

(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2018-520682

(P2018-520682A)

(43) 公表日 平成30年8月2日(2018. 8. 2)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A O 1 K 67/027 (2006.01)	A O 1 K 67/027 Z N A	2 G O 4 5
C 1 2 N 5/0735 (2010.01)	C 1 2 N 5/0735	4 B O 6 5
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47	4 C O 8 1
C O 7 K 14/195 (2006.01)	C O 7 K 14/195	4 C O 8 7
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 79 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2018-500321 (P2018-500321)
 (86) (22) 出願日 平成28年7月1日 (2016. 7. 1)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年2月14日 (2018. 2. 14)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/040880
 (87) 国際公開番号 W02017/004601
 (87) 国際公開日 平成29年1月5日 (2017. 1. 5)
 (31) 優先権主張番号 62/234, 035
 (32) 優先日 平成27年9月29日 (2015. 9. 29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/187, 638
 (32) 優先日 平成27年7月1日 (2015. 7. 1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507081094
 ミネルバ バイオテクノロジーズ コーポ
 レーション
 米国, エムエー O 2 4 5 1, ウォルサム
 , 4 O ベアー ヒル ロード
 (74) 代理人 100088904
 弁理士 庄司 隆
 (74) 代理人 100124453
 弁理士 資延 由利子
 (74) 代理人 100135208
 弁理士 大杉 卓也
 (74) 代理人 100163544
 弁理士 平田 緑

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 幹細胞に基づいた器官および組織生成の方法

(57) 【要約】

以下を含む、非ヒト動物宿主において、ヒト組織若しくは器官を生成する方法:

(i) ヒトのナイーブ状態の幹細胞を生成し、キメラ動物が生成されるように、非ヒト動物宿主の分化している胎児、胚、桑実胚、胚盤胞若しくは受精卵にそれらに移入すること;

(ii) 該キメラ動物から、ヒト組織若しくは細胞によって分泌された若しくは作られた因子、ヒト細胞、器官、若しくは組織を回収すること;

(iii) ヒトへ、ヒト組織の生成に帰着する、前記回収された材料を、移植する若しくは投与すること。

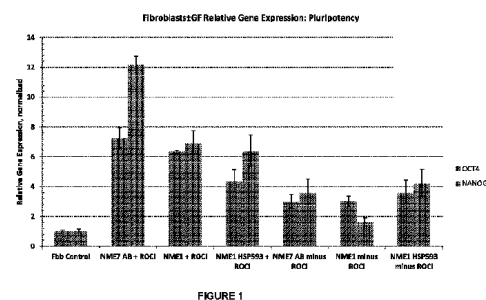


FIGURE 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下を含む、非ヒト動物宿主において、ヒト組織若しくは器官を生成する方法：

- (i) ヒトのナープ状態の幹細胞を生成し、キメラ動物が生成されるように、非ヒト動物宿主の分化している胎児、胚、桑実胚、胚盤胞若しくは受精卵にそれらを移入すること；
- (ii) 該キメラ動物から、ヒト組織若しくは細胞によって分泌された若しくは作られた因子、ヒト細胞、器官、若しくは組織を回収すること；
- (iii) ヒトへ、ヒト組織の生成に帰着する、前記回収された材料を、移植する若しくは投与すること。

【請求項 2】

10

請求項 1 に記載の方法であって、そこではナープ状態の幹細胞は、NME7、NME7-AB、NME7-X1、NME6あるいは二量体NME1を使用して生成される、方法。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の方法であって、そこではナープ幹細胞は、NME7、NME7-AB、NME6、NME7-X1あるいは二量体NME1を含んでいる培地中で、再プログラムされたiPS細胞である、方法。

【請求項 4】

請求項 2 に記載の方法であって、そこではナープ幹細胞は、NME7、NME7-AB、NME6、NME7-X1あるいは二量体NME1を含んでいる培地中で培養された胚性幹細胞である、方法。

【請求項 5】

20

請求項 1 に記載の方法であって、そこでは胚盤胞若しくは胚の非ヒト-細胞が遺伝子変異されている、方法。

【請求項 6】

請求項 5 に記載の方法であって、そこでは該遺伝子変異は、宿主動物がある組織若しくは器官を生成することができないものとなる、方法。

【請求項 7】

請求項 1 に記載の方法であって、そこではナープ状態で幹細胞を維持する若しくはナープ状態へ刺激を受けた（プライム）幹細胞を振り向ける作用薬が、NMEタンパク質、2i、5i、化学薬品若しくは核酸である、方法。

【請求項 8】

30

請求項 7 に記載の方法であって、そこではNMEタンパク質は、NME1二量体、NME7モノマー、NME7-AB、NME6二量体あるいはバクテリアNMEである、方法。

【請求項 9】

請求項 1 に記載の方法であって、そこでは非ヒト動物は、げっ歯動物、ブタ・ウシ、羊あるいは霊長類である、方法。

【請求項 10】

請求項 9 に記載の方法であって、そこではげっ歯動物はマウス若しくはラットである、方法。

【請求項 11】

40

請求項 3 に記載の方法であって、NMEタンパク質が、単一の成長因子としての無血清培地中に存在する、方法。

【請求項 12】

請求項 1 の方法であって、そこでは非ヒト動物宿主が、生成されるべき幹細胞の種の天然の配列に相同の配列をもつNMEタンパク質を発現する、方法。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の方法であって、そこではNMEタンパク質は、NME7、NME7-AB、NME7-X1、あるいは二量体NME1あるいはNME6である、方法。

【請求項 14】

請求項 13 に記載の方法であって、そこではNMEタンパク質はNME7である、方法。

【請求項 15】

50

請求項 1 2 に記載の方法であって、そこではNMEタンパク質は、生成されるべき幹細胞の種の天然NMEタンパク質配列に少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%あるいは95%相同である、方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 4 に記載の方法であって、そこではNMEタンパク質は、生成されるべき幹細胞の種の天然配列に少なくとも60%相同である、方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 4 に記載の方法であって、そこではNMEタンパク質は、生成されるべき幹細胞の種の天然配列に少なくとも70%相同である、方法。

【請求項 1 8】

天然マウスNMEタンパク質に対して少なくとも75%相同配列を持つNMEタンパク質。

【請求項 1 9】

天然ラットNMEタンパク質に対して少なくとも75%相同配列を持つNMEタンパク質。

【請求項 2 0】

天然ブタNMEタンパク質に対して少なくとも75%相同配列を持つNMEタンパク質。

【請求項 2 1】

天然羊NMEタンパク質に対して少なくとも75%相同配列を持つNMEタンパク質。

【請求項 2 2】

天然牛NMEタンパク質に対して少なくとも75%相同配列を持つNMEタンパク質。

【請求項 2 3】

天然カニクイザルNMEタンパク質に対して少なくとも75%相同配列を持つNMEタンパク質。

【請求項 2 4】

天然アカゲザルNMEタンパク質に対して少なくとも75%相同配列を持つNMEタンパク質。

【請求項 2 5】

天然チンパンジーNMEタンパク質に対して少なくとも75%相同配列を持つNMEタンパク質。

【請求項 2 6】

天然コビットチンパンジーNMEタンパク質に対して少なくとも75%相同配列を持つNMEタンパク質。

【請求項 2 7】

天然ゴリラNMEタンパク質に対して少なくとも75%相同配列を持つNMEタンパク質。

【請求項 2 8】

その配列が非ヒトのものである、MUC1*細胞外領域の配列を含むペプチドに結合する抗体。

【請求項 2 9】

その配列が霊長類のものである、MUC1*の細胞外領域の配列を含むペプチドに結合する抗体。

【請求項 3 0】

その配列はマカク、チンパンジー、類人猿、コビットチンパンジーあるいはゴリラのものである、MUC1*細胞外領域の配列を含むペプチドに結合する抗体。

【請求項 3 1】

その配列は非霊長類のものである、MUC1*細胞外領域の配列を含むペプチドに結合する抗体。

【請求項 3 2】

その配列はげっ歯動物のものである、MUC1*細胞外領域の配列を含むペプチドに結合する抗体。

【請求項 3 3】

その配列はマウスまたはラットのものである、MUC1*細胞外領域の配列を含むペプチドに結合する抗体。

【請求項 3 4】

その配列は哺乳類のものである、MUC1*細胞外領域の配列を含むペプチドに結合する抗体

10

20

30

40

50

。

【請求項 35】

その配列はブタ、ウシあるいは羊のものである、MUC1*細胞外領域の配列を含むペプチドに結合する抗体。

【請求項 36】

細胞をNMEタンパク質及び/又は抗MUC1*抗体と接触させることを含む、体細胞あるいは培養幹細胞に多分化能を誘導する幹細胞の生成方法であって、ここで、該NMEタンパク質は、ドナー細胞の配列に少なくとも75%相同であり、及び、該抗MUC1*抗体は、細胞を提供した種の天然配列に少なくとも75%相同な配列である、MUC1*細胞外領域の配列を含むペプチドに結合する、方法。

10

【請求項 37】

請求項 1 に記載の方法を含む、生成された組織あるいは器官で、それを必要とする人を処置する方法。

【請求項 38】

第 1 の非ヒト-哺乳動物へ第 2 の哺乳動物からの細胞を導入することを含む、第 1 の非ヒト-哺乳動物と同じ種若しくは属に、属する若しくは属さない、第 2 の哺乳動物に特異的に由来する、DNA、分子、細胞、組織あるいは器官を含む第 1 の非ヒト哺乳動物の生成方法。

【請求項 39】

請求項 38 に記載の方法であって、そこでは第 2 の哺乳動物からの細胞は始原細胞、幹細胞あるいはナイーブ状態の幹細胞である、方法。

20

【請求項 40】

請求項 39 に記載の方法であって、そこではNMEを含んでいる培地での細胞の培養により、ナイーブ状態の幹細胞は生成される、方法。

【請求項 41】

請求項 40 に記載の方法であって、そこではNMEは二量体NME1、二量体NME6、NME7-X1あるいはNME7-ABである、方法。

【請求項 42】

請求項 41 に記載の方法であって、そこではNMEは、第 2 の哺乳動物に内在性の配列をもつ、方法。

30

【請求項 43】

請求項 38 に記載の方法であって、そこでは第 2 の哺乳動物はヒトである、方法。

【請求項 44】

請求項 38 に記載の方法であって、そこでは第 1 の非ヒト-哺乳動物はげっ歯動物、飼育された哺乳動物、ブタ、ウシあるいは非ヒト霊長類である、方法。

【請求項 45】

請求項 39 に記載の方法であって、そこでは、始原細胞、幹細胞あるいはナイーブ幹細胞が、第 1 の非ヒト-哺乳動物の受精卵、桑実胚、胚盤胞、胚あるいは分化胎児へ導入される、方法。

【請求項 46】

さらに次のものを含む請求項 38 に記載の方法：

第 1 の非ヒト-哺乳動物が分化することを許容し、

第 1 の非ヒト-哺乳動物から、ある第 2 の哺乳類DNAを移入した、分子、細胞、組織あるいは器官を回収すること；

疾病若しくはその状態の処置若しくは予防のために、その必要のある第2の哺乳動物に、該分子、細胞、組織若しくは器官を投与すること。

【請求項 47】

請求項 46 に記載の方法であって、そこでは始原細胞、幹細胞あるいはナイーブ幹細胞はiPS細胞である、方法。

【請求項 48】

40

50

請求項 4 7 に記載の方法であって、そこではiPS細胞が生成される体細胞は、得られた分子、細胞、組織あるいは器官が、疾病若しくはその状態の処置若しくは予防のために、投与される、第 2 の哺乳動物からである、方法。

【請求項 4 9】

請求項 4 6 に記載の方法であって、
器官の分化に關与する内在性遺伝子及び器官の分化時間枠を決定し；そして
第 1 の非ヒト-哺乳動物で器官の分化時間枠中に内在性遺伝子をノックアウト若しくはノックダウンすることであって、そこでは該器官は第 2 の哺乳動物からの細胞から生産される、方法。

【請求項 5 0】

請求項 3 8 に記載の方法であって、そこでは第 1 の非ヒト-哺乳動物は、70%、75%、80%、85%、90%あるいは95%以上であるグローバルな配列同一性で、あるいは45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%あるいは95%以上であるNME配列同一性で、第 2 の哺乳動物に類似している、方法。

【請求項 5 1】

請求項 4 6 に記載の方法であって、
器官分化時間枠と器官の分化に關与する内在性遺伝子を決定すること； 及び
第 2 の哺乳類細胞が、非哺乳類NME7-AB若しくはNME1に応答してタイムリーに展開するように、第 2 の哺乳類のNME7-AB若しくはNME1が、誘導可能若しくは抑制可能プロモータから発現されるように、第 1 の非ヒト哺乳類の分化胎児、若しくは胚の細胞、胚盤胞の細胞、桑実胚の細胞、受精卵を遺伝子的に変更すること、
を含む、方法。

【請求項 5 2】

請求項 3 9 に記載の方法であって、所望の器官若しくは組織が、通常分化する位置で、分化の後期段階で、胚に第 2 の哺乳類幹細胞を注入することを含む、方法。

【請求項 5 3】

請求項 5 2 に記載の方法であって、その位置で、第 1 の非ヒト-哺乳類のあるいは第 2 の哺乳類のNME7若しくはNME1のいずれかの発現を誘導することにより、哺乳類の幹細胞を展開することをさらに含む、方法。

【請求項 5 4】

請求項 5 3 に記載の方法であって、その位置で、第 1 の非ヒト-哺乳類のあるいは第 2 の哺乳類のNME1のいずれかの発現を誘導することにより、哺乳類の幹細胞を展開することを含む、方法。

【請求項 5 5】

請求項 5 3 に記載の方法であって、そこでは、第 2 の哺乳類プロモータが、内在性の第 1 の非ヒト-哺乳類タンパク質にリンクされ、所望の時間および位置で発現され、その後、所望の組織の分化を指図する作用薬を導入する、方法。

【請求項 5 6】

請求項 5 5 に記載の方法であって、そこでは内在性の第 1 の非ヒト-哺乳類タンパク質が、NME1若しくはNME7の発現を誘導するタンパク質である、方法。

【請求項 5 7】

請求項 5 6 に記載の方法であって、そこでは内在性の第1の非ヒト-哺乳類タンパク質は、NME1の発現を引き起こすタンパク質である、方法。

【請求項 5 8】

次のものを含む、いくつかの第 2 の哺乳類DNAあるいはいくつかの第 2 の哺乳類組織を発現するキメラ動物で、潜在的な薬剤の効能あるいは毒性をテストする方法：

(i) 第 1 の非ヒト-哺乳動物の生成であって、それは、第 1 の非ヒト-哺乳動物への第 2 の哺乳動物からの細胞を導入することを含む、第 1 の非ヒト-哺乳動物と同じ種あるいは属に属する若しくは属さない第 2 の哺乳類に特異的に由来する、DNA、分子、細胞、若しくは組織を含む；そして

10

20

30

40

50

(ii) 第2の哺乳動物に由来する組織若しくは器官に対する効果のために、第1の非ヒト-哺乳動物への試験薬を投与すること。

【請求項59】

請求項58に記載の方法であって、そこでは、NMEが、第1の非ヒト-哺乳動物で、発現され、それは第2の哺乳動物由来する細胞の増殖を増強する、方法。

【請求項60】

次のものを含む、いくつかの第2の哺乳動物DNAあるいはいくつかの第2の哺乳動物組織を発現するキメラ動物で潜在的な薬剤を見出す方法：

(i) 第1の非ヒト-哺乳動物の生成であって、それは、第1の非ヒト-哺乳動物への第2の哺乳動物からの細胞を導入することを含む、第1の非ヒト-哺乳動物と同じ種あるいは属に属する若しくは属さない第2の哺乳類に特異的に由来する、DNA、分子、細胞、若しくは組織を含む；そして

(ii) 第2の哺乳動物に由来する組織若しくは器官に対する効果のために、第1の非ヒト-哺乳動物へ化合物を投与することであって、ここで効果的な結果は潜在的な薬の存在を示す。

【請求項61】

請求項60に記載の方法であって、そこでは、NMEが、第1の非ヒト-哺乳動物で、発現され、それは第2の哺乳動物に由来する細胞の増殖を増強する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願発明は非ヒト動物でヒト組織を作る方法に関する。本願発明は、さらに非ヒト動物中に存在させたヒト組織に関連付けて、非ヒト動物上での薬のテストに関する。

【0002】

本願発明は、さらに非ヒト動物から得られたヒト組織または器官で患者を治療する方法に関する。本願発明は、さらにヒト細胞と組織の組込みを可能にするトランスジェニック動物を生成する方法に関する。

【背景技術】

【0003】

現在、分化途上の胚か胚盤胞に幹細胞を組み込むことにより、キメラ動物を作るエリアには相当な研究がある。最終目標は、雌牛、羊あるいはブタのような動物でヒトの臓器あるいは組織を生成することができることである。そこでは得られた臓器あるいは組織はヒトへの移植に使用されうる。

【0004】

ドナー幹細胞は、新しい肝臓、心臓などを必要とする患者由来でありえる。成功すれば、技術は臓器提供者の必要性を代替えするだろう。現在、適切な臓器提供者が識別される前に、ほとんどの患者は死ぬ。

【0005】

本技術は今、次のもののために存在する：

1) 心臓、脾臓、肺あるいは他の器官若しくは組織を分化しないノックアウト動物を作ること；

2) 別のものの桑実胚か胚盤胞にドナー幹細胞を注入することにより、キメラ動物を作ること；

3) キメラ動物を作ることであって、そこでは、受精若しくは未受精卵が、それらにもはや特別の器官か組織を形成するキャパシティーがないように、ノックアウトされた遺伝子を持ち、しかし、そこでは、ドナー幹細胞が特にその器官あるいは組織を形成するキャパシティーを持ち、その結果、キメラ動物は標的器官において、ドナー幹細胞の100%に至るDNAを持っている。

これらの技術は、ラット対マウスおよびマウス対ラットのような異種間での適応に有効であった。生成された器官のサイズは、移植される動物のサイズに依存する。しかしなが

10

20

30

40

50

ら、ラットとマウスは接近している種である。

【0006】

倫理の問題は、非ヒト霊長類-ヒトキメラの生成を妨害しうる。より離れた哺乳動物-ヒトのキメラはある倫理の問題を克服しうるが、非霊長類種-ヒトのキメラを生成する試みはここまで失敗した。

【0007】

1つの問題は、少なくともげっ歯動物の例において、ナイーブ状態の幹細胞だけが、桑実胚若しくは内部細胞塊へ導入することが可能で、キメラを形成できた。刺激を受けた（プライム）状態の幹細胞はそうすることができなかった。

【0008】

本発明は、非ヒト-ヒトのキメラ動物の生成のために、およびさらに非ヒト-環境下で多能性のヒト幹細胞の増殖に適している環境の提供のために、ナイーブ状態のヒト幹細胞を生成する方法の提供により、その問題を解決する。本発明は、それらが非ヒト宿主動物でヒト細胞の増殖および拡張を可能にするヒトファクターを発現するようにそれらを遺伝子組み換えすることにより、宿主動物を「ヒト化する」方法の提供により、その問題を解決する。

【発明の概要】

【0009】

I.

1つの態様では、本発明は、あるヒトのDNAあるいはあるヒト組織を発現するキメラ動物で、潜在的な薬剤の効能あるいは毒性のためにテストする方法を指向する。この方法では、あるヒトのDNAあるいは組織を発現する動物は、非ヒト-細胞若しくは複細胞へ、ヒトのナイーブ状態の幹細胞を導入することにより生成される。

1つの態様では、非ヒト細胞は、卵であり、別の態様では、受精卵であり、別の態様では、細胞は桑実胚、胚盤胞あるいは胚である。

倫理の関係あるいは他の理由で、導入するナイーブ状態の幹細胞は、非ヒトであるが、受容細胞、桑実胚、胚盤胞あるいは胚とは異なっている種である条件で、キメラ動物を生成することは有利でありうる。

上記の方法では、ナイーブ状態で幹細胞を維持するか、ナイーブ状態へ刺激を受けた（プライム）幹細胞を振り向ける作用薬は、NMEタンパク質、2i、5i又は、阻害剤、化学製品若しくは核酸の他のカクテルでありうる。

NMEタンパク質は、NME1二量体、NME7モノマー、NME7-AB、NME7-X1NME6二量体あるいはバクテリアNMEでありうる。

【0010】

非ヒト哺乳動物は、マウスかラットのようなげっ歯動物、マカク、アカゲザル、類人猿、チンパンジー、コビトチンパンジーおよびその他同種のものを含む霊長類、あるいはブタ、羊、牛、などを含む家畜でありうる。キメラ動物は、遺伝病があってもよく、誘導疾患があってもよく、ヒトに由来した細胞から自然に生成されうる若しくは注入されうる癌を持っていたてもよい。

【0011】

上記の方法では、非ヒト動物は遺伝子組み換え動物でありうる。そこでは該動物は、ヒトMUC1若しくはMUC1*若しくはNMEタンパク質を、生殖細胞か体細胞で発現する。そこでは、該生殖細胞と体細胞は、前記動物へ導入された、組み換えヒトMUC1若しくはMUC1*若しくはNME遺伝子配列を含む。ヒトMUC1若しくはMUC1*若しくはNMEタンパク質を発現する遺伝子は、誘導可能なプロモータにコントロールされうる。該プロモータは、分化の前に、後にあるいは中に、動物に投与することができる作用薬に、又は非ヒト動物で自然発生のタンパク質に誘導可能に反応しうる。

二者択一で、非ヒト動物は、遺伝子組み換えでありえ、該動物は生殖細胞または体細胞で、そのネイティブな配列のMUC1若しくはMUC1*若しくはNMEタンパク質を発現し、そこで生殖細胞と体細胞は、該哺乳動物に導入された組み換えネイティブ種MUC1若しくはMUC1*

10

20

30

40

50

若しくはNME遺伝子配列を含む。このNME種は、NME7、NME7-X1、NME1、NME6あるいはバクテリアNMEでありえる。

【0012】

上記の方法では、ナープ状態で幹細胞を維持するか、ナープ状態へ刺激を受けた（プライム）幹細胞を振り向ける作用薬は、NMEタンパク質、2i、5i、又は阻害剤、化学製品若しくは核酸の他のカクテルでありうる。NMEタンパク質は、NME1二量体、NME7モノマー、NME7-ABおよびNME7-X1、NME6二量体あるいはバクテリアNMEでありうる。

【0013】

この方法では、作用薬は、MBD3、CHD4、BRD4あるいはJMJD6の発現を抑えてもよい。作用薬はMBD3、CHD4、BRD4あるいはJMJD6に対して作られたsiRNAでありうる。あるいは、siRNAは、MBD3、CHD4、BRD4あるいはJMJD6の発現をアップレギュレートするタンパク質をコードするあらゆる遺伝子に対して作られてもよい。癌細胞または正常細胞との比較で、癌幹細胞は、CXCR4あるいはe-カドヘリン(CDH1)の増加した発現によって特徴づけられる。

【0014】

別の態様では、本発明は、次のものを含む非ヒト-哺乳動物で異種移植片から組織を生成する方法を指向する：

(i) 遺伝子組み換えの非ヒト-哺乳動物の生成であって、そこでは、哺乳動物は生殖細胞と体細胞で、ヒトMUC1若しくはMUC1*若しくはNMEタンパク質を発現し、該生殖細胞と体細胞は該哺乳動物に導入された組み換えヒトMUC1若しくはMUC1*若しくはNME遺伝子配列を含み、該遺伝子配列の発現は、誘導可能で抑制可能な調節配列によってコントロールされうる；

(ii) 該遺伝子が幹または始原細胞の数を増加させるように発現されるべく誘導されうるように、非ヒト-哺乳動物に、起源において異種である幹細胞あるいは始原細胞を、トランスファーし；そして、

(iii) 該異種移植された幹細胞から組織を生成するために該遺伝子の発現を抑制する。

【0015】

この方法では、ステップ(iii)で、遺伝子発現の抑制は、幹細胞が組織分化因子とのコンタクトにより実行されうる。あるいは、ステップ(iii)では、遺伝子発現の抑制は、自然に生産された宿主組織分化因子に反応して哺乳動物で自然に実行されうる。導入された細胞はヒト由来でありえ、組織は器官でありえる。NMEタンパク質は、NME7、NME7-AB、NME7-X1、NME1、NME6あるいはバクテリアNMEでありうる。動物は、ブタ、羊あるいは牛の種のような飼育された動物、哺乳動物、げっ歯動物、霊長類でありうる。

【0016】

II.

他の態様では、本発明は、少なくとも、いくつかのヒト細胞、若しくはDNAのうちのいくつかはヒト起源である細胞、をもつ動物を作ること指向する。そのような動物は、ヒト若しくはヒト様組織を作り出すために、ヒト組織、いくつかのヒト細胞を含む組織、若しくはいくつかのヒトDNAを含んでいる細胞、を育てる。

他の場合では、そのような動物は、少なくともいくつかのヒト細胞を含む器官を育てうる。他の場合では、そのような動物は、完全にヒト細胞で構成された器官を育てうる。また他の場合では、宿主動物は、ヒトの四肢を育てるために分化の後にさえ遺伝学的にあるいは分子学的に操作することができる。四肢、神経、血管、組織、器官あるいはそれらで作られた若しくはそれらから分泌された因子は、動物から回収され、次のものを含み、これらに限定されない多くの目的に使用されうる：

1) ヒトへの移植；

2) 老化防止を含む医薬の有益性のためのヒトへの投与；

そして

3) 薬物検査および疾病モデリングを含む科学実験。

【0017】

1つの態様では、本発明は、以下を含む、非ヒト動物でヒト組織を生成する方法を指向す

る：

- (i) ヒトのナイーブ状態の幹細胞を生成し、それらが、キメラ動物が生成されるように、非ヒト動物の胚、胚盤胞、桑実胚、受精卵に注入すること；
- (ii) キメラ動物からのヒト組織若しくは細胞によって分泌された、若しくは、において作られた、ヒト組織、器官、細胞若しくは因子の回収；そして
- (iii) ヒトへ、回収された産物を、移植する若しくは投与すること。

ナイーブ状態の幹細胞は、NME7、NME7-AB、NME7-X1あるいは二量体NME1を使用して生成されうる。ナイーブ幹細胞は、NME7、NME7-AB、NME7-X1あるいは二量体NME1を含んでいる培地中で再プログラム化されたiPS細胞でありうる。あるいは、ナイーブ幹細胞は、NME7、NME7-AB、NME7-X1あるいは二量体NME1を含んでいる培地中で培養された胚性幹細胞でありうる。胚盤胞若しくは胚の非ヒト-細胞は、遺伝子組み換えされたものでありうる。また、遺伝子変異は、ある組織若しくは器官を生成することができない宿主動物に帰着しうる。遺伝子変異は、非ヒト動物を、非ヒト-宿主動物で、ヒト幹若しくは始原細胞の組み込み若しくは増殖を促進する若しくは増強するヒト分子を発現させることでありうる。さらに、ナイーブ状態で幹細胞を維持する若しくはナイーブ状態への刺激を受けた（ブライム）幹細胞を振り向ける作用薬は、NMEタンパク質、2i、5i、化学物質あるいは核酸でありうる。NMEタンパク質は、NME1二量体、NME7モノマー、NME7-AB、NME6二量体あるいはバクテリアNME、あるいはNME7-X1でありうる。非ヒト動物は、げっ歯動物、マウス、ラット、ブタ、羊、非ヒト霊長類、マカク、チンパンジー、コビトチンパンジー、ゴリラあるいは任意の非ヒト哺乳動物でありうる。本発明の1つの態様では、非ヒト動物は、ヒトNMEタンパク質、特にヒトNME7-ABあるいはNME7-X1、への高い配列相同性、又はヒトMUC1*細胞外領域への高い配列相同性のために選ばれうる。ある場合には、NMEタンパク質は、単一の成長因子として、無血清培地中に存在しうる。

【0018】

キメラ動物を生成することができるかどうかの1つのテストは、別の種の内部細胞塊(ICM)へ、第1の種からの幹細胞が組み入れされうるかどうかである。

例えば、2つの異なる種が密接に関連づけられる2つのげっ歯動物である場合、キメラ動物はより容易に生成される。本発明者等は、マウス桑実胚にヒトのナイーブ状態の幹細胞を注入し、それらが内部細胞塊へ組み込まれたことを示した。特定の例において、ヒトNME7-ABで生成され、次に、ヒトで培養されたヒトのナイーブ状態の幹細胞は、卵子の受精の2.5日後にマウス桑実胚に注入された。これは内部細胞塊形態の前段階にある。48時間後に、桑実胚は分析され、そのような分析は、キメラ動物が分化するだろうということを示している、内部細胞塊へヒト幹細胞が組み込まれたことを示した。

【0019】

本発明は、以下に記述の詳細な説明、および図示の方法で与えられる添付図からより完全に理解され、それらは本発明を制限するものではない；

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1】図1は、体繊維芽細胞、「fbb」細胞、でのマスター多分化能調節遺伝子Oct4及びNanog発現のRT-PCR測定のプロットを示す。「fbb」細胞は、正常な繊維芽細胞増殖培地又はNME1二量体ともよぶヒト組み換えNM23、NME7-AB、あるいはHSP593バクテリアNME1二量体を加えた無血清最小培地において培養された。「+ ROCi」は、それらを表面に付着させるためにいくつかの細胞に加えられたロー(Rho)キナーゼ阻害剤を指す。

【0021】

【図2】図2は、体繊維芽細胞、「fbb」細胞、での、クロマチン組み換えファクターBRD4、JMJD6、MBD3およびCHD4をコードする遺伝子発現のRT-PCR測定のプロットを示す。「fbb」細胞は、正常な繊維芽細胞増殖培地又はNME1二量体ともよぶヒト組み換えNM23、NME7-AB、あるいはHSP593バクテリアNME1二量体を加えた無血清最小培地において培養された。「+ ROCi」は、それらを表面に付着させるためにいくつかの細胞に加えられたロー(Rho)キナーゼ阻害剤を指す。

【 0 0 2 2 】

【図 3】図3は、体繊維芽細胞、「fbb」細胞、での、多分化能遺伝子Oct4及びNANOG、クロマチン組み換えファクターBRD4、JMJD6、MBD3およびCHD4をコードする遺伝子発現のRT-PCR測定グラフを示す。「fbb」細胞は、正常な繊維芽細胞増殖培地又はNME1二量体ともよぶヒト組み換えNM23、NME7-AB、あるいはHSP593バクテリアNME1二量体を加えた無血清最小培地において培養された。「+ ROCi」は、それらを表面に付着させるためにいくつかの細胞に加えられたロー(Rho)キナーゼ阻害剤を指す。

【 0 0 2 3 】

【図 4】図4A-4Bは、多能性の形態を備えたヒト胚性幹細胞の写真を示し、そこでは、幹細胞は、加えられた唯一の成長因子として組み換えヒトNME1二量体を含む無血清最少培地で培養された。図4Aは、4X拡大で得られた写真を示し、図4Bは、20X拡大で得られた写真を示す。

10

【 0 0 2 4 】

【図 5】図5A-5Cは、多能性の形態を備えたヒト胚性幹細胞の写真を示し、そこでは、幹細胞は、加えられた唯一の成長因子として組み換えヒトNME7-ABを含む無血清最少培地で培養された。図5Aは、4X拡大で得られた写真を示し、図5Bは、10X拡大で得られた写真を示し、また、図5Cは、20X拡大で得られた写真を示す。

【 0 0 2 5 】

【図 6】図6A-6B は、NME7-ABが、MUC1*細胞外領域ペプチドを二量化させることを示すELISAサンドイッチ分析からのHRP信号のグラフを示す。図6Aは、MUC1*細胞外領域ペプチドP SMGFRで被覆された表面に結合したNME7-ABの量を示し、また、図6Bは結合したNME7-ABの第2のサイトに結合している、第2のMUC1*ペプチドを示す。

20

【 0 0 2 6 】

【図 7】図7は、後期ステージの刺激を受けた(ブライム)幹細胞と比較された初期ステージのナイーブヒト幹細胞においての、転写因子BRD4およびコファクターJMJD6の発現レベルのRT-PCR測定グラフを示す。

【 0 0 2 7 】

【図 8】図8は、4X拡大で、ダイマー形態にある、ヒトNME1を含む無血清培地での培養18日後のヒト線維芽細胞の写真を示す。

【 0 0 2 8 】

【図 9】図9は、20X拡大で、ダイマー形態にある、ヒトNME1を含む無血清培地での培養18日後のヒト線維芽細胞の写真を示す。

30

【 0 0 2 9 】

【図 10】図10は、4X拡大で、ヒトNME7-ABを含む無血清培地での培養18日後のヒト線維芽細胞の写真を示す。

【 0 0 3 0 】

【図 11】図11は、20X拡大で、ヒトNME7-ABを含む無血清培地での培養18日後のヒト線維芽細胞の写真を示す。

【 0 0 3 1 】

【図 12】図12は、4X拡大で、NMEタンパク質を含まない標準培地中での培養18日後のヒト線維芽細胞の写真を示す。

40

【 0 0 3 2 】

【図 13】図13は、20X拡大で、NMEタンパク質を含まない標準培地中での培養18日後のヒト線維芽細胞の写真を示す。

【 0 0 3 3 】

【図 14】図14A-14Cは、ヒト幹細胞がどのようにそれらの自己複製を制限するかの本発明者の発見のメカニズムモデルの漫画を示す。図14Aは、NME7-ABがナイーブ幹細胞から分泌され、NME7-ABがどのようにモノマーとしてのMUC1*成長因子レセプターを二量化させ、しかし、後に、コファクターJMJD6がNME1をアップレギュレートしている間に、BRD4によって抑えられるかを示す。図14Bは、NME1が後期ナイーブ状態の幹細胞によって分泌され

50

、しかし唯一二量体としてMUC1*に結合することを示す。また、図14Cは、幹細胞数の増加がNME1濃度の増加となり、MUC1*に結合しない6量体を形成させ、それらが分化を引き起こすことを示す。

【0034】

【図15】図15A-15Bは、本発明者が開発した、NME7-ABおよびNME7-X1を認識する抗体で染色されたヒトの胚盤胞の写真を示す。図15Aは、3日目の胚盤胞を示し、全ての細胞は、NME7-ABあるいはNME7-X1の存在で陽性に染色した。図15Bは、5日目の胚盤胞を示し、内部細胞塊のナープ細胞だけが、NME7-ABあるいはNME7-X1の存在で陽性に染色した。

【0035】

【図16】図16A-16Bは、共免疫沈降実験のウェスタンブロット・ゲルの写真を示す。ここでは、ヒトのナープ状態誘導多能性幹(iPS)細胞と胚性幹(ES)細胞が溶解され、MUC1(Ab5)の細胞質尾部に対する抗体は、MUC1に結合する共免疫沈殿種に使用された。その後、免疫沈殿はウェスタンブロットによって分析された。図16Aは、抗NME7抗体でプローブされた、ウェスタンブロットの写真および図を示し、MUC1へ結合した2つのNME7種、一は30 kDaおよび他は33 kDaの分子量をもつ、を示した。これに対し、天然のままの細胞溶解産物中の全長NME7は、42 kDaの分子量をもつ。図16Bは、図16Aのゲルは裸にされ、抗MUC1*細胞外領域抗体で再プローブされた、ウェスタンブロットの写真を示し、それはNME7-AB若しくはNME7-X1が、グリコシレーションに依存して、17-25 kDaの分子量で挙動し、MUC1*と呼ばれる、MUC1の開裂型に結合することを示す。

10

【0036】

【図17】図17は、MNC3抗MUC1*細胞外領域抗体、の付着表面のただ一つの成長因子としてNME7-ABを使用して、ナープ状態のヒト幹細胞を育てる本発明の方法の漫画を示す。分化を引き起こすことが望まれる時、合成MUC1*細胞外領域ペプチドが、全てのNME7-ABを結合しつくすために加えられた。

20

【0037】

【図18】図18A-18Cは、RNA SEQ実験からのヒートマップを示し、ここでは、FGF、したがって刺激を受けた(プライム)状態、に由来するヒト胚性幹(ES)細胞が、NME7-ABあるいはNME1二量体で培養することにより、より少ない成熟のナープ状態に振り向けられた。図18Aは、親のFGF培養ES細胞のヒートマップを示す。図18Bは、NME7-ABでの10回継代培養された親細胞のヒートマップを示す。また、図18Cは、NME1二量体での10回継代培養された親細胞のヒートマップを示す。

30

【0038】

【図19】図19A-19Bは、ヒストン3のトリメチル化リジン27に結合する抗体で染色されたヒト胚性幹(ES)細胞の写真を示し、ここでは、赤い巢点(red foci)が、当該細胞が刺激を受けた(プライム)状態で、初期の分化を始めた、そしていくつかの細胞の運命を決定をしたことのサインである、女性由来の幹細胞の第2のX染色体が不活性化された、XaXi、を示す。赤い染色の欠如若しくは赤気(red cloud)存在は、両X染色体はなお活性、XaXa、であり、したがって分化決定はなおなされていない、したがって、ナープであることをしめす。図19Aは、FGF培地中で少なくとも10回継代培養された女性由来幹細胞の写真を示し、また、図19Bは、NME7-AB培地中で10回継代培養された同じ細胞の写真を示す。

40

【0039】

【図20】図20A-20Bは、2つのポイントでの、MNC3抗MUC1*抗体表面での、NME7-AB培地中での培養におけるヒト多能性幹細胞の写真を示し、それは、刺激を受けた(プライム)状態の幹細胞よりはるかに速い成長速度である、及び、NME7-ABで培養された幹細胞が、ナープ状態にあるということを示す別の兆候である、4日間での10-20倍の拡張率をしめす。図20Aは、4日目での幹細胞を示す。また、図20Bは、4日目での幹細胞を示す。

【0040】

【図21】図21A-21Cは、センダイウイルス形質導入を使い提供された山中マスター再プログラム化因子、OCT4、NANOG、KLF4、およびc-Mycを使い、多能性幹細胞になるように再プログラム化されている繊維芽細胞の写真を示す。ここで、新しく再プログラム化され誘

50

導された多能性幹細胞がアルカリフォスファターゼで染色され視覚化されている。図21Aは、MEFフィーダー細胞上でのFGF培地中で行われる再プログラム化を示す。図21Bは、マトリゲル (Matrigel) 上でのmTeSR培地中で行われる再プログラム化を示す。図21Cは、MN C3抗MUC1*抗体表面上でのNME7-AB培地中で行われる再プログラム化を示す。

【 0 0 4 1 】

【図 2 2】図22A-22Dは、蛍光マーカー、黄色細胞を担持するヒトiPS細胞の写真を示し、それは、確保しそしてNME7-ABで培養され、2 . 5 日目にマウス胚盤胞に注入され、そして4 . 5 日目である48時間後にイメージ化され、そして、NME7-ABで培養されたヒトiPS細胞が、マウス胚の内部細胞塊へ統合する (組み込まれる) 能力を持っていることを示す。図22Aは、ナীব幹細胞を含んでいるマウス胚の内部細胞塊へのその道を見つけたクローンEヒトiPS細胞 (黄色) の蛍光顕微鏡写真を示す。図22Bは、同じ写真であるが、細胞全てを示すためにDAPI、青、の視覚化をすること 及び NME7-AB細胞は、胎盤へ分化するだろう、栄養外胚葉中の兆候プラス内部細胞塊へ、唯一、統合したということ示すことを可能にする開いた別の蛍光性チャンネルをもつ写真を示す。図22Cは、ナীব幹細胞を含んでいるマウス胚の内部細胞塊へのその道を見つけたクローンRヒトiPS細胞 (黄色) の蛍光顕微鏡写真を示す。また図22Dは同じ写真であるが、細胞全てを示すためにDAPI、青、の視覚化をすること 及び NME7-AB細胞は、胎盤へ分化するだろう、栄養外胚葉中の兆候プラス内部細胞塊へ、唯一、統合したということ示すことを可能にする開いた別の蛍光性チャンネルをもつ写真を示す。

10

【 0 0 4 2 】

【図 2 3】図23A-23Jは、2 . 5 日目のマウス桑実胚に注入された、NME7-AB生成ヒトiPS細胞、クローンE、の共焦点イメージを示す。ヒトTra 1-81 (赤) の染色は、48時間後、マウス桑実胚の内部細胞塊中へのNME7-ABヒト幹細胞の組込みを示す。図23A、23C、23E、23Gおよび23Iは、蛍光画像である。図23B、23D、23F、23Hおよび23Jは、明るいフィールド・イメージである。

20

【 0 0 4 3 】

【図 2 4】図24A-24Jは、2 . 5 日目のマウス桑実胚に注入された、NME7-AB生成ヒトiPS細胞、クローンR、の共焦点イメージを示す。ヒトTra 1-81 (赤) の染色は、48時間後、マウス桑実胚の内部細胞塊中へのNME7-ABヒト幹細胞の組込みを示す。図23A、23C、23E、23Gおよび23Iは、蛍光画像である。矢印は、キメラ動物の形成を示している、マウス桑実胚中への、ナীব状態のNME7-ABヒト幹細胞の組込みを指す。図24B、24D、24F、24Hおよび24Jは、明るいフィールド・イメージである。

30

【 0 0 4 4 】

【図 2 5】図25A-25Dは、2 . 5 日目のマウス桑実胚に注入された、FGF生成ヒトiPS細胞の共焦点イメージを示す。ヒトTra 1-81 (赤) の染色及び栄養外胚葉の染色は、48時間後、いくつかの散在したヒト幹細胞を示すが、マウス桑実胚の内部細胞塊中への刺激を受けた (プライム) 状態のヒト幹細胞の組込みはなく、キメラ動物形成の開始の失敗を示した。図25Aおよび25Cは蛍光画像である。また、図25Bおよび25Dは明るいフィールド・イメージである。

【 0 0 4 5 】

【図 2 6】図26A-26Dは、50%NME7-AB培地および50%KSOM、ポタジウムシンプレックス最適化培地において培養され、その後2 . 5 日目のマウス桑実胚に注入された、ヒトiPS細胞の共焦点イメージを示す。明るいフィールド・イメージと同様に蛍光が、48時間後に得られた。ヒトTra1-81 (赤) の染色及び栄養外胚葉 (緑) の染色は、48時間後、ヒト細胞の最小数、もしあれば、統合、また刺激を受けた (プライム) 状態のマウス桑実胚の内部細胞塊中への組込みの欠如を示し、キメラ動物形成の開始の失敗を示した。図26A、26C、26Eおよび26Gは蛍光画像である。また、図26B、26D、26Fおよび26Hは、DAP染色を含んでいる。

40

【 0 0 4 6 】

【図 2 7】図27A-27Fは、蛍光ラベル、tdtomato、でトランスフェクトされ、その結果、それらは自身で蛍光赤を発する、NME7-AB生成ヒトiPS細胞、クローンE、の共焦点蛍光イ

50

メージを示す。それらは、2.5日目マウス桑実胚に注入された。イメージは48時間後に得られ、マウス桑実胚の内部細胞塊へのNME7-ABヒト細胞の統合を示す。図27A、27B、27Cは、赤で、NME7-ABヒト細胞を、緑でマウス細胞の栄養外胚葉を示す。図27D、27E、27Fは、赤で、NME7-ABヒト細胞を、緑で、マウス細胞の栄養外胚葉を、そして、DAPI染色からの青ですべての細胞核を示す。

【0047】

【図28】図28A-28Jは、蛍光ラベル、tdtomato、でトランスフェクトされ、その結果、それらは自身で蛍光赤を発する、NME7-AB生成ヒトiPS細胞、クローンE、の共焦点蛍光イメージを示す。それらは、2.5日目マウス桑実胚に注入された。イメージは48時間後に得られ、写真は、マウス桑実胚の内部細胞塊へのNME7-ABヒト細胞の統合（組み込み）を示す。図28A、28C、28E、28G及び28Iは、赤で、NME7-ABヒト細胞を、緑でマウス細胞の栄養外胚葉を示す。28B、28D、28F、及び28Hは、赤で、NME7-ABヒト細胞を、緑で、マウス細胞の栄養外胚葉を、そして、DAPI染色からの青ですべての細胞核を示す

10

【0048】

【図29】図29A-29Jは、蛍光ラベル、tdtomato、でトランスフェクトされ、その結果、それらは自身で蛍光赤を発する、NME7-AB生成ヒトiPS細胞、クローンR、の共焦点蛍光イメージを示す。それらは、2.5日目マウス桑実胚に注入された。イメージは48時間後に得られ、写真は、マウス桑実胚の内部細胞塊へのNME7-ABヒト細胞の統合（組み込み）を示す。矢印は、ヒト細胞のマウス内部細胞塊への統合（組み込み）を示す。図29A、29C、29E、29G、29Iは、赤でNME7-ABヒト細胞を、緑でマウス細胞の栄養外胚葉を示し、図29B、29D、29F及び29Hは、赤でNME7-ABヒト細胞を、緑でマウス細胞の栄養外胚葉を、DAPI染色からの青ですべての細胞核を示す。

20

【0049】

【図30】図30A-30Jは、蛍光ラベル、tdtomato、でトランスフェクトされ、その結果、それらは自身で蛍光赤を発する、NME7-AB生成ヒトiPS細胞、クローンR、の共焦点蛍光イメージを示す。それらは、2.5日目マウス桑実胚に注入された。イメージは48時間後に得られ、写真は、マウス桑実胚の内部細胞塊へのNME7-ABヒト細胞の統合（組み込み）を示す。矢印は、ヒト細胞のマウス内部細胞塊への統合（組み込み）を示す。図30A、30C、30E、30G、及び30Iは、赤でNME7-ABヒト細胞を、緑でマウス細胞の栄養外胚葉を示し、図30B、30D、30F、及び30Hは、赤でNME7-ABヒト細胞を、緑でマウス細胞の栄養外胚葉を、DAPI染色からの青ですべての細胞核を示す。

30

【0050】

【図31】図31A-31Fは、非ヒト霊長類誘導多能性幹細胞の生成を実証する実験用のコントロールプレートの写真を示す。これらのコントロール実験では、カニクイザルからの繊維芽細胞が、培養されたが、コアの多分化能遺伝子は形質導入されなかった。イメージは、幹細胞ではない繊維芽細胞の形態を示す。図31Aおよび31Dは、4X拡大写真である。図31Bおよび31Eは、10X拡大写真である。また、図31Cおよび31Fは、20X拡大写真である。

【0051】

【図32】図32A32-Cは、NME7、ここではNME7-AB、培地中で、抗MUC1*抗体の表面上に、培養することにより、そして、コアの多分化能遺伝子、ここではOct4、Sox2、Klf4 及びc-Myc、で細胞を形質導入することによって、誘導多能性幹(iPS)細胞へ再プログラム化されたカニクイザルからの繊維芽細胞の6日目の写真を示す。カニクイザルからの50,000の繊維芽細胞が、6つのウェルプレートのウェルごとに植えつけられた。幹様形態を備えて出現したコロニーをサークルした。図32Aは、4X拡大写真である。図32Bは10X拡大写真である。また、図32Cは20X拡大写真である。

40

【0052】

【図33】図33A-33Fは、NME7、ここではNME7-AB、培地中で、抗MUC1*抗体の表面上に、培養することにより、そして、コアの多分化能遺伝子、ここではOct4、Sox2、Klf4 及びc-Myc、で細胞を形質導入することによって、誘導多能性幹(iPS)細胞へ再プログラム化されたカニクイザルからの繊維芽細胞の6日目の写真を示す。カニクイザルからの100,000の

50

繊維芽細胞が、6つのウェルプレートのウェルごとに植えつけられた。幹様形態を備えて出現したコロニーをサークルした。図33Aおよび33Dは4X拡大写真である。図33Bおよび33Eは10X拡大写真である。また、図33Cおよび33Fは20X拡大写真である。

【 0 0 5 3 】

【 図 3 4 】 図34A-34Fは、NME7、ここではNME7-AB、培地中で、抗MUC1*抗体、ここではMN-C3の表面上に、培養することにより、そして、コアの多分化能遺伝子、ここではOct4、Sox2、Klf4 及びc-Myc、で細胞を形質導入することによって、誘導多能性幹(iPS)細胞へ再プログラム化されたカニクイザルからの繊維芽細胞の6日目の写真を示す。幹細胞コロニーは、はっきり目に見えた。図34A、34Bおよび34Cは、10X拡大写真、図34D、34Eおよび34Fは20X拡大写真である。図34Aと34Dは、植えつけられている24,000のマカク繊維芽細胞からの結果を示し、図34Bおよび34Eは、植えつけられている、6,000のマカク繊維芽細胞からの結果を示し、図34Cおよび34Fは、植えつけられている、12,000のマカク繊維芽細胞からの結果である。

10

【 0 0 5 4 】

【 図 3 5 】 図35A-35Dは、抗MUC1*抗体表面上でNME7-AB培地中においての第2継代の一日目における、ただ一つの成長因子としてNME7-ABを含む無血清培地において増殖されているアカゲザルの胚幹(ES)細胞の写真を示す。胚性幹細胞コロニーは、はっきり目に見えた。図35Aおよび35Bは、4X拡大写真である。また、図35Cおよび35Dは、10X拡大写真である。

【 0 0 5 5 】

【 図 3 6 】 図36A-36Dは、抗MUC1*抗体表面上でNME7-AB培地中においての第2継代の3日目における、ただ一つの成長因子としてNME7-ABを含む無血清培地において増殖されているアカゲザルの胚幹(ES)細胞の写真を示す。胚性幹細胞コロニーは、はっきり目に見えた。図36Aおよび36Bは4X拡大写真である。また、図36Cおよび36Dは、10X拡大写真である。

20

【 0 0 5 6 】

【 図 3 7 】 図37A-37Bは、第3継代の1日目における、ただ一つの成長因子としてNME7-ABを含む無血清培地において増殖されているアカゲザルの胚幹(ES)細胞の写真を示す。図37Aは、1000 μm でのスケールバーを示す。また、図37Bは、400 μm でのスケールバーを示す。

【 0 0 5 7 】

【 図 3 8 】 図38A-38Hは、第3継代の4日目における、ただ一つの成長因子としてNME7-ABを含む無血清培地において増殖されているの胚幹(ES)細胞の写真を示す。図38A、38C、38Fは、4X写真である。図38B、38D、38Gは、10X写真である。図38Eおよび38Hは、20X写真である。

30

【 0 0 5 8 】

【 図 3 9 】 図39A-39Cは、NME7、ここではNME7-AB、培地中で、抗MUC1*抗体、ここではMN-C3、の表面上に、培養することにより、そして、コアの多分化能遺伝子、ここではOct4、Sox2、Klf4 及びc-Myc、で細胞を形質導入することによって、誘導多能性幹(iPS)細胞へ再プログラム化されたアカゲザルからの繊維芽細胞の14日目の写真を示す。図39Aは、4X写真である。図39Bは、10X写真である。また、図39Cは、20X写真である。

【 0 0 5 9 】

【 図 4 0 】 図40A-40Cは、NME7、ここではNME7-AB、培地中で、抗MUC1*抗体、ここではMN-C3、の表面上に、培養することにより、そして、コアの多分化能遺伝子、ここではOct4、Sox2、Klf4 及びc-Myc、で細胞を形質導入することによって、誘導多能性幹(iPS)細胞へ再プログラム化されたアカゲザルからの繊維芽細胞の連続継代の写真を示す。図40Aは、4X写真である。図40Bは、10X写真である。また、図40Cは、20X写真である。

40

【 0 0 6 0 】

【 図 4 1 】 図41A-41Dは、マカク繊維芽細胞は、一つのケースでは、MNC3抗MUC1*抗体表面上に、他方では、マウス胚フィーダー細胞、MEFs、上に植えつけられるということを除き、同一条件により、コアの多分化能遺伝子、ここではOct4、Sox2、Klf4 及びc-Myc、で細胞を形質変換する、NME7-AB培地中でのマカクiPS細胞の16日目派生の写真を示す。マウ

50

スフィーダー細胞がない状態で、植えつけられた時、非ヒト霊長類のiPS派生が、より効率的であることは明白に言える。図41Aおよび41Bは、MNC3抗体表面上に植えつけられ、また、図41Cおよび41Dは、マウスフィーダー細胞上に植えつけられた。

【0061】

【図42】図42A-42Bは、NME7、ここではNME7-AB、培地中で、MEFsの表面上に、培養することにより、そして、コアの多分化能遺伝子、ここではOct4、Sox2、Klf4 及びc-Myc、で細胞を形質導入することによって、誘導多能性幹(iPS)細胞へ再プログラム化されたアカゲザルからの繊維芽細胞の14日目の写真を示す。図42Aは、10X拡大写真である。また、図42Bは、20X拡大写真である。

【0062】

【図43】図43A-43Eは、抗MUC1*抗体、この場合MN-C3、の表面上にアカゲザルからのNME7-AB誘導多能性幹細胞の、継代1、3日目の写真を示す。図43Aは、4X拡大写真である。図43Bは、10X拡大写真である。図43Cは、20X拡大写真である。また、図43Dおよび43Eは、40X拡大写真である。

【0063】

【図44】図44A-44Fは、抗MUC1*抗体、この場合MN-C3、の表面に関するアカゲザルからのNME7-AB誘導多能性幹細胞の、継代2、1日目の、連続継代の写真をこの場合示す。はっきり目に見えるように、幹細胞コロニーは、存在する。図44Aおよび44Dは、10X拡大写真である。図44Bおよび44Eは、20X拡大写真である。また、図44Cおよび44Fは、40X拡大写真である。

【0064】

【図45】図45A-45Hは、マウスフィーダー細胞、MEF、の表面での、アカゲザル繊維芽細胞に由来したNME7-AB誘導多能性幹細胞の、継代2、2日目、連続継代の写真を示す。図45Aおよび45Eは、4X拡大写真である。図45Bおよび45Fは、10X拡大写真である。図45Cおよび45Gは、20X拡大写真である。また、図45Dおよび45Hは、40X拡大写真である。

【0065】

【図46】図46A-46Hは、継代2、3日目の、マウスフィーダー細胞(MEF)上のアカゲザルからのNME7-AB誘導多能性幹細胞を連続継代の写真を示す。図46Aおよび46Eは、4X拡大写真である。図46Bおよび46Fは、10X拡大写真である。図46Cおよび46Gは、20X拡大写真である。また、図46Dおよび46Hは、40X拡大写真である。

【0066】

【図47】図47A-47Gは、継代3、1日目及び2日目の、マウスフィーダー細胞、MEF、上のアカゲザルからのNME7-AB誘導多能性幹細胞を連続継代の写真を示す。図47A、47B、47Cおよび47Dは、継代3の1日目の写真であり、図47E、47F、47Gは、継代3、1日目の写真であり、図47Aおよび47Eは、4X拡大、図47Bおよび47Fは、10X拡大写真であり、図47Cおよび47Gは、20X拡大写真であり、図47Dは、40X拡大写真である。

【0067】

【図48】図48A-48Dは、継代4、3日目の、アカゲザル・マウスフィーダー細胞、MEF、からのNME7-AB誘導多能性幹細胞を連続継代の写真を示す。図48Aは、4X拡大写真である。図48Bおよび48Cは、10X拡大写真である。また、図48Dは、20X拡大写真である。

【発明を実施するための形態】

【0068】

定義

【0069】

ここに使用される、「MUC1*」細胞外領域は、主として、PSMGFR配列；

GTINVHVDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPFSAQSGA(配列番号：6)

よって定義される。MUC1開裂の正確なサイトは、それを開裂する酵素に依存し、開裂酵素は細胞型、組織タイプあるいは細胞の進化での経過時間に依存して変化するので、MUC1*細胞外領域の正確な配列は、N末端で変わりうる。

【0070】

10

20

30

40

50

ここに使用される、用語「PSMGFR」は、

GTINVDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA(配列番号: 6)

として記述されるMUCI成長因子レセプターの一次配列の頭字語である。この点で、「N-10 PSMGFR」、「N-15 PSMGFR」あるいは「N-20 PSMGFR」での「N-数」は、PSMGFRのN末端で欠失されたアミノ酸残基の数を指す。同様に「C-10 PSMGFR」、「C-15 PSMGFR」あるいは「C-20 PSMGFR」での「C-数」は、PSMGFRのC末端で欠失されたアミノ酸残基の数を指す。

【0071】

ここに使用される、「MUCI*の細胞外領域」は、タンデムリピート(縦列反復)領域が欠けているMUCIタンパク質の細胞外の部分を指す。ほとんどの場合、MUCI*は、縦列反復、膜貫通領域および細胞質後尾を欠く短い細胞外領域からなる開裂産物である。恐らく1つを超える酵素によってそれを開裂することができるので、MUCI開裂の正確な位置は知られていない。MUCI*の細胞外領域は、PSMGFR配列の殆どを含んでいるが、さらに付加10-20のN-末端アミノ酸がありうる。

10

【0072】

ここに使用される、「NMEファミリータンパク質」あるいは「NMEファミリーメンバータンパク質」、符号1~10は、それらは、すべて、少なくとも1つのNDPK(ヌクレオチド二リン酸キナーゼ)領域があるので、共に、グループ化されたタンパク質である。ある場合には、NDPK領域は、ADPへのATPの変換を触媒することができるということについて機能的でない。NMEタンパク質は、H1、H2などと番号付けられた、NM23タンパク質として公式に知られていた。ここに、NM23とNMEという用語は互換可能である。ここに、用語NME1、NME2、NME6およびNME7は、NME変種と同様に、自然の蛋白質も参照するために使用される。ある場合には、自然の配列のタンパク質と比較して、これらの変種が、より可溶か、あるいは大腸菌において一層よく発現するか、より可溶である。例えば、本明細書において使用されるNME7は、天然タンパク質、又はその変異が、大腸菌で、可溶性の適切に折り重ねられたタンパク質の高収率発現を可能にするので、よりすぐれた商業的適合性をもつNME7-ABのような、変種を意味する場合がある。ここに参照される「NME1」は、「NM23-H1」と互換可能である。本発明は、NMEタンパク質の正確な配列によって制限されていないことはさらに意図される。NM23-S120Gとも呼ばれる、突然変異体NME1-S120Gは、本願の記述の全体において、互換的に使用される。S120G突然変異体およびP96S突然変異体は、二量体形成に対するそれらの指向性ゆえに好適だが、ここに、NM23二量体あるいはNME1二量体とも参照されうる。

20

30

【0073】

様々な人為的に作成されたNME1二量体は、2012年5月8日に出願された、PCT/US2012/036975(タイトル「遺伝子操作された成長因子変種」)に開示され、そこに示される二量体の成長因子については、参照によって本願の内容に組込まれる。

【0074】

ここに引用されるNME7は、約42kDaの分子量もつ天然NME7、25と33kDaの間の分子量をもつ開裂型、DM10リーダー配列を欠く変種、NME7-ABあるいは組み換えNME7タンパク質、又はその配列が効率的な発現若しくはその増加した生産率、可溶性若しくはNME7をより有効あるいは商業的により価値をもたらす他の特徴を可能にする変異をもつこれらの変種を意味することを意図する。

40

【0075】

ここに使用される、「NM23-H1二量体」として知られている「NME1二量体」は、お互い非共有結合である2つのNME1タンパク質、互いに共有結合でリンクされた2つのNME1タンパク質、あるいはリンカーによる場合を含めて、遺伝的にともに融合される2つのNME1タンパク質でありえる。NME1二量体は、2つのNME1タンパク質を含むDNA構築物を作ることにより遺伝子的に操作することができ、それはフレキシブルなリンカーによって分離することができる。2つのNMEタンパク質は、全長タンパク質あるいは天然配列である必要はない。例えば、二量体形成および安定性を促進するC末端欠失は、使用されうる。二量体形成およ

50

び安定性を促進する、S120G及び/又はP96Sのような突然変異が使用されてもよい。NME2若しくはNME6二量体のような、他のNMEファミリーメンバー二量体は、同様に、お互い非共有結合である2つのNME1タンパク質、互いに共有結合でリンクされた2つのNME1タンパク質、あるいはリンカーによる場合を含めて、遺伝的にともに融合される2つのNME1タンパク質でありえる。

【0076】

ここに使用される、「ナイーブ状態に幹細胞を維持するか、ナイーブ状態へ刺激を受けた(プライム)幹細胞を振り向ける作用薬」は、胚の内部細胞塊の細胞に似る、ナイーブ状態に、単独で若しくは組み合わせで、幹細胞を維持する、タンパク質、小分子あるいは核酸を意図する。例示は限定されないが、NME1二量体、ヒト若しくはバクテリアNME7、NME7-AB、2i、5i、CHD4、BRD4若しくはJMJD6MBD3の発現を抑えるsiRNAのような核酸を含む。

【0077】

ここに使用される、「小分子」と呼ばれる作用薬に関して、それは、50Daと2000Daの間、より好適には、150daと1000daの間で、さらにより好適には、200Daと750Daの間の、分子量をもつ合成化学物質若しくは化学理論に基づいた分子でありうる。

【0078】

ここに使用される、「天然物」と呼ばれている作用薬に関して、その分子が自然界において存在する限り、化学分子あるいは生体分子でありうる。

【0079】

ここに使用される、「2i阻害剤」は、MAPキナーゼシグナル経路の、GSK3ベータ及びMEKの小分子阻害剤を指す。名称2iは、研究論文(Silva Jら、2008)で作り出されたが、ここでは、GSK3ベータあるいはMEKのいずれかの任意の阻害剤を指し、それらがこれらの標的を阻害するなら、多分化能または腫瘍形成に同じ効果がある、多くの小分子あるいは生物学的因子でありうる。

【0080】

ここに使用される、FGF、FGF-2あるいはbFGFは、繊維芽細胞成長因子を指す。

【0081】

ここに使用される、「ロー(Rho)関連キナーゼ阻害剤」は、小分子、ペプチドあるいはタンパク質でありうる(Rath Nら、2012)。ロー(Rho)キナーゼ阻害剤は、ここで及び他のところで、ROCKi若しくはROCKi若しくはRiと短縮化される。特定のロー(Rho)キナーゼ阻害剤の使用は、典型的であるというつもりであり、他のロー(Rho)キナーゼ阻害剤の代替でありうる。

【0082】

ここに使用される、用語「幹様」は、細胞が幹細胞または始原細胞の特性を得る状態を参照し、幹細胞始原細胞の遺伝子発現プロファイルの重要な要素を共有する。幹様細胞は、多分化能遺伝子の発現の増加のような、より少ない成熟した状態への誘導を受けている体細胞でありうる。幹様細胞、また、脱分化を受けたか、それらのターミナルの分化を変更することができるメタ安定状態にある細胞を意図する。

【0083】

配列表フリーテキスト

【0084】

A、g、c、t以外のヌクレオチド・シンボルの使用については、それらは、WIPO標準ST.25、付録2、テーブル1で特定される規定により、そこでは、kはt若しくはgを表わし；nはa、c、t若しくはgを表わし；mはa若しくはcを表し；rはa若しくはgを表し；sはc若しくはgを表わし；wはa若しくはtを表し、そして、yはc若しくはtを表わす。

【0085】

MTPGTQSPFFLLLLLTVLTV VTGSGHASST PGGEKETSAT QRSSVPSSTE KNAVSMTSSV LSSHSPGSGSSTTQG QDVT LAPATEPASGS AATWGQDVTS VPVTRPALGS TTPPAHDVTS APDNKPAPGS TAPPAHGVTSAPDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTSAPDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGSTAPPAHGVTS

SAPDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPP
 AHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPG
 S TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTS APD
 TRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGS TAPPAHGV
 TS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTS APDTRPAPGS TA
 PPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPA
 PGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAHGVTS A
 PDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPAPGS TAPPAHGVTS APDTRPAPGS TAPPAH
 GVTs APDTRPAPGS TAPPAHGVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTS APDNRPALGS TAPPVHNVTS ASGSASGSAS
 TLVHNGTSAR ATTPASKSTPFSIPSHHSDTPTTLASHST KTDASSTHHS SVPPLTSSNH STSPQLSTGV SFFFL
 SFHIS NLQFNSSLEDPSTDYQELQRDISSEMFLQI YKQGGFLGLS NIKFRPGSVV VQLTLAFREG TINVHDVETQ
 FNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPPFSA QSGAGVPGWG IALLVLVCVL VALAIVYLIA LAVCQCRRKN YGQL
 DIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVP PSSTDRSPYE KVSAGNGGSS LSYTNPAVAA ASANL (配列番号:1)
 全長ヒトMUC1レセプター(ムチン1前駆物質、Genbankアセション番号: P15941)。

10

【0086】

MTPGTQSPFFLLLLLLTVLT(配列番号: 2)

【0087】

MTPGTQSPFFLLLLLLTVLT VVTA(配列番号: 3)

【0088】

MTPGTQSPFFLLLLLLTVLT VVTG(配列番号: 4)

20

【0089】

配列番号 (SEQ ID NOS) :2、3および4は、細胞膜表面に、MUC1レセプター及び短縮アイソ
 フォームを指向するN末端MUC-1シグナリング配列を記述する。3つまでのアミノ酸残基が
 、SEQ ID NOS2、3および4において変種によって示されるようなC末端で欠失しうる。

【0090】

GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPPFSAQSGAGVPGWG IALLVLVCVLVALAIVYLI ALAVCQCRRK
 NYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAAASANL(配列番号: 5)

ヒト全長MUC1レセプターの膜貫通及び細胞質配列を含み、そのN末端でnat-PSMGFRをもつ
 、短縮MUC1レセプターアイソフォームである。

【0091】

30

GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPPFSAQSGA(配列番号: 6)

ヒトMUC1成長因子レセプター(nat-PSMGFR : 「PSMGFR」の例)の、天然一次配列の細胞外
 領域である。

【0092】

TINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPPFSAQSGA(配列番号: 7)

配列番号6のN末端で単一のアミノ酸欠失をしている、ヒトMUC1成長因子レセプター(nat-P
 SMGFR : 「PSMGFR」の例)の、天然一次配列の細胞外領域である:

【0093】

GTINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPPFSAQSGA(配列番号: 8)

増強された安定性をもつMUC1成長因子レセプターの天然一次配列の「SPY」の機能的変種
 の細胞外領域(var-PSMGFR : 「PSMGFR」の例)である。

40

【0094】

TINVHDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPPFSAQSGA(配列番号: 9)

配列番号8のC末端で単一のアミノ酸欠失をしている、増強された安定性を持っているMUC
 1成長因子レセプターの天然一次配列の「SPY」の機能的変種の細胞外領域(var-PSMGFR :
 「PSMGFR」の例)である。

【0095】

tgfcagtgccgccgaagaactacgggcagctggacatctttccagcccgggatacctaccatcctatgagcgagtagcc
 cacctaccacacccatgggcgctatgtgccccctagcagtagccgatcgtagccccctatgagaagggttctgcaggtaacg
 gtggcagcagcctctcttacacaaaccagcagtgccagccgcttctgccaaacttg(配列番号: 10)

50

ヒトMUC1細胞質領域のヌクレオチド配列である。

【0096】

CQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSSTRSPYEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAAAASANL(配列番号: 11)

ヒトMUC1の細胞質領域のアミノ酸配列である。

【0097】

gagatcctgagacaatgaatcatagtgaaagattcgttttcattgcagagtggtatgatccaaatgcttcacttcttcga
cgttatgagctttttatcttaccaggggatggatctgttgaaatgcatgatgtaaagaatcatcgcacctttttaagcg
gaccaaataatgataaacctgcacttggagatttatctataggcaacaaagtgaatgtctttctcgacaactggatttaa
ttgactatggggatcaatatacagctcgccagctgggcagtaggaaagaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgca
atatcaaaggctggagaaaataattgaaataataacaaagctggatttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttc
aaggaaagaagcattggattttcatgtagatcaccagtcaagacccttttcaatgagctgatccagttattacaactg
gtcctattattgcatggagattttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaacctctgga
gtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttggaacagatggcataagaaatgcagcgcatggccctga
ttcttttgccttctgcggccagagaaatggagttgtttttccttcaagtggaggtgtgggcccggcaaacactgctaaat
ttactaattgtacctgttgcatgtttaaaccccatgctgtcagtgaggatgttgaaatgactatattcagttacatttt
gttaataggagagcaatgtttattttcttgatgtactttatgtatagaaaataa(配列番号: 12)

10

ヒトNME7ヌクレオチド配列(NME7: GENBANKACCESSION AB209049)である。

【0098】

DPETMNHSERFVFI AEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSGVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFI GNKVNVSFRQLVLI
DYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEII EII NKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFI TTG
PIIAMEILRDDAICEWKRLGPANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKF
TNCTCCIVKPHAVSEGMLNTLYSVHFVNRRAMFIFLMYFMYRK(配列番号: 13)

20

ヒトNME7アミノ酸配列(NME7: GENBANKACCESSION AB209049)。

【0099】

aatggtgctactgtctacttttagggatcgcttttcaaggcgaggggcctcctatctcaagctgtgatacaggaacatgg
ccaactgtgagcgtaccttcatctgcgatcaaaccagatgggggtccagcgggggtctgtgggagagattatcaagcggtttt
gagcagaaaggattccgccttgttggctctgaaattcatgcaagcttccgaagatcttctcaaggaacactacgttgacct
gaaggaccgtccattctttgccggcctggtgaaatacatgcactcagggccggtagttgccatggtctgggaggggctga
atgtggtgaagacgggcccagtgatgctcggggagaccaaccctgcagactccaagcctgggacctccgtggagacttc
tgatacaagttggcaggaacattatacatggcagtgattctgtggagagtgcagagaaggagatcggttgtggtttca
ccctgaggaactggtagattacacgagctgtgctcagaactggatctatgaatga(配列番号: 14)

30

NMEIヌクレオチド配列として知られているヒトNM23-H1(NM23-H1: GENBANKACCESSION AF487339)。

【0100】

MVLLSTLGI VFGGEGPPI SSCDTGTMANCERTFIIA IKPDGVQRGLVGEI IKRFEQKGFRLVGLKFMQASEDLLKEHYVDL
KDRPFFAGLVKYMHS GPVVAMVWEGLNVVKTGRV MLGETNPADSKPGTIRGDFCI QVGRNI IHGSDSVESAEKEI GLWFH
PEELVDYTSCAQNWIIYE(配列番号: 15)

NM23-H1のアミノ酸配列(NMEIとしても知られるNM23-H1: GENBANK ACCESSIONAF487339)。

【0101】

atggtgctactgtctacttttagggatcgcttttcaaggcgaggggcctcctatctcaagctgtgatacaggaacatggc
caactgtgagcgtaccttcatctgcgatcaaaccagatgggggtccagcgggggtctgtgggagagattatcaagcggttttg
agcagaaaggattccgccttgttggctctgaaattcatgcaagcttccgaagatcttctcaaggaacactacgttgacctg
aaggaccgtccattctttgccggcctggtgaaatacatgcactcagggccggtagttgccatggtctgggaggggctgaa
tgtggtgaagacgggcccagtgatgctcggggagaccaaccctgcagactccaagcctgggacctccgtggagacttct
gcatacaagttggcaggaacattatacatggcgggtgattctgtggagagtgcagagaaggagatcggttgtggtttcac
cctgaggaactggtagattacacgagctgtgctcagaactggatctatgaatga(配列番号: 16)

40

ヒトNM23-H1 S120G突然変異体ヌクレオチド配列(NM23-H1: GENBANK ACCESSION AF487339)

。

【0102】

50

MVLLSTLGI VFQGE GPP I SSCDTGTMANCERTF I A I KPDGVQRGLVGE I I KRFEQKGFRLVGLKFMQASEDLLKEHYVDL
KDRPFFAGLVKYMHS GPV VAMVWEG LNVVKTGRV MLGETNPADSKPGT I RGD FC I QVGRN I I HGGDSVESAEKE I GLW FH
PEELVDYTSCAQNW IYE (配列番号: 17)

NM23-H1 S120G突然変異体アミノ酸配列 (NM23-H1: GENBANK ACCESSIONAF487339)。

【 0 1 0 3 】

atggccaacctggagcgcacaccttcacgcacatcaagccggacggcgtgcagcgcggcctgggtgggcgagatcatcaagcg
cttcgagcagaagggattccgcctcgtggccatgaagttcctccgggcctctgaagaacacctgaagcagcactacattg
acctgaaagaccgacattcttccctgggctggtagaattacatgaactcagggccggttgtggccatggctcgggagggg
ctgaacgtggtgaagacaggccgagtgatgcttggggagaccaatccagcagattcaaagccaggcaccattcgtgggga
cttctgcattcaggttggcaggaacatcatctcatggcagtgattcagtaaaaagtgtgaaaaagaaatcagcctatgggt
ttaagcctgaagaactgggtgactacaagttctgtgctcatgactgggtctatgaataa (配列番号: 18)

10

ヒトNM23-H2ヌクレオチド配列 (NM23-H2: GENBANK ACCESSION AK313448)。

【 0 1 0 4 】

MANLERTF I A I KPDGVQRGLVGE I I KRFEQKGFRLVAMKFLRASEEHLKQHY I DLKDRPFFPGLVKYMNSGPV VAMVWEG
LNVVKTGRV MLGETNPADSKPGT I RGD FC I QVGRN I I HGSDSVKSAEKE I SLWFKPEELVDYKSCAHDWVYE (配列番
号: 19)

NM23-H2アミノ酸配列 (NM23-H2: GENBANK ACCESSION AK313448)。

【 0 1 0 5 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNM23-H7-2アイソフォームb配列:

【 0 1 0 6 】

20

(DNA)

【 0 1 0 7 】

atgcatgacgttaaaaaatcacccgtacctttctgaaacgcacgaaatatgataatctgcatctggaagacctgtttattgg
caacaaagtcaatgtgttctctcgtcagctgggtgctgatcgattatggcgaccagtacaccgcgcgtcaactgggtagtc
gcaaaagaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaaagcg
ggtttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaagaagccctggattttcatgtcgaccaccagttctcg
cccgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgatattcgcaatggaaattctgctgtagacgctatct
gcgaatggaaacgctgctgggcccggcaaacctcaggtgttgcgcgtaccgatgccagtgaaatccattcgcgctctgttt
ggcaccgatgggtatccgtaatgcagcacatgggtccggactcatctgcacgagctcgtgaaatggaactgtttttccc
gagctctggcgggttgcgggtccggcaaacaccgccaattttaccaattgtacgtgctgtattgtcaaacgcacgcagttg
cagaaggcctgctgggtaaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttgaaatctcgcccatgcagatgttcaacatg
gaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaaggcggtgggttaccgaatatcacgatatgggttacggaaatgta
ctccggtccgtgctgcgatggaaattcagcaaaacaatgccacaaaacggtttcgtgaattctgtgggtccggcagatc
cggaattcgcacgtcatctgctccgggtaccttgcgcgcaatttttggtaaaacgaaaaatccagaacgctgtgcactgt
accgatctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatactttttcaaaattctggataattga (配列番号: 20)

30

【 0 1 0 8 】

(アミノ酸)

【 0 1 0 9 】

MHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLF I GNKVNVFSRQLVL I DYGDQYTARQLGSRKEKTLAL I KPDA I SKAGE I I E I I NKA
GFT I TKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNEL I QF I TTGP I I AME I LRDDA I CEWKRL LGPANS G VARTDASES I RALF
GTDG I RNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCC I VKPHAVSEGLLGK I LMA I RDAGFE I SAMQMFMN
DRVNVVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAME I QQNNATKTFREFCGPADPE I ARHLRPGTLRA I FGKTK I QNAVHC
TDLPEDGLLEVQYFFK I LDN- (配列番号: 21)

40

【 0 1 1 0 】

ヒトNME7-A:

【 0 1 1 1 】

(DNA)

【 0 1 1 2 】

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaaataattgaaataataaacaagctgg
atttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattttcatgtagatcaccagtcagagc

50

cctttttcaatgagctgatccagttttattacaactggtcctattattgccatggagattttaagagatgatgctatatgt
gaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtggcacgcacagatgcttctgaaagcatttagagccctctttgg
aacagatggcataagaaaatgcagcgcatggccctgatcttttgcctctgcgccagagaaaatggagttgttttttga(
配列番号: 22)

【 0 1 1 3 】

(アミノ酸)

【 0 1 1 4 】

MEKTLALIKPDAISKAGEIIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSEFASAAAREMELFF- (配列番号: 23)

【 0 1 1 5 】

ヒトNME7-A1:

【 0 1 1 6 】

(DNA)

【 0 1 1 7 】

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaaataattgaaataataaacaagctgg
atttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattttcatgtagatcaccagtcaagac
cctttttcaatgagctgatccagttttattacaactggtcctattattgccatggagattttaagagatgatgctatatgt
gaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtggcacgcacagatgcttctgaaagcatttagagccctctttgg
aacagatggcataagaaaatgcagcgcatggccctgatcttttgcctctgcgccagagaaaatggagttgttttttctt
caagtggaggttgtgggcccggcaaacactgctaaatttacttga

(配列番号: 24)

【 0 1 1 8 】

(アミノ酸)

【 0 1 1 9 】

MEKTLALIKPDAISKAGEIIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSEFASAAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFT- (配列番号: 25)

【 0 1 2 0 】

ヒトNME7-A2:

【 0 1 2 1 】

(DNA)

【 0 1 2 2 】

atgaatcatagtgaagatttcgttttcatgtgcagagtggatgatccaaatgcttcacttcttcgacgttatgagctttt
attttacccaggggatggatctgttgaaatgcatgatgtaaagaatcatcgacacctttttaagcggaccaaatatgata
acctgcacttgaagattttatttataggcaacaaagtgaatgtcttttctcgacaactggatttaattgactatggggat
caatatagactcgccagctgggcagtaggaaagaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctgg
agaaaataattgaaataataaacaagctggattttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcat
tggattttcatgtagatcaccagtcaagaccctttttcaatgagctgatccagttttattacaactggtcctattattgcc
atggagattttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtggcacgcacaga
tgcttctgaaagcatttagagccctctttggaacagatggcataagaaaatgcagcgcatggccctgatcttttgcctctg
cgccagagaaaatggagttgttttttttga (配列番号: 26)

【 0 1 2 3 】

(アミノ酸)

【 0 1 2 4 】

MNHSEFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFIGNKVNVSFQRLVLIDYGD
QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIA
MEILRDDAICWKRLLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSEFASAAAREMELFF- (配列番号: 27)

【 0 1 2 5 】

ヒトNME7-A3:

【 0 1 2 6 】

10

20

30

40

50

(DNA)

【 0 1 2 7 】

atgaatcatagtgaaagattcgttttcatgtgcagagtggatgatccaaatgcttcacttcttcgacgttatgagctttt
at t t t a c c c a g g g g a t g g a t c t g t t g a a a t g c a t g a t g t a a a g a a t c a t c g c a c c t t t t a a a g c g g a c c a a a t a t g a t a
a c c t g c a c t t g g a a g a t t a t t t a t a g g c a a c a a a g t g a a t g t c t t t t c t c g a c a a c t g g t a t t a a t t g a c t a t g g g g a t
c a a t a t a c a g c t c g c c a g c t g g g c a g t a g g a a a g a a a a a c g c t a g c c c t a a t t a a a c c a g a t g c a a t a t c a a a g g c t g g
a g a a a t a a t t g a a a t a a a a c a a a g c t g g a t t t a c t a t a a c c a a a c t c a a a a t g a t g a t g c t t t c a a g g a a g a a g c a t
t g g a t t t t c a t g t a g a t c a c c a g t c a a g a c c c t t t t c a a t g a g c t g a t c c a g t t t a t t a c a a c t g g t c c t a t t a t t g c c
a t g g a g a t t t t a a g a g a t g a t g c t a t a t g t g a a t g g a a a a g a c t g c t g g g a c c t g c a a a c t c t g g a g t g g c a c g c a c a g a
t g c t t c t g a a a g c a t t a g a g c c c t c t t t g g a a c a g a t g g c a t a a g a a a t g c a g c g c a t g g c c c t g a t t c t t t t g c t t c t g
c g g c c a g a g a a a t g g a g t t g t t t t t c c t t c a a g t g g a g g t t g t g g g c c g g c a a a c a c t g c t a a a t t a c t t g a (配 列
番 号 : 28)

10

【 0 1 2 8 】

(アミノ酸)

【 0 1 2 9 】

MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSGVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFI GNKVNVSFRQLVLIDYGD
QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEII E I I N K A G F T I T K L K M M M L S R K E A L D F H V D H Q S R P F F N E L I Q F I T T G P I I A
M E I L R D D A I C E W K R L L G P A N S G V A R T D A S E S I R A L F G T D G I R N A A H G P D S F A S A A R E M E L F F P S S G G C G P A N T A K F T - (配 列 番 号 : 29)

20

【 0 1 3 0 】

ヒトNME7-B:

【 0 1 3 1 】

(DNA)

【 0 1 3 2 】

atgaattgtacctgttgcattgtttaaaccccatgctgtcagtgaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgaga
tgcaggttttgaaatctcagctatgcagatgttcaatatggatcgggttaatgttgagggaattctatgaagtttataaag
gagtagtgaccgaatatcatgacatggtgacagaaaatgtattctggcccttgtgtagcaatggagattcaacagaataat
gctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatcctgaaattgcccggcatttacgccctggaactctcagagc
aatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttcactgtactgatctgccagaggatggcctattagagggttcaatact
tcttctga (配 列 番 号 : 30)

30

【 0 1 3 3 】

(アミノ酸)

【 0 1 3 4 】

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNN
ATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (配 列 番 号 : 31)

【 0 1 3 5 】

ヒトNME7-B 1:

【 0 1 3 6 】

(DNA)

【 0 1 3 7 】

atgaattgtacctgttgcattgtttaaaccccatgctgtcagtgaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgaga
tgcaggttttgaaatctcagctatgcagatgttcaatatggatcgggttaatgttgagggaattctatgaagtttataaag
gagtagtgaccgaatatcatgacatggtgacagaaaatgtattctggcccttgtgtagcaatggagattcaacagaataat
gctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatcctgaaattgcccggcatttacgccctggaactctcagagc
aatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttcactgtactgatctgccagaggatggcctattagagggttcaatact
tcttcaagatcttggataaattagtaga (配 列 番 号 : 32)

40

【 0 1 3 8 】

(アミノ酸)

【 0 1 3 9 】

MNCTCCIVKPHA VSEGLLGKILMAIRD AGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQ

50

NNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (配列番号: 33)

【 0 1 4 0 】

ヒトNME7-B2:

【 0 1 4 1 】

(DNA)

【 0 1 4 2 】

atgccttcaagtggagggtgtgggcccggcaaacactgctaaatttactaatgtacctgttgcatgtttaaccccatgc
tgtcagtgaaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcagggttttgaaatctcagctatgcagatgttca
atatggatcgggttaatgttgaggaattctatgaagtttataaaggagtagtgaccgaatatcatgacatggtagacagaa
atgtattctggcccttgtgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgc
tgatcctgaaattgcccggcatttacgccctggaactctcagagcaatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttc
actgtactgatctgccagaggatggcctattagagggtcaatacttcttctga(配列番号: 34)

10

【 0 1 4 3 】

(アミノ酸)

【 0 1 4 4 】

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHA VSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVT
EMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (配列番
号: 35)

【 0 1 4 5 】

ヒトNME7-B3:

【 0 1 4 6 】

(DNA)

【 0 1 4 7 】

atgccttcaagtggagggtgtgggcccggcaaacactgctaaatttactaatgtacctgttgcatgtttaaccccatgc
tgtcagtgaaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcagggttttgaaatctcagctatgcagatgttca
atatggatcgggttaatgttgaggaattctatgaagtttataaaggagtagtgaccgaatatcatgacatggtagacagaa
atgtattctggcccttgtgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgc
tgatcctgaaattgcccggcatttacgccctggaactctcagagcaatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttc
actgtactgatctgccagaggatggcctattagagggtcaatacttcttcaagatcttggataattagtga(配列番号
: 36)

30

【 0 1 4 8 】

(アミノ酸)

【 0 1 4 9 】

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTE
MYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (配
列番号: 37)

【 0 1 5 0 】

ヒトNME7-AB:

【 0 1 5 1 】

(DNA)

【 0 1 5 2 】

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataattgaaataataaacaagctgg
atttactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattttcatgtagatcaccagtcaagac
cctttttcaatgagctgatccagtttattacaactggtcctattattgccatggagattttaagagatgatgctatatgt
gaatggaaaagactgctgggacctgcaaactctggagtggcacgcacagatgcttctgaaagcattagagccctctttgg
aacagatggcataagaaatgcagcgcatggccctgatcttttgccttctgcccagagaaatggagttgtttttcctt
caagtggagggtgtgggcccggcaaacactgctaaatttactaatgtacctgttgcatgtttaaccccatgctgtcagt
gaaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcagggttttgaaatctcagctatgcagatgttcaatatgga
tcgggttaatgttgaggaattctatgaagtttataaaggagtagtgaccgaatatcatgacatggtagacagaaatgtatt
ctggcccttgtgtagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatcct

50

gaaattgcccgccatttacgccctggaactctcagagcaatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttcactgtac
tgatctgccagaggatggcctattagagggtcaatacttcttcaagatcttggataattagtga(配列番号: 38)

【0153】

(アミノ酸)

【0154】

MEKTLALIKPDAISKAGEIIIEINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSEFASAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVS
EGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADP
EIRHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN--(配列番号: 39)

【0155】

10

ヒトNME7-AB 1:

【0156】

(DNA)

【0157】

atggaaaaaacgctagccctaattaaaccagatgcaatatcaaaggctggagaaataattgaaataataaacaagctgg
attactataaccaaactcaaaatgatgatgctttcaaggaaagaagcattggattttcatgtagatcaccagtcaagac
cctttttcaatgagctgatccagttattacaactggctctatttgccatggagattttaagagatgatgctatatgt
gaatggaaaagactgctgggacctgcaaaactctggagtgccacgcacagatgcttctgaaagcatttagagccctcttgg
aacagatggcataagaaatgcagcgcatggccctgatcttttgcctctgcccagagaaatggagtgttttttccctt
caagtggaggttgtggccggcaaacactgctaaatttactaatgtacctgttgcattgttaaaccatgctgtcagt
gaaggactgttgggaaagatcctgatggctatccgagatgcagggtttgaaatctcagctatgcagatgttcaatatgga
tcgggttaattgttgaggaaattctatgaagttataaaggagtagtgaccgaatatcatgacatggtgacagaaatgtatt
ctggcccttgttagcaatggagattcaacagaataatgctacaaagacatttcgagaattttgtggacctgctgatcct
gaaattgcccgccatttacgccctggaactctcagagcaatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttcactgtac
tgatctgccagaggatggcctattagagggtcaatacttcttctga(配列番号: 40)

【0158】

20

(アミノ酸)

【0159】

MEKTLALIKPDAISKAGEIIIEINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSEFASAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVS
EGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADP
EIRHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF--(配列番号: 41)

30

【0160】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-A配列:

【0161】

(DNA)

【0162】

atggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaaagcggg
tttcaccatcacgaaactgaaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggattttcatgtcgaccaccagtctcgcc
cgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgcaatggaaattctgcgtgatgacgctatctgc
gaatggaaacgctgctgggcccggcaaacctcagggtgttgcgcgtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttgg
caccgatggtatccgtaatgcagcacatgggtccggactcatctgcacatcggcagctcgtgaaatggaactgtttttctga(
配列番号: 42)

40

【0163】

(アミノ酸)

【0164】

MEKTLALIKPDAISKAGEIIIEINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSEFASAREMELFF--(配列番号: 43)

【0165】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-A1配列:

50

【 0 1 6 6 】

(DNA)

【 0 1 6 7 】

atggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaaagcggg
tttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggattttcatgtcgaccaccagtctcgcc
cgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgcaatggaaattctgctgatgacgctatctgc
gaatggaaacgctgctgggcccggcaaactcaggtgttgcgcgtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttgg
caccgatgggtatccgtaatgcagcacatgggtccggactcattcgcatcggcagctcgtgaaatggaactgttttcccga
gctctggcggttgcggtccggcaaacaccgccaatttacctga(配列番号: 44)

【 0 1 6 8 】

(アミノ酸)

【 0 1 6 9 】

MEKTLALIKPDAISKAGEIIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFT-(配列番号: 4
5)

【 0 1 7 0 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-A2配列:

【 0 1 7 1 】

(DNA)

【 0 1 7 2 】

atgaatcactccgaacgctttgtttttatcgccgaatggatgacccgaatgcttccctgctgcgccgctacgaactgct
gttttatccgggcatggtagcgtggaaatgcatgacgttaaaaaatcaccgtacctttctgaaacgcacgaaatatgata
atctgcatctggaagacctgtttatggcaacaaagtcaatgtgttctctcgtcagctgggtgctgatcgattatggcgac
cagtacaccgcgcgtcaactgggtagtcgcaagaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctgg
cgaaattatcgaaattatcaacaaagcgggtttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccc
tggattttcatgtcgaccaccagtctcgcccgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgca
atggaaattctgctgatgacgctatctgcgaatggaaacgctgctgggcccggcaaactcaggtgttgcgcgtaccga
tgccagtgaatccattcgcgctctgtttggcaccgatgggtatccgtaatgcagcacatgggtccggactcattcgcatcgg
cagctcgtgaaatggaactgtttttctga(配列番号: 46)

【 0 1 7 3 】

(アミノ酸)

【 0 1 7 4 】

MNHSERFVFAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFI GNKVNVSFRQLVLI DYGD
QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPII A
MEILRDDAICEWKRLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFF-(配列番号: 47)

【 0 1 7 5 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-A3配列:

【 0 1 7 6 】

(DNA)

【 0 1 7 7 】

atgaatcactccgaacgctttgtttttatcgccgaatggatgacccgaatgcttccctgctgcgccgctacgaactgct
gttttatccgggcatggtagcgtggaaatgcatgacgttaaaaaatcaccgtacctttctgaaacgcacgaaatatgata
atctgcatctggaagacctgtttatggcaacaaagtcaatgtgttctctcgtcagctgggtgctgatcgattatggcgac
cagtacaccgcgcgtcaactgggtagtcgcaagaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctgg
cgaaattatcgaaattatcaacaaagcgggtttcaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccc
tggattttcatgtcgaccaccagtctcgcccgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgca
atggaaattctgctgatgacgctatctgcgaatggaaacgctgctgggcccggcaaactcaggtgttgcgcgtaccga
tgccagtgaatccattcgcgctctgtttggcaccgatgggtatccgtaatgcagcacatgggtccggactcattcgcatcgg
cagctcgtgaaatggaactgtttttcccgagctctggcgggtgcggtccggcaaacaccgccaatttacctga(配列
番号: 48)

10

20

30

40

50

【 0 1 7 8 】

(アミノ酸)

【 0 1 7 9 】

MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFIGNKVNVSFRQLVLIDYGD
QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIIEINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIA
MEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFT-(
配列番号: 49)

【 0 1 8 0 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-B配列:

【 0 1 8 1 】

(DNA)

【 0 1 8 2 】

atgaattgtacgtgctgtattgtcaaacccgcacgcagtgtcagaaggcctgctgggtaaaaattctgatggcaatccgtga
tgctggctttgaaatctcgccatgcagatgttcaacatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaag
gcgtgggtaccgaatatcacgatatggttacggaaatgtactccggtccgtgctgcgatggaaattcagcaaaacaat
gccacaaaacgtttcgtgaattctgtggtccggcagatccggaaatcgcacgtcatctgctgccgggtaccctgcgcgc
aatttttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgcactgtaccgatctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatact
ttttctga(配列番号: 50)

【 0 1 8 3 】

(アミノ酸)

【 0 1 8 4 】

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNN
ATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF-(SEQID NO:51)

【 0 1 8 5 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-B 1配列:

【 0 1 8 6 】

(DNA)

【 0 1 8 7 】

atgaattgtacgtgctgtattgtcaaacccgcacgcagtgtcagaaggcctgctgggtaaaaattctgatggcaatccgtga
tgctggctttgaaatctcgccatgcagatgttcaacatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaag
gcgtgggtaccgaatatcacgatatggttacggaaatgtactccggtccgtgctgcgatggaaattcagcaaaacaat
gccacaaaacgtttcgtgaattctgtggtccggcagatccggaaatcgcacgtcatctgctgccgggtaccctgcgcgc
aatttttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgcactgtaccgatctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatact
ttttcaaaattctggataattga(配列番号: 52)

【 0 1 8 8 】

(アミノ酸)

【 0 1 8 9 】

MNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNN
ATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN-(配列番号: 53)

【 0 1 9 0 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-B2配列

【 0 1 9 1 】

(DNA)

【 0 1 9 2 】

atgccgagctctggcggttgcggtccggcaaacaccgccaattttaccaattgtacgtgctgtattgtcaaacccgcacgc
agtgtcagaaggcctgctgggtaaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttgaaatctcgccatgcagatgttca
acatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaagggcggtgggtaccgaatatcacgatatggttacggaa
atgtactccggtccgtgctgcgatggaaattcagcaaaacaatgccacaaaacgtttcgtgaattctgtggtccggc
agatccggaaatcgcacgtcatctgctgccgggtaccctgcgcgcaatttttgggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgc
actgtaccgatctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatactttttctga(配列番号: 54)

10

20

30

40

50

【 0 1 9 3 】

(アミノ酸)

【 0 1 9 4 】

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTE
MYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFF- (配列番号
: 55)

【 0 1 9 5 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-B3配列:

【 0 1 9 6 】

(DNA)

10

【 0 1 9 7 】

atgccgagctctggcgggttgcgggtccggcaaacaccgccaatattaccaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgc
agtgtcagaaggcctgctgggtaaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttgaaatctcgcccatgcagatgttca
acatggaccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaaggcgtgggtaccgaatatcacgatatggttacggaa
atgtactccgggtccgtgctgcgatggaaattcagcaaaaacaatgccacaaaacgtttcgtgaattctgtgggtccggc
agatccggaaaatcgacgctcatctgcgtccgggtaccctgcgcgcaatttttggtaaaacgaaaaatccagaacgctgtgc
actgtaccgatctgccggaagacggtctgctggaagtccaatactttttcaaaattctggataattga(配列番号: 5
6)

【 0 1 9 8 】

(アミノ酸)

20

【 0 1 9 9 】

MPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTE
MYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (配
列番号: 57)

【 0 2 0 0 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-AB配列:

【 0 2 0 1 】

(DNA)

【 0 2 0 2 】

atggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaaagcggg
tttaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggattttcatgtcgaccaccagctctcgcc
cgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgatattcgcaatggaaattctgctgatgacgctatctgc
gaatggaaacgctgctgggcccggcaaacctcagggtgttgcgcgtaccgatgccagtgaaatccattcgcgctctgtttgg
caccgatgggtatccgtaatgcagcacatgggtccggactcatctgcgatcggcagctcgtgaaatggaactgttttccga
gctctggcgggttgcgggtccggcaaacaccgccaatattaccaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgcagtggtca
gaaggcctgctgggtaaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttgaaatctcgcccatgcagatgttcaacatgga
ccgcttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaaggcgtgggtaccgaatatcacgatatggttacggaaatgtact
ccgggtccgtgctgcgatggaaattcagcaaaaacaatgccacaaaacgtttcgtgaattctgtgggtccggcagatccg
gaaatcgacgctcatctgcgtccgggtaccctgcgcgcaatttttggtaaaacgaaaaatccagaacgctgtgcactgtac
cgatctgccggaagacggtctgctggaagtccaatactttttcaaaattctggataattga(配列番号: 58)

30

40

【 0 2 0 3 】

(アミノ酸)

【 0 2 0 4 】

MEKTLALIKPDAISKAGEIIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLGPGANSVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVS
EGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPADP
EIRHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN- (配列番号: 59)

【 0 2 0 5 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME7-AB1配列:

【 0 2 0 6 】

50

(DNA)

【 0 2 0 7 】

atggaaaaaacgctggccctgattaaaccggatgcaatctccaaagctggcgaaattatcgaaattatcaacaaagcggg
tttaccatcacgaaactgaaaatgatgatgctgagccgtaaagaagccctggattttcatgtcgaccaccagttctcgcc
cgtttttcaatgaactgattcaattcatcaccacgggtccgattatcgcaatggaaattctgctgatgacgctatctgc
gaatggaaacgcttgcctgggcccggcaaacctcagggtgttgcgcgtaccgatgccagtgaatccattcgcgctctgtttgg
caccgatggtatccgtaatgcagcacatggtccggactcattcgcatcggcagctcgtgaaatggaactgtttttcccgga
gctctggcgggttgcggtccggcaaacaccgccaattttaccaattgtacgtgctgtattgtcaaaccgcacgcagttgca
gaaggcctgctgggtaaaaattctgatggcaatccgtgatgctggctttgaaatctcggccatgcagatgttcaacatgga
ccgcgttaacgtcgaagaattctacgaagtttacaaggcgtggttaccgaatatcacgatatggttacggaaatgtact
ccggtccgtgctgcgatggaaattcagcaaaaacaatgccacaaaacggtttcgatgaattctgtggtccggcagatccg
gaaatcgacgctcatctgctccgggtaccctgcgcgcaatttttggtaaaacgaaaatccagaacgctgtgcactgtac
cgatctgccggaagacgggtctgctggaagttcaatactttttctga(配列番号: 60)

10

【 0 2 0 8 】

(アミノ酸)

MEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAIC
EWKRLGPNANSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVS
EGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADP
EIRHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVVQYFF-(配列番号: 61)

20

【 0 2 0 9 】

マウスNME6

【 0 2 1 0 】

(DNA)

【 0 2 1 1 】

atgacctccatcttgcgaagtccccaagctcttccagctcacactagccctgatcaagcctgatgcagttgcccaccact
gatcctggaggctgttcatcagcagattctgagcaacaagttcctcatgtacgaacgaggggaactgcagtggaagctgg
aggactgccggagggttttaccgagagcatgaagggcgttttttctatcagcggctggtggagttcatgacaagtgggcca
atccgagcctatatccttggccacaagatgccatccaactttggaggacactgatgggacccaccagagtatctcgagc
acgctatatagccccagattcaattcgtggaagtttgggcctcactgacacccgaaatactacccatggctcagactccg
tggtttccgcccagcagagagattgcagccttcttccctgacttcagtgaaacagcgttggtatgaggaggaggaacccag
ctgcgggtgtggtcctgtgcactacagtcagaggaaggtatccactgtgcagctgaaacaggaggccacaaacaacctaa
caaaccttag(配列番号: 62)

30

【 0 2 1 2 】

(アミノ酸)

【 0 2 1 3 】

MTSILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQLLSNKFLIVRTRELQWKLEDCRRFYREHEGRFFYQRLVEFMTSGP
IRAYILAHKDAIQLWRTLMGPTRVFRARYIAPDSIRGSLGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQ
LRCGPVHYSPEEGIHCAAETGGHKQPNKT-(配列番号: 63)

【 0 2 1 4 】

ヒトNME6:

40

【 0 2 1 5 】

(DNA)

【 0 2 1 6 】

atgaccagaatctggggagtgagatggcctcaatcttgcgaagccctcaggctctccagctcactctagccctgatcaa
gcctgacgcagtcgcccattccactgatcttgaggctgttcatcagcagattctaagcaacaagttcctgatgtacgaa
tgagagaactactgtggagaaaggaagattgccagagggttttaccgagagcatgaagggcgttttttctatcagaggctg
gtggagttcatggccagcgggccaatccgagcctacatccttggccacaaggatgccatccagctctggaggacgctcat
gggacccaccagagtggtccgagcacgccatgtggccccagattctatccgtgggagtttcggcctcactgacacccgca
acaccacccatgggttcggactctgtggtttcagccagcagagagattgcagccttcttccctgacttcagtgaaacagcgc
tggatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtgctatagcccagagggagggtgtccactatgtagctgg

50

aacaggaggcctaggaccagcctga(配列番号: 64)

【 0 2 1 7 】

(アミノ酸)

【 0 2 1 8 】

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRL
VEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTLMPTRVFRARHVPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQR
WYEEEEPQLRCGPVCYSPEGGVHYVAGTGGLGPA-(配列番号: 65)

【 0 2 1 9 】

ヒトNME6 1:

【 0 2 2 0 】

(DNA)

【 0 2 2 1 】

atgacccagaatctggggagtgagatggcctcaatcttgcaagccctcaggctctccagctcactctagccctgatcaa
gcctgacgcagtcgcccattccactgattctggaggctgttcatcagcagattctaagcaacaagttcctgattgtacgaa
tgagagaactactgtggagaaaggaagattgccagaggttttaccgagagcatgaagggcgtttttctatcagaggctg
gtggagttcatggccagcgggccaatccgagcctacatccttgcccacaaggatgccatccagctctggaggacgctcat
gggacccaccagagtggtccgagcacgccatgtggccccagattctatccgtgggagtttcggcctcactgacacccgca
acaccacccatgggttcggactctgtgggttcagccagcagagagattgcagccttcttccctgacttcagtgaaacagcgc
tggtatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtga(配列番号: 66)

【 0 2 2 2 】

(アミノ酸)

【 0 2 2 3 】

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRL
VEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTLMPTRVFRARHVPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQR
WYEEEEPQLRCGPV-(配列番号: 67)

【 0 2 2 4 】

ヒトNME6 2:

【 0 2 2 5 】

(DNA)

【 0 2 2 6 】

atgctcactctagccctgatcaagcctgacgcagtcgcccattccactgattctggaggctgttcatcagcagattctaag
caacaagttcctgattgtacgaatgagagaactactgtggagaaaggaagattgccagaggttttaccgagagcatgaag
ggcgtttttctatcagaggctggaggagttcatggccagcgggccaatccgagcctacatccttgcccacaaggatgcc
atccagctctggaggacgctcatgggacccaccagagtggtccgagcacgccatgtggccccagattctatccgtgggag
tttcggcctcactgacacccgcaacaccacccatgggttcggactctgtgggttcagccagcagagagattgcagccttct
tccctgacttcagtgaaacagcgcgtggtatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtga(配列番号: 68)

【 0 2 2 7 】

(アミノ酸)

【 0 2 2 8 】

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDA
IQLWRTLMPTRVFRARHVPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEPQLRCGPV-(配
列番号: 69)

【 0 2 2 9 】

ヒトNME6 3:

【 0 2 3 0 】

(DNA)

【 0 2 3 1 】

atgctcactctagccctgatcaagcctgacgcagtcgcccattccactgattctggaggctgttcatcagcagattctaag
caacaagttcctgattgtacgaatgagagaactactgtggagaaaggaagattgccagaggttttaccgagagcatgaag

10

20

30

40

50

ggcgttttttctatcagaggctggaggagttcatggccagcgggccaatccgagcctacatccttggccacaaggatgcc
atccagctctggaggacgctcatgggacccaccagagtggtccgagcacgccaatgtggccccagattctatccgtgggag
tttcggcctcactgacacccgcaacaccacccatgggtcggactctgtgggttcagccagcagagagattgcagccttct
tccctgacttcagtgaacagcgctgggtatgaggaggaagagccccagttgcgctgtggccctgtgtgctatagcccagag
ggagggtccactatgtagctggaacaggaggcctaggaccagcctga (配列番号: 70)

【0232】

(アミノ酸)

【0233】

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGPIRAYILAHKDA
IQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRCGPVCYSPE
GGVHYVAGTGGLGPA- (配列番号: 71)

10

【0234】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME6配列:

【0235】

(DNA)

【0236】

atgacgcaaaaatctgggctcggaatggcaagtatcctgcgctccccgcaagcactgcaactgaccctggctctgatcaa
accggacgctgttgctcatccgctgattctggaagcgggtccaccagcaaatcttgagcaacaaaatttctgatcgtgcgta
tgcgcaactgctgtggcgtaaagaagattgccagcgtttttatcggaacatgaaggccgtttcttttatcaacgcctg
gttgaattcatggcctctgggtccgattcgcgcatatatcctggctcacaaagatgcgattcagctgtggcgtagccctgat
gggtccgacgcgcgtcttctgtgcacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctcgttcggcttgaccgatacgcgca
ataccacgcacggtagcgactctgttgttagtgctcccgtgaaatcgcgcccttttcccggacttctccgaacagcgt
tggtacgaagaagaagaaccgcaactgcgctgtggccccgggtctgttatctccggaagggtgggtgtccattatgtggcggg
cacgggtgggtctgggtccggcatga (配列番号: 72)

20

【0237】

(アミノ酸)

【0238】

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRL
VEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQR
WYEEEEEPQLRCGPVCYSPEGGVHYVAGTGGLGPA- (配列番号: 73)

30

【0239】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME6 1配列:

【0240】

(DNA)

【0241】

atgacgcaaaaatctgggctcggaatggcaagtatcctgcgctccccgcaagcactgcaactgaccctggctctgatcaa
accggacgctgttgctcatccgctgattctggaagcgggtccaccagcaaatcttgagcaacaaaatttctgatcgtgcgta
tgcgcaactgctgtggcgtaaagaagattgccagcgtttttatcggaacatgaaggccgtttcttttatcaacgcctg
gttgaattcatggcctctgggtccgattcgcgcatatatcctggctcacaaagatgcgattcagctgtggcgtagccctgat
gggtccgacgcgcgtcttctgtgcacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctcgttcggcttgaccgatacgcgca
ataccacgcacggtagcgactctgttgttagtgctcccgtgaaatcgcgcccttttcccggacttctccgaacagcgt
tggtacgaagaagaagaaccgcaactgcgctgtggccccgggtctga (配列番号: 74)

40

【0242】

(アミノ酸)

【0243】

MTQNLGSEMASILRSPQALQLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRL
VEFMASGPIRAYILAHKDAIQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQR
WYEEEEEPQLRCGPV- (配列番号: 75)

【0244】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME6 2配列:

50

【 0 2 4 5 】

(DNA)

【 0 2 4 6 】

atgctgaccctggctctgatcaaaccggacgctgttgctcatccgctgattctggaagcgggtccaccagcaaatcttgag
 caacaaattctgatcgtagctatgacggaactgctgtggcgtaaagaagattgccagcggttttatcgcgacaatgaag
 gccgtttcttttatcaacgcctgggtgaattcatggcctctgggtccgattcgcgcatatatcctgggtcacaaagatgag
 attcagctgtggcgtaccctgatgggtccgacgcgcgtcttctgtgcacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctc
 gttcgggtctgaccgatacgcgcaataccacgcacggtagcgactctgttgttagtgcggtcccgtagaatcgcggcctttt
 tcccggtacttctccgaacagcgttggtagaagaagaagaaccgcaactgcgctgtggccccggtctga (配列番号:
 76)

10

【 0 2 4 7 】

(アミノ酸)

【 0 2 4 8 】

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGP|RAY|LAHKDA
 IQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRCGPV- (配
 列番号: 77)

【 0 2 4 9 】

大腸菌発現のために最適化されたヒトNME6 3配列:

【 0 2 5 0 】

(DNA)

【 0 2 5 1 】

atgctgaccctggctctgatcaaaccggacgctgttgctcatccgctgattctggaagcgggtccaccagcaaatcttgag
 caacaaattctgatcgtagctatgacggaactgctgtggcgtaaagaagattgccagcggttttatcgcgacaatgaag
 gccgtttcttttatcaacgcctgggtgaattcatggcctctgggtccgattcgcgcatatatcctgggtcacaaagatgag
 attcagctgtggcgtaccctgatgggtccgacgcgcgtcttctgtgcacgtcatgtggcaccggactcaatccgtggctc
 gttcgggtctgaccgatacgcgcaataccacgcacggtagcgactctgttgttagtgcggtcccgtagaatcgcggcctttt
 tcccggtacttctccgaacagcgttggtagaagaagaagaaccgcaactgcgctgtggccccggtctgttatcttccggaa
 ggtgggtgtccattatgtggcgggcacgggtgggtctgggtccggcatga (配列番号: 78)

20

【 0 2 5 2 】

(アミノ酸)

【 0 2 5 3 】

MLTLALIKPDAVAHPLILEAVHQQILSNKFLIVRMRELLWRKEDCQRFYREHEGRFFYQRLVEFMASGP|RAY|LAHKDA
 IQLWRTLMPTRVFRARHVAPDSIRGSFGLTDTRNTTHGSDSVVSASREIAAFFPDFSEQRWYEEEEEPQLRCGPVCYSPE
 GGVHYVAGTGGLGPA- (配列番号: 79)

30

【 0 2 5 4 】

ヒスチジン・タグ

【 0 2 5 5 】

(ctcgag)caccaccaccaccactga (配列番号: 80)

【 0 2 5 6 】

Strept IIタグ

【 0 2 5 7 】

(accggt)tgagccatcctcagttcgaaaagtaatga (配列番号: 81)

40

【 0 2 5 8 】

PSMGFR N - 10のペプチド:

【 0 2 5 9 】

QFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA (配列番号: 82)

【 0 2 6 0 】

PSMGFR C - 10のペプチド

【 0 2 6 1 】

GTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDV (配列番号: 83)

50

【 0 2 6 2 】

ヒトNME7

【 0 2 6 3 】

ヌクレオシド2リン酸キナーゼ7アイソフォーム[ヒト](Hu_7)

【 0 2 6 4 】

MNHSERFVFI AEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKR
 TKYDNLHLEDLFI GNKVNVSFRQLVLI DYGDQYTARQLGSRKEKTLALI KPDAI SKA
 GEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGP I IAMEI LRD
 DAICEWKRL LGPANS GVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPS
 SGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVN
 VEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHL
 RPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN

10

(配列番号: 84)

【 0 2 6 5 】

配列番号:84によって表わされたヒトNME7アイソフォームは、376のアミノ酸オーバーラップ部位のうちの、配列番号:21によって表わされるヒトNME7アイソフォームbと、90.4%の配列同一性がある。

【 0 2 6 6 】

ヒトNME7-X1

【 0 2 6 7 】

(DNA)

【 0 2 6 8 】

atgatgatgctttcaaggaaagaagcatitggattttcatgtagatcaccagtcaagacccttttcaatgagctgatcca
 gtttattacaactggctctattattgccatggagattttaagagatgatgctatatgtgaatggaaaagactgctgggac
 ctgcaaactctggagtgccacgcacagatgcttctgaaagcatitagagccctctttggaacagatggcataagaaatgca
 gcgcatggccctgatcttttgccttctgcccagagaaatggagttgtttttccttcaagtggaggttgtgggcccggc
 aaacactgctaaatttactaatgtacctgttgcatgtttaacccccatgctgtcagtgaggactgttgggaaagatcc
 tgatggctatccgagatgcaggttttgaaatctcagctatgcagatgttcaatatggatcgggttaattgttgaggaaatc
 tatgaagtttataaaggagtagtgaccgaatatcatgacatggtgacagaaatgtattctggcccttgtgtagcaatgga
 gattcaacagaataatgctacaaagacatttgcgagaattttgtggacctgctgatcctgaaatggcccgccatttacgcc
 ctggaactctcagagcaatctttggtaaaactaagatccagaatgctgttccactgtactgatctgccagaggatggccta
 ttagaggttcaatacttcttcaagatcttggataattag(配列番号: 85)

30

【 0 2 6 9 】

(アミノ酸)

【 0 2 7 0 】

MMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGP I IAMEI LRDDAICEWKRL
 LGPANS GVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSFASAAREMELFFPSSGGCGPANT
 AKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYK
 GVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFG
 KTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN*

40

(配列番号: 86)

【 0 2 7 1 】

マウスMUC1およびNME7

【 0 2 7 2 】

マウスMUC1*細胞外領域PSMGFRは、45のアミノ酸オーバーラップ部位において、ヒトと51.1%同一である。

【 0 2 7 3 】

GTFASADVKSQLIQHKKEA-DDYNLTISEVKVNEMQFPSPAQSRP(配列番号: 87)

【 0 2 7 4 】

マウス・アイソフォーム1 NMEは、395のアミノ酸オーバーラップ部位で、ヒトNME7アイソ

50

フォームと84.3 %同一である。

【 0 2 7 5 】

ヌクレオシド2リン酸キナーゼ7(マウスNME7)アイソフォーム1マウス(Mo_7)

【 0 2 7 6 】

MRACQQGRSSSLVSPYMAPKNQSERFAFIAEWYDPNASLLRRYELLYFYPT
DGSVEMHDVKNRRTFLKRTKYEDLRLEDLFIGNKVNVSFSQLVLDYGDQYTARQL
GSRKEKTLALIKPDAVSKAGEIEMINKSGFTITKLMMTLTRKEAADFHVDHHSRPF
YNELIQFITSGPVIAMEILRDDACEWKRLGPGANSGLSRTDAPGSRALFGTDGVRNA
AHGPDTFASAAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIKPHAISEGMLGKILIAIRD
ACFGMSAIQMFNLDRANVEEFYEVYKGVVSEYNDMVELCSGPCVAIEIQSNPTKT
FREFCGPADPEIARHLRPETLRAIFGKTKVQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN
(配列番号:88)

10

【 0 2 7 7 】

マウス・アイソフォーム2 NME7は、253のアミノ酸オーバーラップ部位で、ヒトNME7アイソフォームに88.4%同一である。

【 0 2 7 8 】

ヌクレオシド2リン酸キナーゼ7アイソフォーム2[マウス](Mo2-7)

【 0 2 7 9 】

MRACQQGRSSSLVSPYMAPKNQSERFAFIAEWYDPNASLLRRYELLYFYPT
DGSVEMHDVKNRRTFLKRTKYEDLRLEDLFIGNKVNVSFSQLVLDYGDQYTARQL
GSRKEKTLALIKPDAVSKAGEIEMINKSGFTITKLMMTLTRKEAADFHVDHHSRPF
YNELIQFITSGPVIAMEILRDDACEWKRLGPGANSGLSRTDAPGSRALFGTDGVRNA
AHGPDTFASAAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIKPHAISEDLFHYM
(配列番号: 89)

20

【 0 2 8 0 】

ブタ・イノシシ(Sus scrofa) MUC1およびNME7

【 0 2 8 1 】

MTRDIQAPFFFFGLLLLPVLTGEGNKQTNKNLALSLSSQFLQVYKEDGLLGLFYIKFRPGSVLVELILAFQDSAAAHNLKT
QFDRLEKAEAGTYNLTISEVSVIDAPFPSSAQPGSGVPGWIGALLVLVCILVALAIIYVIALAVCQCRRKNGCGLDIFPTR
DAYHPMS EYPTYHTHGRYVPPGSTKRNPYEQVSAGNGGSLSYSNLAATSANLL(配列番号: 90)

30

【 0 2 8 2 】

ブタMUC1* PSMGFRは、46アミノ酸オーバーラップにおいて、ヒトに52.2%同一である。

【 0 2 8 3 】

QDSAAAHNLKTQFDRLEKAEAGTYNLTISEVSVIDAPFPSSAQPGS(配列番号: 91)

【 0 2 8 4 】

ブタNME7は、ヒトNME7アイソフォームに、453のアミノ酸オーバーラップ部位で、65.6%同一である。

【 0 2 8 5 】

予測された:ヌクレオシド2リン酸キナーゼ7[イノシシSus scrofaおよびブタ](Pi_7)

【 0 2 8 6 】

40

MNHSERFVFAEWYDPNASLFRRYELLYFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKR
TKYEDLHLEDLFIGNKVNVSFSQLVLDYGDQYTARQLGSKKEKTLALIKPDAVSKA
GEIIIEIINKAGFTLTKLMMTLRKEATDFHIDHQSRRPFLNELIQFITSGPIIAMEILRDD
AICEWKLLGPGANSGLARTDAPGSRVAVFGTDGIRNAAHGPDLSLCAAREMELFFPSS
GVCGPANTAKFTNCTTCCIVKPHAISEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNV
EEFYEVYKGVVSEYNEM/TEMYSAPSSSAIWRSPVTLNSLQSDISSRDFSSGPRSIPR
SNFYWLTNHLLEMLSLLLGLGVHKGVPKEVFVGEAHVSPGCAPVLVGGTSLRVKDRK
KENHFSLVFVMLSSVSLPASSRYVKAAGPQLIKGFSRGRGLLLALNTGCGNCFWL
(配列番号:92)

【 0 2 8 7 】

50

羊MUC1およびNME7

【0288】

MTPDIQAPFLSLLLLFQVLTVANVTMLTASVSTSPNSTVQVSSSTQSSPTSSP
TKETSWSTTTTTLLRTSSPAPTPTTSPGRDGASSPTSSAAPSPAASSSHDGALSLTGSPAP
SPTASPGHGGTLTTTSSPAPSPTASPGHDGASTPTSSPAPSPAASPGHDGALSLTGSPA
PSPTASPGHGGTLTTTSSPAPSPTASPGHDGASTPTSSPAPSPAASSSHDGALSLTGSPA
PSPASPAGHGGTLTTTSSPAPSPTASPGHGGTLTTTSSPAPSPTASPGHDGASTPTSSPA
PTAHSSHDGALTTTGSPAPSPAASPGHDSVPPRATSPAPSPAASPGQHAASSPTSSDIS
SVTTSSMSSSMVTSAHKGTSSRATTTTPVSKGTPSSVPSSETAPTAASHSTRTAAASTSP
STALSTASHPKTSQQLSVQVSLFFLSFRITNLQFNSSLENPQTSYYQELQRSILDVILQT
YKQRDFLGLSEIKFRPGSVLVDLTLAFREGTTAELVKAQFSQLEAHAANYSLTISGV
VRDAQFPSSAPSASGVPGWGIALLVLCVLVALAIIYLIALVVCQCGRKKCEQLDIFP
TLGAYHPMSEYSAYHTHGRFVPPGSTKRSPYEEVSAGNGGSNLSYTNLAATSANL

(配列番号: 93)

【0289】

羊MUC1*細胞外領域PSMGFRは、ヒトと46.8%同一である。

【0290】

REGTTAELVKAQFSQLEAHAANYSLTISGVSVRDAQFPSSAPSAS(配列番号: 94)

【0291】

羊NME7は、ヒトNME7アイソフォームに、395アミノ酸オーバーラップ部位で88.4%同一である。

【0292】

予測された:ヌクレオシド2リン酸キナーゼ7アイソフォームXI[ヒツジOvisariesおよび羊]
(Sh_7)

【0293】

MNPTFVLLSLERNVTESLGNHSERFVFAEWFDPNASLFRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYEDLHLEDLF
GNKVNIFSRQLVLLDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAVSKAGEIIIEIINKAGFTLTCLKMMTLRSKEATDFHIDHQS
RPFNLELIQFITSGPVIAAMEILRDDAICEWKRLGPGANSGLARTDAPESIRALFGTDGINKAAHGPDSFACAAAREMELFF
PSSGVCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILITIRDAGFEISAMQMFNMDRINVEEFYEVYKGVVSEYNEMVTE
MYSGPCVAMEIQQTNPMTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN(配
列番号: 95)

【0294】

カニクイマック・マカカファシクラリスCrab-eating MacaqueMacaca fascicularisMUC1およびNME7

【0295】

カニクイザルMUC1*細胞外領域PSMGFRは、ヒトと88.9%同一である。

【0296】

GTTNVHDVETQFNQRKTEAASRYNLTISDISVRDVPFPFSAQTGA(配列番号: 96)

【0297】

カニクイザルNME7は、ヒトNME7アイソフォームに、251アミノ酸オーバーラップで、98%同一である。

【0298】

未命名の蛋白質物品[Macaca fascicularis](Ma_7)(配列不完全、NME7Aのみ)

【0299】

MSHSERFVFAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKR
TKYDSLHLEDLFIGNKVNIVFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAG
EIIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITSGPVIAAMEILRDD
AICEWKRLGPGANS G VARTD AS GSIRALFGTDGIRNA AHGPDS FAS A AREMELFFPS S
GGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEVRRNP

(配列番号: 97)

10

20

30

40

50

【 0 3 0 0 】

アカゲザルMUC1およびNME7

【 0 3 0 1 】

アカゲザルMUC 1 * PSMGFR

【 0 3 0 2 】

アカゲザルMUC1*細胞外領域PSMGFRは、88.9%、ヒトと同一である。

【 0 3 0 3 】

GTTNVHDTVETQFNQRKTEAASRYNLTISDISVRDVPFPFSAQTGA(配列番号: 98)

【 0 3 0 4 】

アカゲザルNME7は、ヒトNME7アイソフォームに、376アミノ酸オーバーラップ部位で、98.4%同一である。 10

【 0 3 0 5 】

マカカムラッタ(アカゲザル)(Mm_7)

【 0 3 0 6 】

MSHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKR
TKYDSLHLEDLFIGNKVNVSFRQLVLDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAG
EIIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITS GPVIAAMEILRDD
AICEWKRLLG PANS G VARTD AS GSIRALFGTDGIRNA AHGPDS FAS A AREMELFFPS S
GGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNV
EEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQNNATKTFREFCGPVDPEIARHLR
PGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN
(配列番号: 99)

20

【 0 3 0 7 】

コビトチンパンジーMUC1およびNME7

【 0 3 0 8 】

コビトチンパンジー・パーン・パニスカス MUC1

【 0 3 0 9 】

MTPGVQSPFFLLLLLTATTAPKPATVVTGSGHASSAPGGEKETSATQR
SSVPSSTEKNAVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGQDVT LAPATEPASGSAATWGQDVT
SVPVTRPALGSTTPPAHDVTSALDNKPAPGSTAPPAHDVTSAPDTRPAGSTAPPAHG
VTSAPDTRPALGSTAPPVHNVTASGSASGSASTLVHNGTSARATTPASKSTPFPSIPS
HHS DTPPTLASHSTKTDASSTHHSTVPPLTSSNHSTSPQLSTGV SFFFLSFHISNLRFNS
SLED PSTDYQELQRDI SEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVQLTLAFREGTINV
HDVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLVLCVLLV
ALAVYLIALAVCQCRRKNYGQLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSTDRSP
YEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL
(配列番号: 100)

30

【 0 3 1 0 】

コビトチンパンジーMUC1*細胞外領域PSMGFRは、100%、ヒトと同一である。

【 0 3 1 1 】

GTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA(配列番号: 101)

40

【 0 3 1 2 】

コビトチンパンジーNME7は、ヒトNME7アイソフォームと、376アミノ酸オーバーラップ部位で、100%同一である。

【 0 3 1 3 】

コビトチンパンジー予測:ヌクレオシド2リン酸キナーゼ7[パーンパニスカス、コビトチンパンジー](Bo_7)

【 0 3 1 4 】

MNHSERFVFIAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFIGNKVNVSFRQLVLDYGD
QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIA

50

MEILRDDAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSEFASAAAREMELFFPS
 SGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVN
 VEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHL
 RPTGLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN

(配列番号: 102)

【0315】

チンパンジーMUC1およびNME7

【0316】

パートログロダイテス(チンパンジー)MUC1

【0317】

MTPG IQSPFFLLLLLLTVLTVVTGSGHASSAPGGEKETSATQRSSVPSSTEKN
 AVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGGQDVTLPATEPASGSAATWGQDVTSVPVTRPALG
 STTPPAHDVTSAPDNKPAPGSTAPPAHDVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPA
 LGSTAPPVHNVTASGSASGSASTLVHNGTSARATTTTPASKSTPFISPHHSDTPTTLA
 SHSTKTDASSTHHSTVPPLTSSNHSTSPQLSTGVSTGVSFFFLSFHISNLRFNSSLEDPTDYY
 QELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVQTLTAFREGTINVHDTVETQFNQY
 KTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLVLCVLAVALAIVYLIALA
 VCQCRKNYQGLDIFPARDTYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSSTRSPYEKVSAGNGG
 SLSYTNPAVAATSANL

(配列番号: 103)

【0318】

チンパンジーMUC1*細胞外領域PSMGFRは、100%、ヒトと同一である。

【0319】

GTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGA(配列番号: 104)

【0320】

チンパンジーNME7は、ヒトNME7アイソフォームに、376アミノ酸オーバーラップ部位で、99.7%同一である。

【0321】

ヌクレオシド2リン酸キナーゼ7[パートログロダイテス(チンパンジー)](CH_7)

【0322】

MNHSERFVFAEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKR
 TKYDNLHLEDLFIGNKVNVFSRQLVLIDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKA
 GEIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRD
 DAICEWKRLGPNASGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPDSEFASAAAREMELFFPS
 SGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVN
 VEEFYEVYKGVVTEYHNMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPADPEIARHL
 RPTGLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN

(配列番号: 105)

【0323】

ゴリラMUC1およびNME7

【0324】

ゴリラゴリラGorilla gorilla MUC1

【0325】

MTPGTQSPFFLLLLLLTVLTATTAPKPTTVVTGSGHASSTPGGEKETSATQRSSVPSSTEKN
 AVSMTSSVLSSHSPGSGSSTTQGGQDVTLPATEPASGSAATWGQDVTSVPVTRPALG
 STTPPAHDVTSAPDNKPAPGSTAPPAHDVTSAPDTRPAPGSTAPPAHGVTSAPDTRPA
 LGSTAPPVHNVTASGSASGSASTLVHNGTSARATTTTPASKSTPFISPHHSDTPTTLA
 SHSTKTDASSTHHSTVPPLTSSNHSTSPQLSTGVSTGVSFFFLSFHISNLRFNSSLEDPTDYY
 QELQRDISEMFLQIYKQGGFLGLSNIKFRPGSVVQTLTAFREGTINVHDTVETQFNQY
 KTEAASRYNLTISDVSVSDVPFPFSAQSGAGVPGWGIALLVLCVLAVALAIVYLIALA
 VCQCRKNYQGLDIFPVRDITYHPMSEYPTYHTHGRYVPPSSSTRSP

10

20

30

40

50

YEKVSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL

(配列番号: 106)

【0326】

ゴリラMUC 1 * PSMGFRは、ヒトに100%同一である。

【0327】

GTINVHDTVETQFNQYKTEAASRYNLTISDVSVDVPPFSAQSGA(配列番号:107)

【0328】

ゴリラNME7は、ヒトNME7アイソフォームに、376アミノ酸オーバーラップ部位で、78.2%同一である。

【0329】

NME7[ENSGGOP00000002464](ゴリラ・ゴリラ(Go_7))

【0330】

MNHSERFVFI AEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKR
TKYDNLHLEDLFI GNKVNVSFRQLVLI DYGDQYTARQLGSRKEKTLALI KPDAI SKA
GEIIEI INKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRD
DAICEWKRLLGPA NSGVARTDASESIRALFGTDGIRNAAHGPD SFASAARLLGKILM
AIRDAGFEISAMQMFNMDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQ
NNATKTFREFCGPADP

(配列番号: 108)

【0331】

マウス

【0332】

ヌクレオシド2リン酸キナーゼ7[マウスMus musculus](Mo_7)

【0333】

MKTNQSERFAFI AEWYDPNASLLRRYELLFYPTDGSVEMHDVKNRRTFL
KRTKYEDLRLEDLFI GNKVNVSFRQLVLI DYGDQYTARQLGSRKEKTLALI KPDAVS
KAGEI IEMINKSGFTITKLRRMTLTRKEAADFHVDHHSRPFYNELIQFITSGPVIAMEI
LRDDAICEWKRLLGPA NSGLSRTDAPGSI RALFGTDGVRNAAHSPDTFASAAREMEL
FFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCI IKPHAI SEGMLGKILIAIRDACFGMSAI QMFNLDRA
NVEEFYEVYKGVVSEYNDM/TELCSGPCVAIEIQQSNPTKTFREFCGPADPEI ARHLR
PETLRAIFGKTKVQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN

(配列番号: 109)

【0334】

マウスNME7は、ヒトNME7アイソフォームに、378アミノ酸オーバーラップ部位で、87.8%同一である。

【0335】

ヌクレオシド2リン酸キナーゼ7アイソフォームXI[マウス](MoXI-7)

【0336】

MHDVKNRRTFLKRTKYEDLRLEDLFI GNKVNVSFRQLVLI DYGDQYTARQLGSRKEKTLALI KPDAVSKAGEI IEMINKS
GFTITKLRRMTLTRKEAADFHVDHHSRPFYNELIQFITSGPVIAMEILRDDAICEWKRLLGPA NSGLSRTDAPGSI RALF
GTDGVRNAAHGPD TFASAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCI IKPHAI SEGMLGKILIAIRDACFGMSAI QMFNL
DRANVEEFYEVYKGVVSEYNDM/TELCSGPCVAIEIQQSNPTKTFREFCGPADPEI ARHLRPETLRAIFGKTKVQNAVHC
TDLPEDGLLEVQYFFKILDN

(配列番号: 110)

【0337】

マウスNME7は、ヒトNME7アイソフォームに、376アミノ酸オーバーラップ部位で、79.8%同一である。

【0338】

Macaca fascicularisカニクイザル

【0339】

10

20

30

40

50

無名の蛋白質物質[カニクイザル](Ma_7)(配列 不完全、NME7Aのみ)

【0340】

MSHSERFVFI AEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRTKYDSLHLEDLFI GNKVNVSFRQLVLI DYGD
QYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAGEIIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITSGPVIA
MEILRDDAICEWKRLGSPANS GVARTD AS GSIRALFGTDGIRNA AHGPDS FAS A AREMELFFPS SGGCGPA
NTAKFTNCTCCIVKPHAVSEVRRNP(配列番号: 111)

【0341】

マカカNME7は、ヒトNME7アイソフォームに、251アミノ酸オーバーラップ部位で、98.0%同
一である。

【0342】

マカカムラッタ(アカゲザル)(Mm_7)

【0343】

MSHSERFVFI AEWYDPNASLLRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKR
TKYDSLHLEDLFI GNKVNVSFRQLVLI DYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAISKAG
EIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITSGPVIA MEILRDD
AICEWKRLGSPANS G VARTD AS GSIRALFGTDGIRNA AHGPDS FAS A AREMELFFPS S
GGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFNMDRVNV
EEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNNATKTFREFCGPVDPEIARHLR
PGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN

(配列番号: 112)

【0344】

マカカNME7は、ヒトNME7アイソフォームに、376アミノ酸オーバーラップ部位で、98.4%同
一である。

【0345】

チンパンジー

【0346】

ヌクレオシド2リン酸キナーゼ7 b[パントログロダイテス、チンパンジー](CHb_7)

【0347】

MHDVKNHRTFLKRTKYDNLHLEDLFI GNKVNVSFRQLVLI DYGDQYTAR QLGSRKETLALIKPDAISKAGEIIEIINK
AGFTITKLKMMMLSRKEALDFHVDHQSRPFFNELIQFITTGPIIAMEILRDDAICEWKRLGSPANS GVARTDASESIRAL
FGTDGIRNA AHGPDSFASAAAREMELFFPSSGGCGPANTAKFTNCTCCIVKPHAVSEGLLGKILMAIRDAGFEISAMQMFN
MDRVNVEEFYEVYKGVVTEYHDMVTEMYSGPCVAMEIQQNN

ATKTFREFCGPADPEIARHSRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILD N

(配列番号: 113)

【0348】

チンパンジーNME7は、ヒトNME7アイソフォームに、376アミノ酸オーバーラップ部位で、9
0.2%同一である。

【0349】

ヒツジOvis aries

【0350】

予測: ヌクレオシド2リン酸キナーゼ7アイソフォームx2(Shx2_7)[Ovis aries、羊]

【0351】

MNHSERFVFI AEWFDPNASLFRRYELLFYPGDGSVEMHDVKNHRTFLKRT
KYEDLHLEDLFI GNKVNIFSRQLVLLDYGDQYTARQLGSRKEKTLALIKPDAVSKAG
EIEIINKAGFTITKLKMMMLSRKEATDFHIDHQSRPFLNELIQFITSGPIIAMEILRDDA
CEWKRLGSPANSGLARTDAPESIRALFGTDGINKAAHGPDSFACAAREMELFFPSSG
VCGPANTAKFTNCTTCCIVKPHAVSEGLLGKILITIRDAGFEISAMQMFNMDRINVEE
FYEVYKGVVSEYNEMVTEMYSGPCVAMEIQQTNPMTTFREFCGPADPEIARHLRPG
TLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILDN

(配列番号: 114)

10

20

30

40

50

【 0 3 5 2 】

羊NME7は、ヒトNME7アイソフォームに、377アミノ酸オーバーラップ部位で、92.6%同一である。

【 0 3 5 3 】

予測：ヌクレオシド2リン酸キナーゼ7アイソフォームX3[*Ovis aries*、羊](Shx3_7)

【 0 3 5 4 】

MHDVKNHRTFLKRTKYEDLHLEDLFI GNKVNIFSRQLVLLDYGDQYTAR
QLGSRKEKTLALIKPDAVSKAGEII EII NKAGFTLTCLKMMTL SRKEATDFHIDHQSRP
FLNELIQFITS GPIIAMEILRDDAICEWKRL LGPANSG LARTDAPESIRALFGTDG I KNA
AHGPDS FAC A AREMELFFPS S G VCGPANT AKFTNCTTCCI VKPHA VSEGLLGKILITIR
DAGFEISAMQMFNMDRINVEEFYEVYKGVVSEYNEMVTEMYSGPCVAMEIQQTNP
TMTFREFCGPADPEIARHLRPGTLRAIFGKTKIQNAVHCTDLPEDGLLEVQYFFKILD
N(配列番号：115)

10

【 0 3 5 5 】

羊NME7は、ヒトNME7アイソフォームに、377アミノ酸オーバーラップ部位で、83.6%同一である。

【 0 3 5 6 】

マウス

【 0 3 5 7 】

マウスMUC1

20

【 0 3 5 8 】

MTPGI RAPFFLLLLLLASLKGFLALPSEENSVTSSQDTSSSLASTTTPVHSSNS
DPATRPPGDSTSSPVQSSTSSPATRAPEDSTSTAVLSGTSSPATTAPVNSASSPVAHGD
TSSPATSLSKDSNSSPVVHSGTSSAATTAPVDSTSSPVVHGGTSSPATSPPGDSTSSPD
HSSTSSPATRAPEDSTSTAVLSGTSSPATTAPVDSTSSPVAHDDTSSPATSLSEDSASSP
VAHGGTSSPATSPLRDSTSSPVHSSASIQNIKTTSDLASTPDHNGTSVTTTSSALGSAT
SPDHSGTSTTTNSSSESVLATTVPYSSMPFSTTKVTSGSAIIPDHNGSSVLPTSSVLGSAT
SLVYNTSAIATTPVSNGTQPSVPSQYPVSPTMATTSSHSTIASSSYSTVPFSTFSSNSS
PQLSVGVSSFFLSFYIQNHFPNSSLEDPSNYYQELKRNISGLFLQIFNGDFLGISSIKFR
SGSVVVESTVVFREGTFASDVKSQLIQHKKEADDYNLTISEVKVNEMQFPSPAQSRP
GVPGWGIALLVLVCI LVALAIVYFLALAVCQCRRKSYGQLDIFPTQDTHPMSEYPT
YHTHGRYVPPGSTKRSPYEEVSAGNGSSSLSYTNPAVVTTSANL
(配列番号：116)

30

【 0 3 5 9 】

Macaca mulatta(アカゲザル)MUC1、部分

【 0 3 6 0 】

VTGSGHTNSTPGGEKETSATQRSSMPISTKNAVSMTSRLSSHSPVSGSSTT
QQQDVTLALATEPATGSATTLGHNVTSAPDTS AAPGSTGPPAGVVTSA PDTS AAPGS
TGPPARVVTSA PDTS AAPGSTGPPARVVTSA PDTS AAPGSTGPPARVVTSA PDTS AAP
GSTGPPARVVTSA PDTS AAPGSTGPPARVVTSA PDTS AAPGSTGPPARVVTSA PDTS AAP
APGSTGPPARVVTSA PDTS AAPGSTGPPARVVTSA PGTS AAPGSTAPPGSTAPPAHDV
TSASDSASGSASTLVHSTTSARATTTTPASKSTPFISPHHSDTPTTLASHSTKTDASSTH
HSTVPPFTSNHSTSPQLSLGVSSFFLSFHSNLQFNSSLEDPSNYYQLQRDISELFLQI
YKQGDFLGLSNIMFRPGSVVVQSTLVFREGTTNVHDVETQFNQRKTEAASRYNLTIS
DISVRDVPFPFSAQTGAGVPGWGIALLVLVCLVVLAI VYFIALAVCQCRCQKNYRQL
DIFPARDAYHPMSEYPTYHTHGRYVPAGGTNRSPYE
(配列番号：117)

40

【 0 3 6 1 】

*Macaca fascicularis*_MUCI(アイソフォームXI)

【 0 3 6 2 】

50

MTPGTQSPFFLLL I LTVLTAATVPEPTTVVTGSGHTNSTPGGEKETSATQRS
 SMP I STKNAVSMTSRLSSHSPVSGSSTTQGGQDVTLLALAMESATGSATTGLGHVVTSA
 DTSAA PGSTGPPAHVVTSA PDTSAA PGSTGPPAHVVTSA PDTSAA PGSTAPPAHVVT
 APDTSAA PGSTAPPAHDVTSASDSASGSASTLVHSTTSARATTTTPASKSTPFS I PSHHS
 DTPTTLASHSTKTDASSTHHSTVPPFTSSNHSTSPQLSLGVSSFFFLSFH I SNLQFNSSLE
 DPSTNYYQQLQRD I SELFLQ I YKQGDFLGLSN I MFRPGSVVQSTLVFREGTTNVHDV
 ETQFNQRKTEAASRYNLT I SD I SVRDVPFPFSAQTGAGVPGWG I ALLVLVCVLVMA
 I VYF I ALAVCQCRRKQNYRQLD I FPARDAYHPMSEYPTYHTHGRYAPAGGTNRSPYEE
 VSAGNGGSSLSYTNPAVAATSANL

(配列番号: 118)

10

【0363】

イノシシ *Sus scrofa* MUC1、部分

【0364】

NSSLEDPTTSYYKDLQRR I SELFLQVYKEDGLLGLFY I KFRPGSVLVEL I LAFQDSAAAHLNKTQFDR LKAEAGTYNLT I
 SEVSVIDAPFPSSAQPGSGVPGWG I ALLVLVC I LVALA I IYV I ALAVCQCRRKNCGLD I FPTRDAYHPMSEYPTYHTHGR
 RYVPPGSTKRNPYEQVSAGNGGSSLSYSNLAATSANL (配列番号: 119)

【0365】

ヒツジ *Ovis aries* MUC1(羊)

【0366】

MTPDIQAPFLSLLLLFQVLTVANVTMLTASVSTSPNSTVQVSSTQSSPTSSPTKETSWSTTTTTLLRTSSPAPTPTTSPGR
 DGASSPTSSAAPSPAASSSHDGLSLTGSPAPSPTASPGHGGTLTTTSSPAPSPTASPGHDGASTPTSSPAPSPAASPGH
 DGALSLTGSPAPSPTASPGHGGTLTTTSSPAPSPTASPGHDGASTPTSSPAPSPAASSSHDGLSLTGSPAPSPPASPGH
 GGTTLTTTSSPAPSPTASPGHGGTLTTTSSPAPSPTASPGHDGASTPTSSPAPTASHSHDGLTTLTGSPAPSPAASPGHDS
 VPPRATSPAPSPAASPGQHAASSPTSSD I SSVTTSSMSSSMVTSAHKGTSSRATTTTPVSKGTPSSVPSSETAPTAASHST
 RTAAASTSPSTALSTASHPKTSQQLSVQVSLFFLSFR I TNLQFNSSLENPQTSYYQELQRS I LDV I LQTYKQRDFLGLSE
 I KFRPGSVLVDLTAFREGTTAELVKAQFSQLEAHAANYSLT I SGVSVRDAQFPSSAPSASGVPGWG I ALLVLVCVLVAL
 A I IYL I ALVVCQCGRKKCEQLD I FPTLGAYHPMSEYSAYHTHGRFVPPGSTKRSPYEEVSAGNGGSSNLSYTNLAATSANL
 (配列番号: 120)

20

【0367】

1. 1つの態様では、本発明は、ヒトのDNAを発現するキメラ動物で若しくはヒト組織で、
 潜在的な薬剤の効能あるいは毒性のためにテストする方法を指向する。この方法では、ヒ
 トのDNAを発現する動物あるいは組織は、非ヒト-細胞若しくは複数細胞へ、ヒトのナイー
 ブ状態の幹細胞を導入することにより生成される。1つの態様では非ヒト-細胞は卵子であ
 り、別の態様では受精卵であり、更に別の態様では細胞は桑実胚、胚盤胞あるいは胚であ
 る。倫理の関係あるいは他の理由で、導入されるナイーブ状態の幹細胞は、また、非ヒト
 だが、受容細胞、桑実胚、胚盤胞あるいは胚とは異なっている種のキメラ動物を生成す
 ることは有利でありうる。上記の方法では、ナイーブ状態で幹細胞を維持するか、ナイーブ
 状態へ刺激を受けた(プライム)幹細胞を振り向ける作用薬は、NMEタンパク質、2i、5i
 又は阻害剤、化学製品あるいは核酸の他のカクテルでありうる。NMEタンパク質は、NME1
 二量体、NME7モノマー、NME7-AB、NME7-X1、NME6二量体あるいはバクテリアNMEでありう
 る。

30

40

【0368】

非ヒト-哺乳動物は、マウスかラットのようなゲッ歯動物、マカク、アカゲザル、類人猿
 、チンパンジー、コビトチンパンジーおよびその他同種のものを含む霊長類あるいはブタ
 、羊、牛などを含む家畜動物でありうる。キメラ動物は、遺伝子疾患、誘導疾患、若しく
 はヒトに由来した細胞から自然に生成される若しくは移植された癌を持ちうる。

【0369】

上記の方法では、非ヒト動物は、遺伝子組み換えでありえ、そこでは、該動物は、ヒトMU
 CI若しくはMUCI*若しくはNMEタンパク質を、生殖細胞か体細胞で発現し、そこでは生殖細
 胞と体細胞は、該動物に導入された、組み換えヒトMUCI若しくはMUCI*若しくはNME遺伝子

50

配列を含む。ヒトMUC1若しくはMUC1*若しくはNMEタンパク質を発現する遺伝子は、誘導可能なプロモータにコントロールされうる。プロモータは、分化の前若しくは後若しくは中に、動物に投与することができる作用薬に、又は非ヒト動物で自然発生のタンパク質に、誘導可能に反応しうる。二者択一で、非ヒト動物は、遺伝子組み換えでありえ、該動物はその元々の配列であるMUC1若しくはMUC1*若しくはNMEタンパク質を生殖細胞または体細胞で発現し、そこで、生殖細胞と体細胞は、該動物に導入された、組み換え天然種MUC1若しくはMUC1*若しくはNME遺伝子配列を含む。NME種は、NME7、NME7-X1、NME1、NME6あるいはバクテリアNMEでありえる。

【0370】

上記の方法では、ナイーブ状態で幹細胞を維持するか、ナイーブ状態への刺激を受けた（プライム）幹細胞を振り向ける作用薬は、NMEタンパク質、2i、5i又は阻害剤、化学製品あるいは核酸の他のカクテルでありうる。NMEタンパク質は、NME1二量体、NME7モノマー、NME7-ABおよびNME7-X1 NME6二量体あるいはバクテリアNMEでありうる。

【0371】

この方法では、作用薬は、MBD3、CHD4、BRD4あるいはJMJD6の発現を抑えてもよい。作用薬は、MBD3、CHD4、BRD4あるいはJMJD6に対して作られたsiRNAでありうる、あるいは、siRNAは、MBD3、CHD4、BRD4あるいはJMJD6の発現をアップレギュレートするタンパク質をコードするあらゆる遺伝子に対して作られうる。癌細胞または正常細胞と比較して、癌幹細胞は、CXCR4あるいはe-カドヘリン(CDH1)の増加した発現が特徴でありうる。

【0372】

別の態様では、発明は、次のものを含む、非ヒト-哺乳動物で異種移植片から組織を生成する方法を指向する：

(i) 遺伝子組み換え非ヒト-哺乳動物の生成することであって、哺乳動物は、ヒトMUC1若しくはMUC1*若しくはNMEタンパク質を、生殖細胞及び体細胞で発現し、該生殖細胞と体細胞は、該哺乳動物へ導入された、組み換えヒトMUC1若しくはMUC1*若しくはNME遺伝子配列を含み、該遺伝子配列の発現は、誘導可能で抑制可能な調節配列にコントロールされうること；

(ii) 遺伝子が、幹若しくは始原細胞の数を増加させるように発現するべく誘導される、非ヒト哺乳類へ、起源において異種である、幹若しくは始原細胞を導入すること；そして

(iii) 異種移植された幹細胞から、組織を生成するように、遺伝子発現を抑制すること。

【0373】

この方法では、ステップ(iii)において、遺伝子発現の抑制は、組織分化因子と幹細胞を接触することにより履行されうる。あるいは、ステップ(iii)においては、遺伝子発現抑制は、自然に生産された宿主の組織分化因子に応答して、該哺乳動物で当然に履行されうる。導入された細胞は、ヒトでありうる。組織は、器官でありうる。NMEタンパク質は、NME7、NME7-AB、NME7-X1、NME1、NME6あるいはバクテリアNMEでありうる。動物は、哺乳動物、げっ歯動物、霊長類あるいはブタ、羊あるいは牛の種のような飼育された動物でありうる。

【0374】

II. 他の態様では、本発明は、少なくともDNAのうちのいくらかがヒトの起源であるヒト細胞あるいは複数細胞をもつ動物を作ること指向する。そのような動物は、ヒト組織若しくはヒト様組織の生成のために、あるヒトDNAを含んでいるあるヒト細胞あるいは複数細胞を含んでいる組織、ヒト組織を育てうる。他の場合では、そのような動物は、少なくともあるヒト細胞を含む器官を育てうる。他の場合では、そのような動物は、完全にヒト細胞で構成された器官を育てうる。まだ他の場合では、宿主動物は、ヒトの四肢を育てるために、分化の後にさえ、遺伝学的にあるいは分子学的に、操作することができる。その後、四肢、神経、血管、組織、器官あるいはそれらで作られたか、それらから分泌された因子は、動物から回収され、次のものを含み、これらに限定されない多くの目的に使用されうる：

1) ヒトへの移植；2) 老化防止を含む医薬的有益性のためのヒトへの投与；そして3) 薬物検

査および疾病モデリングを含む科学実験。

【0375】

1つの態様では、本発明は、以下を含む、非ヒト動物でヒト組織を生成する方法を指向する：

- (i) ヒトナイーブ状態の幹細胞を生成し、キメラ動物が生成されるように、非ヒト動物の受精卵、桑実胚、胚盤胞あるいは胚にそれらを注入すること；
- (ii) キメラ動物から、ヒト組織、器官、細胞又はヒト組織若しくは細胞によって分泌された若しくはで作られた因子の回収をおこなうこと；そして
- (iii) ヒトへ、回収された材料を移植若しくは投与すること。

ナイーブ状態の幹細胞は、NME7、NME7-AB、NME7-X1あるいは二量体NME1を使用して生成されうる。ナイーブ幹細胞は、NME7、NME7-AB、NME7-X1あるいは二量体NME1を含んでいる培地中で、再プログラム化されたiPS細胞でありうる。あるいは、ナイーブ幹細胞は、NME7、NME7-AB、NME7-X1あるいは二量体NME1を含んでいる培地中で培養された胚性幹細胞でありうる。胚盤胞若しくは胚の非ヒト-細胞は、遺伝子組み換えされたものでありうる。また、遺伝子変異は、ある組織や器官を生成することができない宿主動物に帰着しうる。遺伝子変異は、非ヒト動物に、非ヒト-宿主動物でヒト幹若しくは始原細胞の組み込み若しくは増殖を促進する若しくは増強するヒト分子を作らせことでありうる。

さらに、ナイーブ状態で幹細胞を維持するか、ナイーブ状態への刺激を受けた（プライム）幹細胞を振り向ける作用薬は、NMEタンパク質、2i、5i、化学薬品あるいは核酸でありうる。NMEタンパク質は、NME1二量体、NME7モノマー、NME7-AB、NME6二量体あるいはバクテリアNME、あるいはNME7-X1でありえる。非ヒト動物は、げっ歯動物、マウス、ラット、ブタ、羊、非ヒト霊長類、マカク、チンパンジー、コビトチンパンジー、ゴリラあるいは任意の非ヒト-哺乳動物でありうる。本発明の1つの態様では、非ヒト動物は、ヒトNMEタンパク質へのその高い配列相同性により選ばれ、特に、ヒトNME7-ABあるいはNME7-X1あるいはヒトMUC1*細胞外領域への高い配列相同性により、選ばれうる。

ある場合には、NMEタンパク質が、単一の成長因子として無血清培地に添加されうる。

【0376】

キメラ動物を生成することができるかどうかの1つのテストは、第1の種からの幹細胞が、別の第2の種の内部細胞塊(ICM)へ組み込まれうるかどうかである。例えば、2つの異なる種が密接に関連づけられる場合、例えば2つのげっ歯動物、キメラ動物はより容易に生成されうる。本発明者等は、マウス桑実胚に、ヒトのナイーブ状態の幹細胞を注入し、そして、それらが内部細胞塊へ組み込まれたことを示した。特定の例において、ヒトNME7-ABで生成され、次に、ヒトで培養された、ヒトのナイーブ状態の幹細胞が、卵子の受精の2.5日後にマウス桑実胚に注入された。これは、内部細胞塊形態の前段階にある。48時間後に、桑実胚は分析され、そして、その分析は、キメラ動物が分化するだろうことを示す、ヒト幹細胞が内部細胞塊へ組み込まれたことを示した。

【0377】

III. 1つの態様では、本発明は、以下を含む、非ヒト動物宿主において、ヒト組織または器官を生成する方法を指向する；

- (i) ヒトのナイーブ状態の幹細胞を生成し、そして、キメラ動物が生成されるように、それらを、非ヒト動物宿主の分化している胎児、胚、胚盤胞、桑実胚、受精卵に注入すること；
- (ii) キメラ動物から、ヒト組織若しくは細胞によって分泌される若しくはにおいて作られる因子、ヒト細胞、ヒト器官、ヒト組織を回収すること；
- (iii) 回収された物質を、ヒト組織の生成をもたらす、ヒトへ移植する若しくは投与すること。

ナイーブ状態の幹細胞は、NME7、NME7-AB、NME7-X1、NME6あるいは二量体NME1を使用して生成される。ナイーブ幹細胞は、NME7、NME7-AB、NME6、NME7-X1あるいは二量体NME1を含んでいる培地中で再プログラムされたiPS細胞である。ナイーブ幹細胞は、NME7、NME7-AB、NME6、NME7-X1あるいは二量体NME1を含んでいる培地中で培養された胚性幹細胞であ

る。胚盤胞若しくは胚の非ヒト-細胞が、遺伝子組み換えされた。遺伝子変異は、ある組織若しくは器官を生成することができない宿主動物において行われる。ナープ状態で幹細胞を維持する若しくはナープ状態への刺激を受けた（プライム）幹細胞を振り向ける作用薬は、NMEタンパク質、2i、5i、化学薬品あるいは核酸である。NMEタンパク質は、NMEI二量体、NME7モノマー、NME7-AB、NME6二量体あるいはバクテリアNMEである。非ヒト動物は、げっ歯動物、ブタ、ウシ、羊あるいは霊長類である。げっ歯動物は、マウスかラットである。NMEタンパク質は、単一の成長因子として無血清培地中に存在する。非ヒト動物宿主は、生成されるべき幹細胞の種の天然配列にホモローガス配列をもつNMEタンパク質を発現する。NMEタンパク質は、NME7、NME7-AB、NME7-X1、あるいは二量体NMEI若しくはNME6である。NMEタンパク質は、NME7である。NMEタンパク質は、生成されるべき幹細胞の種の天然NMEタンパク質配列に、少なくとも45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%あるいは95%でホモローガスある。NMEタンパク質は、生成されるべき幹細胞の種の天然配列に少なくとも60%ホモローガスである。NMEタンパク質は、生成されるべき幹細胞の種の天然配列に少なくとも70%ホモローガスである。

10

20

30

40

50

【0378】

本発明の他の態様は、次のものを指向する：

天然マウスNMEタンパク質に少なくとも75%ホモローガス配列をもつNMEタンパク質、天然ラットNMEタンパク質に少なくとも75%ホモローガス配列をもつNMEタンパク質、天然ブタNMEタンパク質に少なくとも75%ホモローガス配列をもつNMEタンパク質、天然羊NMEタンパク質に少なくとも75%ホモローガス配列をもつNMEタンパク質、天然牛のNMEタンパク質に少なくとも75%ホモローガス配列をもつNMEタンパク質、天然カニクイザルNMEタンパク質に少なくとも75%ホモローガス配列をもつNMEタンパク質、天然アカゲザルのNMEタンパク質に少なくとも75%ホモローガス配列をもつNMEタンパク質、天然チンパンジーのNMEタンパク質に少なくとも75%ホモローガス配列をもつNMEタンパク質、天然コビトチンパンジーのNMEタンパク質に少なくとも75%ホモローガス配列をもつNMEタンパク質、天然ゴリラのNMEタンパク質に少なくとも75%ホモローガス配列をもつNMEタンパク質、配列がヒト以外由来であるMUC1*細胞外領域の配列を含むペプチドに結合する抗体、配列が霊長類由来であるMUC1*細胞外領域の配列を含むペプチドに結合する抗体、配列がマカク、チンパンジー、類人猿、コビトチンパンジー、あるいはゴリラ由来であるMUC1*の細胞外領域の配列を含むペプチドに結合する抗体、配列が非霊長類由来であるMUC1*の細胞外領域の配列を含むペプチドに結合する抗体、配列がげっ歯動物由来であるMUC1*の細胞外領域の配列を含むペプチドに結合する抗体、配列がマウス若しくはラット由来であるMUC1*の細胞外領域の配列を含むペプチドに結合する抗体、配列が哺乳類由来であるMUC1*の細胞外領域の配列を含むペプチドに結合する抗体、配列が牛、豚若しくは羊由来であるMUC1*の細胞外領域の配列を含むペプチドに結合する抗体。

【0379】

別の態様において、本発明は、幹細胞を生成する方法を指向し、体細胞あるいは培養幹細胞において多分化能を誘導することであって、それはNMEタンパク質及び/又は抗MUC1*抗体と該細胞を接触させる工程を含み、そこではNMEタンパク質は、ドナー細胞の配列に少なくとも75%ホモローガスであり、抗MUC1*抗体は、その配列が細胞を供与した種の天然配列に少なくとも75%ホモローガスであるMUC1*細胞外領域の配列を含むペプチドに結合する。

【0380】

別の態様では、本発明は、上記記載されたステップを行なうことを含む、生成された組織あるいは器官を必要とする人を処置する方法を指向する。

【0381】

また別の態様では、本発明は、第1の非ヒト-哺乳動物への第2の哺乳動物から細胞を導入することを含む、第1の非ヒト-哺乳動物と同じ種あるいは属に属する若しくは属さない、第2の哺乳動物から特異的に由来するDNA、分子、細胞、組織あるいは器官を含む、第1の非ヒト-哺乳動物を生成する方法を指向する。第2の哺乳動物からの細胞は、始原細胞、幹

細胞あるいはナイーブ状態の幹細胞である。ナイーブ状態の幹細胞は、NMEを含んでいる培地で細胞を培養することにより生成される。NMEは、二量体NME1、二量体NME6、NME7-X1あるいはNME7-ABである。NMEは、第2の哺乳動物に内因的な配列をもつ。第2の哺乳動物はヒトである。第1の非ヒト-哺乳動物は、げっ歯動物、飼育された哺乳動物、ブタ、ウシあるいは非ヒト霊長類である。始原細胞、幹細胞あるいはナイーブ幹細胞は、第1の非ヒト-哺乳動物の受精卵、桑実胚、胚盤胞、胚あるいは分化している胎児へ導入される。

【0382】

上記の記述された方法では、さらなるステップは次のものを含んでいる：

第1の非ヒト-哺乳動物が分化することを可能にし、第1の非ヒト-哺乳動物から、第2の哺乳類DNAを組み込んだ、分子、細胞、組織若しくは器官を回収すること；そして、疾患若しくは状態の処置若しくは予防のために、該分子、細胞、組織若しくは器官を、その必要とする第2の哺乳動物に投与すること。

10

始原細胞、幹細胞あるいはナイーブ幹細胞はiPS細胞である。iPS細胞が生成される体細胞は、疾患若しくは状態の処置若しくは予防のために、得られた分子、細胞、組織あるいは器官が、投与される、第2の哺乳動物由来である。

【0383】

上記の記述された方法では、さらなるステップは次のものを含んでいる：

器官の分化に関与する器官の分化期間および内在性遺伝子の決定；

そして、第1の非ヒト-哺乳動物において、器官の分化期間中に内在性遺伝子をノックアウト若しくはノックダウンすることであって、そこで該器官は第2の哺乳動物由来の細胞から生産させられる。

20

【0384】

上記の方法では、第1の非ヒト-哺乳動物は、70%、75%、80%、85%、90%あるいは95%以上であるグローバルな配列同一性を持つ、あるいは45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%あるいは95%以上であるNME配列同一性を持つ、第2の哺乳動物に近い。

【0385】

上記の記述された方法では、さらなるステップは次のものを含んでいる：

器官の分化に関与する器官の分化期間および内在性遺伝子を決定すること；

そして、第2の哺乳類NME7-ABあるいはNME1が、第2の哺乳動物細胞が非哺乳類のNME7-ABあるいはNME1に反応してタイムリーに拡張するように、誘導可能若しくは抑制することができるプロモータから発現されうるように、第1の非ヒト-哺乳動物の胚あるいは分化胎児の細胞、胚盤胞の細胞、桑実胚の細胞、受精卵を、遺伝学的に、変更すること。

30

さらなるステップは、所望の器官若しくは組織が、通常分化する位置で、分化の後期段階にある胚中に、第2の哺乳類幹細胞を注入することを含む。

さらなるステップは、その位置で、第1の非ヒト-哺乳類あるいは第2の哺乳類NME7若しくはNME1のいずれかの発現を引き起こすことにより、哺乳類の幹細胞を拡張することを含む。

さらなるステップは、その位置で、第1の非ヒト-哺乳類あるいは第2の哺乳類NME1のいずれかの発現を引き起こすことにより、哺乳類の幹細胞を拡張することを含んでいる。第2の哺乳類プロモータは内因的な第1の非ヒト-哺乳類タンパク質にリンクされ、そして、所望のとき及び位置で発現され、その後、所望の組織の分化を指図する作用薬を導入する。内因的な第1の非ヒト-哺乳類タンパク質は、NME1あるいはNME7、好適にはNME1、の発現を引き起こすタンパク質である。

40

【0386】

別の態様では、本発明は、次のものを含む、ある第2の哺乳類DNAあるいはある第2の哺乳類組織を発現する、キメラ動物において、潜在的な薬剤の効能若しくは毒性のためのテストする方法を指向する：

(i) 第1の非ヒト-哺乳動物中への第2の哺乳動物からの細胞導入することを含む、第1の非ヒト哺乳類と同じ種あるいは属に属する若しくは属さない第2の哺乳類に特異的に由来するDNA、分子、細胞、組織あるいは器官を含む第1の非ヒト哺乳類を作り出すこと；そして

50

、
(ii) 第2の哺乳動物に由来する組織若しくは器官に対する影響の検討のために、第1の非ヒト-哺乳動物へ被験薬を投与すること。

NMEは、第2の哺乳動物から由来する細胞の増殖を増強する第1の非ヒト-哺乳動物で発現される。

【0387】

別の態様では、本発明は、次のものを含む、ある第2の哺乳動物DNAあるいはある第2の哺乳動物組織を発現する、キメラ動物において、潜在的な薬剤を見出す方法を指向する：

(i) 第1の非ヒト-哺乳動物中への第2の哺乳動物からの細胞導入することを含む、第1の非ヒト哺乳類と同じ種あるいは属に属する若しくは属さない第2の哺乳類に特異的に由来するDNA、分子、細胞、組織あるいは器官を含む第1の非ヒト哺乳類を作り出すこと；そして

、
(ii) 第2の哺乳動物に由来する組織若しくは器官に対する影響の検討のために、第1の非ヒト-哺乳動物へ化合物を投与すること。

そこでは、効果的な結果は、潜在的な薬の存在を示す。

NMEは、第2の哺乳動物に由来する細胞の増殖を増強する第1の非ヒト-哺乳動物で発現される。

【0388】

幹細胞増殖および誘導におけるMUC1*/NME

【0389】

本発明者等は、ヒト幹細胞が、有力な成長因子レセプターであるMUC1*を過剰発現することを見出した。二量体型にある、NME1とも呼ばれるMUC1*の配位子(NM23-H1)は、フィーダー細胞のための必要な、調整培地あるいは他の成長因子あるいはサイトカインなしで、ヒト幹細胞を多能性の状態で成長させるのに単独で十分である(Mahanta Sら、2008; Hikita Sら、2008)。本発明者等は、NME1二量体がMUC1*成長因子レセプターのリガンドであり、そこではMUC1*は、ほとんどの細胞外領域が細胞表面から開裂され流された後に残る膜貫通の部分であることを以前に示した。細胞外領域の残りの部分は、PSMGFR配列から本質的に構成される。NME1二量体は、MUC1*レセプタに、結合しそして二量化させる。合成PSMGFRペプチドを使用する、NME-MUC1*相互作用の拮抗的阻害は、多能性幹細胞の分化を誘導し、それは、多能性幹細胞増殖は、NME1二量体およびMUC1*成長因子レセプター間の相互作用によって仲介されることを示す。ヒト幹細胞はNME1を分泌し、そこでは、二量体化の後、MUC1*レセプタに結合し、ヒト幹細胞の増殖および多分化能を刺激する。PSMGFRペプチドの添加、あるいは抗MUC1*(抗PSMGFR)抗体のFabの添加による、該相互作用の拮抗的阻害は、インビボで、細胞死および分化を誘導した(Hikitaら、2008)。

【0390】

本発明者等は、FGFあるいは他の成長因子がない状態で、ヒト幹細胞を成長させ、その分化を阻害する、新規NMEファミリーである、NME7を見出した。本発明者等は、NME7-ABあるいはrhMNE7-ABと呼ぶ、トランケート(切断型)、組み換えヒトNME7を作った。それは、N末端DM10領域が欠けていて、ほぼ33kDaの分子量をもつ。幹細胞から分泌される自然発生のNME7分解産物は、本質的に、私たちの見出した組み換えNME7-ABと同じであるように見えた。NME7-X1と呼ばれるNME7の選択的スプライシング変種が理論付けされた。本発明者等は、NME7-X1が、自然界において存在し、ヒト幹細胞によっても分泌され、30kDaであることを、PCRによって示した。さらに、本発明者等は、ヒト組み換えNME7-X1をも作った。さらに、本発明者等は、ヒトNME1に対して高い配列相同性を持っているいくつかのバクテリアNME1タンパク質が、ヒトNME1と同じ挙動をとることを示した。それらは、MUC1*細胞外領域に結合し二量化させ、そして、多分化能を引き起こす。私たちが示した、ヒト幹細胞増殖をサポートし、多分化能を引き起こす、バクテリアNME1タンパク質の一つは、HSP593として知られる、Halomonas Sp593である。繊維芽細胞は、幹細胞ではなく体細胞である。しかしながら、本発明者等は、NME7-AB、NME7-X1二量体、NME1二量体およびHSP593二量体が、体細胞を、より少ない成熟した状態に戻すことを誘導することを見出した。

図1は、NME7-AB、NME1二量体あるいはHSP593 NME1二量体でのヒト線維芽細胞を単に培養すると、幹細胞マーカーOCT4およびNANOGのアップレギュレーションを引き起こすことを示す。図2は、これらのNMEタンパク質が、MBD3とCHD4の発現を抑制することをしめす；これらの遺伝子の抑制は、以前に、ヒト幹細胞をよりナイーブ状態に戻らせることが示された(RaisYら、2013年)。BRD4は、NME7の発現を抑制すると示され、また、そのコファクターJMJD6は、NME1をアップレギュレートする。図3のPCRグラフは、NME7-ABあるいはNME1二量体が、多分化能遺伝子のアップレギュレートにより、多分化能を誘導し、そして、他の者が報告した、これらの抑制はナイーブ状態の幹細胞で、抑制されることを示す。図4Aと4Bは、追加の唯一の成長因子としてのNME1二量体でのヒト幹細胞の培養は、完全に、多能性幹細胞増殖をサポートすることを示す。図5A~5Cは、追加の唯一の成長因子としてNME7-ABモノマーでのヒト幹細胞の培養は、完全に、多能性幹細胞増殖をサポートすることを示す。NME1は、MUC1*成長因子レセプターに結合し、二量化させるために、二量体でなければならないが、一方、モノマーNME7-ABおよびNME7-X1は、MUC1*のための2つの結合部位がある。図6Aおよび6Bは、サンドイッチELISA分析で、NME7-ABが、ここでPSMGFRペプチド(JHK SEQ ID?)と呼ばれる、2つのMUC1*細胞外領域ペプチドに同時に結合できることを示す。図2および図7に示されるように、BRD4およびコファクターJMJD6は、ナイーブ状態の幹細胞中で抑制される。図8~11は、NME1二量体およびNME7-ABは、ヒト線維芽細胞を、図12~13に示される繊維芽細胞形態と問題なく異なった形態であって、幹細胞形態に似ている、それらの劇的な変化を見ることができる、より少ない成熟であって、幹様状態への戻りを引き起こすことを示す。

10

20

【0391】

本発明者等は、まさに最も初期のヒト幹細胞では、NME7-ABおよびNME7-X1が分泌され、MUC1*成長因子レセプターの細胞外領域へそれらを結合させ、及びMUC1*成長因子レセプターの細胞外領域を二量化させることを可能にする、と理論付けた。したがって、NME7-ABは、最初のナイーブ状態を安定化させる。後期段階では、BRD4がNME7を抑制し、また、そのコファクターJMJD6は、MUC1*成長因子レセプターに結合し二量化させるのに、二量体であらねばならない、NME1の発現をアップレギュレートする。したがって、NME1二量体は、第2のナイーブ様状態を安定化させる。

分化途上の桑実胚若しくは胚盤胞の幹細胞は、増殖するので、分泌されるNME1の量は増加し、2量体は、6量体になる。6量体のNME1は、MUC1*に結合せず、分化を引き起こす(Smaghgeら、2013)。

30

図14は、幹細胞が、どのように自己複製を制限するかのメカニズムモデルを示す。以前において、NME7は、精巢中で発現されることが唯一報告された。本発明者等は、ヒトの桑実胚の初期の細胞およびヒトの胚盤胞の内部細胞塊が、NME7を発現することを見出した。

図15Aは、3日目のヒトの桑実胚の全ての細胞が、NME7陽性に染めたことを示す(実施例セクション#61においてどの抗体かをいう)。図15Bは、5日目までに、桑実胚が胚盤胞へ分化しており、そして、分化のこの段階では、NME7陽性細胞が、ナイーブ状態であると知られている、内部細胞塊に限定されることを示す。

本発明者等は、ナイーブ状態のヒト幹細胞が、N末端DM10領域を両方欠けている、NME7の2つの短縮型を発現し分泌することを見出した。これらの短縮NME7種は、MUC1*成長因子レセプターの細胞外領域へ結合する。私たちがNME7-ABと呼ぶ1つのNME7型は、~33kDaの明白な分子量で走るNME7種を生産するために、翻訳後分割を受けた。他の短縮型は、互換的な分割アイソフォームで、NME7-X1と呼ばれ、~30 kDaである。これは、~42kDaの計算された分子量をもち、細胞質に制限されるように現れる、全長NME7と対照的である。

40

NME1二量体、NME6二量体、NME7-ABおよびNME7-X1は、ヒト幹細胞の成長因子として機能する。それらは、MUC1*成長因子レセプターに結合し二量化させることにより、ナイーブ状態の増殖、多分化能および誘導を促進する。しかしながら、NME7-ABおよびNME7-X1は、モノマーでその機能を発揮する。それらは、MUC1*の細胞外領域のための2つの結合部位があるからである。

図16A-16Bは、ヒトのナイーブ状態が、多能性幹(iPS)細胞を誘導し、胚幹(ES)細胞が溶

50

解され、また、MUC1(Ab5)の細胞質後尾に対する抗体が、MUC1に結合する種を共免疫沈殿させるために使用された、共免疫沈降実験からのウェスタンブロット・ゲル剤の写真を示す。その後、免疫沈殿はウェスタンブロットによって分析された。図16Aは、抗NME7抗体でプローブされ、MUC1へ結合した、一つは30 kDaの他は33 kDaの分子量をもつ、2つのNME7種を示す、ウェスタンブロットの写真を示す。一方、クルード細胞溶解産物中の全長NME7は、42 kDaの分子量がある。図16Bは、ウェスタンブロットの写真を示し、そこでは図16Aのゲルは、剥がされ、抗MUC1*細胞外領域抗体で再プローブされ、グリコシレーションにより、17-25 kDaの分子量で展開する、MUC1*と呼ばれる、MUC1の開裂型に、NME7-ABあるいはNME7-X1が結合することを示している。

【0392】

図17は、最も初期のナイーブ状態の幹細胞を育てる発明性のある方法を描いた。NME7-ABあるいはNME7-X1は、1nM-60nM、好適には2nM-32nM、更に好適には2nM-10nM、最も好適には4nMの低ナノモラー濃度で、無血清培地に添加された。フィーダー細胞、細胞間マトリックス・タンパク質、および成長因子と信号を伝達する他の生体分子を含む混合物については、ナイーブ状態を引き起こすか安定させる場合それらの使用を回避することは望ましい。MN-C3、MN-C8、MN-C3若しくはMN-C8のヒト化バージョン若しくは断片のような、抗MUC1*抗体、又は幹細胞を表面に付着させる表面コーティング用NMEタンパク質の使用が、好適である。あるいは、細胞は、粘着層のために必要とするものの要素の回避のため、懸濁によって培養されうる。

分化を引き起こすことが望まれる場合、PSMGFRペプチドの大部分あるいはすべてを含むペプチドが加えられる。MUC1*成長因子レセプターの細胞外領域のすべて若しくは大部分の配列をもつペプチドを加えることは、リガンドシンク（溜）として働き、NME成長因子のすべて結合し、その結果、分化が同期されより完全化される。このペプチドの添加は、OCT4陽性細胞の全てが、奇形腫形成のリスクを最小化するか除去し、分化に誘導されることも保証する。

これらの方法は、研究、創薬、治療使用のために幹細胞を生産するのに使われ、又は、あるヒトDNA、分子、細胞、組織あるいは器官を持つ非ヒト動物の生成のために、受精卵、桑実胚、胚盤胞、胚あるいは胎児へ移植することができる。そして、あるヒトDNAを少なくとも含んでいるような分子、細胞、組織あるいは器官は、研究、創薬、薬物検査に使用することができ、又疾患若しくは状態の治療若しくは予防のためにヒトに投与されうる。

非ヒト-宿主へのヒト幹細胞の注入のためには、NME7-AB若しくはNME7-X1は、ヒトの配列あるいは天然ヒト配列に対して少なくとも80%同一の配列を持っているべきである。しかしながら、非ヒト-種間でのキメラを作成することは望ましい。例えば、非ヒト霊長類-非霊長類キメラは、倫理問題を回避するために作成することができうる。その場合、NMEタンパク質の配列は、ヒトあるいは高い配列相同性のために非ヒト霊長類の配列でありえる。しかしながら、下位哺乳動物のキメラを生成することが望まれる場合、NME7配列は、その幹細胞が宿主桑実胚か胚盤胞に挿入されることになっている哺乳動物のそれであるべきである。あるいは、宿主動物のあるエリアでのみ若しくは低率で、ヒト細胞と組織を発現することが望ましい。これらの場合において、最も初期のナイーブ状態ではなく後期ナイーブ状態である幹細胞を注入することは望ましい。これらの場合において、NME1二量体は、上に記述された方法で、幹細胞を培養するために、使用されうる。

【0393】

実際にキメラ動物の生成のために、受精卵、桑実胚あるいは胚盤胞に注入されるべき幹細胞は、ナイーブ状態であらねばならない。図18は、RNA-SEQ実験から生成されたヒートマップを示す。FGFで得られ育てられ、その結果それらはプライムド（刺激された）状態にある、ヒト胚性幹細胞は、添加された成長因子がNME7-ABあるいはNME1二量体のいずれかである、上述の培養系に移された。

遺伝子発現のヒートマップは、FGF成長プライムド（刺激された）状態細胞が、プライムド（刺激された）細胞から異なりそしてナイーブであることを示す、NME7-AB成長細胞あ

10

20

30

40

50

るいはNME1成長細胞のそれとは、完全に異なる遺伝子発現兆候を持つことを示す。NME7とNME1成長細胞が、ナীব状態であるという別の兆候は、NME7-AB、NME1二量体あるいはNME7-X1でのiPS細胞生成が、FGFベース培地でのiPS生成よりはるかに効率的であるということである。

図19A-19Cは、FGFベース培地で、誘導多能性幹細胞(iPS細胞)になるための体細胞再プログラム化は、非常に低効率であることを示す。幹細胞コロニーは、アルカリフォスファターゼで染色されることにより視覚化される。マウス胚繊維芽細胞(MEF)と共に使用されるFGFベース培地は、この初期段階では比較的効率的に見えたが、採取されたコロニーのわずか約15%が、真の幹細胞株に進展する(図19A)。

さらに、マウスフィーダー細胞層は、ヒトにおける、細胞あるいはそれらの後代の最終的な治療使用のために困難な方法へと、非ヒト-非定量化及び非ヒト種を導く。mTeSRは、Matrigelに細胞を植え付けることによりフィーダーなしに使用されうる、FGFベースの培地であるが、しかし、この方法は、図19Bの希薄で小さなコロニーで見られるように非常に非能率的である。対照的に、抗MUC1*抗体の層上におけるNME7-ABでのiPS再プログラム化は、FGFベースの方法より速く発生し、速く成長する豊富な幹細胞コロニーにおいて高度に効率的である(図19C)。さらに、NME7生成iPSコロニーから取られたコロニーの86%以上は、次に真のナীব状態のiPS幹細胞株になる。ナীব状態である幹細胞の別の指標は、女性由来細胞の第2X染色体がなお活発かどうかである。幹細胞がする最も初期の分化決定のうちの1つは、どのX染色体が、雌性細胞において、ターンオフされるかである。1つのX染色体の発現をターンオフするために、ヒストン3のリジン27は、トリメチル化される。

図20Aは、FGF培地において、派生しそして成長した女性由来胚性幹細胞を示す。各細胞の核における焦点の赤いドットは、刺激を受けた(プライム)状態の幹細胞では、第2X染色体が、XaXiと呼ばれる、ターンオフされたことを示す、ヒストン3のトリメチル化リジン27に結合する蛍光抗体である。図20Bは、NME7-ABでのこれらの同じ細胞を培養した後、該第2Xが、焦点の赤いドットの消失を結果的にもたらして、再活性化される(XaXa)ことを示す。同じ結果は、NME1二量体での培養後に得られた。

幹細胞がナীব状態かどうかのより論争的になっている手段は、それらが、別の種の桑実胚か胚盤胞の内部細胞塊へ取り込まれることができるかどうかである。図21A-21Dは、マウス胚盤胞の内部細胞塊へ取り込まれている我らヒトNME7-AB幹細胞の蛍光画像を示す。

しかし、ナীব状態の幹細胞の別の指標は、それらが自発的な分化なしで成長するかどうか、及びそれらが刺激を受けた(プライム)状態の細胞より速く成長するかどうかである。図20A-20Bは、ヒトNME7-AB成長幹細胞が、刺激を受けた(プライム)幹細胞よりはるかに速い成長速度を持っていることを示す。

それらは4日で、10-20倍の拡張をおこし、それは刺激を受けた(プライム)状態の細胞より2~3倍速い。

【0394】

NMEタンパク質は、細胞を、幹様状態若しくはナীব状態に戻することを誘導すると同時に、胚およびiPS細胞の増殖および多分化能を促進する。好ましい態様では、NMEファミリータンパク質は、NME1又はNME1に対して30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%若しくは97%の配列同一性以上を持っているNMEタンパク質であって、そこでは該タンパク質は二量体である。もっと好ましい態様では、NMEファミリータンパク質は、NME7又はNME7領域A若しくはBの少なくとも1つに対して30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%若しくは97%の配列同一性以上を持っておりそしてMUC1*成長因子レセプターを二量化させることができるNMEタンパク質である。

【0395】

ここで、本発明者等は、二量体型NME1、NME7-ABあるいはNME7-X1が、次のことが可能であることを報告する：

10

20

30

40

50

- a) 分化を阻害している間、全面的にヒトES若しくはiPS増殖および多分化能をサポートする；
b) 体細胞を、より幹様若しくはよりナイーブ様の状態へ振り向けること；そして、
c) 他の種の胚盤胞へ、組み込むことができたナイーブ状態のヒト幹細胞を生産すること。

NME7-ABナイーブヒト幹細胞は、2.5日で、マウス桑実胚に注入された。図22A-22Dは、48時間後、桑実胚が、胚盤胞へ分化した時、ヒト細胞(黄色)は、マウスナイーブ細胞が存在する、内部細胞塊(サークル)内にあることを示す。内部細胞塊へのそのような組み込みは、キメラ動物の形成に必要である。図23A-23Jおよび図24A-24Jは、2.5日で、ヒトNME7ナイーブ細胞が注入された、他のマウス胚盤胞の共焦点図を示し、さらに、内部細胞塊への組み込みを示す。図25A-25Dおよび図26A-26Hは、それが同じ条件下で、刺激を受けた(ブライム)状態の、FGF成長ヒト幹細胞は、マウス胚盤胞の内部細胞塊中に組み込まれないことを示す。図27A-27F、図28A-26J、図29A-29J、及び図30A-30Jは、マウス桑実胚へ、2.5日に、注入されたヒトNME7-AB成長ナイーブ幹細胞は、4.5日で48時間後、胚盤胞の内部細胞塊に集中されて見つかることを示す。

10

【0396】

本発明者等は、二量体を安定させるS120G突然変異を担持する、組み換えヒトNME1、二量体を作成した。本発明者等は、ヒトNME1二量体は、MUC1*レセプターの細胞外領域のPSMGFR部分に結合することを以前報告した(Smaggheら、2013)。私たちは、さらに、多能性幹細胞上のMUC1*レセプターの細胞外領域のPSMGFR部分に、モノマーとして、結合し、それを二量化させる、組み換えヒトNME7-ABおよびNME7-X1を作った。それは増殖と多分化能を刺激し、最も初期のナイーブ状態に戻すことを幹細胞に引き起こす。

20

【0397】

NME：普遍的な幹細胞成長因子

【0398】

NME7および短縮型は、多くの種を通じて、普遍的な幹細胞および多分化能成長因子である。例えば、本発明者等は、ヒトNME7-ABを使用して、胚とiPS幹細胞を含むアカゲザルとカニクイザルの幹細胞を増殖することができた。さらに、本発明者等は、表面附着を促進するために、抗MUC1*抗体、MN-C3、を使用して、フィーダー細胞がない状態で、山中またはトムソンの再プログラム化因子と共にNME7-ABを使用して、アカゲザルとカニクイザルで、iPS細胞の生成に成功した。その両マカクNME7の配列は、ヒトNME7に98%同一であり、およびその標的成長因子レセプター、MUC1*細胞外領域は、ヒトPSMGFRと90%同一である。図31A-31Fは、山中多分化能因子、OCT4、SOX2、NANOGおよびc-Mycの形質導入なしで、6日間、NME7-ABでの培養において、カニクイザルからの繊維芽細胞を含むコントロール・プレートの写真を図に表わす。図32A-32C、図33A-33F、及び図34A-34Fは、山中因子およびNME7-ABによって再プログラム化されたカニクイザルからの繊維芽細胞を示す。6日後、出現iPSコロニーは、抗MUC1*抗体表面へ移され、そこで、約14-17日まで拡大し続け、このクローンは、採取され、拡大する。私たちの知っている限りでは、これは、マウスかヒトのフィーダー細胞がない状態での、非ヒト霊長類-iPS細胞の生成に科学者が成功した初めてのことである。

30

研究者は、非ヒト霊長類-幹細胞を培養することに七難八苦を経験する。それらは自然に分化し、FGFベースの培地中でよく成長しない。

40

図35A-35D、図36A-36D、図37A-37Bおよび図38A-38Hで示されるように、NME7-AB培地へ、非ヒト霊長類-細胞を移動させた時、本発明者等は、これらの問題のすべてを克服した。MN-C3抗体表面若しくはMEFs上で、無血清、無FGF、NME7-AB培地での、山中因子あるいはトムソン因子の形質導入によるアカゲザルiPS細胞の生成は、図39A-39C、図40A-40C、図41A-41D、図42A-42B、図43A-43E、図44A-44F、図45A-45H、図46A-46H、図47A-47Gおよび図48A-48Dにおいて様々な段階で示される。

【0399】

本発明の別の態様では、胚の幹細胞あるいはiPS幹細胞は、NMEタンパク質を含んでいる培地を使用して、受精卵又は胚又は再プログラム化細胞を培養することにより、他の非ヒト

50

種で、増殖されるか、維持されるか、あるいは生成される。NMEタンパク質は、NME1二量体若しくはNME6二量体、NME7、NME7-ABあるいはNME7-X1でありうる。ある場合には、NMEタンパク質の配列は、ヒト配列でありうる。他の場合では、NMEタンパク質の配列は、再プログラムのための細胞、胚あるいは幹細胞が由来する、非ヒト-種の配列である。非ヒト-種におけるNME7の配列が、ヒトNME7のそれから異なりすぎる場合、よりよい結果は、非ヒト-標的種に対してより高い配列同一性を持っている配列をもつNMEタンパク質又はその種の天然NMEタンパク質の配列をもつNMEタンパク質を使用して得られる。発明の1つの態様では、NMEタンパク質は、NME1若しくはNME6二量体、NME7、NME7-ABあるいはNME7-X1である。特定のNMEタンパク質が、多分化能成長因子として機能する種を決定する方法は、NMEタンパク質が、標的種の配列をもつPSMGFRペプチドに結合するかどうかをテストすることである。もし、NMEタンパク質が、標的種のPSMGFRペプチドに結合すれば、そのNMEタンパク質は、幹細胞成長因子若しくは多分化能因子として機能する。

10

【0400】

本発明の1つの態様では、非ヒト-幹細胞は、非ヒト-種のNMEタンパク質を含んでいる培地中で、細胞を培養することにより増殖若しくは維持される。本発明の別の態様では、非ヒト-幹細胞は、非ヒト-種幹細胞のそれに少なくとも40%類似である配列をもつNMEタンパク質を含んでいる培地中で、細胞を培養することにより、増殖若しくは維持される。本発明の別の態様では、非ヒト-幹細胞は、PSMGFRペプチドとも呼ばれる、その種のMUC1*細胞外領域の配列をもつペプチドに結合することができるNMEタンパク質を含んでいる培地中で、細胞を培養することにより増殖若しくは維持される。本発明の別の態様では、非ヒト-幹細胞は、ヒト配列NMEタンパク質を含んでいる培地中で細胞を培養することにより増殖若しくは維持される。NMEタンパク質は、NME1若しくはNME6二量体、NME7、NME7-ABあるいはNME7-X1でありうる。

20

【0401】

本発明の別の態様では、非ヒト幹細胞は、非ヒト種のNMEタンパク質を含む培地の存在下で、OCT4、Sox2、Klf4、c-Myc、Nanog、Lin28を含む遺伝子産物あるいは遺伝子の組み合わせの導入のような再プログラム化技術を使用して、生成される。本発明の別の態様では、非ヒト-幹細胞は、非ヒト種幹細胞のそれに少なくとも40%類似の配列をもつNMEタンパク質を含んでいる培地中での再プログラム化技術を使用して生成される。本発明の別の態様では、非ヒト-幹細胞は、PSMGFRペプチドとも呼ばれる、その種のMUC1*細胞外領域の配列をもつペプチドに結合できるNMEタンパク質を含んでいる培地での再プログラム化技術を使用して生成される。本発明の別の態様では、非ヒト-幹細胞は、ヒト配列NMEタンパク質を含んでいる培地中での再プログラム化技術を使用して生成される。NMEタンパク質は、NME1若しくはNME6の二量体、NME7、NME7-ABあるいはNME7-X1でありうる。

30

【0402】

本発明の別の態様では、非ヒト-胚性幹細胞は、その非ヒト種のNMEタンパク質を含んでいる培地中で、受精卵あるいは胚を培養することにより生成される。本発明の別の態様では、非ヒト-胚性幹細胞は、非ヒト種幹細胞のそれに少なくとも40%類似の配列をもつNMEタンパク質を含んでいる培地中で、受精卵若しくは胚を培養することにより生成される。本発明の別の態様では、非ヒト-胚性幹細胞は、PSMGFRペプチドとも呼ばれる、その種のMUC1*細胞外領域の配列をもつペプチドに結合できるNMEタンパク質を含んでいる培地での受精卵あるいは胚の培養により生成される。本発明の別の態様では、非ヒト-胚性幹細胞は、ヒト配列NMEタンパク質を含んでいる培地中で、受精卵あるいは胚を培養することにより生成される。NMEタンパク質は、NME1二量体若しくはNME6二量体、NME7、NME7-ABあるいはNME7-X1でありうる。

40

【0403】

本発明の別の態様中で、そのNMEタンパク質あるいはMUC1*タンパク質がヒトに対して低い配列同一性を持っている、非ヒト種の分化途上の胚盤胞若しくは胚へヒト幹細胞を導入することが望まれる場合、非ヒト種はヒト化される。その、非ヒト種の幹細胞、あるいは受精卵若しくは未受精卵は、その発現が誘導若しくは抑制できる、ヒトNMEタンパク質及び/

50

又はヒトMUC1*タンパク質の発現を可能にするベクターで形質変換される。

【0404】

キメラ動物で候補薬剤のテスト

【0405】

マウスおよび他の動物で、制癌剤をテストするための現行の手技は、動物にヒト癌細胞を移植し、移植後、直ちにあるいは数日後あるいは数週間後に、被験薬を動物に注入する。しかしながら、このアプローチは、宿主が、ヒト癌細胞が成長する若しくは植えつけるのに必要がある成長因子を自然には生産しないので、基本的に欠陥がある。さらに、宿主が、成長因子若しくは成長因子の同じレベル若しくは成長因子のヒト型を生産しないので、動物でテストされている薬は、それらがヒトでのおこるのと同じ効果をもたらさない。マウスNME7は、ヒトNME7にわずか84%類似で、成人では発現されない。したがって、抗癌剤試験のための現在の異種移植片方法は、それらの薬に対するヒトの反応を多くは予知するものではない。この問題は、ヒト腫瘍細胞が腫瘍を育てるためにそれらの同系統の成長因子を持つように、マウスへ、NME1二量体あるいはNME7を導入することにより、解決することができる。NME1二量体あるいはNME7は、様々な方法によって動物へ導入することができる。移植に先立って、それは、腫瘍細胞と混合される、あるいは、それは、腫瘍担持する動物に注入することができる。

10

【0406】

好ましい態様では、ヒトNME7あるいはその断片を発現するトランスジェニック動物が生成される。動物が、自然に分化できるように、NME7は誘導可能なプロモータに支配される。しかし、NME7あるいはNME7断片の発現は、ヒト腫瘍の移植中、あるいは薬効あるいは毒性の評価のために、稼動されうる。好ましい態様では、試験動物に導入されるNME7種は、NME7-ABである。

20

【0407】

代替で、動物が、ヒトMUC1、MUC1*、NME7及び/又はNME1あるいはNME2、二量体形成を指向するNME1若しくはNME2の変種、二量体を形成する単一鎖構築物若しくは他の変種、を発現する、トランスジェニック動物は作ることができる。NMEタンパク質およびMUC1が、ヒトにおいてフィードバックループの部分であり、そこでは一つの発現は他方のアップレギュレーションを引き起こす場合がある、ので、ヒトNMEタンパク質、MUC1あるいは開裂型MUC1*を発現するトランスジェニック動物を生成することは有利になりえる。天然の若しくは設計されたNME種は、マウスのような、動物へ、種々の方法で導入することができ、それは、トランスジェニック動物の生成、天然の若しくは遺伝子組み換えNMEタンパク質あるいはNMEタンパク質の変種の動物への注入を含み、そこでは、NME1、NME6、およびNME7タンパク質若しくは変種が好適で、及び、NME1、NME6およびNME7タンパク質又はMUC1*、特にPSMGFRペプチド、を二量化させることができる変種が、特に好適である。好ましい態様では、NME種は、33kDaのおおよその分子量をもつNME7の短縮型である。もっと好ましい態様では、NME7種は、そのN末端のDM10領域が欠けている。さらにもっと好適な態様では、NME7種はヒトである。

30

【0408】

NMEファミリータンパク質、特にNME1、NME6およびNME7は、ヒト癌で発現され、それはヒト癌の増殖および転移を促進する成長因子として機能する。したがって、ヒトNMEタンパク質あるいはNMEタンパク質の活性型は、ヒト癌の適切な増殖、進化および評価のために、及び化合物、生物学的製剤あるいは薬に対するそれらの反応の決定のために、機能する。

40

【0409】

ヒト化動物

【0410】

いくつかの実例では、NMEタンパク質の発現のタイミングをコントロールすることができることは望ましい。これらの場合では、タンパク質発現は、調整可能なプロモータのような誘導可能な遺伝子要素にリンクされうる。好ましい態様では、ヒト幹細胞あるいは癌細胞

50

胞の移植を増加させるために動物へ導入されるNMEタンパク質は、ヒトNME7である。もっと好適な態様では、NME7タンパク質は~33kDaである断片である。さらにもっと好適な態様では、NMEタンパク質はヒトNME7-ABである。

【0411】

他のものでは、「2i」(Silva Jら、2008)および「5i」(TheunissenTWら、2014)と呼ばれる阻害剤が、ナープ様状態に幹細胞を維持することができると報告した。「2i」阻害剤あるいは「5i」阻害剤での治療は、幹細胞をよりナープ状態に戻させた。2iは、MAPキナーゼ経路の阻害剤、およびPD0325901とCHIR99021のようなGSK3阻害剤を指す。しかしながら、生化学的阻害剤の使用に依存するこれらおよび他の方法は、他の種の内部細胞塊へ導入することができるように、ナープであることの基準を満たしていないし、また、さらに、彼らは、それらが激しい自発的な分化あるいは異常な核型あるいはその両方なしには、10以上の継代のために、幹細胞を増殖することができないと報告する。

10

【0412】

ナープ状態。

【0413】

他の作用薬は、ナープ状態に幹細胞を維持するかあるいはナープ状態への刺激を受けた(プライム)幹細胞を振り向けるということが報告された。染色質再配置因子MBD3及びCHD4は、多分化能の誘導をブロックすることが最近報告された(Rais Y et al, 2013)。例えば、染色質再配置因子MBD3及びCHD4のsiRNA抑制は、ナープ状態への、ヒトの刺激を受けた(プライム)幹細胞を振り向ける方法の重要な要素であることが示された。報告によると、転写因子BRD4およびコファクターJMJD6は、NME7を抑制し、NME1をアップレギュレートする(Lui Wら、2013年)。本発明者等は、それらが後期ステージのプライム化幹細胞においてあったよりナープ幹細胞においてより低いレベルでこれらの因子が発現されることを見出した。本発明者等は、これらの4つの遺伝子、MBD3、CHD4、BRD4およびJMJD6は、NME1二量体、NME7あるいはNME7-ABあるいはNME7-X1で、培養された癌細胞において、自然に抑制される、ことを見出した(図3)。

20

【0414】

本発明者等は、NM23-H1と呼ばれるヒトNME1二量体、バクテリアNME1、NME6、NME7-X1およびNME7-ABが、幹細胞ドナーがヒトならば活性状態で両X染色体を持つグローバルな遺伝子分析によって及び宿主動物で奇形腫を形成する能力を持つことによって、証拠づけられるような、胚性幹細胞の増殖を促進し、そして多能性幹細胞を誘導し、それらの分化を阻害することを示した。

30

【0415】

いくつかの実施例は、刺激を受けた(プライム)状態からより少ない成熟したナープ状態へ幹細胞に戻せうる、作用薬または作用薬(複数)と細胞を接触させることは、種々様々の細胞型をより少ない成熟した状態へ、体細胞を幹若しくは始原細胞へ、及び幹細胞をナープ状態へ、戻らせることができることを示した。

【0416】

好ましい態様では、ヒトNME7あるいはNME7-ABを発現するトランスジェニック動物が生成された。ヒト若しくはバクテリアのNME1およびNME7が、幹細胞の分化を阻害するので、NMEタンパク質、好適にはNME7若しくはNME7抗体の発現のタイミングが、トランスジェニック動物でコントロールすることができる技術を使用することは有利でありうる。例えば、動物の分化の間に、NME7発現の潜在的な問題を回避するために、誘導可能なプロモータの制御下にヒトNME7を持つことは有利である。外来遺伝子の発現を、宿主動物において誘導可能にする方法は、当業者に知られている。当業者に知られているトランスジーンを発現をコントロールする多くの方法のうちのいずれか1つを使用して、NME7若しくはNME7-ABの発現は、誘導可能になりえる。

40

【0417】

あるいは、NME7の発現あるいは発現のタイミングは、哺乳動物によって自然に、発現される別の遺伝子の発現によってコントロールされうる。例えば、それは、心臓のようなある

50

組織で、NME7若しくはNME7バリエーションが、発現されることが好ましい。その後、NME7の遺伝子は、MHCのような心臓中で発現されたタンパク質の発現に操作可能にリンクされる。この事例では、MHC遺伝子産物が発現される時及び場所で、NME7の発現は、阻止される。同様に、人は、その発現の場所及びタイミングが、例えば前立腺の特定のタンパク質の発現によって、コントロールされるように、前立腺で、ヒトNME1、NME6あるいはNME7の発現を、開始若しくは停止させることを望むかもしれない。同様に、非ヒト哺乳動物でヒトNME6あるいはNME7の発現は、乳房組織で発現された遺伝子によってコントロールすることができる。例えば、トランスジェニックマウスでは、ヒトNME6あるいはヒトNME7は、プロラクチン・プロモーターあるいは類似遺伝子から発現される。このように、部位特異的な方法で、ヒトNMEタンパク質の発現を引き起こす若しくは抑制することは可能である。

10

【0418】

ヒト腫瘍を異種移植された、若しくはヒトNME7を注入された動物は、転移癌を発症した。したがって、癌転移の展開のための動物モデルは、ヒトNME7、若しくは、より好適にはNME7-ABを発現するトランスジェニック動物を作ることにより、生成される。最適には、NME7は、動物に正確に展開することを可能にするために誘導可能なプロモーター上にある。あるいは、転移性の動物モデル、できれば、げっ歯動物、は、ヒトNMEかヒトNME7あるいはNME7-ABを発現するトランスジェニック動物を作ることにより調製される。あるいは、動物は、2iまたは5iによって阻害されたキナーゼが、誘導可能なプロモーターによって抑制されるか、キナーゼを抑制する作用薬が、試験動物に投与される、トランスジェニック動物である。その後、転移性動物モデルは、癌の進行における、化合物、生物学的製剤、薬などの効果をテストすると同様に癌の進行若しくは癌の進行の基礎科学を研究するために使用される。

20

【0419】

ヒト組織を発現する動物の生成

【0420】

他の本願発明は、ヒトNME1、バクテリアNME1あるいはヒトNME7好適にはNME7-ABに関する、動物遺伝子導入が、幹細胞または始原細胞あるいは初期中胚葉細胞でありうるヒト細胞の移植若しくは異種移植によってなされることを、包含する。。

例えば、ある場合には、その動物の心臓、肝臓、皮膚あるいは他の器官で、ヒト組織を育てる、マウス、ブタ、羊、牛および霊長類のような動物を生成することが望ましい。

30

【0421】

そうする1つの方法は、ヒトNME7若しくはヒトNME7-ABを発現するために作られた動物へ、ヒト幹細胞を移植することにより、一種のキメラ動物を生成することである。ヒト幹細胞あるいは始原細胞は、インビボ及びインビトロを含めて、分化の胎児期、胚盤胞、あるいは胚で、動物の分化の様々な時期で注入し、移植されえる。NME7は、分化を阻害するので、NME7若しくはNME7-ABトランスジーンは、その発現のタイミングが制御可能な方法にリンクされうる。ヒトNME7若しくはNME7-ABの発現が、分化若しくは成熟化が所望される時若しくは場所で、停止若しくは減少されるような、使用されうる方法は当業者に既知である。トランスジーンを作る1つの方法は、誘導可能若しくは抑制可能であるNME7が、発現が分化において遅くのみ発現する遺伝子の発現に、その発現若しくは抑制をリンクされることである。そのような場合、人は、NME7あるいはNME7-ABの発現が、心臓あるいは心臓始原細胞で発現する後期遺伝子の発現にリンクされるトランスジェニック動物を作るだろう。したがって、NME7の発現若しくは発現のタイミングは、哺乳動物によって自然に発現される別の遺伝子の発現によってコントロールされる。例えば、それは、例えば、心臓のような組織で発現されることがNME7若しくはNME7バリエーションには望ましいかもしれない。その後、NME7のための遺伝子は、MHCのような心臓で発現されたタンパク質の発現に操作可能にリンクされる。この事例では、NME7の発現は、MHC遺伝子産物が発現される時及び場所で、減少若しくは停止される。同様に、人は、ヒトNME1、NME6あるいはNME7の発現を、その発現の位置およびタイミングが、例えば、前立腺の特定のタンパク質の発現によってコントロールされるように、前立腺においてターンオンされる、ことを所望するだろう

40

50

。同様に、非ヒト-哺乳動物で、ヒトNME1あるいはNME7の発現は、乳腺組織で発現される遺伝子によってコントロールされうる。例えば、トランスジェニックマウスでは、ヒトNME1あるいはヒトNME7は、プロラクチン・プロモーター、あるいは類似遺伝子によって発現され若しくは抑制されることができる。

【0422】

このように、ヒトNME7あるいはNME7-ABのための遺伝子組み換え動物は、あるポイントに成長するのを許容し、ついで、ヒトの幹あるいは始原細胞を移植される。そこでは、それらがヒトNMEタンパク質との接触により増殖する。その後、ヒトNMEの発現は、動物の特定の器官あるいは器官の一部が、ヒト組織として分化するようにターンオフされる。

【0423】

別の問題として、ヒトに密接なグローバル配列同等性をもつ何らかの動物若しくは霊長類は、交差-種相互作用が起こり、倫理的問題おこるかもしれないので、よい宿主動物候補にはならないかもしれない。

【0424】

本発明は、ヒトNME1、バクテリアNME1あるいはヒトNME7、あるいはNME7-ABにとって、遺伝子組み換えの動物の多くの適用を包含する。本発明の1つの態様では、ヒト幹若しくは始原細胞は、トランスジェニック動物に、あるいはトランスジェニック動物であるだろう生殖細胞に、移植される。NMEの発現は、誘導可能であり若しくは抑制可能でありうる。幹若しくは始原細胞の移植のサイトおよびタイミングによって、得られる動物は、ヒトの心臓、肝臓、ニューロンの細胞あるいは皮膚を発現するように作ることができる。

【0425】

したがって、ヒト組織は、遺伝子組み換え非ヒト-哺乳動物で生成することができ、そこでは、哺乳動物は、ヒトMUC1若しくはMUC1*若しくはNMEタンパク質を、生殖細胞若しくは体細胞で発現し、ここで、生殖細胞若しくは体細胞は、該哺乳動物へ導入された組み換えヒトMUC1若しくはMUC1*若しくはNME遺伝子配列を含み、そこでは、遺伝子配列の発現は、外部組成物の導入によって、あるいはその発現若しくは抑制が、宿主動物の自然に生じる遺伝子の発現若しくは抑制に、リンクすることによって、誘導若しくは抑制されうる。該遺伝子が、幹あるいは始原細胞を増やすために発現されるべく誘導され、そして異種幹細胞から組織を生成するために遺伝子発現を抑制するように、非ヒト-哺乳動物に起源において異種の幹細胞あるいは始原細胞が、トランスジェニック動物に移入される。トランスジーン（導入遺伝子）の抑制がおこなわれる1つの方法は、組織分化因子と、幹細胞あるいは始原細胞とを接触させることである。トランスジーン（導入遺伝子）の抑制は、また、自然に生成された宿主の組織分化因子に反応して、当該哺乳動物で自然に実行される。

【0426】

これらの動物は創薬に使用することができる。さらに、それらはヒト組織における、あるいは、ヒト組織の分化における、化合物、生物学的薬剤若しくは医薬の効果を決定するために、動物を使つての毒性試験に使われる。あるいは、ヒト幹若しくは始原細胞が移入されたトランスジェニック動物は、ヒトの患者への移植のためのヒト組織を育てるために使用される。ある場合には、移入される幹あるいは始原細胞は、トランスジェニック動物から回収されたヒト組織の受け手になる患者からのものである。

【0427】

1つの態様では、MUC1、MUC1*あるいはNMEタンパク質の発現は、移入された幹あるいは始原細胞の量が十分に多くなるまで、誘導されうる。その後、MUC1、MUC1*あるいはNMEタンパク質発現は、MUC1、MUC1*あるいはNMEタンパク質の発現を抑制する物質を、宿主哺乳動物に注入することによりシャット・ダウンされうる。幹または始原細胞の個体群は、特別の組織が器官のタイプのための分化誘導因子のマウスでの発現によってのような自然な方法によって分化を誘導でき、あるいは、化学若しくはタンパク質物質が、所望の組織タイプに分化をもたらすために、幹若しくは始原細胞転移のサイトで宿主に注入されうる。

【0428】

内胚葉細胞組織のための、誘導、分化/形質転換作用薬は、制限なしで、次の作用薬を含

10

20

30

40

50

んでもよい:

次の細胞タイプ、肝臓、肺、脾臓、甲状腺および腸細胞のために、肝細胞増殖因子、オンコスタチン-M、表皮増殖因子、繊維芽細胞成長因子-4、塩基性繊維芽細胞増殖因子、インシュリン、トランスフェリン、セレン酸、BSA、リノール酸、アスコビル酸塩2リン酸塩、VEGFおよびデキサメサゾン。

【0429】

中胚葉組織のための、誘導、分化/形質転換作用薬は、制限なしで次の作用薬を含む:

次の細胞タイプ、軟骨組織、骨、脂肪、筋肉及び血液細胞のために、インシュリン、トランスフェリン、亜セレン酸、BSA、リノール酸、TGF- β 1、TGF- β 3、アスコビル酸塩2リン酸塩、デキサメサゾン、 α -グリセロリン酸塩、アスコビル酸塩2リン酸塩、BMPおよびインドメタシン。

10

【0430】

外胚葉組織のための、誘導、分化/形質転換作用薬は制限なしで次の作用薬を含む:

次の細胞タイプ、神経、皮膚、脳および目細胞のために、ジブチリルサイクリンAMP、イソブチルメチルキサンチン、ヒト表皮増殖因子、塩基性繊維芽細胞増殖因子、繊維芽細胞成長因子-8、脳由来神経栄養因子及び/又は他の神経組織栄養の成長因子。

【0431】

NMEタンパク質のレギュレータあるいはNMEタンパク質の下流エフェクターは、NMEタンパク質の代わりになることができる。

【0432】

20

これらの研究は、幹様若しくは癌様成長を促進するために、NMEタンパク質が機能する方法の一つの方法は、主にPSMGFR配列から成る、MUC1*と呼ばれる、MUC1膜貫通型タンパク質の短縮型に結合することによることが示された。MUC1*細胞外領域の二量体化は、それらをより転移性にする癌細胞、幹細胞、体細胞の増殖および脱分化を刺激する。

【0433】

NMEタンパク質がそれらの影響を及ぼす別の方法は、それらが他の遺伝子を、刺激する若しくは抑制するために、直接若しくは間接的に機能する核に移入されることによる。OCT4とSOX2が、MUC1およびその分割酵素MMP16のプロモータ・サイトへ結合することは以前に報告された(Boyer et al., 2005年)。同じ研究は、SOX2とNANOGが、NME7のプロモータ・サイトへ結合すると報告した。本発明者等は、我々の実験を基礎に、これらの「山中」多分化因子(高橋および山中、2006年)が、MUC1、その分割酵素MMP16およびその活性化リガンドNME7を、アップレギュレートすると結論した。BRD4が、NME7を抑制し、その一方でそのコファクターJMJD6が、NME1をアップレギュレートしているということは以前に報告された。本発明者等がそれを胚発生中のNME7より遅く発現される自己制御の幹細胞成長因子であるであることを実証した。まだ、他のものは、Mbd3若しくはChd4のsiRNA抑制は、iPS生成への抵抗性を大幅に減じ、ナープ状態に幹細胞を維持することができることを最近報告した(Rais Y et al., 2013年)。ここで示された証拠は、NME7が、BRD4とJMJD6を抑制し、一方、多分化能阻害剤Mbd3およびCHD4をも抑制している、相互のフィードバックループがあることを示す。本発明者等は、ナープヒト幹細胞において、これらの4つの因子、BRD4、JMJD6、Mbd3とCHD4は、後期段階の「刺激を受けた(プライム)」幹細胞におけるそれらの発現に比べ、抑制されていることを注目する。さらに、本発明者等は、マウスプライム幹細胞をナープ状態に戻す、2i阻害剤(Gsk3とMEKの阻害剤)が、同じ4つの因子、BRD4、JMJD6、Mbd3およびCHD4をダウンレギュレートもすることに注目する。

30

40

【0434】

さらに、本発明者等は、NME7が、SOX2(>150X)、NANOG(~10X)、OCT4(~50X)、KLF4(4X)およびMUC1(10X)をアップレギュレートすることを見出した。重要なことには、本発明者等は、NME7が、CXCR4(200X)およびe-カドヘリン(CDH1)を含む癌幹細胞マーカーをアップレギュレートすることを示した。ともに得られた、証拠のこれらの多数のラインは、NME7は、最も原始的な幹細胞増殖および多分化能媒介物であり、また、癌細胞をより転移性の癌幹細胞に形質転換すると同様に体細胞を癌状態に形質転換する強力な因子である、という

50

結論を指摘する。

【0435】

したがって、本発明は、NME7の発現を増加させる遺伝子および遺伝子産物を、NME7に代替することを包含する。同様に、その発明は、NME7の下流エフェクターを、NME7に代替することを包含する。例えば、単独であるいはコンビネーションで、MBD3、CHD4、BRD4あるいはJMJD6を抑制する作用薬は、本発明者等が示したところのMBD3、CHD4、BRD4あるいはJMJD6を抑制する、NME7に、本明細書に記述の方法において、代替できる。

【0436】

幹細胞ベースの器官および組織生成

【0437】

本発明は、ナイーブ状態のヒト幹細胞を、生成、維持、若しくは増殖する方法を示し、また非ヒト-宿主動物のDNA及びヒトドナー幹細胞のDNAからなるキメラ生物体若しくは動物を生成するために、非ヒト動物の非ヒト宿主動物あるいは受精卵あるいは胚盤胞あるいは胚において、得られた該細胞を使うための方法を開示する。あるヒトのDNAを含んでいるキメラ的な種の、四肢、神経、血管、組織、器官あるいはそれらでの作られる因子若しくはそれらから分泌された因子は、ヒトへ移植を含むいくつかの使用に、老化防止を含む医薬学的有益性のためのヒトへの投与、及び薬物検査および疾病モデリングを含む科学実験のために、回収される。

【0438】

第1の方法では、ヒトのナイーブ状態の幹細胞が、人ブライム化状態の幹細胞を、NMEファミリータンパク質若しくはMUC1*成長因子レセプターを二量化させる作用薬と接触させることにより、生成、維持若しくは増殖される。

【0439】

第2の方法では、ヒトのナイーブ状態の幹細胞が、細胞がNMEファミリータンパク質若しくはMUC1*成長因子レセプターを二量化させる作用薬の存在において再プログラムされる、iPS技術の使用を通じて、体細胞をより少ない成熟した状態に戻るのを誘導することにより、生成、維持若しくは増殖される。

【0440】

。

第3の方法では、ヒトのナイーブ状態の幹細胞が、NMEファミリータンパク質若しくはMUC1*成長因子レセプターを二量化させる作用薬の存在において、ヒト胚、胚盤胞あるいは受精卵から得られた細胞を培養することにより、生成、維持若しくは増殖される。

【0441】

該NMEタンパク質若しくはMUC1*を二量化させる作用薬は、ヒトの刺激を受けた（ブライム）状態の幹細胞をナイーブ状態に変換する。また、該NMEタンパク質若しくはMUC1*を二量化させる作用薬は、ヒト胚から得られた細胞からのナイーブ状態の胚幹細胞株の誘導をサポートする。該NMEタンパク質若しくはMUC1*を二量化させる作用薬は、分化細胞が幹細胞状態に再プログラム化される、ナイーブ状態の誘導多能性幹細胞株の生成をサポートする。

【0442】

好ましい態様では、NMEファミリータンパク質は、NME7である。さらにより好ましい態様では、NMEファミリーメンバーは、NME7-AB又はNME7-X1又はNME7の他のアイソフォーム若しくは切断型（トランケート）である。別の態様では、NMEファミリーは、二量体NM23、aka NME1である。さらに別の態様では、NMEファミリーは、NME6である。好ましい態様では、MUC1*を二量化させる作用薬は、MUC1*細胞外領域のPSMGFRペプチドに結合する抗体である。

【0443】

本発明の1つの態様で、ナイーブ状態のヒト幹細胞は以下を含む方法によって生成され、それは、ヒト細胞を、NME1二量体、NME6二量体、NME7、NME7-ABあるいはNME7-X1と接触させ、その後、該細胞を、非ヒト動物の、桑実胚、胚盤胞、胚あるいは胎児に、移入若しく

10

20

30

40

50

は注入される。少なくとも一部分ヒト起源である、又は胚盤胞若しくは胚に移入されたヒト幹細胞から展開した、いくつかの組織、器官あるいは他の身体部分をもつキメラ動物が生成される。組織、器官あるいは他の身体部分は、完全に分化されていた時、あるいは分化の任意の初期のステージで、宿主動物から回収される。その後、これらの人体部分によって生成された、組織、器官あるいは身体部分あるいは因子は、新しい器官を必要とする、あるいは非ヒト-宿主のヒト組織若しくは器官によって分泌された因子の再生の特性を必要とする、ヒトレシーピエントへ、移植される若しくは投与される。

【0444】

本発明の1つの態様では、分化途上の非ヒト動物が、ある組織あるいは器官を生成することができないように、非ヒト動物の細胞が、例えば、生化学的阻害剤で遺伝子組み換えされるか若しくは処理された。この態様で、キメラ動物は、ヒトドナー幹細胞から派生する若しくは重要な貢献をしている、ある組織あるいは器官を生成し、部分的にあるいは完全にヒトである。

10

【0445】

本発明の1つの態様では、ドナー幹細胞は、非ヒト動物で生成される組織若しくは器官を必要とするドナーからのものであり、そして、分化のあるステージで、あるいは動物が成熟後に、該組織若しくは器官は、回収されそしてドナーであるヒトへ移植される。本発明の別の態様では、ドナー幹細胞は、キメラ種で生成された組織、器官あるいは他の材料が、意図した受容体でないドナーからのものである。1つの態様では、ドナー幹細胞は、iPS細胞であり、また、別の態様では、幹細胞は胚性幹細胞である。

20

【0446】

本発明の1つの態様では、幹細胞は、NMEタンパク質を含んでいる培地において培養される。NMEタンパク質は、二量体NME1、二量体NME6、NME7、NME7の二量体B領域、NME7-X1あるいはNME7-ABでありえる。好ましい態様では、NMEタンパク質は、二量体NME1である。

【0447】

もっと好ましい態様では、NMEタンパク質は、NME7-X1である。さらにもっと好ましい態様では、NMEタンパク質は、NME7-ABである。ある場合には、表面への幹細胞接着は、抗MUC1*抗体で該表面を被覆することにより促進され、ここで該抗体は、PSMGFR配列の少なくとも15の連続するアミノ酸を含むペプチドに結合する能力を持っている。別の場合には、表面への幹細胞接着は、NMEタンパク質で該表面を被覆することにより促進され、それは、ある場合には、ヒスチジントグ化であり及びニトリル-トリ-酢酸-ニッケル(aka NTA-Ni⁺⁺)のような、金属キレート金属部分を提示する表面上に被覆される。他の実例では、表面への幹細胞付着は、インテグリンまたはインテグリンの断片で該表面を被覆することにより促進され、そこでインテグリンはビトロネクチン、フィブリネクチン、コラーゲンおよびその他同種のものである。他の実例では、表面への幹細胞付着は、ペプチド、小分子あるいはポリマーで該表面を被覆することにより促進される。ある場合には、ローリキナーゼ阻害剤が、さらに表面付着を増強するために培地に加えられる。

30

【0448】

幹細胞の生成、誘導あるいは維持は、上記記述の方法の部分あるいはすべてによって達成される。しかしながら、非ヒト-幹細胞の生成、誘導あるいは維持の間、細胞を、その配列が非ヒト-種のものであるNMEタンパク質と接触させることは有利である。ブタ幹細胞を生成し、多分化能を誘導し、維持することについては、その配列が、天然ブタNME6、NME1、NME7、NME7-X1あるいはNME7-ABのものであるNMEタンパク質を使用することは有利である。表面附着の促進、それは、MUC1*細胞外領域のPSMGFR部位の少なくとも15の連続するアミノ酸を含むペプチドに結合するその能力によって選ばれた抗体で表面を被覆することは有利であり、ここで、該ペプチドの配列は、ブタMUC1*細胞外領域の天然配列である。

40

【実施例】

【0449】

実施例 1

【0450】

50

最少培地

【0451】

無血清最少培地500 mLは下記成分を含んでいる：

394mL DMEM/F12、GlutaMAX；

100mL ノックアウトTM血清代替物；

5.0mL 100x MEM非必須アミノ酸溶液；

0.9mL -メルカプトエタノール、55mMストック。

【0452】

ロー(Rho)キナーゼ阻害剤、「Ri」あるいは「ROCi」が、添加された。それは、使用直前に、10 μ Mの終濃度に加えられ、Stemgent(ケンブリッジ、MA)からのY27632であった。

10

【0453】

実施例 2

【0454】

NME培地での幹細胞の培養。

【0455】

実施例 1 に述べられた無血清最少培地に、次のNMEタンパク質のうちの1つを加える：

8nM(終濃度)二量体rhNMEI(aka NM23)であって、好適には安定した二量体を確実にするS120G突然変異を持つ、8nM二量体NME6、8nMのバクテリアHSP593組み換えNME1、4nM NME7_{AB}あるいは4nM NME7-X1。幹細胞は、NME培地での懸濁で、あるいは細胞培養プレートで、育てることができる。もし、幹細胞がMN-C3のような抗MUC1*抗体で被覆された細胞培養プレートで培養される場合、ロー(Rho)キナーゼ阻害剤は、10uMの終濃度に、Y-26732のようなものが、加えられた。

20

【0456】

細胞培養プレートは幹細胞植え付け培養の少なくとも1日前に準備された。細胞培養プレートは、MN-C3抗MUC1*抗体の $\sim 12.5 \mu\text{g/mL}$ を含んでいる溶液で被覆された。幹細胞がプレートに植えつけられる前に、およびプレウォッシュステップなしで、被覆されたプレートは、4度で夜通し培養された。幹細胞は、ウェルあたり100,000個 \sim 300,000個の細胞が6つのウェルプレートに植えつけられたときに得られる密度にあまねく対応する密度で植えつけられた。細胞は、それにロー(Rho)キナーゼ阻害剤が加えられたNME培地中で懸濁された。細胞は、5%CO₂/5%O₂インキュベータにおいて、かき混ぜずに、48時間培養された。その後、細胞が、 $\sim 80\%$ 培養密度に達するまで、培地は24時間あるいは48時間ごとに変更された(図20B)。細胞は、トリプシン/EDTAあるいはTrypLEを使用して、単離細胞へかい離された。拡大するためには、始めからのプロセスを繰り返す。

30

【0457】

実施例 3

【0458】

NME培地でのiPS生成

2日前(再プログラム化前48時間):繊維芽細胞が、ウェルあたり25,000-100,000の細胞で、繊維芽細胞培地(グルタミンを含むDMEM高ブドウ糖、10%FBS)のウェルあたり2 mLで、標準組織培養 - 処理の6つのウェルプレートに植えつけられた。5%CO₂中で48時間の培養。

40

0日目:繊維芽細胞培地は、NME培地(実施例 2)に変更された。繊維芽細胞は、標準プロトコルに従って、山中因子あるいはトムソン因子のようなマスター再プログラム化因子で形質転換された。もし望まれれば、OCT4、SOX2、NANOGあるいはKLF4およびc-Mycの発現を起こす核酸を導入するどのような方法も適応が十分可能である。共通の方法は、レンチウイルス、センダイウイルス、ガンマ・レトロウイルスあるいは眠れる森の美女のようなトランスポゾンのような、非インテグレートイングウイルス運搬システムを使用する。

1日目:細胞は、ウイルスと細胞デブリスを除去するために最少培地で洗浄され、次に、ロー(Rho)キナーゼ阻害剤なしで、NME培地のウェルあたり、2 mL \sim 4mLで取り替えられた。

50

3日目：ロー (Rho) キナーゼ阻害剤なしで、NME培地のウェルあたり2mL~4 mLで培地を変える。

5日目：ロー (Rho) キナーゼ阻害剤なしで、NME培地のウェルあたり2mL~4 mLで培地を変える。

6日目：細胞培養プレートは、3.25 $\mu\text{g/mL}$ ~ 24 $\mu\text{g/mL}$ 、好適には約12.5 $\mu\text{g/mL}$ 、の濃度で、細胞培養プレート上にMN-C3のような抗MUC1*抗体で被覆し、準備され、そして、該抗体被覆プレートを、4°Cで夜通しインキュベートした。

7日目：この時まで、幹細胞のそれに形態を変更している、形質転換された細胞は、トリプシン/EDTAでかい離され、細胞濾過器を通過され、10 μM Y-26732のようなローキナーゼ阻害剤加NME培地中でMN-C3被覆プレート上に植えた。再プログラム化した細胞は、その後、ウェルあたり 5×10^4 ~ 1×10^5 で植え付けられた。このポイントから、先、細胞は、10 μM Y-26732のようなロー (Rho) キナーゼ阻害剤添加NME培地において培養され、そして、5%CO₂/5%O₂で、穏やかに、最初の48時間インキュベートされた。

9日目及びその先：10 μM Y-26732のようなロー (Rho) キナーゼ阻害剤加の全体にわたって同じNME培地を使い培地を毎日交換した。

16日目~21日目：コロニーは摘み取られ、また、各クローンはMN-C3被覆表面で、最初に96ウェルプレート、その後、24ウェル、さらに、12ウェル、さらにその後6ウェルで、培養され、また、幹細胞が特徴づけられ、全て正常な多分化能遺伝子、ナイーブ遺伝子を発現することが見出された後のより大きなフォーマットは、動物に移植された時、奇形腫を形成し、そして、正常核型を持っていた。iPS細胞も、一日目及びその先と同じプロセスを使用して、血液から生成された。

図21A、21Bおよび21Cで示される細胞では、新生児の男性の繊維芽細胞が使用された。図21Cでは、使用されたNME培地は、4nM NME7-AB含む最少培地であった。

【0459】

実施例4

【0460】

マスター多分化能レギュレータのOct4、SOX2、KLF4あるいはc-Mycの欠如下で、NMEタンパク質の能力の再プログラム化。

【0461】

この実施例において、繊維芽細胞は、組み換えヒトNME1/NM23二量体、バクテリアのHSP593 NMEI二量体あるいはヒト組み換えNME7-ABを付加された最少培地において培養された。コントロールとして、繊維芽細胞は、それらの通常培地において培養され、それは、500mLのために、ウシ胎児血清(FBS)の50mL、及び445mLDMEM高ブドウ糖基本培地、5mL GlutaMAXである。NME1/NM23二量体、バクテリアのHSP593 NMEI二量体あるいはNME7-ABを含む最少培地での培養の15-20日後に、RT-PCRは、得られた細胞は、幹細胞マーカー遺伝子OCT4およびNANOGの発現を、非常に、増加するということを示した(図1参照)。ちょうど、癌細胞の性質のように、それらは、又、BRD4、JMJD6、MBD3およびCHD4の発現を減少させた。図2は、染色質リアレンジメント因子BRD4、JMJD6、MBD3およびCHD4をコードする遺伝子の発現のRT-PCR測定のグラフを示す。図3は、多分化能遺伝子、染色質リアレンジメント因子BRD4、JMJD6、MBD3およびCHD4をコードする遺伝子およびNMEタンパク質の発現のRT-PCR測定のグラフを示す。ここで、「マイナスROCi」は、非付着になり、表面から浮かんだ細胞を指す。それらが繊維芽細胞としてもはや認識可能でなく、幹細胞のように見えるように、細胞の形態は、又、完全に変わった(図8-11)。

【0462】

実施例5

【0463】

NME7-AB培養ヒト肝細胞が、マウス桑実胚の内部細胞塊へ導入された。マウス卵子は、生体外で受精させた。受精後2.5日で、NME7-ABで生成され、培養された、10のヒト幹細胞が、該受精卵に別々に注入された。2.5日目は、内部細胞塊が生じる前である。48時間後、4.5日目で、桑実胚が、ヒトTra 1-81を染色する蛍光抗体で染色された。図のうちのいくつ

かでは、矢印は、キメラ動物の分化を示す、内部細胞塊へ導入されたヒトナイーブNME7-AB細胞を指す。図22A-22D、図23A-23Jおよび図24A-24Jを参照。それらは、ヒトNME7-ナイーブ細胞が2.5日目で注入された他のマウス胚盤胞の共焦点図を示し、及び4.5日目で胚盤胞の内部細胞塊への一体化を示す。さらに図27A-27F、図28A-26J、図29A-29J、及び図30A-30Jを参照。それらは、2.5日目でマウス桑実胚に注入されたヒトNME7-AB成長ナイーブ幹細胞が、4.5日目、胚盤胞の48時間後の内部細胞塊に濃縮されたのを見出せることを示す。コントロールとして、FGF-成長刺激を受けた（プライム）状態ヒト幹細胞が、2.5日目および4.5日目で、受精卵に注入され、抗ヒトのTra 1-81でおよび栄養外胚葉と呼ばれる非内部細胞塊部位を染色するCDX2で染色された。これらの刺激を受けた（プライム）状態の細胞は、内部細胞塊へ導入されなかったが、栄養外胚葉にはあることを、図25A-25Dおよび26A-26Hが示す。

10

【0464】

実施例6

【0465】

NME7-AB培養ヒト幹細胞が、トマトレッド若しくはTDトマトとよばれる赤フルオロフォアで形質転換された。その後、これらの蛍光性のヒトナイーブ細胞は、2.5日目受精マウス卵に注入され、4.5日目でイメージ化された。桑実胚も、DAPIおよび栄養外胚葉を染色する蛍光抗体で染色された。図27A-27F、図28A-26J、図29A-29J、及び図30A-30Jを参照。それらは、マウス桑実胚への2.5日目で注入された、ヒトNME7-AB成長ナイーブ幹細胞は、4.5日目、胚盤胞の48時間後の内部細胞塊に濃縮されたのを見出せることを示す。矢印は、

20

キメラ動物の形成を示す、内部細胞塊へ導入されたヒト細胞の場所を指す。

【0466】

実施例7

【0467】

非ヒト霊長類種幹細胞は、bFGF欠如状態でのNME7-AB培地で生成された。アカゲザルとカニクイザルの繊維芽細胞は、NME7-ABを含んでいる培地、およびbFGF若しくはフィーダー細胞がない状態で、中核多分化能因子で形質転換された。この場合、山中因子OCT4、Sox2、Klf4およびc-Mycが使用されたが、他の多分化能因子、遺伝子若しくは遺伝子産物のいずれかは代替できた。ポスト遺伝子形質転換の5日目と7日目間で、細胞が表面から分離し始めた時、細胞は、抗MUC1*抗体、ここではMN-C3、で被覆された表面に再度植えつけた。アカゲザルについて、6日目、カニクイザルについて14日目に、始まる、コロニーが出現した。図31A-31Fは、山中多分化能因子Oct4、SOX2、NANOGおよびc-Mycの形質導入なしで、6日間、NME7-ABでの培養にカニクイザルからの繊維芽細胞を含んでいる、コントロール・プレートの写真を表わす。図32A-32C、図33A-33F、また図34A-34Fは、山中因子およびNME7-ABによって再プログラム化されカニクイザルからの繊維芽細胞を示す。6日後、出現するiPSコロニーは、抗MUC1*抗体表面へ移され、そこで、個々のコロニーが採取され、拡張される時、約14-17日目まで、拡張し続ける。私たちの知っている限りでは、これは、マウス若しくはヒトのフィーダー細胞がない状態での、非ヒト霊長類-iPS細胞の生成に科学者が成功した初めてのことである。研究者は、非ヒト霊長類-幹細胞を培養することには、極端な困難性を経験する。それらは自然に分化し、FGFベースの培地中で十分に成長しない。本発明者は、図35A-35D、図36A-36D、図37A-37Bおよび図38A-38Hで示されるように、NME7-AB培地へ非ヒト霊長類-細胞を移動させた時、これらの問題をすべて克服した。無血清、無FGF、MN-C3抗体表面若しくはMEFで、NME7-AB培地での、山中因子あるいはトムソンの因子の形質導入によるアカゲザルiPS細胞の生成が、種々にステージで図39A-39C、図40A-40C、図41A-41Dおよび図42A-42Bで示される。繊維芽細胞が、MN-C2抗体表面、あるいはMEF上で再プログラム化されたかどうかは、臨界的ではないが、表面が抗MUC1*抗体表面だった時、より多くのコロニーが生成された。

30

40

【0468】

実施例8

【0469】

50

霊長類種胚性幹細胞が、NME7-AB培地中で、増殖し、維持される。コロニーが採取された後、それらは、MN-C3抗体被覆表面、あるいはMEF上に再度置かれ、4nMが最良に、2nMと32nMの間の濃度でNME7-ABを含む無血清培地で連続的に無期限に継代することができた。図43A-43E、図44A-44F、図45A-45H、図46A-46H、図47A-47Gおよび図48A-48Dを参照されたい。

【 0 4 7 0 】

以下に引用された参照のすべて、全体に参照によって本発明に統合される。

引用参考文献リスト：

- Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. (2006) Cancer stem cells: perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cell. *Cancer Res.* Oct 1;66(19):9339-44. Epub 2006 Sep 21. 10
- Chen K, Huang YH, Chen JL. (2013) Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. *Acta Pharmacologica Sinica* 34: 732-740; Review
- Darash-Yahana M, Pikarsky E, Abramovitch R, Zeira E, Pal B, Karplus R, Beider K, Avniel S, Kasem S, Galun E, Peled A (2004) Role of high expression levels of CXCR4 in tumor growth, vascularization, and metastasis. *FASEB J* 18(11):1240-1242
- Mahanta S, Fessler S, Park J, Bamdad C. A Minimal Fragment of MUC1 Mediates Growth of Cancer Cells, 2008 *PLoS ONE* 3:e2054-2065. 20
- Hikita S, Clegg O, Kosik K, Bamdad C. MUC1* Mediates the Growth of Human Pluripotent Stem Cells, 2008 *PLoS ONE* 3 :e3312-3325.
- Kumar SM, Liu S, Lu H, Zhang H, Zhang PJ, Gimotty PA, Guerra M, Guo W, Xu X. (2012) Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation. *Oncogene*. Nov 22;31(47):4898-911.
- Liu K, Lin B, Zhao M, Yang X, Chen M, Gao A, Liu F, Que J, Lan X. (2013) The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cellular Signaling* May;25(5): 1264-71. Review
- Yeo JC, Jiang J, Tan ZY, Yim GR, Ng JH, Goke J, Kraus P, Liang H, Gonzales KA, Chong HC, Tan CP, Lim YS, Tan NS, Lufkin T, Ng HH. (2014) Klf2 is an essential factor that sustains ground state pluripotency. *Cell Stem Cell*. Jun 5;14(6):864-72. 30
- Oshima N, Yamada Y, Nagayama S, Kawada K, Hasegawa S, Okabe H, Sakai Y, Aoi T. (2014) Induction of cancer stem cell properties in colon cancer cells by defined factors. *PLoS One*. Jul 9;9(7):e101735
- Wang ML, Chiou SH, Wu CW. (2013) Targeting cancer stem cells: emerging role of Nanog transcription factor. *Oncotargets and Therapy*. Sep 4;6: 1207-20. Review.
- Xu C, Rosier E, Jiang J, Lebkowski JS, Gold JD, et al. (2005) Basic Fibroblast Growth Factor Supports Undifferentiated Human Embryonic Stem Cell Growth Without Conditioned Medium. *STEM CELLS* 23: 315-323.
- Fessler S, Wotkowicz M, Mahanta S, Bamdad C (2009) MUC1* is a determinant of trastuzumab (Herceptin) resistance in breast cancer cells, *Breast Cancer Res Treat* 118:113-124 DOI 10.1007/s10549-009-0412-3 40
- Lissa Nurru Abdulah and Edward Kai-Hua Chow (2013) Mechanisms of chemoresistance in cancer stem cells. *Clinical and Translational Medicine* Jan 17;2(1):3
- Miki J, Furusato B, Li H, Gu Y, Takahashi H, Egawa S, Sesterhenn IA, McLeod DG, Srivastava S, Rhim JS. Identification of putative stem cell markers, CD133 and CXCR4, in hTERT-immortalized primary nonmalignant and malignant tumor-derived human prostate epithelial cell lines and in prostate cancer specimens. *Cancer Res.* 2007 Apr 1;67(7):3153-61.
- Jeter CR, Liu B, Liu X, Chen X, Liu C, Calhoun-Davis T, Repass J, Zaehres H, Shen 50

- JJ, Tang DG. NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene*. 2011 Sep 8;30(36):3833-45. PMID: 21875445.
- Hong X, Chedid K, Kalkanis SN. Glioblastoma cell line-derived spheres in serum-containing medium versus serum-free medium: a comparison of cancer stem cell properties. *Int. J. Oncol.* 2012 Nov;41(5): 1693-700.
- Faber A, Goessler UR, Hoermann K, Schultz JD, Umbreit C, Stern-Straeter J. SDF-1-CXCR4 axis: cell trafficking in the cancer stem cell niche of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 2013 Jun;29(6):2325-31.
- Mukherjee D, Zhao J. The Role of chemokine receptor CXCR4 in breast cancer metastasis. *Am J Cancer Res.* 2013;3(1):46-57. PMID: PMC3555200
- Herreros-Villanueva M, Zhang J-S, Koenig A, Abel EV, Smyrk TC, Bamlet WR, de Narva jas AA-M, Gomez TS, Simeone DM, Bujanda L, Billadeau DD. SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. *Oncogenesis* . 2013;2:e61. PMID: PMC3759123
- Sefah K, Bae K-M, Phillips JA, Siemann DW, Su Z, McClellan S, Vieweg J, Tan W. Cell-based selection provides novel molecular probes for cancer stem cells. *Int. J. Cancer*. 2013 Jun 1;132(11):2578-88.
- Su H-T, Weng C-C, Hsiao P-J, Chen L-H, Kuo T-L, Chen Y-W, Kuo K-K, Cheng K-H. Stem cell marker nestin is critical for TGF- β -mediated tumor progression in pancreatic cancer. *Mol. Cancer Res.* 2013 Jul;11(7):768-79.
- Nichols J, Smith A (2009) Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4:487-492.
- Hanna J, Cheng AW, Saha K, Kim J, Lengner CJ, et al. (2010) Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci US A* 107: 9222-9227.
- Smaghe, B.J. Stewart A.K., Carter M.G., Shelton L.S., Bernier K.J., Hartman E.J., Calhoun A.K., Hatziioannou V.M., Lillacci G., Kirk B.A., DiNardo B.A., Kosik K.S., Bamdad C. (2013) MUC1* Ligand, NM23-H1, Is a Novel Growth Factor That Maintains Human Stem Cells in a More Naive State. *PLoS ONE* 8(3): e58601
- Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A (2008). Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol* . 21;6(10)
- Theunissen TW, Powell BE, Wang H, Mitalipova M, Faddah DA, Reddy J, Fan ZP, Maetzel D, Ganz K, Shi L, Lungjangwa T, Imsoonthornruksa S, Stelzer Y, Rangarajan S, D'Alessio A, Zhang J, Gao Q, Dawlaty MM, Young RA, Gray NS, Jaenisch R. (2014) Systematic Identification of Culture Conditions for Induction and Maintenance of Naive Human Pluripotency. *Cell Stem Cell*. 2014 Jul 24; S 1934-5909(14)00298-7.
- Hugo HJ, Kokkinos MI, Blick T, et al. Defining the E-cadherin repressor interactome in epithelial-mesenchymal transition: the PMC42 model as a case study. (2011) *Cells Tissues Organs*;193:23-40
- Epstein RJ (2004) The CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway as a target of adjuvant breast cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 4(11): 901-909
- Müller, A.; Homey, B.; Soto, H.; Ge, N.; Catron, D.; Buchanan, M. E.; McClanahan, T.; Murphy, E.; Yuan, W.; Wagner, S. N.; Barrera, J. L.; Mohar, A.; Verastegui, E.; Zlotnik, A. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*, 410(6824), 50-56.
- Rais YI, Zviran A, Geula S, Gafni O, Chomsky E, Viukov S, Mansour AA, Caspi I, Krupalnik V, Zerbib M, Maza I, Mor N, Baran D, Weinberger L, Jaitin DA, Lara-Astiaso D, Blecher-Gonen R, Shipony Z, Mukamel Z, Hagai T, Gilad S, Amann-Zalcenstein D,

- Tanay A, Amit I, Novershtern N, Hanna JH (2013). Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. , 502(7469):65-70.
- Liu W, Ma Q, Wong K, Li W, Ohgi K, Zhang J, Aggarwal AK, Rosenfeld MG. Brd4 and JMJD6-Associated Anti-Pause Enhancers in Regulation of Transcriptional Pause Release. Cell. 2013 Dec 19;155(7):1581-95. PMID: PMC3886918.
- Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu C-P, Harris CP, et al. (2000) Clonally Derived Human Embryonic Stem Cell Lines Maintain Pluripotency and Proliferative Potential for Prolonged Periods of Culture. Developmental Biology 227: 271-278.
- Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER, et al. (2006) Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. Nat Biotechnol 24: 185-187. 10
- Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, et al. (2005) Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. Nat Methods 2: 185-190.
- Liu W, Ma Q, Wong K, Li W, Ohgi K, Zhang J, Aggarwal AK, Rosenfeld MG. Brd4 and JMJD6-Associated Anti-Pause Enhancers in Regulation of Transcriptional Pause Release. Cell. 2013 Dec 19;155(7):1581-95. PMID: PMC3886918.
- Rais Y, Zviran A, Geula S, Gafni O, Chomsky E, Viukov S, Mansour AA, Caspi I, Krupalnik V, Zerbib M, Maza I, Mor N, Baran D, Weinberger L, Jaitin DA, Lara-Astiaso D, Blecher-Gonen R, Shipony Z, Mukamel Z, Hagai T, Gilad S, Amann-Zalcenstein D, Tanay A, Amit I, Novershtern N, Hanna JH. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. 2013 Sep 18, Nature 502, 65-70 DOI: 10.1038/nature12587 20
- Herreros-Villanueva M, Zhang J-S, Koenig A, Abel EV, Smyrk TC, Bamlet WR, de Narva JA, Gomez TS, Simeone DM, Bujanda L, Billadeau DD. SOX2 promotes dedifferentiation and imparts stem cell-like features to pancreatic cancer cells. Oncogenesis. 2013;2:e61. PMID: PMC3759123
- Hong X, Chedid K, Kalkanis SN. Glioblastoma cell line-derived spheres in serum-containing medium versus serum-free medium: a comparison of cancer stem cell properties. Int. J. Oncol. 2012 Nov;41(5): 1693-700.
- Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. PLoS Biol. 2008 Oct 21;6(10):e253. PMID: PMC2570424 30
- Boyer et al, 2005, "Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells", Cell, Vol. 122, 947-956
- Takahashi K and Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell 126(4):663-676.
- Porter D et al. (2011) Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. N Engl J Med 365:725-733 DOI: 10.1056/NEJMoal 103849
- Tiller T et al. (2013) A fully synthetic human Fab antibody library based on fixed VH/VL framework pairings with favorable biophysical properties. MABS 9:5(3) PMID: 23571156 40
- Webb PA, Perisic O, Mendola CE, Backer JM and Williams RL. The crystal structure of a human nucleoside diphosphate kinase, NM23-H2. J Mol Biol. 1995, 251:574-587.
- Min K, Song HK, Chang C, Kim S Y, Lee KJ and Suh SW. Crystal structure of human nucleoside diphosphate kinase A, a metastasis suppressor. Proteins. 2002, 46:340- 342.

【 0 4 7 1 】

当業者は、ここに特異的に、記述された発明の特定の実施例への多くの等価物である、多くのルーチン実験以上のものを使うことを認識し、若しくは確実にすることが可能である。

そのような等価物は、本願特許請求の範囲に包含されることを意図するものである。

【 図 1 】

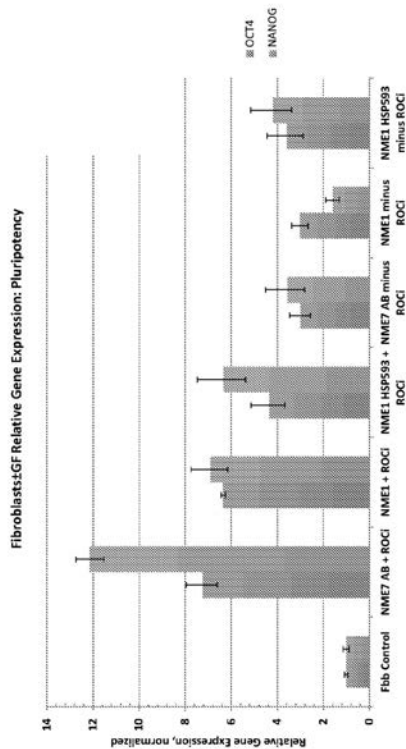


FIGURE 1

【 図 2 】

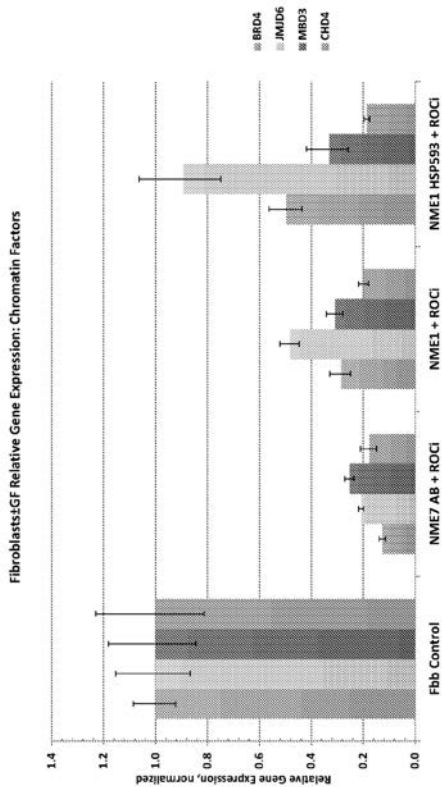


FIGURE 2

【 図 3 】

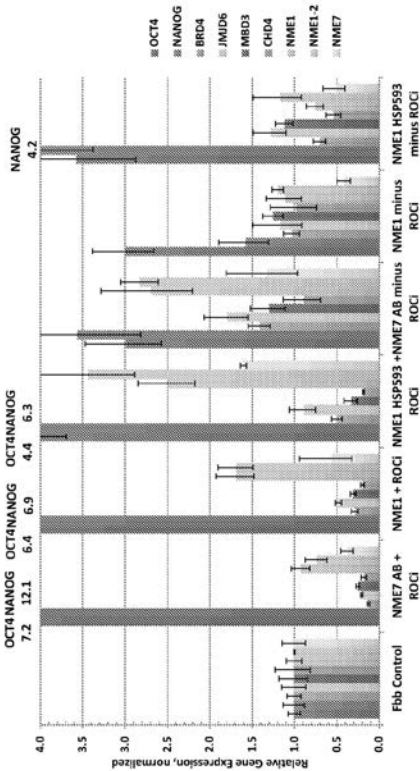


FIGURE 3

【 図 4 】

HES-3 stem cells grown with rhNME23 (NME1) dimers as only growth factor, passage 6

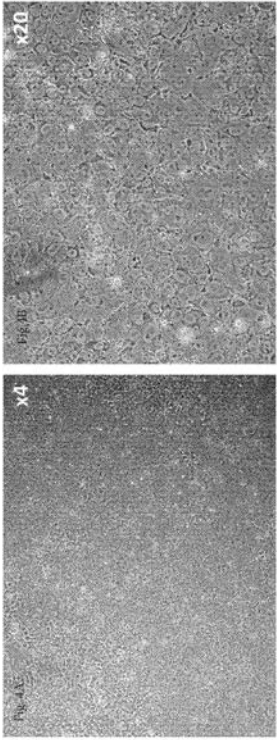


Figure 4

【 図 5 】

HES-3 human stem cells grown with rhNME7-AB as only growth factor, passage 19

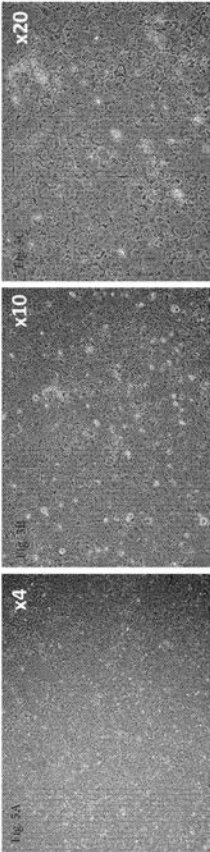
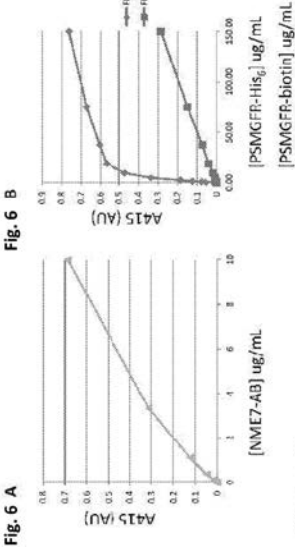


Figure 5

【 図 6 】

ELISA shows NME7 Dimerizes MUC1*
MUC1* extra cellular domain peptide immobilized on plate was bound by NME7 to saturation; a second MUC1* peptide with a C-terminal His-tag or Ectod tag was added and visualized by HRP labeled antibody to either His-tag or HRP labeled streptavidin



【 7 】

BRD4 Suppresses NME7, JMJD4 turns on NME1 (later stage self-regulating stem/cancer growth factor) In Earliest Naive Stem Cells BRD4/JMJD4 Suppressed

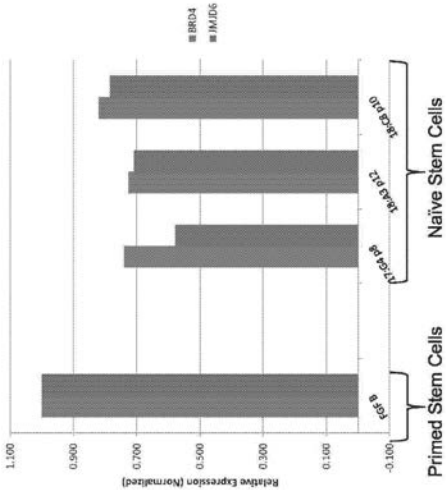


Figure 7

【 8 】

Human NME1 dimers alone causes human fibroblasts to revert to a stem-like state
hFFN.p9.NME1 dimers p2 no ROCi Day 18 4x



Figure 8

【 9 】

Human NME1 dimers alone causes human fibroblasts to revert to a stem-like state
hFFN.p9.NM23-H1 dimers p2 no ROCi Day 18 20x (these look like stem cell naive stem cell colonies)

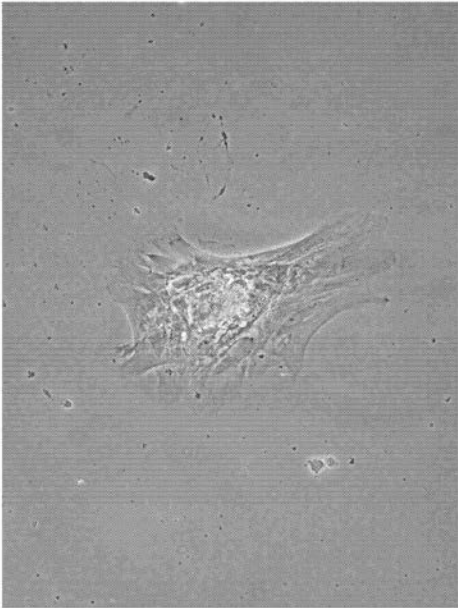


Figure 9

【 10 】

Human NME7-AB alone causes human fibroblasts to revert to a stem-like state
hFFN.p9. p2 no ROCi Day 18 4x

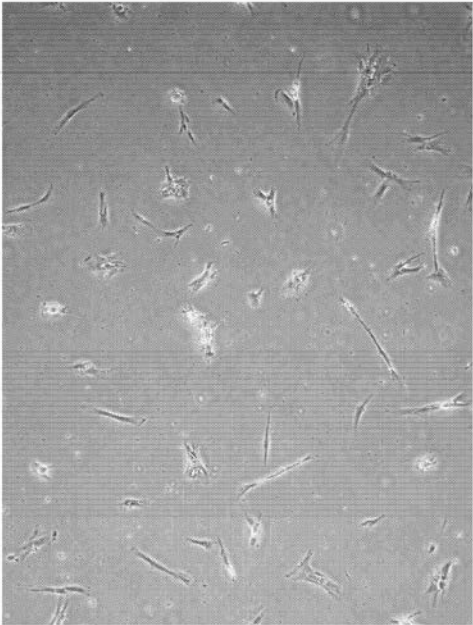


Figure 10

【 1 1 】

Human NME7-AB alone causes human fibroblasts to revert to a stem-like state
hFFN p9. p2 no ROCi Day 18 20x

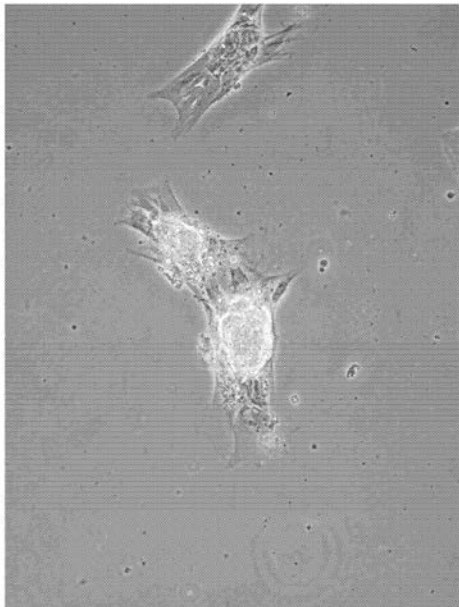


Figure 11

【 1 2 】

Control Cells: Human fibroblasts cultured in media in the absence of an NME protein
hFFN no ROCi Day 18 4x

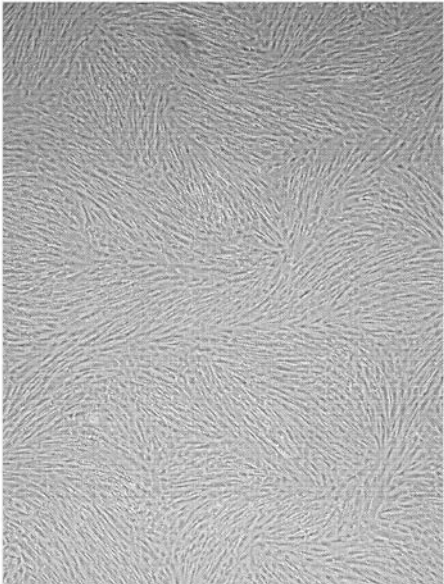


Figure 12

【 1 3 】

Control Cells: Human fibroblasts cultured in media in the absence of an NME protein
hFFN no ROCi Day 18 20x

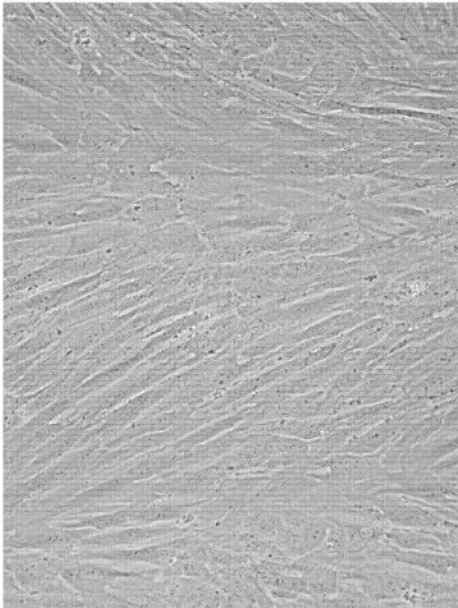


Figure 13

【 1 4 】

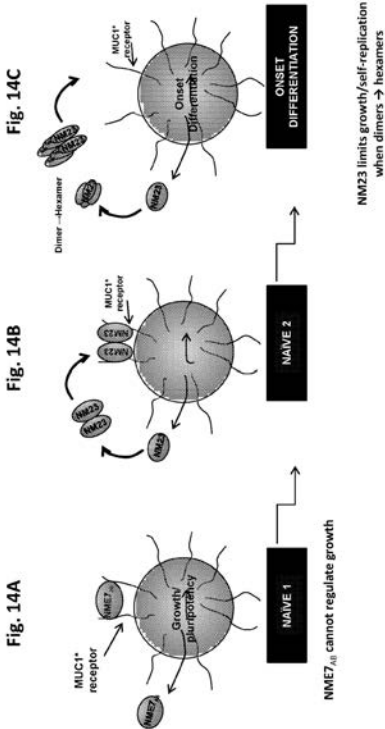
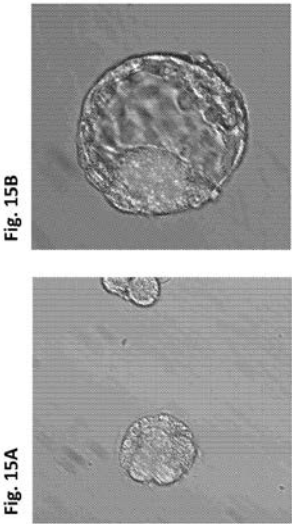


Figure 14

【 図 1 5 】



Day 3 human blastocyst

Day 5 human blastocyst

Figure 15

【 図 1 6 】

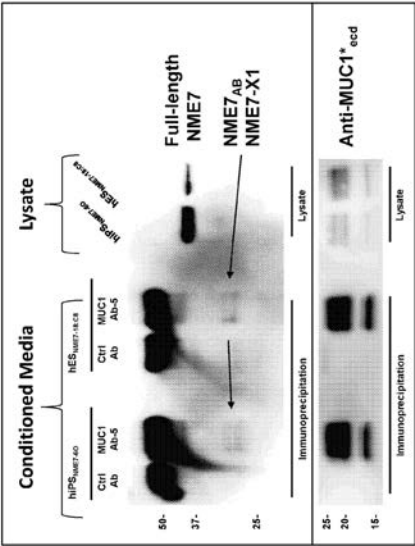


Fig. 16A

Fig. 16B

Figure 16

【 図 1 7 】

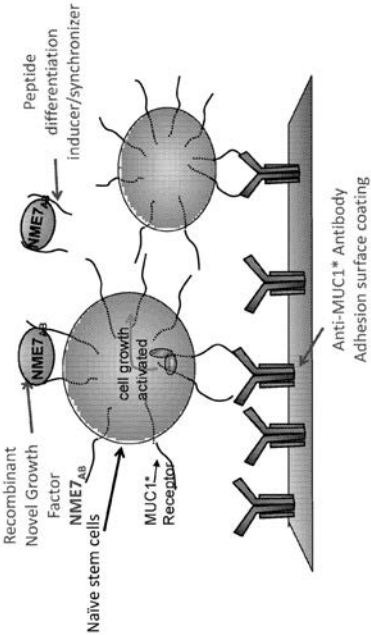


Figure 17

【 図 1 8 】

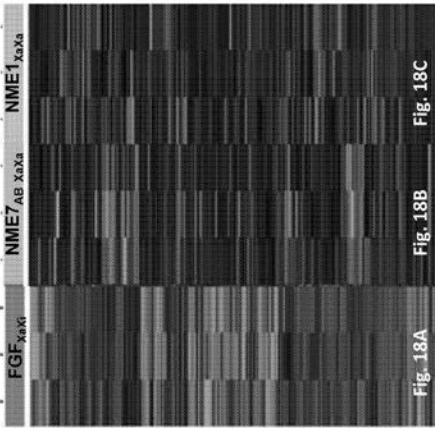


Figure 18

【 図 1 9 】

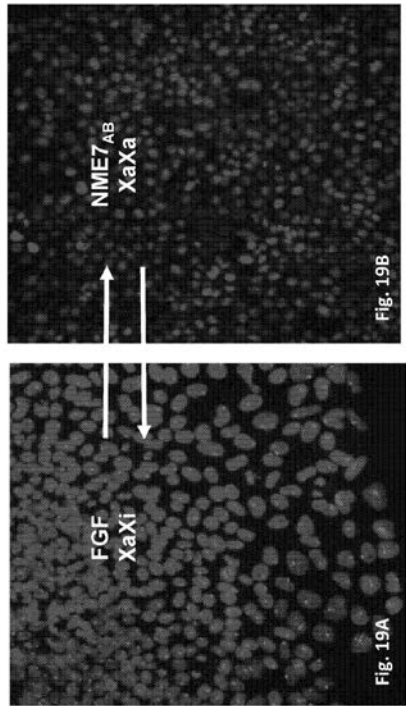


Figure 19

【 図 2 0 】

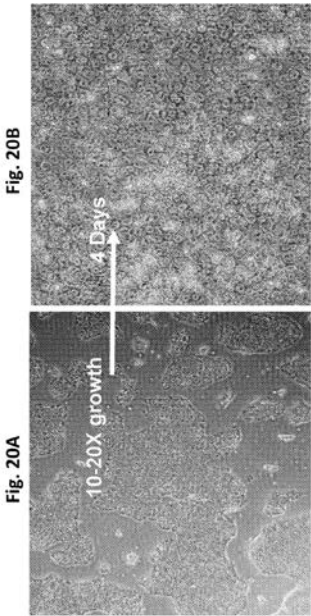


Figure 20

【 図 2 1 】

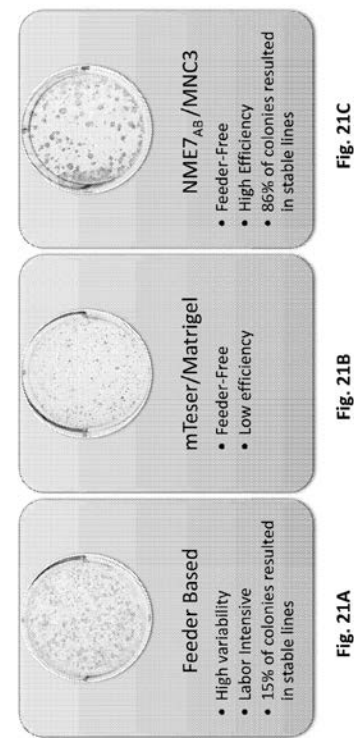


Figure 21

【 図 2 2 】

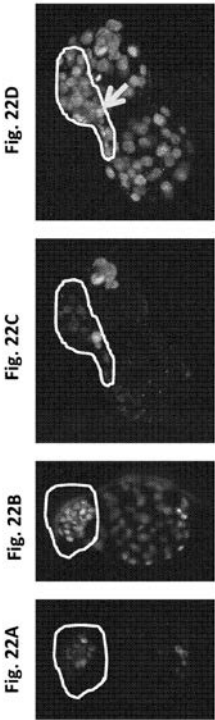


Figure 22

【 2 3 】

Minerva iPS.6E in mouse blastocyst (E4.5)

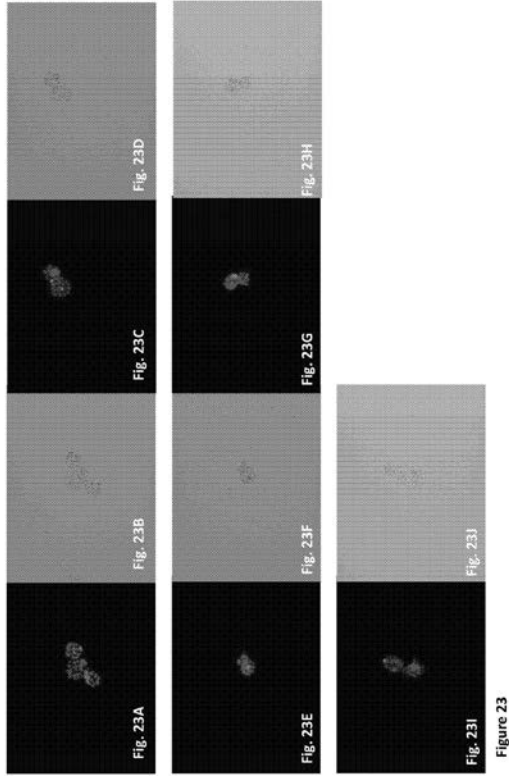


Figure 23

【 2 4 】

Minerva iPS.6R in mouse blastocyst (E4.5)

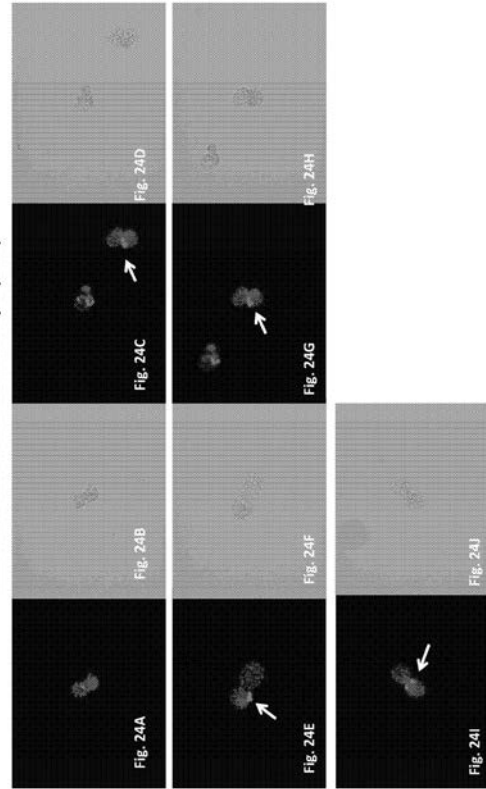
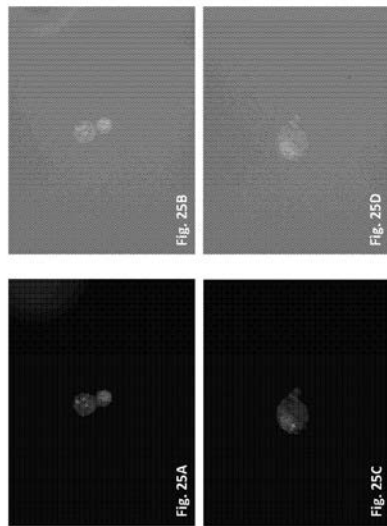


Figure 24

【 2 5 】

Primed cells (iPS.7A6.EB-Vitro) cultured in mouse embryo medium (KSOM)

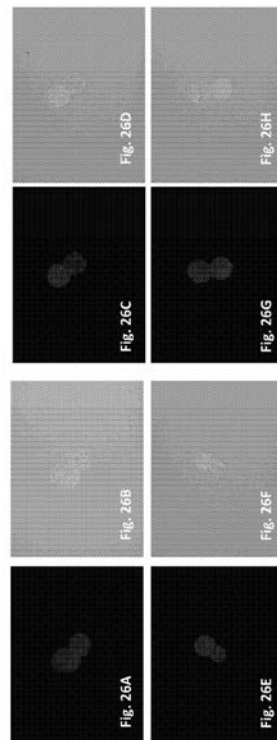


Antibodies used:
Tm-1.68
(Alexa Fluor 568)
CDX2 (Rabbit anti-human)
Tm-1.68
DAPI

Figure 25

【 2 6 】

Primed cells (iPS.7A6.EB-Vitro) cultured in 50% KSOM and 50% NME7 medium

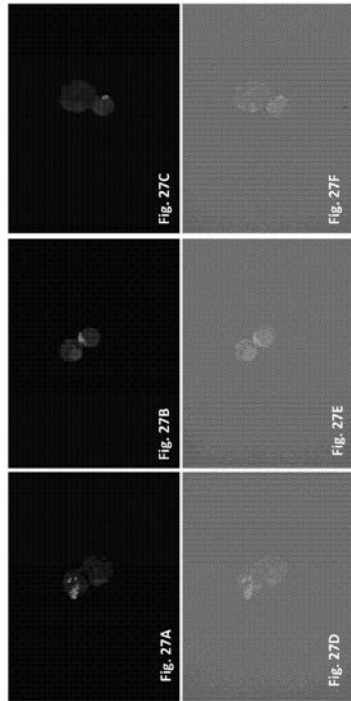


Tm-1.68 (Alexa Fluor 568) CDX2 (Rabbit anti-human) Minerva iPS.7A6.EB-Vitro DAPI

Figure 26

【 図 2 7 】

IPS.6E.tdtomato.p2 cultured in mouse embryo medium (KSOM)

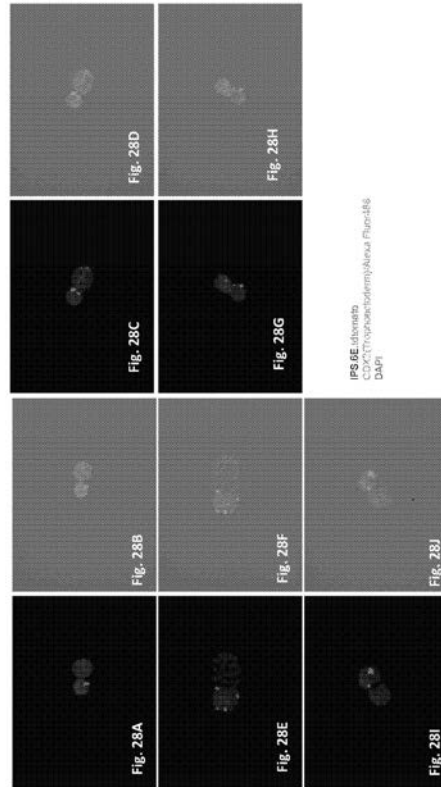


IPS.6E.tdtomato.p2 CD31 (green) DAPI (blue)

Figure 27

【 図 2 8 】

IPS.6E.tdtomato.p2 cultured in NME7 medium

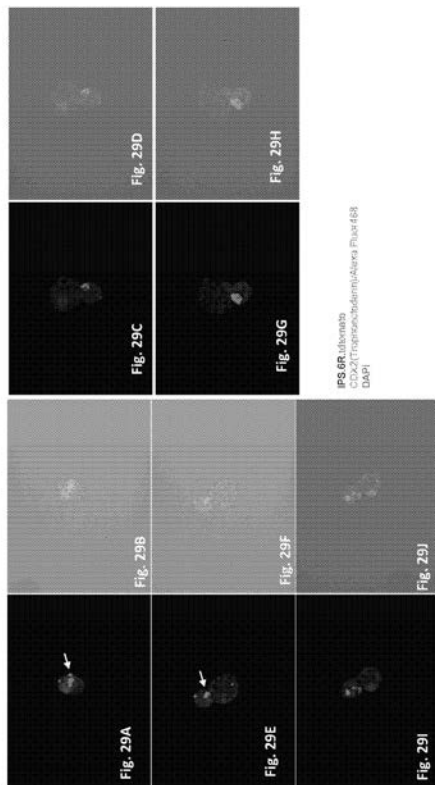


IPS.6E.tdtomato.p2 CD31 (green) DAPI (blue)

Figure 28

【 図 2 9 】

IPS.6R.tdtomato.p2 cultured in NME7-AB media

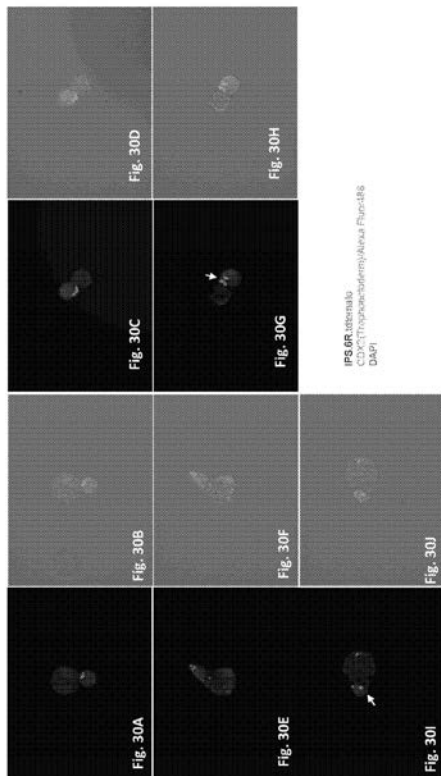


IPS.6R.tdtomato.p2 CD31 (green) DAPI (blue)

Figure 29

【 図 3 0 】

IPS.6R.tdtomato.p2 cultured in NME7 medium



IPS.6R.tdtomato.p2 CD31 (green) DAPI (blue)

Figure 30

【 図 3 1 】

Control plate: fibroblasts from crab-eating macaque at Day 6 in minimal media containing NME7-AB as only growth factor but no core pluripotency genes transduced into cells

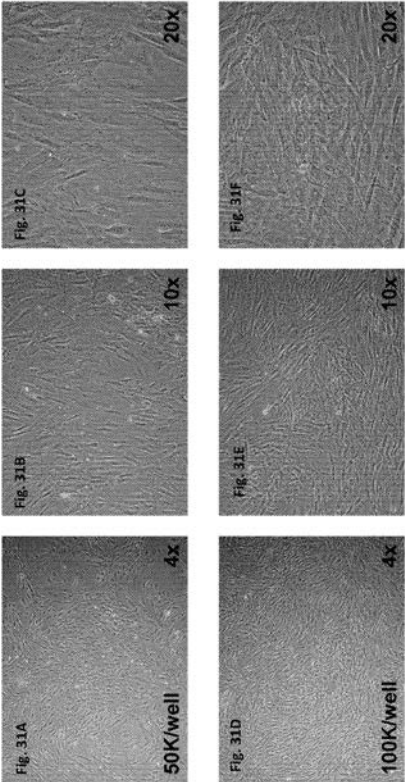


Figure 31

【 図 3 2 】

Crab-eating Macaque iPS generation in NME7-AB over anti-MUC1* antibody MN-C3 surface Day 6

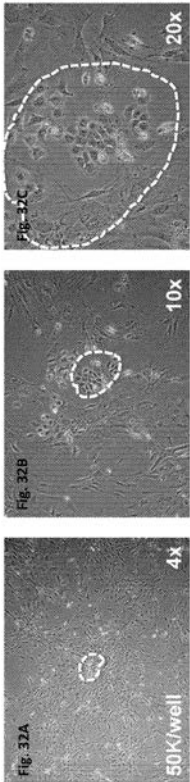


Figure 32

【 図 3 3 】

Crab-eating Macaque iPS generation in NME7-AB over anti-MUC1* antibody MN-C3 surface Day 6

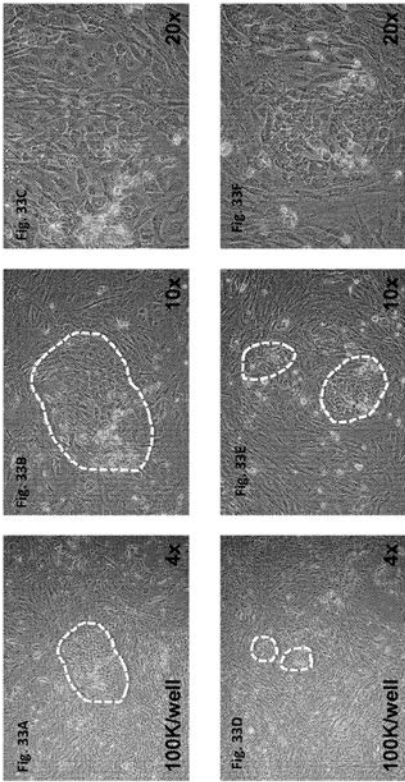


Figure 33

【 図 3 4 】

iPS cells generated from crab-eating macaque fibroblasts; Day 14 post transfection of core pluripotency genes Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc in an FGF-free media containing NME7-AB as single growth factor

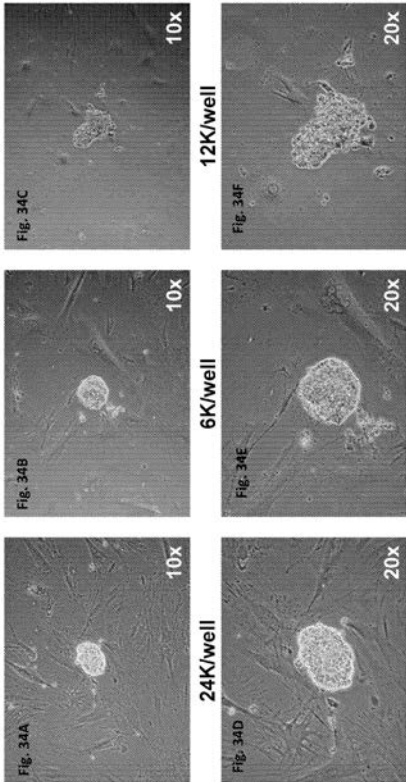
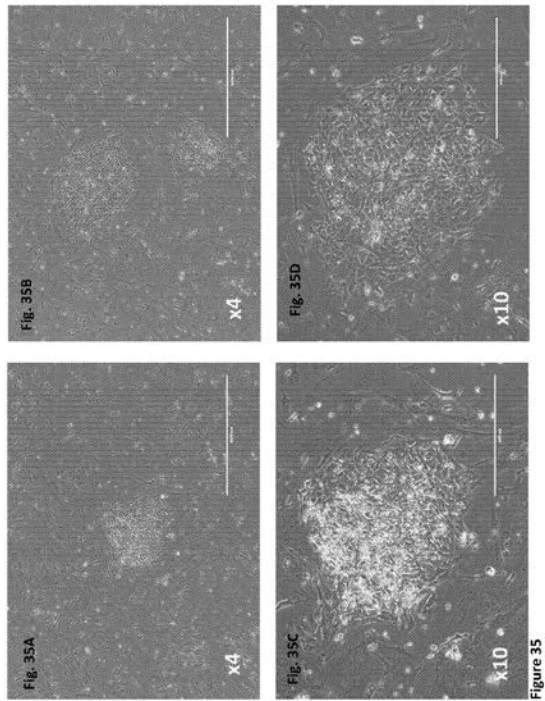


Figure 34

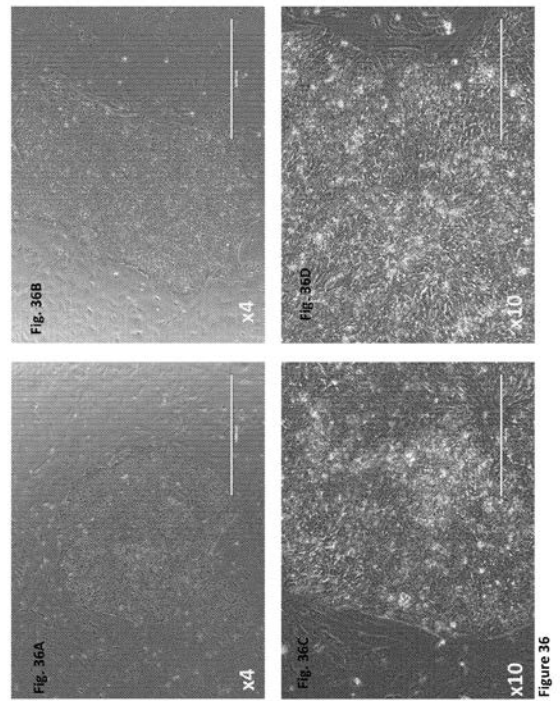
【 3 5 】

Rhesus Macaque ES cells on MEFS + NME7 media passage 2, day 1



【 3 6 】

Rhesus Macaque ES cells on MEFS + NME7 media passage 2, day 3 (passage day)



【 3 7 】

Rhesus Macaque ES cells on MEFS + NME7 media passage 3, day 1

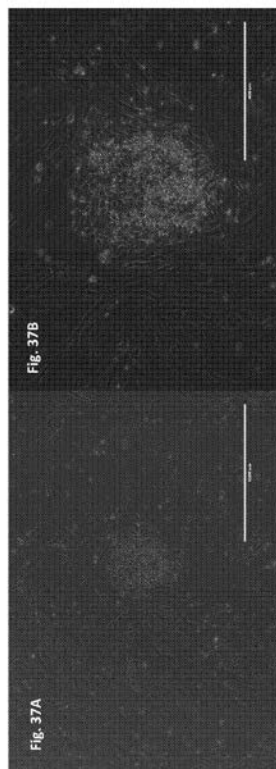


Figure 37

【 3 8 】

Rhesus Macaque ES : MEF+NME7: passage 3 day 4

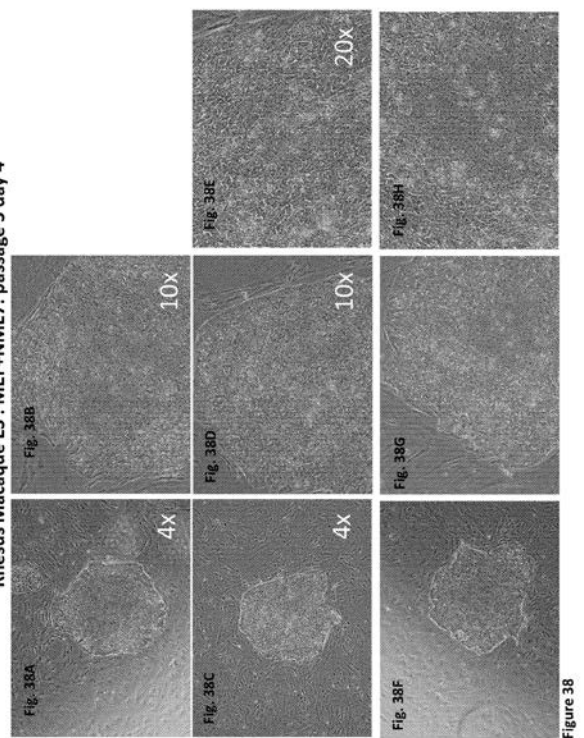


Figure 38

【 図 3 9 】

Rhesus Macaque iPS NME7-AB over MN-C3 antibody surface: Day 14 iPS derivation

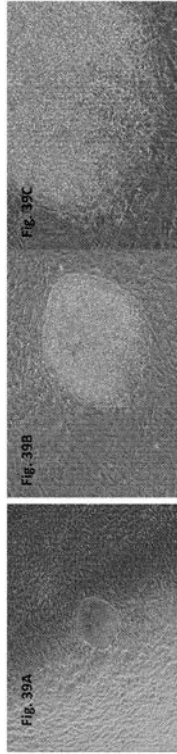
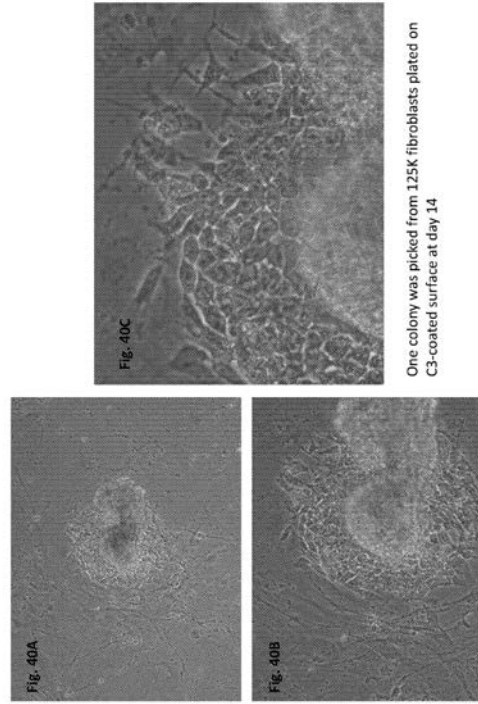


Figure 39

【 図 4 0 】

Macaque iPS cell line derivation in presence of NME7 media on an anti-MUC1* MN-C3 surface



One colony was picked from 125K fibroblasts plated on C3-coated surface at day 14

Figure 40

【 図 4 1 】

Macaque iPS cell line derivation in presence of NME7 media on two surfaces: MEF v C3-coated surface

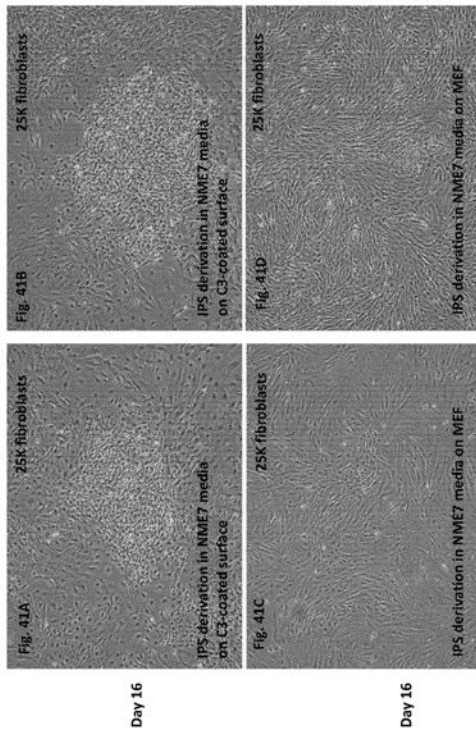
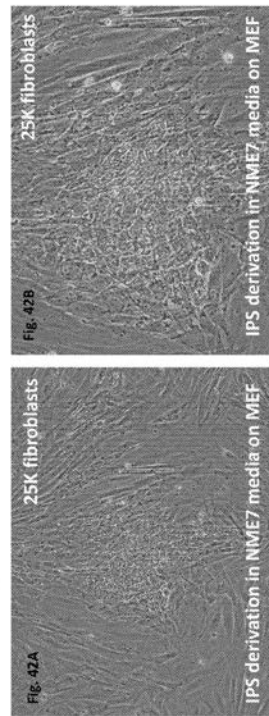


Figure 41

【 図 4 2 】

Macaque iPS cell line derivation in presence of NME7 media on mouse feeder cells, MEFs



Best single potential colony that was found on MEF surface

Figure 42

【 図 4 3 】

Macaque IPS cell line derivation in presence of NME7 media
Passage 1, day 3

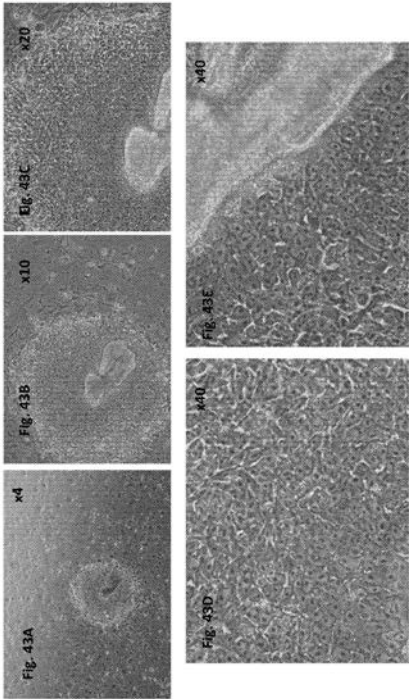


Figure 43

【 図 4 4 】

Macaque IPS cell line derivation in presence of NME7 media
Passage 2, day 1

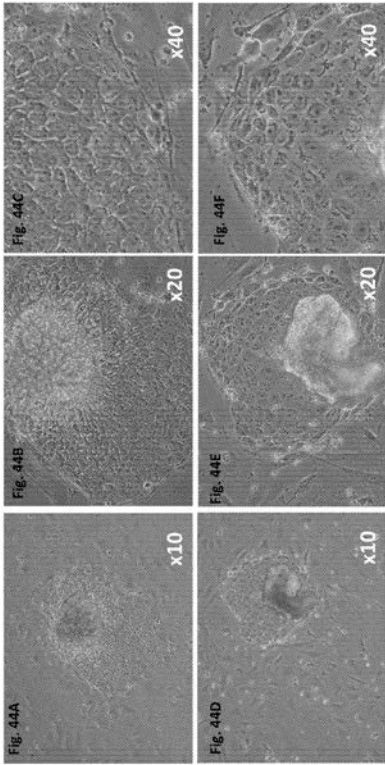


Figure 44

【 図 4 5 】

Macaque IPS cell line derivation in presence of NME7 media on MEFs Passage 2, day 2

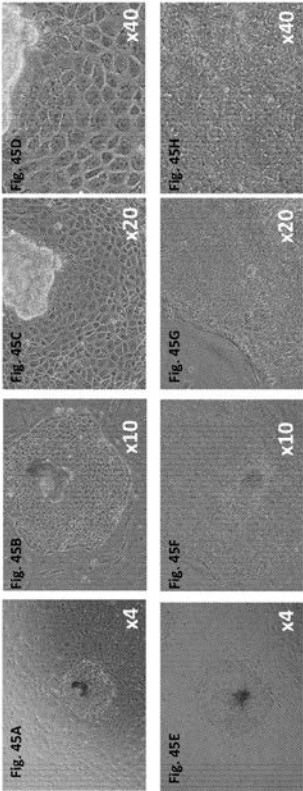


Figure 45

【 図 4 6 】

Macaque IPS cell line derivation in presence of NME7 media on MEFs Passage 2, day 3
(passing day, split 1:2 (12-w))

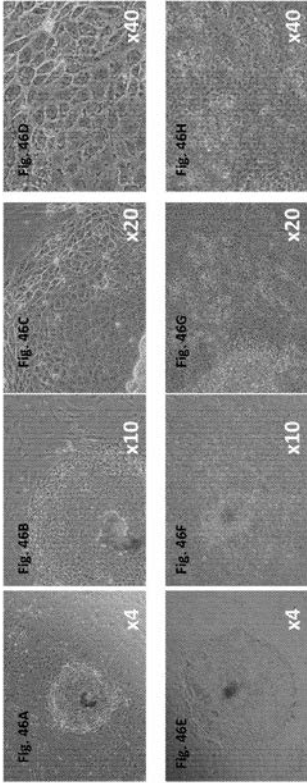
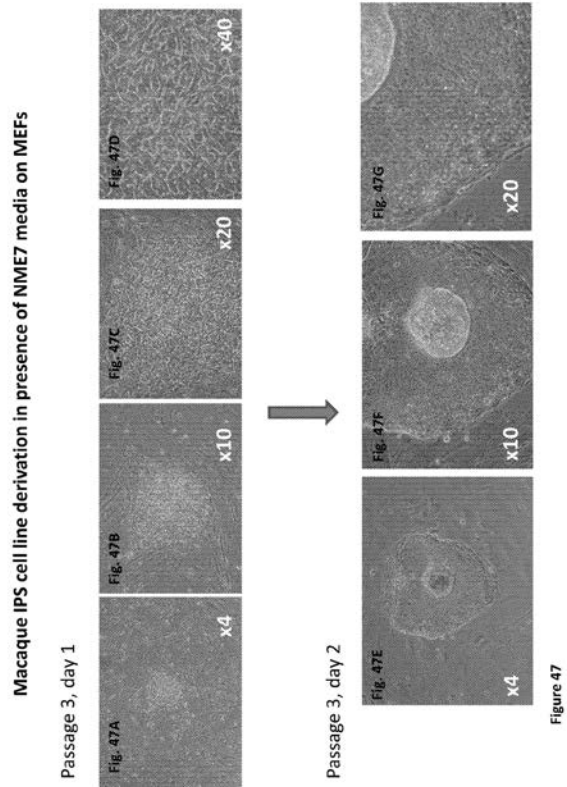
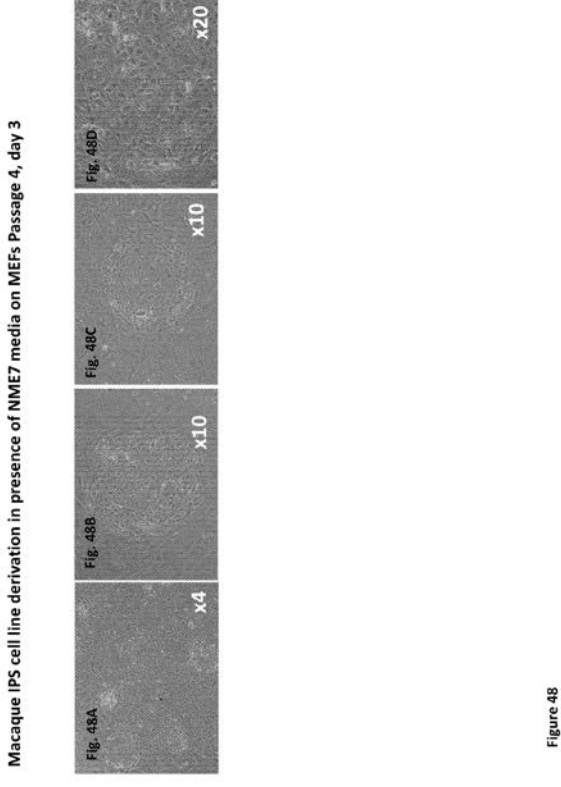


Figure 46

【 図 4 7 】



【 図 4 8 】



【 配 列 表 】

2018520682000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/040880

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - A01K 67/027; A61K 35/12; A61K 35/545; C07K 16/28 (2016.01) CPC - C07K 2317/74; C12N 2500/90; C12Y 207/04006; G01N 33/5073 (2016.08) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC - A01K 67/027; A61K 35/12; A61K 35/545; C07K 16/28 CPC - C07K 2317/74; C12N 2500/90; C12Y 207/04006; G01N 33/5073 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/9.2; 424/93.7; 424/138.1; 435/405 (keyword delimited) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PatBase, Google Patents, Google Scholar, Google, PubMed Search terms used: (human WF1 (tissue* or organ*)) (((non-human) or nonhuman or animal) WF1 host*) ((stem cell*) or IPS* or iPSC*)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	"P15532 (NDKA_MOUSE): Nucleoside diphosphate kinase A," UniProtKB, 01 April 1990 (01.04.1990), Pgs. 1-3. Retrieved from the Internet:<http://www.uniprot.org/uniprot/P15532> on 05 September 2016 (05.09.2016). entire document	18
X	"Q05982 (NDKA_RAT): Nucleoside diphosphate kinase A," UniProtKB, 01 February 1994 (01.02.1994), Pgs. 1-3. Retrieved from the Internet:<http://www.uniprot.org/uniprot/Q05982> on 05 September 2016 (05.09.2016). entire document	19
X	"Q2EN76 (NDKB_PIG): Nucleoside diphosphate kinase B," 21 March 2006 (21.03.2006), Pgs. 1-3. Retrieved from the Internet:<http://www.uniprot.org/uniprot/Q2EN76> on 05 September 2016 (05.09.2016). entire document	20
X	"W5PIB4 (W5PIB4_SHEEP): Uncharacterized protein," UniProtKB, 16 April 2014 (16.04.2014), Pgs. 1-3. Retrieved from the Internet:<http://www.uniprot.org/uniprot/W5PIB4> on 05 September 2016 (05.09.2016). entire document	21
X	"P52174 (NDKA1_BOVIN): Nucleoside diphosphate kinase A1," UniProtKB, 23 January 2007 (23.01.2007), Pgs. 1-3. Retrieved from the Internet:<http://www.uniprot.org/uniprot/P52174> on 05 September 2016 (05.09.2016). entire document	22
X	"G3QVZ0 (G3QVZ0_GORGO): Uncharacterized protein," UniProtKB, 16 November 2011 (16.11.2011), Pgs. 1-3. Retrieved from the Internet:<http://www.uniprot.org/uniprot/G3QVZ0> on 05 September 2016 (05.09.2016). entire document	27
X	MAHANTA et al. "A Minimal Fragment of MUC1 Mediates Growth of Cancer Cells," PLoS One, 30 April 2008 (30.04.2008), Vol. 3, Pgs. 1-12. entire document	29, 34
Y		28, 30-33, 35
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 "I" 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		Date of mailing of the international search report
05 September 2016		23 SEP 2016
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-1114

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/040880

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2015/0089677 A1 (MINERVA BIOTECHNOLOGIES CORPORATION) 26 March 2015 (26.03.2015) entire document	36, 38-48, 50, 51, 58-61
Y		12-17, 49, 52-57
X	"H2QRJ9 (H2QRJ9_PANTR): Uncharacterized protein," UniProtKB, 21 March 2012 (21.03.2012), Pgs. 1-3. Retrieved from the Internet: <http://www.uniprot.org/uniprot/H2QRJ9> on 05 September 2016 (05.09.2016). entire document	25
Y	CN 102397115 A (HUANG) 04 April 2012 (04.04.2012) entire document; see machine translation	1-17, 37
Y	RASHID et al. "Revisiting the Flight of Icarus: Making Human Organs from PSCs with Large Animal Chimeras," Cell Stem Cell, 02 October 2014 (02.10.2014), Vol. 15, Pgs. 406-409. entire document	1-17, 37, 49, 52-57
Y	US 2015/0017726 A1 (MINERVA BIOTECHNOLOGIES CORPORATION) 15 January 2015 (15.01.2015) entire document	2-4, 7, 8, 11
Y	"Q02496 (MUC1_MOUSE): Mucin-1," UniProtKB, 05 February 2008 (05.02.2008), Pgs. 1-4. Retrieved from the Internet: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q02496> on 05 September 2016 (05.09.2016). entire document	28, 31-33
Y	"K7C5F8 (K7C5F8_PANTR): Mucin 1, cell surface associated," UniProtKB, 09 January 2013 (09.01.2013), Pgs. 1-3. Retrieved from the Internet: <http://www.uniprot.org/uniprot/K7C5F8> on 05 September 2016 (05.09.2016). entire document	30
Y	"Q8WML4 (MUC1_BOVIN): Mucin-1," UniProtKB, 01 March 2002 (01.03.2002), Pgs. 1-3. Retrieved from the Internet: <http://www.uniprot.org/uniprot/Q8WML4> on 05 September 2016 (05.09.2016). entire document	35
Y	KOBAYASHI et al. "Targeted Organ Generation Using Mixl1-Inducible Mouse Pluripotent Stem Cells in Blastocyst Complementation," Stem Cells Dev, 15 January 2015 (15.01.2015), Vol. 24, Pgs. 182-9. entire document	55-57
A	"P56597 (NDK5_HUMAN): Nucleoside diphosphate kinase homolog 5," UniProtKB, 15 December 1998 (15.12.1998), Pgs. 1-3. Retrieved from the Internet: <http://www.uniprot.org/uniprot/P56597> on 05 September 2016 (05.09.2016). entire document	25
A	"P15941 (MUC1_HUMAN): Mucin-1," UniProtKB, 18 May 2010 (18.05.2010), Pgs. 1-13. Retrieved from the Internet: <http://www.uniprot.org/uniprot/P15941> on 05 September 2016 (05.09.2016). entire document	28, 31-33

(51) Int. Cl.			F I			テーマコード (参考)		
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10				
C 1 2 N	15/10	(2006.01)	C 1 2 N	15/10		2 0 0		
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	35/12				
A 6 1 L	27/36	(2006.01)	A 6 1 L	27/36		1 0 0		
A 6 1 L	27/38	(2006.01)	A 6 1 L	27/38		3 0 0		
G 0 1 N	33/15	(2006.01)	G 0 1 N	33/15			Z	
G 0 1 N	33/50	(2006.01)	G 0 1 N	33/50			Z	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53			D	

(72)発明者	バンダッド, シンシア								
	米国, マサチューセッツ州	0 2 4 5 1	, ウォルサム, 4 0	ベアー	ヒル	アールディー.			
(72)発明者	スマッジ, ブノワ								
	米国, マサチューセッツ州	0 2 4 5 1	, ウォルサム, 4 0	ベアー	ヒル	アールディー.			
(72)発明者	カーター, マーク								
	米国, マサチューセッツ州	0 2 4 5 1	, ウォルサム, 4 0	ベアー	ヒル	アールディー.			
(72)発明者	スチュアート, アンドリュウ								
	米国, マサチューセッツ州	0 2 4 5 1	, ウォルサム, 4 0	ベアー	ヒル	アールディー.			

F ターム (参考)	2G045	AA24	CB01	DA36	FB03						
	4B065	AA90X	AA93X	AA93Y	AB01	AC20	BA02	BA16	BA30	BD39	CA44
		CA60									
	4C081	AB11	CD34	EA01							
	4C087	AA01	AA02	BB64	CA04	NA14					
	4H045	AA10	AA11	AA30	CA40	DA50	DA76	EA60	FA74		