(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2015 年 4 月 2 日(02.04.2015)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2015/046229 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2014/075248

(22) 国際出願日: 2014 年 9 月 24 日(24.09.2014)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2013-197308 2013 年 9 月 24 日(24.09.2013) JP

(71) 出願人: ディナベック株式会社(DNAVEC CORPORATION) [JP/JP]; 〒3002611 茨城県つくば市大久保６ Ibaraki (JP).

(72) 発明者: 伴　浩志(BAN, Hiroshi); 〒3002611 茨城県つくば市大久保６番　ディナベック株式会社内 Ibaraki (JP). 飯田　章博(IIDA, Akihiro); 〒3002611 茨城県つくば市大久保６番　ディナベック株式会社内 Ibaraki (JP). 長谷川　護(HASEGAWA, Mamoru); 〒3002611 茨城県つくば市大久保６番　ディナベック株式会社内 Ibaraki (JP).

(74) 代理人: アクシス国際特許業務法人(AXIS PATENT INTERNATIONAL); 〒1050004 東京都港区新橋二丁目６番２号　新橋アイマークビル Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

— 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則 4.17(ii))

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

(54) **Title**: METHOD FOR IMPROVING EFFICIENCY OF INDUCING PLURIPOTENT STEM CELL

(54) 発明の名称 : 多能性幹細胞の誘導効率を改善する方法

(57) **Abstract**: The present invention provides a method for improving the efficiency of inducing a pluripotent stem cell, and a vector and composition used for the method. The inventors succeeded in significantly increasing the efficiency of inducing a pluripotent stem cell by further introducing a vector including a KLF gene and not including an OCT gene and a SOX gene in pluripotent stem cell induction including a step for introducing a vector including a KLF gene, an OCT gene, and a SOX gene in this order. This method is capable of efficiently inducing a pluripotent stem cell under temperature conditions closer to a physiological environment, and has excellent characteristics in that the vector is rapidly eliminated after pluripotent stem cell induction. The present invention makes it possible to induce a pluripotent stem cell with greater efficiency.

(57) 要約: 本発明は、多能性幹細胞の誘導効率を改善する方法およびそのために用いられるベクターおよび組成物を提供する。KLF 遺伝子、OCT 遺伝子、および SOX 遺伝子を、この順序で含むベクターを導入する工程を含む多能性幹細胞の誘導において、KLF 遺伝子を含み OCT 遺伝子および SOX 遺伝子を含まないベクターをさらに導入することにより、多能性幹細胞の誘導効率を有意に上昇させることに成功した。本発明の方法は、より生理環境に近い温度条件で効率よく多能性幹細胞を誘導することが可能で、多能性幹細胞を誘導後は、速やかにベクターが除去されるという優れた特徴を有する。本発明により、一段と効率的に多能性幹細胞の誘導を行うことが可能となった。

WO 2015/046229 A1

明　細　書

発明の名称 ： 多能性幹細胞の誘導効率を改善する方法

技術分野

[0001] 本発明は、多能性幹細胞の誘導効率を改善する方法に関する。また本発明は、多能性幹細胞の誘導において用いられる遺伝子導入ベクター、遺伝子導入用組成物およびその使用に関する。本発明は具体的には、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含むベクターを導入する工程を含む多能性幹細胞の誘導において、多能性幹細胞の誘導効率を上昇させる技術に関する。

背景技術

[0002] 体細胞からの多能性幹細胞（induced pluripotent stem（iPS）cells）（人工多能性幹細胞あるいは誘導多能性幹細胞とも言う）の誘導が報告されて以来（非特許文献1）、これまでヒトやマウスを含む様々な哺乳動物細胞において、リプログラミング因子の導入によりiPS細胞が作製されてきた（非特許文献1-9）。その多くはレトロウイルスベクターを用いてリプログラミング因子を導入するものであるが、レトロウイルスベクターは宿主ゲノムへのインテグレーションにより腫瘍発生のリスクがあることで、その使用は制限されてしまう（非特許文献3）。この問題を解決するために、これまでアデノウイルスベクターやプラスミドを用いてiPS細胞を誘導する試みが行われているが、DNA型のベクターを使う限りゲノムへのインテグレーションの懸念を完全に払拭することはできない。また、これらのベクターによるiPS細胞の誘導効率は極めて低い（非特許文献10-13）。

[0003] このような問題を解決することを目指して、本発明者らは以前、RNA型ウイルスの１つであるセンダイウイルスベクターを用いてiPS細胞を誘導する系を開発している（特許文献1，2）。センダイウイルスベクターを用いたiPS細胞の誘導効率は、それまでの他のベクターを用いた場合と比べて有意に高いものであった。またセンダイウイルスベクターは、ライフサイクルにおいてDNA

フェーズを持たず、宿主ゲノムにインテグレーションされる懸念がないため安全性に優れ、またiPS細胞の誘導後にベクターを除去することも簡単である。しかしiPS細胞の誘導効率をさらに高める本発明の技術は知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開WO 2010/008054

特許文献2：国際公開WO 2012/029770

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006) Cell 126, 663-676

非特許文献2：Maherali, N. et al. (2007) Cell Stem Cell 1, 55-70

非特許文献3：Okita, K. et al. (2007) Nature 448, 313-317

非特許文献4：Wernig, M. et al. (2007) Nature 448, 318-324

非特許文献5：Takahashi, K. et al. (2007) Cell 131, 861-872

非特許文献6：Yu, J. et al. (2007) Science 318, 1917-1920

非特許文献7：Lowry, W.E. et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 2883-2888

非特許文献8：Park, I.H. et al. (2008) Nature 451, 141-146

非特許文献9：Masaki, H. et al. (2008) Stem Cell Res. 1, 105-115

非特許文献10：Stadtfeld, M. et al. (2008) Science 322, 945-949

非特許文献11：Okita, K. et al. (2008) Science 322, 949-953

非特許文献12：Yu, J. et al. (2009) Science 324, 797-801

非特許文献13：Zhou, W. et al. (2009) Stem Cells 27, 2667-2674

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、多能性幹細胞の誘導効率を改善する方法に関する。また本発明は、多能性幹細胞の誘導において用いられる遺伝子導入ベクター、遺伝子導入用組成物およびその使用を提供することを課題とする。本発明は具体的に

は、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含むベクターを導入する工程を含む多能性幹細胞の誘導において、多能性幹細胞の誘導効率を上昇させる方法およびそのために用いられる遺伝子導入ベクターおよび組成物を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、リプログラミング因子であるKLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子を、この順序で１つのベクターに含むベクターを導入する工程を含む多能性幹細胞の誘導において、多能性幹細胞の誘導効率をさらに改善する方法の探索を行った。特に、このベクターとして温度感受性ベクターを用いて多能性幹細胞の誘導を行う場合、ベクターを導入後に低温（36℃）で培養すれば、比較的高い効率で多能性幹細胞が誘導されるものの、通常の細胞の培養温度である37℃で培養すると、多能性幹細胞の誘導効率が著しく低下してしまう場合がある。温度感受性ベクターは、多能性幹細胞の誘導後にベクターを迅速に除去できる点では優れているものの、このように多能性幹細胞を効率的に誘導するためにはベクターを導入後に低温で培養する必要があるという問題があった。

[0008] 本発明者らは、温度感受性センダイウイルスベクターを用い、かつベクターを導入後に低温で培養することなく高い効率で多能性幹細胞を誘導できる方法を鋭意探索した。その結果、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子を、この順序で１つのベクターに含むベクターを導入する際に、KLF遺伝子を含みOCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないベクターをさらに導入することにより、低温で培養することなく多能性幹細胞の誘導効率を有意に上昇させることが可能であることを見出した。具体的には、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子を、この順序で１つのベクターに含むベクターと、MYC遺伝子を発現するベクターだけを組み合わせて用いた場合よりも、これらのベクターに、KLF遺伝子を含みOCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないベクターをさらに組み合わせることで、低温培養することなく顕著に高い効率でiPS細胞を誘導することが可能であった。

[0009] これにより、細胞を低温培養することなく高効率で多能性幹細胞を誘導することが可能で、かつ多能性幹細胞の誘導後は速やかにベクターが除去される系を確立させることができた。

すなわち本発明は、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含むベクターを導入する工程を含む多能性幹細胞の誘導において、多能性幹細胞の誘導効率を改善する方法およびそのために用いられる遺伝子導入ベクターおよび組成物等に関し、より具体的には請求項の各項に記載の発明に関する。なお同一の請求項を引用する請求項に記載の発明の２つまたはそれ以上の任意の組み合わせからなる発明も、本明細書において意図された発明である。すなわち本発明は、以下の発明に関する。

〔１〕 KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含む温度感受性センダイウイルスベクターを導入し、低温培養せずに、多能性幹細胞を誘導する方法における多能性幹細胞の誘導効率を改善する方法であって、KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターをさらに導入する工程を含む方法。

〔２〕 約37℃で培養される、〔１〕に記載の方法。

〔３〕 KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含む温度感受性センダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にD433A, R434A, K437A, 及びL511F変異、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔１〕または〔２〕に記載の方法。

〔４〕 KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にL511F変異、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔１〕から〔３〕のいずれかに記載の方法。

〔５〕 MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターを導入

する工程をさらに含む、〔１〕から〔４〕のいずれかに記載の方法。

〔６〕　MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にD433A, R434A, K437A, 及びL511F変異、そしてL蛋白質にL1361C, L1558I, N1197S, 及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔５〕に記載の方法。

〔７〕　KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含む温度感受性センダイウイルスベクターを導入し、低温培養せずに、多能性幹細胞を誘導する方法における多能性幹細胞の誘導効率を改善するための薬剤の製造における、KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターの使用。

〔８〕　多能性幹細胞を誘導する方法が、約37℃で培養する方法である、〔７〕に記載の使用。

〔９〕　KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含む温度感受性センダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にD433A, R434A, K437A, 及びL511F変異、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔７〕または〔８〕に記載の使用。

〔１０〕　KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にL511F変異、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔７〕から〔９〕のいずれかに記載の使用。

〔１１〕　多能性幹細胞を誘導するための組成物であって、

（ａ）KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含む温度感受性センダイウイルスベクター、および

（ｂ）KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイ

ルスベクター、を含む組成物、

〔１２〕　多能性幹細胞を誘導するための組成物であって、

（ａ）KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含む温度感受性センダイウイルスベクターであって、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にD433A, R434A, K437A, 及びL511F変異、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクター、および

（ｂ）KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターであって、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にL511F変異、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクター、

を含む組成物。

〔１３〕　MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターをさらに含む、〔１１〕または〔１２〕に記載の組成物、

〔１４〕　MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターであって、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にD433A, R434A, K437A, 及びL511F変異、そしてL蛋白質にL1361C, L1558I, N1197S, 及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターをさらに含む、〔１３〕に記載の組成物。

〔１５〕　低温培養せずに培養して多能性幹細胞を誘導するための組成物である、〔１１〕から〔１４〕のいずれかに記載の組成物。

〔１６〕　多能性幹細胞を誘導するためのキットであって、

（ａ）KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含む温度感受性センダイウイルスベクター、および

（ｂ）KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクター、を含むキット、

〔１７〕　多能性幹細胞を誘導するためのキットであって、

（ａ）KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクター

に含む温度感受性センダイウイルスベクターであって、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にD433A, R434A, K437A, 及びL511F変異、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクター、および

（ｂ）KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターであって、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にL511F変異、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクター、

を含むキット。

〔１８〕 MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターをさらに含む、〔１６〕または〔１７〕に記載のキット、

〔１９〕 MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターであって、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にD433A, R434A, K437A, 及びL511F変異、そしてL蛋白質にL1361C, L1558I, N1197S, 及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターをさらに含む、〔１８〕に記載のキット。

〔２０〕 低温培養せずに培養して多能性幹細胞を誘導するためのキットである、〔１６〕から〔１９〕のいずれかに記載のキット。

[0010] なお、本明細書に記載した任意の技術的事項およびその任意の組み合わせは、本明細書に意図されている。また、それらの発明において、本明細書に記載の任意の事項またはその任意の組み合わせを除外した発明も、本明細書に意図されている。また本発明に関して、明細書中に記載されたある特定の態様は、それを開示するのみならず、その態様を含むより上位の本明細書に開示された発明から、その態様を除外した発明も開示するものである。

発明の効果

[0011] 本発明により、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で含むベクターを用いた多能性幹細胞の誘導効率を有意に向上させることが可能となる。特に温度感受性ベクターを利用することにより、多能性幹細胞の誘導

後の速やかなベクターの除去を可能としつつ、培養を低温で行うことなく高い効率で多能性幹細胞の誘導を行うことができる点で有用である。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]アルカリホスファターゼ陽性iPS様細胞の誘導効率を示す図である。ヒト新生児包皮由来繊維芽細胞（BJ）にベクターを感染させて28日目のアルカリホスファターゼ染色像を示した。

[図2]アルカリホスファターゼ陽性iPS様細胞の誘導効率を示す図である。各条件は図３と同じである。

[図3]アルカリホスファターゼ染色したコロニーを示した図である。条件1、2においてアルカリホスファターゼ陽性コロニーの出現数は有意に高かった。

[図4]アルカリホスファターゼ陽性iPS様細胞の誘導効率を示した図である。BJ細胞からの多能性幹細胞の誘導効率を示した。各条件は図３と同じである。

[図5]アルカリホスファターゼ陽性iPS様細胞の誘導効率を示す図である。ヒト成人皮膚由来繊維芽細胞（HDF）にベクターを感染させ28日目の細胞をアルカリホスファターゼ染色した結果を示した。

[図6]アルカリホスファターゼ陽性iPS様細胞の誘導効率を示す図である。ヒト成人皮膚由来繊維芽細胞（HDF）からの多能性幹細胞の誘導効率を示した。各条件は図５と同じである。

[図7]アルカリホスファターゼ陽性iPS様細胞の誘導効率を示す図である。ヒト胎児肺細胞由来繊維芽細胞（MRC-5）ベクターを感染させ28日目の細胞をアルカリホスファターゼ染色した結果を示した。

[図8]アルカリホスファターゼ陽性iPS様細胞の誘導効率を示す図である。アルカリホスファターゼ陽性コロニーの誘導効率を示した図である。各条件は図７と同じである。

[図9]誘導された人工多能性幹細胞のin vivo多分化能の評価を示す図である。

[図10]誘導された人工多能性幹細胞の核型解析を示す図である。

[図11]マウス線維芽細胞からのiPS細胞誘導（アルカリホスファターゼ染色結

果）を示す図である。

[図12]抗センダイウイルス抗体染色によるベクター除去の確認を示す図である。

[図13]免疫染色によるマーカー遺伝子発現確認を示す図である。

[図14]マウスiPS細胞の評価（胚葉体形成）の結果を示す図である。

[図15]マウスiPS細胞の評価（内胚葉への試験管内分化）を示す図である。

[図16]マウスiPS細胞の評価（中胚葉への試験管内分化）を示す図である。

[図17]マウスiPS細胞の評価（外胚葉への試験管内分化）を示す図である。

[図18]マウスiPS細胞の評価（外胚葉への試験管内分化）を示す図である。

[図19]ヒト単球からのiPS細胞誘導を示す図である。

[図20]ヒト単球からのiPS細胞誘導（アルカリホスファターゼ染色像）を示す図である。

[図21]ヒト単球からのiPS細胞誘導（iPS細胞の誘導効率）を示す図である。

[図22]ヒト末梢血単核球からのiPS細胞誘導（ドナー1の細胞の様子）を示す図である。

[図23]ヒト末梢血単核球からのiPS細胞誘導（ドナー2の細胞の様子）を示す図である。

[図24]ヒト末梢血単核球からのiPS細胞誘導（アルカリホスファターゼ染色）を示す図である。

[図25]ヒト末梢血単核球からのiPS細胞誘導（誘導効率）を示す図である。

[図26]ヒト単球からのiPS細胞誘導（ドナー3の細胞の様子）を示す図である。

[図27]ヒト単球からのiPS細胞誘導（ドナー4の細胞の様子）を示す図である。

[図28]ヒト単球からのiPS細胞誘導（アルカリホスファターゼ染色）を示す図である。

[図29]ヒト単球からのiPS細胞誘導（誘導効率）を示す図である。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

[0014] 本発明は、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含むベクターを導入する工程を含む多能性幹細胞の誘導において、KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないベクターをさらに導入する工程を含む、多能性幹細胞の誘導効率を上昇させる方法に関する。より具体的には本発明の方法は、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含む温度感受性ウイルスベクターを導入して多能性幹細胞を誘導する方法における多能性幹細胞の誘導効率を改善する方法であって、KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないウイルスベクターをさらに導入する工程を含む方法である。

[0015] ベクターを導入後の培養は、低温下（例えば36.5℃未満、より具体的には例えば36℃、またはそれ未満）で行う必要はない。すなわち本発明の方法は、温度感受性変異体ベクターを用いながら、低温培養（例えば36.5℃未満での培養）をせずに高い効率で多能性幹細胞を誘導することができ、かつ多能性幹細胞の誘導後、速やかにベクターが消失する点で優れている。例えば本発明は、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含む温度感受性センダイウイルスベクターを導入し、低温培養せずに多能性幹細胞を誘導する方法における多能性幹細胞の誘導効率を改善する方法であって、KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターをさらに導入する工程を含む方法に関する。細胞の培養温度は適宜選択することができるが、例えば約37℃、具体的には、36.5～37.5℃、好ましくは36.6～37.4℃、より好ましくは36.7℃～37.3℃で行うことができる。なお本発明において多能性幹細胞の誘導とは、多能性幹細胞の製造を含み、多能性幹細胞の誘導効率の改善には、多能性幹細胞の製造効率の改善を含む。

[0016] 多能性幹細胞の誘導においてMYC遺伝子を導入することは必須ではないが、MYC遺伝子を導入することで多能性幹細胞の誘導効率を上昇させることができる。MYC遺伝子は、例えば温度感受性ウイルスベクター、好ましくは温度感受

性センダイウイルスベクターを用いて導入することができる。

[0017] また本発明は、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含むベクター、およびKLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないベクターを、体細胞等の分化した細胞に導入または接触させる工程を含む、細胞をリプログラムする方法を提供する。また本発明は、細胞のリプログラミングにおいて上記のリプログラミング因子遺伝子を導入するための方法であって、その必要のある細胞に、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含むベクター、およびKLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないベクターを用いてこれらのリプログラミング因子遺伝子を導入することを含む方法、およびその方法における使用のための当該ベクターを含む組成物を提供する。

[0018] 本発明において多能性幹細胞とは、動物の胚盤胞期の胚の内部細胞塊より作られる幹細胞またはそれと類似した表現型を有する細胞を言う。具体的には、本発明において誘導される多能性幹細胞は、ES様細胞の指標であるアルカリホスファターゼを発現する細胞である。ここでES様細胞とは、ES細胞と類似した性質および/または形態を有する多能性幹細胞を言う。また好ましくは、多能性幹細胞は、培養することにより、細胞質に比べ核の容量の比率が高い細胞からなる扁平なコロニーを形成する。培養は、適宜フィーダーと共に培養してもよい。またMEFなどの培養細胞が数週間で増殖が停止するのに対し、多能性幹細胞は長期間の継代が可能であり、例えば３日ごとの継代で１５回以上、好ましくは２０回以上、２５回以上、３０回以上、３５回以上、または４０回以上継代しても、増殖性が失なわれないことにより確認することができる。また多能性幹細胞は、好ましくは内在性のOCT3/4またはNanog、より好ましくはその両方を発現する。また多能性幹細胞は、好ましくはTERTを発現し、テロメラーゼ活性（テロメリックリピート配列を合成する活性）を示す。また多能性幹細胞は、好ましくは三胚葉（内胚葉、中胚葉、外胚葉）に分化する能力（例えばテラトーマ形成および／または胚様体形成において確認できる）を持つ。より好ましくは、多能性幹細胞は、胚盤胞に移植す

ることにより生殖系列キメラを生成する。Germline transmissionが可能な多能性幹細胞は、germline-competentな多能性幹細胞と言う。これらの表現型の確認は、周知の方法により実施することができる（WO2007/69666; Ichisaka T et al., Nature 448(7151):313-7, 2007）。

[0019] また本発明において分化したとは、それ以前よりも分化段階が進んだことを言い、例えば多能性幹細胞よりも分化していることであってよく、複数の細胞系列に分化する能力をまだ持っている状態（例えば体性幹細胞など）、および最終分化した状態を含む。分化した細胞とは、多能性幹細胞から由来する（多能性幹細胞以外の）細胞である。分化した細胞は、例えば三胚葉（内胚葉、中胚葉、外胚葉）に分化する能力を持たないものであってよい。このような細胞は、初期化（reprogramming）されなければ三胚葉を形成する能力を持たない。また分化した細胞は、例えば自身が属する胚葉型以外の細胞を生成できない細胞であってよい。分化した細胞は体細胞であってよく、例えば生殖細胞以外の細胞であってよい。

[0020] 本発明において初期化（リプログラミング；reprogramming）とは、ある細胞の分化状態を、それより未分化な状態にすることを言い、例えば分化した細胞が脱分化すること、例えば分化多能性を持たない細胞から持つ細胞、例えば多能性幹細胞を誘導することが含まれる。また本発明において脱分化とは、ある細胞が、より未熟な（例えば未分化な）状態になることを言う。脱分化とは、ある細胞が分化して来た最初または途上の状態に戻ることであってよい。また脱分化とは、自身が属する胚葉型以外の細胞を生成できない細胞から、他の胚葉の細胞にも分化できる状態になることであってよい。脱分化には、例えば三胚葉分化能を持たない細胞が、三胚葉分化能を獲得することが含まれる。また脱分化には、多能性幹細胞の生成が含まれる。

[0021] また本発明において体細胞とは、例えば多能性幹細胞や生殖細胞以外の細胞である。体細胞には、例えば多細胞生物を構成する細胞のうち多能性幹細胞以外の細胞、およびその培養細胞が含まれる。体細胞には、例えば体性幹細胞および最終分化した細胞が含まれる。

[0022] 本発明において低温培養とは、36.5℃より低い温度で培養することを言う。好ましくは低温培養は、36.4℃未満、より好ましくは36.3℃、36.2℃、36.1℃、36℃、35.9℃、35.8℃、35.7℃、35.6℃、35.5℃、35.4℃、35.3℃、35.2℃、35.1℃、より好ましくは35℃より低い温度で培養することを言う。下限は例えば30℃、好ましくは31℃、より好ましくは32℃、33℃、または34℃である。また、本発明において約37℃とは、具体的には、36.5～37.5℃、好ましくは36.6～37.4℃、より好ましくは36.7℃～37.3℃を言う。

[0023] また本発明において温度感受性とは、低温（例えば30～36℃）に比べ、通常の細胞培養温度（例えば37～38℃）において有意に活性が低下することである。より好ましくは、36℃に比べ、37℃において有意に活性が低下することをいう。例えば発現ベクターの場合、温度感受性ベクターとは、低温（例えば30～36℃）下での発現量に比べ、通常の細胞培養温度（例えば37～38℃）での発現量が有意に低いことを言う。例えばセンダイウイルスのTS 7（L蛋白質のY942H/L1361C/L1558I変異）、TS 12（P蛋白質のD433A/R434A/K437A変異、TS 13（P蛋白質のD433A/R434A/K437A変異および L蛋白質のL1558I変異、TS 14（P蛋白質のD433A/R434A/K437A変異および L蛋白質のL1361C）、TS 15（P蛋白質のD433A/R434A/K437A変異および L蛋白質のL1361C/L1558I）などの変異は、温度感受性変異である。

[0024] 本発明においてベクターは、好ましくはウイルスベクターである。また本発明においてウイルスベクターは、当該ウイルスに由来するゲノム核酸を有し、該核酸に導入遺伝子を組み込むことにより、該遺伝子を発現させることができるベクターである。センダイウイルスベクターは、染色体非組み込み型ウイルスベクターであって、ベクターは細胞質中で発現されるので、導入遺伝子が宿主の染色体（核由来染色体）に組み込まれる危険性がない。従って安全性が高く、またリプログラミングの完了後にベクターを除去することが可能である。本発明においてセンダイウイルスベクターには、感染性ウイルス粒子の他、ウイルスコア、ウイルスゲノムとウイルス蛋白質との複合体、または非感染性ウイルス粒子などからなる複合体であって、細胞に導入す

ることにより搭載する遺伝子を発現する能力を持つ複合体が含まれる。例えばセンダイウイルスにおいて、センダイウイルスゲノムとそれに結合するセンダイウイルス蛋白質（NP、P、およびL蛋白質）からなるリボヌクレオ蛋白質（ウイルスのコア部分）は、細胞に導入することにより細胞内で導入遺伝子を発現することができる（WO00/70055）。細胞への導入は、適宜トランスフェクション試薬等を用いて行えばよい。このようなリボヌクレオ蛋白質（RNP）も本発明においてセンダイウイルスベクターに含まれる。

[0025] センダイウイルスは、モノネガウイルス目(Mononegavirales)ウイルスの1つでパラミクソウイルス科（Paramyxoviridae; Paramyxovirus, Morbillivirus, Rubulavirus, および Pneumovirus属等を含む）に属し、一本のマイナス鎖（ウイルス蛋白質をコードするセンス鎖に対するアンチセンス鎖）のRNAをゲノムとして含んでいる。マイナス鎖RNAはネガティブ鎖RNAとも呼ばれる。

[0026] モノネガウイルス目(Mononegavirales)には、パラミクソウイルス（パラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)ウイルス）の他に、ラブドウイルス（Rhabdoviridae; Vesiculovirus, Lyssavirus, および Ephemerovirus属等を含む）、フィロウイルス（Filoviridae）などの科に属するウイルスが含まれる（ウイルス　第57巻　第1号、pp29-36、2007; Annu. Rev. Genet. 32, 123-162, 1998; Fields virology fourth edition, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1305-1340,2001; Microbiol. Immunol. 43, 613-624, 1999; Field Virology, Third edition pp1205-1241 1996）。センダイウイルス以外のパラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)ウイルスの例としては、ニューカッスル病ウイルス(Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス(Mumps virus)、麻疹ウイルス(Measles virus)、RSウイルス(Respiratory syncytial virus)、牛疫ウイルス(rinderpest virus)、ジステンパーウイルス(distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス（SV5）、ヒトパラインフルエンザウイルス1,2,3型、オルトミクソウイルス科（Orthomyxoviridae)のインフルエンザウイルス(Influenza virus)、ラブドウイルス科(Rhabdoviridae)の水疱性口内炎ウイルス(Vesicular stomatitis virus)、狂犬病ウイルス(Rabies v

irus)等が挙げられ、さらに具体的に例示すれば、例えば Sendai virus (SeV)、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)、phocine distemper virus (PDV)、canine distemper virus (CDV)、dolphin molbillivirus (DMV)、peste-des-petits-ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)、rinderpest virus (RPV)、Hendra virus (Hendra)、Nipah virus (Nipah)、human parainfluenza virus-2 (HPIV-2)、simian parainfluenza virus 5 (SV5)、human parainfluenza virus-4a (HPIV-4a)、human parainfluenza virus-4b (HPIV-4b)、mumps virus (Mumps)、およびNewcastle disease virus (NDV) などが含まれる。より好ましくは、Sendai virus (SeV)、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)、phocine distemper virus (PDV)、canine distemper virus (CDV)、dolphin molbillivirus (DMV)、peste-des-petits-ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)、rinderpest virus (RPV)、Hendra virus (Hendra)、および Nipah virus (Nipah) からなる群より選択されるウイルスが挙げられる。

[0027] 例えばセンダイウイルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセッション番号は、NP遺伝子については M29343、M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046, X17218、P遺伝子については M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007, X17008、M遺伝子については D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956, X00584, X53056、F遺伝子については D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152, X02131、HN遺伝子については D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, X56131、L遺伝子については D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587, X58886を参照のこと。またその他のウイルスがコードするウイルス遺伝子を例示すれば、NP遺伝子（N遺伝子とも言う）については、CDV, AF014953; DMV, X75961; HPIV-1, D01070; HPIV-2, M55320; HPIV-3, D10025; Mapuera, X85128; Mumps, D86172; MV, K01711; NDV, AF064091; PDPR, X74443; PDV, X75717; RPV, X68311; SeV, X0008

7; SV5, M81442; および Tupaia, AF079780、P遺伝子については、CDV, X51869; DMV, Z47758; HPIV-l, M74081; HPIV-3, X04721; HPIV-4a, M55975; HPIV-4b, M55976; Mumps, D86173; MV, M89920; NDV, M20302; PDV, X75960; RPV, X68311; SeV, M30202; SV5, AF052755; および Tupaia, AF079780、C遺伝子については CDV, AF014953; DMV, Z47758; HPIV-1. M74081; HPIV-3, D00047; MV, ABO16162; RPV, X68311; SeV, AB005796; および Tupaia, AF079780、M遺伝子については CDV, M12669; DMV Z30087; HPIV-1, S38067; HPIV-2, M62734; HPIV-3, D00130; HPIV-4a, D10241; HPIV-4b, D10242; Mumps, D86171; MV, AB012948; NDV, AF089819; PDPR, Z47977; PDV, X75717; RPV, M34018; SeV, U31956; および SV5, M32248、F遺伝子については CDV, M21849; DMV, AJ224704; HPN-1. M22347; HPIV-2, M60182; HPIV-3. X05303, HPIV-4a, D49821; HPIV-4b, D49822; Mumps, D86169; MV, AB003178; NDV, AF048763; PDPR, Z37017; PDV, AJ224706; RPV, M21514; SeV, D17334; および SV5, AB021962、HN（HまたはG）遺伝子については CDV, AF112189; DMV, AJ224705; HPIV-1, U709498; HPIV-2. D000865; HPIV-3, AB012132; HPIV-4A, M34033; HPIV-4B, AB006954; Mumps, X99040; MV, K01711; NDV, AF204872; PDPR, Z81358; PDV, Z36979; RPV, AF132934; SeV, U06433; および SV-5, S76876が例示できる。但し、各ウイルスは複数の株が知られており、株の違いにより上記に例示した以外の配列からなる遺伝子も存在する。これらのいずれかの遺伝子に由来するウイルス遺伝子を持つセンダイウイルスベクターは、本発明のベクターとして有用である。例えば本発明のセンダイウイルスベクターは、上記のいずれかのウイルス遺伝子のコード配列と、90%以上、好ましくは95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上の同一性を持つ塩基配列を含む。また、本発明のセンダイウイルスベクターは、例えば上記のいずれかのウイルス遺伝子のコード配列がコードするアミノ酸配列と、90%以上、好ましくは95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上の同一性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む。また、本発明のセンダイウイルスベクターは、例えば上記のいずれかのウイルス遺伝

子のコード配列がコードするアミノ酸配列において、10個以内、好ましくは9個以内、8個以内、7個以内、6個以内、5個以内、4個以内、3個以内、2個以内、または1個のアミノ酸が置換、挿入、欠失、および/または付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む。

[0028] なお本明細書に記載した塩基配列およびアミノ酸配列などのデータベースアクセッション番号が参照された配列は、例えば本願の出願日および優先日における配列を参照するものであって、本願の出願日および優先日のいずれ時点における配列としても特定することができ、好ましくは本願の出願日における配列として特定される。各時点での配列はデータベースのリビジョンヒストリーを参照することにより特定することができる。

[0029] 本発明において用いられるセンダイウイルスベクターは誘導体であってもよく、誘導体には、ウイルスによる遺伝子導入能を損なわないように、ウイルス遺伝子が改変されたウイルス、および化学修飾されたウイルス等が含まれる。

[0030] またセンダイウイルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などに由来してもよい。例えばZ株が挙げられる（Medical Journal of Osaka University Vol.6, No.1, March 1955 p1-15）。つまり、当該ウイルスは、目的とするリプログラミングを誘導できる限り、天然から単離されたウイルスと同様の構造を持つウイルスベクターであっても、遺伝子組み換えにより人為的に改変したウイルスであってもよい。例えば、野生型ウイルスが持ついずれかの遺伝子に変異や欠損があるものであってよい。また、DI粒子（J.Virol. 68: 8413-8417, 1994）などの不完全ウイルスを用いることも可能である。例えば、ウイルスのエンベロープ蛋白質または外殻蛋白質をコードする少なくとも１つの遺伝子に変異または欠損を有するウイルスを好適に用いることができる。このようなウイルスベクターは、例えば感染細胞においてはゲノムを複製することはできるが、感染性ウイルス粒子を形成できないウイルスベクターである。このような伝搬能欠損型のウイルスベクターは、周囲に感染を拡大する懸念がないので安全性が高い。例

えば、Fおよび/またはHNなどのエンベロープ蛋白質またはスパイク蛋白質をコードする少なくとも１つの遺伝子、あるいはそれらの組み合わせが含まれていないウイルスベクターを用いることができる （WO00/70055 および WO00/70070; Li, H.-O. et al., J. Virol. 74(14) 6564-6569 (2000)）。ゲノム複製に必要な蛋白質（例えば NP、P、およびL蛋白質）をゲノムRNAにコードしていれば、感染細胞においてゲノムを増幅することができる。欠損型ウイルスを製造するには、例えば、欠損している遺伝子産物またはそれを相補できる蛋白質をウイルス産生細胞において外来的に供給する（WO00/70055 および WO00/70070; Li, H.-O. et al., J. Virol. 74(14) 6564-6569 (2000)）。また、欠損するウイルス蛋白質を完全に相補することなく、非感染性のウイルス粒子（VLP）としてウイルスベクターを回収する方法も知られている（WO00/70070）。また、ウイルスベクターをRNP（例えば N、L、P蛋白質、およびゲノムRNAからなるRNP）として回収する場合は、エンベロープ蛋白質を相補することなくベクターを製造することができる。

[0031] また、変異型のウイルス蛋白質遺伝子を搭載するウイルスベクターを用いることも好ましい。本発明は、特にウイルス遺伝子に変異および／または欠失を有するセンダイウイルスベクターを用いた、リプログラミングにおける遺伝子導入方法、リプログラムされた細胞の製造方法、そのための組成物、およびキットを提供する。例えば、エンベロープ蛋白質や外殻蛋白質において弱毒化変異や温度感受性変異を含む多数の変異が知られている。これらの変異蛋白質遺伝子を有するセンダイウイルスを本発明において好適に用いることができる。本発明においては、望ましくは細胞傷害性を減弱したベクターを用い得る。細胞傷害性は、例えば細胞からの乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）の放出を定量することにより測定することができる。例えば細胞傷害性が野生型に比べ有意に減弱化したベクターを用いることができる。細胞傷害性の減弱化の程度は、例えば、ヒト由来 HeLa細胞（ATCC CCL-2）またはサル由来 CV-1細胞（ATCC CCL 70）にMOI（感染価） 3で感染させて３日間培養した培養液中のLDH放出量が野生型に比べ有意に低下したもの、例えば20%以

上、25%以上、30%以上、35%以上、40%以上、または50%以上低下したベクターを用いることができる。また細胞傷害性を低下させる変異には、温度感受性変異も含まれる。温度感受性変異とは、低温（30℃ないし36℃、例えば30℃ないし32℃）に比べ、ウイルス宿主の通常の温度（例えば37℃ないし38℃）において有意に活性が低下する変異のことである。このような、温度感受性変異を持つ蛋白質は、許容温度（低温）下でウイルスを作製することができるので便利である。本発明において有用な温度感受性変異を持つウイルスベクターは、例えば培養細胞において32℃で感染させた場合に比べ、37℃で感染させた場合に、増殖速度または遺伝子発現レベルが、少なくとも1/2以下、好ましくは1/3以下、より好ましくは1/5以下、より好ましくは1/10以下、より好ましくは1/20以下である。

[0032] 本発明において用いられるセンダイウイルスベクターは、リプログラミングを阻害せず、リプログラミング因子を発現させ、それによるリプログラミングを誘導または誘導を補助できる限り野生型でもよく、また、好ましくは少なくとも１つ、より好ましくは少なくとも２、３、４、５、またはそれ以上のウイルス遺伝子に欠失または変異を有する。欠失と変異は、各遺伝子に対して任意に組み合わせて導入してよい。ここで変異とは、機能低下型の変異または温度感受性変異であってよく、好ましくは、少なくとも37℃において、野生型または当該変異を有さないウイルスに比べ、ウイルスの粒子形成能（非伝播型ウイルスにおいては非感染性ウイルス様粒子（Nontransmissible virus-like particle formation; NTVLP）形成能（Inoue et al., J. Virol. 77:3238-3246, 2003））、増殖速度および/または搭載するいずれかの遺伝子の発現レベルを好ましくは1/2以下、より好ましくは1/3以下、より好ましくは1/5以下、より好ましくは1/10以下、より好ましくは1/20以下に低下させる変異である。このような改変ウイルスベクターを用いることは、特に多能性幹細胞の誘導には有用であり得る。例えば本発明において好適に用いられるセンダイウイルスベクターは、少なくとも２つのウイルス遺伝子が、欠失または変異している。このようなウイルスには、少なくとも２つのウイルス

遺伝子が欠失しているもの、少なくとも２つのウイルス遺伝子が変異しているもの、少なくとも１つのウイルス遺伝子が変異しており少なくとも１つのウイルス遺伝子が欠失しているものが含まれる。変異または欠失している少なくとも２つのウイルス遺伝子は、好ましくはエンベロープ構成蛋白質をコードする遺伝子である。例えばF遺伝子を欠失し、Mおよび／またはHN遺伝子をさらに欠失するか、Mおよび／またはHN遺伝子に変異（例えばNTVLP形成抑制型変異および/または温度感受性変異）をさらに有するベクターは、本発明において好適に用いられる。また、例えばF遺伝子を欠失し、MまたはHN遺伝子をさらに欠失し、残るMおよび／またはHN遺伝子に変異（例えばNTVLP形成抑制型変異および/または温度感受性変異）をさらに有するベクターも、本発明において好適に用いられる。本発明において用いられるベクターは、より好ましくは、少なくとも３つのウイルス遺伝子（好ましくはエンベロープ構成蛋白質をコードする少なくとも３つの遺伝子；F, HN, およびM）が、欠失または変異している。このようなウイルスベクターには、少なくとも３つの遺伝子が欠失しているもの、少なくとも３つの遺伝子が変異しているもの、少なくとも１つの遺伝子が変異しており少なくとも２つの遺伝子が欠失しているもの、少なくとも２つの遺伝子が変異しており少なくとも１つの遺伝子が欠失しているものが含まれる。より好ましい態様を挙げれば、例えばF遺伝子を欠失し、MおよびHN遺伝子をさらに欠失するか、MおよびHN遺伝子に変異（例えばNTVLP形成抑制型変異および/または温度感受性変異）をさらに有するベクターは、本発明において好適に用いられる。また例えばF遺伝子を欠失し、MあるいはHN遺伝子をさらに欠失し、残るMあるいはHN遺伝子に変異（例えばNTVLP形成抑制型変異および/または温度感受性変異）をさらに有するベクターは、本発明において好適に用いられる。このような変異型のウイルスは、公知の方法に従って作製することが可能である。

[0033] 例えば、センダイウイルスのM遺伝子の好ましい変異としては、M蛋白質における69位（G69）、116位（T116）、および183位（A183）からなる群より任意に選択される部位のアミノ酸置換が挙げられる（Inoue, M. et al., J.Vir

ol. 2003, 77: 3238-3246）。センダイウイルスのM蛋白質に上記の３つの部位のいずれか、好ましくは任意の２部位の組み合わせ、さらに好ましくは３つの部位全てのアミノ酸が他のアミノ酸に置換された変異M蛋白質をコードするゲノムを有するウイルスは、本発明において好適に用いられる。

[0034] アミノ酸変異は、側鎖の化学的性質の異なる他のアミノ酸への置換が好ましく、例えばBLOSUM62マトリックス（Henikoff, S. and Henikoff, J. G.（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919）の値が３以下、好ましくは２以下、より好ましくは１以下、より好ましくは０のアミノ酸に置換する。具体的には、センダイウイルスM蛋白質のG69、T116、およびA183を、それぞれGlu（E）、Ala（A）、およびSer（S）へ置換することができる。また、麻疹ウイルス温度感受性株 P253-505（Morikawa, Y. et al., Kitasato Arch. Exp. Med. 1991: 64; 15-30）のM蛋白質の変異と相同な変異を利用することも可能である。変異の導入は、例えばオリゴヌクレオチド等を用いて、公知の変異導入方法に従って実施すればよい。

[0035] また、HN遺伝子の好ましい変異としては、例えばセンダイウイルスのHN蛋白質の262位（A262）、264位（G264）、および461位（K461）からなる群より任意に選択される部位のアミノ酸置換が挙げられる（Inoue, M. et al., J.Virol. 2003, 77: 3238-3246）。３つの部位のいずれか１つ、好ましくは任意の２部位の組み合わせ、さらに好ましくは３つの部位全てのアミノ酸が他のアミノ酸に置換された変異HN蛋白質をコードするゲノムを有するウイルスは、本発明において好適に用いられる。上記と同様に、アミノ酸の置換は、側鎖の化学的性質の異なる他のアミノ酸への置換が好ましい。好ましい一例を挙げれば、センダイウイルス HN蛋白質のA262、G264、およびK461を、それぞれThr（T）、Arg（R）、およびGly（G）へ置換する。また、例えば、ムンプスウイルスの温度感受性ワクチン株 Urabe AM9を参考に、HN蛋白質の464及び468番目のアミノ酸に変異導入することもできる（Wright, K. E. et al., Virus Res. 2000: 67; 49-57）。

[0036] またセンダイウイルスは、P遺伝子および／またはL遺伝子に変異を有して

いてもよい。このような変異としては、具体的には、SeV P蛋白質の86番目のGlu（E86）の変異、SeV P蛋白質の511番目のLeu（L511）の他のアミノ酸への置換が挙げられる。上記と同様に、アミノ酸の置換は、側鎖の化学的性質の異なる他のアミノ酸への置換が好ましい。具体的には、86番目のアミノ酸のLysへの置換、511番目のアミノ酸のPheへの置換などが例示できる。またL蛋白質においては、SeV L蛋白質の1197番目のAsn（N1197）および／または1795番目のLys（K1795）の他のアミノ酸への置換が挙げられ、上記と同様に、アミノ酸の置換は、側鎖の化学的性質の異なる他のアミノ酸への置換が好ましい。具体的には、1197番目のアミノ酸のSerへの置換、1795番目のアミノ酸のGluへの置換などが例示できる。P遺伝子およびL遺伝子の変異は、持続感染性、２次粒子放出の抑制、または細胞傷害性の抑制の効果を顕著に高めることができる。さらに、エンベロープ蛋白質遺伝子の変異および／または欠損を組み合わせることで、これらの効果を劇的に上昇させることができる。またL遺伝子は、SeV L蛋白質の1214番目のTyr（Y1214）および／または1602番目のMet（M1602）の他のアミノ酸への置換が挙げられ、上記と同様に、アミノ酸の置換は、側鎖の化学的性質の異なる他のアミノ酸への置換が好ましい。具体的には、1214番目のアミノ酸のPheへの置換、1602番目のアミノ酸のLeuへの置換などが例示できる。以上に例示した変異は、任意に組み合わせることができる。

[0037] 例えば、SeV M蛋白質の少なくとも69位のG、116位のT、及び183位のA、SeV HN蛋白質の少なくとも262位のA，264位のG，及び461位のK、SeV P蛋白質の少なくとも511位のL、SeV L蛋白質の少なくとも1197位のN及び1795位のKが、それぞれ他のアミノ酸に置換されており、かつF遺伝子を欠損または欠失するセンダイウイルスベクター、ならびに、細胞傷害性がこれらと同様またはそれ以下、および/または37℃におけるNTVLP形成の抑制がこれらと同様またはそれ以上のF遺伝子欠損または欠失センダイウイルスベクターは、本発明において核初期化因子（nuclear reprogramming factors）を発現させるために特に好適である。具体的な置換例を例示すれば、例えばM蛋白質についてはG69E

, T116A, 及びA183Sの置換を、HN蛋白質についてはA262T, G264R, 及びK461Gの置換を、P蛋白質についてはL511Fの置換を、そしてL蛋白質についてはN1197S及びK1795Eの置換を挙げることができる。

[0038] また、L蛋白質の変異としては、SeV L蛋白質の942位（Y942）、1361位（L1361）、および1558位（L1558）から任意に選択される部位のアミノ酸の他のアミノ酸への置換も挙げられる。上記と同様に、アミノ酸の置換は、側鎖の化学的性質の異なる他のアミノ酸への置換が好ましい。具体的には、942番目のアミノ酸のHisへの置換、1361番目のアミノ酸のCysへの置換、1558番目のアミノ酸のIleへの置換などが例示できる。特に少なくとも942位または1558位が置換されたL蛋白質を好適に用いることができる。例えば1558位に加え、1361位も他のアミノ酸に置換された変異L蛋白質も好適である。また、942位に加え、1558位および/または1361位も他のアミノ酸に置換された変異L蛋白質も好適である。これらの変異により、L蛋白質の温度感受性を上昇させることができる。

またP蛋白質の変異としては、SeV P蛋白質の433位（D433）、434位（R434）、および437位（K437）から任意に選択される部位のアミノ酸の他のアミノ酸への置換が挙げられる。上記と同様に、アミノ酸の置換は、側鎖の化学的性質の異なる他のアミノ酸への置換が好ましい。具体的には、433番目のアミノ酸のAla（A）への置換、434番目のアミノ酸のAla（A）への置換、437番目のアミノ酸のAla（A）への置換などが例示できる。特にこれら３つの部位全てが置換されたP蛋白質を好適に用いることができる。これらの変異により、P蛋白質の温度感受性を上昇させることができる。

[0039] SeV P蛋白質の少なくとも433位のD、434位のR、および437位のKの３箇所が、他のアミノ酸に置換された変異P蛋白質、およびSeV L蛋白質の少なくとも1558位のLが置換された変異L蛋白質（好ましくは少なくとも1361位のLも他のアミノ酸に置換された変異L蛋白質）をコードする、F遺伝子を欠損または欠失するセンダイウイルスベクター、ならびに、細胞傷害性がこれと同様またはそれ以下、および/または温度感受性がこれと同様またはそれ以上のF遺伝

子を欠損または欠失するセンダイウイルスベクターも、本発明において好適に用いられる。各ウイルス蛋白質は、上記の変異以外に他のアミノ酸（例えば10以内、5以内、4以内、3以内、2以内、または1アミノ酸）に変異を有していてもよい。上記に示した変異を有するベクターは高い温度感受性を示すので、リプログラミングが完了した後、細胞を通常温度（例えば約37℃、具体的には36.5～37.5℃、好ましくは36.6～37.4℃、より好ましくは36.7℃～37.3℃）で培養することにより、ベクターを簡便に除去することができる。ベクターの除去においては、やや高温（例えば37.5～39℃、好ましくは38～39℃、または38.5～39℃）で培養してもよい。

より具体的に例を挙げれば、例えば

TS 7：L (Y942H/L1361C/L1558I)

TS 12：P(D433A/R434A/K437A)

TS 13：P(D433A/R434A/K437A), L(L1558I)

TS 14：P(D433A/R434A/K437A), L(L1361C)

TS 15：P(D433A/R434A/K437A), L(L1361C/L1558I)

などの変異を持つセンダイウイルスベクターを好適に用いることができる(国際公開番号 WO2010/008054)。

[0040] 具体的なベクターを例示すれば、例えばM蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を持つF遺伝子欠失型センダイウイルスベクター（例えばZ strain）であってよく、このベクターにさらに上記の TS 7、TS 12、TS 13、TS 14、またはTS 15の変異を導入したベクターはより好ましい。具体的には、SeV18+/TSΔF (WO2010/008054、WO2003/025570) やSeV(PM)/TSΔF、および、これらにさらにTS 7、TS 12、TS 13、TS 14、またはTS 15の変異を導入したベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない。

なお「TSΔF」は、M蛋白質にG69E,T116A,及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T,G264R,及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1

197S及びK1795E変異を持ち、F遺伝子を欠失することを言う。

KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含む温度感受性センダイウイルスベクターとしては、特にM蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を持つF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターであって、さらに上記の TS 7、TS 12、TS 13、TS 14、またはTS 15の変異を有するベクターが好ましい。より好ましくは、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を持ち、さらに TS 12 の変異を持つF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである。KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子を含むセンダイウイルスにおいては、好ましくはKLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子は、この順番でセンダイウイルスのP遺伝子の直後、すなわちP遺伝子のすぐ下流（マイナス鎖RNAゲノムのすぐ5'側）に組み込まれる。

[0041] 特にSeV(PM)KOS/TS7ΔF、SeV(PM)KOS/TS12ΔFなどが好ましいベクターとして挙げられ、より好ましくはSeV(PM)KOS/TS12ΔFが挙げられるが、これらに限定されない。

[0042] このとき、KLF遺伝子を発現するセンダイウイルスベクター（KLF遺伝子を搭載し、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を搭載しないベクター）を組み合わせることが好ましい。KLF遺伝子をコードする（KLF遺伝子を搭載し、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を搭載しない）センダイウイルスベクターとしては、温度感受性であってもなくてもよいが、好ましくは、当該ベクターは37℃においてNTVLP形成が抑制される変異を有する。NTVLP形成は、文献Inoue et al., J. Virol. 77:3238-3246, 2003に従って測定することができる。好ましいベクターとして、例えばM蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を持つF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターを挙げることができる。KLF遺伝子を搭載し、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を搭載しない

センダイウイルスベクターは、37℃で搭載遺伝子（KLF遺伝子）を発現できるものである。当該ベクターとしては、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含むセンダイウイルスベクターよりも、37℃における搭載遺伝子の発現効率が高いものが用いられる。具体的には、上記のKLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含む温度感受性センダイウイルスベクターよりも温度感受性が低い（37℃でも耐性が高く、搭載遺伝子の発現レベルが相対的に高い）ものが好ましい。KLF遺伝子は、例えばセンダイウイルスベクターのN遺伝子の上流（ゲノム上のN遺伝子の3'側）に挿入することができ、特にSeV18+KLF4/TSΔFを好ましいベクターとして挙げることができる。

[0043] またこのとき、MYC遺伝子をコードする温度感受性ウイルスベクターを組み合わせることが好ましい。MYC遺伝子をコードする温度感受性ウイルスベクターとしては、例えばMYC遺伝子をコードする温度感受性センダイウイルスベクターが挙げられる。より具体的には、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にL511F変異、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を持つF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターであって、さらに上記の TS 7、TS 12、TS 13、TS 14、またはTS 15の変異を有するベクターが好ましい。より好ましくは、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を持ち、さらに TS 15 の変異を持つF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである。MYC遺伝子は、例えばHN遺伝子の直後、すなわちHN遺伝子のすぐ下流（マイナス鎖RNAゲノムのすぐ5'側）、例えばHN遺伝子とL遺伝子の間に組み込まれる。より具体的には、SeV(HNL)c-rMYC/TS12ΔF、SeV(HNL)c-rMYC/TS13ΔF、またはSeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF等が挙げられ、特にSeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔFが好ましい。特に、SeV(PM)KOS/TS12ΔF、SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF、およびSeV18+KLF4/TSΔFを組み合わせることで、好適な結果を得ることができる。

[0044] ベクターの細胞傷害性は、例えば細胞からの乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）

の放出を定量することにより測定することができる。具体的には、例えばHeLa（ATCC CCL-2）またはサルCV-1（ATCC CCL 70）にMOI 3で感染させて３日間培養した培養液中のLDH放出量を測定する。LDH放出量が少ないほど細胞傷害性は低い。また温度感受性は、ウイルス宿主の通常の温度（例えば37℃ないし38℃）におけるウイルスの増殖速度または搭載遺伝子の発現レベルを測定することにより決定することができる。変異を有さないものに比べ、ウイルスの増殖速度および/または搭載遺伝子の発現レベルが低下すれば、その変異は温度感受性変異だと判断され、当該増殖速度および/または発現レベルが低下するほど、温度感受性は高いと判断される。

[0045] またエンベロープウイルスを用いる場合は、ウイルスが本来持つエンベロープ蛋白質とは異なる蛋白質をエンベロープに含むウイルスを使用してもよい。例えば、ウイルス製造の際に、所望の外来性エンベロープ蛋白質をウイルス産生細胞で発現させることにより、これを含むウイルスを製造することができる。このような蛋白質に特に制限はなく、哺乳動物細胞への感染能を付与する所望の接着因子、リガンド、受容体等の蛋白質を用いることができる。具体的には、例えば水疱性口内炎ウイルス（vesicular stomatitis virus; VSV）のG蛋白質（VSV-G）を挙げることができる。VSV-G蛋白質は、任意のVSV株に由来するものであってよく、例えば Indiana血清型株（J. Virology 39: 519-528 (1981)）由来のVSV-G蛋白を用いることができるが、これに限定されない。本発明において用いられるセンダイウイルスベクターは、他のウイルス由来のエンベロープ蛋白質を任意に組み合わせて含むことができる。

[0046] 核初期化因子（nuclear reprogramming factors）を持つ組換えセンダイウイルスの再構成は公知の方法を利用して行えばよい。具体的な手順として、典型的には、（ａ）センダイウイルスゲノムRNA（マイナス鎖）またはその相補鎖（プラス鎖）をコードするcDNAを、ウイルス粒子形成に必要なウイルス蛋白質（NP、P、およびL）を発現する細胞で転写させる工程、（ｂ）生成したウイルスを含む培養上清を回収する工程、により製造することができる。粒子形成に必要なウイルス蛋白質は、転写させたウイルスゲノムRNAから発現

されてもよいし、ゲノムRNA以外からトランスに供給されてもよい。例えば、NP、P、およびL蛋白質をコードする発現プラスミドを細胞に導入して供給することができる。ゲノムRNAにおいて粒子形成に必要なウイルス遺伝子が欠損している場合は、そのウイルス遺伝子をウイルス産生細胞で別途発現させ、粒子形成を相補することもできる。ウイルス蛋白質やRNAゲノムを細胞内で発現させるためには、該蛋白質やゲノムRNAをコードするDNAを宿主細胞で機能する適当なプロモーターの下流に連結したベクターを宿主細胞に導入する。転写されたゲノムRNAは、ウイルス蛋白質の存在下で複製され、感染性ウイルス粒子が形成される。エンベロープ蛋白質などの遺伝子を欠損する欠損型ウイルスを製造する場合は、欠損する蛋白質またはその機能を相補できる他のウイルス蛋白質などをウイルス産生細胞において発現させることもできる。

[0047] 例えば、センダイウイルスの製造は、以下の公知の方法を利用して実施することができる（WO97/16539; WO97/16538; WO00/70055; WO00/70070; WO01/18223; WO03/025570； WO2005/071092; WO2006/137517; WO2007/083644; WO2008/007581; Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997、Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466; Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell. M. J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15400-15404; Tokusumi, T. et al. Virus Res. 2002: 86; 33-38、Li, H.-O. et al., J. Virol. 2000: 74; 6564-6569）。またウイルスの増殖方法および組み換えウイルスの製造方法については、ウイルス学実験学 各論、改訂二版（国立予防衛生研究所学友会編、丸善、1982）も参照のこと。

[0048] 上記のセンダイウイルスには、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子が、この順番でセンダイウイルスに組み込まれる。また別のセンダイウイルスには、KLF遺伝子が組み込まれる（このベクターにはOCT遺伝子およびSOX遺伝子は組み込まれない）。これらの外来遺伝子は、一般に、いずれかのウイルス遺伝子（NP, P, M, F, HN, または L）の直前（ゲノムの3'側）または直後（ゲノムの5'側）に挿入することができる。

[0049] KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子を含むセンダイウイルスにおいては、好ましくはKLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子は、この順番でセンダイウイルスのP遺伝子の直後、すなわちP遺伝子のすぐ下流（マイナス鎖RNAゲノムのすぐ5'側）に組み込まれる。例えばP遺伝子とKLF遺伝子の間には、転写開始シグナル（S配列）、転写終結シグナル（E配列）、およびスペーサー配列（介在配列（I配列）など）は含まれうるものの、他の転写単位（例えば蛋白質をコードする遺伝子をコードする転写単位）は含まれない。センダイウイルスはマイナス鎖RNAをゲノムに持つことから、通常とは逆で、ゲノムの3'側が上流にあたり、5'側が下流にあたる。センダイウイルスのゲノム上でKLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子がこの順番で並ぶとき、KLF遺伝子が3つの遺伝子の中では最も3'側に配置され、SOX遺伝子が最も5'側に配置される。なおマイナス鎖RNAは遺伝子をアンチセンスにコードすることから、ゲノム上のKLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子は、蛋白質のコード鎖（センス鎖）ではなくアンチセンス鎖としてコードされている。センダイウイルスゲノムは、細胞に入るとこのゲノムを鋳型にしてアンチゲノムRNAが生成する。アンチゲノムはプラス鎖であって、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子は、蛋白質をコードする鎖（センス鎖）が搭載されている。アンチゲノムRNAにおいては、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子の配置は、KLF遺伝子が3つの遺伝子の中では最も5'側に配置され、SOX遺伝子が最も3'側に配置されている。

[0050] 3つの遺伝子は、好ましくは互いに隣接している（すなわち３つの遺伝子の間に他の遺伝子が入ることはない）。それぞれの遺伝子は、適宜センダイウ

イルスS（Start）配列とE（End）配列で挟まれていてよい。S配列は転写を開始させるシグナル配列であり、E配列で転写が終結する。S配列とE配列で挟まれた領域は、１つの転写単位となる。ある遺伝子のE配列と次の遺伝子のS配列の間は、適宜スペーサーとなる配列（介在配列；intervening sequence）を挿入することができる。例えば S - KLF遺伝子 -E-I-S- OCT遺伝子 -E-I-S- SOX遺伝子 -E（S, I, およびE はそれぞれS配列、I（intervening）配列、およびE配列を表す）の構成をもつ核酸をゲノムに含むセンダイウイルスベクターを好適に用いることができる。センダイウイルスゲノム上のP遺伝子とKLF遺伝子は、P遺伝子 -E-I-S- KLF遺伝子 - ... のように結合される。

OCT遺伝子、SOX遺伝子、およびKLF遺伝子の順番で配置される場合は、例えば S - OCT遺伝子 -E-I-S- SOX遺伝子 -E-I-S- KLF遺伝子 -E（S, I, およびE はそれぞれS配列、I（intervening）配列、およびE配列を表す）の構成をもつ核酸をゲノムに含むセンダイウイルスベクターを好適に用いることができる。センダイウイルスゲノム上のP遺伝子とSOX遺伝子は、P遺伝子 -E-I-S- SOX遺伝子 - ... のように結合される。

[0051] S配列としては、センダイウイルスの所望のS配列を用いることができるが、例えば 3'-UCCCWVUUWC-5'（W= AまたはU; V= A, C, またはG）（配列番号：1）の配列を好適に用いることができる。特に 3'-UCCCAGUUUC-5'（配列番号：2）、3'-UCCCACUUAC-5'（配列番号：3）、および 3'-UCCCACUUUC-5'（配列番号：4）が好ましい。これらの配列は、プラス鎖をコードするDNA配列で表すとそれぞれ 5'-AGGGTCAAAG-3'（配列番号：5）、5'-AGGGTGAATG-3'（配列番号：6）、および 5'-AGGGTGAAAG-3'（配列番号：7）である。センダイウイルスベクターのE配列としては、例えば 3'-AUUCUUUUU-5'（プラス鎖をコードするDNAでは 5'-TAAGAAAAA-3'）が好ましい。I配列は、例えば任意の3塩基であってよく、具体的には 3'-GAA-5'（プラス鎖DNAでは 5'-CTT-3'）を用いればよい。

[0052] 野生型センダイウイルスのゲノムは、3'の短いリーダー領域に続き、ヌクレオキャプシド（NP）遺伝子、ホスホ（P）遺伝子、マトリックス（M）遺伝

子、フュージョン（F）遺伝子、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ（HN）遺伝子、およびラージ（L）遺伝子、及び短い5'トレイラー領域をこの順序で含んでいる。センダイウイルスベクターにおいても、この順番でウイルス遺伝子を配置することができる。野生型ウイルスに相当する組み換えベクターや、様々な変異型ベクターの作製が既に知られている。さらには、そのエンベロープを除いたRNPのみでも遺伝子導入が可能であることが示されている（WO 00/70055）。よって、センダイウイルスRNPをウイルスベクターとして用いてリプログラミングを行うことができる。

[0053] センダイウイルスはNP遺伝子、P遺伝子、およびL遺伝子があればベクターとして十分機能でき、細胞中でゲノムを複製し、搭載されている外来遺伝子（KLF、OCT、およびSOX等）を発現させることができる。ウイルス遺伝子としてNP遺伝子、P遺伝子、およびL遺伝子の３遺伝子を含むセンダイウイルスであれば、KLF、OCT、およびSOX遺伝子のセットは、例えばP遺伝子とL遺伝子の間に挿入される。M遺伝子を含むベクターであれば、KLF、OCT、およびSOX遺伝子のセットは、例えばP遺伝子とM遺伝子の間に挿入される（WO97/16539）。M遺伝子欠失型のセンダイウイルスベクターでF遺伝子を含む場合は、KLF、OCT、およびSOX遺伝子のセットはP遺伝子とF遺伝子の間に挿入される（WO00/70070）。MおよびF遺伝子欠失型であればP遺伝子とHN遺伝子の間に、F、M、HN遺伝子欠失型であればP遺伝子とL遺伝子の間に挿入される（WO2003/025570、WO2006/137517）。ウイルス遺伝子を欠失するベクターは安全性が高いので好ましい。本発明においては、少なくともF遺伝子を欠失したベクターを好適に用いることができる。

[0054] また、KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないベクターであれば、KLF遺伝子は、例えばNP遺伝子の上流（3'リーダー配列とNP遺伝子との間）に挿入される。

[0055] KLF、OCTおよびSOX遺伝子を含む上記センダイウイルスベクターおよびKLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターは、それらだけを用いて適宜リプログラミングにおける遺伝子導入に使

用することができるが、MYC遺伝子をさらに導入するリプログラミングにおいて使用することがより好ましい。MYC遺伝子の代わりにGlis1遺伝子（Maekawa et al., Nature, 474: 225-229, 2011）を発現するベクターを組み合わせてもよい。MYC遺伝子またはGlis1遺伝子は上記のKLF、OCTおよびSOX遺伝子を含むセンダイウイルスベクターまたはKLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターの中に挿入することもできるが、別のベクターに挿入して使用してもよい。MYC遺伝子またはGlis1遺伝子を別のベクターに挿入する場合、ベクターはプラスミド、ウイルスベクター、非ウイルスベクター（例えばリポソーム）など所望のベクターを使用することができる。ウイルスベクターとしてはアデノウイルスベクターやレトロウイルスベクターなどが挙げられるがそれらに限定されない。より好ましくは、MYC遺伝子またはGlis1遺伝子は、センダイウイルスベクターに挿入される。本発明においては、KLF、OCTおよびSOX遺伝子を含む上記センダイウイルスベクターおよび、KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターは、MYC遺伝子またはGlis1遺伝子が挿入された別のセンダイウイルスベクターと組み合わせて用いることがより好ましい。MYC遺伝子またはGlis1遺伝子を挿入する元となるセンダイウイルスベクターは、上記に記載したセンダイウイルスベクターを使用することができる。

[0056] MYC遺伝子またはGlis1遺伝子をセンダイウイルスゲノムに挿入する場合、遺伝子のベクター中の挿入位置は所望の部位を選択することができる。例えばMYC遺伝子またはGlis1遺伝子は、マイナス鎖RNAゲノムの後方（5'側）、例えばマイナス鎖RNAウイルスのゲノムの中央よりも5'端側（順番が真中の遺伝子よりも5'端側）、すなわちゲノム上に配置される複数の蛋白質コード配列において、3'側から数えるよりも5'側から数えた方が早い位置に配置することが好ましい（実施例参照）。MYC遺伝子またはGlis1遺伝子は、例えば最も5'側（すなわち5'側から1番目）、あるいは5'側から2または3番目に配置することができる。MYC遺伝子またはGlis1遺伝子は、例えばゲノムの5'側から2番目、具体的には、ゲノムの最も5'側にL遺伝子があり、その次にHN遺伝子があ

る場合に、HN遺伝子とL遺伝子の間（HN-L間）に配置してもよい。特にMYC遺伝子またはGlis1遺伝子をセンダイウイルスゲノム上のL遺伝子のすぐ上流（3'側、例えばHN遺伝子とL遺伝子の間）、またはすぐ下流（5'側、例えばL遺伝子と5'トレイラー配列の間）に挿入することが好ましい。HN遺伝子とL遺伝子の間にMYC遺伝子が挿入されたセンダイウイルスベクターが最も好適である。センダイウイルスベクターとしては、例えばM蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を持つF遺伝子欠失型センダイウイルスベクター（例えばZ strain）であってよく、このベクターにさらにTS 7、TS 12、TS 13、TS 14、またはTS 15の変異を導入したベクターはより好ましい。

[0057] MYC遺伝子は、野生型c-MYCのみならず、T58A変異体や、N-MYC、L-MYCでも多能性幹細胞を誘導できる（WO2007/69666; Blelloch R. et al., Cell Stem Cell, 1: 245-247, 2007）。このように、ファミリーの遺伝子を様々に選択して使用することが可能であるので、MYCファミリー遺伝子を適宜選択して、リプログラミングを誘導することができる。またMYC遺伝子は、コードされるアミノ酸配列を変えないように適宜サイレント変異を導入し、連続したAまたはTの塩基配列を置換することができる。

[0058] 例えば野生型c-MYCはセンダイウイルスベクターなどのRNAウイルスベクターからの発現量が少ないことが判明した。しかし野生型c-MYCに、a378g、t1122c、t1125c、a1191g、および a1194g から選択される１つ以上、好ましくは２以上、３以上、４以上、または５つ全ての変異を導入することにより、ベクターから遺伝子を安定して高発現させることが可能となる。本発明においては、例えば配列番号：8（アミノ酸配列は配列番号：9）に示された改変型c-MYC遺伝子（これを「c-rMYC」と称す）を好適に用いることができる。具体的には、SeV(HNL)c-rMYC/TSΔF、SeV(L)c-rMYC/TSΔF、SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF（WO2010/008054; Fusaki et al., Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. Vol. 85, p348-362(2009)）などが挙げられ、特に好ましくはSeV(HNL)c-rMY

C/TS15ΔFが挙げられるが、これらに限定されない。

[0059] 上記のKLF、OCTおよびSOX遺伝子を含むセンダイウイルスベクター、KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクター、および/またはMYC遺伝子を含むセンダイウイルスベクターには、適宜、細胞のリプログラミングのための遺伝子などをさらに搭載させることができる。また、それらの遺伝子を搭載した他のベクターを、上記センダイウイルスベクターと組み合わせてもよい。搭載する遺伝子は、分化した細胞からの多能性幹細胞などの種々の幹細胞の誘導等に関与する所望の遺伝子であってよい。例えばリプログラミングの効率を上昇させる遺伝子を搭載させることができる。

本発明は、本発明のセンダイウイルスベクターの、細胞のリプログラミングにおいて遺伝子を導入するための使用、そして、細胞においてリプログラミング因子を発現させ、該細胞のリプログラミングを誘導するための使用を提供する。また本発明は、本発明のセンダイウイルスベクターを含む、細胞のリプログラミングにおいて遺伝子を導入するための剤（導入剤、遺伝子導入剤）、細胞においてリプログラミング因子を発現させるための剤を提供する。また本発明は、本発明のセンダイウイルスベクターを含む、細胞においてリプログラミング因子を発現させ、該細胞のリプログラミングを誘導するための剤に関する。また本発明のベクターは、細胞の核初期化を行う際に、所望の遺伝子を該細胞においてさらに発現させるためにも有用である。本発明のセンダイウイルスベクターは、本発明に従い、細胞のリプログラミングのために利用することができる。リプログラミングの誘導とは、具体的には多能性幹細胞の誘導であってよい。本発明は、医学的用途および非医学的用途のために用いることができ、メディカルおよびノンメディカルの態様において有用である。例えば本発明は、治療、手術、および/または診断、あるいは非治療、非手術、および/または非診断の目的に用いることができる。

[0060] 本発明において核初期化因子（a nuclear reprogramming factor）とは、単独で、または複数の因子と共同して、ある細胞の分化状態をより未分化な

状態に誘導するために用いられる遺伝子またはその産物を言い、例えば分化した細胞の脱分化を誘導するために用いられる遺伝子またはその産物が含まれる。本発明において核初期化因子（a nuclear reprogramming factor）には、核の初期化（reprogramming）に必須の因子、および核初期化の効率を上昇させる補助的な因子（補助因子）が含まれる。本発明においては、核初期化（nuclear reprogramming）に用いるための所望の遺伝子をベクターに搭載してよい。例えば多能性幹細胞の製造に用いるための遺伝子をさらに搭載することができる。多能性幹細胞を誘導するための核初期化因子（nuclear reprogramming factors）としては、具体的には、例えばＥＳ細胞や初期胚などで発現するが、分化した多くの体細胞では発現しないか、発現が低下する遺伝子（ＥＳ細胞特異的遺伝子など）を用いることができる。このような遺伝子は、好ましくは転写因子や核蛋白質等をコードする遺伝子である。核初期化遺伝子（nuclear reprogramming factors）を同定する方法は既に知られており（WO2005/80598）、実際、この方法を用いて同定された遺伝子は、多能性幹細胞へのreprogrammingに有用であることが示されている（WO2007/69666）。

[0061] そのような遺伝子の例を挙げれば、DPPA5 (developmental pluripotency associated 5, ES cell specific gene 1 (ESG1); accession numbers NM_001025290, NM_025274, XM_236761) 、F-box protein 15 (Fbx15, NM_152676, NM_015798)、Nanog (NM_024865, AB093574) 、ECAT1 (ES cell associated transcript 1 ; AB211062, AB211060) 、ERAS (ES cell expressed Ras; NM_181532, NM_181548)、DNMT3L (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-like; NM_013369, NM_019448)、ECAT8 (AB211063, AB211061) 、GDF3 (growth differentiation factor 3; NM_020634, NM_008108) 、SOX15 (SRY (sex determining region Y)-box 15; NM_006942, NM_009235) 、DPPA4 (developmental pluripotency associated 4; NM_018189, NM_028610) 、DPPA2 (NM_138815, NM_028615) 、FTHL17 (ferritin, heavy polypeptide-like 17; NM_031894, NM_031261) 、SALL4 (sal-like 4; NM_020436, NM_175303) 、OCT3/4 (POU5

F1とも呼ばれる; NM_002701, NM_203289, NM_013633, NM_001009178）、SOX2（NM_003106, NM_011443, XM_574919）、Rex-1（ZFP42（zinc finger protein 42 homolog); NM_174900, NM_009556）、Utf1（undifferentiated embryonic cell transcription factor 1; NM_003577, NM_009482）、TCL1A（T-cell leukemia/lymphoma 1A; NM_021966, NM_009337）、DPPA3（Stellaとも呼ばれる, NM_199286, NM_139218, XM_216263)、KLF4（Kruppel-like factor 4; NM_004235, NM_010637）、cateninβ1（cadherin-associated protein beta 1; NM_001904, NM_007614; S33Y変異体を含む）、c-MYC（NM_002467, NM_010849; T58A変異体を含む）、STAT3（signal transducer and activator of transcription 3; NM_139276, NM_213659）、GRB2（growth factor receptor-bound protein 2; NM_002086, NM_008163）、Glis1遺伝子（Maekawa et al., Nature, 474: 225-229, 2011; NM_147193, NM_147221）ならびにこれらの遺伝子が属するファミリーの他のメンバーの遺伝子などが挙げられる。これらの遺伝子は、細胞に導入することにより多能性幹細胞を誘導する（WO2007/69666）。従って、KLF、OCTおよびSOX遺伝子を含むセンダイウイルスベクター、KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクター、および/またはMYC遺伝子を含むセンダイウイルスベクターに、上記の遺伝子のうち、まだベクターに搭載されていない遺伝子をさらに搭載させたり、あるいはそれらの遺伝子を搭載する他のベクターを組み合わせて用いることができる。これらの遺伝子は、１つずつ別のベクターに組み込んでもよいし、複数の遺伝子をまとめて１つのベクターに組み込むこともできる。また、それぞれの遺伝子を一種類のベクターに組み込んでもよく、あるいは異なる種類のベクター（染色体組み込み型ウイルスベクターおよび／または非ウイルスベクターを含む）を、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子を含む上記本発明のセンダイウイルスベクターおよびKLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターと組み合わせて用いてもよい。また個々のウイルスベクターは、別々にパッケージされており使用時に組み合わせて用いることができる。あるいは搭載する遺伝子が異

なる複数のウイルスベクターを、予めまとめてキットとしたり、混合して組成物としてもよい。また、これらの遺伝子の任意の組み合わせ（または全て）を含む、１つまたはそれ以上の非組み込み型ウイルスベクター、および該ベクターをさらに含むキットまたは組成物も、細胞のリプログラミング、特に多能性幹細胞の製造において好適に用いることができる。組成物の場合は、ベクターは適宜、薬学的に許容される担体および/または媒体と組み合わせてよく、例えば、滅菌水、ｐＨ緩衝液、生理的食塩水、培養液等の中に混合されていてよい。尚、これらの系は、核初期化遺伝子の一部または大部分をその発現産物であるタンパク質に置き換えることもできる。すなわち本発明の組成物およびキットは、少なくともKLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子を含む上記センダイウイルスベクターと、KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターとを含む限り、リプログラミング因子を発現する他のベクター（染色体組込み型ウイルスベクターおよび／または非ウイルスベクター）および／またはリプログラムを誘導する化合物、蛋白質等を含んでもよい。リプログラミングに必要な因子は、その全てをセンダイウイルスベクターから発現させることが好ましいが、一部のみをセンダイウイルスベクターから発現させ、その他を他のベクターおよび／または化合物（例えば蛋白質や低分子化合物）により供給してもよい。また、本発明のリプログラムされた細胞の製造方法は、全ての遺伝子導入をセンダイウイルスベクターを用いて行う方法に限定されない。すなわち本発明の方法は、少なくともKLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子を含む上記センダイウイルスベクターと、KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターを用いればよく、リプログラミング因子を発現する他のベクター（染色体組込み型ウイルスベクターおよび／または非ウイルスベクター）および／またはリプログラムを誘導する化合物等を併用することが含まれる。好ましくは、MYC遺伝子またはGlis1遺伝子を含む上記センダイウイルスベクターをさらに組み合わせて用いられる。

[0062] また本発明は、以下の発明も提供する。

〔1〕 KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含むベクターを導入して多能性幹細胞を誘導する方法（製造する方法を含む）における多能性幹細胞の誘導効率を改善（製造効率の改善を含む）する方法であって、KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないベクターをさらに導入する工程を含む方法。

〔2〕 KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で含むベクターが温度感受性ウイルスベクターである、〔1〕に記載の方法。

〔3〕 温度感受性ウイルスベクターが温度感受性センダイウイルスベクターである、〔2〕に記載の方法。

〔4〕 温度感受性センダイウイルスベクターが、TS 7（L蛋白質のY942H, L1361C, およびL1558I変異）、TS 12（P蛋白質のD433A, R434A, およびK437A変異、TS 13（P蛋白質のD433A, R434A, およびK437A変異および L蛋白質のL1558I変異、TS 14（P蛋白質のD433A, R434A, およびK437A変異および L蛋白質のL1361C変異）、および TS 15（P蛋白質のD433A, R434A, およびK437A変異および L蛋白質のL1361C および L1558I変異）からなる群より選択される変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔3〕に記載の方法。

〔5〕 温度感受性センダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含み、さらに TS 12の変異（P蛋白質のD433A、R434A、およびK437Aの変異）を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔4〕に記載の方法。

〔6〕 KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子が、この順番でセンダイウイルスのP遺伝子の直後（マイナス鎖RNAゲノムにおいてP遺伝子の5'側）に組み込まれている、〔3〕から〔5〕のいずれかに記載の方法。

〔7〕 温度感受性センダイウイルスベクターが、SeV(PM)KOS/TS7ΔF、およびSeV(PM)KOS/TS12ΔFからなる群より選択される、〔3〕に記載の方法。

〔8〕 KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないベクターが

センダイウイルスベクターである、〔1〕から〔7〕のいずれかに記載の方法。

〔9〕 KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターが37℃におけるNTVLP形成が抑制される変異を有するセンダイウイルスベクターである、〔8〕に記載の方法。

〔10〕 KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔8〕に記載の方法。

〔11〕 KLF遺伝子が、N遺伝子の上流（マイナス鎖RNAゲノムにおいてN遺伝子の3'側）に組み込まれている、〔8〕から〔10〕のいずれかに記載の方法。

〔12〕 KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターがSeV18+KLF4/TSΔFである、〔8〕に記載の方法。

〔13〕 MYC遺伝子が挿入されたベクターを導入する工程をさらに含む、〔1〕から〔12〕のいずれかに記載の方法。

〔14〕 MYC遺伝子が挿入されたベクターがセンダイウイルスベクターである、〔13〕に記載の方法。

〔15〕 MYC遺伝子が挿入されたセンダイウイルスベクターが温度感受性センダイウイルスベクターである、〔14〕に記載の方法。

〔16〕 MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターが、TS 7、TS 12、TS 13、TS 14、および TS 15 からなる群より選択される変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔15〕に記載の方法。

〔17〕 MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含み、さらに TS 15 の変異（P蛋白質のD433A、R434A、K437Aの変異、並びにL蛋白質のL1361CおよびL1558Iの変異）を含むF遺伝子欠失型センダイウ

イルスベクターである、〔16〕に記載の方法。

〔18〕 MYC遺伝子が、L遺伝子の直前（マイナス鎖RNAゲノムの3'側）に組み込まれている、〔14〕から〔17〕のいずれかに記載の方法。

〔19〕 MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターがSeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔFである、〔14〕に記載の方法。

〔20〕 MYC遺伝子がc-rMycである、〔13〕から〔19〕のいずれかに記載の方法。

〔21〕 低温で培養しない、〔1〕から〔20〕のいずれかに記載の方法。

〔22〕 約37℃で培養する、〔21〕に記載の方法。

[0063] また本発明は、以下の発明も提供する。

〔1〕 KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含むベクターを導入して多能性幹細胞を誘導する方法（製造する方法を含む）における多能性幹細胞の誘導効率を改善（製造効率の改善を含む）するための薬剤の製造における、KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないベクターの使用。

〔2〕 KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で含むベクターが温度感受性ウイルスベクターである、〔1〕に記載の使用。

〔3〕 温度感受性ウイルスベクターが温度感受性センダイウイルスベクターである、〔2〕に記載の使用。

〔4〕 温度感受性センダイウイルスベクターが、TS 7、TS 12、TS 13、TS 14、および TS 15 からなる群より選択される変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔3〕に記載の使用。

〔5〕 温度感受性センダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含み、さらに TS 12 の変異（P蛋白質のD433A、R434A、およびK437Aの変異）を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔4〕に記載の使用。

〔6〕 KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子が、この順番でセンダイウ

イルスのP遺伝子の直後（マイナス鎖RNAゲノムにおいてP遺伝子の5'側）に組み込まれている、〔3〕から〔5〕のいずれかに記載の使用。

〔7〕 温度感受性センダイウイルスベクターが、SeV(PM)KOS/TS7ΔF、およびSeV(PM)KOS/TS12ΔFからなる群より選択される、〔3〕に記載の使用。

〔8〕 KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないベクターがセンダイウイルスベクターである、〔1〕から〔7〕のいずれかに記載の使用。

〔9〕 KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターが37℃におけるNTVLP形成が抑制される変異を有するセンダイウイルスベクターである、〔8〕に記載の使用。

〔10〕 KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔8〕に記載の使用。

〔11〕 KLF遺伝子が、N遺伝子の上流（マイナス鎖RNAゲノムにおいてN遺伝子の3'側）に組み込まれている、〔8〕から〔10〕のいずれかに記載の使用。

〔12〕 KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターがSeV18+KLF4/TSΔFである、〔8〕に記載の使用。

〔13〕 MYC遺伝子が挿入されたベクターを導入する工程をさらに含む、〔1〕から〔12〕のいずれかに記載の使用。

〔14〕 MYC遺伝子が挿入されたベクターがセンダイウイルスベクターである、〔13〕に記載の使用。

〔15〕 MYC遺伝子が挿入されたセンダイウイルスベクターが温度感受性センダイウイルスベクターである、〔14〕に記載の使用。

〔16〕 MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターが、TS 7、TS 12、TS 13、TS 14、および TS 15 からなる群より選択される変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔15〕に記載の使用。

〔17〕 MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含み、さらに TS 15 の変異（P蛋白質のD433A、R434A、K437Aの変異、並びにL蛋白質のL1361CおよびL1558Iの変異）を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔16〕に記載の使用。

〔18〕 MYC遺伝子が、L遺伝子の直前（マイナス鎖RNAゲノムの3'側）に組み込まれている、〔14〕から〔17〕のいずれかに記載の使用。

〔19〕 MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターがSeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔFである、〔14〕に記載の使用。

〔20〕 MYC遺伝子がc-rMycである、〔13〕から〔19〕のいずれかに記載の使用。

〔21〕 該誘導および/または製造において低温で培養しない、〔1〕から〔20〕のいずれかに記載の使用。

〔22〕 約37℃で培養する、〔21〕に記載の使用。

[0064] また本発明は、以下の発明も提供する。

〔1〕（ａ）KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含むベクター、および（ｂ）KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないベクター、を含む多能性幹細胞を誘導（製造を含む）するための組成物およびキット。

〔2〕 KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で含むベクターが温度感受性ウイルスベクターである、〔1〕に記載の組成物およびキット。

〔3〕 温度感受性ウイルスベクターが温度感受性センダイウイルスベクターである、〔1〕に記載の組成物およびキット。

〔4〕 温度感受性センダイウイルスベクターが、TS 7、TS 12、TS 13、TS 14、および TS 15 からなる群より選択される変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔3〕に記載の組成物およびキット。

〔5〕 温度感受性センダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及

びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含み、さらに TS 12の変異（P蛋白質のD433A、R434A、およびK437Aの変異）を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔4〕に記載の組成物およびキット。

〔6〕 KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子が、この順番でセンダイウイルスのP遺伝子の直後（マイナス鎖RNAゲノムにおいてP遺伝子の5'側）に組み込まれている、〔3〕から〔5〕のいずれかに記載の組成物およびキット。

〔7〕 温度感受性センダイウイルスベクターが、SeV(PM)KOS/TS7ΔF、およびSeV(PM)KOS/TS12ΔFからなる群より選択される、〔3〕に記載の組成物およびキット。

〔8〕 KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないベクターがセンダイウイルスベクターである、〔1〕から〔7〕のいずれかに記載の組成物およびキット。

〔9〕 KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターが37℃におけるNTVLP形成が抑制される変異を有するセンダイウイルスベクターである、〔8〕に記載の組成物およびキット。

〔10〕 KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔8〕に記載の組成物およびキット。

〔11〕 KLF遺伝子が、N遺伝子の上流（マイナス鎖RNAゲノムにおいてN遺伝子の3'側）に組み込まれている、〔8〕から〔10〕のいずれかに記載の組成物およびキット。

〔12〕 KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターがSeV18+KLF4/TSΔFである、〔8〕に記載の組成物およびキット。

〔13〕 MYC遺伝子が挿入されたベクターをさらに含む、〔1〕から〔12〕の

いずれかに記載の組成物およびキット。

〔14〕 MYC遺伝子が挿入されたベクターがセンダイウイルスベクターである、〔13〕に記載の組成物およびキット。

〔15〕 MYC遺伝子が挿入されたセンダイウイルスベクターが温度感受性センダイウイルスベクターである、〔14〕に記載の組成物およびキット。

〔16〕 MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターが、TS 7、TS 12、TS 13、TS 14、および TS 15 からなる群より選択される変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔15〕に記載の組成物およびキット。

〔17〕 MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含み、さらに TS 15 の変異（P蛋白質のD433A、R434A、K437Aの変異、並びにL蛋白質のL1361CおよびL1558Iの変異）を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔16〕に記載の組成物およびキット。

〔18〕 MYC遺伝子が、L遺伝子の直前（マイナス鎖RNAゲノムの3'側）に組み込まれている、〔14〕から〔17〕のいずれかに記載の組成物およびキット。

〔19〕 MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターがSeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔFである、〔14〕に記載の組成物およびキット。

〔20〕 MYC遺伝子がc-rMycである、〔13〕から〔19〕のいずれかに記載の組成物およびキット。

〔21〕 該誘導および/または製造において低温で培養しない、〔1〕から〔20〕のいずれかに記載の組成物およびキット。

〔22〕 約37℃で培養する、〔21〕に記載の組成物およびキット。

[0065] また本発明は、以下の発明も提供する。

〔1〕（ａ）KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含むベクター、および（ｂ）KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないベクター、を含む多能性幹細胞の誘導効率を改善（製造効

率の改善を含む）するための組成物およびキット。

〔2〕 KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で含むベクターが温度感受性ウイルスベクターである、〔1〕に記載の組成物およびキット。

〔3〕 温度感受性ウイルスベクターが温度感受性センダイウイルスベクターである、〔1〕に記載の組成物およびキット。

〔4〕 温度感受性センダイウイルスベクターが、TS 7、TS 12、TS 13、TS 14、および TS 15 からなる群より選択される変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔3〕に記載の組成物およびキット。

〔5〕 温度感受性センダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含み、さらに TS 12 の変異（P蛋白質のD433A、R434A、およびK437Aの変異）を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔4〕に記載の組成物およびキット。

〔6〕 KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子が、この順番でセンダイウイルスのP遺伝子の直後（マイナス鎖RNAゲノムにおいてP遺伝子の5'側）に組み込まれている、〔3〕から〔5〕のいずれかに記載の組成物およびキット。

〔7〕 温度感受性センダイウイルスベクターが、SeV(PM)KOS/TS7ΔF、およびSeV(PM)KOS/TS12ΔFからなる群より選択される、〔3〕に記載の組成物およびキット。

〔8〕 KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないベクターがセンダイウイルスベクターである、〔1〕から〔7〕のいずれかに記載の組成物およびキット。

〔9〕 KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターが37℃におけるNTVLP形成が抑制される変異を有するセンダイウイルスベクターである、〔8〕に記載の組成物およびキット。

〔10〕 KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質

にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔8〕に記載の組成物およびキット。

〔11〕 KLF遺伝子が、N遺伝子の上流（マイナス鎖RNAゲノムにおいてN遺伝子の3'側）に組み込まれている、〔8〕から〔10〕のいずれかに記載の組成物およびキット。

〔12〕 KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターがSeV18+KLF4/TSΔFである、〔8〕に記載の組成物およびキット。

〔13〕 MYC遺伝子が挿入されたベクターをさらに含む、〔1〕から〔12〕のいずれかに記載の組成物およびキット。

〔14〕 MYC遺伝子が挿入されたベクターがセンダイウイルスベクターである、〔13〕に記載の組成物およびキット。

〔15〕 MYC遺伝子が挿入されたセンダイウイルスベクターが温度感受性センダイウイルスベクターである、〔14〕に記載の組成物およびキット。

〔16〕 MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターがTS 7、TS 12、TS 13、TS 14、および TS 15 からなる群より選択される変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔15〕に記載の組成物およびキット。

〔17〕 MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含み、さらに TS 15 の変異（P蛋白質のD433A、R434A、K437Aの変異、並びにL蛋白質のL1361CおよびL1558Iの変異）を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、〔16〕に記載の組成物およびキット。

〔18〕 MYC遺伝子が、L遺伝子の直前（マイナス鎖RNAゲノムの3'側）に組み込まれている、〔14〕から〔17〕のいずれかに記載の組成物およびキット。

〔19〕 MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターがSeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔFである、〔14〕に記載の組成物およびキット。

〔20〕 MYC遺伝子がc-rMycである、〔13〕から〔19〕のいずれかに記載の組成物およびキット。

〔21〕 該誘導および/または製造において低温で培養しない、〔1〕から〔20〕のいずれかに記載の組成物およびキット。

〔22〕 約37℃で培養する、〔21〕に記載の組成物およびキット。

[0066] 本明細書記載の発明においては、特にKLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順番で１つのセンダイウイルスベクターに挿入したベクター（好ましくはSeV(PM)KOS/TS12ΔF）を、KLF4遺伝子を含みOCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクター（好ましくはSeV18+KLF4/TSΔF）と組み合わせて用いることが好ましく、このとき、MYC遺伝子を発現するセンダイウイルスベクター（好ましくはSeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF）をさらに組み合わせることはより好ましい。

[0067] 導入する因子（KLF遺伝子、OCT遺伝子、SOX遺伝子、およびMYC遺伝子など）は、リプログラムしたい細胞の由来に合わせて適宜選択すればよく、ヒト由来であっても、その他の哺乳動物由来、例えばマウス、ラット、ウサギ、ブタ、サル等の霊長類由来であってもよい。また、遺伝子および蛋白質の配列は必ずしも野生型の配列でなくてもよく、リプログラミングを誘導できる限り、変異を有していてもよい。変異型遺伝子を用いて多能性幹細胞を作製した例は既に知られている（WO2007/69666）。例えば、１または少数（例えば数個、３個以内、５個以内、１０個以内、１５個以内、２０個以内、２５個以内）のアミノ酸が付加、欠失、置換、および／または挿入されたアミノ酸配列をコードする遺伝子であって、リプログラミングを誘導できる遺伝子は、本発明において使用することができる。また生物学的活性（リプログラミングの誘導能）を維持している限り、例えばＮ末端および／またはＣ末端の１～数残基（例えば２、３、４、５、６、１０、１５または２０残基）のアミノ酸が欠失または付加されたポリペプチド、及び１～数残基（例えば２、３、４、５、６、１０、１５または２０残基）のアミノ酸が置換されたポリペプチドなども使用できる。使用し得るバリアントとしては、例えば天然

の蛋白質の断片、アナログ、派生体、及び他のポリペプチドとの融合蛋白質（例えば異種シグナルペプチドまたは抗体断片を付加したもの等）が含まれる。具体的には、野生型のアミノ酸配列の１またはそれ以上のアミノ酸を置換、欠失、および／または付加した配列を含み、野生型蛋白質と同等の生物学的活性（例えばリプログラミングを誘導する活性）を有するポリペプチドが含まれる。野生型蛋白質の断片を用いる場合は、通常、野生型ポリペプチド（分泌蛋白質の場合は成熟型の形態）の70%以上、好ましくは80%以上、85%以上、より好ましくは90%以上、95%以上または98%以上の連続領域を含む。

[0068] アミノ酸配列のバリアントは、例えば天然のポリペプチドをコードするDNAに変異を導入することにより調製することができる（Walker and Gaastra, eds. Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, New York, 1983); Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492, 1985 ; Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382, 1987; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.), 1989; U.S. Pat. No. 4,873,192）。生物学的活性に影響を与えないようにアミノ酸を置換するためのガイダンスとしては、例えばDayhoffら（Dayhoff et al., in Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), 1978）が挙げられる。

[0069] 改変されるアミノ酸数に特に制限はないが、例えば天然の成熟型ポリペプチドの全アミノ酸の30%以内、好ましくは25%以内、より好ましくは20%以内、より好ましくは15%以内、より好ましくは10%以内、5%以内、または3%以内であり、例えば15アミノ酸以内、好ましくは10アミノ酸以内、より好ましくは8アミノ酸以内、より好ましくは5アミノ酸以内、より好ましくは3アミノ酸以内である。アミノ酸を置換する場合は、側鎖の性質が似たアミノ酸に置換することにより蛋白質の活性を維持することが期待できる。このような置換は、本発明において保存的置換という。保存的置換は、例えば塩基性

アミノ酸（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性アミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性アミノ酸（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性アミノ酸（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分岐アミノ酸（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族アミノ酸（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）などの各グループ内のアミノ酸間の置換などが挙げられる。また、例えば、BLOSUM62置換マトリックス（S. Henikoff and J.G. Henikoff, Proc. Acad. Natl. Sci. USA 89: 10915-10919, 1992）において、正の値の関係にあるアミノ酸間の置換が挙げられる。

[0070] 改変された蛋白質は、野生型蛋白質のアミノ酸配列と高いホモロジーを示す。高いホモロジーとは、例えば70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または96%以上の同一性を有するアミノ酸配列である。アミノ酸配列の同一性は、例えばBLASTPプログラム（Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990）を用いて決定することができる。例えばNCBI (National Center for Biothchnology Information) のBLASTのウェブページにおいて、デフォルトのパラメータを用いて検索を行うことができる（Altschul S.F. et al., Nature Genet. 3:266-272, 1993; Madden, T.L. et al., Meth. Enzymol. 266:131-141, 1996; Altschul S.F. et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Zhang J. & Madden T.L., Genome Res. 7:649-656, 1997）。例えば２つの配列の比較を行うblast2sequencesプログラム（Tatiana A et al., FEMS Microbiol Lett. 174:247-250, 1999）により、２配列のアライメントを作成し、配列の同一性を決定することができる。ギャップはミスマッチと同様に扱い、例えば天然型サイトカイン（分泌後の成熟型の形態）のアミノ酸配列全体に対する同一性の値を計算する。具体的には、野生型蛋白質（分泌蛋白質の場合は成熟型）の全アミノ酸数における一致するアミノ酸数の割合を計算する。

[0071] また遺伝子は、コードされるアミノ酸配列を変えないようにサイレント変異を導入することができる。特にAT richな遺伝子においては、5個以上の連続したAまたはTの塩基について、コードされるアミノ酸配列を変えないようにGまたはCに置換することにより、安定して遺伝子の高発現を得ることができる。

[0072] また改変蛋白質あるいはリプログラミングに用いるタンパク質は、野生型蛋白質をコードする遺伝子のコード領域の一部または全部とストリンジェントな条件でハイブリダイズする核酸がコードする蛋白質であって、野生型蛋白質と同等の活性（リプログラミングを誘導する活性）を有する蛋白質が挙げられる。ハイブリダイゼーションにおいては、例えば野生型蛋白質遺伝子のコード領域の配列またはその相補配列を含む核酸、またはハイブリダイズの対象とする核酸のどちらかからプローブを調製し、それが他方の核酸にハイブリダイズするかを検出することにより同定することができる。ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件は、例えば 5xSSC、7%(W/V) SDS、100μg/ml 変性サケ精子DNA、5xデンハルト液（1xデンハルト溶液は0.2%ポリビニールピロリドン、0.2%牛血清アルブミン、及び0.2%フィコールを含む）を含む溶液中、60℃、好ましくは65℃、より好ましくは68℃でハイブリダイゼーションを行い、その後ハイブリダイゼーションと同じ温度で2xSSC中、好ましくは1xSSC中、より好ましくは0.5xSSC中、より好ましくは0.1xSSC中で、振盪しながら２時間洗浄する条件である。

[0073] 細胞のリプログラミングを誘導するために特に好ましい遺伝子を一般的に例示すれば、F-box protein 15 (Fbx15, NM_152676, NM_015798)、Nanog (NM_024865, AB093574)、ERAS (ES cell expressed Ras; NM_181532, NM_181548)、DPPA2 (NM_138815, NM_028615)、OCT3/4 (POU5F1とも呼ばれる; NM_002701, NM_203289, NM_013633, NM_001009178)、SOX2 (NM_003106, NM_011443, XM_574919)、TCL1A (T-cell leukemia/lymphoma 1A; NM_021966, NM_009337)、KLF4 (Kruppel-like factor 4; NM_004235, NM_010637)、catenin β1 (cadherin-associated protein beta 1; NM_001904, NM_007614; S33Y変異

体を含む）、c-MYC（NM_002467, NM_010849; T58A変異体を含む）、およびGlis1遺伝子（Maekawa et al., Nature, 474: 225-229, 2011; NM_147193, NM_147221）、ならびにこれらの遺伝子が属するファミリーの他のメンバーの遺伝子などが挙げられる。これらの遺伝子を導入した場合、多能性幹細胞の形態を示したコロニーの割合は、４種類の遺伝子（OCT3/4、SOX2、KLF4、およびc-MYC）の導入の場合よりも高いことが報告されている（WO2007/69666）。従って、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子に加えて、上記のいずれかまたはそれらの組み合わせをさらに搭載するセンダイウイルスベクターや、KLF遺伝子に加えて、OCT遺伝子およびSOX遺伝子以外の他の遺伝子を搭載するセンダイウイルスベクター、あるいはKLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子を搭載する本発明のセンダイウイルスベクターとKLF遺伝子を含みOCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないベクターに加えて、上記のいずれかの遺伝子またはそれらの組み合わせを搭載するセンダイウイルスベクターやそれらのベクターの組み合わせをさらに用いることは、本発明において細胞のリプログラミングの誘導に用いるために有用であり、特に、多能性幹細胞の誘導に好適に用いることができる。個々のウイルスベクターは、使用時に組み合わせて用いることができる。また予めまとめてキットとしたり、混合して組成物としてもよい。また、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含むベクターと、KLF遺伝子を含みOCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないベクターに加えて、上記のいずれかの遺伝子の任意の組み合わせ（または全て）を含む、１つまたはそれ以上のセンダイウイルスベクターをさらに導入する方法、およびそれらのベクターを含むキットまたは組成物も本発明に含まれる。

[0074] KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子を発現する本発明のベクターとKLF遺伝子を含みOCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないベクターは、特にMYC遺伝子および/またはGlis1遺伝子を発現するベクターと組み合わせることが好ましい（Takahashi, K. and Yamanaka S., Cell 126, 663-676, 2006; Lowry WE et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 105(8):2883-8, 2008; Masaki, H.

et al., Stem Cell Res. 1:105-115, 2008; Maekawa et al., Nature, 474: 225-229, 2011; WO2007/69666）。ここでSOX蛋白質、KLF蛋白質、MYC蛋白質、およびOCT蛋白質、ならびにそれらの遺伝子とは、それぞれSOXファミリー、KLFファミリー、MYCファミリー、およびOCTファミリーに属するメンバーの蛋白質および遺伝子を言う。これらの４つのファミリーのメンバーをそれぞれ１つ以上発現するように調整することで、分化した様々な細胞から多能性幹細胞を誘導できることが報告されている。例えばSOXファミリーの遺伝子については、SOX1、SOX2、SOX3、SOX15、SOX17 のいずれの遺伝子を用いても、多能性幹細胞を誘導できることが報告されている（WO2007/69666）。またKLFファミリーについても、KLF4でもKLF2でも多能性幹細胞を誘導できた（WO2007/69666）。MYCファミリーについても、野生型c-MYCのみならず、T58A変異体や、N-MYC、L-MYCでも多能性幹細胞を誘導できた（WO2007/69666; Blelloch R. et al., Cell Stem Cell, 1: 245-247, 2007）。このように、ファミリーの遺伝子を様々に選択して使用することが可能であるので、上記の４種のファミリー遺伝子を適宜選択して、リプログラミングを誘導することができる。

[0075] 具体的には、KLFファミリーとしては、KLF1（NM_006563, NM_010635）、KLF2（NM_016270, NM_008452）、KLF4（NM_004235, NM_010637）、KLF5（NM_001730, NM_009769）が含まれ、MYCファミリーとしては、c-MYC（NM_002467, NM_010849, T58A変異体を含む）、N-MYC（NM_005378, NM_008709）、L-MYC（NM_005376, NM_005806）が含まれ、OCTファミリーとしては、OCT1A（NM_002697, NM_198934）、OCT3/4（NM_002701, NM_203289, NM_013633, NM_001009178）、OCT6（NM_002699, NM_011141）が含まれ、SOXファミリーとしては、SOX1（NM_005986, NM_009233）、SOX2（NM_003106, NM_011443, XM_574919）、SOX3（NM_005634, NM_009237）、SOX7（NM_031439, NM_011446）、SOX15（NM_006942, NM_009235）、SOX17（NM_022454, NM_011441）、SOX18（NM_018419, NM_009236）が含まれる。これらの遺伝子のいずれかを本発明の順番に従って搭載するセンダイウイルスベクターは、本発明において細胞の脱分化の誘導

に用いるために有用であり、特に多能性幹細胞の誘導に好適に用いることができる。KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子として最も好ましいのは、それぞれOCT3/4遺伝子、SOX2遺伝子、およびKLF4遺伝子である。

[0076] なお、MYCファミリーの遺伝子は多能性幹細胞の誘導に必須ではなく、MYCファミリー遺伝子を除く３つのファミリーの遺伝子だけでも多能性幹細胞は誘導できる（Nakagawa M. et al., Nat Biotechnol. 26(1):101-6, 2008; Wering M. et al., Cell Stem Cell 2(1):10-2, 2008）。MYC遺伝子を発現させない場合、例えばp53 siRNAおよびUTF1により多能性幹細胞の誘導効率を有意に上昇させることができる（Y. Zhao et al., Cell Stem Cell, 3 (5): 475-479, 2008; N. Maherali, and K. Hochedlinger, Cell Stem Cell, 3 (6): 595-605, 2008）。また、KLFファミリーの遺伝子を除く３つのファミリーの遺伝子だけでも多能性幹細胞を誘導できることが報告されている（Park IH et al., Nature, 451(7175):141-6, 2008）。また、G9aヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤（BIX-01294; Kubicek, S. et al., Mol. Cell 25, 473-481, 2007）を併用することにより、胎児由来のNPCからKLF遺伝子、SOX遺伝子、およびMYC遺伝子の３つの遺伝子のみで多能性幹細胞を誘導できることが報告されている（Shi Y et al., Cell Stem Cell, 2(6):525-8, 2008）。それぞれの遺伝子をコードするウイルスベクターは別々に単体として準備されてもよい。それらは、使用時に組み合わせて用いることができる。また任意の組み合わせまたは全てをまとめてキットとしたり、混合して組成物としてもよい。また本発明は、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子を搭載する本発明のセンダイウイルスベクターおよびKLF遺伝子を含みOCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターに加えて、該３遺伝子以外の遺伝子や化合物の任意の組み合わせ（または全て）を含むキットまたは組成物にも関する。遺伝子は、適宜組換えベクターに搭載されていてよい。更には、このキットに含まれる一部の組換えベクターは、相当の機能を有するタンパク質、合成化合物などに置き換えることも可能である。

[0077] 以上に記載した遺伝子の組み合わせに、さらに別の遺伝子を組み合わせて

、リプログラミングの誘導効率を上昇させることもできる。このような遺伝子としては、TERT (NM_198253, NM_009354) および／またはSV40 large T antigen (NC_001669.1, Fiers,W. (05-11-1978) Nature 273:(5658)113-120) が挙げられる (Park IH. et al., Nature, 451(7175):141-6, 2008) 。また、HPV16 E6、HPV16 E7、Bmil (NM_005180, NM_007552) からなる群より選択される１つ以上の遺伝子をさらに組み合わせてもよい。また、Fbx15 (Mol Cell Biol. 23(8):2699-708, 2003) 、Nanog (Cell 113: 631-642, 2003) 、ERas (Nature 423, 541-545, 2003) 、DPPA2 (Development 130: 1673-1680, 2003) 、TCL1A (Development 130: 1673-1680, 2003) 、β-Catenin (Nat Med 10(1): 55-63, 2004) からなる群より選択される１つまたは任意の組み合わせを発現させてもよい。さらに、ECAT1 (AB211062, AB211060) 、DPPA5 (NM_001025290, NM_025274, XM_236761) 、DNMT3L (NM_013369, NM_019448)、ECAT8 (AB211063, AB211061) 、GDF3 (NM_020634, NM_008108) 、SOX15 (NM_006942, NM_009235) 、DPPA4 (NM_018189, NM_028610) 、FTHL17 (NM_031894, NM_031261) 、SALL4 (NM_020436, NM_175303) 、Rex-1 (NM_174900, NM_009556) 、Utf1 (NM_003577, NM_009482) 、DPPA3 (NM_199286, NM_139218, XM_216263)、STAT3 (NM_139276, NM_213659) 、および GRB2 (NM_002086, NM_008163) からなる群より選択される１つ以上の遺伝子を組み合わせてもよい。また、KLF遺伝子、OCT遺伝子、SOX遺伝子に加えて、NANOG遺伝子 (NM_024865, AB093574) 、および LIN28遺伝子 (NM_024674) の各遺伝子を含む組み合わせも、多能性幹細胞の誘導に有用である (Yu J. et al., Science, 318(5858): 1917-20, 2007) 。また、これらにMYC遺伝子をさらに組み合わせたものも好適である (Liao J et al., Cell Res. 18(5):600-3, 2008) 。これらの遺伝子を付加的に発現させることで、多能性幹細胞の誘導を促進し得る (WO2007/69666) 。成熟Ｂ細胞を対象とする場合は、例えば骨髄球系転写因子C/EBPα (CCAAT/enhancer-binding-protein α) (NM_004364) を異所発現させるか、あるいはＢ細胞系転写因子Pax5 (paired box 5; NM_016734) の発現を抑制してリプログラミングを促進することができる (Hanna J, Cell. 133(2):250

-64, 2008）。これらの因子も、本発明におけるセンダイウイルスベクターを用いて発現させることができる。更には、このキットに含まれる一部の組換えベクターは、相当の機能を有するタンパク質、合成化合物などに置き換えることも可能である。

[0078] また、上記の因子を発現させる以外にも、例えば化合物の添加を組み合わせることでリプログラミングの効率を向上させることができる。例えば、bFGF（basic fibroblast growth factor）および／またはSCF（stem cell factor）は多能性幹細胞の誘導を促進し、さらに多能性幹細胞の誘導におけるc-MYCの機能を代替することができる（WO2007/69666）。またMAPキナーゼ阻害剤（PD98056）も、よりＥＳ細胞に近い多能性幹細胞の樹立等に有用である（WO2007/69666）。また、DNAメチル化酵素（Dnmt）阻害剤および／またはヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤により、多能性幹細胞の誘導効率が改善することが報告されている（Huangfu D et al., Nat Biotechnol. (Published online: 22 June 2008, doi:10.1038/nbt1418); Nat. Biotechnol. 26, 795-797 (2008)）。例えばHDAC阻害剤（VPA）を併用することにより、OCT4とSOX2の2遺伝子のみの導入により多能性幹細胞を誘導することができる（Huangfu, D. et al., Nat Biotechnol. 2008 26(11):1269-75）。本発明のベクターは、これらの化合物の投与と組み合わせて用いるための剤として有用である。Dnmt阻害剤としては、例えば5-アザシチジン等、HDAC阻害剤としては、例えばスベロイラニリド・ハイドロザミック酸（SAHA）、トリコスタチンA（TSA）、バルプロ酸（VPA）等が有用である。また5-アザシチジンを用いる場合、グルココルチコイド（デキサメタゾン）を併用することにより効率を上昇させることができる。

[0079] 細胞をリプログラミングさせるには、例えば（１）KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順番で含む本発明のセンダイウイルスベクターおよびKLF遺伝子を含みOCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクター、（２）（１）のベクターとMYC遺伝子またはGlis1遺伝子を発現するセンダイウイルスベクターとの組み合わせ、（３）（１）および/または（２

）にさらにNANOG遺伝子を発現するセンダイウイルスベクター、およびLIN28を発現するセンダイウイルスベクターを加えた組み合わせ、または（４）（１）から（４）のいずれかに記載のベクターと上記の他の所望のリプログラミング因子を搭載するベクターおよび/またはリプログラミングを誘導する所望の化合物との組み合わせ等を、細胞に導入することができる。複数のベクターおよび／または化合物を組み合わせて導入する場合、導入は同時に行うことが好ましく、具体的には、最初のベクターまたは化合物等を添加してから４８時間以内、好ましくは３６時間以内、より好ましくは２４時間以内、１８時間以内、１２時間以内、１０時間以内、８時間以内、６時間以内、３時間以内、２時間以内、または１時間以内にリプログラミング因子をコードする全てのベクターおよび／または化合物の添加を完了することが好ましい。ベクターの用量は適宜調製することができるが、例えばMOIは0.1以上、好ましくは0.3以上、0.5以上、1以上、2以上、3以上、4以上、または5以上、また、100以下、好ましくは90以下、80以下、70以下、60以下、50以下、40以下、30以下、20以下、10以下、または5以下である。好ましくは、例えばMOI 0.3～100、より好ましくはMOI 0.5～50、より好ましくはMOI 1～40、より好ましくはMOI 1～30、より好ましくはMOI 2～30、例えばMOI 3～30 で感染させる。誘導された多能性幹細胞は、ＥＳ細胞とよく似た扁平なコロニーを形成し、アルカリホスファターゼを発現する。また誘導された多能性幹細胞は、未分化細胞マーカーであるNanog、OCT4、および／またはSOX2等を発現してよい。また誘導された多能性幹細胞は、好ましくはTERTを発現および/またはテロメラーゼ活性を示す。本発明は、アルカリホスファターゼを発現し、好ましくは未分化細胞マーカーであるNanogおよび/またはTERTをさらに発現する細胞の製造方法、および該細胞の製造および該細胞を誘導する薬剤の製造における上記センダイウイルスベクターの使用にも関する。

[0080] 本発明によれば、成人皮膚細胞および新生児包皮細胞を含む所望の細胞から多能性幹細胞を作製することができる。本発明によれば、多能性幹細胞のコロニーを、少なくともある種の細胞（例えば成人皮膚細胞および/または新

生児包皮細胞）から、例えば0.03×10^{-5} 以上、0.1×10^{-5} 以上、0.3×10^{-5} 以上、0.5×10^{-5} 以上、0.8×10^{-5} 以上、または1×10^{-5} 以上（例えば1×10^{-5} ～1×10^{-3}）の出現率で、好ましくは1.5×10^{-5} 以上、1.7×10^{-5} 以上、2.0×10^{-5} 以上、2.5×10^{-5} 以上、3×10^{-5} 以上、4×10^{-5} 以上、5×10^{-5} 以上、8×10^{-5} 以上、1×10^{-4} 以上、2×10^{-4} 以上、3×10^{-4} 以上、5×10^{-4} 以上、8×10^{-4} 以上、1×10^{-3} 以上、1.5×10^{-3} 以上、2×10^{-3} 以上、5×10^{-3}、1×10^{-2} 以上、1.5×10^{-2} 以上、2×10^{-2} 以上、2.5×10^{-2} 以上、3×10^{-2} 以上、4×10^{-2} 以上、または5×10^{-2} 以上の出現率で誘導することができる。例えば、本発明によれば、ヒト末梢血単核球から少なくとも1×10^{-2}(0.01%)、好ましくは少なくとも3×10^{-2}、5×10^{-2}、8×10^{-2}、1×10^{-1}、2×10^{-1}、3×10^{-1}、4×10^{-1}、または5×10^{-1}の効率で多能性幹細胞を誘導することができ、またヒト末梢血単球から少なくとも1×10^{-3}(0.001%)、好ましくは少なくとも3×10^{-3}、5×10^{-3}、8×10^{-3}、1×10^{-2}、2×10^{-2}、3×10^{-2}、4×10^{-2}、または5×10^{-2}の効率で多能性幹細胞を誘導することができる。MOIは上述の通り適宜設定すればよく、例えば5、10または30で実施すればよい。またKLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順番で含む本発明のベクターおよびKLF遺伝子を含みOCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターによる多能性幹細胞のコロニーの出現効率は、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子を発現する本発明のセンダイウイルスベクターは用いるが、KLF遺伝子を含みOCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターは用ない場合に比べて、少なくともある細胞に関して例えば1.2倍以上、好ましくは1.3倍以上、1.5倍以上、1.7倍以上、2倍以上、2.5倍以上、3倍以上、3.5倍以上、4倍以上、4.5倍以上、または5倍以上である。本発明の方法は、ベクターを導入後37℃で培養した場合の多能性幹細胞の導入効率が有意に高く、また、多能性幹細胞誘導後にベクターが速やかに脱落する点で、従来の方法に比べ顕著な効果を発揮する。

[0081] リプログラミングを誘導する対象となる分化した細胞は、特に限定はなく、所望の体細胞等を用いることができる。体細胞からの多能性幹細胞の生成は、マウス胎児由来の細胞からのみならず、成体マウスの尾部から採取した

分化した細胞や、肝細胞および胃粘膜細胞からでも可能であることが示されており、細胞型や分化状態によらないことが示唆される（WO2007/069666; Aoi T. et al., Science [Published Online February 14, 2008]; Science. 2008; 321(5889):699-702）。またヒトにおいても、成人の顔皮膚由来線維芽細胞、成人滑膜細胞、新生児包皮由来線維芽細胞、成人間葉系幹細胞、成人の手のひらの皮膚細胞、胎児細胞等の多様な細胞から、多能性幹細胞が誘導できることが確認されている（Takahashi K et al. (2007) Cell 131: 861-872; Park IH et al., Nature, 451(7175):141-6, 2008）。また、膵臓β細胞やBリンパ球のような最終分化した細胞からも、同様に多能性幹細胞が誘導できることが報告されている（Stadtfeld M et al., Curr Biol. 2008 May 21. [PubMed, PMID: 18501604]; Curr Biol. 2008;18(12):890-4; Hanna J. et al., Cell. 133(2):250-64, 2008）。これらの知見は、多能性幹細胞の誘導が、元になる細胞によらないことを示唆している。これらの所望の体細胞からの多能性幹細胞の誘導において、本発明の方法を適用することができる。具体的には、リプログラミングの対象となる分化した細胞としては、線維芽細胞、滑膜細胞、口腔または胃などの粘膜細胞、肝細胞、骨髄細胞、歯胚細胞、血液細胞（例えばリンパ球、白血球）、その他の所望の細胞が含まれる。血液細胞としては、末梢血細胞であってもよい。また、線維芽細胞、単球、および単核球なども好ましい。また細胞は、例えば胚、胎児、新生児、子供、成人または老人の細胞に由来してよい。また、動物の由来は特に制限はなく、ヒトおよび非ヒト霊長類（サルなど）、マウス、ラットなどのげっ歯類、およびウシ、ブタ、ヤギなどの非げっ歯類を含む哺乳動物等が含まれる。

[0082] リプログラミングが完了した細胞のコロニーからは、ベクターが除去された細胞を適宜選択することができる。例えばベクターが自然除去された細胞を選択すればよい。このために、例えばウイルスベクターに特異的な抗体（例えば抗HN抗体）でネガティブ選択を行うことができる。また、温度感受性ベクターを用いた場合は、通常温度（例えば約37℃、具体的には36.5～37.5

℃、好ましくは36.6～37.4℃、より好ましくは36.7℃～37.3℃）で培養するか、あるいはやや高温（例えば37.5～39℃、好ましくは38～39℃、または38.5～39℃）で培養することによりベクターを簡便に除去することができる。また、SeV(PM)/TSΔFや、これにさらにTS 7、TS 12、TS 13、TS 14、またはTS 15などの変異を導入したベクターを用いた場合は、継代により自然にベクターを脱落させることができる。好ましいベクターとしては、例えばSeV(PM)KOS/TS12ΔFおよびSeV18+KLF4/TSΔFを組み合わせることが挙げられるが、これに限定されない。またこのとき、SeV(HNL)c-rMYC/TS12ΔF、SeV(HNL)c-rMYC/TS13ΔF、またはSeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF等を用いてMYC遺伝子を導入することができる。SeV(PM)KOS/TS12ΔF、SeV18+KLF4/TSΔF、およびSeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔFの組み合わせが特に好ましい。また、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子を搭載するセンダイウイルスベクターにMYC遺伝子を搭載させないことは、癌化に関連するMYC遺伝子を用いずにリプログラミングを行うことができる利点がある他、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子に加え、4つ目の因子としてc-MYC、L-MYC、またはGlis1などを自由に選択して用いることが可能となる点でも優れている。

[0083] 本発明の方法により製造された細胞は、様々な組織や細胞に分化させるために有用であり、所望の試験、研究、診断、検査、治療等において用いることができる。例えば誘導した幹細胞は、幹細胞療法において利用されることが期待される。例えば患者から採取した体細胞を用いて初期化（reprogramming）を誘導し、その後、分化誘導して得られる体性幹細胞やその他の体細胞を患者に移植することができる。細胞の分化誘導の方法は特に限定されず、例えばレチノイン酸処理や、様々な増殖因子・サイトカイン処理、ホルモンによる処理により分化を誘導することができる。また得られた細胞は、所望の薬剤や化合物の効果を検出するために使用することができ、これを通して薬剤や化合物のスクリーニングを実施することが可能である。

実施例

[0084] 以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実

施例に制限されるものではない。また、本明細書中に引用された文献およびその他の参照は、すべて本明細書の一部として組み込まれる。

[0085] [実施例１]

pSeV(PM)/TSΔFの構築

本実施例で用いたセンダイウイルスベクターpSeV(PM)/TSΔFの作製方法を以下に示す。尚、本発明において「(PM)」とは、P遺伝子とM遺伝子の間にリプログラミング遺伝子を挿入することを表し、「(HNL)」とは、HN遺伝子とL遺伝子の間にリプログラミング遺伝子を挿入することを表す。また本発明において「TS」とは、M蛋白質にG69E,T116A,及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T,G264R,及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を持つことを表し、「ΔF」とは、F遺伝子を欠失していることを表す。また下記SeV(PM)/TSΔFとは、M蛋白質にG69E,T116A,及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T,G264R,及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を持つF遺伝子欠失型センダイウイルスベクター（Z strain）である。このベクターは、P遺伝子の直下（immediate downstream）（P遺伝子とM遺伝子の間）に導入遺伝子挿入部位(NotI部位)を有する。但しこれらは例示であって、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0086] pSeV(PM)/TSΔFの構築は以下の通りに行った。Litmus SalINheIfrg PmutMtsHNts ΔF-GFP delGFP(国際公開番号 WO2010/008054)を鋳型にしてPMNOTI-F（5’- GAAATTTCACCTAAGCGGCCGCAATGGCAGATATCTATAG -3’）(配列番号:10)およびPMNOTI-R（5’- CTATAGATATCTGCCATTGCGGCCGCTTAGGTGAAATTTC -3’）(配列番号:11）を用いてPCR反応(94℃-3分→98℃-10秒、55℃-15秒、72℃-12分を25サイクル→72℃-7分)を行った。得られた約11kbのPCR産物をDpn I処理後、この反応液20μlを大腸菌DH5α(ToYoBo Code No. DNA-903)を用いてトランスフォーメーションを行い、NotI消化によりNotI配列の導入されたプラスミドを選択し、次にシークエンスにより配列の正しいクローンを選択しLitmus SalINheIfrg PmutMtsHNts (PM)-dFを得た。次にこのLitmus SalINheIfrg P

mutMtsHNts (PM)-dFをSal IおよびNheIで消化して回収したフラグメント（約8kbp）とL遺伝子に二カ所の変異を有するプラスミドpSeV/ΔSalINheIfrg Lmut(国際公開番号:WO2003/025570)をSalI/NheIで消化して回収したフラグメント（約8kbp）をライゲーションして、pSeV(PM)/TSΔFを得た。このベクターは、P遺伝子およびM遺伝子の間に導入遺伝子挿入部位(NotI部位)を有する。このベクターの転写産物から作製したセンダイウイルスをSeV(PM)/TSΔFと称す。

[0087] [実施例２]

pSeV18+KLF4/TSΔFの構築

JurkatのcDNAライブラリーからPrimeStar HS DNA polymerase（タカラバイオ株式会社 カタログ番号R010A)を用いてPCRを行なうことによりKIF4遺伝子を増幅し、これをブルースクリプトプラスミドベクターのNot Iサイトに挿入して、プラスミドpBS-KS-KLF4を得た（WO2010/008054）。pBS-KS-KLF4をNot Iで消化（37℃で3時間）し、1%アガロースゲル電気泳動により分離し、約1.5k bpのバンドを切り出し、Qiaquick Gel Extraction Kit（キアゲン、カタログ番号28706）で精製した。このKLF4遺伝子を含むNot I断片をpSeV18+/TSΔFベクターのNot Iサイトにクローニングし、シークエンスにより配列の正しいクローンを選択し、pSeV18+KLF4/TSΔFを得た。pSeV18+/TSΔFベクターの転写産物から作製したセンダイウイルスをSeV18+/TSΔF、pSeV18+KLF4/TSΔFベクターの転写産物から作製したセンダイウイルスをSeV18+KLF4/TSΔFと称す。

[0088] [実施例３]

pSeV(PM)/TS12ΔFの構築

pSeV(PM)/TSΔFを鋳型にして、F3208（5'-AGAGAACAAGACTAAGGCTACC-3'（配列番号：12))及びR3787(5'- ACCTTGACAATCCTGATGTGG-3'（配列番号：13))のプライマーを用いて、PrimeSterを使用し、94℃3分、（98℃10秒、55℃15秒、72℃1.5分）のサイクルを30サイクル、72℃5分、4℃∞の条件でPCRを行い、増幅された約600bpのバンドをQIAquick PCR purification kitにて精製し

た。pSeV18+Oct3/4/TS12ΔF(WO2010/008054; WO2012/029770)を鋳型にして、F2001 (5'- CCATCAACACTCCCCAAGGACC-3' (配列番号：14)) 及びR3390(5'- AGACGTGATGCGTTTGAGGCCC-3' (配列番号：15)) のプライマーを用いて、PrimeSterを使用し、94℃3分、 (98℃10秒、55℃15秒、72℃1.5分) のサイクルを30サイクル、72℃5分、4℃∞の条件でPCRを行い、増幅された約1.4kbpのバンドをQIAquick PCR purification kitにて精製した。これらのPCR産物を混合し、F2001及びR3787のプライマーを用いて、PrimeSterを使用し、94℃3分、 (98℃10秒、55℃15秒、72℃2分) のサイクルを30サイクル、72℃5分、4℃∞の条件でPCRを行った。そのPCR産物をQIAquick PCR purification kitにて精製し、SalI及びNot Iで消化後アガロースゲル電気泳動にて分離後、約1.6kbpのバンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction kitにて精製した。pSeV(PM)/TSΔFをSalI及びNot Iで消化後アガロースゲル電気泳動にて分離後、約14.8kbpのバンドを切り出し、QIAquick Gel Extraction kitにて精製した。この2つのSalI及びNot I消化、精製産物を用いてライゲーションを行い、シークエンスにより配列を正しいクローンを選択し、pSeV(PM)/TS12ΔFを得た。このベクターは、P遺伝子およびM遺伝子の間に導入遺伝子挿入部位(NotI部位)を有する。このベクターの転写産物から作製したセンダイウイルスをSeV(PM)/TS12ΔFと称す。

[0089] [実施例４]

pSeV(PM)KOS/TS12ΔFの構築

KLF4-OCT3/4-SOX2遺伝子が搭載されたSeV/TS12ΔFベクター作製用のプラスミドを以下の通り作製した。

pSeV(PM)/TSΔFをNot Iで消化後、QIAquick PCR purification kit(キアゲンカタログ番号28106)で精製し、BAP処理を行った。その後、QIAquick PCR purification kitで精製した。pSeV(PM)KOS/TSΔFをNot Iで消化し、1%アガロースゲル電気泳動により分離し、約3.6kbpのバンドを切り出し、Qiaquick Gel Extraction Kit (キアゲン、カタログ番号28706) で精製した。キットに付属の溶出液100μlに溶出した。このKLF4遺伝子、OCT3/4遺伝子、SOX2遺伝子

を含むNot I断片をpSeV(PM)/TS12ΔFベクターのNot Iサイトにクローニングし、シークエンスにより配列の正しいクローンを選択し、pSeV(PM)KOS/TS12ΔFを得た。このベクターの転写産物から作製したセンダイウイルスをSeV(PM)KOS/TS12ΔFと称す。

[0090] [実施例５]

pSeV(HNL)c-rMyc/TS15ΔFの作製

Litmus38TSΔF-P2(HNL)ΔGFPおよびpSeV/TSΔF-Linker L1361CL1558I (WO2010/008054; WO2012/029770) をそれぞれSalI-NheI消化後、アガロースゲル電気泳動により分離し、それぞれ8.0kbp、8.3kbpのバンドを切り出し精製した。これらの精製断片のライゲーションを行いpSeV(HNL)/TS15ΔFを得た (SeV(HNL)/TS15ΔFのアンチゲノムをコードするプラスミド) 。このpSeV(HNL)/TS15ΔFのNot IサイトにpBS-KS-c-rMycより NotI消化により、切り出し、精製したc-rMyc遺伝子を含むNot I断片を導入し、pSeV(HNL)c-rMyc/TS15ΔFを得た。c-rMycの塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号：8および9に示した。c-rMycは、a378g、t1122c、t1125c、a1191g、および a1194gの変異を有する。このベクターの転写産物から作製したセンダイウイルスをSeV(HNL)c-rMyc/TS15ΔFと称す。

[0091] [実施例６]

細胞初期化用遺伝子を保持するセンダイウイルスベクターによる人工多能性幹細胞の作製１ (iPS細胞)

ヒト新生児包皮由来線維芽細胞(BJ) (ATCC(www.atcc.org), CRL-2522) 5 x 10^5(個)を 10 % FBS (GIBCO-BRL) 及びペニシリン(100u/ml)ストレプトマイシン(100μg/ml) (ナカライテスク, Code 26253-84) を含むDMEM (GIBCO-BRL, 11995), 10 % FBS (Cell Culture BioscienceCat. No. 171012) (以下10%FBS/PS/DMEMとする) 中で37℃、5 % CO_2インキュベーターにて終夜培養した。その後、以下の条件でベクターを細胞に感染させた。

[0092] 条件１：SeV(PM)KOS/TS12ΔF＋SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF+SeV18+KLF4/TSΔF

SeV(PM)KOS/TS12ΔF MOI=30

SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF MOI=30

SeV18+KLF4/TSΔF MOI=3

条件２：SeV(PM)KOS/TS12ΔF＋SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF+SeV18+KLF4/TSΔF

SeV(PM)KOS/TS12ΔF MOI=30

SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF MOI=30

SeV18+KLF4/TSΔF MOI=10

条件３：SeV(PM)KOS/TS12ΔF＋SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF+SeV18+/TSΔF

SeV(PM)KOS/TS12ΔF MOI=30

SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF MOI=30

SeV18+/TSΔF MOI=3

条件４：SeV(PM)KOS/TS12ΔF＋SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF+SeV18+/TSΔF

SeV(PM)KOS/TS12ΔF MOI=30

SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF MOI=30

SeV18+/TSΔF MOI=10

条件５：SeV(PM)KOS/TS12ΔF＋SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF

SeV(PM)KOS/TS12ΔF MOI=30

SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF MOI=30

条件６：ベクター非投与群（コントロール群）

[0093] 上記ベクターを細胞に投与後、37℃、5 % CO_2インキュベータにて培養した。評価はn=2で行った。10%FBS/PS/DMEMでほぼ毎日培地交換を行った。感染6日目に、ゼラチンコート6ウェルプレートに用意したマイトマイシン処理済み

フィーダー細胞（例えばMEF）1.25×10^5（個)に対し、0.25 %トリプシン-EDTA溶液を用いて剥がした上記ベクター導入細胞1.0×10^4（個）を添加し、CO_2インキュベータにて培養した。翌日、10%FBS/PS/DMEMから霊長類ES用培地（ReproCell社, RCHEMD001)(4 ng/ml になるようbFGFを添加した）に培地交換し、37℃で5% CO_2インキュベータで培養した。培地交換は毎日もしくは二日に一度行った。培地はフィーダー細胞のコンディションドメディウムでも構わない。

感染28日目に、ES細胞の未分化マーカーであるアルカリホスファターゼの活性をNBCT/BCIP（PIERCE, NBT/BCIP, 1-Step, # 34042）にて染色してiPS細胞の誘導効率を観察した（図1）。SeV18+KLF4/TSΔFベクターを添加していない試験群（上記条件５）と比較して、SeV18+KLF4/TSΔFベクターを添加した試験群（上記条件１，２）において、iPS細胞の誘導効率がSeV18+KLF4/TSΔFベクターの添加量依存的に改善された。図２は、n=2の誘導効率を平均したグラフを示す。SeV18+KLF4/TSΔFベクターをMOI=3で添加した場合は、約6.9倍、MOI=10で添加した場合は、約12倍iPS細胞の誘導効率が改善された。SeV18+/TSΔFベクターを添加した場合、MOI=3で添加した場合は、約3.2倍、MOI=10で添加した場合は、6倍iPS細胞の誘導効率が改善された。

[0094] [実施例７]

細胞初期化用遺伝子を保持するセンダイウイルスベクターによる人工多能性幹細胞（iPS細胞）の作製2

ヒト新生児包皮由来繊維芽細胞（BJ)(ATCC（www.atcc.org）, CRL-2522) 5x 10^5（個）を6ウェルプレートに 10 % FBS（GIBCO-BRL）及びペニシリン（100u/ml）ストレプトマイシン（100μg/ml）（ナカライテスク, Code 26253-84）を含むDMEM（GIBCO-BRL, 11995), 10 % FBS (Cell Culture BioscienceCat. No. 171012)（以下10%FBS/PS/DMEMとする）中で37℃、5 % CO_2インキュベーターにて終夜培養した。その後、以下の条件でベクターを細胞に感染させた。評価はn=2で行った。

[0095] 条件1：SeV(PM)KOS/TS12ΔF＋SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF+SeV18+KLF4/TSΔ

F

SeV(PM)KOS/TS12ΔF MOI=5

SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF MOI=5

SeV18+KLF4/TSΔF MOI=5

条件２：SeV(PM)KOS/TS12ΔF＋SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF+SeV18+KLF4/TSΔF

SeV(PM)KOS/TS12ΔF MOI=30

SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF MOI=30

SeV18+KLF4/TSΔF MOI=10

条件３：SeV(PM)KOS/TS12ΔF＋SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF

SeV(PM)KOS/TS12ΔF MOI=5

SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF MOI=5

条件４：SeV(PM)KOS/TS12ΔF＋SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF

SeV(PM)KOS/TS12ΔF MOI=30

SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF MOI=30

条件５：ベクター非投与群1（コントロール群1）

条件６：ベクター非投与群2（コントロール群2）

[0096] 上記ベクターを細胞に投与後、条件１、２、５は、37℃、5 % CO_2インキュベータにて培養した。条件３，４，６は、35℃、5 % CO_2インキュベータにて培養した。10%FBS/PS/DMEMでほぼ毎日培地交換を行った。感染6日目に、ゼラチンコート6ウェルプレートに用意したマイトマイシン処理済みフィーダー細胞(例えばMEF) 1.25×10^5（個）に対し、0.25 %トリプシン-EDTA溶液を用いて剥がした上記ベクター導入細胞を1.0×10^4（個）を添加し、37℃で5% CO_2インキュベータにて培養した。翌日、10%FBS/PS/DMEMから霊長類ES用培地（ReproCell社, RCHEMD001)(4 ng/ml になるようbFGFを添加した）に培地交換し、37℃で5% CO_2インキュベータで培養した。培地交換は毎日もしくは二日に一度行った。培地はフィーダー細胞のコンディションドメディウムでも構わない。

感染28日目に、ES細胞の未分化マーカーであるアルカリホスファターゼの

活性をNBCT/BCIP(PIERCE, NBT/BCIP, 1-Step, # 34042)にて染色してiPS細胞の誘導効率を観察した（図３）。SeV18+KLF4/TSΔFベクターを添加していない試験群（上記条件３，４）と比較して、SeV18+KLF4/TSΔFベクターを添加した試験群（上記条件１，２）において、iPS細胞の誘導効率が高かった。ベクター非投与群（上記条件5、6）では、iPS細胞の誘導は認められなかった。図４に、n=2の結果の平均値のグラフを示す。

[0097] [実施例８]

細胞初期化用遺伝子を保持するセンダイウイルスベクターによる人工多能性幹細胞（iPS細胞）の作製3

ヒト成人皮膚由来繊維芽細胞HDF(Applications, Inc. 106-05A-1388) 5 x 10^5(個)を6ウェルプレートに 10 % FBS (GIBCO-BRL) 及びペニシリン (100u/ml) ストレプトマイシン (100μg/ml) (ナカライテスク, Code 26253-84) を含むDMEM (GIBCO-BRL, 11995), 10 % FBS (Cell Culture BioscienceCat. No. 171012) (以下10%FBS/PS/DMEMとする) 中で37℃、5 % CO_2インキュベーターにて終夜培養した。その後、以下の条件でベクターを細胞に感染させた。評価はn=2で行った。

[0098] 条件1：SeV(PM)KOS/TS12ΔF＋SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF+SeV18+KLF4/TSΔF

SeV(PM)KOS/TS12ΔF	MOI=5
SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF	MOI=5
SeV18+KLF4/TSΔF	MOI=5

条件２：SeV(PM)KOS/TS12ΔF＋SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF+SeV18+KLF4/TSΔF

SeV(PM)KOS/TS12ΔF	MOI=30
SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF	MOI=30
SeV18+KLF4/TSΔF	MOI=10

条件３：SeV(PM)KOS/TS12ΔF＋SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF

SeV(PM)KOS/TS12ΔF	MOI=30

SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF MOI=30

条件４：SeV(PM)KOS/TS12ΔF＋SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF

SeV(PM)KOS/TS12ΔF MOI=5

SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF MOI=5

条件５：ベクター非投与群1（コントロール群1）

条件６：ベクター非投与群2（コントロール群2）

[0099] 上記ベクターを細胞に投与後、条件１、２、５は、37℃、5 % CO_2インキュベータにて培養した。条件３，４，６は、35℃、5 % CO_2インキュベータにて培養した。10%FBS/PS/DMEMでほぼ毎日培地交換を行った。感染6日目に、ゼラチンコート6ウェルプレートに用意したマイトマイシン処理済みフィーダー細胞(例えばMEF) 1.25×10^5（個）に対し、0.25 %トリプシン-EDTA溶液を用いて剥がした上記ベクター導入細胞を1.0×10^5（個）を添加し、37℃で5% CO_2インキュベータにて培養した。翌日、10%FBS/PS/DMEMから霊長類ES用培地（ReproCell社, RCHEMD001)(4 ng/ml になるようbFGFを添加した）に培地交換し、37℃で5% CO_2インキュベータで培養した。培地交換は毎日もしくは二日に一度行った。培地はフィーダー細胞のコンディションドメディウムでも構わない。

感染28日目に、ES細胞の未分化マーカーであるアルカリホスファターゼの活性をNBCT/BCIP (PIERCE, NBT/BCIP, 1-Step, # 34042)にて染色してiPS細胞の誘導効率を観察した（図５）。SeV18+KLF4/TSΔFベクターを添加していない試験群（上記条件３，４）と比較して、SeV18+KLF4/TSΔFベクターを添加した試験群（上記条件１，２）において、iPS細胞の誘導効率が高かった。ベクター非投与群（上記条件５、６）では、iPS細胞の誘導は認められなかった。図６に、n=2の結果の平均値のグラフを示す。

[0100] [実施例９]

細胞初期化用遺伝子を保持するセンダイウイルスベクターによる人工多能性幹細胞（iPS細胞）の作製4

ヒト胎児肺細胞由来繊維芽細胞（MRC-5；ATCC, CCL-171）2x 10^5(個)を6ウェルプレートに 10 % FBS (GIBCO-BRL) 及びペニシリン(100u/ml)ストレプト

マイシン(100μg/ml)（ナカライテスク，Code 26253-84）を含むDMEM（GIBCO-BRL，11995)，10％FBS（Cell Culture BioscienceCat. No. 171012)（以下10%FBS/PS/DMEMとする）中で37℃、5％CO_2インキュベーターにて終夜培養した。その後、以下の条件でベクターを細胞に感染させた。評価はn=2で行った。

[0101] 条件1：SeV(PM)KOS/TS12ΔF＋SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF+SeV18+KLF4/TSΔF

SeV(PM)KOS/TS12ΔF MOI=5

SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF MOI=5

SeV18+KLF4/TSΔF MOI=5

条件２：SeV(PM)KOS/TS12ΔF＋SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF+SeV18+KLF4/TSΔF

SeV(PM)KOS/TS12ΔF MOI=30

SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF MOI=30

SeV18+KLF4/TSΔF MOI=10

条件３：SeV(PM)KOS/TS12ΔF＋SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF

SeV(PM)KOS/TS12ΔF MOI=5

SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF MOI=5

条件４：SeV(PM)KOS/TS12ΔF＋SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF

SeV(PM)KOS/TS12ΔF MOI=30

SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF MOI=30

条件５：ベクター非投与群1（コントロール群1)

条件６：ベクター非投与群2（コントロール群2)

[0102] 上記ベクターを細胞に投与後、条件１、２、５は、37℃、5％CO_2インキュベータにて培養した。条件３，４，６は、35℃、5％CO_2インキュベータにて培養した。10%FBS/PS/DMEMでほぼ毎日培地交換を行った。感染6日目に、ゼラチンコート6ウェルプレートに用意したマイトマイシン処理済みフィーダー細胞(例えばMEF）1.25×10^5（個）に対し、0.25％トリプシン-EDTA溶液を用いて

剥がした上記ベクター導入細胞を1.0×10^5（個）を添加し、37℃で5% CO_2インキュベータにて培養した。翌日、10%FBS/PS/DMEMから霊長類ES用培地（Repro Cell社, RCHEMD001)(4 ng/ml になるようbFGFを添加した）に培地交換し、37℃で5% CO_2インキュベータで培養した。培地交換は毎日もしくは二日に一度行った。培地はフィーダー細胞のコンディションドメディウムでも構わない。

感染28日目に、ES細胞の未分化マーカーであるアルカリホスファターゼの活性をNBCT/BCIP(PIERCE, NBT/BCIP, 1-Step, # 34042)にて染色してiPS細胞の誘導効率を観察した（図７）。SeV18+KLF4/TSΔFベクターを添加していない試験群（上記条件３，４）と比較して、SeV18+KLF4/TSΔFベクターを添加した試験群（上記条件１，２）において、iPS細胞の誘導効率が高かった。ベクター非投与群（上記条件５、６）では、iPS細胞の誘導は認められなかった。図８に、n=2の結果の平均値のグラフを示す。

[0103] [実施例１０]

誘導された人工多能性幹細胞のin vivo多分化能の評価

in vivoでの多分化能は免疫不全マウスへのテラトーマ形成で確認を行った。BJ細胞由来iPS細胞のクローンBJ-1215K#1、HDF細胞由来iPS細胞のクローンHDF-1215K#1をSCIDマウス皮下に接種し、約１ヶ月後に腫瘤形成を確認し、約2ヶ月後に検体を回収し、10 %ホルマリン固定後、パラフィン包埋し、組織切片のヘマトキシリン・エオジン染色を行い、三胚葉分化を確認した（図９）。

[0104] [実施例１１]

核型解析

9継代目のBJ細胞由来iPS細胞のクローンBJ-1215K#1、HDF細胞由来iPS細胞のクローンHDF-1215K#1、MRC-5細胞由来iPS細胞のクローンMRC5-1215K#1の核型解析を（株）日本遺伝子研究所に依頼して行った。その結果、46本の染色体を有し、核型が正常であることが示された（図１０）。

[0105] [実施例１２]

マウス線維芽細胞からのiPS細胞の誘導

129+TER/SvJclマウス由来の線維芽細胞を5x10^5cells/ウェルになるように6-

ウェルプレートへ播種し、CO_2インキュベーター（37℃、5% CO_2）で1晩培養した。細胞数測定用のウェルの細胞をトリプシン-EDTA溶液を用いて剥がし、1ウェル当たりの細胞数を測定した。この細胞数を基にベクターの量を算出した。SeV(PM)KOS/TS12ΔFベクター、SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔFベクター、SeV18+KLF4/TSΔFベクターを10%FBS/PS/DMEM培地に各ベクターをMOI=5になるように添加して、最終溶液が1mLとなるようにベクター液を調製した。6-ウェルプレートの培養液を除き、調製したベクター溶液を添加し、CO_2インキュベーター（37℃、5% CO_2）で約24時間、培養を行った。その後、培養液を除き、10%FBS/PS/DMEMを添加（2 mL/ウェル）し、CO_2インキュベーター（37℃、5% CO_2）で約24時間、培養を行った。細胞の培養液を除き、ES細胞用の培地（Neurobasal medium(Life technologies. Cat. No.21103-049)を250 ｍｌ、DMEM/F-12, GlutaMAX (Life technologies. Cat. No. 10565-018) を250 ｍｌ、B27 (Life technologies, Cat. No.17504044) を 10 ｍｌ、N2 (Life technologies. Cat. No.17502-048) を5 ｍｌ、2-メルカプトエタノール（シグマ, Cat. No. M3148-100ML）を3.5μl、L-Glutamine (Life technologies. Cat. No. 25030-0841) を2.5 ｍl、ペニシリンストレプトマイシン（ナカライテスク, Cat. No. 26253-84) を5 ｍl、PD0325901 (5 mMに調製)（フナコシ, Cat. No. Axon1408) を100μl、CT 99021 (15 mMに調製)（フナコシ, Cat. No. Axon1386) を100μlを混合して2i培地を作製。2i培地にLIF (Millipore, Cat. No. ESG1106) を終濃度1000 U/mlになるように添加してマウスES細胞用培地とした（以下2i/LIF培地とする））を添加し、CO_2インキュベーター（37℃、5% CO_2）で培養した。（この後、さらにベクター感染5日目まで、2i/LIF培地で培地交換を行いながら培養を行った。感染5日目に、フィーダー細胞を、0.1%ゼラチン溶液でコートした6ウェルプレートに$1.4x10^5$ cells/ウェル/2 ml 10% FBS/PS/DMEM、10ｃｍディッシュに$7x10^5$ cells/ディッシュ/10 ml 10%FBS/PS/DMEMで播種し、CO_2インキュベーター（37℃、5% CO_2）で培養した。感染6日目に、ベクターを感染させた細胞をトリプシン-EDTAを用いて剥がし、準備したフィーダー上に2i/LIF培地を添加して、$1x10^4$ cells/ウェル、$1x10^5$ cells/ウ

エルの割合で6ウェルプレートに、1x10^4 cells/ディッシュ、1x10^5 cells/ディッシュの割合で10ｃｍディッシュに撒き、CO_2インキュベーター（37℃、5% CO_2）で培養した。これ以降は、ほぼ毎日2i/LIF培地で培地交換を行いながらiPS細胞の誘導を行った。感染21日目にアルカリホスファターゼ染色を行った（図１１）。iPS細胞様でアルカリホスファターゼ陽性の細胞を計測し、誘導効率を求めた結果、約0.1%であった。

[0106] [実施例１３]

マウスiPS細胞のクローンの取得

実施例１２で1x10^4 cells/ディッシュ、1x10^5 cells/ディッシュの割合で細胞を撒いた10ｃｍディッシュから、感染16日目にそれぞれ6クローン、18クローンをピックアップし、継代培養を行い、抗SeV抗体染色を行いセンダイウイルスベクターの除去の確認を行った（図１２）。その結果、９クローン（クローン番号：5-2、5-6、5-7、5-11、5-13、5-14、5-15、5-16、5-17）のセンダイウイルスベクター陰性クローンを得た。

[0107] [実施例１４]

免疫染色による遺伝子発現解析

実施例１２で誘導し、実施例１３でセンダイウイルスベクターが陰性であることが確認されたマウスiPS細胞の評価を抗NANOG抗体、抗OCT4抗体を免疫染色法により行った（図１３）。その結果、3つのiPS細胞のクローン（5-2、5-7、5-17）は、NANOGおよびOCT4が陽性コントロールであるマウスのES細胞と同様に染色された。陰性コントロールのマウス線維芽細胞では、NANOGおよびOCT4は、染色されなかった。従って、評価したiPS細胞は、NANOGおよびOCT4遺伝子をタンパク質レベルで発現している事が示された。

[0108] [実施例１５]

多分化能評価

実施例１２で誘導し、実施例１３でセンダイウイルスベクターが陰性であることが確認されたマウスiPS細胞の多分化能評価を行った。

LIFを含まない血清培地で培養することで胚葉体を形成した（図１４）。マ

ウスES細胞と同様であった。

胚葉体を形成させた後に、ゼラチンコートプレートに継代し、LIFを含まない血清培地で培養することで4日目には、GATA4（内胚葉のマーカーである転写因子）染色により細胞の核が染色された（図１５）。

LIFを含まない血清培地にて、培養を続けることでゼラチンコートプレートに継代して10日目に拍動する心筋と考えられる組織が観察された。14日目に細胞を固定してα-Actininに対する抗体を用いて免疫染色を行った（図１６）。全体的に染色されていた。その中でもいくつかの領域では、強く染色された細胞が観察された。

LIFを含まない2i培地で培養することでゼラチンコートに継代して4日目には、βIIIチューブリン陽性（図１７）Tyrosine Hydroxylase陽性（図１８）、の神経細胞に分化できることが示された。これらの結果より、本発明のセンダイウイルスベクターを使用することでマウスの細胞から3胚葉への分化能を有するiPS細胞が誘導可能であることが示された。

[0109] [実施例１６]

ヒト単球からのiPS細胞誘導1

ヒトCD14+単球からのiPS細胞の誘導を行った。使用した単球は、LONZA社より購入した（カタログ番号 2W-400C）。 単球は10％ウシ胎児血清およびペニシリンストレプトマイシンを含むIMDM（10%FBS/PS/IMDMとする）により培養を行った。凍結された単球の細胞を37℃のウォーターバスで融解し、10%FBS/PS/IMDM培地10mlを入れた50mlファルコンチューブに移し、優しく混合した。100g 5分、室温で遠心分離後、上清を取り除き、10 mlの10%FBS/PS/IMDMを添加、混合した。血球計算盤を用いて細胞数をカウントした。5×10^5cells/ウェル/2ml 10%FBS/PS/IMDMで6-ウェルプレートに播種し、CO_2インキュベーター（37℃、5% CO_2）で培養した。

[0110] 細胞をエッペンドルフチューブに回収し、遠心分離後、上清を除き、500μlの10%FBS/PS/IMDMを添加、混合、細胞数をカウントした。細胞数から必要ベクター量を計算し、SeV(PM)KOS/TS12ΔFベクター、SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔF

ベクター、SeV18+KLF4/TSΔFベクターの3種類のベクターがMOI=5, 10, 30, 50となるようにベクター溶液を10%FBS/PS/IMDMと混合して、最終容量が500μlになるように調製し、ベクター溶液とした。細胞溶液とベクター溶液を混合して6ウェルプレートに添加し、CO_2インキュベーター（37℃、5% CO_2）で終夜培養した。翌日、10%FBS/PS/IMDMを1ml/ウェルで添加、CO_2インキュベーター（37℃、5% CO_2）で2日間培養した。感染3日目と4日目まで10%FBS/PS/IMDMで培地交換を行った。感染6日目に細胞をトリプシン-EDTAを用いて細胞を剥がし、10%FBS/PS/IMDMに細胞を懸濁、フィーダー細胞上に添加し、CO_2インキュベーター（37℃、5% CO_2）で培養した。翌日、霊長類ES用培地（ReproCell社, RCHEMD001)(4 ng/ml になるようbFGFを添加した)を用いて培地交換を行った。この後、培地交換を行いながら、ベクター感染28日目まで培養を行った。誘導過程の細胞の状態を図１９に示した。28日目にアルカリホスファターゼ染色を行い、アルカリホスファターゼ陽性コロニーの誘導が認められた（図２０）。iPS細胞の誘導効率は、ベクター量依存的に高くなり、約0.01%～0.03%であった（図２１）。

[0111] [実施例１７]

ヒト末梢血単核球からのiPS細胞誘導

2名のボランティア（ドナー1、2とする）から提供された血液からフィコール法により末梢血単核球を調製した。PBMC培地（StemPro-34 SFMにStemPro-34 Nutrient、L-Glutamine、ペニシリンストレプトマイシンを添加した培地）にサイトカイン（100 ng/mL SCF、100 ng/mL FLT-3 Ligand、 20 ng/mL Thrombopoetin、10 ng/mL IL-6）を添加した培地（PBMC+培地とする）を用いて培養を行った。培養4日目にベクターの感染を行った。末梢血単核球の細胞数を計測し、MOIが5、10、30、50となるようにベクター量を計算した。PBMC+培地に計算したベクターを添加してベクター溶液を作製した。PBMCの培養液を除き、ベクター溶液を添加し、CO_2インキュベーター（37℃、5% CO_2）で培養した。ベクター感染3日目にトリプシン-EDTAを用いて細胞を剥がし、PBMC+培地に懸濁後、フィーダー細胞上に添加、CO_2インキュベーター（37℃、5% CO_2）

で培養した。翌日から感染6日目まで、PBMC培地を用いて培地交換を行い、CO_2インキュベーター（37℃、5% CO_2）で培養した。感染7日目には、半分の培地を除去し、同量の霊長類ES用培地（ReproCell社, RCHEMD001)(4 ng/ml になるようbFGFを添加した)を添加、CO_2インキュベーター（37℃、5% CO_2）で培養した。これ以降は、霊長類ES用培地（ReproCell社, RCHEMD001)(4 ng/ml になるようbFGFを添加した)を用いて培養を行い感染21日目には、iPS様の細胞が認められた（図２２、図２３）。この後、アルカリホスファターゼ染色を行った（図２４）。アルカリホスファターゼ陽性、iPS細胞様の誘導効率を算出した結果、ドナーやベクター量により誘導効率が異なったが、0.1%～0.8%の誘導効率を達成した（図２５）。

[0112] [実施例１８]

ヒト単球からのiPS細胞誘導2

2名のボランティア（ドナー3、4とする）から提供された血液からフィコール法により末梢血単核球を調製した。この末梢血単核球からEasySep positive selection Human CD14 positive Selection kit（ベリタス, Cat. No. 18058を使用)を用いてCD14+細胞を分離して出発材料とした。抗CD14抗体を用いたFACS解析により、末梢血単核球では、CD14陽性細胞は、約15%であったが、分離後は85%以上にまで純化されたことを確認した。この細胞にSeV(PM)KOS/TS12ΔFベクター、SeV(HNL)c-rMYC/TS15ΔFベクター、SeV18+KLF4/TSΔFベクターの3種類のベクターをMOI=5, 10, 30, 50となるように感染させて、実施例１６で示した方法と同様にiPS細胞の誘導を行った。その結果、アルカリホスファターゼ染色陽性iPS様細胞の誘導が確認され（図２６、図２７、図２８）、誘導効率は、最大で0.12%であった（図２９）。

産業上の利用可能性

[0113] 本発明により、KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で含むベクターを用いた多能性幹細胞の誘導効率を有意に向上させることが可能となる。特に温度感受性ベクターを利用することにより、多能性幹細胞の誘導に速やかなベクターの除去を可能としつつ、培養を低温で行うことなく高い

効率で多能性幹細胞の誘導を行うことができる点で有用である。本発明の方法は、細胞に低温刺激が加わらないことから、生理的により好ましい多能性幹細胞を取得できることが期待される。

請求の範囲

[請求項1] KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含む温度感受性センダイウイルスベクターを導入し、低温培養せずに、多能性幹細胞を誘導する方法における多能性幹細胞の誘導効率を改善する方法であって、KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターをさらに導入する工程を含む方法。

[請求項2] 約37℃で培養される、請求項１に記載の方法。

[請求項3] KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含む温度感受性センダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にD433A, R434A, K437A, 及びL511F変異、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、請求項１または２に記載の方法。

[請求項4] KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にL511F変異、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、請求項１から３のいずれかに記載の方法。

[請求項5] MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターを導入する工程をさらに含む、請求項１から４のいずれかに記載の方法。

[請求項6] MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にD433A, R434A, K437A, 及びL511F変異、そしてL蛋白質にL1361C, L1558I, N1197S, 及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、請求項５に記載の方法。

[請求項7] KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベク

ターに含む温度感受性センダイウイルスベクターを導入し、低温培養せずに、多能性幹細胞を誘導する方法における多能性幹細胞の誘導効率を改善するための薬剤の製造における、KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターの使用。

[請求項8] 多能性幹細胞を誘導する方法が、約37℃で培養する方法である、請求項７に記載の使用。

[請求項9] KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含む温度感受性センダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にD433A, R434A, K437A, 及びL511F変異、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、請求項７または８に記載の使用。

[請求項10] KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にL511F変異、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、請求項７から９のいずれかに記載の使用。

[請求項11] 低温培養せずに培養して多能性幹細胞を誘導するための組成物であって、

（ａ）KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含む温度感受性センダイウイルスベクター、および

（ｂ）KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクター、

を含む組成物。

[請求項12] 多能性幹細胞を誘導するための組成物であって、

（ａ）KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含む温度感受性センダイウイルスベクターであって、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及

びK461Gの変異、P蛋白質にD433A, R434A, K437A, 及びL511F変異、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクター、および

（ｂ）KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターであって、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にL511F変異、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクター、

を含む組成物。

[請求項13] MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターをさらに含む、請求項１１または１２に記載の組成物。

[請求項14] MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にD433A, R434A, K437A, 及びL511F変異、そしてL蛋白質にL1361C, L1558I, N1197S, 及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、請求項１３に記載の組成物。

[請求項15] 低温培養せずに培養して多能性幹細胞を誘導するための組成物である、請求項１２から１４のいずれかに記載の組成物。

[請求項16] 低温培養せずに培養して多能性幹細胞を誘導するためのキットであって、

（ａ）KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つのベクターに含む温度感受性センダイウイルスベクター、および

（ｂ）KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクター、

を含むキット。

[請求項17] 多能性幹細胞を誘導するためのキットであって、

（ａ）KLF遺伝子、OCT遺伝子、およびSOX遺伝子をこの順序で１つの

ベクターに含む温度感受性センダイウイルスベクターであって、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にD433A, R434A, K437A, 及びL511F変異、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクター、および

（ｂ）KLF遺伝子を含み、OCT遺伝子およびSOX遺伝子を含まないセンダイウイルスベクターであって、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にL511F変異、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクター、

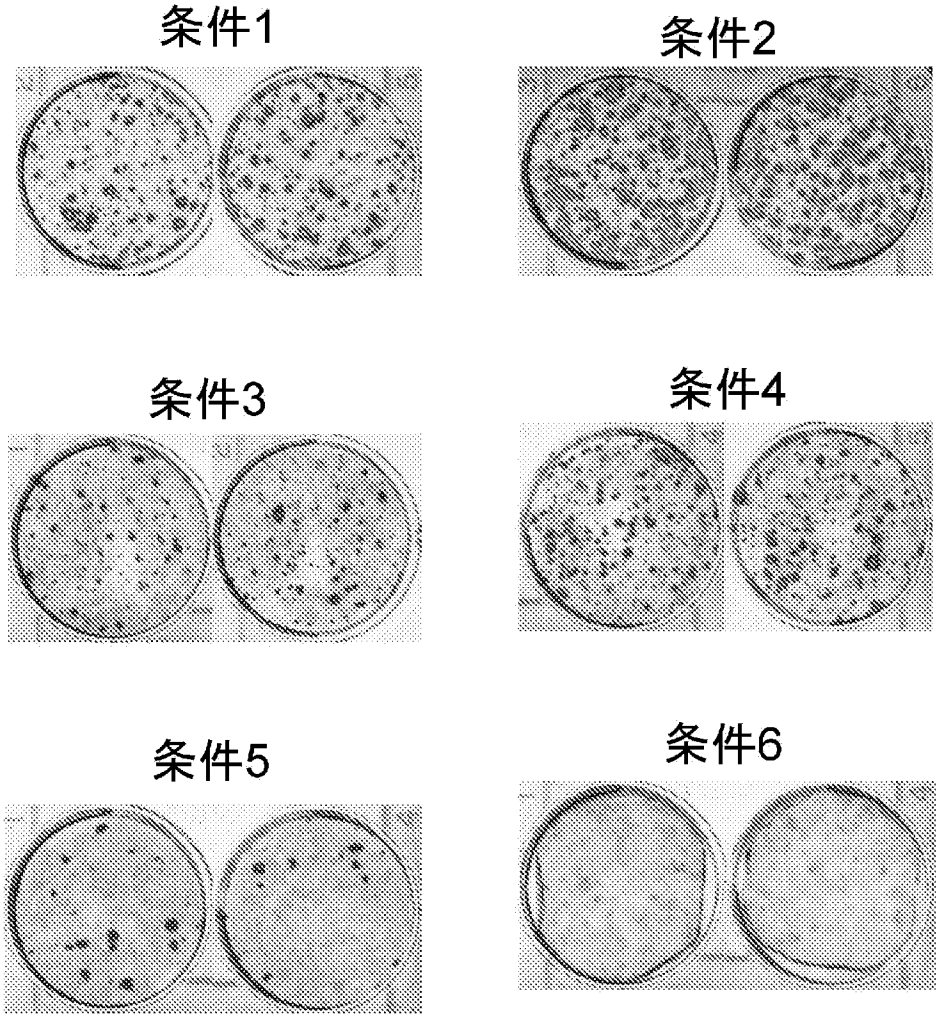
を含むキット。

[請求項18] MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターをさらに含む、請求項１６または１７に記載のキット。

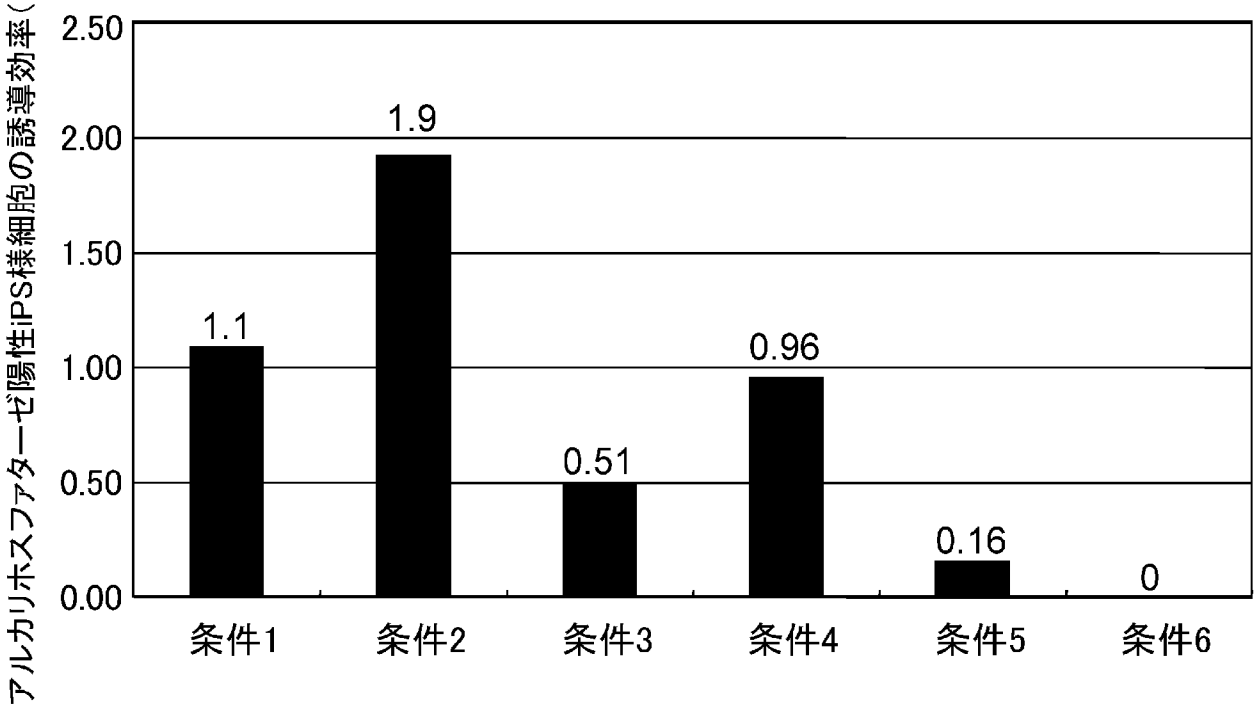
[請求項19] MYC遺伝子が挿入された温度感受性センダイウイルスベクターが、M蛋白質にG69E, T116A, 及びA183Sの変異、HN蛋白質にA262T, G264R, 及びK461Gの変異、P蛋白質にD433A, R434A, K437A, 及びL511F変異、そしてL蛋白質にL1361C, L1558I, N1197S, 及びK1795E変異を含むF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターである、請求項１８に記載のキット。

[請求項20] 低温培養せずに培養して多能性幹細胞を誘導するためのキットである、請求項１７から１９のいずれかに記載のキット。

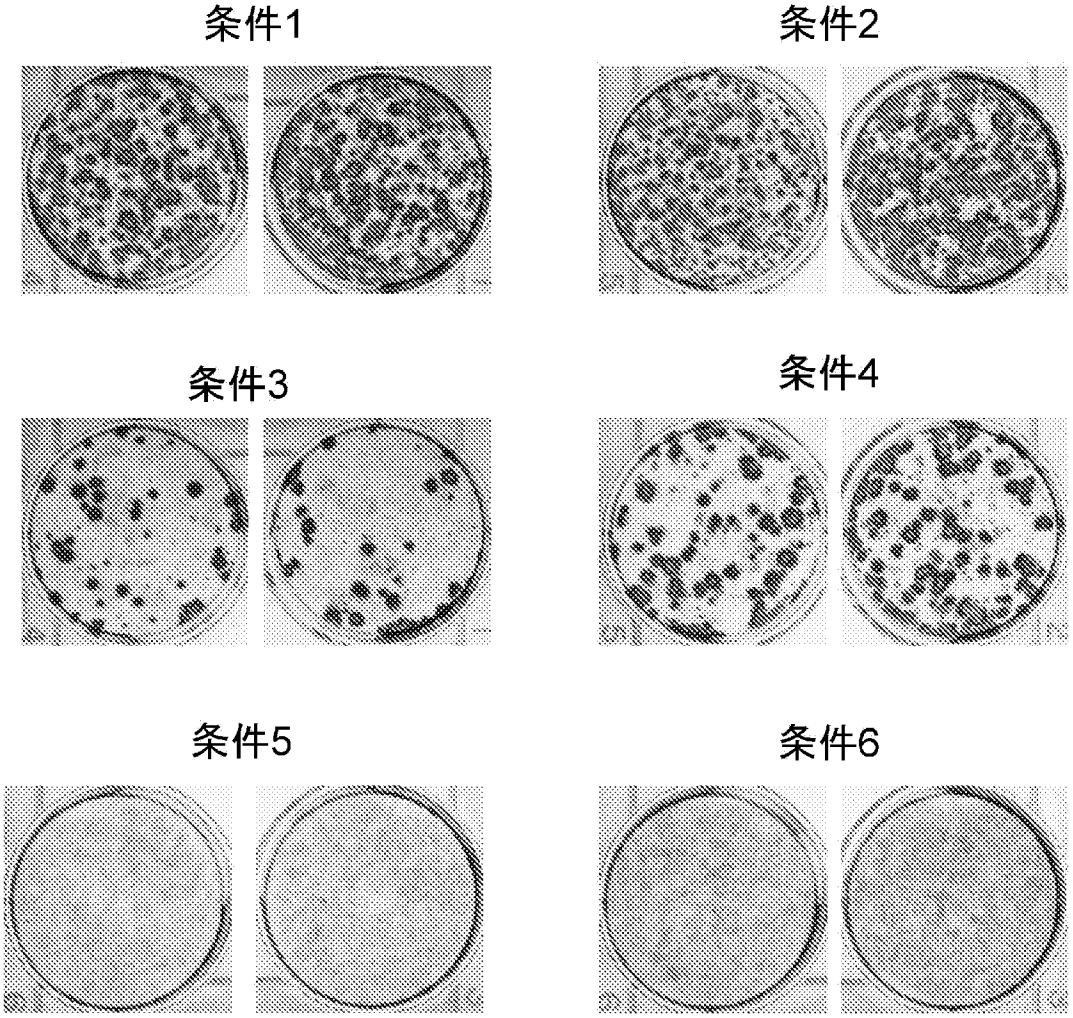
[図1]


条件1
条件2
条件3
条件4
条件5
条件6

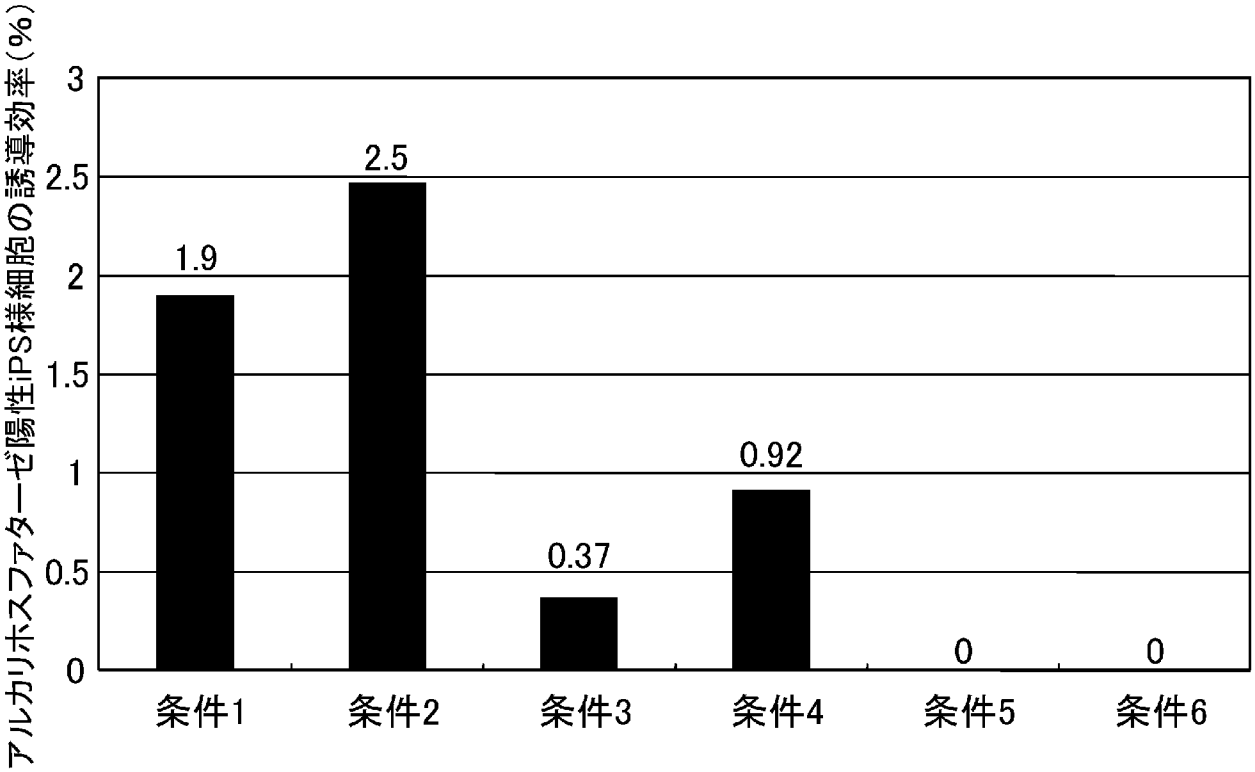
[図2]


アルカリホスファターゼ陽性iPS様細胞の誘導効率（%）
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
1.1
1.9
0.51
0.96
0.16
0
条件1
条件2
条件3
条件4
条件5
条件6

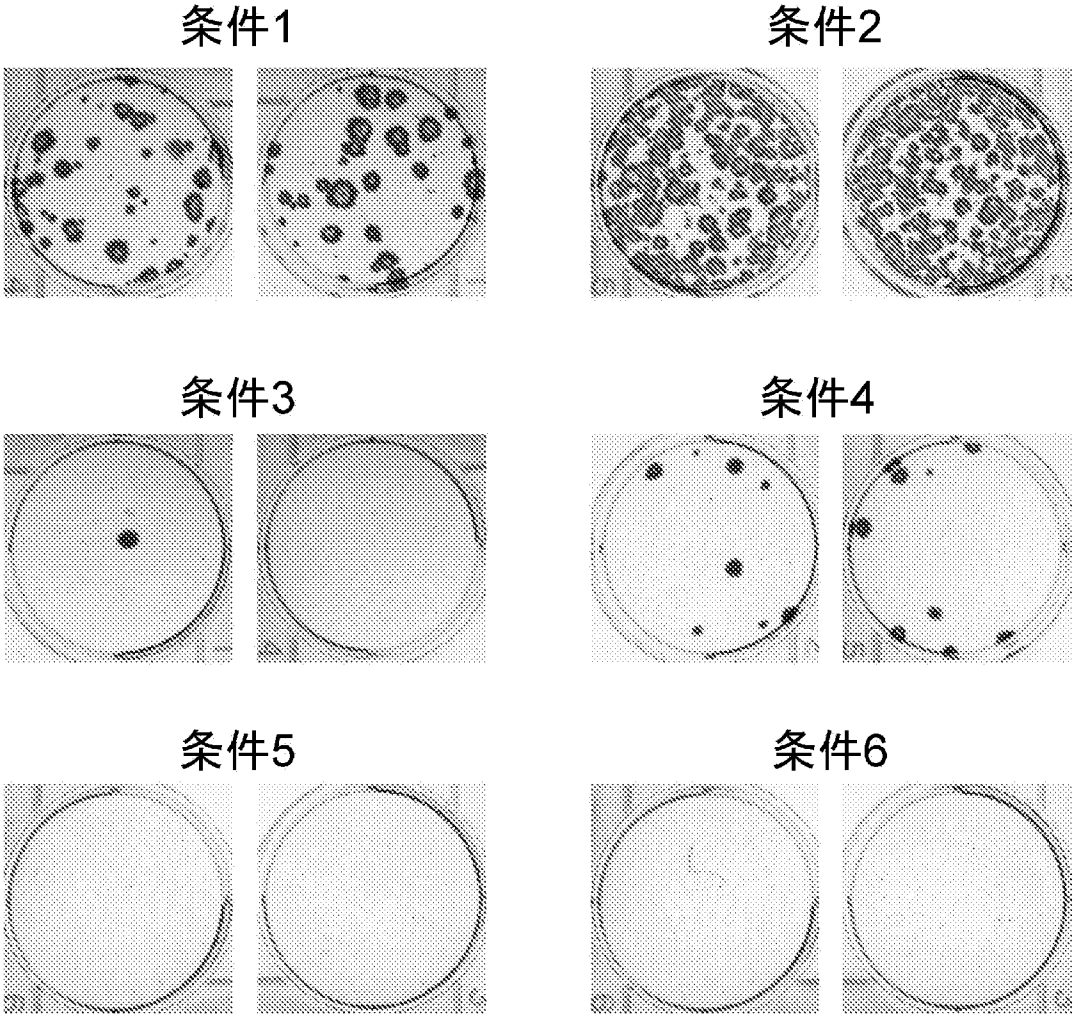
[図3]


条件1
条件2
条件3
条件4
条件5
条件6

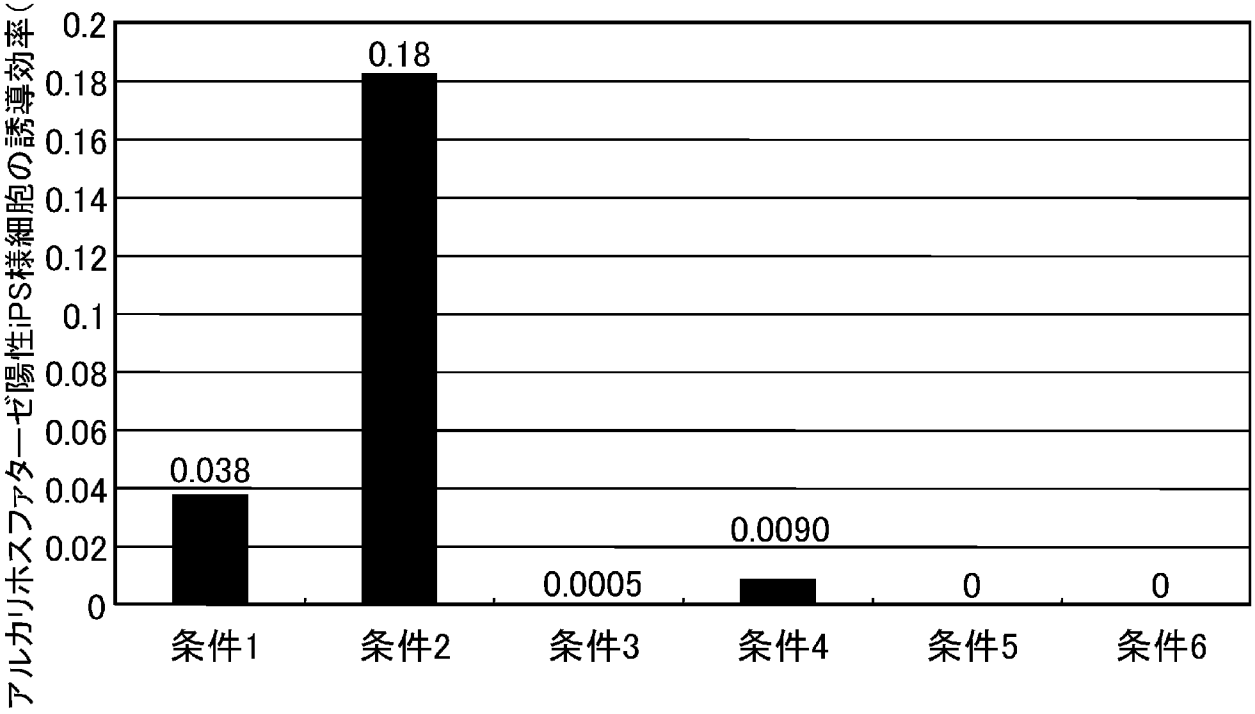
[図4]


アルカリホスファターゼ陽性iPS様細胞の誘導効率（%）
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
1.9
2.5
0.37
0.92
0
0
条件1
条件2
条件3
条件4
条件5
条件6

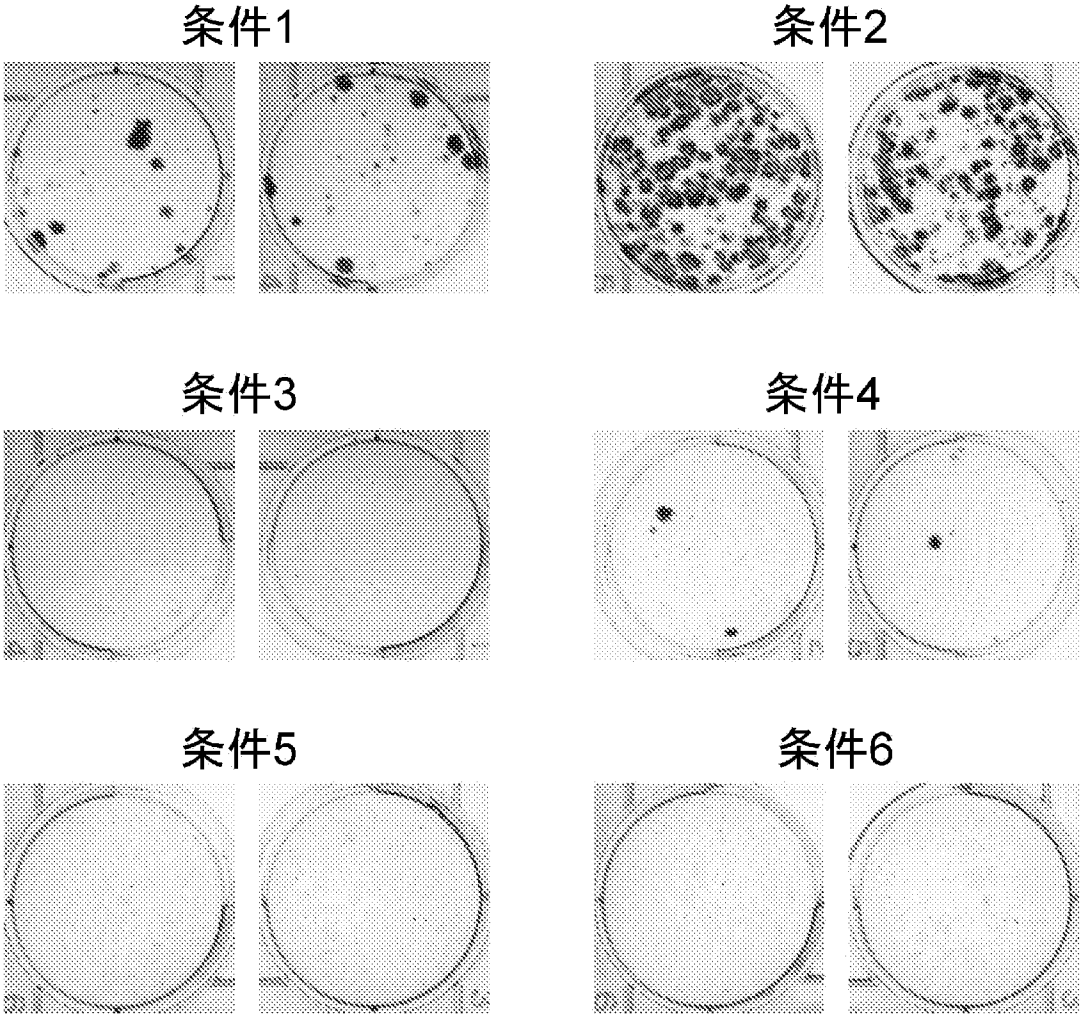
[図5]


条件1
条件2
条件3
条件4
条件5
条件6

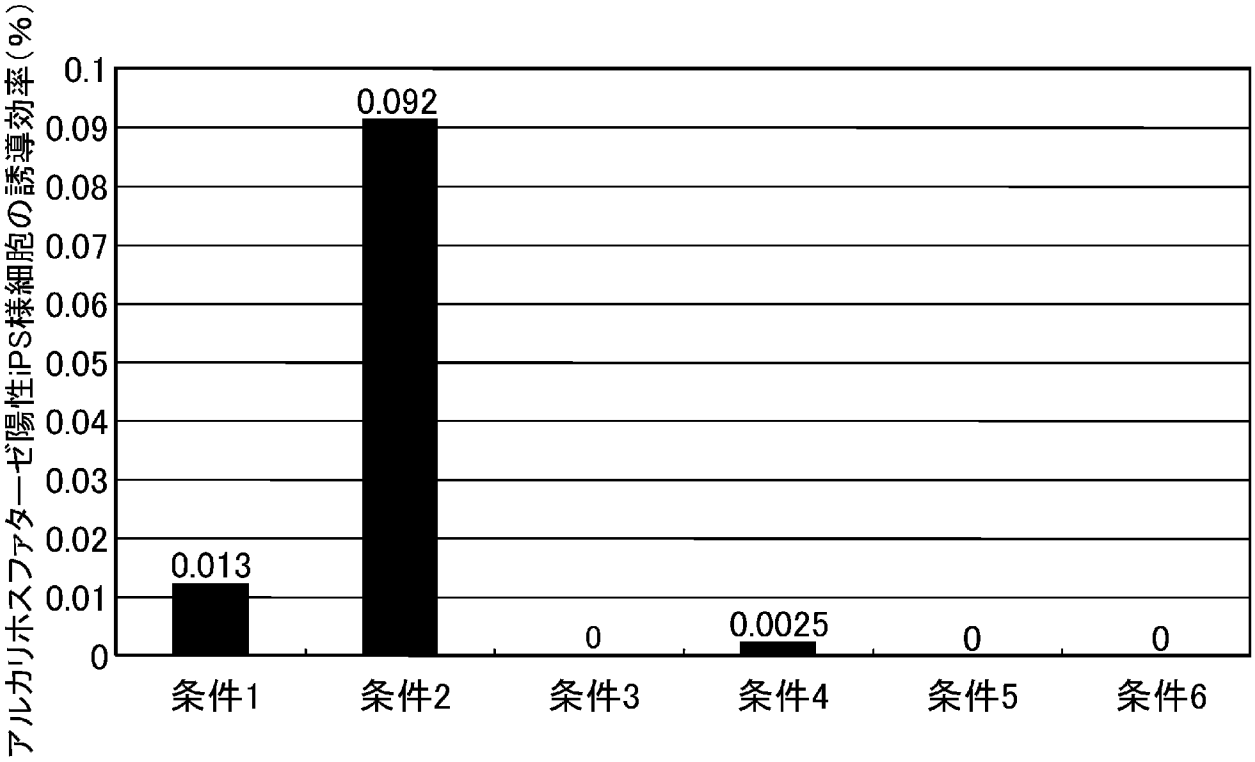
[図6]


アルカリホスファターゼ陽性iPS様細胞の誘導効率（%）
0.2
0.18
0.16
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
0.18
0.038
0.0005
0.0090
0
0
条件1
条件2
条件3
条件4
条件5
条件6

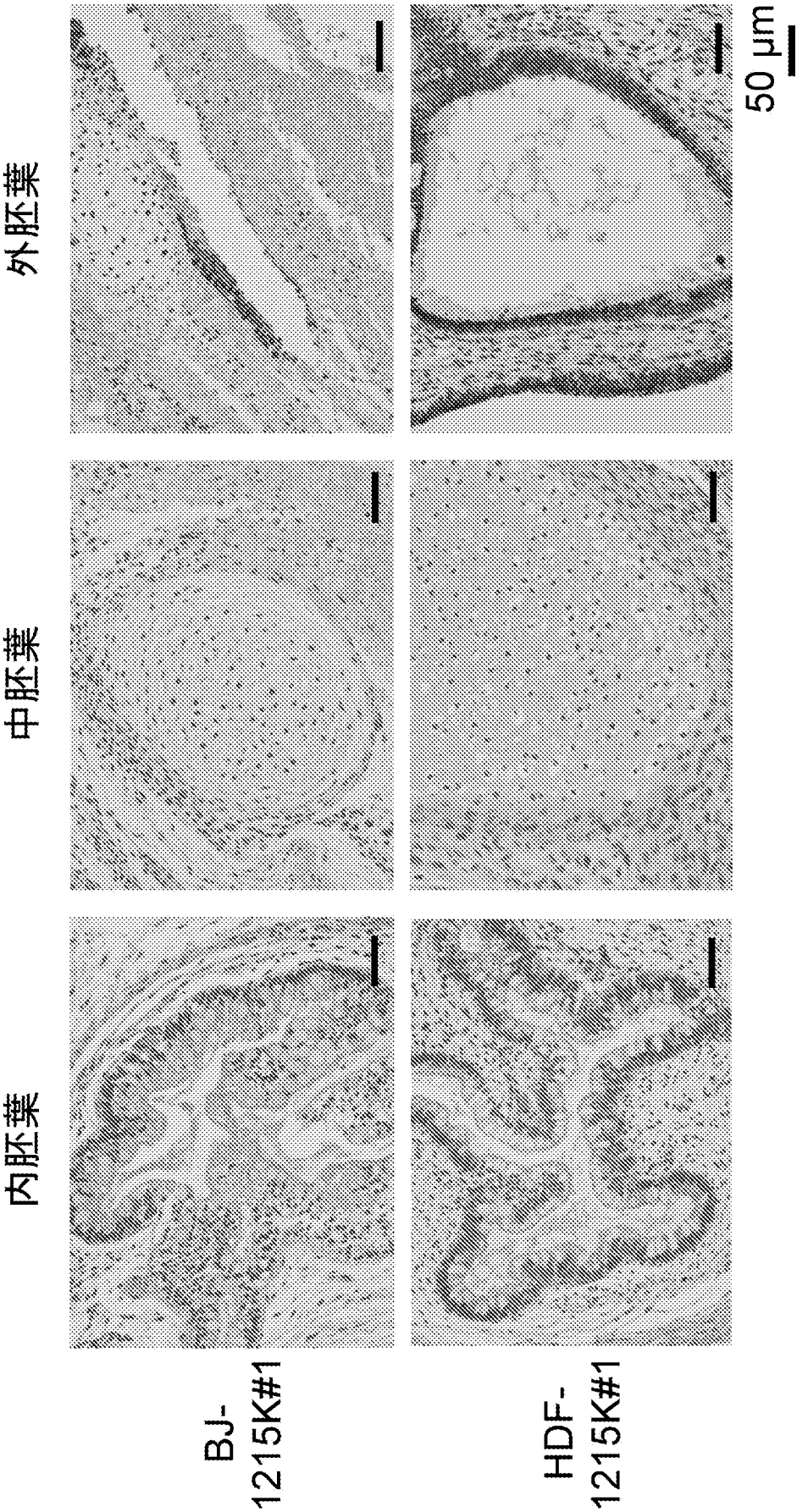
[図7]


条件1
条件2
条件3
条件4
条件5
条件6

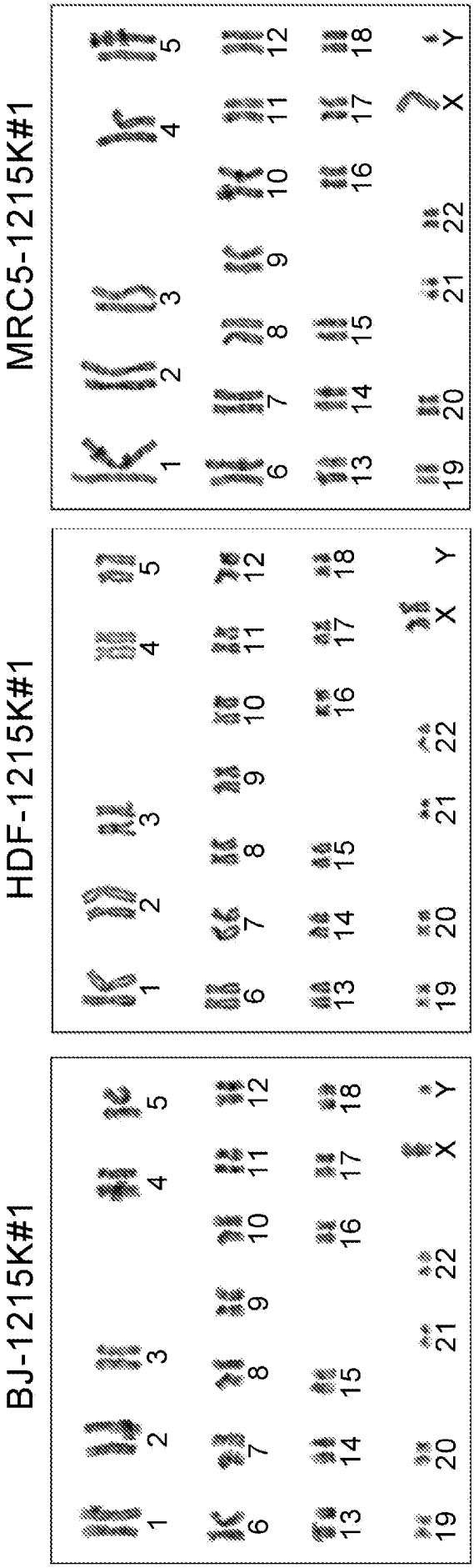
[図8]


アルカリホスファターゼ陽性iPS様細胞の誘導効率（%）
0.1
0.09
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0.092
0.013
0
0.0025
0
0
条件1
条件2
条件3
条件4
条件5
条件6

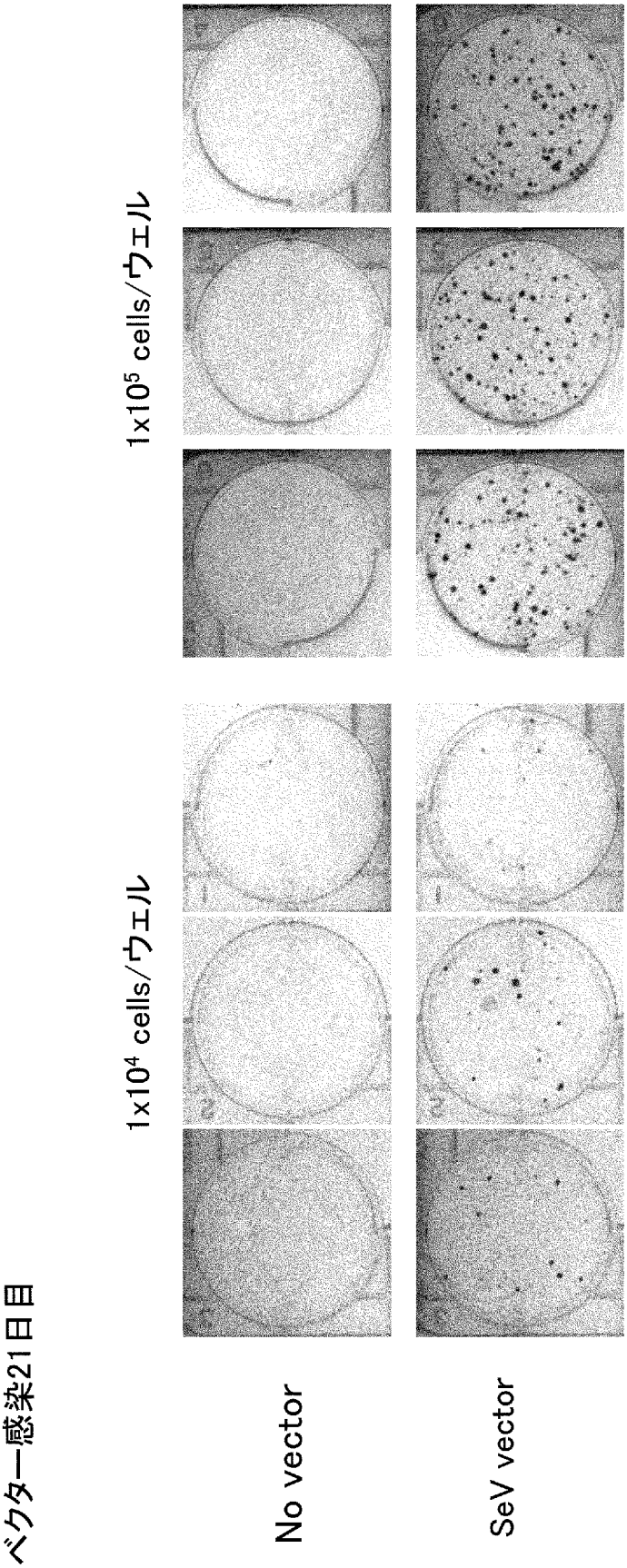
[図9]



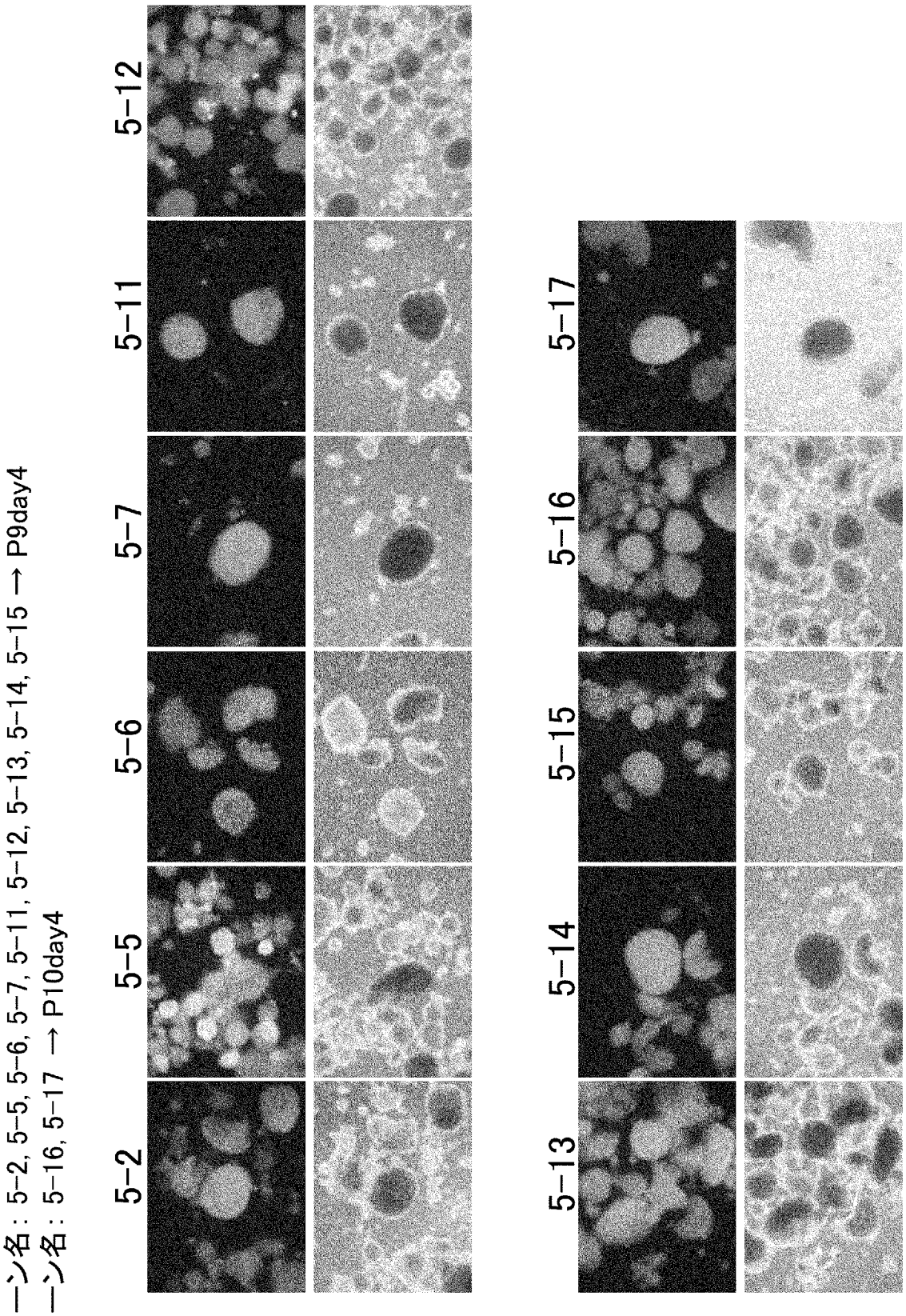
[図10]



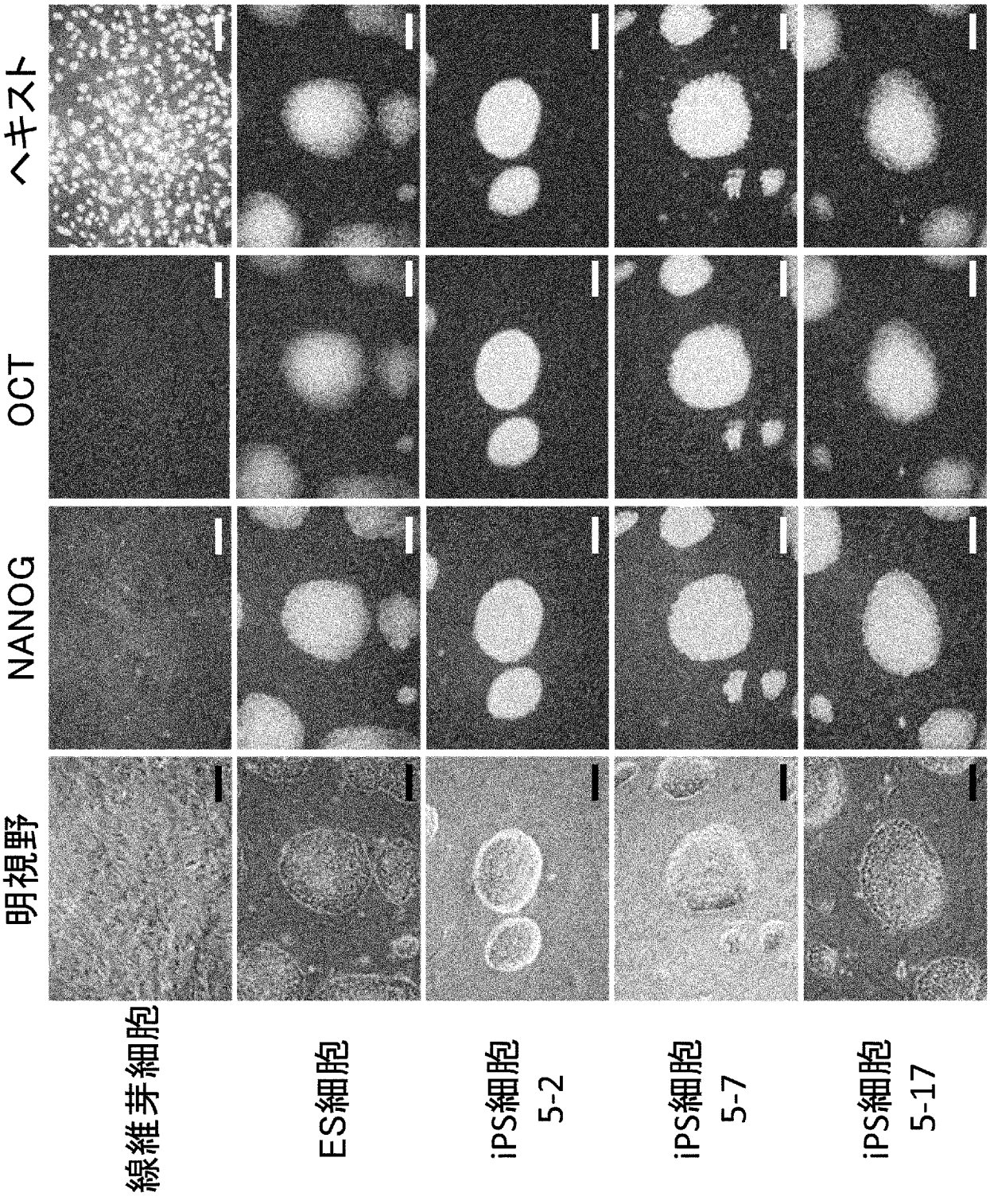
[図11]


ベクター感染21日目
No vector
SeV vector
1x10⁴ cells/ウェル
1x10⁵ cells/ウェル

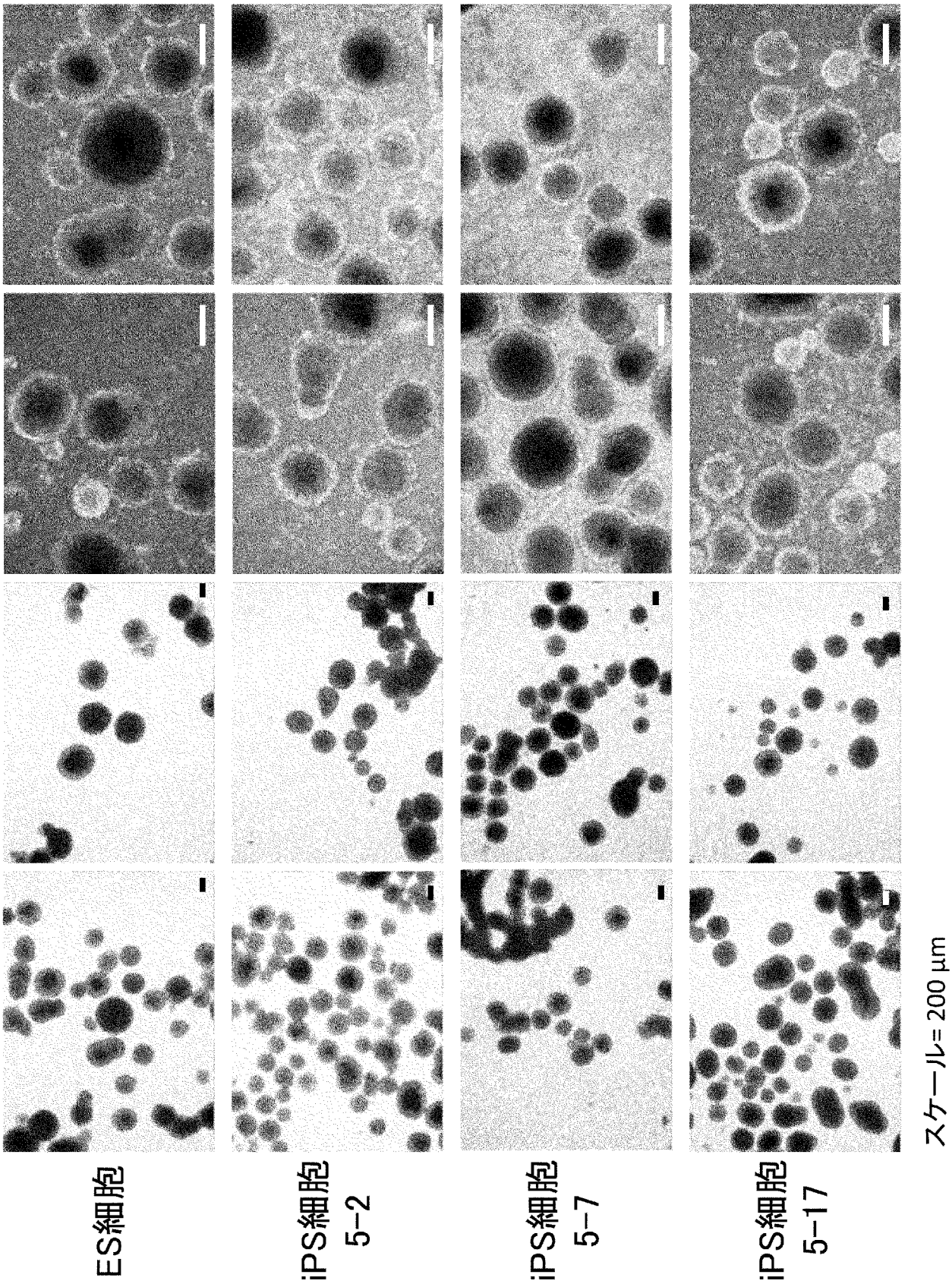
[図12]


クローン名：5-2, 5-5, 5-6, 5-7, 5-11, 5-12, 5-13, 5-14, 5-15 → P9day4
クローン名：5-16, 5-17 → P10day4
5-2
5-5
5-6
5-7
5-11
5-12
5-13
5-14
5-15
5-16
5-17

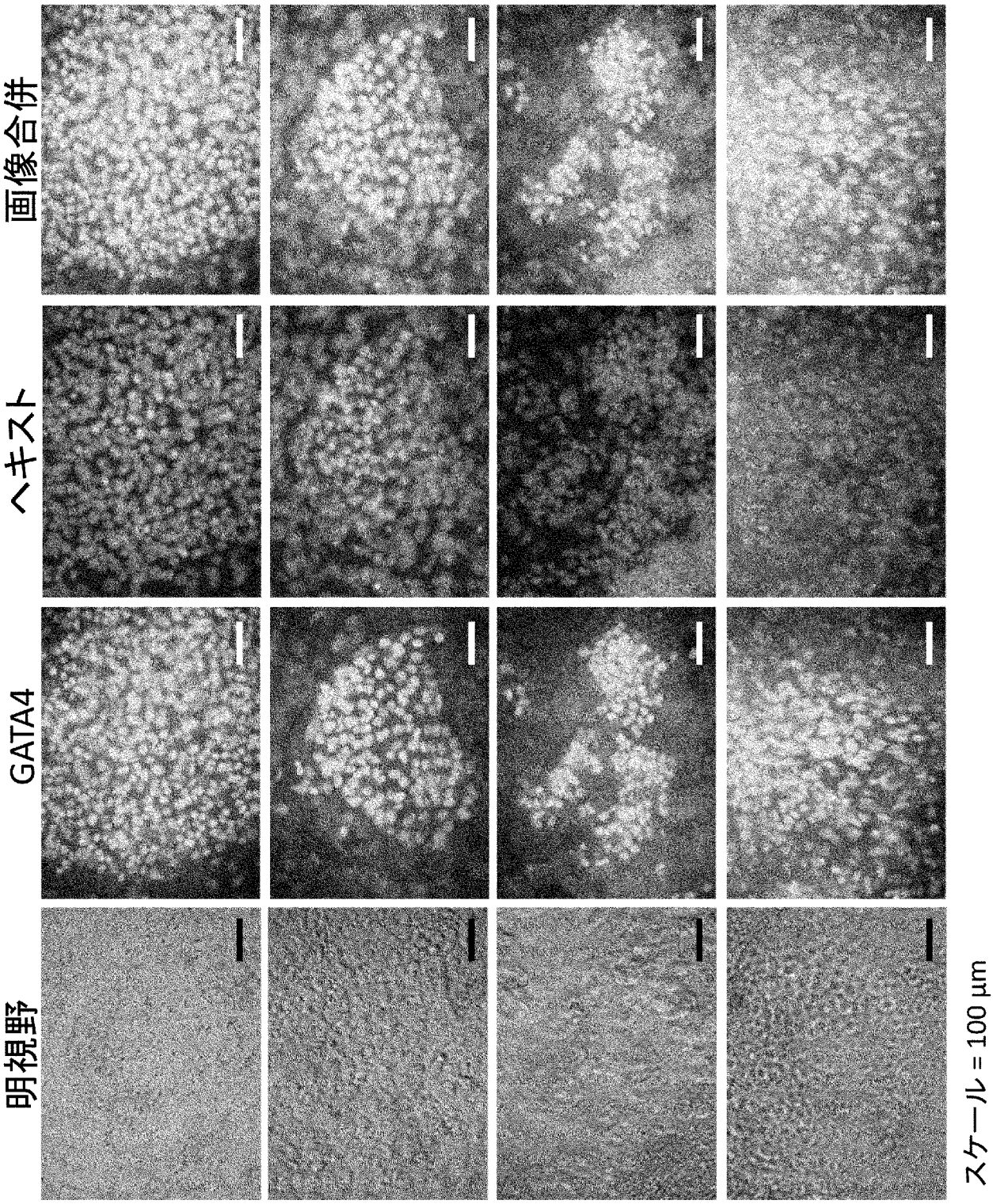
[図13]


明視野
NANOG
OCT
ヘキスト
スケール：200 μm
線維芽細胞
ES細胞
iPS細胞 5-2
iPS細胞 5-7
iPS細胞 5-17

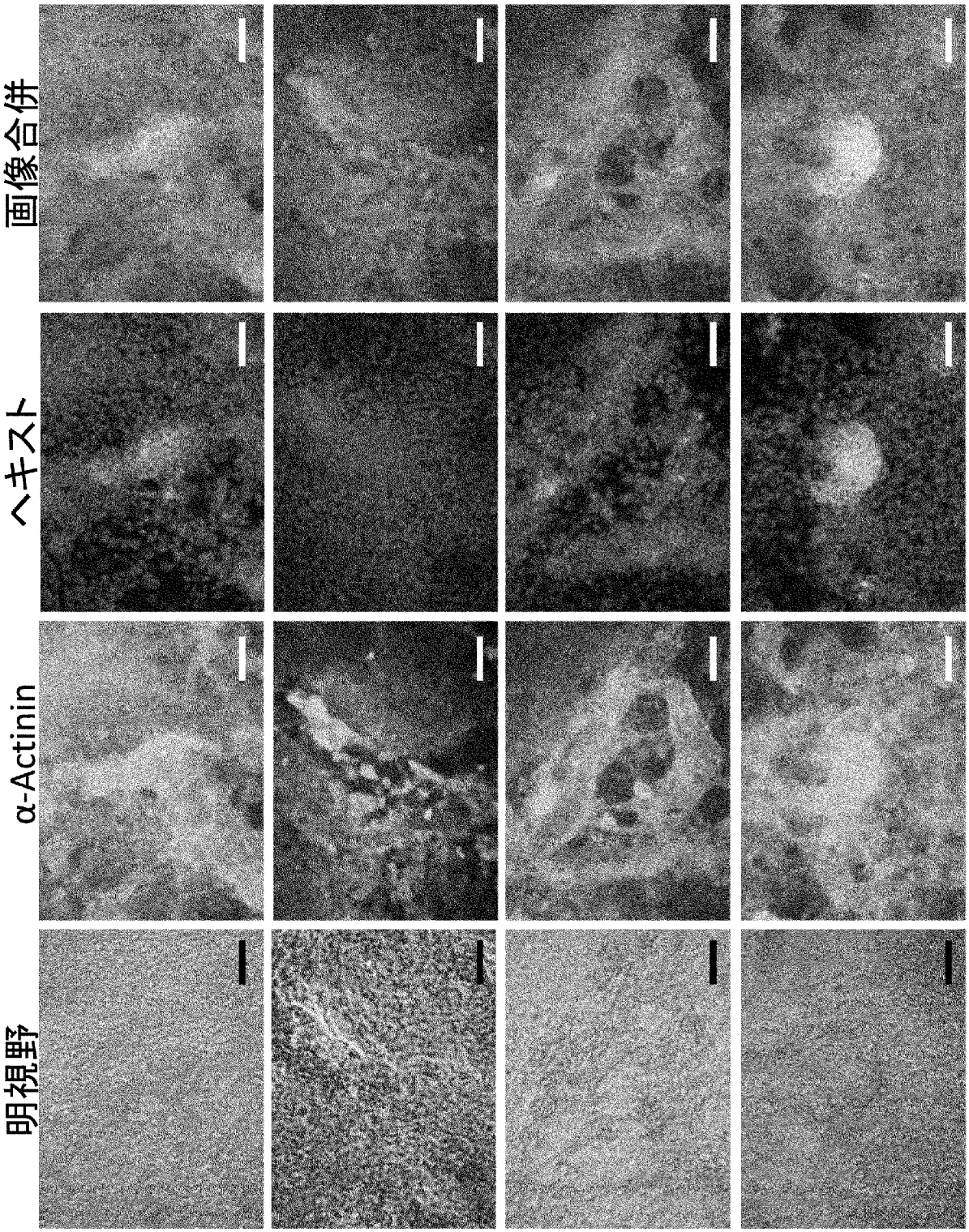
[図14]



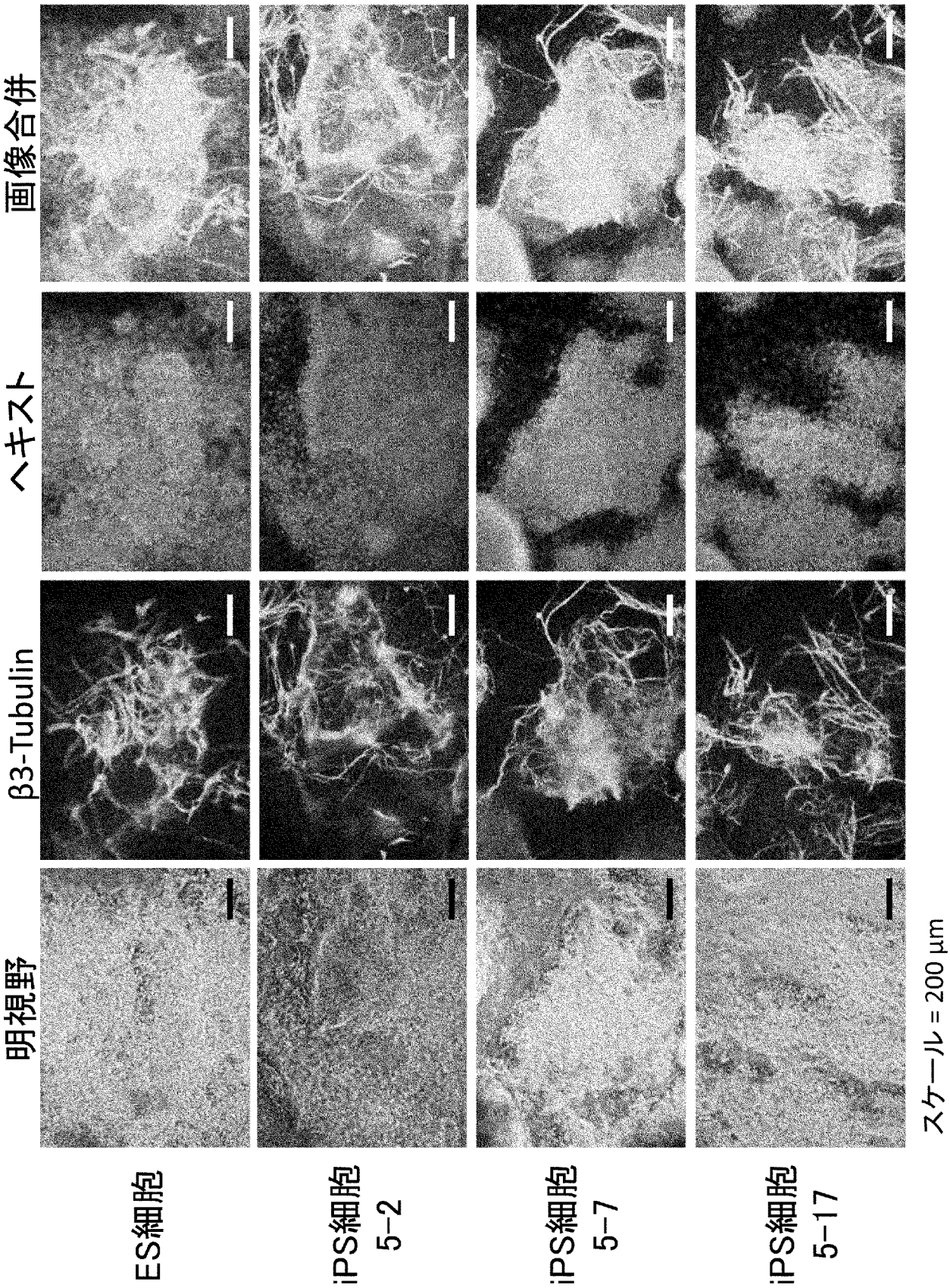
[図15]


明視野
GATA4
ヘキスト
画像合併
ES細胞
iPS細胞 5-2
iPS細胞 5-7
iPS細胞 5-17
スケール = 100 μm

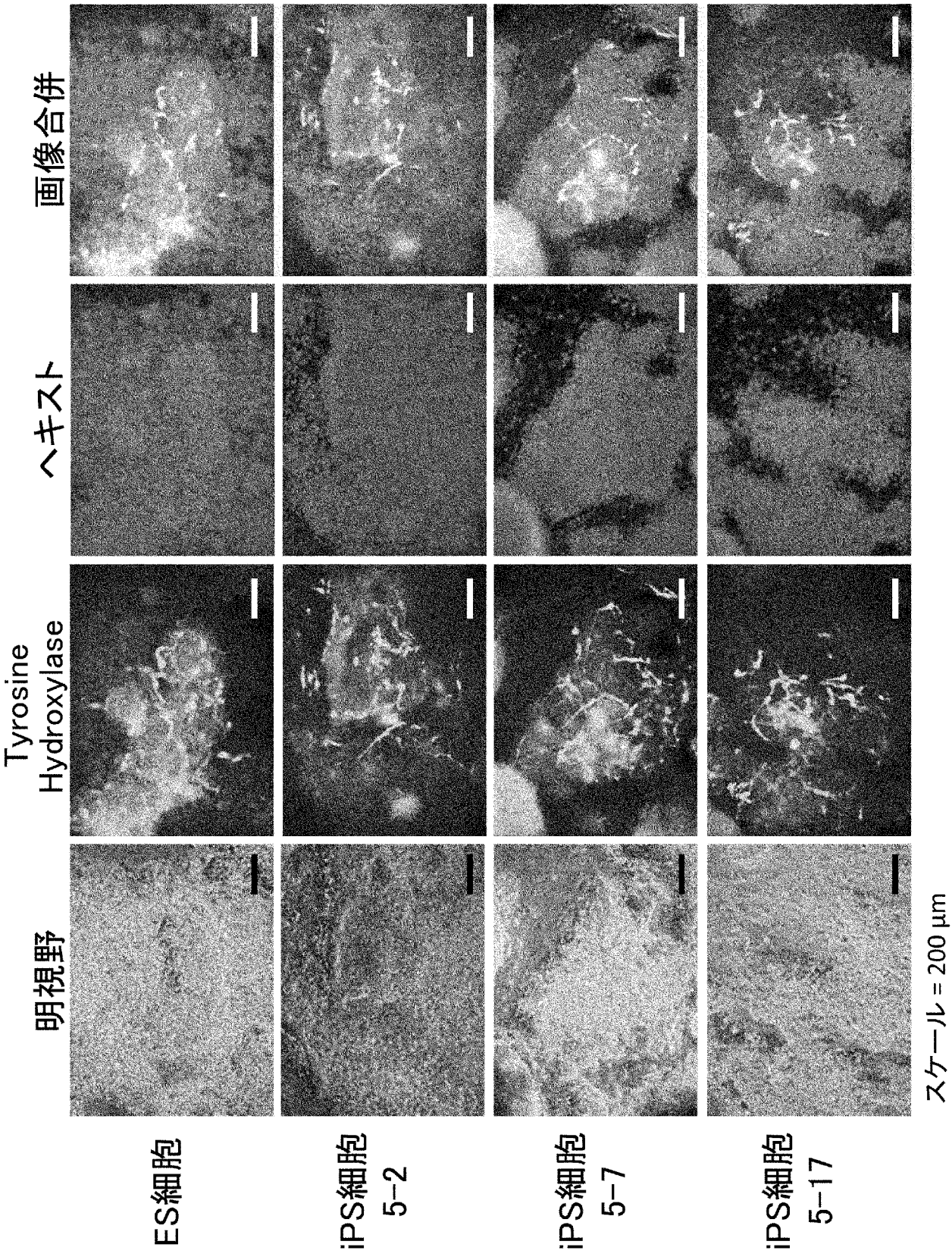
[図16]


明視野
α-Actinin
ヘキスト
画像合併
ES細胞
iPS細胞 5-2
iPS細胞 5-7
iPS細胞 5-17
スケール = 100 μm

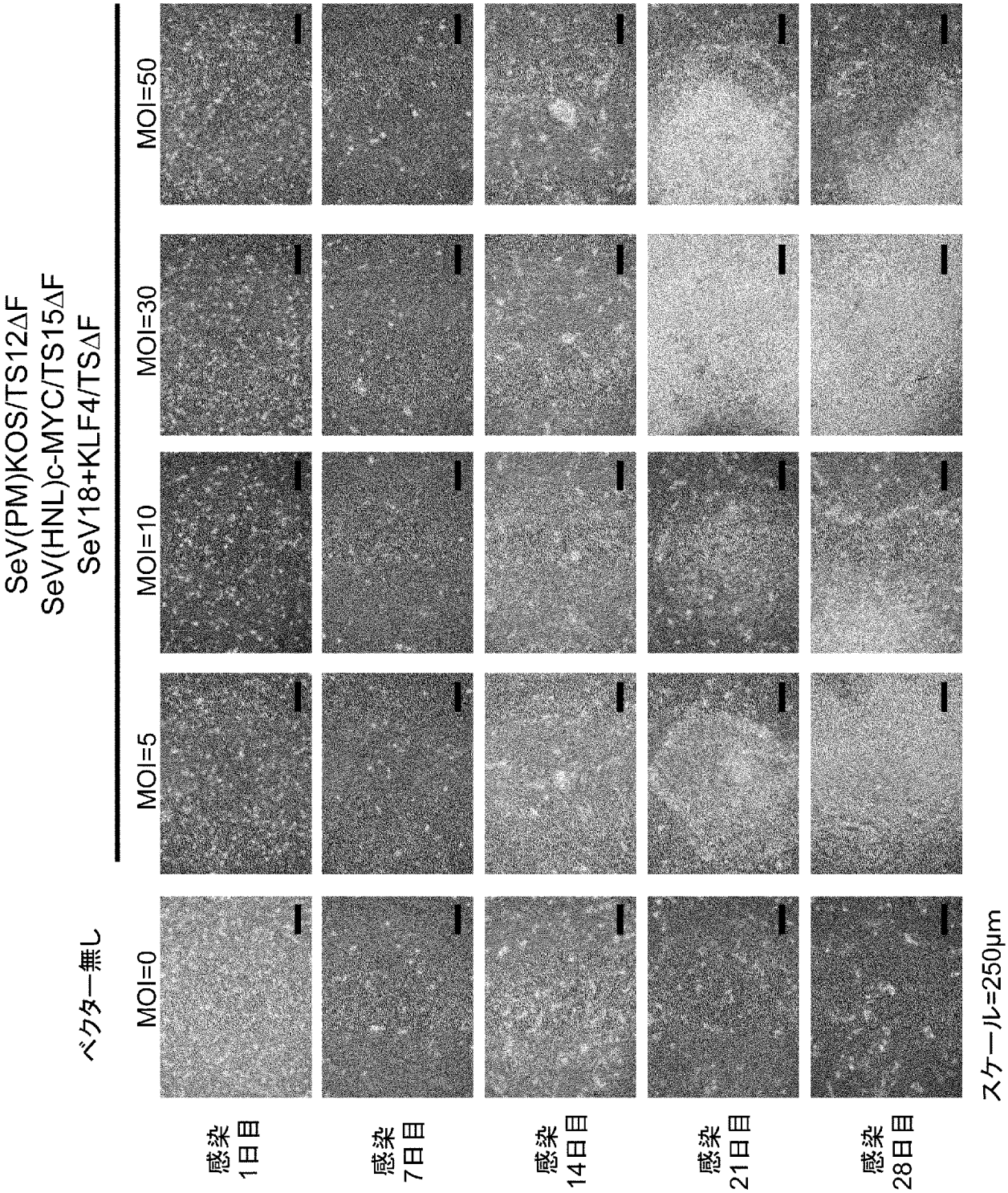
[図17]


明視野
β3-Tubulin
ヘキスト
画像合併
ES細胞
iPS細胞 5-2
iPS細胞 5-7
iPS細胞 5-17
スケール = 200 μm

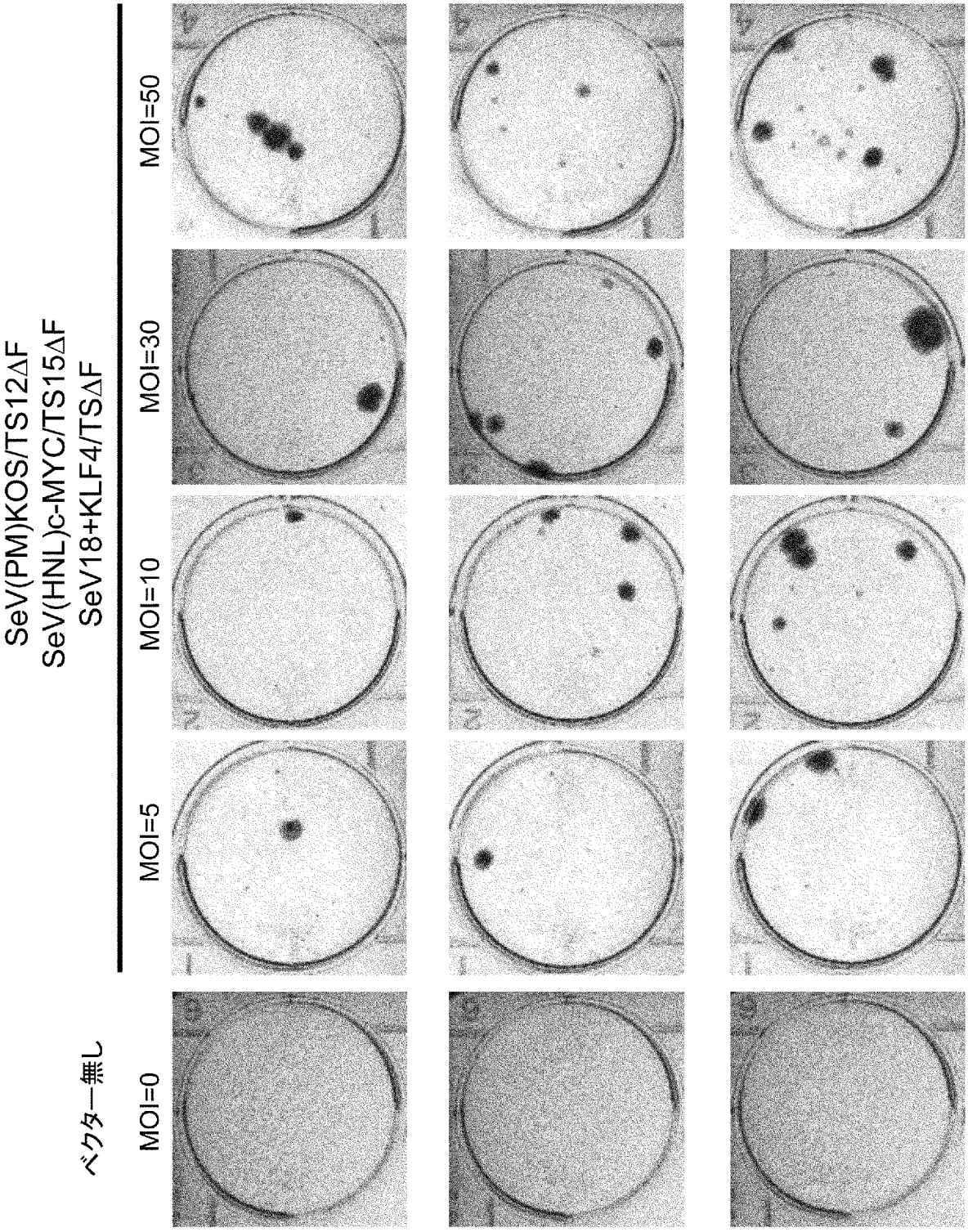
[図18]


明視野
Tyrosine Hydroxylase
ヘキスト
画像合併
ES細胞
iPS細胞 5-2
iPS細胞 5-7
iPS細胞 5-17
スケール = 200 μm

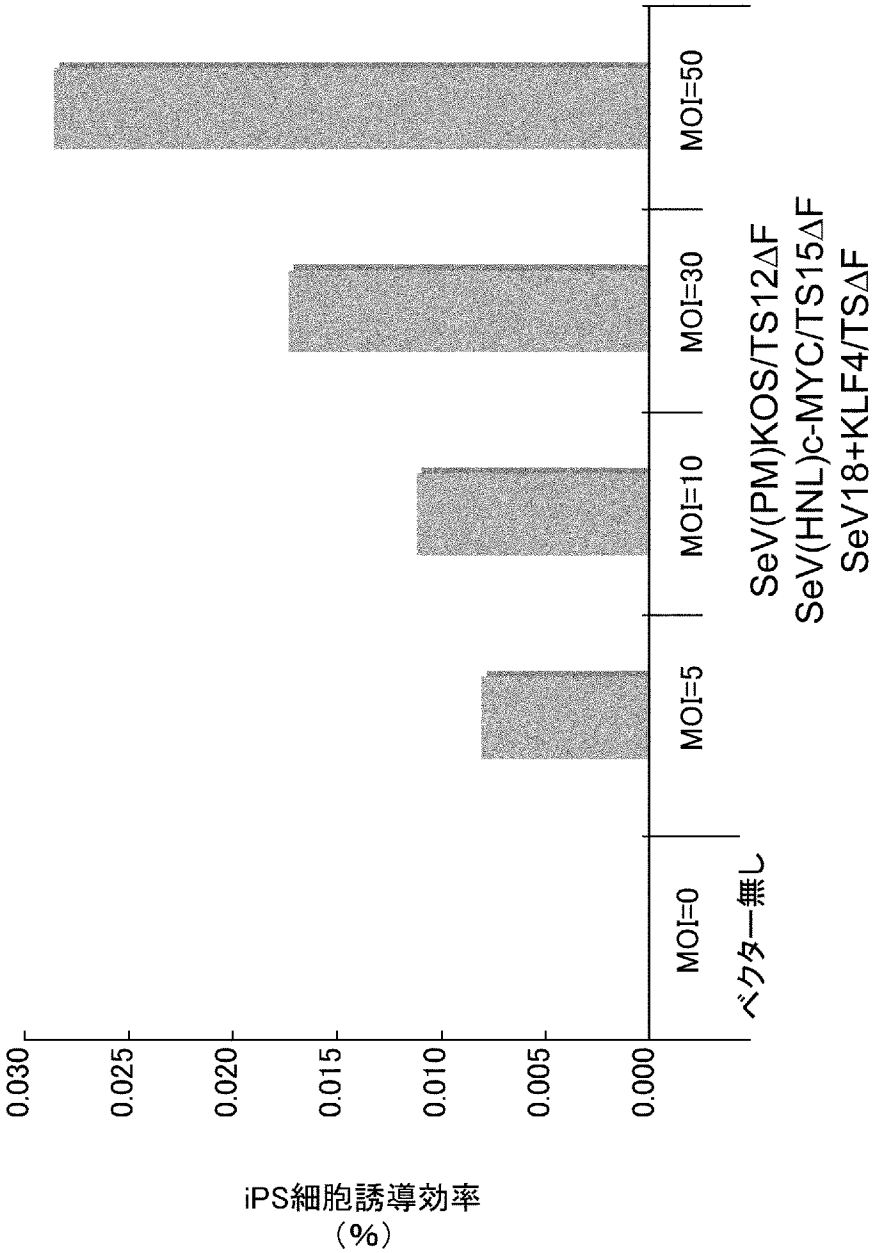
[図19]


SeV(PM)KOS/TS12ΔF
SeV(HNL)c-MYC/TS15ΔF
SeV18+KLF4/TSΔF
ベクター無し
MOI=0
MOI=5
MOI=10
MOI=30
MOI=50
感染
1日目
感染
7日目
感染
14日目
感染
21日目
感染
28日目
スケール=250μm

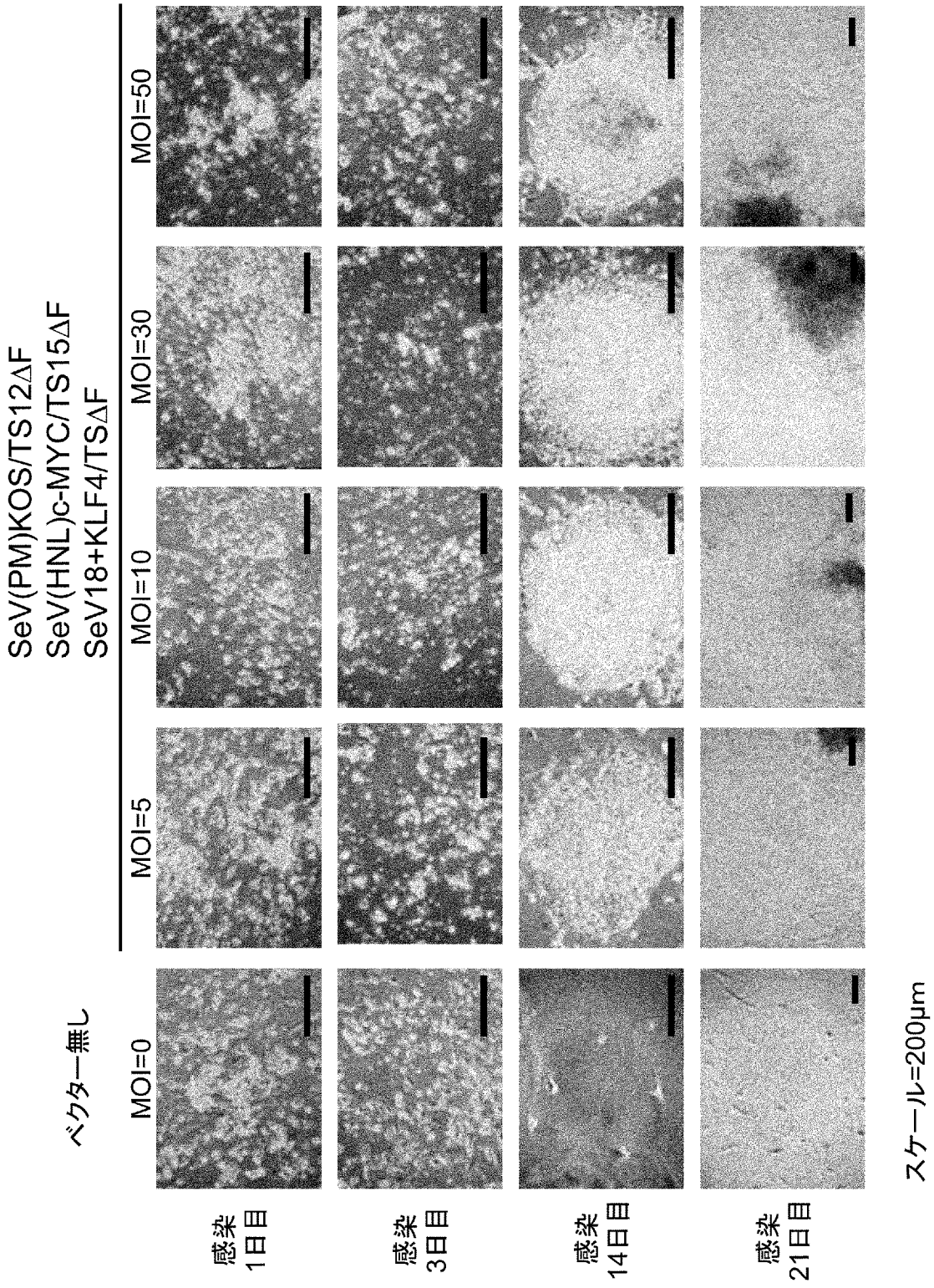
[図20]


SeV(PM)KOS/TS12ΔF
SeV(HNL)c-MYC/TS15ΔF
SeV18+KLF4/TSΔF
ベクター無し
MOI=0
MOI=5
MOI=10
MOI=30
MOI=50

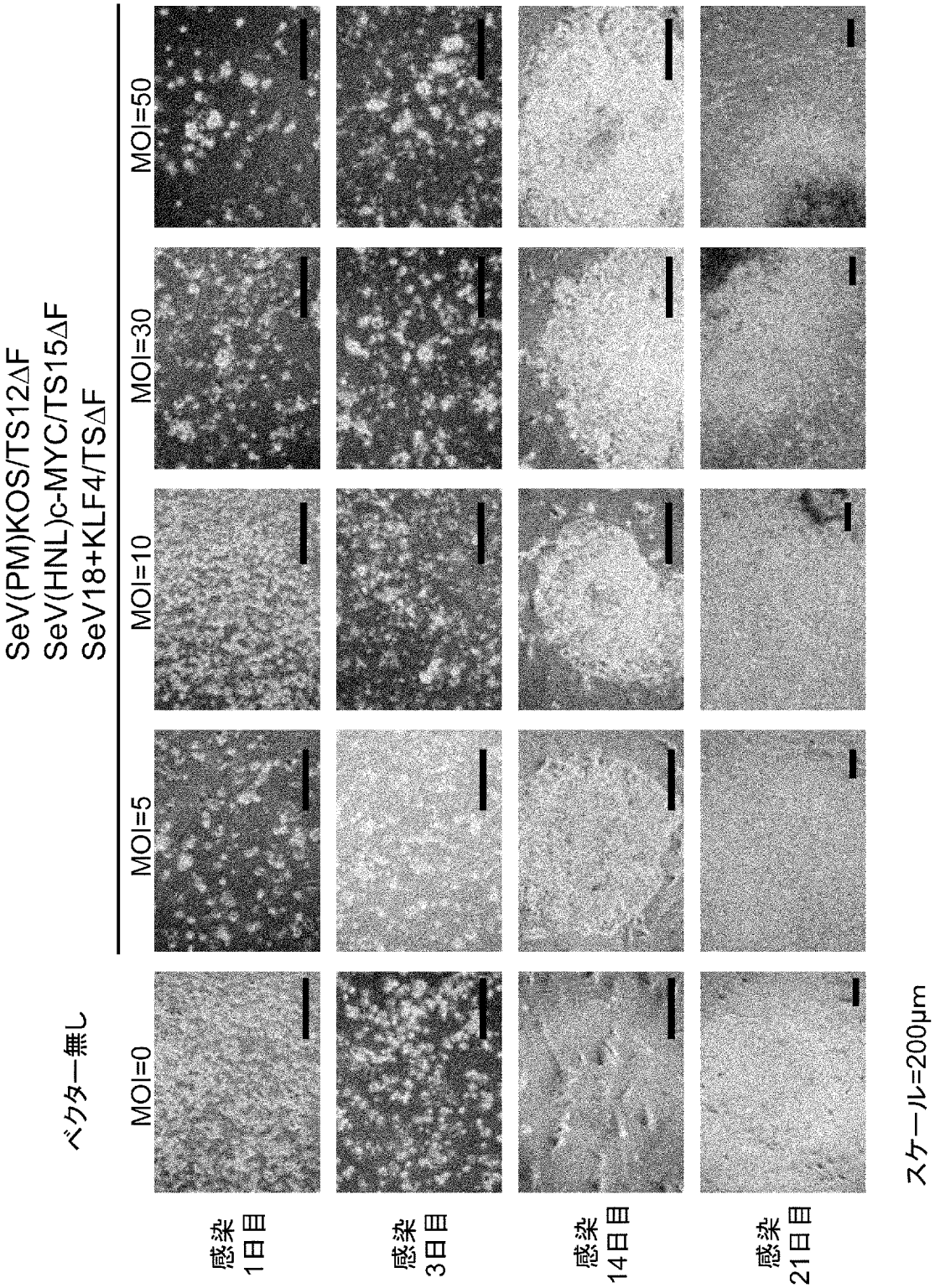
[図21]


0.030
0.025
0.020
0.015
0.010
0.005
0.000
iPS細胞誘導効率
（%）
MOI=0
ベクター無し
MOI=5
MOI=10
MOI=30
MOI=50
SeV(PM)KOS/TS12ΔF
SeV(HNL)c-MYC/TS15ΔF
SeV18+KLF4/TSΔF

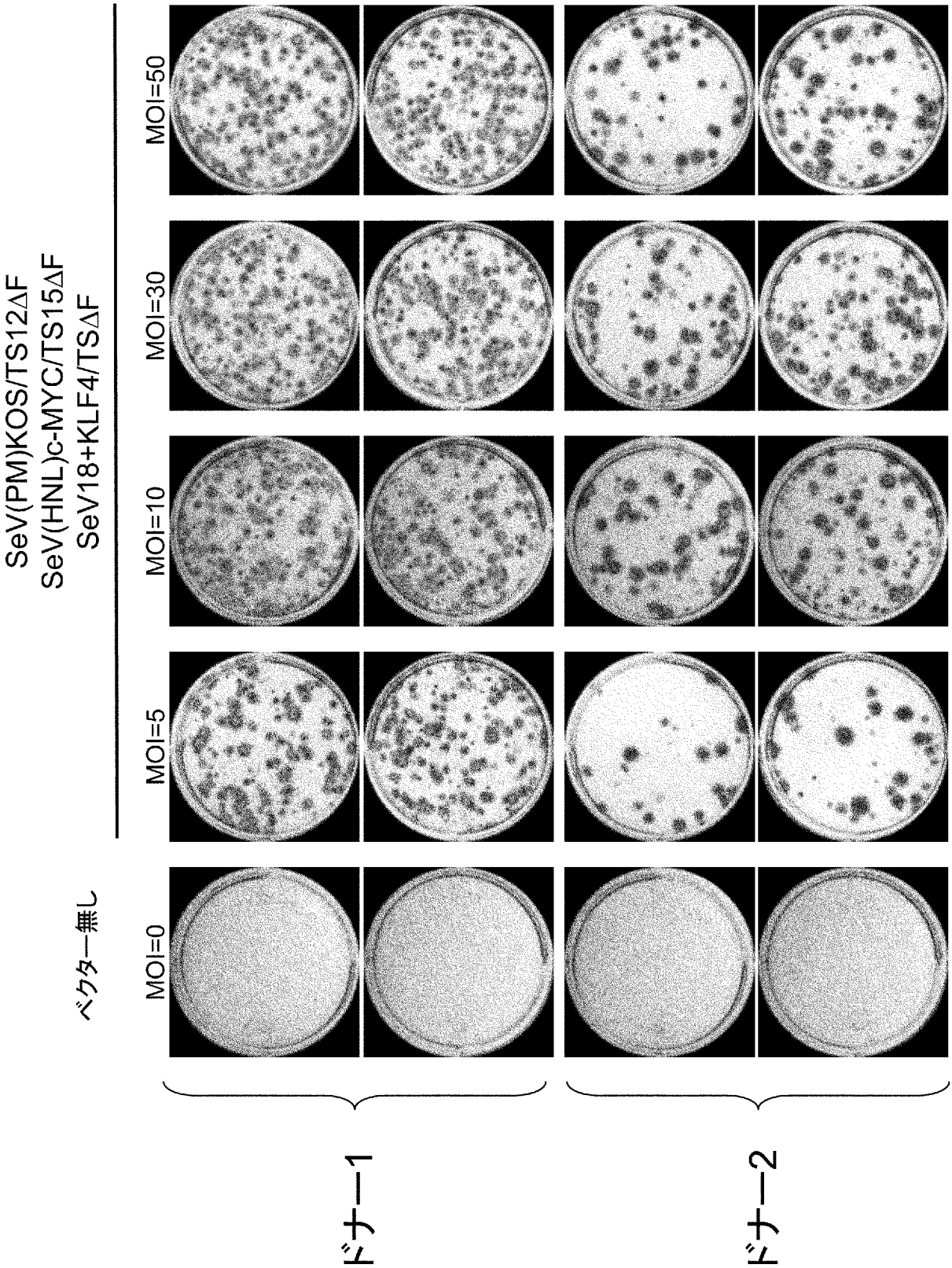
[図22]


ベクター無し
SeV(PM)KOS/TS12ΔF
SeV(HNL)c-MYC/TS15ΔF
SeV18+KLF4/TSΔF
MOI=0
MOI=5
MOI=10
MOI=30
MOI=50
感染
1日目
感染
3日目
感染
14日目
感染
21日目
スケール=200μm

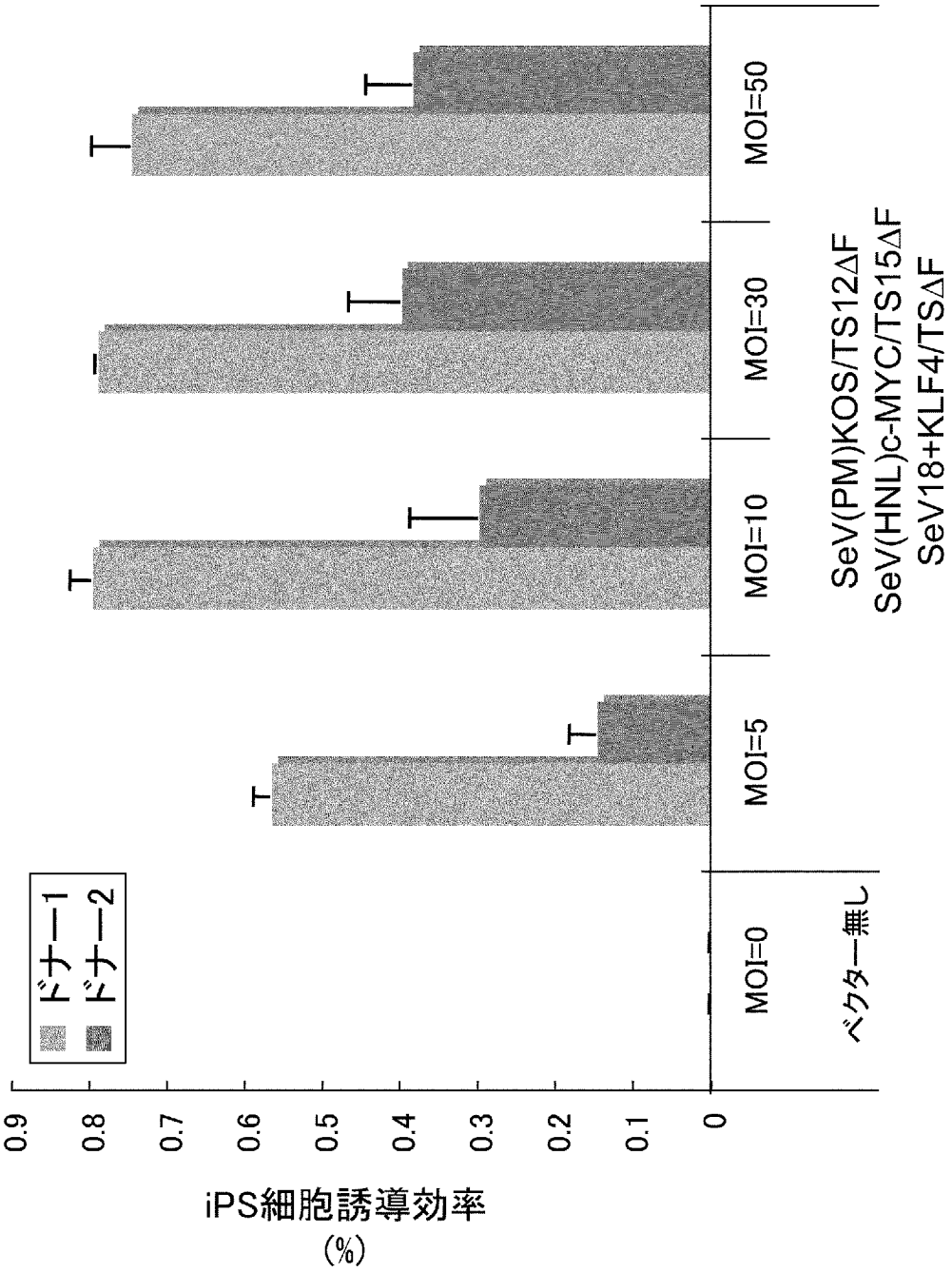
[図23]


ベクター無し
SeV(PM)KOS/TS12ΔF
SeV(HNL)c-MYC/TS15ΔF
SeV18+KLF4/TSΔF
MOI=0
MOI=5
MOI=10
MOI=30
MOI=50
感染
1日目
感染
3日目
感染
14日目
感染
21日目
スケール=200μm

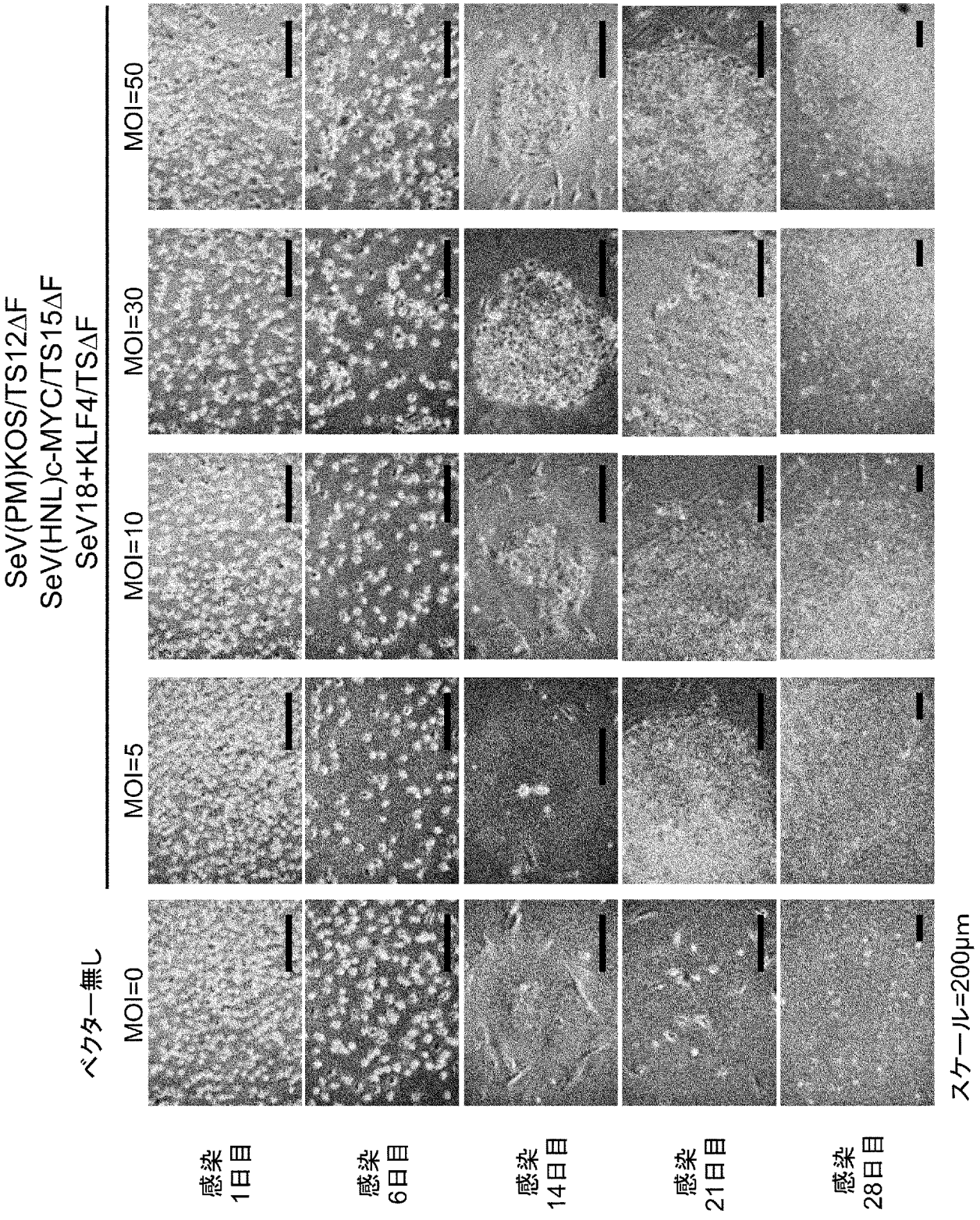
[図24]


SeV(PM)KOS/TS12ΔF
SeV(HNL)c-MYC/TS15ΔF
SeV18+KLF4/TSΔF
ベクター無し
MOI=0
MOI=5
MOI=10
MOI=30
MOI=50
ドナー1
ドナー2

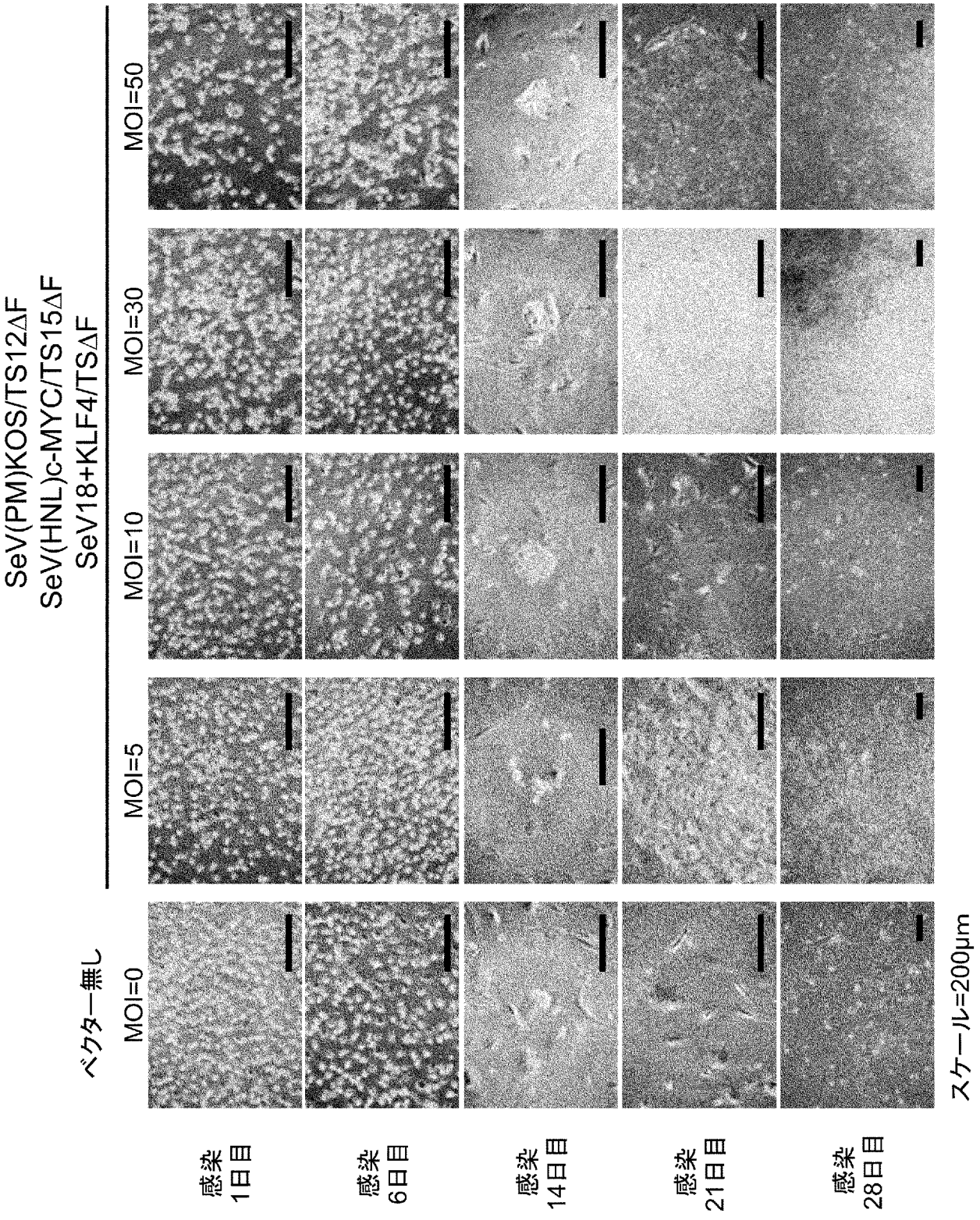
[図25]


ドナー1
ドナー2
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
iPS細胞誘導効率
(%)
MOI=0
MOI=5
MOI=10
MOI=30
MOI=50
ベクター無し
SeV(PM)KOS/TS12ΔF
SeV(HNL)c-MYC/TS15ΔF
SeV18+KLF4/TSΔF

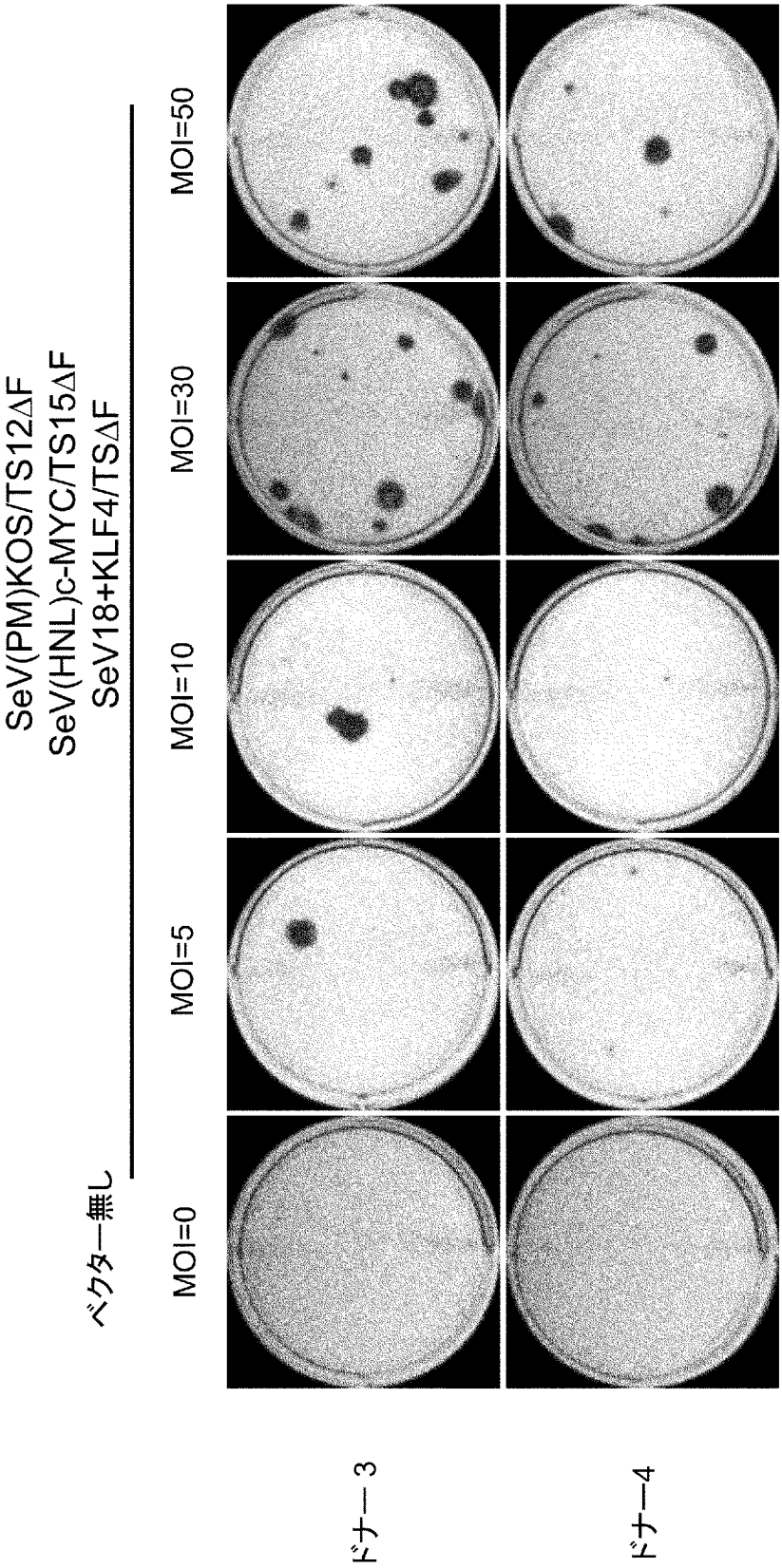
[図26]


SeV(PM)KOS/TS12ΔF
SeV(HNL)c-MYC/TS15ΔF
SeV18+KLF4/TSΔF
ベクター無し
MOI=0
MOI=5
MOI=10
MOI=30
MOI=50
感染 1日目
感染 6日目
感染 14日目
感染 21日目
感染 28日目
スケール=200μm

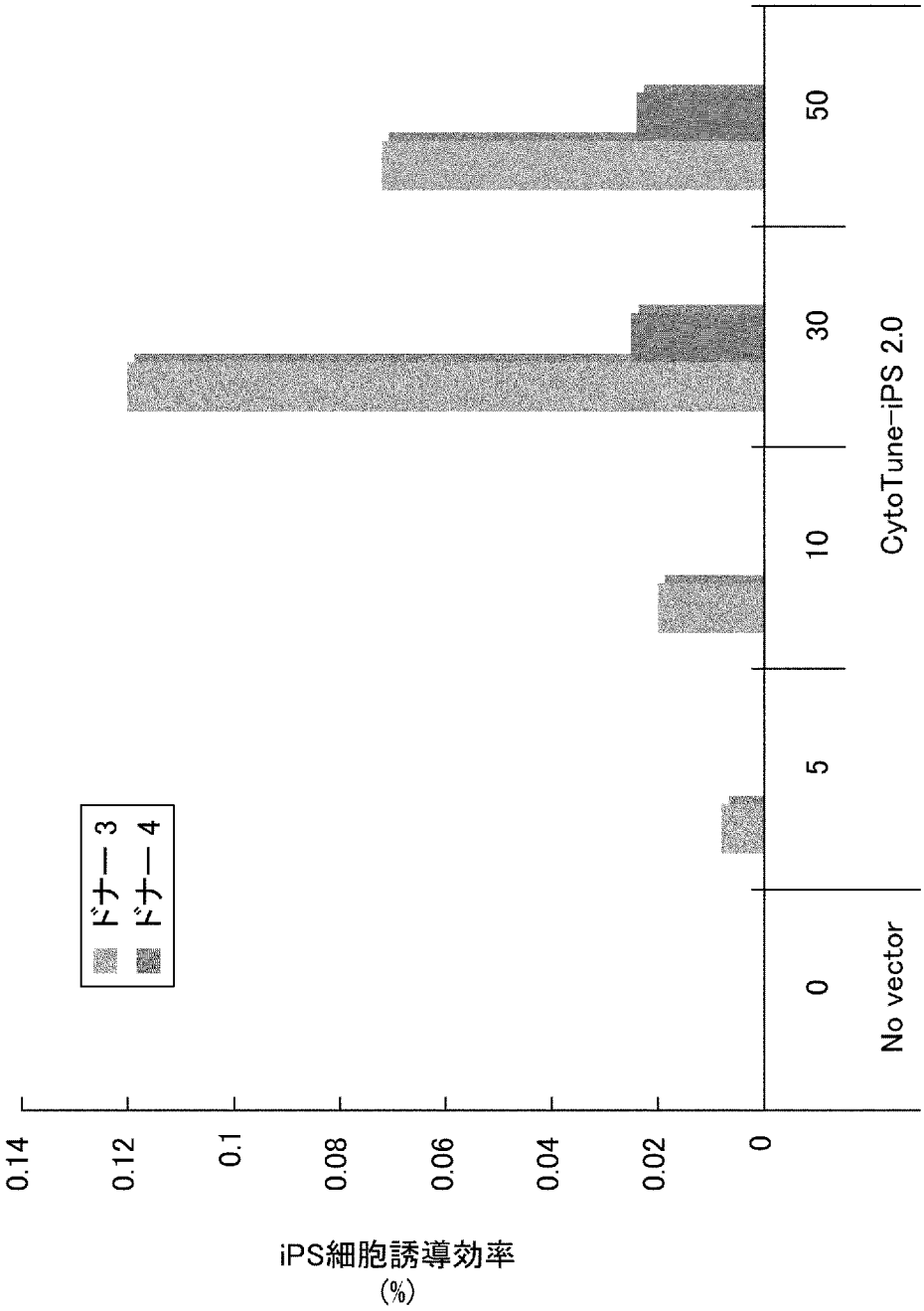
[図27]


SeV(PM)KOS/TS12ΔF
SeV(HNL)c-MYC/TS15ΔF
SeV18+KLF4/TSΔF
ベクター無し
MOI=0
MOI=5
MOI=10
MOI=30
MOI=50
感染 1日目
感染 6日目
感染 14日目
感染 21日目
感染 28日目
スケール=200μm

[図28]


ベクター無し
SeV(PM)KOS/TS12ΔF
SeV(HNL)c-MYC/TS15ΔF
SeV18+KLF4/TSΔF
MOI=0
MOI=5
MOI=10
MOI=30
MOI=50
ドナー3
ドナー4

[図29]


ドナー3
ドナー4
0.14
0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
iPS細胞誘導効率
(%)
No vector
0
5
10
30
50
CytoTune-iPS 2.0

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/075248

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/10(2006.01)i, *C12N15/09*(2006.01)n

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)
C12N5/10, C12N15/09

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)
CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2012/029770 A1 (Dnavec Corp.), 08 March 2012 (08.03.2012), claims; paragraphs [0025], [0032] to [0033], [0049]; example 14; fig. 7 & US 2013/0210150 A1 & EP 2612911 A1	1-20
A	WO 2010/008054 A1 (Dnavec Corp.), 21 January 2010 (21.01.2010), & US 2011/0287538 A1 & EP 2322611 A1	1-20
A	BAN, H. et al., Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors, PNAS, 2011, Vol.108, No.34, pp.14234-14239	1-20

☒ 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
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 December, 2014 (15.12.14)	22 December, 2014 (22.12.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/075248

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-519371 A (Kyoto University), 30 May 2013 (30.05.2013), & US 2013/0029423 A1 & EP 2536828 A1 & WO 2011/102531 A1	1-20
P,X	Jitsutaro KAWAGUCHI et al., "Yori Shinpo shita Taisaibo Reprogramming-ho: Sendai Virus Vector (CytoTune-iPS) ni yoru Shinpo", The Cell, 2014.05, vol.46, no.5, pages 29 to 30	1-20

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／０７５２４８

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/10, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamⅢ)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	WO 2012/029770 A1（ディナベック株式会社）2012.03.08, 特許請求の範囲、【００２５】、【００３２】－【００３３】、【００４９】、実施例１４、図７ & US 2013/0210150 A1 & EP 2612911 A1	１－２０
A	WO 2010/008054 A1（ディナベック株式会社）2010.01.21, & US 2011/0287538 A1 & EP 2322611 A1	１－２０

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１５．１２．２０１４	２２．１２．２０１４

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　４４３４
藤井　美穂
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Ａ	BAN, H. et al., Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors, PNAS, 2011, Vol.108, No.34, pp.14234-14239	１－２０
Ａ	JP 2013-519371 A (国立大学法人京都大学) 2013.05.30, & US 2013/0029423 A1 & EP 2536828 A1 & WO 2011/102531 A1	１－２０
Ｐ，Ｘ	川口実太郎　他，より進歩した体細胞リプログラミング法：センダイウイルスベクター（CytoTune-iPS）による進歩， 細胞，2014.05，Vol.46，No.5，pp.29-30	１－２０