

(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2018-509890

(P2018-509890A)

(43) 公表日 平成30年4月12日(2018.4.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 6 3
C 1 2 N 5/074 (2010.01)	C 1 2 N 5/074	4 B O 6 5
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	4 C O 8 7
C 1 2 Q 1/68 (2018.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
A 6 1 K 35/545 (2015.01)	A 6 1 K 35/545	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 26 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2017-540262 (P2017-540262)	(71) 出願人	506316557
(86) (22) 出願日	平成28年2月1日 (2016.2.1)		センター ナショナル ド ラ ルシエル
(85) 翻訳文提出日	平成29年9月27日 (2017.9.27)		シュ サイエнтиフィーク
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/052085		フランス エフー75794 パリ セデ
(87) 国際公開番号	W02016/120493		ックス 16 リュー ミシエル アンジ
(87) 国際公開日	平成28年8月4日 (2016.8.4)		エ 3
(31) 優先権主張番号	15305145.3	(74) 代理人	100094569
(32) 優先日	平成27年1月30日 (2015.1.30)		弁理士 田中 伸一郎
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100088694
			弁理士 弟子丸 健
		(74) 代理人	100103610
			弁理士 ▲吉▼田 和彦
		(74) 代理人	100084663
			弁理士 箱田 篤
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 人工多能性幹細胞 (iPSC) の生産を再プログラムする方法

(57) 【要約】

本発明は幹細胞の分野に入る。本発明は、特に、 133p53 アイソフォーム、 133p53 アイソフォーム、又は 133p53 及び 133p53 の両アイソフォームを発現するウイルスベクターを分化体細胞に形質導入することによって人工多能性幹細胞 (iPSC) を作製するための再プログラムの方法；前記方法によって作製される人工多能性幹細胞；細胞療法で及び種々の疾患の研究用 in vitro モデルとしての前記の使用；並びに iPSC 検出のための方法に関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

以下の工程を含む、人工多能性幹細胞（iPSC）を作製するための再プログラムの方法：

- a) 分化体細胞に 133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム又は 133p53 及び 133p53 の両アイソフォームを発現するベクターを形質導入する工程；
- b) 形質導入された分化体細胞をそれらの増殖を支援する培地で培養する工程；及び
- c) 人工多能性幹細胞（iPSC）を単離する工程。

【請求項 2】

分化体細胞が、末梢血単核球（PBMC）、線維芽細胞及びCD4+リンパ球を含む群から選択され、前記細胞が、好ましくは線維芽細胞から選択される、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム又は 133p53 及び 133p53 の両アイソフォームを発現するベクターが、レトロウイルスベクター、好ましくはネズミ幹細胞ウイルス（MSCV）ベクターであって、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム又は 133p53 及び 133p53 の両アイソフォームをコードする核酸分子並びにその発現を可能にするために必要なエレメントを含む、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項 4】

工程b) の培地が、無機塩、アミノ酸、ビタミン及びブドウ糖、 β -メルカプトエタノール、少なくとも1つの抗生物質、並びにbFGFを含む基本培地である、請求項1から3のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 5】

人工多能性幹細胞（iPSC）が、幹細胞表面マーカーに基づく選別、DNA染料排除によるサイド集団（SP）表現型に基づくフローサイトメトリー、胚様形成及びiPSCコロニー採取を含む群から選択される手段によって単離される、請求項1から4のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】

細胞に形質導入する工程a) の前に分化体細胞を培養する工程a1) をさらに含む、請求項 1 から5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 7】

分化体細胞に 133p53 アイソフォームを発現するベクターが形質導入される、請求項 1 から6のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 8】

請求項 1 から7のいずれか1項に記載の再プログラムの方法から得られる人工多能性幹細胞（iPSC）。

【請求項 9】

細胞療法で使用される、請求項8に記載の人工多能性幹細胞（iPSC）。

【請求項 10】

加齢関連及び/又は変性疾患の治療で治療薬剤として使用される、請求項8又は9に記載の人工多能性幹細胞（iPSC）。

【請求項 11】

加齢関連及び変性疾患が、心脈管系疾患、糖尿病、癌、関節炎、高血圧、心筋梗塞、卒中、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病及びパーキンソン病を含む群から選択される、請求項10に記載の人工多能性幹細胞（iPSC）。

40

【請求項 12】

筋萎縮性側索硬化症、アデノシンデアミナーゼ欠乏関連重症複合免疫不全、シュバッハマン-ボディアン-ダイヤモンド症候群、III型ゴーシェ病、デュシェンヌ及びベッカー筋ジストロフィー、パーキンソン病、ハンチントン病、真正1型糖尿病、ダウン症候群及び脊髄性筋萎縮症を含む群から選択される疾患のモデルとしての、請求項8に記載の人工多能性幹細胞（iPSC）のin vitroの使用。

【請求項 13】

50

人工多能性幹細胞（iPSC）を検出するin vitroの方法であって、前記方法が、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は133p53 及び133p53 の両アイソフォームのポリペプチドを検出することによって、及び/又は133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は133p53 及び133p53 の両アイソフォームのmRNA及び/又はそのフラグメントを検出することによって、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は133p53 及び133p53 の両アイソフォームの存在を検出する工程を含む、前記方法。

【請求項14】

前記検出工程が、133p53 アイソフォームのポリペプチド及び/又はそのフラグメントを検出することによって、及び/又は133p53 アイソフォームのmRNA及び/又はそのフラグメントを検出することによって、133p53 アイソフォームの存在を検出することに基づく、請求項13に記載のin vitroの方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、細胞生物学の分野、より詳細には幹細胞の分野に入る。本出願は、分化体細胞のp53アイソフォーム発現ベクターによる形質導入を含む人工多能性幹細胞（iPSC）を再プログラムする方法、本発明によって入手される人工多能性幹細胞、及びそれらの使用に関する。本発明はまた、人工多能性幹細胞（iPSC）を検出する方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

人工多能性幹細胞（iPSCとしても知られている）は、成人の細胞から直接的に作製される多能性幹細胞のタイプである。iPSC技術は日本人の山中伸弥氏によって先導開発され、氏は、2006年に、転写因子をコードする4つの特定の遺伝子（Oct4、Sox2、cMyc及びNanog）の導入が成人の細胞を多能性幹細胞に変換できることを示した。

現在、再生医療の分野で多能性幹細胞に大きな期待が寄せられている。その目的は、事故、疾患又は加齢によって変化した組織を修復することである。これは、医学的に途方もなく大きな影響を与える新規な治療分野である。なぜならば、前記はこれまでのところ適切な治療方法がない疾患を治療し治癒させる可能性を提供するからである。再生医療はほとんどの医療分野に当てはまり、バイオテクノロジー産業の最も有望な開発分野の1つを構成する。虚血性疾患、変性疾患及び/又は加齢関連疾患は、先進国の全住民の死亡の主要な原因である。

30

幹細胞は、それらの増殖能力及び分化能力のゆえにこれら疾患の細胞療法のための細胞供給源であろうということは広く認識されている。しかしながら、胚性幹細胞の医学的利用は免疫学的及び倫理的懸念によって阻まれている。

これら2つの障害はiPSC（人工多能性幹細胞）技術によって一時取り除かれた。

【0003】

iPSCは、細胞交換治療法のための自家性細胞供給源を提供し、自家性移植によって組織を交換又は再生する。さらにまた、患者固有のiPSCは、疾患メカニズムのモデリング及び薬剤スクリーニングのためのin vitroモデルとして役立つ。

40

最初の再プログラム因子セット（山中因子とも称される）は遺伝子Oct4、Sox2、cMyc及びNanogを含む。より最近では、これらの因子の3つを含むいくつかの特異的組合せもまたiPSCを生じると報告された。

しかしながら、これらの因子を用いるiPSCの再プログラムはトランスフェクトされた細胞の非常に低いパーセンテージで生じ、iPSCの治療的使用は、多くの障壁（とりわけ安全性、規制に関する問題、経済上の実行可能性、低い再プログラム効率及び得られたiPSCの不確実な安定性）に直面せねばならないことが示された。

低い再プログラム効率の問題に対する種々の解決策が、山中因子の少なくともいくつかに加えて、他の遺伝子の発現の調節（過剰発現又は阻害）に基づいて提唱された。しかしながら、再プログラム効率を増加させるために従来技術で提唱された方法は、DNA修復機

50

構の改変を同時に誘導するために、一般的にDNAの傷害及び染色体異常をもたらす。結果として、再プログラム効率を増加させる一方で、提唱された方法は大量の臨床的に有効なiPSCの調製には適切ではない。

【0004】

例えば、最初の山中因子はc-myc (DNA修復機構を改変しDNAの傷害及び染色体異常をもたらすことが知られている)を含む。この因子は実際のところiPSCの誘導に必要なではないが、その他の山中因子のみを用いると再プログラム効率は減少する。

最近の研究で、幹細胞(SC)の恒常性及び多能性誘導におけるp53の役割が報告された。p53は遺伝子毒性傷害後のゲノムの完全性を担保するだけでなくSCの増殖及び分化を制御する。加えて、p53は、最終分化細胞からiPSCを作製するために効果的な障壁を提供する。野生型(wt)p53が阻害性作用を有するとしたら、いくつかのp53変異体は完全に反対の作用を示す(Sarig et al, 2010)。最近のゲノムワイド研究は、p53はマウスES細胞で約3600遺伝子を調節することを示した(Li et al, 2012)。これらのうち、約2000遺伝子がプラスに調節され1600は抑制される。プラスに調節される遺伝子は分化に必要とされる遺伝子に多く、一方、マイナスに調節される遺伝子はES細胞状態の維持に多い。p53はES表現型の重要な調節因子(例えばOct4、Sox2、c-myc)を抑制する(Li et al, 2012; Lin et al, 2005)。結果として、最近の報告は、p53はp21シグナリング経路を介して細胞の再プログラムを妨害することを示した(Hong et al, 2009)。

p53の枯渇は、細胞の再プログラムの有効性を顕著に増加させ、同時に山中カクテルの2因子(Sox及びOct4)のみを用いて作製されるiPSCを提供することが見出された(Kawamura et al, 2009)。タケナカら(2010)はまた、p53の阻害はCD34+単球由来のiPSCの入手を可能にすることを開示している。

しかしながら、p53の枯渇又は変異p53タンパク質の発現によるiPSCの作製は、これらの細胞が腫瘍類似の特色を提示し、マウスに注射したとき悪性腫瘍を発達させるという事実のために大きなリスクを伴う。p53の永久的抑制はしたがって、iPSCの誘導及び維持の最中に、特にDNAの傷害及び染色体異常の蓄積によってiPSCの品質を低下させ得る(Tapia & Scholer, 2010)。そこで、p53遺伝子の枯渇又は変異p53タンパク質の発現によって得られるiPSCの細胞療法における使用は危険であり不確実である。

【0005】

別には、TP53遺伝子は、少なくとも12の異なる生理学的アイソフォーム(TAp53(、及び)、40p53(、及び)、133p53(、及び)、及び160p53(、及び))を以下のいくつかのメカニズムを介してコードする(Bourdon, 2007)；また別のプロモーターの使用(TA及び133アイソフォーム)、また別のイントロンスプライシングの使用(イントロン2：40アイソフォーム及びイントロン9：、及びアイソフォーム)、及びまた別の翻訳開始部位の使用(40アイソフォーム及び160アイソフォーム)。TAp53、40p53及び133p53のアイソフォーム、及びの特色をまとめた模式図は図1に提示されている。TAp53アイソフォームはもっとも詳しく記載され、古典的にはp53と文献に記述されている。基本的に、p53は以下の2つのグループに分割できる：トランスアクチベーションドメインを含む長アイソフォーム(TA及び40)及びトランスアクチベーションドメインのない短アイソフォーム(133及び160)。さらにまた、及びアイソフォームは共通のC-末端オリゴマー化ドメインを含まないが、今日まで不明の機能を有する追加のドメインを含む(Khoury & Bourdon, 2011)。p53アイソフォームはp53転写活性を調節し、さらに細胞周期の進行、プログラム細胞死、複製老化、ウイルス複製、細胞分化及び血管形成を調節することによって細胞の運命に種々の結果をもたらすことができる(Aoubala et al, 2011; Bourdon et al, 2005; Hofstetter et al, 2012; Nutthasirikul et al, 2013; Terrier et al, 2012)。

WO 2012/044979は、山中因子から選択される少なくとも1つの再プログラム因子の存在下で、再プログラム効率(したがってiPSC誘導)を増大させるために133p53の使用を開示する。しかしながら、前記文献は、開示の方法で得られたiPSCが遺伝的に安定であり、DNA修復機構にDNA損傷又は改変をもたないことを示すデータを含んでいない。結果とし

て、遺伝的損傷がなく、正常な体細胞機能及び特に非改変DNA修復機構を有し、したがってそれらの遺伝的安定性及びそれらの臨床的使用可能性を担保する、人工多能性幹細胞への効率的な体細胞の再プログラムを可能にする方法がなお希求されている。

【発明の概要】

【0006】

本発明の関係で、今や発明者らは、133p53 アイソフォーム及び/又は 133p53 が幹細胞再プログラムに中心的に関与することを見出した。特に、133p53 及び/又は 133p53 アイソフォームは、山中転写因子 (Oct4、Sox2、cMyc及びNanog) のいずれかの異種誘導の非存在下で、又はp53遺伝子の枯渇若しくは変異誘導がなくとも分化体細胞の幹細胞再プログラムを誘導することができる。これらアイソフォームの過剰発現は再プログラムされたiPSCのDNAを改変しない。さらにまた、DNA修復チェックポイント応答もまた機能を維持する。

発明者らはさらに、133p53の中でアイソフォーム 及び のみが全山中因子の非存在下で再プログラムを誘導することができ、133p53 アイソフォームの発現は山中因子の非存在下ではiPSC誘導を許容しないこと示した。発明者らはさらに、133p53 アイソフォームの発現は、133p53 アイソフォームの発現とは反対に、再プログラムされたiPSCのDNA修復機構を改変しないことを示した (133p53 の発現はDNA損傷の存在下でp21WAF1の蓄積の低下をもたらし、133p53 アイソフォームを発現する細胞でp53のDNA修復機構が改変されることを示している)。

これらの発見は予想に反した。なぜならば、発明者らが知る限りでは、幹細胞 (特に人工多能性幹細胞) でのp53アイソフォーム 133p53 及び/又は 133p53 の発現は本発明前には記載されたことがなかったからである。特に、山中因子の非存在下での体細胞のp53アイソフォーム 133p53 及び/又は 133p53 の発現が、そのような体細胞のiPSCへの再プログラムを許容することが示されたことはなかった。さらにまた、発明者らの発見は予想に反した。なぜならば、WO2012/044979は、133p53 アイソフォームの発現は山中因子の少なくとも1つの存在下でのみ再プログラム効率の増加を可能にすることを開示しているからである。前記は本発明者らによって既に確認され、彼らは、この特定のアイソフォームが単独で (全山中因子の非存在下で) 用いられるときは体細胞のiPSC誘導は可能でないこと、及びその発現はDNA修復メカニズムを改変することを示している。133p53

及び/又は 133p53 アイソフォームの発現が再プログラムされたiPSCのDNA修復機構を改変しないという事実は、これらのアイソフォームは遺伝的安定性を保つことを示している。

【0007】

上記の発見は従来技術で生じる欠点の克服を可能にする。なぜならば、体細胞のiPSCへの再プログラムのためにいくつかの転写因子の発現は必要とされず、又はp53の枯渇若しくはp53コード遺伝子に変異を有する構築物の使用は必要とされないからである。本発明者らによって提供される新規な方法は、したがって同時に再プログラム効率を改善し、DNA修復メカニズムの改変による遺伝的不安定性のリスクを低下させる。結果として、本発見は、より良好な効率、DNA改変のないゲノム安定性を示す人工幹細胞の作製を可能にする。

第一の特徴では、本発明はしたがって人工多能性幹細胞 (iPSC) を再プログラムする方法に関し、前記方法は以下の工程を含む：

- a) 分化体細胞に 133p53 、 133p53 又は 133p53 及び 133p53 の両アイソフォームを発現するベクターを形質導入する工程；
- b) 形質導入された分化体細胞をそれらの増殖を支援する培地で培養する工程；及び
- c) 人工多能性幹細胞 (iPSC) を単離する工程。

本発明者らは、133p53 及び 133p53 の両アイソフォーム (133p53 ではない) が、特に 133p53 が入手したiPSCで高度に発現されることを見出した。高発現は、山中転写因子の過剰発現又は変異p53タンパク質の枯渇若しくは発現による場合とは反対に、これらのアイソフォームのレベル上昇は遺伝的不安定性又はDNA修復応答の改変とは無関係

係であることを示す。結果として、再プログラムに生理学的p53アイソフォームを用いることによって、本発明の方法は、遺伝的改変のリスクの低下を可能にし（133p53はDNA修復応答を改変しないため）、したがってより良好な効率及び安定性を有する人工多能性幹細胞（細胞療法で用い得る）の入手を可能にする。

【0008】

第二の特徴では、本発明はしたがって本発明の再プログラムの方法で入手される人工多能性幹細胞（iPSC）に関する。本発明の方法で入手されるiPSCは133p53及び/又は133p53アイソフォームを発現するベクターを含む。

それらのより良好な安定性及び非損傷DNA修復機能により、そのようなiPSCを細胞療法で及び/又は多様な疾患を研究するin vitroモデルとして用いることができる。

第三の特徴では、本発明はしたがって、細胞療法で及び/又は多様な疾患を研究するモデルとして使用される本発明の再プログラムの方法により入手されるiPSCに関する。

人工多能性幹細胞は、特に133p53アイソフォーム、133p53アイソフォーム、又は133p53及び133p53の両アイソフォームを発現するという発見はまた、iPSCを含む細胞集団で133p53、133p53アイソフォーム、又は133p53及び133p53両アイソフォームを検出することによってiPSCの検出を可能にする。

第四の特徴では、本発明はしたがって人工多能性幹細胞（iPSC）を検出する方法に関し、前記方法は、133p53アイソフォーム、133p53アイソフォーム、又は133p53及び133p53の両アイソフォームのポリペプチド及び/又はそのフラグメントを検出することによって、及び/又は133p53、133p53アイソフォーム、又は133p53及び133p53両アイソフォームのmRNA及び/又はそのフラグメントを検出することによって、133p53アイソフォーム、133p53アイソフォーム、又は133p53及び133p53両アイソフォームの存在を検出する工程を含む。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】ヒトp53アイソフォームの模式図。ヒトp53遺伝子は、基部（P1）及び内部（P2）プロモーターを含み、前記はそれぞれp53及び133p53転写物の発現を調節する。p53転写物は2つのアイソフォーム、p53及び40p53をコードし、前記はATG40を用いて内部翻訳開始によって生成される。p53遺伝子は、それぞれ別の態様でスプライスされる3つのカルボキシ末端アイソフォーム（、及び）を発現する。P53及びp53タンパク質アイソフォームは、古典的オリゴマー化ドメインを欠くという点で完全長p53（FLp53）と異なる。133p53転写物は133p53及び160p53の両アイソフォームをコードし、前記はそれぞれ別の態様でスプライスされた及び。エクソンと結合されて、133p53133p53、133p53及び160p53160p53、160p53を生じる（Bourdon et al., 2005; Marcel et al., 2010）。これらのアイソフォームはN-末端トランスアクチベーションドメイン及びDNA結合ドメインの部分が欠失している。

【図2】4因子（Oct4、Sox2、Klf4、c-myc）及び6因子（Oct4、Sox2、Klf4、c-myc、Nano g及びLyn28）感染細胞の3週間後の133p53対TBP発現レベル。133p53は、4因子OSKMと比較して6因子OSKMNLを発現するヒト細胞で高度に発現される。

【図3】線維芽細胞及び幹細胞における133p53アイソフォームの発現。133p53はヒト胚性幹細胞及びiPSCで高度に発現される。133p53 mRNAレベルが、線維芽細胞分化前のヒト胚性幹細胞（ES）及び分化後のヒト胚性幹細胞（ES-F）で、再プログラム前の皮膚線維芽細胞（Sk-F）及び再プログラム後の皮膚線維芽細胞（iPSC）並びに再分化後の皮膚線維芽細胞（iPSC-F）並びにヒト新生児由来の皮膚線維芽細胞（HFFSM3）でqPCRによって分析された。133p53は、線維芽細胞と比較して胚性幹細胞及びiPSCで明瞭に増加する。

【図4】133p53の発現だけで生成された、表示の感染10、14及び22日後のiPSC様細胞の画像。

【図5】多能性因子の発現に対する133p53アイソフォームの影響。133p53の発現によって、Sox2、Nanog、Oct3/4のmRNAレベルの増加、及び前記よりは低い度合いでのc-m

10

20

30

40

50

yc mRNAレベルの増加が、再プログラム後第一週と第三週の間に生じる。

【図 6 A】空ベクター（空ベクター）又は 133p53 アイソフォーム（ 133 ）又は 133p53 アイソフォーム（ 133 ）を発現するヒト皮膚線維芽細胞。A：qPCRによって測定したp53アイソフォーム（ 133p53 及び 133p53 ）のmRNA発現。全アイソフォームを検出する特異的プライマー（ALL）及び 133を除く全アイソフォームを検出するプライマーが用いられた。qPCRの結果は標的遺伝子/参照遺伝子比（TBP、TATA結合タンパク質）として表される。

【図 6 B】B：qPCRによって測定したp21及びMDM2のmRNA発現。

【図 6 C】C：以下の発現レベルを示すウェスタンブロット、共通p53（抗体CM1により検出）、133p53 133p53 アイソフォーム（DO-11、H2AX、Thr68上のリン酸化Chk2（P-Thr68-Chk2）、DNA損傷応答経路及びp21のChk2総タンパク質、細胞周期阻害因子タンパク質及びpRbを用いて検出）。チューブリン（Tub）をローディングコントロールとして使用。

【発明を実施するための形態】

【0010】

定義

特段の規定がなければ、本明細書で用いられる全ての技術用語及び学術用語は、本発明が属する分野の業者が一般に理解する意味と同じ意味を有する。本明細書に記載する方法及び材料と同様な又は等価の任意の方法及び材料を本発明の実施及び試験に用いることができるが、好ましい方法及び材料をこれから記載する。

p53アイソフォーム

p53アイソフォームは図1に示される。

加えて、下記の表1は、完全長のp53（“p53”と表示）並びに 133p53 及び 133p53 アイソフォームのアミノ酸及び核酸配列を提供する。

アイソフォーム	アミノ酸配列（配列番号/ GenBankアクセッション番号	核酸配列（配列番号/ GenBankアクセッション番号
Δ 133p53 β	配列番号:1/NP_001119588.1	配列番号:2/ NM_001126116.1
Δ 133p53 γ	配列番号:3/ NP_001119589.1	配列番号:4/ NM_001126117.1
P53	配列番号:5/ NP_000537.3	配列番号:6/ NM_000546.4

30

表1．完全長のp53（“p53”と表示）並びに 133p53 及び 133p53 アイソフォームのアミノ酸及び核酸配列

【0011】

人工多能性幹細胞（iPSC）及び分化体細胞

本文書では、“人工多能性幹細胞”又は“iPSC”は、非多能性細胞（典型的には成人の体細胞（配偶子又は胚ではない身体の細胞））から、一定の遺伝子の“強制”発現を誘導することによって入手される多能性幹細胞を指す。iPSCは、多くの点において天然の多能性幹細胞（例えば胚性幹細胞（ESC））と類似すると考えられる。iPSCは、成人幹細胞ではなく多能性を与えられた再プログラム細胞である。iPSCは天然に見いだされる細胞には当てはまらない。

40

本文書では、“体細胞”又は“分化体細胞”は分化した成人細胞を指す。本出願で用いられるように、体細胞又は分化体細胞は、非癌性細胞（“正常細胞”とも称される）でも癌性細胞でもよい。好ましくは、本出願で用いられる体細胞又は分化体細胞は非癌性細胞である。

本文書では、“再プログラム”は、部分的又は最終的に分化している体細胞の分化状態を改変又は逆戻りさせるプロセスを指す。

本文書では、“DNA損傷”は、DNAの化学構造の改変、例えば内部物質又は外部物質によって引き起こされ得る一本鎖若しくは二本鎖DNA切断を指す。DNAに対する損傷は天然に生じ得る。なぜならば、代謝改変の結果（反応性酸素種、反応性窒素種、反応性カルボニル

50

種、脂質過酸化種及びアルキル化物質の生成増加をもたらす)は、代謝プロセス(代謝によって反応性酸素種、反応性窒素種、反応性カルボニル種、脂質過酸化種及びアルキル化物質を含むDNAを損傷する化合物が放出される)又は加水分解プロセス(DNAの化学的結合の切断をもたらす)から生じ得るからである。DNA損傷はまた、UV暴露又はガンマ線照射のような外部因子によって引き起こされ得る。

本文書では、“DNA修復”又は“DNA修復チェックポイント応答”若しくは単に“DNA修復応答”又は“DNA修復メカニズム”又は“DNA修復機構”は、細胞がDNA損傷を認識し修正するいくつかのプロセスを指す。各タイプのDNA損傷について、細胞は、損傷を修復するか又は損傷化合物を排除する特有の方法を進化させてきた。多様な細胞タンパク質がDNA修復に関与することが知られており、したがって与えられた細胞でDNA修復改変の有無を決定するために試験することができる。DNA修復に関与することが判明しているタンパク質の例には2つのp53標的、p21WAF-1(サイクリン/Cdk複合体の阻害剤)及びMdm2(p53分解に関与するタンパク質)が含まれる。

【0012】

ベクター

本明細書で用いられる“プラスミドベクター”は、複製可能なDNA構築物を指す。

本明細書で用いられる“ウイルスベクター”という用語は、ウイルスゲノムの少なくとも1つのエレメントを含み、ウイルス粒子にパッケージされ得る核酸ベクターを指す。“ウイルス”、“ビリオン”、“ウイルス粒子”及び“ウイルスベクター粒子”という用語は相互に用いられ、当該核酸ベクターがウイルス粒子の生成を可能にする適切な条件にしたがって適切な細胞又は細胞株に形質導入されるときに形成されるウイルス粒子を指す。本発明の関係では、“ウイルスベクター”という用語は、核酸ベクター(例えばDNAウイルスベクター)とともにそれから生成されるウイルス粒子を含むように広く解釈されねばならない。“感染性”という用語は、ウイルスベクターの宿主細胞に感染し当該細胞に進入する能力を指す。

本明細書で用いられるように、“調節性エレメント”又は“調節配列”という用語は、与えられた宿主細胞又は対象で核酸分子の発現を可能にし、寄与し又は調節する任意のエレメントを指し、前記発現には当該核酸又はその誘導体(すなわちmRNA)の複製、複写、転写、スプライシング、翻訳、安定化及び/又は輸送が含まれる。

他の定義

本文書では、“加齢関連疾患”は老化が進むにつれて頻度が増加する疾患を指す。加齢関連疾患は加齢プロセスそのものとは区別されるべきである。なぜならば、全ての大人の人間は年をとるが、全ての大人の人間がいずれも加齢関連疾患を発症するとは限らないからである。

本文書では、“変性疾患”は時間の経過とともに悪化する医学的問題を指す。これらの変性疾患は、中枢神経系(脳及び脊髄)、骨、血管又は心臓に影響を及ぼし得る。

【0013】

人工多能性幹細胞(iPSC)のために再プログラムする方法

本発明の関係で、発明者らは、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は133p53 及び133p53 両アイソフォームが以下の性能を有することを見出した：

- 全ての山中再プログラム因子の非存在下で、細胞の再プログラムの最中に活性化される表現型と類似の表現型の変化を誘導する；
- 分化細胞に多能性を付与する(このアイソフォームが再プログラム因子セット(Sox2、Oct3/4、Nanog及びc-Myc)の活性を総括することを示す)；
- 当該DNAの構造及び機能に対する損傷を引き起こすことなくiPSCを誘導する；
- DNA修復メカニズムを改変することなくiPSCを誘導する。

これらの発見は非常に重要である。なぜならば、それらアイソフォームは、DNAの損傷を引き起こさないでDNA修復メカニズムを維持しながら、高い効率及び安定性で人工多能性幹細胞を作製する単純な手段(本発明の再プログラムの方法)を提供し、したがってそ

れらアイソフォームを細胞療法で有用にさせるからである。

第一の特徴では、本発明はしたがって人工多能性幹細胞 (iPSC) を作製するための再プログラムの方法に関し、前記方法は以下の工程を含む：

- a) 分化体細胞に 133p53 アイソフォーム、 133p53 アイソフォーム又は 133p53 及び 133p53 の両アイソフォームを発現するベクターを形質導入する工程；
- b) 形質導入された分化体細胞をそれらの増殖を支援する培地で培養する工程；及び
- c) 人工多能性幹細胞を単離する工程。

本発明の再プログラムの方法は *in vitro* の方法である。

ある実施態様では、本発明の再プログラムの方法は、山中転写因子 (Oct4、Sox2、cMyc 及び Nanog) の発現工程又は p53 の欠失工程又は p53 変異タンパク質の発現工程を含まない。換言すれば、この実施態様では、分化体細胞に、1つ以上の山中転写因子 (Oct4、Sox2、cMyc 及び Nanog)、1つ以上の p53 変異タンパク質又は p53 の阻害因子を発現する1つ以上のベクターを形質導入することなく、又は以前に形質導入しておくこともない。

【0014】

分化体細胞

本発明の再プログラムの方法に関して使用される分化体細胞は初代細胞でも不朽化細胞でもよい。そのような細胞は初代細胞 (非不朽化細胞)、例えば動物から新しく単離される細胞でもよく、又は細胞株 (不朽化細胞) から誘導してもよい。体細胞は、哺乳動物細胞、例えばヒトの細胞又はマウスの細胞である。それらは、周知の方法によって種々の器官、例えば皮膚、肺臓、脾臓、肝臓、胃、腸、心臓、生殖器官、膀胱、腎臓、尿道及び他の泌尿系器官 (ただしこれらに限定されない) から、又は一般的には生きている体細胞を含む任意の器官又は組織から入手できる。本発明で有用な哺乳動物体細胞には、例示すれば成人幹細胞、セルトリ細胞、内皮細胞、顆粒層上皮細胞、ニューロン、脾臓細胞、表皮細胞、上皮細胞、肝細胞、毛嚢細胞、ケラチノサイト、造血細胞、メラノサイト、軟骨細胞、リンパ球 (B 及び T リンパ球)、赤血球、マクロファージ、単球、単核球、線維芽細胞、心筋細胞、他の公知の筋肉細胞、及び一般的には任意の生きている体細胞が含まれる。これらの細胞は非癌性でも又は癌性細胞でもよいが、好ましくは、これらの細胞は非癌性細胞である。

好ましくは、本発明の再プログラムの方法に関して用いられる身体の分化した幹細胞は、ヒト末梢血単核球 (PBMC)、CD4+リンパ球又は線維芽細胞から成る群から選択される。より好ましくは、分化体細胞はヒト線維芽細胞である。

【0015】

アイソフォーム

本発明にしたがって人工多能性幹細胞を作製する方法の好ましい実施態様で、分化体細胞に工程 b) で形質導入されるものは、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は 133p53 及び 133p53 両アイソフォーム (好ましくは 133p53 アイソフォーム単独) である。実際、特に 133p53 アイソフォームの発現が多能性幹細胞の誘導と密接に関係する。

133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は 133p53 及び 133p53 両アイソフォームを発現するベクター (工程 b)

133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は 133p53 及び 133p53 両アイソフォームを発現する適切なベクターを用いることができる。

適切なベクターは、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は 133p53 及び 133p53 両アイソフォームをコードする核酸分子及びその発現を可能にするために必要なエレメントを含む。

適切なベクターには特にプラスミドベクター及びウイルスベクターが含まれる。

ウイルスベクターは、複製適合性又は複製選択性であることができ (例えば特定の宿主細胞でより良好に又は選択的に複製するように操作される)、又は遺伝的に能力を失わせて複製欠損又は複製障害性にする事ができる。典型的には、そのようなベクターは、市場で (例えば、Invitrogen、Stratagene、Amersham Biosciences、Promega など)、又は

寄託施設、例えば米国培養細胞系統保存機関（ATCC, Rockville, Md.）から入手可能であり、又は既にそれらの配列、機構及び作製方法を記載した多数の刊行物の主題であって当業者がそれらを利用することを可能にしている。

ある実施態様では、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は 133p53 及び 133p53 両アイソフォームを発現するプラスミドベクターが用いられる。

適切なプラスミドベクターの代表的な例には、pREP4、pCEP4（Invitrogen）、pCI（Promega）、pVAX（Invitrogen）及びpGWiz（Gene Therapy System Inc）が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

形質導入のためには、プラスミドベクターと脂質又はポリマーとで複合体を形成し、特別な構造（例えばリボソーム、リボプレックス又はナノ粒子）を形成することができる。

好ましい実施態様では、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は 133p53 及び 133p53 両アイソフォームを発現するウイルスベクターが用いられる（すなわち、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は 133p53 及び 133p53 両アイソフォームをコードする核酸分子及びその発現を可能にするために必要なエレメントを含むウイルスベクター）。

【0016】

適切なウイルスベクターの代表的な例は、種々の多様なウイルス（例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノウイルス随伴ウイルス（AAV）、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、麻疹ウイルス、泡沫状ウイルス、アルファウイルス、水疱性口内炎ウイルスなど）から作製される。上記に記載したように、“ウイルスベクター”という用語は、ベクターDNA、ゲノムDNAとともにそれらから作製されるウイルス粒子、及び特に感染性ウイルス粒子を包含する。

好ましい実施態様では、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は 133p53 及び 133p53 両アイソフォームを発現するレトロウイルスベクターが用いられる（すなわち、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は 133p53 及び 133p53 両アイソフォームをコードする核酸分子及びその発現を可能にするために必要なエレメントを含むレトロウイルスベクター）。

レトロウイルスは、感染し大半の事例で分裂細胞に組み込まれるという特性を有し、この点に関して、人工多能性幹細胞を作製する本発明の関係で使用するために特に適切である。適切なレトロウイルスは、一般的にはLTR配列、キャプシド形成領域及び 133p53 又は 133p53 アイソフォームをコードする核酸分子を含む。組換えレトロウイルスは、任意の起原（ネズミ、霊長類、ネコ、ヒトなど）のレトロウイルス、特にMoMuLV（モロニーネズミ白血病ウイルス）、MS（ネズミ肉腫ウイルス）、フレンドネズミレトロウイルス（Fb29）、ネズミ胚性幹細胞ウイルス（MESV）、LNウイルス又はネズミ幹細胞ウイルス（MSCV）から誘導することができる。前記ウイルスはキャプシド形成細胞株で増殖させる（前記細胞株は、ウイルス粒子の構成に必要なウイルスポリペプチド（gag、pol及び/又はenv）をトランス態様で供給できる）。そのような細胞株は文献に記載されている（PA317、Psi CRIP GP +Am-12、HEK 293Tなど）。本発明のレトロウイルスベクターは、特にLTR（プロモーター領域を真核細胞プロモーターに交換）又はキャプシド化領域（異種キャプシド化領域に交換）に修正を含むことができる。

特に好ましい実施態様では、工程b)で癌細胞に形質導入するために用いられるベクターはネズミ幹細胞ウイルス（MSCV）であり、前記は、ネズミ胚性幹細胞ウイルス（MESV）及びLNレトロウイルスベクターから誘導される（M. Grez, et al, 1990; A.D. Miller et al, 1989）。特に、形質導入ベクターは、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は 133p53 及び 133p53 両アイソフォームをコードする分子をClontechが市販するpMSCVベクター（例えばpMSCVhyg、pMSCVneo、又はpMSCVpuro）にクローニングすることによって入手できる。

しかしながら、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は 133p53 及び 133p53 両アイソフォームを発現する他のタイプのウイルスベクターも用いることができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

本発明の関係で有用なウイルスベクターの例にはアデノウイルスベクターが含まれ、前記は多様な人間又は動物性供給源（例えばイヌ、ヒツジ、サルアデノウイルスなど）から誘導できる。任意の血清型を用いることができ、ヒトアデノウイルスが特に好ましく、C垂属（Ad2、Ad5、Ad6）及びB垂属（Ad11、Ad34及びAd35）が特に好ましい。前記記載のアデノウイルスはATCCから入手可能であり、又は既にそれらの配列、機構及び作製方法を記載した多数の刊行物の主題であって当業者がそれらを利用することを可能にしている。アデノウイルスベクターを用いるときには、前記は好ましくはE1-欠損アデノウイルスベクターであり、（GenBankにアクセッション番号M73260.1で開示されているAd5の配列を参照して）約459位から3328位又は約459位から3510位に広がる欠失を有する。クローニング性能は、アデノウイルスゲノムの追加部分の欠失（非必須E3領域の全て又は部分、例えば約27867位から30743位の欠失）又は他の必須のE2及び/又はE4領域の欠失によってさらに改善され得る。続いて、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は133p53 及び133p53 両アイソフォームをコードする核酸分子を当該アデノウイルスゲノムの任意の場所に挿入することができ、E1及び/又はE3領域を交換する挿入が特に好ましい。前記核酸分子は、問題の領域の天然の転写方向に対してセンス又はアンチセンスの向きで配置することができる。

10

本発明の関係で用いることができる他のウイルスベクターの例には、ボックスウイルスベクター、例えば鶏痘ベクター（例えばFP9）、カナリアボックスベクター（例えばALVAC）及びワクシニアウイルスベクターが含まれるが、後者が好ましい。適切なワクシニアウイルスには、コペンハーゲン株、ワイス株、NYVAC及び修正アンカラ（MVA）株が含まれるが、ただしこれらに限定されない。組換えボックスウイルスを構築及び作製する一般的条件は当業界で周知である。133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は133p53 及び133p53 両アイソフォームをコードする核酸分子は、好ましくは非必須遺伝子座内のボックスウイルスゲノム中に挿入される。コペンハーゲンワクシニアベクターの挿入ではチミジンキナーゼ遺伝子が特に適切であり、MVAベクターの挿入では欠失II又はIIIが適切である。

20

本発明の関係で適切な他のウイルスベクターは、パラミクソウイルス科から入手できるモルビリウイルスであり、麻疹ウイルスが特に好ましい。P及びM遺伝子の間又はH及びL遺伝子の間に、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は133p53 及び133p53 両アイソフォームをコードする核酸分子を挿入することが特に適切である。

30

【 0 0 1 8 】

上記のベクターで、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は133p53 及び133p53 両アイソフォームをコードする核酸分子は体細胞での発現に適切な形態を有する（このことは、本明細書で示される核酸分子の各々が適切な調節配列に作動できるように連結されることを意味する）。

調節配列の選択はベクターそのもの及び形質導入される体細胞のような要件に左右されること、及び通例的な一般知識及び当該問題に関する刊行物により当業者が容易に選択できることは当業者には理解されるであろう。真核細胞系での構成的発現のために適切なプロモーターにはウイルスプロモーターが含まれる。前記は、例えばSV40プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）最初期プロモーター又はエンハンサー、アデノウイルス初期及び後期プロモーター、単純ヘルペスウイルス（HSV）1型のチミジンキナーゼ（TK）プロモーター、及びレトロウイルス末端ロングリピート（例えばMoMuLV及びラウス肉腫ウイルス（RSV）LTR）の他に細胞性プロモーター、例えばホスホグリセロキナーゼ（PGK）プロモーターである。ネズミ幹細胞ウイルス（MSCV）のために適切なプロモーターの例には、Clontechが市販するpMSCVに存在するもの（例えばpMSCVhyg、pMSCVneo、又はpMSCVpuroプロモーター）が含まれる。

40

工程b)で、形質導入された分化体細胞は、それらの増殖を支援する培地で培養される。そのような培地は基本培地（無機塩、アミノ酸、ビタミン及びブドウ糖を含む、例えばDMEM）であり、前記には、還元剤（例えば -メルカプトエタノール）、少なくとも1つの

50

抗生物質（例えばペニシリン-ストレプトマイシン）、及び/又は形質導入された分化体細胞タイプの増殖を支持することができる少なくとも1つの増殖因子（上皮増殖因子（EGF）及び/又は塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF））を補充することができる。

工程b)は、当該形質導入分化体細胞培養から人工多能性幹細胞を回収するために十分な期間実施される。適切な期間は分化体細胞の各タイプについて最適化されるべきであるが、一般的には3から30日、特に7から20日、より具体的には9から24日であろう。

本発明の方法によって遺伝的安定性を有する（すなわちDNA損傷又はDNA修復応答の損傷がない）iPSCを入手するために、分化体細胞に少なくとも1つの 133p53 アイソフォーム又は 133p53 アイソフォーム又は両アイソフォームを、好ましくは 133p53 アイソフォームを形質導入することが必要である。

10

【0019】

人工多能性幹細胞の単離（工程c）

工程c)では、形質導入された分化体細胞の培養から人工多能性幹細胞が単離される。

形質導入分化体細胞培養で、人工多能性幹細胞は、他の分化体細胞と比較して人工多能性幹細胞に固有である任意の特色を選別することにより単離することができる。

特に、分化体細胞のタイプに応じて、iPSCは以下の手段のいずれか1つによって同定又は単離できる：

- i) iPSC特異的細胞表面マーカーによる単離；
- ii) DNA染料排除によるサイド集団（SP）表現型に基づくフローサイトメトリーによる単離；
- iii) 胚様体形成；及び
- iv) iPSCコロニー採取。

20

方法i)では、iPSCはiPSC特異的細胞表面マーカーに基づいて単離される。この方法では、形質導入分化体細胞を、1つ以上のiPSC特異的細胞表面マーカーに対する抗体を用いて染色し、所望の表面マーカー表現型を有する細胞を分類する。当業者には、細胞表面マーカーに基づくそのような単離の仕方は公知である。例えば、フローサイトメトリー細胞仕分けを用い、形質導入体細胞を1つ以上のiPSC特異的細胞表面マーカーに対する抗体により直接又は間接的に蛍光染色して、所望の表面マーカー表現型を有する、フローサイトメーターレーザーによって検出される細胞を区分する。別の実施態様では、磁性分離を用いることができる。この事例では、抗体標識形質導入体細胞（細胞は、iPSCマーカーに対する抗体が用いられる場合はiPSCに一致し、iPSCによって特異的に発現されない抗体が用いられる場合は非iPSCに一致する）を、当該抗体と特異的に（例えばアビジン/ビオチン相互作用を介するか、又は抗体-抗原結合を介して）結合する磁性ビーズと接触させ、抗体非標識形質導入体細胞から分離する。iPSCによって特異的に発現されるか又は発現されないマーカーによる磁性精製を数回実施することができる。

30

【0020】

iPSCの識別にもっとも一般的に用いられる表面マーカーは、SSEA3、SSEA4、TRA-1-60、及びTRA-1-81である。再プログラム細胞によるSSEA3及びSSEA4の発現は、通常TRA-1-60及びTRA-1-81の発現に先行する（後者は再プログラムの後期でのみ検出される）。TRA-1-60及びTRA-1-81抗原に特異的な抗体は、同じ大きな糖タンパク質ポドカリキシン（ポドカリキシン様、PODXLとも称される）上の別個かつ固有のエピトープを認識すると提唱されている。特異的レクチンの存在を含む他の表面修正もまたiPSCを非iPSCと区別することが示された。いくつかのCD分子が多能性と密接に関連している。前記CD分子は、例えばCD30（腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー8、TNFRSF8）、CD9（白血球抗原、MIC3）、CD50（細胞間接着分子-3、ICAM3）、CD200（MRC OX-2抗原、MOX2）及びCD90（Thy-1細胞表面抗原、THY1）である。CD44による陰性選別によってiPSCを区別することもまた可能である。さらにまた、iPSCを山中転写因子（Oct4、Sox2、cMyc及びNanog）の発現によって選別することができる。

40

当業界で周知の種々のiPSC表面マーカーの1つ以上を用いることによって選別プロトコルを改案することは当業者には公知である。

50

【0021】

方法ii)では、iPSCは、DNA染料サイド集団(SP)表現型に基づくフローサイトメトリによって単離される。この方法は、生細胞による細胞透過性DNA染料の受動的取り込み及びATP結合カセット(ABC)輸送因子を介する幹細胞のサイド集団によるそのようなDNA染料の排出に基づき、前記方法は、適切な波長で低いDNA染料蛍光を有するサイド集団の観察を可能にする。ABCポンプは、例えばベラパミル(最終濃度100 μ M)又はレセルピン(最終濃度5 μ M)のような薬剤によって特異的に阻害され、これらの薬剤を用いてSP表現型が検出できないコントロールサンプルを作製することができる。使用できる適切な細胞透過性DNA染料には、ヘキスト33342(この目的に使用される主要なDNA染料(以下を参照されたい: Golebiewska et al., 2011))及び多様な蛍光(紫色、緑色及び橙色)で利用できるVybrant(商標)DyeCycleTM染料(以下を参照されたい: Telford et al-2010)が含まれる。

10

方法iii)では、iPSCは胚様体(EB)形成によって単離できる。胚様体(EB)は、人工多能性幹細胞(iPSC)によって懸濁状態で形成される三次元凝集物である。胚様体を生成するためにいくつかのプロトコルがあり、胚様体形成に基づくそのような単離の仕方は当業者には公知である。集団的に、iPSCを含む細胞集団を予め胚様体形成によって適切な培養培地で培養する。細胞が60-80%コンフルエンスまで増殖したEB形成の日に、細胞を洗浄し、続いてEDTA/PBS中で3-15分インキュベートしてコロニーを細胞クランプ又は単一細胞にEB形成方法に応じて解離させる。しばしば、凝集物形成は種々の試薬を用いることによって誘発される。使用プロトコルに応じて、種々のEB形成(例えば自家凝集EB、ハンギングドロップEB、アグリウェル(AggreWell ect)のEB)を得ることが可能である(Lin et al, 2014)。

20

方法iv)では、iPSCはiPSCコロニー採取によって単離される。iPSCコロニー採取のプロトコルは下記実施例に記載される。しかしながら、当業者は当業界で周知の他のiPSCコロニー採取プロトコルを実施できる。

好ましい方法にしたがえば、本発明の再プログラムの方法は、工程a)の前に、発現ベクターを形質導入される多能性体細胞を単離及び培養する工程a1)を含む。

好ましくは、工程a1)は、50から80%、特に60から70%コンフルエンスを達成するために、工程a)の約2日前に分化体細胞を細胞培地で培養することによって実施される。例えば、そのような培養培地は“Invitrogenキット”(CytoTune(商標)-iPS 2.0センダイ再プログラムキット(カタログ番号: A16517、A16518))で提供される。

30

本発明の再プログラムの方法の別の好ましい実施態様にしたがえば、工程a)の後で当該ウイルスは、細胞培地を新しい細胞培地と交換することによって形質導入分化体細胞から除去される。

【0022】

本発明の再プログラム方法によって入手される人工多能性幹細胞(iPSC)及びその使用第二の特徴では、本発明は、本発明の再プログラムの方法によって入手される人工多能性幹細胞(iPSC)に関する。本発明の再プログラムの方法は、山中転写因子(Oct4、Sox2、cMyc及びNanog)の発現又はp53の欠失若しくはp53変異タンパク質の発現の工程を実施することを必要とせず(ある実施態様では当該工程は含まれず)、さらに本発明の再プログラムの方法によって入手されるiPSCは安定かつ非癌性であり、さらに非癌性体細胞性の複能性(multipotent)、単能性又は分化体細胞においてより良好な再分化性能を有する。本発明の方法によって入手されるiPSCの遺伝的安定性は、これらアイソフォームの一方又は133p53及び133p53の両アイソフォームの使用により保たれる。なぜならば、それらの発現はDNA損傷を生じず、さらにDNA修復メカニズムを改変しないからである。

40

本発明の再プログラムの方法によって作製されるiPSCは133p53及び/又は133p53アイソフォームをコードする発現ベクターを含む。本発明の方法によって作製されるiPSCはまた133p53及び/又は133p53アイソフォームを発現する。

好ましくは、本発明の再プログラムの方法によって入手されるiPSCは造血幹細胞に分化させることができる。

50

別の特徴では、本発明の再プログラムの方法によって作製されるiPSCは細胞療法で用いられる。

好ましい実施態様にしたがえば、本発明の再プログラムの方法によって作製されるiPSCは、加齢関連及び/又は変性疾患の治療で治療薬剤として用いられる。

加齢関連疾患の例は、アテローム性硬化症、心脈管系疾患、癌、関節炎、白内障、骨粗しょう症、2型糖尿病、高血圧、アルツハイマー病及びパーキンソン病を含む、又は前記から成る群から選択される疾患である。

変性疾患の例は、中枢神経系（アルツハイマー病及びパーキンソン病、ハンチントン病）、骨（デュシェンヌ及びベッカー筋ジストロフィー）、血管又は心臓に影響を与える疾患を含むか又は前記から成る群から選択される疾患である。

10

本発明の好ましい実施態様にしたがえば、本発明の再プログラムの方法によって作製されるiPSCは、加齢関連及び変性疾患の治療のための薬剤として用いられる。前記疾患は、心脈管系疾患、糖尿病、癌、関節炎、高血圧、心筋梗塞、卒中、筋萎縮性側索硬化症、アルツハイマー病及びパーキンソン病から成る群から選択される。

本発明の別の特徴では、本発明の再プログラムの方法によって作製されるiPSCは疾患研究のためのin vitroモデルとして用いられる。前記疾患は、筋萎縮性側索硬化症、アデノシンデアミナーゼ欠乏関連重症複合免疫不全、シュバッハマン-ボディアーン-ダイヤモンド症候群、III型ゴーシェ病、デュシェンヌ及びベッカー筋ジストロフィー、パーキンソン病、ハンチントン病、真正1型糖尿病、ダウン症候群及び脊髄性筋萎縮症を含む、又は前記から成る群から選択される。

20

上記で述べたように、発明者らは、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は133p53 及び133p53 両アイソフォームがiPSCで特異的に発現されることを見出した。

【0023】

人工多能性幹細胞（iPSC）を検出する方法

さらに別の特徴で、本発明はしたがって、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は133p53 及び133p53 両アイソフォームの存在を検出する工程を含む、細胞集団で人工多能性幹細胞（iPSC）を検出する方法に関する。前記方法は、133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は133p53 及び133p53 両アイソフォームのポリペプチド及び/又は前記のフラグメントを検出することによって、及び/又は133p53 アイソフォーム、133p53 アイソフォーム、又は133p53 及び133p53 両アイソフォームのmRNA及び/又は前記のフラグメントを検出することによって実施される。

30

好ましい実施態様にしたがえば、本発明の検出方法は、133p53 アイソフォームの存在の検出に基づく。133p53 アイソフォームの存在の検出は、前記133p53 アイソフォームmRNA、その相補性配列、又はそのフラグメント（前記133p53 アイソフォームに特異的な少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、又はそれより大きいヌクレオチド長を有する）と特異的にハイブリダイズできるプローブを用いることによって実施される。

そのようなプローブ及びフラグメントは国際特許出願WO2011/000891に記載され（前記プローブ及びフラグメントは、好ましくは配列番号:2の配列を有する133p53 アイソフォームmRNAとハイブリダイズする）、本発明の人工多能性幹細胞（iPSC）を検出する方法で用いることができる。

40

さらにまた、133p53 アイソフォームの存在もまた、前記133p53 アイソフォームmRNA、その相補性配列、又はそのフラグメント（前記133p53 アイソフォームに特異的な少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、又はそれより大きいヌクレオチド長を有する）と特異的にハイブリダイズできるプローブを用いることによって検出できる。

そのようなプローブ及びフラグメントもまた、国際特許出願WO2011/000891に記載され（前記プローブ及びフラグメントは、好ましくは配列番号:6の配列を有する133p53 アイソフォームmRNAとハイブリダイズする）、本発明の人工多能性幹細胞（iPSC）を検出す

50

る方法で用いることができる。

【実施例】

【0024】

材料と方法

下記は以下の実施例で用いられる材料と方法に関する記載である。ヒト 133p53 アイソフォームによるiPSC作製のための再プログラムの方法は、Invitrogenキット (CytoTune (商標)-iPS 2.0センダイ再プログラムキット (カタログ番号: A16517、A16518)) から改案される。再プログラムのコントロールのために、上述のキットは、製造業者の指示にしたがって以下のように用いられるであろう。

ヒト線維芽細胞の培養

-2日目: ヒト線維芽細胞 (正常ヒト包皮から樹立) を継代数5回以下で6ウェルプレートの少なくとも2ウェルの線維芽細胞培地にプレートし、それらを形質導入日 (0日目) に50 - 80%コンフルエンスにさせる。

100mLの完全MEF/線維芽細胞培地のために、以下の成分を混合する:

DMEM 89mL、FBS (ESC級) 10mL、MEM非必須アミノ酸溶液 1mL (10mM)、 β -メルカプトエタノール 100 μ L (55mM)。

予め培養したヒト線維芽細胞の種々のウイルスベクターによる形質導入

0日目: CytoTuneR 2.0センダイ再プログラムベクターコントロールプローブ及び 133p53 アイソフォーム (及び) を発現するベクターを適切なMOIで線維芽細胞に形質導入した。細胞を一晩インキュベートした。

1日目: 新しい完全線維芽細胞培地で培地を交換して、ウイルスベクターを除去した。

2 - 6日目: 1日おきに使用済み培地を交換した。

5又は6日目: MEF培養皿を準備した。

7日目: 形質導入細胞を線維芽細胞培地のMEF培養皿にプレートした。

8日目: 培地をiPSC培地に変えた。

100mLの完全iPSC培地のために、以下の成分を混合した:

KnockOut™ DMEM/F-12 78mL

KnockOut™ 血清代用物 (KSR) 20mL

MEM非必須アミノ酸溶液 1mL (10mM)

GlutaMAX™-I 1mL

β -メルカプトエタノール 100 μ L (55mM)

ペニシリン-ストレプトマイシン (任意) 1mL

bFGF (10 μ g/mL) 40 μ L

9 - 28日目: 使用済み培地を毎日交換し、培養容器をiPSCコロニーの出現についてモニターした。iPSCコロニーが移転できるようになった時、それらを採取して新しいMEF培養皿に増殖のために移した。

iPSCコロニー採取

iPSCコロニー採取の前日にゼラチン被覆12ウェルのフィーダープレートを準備した。コロニー採取前に、10 μ mのY27632 (ROCK (rho結合キナーゼ阻害剤)) を含む1mLのhES培地をプレートの各ウェルに添加し、37 °Cインキュベーターでインキュベートした。続いて、iPSCコロニーをフード内の顕微鏡下で調べ、コロニーの目印を皿の底に付けた。200 μ Lピペットを用いて1つのコロニーを小片に切り取り、この切り取り片を200 μ Lピペットで12ウェルフィーダープレートに移した。採取コロニーを含むプレートを37 °Cインキュベーターで24 - 48時間インキュベートした。コロニーがプレートに付着した後、培地を新しいhES培地に交換し、培地を毎日変えた。

ウイルス生成

ウイルス生成のためにヒト 133p53アイソフォーム (及び) をpMSCV-hyg (Clontech Laboratories (Cat No 634401の一部として販売)) でクローニングした。ウイルス粒子は以下の手順で生成した:

1日目: $1 - 2 \times 10^6$ HEK 293T細胞を100mmのプレートに播種した (増殖培地: 10%FCS、ビル

10

20

30

40

50

ビン酸ナトリウム、グルタミン及び抗生物質を補充したMEM)。

2日目：第1回目のトランスフェクションを以下のように実施した：

チューブ1で以下を混合

- ウイルスgag/pol遺伝子を含むベクター、1 μ g
- ウイルスenv遺伝子を含むベクター、1 μ g
- 133p53アイソフォームを含むpMSCV-hyg、3 μ g
- 150mMのNaCl、250 μ L

チューブ2で以下を混合

- 150mMのNaCl、250 μ L
- JetPeiトランスフェクション試薬 (Polyplus Cat No 101-40)、15 μ L

チューブ1及び2を混合した。

混合物を30分間室温でインキュベートした。その間に、細胞を洗浄し、抗生物質を含まない5mLの増殖培地にプレートした。

インキュベーション後、チューブ1及び2の混合物を一滴ずつ細胞に添加し、4時間放置した。細胞をPBSで洗浄し、抗生物質を含む10mLの増殖培地を添加した。

ウイルス生成にHEK 293T細胞を含む100mm皿が2枚以上必要とされる場合には、チューブ1及び2の混合物量は、プレート数に応じて増加させねばならない。

3日目：2回目のトランスフェクションを実施した(2日目と同じ)。

5日目：トランスフェクトした細胞の上清を収集し、0.2 μ mの滅菌フィルターでろ過した。上清のアリコットは直ちに用いるか又は-80 で保存できる。

感染のためには、ウイルスアリコットをゆっくりと解凍し、ポリブレン(臭化ヘキサジメトリン、ストック10mg/mL = 1000 x)の存在下で標的細胞に添加した。

【0025】

[実施例1]

133p53 は分化細胞と比較してES及びiPSCで高度に発現される

上記に記載したプロトコルをここで用いた。さらにまた、4転写因子(Oct4、Sox2、Klf4、c-myc)又は6転写因子(前記4因子の他にNanog及びLyn28)を加えた。

ヒト多能性幹細胞が誘導、維持及び分化中にどのようにしてp53のまた別のスプライシングに適応するかを分析するために、4因子(Oct4、Sox2、Klf4、c-myc)又は6因子(前記4因子の他にNanog及びLyn28)を用いて線維芽細胞から誘導したiPSCで、再プログラム

の3週間後に 133p53 mRNAレベルをqPCRによって分析した。
一般的には、4因子(Oct4、Sox2、Klf4及びc-myc)による強制発現は、非老化細胞からiPSCを作製するために必要かつ十分であった。しかしながら、老人及び百歳以上者由来の多能性幹細胞は、Nanog及びLyn28を4因子組み合わせに添加したときのみ完全な若返り細胞に再分化することが既に示されている(Lapasset et al, 2011)。

図2に示した結果は、老化線維芽細胞から6因子カクテルにより誘導したiPSCは、4因子カクテルで誘導した非老化細胞よりも高レベルの 133p53 を有することを示している。これは、老化/加齢細胞の若返りへの再プログラム/復帰に 133p53 が必要とされる可能性を示している。

133p53 mRNAレベルもまた、ヒト胚性幹細胞で線維芽細胞分化前(ES)及び分化後(ES-F)に、皮膚線維芽細胞で再プログラム前(Sk-F)及び再プログラム後(iPSC)及び再分化後(iPSC-F)に、さらにヒト新生児(HFFSM3)で分析された。図3に示すように、133p53 のmRNA発現は、線維芽細胞と比較して胚性幹細胞及びiPSCで明瞭に増加し、このアイソフォームのレベル上昇は遺伝的不安定性とは無関係であることを示している。これは、変異p53と比較して主要な利点を提供しよう(iPSC技術における変異p53の使用は前記が与える遺伝的不安定性によって妨げられる)。

【0026】

[実施例2]

133p53 は線維芽細胞をiPSCへ再プログラムする

ヒト初代線維芽細胞を正常なヒトの包皮から樹立した。前記は老化開始前に最大72回の

10

20

30

40

50

集団倍加数を示す。図5に示すように、p53の 133p53 スプライスアイソフォームはiPSC様細胞を生じ、前記は多能性の重要な調節因子を発現する(図4)。

したがって、ここで用いられる線維芽細胞は形質転換されていない正常な初代線維芽細胞であることが明瞭に示された。

【0027】

[実施例3]

133p53 の発現は細胞のDNA修復能力を保つ

p53は正常細胞からiPSCへの再プログラムの制限因子であり、さらにまた体細胞のiPSCへの再プログラム時のp53発現の改変は、DNA損傷及び/又は染色体異常を含むiPSCの形成をもたらす可能性があることが懸念される。133p53 の発現はDNA損傷及びDNA損傷応答に影響しないことを確認するために、発明者らは、放射線類似作用物質(ブレオマイシン)によって引き起こされるDNA切断の存在下で、133p53 アイソフォーム又は133p53 アイソフォームを発現する正常線維芽細胞のp53トランスアクチベーション機能を試験した。発明者らが実施した以前の試験は、正常な線維芽細胞はp21WAF-1の蓄積を介してDNA切断の存在下でその細胞周期を停止させることを示した(p21WAF-1はサイクリン依存キナーゼの阻害剤である(Baus et al, EMBO J. 2003; Gire et al, EMBO J. 2004; Jullien et al, NAR 2013))。

133p53 又は 133p53 をコードする構築物又は空ベクター(pMSCV)を形質導入した正常な線維芽細胞を、ブレオマイシン(10 µg/mL)で6時間処理し、続いてこの細胞を収集した。定量的PCR(q-PCR)によって、ヒト線維芽細胞の133p53 又は 133p53 アイソフォームmRNAの過剰発現がそれぞれ立証された(図6AのA11)。加えて、133p53 又は 133p53 アイソフォームの過剰発現は、他のp53アイソフォームのmRNA発現を変化させないことが示された(図6AのTAP53)。

p53標的のp21WAF-1(サイクリン/Cdk複合体の阻害剤)及びMdm2(p53分解に必要なタンパク質)の発現に関する133p53 発現細胞のq-PCR及びウェスタンブロットによる分析は、p21WAF-1及びMdm2の発現は、ブレオマイシンの非存在下又は存在下でコントロールの空ベクターを形質導入された細胞のものと非常に類似することを示した(図6B、6C)。対照的に、133p53 の過剰発現は、当該細胞で蓄積されるp21WAF-1のmRNA及びタンパク質レベルの顕著な低下をもたらす(図6B、6C)。133p53 の発現はしたがってDNA損傷の存在下でp21WAF-1の蓄積を妨げ、野生型p53の転写機能はこれらの細胞で変化することを示している。ヒストン変種H2AX及びChk2キナーゼタンパク質(p53上流のDNA損傷の修復に必要な2つのタンパク質)は、133p53 及び 133p53 を発現する細胞で活性化される。

上記のデータは、DNA損傷に応答するp53タンパク質のトランスアクチベーション機能は、133p53 アイソフォームを発現する正常線維芽細胞で完全なままであるが、一方、p53の同じ機能は133p53 アイソフォームを発現する細胞で変化する。これは、133p53 アイソフォームによって誘導される再プログラム時のDNA損傷の場合、損傷細胞(DNA修復機構は変化せずに維持されている)は、(p21細胞周期阻害剤の蓄積を介して)細胞周期から出ることができ、したがって増殖プールから排除され得る。再プログラムiPSC細胞の最後の生成プールは、したがってDNA損傷を有するか又はDNA修復機構が変化した細胞を含まないはずである。

【0028】

参考文献

Aoubala M, Murray-Zmijewski F, Khoury MP, Fernandes K, Perrier S, Bernard H, Prats AC, Lane DP, Bourdon JC, "p53 directly transactivates 133p53, regulating cell fate outcome in response to DNA damage", Cell Death Differ. 2011 Feb;18(2):248-58. doi: 10.1038/cdd.2010.91

Baus F., Gire V., Piette J., and Dulic V. 2003. Permanent cell cycle exit in G2 phase after DNA damage in normal human fibroblasts. EMBO J 22 : 3992-4002.

Bourdon, J.C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodim

10

20

30

40

50

as, D.P., Saville, M.K., and Lane, D.P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & development* 19, 2122-2137.

Bourdon, J.C. (2007). p53 and its isoforms in cancer. *Br J Cancer* 97, 277-282.

Gire V, Roux P., Wynford-Thomas D, Roux P., Brondello J.-M., and Dulic V. 2004 . DNA damage checkpoint kinase Chk2 triggers replicative senescence. *EMBO J* 23:2 554-63

Golebiewska A, Brons NH, Bjerkvig R, Niclou SP. Critical appraisal of the side population assay in stem cell and cancer stem cell research. *Cell Stem Cell*. 20 11 Feb 4;8(2):136-47.

Hofstetter, G., Berger, A., Berger, R., Zoric, A., Braicu, E.I., Reimer, D., Fiegler, H., Marth, C., Zeimet, A.G., Ulmer, H., et al. (2012). The N-terminally truncated p53 isoform Delta40p53 influences prognosis in mucinous ovarian cancer. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society* 22, 372-379. 10

Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., and Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 460, 1132-1135.

Jullien L., Mestre M, Roux P and Gire V. 2013. Eroded human telomeres are more prone to remain uncapped and to trigger a G2 checkpoint response. *Nucleic Acids Research* 41, 900-11. 20

Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y.V., Menendez, S., Morera, L.B., Raya, A., Wahl, G.M., and Izpisua Belmonte, J.C. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460, 1140-1144.

Lapasset L, Milhavet O, Prieur A, Besnard E, Babled A, Ait-Hamou N, Leschik J, Pellestor F, Ramirez JM, De Vos J, Lehmann S, Lemaitre JM., "Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state." , *Genes Dev*. 2011 Nov 1;25(21):2248-53.

Li, M., He, Y., Dubois, W., Wu, X., Shi, J., and Huang, J. (2012). Distinct regulatory mechanisms and functions for p53-activated and p53-repressed DNA damage response genes in embryonic stem cells. *Mol Cell* 46, 30-42. 30

Lin T1, Chao C, Saito S, Mazur SJ, Murphy ME, Appella E, Xu Y., ,p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression " , *Nat Cell Biol*. 2005 Feb;7(2):165-71.

Lin, Y. and Chen, G., Embryoid body formation from human pluripotent stem cells in chemically defined E8 media (June 1, 2014), StemBook, ed. The Stem Cell Research Community, StemBook.

Marcel et al, 2010 " 160p53 is a novel N-terminal p53 isoform encoded by 133p53 transcript " .

Takenaka C, Nishishita N, Takada N, Jakat LM, Kawamata S, " Effective generation of iPS from CD34+ cord blood cells by inhibition of p53 " ; *Experimental Hematology* 2010, 38: 154-162. 40

Tapia N, Scholer HR., " p53 connects tumorigenesis and reprogramming to pluripotency " , *J Exp Med*. 2010 Sep 27;207(10):2045-8. doi: 10.1084/jem.20101866.

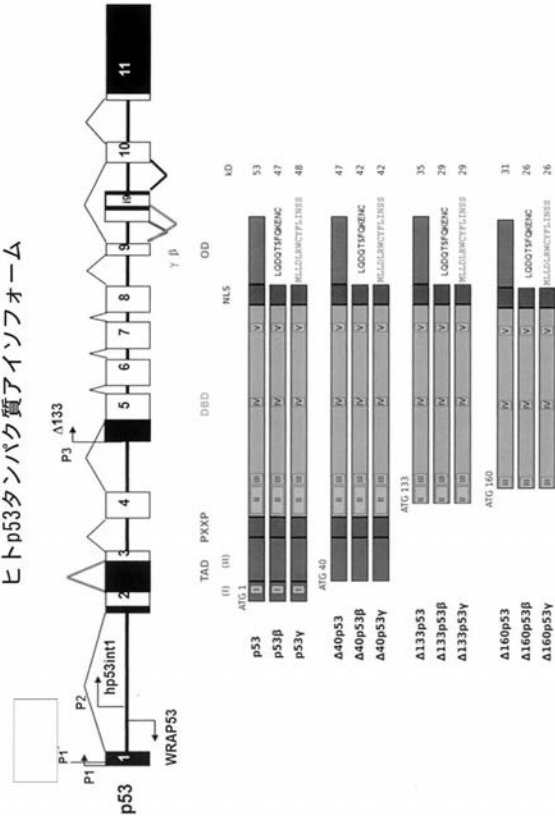
Telford WG. Stem cell side population analysis and sorting using DyeCycle violet. *Curr Protoc Cytom*. 2010 Jan;Chapter 9:Unit9.30.

Terrier O, Marcel V, Cartet G, Lane DP, Lina B, Rosa-Calatrava M, Bourdon JC., Influenza A viruses control expression of proviral human p53 isoforms p53 and Delta133p53 ., *J Virol*. 2012 Aug;86(16):8452-60. 10.1128/JVI.07143-11.

WO2011/000891.

WO2012/044979

【 図 1 】



【 図 2 】

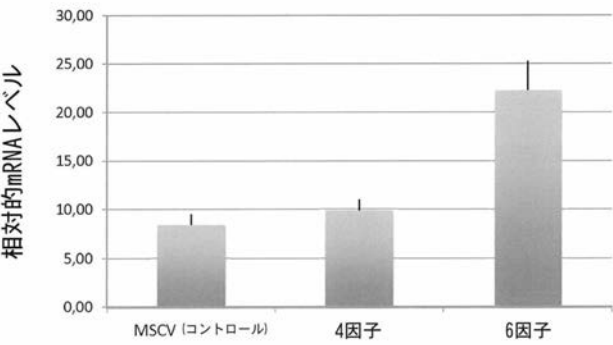


Figure 1

Figure 2

【 図 3 】

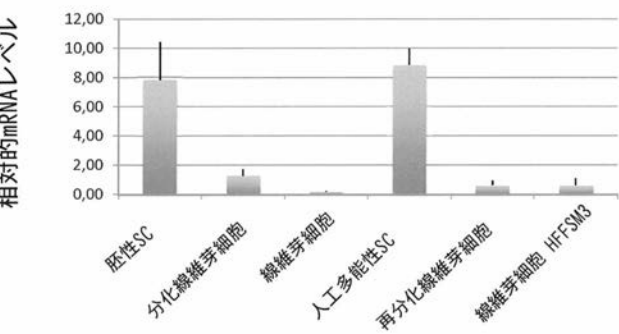


Figure 3

【 図 4 】

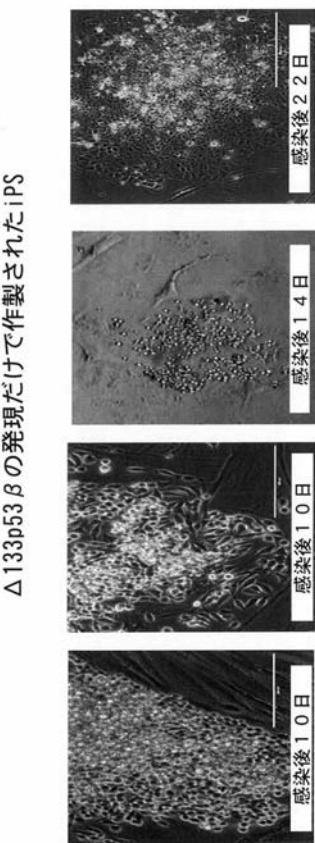


Figure 4

【 図 5 】

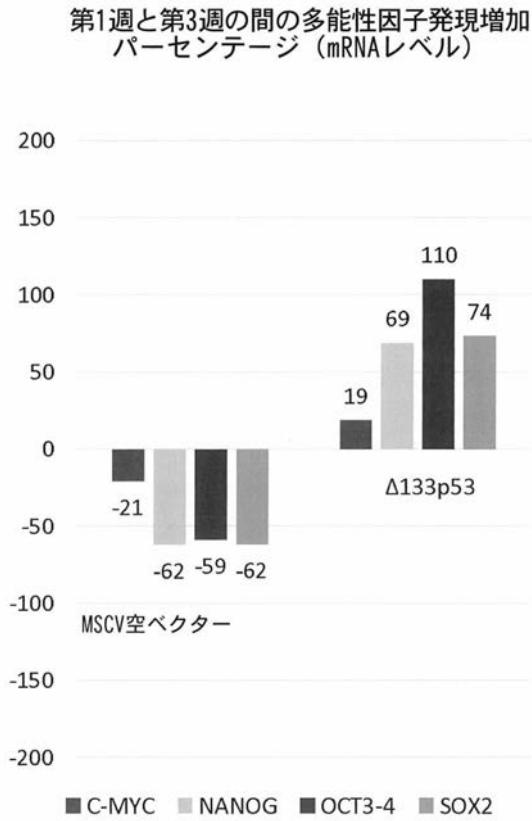


Figure 5

【 図 6 B 】

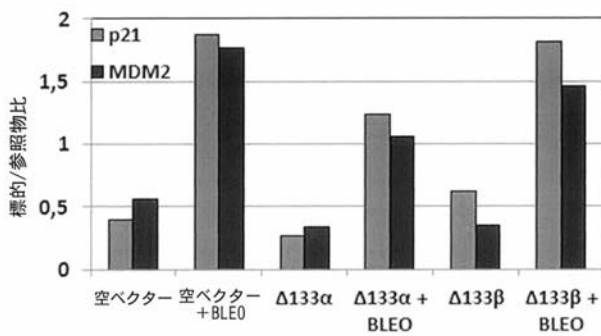


Figure 6B

【 図 6 A 】

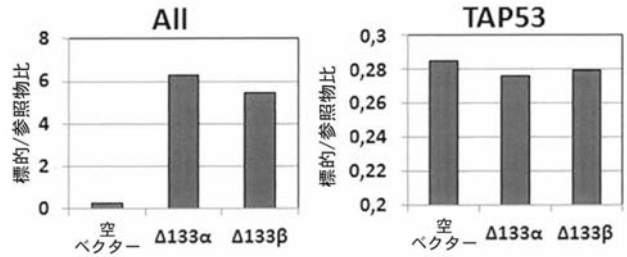


Figure 6A

【 図 6 C 】

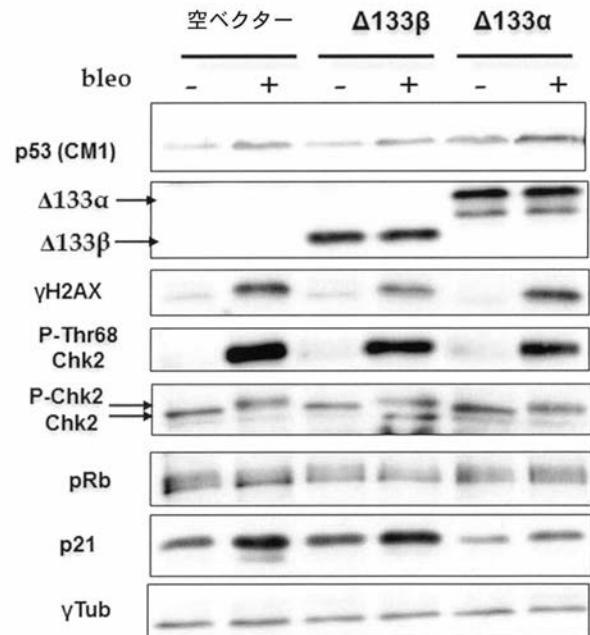


Figure 6C

【配列表】

20185098900000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2016/052085

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/052085

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C12N5/074
ADD.

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)
C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/044979 A2 (US GOV HEALTH & HUMAN SERV [US]; HARRIS CURTIS C [US]; HORIKAWA IZUMI) 5 April 2012 (2012-04-05)	8-12
Y	claims 1-21 example 2	1-7, 13, 14
X	TAKENAKA C ET AL: "Effective generation of iPS cells from CD34<+> cord blood cells by inhibition of p53", EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, ELSEVIER INC, US, vol. 38, no. 2, 1 February 2010 (2010-02-01), pages 154-162.e2, XP026855304, ISSN: 0301-472X, DOI: 10.1016/J.EXPHEM.2009.11.003 [retrieved on 2009-11-14]	8-12
Y	abstract	1-7, 13, 14
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 March 2016

Date of mailing of the international search report

17/03/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel: (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Loubradou-Bourges, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/052085

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	M. P. KHOURY ET AL: "p53 Isoforms: An Intracellular Microprocessor?", GENES & CANCER, vol. 2, no. 4, 1 April 2011 (2011-04-01), pages 453-465, XP055185971, ISSN: 1947-6019, DOI: 10.1177/1947601911408893 abstract figure 1	1-7,13, 14
Y	----- TERUHISA KAWAMURA ET AL: "Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming", NATURE, NATURE PUBLISHING GROUP, UNITED KINGDOM, vol. 460, no. 7259, 1 August 2009 (2009-08-01), pages 1140-1145, XP002639994, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/NATURE08311 abstract	1-7,13, 14
Y	----- JEAN-CHRISTOPHE BOURDON ET AL: "p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity", GENES AND DEVELOPMENT, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, PLAINVIEW, NY, US, vol. 19, no. 18, 1 September 2005 (2005-09-01), pages 2122-2137, XP002671568, ISSN: 0890-9369, DOI: 10.1101/GAD.1339905 abstract figure 1	1-7,13, 14
A	----- H BERNARD ET AL: "The p53 isoform, [Delta]133p53[alpha], stimulates angiogenesis and tumour progression", ONCOGENE, vol. 32, no. 17, 25 June 2012 (2012-06-25), pages 2150-2160, XP055185980, ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/onc.2012.242 abstract	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/052085

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 2012044979 A2	05-04-2012	AU 2011308567 A1	04-04-2013
		CA 2812300 A1	05-04-2012
		EP 2622065 A2	07-08-2013
		JP 2013541951 A	21-11-2013
		US 2013267029 A1	10-10-2013
		W0 2012044979 A2	05-04-2012

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P	9/00 (2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 P	3/10 (2006.01)	A 6 1 P	3/10
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P	19/02
A 6 1 P	9/12 (2006.01)	A 6 1 P	9/12
A 6 1 P	9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10
A 6 1 P	21/00 (2006.01)	A 6 1 P	21/00
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16
A 6 1 P	25/14 (2006.01)	A 6 1 P	25/14
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10

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

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100170944

弁理士 岩澤 朋之

(72)発明者 ルー ピエール

フランス 3 4 9 8 0 サン ジェリー デュ フェス リュー デ エラブル 7 0 0

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QQ08 QQ53 QR55 QS34

4B065 AA90X AB01 AC20 BA02

4C087 AA01 AA02 AA04 BB65 NA14 ZA15 ZA16 ZA36 ZA42 ZA94

ZA96 ZB26 ZC35