

(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
2011年6月9日(09.06.2011)

PCT

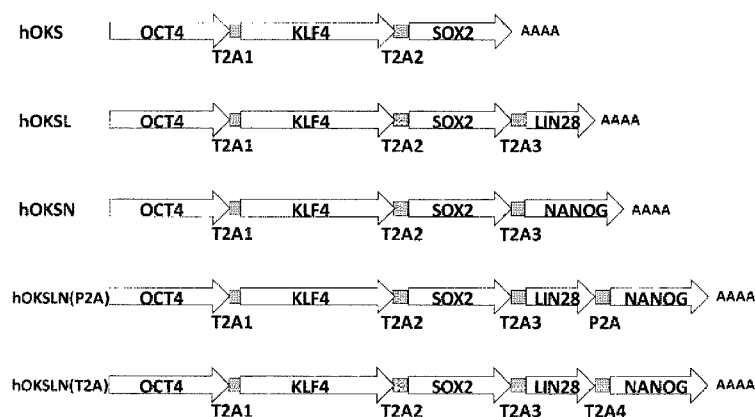
(10) 国際公開番号
WO 2011/068159 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/071585
- (22) 国際出願日: 2010年12月2日(02.12.2010)
- (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 2009-275032 2009年12月3日(03.12.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): タカラバイオ株式会社(TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 Shiga (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 榎 竜嗣 (ENOKI, Tatsuji) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP). 岩本 章子 (IWAMOTO, Fumiko) [JP/JP]; 〒5202193 滋賀県大津市瀬田三丁目4番1号 タカラバイオ株式会社内 Shiga (JP).
- (74) 代理人: 田中 光雄, 外(TANAKA, Mitsuo et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号IMPビル青山特許事務所 Osaka (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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 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: NUCLEIC ACID FOR PRODUCTION OF PLURIPOTENT STEM CELL

(54) 発明の名称: 多能性幹細胞の製造のための核酸

[図1]



(57) Abstract: A nucleic acid which contains coding regions of genes that respectively encode four nuclear reprogramming factors OCT4, KLF4, SOX2 and LIN28 and that are linked to one another through sequences encoding self-cleaving peptides, and which does not contain any encoding region of a MYC family gene; a vector carrying the nucleic acid; a cell containing the nucleic acid or the vector; and a method for producing a pluripotent stem cell, which is characterized by comprising a step of introducing the nucleic acid or the vector into a somatic cell.

(57) 要約: 本発明により、自己切断ペプチドをコードする配列を介して相互に接続されたOCT4、KLF4、SOX2及びLIN28の4種の核初期化因子をコードする遺伝子の各コード領域を含み、かつMYCファミリー遺伝子のコード領域を含まない核酸、当該核酸を含むベクター、当該核酸又はベクターを含む細胞、ならびに体細胞に前記核酸又は前記ベクターを導入する工程を包含することを特徴とする多能性幹細胞の製造方法が提供される。

明 細 書

発明の名称：多能性幹細胞の製造のための核酸

技術分野

[0001] 本発明は、種々の細胞への分化能力を保持した多能性幹細胞（*pluripotent stem cell*）を製造するための核酸、及び当該核酸を使用する多能性幹細胞の製造方法に関する。

なお、本願は、２００９年１２月３日出願の日本国特許出願第２００９－２７５０３２号に対して優先権を主張するものであり、日本国特許出願第２００９－２７５０３２号の全内容を本願に組み込むものである。

背景技術

[0002] 生物体のすべての細胞系列に分化可能な多能性幹細胞は、任意のタイプの細胞に分化し、また、任意のタイプの組織、器官等を生み出す潜在的能力を有している。そのため、当該細胞を使用して、生物体において失われた細胞を再生し補うという新しい治療法（再生医療）に応用することが期待されている。更に、発生学、分子生物学、薬学分野における研究ツールとしても利用可能性を有している。

[0003] 多能性幹細胞として、胚盤胞と呼ばれる段階の初期胚の内部細胞塊から樹立される細胞株である胚性幹細胞（*embryonic stem cell*：ＥＳ細胞）が知られている。しかしながら、ヒト胚を破壊して作製されるヒトＥＳ細胞は、倫理的観点からの反対も多く、その研究が制限されるケースも少なくない。

[0004] これらＥＳ細胞の問題点を解消するため、胚を使用することなく体細胞に人為的に遺伝子を導入して誘導される細胞株である多能性幹細胞（誘導多能性幹細胞：*induced pluripotent stem cell*：ｉＰＳ細胞：例えば非特許文献１）が開発された。当該細胞は、細胞の全能性の獲得又は維持に関与する遺伝子を人為的に体細胞に導入することにより作製される。現在、その作製手法及び利用方法に関して、盛んに研究が進

められている。

- [0005] 前記の非特許文献1には、OCT4、SOX2、c-MYC及びKLF4の4種のポリペプチドをそれぞれコードする遺伝子を導入し、これらポリペプチドを細胞内で個別に発現させることによってヒトiPS細胞を作製する方法が開示されている。また、他の研究者からは、OCT4、SOX2、NANOG及びLIN28の4種のポリペプチドをコードする遺伝子を用いた同様の操作によって、ヒトiPS細胞を作製したとの報告がなされている（非特許文献2）。しかし、これらの遺伝子を導入されたすべての体細胞がiPS細胞に誘導されることはなく、実際にはその一部のみ（総細胞数の0.02%以下）がiPS細胞へと誘導されるに過ぎない。この効率を向上させるため、DNAのメチル化を阻害する薬剤を培地に添加することが試みられている（非特許文献3）。また、c-MYCはがん遺伝子であり、医療への応用を行う際には、導入された細胞のがん化のリスクが不可避である。そのため、c-MYCを除いてiPS細胞を誘導する試みがなされているが、その場合、誘導効率はさらに低下する（総細胞数の0.001%以下）。このように、iPS細胞作製技術は未だ確立したとはいえない状況にある。

先行技術文献

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：セル（Cell）、第131巻、861－872頁、2007年
非特許文献2：サイエンス（Science）、第318巻、1917－1920頁、2007年
非特許文献3：ネイチャー（Nature）、doi：10.1038/nature07056、2008年

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 多能性幹細胞の利用を図るためには、当該細胞を効率よく製造する手法の

開発が急務である。本発明の目的は、多能性幹細胞を効率よく製造するための方法を提供し、当該細胞の研究ならびに利用を促進することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力した結果、多くの核初期化因子の候補の中から、ES細胞様の細胞、すなわち多能性を保持した幹細胞を高頻度でかつ安全に誘導し、多能性幹細胞を高効率で安定して製造できる核初期化因子の組合せを見出し、本発明を完成させた。

[0009] すなわち本発明を概説すれば、

[1] 自己切断ペプチドをコードする配列を介して相互に接続されたOCT4、KLF4、SOX2及びLIN28の4種の核初期化因子をコードする遺伝子の各コード領域を含み、かつMYCファミリー遺伝子のコード領域を含まない核酸、

[2] 5'末端より順に、OCT4、KLF4、SOX2及びLIN28遺伝子の各コード領域を含む、[1]記載の核酸、

[3] 自己切断ペプチドをコードする配列を介して接続されたNANOG遺伝子のコード領域をさらに含む、[1]記載の核酸、

[4] 5'末端より順に、OCT4、KLF4、SOX2、LIN28及びNANOG遺伝子の各コード領域を含む、[3]記載の核酸、

[5] 自己切断ペプチドが、Thomasa signa virus由来2Aペプチド及びporcine teschovirus由来2Aペプチドからなる群より選択される、[1]～[4]のいずれかに記載の核酸、

[6] [1]～[5]のいずれかに記載の核酸を含むベクター、

[7] [1]～[5]のいずれかに記載の核酸又は[6]記載のベクターを含む細胞、

[8] [1]～[5]のいずれかに記載の核酸又は[6]記載のベクターを体細胞に導入する工程を包含することを特徴とする、多能性幹細胞の製造方法、ならびに

[9] 核酸又はベクターを導入する工程がフィブロネクチン又はフィブロネ

クチンフラグメントの存在下で実施される、[8]記載の方法、に関する。

発明の効果

[0010] 本発明の核酸を使用することにより、多能性幹細胞を効率よく製造することが可能であり、当該多能性幹細胞は所望の細胞への分化能を有しており、基礎研究、医療への応用研究において極めて有用である。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1は、実施例において作製した核酸の構造を示す図である。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明について詳細に説明する。

[0013] 本明細書において「核初期化因子」とは、ES細胞などで発現している分化、発生、増殖などに関係する因子のうち、核の初期化（リプログラミング）に関与する因子を意味する。核初期化因子となる候補は、多数報告されている。例えば、セル（Cell）、第126巻、663-676頁、2006年には、24種の核初期化因子の候補が記載されている。非特許文献2には、14種の核初期化因子の候補が記載されている。

[0014] 本明細書において「自己切断ペプチド」とは、ペプチド配列自体の中の2つのアミノ酸残基の間に生じる切断活性を伴うペプチド配列を意味する。例えば、2Aペプチド又は2A様ペプチドでは、切断はこれらのペプチド上のグリシン残基とプロリン残基との間で生じる。これは、翻訳の間に、グリシン残基とプロリン残基との間の正常なペプチド結合の形成が行われない「リボソームスキップ機構」によって生じ、下流の翻訳には影響することはない。かかるリボソームスキップ機構は当該分野において知られており、そして1分子のメッセンジャーRNA（mRNA）によりコードされる複数のタンパク質の発現のために使用される。

[0015] 本明細書において「コード領域」とは、mRNA分子の翻訳の結果生じるポリペプチドに見られるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列をいう。

[0016] 本明細書において「体細胞」とは、生物を構成する細胞のうち、生殖細胞以外の細胞のことを示す。これら体細胞では、核初期化因子を接触させることにより、リプログラミングが起こり、多能性を獲得する。

[0017] (1) 本発明の核酸及びベクター

本発明の核酸は、OCT4、KLF4、SOX2及びLIN28の4種の核初期化因子をコードする遺伝子の各コード領域を含むが、MYCファミリー遺伝子のコード領域を含まず、かつ、それぞれの遺伝子のコード領域の間に自己切断ペプチドをコードする配列を含む核酸である。前記4種の核初期化因子をコードする遺伝子の各コード領域の順は、多能性幹細胞を誘導し得る限りにおいて特に限定はないが、例えば、核酸の5'末端から順に、OCT4、KLF4、SOX2及びLIN28遺伝子の各コード領域を含む核酸が好ましい。

[0018] 本発明の1つの態様として、本発明の核酸はNANOG遺伝子のコード領域をさらに含み得る。すなわち、OCT4、KLF4、SOX2、LIN28及びNANOGの5種の核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域を含み、かつそれぞれの核初期化因子のコード領域の間に自己切断ペプチドのコード領域を含む核酸も、本発明に含まれる。前記5種の核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域の順も、多能性幹細胞を誘導し得る限りにおいて特に限定はないが、例えば、核酸の5'末端から順に、OCT4、KLF4、SOX2、LIN28及びNANOG遺伝子の各コード領域を含む核酸が好ましい。

[0019] 本発明の核酸は、体細胞内で1つのmRNAとして転写される。転写されたmRNAから翻訳されたポリペプチドは、自己切断ペプチド内において切断される。例えば、自己切断ペプチドが2Aペプチドである場合、本発明の核酸から転写されたmRNAが翻訳される時に、リボソームは2Aペプチド内において特定の1カ所のペプチド結合を連結せず、2Aペプチド配列の5'末端側にコードされるポリペプチドと3'末端側にコードされるポリペプチドとを別のポリペプチドとして翻訳する。結果、本発明の核酸にコードさ

れる核初期化因子は、別々のポリペプチドとして生じる。

したがって、本発明の核酸がコードする複数の核初期化因子は、1種も欠けることなく、すべてがほぼ同じ分子数（等量）で発現する。

[0020] 本発明の核酸に使用される核初期化因子をコードする遺伝子の各コード領域は、NCBI（米国国立バイオテクノロジー情報センター）の登録情報からその塩基配列を入手することができる。当業者であれば、登録情報に含まれる塩基配列に基づき、核初期化因子の成熟タンパク質又はプレプロタンパク質のN末端からC末端までをコードする塩基配列を入手することができる。次に、前記塩基配列に基づいてプライマーを設計し、ヒトcDNAライブラリーを鋳型としてPCRなどにより核初期化因子をコードするDNAフラグメントを調製することができる。

[0021] 本発明の核酸に使用される核初期化因子をコードする遺伝子のコード領域には、野生型遺伝子のコード領域が使用できる。更に、前記核初期化因子には複数の変異型（バリエーション）の存在が報告されており、これらの変異型遺伝子のコード領域も本発明に使用できる。野生型遺伝子のコード領域の塩基配列に人為的に1個又は数個、好ましくは1～9個、より好ましくは1～6個の塩基が置換、欠失、付加又は挿入された塩基配列であって、野生型がコードする核初期化因子と同様の機能を有するポリペプチドをコードする塩基配列も使用できる。

[0022] OCT4は、POUファミリーに属する転写因子で、多能性の維持又は未分化マーカーとして報告されている。本発明の核酸に含まれるOCT4遺伝子のコード領域は、RefSeq Acc. No. NM_002701.4に示される。例えば、OCT4遺伝子のコード領域は、配列番号8の塩基番号1～1081に示される塩基配列である。

また、マウスOCT4遺伝子のコード領域には、mRNAの分解、及び翻訳の阻害によって標的遺伝子の発現を抑制するマイクロRNA（miRNA）であるmiR-470の標的配列が存在し、分化した細胞においてこれらの標的遺伝子の発現を抑制している。これらのmiRNA標的配列は、ヒト

OCT4 遺伝子においても保存されていることが報告されている。遺伝子導入後にmiRNAによる発現阻害が起こることを防ぐために、OCT4 遺伝子のコード領域に変異を導入してもよい。例えば、下記実施例の表2に示されるような変異を導入したOCT4 遺伝子のコード領域が使用できる。この変異コード領域は、配列番号8の塩基番号1～1081に示されるOCT4 遺伝子のコード領域のうち、塩基番号393～413（配列番号9の塩基配列）が配列番号10に示される塩基配列に置換されている。

[0023] KLF4は、腫瘍抑制因子又は発癌因子として機能する転写因子である。本発明の核酸に含まれるKLF4 遺伝子のコード領域は、RefSeq Acc. No. NM_004235. 3に示される。例えば、KLF4 遺伝子のコード領域は、配列番号8の塩基番号1147～2556に示される塩基配列である。

[0024] SOX2は、Sox（SRY-related HMG box）遺伝子ファミリーに属し、DNA結合能を持つHMGドメイン及び転写活性化ドメインからなる転写因子である。本発明の核酸に含まれるSOX2 遺伝子のコード領域は、RefSeq Acc. No. NM_003106. 2に示される。例えば、SOX2 遺伝子のコード領域は、配列番号8の塩基番号2623～3573に示される塩基配列である。

また、マウスSOX2 遺伝子のコード領域には、前記OCT4と同様にmiR-134の標的配列が存在する。遺伝子導入後にmiRNAによる発現阻害が起こることを防ぐために、SOX2 遺伝子のコード領域に変異を導入してもよい。例えば、下記実施例の表2に示されるような変異を導入したSOX2 遺伝子のコード領域が使用できる。この変異コード領域は、配列番号8の塩基番号2623～3573に示されるSOX2 遺伝子のコード領域のうち、塩基番号3242～3263の塩基配列（配列番号11の塩基配列）が配列番号12に示される塩基配列に置換されている。

[0025] LIN28は、let-7miRNAプロセッシングを選択的に抑制するRNA結合タンパク質である。本発明の核酸に含まれるLIN28 遺伝子のコ

ード領域は、RefSeq Acc. No. NM_024674. 4に示される。例えば、LIN28遺伝子のコード領域は、配列番号8の塩基番号3640～4266に示される塩基配列である。

[0026] NANOGは、ホメオボックス転写因子である。本発明の核酸に含まれるNANOG遺伝子のコード領域は、RefSeq Acc. No. NM_024865. 2に示される。例えば、NANOG遺伝子のコード領域は、配列番号8の塩基番号4336～5253に示される塩基配列である。

[0027] 本発明の核酸は、MYCファミリー遺伝子を含まないことを特徴とする。がん遺伝子であるMYCファミリー遺伝子を含まないので、本発明の核酸から発現する核初期化因子により、体細胞をより安全にリプログラミングすることができる。MYCファミリー遺伝子は、c-MYC、N-MYC、L-MYCが含まれる [ジャーナル オブ セル サイエンス (J. Cell Sci.)、第119巻、208-216頁、2006年]。例えば、c-MYCのコード領域は、RefSeq Acc. No. NM_002467、N-MYCのコード領域は、RefSeq Acc. No. NM_005378、L-MYCのコード領域は、RefSeq Acc. No. NM_005376に示される。

[0028] 本発明の核酸に使用する自己切断ペプチドは、ウイルスの2A又は2A様配列から得ることが可能である。例えば、口蹄疫ウイルス (FMDV) 由来の2Aペプチド (F2A)、ウマ鼻炎Aウイルス (ERAV) 由来の2Aペプチド (E2A)、porcine teschovirus (PTV-1) 由来の2Aペプチド (P2A) 及びThosea assignavirus (TaV) 由来の2Aペプチド (T2A) から成る群から選択することができる。例えば、配列番号1に示されるアミノ酸配列を有するT2A、配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するP2Aを使用することができる。2Aペプチドは、エキスパート オピニオン オン バイオロジカル セラピー、第5巻、627-638頁、2005年に総説されている。

[0029] 本発明の核酸は複数の「自己切断ペプチドをコードする塩基配列」を含み

得る。これらは、同じアミノ酸配列の自己切断ペプチドをコードするものであってもよく、異なるアミノ酸配列の自己切断ペプチドをコードするものであってもよい。同じアミノ酸配列の自己切断ペプチドコードするものであっても、塩基配列がそれぞれ異なってもよい。更に、本発明の核酸が発現される細胞のコドン使用頻度 (codon frequency) に合わせて、塩基配列を改変させてもよい。例えば、配列番号 2～5 に示される塩基配列を有する T 2 A をコードする配列、配列番号 7 に示される塩基配列を有する P 2 A をコードする配列に改変させてもよい。

[0030] 更に、本発明の核酸は、核初期化因子の発現を確認するためのマーカーとなりうる遺伝子（例えば、薬剤耐性に関する因子をコードする遺伝子、レポーター酵素をコードする遺伝子、蛍光タンパク質をコードする遺伝子等）のコード領域を含みうる。

[0031] 本発明の核酸は、適当なプロモーターの制御下で発現されるように別の核酸と連結して使用することができる。プロモーターとしては、構成的に発現を促進するもの、薬剤等（例えば、テトラサイクリン又はドキシソルビシン）により誘導されるもの等のいずれも用いることができる。また、効率のよい転写を達成するために、プロモーター又は転写開始部位と協同する他の調節要素、例えば、エンハンサー配列又はターミネーター配列を含む核酸を連結してもよい。また、更に本発明の核酸に加えて、当該核酸の発現を確認するためのマーカーとなりうる遺伝子（例えば、薬剤耐性遺伝子、レポーター酵素をコードする遺伝子、蛍光タンパク質をコードする遺伝子等）を組み込んでもよい。

[0032] 本発明の核酸は、体細胞に導入するために、ベクターに挿入して使用することができる。本発明の核酸が挿入されるベクターには特に限定はなく、公知のベクターより適切なものを選択して使用することができる。例えば、ウイルスベクターを使用する方法、又は非ウイルスベクターを使用する方法のいずれもが本発明に使用できる。これらのベクターの詳細についてはすでに多くの文献が公表されており、これら多くの文献より適宜選択して使用すれ

ばよい。

[0033] 上記のウイルスベクターには特に限定はなく、通常、遺伝子導入方法に使用される公知のウイルスベクター、例えば、レトロウイルスベクター（オンコレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、及びシュードタイプベクターを包含する）、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、シミアンウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、センダイウイルスベクター等が使用できる。特に好適には、オンコレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター又はアデノウイルスベクターが使用できる。上記ウイルスベクターとしては、感染した細胞中で自己複製できないように複製能を欠損させたものが好適である。

また、上記の非ウイルスベクターには特に限定はなく、通常、遺伝子導入方法に使用される公知の非ウイルスベクター、例えば、プラスミドベクターが使用できる。

[0034] （２）本発明の多能性幹細胞の製造方法。

本発明の多能性幹細胞の製造方法は、前記（１）に記載する本発明の核酸又はベクターを体細胞に導入する工程を包含することを特徴とする。当該方法は、従来の複数種の核酸又はベクターを同時に体細胞に導入する方法と比べて、多能性幹細胞を高効率で製造することができ、本発明の核酸又はベクターを導入した細胞の約 0.1 ～ 2 % が多能性幹細胞に誘導される。更に、本発明の方法で製造される多能性幹細胞は、導入される核酸又はベクターのコピー数が極めて少なく、導入された核酸又はベクターが染色体に組み込まれる場合、その安全性は飛躍的に向上する。また、本発明の方法によれば、少ない核酸量又は少ないベクター量で多能性幹細胞を含有する細胞集団の製造でき、極めて有用である。

[0035] 本発明の方法に使用される体細胞に特に限定はなく、任意の体細胞を使用することができる。例えば、線維芽細胞、前駆脂肪細胞、肝細胞、血球細胞、皮膚角化細胞、間葉系幹細胞、造血幹細胞、神経幹細胞等の体細胞を使用することができる。前記の体細胞は生体より採取されたもの、又は細胞株と

して樹立されたもののどちらでもよい。作製された多能性幹細胞もしくは当該細胞より分化させた細胞を生体に移植することが望まれる場合には、その生体自身から採取された体細胞から多能性幹細胞を誘導することが好ましい。

[0036] 本発明の方法において、核酸又はベクターを体細胞に導入する工程は、使用する体細胞及びベクターに応じて適宜操作することができる。非ウイルスベクターを使用する場合、リポソーム、リガンドーポリリジンなどの担体を使用して導入する方法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法、パーティクルガン法などで導入することができる。また、ウイルスベクターを使用する場合、核酸又はベクター導入の際に、導入効率を向上させる物質を用いることもできる。導入効率を向上させる物質としては、ウイルスベクターに結合する活性を有する物質、例えば、フィブロネクチン又はフィブロネクチンフラグメントなどの物質が挙げられる。好適には、ヘパリン結合部位を有するフィブロネクチンフラグメント、例えば、レトロネクチン（登録商標、CH-296、タカラバイオ社製）として市販されているフラグメントを用いることができる。更に、本発明を特に限定するものではないが、前記の物質は、レトロウイルスベクター又はレンチウイルスベクターを使用する遺伝子導入に特に好適である。

[0037] 従来、多能性幹細胞の誘導を目的としたレトロウイルスベクターによる遺伝子導入では、レトロウイルスの細胞への感染効率を向上させる作用を有する合成ポリカチオンであるポリブレンが使用されてきた。本発明者らは、ポリブレンを使用せず、レトロウイルスに結合する活性を有する機能性物質の存在下で、レトロウイルスベクターを使用して本発明の核酸又はベクターを体細胞に導入した場合には、ポリブレンを使用した場合と比較して多能性幹細胞の誘導効率が向上する結果、高頻度で多能性幹細胞を取得できることを見出した。すなわち、本発明の1つの態様として、レトロウイルスに結合する活性を有する機能性物質の存在下に本発明の核酸又はベクターを体細胞に導入する工程を包含することを特徴とする、多能性幹細胞の製造方法が提供

される。

[0038] また、レトロウイルスに結合する活性を有する機能性物質としては、当該活性を有する物質であれば特に問題はないが、例えば、フィブロネクチン、線維芽細胞増殖因子、V型コラーゲン、前記のポリペプチドのフラグメント、ポリリジン、DEAE-デキストラン等が挙げられる。更に、前記物質由来のレトロウイルスに結合部位を有する機能性物質を本発明に使用することができる。フィブロネクチンフラグメントとしては分子内にヘパリンーII結合領域を有するものが好適であり、そのようなフラグメントは、例えば国際公開第97/18318号パンフレットにも記載されている。ヘパリンーII結合領域を有する組換えフィブロネクチンフラグメントとしては、レトロネクチン（登録商標、CH-296、タカラバイオ社製）が例示される。また、これらの機能性物質と機能的に同等な物質、例えば、ヘパリン結合性部位を有する機能性物質も使用することができる。また、該機能性物質の混合物、該機能性物質を含有するポリペプチド、該機能性物質の重合体、該機能性物質の誘導体等を使用することができる。

[0039] 更に、レトロウイルスに結合する活性とともに標的細胞、すなわち核酸又はベクターを導入しようとする体細胞への結合活性を有する機能性物質を併用してもよく、レトロウイルスに結合する活性を有する機能性物質及び標的細胞結合活性を有する機能性物質を併用してもよい。標的細胞結合活性を有する機能性物質にも、特に限定はないが、例えば、標的細胞に結合するリガンドを有する物質が挙げられる。該リガンドとしては、細胞接着性のタンパク質（フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン等）もしくはそのフラグメント、ホルモン、サイトカイン、細胞表面の抗原に対する抗体、多糖類、糖タンパク質、糖脂質、糖タンパク質もしくは糖脂質由来の糖鎖、標的細胞の代謝物等が挙げられる。

[0040] 本発明の好適な態様において、前記の機能性物質は適切な固相、例えば、細胞培養に使用される容器（プレート、シャーレ、フラスコもしくはバッグ等）又は担体（マイクロビーズ等）に固定化された状態で使用される。

- [0041] 本発明の核酸又はベクターを体細胞に導入する場合、フィーダー細胞上に培養された体細胞に対して導入を行ってもよいが、フィーダー細胞を使用することなく体細胞に導入を行ってもよい。フィーダー細胞としては、ES細胞の培養に用いられるフィーダー細胞を適宜使用することができるが、例えば、マウス14～15日胚の繊維芽細胞初代培養細胞、繊維芽細胞由来細胞株であるSTO細胞等をマイトマイシンC等の薬剤又は放射線により処理した細胞等を使用することができる。本発明の核酸又はベクターを導入した体細胞の培養はフィーダー細胞上で行うことが好ましいが、フィーダー細胞を使用しないES細胞の培養方法も報告されており、本発明にて使用することができる。
- [0042] 本発明の核酸又はベクターを導入した体細胞を適切な条件下で培養することにより、自律的に核のリプログラミングが進行し、体細胞から多能性幹細胞を製造することができる。当該培養には、ES細胞又はiPS細胞に使用可能な公知の培地を使用することができる。本発明の核酸又はベクターを体細胞に導入した後、体細胞が多能性を獲得して増殖するのに十分な時間にわたり細胞を培養することが好ましい。本発明の核酸又はベクターの導入後の体細胞の培養密度は、例えば、細胞培養用ディッシュあたり $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ cells/mLの細胞密度で培養を継続することが好ましい。
- [0043] 本発明の核酸又はベクターを体細胞に導入する工程を実施してからES細胞用の培地に交換するまで、通常の体細胞を培養するための培地を使用して、例えば、1～12日間、好ましくは2～10日間培養することができる。その後ES細胞用培地に培地を交換して、例えば、5～40日間、好ましくは10～35日間培養してもよい。
- [0044] 本発明の核酸又はベクターを導入した体細胞が多能性を獲得したことは、例えば、未分化細胞に特有のマーカー、例えば、アルカリホスファターゼ（ALP）、SSEA-3、SSEA-4、ABCG-2、E-cadherin等を検出することにより容易に判定することができる。マーカーの種類及び判定手段については、公知文献により具体的かつ詳細に説明されている。

(例えば、セル、第126巻、663-676頁、2006年、セル、第131巻、861-872頁、2007年)。ES細胞特異的発現遺伝子のプロモーター下流にGFP等のマーカー遺伝子を組み込んだDNAを有する体細胞を使用した場合は、当該マーカー遺伝子の発現を指標として多能性幹細胞を特定することが可能である。また、一般的に、多能性の獲得はコロニー形成により判定することもできる。コロニーは通常500~1000 cellsの細胞集団であり、特徴的な外観を呈することが知られているので、多能性幹細胞が増殖して形成したコロニーを容易に特定することができる。

こうして得られた多能性幹細胞のコロニーを単離してクローニングを実施することにより、多能性を有しない細胞が除去された、多能性幹細胞の細胞株を樹立することができる。

実施例

[0045] 以下に実施例をもって本発明を更に具体的に示すが、本発明は以下の実施例の範囲のみに何ら限定されるものではない。

[0046] 調製例1 2Aペプチド連結型iPS細胞誘導プラスミドpDON5-hOKS、pDON5-hOKSL、pDON5-hOKSN、pDON5-hOKSLN(P2A)及びpDON5-hOKSLN(T2A)プラスミドの構築

RefSeq Acc. No. NM_004235.3(KLF4遺伝子)及びNM_003106.2(SOX2遺伝子)の配列情報より、遺伝子増幅用合成プライマーをそれぞれ合成した。HumanBrainPolyA+RNA(クロンテック社製)より合成したcDNAを鋳型とし、各核初期化因子の遺伝子に対応するプライマー対を用いてPrimeSTAR(登録商標) MAX PreMix(タカラバイオ社製)によりPCRを行った。反応終了後、反応液を1.0%アガロースゲル電気泳動に供し、KLF4については約1.5kbp、SOX2については約1kbpのDNAフラグメントを抽出、精製した。また、RefSeq Acc. No. NM_002701.4(OCT4遺伝子)、NM_024674.4(LIN28

遺伝子)、NM_024865.2 (NANOG遺伝子)の配列情報により、OCT4については約1.1 kbp、LIN28については約0.7 kbp、NANOGについては約1 kbpのDNAフラグメントを化学的に合成した。

[0047] Thosea asigna virus及びPorcine teschovirus-1由来の2Aペプチド配列、T2A及びP2Aを、公知文献(ネイチャー バイオテクノロジー (Nature Biotechnology)、第22巻、第5号、589-94頁、2004年)より得た。T2Aのアミノ酸配列を配列番号1に示す。T2Aのアミノ酸配列に対して、ヒトのコドンに最適化した4種類の異なる塩基配列を設計し、それぞれT2A1、T2A2、T2A3及びT2A4と命名した。それぞれの塩基配列を配列番号2、3、4及び5に示す。また、P2Aのアミノ酸配列を配列番号6に、塩基配列を配列番号7に示す。T2A1、T2A2、T2A3、T2A4及びP2Aの塩基配列を有するDNAフラグメントをそれぞれ合成した。

[0048] 前記の核初期化因子のコード領域由来のDNAフラグメント及び2AペプチドをコードするDNAフラグメントを用いて、ベクターへのサブクロニング、PCR、制限酵素消化及びライゲーション反応を繰り返し、核初期化因子のコード領域及び2AペプチドをコードするDNAフラグメントを5'末端から表1に記載される順に含むDNAフラグメントを調製し、レトロウイルスベクターpDON-5 DNA (タカラバイオ社製)に挿入し、それぞれpDON5-hOKS、pDON5-hOKSL、pDON5-hOKSN及びpDON5-hOKSLN (P2A)と命名した。更に、pDON5-hOKSLNのP2AフラグメントをT2A4フラグメントに置換したpDON5-hOKSLN (T2A)を調製した。各挿入DNAフラグメントの構造を図1に示す。pDON5-hOKSLN (T2A)の挿入フラグメントの塩基配列を配列番号8に示す。

[0049]

[表1]

ベクター名	5'末端から順に連結されるDNAフラグメント
pDON5-hOKS	OCT4、T2A1、KLF4、T2A2、SOX2
pDON5-hOKSL	OCT4、T2A1、KLF4、T2A2、SOX2、T2A3、LIN28
pDON5-hOKSN	OCT4、T2A1、KLF4、T2A2、SOX2、T2A3、NANOG
pDON5-hOKSLN(P2A)	OCT4、T2A1、KLF4、T2A2、SOX2、T2A3、LIN28、P2A、NANOG
pDON5-hOKSLN(T2A)	OCT4、T2A1、KLF4、T2A2、SOX2、T2A3、LIN28、T2A4、NANOG

[0050] 調製例2 マイクロRNA回避型iPS細胞誘導プラスミドの構築

マイクロRNA (miRNA) は、メッセンジャーRNAの分解と翻訳の阻害によって標的遺伝子の発現を抑制するRNAである。マウスOCT4遺伝子のコード領域にはmiR-470の、マウスSOX2遺伝子のコード領域にはmiR-134の標的サイトがそれぞれ存在し、分化した細胞においてこれらの標的遺伝子の発現を抑制している。これらのmiRNA標的領域はヒトのOCT4及びSOX2遺伝子においても保存されていることが報告されている（ネイチャー、第455巻、1124-8頁、2008年）。遺伝子導入後にmiRNAによる発現阻害が起こることを防ぐために、OCT4及びSOX2をコードする領域に変異を導入した。変異の導入は、上記のPCR増幅により得られた1.1kbpのOCT4をコードするDNAフラグメント及び約1kbp SOX2をコードするDNAフラグメントを含むプラスミドベクターを鋳型とし、変異配列を有する変異導入プライマーを用いてPCRを行い、PCR産物により大腸菌を形質転換することにより取得した。変異導入後のDNAフラグメントをOCT4mt及びSOX2mtと記載する。OCT4mtでは、OCT4をコードするDNAフラグメント中の配列番号9に示される塩基配列が、配列番号10に示される塩基配列に変異している。また、SOX2mtではSOX2をコードするDNAフラグメント中の配列番号11に示される塩基配列が、配列番号12に示される塩基配列に変異している。なお、OCT4mt及びSOX2mtは、本来のOCT4及びSOX2と同一のアミノ酸配列のポリペプチド配列をコードしている。変異導入前後の塩基配列を表2に示す。表2中、変異を導入した塩基を小文字で示す。

[0051] [表2]

	本来の配列	変異導入後配列
OCT4 (393-413)	AAACCCGGAGGAGTCCCAGGA (配列番号9)	AAACCCGGAGGAaagtCAaGA (配列番号10)
SOX2 (620-641)	ACAACTCCATGACCAGCTCGCA (配列番号11)	ACAACTCCATGACgtcCagtCA (配列番号12)

[0052] OCT4mt及びSOX2mtをコードするDNAフラグメントを使用し、調製例1と同様の方法で、5'末端から表3に記載される順に含むDNAフラグメントを調製し、レトロウイルスベクターpDON5-DNAに挿入し、pDON5-hOKSLmt及びpDON5-hOKSLNmtを構築した。

[0053] [表3]

ベクター名	5'末端から順に連結されるDNAフラグメント
pDON5-hOKSLmt	OCT4mt、T2A1、KLF4、T2A2、SOX2mt、T2A3、LIN28
pDON5-hOKSLN(P2A)mt	OCT4mt、T2A1、KLF4、T2A2、SOX2mt、T2A3、LIN28、P2A、NANOG

[0054] 調製例3 レトロウイルスベクターの調製

(1) レトロウイルスベクターの産生

G3Thi細胞(タカラバイオ社製)を 5×10^5 cells/mLとなるように10F-DMEM[10%牛胎児血清(インビトロジェン社製)及び50U/mLペニシリン/50mg/mLストレプトマイシン(ナカライ社製)含有D-MEM(シグマ社製)]に懸濁し、その4mLを6cmコラーゲンコートディッシュ(イワキ社製)に播種して、37°CのCO₂インキュベーターで24時間培養した。

[0055] 500μLのOPTI-MEM(インビトロジェン社製)に10μLのTransIT(登録商標)-293(タカラバイオ社製)を混合し、室温で5分放置後、2μgのpGPプラスミド(タカラバイオ社製)、1μgのpE-Amp^rプラスミド(タカラバイオ社製)及び2μgの調製例1及び2で調製した各組換えプラスミドをそれぞれ加えて混合し、更に15分間室温で放置した。この混合液を上記のG3Thi細胞に添加して培養を継続し

、24時間後に4mLの10F-DMEM培地に交換した。更に24時間培養を継続した後、ウイルスを含む培地を回収し、0.45 μ mのフィルターでろ過してレトロウイルスベクターを含むウイルス液を調製した。ウイルス液は-80℃で凍結保存し、使用時に室温にて溶解した。

[0056] (2) レトロウイルスベクターの力価測定

得られたレトロウイルスベクターをDNase Iで処理した後、Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) (タカラバイオ社製)を用いて1mL当たりのウイルスRNAコピー数を算出した。

[0057] (3) ウイルス液の混合及び希釈

レトロウイルスは、調製例3-(2)で測定した力価に基づいて、特に記載のない限り 3.55×10^9 コピー/mLとなるよう10F-DMEMにて希釈した。なおコントロールとして、OCT4及びSOX2をEncephalomyocarditis virus由来のIRES (Internal Ribosome Entry Site) を介してポリシストロニックに翻訳させるためのレトロウイルスベクターpDON-5 OCT3/4-SOX2、LIN28及びNANOGをIRESを介してポリシストロニックに翻訳させるためのレトロウイルスベクターpDON-5 LIN28-NANOG、及びKLF4を発現するレトロウイルスベクターpDON-5 KLF4からなるHuman iPS Cell Generation (登録商標) Vector Set (タカラバイオ社製)を用いた。コントロールでは、各ウイルスが 3.55×10^9 コピー/mLとなるよう混合した。表4にベクター名と各ウイルス液の名称を示す。

[0058]

[表4]

ベクター名	ウイルス液
p D O N 5 - h O K S	A
p D O N 5 - h O K S L	B
p D O N 5 - h O K S L m t	B m t
p D O N 5 - h O K S N	C
p D O N 5 - h O K S L N (P 2 A)	D
p D O N 5 - h O K S L N (P 2 A) m t	D m t
p D O N 5 - h O K S L N (T 2 A)	E
p D O N - 5 O C T 3 / 4 - S O X 2 p D O N - 5 L I N 2 8 - N A N O G p D O N - 5 K L F 4	F

[0059] 実施例 1 i P S 細胞の誘導 - 1

(1) レトロネクチンの培養プレートへの固定化

ノントリートメント 12 穴培養プレート（ベクトン・ディッキンソン社製）の各ウェルに $20 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように、リン酸緩衝水溶液（PBS）で希釈したレトロネクチン（タカラバイオ社製）溶液を 1 mL ずつ添加し、 4°C で一晩もしくは室温で 2 時間固定化を行った。その後、各ウェルより溶液を除去し、PBS で 1 回洗浄の後、各実験に供するまで 4°C で保存した。

[0060] (2) レトロウイルスベクターによる遺伝子導入

実施例 1 - (1) で調製したレトロネクチン固定化培養プレートの各ウェルに表 4 に示すウイルス液 B、D、D m t 及び F を 1 mL ずつ添加し、 32°C 、 $2,000 \times g$ で 2 時間遠心した。その後、各ウェルより上清を除去して、1% ブミネート（献血アルブミン、バクスター社製）を含む PBS で 1 回洗浄後、 $4 \times 10^4 \text{ cells}/\text{mL}$ となるように 10 F - DMEM で懸濁したヒト成人皮膚繊維芽細胞（Lonza 社製）を 1 mL ずつ各ウェルに播種し、 37°C の CO_2 インキュベーターで培養を開始した（培養 0 日目）。

[0061] (3) フィーダー細胞上への播種

6 穴培養プレート（コーニング社製）に終濃度 $1 \text{ mg}/\text{mL}$ のゼラチン（シグマ社製）水溶液を各ウェル 1 mL 添加し、 37°C 30 分で固定化した。ここに終濃度 $12 \mu\text{g}/\text{mL}$ のマイトマイシン C（ナカライテスク社製）で

処理したSTO細胞（DSファーマ社製）を、各ウェル2. 5×10^5 cellsずつ播種し、37℃のCO₂インキュベーターで終夜培養することによりフィーダー細胞を調製した。実施例1-（2）で作製した培養6日目の遺伝子導入細胞を回収し10F-DMEM培地に懸濁した。各ウェル20000 Cellsを前記のフィーダー細胞上に播種し、終夜培養した。翌日、培養7日目に上清を除去し、ES細胞用培地〔80% D-MEM/F-12（インビトロジェン社製）、20% KnockOut Serum Replacement（インビトロジェン社製）、4 ng/mL human basic FGF（CALBIOCHEM社製）、1×Non-essential amino acids solution（Lonza社製）、2mM L-Glutamine（Lonza社製）、110 μM 2-メルカプトエタノール（インビトロジェン社製）、50 U/mL ペニシリン/50 mg/mL ストレプトマイシン〕を各ウェル2 mL 添加し、培養28日目まで培養を継続した。この間、2日おきに培地を交換した。

[0062] （4）iPS細胞コロニーの計測

培養28日目にTRACP&ALP double-stain Kit（タカラバイオ社製）によってアルカリホスファターゼ（AP）活性をもつ細胞を染色した。AP活性を示しかつヒトES細胞様の形態を示すiPS細胞コロニー数を計測した。その結果を表5に示す。

[0063] [表5]

条件	iPS細胞コロニー数	
	ウェル1	ウェル2
B	61	61
D	89	94
Dmt	177	171
F	38	48

[0064] 表5に示すように、核初期化因子を2Aペプチドで接続した融合ポリペプチドをコードする遺伝子を保持するベクター（2Aベクター）は、IRESを使用するベクターを混合して用いる従来の条件（IRESベクター）と比

べ約2倍の効率でiPS細胞を誘導した（条件FとDとの比較）。また、m iRNAの標的サイトに変異を導入したウイルスでは、本来の配列をもつウイルスと比べiPS細胞誘導効率が2倍近く上昇した（条件DとD m tとの比較）。

[0065] 実施例2 遠心レトロネクチン法とポリブレン法の比較

レトロウイルスベクターによる遺伝子導入に関して、レトロネクチンあるいはポリブレンを使用する条件で多能性幹細胞の誘導を行い、比較した。

[0066] (1) レトロウイルスベクターによる遺伝子導入1回目

レトロネクチンの培養プレートへの固定化は、実施例1-(1)と同様の方法により行った。レトロネクチンによる遺伝子導入に関しては、表4に示すウイルス液B、D及びFを用いて実施例1-(2)と同様の方法で行った。このとき、2回目の遺伝子導入のためのウイルスコートプレートも同時に調製し、細胞懸濁液の代わりに1%ブミネートを含むPBSを添加し、4℃で保存した。ポリブレンによる遺伝子導入に関しては、以下の方法で行った。すなわち、培養1日前に12穴培養プレートに、 4×10^4 cells/mLとなるように10F-DMEMで懸濁したヒト皮膚繊維芽細胞を1mLずつ各ウェルに播種し、1日培養した。その後、細胞培養プレートより上清を除去し、ウイルス液B、D及びFに終濃度 $8 \mu\text{g/mL}$ となるようにポリブレン（ヘキサジメトリン・ブロミド；アルドリッチ社製）をそれぞれ加えた調製液を各ウェルに1mL添加し、培養を開始した（培養0日目）。

[0067] (2) レトロウイルスベクターによる遺伝子導入2回目

2回目の遺伝子導入を培養1日目に行った。レトロネクチンによる遺伝子導入に関しては、前日遺伝子導入を行った細胞を剥離し、10F-DMEMに懸濁した後、実施例2-(1)で調製したウイルスコートプレートの各ウェルに播種した。ポリブレンによる感染については、前日遺伝子導入を行った細胞上清を除去し、実施例2-(1)と同様にポリブレンを混合して調製したウイルス液を添加し、培養を継続した。いずれの感染法においても、翌日上清を除去し10F-DMEM培地を1mL添加して培養を継続した。

[0068] (3) フィーダー細胞上への播種

培養6日目に実施例1-(3)と同様の方法によりフィーダー細胞上に播種し、培養を継続した。

[0069] (5) iPS細胞コロニーの計測

培養27日目に実施例1-(4)と同様の方法によりiPS細胞コロニー数を計測した。その結果を表6に示す。

[0070] [表6]

条件	iPS細胞コロニー数			
	レトロネクチン感染		ポリブレン感染	
	ウェル1	ウェル2	ウェル1	ウェル2
B	41	38	7	6
D	359	291	17	26
F	78	45	10	12

[0071] 表6に示すように、いずれのレトロウイルスベクターの組合わせにおいても、レトロネクチン感染法の方がポリブレン感染法に比べ、飛躍的に効率よくiPS細胞を誘導することが示された。また従来のIRESベクターと比べて、2Aベクターの方が効率よくiPS細胞を誘導できることが再度確認された。

[0072] 実施例3 ウイルス量の比較

2Aベクターを用いることによって効率よくiPS細胞を誘導できることが明らかになったため、更に少量のウイルスによるiPS細胞誘導を試みた。

[0073] (1) レトロウイルスベクターによる遺伝子導入

レトロネクチンの培養プレートへの固定化は、実施例1-(1)と同様の方法により行った。レトロネクチンによる遺伝子導入は、表4に示すウイルス液D又はFを用い、実施例2-(1)及び(2)と同様の方法により2回行った。ただし、ウイルス量については 3.55×10^9 コピー/mLあるいは 3.55×10^8 コピー/mLの2条件を設定した。

[0074] (2) フィーダー細胞上への播種

培養 6 日目に実施例 1 - (3) と同様の方法によりフィーダー細胞上に播種し、培養を継続した。ただし、フィーダーには S N L 7 6 / 7 細胞 (D S ファーマ社製) を用いた。

[0075] (3) i P S 細胞コロニーの計測

培養 2 6 日目に実施例 1 - (4) と同様の方法により i P S 細胞コロニー数を計測した。その結果を表 7 に示す。ただし、N. T で示す条件については試験を行わなかった。

[0076] [表 7]

条件	i P S 細胞コロニー数			
	3.55 × 10 ⁵ コピー		3.55 × 10 ⁸ コピー	
	ウェル 1	ウェル 2	ウェル 1	ウェル 2
D	5 3	7 5	6 4	7 7
F	N. T	N. T	3 7	2 6

[0077] 表 7 に示すように、ウイルス量を減らしても効率よく i P S 細胞を誘導できることが示された。また、従来の I R E S ベクターと比べて、2 A ベクターの方が効率よく i P S 細胞を誘導できることが再度確認された。

[0078] 実施例 4 レトロネクチンとポリブレンの比較 - 2

実施例 2 について再試を行うとともに、使用遺伝子の検討を行った。

[0079] (1) レトロウイルスベクターによる遺伝子導入

レトロネクチンの培養プレートへの固定化は、実施例 1 - (1) と同様の方法により行った。レトロネクチンもしくはポリブレンによる遺伝子導入は、表 4 に示すウイルス液 A、B、B m t、C、D、D m t 及び F を用い、実施例 2 - (1) 及び (2) と同様の方法により 2 回行った。

[0080] (2) フィーダー細胞上への播種

培養 7 日目に実施例 1 - (3) と同様の方法によりフィーダー細胞上に播種し、培養を継続した。ただし、フィーダーには S N L 7 6 / 7 細胞 (D S ファーマ社製) を用いた。

[0081] (3) i P S 細胞コロニーの計測

培養 3 1 日目に実施例 1 - (4) と同様の方法により i P S 細胞コロニー

数を計測した。その結果を表 8 に示す。

[0082] [表 8]

条件	i P S 細胞コロニー数			
	レトロネクチン感染		ポリブレン感染	
	ウェル 1	ウェル 2	ウェル 1	ウェル 2
A	5	2	1	0
B	6 2	5 6	1 6	1 0
B m t	1 3 2	9 2	1 4	2 9
C	8	5	0	1
D	1 4 0	1 1 4	1 5	1 2
D m t	1 5 1	1 8 5	1 8	1 1
F	3 0	3 6	1 9	1 4

[0083] 表 8 に示すように、ポリブレンによる感染と比べ、レトロネクチンを用いた場合に、はるかに効率よく i P S 細胞を誘導できることが再度確認された。使用遺伝子については、5 遺伝子を用いた場合に 4 遺伝子あるいは 3 遺伝子を用いた条件と比べ効率がよく、4 遺伝子の場合では L I N 2 8 の方が N a n o g より重要であることが示唆された。m i R N A 変異については、i P S 細胞の誘導効率を上昇させることが再度確認された。

[0084] 実施例 5 O K S L N (T 2 A) ベクターの検討

L I N 2 8 及び N A N O G 遺伝子のコード領域を、実施例 1 から 4 で用いた P 2 A フラグメントではなく T 2 A 4 フラグメントにて連結したベクターを用いて、多能性幹細胞を誘導した。更に、ウイルス凍結回数についても検討した。

[0085] (1) レトロウイルスベクターによる遺伝子導入

レトロネクチンの培養プレートへの固定化は、実施例 1 - (1) と同様の方法により行った。レトロネクチンもしくはポリブレンによる遺伝子導入は、表 4 に示すウイルス液 D、E 及び F を用い、実施例 2 - (2) と同様の方法により 1 回行った。同一ロットのウイルス液 E は、- 8 0 ° C にて 1 ~ 5 回凍結融解操作を行った。ウイルス液 D 及び F については、1 回凍結させたウイルスを用いた。

[0086] (2) フィーダー細胞上への播種

培養 6 日目に実施例 1 - (3) と同様の方法によりフィーダー細胞上に播種し、培養を継続した。ただし、フィーダーには S N L 7 6 / 7 細胞 (D S ファーマ社製) を用いた。

[0087] (3) i P S 細胞コロニーの計測

培養 3 0 日目に実施例 1 - (4) と同様の方法により i P S 細胞コロニー数を計測した。その結果を表 9 に示す。ただし、N. T で示す条件については試験を行わなかった。

[0088] [表 9]

培養 3 0 日目の i P S 細胞コロニー数					
条件	凍結回数	レトロネクチン感染		ポリブレン感染	
		ウェル 1	ウェル 2	ウェル 1	ウェル 2
D	1	1 9 8	2 1 3	N. T	N. T
E	1	2 2 9	1 8 0	7	9
E	2	1 5 4	1 3 4	5	5
E	3	1 5 4	1 4 6	N. T	N. T
E	4	1 4 2	1 4 1	N. T	N. T
E	5	1 4 7	1 5 3	N. T	N. T
F	1	3 2	3 0	N. T	N. T

[0089] 表 9 に示すように、p D O N 5 - h O K S L N (T 2 A) は p D O N 5 - h O K S L N (P 2 A) と同様に、非常に効率よく多能性幹細胞を誘導した。また、ポリブレンによる感染と比べ、レトロネクチンを用いた場合にはるかに効率よく多能性幹細胞を誘導できることが再度確認された。更に、p D O N 5 - h O K S L N (T 2 A) を含むウイルス液は、凍結を 5 回まで行っても多能性幹細胞の誘導効率を大きく低下させることはなく、非常に実用的であることが示された。

[0090] 実施例 6 プロウイルスコピー数の計測

実施例 1 及び実施例 4 で誘導した多能性幹細胞のうち、レトロネクチンを使用した条件 D 及び F で誘導された多能性幹細胞コロニーを顕微鏡下でそれぞれ採取し、2 4 ウェルプレートに継代することでクローン化した。各クローンは拡大培養を行った後で、ゲノム D N A を抽出した。

[0091] (1) ゲノム抽出

6ウェルプレートの1ウェルにてコンフルエントになった多能性幹細胞クローンを、ES細胞剥離液（20% Knockout Serum Replacement、1mM CaCl₂、0.1mg/mL Collagenase IV、0.25% Trypsin）で回収し、PUREGENE DNA Purificationキット（QIAGEN社製）を用いてゲノム抽出を行った。

[0092] (2) リアルタイムPCR

多能性幹細胞クローンのゲノムに挿入されたプロウイルスコピー数は、CycleavePCR（登録商標）Core Kit（タカラバイオ社製）を用いてリアルタイムPCRによって算出した。Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human (for Real Time PCR)（タカラバイオ社製）に付属のプライマーセット及びDNAコントロールテンプレートを用いて、実施例6-(1)で抽出したゲノムDNA 200ngあたりのプロウイルスコピー数及びヒトIFN γ コピー数をそれぞれ算出し、（レトロウイルスコピー数）／（ヒトIFN γ コピー数）×2によって1細胞あたりの挿入レトロウイルスコピー数を得た。その結果を表10に示す。

[0093] [表10]

条件	ゲノムコピー数／細胞 (実施例1)	ゲノムコピー数／細胞 (実施例4)	中央値	N数
D	2.7、2.4、4.0	2.6、4.2、2.9、3.9、3.8、6.7	3.8	9
F	6.8	9.2、2.9、8.7	7.7	4

[0094] 表10に示すように、2AベクターはIRESベクターと比べて、ゲノムへの挿入DNAフラグメント数が少ないにもかかわらず、多能性幹細胞を誘導できた。ゲノムに組み込まれたDNAフラグメントのコピー数が少ないことは、安全性の面で極めて有用である。

産業上の利用可能性

[0095] 本発明により、多能性幹細胞を効率よく製造するための核酸が提供される。当該核酸は、多能性幹細胞を効率よくかつ安全に製造する方法に使用され

、基礎研究、医療への応用研究分野等において極めて有用である。

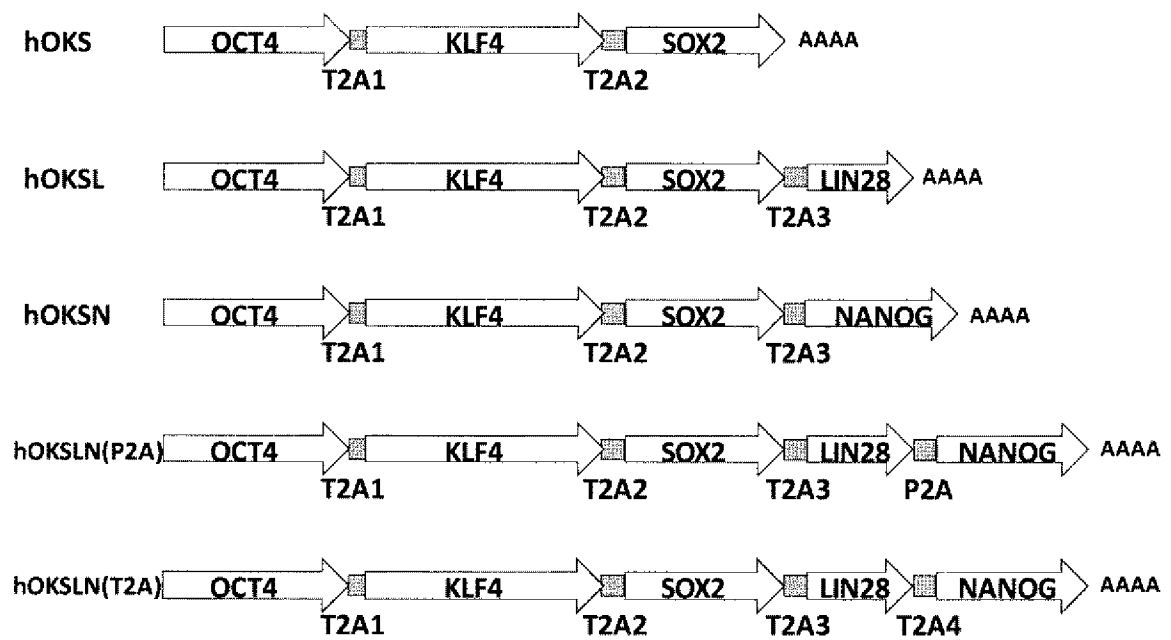
配列表フリーテキスト

[0096] SEQ ID NO:1:T2A peptide fragment
SEQ ID NO:2:Nucleotide sequence of T2A1 DNA fragment
SEQ ID NO:3:Nucleotide sequence of T2A2 DNA fragment
SEQ ID NO:4:Nucleotide sequence of T2A3 DNA fragment
SEQ ID NO:5:Nucleotide sequence of T2A4 DNA fragment
SEQ ID NO:6:P2A peptide fragment
SEQ ID NO:7:Nucleotide sequence of P2A DNA fragment
SEQ ID NO:8:Nucleotide sequence of pDON-hOKSLN(T2A) insertion fragment
ent
SEQ ID NO:9:Nucleotide sequence for a portion of native OCT4 gene.
SEQ ID NO:10:Nucleotide sequence for a portion of mutant OCT4 gene.
SEQ ID NO:11:Nucleotide sequence for a portion of native SOX2 gene.
SEQ ID NO:12:Nucleotide sequence for a portion of mutant SOX2 gene.

請求の範囲

- [請求項1] 自己切断ペプチドをコードする配列を介して相互に接続されたOCT4、KLF4、SOX2及びLIN28の4種の核初期化因子をコードする遺伝子の各コード領域を含み、かつMYCファミリー遺伝子のコード領域を含まない核酸。
- [請求項2] 5'末端より順に、OCT4、KLF4、SOX2及びLIN28遺伝子の各コード領域を含む、請求項1記載の核酸。
- [請求項3] 自己切断ペプチドをコードする配列を介して接続されたNANOG遺伝子のコード領域をさらに含む、請求項1記載の核酸。
- [請求項4] 5'末端より順に、OCT4、KLF4、SOX2、LIN28及びNANOG遺伝子の各コード領域を含む、請求項3記載の核酸。
- [請求項5] 自己切断ペプチドが、Thomaspoxvirus由来2Aペプチド及びporcine teschovirus由来2Aペプチドからなる群より選択される、請求項1～4のいずれか1項に記載の核酸。
- [請求項6] 請求項1～5のいずれか1項に記載の核酸を含むベクター。
- [請求項7] 請求項1～5のいずれか1項に記載の核酸又は請求項6記載のベクターを含む細胞。
- [請求項8] 請求項1～5のいずれか1項に記載の核酸又は請求項6記載のベクターを体細胞に導入する工程を包含することを特徴とする、多能性幹細胞の製造方法。
- [請求項9] 核酸又はベクターを導入する工程がフィブロネクチン又はフィブロネクチンフラグメントの存在下で実施される、請求項8記載の方法。

[図1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/071585

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01) i, C12N5/10(2006.01) i

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)

C12N15/09, C12N5/10

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, CiNii, WPI

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Tatsuji ENOKI et al., "Retro Nectin Idenshi Donyu-ho o Mochiita Koritsuteki na iPS Saibo Yudo", Medical Bio (2009/May), vol.6, no.3, pages 54 to 57	1-9
Y	CAREY B.W. et al, Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector., Proc Natl Acad Sci USA., Jan. 2009, Vol.106, No.1, p.157-162	1-9
Y	CHANG C.W. et al, Polycistronic Lentiviral Vector for "Hit and Run" Reprogramming of Adult Skin Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells., STEM CELLS, Feb. 2009, Vol.27, No.5, p.1042-1049	1-9

☒ 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
09 February, 2011 (09.02.11)

Date of mailing of the international search report
22 February, 2011 (22.02.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/071585

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SHAO L. et al, Generation of iPS cells using defined factors linked via the self-cleaving 2A sequences in a single open reading frame., Cell Res., Mar. 2009, Vol.19, No.3, p.296-306	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

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

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 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, C12N5/10

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

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 1 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 1 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 1 年

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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, CiNii, WPI

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
Y	榎竜嗣 他, レトロネクチン遺伝子導入法を用いた効率的な iPS 細胞誘導, メディカルバイオ (2009/May), Vol.6, No.3, p.54-57	1 - 9
Y	CAREY B. W. et al, Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector., Proc Natl Acad Sci USA., Jan. 2009, Vol.106, No.1, p.157-162	1 - 9

☒ 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

0 9 . 0 2 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

2 2 . 0 2 . 2 0 1 1

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

上 條 肇

4 B

9 4 5 3

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

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
Y	CHANG C.W. et al, Polycistronic Lentiviral Vector for “Hit and Run” Reprogramming of Adult Skin Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells., STEM CELLS, Feb. 2009, Vol.27, No.5, p.1042-1049	1 - 9
Y	SHAO L. et al, Generation of iPS cells using defined factors linked via the self-cleaving 2A sequences in a single open reading frame., Cell Res., Mar. 2009, Vol.19, No.3, p.296-306	1 - 9