

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-529876

(P2017-529876A)

(43) 公表日 平成29年10月12日(2017.10.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/0735 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/0735	4 B 0 6 5
<b>A 0 1 K 67/027 (2006.01)</b>	A 0 1 K 67/027 Z N A	4 C 0 8 1
<b>C 1 2 N 5/07 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/07	4 C 0 8 7
<b>A 6 1 K 35/12 (2015.01)</b>	A 6 1 K 35/12	
<b>A 6 1 P 43/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 48 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-535951 (P2017-535951)  
 (86) (22) 出願日 平成27年9月18日 (2015. 9. 18)  
 (85) 翻訳文提出日 平成29年5月22日 (2017. 5. 22)  
 (86) 国際出願番号 PCT/CN2015/089963  
 (87) 国際公開番号 WO2016/045550  
 (87) 国際公開日 平成28年3月31日 (2016. 3. 31)  
 (31) 優先権主張番号 201410504189.8  
 (32) 優先日 平成26年9月26日 (2014. 9. 26)  
 (33) 優先権主張国 中国 (CN)

(71) 出願人 517104873  
 ホン グァン リミテッド  
 HONG GUAN LTD.  
 中華人民共和国, ペキン 100080  
 , ハイディアン ディストリクト, ハ  
 イディアン ダ ジェ ナンバー3-1,  
 フィフティーンズ フロアー, ルーム  
 1301-エー1519-1  
 (71) 出願人 510117919  
 ペキン ユニバーシティ  
 中華人民共和国, 北京 100871, ハ  
 イディアン ディストリクト, イヘユアン  
 ロード ナンバー5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 TGFβシグナル伝達非依存性ナイーブ型誘導多能性幹細胞の作製方法及び使用

## (57) 【要約】

非ナイーブ型多能性幹細胞をTGFβシグナル伝達非依存性(TSI)ナイーブ型誘導多能性幹細胞(iPSC)へと変換/再プログラミングするための因子のカクテルを提供する。再プログラムする細胞を有効量の化合物と、細胞をTSIナイーブ型iPSCへと再プログラムするのに十分な期間接触することにより、非ナイーブ型PSCをTSIナイーブ型iPSCへと再プログラミングするための方法も提供する。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

単離した多能性細胞の分化能を伸ばす細胞培養培地組成物であって、以下の群、

- (1) サイトカイン、
- (2) グリコーゲン合成酵素キナーゼ (GSK) 阻害剤、
- (3) 細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) 1 / 2 阻害剤、
- (4) c - Jun N末端キナーゼ (JNK) 阻害剤、
- (5) 塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、及び
- (6) p38 マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) 阻害剤

のそれぞれ由来のナイーブ型多能性 (CINP) の化学誘発因子を、非ナイーブ型細胞の TGFシグナル伝達非依存性 (TSI) ナイーブ型誘導多能性幹細胞 (PSC) への再プログラムに有効な量で、含む組成物。

10

## 【請求項 2】

サイトカインが、ヒト白血病抑制因子 (LIF、“L”)、インターロイキン (IL) - 6、IL - 11、IL - 27、IL - 31、白血病抑制因子、オンコスタチンM、カルジオトロフィン - 1、ニューロポイエチン、及びカルジオトロフィン様サイトカイン因子 1 からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 3】

GSK 阻害剤が GSK 3 阻害剤である、請求項 1 に記載の組成物。

## 【請求項 4】

ERK 1 / 2 阻害剤が、PD0325901 (N - [(2R) - 2, 3 - ジヒドロキシプロポキシ] - 3, 4 - ジフルオロ - 2 - [(2 - フルオロ - 4 - ヨードフェニル) アミノ] - ベンズアミド); PD198306 (N - (シクロプロピルメトキシ) - 3, 4, 5 - トリフルオロ - 2 - [(4 - ヨード - 2 - メチルフェニル) アミノ] - ベンズアミド); SL327 ( - [アミノ[(4 - アミノフェニル) チオ]メチレン] - 2 - (トリフルオロメチル) ベンゼンアセトニトリル); 及び U0126 (1, 4 - ジアミノ - 2, 3 - ジシアノ - 1, 4 - ビス[2 - アミノフェニルチオ]ブタジエン) からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

20

## 【請求項 5】

GSK 阻害剤が、CHIR99021 [6 - [[2 - [[4 - (2, 4 - ジクロロフェニル) - 5 - (5 - メチル - 1H - イミダゾール - 2 - イル) - 2 - ピリミジニル] アミノ] エチル] アミノ] - 3 - ピリジンカルボニトリル]; BIO - アセトキシム; GSK 3I 阻害剤 XV; SB - 216763; CHIR99021 トリヒドロクロリド; GSK - 3 阻害剤 IX [(2Z, 3E) - 6' - プロモ - 3 - (ヒドロキシイミノ) - [2, 3' - ピンドリニリデン] - 2' - オン]; GSK 3IX [6 - プロモインジルピン - 3' - オキシム]; GSK - 3 阻害剤 XII [3 - [[6 - (3 - アミノフェニル) - 7H - ピロロ[2, 3 - d]ピリミジン - 4 - イル] オキシ] フェノール]; GSK - 3 阻害剤 XVI [6 - (2 - (4 - (2, 4 - ジクロロフェニル) - 5 - (4 - メチル - 1H - イミダゾール - 2 - イル) - ピリミジン - 2 - イルアミノ) エチル - アミノ) - ニコチノニトリル]; SB - 415286 [3 - [(3 - クロロ - 4 - ヒドロキシフェニル) アミノ] - 4 - (2 - ニトロフェニル) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン]; 及び Bio [(2'Z, 3'E) - 6 - プロモインジルピン - 3' - オキシム] からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

30

40

## 【請求項 6】

JNK 阻害剤が、SP600125 (アントラ [1 - 9 - cd] ピラゾール - 6 (2H) - オン); BI 78D3 (4 - (2, 3 - ジヒドロ - 1, 4 - ベンゾジオキシ - 6 - イル) - 2, 4 - ジヒドロ - 5 - [(5 - ニトロ - 2 - チアゾリル) チオ] - 3H - 1, 2, 4 - トリアゾール - 3 - オン); CEP 1347 ((9S, 10R, 12R) - 5 - 16 - ビス[(エチルチオ)メチル] - 2, 3, 9, 10, 11, 12 - ヘキサヒドロ - 10 - ヒドロキシ - 9 - メチル - 1 - オキソ - 9, 12 - エポキシ - 1H - ジインドロ

50

[ 1 , 2 , 3 - f g : 3 ' , 2 ' , 1 ' - k l ] ピロロ [ 3 , 4 - i ] [ 1 , 6 ] ベンゾジアゾシン - 1 0 - カルボン酸メチルエステル) ; 及び S U 3 3 2 7 ( - [ ( 5 - ニトロ - 2 - チアゾリル ) チオ ] - 1 , 3 , 4 チアジアゾール - 2 - アミン ) からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 7】

p 3 8 M A P K 阻害剤が、S B 2 0 3 5 8 0 塩酸塩 ( 4 - [ 5 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 2 - [ 4 - ( メチルスルフォニル ) フェニル ] - 1 H - イミダゾール - 4 - イル ] ピリジン塩酸塩 ) ; S B 2 0 2 1 9 0 ( 4 - [ 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 5 - ( 4 - ピリジニル ) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル ] フェノール ) ; D B M 1 2 8 5 二塩酸塩 ( N - シクロプロピル - 4 - [ 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 2 - ( 4 - ペリジニル ) - 5 - チアゾリル ] - 2 - ピリミジンアミン二塩酸塩 ) ; S B 2 3 9 0 6 3 ( トランス - 4 - [ 4 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 5 - ( 2 - メトキシ - 4 - ピリミジニル ) - 1 H - イミダゾール - 1 - イル ] シクロヘキサノール ) ; S K F 8 6 0 0 2 二塩酸塩 ( 6 - ( 4 - フルオロフェニル ) - 2 , 3 - ジヒドロ - 5 - ( 4 - ピリジニル ) イミダゾ [ 2 , 1 - b ] チアゾール二塩酸塩 ) からなる群から選択される、請求項 1 に記載の組成物。

10

【請求項 8】

C H I R 9 9 0 2 1 ; P D 0 3 2 5 9 0 1 ; b F G F ; S P 6 0 0 1 2 5 ; S B 2 0 3 5 8 0 及び S P 6 0 0 1 2 5 を含む、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 9】

細胞培養培地を含む、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の組成物。

20

【請求項 10】

小分子量化合物が相対量で存在し、分化した細胞のナイーブ型多能性を誘導するための細胞培養培地へ入れるキットの、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 11】

ドナー細胞を、非ナイーブ型 P S C を T S I ナーブ型 P S C へと再プログラムするのに有効な期間、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の組成物と共に培養するステップを含む、T S I ナーブ型 P S C を産生する方法。

【請求項 12】

ドナー細胞が、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞、多能性幹細胞、血液起源の細胞、胚起源の細胞、皮膚由来細胞、線維芽細胞、脂肪細胞、上皮細胞、内皮細胞、間葉細胞、実質細胞、神経系の細胞、及び結合組織細胞からなる群から選択される、請求項 11 に記載の方法。

30

【請求項 13】

ドナー細胞が、マウス胚性幹細胞、ヒト胚性幹細胞、及び誘導多能性幹細胞からなる群から選択される、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

ドナー細胞が 4 ~ 14 日の範囲の期間培養される、請求項 11 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

T S I ナーブ型 P S C を単離するステップをさらに含む、請求項 14 に記載の方法。

40

【請求項 16】

T S I ナーブ型 P S C が、単一細胞として播種され、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の組成物を含む細胞培養培地で細胞を培養するステップをさらに含む、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 17】

請求項 11 ~ 16 に記載のいずれか 1 つの方法によって得られる、単離した T S I ナーブ型 P S C 。

【請求項 18】

単離した T S I ナーブ型 P S C 。

50

## 【請求項 19】

PRDM14、KLF5、ZFP42 (REX1)、LIFR、TBX3、及びNANOGからなる群から選択される少なくとも1つのマーカーの発現が、ドナー細胞として同じ生物から単離された未処置の相当する細胞と比較した場合上方制御される、請求項17又は18に記載の細胞。

## 【請求項 20】

TRA-1-60、TRA-1-81、及びSSEA-4からなる群から選択される少なくとも1つのマーカーの発現が、ドナー細胞として同じ生物から単離された未処置の相当する細胞と比較した場合上方制御される、請求項17又は18に記載の細胞。

## 【請求項 21】

SSEA-1の発現が、ドナー細胞として相当する生物から単離された未処置の相当する細胞と比較した場合下方制御される、請求項17～19のいずれか一項に記載の細胞。

## 【請求項 22】

TGF $\beta$ 1受容体阻害剤の存在下で対照と比較したTRA-1-81-陽性細胞の割合の倍数変化によって測定した場合、少なくとも5日間TGF $\beta$ 1受容体阻害剤の存在下で対照の培養後、細胞が多能性を維持する、請求項17～21のいずれか一項に記載の細胞。

## 【請求項 23】

請求項20～26のいずれか一項に記載の単離した細胞の少なくとも10%、20%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、又は99%を含む、TSIナীব型PSCの単離した集団。

## 【請求項 24】

注射、人工器官又は組織工学マトリックスの移植によって個体に投与するために製剤化された請求項20～22のいずれか一項に記載のTSIナীব型PSCを含む治療用組成物。

## 【請求項 25】

請求項20又は21に記載の単離したTSIナীব型PSC、並びに

(1) サイトカイン、

(2) グリコーゲン合成酵素キナーゼ (GSK) 阻害剤、

(3) 細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) 1/2 阻害剤、

(4) c-Jun N末端キナーゼ (JNK) 阻害剤、

(5) 塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF)、及び

(6) p38マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) 阻害剤

を含む培養培地を含む細胞培養。

## 【請求項 26】

前記培養培地が、TSIナীব型PSCを、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10回の継代の間、未分化及びナীব型多能性状態に効果的に維持する、請求項25に記載の細胞培養。

## 【請求項 27】

前記TSIナীব型PSCが、最大8ヵ月の培養後、培養で正常な核型を維持する、請求項25に記載の細胞培養。

## 【請求項 28】

a) ドナー哺乳動物由来のTSIナীব型PSCを調製するステップ; b) 前記TSIナীব型PSCをレシピエント哺乳動物の胚盤胞段階の受精卵へと移植するステップ; c) 非ヒト代理親哺乳動物の子宮で受精卵を発生し同産仔を得るステップ; 及びd) 同産仔から標的臓器を得るステップを含む、発生段階で標的臓器の発生の欠如と関連する異常を有するレシピエント非ヒト哺乳動物で臓器を産生する方法。

## 【請求項 29】

産生される臓器が、膵臓、腎臓、胸腺、及び毛髪からなる群から選択される、請求項2

10

20

30

40

50

8に記載の方法。

【請求項30】

レシピエント哺乳動物が、Shall1ノックアウトマウス、Pdx1-Hes1トランスジェニックマウス、Pdx1ノックアウト、及びヌードマウスからなる群から選択されるマウスである、請求項28に記載の方法。

【請求項31】

請求項28の方法に従って産生した非ヒト哺乳動物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般にはTGF-シグナル伝達非依存性(TSI)ナイーブ型誘導多能性幹細胞に関する。

【背景技術】

【0002】

多能性幹細胞(PSC)が2つの異なる安定な多能性状態であるナイーブ型及びプライム型多能性状態に分類できることがげっ歯類における研究により示めされている(Nicholsら、Cell Stem Cell、4:487~492(2009))。ナイーブ型状態は、着床前のマウス胚盤胞胚の内部細胞塊(ICM)由来のマウス胚性幹細胞(mESC)によって表され(Evansら、Nature、292:154~156(1981); Brookら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、94:5709~5712(1997))、一方プライム型状態は着床後のマウスエピブラストから確立したマウスエピブラスト幹細胞(mEpiSC)に相当する(Tesarら、Nature、448:196~199(2007); Bronsら、Nature、448:191~195(2007))。さらに、ナイーブ型及びプライム型多能性幹細胞は、異なる遺伝子発現プロファイル及び異なるシグナル伝達経路を有し、それらの自己複製を支持する。例えば、mESCはLIFシグナル伝達又は細胞外調節タンパク質キナーゼ(Erk)及びグリコーゲン合成酵素キナーゼ-3(GSK3)の組合せの阻害を必要とし、一方mEpiSCは塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)及びトランスフォーミング成長因子(TGF-)シグナル伝達に依存する(Tesarら、Nature、448:196~199(2007); Yingら、Nature、453:519~523(2008))。さらに、雌のmESCは活性なX染色体状態を保持するが、雌のmEpiESCはX-不活性状態のままである。さらに、プライム型PSCは増殖速度が遅い扁平なコロニーを形成し、単一細胞継代には不応であるが、ナイーブ型PSCは急速に成長し、単一細胞継代により増殖することができる(Nichols、Cell Stem Cell、4:487~49(2009))。最も重要なことには、プライム型多能性幹細胞と対照的に、ナイーブ型PSCはin vitroで明らかな分化系列コミットメントバイアスを保持せず、in vivoで高度なキメラ化を伴う初期の胚盤胞のICMへと再配置し(Bradleyら、Nature、309:255~256(1984); Nichols、Cell Stem Cell、4:487~49(2009))、キメラ動物モデルを作製するために重要なナイーブ型PSCを作出し、哺乳動物の遺伝子機能及び初期の発生を研究することができる。

【0003】

異なるナイーブ型及びプライム型多能性状態はげっ歯類においてよく確立されているが、ヒト及びサルESCなど従来霊長類のPSC及び誘導多能性幹細胞(iPSC)は、遺伝子発現プロファイル、増殖に必要なシグナル伝達経路、及び単一細胞継代への不耐性に関して、着床後のマウスEpiSCにより密接に類似している(Thomsonら、Proc. Natl. Acad. Sci、92:7844~7848(1995); Thomsonら、Science、282:1145~1147(1998); Takahashiら、Cell、131:861~872(2007); Yuら、Science、318:1917~1920(2007); Liuら、Cell Stem Cell

10

20

30

40

50

、3:587~590(2008)。したがって、霊長類のナープ型多能性状態を確立することができるかどうか及びどのように確立できるかは重要な課題のままである。近年の研究は、LRH-1及びRAR $\alpha$ の異所性発現又は小分子の使用など、プライム型PSCの変換によって、又は体細胞の直接的な再プログラミングによって、*in vitro*でナープ型ヒトPSCを誘導することを報告した(Smagghera, PLoS One, 8:e58601(2013); Liら, Cell Stem Cell, 4:16~19(2009); Bueckerら, Cell Stem Cell, 6:535~546(2010); Hannaら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107:9222~9227(2010); Wangら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108:18283~18288(2011)。それにもかかわ  
10  
らず、げっ歯類のナープ型PSCの特徴の完全なセットが不在であることは、霊長類の安定なナープ型多能性状態の必要性を示している。最近、いくつかの報告が、*in vitro*で異なる安定な細胞外遺伝子非依存性ヒトナープ型多能性状態を確立した(Gafniら, Nature, 504:282~286(2013); Chanら, Cell Stem Cell, 13:663~675(2013); Wareら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111:4484~4489(2014); Theunissenら, Cell Stem Cell, 15(4):471~87(2014)。さらに、いくつかの研究は、TGFなど高価な成長因子を含む細胞培養で維持することができる多能性幹細胞を同定した。ヒトナープ型PSCの誘導はマウスと異なるシグナル伝達経路が必要なため、*in vitro*で非ヒト霊長類、例えばアカゲザ  
20  
ル由来のナープ型PSCを生成する方法又はいくつかの成長因子の必要性を排除する方法を使用するナープ型PSCの必要性が依然としてある。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

したがって、本発明の目的は、トランスフォーミング成長因子シグナル伝達非依存性(TSI)ナープ型誘導多能性幹細胞を提供することである。

【0005】

また、本発明の目的は、非ナープ型PSCをTSIナープ型誘導多能性幹細胞に変換する方法を提供することである。  
30

【0006】

さらに、本発明の目的は、ナープ型状態において、TSIナープ型誘導多能性幹細胞を維持する方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

非ナープ型多能性幹細胞をナープ型多能性幹細胞へと変換/再プログラムするために使用することができる因子/化合物のカクテルが同定され、以降カクテルと呼ぶ。カクテルは、ナープ型状態に化学的に誘導される、TGF-シグナル伝達非依存性(TSI)ナープ型多能性幹細胞(すなわち、TSIナープ型PSC)を生成するために使用され、ナープ型状態に生成されたように細胞を維持する。化合物のカクテルは、本明  
40  
細書において以下の化合物((ナープ型多能性の化学誘発因子(CINP))を有効量で、組み合わせて含み、非ナープ型PSCをTSIナープ型PSCへと再プログラムする:(1)サイトカイン;(2)グリコーゲン合成酵素キナーゼ(GSK)阻害剤;(3)ERK1/2阻害剤;(4)c-Jun N末端キナーゼ/ストレス活性化タンパク質キナーゼ(JNK/MAPK)阻害剤(5)塩基性線維芽細胞成長因子及び(6)p38マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ阻害剤。好ましい実施形態では、サイトカインは白血病抑制因子(LIF)("L")であり;GSK阻害剤はアミノピリミジン、化学名[6-[2-[4-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(5-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-2-ピリジニル]アミノ]エチル]アミノ]-3-ピリジンカルボニトリル]を有するCHIR99021("C")であり;ERK1/2阻害剤は  
50

PD0325901であり；JNK阻害剤はSP600125（アントラ[1-9-cd]ピラゾール-6(2H)-オン）であり；及びp38阻害剤はSB203580（4-[5-(4-フルオロフェニル)-2-[4-(メチルスルフォニル)フェニル]-1H-イミダゾール-4-イル]ピリジン）である。この有効量の化合物のカクテルは非ナイーブ型多能性幹細胞をTSIナイーブ型PSCへと再プログラムするために使用することができる。

#### 【0008】

本明細書に開示する化合物のカクテルを使用してドナー細胞を再プログラミングすることによって非ナイーブ型PSCをナイーブ型PSCへと誘導/再プログラミングする方法もまた提供する。再プログラムされる細胞（すなわち、ドナー細胞）は、細胞をTSIナイーブ型PSCへと再プログラムするのに十分な期間カクテルと接触させる。いくつかの実施形態では、ドナー細胞は多能性幹細胞ではなく、ドナー細胞はまずプライム型誘導多能性幹細胞(iPSC)へと変換される。この実施形態では、プライム型iPSCは、最初は本明細書に開示の化合物のカクテルで、4~14日間の間、好ましくは7~10日間の間の期間培養する。好ましい実施形態では、細胞培養培地はPKC阻害剤、ROCK阻害剤、TGF、NOTCH阻害剤、TGF阻害剤又はFGFR阻害剤を含まない。化合物のカクテルはTGFを含まないことがより好ましい。TSIナイーブ型PSCを単離しそれらを生成するために使用する同じ化合物のカクテルを補った多能性幹細胞培養培地においてナイーブ型状態を維持する。

#### 【0009】

TSIナイーブ型PSCもまた提供する。TSIナイーブ型PSCは、少なくともTGF1シグナル伝達非依存的な多能性を維持する能力のため同定される。本明細書に開示のように化合物のカクテルと接触する非ナイーブ型再プログラムPSC細胞は：(i)形態（培養中のドーム形状のコロニーの形成に基づく）、(ii)以下の特徴：(a)TGF1非依存性の多能性の維持（TGF1受容体阻害剤の存在下で対照と比較したTRA-1-81-陽性細胞の割合の倍数変化によって測定した場合）；(b)3つの胚葉の組織へと分化する細胞の能力；(c)PRDM14、KLF5、ZFP42(REX1)、LIFR、TBX3、及びNANOGなどのうちの1つ又は複数のナイーブ型状態関連転写産物の発現の上方制御、(d)TRA-1-60、TRA-1-81、及びSSEA-4などのうちの1つ又は複数の多能性マーカーの発現の上方制御；(e)SSEA-1

#### 【0010】

本明細書に開示のTSIナイーブ型PSCは、少なくともそれらを生成するために使用される方法によって、すなわちそれらの起源によって、ヒト又はマウスESC又はiPSCと区別できる。TSIナイーブ型PSCが、本明細書に記載のように、小分子の組合せにより非ナイーブ型PSCを処置することによって得られる場合、ESCが自然発生の細胞であり、例えば他方では、TSIナイーブ型PSCは自然発生ではない（対応する自然発生のESCには見出されない特徴の保持によって証明されるように）。

#### 【0011】

TSIナイーブ型PSCは、培養又は所望の型の細胞へと分化を誘導することができる。TSIナイーブ型PSC及びそれらの子孫は、細胞療法、動物モデル及び組織工学を含むがこれに限定されない多くの適用に使用できる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0012】

10

20

30

40

50

【図1A】図1Aは、プレート後8日間の試験したシグナル伝達モジュレーターと基礎的な変換条件下で増えるナイーブ型*iPSC*のコロニー数を示す棒グラフである。多能性の維持は、全コロニー中のTBX3及びTRA-1-81のダブルポジティブコロニーの割合によって測定した。陰性対照：2i/LIF（白血球抑制因子）+bFGF（ $n = 3$ ウェル）。全ての値は、3ウェルの反復からの平均 $\pm$ SEMである。

【図1B】図1Bは、プレート後5日間の試験したシグナル伝達モジュレーターと基礎的な変換条件下で増えるアカゲザルのナイーブ型*iPSC*のコロニー数を示す棒グラフである。多能性の維持は、全コロニー中のTBX3又はTRA-1-81のシングルポジティブコロニーの割合によって測定した。陰性対照：2i/LIF+bFGF。全ての値は、3ウェルの反復からの平均 $\pm$ SEMである。

【図1C】図1Cは、プレート後5日間の試験したシグナル伝達モジュレーターと基礎的な変換条件下で増えるアカゲザルのナイーブ型*iPSC*のコロニー数を示す棒グラフである。多能性の維持は、全コロニー中のTBX3又はTRA-1-81のシングルポジティブコロニーの割合によって測定した。陰性対照：2i/LIF+bFGF。全ての値は、3ウェルの反復からの平均 $\pm$ SEMである。

【図2A】図2Aは、確立された、プライム型*iPSC*株のゲノムへと挿入したエピソードベクターの喪失の定量的RT-PCR分析を示す図である。Fibro-D6：6日間のエピソードベクター感染後の線維芽細胞；EViPS-1、2；エピソードベクター系によって確立された2つのプライム型*iPSC*株。全ての値は、3回の独立した実験の平均 $\pm$ SEMである。

【図2B】図2Bは、ナイーブ型*iPSC*（DRN-1、DRN-2、DRN-3）、雌のナイーブ型*iPSC*（FN-1、FN-2、FN-3）及びエピソード誘導ナイーブ型*iPSC*（EVN-1、EVN-2、EVN-3）へと直接変換される、アカゲザルにおける多能性マーカー遺伝子発現のRT-PCR分析を示す図である。（ES-7.5：アカゲザルES株）

【図2C】図2Cは、プライム型*iPSC*及びナイーブ型*iPSC*の単一細胞継代後のコロニー再形成を示す図である。多能性の維持は、継代後5日のTRA-1-81-陽性コロニーの数によって測定された（ $n = 3$ ウェル）。 $P < 0.0001$ （スチューデントのt検定）。全ての値は、3ウェルの複製からの平均 $\pm$ SEMである。

【図2D】図2Dは、ナイーブ型*iPSC*における多能性の遺伝子発現のRT-PCR分析を示す図である（N1、N2、N3：3つの独立に確立されたナイーブ型*iPSC*株；ES-7.5：アカゲザルESC株）。

【図3A】最適化した変換条件下で増えるナイーブ型*iPSC*の、TRA-1-81+ドーム型コロニーの倍数変化を示す図である（図3A）。プライム型*iPSC*は、hESC培地で増やした（図3B）。試験したシグナル伝達モジュレーターは、1mM JAK阻害剤、10mM SB431542（TGF $\beta$ R阻害剤）、2ng/ml TGF- $\beta$ 1、及び2mM SU5402（FGFR阻害剤）である。多能性の維持は、対照（ナイーブ型*iPSC*の最適化した変換条件）と比較したTRA-1-81-陽性ドーム形状コロニー又は対照（プライム型*iPSC*のhESC培地）と比較したTRA-1-81-陽性コロニーの割合の倍数変化によって測定した。異なるカラムは個々の細胞株を表す（ $n = 3$ の異なるウェル）。N1、N2、N3：3つのナイーブ型*iPSC*株；P1、P2、P3：3つのプライム型*iPSC*株。全ての値は、3ウェルの複製からの平均 $\pm$ SEMである。

【図3B】最適化した変換条件下で増えるナイーブ型*iPSC*の、TRA-1-81+ドーム型コロニーの倍数変化を示す図である（図3A）。プライム型*iPSC*は、hESC培地で増やした（図3B）。試験したシグナル伝達モジュレーターは、1mM JAK阻害剤、10mM SB431542（TGF $\beta$ R阻害剤）、2ng/ml TGF- $\beta$ 1、及び2mM SU5402（FGFR阻害剤）である。多能性の維持は、対照（ナイーブ型*iPSC*の最適化した変換条件）と比較したTRA-1-81-陽性ドーム形状コロニー又は対照（プライム型*iPSC*のhESC培地）と比較したTRA-1-81-陽性

10

20

30

40

50

コロニーの割合の倍数変化によって測定した。異なるカラムは個々の細胞株を表す ( $n = 3$  の異なるウェル)。N 1、N 2、N 3 : 3つのナイーブ型 iPSC 株 ; P 1、P 2、P 3 : 3つのプライム型 iPSC 株。全ての値は、3ウェルの複製からの平均  $\pm$  SEM である。

【図 3 C】図 3 C は、最適化した変換条件下 ( $2i/LIF + bFGF + SP600125 + SB203580$ ) で増えるアカゲザルのナイーブ型 iPSC の TRA - 1 - 81 + コロニー数の倍数変化を示す図である。異なる濃度の  $Ly294002$  を 5 日間示したように試験した。多能性の維持を、TRA - 1 - 81 陽性ドーム形状コロニーの数によって測定した。全ての値は、3ウェルの複製からの平均  $\pm$  s . e . m である。

【図 3 D】図 3 D は、最適化した変換条件下 ( $2i/LIF + bFGF + SP600125 + SB203580$ ) で増えるアカゲザルのナイーブ型 iPSC の TRA - 1 - 81 + ドーム型コロニー数の倍数変化を示す図である。さらに、 $2ng/ml$  TGF  $\beta$  1 単独及び  $2ng/ml$  TGF  $\beta$  1 と  $10\mu M$  SB431542 (TGF - R 阻害剤) を試験した。多能性の維持は、対照 ( $2i/LIF + bFGF + SP600125 + SB203580$ ) と比較した TRA - 1 - 81 陽性ドーム形状コロニーの倍数変化によって測定した。全ての値は、3ウェルの複製からの平均  $\pm$  s . e . m である。

【図 3 E】図 3 E は、XIST 発現の qPCR 及び RT - PCR 分析を示す図である (FN - 1 及び FN - 2 : 雌のナイーブ型 iPSC 株 ; FP - 1 及び FP - 2 : 雌のプライム型 iPSC 株 ; FF - 1 及び FF - 2 : 雌の線維芽細胞株 ; N 1 : 雄のナイーブ型 iPSC 株 ; MF : 雄の線維芽細胞株)。RT - PCR の結果は、プライム型 iPSC における XIST の平均発現レベルと比較して示す (雌 1 及び 2 : 2つの雌の細胞源 ; N : ナイーブ型 ; P : プライム型 ; F : 線維芽細胞)。全ての値は、3つの独立した実験からの平均  $\pm$  SEM である。

【図 3 F】図 3 F は、階層的クラスタリングを使用してプライム型 (P 1、P 2) 及びナイーブ型 iPSC (N 1、N 2、FN - 1、FN - 2) の全ゲノム発現プロファイル (RNA - seq) において実施したクラスタリングを示す図である。

【図 3 G】図 3 G は、サルスのナイーブ型とプライム型 iPSC 間の上方及び下方制御されたシグナル伝達経路関連遺伝子カテゴリーを示すジーンオントロジー (GO) 分析を示す図である。

【図 3 H】図 3 H は、ナイーブ型及びプライム型 iPSC の典型的な多能性及び系列特異的マーカー遺伝子発現の定量的 PCR バリデーションを示す図である。全ての値は、3つの独立した実験からの平均  $\pm$  SD である。  $P < 0.0001$  (スチューデントの t 検定) 。

【図 3 I】図 3 I は、ナイーブ型及びプライム型 iPSC の典型的な多能性及び系列特異的マーカー遺伝子発現の定量的 PCR バリデーションを示す図である。全ての値は、3つの独立した実験からの平均  $\pm$  SD である。  $P < 0.0001$  (スチューデントの t 検定) 。

【図 3 J】図 3 J は、ナイーブ型及びプライム型 iPSC の典型的な多能性及び系列特異的マーカー遺伝子発現の定量的 PCR バリデーションを示す図である。全ての値は、3つの独立した実験からの平均  $\pm$  SD である。  $P < 0.0001$  (スチューデントの t 検定) 。

【図 4 A】図 4 A は、レトロウイルス誘導 (OK - 1、OK - 2、OK - 3) 及びエピソームベクター誘導 (EV - 1、EV - 2、EV - 3) アカゲザルプライム型 iPSC における多能性マーカー遺伝子発現の RT - PCR 分析を示す図である。「Endo」は、内在性遺伝子発現を示す。

【図 4 B】図 4 B は、レトロウイルス誘導 (OK - 1、OK - 2、OK - 3) 及びエピソームベクター誘導 (EV - 1、EV - 2、EV - 3) アカゲザルプライム型 iPSC における多能性マーカー遺伝子発現の RT - PCR 分析を示す図である。「Endo」は、内在性遺伝子発現を示す。

【図 4 C】図 4 C は、全ての外因性転写因子遺伝子の発現の定量的 RT - PCR 分析を示

10

20

30

40

50

す棒グラフである。全ての値は、3つの独立した実験からの平均  $\pm$  s . e . m である。

【発明を実施するための形態】

【0013】

I . 定義

本明細書で使用する場合、用語「化学的に誘導した多能性幹細胞」(c i P S C)は、多能性ではない細胞、つまり、1つ又は複数の形質導入遺伝子の発現によってではなく、化合物と非多能性細胞を接触させることによる、多能性又は分化した細胞由来の多能性細胞を指す。

【0014】

本明細書で使用する場合、「2 i」は、グリコーゲン合成酵素キナーゼ - 3 及びマイトジェン活性化タンパク質キナーゼシグナル伝達を二重阻害する E S C 培養培地、例えば 2 i を補った E S C 培養培地を指す ( C H I R 9 9 0 2 1 及び P D 0 3 2 5 9 0 1 ) 。

10

【0015】

本明細書で使用する場合、用語「誘導多能性幹細胞」(i P S C)は、人工的に非多能性細胞に由来する多能性幹細胞の型である。C i P S C は i P S C であるが、それらは、多能性を付与するために遺伝子操作されていないという点で、いくつかの i P S C とは異なる。

【0016】

T S I ナイープ型 P S C を指す場合、用語「単離した」又は「精製した」は、少なくとも 10 %、20 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、又は 99 % ナイープ型多能性細胞ではない細胞型を夾雑しない化学的にナイープ型誘導したナイープ型多能性幹細胞を意味する。単離した T S I ナイープ型 P S C はまた、可溶性の、自然発生の分子を実質的に含まない場合がある。

20

【0017】

本明細書で使用する場合、「培地」及び「培養培地」は、細胞培養環境を指す。培地は典型的には等張液であり、液体、ゼラチン状、又は半固体であってよく、例えば細胞接着又は支持のためのマトリックスを提供する。本明細書で使用する場合、培地は、細胞を培養するために必要な栄養学的な、化学的な、及び構造的な支持のための成分を含むことができる。

30

【0018】

本明細書で使用する場合、用語「多能性 ( p l u r i p o t e n c y )」(又は多能性 ( p l u r i p o t e n t ) ) は、3つの胚葉である内胚葉 (例えば、胃内部の膜、胃腸管、肺)、中胚葉 (例えば、筋肉、骨、血液、泌尿生殖器)、又は外胚葉 (例えば、表皮組織及び神経系)の任意に分化する能力を有する幹細胞を指す。多能性幹細胞は、可塑性でなく、より分化し、与えた臓器内の細胞のいくつかの型の1つになり得る。例えば、多能性血液幹細胞は赤血球前駆細胞、白血球又は血小板産生細胞に発生することができる。生体幹細胞は多能性幹細胞である。脂肪由来幹細胞は多能性である。

【0019】

「多能性細胞」は、本明細書において「多能性幹細胞」と交換可能に使用される。

40

【0020】

用語「小分子」は、2000ダルトンより小さい、より好ましくは1500ダルトンより小さい、最も好ましくは1000ダルトンより小さい分子量を有する、有機又は有機金属化合物などの分子を指す。

【0021】

本明細書で使用する場合、用語「T G F - シグナル伝達非依存性 ( T S I ) ナイープ型 P S C」は、「ナイープ型」P S C である特徴が人工的に付与される P S C、本明細書に開示の化合物のカクテルで非ナイープ型 P S C 細胞を培養することによる非ナイープ型 P S C (ドナー細胞)を指し、ナイープ型 P S C への変換/再プログラミングが T G F シグナル伝達非依存的である。ドナー細胞は非 P S C 及び P S C を含み、多能性を維持す

50

る能力は TGF $\beta$  シグナル伝達非依存性である。TGF $\beta$  シグナル伝達非依存性は、少なくとも 5 日間、TGF $\beta$  1 非依存的に培養した場合、ナイーブ型 PSC の多能性を維持する能力によって決定される (TGF $\beta$  1 受容体阻害剤の存在下で対照に対する TRA-1-81-陽性細胞の割合の倍数変化によって測定した場合)。ナイーブ型 PSC の TGF $\beta$  シグナル伝達非依存性を決定する例は、以下に更に記載するように「細胞培養」で提供される。

#### 【0022】

##### II. 組成物

非ナイーブ型多能性幹細胞を TGF $\beta$  - シグナル伝達非依存性 (TSI) ナイーブ型 PSC へと変換するための化合物のカクテルは、非ナイーブ型 PSC を TGF $\beta$  シグナル伝達非依存性 (TSI) ナイーブ型 PSC へと変換/再プログラムするため、及び培養中ナイーブ型状態に細胞を維持するために有効量の本明細書に開示の化合物を含む。化合物のカクテルは、好ましくは PKC 阻害剤、ROCK 阻害剤、TGF $\beta$ 、NOTCH 阻害剤、TGF $\beta$ R 阻害剤、又は FGFR 阻害剤を含まない。化合物のカクテルは TGF $\beta$  を含まないことがより好ましい。

10

#### 【0023】

本明細書に開示の組成物は、単離した TGF $\beta$  - シグナル伝達非依存性 (TSI) ナイーブ型 PSC も含む。

A. 非ナイーブ型 PSC を TGF $\beta$  - シグナル伝達非依存性 (TSI) ナイーブ型 PSC へと再プログラミングするための化合物のカクテル

20

#### 【0024】

化合物のカクテルは、サイトカイン、小分子及び塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) などのタンパク質因子を含む。最も好ましいカクテルは、4 ng/ml bFGF、10 ng/ml ヒト LIF、CHIR99021 (3  $\mu$ M) 及び PD0325901 (0.5  $\mu$ M)、及び SP600125 (10  $\mu$ M)、及び SB203580 (10  $\mu$ M) を含む。

#### 【0025】

##### 1. サイトカイン

好ましいサイトカインは、ヒト白血病抑制因子 (LIF) (“L”)、インターロイキン 6 クラスサイトカインであり、1 ~ 100 ng/ml、好ましくは 1 ~ 50、及びさらにより好ましくは 1 ~ 30 ng/ml の範囲の濃度で使用される。IL-6 は、ニューロポイエチンの創立メンバーであり、構造的に関連するサイトカインのグループである、プロトタイプの 4 ヘリックスバンドルサイトカインであり、IL-6、IL-11、IL-27、IL-31、白血病抑制因子、オンコスタチン M、カルジオトロフィン-1、ニューロポイエチン、及びカルジオトロフィン様サイトカイン因子 1 (新しいニューロトロフィン 1 及び B 細胞刺激因子-3 としても公知)、及び IL-6 の 2 つのウイルス類似体を含む。サイトカインのインターロイキン 6 ファミリーのこれらのメンバーは、LIF について開示したのと同程度の濃度で本明細書に開示の組成物に使用することができる。

30

#### 【0026】

##### 2. 小分子

本明細書に開示の化学カクテルは、単独で又はタンパク質と組み合わせて 2000 ダルトンより小さい、より好ましくは 1500 ダルトンより小さい、最も好ましくは 1000 ダルトンより小さい分子量を有する、有効量の小分子を含む。小分子は、900 ダルトンより小さい又は等しい、若しくは 500 ダルトンより小さい又は等しい分子量を有し得る。より大きな分子は、化学的に誘導する再プログラミング、好ましくは本明細書で同定した小分子と同じ経路の標的化において使用することができる。

40

#### 【0027】

##### (i) ERK1/2 阻害剤

好ましい ERK1/2 阻害剤は、0.1 ~ 5  $\mu$ M、好ましくは 0.5 と 3 の間、さらにより好ましくは 1.5 と 1  $\mu$ M の間の濃度範囲の PD0325901 (N-[ (2R) -

50

2, 3 - ジヒドロキシプロポキシ] - 3, 4 - ジフルオロ - 2 - [(2 - フルオロ - 4 - ヨードフェニル)アミノ] - ベンズアミド)である。例えば、カクテルは、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5 μMの濃度でPD0325901を含むことができる。しかし、他の有用な阻害剤は、限定されないが、PD198306 (N - (シクロプロピルメトキシ) - 3, 4, 5 - トリフルオロ - 2 - [(4 - ヨード - 2 - メチルフェニル)アミノ] - ベンズアミド); SL327 ( - [アミノ[(4 - アミノフェニル)チオ]メチレン] - 2 - (トリフルオロメチル)ベンゼンアセトニトリル); 及びU0126 (1, 4 - ジアミノ - 2, 3 - ジシアノ - 1, 4 - ビス[2 - アミノフェニルチオ]ブタジエン)を含む。

10

## 【0028】

## (ii) GSK阻害剤

GSK阻害剤は好ましくはGSK3を阻害し、好ましくはGSK3に選択的である。好適なGSK阻害剤は、アミノピリミジン、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3阻害剤であるCHIR99021である。CINP組成物は、0.01 ~ 20 μM、好ましくは1と3 μMの間、さらにより好ましくは1.5と3 μMの間の濃度範囲でCHIR99021を含む。例えば、CINPは、0.01、0.05、0.1、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、10、20 μMの濃度でCHIR99021を含み得る。当業者が必要な有効量に容易に合わせることができるよう、これらの数値の間にある濃度を熟慮した。

20

## 【0029】

しかし、他のGSK阻害剤が市販されており、本明細書に開示の組成物に使用することができる。例としては、限定されないが、BIO - アセトキシム; GSK 3I阻害剤XV; SB - 216763; CHIR99021のヒドロクロリド塩であるCHIR99021トリヒドロクロリド; GSK - 3阻害剤IX [(2Z, 3E) - 6' - プロモ - 3 - (ヒドロキシイミノ) - [2, 3' - ビンドリニリデン] - 2' - オン]; GSK 3IX [6 - プロモインジルピン - 3' - オキシム]; GSK - 3阻害剤XII [3 - [[6 - (3 - アミノフェニル) - 7H - ピロロ[2, 3 - d]ピリミジン - 4 - イル]オキシ]フェノール]; GSK - 3阻害剤XVI [6 - (2 - (4 - (2, 4 - ジクロロフェニル) - 5 - (4 - メチル - 1H - イミダゾール - 2 - イル)ピリミジン - 2 - イルアミノ)エチル - アミノ) - ニコチノニトリル]; SB - 415286 [3 - [(3 - クロロ - 4 - ヒドロキシフェニル)アミノ] - 4 - (2 - ニトロフェニル) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン]; 及びBio [(2'Z, 3'E) - 6 - プロモインジルピン - 3' - オキシム]が挙げられる。

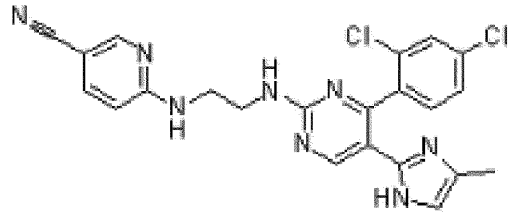
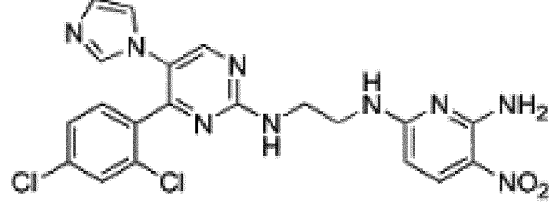
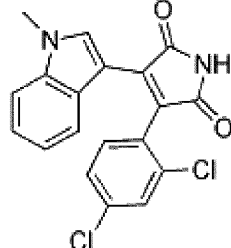
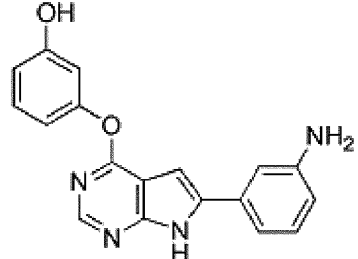
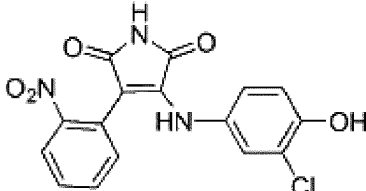
30

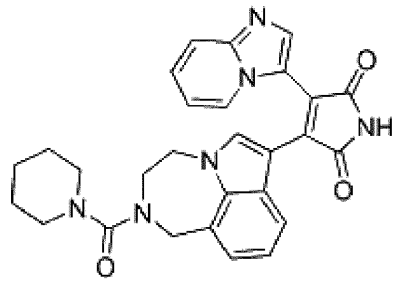
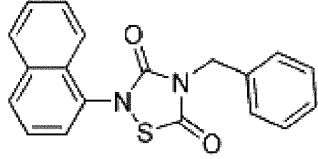
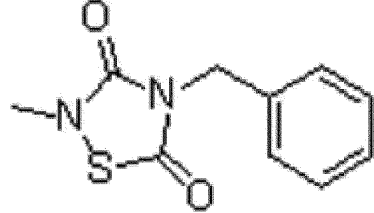
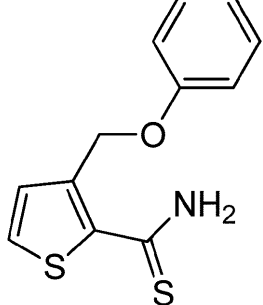
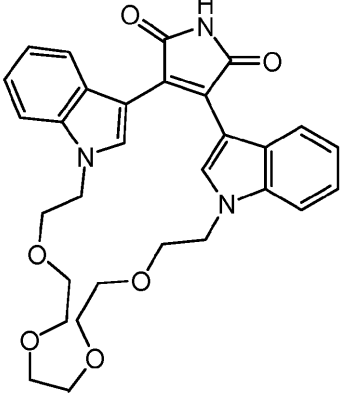
## 【0030】

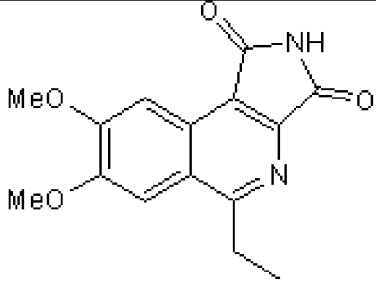
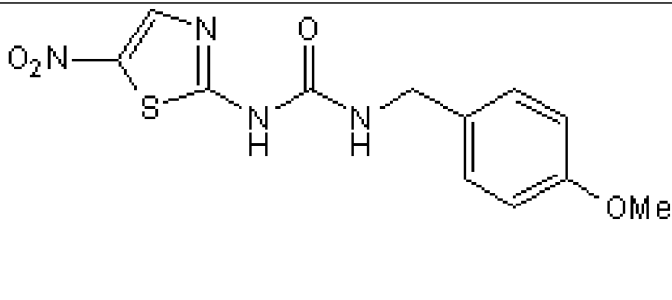
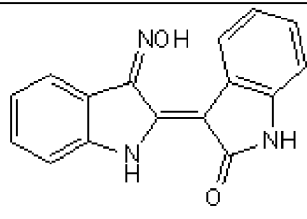
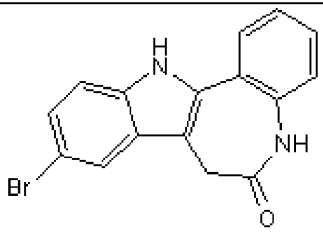
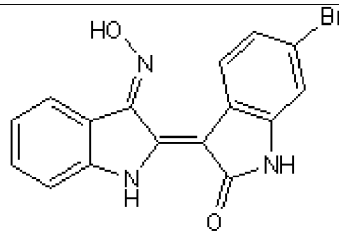
非ナイーブ型細胞をTSIナイーブ型PSCへと再プログラミングするためのカクテルに含むことができる有用な化合物の非限定的なリストを、それらの構造を含む表1に提供する。

【表 1】

表1.有用な化合物

CHIR99021	 <p>Chemical structure of CHIR99021, a complex molecule featuring a central pyrimidine ring system. It is substituted with a 4-cyano-2-pyridylamino group, a 2,4-dichlorophenyl group, and a 2-methylimidazol-5-yl group. The structure is shown as a hydrochloride salt (HCl).</p> <p>HCl</p>	10
CHIR98014	 <p>Chemical structure of CHIR98014, a complex molecule featuring a central pyrimidine ring system. It is substituted with a 2-imidazolyl group, a 2,4-dichlorophenyl group, and a 2-amino-5-nitrophenylamino group.</p>	20
SB216763	 <p>Chemical structure of SB216763, a complex molecule featuring a central pyrimidine ring system. It is substituted with a 2-methylimidazol-5-yl group, a 2,4-dichlorophenyl group, and a 2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-1H-imidazol-5-yl group.</p>	30
TWS119	 <p>Chemical structure of TWS119, a complex molecule featuring a central pyrimidine ring system. It is substituted with a 4-hydroxyphenyl group, a 2-amino-5-nitrophenyl group, and a 2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-1H-imidazol-5-yl group.</p>	40
SB415286	 <p>Chemical structure of SB415286, a complex molecule featuring a central pyrimidine ring system. It is substituted with a 2-nitrophenyl group, a 2-oxo-1,2,3,4-tetrahydro-1H-imidazol-5-yl group, and a 2-amino-5-nitrophenyl group.</p>	40

LY2090314	 <p>Chemical structure of LY2090314, a complex molecule featuring a piperidine ring, a piperazine ring, and a benzimidazole ring system, with a pyrazole-4,5-dione moiety attached to the benzimidazole.</p>	
チデグルシブ	 <p>Chemical structure of チデグルシブ (Tideglusib), a thiazolidine derivative with a fluorenyl group and a benzyl group.</p>	10
TDZD-8	 <p>Chemical structure of TDZD-8, a thiazolidine derivative with a methyl group and a benzyl group.</p>	20
CBM1078	 <p>Chemical structure of CBM1078, a thiazolidine derivative with an amino group and a benzyl group.</p>	30
TD114-2	 <p>Chemical structure of TD114-2, a complex molecule featuring a thiazolidine ring system with multiple fused and linked rings, including a benzimidazole and a benzimidazole derivative.</p>	40

3F8		
AR-A 014418		10
FRATide	<p>Ser-Gln-Pro-Glu-Thr-Arg-Thr-Gly-Asp-Asp-Asp-Pro-His-Arg-Leu-Leu-Gln-Gln-Leu-Val-Leu-Ser-Gly-Asn-Leu-Ile-Lys-Glu-Ala-Val-Arg-Arg-Leu-His-Ser-Arg-Arg-Leu-Gln</p>	20
インジルビン-3'-オキシム		
L803	<p>Lys-Glu-Ala-Pro-Pro-Ala-Pro-Pro-Gln-pSer-Pro</p>	
ケンパウロン		30
BIO		40

## 【 0 0 3 1 】

( i i i ) JNK 阻害剤

好ましい JNK 阻害剤は、1 と 100  $\mu$ M の間、好ましくは 1 ~ 50  $\mu$ M、及びさらにより好ましくは 1 ~ 30  $\mu$ M の濃度範囲の SP600125 (アントラ [1-9-cd] ピラゾール-6(2H)-オン) である。例えば、組成物のカクテルは、5、10、15、20、25、又は 30  $\mu$ M の SP600125 を含み得る。当業者が必要な有効量に容易に合わせることができるように、これらの数値の間にある濃度を熟慮した。

## 【 0 0 3 2 】

他の有用な JNK 阻害剤は、限定されないが、BI 78D3 (4 - (2, 3 - ジヒドロ - 1, 4 - ベンゾジオキシン - 6 - イル) - 2, 4 - ジヒドロ - 5 - [(5 - ニトロ - 2 - チアゾリル)チオ] - 3H - 1, 2, 4 - トリアゾル - 3 - オン); CEP 1347 ((9S, 10R, 12R) - 5 - 16 - ビス[(エチルチオ)メチル] - 2, 3, 9, 10, 11, 12 - ヘキサヒドロ - 10 - ヒドロキシ - 9 - メチル - 1 - オキソ - 9, 12 - エポキシ - 1H - ジインドロ[1, 2, 3 - fg: 3', 2', 1' - k1]ピロロ[3, 4 - i][1, 6]ベンゾジアゾシン - 10 - カルボン酸メチルエステル); 及び SU 3327 (- [(5 - ニトロ - 2 - チアゾリル)チオ] - 1, 3, 4 チアジアゾール - 2 - アミン); AEG 3482 (6 - フェニルイミダゾ[2, 1 - b] - 1, 3, 4 - チアジアゾール - 2 - スルホンアミド)を含む。

10

【0033】

(iv) p38 MAPK 阻害剤

好ましい p38 MAPK 阻害剤は、1と100 μMの間、好ましくは1~50 μM、及びさらにより好ましくは1~30 μMの濃度範囲で使用される SB 203580 (4 - [5 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - [4 - (メチルスルフォニル)フェニル] - 1H - イミダゾール - 4 - イル]ピリジン)である。例えば、組成物のカクテルは5、10、15、20、25、又は30 μMの SB 203580 を含み得る。他の有用な p38 MAPK 阻害剤は、限定されないが、SB 203580 塩酸塩 (4 - [5 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - [4 - (メチルスルフォニル)フェニル] - 1H - イミダゾール - 4 - イル]ピリジン塩酸塩); SB 202190 (4 - [4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - (4 - ピリジニル) - 1H - イミダゾール - 2 - イル]フェノール); DBM 1285 二塩酸塩 (N - シクロプロピル - 4 - [4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - ピペリジニル) - 5 - チアゾリル] - 2 - ピリミジンアミン二塩酸塩); SB 239063 (トランス - 4 - [4 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - (2 - メトキシ - 4 - ピリミジニル) - 1H - イミダゾール - 1 - イル]シクロヘキサノール); SKF 86002 二塩酸塩 (6 - (4 - フルオロフェニル) - 2, 3 - ジヒドロ - 5 - (4 - ピリジニル)イミダゾ[2, 1 - b]チアゾール二塩酸塩)を含む。

20

【0034】

3. タンパク質因子

組換え塩基性線維芽細胞成長因子 (bFGF) などのタンパク質因子は、非ナイーブ型 PSC を TSI ナーブ型 PSC に変換するためのプロトコールにおいて有効であることが実証されている。bFGF は、10 ng/mL ~ 200 ng/mL の濃度範囲、好ましくは 10 ng/mL の濃度で使用することができる。使用することができる他の因子は FGF 1 ~ 18 を含む。

30

【0035】

B. 誘導される細胞 (ドナー細胞)

TSI ナーブ型 PSC は、サルなど、例えば、アカゲザル、チンパンジー、ゴリラ、ヒヒなどの非ヒト霊長類から、いくつかの実施形態において得た多能性細胞、又は部分的に若しくは完全に分化した細胞を誘導/再プログラミングすることによって得た。他の実施形態では、しかしながら、誘導/再プログラムされた細胞はヒトから得られる。供給源は骨髄、線維芽細胞、胎児組織 (例えば、胎児肝臓組織)、末梢血、臍帯血、脾臓、皮膚又は任意の臓器若しくは組織を含む。

40

【0036】

好ましい実施形態では、TSI ナーブ型 PSC は、多能性細胞、例えば胚性幹細胞又は誘導多能性幹細胞 (iPSC) から得られる。iPSC 誘導細胞は、遺伝子工学及び/又は純粋な化学的再プログラミングによって得られる。他の実施形態では、TSI ナーブ型 PSC は、胚盤胞から得られる。

【0037】

iPSC は化学的に誘導した線維芽細胞、組織脂肪幹細胞、神経幹細胞又は腸上皮由来の細胞から得られることが好ましい。いくつかの実施形態では、TSI ナーブ型 PSC

50

は、化学的に誘導した新生児（例えば包皮）又は成人線維芽細胞から得られる。しかしながら、iPSCは、限定されないが、多能性幹細胞、血液起源の細胞、胚起源の細胞、皮膚由来細胞、線維芽細胞、脂肪細胞、上皮細胞、内皮細胞、間葉細胞、実質細胞、神経系の細胞、及び結合組織細胞を含む、他の細胞型から得ることができる。

【0038】

本明細書に開示の方法において使用することができる多能性細胞は、当技術分野で公知であり、記載されており、培養細胞を維持する方法を含む。

【0039】

ドナー細胞は、適当な臓器又は組織を脱凝集することにより単離でき、当業者に公知の技術を使用する細胞源として寄与する。例えば、組織又は臓器は、機械的に脱凝集及び/又は消化酵素及び/又は隣接する細胞間の結合を弱めるキレート剤で処置することができる。組織は明らかな細胞破碎なく個々の細胞の懸濁液を形成するために分散することができる。酵素の解離は、組織を刻むステップ及び刻んだ組織をトリプシン、キモトリプシン、コラゲナーゼ、エラスターゼ、及び/又はヒアルロニダーゼ、DNase、プロナーゼ、ディスパーゼなどのうちの1つ又は複数の酵素で処置するステップによって達成することができる。機械的な破壊も、限定されないが、粉碎機、ブレンダー、ふるい、ホモジナイザー、圧力セル、又はインソネーター（insonator）の使用を含む、多くの方法によって達成することができる。

10

【0040】

C . TGF- $\beta$ 1 - シグナル伝達非依存性（TSI）ナイーブ型PSC

20

TSIナイーブ型PSCは、(i)形態学的に、(ii)機能的に、特徴：(a) TGF $\beta$ 1非依存性の多能性の維持（TGF $\beta$ 1受容体阻害剤の存在下で対照と比較したTRA-1-81-陽性細胞の割合の倍数変化によって測定した場合）；(b) 3つの胚葉の組織へと分化する細胞の能力；(c) PRDM14、KLF5、ZFP42（REX1）、LIFR、TBX3、及びNANOGなどのうちの1つ又は複数のナイーブ型状態関連転写産物の発現の上方制御、(d) TRA-1-60、TRA-1-81、及びSSEA-4などのうちの1つ又は複数の多能性マーカーの発現の上方制御；(e) SSEA-1などのうちの1つ又は複数の多能性マーカーの発現の下方制御；(f) *in vivo*で種間キメラを形成する能力に基づいて同定することができる。

【0041】

30

TSIナイーブ型PSCはドーム形状コロニーを形成する。したがって、ドーム形状コロニーの形成は、TSIナイーブ型PSCを同定し、続いて本明細書に例示するように細胞培養することができる。TSIナイーブ型PSCは、当技術分野で公知の方法を使用して3つの胚葉、外胚葉、中胚葉、及び内胚葉のそれぞれから1つ又は複数の細胞/組織へと分化する能力を有する。

【0042】

外胚葉は胚の外側の層を生成し、胚のエピブラストから形成する。外胚葉は表面の外胚葉、神経冠、及び神経管へと発生する。表面の外胚葉は、表皮、毛髪、爪、目のレンズ、皮脂腺、角膜、歯のエナメル、口及び鼻の上皮を発生する。外胚葉の神経冠は、末梢神経系、副腎髄質、メラニン形成細胞、顔の軟骨組織へと発生する。外胚葉の神経管は、脳、脊髄、下垂体後葉、運動神経、及び網膜へと発生する。

40

【0043】

内胚葉はまず、扁平な細胞からなり、次いで円柱状になる。内胚葉は、口及び咽頭の一部並びに直腸の末端部分を除く消化管全体の上皮内層を形成する（外胚葉の退行によって裏打ちされる）。内胚葉はまた、肝臓及び膵臓のもの；耳管及び鼓膜の上皮；気管、気管支、及び肺の気室；膀胱及び尿道の部分；並びに甲状腺及び胸腺の濾胞内層を含む消化管へ開く全ての腺の表層細胞も形成する。内胚葉は：胃、結腸、肝臓、膵臓、膀胱、気管の上皮部分、肺、咽頭、甲状腺、副甲状腺、及び腸を形成する。

【0044】

中胚葉は、結合組織、筋肉（平滑及び横紋）、リンパ系、骨、漿膜、軟骨組織、脂肪組

50

織、循環系、真皮、泌尿生殖器系、及び脊索を形成する。

【0045】

T S I ナイープ型 P S C は、未処置の相当する *in vitro* での培養細胞又は他の P S C とは、T G F  $\beta$  1 非依存性の多能性を維持する能力 (T G F  $\beta$  1 受容体阻害剤の存在下で対照と比較した T R A - 1 - 8 1 - 陽性細胞の割合の倍数変化によって測定した場合) において、さらに区別することができる。例えば、他の P S C とは対照的に、T S I ナイープ型 P S C は T G F  $\beta$  1 受容体阻害剤の存在下で少なくとも 5 日間培養後、多能性を維持することができる。ナイープ型 P S C の T G F  $\beta$  シグナル伝達非依存性を決定する例は、「細胞培養」で提供される。簡潔に言うと、T S I ナイープ型 P S C は、最適化した変換培地でのアカゲザルのナイープ型 *i* P S C 培養に関して本明細書に開示のように培養される。最適化した変換培地は、補充培地に T G F  $\beta$  1 受容体阻害剤、及び T S I ナイープ型 P S C を捕い、実施例に記載のように T R A - 1 - 8 1 - 陽性細胞を同定し、T G F  $\beta$  1 受容体阻害剤を捕わずに同様に培養した T S I ナイープ型 P S C と比較することができる。ナイープ型細胞は、このアッセイにおいて対照と比較した場合、すなわち、T R A - 1 - 8 1 - 陽性細胞が 2 倍より多く減少し、ナイープ型 P S C が本明細書に定義したように T S I ナイープ型 P S C として特徴づけられない場合、50% より少ない、好ましくは 40%、30%、20%、10%、5% 若しくはそれ以下より少ない T R A - 1 - 8 1 - 陽性細胞の減少に基づいて T S I ナイープ型 P S C として特徴づけられる。或いは、又はさらに、T S I ナイープ型 P S C は、明白な分化及び未処置対照と比較した場合の処置した細胞から得られたコロニーにおける T R A - 1 - 8 1 発現の減少によって測定したように、R h o - 関連の選択的阻害剤、コイルドコイル含有タンパク質キナーゼ (R O C K)、例えば Y 2 7 6 3 2 [ ( + ) - ( R ) - トランス - 4 - ( 1 - アミノエチル ) - N - ( 4 - ピリジル ) シクロヘキサカルボキサミド + + + 二塩酸塩 ] ( 1 0  $\mu$  M ) 及びタンパク質キナーゼ C ( P K C ) 阻害剤、例えば G O 6 9 8 3 [ 3 - [ 1 - [ 3 - ( ジメチルアミノ ) プロピル ] - 5 - メトキシ - 1 H - インドール - 3 - イル ] - 4 - ( 1 H - インドール - 3 - イル ) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ] ( 5  $\mu$  M ) の存在下で多能性を維持することができない点で他の P S C とは区別することができる。

10

20

【0046】

I I I . 作製方法

A . 非 P S C の T S I ナイープ型 P S C への再プログラミング

T S I ナイープ型 P S C は、誘導 / 再プログラムされる細胞 ( 本明細書ではドナー細胞 ) を本明細書に開示の化合物のカクテルを含有する培養培地に、細胞の T S I ナイープ型 P S C への再プログラミングをもたらすのに十分な期間接触させることにより産生される。

30

【0047】

ドナー細胞は、細胞の T S I ナイープ型 P S C への再プログラミングを誘導及び / 又は増強するのに有効な量で本明細書に開示のカクテルと接触する。当業者は、以下の例に概説した方法、又は当業者に公知の他の方法を使用することによって、完全な再プログラミングを提供するのに必要な本明細書に開示の化合物の濃度を容易に決定できる。好ましい実施形態では、ドナーは多能性幹細胞、例えば胚性幹細胞又は誘導多能性幹細胞 ( *i* P S C ) である。*i* P S C は、遺伝子工学及び / 又は純粋な化学的再プログラミングによって得られる細胞を含む。他の実施形態では、T S I ナイープ型 P S C は胚盤胞 ( *b l a c t o c y t* ) から得られる。

40

【0048】

ドナー細胞が線維芽細胞などの多能性幹細胞ではない実施形態では、ドナー細胞は T S I ナイープ型 P S C への再プログラミングの前に、プライム型誘導多能性幹細胞 ( *i* P S C ) へと変換することができる。或いは、細胞は直接 T S I ナイープ型 P S C へと変換することができる。非多能性幹細胞を誘導多能性幹細胞へと変換する方法は、当技術分野で公知であり、例えば、L i u ら、C e l l S t e m C e l l、3 : 5 8 7 ~ 5 9 0 ( 2 0 0 8 ) ; Z h a o ら、C e l l S t e m C e l l、3 : 4 7 5 ~ 4 7 9 ( 2 0 0

50

8)、Okitaら、Nat. Methods、8:409~412(2011)に記載されている。iPSCは、TSIナীব型PSCへの再プログラミング前20~40日の間、好ましくは25~35日の間の期間、iPSC用の培養培地で維持され(先に記載したように)、多能性の誘導へと続く(Liuら、Cell Stem Cell、3:587~590(2008);Zhaoら、Cell Stem Cell、3:475~479(2008)、Okitaら、Nat. Methods、8:409~412(2011))。例えば、Liuら、Cell Stem Cell、3:587~590(2008)に記載のように、レトロウイルス因子含有再プログラミング因子(OCT4、KL4)での線維芽細胞への形質導入後、そのように生成されたiPSCは実施例に記載のように、小分子を捕った幹細胞培養培地で、培地を2日ごとに交換しながら培養する。iPSCコロニーは、TSIナীব型PSCへの再プログラミングのためおよそ20~40日、好ましくはおよそ25~35日で選択し、iPS用の培養条件下でフィーダー細胞上で維持する。iPSCをTSIナীব型PSCへと再プログラムするため、プライム型iPSCを4と14日の間、好ましくは7~10日の間の期間、最初は本明細書に開示の化合物のカクテルで培養する。

10

#### 【0049】

非多能性幹細胞上で直接変換、例えば、線維芽細胞をTSIナীব型PSCへ変換するため、細胞に、例えばLiuら、Cell Stem Cell、3:587~590(2008)に記載のように再プログラミング因子を含有するレトロウイルスベクターを感染させ、15~35日、好ましくは15と20日の間、より好ましくは20日間の期間、基礎培地(DF12、20%KSR、塩基性線維芽細胞成長因子)で維持する。次いで、細胞培養培地を、7~10日の期間、非ナীব型PSCをTSIナীব型PSCへと再プログラミングするための因子のカクテルを含有する細胞培養培地に交換する。

20

#### 【0050】

好ましい実施形態では、細胞をTSIナীব型PSCへと再プログラミングするための細胞培養培地は、PKC阻害剤、ROCK阻害剤、TGF、NOTCH阻害剤、TGF-R阻害剤又はFGFR阻害剤を含まない。化合物のカクテルはTGFを含まないことがより好ましい。TSIナীব型PSCを単離し、それらの生成に使用する同じ化合物のカクテルを含む好適な幹細胞培養培地でナীব型状態に維持する。

30

#### 【0051】

生じた細胞は、(i)形態学的に、(ii)機能的に、特徴:(a)例えば、本明細書に開示のように測定したTGF-1非依存性の多能性の維持(TGF-1受容体阻害剤の存在下で対照と比較したTRA-1-81-陽性細胞の割合の倍数変化によって測定した場合);(b)3つの胚葉の組織へと分化する細胞の能力;(c)PRDM14、KLF5、ZFP42(REX1)、LIFR、TBX3、及びNANOGなどのうちの1つ又は複数のナীব型状態関連転写産物の発現の上方制御、(d)TRA-1-60、TRA-1-81、及びSSEA-4などのうちの1つ又は複数の多能性マーカーの発現の上方制御;(e)SSEA-1など1つ又は複数の多能性マーカーの下方制御;(f)in vivoで種間キメラを形成する能力に基づいて、TSIナীব型PSCとして同定される。

40

#### 【0052】

##### B. TSIナীব型PSCの単離

TSIナীব型PSCの実質的に精製した集団は、例えば培養供給源からの抽出(例えば、密度勾配遠心及び/又はフローサイトメトリーを介して)により得ることができる。純度は任意の適切な方法によって測定できる。多能性細胞は、例えばフローサイトメトリー(例えばFACS分析)により、99%~100%精製できる。TSIナীব型PSCは、例えば誘導多能性幹細胞のマーカー又はマーカーの組合せと結合する分子(例えば抗体、抗体誘導体、リガンド又はFc-ペプチド融合分子)を使用し、それにより分子を結合する細胞をポジティブに選択すること(すなわち、ポジティブ選択)により単離で

50

きる。ポジティブ選択の方法の他の例は、所望の及び所望ではない細胞型の混合集合において所望の細胞型の成長を優先的に促進する方法を含む。或いは、所望の細胞型に存在しないが、所望ではない細胞型には存在するマーカーに結合する分子を使用することにより、そのようなマーカーを含有する所望ではない細胞は所望の細胞から除去することができる（すなわち、ネガティブ選択）。他のネガティブ選択の方法は、所望の及び所望ではない細胞型の混合集団において、所望ではない細胞型を優先的に死滅させ又は成長を阻害することを含む。したがって、ネガティブ選択、ポジティブ選択、又はそれらの組合せを使用することにより、幹細胞の濃縮集団を作製できる。

#### 【0053】

分離の手順は、抗体でコートした磁気ビーズ、アフィニティークロマトグラフィー、モノクローナル抗体に結合した細胞毒性剤、若しくはモノクローナル抗体と併せて使用したそのような薬剤、例えば補体及び細胞毒、並びに固体マトリックス（例えばプレート）に結合した抗体による「パニング」、又は他の便利な技術を使用する磁気分離を含み得る。精密な分離を提供する技術は、洗練の様々な程度、例えば、複数のカラーチャンネル、低角及び鈍角光散乱検出チャンネル（low angle and obtuse light scattering detecting channel）、及びインピーダンスチャンネルを有し得る蛍光活性化細胞ソーターを含む。抗体は、直接分離を可能にする磁気ビーズ、支持体に結合するアビジン又はストレプトアビジンにより除去することができるビオチン、又は蛍光活性化細胞ソーターで使用することができる蛍光色素など、マーカーと結合し、特定の細胞型の分離を容易にし得る。誘導多能性幹細胞の生存能力に過度に有害ではない任意の技術が用いられ得る。一実施形態では、細胞は、マーカーに対する抗体（例えば、TRA-1-81抗体）とインキュベートし、マーカーに対してポジティブに染色された細胞を手動で選択し、継代培養した。

#### 【0054】

濃縮方法の組合せは、精製若しくは濃縮の時間又は効率を改善するために使用され得る。例えば、対象の細胞型を示さないマーカーを有する細胞を除去する濃縮工程後、細胞は、蛍光活性化細胞ソーター（FACS）若しくは高い特異性を有する他の方法論によりさらに分離又は濃縮し得る。マルチカラー分析はFACSと用いられ得る。細胞は、特定の抗原又はその欠損に関する染色のレベルに基づいて分離され得る。蛍光色素は、特定の抗原に特異的な抗体を標識するために使用され得る。そのような蛍光色素は、フィコピリンタンパク質、例えば、フィコエリスリン及びアロフィコシアニン、フルオレセイン、及びテキサスレッドを含む。

#### 【0055】

C. TSIナীব型PSC（及びそれらの子孫）の培養及び保存

TSIナীব型PSCは、培養で増やし、後の回復及び使用のために保存することができる。細胞の培養又は幹細胞の混合培養が確立されると、組織の形成あり又はなしで、細胞増殖を招く条件下で細胞密度を示すように新しい培地に継代することにより、細胞の集団は*in vitro*で有糸分裂的に増える。そのような培養方法は、例えば、分化を誘導する特定の成長因子（例えば、IGF、EGF、FGF、VEGF及び/又は他の成長因子）を欠く培養培地で細胞を継代することを含むことができる。培養細胞は、十分な細胞密度に達した場合、新しい培地に移すことができる。

#### 【0056】

好ましい実施形態では、TSIナীব型PSCを維持するための細胞培養培地は、例えば、ナীব型多能性の誘導に使用する、つまり本明細書に開示の化合物のカクテルを、非ナীব型多能性細胞をTSIナীব型PSCへと再プログラムし、細胞をナীব型状態に維持するのに使用するのと同じ濃度の、本明細書に開示の化合物のカクテルを捕ったN2B27培地である。例えば、TSIナীব型PSCを維持するための細胞培養培地は、N2B27培地（BSAなし）、5%KSR（ノックアウト血清代替物）を捕ったN2B27培地（BSAなし）であり得る。他の基本培地、例えば、20%KSRを捕ったDF12培地を使用することもできる。これらの基本培地は、上記のように化合物

10

20

30

40

50

のカクテルを捕う。本発明のいくつかの実施形態に従って、本明細書に開示の有効量の化合物のカクテルを含む細胞培養培地は、培養の2～100回を超える継代にわたりTSIナイーブ型PSCを未分化及びナイーブ型状態に維持することができる。例えば、カクテルは、培養の2回の継代、3、4、5、6、7、8、9、又は10回の継代、好ましくは10回より多い継代、例えば培養の約20回の継代、例えば、培養中少なくとも約25回、約30回、約35回、約40回、約45回、約50回、約55回、約60回、約65回、約70回、約75回、及び約80回の継代の間、TSIナイーブ型PSCを未分化及びナイーブ型状態に維持することができる。好ましい実施形態では、TSIナイーブ型PSCは、2、3、4、5、6、7、8、9、10回、10回より多く、例えば培養の約20回の継代、例えば、培養中少なくとも約25回、約30回、約35回、約40回、約45回、約50回、約55回、約60回、約65回、約70回、約75回、及び約80回の継代の間、正常な核型を維持する。本明細書で例示するように、開示する化合物のカクテルは、単一細胞を継代した正常な核型のTSIナイーブ型PSCを培養で少なくとも8ヵ月間維持できる。

10

20

30

40

50

#### 【0057】

細胞は、Doyleら、(eds.)、1995、Cell & Tissue Culture: Laboratory Procedures、John Wiley & Sons、Chichesterに記載されるものなど、公知の方法に従って、保管のため凍結保存することができる。例えば、細胞は、15～20%ウシ胎仔血清(FBS)及び10%ジメチルスルホキシド(DMSO)、(5～10%グリセロールあり又はなし)を含有する培養培地など、「凍結培地」に、例えば約4～10×10<sup>6</sup>個の細胞/mlの密度で懸濁することができる。細胞をガラス又はプラスチックバイアルに分注し、次いでそれを密封し、プログラム制御できる又は受動的な冷凍機の凍結チャンパーに移した。凍結の最適な速さは、経験的に決定し得る。例えば、融解熱による-1 /分の温度変化を与える凍結プログラムを使用し得る。細胞を含有するバイアルが-80 に達すると、それらは液体窒素保管場所に移される。凍結保存細胞は1年間保存できる。

#### 【0058】

##### IV. 使用方法

所望の細胞型又は形態を生じることが容易に入手可能な幹細胞源の同定は、治療処置、組織工学及び研究に重要である。幹細胞の入手可能性は、移植、組織工学、血管新生の制御、脈管形成、臓器再生、動物モデル、細胞置換、又は細胞治療、並びに疾患の予防などに非常に有用である。そのような幹細胞は、遺伝子治療レジメンの一部として対象に遺伝子を導入するために使用することもできる。

#### 【0059】

##### A. 分化した体細胞の提供(再分化した細胞)

いったん確立されると、幹細胞の培養は、子孫細胞、例えば、新しい組織を産生することができる線維芽細胞を産生するのに使用され得る。TSIナイーブ型PSCは、例えば、上皮細胞、角化細胞、メラニン形成細胞、脂肪細胞を含む皮膚及び毛髪細胞、例えば筋細胞、軟骨細胞、骨細胞、胚細胞などの骨、筋肉及び結合組織を形成する細胞、例えば肝細胞、腎臓細胞、副腎細胞、及び島細胞などの実質細胞、血液細胞、網膜細胞(及び、耳の毛髪細胞、又は舌の味覚突起を形成するものなど感覚認知に含まれる他の細胞)並びに神経を含む神経組織など、3つの胚葉のいずれかの細胞へと分化誘導され得る。

#### 【0060】

一実施形態では、TSIナイーブ型PSCは、「外胚葉分化」培地に細胞を曝露することにより、外胚葉起源の細胞へと分化誘導される。別の実施形態では、TSIナイーブ型PSCは、「中胚葉分化培地」に細胞を曝露することにより、中胚葉起源の細胞へと分化誘導される。さらに別の実施形態では、TSIナイーブ型PSCは、「内胚葉培地」に細胞を曝露することにより、内胚葉起源の細胞へと分化誘導される。「内胚葉」、「中胚葉」、及び「外胚葉」培地の成分は、当業者に公知である。公知の細胞表面マーカーは、細胞が、細胞培養培地と一致する系列の細胞へと確かに分化することを確認するために使用

できる。3つの胚葉の分化を確かめる最も一般的な許容されるマーカーは、内胚葉細胞に関してはアルファ胎児性タンパク質、中胚葉に関してはアルファ平滑筋アクチン、外胚葉に関してはベータ-I I I チュープリンの発現であり、これら全ては、これらの組織の発生の非常に初期に通常発現する。

#### 【0061】

幹細胞の線維芽細胞又は他の細胞型への分化、続いてそれらからの組織の産生は、特定の細胞外成長因子によって、又は幹細胞培養の培養条件（例えば、密度）の変更によって引き起こされ得る。所望の細胞型の細胞へと細胞の分化を誘導するための方法は、当技術分野で公知である。例えば、T S I ナイブ型 P S C は、細胞の環境に物質（例えば、成長因子、酵素、ホルモン又は他のシグナル分子）を添加することにより分化誘導され得る。分化の誘導に使用され得る因子の例としては、エリスロポエチン、コロニー刺激因子、例えば G M - C S F、G - C S F、又は M - C S F、インターロイキン、例えば I L - 1、- 2、- 3、- 4、- 5、- 6、- 7、- 8、白血病抑制因子（L I F）、又は造血幹細胞因子（S t l）が挙げられ、組織コミット細胞又は他の系列コミット細胞型との共培養は、幹細胞を特定の系列にコミットするように誘導する。

10

#### 【0062】

再分化した細胞は、培養で増やし、後に回復及び使用するために保管することができる。

#### 【0063】

##### B．細胞治療

T S I ナイブ型 P S C の治療用途は、誘導多能性幹細胞、幹細胞集団、又はそれらの子孫を個体に移植し、がん、傷、腫瘍、傷害、ウイルス感染、糖尿病などから生じる疾患及び障害を含む様々な病理を処置することを含む。処置は、現在当技術分野で公知の任意の方法に従って、新しい組織を産生する細胞の使用、及びそのように産生された組織の使用を必要とすることがある。細胞は、移植、注入、又はそうでなければ組織損傷部位に直接投与することができ、それにより *in vivo* で新しい組織が産生される。一実施形態では、投与は、遺伝的に改変した T S I ナイブ型 P S C 又はそれらの子孫の投与を含む。

20

#### 【0064】

好ましい実施形態では、T S I ナイブ型 P S C は自家細胞から得られ、すなわちドナー細胞は自家性である。しかし、細胞は異種細胞から得ることができる。一実施形態では、ドナー細胞は、レシピエントに遺伝的に関連するドナーから得られる。別の実施形態では、ドナー細胞はレシピエントに遺伝的に関連しないドナーから得られる。

30

#### 【0065】

T S I ナイブ型 P S C が、レシピエント対象と比較して異種の（非自家性 / 同種）供給源に由来する場合、例えば免疫抑制剤シクロスポリン又は F K 5 0 6 の投与など付随する免疫抑制療法が典型的には与えられる。しかし、ヒト誘導多能性幹細胞の未熟な状態により、そのような免疫抑制療法が必要ではない場合がある。したがって、一実施形態では、ヒト誘導多能性幹細胞は、免疫調節（例えば免疫抑制）療法の不在下でレシピエントに投与することができる。或いは、細胞は膜にカプセル化することができ、液体の交換を可能にするが、細胞 / 細胞接触を防ぐ。マイクロカプセル化細胞の移植は当技術分野で公知である。例えば B a l l a d u r ら、S u r g e r y、1 1 7 : 1 8 9 ~ 9 4、1 9 9 5 ; 及び D i x i t ら、C e l l T r a n s p l a n t a t i o n、1 : 2 7 5 ~ 7 9 ( 1 9 9 2 )。

40

#### 【0066】

##### ( i ) 糖尿病

糖尿病（D M）は、膵臓が十分なインシュリンを産生しないため又は細胞が産生されるインシュリンに応答しないためのいずれかで、患者が高血糖である代謝疾患のグループである。インシュリン治療の有望な代替案は、インシュリンが必要な患者への島細胞の供給である。S h a p i r o ら、N E n g l J M e d .、3 4 3 ( 4 ) : 2 3 0 ~ 8

50

(2000)は、ベータ細胞ノ島の移植は、糖尿病を有する患者に治療を提供することを実証した。多くのインシュリン型が市販されているが、これらの製剤は注射可能なように提供される。ヒト誘導多能性幹細胞は、糖尿病を予防又は治療するための島細胞の代替供給源を提供する。例えば、誘導多能性幹細胞は、単離され、膵臓細胞型へと分化し、対象に送達することができる。或いは、誘導多能性幹細胞は、対象の膵臓へと送達され、*in vivo*で島細胞へと分化することができる。したがって、細胞は、糖尿病の発症を予防又は治療するための移植に有用である。膵臓の島細胞の生存能力及び効能に影響を及ぼすことなくサイトカイン曝露後に炎症を減少する方法は、例えば、Naziruddinらの米国特許第8637494号に開示される。

#### 【0067】

##### (ii) 神経変性疾患

神経変性疾患は、外傷性又は虚血性脊髄損傷又は脳損傷など、疾患、遺伝性疾患又は損傷の結果として神経細胞の変性を含む状態により特徴づけられる。神経変性状態は、神経細胞の損傷又は変性を含む、任意の疾患又は障害又は症状又はそれらの原因若しくは効果を含む。神経変性状態は、限定されないが、アレキサンダー病、アルパーズ病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、毛細血管拡張性運動失調症、カナバン病、コカイン症候群、皮質基底核変性症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ハンチントン病、ケネディ病、クラッペ病、レビー小体病、マシャド・ジョセフ病、多発性硬化症、パーキンソン病、ペリツェウス・メルツパッヘル病、ニーマン・ピック病、原発性側索硬化症、レフサム病、サンドホフ病、シルダー病、スティーラー・リチャードソン・オルゼウスキー症候群、脊髄癆、又は損傷した神経細胞と関連する任意の他の状態を含み得る。他の神経変性状態は、外傷性脊髄損傷、虚血性脊髄損傷、脳卒中、外傷性脳損傷、及び遺伝性疾患を含む又はそれによって引き起こされ得る。

#### 【0068】

特に、開示する方法は、細胞が神経変性状態を改善できるように*in vitro*で増やしたNSC、神経前駆細胞、又は神経前駆体を、それを必要とする対象に移植することを含む。増やした神経幹細胞の移植は、痙攣、硬直、発作、麻痺、又は任意の他の筋肉の運動亢進の症状を伴う様々な形態の脊髄症を患う対象において、歩行機能を改善するために使用することができる。異なる神経変性状態の治療のために神経細胞及び神経子孫細胞を増やす並びに移植する方法が、例えばJoheraらの米国特許第8236299号に開示されている。

#### 【0069】

##### (iv) がん治療

TSIナীব型PSC及びそれらの子孫の治療用途は、誘導多能性幹細胞、幹細胞集団、又それらの子孫を個体へと移植し、がんに関連する症状を処置及び/又は改善することを含む。例えば、一実施形態では、TSIナীব型PSCは、患者の細胞を死滅、減少、又は損傷する化学療法を受けたがん患者に投与することができる。がんの典型的な幹細胞移植では、しばしば放射線療法と共に、非常に高用量の化学療法が使用され、全てのがん細胞を破壊することを試みる。この治療はまた、骨髄の幹細胞も死滅させる。治療後すぐに、幹細胞を与え、破壊されたものと置換する。

#### 【0070】

別の実施形態では、TSIナীব型PSCは、少なくとも1つのさらなる治療因子で形質導入又は形質転換することができる(脱分化因子に加えて)。例えば、いったんTSIナীব型PSCが単離されると、細胞は、治療用ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドで形質転換され、次いで対象に移植又は投与することができ、又は所望の細胞型に分化し、対象に移植及び送達することができる。そのような条件下で、ポリヌクレオチドはポリペプチド産物の送達のため対象内で発現される。

#### 【0071】

##### (v) 組織工学

TSIナীব型PSC及びそれらの子孫は、当技術分野で公知の方法を使用して、組

10

20

30

40

50

織工学構築物を作製するために使用され得る。組織工学構築物は、損傷した臓器又は組織の修復又は置換のための人工器官として含む様々な目的のために使用され得る。それらは、構築物の細胞によって分泌されるタンパク質若しくは他の分子の *in vivo* 送達系又は一般の薬物送達系としても機能し得る。組織工学構築物は、組織機能の *in vitro* モデルとして又は様々な治療若しくは医薬の効果を試験するためのモデルとしての用途も見出される。最も一般的に使用される幹細胞の移植のための生体材料の足場は、W illerth, S. M. 及び Sakiyama - Elbert, S. E., *Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery* (July 09, 2008)、StemBook, ed. The Stem Cell Research Community、StemBookで概説されている。組織工学技術はしばしば、組織の成長を維持及び促進する適切な培養基質の選択を含む。一般に、これらの基質は三次元であり、対象の組織の所望の形状の足場を形成するために加工可能である。

10

#### 【0072】

米国特許第6962814号は、一般に組織工学構築物及び操作した天然の組織を産生するための方法を開示する。特定の例に関して、Vacantiらの米国特許第7914579号は、組織工学の靱帯及び腱を開示する。米国特許第5716404号は、重合体マトリックスと組み合わせて移植した解離した筋肉細胞を使用する胸部組織の再構築又は増加のための方法及び組成物を開示する。米国特許第8728495号は、自家皮膚線維芽細胞を使用する軟骨組織の修復を開示する。Duailibiらによる米国特許出願公開第20090029322号は、歯の代替物の作製に使用するための歯組織を形成するための幹細胞の使用を開示する。米国特許出願公開第2006/0019326号は、頭蓋内動脈瘤の治療のための細胞シード組織工学ポリマーを開示する。Atalaによる米国特許出願公開第2007/0059293号は、損傷した臓器、例えば腎臓、心臓、肝臓、脾臓、膵臓、膀胱、尿管、及び尿道と置換するために使用することができる組織工学構築物（及びそのような構築物を作製する方法）を開示する。

20

#### 【0073】

(vi) TSIナীব型PSCから産生される細胞（子孫）

TSIナীব型PSCは、例えば上皮細胞、角化細胞、メラニン形成細胞、脂肪細胞を含む皮膚及び毛髪細胞、例えば筋細胞、軟骨細胞、骨細胞、胚細胞などの骨、筋肉及び結合組織を形成する細胞、例えば幹細胞、腎臓細胞、副腎細胞、及び島細胞（例えば、アルファ細胞、デルタ細胞、PP細胞、及びベータ細胞）などの実質細胞、血液細胞（例えば、白血球、赤血球、マクロファージ、及びリンパ球）、網膜細胞（及び、耳の毛髪細胞又は舌の味覚突起を形成するものなど感覚認知に含まれる他の細胞）並びに神経を含む神経組織など、3つの胚葉のいずれかの細胞へと分化誘導され得る。

30

#### 【0074】

(vii) 治療用組成物

TSIナীব型PSCは、投与、送達、又は対象、組織若しくは細胞と接触するために製剤化し、*in vivo* 又は *in vitro/ex vivo* で脱分化を促進することができる。さらなる因子、例えば成長因子、分化若しくは脱分化を誘導する他の因子、分泌産物、免疫調節剤、抗炎症剤、退行因子（*regression factor*）、神経支配、血管新生を促進する生物学的に活性な化合物又はリンパ性ネットワークの増強、及び薬物を組込むことができる。

40

#### 【0075】

誘導多能性細胞は、TSIナীব型PSCの集団若しくはTSIナীব型PSC子孫単独で、又は担体若しくは支持体構造上又は内に含む組成物の方法で患者に投与することができる。多くの実施形態では、担体は必要ない。細胞は、細胞が必要な部位上又は内に注射により投与することができる。これらの場合、細胞は、典型的には細胞培養培地を除去するために洗浄され、生理的緩衝液に懸濁される。

50

## 【 0 0 7 6 】

他の実施形態では、細胞は支持体構造と提供される、又は支持体上若しくは内に組込まれる。支持体構造は、メッシュ、固体支持体、足場、管、多孔質構造、及び/又はヒドロゲルであってよい。支持体構造は、全体又は部分的に生分解性又は非生分解性であってよい。支持体は、天然若しくは合成ポリマー、チタニウムなどの金属、骨若しくはヒドロキシアパタイト、又はセラミックから形成され得る。天然ポリマーは、コラーゲン、ヒアルロン酸、多糖類、及びグリコサミノグリカンを含む。合成ポリマーは、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、及びそれらのコポリマーなどのポリヒドロキシ酸、ポリヒドロキシ酪酸、ポリオルトエステル、ポリ酸無水物、ポリウレタン、ポリカルボン酸、及びポリエステルなどのポリヒドロキシアルカン酸を含む。これらは、移植片、管、メッシュ、又はヒドロゲルの形態であってよい。

10

## 【 0 0 7 7 】

## 固体支持体

支持体構造は目の粗い織布又は不織布メッシュであってよく、細胞はメッシュ内及びメッシュ上に播種される。構造は固体構造支持体を含み得る。支持体は管、例えば神経軸索の再成長のための神経管であってよい。支持体は、ステント又はバルブであってよい。支持体は、膝若しくは腰、又はその部分などの人工関節であってよく、多孔質構造への細胞の内殖及び/又は細胞の播種を可能にする有孔界面を有する。支持体構造の多くの他の型も可能である。例えば、支持体構造はスポンジ、泡、サンゴ、又は内部細孔を有する生体適合性無機構造、又は織り合わせたポリマー繊維のメッシュシートから形成することができる。これらの支持体構造は、公知の方法を使用して調製できる。

20

## 【 0 0 7 8 】

支持体構造は、ヒドロゲル - 細胞混合物を形成及び支持する細孔状腔又は間隙を有する透水構造であってよい。例えば、支持体構造は、多孔質ポリマーメッシュ、天然若しくは合成スポンジ、又は金属又は骨若しくはヒドロキシアパタイトなどの材料から形成される支持体構造であってよい。支持体構造の多孔性は、栄養分が構造中に拡散でき、それにより効果的に内部の細胞に達し、細胞によって産生される老廃物は構造の外へ拡散できる。

## 【 0 0 7 9 】

支持体構造は、新しい組織が所望される空間に適合するように形成することができる。例えば、支持体構造は火傷した皮膚の領域の形状又は欠損した軟骨組織若しくは骨の部分に適合するように形成することができる。作製する材料に依存して、支持体構造は、切断、成形、鋳造、又は所望の形状を産生する任意の他の方法によって形成することができる。支持体は、以下に記載するように、支持体構造に細胞が播種され、又は支持体構造がヒドロゲル - 細胞混合物で満たされる前若しくは後のいずれかに形成することができる。

30

## 【 0 0 8 0 】

好適なポリマーの例は、グリコリド及びラクチドの90 : 10コポリマーであるポリグリラクチンであり、VICRYL (商標) 組み製の吸収性縫合糸 (Ethicon Co.、Somerville, N. J.) として製造される。ポリマー繊維 (VICRYL (商標) など) は、フェルト状ポリマーシートへと編む又は圧縮することができ、次いで任意の所望の形状に切断できる。或いは、ポリマー繊維は鋳型と一緒に圧縮し、支持体構造に望ましい形状へとそれらを鋳造することができる。いくつかの場合、修正又は繊維メッシュにさらなる構造を付与するために成形されるように、さらなるポリマーをポリマー繊維へと添加することができる。例えば、ポリ乳酸溶液をポリグリコール酸繊維メッシュのこのシートに添加することができ、その組合せが一緒に成形され、多孔質支持体構造を形成することができる。ポリ乳酸はポリグリコール酸繊維の架橋に結合し、それによりこれらの個々の繊維をコーティング及び成形した繊維の形状を固定する。ポリ乳酸はまた、繊維間の空間も満たす。したがって、多孔性は支持体に導入されるポリ乳酸の量によって変わり得る。繊維メッシュを所望の形状に成形するのに必要な圧力は中程度であってよい。必要なのは、繊維が、ポリ乳酸の結合及びコーティング作用が効果を生じるのに十分長く決まった場所に固定されることだけである。

40

50

## 【0081】

或いは、又はさらに、支持体構造は、当技術分野で公知の技術によって產生されるポリマー繊維若しくはポリマー構造の他の型を含むことができる。例えば、薄いポリマーフィルムはポリマー溶液から溶媒を蒸発させることによって得ることができる。これらのフィルムは、ポリマー溶液が所望の形状のレリーフパターンを有する鋳型から蒸発する場合、所望の形状へと鋳造することができる。ポリマーゲルは当技術分野で公知の圧縮成形技術を使用して、薄い、透水ポリマー構造も成形することができる。

## ヒドロゲル

## 【0082】

別の実施形態では、細胞をヒドロゲルと混合し、細胞 - ヒドロゲル混合物を形成する。ヒドロゲルは、注射若しくはカテーテルによって、又は他の支持体構造の移植時に投与され得る。投与前、中、後に架橋が生じ得る。

10

## 【0083】

## D. 動物モデル及び臓器再生

単離したT S Iタイプ型P S Cは、T S Iタイプ型P S Cを所望の種(ドナー)から同じ又は異なる種の第二の動物(レシピエント)へと組込む動物モデルを生成するために使用できる。ドナー動物は、ヒト、マウス、ラット、ブタ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、チンパンジー、ゴリラ、オラウータン、サル、マーモセットなどの哺乳動物であってよい。いくつかの好ましい実施形態では、動物モデルを提供するために使用するドナー哺乳動物はヒトであり、レシピエント哺乳動物はヒトではない。他の実施形態では、ドナー及びレシピエント動物はサイズが一致する。レシピエントは、ブタ、ラット、マウス、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、チンパンジー、ゴリラ、オラウータン、サル、マーモセット及びポノポなど、ヒト以外の任意の動物であってよい。T S Iタイプ型P S Cは、ヒトではない哺乳動物における臓器再生に使用することができ；T S Iタイプ型P S Cは、発生段階の臓器の発生の欠如と関連する異常を有する哺乳動物において所望の臓器を產生するために使用することができる。

20

## 【0084】

方法は、T S Iタイプ型P S Cをレシピエント非ヒト哺乳動物の胚盤胞段階の受精卵へと移植するステップ；当技術分野で公知の方法を使用して、同産仔を得るため非ヒト代理親哺乳動物の子宮で受精卵を発生するステップ及び同産仔から臓器を得るステップを含む。產生することができる臓器の例は、限定されないが、腎臓、心臓、膵臓、小脳、肺、甲状腺、毛髪、及び胸腺など、固定した形状を有する固体臓器を含む。レシピエント胚は、ブタ、ラット、マウス、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ウマ、イヌ、チンパンジー、ゴリラ、オラウータン、サル、マーモセットなど、ヒト以外の任意の動物由来であってよい。

30

## 【0085】

ヒト化マウスモデルを生成するための方法は、当技術分野で公知であり(米国特許出願公開第20110258715号)、例えばItora、Cellular & Molecular Immunology、9:208~214(2012)に概説されている。対象の臓器の発生と関連する異常を有し、臓器を再生するために使用することができるレシピエント胚の例は、発生段階における腎臓の発生の欠如と関連する異常を有するShall1ノックアウト動物(Nishinakamuraら、Development、128:3105~3115(2001))；発生段階における膵臓の発生の欠如と関連する異常を有するPdx1ノックアウト動物(Offieldら、Development、122:983~995(1996))；発生段階における小脳の発生の欠如と関連する異常を有するWnt-1(int-1)ノックアウト動物(McMahonら、Cell、62:1073~1085、(1990))；発生段階における肺及び甲状腺の発生の欠如と関連する異常を有するTebpノックアウト動物(Kimuraら、Genes and Development、10:60~69、1996)を含み；又は線維芽細胞成長因子(FGF)受容体(FGFR)の細胞内ドメインの欠損を過剰発現し、腎臓及び肺などの複数の臓器の欠損を引き起こすドミナントネガティブ型トランスジェニック変異体

40

50

動物モデル (Celliら、EMBO J、17:1642~655、(1998)) を使用できる。或いは、毛髪又は胸腺の産生にヌードマウスが使用できる。米国特許出願公開第20110258715号に記載の「ファウンダー」動物も使用され得る。

【0086】

V. キット

本明細書に開示の化学カクテルを含むキットを提供する。化学カクテルは上記の通りである。これらは、細胞培養培地への添加を促進する定義した濃度を有する形態であってよく、所望の濃度を生じる。キットは、所望の濃度範囲及びドナー細胞型に基づく投与時間を提供する指示書を含み得る。キットはまた、ナイーブ型多能性を誘導するため、ドナー細胞の培養用の化学カクテルと予備混合する細胞培養培地も含み得る。

10

【0087】

本発明は以下の非限定的な例を参照してさらに理解される。

【実施例】

【0088】

実験手順

プライム型 iPSC からのアカゲザルナイーブ型 iPSC の生成

本研究に使用する成体のアカゲザル (アカゲザル (Macaca mulatta)、9、2、11、及び12) は個々のケージで飼育した。全ての動物の手順は、中国軍医学会の実験動物センターによって承認され、アカゲザルの体細胞の使用は北京大学治験審査委員会によって認可された。線維芽細胞は、アカゲザルの耳の端から単離し、再プログラミン因子 OCT4 及び KLF4 を含有するレトロウイルスベクターを感染させた。小分子を捕った培地は2日ごとに交換した。プライム型 iPSC コロニーを、ウイルスの形質導入後およそ25~35日で選択し、ヒト ESC 培地で増やした (D/F12 + 20% ノックアウト血清置換 [KSR] + 4 ng/ml bEGF)。ナイーブ型状態の変換のため、プライム型 iPSC コロニーをアクターゼによって解離し、フィーダー細胞上に再播種した。4 ng/ml bEGF、10 ng/ml ヒト LIF、CHIR99021 (3 µM) 及び PD0325901 (0.5 µM)、及び SP600125 (10 µM) 及び SB203580 (10 µM) を含む最適化した変換培地は毎日交換した。およそ7~10日で、ドーム形状のコロニーを選択し、次いで多能性及び分化の特徴のさらなる分析のため新鮮なフィーダー細胞上に移した。

20

30

【0089】

(a) レトロウイルス感染及びアカゲザルプライム型 iPSC 生成

再プログラミン因子 (OCT4、KLF4) を含有するレトロウイルスベクターは、先の報告に記載された (Liu Hら、2008)。レトロウイルスの産生、回収、及び感染も、記載されたように実施した (Liu Hら、2008 及び Zhao, Yら、2008)。小分子 VPA (0.5 mM; Sigma)、CHIR99021 (3 µM; Stemgent)、616452 (1 µM; Calbiochem) 及びトランシルプロミン (5 µM; Tocris) を捕った培地は2日ごとに交換した。アカゲザルプライム型 iPSC コロニーを、ウイルスの形質導入後およそ25日目~30日目に選択し、アカゲザルプライム型 iPSC 用の培養条件下でフィーダー細胞上で維持した。

40

【0090】

(b) プライム型 iPSC からのアカゲザルナイーブ型 iPSC の生成

アカゲザルプライム型 iPSC を、アクターゼによって単一細胞に解離し、フィーダー細胞上に再播種した。4 ng/ml bFGF (R&D Systems)、10 ng/ml ヒト LIF (Millipore)、CHIR99021 (3 µM; Stemgent) 及び PD0325901 (0.5 µM; Stemgent) を含む変換培地は、毎日交換した。およそ7日~10日目に、ドーム形状のコロニーを選択し、新鮮なフィーダー細胞上に移した。伝統的な 2i/LIF 条件 - 10 ng/ml ヒト LIF (Millipore)、CHIR99021 (3 µM; Stemgent) 及び PD0325901 (0.5 µM; Stemgent) も試験し、陰性対照として提供した。

50

## 【0091】

(c) アカゲザルナイーブ型 iPSC のための変換条件の最適化

アカゲザルプライム型 iPSC を、アクターゼによって単一細胞に解離し、フィーダー細胞上に再播種した。4 ng/ml bFGF (R&D Systems)、10 ng/ml ヒト LIF (Millipore)、CHIR99021 (3 μM; Stemgent) 及び PD0325901 (0.5 μM; Stemgent) を含む基本培養培地は、毎日交換した。培養条件の最適化のために試験した小分子は、SB203580 (10 μM; Tocris)、SP600125 (10 μM; Tocris)、Y27632 (10 μM; Tocris) 及び GO6983 (5 μM; Tocris) である。8日間の処置後、細胞を固定し、TRA-1-81 を免疫染色した。

10

## 【0092】

アカゲザル線維芽細胞からのナイーブ型 iPSC の直接変換

再プログラミング因子 (OCT4、SOX2、及び KLF4) を含有するレトロウイルスベクターは、記載された通りである (Liuら、2008)。基本培地 (KO-DMEM、15% KSR) は、感染後2日ごとに交換した。およそ20日で、培地を、別の7~10日間、4 ng/ml bFGF (R&D Systems)、10 ng/ml ヒト LIF (Millipore)、CHIR99021 (3 μM; Stemgent)、PD0325901 (0.5 μM; Stemgent)、SB203580 (10 μM; Tocris) 及び SP600125 (10 μM; Tocris) を含有する最適化した変換培地に交換した。次いで、ドーム形状のコロニーを選択し、新鮮なフィーダー細胞上に移した。

20

## 【0093】

細胞培養

初代アカゲザル皮膚線維芽細胞を、2歳のアカゲザルの耳の端から単離した。線維芽細胞及び293T細胞は、10%ウシ胎仔血清 (Invitrogen) を含有するダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Hyclone) で培養した。Thomsonらによって確立された (Thomson J Aら、1995) アカゲザル胚性幹 (ES) 細胞 (ES-7.5)、及びアカゲザルプライム型 iPSC を培養し、先に記載したように継代した (Liu Hら、2008)。アカゲザルナイーブ型 iPSC は、4 ng/ml bFGF (R&D systems)、10 ng/ml ヒト LIF (Millipore)、CHIR99021 (3 μM; Stemgent)、PD0325901 (0.5 μM; Stemgent)、SB203580 (10 μM; Tocris) 及び SP600125 (10 μM; Tocris) と85%ノックアウトDMEM (KO-DMEM、Invitrogen)、15%ノックアウト血清置換 (KSR、Invitrogen)、N2サプリメント (100X、Invitrogen)、1 mM L-グルタミン、0.1 mM NEAA、0.1 mM 2-ME を含む最適化した変換培地で培養した。アカゲザルナイーブ型 iPSC は、フィーダー細胞上でアクターゼ (Millipore) を使用して4日ごとに単一細胞継代した。TSIナイーブ型PSCは、5%CO<sub>2</sub>、20%O<sub>2</sub>下、37℃で、最適化した変換培地で培養し、培地は毎日交換した。

30

## 【0094】

アカゲザルプライム型 iPSC 及びナイーブ型 iPSC のシグナル伝達分析

アカゲザルプライム型 iPSC は記載したように維持した (Liu Hら、2008)。アカゲザルナイーブ型 iPSC は、4 ng/ml bFGF (R&D Systems)、10 ng/ml ヒト LIF (Millipore)、CHIR99021 (3 μM; Stemgent)、PD0325901 (0.5 μM; Stemgent)、SB203580 (10 μM; Tocris) 及び SP600125 (10 μM; Tocris) で最適化した培地で維持した。試験したシグナル伝達モジュレーターは、SU5402 (2 μM; Tocris)、SB431542 (10 μM; Tocris)、Stat tic (1 μM; Tocris) 及び TGF-1 (2 ng/ml、Peprotech) である。5日間の処置後、細胞を固定し、TRA-1-81 を免疫染色した。

40

50

## 【0095】

## アルカリフォスファターゼ (ALP) 検出及び免疫蛍光法

ALP活性を検出するため、細胞をリン酸緩衝生理食塩水で3回洗浄し、BCIP/NBT (Promega) で15分間染色した。免疫蛍光法のため、一次抗体は、SSEA-1 (1:50、Chemicon)、SSEA-4 (1:20、Santa Cruz Biotechnology)、TRA-1-60 (1:50、Santa Cruz Biotechnology)、TRA-1-81 (1:50、Santa Cruz Biotechnology)、NANOG (1:100、R&D Systems)、TBX3 (1:200、Abcam)、H3K27me3 (1:200、Millipore)、GATA4 (1:200、Santa Cruz Biotechnology)、OCT4 (1:200、Abcam) 及びSOX2 (1:200、Santa Cruz Biotechnology) に対するものを含む。二次抗体は、ローダミン標識ロバ抗マウスIgG (1:100、Santa Cruz Biotechnology)、ローダミン標識ロバ抗ウサギIgG (1:100、Santa Cruz Biotechnology)、ローダミン標識ヤギ抗マウスIgM (1:100、Santa Cruz Biotechnology)、及びローダミン標識ロバ抗ヤギIgG (1:100、Santa Cruz Biotechnology) である。DAPI (Roche Applied Science) は核染色のために使用した。

10

## 【0096】

## RT-PCR及びゲノムPCR

全RNAを、TRIzol (Invitrogen) を使用して細胞から単離し、製造業者の指示に従って、EasyScript逆転写酵素 (TransGen Biotech) を使用して逆転写した。異なる遺伝子のPCR増幅は、2×EasyTaq SuperMix (TransGen Biotech) を使用して実施した。ゲノムPCRに関しては、ゲノムDNAはDNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) で抽出した。使用したプライマーは表2に列挙する。

20

【表 2】

表2.使用したプライマーのリスト

定量的RT-PCRのプライマー	
CD44-S	CTGCCGCTTTGCAGGTGTA (配列番号 1)
CD44-A	CATTGTGGGCAAGGTGCTATT (配列番号 2)
DUSP10-S	ATCGGCTACGTCATCAACGTC (配列番号 3)
DUSP10-A	TCATCCGAGTGTGCTTCATCA (配列番号 4)
DLL1-S	GATTCTCCTGATGACCTCGCA (配列番号 5)
DLL1-A	TCCGTAGTAGTGTTTCGTCACA (配列番号 6)
NCAM1-S	GGCATTTACAAGTGTGTGGTTAC (配列番号 7)
NCAM1-A	TTGGCGCATTCTTGAACATGA (配列番号 8)
SOX1-S	GGAATGGGAGGACAGGATTT (配列番号 9)
SOX1-A	AACAGCCGGAGCAGAAGATA (配列番号 10)
PAX6-S	AAGGATGTTGAACGGGCAGA (配列番号 11)
PAX6-A	TCCGTTGGAAGTATGGAGT (配列番号 12)
HPRT-S	TGACACTGGCAAACAATGCA (配列番号 13)
HPRT-A	GGTCCTTTTCACCAGCAAGCT (配列番号 14)
EOMES-S	CGCCACCAAAGTATGATGAT (配列番号 15)
EOMES-A	CACATTGTAGTGGGCAGTGG (配列番号 16)
CDX2-S	CAGTCGCTACATCACCATCC (配列番号 17)
CDX2-A	TTTCCTCTCCTTTGCTCTGC (配列番号 18)
HAND1-S	AACTCAAGAAGGCGGATGG (配列番号 19)
HAND1-A	CGGTGCGTCCTTTAATCCT (配列番号 20)
ID1-S	AAACGTGCTGCTCTACGACA (配列番号 21)
ID1-A	TAGTCGATGACGTGCTGGAG (配列番号 22)
ID3-S	CTACAGCGCGTCATCGACTA (配列番号 23)
ID3-A	TCGTTGGAGATGACAAGTTCC (配列番号 24)
ZIC1-S	GCGCTCCGAGAATTTAAAGA (配列番号 25)
ZIC1-A	GTCGCTGCTGTTAGCGAAG (配列番号 26)
NANOG-S	GATTTGTGGGCCTGAAGAAA (配列番号 27)
NANOG - A	CAGATCCATGGAGGAAGGAA (配列番号 28)
MIXL1-S	AGCTGCTGGAGCTCGTCTT (配列番号 29)
MIXL1-A	CGCCTGTTCTGGAACCATAC (配列番号 30)

10

20

30

40

定量的RT-PCRのプライマー	
DNMT3A-S	AGTACGACGACGACGGCTA (配列番号 31)
DNMT3A-A	CACACTCCACGCAAAAGCAC (配列番号 32)
DNMT3B-S	AGGGAAGACTCGATCCTCGTC (配列番号 33)
DNMT3B-A	GTGTGTAGCTTAGCAGACTGG (配列番号 34)
DNMT3L-S	TGAACAAGGAAGACCTGGACG (配列番号 35)
DNMT3L-A	CAGTGCCTGCTCCTTATGGCT (配列番号 36)
LIFR-S	AGCGGGAGACAACACGAAAA (配列番号 37)
LIFR-A	CCAGGAAGGGCATCAATCAC (配列番号 38)
SOX2-S	GGCGAACCATCTCTGTGGTC (配列番号 39)
SOX2-A	CAACCTGCATGGCCATTTTT (配列番号 40)
ESRRB-S	TGGCTGGGTTTTGTTTGGTC (配列番号 41)
ESRRB-A	TTAAAGTGTGGCCCGAGGAA (配列番号 42)
ZNF521-S	CAACTGACAGATGGAGTGGATG (配列番号 43)
ZNF521-A	GCTAGGGGAAGTCTGATCCTT (配列番号 44)
PRDM14-S	AATCATTGGTGGCGACAACGA (配列番号 45)
PRDM14-A	CCCGTACAGAACGAAGTGCAG (配列番号 46)
DPPA3-S	TTAATCCAACCTACATCCCAGGG (配列番号 47)
DPPA3-A	AGGGGAAACAGATTCGCTACTA (配列番号 48)
TBX3-S	GAGGCTAAAGAACTTTGGGATCA (配列番号 49)
TBX3-A	CATTTCCGGGGTCGGCCTTA (配列番号 50)
KLF5-S	CCTGGTCCAGACAAGATGTGA (配列番号 51)
KLF5-A	GAAGTGGTCTACGACTGAGGC (配列番号 52)
REX-S	CCCTGAAGGTCATCCACAGCC (配列番号 53)
REX1-A	GTGCCATCCACATTGTCTT (配列番号 54)
PRDM14-S	AATCATTGGTGGCGACAACGA (配列番号 55)
PRDM14-A	CCCGTACAGAACGAAGTGCAG (配列番号 56)
XIST-S	TAATGTGCCAGATACCATGCTGGG (配列番号 57)
XIST-A	ACTTAACCTCACCAGTAAAGTCTTGAT (配列番号 58)

10

20

30

RT-PCRのプライマー	
endo OCT4--S	CAGATCAGCCACATTGCCAG (配列番号59)
endo OCT4-A	CAAAGCCCTGGCACAACTCT (配列番号60)
endo SOX2-S	GGTTACCTCTTCTCCCACTCC (配列番号61)
endo SOX2-A	CCTCCATTTCCTCGTTTT (配列番号62)
endo c-MYC-S	GCGTCGTGGGAAGGGAGATAC (配列番号63)
endo c-MYC-A	ACCGAGTCGTAGTCGAGGTCATA (配列番号64)
endo KLF4-S	TTTTCGGTTTTGGCTTCGTTTC (配列番号65)
endo KLF4-A	GTCCAGGTCCAGGAGATCGTTG (配列番号66)
DPPA4-S	CCACCCCGCATCTTGAA (配列番号 67)
DPPA4-A	CTAACATCTGCCACCCACC (配列番号 68)
Cripto-S	CCCATGGGGATACAGCACAG (配列番号69)
Cripto-A	AAGGCAGATGCCAACTAGCA (配列番号70)
DNMT3B-S	GGTGGAGGCAGACAGTGGA (配列番号71)
DNMT3B-A	TGGTACATGGCTTTTCGATAGG (配列番号72)
SALL4-S	CGACTCGTCCTCGCTGATA (配列番号73)
SALL4-A	CCATGTTGCTTGGCCTGT (配列番号74)
NANOG-S	CCTATGCCTGTGATTTGTGGG (配列番号75)
NANOG-A	AGGTTGTTTGCCTTTGGGAC (配列番号76)
DPPA2-S	CCCCTCCCTTGCCAACCATT (配列番号77)
DPPA2-A	CACTGCCTTGCCTTCCTCGA (配列番号78)
LIN28-S	GTTTCGGCTTCTGTCCAT (配列番号78)
LIN28-A	CACTCCCAATACAGAACCCC (配列番号80)
GAPDH-S	AATCCCATCACCATCTTCCAGGAG (配列番号81)
GAPDH-A	CACCCTGTTGCTGTAGCCAAATTC (配列番号82)
XIST-S	TAATGTGCCAGATACCATGCTGGG (配列番号83)
XIST-A	ACTTAACCTCACCAGTAAAGTCTTGAT (配列番号84)

10

20

30

ゲノムPCRのプライマー	
pMX-S	CCTCAAAGTAGACGGCATCGCA (配列番号85)
pMX OCT4-A	TTATTCGGGGCACCTGCTTGA (配列番号86)
pMX SOX2 - A	AACCTGAGGCCACAGTACGC (配列番号87)
pMX KLF4-A	CTCCGACAAAAGTTTCCACTCTGC (配列番号88)
pMX c-MYC-A	AGGCGTGACCGCAACGTAGG (配列番号89)
pMX GFP-A	GGGGTAGCGGCTGAAGCACT (配列番号90)
EBNA-1-S	ATCAGGGCCAAGACATAGAGATG (配列番号91)
EBNA-1-A	GCCAATGCAACTTGGACGTT (配列番号92)

40

## 【 0 0 9 7 】

## リアルタイムPCR

RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) を使用して、培養細胞のウェル全体から全RNAを単離した。Transcript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix (TransGen Biotech) を使用して、RNAをcDNAに変換した。PCRは、ABI Prism 7300 Sequence Detection SystemでPower SYBR (登録商標) Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を使用して実施した。データはデルタデルタCt法を使用して分析した。リアルタイムPCRに使用したプライマーは、表2に列挙する。

50

## 【0098】

## 奇形種形成

アカゲザルナイーブ型及びプライム型iPSCを回収し、DF12培地に再懸濁した。コンフルエントな60mmディッシュからの細胞を、非肥満糖尿病/重症複合免疫不全(NOD/SCID)マウス(中国)へと皮下注射した。アカゲザルプライム型iPSCでは6~8週間後、ナイーブ型iPSCでは4~5週間後に奇形種を形成した。奇形種は、次いでパラフィンに包埋し、ヘマトキシリン及びエオシン染色のために加工した。

## 【0099】

## 核型分析

Gバンド染色体分析は、北京大学遺伝医学センターで実施した。

## マウス胚頭微操作、全組織標本染色、及び画像化

ナイーブ型及びプライム型iPSC注入のため、細胞をトリプシン処理し、8細胞期の胚又はICR二倍体のマウス胚のE3.5胚盤胞(1胚あたり6~10細胞)に微量注入した。およそ15個の注入した胚を、交尾後2.5日の偽妊娠雌の各子宮角へと移した。Abcamの全組織標本染色手順に従って、抗ヒト核抗体(クローン235~1、1:200、Millipore)での全組織標本染色のため、E10~E11発生段階で胚を切開した。全胚の薄切片標本画像化のため、胚をE16発生段階で切開し、続いて包埋し、凍結し、薄片にし(10mmの薄い切片)、次いで抗ヒト核抗体とGATA4(1:200、Santa Cruz Biotechnology)、又はOCT4(1:200、Abcam)とNANOG(1:200、R&D Systems)で共染色した。共焦点分析のため、マウントした胚及び薄切片標本をUltraVIEW VOXシステム(PerkinElmer)、Andor's Revolution WDスピニングディスク共焦点顕微鏡システム(Andor)、又はImageXpress Microハイコンテツスクリーニングシステム(MolDev)によって画像化した。

## アカゲザルナイーブ型iPSCの生成

## 【0100】

初期の実験では、OCT4及びKLF4の過剰発現並びにマウスにおいてOct4過剰発現のみで再プログラミングを促進することが報告されている(Liら、Cell Res.、21:196~204(2011))小分子の組合せの存在下で細胞を培養することにより、アカゲザルプライム型iPSC株をまず確立した。生じたプライム型iPSC株は、ヒトESC培地で*in vitro*及び*in vivo*で多能性を伴って維持することができ(図4A、図4C及びデータは示さない)、それらはマウスのナイーブ型多能性を維持する2i/LIF条件(2i/LIF)へと移した場合急速に分化し、多能性を失い(図1A)、したがってげっ歯類のナイーブ型多能性を支持する信頼のある条件がサルでのナイーブ型多能性状態を確立するのに十分ではないことを示している。

## 【0101】

2i/LIFの存在下でプライム型iPSCをナイーブ型状態へと変換するため、いくつかの経路モジュレーターを試験した。ドーム形状のコロニーは、bEGFを2i/LIF条件に添加した場合にのみ出現するマウスESCと形態学的に類似している。多能性マーカーTRA-1-81及びOCT4のアルカリフォスファターゼ(ALP)染色及び免疫染色は、TRA-1-81陽性ドーム形状コロニーが、2i/LIF条件での培養の5日後、bEGFの存在下で保持されたことを示した(データは示さない)。注目すべきことに、これらの細胞コロニーは、ナイーブ型多能性の典型的なマーカー遺伝子であるTBX3(データは示さない)も発現する(Dunnら、Science、344:1156~1160(2014);Niwaら、Nature、460:118~122(2009))。これらの結果は、サルのプライム型iPSCをナイーブ型状態へと変換する文脈内で、2i/LIF条件へのbEGF添加の重要性を示しているが、変換効率は低い(全コロニーの8%~10%がTRA-1-81/TBX3ダブルポジティブ及びドーム形状である)(図1A及びデータは示さない)。これらの変換したTRA-1-81/TBX3ダブルポジティブiPSCは、ナイーブ型iPSCと同様に同定した。

10

20

30

40

50

## アカゲザルナイーブ型 i P S C の変換条件の最適化

## 【 0 1 0 2 】

どのように b F G F が作用し、アカゲザルナイーブ型 i P S C を生成するかを理解するため、b F G F の下流の主要な経路、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ ( M A P K ) シグナル伝達経路を調べた。哺乳動物細胞において、少なくとも3つの特徴づけられた M A P K ファミリーがある：古典的な M A P K ( E R K )、c - J u n N 末端キナーゼ / ストレス活性化タンパク質キナーゼ ( J N K / M A P K )、及び p 3 8 キナーゼ ( Z h a n g ら、C e l l R e s、1 2 : 9 ~ 1 8 ( 2 0 0 2 ) )。これらのどれが主な役割を有するか同定するため、E R K、J N K、p 3 8 に特異的なアンタゴニストを先の変換条件下でそれぞれ又は組み合わせて試験した。P D 0 3 2 5 9 0 1、古典的な M A P K / E R K の阻害剤及び 2 i / L I F 条件の不可欠な成分は、T B X 3 / T R A - 1 - 8 1 ダブルポジティブなドーム形状のコロニーの変換及び維持に必須であった ( データは示さない )。さらに、2つの他の分子、J N K i の S P 6 0 0 1 2 5 及び p 3 8 i の S B 2 0 3 5 8 0 は、それぞれ、これらの変換条件下でのナイーブ型 P S C の変換効率を大きく改善することができる ( 図 1 A、1 B、1 C )。これらの2つの阻害剤の組合せは、全コロニーの 7 5 % まで、変換効率をさらに増強する ( 図 1 A 及びデータは示さない )。さらに、これらのコロニーを採取し、単一細胞を継代した場合、マウス胚性線維芽細胞フィーダー細胞において、典型的な A L P 陽性のドーム形状のコロニーが培養 3 日後に現れる。免疫染色によるさらなる同定により、これらのコロニーは T R A - 1 - 8 1 陽性であることが示され、それらが多能性なままであることを示している ( データは示さない )。

10

20

## 【 0 1 0 3 】

変換条件を最適化するため、ヒトナイーブ型 E S C / i P S C の生存及び維持に有益であると開示されている Y 2 7 6 3 2 ( R O C K 阻害剤 ) 及び G O 6 9 8 3 ( P K C 阻害剤 ) もまた試験した ( G a f n i ら、N a t u r e、5 0 4 : 2 8 2 ~ 2 8 6 ( 2 0 1 3 ) )。しかし、本発明者らは、これら2つの化合物が、コロニーにおいて明白な分化を誘導し、T R A - 1 - 8 1 発現を減少することを見出し ( データは示さない )、ヒト及びサルにおいてナイーブ型多能性を確立するためのシグナル伝達制御の異なる要求を意味している。

## 【 0 1 0 4 】

最後に、b F G F 及び 2 i / L I F の存在下での S P 6 0 0 1 2 5 及び S B 2 0 3 5 8 0 の組合せを使用して、安定な T R A - 1 - 8 1 / T B X 3 ダブルポジティブなドーム形状のナイーブ型 i P S C が、プライム型 i P S C から高効率で ( 2 i / h L I F + b F G F のみより 1 0 倍より高い ) 成功裏に確立された ( 図 1 A )。注目すべきことに、この最適化した培養条件で、アカゲザル線維芽細胞は直接 O C T 4、S O X 2、及び K L F 4 の過剰発現により、T R A - 1 - 8 1 陽性のドーム形状のコロニーへと再プログラムされた ( データは示さない )。この最適化した培養条件は、先に記載したように、エピソームベクターに基づく非ウイルス性の組み込み法を使用するナイーブ型 i P S C を確立するためにも使用され ( O k i t a ら、N a t . M e t h o d s、8 : 4 0 9 ~ 4 1 2 ( 2 0 1 1 ) ) ( 図 2 A、図 2 B、及びデータは示さない )、ヒトナイーブ型誘導多能性幹細胞を確立した ( データは示さない )。確立したナイーブ型 i P S C は、アクターゼを使用して 4 ~ 5 日ごとに単一細胞継代することができ、早い成長速度を表す ( 図 2 C 及びデータは示さない )。

30

40

## 【 0 1 0 5 】

## アカゲザルナイーブ型 i P S C の多能性の特徴

これらのナイーブ型 i P S C が確かに多能性であるかどうかの疑問には、R T - P C R を使用して取り組んだ。R T - P C R 分析により、ナイーブ型 i P S C が、O C T 4、S O X 2、S A L L 4、及び N A N O G を含む内在性の多能性マーカー遺伝子を発現したことを示した ( 図 2 B 及び 2 D )。ナイーブ型 i P S C の多能性の特徴を、免疫染色によりさらに調べた。特に、これらの細胞は、T R A - 1 - 6 0、T R A - 1 - 8 1、及び S S E A - 4 を含むが、S S E A - 1 を含まない、多能性特異的な表面マーカーに陽性に染色

50

された（データは示さない）。さらに、ナイーブ型 iPSC は、MIXL1、CDX2、ZIC1、HAND1、EOMES、SOX1、PAX6、DLL1、及び ZNF521 の下方制御を示した（データは示さない）。一方、これらの細胞は正常な核型（雄について 42、XY 及び雌について 42、XX）を有し、ドーム形状の形態及び 8 ヶ月に渡る単一細胞継代の ALP 活性を維持する（データは示さない）。最後に、ナイーブ型 iPSC の分化能を分析するため、3 つの胚葉へと分化するそれらの能力を試験した。ナイーブ型 iPSC は、レシピエントマウスへの注入の 4 ~ 5 週間後に *in vivo* で検出された 3 つの胚葉全ての組織で奇形腫を形成した（データは示さない）。したがって、これらの結果は、アカゲザルナイーブ型 iPSC は多能性の特徴及び分化能を保持することを示している。

10

#### 【0106】

アカゲザルナイーブ型 iPSC はプライム型 iPSC とは異なる特性を保持する

プライム型とナイーブ型 iPSC の間の違いをさらに調べるため、研究は、異なるシグナル伝達刺激又は阻害剤へのプライム型及びナイーブ型 iPSC の明白な応答パターンに注目した (Greberら、Cell Stem Cell、6:215~226 (2010); Niwaら、Nature、460:118~122 (2009); Vallierら、Dev.、136:1339~1349 (2009))。データは、マウス及びヒトナイーブ型 iPSC と同様に、ナイーブ型 iPSC の自己複製が LIF シグナル伝達に依存することを示した。JAK/STAT3 阻害剤に曝露した場合、TRA-1-81 の発現が著しく減少してナイーブ型 iPSC は容易に分化したが、プライム型 iPSC はそれらの多能性の特性を維持した (図 3A 及び 3B)。重要なことに、ヒト細胞のように、bFGF シグナル伝達がアカゲザルプライム型とナイーブ型 iPSC 両方の自己複製に必要であった。FGFR 阻害剤 SU5402 の存在下で、TRA-1-81 陽性コロニーは、プライム型又はナイーブ型 iPSC のいずれかによってほとんど形成されず、霊長類の多能性の制御におけるこの経路の役割を示している (図 3A 及び 図 3B)。典型的なフォスファチジルイノシトール 3 - キナーゼ (PI3K) 阻害剤である Ly294002 は、濃度依存的な方法でナイーブ型変換過程を厳密に遮断することができ、ナイーブ型状態の確立において、FGF 下流の PI3K シグナル伝達の役割を示している (図 3C)。興味深いことに、特異的及び選択的 TGF- $\beta$ 1 阻害剤 SB431542 の培養培地への添加は、アカゲザルナイーブ型 iPSC には効果を示さないが、プライム型 iPSC 自己複製には効果的であることを示し、アカゲザルプライム型 iPSC 及び報告されたヒトナイーブ型 iPSC とは違い (Gafniら、Nature、504:282~286 (2013); Theunissenら、Cell Stem Cell、15(4):471~87 (2014))、TGF- $\beta$  シグナル伝達はサルのナイーブ型 iPSC 自己複製に必ずしも必要ではないことを示している。さらに、TGF- $\beta$  の培養培地への添加は、ナイーブ型 iPSC の自己複製に効果的であったが、プライム型 iPSC には効果的でなかった (図 3A、図 3B、及び 図 3D)。

20

30

#### 【0107】

雌のナイーブ型 iPSC における X 染色体活性化状態を次に分析した。最適化条件によって誘導された雌のナイーブ型 iPSC は、核の H3K27me3 フォーカスの欠損及び XIST 発現レベルの劇的な下方制御によって示されるように、X 染色体再活性化状態を保持した (図 3E 及びデータは示さない)。対照的に、雌のプライム型 iPSC は、体細胞のように H3K27me3 フォーカスの明らかな存在及び XIST の高い発現レベルを有する、X 染色体の不活性化状態を維持する (図 3E 及びデータは示さない)。したがって、これらの結果は、異なる種間のナイーブ型 iPSC において X - 活性化状態の保存を示している。

40

#### 【0108】

次に、ナイーブ型とプライム型 iPSC 間の全体的な遺伝子発現パターンを、RNA シークエンシング (RNA-seq) 分析によって比較した。ゲノム全体での遺伝子発現クラスタリングは、異なる遺伝子発現パターンによりナイーブ型 iPSC がプライム型 iP

50

SCとは別にクラスター化されることを示した(図3F及びデータは示さない)。ジーンオントロジー(GO)ターム解析により、ナイーブ型とプライム型iPSC間の主な発生のシグナル伝達及び代謝に関連する遺伝子発現パターンの変化を明らかにした(図3G)。重要なことに、プライム型iPSCと比較して、複数のナイーブ型状態関連転写産物、例えばPRDM14、KLF5、ZFP42(REX1)、LIFR、TBX3、及びNANOGは、ナイーブ型iPSCにおいて上方制御された(図3F、図3G、及び図S3E)。一方、ナイーブ型iPSCは、HOXA2、MEIS1、及びDLL1を含む、系列特異的遺伝子の発現においても減少を示し、低レベルで発現するが、プライム型iPSCではかなりのレベルで発現した(図3H、図3I、図3J)。まとめると、これらのデータは、アカゲザルにおいて、ナイーブ型iPSCの遺伝子発現パターンがプライム型iPSCとは異なることを示し、マウス及びヒトにおける先の研究と類似している(Gafniら、Nature、504:282~286(2013); Chanら、Cell Stem Cell、13:663~675(2013); Wareら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、111:4484~4489(2014); Theunissenら、Cell Stem Cell、15(4):471~87(2014))。

10

20

30

40

50

## 【0109】

最後に、*in vivo*での種間キメラの生成におけるアカゲザルナイーブ型iPSCの能力を試験するため、ナイーブ型及びプライム型iPSCを、8細胞期の胚又はICRマウスの胎生期3.5(E3.5)胚盤胞に微量注入し、E10~E11発生段階まで発生させた(表3)。

## 【表3】

表3.種間キメラアッセイの要約

サルナイーブ型 iPSC 注射									プライム型 iPSC 注射		
発生段階	8細胞	8細胞	8細胞	胚盤胞	胚盤胞	胚盤胞	胚盤胞	合計	胚盤胞	胚盤胞	合計
細胞株	N1	N2	N3	N2	FN-1	DRN-1	FN-4	---	P1	P2	---
注射した胚	49	61	32	50	104	20	21	337	47	57	104
回復した胚	11	21	14	32	60	12	10	160	23	27	50
キメラ胚	1(E1 0.5) 0(E1 6)	2(E1 0.5)) 1(E1 6)	0(E1 0.5) 0(E1 6)	1(E1 0.5) 0(E1 6)	2(E1 0.5) 1(E1 6)	0(E1 0.5) 0(E1 6)	0(E1 0.5) 0(E1 6)	6(E1 0.5) 2(E1 6)	0(E1 0.5) 0(E1 6)	0(E1 0.5) 0(E1 6)	0(E10 .5) 0(E16 )

## 【0110】

サルの細胞の核を特異的にマークできる抗ヒト核抗体(hNA)の全組織標本免疫染色(データは示さない)を*in vivo*でアカゲザルiPSC由来細胞の存在を検出するために使用した。とりわけ、プライム型iPSCと対照的に、ナイーブ型iPSCとのキメラ胚が得られた(データは示さない)。特に、3つのナイーブ型iPSC株から生成された6つのキメラ胚のうち3つは、ナイーブ型iPSC由来細胞の広範な組込みを示した(データは示さない)。これらのナイーブ型iPSC由来細胞がキメラ胚の胚発生に寄与することができるかどうかさらに調べるため、E16発生段階でのキメラ胚におけるナイーブ型iPSC由来細胞の分布を分析した。2つの独立したナイーブ型細胞株からの2つのE16キメラ胚をさらに分析した。ナイーブ型iPSC由来細胞は、レシピエントマウスの多くの組織及び臓器、例えば腸、肝臓、心臓、及び脳へと組込まれた。OCT4及びNANOGを含む多能性マーカーの発現は、キメラ胚のhNA+細胞において検出できず

(データは示さない)、ナイーブ型 i P S C 由来細胞の多能性の欠損を示している。興味深いことに、心臓領域におけるナイーブ型 i P S C 由来細胞の高度な組込みも観察された (データは示さない)。さらに、心臓特異的マーカー G A T A 4 (ヒトとマウス両方の G A T A 4 と反応する G A T A 4 抗体で染色することによって検出した) はこの段階の心臓でほとんどの h H A + 細胞において発現し (データは示さない) (Kuoら、Genes Dev.、11:1048~1060 (1997))、これらのナイーブ型 i P S C 由来細胞は、発生中の心臓へと組込まれた場合、心臓の運命に向かってさらに分化し得ることを意味している。合わせて、これらのデータは、アカゲザルナイーブ型 i P S C 由来細胞は種間キメラ胚を生成し、さらなる分化を伴うマウス初期胚へと再配置 (repopulate) することができた。

#### 【0111】

##### 考察

本研究は、アカゲザルナイーブ型 i P S C がプライム型 i P S C からの変換により又はサイトカインと小分子阻害剤の簡単な組合せによる線維芽細胞の転写因子駆動再プログラミングにより成功裏に生成できることの証明を提供する。さらに、この変換条件はまた、ナイーブ型 i P S C の自己複製回路の長期間安定な維持も可能にする。重要なことに、本明細書に開示の発見は、マウス胚への種間キメラ能を有するナイーブ型多能性が非ヒト霊長類に由来することができることを示す (データは示さない)。

#### 【0112】

生成したアカゲザルナイーブ型 i P S C は、それらをプライム型 i P S C 及び従来の霊長類の E S C と区別する多くの細胞の特徴を保持する。アカゲザルナイーブ型 i P S C は単一細胞継代に耐え、安定なドーム形状の形態及び正常な核型で長期間繁殖することができる。これらの細胞は b F G F シグナル伝達非依存的に L I F 及び M A P K に応答して、多能性の特徴を伴い自己複製する。H 3 K 2 7 m e 3 核内フォーカスの欠損及び X I S T 転写の下方制御は、ナイーブ型 i P S C の前 X 不活性化状態を示した。さらに、これらの研究において確立されたサル/のナイーブ型 i P S C はまた、マウスとヒト両方のナイーブ型多能性幹細胞と発現特性を共有する。例えば、N A N O G 及び P R D M 1 4 を含むナイーブ型状態関連遺伝子の上方制御が観察され、これがマウスのナイーブ型多能性状態を保護し、シグナル伝達経路及び細胞内のエピジェネティクスの二重制御により分化系列コミットメントを抑えるように働く (Silvaら、Cell、138:722~737 (2009); Yamajiら、Cell Stem Cell、12:368~382 (2013); Graboleら、EMBO Rep.、14:629~637 (2013))。この発見は、D L L 1 及び M E I S 1 などの系列特異的遺伝子の発現の減少と一致し (van Esら、Nat Cell Biol.、14:1099~1104 (2012); Hiraら、EMBO J.、23:450~459 (2004))、アカゲザルナイーブ型 i P S C のより未熟な状態を示している (図 3 H ~ J)。したがって、サル/の 2 つの多能性状態の完全に異なる表現型は、優れたモデルシステムを提供し、霊長類の多能性ネットワーク制御のメカニズムを調べることができる。

#### 【0113】

本研究の別の重要な発見は、サル/のナイーブ型 i P S C が、マウス胚に注入された場合、種間キメラを生成することができることである。このアッセイを使用し、ヒトナイーブ型 P S C を評価したが、これらの細胞がそれらの多能性遺伝子発現を欠損する及びさらに分化し i n v i v o での組織に寄与できるかどうかははっきりしないままである (Gafniら、Nature、504:282~286 (2013); Theunissenら、Cell Stem Cell、15(4):471~87 (2014))。ここで、全組織標本染色、全胚の薄切片、及び画像化を使用して、キメラサル-マウス胚においてアカゲザルナイーブ型 i P S C 由来細胞の分布の概要を得た。抗ヒト核抗体の組織特異的マーカーとの共染色、及び全胚薄切片標本の多能性特異的マーカーの不在は、キメラ胚におけるナイーブ型 i P S C 由来細胞がさらに分化し、胚発生に寄与し得ることをさらに例示した。したがって、全胚分析は代替戦略を与え、ナイーブ型多能性のより厳密な証拠を

10

20

30

40

50

提供する。

【0114】

これらの発見はまた、マウス、サル、及びヒト細胞のナীব型多能性状態を達成するための条件における、進化的な保存及びパリエーションも示す。まず、データはLIF/S/TAT3シグナル伝達が、サルだけでなく他の2種でもナীব型状態を支持することを示し、ナীব型多能性ネットワークの確立においてLIF/S/TAT3シグナル伝達の基本的な効果をしている、第二に、MAPK、ERK、JNK、及びp38の3つの中心成分の拮抗作用(Zhang及びLiu、Cell Res、12:9~18(2002))は、これらの種のナীব型多能性状態を達成するために重要である。アカゲザルナীব型iPSCはbFGFシグナル伝達に依拠し、自己複製を持続する。この発見は、ヒト細胞がナীব型多能性状態を獲得することに関してbFGFシグナル伝達の重要性及び緊要性を示す近年の報告と一致し(Gafniら、Nature、504:282~286(2013); Chanら、Cell Stem Cell、13:663~675(2013); Wareら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、111:4484~4489(2014))、bFGFシグナル伝達が、ヒトとサル両方の細胞のナীব型状態の維持に役割を果たすことを示している。対照的に、bFGFシグナル伝達はマウスのナীব型多能性の維持にネガティブな効果を有し、これは異なる種の異なる遺伝的背景による可能性があり、これは以前の報告によって示唆されている(Hannaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、107:9222~9227(2010))。MAPKのように、bFGFの下流は霊長類のナীব型PSCで抑制される必要があり、PI3KなどのbFGFの下流の他のシグナル伝達経路は、霊長類のナীব型多能性にポジティブな効果を発揮し得る(図3C及びデータは示さない)。さらに、変換過程の間にTGF-シグナル伝達非依存性が明らかになった。これは、TGF-シグナル伝達の存在に依存するヒトナীব型PSCの他の報告とは対照的である(Gafniら、Nature、504:282~286(2013); Theunissenら、Cell Stem Cell、15(4):471~87(2014); 米国特許出願公開第2014/0315301号)。

10

20

【0115】

全体として、アカゲザルナীব型iPSCの生成は、2つの異なる多能性状態(ナীব型及びプライム型)が種を超えて保存されていることを示す。最も重要なことには、ナীব型多能性幹細胞の誘導におけるマウス、サル、及びヒト種間の類似性及び違いの発見は、ナীব型多能性の謎を明らかにすることを助け、他の種の確かなナীব型PSCを得るために有用であり得る。一方、アカゲザルナীব型iPSCの誘導は前臨床研究及び疾患モデルへの適用のための役立つ細胞源も提供する。

30

【0116】

上記明細書において、本発明はそれらの特定の実施形態に関連して記載されているが、多くの詳細が例示の目的で述べられており、本発明のさらなる実施形態が可能であり、本明細書に記載の特定の詳細が本発明の基本原則から逸脱することなくかなり変化し得ることは当業者には明らかである。

【 図 1 A 】

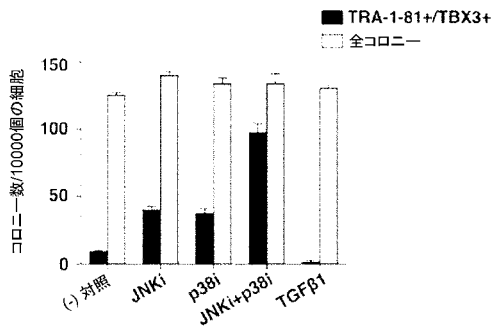


FIG. 1A

【 図 1 B 】

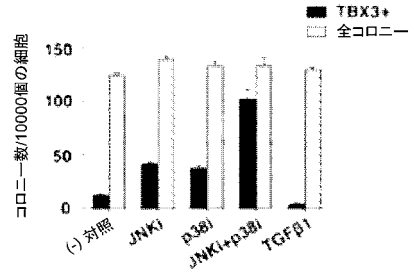


FIG. 1B

【 図 1 C 】

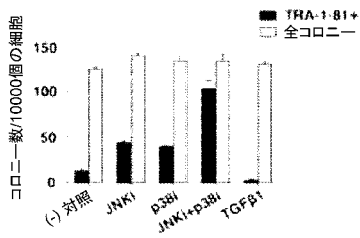


FIG. 1C

【 図 2 A 】

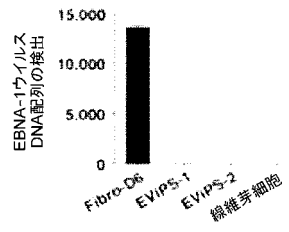


FIG. 2A

【 図 2 B 】

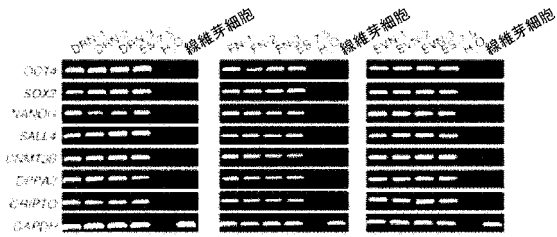


FIG. 2B

【 図 2 C 】

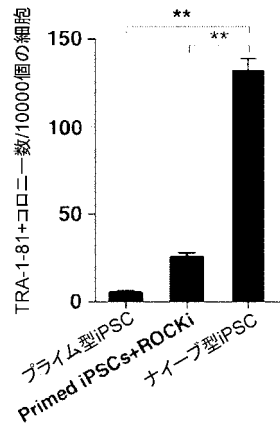


FIG. 2C

【 図 2 D 】

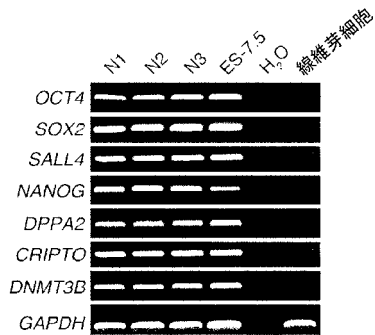


FIG. 2D

【 図 3 A 】

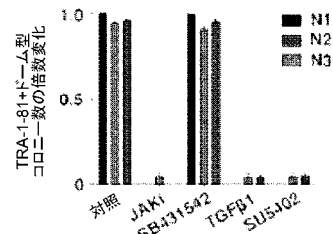


FIG. 3A

【 図 3 B 】

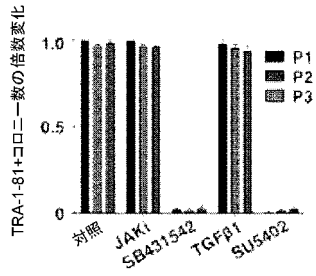


FIG. 3B

【 図 3 C 】

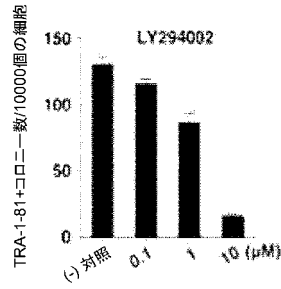


FIG. 3C

【 図 3 D 】

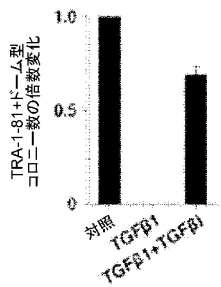


FIG. 3D

【 図 3 E 】

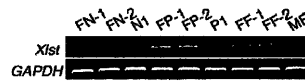


FIG. 3E

【 図 3 F 】

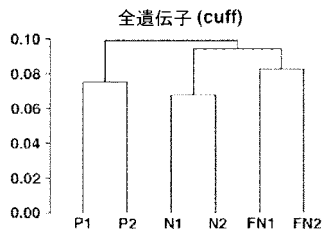


FIG. 3F

【 図 3 G 】

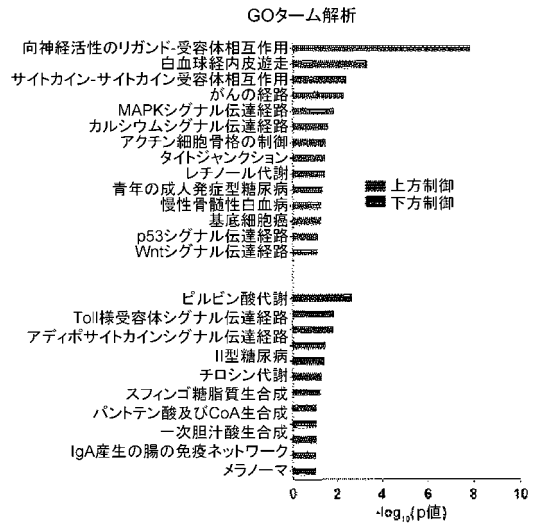


FIG. 3G

【 図 3 H 】

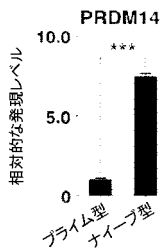


FIG. 3H

【 図 3 I 】

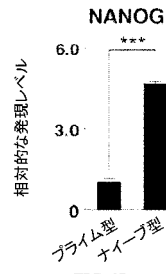


FIG. 3I

【 図 3 J 】

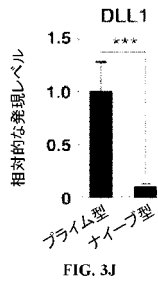


FIG. 3J

【 図 4 A 】

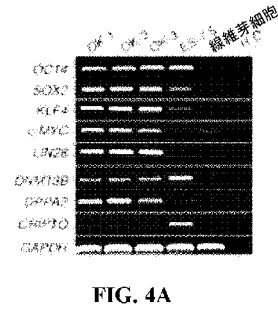


FIG. 4A

【 図 4 B 】

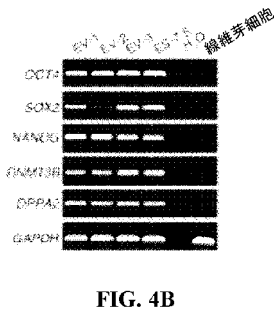


FIG. 4B

【 図 4 C 】

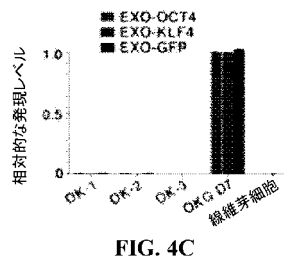


FIG. 4C

【配列表】

2017529876000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. <b>PCT/CN2015/089963</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N 5/0735(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A01K 67/027(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N; A01K  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DATABASES: CPDABS, CNABS, CJD, CSCD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED; SEARCH TERMS: media, medium, isolat+, pluripoten+, cell?, inhibitor?, naive, TGF, induc+, PSC, cytokine, GSK, ERK, JNK, BFGF, MAPK		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEN Yi-fei et al. "Multiple Pluripotent States of Human and Mouse Embryonic Stem Cells" <i>Chinese Journal of Cell Biology</i> , Vol. vol.33, No. no.10, 31 October 2011 (2011-10-31), ISSN: ISSN 1674-7666, pp.1166-1172, see figure 1 and table 1	17-18
A	CHEN Yi-fei et al. "Multiple Pluripotent States of Human and Mouse Embryonic Stem Cells" <i>Chinese Journal of Cell Biology</i> , Vol. vol.33, No. no.10, 31 October 2011 (2011-10-31), ISSN: ISSN 1674-7666, pp.1166-1172, see figure 1 and table 1	1-16, 19-27, 31
A	CN 102604894 A (CHINESE ACAD SCI GUANGZHOU BIOMEDICINE) 25 July 2012 (2012-07-25) see claims 1-5	1-27, 31
A	Jennifer Nichols et al. "Naive and Primed Pluripotent States" <i>Cell Stem Cell</i> , Vol. vol.4, 05 June 2009 (2009-06-05), ISSN: ISSN 1934-5909, pp.487-492, see the abstract and figure 1	1-27, 31
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>12 December 2015</b>		Date of mailing of the international search report <b>28 December 2015</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>STATE INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE OF THE P.R.CHINA 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10)62019451</b>		Authorized officer  <b>WU,Tingchen</b>  Telephone No. (86-10)62089319

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/089963

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: **28-30**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
[1] The subject matter of claims 28-30 relates to a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, and therefore, according to the criteria set out in Rule 39.1(iv), relates to subject matter for which an international search is not required.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2015/089963**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	102604894	A	25 July 2012	JP	2015509719	A	02 April 2015
				KR	20140138221	A	03 December 2014
				CA	2865817	A1	06 September 2013
				WO	2013127293	A1	06 September 2013
				EP	2821481	A4	19 August 2015
				US	2015030570	A1	29 January 2015
				CN	102604894	B	30 July 2014
				EP	2821481	A1	07 January 2015

---

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
<b>A 6 1 L 27/38</b>	<b>(2006.01)</b>		A 6 1 L	27/38	3 0 0	
C 1 2 N 9/99	(2006.01)		A 6 1 L	27/38		
			A 6 1 L	27/38	1 0 0	
			C 1 2 N	9/99		

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

- (71)出願人 517104884  
 ベイジン バイタルスター バイオテクノロジー カンパニー リミテッド  
 BEIJING VITALSTAR BIOTECHNOLOGY CO., LTD.  
 中華人民共和国, ペキン 100107, チャオヤン ディストリクト, ヤン ロード ナンバー 4
- (74)代理人 100107456  
 弁理士 池田 成人
- (74)代理人 100162352  
 弁理士 酒巻 順一郎
- (74)代理人 100123995  
 弁理士 野田 雅一
- (74)代理人 100148596  
 弁理士 山口 和弘
- (72)発明者 デェン, フンクイ  
 中華人民共和国, ペキン 100871, ハイディアン ディストリクト, イヘユアン ロード ナンバー 5, ジン グァン ライフサイエンス ビルディング, ルーム ナンバー 433
- (72)発明者 ファン, リグォ  
 中華人民共和国, ペキン 100871, ハイディアン ディストリクト, イヘユアン ロード ナンバー 5, ジン グァン ライフサイエンス ビルディング, ルーム ナンバー 431
- (72)発明者 リュウ, カン  
 中華人民共和国, ペキン 100871, ハイディアン ディストリクト, イヘユアン ロード ナンバー 5, ジン グァン ライフサイエンス ビルディング, ルーム ナンバー 431
- (72)発明者 ヤン, ウェイフォン  
 中華人民共和国, ペキン 102200, チャンピン ディストリクト, シェンミン ユアン ロード, ナンバー 19

Fターム(参考) 4B065 AA90X AC20 BA02 BB40 BD50 CA44  
 4C081 AB11 AB20 AB35 BA17 BC01 CD34 DA16 EA02 EA03  
 4C087 AA01 AA02 AA03 BB64 CA04 NA14 ZB21