氧浓度下培养的 4 因子转导的 MEF 的微阵列分析显示,73.2% 的 ES 细胞特异性基因 (总共 1045 种基因中的 765 种基因) 在用低氧处理的细胞中上调,并且 85.8% 的 MEF 特异性基因 (总共 1142 种基因中的 980 种基因) 下调 (图 21a) 和 b))。此外,定量实时 RT-PCR 分析证实,在低氧处理 3 天后,内源 Oct3/4 和 Nanog 的表达在 4 因子转导的 MEF 中分别增加 3.4 倍和 2.1 倍 (图 22a) 和 b))。

[0205] 为了排除低氧通过刺激 STO 细胞来增强 iPS 细胞产生的可能性,在不含 STO 细胞的饲养层的低氧培养下检查了 iPS 细胞的生长情况。图 23 显示在 5%氧下的培养增加了 GFP 阳性集落的数目,暗示重编程的低氧增强并非由 STO 细胞介导。

[0206] 实施例 12 :通过在低氧培养下表达质粒载体的瞬时转染建立 iPS 细胞

[0207] 如先前所述 (Okita, K, 等人 Science 322, 949-953, (2008)) 执行由质粒转染产生 iPS 细胞。简言之,将包含 Nanog-GFP-IRES-Puror 报道物的 MEF 以 1.0×10^5 细胞 / 孔接种在 6 孔板中 (第 0 天)。在第 1、3、5 和 7 天时,用 pCX-OXS-2A 和 pCX-c-Myc 转染细胞,并且在第 9 天时,用胰蛋白酶收获细胞,并且再接种到具有 STO 饲养细胞的 100-mm 皿上。在第 25 天时,计数 GFP 阳性集落的数目。对于低氧处理,从第 10 天到第 24 天,细胞在 5%氧下培养。

[0208] 表 5 显示低氧培养使 GFP 阳性集落数目增加 2.0 倍。

[0209] 表 5

[0210]

实验编号	细胞数目	O2浓度	GFP阳性集落	总集落
实验1	1×10 ⁶	20%	3	18
		5%	7	32
实验2	1×10 ⁶	20%	1	2
		5%	2	2
实验3	1×10 ⁶	20%	23	61
		5%	35	62

[0211] 实施例 13 :通过在低氧培养下的 piggyback 转染系统建立 iPS 细胞

[0212] 如先前所述且具有某些修改 (Woltjen 等人,Nature ;458 :766-70, (2009)) 执行由

piggyback (PB) 转座的直接重编程。简言之,将包含 Nanog-GFP-IRES-Puro^r 报道物的 MEF 以 1.0×10^5 细胞 / 孔接种在 6 孔板中。培养 24 小时后, Fugene HD (Roche, Switzerland) 用于为细胞转染 PB-TET-MKOS、PB-CA-rtTA Adv 和 PB 转座酶表达载体。24 小时后, 用含多西环素的培养基 (1.5ug/ml) 替换培养基 (第 0 天)。细胞在低氧或正常氧条件下进行培养, 并且在第 12 天时计数 GFP 阳性集落数目。PB-TET-MKOS 和 PB-CA-rtTA adv 由 Addgene (Addgene 质粒 20910 和 20959) 提供。PB 转座酶构建体通过 PCR 由 pBSII-IFP2-orf (来自 Dr. Malcolm J. Fraser, Jr, University of Notre Dame 的慷慨赠予) 进行扩增, 并且插入经由 CAG- 启动子 (pCX-EGFP) 驱动的表达载体内。

[0213] 图 24 显示低氧处理 5 和 10 天分别使 GFP 阳性集落数目增加 2.9 倍和 4.0 倍。这些数据暗示低氧可以增加通过非病毒载体例如 piggybac 转座系统的 iPS 产生效率。

[0214] 虽然本发明已着重于优选实施方案进行描述, 但对于本领域技术人员显而易见的是, 优选实施方案可以进行修改。本发明意欲本发明可以通过除本说明书中详细描述的那些外的方法来实现。因此, 本发明包含了在所附“权利要求”的要旨和范围中包含的所有修改。

[0215] 此外, 本文引用的所有出版物包括专利和专利申请中公开的内容在此通过参考整体引入, 其程度与它们已在本文中公开一样。

[0216] 本申请基于美国临时专利申请号 61/084, 842、61/141, 177 和 61/203, 931, 所述美国临时专利申请的内容在此通过参考引入。

序列表

<110>Kyoto University

<120> 有效建立诱导的多能干细胞的方法

<130>091416

<150>US61/084, 842

<151>2008-07-30

<150>US61/141, 177

<151>2008-12-29

<150>US61/203, 931

<151>2008-12-30

<160>36

<170>PatentIn version 3.5

<210>1

<211>24

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 (小鼠 c-Myc (末端))

<400>1

cagaggagga acgagctgaa gcgc 24

<210>2

<211>28

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 (小鼠 c-Myc (末端))

<400>2

ttatgcacca gagtttcgaa gctgttcg 28

<210>3

<211>23

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物 (小鼠 Oct3/4 (末端))

<400>3

tctttccacc aggcctccgg ctc 23

<210>4

<211>23

<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (小鼠 Oct3/4(末端))	
<400>4	
tgcgggcgga catggggaga tcc	23
<210>5	
<211>23	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (小鼠 Sox2(末端))	
<400>5	
tagagctaga ctccgggcga tga	23
<210>6	
<211>23	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (小鼠 Sox2(末端))	
<400>6	
ttgccttaaa caagaccacg aaa	23
<210>7	
<211>23	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (小鼠 Klf4(末端))	
<400>7	
ccaacttgaa catgcccgga ctt	23
<210>8	
<211>23	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (小鼠 Klf4(末端))	
<400>8	
tctgcttaaa ggcatacttg gga	23
<210>9	

<211>24	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (小鼠 Oct3/4(Tg))	
<400>9	
ttgggctaga gaaggatgtg gttc	24
<210>10	
<211>24	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (小鼠 Oct3/4(Tg))	
<400>10	
gacatggcct gcccggttat tatt	24
<210>11	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (小鼠 Nanog)	
<400>11	
agggtctgct actgagatgc t	21
<210>12	
<211>24	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (小鼠 Nanog)	
<400>12	
caacacctgg tttttctgcc accg	24
<210>13	
<211>24	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (小鼠 Rex1)	
<400>13	
acgagtggca gtttcttctt ggga	24

<210>14	
<211>24	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (小鼠 Rex1)	
<400>14	
tatgactcac ttccaggggg cact	24
<210>15	
<211>28	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (小鼠 ECAT1)	
<400>15	
tgtggggccc tgaaaggcga gctgagat	28
<210>16	
<211>28	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (小鼠 ECAT1)	
<400>16	
atggggccgcc atacgacgac gctcaact	28
<210>17	
<211>20	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (小鼠 G3PDH)	
<400>17	
accacagtcc atgccatcac	20
<210>18	
<211>20	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (小鼠 G3PDH)	
<400>18	

tccaccaccc tgttgctgta	20
<210>19	
<211>26	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (人 c-Myc (末端))	
<400>19	
gcgtcctggg aaggagatc cggagc	26
<210>20	
<211>26	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (人 c-Myc (末端))	
<400>20	
ttgaggggca tcgtcgcggg aggctg	26
<210>21	
<211>24	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (人 Oct3/4 (末端))	
<400>21	
gacaggggga ggggaggagc tagg	24
<210>22	
<211>26	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (人 Oct3/4 (末端))	
<400>22	
cttcctcca accagttgcc ccaaac	26
<210>23	
<211>26	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (人 Sox2 (末端))	

<400>23	
gggaaatggg aggggtgcaa aagagg	26
<210>24	
<211>26	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (人 Sox2(末端))	
<400>24	
ttgcgtgagt gtggatggga ttggtg	26
<210>25	
<211>25	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (人 Klf4(末端))	
<400>25	
acgatcgtgg ccccgaaaa ggacc	25
<210>26	
<211>28	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (人 Klf4(末端))	
<400>26	
tgattgtagt gctttctggc tgggctcc	28
<210>27	
<211>25	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (人 Nanog)	
<400>27	
cagccccgat tcttccacca gtccc	25
<210>28	
<211>25	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	

<223> 引物 (人 Nanog)	
<400>28	
cggaagattc ccagtcgggt tcacc	25
<210>29	
<211>24	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (人 GDF3)	
<400>29	
cttatgctac gtaaaggagc tggg	24
<210>30	
<211>21	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (人 GDF3)	
<400>30	
ccaaccagg tcccgaagt t	21
<210>31	
<211>24	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (人 ESG1)	
<400>31	
atatcccgcc gtgggtgaaa gttc	24
<210>32	
<211>24	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (人 ESG1)	
<400>32	
actcagccat ggactggagc atcc	24
<210>33	
<211>24	
<212>DNA	
<213> 人工序列	

<220>	
<223> 引物 (人 Rex1)	
<400>33	
cagatcctaa acagctcgca gaat	24
<210>34	
<211>23	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (人 Rex1)	
<400>34	
gcgtacgcaa attaaagtcc aga	23
<210>35	
<211>20	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (人 G3PDH)	
<400>35	
accacagtcc atgcatcac	20
<210>36	
<211>20	
<212>DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 (人 G3PDH)	
<400>36	
tccaccaccc tgttgctgta	20

GFP阳性集落的数目

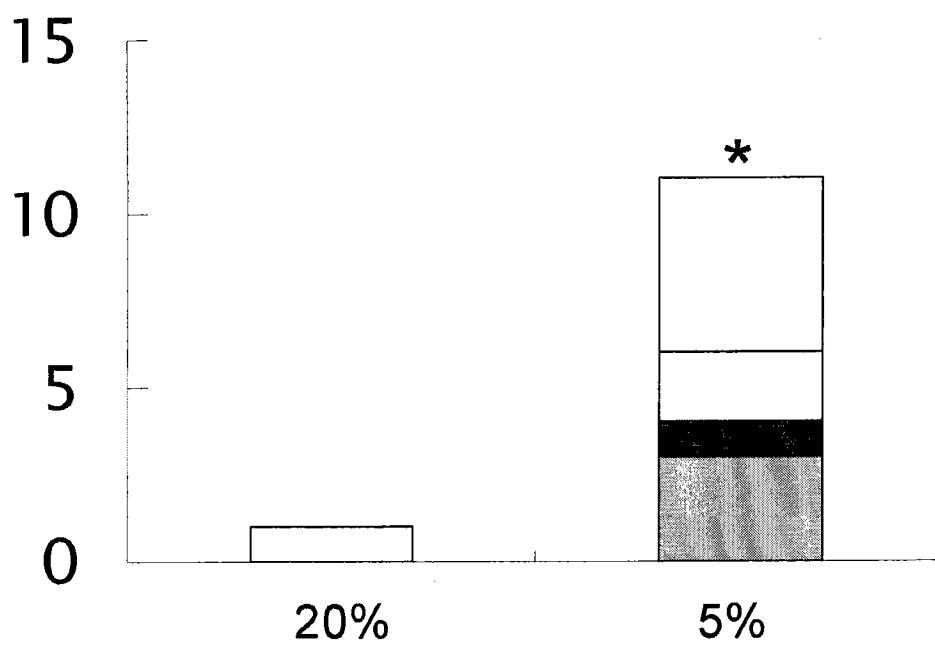


图 1

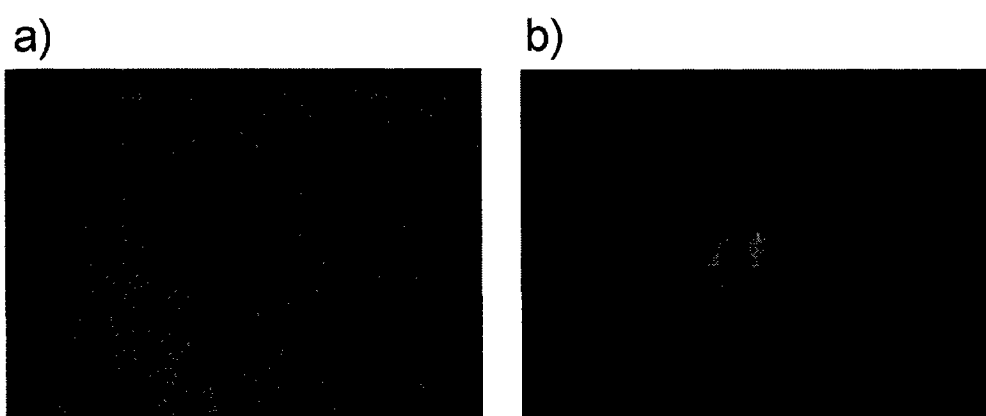


图 2

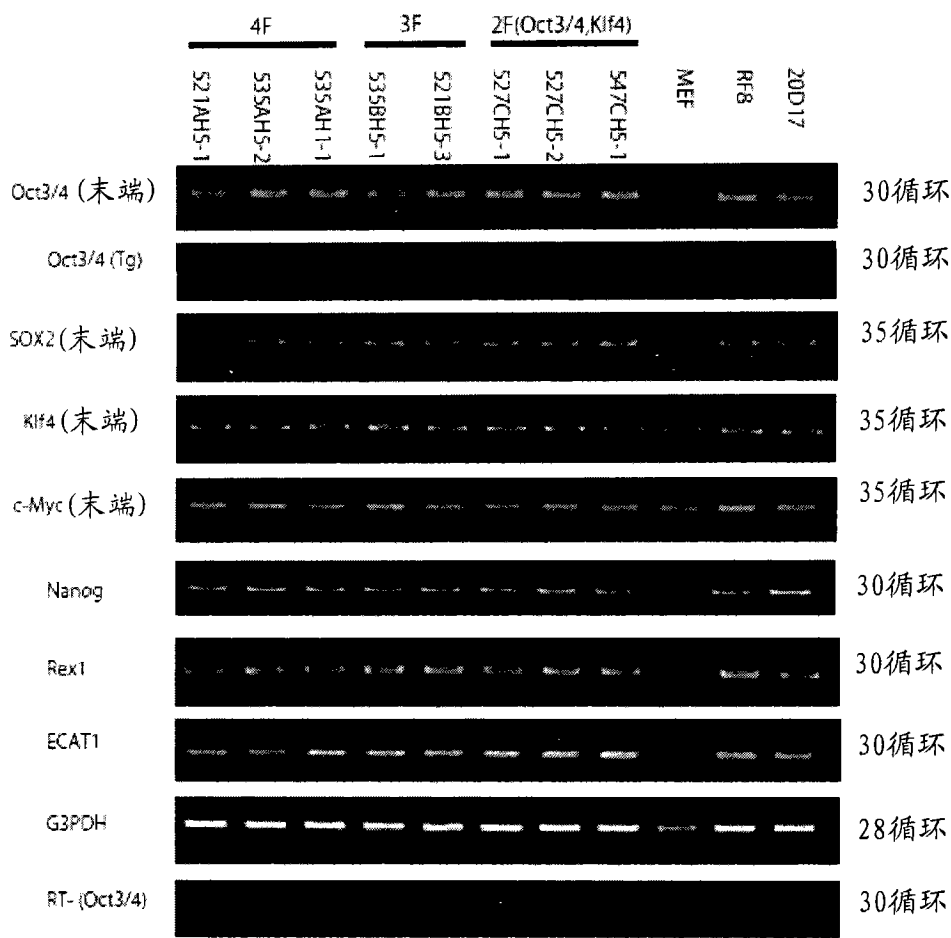


图 3

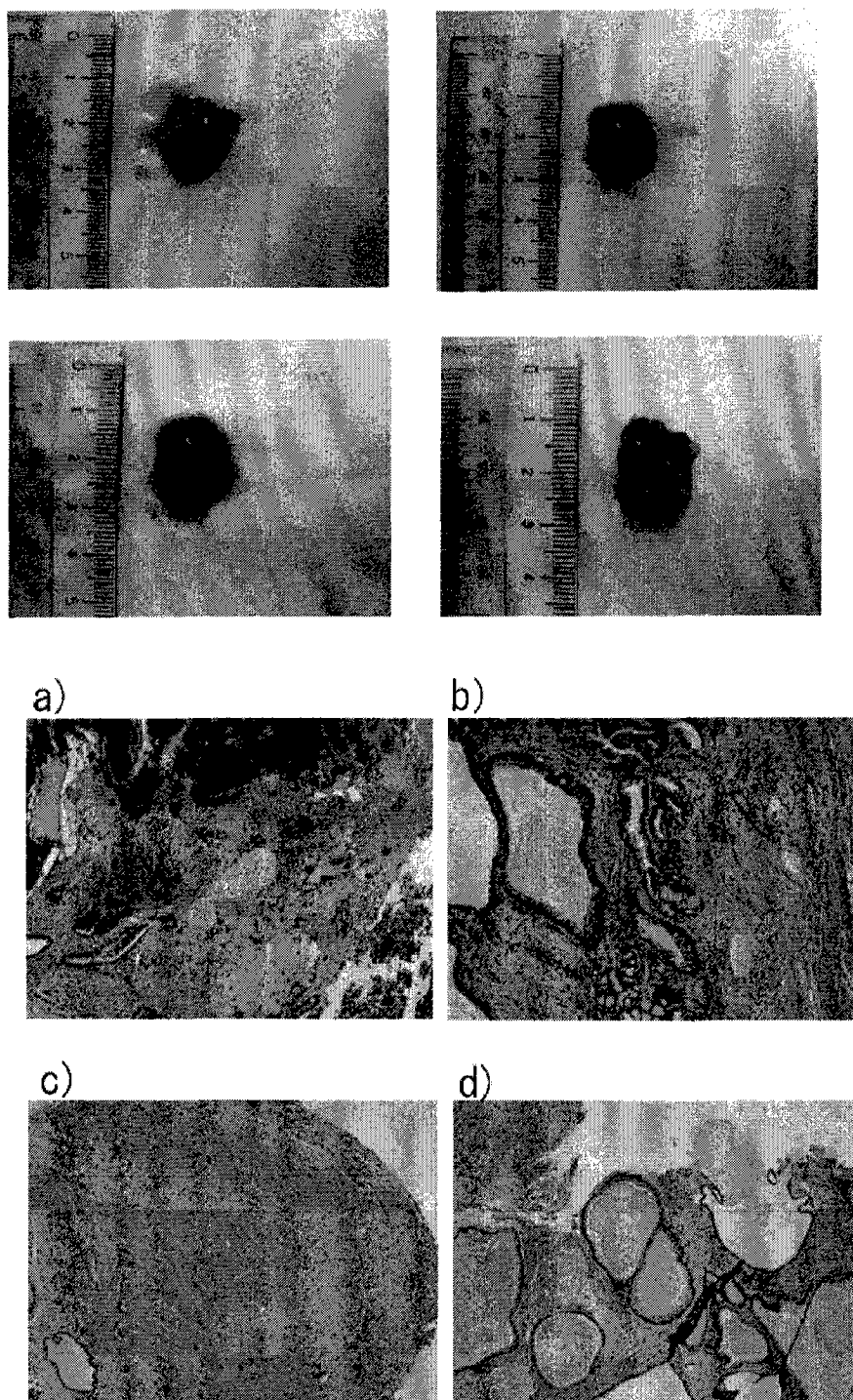


图 4

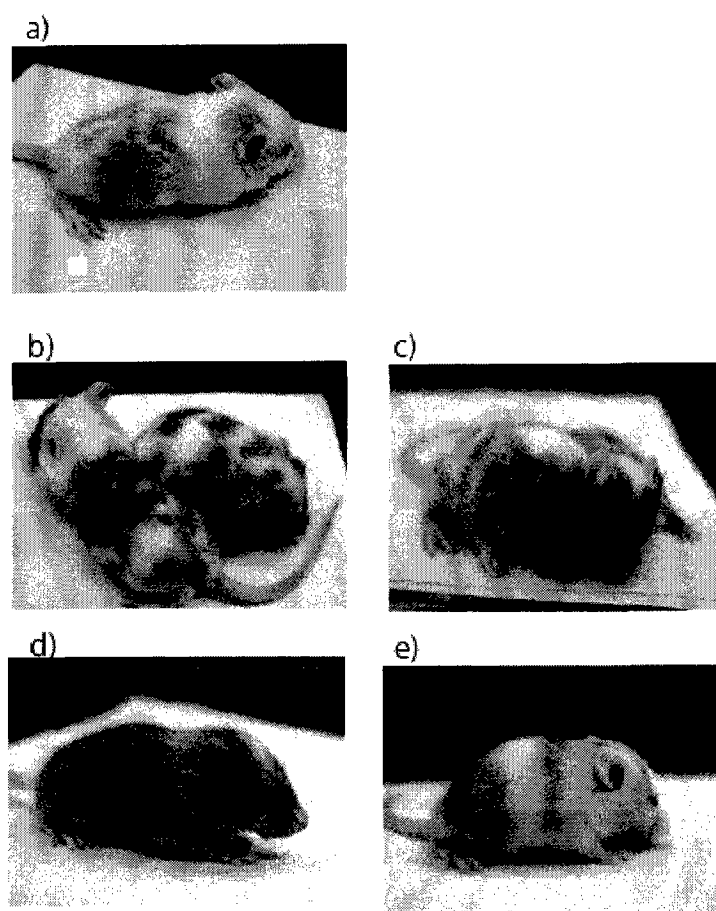


图 5

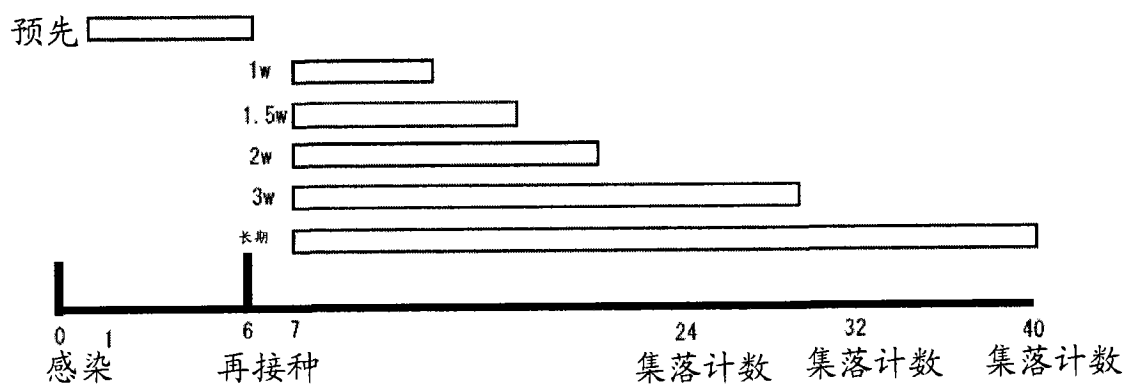


图 6

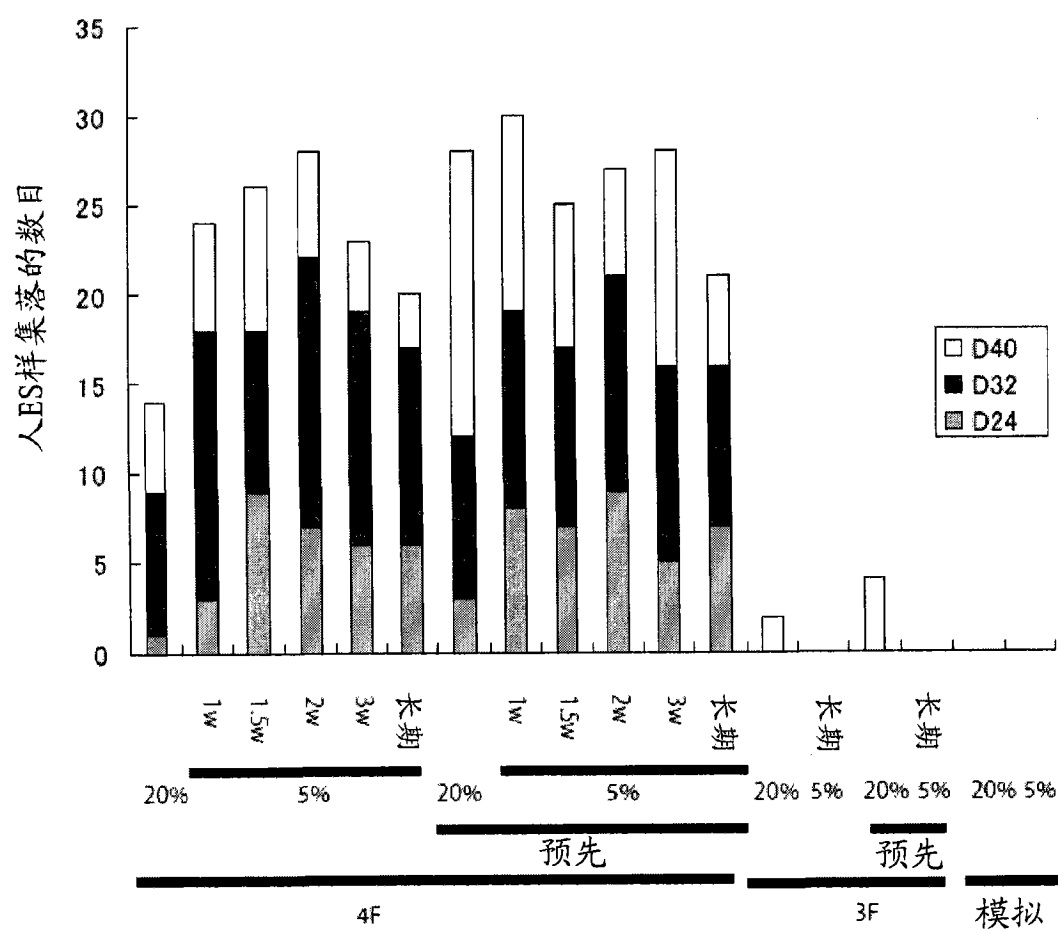


图 7

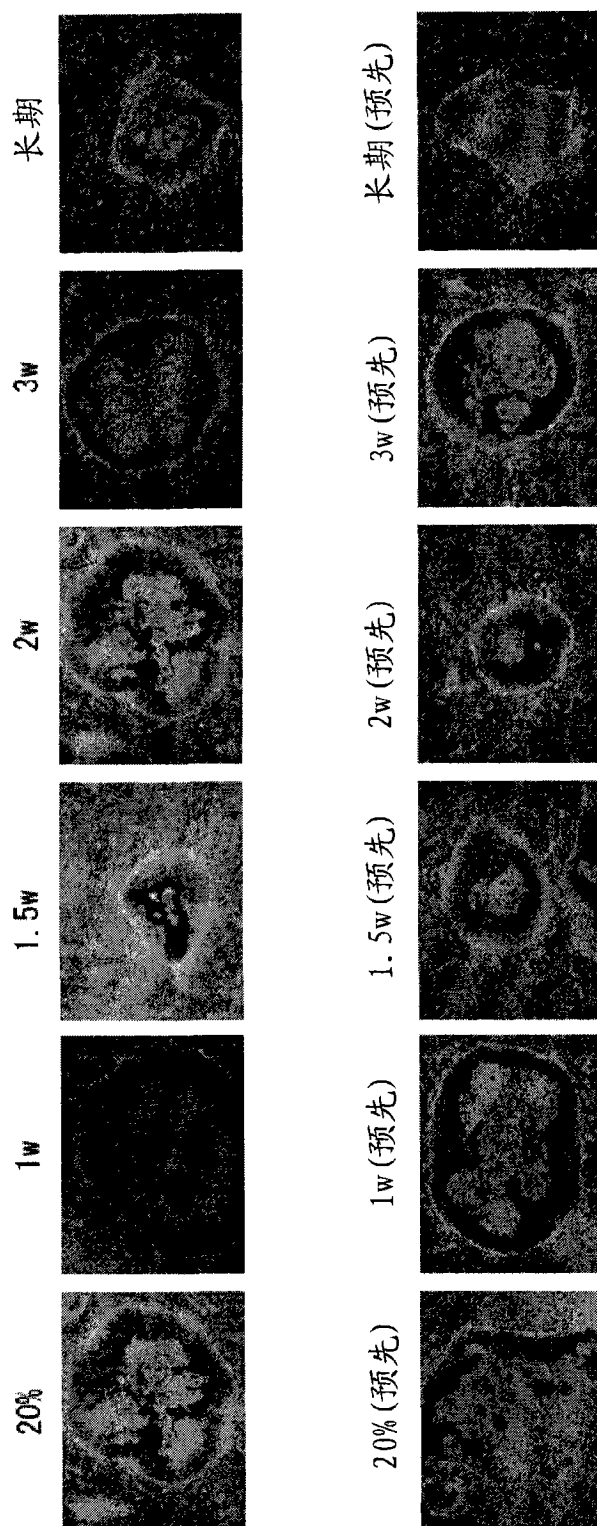


图 8

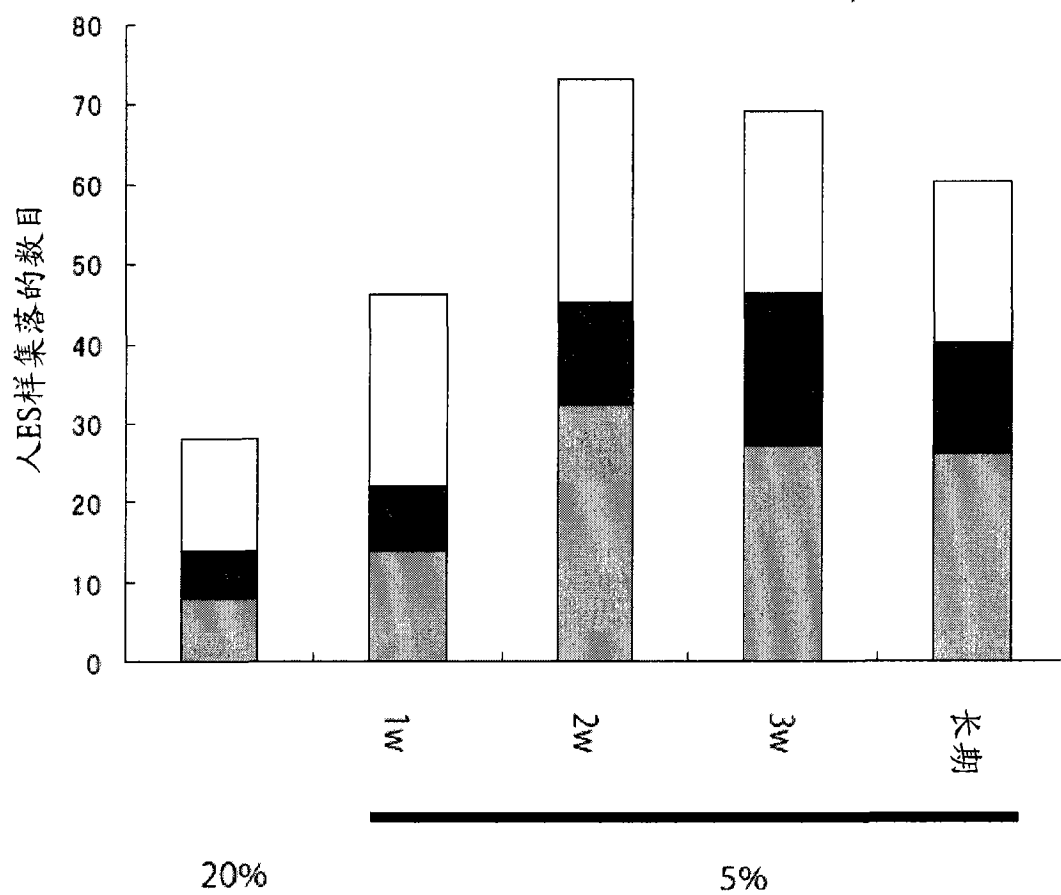


图 9

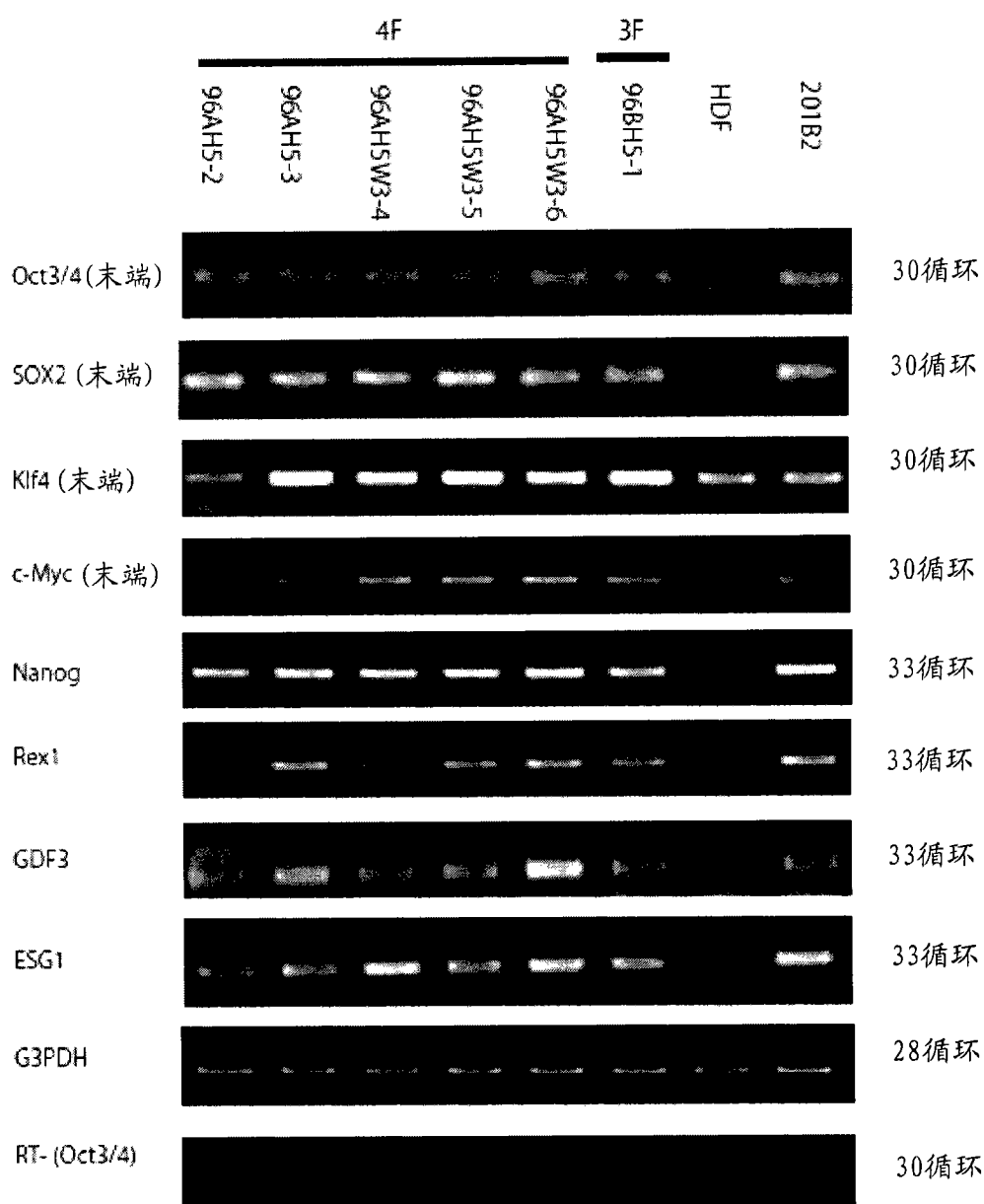


图 10

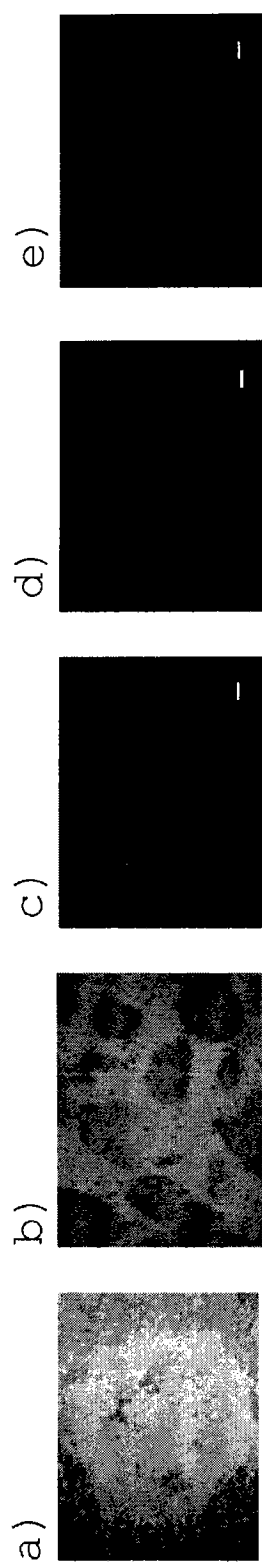


图 11

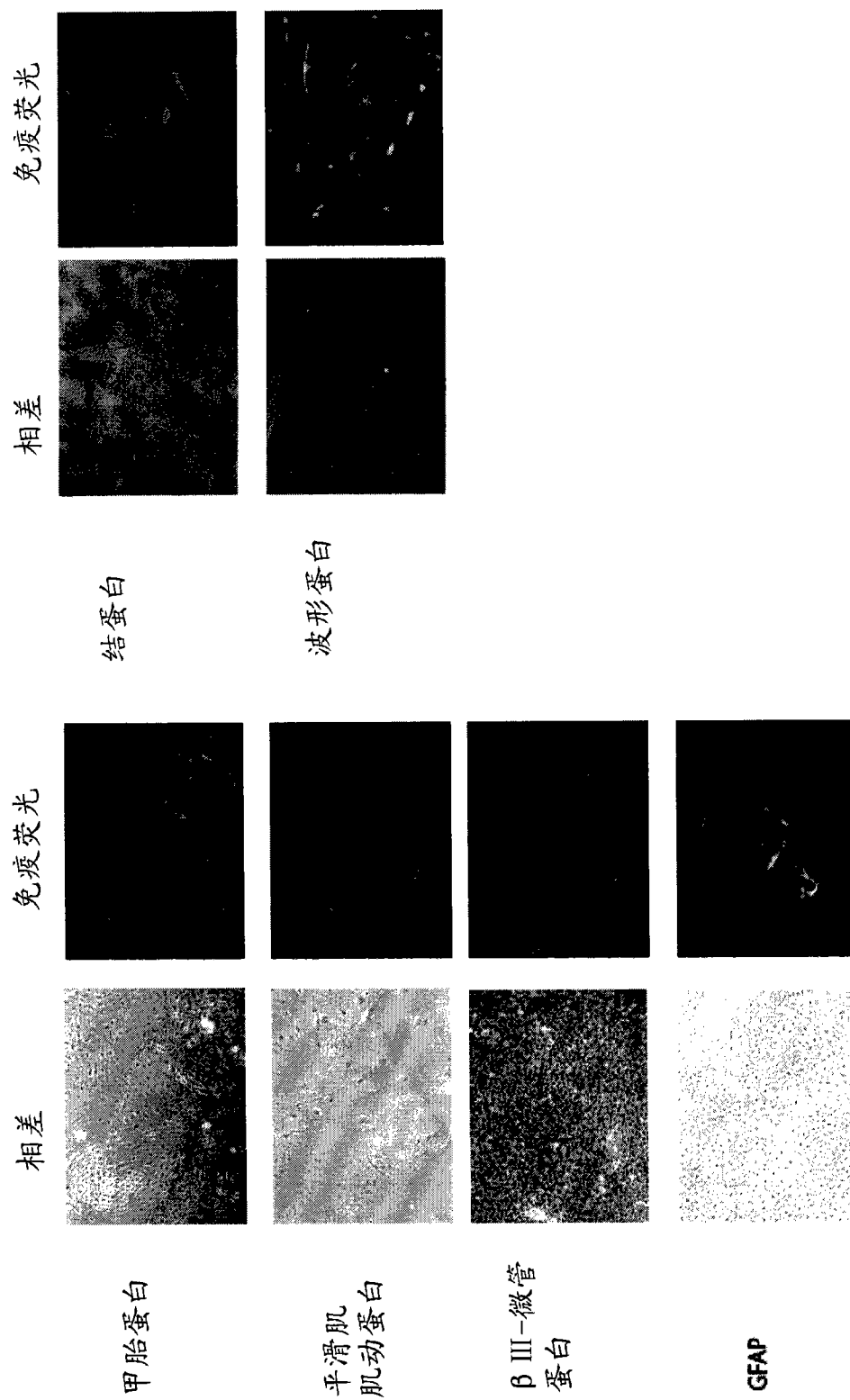


图 12

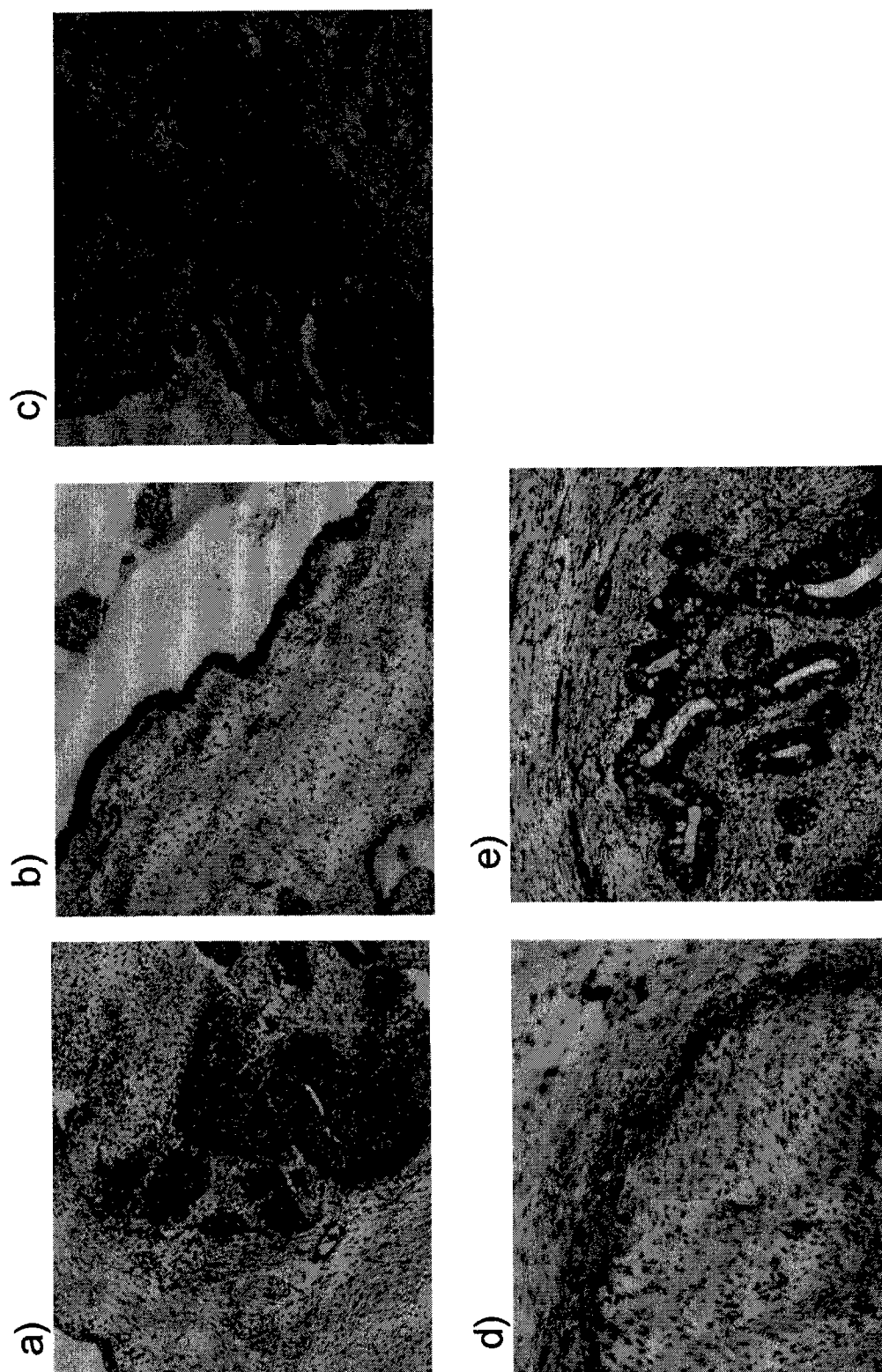


图 13

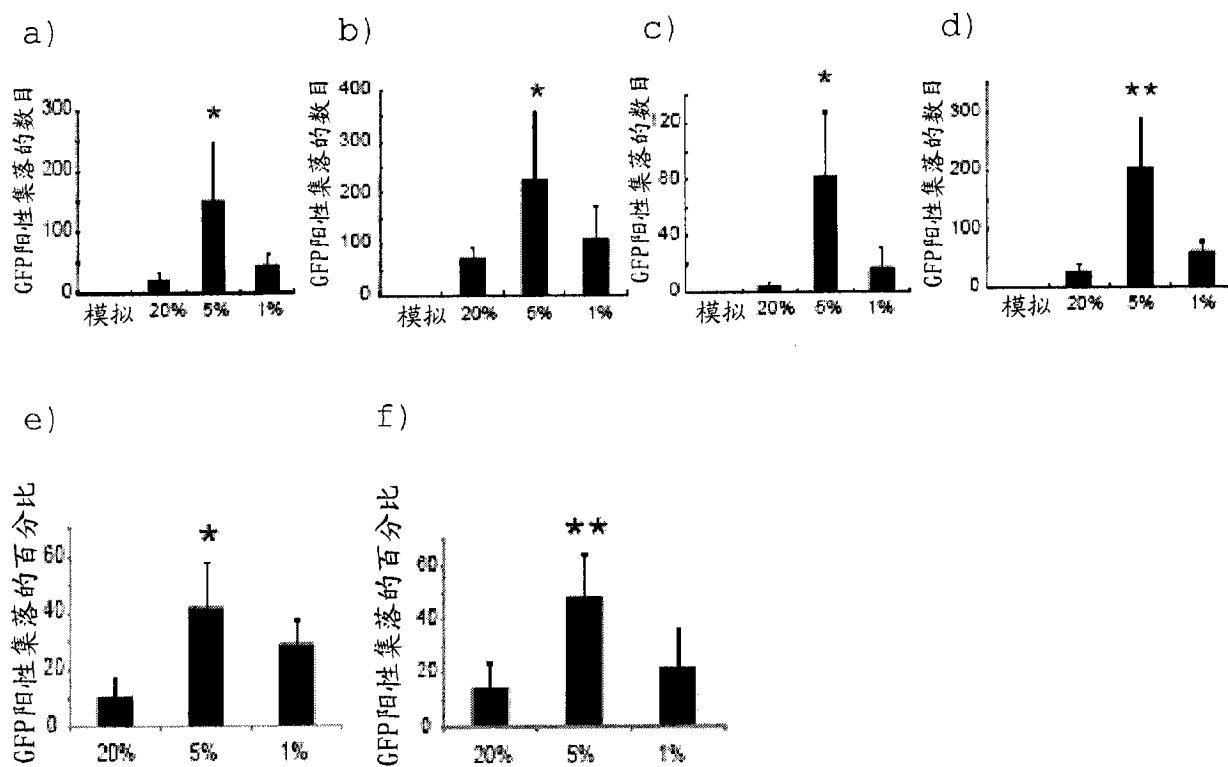


图 14

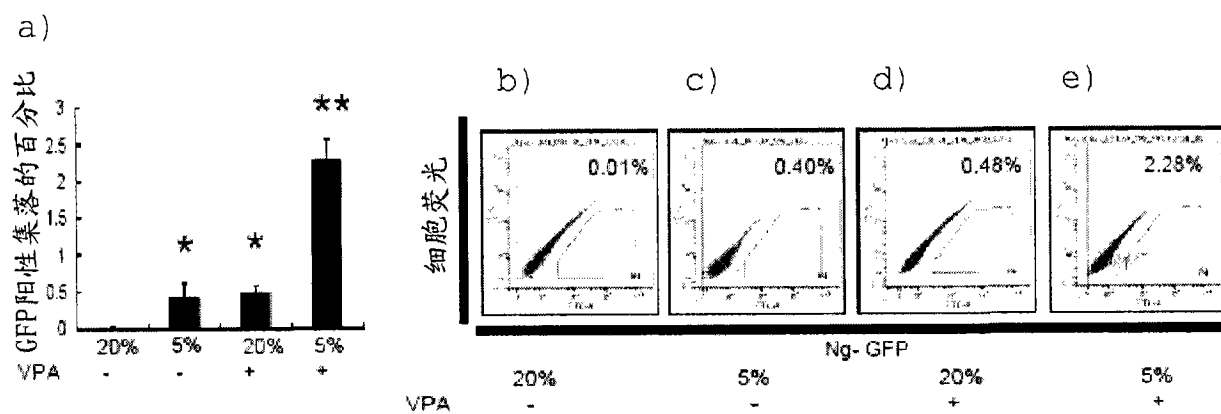


图 15

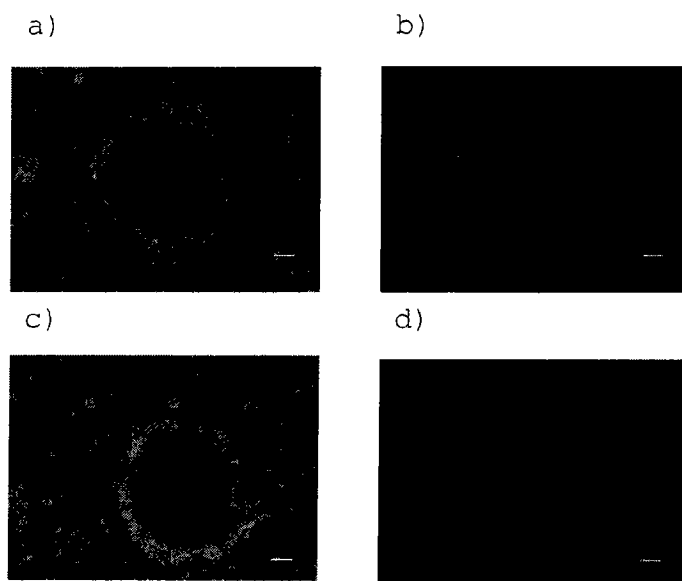


图 16

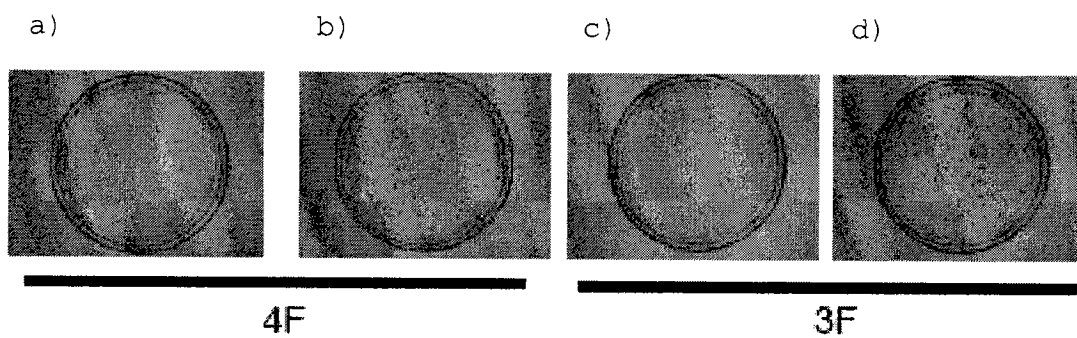


图 17

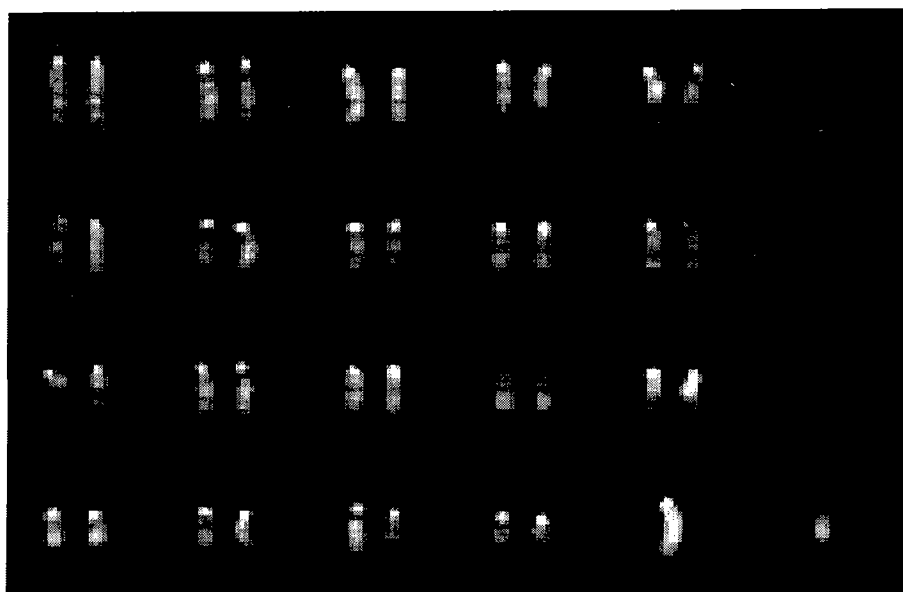


图 18

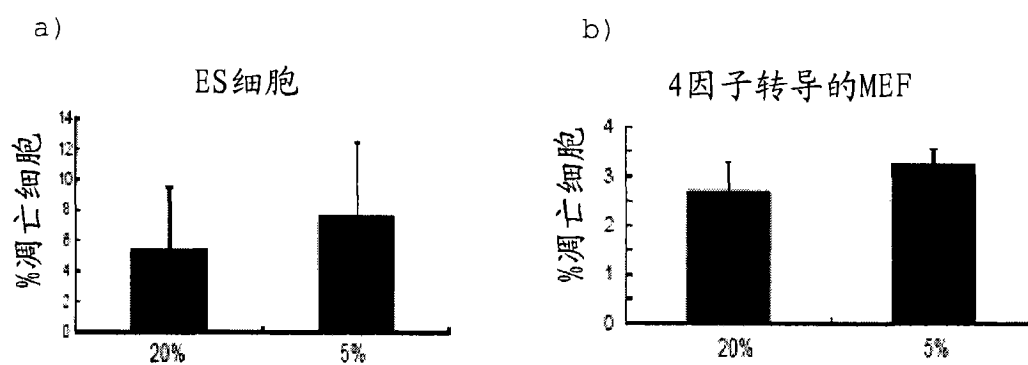


图 19

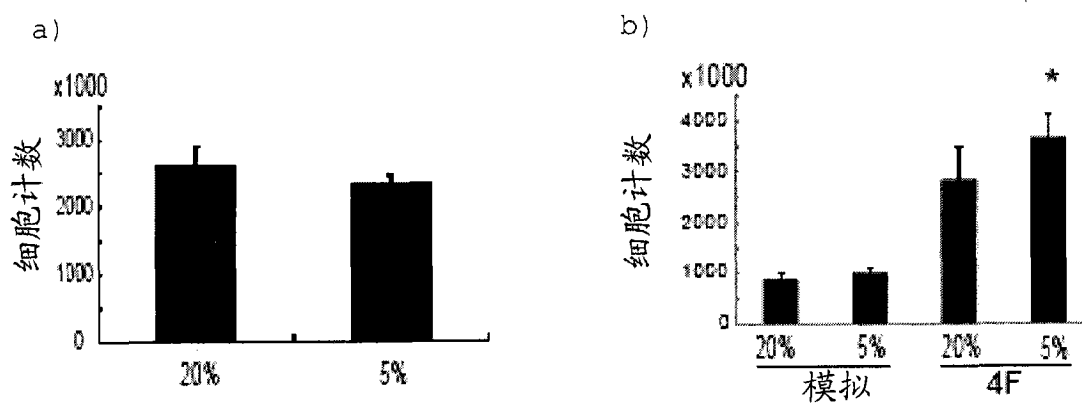


图 20

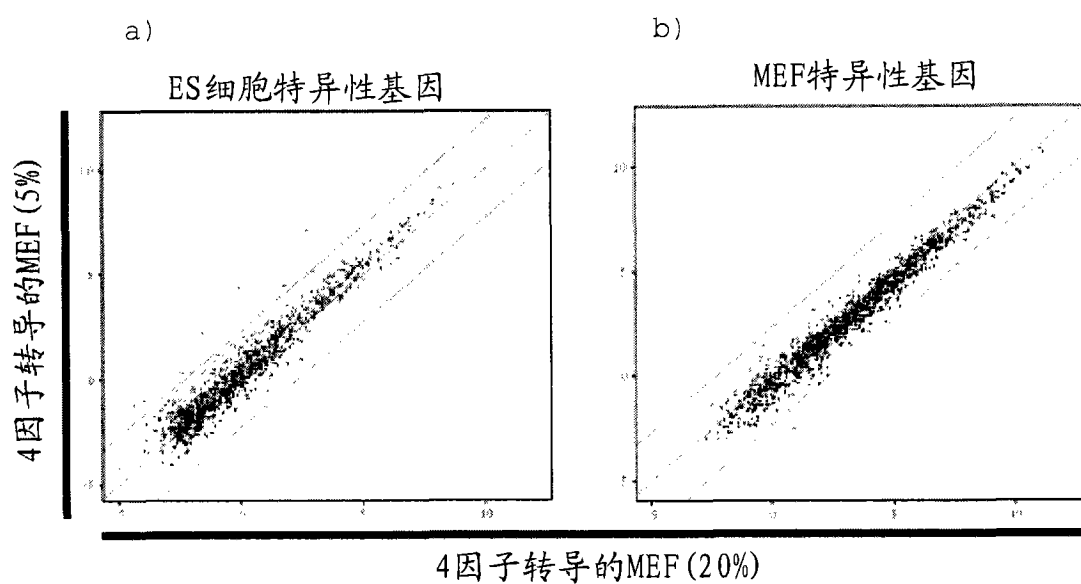


图 21

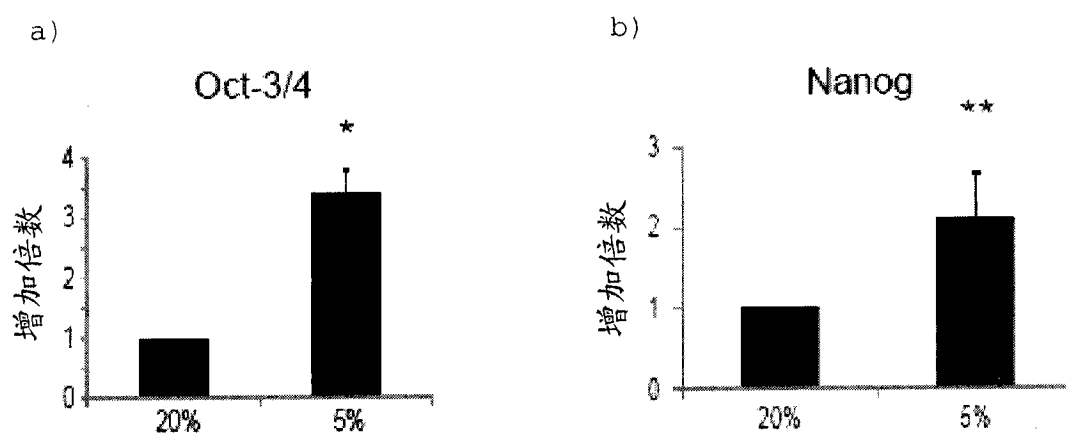


图 22

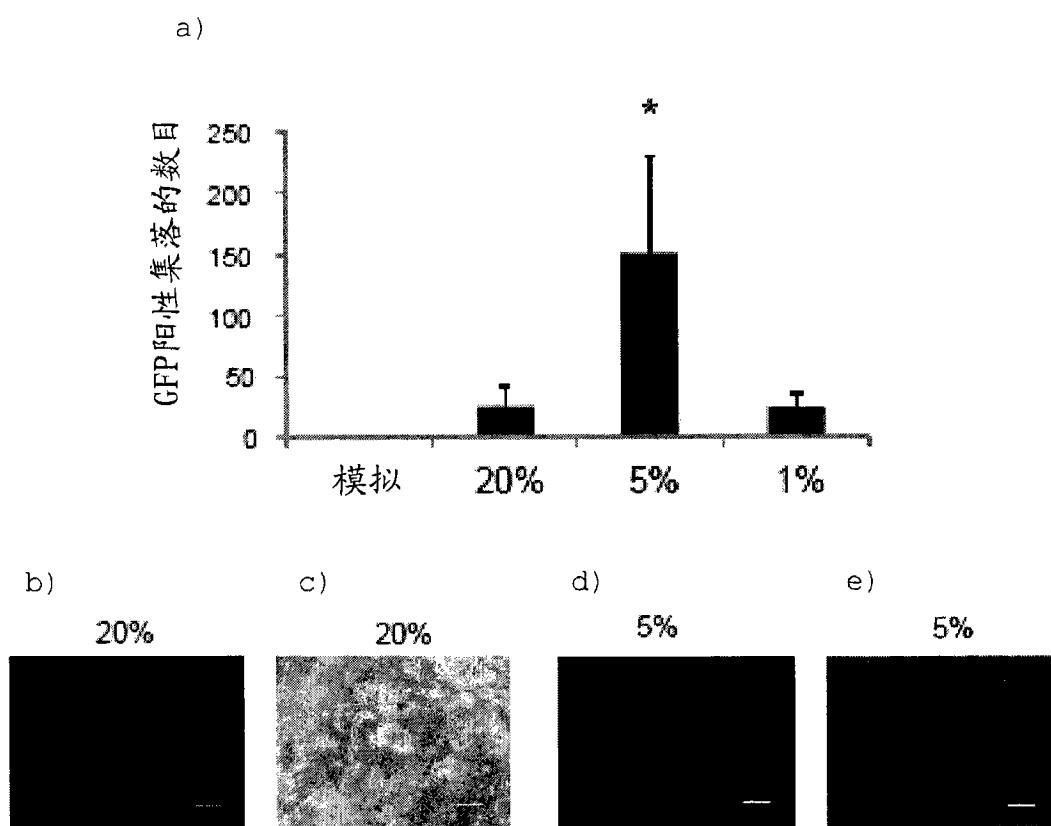


图 23

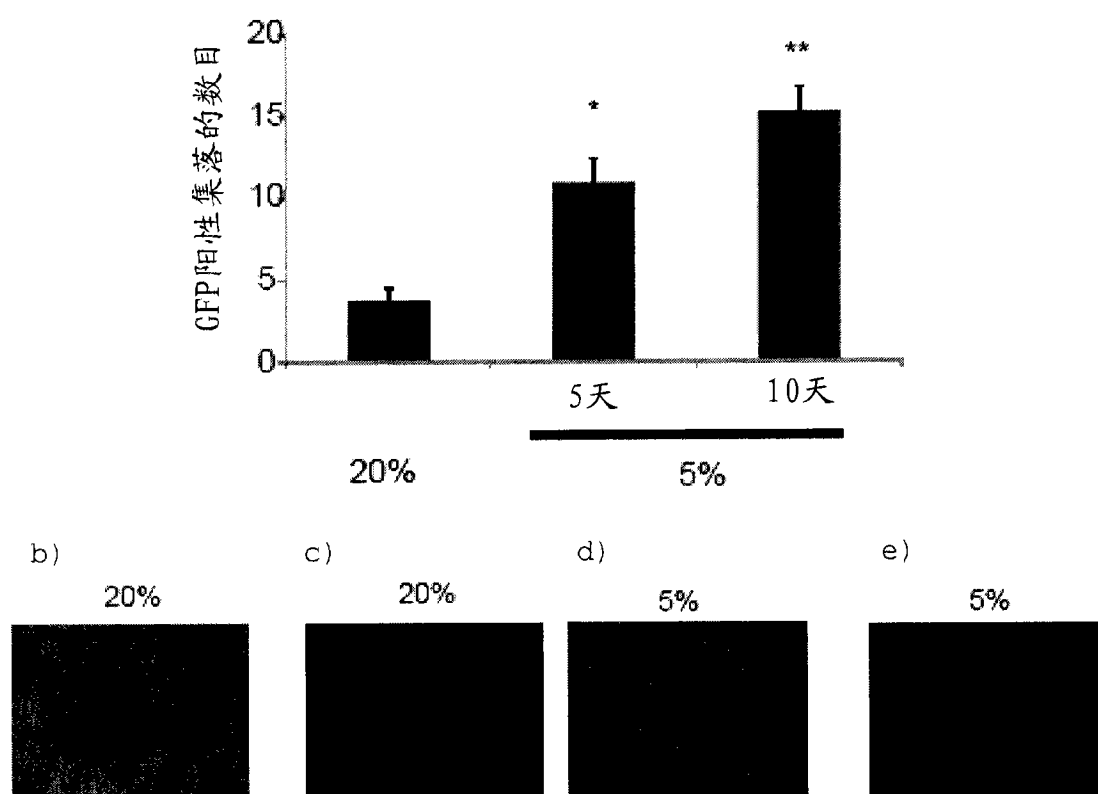


图 24