(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2016-521971
(P2016-521971A)
(43)公表日　平成28年7月28日(2016.7.28)

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード（参考）
C12N	5/0735	(2010.01)	C12N	5/0735		4B024
C12N	5/073	(2010.01)	C12N	5/073		4B065
C12N	5/071	(2010.01)	C12N	5/071		4C087
C12N	5/10	(2006.01)	C12N	5/10		
C12N	15/09	(2006.01)	C12N	15/00	A	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 237 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-509588 (P2016-509588)
(86)(22)出願日　平成26年4月23日 (2014.4.23)
(85)翻訳文提出日　平成27年12月18日 (2015.12.18)
(86)国際出願番号　PCT/IB2014/060954
(87)国際公開番号　WO2014/174470
(87)国際公開日　平成26年10月30日 (2014.10.30)
(31)優先権主張番号　61/814,920
(32)優先日　平成25年4月23日 (2013.4.23)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/878,769
(32)優先日　平成25年9月17日 (2013.9.17)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/932,935
(32)優先日　平成26年1月29日 (2014.1.29)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　514045290
イェダ　リサーチ　アンド　ディベロップメント　カンパニー　リミテッド
イスラエル国　７６１００　レホボト，ピー　オー　ボックス　９５　アット　ワイツマン　インスティチュート　オブ　サイエンス
(74)代理人　100133503
弁理士　関口　一哉
(72)発明者　ハンナ，ヤクブ
イスラエル国，　６５２７１０６　テルアビブ，　アパートメント１４，　ロートシルト　ブールバール　１０６

最終頁に続く

(54)【発明の名称】単離ナイーブ型多能性幹細胞およびそれを発生させる方法関連出願本出願は、米国特許法１１９条第（ｅ）項に基づき、２０１４年１月２９日出願の米国特許仮出願第６１／９３２，９３５号

(57)【要約】
単離ヒトナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）であって、（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣはＸ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有する、単離ヒトナイーブ型ＰＳＣが提供される。また、培養基であって、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ベータ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＳＴＡＴ３活性化因子、ならびにｂＦＧＦ、ＴＧＦベータ１、ＰＫＣ阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤、およびＮＯＴＣＨ阻害剤からなる群より選択される少なくとも一種の薬剤、またはＴＧＦＲ阻害剤、ＦＧＦＲ阻害剤、ＰＫＣ阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤、およびＮＯＴＣＨ阻害剤からなる群より選択される少なくとも一種の薬剤を含有する培養基が提供される。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
単離ヒトナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）であって、　非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）前記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、前記ナイーブ型女性ＰＳＣは前記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）前記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、前記ナイーブ型男性ＰＳＣは前記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、および／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイにより決定される核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とする、単離ヒトナイーブ型ＰＳＣ。
【請求項２】
前記単離ナイーブ型ＰＳＣは、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、ＪＮＫ阻害剤、およびＰ３８阻害剤からなる群より選択される薬剤の存在下においてインキュベートされると多能性表現型を維持する、請求項１に記載の単離ヒトナイーブ型ＰＳＣ。
【請求項３】
ヒトプライム型ＰＳＣにおけるＣｐＧアイランドのメチル化レベルと比較して、前記ヒトナイーブ型ＰＳＣにおけるＣｐＧアイランドのメチル化レベルが低いことを特徴とする、請求項１または２に記載の単離ヒトナイーブ型ＰＳＣ。
【請求項４】
請求項１、２、または３に記載の単離ヒトナイーブ型ＰＳＣ細胞を少なくとも１０％含む、単離ナイーブ型ＰＳＣ集団。
【請求項５】
請求項１、２、もしくは３に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ、または請求項４に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ集団、および培養基を含有する、細胞培養液。
【請求項６】
前記培養基は、少なくとも１０回継代するあいだ前記ナイーブ型ＰＳＣを未分化多能性状態で維持できる、請求項５に記載の細胞培養液。
【請求項７】
ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３β阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＳＴＡＴ３活性化因子、ならびに塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）、プロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤、およびＮＯＴＣＨ阻害剤からなる群より選択される少なくとも一種の薬剤を含有する、培養基。
【請求項８】
ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３β阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＳＴＡＴ３活性化因子、ならびに形質転換増殖因子受容体（ＴＧＦＲ）阻害剤、線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤、プロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤、およびＮＯＴＣＨ阻害剤からなる群より選択される少なくとも一種の薬剤を含有する、培養基。
【請求項９】
前記ＳＴＡＴ３活性化因子は白血病抑制因子（ＬＩＦ）およびインターロイキン６（ＩＬ６）からなる群より選択される、請求項７または８に記載の培養基。
【請求項１０】
インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ１）、インスリン様増殖因子ＩＩ（ＩＧＦＩＩ）、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）シグナリング阻害剤、ソニックヘッジホッグ経路（ＳＨＨ）阻害剤、ＥＲＫ５阻害剤、フォルスコリン、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される少なくとも一種のさらなる薬剤をさらに含有する、請求項７、８、または９に記載の培養基。
【請求項１１】
インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ１）、インスリン様増殖因子ＩＩ（ＩＧＦＩＩ）、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、ソニックヘッジホッグ経路（ＳＨＨ）阻害剤、ＥＲＫ５阻

害剤、フォルスコリン、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される少なくとも一種のさらなる薬剤をさらに含有する、請求項７、８、または９に記載の培養基。
【請求項１２】
前記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、前記少なくとも一種の薬剤はＰＫＣ阻害剤を含む、請求項７、８、９、１０、または１１に記載の培養基。
【請求項１３】
ＦＧＦＲ阻害剤をさらに含有する、請求項１２に記載の培養基。
【請求項１４】
ＴＧＦＲ阻害剤をさらに含有する、請求項１２または１３に記載の培養基。
【請求項１５】
前記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、前記少なくとも一種の薬剤はＴＧＦβ１およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含む、請求項７、９、１０、または１１に記載の培養基。
【請求項１６】
ＦＧＦＲ阻害剤をさらに含有する、請求項１５に記載の培養基。
【請求項１７】
前記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、前記少なくとも一種の薬剤はｂＦＧＦおよびＴＧＦβ１を含む、請求項７、９、１０、または１１に記載の培養基。
【請求項１８】
ＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する、請求項１７に記載の培養基。
【請求項１９】
プロテインキナーゼＣ阻害剤をさらに含有する、請求項１７または１８に記載の培養基。

【請求項２０】
前記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、前記少なくとも一種の薬剤はｂＦＧＦ、ＲＯＣＫ阻害剤、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）阻害剤、ＮＯＴＣＨ阻害剤、および形質転換増殖因子受容体（ＴＧＦＲ）阻害剤を含む、請求項７、９、または１０に記載の培養基。
【請求項２１】
ソニックヘッジホッグ経路（ＳＨＨ）阻害剤をさらに含有する、請求項２０に記載の培養基。
【請求項２２】
前記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、前記少なくとも一種の薬剤はＮＯＴＣＨ阻害剤および線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤を含む、請求項８、９、１０、または１１に記載の培養基。
【請求項２３】
インスリン様増殖因子ＩＩ（ＩＧＦＩＩ）、幹細胞因子（ＳＣＦ）、および形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）からなる群より選択される薬剤をさらに含有する、請求項２２に記載の培養基。
【請求項２４】
アスコルビン酸をさらに含有する、請求項７～２３のいずれか一項に記載の培養基。
【請求項２５】
オレイン酸をさらに含有する、請求項７～２４のいずれか一項に記載の培養基。
【請求項２６】
リノール酸および／またはピペコリン酸をさらに含有する、請求項７～２５のいずれか一項に記載の培養基。
【請求項２７】
動物血清を含有しない、請求項７～２６のいずれか一項に記載の培養基。
【請求項２８】
血清代替物をさらに含有する、請求項７～２７のいずれか一項に記載の培養基。

【請求項２９】
細胞および請求項７～２８のいずれか一項に記載の培養基を含有する、細胞培養液。
【請求項３０】
前記培地は、少なくとも２回継代するあいだナイーブ型多能性幹細胞を未分化状態で維持できる、請求項２９に記載の細胞培養液。
【請求項３１】
ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる方法であって、　非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、前記非ナイーブ型ＰＳＣからナイーブ型ＰＳＣを発生させることのできる条件下においてインキュベートする工程を有し、　（ｉ）前記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、前記ナイーブ型女性ＰＳＣはＸ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）前記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、前記ナイーブ型男性ＰＳＣは前記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、および／または　前記ナイーブ型ＰＳＣにおける転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイにより決定される核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とする、ナイーブ型ＰＳＣを発生させる方法。
【請求項３２】
前記条件は請求項７～２８のいずれか一項に記載の培養基を含む、請求項３１に記載の方法。
【請求項３３】
前記条件は低酸素を含む、請求項３１または３２に記載の方法。
【請求項３４】
前記培養基はＭＢＤ３阻害剤をさらに含有する、請求項３１～３３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３５】
前記培養基はクロモドメインヘリカーゼＤＮＡ結合タンパク質４（ＣＨＤ４）阻害剤をさらに含有する、請求項３１～３４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３６】
前記培養基はＰ６６アルファ・コイルドコイル・ドメインをさらに含有する、請求項３１～３５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３７】
前記非ナイーブ型ＰＳＣはプライム型ＰＳＣ、胚盤胞、人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）、および体細胞からなる群より選択される、請求項３１～３６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３８】
前記非ナイーブ型ＰＳＣが体細胞を含む場合、前記方法は前記体細胞を脱分化条件に供する工程をさらに有し、結果として人工多能性幹細胞を得る、請求項３１～３７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項３９】
前記脱分化条件は、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃからなる群より選択される少なくとも二種の増殖因子を前記体細胞中において発現させる工程を含む、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】
体細胞からの人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）の発生を改善する方法であって、　（ａ）Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃからなる群より選択される少なくとも二種の増殖因子を、体細胞中において発現させる工程、ならびに　（ｂ）前記体細胞中におけるＭｂｄ３の発現および／または活性を阻害する工程を有する、　体細胞からのｉＰＳＣの発生を改善する方法。
【請求項４１】
前記Ｍｂｄ３活性の前記阻害を、ヌクレオソームリモデリング脱アセチル化酵素（ＮｕＲＤ）複合体への前記Ｍｂｄ３の結合を阻害することによって実施する、請求項４０に記載

の方法。
【請求項４２】
前記Ｍｂｄ３のＮｕＲＤ複合体への前記結合の前記阻害を、クロモドメインヘリカーゼＤＮＡ結合タンパク質４（ＣＨＤ４）阻害剤を用いて実施する、請求項４１に記載の方法。

【請求項４３】
前記Ｍｂｄ３のＮｕＲＤ複合体への前記結合の前記阻害を、Ｐ６６アルファ・コイルドコイル・ドメインを用いて実施する、請求項４１に記載の方法。
【請求項４４】
前記Ｍｂｄ３発現の前記阻害をプロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）阻害剤を用いて実施する、請求項４１に記載の方法。
【請求項４５】
前記体細胞においてＥＳ細胞発現Ｒａｓ（ＥＲＡＳ）コード配列を外因的に発現させる工程、または前記体細胞において前記ＥＲＡＳの内因的発現を活性化する工程をさらに有する、請求項４０～４４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４６】
前記発現をさせる前の前記Ｍｂｄ３のレベルのうち１０～３０％が前記Ｍｂｄ３の前記阻害により阻害されるよう、前記発現を少なくとも４８時間実施する、請求項４０に記載の方法。
【請求項４７】
前記発現を約４８時間実施し、前記約４８時間の後で前記阻害を実施する、請求項４０に記載の方法。
【請求項４８】
前記ｉＰＳＣはネズミｉＰＳＣである、請求項４０～４７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項４９】
ＬＩＦ、ＥＲＫ１／２阻害剤、およびＧＳＫ３ｂ阻害剤を含有する培地中で前記ネズミｉＰＳＣを培養する工程をさらに有する、請求項４８に記載の方法。
【請求項５０】
前記ｉＰＳＣがヒトｉＰＳＣである場合、前記方法は、　（ｃ）ＬＩＦ、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、Ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、および形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）を含有する培養基中で前記ヒトｉＰＳＣを培養する工程　をさらに有する、請求項４０～４７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５１】
前記培地はＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する、請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
工程（ｃ）を、工程（ａ）における前記発現から約４８時間後に実施する、請求項５０または５１に記載の方法。
【請求項５３】
前記発現を、前記増殖因子のＤＮＡトランスフェクションによって実施する、請求項３９～５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５４】
前記発現を、前記増殖因子のＲＮＡトランスフェクションによって実施する、請求項３９～５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５５】
前記発現を、前記増殖因子のタンパク質トランスフェクションによって実施する、請求項３９～５２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５６】
前記ＰＳＣは胚性幹細胞（ＥＳＣ）、人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）、および胚性生殖細

胞（ＥＧＣ）からなる群より選択される、請求項１、２、もしくは３に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ、
請求項４に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ集団、請求項５もしくは６に記載の細胞培養液、または請求項３１～３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５７】
前記ナイーブ型ＰＳＣはＸＩＳＴを発現する、請求項１、２、もしくは３に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ、請求項４に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ集団、請求項５もしくは６に記載の細胞培養液、または請求項３１～３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５８】
前記ナイーブ型ＰＳＣはＸＩＳＴ体を含まない、請求項１、２、もしくは３に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ、請求項４に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ集団、請求項５もしくは６に記載の細胞培養液、または請求項３１～３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項５９】
前記ナイーブ型ＥＳＣは分化誘導されるとＸ不活性化可能となる、請求項１、２、もしくは３に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ、請求項４に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ集団、請求項５もしくは６に記載の細胞培養液、または請求項３１～３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６０】
前記ナイーブ型ＰＳＣは内胚葉性、中胚葉性、および外胚葉性の胚性胚葉に分化できる、請求項１、２、もしくは３に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ、請求項４に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ集団、請求項５もしくは６に記載の細胞培養液、または請求項３１～３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６１】
前記ナイーブ型ＰＳＣは２０回を超えて継代培養しても前記未分化多能性状態を維持できる、１、２、もしくは３に記載の前記単離ナイーブ型ＰＳＣ、請求項４に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ集団、請求項５もしくは６に記載の細胞培養液、または請求項３１～３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６２】
前記ナイーブ型ＰＳＣのＭＨＣクラスＩの発現レベルは、同一検出アッセイ条件下におけるプライム型ＰＳＣの場合より低く、前記プライム型ＰＳＣは、ＸＩＳＴのメチル化対立遺伝子１つおよびＸＩＳＴの非メチル化対立遺伝子１つを呈し、ＸＩＳＴを発現し、ＸＩＳＴ体を呈し、かつＨ３Ｋ２７ｍｅ３／ポリコーム集積を呈する、請求項１、２、もしくは３に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ、請求項４に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ集団、請求項５もしくは６に記載の細胞培養液、または請求項３１～３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３】
前記ナイーブ型ＰＳＣは、染色体上で休止しているＲＮＡポリメラーゼＩＩが、同一アッセイ条件下におけるプライム型ＰＳＣの場合よりも少なくとも１０％多いことを特徴とし、前記プライム型ＰＳＣは、ＸＩＳＴのメチル化対立遺伝子１つおよびＸＩＳＴの非メチル化対立遺伝子１つを呈し、ＸＩＳＴを発現し、ＸＩＳＴ体を呈し、かつＨ３Ｋ２７ｍｅ３／ポリコーム集積を呈する、請求項１、２、もしくは３に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ、請求項４に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ集団、請求項５もしくは６に記載の細胞培養液、または請求項３１～３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６４】
プライム型ＰＳＣの場合と比較してｐ３８経路が阻害されている、請求項１、２、もしくは３に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ、請求項４に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ集団、請求項５もしくは６に記載の細胞培養液、または請求項３１～３９のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６５】
プライム型ＰＳＣの場合と比較してＪＮＫ経路が阻害されている、請求項１、２、もしく

は３に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ、請求項４に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ集団、請求項５もしくは６に記載の細胞培養液、または請求項３１～３９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６６】

プライム型ＰＳＣの場合と比較してＲＯＣＫ経路が阻害されている、請求項１、２、もしくは３に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ、請求項４に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ集団、請求項５もしくは６に記載の細胞培養液、または請求項３１～３９のいずれか一項に記載の方法。

【請求項６７】

ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる方法であって、非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、前記非ナイーブ型ＰＳＣからナイーブ型ＰＳＣを発生させることのできる条件下においてインキュベートする工程を有し、　前記ナイーブ型ＰＳＣは、非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）前記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、前記ナイーブ型女性ＰＳＣは前記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）前記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、前記ナイーブ型男性ＰＳＣは前記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、および／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とし、　前記条件は、ＫＯ－ＤＭＥＭ、Ｎ２サプリメント（Ｇｉｂｃｏ）、Ａｌｂｕｍａｘ　Ｉ、ＬＩＦ、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培養基を含む、ナイーブ型ＰＳＣを発生させる方法。

【請求項６８】

前記培養基はＦＧＦＲ阻害剤をさらに含有する、請求項６７に記載の方法。

【請求項６９】

前記培養基はＴＧＦＲ阻害剤をさらに含有する、請求項６７または６８に記載の方法。

【請求項７０】

ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる方法であって、非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、前記非ナイーブ型ＰＳＣからナイーブ型ＰＳＣを発生させることのできる条件下においてインキュベートする工程を有し、　前記ナイーブ型ＰＳＣは、非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）前記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、前記ナイーブ型女性ＰＳＣは前記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）前記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、前記ナイーブ型男性ＰＳＣは前記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、および／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とし、　前記条件は、ＫＯ－ＤＭＥＭ、Ｎ２サプリメント（Ｇｉｂｃｏ）、Ａｌｂｕｍａｘ　Ｉ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＬＩＦ、ＴＧＦβ１、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培養基を含む、ナイーブ型ＰＳＣを発生させる方法。

【請求項７１】

前記培養基はＦＧＦＲ阻害剤をさらに含有する、請求項７０に記載の方法。

【請求項７２】

ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる方法であって、非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、前記非ナイーブ型ＰＳＣからナイーブ型ＰＳＣを発生させることのできる条件下においてインキュベートする工程を有し、　前記ナイーブ型ＰＳＣは、非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）前記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、前記ナイーブ型女性ＰＳＣは前記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）前記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、前記ナイーブ型男性ＰＳＣは前記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、および／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から

細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とし、　前記条件は、ＫＯ－ＤＭＥＭ、Ｎ２サプリメント（Ｇｉｂｃｏ）、Ａｌｂｕｍａｘ　Ｉ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＬＩＦ、ｂＦＧＦ、ＴＧＦβ１、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、およびＪＮＫ阻害剤を含有する培養基を含む、ナイーブ型ＰＳＣを発生させる方法。

【請求項７３】

ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる方法であって、非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、前記非ナイーブ型ＰＳＣからナイーブ型ＰＳＣを発生させることのできる条件下においてインキュベートする工程を有し、　前記ナイーブ型ＰＳＣは、非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）前記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、前記ナイーブ型女性ＰＳＣは前記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）前記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、前記ナイーブ型男性ＰＳＣは前記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、および／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とし、　前記条件は、ＫＯ－ＤＭＥＭ、Ｎ２サプリメント（Ｇｉｂｃｏ）、限定脂質濃縮液（Ｇｉｂｃｏ）、ＬＩＦ、ｂＦＧＦ、ＴＧＦβ１、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびＭＢＤ３阻害剤を含有する培養基を含む、ナイーブ型ＰＳＣを発生させる方法。

【請求項７４】

請求項３１～３９および６７～７３のいずれか一項に記載の方法によって取得できる、単離ナイーブ型多能性幹細胞。

【請求項７５】

前記ナイーブ型多能性幹細胞は非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）前記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、前記ナイーブ型女性ＰＳＣは前記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）前記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、前記ナイーブ型男性ＰＳＣは前記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、および／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とする、　請求項７４に記載の単離ナイーブ型多能性幹細胞。

【請求項７６】

分化細胞を発生させる方法であって、請求項３１～３９および６７～７３のいずれか一項に記載の方法により発生させたナイーブ型多能性幹細胞、請求項１～３、５６～６６、および７４のいずれか一項に記載の単離ナイーブ型多能性幹細胞、または請求項４および５６～６６のいずれか一項に記載の単離ナイーブ型ＰＳＣ集団を、分化条件に供する工程を有する、分化細胞を発生させる方法。

【請求項７７】

始原生殖細胞を発生させる方法であって、霊長類ナイーブ型多能性幹細胞を、前記霊長類ナイーブ型多能性幹細胞から始原生殖細胞を誘導できるよう選択された培養基中において培養する工程を有し、前記培養基はＲｈｏキナーゼ（ＲＯＣＫ）阻害剤および骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）を含有する、始原生殖細胞を発生させる方法。

【請求項７８】

前記霊長類ナイーブ型多能性幹細胞は非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）前記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、前記ナイーブ型女性ＰＳＣは前記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）前記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、前記ナイーブ型男性ＰＳＣは前記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、および／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とする　請求項７７に記載の方法。

【請求項７９】

前記始原生殖細胞はＣＤ６１（インテグリンベータ３）発現パターンを特徴とする、請求項７７に記載の方法。
【請求項８０】
前記始原生殖細胞はＣＤ６１$^{+}$／ＳＳＥＡ４$^{+}$発現パターンを特徴とする、請求項７９に記載の方法。
【請求項８１】
前記培養基は、白血病抑制因子（ＬＩＦ）、幹細胞因子（ＳＣＦ）、および上皮増殖因子（ＥＧＦ）からなる群より選択される少なくとも一種の薬剤をさらに含有する、請求項７７～８０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８２】
前記霊長類はヒトである、請求項７７～８１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８３】
請求項７７～８２のいずれか一項に記載の方法により発生させた霊長類始原生殖細胞を含む、単離霊長類始原生殖細胞集団。
【請求項８４】
ＣＤ６１$^{+}$／ＳＳＥＡ４$^{+}$発現パターンを特徴とする始原生殖細胞を少なくとも５０％含む、請求項８３
に記載の単離霊長類始原生殖細胞集団。
【請求項８５】
処置を必要とする対象を処置する方法であって、請求項８３または８４に記載の始原生殖細胞を前記対象の生殖腺に投与する工程を有し、結果として、処置を必要とする前記対象を処置する方法。
【請求項８６】
前記対象は不妊症である、請求項８５に記載の方法。
【請求項８７】
請求項８３または８４に記載の霊長類始原生殖細胞および不妊症処置用の医薬を有するキット。
【請求項８８】
キメラ動物を発生させる方法であって、請求項１に記載の単離ナイーブ型ヒトＰＳＣまたは請求項８３もしくは８４に記載の始原生殖細胞を宿主動物の着床前胚に導入する工程を有し、結果としてキメラ動物を発生させる方法。
【請求項８９】
前記着床前胚をｅｘ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏにおいて成長させる工程をさらに有する、請求項８８に記載の方法。
【請求項９０】
前記導入をｉｎ　ｖｉｖｏにおいて実施する、請求項８８に記載の方法。
【請求項９１】
前記導入をｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏにおいて実施する、請求項８８に記載の方法。
【請求項９２】
前記着床前胚が含む細胞は少なくとも４個である、請求項８８～９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９３】
前記着床前胚が含む細胞は１２８個を超えない、請求項８８～９１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９４】
前記宿主動物はマウスである、請求項８８～９３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９５】
前記単離ナイーブ型ＰＳＣまたは前記始原生殖細胞は前記宿主動物と同種である、請求項８８～９３のいずれか一項に記載の方法。

【請求項９６】
前記単離ナイーブ型ＰＳＣまたは前記始原生殖細胞は前記宿主動物とは異種である、請求項８８～９３のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は，ある実施形態において、単離ナイーブ型多能性幹細胞、上記ナイーブ型多能性幹細胞の発生に用い得る新規の培養基、および上記ナイーブ型多能性幹細胞を発生させかつ培養する方法に関する。より具体的には、本発明は、ある実施形態において、人工多能性幹細胞を発生させる目的で体細胞の脱分化を改善する方法に関するが、これに限定されるものではない。
【背景技術】
【０００２】
ＥＳＣ様細胞は人工多能性（ｉＰＳ）細胞とよばれ、種々の転写因子、当初はＯｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃ（Ｔａｋａｈａｓｈｉ ａｎｄ Ｙａｍａｎａｋａ，２００６）の異所性発現によって、体細胞から発生させることができる。ＥＳＣ様細胞は、ナイーブ型マウスＥＳＣのもつ特徴的な特色をすべて有する（Ｔａｋａｈａｓｈｉ ａｎｄ Ｙａｍａｎａｋａ，２００６；Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，２００９ａ）。初期化には、典型的に、短くて１週間にわたって細胞が大量に増殖し、続いて子孫細胞が一定の割合で、予測不可能なパターンにおいて異なる潜伏期を経て、ＥＳ様の状態に変換できることが必要である（Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，２００９ｂ）。Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃ（ＯＳＫＭ）以外にも、これら外来因子と組み合わせてそのうち一部を置き換えることができたり初期化効率を上げたりする別の転写因子および小分子について、その同定が大きな進展を遂げている（Ｏｒｋｉｎ ａｎｄ Ｈｏｃｈｅｄｌｉｎｇｅｒ，２０１１）。上記初期化因子と共に作用して必須の初期および後期クロマチン構造変化を促進することにより、ドナー細胞の子孫の一部をｉＰＳＣへと確実に初期化できる、多様な酵素およびクロマチンリモデリング因子が同定されている（例えばＷｄｒ５、Ｕｔｘ、Ｔｅｔ２）（Ａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１１；Ｍａｎｓｏｕｒ ｅｔ ａｌ．，２０１２；Ｏｎｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，２０１２）。
【０００３】
こうした進展にもかかわらず、初期化法を高度に最適化して用いても、体細胞初期化効率は未だ低い（高くて０．１～２０％）（Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，２０１０ｂ）。また、体細胞エピゲノムを出発点とし初期化因子を過剰発現させて誘発した際、得られた結果は非常に推計学的で、細胞のほぼすべてについて初期化レベルが相異なっていた（Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，２００９ｂ）。後者の研究をもとに、途中段階の多様な細胞集団を単離して表面マーカーで同定することが可能となり、この細胞をさらに誘発して秩序を喪失させ、ｉＰＳＣを無作為に発生させることが可能となった（Ｐｏｌｏ ｅｔ ａｌ．，２０１２）。初期化の推計的要素と進行について、その性質をモデル化するために生体系で研究した。その結果、体細胞の初期化に関与する分子変化は何千もあるが、たった１つの律速事象によって、クローン細胞観察実験で実証されたカイネティックを十分に再現できることが明らかとなった（Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，２００９ｂ）。こうした推計的な律速要素が何であるかは、依然わかっていない。
【０００４】
また、細胞融合または核移植による初期化アプローチで誘導できるのは初期化が十分進んだＥＳ様細胞のみであり、一部初期化された細胞についてはそうした知見がないことから、核移植または細胞融合による初期化については、ＯＳＫＭに誘導される初期化よりも同調性および決定性の高いパターンで生じる可能性が示唆される（Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，２０１０ｂ）。このことから、決定的かつ直接的なｉＰＳＣ初期化アプローチを考案可能であり、転写因子形質導入によりさらに遺伝子操作を行えば同調的かつ決定的にｉｎ

ｖｉｔｒｏにおいて初期化できるかもしれない、との仮説が生まれた。

【０００５】

胚性幹細胞（ＥＳＣ）はマウス胚から初めて単離された。発生途中の胚の内部細胞塊（ＩＣＭ）を、白血病抑制因子（ＬＩＦ）サイトカインおよびマウス胚フィーダー（ＭＥＦ）細胞の存在下、ｉｎ ｖｉｔｒｏにて外植することによって実施された（Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，２０１０ａ；Ｔａｋａｈａｓｈｉ ａｎｄ Ｙａｍａｎａｋａ，２００６）。マウスＥＳＣは発生期ＩＣＭの分子署名を再現しているため、「ナイーブ型多能性細胞」とよばれる（Ｈａｎｎａ，２０１０；Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，２０１０ａ；２００９ａ；Ｔａｋａｈａｓｈｉ ａｎｄ Ｙａｍａｎａｋａ，２００６）。多能性遺伝子Ｏｃｔ４、Ｎａｎｏｇ、およびＫｌｆを発現し、エピブラストおよび体細胞において初期系譜特異的マーカーが欠損しており、女性細胞中で活性をもつ両Ｘ染色体が前Ｘ不活性化状態を維持していることが含まれる。また、マウスＥＳＣ細胞の発生能力は無制限であり、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおいてあらゆる細胞型へと良好に分化でき、マウス胚盤胞中に注入すると、キメラ動物において高い効率で三胚葉が生じかつ生殖系が生じる（Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，２０１０ａ；２００９ｂ）。最後に、マウスＥＳ細胞は、増殖率が高くクロマチンコンフォメーションがオープンであり、そのため相同組換えによって遺伝子を高効率かつ特異的にターゲティングできることから、マウスの遺伝的性質を調べる際の最も有用な手段の１つである（Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，２０１０ａ；Ｏｒｋｉｎ ａｎｄ Ｈｏｃｈｅｄｌｉｎｇｅｒ，２０１１）。

【０００６】

近年、ＥｐｉＳＣとよばれる非常に異なる多能性細胞が、ＦＧＦ２（「塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）」としても知られる）およびアクチビンを添加した増殖条件下で着床後エピブラストを外植することによって誘導された（Ａｎｇ ｅｔ ａｌ．，２０１１；Ｍａｎｓｏｕｒ ｅｔ ａｌ．，２０１２；Ｏｎｄｅｒ ｅｔ ａｌ．，２０１２；Ｔｅｓａｒ ｅｔ ａｌ．，２００７）。ＥｐｉＳＣは多能性ではあるが、ＥＳＣと比較すると成長能力は限定的であるため、「プライム型多能性細胞」とよばれる。ＥｐｉＳＣは動物キメラの発生効率が非常に低く、Ｘ染色体不活性化を既に受けており、かつ初期分化系列決定マーカーの発現が不均一である（Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，２００９ａ；２０１０ａ）。近年、Ｈａｎｎａ Ｙ．，ｅｔ ａｌ．（２００９ａ）の研究により、これら２つの異なる多能性状態が互いに関連することが明らかとなった。ナイーブ型ネズミ多能性細胞は、アクチビンおよびＦＧＦ２のシグナリングの促進によりｉｎ ｖｉｔｒｏにおいてプライム型ＥｐｉＳＣ様状に分化でき、一方、ＥｐｉＳＣは、規定のシグナリング刺激によってエピジェネティックにＥＳＣ様ナイーブ型多能性状態に戻ることができる。

【０００７】

注目すべきことに、ヒト由来ＥＳＣの特色は、マウスのＥＳＣ細胞よりむしろＥｐｉＳＣ細胞の特徴的な特色の一部とほぼ同じである。マウスＥＳＣの場合とは異なり、ヒトＥＳ細胞の維持には（ＬＩＦ／Ｓｔａｔ３シグナリングではなく）ＦＧＦ２およびアクチビンが必要とされ、ヒトＥＳ細胞は単一細胞継代培養に対して非常に感受性が高く、エピブラストおよび分化系列決定マーカーの発現が不均一であり、かつ（ＩＣＭにおいて活性をもつ遠位Ｏｃｔ４エンハンサーではなく）近位エンハンサーエレメントにより着床後エピブラストのＯｃｔ４発現を促進する（Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，２００９ａ；２００９ｂ）。このように、ヒトＥＳＣとマウスエピブラストＥｐｉＳＣとが分子的かつ生物学的に相似していることから、ヒトＥＳＣはマウスＥＳＣのナイーブ型多能性状態よりもそのプライム型多能性状態に近いことが示唆され、そしてこの事情から、従来型ヒトＥＳＣの疾患関連研究への利用をその生物学的特性が妨げている可能性が示唆される（Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，２０１０ｂ；Ｐｏｌｏ ｅｔ ａｌ．，２０１２）。培養条件が難しいこと、相同組換えによる遺伝子ターゲティング効率が低いこと、ならびに種々のヒトＥＳＣ系および種々のヒトｉＰＳＣ系のなかでも分化傾向が著しく不均一であることが含まれる（Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，２００９ｂ；２０１０ａ）。

【０００８】

従来型／プライム型ヒトＥＳＣはＩＣＭに由来するため、ヒトにおいて単離できる唯一のまたは「デフォルト」の多能状態はプライム状態であると誤って示唆されていた（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０ａ）。しかし、本発明者らの研究で、比較的「非許容的」なマウス系統における多能性状態のｉｎ　ｖｉｔｒｏ安定性を決定しこの多能性状態を同定して、ナイーブ型ＥＳ（近年までＥｐｉＳＣ様の多能性細胞のみ）を誘導できたことから、上述の考えを再考することとなった（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２００９ａ）。マウスナイーブ型ＥＳＣ細胞は、さらなるシグナリング分子または転写因子とＬＩＦサイトカインとが外から添加された場合にのみ、非肥満糖尿病誘発（ＮＯＤ）マウスの胚盤胞から誘導できる（例えば、ナイーブ型ＮＯＤ　ＥＳＣおよびｉＰＳＣを、ＰＤ０３２５９０１／ＣＨＩＲ９９０２１／ＬＩＦもしくはケンパウロン／ＣＨＩＲ９９０２１／ＬＩＦ中において増殖させることができた、またはＫｌｆ４／Ｌｉｆおよびｃ－Ｍｙｃ／ＬＩＦの条件下において恒常的に発現させることができた）（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２００９ａ）。これらの因子が存在しない場合には（または、ＬＩＦのみの条件下においては）、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで多能性状態が獲得されるためにナイーブ状態は表れず、たとえマウスＩＣＭから分けたとしてもナイーブ状態は表れない。というのは、この多能性状態は、通常の初期発生でみられるｉｎ　ｖｉｖｏにおける分化を恐らくは模倣する過程のＥｐｉＳＣ細胞と、ほぼ区別がつかないからである（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２００９ａ）。これらの知見をもとに、十分に多能性であるナイーブ型ＥＳ細胞およびｉＰＳ細胞を、以前は「非許容的」と考えられていた系統から発生させることができた。ＮＯＤマウスにおいて実験したところ疑問が提起された。その疑問とは、ヒトにおけるナイーブ型またはマウスＥＳＣ様幹細胞の誘導を可能とする適切な条件はまだ見つかっていないのではないか、そして、ナイーブ型ヒト多能性状態の安定化には他にもまだ未知の因子（ＮＯＤマウスおよびラットのＥＳＣ／ｉＰＳＣに添加された因子と類似する因子、またはこれらとは別の因子）が必要なのではないか、というものであった（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２００９ａ）。また、外植した胚盤胞がｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいてプライム状態に分化する可能性について、この可能性を支持する根拠が、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ誘導ヒト女性ＥＳＣ系においてＸ染色体のダイナミクスを詳細に観察した結果得られた。この細胞は誘導後にｉｎ　ｖｉｔｒｏ適応プロセスの一環としてＸ染色体不活性化を受け、Ｘ染色体不活性化は高酸素濃度で加速され得、ＬＩＦまたは未同定のシグナルを発する特定のフィーダー細胞を添加すると一部減弱され得る、ということが分かったのである（Ｌｅｎｇｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０；Ｏｋａｍｏｔｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１；Ｔｏｍｏｄａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２）。これらの結果から、ＸａＸａ（Ｘ活性、Ｘ活性、ＸＩＳＴ体が存在しないことに基づく）ナイーブ型細胞がヒトＩＣＭ中に存在する可能性、また、ｉｎ　ｖｉｔｒｏで得た従来型ヒトＥＳＣはＩＣＭ中に存在するものとはあまり類似しないことが示された（Ｏｋａｍｏｔｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１）。

【０００９】

こうした観察から、プライム型またはＥｐｉＳＣ様細胞の作製に従来用いていた多様な種から、恐らくはヒトを含む多様な種から、ナイーブ型幹細胞を単離する適切な条件は、未だ明らかになっていない可能性が高まった（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２００９ａ）。追加研究により、確かに、ネズミＥＳＣの特徴的な特色をより多く有する別のヒト多能性細胞状態を誘導できる可能性について、その根拠が得られた。以前に記載の通り（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０ｂ）、スクリーニング法として、ナイーブ型多能性状態を支持する初期化因子および／または小分子の導入を伴う方法を用い、ネズミＥＳＣの特徴的な特色のうち一部を有する新規の多能性細胞状態を、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて安定化した（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０ｂ）。ＬＩＦサイトカインと、ＥＲＫ１／２阻害剤ＰＤ０３２５９０１およびＧＳＫ３ｂ阻害剤ＣＨＩＲ９９０２１（２ｉ添加条件と略す。ＥＲＫ１／２シグナリングおよびＧＳＫ３βの小分子阻害剤二種によりＷＮＴシグナリングを促進。「ＰＤ／ＣＨ」または「２ｉ」条件とも略す。）との存在下、ＯＣＴ４／ＫＬＦ４またはＫＬＦ２／ＫＬＦ４を過剰発現させて増殖させることによって、従来型ヒトＥＳ細胞およびｉＰＳ細胞が、当時ヒトナイーブ型多能性状態であると誤って認識さ

れていた、マウスＥＳＣとよく似た状態に変換された（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０ｂ）。これらの以前に記載されたナイーブ型ヒトＥＳＣは、胚様体分化およびｉｎ　ｖｉｖｏテラトーマ形成等いくつかの既知の基準に基づいて、多能性とされた。重要なことには、これら以前に記載されたナイーブ型ヒトＥＳＣは、エピジェネティックな点から、また分子的な点から、従来型「プライム型」ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣとは異なるということである。Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０ｂが得た「ナイーブ型」ｈＰＳＣは、両Ｘ対立遺伝子がＸＩＳＴメチル化を呈し、単一細胞クローニング効率が高く、ナイーブ型マウスＥＳ細胞に似た遺伝子発現パターンを示した（ＭＨＣクラスＩ発現の欠如、および発現オルソログ遺伝子９７７３個についての異種間不偏的遺伝子クラスタリングによるネズミナイーブ型ＥＳＣとのクラスタリング）（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０ｂ）。とはいうものの、研究は未だ大いに制限されており、疑問も解決されていないため、これまでに発表され確立された系の真の多能性と安定性も確かではない。１８回を超えて継代しても維持できたのは、導入遺伝子依存型ナイーブ型ＥＳＣ／ｉＰＳＣのみである。外来因子および２ｉ／ＬＩＦをフォルスコリンで置き換えることができたが、この場合も継代が１９回を超えると不可能となり、培養物の分化傾向が高いままであった（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０ｂ）。以前のナイーブ型ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣのＸＩＳＴは完全にメチル化されておりＸＩＳＴ転写が完全に欠如していたが（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０ｂ）、このことは、ｉｎ　ｖｉｖｏでヒト胚盤胞において明瞭なＸＩＳＴ転写（ＸＩＳＴ体、すなわちＸＩＳＴ被覆Ｘ染色体を形成しない）がみられたことと相反するものであった（Ｏｋａｍｏｔｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１）。上記知見を総合すると、これまでに単離された細胞は、ヒトＩＣＭの真の特色を反映するものではなく、多能性が不完全で分化傾向が強いことが示唆される。多くの様々な研究グループが発表している多くのデータにより、遺伝子未改変の多能性ナイーブ型ヒト幹細胞の単離が未だ十分に達成されておらず、この細胞とその分子特性（細胞の存在が立証済みであるとして）を発展させ得る条件は未だ知られていない、という考えに対する根拠が強調される（Ｄｅ　Ｌｏｓ　Ａｎｇｅｌｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２；Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０ｂ）。

【００１０】

他の背景先行技術は、Ｘｕ　Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．，２０１３（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２８８：９７６７－９７７８）；Ｌｕｏ　Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．，２０１３（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ．Ｍａｒ　２６．ｄｏｉ：１０．１００２／ｓｔｅｍ．１３７４．（電子出版、出版前））；国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ０８／０４５１６号（“Ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ　ｏｆ　Ｓｏｍａｔｉｃ　Ｃｅｌｌｓ”，Ｊａｅｎｉｓｃｈ；Ｒｕｄｏｌｆ；ｅｔ　ａｌ）を含む。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１１】

【特許文献１】国際出願第ＰＣＴ／ＵＳ０８／０４５１６号

【非特許文献】

【００１２】

【非特許文献１】Ｔａｋａｈａｓｈｉ　ａｎｄ　Ｙａｍａｎａｋａ，２００６

【非特許文献２】Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２００９ａ

【非特許文献３】Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２００９ｂ

【非特許文献４】Ｏｒｋｉｎ　ａｎｄ　Ｈｏｃｈｅｄｌｉｎｇｅｒ，２０１１

【非特許文献５】Ａｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１

【非特許文献６】Ｍａｎｓｏｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２

【非特許文献７】Ｏｎｄｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２

【非特許文献８】Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０ｂ

【非特許文献９】Ｐｏｌｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２

【非特許文献１０】Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０ａ

【非特許文献１１】Ｈａｎｎａ，２０１０
【非特許文献１２】Ｔｅｓａｒ　ｅｔ　ａｌ．，２００７
【非特許文献１３】Ｌｅｎｇｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０
【非特許文献１４】Ｏｋａｍｏｔｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０１１
【非特許文献１５】Ｔｏｍｏｄａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２
【非特許文献１６】Ｄｅ　Ｌｏｓ　Ａｎｇｅｌｅｓ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２
【非特許文献１７】Ｘｕ　Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．，２０１３（Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ，２８８：９７６７－９７７８）
【非特許文献１８】Ｌｕｏ　Ｍ．，ｅｔ　ａｌ．，２０１３（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ．Ｍａｒ　２６．ｄｏｉ：１０．１００２／ｓｔｅｍ．１３７４．（電子出版、出版前））

【発明の概要】
【課題を解決するための手段】
【００１３】
本発明のある実施形態の一態様によれば、（例えば、ヒト等の霊長類の）単離ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）であって、　非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、かつ／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とする　単離ナイーブ型多能性幹細胞が提供される。
【００１４】
本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の霊長類（例えばヒト）単離ナイーブ型ＰＳＣは多能性状態にあり、上記単離ナイーブ型ＰＳＣは、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、ＪＮＫ阻害剤、およびＰ３８阻害剤からなる群より選択される薬剤の存在下においてインキュベートされると、上記多能性状態を維持しかつ多能性表現型を維持する。
【００１５】
本発明のある実施形態によれば、霊長類（例えばヒト）プライム型ＰＳＣにおけるＣｐＧアイランドのメチル化レベルと比較して、上記霊長類（例えばヒト）ナイーブ型ＰＳＣにおけるＣｐＧアイランドのメチル化レベルが低いことを特徴とする。
【００１６】
本発明のある実施形態の一態様によれば、本発明のある実施形態の霊長類（例えばヒト）単離ナイーブ型ＰＳＣ細胞を少なくとも１０％含む単離ナイーブ型ＰＳＣ集団が提供される。
【００１７】
本発明のある実施形態の一態様によれば、本発明のある実施形態の単離ナイーブ型ＰＳＣ、または本発明のある実施形態の単離ナイーブ型ＰＳＣ集団、および培養基を含有する細胞培養液が提供される。
【００１８】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、少なくとも１０回継代するあいだ上記ナイーブ型ＰＳＣを未分化多能性状態で維持できる。
【００１９】
本発明のある実施形態の一態様によれば、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３β阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＳＴＡＴ３活性化因子、ならびに塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）、プロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤、およびＮＯＴＣＨ阻害剤からなる群より選択される少なくとも一種の薬剤を含有する、培養基が提供される。
【００２０】
本発明のある実施形態の一態様によれば、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３β阻害剤、ｐ３

８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＳＴＡＴ３活性化因子、ならびに形質転換増殖因子受容体（ＴＧＦＲ）阻害剤、線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤、プロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤、およびＮＯＴＣＨ阻害剤からなる群より選択される少なくとも一種の薬剤を含有する、培養基が提供される。

【００２１】

本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子は白血病抑制因子（ＬＩＦ）およびインターロイキン６（ＩＬ６）からなる群より選択される。

【００２２】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ１）、インスリン様増殖因子ＩＩ（ＩＧＦＩＩ）、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）シグナリング阻害剤、ソニックヘッジホッグ経路（ＳＨＨ）阻害剤、ＥＲＫ５阻害剤、フォルスコリン、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される少なくとも一種のさらなる薬剤をさらに含有する。

【００２３】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ１）、インスリン様増殖因子ＩＩ（ＩＧＦＩＩ）、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、ソニックヘッジホッグ経路（ＳＨＨ）阻害剤、ＥＲＫ５阻害剤、フォルスコリン、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される少なくとも一種のさらなる薬剤をさらに含有する。

【００２４】

本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、上記少なくとも一種の薬剤はＰＫＣ阻害剤を含む。

【００２５】

本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、上記少なくとも一種の薬剤はＴＧＦβ１およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含む。

【００２６】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＦＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。

【００２７】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＴＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。

【００２８】

本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、上記少なくとも一種の薬剤はＴＧＦβ１およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含む。

【００２９】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＦＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。

【００３０】

本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、上記少なくとも一種の薬剤はｂＦＧＦおよびＴＧＦβ１を含む。

【００３１】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する。

【００３２】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基はプロテインキナーゼＣ阻害剤をさらに含有する。

【００３３】

本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、上記少なくとも一種の薬剤はｂＦＧＦ、ＲＯＣＫ阻害剤、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）阻害剤、ＮＯＴＣＨ阻害剤、および形質転換増殖因子受容体（ＴＧＦＲ）阻害剤を含む。

【００３４】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基はソニックヘッジホッグ経路（ＳＨＨ）阻害剤をさらに含む。

【００３５】

本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、上記少なくとも一種の薬剤はＮＯＴＣＨ阻害剤および線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤を含む。

【００３６】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、インスリン様増殖因子ＩＩ（ＩＧＦＩＩ）、幹細胞因子（ＳＣＦ）、および形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）からなる群より選択される薬剤をさらに含有する。

【００３７】

本発明のある実施形態の一態様によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培養基が提供される。

【００３８】

本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の培養基はＦＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。

【００３９】

本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の培養基はＴＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。

【００４０】

本発明のある実施形態の一態様によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＴＧＦβ１、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培養基が提供される。

【００４１】

本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の培養基はＦＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。

【００４２】

本発明のある実施形態の一態様によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、および形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）を含有する培養基が提供される。

【００４３】

本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の培養基はＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する。

【００４４】

本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の培養基はプロテインキナーゼＣ阻害剤をさらに含有する。

【００４５】

本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の培養基は、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、ＩＧＦ１、ＩＧＦＩＩ、フォルスコリン、ＦＧＦＲ阻害剤、ＴＧＦＲ阻害剤、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される因子をさらに含有する。

【００４６】

本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の培養基はＢＭＰ受容体Ｉ型（ＡＬＫ２，３，６）阻害剤をさらに含有する。

【００４７】

本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の培養基はアスコルビン酸をさらに含有する。

【００４８】

本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の培養基はオレイン酸をさらに含有する。

【００４９】

本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の培養基はリノール酸をさらに含有する。
【００５０】
本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の培養基はピペコリン酸をさらに含有する。
【００５１】
本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の培養基は動物血清を含有しない。
【００５２】
本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の培養基は血清代替物をさらに含有する。
【００５３】
本発明のある実施形態の一態様によれば、細胞および本発明のある実施形態の培養基を含有する細胞培養液が提供される。
【００５４】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、少なくとも２回継代するあいだナイーブ型多能性幹細胞を未分化状態で維持できる。
【００５５】
本発明のある実施形態の一態様によれば、ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる方法であって、　非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、上記非ナイーブ型ＰＳＣからナイーブ型ＰＳＣを発生させることのできる条件下においてインキュベートする工程を有し、（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣはＸ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、かつ／または　上記ナイーブ型ＰＳＣにおける転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とし、　結果として上記ナイーブ型ＰＳＣを発生させる方法が提供される。
【００５６】
本発明のある実施形態によれば、上記ＰＳＣは霊長類ＰＳＣである。
【００５７】
本発明のある実施形態によれば、上記ＰＳＣはヒトＰＳＣである。
【００５８】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は本発明のある実施形態の培養基を含む。
【００５９】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は低酸素を含む。
【００６０】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３β阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＳＴＡＴ３活性化因子、ならびに塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）、プロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤、およびＮＯＴＣＨ阻害剤からなる群より選択される少なくとも一種の薬剤を含有する培養基を含み、上記ＳＴＡＴ３活性化因子は白血病抑制因子（ＬＩＦ）およびインターロイキン６（ＩＬ６）からなる群より選択される。
【００６１】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３β阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＳＴＡＴ３活性化因子、ならびに形質転換増殖因子受容体（ＴＧＦＲ）阻害剤、線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤、プロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤、およびＮＯＴＣＨ阻害剤からなる群より選択される少なくとも一種の薬剤を含有する培養基を含み、上記ＳＴＡＴ３活性化因子は白血病抑制因子（ＬＩＦ）およびインターロイキン６（ＩＬ６）からなる群より選択される。

【００６２】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ１）、インスリン様増殖因子ＩＩ（ＩＧＦＩＩ）、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）シグナリング阻害剤、ソニックヘッジホッグ経路（ＳＨＨ）阻害剤、ＥＲＫ５阻害剤、フォルスコリン、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、
および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される少なくとも一種のさらなる薬剤をさらに含有する培養基を含む。
【００６３】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ１）、インスリン様増殖因子ＩＩ（ＩＧＦＩＩ）、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、ソニックヘッジホッグ経路（ＳＨＨ）阻害剤、ＥＲＫ５阻害剤、フォルスコリン、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される少なくとも一種のさらなる薬剤をさらに含有する培養基を含む。
【００６４】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培養基を含む。
【００６５】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、およびＪＮＫ阻害剤を含有する培養基を含む。
【００６６】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびＢＭＰ阻害剤を含有する培養基を含む。
【００６７】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＦＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。
【００６８】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＴＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。
【００６９】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＴＧＦβ１、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培養基を含む。
【００７０】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＦＧＦＲｉをさらに含有する。
【００７１】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、および形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）を含有する培養基を含む。
【００７２】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する。
【００７３】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はプロテインキナーゼＣ阻害剤をさらに含有する。
【００７４】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、ＩＧＦ１、ＩＧＦＩＩ、フォルスコリン、ＦＧＦＲ阻害剤、ＴＧＦＲ阻害剤、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される因子をさらに含有する。

【００７５】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はアスコルビン酸をさらに含有する。
【００７６】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はオレイン酸をさらに含有する。
【００７７】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はリノール酸をさらに含有する。
【００７８】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はピペコリン酸をさらに含有する。
【００７９】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は動物血清を含有しない。
【００８０】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は血清代替物をさらに含有する。
【００８１】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＭＢＤ３阻害剤をさらに含有する。
【００８２】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はクロモドメインヘリカーゼＤＮＡ結合タンパク質４（ＣＨＤ４）阻害剤をさらに含有する。
【００８３】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＰ６６アルファ・コイルドコイル・ドメインをさらに含有する。
【００８４】
本発明のある実施形態によれば、上記非ナイーブ型ＰＳＣは、プライム型ＰＳＣ、胚盤胞、人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）、および体細胞からなる群より選択される。
【００８５】
本発明のある実施形態によれば、上記非ナイーブ型ＰＳＣが体細胞を含む場合、上記方法は上記体細胞を脱分化条件に供する工程をさらに有し、結果として人工多能性幹細胞を得る。
【００８６】
本発明のある実施形態によれば、上記脱分化条件は、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃからなる群より選択される少なくとも二種の増殖因子を上記体細胞中において発現させる工程を含む。
【００８７】
本発明のある実施形態の一態様によれば、体細胞からの人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）の発生を改善する方法であって、　（ａ）Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃからなる群より選択される少なくとも二種の増殖因子を、体細胞中において発現させる工程、ならびに　（ｂ）上記体細胞中におけるＭｂｄ３の発現および／または活性を阻害する工程を有し、　結果として体細胞からのｉＰＳＣの発生を改善する方法が提供される。
【００８８】
本発明のある実施形態によれば、Ｍｂｄ３活性の阻害を、ヌクレオソームリモデリング脱アセチル化酵素（ＮｕＲＤ）複合体へのＭｂｄ３の結合を阻害することによって実施する。
【００８９】
本発明のある実施形態によれば、Ｍｂｄ３のＮｕＲＤ複合体への結合の阻害を、クロモドメインヘリカーゼＤＮＡ結合タンパク質４（ＣＨＤ４）阻害剤を用いて実施する。
【００９０】
本発明のある実施形態によれば、Ｍｂｄ３のＮｕＲＤ複合体への結合の阻害を、Ｐ６６アルファ・コイルドコイル・ドメインを用いて実施する。
【００９１】
本発明のある実施形態によれば、Ｍｂｄ３発現の阻害をプロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）

阻害剤を用いて実施する。
【００９２】
本発明のある実施形態によれば、上記方法は、上記体細胞において胚性幹（ＥＳ）細胞発現Ｒａｓ（ＥＲＡＳ）コード配列を外因的に発現させる工程、または上記体細胞において上記ＥＲＡＳの内因的発現を活性化する工程をさらに有する。
【００９３】
本発明のある実施形態によれば、上記発現をさせる前のＭｂｄ３のレベルのうち１０～３０％がＭｂｄ３の上記阻害により阻害されるよう、上記発現を少なくとも４８時間実施する。
【００９４】
本発明のある実施形態によれば、上記発現を約４８時間実施し、上記約４８時間の後で上記阻害を実施する。
【００９５】
本発明のある実施形態によれば、上記ｉＰＳＣはネズミｉＰＳＣである。
【００９６】
本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の方法は、ＬＩＦ、ＥＲＫ１／２阻害剤、およびＧＳＫ３ｂ阻害剤を含有する培地中で上記ネズミｉＰＳＣを培養する工程をさらに有する。
【００９７】
本発明のある実施形態によれば、上記ｉＰＳＣが霊長類（例えばヒト）ｉＰＳＣである場合、上記方法は、（ｃ）ＬＩＦ、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、Ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、および形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）を含有する培養基中で上記霊長類（例えばヒト）ｉＰＳＣを培養する工程をさらに有する。
【００９８】
本発明のある実施形態によれば、上記培地はＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する。
【００９９】
本発明のある実施形態によれば、工程（ｃ）を、工程（ａ）における発現から約４８時間後に実施する。
【０１００】
本発明のある実施形態によれば、発現を、上記増殖因子のＤＮＡトランスフェクションによって実施する。
【０１０１】
本発明のある実施形態によれば、発現を、上記増殖因子のＲＮＡトランスフェクションによって実施する。
【０１０２】
本発明のある実施形態によれば、発現を、上記増殖因子のタンパク質トランスフェクションによって実施する。
【０１０３】
本発明のある実施形態によれば、上記ＰＳＣは、胚性幹細胞（ＥＳＣ）、人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）、および胚性生殖細胞（ＥＧＣ）からなる群より選択される。
【０１０４】
本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣはＸＩＳＴを発現する。
【０１０５】
本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣはＸＩＳＴ体を含まない。
【０１０６】
本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＥＳＣは分化誘導されるとＸ不活性化可能となる。
【０１０７】
本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣは内胚葉性、中胚葉性、および外

胚葉性の胚性胚葉に分化できる。
【０１０８】
本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣは２０回を超えて継代培養しても上記未分化多能性状態を維持できる。
【０１０９】
本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣのＭＨＣクラスＩの発現レベルは、同一検出アッセイ条件下におけるプライム型ＰＳＣの場合より低く、上記プライム型ＰＳＣは、ＸＩＳＴのメチル化対立遺伝子１つおよびＸＩＳＴの非メチル化対立遺伝子１つを呈し、ＸＩＳＴを発現し、ＸＩＳＴ体を呈し、かつＨ３Ｋ２７ｍｅ３／ポリコーム集積を呈する。
【０１１０】
本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣは、染色体上で休止しているＲＮＡポリメラーゼＩＩが、同一アッセイ条件下におけるプライム型ＰＳＣの場合よりも少なくとも１０％多いことを特徴とし、上記プライム型ＰＳＣは、ＸＩＳＴのメチル化対立遺伝子１つおよびＸＩＳＴの非メチル化対立遺伝子１つを呈し、ＸＩＳＴを発現し、ＸＩＳＴ体を呈し、かつＨ３Ｋ２７ｍｅ３／ポリコーム集積を呈する。
【０１１１】
本発明のある実施形態によれば、上記単離ナイーブ型ＰＳＣは、プライム型ＰＳＣの場合と比較してｐ３８経路が阻害されている。
【０１１２】
本発明のある実施形態によれば、上記単離ナイーブ型ＰＳＣは、プライム型ＰＳＣの場合と比較してＪＮＫ経路が阻害されている。
【０１１３】
本発明のある実施形態によれば、上記単離ナイーブ型ＰＳＣは、プライム型ＰＳＣの場合と比較してＲＯＣＫ経路が阻害されている。
【０１１４】
本発明のある実施形態の一態様によれば、ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる方法であって、非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、上記非ナイーブ型ＰＳＣからナイーブ型ＰＳＣを発生させることのできる条件下においてインキュベートする工程を有し、　上記ナイーブ型ＰＳＣは、非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、かつ／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とし、　上記条件は、ＫＯ－ＤＭＥＭ、Ｎ２サプリメント（Ｇｉｂｃｏ）、Ａｌｂｕｍａｘ　Ｉ、ＬＩＦ、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培養基を含み、　結果として上記ナイーブ型ＰＳＣを発生させる方法 が提供される。
【０１１５】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＦＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。
【０１１６】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＴＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。
【０１１７】
本発明のある実施形態の一態様によれば、ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる方法であって、非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、上記非ナイーブ型ＰＳＣからナイーブ型ＰＳＣを発生させることのできる条件下においてインキュベートする工程を有し、　上記ナイーブ型ＰＳＣは、非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型Ｐ

ＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、かつ／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを
特徴とし、上記条件は、ＫＯ－ＤＭＥＭ、Ｎ２サプリメント（Ｇｉｂｃｏ）、Ａｌｂｕｍａｘ　Ｉ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＬＩＦ、ＴＧＦβ１、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培養基を含み、　結果として上記ナイーブ型ＰＳＣを発生させる方法 が提供される。

【０１１８】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＦＧＦＲｉをさらに含有する。
【０１１９】
本発明のある実施形態の一態様によれば、ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる方法であって、非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、上記非ナイーブ型ＰＳＣからナイーブ型ＰＳＣを発生させることのできる条件下においてインキュベートする工程を有し、　上記ナイーブ型ＰＳＣは、非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、
（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、かつ／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とし、　上記条件は、ＫＯ－ＤＭＥＭ、Ｎ２サプリメント（Ｇｉｂｃｏ）、Ａｌｂｕｍａｘ　Ｉ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＬＩＦ、ｂＦＧＦ、ＴＧＦβ１、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、およびＪＮＫ阻害剤を含有する培養基を含み、　結果として上記ナイーブ型ＰＳＣを発生させる方法 が提供される。
【０１２０】
本発明のある実施形態の一態様によれば、ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる方法であって、非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、上記非ナイーブ型ＰＳＣからナイーブ型ＰＳＣを発生させることのできる条件下においてインキュベートする工程を有し、　上記ナイーブ型ＰＳＣは、非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、
（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、かつ／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とし、　上記条件は、ＫＯ－ＤＭＥＭ、Ｎ２サプリメント（Ｇｉｂｃｏ）、限定脂質濃縮液（Ｇｉｂｃｏ）、ＬＩＦ、ｂＦＧＦ、ＴＧＦβ１、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびＭＢＤ３阻害剤を含有する培養基を含み、　結果として上記ナイーブ型ＰＳＣを発生させる方法 が提供される。
【０１２１】
本発明のある実施形態の一態様によれば、本発明のある実施形態の方法によって取得できる単離ナイーブ型多能性幹細胞が提供される。
【０１２２】
本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型多能性幹細胞は非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、かつ／または
転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とする。

【０１２３】
本発明のある実施形態の一態様によれば、分化細胞を発生させる方法であって、本発明のある実施形態により発生させたナイーブ型多能性幹細胞または本発明のある実施形態の単離ナイーブ型多能性幹細胞を分化条件に供する工程を有し、結果として分化細胞を発生させる方法が提供される。
【０１２４】
本発明のある実施形態の一態様によれば、始原生殖細胞を発生させる方法であって、霊長類（例えばヒト）ナイーブ型多能性幹細胞を、上記霊長類ナイーブ型多能性幹細胞から始原生殖細胞を誘導できるよう選択された培養基中において培養する工程を有し、上記培養基はＲｈｏキナーゼ（ＲＯＣＫ）阻害剤および骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）を含有し、結果として上記始原生殖細胞を発生させる方法が提供される。
【０１２５】
本発明のある実施形態によれば、上記霊長類ナイーブ型多能性幹細胞は非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、かつ／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とする。
【０１２６】
本発明のある実施形態によれば、上記始原生殖細胞はＣＤ６１（インテグリンベータ３）発現パターンを特徴とする。
【０１２７】
本発明のある実施形態によれば、上記始原生殖細胞はＣＤ６１$^{+}$／ＳＳＥＡ４$^{+}$発現パターンを特徴とする。
【０１２８】
本発明のある実施形態によれば、始原生殖細胞を発生させる上記方法に用いる上記培養基は、白血病抑制因子（ＬＩＦ）、幹細胞因子（ＳＣＦ）、および上皮増殖因子（ＥＧＦ）からなる群より選択される少なくとも一種の薬剤をさらに含有する。
【０１２９】
本発明のある実施形態の一態様によれば、本発明のある実施形態の方法により発生させた霊長類始原生殖細胞を含む単離霊長類始原生殖細胞集団が提供される。
【０１３０】
本発明のある実施形態によれば、上記単離霊長類始原生殖細胞集団は、ＣＤ６１$^{+}$／ＳＳＥＡ４$^{+}$発現パターンを特徴とする始原生殖細胞を少なくとも５０％含む。
【０１３１】
本発明のある実施形態の一態様によれば、処置を必要とする対象を処置する方法であって、本発明のある実施形態の始原生殖細胞を上記対象の生殖腺組織に投与する工程を有し、結果として、処置を必要とする上記対象を処置する、方法が提供される。
【０１３２】
本発明のある実施形態によれば、上記対象は不妊症である。
【０１３３】
本発明のある実施形態の一態様によれば、本発明のある実施形態の霊長類始原生殖細胞および不妊症処置用の医薬を有するキットが提供される。
【０１３４】
本発明のある実施形態の一態様によれば、キメラ動物を発生させる方法であって、本発明のある実施形態の単離ナイーブ型霊長類（例えばヒト）ＰＳＣまたは本発明のある実施形態の始原生殖細胞を宿主動物の着床前胚に導入する工程を有し、結果としてキメラ動物を発生させる方法が提供される。
【０１３５】

本発明のある実施形態によれば、上記方法は、上記着床前胚をｅｘ　ｖｉｖｏまたはｉｎ　ｖｉｖｏにおいて成長させる工程をさらに有する。

【０１３６】

本発明のある実施形態によれば、上記導入をｉｎ　ｖｉｖｏにおいて実施する。

【０１３７】

本発明のある実施形態によれば、上記導入をｉｎ　ｖｉｔｒｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏにおいて実施する。

【０１３８】

本発明のある実施形態によれば、上記着床前胚が含む細胞は少なくとも４個である。

【０１３９】

本発明のある実施形態によれば、上記着床前胚が含む細胞は１２８個を超えない。

【０１４０】

本発明のある実施形態によれば、上記宿主動物はマウスである。

【０１４１】

本発明のある実施形態によれば、上記単離ナイーブ型ＰＳＣまたは上記始原生殖細胞は上記宿主動物と同種である。

【０１４２】

本発明のある実施形態によれば、上記単離ナイーブ型ＰＳＣまたは上記始原生殖細胞は上記宿主動物とは異種である。

【０１４３】

特に定義がなければ、本明細書中の技術的および／または科学的用語はすべて、本発明が属する分野の当業者が一般的に理解できる意味と同様の意味で用いられる。本明細書中に記載するものと類似または等価の方法および材料を本発明の実施形態の実施または試験において用い得るが、以下に、方法および／または材料の具体例を記載する。矛盾が生じる場合は、本特許明細書と定義にしたがう。また、材料、方法、および例示は説明を目的とするものであり、制限を加えることを必ずしも意図しない。

【図面の簡単な説明】

【０１４４】

本発明のある実施形態を、付属の図面を参照して、具体例を示す目的のみにおいて本明細書中に記載する。特定の図面を参照して詳細に記載するが、図面中の詳細事項は具体例であり、本発明の実施形態を説明して考察する目的で記載することを強調する。この点において、当業者であれば、記載と図面とを参照することにより、本発明の実施形態をどのように実施できるかを明白に理解する。　以下に図面について説明する。

【図１Ａ－Ｎ】図１Ａ～Ｎは、エピジェネティックな逆戻りによるマウスプライム型多能性細胞のナイーブ型多能性獲得をＭｂｄ３の阻害が促進することを示す。図１Ａ～Ｂは、プライム型ＥｐｉＳＣからナイーブ型ＥＳＣへのエピジェネティックな逆戻りを促進できる因子を選別するｓｉＲＮＡスクリーニングを示す。スクリーニングにはＮａｎｏｇ－ＧＦＰマウスＥｐｉＳＣを用いた。２ｉ／ＬＩＦ条件下において増やした後のナイーブ型多能性形成の特異的マーカーとして、Ｎａｎｏｇ－ＧＦＰ再活性化を用いる。図１Ａは、ｓｉＲＮＡスクリーニングを示す概略図である。図１Ｂは、試験したｓｉＲＮＡで阻害した結果得たＮａｎｏｇ－ＧＦＰ発現細胞の割合（パーセント）を示すヒストグラムである。Ｍｂｄ３の阻害によって、ＥｐｉＳＣのナイーブ型ＥＳＣへの初期化が著しく増大したことに注目する。図１Ｃ～Ｇについて、２ｉ／ＬＩＦ中におけるＭｂｄ３$^{+/+}$およびＭｂｄ３$^{flox/-}$ＥｐｉＳＣのナイーブ型細胞への逆戻りを調べた。図１Ｃは、ＥｐｉＳＣからナイーブ型ＥＳ様コロニーへの逆戻りを調べたアッセイを示す概略図である。図１Ｄ～Ｇは、Ｍｂｄ３$^{+/+}$ＥｐｉＳＣ（図１Ｄ）またはＭｂｄ３$^{flox/-}$ＥｐｉＳＣ（図１Ｅ）からのナイーブ型ＥＳ様コロニーの形成を示す顕微鏡写真である。Ｍｂｄ３欠損細胞において初期化効率が著しく増加したことに注目する。図１Ｆ～Ｇについて、Ｍｂｄ３$^{flox/-}$Ｒｏｓａ２６－ＣｒｅＥＲ$^{+/-}$Ｎａｎｏｇ－ＧＦＰ$^{+/-}$細胞を、位相差顕微鏡検査（図１Ｆ）および蛍光顕微鏡検査（図１Ｇ）により示す。Ｎａｎｏｇ－Ｇ

ＦＰマーカーが均一に再活性化されていることに注目する（図１Ｇ）。図１Ｈは、異なる変異体株をナイーブ型ＥＳＣとするＥｐｉＳＣ初期化効率についての、単一細胞クローニング効率および定量結果を示す。とりわけ、図示する株において安定的に発現していたｐＢＲＹ－Ｍｂｄ３レスキューコンストラクトについて、初期化効率がＭｂｄ３$^{+/+}$ＷＴ細胞での観察結果と同等まで減少した。図は、２ｉ／ＬＩＦ条件下において種々の変異体株をナイーブ型細胞に逆戻りさせた後のＮａｎｏｇ－ＧＦＰ$^{+}$細胞の割合（パーセント）の平均を示すヒストグラムである。図１Ｉ～Ｊは、異なる変異体ＥＳ株におけるＭｂｄ３発現レベルを示すウェスタンブロット分析である。Ｍｂｄ３$^{+/+}$細胞と比較して、Ｍｂｄ３$^{flox/-}$細胞におけるＭｂｄ３発現レベルは８０％を超えて減少した。Ｍｂｄ３$^{-/-}$細胞にはＭｂｄ３タンパク質が全く存在しない。図１Ｋ～Ｌは、Ｍｂｄ３欠損に続いて初期化したＥｐｉＳＣから得たアグーチ色のキメラの写真である。写真は、逆戻りによりナイーブ型多能性を獲得した細胞をマイクロインジェクションした後で発生させたキメラマウスの２つの例である。アグーチ色の毛色は注入した細胞に由来し、黒の毛色は宿主マウスに由来する。これらの結果から、逆戻りさせた方の細胞はナイーブ型細胞として機能的に多能性であり、ｉｎ　ｖｉｖｏにおける分化の際に分化細胞を誘発できたことがわかる。図１Ｍは、Ｅ８．５日のＰＧＣを単離する目的におけるキメラの発生を示す概略図である。ＥＳＣ系Ｍｂｄ３$^{flox/-}$およびＭｂｄ３$^{+/+}$（Ｍｂｄ３過剰発現ｐＢＲＹ－Ｍｂｄ３レスキュー対立遺伝子有りまたは無し、図示する通り）について、Ｏｃｔ４－ＧＦＰレポーターによりターゲティングし、宿主キメラ中に注入した。図１Ｎは、ＰＧＣからのナイーブ型ＥＳ様細胞の発生の評価を示すヒストグラムである。Ｅ８．５日の始原生殖細胞（ＰＧＣ）を選別してナイーブ型条件に移し（Ｎ２Ｂ２７および２ｉ／ＬＩＦ／ＳＣＦ（幹細胞因子、１０ｎｇ／ｍｌ）／ｂＦＧＦ（塩基性線維芽細胞増殖因子、８ｎｇ／ｍｌ））、ＥＳ様胚性生殖細胞（ＥＧ細胞）の発生効率を評価した。Ｍｂｄ３欠損ＰＧＣは、ｅｘ　ｖｉｖｏにおいてナイーブ型ＥＳ様細胞にほぼ１００％の効率で変換する。

【図１Ｏ－Ｔ】図１Ｏ～Ｔは、発生途中のマウス胚におけるＭｂｄ３の経時的な発現を共焦点免疫染色分析により調べた結果を示す画像である。図１Ｏは接合期、図１Ｐは２細胞期、図１Ｑは８細胞期、図１Ｒは桑実胚期、図１Ｓは胎齢３．２５日の胚盤胞、図１Ｔは胎齢３．７５日の胚盤胞を示す。矢印は極体を示す。受精後にＭｂｄ３発現が減少すること、また、後期胚盤胞期でどのように再度発現するのかに注目する。右のパネルは、破線で強調した領域を拡大して表す。

【図２Ａ－Ｏ】図２Ａ～Ｏは、Ｍｂｄ３$^{-/-}$胚盤胞からのＥＳＣの誘導を示す。図２Ａは、ナイーブ型マウスＥＳＣの発生を示す概略図である。Ｍｂｄ３$^{+/-}$ヘテロ接合体マウスを交配し、ナイーブ型限定２ｉ／ＬＩＦ条件下において胚盤胞からＥＳＣを誘導した。メンデル比で予期した通りにＭｂｄ３$^{-/-}$ＥＳＣを得た。図２Ｂ～Ｃは、９日目におけるＭｂｄ３$^{-/-}$ＥＳ細胞の最初のコロニー（図２Ｂ）、ならびに継代４回目で確立および画像化したナイーブ型Ｍｂｄ３$^{-/-}$ＥＳＣ（図２Ｃ）の画像であり、いずれもＥＳ様の形態を呈している。図２Ｄ～Ｅは、ＭＢＤ３野生型（＋／＋）ＥＳＣおよびＭＢＤ３欠損（－／－）ＥＳＣにおいてアルカリホスファターゼ（ＡＰ）多能性幹細胞マーカーを染色した画像である。注目すべきは、ＭＢＤ３$^{-/-}$ＥＳＣにおけるＡＰ染色が著しく、ＭＢＤ３$^{-/-}$ＥＳＣが幹細胞マーカーを通常発現しているとわかる点である。図２Ｆ～Ｇは、ＭＢＤ３$^{+/-}$（ヘテロ接合体）（図２Ｆ）およびＭＢＤ３$^{-/-}$（欠損）（図２Ｇ）においてＯｃｔ４を免疫染色した画像である。これらの結果から、ｉｎ　ｖｉｖｏおよびｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける多能性の確立にＭｂｄ３は必須でないこと、また、Ｍｂｄ３欠損ＥＳ細胞はＥＳおよびｉＰＳの野生型細胞と区別がつかないことがわかる。図２Ｈ～Ｏは、ＭＢＤ３野生型（＋／＋）ＥＳＣまたはＭＢＤ３欠損（－／－）ＥＳＣの多能性マーカーについて調べたウェスタンブロット分析を示す。図２ＨはＭｂｄ３、図２ＩはＧａｐｄｈ、図２ＪはＳｏｘ２、図２ＫはＳａｌｌ４、図２ＬはＫｌｆ４、図２ＭはＭｉ２β、図２ＮはＫｌｆ５、図２Ｏはｃ－Ｍｙｃを示す。

【図３Ａ－Ｇ】図３Ａ～Ｇは、マウス細胞における決定的初期化のための遺伝子操作系を

示す。図３Ａについて、本発明者らは、（１）Ｏｃｔ４－ＧＦＰレポーター、（２）ｍＣｈｅｒｒｙ構造的発現マーカー、（３）ｍ２ＲｔＴａ、および（４）ＴｅｔＯ誘導性ＯＫＳＭポリシストロン性カセットを有する、初期化可能なＭｂｄ３$^{+/+}$およびＭｂｄ３ｆｌｏｘ／－マウスｉＰＳＣ株を確立した。これらの株を宿主胚盤胞中に注入し、分化した派生物をｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて再度単離した。続いて、ＤＯＸ誘導後に初期化の効率および進行を分析できる。この厳密な系によって、図４Ａ～Ｏに示すように６日間で１００％初期化できる。さらに、この遺伝子組換え系により、均一の体細胞を無制限に誘導でき、ＤＯＸ処理からｉＰＳＣが完全に発生するまでの７日間のあいだ２４時間毎に回収できる。図３Ｂ～Ｄは、単離したＭｂｄ３$^{flox/-}$ＥＳＣの位相差顕微鏡写真（図３Ｂ）および蛍光顕微鏡写真である。図３ＣはｍＣｈｅｒｒｙ発現（赤）の染色結果を示す。図３ＤはＯｃｔ４－ＧＦＰ発現（緑）の染色結果を示す。図３Ｅ～Ｆは、抗Ｍｂｄ３抗体（図３Ｅ）および抗Ｈｓｐ９０抗体（図３Ｆ）染色によるウェスタンブロット分析を示す。図は、ｐＢＲＹ－Ｍｂｄ３レスキュー導入遺伝子を添加または添加しない場合のＭｂｄ３$^{-/-}$ＥＳＣ／ｉＰＳＣにおけるＭｂｄ３発現を示す（クローンを回収した）。図３Ｇは、Ｍｂｄ３$^{flox/-}$ＥＳＣ中に導入したＣｒｅ－ＥＲノックインコンストラクトでＲｏｓａ２６座を正確に遺伝子ターゲティングした際のサザンブロット分析を示す。上記結果を合わせると、マウス細胞における決定的初期化のための遺伝子操作系がわかる。

【図４Ａ－Ｐ】図４Ａ～Ｐは、Ｍｂｄ３欠損後のマウス線維芽細胞のｉＰＳＣへの決定的かつ同調的な初期化を示す。図４Ａについて、Ｍｂｄ３　ＷＴ細胞およびＭｂｄ３欠損（ｆｌｏｘ／－または－／－）細胞を、ポリシストロン性ＯＫＳＭカセットを発現するレンチウイルスに直接感染させ、マウスナイーブ型２ｉ／ＬＩＦ条件下において増やした。Ｏｃｔ４－ＧＦＰ$^{+}$細胞の割合（パーセント）を測定することによって初期化効率を評価したところ、Ｍｂｄ３欠損細胞で観察されたＯｃｔ４－ＧＦＰ$^{+}$レベルが９５％を超えたことに注目した。図４Ｂについて、Ｏｃｔ４－ＧＦＰレポーターおよびｍＣｈｅｒｒｙ構造的発現マーカーを有する二次的初期化可能線維芽細胞を、単一細胞選別し、ＤＯＸ初期化に供した。Ｏｃｔ４－ＧＦＰ$^{+}$のウェル数をｍＣｈｅｒｒｙ＋（播く効率を標準化するためにｍＣｈｅｒｒｙを用いた）のウェル数で割って、１０日目の初期化効率を計算した。２ｉ／ＬＩＦ条件を２日目から開始した。Ｍｂｄ３欠損試料（ｆｌｏｘ／－または－／－）中のｍｃｈｅｒｒｙ＋クローンがすべてＯｃｔ４－ＧＦＰ＋細胞になったことに注目する（緑色で示す）。Ｍｂｄ３$^{+/+}$試料中のみにおいて、特異的多能性マーカーＯｃｔ４－ＧＦＰを活性化しない（赤四角で示す）ｍＣｈｅｒｒｙ＋クローン集団があった。図４Ｃ～Ｅは、Ｍｂｄ３$^{+/+}$ｉＰＳＣ（図４Ｃ）、Ｍｂｄ３$^{flox/-}$ｉＰＳＣ（図４Ｄ）、またはＭｂｄ３－／－ｉＰＳＣ（図４Ｅ）クローンにおける、多能性マーカーＯｃｔ４（左）、Ｎａｎｏｇ（中央）、またはアルカリホスファターゼ（ＡＰ）（右）の免疫染色分析を示す。Ｍｂｄ３欠損後に得たｉＰＳＣが通常、野生型Ｍｂｄ３$^{+/+}$細胞の場合と同様、試験した多能性マーカーすべてを発現することに注目する。図４Ｆ～Ｇは、毛色がアグーチ色のキメラの写真（図４Ｆ）と、誘導したＭｂｄ３$^{flox/-}$ｉＰＳＣから生殖系への伝達の写真（図４Ｇ）である。これより、Ｍｂｄ３欠損ｉＰＳＣは、宿主マウスに注入すると成体キメラ動物を誘発でき、かつ多能性である、ということがわかる。図４Ｈ～Ｉは、１ウェルあたり細胞５０個を播いた後のＭｂｄ３$^{+/+}$細胞（図４Ｈ）およびＭｄｂ３$^{flox/-}$細胞（図４Ｉ）の初期化を示すライブイメージングの画像である。Ｍｂｄ３$^{flox/-}$細胞においてＥＳ様コロニーの形成が著しく増加したことに注目する。図４Ｊ～Ｏは、Ｍｄｂ３$^{+/+}$細胞（図４Ｊ、４Ｋ、および４Ｌ）またはＭｄｂ３$^{flox/-}$細胞（図４Ｍ、４Ｎ、および４Ｏ）において、ｍＣｈｅｒｒｙ（図４Ｊおよび４Ｍ）、Ｏｃｔ４－ＧＦＰ（図４Ｋおよび４Ｎ）、およびｍＣｈｅｒｒｙ　Ｏｃｔ４－ＧＦＰ（図４Ｌおよび４Ｏ）を染色した際の免疫蛍光を示す画像である。６日目までに、ほぼ９０％を超えるｍＣｈｅｒｒｙ＋およびＯｃｔ４－ＧＦＰ＋がＭｂｄ３$^{flox/-}$細胞に共存していたが、ＷＴ細胞ではこれはみられなかった。図４Ｐは、Ｍｂｄ３$^{flox/-}$細胞においてＯｃｔ４－ＧＦＰ＋コロニーの形成が６日目までに累積ほぼ９９％となったことをライブイメージング追跡によって示すグラフである（赤のグラフ）。Ｏｃｔ

４－ＧＦＰ活性化が同調するのは４～５日目に限られていることに注目する（赤線および青棒グラフ）。

【図４Ｑ－Ｒ】図４Ｑ～Ｒは、非常に高効率かつ同調したｉＰＳＣ初期化と多能性獲得を示す。図４Ｑは、Ｍｂｄ$^{3\,flox/-}$（赤プロット）およびＭｂｄ３$^{+/+}$（青プロット）におけるＯｃｔ４－ＧＦＰ＋コロニーの累積をライブイメージング追跡によって示すグラフである。分割した全コロニーについてＯｃｔ４－ＧＦＰ活性化を統計的に計算した。Ｏｃｔ４－ＧＦＰ活性化が同調するのは４～５日目に限られていることに注目する。図４Ｒは、ライブイメージング追跡で測定した単一コロニー中のＯｃｔ４－ＧＦＰ$^{+}$細胞の割合について、その平均値を示すグラフである。個々のＭｂｄ３$^{flox/-}$クローン集団中の細胞の約８５％が６日目までにＯｃｔ４－ＧＦＰ＋細胞になった。プロット値は平均値を、エラーバーは、各試料および各時点につき４回分（ウェル４つ）の測定値に対して計算した標準偏差を示す。

【図５Ａ－Ｆ】図５Ａ～Ｆは、初期化中のＭｂｄ３欠損体細胞の特性についての比較分析を示す。図５Ａは、図示する通りＤＯＸ存在下または非存在下、（ＢＵ－Ｖ１９－ＯＳＫＭトランスジェニック初期化可能系由来の）異なる体細胞における導入遺伝子誘導の相対レベルを調べたＲＴ－ＰＣＲ分析について、その結果を示すヒストグラムである。結果は、試料１つあたり３回測定した際の＋／－　ｓ．ｄ．（標準偏差）で示す。導入遺伝子誘導のレベルは、ＤＯＸ有りのＭｂｄ３欠損ＭＥＦ細胞またはＢ細胞において８日間変化しなかった。図５Ｂ～Ｃは、抗熱ショックタンパク質９０（Ｈｓｐ９０）抗体（図５Ｂ）および抗Ｍｂｄ３抗体（図５Ｃ）によるウェスタンブロット解析を示し、ＮＧＦＰ１ノックダウン（ＫＤ）細胞においてＭｂｄ３タンパク質が減少することが実証された。図５Ｄは、図示する通りＤＯＸ存在下または非存在下、（ＮＧＦＰ１トランスジェニック初期化可能系由来の）異なる体細胞における導入遺伝子誘導の相対レベルを調べたＲＴ－ＰＣＲ分析について、その結果を示すヒストグラムである。結果は、試料１つあたり３回測定した際の＋／－　ｓ．ｄ．で示す。導入遺伝子誘導のレベルは、ＤＯＸ有りのＭｂｄ３欠損ＭＥＦ細胞（マウス胚線維芽細胞）またはＢ細胞において８日間変化しなかった。図５Ｅは、ＤＯＸ誘導後の、野生型およびＭｂｄ３欠損のＭＥＦ細胞およびＢ細胞におけるアポトーシスの検出に基づくフローサイトメトリーについて、その結果を示すヒストグラムである。この結果は、いずれの細胞試料においても導入遺伝子誘導時のアポトーシスのレベルが類似していたことを示す。図５Ａ～Ｅの結果を総合すると、導入遺伝子の誘導または増殖における変化または欠陥は、Ｍｂｄ３欠損体細胞における初期化の促進を生じる潜在的因子ではないことがわかる。図５Ｆについて、ＤＯＸ介在性の導入遺伝子誘導において、Ｍｂｄ３$^{+/+}$ＭＥＦおよびＭｂｄ３$^{flox/-}$ＭＥＦで観察された増殖カイネティックは互いに類似していた。２回の実験を代表して、そのうち１回について示す。図５Ａ～Ｅの結果を総合すると、導入遺伝子の誘導または増殖における変化は、Ｍｂｄ３欠損体細胞における初期化の促進を生じる主な因子ではないことがわかる。

【図６Ａ－Ｂ】図６Ａ～Ｂは、Ｍｂｄ３欠失により複数の成体体細胞種が決定的かつ完全に初期化されることを示す。ＮＧＦＰ１コントロール（図６Ａ）およびＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{KD}［ノックダウン（ＫＤ）］（図６Ｂ）成体キメラに由来する、図示の体細胞を単離し、単一細胞初期化に供し、ＤＯＸ８日後のＮａｎｏｇ－ＧＦＰ発現を評価した。「ＥｐｉＳＣ」はエピブラスト幹細胞、「ＮＰＣ」は神経前駆体、「ＨＳＣ」は造血幹細胞、「ＣＭＰ」は骨髄系共通前駆細胞、「単球」は血液細胞マクロファージ、「プロＢリンパ球」、「成熟Ｂ」は成熟Ｂリンパ球、「成熟Ｔ」は成熟Ｔ細胞を示す。試験したＭｂｄ３$^{flox/-}$（Ｍｂｄ３欠損）体細胞種のすべてについて、ほぼ１００％の効率が得られた。各細胞種につき、独立した実験２～３回の平均を示す。

【図７】図７は、ＤＯＸ誘導８日目にＭｂｄ３欠損細胞が完全に初期化され、ＥＳＣ／ｉＰＳＣと転写の観点から区別がつかなくなることを示す。遺伝的に一致する、図示のマウス試料について、遺伝子発現分析を実施した。ＯＫＳＭ（ＤＯＸ）誘導の４日後には、Ｍｂｄ３$^{flox/-}$ＭＥＦがドナーの体細胞ＭＥＦから別々にクラスターを形成したが、Ｍｂｄ３$^{+/+}$ＭＥＦはしなかった。８日目には、ｆｌｏｘ／－細胞は、確立されたＥＳ

Ｃ株およびｉＰＳＣ株と転写の観点から区別がつかなくなった。初期化期間を延ばして１１日後でも、Ｍｂｄ３$^{+/+}$集団は多能性ＥＳＣ－ｉＰＳＣ株とのクラスターを形成しなかった。これらの知見から、ＯＳＫＭ過剰発現とＭｂｄ３の阻害の後ドナー体細胞が完全に初期化されることが裏付けられる。

【図８Ａ－Ｑ】図８Ａ～Ｑは、マウス細胞およびヒト細胞における、Ｍｂｄ３欠損後の決定的かつ同調的な初期化を示す。図８Ａ～Ｄは、８日目（図８Ａおよび８Ｂ）または継代２回目（図８Ｃおよび８Ｄ）におけるＭｂｄ３$^{flox/-}$細胞（図８Ａおよび８Ｃ）およびＭｂｄ３$^{+/+}$細胞の画像である。Ｍｂｄ３$^{flox/-}$体細胞の初期化後に得たコロニーがＥＳＣ様の形態を有し、継代１回目でＮａｎｏｇ発現についてのＧＦＰが均一になることに注目する。ＷＴ細胞において、コロニーの大部分は初期化が十分に進んでおらず、ＥＳ様の形態を有さない。図８Ｅは、Ｎａｎｏｇ－ＧＦＰ陽性細胞の定量を示すヒストグラムである。検出時（Ｍｂｄ３－ＫＤ細胞については８日目）におけるＮａｎｏｇ－ＧＦＰ陽性細胞の定量により、８日目にＭｂｄ３ＫＤ細胞の各クローン集団中９９％を超える細胞が陽性であることがわかる。図示する他の初期化組み合わせについては、クローン集団が陽性になると（設定閾値０．５％を超えると）少数の細胞においてＮａｎｏｇ－ＧＦＰが活性化することから、クローンの一部のみが初期化できることがわかる。これらの知見から、ナイーブ型多能性促進増殖条件下においてＭｂｄ３の発現および作用を阻害することによって初期化が決定的かつ同調的に完了することが裏付けられる。図８Ｆ～Ｋは、図８Ｆは未処理、図８ＧはスクランブルｓｉＲＮＡ処理の２０日後、図８Ｈは未処理の２０日後、図８Ｉは５－ａｚａ＋ＴＳＡ処理の２０日後、図８ＪはＭｂｄ３　ｓｉＲＮＡ処理の５日後、図８ＫはＭｂｄ３　ｓｉＲＮＡ処理の６日後に、一部初期化され、ＯＳＫＭ導入遺伝子を有しＯｃｔ４－ＧＦＰレポーターが再活性化されていない細胞クローンについての、フローサイトメトリー分析を示す。Ｍｂｄ３のノックダウンによって初期化が完全かつ迅速に完了した。４－ＡｚａおよびＴＳＡでの処理により初期化が促進されると以前に報告されたが、細胞の一部を活性化しているにすぎない。これらの結果から、Ｍｂｄ３を除去すると初期化と多能性獲得への「入口」が大きく開かれることがわかる。図８Ｌについて、ＴＡＬＥヌクレアーゼエフェクターを用いて遺伝子操作し、Ｍｂｄ３$^{flox/-}$ヒトＥＳ細胞を発生させた。ｌｏｘＰが導入された条件対立遺伝子についてのターゲティング計画を示す。図８Ｍ～Ｎは、サザンブロットでの結果に基づいて、正確にターゲティングしたＭＢＤ３$^{flox/-}$クローンを抗ＭＢＤ３抗体（図８Ｍ）または抗ＨＳＰ９０抗体（図８Ｎ）を用いてウェスタンブロット分析に供した結果を示す。ＭＢＤ３タンパク質の発現レベルの減少が９０％を超えたことに注目する（図１Ｉ～Ｊ中のマウスｆｌｏｘ／－細胞でみられた減少と同等）。図８Ｏについて、ＤＯＸ誘導性ＯＫＳＭ導入遺伝子を有するＭＢＤ３$^{+/+}$およびＭＢＤ３$^{flox/-}$ｉＰＳＣを、構造的に発現するｍＣｈｅｒｒｙで標識し、ＯＣＴ４－ＧＦＰノックイン対立遺伝子でターゲティングした。後者株からｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて分化した線維芽細胞を、図示のスキームで初期化した。ヒトＭｂｄ３$^{flox/-}$線維芽細胞の９８～１００％が導入遺伝子誘導８日後にＧＦＰ＋ＩＰＳＣになる。これらの結果から、Ｍｂｄ３の阻害がマウスおよびヒトにおける初期化に対して類似の効果を及ぼすことがわかる。エラーバーは生体サンプル２つのｓ．ｄ．を示す。＊は、ＭＢＤ３$^{+/+}$試料と比較して有意なＰ値＜０．０１を示す（ｎ＝２）。図８Ｐ～Ｑは、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地中におけるＭＢＤ３ｆｌｏｘ／－細胞の画像である。ＭＢＤ欠損ヒト多能性幹細胞は、著しい円形となってマウスＥＳＣ様の形態をとり、均一に増殖する。これらの結果から、Ｍｂｄ３の阻害によって（本明細書中に記載の）ＷＩＳ－ＮＨＳＭナイーブ型増殖条件をさらに改善できる可能性がわかる。

【図８Ｒ－Ｓ】図８Ｒ～Ｓについて、Ｍｂｄ３発現を緩和すると、マウスおよびヒトの細胞において基底状態多能性への転移が促進される。図８Ｒは、発現した遺伝子１６，６２０個すべての遺伝子発現レベルの測定による、図示した遺伝的に一致するマウス試料同士のＳｐｅａｒｍａｎの相関関係行列である。行列を階層的クラスタリングに供して得た系統樹を示す。ＯＫＳＭ（ＤＯＸ）誘導４日後、Ｍｂｄ３$^{flox/-}$ＭＥＦは元の体細胞ＭＥＦに類似するというよりも確立されたＥＳＣ株およびｉＰＳＣ株に類似していたが、

Ｍｂｄ３$^{+/+}$ＭＥＦではこれはみられなかったことに注目する。８日目には、Ｍｂｄ３$^{flox/-}$細胞は転写の観点からＥＳＣおよびｉＰＳＣと区別がつかなくなる。Ｍｂｄ３$^{+/+}$集団は、ＯＫＳＭ誘導後１１日経ってもＥＳＣおよびｉＰＳＣとクラスターを形成しなかった。図８Ｓは、Ｍｂｄ３$^{+/+}$および$^{flox/-}$二次的細胞から確立し、２ｉ－ＬＩＦ＋ＤＯＸにおいて初期化したモノクローナル株を示す。マーカーＯｃｔ４またはＮａｎｏｇ　ＧＦＰを再活性化しない（ＳＳＥＡ１陽性または陰性のいずれかである）前ｉＰＳクローンの割合を示す。Ｍｂｄ３欠損細胞はすべて１０日目には既に初期化が十分に進んだため、ＧＦＰ陰性クローンの確立はできなかった。

【図９】図９は、ＮｕＲＤ複合体および他の関連タンパク質の進化解析を示す概略図である。本発明者らは、ＮｕＲＤ複合体の一部であると知られている（または次のタンパク質に関連する）多くのヒトタンパク質と、代表的な後生動物種１５種（マウス－Ｍ．ｍｕｓｃｕｌｕｓ、カモノハシ－Ｏ．ａｎａｔｉｎｕｓ、キンカチョウ－Ｔ．ｇｕｔｔａｔａ、ニワトリ－Ｇ．ｇａｌｌｕｓ、カエル－Ｘ．ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、ゼブラフィッシュ－Ｄ．ｒｅｒｉｏ、フグ－Ｔ．ｎｉｇｒｏｖｉｒｉｄｉｓ、ナメクジウオ－Ｂ．ｆｌｏｒｉｄａｅ、ウニ－Ｓ．ｐｕｒｐｕｒａｔｕｓ、蚊－Ａ．ｇａｍｂｉａｅ、ショウジョウバエ－Ｄ．ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ、ミツバチ－Ａ．ｍｅｌｌｉｆｅｒａ、カブトムシ－Ｔ．ｃａｓｔａｎｅｕｍ、イソギンチャク－Ｎ．ｖｅｃｔｅｎｓｉｓ、センモウヒラムシ－Ｔ．ａｄｈａｅｒｅｎｓ）と、アウトグループとして酵母Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅとに、オルソログを割り当てた。上記リストの最後に記載される後生動物であるＴ．ａｄｈａｅｒｅｎｓは、後生動物の基本グループを表し、これを用いて動物多細胞性の由来を研究する。Ｔ．ａｄｈａｅｒｅｎｓにおいてオルソログを有するタンパク質は上記基本グループの多細胞動物中に存在する可能性が高かったが、酵母中に存在するタンパク質は動物多細胞性に先行する。分析の結果、Ｍｂｄ３および他のＮｕＲＤ構成要素はすべての多細胞生物に保存されており、したがってＭｂｄ３作用の阻害によって多くの（さらにはあらゆる）多細胞生物において直接的な初期化が促進される可能性があることがわかる。カラースケールは、相同性の度合い、すなわちタンパク質間の配列類似性の割合（パーセント）を示す。

【図１０Ａ－Ｐ】図１０Ａ～Ｐは、ＭＢＤ３のｓｉＲＮＡ阻害がＯＳＫＭによるヒトｉＰＳＣの初期化を促進することを示す。図１０Ａは、図示したＤＯＸでの初期化プロトコールにおける、ＤＯＸ誘導性ＯＳＫＭ導入遺伝子を有する二次的ヒト初期化可能線維芽細胞を示す概略図である。図１０Ｂ～Ｃは、ＭＢＤ３　ｓｉＲＮＡ処理、コントロールｓｉＲＮＡ処理、または未処理のままの細胞についての、抗ＭＢＤ３抗体（図１０Ｂ）または抗Ｈｓｐ９０抗体（図１０Ｃ）によるウェスタンブロット分析を示す。ＭＢＤ３　ｓｉＲＮＡ処理した細胞においてＭＢＤ３が減少したが、コントロールｓｉＲＮＡ処理した細胞または未処理の細胞ではこれはみられなかったことに注目する。図１０Ｄについて、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ増殖条件下において２日目および４日目に、スクランブルコントロールｓｉＲＮＡは添加せずにＭｂｄ３をノックダウンしたところ、アルカリホスファターゼ＋ｉＰＳＣクローンの形成が著しく増加した。図１０Ｅは、１回の初期化を示す概略図である。ヒト線維芽細胞をＭＢＤ３　ｓｉＲＮＡ処理に供し、その７日後および２日後にＯＳＫＭおよびＬｉｎ２８因子でのｍＲＮＡトランスフェクションに供する。図１０Ｆ～Ｏは、形成されたｉＰＳＣの画像である。図１０Ｆは継代０回で７日目のｉＰＳコロニー、図１０Ｇは継代３回のｉＰＳＣ、図１０Ｉ～ＪはＤａｐｉ（青、核染色）（図１０Ｉ）およびＯＣＴ４（赤）（図１０Ｊ）を染色したＩＰＳＣ（継代７回）、図１０Ｌ～ＭはＤａｐｉ（青、核染色）（図１０Ｌ）およびＮａｎｏｇ（赤）（図１０Ｍ）を染色したＩＰＳＣ（継代１０回）、図１０Ｎ～ＯはＤａｐｉ（青、核染色）（図１０Ｎ）およびＴＲＡ１－６０（緑）（図１００）を染色したＩＰＳＣ（継代１０回）、図１０Ｈ、１０Ｋ、および１０Ｐはｉ ＰＳＣから分化した細胞の組織染色を示す。Ｐ８　ｉＰＳＣからｉｎ　ｖｉｖｏでテラトーマが形成されたことから、胚性胚葉である外胚葉（図１０Ｈ）、中胚葉（図１０Ｋ）、および外胚葉（図１０Ｐ）への分化がわかる。これらの結果から、７日目にヒト線維芽細胞をＭＢＤ３　ｓｉＲＮＡで処理することによって、ＯＳＫＭおよびＬｉｎ２８因子

でのｍＲＮＡトランスフェクションで初期化を１回実施すればＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下においてｉＰＳＣを発生させることができ、ｍＲＮＡトランスフェクションを何度も繰り返す必要が少なくなることがわかる。これらの結果から、ＭＢＤ３の発現および／または作用を阻害すると、一過性ｍＲＮＡまたは他の一過性トランスフェクションプロトコール（タンパク質またはｃＤＮＡを用いる）でのｉＰＳＣの形成が促進されることがわかる。

【図１１Ａ－Ｐ】図１１Ａ～Ｐは、Ｍｂｄ３の作用機序およびＭｂｄ３が初期化と多能性獲得に及ぼす影響の機序を示す。図１１Ａ～Ｈは、抗ＭＢＤ３抗体（図１１Ａ～Ｄ）または抗ＦＬＡＧ抗体（図１１Ｅ～１１）によるイムノブロット分析を示す。ＦｌａｇタグＯＣＴ４（図１１Ａおよび１１Ｅ）、またはＦｌａｇタグＫＬＦ４（図１１Ｃおよび１１Ｇ）、またはＦｌａｇタグＳＯＸ２（図１１Ｂおよび１１Ｆ）、またはＦｌａｇタグＨＤＡＣ１（ポジティブコントロールとして、図１１Ｄおよび１１Ｈ）をコードするコンストラクトを、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞中にトランスフェクションし、あわせてＭＢＤ３も実施した。細胞溶解物を抗Ｆｌａｇ抗体（またはコントロールとして抗ＩｇＧ抗体）による免疫沈降（ＩＰ）に供し、続いてイムノブロット分析（ＩＢ）を実施した。全細胞溶解物またはＩＰ抽出物における発現レベルを、ＩＢにより抗Ｆｌａｇ抗体（図１１Ｅ～Ｈ）または抗Ｍｂｄ３抗体（図１１Ａ～Ｄ）を用いて決定した。この分析結果から、Ｍｂｄ３と多能性因子ＯＳＫとが直接相互作用することがわかる。図１１Ｉ～Ｐは、抗ＭＢＤ３抗体（図１１Ｉ～Ｌ）または抗ＦＬＡＧ抗体（図１１Ｍ～Ｐ）によるイムノブロット分析を示す。Ｍｂｄ３の代わりにＭｂｄ２を過剰発現させる以外は図１１Ａ～Ｈにおける実験を繰り返した。ＦｌａｇタグＯＣＴ４（図１１Ｉおよび１１Ｍ）、またはＦｌａｇタグＫＬＦ４（図１１Ｋおよび１１Ｏ）、またはＦｌａｇタグＳＯＸ２（図１１Ｊおよび１１Ｎ）、またはＦｌａｇタグＨＤＡＣ１（ポジティブコントロールとして、図１１Ｌおよび１１Ｐ）をコードするコンストラクトを、ＨＥＫ２９３Ｔ細胞中にトランスフェクションし、あわせてＭＢＤ２も実施した。この分析から、ＭＢＤ２と初期化因子ＯＳＫとはリッチなまたは特異的な相互作用をしないことがわかった。これらの結果から、Ｍｂｄ３が初期化多能性因子と相互に直接影響し合っており、したがってＮｕＲＤ複合体を補充すると初期化多能性因子の活性が阻害され初期化多能性因子の下流のターゲット遺伝子の再活性化が抑制されることがわかる。

【図１２Ａ－Ｖ】図１２Ａ～Ｖは、導入遺伝子非依存型かつ長期安定的なナイーブ型ヒト多能性細胞について、そのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける安定化を示す。図１２Ａは、導入遺伝子非依存型のナイーブ型ｉＰＳＣをＥＲＫ阻害下で単離する条件を較正する計画を示す概略図である。本発明者らは、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃをコードしているｄｏｘ誘導性のレンチウイルス（ＴｅｔＯ）を有するＣ２ヒトｉＰＳＣ株を用いた。この細胞系をＴＡＬＥエフェクターヌクレアーゼによるターゲティングに供し、内在性ＯＣＴ４座にＧＦＰ－２Ａ－Ｐｕｒｏ対立遺伝子を挿入した。ＧＦＰ＋Ｃ２細胞は、ＤＯＸが存在する場合のみ２ｉ／ＬＩＦ条件下において増殖させることができ、正確にターゲティングしたクローンの約６０％がＧＦＰを特異的に発現した。本発明者らは、スクリーニングを実施して、ＤＯＸ非存在下かつＥＲＫ阻害下においてＯｃｔ４－ＧＦＰ陽性細胞を取得できる他の小分子因子およびサイトカインを選別した。このスクリーニングには、図示する通り、因子を組み合わせたプールを２つ用いた。プール１は、ＥＲＫｉ、ＧＳＫ３βＩ、ＬＩＦ、ＢＭＰ４、ＩＧＦ、Ｐ３８ｉ、ＪＮＫｉ、フォルスコリン。プール２は、ＦＧＦｉ、ＴＧＦｉ、ケンパウロン、Ｇｏ６９８３、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、ＲＯＣＫｉ、およびＳＣＦ。図１２Ｂ～Ｃは、正確にターゲティングしスクリーニングに用いたＣ２　ｉＰＳクローンについての位相差顕微鏡画像（図１２Ｂ）、およびそのＧＦＰ蛍光染色による顕微鏡画像（緑、図１２Ｃ）である。図１２Ｄは、図示した因子の異なる組み合わせの存在下における１４日目のＯｃｔ４－ＧＦＰ＋コロニーについて、その割合（パーセント）を示すヒストグラムである（ｓ．ｄ．ｍ、ｎ＝３）。細胞を、ＤＯＸ＋２ｉＬＩＦにおいて、ＤＯＸ単独（ＯＳＫＭ遺伝子組換え因子を誘導するためにＤＯＸを使用）、２ｉ／ＬＩＦ単独、１６Ｆ（プール１および２の組み合わせ）等の種々の培地中で増やした。この際、１６Ｆ培地については次の因子、すなわち－２ｉ／ＬＩＦ

、－プール１、－プール２、－ＴＧＦｉ／－ＦＧＦｉ、－ＴＧＦｉ／－ＦＧＦｉ＋ＦＧＦ２（ｂＦＧＦ）、およびＴＧＦβ１を欠失（「－」と記載）または添加（「＋」と記載）し、プール２については次の因子、すなわち－ＴＧＦｉ、－ＦＧＦｉを欠失させ、プール１についてはＦＧＦ２およびＴＧＦβ１を添加した。ＤＯＸ非依存型のＯＣＴ４－ＧＦＰ＋細胞を維持するために２ｉ／ＬＩＦまたはプール１の存在が必須であることに注目する。また、ＤＯＸ非依存型のＯＣＴ４－ＧＦＰ＋細胞にＴＧＦｉおよびＦＧＦｉが負の影響を及ぼすこと、そして、２ｉ／ＬＩＦ培地について、ＴＧＦβ１およびＦＧＦ２の添加はＤＯＸ非依存型のＯＣＴ４－ＧＦＰ＋細胞の維持を積極的に助けることに注目する。図１２Ｅは、図示した因子の異なる組み合わせの存在下、２０日目のＯｃｔ４－ＧＦＰ$^{+}$コロニーについて、コントロール細胞に対するその割合（パーセント）を示すヒストグラムである。細胞を、１４種の因子（プール１および２の因子１６種からＦＧＦ経路およびＴＧＦ経路の阻害剤を除いたもの）とＴＧＦβ１およびｂＦＧＦとを含有する１４Ｆ＋ｂＦＧＦ／ＴＧＦβ１培地中で増やした。本発明者らは次に、この培地組み合わせ（１４Ｆ＋ｂＦＧＦ／ＴＧＦβ１）から、例えばＥＲＫｉ（図１２Ｅ中「－ＥＲｋｉ」と示す）等の「Ｘ」軸付近の因子を除き、これによって、ＤＯＸ非存在下におけるＯｃｔ４－ＧＦＰ$^{+}$細胞の維持に必要な必須の因子を決定した。この分析から、ＥＲＫｉ、ＣＨＩＲ、Ｐ３８ｉ、ＪＮＫｉ、ＬＩＦ、ｂＦＧＦ、およびＴＧＦＢが必須の構成要素であったことがわかる。これらのいずれかを除くと、ＤＯＸ非存在下においてＣ２　Ｏｃｔ４－ＧＦＰ$^{+}$細胞が著しく減少し分化した。図１２Ｆは、８日目のＯｃｔ４－ＧＦＰ$^{+}$コロニーについて、コントロール細胞に対するその割合（パーセント）を示すヒストグラムである。ナイーブ型増殖条件とノックアウト血清代替物の代替品とをさらに最適化するため、ノックアウト血清代替物を、Ｎ２サプリメントおよび１％のａｌｂｕｍａｘまたは１％の限定脂肪酸混合濃縮物（ＦＡＡ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）のいずれかでのみ代替することができる。図１２Ｇは、ヒトナイーブ型多能性細胞を外来導入遺伝子無しで長期間にわたって増やすために必須の要素をまとめたものである。この培地はＷＩＳ－ＮＨＳＭ（Ｗｅｉｚｍａｎｎ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　Ｓｃｉｅｎｃｅ－　Ｎａｉｖｅ　Ｈｕｍａｎ　Ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ　Ｍｅｄｉｕｍ）とよばれる。図１２Ｈは、図示した種々の条件下において増殖させて８日目のＯｃｔ４－ＧＦＰ＋コロニーについて、コントロール細胞に対するその割合（パーセント）を示すヒストグラムである。ナイーブ型ヒトｉＰＳＣを、フィーダー細胞無しで、マトリゲル被覆プレートまたは０．２％ゼラチン＋１ｎｇ／ｍｌビトロネクチン被覆プレート（ただしゼラチン単独ではない）上において増殖させ得ることに注目する。図１２Ｉは、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地中における、導入遺伝子非依存型のＣ１ナイーブ型多能性細胞株の核型を示す。図１２Ｊ～Ｋは、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ下でＤＯＸ非依存的に増やしたＣ２　ｉＰＳＣクローンの位相差顕微鏡画像（図１２Ｊ）または蛍光顕微鏡画像（図１２Ｋ）であり、Ｏｃｔ４－ＧＦＰが均一に発現していることを示す。Ｏｃｔ４－ＧＦＰの発現（緑に染色、図１２Ｋ）は細胞が多能性であることを示すことに注目する。図１２Ｌ～Ｎは、図１２Ｉ～Ｋに示すＣ２　ｉＰＳクローン株からのテラトーマ形成について実施した形態学的染色の画像である。胚性胚葉である中胚葉（図１２Ｌ）、内胚葉（図１２Ｍ）、および外胚葉（図１２Ｎ）の細胞への分化からナイーブ型Ｃ２　ｉＰＳＣ細胞系の多能性がわかることに注目する。図１２Ｏ～Ｒは、ＢＪ線維芽細胞由来のｉＰＳＣを示す画像である。レンチウイルスで運搬したＯＫＳＭポリシストロン性カセットで直接感染させることによって、ヒトＢＪ線維芽細胞からヒトナイーブ型ｉＰＳＣを直接形成できる。図１２Ｏは、ＤＯＸを添加したＷＩＳ－ＮＨＳＭＰ３培地中で６日目のｉＰＳＣコロニーの位相差顕微鏡画像を示す。図２０Ｐは、継代３回目のＢＪ　ｉＰＳＣの位相差顕微鏡画像を示す。図１２Ｑは、継代８回目のｉＰＳ細胞由来のＢＪ線維芽細胞において、Ｎａｎｏｇが発現していること（緑に染色）を示す蛍光顕微鏡画像である。挿入図はＤＡＰＩ染色（青）を示す。図１２Ｒは、継代１３回目のＢＪ　ｉＰＳＣ細胞におけるＳＳＥＡ４発現（赤く染色）を示す蛍光顕微鏡画像である。挿入図はＤＡＰＩ染色（青）を示す。図１２Ｏ～Ｒから総合的に、確立したＢＪ　ｉＰＳＣ株が試験したすべての多能性マーカーを発現していたことがわかる。図１２Ｓについて、ｂＦＧＦ／ＴＧＦβおよびプール１因

子の存在下において細胞を増やし、また、これらの構成要素（緑の字）を中止した際のＧＦＰの喪失についてスクリーニングすることによって、ＤＯＸ非存在下におけるＯＣＴ４－ＧＦＰ＋細胞の維持に必要な必須の因子を決定した。独立した３回の実験を代表して、そのうち１回について示す。＊は、ｔ検定（線でつないで示した試料の間で実施）のＰ値＜０．０１を示す。エラーバーは、ｓ．ｄ．ｍ（ｎ＝４）を示す。図１２Ｔは、ヒトナイーブ型多能性細胞を外来導入遺伝子無しで長期間にわたって増やすために必須の要素をまとめたものである。最適化したこの培地は、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ（Ｗｅｉｚｍａｎｎ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ－ Ｎａｉｖｅ ｈｕｍａｎ Ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ Ｍｅｄｉｕｍ）とよばれる。図１２Ｕは、最適化したＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件の構成要素を示す。図１２Ｖは、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地中で増殖させたＯＣＴ４－ＧＦＰ＋ｈｉＰＳＣコロニーについて、その大視野の代表的なものである。

【図１３Ａ－Ｗ】図１３Ａ～Ｗは、既に確立されたプライム型／従来型ＥＳＣ系または胚盤胞からのヒトナイーブ型ｉＰＳＣおよびＥＳＣの誘導を示す。図１３Ａは、遺伝的改変をしない場合の、プライム型／従来型ヒトＥＳＣの基底状態ナイーブ状態へのエピジェネティックな逆戻りを示す概略図である。既に確立されたプライム型細胞系Ｈ１、Ｈ９、ＢＧＯ１、ＷＩＢＲ２、ＷＩＢＲ３ ｈＥＳＣ、およびＣ１、Ｃ２ ｉＰＳＣをゼラチン／ビトロネクチン被覆プレート上に蒔き、ＷＩＳＮＨＳＭ条件下において増殖させた。５日間で多くの細胞が分化するが、円形の半球形のコロニーが現れる。トリプシン処理および継代後、均一のナイーブ型ＥＳＣ／ｉＰＳＣ株を確立できる。図１３Ｂ～Ｅは位相差顕微鏡画像である。図１３Ｂはプライム型ＢＧ０１ ｈＥＳＣ、図１３Ｃは継代２回目のナイーブ型ＢＧＯ１細胞系、図１３ＤはＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地中で５日目のＢＧＯ１細胞系、図１３Ｅは継代３１回目のＢＧＯ１細胞系を示す。図１３Ｆ～Ｊは、ナイーブ型ＢＧＯ１による多能性マーカーの発現を示す顕微鏡画像の代表例である。図１３Ｆは、ナイーブ型ＢＧ０１ ｈＥＳＣにおいてＨｏｅｃｈｓｔ（左のパネル、青く核染色）およびＮａｎｏｇ（中央のパネル、緑に染色）を染色したもの、また、Ｈｏｅｃｈｓｔの画像とＮａｎｏｇの画像の合成（右のパネル）を示す。図１３Ｇは、継代４１回目のナイーブ型ＢＧ０１ ｈＥＳＣ（４６ＸＹ）においてＨｏｅｃｈｓｔ（左のパネル、青く核染色）およびＳＳＥＡ３（中央のパネル、赤く染色）を染色したもの、また、Ｈｏｅｃｈｓｔの画像とＳＳＥＡ３の画像の合成（右のパネル）を示す。図１３Ｈは、継代４１回目のナイーブ型ＢＧ０１ ｈＥＳＣ（４６ＸＹ）においてＨｏｅｃｈｓｔ（左のパネル、青く核染色）およびＳＳＥＡ４（中央のパネル、赤く染色）を染色したもの、また、Ｈｏｅｃｈｓｔの画像とＳＳＥＡ４の画像の合成（右のパネル）を示す。図２４Ｉは、継代４１回目のナイーブ型ＢＧ０１ ｈＥＳＣ（４６ＸＹ）においてＨｏｅｃｈｓｔ（左のパネル、青く核染色）およびＴＲＡ１－６０（左から２つめのパネル、赤く染色）を染色したもの、また、Ｈｏｅｃｈｓｔの画像とＴＲＡ１－６０の画像の合成（左から３つめのパネル）、およびアルカリホスファターゼ（ＡＰ）染色（ピンクがかった紫に染色、右のパネル）を示す。図１３Ｊは、継代４１回目のナイーブ型ＢＧ０１ ｈＥＳＣ（４６ＸＹ）においてＨｏｅｃｈｓｔ（左のパネル、青く核染色）、Ｏｃｔ４（左から２つめのパネル、赤く染色）、およびＴＲＡ１－８１（左から３つめのパネル）を染色したもの、また、ＴＲＡ－８１の染色の画像とＯｃｔ４の染色の画像の合成（右のパネル）を示す。図１３Ｆ～Ｊ中に示す結果から、ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）が既知のヒト多能性マーカーのすべてを発現し、外来導入遺伝子の非存在下において多回数継代しても正常な４６ＸＹ男性核型を保持することがわかる。ここで記載したすべてのナイーブ型株は、増やしても（ここまでで７０回を超えて継代しても）変質、危機、または減少の兆候を示さない。図１３Ｋ～Ｍは、ナイーブ型ＰＳＣから形成したテラトーマについて実施した形態学的染色の画像である。図示する細胞は、胚性胚葉である中胚葉（図１３Ｋ）、外胚葉（図１３Ｌ）、および内胚葉（図１３Ｍ）の細胞であり、ナイーブ型ＰＳＣは、ｉｎ ｖｉｖｏにおいて分化したテラトーマを発生させ得ることから多能性であることがわかる。図１３Ｎは、胚盤胞からのヒトナイーブ型ＰＳＣの発生を示す概略図である。ヒトＩＣＭの胚盤胞を、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下においてフィーダー細胞上に蒔いた。６～８日目に最初の増殖物をトリプシン処理

し、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下、ゼラチン／ビトロネクチン被覆プレート上において、フィーダー非依存的に、ナイーブ型多能性細胞株を確立した（確立した株のＰ３における画像の代表的なものを示す）。図１３Ｏは、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地中で培養したヒト胚盤胞から形成されたナイーブ型ＰＳＣについて、その継代０回（６日目）および３回における位相差顕微鏡画像である。図１３Ｐは、ナイーブ型ＷＩＳ１　ｈＥＳＣにおいてＨｏｅｃｈｓｔ（上のパネル、青く染色）、ｎａｎｏｇ（上から２つめのパネル、緑に染色）、およびＳＳＥＡ４（上から３つめのパネル、赤く染色）を染色した蛍光顕微鏡画像、また、Ｈｏｅｃｈｓｔの蛍光顕微鏡画像、Ｎａｎｏｇの蛍光顕微鏡画像、およびＳＳＥＡ４の蛍光顕微鏡画像を合成したもの（一番下のパネル）を示す。図１３Ｑは、ナイーブ型ＷＩＳ１　ｈＥＳＣにおいてＨｏｅｃｈｓｔ（上のパネル、青く染色）およびＯＣＴ４（緑に染色、中央のパネル）を染色した蛍光顕微鏡画像、また、Ｈｏｅｃｈｓｔの蛍光顕微鏡画像とＯＣＴ４の蛍光顕微鏡画像の合成（一番下のパネル）を示す。図１３Ｒは、ナイーブ型ＷＩＳ１　ｈＥＳＣにおいてＨｏｅｃｈｓｔ（上のパネル、青く染色）およびＳＳＥＡ３（緑に染色、中央のパネル）を染色した蛍光顕微鏡画像、また、Ｈｏｅｃｈｓｔの蛍光顕微鏡画像とＳＳＥＡ３の蛍光顕微鏡画像の合成（一番下のパネル）を示す。図１３Ｓ～Ｕは、ナイーブ型ＷＩＳ１　ｈＥＳＣ株から形成されたテラトーマの形態学的染色を示す画像である。図示する細胞は、胚性胚葉である内胚葉（図１３Ｓ）、中胚葉（図１３Ｔ）、および外胚葉（図１３Ｕ）の細胞である。図１３Ｐ～Ｕ中に示す結果について、多能性マーカーの発現（図１３Ｐ～Ｒ）およびｉｎ　ｖｉｖｏにおけるテラトーマの分化（図１３Ｓ～Ｕ）からナイーブ型ＷＩＳ１　ｈＥＳＣ株が多能性であることがわかる。図１３Ｖについて、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下におけるｍＲＮＡトランスフェクションにて初期化することによって、ヒトＢＪ線維芽細胞からナイーブ型ｈｉＰＳＣを直接形成できる。因子を形質導入して１０日目に明瞭な半球形のコロニーが現れることに注目する。図１３Ｗについて、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下においてヒトＢＪ線維芽細胞からナイーブ型ｈｉＰＳＣを直接形成できる。

【図１４Ａ－Ｄ】図１４Ａ～Ｄは、遺伝的に一致するナイーブ型およびプライム型ヒト多能性細胞株の形態を示す画像（位相差顕微鏡）である。図１４Ａ～Ｂは、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において胚から誘導したナイーブ型ｈＥＳＣ（「ＷＩＳ１　ｈＥＳＣ」、「ＷＩＳ２　ｈＥＳＣ」、「ＬＩＳ１　ｈＥＳＣ」、および「ＬＩＳ２　ｈＥＳＣ」と記載）をフィーダー細胞有り（図１４Ｂ）またはフィーダー細胞無し（図１４Ａ）で増殖させた際の、別個の形態を示す画像の代表的なものである。図１４Ｃ～Ｄは、従来型／プライム型多能性細胞株（図１４Ｃ）と、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において増殖させた遺伝的に一致するナイーブ型ｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣ（図１４Ｄ）と、が異なる形態を有することを示す画像の代表的なものである。ナイーブ型細胞の方が、半球形の形態がはっきりしていて、細胞と細胞の境界がわかりにくい。Ｐは継代回数を示す。ナイーブ型細胞について、Ｐは、ナイーブ型ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において既に継代した回数を示す。プライム型細胞については、Ｐは、ナイーブ型ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下（継代６回）およびプライム型条件下において既に継代した回数を含む。

【図１５Ａ－Ｍ】図１５Ａ～Ｍは、ヒトナイーブ型ｉＰＳＣおよびＥＳＣのシグナリング状態および核型を示す。プライム型またはナイーブ型ヒト多能性細胞（継代２５回目）（ＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣ）について、別個のシグナリングアダプタの全体およびリン酸化形態に対する抗体を用い実施した、ウェスタンブロット分析を示す。図１５ＡはｐＥＲＫ１／２　４２，４４、図１５Ｂは総ＥＲＫ１／２、図１５ＣはＨＳＰ９０、図１５Ｄは総ｐ３８、図１５ＥはｐＰ３８　１８０，１８２、図１５ＦはＨＳＰ９０を示す。図１５Ｇはｐ ＳＴＡＴ３　７０５、図１５Ｈは総ＳＴＡＴ３、図１５Ｉはｐβカテニン３３，３７、図１５Ｊはβカテニン、図１５ＫはｐＪＮＫ１，２、図１５ＬはＪＮＫ、図１５ＭはＨＳＰ９０を示す。ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において増殖させたヒトＷＩＢＲ３ナイーブ型ｈＥＳＣにおいて、ナイーブ型多能性においてＥＲＫ１、Ｐ３８、およびＪＮＫの活性が特異的に遮断され減少していることに注目する。ＷＩＳ－ＮＨＳＭ下におけるＬＩＦの本質的な性質と矛盾することなく、ナイーブ型ｈＥＳＣにおいてリン酸化ＳＴＡＴ３のレベル

が増大している。整合性をとるため、試料はいずれも３か所に載せた。ナイーブ型およびプライム型のＣ１　ｈｉＰＳＣ、ＷＩＳ２　ｈＥＳＣ（図示せず）の分析結果もこれと類似していた。図１５Ｈ～Ｉは、異なるナイーブ型ヒトＥＳＣおよびｉＰＳＣの核型を示す。

【図１５Ｎ－Ｓ】図１５Ｎ～Ｓは、ヒトナイーブ型多能性細胞の核型およびクローンの安定性を示す。図示は核型分析の結果の代表的なものであり、異なるナイーブ型ｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣの正常な核型を示す。図１５ＮはＣ１ナイーブ型ｈｉＰＳＣ、図１５ＯはＷＩＳ１ナイーブ型ｈＥＳＣ、図１５ＰはＷＩＢＲ３ナイーブ型ｈＥＳＣ、図１５ＱはＢＧ０１ナイーブ型ｈＥＳＣ、図１５ＲはＬＩＳ１ナイーブ型ｈＥＳＣ、図１５ＳはＬＩＳ２ナイーブ型ｈＥＳＣを示す。核型分析のために細胞を回収した際の継代回数（ｐ）を示す。これらのデータから、両性からナイーブ型ｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣを確立でき、両性とも、染色体異常となる傾向を顕著に呈することなく正常な核型を維持できることがわかる。

【図１５Ｔ－Ｕ】図１５Ｔ～Ｕは、ナイーブ型ｈＥＳＣ株ＷＩＢＲ３（図１５Ｔ）およびＢＧＯ１（図１５ＵＯ）から得たサブクローン株（１～４で表示）の各々において、多能性マーカーを免疫染色した結果を示す。いずれのナイーブ型ｈＥＳＣ株もＯＣＴ４、ｎａｎｏｇ、Ｔｒａ－１－６０、Ｔｒａ－１－８１、およびＳＳＥＡ４を発現することに注目する。

【図１６Ａ－Ｈ】図１６Ａ～Ｈは、ナイーブ型ＷＩＢＥＲ３　ｈＥＳＣにおいて多能性マーカーを免疫染色して分析した画像である。図１６ＡはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、左のパネル）およびＴＲＡ１－８０（緑に染色、中央のパネル）とこれらの画像の合成（右のパネル）、図１６ＢはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、左のパネル）およびＴＲＡ１－８０（緑に染色、中央のパネル）とこれらの画像の合成（右のパネル）、図１６ＣはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、左のパネル）およびＫＬＦ４（赤く染色、中央のパネル）とこれらの画像の合成（右のパネル）、図１６ＤはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、左のパネル）およびＫＬＦ４（赤く染色、中央のパネル）とこれらの画像の合成（右のパネル）、図１６ＥはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、左のパネル）およびＳＳＥＡ１（中央のパネル）とこれらの画像の合成（右のパネル）、図１６ＦはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、上のパネル）、ＴＲＡ１－６０（緑に染色、２つめのパネル）、およびＮａｎｏｇ（赤く染色、３つめのパネル）とこれらの画像の合成（一番下のパネル）、図１６ＧはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、上のパネル）、Ｅ－カドヘリン（緑に染色、２つめのパネル）、およびＯｃｔ４（赤く染色、３つめのパネル）とこれらの画像の合成（一番下のパネル）、図１６ＨはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、上のパネル）、ＳＳＥＡ４（緑に染色、２つめのパネル）、およびＯＣＴ４（赤く染色、３つめのパネル）とこれらの画像の合成（一番下のパネル）を示す。免疫染色の結果から、ナイーブ型ｈＥＳＣ株は、試験した既知のヒト多能性マーカーすべてについて陽性染色を呈することがわかる。とりわけ、ヒト多能性細胞ではなくマウス多能性細胞に対して特異的なＳＳＥＡ１は、ヒトナイーブ型ＥＳＣおよびｉＰＳＣにおいて発現していない（図１６Ｅ、中央のパネル）。

【図１７Ａ－Ｈ】図１７Ａ～Ｈは、ナイーブ型Ｃ１　ｈｉＰＳＣについて、多能性マーカーの免疫染色分析を示す画像である。図１７ＡはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、左のパネル）およびＴＲＡ１－８０（緑に染色、中央のパネル）とこれらの画像の合成（右のパネル）、図１７ＢはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、左のパネル）およびＴＲＡ１－８０（緑に染色、中央のパネル）とこれらの画像の合成（右のパネル）、図１７ＣはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、左のパネル）およびＫＬＦ４（赤く染色、中央のパネル）とこれらの画像の合成（右のパネル）、図１７ＤはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、左のパネル）およびＮａｎｏｇ（赤く染色、中央のパネル）とこれらの画像の合成（右のパネル）、図１７ＥはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、左のパネル）およびＳＳＥＡ１（中央のパネル）とこれらの画像の合成（右のパネル）、図１７ＦはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、上のパネル）、ＴＲＡ１－６０（緑に染色、２つめのパネル）、およびＮａｎｏｇ（赤く染色、３つめのパネル）とこれらの画像の合成（一番下のパネル）、図１７ＧはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、上のパ

ネル）、Ｅ－カドヘリン（緑に染色、２つめのパネル）、およびＯｃｔ４（赤く染色、３つめのパネル）とこれらの画像の合成（一番下のパネル）、図１７ＨはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、上のパネル）、ＳＳＥＡ４（緑に染色、２つめのパネル）、およびＯＣＴ４（赤く染色、３つめのパネル）とこれらの画像の合成（一番下のパネル）を示す。免疫染色の結果から、ナイーブ型Ｃ１　ｈｉＰＳＣ株は、試験した既知のヒト多能性マーカーすべてについて陽性染色を呈することがわかる。とりわけ、ヒト多能性細胞でなくマウス多能性細胞に対して特異的なＳＳＥＡ１は、ヒトナイーブ型ｉＰＳＣおよびＥＳＣにおいて発現していない（図１７Ｅ、中央のパネル）。

【図１８Ａ－Ｆ】図１８Ａ～Ｆは、ナイーブ型Ｃ２　ｈｉＰＳＣにおいて多能性マーカーを免疫染色して分析した画像である（図１８Ａ～Ｆ）。図１８ＡはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、上のパネル）およびＫＬＦ４（赤く染色、２つめのパネル）とこれらの画像の合成（一番下のパネル）、図１８ＢはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、上のパネル）およびＴＲＡ１－８１（黄に染色、２つめのパネル）とこれらの画像の合成（一番下のパネル）、図１８ＣはアルカリホスファターゼＡＰ、上のパネル）、Ｈｏｅｃｈｓｔ（青く染色、２つめのパネル）、およびＳＳＥＡ１（３つめのパネル）とこれらの画像の合成（下）、図１８ＤはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、上のパネル）、ＴＲＡ１－６０（黄に染色、２つめのパネル）、およびＮａｎｏｇ（赤く染色、３つめのパネル）とこれらの画像の合成（一番下のパネル）、図１８ＥはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、上のパネル）、Ｅ－カドヘリン（緑に染色、２つめのパネル）、およびＯｃｔ４（赤く染色、３つめのパネル）とこれらの画像の合成（一番下のパネル）、図１８ＦはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、上のパネル）、ＳＳＥＡ４（緑に染色、２つめのパネル）、およびＯｃｔ４（赤く染色、３つめのパネル）とこれらの画像の合成（一番下のパネル）を示す。免疫染色の結果から、ナイーブ型Ｃ２　ｈｉＰＳＣ株は、試験した既知のヒト多能性マーカーすべてについて陽性染色を呈することがわかる。とりわけ、ヒト多能性細胞でなくマウス多能性細胞に対して特異的なＳＳＥＡ１は、ヒトナイーブ型ｉＰＳＣおよびＥＳＣにおいて発現していない（図１８Ｃ、一番上から３つめのパネル）。

【図１９Ａ－Ｉ】図１９Ａ～Ｉは、ヒトナイーブ型ＥＳＣおよびｉＰＳＣのｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける分化能力を示す画像である。図示した画像は、図示する細胞系（名称および継代回数で示す）における６日目のＥＢ構造を示す。画像は、分化した胚様体構造を示す。図１９Ａはナイーブ型ＷＩＢＲ３　ＥＢ（継代２１回）、図１９Ｂはナイーブ型Ｈ１　ＥＢ（継代５１回）、図１９Ｃはナイーブ型ＢＧ０１　ＥＢ（継代４１回）、図１９Ｄはナイーブ型Ｃ１　ＥＢ（継代２１回）、図１９Ｅはナイーブ型Ｃ２　ＥＢ（継代２７回）、図１９Ｆはナイーブ型ＷＩＳ１　ＥＢ（継代１３回）、図１９Ｇはナイーブ型ＷＩＳ２　ＥＢ（継代２１回）、図１９Ｈはナイーブ型ＬＩＳ１　ＥＢ（継代１７回）、図１９Ｉはナイーブ型ＬＩＳ２　ＥＢ（継代１１回）を示す。これらの結果から、ヒトナイーブ型ｉＰＳＣおよびＥＳＣはｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて胚型体（ＥＢ）に分化できることがわかる。

【図１９Ｊ－Ｏ】図１９Ｊ～Ｏは、系譜分化マーカー（図１９Ｊはブラキュリ、図１９ＫはＳＯＸ１７、図１９ＬはＰＡＸ６、図１９ＭはＡＦＰ、図１９ＮはＳＯＸ１）および多能性マーカー（図１９ＯはＯＣＴ４）の発現についてのｑＲＴ－ＰＣＲ解析を示す。ＥＢは、次の細胞系、すなわちＷＩＢＲ３　ＥＳＣ、Ｈ１　ＥＳＣ、ＢＧ０１　ＥＳＣ、Ｃ１　ｉＰＳＣ、Ｃ２　ｉＰＳＣ、ＷＩＳ１　ＥＳＣ、ＷＩＳ２　ＥＳＣ、ＬＩＳ１　ＥＳＣ、およびＬＩＳ２　ＥＳＣから発生させた。試験した細胞系はいずれも、分化系列決定遺伝子が著しく上方調節され、ＯＣＴ４多能性マーカーが下方調節されていた。この結果は、系譜分化と一致するものであった。相対的なｑＲＴ－ＰＣＲ発現レベルを、分化前のナイーブ型多能性細胞における発現レベルに標準化した。

【図２０Ａ－Ｌ】図２０Ａ～Ｌは、ヒトナイーブ型ＥＳＣおよびｉＰＳＣのｉｎ　ｖｉｖｏにおける分化能力を示す画像である。ヒトナイーブ型ｉＰＳＣおよびＥＳＣを、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において、図示する回数だけ継代して増やした。細胞を回収し、免疫不全マウスの皮下に注入し、テラトーマ形成について調べた。図２０Ａはナイーブ型ＷＩＢ

Ｒ３　ｈＥＳＣ（継代９回）、図２０Ｂはナイーブ型ＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣ（継代２２回）、図２０Ｃはナイーブ型ＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣ（継代４０回）、図２０Ｄはナイーブ型Ｈ１　ｈＥＳＣ（継代２２回）、図２０Ｅはナイーブ型ＢＧ０１　ｈＥＳＣ（継代３８回）、図２０Ｆはナイーブ型Ｈ９　ｈＥＳＣ（継代２０回）、図２０Ｇはナイーブ型ＷＩＢＲ１　ｈＥＳＣ（継代２１回）、図２０Ｈはナイーブ型Ｃ２　ｈｉＰＳＣ（継代４１回）、図２０Ｉはナイーブ型Ｃ１　ｈｉＰＳＣ（継代５１回）、図２０Ｊはナイーブ型ＢＪ１　ｈｉＰＳＣ（継代２５回）、図２０Ｋはナイーブ型ＬＩＳ１　ｈＥＳＣ（継代９回）、図２０Ｌはナイーブ型ＬＩＳ２　ｈＥＳＣ（継代９回）を示す。試験した株のいずれにおいても、内胚葉、中胚葉、および外胚葉の三種の生殖系譜からの細胞を有する、十分に分化の進んだ成熟テラトーマが誘発された。「Ｐ」は、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において細胞を回収し注入した際の継代回数を示す。

【図２０Ｍ－Ｔ】図２０Ｍ～Ｔについて、ＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣ株（図２０Ｍ～Ｐ）およびＢＧＯ１　ｈＥＳＣ株（図２０Ｑ～Ｔ）からサブクローニングした各ナイーブ型株（サブクローン番号１～４）のすべてが多能性であって成熟テラトーマを形成できることがわかった。

【図２１Ａ－Ｌ】図２１Ａ～Ｌは、ネズミＥＳＣ／ｉＰＳＣに類似する、ヒトナイーブ型ＥＳＣ／ｉＰＳＣにおける別個のシグナリング依存および反応を示す。図示は、種々の培地における多能性細胞株のコロニー形成を示すヒストグラムである。細胞集団を等分割し、図示する増殖培地を入れたゼラチン／ビトロネクチン被覆プレート上に蒔いた（マウスナイーブ型細胞は２ｉ／ＬＩＦ含有培地、ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣはＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地、マウスＥｐｉＳＣおよびヒトプライム型ＥＳＣ／ｉＰＳＣはＫＳＲ／ｂＦＧＦ／ＴＧＦβ培地）。増殖培地は、該当する細胞系の維持に通常用いる増殖培地である。３６時間後、図示する阻害剤または増殖因子をウェルに添加した。１４日（継代２回）後、Ｏｃｔ４－ＧＦＰ多能性マーカーの発現について各ウェルをＦＡＣＳ分析に供し、多能性コロニーの相対的な割合（パーセント）を調べた。多能性細胞の頻度を内部コントロールについて標準化し、一番左の列にのみ「増殖培地」と示す（方法の項目に明記するように、ナイーブ型細胞の増殖培地はＷＩＳ－ＮＨＳＭ、プライム型細胞については従来型ＫＳＲ／ｂＦＧＦ／ＴＧＦβ含有培地）。ＷＩＳ－ＮＨＳＭに既に含有される構成要素を添加する場合は、相対濃度で２倍となるよう増やした。標準化した割合（パーセント）が５０％より低い場合に、添加した阻害剤の存在に「敏感」であると決定する。図２１Ａはナイーブ型１２９　ｍＥＳＣ、図２１Ｂはプライム型１２９　ｍＥｐｉＳＣ、図２１Ｃはナイーブ型ＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣ、図２１Ｄはプライム型／従来型ＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣ、図２１Ｅはナイーブ型Ｃ１　ｈｉＰＳＣ、図２１Ｆはプライム型／従来型Ｃ１　ｈｉＰＳＣ、図２１Ｇはナイーブ型Ｃ１　ｈＥＳＣ、図２１Ｈはプライム型Ｃ１　ｈＥＳＣ、図２１Ｉはナイーブ型ＷＩＳ１　ｈＥＳＣ、図２１Ｊはプライム型ＷＩＳ１　ｈＥＳＣ、図２１ＫはＬＩＳ１　ｈＥＳＣ、図２１Ｌはプライム型ＬＩＳ１　ｈＥＳＣを示す。異なる阻害剤、すなわちＥＲＫ阻害剤、ＧＳＫ３β阻害剤、およびＲＡＦ阻害剤の存在下においてヒトナイーブ型ＥＳＣが多能性のままであることに注目する。ヒトナイーブ型多能性細胞は、ＢＭＰ４（ＢＭＰ４を５～１０ｎｇ／ｍｌまで）またはフォルスコリンを添加しても分化しない。プライム型ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣは、ＥＲＫ、ＧＳＫ３ｂ、ＲＡＦを阻害すると、またはＢＭＰ４もしくはフォルスコリンで刺激すると、分化した。重要なことには、ナイーブ型ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣは、ＬＩＦおよびｂＦＧＦ／ＴＧＦβシグナリング（ならびに、複数の阻害剤、すなわちＥＲＫ阻害剤、ｐ３８阻害剤、およびＪＮＫ阻害剤の存在）に依存する点で、以前に報告されたナイーブ型多能性の株のいずれとも異なっている。

【図２２Ａ－Ｋ】図２２Ａ～Ｋは、ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣに特有のシグナリング要求および反応を示す。５ｎｇ／ｍｌのＢＭＰ４を添加したＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において増殖させたナイーブ型ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣは多能性のままであり、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいてテラトーマに分化できる。ナイーブ型ＰＳＣによって形成されたテラトーマの形態学的染色を示す画像を示す。図２２Ａ～Ｃはナイーブ型Ｈ１　ｈＥＳＣ（ＢＭＰ４（５ｎ

ｇ／ｍｌ）を添加して継代３２回）、図２２Ｄ～Ｆはナイーブ型Ｃ１　ｈｉＰＳＣ（ＢＭＰ４（５ｎｇ／ｍｌ）を添加して継代２５回）、図２２Ｇは、ナイーブ型Ｈ１構造的活性Ｓｔａｔ　３（「ナイーブ型条件」であるＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において、ＬＩＦを添加せずに増やした）を示す。図２２Ｈは、ナイーブ型ＷＩＳ１－Ｓｔａｔ３－ＣＡ（ナイーブ型ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において、ＬＩＦを添加せずに増やした）を示す。胚性胚葉である内胚葉（図２２Ａ、２２Ｄ、２２Ｇ（左のパネル）、および２２Ｈ（左のパネル））、中胚葉（図２２Ｂ、２２Ｅ、２２Ｇ（中央のパネル）、および２２Ｈ（中央のパネル））、および外胚葉（図２２Ｃ、２２Ｆ、２２Ｇ（右のパネル）、および２２Ｈ（右のパネル））への分化に注目する。図２２Ｉ～Ｋは、構造的活性Ｓｔａｔ３変異体を有するナイーブ型ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣにおける多能性マーカーの発現を示す免疫蛍光画像である。図２２ＩはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、上のパネル）、Ｎａｎｏｇ（緑に染色、２つめのパネル）、およびＳＳＥＡ４（赤く染色、３つめのパネル）とこれらの画像の合成（下）、図２２ＪはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、上のパネル）およびＯｃｔ４（緑に染色、２つめのパネル）とこれらの画像の合成（一番下のパネル）、図２２ＫはＨｏｅｃｈｓｔ（青く染色、上のパネル）およびＳＳＥＡ３（緑に染色、２つめのパネル）とこれらの画像の合成（一番下のパネル）を示す。この結果から、構造的活性Ｓｔａｔ３変異体を有するナイーブ型ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣは、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地中に外来ＬＩＦがない場合に多能性のままであることが、テラトーマ形成および多能性マーカー免疫染色によって示される。これらの結果から、ここに記載のナイーブ型ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣは、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下における多能性の維持がＬＩＦ／Ｓｔａｔ３シグナリングに依存し、外来サイトカインＢＭＰ４、少なくとも、この試験における５ｎｇ／ｍｌ～１０ｎｇ／ｍｌと低いレベルであればＢＭＰ４を許容するという特徴的な特色を有し、これらの特色は齧歯類ナイーブ型ＰＳＣと共通していることがわかる。

【図２３Ａ－Ｄ】図２３Ａ～Ｄは、女性ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣがＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において特徴的な前Ｘ不活性化状態を保持することを示す。図２３Ａに図示するのは、ＸＩＳＴプロモーターアンプリコンの単一クローンにおける６つのＣｐＧ部位についてのバイサルファイトシーケンシング分析である（下）。ナイーブ型細胞の対立遺伝子はいずれも脱メチル化されているのに対しプライム型細胞では対立遺伝子の１つが発現抑制されていることに注目する。Ｏｃｔ４座ＣｐＧのメチル化をコントロールとして示す（上のパネル）。図２３Ｂは、種々のナイーブ型および体細胞におけるＸＩＳＴ転写物のＲＴ－ＰＣＲ分析による定量を示すヒストグラムである。分化した女性線維芽細胞ではＸＩＳＴ発現が上方調節されているが、これと比較してナイーブ型ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣにおいては、ＸＩＳＴの発現レベルが低いことに注目する。図２３Ｃ～Ｄは、Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３／ポリコーム体の存在を示す免疫蛍光分析である。図２３Ｃはナイーブ型ＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣ、図２３Ｄはナイーブ型ＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣ由来の分化細胞を示す。分化細胞中には核内にＨ３Ｋ２７ｍｅ３／ポリコーム体が顕著に存在することがわかったが、ナイーブ型細胞については、核内にＨ３Ｋ２７ｍｅ３／ポリコーム体を有することがわかった細胞は極少数であった（図２３Ｃ）ことに注目する。したがって、Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３／ポリコーム体の数は分化により著しく増加し、このことから、女性ヒトナイーブ型細胞は分化の後でＸ染色体不活性化を開始できることがわかる。この結果から、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において増殖させた女性ナイーブ型ｉＰＳＣ／ｈＥＳＣ中のＸ染色体は、ヒトＩＣＭ中での場合について記載した前活性化状態と類似した前活性化状態にあることがわかる。

【図２４Ａ－Ｃ】図２４Ａ～Ｃは、ナイーブ型ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣが異なる転写プログラムを呈することを示す。図２４Ａは、図示した異なる従来型／プライム型およびナイーブ型のｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣ株における発現変動遺伝子の階層的クラスタリングを示す。ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣのいずれについてもクラスタリング結果がプライム型試料のいずれとも無関係であることに注目する。ナイーブ型ＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣを従来型プライム型増殖条件下に再度移すと（再プライム化）、他のプライム型試料のいずれともクラスターを形成することに注目する。このことから、両状態が増殖条件下において相互転換できることがわかる。図２４Ｂ～Ｃは、図示するナイーブ型およびプライム型細胞系の

表面におけるＭＨＣクラスＩの発現をＦＡＣＳ分析に供した結果を示すヒストグラムである。図２４ＢはＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣ、図２４ＣはＣ１　ｈｉＰＳＣを示す。２９３ＨＥＫ細胞を分化細胞（典型的にはＭＨＣクラスＩを高レベルで発現する）のコントロールとして用いた。蛍光強度の中央値（ＭＦＩ）を示す。このことから、ナイーブ型細胞はＭＨＣクラスＩを全く発現しないまたは低レベルで発現し、一方、プライム型細胞はＭＨＣクラスＩを中レベルおよび高レベルで発現することがわかる。両細胞系について、ＭＨＣクラスＩの染色に供した試料に対する正確なコントロールとして、染色無しの曲線もあわせて示す。

【図２５Ａ－Ｍ】図２５Ａ～Ｍは、ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣによるＯｃｔ４エンハンサーの利用が特徴的であることを示す。図２５Ａは、図示する多能性細胞株におけるヒトＯｃｔ４遠位エンハンサーおよび近位エンハンサーについて、レポーター遺伝子の活性を評価したヒストグラムである。空ベクターでトランスフェクションすることによって、基礎活性を分析した。ナイーブ型ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下で増殖させたｈＥＳＣ／ｉＰＳＣにおいて、遠位エンハンサーが主に利用されていることが明らかである。図２５Ｂ～Ｍは、以下によって安定的にトランスフェクションしたＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣ、またはトランスフェクションしていないＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣ（図２５Ｂ、２５Ｄ、および２５Ｆ）、についてのフローサイトメトリー分析を示す：１）すべての型の多能性細胞（ナイーブ型およびプライム型）に特徴的なＯｃｔ４－ＧＦＰ－２Ａレポーター（図２５Ｃ、２５Ｅ、２５Ｇ）、２）典型的にはプライム型多能性細胞中においてより活性が高いデルタＤＥ－Ｏｃｔ４－ＧＦＰ－２Ａ－Ｐｕｒｏ（マウスにおけるデータに基づく（図２５Ｉ、２５Ｋ、および２５Ｍ）、３）典型的にはナイーブ型多能性細胞中においてより活性が高いデルタＰＥ－ＯＣＴ４ＧＦＰ－２Ａ－Ｐｕｒｏ（図２５Ｈ、２５Ｊ、および２５Ｌ）。図２５Ｂ～Ｃおよび２５Ｈ～Ｉは、ナイーブ型ＷＩＳ－ＮＨＳＭ増殖条件下において増殖させた細胞を示す。図２５Ｄ～Ｅおよび２５Ｊ～Ｋは、従来型／プライム型ｂＦＧＦ／ＴＧＦβ培地中で増殖させた細胞を示す。図２５Ｆ～Ｇおよび２５Ｌ～Ｍは分化用培地中で増殖させた細胞を示す。分化用培地中で２１日目、細胞が線維芽細胞に分化した際に、細胞をフローサイトメトリー分析に供した。分析結果から、ｄｅｔａＰＥ－Ｏｃｔ４－ＧＦＰレポーターは、プライム型／従来型条件において（図２５Ｊ）、または線維芽細胞に分化した細胞に対して（図２５Ｌ）よりも、ナイーブ型ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下においての方が活性が高い（図２５Ｈ）ことがわかる。一方、ｄｅｌａｔＤＥ－ＯＣＴ４－ＧＦＰレポーターは、ナイーブ型条件下において（図２５Ｉ）、または線維芽細胞に分化した細胞に対して（図２５Ｍ）よりも、プライム型／従来型条件下において（図２５Ｋ）、活性を有する。これらの結果から、本発明のある実施形態によるナイーブ型ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣが有するエピジェネティックな安定性および配置が特徴的であることがわかる。ＭＦＩ＝蛍光強度の中央値。

【図２６Ａ－Ｋ】図２６Ａ～Ｋは、異種間のマウス－ヒトキメラ胚を示す。図２６Ａ～Ｃについて、図示するのは、ナイーブ型ヒトｉＰＳＣがｉｎ　ｖｉｖｏにおけるマウスの発達に貢献できることを示す画像である。ヒトナイーブ型Ｃ２　ｉＰＳＣを、ＧＦＰおよびＢＣＬ－２過剰発現ベクターで構造的に標識した。発生途中のマウス胚桑実胚と細胞を凝集させると、発生途中の初期マウス胚においてＧＦＰ細胞は２４時間生存できた。この結果から、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において増殖させたヒトナイーブ型細胞は異種間キメラ生物の作製に貢献できることがわかる。図２６Ｄ～Ｋは、ＧＦＰ標識ヒトナイーブ型ｉＰＳＣをＥ２．５マウス桑実胚中に注入できる様子と、Ｅ３．５において胚盤胞に組み込まれる様子とを示す。図２６Ｄは、ヒトナイーブ型ＧＦＰ＋（陽性）ｉＰＳＣを載せたもの、図２６Ｅは、図２６Ｄに示す細胞をマウス桑実胚中に注入したもの、図２６Ｆ～Ｈは、マウス桑実胚中に注入した細胞の注入当日（Ｉｎｊ．）の様子を示す、明視野（図２６Ｆ）、ＥＧＦＰ（高感度緑色蛍光タンパク質）（図２６Ｇ）、およびこれらの画像の合成（図２６Ｈ）である。図２６Ｉ～Ｋは、マウス桑実胚中に注入した細胞の注入１日後の様子を示す。図２６Ｉは明視野、図２６ＪはＥＧＦＰ、図２６Ｋはこれらの画像の合成を示す。

【図２７】図２７は、本発明のある実施形態によるバイサルファイトシーケンシングによって形成したＸＩＳＴアンプリコン（配列番号７０）の核酸配列を示す。ＣｐＧアイランドを黄色で強調して示す。図示するアンプリコン中にＣｐＧアイランドが６つあることに注目する。

【図２８Ａ－Ｃ】図２８Ａ～Ｃは、ナイーブ型ヒトＥＳＣ中の転写物について、核内発現レベル／細胞質内発現レベルの比率を示す。図２８Ａ～Ｂについて、ナイーブ型およびプライム型ｈＥＳＣにおいてＴＦＥ３およびＯＣＴ４を二重免疫染色した。細胞をＤＡＰＩでカウンター染色した（核染色）。プライム型ＬＩＳ２　ｈＥＳＣ株およびナイーブ型ＬＩＳ２　ｈＥＳＣ株における共焦点画像の代表的なものを示す。挿入図は、破線で四角に囲った部分を拡大して表す。ナイーブ型ｈＥＳＣにおいて強い核移行が観察されたが、プライム型条件下において増殖させた細胞ではこれが観察されなかった。図２８Ｃについて、各試料につき独立画像フレームから無作為に選択した細胞２００個について、その優先的な核移行を定量的不偏的イメージングで調べた。ナイーブ型およびプライム型のマウスおよびヒトＥＳＣにおける核内ＴＦＥ３／細胞質内ＴＦＥ３の比率を箱ひげ図で示す。ナイーブ型ｈＥＳＣにおける分布はナイーブ型ｍＥＳＣにおける分布と類似し、プライム型のヒトおよびマウスＥＳＣでは核内でのエンリッチメントが失われていた。＊はｔ検定のＰ値＜１×１０$^{-100}$を示す。

【図２９Ａ－Ｄ】図２９Ａ～Ｄは、ヒトナイーブ型多能性のエピジェネティックな配置を示す。図２９Ａ～Ｂは、ナイーブ型（図２９Ｂ）およびプライム型（図２９Ａ）のヒト細胞においてＯＣＴ４およびＤＮＭＴ３Ｂ（ＤＮＡ（シトシン－５－）－メチルトランスフェラーゼ３ベータ）を免疫染色して分析した結果を示す。ヒトナイーブ型細胞において、ＤＮＭＴ３Ｂタンパク質の発現が下方調節されるが、ＯＣＴ４タンパク質の発現は下方調節されなかった。図２９Ｃ～Ｄは、ヒトおよびマウスのプライム型試料およびナイーブ型試料におけるメチル化の変化を示すヒストグラムである。このヒストグラムは、ＣｐＧリッチ領域（ＣｐＧ含有量が４％を超える）中に存在し両試料において≧１０ｘをカバーするすべてのＣｐＧについて計算した、ＣｐＧあたりのメチル化の違いを示す分布である。明確さを期して、メチル化の変化がゼロではないＣｐＧのみをヒストグラムに含める。分布は左に裾をひいたものとなり、ナイーブ型試料においてメチル化が全般的に減少したことを示す。

【図３０Ａ－Ｉ】図３０Ａ～Ｉは、ヒトナイーブ型多能性におけるＤＮＡメチル化の変化を示す。図３０Ａ～Ｃは、プライム型およびナイーブ型のヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣにおけるＤＮＭＴ３Ａ（図３０Ａ）、ＤＮＭＴ３Ｂ（図３０Ｂ）、およびＨＳＰ９０（図３０Ｃ）のレベルを示すウェスタンブロット分析である。プライム型ヒトＰＳＣの場合と比較して、ナイーブ型ヒトＰＳＣにおいてＤＮＭＴ３Ａ（図３０Ａ）およびＤＮＭＴ３Ｂ（図３０Ｂ）の発現レベルが有意に下方調節されたことに注目する。図３０Ｄは、プライム型ＷＩＢＲ３細胞およびナイーブ型ＬＩＳ２細胞におけるメチル化の変化を示すヒストグラムである。このヒストグラムは、ＣｐＧリッチ領域（ＣｐＧ含有量が４％を超える）中に存在し両試料において≧１０ｘをカバーするすべてのＣｐＧについて計算した、ＣｐＧあたりのメチル化の違いを示す分布である。明確さを期して、メチル化の変化がゼロではないＣｐＧのみをヒストグラムに含める。右側の棒グラフは、この差異が２標準偏差を超えたＣｐＧの数を計数したものである。ナイーブ型試料のメチル化（青）がより低いこと、またはプライム型試料のメチル化（緑）がより低いことがわかる。点線は、差異が２標準偏差を超え正規分布を呈するＣｐＧの数を予測したものである。図３０Ｅについて、図３０Ｄと同様に試料二種を分析し、この際、各領域のＣｐＧ含量にかかわらず、両試料において≧１０ｘをカバーするすべてのＣｐＧについて分析した。図３０Ｆは、サイトカインＦＧＦ２およびＴＧＦＢを含有しない代わりにＰＫＣｉ、ＦＧＦＲｉ、およびＴＧＦＲｉを含有するナイーブ型ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地の組成を示す。培地は、ＬＩＦ（２０ｎｇ／ｍｌ）、ＥＲＫ１／２ｉ（ＰＤ０３２５９０１　１μＭ）、ＧＳＫ３βｉ（ＣＨＩＲ９９０２１　３μＭ）、ＪＮＫｉ（ＳＰ６００１２５　１０μＭ）、Ｐ３８ｉ（ＢＩＲＢ７９６　２μＭ）、ＦＧＦＲｉ（ＰＤ１７３０７４　０．２μＭ）、ＴＧＦβ１（８ｎｇ／ｍｌ）

＋／－ＲＯＣＫｉ（Ｙ２７６３２　２μＭ）を含有する。図３０Ｇについて、これらの条件下において（上記図３０Ｆ中に記載する組成の培地中で）８日間増やしたヒトナイーブ型ｉＰＳＣおよびＥＳＣにおいて、メチル化シトシン総レベル（ｍｄＣ）が著しく減少することが、ＬＣ－ＭＳ定量分析およびｄＧ含有量レベルでの標準化によってわかる。図３０Ｈについて、ヒトおよびマウスのナイーブ型およびプライム型細胞を、ＤＮＡメチル化（５ｄ－ＡＺＡ）またはＥＥＤポリコーム構成要素（ＤｚＮＥＰ）の阻害剤の存在下または非存在下において増やした。これらの阻害剤の存在下において継代した後も多能性を保持したのは、ナイーブ型細胞のみである。Ｏｃｔ４－ＧＦＰ特異的レポーターレベルを追跡することにより、多能性を測定した。図３０Ｉは、脆弱Ｘ男性患者の線維芽細胞に由来するナイーブ型およびプライム型ヒトｉＰＳＣにおけるＦＭＲ１プロモーター領域のメチル化の相対量を示す。ナイーブ型ヒト脆弱Ｘ　ｉＰＳＣは、脆弱Ｘ患者のＦＭＲ１プロモーターにおいてメチル化が優勢的に喪失していることを示す。＊はｔ検定のＰ値＜０．０５を示す。

【図３１Ａ－Ｅ】図３１Ａ～Ｅは、Ｍｂｄ３欠損後の直接的なｉＰＳＣ初期化を数値に基づいて説明する。図３１Ａは、二次的ＮＧＦＰ１コントロール（$Mbd3^{+/+}$）、Ｎａｎｏｇ過剰発現（ＮＧＦＰ１－$Nanog^{OE}$）、およびＭｂｄ３欠損（ＮＧＦＰ１－$Mbd3^{KD}$）であるプレＢ細胞を、ＤＯＸ初期化に供し、ＦＡＣＳにより週１回測定し（モノクローナルウェルについて）、また、初期化して最初の８日間はポリクローナルＮａｎｏｇ－ＧＦＰ追跡についても１日１回測定した。図３１Ｂ～Ｃは、ＤＯＸ添加後の時間に対するＮａｎｏｇ－ＧＦＰ＋ウェルの累積的な割合（パーセント）を、種々のクローンＢ細胞由来集団について測定した結果を示す。ＮＧＦＰ１コントロール、ＮＧＦＰ１－$Nanog^{OE}$、およびＮＧＦＰ１－$Mbd3^{KD}$は、その潜伏時間の累積分布が互いにはっきりと異なる。２回の実験を代表して、そのうち１回について示す。図３１ＢはＤＯＸ後の日数、図３１ＣはＤＯＸ後の細胞分裂を示す。図３１Ｄ～Ｅは、適合度について調整済みＲ２（詳細は方法の項目を参照）統計法を適用し、ＮＧＦＰ１コントロール（図３１Ｄ）およびＮＧＦＰ１－$Mbd3^{KD}$（図３１Ｅ）の初期化潜伏時間（測定スケール：日）を決定的なステップ関数モデルにフィッティングした結果を示す。ＮＧＦＰ１－$Mbd3^{KD}$は、決定的なステップ関数モデルに密接にフィットしたが（R^2＞０．９）、ＮＧＦＰ１コントロールでは密接度が低かった（R^2＝０．５５）。

【図３２Ａ－Ｈ】図３２Ａ～Ｈは、初期化と多能性獲得に及ぼすＯＳＫＭ存在下でのＭｂｄ３の阻害効果について、その機序を示す。図３２Ａ～Ｂについて、ＦｌａｇタグＯＣＴ４、ｃ－ＭＹＣ、ＫＬＦ４、ＳＯＸ２、ＮＡＮＯＧ、またはＨＤＡＣ１（ポジティブコントロールとして）をコードするコンストラクトをＨＥＫ２９３Ｔ細胞中にトランスフェクションし、あわせてＭｂｄ３も実施した。細胞溶解物を抗Ｆｌａｇ抗体（またはコントロールとして抗ＩｇＧ抗体）による免疫沈降（ＩＰ）に供し、続いてイムノブロット分析（ＩＢ）を実施した。全細胞溶解物またはＩＰ抽出物における発現レベルを、ＩＢにより抗Ｆｌａｇ抗体（図３２Ｂ）または抗Ｍｂｄ３抗体（図３２Ａ）を用いて調べた。この分析結果から、Ｍｂｄ３は多能性因子ＯＳＫＭと直接相互作用するがＮａｎｏｇとは直接相互作用しないことがわかる。ポジティブコントロールとしてＨｄａｃ１を用いた。図３２Ｃは、Ｍｂｄ３の直接的なターゲットの機能的エンリッチメントを、ＯＳＫＭ誘導の前後で体細胞ＭＥＦにおいて測定した結果を示す。図３２Ｄは、Ｍｉ２β（Ｃｈｄ４）の直接的なターゲットの機能的エンリッチメントを、ＯＳＫＭ誘導の前後で体細胞ＭＥＦにおいて測定した結果を示す。色の度合いは、ＦＤＲ閾値０．０００１％を超えたエンリッチメントＰ値を示す（フィッシャーの直接確率検定により計算）。白は、エンリッチメントが上記閾値未満であった場合を示す。図３２Ｅは、初期化期間全体（０日目、４日目、８日目、１１日目、およびｉＰＳＣ／ＥＳＣ）を通しての遺伝子発現を、$Mbd3^{+/+}$試料（青）および$Mbd3^{flox/-}$試料（赤）中のＭＥＦと比較した倍変化で示す分布である。箱型図において、中心は中央値を示し、四角の端は２５パーセンタイルおよび７５パーセンタイルを示す。グラフ中に示す分布差のＰ値は、一対の試料についてのｔ検定によって推定した値である。この分析では、ＯＳＫＭ誘導後の$Mbd3^{+/+}$細胞からのＭｂ

ｄ３（遺伝子１４００個）について同定されたすべての結合ターゲットを計算した。この結果から、初期化プロセス全体を通してＭｂｄ３ターゲットが全般的に活性化され、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$試料においてＭｂｄ３ターゲットの活性化が特異的に加速されたことがわかる。図３２Ｆは、ＯＳＫＭ（ＤＯＸ）誘導４日後のヒストンマークの分布およびＯｃｔ４結合レベルをｚスコア値で示す。この分析は、Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$試料からのＭｂｄ３（遺伝子１４００個）の同定されたすべての結合ターゲットに対して実施した。箱型図において、中心は中央値を示し、四角の端は２５パーセンタイルおよび７５パーセンタイルを示す。グラフ中に示す分布差のＰ値は、一対の試料についてのｔ検定によって推定した値である。この結果から、Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$試料と比較してＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$試料においてＨ３Ｋ２７ａｃおよびＨ３Ｋ４ｍｅ３が有意に誘導されＨ３Ｋ２７ｍｅ３が減少したこと、また、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$試料においてＯｃｔ４結合が誘導されたことがわかる。図３２Ｇは、野生型および図示する種々の変異Ｍｂｄ３挿入断片をコードするレンチウイルスに感染させた後のＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$ＭＥＦの初期化効率を示す。エラーバーは生体サンプル３つのｓ．ｄ．を示す。＊は、非感染コントロール試料と比較して有意なＰ値＜０．００１を示す。図３２Ｈは、体細胞における多能性誘導機序のモデルを示すスキームである。

【図３３Ａ－Ｇ】図３３Ａ～Ｇは、ＥｐｉＳＣにおけるエピジェネティックリプレッサーのノックダウンスクリーニングを示す。図３３Ａは、ｑＲＴ－ＰＣＲで測定した、ＥｐｉＳＣにおける図示のｓｉＲＮＡプールについてのノックダウンの効率を示す。各遺伝子の発現値を、コントロールｓｉＲＮＡでの測定値に標準化した。エラーバーはｓ．ｄ．を示す。＊は、スチューデントｔ検定のｐ値＜０．０５を示す。図３３Ｂ～Ｃは、本研究におけるＭｂｄ３$^{＋／＋}$（図３３Ｂ）およびＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$（図３３Ｃ）ＥｐｉＳＣ株を示す相画像である。細胞系は、ゼラチン／ビトロネクチン被覆プレートまたはマトリゲル被覆プレート上（フィーダー非添加条件下）で増やすと、特徴的な平たい形態を呈した。図３３Ｄ～Ｅは、ＥｐｉＳＣ株においてＯｃｔ４を免疫染色した結果を示す。Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$ＥｐｉＳＣ（図３３Ｄ）、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$ＥｐｉＳＣ（図３３Ｅ）。図３３Ｆ～Ｇについて、ＥｐｉＳＣ株は、免疫不全マウスの皮下にマイクロインジェクションすると成熟かつ分化したテラトーマを形成できたため、多能性であることがわかった。Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$ＥｐｉＳＣ（図３３Ｆ）、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$ＥｐｉＳＣ（図３３Ｇ）。

【図３４Ａ－Ｃ】図３４Ａ～Ｃは、Ｍｂｄ３$^{－／－}$胚盤胞からのＥＳＣの誘導を示す。図３４Ａ～Ｂは、ＦＢＳ／ＬＩＦ条件または２ｉ／ＬＩＦ条件のいずれかにおいて増やしたＭｂｄ３$^{＋／＋}$ＥＳＣ（図３４Ａ）およびＭｂｄ３$^{－／－}$ＥＳＣ（図３４Ｂ）におけるＯｃｔ４および栄養膜マーカーの発現について、ＲＴ－ＰＣＲで分析した結果を示すヒストグラムである。Ｍｂｄ３$^{－／－}$ＥＳＣのみにおいて、かつ血清条件下においてのみ、栄養膜分化マーカーが上方調節される。ストリンジェントな無血清２ｉ／ＬＩＦ条件下において、Ｍｂｄ３$^{－／－}$ＥＳＣがＭｂｄ３$^{＋／＋}$ＥＳＣと同程度に維持される。エラーバーは生体試料３つのｓ．ｄ．を示す。図３４Ｃは、Ｍｂｄ３に対するレスキュー発現導入遺伝子を有するＭｂｄ３$^{－／－}$ＥＳＣ系を胚盤胞マイクロインジェクションした後に誘導されたアグーチキメラを示す。

【図３５Ａ－Ｃ】図３５Ａ～Ｃは、前着床発達におけるＭｂｄ３の転写的発現を示す。図３５Ａ～Ｂは、マウスの初期発達におけるＭｂｄ３（図３５Ｂ）およびＮａｎｏｇ（図３５Ａ）の発現をＲＴ－ＰＣＲ分析に供し、相対定量値を柱状スキームで示す。エラーバーは生体サンプル３つのｓ．ｄ．を示す。卵母細胞においてＭｂｄ３転写物が低レベルで検出され、一方、卵母細胞および接合体においてＭｂｄ３タンパク質が免疫染色で難なく検出されたことから（図３６Ａ～Ｄおよび図１０～Ｔ）、母性遺伝と矛盾しないことがわかる。前着床発達が終了に近づき桑実胚段階および胚盤胞段階になるとＭｂｄ３転写が増加し、この結果は、後期胚盤胞期においてＭｂｄ３タンパク質が再度発現する場合と矛盾しない（図１０～Ｔ）。図３５Ｃは、（ｉｎｔｒａｎｅｔ（ｄｏｔ）ｃｍｒｂ（ｄｏｔ）ｅｕ／Ｈｕｍａｎ＿ｅｍｂｒｙｏｓ／ｈｏｍｅ．ｈｔｍｌ）で入手できる、ヒト胚の初期発生過程における転写測定のリポジトリに基づいて、ヒト着床前胚におけるＭＢＤ３の転写

レベルを相対的に示すものであり、マウス胚での測定結果と類似している。これらのデータから、前着床発達の後期段階においてＭｂｄ３転写が増加したことがわかり、この結果は、後期胚盤胞期における顕著な発現を示すタンパク質免疫染色データと矛盾しない（図１Ｏ～Ｔ）。

【図３６Ａ－Ｊ】図３６Ａ～Ｊは、Ｍｂｄ３の免疫染色分析を示す。図３６Ａ～Ｄはマウス卵母細胞におけるＭｂｄ３の免疫染色を示し、Ｍｂｄ３の母性遺伝を示す。図３６Ｅ～Ｈは、Ｅ５．５着床後エピブラストにおけるＭｂｄ３および系譜マーカーの免疫染色を示し、後期胚盤胞期にみられたものと同じ顕著な発現を示す（図１Ｏ～Ｔ）。図３６Ｉ～ＪはＭｂｄ３の免疫染色分析を示し、ナイーブ型およびプライム型限定増殖条件下で増やした多能性細胞の核内発現が顕著であることを示す。これらの結果では、ナイーブ型２ｉ／ＬＩＦ条件下におけるＭｂｄ３タンパク質の核移行に対する摂動は除外している。

【図３７Ａ－Ｃ】図３７Ａ～Ｃは、初期化中のＭｂｄ３欠損体細胞の特性についての比較分析を示す。図３７Ａは、図示するＭＥＦ株を各因子をコードするモロニーレトロウイルスに感染させた後の初期化効率を示す。図３７Ｂは、図示するＭＥＦ株をポリシストロン性ＯＫＳＭをコードするレンチウイルスに感染させた後の初期化効率を示す。図３７Ｃについて、図示する外因性の添加が有る場合または無い場合で、ＬＩＦ含有ＥＳ培地中で、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$ＭＥＦをポリシストロン性ＯＫＳＭベクターに感染させた。＊は、Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$コントロールに対するスチューデントｔ検定のｐ値＜０．０１を示す。形質導入９日目のＯｃｔ４－ＧＦＰレベルによって初期化効率を評価した。このプロセスにおいて、細胞分割は実施しなかった。

【図３８Ａ－Ｂ】図３８Ａ～Ｂは、Ｍｂｄ３欠損により複数の成体体細胞種が決定的かつ非常に高効率で初期化されることを示す。図３８Ａについて、Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$、Ｍｂｄ３$^{－／－}$、およびＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$ＭＥＦ、成体の尾の先に由来する線維芽細胞（ＴＴＦ）、ならびに神経前駆体細胞（ＮＰＣ）を試験に供し、２ｉ／ＬＩＦ中において、ＯＫＳＭレンチウイルスを形質導入した場合または形質導入しない場合のｉＰＳＣの形成を調べた。この分析結果から、ｉＰＳの形成にＯＫＳＭが必須であること、また、Ｍｂｄ３を欠損させるのみでは、これらの細胞型のいずれについても初期化して多能性を獲得させるには十分でないことがわかる（追跡３０日後であっても）。図３８Ｂは、初期化因子を図示の通りに組み合わせたもので形質導入して１０日目のＭＥＦの初期化効率を示す。ＯＳＫおよびＯＳＫＭの組み合わせについて、ポリシストロン性レンチウイルスベクターを用いた。エラーバーは、複数の同様の試料のｓ．ｄ．を示す。

【図３９Ａ－Ｄ】図３９Ａ～Ｄは、Ｍｂｄ３$^{－／－}$ｉＰＳＣによるテラトーマの形成を示す。図３９Ａ～Ｃについて、無作為に選択したＭｂｄ３$^{－／－}$ｉＰＳＣクローン（クローン１、２、および３）を増やし、免疫不全マウスの皮下に注入した。いずれの株においても、三種の生殖系譜（中胚葉、内胚葉、および外胚葉）に由来する分化細胞を有するテラトーマが発生した。これらの結果は、Ｍｂｄ３$^{－／－}$ＥＳＣにおいて得られた結果と矛盾しない（Ｋａｊｉ ｅｔ ａｌ．ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ２００７）。後者の細胞（Ｍｂｄ３発現の再構成無し）は、寄与率の高いキメラを形成する場合には発達能力が限定的だが、分化したテラトーマを形成することはできる（Ｋａｊｉ ｅｔ ａｌ．ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ２００７）。さらに、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$体細胞も１００％の効率で初期化でき、Ｍｂｄ３を外因的に過剰発現させることなく生殖系への伝達によって成体キメラを取得可能であることに注目する。技術的な観点から、将来的にＭｂｄ３の阻害小分子が発見され、初期化および分化においてＭｂｄ３の発現および活性を遺伝子操作なしでより容易に調節できることが期待される。図３９Ｄについて、Ｍｂｄ３$^{－／－}$ｉＰＳＣは、２ｉ／ＬＩＦ限定条件下において増やした後も正常な核型（４０）を保持できる。Ｐは継代回数を示す。

【図４０Ａ－Ｅ】図４０Ａ～Ｅは、細胞の初期化をタイムラプスライブ顕微鏡観察に供し追跡した画像である。自動セグメンテーションプロトコールの主な工程の概略図を示す。このプロトコールを用いて、ウェル全体のモザイクデータをタイムラプスで自動的に分析した。測定は２通りの蛍光波長で実施した。このプロトコールの主な工程は、プレート縁

を除去し、各チャネルおよび各時点について適応性検出を適用し、特異的形態学的フィルターを用いて高密度のコロニーを分け、ｌｏｗ－ｐａｓｓ－ｆｉｌｔｅｒ（ＬＰＦ）および連結要素クラスタリングを用いてクラスタリングを実施し、各コロニーについてコロニー情報およびＯｃｔ４－ＧＦＰ活性化情報を抽出し、時点情報のすべてについて統計的分析を実施する（方法の項目を参照）。

【図４１Ａ－Ｄ】図４１Ａ～Ｄは、ｍＣｈｅｒｒｙおよびＯｃｔ４－ＧＦＰの再活性化の時間変化を、全ウェルのモザイク（図４１Ａ）と、追跡したコロニー約１００個のうち代表的な単一Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$コロニー３つ（図４１Ｂ～Ｄ）とについて示す。

【図４２Ａ－Ｅ】図４２Ａ～Ｅは、決定的なｉＰＳＣ初期化のタイムラプスライブイメージングを示す。図４２Ａ～Ｃは、ｍＣｈｅｒｒｙ（図４２Ａ）、Ｏｃｔ４－ＧＦＰ（図４２Ｂ）、およびチャネル組み合わせ（図４２Ｃ）について、２ｉ／ＬＩＦおよび５％ pO_2 の条件下におけるＤＯＸ６日後のウェル全体のモザイク画像を示す。Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$細胞において、ＥＳ様ｍＣｈｅｒｒｙ＋コロニーが豊富であり、Ｏｃｔ４－ＧＦＰシグナルと共局在化している。図４２Ｄは、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$について、Ｏｃｔ４－ＧＦＰ＋コロニーの累積分布（赤のグラフ）と、Ｏｃｔ４－ＧＦＰ＋活性化の密度汎関数（青の棒グラフ）を示す。検出したすべてのコロニーについて、統計値を分析した（１ウェルあたり約１００個のコロニーをセグメンテーションした）。結果から、Ｏｃｔ４－ＧＦＰ活性化が同調するのは４．５日目あたりに限られ、５０％を超えるコロニーが０．５日間隔でＯｃｔ４－ＧＦＰを再活性化することがわかる。４回の実験を代表して、そのうち１回について示す。図４２Ｅは、コロニー内の子孫Ｏｃｔ４－ＧＦＰの活性化について、その分布（セグメンテーションした各コロニー中の全ｍＣｈｅｒｒｙ＋ピクセルのうちＯｃｔ４－ＧＦＰ＋かつｍＣｈｅｒｒｙ＋ピクセルの比率）を誘導後の時間に対して示す箱型図グラフである。箱型図において、中心は中央値を示し、四角の端は２５パーセンタイルおよび７５パーセンタイルを示す。１００個のコロニー（検出したすべてのコロニー）をセグメンテーションし、統計値を計算した。６日目に、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$コロニーの９５％が、Ｏｃｔ４－ＧＦＰ陽性の子孫細胞を８５％を超えて有する。

【図４３Ａ－Ｂ】図４３Ａ～Ｂは、Ｏｃｔ４－ＧＦＰの再活性化およびｉＰＳＣの形成が大きく増大したことを示す。Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$細胞（図４３Ｂ）またはＭｂｄ３$^{＋／＋}$細胞（図４３Ａ）における、２ｉ／ＬＩＦ中、ＤＯＸ（ＯＳＫＭ）誘導後の、Ｏｃｔ４－ＧＦＰ再活性化ダイナミクスのフローサイトメトリー測定を示す。ドナー細胞集団全体において、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$二次的細胞は７日目までにＯｃｔ４－ＧＦＰを同調的かつ迅速に再活性化する。重要なことには、図示する時点においてウェルを回収に供し、初期化過程のあいだ前もって継代せず、分割もせずに、分析に供した。独立した３回の実験のうち１回について示す。（ＦＳＣは前方散乱）。Ｏｃｔ４－ＧＦＰの著しい再活性化は、顕微鏡によるタイムラプスライブイメージングで測定した際にもみられたように、４～５日目の短い時間に生じることに注目する。

【図４４Ａ－Ｂ】図４４Ａ～Ｂは、体細胞が決定的な初期化により多能性を獲得する際にＭｂｄ３発現の再構成に及ぶ効果を調べたものである。図４４Ａは、初期化においてｉＰＳ形成を経時的に阻害するＭｂｄ３の能力を調べるための実験計画を示すスキームである。図４４Ｂについて、二次的ＯＳＫＭ初期化可能Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$ＭＥＦを試験に供し、初期化中の異なる時点でＭｂｄ３、Ｍｂｄ２、または空のＦＵＷレンチウイルスを過剰発現させた際の初期化感度を調べた。Ｍｂｄ２または偽ベクターでトランスフェクションした際、ｉＰＳＣ初期化効率は低下しなかった。Ｍｂｄ３を導入すると、初期化５日目より前に導入を実施した場合に、ｉＰＳＣの形成が大幅に減少した。２回の代表的な実験のうち１回について示す。各条件につき２回の平均を示す。エラーバーはｓ．ｄ．を示す。

【図４５Ａ－Ｂ】図４５Ａ～Ｂは、Ｍｂｄ３欠損後のｉＰＳＣ初期化における遺伝子発現の分析を示す。図４５Ａについて、ＤＯＸ誘導前後のドナー線維芽細胞における遺伝子発現を測定し、確立された多能性ｉＰＳＣ系およびＥＳＣ系と比較した。全遺伝子符号（遺伝子１６，６２０個）を、Ｓｐｅａｒｍａｎの相関関係を距離メトリックとして用いかつ

平均連結法を用いた階層的クラスタリングによって、クラスタリングに供した。結果から、ＯＫＳＭ（ＤＯＸ）誘導の４日後には、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$ＭＥＦがドナーの体細胞ＭＥＦから別々にクラスターを形成したが、Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$ＭＥＦはしなかったことがわかる。８日目には、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$細胞は、確立されたＥＳＣ株およびｉＰＳＣ株と転写の観点から区別がつかなくなった。初期化期間を延ばして１１日目でも、Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$集団は４日目のＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$細胞とクラスターを形成したが、多能性ＥＳＣ－ｉＰＳＣ株とはクラスターを形成しなかった。図４５Ｂは、主成分分析（ＰＣＡ）による全遺伝子発現符号（遺伝子１６，６２０個）のクラスタリングを示し、当該データ中で最も変動の大きい主成分を検出した。主成分のプロットより、データ変動が８０％を超えることがわかる。同じ色つき楕円内の試料はダイナミクスが類似することを示し、８日目のＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$細胞は確立されたＥＳＣ株およびｉＰＳＣ株と転写の観点から区別がつかない。（ＫＯ＝Ｍｂｄ３$^{－／－}$、ＨＥＴ＝Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$、ＷＴ＝Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$）。

【図４６Ａ－Ｅ】図４６Ａ～Ｅは、ｉＰＳＣ初期化における遺伝子発現パターンの変化を示す。単一遺伝子発現の進行は、ｉＰＳＣにおいて各遺伝子が発現値に到達する程度を示す。これらの値を次の変換により定量した。

【数１】

$$\hat{X}_j(t) = \max\left(\frac{X_j(t) - X_j(MEF_Mbd3^{+/+})}{\overline{X}_j(IPS) - \overline{X}_j(MEF)}, 0\right)$$

上記変換は、ＭＥＦ発現値（０と設定）からｉＰＳ値（１と設定）に向かう距離を表す。多能性関連遺伝子の選択された群または選択されたＭｂｄ３ターゲットを、ＤＯＸ誘導後の異なる時点においてプロットする。赤の棒グラフはＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$における遺伝子発現の進行を表し、青の棒グラフはＭｂｄ３$^{＋／＋}$における遺伝子発現の進行を表す。図４６Ａについて、ＭＥＦ試料において真の多能性遺伝子が最初は転写されないことがわかる（Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$およびＭｂｄ３$^{＋／＋}$の両方）。図４６Ｂについて、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$においてＳａｌｌ４、Ｌｉｎ２８ａ、Ｕｔｆ１、およびＮａｎｏｇを含む複数の多能性関連遺伝子がＯＳＫＭ誘導４日目に迅速に誘導され、Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$においてはこれが誘導されないことがわかる。図４６Ｃについて、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$においてこれらの遺伝子が８日目にはｉＰＳ／ＥＳ細胞で観察されるレベル（約１）に到達し、Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$ではほとんどの遺伝子について到達しない。図４６Ｄ～Ｅは、多能性遺伝子マーカーを検出するための単一細胞ｑＲＴ－ＰＣＲ解析を示す。Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$ＭＥＦ（図４６Ｄ）およびＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$ＭＥＦ（図４６Ｅ）について、ＤＯＸ誘導前（０日目）およびＤＯＸ誘導６日後に分析を実施した。検出レベルを超えて発現した遺伝子を緑で示す（検出されないものは赤で示す）。Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$試料のみにおいて、かつＤＯＸ後においてのみ、分析した細胞１２個中１２個において試験したすべての多能性マーカーが再活性化されたことが注目される。ＲＴ－ＰＣＲによる内因性のＳｏｘ２再活性化がＷＴ細胞において２ｉ／ＬＩＦ＋ＤＯＸ中で強いため、真性の多能性再活性化をストリンジェントに反映するものではないことがわかる。

【図４７Ａ－Ｂ】図４７Ａ～Ｂは、発現変動遺伝子について測定したすべてのヒストンマーク値のクラスタリングを示す。ドナーの線維芽細胞においてＤＯＸ誘導の前後でクロマチンＩＰ－Ｓｅｑ（ＩＰ＝免疫沈降）を実施し、確立された多能性ｉＰＳＣ系およびＥＳＣ系のクロマチンＣｈＩＰ－Ｓｅｑと比較した。Ｈ３Ｋ４ｍｅ３、Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３、およびＨ３Ｋ２７ａｃの遺伝子プロファイルを抽出し、ｚスコアに標準化した。この分析において、各遺伝子および各ヒストンマークの値を適切なｚスコアプロファイルの最大値として選択した。各遺伝子のすべてのヒストンマーク（Ｈ３Ｋ４ｍｅ３、Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３、およびＨ３Ｋ２７ａｃ）を有する連結ベクターについて、クラスタリングを実施した。図４７Ａは、野生型のＭＥＦ試料とＥＳＣ試料とで遺伝子発現が異なる遺伝子の上位１３

２３個を対象としたＨ３Ｋ４ｍｅ３、Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３、およびＨ３Ｋ２７ａｃの階層的クラスタリングを示す。（方法の項目を参照）。Ｓｐｅａｒｍａｎの相関関係を距離メトリックとして用いかつ平均連結法を用いて、階層的クラスタリングを計算した。結果から、８日目にはＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$は確立されたＥＳＣ株およびｉＰＳＣ株とエピジェネティックに類似していたが、Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$は類似していなかったことがわかる。図４７Ｂは、上述のベクターの間のＳｐｅａｒｍａｎの相関関係を示す（すべてのヒストンマークを有する遺伝子１３２３個）。ここでも、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$ＭＥＦがＯＫＳＭ（ＤＯＸ）誘導の４日後にはドナーの体細胞ＭＥＦから別々にクラスターを形成したが、Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$ＭＥＦはしなかったことがわかる。８日目には、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$細胞は、確立されたＥＳＣ株およびｉＰＳＣ株と強い相関関係にあるエピジェネティックな符号を示す。Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$集団は、初期化から８日経っても多能性ＥＳＣ－ｉＰＳＣ株との強い相関関係を示さない。

【図４８Ａ－Ｃ】図４８Ａ～Ｃは、各ヒストンマークのクラスタリングを別個に示す。野生型のＭＥＦ試料とＥＳ試料とで遺伝子発現が異なる遺伝子の上位１３２３個を対象としたＨ３Ｋ２７ｍｅ３（図４８Ａ）、Ｈ３Ｋ２７ａｃ（図４８Ｂ）、およびＨ３Ｋ４ｍｅ３（図４８Ｃ）のｚスコア値の階層的クラスタリングを示す（方法の項目を参照）。Ｓｐｅａｒｍａｎの相関関係を距離メトリックとして用いかつ平均連結法を用いて、階層的クラスタリングを計算した。結果から、各ヒストンマークを別個に考慮したとしても、８日目にはＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$は確立されたＥＳＣ株およびｉＰＳＣ株とエピジェネティックに類似していたが、Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$は類似していなかったことがわかる。

【図４９Ａ－Ｂ】図４９Ａ～Ｂは、決定的な初期化におけるＤＮＡメチル化レベルの変化を示す。図４９Ａについて、ＯＳＫＭ（ＤＯＸ）誘導の８日後にＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$細胞においてＤＮＡメチル化の平均レベルが低下するが、Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$細胞においては低下しない。全ゲノムについてメチル化レベルを、ｒｅｄｕｃｅｄ　ｒｅｐｒｅｓｅｎｔａｔｉｏｎ　ｂｉｓｕｌｆｉｔｅ　ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ（ＲＲＢＳ、方法の項目を参照）によりアッセイした。メチル化レベルを各ＣｐＧジヌクレオチドについて別個に計算し、次いで５つ以上の別個のシーケンシングリードにカバーされるすべてのＣｐＧについて、平均値を求めた（ＣｐＧ部位全３４，５２２個）。低継代Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$ｉＰＳＣの平均メチル化レベル（同じＣｐＧ群について計算）を、参照として破線で示す。図４９Ｂについて、平均メチル化について（ａ）と同様に分析した。ただし、ＣｐＧリッチ領域（すなわちＣｐＧが４％を超えて豊富）におけるＣｐＧ　１８，７４９個（３４，５２２個中）のみを用いた。

【図５０Ａ－Ｃ】図５０Ａ～Ｃは、２ｉ／ＬＩＦ条件下におけるＭｂｄ３欠損後の決定的かつ同調性のｉＰＳＣ初期化を示す。図５０Ａは、二次的Ｍｂｄ３＋／＋ＭＥＦから発生させ、２ｉ／ＬＩＦ＋ＤＯＸ条件下において増やした、一部初期化された（前ｉＰＳＣ株）の代表的な例を示す。ｍＣｈｅｒｒｙ＋前ｉＰＳＣ株がＯｃｔ４－ＧＦＰを発現しないことに注目する。Ｏｃｔ４－ＧＦＰ＋／ｍＣｈｅｒｒｙ＋ｉＰＳＣ株のサブクローンをポジティブコントロールとして示す（下段のパネル）。図５０Ｂについて、以前に記載された（Ｍｉｋｋｅｌｓｅｎ，Ｔ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４５４，４９－５５，２００８）一部初期化された（中間の前ｉＰＳ）細胞系ＢＩＶ１、ＭＣＶ６、およびＭＣＶ８を、コントロール（スクランブル）またはＭｂｄ３　ｓｉＲＮＡでのトランスフェクションに２回供し、２ｉ／ＬＩＦ条件下において増やした。Ｍｂｄ３の欠損により、細胞の大部分が多能性ｉＰＳＣに著しく変換された。エラーバーは生体サンプルの標準偏差を示す。図５０Ｃは、アグーチ色の毛色への寄与から明らかなように、レスキューＢＩＶ１ｉＰＳＣから発生させた成体キメラを示す。

【図５１】図５１は、２ｉ／ＬＩＦ条件下のＭｂｄ３欠損による、細胞融合に基づく初期化の増大を示す。体細胞ＭＥＦおよびＥＳＣの間で細胞融合初期化アッセイを実施して、Ｍｂｄ３発現を阻害することにより、強い初期化と多能性獲得が促進される。Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$ＥＳＣおよびＭｂｄ３$^{－／－}$ＥＳＣ（Ｏｃｔ４－ＧＦＰレポーターを有さない）を、構成型ＣＡＡＧＳプロモーターにより開始されるハイグロマイシン抵抗カセットをコード

するコンストラクトで遺伝子組換えした。これらの細胞について、ＰＥＧ介在細胞融合により野生型Ｍｂｄ３欠損（Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$）ＭＥＦ（Ｏｃ４－ＧＦＰレポーターおよび構成型ピューロマイシン抵抗カセットを有する）を初期化する能力を評価した。ＰＥＧ細胞融合を実施し、ピューロマイシン＋ハイグロマイシンにおいて細胞をインキュベートすることによって、二重耐性コロニーを選択した。初期化されたＭＥＦにおける２ｉ／ＬＩＦ条件下でのＯｃｔ４－ＧＦＰ導入遺伝子の再活性化を用いて、細胞融合初期化効率を定量した。その結果は、Ｍｂｄ３ならびにドナーおよびレシピエント細胞を欠損させると、体細胞のＮａｎｏｇ＋多能性獲得への初期化が２ｉ／Ｌｉｆにおいて大いに加速されることを明瞭に示す。各パネルは、独立した２回の実験のうち１回について示す。＊はスチューデントｔ検定のＰ値＜０．０１を示す。エラーバーはｓ．ｄ．を示す。

【図５２Ａ－Ｃ】図５２Ａ～Ｃは、ヒト多能性細胞中のＭＢＤ３座に対するＴＡＬＥヌクレアーゼによるターゲティングを示す。図５２Ａは、ＭＢＤ３のノックアウト条件対立遺伝子を発生させるターゲティング計画を示す概略図であり、このターゲティング計画では、Ｃｒｅリコンビナーゼによるトランスフェクション後にエクソン２を除去する。サザンブロットプローブを黒線で示し、エクソンを青四角で示す。ＮｈｅⅠおよびＨｉｎｄＩＩＩの消化部位を示す。図５２Ｂ～Ｃは、ヒトＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣ株を５’プローブ（図５２Ｂ）および３’プローブ（図５２Ｃ）でターゲティングした後のサザンブロット解析を示す。ターゲティング効率は高く、１回のターゲティングで両対立遺伝子が正確に改変された位置でクローンを単離できた。サザンブロット分析は、ＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣクローン＃３３および＃３７における両Ｍｂｄ３対立遺伝子の正確な５’および３’ターゲティングを示す。ＭＢＤ３タンパク質（図８Ｍ～Ｎ）の形質発現程度が低いクローン＃３７を選択し、実験でさらなる追跡および分析に供した。

【図５３Ａ－Ｅ】図５３Ａ～Ｅは、Ｍｂｄ３発現の欠損により、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて分化した線維芽細胞からのヒトｉＰＳＣ形成が促進されることを示す。図５３Ａは、ＤＯＸ誘導性ＯＫＳＭ導入遺伝子を有するＭＢＤ３$^{＋／＋}$およびＭＢＤ３$^{ｆｌｏｘ／－}$ｉＰＳＣを、構造的発現ｍＣｈｅｒｒｙで標識し、ＯＣＴ４－ＧＦＰノックイン対立遺伝子５４でターゲティングした（Ｈｏｃｋｅｍｅｙｅｒ，Ｄ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２９，７３１－７３４，２０１１）。後者株からｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて分化した線維芽細胞を、図示のスキームによって初期化した。９５％を超えるヒトＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$線維芽細胞が、導入遺伝子誘導の８日後にＮＡＮＯＧ／ＴＲＡ１－６０＋ＩＰＳＣになった。エラーバーは生体サンプルのｓ．ｄ．を示す。＊は、ＭＢＤ３$^{＋／＋}$試料に対する有意なＰ値＜０．００１を示す。図５３Ｂは、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ増殖条件下において維持したＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$ｉＰＳＣクローンの正常な核型を示す。図５３Ｃ～Ｅは、無作為に選択されたｉＰＳＣクローン（１、２、および３）の、テラトーマ形成により明らかにわかる多能性を示し、また、三種の生殖系譜（中胚葉、内胚葉、および外胚葉）からの分化細胞の発生を示す。

【図５４Ａ－Ｇ】図５４Ａ～Ｇは、ＭＢＤ３をｓｉＲＮＡ阻害するとＯＳＫＭによるヒトｉＰＳＣ初期化が促進されることを示す。図５４Ａ～Ｂについて、ヒト一次的線維芽細胞をＭＢＤ３　ｓｉＲＮＡで処理することによって、因子ＯＳＫＭおよびＬＩＮ２８（ＳＴＥＭＧＥＮＴ）でのｍＲＮＡトランスフェクションで初期化を２回実施すればｉＰＳＣを発生させることができ、多能性因子でのｍＲＮＡトランスフェクションを何度も繰り返す必要が少なくなる。コントロールｓｉＲＮＡで処理した細胞（図５４Ｂ）ではなく、ＭＢＤ３　ｓｉＲＮＡで処理した細胞における８日目のｎａｎｏｇ＋／ＳＳＥＡ４＋コロニーの数に注目する。図５４Ｃについて、異なる時点および継代回数における、代表的なヒトｉＰＳＣクローン（１および２）を示す（Ｐは継代回数を示す、７日目および継代１１回目）。図５４Ｄ～Ｆについて、無作為に選択されたクローン（１および２）の多能性を、多能性マーカーＯＣＴ４およびＳＳＥＡ４（図５４Ｄ）およびテラトーマ形成（図５４Ｅおよび５４Ｆ）に対して特異的な染色によって示す。図５４Ｇについて、ヒトナイーブ型細胞をＳＣＩＤ免疫不全マウスの皮下に注入したところ、その４～８週間後に形成されたのは、三種の系譜（内胚葉（左）、外胚葉（中）、および中胚葉（右））への分化が十分

に進んだテラトーマ腫瘍であった。この結果は、細胞が機能的に多能性であることを示す。これらの結果から、ＭＢＤ３の発現および／または作用を阻害すると、一過性ｍＲＮＡまたはｉＰＳＣ初期化のための他の一過性トランスフェクションプロトコールでのｉＰＳＣの形成が促進されることがわかる。

【図５５Ａ－Ｄ】図５５Ａ～Ｄは、Ｍｂｄ３欠損後の初期化カイネティックを示す。図５５Ａは、時間（日）に対するＧＦＰ＋ウェルの累積的な割合（パーセント）をＦＡＣＳで測定した結果を示す。ＮＧＦＰ１コントロールおよびＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{KD}を２つずつ、１日１回１０日間測定した。結果から、９５％を超えるＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３ＫＤ細胞において、４日目から６日目の間に迅速にＮａｎｏｇ－ＧＦＰが活性化されたことがわかる。図５５Ｂについて、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{KD}プレＢ細胞の初期化のＦＡＣＳ測定と、Ｍｂｄ３$^{flox/-}$ＭＥＦの初期化の顕微鏡検査ライブイメージング測定と、からわかるカイネティックが類似することがわかる。グラフ値は平均を示し、エラーバーは、４つのＭＥＦおよび２つのＢ細胞について計算した標準偏差を示す。図５５Ｃ～Ｄは、ＮＧＦＰ１コントロール（図５５Ｃ）およびＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{KD}（図５５Ｄ）の初期化潜伏時間（測定スケール：日）を、複数の二連律速工程からなるモデルにフィッティングした結果を示す。図５５Ｃ（中）は、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３$^{+/+}$を、指数関数的遷移２つおよび中間状態１つを有する多相プロセスにフィッティングしたプロットである。図５５Ｄ（中）は、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{KD}を、中間状態を有さない指数関数的遷移１つにフィッティングしたプロットである。フィッティングは、調整済みR^2統計値との非線形回帰と、ｃｈｉ^{2}最小化による加重非線形フィッティングとを実施することにより実施した（詳細は方法の項目を参照）。ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３$^{+/+}$が遷移１つのプロセスにあまりフィットせず、中間相１～２つを有するプロセスに最もよくフィットすることに注目する（図５６Ａ～Ｆ、５７Ａ～Ｄ）。一方、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{KD}は、中間状態を有さない指数関数的遷移１つに最適にフィットする（ａｄｊ　R^2＝０．９９２）。モデルフィットの遷移率から計算した初期化率を、一番下のパネルで示す。ポリクローナルアッセイおよびモノクローナルアッセイでの測定の違いに起因して（方法の項目を参照）、初期化率が異なって計測されることに注目する。

【図５６Ａ－Ｆ】図５６Ａ～Ｆは、ガウス分布を用いる統計的分析を示す。ＮＧＦＰ１コントロールおよびＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{KD}の初期化潜伏時間をガウス分布にフィットさせた。図５６Ａ～Ｂは、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３$^{+/+}$（図５６Ａ）およびＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{KD}（図５６Ｂ）のガウス分布へのフィッティングについて、その適合度をプロットしたものである。図５６Ｃ～Ｄのグラフは、平均初期化時間が１２分の１に減少したこと（図５６Ｃ）、およびＭｂｄ３^{KD}標準偏差が８０分の１に減少したこと（図５６Ｄ）を示す。図５６Ｅ～Ｆのグラフは、６細胞周期（図５６Ｅ）の後に体細胞状態からｉＰＳへ同調的に形質転換したことを示し、変量（標準偏差）は半細胞周期より小さい（図５６Ｆ）。エラーバーは、最尤法により推定したパラメータの９５％信頼区間を表す。

【図５７Ａ－Ｅ】図５７Ａ～Ｅは、細胞周期の変動の統合後におけるｉＰＳＣ初期化の定量を示す。初期化潜伏時間の測定において観察された変動を定量し、さらに固有の細胞周期変動と比較した。図５７Ａについて、各試料（Ｍｂｄ３^{KD}およびＭｂｄ３$^{+/+}$）の変動係数（ＣＶ＝ｓｔｄ／平均）（濃い赤および濃い青）を、同じ試料について測定した細胞周期の変動係数（薄い赤および薄い青）と比較した。グラフから、Ｍｂｄ３$^{+/+}$試料の変動係数が０．５であり、Ｍｂｄ３^{KD}の変動係数が０．０９に減少して、細胞周期推定変動係数（０．０８）に非常に近くなったことがわかる。エラーバーは、最尤法により推定し誤差の伝搬によって計算した、変動係数の９５％信頼区間を表す（方法の項目を参照）。図５７Ｂについて、本発明者らは、ブラウン運動（ＢＭ）モデルを用いて、各試料のダイナミック変動性を推定した（方法の項目を参照）。この変動性は、ブラウン運動標準偏差（σ）をブラウン運動ドリフトパラメータ（ν）で割った比率である。ここで、σ／ν＞１は、変動性ダイナミクスが高い場合に相当する。本発明者らは、Ｍｂｄ３$^{+/+}$試料におけるダイナミック変動性はσ／ν＞５であるが、Ｍｂｄ３^{KD}および細胞周期の測定から両者が

【数２】

$$\sigma/\nu \approx 0.5$$

のダイナミック変動を呈することを示す。エラーバーは、最尤法により推定し誤差の伝搬によって計算した、変動係数の９５％信頼区間を表す（方法の項目を参照）。図５７Ｃは、第一通過過程モデルの例である。このブラウン運動（ＢＭ）モデルにおいて、本発明者らは、初期化時間は、いくつかの主要な調節因子（すなわちＮａｎｏｇまたはＯｃｔ４）が不活性である低い発現値からこれらが発現する高い発現値へと、規定発現閾値を超えて初めて転移することによって決まる、と仮定する。図５７Ｄ～Ｅについて、本発明者らは次いで、細胞周期時間分布（方法の項目を参照）を、観察された初期化潜伏時間にフィットさせた。この方法によって、本発明者らは、Ｍｂｄ３^{KD}ダイナミクスと細胞周期モデルとが完全にフィットしたが（Ｒ^{2}＝０．９９９）（図５７Ｅ）、コントロールＭｂｄ３$^{+/+}$ダイナミクスはそうではなかった（Ｒ^{2}＝０．７３）（図５７Ｄ）ことを示す。

【図５８Ａ－Ｄ】図５８Ａ～Ｄは、ｉＰＳＣ初期化についての複数の律速プロセスのモデリングを示す。ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３$^{+/+}$およびＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{KD}の初期化潜伏時間を、複数の二連律速工程からなるモデルにフィットさせた。実験の各データセットについて、指数関数的遷移１～５つを有するモデルに対して調べた。フィッティングは、非線形回帰および調整済みＲ２統計値を実施することによりおこなった（方法の項目を参照）。図５８Ａは、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３$^{+/+}$を、中間状態を有さない指数関数的遷移１つにフィッティングした結果を示す。ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３$^{+/+}$が遷移１つのプロセスにあまりフィットしないことに注目する（ａｄｊ　Ｒ^{2}＝０．９４）。図５８Ｂは、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３$^{+/+}$を、指数関数的遷移２つおよび中間状態１つを有する多相プロセスにフィッティングした結果を示す。ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３$^{+/+}$が指数関数的遷移２つを有するプロセスに適度にフィットすることに注目する（ａｄｊ　Ｒ^{2}＝０．９９６）。図５８Ｃは、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３$^{+/+}$を、指数関数的遷移３つおよび中間状態２つを有する多相プロセスにフィッティングした結果を示す。ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３$^{+/+}$が指数関数的遷移３つを有するプロセスに最適にフィットすることに注目する（ａｄｊ　Ｒ^{2}＝０．９９８）。図５８Ｄは、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３$^{+/+}$（青）およびＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{KD}（赤）についての異なるモデルで得た調整済みＲ^{2}値を示す。これより、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{KD}に最もよくフィットするモデルは中間状態を有さない指数関数的遷移１つであり、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３$^{+/+}$に最もよくフィットするモデルは指数関数的遷移３つおよび中間状態２つを有する多相プロセスであることがわかる。

【図５９Ａ－Ｇ】図５９Ａ～Ｇは、ｉＰＳＣ初期化についての複数の律速プロセスのモデリングを示す。フィッティング結果を、ｃｈｉ^{2}最小化による加重非線形フィッティングに基づく第二のフィッティング手順によって確認した（方法の項目を参照）。各モデルについて、グラフの適合度を左に示し（図５９Ａ、Ｃ、Ｅ）、観測誤差（残差）を右に示す（図５９Ｂ、Ｄ、Ｆ）。図５９Ａ～Ｂは、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３$^{+/+}$を、中間状態を有さない指数関数的遷移１つにフィッティングした結果を示す。図５９Ｃ～Ｄは、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３$^{+/+}$を、指数関数的遷移２つおよび中間状態１つを有する多相プロセスにフィッティングした結果を示す。図５９Ｅ～Ｆは、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３$^{+/+}$を、指数関数的遷移３つおよび中間状態２つを有する多相プロセスにフィッティングした結果を示す。図５９Ｇは、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３$^{+/+}$（青）およびＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{KD}（赤）についての異なるモデルで得たＣｈｉ^{2}値を示す。これより、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{KD}に最もよくフィットするモデルは中間状態を有さない指数関数的遷移１つであり、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３$^{+/+}$に最もよくフィットするモデルは指数関数的遷移３つおよび中間状態２つを有する多相プロセスであることがわかる。

【図６０Ａ－Ｃ】図６０Ａ～Ｃは、初期化中にＭｂｄ３／ＮｕＲＤと多能性因子ＯＳＫＭとが直接相互作用することを示す。図６０Ａについて、ＨＥＫ２９３細胞におけるＦｌａｇタグＭｂｄ３とＯｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、ｃ－Ｍｙｃ、またはＮａｎｏｇとの同

時の過剰発現に続いて、免疫共沈降（ｃｏ－ＩＰ）アッセイを実施した。Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、ｃ－Ｍｙｃ、およびＮａｎｏｇに対する抗体を用いたイムノブロット分析（ＩＢ）により、Ｍｂｄ３とＮａｎｏｇ以外の多能性因子とが特異的に結合することがわかった。図６０Ｂは、ターゲティングコンストラクトを用いて、内因的標識ＦｌａｇタグＯｃｔ４対立遺伝子を発生させる、ネズミＶ６．５　ＥＳＣにおけるノックインターゲティング計画を示す。この株では、２ｉ／ＬＩＦ条件下において、Ｍｂｄ３がＯｃｔ４と特異的なｃｏ－ＩＰを示す。Ｎａｎｏｇとのｃｏ－ＩＰをポジティブコントロールとして示す。図６０Ｃは、二次的Ｍｂｄ３$^{+/+}$線維芽細胞において、ＮｕＲＤ複合体のコアサブユニットであるＣｈｄ４（Ｍｉ２ｂ）について、Ｄｏｘ誘導および２ｉ／ＬＩＦ条件適用の３日後に実施したｃｏ－ＩＰアッセイを示す。ＮｕＲＤ構成要素であるＣｈｄ４についてのｃｏ－ＩＰに続いてＩＢ分析を実施したところ、他のＭｂｄ３／ＮｕＲＤ構成要素（Ｍｂｄ３およびＭｔａ２）および初期化因子ＯＳＫＭが特異的にプルダウンされることがわかった。

【図６１Ａ－Ｃ】図６１Ａ～Ｃから、ＥＳＣにおいてＭｂｄ３が多能性タンパク質に結合するがＭｂｄ２は結合しないことがわかる。図６１Ａについて、本発明者らは、Ｍｂｄ３－／－ＥＳＣ系に挿入されたＦｌａｇタグ Ｍｂｄ３導入遺伝子のリカバリを有するＥＳＣ系を確立した。ｆｌａｇビーズを用いた免疫共沈降に続いてウェスタンブロットを実施したところ、ＮｕＲＤ複合体の要素Ｍｉ２ｂおよび Ｍｔａ２にＭｂｄ３が強く結合するがＭｂｄ２は結合しないことがわかる。また、ＥＳＣにおいて、Ｍｂｄ３が多能性初期化因子Ｓａｌｌ４と相互に影響し合う。図６１Ｂ～Ｃについて、コントロールＥＳＣ系ではＮｕＲＤ複合体の要素であるＭｔａ２がＭｂｄ３またはＭｂｄ２のいずれかに結合する（図６１Ｂ）。しかし、Ｍｂｄ２のプルダウンでは、Ｍｂｄ３との相互作用は全くみられなかった（図６１Ｃ）。こうしたアッセイは、Ｍｂｄ２およびＭｂｄ３が相互排他的な複合体を形成する多くの他の細胞系における観察を再現するものである（Ｌｅ　Ｇｕｅｚｅｎｎｅｃ，Ｘ．ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．２６，８４３－８５１，２００６；Ａｇｕｉｌｅｒａ，Ｃ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４６９，２３１－２３５，２０１１）。

【図６２Ａ－Ｃ】図６２Ａ～Ｃから、Ｍｂｄ３のＭＢＤドメインが初期化因子ＯＳＫＭとの直接の相互作用に重要であることがわかる。Ｍｂｄ３結合領域を見つけるため、Ｍｂｄ３のＭＢＤ部位における欠失変異を設計した。ＨＥＫ２９３Ｔ細胞において、ＦｌａｇタグＦｌａｇタグ変異コンストラクトをＯｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃで４８時間にわたってコトランスフェクションし、続いて抗ｆｌａｇビーズで免疫共沈降を実施し、Ｏｃｔ４、Ｋｌｆ４、Ｓｏｘ２、およびｃ－Ｍｙｃについてのイムノブロットに供した。この分析から、Ｍｂｄ３のアミノ酸領域２５位～４９位を欠失させるとＭｂｄ３とＯＳＫＭの結合および相互作用が失われることがわかった（概略を図６２Ｃ中に示す）。

【図６３】図６３は、初期化後のＭｂｄ３の結合についてのモチーフエンリッチメント分析を示す。ＯＳＫＭ誘導後、Ｍｂｄ３結合領域において上位のモチーフが豊富に存在する。選択したモチーフのシーケンスロゴと、関連因子、Ｚスコア、およびＰ値とを示す。モチーフの推定は、Ｃｉｓｔｒｏｍｅ　ｐａｃｋａｇｅのＳｅｑＰｏｓソフトウェアを用いて実施した（方法の項目を参照）。

【図６４Ａ－Ｈ】図６４Ａ～Ｈは、ＯＳＫＭおよびＭｉ２ｂに共通のターゲットにＭｂｄ３欠損が及ぼす効果を示す。図６４Ａ～Ｄは、Ｍｂｄ３$^{+/+}$試料（青）およびＭｂｄ３$^{flox/-}$試料（赤）について、４日目におけるＭｉ２ｂ（Ｃｈｄ４）結合リード密度のプロファイルを示す。プロファイルは、ＴＳＳの１Ｋｂ上流および下流のｚスコアに標準化したリード密度を示す。各プロットは、ＯＳＫＭ因子（Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃ）の１つの結合ターゲットであることが以前に調べられている遺伝子（Ｓｒｉｄｈａｒａｎ，Ｒ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　３６：３６４－７７，２００９）を含む。ｚスコアプロファイルは、一連の因子結合ターゲットに含まれるすべての遺伝子についての平均である。図から、Ｍｂｄ３欠損によりＭｉ２ｂとＯＳＫＭターゲットとの結合が減少したことがわかる。図６４Ｅ～Ｆは、Ｍｂｄ３またはＣｈｄ４ターゲティ

ングｓｉＲＮＡプールのｓｉＲＮＡトランスフェクションによるタンパク質欠損効率を調べたウェスタンブロットを示す。図６４Ｇ～Ｈは、Ｍｂｄ３またはＣｈｄ４のノックダウン（スキームに示す通り）後の、Ｍｂｄ３$^{+/+}$二次的ＭＥＦＳの初期化効率を示す。エラーバーはｓ．ｄ．を示す。＊は、スチューデントｔ検定のｐ値＜０．０１を示す。

【図６５Ａ－Ｅ】図６５Ａ～Ｅは、Ｍｂｄ３欠損がＯＳＫＭターゲット遺伝子に及ぼす効果を示す。図６５Ａ～Ｂは、箱型図において、中心は中央値を示し、四角の端は２５パーセンタイルおよび７５パーセンタイルを示す。グラフ（の各パネル）に示す分布差のＰ値は、一対の試料についてのｔ検定によって推定した。図６５Ａは、初期化期間全体（０日目、４日目、８日目、およびｉＰＳ／ＥＳ）を通しての遺伝子発現を、図３２Ｆ中に記載するＭｂｄ３$^{+/+}$試料（青）およびＭｂｄ３$^{flox/-}$試料（赤）のＭＥＦと比較した倍変化で示す分布である。ここでは、ＯＳＫＭ誘導したＭＥＦまたはＥＳＣにおいて次の因子、すなわちＯｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、ｃ－Ｍｙｃ、およびＮａｎｏｇのうち少なくとも１つに結合すると以前にわかっていて（Ｓｒｉｄｈａｒａｎ，Ｒ．，ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ，３６：３６４－７７，２００９）、かつ野生型細胞の初期化中に上方調節される遺伝子２９２８個について計算した。図６５Ｂは、ＯＳＫＭ（ＤＯＸ）誘導４日後のヒストンマークの分布およびＯｃｔ４結合レベルをｚスコア値で示す。計算は、上述したものと同じ遺伝子２９２８個について実施した。この結果から、Ｍｂｄ３$^{+/+}$と比較して、Ｍｂｄ３$^{flox/-}$試料においてＯＳＫＭターゲットの転写活性化が増大し、Ｈ３Ｋ２７ａｃおよびＨ３Ｋ４ｍｅ３が有意に誘導された一方でＭｂｄ３$^{flox/-}$試料においてＨ３Ｋ２７ｍｅ３が減少し、また、Ｍｂｄ３$^{flox/-}$試料においてＯｃｔ４結合が穏やかに誘導されたことがわかる。図６５Ｃ～Ｅについて、４日目におけるＨ３Ｋ２７ｍｅ３（図６５Ｃ）、Ｈ３Ｋ２７ａｃ（図６５Ｄ）、およびＨ３Ｋ４ｍｅ３（図６５Ｅ）のリード密度のプロファイルを、４つの代表的なＯＳＫＭターゲット遺伝子（Ｓａｌｌ４、Ｋｌｆ５、Ｐｒｄｍ１４、およびＴｂｘ３）についてプロットした。プロファイルは、ＴＳＳおよびＴＥＳの１Ｋｂ上流のｚスコアに標準化したリード密度を示す。Ｈ３Ｋ２７ａｃおよびＨ３Ｋ４ｍｅ３（赤の領域）のＭｂｄ３$^{flox/-}$プロファイルが有意に増加し（＞３　Ｓｔｄ）、Ｍｂｄ３$^{+/+}$試料（青の領域）と比較してＨ３Ｋ２７ｍｅ３が有意に減少した。

【図６６Ａ－Ｆ】図６６Ａ～Ｆは、Ｍｂｄ３欠損がＯＳＫＭおよびＭｂｄ３に及ぼす効果を示す。箱型図において、中心は中央値を示し、四角の端は２５パーセンタイルおよび７５パーセンタイルを示す。グラフ中に示す分布差のＰ値は、一対の試料についてのｔ検定によって推定した値である。図６６Ａは、図６５Ａ中と同様であるが、ただし、ＯＳＫＭおよびＭｂｄ３ターゲットの両方が結合する遺伝子（ｎ＝遺伝子３２０個）について計算した。図６６Ｂは、６５Ｂと同様であるが、ただし、Ｍｂｄ３が結合しかつ初期化中に上方調節される遺伝子について計算した（方法の項目に記載する発現変動遺伝子符号）。ここでの結果から、図６５Ａ～Ｂ中に記載した結果と類似する傾向がわかる。図６６Ｃ～Ｆは、Ｍｂｄ３欠損細胞（Ｍｂｄ３$^{flox/-}$）または野生型細胞（Ｍｂｄ３$^{+/+}$）におけるヒストンマークの分布およびＯｃｔ４結合レベルをｚスコア値で示す。図６６Ｃ～Ｆ中に示す結果から、Ｍｂｄ３欠損試料において、初期化中、Ｍｂｄ３ターゲットおよび／またはＯＳＫＭターゲットのクロマチンがよりオープンになり容易かつ十分に再活性化されることがわかる。

【図６７Ａ－Ｄ】図６７Ａ～Ｄから、決定的なｉＰＳＣ形成と推計学的なｉＰＳＣ形成とのいずれにとっても、多能性を促進するエピジェネティックな活性化剤が必須であることがわかる。図６７Ａは、Ｍｂｄ３$^{+/+}$およびＭｂｄ３$^{flox/-}$二次的ＭＥＦＳからのｉＰＳＣ初期化において、ＤＯＸ介在性導入遺伝子誘導が必要であることを示す。Ｏｃｔ４－ＧＦＰコロニーの割合（パーセント）を最終設定時点である９日目に定量した。２つの細胞試料において、最小限のＤＯＸ誘導を要する時間枠は類似していた。図６７Ｂ～Ｄについて、ｉＰＳＣ形成に必要なエピジェネティックな調節因子であるＵｔｘ（リシン（Ｋ）特異的脱メチル化酵素６Ａ、ＫＤＭ６Ａ、遺伝子ＩＤ：７４０３）およびＷｄｒ５（ＷＤ繰り返しドメイン５、遺伝子ＩＤ：１１０９１）（Ｍａｎｓｏｕｒ ｅｔ ａｌ．

２０１２，Ｎａｔｕｒｅ　４８８，４０９－４１３；Ａｎｇ　Ｙ．－Ｓ．ｅｔ　ａｌ　２０１１，Ｃｅｌｌ　１４５，１８３－１９７）を特異的にノックダウンすると、Ｍｂｄ３$^{+/+}$およびＭｂｄ３$^{flox/-}$細胞のいずれにおいてもｉＰＳＣ形成が有意に阻害された。＊は、コントロールｓｉＲＮＡ試料に対するｐ値＜０．０１を示す。独立した２回の実験のうち１回について示す。ｓ．ｄ．は、複数の同一試料を測定して求めた。

【図６８Ａ－Ｋ】図６８Ａ～Ｋから、ナイーブ型ヒト幹細胞が、マウスＥＳＣのもつエピジェネティックな特徴的特色を有することがわかる。図６８Ａ～Ｂは、代表的な例として、ＷＩＳ１（図６８Ａ）およびＷＩＳ２（図６８Ｂ）ナイーブ型ｈＥＳＣの特徴の決定を示す。図示する継代回数（ＷＩＳ１については継代３１回、ＷＩＳ２については継代２７回）にて細胞を回収したところ、試験したすべてのヒト多能性マーカー（すなわち、ＮＡＮＯＧ、ＴＲＡ－１－６０、ＯＣＴ４、ＴＲＡ－１－８１、ＳＳＥＡ３、ＳＯＸ２、およびＳＳＥＡ４）を発現し、ＳＳＥＡ１は発現していなかった。ここで記載したすべてのナイーブ型株は、増やしても（ここまでの試験で３０～７０回を超えて継代しても）変質、危機、または減少の兆候を示さない。図６８Ｃ～Ｈについて、ナイーブ型ヒト細胞の多能性能を、ＷＩＳ１については継代３３回目（図６８Ｃ、Ｅ、およびＧ）、ＷＩＳ２については継代１９回目（図６８Ｄ、Ｆ、Ｈ）において、３つの胚性胚葉のいずれかの細胞とテラトーマを形成する能力によって評価した。テラトーマ切片のヘマトキシリン染色およびエオシン染色の結果の代表的なものを示す。図６８Ｃ～Ｄは内胚葉への分化、図６８Ｅ～Ｆは中胚葉への分化、図６８Ｇ～Ｈは外胚葉への分化を示す。図６８Ｉ～Ｋは、ナイーブ型試料（図６８Ｉ）、プライム型試料（図６８Ｊ）、および分化した試料（ナイーブ型細胞から得た胚型体、図６８Ｋ）において、ＯＣＴ４およびＨ３Ｋ２７ｍｅ３を二重免疫染色した際の、共焦点画像の代表的なものを示す。ナイーブ型女性多能性細胞においては、不活性Ｘ対立遺伝子に特徴的なＨ３Ｋ２７ｍ３集積がほとんど形成されていない（図６８Ｉ、Ｈ３Ｋ２７ｍ３集積を呈する細胞が２％未満）。プライム型細胞においては、ＯＣＴ４多能性マーカーの発現を保持しつつ、ほとんどの細胞においてＨ３Ｋ２７ｍｅ３集積（核１つにつき１つ）が明瞭に検出できるようになった（図６８Ｊ、左のパネル、矢印）。ナイーブ型多能性細胞が体細胞に分化する際、ＯＣＴ４の発現がなくなり、核内にＨ３Ｋ２７ｍ３が集積する（図６８Ｋ）。試料１つあたり細胞１５０～２００個のうち、陽性とカウントされた核の割合（パーセント）の平均を示す。

【図６９Ａ－Ｉ】図６９Ａ～Ｉは、ヒトナイーブ型多能性の網羅的転写プロファイルを示す。図６９Ａは、ナイーブ型ヒト細胞株の場合と比較して、プライム型ヒト細胞株で上方調節された遺伝子が有意にリッチなＧｏ区分を、（－ｌｏｇ１０）ＦＤＲ補正Ｐ値で示す。マウスでも有意にリッチな区分について、マウスでの倍変化エンリッチメントの値にてそれぞれ示す。図６９Ｂは、マウスおよびヒトのナイーブ型およびプライム型多能性細胞についての、異種間階層的クラスタリングを示す。ナイーブ型ｍＥＳＣにおける遺伝子発現およびナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣにおける遺伝子発現は、ｍＥｐｉＳＣおよびプライム型／従来型ｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣとは異なる群を形成した。マウス細胞には「１２９」および「ＮＯＤ」が含まれ、それ以外はすべてヒト細胞である。遺伝子発現の相関関係行列を、Ｓｐｅａｒｍａｎの相関関係および平均連結法を用いてクラスタリングした。色つきの棒グラフは相関関係の強さを示す。図６９Ｃ～Ｄについて、種々のナイーブ型試料における遺伝子発現は、種々のプライム型試料の場合よりもノイズが少なく均一度が高い。箱型図は、各相同遺伝子に関して計算した分散について、分散係数（σ／μ）の分布の中央値および四分位数を示す。ナイーブ型の分布はプライムの分布より有意に小さい（尾が１つのｔ検定、ｐ＝０）。図６９Ｃはヒトナイーブ型多能性幹細胞とヒトプライム型多能性幹細胞、図６９Ｄはマウスナイーブ型多能性幹細胞とマウスプライム型多能性幹細胞を比較する。図６９Ｅ～Ｆについて、ナイーブ型ヒトｈＥＳＣ（図６９Ｆ）およびプライム型ヒトｈＥＳＣ（図６９Ｅ）においてＴＦＥ３およびＯＣＴ４を二重免疫染色した。ＬＩＳ２　ｈＥＳＣ株について、共焦点画像の代表的なものを示す。挿入図は、破線で四角に囲った部分を拡大して表す。いずれの状態（プライム型およびナイーブ型）の細胞においても、Ｏｃｔ４染色は核に局在化している。一方、ナイーブ型ｈＥＳＣにおいて

はＴＦＥ３の強い核移行がみられるが、プライム型条件下においてはみられず、このことから、ＴＦＥ３は細胞の状態に応じて往復し変化することがわかる。図６９Ｇについて、各試料につき独立画像フレームから無作為に選択した細胞２００個について、その優先的な核移行を定量的不偏的イメージングで調べた。ナイーブ型およびプライム型のマウスＥＳＣおよびヒトＥＳＣにおける核内ＴＦＥ３と細胞質内ＴＦＥ３の比率を箱ひげ図で示す。ナイーブ型ｈＥＳＣにおける分布はナイーブ型ｍＥＳＣにおける分布と類似し、プライム型のヒトＥＳＣおよびマウスＥＳＣでは核内でのエンリッチメントが失われていた。＊はｔ検定のＰ値＜1×10^{-100}を示す。図６９Ｈは、ｉｎ ｖｉｔｒｏおよびｉｎ ｖｉｖｏにおいて単離したヒト多能性細胞における転写を比較して示す。ナイーブ型試料およびプライム型試料における発現変動遺伝子の発現プロファイルの平均を、Ｓｐｅａｒｍａｎの相関関係を用い、異なる群（ナイーブ型（本研究）、プライム型（本研究）、Ｂｅｌｍｏｎｔｅのプライム型ＥＳＣ、およびヒトＩＣＭ（Ｂｅｌｍｏｎｔｅら（Ｖａｓｓｅｎａ，Ｒ．ｅｔ ａｌ．Ｗａｖｅｓ ｏｆ ｅａｒｌｙ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ａｎｄ ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ ｐｒｏｇｒａｍ ｉｎｉｔｉａｔｉｏｎ ｄｕｒｉｎｇ ｈｕｍａｎ ｐｒｅｉｍｐｌａｎｔａｔｉｏｎ ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ １３８，３６９９－３７０９，２０１１））））に分けて、階層的クラスタリングに供した（ＦＤＲ＜０．０５）。Ｂｅｌｍｏｎｔｅらが以前に誘導したプライム型ＥＳＣ試料は本明細書中で誘導したプライム型試料とクラスターを形成し、ヒトＩＣＭ試料はＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において増やしたナイーブ型試料とクラスター形成したことに注目する。図６９Ｉは、ヒトＩＣＭ試料がプライム型試料よりもナイーブ型試料に近い（第一主成分軸に沿う）ことを示す主成分分析である。プライム型試料での方が分散度が大きく変動性と不均一性とが高いことが示され、また、ヒトナイーブ型試料とヒトＩＣＭ試料とが近いほどには近くない。

【図７０Ａ－Ｊ】図７０Ａ～Ｊは、ヒトナイーブ型多能性のエピジェネティックな配置を示す。図７０Ａ～Ｂは、ヒト（図７０Ａ）およびマウス（図７０Ｂ）のナイーブ型（青）およびプライム型（赤）における発生遺伝子のＨ３Ｋ２７ｍｅ３クロマチンマークについて、そのプロファイルを、標準化したリード密度で表す。ヒトのプロファイルは、５つの異なる細胞系（Ｃ１、ＬＩＳ２、ＷＩＢＲ３、ＷＩＢＲ３－ＭＢＤ３ｍｕｔ、およびＢＧＯ１）について計算した平均およびｓ．ｄ．（エラーバー）を示す。プロット間の差異の平均を、分散およびＰ値（一対の試料についてのｔ検定により計算）と共に示す。図７０Ｃ～Ｄは、多能性遺伝子５つを例にとり、それらのクロマチンランドスケープを示す。ヒト（図７０Ｃ）およびマウス（図７０Ｄ）のいずれについても、ナイーブ型細胞系（青）およびプライム型細胞系（赤）についてのＨ３Ｋ２７ｍｅ３およびＨ３Ｋ４ｍｅ３マークを示すが、ヒトとマウスとがよく一致することがわかる。図７０Ｅ～Ｆは、発生遺伝子５つについて図７０Ｃ～Ｄと同様に示す。図７０Ｅはヒト、図７０Ｆはマウス、図７０Ｇは、ヒトのナイーブ型およびプライム型ＷＩＢＲ３細胞における転写物の相対レベルについて、代表的な結果を示す。＊はｔ検定のＰ値＜０．０１を示す。エラーバーはｓ．ｄ．（ｎ＝３）を示す。図７０Ｈは、ヒトのナイーブ型細胞（下のパネル）およびプライム型細胞（上のパネル）においてＯＣＴ４（左のパネル）およびＤＮＭＴ３Ｂ（右のパネル）を免疫染色した結果を示す。ヒトナイーブ型細胞においては、ＭＢＤ３タンパク質の発現が下方調節されているが、ＯＣＴ４タンパク質の発現は下方調節されていない。図７０Ｉ～Ｊは、ヒト（図７０Ｉ）およびマウス（図７０Ｊ）のプライム型試料およびナイーブ型試料におけるメチル化の変化を示すヒストグラムである。このヒストグラムは、ＣｐＧリッチ領域（ＣｐＧ含有量が４％を超える）中に存在し両試料において≧１０ｘをカバーするすべてのＣｐＧについて計算した、ＣｐＧあたりのメチル化の違いを示す分布である。明確さを期して、メチル化の変化がゼロではないＣｐＧのみをヒストグラムに含める。分布は左に裾をひいたものとなり、ナイーブ型試料においてメチル化が全般的に減少したことを示す。

【図７１Ａ－Ｇ】図７１Ａ～Ｇは、ヒトナイーブ型多能性のシグナリングおよび機能的特徴を示す。図７１Ａについて、ＷＩＳ－ＮＨＳＭにおけるナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳ

Ｃのｉｎ ｖｉｔｒｏ安定性を安定させるためにＬＩＦ／Ｓｔａｔ３が必要である。ナイーブ型Ｖ６．５ ＮＯＤ ｍＥＳＣ、ナイーブ型ＷＩＳ１およびＨ１ ｈＥＳＣ、ならびにＢＪナイーブ型ｈｉＰＳＣを、偽ｐＢＲＹ－ＣＡＧＧＳ－ｆｌｏｘ－ＤｓＲｅｄＴ４－ＩＲＥＳ－Ｐｕｒｏコントロールプラスミド、優性ネガティブＳｔａｔ３ Ｙ７０５Ｆ変異体をコードするプラスミド（Ｓｔａｔ３－ＤＮ）、またはＳｔａｔ３－Ｃ構造的活性変異体のプラスミド（ｐＢＲＹ－Ｓｔａｔ３－ＣＡ）を用いて、電気穿孔に供した。ピューロマイシン選択下で細胞を３回継代した。２０日後、ＯＣＴ４多能性マーカー陽性コロニーを計数し、空ベクターを用いて電気穿孔した細胞由来のコロニーで標準化した。（各条件につきｎ＝３、エラーバーはｓ．ｄ．を示す）。＊はスチューデントｔ検定のＰ値＜０．０１を示す。図７１Ｂ～Ｃについて、上パネルは、ＯＣＴ４座（図７１Ｃ）およびＣＯＬ１Ａ座（図７１Ｂ）の遺伝子ターゲティングを示すスキームである。表は、正確にターゲティングしたＥＳクローンの数および割合（パーセント）を、５’および３’両方についてサザンブロットで確認して決定したものを示す。図７１Ｄは、ナイーブ型（青のスキーム）条件またはプライム型／従来型（赤のスキーム）条件において初期化した際の、野生型細胞およびＭＢＤ３欠損細胞（ＭＢＤ３^{ｍｕｔ}）の二次的ｉＰＳＣ初期化効率を示す。エラーバーはｓ．ｄ．ｍ（ｎ＝３）を示す。＊はｔ検定のＰ値＜０．０１を示す。図７１Ｅは、健康なヒトまたは脆弱Ｘ患者から単離した細胞におけるＦＭＲ１およびＮＡＮＯＧ遺伝子について、転写物の発現を相対的に示す。エラーバーはｓ．ｄ．ｍ（ｎ＝３）を示す。図７１Ｆ～Ｇは、Ｈ９ ＥＳＣにおけるＣＯＬ１Ａ座の相同組換えによるターゲティング計画を示す。ナイーブ型およびプライム型Ｈ９多能性細胞を用いた複数回の実験における正確なターゲティング効率を示す。正確なターゲティングのスコア化は、分析したクローンから抽出したＤＮＡを５’および３’両方のサザンブロット分析に供して確認した後で実施した。＊＊は有意なＰ値＜０．０２を示す。ｂはａと同様だが、ただしＯＣＴ４座について示す。＊は有意なＰ値＜０．０５を示す。

【図７２Ａ－Ｄ】図７２Ａ～Ｄは、導入遺伝子非依存型のヒトナイーブ型多能性ｉＰＳＣを取得する条件の決定および最適化を示す。図７２Ａは、内在性ＯＣＴ４多能性マーカーおよびＳＯＸ１神経マーカーの相対的な発現を調べたｑＲＴ－ＰＣＴ分析を示す。プライム型／従来型１．２ ｉＰＳＣ株において測定した値に対する相対値を示す。ＤＯＸ存在下において、細胞は内在性多能性ＯＣＴ４を発現し（以前に記載された結果およびこれらの細胞のテラトーマ形成能力と矛盾しないが（Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７，２０１０））、ＳＯＸ１が有意に上方調節され、この結果は、これらの条件下において多能性維持が不安定であることと矛盾しない（Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７，２０１０）。本研究で最適化したＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下においては、ＯＣＴ４発現が維持され、異所におけるＳＯＸ１の上方調節が生じない。エラーバーはｓ．ｄ．を示す。２回の実験を代表して、そのうち１回について示す。図７２Ｂについて、ｍＲＮＡ初期化アプローチにより発生させた、遺伝子未改変のＢＪ１ナイーブ型ｈｉＰＳＣ株は、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において、Ｃ１．２ナイーブ型ｈｉＰＳＣ株（ＤＯＸ無しで増やした）での観察結果（図１２Ｓ）と類似する依存を示した。これらの結果には、ＷＩＳ－ＮＨＳＭにおけるナイーブ型多能性に貢献する独立パラメータとして、Ｃ１株における漏出性を含めていない。このデータは、遺伝子未改変のナイーブ型ｈＥＳＣをＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において強く発生させ得るとする、本研究全体を通しての内容と矛盾しない。＊は、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下におけるコントロールに対するスチューデントｔ検定のＰ値＜０．０１を示す。図７２Ｃについて、ナイーブ型増殖条件をさらに最適化するため、１％のＡｌｂｕｍａｘを１５％のＫＳＲ（ノックアウト血清代替物）または化学組成が限定された１％の脂質濃縮液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）のいずれかで置き換えることができる。１％のａｌｂｕｍａｘは、本研究全体を通して決定するＷＩＳ－ＮＨＳＭにおいて用い、またナイーブ型細胞の分子分析においても用いた。図７２Ｄは、図示する構成要素で被覆した組織培養プレート上でＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地中で増やしたナイーブ型多能性細胞について、この細胞のＯＣＴ４－ＧＦ

Ｐ＋レベルを示す。ナイーブ型ｈｉＰＳＣは、フィーダー細胞無しでマトリゲル被覆プレート、ビトロネクチン被覆プレート、または０．２％ゼラチン＋１ｎｇ／ｍｌ　ビトロネクチン被覆プレート（ただし、ゼラチン単独ではない）の何れかにおいて増殖させ得る。＊は、コントロールであるゼラチン＋フィーダー細胞（ＭＥＦ）条件に対するスチューデントｔ検定のＰ値＜０．０１を示す。３回の実験を代表して、そのうち１回について示す。

【図７３Ａ－Ｆ】図７３Ａ～Ｆは、新たな胚由来のナイーブ型ｈＥＳＣにおいて多能性マーカーを免疫染色した結果を示す。図７３Ａ～Ｂについて、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下においてヒトＩＣＭから確立したＬＩＳ１（図７３Ｂ）、ＬＩＳ２（図７３Ａ）、ＷＩＳ１、およびＷＩＳ２　ＥＳＣ系を分析に供したところ、図示するヒト多能性マーカー（ＯＣＴ４、ＮＡＮＯＧ、ＳＳＥＡ３、ＳＳＥＡ４、ＴＲＡ１－６０、ＴＲＡ１－８１、およびＳｏｘ２）のすべてについて均一の強い染色を示した。とりわけ、ヒト多能性細胞に対してではなくマウス多能性細胞（ナイーブ型幹細胞およびプライム型幹細胞の両方）に対して特異的なＳＳＥＡ１は、ナイーブ型ｈＥＳＣに発現していない。図７３Ｃ～Ｆは、ナイーブ型ｈＥＳＣにおける多能性因子ＫＬＦ２およびＥＳＲＲＢの発現を示す。図７３Ｃはナイーブ型ＬＩＳ２　ｈＥＳＣ、図７３Ｄはナイーブ型ＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣ、図７３Ｅはナイーブ型Ｖ６．５　ｍＥＳＣ、図７３ＦはプライムＭｍＥｐｉＳＣを示す。代表として示す共焦点二重免疫染色画像により、ナイーブ型のヒトＥＳＣおよびマウスＥＳＣにおける多能性因子ＫＬＦ２およびＥＳＲＲＢの発現がわかる。

【図７４Ａ－Ｄ】図７４Ａ～Ｄは、ヒトナイーブ型多能性幹細胞において増殖率および単一細胞クローニング効率が上がったことを示す。図７４Ａは、マウスおよびヒトの種々の多能性幹細胞株について、細胞数２倍増加時間を示す。各細胞系を複数通りに播いた後、２日目、４日目、および６日目に細胞を回収した。各段階において細胞数を計数し、２日目に回収して計数した細胞数に対する増殖率を計算することによって（蒔いた細胞の数をもとにして播種後の生存の変動を表すのではなく）、増殖数を標準化した。エラーバーはｓ．ｄ．を表す。Ｐ値は、プライム型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣ株の平均とナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣ株の平均とのｔ検定を表す。図７４Ｂは、異なる多能性幹細胞株の単一細胞クローニング効率を、播いて６日目にＮＡＮＯＧ＋コロニーを含むウェルの数から求めて示す（図示する通りＲＯＣＫ阻害剤有りまたは無し）。＊は、比較した群の平均値についてのスチューデントｔ検定のＰ値＜０．０１を示す。エラーバーはｓ．ｄ．を示す。これらの結果は、従来型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣと比較して、ナイーブ型多能性細胞において単一細胞の生存およびクローニング効率が増大したことを強調する。図７４Ｃについて、異種間でＥＲＡＳタンパク質の発現が異なると、この差異が、ヒトおよびマウスの遺伝子未改変ナイーブ型ＰＳＣにおける残存増殖特性の差異に影響を及ぼすことがわかる。異なる多能性幹細胞株の単一細胞クローニング効率を、播いて６日目にＮａｎｏｇ＋コロニーを含むウェルの数から求めて示す（図示する通りＲＯＣＫ阻害剤は用いない）。＊は、比較した群の平均値についてのスチューデントｔ検定のＰ値＜０．０１を示す。エラーバーはｓ．ｄ．を示す。これらの結果は、従来型ＥＳＣ／ｉＰＳＣにおいてよりもＥｒａｓノックアウトナイーブ型ｍＥＳＣにおいての方が、単一細胞の生存およびクローニング効率が損なわれたことを強調する。こうして相対的に損なわれた分は、単一細胞コロニー形成アッセイにおいてナイーブ型ｈＥＳＣにおいてＥＲＡＳを再構成すると回復する。図７４Ｄは、２ｉ／ＬＩＦ／ＭＥＦフィーダー条件下におけるＷＴまたはＥｒａｓ　ＫＯ　ＩＣＭからのマウスＥＳＣ誘導効率を示す。エラーバーはｓ．ｄ．ｍを示す。スチューデントｔ検定のＰ値を示す。

【図７５Ａ－Ｉ】図７５Ａ～Ｉは、マウスおよびヒトのナイーブ型多能性において遠位エンハンサーエレメントが主に利用されていることを示す。図７５Ａは、進化的に保存された遠位および近位エンハンサーエレメントがヒトＯＣＴ４座に相対的に局在することを示す概略図である。遠位エンハンサー（ＤＥ）および近位エンハンサー（ＰＥ）はヒトＯＣＴ４座において目立つため、これに応じて、本研究で用いるΔＰＥおよびΔＤＥレポーターコンストラクト中では欠失させた。ＧＦＰ－２Ａ－ピューロマイシン抵抗カセットをＢ

ＡＣ組み換え操作によって挿入する部位を示す。図７５Ｂ～Ｅについて、ＷＩＳ１（図７５Ｂおよび７５Ｃ）およびＬＩＳ２（本明細書中「ＬＩＳ３９」ともよぶ）（図７５Ｄ～Ｅ）のナイーブ型ｈＥＳＣを、ナイーブ型多能性配置に特徴的なΔＰＥ－ＯＣＴ４－ＧＦＰ－２Ａレポーターコンストラクトで安定的にトランスフェクションした。フローサイトメトリーにより、ナイーブ型多能性細胞においてＧＦＰの発現が特異的に検出されたが（図７５Ｂおよび７５Ｄ）、遺伝的に一致するプライム型細胞をプライム型／従来型ｈＥＳＣ条件下において１０日目に発生させたところ、ＧＦＰの発現はみられなかった（図７５Ｃおよび７５Ｅ）。図７５Ｆ～Ｇについて、ナイーブ型ネズミＶ６．５　ＥＳＣにΔＰＥレポーターを挿入したところ上記と類似する結果が得られ、このことから、細胞をｍＥｐｉＳＣプライム型培地に移すとＧＦＰ活性が特異的に下方調節されることがわかった（図７５Ｇ）。以上より、ヒトΔＰＥ－Ｏｃｔ４－ＧＦＰ－２Ａ－ＰＵＲＯレポーターは、２ｉ／ＬＩＦ中で増やしたｍＥＳＣにおいて上記と類似する特異的活性を示したが、プライム型ｍＥｐｉＳＣにおいてはこれを示さなかった（図７５ＦおよびＧ）。このことは、用いたレポーターの特異性と、マウスおよびヒトのナイーブ型多能性の配置が相似していることとをさらに裏付ける。図７５Ｈ～Ｉについて、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地中で増殖させたナイーブ型Ｃ１．２　ｈｉＰＳＣがＧＦＰマーカーの特異的な発現を示したが（図７５Ｈ）、以前に記載された２ｉ／ＬＩＦ＋ＤＯＸ条件下（誘導したＯＳＫ導入遺伝子に対して）において増殖させたＣ１細胞においてはＧＦＰ活性が下方調節され、発現パターンが不均一であった（図７５Ｉ）。後者は図１２Ａ～Ｃおよび７２Ａ～Ｄ中のデータと合致していて、以前に記載された（Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７，２０１０）導入遺伝子依存型ナイーブ型多能性細胞は、本研究中に記載する、導入遺伝子非依存型で遺伝子未改変の細胞と比較して不安定であることを示す。

【図７６Ａ－Ｃ】図７６Ａ～Ｃは、女性ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣがＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において特徴的な前Ｘ不活性化状態を保持することを示す。図７６Ａについて、ナイーブ型試料、プライム型試料、および分化した試料においてＯＣＴ４およびＨ３Ｋ２７ｍｅ３を二重免疫染色した際の共焦点画像を分析し、不活性Ｘ対立遺伝子に特徴的な核内Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３集積を有する細胞の画分を定量した。試料１つにつき少なくとも１０個の独立フレーム内で計数した細胞１５０～２００個における割合（パーセント）について、その平均値を示す。エラーバーはｓ．ｄ．を示す。＊は、試料をナイーブ型多能性細胞と比較した際のスチューデントｔ検定のＰ値＜０．０１を示す。ナイーブ型女性多能性細胞におけるＨ３Ｋ２７ｍ３集積は非常に少ない。プライム型細胞および分化細胞においては、ほとんどの細胞においてＨ３Ｋ２７ｍｅ３集積（核１つにつき１つ）が明瞭に検出できるようになった。予期した通り、男性株ではいずれの状態においてもＨ３Ｋ２７ｍｅ３集積／クラウドがみられない。図７６Ｂについて、ｑＲＴ－ＰＣＲ解析から、ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣにおいてはＸＩＳＴが全く発現していないまたは低レベルで発現しているが、女性分化線維芽細胞ではＸＩＳＴ発現が上方調節されていることを示す。エラーバーはｓ．ｄ．ｍ（ｎ＝３）を示す。＊はスチューデントｔ検定のＰ値＜０．０１を示す。図７６Ｃは、染色体Ｘ中の全遺伝子について、そのＨ３Ｋ９ｍ３レベル（ＲＰＫＭ（百万個規模のリード数をキロベースあたりのリード数に補正））の分布を示す。染色体Ｘ遺伝子中のＨ３Ｋ９ｍｅ３レベルについて、そのＲＰＫＭの分布を異なる細胞系において測定した。四角は２５パーセンタイルおよび７５パーセンタイル、横線は中央値、十字記号は外れ値を示す。各遺伝子について、ＴＳＳ（転写開始点）およびＴＥＳ（転写終了点）の１Ｋｂ上流のＲＰＫＭを測定した。ヒト細胞株４種（ＷＩＢＲ３、Ｃ１、ＬＩＳ２、ＷＩＳ２）について示す。青はナイーブ型細胞系、赤はプライム型細胞系を示す。ＷＩＢＲ３株、Ｃ１株、およびＬＩＳ２株は女性細胞系、ＢＧＯ１株は男性細胞系である。女性プライム型細胞におけるＨ３Ｋ９ｍｅ３の分布はそのナイーブ型よりも有意に高いが、男性細胞においてはその分布は同じである。一対の試料についての尾が１つのｔ検定によってＰ値を計算した。

【図７７Ａ－Ｂ】図７７Ａ～Ｂは、ヒトナイーブ型ＥＳＣ／ｉＰＳＣについてのトランス

クリプトームを明瞭に示す。図７７Ａは、選択した多能性マーカー遺伝子および系譜特異的マーカー遺伝子のマイクロアレイ転写プロファイルを示し、また、プライム型ｈＥＳＣおよびナイーブ型ｈＥＳＣにおけるその平均発現率を全試料の中央値に対して示す。値は、天然におけるスケールで示す。エラーバーは各遺伝子のＳＥＭを表す。アスタリスクは、ナイーブ型試料群およびプライム型試料群において、偽発見率が０．０５を超えて統計的に有意な発現変動遺伝子を表す。画像はＲソフトウェアを用いて作成した。図７７Ｂは、ナイーブ型ヒト多能性細胞およびプライム型ヒト多能性細胞において上方調節または下方調節された遺伝子について、ｑＲＴ－ＰＣＲで検証分析した結果を示す。＊は、ナイーブ型試料およびプライム型試料を比較したスチューデントｔ検定のＰ値＜０．０１を示す。エラーバーはｓ．ｄ．ｍ（ｎ＝３）を示す。

【図７８】図７８は、ヒトナイーブ型多能性において下方調節された遺伝子についてのＧＯオントロジー分析を示す。ナイーブ型多能性において下方調節された遺伝子がリッチなＧＯオントロジー区分について調べ、オンラインツールＧＯｒｉｌｌａを用いて可視化した。色つきのバーはｐ値を示す。系統図は、ｐ値＜１０－５、したがってＦＤＲ補正ｐ値＜０．０５のＧＯ　ｔｅｒｍを含む項目のみを示す。

【図７９Ａ－Ｄ】図７９Ａ～Ｄは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏにおいて単離したヒト多能性細胞の転写を比較したものである。図７９Ａは、ヒト細胞株およびヒト内部細胞塊（ＩＣＭ）のナイーブ型試料およびプライム型試料の発現変動遺伝子について、その遺伝子発現をＳｐｅａｒｍａｎの相関関係を用いて階層的クラスタリングに供した結果を示す。Ｂｅｌｍｏｎｔｅらが以前に誘導したＥＳＣ試料は本明細書中で誘導したプライム型試料とクラスターを形成し、ヒトＩＣＭ試料はナイーブ型試料とクラスターを形成したことに注目する。図７９Ｂは、異なる群（ナイーブ型、プライム型、ＢｅｌｍｏｎｔｅのＥＳＣ、およびＩＣＭ）の遺伝子のすべてについて、その発現特性の平均をＳｐｅａｒｍａｎの相関関係を用いて階層的クラスタリングに供した結果を示す。図７９Ｃは、すべての試料について、発現変動遺伝子の発現特性の平均を階層的クラスタリングに供した結果を示す。図７９Ｄは、ヒトＩＣＭ試料がプライム型試料よりもナイーブ型試料に近い（第一主成分軸に沿う）ことを示す主成分分析である。プライム型試料での方が分散度が大きく、変動性と不均一性とが高いことが示され、また、ナイーブ型試料とＩＣＭ試料とが近いほどには近くない。

【図８０Ａ－Ｄ】図８０Ａ～Ｄは、ナイーブ型ヒト多能性細胞においてＭＨＣクラスＩタンパク質およびＴＦＥ３タンパク質の細胞内局在化パターンが異なることを示す。ＯＣＴ４およびＴＦＥ３を二重免疫染色した際の共焦点画像の代表的なものと、黄破線で四角く囲った領域の蛍光強度プロファイルを示す。図８０Ａはナイーブ型ｍＥＳＣ、図８０Ｂはナイーブ型ＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣ、図８０Ｃはプライム型ｍＥｐｉＳＣ、図８０Ｄはプライム型ＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣを示す。この分析から、マウスおよびヒトの多能性細胞（ナイーブ型およびプライム型）において、核内のＯＣＴ４発現とＴＦＥ３発現が重なることがわかった。これらの代表的な画像から、ナイーブ型多能性においてはＴＦＥ３は忠実に核移行していて、一方、プライム型多能性においては、プライム型細胞系はマウスおよびヒトのいずれについてもＴＦＥ３の細胞質内局在化が増加することがわかる。Ｙ軸は、Ｚｅｎ　ｂｌｕｅ　２０１１ソフトウェアで測定した蛍光強度のプロファイルを表す。体系的に実施した不偏的定量化については、図３ｅおよび方法の項目を参照。

【図８１Ａ－Ｄ】図８１Ａ～Ｄは、ヒトナイーブ型多能性細胞の表面におけるＥ－カドヘリンの発現が増大したことを示す。遺伝的に一致するナイーブ型ｈＥＳＣ（図８１Ａおよび８１Ｃ）およびプライム型ｈＥＳＣ（図８１Ｂおよび８１Ｄ）においてＥ－カドヘリンおよびＯＣＴ４の発現を免疫染色した際の、共焦点画像の代表的なものを示す。試料は同時に処理し、同一条件下において分析した。挿入図は、四角に囲った領域を拡大して表す。プライム型ｈＥＳＣにおいてＥ－カドヘリンが発現しており、その発現は、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下で増やしたヒトナイーブ型ｈＥＳＣにおいて均一に分布しかつ発現が増大している。

【図８２Ａ－Ｂ】図８２Ａ～Ｂは、ナイーブ型多能性およびプライム型多能性の異種間ク

ラスタリングを示す。図８２Ａは、本研究で用いたマウスおよびヒトの遺伝子アレイ中に表すオルソログス遺伝子９，８０３個すべてについて、Ｐｅａｒｓｏｎ相関関係を用いてクラスタリングを実施した際の、異種間遺伝子発現の階層的クラスタリングを示す。マウスおよびヒトのナイーブ型多能性細胞は、プライム型ｍＥｐｉＳＣならびに従来型／プライム型のｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣとは異なる群を形成した。ヒートマップにより、行基準化した発現レベル（対数比率）を示す。赤および緑は、上方調節および下方調節された遺伝子をそれぞれ表す。ナイーブ型細胞は青で表示し、プライム型細胞は赤で表示する。マウス試料は１２９系統またはＮＯＤ系統のいずれかから得た。この分析が顕著に示すのは、多能性細胞株が、由来種に基づいてというより、ナイーブ型配置およびプライム型配置に基づいて優先的にクラスターを形成することである。図８２Ｂは、プライム型試料における遺伝子特異的な遺伝子発現レベルを示す箱型図であり、ナイーブ型試料よりもノイズが多く不均一度が高いことがわかる。このパターンは、図６９Ａ～Ｇ中の全ゲノムデータと矛盾しない。遺伝子９つのうち５つが有意に可変的であることが、等分散性のＦ検定によりわかった。

【図８３Ａ－Ｄ】図８３Ａ～Ｄは、ナイーブ型およびプライム型多能性細胞におけるＨ３Ｋ２７ｍｅ３およびＨ３Ｋ４ｍｅ３の全般的な沈着を示す。ヒト（ｎ＝４３，４６３、図８３Ａおよび８３Ｃ）およびマウス（ｎ＝３０，４８０、図８３Ｂおよび８３Ｄ）のナイーブ型（青）およびプライム型（赤）において、全ＲｅｆＳｅｑ遺伝子についてＨ３Ｋ２７ｍｅ３（図８３Ａ～Ｂ）およびＨ３Ｋ４ｍｅ３（図８３Ｃ～Ｄ）のクロマチン修飾のプロファイルを、標準化したリード密度で表す。ヒトのプロファイルは、５種の異なる細胞系（Ｃ１、ＬＩＳ２、ＷＩＢＲ３、ＷＩＢＲ３－ＭＢＤ３^{ｍｕｔ}、およびＢＧＯ１）について計算した平均およびｓ．ｄ．（エラーバー）を示す。プロット間の差異の平均を、分散およびＰ値（一対の試料についてのｔ検定により計算）と共に示す。

【図８４Ａ－Ｇ】図８４Ａ～Ｇは、ヒトナイーブ型多能性におけるＨ３Ｋ２７ｍｅ３の全ゲノム再分布を示す。図８４Ａ～Ｂは、ヒト細胞株（ＷＩＢＲ３、Ｃ１、およびＢＧＯ１）における異なるゲノム構成要素（プロモーター、遺伝子本体、および遺伝子間領域）でのＨ３Ｋ２７ｍｅ３ピークの分布を、ピーク密度（ＲＰＫＭで表す、百万個規模のリード数をキロベースあたりのリード数に補正）との相関関係において示す。ナイーブ型条件下において、ピーク総数が減少しただけでなく、ピーク分布がプライム型のものとは異なり、プライム型条件下よりもプロモーターおよび遺伝子本体のピーク数が少ない。図８４Ｃは、ナイーブ型およびプライム型のＬＩＳ２　ｈＥＳＣ試料における総Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３レベルを定量したウェスタンブロット解析を示す。Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３の総レベルは、ナイーブ型試料およびプライム型試料の間で有意な差はなかった（マウスでの観察結果と類似）。ＷＩＢＲ３細胞系およびＣ１細胞系においても類似する結果がみられた（データは示さず）。図８４Ｄ～Ｅは、ナイーブ型（青）およびプライム型（赤）のヒト（図８４Ｄ）およびマウス（図８４Ｅ）における、クラスＩ（活発な転写）およびクラスＩＩ（休止）のエンハンサーの数を示す。ヒトにおいて、これらの数値は、ＷＩＢＲ３株およびＣ１株に共通のエンハンサーに対応する。全ヒト試料中のリード数が同数、全マウス試料中のリード数も同数となるようダウンサンプルして、リード数を標準化した。クラスＩＩエンハンサーの著しい減少は、ヒトおよびマウスいずれのナイーブ型細胞においても観察し得る。図８４Ｆ～Ｇは、ヒト細胞（図８４Ｆ）またはマウス細胞（図８４Ｇ）のナイーブ型細胞のみ（青）またはプライム型細胞のみ（赤）に存在するクラスＩおよびクラスＩＩエンハンサーに関連する遺伝子について、その発現レベルの分布を示す。全遺伝子の発現レベルの分布をコントロールとして示す。四角は２５分位および７５分位を示す。ひげは、外れ値でない最小値および最大値を示す。分析から、プライム状態に特異的なクラスＩＩエンハンサーの発現レベルが、ナイーブ型およびプライム型いずれの状態においても非常に低く保たれることがわかる（ナイーブ型多能性において、そのエンハンサーに対してＨ３Ｋ２７ｍｅ３マークがないにもかかわらず）。Ｐ値（ｔ検定）は、ナイーブ型細胞およびプライム型細胞での分布における有意差を示す。

【図８５Ａ－Ｃ】図８５Ａ～Ｃについて、プライム型／従来型ＷＩＢＲ３ヒトＥＳＣを１

２種の異なるＷＩＳ－ＮＨＳＭ系条件下において継代した。図８５Ａは、この実験で、１％のＡＬＢＵＭＡＸ、５０マイクログラム／ｍｌ（μｇ／ｍｌ）のＬ－アスコルビン酸、Ｎ２サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、さらに６．２５ｍｇのヒトインスリンを添加した塩基性媒体ＫＯ－ＤＭＥＭ以外に用いる、異なるＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件の組成を示す。条件の組み合わせ１～１２に示す通りの小分子およびサイトカインを含有するものとした。細胞を、０．２％ゼラチン被覆プレート上で２５日間（継代６回）増やした。図８５Ｂについて、これらの条件下における多能性の維持を測定するためにＯＣＴ４－ＧＦＰ＋レベルをＦＡＣＳ分析で評価し、その結果をヒストグラムで示す。エラーバーはｓ．ｄ．（ｎ＝２）を示す。図８５Ｃは、メチル化シトシンの割合（パーセント）を示すヒストグラムである。ゲノムＤＮＡを回収し、質量分析によってメチル化シトシンの頻度を定量した。エラーバーはｓ．ｄ．（ｎ＝２）を示す。参照コントロール試料としてプライム型細胞を用いた。

【図８６Ａ－Ｃ】図８６Ａ～Ｃは、ナイーブ型およびプライム型のヒト多能性細胞に対してＭＡＰＫシグナリングの摂動が及ぼす影響を示す。図８６Ａは、異なる条件下における図示する分化系列決定遺伝子の発現をｑＲＴ－ＰＣＲで調べた結果である。ＥＲＫｉ、ＧＳＫ３βｉ（ＣＨＩＲ９９０２１）、またはその両方（２ｉ）をプライム型ｈＥＳＣに添加することによってＳＯＸ１神経マーカーが上方調節される。この結果は、ＥＲＫを阻害するとプライム型ｈＥＳＣが分化傾向をみせることと矛盾しない。図８６Ｂは、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において増やしたナイーブ型ＷＩＳ１　ｈＥＳＣを、図示する因子をＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件から除いて７２時間にわたって増やした。分化系列決定遺伝子のｑＲＴ－ＰＣＲを示す。この結果から、培地中にＥＲＫｉが存在することにより誘導されたＳＯＸ１誘起効果をＴＧＦβが遮断することがわかる。図８６Ｃは、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件からｐ３８ｉおよび／またはＪＮＫｉを除き、その７２時間後に分化系列決定遺伝子が上方調節されたことを示すｑＲＴ－ＰＣＲ解析である。これらの結果から、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件の構成要素が多能性安定性を協同的に促進し、また、一部の成分が誘導した分化促進効果を相殺し中和することがわかる。エラーバーはｓ．ｄ．ｍ（ｎ＝３）を示す。３回の生体実験を代表して、そのうち１回について示す。＊はスチューデントｔ検定のＰ値＜０．０１を示す。

【図８７Ａ－Ｂ】図８７Ａ～Ｂは、ナイーブ型ｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣの維持に必要なシグナリングを示す。図８７Ａについて、ナイーブ型ｈＥＳＣであるＷＩＳ１およびＬＩＳ１をΔＰＥ－ＯＣＴ４－ＧＦＰレポーターを用いたターゲティングに供し、図示する異なる条件下においてナイーブ型多能性を保持できるか否かを調べた。２回の実験でＦＡＣＳにより検出したＯＣＴ４－ＧＦＰ＋レベルを平均した。エラーバーはｓ．ｄ．を示す。この結果、ＷＩＳ－ＮＨＳＭにおけるｈＥＳＣの維持にはＥＲＫの阻害が必須であり、二種の異なるＥＲＫ阻害剤（ＰＤ０３２５９０１またはＰＤ１８４３５２）を用いてこの効果を得ることができると示される。また、ＷＩＳ－ＮＨＳＭにおけるｈＥＳＣの維持にはｐ３８の阻害が必須であり、二種の異なるｐ３８キナーゼ阻害剤（ＳＢ２０３５８０またはＳＢ２０２１９０）を用いてこの効果を得ることができる。図８７Ｂは、ＯＣＴ４－ＧＦＰまたはΔＰＥ－ＯＣＴ４ＧＦＰレポーターを有する異なるｈＥＳＣ株およびｈｉＰＳＣ株について、異なる条件下において多能性を維持できるか否か、具体的にはナイーブ型多能性を維持できるか否かを評価した（ΔＰＥコンストラクトによって）。ＯＣＴ４－ＧＦＰおよびΔＰＥ－ＯＣＴ４－ＧＦＰレポーターの両方を活性化しながら試験した細胞系すべてを維持できたのは、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件のみであった。＊は、図示した比較対象の試料および群についてのスチューデントｔ検定のＰ値＜０．０１を示す。エラーバーは、複数のウェルについてのｓ．ｄ．ｍ（ｎ＝３）を示す。

【図８８Ａ－Ｊ】図８８Ａ～Ｊは、マウスナイーブ型多能性を維持できる異なる限定増殖条件を示す。図８８Ａ～Ｇについて、ナイーブ型多能性特異的ΔＰＥ－Ｏｃｔ４－ＧＦＰレポーターを有するＶ６．５　ｍＥＳＣを、画像のタイトルに示す、化学組成が限定された別個の増殖条件下において維持した。図８８ＡはＮ２Ｂ２７　ＬＩＦ、図８８ＢはＮ２Ｂ２７　ＥＲＫｉ／ＧＳＫ３βｉ（２ｉ）／ＬＩＦ、図８８ＣはＮ２Ｂ２７　ｐ３８ｉ／

ＧＳＫ３βｉ／ＬＩＦ、図８８ＤはＮ２Ｂ２７　ＪＮＫｉ／ＧＳＫ３βｉ／ＬＩＦ、図８８ＥはＷＩＳ－ＮＨＳＭ、図８８ＦはＦＧＦ２／ＴＧＦβ無しのＷＩＳ－ＮＨＳＭ、図８８ＧはｍＥｐｉＳＣ培地（ＦＧＦ２／ＴＧＦβ有り）を示す。分析から、ＬＩＦおよびＧＳＫ３βｉと、ＥＲＫ１／２ｉ、ｐ３８ｉ、またはＪＮＫｉのいずれかとにおいて、ナイーブ型ＧＦＰ＋ｍＥＳＣを維持できることがわかる。図８８Ｈ～Ｊは、図示する株を胚盤胞マイクロインジェクションに供して発生させた寄与率の高いキメラの画像のうち、代表的なものを示す。図８８ＨはＮ２Ｂ２７　ｐ３８ｉ／ＧＳＫ３βｉ／ＬＩＦ、図８８ＩはＮ２Ｂ２７ＪＮＫｉ／ＧＳＫ３βｉ／ＬＩＦ、図８８ＪはＷＩＳ－ＮＨＳＭを示す。アグーチ色の毛色は、キメラ寄与率が高いことを示す。

【図８９Ａ－Ｄ】図８９Ａ～Ｄは、異なるマウスナイーブ型増殖条件の適性を、四倍体胚相補性アッセイにおいて調べた結果を示す。図８９Ａについて、図示する条件下において継代１２回によりＶ６．５ナイーブ型ｍＥＳＣを増やし、続いて、ＥＳＣのみからなる動物を作製する四倍体胚補完アッセイによって調べた。分析から、ナイーブ型ｍＥＳＣをｐ３８ｉ、ＪＮＫｉ、またはＥＲＫ１／２ｉを添加して増やすと（いずれの条件においてもＬＩＦおよびＧＳＫ３βｉと共に添加）、機能レベルで等しく無制限に発生できることがわかる。図８９Ｂ～Ｃは、上記で得た「ＥＳＣのみからなる」毛色がアグーチ色の動物の画像のうち、代表的なものである。図８９Ｄは、異なるマウスナイーブ型増殖条件の適性を、四倍体胚相補性アッセイにおいて調べた結果を示す。図示する条件下において継代１２回によりＶ６．５ナイーブ型ｍＥＳＣを増やし、続いて、ＥＳＣのみからなる動物を作製する四倍体胚補完アッセイによって調べた。分析から、ナイーブ型ｍＥＳＣをｐ３８ｉ、Ｊｎｋｉ、またはＥｒｋ１／２ｉを添加して増やすと（いずれの条件においてもＬＩＦおよびＧＳＫ３βｉと共に添加）、機能レベルで等しく無制限に発生できることがわかる。

【図９０】図９０は、ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣにおけるＬＩＦ／ＳＴＡＴ３シグナリング依存を示す。ナイーブ型ＷＩＳ１　ｈＥＳＣに対し、ＬＩＦの中止および／またはＪＡＫ阻害小分子（０．６μＭのＪＡＫｉ）の添加を７２時間にわたって実施し、図示する分化系列決定遺伝子のｑＲＴ－ＰＣＲレベルを調べた。生体サンプル３つの平均を、非刺激コントロールで標準化したレベルで示す。エラーバーはｓ．ｄ．ｍ（ｎ＝３）を示す。ＬＩＦ／ＳＴＡＴ３シグナリングを妨げることによって、ナイーブ型ｈＥＳＣにおいて分化系列決定遺伝子が特異的に上方調節される。＊は、コントロールであるＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件と比較したスチューデントｔ検定のＰ値＜０．０１を示す。エラーバーはｓ．ｄ．を示す。

【図９１Ａ－Ｃ】図９１Ａ～Ｃは、ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣに特徴的な、ＢＭＰ４シグナリング要求およびＢＭＰ４に対する反応を示す。図９１Ａ～Ｂは、ナイーブ型（図９１Ｂ）およびプライム型（図９１Ａ）ＷＩＳ１　ｈＥＳＣを７２時間にわたってＢＭＰ４に供し、図示する決定遺伝子のｑＲＴ－ＰＣＲレベルを調べた結果である。生体サンプル３つの平均を、非刺激コントロールで標準化したレベルで示す。エラーバーはｓ．ｄ．ｍ（ｎ＝３）を示す。ナイーブ型ＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣにおいては、ＢＭＰ４（５～１０ｎｇ／ｍｌ、骨形成タンパク質４）に応答して、ＩＤ３（ＤＮＡ結合阻害剤３、優性ネガティブであるヘリックス・ループ・ヘリックスタンパク質、遺伝子ＩＤ：３３９９）が上方調節されたが、栄養膜初期マーカーＣＤＸ２（ｃａｕｄａｌ型ホメオボックス２、遺伝子ＩＤ：１０４５）およびＨＡＮＤ１（ｈｅａｒｔ　ａｎｄ　ｎｅｕｒａｌ　ｃｒｅｓｔ　ｄｅｒｉｖａｔｉｖｅｓ　ｅｘｐｒｅｓｓｅｄ　１、遺伝子ＩＤ：９４２１）は上方調節されなかった。この結果は、ナイーブ型ｍＥＳＣのＢＭＰ４に対する応答とよく似ており、ナイーブ型ｍＥＳＣではＩｄ３の上方調節によって多能性が補助かつ維持されることが示されている（Ｙｉｎｇ，Ｑ．－Ｌ．，ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１１５，２８１－２９２（２００３）．ＢＭＰ　Ｉｎｄｕｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｉｄ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　Ｓｕｐｐｒｅｓｓｅｓ　Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ　ａｎｄ　Ｓｕｓｔａｉｎｓ　Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｓｅｌｆ－Ｒｅｎｅｗａｌ　ｉｎ　Ｃｏｌｌａｂｏｒａｔｉｏｎ　ｗｉｔｈ　ＳＴＡＴ３）。プライム型ＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣにおいてはＢ

ＭＰ４に応答して栄養膜分化マーカーＣＤＸ２およびＨＡＮＤ１が上方調節され、ＩＤ３は上方調節されない。図９１Ｃについて、網羅的遺伝子発現分析を実施したところ、継代１２回にわたりＢＭＰ４を添加して増やしたナイーブ型ＷＩＳ２、Ｈ９、およびＢＧＯ１が、プライム型細胞とではなくナイーブ型のｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣとクラスターを形成する転写プログラムを有することがわかる。ヒト細胞株の全ゲノム遺伝子発現について、ユークリッド距離にて階層的クラスタリングを実施した。ＢＭＰ４有りまたは無しいずれの場合も、ナイーブ型ｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣのクラスタリングは系統樹で示す通りとなり、従来型／プライム型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣのクラスタリングとは異なっていた。ヒートマップにより、行基準化した発現レベルを示す。赤および緑は、上方調節および下方調節された遺伝子をそれぞれ表す。遺伝学的に同一である左端２つの試料について、バッチ効果を補正し、２つの異なるデータセットを統合して以降の分析で用いたことに注目する（オンライン上の方法を参照）。これらの知見を総合すると、ナイーブ型ヒト多能性細胞がＢＭＰ４に対して特徴的な許容性を有し、これによりナイーブ型多能性状態の維持を損なうことはないことがわかる。

【図９２Ａ－Ｄ】図９２Ａ～Ｄは、Ｍｂｄ３（Ｍｂｄ３　ｓｉＲＮＡ）またはＣｈｄ４（Ｃｈｄ４　ｓｉＲＮＡ）をノックダウンした後のＭｂｄ３$^{+/+}$二次的ＭＥＦの初期化効率を示す。図９２Ａについて、ＭＥＦをＤＯＸ誘導を伴うＳＴＥＭＣＣＡ－ＯＫＳＭにより初期化し、３日目に２ｉ／ＬＩＦ培地を添加した。２日目、４日目、および６日目に、図示するｓｉＲＮＡを添加した。図９２Ｂ～Ｃは、Ｍｂｄ３（図９２Ｃ）またはＣｈｄ４（図９２Ｂ）ターゲティングｓｉＲＮＡプールのｓｉＲＮＡトランスフェクションによるタンパク質欠損効率を示すウェスタンブロット分析である。図９２Ｄは、初期化効率を示すヒストグラムである。ＯＣＴ４－ＧＦＰ陽性細胞を定量化することによって（ＦＡＣＳによりアッセイ）、初期化効率を測定した。エラーバーは平均からのｓ．ｄ．（ｎ＝３）を示す。アスタリスクは、スチューデントｔ検定のＰ値＜０．０１を示す。

【図９３】図９３は、Ｍｂｄ３のＣｈｄ４への結合に対するＰ６６ａ－ＣＣの妨害を示す。Ｆｌａｇ－Ｍｂｄ３（ＷＴ）およびＰ６６ａ－ＣＣ（配列番号７１、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号：ＮＭ＿０１７６６０．３）の両方で、またはコントロールベクター（ｍＣｈｅｒｒｙ）で２９３Ｔ細胞をトランスフェクションし、Ｍｂｄ３と相互に影響し合うタンパク質を、Ｆｌａｇ磁気ビーズを用いた免疫沈降（ＩＰ）によってプルダウンした。その結果、ｐ６６ａ－ＣＣトランスフェクション後にＣｈｄ４とＭｂｄ３との相互作用が特異的に失われたことがわかる。

【図９４Ａ－Ｂ】図９４Ａ～Ｂは、ナイーブ型ヒトＥＳＣ（ＷＩＳ１）のＮａｎｏｓ３座におけるｍＣｈｅｒｒｙノックインレポーター対立遺伝子の発生を示す。図９４Ａは、Ｎａｎｏｓ３座においてｍＣｈｅｒｒｙノックインレポーター対立遺伝子を発生させるために、ＷＩＳ１ナイーブ型ヒトＥＳＣにおいてＴＡＬＥＮを用いて実施した遺伝子操作を示す概略図である。スキームはターゲティング計画を示す。図９４Ｂは、複数のＷＩＳクローンにおいて正確にターゲティングした対立遺伝子（ｍｕｔ）（２ｈ、４ｇ、８ａ、および８ｅ）のサザンブロット分析を示す。

【図９５】図９５は、ナイーブ型ＥＩＳ１　ＮＡＮＯＳ３－ｃｈｅｒｒｙレポーターヒトＥＳＣを始原生殖細胞（ＰＧＣ）様細胞（ＰＧＣＬＣと略記）に分化させる計画を示す。分化プロセスにおける細胞およびコロニーの画像を示す。

【図９６Ａ－Ｉ】図９６Ａ～Ｉは、ヒトＥＳＣを始原生殖細胞様細胞に分化させるプロセスを示す。図９６Ａは分化プロセスの概略図である。図９６Ｂ～Ｉは、ＰＧＣＬＣマーカー発現ＮＡＮＯＳ３－Ｃｈｅｒｒｙを検出するＦＡＣＳ分析を示す。図９６Ｂはナイーブ型ＥＳＣ、図９６ＣはプライムＥｐｉＬＣ、図９６Ｄ～ＦはＢＭＰ４を含有するＰＧＣ培地中で培養した細胞、図９６Ｇ～ＩはＢＭＰ４を含有しないＰＧＣ培地中で培養した細胞を示す。ＰＧＣ培地中で２日目（図９６Ｄおよび９６Ｇ）、４日目（図９６Ｅおよび９６Ｈ）、および６日目（図９６Ｆおよび９６Ｉ）のＦＡＣＳの結果を示す。図より、分化用培地がＢＭＰ４を含有する場合にのみ、２＋４日目にｍＣｈｅｒｒｙレポーターが特異的に誘導されたことがわかる（図９６Ｅ）。ナイーブ型ＥＳＣはｍＣｈｅｒｒｙを発現せ

ず（図９６Ｂ）、ＥｐｉＬＣ細胞もｍＣｈｅｒｒｙを発現しない（図９６Ｃ）ことに注目する。５回の実験を代表して、そのうち１回について示す。＋／－はｓ．ｄ．を示す（ｎ＝５）。

【図９７Ａ－Ｈ】図９７Ａ～Ｈは、ヒトＰＧＣＬＣ細胞におけるＰＧＣマーカーの発現を示す。誘導プロトコールにおける異なるＰＧＣマーカーの発現について実施したリアルタイムＰＣＲ分析を示す。図９７ＡはＴＦＡＰ２ｃ（ＡＰ２ｇａｍｍａとしても知られる）、図９７ＢはＢＬＩＭＰ１（ＰＲＤＭ１またはＰＲドメインタンパク質１としても知られる、遺伝子ＩＤ：６３９のＺＮＦドメインを有する）、図９７ＣはＰＲＤＭ１４（ＰＲドメインタンパク質１４）、図９７ＤはＳＴＥＬＬＡ（ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌ ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ３）、図９７ＥはＤＮＤ１（ＤＮＤ ｍｉｃｒｏＲＮＡ－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｒｅｐｒｅｓｓｉｏｎ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ １）、図９７ＦはＮＡＮＯＳ３（ｎａｎｏｓホモログ３）、図９７ＧはインテグリンＢ３（インテグリン、ベータ３（血小板糖タンパク質ＩＩＩａ、抗原ＣＤ６１））、図９７ＨはＶＡＳＡを示す。この結果、ヒトナイーブ型ＥＳＣに適用した、ＳＴＥＬＬＡ（図９７Ｄ）、ＩＮＴＥＧＲＩＮＢ３（図９７Ｇ）、ＢＬＩＭＰ１（図９７Ｂ）、およびＶＡＳＡ（図９７Ｈ）を含むプロトコールにおいて、ＰＧＣＬＣマーカーが誘導されたことが明瞭にわかる。

【図９８Ａ－Ｂ】図９８Ａ～Ｂは、後述の実施例部分の実施例１１および上記図９５～９７中に記載する誘導プロトコールと同様の誘導プロトコールに供した従来型／プライム型ヒトＥＳＣのＦＡＣＳ分析を示す。図９８Ａは、ＰＧＣ培地中で４日目のＦＡＣＳ分析を示す。図９８Ｂは、プライム型ＥＳＣをエピブラスト培地（ＥｐｉＬＣ培地）に２日間供し、ＰＧＣ培地中にさらに４日間供した後で実施したＦＡＣＳ分析を示す。図９８Ａ中の細胞においてｎａｎｏ－ｃｈｅｒｒｙの割合（パーセント）が低く（０．２５％）、図９８Ｂにおいてｎａｎｏｓ－ｃｈｅｒｒｙ陽性細胞がわずかに増加したこと（１．７４％）に注目する。これらの結果から、ＢＭＰ４を含むＰＧＣＬＣ誘導プロトコールに供した従来型／プライム型ヒトＥＳＣはＮＡＮＯＳ３ ｍＣｈｅｒｒｙレポーターを活性化できないことがわかる。この結果は、ヒトＰＧＣＬＣ誘導の出発点としてヒトナイーブ型多能性細胞を用いることが重要であると示す。

【図９９Ａ－Ｇ】図９９Ａ～Ｇは、ＭＢＤ３ノックダウンヒト線維芽細胞の初期化を示す。図９９Ａについて、ヒトＢＪ線維芽細胞を、ＴＲＩＰＺ ＭＢＤ３ ｓｈＲＮＡレンチウイルスに感染させた（３．１、３．２、３．３は、ＭＢＤ３をターゲティングする３つの異なるヘアピンコンストラクトを示す）。ＤＯＸ誘導有りまたは無しで７２時間後にＭＢＤ３についてのリアルタイムＰＣＲ発現を実施し、定量化してヒストグラムで示す。この結果から、ＤＯＸに依存してヒト線維芽細胞においてＭＢＤ３が下方調節されることが実証される。図９９Ｂ～Ｇについて、ヒト成体真皮線維芽細胞を、ＦＵＷ－ＲｔＴＡ、ＴｅｔＯ－ＯＫＳＭ、ＴｅｔＯ－ＥＲＡＳ、およびＴｒｉｐｚ－ＭＢＤ３ ｓｈＲＮＡ混合レンチウイルスに感染させた。次のＤＯＸ誘導性ＭＢＤ３ノックダウンレンチウイルスクローン、すなわちＴＲＩＰＺヒトＭＢＤ３ ｓｈＲＮＡクローン、ＩＤ：Ｖ３ＴＨＳ＿３９２２０６（＃１）、Ｖ３ＴＨＳ＿３９２２０９（＃２）、およびＶ３ＴＨＳ＿３９２２１０（＃３）を用いた。初期化の最初の３日間は、１５％のＦＢＳ（ウシ胎児血清）＋５０マイクログラム／ｍｌのビタミンＣ＋ＤＯＸ（２マイクログラム／ｍｌ）を添加したＤＭＥＭ培地の存在下において実施した。３日後、ＤＯＸ誘導を継続したまま、ＮＨＳＭ条件を適用した（ＮＨＳＭ培地を用いた）。図９９Ｂ～Ｃは、ＭＢＤ３ノックダウンヒト線維芽細胞の初期化を示す。ｓｈＭＢＤ３－赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）を発現する初期化細胞を、赤色蛍光（図９９Ｂ）または明視野（ＢＦ、図９９Ｃ）にて示す。図９９Ｄ～Ｇは、ＮＨＳＭ条件下におけるＯＫＳＭおよびＥＲＡＳの過剰発現を伴うＭＢＤ３ ＫＤ一次的ヒト線維芽細胞の初期化を示す。５日目（図９９Ｄ～Ｅ）および１１日目（図９９Ｆ～Ｇ）に現れたＥＳ様の形態を有するクローン集団を示す。図９９Ｄおよび９９Ｆに位相差画像を示す。図９９Ｅおよび９９Ｇに赤色蛍光画像を示す。ＥＲＡＳを過剰発現するＭＢＤ３ノックダウンクローンが５日で成長し、これをｉＰＳＣ追跡分析に供した。

【図１００Ａ－Ｔ】図１００Ａ～Ｔは、ＯＫＳＭ、ＲｔＴａ、ＥＲＡＳ、およびＭＢＤ３　ｓｈＲＮＡ　ＤＯＸ誘導の１０日後に、ＮＨＳＭ条件下において初期化中の細胞において、多能性マーカーＯＣＴ４、ＳＳＥＡ４、ＴＲＡ１－６０、およびＴＲＡ１－８１を染色した結果を示す。図１００Ａ～Ｄは、ＤＡＰＩ（図１００Ａ）、ＯＣＴ４（図１００Ｂ）、およびＳＳＥＡ４（図１００Ｃ）を染色した細胞を示す。図１００Ｄは、これらの画像の合成である。ＯＣＴ４およびＳＳＥＡ４が共発現していることに注目する。図１００Ｅ～Ｉは、ＤＡＰＩ（図１００Ｅ）、ＯＣＴ４（図１００Ｆ）、ＳＳＥＡ４（図１００Ｇ）を染色した細胞を示す。図１００Ｈはこれらの画像の合成であり、ＯＣＴ４およびＳＳＥＡ４の共発現を示す。図１００Ｉは、ＭＢＤ３－ｓｈＲＮＡ誘導レポーターの染色結果を示す。多能性マーカーＯＣＴ４およびＳＳＥＡ４を発現する細胞とｓｈＭＢＤ３とが共局在化していることに注目する。１００Ｊ～Ｎは、ＤＡＰＩ（図１００Ｊ）、ＯＣＴ４（図１００Ｋ）、ＴＲＡ１－６０（図１００Ｌ）を染色した細胞を示す。図１００Ｍはこれらの画像の合成であり、ＯＣＴ４およびＴＲＡ１－６０の共発現を示す。図１００Ｎは、ＭＢＤ３－ｓｈＲＮＡ誘導レポーターの染色結果を示す。多能性マーカーＯＣＴ４およびＴＲＡ１－６０を発現する細胞とｓｈＭＢＤ３とが共局在化していることに注目する。図１０００Ｏ～Ｓは、ＤＡＰＩ（図１０００）、ＯＣＴ４（図１００Ｐ）、ＴＲＡ１－８１（図１００Ｑ）を染色した細胞を示す。図１００Ｒはこれらの画像の合成であり、ＯＣＴ４およびＴＲＡ１－８１の共発現を示す。図１００Ｓは、ＭＢＤ３－ｓｈＲＮＡ誘導レポーターの染色結果を示す。多能性マーカーＯＣＴ４およびＴＲＡ１－８１を発現する細胞とｓｈＭＢＤ３とが共局在化していることに注目する。図１００Ｔは、１０日目のＮａｎｏｇ＋／ＴＲＡ１－６０＋ヒトｉＰＳＣコロニーの定量化を示すヒストグラムである。一次的成体女性真皮線維芽細胞（＃１３株）を、初期化中にＴＲＩＰＺ－ＭＢＤ３　ｓｈＲＮＡ　１＋３を添加することによってＭＢＤ３をノックダウンし、またはノックダウンせず、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件において、ＲｔＴａ、ＯＳＫＭ、およびＥＲＡＳベクターにより形質導入した。１０日目に、ＮＡＮＯＧおよびＴＲＡ１－６０マーカーを染色することによって、ｉＰＳＣコロニーの数を計数した（図１００Ｔ）。ＭＢＤ３の阻害を導入すると一次的ヒト体細胞からのｉＰＳＣ形成が著しく増加したことに注目する。

【図１０１Ａ－Ｂ】図１０１Ａ～Ｂは、異なる処理に供したｖ６．５マウスＥＳ細胞におけるＭＢＤ３（図１０１Ｂ）およびＨＳＰ９０（図１０１Ａ）の発現を示すウェスタンブロット分析である。Ｖ６．５マウスＥＳ細胞を、図示する条件下において４日間にわたって増やし、ＭＢＤ３タンパク質の発現を調べるためにウェスタンブロット解析に供した。条件は、図中、レーン上に示す。図示する因子および薬剤の省略形および濃度を以下に示す。ＰＢＳ＝リン酸緩衝生理食塩水、「ＬＩＦ」＝白血病抑制因子（濃度２０ナノグラム／ミリリットル（ｎｇ／ｍｌ））、ＫＳＲ＝ノックアウト血清代替物、「２ｉ／ＬＩＦ」＝阻害小分子ＣＨＩＲ９９０２１（ＣＨ、３μＭ、Ａｘｏｎ　Ｍｅｄｃｈｅｍ）およびＰＤ０３２５９０１（ＰＤ、１μＭ、ＴＯＣＲＩＳ）（２０ｎｇ／ｍｌのＬＩＦと共に）、「ＤＭＳＯ」＝ジメチルスルホキシド（濃度０．１％）、ＴＧＦＲｉ（形質転換増殖因子受容体の阻害剤、ＳＢ４３１５４２、５マイクロモル）、ＰＫＣ－ｉ（プロテインキナーゼＣの阻害剤、Ｇｏ６９８３、５マイクロモル）。ＰＫＣ阻害剤（Ｇｏ６９８３　５マイクロＭ）（ＰＫＣｉ）で処理した細胞においてＭＢＤ３タンパク質のレベルが有意に減少したことに注目する。この結果から、マウス胚性幹細胞においてＰＫＣを阻害するとＭＢＤ３の発現が下方調節されることがわかる。

【図１０２】図１０２は、表３（後述の実施例部分の実施例１３）中に示す種々のＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地がＤＮＡのメチル化（ｄＧに標準化、メチル化シトシン総レベル％（５ｍｄＣ））に及ぼす効果を示すヒストグラムである。

【図１０３】図１０３は、表３（後述の実施例部分の実施例１３）中に示す種々のＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地が相対的なＤＮＭＴ３Ｌ　ｍＲＮＡ発現（プライム型細胞に標準化）に及ぼす効果を示すヒストグラムである。

【図１０４】図１０４は、表３（後述の実施例部分の実施例１３）中に示す種々のＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地が相対的なＤＮＭＴ３Ｂ　ｍＲＮＡ発現（プライム型細胞に標準化）に及

ぼす効果を示すヒストグラムである。
【図１０５】図１０５は、表３（後述の実施例部分の実施例１３）中に示す種々のＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地が、０．２％ゼラチンプレート上で９回継代したＯＣＴ４＋ＷＩＢＲ３細胞の割合％に及ぼす効果を示すヒストグラムである。
【図１０６Ａ－Ｄ】図１０６Ａ～Ｄは、ＮＡＮＯｓ３　ｍＣｈｅｒｒｙノックインレポーターを有するヒトナイーブ型ＥＳＣ（図１０６Ａ～Ｂ）およびＰＧＣＬＣ（誘導後４日目、図１０６Ｃ～Ｄ）における抗ヒトＣＤ６１抗体（インテグリンＢ３）の発現を調べたＦＡＣＳ分析を示す。図１０６Ａおよび１０６Ｃはコントロール細胞（抗体染色せず）、図１０６Ｂおよび１０６Ｄは抗ヒトＣＤ６１（Ａｌｅｘａ－６４７）抗体で染色した細胞を示す。
【図１０７Ａ－Ｂ】図１０７Ａ～Ｂは、ＮＡＮＯＳ３　ｍＣｈｅｒｒｙノックインレポーターを有するヒトＰＧＣＬＣ（ヒトナイーブ型細胞から誘導して２＋４日後）における抗ヒトＳＳＥＡ４抗体（図１０７Ａ）または抗ヒトＣＤ６１抗体（インテグリンβ３、図１０７Ｂ）の発現を調べたＦＡＣＳ分析を示す。
【図１０８Ａ－Ｃ】図１０８Ａ～Ｃは、ヒトナイーブ型多能性のシグナリングおよび機能的特徴を示す。図１０８Ａは、種々の培地条件下で培養した異なる多能性細胞株における多能性維持を示す。ヒトおよびマウスの多能性細胞のシグナリング特徴を明らかにするため、本発明者らは、種々の培地条件下で培養した異なる多能性細胞株における多能性維持を調べた。細胞集団を等分割し、図示する増殖培地を入れたゼラチン／ビトロネクチン被覆プレート上に蒔いた（マウスナイーブ型細胞はＮ２Ｂ２７－２ｉ／ＬＩＦ条件、ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣはＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件、ｍＥｐｉＳＣおよびプライム型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣはＫＳＲ／ｂＦＧＦ／ＴＧＦβ条件）。増殖培地は、該当する細胞系の維持に通常用いる増殖培地である。３６時間後、図示する阻害剤または増殖因子をウェルに添加した。１４日（継代２回）後、ＯＣＴ４を免疫染色して分析することによって、各ウェルにおけるＯＣＴ４－ＧＦＰ多能性レポーターの発現を直接検出し、未分化多能性細胞の相対的な割合（パーセント）を決定した。コロニー形成を内部コントロールについて標準化し、一番左の列にのみ「増殖培地」と示す。ＷＩＳ－ＮＨＳＭに既に含有される構成要素を添加する場合は、相対濃度で２倍となるよう増やした。標準化した割合（パーセント）が５０％より低い場合に、添加した阻害剤の存在に「敏感」であると決定する。図１０８Ｂについて、ＷＩＳ－ＮＨＳＭにおけるナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣのｉｎｖｉｔｒｏ安定性を安定させるためにＬＩＦ／Ｓｔａｔ３が必要である。ナイーブ型Ｖ６．５　ｍＥＳＣ、ナイーブ型ＷＩＳ１およびＨ１　ｈＥＳＣ、ならびにＢＪナイーブ型ｈｉＰＳＣを、偽ｐＢＲＹ－ＣＡＧＧＳ－ｆｌｏｘ－ＤｓＲｅｄＴ４－ＩＲＥＳ－Ｐｕｒｏコントロールプラスミド、優性ネガティブＳｔａｔ３　Ｙ７０５Ｆ変異体をコードするプラスミド（Ｓｔａｔ３－ＤＮ）、またはＳｔａｔ３－ＣＡ構造的活性変異体をコードするプラスミド（ｐＢＲＹ－Ｓｔａｔ３－ＣＡ）を用いて、電気穿孔に供した。ピューロマイシン選択下で細胞を３回継代した。２０日後、ＯＣＴ４多能性マーカー陽性コロニーを計数し、空ベクターを用いて電気穿孔した細胞由来のコロニーで標準化した。（各条件につきｎ＝３、エラーバーはｓ．ｄ．を示す）。図１０８Ｃは、ヒトナイーブ型ＧＦＰ標識ｉＰＳＣに由来する細胞を、Ｅ１０．５マウス胚の前方部分の異なる位置に組込んだ際の、代表的な画像である。１列目は全胚を示す（ｚ－ｓｔａｃｋ間隔３０ｕｍ、焦平面の総数１８）。２列目は、頭部領域（白四角Ｒ１）に焦点を合わせた拡大画像であり、ｈｉＰＳＣ由来細胞（ＧＦＰ陽性細胞）を示す（矢印、ｚ－ｓｔａｃｋ間隔２０μｍ、スタック総数１１）。３列目は胚の後方部分を示し（黄四角Ｒ２）、ＧＦＰ陽性細胞は検出されなかった（ｚ－ｓｔａｃｋ間隔２０μｍ、焦平面の総数９）。２列目に示す画像のうち最初の２つにおいて、淡青の四角は、当該画像の角の挿入図に示す領域を指す。（ｏｖは眼胞、ｏｐは視窩、ｆｂａは第一鰓弓、ｆｌｂは前肢芽、ｓは体節）。いずれの画像においてもスケールバーは５０μｍを示す。
【図１０９Ａ－Ｅ】図１０９Ａ～Ｅは、ヒトナイーブ型ｉＰＳＣ由来の細胞をマウス桑実胚中にマイクロインジェクションした後で生じたキメラ化を示す。図１０９Ａについて、

Ｃ１ヒトナイーブ型ｉＰＳＣに対し、構造的ＣＡＧＧＳプロモーターにより開始するＥＧＦＰを用いて、ＺＦＮ利用のもと、ヒトＡＡＶＳ１座へのターゲティングを実施した。続いて、細胞をＥ２．５マウス初期桑実胚中にマイクロインジェクションし、顕微操作した胚を、胚盤胞中においてｉｎ　ｖｉｔｒｏでさらに２４時間にわたり回復させ成長させた。画像は、マウス着床前胚にＧＦＰ＋ヒト細胞が特異的に生存しかつ組込まれていることを示す。図１０９Ｂは、ナイーブ型およびプライム型のＧＦＰ＋ヒトｉＰＳＣについて、マウス桑実胚中にマイクロインジェクションして２４～３６時間後のｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける生存を示すヒストグラムである。＊はスチューデントｔ検定のＰ値＜０．０１を示す。エラーバーはｓ．ｄ．（ｎ＝３）を示す。ナイーブ型ｉＰＳＣ（全細胞のほぼ８０％）は注入後２４～３６時間、マウス胚盤胞中において生存したが、胚盤胞中において生存したプライム型ＰＳＣはわずかであった（５％未満）ことに注目する。図１０９Ｃについて、ＧＦＰ標識ナイーブ型ｈｉＰＳＣをマウス桑実胚中にマイクロインジェクションして２４時間後、ＧＦＰ（緑）、ＯＣＴ４（赤）、およびＣＤＸ２（マゼンタ）を免疫染色し、続いて共焦点分析を実施した。その結果の代表的なものを示す。生存ＧＦＰ＋細胞（白矢印）が、特異的に一体化してＯＣＴ４陽性染色を示すが、ＣＤＸ２陽性染色は示さないことに注目する（ＧＦＰおよびＣｄｘ２の共局在化は観察されず）。スケールバーは１０μｍを示す。図１０９Ｄについて、続いて、マウス胚盤胞をｉｎ　ｖｉｖｏにおいてマウスに移植し、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいてさらに７日間成長させた後（図示）、解剖して共焦点分析に供した。ｈｉＰＳＣ由来細胞のＥ８．５マウス胚神経ヒダへの組込みが強く示され、その画像の代表的なものを示す（上のパネル）。特に、注入を受けていないコントロールマウス胚においてはＧＦＰが検出されなかった（ｎ＝３、下のパネル）。ｚ－ｓｔａｃｋ間隔は２０μＭ、焦平面の総数は１７であった（ｎｆは神経ヒダ）。スケールバーは５０μｍを示す。図１０９Ｅは、ナイーブ型ｈｉＰＳＣ由来の細胞がＥ１０．５マウス胚の頭蓋顔面領域内の異なる位置に統合されたことを示す。１０８Ｃ中の異なる焦平面と並べてみると、複数のｈｉＰＳＣ由来細胞が頭蓋顔面領域の異なる位置に統合されたことがわかる（矢印）。各行１つめの画像は、全ｚ－ｓｔａｃｋの最大強度投影を示す。異なる焦平面同士の間隔を、各画像の上右角に示す。（ｏｖは眼胞、ｏｐは視窩、ｆｂａは第一鰓弓）。スケールバーは５０μｍを示す。

【発明を実施するための形態】

【０１４５】

本発明は，ある実施形態において、霊長類（例えばヒト）単離ナイーブ型多能性幹細胞、上記ナイーブ型多能性幹細胞の発生に用い得る新規の培養基、および上記ナイーブ型多能性幹細胞を発生させかつ培養する方法に関する。より具体的には、本発明は，ある実施形態において、人工多能性幹細胞を発生させる目的で体細胞の脱分化を改善する方法に関するが、これに限定されるものではない。

【０１４６】

本発明の少なくとも１つの実施形態を以下に詳細に説明するが、これに先立って理解されるべきことは、本発明の用途が以下の記載に示すまたは実施例に例示する詳細に必ずしも制限されないということである。本発明は、下記以外の実施形態においても実施でき、また多様な様式において実施または実行できる。

【０１４７】

本発明者らは、霊長類（例えばヒト）ナイーブ型多能性幹細胞の単離および発生ならびに霊長類（例えばヒト）ナイーブ型多能性幹細胞のナイーブ状態における維持に必要な条件を明らかにした。

【０１４８】

したがって、本発明のある実施形態の一態様によれば、霊長類（例えばヒト）単離ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）であって、　非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記Ｘ

ＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、かつ／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とする　霊長類単離ナイーブ型多能性幹細胞が提供される。

【０１４９】

本明細書中において、記載「多能性幹細胞（ＰＳＣ）」は、三種の胚性生殖細胞層、すなわち中胚葉、外胚葉、および内胚葉という胚性胚葉のいずれにも分化できる未分化の細胞（例えば、霊長類細胞、哺乳類細胞）を指す。

【０１５０】

本発明のある実施形態によれば、上記多能性幹細胞は、胚性幹細胞（ＥＳＣ）、人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）、および胚性生殖細胞（ＥＧＣ）からなる群より選択される。

【０１５１】

本発明のある実施形態によれば、上記霊長類ナイーブ型多能性幹細胞は、ホモ・サピエンス（ヒト）、サル、チンパンジー、ゴリラ、アカゲザル、および／またはヒヒのナイーブ型多能性幹細胞である。

【０１５２】

記載「ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）」は、ＰＳＣを作製でき、前Ｘ不活性化状態を呈し、したがって上記ＰＳＣの起点となると考えられる細胞を指す。

【０１５３】

本発明のある実施形態による前Ｘ不活性化状態は、女性細胞中にＸ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子の非メチル化対立遺伝子が２つ存在し、男性細胞中に上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子が１つ存在することを特徴とする。

【０１５４】

上記ＸＩＳＴ遺伝子はヒトＸｑ１３．２染色体上にあり、ＧｅｎＢａｎｋのバージョンＧＲＣｈ３７．ｐ１０に基づくクローンＮＣ＿０００００２３．１０（７３０４０４８６．．７３０７２５８８）（相補）に示される配列を有する。上記ＸＩＳＴ遺伝子は、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＲ＿００１５６４．２（配列番号２０）のノンコーディングＲＮＡを有する。

【０１５５】

本発明のある実施形態によれば、女性細胞中にＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子が２つ存在するということは、ＸＩＳＴプロモーターにおいてシーケンシングされたＣｐＧのメチル化リードを約２０％よりも少なく有すること、例えば、ＸＩＳＴプロモーターにおいてシーケンシングされたＣｐＧのメチル化リードを約１９％よりも少なく、約１８％よりも少なく、約１７％よりも少なく、約１６％よりも少なく、約１５％よりも少なく、約１４％よりも少なく、約１３％よりも少なく、約１２％よりも少なく、約１１％よりも少なく、約１０％よりも少なく、約９％よりも少なく、約８％よりも少なく、約７％よりも少なく、約６％よりも少なく、約５％よりも少なく、約４％よりも少なく、約３％よりも少なく、約２％よりも少なく、約１％よりも少なく、例えば０％有する（例えば、全く存在しない）ことを指す。

【０１５６】

本発明のある実施形態によれば、男性細胞中にＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子が１つ存在するということは、ＸＩＳＴプロモーターにおいてシーケンシングされたＣｐＧのメチル化リードを約２０％よりも少なく有すること、例えば、ＸＩＳＴプロモーターにおいてシーケンシングされたＣｐＧのメチル化リードを約１９％よりも少なく、約１８％よりも少なく、約１７％よりも少なく、約１６％よりも少なく、約１５％よりも少なく、約１４％よりも少なく、約１３％よりも少なく、約１２％よりも少なく、約１１％よりも少なく、約１０％よりも少なく、約９％よりも少なく、約８％よりも少なく、約７％よりも少なく、約６％よりも少なく、約５％よりも少なく、約４％よりも少なく、約３％よりも少なく、約２％よりも少なく、約１％よりも少なく、例えば０％有することを指す。

【０１５７】

メチル化されていてもいなくてもよいＣｐＧアイランドを含むＸＩＳＴプロモーターの例を、配列番号７０に記載するＸＩＳＴプロモーターアンプリコンに記載するが、これらに限定されない。

【０１５８】

本発明のある実施形態によれば、上記ヒトナイーブ型ＰＳＣについて、ヒトプライム型ＰＳＣにおけるＣｐＧアイランドのメチル化レベルと比較して、上記ヒトナイーブ型ＰＳＣのＣｐＧアイランドのメチル化レベルが低いことを特徴とする。

【０１５９】

したがって、図３０Ｇ中に示すように、ヒトナイーブ型ｉＰＳＣおよびヒトナイーブ型ＥＳＣは、液体クロマトグラフィー質量分析（ＬＣ－ＭＳ）による定量分析にて、各細胞中の総グアニンヌクレオチドのうちメチル化シトシンの総レベルを決定した際、そのレベルが有意に低い（例えば１～２％、図３０Ｇ）ことを特徴とする。

【０１６０】

本発明のある実施形態によれば、上記ヒトナイーブ型ＰＳＣは、上記ナイーブ型ＰＳＣ細胞中の総グアニンヌクレオチドのうち総メチル化シトシンが０～３％であることを特徴とする。これと比較して、上記プライム型ＰＳＣまたは体細胞は、上記プライム型ＰＳＣ細胞中の総グアニンヌクレオチドのうち総メチル化シトシンが３．５％～５％である。

【０１６１】

このように、本発明のある実施形態のナイーブ型多能性幹細胞はナイーブ状態にある。

【０１６２】

本明細書中において、記載「ナイーブ状態」は、未分化状態、すなわち、女性細胞のＸ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子の両対立遺伝子がメチル化されていないこと、または男性細胞のＸＩＳＴ対立遺伝子がメチル化されていないことを指す。

【０１６３】

注目するべきは、本発明のある実施形態のナイーブ型ＰＳＣ（前Ｘ不活性化の状態であり、かつナイーブ状態である）が、分化の際に、Ｘ染色体対立遺伝子の１つを不活性化してＸＩＳＴ遺伝子の１つをメチル化することができる点である。

【０１６４】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣは、ＥＲＫ１／２阻害剤（例えば以下に例示）の存在下において維持される間（例えば培養される間）、ナイーブ状態を維持する（上記に定義）。

【０１６５】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣは、ＴＧＦβシグナリング阻害の非存在下（例えばＴＧＦβｉの非存在下）において維持される間（例えば培養される間）、ナイーブ状態を維持する（上記に定義）。

【０１６６】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣは、ＴＧＦβ刺激の存在下、例えばＴＧＦβ１および／またはＦＧＦ２刺激の存在下において維持される間（例えば培養される間）、ナイーブ状態を維持する（上記に定義）。

【０１６７】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣは、ＥＲＫ１／２阻害剤の存在下、かつＴＧＦβ１刺激（例えばＴＧＦβ１の添加による）および／またはＦＧＦ２刺激の存在下において維持される間（例えば培養される間）、ナイーブ状態を維持する（上記に定義）。

【０１６８】

記載「プライム型ＰＳＣ」または「従来型ＰＳＣ」は、本明細書中において区別なく用い、現時点で既知のＰＳＣ、例えばヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）、ヒト人工多能性幹細胞（ｈｉＰＳＣ）、およびヒト胚性生殖細胞（ｈＥＧＣ）を指す。これらの既知のＰＳＣは、女性細胞中にＸＩＳＴのメチル化対立遺伝子１つとＸＩＳＴの非メチル化対立遺伝子１つが存在しかつ男性細胞中にメチル化対立遺伝子が１つ存在することを特徴とする。

【０１６９】
本明細書中において、用語「単離された」は、自然環境、例えば霊長類（例えば哺乳類）の胚または霊長類（例えば哺乳類）の身体から少なくとも部分的に分離されたことを指す。
【０１７０】
記載「胚性幹細胞」は、三種の胚性胚葉（すなわち内胚葉、外胚葉、および中胚葉）のいずれの細胞にも分化できる胚細胞、または未分化状態を保つ胚細胞を指す。記載「胚性幹細胞」は、妊娠後（この時期に形成される胚組織は、例えば胚盤胞）かつ胚着床前に形成された胚組織から得られる細胞（すなわち着床前胚盤胞）、着床後／前原腸形成段階の胚盤胞から得られる拡張胚盤胞細胞（ＥＢＣ）（ＷＯ２００６／０４０７６３参照）、および妊娠中、好ましくは妊娠１０週未満の任意の時点で胎児生殖器組織から得られる胚性生殖（ＥＧ）細胞を含んでもよい。
【０１７１】
人工多能性幹細胞（ｉＰＳ、
胚様幹細胞）は、成体体細胞の脱分化により得られる、多能性を付与された（すなわち、三種の胚性生殖細胞層、つまり内胚葉、外胚葉、および中胚葉に分化できる）細胞である。本発明のある実施形態によれば、こうした細胞は、分化した組織（例えば、皮膚等の体細胞組織）から得、遺伝子操作により脱分化させて細胞を初期化し、胚性幹細胞の特徴をもたせたものである。本発明のある実施形態によれば、上記人工多能性幹細胞は、体性幹細胞においてＯｃｔ－４、Ｓｏｘ２、Ｋｆｌ４、およびｃ－Ｍｙｃの発現を誘導することによって作製される。
【０１７２】
本発明のある実施形態の胚性幹細胞は、既知の細胞培養法によって得ることができる。例えば、ヒト胚性幹細胞はヒト胚盤胞から単離できる。ヒト胚盤胞は、典型的には、ヒトｉｎ　ｖｉｖｏ着床前胚または体外受精（ＩＶＦ）胚から得られる。あるいは、ヒト胚の単一細胞を胚盤胞段階に拡張することもできる。ヒトＥＳ細胞の単離は、胚盤胞から透明帯を除去し、免疫外科法によって内部細胞塊（ＩＣＭ）を単離し、穏やかにピペッティングすることによって完全なＩＣＭから栄養外胚葉細胞を溶解して除去することによって実施する。次いで、適切な培地を入れた組織培養フラスコにＩＣＭを播種して増殖させる。９～１５日後、ＩＣＭ由来の増殖物を機械的に解離させることによってまたは酵素分解で解離させることによって凝集塊を得、次いで、細胞を新しい組織培養基に播種する。未分化形態を示すコロニーをマイクロピペットで１つ１つ選択し、機械的に解離させて凝集塊を得、再度播種する。その後、得られたＥＳ細胞を４～７日毎に定期的に分割する。ヒトＥＳ細胞調製法の詳細は、Ｔｈｏｍｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（米国特許第５，８４３，７８０号；Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８２：１１４５，１９９８；Ｃｕｒｒ．Ｔｏｐ．Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．３８：１３３，１９９８；Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９２：７８４４，１９９５）、Ｂｏｎｇｓｏ　ｅｔ　ａｌ．（Ｈｕｍ　Ｒｅｐｒｏｄ　４：７０６，１９８９）、およびＧａｒｄｎｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（Ｆｅｒｔｉｌ．Ｓｔｅｒｉｌ．６９：８４，１９９８）を参照。
【０１７３】
別のＥＳ細胞調製法が、Ｃｈｕｎｇ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ，Ｖｏｌｕｍｅ　２，Ｉｓｓｕｅ　２，１１３－１１７，７　Ｆｅｂｒｕａｒｙ　２００８中に記載される。この方法は、体外受精中に胚から単一細胞を除去することを有する。この方法によれば胚は破壊されない。
【０１７４】
本発明のある実施形態によれば市販の幹細胞も用い得ることが理解されるだろう。ヒトＥＳ細胞は、ＮＩＨ　ｈｕｍａｎ　ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌｓ　ｒｅｇｉｓｔｒｙより購入できる（ハイパーテキスト転送プロトコール：／／ｇｒａｎｔｓ（ｄｏｔ）ｎｉｈ（ｄｏｔ）ｇｏｖ／ｓｔｅｍ＿ｃｅｌｌｓ／ｒｅｇｉｓｔｒｙ／ｃｕｒｒｅｎｔ（ｄｏｔ）ｈｔｍ）。市販の胚性幹細胞系の例として、ＢＧ０１、ＢＧ０２、ＢＧ０３

、ＢＧ０４、ＣＹ１２、ＣＹ３０、ＣＹ９２、ＣＹ１０、ＴＥ０３、ＴＥ３２、ＣＨＢ－４、ＣＨＢ－５、ＣＨＢ－６、ＣＨＢ－８、ＣＨＢ－９、ＣＨＢ－１０、ＣＨＢ－１１、ＣＨＢ－１２、ＨＵＥＳ　１、ＨＵＥＳ　２、ＨＵＥＳ　３、ＨＵＥＳ　４、ＨＵＥＳ　５、ＨＵＥＳ　６、ＨＵＥＳ　７、ＨＵＥＳ　８、ＨＵＥＳ　９、ＨＵＥＳ　１０、ＨＵＥＳ　１１、ＨＵＥＳ　１２、ＨＵＥＳ　１３、ＨＵＥＳ　１４、ＨＵＥＳ　１５、ＨＵＥＳ　１６、ＨＵＥＳ　１７、ＨＵＥＳ　１８、ＨＵＥＳ　１９、ＨＵＥＳ　２０、ＨＵＥＳ　２１、ＨＵＥＳ　２２、ＨＵＥＳ　２３、ＨＵＥＳ　２４、ＨＵＥＳ　２５、ＨＵＥＳ　２６、ＨＵＥＳ　２７、ＨＵＥＳ　２８、ＣｙＴ４９、ＲＵＥＳ３、ＷＡ０１、ＵＣＳＦ４、ＮＹＵＥＳ１、ＮＹＵＥＳ２、ＮＹＵＥＳ３、ＮＹＵＥＳ４、ＮＹＵＥＳ５、ＮＹＵＥＳ６、ＮＹＵＥＳ７、ＵＣＬＡ　１、ＵＣＬＡ　２、ＵＣＬＡ　３、ＷＡ０７７（Ｈ７）、ＷＡ０９（Ｈ９）、ＷＡ１３（Ｈ１３）、ＷＡ１４（Ｈ１４）、ＨＵＥＳ　６２、ＨＵＥＳ　６３、ＨＵＥＳ　６４、ＣＴ１、ＣＴ２、ＣＴ３、ＣＴ４、ＭＡ１３５、Ｅｎｅａｖｏｕｒ－２、ＷＩＢＲ１、ＷＩＢＲ２、ＷＩＢＲ３、ＷＩＢＲ４、ＷＩＢＲ５、ＷＩＢＲ６、ＨＵＥＳ　４５、Ｓｈｅｆ　３、Ｓｈｅｆ　６、ＢＪＮｈｅｍ１９、ＢＪＮｈｅｍ２０、ＳＡ００１、およびＳＡ００１が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１７５】
また、ＥＳ細胞は、他の種からも得ることができる。上記種は、マウス（Ｍｉｌｌｓ　ａｎｄ　Ｂｒａｄｌｅｙ，２００１）、ゴールデンハムスター（Ｄｏｅｔｓｃｈｍａｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９８８，Ｄｅｖ　Ｂｉｏｌ．１２７：２２４－７）、ラット（Ｉａｎｎａｃｃｏｎｅ　ｅｔ　ａｌ．，１９９４，Ｄｅｖ　Ｂｉｏｌ．１６３：２８８－９２）、ウサギ（Ｇｉｌｅｓ　ｅｔ　ａｌ．１９９３，Ｍｏｌ　Ｒｅｐｒｏｄ　Ｄｅｖ．３６：１３０－８；Ｇｒａｖｅｓ＆Ｍｏｒｅａｄｉｔｈ，１９９３，Ｍｏｌ　Ｒｅｐｒｏｄ　Ｄｅｖ．１９９３，３６：４２４－３３）、一部の家畜種（Ｎｏｔａｒｉａｎｎｉ　ｅｔ　ａｌ．，１９９１，Ｊ　Ｒｅｐｒｏｄ　Ｆｅｒｔｉｌ　Ｓｕｐｐｌ．４３：２５５－６０；Ｗｈｅｅｌｅｒ　１９９４，Ｒｅｐｒｏｄ　Ｆｅｒｔｉｌ　Ｄｅｖ．６：５６３－８；Ｍｉｔａｌｉｐｏｖａ　ｅｔ　ａｌ．，２００１，Ｃｌｏｎｉｎｇ．３：５９－６７）、およびヒト以外の霊長類種（アカゲザルおよびマーモセット）（Ｔｈｏｍｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９５，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．９２：７８４４－８；Ｔｈｏｍｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，１９９６，Ｂｉｏｌ　Ｒｅｐｒｏｄ．５５：２５４－９）を含む。
【０１７６】
拡張胚盤胞細胞（ＥＢＣ）は、受精後９日目以降で原腸形成より前の段階の胚盤胞から得ることができる。胚盤胞を培養する前に透明帯を消化することによって（例えば、タイロード酸性液（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｓｔ　Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ、米国）を使用）、内部細胞塊を露出させる。次いで、受精後９日以上１４日を超えずに（すなわち原腸形成が生じる前まで）、胚盤胞を全胚として、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて、標準的な胚性幹細胞培養法により培養する。
【０１７７】
ＥＧ細胞は、妊娠約８～１１週（ヒト胎児の場合）の胎児から得た始原生殖細胞から、当技術分野の当業者に既知の実験技術によって調製する。生殖隆起を解離させて切断した小塊を、機械的に解離、脱凝集させることによって細胞を得る。次いで、ＥＧ細胞を、適切な培地を入れた組織培養フラスコ中で増殖させる。細胞は、培地を１日１回換えて、ＥＧ細胞の細胞形態と同様の細胞形態が観察されるまで培養する。典型的には、７～３０日間培養、または１～４回継代する。ヒトＥＧ細胞調製法の詳細は、Ｓｈａｍｂｌｏｔｔ　ｅｔ　ａｌ．（Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９５：１３７２６，１９９８）および米国特許第６，０９０，６２２号参照。
【０１７８】
人工多能性幹細胞（ｉＰＳ）（胚様幹細胞）は、体細胞から体細胞遺伝子操作によって、例えば、線維芽細胞、肝細胞、胃上皮細胞等の体細胞にＯｃｔ－３／４、Ｓｏｘ２、ｃ－

Ｍｙｃ、およびＫＬＦ４等の転写因子を、レトロウイルスを用いて形質導入することによって発生させることができる（Ｙａｍａｎａｋａ Ｓ，Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ．２００７，１（１）：３９－４９；Ａｏｉ Ｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ ｆｒｏｍ Ａｄｕｌｔ Ｍｏｕｓｅ Ｌｉｖｅｒ ａｎｄ Ｓｔｏｍａｃｈ Ｃｅｌｌｓ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．２００８ Ｆｅｂ １４．（電子出版、出版前）；ＩＨ Ｐａｒｋ，Ｚｈａｏ Ｒ，Ｗｅｓｔ ＪＡ，ｅｔ ａｌ．Ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｓｏｍａｔｉｃ ｃｅｌｌｓ ｔｏ ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ ｗｉｔｈ ｄｅｆｉｎｅｄ ｆａｃｔｏｒｓ．Ｎａｔｕｒｅ ２００８；４５１：１４１－１４６；Ｋ Ｔａｋａｈａｓｈｉ，Ｔａｎａｂｅ Ｋ，Ｏｈｎｕｋｉ Ｍ，ｅｔ ａｌ．Ｉｎｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ ｆｒｏｍ ａｄｕｌｔ ｈｕｍａｎ ｆｉｂｒｏｂｌａｓｔｓ ｂｙ ｄｅｆｉｎｅｄ ｆａｃｔｏｒｓ．Ｃｅｌｌ ２００７；１３１：８６１－８７２）。他の胚様幹細胞は、卵母細胞中への核移植、胚性幹細胞との融合、またはレシピエント細胞の有糸分裂が抑止されている場合には接合体中への核移植により、発生させることができる。

【０１７９】

染色体Ｘ不活性化は哺乳類の雌における初期発生過程であり、Ｘ染色体２つのうち１つの転写が抑制されて雄と雌の間で遺伝子量補償がなされる。このプロセスは、染色体Ｘ上のＸ不活性化センター（ＸＩＣ）とよばれる領域を含むいくつかの因子によって調節される。ＸＩＣは、いくつかの非翻訳遺伝子およびタンパク質コード遺伝子を有し、ＸＩＣ中で最初に同定された非翻訳遺伝子がＸＩＳＴ遺伝子である。

【０１８０】

ＸＩＳＴ体が存在すると不活性Ｘ染色体のＸＩＣから限定的にＸＩＳＴが発現され、この発現はＸ不活性化の拡大に必須となる。

【０１８１】

ＸＩＳＴ遺伝子のメチル化ステータスを、種々の方法、例えばＸＩＳＴ遺伝子のプロモーター領域のバイサルファイトシーケンシング等（Ｌｅｎｇｎｅｒ Ｃｅｌｌ １４１，８７２－８８３（２０１０）；Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １４３，５０８－５２５（２０１０）、両文献の全体を参考として本明細書に組み込む）によって決定できる。ＸＩＳＴプロモーター領域を以下のＰＣＲプライマー、すなわち、順方向プライマー（バイサルファイト処理ＤＮＡに使用）である５’－ｔａａ ａｔｔ ｔｔａ ａａｔ ｔａａ ｔｔａ ａａｔ ｔａｔ（配列番号２２）、および逆方向プライマー（バイサルファイト処理ＤＮＡに使用）である５’－ｔｇｔ ｔｔｔ ａｇａ ａａｇ ａａｔ ｔｔｔ ａａｇ ｔｇｔ ａｇａ ｇａ（配列番号２３）によって増幅させることができる。上記プライマーで増幅させたアンプリコン領域（ヒトＸＩＳＴ転写開始点を包含する２０３ｂｐ）を、配列番号７０に記載する。こうしたＸＩＳＴバイサルファイトシーケンシングによって得られる結果について、その代表的なものを図２３Ａ中に示す。ＸＩＳＴプロモーターアンプリコンのＣｐＧアイランドを、図２７中に黄色で強調して示す。

【０１８２】

ＸＩＳＴ遺伝子のメチル化特異的ＰＣＲアッセイについて以下に説明するが、これに限定されない。ゲノムＤＮＡのバイサルファイト処理を、ＥｐｉＴｅｃｔ Ｂｉｓｕｌｆｉｔｅ ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ、ドイツ）を用いて実施する。この亜硫酸水素ナトリウム処理を実施することによって、メチル化特異的ＰＣＲ（ＭＳ－ＰＣＲ）においてメチル化ＤＮＡと非メチル化ＤＮＡとを区別できる。精製された非メチル化およびメチル化ヒトＤＮＡの標準（メチル化検出に用いるネガティブコントロールおよびポジティブコントロールとして使用）は、Ｈｕｍａｎ Ｍｅｔｈｙｌａｔｅｄ＆Ｎｏｎ－ｍｅｔｈｙｌａｔｅｄ ＤＮＡ ｓｅｔ（Ｚｙｍｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、米国）を含む。各試料の分析を、ＭＳ－ＰＣＲ反応を独立して２回実施することにより行う。ＰＣＲ反応では、２Ｘ ＰＣＲ ＨｏｔＳｔａｒｔ Ｐｒｅｍｉｘ ｂｕｆｆｅｒ（Ｔａｋａｒａ、東京、日本）と、メチル化インプリントを特異的に増幅するＰＣＲ反応では０．５μＭの順方向プライマーＭおよび

０．５μＭの逆方向プライマーＭ、または非メチル化ＰＣＲでは０．５μＭの順方向プライマーＵおよび０．５μＭの逆方向プライマーＵと、２μｌのバイサルファイト修飾ＤＮＡと、を含有するＰＣＲ反応混合液２５μｌを用いた。ＸＩＳＴ遺伝子のメチル化および非メチル化特異的ＰＣＲに用いるプライマー対は、非メチル化順方向５’－ＴＧＴＴＴＴＴＴＴＧＴＴＴＡＴＴＧＧＧＧＴＴＧＴＧ（配列番号２１；Ｍ９７１６８、６９１－７１５）および非メチル化逆方向５’－ＡＣＡＡＣＴＡＡＣＣＴＡＡＡＣＣＡＡＡＴＴＡＴＡＣＡ（配列番号６７；Ｍ９７１６８、９４４－９７０）、またメチル化順方向５’－ＴＧＴＴＴＴＴＴＴＧＴＴＴＡＴＣＧＧＧＧＴＣＧＣＧ（配列番号６８；Ｍ９７１６８、６９１－７１５）およびメチル化逆方向５’－ＣＧＡＡＴＴＡＴＡＣＧＡＣＡＡＡＴＣＴＡＡＡＡＴＡＡＣＧ（配列番号６９；Ｍ９７１６８、９２７－９５４）を含み、これらは他に記載の通りに用いることができ（Ｋａｗａｋａｍｉ Ｔ，ｅｔ ａｌ．，Ｌａｎｃｅｔ．２００４ Ｊａｎ ３；３６３（９４０２）：４０－２．ＸＩＳＴ ｕｎｍｅｔｈｙｌａｔｅｄ ＤＮＡ ｆｒａｇｍｅｎｔｓ ｉｎ ｍａｌｅ－ｄｅｒｉｖｅｄ ｐｌａｓｍａ ａｓ ａ ｔｕｍｏｕｒ ｍａｒｋｅｒ ｆｏｒ ｔｅｓｔｉｃｕｌａｒ ｃａｎｃｅｒ、その全体を参考として本明細書に組み込む）、その際のＰＣＲ条件は以下の通りである。ポリメラーゼを９５℃において５分間活性化する。ＤＮＡを、９４℃、６０℃、７２℃において各４５秒間、３５サイクルにわたって増幅させ、続いて最後の伸長を７２℃において５分間実施する。得られるＰＣＲ断片は、メチル化対立遺伝子（Ｍ）については２６４ｂｐ（塩基対）、非メチル化対立遺伝子（Ｕ）については２８０ｂｐである。ＰＣＲ産物を２％アガロースゲルで分離し、臭化エチジウム染色し、紫外線照射によって可視化する。

【０１８３】

付加的にまたは代替的に、ＸＩＳＴ遺伝子のメチル化ステータスは、メチル化感受性制限酵素およびＸＩＳＴ遺伝子（またはＣｐＧアイランド）特異的プローブを用いたサザンブロット解析によって、本質的にＬｅｎｇｎｅｒ Ｃｅｌｌ １４１，８７２－８８３（２０１０）およびＨａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １４３，５０８－５２５（２０１０）中に記載される通りに決定できる。両文献の全体を参考として本明細書に組み込む。細胞中のＸＩＳＴ遺伝子のメチル化ステータスを決定するために用い得るメチル化アッセイについて以下に説明するが、これに限定されない（ＴＡＫＡＳＨＩ ＳＡＤＯ ｅｔ ａｌ．，ＤＥＶＥＬＯＰＭＥＮＴＡＬ ＤＹＮＡＭＩＣＳ ２０５：４２１－４３４（１９９６）．Ｍｏｓａｉｃ Ｍｅｔｈｙｌａｔｉｏｎ ｏｆ Ｘｉｓｔ Ｇｅｎｅ Ｂｅｆｏｒｅ Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ Ｉｎａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｉｎ Ｕｎｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｅｄ Ｆｅｍａｌｅ Ｍｏｕｓｅ Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ Ｓｔｅｍ ａｎｄ Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ Ｇｅｒｍ Ｃｅｌｌｓ、その全体を参考として本明細書に組み込む）。細胞からゲノムＤＮＡを、既知の方法（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇｓ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９，１９９２））によって調製する。簡潔には、１０μｇのＤＮＡを、メチル化感受性酵素（ＨｐａＩＩ、ＣｆｏＩ、ＭＺｕＩ、ＳａｃＩＩ、およびＡｕａＩ）の１つとＥｃｏＲＩまたはＥｃｏＲＩ＋ＰｕｕＩＩとを組み合わせたもので、製造元の推奨に従って消化する。消化は、各酵素を１０倍過剰量含有する反応液３００μｌ中で一晩実施する。制限酵素消化後のＤＮＡをフェノール抽出により精製し、エタノールで沈澱させ、１％または２％アガロースゲルにより電気泳動し、Ｈｙｂｏｎｄ Ｎ＋（Ａｍｅｒｓｈａｍ、Ｂｕｃｋｉｎｇｈａｍｓｈｉｒｅ、英国）にブロットし、無作為のプライミングにより標識済の、Ｘｉｓｔ５’部分のｃＤＮＡ断片（プローブ１）または５’上流領域のゲノムＨｐａＩ－ＭｌｕＩ断片（プローブ２）により、プローブする。続いて、メンブレン製造元の推奨に従って洗浄する。

【０１８４】

このように、当業者であれば、ＸＩＳＴの非メチル化対立遺伝子とＸＩＳＴのメチル化対立遺伝子を区別できるため、ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有する女性細

胞と、ＸＩＳＴのメチル化対立遺伝子１つおよびＸＩＳＴの非メチル化対立遺伝子１つを有する女性細胞とを容易に区別できる。同様に、当業者であれば、メチル化ＸＩＳＴ対立遺伝子を有する男性細胞と非メチル化ＸＩＳＴ対立遺伝子を有する男性細胞とを容易に区別できる。

【０１８５】

上述のように、上記霊長類（例えばヒト）単離ナイーブ型ＰＳＣは未分化多能性状態（三種の胚性胚葉のいずれにも分化できる状態）にある。

【０１８６】

ｈｉＰＳＣまたはｈＥＳＣ等のプライム型ヒトＰＳＣを、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、ＪＮＫ阻害剤、およびＰ３８阻害剤と共にインキュベートすることによって分化誘導する（Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ １４３，５０８－５２５（２０１０）；Ｄｅ Ｌｏｓ Ａｎｇｅｌｅｓ，ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．Ｄｅｖ．２２，２７２－２８２（２０１２））。

【０１８７】

既知のプライム型ＰＳＣとは異なり、本発明のある実施形態のナイーブ型ＰＳＣは、ＢＭＰ４、ＪＮＫ阻害剤、および／またはＰ３８阻害剤による分化誘導に「耐性がある」。したがって、図２１（Ａ～Ｌ）～２２（Ａ～Ｈ）中に示すように、上記ナイーブ型ＰＳＣをＢＭＰ４またはフォルスコリンと共にインキュベートしても、上記ナイーブ型ＰＳＣの未分化多能性状態は変化しなかった。

【０１８８】

本発明のある実施形態によれば、上記単離ナイーブ型ＰＳＣは、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、ＪＮＫ阻害剤、およびＰ３８阻害剤からなる群より選択される薬剤の存在下においてインキュベートされると多能性状態を維持する。

【０１８９】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣは、プライム型ＰＳＣの場合と比較してｐ３８経路が阻害されている。例えば、上記ナイーブ型ＰＳＣにおいてはｐ３８活性が阻害されている。

【０１９０】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣ中におけるｐ３８　ＲＮＡおよび／またはリン酸化ｐ３８タンパク質のレベルは、同様条件下でｐ３８阻害に供せずにインキュベートおよび／または培養した非ナイーブ型ＰＳＣ中のｐ３８　ＲＮＡおよび／またはリン酸化ｐ３８タンパク質それぞれのレベルの約３０％未満、例えば約２０％未満、例えば約５％未満、例えば約０．５％未満、例えば約０．１％未満である。

【０１９１】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣは、プライム型ＰＳＣの場合と比較してＪＮＫ経路が阻害されている。例えば、上記ナイーブ型ＰＳＣにおいてはＪＮＫ活性が阻害されている。

【０１９２】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣ中におけるＪＮＫ　ＲＮＡおよび／またはリン酸化ＪＮＫタンパク質のレベルは、同様条件下でＪＮＫ阻害に供せずにインキュベートおよび／または培養した非ナイーブ型ＰＳＣ中のＪＮＫ　ＲＮＡおよび／またはリン酸化ＪＮＫタンパク質それぞれのレベルの約３０％未満、例えば約２０％未満、例えば約５％未満、例えば約０．５％未満、例えば約０．１％未満である。

【０１９３】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣは、プライム型ＰＳＣの場合と比較してＲＯＣＫ経路が阻害されている。例えば、上記ナイーブ型ＰＳＣにおいてはＲＯＣＫ活性が阻害されている。

【０１９４】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣ中におけるＲＯＣＫ　ＲＮＡおよび／またはリン酸化ＲＯＣＫタンパク質のレベルは、同様条件下でＲＯＣＫ阻害に供せず

にインキュベートおよび／または培養した非ナイーブ型ＰＳＣ中のＲＯＣＫ　ＲＮＡおよび／またはリン酸化ＲＯＣＫタンパク質それぞれのレベルの約３０％未満、例えば約２０％未満、例えば約５％未満、例えば約０．５％未満、例えば約０．１％未満である。

【０１９５】

多能性幹細胞の分化状態の監視　培養工程において、上記多能性幹細胞の分化状態をさらに監視する。細胞分化は、分化の指標として知られる細胞または組織特異的マーカーを検査することによって決定できる。例えば、霊長類ＰＳＣは、段階特異的な胚抗原（ＳＳＥＡ）４、ならびに腫瘍拒絶抗原（ＴＲＡ）１－６０およびＴＲＡ－１－８１を発現する場合がある。未分化多能性幹細胞はＳＳＥＡ４、ＴＲＡ－１－６０、およびＴＲＡ－１－８１のマーカーを多く発現し、分化する際にはそれらの発現が下方調節される。

【０１９６】

組織／細胞特異的マーカーは、当技術分野において公知の免疫学的技術によって検出できる［Ｔｈｏｍｓｏｎ　ＪＡ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９８）．Ｓｃｉｅｎｃｅ　２８２：１１４５－７］。例として、膜結合マーカーに対してはフローサイトメトリー、細胞外および細胞内マーカーに対しては免疫組織化学的検査、および分泌された分子マーカーに対しては酵素イムノアッセイが含まれるが、これらに限定されない。

【０１９７】

ＰＳＣ分化の決定は、アルカリホスファターゼ活性の測定によっても実施できる。未分化のヒトＥＳ細胞はアルカリホスファターゼ活性を有する。この活性は、細胞を４％パラホルムアルデヒドによって固定し、Ｖｅｃｔｏｒ　Ｒｅｄ　ｓｕｂｓｔｒａｔｅ　ｋｉｔ（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｂｕｒｌｉｎｇａｍｅ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ、米国）を製造元の指示書通りに用いて展開することによって検出できる。

【０１９８】

本発明のある実施形態の一態様によれば、本発明のある実施形態の単離ヒトナイーブ型ＰＳＣ細胞を少なくとも約１０％、少なくとも約１２％、少なくとも約１４％、少なくとも約１６％、少なくとも約１８％、少なくとも約２０％、少なくとも約２２％、少なくとも約２４％、少なくとも約２６％、少なくとも約２８％、少なくとも約３０％、少なくとも約３２％、少なくとも約３４％、少なくとも約３６％、少なくとも約３８％、少なくとも約４０％、少なくとも約４２％、少なくとも約４４％、少なくとも約４６％、少なくとも約４８％、少なくとも約５０％、少なくとも約５５％、少なくとも約６０％、少なくとも約６５％、少なくとも約７０％、少なくとも約７５％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、少なくとも約９６％、少なくとも約９７％、少なくとも約９８％、少なくとも約９９％、例えば１００％含む単離ナイーブ型ＰＳＣ集団が提供される。

【０１９９】

本発明の特定の実施形態によれば、上記単離細胞集団は一種以上のマーカーに対して陽性である。陽性は（＋）とも略記する。マーカーに対して陽性とは、当業者に既知の方法（例えば、蛍光標示式細胞分取（ＦＡＣＳ）分析、免疫蛍光、免疫組織化学的検査、ウェスタンブロット解析）によりアッセイした際に、集団中の細胞のうち少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約８５％、少なくとも約９０％、少なくとも約９５％、または少なくとも約１００％が、そのマーカー（例えば、ＯＣＴ４、ＮＡＮＯＧ、ＴＲＡ１－８１、ＴＲＡ１－６０、ＳＳＥＡ３、ＳＳＥＡ４）を検出可能なレベルで呈することを意味する。したがって、例えば、抗ＳＳＥＡ３抗体を用いたＦＡＣＳによる細胞の染色が陽性であった場合、またはＯＣＴ４抗体を用いた免疫蛍光もしくは免疫組織化学的検査による染色が陽性であった場合を意味する。この実施形態によるＯＣＴ４、ＮＡＮＯＧ、ＴＲＡ１－８１、ＴＲＡ１－６０、ＳＳＥＡ３、ＳＳＥＡ４に対して陽性である細胞は、例えばＳＳＥＡ１等一種以上のマーカーでの染色が陰性となる。陰性は（－）とも略記する。マーカーに対して陰性とは、免疫蛍光またはＦＡＣＳ等の当業者に既知の方法によりアッセイした際に、集団中の細胞のうち約３０％を超えない、約２５％を超えない、約２０％を超えない、約１５％を超えない、約１０％を超えない、約５％を超えない、約４％

を超えない、約３％を超えない、約２％を超えない、約１％を超えない細胞が、そのマーカー（例えばＳＳＥＡ１）を検出可能なレベルで呈することを意味する。このようにマーカーを呈することを、単一細胞または単離細胞集団のいずれの場合においても、符号ともよぶ。

【０２００】

図１２Ｆおよび２５Ｂ～Ｍ中に示すように、本発明者らは、ナイーブ型ＰＳＣを約９９％有する幹細胞集団を示した。

【０２０１】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣはＸＩＳＴを発現する。

【０２０２】

ＸＩＳＴ発現の検出方法は技術分野において公知であり、例えば、図２３Ｂ中に示すように、ＸＩＳＴ特異的ＰＣＲプライマー、例えば順方向プライマーである５’－ＡＧＧＧＡＧＣＡＧＴＴＧＣＣＣＴＡＣＴ（配列番号２４）および逆方向プライマーである５’－ＣＡＣＡＴＧＣＡＧＣＧＴＧＧＴＡＴＣＴＴ（配列番号２５）を用いる逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（ＲＴ－ＰＣＲ）分析を含む。

【０２０３】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣはＸＩＳＴ体を含まない。

【０２０４】

本明細書中において、記載「ＸＩＳＴ体」は、ＸＩＳＴ被覆不活性Ｘ染色体を指す。

【０２０５】

ＸＩＳＴ体の検出方法は当技術分野において公知であり、例えばＲＮＡ蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーションを含む。ＲＮＡ蛍光ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション（ＦＩＳＨ）は、以前の記載通りに実施する（Ｈａｎｎａ　Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　１４３，５０８－５２５）。簡潔には、ヒト多能性幹細胞を回収し、ＭＥＦを欠損させ、スライドガラス上でサイトスピンにより遠心分離した後、固定する。ＸＩＳＴエクソン１（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号Ｕ８０４６０：６１２５１－６９４４９、配列番号２６）およびエクソン６（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号Ｕ８０４６０：７５０８１－７８６５８、配列番号２７）のｃＤＮＡプローブを作製し、ニックトランスレーション（Ｒｏｃｈｅ）によりＣｙ３－ｄＵＴＰ（Ａｍｅｒｓｈａｍ）で標識し、Ｃｏｔ－１　ＤＮＡをＰｒｉｍｅ－Ｉｔ　Ｆｌｕｏｒ　Ｌａｂｅｌｉｎｇ　Ｋｉｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を用いてフルオレセイン－１２－ｄＵＴＰで標識する。

【０２０６】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣはＨ３Ｋ２７ｍｅ３／ポリコーム集積を含まない。

【０２０７】

本明細書中において、記載「Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３／ポリコーム集積」は免疫染色後に得られる核内集積を指し、不活性Ｘ染色体が凝縮されたものに相当する。

【０２０８】

Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３／ポリコーム集積の検出方法は当技術分野において公知であり、例えば、図２３Ｃ～Ｄ等に示すように、抗Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３抗体（例えば、ウサギ抗Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、ＣＡ、米国、カタログ番号：０７－４４９）を用いた免疫蛍光分析を含む。

【０２０９】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣは、Ｘ染色体がいずれも不活性化されておらずＸＩＳＴ体が存在しないナイーブ状態では、ＸＩＳＴ発現レベルが低い。

【０２１０】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣは分化誘導されるとＸ不活性化可能となる。

【０２１１】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣは、内胚葉性、中胚葉性、および

外胚葉性の胚性胚葉に分化できる。
【０２１２】
幹細胞が内胚葉性、中胚葉性、および外胚葉性の胚性胚葉に分化する能力を決定する方法は、例えば、後述の実施例部分ならびに図１２Ｌ～Ｎ、図１３Ｋ～Ｍ、図１３Ｓ～Ｕ、図１９Ａ～Ｉ、および図２０Ａ～Ｔ等の図に示すように、胚型体（ｉｎ　ｖｉｔｒｏ）またはテラトーマ（ｉｎ　ｖｉｖｏ）の発生を含む。
【０２１３】
本明細書中において、記載「胚型体」（ＥＢ）は、三種の胚性胚葉の分化および未分化細胞派生物について、その三次元多細胞凝集体を指す。
【０２１４】
胚型体は、フィーダー細胞層非添加培養系またはフィーダー細胞非添加培養系から上記ナイーブ型ＰＳＣを取り出すと形成される。ナイーブ型ＰＳＣは、短時間のＩＶ型コラゲナーゼ処理またはトリプシンによって取り出すことができる。細胞を培養面から剥がし、血清およびアミノ酸を添加した培養基を入れた組織培養プレートに移す。
【０２１５】
培養期間中、ＥＢの分化状態をさらに監視する。細胞分化は、分化の指標として知られる細胞または組織特異的マーカーを検査することによって決定できる。例えば、ＥＢ由来分化細胞は、外胚葉細胞系譜に特有のマーカーである６８ＫＤの神経フィラメントを発現する場合がある。
【０２１６】
ＥＢ細胞の分化レベルは、Ｏｃｔ－４発現の喪失、ならびにα－フェトプロテイン、６８ｋＤａのＮＦ、α－心臓マーカー、およびアルブミン等の他のマーカーの発現レベルの増加を追跡することによって監視できる。特定遺伝子の発現レベルの監視に有用な方法は当技術分野において公知であり、ＲＴ－ＰＣＲ、半定量ＲＴ－ＰＣＲ、ノーザンブロット、ＲＮＡ　ｉｎ　ｓｉｔｕハイブリダイゼーション、ウェスタンブロット解析、および免疫組織化学的検査を含む。
【０２１７】
テラトーマ：本発明のある実施形態のナイーブ型ＰＳＣの多能性能は、細胞をＳＣＩＤマウスに注入することによっても確認でき［Ｅｖａｎｓ　ＭＪ　ａｎｄ　Ｋａｕｆｍａｎ　Ｍ（１９８３）．　Ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔｉａｌ　ｃｅｌｌｓ　ｇｒｏｗｎ　ｄｉｒｅｃｔｌｙ　ｆｒｏｍ　ｎｏｒｍａｌ　ｍｏｕｓｅ　ｅｍｂｒｙｏｓ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｓｕｒｖ．２：１８５－２０８］、注入するとテラトーマが形成される。テラトーマを４％パラホルムアルデヒドにより固定し、三胚葉（すなわち内胚葉、中胚葉、および外胚葉）について組織学的に検査する。
【０２１８】
分化状態の監視に加えて、細胞学的ユープロイディティを確認するために、上記ナイーブ型ＰＳＣの核型を監視することが多い。細胞学的ユープロイディティとは、全染色体が存在すること、そして培養中の変化が検出不可能な程度であること、である。培養したナイーブ型ＰＳＣの核型分析は、標準的なギムザ染色で、対応する種について発表されている核型と比較することによって実施できる。
【０２１９】
本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣは、約２０回を超えて継代培養しても、例えば少なくとも約２５回、少なくとも約３０回、少なくとも約３５回、少なくとも約４０回、少なくとも約４５回、少なくとも約５０回、少なくとも約５５回、少なくとも約６０回、少なくとも約６５回、少なくとも約７０回、少なくとも約７５回、および少なくとも約８０回継代培養しても、ナイーブ状態を維持したまま（上記に定義）未分化多能性状態を維持できる。
【０２２０】
本発明のある実施形態によれば、未分化で多能性のナイーブ状態（上記に定義）で維持される上記ナイーブ型ＰＳＣは、ＳＯＸ１発現レベルが、同一のＳＯＸ１アッセイ条件下に

おけるプライム型ＰＳＣ（例えばプライム型ＥＳＣ）のＳＯＸ１発現レベルと比較して有意に低い。また、上記プライム型ＰＳＣは、ＸＩＳＴのメチル化対立遺伝子１つおよびＸＩＳＴの非メチル化対立遺伝子１つ（女性細胞中）またはＸＩＳＴのメチル化対立遺伝子１つ（男性細胞中）を呈し、ＸＩＳＴを発現し、ＸＩＳＴ体を呈し、かつＨ３Ｋ２７ｍｅ３／ポリコーム集積を呈する。

【０２２１】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣのＭＨＣクラスＩの発現レベルは、同一検出アッセイ条件下におけるプライム型ＰＳＣの場合より低く、上記プライム型ＰＳＣは、ＸＩＳＴのメチル化対立遺伝子１つおよびＸＩＳＴの非メチル化対立遺伝子１つ（女性細胞中）またはＸＩＳＴのメチル化対立遺伝子１つ（男性細胞中）を呈し、ＸＩＳＴを発現し、ＸＩＳＴ体を呈し、かつＨ３Ｋ２７ｍｅ３／ポリコーム集積を呈する。

【０２２２】

ＭＨＣクラスＩのレベルは、当技術分野において公知の種々の方法、例えば、特異的抗体を用いてＭＨＣクラスＩ分子の表面発現を検出し（例えば図２４Ｂおよび図２４Ｃ参照）、蛍光標識抗ＨＬＡ－Ａ抗体、抗ＨＬＡ－Ｂ抗体、抗ＨＬＡ－Ｃ抗体（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いるＦＡＣＳ分析等によって決定できる。

【０２２３】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣは、染色体上で休止しているＲＮＡポリメラーゼＩＩが、同一アッセイ条件下におけるプライム型ＰＳＣの場合よりも少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、少なくとも約８０％、少なくとも約９０％多いことを特徴とし、上記プライム型ＰＳＣは、ＸＩＳＴのメチル化対立遺伝子１つおよびＸＩＳＴの非メチル化対立遺伝子１つ（女性細胞中）またはＸＩＳＴのメチル化対立遺伝子１つ（男性細胞中）を呈し、ＸＩＳＴを発現し、ＸＩＳＴ体を呈し、かつＨ３Ｋ２７ｍｅ３／ポリコーム集積を呈する。

【０２２４】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型ＰＳＣは、ヒト内部細胞塊（ＩＣＭ）の前Ｘ不活性化ステータスに類似する前Ｘ不活性化ステータスを呈する。

【０２２５】

本発明のある実施形態の一態様によれば、本発明のある実施形態の単離ナイーブ型ＰＳＣ、または本発明のある実施形態の単離ナイーブ型ＰＳＣ集団、および培養基を含有する細胞培養液が提供される。

【０２２６】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、少なくとも１０回継代するあいだ上記ナイーブ型ＰＳＣを未分化多能性状態で維持できる。

【０２２７】

上記細胞培養液は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて培養条件下で維持でき、この際、細胞は、ナイーブ型で多能性の未分化状態を維持したまま長期間継代される（例えば、少なくとも２０回継代される、例えば少なくとも約３０回、少なくとも約４０回、少なくとも約５０回、少なくとも約６０回、少なくとも約７０回、少なくとも約８０回、少なくとも約９０回、少なくとも約１００回、またはそれを超えて継代される）。

【０２２８】

本明細書中において、記載「培養基」は、幹細胞の増殖を補助し幹細胞を未分化状態で維持するために用いる固体または液状物質を指す。好ましくは、記載「培養基」は、本明細書中において、幹細胞を未分化状態で維持できる液状物質を指す。本発明に用いる培養基は、塩、栄養剤、無機物、ビタミン、アミノ酸、核酸、ならびにサイトカイン、増殖因子、およびホルモン等のタンパク質といった物質を組み合わせて含有する水系培地であり得る。これらの物質はいずれも細胞増殖に必要であり、また、幹細胞を未分化状態で維持できる。例えば、培養基は、Ｋｏ－ＤＭＥＭ（Ｇｉｂｃｏ－Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎの製品、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ、米国）、ＤＭＥＭ／Ｆ１２

（Ｇｉｂｃｏ－Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎの製品、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ、米国）、またはＤＭＥＭ／Ｆ１２（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ、Ｂｉｅｔ　Ｈａｅｍｅｋ、イスラエル）等の合成組織培養基に、以下にさらに記載する必須の添加剤を添加したものであり得る。好ましくは、本発明の培養基に含有される成分はいずれも実質的に純粋であり、組織培養グレードである。

【０２２９】

本発明者らは、ナイーブ型ＰＳＣを発生させ多能性未分化状態で維持するために用い得る新規の培養基を明らかにした。その結果、図１２Ａ～Ｇ、８５Ａ～Ｃ、１０２、１０３、１０４、および１０５、表３、４、および５、ならびに後述の実施例部分に記載するように困難な実験を実施した結果、本発明者らは、ナイーブ型ＰＳＣを「ナイーブ状態」で維持するのに必要な因子を明らかにした。このことを、ＯＣＴ４－ＧＦＰ＋（陽性）細胞の発現および総メチル化シトシンの割合（パーセント）（％５ｍｄＣ）によって証明した。

【０２３０】

本発明のある実施形態の一態様によれば、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３β阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＳＴＡＴ３活性化因子、ならびに塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）、プロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤、およびＮＯＴＣＨ阻害剤からなる群より選択される少なくとも一種の薬剤を含有する、培養基が提供される。

【０２３１】

本発明のある実施形態の一態様によれば、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３β阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＳＴＡＴ３活性化因子、ならびに形質転換増殖因子受容体（ＴＧＦＲ）阻害剤、線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤、プロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤、およびＮＯＴＣＨ阻害剤からなる群より選択される少なくとも一種の薬剤を含有する、培養基が提供される。

【０２３２】

本明細書中において、用語「ＳＴＡＴ３」は、シグナリング兼転写活性化因子３遺伝子産物（急性期反応因子）（遺伝子ＩＤ　６７７４）を指す
。ＳＴＡＴファミリーのメンバーは、サイトカインおよび増殖因子に応答して受容体関連キナーゼによりリン酸化され、次いでホモダイマーまたはヘテロダイマーを形成する。このホモダイマーまたはヘテロダイマーは細胞核に移動し、転写活性化剤として作用する。既知のＳＴＡＴ３活性化因子は、インターフェロン（ＩＦＮ）、上皮増殖因子（ＥＧＦ）、インターロイキン５（ＩＬ５）、インターロイキン６（ＩＬ６）、肝細胞増殖因子（ＨＧＦ）、白血病抑制因子（ＬＩＦ）、および骨形成タンパク質２（ＢＭＰ２）を含むが、これらに限定されない。

【０２３３】

本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の培地、細胞、および／または方法に用いるＳＴＡＴ３活性化因子は、ＬＩＦ、ＩＬ６、およびＥＧＦからなる群より選択される。

【０２３４】

本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の培地、細胞、および／または方法に用いるＳＴＡＴ３活性化因子は、ＬＩＦおよびＩＬ６からなる群より選択される。

【０２３５】

本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の培地、細胞、および／または方法に用いるＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦである。

【０２３６】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ１）、インスリン様増殖因子ＩＩ（ＩＧＦＩＩ）、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）シグナリング阻害剤、ソニックヘッジホッグ経路（ＳＨＨ）阻害剤、ＥＲＫ５阻害剤、フォルスコリン、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からな

る群より選択される少なくとも一種のさらなる薬剤をさらに含有する。
【０２３７】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ１）、インスリン様増殖因子ＩＩ（ＩＧＦＩＩ）、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、ソニックヘッジホッグ経路（ＳＨＨ）阻害剤、ＥＲＫ５阻害剤、フォルスコリン、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される少なくとも一種のさらなる薬剤をさらに含有する。
【０２３８】
本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、上記少なくとも一種の薬剤はＰＫＣ阻害剤を含む。
【０２３９】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＦＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。
【０２４０】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＴＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。
【０２４１】
本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、上記少なくとも一種の薬剤はＴＧＦβ１およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含む。
【０２４２】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＦＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。
【０２４３】
本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、上記少なくとも一種の薬剤はｂＦＧＦおよびＴＧＦβ１を含む。
【０２４４】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する。
【０２４５】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はプロテインキナーゼＣ阻害剤をさらに含有する。
【０２４６】
本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、上記少なくとも一種の薬剤は、ｂＦＧＦ、ＲＯＣＫ阻害剤、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）阻害剤、ＮＯＴＣＨ阻害剤、および形質転換増殖因子受容体（ＴＧＦＲ）阻害剤を含む。
【０２４７】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はソニックヘッジホッグ経路（ＳＨＨ）阻害剤をさらに含有する。
【０２４８】
本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、上記少なくとも一種の薬剤はＮＯＴＣＨ阻害剤および線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤を含む。
【０２４９】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、インスリン様増殖因子ＩＩ（ＩＧＦＩＩ）、幹細胞因子（ＳＣＦ）、および形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）からなる群より選択される薬剤をさらに含有する。
【０２５０】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する。
【０２５１】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤（ＦＧＦＲｉ）をさらに含有する。
【０２５２】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基は形質転換増殖因子受容体阻害剤（ＴＧＦＲｉ）をさらに含有する。

【０２５３】

本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する上記培養基は、線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤（ＦＧＦＲｉ）をさらに含有する。

【０２５４】

本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する上記培養基は、形質転換増殖因子受容体阻害剤（ＴＧＦＲｉ）をさらに含有する。

【０２５５】

本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する上記培養基は、線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤（ＦＧＦＲｉ）および形質転換増殖因子受容体阻害剤（ＴＧＦＲｉ）をさらに含有する。

【０２５６】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＴＧＦβ１、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する。

【０２５７】

本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＴＧＦβ１、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培地は、ＦＧＦＲ阻害剤（ＦＧＦＲｉ）をさらに含有する。

【０２５８】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、および形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）を含有する。

【０２５９】

本明細書中において、用語「白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）」は、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＭ＿００１２５７１３５（配列番号３０）に記載のヌクレオチド配列にコードされるＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００１２４４０６４．１（配列番号１１９）に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。好ましくは、本発明のある実施形態による方法に用いるＬＩＦは、本明細書中に記載の他の因子と共に、ナイーブ型霊長類（例えばヒト）ＰＳＣの未分化における増殖を、その多能性能を維持したまま補助できる。ＬＩＦは、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、およびＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ等の種々の製造元から入手できる。

【０２６０】

本発明のある実施形態によれば、ＬＩＦは、１ミリリットルあたり約０．５ナノグラム（ｎｇ／ｍｌ）～約１０００ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～１０００ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～９００ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～８００ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～７００ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～６００ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～５００ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～４００ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～３００ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～２００ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～１００ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～５０ｎｇ／ｍｌ、例えば約２～５０ｎｇ／ｍｌ、例えば約４～５０ｎｇ／ｍｌ、例えば約５～５０ｎｇ／ｍｌ、例えば約１０～５０ｎｇ／ｍｌ、例えば約１０～４０ｎｇ／ｍｌ、例えば約１０～３０ｎｇ／ｍｌ、例えば約２０ｎｇ／ｍｌの範囲の濃度で提供される。

【０２６１】

本明細書中において、用語「インターロイキン６（ＩＬ６）」は、ＧｅｎＢａｎｋ受入番

号ＮＭ＿０００６００．３（配列番号１１１）に記載の核酸にコードされるＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿０００５９１．１（配列番号１２０）に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドを指す。好ましくは、本発明のある実施形態による方法に用いるＩＬ６は、本明細書中に記載の他の因子と共に、ナイーブ型霊長類（例えばヒト）ＰＳＣの未分化における増殖を、その多能性能を維持したまま補助できる。ＩＬ６は、Ｓｐｅｅｄ　ＢｉｏＳｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、およびＲ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ等の種々の製造元から入手できる。

【０２６２】

本発明のある実施形態によれば、ＩＬ６は、約０．１ｎｇ／ｍｌ～約１００ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～９０ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～８０ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～７０ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～５０ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～４０ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～３０ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～２０ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～１０ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～８ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～７ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～６ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～５ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～４ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～３ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～４ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．５～４ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．５～４ｎｇ／ｍｌ、例えば約３ｎｇ／ｍｌの範囲の濃度で提供される。

【０２６３】

本明細書中において、記載「ＴＧＦβ１」は、形質転換増殖因子ベータのアイソフォームベータ１（β１）（例えば、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＭ＿０００６６０．５および配列番号３１に示す配列にコードされるＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿０００６５１および配列番号２８のホモ・サピエンスＴＧＦβ１）を指す。ＴＧＦβの作用は形質転換の誘導であり、またネガティブ自己分泌増殖因子としても作用する。ＴＧＦβ１アイソフォームは、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｍｉｎｎｅａｐｏｌｉｓ、ＭＮ、米国等の種々の商業的供給元から入手できる。

【０２６４】

本発明のある実施形態によれば、ＴＧＦβ１は、１ミリリットルあたり約０．１ナノグラム（ｎｇ／ｍｌ）～約５００ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～４００ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～３００ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～２００ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～１００ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～５０ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～３０ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～２０ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～１０ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～８ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～７ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～６ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～５ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～４ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～３ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．１～２ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．５～２ｎｇ／ｍｌ、例えば約０．５～１．５ｎｇ／ｍｌ、例えば約１ｎｇ／ｍｌの範囲の濃度で提供される。

【０２６５】

本発明のある実施形態によれば、ＴＧＦ／アクチビン経路の活性化剤は、アクチビンＡ（インヒビンベータＡおよびＩＮＨＢＡとしても知られる、遺伝子ＩＤ：３６２４、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＭ＿００２１９２．２（配列番号１２３）、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００２１８３．１および配列番号１１７をコード）を含み、ＴＧＦβ１の代わりに用い得る。

【０２６６】

本発明のある実施形態によれば、ＴＧＦβ１サイトカインの代わりに組換えノーダルおよび／またはアクチビンを用い得る。　記載「塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）」または「ＦＧＦ２」は、本明細書中において区別なく用い、線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）ファミリーのポリペプチドを指す。この線維芽細胞増殖因子（ＦＧＦ）ファミリーのポリペプチドはヘパリンに結合し、広く分裂促進活性および血管新生活性を有する。ＢＦＧＦ遺伝子のｍＲＮＡは複数のポリアデニル化部位を含有し、また非ＡＵＧ（ＣＵＧ）開始コドンおよびＡＵＧ開始コドンから翻訳されて、異なる特性を有する５つの異なるアイソフォームとなる。ＣＵＧから開始するこれらのアイソフォームは核に局在して細胞内分泌

効果を
引き起こすが、ＡＵＧから開始するアイソフォームはその多くがサイトゾルに存在し、このＦＧＦの傍分泌および自己分泌効果を引き起こす。
【０２６７】
本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の培地に用いるｂＦＧＦは、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００１９９７（配列番号２９）に提供される。ＢＦＧＦは、Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、ＲｎＤ　ｓｙｓｔｅｍｓ、およびＭｉｌｌｉｐｏｒｅ等の種々の製造元から入手できる。本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態の培地に用いるｂＦＧＦは、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓより提供される（カタログ番号：２３３－ＦＢ）。
【０２６８】
本発明のある実施形態によれば、ｂＦＧＦは、１ミリリットルあたり約０．５ナノグラム（ｎｇ／ｍｌ）～約５００ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～５００ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～４００ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～３００ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～２００ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～１００ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～８０ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～７０ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～７０ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～６０ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～５０ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～４０ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～３０ｎｇ／ｍｌ、例えば約１～２０ｎｇ／ｍｌ、例えば約２～２０ｎｇ／ｍｌ、例えば約２～１０ｎｇ／ｍｌ、例えば約３～１０ｎｇ／ｍｌ、例えば約４～１０ｎｇ／ｍｌ、例えば約８ｎｇ／ｍｌの範囲の濃度で提供される。
【０２６９】
本発明のある実施形態の培養基に用いるタンパク質因子（例えば、ＬＩＦ、ＩＬ６、ＴＧＦβ１、またはｂＦＧＦ）はいずれも組換えによって発現または生化学的に合成できることが理解されるだろう。また、天然に存在するｂＦＧＦおよびＴＧＦβ等のタンパク質因子は、生物試料（例えばヒト血清や細胞培養液）から、当技術分野において公知の方法によって精製できる。
【０２７０】
本発明のタンパク質因子（例えば、ＬＩＦ、ＩＬ６、ＴＧＦβ１、またはｂＦＧＦ）の生化学的合成は、標準的な固相技術によって実施できる。これらの方法は、排除固相合成、部分固相合成法、断片縮合、および伝統的な溶液合成を含む。
【０２７１】
本発明のタンパク質因子（例えば、ＬＩＦ、ＩＬ６、ＴＧＦβ１、またはｂＦＧＦ）の組換え発現は、組換え技術、例えば、Ｂｉｔｔｅｒ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８７）Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１５３：５１６－５４４，Ｓｔｕｄｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８５：６０－８９，Ｂｒｉｓｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８４）Ｎａｔｕｒｅ　３１０：５１１－５１４，Ｔａｋａｍａｔｓｕ　ｅｔ　ａｌ．（１９８７）ＥＭＢＯ　Ｊ．６：３０７－３１１，Ｃｏｒｕｚｚｉ　ｅｔ　ａｌ．（１９８４）ＥＭＢＯ　Ｊ．３：１６７１－１６８０，Ｂｒｏｇｌｉ　ｅｔ　ａｌ．，（１９８４）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２２４：８３８－８４３，Ｇｕｒｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９８６）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．６：５５９－５６５　ａｎｄ　Ｗｅｉｓｓｂａｃｈ＆Ｗｅｉｓｓｂａｃｈ，１９８８，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　Ｐｌａｎｔ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ，Ｓｅｃｔｉｏｎ　ＶＩＩＩ，ｐｐ　４２１－４６３に記載される技術によって実施できる。

【０２７２】
例えば、ＬＩＦ、ＩＬ６、ＴＧＦβ１、またはｂＦＧＦを発生させる場合、好ましくは、ＬＩＦ、ＩＬ６、ＴＧＦβ１、またはｂＦＧＦをコードするポリヌクレオチド配列（例えば、配列番号３０（ＬＩＦ、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＭ＿００１２５７１３５）、配列番号３１（ＴＧＦβ１、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＭ＿０００６６０）、配列番号３２（ＢＦＧＦ、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＭ＿００２００６）、配列番号１１１（ＩＬ６、Ｇ

ｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＭ＿０００６００．３）に記載のポリヌクレオチド）を、宿主細胞（すなわち、選択したポリペプチド（例えば、ＬＩＦ、ＩＬ６、ＴＧＦβ１、またはｂＦＧＦ）をコードするポリヌクレオチドが発現している細胞）中で発現させるのに好適な核酸コンストラクトにライゲーションさせる。天然に存在するＬＩＦ、ＩＬ６、ＴＧＦβ１、またはｂＦＧＦと同等のグリコシル化量およびグリコシル化パターンを有するＬＩＦ、ＩＬ６、ＴＧＦβ１、またはｂＦＧＦを発生させる場合、宿主細胞には好ましくは真核生物宿主細胞を用い、より好ましくはヒト細胞またはＣＨＯ細胞等の哺乳類宿主細胞を用いる。目的のポリペプチド（例えば上述のタンパク質因子）の生成に用い得る核酸コンストラクト（または発現ベクター）について、以下にさらに説明する。

【０２７３】

本明細書中において、用語「ＥＲＫ１」は、ＭＡＰＫシグナリング活性を有する、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００２７３７．２（配列番号３３）に記載のマイトジェン活性化プロテインキナーゼ３（ＭＡＰＫ３）アイソフォーム１、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００１０３５１４５．１（配列番号３４）に記載のＭＡＰＫ３アイソフォーム２、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００１１０３３６１．１（配列番号３５）に記載のＭＡＰＫ３アイソフォーム３、および／またはＧｅｎＢａｎｋ受入番号Ｍ８４４９０（配列番号３６）に記載のＥＲＫ１を指す。

【０２７４】

本明細書中において、用語「ＥＲＫ２」は、ＭＡＰＫシグナリング活性を有するＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００２７３６．３（配列番号３７）および／またはＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿６２０４０７．１（配列番号３８）に記載のマイトジェン活性化プロテインキナーゼ１（ＭＡＰＫ１）を指す。

【０２７５】

本明細書中において、用語「ＥＲＫ１／２阻害剤」はＥＲＫ１／２の活性を阻害できる任意の分子を指し、この阻害能は、リン酸化ＥＲＫ１／２タンパク質をウェスタンブロットによりタンパク質検出して決定される。

【０２７６】

ＥＲＫ１／２阻害剤の例として、ＰＤ０３２５９０１（ＡＸＯＮＭＥＤＣＨＥＭ、ＡＸＯＮ　１４０８）、ＰＤ９８０５９（ＡＸＯＮＭＥＤＣＨＥＭ、Ａｘｏｎ　１２２３）、およびＰＤ１８４３５２（ＡＸＯＮＭＥＤＣＨＥＭ、ＡＸＯＮ　１３６８）が挙げられ、またはソラフェニブもしくはＳＢ（ＡＸＯＮＭＥＤＣＨＥＭ、ＡＸＯＮ　１３９７）等のＲＡＦ（ＥＲＫ上流にある）の阻害剤も挙げられるが、これらに限定されない。

【０２７７】

本発明のある実施形態によれば、ＰＤ０３２５９０１は、約０．０１マイクロＭ（μＭ）～約５０μＭ、例えば約０．０５～４５μＭ、例えば約０．１～５０μＭ、例えば約０．１～４５μＭ、例えば約０．１～４０μＭ、例えば約０．１～３５μＭ、例えば約０．１～３０μＭ、例えば約０．１～２５μＭ、例えば約０．１～２０μＭ、例えば約０．１～１５μＭ、例えば約０．１～１０μＭ、例えば約０．２～１０μＭ、例えば約０．３～１０μＭ、例えば約０．４～１０μＭ、例えば約０．５～１０μＭ、例えば約０．６～１０μＭ、例えば約０．７～１０μＭ、例えば０．８～１０μＭ、例えば０．９～１０μＭ、例えば０．９～９μＭ、例えば０．９～８μＭ、例えば０．９～７μＭ、例えば０．９～６μＭ、例えば０．８～５μＭ、例えば０．８～４μＭ、例えば０．８～３μＭ、例えば０．８～２μＭ、例えば０．８～１．５μＭ、例えば０．９～１．２μＭ、例えば約１μＭの範囲の濃度で提供される。

【０２７８】

本発明のある実施形態によれば、ＰＤ９８０５９は、約０．１マイクロＭ（μＭ）～約７０μＭ、例えば約０．１～６５μＭ、例えば約０．１～５５μＭ、例えば約０．１～５０μＭ、例えば約０．１～４５μＭ、例えば約０．１～４０μＭ、例えば約０．１～３５μＭ、例えば約０．１～３０μＭ、例えば約０．１～２５μＭ、例えば約０．１～２０μＭ、例えば約０．１～１５μＭ、例えば約２～２０μＭ、例えば約５～１５μＭ、例えば約

１０μＭ、例えば約０．１～１０μＭ、例えば約０．２～１０μＭ、例えば約０．３～１０μＭ、例えば約０．４～１０μＭ、例えば約０．５～１０μＭ、例えば約０．６～１０μＭ、例えば約０．７～１０μＭ、例えば０．８～１０μＭ、例えば０．９～１０μＭ、例えば０．９～９μＭ、例えば０．９～８μＭ、例えば０．９～７μＭ、例えば０．９～６μＭ、例えば０．８～５μＭ、例えば０．８～４μＭ、例えば０．８～３μＭ、例えば０．８～２μＭ、例えば０．８～１．５μＭ、例えば０．９～１．２μＭの範囲の濃度で提供される。

【０２７９】

本発明のある実施形態によれば、ＰＤ１８４３５２は、約０．１マイクロＭ（μＭ）～約７０μＭ、例えば約０．１～６０μＭ、例えば約０．１～５０μＭ、例えば約０．５～５０μＭ、例えば約０．５～４５μＭ、例えば約０．５～４０μＭ、例えば約０．１～３５μＭ、例えば約０．５～３０μＭ、例えば約０．５～２５μＭ、例えば約０．５～２０μＭ、例えば約０．５～１５μＭ、例えば約０．５～１０μＭ、例えば０．５～９μＭ、例えば０．５～８μＭ、例えば０．５～７μＭ、例えば０．９～６μＭ、例えば０．８～５μＭ、例えば０．８～４μＭ、例えば０．８～３μＭ、例えば約３μＭ、例えば０．８～２μＭ、例えば０．８～１．５μＭ、例えば０．９～１．２μＭの範囲の濃度で提供される。

【０２８０】

本発明のある実施形態によれば、ソラフェニブは、約０．１マイクロＭ（μＭ）～約７０μＭ、例えば約０．１～６０μＭ、例えば約０．１～５０μＭ、例えば約０．５～５０μＭ、例えば約０．５～４５μＭ、例えば約０．５～４０μＭ、例えば約０．１～３５μＭ、例えば約０．５～３０μＭ、例えば約０．５～２５μＭ、例えば約０．５～２０μＭ、例えば約０．５～１５μＭ、例えば約０．５～１０μＭ、例えば０．５～９μＭ、例えば０．５～８μＭ、例えば０．５～７μＭ、例えば０．９～６μＭ、例えば０．８～５μＭ、例えば約５μＭ、例えば０．８～４μＭ、例えば０．８～３μＭ、例えば０．８～２μＭ、例えば０．８～１．５μＭ、例えば０．９～１．２μＭの範囲の濃度で提供される。

【０２８１】

本明細書中において、用語「ＧＳＫ３ｂ」は、そのキナーゼ活性によりＷＮＴシグナリング調節活性を有する、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００２０８４．２（配列番号１２１）および／またはＮＰ＿００１１３９６２８．１（配列番号１２２）に記載のグリコーゲンシンターゼキナーゼ３ベータタンパク質を指す。

【０２８２】

本明細書中において、用語「ＧＳＫ３ｂ阻害剤」はＧＳＫ３ｂの活性を阻害できる任意の分子を指し、この阻害能は、（細胞中に存在する総ＧＳＫ３ｂのうち）リン酸化ＧＳＫ３ｂのレベルを特異的に阻害する能力として決定される。

【０２８３】

ＧＳＫ３ｂ阻害剤の例として、ＣＨＩＲ９９０２１（ＡＸＯＮＭＥＤＣＨＥＭ、ＡＸＯＮ　１３８６）、ＢＩＯ（ＡＸＯＮＭＥＤＣＨＥＭ、Ａｘｏｎ　１６９３）、およびケンパウロン（ＴＯＣＲＩＳ、カタログ番号：１３９８）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２８４】

本発明のある実施形態によれば、ＣＨＩＲ９９０２１は、約０．１～５０μＭ、例えば約０．２μＭ～約５０μＭ、例えば約０．２～４５μＭ、例えば約０．２～５０μＭ、例えば約０．２～４５μＭ、例えば約０．２～４０μＭ、例えば約０．２～３５μＭ、例えば約０．２～３０μＭ、例えば約０．２～２５μＭ、例えば約０．２～２０μＭ、例えば約０．２～１５μＭ、例えば約０．２～１０μＭ、例えば約０．２～１０μＭ、例えば約０．３～１０μＭ、例えば約０．４～１０μＭ、例えば約０．５～１０μＭ、例えば約０．６～１０μＭ、例えば約０．７～１０μＭ、例えば０．８～１０μＭ、例えば０．９～１０μＭ、例えば０．９～９μＭ、例えば１～８μＭ、例えば１～７μＭ、例えば１～６μ

Ｍ、例えば１～５μＭ、例えば２～４μＭ、例えば約３μＭの濃度範囲で提供される。
【０２８５】
本発明のある実施形態によれば、ＢＩＯは、約０．１～７０μＭ、
例えば約０．２μＭ～約７０μＭ、例えば約０．２～６０μＭ、例えば約０．２～５５μＭ、例えば約０．２～５０μＭ、例えば約０．２～４５μＭ、例えば約０．２～４０μＭ、例えば約０．２～３５μＭ、例えば約０．２～３０μＭ、例えば約０．２～２５μＭ、例えば約０．２～２０μＭ、例えば約０．２～１５μＭ、例えば約０．２～１０μＭ、例えば約０．３～１０μＭ、例えば約０．４～１０μＭ、例えば約０．５～１０μＭ、例えば約０．６～１０μＭ、例えば約０．７～１０μＭ、例えば０．８～１０μＭ、例えば０．９～１０μＭ、例えば０．９～９μＭ、例えば１～８μＭ、例えば１～７μＭ、例えば１～６μＭ、例えば１～５μＭ、例えば約５μＭ、例えば２～４μＭの濃度範囲で提供される。
【０２８６】
本発明のある実施形態によれば、ケンパウロンは、約０．１～７０μＭ、例えば約０．２μＭ～約７０μＭ、例えば約０．２～６０μＭ、例えば約０．２～５５μＭ、例えば約０．２～５０μＭ、例えば約０．２～４５μＭ、例えば約０．２～４０μＭ、例えば約０．２～３５μＭ、例えば約０．２～３０μＭ、例えば約０．２～２５μＭ、例えば約０．２～２０μＭ、例えば約０．２～１５μＭ、例えば約０．２～１０μＭ、例えば約０．３～１０μＭ、例えば約０．４～１０μＭ、例えば約０．５～１０μＭ、例えば約０．６～１０μＭ、例えば約０．７～１０μＭ、例えば０．８～１０μＭ、例えば０．９～１０μＭ、例えば０．９～９μＭ、例えば１～８μＭ、例えば１～７μＭ、例えば１～６μＭ、例えば１～５μＭ、例えば２～４μＭ、例えば約５μＭの濃度範囲で提供される。
【０２８７】
本明細書中において、用語「ｐ３８」は、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００１３０６．１（配列番号３９）に記載のＭＡＰＫ１４アイソフォーム１、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿６２０５８１．１（配列番号４０）に記載のＭＡＰＫ１４アイソフォーム２、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿６２０５８２．１（配列番号４１）に記載のＭＡＰＫ１４アイソフォーム３、およびＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿６２０５８３．１（配列番号４２）に記載のＭＡＰＫ１４アイソフォーム４を含む「ｐ３８α（アルファ）」マイトジェン活性化プロテインキナーゼ１４（ＭＡＰＫ１４）、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００２７４２．３（配列番号４３）に記載の「ｐ３８β（ベータ）」（ＭＡＰＫ１１）、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００２９６０．２（配列番号４４）に記載の「ｐ３８γ（ガンマ）」（ＭＡＰＫ１２）、および／またはＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００２７４５．１（配列番号４５）に記載の「ｐ３８δ（デルタ）」（ＭＡＰＫ１３）を指す。これらはいずれも、キナーゼ活性を有しシグナリングに関与する。
【０２８８】
本明細書中において、用語「ｐ３８阻害剤」は、ｐ３８ファミリーのメンバーの活性を阻害できる任意の分子（例えば、小分子またはタンパク質）を指し、この阻害能は、リン酸化ｐ３８のレベルをウェスタンブロットで定量化することによって決定される。
【０２８９】
ｐ３８阻害剤の例として、ＳＢ２０３５８０（ＡＸＯＮＭＥＤＣＨＥＭ、Ａｘｏｎ　１３６３）、ＳＢ　２０２１９０（ＡＸＯＮＭＥＤＣＨＥＭ、Ａｘｏｎ　１３６４）、ＬＹ２２２８８２０（ＡＸＯＮＭＥＤＣＨＥＭ、Ａｘｏｎ　１８９５）、ＢＩＲＢ７９６（Ａｘｏｎ　Ｍｅｄｃｈｅｍ　１３５８）、およびＰＤ１６９３１６（ＡＸＯＮＭＥＤＣＨＥＭ、Ａｘｏｎ　１３６５）が挙げられるが、これらに限定されない。
【０２９０】
ｐ３８シグナリングを活性化するのがＢＭＰシグナリングであるため、ｐ３８阻害剤の例には、ドルソモルフィン（ＡＸＯＮＭＥＤＣＨＥＭ－Ａｘｏｎ　２１５０）およびＬＤＮ１９３１８９（ＡＸＯＮ　ＭＥＤＣＨＥＭ、ＡＸＯＮ　１５０９）等のＢＭＰ阻害剤も含まれる、あるいは、組換えＮＯＧＧＩＮタンパク質（ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００

５４４１．１（配列番号１１８））等の他のＢＭＰ経路阻害剤を、ＢＭＰシグナリング阻害小分子の代わりに用い得る。

【０２９１】

本発明のある実施形態によれば、ＰＤＳＢ２０３５８０は、約０．５～７０μＭ、例えば約１μＭ～約７０μＭ、例えば約１～６０μＭ、例えば約１～５５μＭ、例えば約１～５０μＭ、例えば約１～４５μＭ、例えば約１～４０μＭ、例えば約１～３５μＭ、例えば約１～３０μＭ、例えば約１～２５μＭ、例えば約１～２０μＭ、例えば約１～１５μＭ、例えば約１～１０μＭ、例えば約２～１０μＭ、例えば約３～１０μＭ、例えば約４～１０μＭ、例えば約４～６μＭ、例えば約５μＭ、例えば約１０μＭの濃度範囲で提供される。

【０２９２】

本発明のある実施形態によれば、ＳＢ　２０２１９０は、約０．１μＭ～約５０μＭ、例えば約０．５μＭ～約５０μＭ、例えば約１μＭ～約５０μＭ、例えば約１～４５μＭ、例えば約１～４０μＭ、例えば約１～３５μＭ、例えば約１～３０μＭ、例えば約１～２５μＭ、例えば約１～２０μＭ、例えば約１～１５μＭ、例えば約１～１０μＭ、例えば約１～９μＭ、例えば約１～８μＭ、例えば約１～７μＭ、例えば約２～７μＭ、例えば約３～７μＭ、例えば約４～７μＭ、例えば約４～６μＭ、例えば約５μＭの濃度範囲で提供される。

【０２９３】

本発明のある実施形態によれば、ＢＩＲＢ７９６は、約０．０５～約３０μＭ、例えば約０．１～約３０μＭ、例えば約０．２～３０μＭ、例えば約０．２～２５μＭ、例えば約０．２～２０μＭ、例えば約０．２～１５μＭ、例えば約０．２～１０μＭ、例えば約０．２～８μＭ、例えば約０．２～６μＭ、例えば約０．５～６μＭ、例えば約０．５～５μＭ、例えば約０．５～４μＭ、例えば約０．５～３μＭ、例えば約０．５～２μＭ、例えば約１～３μＭ、例えば約１～２．５μＭ、例えば約２μＭの濃度範囲で提供される。

【０２９４】

本明細書中において、用語「ＪＮＫ」は、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿６２０６３７．１（アイソフォームアルファ２）（配列番号４６）、ＮＰ＿６２０６３５．１（アイソフォームベータ２）（配列番号４７）、ＮＰ＿６２０６３４．１（アイソフォームベータ１）（配列番号４８）、ＮＰ＿００２７４１．１（アイソフォームアルファ１）（配列番号４９）に記載のマイトジェン活性化プロテインキナーゼ８（ＭＡＰＫ８）タンパク質を指す。これらは、増殖、分化、転写調節、および発達等の多種多様の細胞プロセスに関与する。

【０２９５】

本明細書中において、用語「ＪＮＫ阻害剤」はＪＮＫの活性を阻害できる任意の分子を指し、この阻害能は、ＪＮＫファミリーに属するタンパク質のリン酸化をウェスタンブロット解析で調べることによって決定される。

【０２９６】

ＪＮＫ阻害剤の例として、ＳＰ６００１２５（ＴＯＣＲＩＳ、カタログ番号：１４９６）、ＡＥＧ３４８２（ＡＸＯＮＭＥＤＣＨＥＭ、ＡＸＯＮ　１２９１）、およびＢＩＲＢ７９６（ＡＸＯＮＭＥＤＣＨＥＭ、Ａｘｏｎ　１３５８）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０２９７】

本発明のある実施形態によれば、ＳＰ６００１２５は、約０．５～１００μＭ、例えば約１μＭ～約１００μＭ、例えば約１～９０μＭ、例えば約１～８０μＭ、例えば約１～７０μＭ、例えば約１～６０μＭ、例えば約１～５５μＭ、例えば約１～５０μＭ、例えば約１～４５μＭ、例えば約１～４０μＭ、例えば約１～３５μＭ、例えば約１～３０μＭ、例えば約１～２５μＭ、例えば約１～２０μＭ、例えば約１～１５μＭ、例えば約１～１０μＭ、例えば約２～１０μＭ、例えば約３～１０μＭ、例えば約４～１０μＭ、例え

ば約４～６μＭ、例えば約５μＭの濃度範囲で提供される。
【０２９８】
本明細書中において、用語「プロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）」は、ＰＫＣα（アルファ）、ＰＫＣβ（ベータ）、ＰＫＣγ（ガンマ）、ＰＫＣδ（デルタ）、ＰＫＣζ（ゼータ）、およびＰＫＣμ（ミュー）タンパク質アイソフォームを指す。
【０２９９】
本明細書中において、用語「プロテインキナーゼＣ阻害剤」はプロテインキナーゼＣの活性を阻害できる任意の分子を指し、この阻害能は、非リン酸化ＰＫＣアイソフォームに対するリン酸化ＰＫＣアイソフォームのレベルを低減する能力として決定される。
【０３００】
プロテインキナーゼＣ阻害剤の例としてＧｏ６９８３（ＣＡＳ　１３３０５３－１９－７）が挙げられるが、これに限定されない。Ｇｏ６９８３（ＣＡＳ　１３３０５３－１９－７）は、プロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）の強力な阻害剤であって、細胞透過性かつ可逆性であり、ＡＴＰと競合し、スペクトルが広い（ＩＣ５０値はＰＫＣα、ＰＫＣβ、ＰＫＣγ、ＰＫＣδ、ＰＫＣζ、およびＰＫＣμそれぞれについて７ｎＭ、７ｎＭ、６ｎＭ、１０ｎＭ、６０ｎＭ、および２００００ｎＭ）。Ｇｏ６９８３は、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ（カタログ番号：３６５２５１－５００ＵＧ）およびＴＯＣＲＩＳ（カタログ番号：２２８５）等の種々の供給元から入手できる。
【０３０１】
本発明のある実施形態によれば、Ｇｏ６９８３は、約０．５～１００μＭ、例えば約１μＭ～約１００μＭ、例えば約１～９０μＭ、例えば約１～８０μＭ、例えば約１～７０μＭ、例えば約１～６０μＭ、例えば約１～５５μＭ、例えば約１～５０μＭ、例えば約１～４５μＭ、例えば約１～４０μＭ、例えば約１～３５μＭ、例えば約１～３０μＭ、例えば約１～２５μＭ、例えば約１～２０μＭ、例えば約１～１５μＭ、例えば約１～１０μＭ、例えば約２～１０μＭ、例えば約３～１０μＭ、例えば約４～１０μＭ、例えば約４～６μＭ、例えば約５μＭの濃度範囲で提供される。
【０３０２】
本明細書中において、用語「線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）」はＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、およびＦＧＦＲ３を指す。
【０３０３】
本明細書中において、用語「ＦＧＦＲ阻害剤（またはＦＧＦＲｉ）」はＦＧＦＲ発現および／またはＦＧＦＲ活性レベルを阻害できる分子を指し、この発現および／または活性レベルは、リン酸化ＦＧＦＲ１、２、および３のレベルにより決定される。
【０３０４】
ＦＧＦＲ阻害剤の例としてＰＤ１７３０７４およびＳＵ５４０１が挙げられるが、これらに限定されない。
【０３０５】
本発明のある実施形態によれば、ＦＧＦＲ阻害剤（ＦＧＦＲｉ）はＰＤ１７３０７４であり、約０．０１～４０μＭ、例えば約０．０２～４０μＭ、例えば約０．０５～４０μＭ、例えば約０．１～４０μＭ、約０．５～４０μＭ、約１～４０μＭ、例えば約２～４０μＭ、約５～４０μＭ、約１０～４０μＭ、例えば約０．０５～５μＭ、例えば約０．１～５μＭの濃度範囲で提供される。
【０３０６】
本発明のある実施形態によれば、ＦＧＦＲ阻害剤（ＦＧＦＲｉ）はＳＵ５４０１であり、約０．１～４０μＭ、例えば約０．５～４０μＭ、約１～４０μＭ、例えば約２～４０μＭ、約５～４０μＭ、約１０～４０μＭの濃度範囲で提供される。
【０３０７】
本明細書中において、用語「形質転換増殖因子受容体（ＴＧＦＲ）」は、ＴＧＦ－β受容体Ｉ型ＡＬＫ５、Ｉ型アクチビン／ノーダル受容体ＡＬＫ４、およびＩ型ノーダル受容体ＡＬＫ７を指す。

【０３０８】
本明細書中において、用語「ＴＧＦＲ阻害剤（またはＴＧＦＲｉ）」は、ＴＧＦＲ発現および／またはＴＧＦＲ活性レベルを阻害できる分子を指し、この発現および／または活性レベルはリン酸化ＡＬＫ４、５および、７により決定される。
【０３０９】
ＴＧＦＲ阻害剤の例としてＳＢ４３１５４２およびＡ　８３－０１小分子化合物が挙げられるが、これらに限定されない。
【０３１０】
本発明のある実施形態によれば、ＴＧＦＲ阻害剤は、約０．１～３０μＭ、例えば約１～３０μＭ、例えば５～２５μＭ、例えば５～１０μＭ、例えば０．１～５μＭ、例えば０．２～４μＭ、例えば０．５～３μＭの濃度範囲で提供される。
【０３１１】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する。
【０３１２】
本明細書中において、用語「ＲＯＣＫ」は、セリン／トレオニンキナーゼ活性を有するＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００５３９７．１（Ｐ１６０ＲＯＣＫ、配列番号５０）およびＮＰ＿００４８４１
．２（ＲＯＣＫ２、配列番号５１）に記載のタンパク質を指し、ＲＯＣＫは、細胞質分裂、平滑筋収縮、アクチンストレスファイバーおよび接着斑の形成、ならびにｃ－ｆｏｓ血清応答配列の活性化を調節する。
【０３１３】
本明細書中において、用語「ＲＯＣＫ阻害剤」はＲＯＣＫの活性を阻害できる任意の分子を指し、この阻害能は、ＲＯＣＫリン酸化レベルを阻害する能力（ウェスタンブロット解析により検出）として決定される。
【０３１４】
ＲＯＣＫ阻害剤の例としてＹ２７６３２（ＴＯＣＲＩＳ、カタログ番号：１２５４）が挙げられるが、これに限定されない。
【０３１５】
本発明のある実施形態によれば、Ｙ２７６３２は、約０．１～１００μＭ、例えば約０．１μＭ～約９０μＭ、例えば約０．１～８５μＭ、例えば約０．１～８０μＭ、例えば約０．１～７０μＭ、例えば約０．１～６０μＭ、例えば約０．１～５５μＭ、例えば約０．１～５０μＭ、例えば約０．１～４５μＭ、例えば約０．１～４０μＭ、例えば約０．１～３５μＭ、例えば約０．１～３０μＭ、例えば約０．１～２５μＭ、例えば約１～２０μＭ、例えば約１～１５μＭ、例えば約１～１０μＭ、例えば約２～１０μＭ、例えば約３～１０μＭ、例えば約４～１０μＭ、例えば約４～６μＭ、例えば約５μＭの濃度範囲で提供される。
【０３１６】
本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する上記培養基は、ＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する。
【０３１７】
本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、プロテインキナーゼＣ阻害剤、および線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤（ＦＧＦＲｉ）を含有する上記培養基は、ＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する。
【０３１８】
本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、プロテインキナーゼＣ阻害剤、および形質転換増殖因子受容体阻害剤（ＴＧＦＲｉ）を含有する上記培養基は、ＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する。

【０３１９】
本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、プロテインキナーゼＣ阻害剤、線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤（ＦＧＦＲｉ）、および形質転換増殖因子受容体阻害剤（ＴＧＦＲｉ）を含有する上記培養基は、ＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する。
【０３２０】
本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＴＧＦβ１、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する上記培養基は、ＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する。
【０３２１】
本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＴＧＦβ１、プロテインキナーゼＣ阻害剤、および線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤を含有する上記培養基は、ＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する。
【０３２２】
本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、および形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）を含有する上記培養基は、ＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する。
【０３２３】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はプロテインキナーゼＣ阻害剤をさらに含有する。
【０３２４】
本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、および形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）を含有する上記培養基は、プロテインキナーゼＣ阻害剤をさらに含有する。
【０３２５】
本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）、およびＲＯＣＫ阻害剤を含有する上記培養基は、プロテインキナーゼＣ阻害剤をさらに含有する。
【０３２６】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ１）、フォルスコリン、線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤（ＦＧＦＲｉ）、形質転換増殖因子受容体阻害剤（ＴＧＦＲｉ）、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される因子をさらに含有する。
【０３２７】
本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する上記培養基は、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ１）、フォルスコリン、線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤（ＦＧＦＲｉ）、形質転換増殖因子受容体阻害剤（ＴＧＦＲｉ）、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される少なくとも一種の因子をさらに含有する。
【０３２８】
本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、プロテインキナーゼＣ阻害剤、および線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤（ＦＧＦＲｉ）を含有する上記培養基は、骨

形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ１）、フォルスコリン、形質転換増殖因子受容体阻害剤（ＴＧＦＲｉ）、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される少なくとも一種の因子をさらに含有する。

【０３２９】

本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、プロテインキナーゼＣ阻害剤、および形質転換増殖因子受容体阻害剤（ＴＧＦＲｉ）を含有する上記培養基は、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ１）、フォルスコリン、線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤（ＦＧＦＲｉ）、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される少なくとも一種の因子をさらに含有する。

【０３３０】

本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、プロテインキナーゼＣ阻害剤、線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤（ＦＧＦＲｉ）、および形質転換増殖因子受容体阻害剤（ＴＧＦＲｉ）を含有する上記培養基は、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ１）、フォルスコリン、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される少なくとも一種の因子をさらに含有する。

【０３３１】

本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＴＧＦβ１、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する上記培養基は、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ１）、フォルスコリン、線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤（ＦＧＦＲｉ）、形質転換増殖因子受容体阻害剤（ＴＧＦＲｉ）、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される少なくとも一種の因子をさらに含有する。

【０３３２】

本発明のある実施形態によれば、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、および形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）を含有する上記培養基は、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ１）、フォルスコリン、線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤（ＦＧＦＲｉ）、形質転換増殖因子受容体阻害剤（ＴＧＦＲｉ）、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される少なくとも一種の因子をさらに含有する。

【０３３３】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基はアスコルビン酸をさらに含有する。

【０３３４】

本明細書中において、記載「アスコルビン酸」または「ビタミンＣ」は、本明細書中において区別なく用い、Ｌ－アスコルビン酸２－リン酸塩を指す。アスコルビン酸は例えばＳｉｇｍａ（カタログ番号：Ａ８９６０）から入手できる。

【０３３５】

本発明のある実施形態の培地と共に用いるアスコルビン酸の濃度は、約１～３００μｇ／ｍｌ、例えば約５０μｇ／ｍｌであり得る。

【０３３６】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基はオレイン酸をさらに含有する。注目するべきは、オレイン酸をＡＬＢＵＭＡＸ（登録商標）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）の代わりに、またはＡＬＢＵＭＡＸ（登録商標）と共に用い得ることである。

【０３３７】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基はリノール酸をさらに含有する。注目するべきは、リノール酸をＡＬＢＵＭＡＸ（登録商標）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）の代わりに、またはＡＬＢＵＭＡＸ（登録商標）と共に用い得ることである。

【０３３８】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基はピペコリン酸をさらに含有する。注目するべきは、ピペコリン酸をＡＬＢＵＭＡＸ（登録商標）（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）の代わりに、またはＡＬＢＵＭＡＸ（登録商標）と共に用い得ることである。

【０３３９】

本発明のある実施形態によれば、オレイン酸（Ｏ１２５７、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）を、上記培養基中約１～２００μｇ／ｍｌ、例えば約１０μｇ／ｍｌの濃度において用い得る。

【０３４０】

本発明のある実施形態によれば、オレイン酸（Ｏ１００８、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、ＤＭＳＯ溶液）を、上記培養基中１～２００μｇ／ｍｌ、例えば約１０μｇ／ｍｌの濃度において用い得る。

【０３４１】

本発明のある実施形態によれば、ピペコリン酸（Ｐ２５１９、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、ＤＭＳＯ溶液）を、上記培養基中１～２００μｇ／ｍｌ、例えば約１０μｇ／ｍｌの濃度において用い得る。

【０３４２】

本発明のある実施形態によれば、オレイン酸－アルブミン（Ｏ３００８、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）を、上記培養基中約１～２００μｇ／ｍｌ、例えば約１０μｇ／ｍｌの濃度において用い得る。

【０３４３】

本発明のある実施形態によれば、上記培地は、リノール酸－オレイン酸－アルブミンサプリメント（Ｌ９６５５、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ）を、上記培養基中約１～２００μｇ／ｍｌ、例えば約１０μｇ／ｍｌの濃度において含有する。

【０３４４】

多能性幹細胞をナイーブ状態で維持するために（かつナイーブ状態を誘導するために）用い得る培養基の例を次に挙げるが、これらに限定されない：白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、および形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）、ならびに下記構成要素の一種以上：　ａ）ＩＧＦＩＩ（最終濃度０．１～１００ｎｇ／ｍｌの範囲）、　ｂ）ＩＧＦ１［インスリン様増殖因子１（ソマトメジンＣ）］（最終濃度０．１～１００ｎｇ／ｍｌの範囲）、　ｃ）ＳＣＦ（最終濃度０．１～１００ｎｇ／ｍｌの範囲）、　ｄ）ＢＭＰシグナリング阻害剤（例として、ＬＤＮ１９３１８９（ＡＸＯＮ　１５０９、最終濃度０．０１～２０マイクロＭ）、Ｋ０２２８８（Ａｘｏｎ　２１８９、最終濃度０．１～２０マイクロＭ
）、ドルソモルフィン塩酸塩（ＡＸＯＮ　２１５０、最終濃度０．１～２０マイクロＭ）が含まれるが、これらに限定されない）、　ｅ）ＮＯＴＣＨシグナリング阻害剤［例として次のガンマセクレターゼ阻害剤が含まれるが、これらに限定されない：ＤＡＰＴ（Ａｘｏｎ　Ｍｅｄｃｈｅｍ　１４８４、最終濃度０．０５～５０マイクロＭ］、ＬＹ２８８６７２１塩酸塩（Ａｘｏｎ　Ｍｅｄｃｈｅｍ　１９６４、最終濃度０．０５～５０マイクロＭ）、ＤＢＺ（Ａｘｏｎ　Ｍｅｄｃｈｅｍ、Ａｘｏｎ　１４８８、最終濃度０．０５～５０マイクロＭ））、　ｆ）ソニックヘッジホッグ経路（ＳＨＨ）阻害剤［例として、ＧＡＮＴ６１（ＳｉｇｍａＡｌｄｒｉｃｈ、最終濃度０．０５～５０マイクロＭ）およびＲＵ－ＳＫＩ　４３（Ａｘｏｎ　Ｍｅｄｃｈｅｍ、Ａｘｏｎ　２０３５、最終濃度０．０５～５０マイクロＭ）が含まれるが、これらに限定されない］、　ｇ）ＥＲＫ５阻害剤（ＢＩＸ０２１８９　Ａｘｏｎ　１８０９、最終濃度０．１～１００マイクロＭの範囲）、　ｈ）ＲＯＣＫ阻害剤［Ｙ２７６３２（ＡＸＯＮ　１６８３）、最終０．０５～１０

０マイクロＭ］、　ｉ）ＦＧＦシグナリング阻害剤（ＦＧＦＲ阻害剤の例としてＰＤ１７３０７４およびＳＵ５４０１が挙げられるが、これらに限定されない）、および　ｊ）ＴＧＦ経路阻害剤（ＴＧＦＲ阻害剤の例としてＳＢ４３１５４２およびＡ　８３－０１小分子化合物が挙げられるが、これらに限定されない。（本明細書中において、用語「ＴＧＦＲ阻害剤（またはＴＧＦＲｉ）」はＴＧＦＲ発現および／またはＴＧＦＲ活性レベルを阻害できる分子を指し、この発現および／または活性レベルはリン酸化ＡＬＫ４、５、および７により決定される））。

【０３４５】

本発明のある実施形態によれば、本発明の培養基は、後述の実施例部分の表３～５中に記載する条件１～５および７～１７の任意の１つにより定義される。

【０３４６】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＭＢＤ３阻害剤をさらに含有する。

【０３４７】

本明細書中において、用語「ＭＢＤ３」は、コリプレッサーおよびクロマチンリモデリング機能活性を有する、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００３９１７．１（配列番号７）に記載のメチル－ＣｐＧ結合ドメイン３タンパク質を指す。

【０３４８】

本明細書中において、用語「ＭＢＤ３阻害剤」は、ＭＢＤ３の発現レベルおよび／または活性を下方調節でき、かつ／またはＭＢＤ３とＯＣＴ４との、および／もしくはＭＢＤ３とＳＯＸ２との、および／もしくはＭＢＤ３とＫＬＦ４との、および／もしくはＭＢＤ３とＣ－Ｍｙｃとの相互作用を妨害でき、かつ／またはＭＢＤ３のヌクレオソームリモデリング脱アセチル化酵素（ＮｕＲＤ）への結合を阻害できる、任意の薬剤（例えば分子）を指す。ＭＢＤ３の下方調節は、転写および／または翻訳を妨げる多様な分子［例えば、ＲＮＡサイレンシング剤（アンチセンス、ｓｉＲＮＡ、ｓｈＲＮＡ、ｍｉｃｒｏ－ＲＮＡ等）、リボザイム、およびＤＮＡザイム］を用いてゲノムレベルならびに／または転写物レベルで、または例えば抗体（中和抗体等）、拮抗薬、例えば上記初期化因子（Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、またはｃ－Ｍｙｃ）のいずれかと相互に直接影響し合うＭＢＤ３の活性もしくは能力を阻害する小分子、およびこのポリペプチドを切断する酵素を用いて、タンパク質レベルでおこなわれ得る。

【０３４９】

ＭＢＤ３阻害剤の例として、ＭＢＤ３　ｍＲＮＡに対するｓｉＲＮＡ、例えばｍＢＤ３ＨＳＳ１４７５８１（３＿ＲＮＡＩ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）：ＡＧＧＵＣＡＡＧＧＧＣＡＡＧＣＣＣＧＡＣＣＵＧＡＡ（配列番号５２）およびＭＢＤ３ＨＳＳ１４７５８１（３＿ＲＮＡＩ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）：ＵＵＣＡＧＧＵＣＧＧＧＣＵＵＧＣＣＣＵＵＧＡＣＣＵ（配列番号５３）といったＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ提供品が挙げられるが、これらに限定されない。用い得る別の好適な、ＭＢＤ３　ｍＲＮＡに対するｓｉＲＮＡは、市販品である、ＨＳＳ１４７５８０およびＨＳＳ１４７５８１構成要素を含むＭＢＤ３　Ｓｔｅａｌｔｈ　ｓｉＲＮＡ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｉｏｌｏｇｉｅｓ（商標）、カタログ番号：１２９９００１）であり、この商品はヒト細胞において高効率でＭＢＤ３をノックダウンすることがわかった。

【０３５０】

本発明のある実施形態によれば、Ｍｂｄ３のＮｕＲＤ複合体への結合の阻害を、クロモドメインヘリカーゼＤＮＡ結合タンパク質４（ＣＨＤ４）阻害剤を用いて実施する。

【０３５１】

ＣＨＤ４阻害剤の例として、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ（商標）より入手できるＣＨＤ４　ｓｔｅａｌｔｈ　ｓｉＲＮＡ　ＨＳＳ１０１８５０等の、ヒトＣＨＤ４　ｓｉＲＮＡが挙げられるが、これらに限定されない。これらは、ヒト細胞においてＣＨＤ４を効率よくノックダウンすることがわかった。

【０３５２】

本発明のある実施形態によれば、Ｍｂｄ３のＮｕＲＤ複合体への結合の阻害を、Ｐ６６ア

ルファ・コイルドコイル（Ｐ６６α－ＣＣ）ドメインを用いて実施する。
【０３５３】
Ｐ６６α－ＣＣ（配列番号１１４）ペプチドは、上記培地にそのまま添加できる、またはＰ６６α－ＣＣ配列をコードするベクター（例えば、配列番号１１３に記載のヌクレオチド配列を含むベクター）から組換えによって発現させることができる。
【０３５４】
本発明のある実施形態によれば、Ｍｂｄ３発現の阻害を、プロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）阻害剤を用いて（例えば上述の薬剤および分子を用いて）実施する。
【０３５５】
本発明のある実施形態によれば、上記培地は、内在性ＥＲＡＳおよび／または組換えＥＲＡＳの発現を増加させる薬剤をさらに含有する。
【０３５６】
本発明のある実施形態によれば、上記ＭＢＤ３阻害剤は、細胞中におけるＭＢＤ３　ＲＮＡおよび／またはタンパク質の発現レベルを、同様の細胞を同様の（例えば同一の）条件下において上記ＭＢＤ３阻害剤無しでインキュベートおよび／または培養した場合の同細胞中におけるＭＢＤ３　ＲＮＡおよび／またはタンパク質の発現レベルと比較して、少なくとも約３０％、例えば少なくとも約３５％、例えば少なくとも約４０％、例えば少なくとも約４５％、例えば少なくとも約５０％、例えば少なくとも約５５％、例えば少なくとも約６０％、例えば少なくとも約６５％、例えば少なくとも約７０％、例えば少なくとも約７５％、例えば少なくとも約８０％下方調節するのに十分な量で提供される。
【０３５７】
本発明のある実施形態によれば、上記ＭＢＤ３阻害剤は、細胞中におけるＭＢＤ３　ＲＮＡおよび／またはタンパク質の発現レベルを、同様の細胞を同様の（例えば同一の）条件下において上記ＭＢＤ３阻害剤無しでインキュベートおよび／または培養した場合の同細胞中におけるＭＢＤ３　ＲＮＡおよび／またはタンパク質の発現レベルと比較して、約３０～９０％、例えば約３０～８５％、例えば約４０～８５％、例えば約５０～８５％、例えば約６０～８５％、例えば約７０～８５％、例えば約８０～８５％、例えば約８５％下方調節するのに十分な量で提供される。
【０３５８】
細胞中のＭＢＤ３の発現レベルは、リアルタイム逆転写ＰＣＲおよびウェスタンブロット等の種々の方法により決定できる。このようなアッセイの例を、ＭＢＤ３$^{flox/-}$コンストラクトで形質転換した細胞におけるＭＢＤ３タンパク質レベルが約８５％阻害されたことを示す、後述の実施例部分および図１Ｉ～Ｊに示すが、これらに限定されない。
【０３５９】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は血清を含有しない、例えばどんな動物血清も含有しない。
【０３６０】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、どんな動物混入物も、すなわち動物細胞、体液、または病原体（例えば、動物細胞に感染するウイルス）を、含有しない。例えば異物を含有しない。
【０３６１】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はヒト由来血清を含有しない。
【０３６２】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、血清代替物（すなわち血清代替品）、例えばＫＮＯＣＫＯＵＴ（商標）Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔ（Ｇｉｂｃｏ－Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ　Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ、Ｇｒａｎｄ　Ｉｓｌａｎｄ、ＮＹ、米国）、ＡＬＢＵＭＡＸ（登録商標）ＩＩ（Ｇｉｂｃｏ（登録商標）、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ－Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号：１１０２１－０２９、脂質に富み細胞培養液用のウシ血清アルブミン）、または化学組成が限定された脂質濃縮液（Ｇｉｂｃｏ（登録商標）、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ－Ｉｎ

ｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号：１１９０５－０３１）をさらに含有する。
【０３６３】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、化学組成が限定された無血清サプリメントであるＮ２サプリメント（Ｇｉｂｃｏ（登録商標）、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ－Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、カタログ番号：１７５０２－０４８）をさらに含有する。培養基５００ｍｌに対してこのＮ２混合物（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）５ｍｌを添加できる。
【０３６４】
あるいは、次の材料（Ｎ２サプリメントの代わりに）を培養基５００ｍｌに添加できる。すなわち、培養基（例えばＷＩＳ－ＮＨＳＭ）５００ｍｌに対して、Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ｉｎｓｕｌｉｎ（Ｓｉｇｍａ、Ｉ－１８８２）最終濃度１２．５マイクロｇ／ｍｌ（μｇ／ｍｌ）、Ａｐｏ－Ｔｒａｎｓｆｅｒｒｉｎ（Ｓｉｇｍａ、Ｔ－１１４７）最終濃度５００μｇ／ｍｌ、プロゲステロン（Ｓｉｇｍａ、Ｐ８７８３）最終濃度０．０２μｇ／ｍｌ、プトレシン（Ｓｉｇｍａ、Ｐ５７８０）最終濃度１６μｇ／ｍｌ、および亜セレン酸ナトリウム（Ｓｉｇｍａ、Ｓ５２６１）の３ｍＭ貯蔵品５マイクロＬ（μｌ）を添加する。
【０３６５】
本発明のある実施形態によれば、上記ＫＮＯＣＫＯＵＴ（商標）Ｓｅｒｕｍ　Ｒｅｐｌａｃｅｍｅｎｔは、少なくとも０．５％、例えば約０．５％～２５％の範囲、例えば約５％、約１０％、約１５％、約２０％、または約２５％の濃度において提供される。
【０３６６】
本発明のある実施形態によれば、上記ＡＬＢＵＭＡＸ（商標）は、少なくとも０．０１％、例えば約０．０１％～１０％の範囲、例えば約０．１％、約０．２％、約０．３％、約０．４％、約０．５％、約０．６％、約０．７％、約０．８％、約０．９％、約１％、約２％、約３％、約４％、約５％、約６％、約７％、約８％、約９％、または約１０％、例えば１％の濃度において提供される。
【０３６７】
本発明のある実施形態によれば、上記限定脂質濃縮液は、少なくとも約０．１％、例えば０．１～５％の範囲、例えば約０．２％、約０．３％、約０．４％、約０．５％、約０．６％、約０．７％、約０．８％、約０．９％、約１％、約２％、約３％、約４％、約５％、例えば１％の濃度において提供される。
【０３６８】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、上記Ｎ２サプリメント（例えば、培養基５００ｍｌあたりＮ２を５ｍｌ）および上記限定脂質濃縮液（培地５００ｍｌあたり５ｍｌの限定脂質濃縮液）を含有する。
【０３６９】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、上記Ｎ２サプリメント（例えば、培養基５００ｍｌあたりＮ２を５ｍｌ）およびＡＬＢＵＭＡＸ（登録商標）ＩＩ（例えば、１％のＡｌｂｕｍａｘ（登録商標）ＩＩ、Ｇｉｂｃｏ（登録商標）、Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ－Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を含有する。
【０３７０】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、抗生物質（例えばＰＥＮ－ＳＴＲＥＰ）、Ｌ－グルタミン、ＮＥＡＡ（非必須アミノ酸）をさらに含み得る。
【０３７１】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、Ｎ２サプリメント（例えば培養基５００ｍｌあたりＮ２を約５ｍｌ）を添加し、培地５００ｍｌあたり約５ｍｌの限定脂質濃縮液を添加し、ＬＩＦ（約２０ｎｇ／ｍｌ）、ｂＦＧＦ（約８ｎｇ／ｍｌ）、ＴＧＦβ１（約１ｎｇ／ｍｌ）、ＥＲＫ１／２ｉ（約１μＭのＰＤ０３２５９０１）、ＧＳＫ３ｂｉ（ＣＨＩＲ９９０２１、約３μＭ）、ｐ３８ｉ（ＳＢ２０３５８０、約５μＭ）、およびＪＮＫｉ（ＳＰ６００１２５、約５～１０μＭ）を添加

したＫＯ－ＤＭＥＭを含有する。
【０３７２】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、Ｎ２サプリメント（例えば培養基５００ｍｌあたりＮ２を約５ｍｌ）を添加し、約１～２％のＡｌｂｕｍａｘ（登録商標）ＩＩ、ＬＩＦ（約２０ｎｇ／ｍｌ）、ｂＦＧＦ（約８ｎｇ／ｍｌ）、ＴＧＦβ１（約１ｎｇ／ｍｌ）、ＥＲＫ１／２ｉ（約１μＭのＰＤ０３２５９０１）、ＧＳＫ３ｂｉ（ＣＨＩＲ９９０２１、約３μＭ）、ｐ３８ｉ（ＳＢ２０３５８０、約５μＭ）、およびＪＮＫｉ（ＳＰ６００１２５、５～約１０μＭ）を添加したＫＯ－ＤＭＥＭを含有する。
【０３７３】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、Ｎ２サプリメント（例えば培養基５００ｍｌあたりＮ２を約５ｍｌ）を添加し、約１５％のＫｏｃｋｏｕｔ　ＳＲ（Ｇｉｂｃｏ）、ＬＩＦ（約２０ｎｇ／ｍｌ）、ｂＦＧＦ（約８ｎｇ／ｍｌ）、ＴＧＦβ１（約１ｎｇ／ｍｌ）、ＥＲＫ１／２ｉ（約１μＭのＰＤ０３２５９０１）、ＧＳＫ３ｂｉ（ＣＨＩＲ９９０２１、約３μＭ）、ｐ３８ｉ（ＳＢ２０３５８０、約５μＭ）、ＪＮＫｉ（ＳＰ６００１２５、約５～１０μＭ）を添加したＫＯ－ＤＭＥＭを含有する。
【０３７４】
本発明のある実施形態の一態様によれば、細胞および本発明のある実施形態の培養基を含有する細胞培養液が提供される。
【０３７５】
本発明のある実施形態によれば、上記細胞は任意の細胞、例えば原核生物または真核生物の細胞、例えば霊長類細胞、例えば哺乳類細胞、例えばヒト細胞であり得る。
【０３７６】
本発明のある実施形態によれば、上記細胞は、体細胞、幹細胞、プライム型多能性幹細胞、および／またはナイーブ型多能性幹細胞であり得る。
【０３７７】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、少なくとも２回継代するあいだ、例えば少なくとも５回、少なくとも１０回、少なくとも２０回、少なくとも３０回、少なくとも４０回、少なくとも５０回、少なくとも６０回、少なくとも７０回、少なくとも８０回、少なくとも９０回、または少なくとも１００回継代するあいだ、ナイーブ型多能性幹細胞を未分化状態で維持できる。
【０３７８】
本発明のある実施形態の一態様によれば、ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる方法であって、　非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、上記非ナイーブ型ＰＳＣからナイーブ型ＰＳＣを発生させることのできる条件下においてインキュベートする工程を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣはＸ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、　結果として上記ナイーブ型ＰＳＣを発生させる方法が提供される。
【０３７９】
本発明のある実施形態によれば、上記ＰＳＣは霊長類（例えば哺乳類、例えばヒト）ＰＳＣである。
【０３８０】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は本発明のある実施形態の培養基を含む。
【０３８１】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、１～２０％の酸素（O_2）および５％のCO_2の存在下において細胞を増殖させることを含む。
【０３８２】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は低酸素を含む。低酸素条件（低酸素）は、増殖環境下、１０％未満のO_2（酸素）の存在下において導入できる。

【０３８３】
上記増殖環境（例えば組織培養インキュベーター）は、約３７℃、５％のCO_2、および低酸素（空気中に１０％未満のO_2）を含み得る。
【０３８４】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３β阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＳＴＡＴ３活性化因子、ならびに塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）、プロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤、およびＮＯＴＣＨ阻害剤からなる群より選択される少なくとも一種の薬剤を含有する培養基を含む。
【０３８５】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３β阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＳＴＡＴ３活性化因子、ならびに形質転換増殖因子受容体（ＴＧＦＲ）阻害剤、線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤、プロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）阻害剤、ＲＯＣＫ阻害剤、およびＮＯＴＣＨ阻害剤からなる群より選択される少なくとも一種の薬剤を含有する培養基を含む。
【０３８６】
本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦ、ＩＬ６、およびＥＧＦからなる群より選択される。
【０３８７】
本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦおよびＩＬ６からなる群より選択される。
【０３８８】
本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦである。
【０３８９】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ１）、インスリン様増殖因子ＩＩ（ＩＧＦＩＩ）、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）シグナリング阻害剤、ソニックヘッジホッグ経路（ＳＨＨ）阻害剤、ＥＲＫ５阻害剤、フォルスコリン、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される少なくとも一種のさらなる薬剤をさらに含有する。
【０３９０】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、インスリン様増殖因子１（ＩＧＦ１）、インスリン様増殖因子ＩＩ（ＩＧＦＩＩ）、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、ソニックヘッジホッグ経路（ＳＨＨ）阻害剤、ＥＲＫ５阻害剤、フォルスコリン、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される少なくとも一種のさらなる薬剤をさらに含有する。
【０３９１】
本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、上記少なくとも一種の薬剤はＰＫＣ阻害剤を含む。
【０３９２】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＦＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。
【０３９３】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＴＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。
【０３９４】
本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、上記少なくとも一種の薬剤はＴＧＦβ１およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含む。
【０３９５】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＦＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。
【０３９６】
本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、上記少なくとも一種の薬剤はｂＦＧＦおよびＴＧＦβ１を含む。

【０３９７】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する。
【０３９８】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はプロテインキナーゼＣ阻害剤をさらに含有する。
【０３９９】
本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、上記少なくとも一種の薬剤は、ｂＦＧＦ、ＲＯＣＫ阻害剤、骨形成タンパク質（ＢＭＰ）阻害剤、ＮＯＴＣＨ阻害剤、および形質転換増殖因子受容体（ＴＧＦＲ）阻害剤を含む。
【０４００】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はソニックヘッジホッグ経路（ＳＨＨ）阻害剤をさらに含有する。
【０４０１】
本発明のある実施形態によれば、上記ＳＴＡＴ３活性化因子はＬＩＦを含み、上記少なくとも一種の薬剤はＮＯＴＣＨ阻害剤および線維芽細胞増殖因子受容体（ＦＧＦＲ）阻害剤を含む。
【０４０２】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は、インスリン様増殖因子ＩＩ（ＩＧＦＩＩ）、幹細胞因子（ＳＣＦ）、および形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）からなる群より選択される薬剤をさらに含有する。
【０４０３】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、ＬＩＦ、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培養基を含む。
【０４０４】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＦＧＦＲ阻害剤（ＦＧＦＲｉ）をさらに含有する。
【０４０５】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＴＧＦＲ阻害剤（ＴＧＦＲｉ）をさらに含有する。
【０４０６】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、ＬＩＦ、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培養基を含み、ＦＧＦＲ阻害剤（ＦＧＦＲｉ）をさらに含む。
【０４０７】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、ＬＩＦ、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培養基を含み、ＴＧＦＲｉをさらに含む。
【０４０８】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、ＬＩＦ、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培養基を含み、ＦＧＦＲ阻害剤およびＴＧＦＲｉをさらに含む。
【０４０９】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、ＬＩＦ、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＴＧＦβ１、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培養基を含む。
【０４１０】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、ＬＩＦ、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＴＧＦβ１、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培養基を含み、ＦＧＦＲ阻害剤（ＦＧＦＲｉ）をさらに含む。

【０４１１】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、ＬＩＦ、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ｂＦＧＦ、およびＴＧＦβ１を含有する培養基を含む。
【０４１２】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培養基を含む。
【０４１３】
本発明のある実施形態によれば、上記培地はＦＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。
【０４１４】
本発明のある実施形態によれば、上記培地はＴＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。
【０４１５】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、ＴＧＦβ１、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培養基を含む。
【０４１６】
本発明のある実施形態によれば、上記培地はＦＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。
【０４１７】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、および形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）を含有する培養基を含む。
【０４１８】
本発明のある実施形態によれば、上記培地はＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する。
【０４１９】
本発明のある実施形態によれば、上記培地はプロテインキナーゼＣ阻害剤をさらに含有する。
【０４２０】
本発明のある実施形態によれば、上記培地は、骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）、ＩＧＦ１、フォルスコリン、ＦＧＦＲ阻害剤、ＴＧＦＲ阻害剤、ケンパウロン、ＢａｙＫ８６４４、Ｂｉｘ１２９４、および幹細胞因子（ＳＣＦ）からなる群より選択される因子をさらに含有する。
【０４２１】
本発明のある実施形態によれば、上記培地はアスコルビン酸をさらに含有する。
【０４２２】
本発明のある実施形態によれば、上記培地はオレイン酸をさらに含有する。
【０４２３】
本発明のある実施形態によれば、上記培地はリノール酸をさらに含有する。
【０４２４】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基は動物血清を含有しない（例えばウシ血清やマウス血清を含有しない、異物を含有しない、動物混入物を含有しない）。
【０４２５】
本発
明のある実施形態によれば、上記培養基は血清代替物をさらに含有する。
【０４２６】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＭＢＤ３阻害剤をさらに含有する。
【０４２７】
本発明のある実施形態によれば、上記条件は、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、塩基性線維芽細胞増殖因子

（ｂＦＧＦ）、および形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）を含有する培養基を含む。

【０４２８】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する。

【０４２９】
本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＭＢＤ３阻害剤をさらに含有する。

【０４３０】
本発明のある実施形態によれば、上記非ナイーブ型ＰＳＣは、プライム型ＰＳＣ、胚盤胞、人工多能性幹細胞（プライム型ｉＰＳＣ）、および体細胞からなる群より選択される。

【０４３１】
注目するべきは、上記非ナイーブ型ＰＳＣがプライム型ＰＳＣ（例えば、胚盤胞、胚性幹細胞、胚性生殖細胞、または人工多能性幹細胞）である場合、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃを外因的に発現させる必要はなく、単離Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、および／またはｃ－Ｍｙｃ因子を上記培地に添加する必要もないことである。

【０４３２】
本発明のある実施形態によれば、上記非ナイーブ型ＰＳＣがプライム型ＰＳＣ、胚盤胞、または人工多能性幹細胞（プライム型ｉＰＳＣ）である場合、上記培地はＯｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、および／またはｃ－Ｍｙｃ因子を含まない。

【０４３３】
本発明のある実施形態によれば、上記非ナイーブ型ＰＳＣがプライム型ＰＳＣ、胚盤胞、または人工多能性幹細胞（プライム型ｉＰＳＣ）である場合、上記細胞は、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、および／またはｃ－Ｍｙｃ因子を発現させる遺伝子改変を受けていない。

【０４３４】
本発明のある実施形態によれば、上記非ナイーブ型ＰＳＣが体細胞を含む場合、上記方法は上記体細胞を脱分化条件に供する工程をさらに有し、結果として人工多能性幹細胞を得る。

【０４３５】
本発明のある実施形態によれば、脱分化条件は、上記体細胞内において、ＯＣＴ４［ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００２６９２．２（配列番号５４）およびＮＭ＿００２７０１．４（配列番号５５）］、ＳＯＸ２［ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００３０９７．１（配列番号５６）およびＮＭ＿００３１０６．３（配列番号５７）］、ＫＬＦ４［ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００４２２６．３（配列番号５８）およびＮＭ＿００４２３５．４（配列番号５９）］、およびｃ－Ｍｙｃ［ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＮＰ＿００２４５８．２（配列番号６０）およびＮＭ＿００２４６７．４（配列番号６１）］からなる群より選択される少なくとも二種の増殖因子を外因的に発現させることを含む。

【０４３６】
本明細書中において、記載「外因的に発現させる」は、上記細胞内に天然に発現していなくてもよいまたは上記細胞内での過剰発現が望まれる異種核酸配列について、これを発現させることを指す。上記外来ポリヌクレオチドは、安定した手法または一過性の手法により上記細胞中に導入されてリボ核酸（ＲＮＡ）分子および／またはポリペプチド分子を生成するものであってもよい。注目するべきは、上記外来ポリヌクレオチドは上記細胞の内在性核酸配列と同一または一部相同する核酸配列を含んでもよいことである。

【０４３７】
用語「内在性」は、本明細書中において、上記細胞中に存在するかつ／または天然に発現している任意のポリヌクレオチドまたはポリペプチドを指す。

【０４３８】
本発明のある実施形態によれば、脱分化条件は、上記体細胞中でＫｌｆ４およびＯｃｔ４を発現させることを含む。

【０４３９】
本発明のある実施形態によれば、脱分化条件は、上記体細胞中でＯｃｔ４、Ｓｏｘ２、およびＫｌｆ４を発現させることを含む。
【０４４０】
本発明のある実施形態によれば、脱分化条件は、上記体細胞中でＯｃｔ４、Ｋｌｆ４、およびｃＭｙｃを発現させることを含む。
【０４４１】
本発明のある実施形態によれば、上記増殖因子の発現を、上記増殖因子のＤＮＡトランスフェクションによって実施する。
【０４４２】
哺乳類細胞へのＤＮＡトランスフェクションの方法は当技術分野において公知であり、例えば図１ａおよび先行技術文献（Ｍａｎｓｏｕｒ　ｅｔ　ａｌ．２０１２）に記載される方法が挙げられる。この先行技術文献は、その全体を参考として本明細書に組み込む。発現ベクターの調製および細胞中への発現ベクターの投与様式を、以下にさらに説明する。

【０４４３】
本発明のある実施形態によれば、上記増殖因子の発現を、上記増殖因子のＲＮＡトランスフェクションによって実施する。
【０４４４】
哺乳類細胞へのＲＮＡトランスフェクションの方法は当技術分野において公知であり、例えば文献（Ｗａｒｒｅｎ　ｅｔ　ａｌ．２０１０）に記載される方法が挙げられる。この先行技術文献は、その全体を参考として本明細書に組み込む。
【０４４５】
取得した細胞を培地中で培養し、連続して継代する。
【０４４６】
注目するべきは、上記ナイーブ型ＰＳＣの培養は、上記培養基を（同一組成の）「新しい」培地と２４～４８時間毎に交換し、３～５日毎に各培養皿（例えばプレート）を２つまたは３つの培養皿（例えばプレート）に継代することを伴うことである。この際、培養中の細胞が約６０～９０％コンフルエントに達したら上清を捨て、培養皿を洗浄［例えばリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）により］して、細胞を培養皿から酵素により、例えばトリプシン処理（０．２５％または０．０５％トリプシン＋ＥＤＴＡ）により剥がして、例えば分離によって個々の単一細胞または個々の細胞凝集塊とする。
【０４４７】
注目するべきは、本発明者らが明らかにした培養条件によって、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、および／またはｃ－Ｍｙｃ因子をさらに外因的に発現させる必要なく、ヒトｉＰＳＣ等のヒトＰＳＣをナイーブ型ＰＳＣ状態で維持できることである。このことは、従来の試みのいずれにおいても、ナイーブ型ヒトＰＳＣの発生にＯｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、および／またはｃ－Ｍｙｃ因子の外因的発現が必要であり、これらの因子の発現を中止するとナイーブ型ＰＳＣが自発的に分化してしまい未分化多能性幹細胞のまま維持できなかったが（例えば、Ｈａｎｎａ　Ｊ，２０１０ｂ参照）、そうした結果とは大きく異なる。
【０４４８】
本発明のある実施形態によれば、上記増殖因子の外因的発現を、限られた時間にわたって実施する。例えば培養期間は１０日間を超えないとする、例えば継代は１回を超えないとする。
【０４４９】
本発明のある実施形態によれば、上記体細胞から発生させた上記ナイーブ型ｉＰＳＣを、本発明のある実施形態の培養基（例えばＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地）中で、上記ナイーブ型ｉＰＳＣにＯｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、および／またはｃ－Ｍｙｃ因子を外因的に発現させずに、単離Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、および／またはｃ－Ｍｙｃ因子を上記培

養基に添加せずに、さらに培養する。
【０４５０】
本明細書中において、記載「単離．．．因子」は、宿主細胞（例えば細菌）中において発現ベクターから組換えによって発現させた、生化学的に合成した、または生物試料（例えば血清または細胞）から単離した因子を指す。
【０４５１】
本発明のある実施形態の方法によれば、Ｍｂｄ３発現をさらに阻害せずに体細胞中でＯｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃ因子を発現させて体細胞からｉＰＳＣを発生させる場合と比較して、体細胞からのｉＰＳＣの発生を改善できる。
【０４５２】
例えばヒト体細胞を用いる場合、上記方法は、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）、およびＭＢＤ３阻害剤を含有し、任意にＲＯＣＫ阻害剤も含有する培地を用いて実施する。上記増殖因子（例えば、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃのうち少なくとも二種）のＤＮＡトランスフェクションによって上記体細胞を脱分化に供する場合、上記方法によって得られるｉＰＳＣは、Ｍｂｄ３発現をさらに阻害せずに上記体細胞中におけるＤＮＡトランスフェクションによってＯｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃを発現させて得られるｉＰＳＣと比較して、少なくとも約３０％、例えば少なくとも約４０％、少なくとも約５０％、例えば少なくとも約６０％、少なくとも約７０％、例えば少なくとも約８０％、少なくとも約９０％、例えば少なくとも約９５％、少なくとも約９９％、例えば１００％多い。
【０４５３】
例えばヒト体細胞を用いる場合、上記方法は、白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）、およびＭＢＤ３阻害剤を含有し、任意にＲＯＣＫ阻害剤も含有する培地を用いて実施する。上記増殖因子（例えば、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃのうち少なくとも二種）のＲＮＡトランスフェクションによって上記体細胞を脱分化に供する場合、上記方法によって得られるｉＰＳＣは、Ｍｂｄ３発現をさらに阻害せずに上記体細胞中におけるＲＮＡトランスフェクションによってＯｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃを発現させて得られるｉＰＳＣと比較して、少なくとも約５％、例えば少なくとも約１０％、少なくとも約２０％、例えば少なくとも約３０％、少なくとも約４０％、例えば少なくとも約５０％、少なくとも約６０％、例えば少なくとも約７５％、少なくとも約９９％、例えば１００％多い。また、先行技術の方法（ＭＢＤ３を阻害せず、本発明のある実施形態の培地も用いない）ではＲＮＡトランスフェクションを１０～２０回実施してヒト体細胞を脱分化させるが、本発明のある実施形態の方法においてはＲＮＡトランスフェクションを１～４回実施してヒト体細胞を脱分化させるため、効率が大幅に高く時間がかかる。
【０４５４】
本発明のある実施形態の一態様によれば、ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる方法であって、非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、上記非ナイーブ型ＰＳＣからナイーブ型ＰＳＣを発生させることのできる条件下においてインキュベートする工程を有し、　上記ナイーブ型ＰＳＣは、非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、かつ／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とし、　上記条件は、ＫＯ－ＤＭＥＭ、Ｎ２サプリメント（Ｇｉｂｃｏ）、限定脂質濃縮液（Ｇｉｂｃｏ）またはＡｌｂｕｍａｘ　Ｉ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、

ＬＩＦ、ｂＦＧＦ、ＴＧＦβ１、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培養基を含み、　結果として上記ナイーブ型ＰＳＣを発生させる方法 が提供される。

【０４５５】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＦＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。

【０４５６】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＴＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。

【０４５７】

本発明のある実施形態の一態様によれば、ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる方法であって、非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、上記非ナイーブ型ＰＳＣからナイーブ型ＰＳＣを発生させることのできる条件下においてインキュベートする工程を有し、　上記ナイーブ型ＰＳＣは、非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、かつ／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とし、　上記条件は、ＫＯ－ＤＭＥＭ、Ｎ２サプリメント（Ｇｉｂｃｏ）、限定脂質濃縮液（Ｇｉｂｃｏ）またはＡｌｂｕｍａｘ　Ｉ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＬＩＦ、ｂＦＧＦ、ＴＧＦβ１、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびプロテインキナーゼＣ阻害剤を含有する培養基を含み、　結果として上記ナイーブ型ＰＳＣを発生させる方法 が提供される。

【０４５８】

本発明のある実施形態によれば、上記培養基はＦＧＦＲ阻害剤をさらに含有する。

【０４５９】

本発明のある実施形態の一態様によれば、ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる方法であって、非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、上記非ナイーブ型ＰＳＣからナイーブ型ＰＳＣを発生させることのできる条件下においてインキュベートする工程を有し、　上記ナイーブ型ＰＳＣは、非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、かつ／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とし、　上記条件は、ＫＯ－ＤＭＥＭ、Ｎ２サプリメント（Ｇｉｂｃｏ）、限定脂質濃縮液（Ｇｉｂｃｏ）またはＡｌｂｕｍａｘ　Ｉ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＬＩＦ、ｂＦＧＦ、ＴＧＦβ１、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、およびＪＮＫ阻害剤を含有する培養基を含み、　結果として上記ナイーブ型ＰＳＣを発生させる方法 が提供される。

【０４６０】

本発明のある実施形態の一態様によれば、ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる方法であって、非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、上記非ナイーブ型ＰＳＣからナイーブ型ＰＳＣを発生させることのできる条件下においてインキュベートする工程を有し、　上記ナイーブ型ＰＳＣは、非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、かつ／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超え

ることを特徴とし、　上記条件は、ＫＯ－ＤＭＥＭ、Ｎ２サプリメント（Ｇｉｂｃｏ）、限定脂質濃縮液（Ｇｉｂｃｏ）、ＬＩＦ、ｂＦＧＦ、ＴＧＦβ１、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、およびＭＢＤ３阻害剤を含有する培養基を含み、　結果として上記ナイーブ型ＰＳＣを発生させる方法 が提供される。

【０４６１】

本発明のある実施形態によれば、ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる上記方法は、非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、Ｎ２サプリメント（例えば培養基５００ｍｌあたりＮ２を約５ｍｌ）を添加し、培地５００ｍｌあたり約５ｍｌの限定脂質濃縮液を添加し、ＬＩＦ（約２０ｎｇ／ｍｌ）、ｂＦＧＦ（約８ｎｇ／ｍｌ）、ＴＧＦβ１（約１ｎｇ／ｍｌ）、ＥＲＫ１／２ｉ（約１μＭのＰＤ０３２５９０１）、ＧＳＫ３ｂｉ（ＣＨＩＲ９９０２１、約３μＭ）、ｐ３８ｉ（ＳＢ２０３５８０、約５μＭ）、およびＪＮＫｉ（ＳＰ６００１２５、約５～１０μＭ）を添加したＫＯ－ＤＭＥＭを含有する培養基を含む条件下においてインキュベートする工程を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣはＸ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、　結果として上記ナイーブ型ＰＳＣを発生させる。

【０４６２】

本発明のある実施形態によれば、ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる上記方法は、非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、Ｎ２サプリメント（例えば培養基５００ｍｌあたりＮ２を約５ｍｌ）を添加し、約１～２％のＡｌｂｕｍａｘ（登録商標）ＩＩ、ＬＩＦ（約２０ｎｇ／ｍｌ）、ｂＦＧＦ（約８ｎｇ／ｍｌ）、ＴＧＦβ１（約１ｎｇ／ｍｌ）、ＥＲＫ１／２ｉ（約１μＭのＰＤ０３２５９０１）、ＧＳＫ３ｂｉ（ＣＨＩＲ９９０２１、約３μＭ）、ｐ３８ｉ（ＳＢ２０３５８０、約５μＭ）、およびＪＮＫｉ（ＳＰ６００１２５、約５～１０μＭ）を添加したＫＯ－ＤＭＥＭを含有する培養基を含む条件下においてインキュベートする工程を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣはＸ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、　結果として上記ナイーブ型ＰＳＣを発生させる。

【０４６３】

本発明のある実施形態によれば、ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる上記方法は、非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、Ｎ２サプリメント（例えば培養基５００ｍｌあたりＮ２を５ｍｌ）を添加し、約１５％のＫｏｃｋｏｕｔ　ＳＲ（Ｇｉｂｃｏ）、ＬＩＦ（約２０ｎｇ／ｍｌ）、ｂＦＧＦ（約８ｎｇ／ｍｌ）、ＴＧＦβ１（約１ｎｇ／ｍｌ）、ＥＲＫ１／２ｉ（約１μＭのＰＤ０３２５９０１）、ＧＳＫ３ｂｉ（ＣＨＩＲ９９０２１、約３μＭ）、ｐ３８ｉ（ＳＢ２０３５８０、約５μＭ）、およびＪＮＫｉ（ＳＰ６００１２５、約５～１０μＭ）を添加したＫＯ－ＤＭＥＭを含有する培養基を含む条件下においてインキュベートする工程を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣはＸ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、　結果として上記ナイーブ型ＰＳＣを発生させる。

【０４６４】

本発明のある実施形態によれば、ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる上記方法は、非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、Ｎ２サプリメント（例えば培養基５００ｍｌあたりＮ２を約５ｍｌ）を添加し、培地５００ｍｌあたり約５ｍｌの限定脂質濃縮液を添加し、ＬＩＦ（約２０ｎｇ／ｍｌ）、ｂＦＧＦ（約８ｎｇ／ｍｌ）、ＴＧＦβ１（約１ｎｇ／ｍｌ）、ＥＲＫ１／２ｉ（約１μＭのＰＤ０３２５９０１）、ＧＳＫ３ｂｉ（ＣＨＩＲ９９０２１、約３μＭ）、ｐ３８ｉ（ＳＢ２０３５８０、約５μＭ）、ＪＮＫｉ（ＳＰ６００１

２５、約５～１０μＭ）、およびＭＢＤ３阻害剤を添加したＫＯ－ＤＭＥＭを含有する培養基を含む条件下においてインキュベートする工程を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣはＸ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、　結果として上記ナイーブ型ＰＳＣを発生させる。

【０４６５】

本発明のある実施形態によれば、ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる上記方法は、非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、Ｎ２サプリメント（例えば培養基５００ｍｌあたりＮ２を約５ｍｌ）を添加し、約１～２％のＡｌｂｕｍａｘ（登録商標）ＩＩ、ＬＩＦ（約２０ｎｇ／ｍｌ）、ｂＦＧＦ（約８ｎｇ／ｍｌ）、ＴＧＦβ１（約１ｎｇ／ｍｌ）、ＥＲＫ１／２ｉ（約１μＭのＰＤ０３２５９０１）、ＧＳＫ３ｂｉ（ＣＨＩＲ９９０２１、約３μＭ）、ｐ３８ｉ（ＳＢ２０３５８０、約５μＭ）、ＪＮＫｉ（ＳＰ６００１２５、約５～１０μＭ）、およびＭＢＤ３阻害剤を添加したＫＯ－ＤＭＥＭを含有する培養基を含む条件下においてインキュベートする工程を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣはＸ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、　結果として上記ナイーブ型ＰＳＣを発生させる。

【０４６６】

本発明のある実施形態によれば、ナイーブ型多能性幹細胞（ＰＳＣ）を発生させる上記方法は、非ナイーブ型ＰＳＣ細胞を、Ｎ２サプリメント（例えば培養基５００ｍｌあたりＮ２を約５ｍｌ）を添加し、約１５％のＫｏｃｋｏｕｔ　ＳＲ（Ｇｉｂｃｏ）、ＬＩＦ（約２０ｎｇ／ｍｌ）、ｂＦＧＦ（約８ｎｇ／ｍｌ）、ＴＧＦβ１（約１ｎｇ／ｍｌ）、ＥＲＫ１／２ｉ（約１μＭのＰＤ０３２５９０１）、ＧＳＫ３ｂｉ（ＣＨＩＲ９９０２１、約３μＭ）、ｐ３８ｉ（ＳＢ２０３５８０、約５μＭ）、ＪＮＫｉ（ＳＰ６００１２５、約５～１０μＭ）、およびＭＢＤ３阻害剤を添加したＫＯ－ＤＭＥＭを含有する培養基を含む条件下においてインキュベートする工程を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣはＸ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、　結果として上記ナイーブ型ＰＳＣを発生させる。

【０４６７】

本発明のある実施形態の一態様によれば、体細胞からの人工多能性幹細胞（ｉＰＳＣ）の発生を改善する方法であって、　（ａ）Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃからなる群より選択される少なくとも二種の増殖因子を、体細胞中において発現させる工程、ならびに　（ｂ）上記体細胞中におけるＭｂｄ３の発現を阻害する、かつ／または上記体細胞中におけるＭｂｄ３のヌクレオソームリモデリング脱アセチル化酵素（ＮｕＲＤ）複合体への結合を阻害する工程を有し、　結果として体細胞からのｉＰＳＣの発生を改善する方法が提供される。

【０４６８】

本発明のある実施形態によれば、Ｍｂｄ３のＮｕＲＤ複合体への結合の阻害を、クロモドメインヘリカーゼＤＮＡ結合タンパク質４（ＣＨＤ４）阻害剤を用いて実施する。

【０４６９】

本発明のある実施形態によれば、Ｍｂｄ３のＮｕＲＤ複合体への結合の阻害を、Ｐ６６アルファ・コイルドコイル・ドメインを用いて実施する。

【０４７０】

本発明のある実施形態によれば、Ｍｂｄ３発現の阻害をプロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）阻害剤を用いて実施する。

【０４７１】

後述の実施例部分の実施例１５中に記載するように、本発明者らは、多能性幹細胞においてＥＲＡＳを過剰発現させることまたは内在性ヒトＥＲＡＳを活性化させることにより、多能性幹細胞においてナイーブ状態を誘導できることを明らかにした。

【０４７２】

本発明のある実施形態によれば、上記方法は、上記体細胞においてＥＳ細胞発現Ｒａｓ（ＥＲＡＳ）コード配列（例えば、配列番号１０９）を外因的に発現させる工程、または上記体細胞において上記ＥＲＡＳの内因的発現を活性化する工程をさらに有する。

【０４７３】

本発明のある実施形態によれば、ＥＲＡＳの内因的発現の活性化は、内在性ＥＲＡＳ遺伝子（配列番号１０８）の未成熟ポリアデニル化部位、例えば文献Ｋａｍｅｄａ ｅｔ ａｌ．Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ ２００５；２３：１５３５－１５４０の図３中のＡ－１、Ａ２、またはＡ－３の四角い枠内に記載した配列における未成熟ポリアデニル化部位、を除去することによって実施する。上記文献はその全体を参考として本明細書に組み込む。

【０４７４】

本発明のある実施形態によれば、上記発現をさせる前のＭｂｄ３のレベルのうち１０～３０％がＭｂｄ３の上記阻害により阻害されるよう、上記発現を少なくとも４８時間実施する。

【０４７５】

本発明のある実施形態によれば、上記発現を約４８時間実施し、上記約４８時間の後で上記阻害を実施する。

【０４７６】

注目するべきは、Ｍｂｄ３の阻害を４８時間後に実施し、上記阻害がＭＢＤ３の活性の発現レベルの１００％であることである。

【０４７７】

本発明のある実施形態によれば、上記ｉＰＳＣはネズミｉＰＳＣである。

【０４７８】

本発明のある実施形態によれば、上記方法は、ＬＩＦ、ＥＲＫ１／２阻害剤、およびＧＳＫ３ｂ阻害剤を含有する培地中で上記ネズミｉＰＳＣを培養する工程をさらに有する。

【０４７９】

本発明のある実施形態によれば、上記ｉＰＳＣがヒトｉＰＳＣである場合、上記方法は、

（ｃ）ＬＩＦ、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、Ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、および形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）を含有する培養基中で上記ヒトｉＰＳＣを培養する工程　をさらに有する。

【０４８０】

本発明のある実施形態によれば、工程（ｃ）を、工程（ａ）に記載の発現の開始から約４８時間後に実施する。

【０４８１】

本発明のある実施形態によれば、上記培地はＲＯＣＫ阻害剤をさらに含有する。

【０４８２】

本発明のある実施形態によれば、発現を、上記増殖因子のＤＮＡトランスフェクションによって実施する。

【０４８３】

本発明のある実施形態によれば、発現を、上記増殖因子のＲＮＡトランスフェクションによって実施する。

【０４８４】

本発明のある実施形態によれば、発現を、上記増殖因子のタンパク質トランスフェクションによって実施する。

【０４８５】

注目するべきは、細胞および細胞核へのタンパク質トランスフェクションを、Ｈｏｎｇｙ

ａｎ Ｚｈｏｕ，Ｓｈｉｌｉ Ｗｕ，ｅｔ ａｌ．“Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｉｎｄｕｃｅｄ Ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ Ｕｓｉｎｇ Ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ Ｐｒｏｔｅｉｎｓ”．Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ－５ Ｊｕｎｅ ２００９，Ｖｏｌ．４，Ｉｓｓｕｅ ６，ｐｐ．５８１に記載される通りに、本質的には、上記組換え因子を上記細胞内または上記細胞核内へ方向づけるシグナルペプチドを結合させることによって、実施できることである。上記文献はその全体を参考として本明細書に組み込む。

【０４８６】

本発明のある実施形態の一態様によれば、本発明のある実施形態の方法によって取得できる単離ナイーブ型多能性幹細胞が提供される。

【０４８７】

本発明のある実施形態によれば、上記ナイーブ型多能性幹細胞は非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、かつ／または転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とする。

【０４８８】

本発明のある実施形態の一態様によれば、分化細胞を発生させる方法であって、本発明のある実施形態の方法により発生させたナイーブ型多能性幹細胞を分化条件に供する工程を有し、結果として分化細胞を発生させる方法が提供される。

【０４８９】

本発明のある実施形態によれば、本発明のある実施形態のナイーブ型ＰＳＣを用いて、系譜特異的細胞を単離できる。

【０４９０】

本明細書中において、記載「系譜特異的細胞を単離」は、多様な培養細胞からなる細胞集団について、特定系譜表現型に関連する少なくとも１つの特徴を主として示す細胞を豊富に含むようにすることを指す。どの細胞系譜も三種の胚性胚葉に由来することが理解されるだろう。したがって、例えば、肝細胞および膵細胞は胚の内胚葉に由来し、骨組織、軟骨組織、弾性組織、線維性結合組織、ヨット、心筋細胞、骨髄細胞、血管細胞（すなわち内皮細胞および平滑筋細胞）、および造血細胞は胚の中胚葉から分化し、神経細胞、網膜細胞、および表皮細胞は胚の外胚葉に由来する。

【０４９１】

系譜特異的細胞は、未分化のナイーブ型ＰＳＣを増やし、特定細胞系譜の分化に好適な培養条件に直接誘導することによって取得できる。

【０４９２】

ＥＢの分化を系譜特異的細胞へ誘導する複数の手順およびアプローチを以下に説明するが、これらに限定されない。

【０４９３】

神経前駆体細胞　本発明のある実施形態のＥＢを神経前駆体に分化させる場合、５ｍｇ／ｍｌのインスリン、５０ｍｇ／ｍｌのトランスフェリン、３０ｎＭの塩化セレン、および５ｍｇ／ｍｌのフィブロネクチンを添加したＤＭＥＭ／Ｆ－１２培地を入れた組織培養皿中で、４日齢のＥＢを５～１２日間培養する（Ｉｔｓ ｍｅｄｉｕｍ，Ｏｋａｂｅ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．，１９９６，Ｍｅｃｈ．Ｄｅｖ．５９：８９－１０２）。得られた神経前駆体をさらに移植することによって、ｉｎ ｖｉｖｏにおいて神経細胞を発生させることができる（Ｂｒｉｓｔｌｅ，Ｏ．ｅｔ ａｌ．，１９９７．Ｉｎ ｖｉｔｒｏ－ｇｅｎｅｒａｔｅｄ ｎｅｕｒａｌ ｐｒｅｃｕｒｓｏｒｓ ｐａｒｔｉｃｉｐａｔｅ ｉｎ ｍａｍｍａｌｉａｎ ｂｒａｉｎ ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．９４：１４８０９－１４８１４）。移植より前に、神経前駆体をト

リプシン処理し、０．１％　ＤＮａｓｅの存在下において粉砕して単一細胞懸濁液とすることが理解されるだろう。

【０４９４】

オリゴデンドロサイトおよび有髄細胞　本発明のある実施形態のＥＢを、改変ＳＡＴＯ培地中、すなわち、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）、ピルビン酸塩、プロゲステロン、プトレシン、チロキシン、トリヨードチロニン、インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、アミノ酸、ニューロトロフィン３、毛様体神経栄養因子、およびＨｅｐｅｓを添加したＤＭＥＭ中で細胞を培養すると、オリゴデンドロサイトおよび有髄細胞に分化させることができる（Ｂｏｔｔｅｎｓｔｅｉｎ，Ｊ．Ｅ．＆Ｓａｔｏ，Ｇ．Ｈ．，１９７９，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　７６，５１４－５１７；Ｒａｆｆ，Ｍ．Ｃ．，Ｍｉｌｌｅｒ，Ｒ．Ｈ．，＆Ｎｏｂｌｅ，Ｍ．，１９８３，Ｎａｔｕｒｅ　３０３：３９０－３９６）。簡潔には、０．２５％トリプシン／ＥＤＴＡ（５分間、３７℃）によってＥＢを解離させ、粉砕して単一細胞懸濁液を得る。懸濁液中の細胞を、５％ウマ血清および５％ウシ胎仔血清（ＦＣＳ）を添加したＳＡＴＯ培地を入れたフラスコ中に蒔く。４日間培養した後、フラスコを穏やかに振とうすることによって、緩く接着している細胞（主にオリゴデンドロサイト）を懸濁する。このとき、星状細胞はフラスコに接着したままであり、ならし培地を産生し続ける。最初に得られたオリゴデンドロサイトを、ＳＡＴＯ培地を入れた新しいフラスコに移し、さらに２日間培養する。合計６日間培養した後、オリゴスフィアの一部を解離させてＳＡＴＯ培地中に再懸濁し、細胞移植に用いる、またはオリゴスフィアを完全に解離させて、先の振とう工程で得たオリゴスフィアならし培地に蒔く（Ｌｉｕ，Ｓ．ｅｔ　ａｌ．，（２０００）．Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌｓ　ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｅ　ｉｎｔｏ　ｏｌｉｇｏｄｅｎｄｒｏｃｙｔｅｓ　ａｎｄ　ｍｙｅｌｉｎａｔｅ　ｉｎ　ｃｕｌｔｕｒｅ　ａｎｄ　ａｆｔｅｒ　ｓｐｉｎａｌ　ｃｏｒｄ　ｔｒａｎｓｐｌａｎｔａｔｉｏｎ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．９７：６１２６－６１３１）。

【０４９５】

マスト細胞　マスト細胞に分化させる場合、本発明のある実施形態の２週齢のＥＢを、１０％のＦＣＳ、２ｍＭのＬ－グルタミン、１００ユニット／ｍｌのペニシリン、１００ｍｇ／ｍｌのストレプトマイシン、２０％（ｖ／ｖ）のＷＥＨＩ－３細胞ならし培地、および５０ｎｇ／ｍｌの組換えラット幹細胞因子を添加したＤＭＥＭ培地を入れた組織培養皿に移す（ｒｒＳＣＦ，Ｔｓａｉ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．，２０００．Ｉｎ　ｖｉｖｏ　ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　ｆｕｎｃｔｉｏｎ　ｏｆ　ｍａｓｔ　ｃｅｌｌｓ　ｄｅｒｉｖｅｄ　ｆｒｏｍ　ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌｓ：Ａｎ　ａｐｐｒｏａｃｈ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　ｒａｐｉｄ　ａｎａｌｙｓｉｓ　ｏｆ　ｅｖｅｎ　ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　ｌｅｔｈａｌ　ｍｕｔａｔｉｏｎｓ　ｉｎ　ａｄｕｌｔ　ｍｉｃｅ　ｉｎ　ｖｉｖｏ．Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　ＵＳＡ．９７：９１８６－９１９０）。週１回、細胞を新しいフラスコに移して培養基の半量を交換することによって、培養物を増やす。

【０４９６】

血液リンパ系細胞　本発明のある実施形態のＥＢから血液リンパ系細胞を発生させる場合、酸素量を調整できるインキュベーターを用いて７．５％のCO_2および５％のO_2の存在下において、２～３日齢のＥＢを気体透過性培養皿に移す。１５日間分化させた後、細胞を回収し、いずれもＦ．Ｈｏｆｆｍａｎ－Ｌａ　Ｒｏｃｈｅ　Ｌｔｄ、Ｂａｓｅｌ、スイスより入手できるコラゲナーゼ（０．１ユニット／ｍｇ）およびディスパーゼ（０．８ユニット／ｍｇ）で穏やかに消化することによって、解離させる。抗ＣＤ４５モノクローナル抗体（ｍＡｂ）Ｍ１／９．３．４．ＨＬ．２とヤギ抗ラット免疫グロブリン標識常磁性マイクロビーズ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）とを用いて、Ｐｏｔｏｃｎｉｋ、Ａ．Ｊ．ｅｔ　ａｌ．，（Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　Ｈｅｍａｔｏ－ｌｙｍｐｈｏｉｄ　ｉｎ　ｖｉｖｏ　ｒｅｃｏｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎ　ｐｏｔｅｎｔｉａｌ　ｏｆ　ｓｕｂｐｏｐｕｌａｔｉｏｎｓ　ｄｅｒｉｖｅｄ　ｆｒｏｍ　ｉｎ　ｖｉｔｒｏ　ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｅｄ

ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．１９９７，９４：１０２９５－１０３００）中に記載される通りに、ＣＤ４５陽性細胞を単離する。単離したＣＤ４５陽性細胞を、ＭＡＣＳカラム（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を１回通すことによってさらに濃縮する。

【０４９７】

ＥＢは構造が複雑であるため、ＥＢを特定の分化細胞、組織、または臓器に分化させるためにはＥＢから系譜特異的細胞を単離する必要がある場合があることが理解されるだろう。

【０４９８】

この単離は、蛍光標示式細胞分取（ＦＡＣＳ）に供してＥＢの細胞を選別するか、ＥＢに含まれる細胞、組織、および／もしくは組織様構造を機械的に分離するか、によって実施してもよい。

【０４９９】

ＥＢ由来分化細胞をＦＡＣＳ分析により単離する方法は、当技術分野において公知である。一方法によれば、トリプシンおよびＥＤＴＡ（それぞれ０．０２５％および０．０１％）の溶液を用いてＥＢを脱凝集させ、５％のウシ胎児血清（ＦＢＳ）を含有するリン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で洗浄し、特定細胞系譜に特有の細胞表面抗原に対する蛍光標識抗体と共に氷上で３０分間インキュベートする。内皮細胞は、例えば、Ｌｅｖｅｎｂｅｒｇ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．，（Ｅｎｄｏｔｈｅｌｉａｌ ｃｅｌｌｓ ｄｅｒｉｖｅｄ ｆｒｏｍ ｈｕｍａｎ ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．２００２．９９：４３９１－４３９６）中に記載される通りに、ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ、Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ Ｂｉｏ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ｓａｎ Ｊｏｓｅ、ＣＡ、米国）より入手できる蛍光標識ＰＥＣＡＭ１抗体（３０８８４Ｘ）等の血小板内皮細胞接着分子１（ＰＥＣＡＭ１）に対する抗体に付着させることによって単離する。造血細胞は、ＣＤ３４－ＦＩＴＣ、ＣＤ４５－ＰＥ、ＣＤ３１－ＰＥ、ＣＤ３８－ＰＥ、ＣＤ９０－ＦＩＴＣ、ＣＤ１１７－ＰＥ、ＣＤ１５－ＦＩＴＣ、クラスＩ－ＦＩＴＣ（いずれのＩｇＧ１もＰｈａｒＭｉｎｇｅｎより入手できる）、ＣＤ１３３／１－ＰＥ（ＩｇＧ１）（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃ、Ａｕｂｕｒｎ、ＣＡより入手できる）、およびグリコホリンＡ－ＰＥ（ＩｇＧ１）（Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈ（Ｍｉａｍｉ、ＦＬ）より入手できる）等の蛍光標識抗体を用いて単離する。生細胞（すなわち未固定の細胞）を、ＦＡＣＳｃａｎ（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ Ｂｉｏ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ）で、死細胞除外のためヨウ化プロピジウムを用い、ＰＣ－ＬＹＳＩＳソフトウェアまたはＣＥＬＬＱＵＥＳＴソフトウェアによって分析する。単離した細胞を、Ｋａｕｆｍａｎ，Ｄ．Ｓ．ｅｔ ａｌ．，（Ｈｅｍａｔｏｐｏｉｅｔｉｃ ｃｏｌｏｎｙ－ｆｏｒｍｉｎｇ ｃｅｌｌｓ ｄｅｒｉｖｅｄ ｆｒｏｍ ｈｕｍａｎ ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ．２００１，９８：１０７１６－１０７２１）に記載される通りに、磁気標識二次抗体および磁気分離カラム（ＭＡＣＳ、Ｍｉｌｔｅｎｙｉ）を用いてさらに濃縮できることが理解されるだろう。

【０５００】

拍動する心筋細胞をＥＢから機械的に単離する例が、Ｘｕ ｅｔ ａｌ．の米国特許出願第２００３００２２３６７号中に開示される。簡潔には、本発明のある実施形態の４日齢のＥＢをゼラチン被覆プレートまたはチャンバースライドに移し、付着させて分化させる。自発的に収縮する細胞が分化８日目から観察されるが、この細胞を機械的に分離して、低カルシウム培地またはＰＢＳを入れた１５ｍＬのチューブに採取する。細胞をコラゲナーゼＢにより、コラゲナーゼ活性に応じて６０～１２０分間、３７℃において消化することによって、解離させる。次いで、解離させた細胞を、分化ＫＢ培地（８５ｍＭのＫＣＩ、３０ｍＭのK_2HPO_4、５ｍＭの$MgSO_4$、１ｍＭのＥＧＴＡ、５ｍＭのクレアチン、２０ｍＭのグルコース、２ｍＭのNa_2ATP、５ｍＭのピルビン酸塩、および２０

ｍＭのタウリン、ｐＨ７．２に緩衝、Ｍａｌｔｓｅｖ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｉｒｃ，Ｒｅｓ．７５：２３３，１９９４）中に再懸濁し、３７℃において１５～３０分間インキュベートする。解離後、細胞をチャンバースライドに播種し、上記分化用培地中で培養して、拍動できる単一心筋細胞を発生させる。

【０５０１】

上記単離した系譜特異的細胞を分化させたり増やしたりするのに好適な培養条件が種々の組織培養基、増殖因子、抗生物質、およびアミノ酸等を含むこと、そして、特定の細胞種および／または細胞系譜を増やしたり分化させたりするために適用すべき条件を当業者であれば決定できることが理解されるだろう［Ｆｉｊｎｖａｎｄｒａａｔ　ＡＣ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ　Ｒｅｓ．２００３；５８：３０３－１２；Ｓａｃｈｉｎｉｄｉｓ　Ａ，ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｒｄｉｏｖａｓｃ　Ｒｅｓ．２００３；５８：２７８－９１；Ｓｔａｖｒｉｄｉｓ　ＭＰ　ａｎｄ　Ｓｍｉｔｈ　ＡＧ，２００３；Ｂｉｏｃｈｅｍ　Ｓｏｃ　Ｔｒａｎｓ．３１（Ｐｔ　１）：４５－９に参照される］。

【０５０２】

本発明のＥＢを、上記の系譜特異的な初代培養以外に、培養により無制限に増やせる系譜特異的細胞系を発生させるために用い得る。

【０５０３】

当技術分野において公知の方法でＥＢ由来細胞を不死化することによって、本発明のある実施形態の細胞系を産生できる。上記方法には、例えば、細胞中におけるテロメラーゼ遺伝子の発現（Ｗｅｉ，Ｗ．ｅｔ　ａｌ．，２００３．Ｍｏｌ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ．２３：２８５９－２８７０）または細胞とＮＩＨ　３Ｔ３　ｈｐｈ－ＨＯＸ１１レトロウイルス産生細胞との共培養（Ｈａｗｌｅｙ，Ｒ．Ｇ．ｅｔ　ａｌ．，１９９４．Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　９：１－１２）が含まれる。

【０５０４】

本発明のある実施形態のナイーブ型ＰＳＣから系譜特異的細胞を分化させるおよび／または増やすのに好適な培養条件の例を以下に記載するが、これらに限定されない。注目するべきは、上記ナイーブ型ＰＳＣの分化細胞への分化を誘導するためには、上記細胞をナイーブ型未分化多能性状態で維持するための培地を適切な分化用培地に交換する必要があるということである。

【０５０５】

ＣＤ７３陽性およびＳＳＥＡ－４陰性である間葉系間質細胞を、ナイーブ型ＰＳＣから、ナイーブ型ｈＰＳＣの培養液中に生成した線維芽細胞様分化細胞の画分を機械的に増やすことによって、本質的にＴｒｉｖｅｄｉ　Ｐ　ａｎｄ　Ｈｅｍａｔｔｉ　Ｐ．Ｅｘｐ　Ｈｅｍａｔｏｌ．２００８，３６（３）：３５０－９中に記載される通りに、発生させることができる。簡潔には、ｈＥＳＣの分化を誘導する際、培地交換の間隔を長くして３～５日間とすると、上記ナイーブ型ＰＳＣコロニーの周辺の細胞が紡錘状の細胞となり、線維芽細胞様の外観を呈する。この条件下において９～１０日後、培養液中の細胞の約４０～５０％がこのように線維芽細胞様の外観を呈したら、ナイーブ型ＰＳＣコロニーのうち未分化の部分を物理的に除去し、残った分化細胞を同様条件下で新しい培養プレートに継代する。

【０５０６】

ナイーブ型ｈＰＳＣのドーパミン作動性（ＤＡ）ニューロンへの分化誘導は、本質的に、Ｖａｚｉｎ　Ｔ，ｅｔ　ａｌ．，ＰＬｏＳ　Ｏｎｅ．２００９　Ａｕｇ　１２；４（８）：ｅ６６０６、およびＥｌｋａｂｅｔｚ　Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ．２００８　Ｊａｎｕａｒｙ　１５；２２：１５２－１６５中に記載される通りに、上記細胞をマウス間質細胞系ＰＡ６またはＭＳ５と共に共培養することによって、または間質細胞由来因子１（ＳＤＦ－１／ＣＸＣＬ１２）、プレイオトロフィン（ＰＴＮ）、インスリン様増殖因子２（ＩＧＦ２）、およびエフリンＢ１（ＥＦＮＢ１）を組み合わせたものと共に培養することによって実施できる。

【０５０７】

中脳ドーパミン（ｍｅｓＤＡ）ニューロンの発生は、本質的にＦｒｉｌｉｎｇ Ｓ．，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２００９，１０６：７６１３－７６１８中に記載される通りに、ナイーブ型ｈＰＳＣを遺伝子改変して（例えば、ＰＧＫプロモーターおよびＬｍｘ１ａを有するレンチウイルスベクターを用いることにより）転写因子Ｌｍｘ１ａを発現させることによって実施できる。

【０５０８】

ナイーブ型ｈＰＳＣからの肺上皮（ＩＩ型肺細胞）の発生は、上記ナイーブ型ＰＳＣを、市販の細胞培養培地（Ｓｍａｌｌ Ａｉｒｗａｙ Ｇｒｏｗｔｈ Ｍｅｄｉｕｍ、Ｃａｍｂｒｅｘ、Ｃｏｌｌｅｇｅ Ｐａｒｋ、ＭＤ）の存在下において、または、Ｒｉｐｐｏｎ ＨＪ．，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ａｍ Ｔｈｏｒａｃ Ｓｏｃ．２００８；５：７１７－７２２中に記載される通りに肺細胞系（例えばＡ５４９ヒト肺腺癌細胞株）から採取したならし培地の存在下において、培養することにより実施できる。

【０５０９】

ナイーブ型ｈＰＳＣ細胞の神経細胞への分化誘導は、上記多能性幹細胞を、本質的にＣｈａｍｂｅｒｓ ＳＭ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００９，２７：２７５－２８０中に記載される通りに、ＴＧＦ－ｂ阻害剤（ＳＢ４３１５４２、Ｔｏｃｒｉｓ、例えば１０ｎＭ）およびＮｏｇｇｉｎ（Ｒ＆Ｄ、例えば５００ｎｇ／ｍｌ）を添加した血清代替培地の存在下において約５日間培養し、続いてＮ２培地の量を増やしながら（例えば、２日毎に２５％、５０％、７５％と変える）（Ｌｉ ＸＪ．，ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２００５，２３：２１５～２１）、５００ｎｇ／ｍＬのＮｏｇｇｉｎの存在下において細胞を培養することにより実施できる。

【０５１０】

本発明は、ある実施形態によれば、本発明のナイーブ型多能性幹細胞から発生させた細胞、組織、および臓器を、当技術分野において公知の任意の分化プロトコールに従って用いることを意図する。

【０５１１】

本発明のある実施形態の教示に従って得られる系譜特異的細胞または細胞系が、ヒト胚中に天然に存在する分化プロセスに似た分化プロセスで発生することから、この系譜特異的細胞または細胞系を用いて、ヒト細胞に基づく療法および組織再生をさらに実施できることが理解されるだろう。

【０５１２】

したがって本発明は、ある実施形態によれば、細胞置換療法を要する障害を、本発明のある実施形態の、増やしたかつ／または分化させた系譜特異的細胞または細胞系を用いて、処置することを構想する。

【０５１３】

例えば、ＰＳＣまたはＰＳＣ由来細胞の治療目的の移植により処置できると予期されている疾患は、パーキンソン病、心筋梗塞、若年型糖尿病、および白血病を含む（Ｇｅａｒｈａｒｔ Ｊ．Ｓｃｉｅｎｃｅ １９９８，２８２：１０６１；Ｒｏｓｓａｎｔ ａｎｄ Ｎａｇｙ，Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈ．１９９９，１７：２３）。

【０５１４】

例えば、オリゴデンドロサイト前駆体を用いてミエリン障害を処置でき（Ｒｅｐａｉｒ ｏｆ ｍｙｅｌｉｎ ｄｉｓｅａｓｅ：Ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ａｎｄ ｐｒｏｇｒｅｓｓ ｉｎ ａｎｉｍａｌ ｍｏｄｅｌｓ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ Ｔｏｄａｙ．１９９７．ｐｐ．５５４－５６１）、軟骨細胞または間葉細胞を用いて骨および軟骨の欠陥を処置でき（米国特許第４，６４２，１２０号）、上皮系譜の細胞を用いて傷または熱傷を受けた皮膚を再生できる（米国特許第５，７１６，４１１号）。

【０５１５】

特定遺伝子産物が欠損している遺伝障害［例えば、嚢胞性線維症患者におけるＣＦＴＲ遺伝子産物の欠損（Ｄａｖｉｅｓ ＪＣ，２００２．Ｎｅｗ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ ｆｏｒ ｃｙｓｔｉｃ ｆｉｂｒｏｓｉｓ ｌｕｎｇ ｄｉｓｅａ

ｓｅ．Ｊ．Ｒ．Ｓｏｃ．Ｍｅｄ．９５　Ｓｕｐｐｌ　４１：５８－６７）］等、特定の障害については、ＰＳＣ由来細胞を操作して目的の変異遺伝子を過剰発現させてから患者に投与することが好ましい。その他の障害については、ＰＳＣ由来細胞を操作して特定遺伝子を除去すべきであることが理解されるだろう。

【０５１６】

遺伝子の過剰発現または除去は、ノックインおよび／またはノックアウトコンストラクトを用いて実施できる［例えば、Ｆｕｋｕｓｈｉｇｅ，Ｓ．ａｎｄ　Ｉｋｅｄａ，Ｊ．Ｅ．：Ｔｒａｐｐｉｎｇ　ｏｆ　ｍａｍｍａｌｉａｎ　ｐｒｏｍｏｔｅｒｓ　ｂｙ　Ｃｒｅ－ｌｏｘ　ｓｉｔｅ－ｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｒｅｃｏｍｂｉｎａｔｉｏｎ．ＤＮＡ　Ｒｅｓ　３（１９９６）７３－５０；Ｂｅｄｅｌｌ，Ｍ．Ａ．，Ｊｅｒｋｉｎｓ，Ｎ．Ａ．ａｎｄ　Ｃｏｐｅｌａｎｄ，Ｎ．Ｇ．：Ｍｏｕｓｅ　ｍｏｄｅｌｓ　ｏｆ　ｈｕｍａｎ　ｄｉｓｅａｓｅ．Ｐａｒｔ　Ｉ：Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　ａｎｄ　ｒｅｓｏｕｒｃｅｓ　ｆｏｒ　ｇｅｎｅｔｉｃ　ａｎａｌｙｓｉｓ　ｉｎ　ｍｉｃｅ．Ｇｅｎｅｓ　ａｎｄ　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　１１（１９９７）１－１１；Ｂｅｒｍｉｎｇｈａｍ，Ｊ．Ｊ．，Ｓｃｈｅｒｅｒ，Ｓ．Ｓ．，Ｏ’Ｃｏｎｎｅｌｌ，Ｓ．，Ａｒｒｏｙｏ，Ｅ．，Ｋａｌｌａ，Ｋ．Ａ．，Ｐｏｗｅｌｌ，Ｆ．Ｌ．ａｎｄ　Ｒｏｓｅｎｆｅｌｄ，Ｍ．Ｇ．：Ｔｓｔ－１／Ｏｃｔ－６／ＳＣＩＰ　ｒｅｇｕｌａｔｅｓ　ａ　ｕｎｉｑｕｅ　ｓｔｅｐ　ｉｎ　ｐｅｒｉｐｈｅｒａｌ　ｍｙｅｌｉｎａｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｉｓ　ｒｅｑｕｉｒｅｄ　ｆｏｒ　ｎｏｒｍａｌ　ｒｅｓｐｉｒａｔｉｏｎ．Ｇｅｎｅｓ　Ｄｅｖ　１０（１９９６）１７５１－６２を参照］。

【０５１７】

細胞置換療法に加え、本発明のある実施形態の系譜特異的細胞を用いて、ｃＤＮＡライブラリを作製できる。標準的な技術によって上記系譜特異的細胞からｍＲＮＡを調製し、さらに逆転写を実施してｃＤＮＡを形成する。このｃＤＮＡ調製物から、胚線維芽細胞、および望ましくない特異性を有する他の細胞に由来するヌクレオチドを除いて、当技術分野において公知の技術によりサブトラクトｃＤＮＡライブラリを作製できる。

【０５１８】

本発明のある実施形態の系譜特異的細胞を用いて、系譜前駆体を高分化細胞に分化させる際に影響を及ぼす因子（小分子ドラッグ、ペプチド、およびポリヌクレオチド等）または条件（培養条件または操作等）をスクリーニングできる。例えば、増殖に影響を及ぼす物質、毒素、または潜在的分化因子の試験を、これらを上記培養基に添加することによって実施できる。

【０５１９】

本発明のある実施形態の一態様によれば、始原生殖細胞を発生させる方法であって、霊長類ナイーブ型多能性幹細胞を、上記霊長類ナイーブ型多能性幹細胞から始原生殖細胞を誘導できるよう選択された培養基中において培養する工程を有し、上記培養基はＲｈｏキナーゼ（ＲＯＣＫ）阻害剤および骨形成タンパク質４（ＢＭＰ４）を含有し、結果として上記始原生殖細胞を発生させる方法が提供される。

【０５２０】

本発明のある実施形態によれば、上記霊長類ナイーブ型多能性幹細胞は非メチル化Ｘ不活性化特異的転写産物（ＸＩＳＴ）遺伝子を有し、　（ｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが女性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型女性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を２つ有し、　（ｉｉ）上記ナイーブ型ＰＳＣが男性ＰＳＣである場合、上記ナイーブ型男性ＰＳＣは上記ＸＩＳＴ遺伝子の非メチル化対立遺伝子を１つ有し、かつ／または　転写因子Ｅ３（ＴＦＥ３）の発現レベルについて、免疫染色アッセイによる核から細胞質への発現率が１に等しいもしくは１を超えることを特徴とする。

【０５２１】

本発明のある実施形態によれば、上記始原生殖細胞はＣＤ６１（インテグリンベータ３）陽性発現パターンであることを特徴とする。

【０５２２】

本発明のある実施形態によれば、上記始原生殖細胞はＣＤ６１＋／ＳＳＥＡ４＋発現パターン（発現符号）であることを特徴とする。

【０５２３】

本発明のある実施形態によれば、上記霊長類ナイーブ型多能性幹細胞から始原生殖細胞を誘導できるよう選択された培養基は、白血病抑制因子（ＬＩＦ）、幹細胞因子（ＳＣＦ）、および上皮増殖因子（ＥＧＦ）からなる群より選択される少なくとも一種の薬剤をさらに含有する。

【０５２４】

本発明のある実施形態の一態様によれば、本発明のある実施形態の方法により発生させた霊長類始原生殖細胞を含む単離霊長類始原生殖細胞集団が提供される。

【０５２５】

本発明のある実施形態によれば、上記単離霊長類始原生殖細胞集団は、ＣＤ６１$^{+}$／ＳＳＥＡ４$^{+}$発現パターンを特徴とする始原生殖細胞を少なくとも約５０％、例えば少なくとも約６０％、例えば少なくとも約７０％、例えば少なくとも約８０％、例えば少なくとも約９０％、例えば少なくとも約９５％、例えば少なくとも約９９％、例えば１００％含む。

【０５２６】

注目するべきは、本発明のある実施形態の単離始原生殖細胞（ＰＧＣ）を成体ヒト精巣または卵巣中に注入し、完全に成熟させて精子または卵を発生させ得るということである。

【０５２７】

本発明のある実施形態の一態様によれば、処置を必要とする対象を処置する方法であって、本発明のある実施形態の始原生殖細胞を上記対象の生殖腺組織に投与する工程を有し、結果として、処置を必要とする上記対象を処置する、方法が提供される。

【０５２８】

用語「対象」は、目的の病理を有する任意の年齢の哺乳類、例えば霊長類、好ましくはヒトを指す。

【０５２９】

用語「処置」は、病理（疾患、障害、または病状）の進行を阻害、予防、もしくは抑止すること、および／または病理を軽減、寛解、もしくは退縮させることを指す。当業者であれば、種々の方法およびアッセイにより病理の進行を評定できること、また同様に、種々の方法およびアッセイにより病理の軽減、寛解、または退縮を評定してもよいことを理解するであろう。

【０５３０】

本発明のある実施形態によれば、上記対象は不妊症である。

【０５３１】

本発明のある実施形態の一態様によれば、本発明のある実施形態の霊長類始原生殖細胞および不妊症処置用の医薬を有するキットが提供される。

【０５３２】

上記キットは、上記キットの品質保持期間を改善するための適切なバッファーおよび防腐剤をさらに有してもよい。

【０５３３】

上記キットは、例えば対象の不妊症の処置といった対象の処置の目的で用いる際の適切な使用説明書、およびその際の使用がＦＤＡにより承認済であることを示すラベルを有してもよい。

【０５３４】

図２６Ａ～Ｃ、１０８Ａ～Ｃ、および１０９Ａ～Ｅ中に示すように、また後述の実施例部分の実施例８中に記載するように、本発明者らは、本発明のある実施形態の単離ナイーブ型ＰＳＣを用いて、ヒトとマウスのキメラ生物を発生させることができ、かつｉｎ ｖｉｖｏにおけるマウス胚の発達に貢献することができた（Ｇａｆｎｉ ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ

ｕｒｅ　２０１３；Ｄｅｃ　１２；５０４（７４７９）：２８２－６．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎａｔｕｒｅ１２７４５．Ｅｐｕｂ　２０１３　Ｏｃｔ　３０）。注入した細胞は、上記ヒトＰＳＣを投与して２４時間後以降、発生途中の初期マウス胚において生存できた。この結果から、本発明のある実施形態の培地（例えばＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件）中で増殖させたヒトナイーブ型細胞は異種間キメラ生物の作製に貢献できることが示される。

【０５３５】
したがって、本発明のある実施形態の一態様によれば、キメラ動物を発生させる方法が提供される。上記方法は、本発明のある実施形態の単離霊長類（例えばヒト）ナイーブ型ＰＳＣ、または本発明のある実施形態の始原生殖細胞を、宿主動物の着床前胚に導入する工程を有し、結果としてキメラ動物を発生させる。
【０５３６】
本発明のある実施形態によれば、上記方法は、上記キメラ動物をｉｎ　ｖｉｖｏまたはｅｘ　ｖｉｖｏにおいて成長させる工程をさらに有する。
【０５３７】
注目するべきは、上記単離ナイーブ型多能性幹細胞または上記始原生殖細胞は着床前胚中に導入されるため正常な胚を形成する可能性が高いということである。
【０５３８】
本明細書中において、記載「キメラ動物」は、少なくとも二種の遺伝学的に別個の個体に由来する細胞を有する動物を指す。
【０５３９】
本明細書中において、用語「着床前胚」は、８細胞期の胚、１６細胞期胚、初期桑実胚、後期桑実胚、初期胚盤胞、および／または後期胚盤胞を指す。
【０５４０】
二種の異なる種のまたは同じ種の２つの別個体について、それら個体の細胞から上記キメラ動物を構成できることが注目される。
【０５４１】
本発明のある実施形態によれば、上記単離ナイーブ型ＰＳＣまたは上記始原生殖細胞は上記宿主動物と同種である。
【０５４２】
本明細書中において、用語「同種」は、遺伝学的には異なるが同じ種に属する少なくとも２つの個体を指す。
【０５４３】
本発明のある実施形態によれば、上記単離ナイーブ型ＰＳＣまたは上記始原生殖細胞は上記宿主動物とは異種である。
【０５４４】
本明細書中において、用語「異種」は、異なる種に属する少なくとも２つの個体を指す。

【０５４５】
本発明のある実施形態によれば、上記宿主動物はヒト以外である。
【０５４６】
本発明のある実施形態によれば、上記細胞の導入をｉｎ　ｖｉｖｏにおいて実施する。
【０５４７】
ｉｎ　ｖｉｖｏにおける動物の桑実胚中への細胞の投与方法は当技術分野において公知であり、例えば、Ｇａｆｎｉ　Ｏ，Ｗｅｉｎｂｅｒｇｅｒ　Ｌ，Ｍａｎｓｏｕｒ　ＡＡ，Ｍａｎｏｒ　ＹＳ，Ｃｈｏｍｓｋｙ　Ｅ，Ｂｅｎ－Ｙｏｓｅｆ　Ｄ，Ｋａｌｍａ　Ｙ，Ｖｉｕｋｏｖ　Ｓ，Ｍａｚａ　Ｉ，Ｚｖｉｒａｎ　Ａ，Ｒａｉｓ　Ｙ，Ｓｈｉｐｏｎｙ　Ｚ，Ｍｕｋａｍｅｌ　Ｚ，Ｋｒｕｐａｌｎｉｋ　Ｖ，Ｚｅｒｂｉｂ　Ｍ，Ｇｅｕｌａ　Ｓ，Ｃａｓｐｉ　Ｉ，Ｓｃｈｎｅｉｒ　Ｄ，Ｓｈｗａｒｔｚ　Ｔ，Ｇｉｌａｄ　Ｓ，Ａｍａｎｎ－Ｚａｌｃｅｎｓｔｅｉｎ　Ｄ，Ｂｅｎｊａｍｉｎ　Ｓ，Ａｍｉｔ　Ｉ，Ｔａｎａｙ　Ａ

，Ｍａｓｓａｒｗａ Ｒ，Ｎｏｖｅｒｓｈｔｅｒｎ Ｎ，Ｈａｎｎａ ＪＨ．Ｎａｔｕｒｅ．２０１３ Ｄｅｃ １２；５０４（７４７９）：２８２－６．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎａｔｕｒｅ１２７４５．Ｅｐｕｂ ２０１３ Ｏｃｔ ３０．；およびＲｉｃｈａｒｄ Ｂｅｈｒｉｎｇｅｒ；Ｍａｒｉｎａ Ｇｅｒｔｓｅｎｓｔｅｉｎ；Ｋｒｉｓｔｉｎａ Ｖｉｎｔｅｒｓｔｅｎ Ｎａｇｙ；Ａｎｄｒａｓ ＮａｇｙによるＭａｎｉｐｕｌａｔｉｎｇ ｔｈｅ Ｍｏｕｓｅ Ｅｍｂｒｙｏ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｆｏｕｒｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎに記載される。上記文献はその全体を参照として本明細書に組み込む。

【０５４８】

本発明のある実施形態によれば、上記細胞の導入は、ｉｎ ｖｉｔｒｏまたはｅｘ ｖｉｖｏにおいて、発生途中の宿主胚に直接注入することによって、または発生途中の宿主胚と共に凝集させることによって実施される。

【０５４９】

本発明のある実施形態によれば、上記桑実胚が含む細胞は少なくとも４個である。

【０５５０】

本発明のある実施形態によれば、上記桑実胚が含む細胞は１２８個を超えない。

【０５５１】

本発明のある実施形態によれば、上記宿主動物は霊長類、例えば哺乳類である。

【０５５２】

本発明のある実施形態によれば、上記宿主動物はマウスである。

【０５５３】

本発明のある実施形態によれば、上記宿主動物はブタである。

【０５５４】

本発明のある実施形態によれば、上記宿主動物はサルである。

【０５５５】

本発明のある実施形態によれば、上記宿主動物はチンパンジーである。

【０５５６】

注目するべきは、キメラ動物を作製して成長させれば、上記キメラ動物の細胞を細胞療法に用い得ることである。例えば、本発明のある実施形態に基づいて上記キメラ動物中で発生させた成熟分化細胞（例えば、造血幹細胞、肝臓の肝細胞、インスリン産生ベータ細胞）を、成体ヒトに移植できる、または生物医学的用途に用い得る。

【０５５７】

したがって、本発明のある実施形態の一態様によれば、本発明のある実施形態のキメラ動物から分化細胞、細胞系譜、組織、または臓器を単離する方法が提供される。

【０５５８】

このような分化細胞、組織または、臓器を単離する方法は当技術分野において公知であり、上記にも記載されている。

【０５５９】

したがって、上記キメラ動物の作製に用いた上記ナイーブ型ＰＳＣがヒト細胞である場合、この細胞を上記作製したキメラ動物からさらに単離してヒト対象の処置に用い得る。

【０５６０】

本発明のある実施形態によれば、上記方法は、上記キメラ動物から、ヒト由来（ヒトから生じる）細胞または組織を単離する工程をさらに有する。

【０５６１】

このようなヒトから生じる細胞、組織、または臓器の使用の例として細胞系療法、組織置換、または臓器もしくは組織の移植が挙げられるが、これらに限定されない。

【０５６２】

細胞中での目的ポリペプチド（例えば上述したタンパク質のうち任意のもの、例えばＯＣＴ４、ｃ－ＭＹＣ、ＳＯＸ２、ＫＬＦ４、ＬＩＦ、ｂＦＧＦ、ＴＧＦβ１）の発現に用い得る発現ベクター、および上記発現ベクターの細胞への投与様式について以下に説明する

が、これらに限定されない。

【０５６３】

哺乳類細胞中で外来タンパク質を発現させる場合、目的ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を、哺乳類細胞での発現に好適な核酸コンストラクトにライゲーションさせることが好ましい。このような核酸コンストラクトは、細胞中における上記ポリヌクレオチド配列の転写を構成的または誘導的に方向づけるプロモーター配列を含む。

【０５６４】

本発明のある実施形態の核酸コンストラクト（本明細書中、「発現ベクター」とも呼ばれる）は、このベクターが原核生物、真核生物、または好ましくはその両方（例えばシャトルベクター）に好適に複製および組込みまれるよう、さらなる配列を有する。また、典型的には、クローニングベクターは、転写および翻訳開始配列、転写および翻訳ターミネーター、ならびにポリアデニル化シグナルをさらに有してもよい。例えば、このようなコンストラクトは典型的には、５’ＬＴＲ、ｔＲＮＡ結合部位、パッケージングシグナル、二本目ＤＮＡの合成の起点、および３’ＬＴＲまたはその一部を有する。

【０５６５】

本発明のある実施形態の核酸コンストラクトは、典型的には、その核酸コンストラクトを含む宿主細胞から目的ペプチドを分泌するためのシグナル配列を有する。この目的で用いる
シグナル配列は、哺乳類のシグナル配列、または本発明のある実施形態の変異型ポリペプチドのシグナル配列であることが好ましい。

【０５６６】

真核生物プロモーターは、典型的には、二種の認識配列、ＴＡＴＡボックス、および上流プロモーターエレメントを有する。ＴＡＴＡボックスは転写開始点から２５～３０塩基対上流に位置し、ＲＮＡ合成開始のＲＮＡポリメラーゼへの指示に関与すると考えられている。それ以外の上流プロモーターエレメントによって、転写開始率が決定される。

【０５６７】

エンハンサーエレメントは、結合した相同または異種プロモーターからの転写を１０００倍まで促進できる。エンハンサーは、転写開始点の下流または上流に位置する場合に活性を有する。ウイルス由来のエンハンサーエレメントの多くは、多様な宿主に作用し、多様な組織に対して活性を有する。例えば、ＳＶ４０初期遺伝子エンハンサーは、多くの細胞種に対して好適に用い得る。本発明のある実施形態において好適な、他のエンハンサーとプロモーターとの組み合わせは、種々のレトロウイルスの末端反復配列、例えば
ポリオーマウイルス、ヒトまたはネズミのサイトメガロウイルス（ＣＭＶ）、ネズミ白血病ウイルス、ネズミまたはラウス肉腫ウイルス、およびＨＩＶ等の種々のレトロウイルスの末端反復配列に由来するものを含む。Ｅｎｈａｎｃｅｒｓ ａｎｄ Ｅｕｋａｒｙｏｔｉｃ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．１９８３参照。上記文献は参考として本明細書に組み込む。

【０５６８】

上記発現ベクターの構成において、上記プロモーターは、天然における転写開始点からの距離とほぼ同様の距離だけ、異種の転写開始点から離れて位置することが好ましい。しかし、当技術分野において公知の通り、この距離が多少変わってもプロモーター機能を失わない。

【０５６９】

上記発現ベクターにポリアデニル化配列を加えることによって、ｍＲＮＡ翻訳効率を増大させることもできる。正確かつ高効率のポリアデニル化には二種の別個の配列エレメント、すなわち、ポリアデニル化部位下流に位置するＧＵまたはＵリッチ配列、およびヌクレオチド１１～３０個分上流に位置するＡＡＵＡＡＡというヌクレオチド６つの高度に保存された配列が必要である。本発明のある実施形態において好適な停止およびポリアデニル化シグナルは、ＳＶ４０由来のものを含む。

【０５７０】
上述の要素の他、本発明のある実施形態の発現ベクターは、典型的には、クローニングした核酸の発現レベルを増大させるため、または組換えＤＮＡを有する細胞の同定を促進するための他の特殊要素を有してもよい。例えば、動物ウイルスの多くは、用い得る細胞種のウイルスゲノム中に余分な染色体の複製を促進するＤＮＡ配列を有する。こうしたウイルスレプリコンを有するプラスミドは、プラスミド上の遺伝子または宿主細胞のゲノムの遺伝子によって適切な因子が提供される場合に、エピソームとして複製する。
【０５７１】
上記ベクターは、真核レプリコンを有してもよいし、有していなくてもよい。真核レプリコンを有する場合、上記ベクターは、適切な選択マーカーを用いて真核細胞中で増幅させることができる。上記ベクターが真核レプリコンを有さない場合、エピソームは増幅できない。その代り、操作した細胞のゲノムと組換えＤＮＡとが一体化し、プロモーターが所望の核酸の発現を指示する。
【０５７２】
本発明のある実施形態の発現ベクターは、例えば内部リボソーム進入部位（ＩＲＥＳ）等の単一のｍＲＮＡから数種のタンパク質を翻訳することを可能とする、さらなるポリヌクレオチド配列、およびゲノム内においてプロモーターキメラポリペプチドを一体化するための配列をさらに有し得る。
【０５７３】
上記発現ベクター中の上記個々の要素は多様な配置をとり得ることが理解されるだろう。例えば、エンハンサーエレメントやプロモーター等、また目的タンパク質をコードするポリヌクレオチド配列は、「同方向（ｈｅａｄ－ｔｏ－ｔａｉｌ）」で配置され得、その配置は逆相補的であってもよいし、相補的に逆平行鎖として配置されていてもよい。こうした多様な配置は上記発現ベクターの非コードエレメントがとる場合が多いが、上記以外の配置を上記発現ベクター中のコード配列がとる場合も構想に含まれる。
【０５７４】
哺乳類発現ベクターの例として、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎより入手できるｐｃＤＮＡ３、ｐｃＤＮＡ３．１（＋／－）、ｐＧＬ３、ｐＺｅｏＳＶ２（＋／－）、ｐＳｅｃＴａｇ２、ｐＤｉｓｐｌａｙ、ｐＥＦ／ｍｙｃ／ｃｙｔｏ、ｐＣＭＶ／ｍｙｃ／ｃｙｔｏ、ｐＣＲ３．１、ｐＳｉｎＲｅｐ５、ＤＨ２６Ｓ、ＤＨＢＢ、ｐＮＭＴ１、ｐＮＭＴ４１、ｐＮＭＴ８１、Ｐｒｏｍｅｇａより入手できるｐＣＩ、Ｓｔｒａｔｅｇｅｎｅより入手できるｐＭｂａｃ、ｐＰｂａｃ、ｐＢＫ－ＲＳＶ、およびｐＢＫ－ＣＭＶ、Ｃｌｏｎｔｅｃｈより入手できるｐＴＲＥＳ、ならびにそれらの派生物が含まれるが、これらに限定されない。
【０５７５】
レトロウイルス等の真核ウイルス由来の調節エレメントを有する発現ベクターも用い得る。ＳＶ４０ベクターにはｐＳＶＴ７およびｐＭＴ２が含まれる。ウシパピローマウイルス由来のベクターにはｐＢＶ－１ＭＴＨＡが含まれ、エプスタイン・バーウイルス由来のベクターにはｐＨＥＢＯおよびｐ２Ｏ５が含まれる。上記以外のベクターの具体例として、ｐＭＳＧ、ｐＡＶ００９／Ａ$^{+}$、ｐＭＴＯ１０／Ａ$^{+}$、ｐＭＡＭｎｅｏ－５、バキュロウイルスｐＤＳＶＥが含まれ、また、ＳＶ－４０初期プロモーター、ＳＶ－４０後期プロモーター、メタロチオネインプロモーター、ネズミ乳房腫瘍ウイルスプロモーター、ラウス肉腫ウイルスプロモーター、ポリヘドリンプロモーター、または真核細胞中での発現に有効であると示されている他のプロモーターの誘導によりタンパク質の発現をなし得る任意の他のベクターが含まれる。
【０５７６】
上述するように、ウイルスは非常に特殊な感染病原体であり、宿主の防御機構を免れて進化したものが多い。典型的には、ウイルスは感染して特定細胞種中で増殖する。ウイルスベクターはターゲティング特異性を有し、すなわち所定の細胞種を特異的にターゲティングする固有の特異性を有しており、この特異性によって、感染した細胞中に組換え遺伝子を導入する。したがって、本発明のある実施形態においてどの種類のベクターを用いるか

は、形質転換する細胞種によって決まる。当業者であれば、形質転換する細胞種に応じて好適なベクターを選択できるため、本明細書中ではこの選択について概説しない。例えば、骨髄細胞はヒトＴ細胞白血病ウイルスＩ型（ＨＴＬＶ－Ｉ）を用いてターゲティングでき、腎細胞は、Ｌｉａｎｇ ＣＹ ｅｔ ａｌ．，２００４（Ａｒｃｈ Ｖｉｒｏｌ．１４９：５１－６０）中に記載されるバキュロウイルスであるオートグラファカリフォルニア核多角体病ウイルス（ＡｃＭＮＰＶ）中に存在する異種のプロモーターを用いてターゲティングできる。

【０５７７】

組換えウイルスベクターは、横方向に感染できたりターゲティング特異性があったりする等の利点があり、そのためｉｎ ｖｉｖｏにおける目的タンパク質の発現に有用である。横方向の感染はレトロウイルス等のライフサイクルに特有のプロセスであり、感染細胞１つから多くのウイルス粒子子孫が産生され、続いてこれらが出芽して付近の細胞に感染する、というものである。この結果、元のウイルス粒子に最初に感染した領域以外の広い領域も含めた広い範囲に、感染が急速に広がる。この点で、横方向の感染は、感染病原体が娘子孫を通じてのみ広がる縦方向の感染とは異なる。ウイルスベクターは、水平方向に広がることができないようにも作製できる。この特徴は、ターゲット細胞の一部に限局的に特定遺伝子を導入したい場合に有用であり得る。

【０５７８】

種々の方法によって、本発明のある実施形態の発現ベクターを幹細胞中に導入できる。こうした方法は、一般的に、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇｓ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ（１９８９，１９９２），ｉｎ Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｍｄ．（１９８９），Ｃｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．，Ｓｏｍａｔｉｃ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒａｐｙ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ，Ｍｉｃｈ．（１９９５），Ｖｅｇａ ｅｔ ａｌ．，Ｇｅｎｅ Ｔａｒｇｅｔｉｎｇ，ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ａｎｎ Ａｒｂｏｒ Ｍｉｃｈ．（１９９５），Ｖｅｃｔｏｒｓ：Ａ Ｓｕｒｖｅｙ ｏｆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｖｅｃｔｏｒｓ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｕｓｅｓ，Ｂｕｔｔｅｒｗｏｒｔｈｓ，Ｂｏｓｔｏｎ Ｍａｓｓ．（１９８８）およびＧｉｌｂｏａ ｅｔ ａｔ．［Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ４（６）：５０４－５１２，１９８６］中に記載される。上記方法には、例えば、安定的トランスフェクションまたは一過性トランスフェクション、リポフェクション、電気穿孔、および組換えウイルスベクターによる感染が含まれる。また、陽性・陰性の選択法については米国特許第５，４６４，７６４号および米国特許第５，４８７，９９２号を参照。

【０５７９】

ウイルス感染によって核酸を導入すると、ウイルスが感染性であるためにトランスフェクション効率が高いため、リポフェクションおよび電気穿孔等の他の方法では得られないいくつかの利点が得られる。

【０５８０】

現在好ましく用いられるｉｎ ｖｉｖｏ核酸転移技術には、アデノウイルス、レンチウイルス、単純ヘルペスＩ型ウイルス、またはアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）等のウイルス性もしくは非ウイルス性コンストラクトによるトランスフェクション、および脂質系機構によるトランスフェクションが含まれる。上記遺伝子の脂質介在性転移に用いる有用な脂質は、例えばＤＯＴＭＡ、ＤＯＰＥ、およびＤＣ－Ｃｈｏｌである［Ｔｏｎｋｉｎｓｏｎ ｅｔ ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｖｅｓｔｉｇａｔｉｏｎ，１４（１）：５４－６５（１９９６）］。遺伝子療法において最も好ましく用いるコンストラクトはウイルスであり、最も好ましくはアデノウイルス、ＡＡＶ、レンチウイルス、またはレトロウイルスである。レトロウイルスコンストラクト等のウイルスコンストラクトは、少なくとも１つの転写プロモーター／エンハンサーもしくは遺伝子座規定要素を有する、または、他の手段、

例えば選択的スプライシング、核ＲＮＡの核外輸送、もしくはメッセンジャー翻訳後修飾等によって遺伝子発現を制御する他の要素を有する。このようなベクターコンストラクトは、用いるウイルスに適切なパッケージングシグナル、末端反復配列（ＬＴＲ）またはその一部、ならびにプラスおよびマイナス鎖プライマー結合部位が上記ウイルスコンストラクト中に存在しない場合には、これらをさらに有する。また、このようなコンストラクトは、典型的には、そのコンストラクトを含む宿主細胞からペプチドを分泌するためのシグナル配列を有する。この目的で用いるシグナル配列は、哺乳類のシグナル配列、または本発明のある実施形態の変異型ポリペプチドのシグナル配列であることが好ましい。任意に、上記コンストラクトは、ポリアデニル化を誘導するシグナル、ならびに制限部位１つ以上および翻訳終結配列１つをさらに有してもよい。例えば、このようなコンストラクトは典型的には、５’ＬＴＲ、ｔＲＮＡ結合部位、パッケージングシグナル、二本目ＤＮＡの合成の起点、および３’ＬＴＲまたはその一部を有する。ウイルスではない他のベクター、例えばカチオン化脂質、ポリリシン、およびデンドリマー等も用い得る。

【０５８１】

本発明のある実施形態の発現コンストラクトは、挿入したコード配列の転写および翻訳に必要な要素を有するほか、発現させるペプチドの安定性、生産性、精製、収率、または毒性を増大させるよう操作した配列をさらに有する。例えば、本発明のある実施形態の目的ポリペプチドと共に異種のタンパク質も有する融合タンパク質または切断可能融合タンパク質を発現するように操作できる。このような融合タンパク質を、アフィニティクロマトグラフィーにより、例えば異種のタンパク質に特異的なカラム上に固定することにより、融合タンパク質を簡単に単離できるよう設計できる。目的タンパク質と異種のタンパク質の間に切断部位がくるように操作すれば、切断部位を破壊する適切な酵素または薬剤で処理することによって目的タンパク質をクロマトグラフィーカラムから放出させることができる［例えば、Ｂｏｏｔｈ　ｅｔ　ａｌ．（１９８８）Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｌｅｔｔ．１９：６５－７０；およびＧａｒｄｅｌｌａ　ｅｔ　ａｌ．，（１９９０）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６５：１５８５４－１５８５９参照］。

【０５８２】

上述のように、多様な原核細胞または真核細胞を、本発明のある実施形態のポリペプチドを発現させる宿主発現系として用い得る。こうした多様な原核細胞または真核細胞には、挿入コード配列を有する

組換えバクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ、またはコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換した細菌等の微生物、挿入コード配列を有する組換え酵母発現ベクターで形質転換した酵母、挿入コード配列を有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルスＣａＭＶやタバコモザイクウイルスＴＭＶ）に感染させた、または挿入コード配列を有するＴｉプラスミド等の組換えプラスミド発現ベクターで形質転換した植物細胞系が含まれるが、これらに限定されない。哺乳類発現系によって本発明のある実施形態のポリペプチドを発現させることもできる。

【０５８３】

細菌コンストラクトの例として、ｐＥＴ系の大腸菌発現ベクターが挙げられる［Ｓｔｕｄｉｅｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８５：６０－８９］。

【０５８４】

酵母においては、米国特許出願第５，９３２，４４７号中に開示されるような、構成型または誘導性プロモーターを有する複数のベクターを用い得る。あるいは、外来性ＤＮＡ配列の酵母染色体中への組込みを促進するベクターも用い得る。

【０５８５】

植物発現ベクターを用いる場合、挿入コード配列の発現を複数のプロモーターによって開始させることができる。例えば、ＣａＭＶの３５Ｓ　ＲＮＡおよび１９Ｓ　ＲＮＡプロモーター等のウイルスプロモーター（Ｂｒｉｓｓｏｎ　ｅｔ　ａｌ．（１９８４）Ｎａｔｕｒｅ　３１０：５１１－５１４）、またはＴＭＶに対するコートタンパク質プロモーター

（Ｔａｋａｍａｔｓｕ ｅｔ ａｌ．（１９８７）ＥＭＢＯＪ．６：３０７－３１１）を用い得る。あるいは、ＲＵＢＩＳＣＯの小サブユニット等の植物プロモーター（Ｃｏｒｕｚｚｉ ｅｔ ａｌ．（１９８４）ＥＭＢＯ Ｊ．３：１６７１－１６８０ ａｎｄ Ｂｒｏｇｌｉ ｅｔ ａｌ．，（１９８４）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２２４：８３８－８４３）、または例えば大豆ｈｓｐ１７．５－Ｅもしくはｈｓｐ１７．３－Ｂ等の熱ショックプロモーター（Ｇｕｒｌｅｙ ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．６：５５９－５６５）も用い得る。こうしたコンストラクトを、Ｔｉプラスミド、Ｒｉプラスミド、植物ウイルスベクター、直接的なＤＮＡ形質転換、マイクロインジェクション、電気穿孔、および当業者に既知の他の技術によって、植物細胞中に導入できる。例えば、Ｗｅｉｓｓｂａｃｈ＆Ｗｅｉｓｓｂａｃｈ，１９８８，Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ Ｐｌａｎｔ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ，ＮＹ，Ｓｅｃｔｉｏｎ ＶＩＩＩ，ｐｐ ４２１－４６３を参照。

【０５８６】

当技術分野において公知であり以下に記載する昆虫および哺乳類の宿主細胞系等の他の発現系も、本発明のある実施形態において用い得る。

【０５８７】

形質転換した細胞を、目的の組換えポリペプチド（例えば、ＬＩＦ、ＴＧＦβ１、ｂＦＧＦ、ＯＣＴ４、ｃ－ｍｙｃ、ＳＯＸ２、ＫＬＦ－４）を多量に発現できる効果的な条件のもとで培養する。所定時間にわたって培養した後、組換えポリペプチドを回収する。記載「組換えポリペプチドの回収」は、本明細書中において、上記ポリペプチドを含有する発酵培地全体を採取することを指し、分離または精製といったさらなる工程を必ずしも示唆しない。

【０５８８】

したがって、目的ポリペプチドを、多様な標準的タンパク質精製技術、例えばアフィニティクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ろ過、電気泳動、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、コンカナバリンＡクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、および分別可溶化によって精製できるが、これらに限定されない。

【０５８９】

目的ポリペプチドは、好ましくは、「実質的に純粋」な状態で取り出す。本明細書中において、記載「実質的に純粋」は、「実質的に純粋」な目的ポリペプチド（例えば、ＬＩＦ、ＴＧＦβ１、ｂＦＧＦ）を用いれば上記ヒト胚性幹細胞を培養中にわたり未分化状態で維持できる、という純度を指す。

【０５９０】

本明細書中において、用語「約」は±１０％を指す。

【０５９１】

用語「含む」、「有する」、「含有する」、「もつ」、「持つ」、およびこれらの活用形は、「非限定的に含む」ことを意味する。

【０５９２】

用語「からなる」は「限定的に含む」ことを意味する。

【０５９３】

用語「から本質的になる」は、組成物、方法、または構造がさらなる成分、工程、および／または部分を、これらさらなる成分、工程、および／または部分が上記組成物、方法、または構造の基本的かつ新規の特徴を変更しない場合にのみ、含んでもよいことを意味する。

【０５９４】

本明細書中において、単数形「ａ」、「ａｎ」、および「ｔｈｅ」は、本明細書において別途明瞭に指定されない限り、複数形も含む。例えば、用語「化合物」または「少なくとも１つの化合物」は、複数の化合物およびそれらの混合物を含んでもよい。

【０５９５】

本出願の全体にわたって、本発明の種々の実施形態を範囲様式で記載する場合がある。範囲様式での記載は便利さと簡潔さを期してのものであり、本発明の範囲を不変に変更すると解釈されるべきでないことが理解されるだろう。したがって、範囲の記載は、考え得るあらゆる副範囲および当該範囲内の個々の数値を具体的に開示すると考えられるべきである。例えば、１～６等の範囲を記載する場合、１～３、１～４、１～５、２～４、２～６、３～６等の副範囲ならびに当該範囲内の個々の数値、例えば１、２、３、４、５、および６を具体的に開示すると考えられるべきである。上記説明は、該当範囲の幅にかかわらず適用される。

【０５９６】

本明細書中の数値範囲はいずれも、記載範囲内の任意の数値（分数または整数）を含むものである。第一の記載数値および第二の記載数値「の範囲／の間の範囲」、ならびに第一の記載数値「～」第二の記載数値「の範囲／の間の範囲」という記載は、本明細書中において区別なく用い、第一および第二の記載数値ならびにその間のすべての分数および整数を含むことを意味する。

【０５９７】

本明細書中において、用語「方法」は所与の課題や作業を達成するための手法、手段、技術、および手順を指し、例えば、化学分野、薬理学分野、生物学分野、生化学分野、および医学分野において実際の業務にあたる者に既知の手法、手段、技術、および手順、または化学分野、薬理学分野、生物学分野、生化学分野、および医学分野において実際の業務にあたる者が既知の手法、手段、技術、および手順に基づいて簡単に開発できる手法、手段、技術、および手順を含むが、これらに限定されない。

【０５９８】

本明細書中において、用語「処置」は、病状の進行を排除、実質的に阻害、減速、もしくは逆転すること、病状の臨床的もしくは審美的な症状を実質的に改良すること、または病状の臨床的または審美的な症状の出現を実質的に予防することを含む。

【０５９９】

別個の実施形態中に明確に記載される本発明の特色を組み合わせて１つの実施形態中に提供してもよいことが理解される。逆に、１つの実施形態中に簡潔に記載される本発明の種々の特色を、本発明に記載の他の任意の実施形態中において、別々に、または任意の好適な副次組み合わせにおいて、または好適に提供してもよい。種々の実施形態中に記載する特色はいずれも、当該要素が当該実施形態の実施に不可欠でない限り、当該実施形態にとって必須の特色であるとはみなされない。

【０６００】

上記に詳細に記載する本発明の種々の実施形態および態様、ならびに下記の請求項部分中に主張する本発明の種々の実施形態および態様は、以下の実施例により実験的に裏づけられる。

【０６０１】

実施例　下記の実施例について説明する。下記の実施例は上記記載と共に、本発明のある実施形態の例を、限定することなく説明するものである。

【０６０２】

一般的に、本明細書中で用いる学術用語、および本発明において用いる実験手順は、分子学的技術、生化学的技術、微生物学的技術、および組換えＤＮＡ技術を含む。こうした技術は、先行技術において十分に説明されている。例えば以下を参照：“Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ”Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ.，（１９８９）；“Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ”Ｖｏｌｕｍｅｓ Ｉ－ＩＩＩ Ａｕｓｕｂｅｌ，Ｒ.Ｍ.，ｅｄ.（１９９４）；Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ.，“Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ”，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ，Ｂａｌｔｉｍｏｒｅ，Ｍａｒｙｌａｎｄ（１９８９）；Ｐｅｒｂａｌ，“Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ｇｕｉｄｅ ｔｏ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ”，Ｊ

ohn Wiley&Sons, New York（1988）；Watson et al.,“Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York；Birren et al.（eds）“Genome Analysis：A Laboratory Manual Series”, Vols.1－4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York（1998）；米国特許第4，666，828号、米国特許第4，683，202号、米国特許第4，801，531号、米国特許第5，192，659、および米国特許第5，272，057に記載の方法；“Cell Biology：A Laboratory Handbook”, Volumes I－III Cellis, J.E., ed.（1994）；“Current Protocols in Immunology”Volumes I－III Coligan J.E., ed.（1994）；Stites et al.（eds）,“Basic and Clinical Immunology”（8th Edition）, Appleton&Lange, Norwalk, CT（1994）；Mishell and Shiigi（eds）,“Selected Methods in Cellular Immunology”, W.H. Freeman and Co., New York（1980）；米国特許第3，791，932号、米国特許第3，839，153号、米国特許第3，850，752号、米国特許第3，850，578号、米国特許第3，853，987号、米国特許第3，867，517号、米国特許第3，879，262号、米国特許第3，901，654号、米国特許第3，935，074号、米国特許第3，984，533号、米国特許第3，996，345号、米国特許第4，034，074号、米国特許第4，098，876号、米国特許第4，879，219号、米国特許第5，011，771号、および米国特許第5，281，521号等、特許および科学文献中に広く記載される、利用可能なイムノアッセイ；“Oligonucleotide Synthesis”Gait, M.J., ed.（1984）；“Nucleic Acid Hybridization”Hames, B.D., and Higgins S.J., eds.（1985）；“Transcription and Translation”Hames, B.D., and Higgins S.J., Eds.（1984）；“Animal Cell Culture”Freshney, R.I., ed.（1986）；“Immobilized Cells and Enzymes”IRL Press,（1986）；“A Practical Guide to Molecular Cloning”Perbal, B.,（1984）and“Methods in Enzymology”Vol.1－317, Academic Press；“PCR Protocols：A Guide To Methods And Applications”, Academic Press, San Diego, CA（1990）；Marshak et al.,“Strategies for Protein Purification and Characterization－A Laboratory Course Manual”CSHL Press（1996）。上記文献はすべてその全体を参照として本明細書に組み込み、本明細書中に記載されているのと同等とする。上記以外の一般的な先行技術文献も本明細書中に提供される。これら先行技術文献中の手順は、当技術分野において公知であるとみなし、読者の便宜のために提供される。これら先行技術文献に含まれる情報はすべて、参考として本明細書に組み込む。

【0603】

一般的な材料および実験方法　マウス幹細胞株および細胞培養液　ネズミナイーブ型多能性細胞の初期化および維持を、240mlのDMEM／F12（Biological Industries、オーダーメイド）、240mlのNeurobasal（Invitrogen、21103）、5mlのN2サプリメント（Invitrogen、17502048）、5mlのB27サプリメント（Invitrogen、17504044）、15％のノックアウト血清代替物（Invitrogen、10828）、1

ｍＭのグルタミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、１％の非必須アミノ酸（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、０．１ｍＭのβ－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ）、ペニシリン－ストレプトマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、５ｍｇ／ｍｌのＢＳＡ（Ｓｉｇｍａ）を含有する、化学組成が限定された無血清Ｎ２Ｂ２７系培地中で実施した。ネズミＰＳＣ用のナイーブ型条件は、１０ｎｇ／ｍｌの組換えヒトＬＩＦ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、ＬＩＦ１００５）（５００ｍｌあたり５μｇ）を含むものであった。「２ｉ」阻害剤と記載される場合、次の薬剤を添加した：小分子阻害剤ＣＨＩＲ９９０２１（ＣＨ、３μＭ、Ａｘｏｎ Ｍｅｄｃｈｅｍ）およびＰＤ０３２５９０１（ＰＤ、１μＭ、ＴＯＣＲＩＳ）。「２ｉ」は、ＯＳＫＭ誘導の４８時間後に添加した。

【０６０４】

ネズミ細胞（ＥｐｉＳＣ）用の「プライム型Ｎ２Ｂ２７培地」は、８ｎｇ／ｍｌの組換えヒトｂＦＧＦ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ Ａｓｉａ）および２０ｎｇ／ｍｌの組換えヒトアクチビン（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ Ａｓｉａ）を含有するものであった。

【０６０５】

幹細胞株と、Ｍｂｄ３欠失マウスおよびこれに由来するＥＳ株とを、以前の記載通りに入手した（Ｋａｊｉ ｅｔ ａｌ．，２００７）（Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／ｆｌｏｘ}$、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$、およびＭｂｄ３$^{＋／－}$）（Ｋａｊｉ ｅｔ ａｌ．，２００６）。マウス多能性幹細胞株のさらなる遺伝子ターゲティング（Ｎａｎｏｇ－ＧＦＰレポーター、ｐＢＲＹ－Ｍｂｄ３レスキューコンストラクト、Ｒｏｓａ２６－ＣｒｅＥＲ）を実施するため、ターゲティングコンストラクトのＤＮＡを５０μｇ、直線化に供し、該当する多能性細胞株中に電気穿孔した。次いで、得られた多能性細胞株をＧ４１８（３００マイクロｇ／ｍｌ）またはピューロマイシン（１マイクロｇ／ｍｌ）による選択に供した。抗生物質選択を１０日間実施した後、薬剤耐性クローンをＰＣＲまたはサザンブロット分析によって分析し、ターゲティングの正確性を期した。

【０６０６】

限定マウス２ｉ／ＬＩＦ条件下においてＥＳＣ誘導するＭｂｄ３Ｕｔｘ$^{＋／－}$の雄と雌を交配した。Ｅ３．５胚盤胞を回収し、外植して、限定マウス２ｉ／ＬＩＦ条件下においてＭＥＦ被覆プレート上でＥＳＣ誘導を実施した。

【０６０７】

以前の記載通りに、ＳｈＲＮＡ ｐＬＫＯ－Ｔｅｔ－Ｏｎベクター（ａｄｄｇｅｎｅ）による二次的ＮＧＦＰ１ ｉＰＳＣ株の感染およびサブクローニングを実施し、これによりＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{ＫＤ}を確立した（Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ４６２，５９５－６０１，２００９）。Ｆｌａｇタグ内在性Ｏｃｔ４対立遺伝子（図６０Ｃ）を有するＶ６．５マウスＥＳＣを、以前の記載通りに、直接的な遺伝子ターゲティングにより発生させた（Ｔｓａｉ，Ｈ．Ｈ．，Ｂｏｕｒｑｕｅ，Ｇ．＆Ｌｕｆｋｉｎ，Ｔ．Ｉｎ ｓｉｌｉｃｏ ｔａｎｄｅｍ ａｆｆｉｎｉｔｙ ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ｒｅｆｉｎｅｓ ａｎ Ｏｃｔ４ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ ｌｉｓｔ．Ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｔｈｅｒ．２：２６，２０１１）。マイコプラズマ属検出試験を週１回実施して、混入細胞を確実かつ完全に除外する。遺伝子型の判定とＭｂｄ３欠損に関する機能の検証とを、本研究全体を通して示す（例として、図１Ｉ～Ｊおよび図８Ｍ～Ｎ）。

【０６０８】

マウスプライム型エピブラスト細胞のエピジェネティックな逆戻り ２ｉ／ＬＩＦ条件下において維持される雄ナイーブ型Ｖ６．５（Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$）Ｎａｎｏｇ－ＧＦＰ ＥＳＣ（Ｍａｎｓｏｕｒ ｅｔ ａｌ．，２０１２）細胞を、ＢＤＦ２胚盤胞およびエピブラストに注入した。Ｅ６．５日齢においてキメラ胚を解剖し、１μｇ／ｍｌピューロマイシンを添加したＮ２Ｂ２７ ｂＦＧＦ／アクチビン条件下において、ゼラチン／ビトロネクチン被覆プレート上に外植した。こうしてＮａｎｏｇ－ＧＦＰ ＥｐｉＳＣを単離した。エピジェネティックな逆戻りによりネズミＥｐｉＳＣにナイーブ型多能性を獲得させるため、細胞を継代して、Ｎ２Ｂ２７ ２ｉ／ＬＩＦ条件かつビトロネクチン（１μｇ／ｍ

１）およびゼラチン（０．２％）被覆プレート上に移した（外来初期化因子を過剰発現させずに）。エピジェネティックな逆戻りのアッセイにおいて単一細胞を播く際、トリプシン処理前の２４時間にわたってＥｐｉＳＣ増殖培地にＲＯＣＫ阻害剤を添加した。ｓｉＲＮＡ（ＯＮ－ＴＡＲＧＥＴｐｌｕｓ　ＳＭＡＲＴｐｏｏｌ）およびコントロールｓｉＲＮＡ（ＯＮ－ＴＡＲＧＥＴｐｌｕｓ　Ｎｏｎ－ｔａｒｇｅｔｉｎｇ　ｐｏｏｌ　Ｄ－００１８１０－１０－０５）をＤｈａｒｍａｃｏｎから購入した。１０ｎＭのｓｉＲＮＡまたはコントロールを用いてＬｉｐｏｆｅｃｔａｍｉｎｅ　ＲＮＡｉＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）によるトランスフェクションを実施した。

【０６０９】

ＥＧ（マウス胚性生殖細胞）誘導実験において、Ｏｃｔ４－ＧＦＰ＋　ＰＧＣ（始原生殖細胞）細胞をＥ８．５解剖キメラ胚から選別し、Ｎ２Ｂ２７－１５％ＫＳＲ、ＬＩＦ（２０ｎｇ／ｍｌ）／ＳＣＦ（１０ｎｇ／ｍｌ）／ｂＦＧＦ（８ｎｇ／ｍｌ）培地、および２ｉ（４８時間後に添加）に単独で蒔いた。ＥｐｉＳＣおよびこれに由来するＰＧＣの核ｍＣｈｅｒｒｙ標識により、播く効率を計算でき、また初期化効率（初期化効率％＝Ｏｃｔ４またはＮａｎｏｇ－ＧＦＰクローン／ｍＣｈｅｒｒｙ＋クローン）を計算した。

【０６１０】

ＯＫＳＭ因子：Ｏｃｔ４（配列番号５４のタンパク質）、Ｓｏｘ２（配列番号５６のタンパク質）、ｃ－Ｍｙｃ（配列番号６０のタンパク質）、およびＫｌｆ４（配列番号５８のタンパク質）。

【０６１１】

マウス体細胞初期化および細胞感染　種々の初期化ウイルス（ＳＴＥＭＣＡ－ＯＫＳＭポリシストロン性ベクター（配列番号６２）（Ｄｏｘ誘導性かつ恒常的発現）（Ｍａｎｓｏｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２）、ＳＴＥＭＣＣＡ－ＯＫＳポリシストロン性ベクター（ＤＯＸ誘導性かつ恒常的発現）、ＦＵＷ－ｔｅｔＯ－ｌｏｘ－ｈＫＬＦ４、ＦＵＷ－ｔｅｔＯ－ｌｏｘ－ｈＯＣＴ４およびＦＵＷ－ｔｅｔＯ－ｌｏｘ－ｈＳＯＸ２、ＦＵＷ－ｔｅｔＯ－ｍＫｌｆ４、ＦＵＷ－ｔｅｔＯ－ｍＯｃｔ４、ＦＵＷ－ｔｅｔＯ－ｍＳｏｘ２、ＦＵＷ－ｔｅｔＯ－ｃ－Ｍｙｃ、ＦＵＷ－Ｏｃｔ４－２Ａ－Ｓｏｘ２、ＦＵＷ－Ｏｃｔ４－２Ａ－Ｋｌｆ４、ＦＵＷ－ｔｅｔＯ－ｌｏｘ－ＳＯＸ２、ｐＭＸｓ－ＯＣＴ４、ｐＭＸｓ－ＳＯＸ２、ｐＭＸｓ－ＫＬＦ４、およびｐＭＸｓ－ｃＭＹＣ）のウイルス含有上清に、ＦＵＷ－ｌｏｘ－Ｍ２ｒｔＴＡウイルス（必要時）および等体積の新しい培養基を添加して、感染を実施した。マウス線維芽細胞と他の体細胞型とを分け、二次的トランスジェニック初期化可能キメラから単一細胞を選別した（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２００９ａ；Ｍａｎｓｏｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２）。ＤＯＸ誘導性ＯＳＫＭをコードする導入遺伝子を有する二次的トランスジェニックマウス体細胞（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２００９ａ；Ｍａｎｓｏｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２）を、マウスナイーブ型ＥＳＣ培地＋ドキシサイクリン（ＤＯＸ）を用いて初期化した（最初の４８時間は２ｉ無しで、その後工程終了まで２ｉ添加にて）。ヒトｉＰＳＣの初期化は、ＯＳＫＭをコードするレンチウイルスを用いて、ヒト分化細胞のレンチウイルス感染によって実施し、感染させて４８時間後からＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件を開始した。

【０６１２】

ｉＰＳＣの初期化は、マウスナイーブ型ＥＳＣ培地２ｉ／ＬＩＦ＋ＤＯＸ（１μｇ／ｍｌ）（最初の４８時間は２ｉ無しで）を用いて、生理的５％Ｏ２条件下において実施した。Ｍｂｄ３$^{-/-}$ＭＥＦ（多能性細胞ではない）の老化が加速されて増殖能を喪失したため、ＯＳＫＭ誘導の４８時間後にＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ/-}$細胞にタモキシフェンを添加して、Ｍｂｄ３$^{-/-}$細胞を初期化した。同様に、初期化を促進する目的で、Ｍｂｄ３　ｓｉＲＮＡを用いて体細胞中におけるＭｂｄ３の急性ノックダウンを実施し、ＯＳＫＭ誘導の少なくとも４８時間後にトランスフェクションを実施した。あるいは、Ｍｂｄ３の形質発現程度が低い（が全くないわけではない）体細胞は、残差Ｍｂｄ３発現レベルのため増殖喪失または老化加速を示さないが、そのＭｂｄ３レベルが十分に低いために、ＯＳＫＭによって決定的かつ同調的な初期化が生じ得る（図４Ｂ）。したがって、本研究全体を通して

主に次の系、すなわちＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{ＫＤ}、またはＷＩＢＲ３－ＭＢＤ３$^{ｆｌｏｘ／ｆｌｏｘ}$を、遺伝的バックグラウンドとして好ましく用いた。とりわけ、本明細書中で用いた初期化条件下において、ＭＥＦ単一細胞を播いた場合の生存率は約７０％であった（ＤＯＸ有りまたはＤＯＸ無し）。そして、１ウェルあたりＭＥＦを１５０個播いた場合にＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$試料由来のコロニーが１００～１２０個形成され、本発明者らはこれをライブイメージングにより観察した。重要なことには、播いた後の生存を構成型ｍＣｈｅｒｒｙにより制御できたため、正確で偏性のない初期化効率を取得できた（初期化効率％＝Ｏｃｔ４またはＮａｎｏｇ－ＧＦＰクローン（細胞）／ｍＣｈｅｒｒｙ＋クローン（細胞））。マウス照射フィーダー細胞、またはゼラチン、マトリゲル、もしくはゼラチン／ビトロネクチンで被覆したプレートについても同等の初期化効率が得られた。ライブイメージングおよび単一細胞初期化実験の際に細胞の生存および接着を増大させるために、照射ＤＲ４　ＭＥＦ細胞の初期化を好ましく用いた。構成要素ＭＳＳ－２３７２３８、ＭＳＳ－２７５６５８、およびＭＳＳ－２７５６５９を含むＭｂｄ３　Ｓｔｅａｌｔｈ　ｓｉＲＮＡ　ｍｉｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ならびにＭＳＳ－２００８９４、ＭＳＳ－２００８９５、およびＭＳＳ－２００８９６を含むＣｈｄ４　Ｓｔｅａｌｔｈ　ｓｉＲＮＡ　ｍｉｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、マウス細胞におけるノックダウンを高効率で実施した。トランスフェクションは、ＲＮＡｉＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を製造元の指示書通りに用いて実施した。

【０６１３】

ＤＮＡプラスミドおよびＴＡＬＥＮ遺伝子編集　以下のレンチウイルスおよび哺乳類構成型過剰発現ベクター、すなわちｐＢＲＹ－Ｍｂｄ３－Ｉｒｅｓ－Ｚｅｏｃｉｎを、体細胞および多能性細胞において用いた。体細胞またはＰＳＣ株中にウイルス形質導入を実施して安定的に組込み、ＦＵＷベクターのＥｃｏＲＩ部位への挿入クローニングにより恒常的に発現させることによって、レンチウイルスＦＵＷ－Ｍｂｄ２およびＦＵＷ－Ｍｂｄ３を構造的に発現させた。

【０６１４】

Ｆｌａｇ－Ｍｂｄ３変異および欠失を、Ｑ５　ＤＮＡポリメラーゼ（ＮＥＢ）を用いたＰＣＲによって実施した。ＴＡＬＥＮ　ｔａｒｇｅｔｅｒ　２．０［ｔａｌｅｎｔ（ｄｏｔ）ｃａｃ（ｄｏｔ）ｃｏｒｎｅｌｌ（ｄｏｔ）ｅｄｕ／］を用いてＴＡＬＥＮ発現プラスミドを設計し、Ａｄｄｇｅｎｅ（Ｂｅｄｅｌｌ，ＶＭ，ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４９１：１１４－８，２０１２）から購入したＧｏｌｄｅｎＧａｔｅ　ＴＡＬＥＮ　ｋｉｔ　２．０を公開されているプロトコールに従って用いて、クローニングを実施した。Ｇのターゲティングには、本発明者らはＮＮ型反復配列を用いた。ＷＩＢＲ３ヒトＥＳＣゲノムＤＮＡから増幅させたＤＮＡ断片を用いて、ドナーコンストラクトを作製した。ＥＳＣを１０^{7}個、３０μｇのドナープラスミドと１０μｇの各ＴＡＬＥＮ発現プラスミドとを用いて電気穿孔に供し、Ｇ４１８（７５μｇ／ｍｌ）および０ｉｃｌｏｖｉｒ（１μＭ）の存在下において増殖させた。耐性クローンを単離し、ゲノムＤＮＡを抽出して、サザンブロットおよびＰＣＲ分析に供した。ＯＣＴ４－ＧＦＰレポーターサブクローン細胞系を発生させるため、ＭＢＤ３$^{＋／＋}$およびＭＢＤ３$^{ｆｌｏｘ／－}$ｉＰＳＣを１０^{7}個、以前に記載されたＯＣＴ４－ＧＦＰ－２Ａ－ＰＵＲＯノックインドナープラスミド（Ｈｏｃｋｅｍｅｙｅｒ，Ｄ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２９，７３１－７３４，２０１１、Ｊａｅｎｉｓｃｈ教授の厚意によりＡｄｄｇｅｎｅ経由で提供された）３０μｇと１０μｇの各ＴＡＬＥＮ発現プラスミドとを用いて電気穿孔に供し、ピューロマイシン（０．４μｇ／ｍｌ）の存在下において増殖させた。耐性クローンを単離し、ゲノムＤＮＡを抽出して、サザンブロットおよびＰＣＲ分析に供した。ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣからｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて線維芽細胞を分化させ、これを以前の記載通りに実施した（Ｈｏｃｋｅｍｅｙｅｒ，Ｄ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　３，３４６－３５３，２００８）。

【０６１５】

ヒト体細胞初期化および細胞感染　初期化を、ＤＯＸ（１～２μｇ／ｍｌ）添加条件下

において５％のｐＯ２で実施した。１）最初の４８時間、従来のヒトＥＳ培地（ｈＥＳＭ、下記参照）中で細胞をインキュベートした。２）４８時間後に、ＲＯＣＫｉ（最終濃度５ｍＭ）を添加したＷＩＳ－ＮＨＳＭ（下記参照）と呼ばれるナイーブ型限定増殖条件に細胞を移し、７～８日目まで続けた。３）８日後、ＤＯＸを中止し、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において細胞を増やした。構成要素ＨＳＳ１４７５８０、ＨＳＳ１４７５８１を含むＭＢＤ３　Ｓｔｅａｌｔｈ　ｓｉＲＮＡ（カタログ番号：＃１２９９００３）を用いて、ヒト細胞におけるＭＢＤ３ノックダウンを高効率で実施した。トランスフェクションを、ＲＮＡｉＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を製造元の指示書通りに用いて実施した。

【０６１６】

従来型ヒトＥＳ条件（ｈＥＳＭ）は、４７５ｍｌのノックアウトＤＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１０８２９）、１５％のＫＳＲ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、８ｎｇ／ｍｌの組換えｂＦＧＦ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、１ｎｇ／ｍｌの組換えＴＧＦβ１（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、１ｍＭのグルタミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、１％の非必須アミノ酸（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、０．１ｍＭのβ－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ）、およびペニシリン－ストレプトマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を含む。

【０６１７】

「ＷＩＳ－ＮＨＳＭ」（Ｗｅｉｚｍａｎｎ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　Ｎａｉｖｅ　ｈｕｍａｎ　Ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ　Ｍｅｄｉｕｍ）と呼ばれる次の無血清限定条件を用いて、ナイーブ型ヒト多能性幹細胞（ＰＳＣおよびＥＳＣ）の単離、発生、誘導、および安定化を実施した。ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地は、４７５ｍｌのノックアウトＤＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１０８２９）、１５％のＫＳＲ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）または５ｇｒのＡｌｂｕＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１１０２０－０２１）、５ｍｌのＮ２サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１７５０２０４８）、１０μｇの組換えヒトＬＩＦ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、８ｎｇ／ｍｌの組換えｂＦＧＦ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、１ｎｇ／ｍｌの組換えＴＧＦβ１（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、１ｍＭのグルタミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、１％の非必須アミノ酸（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、０．１ｍＭのβ－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ）、ペニシリン－ストレプトマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、および小分子阻害剤ＰＤ０３２５９０１（１μＭ、ＥＲＫ１／２ｉ、ＡＸＯＮ　ＭＥＤＣＨＥＭ）、ＣＨＩＲ９９０２１（３μＭ、ＧＳＫ３βｉ、ＡＸＯＮ　ＭＥＤＣＨＥＭ）、ＳＢ２０３５８０（５μＭ、ｐ３８ｉ、ＴＯＣＲＩＳ）、ＳＰ６００１２５（１０μＭ、ＪＮＫｉ、ＴＯＣＲＩＳ）を含むよう調整した。本研究全体を通して、ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣの増殖を、０．２％ゼラチン＋１ｎｇ／ｍｌビトロネクチン被覆プレート上で３７℃において少なくとも１時間実施した。３～４日毎に、単一細胞トリプシン処理（０．２５％または０．０５％Ｔｒｙｓｉｎ＋ＥＤＴＡ）によって細胞を継代した。必須ではないが、細胞継代前後２４時間にわたってＲＯＣＫ経路阻害剤Ｙ－２７６３２（５μＭ、ＲＯＣＫｉ、Ａｘｏｎ　Ｍｅｄｃｈｅｍ）をＷＩＳ－ＮＨＳＭに添加することにより、単一細胞クローニング効率を増大させ得る。

【０６１８】

着床前胚および着床後胚の免疫蛍光染色　着床前胚について、ホルモンプライム型Ｂ６Ｄ２Ｆ１マウスの卵管から卵母細胞および単細胞胚を採取し、所望の段階までＫＳＯＭ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）中で培養した。免疫染色を、以前に記載された方法を改変した方法によって実施した（Ｓｉｌｖａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１３８，７２２－７３７，２００９）。簡潔には、酸性タイロード液（Ｓｉｇｍａ）を用いて透明帯を除去した。時計皿シャーレ（Ｇｅｎｅｎｅｔ）に胚を移し、４％のＰＦＡを含有するリン酸バッファー（ＰＢ）中で１５分間にわたって固定し、３ｍｇ／ｍｌのＰＶＰを含有するＰＢＳ中で３回すすぎ、１％ｔｒｉｔｏｎ　Ｘ－１００を添加したＰＢＳ／ＰＶＰ中で３０分間にわたって透過処理を実施し、ブロッキング液（２％の正常ロバ血清、０．０５％のＢＳＡ、０．０１％Ｔｗｅｅｎを含有するＰＢＳ）中で１時間ブロッキングした。得られた胚を、ブロッキング液中に希釈した一次抗体と共に４℃において一晩インキュベートし、ブロッキング液中で１５分間の洗浄を３回実施し、室温において二次抗体と共に１時間インキュベ

ートし、ＤＡＰＩにより１５分間にわたって対比染色し、ＰＢＳ中で2回洗浄し、９６ウェルガラス底プレートに載せて共焦点イメージングで調べた。着床後胚は、以前に記載された方法を改変した方法によって、パラフィンに固定し包埋した（Ａｃａｍｐｏｒａ，Ｄ．，ｅｔ　ａｌ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ．１９９７；１２４：３６３９－５０）。母親の脱落膜の胚を４％のＰＦＡ／ＰＢ中で４℃において一晩固定し、ＰＢＳ中での３０分間の洗浄を3回実施し、乾燥させて、標準的な手順によりパラフィン包埋した。胚のパラフィン切片（５～７μｍ）を再度水和させ、抗原賦活化処理に供し、ＰＢＳ中ですすぎ、０．１％Ｔｒｉｔｏｎ／ＰＢＳ中で１０分間にわたって透過処理に供し、ＰＢＴ（０．０２％Ｔｗｅｅｎ／ＰＢＳ）中ですすぎ、ブロッキング液（５％の正常ロバ血清および０．０５％のＢＳＡを含有するＰＢＳ）中で1時間ブロッキングした。次いで、スライドガラスを、上述の通りに適切な一次抗体および二次抗体を希釈したブロッキング液中でインキュベートし、以前の記載通りに処理した（Ｍａｎｓｏｕｒ，ＡＡ，ｅｔ　ａｌ．　Ｎａｔｕｒｅ　４８８，４０９－４１３，２０１２）。次の抗体を用いた：マウス抗Ｏｃｔ４（１：１００、Ｃ－１０、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　ＳＣ－５２７９）、ヤギ抗Ｍｂｄ３（１：５０、Ｃ－１８、Ｓａｎｔａ　ＣｒｕｚＳＣ－９４０２）。

【０６１９】

免疫沈降およびイムノブロッティング分析　ＨＥＫ２９３Ｔ細胞を、各ｃＤＮＡクローンを入れた発現ベクターを用いて、ｊｅｔＰＥＩ（Ｐｏｌｙｐｌｕｓ　ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ）を用いてトランスフェクションし、４８時間後に、溶解バッファー（５０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ７．４、１５０ｍＭのＮａＣｌ、１％のＴｒｉｔｏｎ、０．１％のＮＰ４０、および１．５ｍＭのＥＤＴＡ）中に溶解させた。トランスフェクションは、次のプラスミドを種々の組み合わせで用いて実施した：ｐＣａｇｇｓ－Ｍｂｄ３、ＦＵＷ－Ｏｃｔ４、ＦＵＷ－Ｋｌｆ４、ＦＵＷ－Ｓｏｘ２、ＦＵＷ－ｃ－Ｍｙｃ、ＦＵＷ－Ｎａｎｏｇ、ｐＣａｇｇｓ－Ｆｌａｇ－Ｍｂｄ３、ｐＭＳＣＶ－Ｆｌａｇ－ＯＣＴ４、ｐＭＳＣＶ－Ｆｌａｇ－ＳＯＸ２、ｐＭＳＣＶ－Ｆｌａｇ－ＫＬＦ４、ｐＣａｇｇｓ－Ｆｌａｇ－ｃ－Ｍｙｃ、ｐＣａｇｇｓ－Ｆｌａｇ－Ｎａｎｏｇ、ｐｃＤＮＡ３．１－Ｆｌａｇ－ＨＤＡＣ１（ａｄｄｇｅｎｅ経由で入手）。抗ＦｌａｇＭ２磁気ビーズ（Ｓｉｇｍａ）３０μｌを、細胞溶解物画分中で6時間インキュベートし、ＩｇＧコントロールとして、６μｇのＩｇＧおよび５０μｌのｐｒｏｔｅｉｎ－Ｇ　Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を上記細胞溶解物に6時間添加しておいた。両画分（抗ｆｌａｇおよび抗ＩｇＧ）をＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製の磁気分離機に載せ、溶解バッファーでビーズを6回洗浄した。結合タンパク質を、抗ｆｌａｇＭ２ビーズについては０．５μｇ／ｍｌのＸ３Ｆｌａｇペプチド（ｓｉｇｍａ）バッファーで、または試料バッファーと共に煮沸することによって、溶出させた。続いて、ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動およびイムノブロッティングによって分析した。イムノブロット分析は、次の一次抗体を用いて実施した：抗Ｆｌａｇ（クローンＭ２、Ｆ３１６５、Ｓｉｇｍａ）、抗Ｍｂｄ３（Ａ３００－２５８Ａ、Ｂｅｔｈｙｌ）、抗Ｎａｎｏｇ（Ａ３００－３９７Ａ、Ｂｅｔｈｙｌ）、抗ＯＣＴ４（ｓｃ－９０８１、Ｈ１３４、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）、抗ＫＬＦ４（ｓｃ２０６９１、Ｈ１８０、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）、抗ＳＯＸ２（＃２７４８ｓ、Ｃｅｌｌ　ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）、抗ｃ－Ｍｙｃ（＃９４０２ｓ、Ｃｅｌｌ　ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）。

【０６２０】

始原生殖細胞（ＰＧＣ）の単離および分化　ＥＧ誘導実験において、Ｏｃｔ４－ＧＦＰ＋細胞をＥ８．５解剖キメラ胚から選別し、Ｎ２Ｂ２７　２ｉ／ＬＩＦ／ＳＣＦ（１０ｎｇ／ｍｌ）／ｂＦＧＦ（８ｎｇ／ｍｌ）培地中に単独で蒔いた。

【０６２１】

ＲＴ－ＰＣＲ分析　ＲＮｅａｓｙ　ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて全ＲＮＡを単離した。３μｇの全ＲＮＡをＤＮａｓｅ　Ｉで処理し、ゲノムＤＮＡに混入しているかもしれない異物をＤＮＡ　Ｆｒｅｅ　ＲＮＡ　キット（Ｚｙｍｏ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ）を用いて除去した。ＤＮａｓｅ－Ｉで処理したＲＮＡを１μｇ、Ｆｉｒｓｔ　Ｓｔｒａｎｄ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いた逆転写に供し、最後に１００

μｌの水に再懸濁した。定量ＰＣＲ分析を、Ｖｉｉａ７　プラットフォーム（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）の逆転写反応の１／５０によって３回実施した。エラーバーは、３回実施した測定について、各測定の標準偏差を示す。

【０６２２】

単一細胞ＲＴ－ＰＣＲ分析において、異なる試料に由来する単一細胞を単一細胞選別に供し、Ａｍｂｉｏｎ（登録商標）Ｓｉｎｇｌｅ　Ｃｅｌｌ－ｔｏ－ＣＴ（商標）キットを製造元の指示書通りに用いて、試料を処理した。Ｖｉｉａ７　プラットフォームにおいてＴａｑＭａｎ　ｐｒｏｂｅ　ｂａｓｅｄ　ｃｈｅｍｉｓｔｒｙおよびＴａｑＭａｎ　Ｒｅａｌ－Ｔｉｍｅ　ＰＣＲ　ｍａｓｔｅｒ　ｍｉｘを用いて、遺伝子発現を検出した。次のＴａｑＭａｎ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）プローブ、すなわち、Ｓａｌｌ４　Ｍｍ００４５３０３７＿ｓ１、Ｅｓｒｒｂ　Ｍｍ００４４２４１１＿ｍ１、Ｕｔｆ１　Ｍｍ００４４７７０３＿ｇ１、Ｓｏｘ２（内在性マウス対立遺伝子特異的）Ｍｍ０３０５３８１０＿ｓ１、ＮａｎｏｇＭｍ０２３８４８６２＿ｇ１、ＧａｐｄｈＭｍ９９９９９９１５＿ｇ１を用いた。

３９サイクルのＣＴカットオフを、転写物検出を決める閾値とした。

【０６２３】

ｓｉＲＮＡによるヒトｍｂｄ３ノックダウン　ヒト細胞ｓｉＲＮＡに対し、本発明者らは、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎの次のカタログ番号の「Ｓｔｅａｌｔｈ」を用いた：ＡＧＧＵＣＡＡＧＧＧＣＡＡＧＣＣＣＧＡＣＣＵＧＡＡ（配列番号５２）についてカタログ番号：１０６２０３１８／１６８７５０　Ｆ０２「ＭＢＤ３ＨＳＳ１４７５８１」（３＿ＲＮＡＩ）、およびＵＵＣＡＧＧＵＣＧＧＧＣＵＵＧＣＣＣＵＵＧＡＣＣＵ（配列番号５３）についてカタログ番号：１０６２０３１９／１６８７５０　Ｆ０３「ＭＢＤ３ＨＳＳ１４７５８１」（３＿ＲＮＡＩ）。

【０６２４】

ｓｈＲＮＡによるマウスｍｂｄ３のノックダウン　本発明者らは、マウス細胞に対して、次の配列を有するｐＬＫＯ．１レンチウイルスまたはｐＬＫＯ－Ｔｅｔ－Ｏｎ系を用いた。「ＴＲＣＮ０００００３９０６９　Ｆ」：ＣＣＧ　ＧＣＴ　ＡＡＧ　ＴＧＧ　ＡＴＴ　ＧＡＧ　ＴＧＣ　ＣＴＴ　ＴＣＴ　ＣＧＡ　ＧＡＡ　ＡＧＧ　ＣＡＣ　ＴＣＡ　ＡＴＣ　ＣＡＣ　ＴＴＡ　ＧＴＴ　ＴＴＧ（配列番号６３）および「ＴＲＣＮ０００００３９０６９　Ｒ」：ＡＡＴ　ＴＣＡ　ＡＡＡ　ＡＣＴ　ＡＡＧ　ＴＧＧ　ＡＴＴ　ＧＡＧ　ＴＧＣ　ＣＴＴ　ＴＣＴ　ＣＧＡ　ＧＡＡ　ＡＧＧ　ＣＡＣ　ＴＣＡ　ＡＴＣ　ＣＡＣ　ＴＴＡ　Ｇ（配列番号６４）、または「ＴＲＣＮ０００００３９０７１　Ｆ」：ＣＣＧ　ＧＧＣ　ＧＣＴ　ＡＴＧ　ＡＴＴ　ＣＴＴ　ＣＣＡ　ＡＣＣ　ＡＣＴ　ＣＧＡ　ＧＴＧ　ＧＴＴ　ＧＧＡ　ＡＧＡ　ＡＴＣ　ＡＴＡ　ＧＣＧ　ＣＴＴ　ＴＴＧ（配列番号６５）および「ＴＲＣＮ０００００３９０７１　Ｒ」：ＡＡＴ　ＴＣＡ　ＡＡＡ　ＡＧＣ　ＧＣＴ　ＡＴＧ　ＡＴＴ　ＣＴＴ　ＣＣＡ　ＡＣＣ　ＡＣＴ　ＣＧＡ　ＧＴＧ　ＧＴＴ　ＧＧＡ　ＡＧＡ　ＡＴＣ　ＡＴＡ　ＧＣＧ　Ｃ（配列番号６６）

【０６２５】

顕微鏡画像の取得および分析　Ｏｃｔ４－ＧＦＰ多能性レポーターを有し核ｍＣｈｅｒｒｙマーカーを構造的に発現する二次的ＯＫＳＭ誘導性Ｍｂｄ３$^{+/+}$およびＭｂｄ３$^{flox/-}$ＭＥＦを、１２ウェルプレートに低密度（１ウェルあたり細胞１５０個）で蒔き、ＡｘｉｏＯｂｓｅｒｖｅｒ　Ｚ１（Ｚｅｉｓｓ）を用い、％５　O_2、％５　CO_2、および３７℃で制御された条件下においてイメージングした。３～４日目にプレートを取り出して培地交換し（ただし継代や分割はせず）、自動ライブイメージングステージに戻した。全ウェルのモザイク画像を倍率５倍で１２時間毎に６日間にわたって取得した。この画像には、位相差画像と２枚の蛍光波長画像とが含まれる。当研究室で自動セグメンテーションプロトコールを開発してＭａｔｌａｂで実施し、これによって、蛍光ｍＣｈｅｒｒｙおよびＯｃｔ４－ＧＦＰマーカーによる全ウェルのモザイク模様をタイムラプス測定した結果を分析した。

【０６２６】

このプロトコールで困難であったのは、ピクセル10^8個のモザイク画像中において、未知数のコロニーを迅速にセグメンテーションすることであった。プロトコールの主要な工程（図４０Ａ～Ｅ中に示す）は以下を含む：

【０６２７】

適応性の検出：円形フィルターを用いてプレート縁を消す。中央値と定常偏差（ダイナミックレンジの１０％）を用いて検出閾値を決定し、検出したピクセルの二値画像を作成する。これらの工程は、各時点および各蛍光波長について別個に実施した。

【０６２８】

複雑度の低減：この目的にあたって、本発明者らは形態学的フィルターを用い、メディアン・スライディング・フィルター（６０［μｍ］×６０［μｍ］）でｍＣｈｅｒｒｙコロニーを分離した（Ａｒｃｅ，Ｇ．Ｒ．Ｎｏｎｌｉｎｅａｒ Ｓｉｇｎａｌ Ｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ：Ａ Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ－Ｇｏｎｚａｌｏ Ｒ．Ａｒｃｅ－Ｇｏｏｇｌｅ Ｂｏｏｋｓ，２００５）。このフィルターは高密度のコロニーのみを保持し、ノイズおよび単一の単離細胞（単一の核は約６［ｕｍ］×６［ｕｍ］）を除外する。この工程は、クラスタリング作業の規模を小さくするために非常に重要である。

【０６２９】

コロニーセグメンテーション：セグメンテーションは、Ｍｏｖｉｎｇ ａｖｅｒａｇｅ ｆｉｌｔｅｒ（Ｌｏｗ－ｐａｓｓ ｆｉｌｔｅｒ）（６０［ｕｍ］×６０［ｕｍ］）を用いて実施した（Ａｒｃｅ，Ｇ．Ｒ．Ｎｏｎｌｉｎｅａｒ Ｓｉｇｎａｌ Ｐｒｏｃｅｓｓｉｎｇ：Ａ Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ－Ｇｏｎｚａｌｏ Ｒ．Ａｒｃｅ－Ｇｏｏｇｌｅ Ｂｏｏｋｓ，２００５）。隣接するコロニー断片を合併して大きな連結コロニーとし、次いで連結要素クラスタリングを適用することによって、連結した対象物を８つの連結する近傍領域を用いてラベリングした。

【０６３０】

コロニー特色の抽出：各ｍＣｈｅｒｒｙコロニーの特色の抽出は、領域、領域を指定した枠組み、および重心を含む。本発明者らは、ｍＣｈｅｒｒｙコロニーセグメンテーションをＧＦＰ二値画像（検出されたピクセル）に重ねることによって、各コロニーについて全ｍＣｈｅｒｒｙ＋ピクセルから、ＧＦＰ＋指標（０／１）と、ＧＦＰ＋およびｍＣｈｅｒｒｙ＋ピクセルの分数とを抽出する。

【０６３１】

このセグメンテーションプロトコールをタイムラプスモザイクに対して実行して、コロニー形成ダイナミクス、コロニーGFP^+ダイナミクス、および子Ｏｃｔ４－GFP^+細胞の比率についての情報を取得した。次いで、コロニーおよび初期化ダイナミクスの特色をＭａｔｌａｂプログラムによって統計的に分析した。分析には、累積分布の推定、密度汎関数、および箱型図による視覚的評価が含まれる（図４２Ａ～Ｅ）。箱型図による分析は、セグメンテーションした単一コロニーすべてについて、コロニー内Ｏｃｔ４－ＧＦＰ再活性化の分布の特徴を調べ、セグメンテーション化したコロニー内の子ｉＰＳ細胞の分布を表すものである。また、カスタマイズしたＭａｔｌａｂプログラムで、プロセスダイナミクスの特徴を調べるための動画を作成した。上記プログラムを、人為的に作成した入力行列によって、またＥＳモザイク画像コレクションを用いて、確認した。また、検出閾値の頑健性およびフィルターのサイズを、異なるパラメータを用いて測定した（データは示さず）。

【０６３２】

クロマチン免疫沈降およびシーケンスライブラリ調製（以下の実施例１～４について）

ディープシーケンシング（ＣｈＩＰ－Ｓｅｑ）とこれに続くクロマチン免疫沈降を、次のタンパク質、すなわちＨ３Ｋ４ｍｅ３、Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３、Ｈ３Ｋ２７ａｃ、およびＭｂｄ３について、初期化期間全体のうち４つの異なる時点、すなわち０日目（ＭＥＦ）、４日目、８日目、ｉＰＳにおいて、測定した。各タンパク質の結合を、$Mbd3^{+/+}$条件および$Mbd3^{flox/-}$条件の両方において、また$Mbd3^{-/-}$ＥＳ細胞中において測定した。８日目を除く上記条件のすべてにおいてＯｃｔ４を測定した。細胞約４０

×１０６個をホルムアルデヒド（最終濃度１％、１０分間、室温（ＲＴ））中で架橋させ、次いでグリシン（５分間、室温）で失活させた。固定した細胞を、５０ｍＭかつｐＨ７．５のＨＥＰＥＳ　ＫＯＨ、１４０ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、１０％のグリセリン、０．５％のＮＰ－４０代品、０．２５％のＴｒｉｔｏｎにプロテアーゼ阻害剤を添加したものに４℃において溶解させ（Ｒｏｃｈｅ、０４６９３１５９００１）、９５０ｘｇで１０分間遠心分離し、０．２％のＳＤＳ、１０ｍＭのＥＤＴＡ、１４０ｍＭのＮａＣｌ、および１０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣＬ中に再懸濁した。次いで細胞をＢｒａｎｓｏｎ　Ｓｏｎｉｆｉｅｒ（モデルＳ－４５０Ｄ）により－４℃において断片化して、２００～８００ｂｐの範囲のサイズとし、遠心分離によって沈澱させた。各抗体１０μｇをＰｒｏｔｅｉｎ－Ｇ　Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１００－０７Ｄ）と共に、ブロッキングバッファー（０．５％のＴＷＥＥＮおよび０．５％のＢＳＡを添加したＰＢＳ）中、室温において２時間インキュベートすることにより、予備的に結合させた。洗浄したビーズをクロマチン溶解物に加え、次いで一晩インキュベートした。試料を、ＲＩＰＡバッファーで５回、５００ｍＭのＮａＣｌを添加したＲＩＰＡバッファーで２回、ＬｉＣｌバッファー（１０ｍＭのＴＥ、２５０ｍＭのＬｉＣｌ、０．５％のＮＰ－４０、０．５％のＤＯＣ）で２回、ＴＥ（１０ｍＭかつｐＨ８．０のＴｒｉｓ－ＨＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ）で１回洗浄し、次いで０．５％のＳＤＳ、３００ｍＭのＮａＣｌ、５ｍＭのＥＤＴＡ、１０ｍＭのＴｒｉｓ　Ｈｃｌ中に、ｐＨ８．０において６５℃で溶出させた。溶出液を６５℃において８時間インキュベートし、次いでＲＮａｓｅＡ（Ｒｏｃｈｅ、１１１１９９１５００１）で３０分間、プロテイナーゼＫ（ＮＥＢ、Ｐ８１０２Ｓ）で２時間、連続的に処理した。ＤＮＡを、Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ　ＡＭＰｕｒｅ　ＸＰ　ｓｙｓｔｅｍ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ　Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、Ａ６３８８１）を用いて精製した。クロスリバースＣｈＩＰ　ＤＮＡ試料のライブラリを、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　Ｇｅｎｏｍｉｃ　ＤＮＡプロトコールを改変した方法によって、以前に記載された通りに調製した７５（Ｂｌｅｃｈｅｒ－Ｇｏｎｅｎ，Ｒ．，ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ．Ｐｒｏｔｏｃ．２０１３，８：５３９－５４）。簡潔には、ＣｈＩＰ　ＤＮＡをＩｌｌｕｍｉｎａアダプタにライゲーションさせ、ＰＣＲ増幅を１４サイクル実施した。２００～８００ｂｐの増幅産物を２％アガロースゲルで精製した。次いでＤＮＡライブラリ約５ピコモルをフローセルの各レーンに載せ、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　Ｈｉｓｅｑ２０００シーケンサーで、標準的なＩｌｌｕｍｉｎａプロトコールに従ってシーケンシングした。クロマチン－ＩＰ実験に用いた抗体は、Ｃｏｎｔｒｏｌ　ＩｇＧ（ＣｈＩＰグレード、ａｂ４６５４０、Ａｂｃａｍ）、Ａｎｔｉ－Ｈｉｓｔｏｎｅ　Ｈ３　ｔｒｉ　ｍｅｔｈｙｌ　Ｋ４（ＣｈＩＰグレード、ａｂ８５８０、Ａｂｃａｍ）、Ａｎｔｉ－Ｈｉｓｔｏｎｅ　Ｈ３　ａｃｅｔｙｌ　Ｋ２７（ＣｈＩＰグレード、ａｂ４７２９、Ａｂｃａｍ）、ａｎｔｉ－Ｈｉｓｔｏｎｅ　Ｈ３　ｔｒｉ　ｍｅｔｈｙｌ　Ｋ２７（ＣｈＩＰグレード、０７－４４９、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）、ａｎｔｉ－Ｏｃｔ４（ｓｃ５７２９（Ｃ－１０）、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）、ａｎｔｉ－Ｃｈｄ４（ＣｈＩＰグレード、ａｂ７０４６９、Ａｂｃａｍ）である。Ｍｂｄ３に対しては、ｃｈｉｐ抗体であるａｎｔｉ－Ｍｂｄ３（Ｂｅｔｈｙｌ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ａ３０２－５２８?９Ａ）およびａｎｔｉ－Ｍｂｄ３（ａｂ１６０５７、Ａｂｃａｍ）を１：１で混合して用いた。

【０６３３】

アライメントおよびピーク検出　本発明者らは、ｂｏｗｔｉｅソフトウェア（Ｌａｎｇｍｅａｄ，Ｂ．，Ｔｒａｐｎｅｌｌ，Ｃ．，Ｐｏｐ，Ｍ．＆Ｓａｌｚｂｅｒｇ，Ｓ．Ｌ．Ｕｌｔｒａｆａｓｔ　ａｎｄ　ｍｅｍｏｒｙ－ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ　ａｌｉｇｎｍｅｎｔ　ｏｆ　ｓｈｏｒｔ　ＤＮＡ　ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｔｏ　ｔｈｅ　ｈｕｍａｎ　ｇｅｎｏｍｅ．Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌ．（２００９））のバージョン０．１２．５を用いて、リードとマウスｍｍ９参照ゲノムとを整列させた（ＵＣＳＣ、２００７年７月）。本発明者らは、ミスマッチ上限１つまででゲノムと一意に整列するリードのみを検討し、各リードについて最もよく一致する１つのみを選んだ。本発明者らは、ＭＡＣＳのバージョン１．４．１を用いて、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３、Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３、Ｈ３Ｋ２７ａｃ、Ｍｂｄ３、お

よびＯｃｔ４のリッチ区間を同定した（Ｚｈａｎｇ，Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌ．２００８，９（９）：Ｒ１３７）。本発明者らは、全細胞抽出物をシーケンシングしてコントロールとすることによって、バックグラウンドモデルを決定した。完全に同じ位置に整列した重複するリードを、ＭＡＣＳデフォルト配置によって除外した。転写開始点（ＵＣＳＣゲノムブラウザのＲｅｆＳｅｑ既知遺伝子
テーブルから取得）の周囲で１Ｋｂ対称区間に重なるリッチ区間を、遺伝子にマッピングした。野生型試料で得たＣｈＩＰ－ｓｅｑデータは、以前の刊行物（Ｓｒｉｄｈａｒａｎ，Ｒ．，ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　３６（２）：３６４－７７，２００９；Ｍｉｋｋｅｌｓｅｎ，Ｔ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４５４，４９－５５，２００８）中のものよりも再現性が高かった（データは示さず）。

【０６３４】

モチーフ検出（図６３）　Ｍｂｄ３結合領域をリッチに含むモチーフを、Ｃｉｓｔｒｏｍｅ　ｐａｃｋａｇｅ［ｃｉｓｔｒｏｍｅ（ｄｏｔ）ｏｒｇ／ａｐ／］のＳｅｑＰｏｓｔｏｏｌを用いて検出した。ＭＥＦ、ＭＥＦ＋ＤＯＸ、およびｉＰＳＣにおけるＭｂｄ３ピークは、ｐ値カットオフ値０．００１を有しＣｉｓｔｒｏｍｅで精選したモチーフデータベースとは逆となった。

【０６３５】

ヒストンマークプロファイル（図Ｃ～Ｅ）を、当研究室で作成したスクリプトを用いて計算した。このスクリプトは、簡単には、所与のゲノム区間においてリード密度の行列を作成するものである。この場合、全Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子２９，９５２個（ｍｍ９、ＵＣＳＣ既知遺伝子テーブルから取得）のプロファイルを、ＴＳＳおよびＴＥＳから１ｋｂ上流について計算した。次いで、試料ノイズ

$$\hat{X}_j = \frac{X_j - \mu_{Noise}}{\sigma_{Noise}}$$

の平均および標準偏差で各位置を標準化することによって、リード密度をｚスコアに変換した。ゲノム全体から無作為に6×10^7ｂｐを選び、各試料についてのノイズパラメータを推定した。最後に、整列プロファイルを示す目的で、各遺伝子のｚスコアプロファイルを、ＴＳＳ上流について２０個のビンに区切り、ＴＳＳとＴＥＳの間についてはさらに１００分位に区切った。各ビンまたは各分位の値について、その区間における最大値を選択した。

【０６３６】

ヒストンマーク分布分析の結果（図６５Ａ～Ｅおよび６６Ａ～Ｊ）、ならびにヒストンマークの相関関係およびクラスタリングの結果（図４７Ａ～Ｂおよび図４８Ａ～Ｃ）について、各遺伝子および各ヒストンマークを、その遺伝子のプロファイルにおける測定ｚスコア最大値と共に表す。このプロファイルの計算は上述の通り実施した。一列に並んだ遺伝子一つ一つに対するマークをすべて含む連鎖状ベクターについて、ヒストンマークのクラスタリングを実施した。

【０６３７】

アノテーションエンリッチメント分析　Ｇｅｎｅ　Ｏｎｔｏｌｏｇｙ［ＧＯ、ｇｅｎｅ　ｏｎｔｏｌｏｇｙ（ｄｏｔ）ｏｒｇ］から取得した機能遺伝子群がＭｂｄ３ターゲット遺伝子中にリッチであるかを調べた。タンパク質とＤＮＡの結合についてのアノテーションは、種々の刊行物から入手した（Ｂｏｙｅｒ，Ｌ．Ａ．，ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ．２００５，１２２（６）：９４７－５６；Ｍｉｋｋｅｌｓｅｎ，Ｔ．Ｓ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４４８，５５３－５６０，２００７；Ｋｉｍ，Ｊ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　１３２（６）：１０４９－６１，２００８；Ｌｏｈ，ＹＨ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｇｅｎｅｔ　３８，４３１－４４０，２００６）。フィッシャーの直接確率検定（Ｆｉｓｈｅｒ，Ｓ．，Ｇｅｎｅｔｉｋｅｒ，Ｓ．，Ｆｉｓｈｅｒ，Ｒ．Ａ．＆Ｇｅｎｅｔｉｃｉａｎ，Ｓ．Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ　ｍｅｔｈｏｄｓ　ｆｏｒ　ｒｅｓｅａｒｃｈ　ｗｏｒｋｅｒｓ，１９７０）によってエンリッチメントＰ値を計算し、これを、偽発見率（ＦＤＲ）

閾値０．０００１％を用いて複数の仮説について補正した。

【０６３８】

遺伝子発現データの取得、処理、および分析　記載の細胞系から全ＲＮＡを単離した。ＲＮＡ濃度を定量し、Ａｇｉｌｅｎｔ　Ｂｉｏａｎａｌｙｚｅｒでその質を管理した。各試料に由来するＲＮＡを２５０ｎｇずつ同時に処理した。ｃＤＮＡを断片化し、標識し、プローブ３５，５５７個を含むＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　Ｍｏｕｓｅ　Ｇｅｎｅ　１．０　ＳＴ　ＧｅｎｅＣｈｉｐ（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ、Ｓａｎｔａ　Ｃｌａｒａ、ＣＡ）とハイブリダイズさせた。Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘアレイを用いて、ヒト細胞試料を分析した。分位を標準化することにより非生物試料でのばらつきに対して補正するＲＭＡ法（Ｉｒｉｚａｒｒｙ，Ｒ．Ａ．ｅｔ　ａｌ．Ｂｉｏｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ，２００３，４：２４９－６４）によって、画像ファイル（Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　ＣＥＬファイルおよびＣＤＦファイル（バージョンＶ１．ｒ３、プローブをプローブ群３３，２５２個にマッピングする）より）から、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ「ＥｘｐｒｅｓｓｉｏｎＣｏｎｓｏｌｅ」ソフトウェアを用いて転写物レベルを処理した。データをさらに選別して、６４（＝2^6）を超えるコール（ｃａｌｌ）少なくとも１つを有するプローブ２１，８１１個を選び、ＲｅｆＳｅｑ転写物１５，８１５個に対してマッピングした［ｎｃｂｉ（ｄｏｔ）ｎｌｍ（ｄｏｔ）ｎｉｈ（ｄｏｔ）ｇｏｖ／ＲｅｆＳｅｑ／］。一意のＥｎｔｒｅｚ　ＩＤは、Ａｆｆｙｍｅｔｒｉｘ（ＮｅｔＡｆｆｘアノテーションファイル、バージョン３３．１）およびＮＣＢＩ部位に基づいて今回実施したアノテーションを用いている。同じ遺伝子をターゲティングするプローブを中央値でコラプス（ｃｏｌｌａｐｓｅ）し、遺伝子数は１３，８９４個となった。マイクロアレイデータは、国立生物工学情報センター遺伝子発現情報データベース（Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　Ｏｍｎｉｂｕｓ　ｄａｔａｂａｓｅ）において、系列受入番号ＧＳＥ３７８２２、ＧＳＥ４５３５２、およびＧＳＥ４６８７２にて利用できる。以前に記載された、プローブ群５４，６７５個を含むＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　ＧｅｎｅＣｈｉｐ　Ｈｕｍａｎ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｕ１３３　Ｐｌｕｓ　２．０　Ａｒｒａｙｓからの、別のヒトＥＳＣ試料データ（ＧＳＥ２１２２２；（Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．　Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７，２０１０）を、以前に記載した処理に供したところ、遺伝子数は１５，５７１個となった。次いで、得られた遺伝子リスト２つの共通部分をとって、遺伝子１２，０７１個を含む１つのリストを作成した。各データセットを遺伝子型が同じ試料（ＷＩＢＲ３、以降の分析からは参照試料を除外）に標準化することによって、２つの異なるプラットフォームから生じたバッチ効果を補正し、２つのデータセットを統合した。これを以降の分析で用いた。平均連結法と、ＳｐｅａｒｍａｎまたはＰｅａｒｓｏｎの相関関係のいずれかとを、記載された距離行列として用い、試料を階層的クラスタリングに供したところ、得られた結果は類似していた。試料を内部細胞塊（ＩＣＭ）段階の細胞と比較するため、Ｖａｓｓｅｎａ　ｅｔ　ａｌ．（Ｖａｓｓｅｎａ，Ｒ．ｅｔ　ａｌ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　１３８，３６９９－３７０９，２０１１）のヒト前着床データも算上した。このデータは、以前に記載されたＡｆｆｙｍｅｔｒｉｘ　ＨｕＧｅｎｅ　１．０ｓｔ　ｍｉｃｒｏａｒｒａｙで取得されたものであり、これを、以前に記載された処理と同様の処理に供した。その結果、遺伝子数は、前出の遺伝子リストとの共通部分をとる前では１６，９５３個、前出の遺伝子リストとの共通部分をとった後では１２，０６２個となった。この新しいデータをそのＥＳＣ試料の平均値に標準化することによって、バッチ効果を補正した。２つの試料についての両側ｔ検定によりナイーブ型試料およびプライム型試料の発現変動遺伝子を見い出し、そのｐ値を、Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ－Ｈｏｃｈｂｅｒｇ偽発見率（ＦＤＲ）閾値０．０５と二倍差発現閾値とを組み合わせて用いて補正し、この補正を複数の仮説について実施した。発現変動遺伝子の機能的エンリッチメントを、オンラインツールＧＯｒｉｌｌａ［ｃｂｌ－ｇｏｒｉｌｌａ（ｄｏｔ）ｃｓ（ｄｏｔ）ｔｅｃｈｎｉｏｎ（ｄｏｔ）ａｃ（ｄｏｔ）ｉｌ／（Ｅｄｅｎ，Ｅ．，ｅｔ　ａｌ．ＢＭＣ　Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ　１０，４８，２００９）］を用い、バックグラウンドを全遺伝子リストとして調べた。ＦＤＲ補正したｐ値閾値０．０５を用いた。遺伝子発現の統計的分析に

おいて、本発明者らは、「Ｃｌｕｓｔｅｒ」ソフトウェア［ｒａｎａ（ｄｏｔ）ｌｂｌ（ｄｏｔ）ｇｏｖ／ＥｉｓｅｎＳｏｆｔｗａｒｅ（ｄｏｔ）ｈｔｍ］を用い、完全連結法による中央相関関係を距離メトリックとして、試料を階層的クラスタリングに供した。本発明者らは、ＭａｔｌａｂのバージョンＲ２０１１ａおよびバージョンＲ２０１２ｂならびにこれらのＢｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ｔｏｏｌｂｏｘを用いて、主成分分析を実施し、当該データ中で最も変化が大きい主成分を検出した。

【０６３９】

遺伝子発現分析　プローブをＥｎｔｒｅｚ遺伝子ＩＤにマッピングし、さらに選別して、３２（＝2^5）を超えるコール少なくとも１つを有するＩＤを選んだところ、遺伝子ＩＤ数は１６，６２０個となった。遺伝子発現分析において、本発明者らはＭａｔｌａｂのバージョンＲ２０１１ｂを用いた。ＭＥＦ試料（Ｍｂｄ３$^{+/+}$、Ｍｂｄ３$^{f/-}$、Ｍｂｄ３$^{-/-}$ＭＥＦ試料）およびＥＳ試料（ＥＳ　Ｖ６．５、Ｍｂｄ３$^{-/-}$　ＥＳ、Ｍｂｄ３$^{f/-}$　ＩＰＳ、およびＭｂｄ３$^{+/+}$　ｉＰＳ）の発現変動遺伝子符号の特徴を、２つの試料についてのｔ検定によって調べ、偽発見率（ＦＤＲ）［Ｂｅｎｊａｍｉｎｉ，Ｙ．ａｎｄ　Ｈｏｃｈｂｅｒｇ，Ｙ．Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　ｔｈｅ　Ｒｏｙａｌ　Ｓｔａｔｉｓｔｉｃａｌ　Ｓｏｃｉｅｔｙ　Ｓｅｒｉｅｓ　Ｂ（Ｍｅｔｈｏｄｏｌｏｇｉｃａｌ），５７：２８９－３００，１９９５］を用いて補正し、この補正を複数の仮説について実施した。発現変動遺伝子符号は、ＦＤＲ閾値５％に満たない遺伝子と４倍変化を超える遺伝子とを含んでおり、遺伝子数は１，３２３個となった。遺伝子全１６，６２０個（図８Ｒおよび図４５Ａ～Ｂ）および発現変動遺伝子１，３２３個（図７）について実施した試料クラスタリングは、２通りの方法で実施した。すなわち、（１）Ｓｐｅａｒｍａｎの相関関係を距離メトリックとして用い、かつ平均連結法を用いた、階層的クラスタリング（Ｓｉｂｓｏｎ，Ｒ．ＳＬＩＮＫ：Ａｎ　ｏｐｔｉｍａｌｌｙ　ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ　ａｌｇｏｒｉｔｈｍ　ｆｏｒ　ｔｈｅ　ｓｉｎｇｌｅ－ｌｉｎｋ　ｃｌｕｓｔｅｒ　ｍｅｔｈｏｄ．Ｔｈｅ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｊｏｕｒｎａｌ　１６，３０－３４，１９７３）、（２）データ中で変動率が最も大きい主成分を検出する主成分分析（ＰＣＡ）。初期化における単一遺伝子の進行（図４６Ａ～Ｅ）を、次の変換により定量した。

$$\hat{X}_j(t) = \max\left(\frac{X_j(t) - X_j(MEF_Mbd3^{+/+})}{\bar{X}_j(IPS) - \bar{X}_j(MEF)}, 0\right)$$

式中、Ｘｊ（ｔ）は時間ｔにおける遺伝子ｊ発現値を表し（例えばＸｊ（４ｄ）またはＸｊ（ＭＥＦ））、

$\bar{X}_j(IPS), \bar{X}_j(MEF)$

はＩＰＳ試料およびＭＥＦ試料それぞれについての平均発現値を表す。上記変換は、ＭＥＦ発現値（０と設定）からｉＰＳ値（１と設定）に向かう間隔を表し、発現するとそのｉＰＳ値が（上方／下方調節）される遺伝子は、

$\hat{X}_j(t) > 0$

を示す。ＭＥＦに対する遺伝子発現の倍変化の分布を箱型図によって示す（図３６Ａ～Ｊ、図６５Ａ～Ｅ、および図６６Ａ～Ｊ）。分布差の有意性は、一対の試料についてのｔ検定によって計算した。

【０６４０】

Ｒｅｄｕｃｅｄ　Ｒｅｐｒｅｓｅｎｔａｔｉｏｎ　Ｂｉｓｕｌｆｉｔｅ　Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇライブラリの調製および分析　以前に記載された方法をわずかに改変した方法によって、ＲＲＢＳライブラリを作成した（Ｓｍｉｔｈ，Ｚ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４８４，３３９－３４４，２０１２）。簡潔には、急速凍結させた細胞ペレットから、Ｑｕｉｃｋ－ｇＤＮＡ　ｍｉｎｉ　ｐｒｅｐ　ｋｉｔ（Ｚｙｍｏ）を用いてＤＮＡを単離した。次いで、単離したＤＮＡをＭｓｐＩ消化（ＮＥＢ）に供し、続いてＴ４　ＰＮＫ

／Ｔ４　ＤＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ　ｍｉｘ（ＮＥＢ）を用いてエンドリペアを実施し、Ｋｌｅｎｏｗ　ｆｒａｇｍｅｎｔ（３’→５’ｅｘｏ－）（ＮＥＢ）を用いてＡ－テーリングを実施し、ＳＰＲＩ　ｂｅａｄｓ（Ｂｅｃｋｍａｎ　Ｃｏｕｌｔｅｒ）を用いて５００ｂｐより短い断片をサイズ選択し、ｑｕｉｃｋ　Ｔ４　ＤＮＡ　ｌｉｇａｓｅ（ＮＥＢ）を用いてプラスミド中にライゲーションさせた。ＥＺ　ＤＮＡ　Ｍｅｔｈｙｌａｔｉｏｎ－Ｇｏｌｄ　ｋｉｔ（Ｚｙｍｏ）を用いてプラスミドを亜硫酸水素ナトリウムで処理し、ＧｏＴａｑ　Ｈｏｔ　Ｓｔａｒｔ　ＤＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて生成物をＰＣＲにより増幅させた。Ｋｌｅｎｏｗ　ｆｒａｇｍｅｎｔを用いてＰＣＲ産物をＡ－テーリングに供し、ｑｕｉｃｋ　Ｔ４　ＤＮＡ　ｌｉｇａｓｅを用いて、インデックスされたＩｌｌｕｍｉｎａアダプタにライゲーションさせ、ＧｏＴａｑ　ＤＮＡ　ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅを用いてＰＣＲにより増幅させた。次いで、ライブラリから２００～５００ｂｐをサイズ選択し、ＮｕＳｉｅｖｅ　３：１　ａｇａｒｏｓｅ（Ｌｏｎｚａ）を用いてエクステンデッドゲル電気泳動を実施し、ゲル抽出を実施した（Ｑｉａｇｅｎ）。ライブラリをプールし、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　ＨｉＳｅｑ　２５００　ｓｙｓｔｅｍによってシーケンシングした。シーケンシングリードを、Ｂｉｓｍａｒｋを用いてＭｏｕｓｅ　Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｕｉｌｄ　３７（ｍｍ９）と整列させた。メチル化レベルを計算し、ライブラリ全体を通して５つ以上の別個のシーケンシングリードにカバーされるＣｐＧのみについて、その平均をとった。各ＣｐＧ部位の「有する」ＣｐＧ含有量を、この部位の周囲５００ｂｐウィンドウ内にみられるＣｐＧジヌクレオチド数をウィンドウサイズで割ったものとして定義した。

【０６４１】

数値モデル化分析　モデル化のためのデータ取得　本発明者らは、初期化ダイナミクスの経験的累積分布を確立するため、複数の系についての初期化潜伏時間を測定した。モノクローナル二次的ＮＧＦＰ１（Ｍｂｄ３$^{+/+}$）Ｂ細胞の初期化ダイナミクスを、追加的な遺伝的摂動（スクランブルｓｈＲＮＡ、Ｎａｎｏｇ過剰発現（Ｎａｎｏｇ^{ＯＥ}））がある場合とない場合とで、ＦＡＣＳを用いて週１回、以前に記載の通りに測定した（Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４６２，５９５－６０１，２００９）。ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{ＫＤ}　ｉＰＳＣ株を確立し、キメラ動物からプレＢ細胞を回収し、ＤＯＸ初期化に供した。単一細胞を播き、続いて７日目（１週間）にＮａｎｏｇ－ＧＦＰを検出することによって、モノクローナルの追跡測定を実施した。モノクローナル追跡は、ＮＧＦｐ１－Ｍｂｄ３^{ＫＤ}　プレＢ細胞における効率が１００％であったため、本発明者らはプレＢ細胞由来のＮＧＦＰ１およびＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{ＫＤ}に対するポリクローナル初期化実験をさらに実施し、ＯＳＫＭ誘導を開始して最初の８～１０日間、Ｎａｎｏｇ－ＧＦＰをＦＡＣＳによって１日１回測定した（図３１Ａ～Ｅ）。最後に、ＮＧＦＰ１のモノクローナル測定を週１回、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{ＫＤ}のポリクローナル測定を１日１回実施して、初期化ダイナミクスの潜伏時間分布を確立した。この潜伏時間分布を、以下に記載するように、複数のモデル化スキームにフィットさせた。

【０６４２】

モデルフィッティングの実施　Ｍａｔｌａｂプログラムによって調整済みＲ^{2}統計値との非線形回帰フィッティングを実施することにより、モデル（詳細は下記）へのフィッティングを実施した。調整済みＲ^{2}を以下に定義する。

$$\text{調整済みR}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \hat{y}_i)^2}{n-m} \cdot \frac{n-1}{\sum_{i=1}^{n}(y_i - \bar{y})^2} = 1 - \frac{MSE}{Var(y)}$$

式中、y_iは上記で測定した潜伏時間分布のデータ点であり、$\hat{y}_i$は予測モデルに従って推定されたデータ点であり、$\bar{y}$は上記で測定した潜伏時間分布の平均値である。また、ｎは採取した試料の数を表し、ｍはモデルフィッティングで用いたモデルパラメータの数を表す。上記モデルの一部については、以下に詳細を記載する最尤推定量によるフィッテ

ィングもあわせて実施した。

【０６４３】

ステップ関数モデルへのフィッティング　決定論的ケースでは、ＤＯＸ誘導後に全細胞が同時に多能性を獲得する。この挙動は、ステップ関数様ダイナミクスによって十分に近似される。本発明者らは、初期化潜伏時間の観察結果をステップ関数にフィットさせ、調整済みR^2統計値を最適化することによって決定的な遷移時間を推定した。フィッティングはＭａｔｌａｂにより、非線形回帰を用いて実施した（図３５Ａ～Ｃ）。

【０６４４】

ガウスモデルへのフィッティング　上記の初期化潜伏時間の測定で観察された変動性を推定する際、本発明者らは、ガウス分布へのフィッティングを実施して、各試料（Ｍｂｄ３$^{+/+}$およびＭｂｄ３^{KD}）についての平均、分散、および変動係数（ＣＶ＝ｓｔｄ／平均）を計算した（図５６Ａ～Ｆ、図５７Ａ～Ｄ）。フィッティングはＭａｔｌａｂにより、非線形回帰および最尤推定の両方を用いて実施した。

【０６４５】

ブラウン運動モデルへのフィッティング　生物学的変化（例えば遺伝子発現）は、化学ランジュバン方程式（ｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｌａｎｇｅｖｉｎ　ｅｑｕａｔｉｏｎ）（ＣＬＥ）によって説明される場合がある［Ｗｉｌｋｉｎｓｏｎ，Ｄ．Ｊ．Ｓｔｏｃｈａｓｔｉｃ ｍｏｄｅｌｌｉｎｇ ｆｏｒ ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ ｄｅｓｃｒｉｐｔｉｏｎ ｏｆ ｈｅｔｅｒｏｇｅｎｅｏｕｓ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ｓｙｓｔｅｍｓ．Ｎａｔ Ｒｅｖ Ｇｅｎｅｔ １０，１２２－１３３（２００９）］。

$$dX_t = (\beta - \alpha \cdot X_t)\, dt + \sqrt{\beta + \alpha \cdot X_t} \cdot dW_t$$

式中、X_iは時間との相関関係における遺伝子／タンパク質の発現を示し、βは産生率を表し、αは分解率を表し、Ｗｔはウィーナー過程（または標準的なブラウン運動）を示す。ここで、測定した初期化継続時間のスケールは、産生時間および分解時間のスケールより１桁または２桁大きかった（Ｍｂｄ３^{KD}について１０日、かつＷＴについて＞１００日）。また、初期化潜伏時間を測定した試料間における時間は、産生プロセスおよび分解プロセスの半減期（$T_{1/2}$）より長かった。このため本発明者らは、時間スケールを分けることによって、産生プロセスおよび分解プロセスが準定常状態にあると仮定する。準定常状態においては、産生率βに影響を及ぼす調節性変化のために、そして恐らくはエピジェネティックな修飾のために、定常状態における発現（β／α）値がゆっくりと変化する。こうしてゆっくりと累積する変化に対して、本発明者らはより単純な線形拡散モデルを仮定する。

$$\cdot = \cdot_0 + \nu \cdot + \sigma \cdot$$

式中、X_iは時間との相関関係における準定常状態発現を示し、ν・ｔは決定的ダイナミクスを表し、νはプロセスドリフトとよばれ、σ・W_iは遺伝子発現ノイズを表し、σは標準偏差を示し、Ｗｔはウィーナー過程を示す。

【０６４６】

本発明者らは、初期化ダイナミクスの観察結果はいくつかの主要な調節因子（恐らくＮａｎｏｇまたはＯｃｔ４）の低い不活性状態から高い発現状態への転移に支配されている、と仮定する。この転移に関し、初期化潜伏時間は第一通過過程分布に対応する（図５７Ｃ中の説明を参照）。第一通過過程分布では、初期化時間が、いくつかの規定発現閾値の第一通過過程に依存する。したがって、固定された（未知の）発現閾値α＞X_0について、以下が成り立つ。[87]：

$$T = \inf\left\{ t > 0 \middle| X_t = \alpha \right\} \sim IG\left(\alpha/\nu, \alpha^2/\sigma^2\right)$$

$$f_T(x) = \frac{\alpha}{\sigma\sqrt{2\pi \cdot x^3}} \exp\left\{ -\frac{(\alpha - \nu \cdot x)^2}{2\sigma^2 x} \right\}$$

式中、Ｔは初期化時間（または第一通過過程）を表す確率変数であり、ＩＧ（：，：）は逆ガウス分布（またはワルド分布）を表し、パラメータは

$$\mu = \frac{\alpha}{\nu}$$

（平均）および

$$\lambda = \frac{\alpha^2}{\sigma^2}$$

（形状パラメータ）であり、f_Tは密度汎関数である。本発明者らは一般性を失うことなくX_0はゼロであると仮定し、それ以外の場合には、本発明者らは、α’＝α－X^0＞０を含むあらゆる可能性にシフトできる。

【０６４７】

こうして、本発明者らは、初期化潜伏時間の観察結果を、最尤推定量を用いて逆ガウス分布にフィットさせ、各試料について最もよくフィットするパラメータ（μ、λ）を見つける。モデルパラメータαは未知でも、本発明者らは、フィッティング結果から

$$\mu/\sqrt{\lambda} = \sigma/\nu$$

を計算できる。

$$\mu/\sqrt{\lambda} = \sigma/\nu$$

は、各試料についてのダイナミック変動性を定義する。この変動性は、ブラウン運動の標準偏差比率（σ）をブラウン運動ドリフトパラメータ（ν）で割ったものである。ここで、σ／ν＞１は、変動性ダイナミクスが高い場合に相当する。本発明者らは、Ｍｂｄ３$^{+}$／$^{+}$試料におけるダイナミクス変動性はσ／ν＞５であるが、Ｍｂｄ３^{KD}および細胞周期の測定から両者が

$$\sigma/\nu \approx 0.5$$

のダイナミック変動を呈することを示す（図５７Ｂ）。

【０６４８】

誤差の伝搬　フィッティングのガウス分布および逆ガウス分布により、上記パラメータの９５％信頼区間が得られる。本発明者らは、変動係数およびダイナミクス変動性の比率を計算し、σおよびμは相関関係にないと仮定し、誤差に対して次の等式を用いた。

$$\Sigma_{CV} = \sqrt{\Sigma_\sigma^2 \cdot \frac{1}{\mu^2} + \Sigma_\mu^2 \cdot \frac{\sigma^2}{\mu^4}}$$

式中、

Σ_{CV}，Σ_μ、およびΣ_σ

は変動係数、平均、および標準偏差における誤差をそれぞれ表す。

【０６４９】

モデル化細胞周期継続時間　対象のＭｂｄ３$^{+}$／$^{+}$およびＭｂｄ３^{KD}細胞系について

の２倍増加時間パラメータ（平均および標準偏差）を、以前にＨａｎｎａ、Ｊ．ｅｔ ａｌ．２００９（Ｎａｔｕｒｅ ４６２，５９５－６０１）中に記載される通りに測定した。本発明者らの目的は、初期化継続時間に従って世代数を推定し、初期化潜伏時間の観察結果に細胞周期時間分布をフィットさせることであった。ここで、Ｈａｎｎａ、Ｊ．ｅｔ ａｌ．２００９（Ｎａｔｕｒｅ ４６２，５９５－６０１）に、細胞周期時間と初期化潜伏時間の分布とが互いに依存すると示されていることに注目する。いずれの理論にもとらわれずに、本発明者らは、律速バリアが減少するために初期化変動性が低くなり、その結果、変動性が細胞周期単独で説明できる、と主張する。２倍増加時間分布は、Ｂリンパ球についてその特徴が以前に調べられており（Ｄｕｆｆｙ，Ｋ．Ｒ．ｅｔ ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３５，３３８－３４４，２０１２）、本発明者らは、簡単にするために、細胞周期時間がガウス分布に従うと仮定する。この仮定は、（Ｄｕｆｆｙ Ｋ．Ｒ，２０１２，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３５：３３８－３４４、図３Ａ）によって裏付けられており、また、２倍増加時間の測定値（Ｐ値＞０．７）にＳｈａｐｉｒｏ－Ｗｉｌｋ正規性検定（Ｓｈａｐｉｒｏ，Ｓ．Ｓ．ａｎｄ Ｗｉｌｋ，Ｍ．Ｂ．Ａｎ ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｖａｒｉａｎｃｅ ｔｅｓｔ ｆｏｒ ｎｏｒｍａｌｉｔｙ（ｃｏｍｐｌｅｔｅ ｓａｍｐｌｅｓ）．Ｂｉｏｍｅｔｒｉｋａ（１９６５），５２：５９１）を適用することによって検証されている。また、複数世代細胞周期分布に対するモデルを定義する必要があり、その分析で本発明者らは２つの対立するモデルについて検討した。

【０６５０】

依存モデル：細胞周期時間は同胞間および世代間で遺伝する。したがって、各モノクローナル集団（各ウェル）は、細胞周期分布

$(\tau_i \sim N(\mu,\sigma))$

の単一試料を表す。その故に、各ウェルについてＫ回分裂する時間ｉは、

$T_i^K = K\cdot\tau_i \sim N(K\cdot\mu, K\cdot\sigma)$

の分布を示す。式中、Ｎ（：，：）は正規分布を表す。

【０６５１】

独立モデル：細胞周期時間は同胞間および世代間で独立している。したがって、各モノクローナル集団（各ウェル）についてＫ回分裂する時間ｉは、ランダムウォーク過程である。その故に、

$$T_i^K = \tau_i^1 + \tau_i^2 + \ldots + \tau_i^K \sim N\left(K\cdot\mu, \sqrt{K}\cdot\sigma\right)$$

が成り立ち、式中、

$\tau_i^j \sim N(\mu,\sigma)$

は、ｉｉｄ（独立同分布）確率変数である。

【０６５２】

現実の生物学的過程は恐らく、上記２つの対立するモデルの中間であろう。同胞間の相関関係について、その特徴は（Ｄｕｆｆｙ Ｋ．Ｒ，２０１２，Ｓｃｉｅｎｃｅ ３３５：３３８－３４４、図２Ｆ）によって調べられている。この文献は依存モデルを裏付けるものであるが、相関関係は時間経過と共に小さくなるため、複数世代プロセスの独立挙動を裏付ける。その故に、本発明者らは、上記結果を信頼可能とする境界を計算するために両モデル（依存モデルおよび独立モデル）についてフィッティングを調べることとした。

【０６５３】

フィッティング手順は、以下からなる。１）以前に記載される通り（Ｈａｎｎａ，Ｎａｔｕｒｅ ２００９）、各試料（Ｍｂｄ３$^{+/+}$およびＭｂｄ３^{KD}）中における２倍増加時間の平均（μ）および標準偏差（σ）を推定する。２）初期化潜伏時間の観察結果を両モデルに対してフィッティングする：依存モデルにはＮ（Ｋ・μ，Ｋ・σ）、独立モデルには

$N\left(K\cdot\mu,\sqrt{K}\cdot\sigma\right)$

。平均（μ）および標準偏差（σ）は各試料から経験的に推定する。フィッティングはＭａｔｌａｂにより、非線形回帰を用いて実施した。３）測定した初期化継続時間を生じるのに必要な世代数（Ｋ）を、調整済みＲ２統計値を最適化することによって推定する（調整済みＲ２の詳細は上記参照）。

【０６５４】

依存モデルのフィッティングを（図５７Ｄ～Ｅ）に示すが、下記表１に示すように、独立モデルの結果は依存モデルの結果と非常によく類似する。

【０６５５】

【表１】

	依存モデル	独立モデル
$Mbd3^{KD}$	Ａｄｊ R^2＝０．９９８６	Ａｄｊ R^2＝０．９９８２
$Mbd3^{+/+}$	Ａｄｊ R^2＝０．７３	Ａｄｊ R^2＝０．６９

【０６５６】

このように、依存モデルおよび独立モデルにおけるフィッティング結果は互いに同等であり、実際の細胞周期モデルにもあてはまると考えられる（相関関係は一部、世代に依存する）。

【０６５７】

構造モデル（相－型モデル）についての推論　二連律速工程によって初期化プロセスをモデル化できると示唆する論文がいくつかある（Ｂｕｇａｎｉｍ，Ｙ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１５０，１２０９－１２２２（２０１２）；Ｐｏｌｏ，Ｊ．Ｍ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１５１，１６１７－１６３２（２０１２）；Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４６２，５９５－６０１（２００９）；Ｓｍｉｔｈ，Ｚ．Ｄ．，ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２８，５２１－５２６（２０１０））。初期化におけるＭｂｄ３欠損後にこの複数工程プロセスがどのように変化するかを研究するため、本発明者らは相－型（ＰＨ）モデル化を適用した（Ｂｏｌｃｈ，Ｇ．，Ｇｒｅｉｎｅｒ，Ｓ．，ｄｅ　Ｍｅｅｒ，Ｈ．＆Ｔｒｉｖｅｄｉ，Ｋ．Ｓ．Ｑｕｅｕｅｉｎｇ　ｎｅｔｗｏｒｋｓ　ａｎｄ　Ｍａｒｋｏｖ　ｃｈａｉｎｓ：ｍｏｄｅｌｉｎｇ　ａｎｄ　ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ　ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　ｗｉｔｈ　ｃｏｍｐｕｔｅｒ　ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ．ＷＩＬＥＹ，Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，２００６）。この相－型（ＰＨ）モデル化は、単一の吸収相（本発明においてはｉＰＳＣ相）を有する、有限空間における連続時間マルコフ連鎖モデルについて、そのダイナミクスの特徴を調べるための新規のアプローチである。$Mbd3^{KD}$および$Mbd3^{+/+}$において観察された初期化潜伏時間は、複数の二連工程モデルにフィットした。この際、最もよくフィットするモデルを推定効率の収束によって選択した（図５５Ｃ～Ｄ、５８Ｄ、５９Ｇ）。このモデルについて、本発明者らは、顕微鏡検査を同時に行うことによって取得したＭｂｄ３ＫＤ測定結果を用いて、初期化移行期間の時間分解能を高めたことに注目する（１２時間毎に試料採取）。こうした測定により、ＦＡＣＳで取得したＭｂｄ３ＫＤ測定結果と同等のダイナミクスがわかる（図５５Ｂ）。

【０６５８】

いずれの理論にもとらわれずに、本発明者らは、初期化プロセスは、Ｍ個の相を有する連続的なマルコフ連鎖モデルであると説明する。時間ｔにおいて相

$i\ \left(i\in\{1,\ldots,M\}\right)$

にある確率をＰｉ（ｔ）で表す。このモデルにおいて、誘導細胞がＢ細胞である確率はP_1（ｔ）であり、ｉＰＳＣである確率はP_M（ｔ）であり、Ｂ細胞相からｉＰＳＣ相までにはＭ－２個の中間相が存在する。ｉ番目の相と（ｉ＋１）番目の相の間で移行率μ_iに

おいて移行が生じると仮定され、この仮定が意味するのは、このモデルが相間フィードバックを無視しているということである。また、このモデルにおいて決定的な遅延を生じさせるため、本発明者らは、モデルダイナミクスにおける決定的な「シフト」を表すさらなるパラメータｔ０をフィッティングに組み込んだ。その結果、すべてのｔ＞ｔ$_0$についてＭ個の相モデルの特徴を、次の等式によって調べることができる。

$$\begin{cases} \dfrac{dP_1(t-t_0)}{dt} = -\mu_1 \cdot P_1(t-t_0) & i=1 \text{について} \quad ; \\ \dfrac{dP_i(t-t_0)}{dt} = \mu_{i-1} \cdot P_{i-1}(t-t_0) - \mu_i \cdot P_i(t-t_0) & i \in \{2,\ldots,M-1\} \text{について} \quad ; \\ \dfrac{dP_M(t-t_0)}{dt} = \mu_{M-1} \cdot P_{M-1}(t-t_0). & i=M \text{について} \quad . \end{cases}$$

このモデルは、次の初期条件、すなわち、Ｐ$_1$（ｔ）＝１であり、すべてのｉ＞１およびすべてのｔ≦ｔ$_0$についてＰ$_i$（ｔ）＝０であるという条件によって解くことができる。Ｍ個の相のモデルについて、その解は、移行率

$$(\mu_i,\ i \in \{1,\ldots,M-1\})$$

との相関関係において、すべてのｔ＞０についてＰ$_i$（ｔ）を定義する。ｔ$_0$は、物理的構成においてはＰ$_i$（ｔ）であるが、相ｉにおける細胞集団の比率の時間変化を示す。

【０６５９】

本発明者らは、Ｍｂｄ３^{KD}およびコントロールＭｂｄ３$^{+/+}$ダイナミクスの、Ｍが２から６である複数のモデルへのフィッティングについて、入れ子構造のフィッティング手順を構築した。本発明者らは完全な初期化潜伏時間を有する分布についてのみ測定した。このため、フィッティングは、各系の潜伏時間分布測定結果と各モデルのＰ$_M$（ｔ）関数計算結果との間で実施し、潜伏時間分布測定結果のそれぞれに最もよくフィットするモデルを求めた。本発明者らは、各モデルと調整済みＲ２統計値との非線形回帰フィッティングを適用し、これによって、過学習モデルを排除した。残差の平方の合計が収束する（推定効率収束）限り、モデルパラメータｍの数が増えると調整済みＲ２統計値が減るため、過学習が調整済みＲ^{2}によって排除されることに注目する。

【０６６０】

最もよくフィットするモデルによって、各初期化系（Ｍｂｄ３^{KD}およびＭｂｄ３$^{+/+}$）のダイナミクスを再現する相の数が定義される。フィッティング手順によって、最適化された移行率μｉおよび決定的遅延ｔ０が計算される。以前の報告［Ｂｕｇａｎｉｍ，Ｙ．ｅｔ ａｌ．Ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ａｎａｌｙｓｅｓ ｄｕｒｉｎｇ ｃｅｌｌｕｌａｒ ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ ｒｅｖｅａｌ ａｎ ｅａｒｌｙ ｓｔｏｃｈａｓｔｉｃ ａｎｄ ａ ｌａｔｅ ｈｉｅｒａｒｃｈｉｃ ｐｈａｓｅ．Ｃｅｌｌ １５０，１２０９－１２２２（２０１２）；Ｐｏｌｏ，Ｊ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．Ａ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｒｏａｄｍａｐ ｏｆ Ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ Ｓｏｍａｔｉｃ Ｃｅｌｌｓ ｉｎｔｏ ｉＰＳ Ｃｅｌｌｓ．Ｃｅｌｌ １５１，１６１７－１６３２（２０１２）；Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｄｉｒｅｃｔ ｃｅｌｌ ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ ｉｓ ａ ｓｔｏｃｈａｓｔｉｃ ｐｒｏｃｅｓｓ ａｍｅｎａｂｌｅ ｔｏ ａｃｃｅｌｅｒａｔｉｏｎ．Ｎａｔｕｒｅ ４６２，５９５－６０１（２００９）；Ｓｍｉｔｈ，Ｚ．Ｄ．，Ｎａｃｈｍａｎ，Ｉ．，Ｒｅｇｅｖ，Ａ．＆ Ｍｅｉｓｓｎｅｒ，Ａ．Ｄｙｎａｍｉｃ ｓｉｎｇｌｅ－ｃｅｌｌ ｉｍａｇｉｎｇ ｏｆ ｄｉｒｅｃｔ ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ ｒｅｖｅａｌｓ ａｎ ｅａｒｌｙ ｓｐｅｃｉｆｙｉｎｇ ｅｖｅｎｔ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２８，５２１－５２６（２０１０）］と合致していて、Ｍｂｄ３$^{+/+}$ダイナミクスは、１つまたは２つであって０個ではない中間相からなる多工程プロセスとフィットする（図５５Ｃ～Ｄ、５８Ａ～Ｄ）。注目すべきことに、Ｍｂｄ３^{KD}におけるダイナミクスの測定結果が、中間相

を有さない単一工程プロセスに最適にフィットする（図５５Ｃ～Ｄおよび５８Ｄ）。また、次いで、各試料について初期化プロセスの平均割合を、

$$v_{eff} = 1 \Big/ \sum_{i=1}^{M-1} \frac{1}{\mu_i}$$

によって推定した。フィッティング結果および推定モデルパラメータを記録した（データは示さず）。モデルのフィットを、ｃｈｉ^{2}最小化による加重非線形フィッティングに基づく第二のフィッティング手順によって確認したことに注目する。結果から、２つのフィッティング手順によって得た結果が同等であったことがわかる（図５８Ａ～Ｄおよび図５９Ａ～Ｇ）。

【０６６１】

Ｍｂｄ３^{KD}で得た結果から、中間状態が減少し、したがって律速バリアが減少するという推論の余地がある。ここから偶然性が直に主張されるわけではないが、バリアとプロセス変動性との間には明瞭な関連がある。また、この結果にはこれらについて、例えば、以前の研究（Ｍｉｋｋｅｌｓｅｎ，Ｔ．Ｓ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ４５４，４９－５５，２００８）で広くその特徴が調べられ初期化において以前に確立された中間相について、その存在を裏付ける多くの実験観察結果が含まれる。バリア無しの初期化ダイナミクスがＭｂｄ３^{KD}プロトコールにより得られるというモデル予測は、ＷＴ（野生型）試料において中間（ＳＳＥＡ１陽性、Ｏｃｔ４陰性、かつＮａｎｏｇ陰性）が検出されたがＭｂｄ３^{KD}試料においてはこの中間は観察されなかったという事実によって裏付けられる（図８Ｓおよび図８Ｆ～Ｋ）。また、以前に記載された（Ｍｉｋｋｅｌｓｅｎ，Ｔ．Ｓ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ４５４，４９－５５，２００８）、一部初期化された（中間前ｉＰＳ）細胞系は、Ｍｂｄ３欠損時にｉＰＳＣに良好に変換された（図５０Ｂ）。こうした結果を合わせると、Ｍｂｄ３^{KD}初期化プロトコールにおける律速バリアを排除するためのモデル予測について、実験的に検証される。

【０６６２】

技術に基づく上記以外の記録を次に示す。第一に、ポリクローナルアッセイおよびモノクローナルアッセイでの測定の違いに起因して、Ｍｂｄ３^{KD}についての割合の増減とＭｂｄ３$^{+/+}$についての割合の増減とが異なることに注目する（図５５Ｃ～Ｄ）。Ｍｂｄ３$^{+/+}$モノクローナル系については、クローン集団におけるｉＰＳ細胞の陽性検出は、１ウェルあたりＧＦＰ＋細胞が＞０．５％であるＦＡＣＳ閾値によって定義される。この系について、以前に記載されたモデル（Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ４６２，５９５－６０１，２００９）に従い、移行率および総割合が増減によって

$$\mu_i' = \frac{\mu_i}{N_{eff}}$$

で示す集団平均率となると考えられる。この増減が生じる理由は、各活性化事象（ウェル）が、多くのｉｉｄ（独立同分布）指数変数の間での競合を表すからである。一方、Ｍｂｄ３^{KD}ポリクローナルアッセイについては、集団の全体のうちＮａｎｏｇ－ＧＦＰ＋細胞の全般的画分を１日１回測定したが、この単一細胞の測定において、移行率を増減させて集団平均とする必要はない。

【０６６３】

第二に、Ｈｉｌｌ関数における非線形効果等の非線形効果によって、初期化潜伏時間ダイナミクスの観察結果と類似するダイナミクスが得られてもよいが、多ウェルモノクローナル（均質集団）測定スキームであるために本発明者らはこの効果を排除できることに注目する。各活性化事象（各ウェル）が独立していて他のウェルのいずれからも物理的に離れており、付近のウェルの活性化の影響を受けないことは明瞭である。また、初期化された細胞系は、均質なＤＯＸ誘導安定コンストラクトを有する第二の系であった。このため、Ｓ関数のダイナミクスは初期化潜伏時間の分布に対応し、他の非線形効果には対応しないはずである、と考えられる。

【０６６４】
最後に、本発明者らは、モデルフィッティングで用いるパラメータｔ０がプロセスの開始点ではないことに着目している。遺伝子発現およびクロマチンの結果を検査すると、遺伝子発現およびクロマチンにおける大きな変化は誘導４日後（Ｍｂｄ３^{KD}）および８日後（ＷＴ）には既に明瞭となることがわかる（図４５Ａ～Ｂ、４７Ａ～Ｂ参照）。パラメータｔ０は、分布を動かして互いにフィットさせるための手法上のものであり、初期化において必要な変化に要求される最低限の決定的継続時間を表すものであってもよい。モノクローナルＭｂｄ３$^{+}$／$^{+}$系について、検出の遅延はＦＡＣＳで得られかつ式

$$t = T_d \cdot Log_2(N_{FACS} \cdot Thr_{FACS}) \approx 4d$$

で示す閾値によるものであることに注目する。式中、Ｔ$_{d}$は２倍増加時間（～２０時間）であり、Ｎ$_{ＦＡＣＳ}$は細胞５０００個に等しく、Ｔｈｒは０．０５％に等しい。ＤＯＸ誘導の遅延は約０．５日である。このＭｂｄ３^{KD}検出の遅延はごくわずかである（ポリクローナルアッセイ）。こうした機構的な遅延について、Ｍｂｄ３$^{+}$／$^{+}$およびＭｂｄ３^{KD}の「最小継続時間」は約３（日間）であると本発明者らは理解しているが、推定値ｔ$_{0}$より小さくするためには初期化変化の完了が必要である。

【０６６５】
非線形回帰についての仮定　上記の推定モデルの大部分は、非線形回帰をフィッティング手順として用いる。これについて、本発明者らは以下仮定する。１）観測誤差、すなわち観察値とモデル予測値の間の差異として定義される残差は、分布するのが一般的である。２）連続して観察した際に生じたミスは観察回毎に独立している。３）観察ミス（σ^{2}）の分散は状態変数および観察回のすべてについて同じである。本発明者らは、推定に関する以前の問題すべてに対し、コルモゴロフ・スミルノフ検定およびＳｈａｐｉｒｏ－Ｗｉｌｋ正規性検定［Ｓｈａｐｉｒｏ，Ｓ．Ｓ．＆Ｗｉｌｋ，Ｍ．Ｂ．Ａｎ ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ ｖａｒｉａｎｃｅ ｔｅｓｔ ｆｏｒ ｎｏｒｍａｌｉｔｙ（ｃｏｍｐｌｅｔｅ ｓａｍｐｌｅｓ）．Ｂｉｏｍｅｔｒｉｋａ（１９６５），５２：５９１；Ｓｍｉｒｎｏｖ，Ｎ．ＪＳＴＯＲ：Ｔｈｅ Ａｎｎａｌｓ ｏｆ Ｍａｔｈｅｍａｔｉｃａｌ Ｓｔａｔｉｓｔｉｃｓ，Ｖｏｌ．１９，Ｎｏ．２（Ｊｕｎ．，１９４８），ｐｐ．２７９－２８１）によって、残差の分布を調べた。残差は、ＲａｉｓＹ，ｅｔ ａｌ．（“Ｄｅｔｅｒｍｉｎｉｓｔｉｃ ｄｉｒｅｃｔ ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ ｏｆ ｓｏｍａｔｉｃ ｃｅｌｌｓ ｔｏ ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ”，Ｎａｔｕｒｅ．２０１３ Ｏｃｔ ３；５０２（７４６９）：６５－７０．Ｅｐｕｂ ２０１３ Ｓｅｐ １８］の副表１に報告されたＰ値を有する正規性検定に合格した。上記文献はその全体を参考として本明細書に組み込む。

【０６６６】
ＮｕＲＤ複合体および他の関連タンパク質の進化解析　本発明者らは、上記ＮｕＲＤ複合体の一部であると知られているかまたは次のタンパク質に関連するヒトタンパク質１５個と、代表的な後生動物種１５種（マウス－Ｍ．ｍｕｓｃｕｌｕｓ、カモノハシ－Ｏ．ａｎａｔｉｎｕｓ、キンカチョウ－Ｔ．ｇｕｔｔａｔａ、ニワトリ－Ｇ．ｇａｌｌｕｓ、カエル－Ｘ．ｔｒｏｐｉｃａｌｉｓ、ゼブラフィッシュ－Ｄ．ｒｅｒｉｏ、フグ－Ｔ．ｎｉｇｒｏｖｉｒｉｄｉｓ、ナメクジウオ－Ｂ．ｆｌｏｒｉｄａｅ、ウニ－Ｓ．ｐｕｒｐｕｒａｔｕｓ、蚊－Ａ．ｇａｍｂｉａｅ、ショウジョウバエ－Ｄ．ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ、ミツバチ－Ａ．ｍｅｌｌｉｆｅｒａ、カブトムシ－Ｔ．ｃａｓｔａｎｅｕｍ、イソギンチャク－Ｎ．ｖｅｃｔｅｎｓｉｓ、センモウヒラムシ－Ｔ．ａｄｈａｅｒｅｎｓ）と、アウトグループとして酵母Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅとに、オルソログを割り当てた：ＭＢＤ１（遺伝子ＩＤ：４１５２、配列番号５）、ＭＢＤ２（遺伝子ＩＤ：８９３２、配列番号６）、ＭＢＤ３（遺伝子ＩＤ：５３６１５、配列番号７）、ＭＢＤ４（遺伝子ＩＤ：８９３０、配列番号８）、ＯＣＴ４（遺伝子ＩＤ：５４６０、配列番号９）、ＳＯＸ２（遺伝子ＩＤ：６６５７、配列番号１０）、ＣＨＤ４（遺伝子ＩＤ：１１０８、配列番号１１）、Ｎａｎｏｇ（遺伝子ＩＤ：７９９２３、配列番号１２）、ＲＢＢＰ４（遺伝子ＩＤ：

５９２８、配列番号１３）、ＲＢＢＰ６（遺伝子ＩＤ：５９３０、配列番号１４）、ＲＢＢＰ７（遺伝子ＩＤ：５９３１、配列番号１５）、ＨＤＡＣ１（遺伝子ＩＤ：３０６５、配列番号１６）、ＨＤＡＣ２（遺伝子ＩＤ：３０６６、配列番号１７）、ＭＴＡ１（遺伝子ＩＤ：９１１２、配列番号１８）、およびＭＴＡ２（遺伝子ＩＤ：９２１９、配列番号１９）。上記リストの最後に記載される後生動物であるＴ．ａｄｈａｅｒｅｎｓは、後生動物の基本グループを表し、これを用いて動物多細胞性の由来を研究する［Ｒｏｋａｓ，Ａ．Ａｎｎｕａｌ ｒｅｖｉｅｗ ｏｆ ｇｅｎｅｔｉｃｓ，４２：２３５－２５１，２００８；Ｋｎｏｌｌ，Ａ．Ｈ．Ａｎｎｕ．Ｒｅｖ．Ｅａｒｔｈ Ｐｌａｎｅｔ．Ｓｃｉ．３９，２１７－２３９，２０１１］。Ｔ．ａｄｈａｅｒｅｎｓにおいてオルソログを有するタンパク質は上記基本グループの多細胞動物中に存在する可能性が高いが、酵母中に存在するタンパク質は動物多細胞性に先行する。上記オルソログを、ＳＴＲＩＮＧ ｄａｔａｂａｓｅ（バージョン９．０）（Ｓｚｋｌａｒｃｚｙｋ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．Ｔｈｅ ＳＴＲＩＮＧ ｄａｔａｂａｓｅ ｉｎ ２０１１：ｆｕｎｃｔｉｏｎａｌ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ ｎｅｔｗｏｒｋｓ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ，ｇｌｏｂａｌｌｙ ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ ａｎｄ ｓｃｏｒｅｄ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３９，Ｄ５６１－Ｄ５６８，２０１０）のＣＯＧ ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ（バージョン９．０）を用いて抽出した。本発明者らは、上記ヒトタンパクと同じオルソログ（ＣＯＧ）クラスター中にみられるオルソログのみについて分析した（そして、異なるＣＯＧに割り当てられている他の類似タンパク質はすべて無視した）。１つの種に対して１を超えるオルソログがみられた場合（Ａｌｔｓｃｈｕｌ，Ｓ．Ｆ．，ｅｔ ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１９９７，２５：３３８９－４０２）、本発明者らは、当該種の種々のオルソログをヒトオルソログに対するＢＬＡＳＴに供して、相対的な類似度を定量した。本発明者らは、５０残基より短いタンパク質またはｅ値が０．００１を超えるタンパク質を除外した。残ったタンパク質のうち、上記ヒトタンパク質に最も近いホモログとして、本発明者らは、比較対象の種においてｅ値が最も小さいオルソログを選択した。本発明者らは、２つのオルソログ（ヒトオルソログおよび比較対象の種のオルソログ）の間の類似度スコアを当該２つのオルソログのうち長い方のタンパク質の長さで割ることによって、当該２つのオルソログの間の標準類似度スコアを計算した。

【０６６７】

ナイーブ型ヒト多能性細胞の取得　ＷＩＳ－ＮＨＳＭ（Ｗｅｉｚｍａｎｎ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ Ｎａｉｖｅ ｈｕｍａｎ Ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ Ｍｅｄｉｕｍ）とよばれる次の無血清限定条件を用いて、本研究中に記載する特有の生物学的特性を有するナイーブ型ヒト多能性幹細胞（ｉＰＳＣおよびＥＳＣ）の単離、発生、誘導、および安定化を実施した。ＷＩＳ－ＮＨＳＭ－（ｉ）培地は、４７５ｍｌのノックアウトＤＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１０８２９）、５グラムのＡｌｂｕＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１１０２０－０２１）、５ｍｌのＮ２サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１７５０２０４８）、１０μｇ（マイクログラム）の組換えヒトＬＩＦ（白血病抑制因子）（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、８ｎｇ／ｍｌの組換えｂＦＧＦ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、１ｎｇ／ｍｌの組換えＴＧＦβ１（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、１ｍＭのグルタミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、１％の非必須アミノ酸（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、０．１ｍＭのβ－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ）、ペニシリン－ストレプトマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、および小分子阻害剤ＰＤ０３２５９０１（１μＭ、ＥＲＫ１／２ｉ、Ａｘｏｎ Ｍｅｄｃｈｅｍ）、ＣＨＩＲ９９０２１（３μＭ、ＧＳＫ３βｉ、Ａｘｏｎ Ｍｅｄｃｈｅｍ）、ＳＰ６００１２５（１０μＭ、ＪＮＫｉ、ＴＯＣＲＩＳ）、ＳＢ２０３５８０（５～１０μＭ、ｐ３８ｉ、ＴＯＣＲＩＳ）を含むよう調整した。さらに最適化した結果、Ｐ３８阻害を増大させるために、本発明者らは、ＳＢ２０３５８０の代わりにＳＢ２０２１９０（５μＭ、ｐ３８ｉ、Ａｘｏｎ Ｍｅｄｃｈｅｍ）またはＢＩＲＢ７９６（２μＭ、Ｐ３８ｉ、Ａｘｏｎ Ｍｅｄｃｈｅｍ）を用いた。

【０６６８】

本研究全体を通して、０．２％ゼラチン＋１ｎｇ／ｍｌビトロネクチン被覆プレート上、

３７℃において少なくとも１時間、ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣを増殖させた。とりわけ、１ｎｇ／ｍｌの組換えビトロネクチンまたはラミニン（Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、Ｌ２０２０、１ｎｇ／ｍｌ、３７℃において少なくとも１時間）を用いて、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下においてヒトナイーブ型細胞を維持することもできる。

【０６６９】

３～４日毎に、単一細胞トリプシン処理（０．２５％または０．０５％Ｔｒｙｓｉｎ＋ＥＤＴＡ）によって細胞を継代した。必須ではないが、細胞継代前後２４時間にわたってＲＯＣＫ経路阻害剤Ｙ－２７６３２（５μＭ、ＲＯＣＫｉ、Ａｘｏｎ　Ｍｅｄｃｈｅｍ）をＷＩＳ－ＮＨＳＭに添加することにより、単一細胞クローニング効率を増大させ得る。ナイーブ型ｈｉＰＳＣ／ｈＥＳＣの継代回数は、ナイーブ状態の誘導または安定化後に計数した継代回数を示す（これに先立って、従来型／プライム型ＥＳＣ条件下において細胞を確立、維持した際の継代回数は含まない）。マウスおよびヒトナイーブ型ｉＰＳＣ／ＥＳＣをトランスフェクションするため、０．０５％のトリプシン－ＥＤＴＡ溶液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて細胞を回収し、ＰＢＳ中に再懸濁した細胞を、７５μｇのＤＮＡコンストラクト（Ｇｅｎｅ　Ｐｕｌｓｅｒ　Ｘｃｅｌｌ　Ｓｙｓｔｅｍ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ、５００Ｖ、２５μＦ、０．４ｃｍキュベット）を用いてトランスフェクションした。

【０６７０】

本研究において記載および分析した細胞を上述の通りに維持する際、本発明者らは、ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣがゼラチン被覆プレート上で、マイトマイシンＣ不活性化に供したまたはガンマ線照射に供したマウス胚線維芽細胞（ＭＥＦ）フィーダー細胞と共に増え得ることに注目する。

【０６７１】

さらに、構成要素であるＡｌｂｕｍａｘを１５～２０％のノックアウト血清代替物（ＫＳＲ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１０８２８－０２８）、ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ　Ｄｅｆｉｎｅｄ　Ｌｉｐｉｄ　Ｃｏｎｃｅｎｔｒａｔｅ（ＧＩＢＣＯ０、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１１９０５－０３１）、オレイン酸－アルブミン（Ｏ３００８、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、最終１０μ／ｍｌ）、オレイン酸（Ｏ１２５７、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、最終濃度１０μｇ／ｍｌ）、リノレン酸／オレイン酸／アルブミンサプリメント（Ｌ９６５５、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ、最終濃度１０μｇ／ｍｌ）、またはオレイン酸［Ｏ１００８、Ｓｉｇｍａ　Ａｌｄｒｉｃｈ（ＤＭＳＯ溶液）、最終濃度１０μｇ／ｍｌ］で置き換えることによって調整した別の組成のＷＩＳ－ＮＨＳＭも用い得る。

【０６７２】

５ｍｌの調製済Ｎ２混合物を添加する代わりに、個々の構成要素を次の最終濃度で５００ｍｌの培地ボトルに添加することもできる：１）組換えヒトインスリン（Ｓｉｇｍａ、Ｉ－１８８２）の最終濃度は１２．５μｇ／ｍｌ、２）Ａｐｏ－Ｔｒａｎｓｆｅｒｒｉｎ（Ｓｉｇｍａ、Ｔ－１１４７）の最終濃度は５００μｇ／ｍｌ、３）プロゲステロン（Ｓｉｇｍａ、Ｐ８７８３）の最終濃度は０．０２μｇ／ｍｌ、４）プトレシン（Ｓｉｇｍａ、Ｐ５７８０）の最終濃度は１６μｇ／ｍｌ、５）亜セレン酸ナトリウム（Ｓｉｇｍａ、Ｓ５２６１）は３ｍＭ保存液を５μＬ、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地５００ｍｌに対して添加する。

【０６７３】

ＳＢ２０３５８０（ｐ３８ｉ）の代わりに、上記ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地はＳＢ２０２１９０（５μＭ、ｐ３８ｉ、ＴＯＣＲＩＳ）またはＢＩＲＢ７９６（２μＭ、Ｐ３８ｉ、Ａｘｏｎ　Ｍｅｄｃｈｅｍ）を含み得、この場合にもＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下におけるＯＣＴ４－ＧＦＰの発現は全く変化しない。

【０６７４】

Ｖｉｔａｍｉｎ　Ｃ（Ｌ－アスコルビン酸２－リン酸塩、Ｓｉｇｍａ、Ａ８９６０、最終濃度５０マイクロｇ／ｍｌ）の添加、および／または低酸素増殖条件（５％のPO_2）について調べたところ、Ｏｃｔ４－ＧＦＰ＋ナイーブ型ヒトＥＳＣおよびｉＰＳＣを増やし得ることを見いだした。

【０６７５】
ＫＯ－ＤＭＥＭの代わりに、次の培地、すなわちＤＭＥＭ－Ｆ１２（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓまたは Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、ＫＯ－ＤＭＥＭ／Ｆ１２（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１２６６０－０１２）、ＧＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１１７１０）、またはＤＭＥＭ／Ｆ１２とＮｅｕｒｏｂａｓａｌ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、２１１０３－０４９）を１：１で混合したものも用い得る。
【０６７６】
本発明のある実施形態のナイーブ型細胞の培養に用いた別のＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地（「ＷＩＳ－ＮＨＳＭ－ｉｉ」とよぶ）の例として、４２５ｍｌのノックアウトＤＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１０８２９）、７４ｍｌのノックアウト血清代替物（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１０８２８－０２８）、５ｍｌのＮ２サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１７５０２０４８）、１０μｇの組換えヒトＬＩＦ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、ＬＩＦ１００５）、８ｎｇ／ｍｌの組換えｂＦＧＦ、１ｎｇ／ｍｌの組換えＴＧＦβ１（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、１ｍＭのグルタミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、１％の非必須アミノ酸（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、０．１ｍＭのβ－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ）、ペニシリン－ストレプトマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、および小分子阻害剤ＰＤ０３２５９０１（１μＭ、ＥＲＫ１／２ｉ、ＡＸＯＮＭＥＤＣＨＥＭ）、ＣＨＩＲ９９０２１（３μＭ、ＧＳＫ３ｂｉ、ＡＸＯＮ ＭＥＤＣＨＥＭ）、ＳＢ２０３５８０（５μＭ、ｐ３８ｉ、ＴＯＣＲＩＳ）、ＳＰ６００１２５（５μＭ、ＪＮＫｉ、ＴＯＣＲＩＳ）に、Ｙ－２７６３２（５μＭ、ＲＯＣＫｉ、Ａｘｏｎ Ｍｅｄｃｈｅｍ）を添加または非添加のものが挙げられるが、これらに限定されない。
【０６７７】
ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地の別の組成として、１５％のＫＳＲを１％のａｌｂｕｍａｘで置き換えた：５００ｍｌのノックアウトＤＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１０８２９）、５ｇｒのＡｌｂｕＭＡＸ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１１０２０－０２１）、５ｍｌのＮ２サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１７５０２０４８）、１０μｇの組換えヒトＬＩＦ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ、ＬＩＦ１００５）、８ｎｇ／ｍｌの組換えｂＦＧＦ、１ｎｇ／ｍｌの組換えＴＧＦβ１（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、１ｍＭのグルタミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、１％の非必須アミノ酸（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、０．１ｍＭのβ－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ）、ペニシリン－ストレプトマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、および小分子阻害剤ＰＤ０３２５９０１（１μＭ、ＥＲＫ１／２ｉ、ＡＸＯＮＭＥＤＣＨＥＭ）、ＣＨＩＲ９９０２１（３μＭ、ＧＳＫ３ｂｉ、ＡＸＯＮ ＭＥＤＣＨＥＭ）、ＳＢ２０３５８０（５μＭ、ｐ３８ｉ、ＴＯＣＲＩＳ）、ＳＰ６００１２５（５μＭ、ＪＮＫｉ、ＴＯＣＲＩＳ）に、Ｙ－２７６３２（５μＭ、ＲＯＣＫｉＡｘｏｎ Ｍｅｄｃｈｅｍ）を添加または非添加のもの。
【０６７８】
ｉＰＳＣの誘導 ｉＰＳＣを線維芽細胞から直接（既に確立されたｉＰＳＣ株からではなく）誘導するために、初期化因子Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、およびＫｌｆ４（Ｈａｎｎａ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．２０１０．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７）をコードするドキシサイクリン（ＤＯＸ）レンチウイルスベクターおよびリバーステトラサイクリントランス作用因子をコードする構造的活性レンチウイルスを有する、ＢＪ線維芽細胞またはＣ１／２由来の二次的線維芽細胞（Ｈａｎｎａ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．２０１０．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７）を、ＤＯＸ存在下、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件（上述）において、ビトロネクチン／ゼラチン被覆プレート上で増殖させた。最初のＰＳＣコロニーが観察されたら、サブクローニングを実施した。
【０６７９】
ヒト胚盤胞からのＥＳＣ誘導 Ｗｅｉｚｍａｎｎ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ＥＳＣＲＯ ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ承認、Ｌｉｓ ｈｏｓｐｉｔａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｉｏｎａｌ ｒｅｖｉｅｗ ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ承認、およびＩｓｒａｅｌｉ Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｅｔ

ｈｉｃｓ Ｃｏｍｍｉｔｔｅｅ承認（７／０４－０４３）のプロトコールに従い、書面にてインフォームドコンセントを受けて、ヒト着床前胚を用いたＥＳＣ誘導を実施した。本研究において、インフォームドコンセント用紙に署名したカップルに自主的に参加してもらい、胚の提供に対して金銭的な補償はしなかった。レーザー補助を伴う顕微操作によって、受精後６～７日目の余剰ＩＶＦ胚から内部細胞塊（ＩＣＭ）を機械的に分離した［Ｂｅｎ－Ｙｏｓｅｆ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．Ｆｅｍａｌｅ Ｓｅｘ Ｂｉａｓ ｉｎ Ｈｕｍａｎ Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅｓ．Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ ２１，３６３－３７２（２０１２）］。このＩＣＭ凝集塊をそのまま、照射処理ＤＲ４マウス胚線維芽細胞のフィーダー細胞層の上に置き、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地中で培養した。増殖中のＥＳＣが初めて増殖した際、この最初の増殖は６日目までに明らかとなり、ＩＣＭを播いてから６～１０日後にトリプシン処理によって単一細胞とした。こうして新たに確立した細胞系をトリプシンを用いてさらに増殖させ、次いで凍結またはさらなる分析に用いた。

【０６８０】

小分子化合物およびサイトカイン　小分子およびサイトカインをＴｏｃｒｉｓ、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、Ｓｔｅｍｇｅｎｔ、Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ、またはＳｉｇｍａから購入し、次の最終濃度で、記載の通りに添加した：ＪＡＫ阻害剤（４２００９９、ＪＡＫｉ、０．６μＭ、ＣＡＬ ＢＩＯＣＨＥＭ）、ケンパウロン（ＫＰ、５μＭ、Ｓｉｇｍａ Ａｌｄｒｉｃｈ）、ＰＤ０３２５９０１（ＰＤ、１μＭ、Ａｘｏｎ Ｍｅｄｃｈｅｍ）、ＣＨＩＲ９９０２１（ＣＨ、３μＭ、ＡＸＯＮ ＭＥＤＣＨＥＭ）、フォルスコリン（ＦＫ、１０μＭ、ＴＯＣＲＩＳ）、ＦＧＦ４受容体阻害剤ＰＤ１７３０７４（０．１μＭ、ＴＯＣＲＩＳ）およびＳＵ５４０１（２μＭ、ＴＯＣＲＩＳ）、ＴＧＦβ／ＡＬＫ阻害剤Ａ８３－０１（１μＭ、ＳＴＥＭＧＥＮＴ）、ＰＫＣ阻害剤Ｇｏ６９８３（１μＭ、ＴＯＣＲＩＳ）、ＡＬＫ阻害剤（ＡＬＫｉ、ＳＢ４３１５４２、２μＭ、ＴＯＣＲＩＳ）、ＡＩＣＡＲ（０．５ｍＭ）、ＢｉｘＯ１２９４（１μＭ）、ＢａｙＫ８６４４（１μＭ、Ｓｔｅｍｇｅｎｔ）、ＳＢ２０３５８０（５～１０μＭ、ｐ３８ｉ、ＴＯＣＲＩＳ）、ＳＢＳ２０２１９０（５μＭ、ｐ３８ｉ、ＴＯＣＲＩＳ）、ＢＩＲＢ７９６（２μＭ、Ａｘｏｎ Ｍｅｄｃｈｅｍ）、ＳＰ６００１２５（１０μＭ、ＪＮＫｉ、ＴＯＣＲＩＳ）、組換えヒトＢＭＰ４（５～１０ｎｇ／ｍｌ、Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、組換えヒトＳＣＦ（１０ｎｇ／ｍｌ、Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、組換えヒトＩＧＦ１（１０ｎｇ／ｍｌ、Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）。阻害剤を含有する培地を２４～４８時間毎に交換した。

【０６８１】

従来型／プライム型ヒトＥＳＣおよびｉＰＳＣの培養　既に確立されている次の従来型ヒトＥＳＣおよびｉＰＳＣ株を用いた（ナイーブ型多能性に変換するために実施した細胞系継代回数を括弧内に示す）。ヒト人工多能性幹細胞Ｃ１（Ｐ２１）およびＣ２（Ｐ９）ｈｉＰＳＣ株（Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７，２０１０）、ならびにヒト胚性幹細胞（ｈＥＳＣ）株ＢＧＯ１（Ｐ３５）（アメリカ国立衛生研究所、ＩＤコードＢＧ０１、ＢｒｅｓａＧｅｎ）、Ｈ１（Ｐ４０）、Ｈ９（Ｐ３７）、ＷＩＢＲ１（Ｐ１３）、ＷＩＢＲ２、ＷＩＢＲ３（Ｐ１１）ｈＥＳＣ（Ｌｅｎｇｎｅｒ，Ｃ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ １４１，８７２－８８３，２０１０）を、２０％のｐＯ２条件（特に記載がなければ）下において、照射マウス胚線維芽細胞（ＭＥＦ）フィーダー細胞層またはゼラチン／ビトロネクチン被覆プレート上で、１５％のノックアウト血清代替物（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１０８２８－０２８）、１ｍＭのグルタミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、１％の非必須アミノ酸（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、０．１ｍＭのβ－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ）、８ｎｇ／ｍＬのｂＦＧＦ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、および１～８ｎｇ／ｍｌ（例えば１～２ｎｇ／ｍｌ）の組換えヒトＴＧＦβ１（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）を４２５ｍｌのノックアウトＤＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１０８２９）に添加したｈＥＳＣ培地中で維持した。培養物を５～７日毎に、手作業でまたはトリプシン処理によって継代した（ＲＯＣＫ阻

害剤を濃度５～１０ｎＭにおいて添加する前２４時間、および添加した後２４時間）。ｈｉＰＳＣおよびｈＥＳＣ株のトランスフェクションに際し、Ｒｈｏキナーゼ（ＲＯＣＫ）阻害剤（Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ、Ｙ－２７６３２）中で細胞を培養し、２４時間後に電気穿孔に供した。プライム型／従来型ヒトＥＳＣおよびｉＰＳＣ細胞を０．０５％のトリプシン－ＥＤＴＡ溶液（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて回収し、ＰＢＳ中に再懸濁した細胞を、７５μｇのＤＮＡコンストラクト（Ｇｅｎｅ Ｐｕｌｓｅｒ Ｘｃｅｌｌ Ｓｙｓｔｅｍ、Ｂｉｏ－Ｒａｄ、２５０Ｖ、５００μＦ、０．４ｃｍキュベット）を用いてトランスフェクションした。続いて、最初の２４時間にわたり、ＲＯＣＫ阻害剤を添加したｈＥＳＣ培地中のＭＥＦフィーダー細胞層（ピューロマイシン選択用のＤＲ４ ＭＥＦ）上に細胞を蒔き、次いで抗生物質選択に供した。

【０６８２】

マウスナイーブ型およびプライム型幹細胞株および培養　ネズミナイーブ型Ｖ６．５ＥＳＣ（Ｃ５７Ｂ６／１２９ｓＪａｅ）多能性細胞を、化学組成が限定された無血清Ｎ２Ｂ２７系培地中で、すなわち５００ｍｌのＫＯ－ＤＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、５ｍｌのＮ２サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１７５０２０４８）、５ｍｌのＢ２７サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１７５０４０４４）、１ｍＭのグルタミン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、１％の非必須アミノ酸（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、０．１ｍＭのβ－メルカプトエタノール（Ｓｉｇｍａ）、ペニシリン－ストレプトマイシン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、５ｍｇ／ｍｌのＢＳＡ（ウシ血清アルブミン、Ｓｉｇｍａ）中で、維持して増やした。ネズミＰＳＣ用のナイーブ型２ｉ／ＬＩＦ条件は、５μｇの組換えヒトＬＩＦ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）を含むものであった。「２ｉ」と記載される場合、小分子阻害剤ＣＨＩＲ９９０２１（ＣＨ、３μＭ、Ａｘｏｎ Ｍｅｄｃｈｅｍ）およびＰＤ０３２５９０１（ＰＤ、１μＭ、ＴＯＣＲＩＳ）を添加した。特に記載がなければ、ネズミナイーブ型ＥＳＣおよびｉＰＳＣをゼラチン被覆プレート上で増やした。以前に記載されたＥｒａｓ$^{-/Y}$ＥＳＣは、Ｓｈｉｎｙａ Ｙａｍａｎａｋａ博士（Ｔａｋａｈａｓｈｉ，Ｋ．，Ｍｉｔｓｕｉ，Ｋ．＆Ｙａｍａｎａｋａ，Ｓ．Ｎａｔｕｒｅ ４２３，５４１－５４５（２００３））の厚意により提供された。プライム型１２９ｓＪａｅ ＥｐｉＳＣ株（Ｅ６．５胚由来）またはＣ５７ＢＬ６／１２９ｓＪａｅ ＥｐｉＳＣ株（ｉｎ ｖｉｔｒｏにおけるＶ６．５マウスＥＳＣのプライミングに続いて得られる）を、８ｎｇ／ｍｌの組換えヒトｂＦＧＦ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ Ａｓｉａ）および２０ｎｇ／ｍｌの組換えヒトアクチビン（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ Ａｓｉａ）および１％のＫＳＲ（ノックアウト血清代替物）を添加したＮ２Ｂ２７中で増やした。ネズミＥｐｉＳＣを、フィーダー非添加ゼラチン／ビトロネクチンまたはマトリゲル被覆プレート上で増やした。細胞系について、マイコプラズマ属の混入を月１回定期的に調べたところ（ＬＯＮＺＡ、ＭＹＣＯＡＬＥＲＴ ＫＩＴ）、本研究で分析した試料のいずれにも混入はなかった。

【０６８３】

体細胞初期化および細胞感染　種々の初期化ウイルス、すなわちＳＴＥＭＣＡ－ＯＫＳＭポリシストロン性ベクター（ＤＯＸ誘導性かつ恒常的発現）（Ｍａｎｓｏｕｒ，Ａ．Ａ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ４８８，４０９－４１３（２０１２））のウイルス含有上清に、ＦＵＷ－ｌｏｘ－Ｍ２ｒｔＴＡウイルス（必要時）および等体積の新しい培養基を添加して、感染を実施した。ｉＰＳＣを線維芽細胞から直接（既に確立されたｉＰＳＣ株からではなく）誘導するために、初期化因子Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、およびＫｌｆ４をコードするドキシサイクリン（ＤＯＸ）レンチウイルスベクターおよびリバーステトラサイクリントランス作用因子（Ｈｏｃｋｅｍｅｙｅｒ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ３，３４６－３５３（２００８））をコードする構造的活性レンチウイルスを有する、ＢＪ線維芽細胞またはＣ１．２由来の二次的線維芽細胞（Ｈｏｃｋｅｍｅｙｅｒ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ３，３４６－３５３（２００８））を、ＤＯＸ存在下、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において、ビトロネクチン／ゼラチン被覆プレート上で増殖させた。最初のｉＰＳＣコロニーが観察されたら、サブクローニングを実施した。ヒトＢＪ包皮線維芽細胞からＢＪ１ ｈｉＰＳＣを、ＯＳＫＭおよびＬＩＮ２８

ｍＲＮＡトランスフェクションキット（Ｓｔｅｍｇｅｎｔ）を製造元の指示書通りに用いて発生させた。この際、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件は、初期化プロセス２日目から開始した。脆弱Ｘ男性患者に特異的な線維芽細胞を、Ｃｏｒｉｅｌｌリポジトリから入手した（ＧＭ０５１３１およびＧＭ０７０７１）。図２１Ａ～Ｄおよび７１Ａ～Ｅに示すように、従来型またはナイーブ型（ＷＩＳ－ＮＨＳＭ）条件下においてｉＰＳＣを初期化した。以前に記載されたＰＣＲプライマーを用いて、ＦＭＲ１遺伝子を検出した（Ｕｒｂａｃｈ，Ａ．，ｅｔ　ａｌ．Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　６，４０７－４１１（２０１０））。順方向プライマー：５’－ＣＡＧＧＧＣＴＧＡＡＧＡＧＡＡＧＡＴＧＧ－３’（配列番号７２）、逆方向プライマー：５’－ＡＣＡＧＧＡＧＧＴＧＧＧＡＡＴＣＴＧＡ－３’（配列番号７３）。ＦＭＲ１座におけるメチル化のパイロシーケンシング分析を、以前の記載通りに実施した［Ｕｒｂａｃｈ，Ａ．，ｅｔ　ａｌ．Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　６，４０７－４１１（２０１０）］。

【０６８４】

ヒトｉＰＳＣおよびＥＳＣの分化アッセイ　胚型体（ＥＢ）を分化誘導するため、ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣをトリプシン処理し、非接着浮遊培養用シャーレ（Ｃｏｒｎｉｎｇ）中において、１５％ウシ胎児血清を添加したＤＭＥＭ中で６～８日間培養した。テラトーマの形成および分析のため、注入前のナイーブ型ｈＥＳＣおよびｉＰＳＣをトリプシン処理により回収した。細胞を、６～８週齢の雄ＮＳＧマウス（Ｊａｃｋｓｏｎ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）に皮下（ｓ．ｃ．）注入した。一般的に４～６週間で腫瘍が成長し、腫瘍の大きさが直径１．５ｃｍを超える前に動物を屠殺した。ナイーブ型Ｃ１　ｈｉＰＳＣを、ＶＡＳＡ－ＥＧＦＰレポーターコンストラクトを有するレンチウイルスに感染させ、ネオマイシン選択に供し、サブクローニングし、続いて始原生殖細胞（ＰＧＣ）分化プロトコールに供した（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０ｂ）。動物実験はすべて、Ｗｅｉｚｍａｎｎ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ＩＡＣＵＣの指針に従い、かつその承認を受けて実施した（承認＃００９６０２１２－３）。

【０６８５】

マウス胚顕微操作　多能性マウスＥＳＣまたはナイーブ型ヒトｉＰＳＣ（１０μＭのＲＯＣＫｉで１２時間にわたって前処理）をトリプシン処理し、続いてＢＤＦ２二倍体マウス桑実胚または胚盤胞中に注入し、６週齢の雌ホルモンプライム型ＢＤＦ１から回収した。鉱物油存在下、Ｍ１６培地中のＥ２．５桑実胚またはＥ３．５胚盤胞中に、平型マイクロインジェクションピペットによりマイクロインジェクションを実施した。ヒトｉＰＳＣを注入した胚を、ＲＯＣＫｉ（５μＭ）を添加したＫＳＯＭ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）中で回収し、３～９時間後に偽妊娠中の代理マウスに移植した。細胞数を１０～１２個に制御しながら、胚盤胞腔中に注入した。注入後、胚盤胞をＫＳＯＭ培地（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に戻し、レシピエント雌に移すまで３７℃で保った。注入した胚盤胞１０～１５個を、交尾後２．５日目の偽妊娠中の雌の子宮角にそれぞれ移した。２細胞期のＢＤＦ２胚を融合させることによって、４ｎ四倍体相補性アッセイを実施し［Ｓｔａｄｔｆｅｌｄ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４６５，１７５－１８１（２０１０）］、続いて胚を成長させて３．５日目の段階の胚盤胞とし、次いでＰＳＣマイクロインジェクションに用いた。胚を成長させて成熟させた。生殖系へ伝達されたか否かを決定するため、キメラ動物とＣ５７Ｂ／６雌とを交配し、アグーチ色の子が発生するかを連続的に調べた。テラトーマの形成および分析のため、注入前のナイーブ型ｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣをトリプシン処理により回収した。細胞を、ＮＳＧマウス（Ｊａｃｋｓｏｎ　ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）に皮下注入した。一般的に４～６週間で腫瘍が成長し、腫瘍の大きさが直径１．５ｃｍを超える前に動物を殺した。動物実験はすべて、Ｗｅｉｚｍａｎｎ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ＩＡＣＵＣの指針に従い、かつその承認を受けて実施した（承認＃００９６０２１２－３）。本発明者らは上記分析で用いた動物を除外せず、盲検化による無作為化は実施しなかった。

【０６８６】

ＢＡＣ組み換え操作およびＴＡＬＥＮ遺伝子編集　ＴＡＬＥＮ　ｔａｒｇｅｔｅｒ　２

．０を用いてＴＡＬＥＮ発現プラスミドを設計し、Ａｄｄｇｅｎｅから購入したＧｏｌｄｅｎＧａｔｅ ＴＡＬＥＮ ｋｉｔ ２．０を公開されているプロトコールに従って用いてクローニングした［Ｂｅｄｅｌｌ，ＶＭ，ｅｔ ａｌ．， Ｎａｔｕｒｅ ４９１：１１４－８．（２０１２）］。Ｇのターゲティングに際し、本発明者らはＮＮ型反復配列を用いた。以前に記載されたＯＣＴ４－ＧＦＰ－２Ａ－ＰＵＲＯノックインドナープラスミド［Ｈｏｃｋｅｍｅｙｅｒ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．，Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２９，７３１－７３４（２０１１）］（Ｒ．Ｊａｅｎｉｓｃｈ氏の厚意によりＡｄｄｇｅｎｅ経由で提供された）３０μｇと１０μｇの各ＴＡＬＥＮ発現プラスミドとを用いて１０７個のＥＳＣ／ｉＰＳＣを電気穿孔に供し、抗生物質選択しながら増殖させた。耐性クローンを単離し、ゲノムＤＮＡを抽出して、サザンブロットおよびＰＣＲ分析に供した。ＯＣＴ４－ＧＦＰ－２Ａ－ＰＵＲＯ、ΔＰＥ－ＯＣＴ４－ＧＦＰ－２Ａ－ＰＵＲＯ、およびΔＤＥ－ＯＣＴ４－ＧＦＰ－２ＡＰＵＲＯコンストラクトを、ヒトＯＣＴ４遺伝子座を有するＢＡＣクローンを用いて、Ｒｅｄ／ＥＴでの組換え（Ｇｅｎｅ Ｂｒｉｄｇｅｓ）により作製した。簡潔には、ＧＦＰ－２Ａ－ｐｕｒｏカセットを ＯＣＴ４の翻訳開始点中に挿入し、次いで、ＴＳＳの８ｋｂ上流から１０ｋｂ下流までのゲノム領域をｐＢＳベクター中にサブクローニングした。近位（ＰＥ）および遠位（ＤＥ）配列を、［Ｂａｏ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ４６１，１２９２－１２９５（２００９）］中に記載の通り、ルシフェラーゼ試験アッセイで得られた結果に基づいて、マウスＯｃｔ４の各配列との相同性により決定した（図２５Ａ）。野生型コンストラクトのΔＰＥおよびΔＤＥを、これらの領域をカナマイシン選択カセットと交換することによって欠失させ、続いてカナマイシン選択カセットを制限により除去した。ターゲティングベクターをＳｓｐＩにより直線化し、異なるプライム型およびナイーブ型多能性細胞株中に上述の通り電気穿孔した。マウスΔＰＥ－Ｏｃｔ４－ＧＦＰレポーターを作製するため、本発明者らは、以前に記載されたｍＧＯＦ１８ΔＰＥコンストラクト［Ｙｅｏｍ，Ｙ．Ｉ．ｅｔ ａｌ．Ｇｅｒｍｌｉｎｅ ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ ｅｌｅｍｅｎｔ ｏｆ Ｏｃｔ－４ ｓｐｅｃｉｆｉｃ ｆｏｒ ｔｈｅ ｔｏｔｉｐｏｔｅｎｔ ｃｙｃｌｅ ｏｆ ｅｍｂｒｙｏｎａｌ ｃｅｌｌｓ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ．１９９６，１２２（３）：８８１－９４］を、ｐＲｅｄ／ＥＴ組換えによって改変した。クローン化Ｏｃｔ４ゲノム断片（Ｏｃｔ４ ＴＳＳの９．７ｋｂ下流）の３’末端にｐｇｋ－ｇｂ２－Ｎｅｏカセット（ＧｅｎｅＢｒｉｄｇｅｓ）を挿入した。挿入したｎｅｏカセットはＯｃｔ４遺伝子と同様の配向を有する。コンストラクトをＳｓｐＩにより直線化し、マウスＶ６．５ ＥＳＣ中に電気穿孔して、図８６Ａ～Ｃおよび図８７Ａ～Ｂの実験に用いた。ヒトＯＣＴ４およびＣＯＬ１Ａ座の遺伝子ターゲティングのため、図７１Ｂ～Ｃに詳細を示すようにターゲティングベクターを設計および計画した。Ｈ９ ｈＥＳＣ由来ゲノムＤＮＡのホモロジーアームをＰＣＲにより増幅させた。直線化および形質導入の後、アイソジェニックベクターを用いて、ナイーブ型およびプライム型Ｈ９ ｈＥＳＣ中に遺伝子ターゲティングを導入した。正確にターゲティングしたクローンについて、５’外部プローブおよび３’外部プローブの両方によるターゲティングの正確性を、サザンブロットスクリーニングで確認した（図２１Ａ～Ｄ）。

【０６８７】

ＤＮＡコンストラクトおよびプラスミドクローニング ｐＣＡＧ－ＩｒｅｓＰｕｒｏまたはｐＣＡＧ－ｆｌｏｘ－ＤｓＲｅｄ－ＩＲＥＳ－Ｐｕｒｏベクター（Ｆｉｃｚ Ｇ，ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ．２０１３ Ｓｅｐ ５；１３（３）：３５１－９．ｄｏｉ：１０．１０１６／ｊ．ｓｔｅｍ．２０１３．０６．００４．Ｅｐｕｂ ２０１３ Ｊｕｌ １１）は、次の挿入断片をコードするものであった（ＸｈｏＩ－ＮｏｔＩ部位における付着末端ライゲーションまたは平滑末端ライゲーションによりクローニング）：Ｓｔａｔ３－ＣＡ変異体（Ａｄｄｇｅｎｅ、１３３７３）（Ａ６６２ＣおよびＮ６６４Ｃ変異、Ｓｔａｔ３分子のＡ６６２およびＮ６６４によるシステイン残基の置換、Ｓｔａｔ３モノマー同士の間にジスルフィド結合が形成されていてもよく、このジスルフィド結合のため、Ｙ７０５上にリン酸基がなくてもＳｔａｔ３分子が二量体化できる）、Ｓｔａｔ３－Ｙ７０５Ｆ（優性ネガティブ対立遺伝子、Ａｄｄｇｅｎｅ、８７０９）。ヒト

ＯＣＴ４エンハンサー配列（Ｏｃｔ４ＤＥルシフェラーゼ（Ｌｕｃ）コンストラクトおよびＯｃｔ４ＰＥ－ＳＶ４０ルシフェラーゼ（Ｌｕｃ）コンストラクト）を、次のプライマーを有するｐＧＬ３プロモーターベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ）中にクローニングした：５’ｈＯｃＣＴ４ＰＥ　ＫｐｎＩとして５’－ＧＧＴＡＣＣＧＧＡＴＡＣＴＣＡＧＧＣＣＡＧＧＣＣＣＡＧＡＡＡ－３’（配列番号７４）、３’ｈＯＣＴ４ＰＥ　ＸｈｏＩとして５’－ＣＴＣＧＡＧＴＣＣＡＣＡＧＡＣＣＴＣＴＧＧＣＡＣＴ－３’（配列番号７５）、５’ｈＯＣＴ４ＤＥ　ＫｐｎＩとして５’－ＧＧＴＡＣＣＣＡＴＴＧＡＧＴＣＣＡＡＡＴＣＣＴＣＴＴＴＡＣＴＡＧＧＴＧ－３’（配列番号７６）、３’ｈＯＣＴ４ＤＥ　ＸｈｏＩとして５’－ＣＴＣＧＡＧＣＴＧＡＧＧＣＴＣＡＴＧＣＴＧＣＴＧＧ－３’（配列番号７７）。レポーターコンストラクトを用いてＯｃｔ４発現の調節のパターンを決定し、ｐＲＬ－ＴＫ（Ｒｅｎｉｌｌａ）ベクターにより細胞０．５～３×１０^{6}個を電気穿孔に供し、標準化した。アッセイは、Ｄｕａｌ－Ｇｌｏ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ａｓｓａｙ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ）使用の４８時間後に実施した。空のルシフェラーゼベクターの基礎活性を１．０に設定した。Ａｄｄｇｅｎｅより発現コンストラクト（ベクター３０２５）を入手した後、以前の記載通りに、組換えビトロネクチンを作製して精製した［Ｃｈｅｎ，Ｇ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｈｅｍｉｃａｌｌｙ　ｄｅｆｉｎｅｄ　ｃｏｎｄｉｔｉｏｎｓ　ｆｏｒ　ｈｕｍａｎ　ｉＰＳＣ　ｄｅｒｉｖａｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｃｕｌｔｕｒｅ．Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ　８，４２４－４２９（２０１１）］。

【０６８８】

ＲＴ－ＰＣＲ分析（実施例５～９の説明）　Ｔｒｉｚｏｌ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて全ＲＮＡを単離した。ＤＮａｓｅ－Ｉで処理したＲＮＡを１μｇ、Ｆｉｒｓｔ　Ｓｔｒａｎｄ　Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　ｋｉｔ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いた逆転写に供し、最後に１００μｌの水に再懸濁した。定量ＰＣＲ分析を、Ｖｉｉａ７　プラットフォーム（Ａｐｐｌｉｅｄ　Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）の逆転写反応の１／５０によって３回実施した。エラーバーは、３回実施した測定について、各測定の標準偏差を示す。ここで用いたＲＴ－ＰＣＲプライマーは次の通り：ＸＩＳＴ－順方向として５’－ＡＧＧＧＡＧＣＡＧＴＴＴＧＣＣ　ＣＴＡＣＴ－３’（配列番号７８）、ＸＩＳＴ－逆方向として５’－ＣＡＣＡＴＧＣＡＧＣＧＴＧＧＴＡＴＣＴＴ－３’（配列番号７９）、ＯＣＴ４－順方向として５’－ＡＧＴＧＡＴＴＣＴＣＣＴＧＣＣＴＣＡＧＣ－３’（配列番号８０）、ＯＣＴ４－逆方向として５’－ＣＴＴＣＴＧＣＴＴＣＡＧＧＡＧＣＴＴＧＧ－３’（配列番号８１）、ＳＯＸ１－順方向として５’－ＧＧＡＡＴＧＧＧＡＧＧＡＣＡＧＧＡＴＴＴ－３’（配列番号８２）、ＳＯＸ１－逆方向として５’－ＡＡＣＡＧＣＣＧＧＡＧＣＡＧＡＡＧＡＴＡ－３’（配列番号８３）、ＰＡＸ６－順方向として５’－ＡＡＧＧＡＴＧＴＴＧＡＡＣＧＧＧＣＡＧＡ－３’（配列番号８４）、ＰＡＸ６－逆方向として５’－ＴＣＣＧＴＴＧＧＡＡＣＴＧＡＴＧＧＡ　ＧＴ－３’（配列番号８５）、ＨＰＲＴ－順方向として５’－ＴＧＡＣＡＣＴＧＧＣＡＡＡＡＣＡＡＴＧＣＡ－３’（配列番号８６）、ＨＰＲＴ－逆方向として５’－ＧＧＴＣＣＴＴＴＴＣＡＣＣＡＧＣＡＡＧＣＴ－３’（配列番号８７）、ＥＯＭＥＳ－順方向として５’－ＣＧＣＣＡＣＣＡＡＡＣＴＧＡＧＡＴＧＡＴ－３’（配列番号８８）、ＥＯＭＥＳ－逆方向として５’－ＣＡＣＡＴＴＧＴＡＧＴＧＧＧＣＡＧＴＧＧ－３’（配列番号８９）、ＣＤＸ２－順方向として５’－ＣＡＧＴＣＧＣＴＡＣＡＴＣＡＣＣＡＴＣＣ－３’（配列番号９０）、ＣＤＸ２－逆方向として５’－ＴＴＴＣＣＴＣＴＣＣＴＴＴＧＣＴＣＴＧＣ－３’（配列番号９１）、ＨＡＮＤ１－順方向として５’－ＡＡＣＴＣＡＡＧＡＡＧＧＣＧＧＡＴＧＧ－３’（配列番号９２）、ＨＡＮＤ１－逆方向として５’－ＣＧＧＴＧＣＧＴＣＣＴＴＴＡＡＴＣＣＴ－３’（配列番号９３）、ＧＳＣ－順方向として５’－ＣＧＣＣＴＣＧＧＣＴＡＣＡＡＣＡＡＣＴＡ－３’（配列番号９４）、ＧＳＣ－逆方向として５’－ＣＧＣＣＴＣＧＧＣ　ＴＡＣＡＡＣＡＡＣＴＡ－３’（配列番号９５）、ＩＤ１－順方向としてＡＡＡＣＧＴＧＣＴＧＣＴＣＴＡＣＧＡＣＡ－３’（配列番号９６）、ＩＤ１－逆方向として５’－ＴＡＧＴＣＧＡＴＧＡＣＧＴＧＣＴＧＧＡＧ－３’（配列番号９７）、ＩＤ３－順方向として５’－ＣＴＡＣＡＧＣＧＣＧＴＣＡＴＣＧＡＣＴＡ－３’（配列番号９８）、ＩＤ３－逆方向として５’－ＴＣＧ

ＴＴＧＧＡＧＡＴＧＡＣＡＡＧＴＴＣＣ－３’（配列番号９９）、ＺＩＣ１－順方向として５’－ＧＣＧＣＴＣＣＧＡＧＡＡＴＴＴＡＡＡＧＡ－３’（配列番号１００）、ＺＩＣ１－逆方向として５’－ＧＴＣＧＣＴＧＣＴＧＴＴＡＧＣＧＡＡＧ－３’（配列番号１０１）、ＮＡＮＯＧ－順方向として５’－ＧＡＴＴＴＧＴＧＧＧＣＣＴＧＡＡＧＡＡＡ－３’（配列番号１０２）、ＮＡＮＯＧ－逆方向として５’－ＣＡＧＡＴＣＣＡＴＧＧＡＧＧＡＡＧＧＡＡ－３’（配列番号１０３）、ＭＩＸＬ１－順方向として５’－ＡＧＣＴＧＣＴＧＧＡＧＣＴＣＧＴＣＴＴ－３’（配列番号１０４）、ＭＩＸＬ１－逆方向として５’－ＣＧＣＣＴＧＴＴＣＴＧＧＡＡＣＣＡＴＡＣ－３’（配列番号１０５）。

【０６８９】

免疫蛍光染色　ガラスカバースリップ（１３ｍｍ、１．５Ｈ、Ｍａｒｉｅｎｆｅｌｄ、０１１７５３０）上で細胞を２日間増殖させ、４％のパラホルムアルデヒド／リン酸バッファーで室温において１５分間固定し、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）で３回洗浄し、ＰＢＳ／０．１％Ｔｒｉｔｏｎ中で１０分間にわたって透過処理に供した。ブロッキング液（２％の正常ロバ血清および０．１％のＢＳＡを含有するＰＢＳ／０．０５％Ｔｗｅｅｎ）を用いて細胞をブロッキングし、ブロッキング液で希釈した一次抗体と共に４℃において一晩インキュベートした（本研究における抗体はいずれも、文献および発明者らにより検証済である）。次いで、細胞をＰＢＳ／０．０５％Ｔｗｅｅｎで３回洗浄し、二次抗体と共に室温において１時間インキュベートし、ＰＢＳ／０．０５％Ｔｗｅｅｎ中で洗浄し、ＤＡＰＩ（１μｇ／ｍｌ）で対比染色し、Ｓｈａｎｄｏｎ　Ｉｍｍｕ－Ｍｏｕｎｔ（Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、９９９０４１２）を用いて封入し、画像化した。Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３および核タンパク質を染色するため、ＰＢＳ／０．５％Ｔｒｉｔｏｎ中でそれぞれ３０分間または１０分間、細胞を透過処理した。０．１％のＴｒｉｔｏｎを含有するブロッキング液を用いた。比較実験はいずれも同時に実施した。抗ＭＨＣクラスＩ抗体（ＢＥ　ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）を用いてヒト細胞のＭＨＣクラスＩを染色し、ＦＡＣＳ　ＡＲＩＡ　ＩＩＩ分析装置および分取システムによって細胞を分析した。次の抗体を、記載の希釈率にて用いた。

【０６９０】

【表２】

抗体	製造元（または供給元）とカタログ番号	希釈
マウス抗ＴＲＡ－１－６０	Ａｂｃａｍ（ａｂ１６２８８）	１：５００
マウス抗ＴＲＡ－１－８１	Ａｂｃａｍ（ａｂ１６２８９）	１：５００
マウス抗ＳＳＥＡ１（ＭＣ４８０）	Ａｂｃａｍ（ａｂ１６２８５）	１：１００
マウス抗ＳＳＥＡ４（ＭＣ８１３）	Ａｂｃａｍ（ａｂ１６２８７）	１：５０
ラット抗ＳＳＥＡ３（ＭＣ６３１）	Ａｂｃａｍ（ａｂ１６２８６）	１：５０
ウサギ抗Ｋｌｆ２	Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ（０９－８２０）	１：５００
ウサギ抗Ｎａｎｏｇ	Ｂｅｔｈｙｌ（Ａ３００－３９７Ａ）	１：４００
ウサギ抗Ｎａｎｏｇ	Ａｂｃａｍ（ａｂ８０８９２）	１：２００
ウサギ抗Ｏｃｔ３／４（Ｈ１３４クローン）	Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ（ＳＣ９０８１）	１：４００
マウス抗Ｏｃｔ４（Ｃ－１０クローン）	Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ（ＳＣ５２７９）	１：２００
ウサギ抗Ｋｌｆ４（Ｈ－１８０クローン）	Ｓａｎｔａ Ｃｒｕｚ（ＳＣ２０６９１）	１：２００
マウス抗Ｅ－カドヘリン	Ａｂｃａｍ（ａｂ１４１６－５００）	１：１００
ウサギ抗Ｎ－カドヘリン	Ａｂｃａｍ（ａｂ１２２２１）	１：８００
ウサギ抗Ｓｏｘ２	Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ ＡＢ５６０３	１：５００
マウス抗ＮＲ３Ｂ２（ＥＳＲＲＢ）	Ｒ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓ（ＰＰ－Ｈ６７０５－００）	１：１０００
ウサギ抗ＴＦＥ３	Ｓｉｇｍａ（ＨＰＡ０２３８８１）	１：２００；１：５００
ウサギ抗Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３	Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ（０７－４４９）	１：４０００
ロバ抗マウスＩｇＧ Ａｌｅｘａ ４８８	Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ（７１５－５４５－１５０）	１：２００
ロバ抗マウスＩｇＧ ＲＲＸ	Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ（７１５－２９５－１５０）	１：２００
ロバ抗マウスＩｇＧ Ａｌｅｘａ ６４７	Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ（７１５－６０５－１５０）	１：２００
ロバ抗ウサギＩｇＧ Ａｌｅｘａ ４８８	Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ（７１１－５４５－１５２）	１：２００
ロバ抗ウサギＩｇＧ ＲＲＸ	Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ（７１１－２９５－１５２）	１：２００
ロバ抗ウサギＩｇＧ Ａｌｅｘａ ６４７	Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ（７１１－６０５－１５２）	１：２００
ロバ抗マウスＩｇＭ ＲＲＸ	Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ（７１５－２９５－０２０）	１：２００
ヤギ抗ラットＩｇＭ ＲＲＸ	Ｊａｃｋｓｏｎ Ｉｍｍｕｎｏ（１１２－２９５－０７５）	１：２００

【０６９１】

画像処理、定量化、および統計的分析　ＤＰ７３カメラ（Ｏｌｙｍｐｕｓ、日本）を備

えたＤ１倒立顕微鏡（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ、ドイツ）、または４０５ｎｍ、４８８ｎｍ、５５５ｎｍ、および６３５の固体レーザーを備えたＺｅｉｓｓ　ＬＳＭ　７００倒立共焦点顕微鏡（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ、ドイツ）と、２０ｘ　Ｐｌａｎ－Ａｐｏｃｈｒｏｍａｔ対物レンズ（ＮＡ：０．８）と、を用いて画像を取得した。画像はいずれも連続モードで取得した。比較分析のため、各実験の全体を通して、すべてのパラメータを画像取得中一定に保った。画像処理を、Ｚｅｎ　ｂｌｕｅ　２０１１ソフトウェア（Ｃａｒｌ　Ｚｅｉｓｓ、ドイツ）およびＡｄｏｂｅ　Ｐｈｏｔｏｓｈｏｐ　ＣＳ４を用いて実施した。染色されたＨ３Ｋ２７ｍｅ３が核１つ１つに凝縮かつ集積していることを確認して、Ｘ染色体不活性化のアッセイとし、ＩｍａｇｅＪソフトウェア（ＮＩＨ）により手動で定量した。

【０６９２】

ＴＦＥ３局在化の自動定量的画像分析　単一細胞の蛍光強度を、Ｚｅｎ　Ｂｌｕｅ　２０１１ソフトウェアのプロファイルファンクションによって分析した。当研究室で開発した自動セグメンテーションプロトコールは、各画像の中の細胞の核をセグメンテーションするプロトコールである。ＤＡＰＩの蛍光照度とＯＣＴ４の蛍光照度との共通部分をとることによって、核を区別した。このプロトコールはＲａｉｓ　ｅｔ　ａｌ（Ｒａｉｓ　Ｙ．，ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ．２０１３　Ｏｃｔ　３；５０２（７４６９）：６５－７０．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎａｔｕｒｅ１２５８７．Ｅｐｕｂ　２０１３　Ｓｅｐ　１８）中に記載され、当研究室のウェブサイト［ｗｅｉｚｍａｎｎ（ｄｏｔ）ａｃ（ｄｏｔ）ｉｌ／ｍｏｌｇｅｎ／Ｈａｎｎａ／Ｈｏｍｅ（ｄｏｔ）ｈｔｍｌ］に掲載されている。次いで、核内のＴＦＥ３強度と細胞質中のＴＦＥ３強度との間の比率を推定するため、セグメンテーションした細胞を１つ１つ処理した。この処理の主要工程は以下である。１）セグメンテーションした核を含む領域を指定した枠組みと、核の外周１０ピクセル分との定義。２）核マスク内における平均ＴＦＥ３強度の推定。３）枠組みの内側でかつ核マスクの外側における平均ＴＦＥ３強度の推定。データ測定は、試料１つ１つについて、独立した画像野少なくとも４つから得られた細胞２００個について実施した。全細胞についての強度比の分布を箱型図で提示する。箱型図において、中心は中央値を示し、箱の端は２５パーセンタイルおよび７５パーセンタイルを示す。グラフ中に示す分布差のＰ値は、一対の試料についてのｔ検定によって推定した値である。

【０６９３】

タンパク質ウェスタンブロッティング分析　全細胞タンパク質抽出物をヒトＥＳ細胞から分離した。ブロットを、次の抗体と共に３％ＢＳＡ／ＴＢＳＴまたはＰＢＳＴ中においてインキュベートした：ｐＳＴＡＴ３（９３１８、１：１，０００、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）、ＳＴＡＴ３（Ｃ－２０、１：１，０００、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）、ｐβ－Ｃａｔｅｎｉｎ（９５６１、１：７５０、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）、β－Ｃａｔｅｎｉｎ（６１０１５３、１：２，０００、ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）、ＨＳＰ９０α（ＣＡ１０１６、１：５，０００、Ｃａｌｂｉｏｃｈｅｍ）、ｐＪＮＫ（９２５１、１：５００、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）、ＪＮＫ（ＳＣ－５７１、１：１００、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）、ｐｐ３８（９２１５、１：１００、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）、ｐ３８（９２１２、１：１，０００、Ｃｅｌｌ　Ｓｉｇｎａｌｉｎｇ）、ｐＥＲＫ（Ｅ４、１：１００、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）、ＥＲＫ１，２（Ｃ－１４、１：１００、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）、ＫＬＦ４（ＡＦ３１５８、１：２００、Ｒ＆Ｄ）、ＯＣＴ４（Ｈ－１３４、１：１，０００、Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ）、Ｎａｎｏｇ（３９７Ａ、１：１，０００、Ｂｅｔｈｙｌ）。二次抗体は、ＨＲＰで標識したヤギ抗マウス二次抗体、ヤギ抗ウサギ二次抗体、およびウサギ抗ヤギ二次抗体（１：１０，０００、Ｊａｃｋｓｏｎ）を用いた。ブロットの展開はＥＣＬ（Ｔｈｅｒｍｏ）により実施した。

【０６９４】

異種間の遺伝子発現分析

異種間の遺伝子発現分析を、上述のヒトアレイと、以前に記載されたマウスＥＳＣおよびＥｐｉＳＣ遺伝子発現データセットとについて、プローブ４５，０１８個を含むＡｇｉ

ｌｅｎｔ ４×４４ｋアレイプラットフォーム（ＧＳＥ１５６０３、［Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ４，５１３－５２４（２００９）］中に記載される）を用いて実施した。マウスのデータを上述の通りに処理したところ、固有の遺伝子は１７，８８５個であった。ヒトとマウスとの間のオルソロジーを、オルソロガス遺伝子対１７，７７２個を含むＭＧＩ（ｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ（ｄｏｔ）ｊａｘ（ｄｏｔ）ｏｒｇ）からダウンロードした。そのうち９，８０３個を、本発明者らの発現データにマッピングした。マウス由来の発現値とヒト由来の発現値を別個に、相対的存在度に変換した［Ｌｉａｏ，Ｂ．Ｙ．Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ ａｎｄ Ｅｖｏｌｕｔｉｏｎ ２３，５３０－５４０（２００５）］。各遺伝子の相対的存在度は、ある遺伝子の発現値を、ある種由来の試料すべてにおけるその遺伝子の発現値の平均で割った値である。得られた発現行列を階層的クラスタリング（Ｓｐｅａｒｍａｎの相関関係、平均連結法）に供し、同様の階層的クラスタリングを、試料のＳｐｅａｒｍａｎの相関関係の行列についても実施した。ノイズの指標は分散係数であり、標準偏差を平均で割って定義される。この分散係数を、２つの種のそれぞれとナイーブ状態およびプライム状態とについて別個に計算した。２つの状態についての分散係数の分布について、その統計的有意性を、尾が１つのｔ検定によって計算した。外れ値はプロット中に図示していないが、統計検定には含めた。

【０６９５】

クロマチン免疫沈降およびシーケンスライブラリの調製（下記実施例５～９について）

ディープシーケンシング（ＣｈＩＰ－Ｓｅｑ）とこれに続くクロマチン免疫沈降を、次のタンパク質、すなわちＨ３Ｋ４ｍｅ３、Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３、Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、Ｈ３Ｋ２７Ａｃ、およびＨ３Ｋ９ｍｅ３について測定した。測定は、マウスおよびヒト多能性細胞（ＥＳＣ、ＥｐｉＳＣ、および／またはｉＰＳＣ）を、ウシ胎児血清非添加かつフィーダー非添加のナイーブ型またはプライム型／従来型増殖条件（ＦＢＳ非添加かつフィーダー非添加で増やした、ゼラチン／ビトロネクチン被覆プレート上）下で増やしたものに対して実施した。細胞約４０×１０^{6}個をホルムアルデヒド［最終濃度１％、１０分間、室温（ＲＴ）］中で架橋させ、次いでグリシン（５分間、室温）で失活させた。固定した細胞を、５０ｍＭかつｐＨ７．５のＨＥＰＥＳ ＫＯＨ、１４０ｍＭのＮａＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ、１０％のグリセリン、０．５％のＮＰ－４０代品、０．２５％のＴｒｉｔｏｎにプロテアーゼ阻害剤を添加したものに４℃において溶解させ（Ｒｏｃｈｅ、０４６９３１５９００１）、９５０ｘｇで１０分間遠心分離し、０．２％のＳＤＳ、１０ｍＭのＥＤＴＡ、１４０ｍＭのＮａＣｌ、および１０ｍＭのＴｒｉｓ－ＨＣＬ中に再懸濁した。次いで細胞をＢｒａｎｓｏｎ Ｓｏｎｉｆｉｅｒ（モデルＳ－４５０Ｄ）により－４℃において断片化して、２００～８００ｂｐの範囲のサイズとし、遠心分離によって沈澱させた。各抗体１０μｇをＰｒｏｔｅｉｎ－Ｇ Ｄｙｎａｂｅａｄｓ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、１００－０７Ｄ）と共に、ブロッキングバッファー（０．５％のＴＷＥＥＮおよび０．５％のＢＳＡを添加したＰＢＳ）中、室温において２時間インキュベートすることにより、予備的に結合させた。洗浄したビーズをクロマチン溶解物に加え、次いで一晩インキュベートした。試料を、ＲＩＰＡバッファーで５回、５００ｍＭのＮａＣｌを添加したＲＩＰＡバッファーで２回、ＬｉＣｌバッファー（１０ｍＭのＴＥ、２５０ｍＭのＬｉＣｌ、０．５％のＮＰ－４０、０．５％のＤＯＣ）で２回、ＴＥ（１０ｍＭかつｐＨ８．０のＴｒｉｓ－ＨＣｌ、１ｍＭのＥＤＴＡ）で１回洗浄し、次いで０．５％のＳＤＳ、３００ｍＭのＮａＣｌ、５ｍＭのＥＤＴＡ、１０ｍＭのＴｒｉｓ Ｈｃｌ中に、ｐＨ８．０において６５℃で溶出させた。溶出液を６５℃において８時間インキュベートし、次いでＲＮａｓｅＡ（Ｒｏｃｈｅ、１１１１９９１５００１）で３０分間、プロテイナーゼＫ（ＮＥＢ、Ｐ８１０２Ｓ）で２時間、連続的に処理した。ＤＮＡを、Ａｇｅｎｃｏｕｒｔ ＡＭＰｕｒｅ ＸＰ ｓｙｓｔｅｍ（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、Ａ６３８８１）を用いて精製した。クロスリバースＣｈＩＰ ＤＮＡ試料のライブラリを、Ｉｌｌｕｍｉｎａ Ｇｅｎｏｍｉｃ ＤＮＡプロトコールを改変した方法によって、以前に記載された通りに調製した［Ｂｌｅｃｈｅｒ－Ｇｏｎｅｎ，Ｒ．，ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｐｒ

ｏｔｏｃ．２０１３　Ｍａｒ；８（３）：５３９－５４．ｄｏｉ：１０．１０３８／ｎｐｒｏｔ．２０１３．０２３．Ｅｐｕｂ　２０１３　Ｆｅｂ　２１］。簡潔には、ＣｈＩＰ　ＤＮＡをＩｌｌｕｍｉｎａアダプタにライゲーションさせ、ＰＣＲ増幅を１４サイクル実施した。２００～８００ｂｐの増幅産物を２％アガロースゲルで精製した。次いでＤＮＡライブラリ約５ピコモルをフローセルの各レーンに載せ、Ｉｌｌｕｍｉｎａ　Ｈｉｓｅｑ２０００シーケンサーで、標準的なＩｌｌｕｍｉｎａプロトコールに従ってシーケンシングした。クロマチン－ＩＰ実験に用いた抗体は、Ｃｏｎｔｒｏｌ　ＩｇＧ（ＣｈＩＰグレード、ａｂ４６５４０、Ａｂｃａｍ）、Ａｎｔｉ－Ｈ３Ｋ４ｍｅ３（ａｂ８５８０、Ａｂｃａｍ）、Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３（０７－４４９、Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）である。

【０６９６】

クロマチンＩＰシーケンシングのデータ分析　クロマチンマーカーＨ３Ｋ２７ｍｅ３、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３、Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、Ｈ３Ｋ２７Ａｃ、およびＨ３Ｋ９ｍｅ３を、４種の異なるヒト多能性細胞株、すなわちＣ１、ＷＩＢＲ３、ＬＩＳ２（ナイーブ型およびプライム型）、ＢＧＯ１、およびＷＩＢＲ３－ＭＢＤ３ｍｕｔ（ナイーブ型）において測定した。また、Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３、Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、およびＨ３Ｋ２７Ａｃについては、マウスＶ６．５ナイーブ型およびプライム型ＥｐｉＳＣにおいても測定した。ナイーブ型マウスＥＳにおけるＨ３Ｋ２７ｍｅ３およびＨ３Ｋ４ｍｅ３の測定結果は、本発明者らのグループが以前に発表している（Ｍａｎｓｏｕｒ，Ａ．Ａ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４８８，４０９－４１３（２０１２））。各試料について、全細胞抽出物を注入するコントロールシーケンシング実験も合わせて実施した。本発明者らは、ｂｏｗｔｉｅソフトウェア［Ｌａｎｇｍｅａｄ，Ｂ．，ｅｔ　ａｌ．Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌ．２００９；１０（３）：Ｒ２５］のバージョン１．０．０を用いて、ヒトリードをヒト参照ゲノムｈｇ１９（ＵＣＳＣ、２００９年２月）と整列させ、またマウスリードをマウスｍｍ９参照ゲノム（ＵＣＳＣ、２００７年７月）と整列させた。本発明者らは、ミスマッチ上限１つまででゲノムと一意に整列するリードのみを検討し、各リードについて最もよく一致する１つのみを選んだ。シーケンシングの読みの深さが偏るのを防ぐため、各試料中の整列リード数が同数となるよう整列配列をダウンサンプルした。Ｈ３Ｋ４ｍｅ３、Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３、Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、およびＨ３Ｋ２７Ａｃのマークを有するヒト試料と全細胞抽出物とをダウンサンプルして、整列リード数を３，７５０，０００個とした。Ｈ３Ｋ９ｍｅ３試料をダウンサンプルして、整列リード数を５，９００，０００個とした。Ｈ３Ｋ４ｍｅ３、Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３、Ｈ３Ｋ４ｍｅ１、およびＨ３Ｋ２７Ａｃのマークを有するマウス試料をダウンサンプルして、整列リード数を３，４２０，０００個とした。

【０６９７】

クロマチンプロファイル（図７０Ａ～Ｆおよび図８３Ａ～Ｄ）を全ＲｅｆＳｅｑ遺伝子（ｎ＝４３，４６３）と発生遺伝子とについて、下記のように計算した。（ｉ）ＴＳＳの３Ｋｂ上流とＴＥＳの３Ｋｂ下流との間のリード密度を計算した。（ｉｉ）各遺伝子を、大きさ１００のビンに区切り、各ビンにおけるリードの合計を計算した。（ｉｉｉ）全遺伝子についてプロファイルの平均を計算した。遺伝子本体はそのサイズが変わるが、このサイズを１００分位で表した。１Ｋｂ未満のサイズの遺伝子は除外した。（ｉｖ）ヒト試料のプロファイルはプライム型試料３つおよびナイーブ型試料５つの平均および標準偏差（エラーバー）で表す。最後に、発達または分化に関するＧＯアノテーションを有する発生遺伝子を選択した。この基準により、本発明者らは、ＲｅｆＳｅｑヒト発生遺伝子５９２２個、およびＲｅｆＳｅｑマウス発生遺伝子４２０個を得た。具体例な遺伝子（図７１Ｂ～Ｄ）を、ＩＧＶソフトウェアのバージョン２．０を用いて処理および可視化した（Ｒｏｂｉｎｓｏｎ，Ｊ．Ｔ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２９，２４－２６（２０１１））。

【０６９８】

また、染色体ＸにおけるＨ３Ｋ９ｍｅ３マーカーの蓄積（図７６Ｃ）についても、ＩＧＶ[69]を用いて処理および可視化した。ここで、各染色体は無作為の遺伝子１００個で表す。染色体Ｘ遺伝子中におけるＨ３Ｋ９ｍｅ３蓄積の分布を測定するため、各遺伝子につい

てＲＰＫＭ（リード数５，９００，０００個をキロベースあたりのリード数に補正）を計算した（ＴＳＳの上流１ＫｂとＴＥＳの上流１Ｋｂとの間）。一対の試料についての尾が１つのｔ検定によって、分布と分布の間のＰ値を計算した。

【０６９９】

Ｒａｄａ－Ｉｇｌｅｓｉａｓ　ｅｔ　ａｌ．設定の指針に従って、エンハンサーを検出した［Ｒａｄａ－Ｉｇｌｅｓｉａｓ，Ａ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４７０，２７９－２８３（２０１１）］。簡潔には、１型のエンハンサーは、Ｈ３Ｋ４ｍｅ１およびＨ３Ｋ２７Ａｃマークを有し、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３またはＨ３Ｋ２７ｍｅ３マークを有さず、いずれのＴＳＳからも少なくとも５００ｂｐ離れたゲノム区間である。２型のエンハンサーは、Ｈ３Ｋ４ｍｅ１およびＨ３Ｋ２７ｍｅ３マークを有し、Ｈ３Ｋ２７Ａｃマークを有さず、いずれのＴＳＳからも少なくとも５００ｂｐ離れたゲノム区間である。これらエンハンサーを見つけるため、本発明者らはまず、ＭＡＣＳのバージョン１．４．１を用いて上記マークのリッチ区間を同定した［Ｚｈａｎｇ，Ｙ．，Ｇｅｎｏｍｅ　Ｂｉｏｌ．２００８；９（９）：Ｒ１３７］。本発明者らは、全細胞抽出物をシーケンシングしてコントロールとすることによって、バックグラウンドモデルを定義した。完全に同じ位置に整列した重複するリードを、ＭＡＣＳデフォルト配置によって除外した。少なくとも１ｂｐ重なるリッチ区間（「ピーク」）について、除外したマークのいずれか（例えば、１型のエンハンサーの場合はＨ３Ｋ２７ｍｅ３）またはＴＳＳと重なる部分が１０％かそれ以上であれば、これを重なっているとしてみなし、これらを合わせてエンハンサー区間と定義した。ヒト試料中のエンハンサーの数を計算するため（図８４Ｄ～Ｅ）、本発明者らは、２つのプライム型細胞系Ｃ１およびＷＩＢＲ３に共通のエンハンサーまたは４つのナイーブ型細胞株Ｃ１、ＷＩＢＲ３、ＷＩＢＲ３－ＭＢＤ３^{mut}、およびＢＧＯ１に共通のエンハンサーのみについて考察した。エンハンサーに関連する遺伝子の発現レベル（図８４Ｇ～Ｆ）を、最も近い（が１００Ｋｂを超えて離れていない）遺伝子に各エンハンサーをマッピングし、Ｅｎｔｒｅｚ遺伝子に変換し、その発現値を上述の未加工の遺伝子発現データセットから取り出すことによって計算した。

【０７００】

２価の遺伝子を検出するため、本発明者らは、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３およびＨ３Ｋ２７ｍｅ３のリッチ区間をＭＡＣＳを用いて同定した。リッチ区間を遺伝子にマッピングした。マッピング先の遺伝子は、その転写開始点の前３ｋｂ区間および転写終結点の後３ｋｂ区間が当該リッチ区間と重なるものを選んだ。遺伝子がＨ３Ｋ２７ｍｅ３およびＨ３Ｋ４ｍｅ３の両方を有する場合、この遺伝子を２価とした。本発明者らは、ヒト試料中の遺伝子は少なくとも２つの細胞系において２価である必要があるとした。ゲノム構成要素中におけるＨ３Ｋ２７ｍｅ３マークの分布を、各構成要素、すなわちプロモーター（ＴＳＳの周りの６Ｋｂ対称区間）、遺伝子本体分（ＴＳＳの３Ｋｂ下流とＴＥＳの３Ｋｂ下流の間）、および遺伝子間（プロモーターの外側かつ遺伝子本体分の外側）におけるＨ３Ｋ２７ｍｅ３ピークを計数することによって計算した。ピークをその高さに応じてビンに区切り、計算してＲＰＫＭとした。

【０７０１】

ヒト多能性細胞に挿入したＤＮＡコンストラクト

ｐＣＡＧ－ＩｒｅｓＰｕｒｏまたはｐＣＡＧ－ｆｌｏｘ－ＤｓＲｅｄ－ＩＲＥＳ－Ｐｕｒｏベクター（７）は、次の挿入断片をコードするものであった（ＸｈｏＩ－ＮｏｔＩ部位における付着末端ライゲーションまたは平滑末端ライゲーションによりクローニング）：Ｓｔａｔ３－Ｃ（Ａ６６２ＣおよびＮ６６４Ｃ変異）（８）、Ｓｔａｔ３－Ｙ７０５Ｆ（優性ネガティブ対立遺伝子）。ヒトＯｃｔ４エンハンサー配列（Ｏｃｔ４ＤＥルシフェラーゼ（Ｌｕｃ）コンストラクトおよびＯｃｔ４ＰＥ－ＳＶ４０ルシフェラーゼ（Ｌｕｃ）コンストラクト）を、次のプライマーを有するｐＧＬ３プロモーターベクター（Ｐｒｏｍｅｇａ）中にクローニングした：５’ｈＯｃＣＴ４ＰＥ　ＫｐｎＩとして５’－ＧＧＴＡＣＣＧ　ＧＡＴＡＣＴＣＡＧＧＣＣＡＧＧＣＣＣＡＧＡＡＡ－３’（配列番号１）、３’ｈＯＣＴ４ＰＥ　ＸｈｏＩとして５’－ＣＴＣＧＡＧＴＣＣＡＣＡＧＡＣＣＴＣＴＧＧ

ＣＡＣＴ－３’（配列番号２）、５’ｈＯＣＴ４ＤＥ　ＫｐｎＩとして５’－ＧＧＴＡＣＣＣＡＴＴＧＡＧＴＣＣＡＡＡＴＣＣＴＣＴＴＴＡＣＴＡＧＧＴＧ－３’（配列番号３）、３’ｈＯＣＴ４ＤＥ　ＸｈｏＩとして５’－ＣＴＣＧＡＧＣＴＧＡＧＧＣＴＣＡＴＧＣＴＧＣＴＧＧ－３’（配列番号４）。レポーターコンストラクトを用いてＯｃｔ４発現の調節のパターンを決定し、ｐＲＬ－ＴＫベクターにより細胞０．５～３×１０$^{-6}$個を電気穿孔に供し、標準化した。アッセイは、Ｄｕａｌ－Ｇｌｏ　Ｌｕｃｉｆｅｒａｓｅ　Ａｓｓａｙ　Ｓｙｓｔｅｍ（Ｐｒｏｍｅｇａ）使用の４８時間後に実施した。空のルシフェラーゼベクターの基礎活性を１．０に設定した。

【０７０２】

ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３ＫＤ細胞系の発生：以前の記載通りに、ＳｈＲＮＡ　ｐＬＫＯ－Ｔｅｔ－Ｏｎベクター（ａｄｄｇｅｎｅ）による二次的ＮＧＦＰ１　ｉＰＳＣ株の感染およびサブクローニングを実施し、これによりＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{ＫＤ}を確立した（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　２００９）。

【０７０３】

免疫細胞化学およびＦＡＣＳ分析　４％のパラホルムアルデヒドを添加したＰＢＳ中において細胞を固定し、次の一次抗体を用いて、標準的なプロトコールに従って免疫染色した：ＳＳＥＡ１、ＳＳＥＡ４、およびＳＳＥＡ３（Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔａｌ　Ｓｔｕｄｉｅｓ　Ｈｙｂｒｉｄｏｍａ　Ｂａｎｋ）、Ｔｒａ－１－６０およびＴｒａ－１－８１（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）、ＳＯＸ２（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、ＯＣＴ３／４（Ｓａｎｔａ　Ｃｒｕｚ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）、ヒトＮＡＮＯＧ（ヤギポリクローナル、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）、マウスＮａｎｏｇ（ポリクローナルウサギ、Ｂｅｔｈｙｌ）。適切なアレクサ・フルオル色素標識二次抗体（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅｓ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いた。ヒト細胞のＭＨＣクラスＩを染色するため、本発明者らは抗ＭＨＣクラスＩ抗体（ＢＥ　ｐｈａｒｍｉｎｇｅｎ）を用いた。マウス細胞については、本発明者らは、抗マウスＭＨＣクラスＩ　Ｈ－２ＫｂおよびＨ－２Ｋｄ（ｅＢｉｏｓｃｉｅｎｃｅ）を用いた。ヒト細胞において、特異的細胞表面マーカー、すなわち、ＳＳＥＡ４標識ＡＰＣまたはＴＲＡ－１－６０（登録商標）標識ＰＥ（Ｒ＆Ｄ）を染色した。データ取得をＢＤ　ＦＡＣＳ　ＡＲＩＡ　ＩＩＩを用いて実施し、分析をＦｌｏｗｊｏｗソフトウェアで実施した。

【０７０４】

ＤＮＡメチル化分析　ＤＮＡをプロテイナーゼＫで処理し、抽出し、ＤＮＡの１μｇをＱｉａｇｅｎ　ＥｐｉＴｅｃｔ　Ｂｉｓｕｌｆｉｔｅ　Ｋｉｔを用いて変換した。以前に記載されたプライマーを用いて、ＯＣＴ４およびＸＩＳＴのプロモーター領域を増幅させた（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０ｂ；Ｌｅｎｇｎｅｒ　ＣＪ，ｅｔ　ａｌ．（２０１０）Ｄｅｒｉｖａｔｉｏｎ　ｏｆ　ｐｒｅ－ｘ　ｉｎａｃｔｉｖａｔｉｏｎ　ｈｕｍａｎ　ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ　ｌｉｎｅ　ｉｎ　ｐｈｙｓｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ｏｘｙｇｅｎ　ｃｏｎｄｉｔｉｏｎｓ．Ｃｅｌｌ．２０１０　Ｍａｙ　２８；１４１（５）：８７２－８３；Ｈｏｃｋｅｍｅｙｅｒ　Ｄ，ｅｔ　ａｌ．（２００８）Ａ　ｄｒｕｇ－ｉｎｄｕｃｉｂｌｅ　ｓｙｓｔｅｍ　ｆｏｒ　ｄｉｒｅｃｔ　ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ　ｏｆ　ｈｕｍａｎ　ｓｏｍａｔｉｃ　ｃｅｌｌｓ　ｔｏ　ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ．Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　３：３４６－３５３；ａｎｄ　Ｓｏｌｄｎｅｒ　Ｆ，ｅｔ　ａｌ．（２００９）Ｐａｒｋｉｎｓｏｎ’ｓ　ｄｉｓｅａｓｅ　ｐａｔｉｅｎｔ－ｄｅｒｉｖｅｄ　ｉｎｄｕｃｅｄ　ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌｓ　ｆｒｅｅ　ｏｆ　ｖｉｒａｌ　ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ　ｆａｃｔｏｒｓ．Ｃｅｌｌ　１３６：９６４－９７７、両文献の全体を参考として本明細書に組み込む）。ＸＩＳＴ順方向プライマー（バイサルファイト処理ＤＮＡに使用）は５’－ｔａａａｔｔ　ｔｔａ　ａａｔ　ｔａａ　ｔｔａ　ａａｔ　ｔａｔ－３’（配列番号１０６）、ＸＩＳＴ逆方向プライマー（バイサルファイト処理ＤＮＡに使用）は５’－ｔｇｔ　ｔｔｔ　ａｇａ　ａａｇ　ａａｔ　ｔｔｔ　ａａｇ　ｔｇｔ　ａｇａ　ｇａ－３’（配列番号１０７）であった。ＰＣＲ産物をｐＣＲ２．１－ＴＯＰＯベクターを用いてクローニング

し、Ｍ１３順方向プライマーを用いてシーケンシングした。シトシンメチル化の相対量をＬＣ－ＭＳによって定量化する方法として、５－メチルシトシン（５ｍＣ）含有量の質量分析測定を、以前に記載された方法をわずかに改変した方法によって実施した（対象は、ヒトプライム型ｉＰＳＣ／ＥＳＣと、ＰＫＣｉを含みＦＧＦ２またはＴＧＦＢサイトカインを含まない改変ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において増やしたヒトナイーブ型ｉＰＳＣ／ＥＳＣと、で実施した）［Ｌｅｉｔｃｈ，Ｈ．Ｇ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｉｖｅ ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ ｉｓ ａｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｗｉｔｈ ｇｌｏｂａｌ ＤＮＡ ｈｙｐｏｍｅｔｈｙｌａｔｉｏｎ．Ｎａｔ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２０，３１１－３１６（２０１３）］。簡潔には、ＭＥＦフィーダー細胞非添加で増やしたナイーブ型またはプライム型多能性細胞からゲノムＤＮＡを採取し、その２５０ｎｇを１００℃において３分間加熱することによって変性させた。試料を、１／１０体積かつｐＨ５．３かつ０．１Ｍの酢酸アンモニウムおよび２ユニット（Ｕ）のヌクレアーゼＰ１と共に、４５℃において２時間インキュベートした。１／１０体積かつ１Ｍの重炭酸アンモニウムおよび０．００２ユニットのホスホジエステラーゼＩを添加し、続いて３７℃において２時間インキュベートした。最後に、試料を０．５Ｕのアルカリホスファターゼと共に３７℃において１時間インキュベートした。続いて、ｐＨ５．５かつ２ｍＭのギ酸アンモニウム中に試料を希釈した。２．１×１００ｍｍであるＡｇｉｌｅｎｔ ＲＲＨＤ Ｅｃｌｉｐｓｅ Ｐｌｕｓ Ｃ１８の１．８ｕカラムにより、ＨＰＬＣ ｓｙｓｔｅｍ １２００（Ａｇｉｌｅｎｔ）を用いてヌクレオシドを分離し、Ａｇｉｌｅｎｔ ６４９０トリプル四重極質量分析計を用いて分析した。分析した試料中の個々のヌクレオシドの濃度を計算するため、既知量の合成ヌクレオシドで検量線を引き、これによって、ピーク領域の値を濃度に対応させて変換した。

【０７０５】

ＤＮＡメチル化の全ゲノム・シーケンシング・プロファイルを調べるためのＲｅｄｕｃｅｄ Ｒｅｐｒｅｓｅｎｔａｔｉｏｎ Ｂｉｓｕｌｆｉｔｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ（ＲＲＢＳ）ライブラリ　以前に記載された方法をわずかに改変した方法によって、ＲＲＢＳライブラリを作成した（Ｓｍｉｔｈ，Ｚ．Ｄ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ４８４，３３９－３４４（２０１２））。簡潔には、急速凍結させた細胞ペレットから、Ｑｕｉｃｋ－ｇＤＮＡ ｍｉｎｉ ｐｒｅｐ ｋｉｔ（Ｚｙｍｏ）を用いてＤＮＡを単離した。次いで、単離したＤＮＡをＭｓｐＩ消化（ＮＥＢ）に供し、続いてＴ４ ＰＮＫ／Ｔ４ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ ｍｉｘ（ＮＥＢ）を用いてエンドリペアを実施し、Ｋｌｅｎｏｗ ｆｒａｇｍｅｎｔ（３’→５’ｅｘｏ－）（ＮＥＢ）を用いてＡ－テーリングを実施し、ＳＰＲＩ ｂｅａｄｓ（Ｂｅｃｋｍａｎ Ｃｏｕｌｔｅｒ）を用いて５００ｂｐより短い断片をサイズ選択し、ｑｕｉｃｋ Ｔ４ ＤＮＡ ｌｉｇａｓｅ（ＮＥＢ）を用いてプラスミド中にライゲーションさせた。ＥＺ ＤＮＡ Ｍｅｔｈｙｌａｔｉｏｎ－Ｇｏｌｄ ｋｉｔ（Ｚｙｍｏ）を用いてプラスミドを亜硫酸水素ナトリウムで処理し、ＧｏＴａｑ Ｈｏｔ Ｓｔａｒｔ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（Ｐｒｏｍｅｇａ）を用いて生成物をＰＣＲにより増幅させた。Ｋｌｅｎｏｗ ｆｒａｇｍｅｎｔを用いてＰＣＲ産物をＡ－テーリングに供し、ｑｕｉｃｋ Ｔ４ ＤＮＡ ｌｉｇａｓｅを用いて、インデックスされたＩｌｌｕｍｉｎａアダプタにライゲーションさせ、ＧｏＴａｑ ＤＮＡ ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅを用いてＰＣＲにより増幅させた。次いで、ライブラリから２００～５００ｂｐをサイズ選択し、ＮｕＳｉｅｖｅ ３：１ ａｇａｒｏｓｅ（Ｌｏｎｚａ）を用いてエクステンデッドゲル電気泳動を実施し、ゲル抽出を実施した（Ｑｉａｇｅｎ）。ライブラリをプールし、Ｉｌｌｕｍｉｎａ ＨｉＳｅｑ ２５００ ｓｙｓｔｅｍによってシーケンシングした。シーケンシングリードを、Ｂｉｓｍａｒｋを用いてＭｏｕｓｅ Ｇｅｎｏｍｅ Ｂｕｉｌｄ ３７（ｍｍ９）と整列させた。メチル化レベルを計算し、ライブラリ全体を通して５つ以上の別個のシーケンシングリードにカバーされるＣｐＧのみについて、その平均をとった。各ＣｐＧ部位の「有する」ＣｐＧ含有量を、この部位の周囲５００ｂｐウィンドウ内にみられるＣｐＧジヌクレオチド数をウィンドウサイズで割ったものとして定義した。

【０７０６】
ヒトおよび霊長類ナイーブ型多能性幹細胞を注入する際のプロトコール：　１．雄Ｂ６Ｄ２Ｆ１と交配させた雌ホルモンプライム型Ｂ６Ｄ２Ｆ１の卵管を解剖して、接合体を抽出する（マウスの顕微操作を実施する際に常に実施）。　２．鉱物油で覆ったＫＳＯＭ培地の液滴（Ｚｅｎｉｔｈ　Ｂｉｏｔｅｃｈ　ＫＳＯＭａａ　Ｅｖｏｌｖｅ、カタログ番号：ＺＥＫＳ－０５０）中で、接合体を３７℃において２日間、５％O_2インキュベーター中で培養し、桑実胚段階まで成長させる。　３．ヒトナイーブ型細胞を、ゼラチン／ＤＲ４照射ＭＥＦ被覆プレート上でＮＨＳＭ培地中で、７０～９０％コンフルエントまで増殖させる。　４．細胞を回収する前日に、１０μＭのＲＯＣＫｉを細胞に添加する（ＮＨＳＭ培地中へのＲＯＣＫｉ添加が引き続き行われていない場合）。　５．細胞を～５分間、０．０５％のトリプシンでトリプシン処理し、振とうし、入念にピペッティングして、単一細胞の懸濁液とする。ＤＭＥＭ＋１５％ＦＢＳで反応を停止させ、１０００ＲＰＭで３分間遠心分離する。吸引によって培地を捨てる。　６．９００μｌのＮＨＳＭ培地中に細胞を再懸濁し、１００μｌのろ過ＦＢＳ（細胞の粘着性を減少させるため）および１０μＭのＲＯＣＫｉを添加する。注入するまで、また注入中も氷上で維持する（非常に重要）。細胞は、回収後できるだけ早く注入するのが好ましい。　７．ヒトナイーブ型細胞１５～２０個をＰｉｅｚｏを用いてマウス桑実胚中に注入する（マウスＥＳの注入を実施する際に常に実施）。　８．注入後、１０μＭのＲＯＣＫｉを添加し鉱物油で覆ったＫＳＯＭ液滴中で、３～４時間インキュベートする。　９．３～４時間後、鉱物油で覆ったＫＳＯＭ液滴（ＲＯＣＫｉ無し）中に桑実胚を移し、一晩インキュベートする。　１０．翌日、桑実胚の大部分が胚盤胞に成長しているはずである。胚盤胞１５～２０個を偽妊娠中の雌Ｂ６Ｄ２Ｆ１マウスの子宮に移す。

【実施例１】

【０７０７】
プライム型幹細胞のナイーブ型多能性獲得への逆戻りの促進　本発明者らは、遺伝子操作をさらに実施すれば初期化を非常に高効率かつ均一とし基底状態多能性の獲得を目指し得るかどうかを調べるため、試験に着手した。最近の研究によって、体細胞のｉＰＳＣへの変換にクロマチン抑制解除が重要であると指摘されている（Ｍａｎｓｏｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２；Ｓｏｕｆｉ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２）。また、基底状態多能性は、抑圧的なクロマチンマークのレベルが低いオープンなクロマチン配置に関与する（Ｍａｒｋ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２）。したがって、本発明者らは、初期化効率を著しく増強して基底状態多能性を獲得するために、エピジェネティックリプレッサー因子の機能喪失をスクリーニングすることを目標とした。本発明者らは、まず、外因性の転写因子を過剰発現させずにプライム型エピブラスト幹細胞（ＥｐｉＳＣ）（Ｍａｎｓｏｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２）の逆戻りを実施すると、ナイーブ型２ｉ／ＬＩＦ（２ｉ＝ＰＤ０３２５９０１　ＥＲＫ１／２阻害剤およびＧＳＫ３β阻害剤ＣＨＩＲ９９０２１）増殖条件下において７日でナイーブ型多能性状態に変換できることに焦点を当てた。本発明者らは、ナイーブ型基底状態でのみ活性を示すＮａｎｏｇ－ＧＦＰノックインレポーターを有するＥｐｉＳＣ株を利用し（Ｍａｎｓｏｕｒ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２）、ＥｐｉＳＣのＮａｎｏｇ－ＧＦＰ＋ナイーブ型多能性細胞への逆戻りを促進する増強因子を同定するためにｓｉＲＮＡスクリーニングを実施した（図１Ａ～Ｂおよび３３Ａ～Ｇ）。Ｄｎｍｔ１およびＥＥＤ／Ｓｕｚ１２をノックダウンするとＤＮＡメチル化およびＨ３Ｋ２７ｍｅ３がそれぞれ阻害され（Ｍｉｋｋｅｌｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．，２００８）、エピジェネティックな逆戻りの効率が増大するが、Ｎａｎｏｇ－ＧＦＰレポーターを活性化したのはドナー細胞のうち少数のみであった（図１Ａ～Ｂ）。注目すべきことに、本発明者らは、Ｍｂｄ３ｓｉＲＮＡ（ｍＢＤ３ＨＳＳ１４７５８１（３＿ＲＮＡＩ）Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ：ＡＧＧＵＣＡＡＧＧＧＣＡＡＧＣＣＣＧＡＣＣＵＧＡＡ（配列番号５２）；ＭＢＤ３ＨＳＳ１４７５８１（３＿ＲＮＡＩ）Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ－ＵＵＣＡＧＧＵＣＧＧＧＣＵＵＧＣＣＣＵＵＧＡＣＣＵ；（配列番号５３））によりＭｂｄ３を阻害すると、ＥｐｉＳＣの逆戻り効率が著しく増大し、この際、トランスフェクションされた細胞のうち多くて８

０％が２ｉ／ＬＩＦ条件下においてＮａｎｏｇ－ＧＦＰを活性化し（図１Ａ～Ｂ）、コントロールＥｐｉＳＣではこの活性化が２０％未満であった（図１Ａ～Ｂ）ことに注目した。このような著しい効果は、試験した他の因子のいずれについても、例えばＭｂｄファミリーのうち試験した他のメンバーのいずれについても観察されなかった（図１Ａ～Ｂ）。

【０７０８】
メチル－ＣｐＧ結合ドメイン３（Ｍｂｄ３；配列番号７）は、ヌクレオソームリモデリングおよび脱アセチル化（ＮｕＲＤ）複合体における化学構造構成要素タンパク質であり、もともと、Ｍｂｄ１、２、および４と同様、ＭｅＣＰ２のメチル－ＣｐＧ結合ドメイン（ＭＢＤ）と相同性が高い領域を有するタンパク質であることを特徴とする（Ｋａｊｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００７）。Ｍｂｄ２およびＭｂｄ３は集合して相互排他的かつ特徴的なＮｕＲＤ複合体となる（Ｌｅ　Ｇｕｅｚｅｎｎｅｃ，Ｘ．ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．２６，８４３－８５１，２００６）。このＮｕＲＤ複合体は、ヒストン脱アセチル化酵素１（ＨＤＡＣ１）および２によるヒストン脱アセチル化を介して遺伝子抑制に影響を及ぼし、かつ、そのクロモドメインヘリカーゼＤＮＡ結合タンパク質３（ＣＨＤ３）（Ｍｉ２ａ）およびＣＨＤ４（Ｍｉ２ｂ）サブユニットを介して、クロマチンリモデリングのＡＴＰａｓｅ活性にも影響を及ぼし得る（Ｚｈｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００９）。
【０７０９】
Ｍｂｄ３／ＮｕＲＤは、転写された遺伝子に優先的に結合し、これを活発に抑制する。その構成要素のなかには（例えばＣｈｄ４）、特定座における転写活性化因子としての作用に関連するものもある［Ｒｅｙｎｏｌｄｓ，Ｎ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ，２０１２，１０：５８３－５９４；Ｇｕｎｔｈｅｒ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２０１３，４１：３０１０－３０２１］。
【０７１０】
ｓｉＲＮＡスクリーニング結果を実証するため、本発明者らは、Ｍｂｄ３$^{+/+}$およびＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ/-}$ＥＳＣ（Ｋａｊｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００７）を用い、Ｒｏｓａ２６－ＣｒｅＥＲおよびＮａｎｏｇ－ＧＦＰノックイン対立遺伝子を遺伝子ターゲティングによって導入した（図１Ｃおよび１Ｈ）。Ｅ３．５胚盤胞中にマイクロインジェクションし、Ｅ６．５において着床後エピブラストから再誘導することによって、上記後者の操作株からＥｐｉＳＣを確立した（図３３Ｂ～Ｇ）。Ｍｂｄ３$^{+/+}$ＥｐｉＳＣと比較して、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ/-}$プライム型細胞は、２ｉ／ＬＩＦ＋タモキシフェン条件下におけるＥｐｉＳＣへの逆戻り効率が高く（図１Ｃおよび１Ｈ）、Ｎａｎｏｇ－ＧＦＰ再活性化が均一であった。これらの結果は、基底状態多能性[36]への逆戻りと矛盾しない（図１Ｄ～Ｌ）。ＥｐｉＳＣ（播く効率を制御できるよう構造的にｍＣｈｅｒｒｙ標識）のエピジェネティックな逆戻りを調べるために単一細胞クローンを分析したところ、Ｍｂｄ３欠損細胞におけるＮａｎｏｇ－ＧＦＰ＋単一細胞の逆戻り効率は９５％であった（図１Ｃおよび１Ｈ）。重要なことには、低形質（～２０％）Ｍｂｄ３タンパク質の発現が維持されているＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ/-}$ＥｐｉＳＣについても（図１Ｉ～Ｊ）（Ｋａｊｉ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ　８，２８５－２９２，２００６）、９３％を超える効率でＥＳＣが逆戻りした（図１Ｃおよび１Ｈ）。逆戻りしたＭｂｄ３－／－細胞（遺伝子組換えによりＭｂｄ３を挿入して分化可能とした後（Ｋａｊｉ，Ｋ．，ｅｔ　ａｌ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　１３４，１１２３－１１３２，２００７；Ｋａｊｉ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｃｅｌｌ　Ｂｉｏｌ　８，２８５－２９２，２００６））およびＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ/-}$細胞はいずれも、成体キメラの作製に貢献できる（図１Ｉ、１Ｊ、１Ｋ、１Ｌ）。Ｍｂｄ３$^{-/-}$およびＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ/-}$ＥｐｉＳＣにおいてＭｂｄ３発現が再構成されたため、２ｉ／ＬＩＦにおける逆戻り効率が阻害されて、野生型細胞で典型的にみられる２０％未満になった（図１Ｃおよび１Ｈ）。この結果はまさに、Ｍｂｄ３タンパク質レベルの低下によりネズミＥｐｉＳＣが基底状態多能性にほぼ完全に逆戻りすることを示す。
【０７１１】

Ｍｂｄ３の欠失によって多能性獲得への逆戻りが促進されるという事実と、受精後に基底状態多能性を確立するにはＭｂｄ３が必須であることを示唆する以前のｉｎ　ｖｉｖｏ研究とは、一見して矛盾する（Ｋａｊｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００６；２００７）。後者の結論は、Ｍｂｄ３－／－Ｅ３．５胚の内部細胞塊中でＯｃｔ４＋細胞を観察し得たが、外植後、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて血清／ＬＩＦ誘導条件下でＭｂｄ３－／－ＥＳＣを誘導できなかったという事実に基づいている（Ｋａｊｉ　ｅｔ　ａｌ．，２００６；２００７）。しかし、既に確立されたＥＳ細胞では、遺伝子ターゲティングの後でＭｂｄ３が欠失してもよく、血清を含む条件下において栄養膜分化傾向を示す（図３４Ａ～Ｂ）（Ｚｈｕ　ｅｔ　ａｌ．，２００９）。従来は技術の制約があり、血清を含む条件下ではＭｂｄ３－／－ＥＳＣを誘導できなかったが、このことも上記のことに基づいている可能がある。したがって、本発明者らは、無血清２ｉ／ＬＩＦ条件下におけるＭｂｄ３－／－Ｅ３．５胚からのＥＳＣ誘導について再考したところ［Ｙｉｎｇ，Ｑ．－Ｌ．ｅｔ　ａｌ．Ｔｈｅ　ｇｒｏｕｎｄ　ｓｔａｔｅ　ｏｆ　ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ　ｓｅｌｆ－ｒｅｎｅｗａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４５３，５１９－５２３（２００８）］、試験した多能性マーカーをすべて発現するＭｂｄ３－／－ＥＳＣを実際に単離できた（図３４Ａ～Ｃ、２Ａ～Ｏ）。このことから、基底状態多能性の確立およびマウスＥＳＣの誘導にＭｂｄ３は必須でないことがわかる。これと矛盾することなく、Ｍｂｄ３タンパク質の核内発現は、受精のあと前着床発達期間全体を通して減少し、そして難なく検出されるようになるのは後期胚盤胞段階および着床後エピブラストになってからである（図１Ｏ～Ｔ、図３５Ａ～Ｃ、および図３６Ａ～Ｊ）。ナイーブ型およびプライム型マウス多能性細胞の両方において、核内におけるＭｂｄ３タンパク質の発現はｉｎ　ｖｉｔｒｏ誘導のあと保存されている（図３６Ｅ～Ｈ）。こうした結果から、着床前のｉｎ　ｖｉｖｏでの初期化と発達においてはＭｂｄ３が発現していないが多能性確立後にＭｂｄ３が再度発現することがわかった。この結果は、ナイーブ型多能性からの分化と離脱をＭｂｄ３が可能にするという、Ｍｂｄ３の重要な役割と矛盾しない［Ｒｅｙｎｏｌｄｓ，Ｎ．，Ｓｔｒｏｕｂｏｕｌｉｓ，Ｊ．，Ｂｅｈｒｅｎｓ，Ａ．，Ｂｅｒｔｏｎｅ，Ｐ．＆Ｈｅｎｄｒｉｃｈ，Ｂ．Ｎｕ　ＲＤ　ｓｕｐｐｒｅｓｓｅｓ　ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ　ｇｅｎｅ　ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｔｏ　ｐｒｏｍｏｔｅ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ　ｈｅｔｅｒｏｇｅｎｅｉｔｙ　ａｎｄ　ｌｉｎｅａｇｅ　ｃｏｍｍｉｔｍｅｎｔ．Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ，２０１２，１０：５８３－５９４］。最後に、本発明者らは、Ｍｂｄ３発現が減少するとＯｃｔ４＋始原生殖細胞のＥＳ様多能性胚性生殖（ＥＧ）細胞への初期化に影響を及ぶか否かを調べることとした。典型的には、これらの細胞はＥＳ増殖条件下で外植を受けたＥ８．５ＰＧＣから誘導される［Ｄｕｒｃｏｖａ－Ｈｉｌｌｓ，Ｇ．，Ｔａｎｇ，Ｆ．，Ｄｏｏｄｙ，Ｇ．，Ｔｏｏｚｅ，Ｒ．＆Ｓｕｒａｎｉ，Ｍ．Ａ．Ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ　ｐｒｉｍｏｒｄｉａｌ　ｇｅｒｍ　ｃｅｌｌｓ　ｉｎｔｏ　ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌｓ．ＰＬｏＳ　ＯＮＥ　３，ｅ３５３１（２００８）；Ｌｅｉｔｃｈ，Ｈ．Ｇ．ｅｔ　ａｌ．Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　ｇｅｒｍ　ｃｅｌｌｓ　ｆｒｏｍ　ｍｉｃｅ　ａｎｄ　ｒａｔｓ　ｅｘｈｉｂｉｔ　ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ　ｃｏｎｓｉｓｔｅｎｔ　ｗｉｔｈ　ａ　ｇｅｎｅｒｉｃ　ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ　ｇｒｏｕｎｄ　ｓｔａｔｅ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　１３７，２２７９－２２８７（２０１０）］。キメラ動物から単一細胞として選別したＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$Ｏｃｔ４－ＧＦＰ＋　Ｅ８．５ＰＧＣはＥＧ細胞コロニーおよびＥＧ細胞株を形成できたが（９５％を超える効率で）、外因性Ｍｂｄ３発現導入遺伝子を有するＭｂｄ３$^{＋／＋}$またはＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$細胞から発生させたキメラにおいては、単離したＰＧＣの初期化効率が１０％未満であった（図１Ｎ～Ｍ）。これらの知見を総合すると、Ｍｂｄ３発現を中和すれば初期胚のＯｃｔ４発現細胞から基底状態多能性を容易に獲得できることがわかる。

【実施例２】

【０７１２】

Ｍｂｄ３の阻害の緩和による体細胞初期化の促進　本発明者らは、Ｏｃｔ４等の内在性多能性マーカーの発現が欠如しかつ発生上の制限がＥｐｉＳＣおよびＰＧＣよりも大きい

体細胞において、Ｍｂｄ３を阻害することにより、基底状態多能性獲得への直接的な変換が促進されて効率がほぼ１００％となるか否かを調べた。Ｏｃｔ４－ＧＦＰレポーターを有する線維芽細胞Ｍｂｄ３$^{+/+}$、Ｍｂｄ３$^{flox/-}$、およびＭｂｄ３$^{-/-}$を、Ｏ、Ｋ、Ｓ、Ｍをコードするモロニーウイルスに直接感染させ、Ｏｃｔ４－ＧＦＰの再活性化をフローサイトメトリーで評価した。Ｍｂｄ３欠損細胞の初期化効率は野生型細胞の初期化効率より高かったが、Ｍｂｄ３$^{flox/-}$およびＭｂｄ３$^{-/-}$欠損試料から得られたＯｃｔ４－ＧＦＰ細胞は１５％と少なかった（図３７Ａ）。この結果は、Ｍｂｄ３ノックダウン後のｉＰＳＣ形成効率は高くても１．５％であるという最近の研究報告と矛盾しない［Ｌｕｏ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．ＮｕＲＤ Ｂｌｏｃｋｓ ＲｅｐｒｏｇＡｒａｍｍｉｎｇ ｏｆ Ｍｏｕｓｅ Ｓｏｍａｔｉｃ Ｃｅｌｌｓ ｉｎｔｏ Ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ．Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ（２０１３）］。ＯＫＳＭポリシストロン性ベクターでの感染により［Ｓｏｍｍｅｒ，Ｃ．Ａ．ｅｔ ａｌ．Ｉｎｄｕｃｅｄ ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｕｓｉｎｇ ａ ｓｉｎｇｌｅ ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ ｃａｓｓｅｔｔｅ．Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ ２７，５４３－５４９（２００９）］、Ｍｂｄ３ｆｌｏｘ／－のｉＰＳＣ初期化が著しく増加して４５％となった。この結果は、個々の体細胞への導入遺伝子の輸送が増大したために生じた可能性がある（図３７Ｂ）。Ｍｂｄ３欠損ＥＳＣが多能性を最適に維持するためには無血清２ｉ／ＬＩＦ増殖条件が必要であるため（図３４Ａ～Ｂ）、本発明者らは次に、ナイーブ型幹細胞の増殖を促進する多様な外来因子を添加すると効率が最大となり得るが否かを調べた（図３７Ｃ）。注目すべきことに、ＥＳ培地への２ｉ添加を導入遺伝子誘導後４８時間の時点で開始し、かつ生理的酸素条件を適用することによって、初期化が著しく増大した。この条件下において、Ｍｂｄ３$^{flox/-}$細胞およびＭｂｄ３$^{-/-}$細胞の９５％が１０日目にＯｃｔ４－ＧＦＰ陽性となり、一方、同一の増殖条件および初期化条件において初期化したコントロールＭｂｄ３$^{+/+}$線維芽細胞で観察されたレベルは高くて１８％であった（図４Ａ）。初期化のカイネティックおよび効率を正確に評価するため、本発明者らは、「二次的初期化可能」（Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，２００９ｂ；Ｗｅｒｎｉｇ ｅｔ ａｌ．，２００８）Ｍｂｄ３$^{+/+}$およびＭｂｄ３$^{flox/-}$トランスジェニック細胞系を確立した。この細胞系は、ＤＯＸ誘導性ＯＫＳＭポリシストロン性カセット［Ｓｏｍｍｅｒ，Ｃ．Ａ．ｅｔ ａｌ．Ｉｎｄｕｃｅｄ ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｕｓｉｎｇ ａ ｓｉｎｇｌｅ ｌｅｎｔｉｖｉｒａｌ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ ｃａｓｓｅｔｔｅ．Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌｓ ２７，５４３－５４９（２００９）］、構成型核ｍＣｈｅｒｒｙマーカー（個々の細胞を追跡できるよう、かつ播く効率を制御できるよう）、およびＯｃｔ４－ＧＦＰ特異的レポーター（Ｂｏｉａｎｉ，Ｍ．，Ｋｅｈｌｅｒ，Ｊ．＆Ｓｃｈｏｌｅｒ，Ｈ．Ｒ．ｉｎ ＭＥＴＨＯＤＳ ＩＮ ＭＯＬＥＣＵＬＡＲ ＢＩＯＬＯＧＹ，２００４，２５４：００１－０３４）を有する（図３Ａ～Ｄおよび３Ｇ）。この細胞を宿主胚盤胞中に注入したところ、二次的初期化可能ＭＥＦが誘導され、初期化定量化に用いた（Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，２００９ｂ）。ｍＣｈｅｒｒｙ＋Ｍｂｄ３$^{flox/-}$ＭＥＦの単一細胞を選別し、続いて２ｉ－ＬＩＦ＋ＤＯＸおよび５％Ｏ２条件下において初期化したところ、８日目にはｉＰＳＣ誘導効率が１００％となり、再現性も良好であった。同一条件下において野生型細胞を初期化した際には、Ｏｃｔ４－ＧＦＰの再活性化がみられたクローンは２０％を超えず、ｍＣｈｅｒｒｙ二次的線維芽細胞の大半にはＯｃｔ４－ＧＦＰマーカーの再活性化もＥＳ様形態の獲得もなかった（図４Ｂ）。Ｍｂｄ３欠損体細胞の場合も、コントロール野生型細胞と比較して、ＤＯＸによる増殖率が類似し、かつＯＳＫＭ誘導時のバックグラウンド生存レベルが類似していた。したがって、細胞増殖およびアポトーシスは、ｉＰＳＣ誘導効率にみられた差異を生じる潜在的因子ではない（図５Ａ～Ｆ）。ＯＫＳＭ組込みが異なる（図４Ｂ）複数のＭｂｄ３$^{flox/-}$二次的株を、多様な成体始原細胞と、ＤＯＸ誘導性Ｍｂｄ３特異的ｓｈＲＮＡ（Ｍｂｄ３－ＫＤ）対立遺伝子およびＮａｎｏｇ－ＧＦＰノックインレポーター（図３１Ａ～Ｅおよび３８Ａ～Ｂ）を有するＮＧＦＰ１　ｉＰＳＣ株由来の高分化細胞とから確立したところ（

Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４６２，５９５－６０１，２００９）、非常に高い単一細胞初期化効率が得られた。無作為に試験したすべてのクローンが、アルカリホスファターゼ（ＡＰ）ならびに多能性マーカーＯｃｔ４およびＮａｎｏｇの陽性染色を示した（図４Ｃ～Ｇ）。複数のｉＰＳＣクローンから成熟テラトーマおよび貢献度の高いキメラが得られ、その一部は生殖系に伝達できるものであった（図４Ｃ～Ｇおよび３９Ａ～Ｄ）。この結果は、基底状態多能性への初期化とよく一致する。

【０７１３】

本発明者らは、顕微鏡ライブイメージングによって「二次的」Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$およびコントロールＭｂｄ３$^{＋／＋}$線維芽細胞の初期化ダイナミクスを分析した（Ｓｍｉｔｈ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０）（図４０Ａ～Ｅ）。タイムラプス測定により、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$線維芽細胞におけるＥＳ様コロニー形成の著しい増加が示された（図４Ｈ～Ｉ）。単一ｍＣｈｅｒｒｙコロニーをセグメンテーションしてクローン集団初期化中のＯｃｔ４－ＧＦＰの再活性化ダイナミクスを追跡できるアルゴリズムを当研究室で開発して、適用した（図４０Ａ～Ｅ、４Ｈ～Ｉ、４１Ａ～Ｄ、４２Ａ～Ｅ）。ＤＯＸ誘導６日後には、Ｏｃｔ４－ＧＦＰ多能性マーカーが再活性化されたＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$クローン集団は９８％を超えたが、同一増殖条件下（２ｉ／ＬＩＦおよび５％　ｐＯ２を含む）において初期化したコントロール試料で検出した効率は、高くて１５％であった（図４Ｊ～Ｏ、４Ｑ、４Ｒ）。６日目には、各Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$クローン集団中の細胞の約８５％がＯｃｔ４－ＧＦＰ$^{＋}$細胞となり、一方、初期化できたＭｂｄ３$^{＋／＋}$クローンのうちＯｃｔ４－ＧＦＰマーカー陽性となった細胞は２％未満であった（図４Ｒ）。こうして実施した、不偏的定量化分析から、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$クローン集団において、４．５～５．５日目と限られた期間に、Ｏｃｔ４－ＧＦＰのクローン内再活性化とクローン間再活性化とが著しく同調していることが示され（図４Ｑ～Ｒおよび図４２Ａ～Ｅ）、また、ＯＳＫＭ形質導入体細胞においてＭｂｄ３欠損後に初期化の同調性および効率が著しく増加することが強調される。ポリクローナル集団中のＯｃｔ４－ＧＦＰをフローサイトメトリーにより検出したところ、ｉＰＳＣの初期化と類似するカイネティックを示した（図４３Ａ～Ｂ）。初期化５日目よりも前に、Ｍｂｄ２ではなくＭｂｄ３をコードするレンチウイルスに再度感染させると、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$ＭＥＦからのｉＰＳＣの発生に対する阻害効果が顕著であったが、一方、再感染を５日目より後に実施した場合にはこの効果が小さかった（図４４Ａ～Ｂ）。上記のカイネティック分析から、Ｍｂｄ３は、初期化最終段階よりも前、すなわち内在性Ｏｃｔ４／Ｎａｎｏｇの再活性化よりも前に導入すれば、初期化を阻害できることが示唆される（Ｓｉｌｖａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１３８，７２２－７３７，２００９）。しかし、多能性が再び確立されてからは、Ｍｂｄ３が存在していても許容され、基底状態多能性の維持が損なわれることはない。

【０７１４】

ＯＳＫＭ形質導入Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$およびＭｂｄ３$^{＋／＋}$体細胞における初期化を分子レベルで評価するため、本発明者らは、ＤＯＸ誘導後０、４、および８日目に、継代をしていないドナーＭＥＦの網羅的遺伝子発現分析を実施し、結果をｉＰＳＣおよびＥＳＣ系の結果と比較した。ＤＯＸ４日後に既にドナー線維芽細胞から別々にクラスターを形成したのは、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$体細胞のみであった。驚くべきことに、８日目には、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$体細胞は複数のＥＳＣ株および複数の確立されたサブクローンｉＰＳＣ株と転写の観点から区別がつかなくなった（図８Ｒ、図４５Ａ～Ｂ、図７、および図４６Ａ～Ｅ）。単一細胞のＲＴ－ＰＣＲ分析を実施したところ、初期化に成功した細胞の指標であると近年示された多能性マーカーのすべてを、試験した単一細胞の１００％（１２／１２）が発現した試料は、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$初期化試料のみであったことが確認された（Ｂｕｇａｎｉｍ，Ｙ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１５０，１２０９－１２２２，２０１２）（Ｓａｌｌ４、Ｕｔｆ１、Ｅｓｒｒｂ、Ｓｏｘ２、およびＮａｎｏｇ）（図４６Ｄ～Ｅ）。クロマチン免疫沈降によりＨ３Ｋ２７ｍｅ３（Ｋ２７ｍｅ３）、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３（Ｋ４ｍｅ３）、およびＨ３Ｋ２７ａｃｅｔｙｌ（Ｋ２７ａｃ）のついての全ゲノムクロマチンマッピングを実施し、続いてシーケンシング分析（Ｃｈｉｐ－Ｓｅｑ）を行ったと

ころ、８日目までにＥＳ様クロマチンプロファイルを呈したのはＭｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$形質導入ＭＥＦのみであることも確認した（図４７Ａ～Ｂ、４８Ａ～Ｃ）。Ｒｅｄｕｃｅｄ Ｒｅｐｒｅｓｅｎｔａｔｉｏｎ Ｂｉｓｕｌｆｉｔｅ Ｓｅｑｕｅｎｃｉｎｇ（ＲＲＢＳ）による全ゲノムＤＮＡメチル化マッピングを実施したところ、Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$ポリクローナル集団試料はＤＯＸ処理の８日後にはｉＰＳＣ様メチル化パターンを呈し得るが、Ｍｂｄ３$^{＋／＋}$細胞にはこれが当てはまらないことを確認した。この結果は、ＣｐＧのメチル化の喪失が順調な初期化における後の方の段階で主として生じることを示す結果と矛盾しない（Ｐｏｌｏ，Ｊ．Ｍ．ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ １５１，１６１７－１６３２，２０１２）（図４９Ａ～Ｂ）。上記結果を総合すると、２ｉ／ＬＩＦ条件下におけるＯＳＫＭ誘導後のＭｂｄ３欠損は、ドナー体細胞とその子孫をあわせた集団全体において基底状態多能性が真に分子的に再確立されることを示している。

【０７１５】

Ｍｂｄ３発現の欠損の後、Ｏｃｔ４／Ｎａｎｏｇ－ＧＦＰを再活性化せずｉｎ ｖｉｔｒｏにおいて安定して増やすことのできる、安定で一部初期化された細胞を、ＯＳＫＭ形質導入野生型体細胞からは典型的には得ることができるが、本発明者らはこの細胞を単離できなかった（図８Ｓ、８Ａ～Ｄ、８Ｅ）［Ｓｒｉｄｈａｒａｎ，Ｒ．，ｅｔ ａｌ．，Ｃｅｌｌ ３６（２）：３６４－７７（２００９）；Ｍｉｋｋｅｌｓｅｎ，Ｔ．Ｓ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ４５４，４９－５５（２００８）；Ｃｏｓｔａ Ｙ．，ｅｔ ａｌ．ＮＡＮＯＧ－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｆｕｎｃｔｉｏｎ ｏｆ ＴＥＴ１ ａｎｄ ＴＥＴ２ ｉｎ ｅｓｔａｂｌｉｓｈｍｅｎｔ ｏｆ ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ．Ｎａｔｕｒｅ ４９５，３７０－３７４（２１ Ｍａｒｃｈ ２０１３）］。Ｍｂｄ３$^{ｆｌｏｘ／－}$細胞において６日目に残っていたＯｃｔ４－ＧＦＰ陰性細胞１～１５％は（図４Ｑおよび４Ｒ）、初期化継続中に１～２日で迅速にＧＦＰ＋となった（図４３Ａ～Ｂ）。本発明者らは、異なる初期化方法によって線維芽細胞またはＢ細胞にＯＳＫＭを形質導入し一部初期化したＭｂｄ３＋／＋独立株を３つ選び、Ｍｂｄ３を阻害することによってその初期化を完了させることを試みた。注目すべきことに、Ｍｂｄ３ ｓｉＲＮＡを導入することによって（ｍＢＤ３ＨＳＳ１４７５８１（３＿ＲＮＡＩ）Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ：５’－ＡＧＧＵＣＡＡＧＧＧＣＡＡＧＣＣＣＧＡＣＣＵＧＡＡ（配列番号５２）、ＭＢＤ３ＨＳＳ１４７５８１（３＿ＲＮＡＩ）Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ：５’－ＵＣＡＧＧＵＣＧＧＧＣＵＵＧＣＣＣＵＵＧＡＣＣＵ；（配列番号５３））、２ｉ／ＬＩＦにおいてＯＳＫＭ発現を継続させた後、３つのクローンすべてが多能性マーカーＯｃｔ４－ＧＦＰまたはＮａｎｏｇ－ＧＦＰに対して著しく陽性となった（図８Ｆ～Ｋおよび５０Ａ～５０Ｂ）。最後に、体細胞エピゲノムまたは多能性細胞においてＭｂｄ３が発現すると、細胞融合によるネズミ体細胞の初期化と多能性の獲得が特異的に妨げられた（図５１）（Ｔａｄａ，Ｍ．，ｅｔ ａｌ．Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｂｉｏｌｏｇｙ，１１：１５５３－１５５８，２００１）。これらの結果から、Ｍｂｄ３発現が欠損していると基底状態多能性への「入口」が開くことがわかる。

【０７１６】

全クレード（哺乳類から最も単純な多細胞動物であるＴ．ａｄｈａｅｒｅｎｓまで）から選択した後生動物１６種について

、

Ｍｂｄ３および他のＮｕＲＤ複合体タンパク質を系統発生解析に供したところ、Ｍｂｄ３および他のＮｕＲＤ複合体タンパク質は、Ｔ．ａｄｈａｅｒｅｎｓ中のオルソログを有するが酵母中のオルソログは有さないことが見いだされた。この結果から、Ｍｂｄ３および他のＮｕＲＤ複合体タンパク質がＯｃｔ４と共にこれら最初の多細胞動物において出現したのではないかということと、発生多能性とを示唆する可能性がある（図９）。

【０７１７】

ヒトｉＰＳＣの初期化においてＭＢＤ３の阻害的役割が保存されているかどうかを、機能の点から実証するため（図９）、本発明者らは、ＴＡＬＥヌクレアーゼエフェクターによる遺伝子編集を実施してＭＢＤ３$^{ｆｌｏｘ／－}$ｈＥＳＣを発生させ（図８Ｌおよび図５２

Ａ～Ｃ）（Ｈｏｃｋｅｍｅｙｅｒ，Ｄ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２９，７３１－７３４，２０１１）、正確に操作したクローンにおいて低形質ＭＢＤ３タンパク質の発現を確認した（図８Ｍ～Ｎ）。近年記載されたヒトナイーブ型多能性促進条件（ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件、２ｉ／ＬＩＦ＋ｂＦＧＦを含む）下において、ＭＢＤ$^{3+/+}$およびＭＢＤ３$^{flox/-}$ｈＥＳＣからｉｎ ｖｉｔｒｏにおいて線維芽細胞を分化させてＯＳＫＭ形質導入によって初期化し、８日目にＳＳＥＡ４およびＴＲＡ１－６０染色に供したところ、９０％を超える著しいｉＰＳＣ効率をＭＢＤ３欠損試料のみが示した（図８Ｏ）。ＤＯＸ誘導性ＯＳＫＭ因子を有するＭＢＤ３$^{+/+}$およびＭＢＤ３$^{flox/-}$ｈｉＰＳＣ中にＯＣＴ４－ＧＦＰノックインレポーターおよび構成型ｍＣｈｅｒｒｙを導入した後、単一細胞の初期化効率を調べた。Ｍｂｄ３$^{flox/-}$細胞からｉｎ ｖｉｔｒｏにおいて分化させた二次的線維芽細胞はほぼ１００％の効率で初期化されたが、一方、同様の方法によりＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において分化および初期化させた二次的線維芽細胞の初期化効率は高くて２％であった（図８Ｏ、図５３Ａ～Ｅ）。ＤＯＸ誘導した後にのみＭＢＤ３$^{flox/-}$ｉＰＳＣがはっきりと現われ、この効果はＭｂｄ３の過剰発現によって阻害された。この結果から、初期化効率が高く観察されたのは残存する一次的ｉＰＳＣの混入によるものではないとした（図８Ｏ）。さらに、ＤＯＸ誘導後２日目および４日目に、ＭＢＤ$^{3+/+}$ＯＳＫＭトランスジェニック二次的線維芽細胞中に、ＭＢＤ３ ｓｉＲＮＡ（ｍＢＤ３ＨＳＳ１４７５８１（３＿ＲＮＡＩ）Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ：ＡＧＧＵＣＡＡＧＧＧＣＡＡＧＣＣＣＧＡＣＣＵＧＡＡ（配列番号５２）、ＭＢＤ３ＨＳＳ１４７５８１（３＿ＲＮＡＩ）Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ：ＵＵＣＡＧＧＵＣＧＧＧＣＵＵＧＣＣＣＵＵＧＡＣＣＵ（配列番号５３））を適用することによって、ヒトｉＰＳＣの形成が著しく増加した（図１０Ａ～Ｄ）。ＭＢＤ３ ｓｉＲＮＡ処理によれば、ＯＳＫＭ＋ＬＩＮ２８ ｍＲＮＡによるトランスフェクションを２～３回実施し（Ｗａｒｒｅｎ，Ｌ．ｅｔ ａｌ．Ｈｉｇｈｌｙ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ Ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ ｔｏ Ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ ａｎｄ Ｄｉｒｅｃｔｅｄ Ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｉｏｎ ｏｆ Ｈｕｍａｎ Ｃｅｌｌｓ ｗｉｔｈ Ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ ｍＲＮＡ．Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ（２０１０））、続いて８日目にコロニー検出および単離を実施したのみで、成体ヒト患者特異的線維芽細胞からヒトｉＰＳＣを発生させることができ、再現性も良好であった（図５４Ａ～Ｇ）。これらの結果を総合すると、ＭＢＤ３を阻害することによって、ＯＳＫＭによるヒト体細胞の直接的な初期化と多能性獲得を妨げる最も大きな障害が小さくなることがわかる。したがって、ＭＢＤ３の阻害を、ｉＰＳＣ形成を促進する新しい技術プラットフォームにおいて用い得る。重要なことには、ＭＢＤ欠損ヒト多能性幹細胞は、著しい円形となってマウスＥＳＣ様の形態をとり、均一に増殖する（図８Ｐ～Ｑ）。これらの結果は、Ｍｂｄ３の阻害によって（本明細書中に記載の）ＷＩＳ－ＮＨＳＭナイーブ型増殖条件をさらに改善できる可能性を示す。

【実施例３】

【０７１８】

ＭＢＤ３欠損後のＯＳＫＭによる初期化についての数値による説明　次に、本発明者らは、Ｍｂｄ３$^{+/+}$およびＭｂｄ３^{KD}試料の両方について初期化潜伏時間分布の特徴を量的に調べ、結果を既知の決定的な挙動と比較する必要があった。この目的で、本発明者らは、以前に記載されたアプローチをモノクローナルネズミプレＢ細胞に適用し、Ｎａｎｏｇ－ＧＦＰの再活性化を週１回追跡した（図３１Ａ）（Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ ４６２，５９５－６０１，２００９）。二次的ＯＳＫＭトランスジェニックＮＧＦＰ１－ｉＰＳＣ株を遺伝子組換えに供して、ＤＯＸ誘導性Ｍｂｄ３ノックダウンとした（ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{KD}）（図５Ｂ、５Ｃ、および５Ｄ）。確かに、ＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{KD}由来のモノクローナルＢ細胞集団のみが、７日目に効率１００％でＮａｎｏｇ－ＧＦＰ＋ｉＰＳＣに変換された（図３１Ｂ～Ｃ）。続いて、初期化の最初１０日間、本発明者らは、ポリクローナルＮＧＦＰ１コントロールおよびＮＧＦＰ１－Ｍｂｄ３^{KD}Ｂ細胞集団を１日１回Ｎａｎｏｇ－ＧＦＰ検出に供した。後者の細胞は初期化が著し

く増加し、そのカイネティックを顕微鏡ライブイメージングで測定したところ、Ｍｂｄ３ｆｌｏｘ／－ＭＥＦで測定されたものと類似していた（図５５Ａ～Ｂ）。次に、本発明者らは、Ｍｂｄ３^{KD}細胞の初期化が決定的な作用として生じるかを調べた。この試験について、本発明者らは、ＤＯＸ誘導後に全細胞が同時に多能性となると予想した。こうした決定的な挙動は、規定の決定的時点より前には初期化が０％でありその後ｉＰＳ形成が１００％となるというステップ関数によってよく近似される。クローン細胞の初期化ダイナミクスをこのような決定的なステップ関数にフィットさせることによって、Ｍｂｄ３^{KD}細胞によるフィットは密接だが（R^2＞０．９、Chi^2＝５２）コントロールＭｂｄ３$^{+/+}$細胞によるフィットは密接ではない（R^2＝０．５５、Chi^2＝４０５）ことが明らかになった（図３１Ｄ～Ｅ）。決定的な挙動との相似点はみられたが、Ｍｂｄ３^{KD}試料における変動は、本明細書中で考案した最適条件下において未だ明らかであった。そこで、本発明者らは、Ｍｂｄ３$^{+/+}$およびＭｂｄ３^{KD}両試料における初期化潜伏時間の測定で検出された変動性を定量して比較し、さらにその結果を、細胞周期固有の変動性を測定した結果と比較する必要があった（Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４６２，５９５－６０１，２００９）。この目的で、本発明者らは２つのモデリングスキームを用いた。第一に、本発明者らは、初期化潜伏時間の観察結果をガウス分布にフィットさせた。ここで本発明者らが、各試料の変動係数（ＣＶ＝ｓｔｄ／平均）を推定したところ、Ｍｂｄ３$^{+/+}$試料中の変動係数は０．５であるが、Ｍｂｄ３^{KD}の変動係数は０．０９に減少し、細胞周期から推定した変動係数（０．０８）と非常に近くなることを見い出した（図５６Ａ～Ｆおよび５７Ａ）。第二に、本発明者らは、動学的確率的モデルを用いて初期化変動性を推定する必要があった。本発明者らはブラウン運動（ＢＭ）モデル（図５７Ｃ）を用いた。その結果、Ｍｂｄ３^{KD}および細胞周期の測定結果は確かに同様の動的変動を示すがＭｂｄ３$^{+/+}$試料の変動性の方が高いことを見いだした（図５７Ｂ、ならびに上述した一般的な材料および実験方法）。Ｍｂｄ３欠損時の律速バリアが減少する根拠をさらに示すため、本発明者らは、ＯＳＫＭ初期化プロセスのダイナミクスを、多工程マルコフ連鎖モデル（相－型（ＰＨ）モデリング）を用いてモデル化した（Ｂｏｌｃｈ，Ｇ．，Ｇｒｅｉｎｅｒ，Ｓ．，ｄｅ　Ｍｅｅｒ，Ｈ．＆　Ｔｒｉｖｅｄｉ，Ｋ．Ｓ．Ｑｕｅｕｅｉｎｇ　ｎｅｔｗｏｒｋｓ　ａｎｄ　Ｍａｒｋｏｖ　ｃｈａｉｎｓ：ｍｏｄｅｌｉｎｇ　ａｎｄ　ｐｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ　ｅｖａｌｕａｔｉｏｎ　ｗｉｔｈ　ｃｏｍｐｕｔｅｒ　ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ．ＷＩＬＥＹ，Ｓｅｃｏｎｄ　Ｅｄｉｔｉｏｎ，２００６）（図５５Ｃ～Ｄ、５８Ａ～Ｄ、５９Ａ～Ｇ）。最後に、いずれの理論にもとらわれずに、本発明者らは、Ｍｂｄ３ＫＤ試料における律速バリアが減少するために初期化変動性が低くなり、その結果、変動性が細胞周期単独で説明できる、と仮定した。この目的のため、本発明者らは、初期化潜伏時間の観察結果を、必要な初期化継続時間をとらえる細胞周期モデルにフィットさせた（上述した一般的な材料および実験方法、データは示さず）（Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４６２，５９５－６０１，２００９；Ｄｕｆｆｙ，Ｋ．Ｒ．ｅｔ　ａｌ．Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ－Ｉｎｄｕｃｅｄ　Ｂ　Ｃｅｌｌ　Ｆａｔｅｓ　Ａｒｅ　Ｓｅｌｅｃｔｅｄ　ｂｙ　Ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ　Ｓｔｏｃｈａｓｔｉｃ　Ｃｏｍｐｅｔｉｔｉｏｎ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　３３５，３３８－３４４，２０１２）。具体的には、本発明者らは、初期化継続時間に従って発生の数を推定し、細胞周期時間分布を初期化潜伏時間の観察結果にフィットさせた。この方法により、本発明者らは、細胞周期モデルはＭｂｄ３^{KD}ダイナミクスとは顕著にフィットするが（R^2＝０．９９９）コントロールＭｂｄ３$^{+/+}$ダイナミクスとは顕著にフィットしない（R^2＝０．７３）ことを見い出した（図５７Ｄ～Ｅ）。これらの結果はいずれも、Ｍｂｄ３欠損時において初期化変動性が減少して動的な挙動が決定的に近くなり、残留変動性は固有の細胞周期変動性に起因し得ることを示す。重要なことには、これらの知見を総合すると、ＯＳＫＭ誘導後にＭｂｄ３欠損細胞において観察された決定的な初期化ダイナミクスをさらに加速または改善できる、かつ／またはＭｂｄ３の発現もしくは活性を操作せずに多能性を決定的に誘導できる別の経路が存在する可能性を除外しない（Ｍａｅｋａｗａ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４７４，２２５－２２９，２０

１１）。さらに、これらの結果から、内在性多能性遺伝子再活性化の測定に基づいて最終的にｉＰＳＣを取得できる決定的な経路が示される。

【実施例４】

【０７１９】

ＯＳＫＭによるＩＰＳＣ初期化をＭＢＤ３が阻害する機構　最近の研究から、多能性因子Ｚｆｐ２８１がＮａｎｏｇプロモーターにＭｂｄ３／ＮｕＲＤを直接補充してその発現を抑制していること（Ｆｉｄａｌｇｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２）、また、Ｚｆｐ５２８１を阻害するとｉＰＳＣ形成効率が少々、すなわち２倍に増加することが示された（Ｆｉｄａｌｇｏ　ｅｔ　ａｌ．，２０１２）。本研究で実施したＭｂｄ３阻害がもたらした効果はＺｆｐ２８１欠損の場合と比較して大幅に顕著であることから、Ｍｂｄ３は多くの他の多能性促進因子と相互に直接影響し合うために多能性調節においてより全般的に作用する可能性があるという仮説を立てた。本発明者らは、２９３ＨＥＫ細胞における過剰発現の後、ＦｌａｇタグＯｃｔ４、Ｋｌｆ４、およびＳｏｘ２とＭｂｄ３とが特異的な免疫共沈降を呈したことを示す（図１１Ａ～Ｄおよび図１１Ｉ～Ｌ）。重要なことは、Ｍｂｄ２は試験した他の多能性因子すべてと直接相互に影響し合ったわけではないということである（図１１Ｅ～Ｈおよび図１１Ｍ～Ｐ）。上記のことは、Ｍｂｄ２およびＭｂｄ３が初期化に別々に影響を及ぼして基底状態多能性に至っていることを示している可能性がある（図１Ａ～Ｂ）。これらの結果を総合すると、ＯＳＫＭによるｉＰＳＣ形成阻害において多能性因子とＭｂｄ３との直接の相互作用が重要な役割を果たしていることが裏付けられる。

【０７２０】

Ｍｂｄ３阻害は、本明細書中で報告する多能性を非常に高効率で進行させる際に重要かつ主要な貢献をしていた。そこで、本発明者らは、ｉＰＳＣ初期化のＭｂｄ３による阻害機構を定義することを目標とした。体細胞中においてＯＳＫＭを外因的に過剰発現させない場合には、Ｍｂｄ３発現を阻害してもｉＰＳＣ形成を十分に誘導できなかった（Ｏｃｔ４発現単独で初期化され得るＮＰＣにおいても）（Ｋｉｍ，Ｊ．Ｂ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４６１，６４９－６５３，２００９）（図３８Ａ）。Ｍｂｄ３による外因性ＯＳＫ発現の置き換えおよびｉＰＳＣの誘発は生じなかった（図３８Ｂ）。外来ｃ－Ｍｙｃの存在が、因子形質導入後における効率１００％でのｉＰＳＣの取得に必須であった（図３８Ｂ）。ＯＳＫＭ発現を伴わない場合、Ｍｂｄ３欠損が単独で真の多能性遺伝子の内因的再活性化を導くことはなかった（図３８Ａ）。さらに、多能性に対するＭｂｄ３阻害効果は、Ｍｂｄ３が内在性Ｎａｎｏｇを直接または間接的に抑制する能力に主に起因する可能性はないであろう［Ｌｕｏ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．ＮｕＲＤ　Ｂｌｏｃｋｓ　ＲｅｐｒｏｇＡｒａｍｍｉｎｇ　ｏｆ　Ｍｏｕｓｅ　Ｓｏｍａｔｉｃ　Ｃｅｌｌｓ　ｉｎｔｏ　Ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ．Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ（２０１３）；Ｆｉｄａｌｇｏ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．Ｚｆｐ２８１　ｍｅｄｉａｔｅｓ　Ｎａｎｏｇ　ａｕｔｏｒｅｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｔｈｒｏｕｇｈ　ｒｅｃｒｕｉｔｍｅｎｔ　ｏｆ　ｔｈｅ　ＮｕＲＤ　ｃｏｍｐｌｅｘ　ａｎｄ　ｉｎｈｉｂｉｔｓ　ｓｏｍａｔｉｃ　ｃｅｌｌ　ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０９，１６２０２－１６２０７（２０１２）］。というのは、異所性のＮａｎｏｇ過剰発現とＯＳＫＭとが組み合わさってｉＰＳＣ形成が少し増強され、プロセスは依然として推計学的な経過をたどったからである（Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４６２，５９５－６０１，２００９）（図３１Ａおよび図８Ｅ）。最近の研究から、多能性因子Ｚｆｐ２８１がＭｂｄ３／ＮｕＲＤを直接補充してＮａｎｏｇプロモーター活性を抑制していること、また、Ｚｆｐ５２８１を阻害するとｉＰＳＣ形成効率が少々、すなわち２倍に増加することが示された（Ｆｉｄａｌｇｏ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０９，１６２０２－１６２０７、２０１２）。そうだとすれば、Ｚｆｐ２８１欠損またはＮａｎｏｇ過剰発現と比較して（Ｆｉｄａｌｇｏ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０９，１６２０２－１６２０７，２０１２）Ｍｂｄ３阻害がもたらした効果は大幅に顕著であることから、Ｍｂｄ３

は、他の重要な多能性促進因子と相互に直接影響し合うことから、初期化調節においてより全般的に作用する可能性があるという仮説を立てた。本発明者らは、ＨＥＫ２９３細胞における外因的過剰発現の後、ＦｌａｇタグＯｃｔ４、Ｋｌｆ４、Ｓｏｘ２、およびｃ－ＭｙｃとＭｂｄ３とが特異的な免疫共沈降を呈すると確立した（図３２Ａ～Ｂ）。逆の実験を実施したところ、ＦｌａｇタグＭｂｄ３はＯｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、およびｃ－Ｍｙｃと特異的に免疫共沈降するがＮａｎｏｇとは特異的に免疫共沈降しないことがわかった（図６０Ａ～Ｂ）。ＯＳＫＭ誘導の３日後、ＭＥＦ細胞中においてＯＳＫＭがＭｂｄ３／ＮｕＲＤ構成要素と特異的に免疫共沈降し、初期化された（図６０Ｃ）。ＦｌａｇタグＭｂｄ３導入遺伝子を発現するＭｂｄ３－／－ＥＳＣにより、Ｍｂｄ３とＳａｌｌ４初期化因子とが直接相互作用することが検証された。Ｓａｌｌ４初期化因子は、初期化プロセスにおける以降の時点で再活性化され、ＯＳＫＭと共に初期化プロセスを完了させることが知られている（図６１Ａ）（Ｂｕｇａｎｉｍ，Ｙ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１５０，１２０９－１２２２，２０１２；Ｍａｎｓｏｕｒ，Ａ．Ａ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４８８，４０９－４１３，２０１２）。これらの相互作用はＭｂｄ３のＭＢＤドメインに介在され、ＭＢＤドメインへの導入が規定の欠失によってＭｂｄ３とＯＳＫＭ初期化因子との免疫共沈降が排除された（図６２Ａ～Ｃ）。以前に多様な体細胞株および癌細胞株においてみられたように（Ｌｅ　Ｇｕｅｚｅｎｎｅｃ，Ｘ．ｅｔ　ａｌ．Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．２６，８４３－８５１，２００６）、Ｍｂｄ２とＭｂｄ３は１つのＮｕＲＤ複合体に共存せず、これを免疫共沈降実験によって確認した（図６１Ａ～Ｃ）。このことによって、基底状態多能性獲得への初期化に及ぼす、Ｍｂｄ２発現を乱すための大きな影響が欠如していることについて、少なくともいくらか説明がつく（図１Ａ～Ｂ、１Ａ、および４４Ａ～Ｂ）。

【０７２１】

Ｍｂｄ３／ＮｕＲＤ複合体とＯＳＫＭについて上記に報告した直接的なタンパク質相互作用と合致していて、ＤＯＸ誘導性野生型ＭＥＦにおけるＭｂｄ３結合を全ゲノムＣｈＩＰ－ｓｅｑ分析によって調べたところ、ＯＳＫＭ誘導後にＭｂｄ３の補充と結合が全般的に増加することがわかった（ＯＳＫＭ誘導後、ＭＥＦ中の結合領域が８６５７個から１１７７個に）。ＤＯＸ誘導後に初めて、Ｋｌｆ４、Ｏｃｔ４、Ｓｏｘ２、およびＥｓｒｒｂのターゲットであるＭｂｄ３結合遺伝子が増え（$p<10^{-22}$）、ＥＳ細胞中においてＨ３Ｋ４ｍｅ３活性クロマチンマークを有する遺伝子も増える（$p<10^{-38}$）（図３２Ｃ～Ｄ）。Ｍｂｄ３結合位置におけるモチーフ探索分析によって、モチーフ３０個を同定し（ｐ＜０．００１）、Ｋｌｆ４、Ｓｏｘ２、およびＯｃｔ４のモチーフは上位６番目までに入っている（$p<10^{-30}$）（図６３）。重要なことには、ＯＳＫＭ誘導より前の体細胞ＭＥＦ中において、Ｍｂｄ３は多能性因子ターゲット遺伝子に局在化していない（図３２Ｃ～Ｄ）。ＮｕＲＤ構成要素Ｃｈｄ４も同様に、ＤＯＸ誘導後に下流のターゲットに補充され、このことから、ＤＯＸ誘導後にＮｕＲＤとＭｂｄ３が補充されることがわかった（図３２Ｃ～Ｄ）。ＯＫＳＭの下流のターゲットにおけるＣｈｄ４の局在化はＭｂｄ３欠損細胞において減少し、初期化を受けるＭｂｄ３$^{+}$／$^{+}$ＭＥＦにおけるそのノックダウンによりｉＰＳＣ形成が有意に増大し（８日目にＯｃｔ４－ＧＦＰ＋細胞が多くて５０％、図６３）、この結果は、主にＮｕＲＤ複合体依存性の作用を介してＭｂｄ３の初期化に対する阻害作用が働くという概念を裏付ける。とりわけ、ｉＰＳＣ初期化増強に対するＣｈｄ４の阻害効果はＭｂｄ３欠損の場合と比較して比較的穏やかであり、これは恐らく、Ｃｈｄ４（Ｍｉ２ｂとしても知られる）が、多能性に及ぼす影響が未だ定義されていない他のタンパク質複合体にもみられるからであろう（例えばＥｐ３００活性化複合体（Ｒｅｙｎｏｌｄｓ，Ｎ．，Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　１４０，５０５－５１２，２０１３））。しかし、いずれの理論にもとらわれずに、本発明者らはＮｕＲＤとは独立したＭｂｄ３のさらなる初期化阻害の可能性を除外できない。

【０７２２】

ＤＯＸ４日後以降のＭｂｄ３ターゲット遺伝子の転写レベルはＭｂｄ３欠損試料においてＤＯＸ後に有意に上方調節された（図３２Ｅ）。この結果は、初期化中にＭｂｄ３／Ｎｕ

ＲＤ複合体が多能性遺伝子ネットワークのリプレッサーとして主に作用することと矛盾しない。Ｍｂｄ３の直接的なターゲットのクロマチンは、Ｍｂｄ３欠損試料中において初期化中の活性が有意に高くオープンであり、例えば、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３およびＨ３Ｋ２７ａｃのレベルが統計的有意に高く、Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３の抑圧的なクロマチンマークが減少していた（図３２Ｆ）。さらに、Ｍｂｄ３を欠損させると、ＤＯＸ４日後に、Ｍｂｄ３ターゲットへの外来Ｏｃｔ４の結合が増大した（ｐ＜１０$^{-16}$、図３２Ｆ）。ｉＰＳＣ形成中に再活性化されることが知られる既知のＯＳＫＭターゲット遺伝子が、４日目にＭｂｄ３欠損細胞において、コントロールＭｂｄ３$^{+/+}$細胞の場合と比較して有意に上方調節されたことから、オープンクロマチンコンフォメーションが保持されていることがわかった（図６５Ａ～Ｅ）。これと類似する遺伝子発現およびクロマチンパターンが、Ｍｂｄ３と初期化因子（ＯＳＫＭ）の共通のターゲットにおいても観察された（図６６Ａ～Ｊ）。ＯＳＫＭ初期化因子と相互に直接影響し合うことのできないＭｂｄ３変異体は、Ｍｂｄ３$^{flox/-}$体細胞の初期化効率を十分に低減できない。このことから、ｉＰＳＣ形成の阻害には、ＯＳＫＭとＭｂｄ３との間の直接的な相互作用が重要であるという概念が裏付けられる（図３２Ｇ）。重要なことに、本発明者らは、Ｍｂｄ３$^{+/+}$およびＭｂｄ３$^{flox/-}$細胞からｉＰＳＣを得るには、導入遺伝子（ＤＯＸ）を最短５日間は外因的に誘導する必要もあること（図６７Ａ～Ｄ）、また、ＯＳＫとの相互作用により初期化と多能性獲得を推進する因子（ＵｔｘおよびＷｄｒ５等）の発現も、Ｍｂｄ３欠損細胞におけるｉＰＳＣ形成にとって必須であることに注目した（図６７Ｂ～Ｄ）。これらの結果を総合すると、多能性促進遺伝子ネットワークを抑制解除する複数のエピジェネティック複合体と（例えば、Ｗｄｒ５またはＵｔｘを含有する複合体）、外来ＯＳＫＭとが相互に影響し合い（Ａｎｇ，Ｙ．－Ｓ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１４５，１８３－１９７，２０１１；Ｍａｎｓｏｕｒ，Ａ．Ａ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４８８，４０９－４１３，２０１２）、これらがさらにＭｂｄ３／ＮｕＲＤリプレッサー複合体と直接会合する、というパラダイムが確立される。そして結果として、Ｍｂｄ３／ＮｕＲＤが、初期化プロセスの推進に必要な下流のＯＳＫＭターゲット遺伝子に直接補充され、ＯＳＫＭターゲット遺伝子の強い再活性化を有効に打ち消す（Ｈａｎ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４６３，１０９６－１１００，２０１０；Ｄｏｅｇｅ，Ｃ．Ａ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４８８，６５２－６５５，２０１２；Ｃｈｉａ，Ｎ．－Ｙ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４６８，３１６－３２０，２０１０）。Ｍｂｄ３阻害効果がない場合、多能性を促進するエピジェネティック調節因子とＯＳＫＭとの相互作用が機能的に勝り、そのため、直接的な初期化と多能性獲得が邪魔されずに進行する。

【０７２３】

分析および考察　Ｍｂｄ３と、基底状態ナイーブ型多能性への決定的な初期化　この節で、本発明者らは、ＥｐｉＳＣ、ＰＧＣ、および体細胞のエピジェネティックな逆戻りによる基底状態多能性獲得を規定のシグナリングおよび転写インプットによって妨げる、大きな障害であるＭｂｄ３／ＮｕＲＤリプレッサー複合体について、詳細を明らかにする。この複合体は、多細胞生物が出現してから進化的に保存されており、基底状態多能性の確立において協同する多様な多能性因子が有する初期化能力を抑制する。多能性が確立された後はＭｂｄ３の抑制は許容されるが、多能性状態となる前にはＭｂｄ３の阻害作用が著しく律速となり、そのため、細胞の大半は多能性状態を獲得できない。これらの知見を総合すると、直接的な初期化による多能性獲得は推計学的である必要はなく、ＯＳＫＭやこれまでに適用した他の初期化方法は還元主義に基づくことがわかる。多能性を決定的に誘導できる、かつ／またはＯＳＫＭ誘導後のＭｂｄ３欠損細胞にて観察された決定的初期化ダイナミクスをより加速できる別の経路があるか否かを調べることは、興味深いであろう。前着床および生殖系初期化の過程においてｉｎ　ｖｉｖｏでＭｂｄ３が中和されるか、またどのように中和されるか、を調べることも、注目に値するであろう。

【０７２４】

体細胞をｉＰＳＣに直接初期化できる可能性がある。このことは、エピジェネティックな初期化のダイナミクスの詳細な理解に向けての学術的関心、また、ｉＰＳＣ形成過程全体

を通して転写因子とクロマチンリモデリング因子の間に生じる時間的な調節の正確な定義に向けての学術的関心が盛り上がった。この技術分野は大きく進歩したが、クロマチン調節の異なる段階における分子機構、ダイナミクス、および相互依存関係について、また、これらが種々の多能性状態をどのように導くのかについて、
本発明者らの理解は未だ非常に限られている。後者の理解が限られている直接の理由は、現在までに考案された初期化方法が非効率的で偶然的であるため、また、正確かつ迅速にｉＰＳＣに初期化される希少な細胞を予測して単離するのが困難であるためである。途中段階の細胞についての研究から、多能性初期化の機構に関して重要な洞察が得られたが、こうした細胞は分子の不均一性が高く、多能性獲得まで偶然性を保つ。本明細書中で報告する初期化計画は決定的に近いため、真性の分子事象の分析が可能となり、ｉＰＳＣ獲得パターンがより同調的、より非跳躍的となった。こうしたことは、未知の初期化機構を分子レベルで理解するために重要である。

【０７２５】

ＯＳＫＭによる直接的な初期化の経路は推計学的かつ非同調的であるが（Ｈａｎｎａ，Ｊ．Ｈ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ，１４３，５０８－５２５，２０１０）、本発明者らは、初期化アプローチを改変すれば、この経路をうまく扱って非常に高効率かつ決定的とできることを示す。本発明者らは、正常な前着床発達においてもともと欠損している（図１Ｏ～Ｔ）Ｍｂｄ３／ＮｕＲＤリプレッサー複合体が、ＥｐｉＳＣ、ＰＧＣ、および体細胞のエピジェネティックな逆戻りによる基底状態多能性獲得を規定のシグナリングおよび転写インプットによって妨げる、大きな障害の役割を有すると強調する。多様な重要な初期化因子が相互に直接影響し合い、Ｍｂｄ３／ＮｕＲＤ複合体を補充し、これによって、高い効力を有しプロセス全体を通して多能性遺伝子の再活性化を抑制する陰性調節複合体を形成する。この阻害経路を緩和することによって、ｉＰＳＣへの直接的かつ同調的な変換が、規定の転写およびシグナリングインプットによって促進される（図３２Ｈ）。Ｍｂｄ３の抑制なく直接初期化すると、初期化した細胞の質が改善されるか、そしてｉＰＳＣの初期化が異常を来たす頻度が下がるか、と探究することは注目に値するであろう（Ｚｗａｋａ，Ｔ．Ｐ．Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ：Ｔｒｏｕｂｌｅｓｏｍｅ　ｍｅｍまたはｉｅｓ．Ｎａｔｕｒｅ．２０１０，４６７：２８０－１）。最後に、現在までに考案された初期化方法が非効率的で偶然的であるため、また、正確かつ迅速にｉＰＳＣに初期化される希少な細胞を予測して単離するのが困難であるために、ｉＰＳＣ形成過程全体を通して転写因子とクロマチンリモデリング因子の間に生じる時間的な調節の特徴を十分に調べることができなかった（Ｂｕｇａｎｉｍ，Ｙ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１５０，１２０９－１２２２，２０１２）。途中段階の細胞についての研究から（Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４６２，５９５－６０１，２００９）、多能性初期化の機構に関して重要な洞察が得られたが、こうした細胞は分子の不均一性が高く、多能性獲得まで偶然性を保つ（Ｐｏｌｏ，Ｊ．Ｍ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１５１，１６１７－１６３２，２０１２）。本明細書中で報告する初期化計画は決定的であるため、真性の分子事象の分析が可能となり、ｉＰＳＣ獲得パターンがより同調的かつ非跳躍的である。こうしたことは、未知の初期化機構を生化学的かつ機能的に理解するために重要である。

【実施例５】

【０７２６】

導入遺伝子非依存型でかつ無期的に安定であるヒトナイーブ型多能性細胞を誘導するための、化学組成が限定された増殖条件　以前はＥＳＣ誘導「非許容的」と考えられていた非肥満体糖尿病（ＮＯＤ）マウス系統およびラットから（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２００９ａ）、阻害的分化のきっかけを緩和するかつ／またはナイーブ型多能性の中心的転写回路の安定化に重要なシグナリング経路を増大させる小分子または増殖因子を添加することによって、ナイーブ型多能性幹細胞を、最近になって単離できた（Ｈａｎｎａ　ｅｔ　ａｌ．，２０１０ｂ）。

【０７２７】

ヒトナイーブ型多能性増殖条件の決定　ＥＲＫ１／２シグナリング非依存型のヒトナイ

ーブ型多能性細胞を増やす条件を決定するため、本発明者らは、まず、以前に記載され、初期化因子ＯＣＴ４（配列番号５４のタンパク質）、ＳＯＸ２（配列番号５６のタンパク質）、およびＫＬＦ４（配列番号５８のタンパク質）をコードするドキシサイクリン（ＤＯＸ）誘導性レンチウイルス導入遺伝子を有する「二次的」ヒト女性Ｃ１．２　ｉＰＳＣ株と［Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７，２０１０；Ｃｈｉａ，Ｎ．－Ｙ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４６８，３１６－３２０（２０１０）；Ｌｅｎｇｎｅｒ，Ｃ．Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１４１，８７２－８８３（２０１０）；Ｔｏｍｏｄａ，Ｋ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　１１，９１－９９（２０１２）；Ｂｅｒｎｓｔｅｉｎ，Ｂ．Ｅ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１２５，３１５－３２６（２００６）；Ｇｕｅｎｔｈｅｒ，Ｍ．Ｇ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　７，２４９－２５７（２０１０）］、リバーステトラサイクリントランス作用因子（ＦＵＷ－Ｍ２ｒｔＴＡ）をコードし構造的活性を有するレンチウイルスと、を利用した（図１２Ａ～Ｃ）。このクローンを、ＯＣＴ４－ＧＦＰ－２Ａ－ＰＵＲＯノックインレポーターコンストラクトでターゲティングし［Ｔａｋａｈａｓｈｉ，Ｋ．＆Ｙａｍａｎａｋａ，Ｓ．Ｃｅｌｌ　１２６，６６３－６７６（２００６）；Ｈｏｃｋｅｍｅｙｅｒ，Ｄ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　２９，７３１－７３４（２０１１）］、その多能性維持を追跡した（図１２Ａ～Ｃ）。以前に確立された［Ｎｉｃｈｏｌｓ，Ｊ．＆Ｓｍｉｔｈ，Ａ．Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　４，４８７－４９２（２００９）；Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７，２０１０］、ＤＯＸ添加による初期化因子導入遺伝子の外因的発現によって、ｍＥＳＣと形態が類似する細胞を維持でき、この際、２ｉ／ＬＩＦ条件下においてＯＣＴ４－ＧＦＰ＋細胞画分を約６０％保持できる（図１２Ｄ）。とりわけ、ＳＯＸ１神経マーカーの発現が高く、このことから、以前に記載された、ｍＥＳＣと形態が類似する細胞は、２ｉ／ＬＩＦ＋ＤＯＸにおいて異常に安定化されていて分化傾向を保持していることがわかる（図７２Ａ）。ＤＯＸ依存性のＣ１．２　ｈｉＰＳＣ株を用いて、ＤＯＸを中止した際に２ｉ／ＬＩＦにおいてＣ１．２　ｈｉＰＳＣを無期的に安定化しかつ（細胞の１００％近くに）ＯＣＴ４－ＧＦＰを均一に発現させ得るさらなる化合物および／または増殖因子をスクリーニングした［Ｙｉｎｇ，Ｑ．－Ｌ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４５３，５１９－５２３（２００８）；Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７，２０１０；Ｔｉｗａｒｉ，ＶＫ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔ　Ｇｅｎｅｔ　２０１１，４４（１）：９４－１００；Ｄｅ　Ｌｏｓ　Ａｎｇｅｌｅｓ　Ａ．，ｅｔ　ａｌ．Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｇｅｎｅｔ．Ｄｅｖ．２２，２７２－２８２（２０１２）；Ｌｉ，Ｗ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　４，１６－１９（２００９）］（図１２Ａ～Ｃ）。

【０７２８】

２ｉ／ＬＩＦ単独条件下においてＣ１．２細胞が迅速に分化する間、１６個の因子を含む条件（１６Ｆ、サブグループとしてプール１およびプール２に分けた）の総合的な作用によって分化傾向が弱まり、ＤＯＸ中止後１４日目に測定したところ、ＯＣＴ４－ＧＦＰ＋細胞のうち３２％が保持されていた（図１２Ｄ）。この結果から、１６Ｆ組み合わせに含まれる因子は２ｉ／ＬＩＦ条件下においてヒト多能性維持を協同的に促進することがわかる。プール２の要素を除去すると（図１２Ｄ）、ＯＣＴ４－ＧＦＰ＋細胞画分が１６Ｆ組み合わせに対して有意に増加した。この結果から、プール２に含まれる因子はＧＦＰ＋細胞の維持に負の影響を及ぼすことが示唆される（図１２Ｄ）。いずれの理論にもとらわれずに、本発明者らは、ＦＧＦ経路およびＴＧＦβ経路の阻害が２ｉ／ＬＩＦ条件下におけるヒト多能性細胞の増殖にとって好ましくない、と仮定した。進化上、ＦＧＦ２およびＴＧＦβは、ｈＥＳＣにおいてＫＬＦ４およびＮＡＮＯＧの発現を誘導することによってヒトにおける多能性の促進に対して多様な作用を有する［Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７，２０１０；Ｄｅ　Ｌｏｓ　Ａｎｇｅｌｅｓ，Ａ．，ｅｔ　ａｌ．Ｄｅｖ．２２，２７２－２８

２（２０１２）；Ｌｉ，Ｗ．ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ４，１６－１９（２００９）；Ｐｒｉｂｌｕｄａ，Ａ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ３０，２４７－２４９（２０１２）；Ｎｉｃｈｏｌｓ，Ｊ．＆ Ｓｍｉｔｈ，Ａ．Ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ ｉｎ ｔｈｅ ｅｍｂｒｙｏ ａｎｄ ｉｎ ｃｕｌｔｕｒｅ．Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂ Ｐｅｒｓｐｅｃｔ Ｂｉｏｌ ４，ａ００８１２８（２０１２）；Ｒｏｏｄｅ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．３６１，３５８－３６３（２０１２）；Ｒａｄ，Ｒ．，ｅｔ ａｌ．，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ Ｕ Ｓ Ａ．２０１１，１０８（４５）：１８２８３－８；Ｘｕ，Ｙ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，８１２９－８１３４（２０１０）；Ｂｕｅｃｋｅｒ，Ｃ．ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ６，５３５－５４６（２０１０）］。しかしｍＥｐｉＳＣにおいては、ＦＧＦ２およびＴＧＦβはその作用を有さずに反対の役割を果たしており、ネズミ多能性のプライミングを促進する。さらに、発生中のヒト胚盤胞をＦＧＦ受容体阻害に供してもＩＣＭ分化は妨げられなかった。この結果はさらに、ヒトにおける多能性に対して及ぼす影響という点でＦＧＦシグナリングが多様な役割を有することを示唆する（Ｒｏｏｄｅ，Ｍ．ｅｔ ａｌ．Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．３６１，３５８－３６３（２０１２）；Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７，２０１０）。確かに、ＴＧＦβおよびＦＧＦ受容体阻害剤を両方とも除去すると、ＤＯＸおよびプール２の要素を除去した際に得られる表現型が同様に得られる（図１２Ｄ）。この結果から、２ｉ／ＬＩＦを含む条件下におけるＧＦＰ＋細胞の維持を促進するためにプール２の要素は必要でないことがさらに示唆される。また、外来ＦＧＦ２およびＴＧＦβサイトカインをプール１の要素に添加すると、２ｉ／ＬＩＦを含む条件下において、ＤＯＸ非依存型細胞のうち９５％を超える細胞が均一にＯＣＴ４－ＧＦＰとなった（図１２Ｄ）。次いで、本発明者らは、プール１の要素のうちいずれがＯＣＴ４－ＧＦＰ＋ ＤＯＸ非依存型のＣ１．２ ｈｉＰＳＣの維持に必須であるかを調べた。その結果、外来導入遺伝子非依存型のＧＦＰ＋Ｃ１．２クローンをフィーダー非添加ゼラチン／ビトロネクチン被覆プレート上で維持するためには、２ｉ／ＬＩＦ、ｐ３８ｉ、ＪＮＫｉ、ならびにサイトカインＦＧＦ２およびＴＧＦβ１を添加することが必須であることを見いだした（図１２Ｓ）。二次的に最適化を実施して、Ｒｈｏ結合コイルドコイルキナーゼ（ＲＯＣＫ）（Ｗａｔａｎａｂｅ，Ｋ．ｅｔ ａｌ．Ａ ＲＯＣＫ ｉｎｈｉｂｉｔｏｒ ｐｅｒｍｉｔｓ ｓｕｒｖｉｖａｌ ｏｆ ｄｉｓｓｏｃｉａｔｅｄ ｈｕｍａｎ ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ２５，６８１－６８６（２００７））およびプロテインキナーゼＣ（ＰＫＣ）（Ｒａｊｅｎｄｒａｎ，Ｇ．ｅｔ ａｌ．Ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎ ｋｉｎａｓｅ Ｃ ｓｉｇｎａｌｉｎｇ ｍａｉｎｔａｉｎｓ ｒａｔ ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ．Ｊｏｕｒｎａｌ ｏｆ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ２８８，２４３５１－２４３６２（２０１３））の阻害剤を任意の細胞生存性増強因子として同定した。その結果、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ（Ｗｅｉｚｍａｎｎ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ｓｃｉｅｎｃｅ－Ｎａｉｖｅ Ｈｕｍａｎ Ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ Ｍｅｄｉｕｍ）とよばれる、化学組成が限定された条件を最適化した（図１２Ｕ）。こうして最適化した、「ＷＩＳ－ＮＨＳＭ」とよばれる化学組成が限定された条件（図１２Ｇ、１２Ｔ、７２Ｂ、７２Ｃ、および７２Ｄ）によって、正常な核型を有するＧＦＰ＋Ｃ１．２ ｈｉＰＳＣを５０回を超えて継代して増やすことができた（図１２Ｊ～Ｋ、１２Ｖ）。注目すべきことに、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地中で増殖させたヒト多能性細胞は、ネズミナイーブ型細胞と類似する半球状のコロニーを形成する。このため、本発明者らは、こうして選択した細胞をナイーブ型ヒトｉＰＳＣおよびＥＳＣと称し、この主張に基づいて、分子レベルでの根拠を以下に体系的に実証する。

【実施例６】

【０７２９】

基底状態ナイーブ型ヒトＥＳＣの誘導　新しいヒト胚由来ナイーブ型ＥＳＣ　次に、本発明者らは、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件によってヒト胚盤胞のＩＣＭから新しいｈＥＳＣ株を誘導できるか否かを調べた［Ｌｅｎｇｎｅｒ，Ｃ．Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１４１，８７２－８８３（２０１０）；Ｒｏｏｄｅ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．３６１，３５８－３６３（２０１２）］。２ｉ／ＬＩＦ／ＦＧＦ２条件下において外植した胚盤胞からは細胞系の誘導はなかったが（効率０％、ｎ＝８２）、マウス胚線維芽細胞（ＭＥＦ）被覆プレート上、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地中に蒔いたヒト胚盤胞は、播いて６～８日間と短い期間で半球形の細胞を増殖させることができた（図１３Ｎ～Ｏ）。次いで、本発明者らは、ＩＣＭ由来の増殖物をトリプシン処理して継代し、ナイーブ型条件下、ＬＩＳ１、ＬＩＳ２、ＷＩＳ１、およびＷＩＳ２　ｈＥＳＣとよばれる４つの幹細胞株を効率３６％（胚はｎ＝１１）で新たに誘導し、その特徴を調べることができた（図１３Ｎ～Ｏ、１４Ａ～Ｂ）。以前に発表された従来型／プライム型条件下［Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　４，５１３－５２４（２００９）；Ｎｉｃｈｏｌｓ，Ｊ．＆Ｓｍｉｔｈ，Ａ．Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　４，４８７－４９２（２００９）；Ｂｅｎ－Ｙｏｓｅｆ，Ｄ．ｅｔ　ａｌ．Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　および　Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ　２１，３６３－３７２（２０１２）］において、この効率は９．５％であった。また、既に確立された従来型ｈＥＳＣ株をＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において増殖させた場合についても、評価を実施した。複数のプライム型／従来型ｈＥＳＣ株（Ｈ１、Ｈ９、ＢＧＯ１、ＷＩＢＲ１、ＷＩＢＲ３）およびｈｉＰＳＣ株（Ｃ１およびＣ２）を、ゼラチン／ビトロネクチン被覆シャーレ上、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地中に蒔いた（図１３Ａ～Ｅ）。このプロトコールを適用して４～８日後、ｍＥＳＣに特有の凝縮された円形の細胞形態を有する半球形のコロニーを難なく単離でき、さらに増やすことができた（図１３Ａ～Ｅおよび６８Ａ～Ｂ）。ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において、ＤＯＸ誘導性ＯＫＳＭ因子を有するレンチウイルスを用いた形質導入により、またはＯＳＫＭおよびＬｉｎ２８　ｍＲＮＡの一過性トランスフェクションにより、ヒトＢＪ線維芽細胞を初期化してｈｉＰＳＣとした（図１３Ｖ～Ｗ）。ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地中で初期化因子を形質導入して１０日後に半球形のｉＰＳＣコロニーが現れ（図１３Ｖ）、これを続いて選択に供し、トリプシン処理し、増やして、さらに追跡して特徴を決定した（図１４Ａ～Ｄ）。ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において増やしたポリクローナルおよびサブクローンのｈＥＳＣおよびｉＰＳＣ株はすべて、多能性マーカーに対して一様に陽性であり（代表的な画像は図６８Ａ～Ｂ、１５Ｎ～Ｏ、１８Ａ～Ｆ、１６Ａ～Ｈ、および７３Ａ～Ｆ）、培養するとｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて十分に分化して胚様体となり（図１９Ａ～Ｉおよび１９Ｊ～Ｏ）、ｉｎ　ｖｉｖｏにおいて成熟テラトーマを形成した（図６８Ｃ～Ｈ、２０Ａ～Ｌ、および２０Ｍ～Ｔ）。

【０７３０】

ナイーブ型のｈＥＳＣ株およびｈｉＰＳＣ株を、フィーダー非依存型またはウシ胎児血清非依存型の限定増殖条件下、ビトロネクチン／ゼラチン被覆プレート上で増やし、トリプシン処理後に継代して単一細胞とした。ヒトナイーブ型多能性株は、長期間継代しても正常な核型を維持した（図１５Ｈ～Ｍ）。ＷＩＳ－ＮＨＳＭにおけるナイーブ型ｈＥＳＣの２倍増加時間は平均して有意に減少し、プライム型ｈＥＳＣでは２６時間だったものがナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣでは１４時間となった（図７４Ａ）。ヒトナイーブ型ｉＰＳＣ／ＥＳＣは、トリプシン処理および選別後の単一細胞クローニング効率が３５％であるが（ＲＯＣＫ阻害剤は用いず）、遺伝的に一致する従来のプライム型ｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣは単一細胞クローニング後は生存しなかった（図７４Ｂ）（Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７，２０１０）。ＲＯＣＫ阻害剤の存在下では、ナイーブ型ｈＰＳＣの単一細胞クローニング効率が最大８８％と高かったが、プライム型細胞の単一細胞クローニングは２２％までしか増加しなかった（図７４Ｂ）。ただし、ヒトナイーブ型ＰＳＣにおいて単一細胞クローニング効率が相対的に減少したのは、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件により限定されたためではなく、齧歯類の場合とは異なってヒトでは、上流の未成熟ポリアデニル化シグナル

とその生成物である切断型非翻訳領域転写物が存在するためにマウスナイーブ型多能性特異的タンパク質ＥＲＡＳが発現されないことによる［Ｋａｍｅｄａ，Ｔ．＆Ｔｈｏｍｓｏｎ，Ｊ．Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ２３，１５３５－１５４０（２００５）］。注目すべきことに、ナイーブ型Ｅｒａｓ－／ＹｍＥＳＣにおいて、ＲＯＣＫ阻害剤を用いない単一細胞プレーティングレベルが、、ナイーブ型ｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣの場合と同様に約４５％であった（図７４Ｃ）。ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣ条件下において遺伝子組換えによりＥＲＡＳを再構成すると、単一細胞クローニング効率をｍＥＳＣの場合と同等とすることができた（図７４Ｃ）。本発明者らはまた、Ｅｒａｓ欠損下のｍＥＳＣ誘導効率が２ｉ／ＬＩＦ下の野生型（ＷＴ）胚のｍＥＳＣ誘導効率より低いことにも注目する（図７４Ｄ）。これらの結果を総合し、特にこれら二種の間で機能的ＥＲＡＳ遺伝子について違いがあることを考慮すると、ナイーブ型ｈＥＳＣの増殖特性はプライム型ｈＥＳＣの増殖特性とは異なり、ｍＥＳＣの増殖特性と同等であることがわかる。

【０７３１】

本明細書中に記載のナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣはｉｎ ｖｉｔｒｏにおいて安定的に多能性を保つ いずれの細胞系も、多能性マーカーＯｃｔ４、Ｓｏｘ２、Ｎａｎｏｇ、ＳＳＥＡ３、ＳＳＥＡ４、ＴＲＡ１－６０、およびＴＲＡ１－８１の一様な陽性染色を示した（代表的な画像は、図１３Ｆ～Ｈ、図１６Ａ～Ｈ、図１７Ａ～Ｈ、および図１８Ａ～Ｆ）。ｉｎ ｖｉｔｒｏにおけるナイーブ型ｈｉＰＳＣおよびｈＥＳＣの分化能力を調べるため、本発明者らは、浮遊培養によって胚型体（ＥＢ）を形成させた。浮遊培養して６日後、試験した細胞系すべてが球形構造を難なく形成した（図１９Ａ～Ｆ）。

【０７３２】

本明細書中に記載のナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣはｉｎ ｖｉｖｏにおいて安定的に多能性を保つ ｉｎ ｖｉｖｏにおける多能性を試験するため、本発明者らはナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣを免疫不全（ＳＣＩＤ）マウスの皮下に移植し、注入３～５週間後にテラトーマを抽出して組織学的検査に供したところ、この腫瘍は消化管様上皮組織（内胚葉）、横紋筋（中胚葉）、軟骨（中胚葉）、神経組織（外胚葉）等の種々の組織を含んでいた（図２０Ａ～Ｕ）。

【０７３３】

これらの結果を総合すると、以前に単離されたプライム型ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣから確立したナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣ株は多能性ＥＳＣおよびｉＰＳＣの機能的特性および発生能力を有することがわかる。

【０７３４】

ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地を用いてヒト内部細胞塊（ＩＣＭ）からナイーブ型ＰＳＣを発生させ得る 本発明者らは、ヒトＩＣＭ由来細胞（Ｌｅｎｇｎｅｒ ｅｔ ａｌ．，２０１０）をＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において増やせるか否かを調べた。ヒト胚盤胞をＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地中のマウス胚線維芽（ＭＥＦ）細胞に蒔いた（図１３Ｎ～Ｏ）。８日目に増殖が明らかとなり、トリプシン処理して継代した。多能性細胞株を確立し、ＷＩＳ１ ｈＥＳＣ株と称した（図１３Ｏ）。この株は、正常な核型である４６ＸＸを呈し、試験したすべての多能性マーカーについて陽性染色を示し、ｉｎ ｖｉｖｏにおいて分化してテラトーマとなった（図１３Ｐ～Ｕ）。この結果から、ヒト胚からヒトＥＳＣ系を直接誘導する過程をＷＩＳ－ＮＨＳＭが補助することがわかる。

【実施例７】

【０７３５】

ヒトナイーブ型多能性のエピジェネティックな特色 次に、本発明者らは、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において確立したナイーブ型ｈｉＰＳＣと遺伝子非改変型ｈＥＳＣのエピジェネティックな特色を調べた。Ｏｃｔ４遺伝子の遠位エンハンサー（ＤＥ）および近位エンハンサー（ＰＥ）領域は進化の過程で保存され、着床前および着床後のマウス胚において相互に調節を受ける。そのため、ナイーブ型ｍＥＳＣにおいて主に利用されるのはＯｃｔ４の遠位エンハンサーであり（Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７，２０１０）、プライム型ｍ

ＥｐｉＳＣにおいて優先的に活性を有するのは近位エンハンサーエレメントである。プライム型およびナイーブ型のｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣを、ＯＣＴ４遺伝子の発現を制御する遠位または近位いずれかのヒトエンハンサー配列の制御下、ルシフェラーゼレポーターコンストラクトでトランスフェクションした（図２５Ａ）。以前の報告と合致して、プライム型ｈＥＳＣにおいて近位ＯＣＴ４エンハンサーエレメントが優先的に活性化された。これと同様の結果が、ｍＥｐｉＳＣにおいても典型的にみられる［Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７，２０１０；Ｃｈｉａ，Ｎ．－Ｙ．ｅｔ ａｌ．Ａ ｇｅｎｏｍｅ－ｗｉｄｅ ＲＮＡｉ ｓｃｒｅｅｎ ｒｅｖｅａｌｓ ｄｅｔｅｒｍｉｎａｎｔｓ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌ ｉｄｅｎｔｉｔｙ．Ｎａｔｕｒｅ ４６８，３１６－３２０（２０１０）］。注目すべきことに、検出結果によれば、ナイーブ型ｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣにおいてＯＣＴ４遠位エンハンサーが主に利用されていた。この結果から、ｍＥＳＣにおける典型的な観察結果と同様、ナイーブ型ｈＥＳＣにおいて活性を有する遺伝子発現プログラムが遠位Ｏｃｔ４エンハンサーの利用にとって有利であることがわかる（図２５Ａ）。この知見をさらに実証するため、操作型ＢＡＣレポーターコンストラクトである全長ＯＣＴ４－ＧＦＰ－２Ａ－ＰＵＲＯ、ΔＰＥ－ＯＣＴ４－ＧＦＰ－２Ａ－ＰＵＲＯ、またはΔＤＥ－ＯＣＴ４－ＧＦＰ－２Ａ－ＰＵＲＯで、ＷＩＢＲ３ ｈＥＳＣを安定的にトランスフェクションした（図７５Ａ）。野生型ＯＣＴ４－ＧＦＰレポーターは、ナイーブ型条件およびプライム型条件のいずれにおいても特異的に活性を示したが、分化すると検出されなくなった（図２５Ａ）。ΔＰＥ－ＯＣＴ４－ＧＦＰレポーターはナイーブ型増殖条件下で主に活性を示したが、ΔＤＥ－ＯＣＴ４－ＧＦＰレポーターはプライム型多能性細胞において活性をより強かった（図２５Ａおよび図７５Ａ～Ｉ）。これらの知見を総合すると、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において得たｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣは、従来型／プライム型のｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣとは異なる機構でＯＣＴ４発現をエピジェネティックに調節することがわかる。

【０７３６】

前Ｘ不活性化状態を維持できるヒトプライム型ＰＳＣ株は少ないため［Ｍｅｋｈｏｕｂａｄ，Ｓ．ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ １０，５９５－６０９（２０１２）；Ｐａｐｐ，Ｂ．＆Ｐｌａｔｈ，Ｋ．Ｃｅｌｌ １５２，１３２４－１３４３（２０１３）］、Ｘ染色体のエピジェネティックなステータスを、ナイーブ型状態とプライム状態とを明確に区別するための唯一のマーカーとして信頼し得ないであろう。しかし、本発明者らは、複数のナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣ株におけるＸ不活性化状態の頻度および特性を分析することを目標にした。

【０７３７】

後期段階胚盤胞のヒト女性ＩＣＭ（内部細胞塊）細胞は、固有の前Ｘ不活性化状態を呈するが、ＸＩＳＴ遺伝子の転写は弱く（男性胚においても）、両Ｘ染色体が前Ｘ不活性化状態を呈し、分化するまでＨ３Ｋ２７ｍｅ３およびＸＩＳＴ染色体被覆を示さない［Ｏｋａｍｏｔｏ，Ｉ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ．２０１１；４７２（７３４３）：３７０－４］。

【０７３８】

本発明者らは、ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣにおけるＸ染色体不活性化状態の特徴を調べた。プライム型／従来型ＷＩＢＲ３ ｈＥＳＣはＸ不活性化を呈する。このことは、ＸＩＳＴ遺伝子のメチル化が～５０％であってＸＩＳＴ転写物の転写が非常に高く、Ｘ染色体不活性化の開始と一致することからわかる（図２３Ａ～Ｄ）。注目すべきことに、ナイーブ型ｈＥＳＣおよびＩＰＳＣのクローンはいずれもＷＩＳ－ＮＨＳＭ下で増え、試験したところ固有の前Ｘ不活性化ステータスを示した。この結果は、ヒトＩＣＭについて記載された前Ｘ不活性化ステータスと類似していた。Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３／ポリコーム集積はは、細胞中のＸ染色体対立遺伝子上にほとんど存在せず（図２３Ｃ）、ＥＢ分化の際に上方調節された（図２３Ｄ）。

【０７３９】

従来型ｂＦＧＦ／ＴＧＦβ単独条件下ｉｎ ｖｉｔｒｏでの誘導におけるプライム型雌ｈＥＳＣ株のＸ染色体ダイナミクスを詳細に監視したところ、この細胞は、ｉｎ ｖｉｔｒｏ適応プロセスの一部としてＸ染色体不活性化を受ける傾向を大いに示した［Ｌｅｎｇｎｅｒ，Ｃ．Ｊ．ｅｔ ａｌ．Ｃｅｌｌ １４１，８７２－８８３（２０１０）；Ｐａｐｐ，Ｂ．＆ Ｐｌａｔｈ，Ｋ．Ｃｅｌｌ １５２，１３２４－１３４３（２０１３）；Ｏ’Ｌｅａｒｙ，Ｔ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ ３０，２７８－２８２（２０１２）］。確かに、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ下で得たナイーブ型多能性細胞は、核内Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３集積がほとんどなくＸＩＳＴ発現が下方調節されたことから明らかなように、前不活性化Ｘ染色体を一様に維持している（図６８Ｉ～Ｋおよび図７６Ａ～Ｂ）。プライム型／従来型のｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣの場合は、核内Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３の集積、ＸＩＳＴ遺伝子対立遺伝子の１つのメチル化、およびＸ染色体不活性化の開始と一致してＸＩＳＴ転写物の転写が非常に高いことから明らかなように、プライム型／従来型のｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣの大部分がＸ不活性化を呈する（図６８Ｉ～Ｋおよび７６Ａ～Ｂ）。女性および男性のナイーブ型およびプライム型ヒト多能性細胞において、クロマチン免疫沈降によるＨ３Ｋ９ｍｅ３の全ゲノムマッピングとこれに続いてディープシーケンシング（ＣｈＩＰ－Ｓｅｑ）を実施したところ、上記結果と合致して、女性細胞株中、常染色体１以外のＸ染色体上にＨ３Ｋ９ｍｅ３マークの有意な増加がみられ（ｐ＜２．１$^{-10}$）、こうした増加は女性プライム型多能性細胞でのみみられた（図７６Ｃ）。重要なことには、ヒトＩＣＭ細胞での観察結果が示すように、ヒトナイーブ型多能性状態におけるＸＩＳＴ転写レベルは低く、同様の結果が男性細胞株中でも得られた（図７６Ｂ）。ＸＩＳＴプロモーター対立遺伝子は、男性および女性のナイーブ型ＥＳＣにおいて完全に脱メチル化されている（図２３Ａ）。女性ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣについて、ＥＢへの分化に際してＸ染色体対立遺伝子の１つの不活性化が明らかとなり、細胞中にＨ３Ｋ２７ｍｅ３のクラウドがみられ、ＸＩＳＴ転写が上方調節され、同時にＸＩＳＴプロモーター領域の１つがメチル化される（図６８Ｉ～Ｋ、図７６Ｂ、および図２３Ａ）。これらの結果を総合すると、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ下で増やしたｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣは、ヒトおよび霊長類ＩＣＭについての記載と類似して、固有の前Ｘ不活性化状態を一様に維持し［Ｏｋａｍｏｔｏ，Ｉ．ｅｔ ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ．２０１１，４７２（７３４３）：３７０－４；Ｍａｓｔｅｒｓｏｎ，ＫＲ．，ｅｔ ａｌ．Ｄｅｖ Ｂｉｏｌ．２０１２，３７１（２）：１４６－５５］、また、分化の際にＸ染色体不活性化を十分に開始できることがわかる。

【実施例８】

【０７４０】

ヒトナイーブ型多能性の転写状態およびクロマチン状態　本発明者らは、ナイーブ型およびプライム型のｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣの網羅的遺伝子発現パターンを比較したところ、遺伝子発現パターンの多くが遺伝的に一致していた。全ゲノムの発現特性を不偏的クラスタリングに供したところ、ナイーブ型ｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣは従来型／プライム型ｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣとは異なる遺伝子発現パターンを有し、これらとは別個にクラスターを形成することがわかった（図６９Ａおよび図２４Ａ）。ＯＣＴ４およびＫＬＦ４はナイーブ型細胞およびプライム型細胞において同様に転写されるが、ナイーブ型多能性に関連する他の転写物はナイーブ型細胞において有意に上方調節されることが、遺伝子発現分析からわかった。後者はＮＡＮＯＧおよびＤＵＳＰファミリーに属する遺伝子を含む。これらの遺伝子は、齧歯類ナイーブ型ＥＳＣにおけるＥＲＫ脱リン酸化を維持することが示されている（図７７Ａ～Ｂ）［Ｃｈａｐｐｅｌｌ，Ｊ．，ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｅ Ｄｅｖ．２７，７２５－７３３（２０１３）］。重要なことには、ナイーブ型多能性細胞においては、ＺＩＣ１、ＳＯＸ６、およびＳＯＸ１１等の分化系列決定遺伝子に関連する転写物が大幅に下方調節されているが、プライム型ｈＥＳＣにおいては、こうした遺伝子の発現レベルは低くはあったが測定できるレベルであった（図７７Ａ～Ｂ）。発現変動遺伝子を遺伝子オントロジー（ＧＯ）を用いて機能的アノテーション分析に供したところ、ナイーブ型多能性において下方調節される遺伝子は、発生プロセス、特に外胚葉および神

経系生殖細胞の特定化に関連するＧＯ　ｔｅｒｍが有意に豊かであることが明らかとなった（図６９Ａおよび図７８）。さらに、階層的クラスタリングおよび主成分分析（ＰＣＡ）から、ヒトＩＣＭ試料はプライム型細胞にというよりもナイーブ型ｈＥＳＣに転写的に類似することがわかった（図６９Ｈ～Ｉ）。また、これらのｔｅｒｍのほぼすべてが、ｍＥｐｉＳＣと比較して、マウスナイーブ型多能性細胞において有意に下方調節されていることがわかった（図６９Ａ）。この結果は、マウスで報告のある、多能性プライミングに関連する転写変化と矛盾しない［Ｍａｒｋｓ，Ｈ．ｅｔ　ａｌ．Ｔｈｅ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ　ａｎｄ　ｅｐｉｇｅｎｏｍｉｃ　ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎｓ　ｏｆ　ｇｒｏｕｎｄ　ｓｔａｔｅ　ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ．Ｃｅｌｌ　１４９，５９０－６０４（２０１２）］。さらに、ＩＣＭ細胞はｉｎ　ｖｉｔｒｏ誘導後に大きな転写変化を受けることが知られているが［Ｃｈｕ，Ｌ．－Ｆ．，ｅｔ　ａｌ．Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．２１，１７５９－１７６５（２０１１）］、階層的クラスタリングおよび主成分分析（ＰＣＡ）から、ヒトＩＣＭ試料はプライム型細胞にというよりナイーブ型ｈＥＳＣにより近く、転写的にクラスターを形成することがわかった（図７９）。マウスナイーブ型幹細胞とプライム型幹細胞との間で発現パターンが異なるのと類似して、プライム型ｈＥＳＣは体細胞と比較してＭＨＣクラスＩ抗原の発現レベルが中程度であるが、ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣではＭＨＣクラスＩ表面抗原の発現レベルが極微量である（図２４Ｂ～Ｃ）。また、Ｅ－カドヘリンがプライム型ｈＥＳＣにおいて発現するが、その表面発現パターンの分布はナイーブ型ｈＥＳＣコロニーの細胞表面膜上においてより顕著かつ均一である（図８１Ａ～Ｄ）。次に、本発明者らは、トランスクリプトームを全般的に測定して不偏的異種間階層的クラスタリングに供し、本明細書中に記載のヒトのプライム型／従来型多能性細胞およびナイーブ型多能性細胞とマウスで確立された系とが全般的に対応するか否かを評価した（Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７，２０１０）。以前に確立された異種間遺伝子発現分析法を用いて、本発明者らの遺伝子発現データセット中にみられるマウス－ヒトオルソログス遺伝子９，８０３個すべてについて調べた［Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７，２０１０；Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　４，５１３－５２４（２００９）］。その結果、本発明者らは、プライム型／従来型ｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣがｍＥｐｉＳＣとクラスターを形成するのに対し、ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣはいずれもｍＥＳＣおよびｍｉＰＳＣとクラスターを形成し、この際、遺伝的バックグラウンドにも用いたナイーブ型増殖条件にも依存しないことを見いだした（図６９Ｂおよび８２Ａ）。さらに、マウスおよびヒトのプライム型多能性細胞における発現パターンは、マウスまたはヒトそれぞれについて当該二種の群のノイズ分布からわかるように、ナイーブ型多能性細胞よりも有意に不均一であった（図６９Ｃ～Ｄ）。この結論は、血清プライム型ｍＥＳＣについて報告された知見と矛盾しない［Ｍａｒｋｓ，Ｈ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１４９，５９０－６０４（２０１２）］。また、ヒトのｉＰＳＣとＥＳＣとで大きく変動することが知られる、以前に強調された［Ｏａｋｌｅｙ，Ｄ．Ｈ．，Ｃｅｌｌ　１４４，４３９－４５２（２０１１）］マーカー転写不均一性を考察する場合にもあてはまる（図８２Ｂ）。最後に、近年になって、転写因子ＴＦＥ３の核移行がナイーブ型ｍＥＳＣにおいて増大し多能性プライミング時に損なわれることが示された［Ｂｅｔｓｃｈｉｎｇｅｒ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１５３，３３５－３４７（２０１３）］。注目すべきことに、ナイーブ型ｈＥＳＣにおいても類似のＴＦＥ３核内エンリッチメントパターンを明らかとし、また相対的に、プライム型／従来型ｈＥＳＣにおいてエンリッチメントが損なわれていた（図６９Ｅ、６９Ｆ、および６９Ｇ、ならびに図８０Ａ～Ｄ）。これらのデータを総合すると、典型的には基底状態ナイーブ型ｍＥＳＣにみられる多能性遺伝子発現パターンの特徴的な特色が、ＷＩＳ－ＮＨＳＭを用いるとヒト多能性細胞にも与えられることがわかる［Ｍａｒｋｓ，Ｈ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１４９，５９０－６０４（２０１２）］。

【０７４１】

次に、本発明者らは、ヒトのナイーブ型細胞とプライム型細胞との差異はクロマチンレベルでも明らかか否かを調べた。というのは、２ｉ中止と血清添加によって誘導されるネズミナイーブ型ＥＳＣのプライミングが、発生調節遺伝子上におけるＨ３Ｋ２７ｍｅ３マークの蓄積と２価のドメイン（Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３およびＨ３Ｋ４ｍｅ３と表示した遺伝子プロモーター）の形成に関連するからである［Ｍａｒｋｓ，Ｈ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１４９，５９０－６０４（２０１２）］。本発明者らは、マウスおよびヒトのナイーブ型ＥＳＣおよびプライム型ＥｐｉＳＣ（いずれも無血清条件下において増やした）において、ＣｈＩＰ－Ｓｅｑにより、Ｈ３Ｋ４ｍｅ３およびＨ３Ｋ２７ｍｅ３のクロマチンマークをマッピングした。その結果、いずれのエピジェネティックマーカーも全遺伝子に分布があったが、Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３の分布が確かに有意に少なく（ｐ＜２ｅ$^{-37}$）（図８３Ａ～Ｄ）、２ｉ／ＬＩＦ条件下のｍＥＳＣの発生遺伝子ではｍＥｐｉＳＣより両マークともさらに著しく少なかった（ｐ＜２．５ｅ$^{-50}$、図７０Ｂ）。注目すべきことに、総Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３レベルは変わらないが、ヒトナイーブ型細胞の発生遺伝子（ｎ＝５９２２）のプロモーターおよび遺伝子本体領域中において、Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３の再分布および減少がプライム型と比較して著しかった（ｐ＜８．６ｅ$^{-61}$）（図７０Ａ～Ｂおよび７０Ｅ～Ｆ）。また、齧歯類細胞においても同等の観察結果を得た。とりわけ、ナイーブ型細胞において
Ｈ３Ｋ２７ｍｅ３が減少したのと合わせて、ナイーブ型細胞中の発生遺伝子のプロモーターにおいてもＨ３Ｋ４ｍｅ３がやや減少している（ｐ＜１．４ｅ$^{-9}$）（図７０Ａ～Ｂ）。ヒトナイーブ型細胞においてＨ３Ｋ２７ｍｅ３マークがバックグラウンドレベル近くまで減少したことは、２価遺伝子の数にも反映されている。プライム型における２価遺伝子の数（３０１３個）はナイーブ型細胞における２価遺伝子の数（２２６個）の１３倍を超える。多能性遺伝子（例えばＯＣＴ４、ＳＯＸ２、ＳＡＬＬ４）は、ヒトでもマウスでもナイーブ型条件およびプライム型条件の両方でクロマチン活性が一貫していたが、ＴＢＸ３多能性調節因子のＨ３Ｋ２７ｍｅ３マークはヒトおよびマウス両方のプライム型試料中で抑圧されていた（図７０Ｃ～Ｄ）。

【０７４２】

本発明者らは、ＷＩＳ－ＮＨＳＭナイーブ型ヒト条件がエンハンサー等の他のゲノム構成要素にも効果を有するか否かを調べた。この目的で、本発明者らはまず、ゲノム構成要素三種、すなわちプロモーター、遺伝子本体、および遺伝子間領域におけるＨ３Ｋ２７ｍｅ３の分布を測定した。マウス細胞での観察結果と合致して［Ｍａｒｋｓ，Ｈ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１４９，５９０－６０４（２０１２）］、本発明者らは、ナイーブ型細胞状態において、プロモーターおよび遺伝子本体でのＨ３Ｋ２７ｍｅ３ピークが遺伝子間領域でより少ないことを見いだした（図８４Ａ～Ｂ）。次いで、本発明者らは、両多能性状態においてクラスＩおよびクラスＩＩのエンハンサーを網羅的にマッピングした。クラスＩエンハンサー［Ｒａｄａ－Ｉｇｌｅｓｉａｓ，Ａ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４７０，２７９－２８３（２０１１）］は、Ｈ３Ｋ４ｍｅ１マークおよびＨ３Ｋ２７ａｃマークが存在しＨ３Ｋ４ｍｅ３マークおよびＨ３Ｋ２７ｍｅ３マークが存在しないことを特徴とし、付近の遺伝子の活性発現に関連する。一方、クラスＩＩエンハンサーは、Ｈ３Ｋ４ｍｅ１マークおよびＨ３Ｋ２７ｍｅ３マークが存在しＨ３Ｋ２７ａｃマークが存在しないことを特徴とし、活性化休止に関連する［Ｒａｄａ－Ｉｇｌｅｓｉａｓ，Ａ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４７０，２７９－２８３（２０１１）］。ナイーブ型多能性において系譜プライミング分子の特色が減少するが、本発明者らの観察結果もこれと合致していて、アノテートしたナイーブ型細胞状態のクラスＩＩエンハンサーがヒト（５．８倍）およびマウス（６２．５倍）の両方において大幅に減少していた（図８４Ｄ～Ｅ）。クラスＩＩ関連遺伝子は、ナイーブ状態においてＨ３Ｋ２７ｍｅ３マークを失うが、転写活性が増大するわけではない（図８４Ｆ～Ｇ）（以前にマウスで観察されている［Ｍａｒｋｓ，Ｈ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　１４９，５９０－６０４（２０１２）］。これらの知見を総合すると、ナイーブ型基底状態多能性において、抑制された発生遺伝子の前マーク付けに関連する特色と、抑制された発生遺伝子の活性化休止に関連する特色とが大幅に欠如していること

がわかる。

【０７４３】

齧歯類の基底状態ナイーブ型多能性は、エピジェネティックなインプリンティング符号を維持する一方、全般的なＤＮＡ低メチル化に関連する。この現象は、新規のメチルトランスフェラーゼ酵素の２ｉ介在性下方調節の介在によって生じ、ＴＥＴヒドロキシラーゼおよびＤｎｍｔ１酵素の発現が維持される。注目すべきことに、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において増やしたヒトナイーブ型ＥＳＣおよびＩＰＳＣにおいてＤＮＭＴ３ａ、ＤＮＭＴ３ｂ、およびＤＮＭＴ３Ｌメチル－トランスフェラーゼ酵素が著しく下方調節されていたが、ＤＮＭＴ１およびＴＥＴ１／２酵素の著しい下方調節はなかった（図７１Ｄ）。次いで、本発明者らは、ヒトのナイーブ型およびプライム型多能性細胞について、５－メチルシトシン（５ｍＣ）の全般的なレベルをＬＣ－ＭＳにより分析した［Ｌｅｉｔｃｈ，Ｈ．Ｇ．ｅｔ ａｌ．Ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｇｅｒｍ ｃｅｌｌｓ ｆｒｏｍ ｍｉｃｅ ａｎｄ ｒａｔｓ ｅｘｈｉｂｉｔ ｐｒｏｐｅｒｔｉｅｓ ｃｏｎｓｉｓｔｅｎｔ ｗｉｔｈ ａ ｇｅｎｅｒｉｃ ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ ｇｒｏｕｎｄ ｓｔａｔｅ．Ｄｅｖｅｌｏｐｍｅｎｔ １３７，２２７９－２２８７（２０１０）；Ｍｅｉｓｓｎｅｒ，Ａ．ｅｔ ａｌ．Ｇｅｎｏｍｅ－ｓｃａｌｅ ＤＮＡ ｍｅｔｈｙｌａｔｉｏｎ ｍａｐｓ ｏｆ ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ ａｎｄ ｄｉｆｆｅｒｅｎｔｉａｔｅｄ ｃｅｌｌｓ．Ｎａｔｕｒｅ ４５４，７６６－７７０（２００８）］。ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において５ｍＣ含有量が全般的に著しく減少した。この結果は、ナイーブ型ｍＥＳＣにおいて２ｉ／ＬＩＦ条件下で測定した結果、またはマウスＩＣＭにおいて測定した結果と同等であった。（図７１Ｅ）。これらの結果を総合すると、本明細書中で得たヒトナイーブ型多能性細胞が齧歯類ナイーブ型多能性の決定的なエピジェネティックな特徴を有すること、すなわち、ＤＮＡメチル化が全般的に減少し、連係する分化系列決定遺伝子プロモーターおよびエンハンサーにおいてＨ３Ｋ２７ｍｅ３修飾が全般的に減少することが強調される。

【０７４４】

ナイーブ型ヒトＰＳＣにおけるＩＣＭ様前ｘ不活性化状態　Ｏｃｔ４遺伝子の高度に保存された遠位および近位エンハンサー領域は着床前および着床後のマウス胚において相互に調節を受け、そのため、マウスナイーブ型ＥＳＣにおいて主に利用されるのはＯｃｔ４の遠位エンハンサーである（Ｈａｎｎａ ｅｔ ａｌ．，２０１０ｂ）。プライム型およびナイーブ型のｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣを、Ｏｃｔ４遺伝子の発現を制御する遠位または近位いずれかのヒトエンハンサー配列の制御下で、ルシフェラーゼレポーターコンストラクトでトランスフェクションした（図２５Ａ）。ｒｅｖ－ｈＥＳＣおよびヒトｉＰＳＣにおいてＯｃｔ４遠位エンハンサーが主に利用されることが観察された。この結果から、マウスＥＳＣにおける典型的な観察結果と同様、ｒｅｖ－ｈＥＳＣにおいて活性を有する遺伝子発現プログラムが遠位Ｏｃｔ４エンハンサーの利用にとって有利であることがわかる（図２５Ａ）。後者の知見をさらに実証するため、Ｏｃｔ４－ＧＦＰ－２Ａ－ＰＵＲＯまたはデルタＰＥ－Ｏｃｔ４－ＧＦＰ－２Ａ－ＰＵＲＯで、ＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣをターゲティングした（図２５Ｂ～Ｍ）。完全Ｏｃｔ４　ＧＦＰレポーターは、ナイーブ型条件およびプライム型条件のいずれにおいても特異的に活性を示した（分化の際に失われる）。デルタＰＥ－Ｏｃｔ４－ＧＦｐ－２Ａ－ＰＵＲＯレポーターは、ナイーブ型多能性増殖条件下において特異的な活性を示したが、従来型／プライム型多能性増殖条件下においては特異的な活性を示さなかった（図２５Ｂ～Ｍ）。これらの知見を総合すると、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において増やしたＥＳＣ／ｉＰＳＣは異なる分子状態およびエピジェネティック状態を有することがわかる。

【０７４５】

ナイーブ型ヒトｉＰＳＣはｉｎ　ｖｉｖｏにおけるマウスの発達に貢献できる　ヒトナイーブ型Ｃ２　ｉＰＳＣをＧＦＰおよびＢＣＬ－２過剰発現ベクターで構造的に標識した。この細胞を発生途中のマウス胚桑実胚と凝集させると、ＧＦＰ細胞が発生途中の初期マウス胚中で２４時間生存できた（図２６Ａ～Ｃ）。これらの結果から、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ

条件下において増殖させたヒトナイーブ型細胞は異種間のキメラ生物の作製に貢献できることがわかる。

【実施例９】

【０７４６】

ヒトナイーブ型ＰＳＣの機能的特性およびシグナリング特性　上記結果から、ヒトナイーブ型増殖条件およびヒトプライム型増殖条件はいずれもｂＦＧＦおよびＴＧＦβサイトカインを含み、ナイーブ型条件に２ｉ／ＬＩＦ、ｐ３８、およびＪＮＫ阻害剤を添加するとヒト多能性細胞の分子特性およびエピジェネティック特性が再構成されることがわかる。したがって、本発明者らは次に、ナイーブ型およびプライム型のヒト多能性細胞の、異なるシグナリング刺激または阻害剤に対するシグナリング依存および反応パターンの特徴を、齧歯類の場合と比較して調べた。ｍＥＳＣの多能性はＲＡＦ－ＥＲＫ１／２経路を阻害すると安定するが、ｈＥＳＣおよびｍＥｐｉＳＣにおいては（Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７，２０１０）、四種の異なる小分子のうちいずれか一種によりＥＲＫおよびＲＡＦを阻害すると分化が導かれる（図２１Ａ～Ｆおよび図１５Ａ～Ｍ）。しかし、ナイーブ型ｍＥＳＣでの観察結果と同様に、ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣの安定性も、ＥＲＫ１／２阻害が連続的になされるか否かに依存した。（図１２Ｓ、８６Ａ～Ｃ、８７Ａ）。ナイーブ型ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下においてＥＲＫ阻害による神経分化促進効果を阻害するには、ＴＧＦβの添加が必要である（図８６Ｂ）。ｐ３８経路およびＪＮＫ経路のシグナリングに関する必要条件を調べたところ、これらの経路を阻害するとプライム型ｈＥＳＣおよびｍＥｐｉＳＣが分化する傾向がある（図２１Ａ～Ｄ、１５Ａ～Ｍ、および８６Ｃ）。ネズミＥＳＣにおいてｐ３８経路、ＪＮＫ経路、またはＥＲＫ経路のいずれか１つを阻害すると、特徴的なナイーブ型多能性状態が維持されることがΔＰＥ－Ｏｃｔ４－ＧＦＰ発現測定結果よりわかり、また「全ＥＳＣ」マウス形成能力が維持されることが四倍体胚相補性アッセイ測定結果よりわかる（図８８Ａ～Ｊおよび８９Ａ～Ｄ）。ヒトナイーブ型細胞におけるナイーブ型多能性の維持には、これらの経路を同時に阻害することが本質的に必要であり、これらの経路を遮断すると分化が生じ分化系列決定遺伝子が上方調節される（図２１Ａ～Ｌ、１５Ａ～Ｍ、８６Ａ～Ｃ、および８７Ａ～Ｂ）。ナイーブ型ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下においてＥＲＫ阻害による神経分化促進効果を阻害するには、ＴＧＦβの添加が必要である。優性ネガティブＳｔａｔ３をコードする導入遺伝子で安定的にトランスフェクションしたナイーブ型ｈＥＳＣは、迅速に分化し、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて維持できなかったのに対し、構造的活性Ｓｔａｔ３変異体（Ｓｔａｔ３－ＣＡ）を遺伝子組換えした細胞は、外来ＬＩＦ非存在下でｉｎ　ｖｉｔｒｏにおいて増殖させることができた（図１０８Ｂ）。これらの知見から強調されるように、マウスでの観察結果と類似する様式にて、ヒトの両多能性状態もいくつかのシグナリング経路によって別々に調節される［Ｍａｒｋｓ，Ｈ．ｅｔ　ａｌ．Ｔｈｅ　ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ　ａｎｄ　ｅｐｉｇｅｎｏｍｉｃ　ｆｏｕｎｄａｔｉｏｎｓ　ｏｆ　ｇｒｏｕｎｄ　ｓｔａｔｅ　ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ．Ｃｅｌｌ　１４９，５９０－６０４（２０１２）；Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｈｕｍａｎ　ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌｓ　ｗｉｔｈ　ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ａｎｄ　ｅｐｉｇｅｎｅｔｉｃ　ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｓｔｉｃｓ　ｓｉｍｉｌａｒ　ｔｏ　ｔｈｏｓｅ　ｏｆ　ｍｏｕｓｅ　ＥＳＣｓ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７（２０１０）］。

【０７４７】

ＬＩＦ／Ｓｔａｔ３シグナリングは、齧歯類におけるナイーブ型基底状態多能性の促進において重要な経路である。２ｉ／ＬＩＦ条件下において、ｍＥＳＣはＬＩＦシグナリングに依存し、Ｓｔａｔ３リン酸化を遮断するＪＡＫ阻害剤（ＪＡＫｉ）に曝露されると難なく分化する（図２１Ａ～Ｄ）［Ｎｉｗａ，Ｈ．，ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４６０，１１８－１２２（２００９）］。慣習的なｈＥＳＣではリン酸化ＳＴＡＴ３（ｐＳＴＡＴ３）レベルが低く維持され、ＬＩＦを添加するとこのレベルが増加するが、この細胞はＪＡ

Ｋ１阻害剤添加に耐性があった（図１５Ａ～Ｍおよび９０）。一方、ナイーブ型ｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣではｐＳＴＡＴ３レベルが高く（図１５Ａ～Ｍ）、薬理学的にＪＡＫ／ＳＴＡＴ３を阻害すると分化し（図２１Ａ～Ｄ）、ｍＥＳＣでの観察結果と同様であった。優性ネガティブＳｔａｔ３をコードする導入遺伝子で安定的にトランスフェクションしたナイーブ型ｈＥＳＣは、迅速に分化してしまったため、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下ｉｎ ｖｉｔｒｏにおいて維持できなかったのに対し、構造的活性Ｓｔａｔ３変異体（Ｓｔａｔ３－ＣＡ）を遺伝子組換えした細胞は、外来組換えＬＩＦの非存在下ｉｎ ｖｉｔｒｏにおいて増殖させることができ、テラトーマを生じた（図７１Ａ、図２２Ｇ～Ｌ）。最後に、ＢＭＰ４サイトカインとＰＫＡ作動薬であるフォルスコリンとによりヒトまたはマウスのプライム型多能性細胞の分化が導かれたが、ナイーブ型においてはこれが生じなかった（図２１Ａ～Ｄ、図２２Ａ～Ｆ、および図９１Ａ～Ｃ）。この結果から、ｍＥＳＣおよびｍＥｐｉＳＣでの観察結果と類似して、ヒトの両多能性細胞状態の間でも差次的に調節される経路がいくつかあることがわかる。

【０７４８】

次に、本発明者らは、ヒトナイーブ型多能性細胞およびヒトプライム型多能性細胞の機能の違いを調べた。内在性のＯＣＴ４座およびＣＯＬ１Ａ座をターゲティングするアイソジェニックターゲティングベクターで相同組換えした際の遺伝子ターゲティングの影響を、ナイーブ型ヒト多能性細胞は、その遺伝学的に対応するプライム型細胞よりも受けやすく、この結果は再現性がよい（図７１Ｂ、７１Ｃ）。また、ＯＳＫＭによりＭｂｄ３欠損マウスの多能性を誘導する際にナイーブ型多能性促進条件が重要であることがわかっているが、ＯＳＫＭ誘導後のＭｂｄ３欠損ヒト線維芽細胞からナイーブ型基底状態ｉＰＳＣを形成する程度をほぼ１００％とするためには、ＷＩＳ－ＮＨＳＭもまた重要である（図７１Ｄ）。ナイーブ型ヒト多能性条件下においてＤＮＡメチル化レベルが全般的に減少するが、これと合致して、脆弱Ｘ患者特異的線維芽細胞由来のｉＰＳＣは［Ｕｒｂａｃｈ，Ａ．，Ｂａｒ－Ｎｕｒ，Ｏ．，Ｄａｌｅｙ，Ｇ．Ｑ．＆ Ｂｅｎｖｅｎｉｓｔｙ，Ｎ．Ｂｒｉｅｆ Ｒｅｐｏｒｔ．Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ ６，４０７－４１１（２０１０）］、プライム型でなくナイーブ型多能性条件下において、初期化に続いてＦＭＲ１遺伝子が再活性化され脱メチル化され得る（図７１Ｅ～Ｇ）。最後に、Ｅ－カドヘリンが強く発現し単一細胞の生存が増大するが、これと合致して、マウス桑実胚中にヒトナイーブ型ｉＰＳＣをマイクロインジェクションしたところＥ３．５のマウスＩＣＭ中への組込みが強く示され（図２６Ｄ～Ｋ）、マウスＥ２．５桑実胚中にヒトＧＦＰ標識ナイーブ型ｉＰＳＣをマイクロインジェクションしたところ、ｉｎ ｖｉｔｒｏにおいて成長させたＥ３．５のマウスＩＣＭへの組込みが強く示され、この組込みはプライム型多能性細胞の場合よりも強かった（図１０９Ａ～Ｃ）。後者の結果（図１０９Ｂのプライム型ｉＰＳＣに関して）は、霊長類プライム型ＥＳＣを胚にマイクロインジェクションしても組込みもキメラもほとんど生じないという以前の報告と矛盾しない（Ｊａｍｅｓ，Ｄ．，Ｎｏｇｇｌｅ，Ｓ．Ａ．，Ｓｗｉｇｕｔ，Ｔ．＆ Ｂｒｉｖａｎｌｏｕ，Ａ．Ｈ．Ｃｏｎｔｒｉｂｕｔｉｏｎ ｏｆ ｈｕｍａｎ ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｓｔｅｍ ｃｅｌｌｓ ｔｏ ｍｏｕｓｅ ｂｌａｓｔｏｃｙｓｔｓ．Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．２９５，９０－１０２（２００６）；Ｔａｃｈｉｂａｎａ，Ｍ．，Ｓｐａｒｍａｎ，Ｍ．，Ｒａｍｓｅｙ，Ｃ．，Ｍａ，Ｈ．＆ Ｌｅｅ，Ｈ．Ｓ．Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ｏｆ Ｃｈｉｍｅｒｉｃ Ｒｈｅｓｕｓ Ｍｏｎｋｅｙｓ．Ｃｅｌｌ １４８，２８５－２９５（２０１２）］。ヒトナイーブ型ｉＰＳＣをマイクロインジェクションして得たマウス胚盤胞を偽妊娠中の雌マウスに移植し、ｉｎ ｖｉｖｏにおいてさらに７日間成長させた。その後、解剖し、全体を共焦点顕微鏡検査により画像化してＧＦＰ＋細胞を検出した。注目すべきことに、本発明者らは、発生段階Ｅ８．５～Ｅ１０．５に対応する複数のマウス胚（ｎ＝４）を取得でき、これら複数のマウス胚はナイーブ型ヒトｉＰＳＣ由来ＧＦＰ＋細胞とのキメラであって、頭蓋顔面組織および胚神経ヒダ等の異なる位置で一体化していた（図１０８Ｃ、図１０９Ｄ）。ｉｎ ｖｉｖｏにおいて一体化したヒトナイーブ型ｉＰＳＣ由来細胞について、その機能および発生をさらに深く分析することは、将来的に大いに学術的関心がもたれる。上記から総合的に示さ

れることは、ヒトナイーブ型ＰＳＣは生物学的特色が上記のように変化し、これに直接起因して特徴的な機能的特性を獲得する、ということである。

【０７４９】

しかし、本明細書中で発生させたナイーブ型ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣは、とりわけ、ｂＦＧＦおよびＴＧＦシグナリングに未だ依存しているという点でネズミナイーブ型細胞とは異なり、これらの経路を阻害するとナイーブ型細胞状態が失われて分化が導かれる。

【０７５０】

これらの知見を総合すると、ナイーブ型基底状態多能性には増殖因子およびサイトカインの固有の組み合わせが必要であることがわかる。ヒト細胞はマウス細胞よりもストリンジェントであるため、異なるＭＡＰＫ経路を同時に阻害（ＥＲＫとＪＮＫとｐ３８の同時阻害）し、あわせてＬＩＦおよびＷＮＴによって刺激（ＣＨＩＲ９９０２１により）することが必要となる。また、ｂＦＧＦおよびＴＧＦはマウスとヒトとで異なり、本明細書中に記載のヒトのナイーブ型多能性においては、ナイーブ型多能性を促進しかつその特徴的な分子配置とエピジェネティックな配置とに寄与するためにも必須である。

【０７５１】

これらの知見から、ヒト多能性細胞におけるナイーブ型基底状態の概念が実証された。ヒト多能性細胞におけるナイーブ型基底状態の維持には、増殖因子およびサイトカインの固有の組み合わせが必要であることがわかる。ヒト多能性細胞はマウス多能性細胞よりもストリンジェントであり、異なるＭＡＰＫ経路を同時に阻害（ＥＲＫ、ＪＮＫ、およびＰ３８　ＭＡＰＫの同時阻害）し、あわせてＬＩＦおよびＷＮＴによって刺激（ＣＨＩＲ９９０２１により）することが必要となる。ＦＧＦ２およびＴＧＦβシグナリングはマウスとヒトとで異なり［Ｇｒｅｂｅｒ，Ｂ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　６，２１５－２２６（２０１０）；Ｒｏｏｄｅ，Ｍ．ｅｔ　ａｌ．Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．３６１，３５８－３６３（２０１２）］、本明細書中に記載のヒトのナイーブ型多能性においては、ナイーブ型多能性を促進しかつその特徴的な分子配置とエピジェネティックな配置とに寄与するためにも必須である。これらの結果から、ヒト多能性細胞のエピジェネティックなプライミングは主にＬＩＦおよびＭＡＰＫのシグナリング阻害剤を中止すると生じることが示唆される［Ｐｒｉｂｌｕｄａ，Ａ．＆Ｈａｎｎａ，Ｊ．Ｈ．Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ　３０，２４７－２４９（２０１２）］。これらの知見は、遺伝的バックグラウンドが異なるとｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける多能性の状態も異なるという概念と矛盾しない。この多能性について、その安定性は内在性遺伝的決定因子によって調節され、ナイーブ型基底状態多能性を補助する規定の外来因子によって改変され得る。これらの因子を要求するストリンジェンシーの
度合いは種によって異なるようであり、その一例として、ヒトナイーブ型細胞では複数のＭＡＰＫキナーゼ経路を同時に阻害することが必要である（Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｃｅｌｌ　Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　４，５１３－５２４（２００９）；Ｈａｎｎａ，Ｊ．Ｈ．，ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　１４３，５０８－５２５（２０１０）；Ｈａｎｎａ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．１０７，９２２２－９２２７，２０１０）。シグナリング経路を阻害するだけでヒトのナイーブ型基底状態多能性を誘導できるか否かを調べることは、注目に値するであろう［Ｙｉｎｇ，Ｑ．－Ｌ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４５３，５１９－５２３（２００８）］。ナイーブ型多能性条件がエピジェネティックな変化を誘導したということは、ナイーブ型条件が、ヒトｉＰＳＣにおいて以前に記載された表現型に影響を及ぼす可能性があること、すなわちエピジェネティックメモリーおよび異所初期化に影響を及ぼす可能性があることを示す。

【０７５２】

いずれの理論にもとらわれずに、上記データは、ヒトのナイーブ型およびプライム型多能性状態がマウスのそれと同一であると主張するものではない。実のところ、本研究中に記載するナイーブ型ｍＥＳＣとナイーブ型ヒト多能性細胞とが異なっていてもよい。いずれの理論にもとらわれずに、本発明者らは、本明細書中に記載の特色と類似の特色を有するヒトナイーブ型多能性細胞を得るための増殖条件として、上記と異なる増殖条件を考案で

きる可能性を除外できない。また、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件を改変することでヒト多能性細胞のナイーブ型の程度を改善できる可能性も除外できない。ヒトＩＣＭ細胞の分子的特徴をさらに調べることは、本明細書中に記載のナイーブ型多能性のｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける特徴について、その妥当性を改善し理解する上で役立つであろう［Ｓｍｉｔｈ，Ｚ．Ｄ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　４８４，３３９－３４４（２０１２）；Ｏｋａｍｏｔｏ，Ｉ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ．２０１１，４７２（７３４３）：３７０－４；Ｎｉａｋａｎ　ＫＫ，ｅｔ　ａｌ．Ｄｅｖ．Ｂｉｏｌ．３７５，５４－６４（２０１３）］。最後に、安定であり遺伝的改変を全く必要としない新規のナイーブ型多能性状態をヒトにおいて確立することは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける初期分化系列の決定を分子的に研究するにあたって、また、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏにおける再生医療用医薬品の研究および疾患モデリングにおいてｈＥＳＣおよびｈｉＰＳＣを利用できる可能性を広げるにあたって、妥当である可能性がある［Ｄｉｍｏｓ　ＪＴ，ｅｔ　ａｌ．Ｓｃｉｅｎｃｅ　３２１，１２１８－１２２１（２００８）；Ｓａｎｄｏｅ，Ｊ．ｅｔ　ａｌ．Ｎａｔｕｒｅ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ　Ｇｒｏｕｐ　１６，７８０－７８９（２０１３）］。

【０７５３】

本明細書中に記載の結果から、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ下で増殖させたナイーブ型ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣは以前に単離されたｈＥＳＣ／ｈｉＰＳＣとは異なり、マウス着床後エピブラストおよびＥｐｉＳＣではなくナイーブ型マウスＥＳＣの増殖特徴、シグナリング依存状態、エピジェネティック特性、および転写特性を広く有することがわかる。さらに、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ下で増殖させたナイーブ型ｈＥＳＣ／ｉＰＳＣは、齧歯類／マウスＩＣＭは有さないがヒトＩＣＭは有する分子的特色をもっている。これらの知見は、遺伝的バックグラウンドが異なるとｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける多能性の状態も異なるという概念を裏付ける。この多能性の安定性は、内在性遺伝的決定因子によって調節され、ナイーブ型多能性状態を補助する規定の外来因子によって改変され得る。これらの因子についての閾値およびこれらの因子に対する要求は種によって異なる。「許容的」１２９マウス系においてはＬＩＦ／Ｓｔａｔ３シグナリングによってマウスＥＳＣが安定化され得るのに対し、ＮＯＤ遺伝的バックグラウンドにおいては、Ｗｎｔシグナリングを促進しかつＥＲＫ１を阻害することによって、またはＫｌｆ２／４発現（ＫＰまたはＦＫ）を促進する小分子を添加することによって、ＮＯＤ　ＥＳＣが安定化される。ヒト遺伝的バックグラウンドの場合は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏでナイーブ状態を安定化するのにさらなるシグナリング経路を変調させる必要があるため、許容性がより低いようである。進化上の分岐は、ヒトだけでなく、恐らく他の種における知見にも貢献してきており、またｂＦＧＦおよびＴＧＦシグナリングはヒトナイーブ型多能性の維持に貢献している。最後に、無期安定で遺伝的改変を全く必要としない新規のナイーブ型多能性状態をヒトにおいて確立することは、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける初期分化系列の決定を分子的に研究するにあたって、また、ｉｎ　ｖｉｔｒｏおよびｉｎ　ｖｉｖｏにおける再生医療用医薬品の研究および疾患モデリングにおいてヒトＥＳＣおよびｉＰＳＣを利用できる可能性を広げるにあたって、妥当である可能性がある。

【０７５４】

こうした課題に際してＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件および／またはＭｂｄ３阻害を考慮することは、ヒトの発達初期を理解するためだけでなく、外来導入遺伝子非存在下でのヒトナイーブ型多能性状態細胞における中心的転写回路を詳細に分析するためにも重要であろう。というのは、このヒトナイーブ型多能性状態についてのより信頼性の高い分析が可能となるからである。非常に重要なことには、ヒトプライム型ＥＳＣは、分化系列決定遺伝子発現変動やＸ染色体活性化ステータス等、遺伝子の発現が非常に不均一である。また、細胞系によって遺伝子発現に相当な差異があるが、この差異は未分化状態では明らかではなく、同じ増殖条件下で細胞が分化すると現れる。特定系譜への定方向分化を注意深く比較分析したところ、異なるヒト胚性幹細胞系では分化傾向が著しく異なることが明らかとなり、この結果から著しい不均一性があることがわかった。この著しい不均一性が生じる直接の原因は、用いた細胞の段階がＥｐｉＳＣ段階に対応していたことによる可能性がある。と

いうのは、ＥｐｉＳＣ段階は、分化のきっかけが外因的に生じるとこれに応答する細胞の感度が上がって分化系列決定が開始する段階だからである。ナイーブ型ヒトＥＳＣ／ｉＰＳＣは、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下において増やす際、機能的にも分子的にも均一である。いずれの理論にもとらわれずに、ナイーブ型多能性細胞は本質的に、ナイーブ型多能性を促進する分化シグナルが存在してもこれに対して耐性をもつようであり、そのために、分化の際の不均一性が低いといえるであろう。

【０７５５】

ナイーブ型ヒト多能性状態は、分化傾向が不均一であることに加えて、ナイーブ型マウスＥＳＣでのみ成功している分化プロトコールを変更して適用するプロセスを容易にできる可能性がある。顕著な例として、長期にわたりｉｎ　ｖｉｖｏで集団を再編できかつ二次的に生着できる生着可能造血始原細胞を、マウスＥＳＣを用いて発生させる例が挙げられる。ただし、従来型ヒトＥＳＣを用いたこの研究の成果は未だ基本的な段階である。ヒトと動物のキメラに疾患関連表現型をもたせる場合にヒトナイーブ型多能性細胞をより有用かつより高効率に用い得るか否かは、未知である（本明細書中の図２６Ａ～Ｃに記載）。最後に、現在までのところ、プライム型／従来型ヒト胚性幹細胞における相同組換え効率は非常に低い。ジンクフィンガーエキソヌクレアーゼを用いた方法が大きな成果を収めているが、この方法は複雑で費用がかかる上、同定困難な非特異的遺伝子変化を操作後の細胞中に導入してしまう恐れがある。マウスおよびヒトにおいて、ＷＩＳ－ＮＨＳＭナイーブ型多能性状態とプライム型多能性状態との相同組換えに対する感受性を比較分析すれば、相同組換えに対するナイーブ型細胞の感受性が有意に高いか否かについて決定的な答えが出る可能性がある。

【実施例１０】

【０７５６】

ＭＢＤ３／ＮＵＲＤの優性ネガティブ阻害剤として、またＩＰＳＣの決定的初期化の促進因子としての、Ｐ６６アルファ・コイルドコイル・ドメイン　初期化プロセスにＭｂｄ３が及ぼす効果に関する上記研究に続き、本発明者らは、ＭＢＤ３／ＮｕＲＤ複合体の作用の中和を目的としてＭＢＤ３阻害剤のスクリーニングを目指した。

【０７５７】

Ｍｂｄ３の阻害効果にはＮｕＲＤ複合体の補充が恐らく介在するため、本発明者らは一アプローチとして、ＭＢＤ３の複合体への結合を妨げることを試みた。

【０７５８】

Ｇｎａｎａｐｒａｇａｓａｍ　ｅｔ　ａｌ．（Ｇｎａｎａｐｒａｇａｓａｍ　ｅｔ　ａｌ．２０１１．“ｐ６６α－ＭＢＤ２　ｃｏｉｌｅｄ－ｃｏｉｌ　ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｒｅｃｒｕｉｔｍｅｎｔ　ｏｆ　Ｍｉ－２　ａｒｅ　ｃｒｉｔｉｃａｌ　ｆｏｒ　ｇｌｏｂｉｎ　ｇｅｎｅ　ｓｉｌｅｎｃｉｎｇ　ｂｙ　ｔｈｅ　ＭＢＤ２－ＮｕＲＤ　ｃｏｍｐｌｅｘ”．Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１０８：７４８７－７４９２）に、ＭＢＤ２と、同じくＮｕＲＤ複合体の構成要素であるｐ６６αとの間の特徴的なコイルドコイル相互作用が、両タンパク質中の２つのコイルドコイル領域により介在されることが記載されている。

【０７５９】

ＭＢＤ２コイルドコイル領域は、ＭＢＤ２ホモログ（ＭＢＤ３を含む）の間でも種の間でも高度に保存されている。

【０７６０】

Ｇｎａｎａｐｒａｇａｓａｍ　ｅｔ　ａｌ．２０１１（上述）は、ｐ６６αコイルドコイル領域の過剰発現が野生型ｐ６６αと競合し、ＭＢＤ２のＭｉ－２（αまたはβ）への結合を阻害することを示す。Ｇｎａｎａｐｒａｇａｓａｍ　ｅｔ　ａｌ．２０１１（上述）はさらに、ｐ６６α－ＣＣは同領域内のＭＢＤ３にも結合し、類似する構造を形成することも示す［Ｎｕｃｌｅａｒ　ｍａｇｎｅｔｉｃ　ｒｅｓｏｎａｎｃｅ（ＮＭＲ）ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　ｏｆ　ＭＢＤ２　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｔｏ　ｔｈｅ　ｐ６６α－ＣＣ　ｉｓ　ｆｏｕｎｄ　ｕｎｄｅｒ　ｔｈｅ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｄａｔａ　Ｂａｎｋ（ＰＤＢ）ＩＤ

－２Ｌ２Ｌ；Ａｎ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｐｏｒｔａｌ ｔｏ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｍａｃｒｏｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅｓ］。ｐ６６α－ＣＣとＭＢＤ２とがこのように相互作用すると、下流のターゲット遺伝子の発現を抑制するＭＢＤ２の能力が阻害される。この阻害には、恐らく、ＣＨＤ４（クロモドメインヘリカーゼＤＮＡ結合タンパク質４）への結合が介在する。

【０７６１】

この論文とは別に、Ｗａｌａｖａｌｋａｒ ｅｔ ａｌ．が近年発表した論文は（Ｗａｌａｖａｌｋａｒ ｅｔ ｅｌ．２０１３．“Ｕｎｉｑｕｅ ｆｅａｔｕｒｅｓ ｏｆ ｔｈｅ ａｎｔｉ－ｐａｒａｌｌｅｌ，ｈｅｔｅｒｏｄｉｍｅｒｉｃ ｃｏｉｌｅｄ－ｃｏｉｌ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎ ｂｅｔｗｅｅｎ ｍｅｔｈｙｌ－ｃｙｔｏｓｉｎｅ－ｂｉｎｄｉｎｇ ｄｏｍａｉｎ ２（ＭＢＤ２）ｈｏｍｏｌｏｇｕｅｓ ａｎｄ ＧＡＴＡ ｚｉｎｃ ｆｉｎｇｅｒ ｄｏｍａｉｎ ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ２Ａ（ＧＡＴＡＤ２Ａ?Ｐ６６α）”．Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２８８：３４１９－３４２７）、ｐ６６αコイルドコイル・ドメインはＭｂｄ３、ｍｂｄ３ｌ１、ｍｂｄ３ｌ２と異なる効率で相互に影響し合い、ＭＢＤ２およびＭＢＤ３はほぼ同じ効率でｐ６６αに結合することを示す。上記より、いずれの理論にもとらわれずに、本発明者らは、ｐ６６αコイルドコイル・ドメインがＮｕＲＤ複合体のアセンブリを邪魔し、重要な構成要素であるＣｈｄ４の補充を阻害し得るという構想を打ち出す。

【０７６２】

上述のように、ｐ６６αはＮｕＲＤ複合体の構成要素である。Ｐ６６α欠損（作用喪失）マウスは発生初期（１０日目）に死ぬため、ｐ６６は胚盤胞形成に不要であることが示されている（Ｍａｒｉｎｏ ｅｔ ａｌ．２００７．“Ｍｕｔａｎｔｓ ｉｎ ｔｈｅ ｍｏｕｓｅ ＮｕＲＤ／Ｍｉ２ ｃｏｍｐｏｎｅｎｔ ｐ６６ ａｒｅ ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｌｅｔｈａｌ”．ＰＬｏＳ ＯＮＥ ２（６）：ｅ５１９．ｄｏｉ：１０．１３７１／ｊｏｕｒｎａｌ．ｐｏｎｅ．０００５１９）。

【０７６３】

この概念を実証するために、本発明者らは、ｐ６６αコイルドコイル・ドメインをｐＣＡＧ－ＨＡベクターにクローニングし、ＮｕＲＤ複合体アセンブリに対するその効果を調べた。

【０７６４】

本発明者らは、２９３Ｔ細胞においてＭＢＤ３－ＷＴ（配列番号１１２）およびＨＡタグｐ６６α－ＣＣを過剰発現させた。そして、免疫共沈降により抗Ｍｂｄ３プルダウンアッセイを実施し、ｐ６６αが存在するとＭＢＤ３の結合およびＣＨＤ４への補充が阻害されることをさらに示す（図９３）。

【０７６５】

また、図９２Ａ～Ｃは、Ｍｂｄ３またはＣｈｄ４のノックダウンによるＭＥＦの初期化効率について、効率が増大したことを示す（図９２Ａ～Ｄ）。

【０７６６】

本発明者らが用いたＭＢＤ３およびＣＨＤ４　ｓｉＲＮＡを以下に示す。

【０７６７】

マウスに対して：　構成要素ＭＳＳ－２３７２３８、ＭＳＳ－２７５６５８、およびＭＳＳ－２７５６５９を含むＭｂｄ３　Ｓｔｅａｌｔｈ　ｓｉＲＮＡ　ｍｉｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、

【０７６８】

ＭＳＳ－２００８９４、ＭＳＳ－２００８９５、およびＭＳＳ－２００８９６を含むＣｈｄ４　Ｓｔｅａｌｔｈ　ｓｉＲＮＡ　ｍｉｘ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、マウス細胞におけるノックダウンを高効率で実施した。

【０７６９】

ヒトに対して：　構成要素ＨＳＳ１４７５８０およびＨＳＳ１４７５８１を含むＭＢＤ３　Ｓｔｅａｌｔｈ　ｓｉＲＮＡ（カタログ番号：１２９９００３）を用いて、ヒト細胞

におけるＭＢＤ３ノックダウンを高効率で実施した。
【０７７０】
Ｈｕｍａｎ　ＣＨＤ４　ｓｔｅａｌｔｈ　ｓｉＲＮＡ（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、ＨＳＳ１０１８５０）を用いて、ヒトにおけるＣＨＤ４ノックダウンを効率よく実施した。
【０７７１】
本発明者らは以前の実験で、ＭＢＤ３阻害効果には恐らく主としてＣｈｄ４が介在することを立証したが、いずれの理論にもとらわれずに、Ｃｈｄ４のＭｂｄ３への結合を阻害できるペプチドはＭＢＤ３阻害剤として有効に作用し得ると仮定する。
【０７７２】
Ｐ６６ａＣＣを過剰発現させるとＭＢＤ３が作用を失う現象について、引き続き生化学的に調べている（ＯＳＫＭおよびＮｕＲＤ複合体、上記以外のメンバーであるＭｔａ２、Ｈｄａｃ１、２との相互作用を調べる）。Ｐ６６アルファ・コイルドコイル・ドメインのコード配列を、配列番号１１５および１１６に記載のプライマーを用いて増幅させた。得られたＰ６６アルファ・コイルドコイル・ドメインのコード配列を配列番号１１３に記載し、コードされるＰ６６アルファ・コイルドコイル・ドメインアミノ酸配列を配列番号１１４に記載する。Ｐ６６アルファ・コイルドコイル・ドメイン（配列番号１１４）はＭＢＤ３の阻害剤として用い得る。
【０７７３】
初期化を含む機能を調べるアッセイ（ｐ６６ａＣＣ処理有りまたは無しでのｃｈｉｐ－ｓｅｑの後）を引き続き実施している。
【０７７４】
ＭＢＤ３の上記領域に結合できる化合物の発見またはその設計を目的として、ＮＭＲ結果を予測し、詳細な化学構造分析を引き続き実施している。
【０７７５】
機能を調べる目的で、ｐ６６アルファＣＣ領域（ＴＡＴ－ＮＬＳ－シグナルを有する）のペプチドの合成を引き続き実施している。
【実施例１１】
【０７７６】
　ＯＫＳＭおよびＥＲＡＳの過剰発現とＭＢＤ３欠損とによる、ヒト成体体細胞からのＩＰＳＣの初期化　ヒトＢＪ線維芽細胞を、ＴＲＩＰＺ　ＭＢＤ３　ｓｈＲＮＡレンチウイルス（３．１、３．２、３．３は、ＭＢＤ３をターゲティングする３つの異なるヘアピンコンストラクトを示す）に感染させた。７２時間後、リアルタイムＰＣＲにより、ＤＯＸ誘導有りまたは無しでＭＢＤ３を発現させた。結果を図９９Ａ中に示す。この結果から、ヒト線維芽細胞においてＭＢＤ３がＤＯＸ依存的に下方調節されることがわかる。ＳｈＲＮＡヘアピン１および３を組み合わせて用いて、さらに分析した。
【０７７７】
ヒト一次的線維芽細胞系＃１３および１４＃（成体の健康な真皮生検から取得）を、ＯＫＳＭ、ＲｔＴａ、ＥＲＡＳ（配列番号１０９）をコードするレンチウイルス（ＯＫＳＭ、ＲｔＴａ、およびＥＲＡＳを過剰発現させるため）、およびＭＢＤ３　ｓｈＲＮＡをコードするレンチウイルス（ＭＢＤ３下方調節のため）に感染させた。
【０７７８】
ＲｔＴａ（Ｍ２ｒｔＴＡとしても知られる）は、ドキシサイクリンに対する応答を可能とする要素である。いずれのＤＯＸ誘導系にもＲｔＴＡ要素の導入が必要であるため、本発明者らは、リバーステトラサイクリントランス作用因子（Ｍ２ｒｔＴＡ）を発現するレンチウイルスプラスミドを用いた（ａｄｄｇｅｎｅより入手のベクター、カタログ番号：２０３４２、配列番号１１０）。
【０７７９】
ＤＯＸ誘導性ＭＢＤ３ノックダウンレンチウイルスのクローンとして、ＴＲＩＰＺ（ヒトＭＢＤ３　ｓｈＲＮＡクローン、ＩＤ：Ｖ３ＴＨＳ＿３９２２０６（＃１）およびＶ３Ｔ

ＨＳ＿３９２２１０（＃３）、Ｔｈｅｒｍｏ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ）を用いた。ＤＯＸ誘導６～１０日後に、ＥＳ様の形態を有するクローン集団が現れた（図９９Ｂ～Ｃ）。赤色蛍光タンパク質（ＲＦＰ）の蛍光は、ＴＲＩＰＺ－ＭＢＤ３　ｓｈＲＮＡコンストラクトのＴｅｔＯプロモーター（ＤＯＸ応答性）によって促される。５日目または１１日目に観察したコロニーについて、更なる例を図９９Ｄ～Ｇ中に示す。

【０７８０】

図１００Ａ～Ｉは、ＯＫＳＭ、ＲｔＴａ、ＥＲＡＳ、およびＭＢＤ３　ｓｈＲＮＡをＤＯＸ誘導した１０日後、ＮＨＳＭ条件下において初期化中の細胞における、多能性マーカーＯＣＴ４およびＳＳＥＡ４の染色を示す。ＭＢＤ３－ｓｈＲＮＡ誘導レポーター（ＳｈＭＢＤ３ベクター活性を赤色蛍光レポーターの活性化により示す、赤色蛍光レポーターはＤＯＸ誘導性ＴｅｔＯプロモーターの制御下でＴＲＩＰＺ－ＭＢＤ３ベクター上にコード、図１００Ｉ）がＯＣＴ４発現およびＳＳＥＡ４多能性マーカーと共局在化していることが注目される。

【０７８１】

図１００Ｊ～Ｎは、ＯＫＳＭ、ＲｔＴａ、ＥＲＡＳ、およびＭＢＤ３　ｓｈＲＮＡをＤＯＸ誘導した１０日後、ＮＨＳＭ条件下において初期化中の細胞における、多能性マーカーＯＣＴ４およびＴＲＡ１－６０の染色を示す。ＭＢＤ３－ｓｈＲＮＡ誘導レポーター（ＳｈＭＢＤ３、図１００Ｉ）がＯＣＴ４発現およびＴＲＡ１－６０多能性マーカーと共局在化していることが注目される。

【０７８２】

図１０００～Ｓは、ＯＫＳＭ、ＲｔＴａ、ＥＲＡＳ、およびＭＢＤ３　ｓｈＲＮＡをＤＯＸ誘導した１０日後、ＮＨＳＭ条件下において初期化中の細胞における、多能性マーカーＯＣＴ４およびＴＲＡ１－８１の染色を示す。ＭＢＤ３－ｓｈＲＮＡ誘導レポーター（ＳｈＭＢＤ３、図１００Ｉ）がＯＣＴ４発現およびＴＲＡ１－８１多能性マーカーと共局在化していることが注目される。

【０７８３】

一次的女性成体真皮線維芽細胞（株＃１３）に、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件下、ＴＲＩＰＺ－ＭＢＤ３　ｓｈＲＮＡ　１＋３　ｍｉｘ（ヒトＭＢＤ３のノックダウンのため）有りまたは無しで、ＲｔＴａ、ＯＳＫＭ、およびＥＲＡＳベクターを形質導入した。１０日目に、ＮＡＮＯＧおよびＴＲＡ１－６０マーカーの染色によってｉＰＳＣコロニーの数をカウントした（図１００Ｔ）。ＭＢＤ３阻害を導入すると一次的ヒト体細胞からのｉＰＳＣの形成が著しく増加することに注目する。

【実施例１２】

【０７８４】

ヒトナイーブ型ｉＰＳＣおよびＥＳＣは始原生殖細胞前駆体に分化できる　ヒトナイーブ型ｉＰＳＣ／ＥＳＣ由来の始原生殖細胞（ＰＧＣ）様細胞（ＰＧＣＬＣ）をヒト／霊長類またはマウスの精巣中に注入して、機能を有する精子を誘発できる。あるいは、上記細胞を用いて卵母細胞を発生させてもよい。

【０７８５】

材料および培地：　Ｎ２－ＫＳＲ培地　２５０ｍｌのＮｅｕｒｏｂａｓａｌ　ｍｅｄｉｕｍ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、＃２１１０３－０４９）、２５０ｍｌのＤＭＥＭ－Ｆ１２、Ｎ２サプリメント（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、＃１７５０２－０４８）、１％のＫＳＲ（ノックアウト血清代替物、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、＃１０８２８０２８）培地）に８ｎｇ／ｍｌのｂＦＧＦ（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、１ｎｇ／ｍｌのＴＧＦ－β１（Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）、およびＲＯＣＫｉ（１０μＭ）を添加したもの。

【０７８６】

ＰＧＣ培地は、ＧＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、＃２１７１００８２）、１５％のＫＳＲ、１％のＮＮＥＡ（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　ｉｎｄｕｓｔｒｉｅｓ、０１－３４０－１Ｂ）、ペニシリン－ストレプトマイシン、１ｍＭのＬ－グルタミン、５μＭのＲＯＣＫｉ（Ｙ－２７６３２、Ａｘｏｎ　Ｍｅｄｃｈｅｍ）、ならびに次のサイトカインからなる：

５００ｎｇ／ｍｌのＢＭＰ４（骨形成タンパク質４、Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ　Ｉｎｃ．）、２０ｎｇ／ｍｌのＬＩＦ（白血病抑制因子、ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ）、１００ｎｇ／ｍｌのＳＣＦ（幹細胞因子、ＰｅｐｒｏＴｅｃｈ）、５０ｎｇ／ｍｌのＥＧＦ（上皮増殖因子、Ｐｅｐｒｏｔｅｃｈ）。

【０７８７】

実験方法：　ＮＡＮＯＳ３座におけるｍＣｈｅｒｒｙノックインレポーター対立遺伝子の発生　ｍＣｈｅｒｒｙレポーターの発現を内在性ヒトＮＡＮＯＳ３座によって促進させるため、本発明者らは、ＮＡＮＯＳ３遺伝子の最後のエクソンを有するフレーム内にｐ２ａ－ｍＣｈｅｒｒｙコード配列をノックインすることにした。本発明者らは、ＮＡＮＯＳ３停止コドンを有する領域に対して特異的なＴＡＬＥＮ分子をコードするプラスミドを発生させた。ＴＡＬＥＮコンストラクトを、ＧｏｌｄｅｎＧａｔｅ　ＴＡＬＥＮ　ｋｉｔ２．０（ａｄｄｇｅｎｅ、カタログ番号：１０００００００２４）を用いて発生させた。

【０７８８】

２Ａ－ｍＣｈｅｒｒｙノックインをターゲティングするターゲティングコンストラクトを、図９４Ａ中に示すように設計した。ＷＩＳ１ナイーブ型ヒトＥＳＣ（デルタＰＥ－ＯＣＴ４－ＧＦＰレポーターも有する）に、ＴＡＬＥＮをコードするプラスミドとドナーターゲティングコンストラクトとを、電気穿孔によって導入した。本発明者らは、Ｇ４１８（１５０μｇ／ｍｌ）およびガンシクロビル（２μＭ）で選択した後、生存クローン９６個をＰＣＲによって分析した。正確にターゲティングしたクローン（ＰＣＲおよびサザンブロット分析により）の１つを、酵素フリッパーゼをコードするプラスミドと共にトランスフェクションに供し、続いてサブクローニングを実施した。Ｎｅｏカセットの欠失をＰＣＲにより確認した。こうしてターゲティングした座をすべてシーケンシングし、さらに、正確にターゲティングしたクローンの１つについて核型分析を実施した。シーケンシングおよび核型分析のいずれによっても異常は全くみられなかったため、この細胞をさらなる機能的検証に供した。

【０７８９】

エピブラスト状態の誘導　ＮＡＮＯＳ３－ｍＣｈｅｒｒｙコンストラクトにより遺伝子を改変したまたは未改変のナイーブ型ヒトＥＳＣを、照射マウス胚線維芽細胞（ＭＥＦ）または０．２％ゼラチンまたはビトロネクチン／ゼラチン被覆プレート上で、５μＭのＲＯＣＫｉ（Ｙ－２７６３２、Ａｘｏｎ　Ｍｅｄｃｈｅｍ）を添加したＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地中で増殖させた。細胞を０．０５％トリプシン＋ＥＤＴＡでトリプシン処理し、細胞５０，０００個／６ウェルを、１ｎｇ／ｍｌフィブロネクチン（Ｆ１１４１、Ｓｉｇｍａ）被覆プレート上で、エピブラスト様（ＥｐｉＬＣ）状態を誘導するＮ２－ＫＳＲ培地中に蒔いた。

【０７９０】

Ｎ２－ＫＳＲ培地中に蒔いて２日後、ＥｐｉＬＣ細胞をトリプシン処理して、ｌｏｗ－ｃｅｌｌ－ｂｉｎｇｉｎｇ　９６－ｗｅｌｌ　ｐｌａｔｅ（１４５３９９、ＮＵＮＣ）に移し、１２０μｌのＰＧＣ培地中に細胞２５００個／ウェルの密度とした。

【０７９１】

２日後、５０マイクロリットル（５０μｌ）の新しいＰＧＣ培地を各ウェルに添加した。細胞をＰＧＣ培地に移して４日目または６日目に、ＴｒｉｐＬＥ　ｓｅｌｅｃｔ（１０倍）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて細胞を分離し、フローサイトメトリーまたは分子分析に供した。

【０７９２】

実験結果　Ｎａｎｏｓ３座におけるｍＣｈｅｒｒｙノックインレポーター対立遺伝子の発生　図９４Ａ～Ｂ中に示すように、ヒトナイーブ型細胞（ＷＩＳ１）をターゲティングに供し、ＴＡＬＥＮを用いた遺伝子操作処理に供して、レポーター遺伝子ｍＣｈｅｒｒｙの発現によりＮＡＮＯＳ３の発現を視認できる細胞を調製した。ＮＡＮＯＳ３は、ＰＧＣにおいて発達初期段階から既に特異的に発現している遺伝子である（Ｊｕｌａｔｏｎ

ｅｔ ａｌ．Ｈｕｍ Ｍｏｌ Ｇｅｎｅｔ．２０１１ Ｊｕｎ １；２０（１１）：２２３８－５０）。

【０７９３】

ナイーブ型ＥＳＣ細胞をフィブロネクチン被覆プレート上に播き、Ｎ２－ＫＳＲ培地の存在下で２日間インキュベートすることによって、エピブラスト状態を誘導した。続いて、トリプシン処理により細胞をプレートから剥がし、ＰＧＣ培地の存在下においてｌｏｗ－ｃｅｌｌ－ｂｉｎｇｉｎｇ ｐｌａｔｅに移した。４～６日後、ＴｒｉｐＬＥ ｓｅｌｅｃｔ剤を用いて細胞をプレートから分離し、フローサイトメトリーおよび分子分析に供した。図９５は、分化プロセスの細胞を示す代表的な画像である。

【０７９４】

ＢＭＰ４はＮＡＮＯＳ３－ｍＣｈｅｒｒｙレポーター遺伝子の発現を誘導する Ｎ２－ＫＳＲおよびＰＧＣ培地を用いる本明細書中に記載の分化プロセスに供した細胞を、ＦＡＣＳに供し、細胞がＰＧＣ様状態であることを示すＮＡＮＯＳ３－ｍＣｈｅｒｒｙレポーター遺伝子の発現を調べた。その結果、図９６Ａおよび９６Ｂ中に示すように、ナイーブ型ＥＳＣ細胞（図９６ＢＡ）およびプライム型ＥｐｉＬＣ細胞（図９６Ｃ）はＮＡＮＯＳ３－ｍＣｈｅｒｒｙレポーターを発現していなかったが、ＰＧＣ培地に蒔いて４日後（Ｎ２－ＫＳＲ培地中で２日間培養後）、ＰＧＣ培地中にＢＭＰ４が存在する状態において、著しい数の細胞がｍＣｈｅｒｒｙレポーター遺伝子を発現し、ＮＡＮＯＳ３の発現を示した（１７．７％、図９６Ｅ）。一方、ＰＧＣ培地中にＢＭＰ４を添加しないこと以外は同じ条件とした場合には、ｍＣｈｅｒｒｙレポーターの発現は微小であり、（細胞の０．４５％、図９６Ｈ）、この結果から、ヒトナイーブ型細胞のＰＧＣ様細胞（ＰＧＣＬＣ）への分化にとってＢＭＰ４が重要であることが示唆される。

【０７９５】

ナイーブ型ＥＳＣから誘導したＰＧＣＬＣ細胞におけるＰＧＣマーカーの評価により、ナイーブ型多能性幹細胞からＰＧＣが発生することがわかる 本明細書中に記載の方法で発生させたＰＧＣＬＣ細胞を、ＰＧＣマーカーの発現についてさらに評価した。その結果、図９７Ａ～Ｈ中に示すように、ヒトナイーブ型ＥＳＣに適用したプロトコールでは、ＳＴＥＬＬＡ（図９７Ｄ）、ＩＮＴＥＧＲＩＮＢ３（図９７Ｇ）、ＢＬＩＭＰ１（図９７Ｂ）、およびＶＡＳＡ（図９７Ｈ）等のＰＧＣＬＣマーカーが誘導される。

【０７９６】

ＮＡＮＯＳ３－ｍＣｈｅｒｒｙノックインベクターで遺伝子改変したプライム型ＥＳＣを、本明細書中に記載の同じ分化プロトコールに供したが、ＰＧＣＬＣは形成されなかった。そして、図９８Ａ～Ｂ中に示すように、従来型／プライム型ヒトＥＳＣをＰＧＣ培地単独でインキュベート（図９８Ａ）またはＥｐｉＬＣ培地と続いてＰＧＣ培地とでインキュベートし（図９８Ｂ）、ＦＡＣＳ分析に供したところ、ＮＡＮＯＳ３－ｍＣｈｅｒｒｙレポーター遺伝子の発現はなかった。これより、始原生殖細胞に分化していないことがわかった。この結果から、ＢＭＰ４を含むＰＧＣＬＣ誘導プロトコールに供した従来型／プライム型ヒトＥＳＣはＮＡＮＯＳ３ ｍＣｈｅｒｒｙレポーターを活性化できないことがわかる。

【０７９７】

さらにＦＡＣＳ分析を実施したところ（図１０６Ａ～Ｄ）、ＮＡＮＯＳ３ ｍｃｈｅｒｒｙ＋細胞は表面マーカーＣＤ６１（ＩｎｔｅｒｇｒｉｎＢ３）を特異的に上方調節することがわかる。また、ＮＡＮＯＳ３－ｍＣｈｅｒｒｙ＋細胞は表面マーカーＳＳＥＡ４も発現する（図１０７Ａ～Ｂ）。この分析結果から、ＣＤ６１＋細胞マーカーまたはＣＤ６１＋／ＳＳＥＡ４＋細胞表面の組み合わせを用いて、ヒトナイーブ型多能性細胞に由来するヒトＰＧＣＬＣを選別および単離できることがわかる（ＮＡＮＯｓ３ノックインレポーター遺伝子操作の必要とせず）。この結果から、ヒトＰＧＣＬＣの誘導はヒトナイーブ型多能性細胞から実施することが重要であると示される。

【実施例１３】

【０７９８】

プロテインキナーゼＣを阻害すると胚性幹細胞のＭＢＤ３タンパク質レベルが減少する

本発明者らは、種々の因子、小分子、および薬剤について、胚性幹細胞においてＭＢＤ３タンパク質発現レベルを減少させ得るか否かを調べた。

【０７９９】

Ｖ６．５マウスＥＳ細胞を種々の条件下において４日間増やし、ＭＢＤ３タンパク質のレベルを減少させる因子組み合わせを調べた。図１０１Ａ～Ｂ中に示すように、ＤＭＳＯ有りもしくは無しの「２ｉ／ＬＩＦ」条件における処理、またはＴＧＦβ阻害剤の添加は、ＭＢＤ３レベルに影響を及ぼさないが、ＰＫＣ阻害剤を添加した「２ｉ／ＬＩＦ」条件においてはＭＢＤ３タンパク質のレベルが有意に減少した。この結果から、ＰＫＣを阻害するとマウス胚性幹細胞におけるＭＢＤ３発現が下方調節されることがわかる。これらの結果から、ＭＢＤ３発現を欠損または下方調節する薬剤として、かつ決定的ｉＰＳＣ初期化の増強因子として、ＰＫＣ阻害剤を用いることが示唆される。

【実施例１４】

【０８００】

ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地の調整　本発明者らは、基本のＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地について種々の改変を考案し、ナイーブ型多能性幹細胞に対する阻害剤および増殖因子の効果を調べた。下記表３および図１０２～１０５は、ナイーブ型多能性状態の維持に対する種々の因子および阻害剤の効果を記載する。

【０８０１】

【表３】

条件の番号／薬剤	1	2	3	4	5	6
ＬＩＦ	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ
ＥＲＫ１／２ｉ（ＰＤ０３２５９０１）	１μＭ	１μＭ	１μＭ	１μＭ	１μＭ	１μＭ
ＧＳＫ３βｉ（ＣＨＩＲ９９０２１）	３μＭ	３μＭ	３μＭ	３μＭ	３μＭ	３μＭ
ＪＮＫｉ（ＳＰ６００１２５）	５μＭ	５μＭ	５μＭ	５μＭ	５μＭ	５μＭ
Ｐ３８ｉ（ＢＩＲＢ７９６）	２μＭ	２μＭ	２μＭ	２μＭ	２μＭ	－
ＦＧＦ２	１６ｎｇ／ｍｌ	１６ｎｇ／ｍｌ	１６ｎｇ／ｍｌ	１６ｎｇ／ｍｌ	１６ｎｇ／ｍｌ	１６ｎｇ／ｍｌ
ＴＧＦβ１	２ｎｇ／ｍｌ	２ｎｇ／ｍｌ	２ｎｇ／ｍｌ	２ｎｇ／ｍｌ	２ｎｇ／ｍｌ	２ｎｇ／ｍｌ
ＲＯＣＫｉ（Ｙ２７６３２）	５μＭ	５μＭ	５μＭ	５μＭ	５μＭ	５μＭ
ＩＧＦＩＩ	－	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ	－	－
ＳＣＦ	－	－	１０ｎｇ／ｍｌ	１０ｎｇ／ｍｌ	－	－
ＢＭＰｉ（ＬＤＮ－１９３１８９）	－	－	－	０．５μＭ	０．５μＭ	０．５μＭ

表３：基本のＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地を種々に改変した培地に含有される薬剤（因子、阻害剤）を記載する。ＬＩＦは白血病抑制因子であり、ＦＧＦ２は線維芽細胞増殖因子２（「塩基性ＦＧＦ」ともよばれる）であり、ＴＧＦβ１は形質転換増殖因子ベータ１であり、ＳＣＦは幹細胞因子であり、ＢＭＰｉは骨形成阻害タンパク質であり、ＩＧＦＩＩはインスリン様増殖因子２（ソマトメジンＡ）である。条件６はｐ３８ｉを含まないことに注目。

【０８０２】

図１０２～１０５は、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地を種々に改変した培地が、ＤＮＡのメチル化（総メチル化シトシンのレベル（％）（５ｍｄＣ）、ｄＧに標準化、図１０２）、相対

的なＤＮＭＴ３Ｌ　ｍＲＮＡ発現（プライム型細胞に標準化、図１０３）、相対的なＤＮＭＴ３Ｂ　ｍＲＮＡ発現（プライム型細胞に標準化、図１０４）、および０．２％ゼラチンプレート上で９回継代した後のＯＣＴ４＋　ＷＩＢＲ３細胞の割合（パーセント）（％）（図１０５）に及ぼす効果を示す。これらの実験結果から、ナイーブ型多能性の特色のうち、新規のＤＮＡメチルトランスフェラーゼ遺伝子ＤＮＭＴ３ｂおよびＤＮＭＴ３Ｌの下方調節に関連する特色を維持し、ＤＮＡメチル化レベルを全般的に低下させるには、ｐ３８ｉを含めることが必須であると示される。一方、ｐ３８ｉを取り除いてＢＭＰｉを添加すると（組み合わせ６、上記表３）、ヒトナイーブ型多能性の際だった特徴であるこの効果が得られなかった。ＢＭＰｉはｐ３８ｉと共に添加することができ、組み合わせ（組み合わせ４または５、上記表３）て用いてもナイーブ型多能性を損なうことはない。

【０８０３】

同様に、下記表４および５および図８５Ａ～Ｃは、種々の培地組成が多能性幹細胞のナイーブ状態に及ぼす効果を示す。ＷＩＢＲ３　ｈＥＳＣをＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件１および７～１７において培養し、細胞を試験に供して、多能性幹細胞の割合（パーセント）（ＯＣＴ４陽性細胞により、図８５Ｂ）および総メチル化シトシンの割合（パーセント）（５ｍｄＣ、図８５Ｃ）を調べた。

【０８０４】

【表４】

条件の番号／薬剤	1	7	8	9	１０	１１
ＬＩＦ	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ
ＥＲＫ１／２ｉ（ＰＤ０３２５９０１）	１μＭ	１μＭ	１μＭ	１μＭ	１μＭ	１μＭ
ＧＳＫ３βｉ（ＣＨＩＲ９９０２１）	３μＭ	３μＭ	３μＭ	３μＭ	３μＭ	３μＭ
ＪＮＫｉ（ＳＰ６００１２５）	５μＭ	５μＭ	５μＭ	５μＭ	５μＭ	５μＭ
Ｐ３８ｉ（ＢＩＲＢ７９６）	２μＭ	２μＭ	２μＭ	２μＭ	２μＭ	２
ＦＧＦ２	１６ｎｇ／ｍｌ	１６ｎｇ／ｍｌ	１６ｎｇ／ｍｌ	１６ｎｇ／ｍｌ	１６ｎｇ／ｍｌ	１６ｎｇ／ｍｌ
ＴＧＦβ１	２ｎｇ／ｍｌ	２ｎｇ／ｍｌ	２ｎｇ／ｍｌ	２ｎｇ／ｍｌ	２ｎｇ／ｍｌ	２ｎｇ／ｍｌ
ＲＯＣＫｉ（Ｙ２７６３２）	５μＭ	５μＭ	５μＭ	５μＭ	５μＭ	５μＭ
ＩＧＦＩＩ	－	－	－	－	２０ｎｇ／ｍｌ	－
ＳＣＦ	－	－	－	－	－	－
ＢＭＰｉ（ＬＤＮ－１９３１８９）	－	０．５μＭ	－	０．５μＭ	０．５μＭ	０．５μＭ
ＮＯＴＣＨｉ（ＤＢＺ）	－	－	２μＭ	２μＭ	２μＭ	２μＭ
ＳＨＨｉ（ＲＵ－ＳＫＩ－４３）	－	－	－	－	－	５μＭ

表４：ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地に含有される薬剤（因子、阻害剤）を記載する。ＬＩＦは白血病抑制因子であり、ＦＧＦ２は線維芽細胞増殖因子２（「塩基性ＦＧＦ」ともよばれる）であり、ＴＧＦβ１は形質転換増殖因子ベータ１であり、ＳＣＦは幹細胞因子であり、ＢＭＰｉは骨形成阻害タンパク質であり、ＩＧＦＩＩはインスリン様増殖因子２（ソマトメジンＡ）である。ＮＯＴＣＨｉはＮＯＴＣＨ阻害剤であり、ＳＨＨｉはソニックヘッ

ジホッグ経路（ＳＨＨ）阻害剤であり、ＴＧＦＲｉは形質転換増殖因子受容体阻害剤であり、ＦＧＦＲｉは線維芽細胞増殖因子受容体阻害剤である。

【０８０５】

【表５】

条件の番号／薬剤	１２	１３	１４	１５	１６	１７
ＬＩＦ	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ
ＥＲＫ１／２ｉ（ＰＤ０３２５９０１）	１μＭ	１μＭ	１μＭ	１μＭ	１μＭ	１μＭ
ＧＳＫ３βｉ（ＣＨＩＲ９９０２１）	３μＭ	３μＭ	３μＭ	３μＭ	３μＭ	３μＭ
ＪＮＫｉ（ＳＰ６００１２５）	５μＭ	５μＭ	５μＭ	５μＭ	５μＭ	５μＭ
Ｐ３８ｉ（ＢＩＲＢ７９６）	２μＭ	２μＭ	２μＭ	２μＭ	２μＭ	２
ＦＧＦ２	１６ｎｇ／ｍｌ	１６ｎｇ／ｍｌ	－	１６ｎｇ／ｍｌ	－	－
ＴＧＦβ１	－	２ｎｇ／ｍｌ	－	－	２ｎｇ／ｍｌ	－
ＲＯＣＫｉ（Ｙ２７６３２）	５μＭ	５μＭ	５μＭ	５μＭ	５μＭ	５μＭ
ＩＧＦＩＩ	－	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ	－	２０ｎｇ／ｍｌ	２０ｎｇ／ｍｌ
ＳＣＦ	－	１０ｎｇ／ｍｌ	１０ｎｇ／ｍｌ	－	１０ｎｇ／ｍｌ	１０ｎｇ／ｍｌ
ＢＭＰｉ（ＬＤＮ－１９３１８９）	０．５μＭ	０．５μＭ	０．５μＭ	０．５μＭ	０．５μＭ	０．５μＭ
ＮＯＴＣＨｉ（ＤＢＺ）	２μＭ	２μＭ	２μＭ	２μＭ	２μＭ	２μＭ
ＳＨＨｉ（ＲＵ－ＳＫＩ－４３）	－	－	－	５μＭ	５μＭ	５μＭ
ＴＧＦＲｉ（ＳＢ４３２５４１）	２μＭ	－	２μＭ	２μＭ		２μＭ
ＦＧＦＲｉ（ＰＤ１７３４７１）		－	０．１μＭ	－	０．１μＭ	０．１μＭ

表５：ＷＩＳ－ＮＨＳＭ培地に含有される薬剤（因子、阻害剤）を記載する。ＬＩＦは白血病抑制因子であり、ＦＧＦ２は線維芽細胞増殖因子２（「塩基性ＦＧＦ」ともよばれる）であり、ＴＧＦβ１は形質転換増殖因子ベータ１であり、ＳＣＦは幹細胞因子であり、ＢＭＰｉは骨形成阻害タンパク質であり、ＩＧＦＩＩはインスリン様増殖因子２（ソマトメジンＡ）である。ＮＯＴＣＨｉはＮＯＴＣＨ阻害剤であり、ＳＨＨｉはソニックヘッジホッグ経路（ＳＨＨ）阻害剤であり、ＴＧＦＲｉは形質転換増殖因子受容体阻害剤であり、ＦＧＦＲｉは線維芽細胞増殖因子受容体阻害剤である。

【０８０６】

図８５Ａ～Ｃ中に示すように、条件１および７～１７はいずれも多能性幹細胞のナイーブ状態を維持でき、総メチル化シトシンの割合（パーセント）が著しく低下した。

【０８０７】

注目すべきは、条件１２および１５において（上記表５）、ＮＯＴＣＨｉを用いる場合、次いでＴＧＦＲｉを用いることによって（組換えＴＧＦＢ１は省くことができる）、ナイーブ型多能性を維持しＤＮＡメチル化レベルを低下させ得るということである。

【０８０８】

また、条件１６において、ＮＯＴＣＨｉを用いる場合、次いでＦＧＦＲｉを用いることによって（組換えＦＧＦ２は省くことができる）、ナイーブ型多能性を維持しＤＮＡメチル

化レベルを低下させ得る。これらの条件において、組換えＩＧＦＩＩおよびＳＣＦは、ＦＧＦ２シグナリングの非存在下においてヒトナイーブ型細胞の増殖を促すために用いる。

【０８０９】
また、条件１４および１７において、ＮＯＴＣＨｉを用いる場合、次いでＦＧＦＲｉおよびＴＧＲＦｉを用いることによって（組換えＦＧＦ２およびＴＧＦＢ１は省くことができる）、ナイーブ型多能性を維持しＤＮＡメチル化レベルを低下させ得る。これらの条件において、組換えＩＧＦＩＩおよびＳＣＦは、ＦＧＦ２シグナリングの非存在下においてヒトナイーブ型細胞の増殖を促すために用いる。
【０８１０】
注目するべきは、ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件１５の培地（上記表５）は、半球形のコロニー形態と、各コロニー中の個々の細胞の間に明確な境界がないこととから明らかなように、ナイーブ状態にあるヒト多能性幹細胞の培養に優れることである（データは示さず）。
【０８１１】
注目するべきは、上記ＷＩＳ－ＮＨＳＭ条件を用いて、非ヒト霊長類多能性幹細胞のナイーブ状態を維持できることである。
【０８１２】
以上を要約すると、ナイーブ型多能性状態確立のために次のように培地を改変できるということである：
【０８１３】
Ｐ３８ｉ：Ｐ３８の阻害剤は、ｐ３８シグナリングを活性化する経路の上流遮断薬を含む：ＢＭＰシグナリング阻害剤を含む
【０８１４】
ＳＴＡＴ３活性化：ＳＴＡＴ３シグナリングの活性化剤を、ＩＬ－６等のＬＩＦの代わりに用い得る。
【０８１５】
ＴＧＦＢ１：アクチビンＡ等のＴＧＦ／アクチビン経路の活性化剤（インヒビンベータＡとしても知られる、遺伝子ＩＤ：３６２４、ＴＧＦＢ１の代わりに用い得る）。
【０８１６】
ＢＭＰｉ：組換えＮＯＧＧＩＮタンパク質等のＢＭＰ経路阻害タンパク質を、ＢＭＰシグナリング阻害小分子の代わりに用い得る。
【０８１７】
多能性幹細胞をナイーブ状態で維持するために（かつナイーブ状態を誘導するために）用い得る培養基の例を次に挙げるが、これらに限定されない：白血病抑制剤因子（ＬＩＦ）、ＥＲＫ１／２阻害剤、ＧＳＫ３ｂ阻害剤、ｐ３８阻害剤、ＪＮＫ阻害剤、塩基性線維芽細胞増殖因子（ｂＦＧＦ）、および形質転換増殖因子ベータ１（ＴＧＦβ１）、ならびに下記構成要素の一種以上を含有する培養基：　ａ）ＩＧＦＩＩ（最終濃度０．１～１００ｎｇ／ｍｌの範囲）、　ｂ）ＩＧＦ１（インスリン様増殖因子１（ソマトメジンＣ））（最終濃度０．１～１００ｎｇ／ｍｌの範囲）、　ｃ）ＳＣＦ（最終濃度０．１～１００ｎｇ／ｍｌの範囲）、　ｄ）ＢＭＰシグナリング阻害剤（例として、ＬＤＮ１９３１８９（ＡＸＯＮ１５０９、最終濃度０．０１～２０マイクロＭ）、Ｋ０２２８８（Ａｘｏｎ２１８９、最終濃度０．１～２０マイクロＭ）、ドルソモルフィン塩酸塩（ＡＸＯＮ２１５０、最終濃度０．１～２０マイクロＭ）が含まれるが、これらに限定されない）、　ｅ）ＮＯＴＣＨシグナリング阻害剤（例として次のガンマセクレターゼ阻害剤が含まれるが、これらに限定されない：ＤＡＰＴ（Ａｘｏｎ　Ｍｅｄｃｈｅｍ　１４８４、最終濃度０．０５～５０マイクロＭ）、ＬＹ２８８６７２１塩酸塩（Ａｘｏｎ　Ｍｅｄｃｈｅｍ　１９６４、最終濃度０．０５～５０マイクロＭ）、ＤＢＺ（Ａｘｏｎ　Ｍｅｄｃｈｅｍ、Ａｘｏｎ１４８８、最終濃度０．０５～５０マイクロＭ））、　ｆ）ソニックヘッジホッグ経路（ＳＨＨ）阻害剤（例として、ＧＡＮＴ６１（ＳｉｇｍａＡｌｄｒｉｃｈ、最終濃度０．０５～５０マイクロＭ）およびＲＵ－ＳＫＩ４３（Ａｘｏｎ　Ｍｅｄｃｈｅ

ｍ、Ａｘｏｎ２０３５、最終濃度０．０５～５０マイクロM）が含まれるが、これらに限定されない）、　ｇ）ＥＲＫ５阻害剤（ＢＩＸ０２１８９　Ａｘｏｎ１８０９、最終濃度０．１～１００マイクロMの範囲）、　ｈ）ＲＯＣＫ阻害剤［Ｙ２７６３２（ＡＸＯＮ１６８３）、最終０．０５～１００マイクロM］、　ｉ）ＦＧＦシグナリング阻害剤（ＦＧＦＲ阻害剤の例としてＰＤ１７３０７４およびＳＵ５４０１が挙げられるが、これらに限定されない）、および　ｊ）ＴＧＦ経路阻害剤（ＴＧＦＲ阻害剤の例としてＳＢ４３１５４２およびＡ８３－０１小分子化合物が挙げられるが、これらに限定されない。（本明細書中において、用語「ＴＧＦＲ阻害剤（またはＴＧＦＲｉ）」はＴＧＦＲ発現および／またはＴＧＦＲ活性レベルを阻害できる分子を指し、この発現および／または活性レベルはリン酸化ＡＬＫ４、５、および７により決定される））。

【実施例１５】

【０８１８】

ナイーブ型多能性状態を誘導し維持するためのＥＲＡＳ活性化　ヒトＥＳ　Ｒａｓ（ＥＲＡＳ）遺伝子（遺伝子ＩＤ：３２６６）は上流に未成熟ポリアデニル化シグナルを有し、このポリアデニル化シグナルは切断型非翻訳領域転写物を与える（Ｋａｍｅｄａ　Ｔ，ａｎｄ　Ｔｈｏｍｓｏｎ　ＪＡ，Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ　２００５，２３：１５３５－４０）。

【０８１９】

本発明者らはさらに、多能性幹細胞におけるＥＲａｓ過剰発現または内在性ヒトＥＲａｓ活性化によって、多能性幹細胞においてナイーブ状態を誘導できるという構想を立てた。その結果、ＥＲａｓが過剰発現または内因的に活性化されるよう遺伝子が改変された多能性幹細胞が多能性幹細胞のナイーブ状態を呈する。

【０８２０】

多能性幹細胞におけるＥＲａｓ過剰発現　ＥＲａｓを構成的または一過的に発現するよう設計された核酸コンストラクト（配列番号１０９）を用いて、ヒト多能性幹細胞を形質転換する。

【０８２１】

ヒト多能性幹細胞におけるＥＲＡＳの内因的発現の活性化　ヒト細胞は、ヒトゲノム中に組込まれてＥＲＡＳの発現を遮断するウイルス配列が存在するために、ＥＲＡＳ遺伝子の発現がない。ヒトＥＲＡＳの内因的発現の活性化は、ポリアデニル化部位（配列表の配列番号１０８中に「未成熟ポリアデニル化部位」として示す、文献Ｋａｍｅｄａ　ｅｔａｌ．Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌｓ　２００５；２３：１５３５－１５４０の図３中のＡ－１、Ａ２、またはＡ－３の四角い枠内において「ポリＡシグナル」とも示す。この文献はその全体を参考として本明細書に組み込む）の組み合わせを除去することによって実施する。この改変は、ＣＲＩＳＰＲという相同組換え［Ｒｙａｎ　Ｍ．Ｗａｌｓｈ　ａｎｄ　Ｋｏｎｒａｄ　Ｈｏｃｈｅｄｌｉｎｇｅｒ，Ｐｒｏｃ　Ｎａｔｌ　Ａｃａｄ　Ｓｃｉ　Ｕ　Ｓ　Ａ．２０１３　Ｓｅｐ　２４；１１０（３９）：１５５１４－５；ａｎｄ　Ｙａｎｇ　Ｈｕｉ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃｅｌｌ　１５４：１３７０－１３７９，Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ　１２，２０１３中に記載、両文献の全体を参考として本明細書に組み込む］、またはＴＡＬＥＮ［Ｈｏｃｋｅｍｅｙｅｒ　Ｄ，ｅｔ　ａｌ．，Ｎａｔ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．２０１１　Ｊｕｌ　７；２９（８）：７３１－４、その全体を参考として本明細書に組み込む］を単独でまたは組み合わせることによって実施できる。

【０８２２】

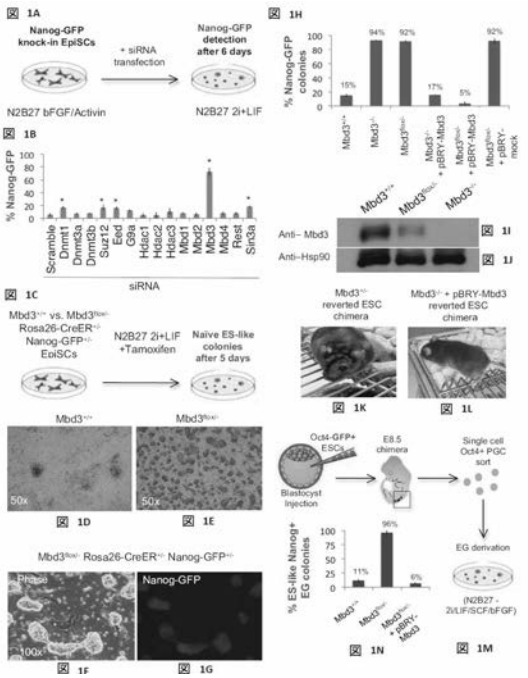
ヒトＥＲＡＳ遺伝子の発現／再活性化は、ヒトナイーブ型多能性細胞の増殖を促すための、本明細書中に記載のナイーブ型多能性幹細胞用培地のいずれかと組み合わせて実施してもよい。

【０８２３】

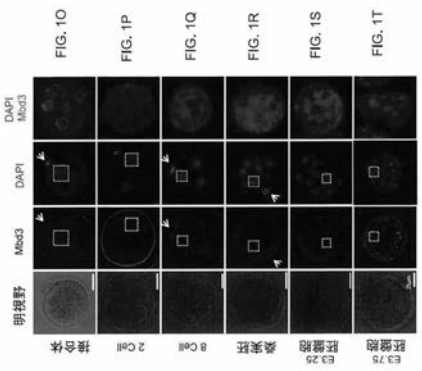
本発明は、本発明の特定の実施形態と共に記載されるが、多くの代替、改変、および変形が当業者には明白であろうことは明らかである。したがって、付属の請求項の思想と広い意味での範囲とに含まれるあらゆる代替、改変、および変形を包含することを意図する。

【０８２４】
本明細書中で言及するすべての刊行物、特許、および特許出願は、各刊行物、特許、および特許出願を参照として本明細書に組み込むことが具体的かつ個別に表記されているかのごとく、その全体を参考として本明細書に組み込む。また、本出願中において参考文献を引用または確認している場合、本発明の先行技術として当該参考文献を用いることを認めたものとは解釈されない。各項目の見出しについて、これらは必ずしも制限を加えるものとして解釈されない。

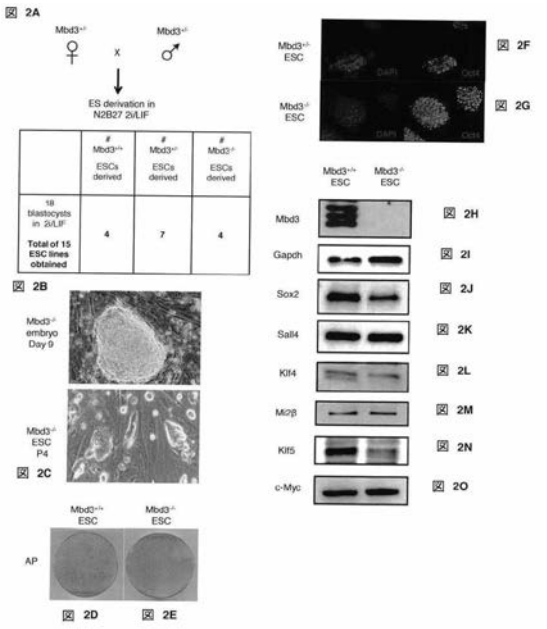
【図１Ａ－Ｍ】



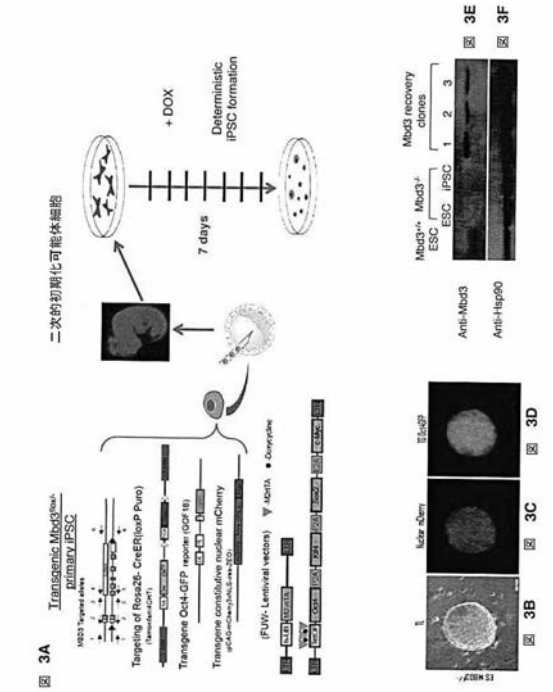
【図１Ｏ－１Ｔ】



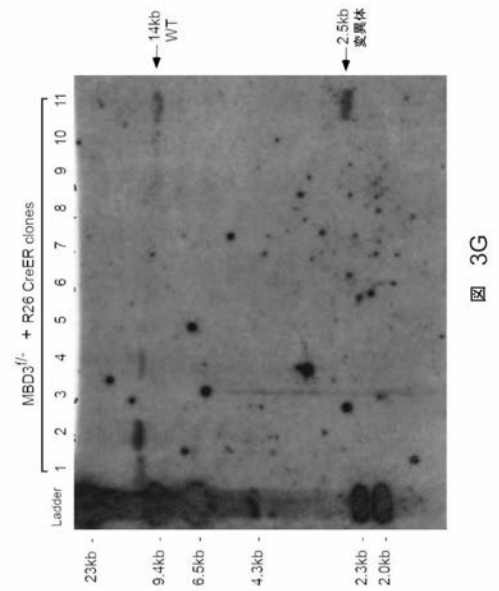
【図２－２Ｏ】



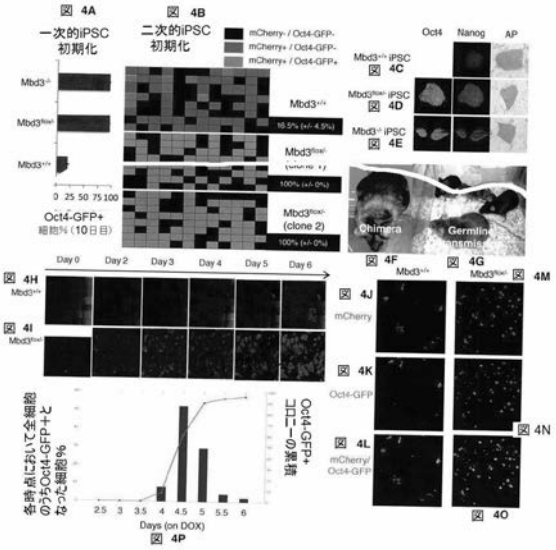
【図３Ａ－Ｆ】



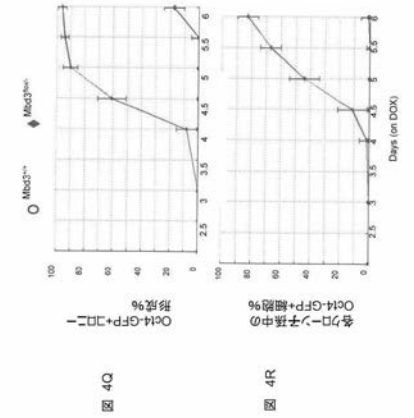
【図３Ｇ】



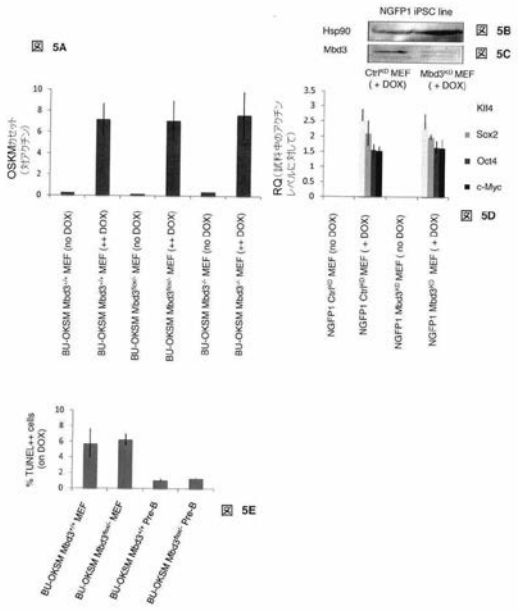
【図４Ａ－Ｐ】



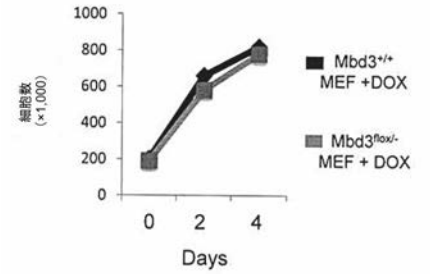
【図４Ｑ－Ｒ】



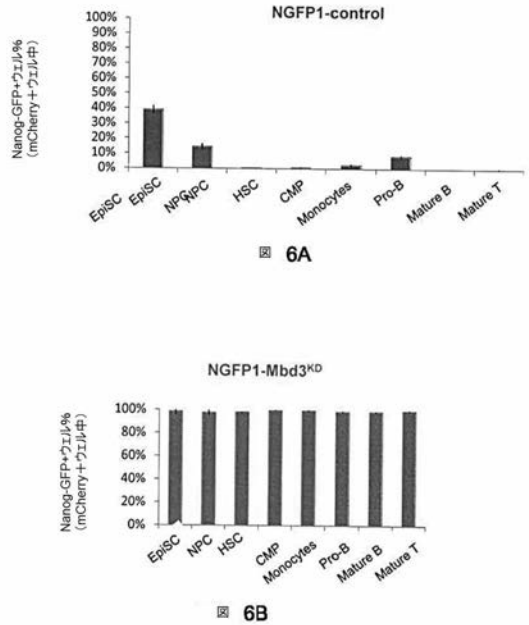
【図５Ａ－Ｅ】



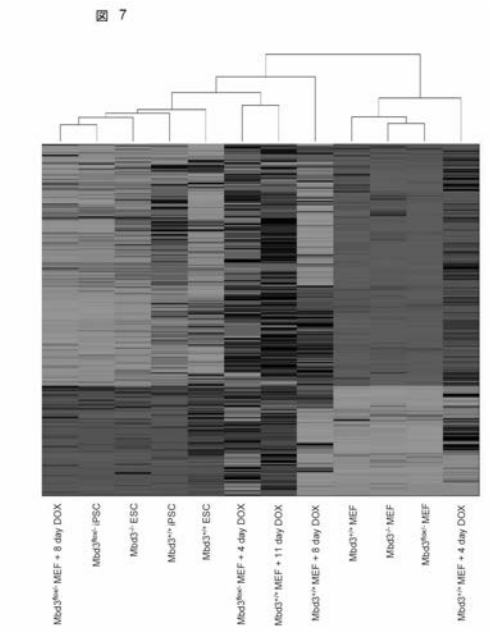
【図５Ｆ】



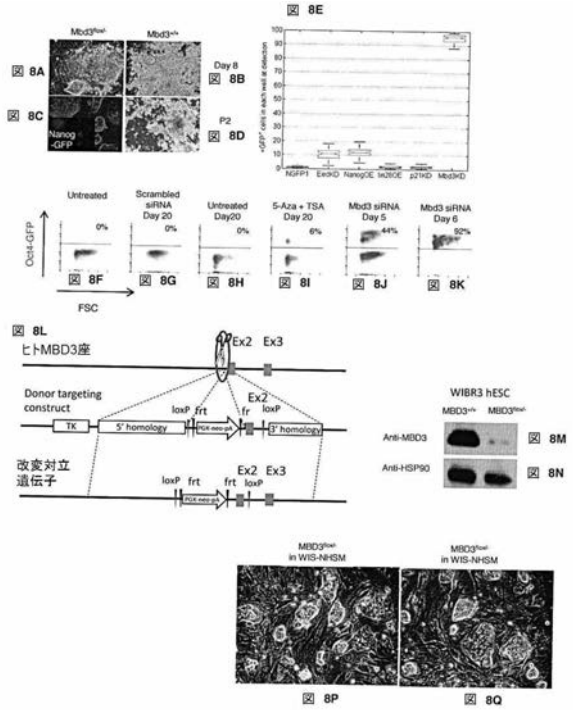
【図６Ａ－Ｂ】



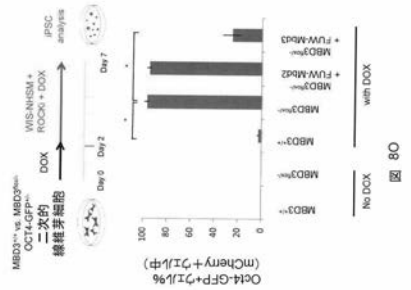
【図７】



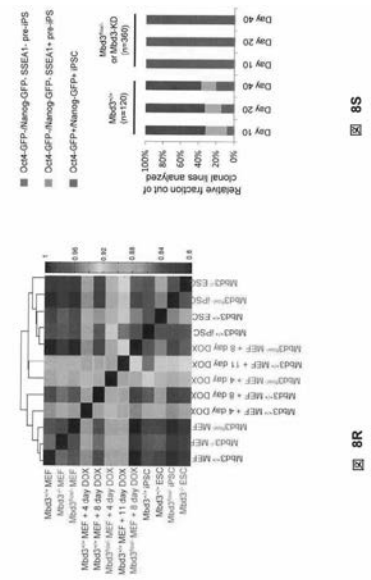
【図８Ａ－Ｑ】



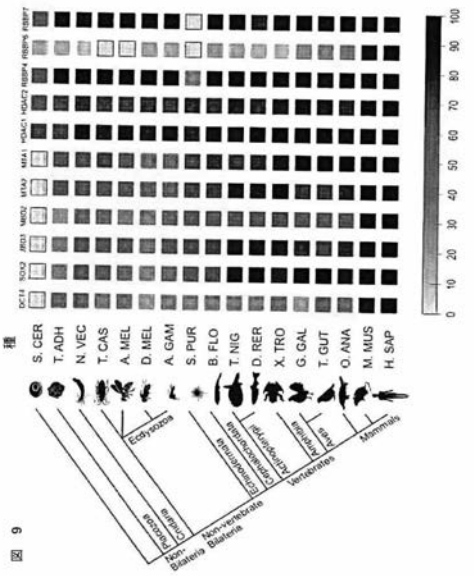
【図８Ｏ】



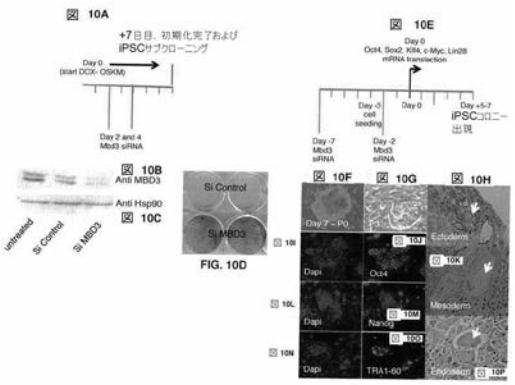
【図８Ｒ－Ｓ】



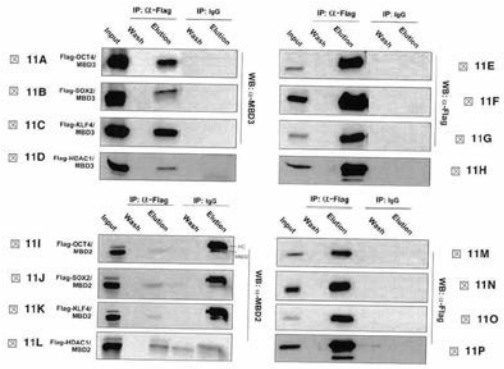
【図９】



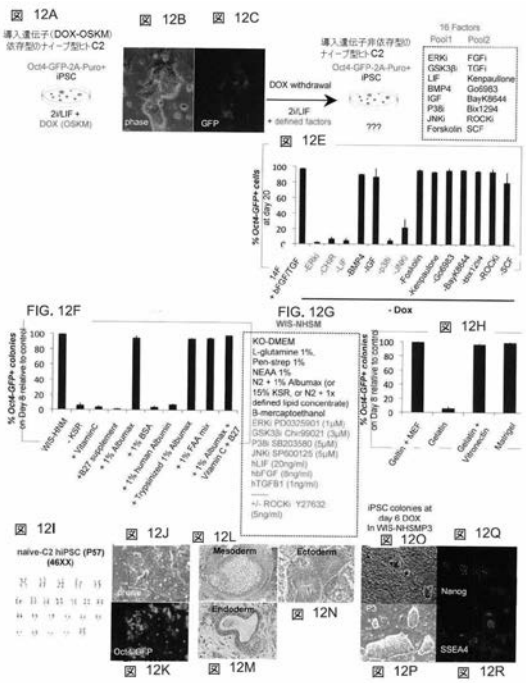
【図１０Ａ－Ｅ】



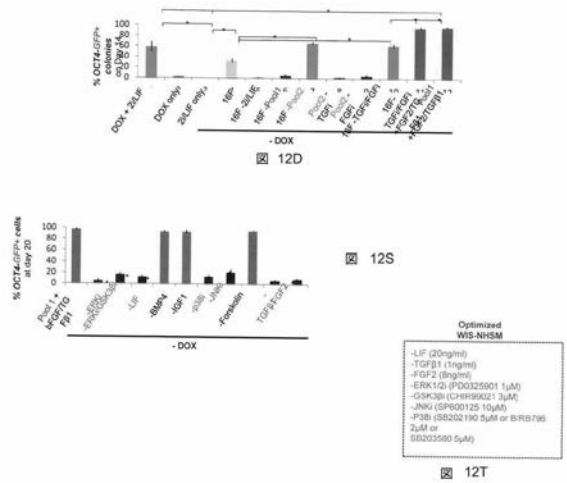
【図１１Ａ－Ｐ】



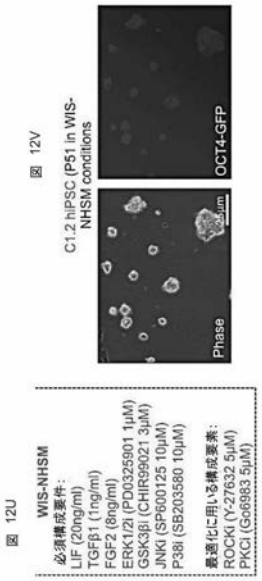
【図１２Ａ－Ｃ．Ｅ－Ｒ】



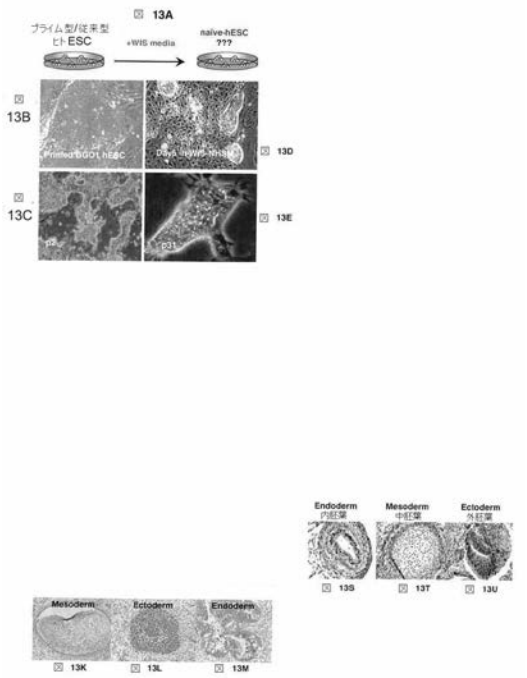
【図１２Ｄ．Ｓ－Ｔ】



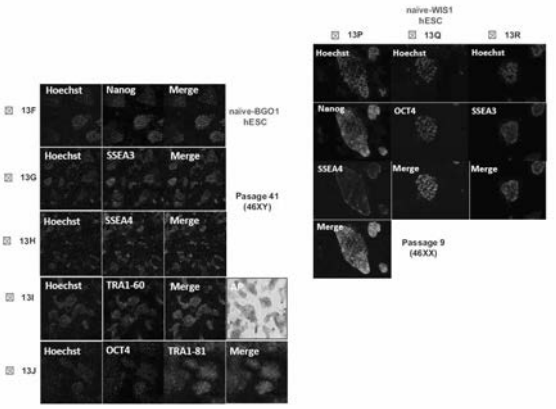
【図１２Ｕ－Ｖ】



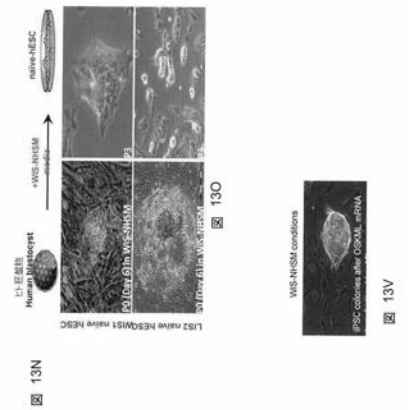
【図１３Ａ－Ｅ】



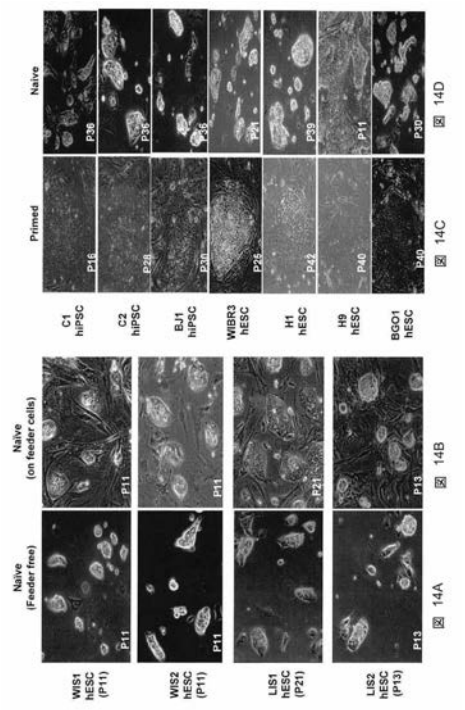
【図１３Ｆ－Ｊ．Ｐ－Ｒ】



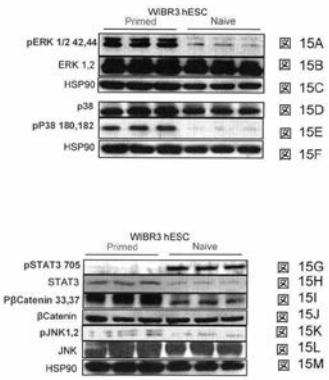
【図１３Ｎ－Ｏ．Ｖ】



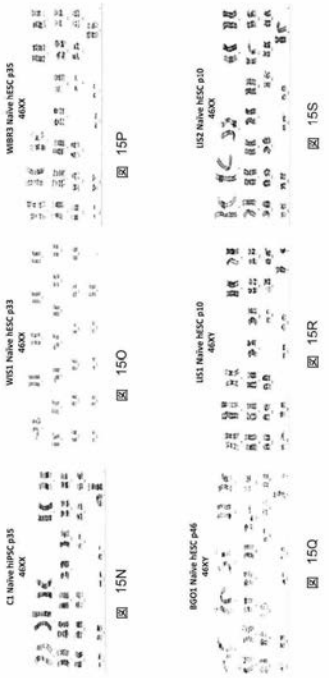
【図１４Ａ－Ｄ】



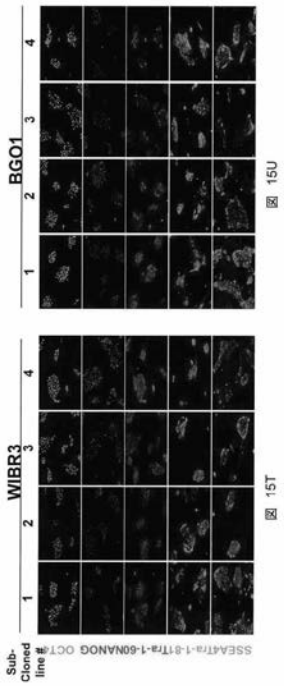
【図１５Ａ－Ｍ】



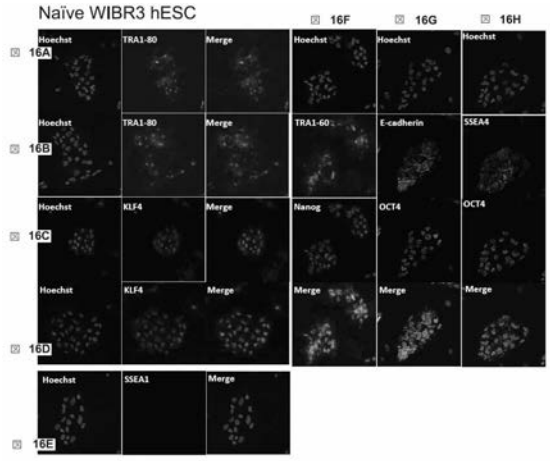
【図１５Ｎ－Ｓ】



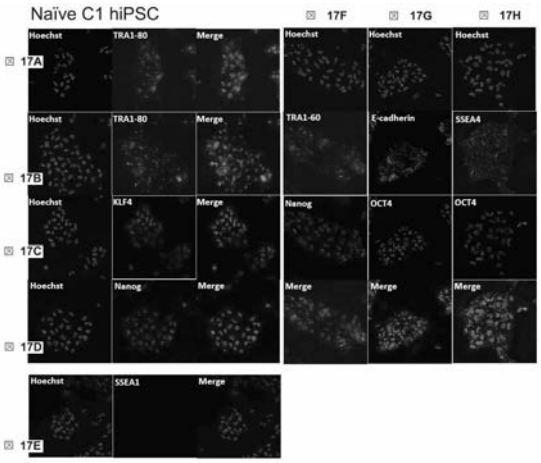
【図１５Ｔ－Ｕ】



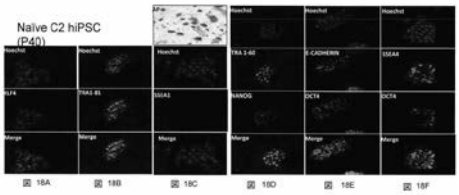
【図１６Ａ－Ｈ】



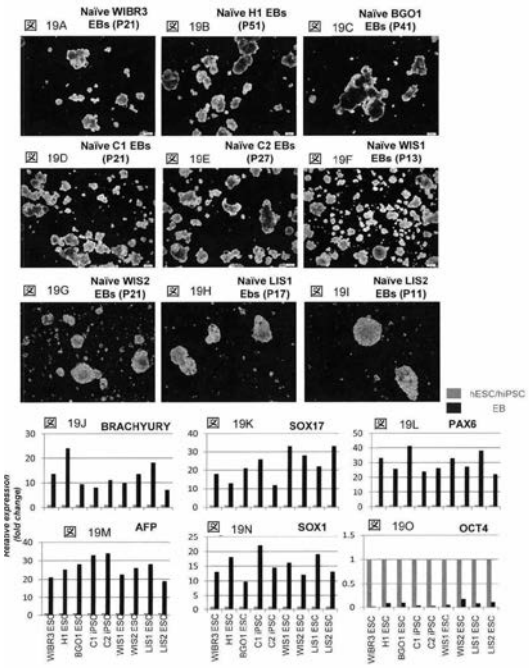
【図１７Ａ－Ｈ】



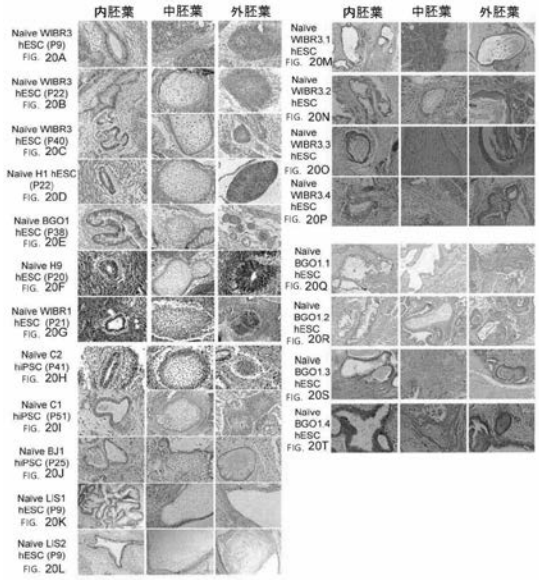
【図１８Ａ－Ｆ】



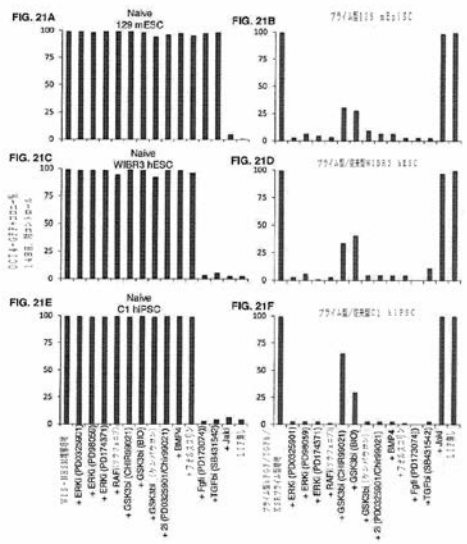
【図１９Ａ－Ｏ】



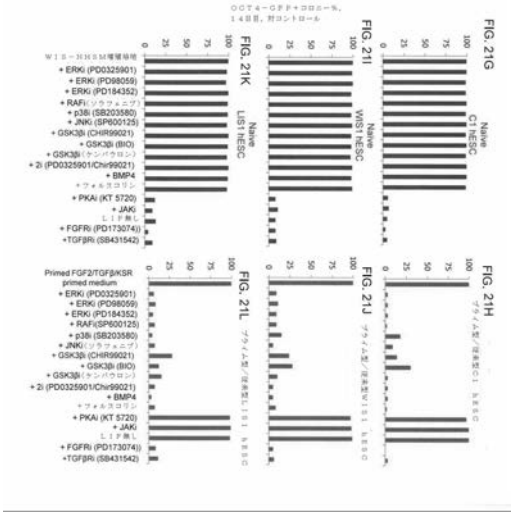
【図２０Ａ－Ｔ】



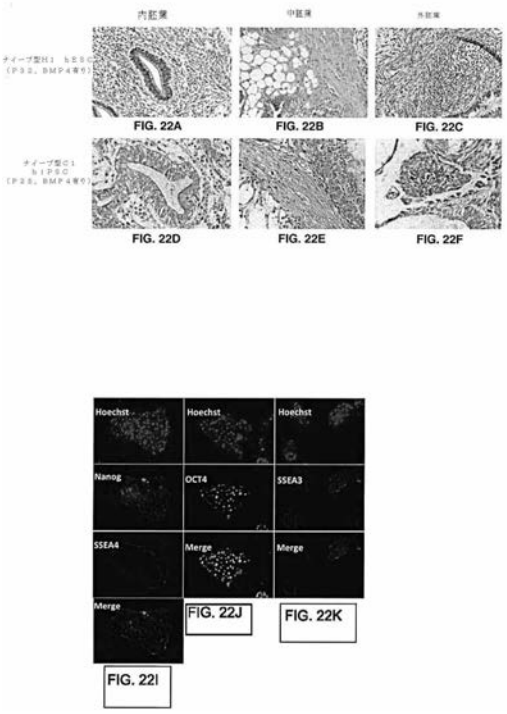
【図２１Ａ－Ｆ】



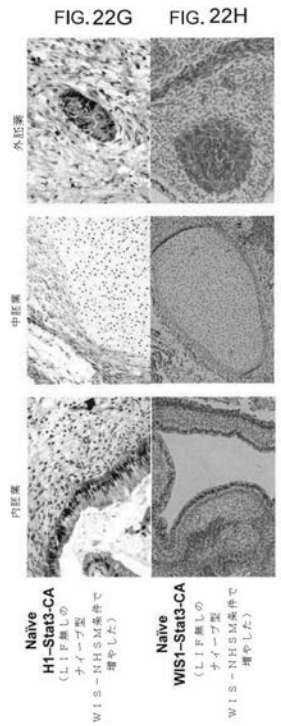
【図２１Ｇ－Ｌ】



【図２２Ａ－Ｆ．Ｊ－Ｌ】



【図２２Ｇ－Ｈ】



【図２３Ａ】

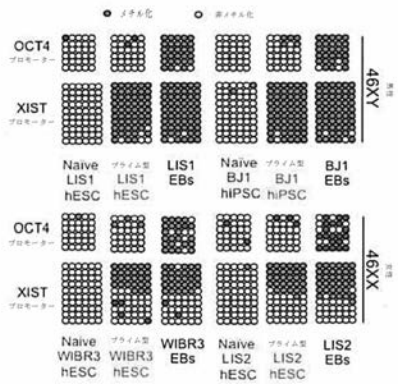


FIG. 23A

【図２３Ｂ－Ｄ】

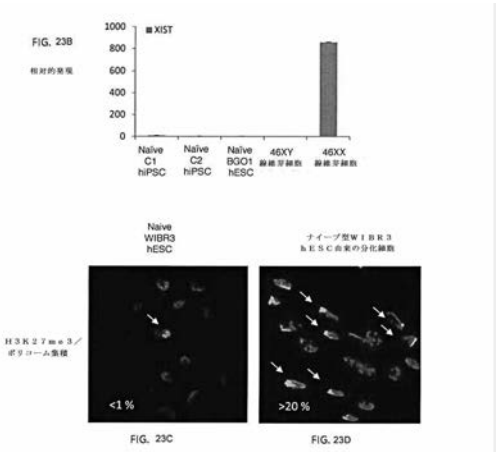


FIG. 23C　FIG. 23D

【図２４Ａ－Ｃ】

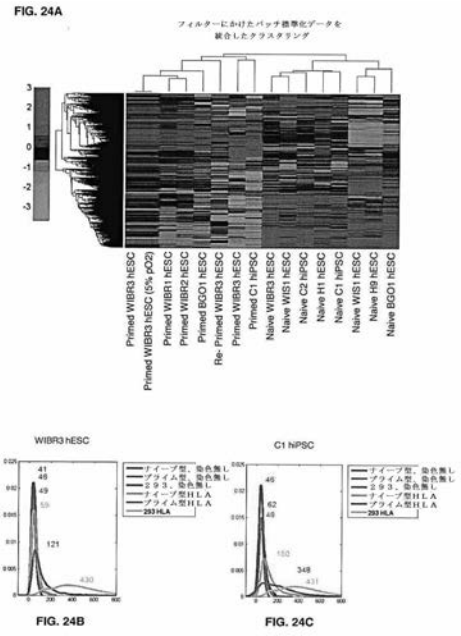
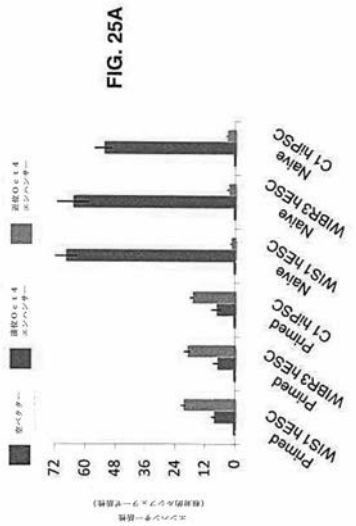
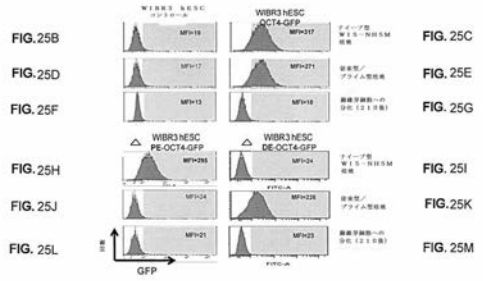


FIG. 24B　FIG. 24C

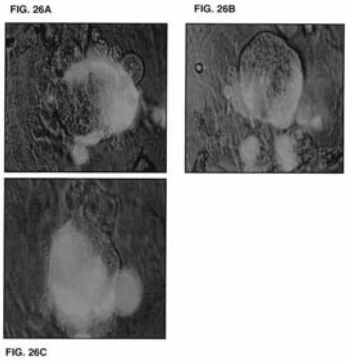
【図２５Ａ】



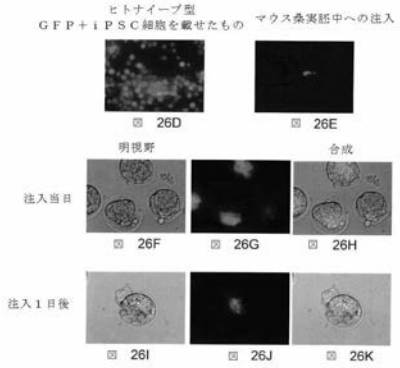
【図２５Ｂ－Ｍ】



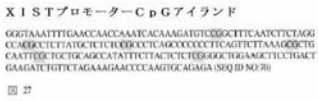
【図２６Ａ－Ｃ】



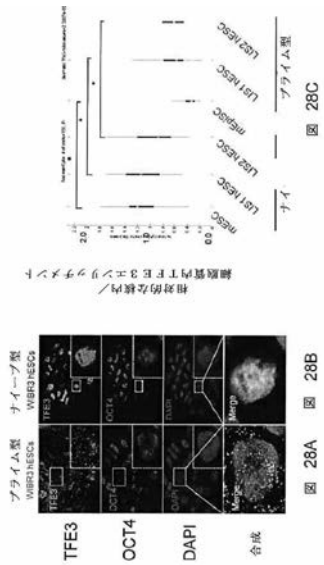
【図２６Ｄ－Ｋ】



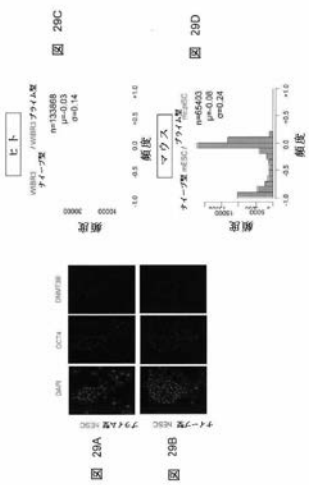
【図２７】



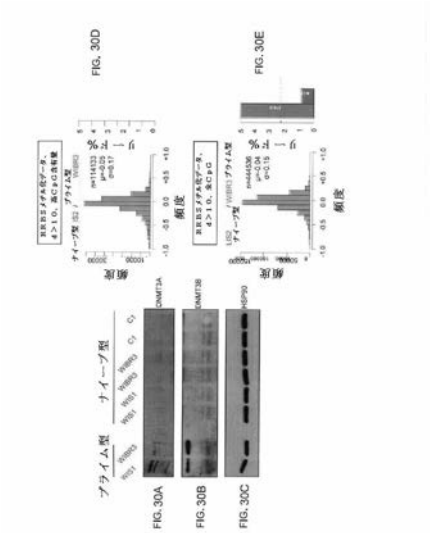
【図２８Ａ－Ｃ】



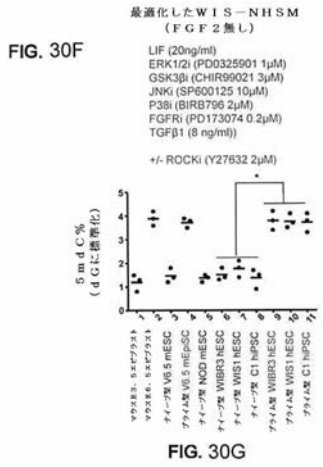
【図２９Ａ－Ｄ】



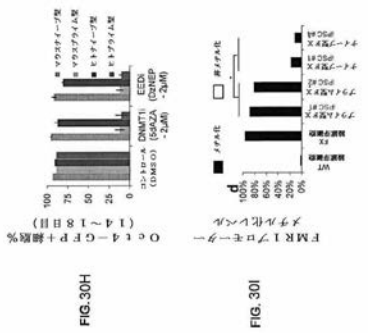
【図３０Ａ－Ｅ】



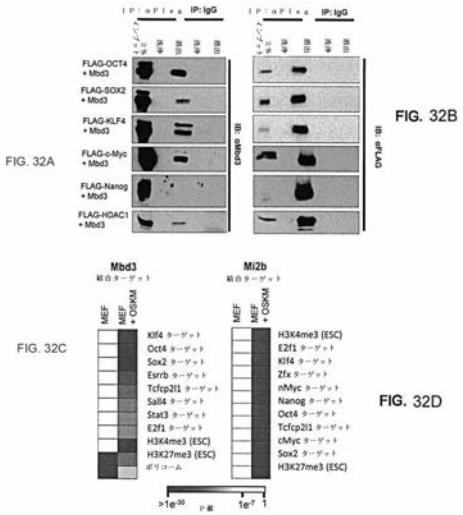
【図３０Ｆ－Ｇ】



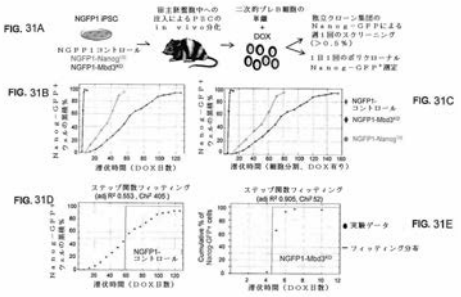
【図３０Ｈ－Ｉ】



【図３２Ａ－Ｄ】



【図３１Ａ－Ｅ】



【図３２Ｅ－Ｆ】

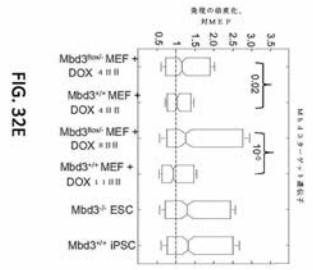


FIG. 32E

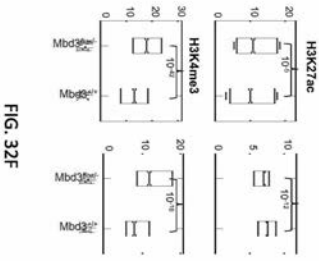


FIG. 32F

【図３２Ｇ－Ｈ】

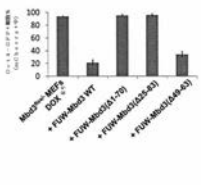


FIG. 32G

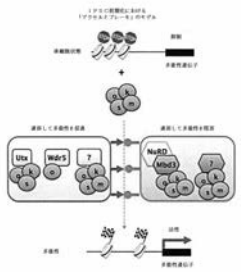


FIG. 32H

【図３３Ａ－Ｃ】

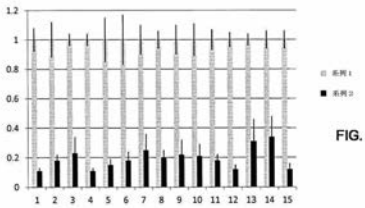


FIG. 33A

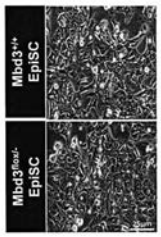


FIG. 33B

FIG. 33C

【図３３Ｄ－Ｇ】

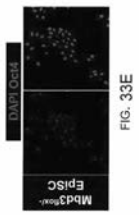


FIG. 33E

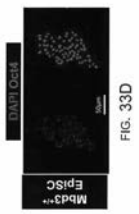


FIG. 33D

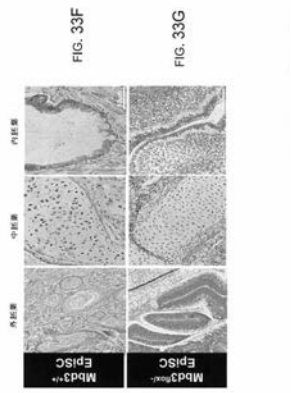


FIG. 33F

FIG. 33G

【図３４Ａ－Ｃ】

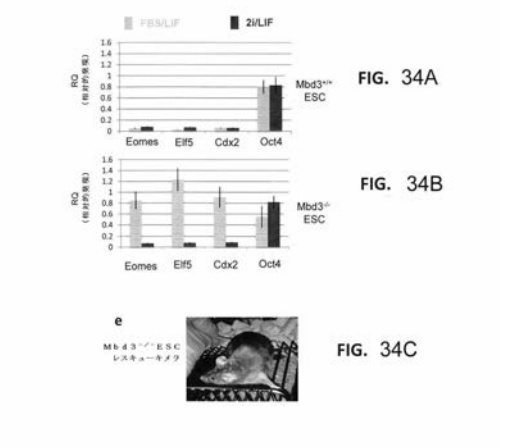


FIG. 34A

FIG. 34B

FIG. 34C

【図３５Ａ－Ｂ】

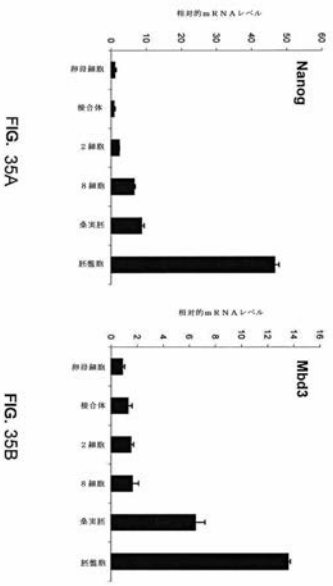


FIG. 35A

FIG. 35B

【図３５Ｃ】

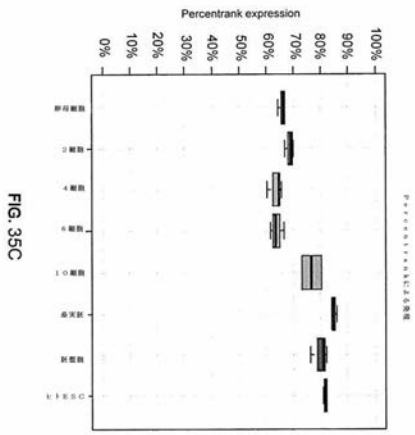


FIG. 35C

【図３６Ａ－Ｈ】

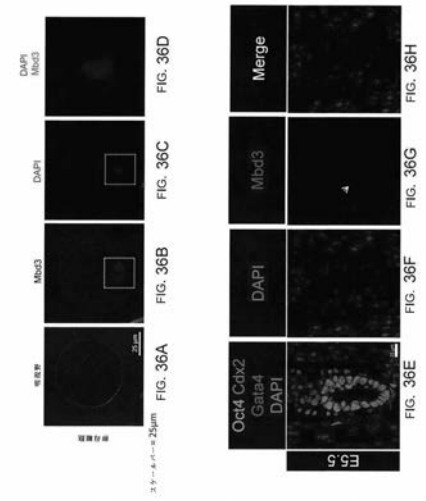


FIG. 36A
FIG. 36B
FIG. 36C
FIG. 36D
FIG. 36E
FIG. 36F
FIG. 36G
FIG. 36H

【図３６Ｉ－Ｊ】

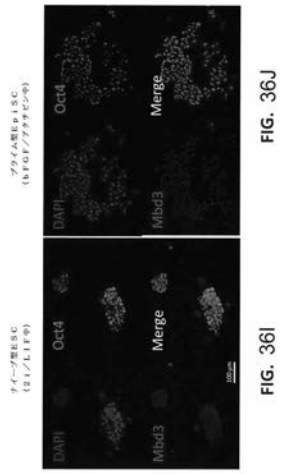


FIG. 36J

FIG. 36I

【図３７Ａ－Ｃ】

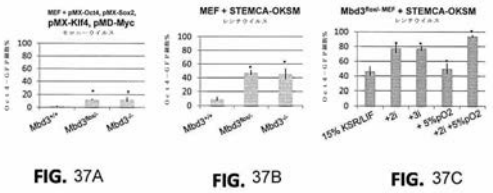


FIG. 37A

FIG. 37B

FIG. 37C

【図３８Ａ－Ｂ】

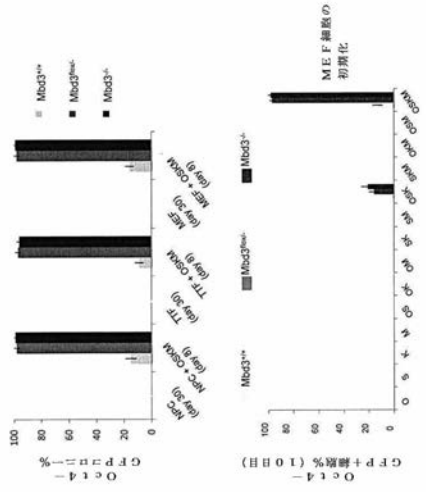


FIG. 38A

FIG. 38B

【図３９Ａ－Ｃ】

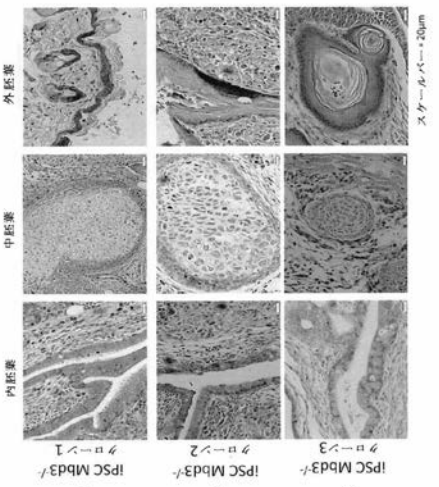
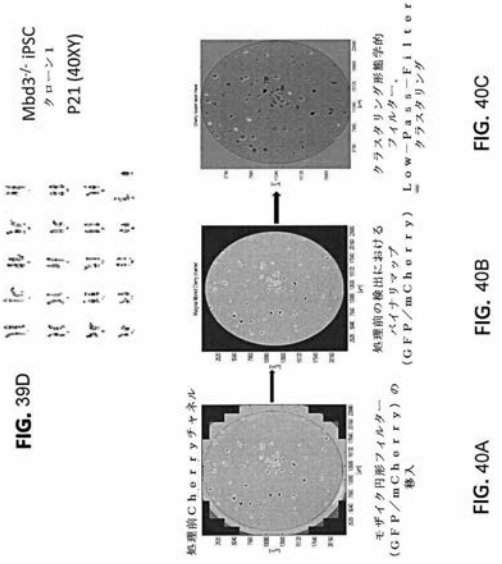


FIG. 39A

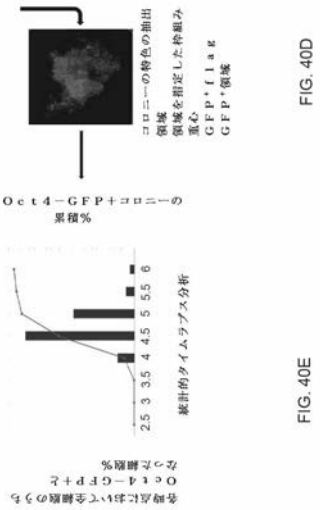
FIG. 39B

FIG. 39C

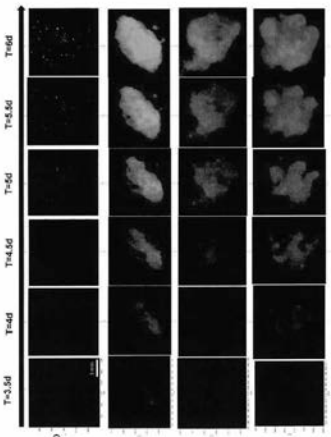
【図４０Ａ－Ｃ】



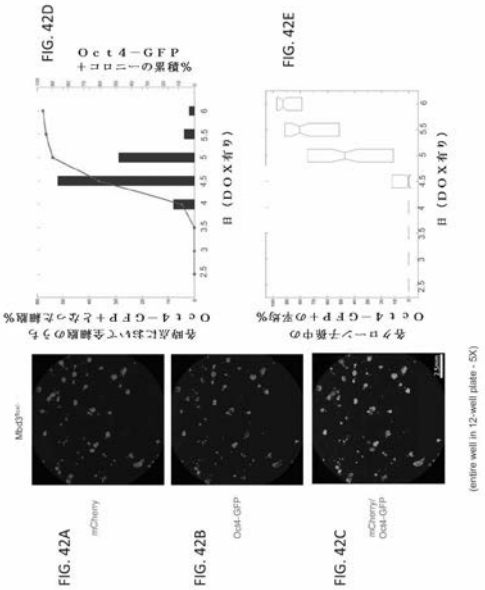
【図４０Ｄ－Ｅ】



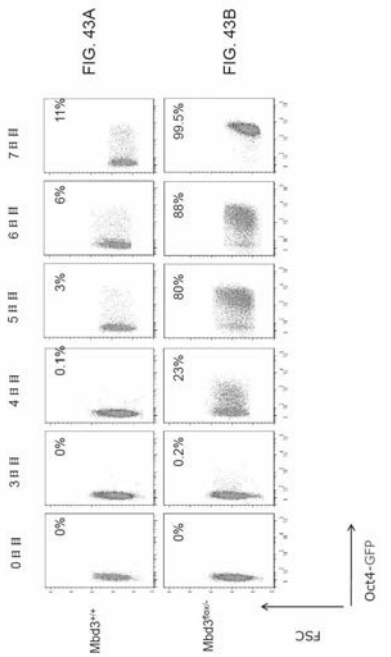
【図４１Ａ－Ｄ】



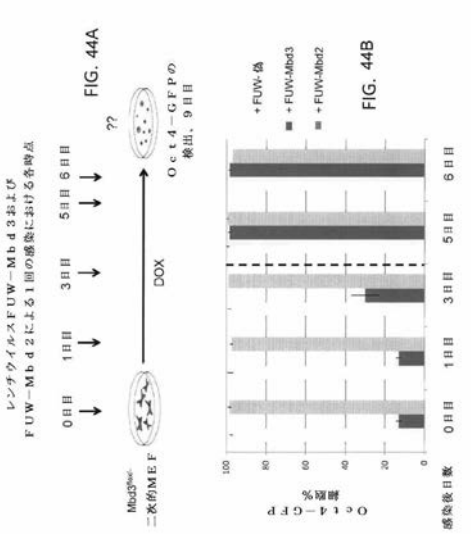
【図４２Ａ－Ｅ】



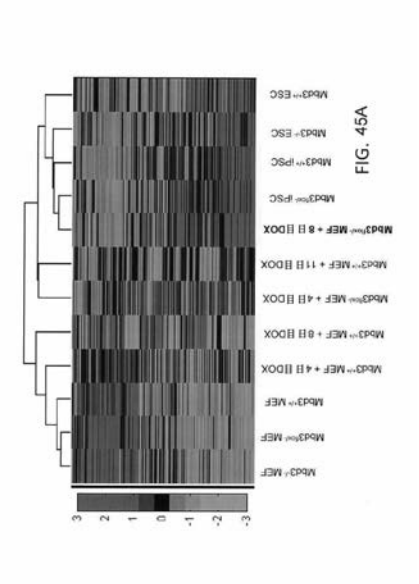
【図４３Ａ－Ｂ】



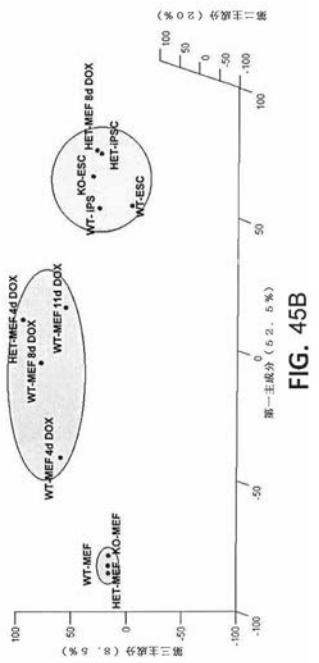
【図４４Ａ－Ｂ】



【図４５Ａ】



【図４５Ｂ】



【図４６Ａ－Ｃ】

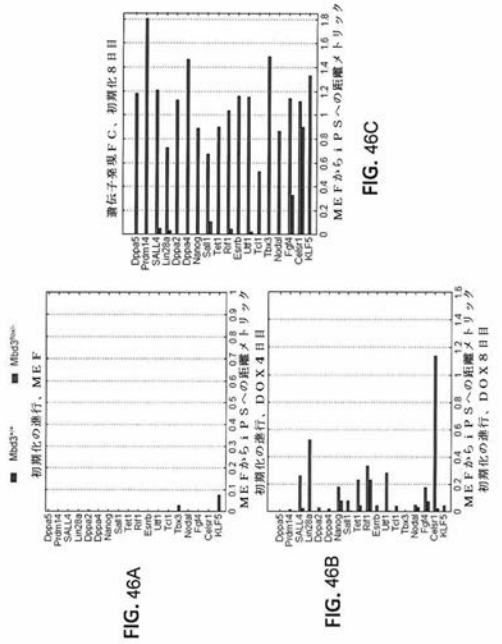


FIG. 46A

FIG. 46B

FIG. 46C

【図４６Ｄ－Ｅ】

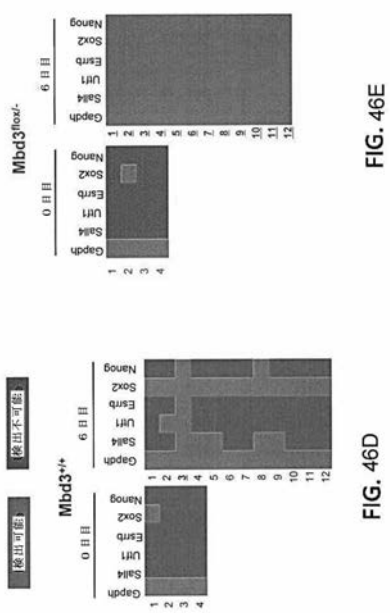


FIG. 46D

FIG. 46E

【図４７Ａ】

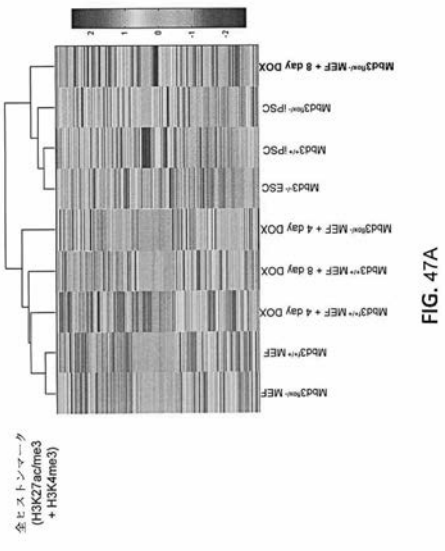


FIG. 47A

【図４７Ｂ】

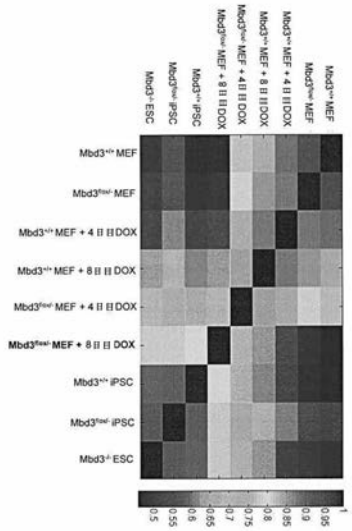
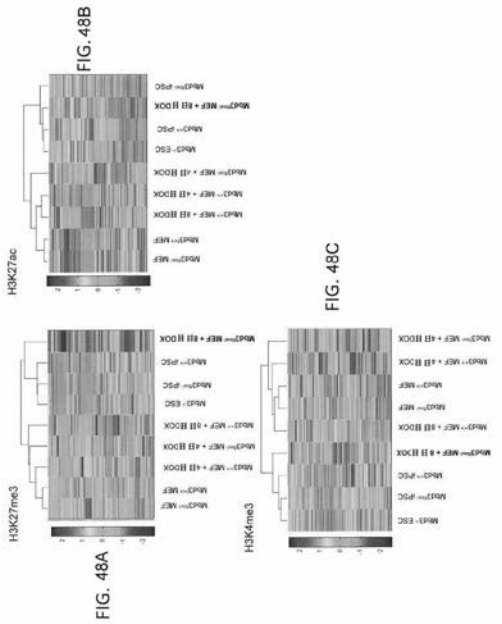
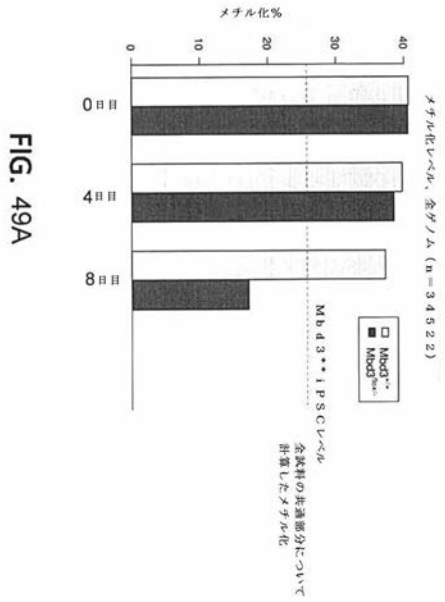


FIG. 47B

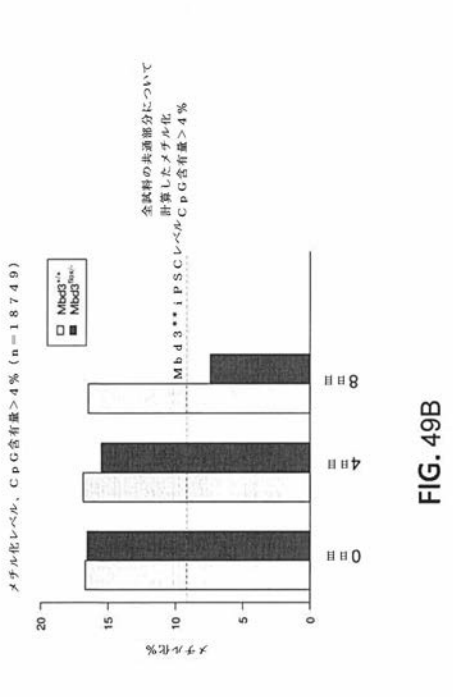
【図４８Ａ－Ｃ】



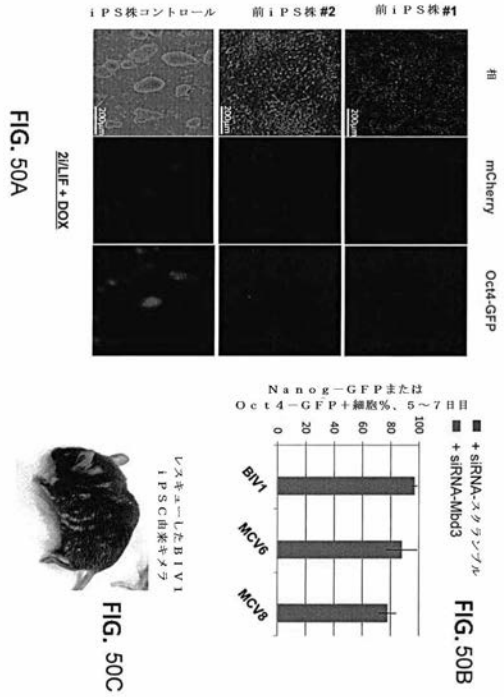
【図４９Ａ】



【図４９Ｂ】



【図５０Ａ－Ｃ】



【図５１】

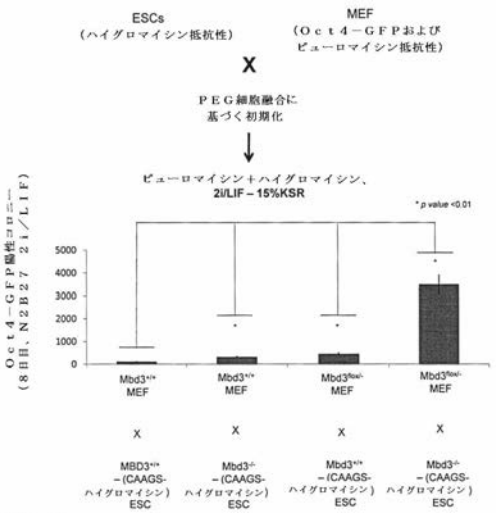


FIG. 51

【図５２Ａ－Ｃ】

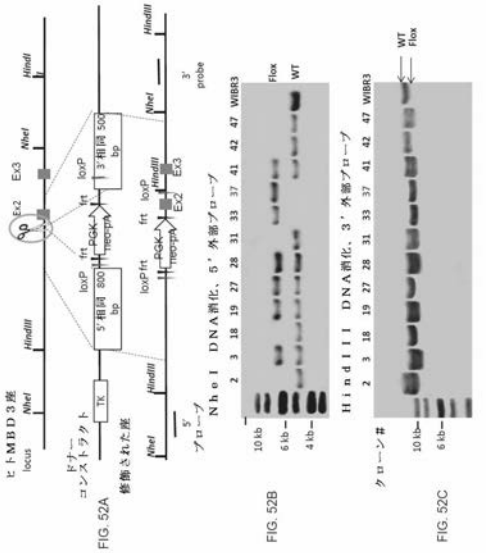


FIG. 52A

FIG. 52B

FIG. 52C

【図５３Ａ－Ｃ】

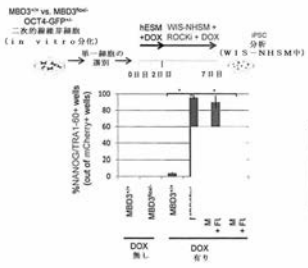


FIG. 53A

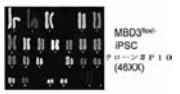


FIG. 53B

【図５３Ｃ－Ｅ】

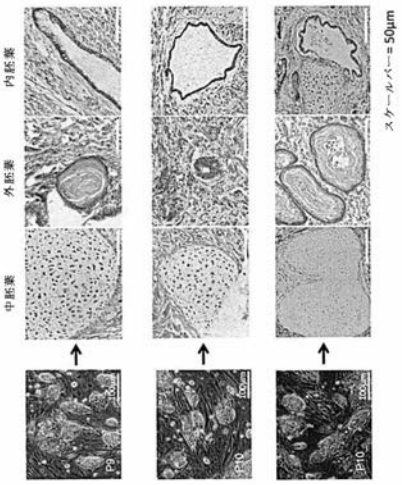
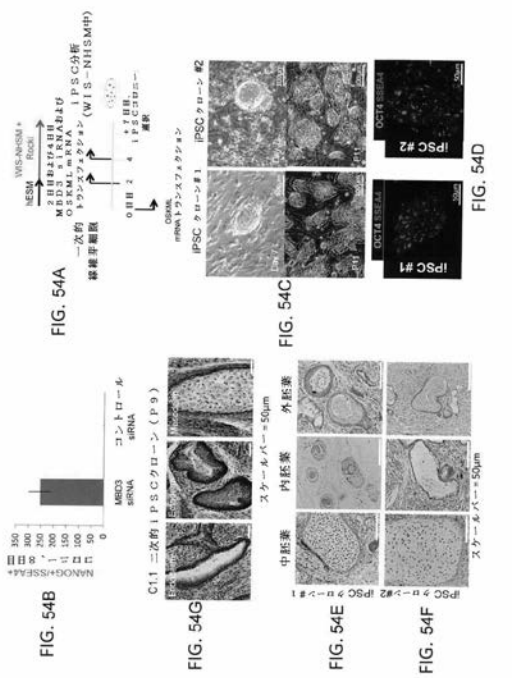


FIG. 53C

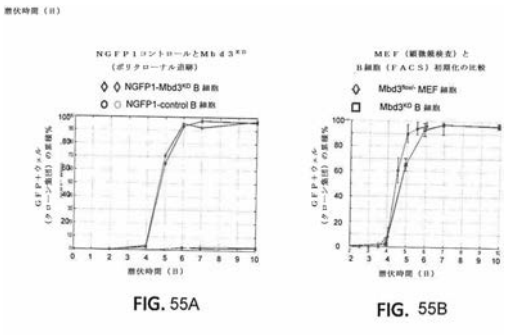
FIG. 53D

FIG. 53E

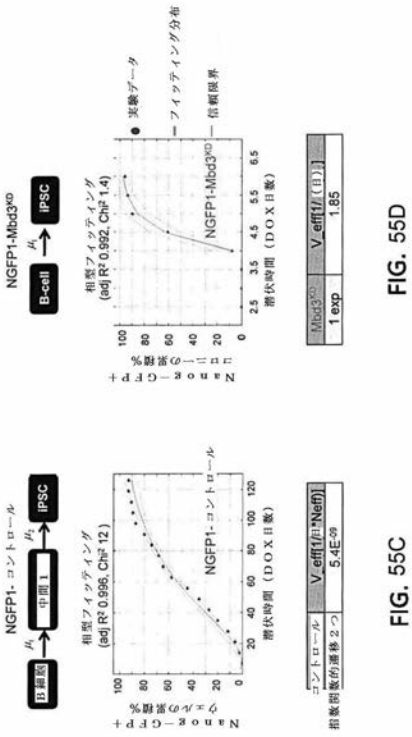
【図５４Ａ－Ｇ】



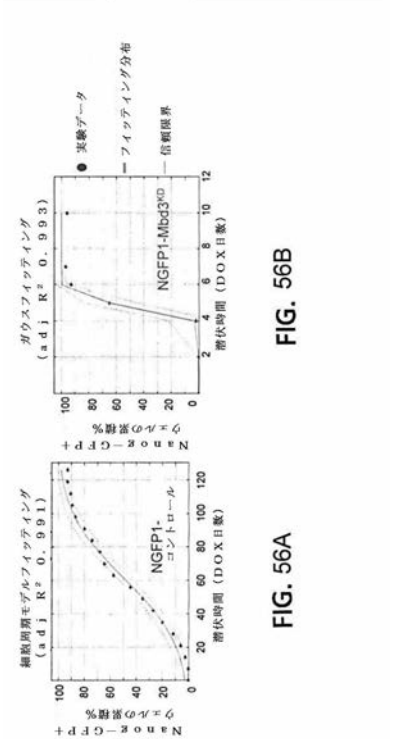
【図５５Ａ－Ｂ】



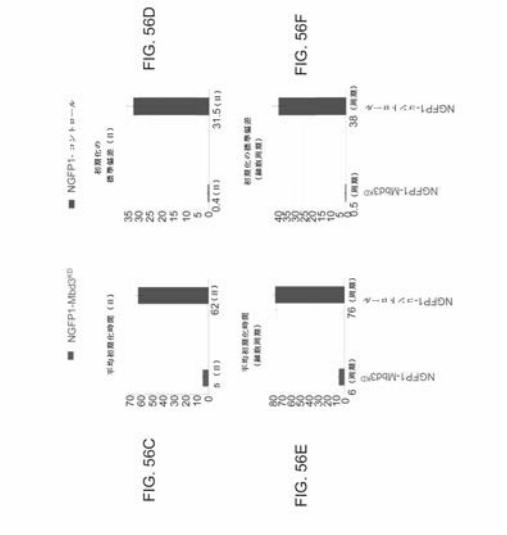
【図５５Ｃ－Ｄ】



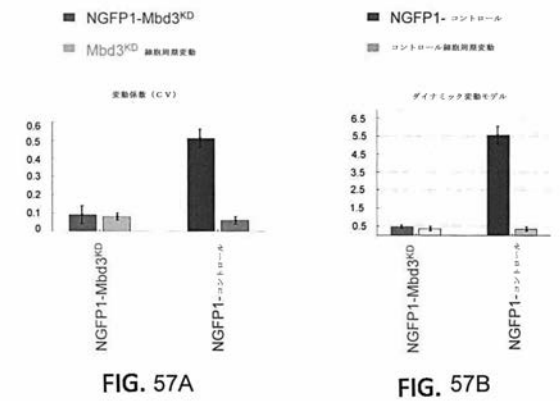
【図５６Ａ－Ｂ】



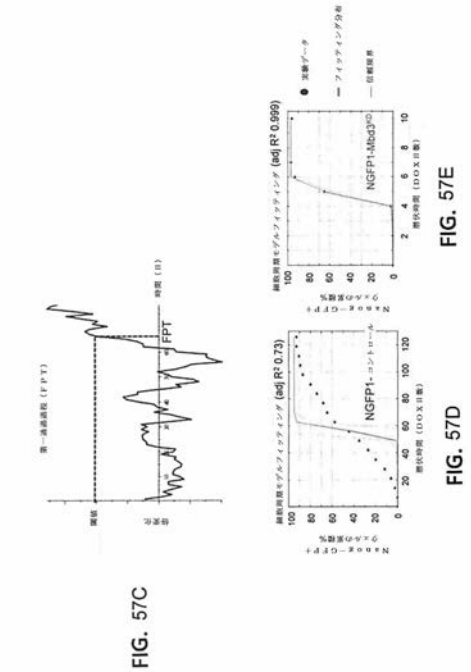
【図５６Ｃ－Ｆ】



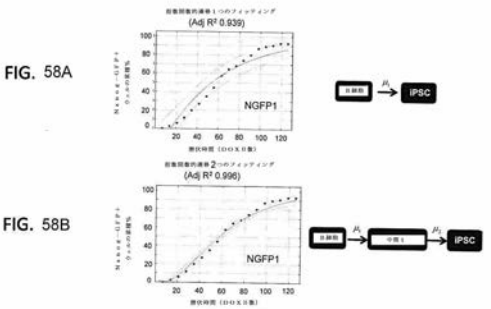
【図５７Ａ－Ｂ】



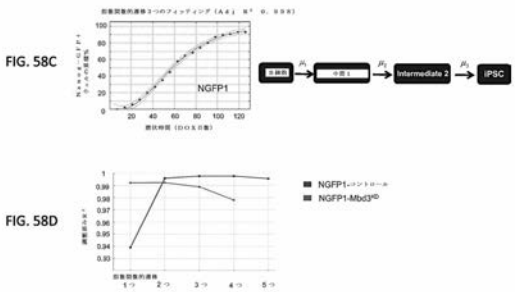
【図５７Ｃ－Ｅ】



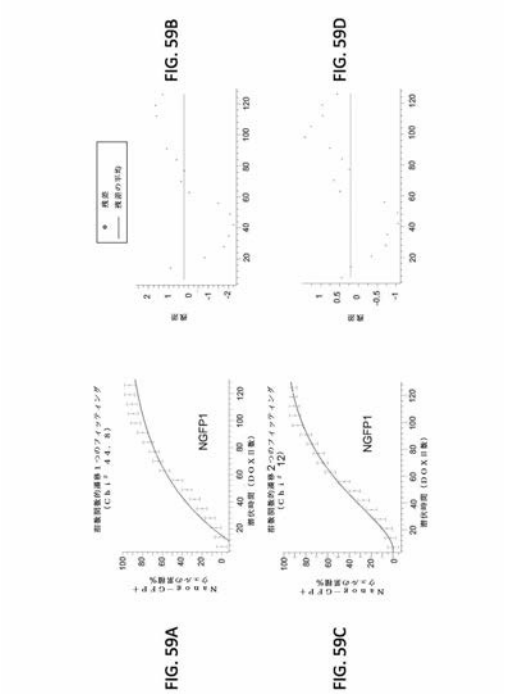
【図５８Ａ－Ｂ】



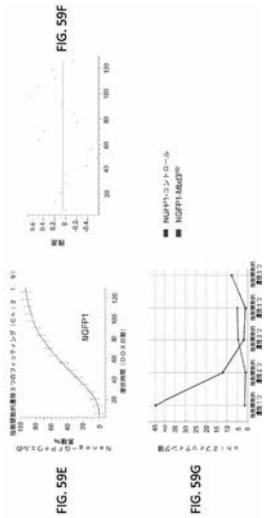
【図５８Ｃ－Ｄ】



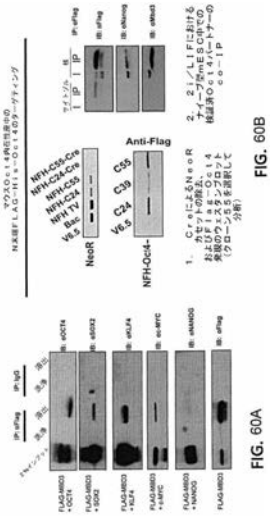
【図５９Ａ－Ｄ】



【図５９Ｅ－Ｇ】



【図６０Ａ－Ｂ】



【図６０Ｃ】

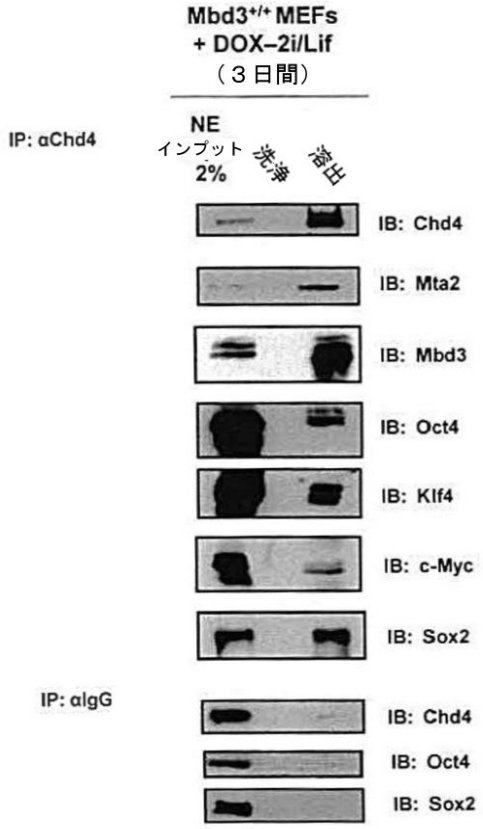


FIG. 60C

【図６１Ａ－Ｃ】

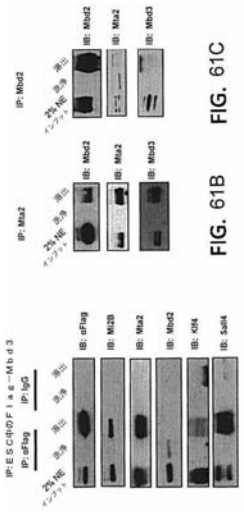


FIG. 61C

FIG. 61B

FIG. 61A

【図６２Ａ－Ｃ】

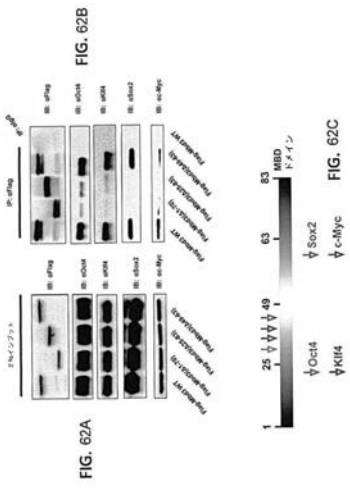


FIG. 62B

FIG. 62C

FIG. 62A

【図６３】

ＯＳＫＭ誘導後の
Ｍｂｄ３結合領域におけるモチーフ

因子	Ｚスコア	Ｐ値
Smad2/3	-20.7289	1.00E-30
Pou5f1	-20.646	1.00E-30
Klf1	-18.7681	1.00E-30
Sox2	-18.1417	1.00E-30
Klf4	-18.0815	1.00E-30
Klf7	-14.6281	1.00E-30
Rxra	-8.8792	3.37E-19
Zfp281	-7.90E+00	1.35E-15
Nr2f2	-7.6746	8.30E-15
Rara	-7.2955	1.49E-13
Sox11	-7.1281	5.09E-13
Nr5a2	-6.7859	5.77E-12
Nr1d2	-6.6024	2.02E-11
Sox30	-5.1197	1.53E-07
Rela	-4.7827	8.65E-07
Ctcf	-4.7463	0.000001036
Zic3	-4.6215	1.9045E-06
Zfp423	-4.6082	2.0304E-06
LMO2,Lmo2	-4.03E+00	0.000028302
Egr2	-3.8483	0.000059459
Sox15	-3.7769	0.000079394
Zfp740	-3.7689	0.000081987
Tcfap2a	-3.7374	0.000092951
Tcfap2c	-3.5205	0.00021537
Ppara	-3.39E+00	0.00034913
Sox12	-3.2536	0.00056986
Tcfap2b	-3.2505	0.00057604
Zfp161	-5.6591	7.61E-09
Zscan10	-3.6055	0.00015575
Zfp161	-3.1773	0.00074322

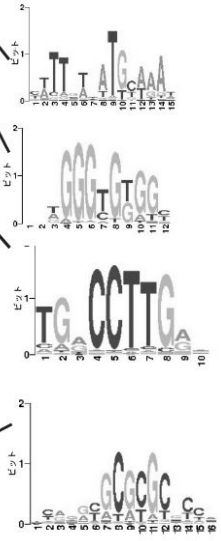


FIG. 63

【図６７Ａ－Ｄ】

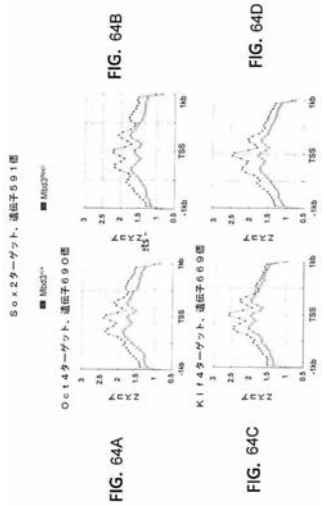


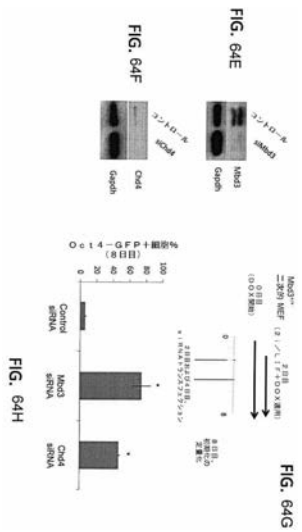
FIG. 64B

FIG. 64D

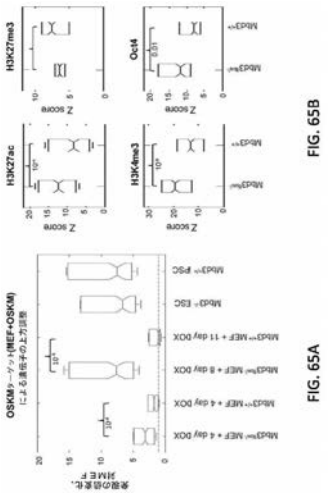
FIG. 64A

FIG. 64C

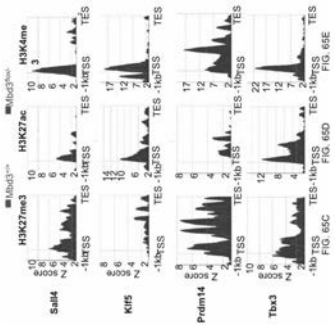
【図６４Ｅ－Ｈ】



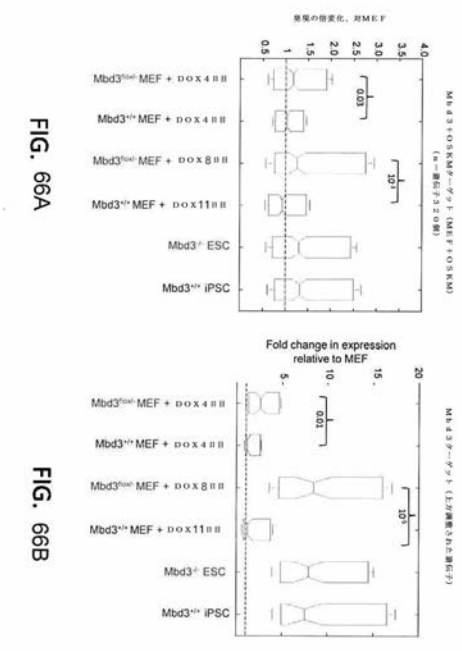
【図６５Ａ－Ｂ】



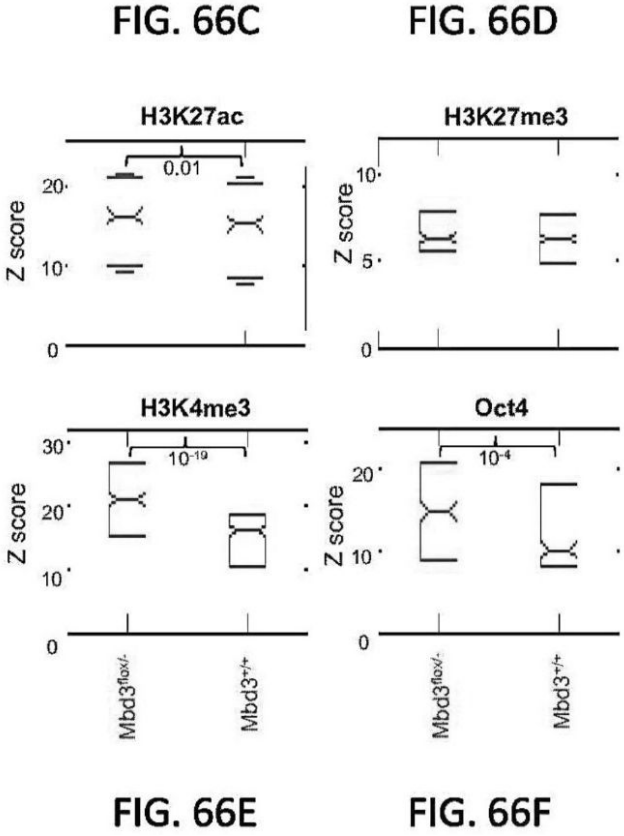
【図６５Ｃ－Ｅ】



【図６６Ａ－Ｂ】



【図６６Ｃ－Ｆ】



【図６７Ａ】

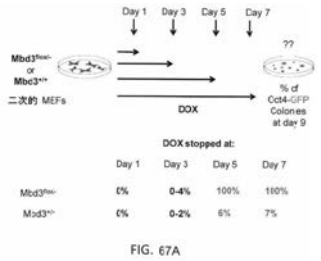
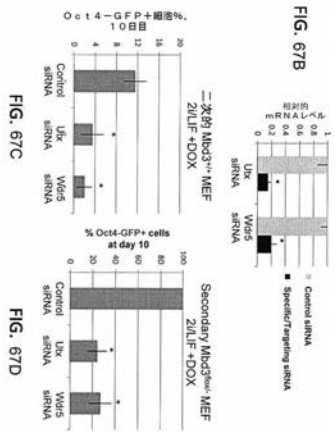
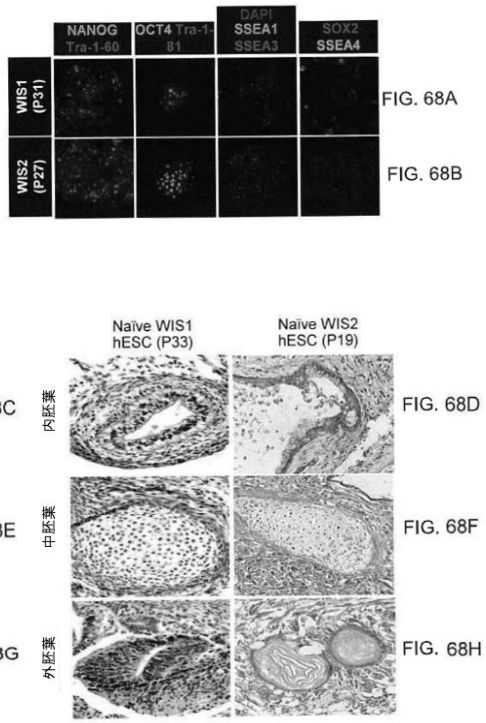


FIG. 67A

【図６７Ｂ－Ｄ】



【図６８Ａ－Ｈ】



【図６８Ｉ－Ｋ】

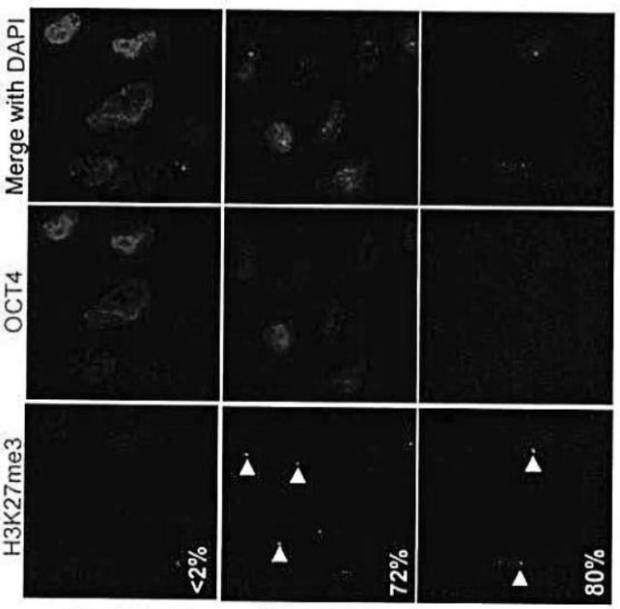


FIG. 68I
FIG. 68J
FIG. 68K

【図６９Ａ－Ｂ】

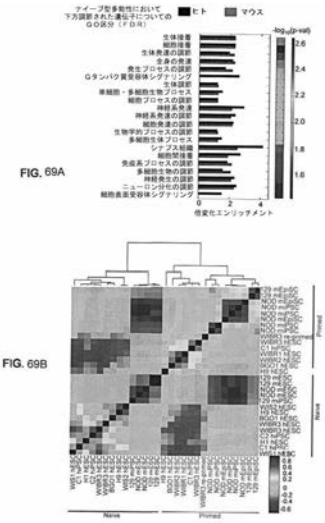
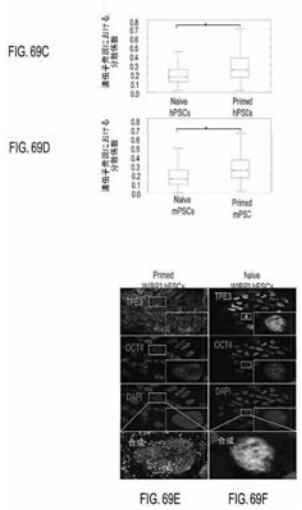


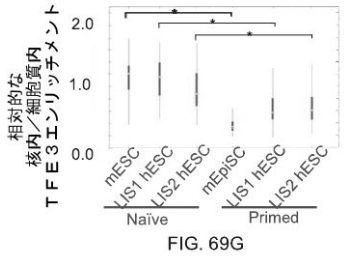
FIG. 69A

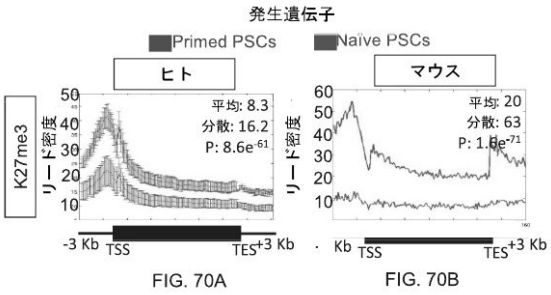
FIG. 69B

【図６９Ｃ－Ｆ】

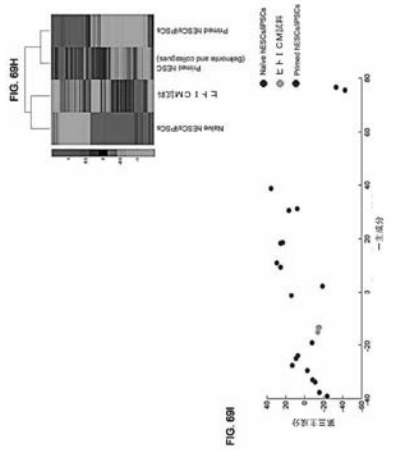


【図６９Ｇ－７０ＡＢ】

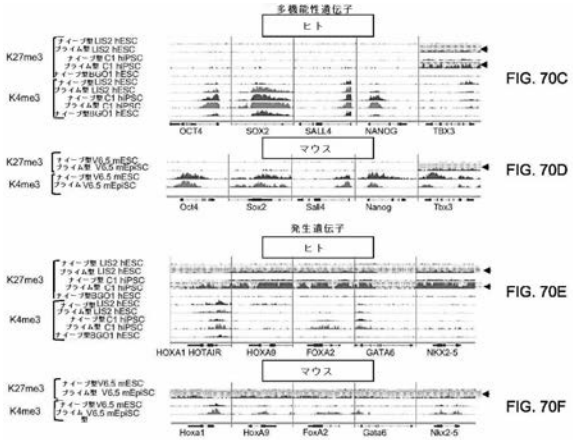




【図６９Ｈ－Ｉ】



【図７０Ｃ－Ｆ】



【図７０Ｇ－Ｊ】

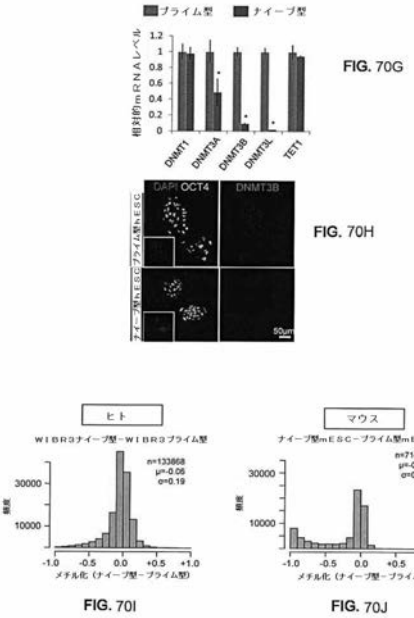


FIG. 70G

FIG. 70H

FIG. 70I

FIG. 70J

【図７１Ａ－Ｃ】

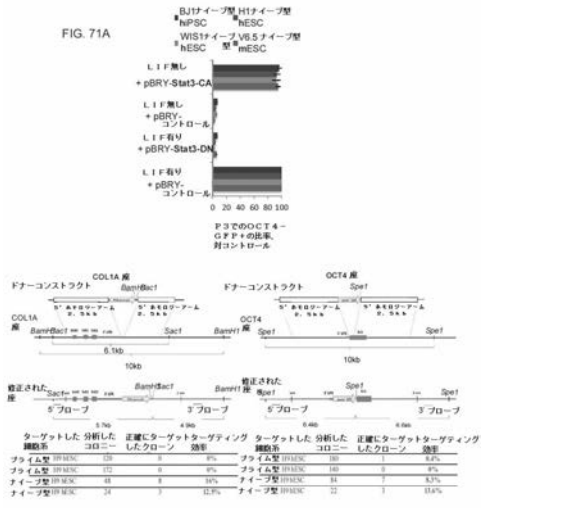


FIG. 71B

FIG. 71C

【図７１Ｄ－Ｅ】

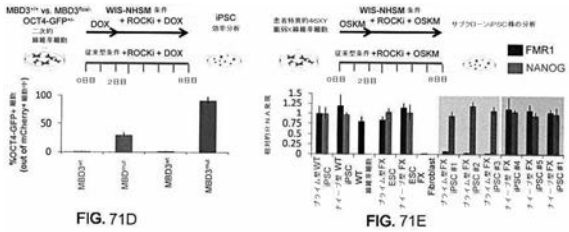


FIG. 71D

FIG. 71E

【図７１Ｆ－Ｇ】

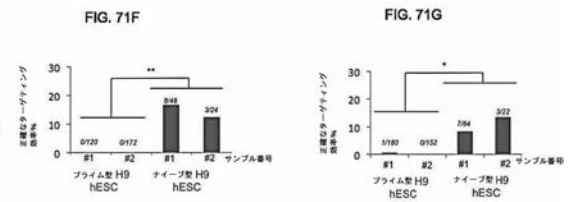


FIG. 71F

FIG. 71G

【図７２Ａ－Ｄ】

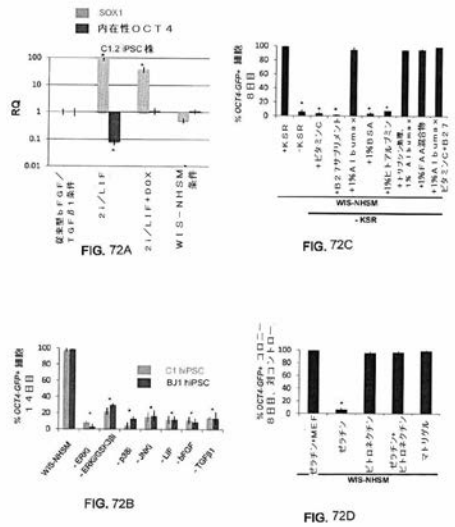


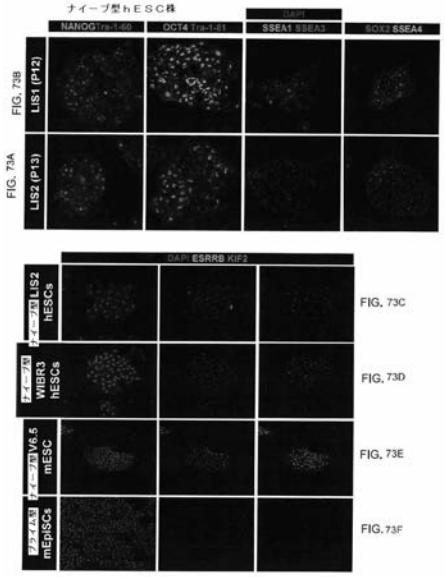
FIG. 72A

FIG. 72C

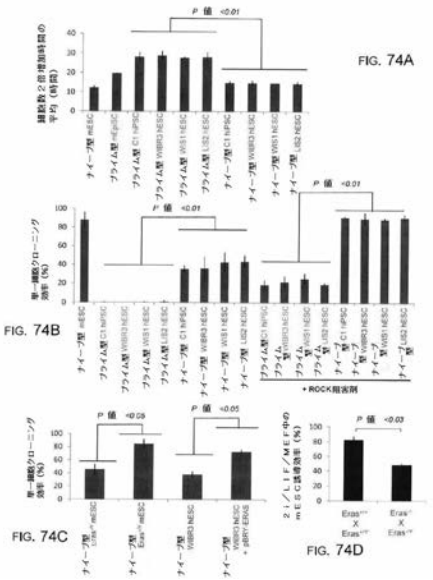
FIG. 72B

FIG. 72D

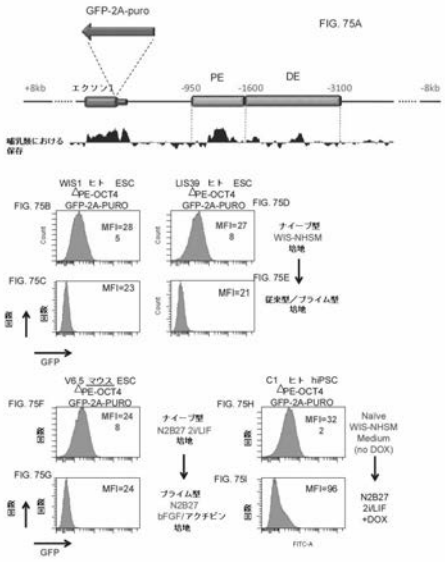
【図７３Ａ－Ｆ】



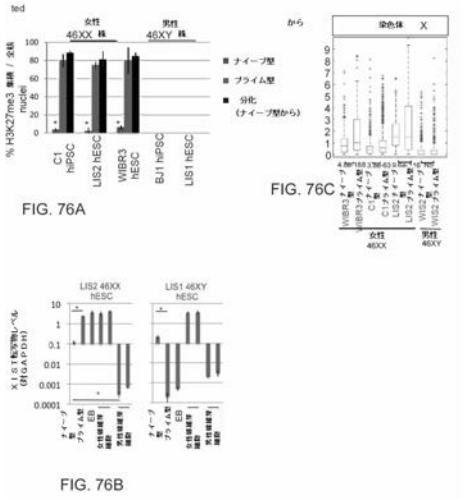
【図７４Ａ－Ｆ】



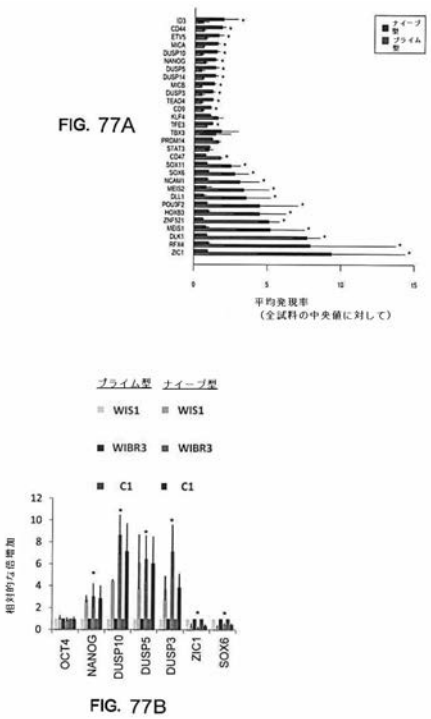
【図７５Ａ－Ｉ】



【図７６Ａ－Ｃ】



【図７７Ａ－Ｂ】



【図７８】

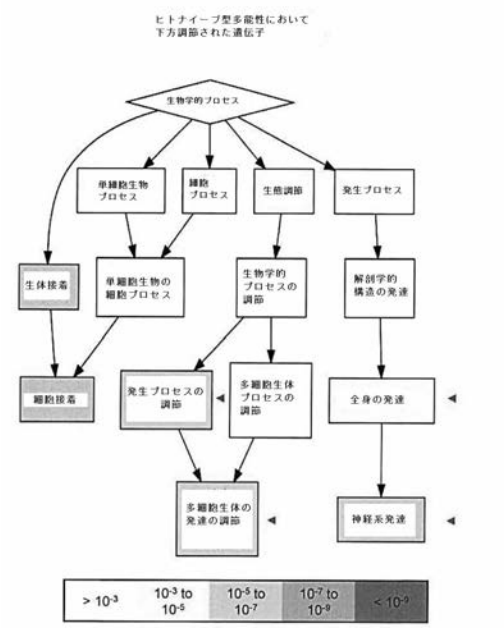
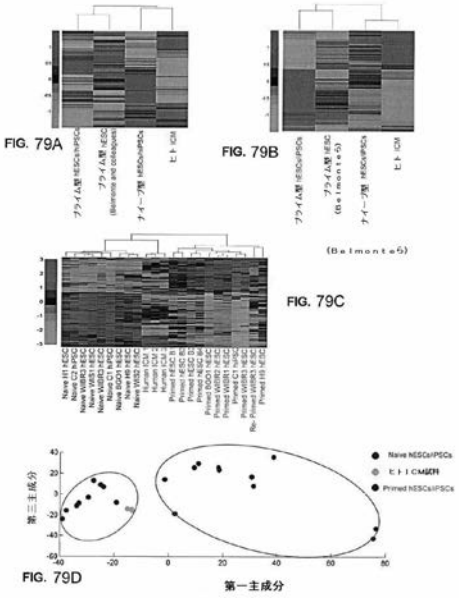
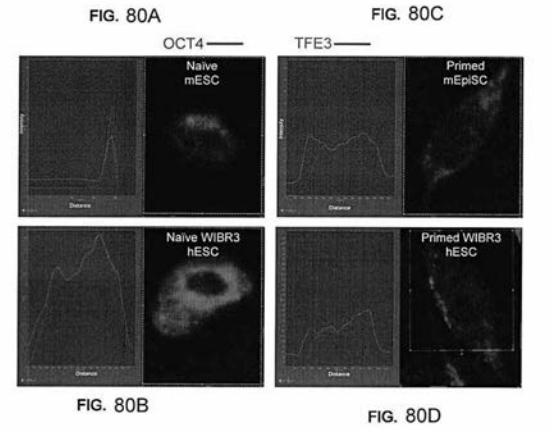


FIG. 78

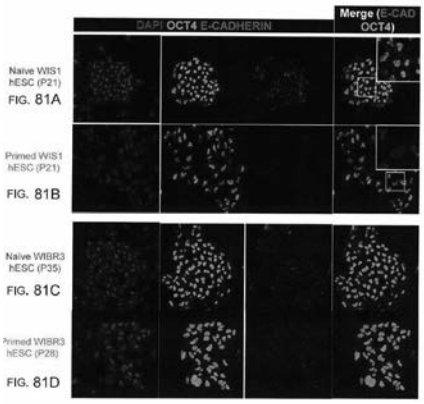
【図７９Ａ－Ｄ】



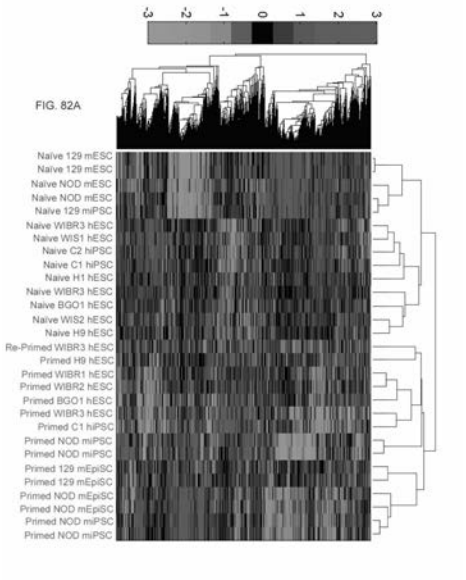
【図８０Ａ－Ｄ】



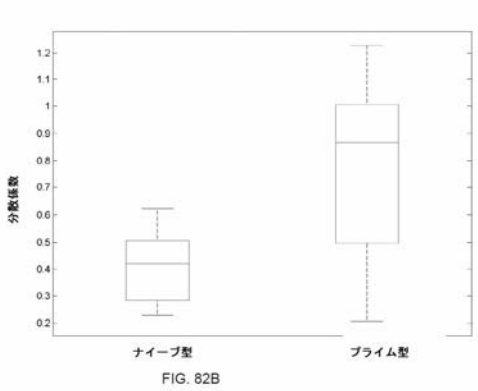
【図８１Ａ－Ｄ】



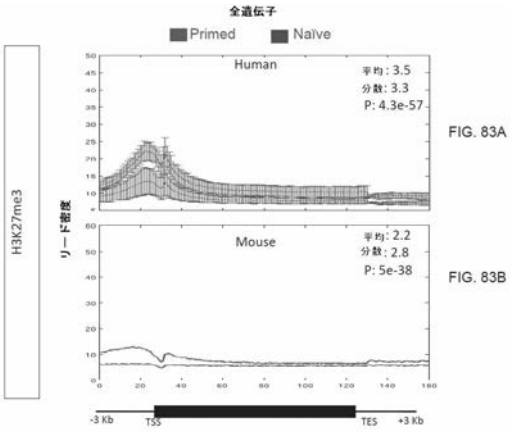
【図８２Ａ】



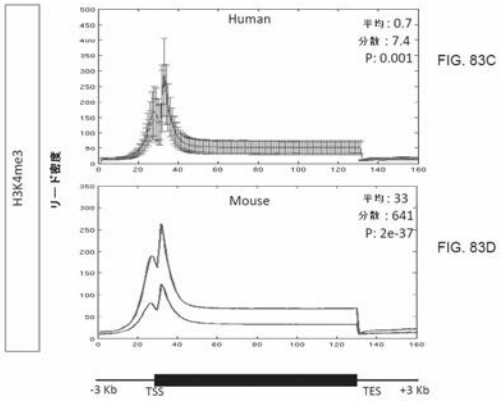
【図８２Ｂ】



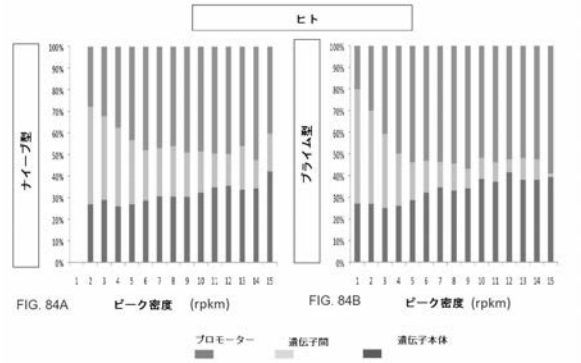
【図８３Ａ－Ｂ】



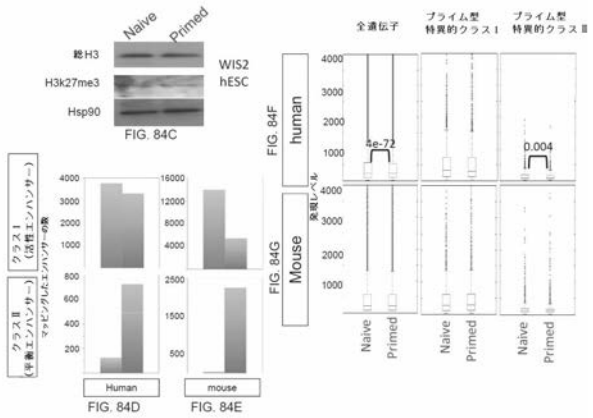
【図８３Ｃ－Ｄ】



【図８４Ａ－Ｂ】

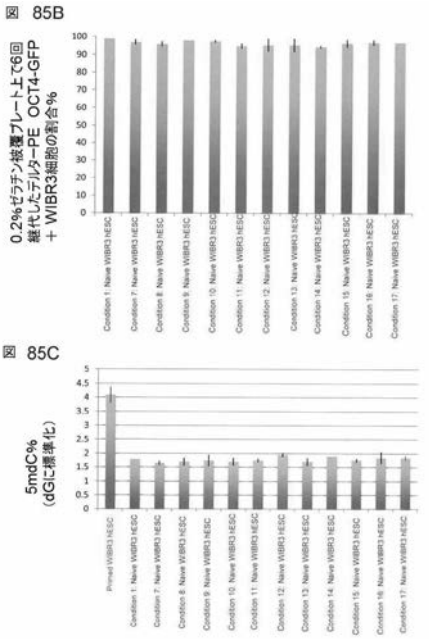


【図８４Ｃ－Ｅ】

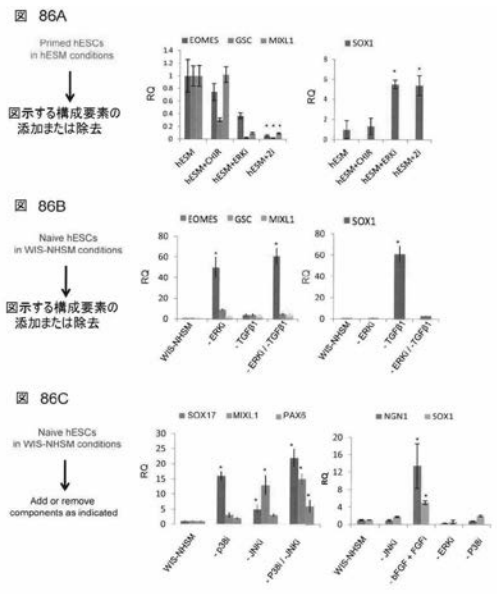


【図８５】

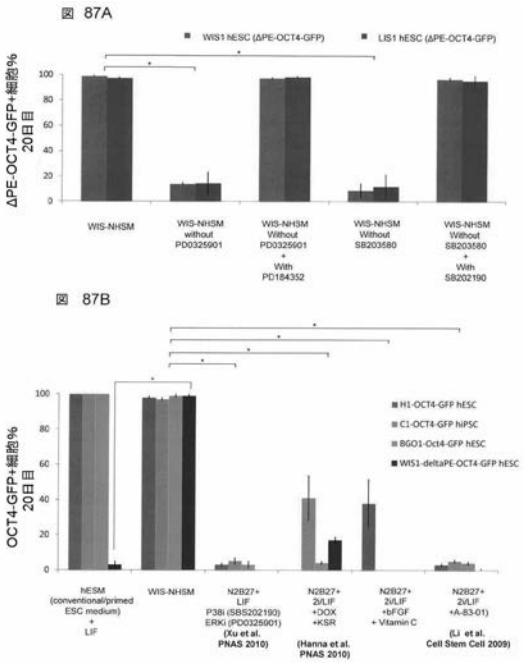
【図８５－２】



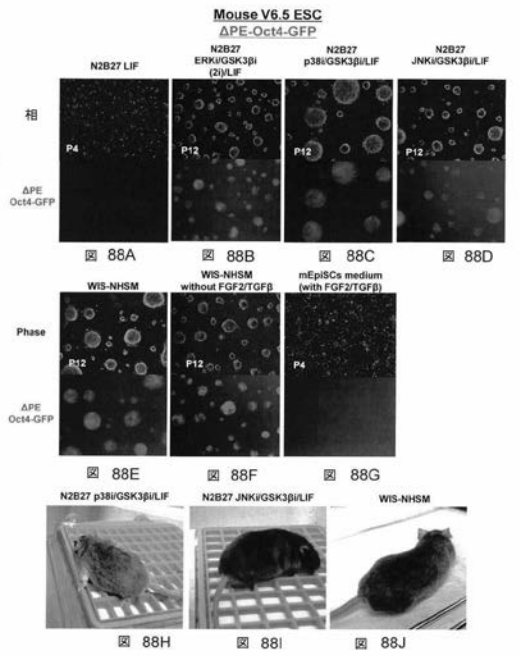
【図８６】



【図８７】



【図８８】



【図８９】

図 89A

培地	注入した胚	レシピエント雌	死んだ胎児および子	生きて産まれた子	代理親に育てられた子
N2B27 2i/LIF	150	7	1	9	7
N2B27 p38i/GSK3βi, LIF	160	8	3	6	4
N2B27 JNKi/GSK3βi, LIF	145	7	1	10	6
WIS-NHSM	150	7	2	12	7
WIS-NHSM (without FGF2/TGFβ)	135	6	3	8	4

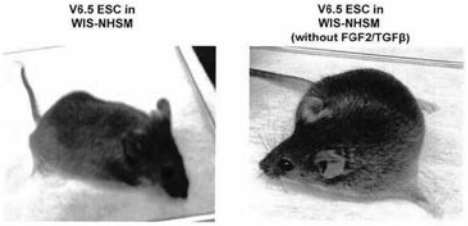


図 89B　　図 89C

【図８９－２】

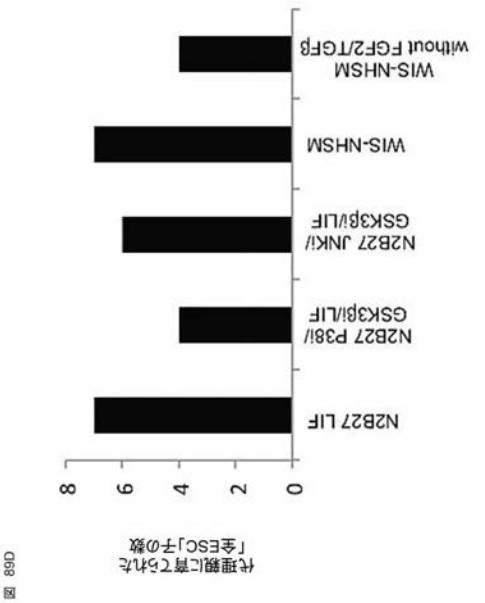
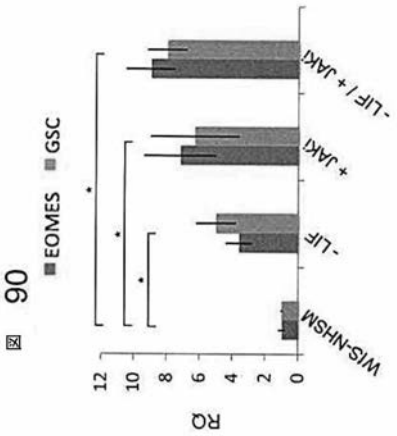
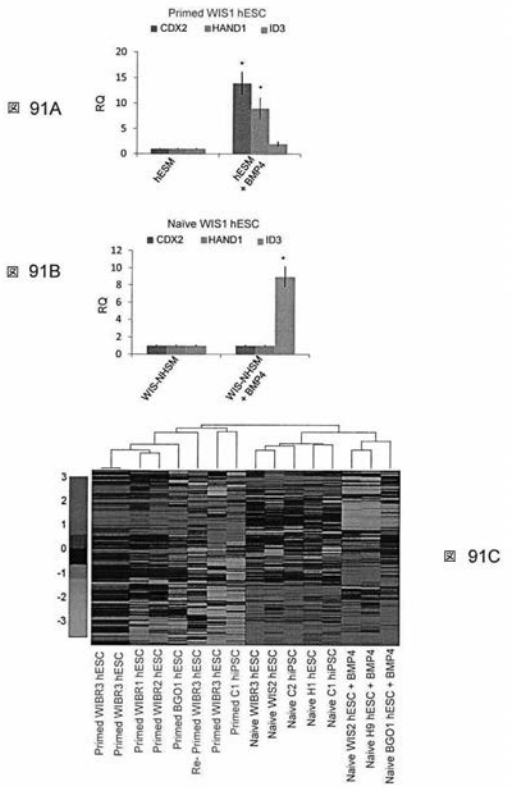


図 89D

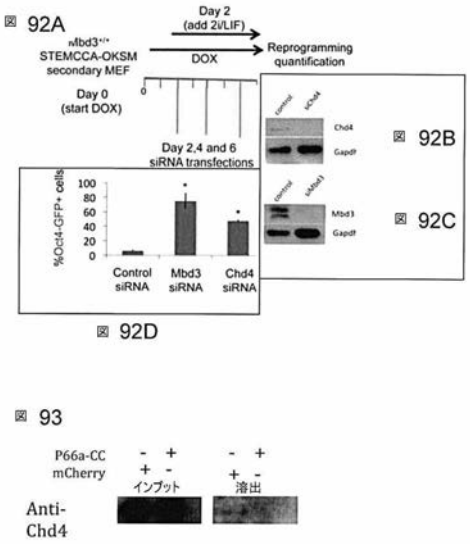
【図９０】



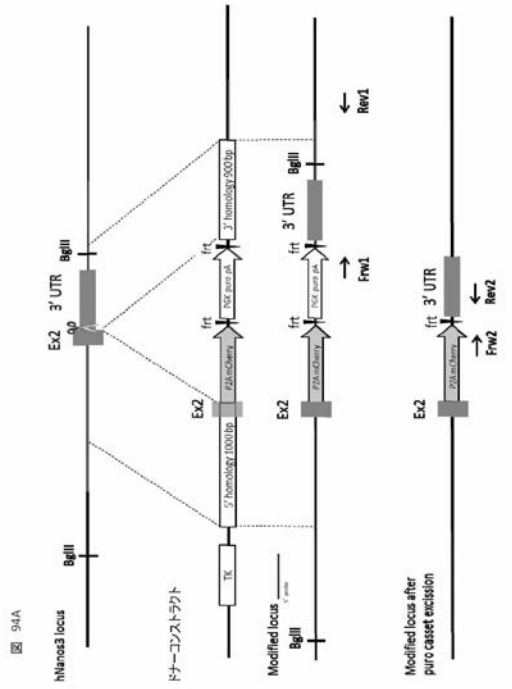
【図９１】



【図９２－９３】



【図９４】



【図９４－２】

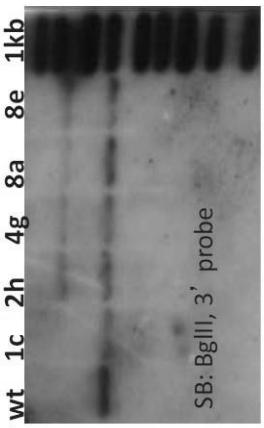
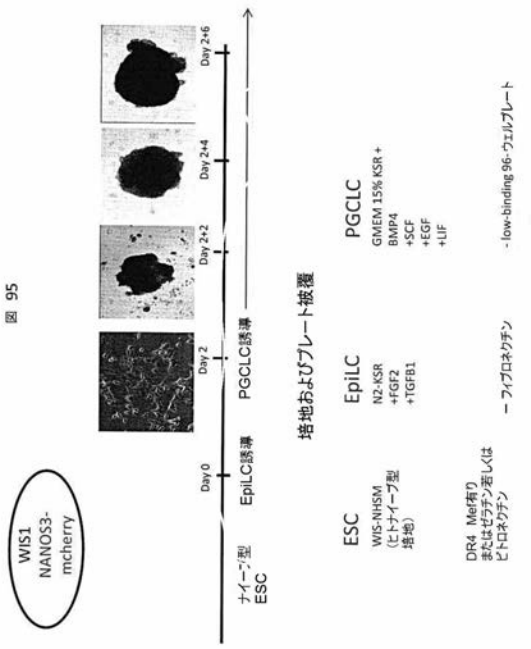
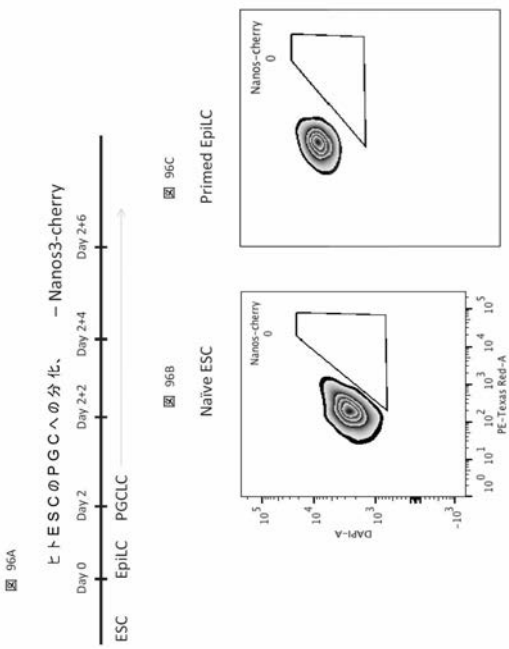


図 94B

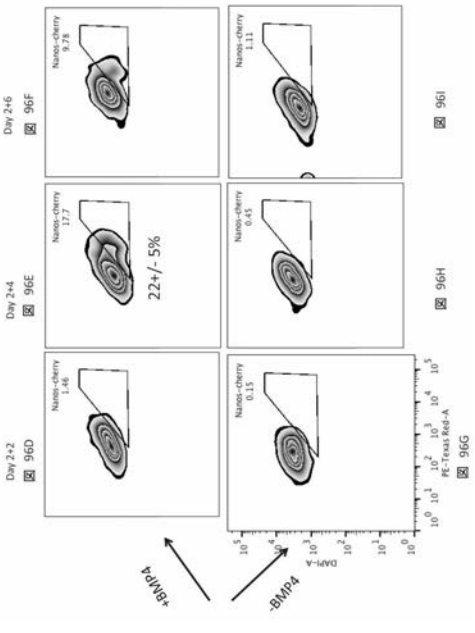
【図９５】



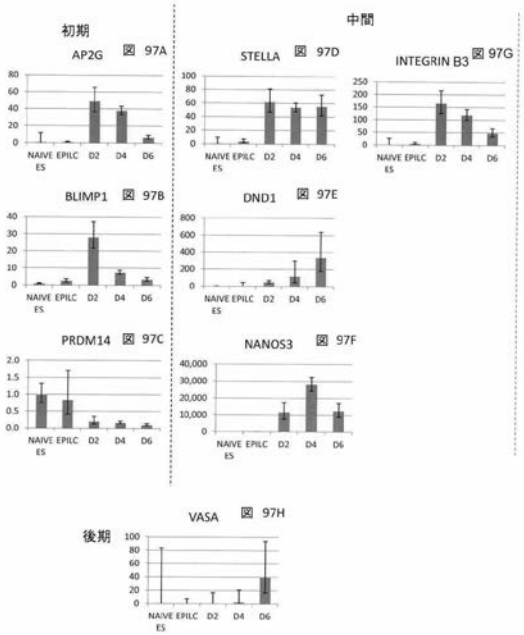
【図９６】



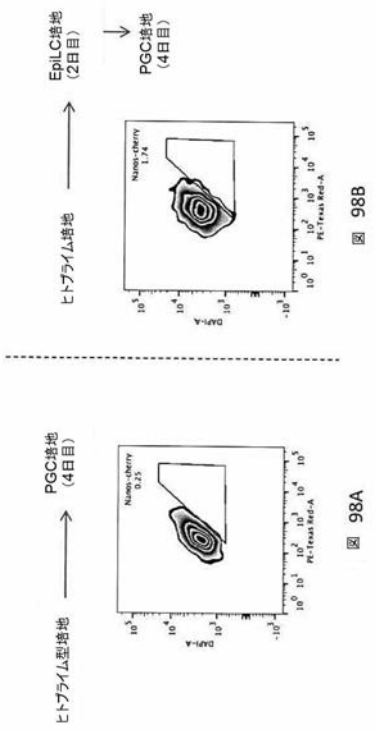
【図９６－２】



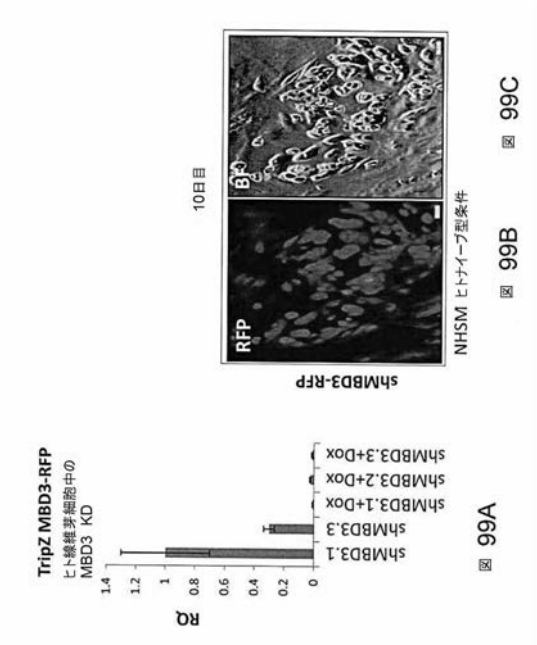
【図９７】



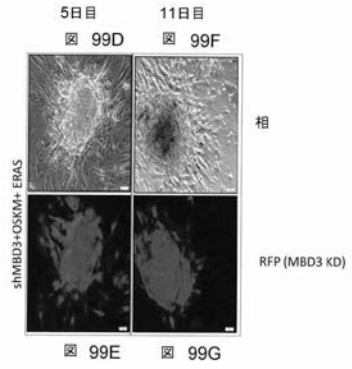
【図９８】



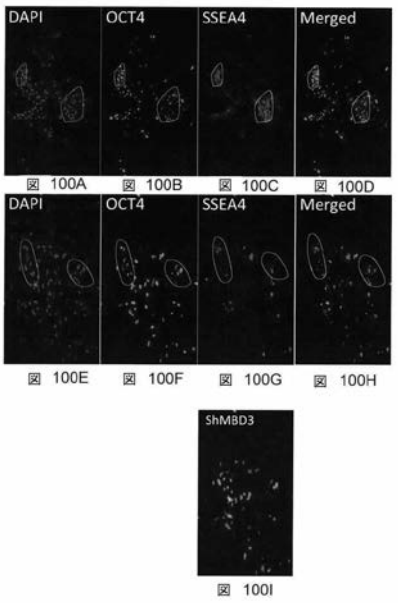
【図９９】



【図９９－２】



【図１００】



【図１００－２】

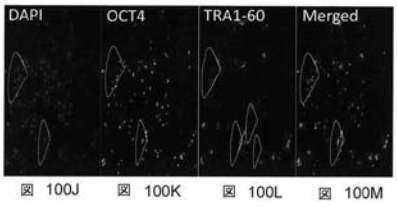


図 100J 図 100K 図 100L 図 100M

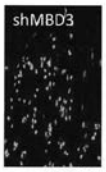


図 100N

【図１００－３】

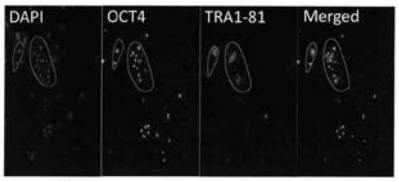


図 100O 図 100P 図 100Q 図 100R

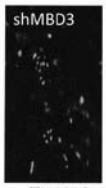


図 100S

【図１００－４】

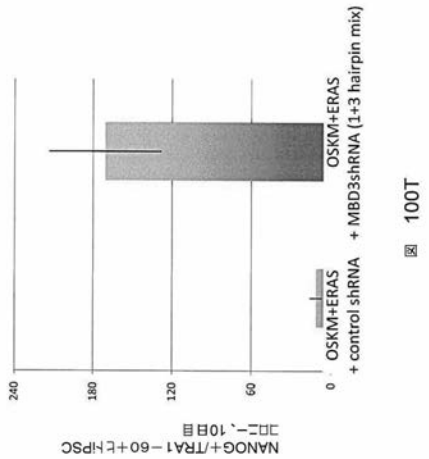


図 100T

【図１０１】

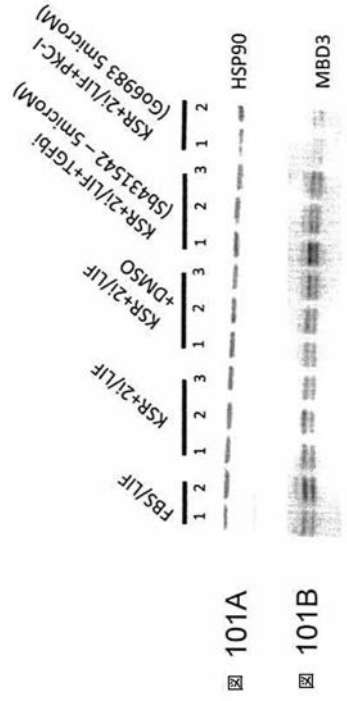
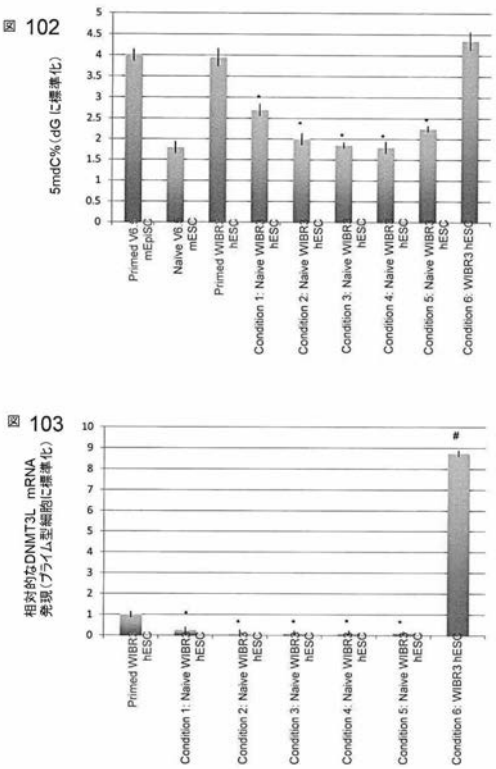
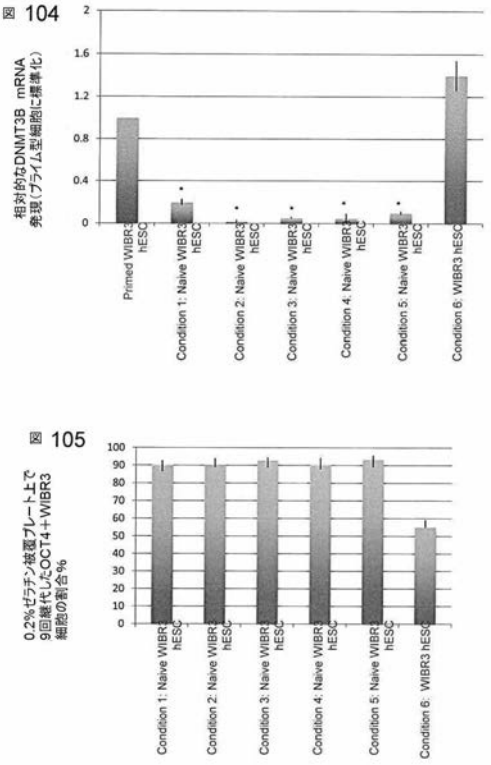


図 101A 図 101B

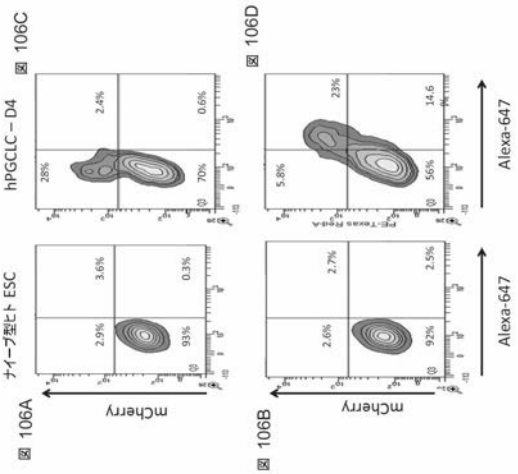
【図１０２－１０３】



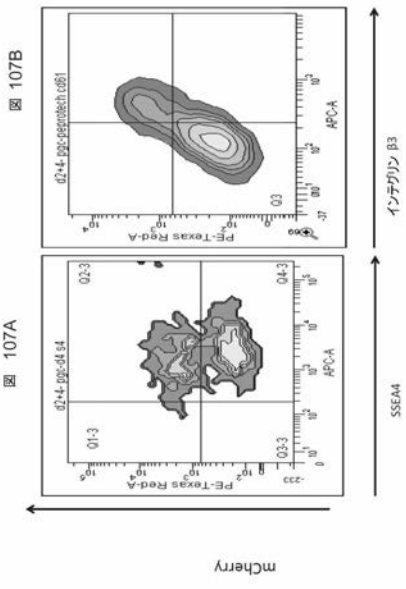
【図１０４－１０５】



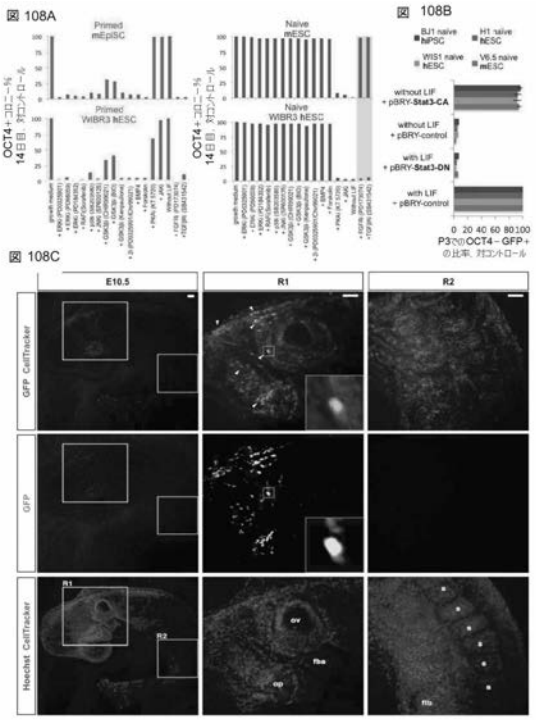
【図１０６】



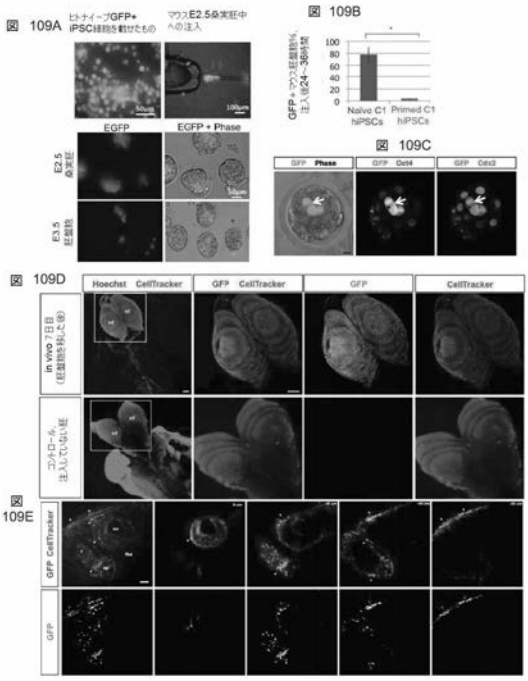
【図１０７】



【図１０８】



【図１０９】



【配列表】

2016521971000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2014/060954

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N5/0735 C12N5/074
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N

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

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	J. HANNA ET AL: "Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 107, no. 20, 18 May 2010 (2010-05-18) , pages 9222-9227, XP055054545, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1004584107 page 9224 - page 9225 ----- -/--	1-6,31, 38,39, 56-66, 74-76, 88-96

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] 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
23 September 2014	07/10/2014

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Trommsdorff, Marion

2

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2014/060954

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHRISTOPHER J. LENGNER ET AL: "Derivation of Pre-X Inactivation Human Embryonic Stem Cells under Physiological Oxygen Concentrations", CELL, vol. 141, no. 5, 1 May 2010 (2010-05-01), pages 872-883, XP055075377, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2010.04.010 figures 2, 3	1-6,31, 33,37, 56-66
X	WO 2010/077955 A1 (SCRIPPS RESEARCH INST [US]; LI WENLIN [US]; ZHOU HONGYAN [US]; DING SH) 8 July 2010 (2010-07-08) page 17; example 1	7-11,27, 28
X,P	OHAD GAFNI ET AL: "Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells", NATURE, vol. 504, no. 7479, 30 October 2013 (2013-10-30), pages 282-286, XP055128176, ISSN: 0028-0836, DOI: 10.1038/nature12745 the whole document	1-39, 56-76, 88-96
A	PABLO BERMEJO-ALVAREZ ET AL: "Solving the "X" in Embryos and Stem Cells", STEM CELLS AND DEVELOPMENT, vol. 21, no. 8, 20 May 2012 (2012-05-20), pages 1215-1224, XP055128368, ISSN: 1547-3287, DOI: 10.1089/scd.2011.0685 the whole document	1-39, 56-76, 88-96
A	Y. ZHANG ET AL: "Small molecules, big roles - the chemical manipulation of stem cell fate and somatic cell reprogramming", JOURNAL OF CELL SCIENCE, vol. 125, no. 23, 1 December 2012 (2012-12-01), pages 5609-5620, XP055112620, ISSN: 0021-9533, DOI: 10.1242/jcs.096032 the whole document	1-39, 56-76, 88-96
A	JACOB H. HANNA ET AL: "Pluripotency and Cellular Reprogramming: Facts, Hypotheses, Unresolved Issues", CELL, vol. 143, no. 4, 1 November 2010 (2010-11-01), pages 508-525, XP055074652, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/j.cell.2010.10.008 the whole document	1-39, 56-76, 88-96

2 -/--

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2014/060954

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ALEJANDRO DE LOS ANGELES ET AL: "Accessing nave human pluripotency", CURRENT OPINION IN GENETICS & DEVELOPMENT, vol. 22, no. 3, 29 March 2012 (2012-03-29) , pages 272-282, XP028493568, ISSN: 0959-437X, DOI: 10.1016/J.GDE.2012.03.001 [retrieved on 2012-03-06] the whole document	1-39, 56-76, 88-96
T	WARE CAROL B ET AL: "Derivation of naive human embryonic stem cells", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, vol. 111, no. 12, March 2014 (2014-03), pages 4484-4489, XP002727154, ISSN: 0027-8424 the whole document	
A	KATSUHIKO HAYASHI ET AL: "Reconstitution of the Mouse Germ Cell Specification Pathway in Culture by Pluripotent Stem Cells", CELL, CELL PRESS, US, vol. 146, no. 4, 28 June 2011 (2011-06-28) , pages 519-532, XP028383021, ISSN: 0092-8674, DOI: 10.1016/J.CELL.2011.06.052 [retrieved on 2011-07-16] page 531; figure 6	77-96
X	WO 98/43679 A1 (UNIV JOHNS HOPKINS MED [US]; GEARHART JOHN D [US]; SHAMBLOTT MICHAEL J) 8 October 1998 (1998-10-08) examples 1-4	83-96
X	US 6 090 622 A (GEARHART JOHN D [US] ET AL) 18 July 2000 (2000-07-18) cited in the application examples 1-4	83-96
X	EGUIZABAL C ET AL: "Generation of primordial germ cells from pluripotent stem cells", DIFFERENTIATION, SPRINGER VERLAG, DE, vol. 78, no. 2-3, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 116-123, XP026601254, ISSN: 0301-4681, DOI: 10.1016/J.DIFF.2009.07.001 [retrieved on 2009-08-15] figures 1, 2	83,84,87

-/--

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2014/060954

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AHN K S ET AL: "Production of human CD59-transgenic pigs by embryonic germ cell nuclear transfer", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 400, no. 4, 1 October 2010 (2010-10-01), pages 667-672, XP027356570, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2010.08.125 [retrieved on 2010-09-08] the whole document	88-96
X	PARK TAE SUB ET AL: "Derivation of Primordial Germ Cells from Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells Is Significantly Improved by Coculture with Human Fetal Gonadal Cells", STEM CELLS (MIAMISBURG), vol. 27, no. 4, 2009, pages 783-795, XP002730074, ISSN: 1066-5099 the whole document	83-87
A	YING YING ET AL: "Induction of primordial germ cells from pluripotent epiblast", THE SCIENTIFIC WORLD, THE SCIENTIFICWORLD LTD, GB, vol. 2, 26 March 2002 (2002-03-26), pages 801-810, XP009097195, ISSN: 1532-2246 the whole document	77-87

2

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/IB2014/060954

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010077955 A1	08-07-2010	AU 2009333259 A1	11-08-2011
		CA 2747398 A1	08-07-2010
		CN 102317442 A	11-01-2012
		EP 2373784 A1	12-10-2011
		JP 2012511935 A	31-05-2012
		KR 20110094348 A	23-08-2011
		SG 172160 A1	28-07-2011
		US 2012028351 A1	02-02-2012
		WO 2010077955 A1	08-07-2010
WO 9843679 A1	08-10-1998	AU 745976 B2	11-04-2002
		AU 6947798 A	22-10-1998
		CA 2285274 A1	08-10-1998
		EP 1023085 A1	02-08-2000
		JP 2001521380 A	06-11-2001
		US 6245566 B1	12-06-2001
		US 6331406 B1	18-12-2001
		US 6562619 B1	13-05-2003
		US 2003148514 A1	07-08-2003
		WO 9843679 A1	08-10-1998
US 6090622 A	18-07-2000	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2014/060954

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

1-39, 56-96

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/ IB2014/ 060954

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-39, 56-76(completely); 88-96(partially)

An isolated human naive pluripotent stem cell having the characteristics of claim 1, a population comprising such a cell, a cell culture, a culture medium suitable for obtaining said naive pluripotent stem cell, methods for generating these cells, methods of generating a chimeric animal using these cells.

---

2. claims: 40-55

A method for improving generation of induced pluripotent stem cells from a somatic cell.

---

3. claims: 77-87(completely); 88-96(partially)

A method for generating a primordial germ cell, an isolated population of primate primordial germ cells, methods of treatment using these cells, methods of generating a chimeric animal using these cells.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI			テーマコード（参考）
C12N 15/873	*(2010.01)*	C12N	15/00	K	
A01K 67/027	*(2006.01)*	A01K	67/027		
A61P 15/00	*(2006.01)*	A61P	15/00	171	
A61K 35/545	*(2015.01)*	A61K	35/545		

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

(72)発明者 ノヴァーシュテルン，ノア
イスラエル国 ７６１０００２ レホヴォト，ピー. オー. ボックス ９５， アットザ ワイツマン インスティテュート オブ サイエンス， ｃ／ｏ イェダ リサーチ アンド ディベロップメント カンパニー リミテッド
(72)発明者 ライス，ヨアホ
イスラエル国 ７６１０００２ レホヴォト，ピー. オー. ボックス ９５， アットザ ワイツマン インスティテュート オブ サイエンス， ｃ／ｏ イェダ リサーチ アンド ディベロップメント カンパニー リミテッド

Ｆターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BA80 CA04 CA12 DA02 DA03 GA11 GA23
4B065 AA90X AA93X AB01 AC12 AC20 BA01 BA06 BA30 BB13 BB19
BC06 BC12 BC14 CA44 CA60
4C087 AA01 AA02 BB61 NA14 ZA81

(54)【発明の名称】単離ナイーブ型多能性幹細胞およびそれを発生させる方法関連出願本出願は、米国特許法１１９条第（ｅ）項に基づき、２０１４年1月２９日出願の米国特許仮出願第６１／９３２，９３５号、２０１３年9月１７日出願の米国特許仮出願第６１／８７８，７６９号、および２０１３年４月２３日出願の米国特許仮出願第６１／８１４，９２０号の優先権を主張する。また、本出願は、同時に提出された同出願人による同時係属出願である、ＹａｑｕｂＨＡＮＮＡ、ＮｏａＮＯＶＥＲＳＨＴＥＲＮ、およびＹｏａｃｈＲＡＩＳによる米国特許出願（発明の名称「単離ナイーブ型多能性幹細胞およびそれを発生させる方法（ＩＳＯＬＡＴＥＤＮＡＩＶＥＰＬＵＲＩＰＯＴＥＮＴＳＴＥＭＣＥＬＬＳＡＮＤＭＥＴＨＯＤＳＯＦＧＥＮＥＲＡＴＩＮＧＳＡＭＥ）」）（代理人事件記録簿第５８８７０号）にも関する。上記出願の内容はその全体を参考として本明細書に組み込む。