

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5553178号
(P5553178)

(45) 発行日 平成26年7月16日 (2014. 7. 16)

(24) 登録日 平成26年6月6日 (2014. 6. 6)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 5/10 (2006. 01)

C 1 2 N 5/00 1 O 2

C 1 2 N 5/0775 (2010. 01)

C 1 2 N 5/00 2 O 2 H

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 A

A 6 1 L 27/00 (2006. 01)

A 6 1 L 27/00 V

請求項の数 4 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2011-504267 (P2011-504267)
 (86) (22) 出願日 平成20年10月2日 (2008. 10. 2)
 (65) 公表番号 特表2011-529330 (P2011-529330A)
 (43) 公表日 平成23年12月8日 (2011. 12. 8)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2008/068320
 (87) 国際公開番号 W02010/013359
 (87) 国際公開日 平成22年2月4日 (2010. 2. 4)
 審査請求日 平成23年9月30日 (2011. 9. 30)
 (31) 優先権主張番号 61/085, 308
 (32) 優先日 平成20年7月31日 (2008. 7. 31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

特許法第30条第1項適用 岐阜新聞平成20年4月9日付 (平成20年4月9日) 岐阜新聞社発行第29ページに発表

(73) 特許権者 304019399
 国立大学法人岐阜大学
 岐阜県岐阜市柳戸1番1
 (73) 特許権者 504132272
 国立大学法人京都大学
 京都府京都市左京区吉田本町36番地1
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一
 (74) 代理人 100125070
 弁理士 土井 京子
 (74) 代理人 100136629
 弁理士 鎌田 光宣
 (74) 代理人 100121212
 弁理士 田村 弥栄子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 効率的な人工多能性幹細胞の樹立方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト歯髄幹細胞に核初期化物質を接触させることを含む、ヒト人工多能性幹細胞の製造方法であって、該歯髄幹細胞が根末形成期の智歯由来の歯髄組織から樹立された細胞であり、該根末形成期の智歯が20歳以下のヒト個体から単離された智歯である、方法。

【請求項2】

核初期化物質が、以下の(1)～(3)のいずれかの組み合わせ、またはそれらをコードする核酸を含む、請求項1記載の方法。

(1) Oct3/4, Klf4およびSox2

(2) Oct3/4, Klf4, Sox2およびc-Myc

(3) Oct3/4, Klf4, Sox2およびL-Myc

【請求項3】

人工多能性幹細胞が、個々人、または多種類のHLA抗原の型に対応するバンクの形態である、請求項1または2記載の方法。

【請求項4】

ヒト人工多能性幹細胞を製造するための体細胞ソースとしての、ヒト歯髄幹細胞の使用であって、該歯髄幹細胞が根末形成期の智歯由来の歯髄組織から樹立された細胞であり、該根末形成期の智歯が20歳以下のヒト個体から単離された智歯である、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

発明の技術分野

本発明は、人工多能性幹（以下、iPSという）細胞の樹立効率の改善方法およびそのための歯髄幹細胞の使用に関する。

【 背景技術 】

【 0 0 0 2 】

発明の背景

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

10

【 0 0 0 3 】

さらに、Takahashiら（6）は、ヒトの皮膚由来線維芽細胞にマウスと同様の4遺伝子を導入することにより、iPS細胞を樹立することに成功した。一方、Yuら（7）は、Klf4とc-Mycの代わりにNanogとLin28を使用してヒトiPS細胞を作製した。また、Parkら（8）は、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycの4因子に加えて、ヒト細胞不死化遺伝子として知られるTERTとSV40ラージT抗原を用いて、ヒトiPS細胞を作製した。このように、ヒト及びマウスで、分化多能性においてES細胞と遜色のないiPS細胞を作製できることが示された。

20

【 0 0 0 4 】

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

【 0 0 0 5 】

30

3因子または4因子導入によるヒトiPS細胞の樹立に関しては、今まで成人皮膚由来線維芽細胞や滑膜由来細胞、また胎児や新生児由来の線維芽細胞からのヒトiPS細胞の樹立が報告されている（5,6,7,8を参照）。しかしながら、その樹立効率は極めて低く、例えば3因子（Oct3/4、Sox2、Klf4）の導入のみでヒトiPS細胞を樹立したNakagawaらの論文（5）によれば、 5×10^5 個のヒト成人皮膚線維芽細胞（HDF）から、わずか0-5個のES細胞様コロニーを得たにとどまっている。

【 0 0 0 6 】

ある種の化学物質を用いて、マウス胎児由来線維芽細胞（MEF）における3因子または4因子導入によるiPS細胞樹立効率を改善した例がいくつか報告されている（例えば9,10を参照）。しかし、そのような樹立効率改善物質や他の核初期化因子を用いることなく、3因子または4因子の導入のみでヒトのiPS細胞の樹立効率を顕著に改善したという報告は皆無である。

40

引用文献：

1. Takahashi, K. and Yamanaka, S., Cell, 126: 663-676 (2006)
2. Okita, K. et al., Nature, 448: 313-317 (2007)
3. Wernig, M. et al., Nature, 448: 318-324 (2007)
4. Maherali, N. et al., Cell Stem Cell, 1: 55-70 (2007)
5. Nakagawa, M. et al., Nat. Biotechnol., 26: 101-106 (2008)
6. Takahashi, K. et al., Cell, 131: 861-872 (2007)
7. Yu, J. et al., Science, 318: 1917-1920 (2007)

50

8. Park, I.H. et al., Nature, 451: 141-146 (2008)
9. Huangfu D. et al., Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008)
10. Shi Y. et al., Cell Stem Cell, 2: 525-528 (2008)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

発明の要約

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

また、本発明の別の目的は、比較的入手が容易な細胞からiPS細胞を樹立する手段を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記の目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、ヒトiPS細胞作製のための出発材料として用いる体細胞(iPS細胞の供給源となる細胞)として歯髄幹細胞を用いることにより、iPS細胞の樹立効率が格段に上昇することを見出した。すなわちヒトの歯髄幹細胞に、3因子(Oct3/4, Klf4, Sox2)または4因子(Oct3/4, Klf4, Sox2, c-Myc)を導入することにより、ヒトiPS細胞の樹立を試みた結果、従来のヒト成人皮膚線維芽細胞(HDF)から樹立した場合に比して、格段に多くのiPS細胞が樹立できることを初めて見出した。

【0009】

すなわち、本発明は以下の通りのものである。

- [1] 歯髄幹細胞に核初期化物質を接触させることを含む、iPS細胞の製造方法。
- [2] 核初期化物質が、Oct3/4, Klf4およびSox2、またはそれらをコードする核酸である、上記[1]記載の方法。
- [3] 核初期化物質がOct3/4, Klf4, Sox2およびc-Myc、またはそれらをコードする核酸である、上記[1]記載の方法。
- [4] 歯髄幹細胞がヒト由来である、上記[1]記載の方法。
- [5] iPS細胞を製造するための体細胞ソースとしての、歯髄幹細胞の使用。

【発明の効果】

【0010】

歯髄幹細胞の使用はiPS細胞の樹立効率を顕著に増大させることができるので、従来樹立効率の低かったヒトiPS細胞の誘導、特にc-Mycを除く3因子導入によるiPS細胞誘導に有用である。c-Mycは再活性化による腫瘍発生が危惧されることから、3因子によるiPS樹立効率の改善を実現したことは、iPS細胞の再生医療への応用において極めて有用である。

また、歯髄幹細胞は、智歯や歯周病等で抜いた歯から単離、調製することができるため、入手が容易であり、iPS細胞バンクのための体細胞ソースとしての利用が期待される。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、歯髄幹細胞を初期化して得られたES様細胞(iPS細胞)コロニーの数を示したグラフである。図1中、DP28, DP31, DP47, DP54, DP75, DP87は歯髄幹細胞の結果を、またHDFは成人皮膚線維芽細胞の結果を示す。縦軸はコロニー数を示す。それぞれ左棒はES様コロニーの数を、右棒は全コロニー数を示す。「3因子, d26」は、3因子(Oct3/4, Sox2, Klf4)を導入した際の26日目の結果を示す。また「4因子, d21」は4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を導入した際の21日目の結果を示す。

【図2】図2は、歯髄幹細胞由来iPS細胞の遺伝子発現を調べた結果を示す写真である。歯髄幹細胞(DP31, DP75)由来iPS細胞(iPS-DP31, iPS-DP75)におけるES細胞特異的マーカー(Oct3/4, Sox2, Nanog)の発現を、RT-PCRで確認した。図中、3fは3因子導入で作製したクローン、4fは4因子導入で作製したクローンを示す。3f、4fの下に数字はクローンナンバーを示す。「ES」はES細胞を、「DP31」、「DP75」は歯髄幹細胞を、「201B6」は

10

20

30

40

50

ヒト成人皮膚線維芽細胞由来のiPS細胞 (Cell, 131, p861-872 (2007))を、「AHDF」はヒト成人皮膚線維芽細胞を、それぞれ示す。NAT 1 はポジティブコントロール、RT- (OCT3/4) はネガティブコントロール (逆転写反応を行わずOct3/4のPCR反応を行ったもの) を、それぞれ示す。

【図3】図3は、図1と同様にES様細胞 (iPS細胞) コロニーの数を示したグラフである。図3Aは3因子 (3F) 導入の結果を、図3Bは4因子 (4F) 導入の結果を示す。「4 ES様」、「4 合計」は歯髄幹細胞 5×10^4 個を用いた場合、また「5 ES様」、「5 合計」は歯髄幹細胞 5×10^5 個を用いた場合のES様コロニー数および合計コロニー数をそれぞれ示す。

【図4】図4は、歯髄幹細胞DP47から樹立されたES様コロニー (iPS-DP47) が、ES細胞のマーカーであるNanog及びOct3/4 (Oct) を発現していることを免疫染色で示し、また、アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色でも陽性であることを示した写真である。コントロールとしてヒトES細胞 (hES) も染色した。

【図5】図5は、歯髄幹細胞DP31から樹立された2つのiPSクローン (DP31 4f-3及びDP31 3f-1) における幹細胞マーカー (SSEA1、SSEA3、TRA-1-81及びNANOG) の発現を実証する写真を示す。

【図6】図6は、ヒト歯髄幹細胞由来のiPS細胞の分化多能性を示す。図6Aは、歯髄幹細胞DP31から樹立された2つのiPSクローン (DP31 4f-3及びDP31 3f-1) における胚様体の形成を実証する写真を示す。図6Bは、iPSクローンにおける、外胚葉分化マーカー (III-チューブリン)、中胚葉分化マーカー (-SMA) 及び内胚葉分化マーカー (AFP) の発現を実証する写真を示す。コントロール：二次抗体のみ。

【図7】図7は、ヒト歯髄幹細胞から樹立されたiPS細胞由来のテラトーマ形成を実証する写真を示す。テラトーマは、脂肪組織 (b)、神経組織 (c)、腸管様組織 (d)、軟骨組織 (e) 及び神経管様組織 (f) などの複数の細胞型からなっていた。(a)：テラトーマの概観。

【発明を実施するための形態】

【0012】

発明の詳細な説明

本発明は、歯髄幹細胞に核初期化物質を接触させることを含む、iPS細胞の製造方法を提供する。

【0013】

(1) 歯髄幹細胞

本発明のiPS細胞の製造方法に使用される体細胞ソースである歯髄幹細胞は、歯の象牙質の内側の歯髄組織中に存在し、歯髄や象牙質等に分化する能力を有する (主として象牙芽細胞に分化する能力を有する) 体性幹細胞の1つである。歯髄幹細胞は、1) 矯正治療に伴う便宜拔牙や歯周病等で抜去された歯、2) 矯正治療や智歯周囲炎等の治療のために抜歯した智歯から、歯髄組織を摘出し、適当な大きさの組織片に刻んだ後コラゲナーゼ等で酵素処理し、得られる細胞懸濁液を間葉系幹細胞用の培地 (例えば、特表平11-506610号公報、特表2000-515023号公報参照。例えばMesenchymal stem cells basal medium (Lonza社)、MesenPRO RS Medium (GIBCO) 等が市販されている) に播種して、常法に従って培養することで得ることができる。

【0014】

歯髄幹細胞のソースとしては、歯髄組織が残存する歯であれば特に制限はないが、増殖能力の高い歯髄幹細胞を多く含むものを選択することが好ましい。特に、核初期化物質がレトロウイルスベクターを用いて歯髄幹細胞に導入される場合、導入可能な細胞が分裂期細胞に限定されるので、遺伝子導入効率の点からも増殖能力の高い歯髄幹細胞を含む歯髄組織を出発材料とすることが望ましい。

【0015】

最も適した歯髄幹細胞のソースは、矯正目的にて抜去された若年者 (例えばヒトの場合、12-16歳程度) の智歯由来の歯髄組織である。この時期の智歯は、まだ歯の分化ステージが初期である根末形成期にあたり、歯髄組織が豊富に存在し、歯髄幹細胞の密度も比較的高く、その増殖能も非常に高い。

【0016】

なお、矯正目的では他の年齢層でも智歯を抜去することがあったり、便宜抜歯により、智歯以外の歯からも歯髄組織を得ることができるため、ソースの入手機会が多い。

【0017】

他に歯髄幹細胞のソースになり得るのは、歯周病治療のために抜歯した歯や智歯周囲炎のために抜歯した智歯などがある。この場合、コンタミネーションの危険性が高くなることや、得られる歯髄組織が少ないというデメリットがあるものの、成人（特に高齢者）からでも容易に入手可能であるという点で、製造されるiPS細胞から分化させた細胞・組織の自家移植を念頭においた場合には、主要な歯髄幹細胞のソースとなり得る。

【0018】

ただし、いかなる場合でも、抜歯した歯に齲蝕がある時には、歯髄組織にまで炎症が及んでいないものを選択する必要がある。

【0019】

本発明に用いることができる歯髄幹細胞は、当該歯髄幹細胞に核初期化物質を接触させることによりiPS細胞を樹立することができるいかなる動物種（哺乳動物を含む）由来のものであってもよく、具体的にはヒトおよびマウス由来のものが挙げられるが、好ましくはヒト由来の歯髄幹細胞である。歯髄幹細胞は任意の動物種から採取することができるが、得られるiPS細胞がヒトの再生医療用途に使用される場合には、拒絶反応が起こらないという観点から、患者本人またはHLAの型が同一である他人から歯髄幹細胞を採取することが特に好ましい。また、ヒトに投与（移植）しない場合でも、例えば、患者の薬剤感受性や副作用の有無を評価するためのスクリーニング用の細胞のソースとしてiPS細胞を使用する場合には、患者本人または薬剤感受性や副作用と関連する遺伝子多型が同一である他人から歯髄幹細胞を採取する必要がある。

【0020】

抜歯もしくは自然脱落した歯から、上述の方法により調製した歯髄幹細胞は、直ぐに核初期化物質と接触させてiPS細胞を誘導してもよいし、あるいは常法により凍結保存し、用時融解して培養した後に核初期化物質と接触させて、iPS細胞を誘導することもできる。従って、例えば、自身の乳歯や比較的若い時期に抜歯した永久歯もしくは智歯から調製した歯髄幹細胞を長期間凍結保存しておき、後年細胞・臓器移植が必要となった際に、該歯髄幹細胞からiPS細胞を誘導し、そこから分化誘導して得られた細胞、組織、臓器等を自家移植するということも可能である。

【0021】

(2) 核初期化物質

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

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

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

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

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

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

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

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

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

（以上、WO 2007/069666を参照（但し、上記(2)の組み合わせにおいて、Sox2からSox18へ

10

20

30

40

50

の置換、Klf4からKlf1もしくはKlf5への置換については、Nature Biotechnology, 26, 101-106 (2008)を参照)。「Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2」の組み合わせについては、Cell, 126, 663-676 (2006)、Cell, 131, 861-872 (2007) 等も参照。「Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, hTERT, SV40 Large T」の組み合わせについては、Nature, 451, 141-146 (2008)も参照)

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

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

(11) Oct3/4, Sox2, Nanog, Lin28, hTERT, SV40 Large T (Stem Cells Express, published online May 29, 2008, p1-16を参照)

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

(13) Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2, SV40 Large T (Stem Cells Express, published online May 29, 2008, p1-16も参照)

(14) Oct3/4, Klf4 (Nature, Published online, 29 June 2008, p1-5 (doi:10.1038/nature07061)を参照)

(15) Oct3/4, c-Myc (Nature, Published online, 29 June 2008, p1-5 (doi:10.1038/nature07061)を参照)

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

【 0 0 2 2 】

上記(1)-(16)には該当しないが、それらのいずれかにおける構成要素をすべて含み、且つ任意の他の物質をさらに含む組み合わせも、本発明における「核初期化物質」の範疇に含まれ得る。また、歯髄幹細胞が上記(1)-(16)のいずれかにおける構成要素の一部を、核初期化のために十分なレベルで内在的に発現している条件下にあっては、当該構成要素を除いた残りの構成要素のみの組み合わせもまた、本発明における「核初期化物質」の範疇に含まれ得る。

【 0 0 2 3 】

これらの組み合わせの中で、得られるiPS細胞を治療用途に用いることを念頭においた場合、Oct3/4, Sox2及びKlf4の3因子の組み合わせ(即ち、上記(9))が好ましい。一方、iPS細胞を治療用途に用いることを念頭に置かない場合(例えば、創薬スクリーニング等の研究ツールとして用いる場合など)は、Oct3/4, Klf4, c-Myc, Sox2及びLin28の5因子が、それにNanogを加えた6因子(即ち、上記(12))が好ましい。

【 0 0 2 4 】

上記の各タンパク性因子のマウス及びヒトcDNA配列情報は、WO 2007/069666に記載のNCBI accession numbersを参照することにより取得することができ(Nanogは当該公報中では「ECAT4」との名称で記載されている。尚、Lin28のマウス及びヒトcDNA配列情報は、それぞれNCBI accession number NM_145833及びNM_024674を参照することにより取得できる。)、当業者は容易にこれらのcDNAを単離することができる。核初期化物質としてタンパク性因子自体を用いる場合には、得られたcDNAを適当な発現ベクターに挿入して宿主細胞に導入し、該細胞を培養して得られる培養物から組換えタンパク性因子を回収することにより調製することができる。一方、核初期化物質としてタンパク性因子をコードする核酸を用いる場合、得られたcDNAを、ウイルスベクターもしくはプラスミドベクターに挿入して発現ベクターを構築し、核初期化工程に供される。

【 0 0 2 5 】

核初期化物質の歯髄幹細胞への接触は、該物質がタンパク性因子である場合、自体公知の細胞へのタンパク質導入方法を用いて実施することができる。そのような方法としては、例えば、タンパク質導入試薬を用いる方法、タンパク質導入ドメイン(PTD)融合タンパク質を用いる方法、マイクロインジェクション法などが挙げられる。タンパク質導入試薬としては、カチオン性脂質をベースとしたBioPOTER Protein Delivery Reagent (Gene Therapy Systems)、Pro-Ject™ Protein Transfection Reagent (PIERCE) 及びProVectin (IMGENEX)、脂質をベースとしたProfect-1 (Targeting Systems)、膜透過性ペプチド

をベースとしたPenetrain Peptide (Q biogene) 及びChariot Kit (Active Motif) 等が市販されている。導入はこれらの試薬に添付のプロトコルに従って行うことができるが、一般的な手順は以下の通りである。核初期化物質を適当な溶媒 (例えば、PBS、HEPES等の緩衝液) に希釈し、導入試薬を加えて室温で5-15分程度インキュベートして複合体を形成させ、これを無血清培地に交換した細胞に添加して37℃で1ないし数時間インキュベートする。その後培地を除去して血清含有培地に交換する。

【0026】

PTDとしては、ショウジョウバエ由来のAntP、HIV由来のTAT、HSV由来のVP22等のタンパク質の細胞通過ドメインを用いたものが開発されている。核初期化物質のcDNAとPTD配列とを組み込んだ融合タンパク質発現ベクターを作製して組換え発現させ、融合タンパク質を回収して導入に用いる。導入は、タンパク質導入試薬を添加しない以外は上記と同様にして行うことができる。

10

【0027】

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

【0028】

歯髄幹細胞への導入の容易さを考慮すると、核初期化物質は、タンパク質因子自体としてよりも、それをコードする核酸の形態で用いることがむしろ好ましい。該核酸はDNAであってもRNAであってもよく、あるいはDNA/RNAキメラであってもよいが、また、該核酸は二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。好ましくは該核酸は二本鎖DNA、特にcDNAである。

20

【0029】

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

【0030】

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

30

【0031】

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

【0032】

核初期化物質である核酸を含む発現ベクターは、ベクターの種類に応じて、自体公知の手法により細胞に導入することができる。例えば、ウイルスベクターの場合、該核酸を含むプラスミドを適当なパッケージング細胞 (例、Plat-E細胞) や相補細胞株 (例、293細胞) に導入して、培養上清中に産生されるウイルスベクターを回収し、各ウイルスベクターに応じた適切な方法により、該ベクターを細胞に感染させる。一方、プラスミドベクターの場合には、リポフェクション法、リポソーム法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃法などを用いて該ベクターを細胞に導入することができる。

40

【0033】

核初期化物質が低分子化合物である場合、該物質の歯髄幹細胞への接触は、該物質を適

50

当な濃度で水性もしくは非水性溶媒に溶解し、歯髄幹細胞の培養に適した培地（例えば、約5～20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、RPMI1640培地、199培地、F12培地など。あるいはMesenchymal stem cells basal medium(Lonza社)などの間葉系幹細胞用培地）中に、核初期化物質濃度が歯髄幹細胞において核初期化が起こるのに十分で且つ細胞毒性がみられない範囲となるように該物質溶液を添加して、細胞を一定期間培養することにより実施することができる。核初期化物質濃度は用いる核初期化物質の種類によって異なるが、約0.1nM～約100nMの範囲で適宜選択される。接触期間は細胞の核初期化が達成されるのに十分な、任意の時間であってよい。

【0034】

(3) iPS細胞の樹立効率改善物質

従来iPS細胞の樹立効率が低いために、近年、その効率を改善する物質が種々提案されている。よって前記核初期化物質に加え、これら樹立効率改善物質を歯髄幹細胞に接触させることにより、iPS細胞の樹立効率をより高めることが期待できる。

【0035】

iPS細胞の樹立効率改善物質としては、例えば、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤〔例えば、バルプロ酸（VPA）(Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA（例、HDAC1 siRNA Smartpool(登録商標) (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等）等の核酸性発現阻害剤など〕、G9aヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤〔例えば、BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2: 525-528 (2008))等の低分子阻害剤、G9aに対するsiRNAおよびshRNA（例、G9a siRNA(human) (Santa Cruz Biotechnology)等）等の核酸性発現阻害剤など〕等が挙げられるが、それらに限定されない。核酸性の発現阻害剤はsiRNAもしくはshRNAをコードするDNAを含む発現ベクターの形態であってもよい。

【0036】

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

【0037】

iPS細胞の樹立効率改善物質の歯髄幹細胞への接触は、該物質が(a) タンパク性因子である場合、(b) 該タンパク性因子をコードする核酸である場合、あるいは(c) 低分子化合物である場合に依りて、核初期化物質についてそれぞれ上記したと同様の方法により、実施することができる。

【0038】

iPS細胞の樹立効率改善物質は、該物質の非存在下と比較して歯髄幹細胞からのiPS細胞樹立効率が有意に改善される限り、核初期化物質と同時に歯髄幹細胞に接触させてもよいし、また、どちらかを先に接触させてもよい。一実施態様において、例えば、核初期化物質がタンパク性因子をコードする核酸であり、iPS細胞の樹立効率改善物質が化学的阻害物質である場合には、前者は遺伝子導入処理からタンパク性因子を大量発現するまでに一定期間のラグがあるのに対し、後者は速やかに細胞に作用しうることから、遺伝子導入処理から一定期間細胞を培養した後に、iPS細胞の樹立効率改善物質を培地に添加することができる。別の実施態様において、例えば、核初期化物質とiPS細胞の樹立効率改善物質とがいずれもウイルスベクターやプラスミドベクターの形態で用いられる場合には、両者を同時に細胞に導入してもよい。

【0039】

10

20

30

40

50

歯髄幹細胞は、その培養に適した自体公知の培地（例えば、特表平11-506610号公報、特表2000-515023号公報参照。例えばMesenchymal stem cells basal medium（Lonza社）、MesenPRO RS Medium（GIBCO）等が市販されている）で前培養することができる。また、例えば約5～20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、RPMI1640培地、199培地またはF12培地等で前培養することも可能である。

【0040】

核初期化物質（及びiPS細胞の樹立効率改善物質）との接触に際し、例えば、カチオニックリポソームなど導入試薬を用いる場合には、導入効率の低下を防ぐため、無血清培地に交換しておくことが好ましい場合がある。核初期化物質（及びiPS細胞の樹立効率改善物質）を接触させた後、細胞を、例えばES細胞の培養に適した条件下で培養することができる。ヒト細胞の場合、通常の培地に分化抑制因子として塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を添加して培養を行うことが好ましい。一方、マウス細胞の場合には、bFGFの代わりにLeukemia Inhibitory Factor（LIF）を添加することが望ましい。また通常、細胞は、フィーダー細胞として、放射線や抗生物質で処理して細胞分裂を停止させたマウス胎仔由来の線維芽細胞（MEF）の共存下で培養される。MEFとしては、通常STO細胞等がよく使われるが、iPS細胞の誘導には、SNL細胞（McMahon, A. P. & Bradley, A. Cell 62, 1073-1085（1990））等がよく使われている。

【0041】

iPS細胞の候補コロニーの選択は、薬剤耐性とレポーター活性を指標とする方法と目視による形態観察による方法とが挙げられる。前者としては、例えば、分化多能性細胞において特異的に高発現する遺伝子（例えば、Fbx15、Nanog、Oct3/4など、好ましくはNanog又はOct3/4）の遺伝子座に、薬剤耐性遺伝子及び／又はレポーター遺伝子をターゲティングした組換え歯髄幹細胞を用い、薬剤耐性及び／又はレポーター活性陽性のコロニーを選択するというものである。一方、目視による形態観察で候補コロニーを選択する方法としては、例えばTakahashi et al., Cell, 131, 861-872（2007）に記載の方法が挙げられる。レポーター細胞を用いる方法は簡便で効率的ではあるが、iPS細胞がヒトの治療用途を目的として作製される場合、安全性の観点から目視によるコロニー選択が望ましい。核初期化物質としてOct3/4、Klf4及びSox2の3因子を用いた場合、樹立クローン数は減少するものの、生じるコロニーのほとんどがES細胞と比較して遜色のない高品質のiPS細胞であることから、レポーター細胞を用いなくとも効率よくiPS細胞を樹立することが可能である。特に、本発明は3因子の導入によるiPS細胞の樹立効率を格段に改善させる作用効果を奏することから、目視による形態観察で十分効率よくiPS細胞の候補コロニーを選択することができる。

【0042】

選択されたコロニーの細胞がiPS細胞であることの確認は、自体公知の種々の試験方法、例えば後記実施例に記載されるES細胞特異的遺伝子の発現解析などにより行うことができる。さらに正確を期す場合は、選択された細胞をマウスに移植してテラトーマ形成を確認すればよい。

【0043】

このようにして樹立されたiPS細胞は、種々の目的で 사용할 ことができる。例えば、ES細胞で報告されている分化誘導法を利用して、iPS細胞から種々の細胞（例、心筋細胞、網膜細胞、血液細胞、神経細胞、血管内皮細胞、インスリン分泌細胞等）・組織・臓器への分化を誘導することができる。

【0044】

歯髄幹細胞は、矯正手術により抜歯した歯・智歯、また虫歯、歯周病、智歯周囲炎等により抜いた歯・智歯などから調製することができるため、多数の人の歯髄幹細胞を容易に収集することができる（現在、歯髄幹細胞バンクとして設立されているものもある）。従って、本発明の歯髄幹細胞は、(1)個々人のiPS細胞、または(2)多種類のHLA抗原の型に対応するiPS細胞、を調製する際のソースとして、極めて有効に用いることができる。

【0045】

患者への細胞・組織の移植に緊急を要する場合、疾患発症後に患者の体細胞からiPS細胞を作製し、それを分化させていたのでは間に合わない場合もある。そのような場合に備えて、(1)あらかじめ個々人の体細胞からiPS細胞もしくはそれから分化させた細胞や組織のバンクを作製しておくか、または(2)HLA抗原の型ごとにiPS細胞もしくはそれから分化させた細胞や組織のバンクを作製しておけば、前記課題を克服し、緊急時であっても移植が可能となる。本発明の歯髄幹細胞は、このような、オーダーメイド再生医療やセミオーダーメイド再生医療においても有効に用いることができる。

【0046】

さらに、iPS細胞から分化させた機能細胞(例、肝細胞)は、対応する既存の細胞株よりも実際の生体内での該機能細胞の状態をより反映していると考えられるので、医薬候補化合物の薬効や毒性のin vitroスクリーニング等にも好適に用いることができる。

10

【0047】

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

【実施例】

【0048】

実施例1：ヒト歯髄幹細胞からのiPS細胞の樹立(1)

実験方法

12~24歳のヒトの抜歯した歯から歯髄由来の幹細胞を調製した(DP28, DP31, DP47, DP54, DP75, DP87)。具体的には、矯正または智歯周囲炎の患者から抜歯した智歯より歯髄組織を摘出し、眼科クーパーにて約1~2mm大の組織片に刻んだ後、Collagenase type I(1mg/ml)で37℃、0.5~1時間処理をした。これをMesenchymal stem cells basal medium(Lonza社製)中で、培養することにより歯髄幹細胞のセルラインを樹立した。コントロールとして36歳の成人皮膚由来線維芽細胞(HDF)も調製した。これらの細胞に対して、Cell, 131, 861-872 (2007)に記載の方法に従い、レンチウイルスを用いて、マウスエコトロピックウイルスレセプターSlc7a1遺伝子を発現させた。

20

これらの細胞(8×10^5 個)に対して、Cell, 131, 861-872 (2007)に記載の方法に従い、ヒト由来の4因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)または3因子(Oct3/4, Sox2, Klf4)をレトロウイルスで導入した。ウイルス感染から6日後に細胞を回収し、フィーダー細胞上への蒔き直しを行った(5×10^4 個または 5×10^5 個/100 mmディッシュ)。フィーダー細胞にはマイトマイシンCで処理して、細胞分裂を止めたSNL細胞(McMahon, A. P. & Bradley, A. Cell 62, 1073-1085 (1990))を用いた。翌日から霊長類ES細胞培養用培地(Rep roCELL)に4 ng/mlのリコンビナントヒトbFGF(WAKO)を加えた培地で培養を行った。

30

4因子を導入した細胞では、レトロウイルス感染後、21日目に出現したコロニー数のカウントを行った。コロニーは形態的に判断し、ES様細胞(iPS細胞)と非ES様細胞(非iPS細胞)に分けてカウントした。結果を表1および図1に示す(図1は表1をグラフ化したものである)。

【0049】

【表1】

	年齢 (M/F)	細胞数	26日目		21日目	
			3因子		4因子	
			ES様	合計	ES様	合計
HDF	36F	5×10^5	0	0	10	246
		5×10^4	0	0	2	24
DP28	14M	5×10^5	176	263	19	734
		5×10^4	8	19	11	74
DP31	14F	5×10^5	116	129	42	465
		5×10^4	5	5	20	75
DP47	12F	5×10^5	46	59	42	903
		5×10^4	6	8	30	116
DP54	19M	5×10^5	76	77	76	410
		5×10^4	2	2	24	50
DP75	24M	5×10^5	1	1	18	117
		5×10^4	0	0	0	4
DP87	20F	5×10^5	123	218	0	>1000
		5×10^4	19	21	169	428

【0050】

4因子を導入した歯髄由来幹細胞6株中5株において、皮膚由来線維芽細胞と比較して、 5×10^5 個の場合は2～8倍の効率で、また 5×10^4 個の場合は5～80倍の効率で、ES様のコロニーが得られた(表1、図1右)。

3因子を導入した細胞では、レトロウイルス感染後、26日目に出現したコロニー数のカウントを行った。3因子を導入した皮膚由来線維芽細胞では26日目においてコロニーは認められなかったが、歯髄由来幹細胞では6株中5株において、2～19個(5×10^4 個から)、46～176個(5×10^5 個から)のES様のコロニーが得られた(表1、図1左)。

歯髄由来幹細胞から樹立したiPS細胞は皮膚由来細胞から樹立したiPS細胞と同様にヒトES細胞様の形態を示し、フィーダー細胞上で増殖を続けることができた。

【0051】

Rever Tra Ace kit (Takara) を使用してRT-PCR解析を行った結果、DP31とDP75から樹立されたES様コロニーはヒトES細胞特異的なマーカー遺伝子であるOct3/4, Sox2, Nanogを発現しており、その発現量はヒトES細胞や過去に樹立した皮膚由来iPS細胞(201B6)と同等であることが示された(図2)。以上の結果より、歯髄由来幹細胞から樹立した細胞は、iPS細胞であることが確認された。

【0052】

実施例2：ヒト歯髄幹細胞からのiPS細胞の樹立(2)

実験方法

実施例1と同じ歯髄幹細胞を用いて、実施例1と同様の方法にて4因子または3因子を導入し、iPS細胞を樹立した。

4因子を導入した細胞では、レトロウイルス感染後、各ラインでES様のコロニーがピックアップできる時期に、出現したコロニー数のカウントを行った。コロニーは形態的に判断し、ES様細胞(iPS細胞)と非ES様細胞(非iPS細胞)に分けてカウントした。結果を図3に示す。

4因子を導入した歯髄由来幹細胞6株中5株において、HDFと比較して、 5×10^5 個の場合は2～19倍の効率で、また 5×10^4 個の場合は3～9倍の効率で、ES様のコロニーが得られた(図3B)。

3因子を導入した細胞では、 5×10^5 個の場合は歯髄由来幹細胞6株中5株において、HDFと比較して2～10倍の効率で、また 5×10^4 個の場合はHDFではES様コロニーが出現しな

ったのに対して、歯髄由来幹細胞は6株中6株においてES様コロニーができ、多いものでは200個近く出現した(図3A)。

DP47から樹立されたES様コロニーについて、ES細胞のマーカーであるNanogおよびOct3/4の発現を免疫染色で調べた。抗体は、抗-NanogがR&D systems社製、抗-Oct3/4はSanta Cruz Biotechnology社製のものを用いた。その結果、いずれの因子の発現も確認された(図4)。またアルカリフォスファターゼ活性も陽性であった(図4)。以上の結果より、歯髄幹細胞から樹立した細胞は、iPS細胞であることが確認された。

【0053】

実施例3：iPS細胞における幹細胞マーカー発現

実験方法

実施例1において得たiPS細胞を、マイトマイシンC処理したSNLフィーダー細胞上に蒔き、5日間インキュベートした。細胞を4% パラホルムアルデヒドで固定し、5% 正常ヤギ血清、1% BSA及び0.2% TritonX-100を含むPBSで透過処理並びにブロッキングを行った。幹細胞マーカー (SSEA1、SSEA3、TRA-1-81、NANOG) の発現を、免疫組織化学的に調べた。一次抗体として、抗-SSEA1 (1:100、Developmental Studies Hybridoma Bank of Iowa University)、抗-SSEA3 (1:100、Dr. Peter Andrewsより提供)、TRA-1-81 (1:100、Dr. Peter Andrewsより提供) 及び抗-NANOG (1:20、R&D systems) を使用した。使用した二次抗体は以下の通りである；Alexa 488-標識抗-マウスIgM (1:500、Invitrogen)、Cy3-標識抗-ラットIgM (1:500、Jackson ImmunoResearch) 及びAlexa-546-標識抗-ヤギIgG (1:500、Invitrogen)。核は、Hoechst 33342 (Invitrogen) で染色した。結果を図5に示す。分析した全てのiPSクローンが、SSEA3、TRA-1-81及びNANOGタンパク質を発現していた。対照的に、いくつかのコロニーの周縁で陽性細胞が観察されたものの、ほとんどの細胞は抗-SSEA1抗体で染色されなかった。ヒトES細胞及びiPS細胞で同様の発現パターンが以前に報告された。これらのデータは、ヒト歯髄幹細胞由来のiPS細胞も、未分化ES細胞マーカー発現においてES細胞と同等であることを示唆した。

【0054】

実施例4：ヒト歯髄幹細胞由来のiPS細胞の分化多能性

実験方法

次に、本発明者らは、これらのiPS細胞が分化多能性であるかどうかをin vitro分化により確認した。胚様体を形成させるために、細胞を採取し、ポリヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)-コートディッシュに移し、8日間インキュベートした。浮遊培養の後、形成された胚様体をゼラチン-コートプレート上に蒔き、さらに8日間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を4% パラホルムアルデヒドで固定し、5% 正常ヤギ血清、1% BSA及び0.2% TritonX-100を含むPBSで透過処理し並びにブロッキングを行った。分化マーカー (III-チューブリン、 α -SMA、AFP) の発現を免疫組織化学的に調べた。一次抗体として、抗-III-チューブリン (1:100、Chemicon)、抗- α -平滑筋アクチン (α -SMA) (1:500、DAKO) 及び抗-AFP (AFP) (1:100、R&D systems) を使用した。Cy3-標識抗-マウスIgG (1:500、Chemicon) を二次抗体として使用した。核は、Hoechst 33342 (Invitrogen) で染色した。結果を図6に示す。浮遊培養の8日後、iPS細胞は胚様体を形成した(図6A)。ゼラチン-コートプレート上でのインキュベーションの後、細胞は様々な細胞型へと形態的に変化した。iPS細胞が外胚葉 (III-チューブリン)、中胚葉 (α -SMA) 及び内胚葉 (AFP) の三胚葉へと分化したことが、免疫組織化学的に示された(図6B)。iPSクローンの間で分化能における顕著な違いは見出されなかった。

【0055】

実施例5：テラトーマ形成

実験方法

本発明者らは、iPS細胞の分化多能性を、テラトーマ形成アッセイにより更に分析した。細胞を10 μ M Y-27632 (Wako) で1時間処理した後、集めた。該細胞を、10 μ M Y-27632を添加したDMEM/F12中におよそ1 $\times 10^7$ cells/mlで懸濁した。30 μ lの細胞懸濁液を、ハミルトンシリンジを使用して、重症複合免疫不全 (Severe Combined Immunodeficiency)(

10

20

30

40

50

SCID) マウス (Charles River) の精巢に注射した。注射の2又は3ヶ月後、テラトーマを解剖し、10% ホルマリンを含むPBSで固定した。パラフィン包埋試料を薄切し、ヘマトキシリン及びエオシンで染色した。結果を図7に示す。テラトーマは、脂肪組織、神経組織、腸管様組織、軟骨組織及び神経管様組織を含む複数の細胞型からなっており、このことはiPS細胞の分化多能性を実証した。

【0056】

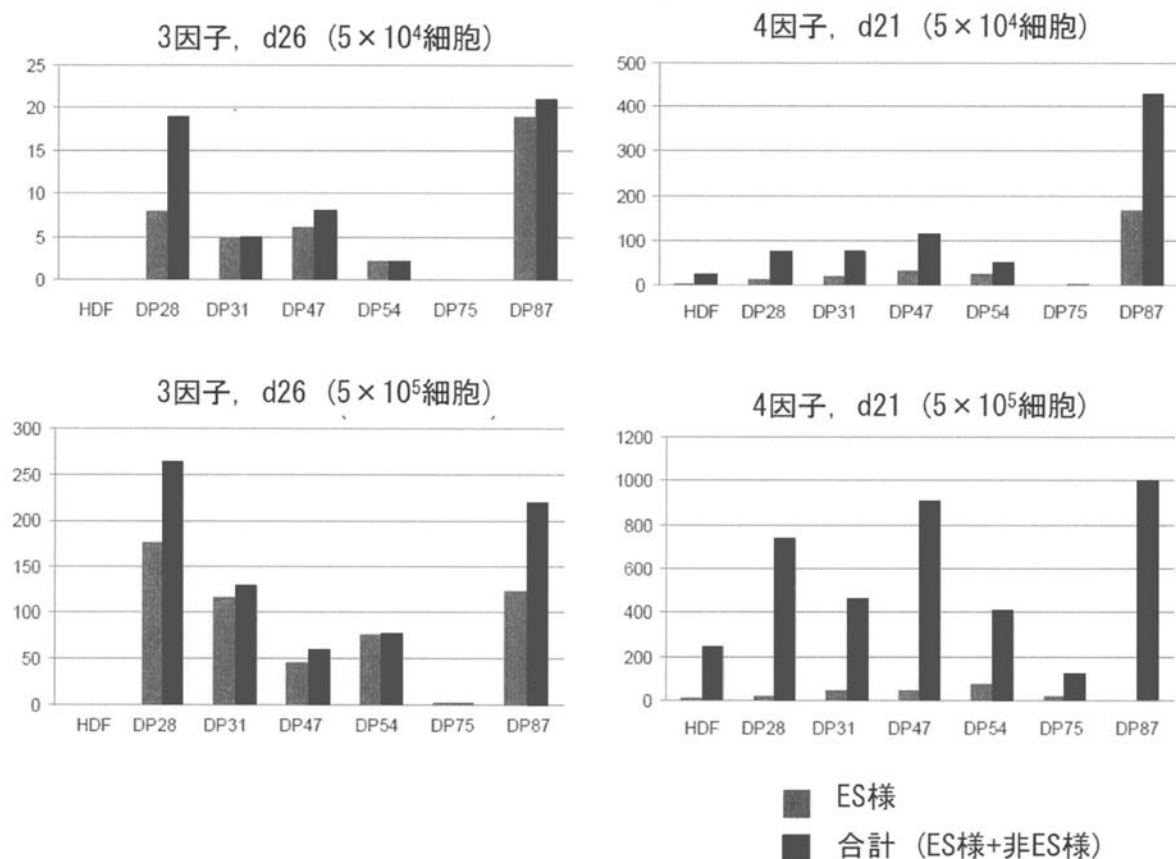
本発明を好ましい態様を強調して説明してきたが、好ましい態様に変更され得ることは当業者にとって自明であろう。本発明は、本発明が本明細書に詳細に記載された以外の方法で実施され得ることを意図する。したがって、本発明は添付の「請求の範囲」の精神および範囲に包含されるすべての変更を含むものである。

10

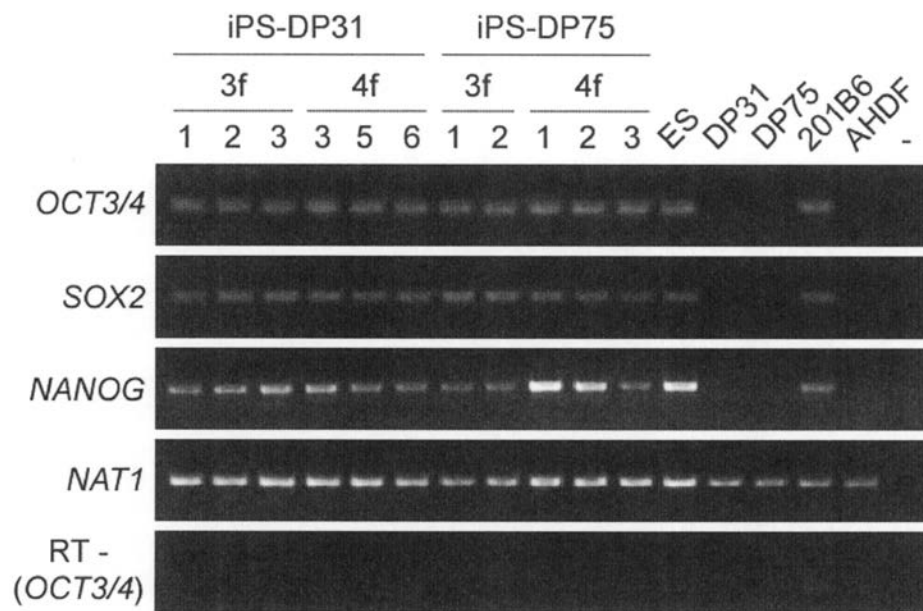
【0057】

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

【図1】

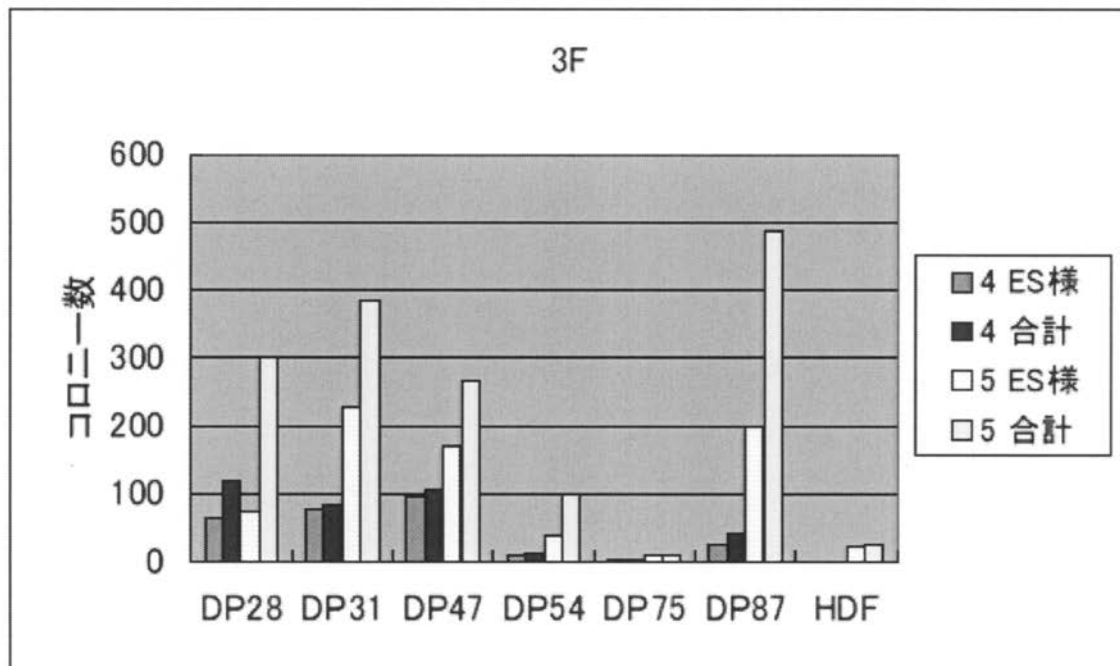


【 図 2 】

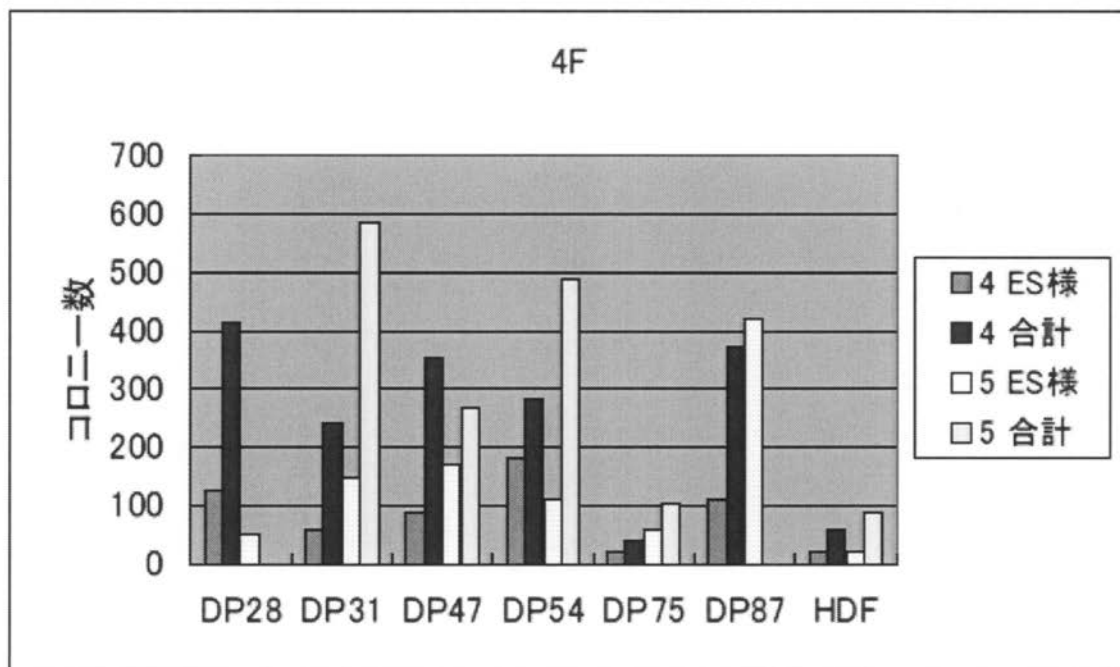


【図3】

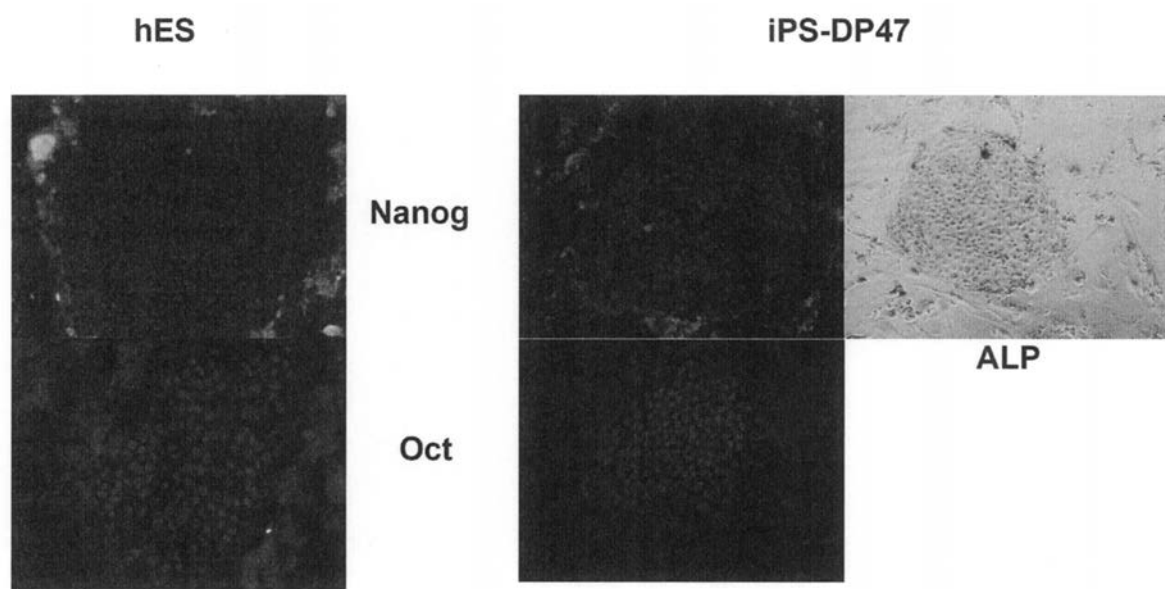
A



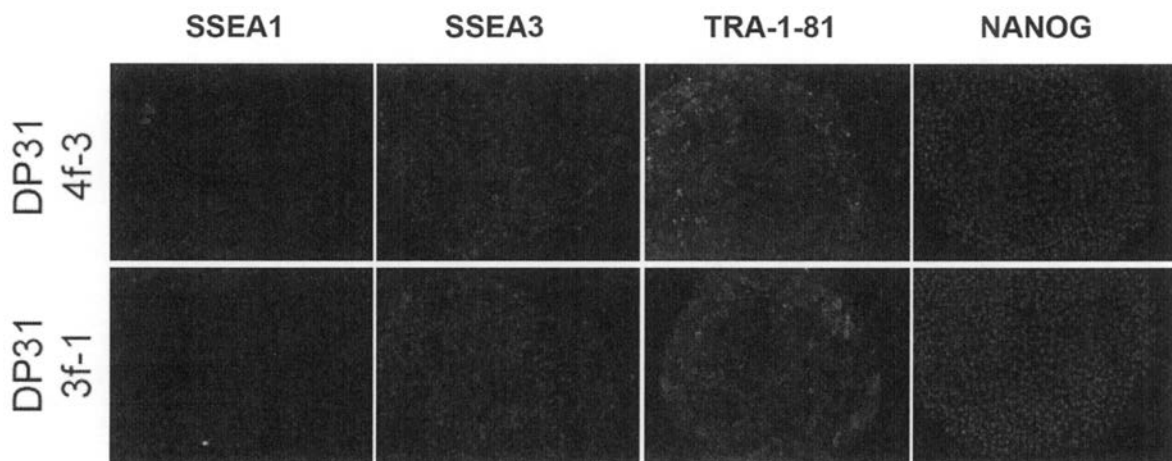
B



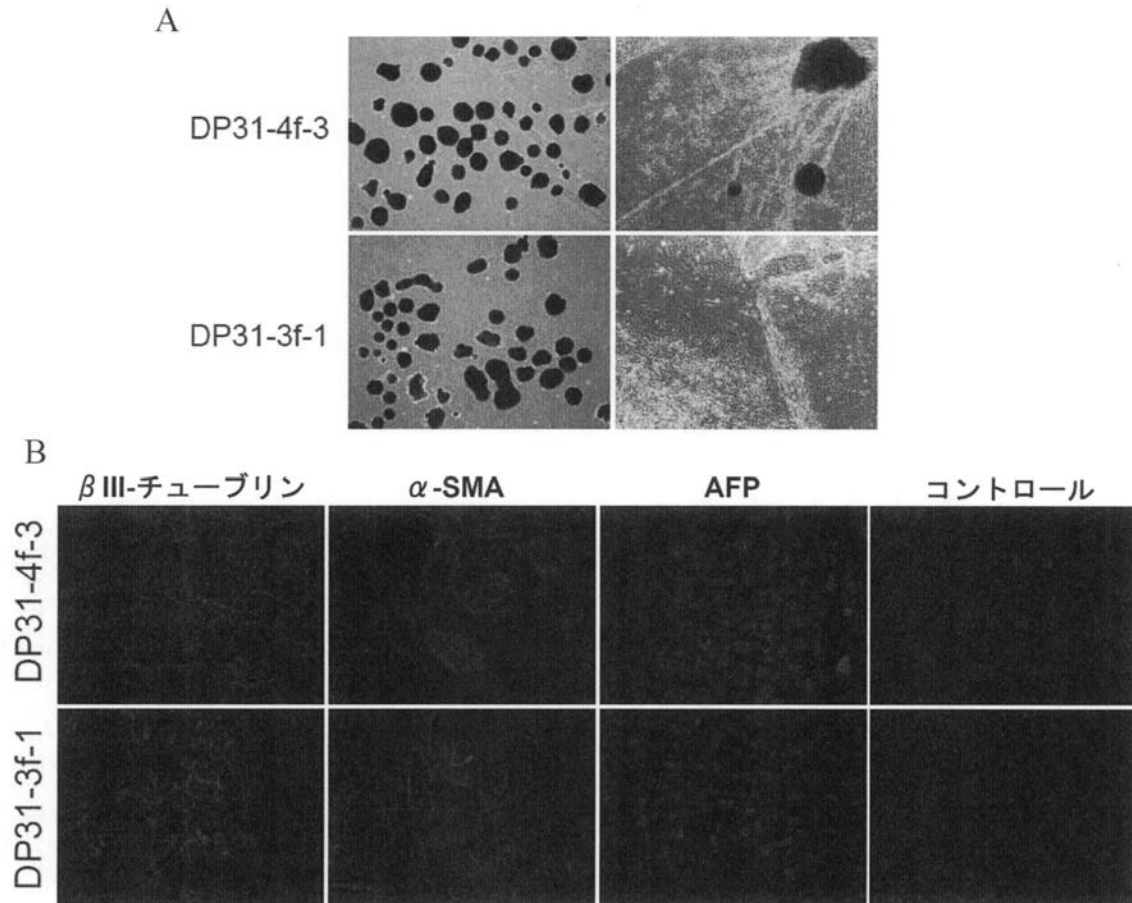
【 図 4 】



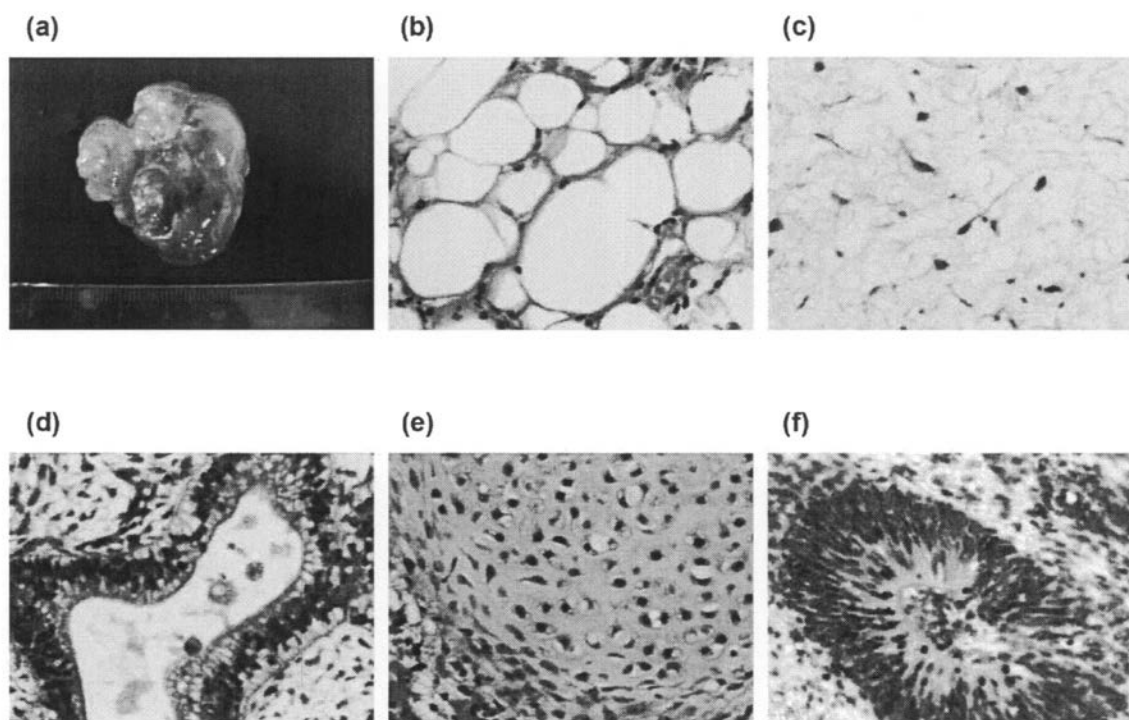
【 図 5 】



【図 6】



【図 7】



フロントページの続き

(出願人による申告)平成20年度、独立行政法人科学技術振興機構、戦略的創造研究推進事業(CREST)、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(74)代理人 100122688

弁理士 山本 健二

(74)代理人 100117743

弁理士 村田 美由紀

(72)発明者 手塚 建一

岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐阜大学内

(72)発明者 柴田 敏之

岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐阜大学内

(72)発明者 國貞 隆弘

岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐阜大学内

(72)発明者 玉置 也剛

岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐阜大学内

(72)発明者 武田 知子

岐阜県岐阜市柳戸1番1 国立大学法人岐阜大学内

(72)発明者 山中 伸弥

京都府京都市左京区聖護院川原町53 国立大学法人京都大学iPS細胞研究所内

(72)発明者 高橋 和利

京都府京都市左京区聖護院川原町53 国立大学法人京都大学iPS細胞研究所内

審査官 上條 肇

(56)参考文献 国際公開第2007/069666(WO, A1)

日本臨床内科医会誌, 2008年 3月, Vol.22, No.5, p.533-542

Nature Biotechnol., 2008年 1月, Vol.26, No.1, p.101-106

Inflammation and Regeneration, 2008年 3月, Vol.28, No.2, p.76-77

日本骨代謝学会雑誌, 2006年, Vol.24, suppl., p.258

Pediatric Dental Journal, 2006年, Vol.16, No.2, p.154-162

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/10

C12N 15/09 - 15/90

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS(JDreamIII)

PubMed

CiNii

医学・薬学予稿集全文データベース

G-Search

メディカルオンライン

Google Scholar