

(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2014-520551

(P2014-520551A)

(43) 公表日 平成26年8月25日(2014.8.25)

(51) Int.Cl.		F I			テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 O 2		4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A		4 B O 6 5
C 1 2 N 15/00	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A		

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 89 頁)

(21) 出願番号	特願2014-520269 (P2014-520269)	(71) 出願人	510003830
(86) (22) 出願日	平成24年7月11日 (2012.7.11)		セルラー ダイナミクス インターナショナル, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成25年12月24日 (2013.12.24)		アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53711, マディソン, サイエンス ドライブ 525, スイート 200, ユニバーシティ リサーチ パーク
(86) 国際出願番号	PCT/US2012/046194		
(87) 国際公開番号	W02013/009825	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成25年1月17日 (2013.1.17)		弁理士 山本 秀策
(31) 優先権主張番号	61/506,314	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成23年7月11日 (2011.7.11)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞のリプログラミング方法およびゲノムの改変方法

(57) 【要約】

改変した人工多能性幹 (i P S) 細胞を生産するための方法を提供する。この方法は、体細胞に、それらのゲノムに組み込むための第一の核酸を導入することと、細胞をリプログラミングし、核酸がそれらのゲノムに組み込まれた改変された i P S 細胞を生産することを含む。例えば、特定の側面では、1つまたは複数のリプログラミング因子を発現する遺伝要素を導入し、この細胞を、リプログラムされた細胞を生産するのに十分な条件下で培養することにより、細胞をリプログラムする。

【選択図】 図 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) 体細胞を得る工程；
- b) 該細胞のゲノムに組み込むための第一の核酸分子および、該体細胞中で発現した場合に、該体細胞を多能性幹細胞へと変換するのに十分な 1 つまたは複数のリプログラミング因子を発現する遺伝要素を含む少なくとも 1 つの第二の核酸分子を前記細胞に導入する工程；
- c) 前記細胞をリプログラミング条件下で培養する工程；および
- d) それらのゲノム中に組み込まれた前記第一の核酸を含む i P S 細胞の集団を得る工程を含み、ここで前記第一の核酸が発現可能であり、かつ、該第二の核酸分子が該 i P S 細胞中には存在しない、人工多能性幹 (i P S) 細胞集団の生産方法。

10

【請求項 2】

- d) (i) それらのゲノムに組み込まれた前記第一の核酸を含む細胞および (i i) それらのゲノムに組み込まれた該第一の核酸を含まない細胞を含む i P S 細胞の集団を得る工程をさらに含む、請求項 1 の方法。

【請求項 3】

- d) それらのゲノムに組み込まれた前記第一の核酸を含む i P S 細胞の第一集団およびそれらのゲノムに組み込まれた該第一の核酸を含まない i P S 細胞の第二集団を得る工程をさらに含む、請求項 1 の方法。

【請求項 4】

- d) それらのゲノムに組み込まれた、発現可能な第一の核酸を含む i P S 細胞をスクリーニングまたは選択し、それによって、前記第一の核酸が発現可能である、i P S 細胞の該集団を得る工程をさらに含む、請求項 1 の方法。

20

【請求項 5】

- 該 i P S 細胞の分化に際して該第一の核酸が発現可能な、請求項 1 の方法。

【請求項 6】

- 該体細胞、該第一の核酸分子および該第二の核酸分子を含有する組成物を形成すること、ならびに前記組成物を培養することによってさらに定義される、請求項 1 の方法。

【請求項 7】

- 該第一のまたは第二の核酸分子が、該細胞の該ゲノム中に無作為に組み込まれている、請求項 1 の方法。

30

【請求項 8】

- 工程 (b) が、該第一のもしくは第二の核酸分子を含有しているウイルスベクターを該細胞に形質導入すること、または該第一のもしくは第二の核酸分子を含有している p i g g y B a c ベクターをトランスフェクトすることを含む、請求項 1 の方法。

【請求項 9】

- 該ウイルスベクターがアデノ随伴ウイルス (A A V)、シンプルレトロウイルスまたはレンチウイルスベクターである、請求項 8 の方法。

【請求項 10】

- 該第一のまたは第二の核酸分子が、該細胞のゲノムの選択された部位に組み込まれている、請求項 1 の方法。

40

【請求項 11】

- 該選択された部位が A A V S 1 組み込み部位である、請求項 10 の方法。

【請求項 12】

- 該第一のまたは第二の核酸分子が、メガヌクレアーゼ、または該選択された部位でゲノム D N A を切断する転写活性化因子様エフェクターエンドヌクレアーゼ (T A L E N) を使用して、選択されたゲノム部位に組み込まれる、請求項 10 の方法。

【請求項 13】

- 該第一のまたは第二の核酸分子が相同的組換えを使用して選択されたゲノム部位に組み込まれる、請求項 10 の方法。

50

【請求項 14】

該第一の核酸分子が、スクリーニング可能なマーカーまたは選択マーカーのコード配列を含む、請求項 1 の方法。

【請求項 15】

該第一の核酸分子が、細胞内の遺伝的欠損を修正する配列；病原体感染に対する耐性を付与する配列；薬剤物への耐性を付与する配列；薬剤物への感受性を付与する配列；細胞の免疫原性を変える配列；および細胞内に遺伝的タグを付与する配列からなる群より選択される核酸配列を含む、請求項 1 の方法。

【請求項 16】

該体細胞が、ヒト線維芽細胞、角化細胞、造血細胞、間葉細胞、脂肪細胞、内皮細胞、上皮細胞、神経細胞、筋肉細胞、乳房細胞、肝臓細胞、腎臓細胞、皮膚細胞、消化管細胞、卵丘細胞、腺細胞、または膵島細胞である、請求項 1 の方法。

10

【請求項 17】

該第二の核酸分子が染色体外の遺伝要素である、請求項 1 の方法。

【請求項 18】

該第二の核酸分子が RNA である、請求項 17 の方法。

【請求項 19】

該第二の核酸分子がエピソームベクターである、請求項 17 の方法。

【請求項 20】

該エピソームベクターが、複製起点および、リプログラミング因子を発現させるための 1 つもしくは複数の発現カセットを含み、ここで 1 つもしくは複数の前記発現カセットが、染色体外の鋳型を複製するための該複製起点に結合するトランス活性化因子をコードしているヌクレオチド配列をさらに含み、ならびに / または該体細胞がそのようなトランス活性化因子を発現している、請求項 19 の方法。

20

【請求項 21】

該リプログラミング因子が、Sox、Oct、Nanog、Lin-28、Klf4、C-myc、L-myc、形質転換欠損性の myc 突然変異体またはホモログ、および SV40LT からなる群より選択される 1 つまたは複数を含む、請求項 1 の方法。

【請求項 22】

前記細胞をリプログラミング条件下で培養する工程 (c) が、フィーダー細胞を本質的に使用せずに該細胞を培養することを含む、請求項 1 の方法。

30

【請求項 23】

前記細胞をリプログラミング条件下で培養する工程 (c) が、マトリックス成分の存在下で該細胞を培養することを含む、請求項 1 の方法。

【請求項 24】

工程 (c) が、該第一の核酸分子の存在に関して、前記細胞を選択することまたはスクリーニングすることをさらに含む、請求項 1 の方法。

【請求項 25】

該選択またはスクリーニングが、蛍光活性化セルソーティング (FACS)、磁気活性化セルソーティング (MACS) またはフローサイトメトリーによる、請求項 24 の方法。

40

【請求項 26】

該選択することが、該細胞培養への薬剤の添加を含む、請求項 24 の方法。

【請求項 27】

該細胞が、該第一の核酸分子および染色体外の遺伝要素の該細胞への導入後、およそ 1 日目 ~ 3 日目に開始される該薬剤の存在下で培養される、請求項 26 の方法。

【請求項 28】

該細胞が、およそ 1 ~ 10 日間、該薬剤の存在下で培養される、請求項 26 の方法。

【請求項 29】

前記細胞をリプログラミング条件下で培養する工程 (c) が、該細胞を、少なくともお

50

よそ 1 日 ~ 1 5 日間、リプログラミング条件下で培養することを含む、請求項 1 の方法。

【請求項 3 0】

前記細胞をリプログラミング条件下で培養する工程 (c) が、該細胞をリプログラミング培地中で培養することを含む、請求項 2 9 の方法。

【請求項 3 1】

該リプログラミング培地が、G S K - 3 阻害剤、M E K 阻害剤、T G F - 受容体阻害剤またはそれらの組み合わせを含む、請求項 3 0 の方法。

【請求項 3 2】

該リプログラミング培地が、外部から添加された線維芽細胞成長因子 (F G F)、白血病抑制因子 (L I F)、R h o 結合キナーゼ (R O C K) 阻害剤またはミオシン I I 阻害剤を含む、請求項 3 0 の方法。

10

【請求項 3 3】

該リプログラミング培地が化学的に規定されている、請求項 3 0 の方法。

【請求項 3 4】

該化学的に規定されている培地が、T e S R 培地、必須 8 培地、ヒト胚細胞培養用培地、または N 2 B 2 7 培地である、請求項 3 3 の方法。

【請求項 3 5】

(e) 該 i P S 細胞を増殖条件下で培養する工程をさらに含む、請求項 1 の方法。

【請求項 3 6】

該 i P S 細胞を増殖条件下で培養する工程 (e) が、外部から添加された G S K - 3 阻害剤、M E K 阻害剤、および T G F - 受容体阻害剤を本質的に含まない培地中で該 i P S 細胞を培養することを含む、請求項 3 5 の方法。

20

【請求項 3 7】

該増殖培地が化学的に規定されている、請求項 3 6 の方法。

【請求項 3 8】

該増殖培地が T e S R 培地、m T e S R 培地または必須 8 培地である、請求項 3 7 の方法。

【請求項 3 9】

(f) 該 i P S 細胞を特徴付ける工程をさらに含む、請求項 3 5 の方法。

【請求項 4 0】

30

該 i P S 細胞を特徴付ける工程 (f) が、1 つ以上の多能性マーカーを検出すること；核型分析を実施すること；該第一の核酸分子の存在を検出すること；該第一の核酸分子の配列を決定すること；該染色体外の遺伝要素の存在を検出すること；テラトーマ形成解析；エピジェネティック解析；R N A 発現解析；タンパク質発現解析；または縦列型反復配列 (S T R) の検出を含む、請求項 3 9 の方法。

【請求項 4 1】

a) 体細胞を得る工程；

b) 該細胞のゲノムに組み込むための第一の核酸分子および、該体細胞中で発現した場合に、該体細胞を多能性幹細胞へと変換するのに十分な 1 つまたは複数のリプログラミング因子を発現している遺伝要素を含む少なくとも 1 つの第二の核酸分子を前記細胞に導入する工程；

40

c) 前記細胞をリプログラミング条件下で培養する工程；および

d) それらのゲノムに組み込まれた前記第一の核酸を含む i P S 細胞の第一の集団およびそれらのゲノムに組み込まれた該第一の核酸を含まない i P S 細胞の第二の集団を得る工程を含む、人工多能性幹 (i P S) 細胞の集団および改変した i P S 細胞の集団を生産するための方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

この出願は、2 0 1 1 年 7 月 1 1 日に出願の、米国仮特許出願第 6 1 / 5 0 6 , 3 1 4

50

号の優先権を主張し、その全文は参照することにより本明細書に組み入れられる。

【 0 0 0 2 】

発明の分野

本発明は、基本的には、幹細胞開発の分野に関わる。より具体的には、本発明は、改変した多能性幹細胞の生成に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 3 】

ヒト胚性幹（E S）細胞の制限のない増殖能および多能性によって、前例のなかった、ヒトの体全ての細胞型を入手する機会がもたらされた。望まれる遺伝的バックグラウンドをもった患者の体細胞から直接誘導されたヒト人工多能性幹（i P S）細胞は、これら2つのヒトE S細胞の重要な特性を有するため、これらの細胞は、疾患モデル、薬剤物のスクリーニング、毒性試験および移植治療に関する有力な候補となっている。しかしながら、ヒト体細胞を人工多能性幹細胞（i P S C）へと遺伝的にリプログラミングするには、依然として時間がかかり、費用も高額となり、また、この工程の効率は総体的に低い。さらに、望ましいi P S Cが生成されたとしても、多くの使用用途では、網羅的な解析や細胞特性を特徴付けに加えて、これらの細胞をさらに遺伝的に修飾する必要がある。

10

【 0 0 0 4 】

そのため、遺伝的に改変した人工多能性幹細胞の調製における効率の低さ、高い費用、および他の問題に取り組む必要が依然として残っている。

20

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 5 】

本発明は、遺伝的に改変した人工多能性幹（i P S）細胞を生産するための効率的な方法を提供することによって、当該分野における大きな欠点を克服するものである。第一の態様では、改変したi P S細胞の集団を生産するための方法を提供し、この方法は、（a）体細胞を得る工程；（b）前記細胞に、この細胞のゲノムに組み込むための第一の核酸分子と、1つまたは複数のリプログラミング因子を発現している遺伝的要素を含む、少なくとも1つの第二の核酸分子を導入する工程；（c）前記細胞を、リプログラミング条件下で培養する工程；および（d）前記第一の核酸がゲノムに組み込まれたi P S細胞の集団を回収する工程、を含む。従って、本態様で使用される場合、この1つまたは複数のリプログラミング因子は、適切な細胞培養条件下で体細胞内において発現する場合には、体細胞を多能性幹細胞へと変換するのに十分な能力を有するものである。この態様のさらなる側面では、方法は、細胞のゲノムに組み込まれた第一の核酸を含まない、i P S細胞の少なくとも第二の集団を生産する工程を含む。特定の側面では、この態様の方法によって得られたi P S細胞および/または改変したi P S細胞は、リプログラミング因子（つまり、遺伝的要素によってコードされている因子）を発現しない。一層さらなる側面では、そのような方法によって得られたi P S細胞（および/または改変したi P S細胞）は、細胞に組み込まれた第二の核酸分子の遺伝的要素を含まない。従って、特定の側面では、1つまたは複数のリプログラミング因子を発現している遺伝的要素は、染色体外の遺伝的要素である。

30

40

【 0 0 0 6 】

第二の態様では、改変したi P S細胞の集団を生産するための方法を提供し、この方法は、（a）体細胞を得る工程；（b）この細胞のゲノムに組み込むための第一の核酸分子を細胞に導入する工程；（c）前記細胞に、1つまたは複数のリプログラミング因子を発現している染色体外要素を導入する工程；および（d）前記第一の核酸がゲノムに組み込まれたi P S細胞の集団を生産するために、前記細胞をリプログラミング条件下で培養する工程、を含む。特定の側面では、この態様の方法によって生産されたi P S細胞および/または改変したi P S細胞は、細胞に組み込まれた染色体外の遺伝的要素を含まない。さらなる態様では、人工多能性幹（i P S）細胞の集団および改変したi P S細胞の集団を生産するための方法を提供し、この方法は、（a）体細胞を得る工程；（b）前記細胞

50

に、この細胞のゲノムに組み込むための第一の核酸分子を導入する工程；(c)前記細胞に、1つまたは複数のリプログラミング因子を発現している染色体外の遺伝的要素を導入する工程；および(d)iPS細胞の集団を生産し、前記第一の核酸がゲノムに組み込まれている第一のiPS細胞とゲノムに第一の核酸が組み込まれていない第二のiPS細胞の両方を回収するために、前記細胞をリプログラミング条件下で培養する工程、を含み、この場合、第一のiPS細胞でも第二のiPS細胞でも、染色体外の遺伝的要素はそれらのゲノムに組み込まれていない。

【0007】

さらなる側面では、この態様の方法によって生産されたiPS細胞は、ゲノムに組み込まれた第一の核酸分子を含み、ここでこの第一の核酸は発現可能である。例えば、第一の核酸は、適切な条件において、iPS細胞内でまたはiPS細胞から分化した細胞内で発現可能な少なくとも1つの遺伝的要素(例えば、RNAまたはポリペプチドをコードしている配列)を含む場合がある。いくつかの側面では、第一の核酸分子は、誘導性のまたは組織もしくは細胞特異的なプロモーターの制御下にある遺伝的要素を含む。この場合遺伝的要素は、プロモーターが活性な条件において(例えば、誘導剤の存在下で、または特定の分化した細胞型の場合に)発現可能となる。その上さらなる側面では、この態様の方法は、iPS細胞内にある発現可能な第一の核酸分子の存在をスクリーニングするためまたは選択するための工程を含む。

【0008】

この態様の特定の側面では、遺伝的要素(1つまたは複数のリプログラミング因子を発現している)を含む第一の核酸分子と第二の核酸は、約1週間以内の時間間隔で、例えば2、3、4、5または6日の時間間隔で、体細胞に導入される。一層さらなる側面では、第一の核酸分子と第二の核酸分子は、同じ日に、例えば2、3、4、5、または6時間の間隔をあけて、細胞に導入される。一層さらなる側面では、第一の核酸分子と第二の核酸分子は、本質的に同時に細胞に導入される。例えば、この態様による方法は、体細胞、第一の核酸分子および第二の核酸分子(遺伝的要素を含んでいる)を含む組成物を作成する工程、および前記組成物を培養する工程を含む場合がある。

【0009】

この態様の特定の側面は、細胞のゲノムに組み込むための第一の核酸分子に関する。このような核酸分子を、細胞ゲノムの選択した位置に、もしくは特定の領域内に組み込んでもよく、または本質的に無作為にゲノムに組み込んでもよい。いくつかの例では、ゲノム中の1つの部位に、第一の核酸を1コピーだけ組み込む。他の例では、2、3、4、5、6、7、8またはそれ以上のコピーのこの核酸を、ゲノム中の単一の部位に(例えば、コピーを一続きにして)または複数の部位に組み込む。体細胞のゲノムに第一の核酸分子を組み込むには、様々な機構を使用することができる。例えば、ゲノム中の本質的に無作為な位置に組み込む場合、第一の核酸を、レトロウイルスベクター(例えば、レンチウイルスベクター)、アデノ随伴ウイルスベクター(機能性Rep遺伝子を除いたもの)に組み込むことができるか、またはトランスポゾンシステム、例えばpiggyBacベクターの一部として組み込むことができる。他の側面では、第一の核酸をゲノム中の選択した位置に組み込む。例えば核酸を、AAVS1組み込み部位(例えば、機能性Rep遺伝子存在下でアデノ随伴ウイルスベクターを使用することによって)に組み込むことができる。同様に、特定の側面では、相同的組換えによって、ゲノム中の選択した位置に組み込むことができる。例えば、メガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼまたはゲノムDNAを選択した位置で開裂させる転写活性化因子様エフェクターエンドヌクレアーゼ(TALEN)を使用して、選択した位置への組み込みを仲介させることができる。本明細書で使用する場合、ゲノム中の選択した位置への組み込みとは、ゲノム中の2つの連続したヌクレオチド位置の間に、または連続していない2つのヌクレオチド位置の間に(例えば、その結果、間に挟まれているゲノム配列が置き換わる)、核酸分子(もしくはその一部分)を挿入することも含み得る。例えば、ゲノム中の選択した位置への核酸の組み込みは、遺伝子のエクソン、イントロン、プロモーター、コード配列または遺伝子全体の置換も

10

20

30

40

50

含み得る。

【0010】

この態様のさらなる側面では、第一の核酸分子は、スクリーニング可能なマーカーまたは選択マーカーのコード配列を含む。あるいは、またはそれに加えて、第一の核酸分子は、細胞内の遺伝的欠損を修正する配列；病原体感染に対する耐性を付与する配列；薬剤物への耐性を付与する配列；薬剤物への感受性を付与する配列；細胞の免疫原性を変える配列；および細胞内に遺伝的タグを付与する配列、からなる群より選択される核酸配列を含む。その上さらなる側面では、この態様の方法は、ゲノムに組み込むための第二の、第三の、第四のまたは第五の核酸分子を体細胞に導入する工程を含み、ここで核酸分子はそれぞれ別のものであり、かつ、それぞれ独立してゲノムに組み込まれる。

10

【0011】

本明細書で使用する場合、1つまたは複数のリプログラミング因子を発現する遺伝的要素とは、いかなる遺伝子材料または核酸、例えば、DNAまたはRNAであってよい。特定の側面では、遺伝的要素は細胞のゲノムに組み込まれてもよい（つまり、上述したように、無作為にまたは特定の位置に組み込まれてもよい）。しかしながら、特定の好ましい側面では、遺伝的要素は、エピソードベクターまたはRNAなどの、細胞への導入に際しても染色体外に保持される要素である。例えば、エピソードベクターは、複製起点および、リプログラミング因子を発現させるための1つまたは複数の発現カセットを含んでいてもよい。そのような1つまたは複数の発現カセットは、複製起点に結合して、染色体外の鋳型を複製するための、トランス活性化因子をコードしているヌクレオチド配列をさらに含んでいてもよい。あるいは、またはこれに加えて、体細胞がそのようなトランス活性化因子を発現してもよい。

20

【0012】

特定の側面では、本発明に従って使用するためのエピソードベクターは、本質的に、細菌の構成要素を含まない可能性がある。そのような細菌の構成要素とは、細菌内でプラスミドを増やすために必要とされるベクター骨格の成分、例えば、細菌の複製起点、例えば、pUC複製起点、および細菌の選択カセット、例えば、アンピシリン選択カセットであってよい。

【0013】

例示的な態様では、複製起点は、リンパ増殖性のヘルペスウイルス、すなわちガンマヘルペスウイルス、アデノウイルス、SV40、ウシバビローマウイルス、または酵母の複製起点、例えば、リンパ増殖性のヘルペスウイルス、すなわちEBVのoriPに対応するガンマヘルペスウイルスの複製起点であってよい。さらなる側面では、リンパ増殖性のヘルペスウイルスは、エプスタイン-バーウイルス(EBV)、カポジ肉腫ヘルペスウイルス(KSHV)、サイミリヘルペスウイルス(HSV)、またはマレック病ウイルス(MDV)であってもよい。

30

【0014】

染色体外の遺伝的要素を複製するため、および一過的に維持するために、トランス活性化因子は、EBVのEBNA-1(EBV核抗原1)の野生型タンパク質に対応するポリペプチドであるか、またはこれに由来するものであってよく、好ましくは、EBVのOriPに対応する複製起点が存在する。誘導体が組み込まれた鋳型からの転写を活性化する能力は野生型EBNA-1と比較して低い可能性があるため、染色体遺伝子を異所的に活性化し、癌への転換を引き起こす可能性も低くなる。同時に、誘導体が複製起点に結合した後の染色体外の鋳型からの転写は、対応する野生型タンパク質の少なくとも5%となり得る。

40

【0015】

体細胞をリプログラミングするために、本方法の特定の側面は、適切な細胞培養条件において体細胞中で発現させた場合に、体細胞を多能性幹細胞へと変換するのに十分なリプログラミング因子を使用することを含んでいてもよい。例えば、リプログラミング因子には、Sox、Oct、Nanog、Lin-28、Klf4、C-myc、L-mycお

50

よびSV40LTからなる群より選択される1つまたは複数が、例えば、Sox、Oct、Nanog、および必要に応じてLin-28のセット、Sox、Oct、Klf4、および必要に応じてC-mycのセット、またはこれら因子の組み合わせが含まれる。特定の側面では、C-mycが発現することによって起こる可能性のある毒性効果を低減するために、SV40ラージT遺伝子(SV40LT)がc-Mycと共に含まれていてもよい。特定の側面では、さらにリプログラミング効率を高めるために、形質転換活性を欠損したMyc変異体、変異株またはホモログを使用してもよい。非限定的な例としては、Myc原癌遺伝子ファミリーメンバー、例えばLMYC(NM_001033081)、N-末端の41アミノ酸を欠損したMYC(dN2MYC)、または136番目のアミノ酸が変異したMYC(W136E)が挙げられる。

10

【0016】

特定の側面では、この態様に従って使用するための体細胞は、生きているヒト対象から直接得られた細胞である初代ヒト細胞であり、かつ、確立されたまたは不死化した細胞株は使用しなくてもよい。いくつかの側面では、高分化したヒト細胞を使用することができる。初代ヒト細胞の非限定的な例としては、線維芽細胞、角化細胞、造血細胞、間葉細胞、脂肪細胞、内皮細胞、神経細胞、筋肉細胞、上皮細胞、乳房細胞、肝臓細胞、腎臓細胞、皮膚細胞、消化管細胞、卵丘細胞、腺細胞、または膵島細胞が挙げられる。より具体的には、初代ヒト細胞は、造血前駆細胞、例えばCD34⁺細胞であってよい。初代ヒト細胞は、血液試料、毛髪試料、皮膚試料、唾液試料、固形組織試料または当業者に既知のいずれの供給源に由来するものであってよい。

20

【0017】

特定の側面では、リプログラミング条件下で細胞を培養する工程には、リプログラミング培地で細胞を培養することが含まれる。例えば、リプログラミング培地は、1種または複数種のシグナル伝達阻害剤を含む場合がある(例えば、培地に添加された阻害剤)。シグナル伝達阻害剤は、グリコーゲン合成酵素キナーゼ3(GSK-3)阻害剤、マイトゲン活性化タンパク質キナーゼキナーゼ(MEK)阻害剤、トランスフォーミング増殖因ベータ(TGF-β)受容体阻害剤、白血病抑制因子(LIF)、およびその組み合わせからなる群より選択される1種または複数種であってよい。特に、リプログラミング培地は、GSK-3阻害剤、MEK阻害剤、TGF-β受容体阻害剤、および必要に応じてLIF、の組み合わせを含む可能性がある。この培地は、外から添加されたROCK阻害剤またはミオシンII阻害剤をさらに含む場合もある。ROCK阻害剤はHA-100であってよい。この培地は、外から添加されたFGFをさらに含んでもよい。特定の側面では、組成物は、化学的に規定された培地をさらに含んでもよい。化学的に規定された培地の非限定的な例としては、TeSR培地、ヒト胚細胞培地、N2B27培地、必須8TM培地として市販されているE8培地(Chen et al., 2011、参照することによって本明細書に組み込まれる)、およびその派生物が挙げられる。体細胞をリプログラミングするためのさらなる方法は、米国特許公開第20110104125号に詳細に記載されており、その全体は、参照することによって本明細書に組み込まれる。

30

【0018】

その上さらなる側面では、この態様による方法には、フィーダー細胞、例えば照射マウス胚性線維芽細胞(MEF)フィーダー細胞の存在下で細胞を培養することが含まれる。あるいは、フィーダー細胞を本質的に含まない条件で細胞を培養してもよい。例えば、この態様による方法には、フィーダー細胞の代わりに、細胞集団の培養を支持するためのマトリックス成分存在下で細胞を培養することが含まれる場合がある。細胞接着用の、そのようなマトリックス成分は、幹細胞またはフィーダー細胞(使用した場合には)を付着させることを目的とする、いかなる材料であってよい。マトリックス成分の非限定的な例としては、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、ビトロネクシン、ラミニン、ならびにフィブロネクシンおよびその混合物、例えば、Matrigel(商標)と溶解した細胞膜との調製物が挙げられる。特定の例では、マトリックス組成物に

40

50

は、フィブロネクチン断片、例えばR e t r o N e c t i n (登録商標) (例えば、参照することによって本明細書に組み込まれる米国特許第5,686,278号;同第6,033,907号、同第7,083,979号および同第6,670,177号を参照のこと)が含まれる。R e t r o N e c t i n (登録商標)は、574アミノ酸からなるおよそ63kDaのタンパク質で、ヒトフィブロネクチンの中心となる細胞結合ドメイン(I I I型反復、8、9、10)、高親和性のヘパリン結合ドメインI I (I I I型反復、12、13、14)、およびC S 1部位、あるいはスプライシングされたI I I C S領域を含むものである。

【0019】

いくつかの側面では、リプログラミング条件下で細胞を培養する工程には、細胞をリプログラミング条件下で少なくとも約1日、1週間または1ヶ月培養することが含まれる。例えば、細胞をリプログラミング培地(例えば、上述したシグナル伝達阻害剤を含む培地)中で、少なくともまたはおよそ1、2、3、4、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20日間、またはここから導き出せる任意の期間、培養することができる。第一の核酸分子および/または染色体外の要素を体細胞に導入した後、少なくとも約1日から5日を含む間は、リプログラミング条件を維持してもよい。開始時および終了時は、導入後、1、2、3、4、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20日、またはここから導き出せる任意の期間、例えば、核酸の導入後約1日~15日間、から選択することができる。

【0020】

この態様の一層さらなる側面では、リプログラミング条件下で細胞を培養する工程には、第一の核酸分子に関して、細胞を選択するまたはスクリーニングすることがさらに含まれる。例えば、蛍光活性化セルソーティング(FACS)、磁気活性化セルソーティング(MACS)またはフローサイトメトリーによって、細胞を選択またはスクリーニングすることができる。あるいはまたはこれに加えて、第一の核酸が薬剤耐性マーカーを含んでいてもよく、細胞培養用培地に適切な薬剤(例えば、ピューロマイシン)を添加することで、細胞を選択することができる。従って特定の側面では、リプログラミング条件下で細胞を培養する工程には、第一の核酸分子を含む細胞を選択するための薬剤を含むリプログラミング培地中で、細胞を培養することが含まれる。例えば、第一の核酸分子および/または染色体外の遺伝的要素を細胞に導入した後、最初の約1~10日間(例えば、約1~2日間、1~3日間または1~5日間)の間、細胞を選択薬剤の存在下で培養することができる。同様に、特定の側面では、細胞を薬剤の存在下で少なくとも約1~10日間、例えば約5、10、15、20、25、30日間またはそれ以上の期間、培養する。従って特定の態様では、細胞がリプログラミング培地中にある間ずっと、選択薬剤の存在下で細胞を培養してもよい(例えば、少なくともiPS細胞が生産されるまで)。しかしながら別の態様では、薬剤による選択は、細胞がリプログラミング培地中にある期間のうちの一定の期間のみに実施される。

【0021】

一層さらなる側面では、この態様の方法は、iPS細胞を選択すること、例えば、1つまたは複数の胚細胞の特徴、例えばES細胞様の形態に基づいて、iPS細胞を選択することをさらに含む場合がある。従って、その上さらなる態様において方法には、少なくとも第一の多能性マーカーの発現に基づいて多能性の細胞を選択すること、および第一の核酸分子の存在に関して細胞を選択することが含まれる。そのような選択工程は、連続して、または本質的に同時に実施することができる。例えば、少なくとも第一の多能性マーカー(例えば、T r a 1 6 0)を発現している細胞の集団を、クローナルな細胞のコロニーを採取すること、またはFACSによって、単離することができる。次いで、その多能性の集団を、第一の核酸分子を含む細胞(改変したiPS細胞)と第一の核酸分子を含まない細胞(iPS細胞)とに、さらに分離することができる。

【0022】

この態様のさらなる側面において、この態様の方法は、(e)増殖条件下で、iPS細胞

10

20

30

40

50

胞および／または改変した i P S 細胞を培養する工程を含む。例えば、リプログラムした後（および／またはスクリーニングもしくは選択した後）、細胞を、例えば増殖培地で培養することによって、増殖条件におくことができる。増殖培地は、例えば、外から添加された G S K - 3 阻害剤、M E K 阻害剤、および T G F - 受容体阻害剤を本質的に含まないものであってよい。特定の側面では、増殖培地は、1 種または複数種のシグナル伝達阻害剤および／または L I F を含んでいてもよい。増殖培地の例としては、通常の E S 細胞用培地、必須 8 培地または T e S R 培地が挙げられるがこれらには限定されない。

【0023】

その上さらなる側面において、この態様の方法は、(f) i P S 細胞および／または改変した i P S 細胞を特徴付ける工程、を含む。例えば、i P S 細胞を特徴付ける工程は、1 つまたは複数の多能性マーカーを検出すること；核型の解析を実施すること；第一の核酸分子の存在を検出すること；第一の核酸分子の配列を決定すること；染色体外の遺伝的要素の存在を検出すること；テラトーマ形成の解析；エピジェネティック解析；R N A 発現の解析；タンパク質の発現解析；または縦列型反復配列 (S T R) の検出、を含む可能性がある。

10

【0024】

特定の側面では、本方法に関する出発細胞は、少なくともまたはおよそ、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 個の細胞、またはここから導き出せる任意の範囲の数の細胞を含み得る。出発細胞の集団の播種密度は、少なくともまたはおよそ、 10 、 10^1 、 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 細胞 / m l、またはここから導き出せる任意の範囲であってよい。

20

【0025】

本発明の方法および／または組成物に関して議論した態様を、本明細書に記載の他の方法または組成物のいずれかにに関して使用してもよい。従って、1 つの方法または組成物に関する態様は、同様に、本発明の他の方法や組成物にも適用することができる。

【0026】

本明細書で使用する場合、核酸に関する用語、「コードする」または「コードしている」は、当業者が本発明を容易に理解できるように使用される。しかしながら、これらの用語は、それぞれ、「含む」または「含んでいる」と同じ意味で使用される場合もある。

【0027】

本明細書で使用する場合、「1 つ」または「1 個」は、1 つ以上を意味する場合がある。特許請求の範囲で、語「含む（含有する）」と関連して使用する場合、語「1 つ」または「1 個」は、1 つまたは 1 を上回ることを意味し得る。

30

【0028】

本開示では、「または」は選択肢のどちらか一方および「および／または」を指すという定義を支持するが、特許請求の範囲で使用する場合は用語「または」は、どちらか一方であることが明示されていない限り、または選択肢が相互に相容れない場合以外は、「および／または」を意味するとして使用される。本明細書で使用する場合は「別の」は、少なくとも第二の、またはそれ以上を意味し得る。

【0029】

この出願全体を通じて、用語「約（およそ）」は、ある値が、装置やその値を決定するのに使用される方法につきものの誤差の変動、または被検対象間に存在する違いを含むことを示すために使用される。

40

【0030】

本発明の他の目的、特徴および利点は、以下に記す詳細な説明から明らかになる。しかしながら、詳細な説明および特定の実施例は本発明の好ましい態様を示してはいるが、当然のことながらこれらは例を示すためだけに記載されているものであり、当業者はこの詳細な説明から、本発明の精神および範囲内で、様々な変更や修正を理解するだろう。

【図面の簡単な説明】

【0031】

50

以下の図面は本明細書の一部をなし、かつ、本発明の特定の側面を示すためにさらに含まれるものである。本発明は、これらの図面のうちの1つまたはいくつかを、本明細書に提示する特定の態様の詳細な説明と合わせて参照するにあいに、より深く理解されるだろう。

【0032】

【図1】この態様による例示的な方法の模式図。この例のゲノム改変構築物には、*z s Green*用の発現カセットが含まれており、また、多能性は、赤色蛍光色素を用いて可視化した抗*Tra160*抗体によって評価される。この方法では、4種類の細胞型が得られる可能性がある：1．リプログラミングされ、かつ、改変された*iPS*細胞。*Tra160*⁺（赤）および*z s Green*⁺（緑）；2．リプログラミングされた*iPS*細胞。*Tra160*⁺および*z s Green*⁻；3．改変された細胞。*Tra160*⁻および*z s Green*⁺、および4．改変もリプログラミングもされなかった細胞。*Tra160*⁻および*z s Green*⁻。

10

【図2】ベクター1024の模式図。このベクターは、ジンクフィンガーヌクレアーゼRNAと共に、恒常的に発現しているピューロマイシン耐性遺伝子をAAVS1切断部位 - 染色体19：60、318、931～60、318、961に挿入するのに使用することができる。このベクターはまた、蛍光タンパク質（EGFP）を心筋トロポニンT（TNNT2）プロモーターの制御下に挿入する。

【図3】細胞リプログラミングベクター#34、pEP4EO2SEN2Kの模式図。

【図4】細胞リプログラミングベクター#36、pEP4EO2SET2Kの模式図。

20

【図5】細胞リプログラミングベクター#123、pCEP4-LM2L（L-mycires Lin28とも呼ぶ）の模式図。

【図6】細胞改変ベクター#1036、pZD EFX-ZsGreen PGKpur oの模式図。このベクターをジンクフィンガーヌクレアーゼRNAと共に使用して、pEFxプロモーターを使用した恒常的に活性の*z s Green*蛍光タンパク質遺伝子と、PGKプロモーターを使用した恒常的に活性のピューロマイシン耐性遺伝子の両方を挿入することができる。

【図7】ピューロマイシン耐性遺伝子および*Z s Green*蛍光タンパク質遺伝子を恒常的に発現させるための、pigg yBacベクター#1038の模式図。このベクターを、pigg yBacトランスポサゼをコードしているプラスミドまたはpigg yBacトランスポサゼをコードしているRNAと共に使用して、プラスミド#1038由来の配列をゲノムに挿入することができる。

30

【図8】ゲノム改変のためにpigg yBacトランスポゾンシステムを使用した、この態様による例示的な方法の模式図。

【図9】ゲノム改変のためにジンクフィンガーヌクレアーゼシステムを使用した、この態様による例示的な方法の模式図。

【図10】ゲノムの改変とリプログラミングを連続して実施した方法の効率と、本発明の態様による、ゲノム改変とリプログラミングを組み合わせた方法の効率を比較する模式図。

【発明を実施するための形態】

40

【0033】

序論

治療用ツールおよび研究用ツール両者の*iPS*細胞を獲得するための様々なプロトコルでは、細胞を、それらのゲノム中に組み込まれる外生の核酸分子で改変する必要がある。しかしながら、*iPS*細胞のリプログラミングは、それ自体が複雑で、時間と費用のかかる過程である。さらに、そのような細胞のゲノムの改変は、その生産過程を煩雑で長期間にわたるものにし、また、得られる細胞いずれもの価格を上昇させる。そのためこの分野では、改変した*iPS*細胞を生産するための、改良された方法が必要とされている。

【0034】

本発明は、部分的には、遺伝的に改変した*iPS*細胞を生産するための、細胞のリプログラミングと改変を実質的に同時行うことができる方法という、驚くべき発見に基づいている

50

。具体的には、リプログラムが成功した後でさえも、リプログラミングの過程でサイレンシングを受けず、かつ、i P S 細胞中で（またはそれに由来する分化した細胞中で）発現可能な、細胞ゲノムを改変した構築物を用いて i P S 細胞を生産することができる、ということを見出した。さらに、体細胞をリプログラミングする間は、細胞培養の条件を厳しく制御する必要があるにもかかわらず、リプログラミング過程の間に、選択した核酸分子のゲノムへの組み込みに関して、細胞をスクリーニング、または選択さえもすることができる。そのような同時並行の選択（またはスクリーニング）およびリプログラミングの後、個別の組み込み事象を提示している i P S 細胞のクローンを単離し、増殖させることができる。図 1 および図 10 に例を図示するこの組み合わせた過程によって、時間と費用が大きく削減される。具体的には、この態様による方法によって、時間を少なくとも 1 / 3 短縮することができ（34 % の短縮）、またこの方法では、リプログラミングの後にゲノムの改変を行う方法と比較して、使用される培養プレートの量が半分未満となる（60 % 少ない）。同様に、遺伝的に改変した i P S 細胞の単離に加えて、組み込み事象が起こっていない細胞も同時に単離することができるため、i P S 細胞と改変した i P S 細胞の両方が、同じ方法で生産される。改変していない i P S C は、改変した i P S C の解析に関して対照として役立つ場合があるため、改変した i P S C と改変していない i P S C の両方を並行して生成する能力は特に有用である。

10

【0035】

改変した i P S 細胞集団を生産するための組成物および方法に関するさらなる利点は以下にも記載する。

20

II. 定義

【0036】

本明細書で使用する場合、「初代細胞」とは、生体またはその子孫から、細胞株としての確立または不死化を経ずに、直接得られた細胞を指す。「ヒト初代細胞」とは、生きているヒト対象から得られた初代細胞を指す。

【0037】

「胚性幹（E S）細胞」は、初期胚から誘導した多能性幹細胞である。E S 細胞は最初、1981年に確立され、1989年からは、ノックアウトマウスの生産に使用されてきた。ヒト E S 細胞は1998年に確立され、現在では、再生医療に利用可能となってきた。

30

【0038】

「人工多能性幹細胞」、一般的には i P S 細胞または i P S C と略されている、は、多能性でない細胞、通常は成体の体細胞、または高分化した細胞、例えば線維芽細胞、造血細胞、筋細胞、ニューロン、上皮細胞などから、リプログラムすることによって人工的に調製された型の多能性幹細胞を指す。

【0039】

「多能性」とは、1つ以上の組織もしくは器官を構成している全ての細胞、または、好ましくは、三胚葉：内胚葉（胃内部の裏打ち、胃腸管、肺）、中胚葉（筋肉、骨、血液、泌尿生殖器）、もしくは外胚葉（上皮組織および神経系）のうちのいずれかに分化する能力を有する幹細胞を指す。本明細書で使用する場合、「多能性幹細胞」は、三胚葉のいずれかに由来する細胞に分化することが可能な細胞、例えば、全能性細胞の直接の子孫、胚性幹細胞、または人工多能性幹細胞を指す。

40

【0040】

本明細書で使用する場合、用語「体細胞」は、生殖細胞、例えば、卵、精子など以外の、そのDNAを次世代に直接伝達しないいづれもの細胞を指す。通常、体細胞の多能性は限定されているか、または体細胞は全く多能性をもたない。本明細書で使用する体細胞は、天然に存在するものであってもまたは遺伝的に変更されたものであってもよい。

【0041】

「リプログラミング」とは、培養中またはインビボのいずれかで、リプログラミングしないで同じ条件で有し得るよりも、少なくとも1つの新しい細胞型の後代を形成する測定

50

可能な程度の高い能力を細胞に付与する過程である。より具体的には、リプログラミングとは、体細胞に多能性能を付与する過程である。これは、十分に増殖させた後には、新しい細胞型の表現型の特徴を有する後代がリプログラミング前には本質的には形成されないとしても、測定可能な程度の割合の後代がそのような表現型の特徴を有すること、あるいは、新しい細胞型の特徴を有する後代の割合がリプログラミング前を測定可能な程度に上回る、ことを意味する。特定の条件では、新しい細胞型の特徴を有する後代の割合は、昇順で、少なくとも約 0.05%、0.1%、0.5%、1%、5%、25% またはそれ以上であってもよい。

【0042】

本明細書で使用する場合、細胞に関連する用語、「改変した」は、細胞のゲノムに組み込まれた、細胞にとって外生の少なくとも 1 つの遺伝的要素を含む細胞を指す。いくつかの側面では、外生の遺伝的要素は、細胞ゲノムの無作為の位置に組み込まれる可能性がある。他の側面において遺伝的要素は、ゲノムの特定の位置に組み込まれる。例えば、遺伝的要素は特定の位置に組み込まれて、例えば内生の配列に関連する変化（例えば、単一のヌクレオチド位置における変化）を生じるために、内生の核酸配列と置き換わる場合がある。

【0043】

タンパク質、遺伝子、核酸、ポリヌクレオチド、遺伝的要素、または細胞もしくは器官中のベクター要素に関連して使用される場合、用語「外生の」は、人工的な手段でまたは天然にある手段によって、細胞または生物中に導入されたタンパク質、遺伝子、核酸、ポリヌクレオチド、遺伝的要素またはベクター要素を指し、細胞に関連して使用される場合には、単離した後に、人工的な手段でまたは天然にある手段によって、他の細胞または生物に導入された細胞を指す。外生の核酸は、別の生物もしくは細胞に由来するものであってよく、または、その生物もしくは細胞中に天然に生じる核酸の 1 つ以上の追加的なコピーであってもよい。外生の細胞は別種の生物に由来するものであってよく、または同種の生物に由来するものであってよい。外生の核酸の非限定的な例としては、天然の状態の細胞とは異なる染色体上の位置にある核酸、そうでなければ、天然の状態とは別の核酸配列と隣接した核酸がある。あるいは、外生の核酸は染色体外に、例えばエピソードベクター中であってもよい。

【0044】

用語「薬剤」は、疾患に関連する表現型を変えるまたは変える候補である、低分子、核酸およびタンパク質またはその組み合わせを含むがこれらには限定されない分子を指す。

【0045】

「複製の起点」(「ori」)または「複製起点」は、例えば、リンパ増殖性のヘルペスウイルス中であって、細胞内のプラスミド中に含まれる場合にプラスミド中の関連する配列を維持することができる DNA 配列、および / または DNA 合成が開始される部位またはその近傍の部位の DNA 配列である。EBV の ori には、FR 配列 (30 bp 反復の 20 個の不完全なコピー) と、好ましくは DS 配列が含まれるが、EBV 中の他の部位は EBNA-1 する。例えば、Rep^{*} 配列を複製の起点として DS と置き換えることができる (Kirchmaier および Sugden, 1998)。従って、EBV の複製起点には、FR、DS もしくは Rep^{*} 配列または、それらに由来する修飾または合成の組み合わせを介した任意の機能性の等価な配列が含まれる。例えば、本発明では、Lindner et al (2008) に具体的に記載されているように、遺伝的に改変した、例えば挿入または個々の要素の変異によって改変した EBV の複製起点を使用してもよい。

【0046】

「リンパ増殖性の」ヘルペスウイルスとは、リンパ芽球 (例えば、ヒト B リンパ芽球) または他の細胞型中で複製され、かつ、その天然の生活環の少なくとも一部分で、染色体外に複製されるヘルペスウイルスである。宿主に感染すると、これらのウイルスは、ウイルスゲノムをプラスミドとして維持することで、宿主に潜在的に影響を及ぼす。単純ヘル

10

20

30

40

50

ペスウイルス（HSV）は「リンパ増殖性の」ヘルペスウイルスではない。リンパ増殖性のヘルペスウイルスの例としては、EBV、カポジ肉腫ヘルペスウイルス（KSHV）、サイミリヘルペスウイルス（HS）およびマレック病ウイルス（MDV）が挙げられるがこれらには限定されない。

【0047】

「ベクター」または「構築物」（遺伝子送達または遺伝子移入「媒体」と呼ばれることもある）は、インビトロまたはインビボのいずれかで、宿主細胞に送達されるポリヌクレオチドを含む高分子または分子の複合体を指す。

【0048】

一般的な型のベクターである「プラスミド」は、染色体DNAとは別の染色体外のDNA分子であり、これは、染色体DNAとは独立して複製することができる。特定の例では、プラスミドは環状であり、かつ、二本鎖である。

【0049】

本明細書で使用する場合、「鑄型」とは、複製起点を含むDNAまたはRNA分子である。「組み込まれた鑄型」は、細胞のゲノム中に安定に維持されている鑄型、例えば細胞の染色体に組み込まれた鑄型である。「染色体外の鑄型」は、細胞内で安定に維持されているが、染色体には組み込まれていない鑄型である。

【0050】

「発現構築物」または「発現カセット」は、転写を誘導することが可能な核酸分子を意味する。発現構築物には、少なくとも、プロモーターまたはプロモーターと機能的に等価な構造が含まれる。その他の要素、例えばおエンハンサー、および/または転写終結シグナルも含まれ得る。核酸分子はDNAであってもRNAであってもよい。

【0051】

本明細書で使用される、用語「に対応する」は、あるポリヌクレオチド配列が、参照しているポリヌクレオチド配列の全体もしくは一部と相同である（つまり、同一であるが、厳密には進化的な関連はない）こと、またはあるポリペプチド配列が、参照しているポリペプチド配列と同一であることを意味する。それと対比して、本明細書で使用される、用語「相補的な」は、その相補的な配列が、参照しているポリヌクレオチド配列の全体または一部と相同であることを意味する。例えば、ヌクレオチド配列「TATAC」は、参照配列「TATAC」に対応し、かつ、参照配列「GTATA」に相補的である。

III. iPS細胞

【0052】

人工多能性幹細胞、一般的にはiPS細胞またはiPSCと略されている、は、多能性でない細胞、通常は成体の体細胞から人工的に誘導された種の多能性幹細胞である。人工多能性幹細胞は、天然の多能性幹細胞、例えば胚性幹細胞と同一とまでは言わないまでも、多くの点で、例えば、特定の幹細胞遺伝子およびタンパク質の発現、クロマチンのメチル化パターン、倍加時間、胚様体の形成、テラトーマの形成、生存可能なキメラの形成、ならびに潜在力や分化能に関しては同様であると考えられているが、天然の多能性幹細胞と人工多能性幹細胞との関係の全体像については、まだ評価されている途中である。

【0053】

胚を起源とするのではなく、ヒト組織からの人工多能性細胞の生成は、胚や胚性組織を研究に使用することに関する倫理的な問題を低減するために望まれている。人工多能性細胞の治療への応用がさかんに言われている。治療への応用には、いくつかの例を挙げると、アルツハイマー病、糖尿病および脊髄損傷の治療が挙げられる。他の応用例としては、疾患モデルおよび医薬品のスクリーニングが挙げられる。

【0054】

iPS細胞は最初、2006年にマウス細胞から（Takahashi et al., 2006）、そして2007年にヒトの細胞から（Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007）生産された。研究にとって重要であり、かつ、治療に使用できる可能性のある多能性幹細胞を、従来のように胚を使用すること

10

20

30

40

50

なく、研究者らが得られるようになったことから、これらは幹細胞に関する研究における重要な前進であったと言われている。最初にうまくいくことが示された、マウスまたはヒト組織からの人工多能性細胞（iPS細胞）の生成には、特定のセットの転写因子を発現しているレトロウイルスベクターが使用されていた。James Thomson研究室および山中伸弥研究室の研究から、レトロウイルスベクターを使って、特定の転写因子をマウスまたはヒト線維芽細胞に導入することで、十分に、これらの細胞を未分化の多能性幹細胞へとリプログラミングされることが示された。Thomsonは、Oct 4、Sox 2、NanogおよびLin 28の因子を使用した。山中の使用した因子は、Oct 4、Sox 2、Klf 4およびc-Mycであった。いずれの遺伝子セットによるリプログラミングも、転写因子が宿主細胞のゲノムに組み込まれて発現することによって起こる。Oct 4およびSox 2はリプログラミングに必須の転写因子だと考えられる。リプログラミングの効率は低く、その頻度は、出発細胞集団の0.01~0.02%の範囲である。

10

【0055】

胚性幹細胞（ES細胞）はそもそも、初期段階の胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する多能性幹細胞である。ES細胞は、その多能性とES細胞自体を無限に自己再生する能力という2つの特徴によって識別される。ES細胞は多能性である。すなわちES細胞は、初期の三胚葉、つまり内胚葉、中胚葉、外胚葉から誘導される全ての細胞に分化することができる。加えて胚性幹細胞は、限定的な条件では自己を無制限に増殖することができる。そのため胚性幹細胞は、研究または臨床用途用に、継続して数に制限なく自己を生産できるため、研究と再生医療双方にとって有用なツールとして使用することができる。

20

【0056】

しかしながら、マウス細胞とヒトES細胞の間には注目すべき違いがある。James Thomsonによって発見された時点でヒトES細胞は、その可能性およびそれらの培養条件がマウスES細胞とは異なることが見出された。ヒトES細胞はLIF（マウスES細胞の培養には必須の要素）には全く反応せず、これは、ヒトES細胞内の白血病抑制因子経路が不活性であることによって生じる。現存するヒトiPS細胞は、これらの点に関してヒトES細胞と類似しているため、彼らは、ヒトES細胞様iPS細胞と命名することができた。

IV．核酸のゲノムへの組み込み

【0057】

特定の態様では、本発明は、遺伝子操作を介した、核酸分子のゲノムへの組み込みを含む。例えば、そのような核酸を、細胞の遺伝的欠損を修正するために、病原体感染に対する耐性を付与するために、薬剤耐性を付与するために、薬剤への感受性を付与するために、細胞の免疫原性を変更するために、または細胞に遺伝的タグ（例えば、発現している蛍光マーカー）を付与するために、使用してもよい。そのような核酸分子を部位特異的にまたは無作為にゲノムに組み込むための方法は当該分野において公知であり、かつ、遺伝子进行操作するために用いることができる。

30

A．ウイルスベクター

【0058】

特定の側面では、ウイルスベクターを使用して、細胞ゲノムへの核酸分子の組み込みを促進してもよい。例えばレトロウイルスを使用して、宿主細胞ゲノムに、核酸分子を無作為に組み込むことができる。レトロウイルスベクターを構築するために、ウイルスゲノムの特定のウイルス配列の部位に核酸を挿入して、複製欠損ウイルスを生産する。ウイルス粒子を生産するには、gag、pol、およびenv遺伝子を含むがLTRを含まないパッケージング細胞株と、パッケージング成分を構築する（Mann et al., 1983）。cDNAを含む組換えプラスミドの場合には、レトロウイルスLTRとパッケージング配列を一緒に、特殊な細胞株に導入する（例えば、リン酸カルシウム沈殿などによって）。この場合、パッケージング配列によって組換えプラスミドのRNA転写産物のウイルス粒子へのパッケージングが可能となり、これが次いで、培地に分泌される（Nicolas and Rubenstein, 1988; Temin, 1986; Mann

40

50

et al, 1983)。その後、組換えたレトロウイルスを含む培地を回収し、必要に応じて濃縮し、遺伝子移入に使用する。レトロウイルスベクターは、多様な細胞型に感染することができる。しかしながら、組み込みと安定な発現には、宿主細胞の分裂が必要とされる (Paskind et al., 1975)。

【0059】

レンチウイルスは複雑なレトロウイルスであり、一般的にはレトロウイルス遺伝子である gag、pol、および env に加えて、制御的なまたは構造的な機能を有する他の遺伝子を含む。レンチウイルスベクターは当該分野において良く知られている (例えば、Naldini et al., 1996; Zufferey et al., 1997; Blomer et al., 1997; 米国特許第 6,013,516 号および同第 5,994,136 号を参照のこと)。

【0060】

組換えレンチウイルスベクターは、分裂していない細胞に感染することができ、かつ、インピボおよびエクスピボ両方での遺伝子移入ならびに核酸配列の発現に使用することができる。例えば、好適な宿主細胞にパッケージング機能、すなわち gag、pol および env、ならびに rev および tat を含んでいる 2 つ以上のベクターが導入されている、分裂していない細胞に感染することができる組換えレンチウイルスが、参照することによって本明細書に組み込まれる米国特許第 5,994,136 号に記載されている。

【0061】

同様に、宿主細胞ゲノムへの核酸分子の組み込みを仲介させるために、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを使用することもできる。例えば、パッケージングに必要な領域以外の遺伝子を欠損させた (gutless) AAV ベクターを使用して、ウイルスの逆方向末端反復 (ITR) が組み込む核酸分子に隣接するようにしてもよい。そのようなベクターを細胞に導入する場合には、本質的に無作為なゲノムへの組み込みが起こり得る。一方、機能性 AAV Rep 遺伝子 (ウイルス中で発現しているかまたはトランスで発現している) の存在下で細胞への形質導入を行う場合には、その配列は AAV S1 の組み込み部位へと、部位特異的に組み込まれる可能性がある。

B. トランスポゾンを利用した組み込みシステム

【0062】

別の特定の態様では、核酸の組み込みには、トランスポゾン - トランスポサゼシステムを使用してもよい。そのようなシステムを使って、核酸分子を細胞ゲノムに効率的に、かつ、無作為に挿入することができる。例えば、使用されるトランスポゾン - トランスポサゼシステムは、良く知られている Sleeping Beauty、Frog Prince トランスポゾン - トランスポサゼシステム (後者については、例えば欧州特許第 1507865 号明細書を参照のこと)、または TTA 特異的トランスポゾン piggyBac システムとなり得る。

【0063】

トランスポゾンとは、転位と呼ばれる過程で、単一の細胞のゲノム内で、別の位置へと動き回ることができる DNA の配列である。この過程で、トランスポゾンは突然変異やゲノム中の DNA 量の変化を起こす場合がある。トランスポゾンはジャンピング遺伝子と呼ばれていたこともあり、可動遺伝要素の代表的なものである。

【0064】

可動遺伝要素には様々なものがあり、転位の機構によってそれらを分類することができる。I 型の可動遺伝要素、すなわちレトロトランスポゾンは、最初に RNA へと転写され、次いで逆転写酵素によって DNA へと逆転写され、その後ゲノム中の別の位置に挿入されることによって、それら自体を複製する。II 型の可動遺伝要素は、それら自体をゲノム中で「カットアンドペースト」するトランスポサゼを使って、ある位置から直接別の位置に移動する。この態様による核酸分子のゲノムへの組み込みの仲介には、そのようなシステムのいずれを用いてもよい。

C. 相同的組換え

【0065】

本発明の特定の側面では、核酸分子を細胞に、ゲノム改変に特異的な様式で、例えば相
同的組換えを介して、導入することができる。上述したように、遺伝子を細胞内で発現さ
せるためのいくつかの方法には、ウイルスベクターまたは導入ゲノム中に無作為に組み込
むための遺伝子の使用が含まれる。しかしながらこれらの方法には、組み込まれた核酸
からの発現を仲介するのに適していない位置にも組み込みが起こること、または天然の遺
伝子が破壊されるという欠点がある。無作為な組み込みに関連する問題は、標的ゲノムの
特定の遺伝子座、例えば、AAVS1またはRosa26遺伝子座を相同的に組換えることによ
って、部分的に克服することができた。

【0066】

普遍的組換えとしても知られている相同的組換え(HR)は、全ての形の生命において
使用されている普遍的な組換えであり、HRでは、ヌクレオチド配列がDNAの2本の類
似した鎖または同一の鎖の間で交換される。この技術は、1980年代の半ばから、哺乳
類の細胞におけるゲノム改変の標準的な方法となっている。この過程には、物理的な切断
やその後起こるDNAの再結合などの複数の工程が含まれる。この過程は、DNAの中
で、致死となる可能性のある二本鎖の損傷を修復するために、最もよく使用される。加え
て、相同的組換えによって、真核生物が精子や卵子のような生殖細胞を形成する過程であ
る減数分裂の間に、DNA配列の新しい組み合わせが生成される。これらDNAの新しい
組み合わせは子孫における遺伝的な変動を表し、これによって、経時的な環境条件の変化
に、その集団が進化的に適応することが可能となる。相同的組換えは、細菌やウイルスの
異なる系統や種間で遺伝材料を交換するための水平遺伝子伝達にも使用されている。相同
的組換えはまた、標的生物に遺伝的な変化を導入するための分子生物学における技術とし
ても用いられている。

【0067】

相同的組換えを、標的ゲノムの修飾に使用することもできる。哺乳類細胞における標準
的なHRの効率は、僅か、処理した細胞の $10^{-6} \sim 10^{-9}$ である(Capucci
、1990)。メガヌクレアーゼ、またはホーミングエンドヌクレアーゼ、例えばI-S
ceIを使用することで、HRの効率は高められてきた。HRの効率を高めるために、タ
ーゲティング特性を変えた天然のメガヌクレアーゼおよび改変したメガヌクレアーゼの両
方が使用されてきた(Pingoud and Silva、2007; Chevalier et al.、2002)。

【0068】

HRの効率を向上させる過程で、プログラム可能なDNA特異性ドメインを用いて、キ
メラエンドヌクレアーゼが設計されてきた(Silva et al.、2011)。ジンクフィンガー
ヌクレアーゼ(ZFN)は、そのようなキメラ分子の一例であり、ZFN
では、ジンクフィンガーDNA結合ドメインが、IIS型制限エンドヌクレアーゼ、例え
ばFokIの触媒ドメインに融合されている(Durai et al.、2005; P
CT/US 2004/030606に概説されている)。

【0069】

そのような特定の分子の他のクラスには、転写活性化因子様エフェクター(TALE)
DNA結合ドメインを、IIS型制限エンドヌクレアーゼ、例えばFokIの触媒ドメイ
ンに融合させたものが含まれる(Miller et al.、2011; PCT/IB
2010/000154)。実質的に、目的の部位のいずれでもゲノムを部位特異的に修
飾するために、TALENを設計することができる(Cermak et al.、20
11; Christian et al.、2010; Li et al.、2011; M
iller et al.、2011; Weber et al.、2011; Zha
ng et al.、2011)。部位特異的DNA結合ドメインは、DNA開裂酵素、
例えばFokIとの融合タンパク質として発現される。DNA結合ドメインは、反復して
いるアミノ酸の骨格であり、接続しているそれぞれの反復は、DNA内の単一のヌクレオ
チドに結合する2つのアミノ酸である。例えば、Asn-Asnはグアノシンに結合し、

10

20

30

40

50

Asn - Ile はアデノシンに結合し、Asn - Gly はチミジンに結合し、His - Asp はシトシンに結合する。これら 2 つのアミノ酸は、反復可変 2 残基 (Repeat Variable Diresidue) または RVD として知られている。RVD には様々な種類があり、それらを TALE 効果ター/FokI タンパク質構築物中に組み込んで、特定の TALEN を作成することができる。その後、組換え TALEN をコードしている RNA を精製し、部位特異的にゲノムを修飾するために、細胞に導入することができる。TALEN による二本鎖 DNA の切断が生じた後には、非相同末端結合 (NHEJ) によってまたは相同組換え修復 (HDR) によって、DNA を修飾することができる。これにより、DNA 修復の間に存在する追加の配列に応じた DNA 突然変異生成、欠損、または付加が可能となる。

10

V. リプログラミングのための遺伝要素

【0070】

ヒト体細胞からの多能性幹細胞の誘導は、リプログラミング遺伝子を異所的に発現させるためのレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターを使用して行われてきた。組換えレトロウイルス、例えばモロニー Maus 白血病ウイルスは、安定な様式で、宿主ゲノム中に組み込む能力を有する。これらには、宿主ゲノムへの組み込みを可能にする、逆転写酵素が含まれている。レンチウイルスは、レトロウイルスの下位区分である。これらは、分裂していない細胞および分裂している細胞のゲノムに組み込むその能力によって、ベクターとして広く適合されている。RNA の形態のウイルスゲノムは、ウイルスが細胞に進入すると、DNA を生産するために逆転写され、次いで、ウイルスの組み込み酵素によって、ゲノムの無作為な位置に挿入される。そのため、現在うまくいっているリプログラミング技術は、組み込みに基づくウイルスによる方法に依存している。

20

【0071】

しかしながら、特定の態様において本発明の方法は、リプログラミングに染色体外の遺伝要素を活用する。例えば、染色体外で複製しているベクター、またはエピソームで複製することが可能なベクター (参照することによって本明細書に組み込まれる米国特許公開第 20100003757 号を参照のこと) を用いることができる。さらなる側面では、リプログラミング因子をコードしている RNA 分子またはリプログラミング因子タンパク質を使用することができる。それぞれの場合、リプログラミング因子の発現と、最適なリプログラミング効率および動力学を達成するための細胞間シグナル伝達阻害剤の存在下における細胞の培養とを併用することができる。

30

【0072】

多数の DNA ウイルス、例えば、アデノウイルス、サル空胞ウイルス 40 (SV40)、ウシパピローマウイルス (BPV)、または出芽酵母 ARS (Autonomously Replicating Sequences) を含有するプラスミドが、哺乳類細胞内で染色体外に複製される。これらのエピソームプラスミドは、組み込みベクターに関連のあるこれらの欠点を、本質的に含まないものである (Bode et al., 2001)。エプスタイン - バーウイルス (EBV) などのリンパ増殖性のヘルペスウイルスを利用したシステムもまた、染色体外で複製され、リプログラミング遺伝子の体細胞への送達を補助し得る。

40

【0073】

例えば、本発明で使われるエピソームベクターを利用した方法では、以下に詳述するように臨床現場でのシステムの扱いやすさを損なうことなく、EBV 要素を利用したシステムの複製および維持の成功に必要な、強力な要素が抽出される。有用な EBV 要素は、OriP および EBNA - 1 であるか、またはそれらの変異体もしくは機能性の均等物である。このシステムの別の利点は、これらの外生の要素は、細胞に導入した後、時間経過とともに消失し、これらの要素を本質的に含まない、自家持続性の iPS 細胞を生じることである。

A. エプスタイン・バーウイルス

【0074】

50

ヒトヘルペスウイルス4 (HHV-4) と呼ばれるエプスタイン・バーウイルス (EBV) は、ヘルペスファミリー (単純ヘルペスウイルスやサイトメガロウイルスを含む) のウイルスであり、かつ、ヒトに最も一般的なウイルスの1種である。EBVはそのゲノムを染色体外で維持し、効率的な複製と維持のために、宿主細胞の機構と協調して機能する (Lindner および Sugden, 2007)。EBVの複製と維持は、細胞分裂の間でのその複製と保持に必須の、たった2つの特徴に依存している (Yates et al., 1985; Yates et al., 1984)。一般的に oriP と呼ばれている1つめの要素はシスに存在し、複製の起点となる。もう1つの因子である EBNA-1 は、プラスミドDNAの複製と維持を促進するために、oriP中の配列に結合することによってトランスで機能する。非限定的な例として、本発明の特定の側面では、これら2つの特徴を引き出し、リプログラミングに必要な遺伝子の複製と持続した発現を標準的なプラスミドよりも促進するために、これら遺伝子を体細胞に運ぶためのベクターに関連して、それらを使用する。

10

B. 複製起点

【0075】

特定の側面では、EBVの複製起点である OriP を使用してもよい。OriP は、DNAの複製が開始する位置またはその近傍であり、2つのシス活性化配列から構成されている。これら2つのシス活性化配列は、およそ1キロベースペアの間隔で位置しており、FR (family of repeats) および DS (dyad symmetry) として知られている。

20

【0076】

FRは、30bp反復の、不完全な21のコピーから構成されており、20の高親和性 EBNA-1 - 結合部位を含む。FRにEBNA-1が結合すると、この両者が、シスの10kb離れた位置までのプロモーターの転写エンハンサーとして機能し (Reisman and Sugden, 1986; Yates, 1988; Sugden and Warren, 1989; Wysokenski and Yates, 1989; Gahn and Sugden, 1995; Kennedy and Sugden, 2003; Altmann et al., 2006)、FR含有プラスミドの核での保持と忠実な維持に寄与する (Langley-Rouault et al., 1998; Kirchmaier and Sugden, 1995; Wang et al., 2006; Nanbo and Sugden, 2007)。oriPプラスミドの効率的な分割もまた、FRに起因するようである。ウイルスは、FR中で20のEBNA-1 - 結合部位を維持するように進化してきたが、効率的なプラスミドの維持には、これらの部位のうちのたった7つだけが必要であり、およそ3コピーのDSのポリマーによって、合計で12のEBNA-1 - 結合部位を有するように再構成することができる (Wysokenski and Yates, 1989)。

30

【0077】

DS (dyad symmetry) 要素は、EBNA-1存在下でのDNA合成の開始に十分なものであり (Aiyar et al., 1998; Yates et al., 2000)、開始は、DSまたはその近傍で起こる (Gahn and Schildkraut, 1989; Niller et al., 1995)。FRにEBNA-1が結合すると、FRが複製フォークの障壁として機能することが2次元ゲル電気泳動によって示されたことから (Gahn and Schildkraut, 1989; Ermakova et al., 1996; Wang et al., 2006)、ウイルスDNA合成の終了はFRで起こると考えられている。DSからのDNA合成の開始は、一細胞周期に一度だけ (once-per-cell cycle) であることが認められており (Adams, 1987; Yates and Guan, 1991)、かつ、細胞複製システムの成分によって制御されている (Chaudhuri et al., 2001; Ritzi et al., 2003; Dhar et al., 2001; Schepers et al., 2001; Zhou et al., 2005; Ju

40

50

lien et al., 2004)。DSは、4つのEBNA-1-結合部位を含むが、FRに見られるものよりも親和性が低い(Reisman et al., 1985)。DSのトポロジーは、各組の間の中心間の距離が21bpとなり、組になっていない、内側にある2つの結合部位の間の中心間の距離が33bpとなるように、4つの結合部位が、2組の部位として配置されるというものである(Baer et al., 1984; Rawlins et al., 1985)。

【0078】

DSに含まれている要素の機能的な役割は、Rep*と名付けられた、EBVゲノムの別の領域に関する研究によって確認されてきた。Rep*は、効率は悪いがDSの代わりになる可能性のある要素として同定された(KirchmaierおよびSugden、1998)。Rep*を8つ重合させると、複製の支持においてDSと同程度の効率を有する要素となる(Wang et al., 2006)。Rep*の生化学的な解析から、中心間の距離が21bpの、一对のEBNA-1結合部位がその複製機能に重要であることが同定された(ibid)。ポリマー中の全ての隣接した配列をファージ由来の配列と置き換えた後も複製機能が維持されたことから、Rep*の最小レプリケーターがEBNA-1結合部位の組であることが分かった。DSとRep*の比較から、これらのレプリケーターは、適切な距離をおいて配置された一对の部位、EBNA-1による屈曲および結合を介して細胞の複製機構を補充することによってDNA合成の開始を支持するという、共通の機構が明らかになった。

【0079】

哺乳類細胞内で複製し、EBVとは関連がなく、かつ、いくつかの点でEBVのRaji株に含まれている開始領域に類似しているように考えられる、染色体外の、認可されたプラスミドが他にもある。Hans Lippsと彼の共同研究者らは、「核の足場/マトリックス結合領域」(S/MAR)と強力な転写単位を含むプラスミドを開発し、調査した(Piechaczek et al., 1999; Jenke et al., 2004)。彼らのS/MARはヒトインターフェロンベータ遺伝子に由来するものでA/Tに富み、かつ、核マトリックスとの関係と、低イオン強度でのまたはスーパーコイルDNAに埋め込まれた場合のその優先的な巻き戻しによって、操作的に定義される(Bode et al., 1992)。これらのプラスミドは半保存的に複製し、ORCタンパク質に結合し、そしてそのDNA全体を通して無作為に、DNA合成の開始を効率よく支持する(Schaarschmidt et al., 2004)。それらは薬剤選択なしでも、増殖しているハムスター細胞およびヒト細胞中で効率よく維持され、ブタの胚に導入した場合には、胎仔のほとんどの組織におけるGFPの発現を支持することができる(Manzini et al., 2006)。

C. トランス活性化因子

【0080】

トランス活性化因子の具体例としては、エプスタイン・バー核抗原1(EBNA-1)を挙げることができる。EBNA-1は、oriPまたはRep*のFRおよびDSに結合して、複製と、細胞の染色体とは独立しているがこれらと協調して、各細胞分裂の間にEBVベースのベクターの娘細胞への忠実な分割を促進するDNA結合タンパク質である。

【0081】

EBNA-1の641個のアミノ酸(AA)は、変異を用いた解析および欠損を用いた解析によって、その多様な機能に関連するドメイン毎に分類された。AA40-89およびAA329-378の2領域は、EBNA-1が結合すると、シスまたはトランスにある2つのDNA要素に結合することができる。そのためこれらは結合領域1および2(LR1、LR2)と命名された(Middleton and Sugden, 1992; Frappier and O'Donnell, 1991; Suet al., 1991; Mackey et al., 1995)。EBNA-1のこれらドメインをGFPに融合すると、GFPは有糸分裂染色体に接近する(Marechal et al.,

1999; Kanda et al., 2001)。複製に関しては、LR1とLR2の機能は重複しており、どちらか一方を欠損させても、DNA複製を支持することが可能なEBNA-1の派生物が生じる(Mackey and Sugden, 1999; Sears et al., 2004)。LR1とLR2はアルギニン残基とグリシン残基に富んでおり、A/Tに富むDNAに結合するAT-フックモチーフに類似している(AravindおよびLandsman, 1998)、(Sears et al., 2004)。EBNA-1のLR1とLR2のインビトロ解析から、それらがA/Tに富むDNAに結合可能なことが示された(Sears et al., 2004)。そのようなAT-フックを1つ含むLR1を、EBNA-1のDNA結合ドメインおよび二量体化ドメインに融合させると、野生型EBNA-1(ibid)の効率より低くはあるが、oriPプラスミドのDNA複製に十分となることが分かった。10

【0082】

しかしながら、LR1とLR2の機能は異なる。LR1のC末端側の半分は、N末端側半分にあるArg-Glyの反復以外のアミノ酸で構成されており、ユニーク領域1(UR1)と命名されている。UR1は、EBNA-1が、導入され、組み込まれたFRを含むレポーターDNAから、効率的に転写を活性化させるのに必須である(Wu et al., 2002; Kennedy and Sugden, 2003; Altmann et al., 2006)。また、UR1は、EBVを感染させたB細胞の効率的な形質転換に必須である。ウイルス全体に関して、このドメインを欠損しているEBNA-1の派生物で野生型タンパク質を置き換えると、これら派生ウイルスの形質転換能は、野生型ウイルスの0.1%となる(Altmann et al., 2006)。20

【0083】

LR2は、EBNA-1がoriPの複製を支持するのには必要ではない(Shire et al., 1999; Mackey and Sugden, 1999; Sears et al., 2004)。加えて、EBNA-1のN末端側の半分はAT-フックモチーフを含む細胞タンパク質、例えばHMGA1aで置き換えることができ、それでもなお、複製機能は維持される(Hung et al., 2001; Sears et al., 2003; Altmann et al., 2006)。これらの発見は、LR1とLR2のAT-フック活性が、ヒト細胞でのoriPの維持に必要である可能性があることを示している。30

【0084】

第三のEBNA-1の残基(AA91-328)は、プロテアソーム分解と提示によって宿主の免疫応答を回避するEBNA-1の能力に関与している、グリシン-グリシン-アラニン(GGA)の反復から構成されている(Levitskaya et al., 1995; Levitskaya et al., 1997)。これらの反復が、インビトロおよびインビボでEBNA-1の翻訳を阻害することも分かっている(Yin et al., 2003)。しかしながら、細胞培養中ではこのドメインの大部分を欠損させてもEBNA-1の機能に明かな効果がないことから、このドメインの機能を明かにすることは難しくなっている。

【0085】

核局在シグナル(NLS)は、細胞の核輸送機構にも関係のある、AA379-386によってコードされている(Kim et al., 1997; Fischer et al., 1997)。LR1およびLR2のArg-Glyに富む領域中の配列も、それらが高度に塩基性であることから、NLSとして機能し得る。

【0086】

最後に、C-末端(AA458-607)は、EBNA-1の重複しているDNA結合ドメインおよび二量体化ドメインをコードしている。DNAに結合しているこれらドメインの構造がX線を用いた結晶学によって明らかになっており、パピローマウイルスのE2タンパク質のDNA結合ドメインと類似していることが分かった(Hegde et al., 1992; Kim et al., 2000; Bochkarev et al., 50

, 1996)。

【0087】

本発明の特異的態様では、リプログラミングベクターは、oriPと、プラスミドの複製および細胞分裂している間でのその正確な維持を支持する、EBNA-1の相補型をコードしている短い配列との両方を含む。野生型EBNA-1のアミノ末端の3分の1に含まれる非常に反復性の高い配列と、様々な細胞において毒性が示されている25アミノ酸領域の除去は、oriPと関連があるEBNA-1のトランス活性化機能には必須ではない(Yates et al., 1985; Kennedy et al., 2003)。そのため、一態様では、このエピソームベクターを利用したシステムにおいて、デルタUR1としても知られる短くなった型のEBNA-1を、oriPに並べて使用してもよい。

10

【0088】

特定の側面では、本発明で使用するすることができるEBNA-1の派生物は、修飾されたアミノ酸配列を有する、対応する野生型ポリペプチドに関連のあるポリペプチドである。修飾には、EBNA-1のLR1(残基約40~約89)のユニーク領域(約65~約89番目の残基)に対応する領域における少なくとも1つのアミノ酸残基の欠失、挿入または置換が含まれ、また、得られる派生物が望ましい特性、例えば、二量体化し、oriPに対応するoriに結合する、核に局在する、毒性でない、および染色体外からの転写を活性化するが、組み込まれた鋳型からの転写は実質的に活性化しない、などの特性を有する限り、EBNA-1の他の残基に対応する領域中の1つまたは複数のアミノ酸残基、例えば、約1番目の残基~約40番目の残基、約90番目~約328番目の残基(「Gly-Gly-Ala」反復領域)、約329番目~約377番目の残基(LR2)、約379番目~約386番目の残基(NLS)、約451番目~約608番目の残基(DNA結合および二量体化)、または約609番目~約641番目の残基の欠失、挿入および/または置換が含まれ得る。

20

D. 残基とは無関係の特徴

【0089】

さらに重要なことに、oriPを利用したエピソームベクターの複製と維持は不完全で、かつ、細胞に導入されてから最初の2週間の間には、細胞から、急速に(細胞分裂1回当たり25%)失われる。しかしながら、プラスミドを保持している細胞の消失率はもっと低い(細胞分裂1回当たり3%)(Leight and Sugden, 2001; Nanbo and Sugden, 2007)。プラスミドを内部に保有している細胞の選択を行わなければ、プラスミドは、それらが以前存在したことの足跡を、生じる娘細胞の中に残すことなく、時間経過とともにそれら全てが消失するまで、各細胞分裂の経過中に失われる。本発明の特定の側面は、oriPを利用したシステムのこの足跡を残さない特性を、遺伝子を送達してiPS細胞を生成するために現在使用されている、ウイルスを介した方法の代わりとして活用する。他の染色体外のベクターも、複製と宿主細胞の成長の間に消失する可能性があり、本発明において使用することもできるだろう。

30

E. リプログラミング因子

【0090】

iPS細胞の生成は、導入に使用された遺伝子に対して重要である。本発明で開示するベクターシステムでは、以下に挙げる因子またはその組み合わせが使用され得る。特定の側面では、SoxおよびOct(好ましくはOct3/4)をコードしている核酸がリプログラミングベクターに含まれる。例えば、リプログラミングベクターは、Sox2、Oct4、Nanogおよび必要に応じてLin-28をコードしている発現カセット、またはSox2、Oct4、Klf4および必要に応じてC-myc、L-mycまたはGli3-1をコードしている発現カセットを含み得る。これらのリプログラミング因子をコードしている核酸は、同じ発現カセットに含まれていても、別々の発現カセットに含まれていてもよく、同じリプログラミングベクターに含まれていても、または別々のリプログラミングベクターに含まれていてもよい。

40

50

【0091】

Oct-3/4と、Sox遺伝子ファミリーの特定のメンバー（Sox1、Sox2、Sox3、およびSox15）が、導入過程に重要な転写制御因子であり、これらがないと導入が不可能であることが分かっている。しかしながら、Klfファミリーの特定のメンバー（Klf1、Klf2、Klf4、およびKlf5）、Mycファミリー（C-myc、L-myc、およびN-myc）、Nanog、ならびにLIN28を含むさらなる遺伝子が、導入効率を高めることが分かっている。

【0092】

Oct-3/4（Pou5f1）は、オクタマー（「Oct」）転写因子のファミリーのうちの1つであり、多能性の維持に重要な役割を果たしている。割球や胚性幹細胞などのOct-3/4+細胞でOct-3/4が欠損すると栄養膜への自発的な分化が生じるため、Oct-3/4の存在が、多能性および胚性幹細胞の分化能を与えている。Oct-3/4の近縁であるOct1およびOct6を含む、「Oct」ファミリーの多くの他の遺伝子は、導入を促進しない。

10

【0093】

Soxファミリー遺伝子は、Oct-3/4と同様に、多能性の維持に関係しているが、主に多能性幹細胞で発現しているOct-3/4とは対照的に、多分化能をもつ幹細胞や単分化能をもつ幹細胞とも関係がある。Sox2は、Takahashi et al.（2006）、Wernig et al.（2007）、およびYu et al.（2007）によって導入に使用された最初の遺伝子であるが、導入の過程では、Soxファミリーの他の遺伝子も同様に機能することが分かった。Sox1とSox2は同程度の効率でiPS細胞を生じる。Sox3、Sox15、およびSox18遺伝子もiPS細胞を生成するが、その効率は低い。

20

【0094】

Nanogは、未分化の胚性幹細胞の自己再生に關与する、重要な転写因子である。ヒトでは、このタンパク質は、NANOG遺伝子によってコードされている。Nanogは胚性幹細胞（ESC）で発現する遺伝子であり、多能性の維持に重要な因子であると考えられている。NANOGは、Oct4（POU5F1）およびSox2などの他の因子と協調して、ESCの独自性の確立に機能していると考えられる。

30

【0095】

LIN28は、分化と増殖に関連のある胚性幹細胞と胚性癌細胞で発現する、mRNA結合タンパク質である。Yu et al.（2007）によって、この因子がiPSの生成に關与するが、必須ではないことが示された。

【0096】

Klfファミリー遺伝子のKlf4は、最初、Takahashi et al.（2006）によって同定され、その後、Wernig et al.（2007）によって、マウスiPS細胞の生成に關する因子であることが確認され、ヒトiPS細胞の生成にも關与する因子であることがTakahashi et al.（2007）によって示された。しかしながら、Yu et al.（2007）は、ヒトiPS細胞の生成には、Klf4は必須ではないことを報告した。Klf2およびKlf4がiPS細胞を生じることができる因子であること、および関連遺伝子であるKlf1およびKlf5も同様に機能するが、その効率は低いことが分かった。

40

【0097】

Mycファミリーの遺伝子は、癌に關係のある癌原遺伝子である。Takahashi et al.（2006）およびWernig et al.（2007）によって、C-mycがマウスiPS細胞の生成に關係のある因子であることが示され、また、Yamanaka et al.によって、C-mycがヒトiPS細胞の生成にも關係のある因子であることが示された。しかしながら、Yu et al.（2007）およびTakahashi et al.（2007）は、c-mycはヒトiPS細胞の生成には必須ではないと報告した。c-mycで誘導したiPS細胞を移植したマウスの25%

50

で致死的な奇形腫が発生したことから、「m y c」ファミリーの遺伝子を i P S 細胞の誘導に使用することは、最終的に、その i P S 細胞を臨床治療に使用する場合には問題がある。C - m y c の替りに、N - m y c および L - m y c も同程度の効率で多能性を誘導することが分かっている。特定の側面では、M y c 変異体、変異株、ホモログ、または誘導体、例えば細胞の形質転換効率の低い突然変異体を使用してもよい。例としては、L M Y C (N M _ 9 0 1 0 3 3 0 8 1)、N - 末端の 4 1 アミノ酸が欠失した M Y C (d N 2 M Y C)、または 1 3 6 番目のアミノ酸が変異した M Y C (例えば、W 1 3 6 E) が挙げられる。

V I . 細胞間シグナル伝達阻害剤

【 0 0 9 8 】

本発明の特定の側面では、少なくともリプログラミング過程の一部では、細胞を、シグナル伝達カスケードに関連のあるシグナルトランスデューサーを阻害する、1つまたは複数のシグナル伝達阻害剤の存在下に、例えば、M E K 阻害剤、G S K 3 阻害剤、T G F - 受容体阻害剤、M E K 阻害剤と G S K 3 阻害剤の両方、G S K 3 阻害剤と T G F - 受容体阻害剤の両方、M E K 阻害剤と T G F - 受容体阻害剤の両方、これら 3 つの阻害剤の組み合わせ、またはこの同じ経路に含まれる他のシグナルトランスデューサーの阻害剤の存在下に維持してもよい。特定の側面では、R O C K 阻害剤、例えば H A - 1 0 0 および H - 1 1 5 2、またはミオシン I I 阻害剤、例えばプレバスタチンを、リプログラミングされた細胞のクローナルな増殖を促進し、i P S 細胞を得るために、使用してもよい。高濃度の F G F を、特定のリプログラミング培地と組み合わせて、例えば馴化ヒト E S 細胞用培地または化学的に規定されている培地、例えば血清を含まない限定 N 2 B 2 7 培地、T e S R 培地、もしくは必須 8 培地と組み合わせて使用して、リプログラミング効率を高めてもよい。

【 0 0 9 9 】

特定の態様では、染色体外の遺伝要素によって、1つまたは複数の（例えば、本明細書に記載したように 2 つ、3 つまたはそれ以上の）リプログラミング因子を細胞に導入することに加えて、細胞を、M E K 阻害剤、T G F - 受容体阻害剤、G S K 3 阻害剤、および必要に応じて L I F を含むリプログラミング培地で処理する。このような培地は、リプログラミング効率やリプログラミングの動力学を高め、初代リプログラミング培養における i P S 細胞の同定を促し、その結果、i P S 細胞の同一性を保つという利点を有する。

【 0 1 0 0 】

当然のことながら、これらの側面および態様では、M E K 阻害剤が望ましい場合には、同じシグナル伝達経路（例えば E R K 1 または E R K 2 カスケード）のシグナル伝達成分を阻害する他のシグナル伝達阻害剤を置き換えてもよい。このことには、M A P K 経路の上流での刺激の阻害、具体的には F G F 受容体を介した阻害（Y i n g、2 0 0 8）が含まれ得る。同様に、G S K 3 関連シグナル伝達経路、例えばインスリンの合成および W n t / - カテニンシグナル伝達の他の阻害剤が望ましい場合には G S K 3 阻害剤を置き換えてもよく；S t a t 3 または g p 1 3 0 シグナル伝達の他の活性化因子が望ましい場合には L I F を置き換えてもよい。

【 0 1 0 1 】

そのようなシグナル伝達阻害剤、例えば、M E K 阻害剤、G S K 3 阻害剤、T G F - 受容体阻害剤は、少なくともまたは約 0 . 0 2、0 . 0 5、0 . 1、0 . 2、0 . 5、1、2、3、4、5、1 0、1 5、2 0、2 5、3 0、3 5、4 0、4 5、5 0、1 0 0、1 5 0、2 0 0、5 0 0 ~ 約 1 0 0 0 μ M、またはここから導き出される任意の範囲である有効な濃度で 사용할 ことができる。

【 0 1 0 2 】

阻害剤は、標準的な手段または標準的な供給源から、当業者によって提供されても、あるいは得られてもよい（国際公開第 2 0 0 7 1 1 3 5 0 5 号パンフレットもまた参照のこと）。

A . グリコーゲン合成酵素キナーゼ 3 阻害剤

【0103】

グリコーゲン合成酵素キナーゼ3 (GSK-3) は、特定のセリンおよびトレオニンアミノ酸、具体的には細胞基質へのリン酸分子の付加を仲介するセリン/トレオニンタンパク質キナーゼである。GSK-3によるこれらタンパク質のリン酸化は、通常、標的タンパク質(「基質」とも呼ばれる)を阻害する。GSK-3は、上述したようなリン酸化と、その結果起こるグリコーゲン合成の不活性化に関して知られている。GSK-3は、損傷を受けたDNAに対する細胞反応の制御やWntシグナル伝達にも関与している。また、GSK-3は、Hedgehog(Hh)経路中のCiをリン酸化し、その結果、Ciをタンパク質分解へと誘導して不活性化形態にする。グリコーゲン合成に加えて、GSK-3は他にも多くの基質をもつ。しかしながら、GSK-3は、通常、基質を前もってリン酸化する「プライミングキナーゼ」を必要とする点で、他のキナーゼとは異なる。

10

【0104】

GSK-3によるリン酸化の結果は、通常、基質の阻害である。例えば、GSK-3が基質のもう一方の基質であるNFATファミリーの転写因子をリン酸化すると、これらの転写因子は核移行することができず、その結果、阻害される。Wntシグナル伝達経路における重要な役割に加えて、GSK-3は、発達途中の組織パターンの確立にも必要である。また、GSK-3は骨格筋肥大などの状況で誘導されるタンパク質の合成にも重要である。NFATキナーゼとしての役割から、GSK-3は分化および細胞増殖両方の重要な制御因子でもある。

20

【0105】

GSK3阻害とは、1つまたは複数のGSK3酵素を阻害することを指す可能性がある。GSK3酵素のファミリーは良く知られており、かつ、多数の変異体についての記載がある(を参照のこと例えばSchaffner et al., 2003)。特定の態様では、GSK3- が阻害される。GSK3- 阻害剤もまた適しており、本発明特定の側面で使用される阻害剤は、GSK3- とGSK3- の両方を阻害する。

【0106】

GSK3の阻害剤としては、GSK3に結合する抗体、GSK3の優性阻害変異体、ならびにGSK3を標的とするsiRNAおよびアンチセンス核酸が挙げられ得る。GSK3阻害剤の例は、Bennett et al. (2002)およびRing et al. (2003)に記載されている。

30

【0107】

GSK3阻害剤の具体例としては、ケンパウロン(Kenpaulone)、1-アザケンパウロン、CHIR99021、CHIR98014、AR-A014418(例えば、Gould et al., 2004を参照のこと)、CT99021(例えば、Wagman, 2004を参照のこと)、CT20026(Wagman, 上記を参照のこと)、SB415286、SB216763(例えば、Martin et al., 2005を参照のこと)、AR-A014418(例えば、Noble et al., 2005を参照のこと)、リチウム(例えば、Gould et al., 2003を参照のこと)、SB415286(例えば、Frame et al., 2001を参照のこと)およびTDZD-8(例えば、Chin et al., 2005を参照のこと)が挙げられるがこれらには限定されない。Calbiochemから入手可能なさらなるGSK3阻害剤の例としては(参照により本明細書に組み込まれる、例えば、Dalton et al., 国際公開第2008/094597号パンフレットを参照のこと)、BIO(2'-Z、3'-E)-6-プロモジルビン-3'-オキシム(GSK3阻害剤IX); BIO-アセトキシム(2'-Z、3'-E)-6-プロモインジルビン-3'-アセトキシム(GSK3阻害剤X); (5-メチル-1H-ピラゾール-3-イル)-(2-フェニルキナゾリン-4-イル)アミン(GSK3-阻害剤XIII); ピリドカルバゾール-シクロペナジエニルルテニウム錯体(GSK3阻害剤XV); TDZD-8 4-ベンジル-2-メチル-1, 2, 4-チアジアゾリジン-3, 5-ジオン(GSK3ベータ阻害剤I); 2-チオ(3-ヨードベンジル)-5-(1-ビリジル)-[1, 3, 4]

40

50

- オキサジアゾール (G S K 3 ベータ阻害剤 I I) ; O T D Z T 2 , 4 - ジベンジル - 5 - オキソチアジアゾリジン - 3 - チオン (G S K 3 ベータ阻害剤 I I I) ; アルファ - 4 - ジブロモアセトフェノン (G S K 3 ベータ阻害剤 V I I) ; A R - A O 1 4 4 1 8 N - (4 - メトキシベンジル) - N ' - (5 - ニトロ - 1 , 3 - チアゾール - 2 - イル) 尿素 (G S K - 3 ベータ阻害剤 V I I I) ; 3 - (1 - (3 - ヒドロキシプロピル) - 1 H - ピロロ [2 , 3 - b] ピリジン - 3 - イル] - 4 - ピラジン - 2 - イル - ピロール - 2 , 5 - ジオン (G S K - 3 ベータ阻害剤 X I) ; T W S 1 1 9 ピロールピリミジン化合物 (G S K 3 ベータ阻害剤 X I I) ; L 8 0 3 H - K E A P P A P P Q S p P - N H 2 またはそのミリストイル化型 (G S K 3 ベータ阻害剤 X I I I) ; 2 - クロロ - 1 - (4 , 5 - ジブロモ - チオフェン - 2 - イル) - エタノン (G S K 3 ベータ阻害剤 V I) ; A R - A O 1 4 4 - 1 8 ; S B 2 1 6 7 6 3 ; および S B 4 1 5 2 8 6 が挙げられるがこれらには限定されない。

10

【 0 1 0 8 】

G S K 3 阻害剤は、例えば、W n t / - カテニン経路を活性化することができる。
- カテニンの下流遺伝子の多くは一緒になって、多能性遺伝子のネットワークを制御する。例えば、G S K 阻害剤は c M y c の発現を活性化し、そのタンパク質の安定性と転写活性を高める。従って、いくつかの態様では、細胞内の内生 M y c ポリペプチドの発現を刺激し、それによって多能性を誘導するのに必要とされる M y c の発現を排除するために、G S K 3 阻害剤を使用することができる。

20

【 0 1 0 9 】

加えて、G S K 3 - の活性部位の構造が解析され、特異的な阻害剤および非特異的な阻害剤と相互作用する重要な残基が同定されている (B e r t r a n d e t a l . , 2 0 0 3) 。この構造解析から、さらなる G S K 阻害剤を容易に同定することが可能になっている。

【 0 1 1 0 】

本明細書で使用される阻害剤は、好ましくは、標的となるキナーゼに特異的なものである。特定の態様の阻害剤は、G S K 3 - および G S K 3 - に特異的なものであり、実質的には e r k 2 を阻害せず、かつ、実質的に c d c 2 を阻害しない。好ましくは、阻害剤は、I C ₅₀ 値の比として測定した場合に、マウス e r k 2 および / またはヒト c d c 2 よりもヒト G S K 3 に対して、少なくとも 1 0 0 倍、より好ましくは少なくとも 2 0 0 倍、さらに好ましくは少なくとも 4 0 0 倍高い選択性を有する。ここで、G S K 3 の基準となる I C ₅₀ 値は、ヒト G S K 3 - および G S K 3 - の平均値を指す。G S K 3 に特異的な C H I R 9 9 0 2 1 を使用した場合に、良い結果が得られた。使用に適した C H I R 9 9 0 2 1 の濃度は、0 . 0 1 ~ 1 0 0 、好ましくは 0 . 1 ~ 2 0 、より好ましくは 0 . 3 ~ 1 0 マイクロモルの範囲である。

30

B . M E K 阻害剤

【 0 1 1 1 】

本発明の特定の側面では、マイトゲン活性化タンパク質キナーゼキナーゼ (M A P K / E R K キナーゼまたは M E K) またはその関連するシグナル伝達経路、例えば M A P K カスケードの阻害剤を含む M E K 阻害剤を使用してもよい。マイトゲン活性化タンパク質キナーゼキナーゼ (s i c) は、マイトゲン活性化タンパク質キナーゼをリン酸化するキナーゼである。これは M A P 2 K としても知られている。細胞外刺激は、M A P キナーゼ、M A P キナーゼキナーゼ (M E K 、 M K K 、 M E K K 、または M A P 2 K) 、および M A P キナーゼキナーゼキナーゼ (M K K K または M A P 3 K) から構成されるシグナル伝達カスケード (「 M A P K カスケード」) を介して、M A P キナーゼの活性化を誘導する。

40

【 0 1 1 2 】

本明細書では、M E K 阻害剤とは、一般的な M E K 阻害剤を指す。従って、M E K 阻害剤は、M E K 1 、M E K 2 および M E K 5 を含む M E K ファミリータンパク質のメンバーのいかなる阻害剤をも指す。M E K 1 、M E K 2 および M E K 5 阻害剤についても説明する。当該分野において既知の好適な M E K 阻害剤の例としては、M E K 1 阻害剤である P

50

D 1 8 4 3 5 2 および P D 9 8 0 5 9、M E K 1 と M E K 2 の阻害剤である U 0 1 2 6 および S L 3 2 7、ならびに D a v i e s e t a l . (2 0 0 0) で議論されている阻害剤が挙げられる。

【 0 1 1 3 】

具体的には、P D 1 8 4 3 5 2 および P D 0 3 2 5 9 0 1 が、他の既知の M E K 阻害剤と比較して、高い特異性および効力をもつことが分かっている (B a i n e t a l . , 2 0 0 7)。他の M E K 阻害剤および M E K 阻害剤のクラスに関しては、Z h a n g e t a l . (2 0 0 0) に記載されている。

【 0 1 1 4 】

M E K の阻害剤としては、M E K に対する抗体、M E K の優性阻害変異体、ならびに M E K の発現を抑制する s i R N A およびアンチセンス核酸が含まれ得る。M E K 阻害剤の具体例としては、P D 0 3 2 5 9 0 1 (例えば、R i n e h a r t e t a l . , 2 0 0 4 を参照のこと)、P D 9 8 0 5 9 (例えば、C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y から入手可能)、U 0 1 2 6 (例えば、C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y から入手可能)、S L 3 2 7 (例えば、S i g m a - A l d r i c h から入手可能)、A R R Y - 1 6 2 (例えば、アレイ B i o p h a r m a から入手可能)、P D 1 8 4 1 6 1 (例えば、K l e i n e t a l . , 2 0 0 6 を参照のこと)、P D 1 8 4 3 5 2 (C I - 1 0 4 0) (例えば、M a t t i n g l y e t a l . , 2 0 0 6 を参照のこと)、スニチニブ (例えば、参照することによって本明細書に組み込まれる V o s s , e t a l . , U S 2 0 0 8 0 0 4 2 8 7 を参照のこと)、ソラフェニブ (V o s s 上記を参照のこと)、バンデタニブ (V o s s 上記を参照のこと)、バゾバニブ (例えば、V o s s 上記を参照のこと)、アキシチニブ (V o s s 上記を参照のこと) および P T K 7 8 7 (V o s s 上記を参照のこと) が挙げられるがこれらには限定されない。

【 0 1 1 5 】

現在の、複数の M E K 阻害剤に関する臨床評価が行われている。C I - 1 0 4 0 は、癌の第 I 相試験および第 II 相試験で評価された (例えば、R i n e h a r t e t a l . , 2 0 0 4 を参照のこと)。臨床試験での評価が行われている他の M E K 阻害剤には、P D 1 8 4 3 5 2 (を参照のこと例えば、E n g l i s h e t a l . , 2 0 0 2)、B A Y 4 3 - 9 0 0 6 (を参照のこと例えば、C h o w e t a l . , 2 0 0 1)、P D - 3 2 5 9 0 1 (P D 0 3 2 5 9 0 1 と同)、G S K 1 1 2 0 2 1 2、A R R Y - 4 3 8 1 6 2、R D E A I 1 9、A Z D 6 2 4 4 (A R R Y - 1 4 2 8 8 6 または A R R Y - 8 8 6 と同)、R 0 5 1 2 6 7 6 6、X L 5 1 8 および A Z D 8 3 3 0 (A R R Y - 7 0 4 と同) がある。

【 0 1 1 6 】

M E K は、R N A 介在性の干渉 (R N A i) を使用することでも阻害することができる。通常、M E K 遺伝子の全体または一部分に相補的な二本鎖 R N A を多能性細胞に導入し、M E K をコードしている m R N A 分子の特異的な分解を促進する。この転写後機構によって、標的 M E K 遺伝子の発現が抑制されるかまたは完全に消失する。R N A i を用いて M E K を阻害するための好適な技術およびプロトコールは知られている。

【 0 1 1 7 】

G S K 3 阻害剤や M E K 阻害剤を含むキナーゼ阻害剤を同定するためのいくつかのアッセイが知られている。例えば、D a v i e s e t a l . (2 0 0 0) には、ペプチド基質と放射性標識した A T P 存在下でキナーゼをインキュベートするキナーゼアッセイが記載されている。キナーゼによって基質がリン酸化される結果、基質に標識が取り込まれる。各反応の分割量をホスホセルロース紙上に固定化し、リン酸中で洗浄して遊離 A T P を除去する。その後、インキュベートした後の基質の活性を測定し、キナーゼ活性の目安を提供する。そのようなアッセイを使用することで、候補キナーゼ阻害剤の存在下および非存在下での総体的なキナーゼ活性を容易に決定することができる。D o w n e y e t a l . (1 9 9 6) にも、キナーゼ阻害剤を同定するためのキナーゼ活性に関するアッ

セイが記載されている。

C . T G F - 受容体阻害剤

【 0 1 1 8 】

T G F - 受容体阻害剤には、いずれもの T G F のシグナル伝達を全体的に阻害する阻害剤、または T G F - 受容体（例えば、A L K 5）阻害剤に特異的な阻害剤が含まれてもよく、これらには、T G F 受容体（例えば、A L K 5）に対する抗体、T G F 受容体の優性阻害変異体、および T G F 受容体の発現を抑制する s i R N A およびアンチセンス核酸が含まれる可能性がある。T G F 受容体 / A L K 5 阻害剤の例としては、S B 4 3 1 5 4 2（例えば、Inman et al., 2002を参照のこと）、A - 8 3 - 0 1（3 - （6 - メチル - 2 - ピリジニル） - N - フェニル - 4 - （4 - キノリニル） - 1 H - ピラゾール - 1 - カルボチオアミドとしても知られている）（例えば、Tojo et al., 2005を参照のこと、また、例えば、Toicris Bioscience から入手可能である）；2 - （3 - （6 - メチルピリジン - 2 - y 1） - 1 H - ピラゾール - 4 - イル） - 1、5 - ナフチリジン、Wnt 3 a / B I O（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Dalton et al., W02008 / 094597、を参照のこと）、BMP 4（Dalton、上記を参照のこと）、GW788388（ - （4 - [3 - （ピリジン - 2 - イル） - 1 H - ピラゾール - 4 - イル] ピリジン - 2 - イル } - N - （テトラヒドロ - 2 H - ピラン - 4 - イル）ベンズアミド）（例えば、Gellibert et al., 2006を参照のこと）、SM16（例えば、Suzuki et al., 2007を参照のこと）、IN - 1130（3 - （（5 - （6 - メチルピリジン - 2 - イル） - 4 - （キノキサリン - 6 - イル） - 1 H - イミダゾール - 2 - イル）メチル）ベンズアミド）（例えば、Kim et al., 2008を参照のこと）、GW6604（2 - フェニル - 4 - （3 - ピリジン - 2 - イル - 1 H - ピラゾール - 4 - イル）ピリジン）（例えば、deGouvillle et al., 2006を参照のこと）、SB - 505124（2 - （5 - ベンゾ [1 , 3] ジオキソール - 5 - イル - 2 - tert - ブチル - 3 H - イミダゾール - 4 - イル） - 6 - メチルピリジン塩酸塩）（例えば、DaCosta et al., 2004を参照のこと）およびピリミジン誘導体（例えば、参照により本明細書に組み込まれるStiefl et al., 国際公開第2008 / 006583号パンフレットに記載されている誘導体を参照のこと）が挙げられるがこれらには限定されない。

【 0 1 1 9 】

さらに、「A L K 5 阻害剤」は非特異的キナーゼ阻害剤を包含することを意図しないが、「A L K 5 阻害剤」が A L K 5 に加えて A L K 4 および / または A L K 7 を阻害する阻害剤、例えば、S B - 4 3 1 5 4 2 を包含すると理解すべきである（例えば、Inman et al., 2002を参照のこと）。本発明の範囲を制限することを意図しないが、A L K 5 阻害剤は、間葉から上皮への転換 / 移行（M E T）過程に影響を及ぼすと考えられている。T G F / アクチビン経路は、上皮から間葉への移行（E M T）を誘導するものである。本願発明者らは、T G F / アクチビン経路を阻害することで、M E T（つまり、リプログラミング）過程を促進することができるということを想定している。

【 0 1 2 0 】

T G F / アクチビン経路を阻害することも、同様な効果を有すると考えられている。従って、T G F / アクチビン経路の任意の阻害剤（例えば、上流または下流の阻害剤）を、本明細書に記載したように、T G F - / A L K 5 阻害剤と併せて、あるいは T G F - / A L K 5 阻害剤の代わりに使用することができる。T G F / アクチビン経路阻害剤の例としては、T G F 受容体阻害剤、S M A D 2 / 3 リン酸化の阻害剤、S M A D 2 / 3 と S M A D 4 の相互作用の阻害剤、ならびに S M A D 6 および S M A D 7 の活性化因子 / アゴニストが挙げられるがこれらには限定されない。さらに、本明細書に記載した分類は、単にまとめるための目的のものであり、当業者であれば、化合物が、経路中の複数の点で効果を発揮し、そのため、定義した分類の2つ以上の機能を有する場合もあることを理解するだろう。

【0121】

TGF 受容体阻害剤には、TGF 受容体に対する抗体、TGF 受容体の優性阻害変異体、およびTGF 受容体を標的とするsiRNAまたはアンチセンス核酸が含まれ得る。阻害剤の具体例としては、SU5416；2-(5-ベンゾ[1,3]ジオキソール-5-イル-2-tert-ブチル-3H-イミダゾール-4-イル)-6-メチルピリジン塩酸塩(SB-505124)；ラルデリムマブ(lerdelimumab)(CAT-152)；メテリムマブ(metelimumab)(CAT-192)；GC-1008；ID11；AP-12009；AP-11014；LY550410；LY580276；LY364947；LY2109761；SB-505124；SB-431542；SD-208；SM16；NPC-30345；Ki26894；SB-203580；SD-093；グリベック；3、5、7、2'、4'-ペンタヒドロキシフラボン(pentahydroxyflavone)(Morin)；アクチビン-M108A；P144；可溶性TBR2-Fc；および、TGF を標的とするアンチセンスを導入した腫瘍細胞(例えば、Wrzesinski et al., 2007；Kaminska et al., 2005；およびChang et al., 2007を参照のこと)が挙げられるがこれらには限定されない。

10

D. ROCK阻害剤およびミオシンII ATPアーゼ阻害剤

【0122】

多能性幹細胞、特にヒトES細胞およびiPS細胞は、細胞が脱離および分離するとアポトーシスを起こしやすく、このことは、クローンの単離または増殖、および分化の誘導に重要である。最近になって、ある少数の分子、例えばRho結合キナーゼ(ROCK)阻害剤が、クローン効率および分離した多能性幹細胞の生存を高めることが分かった。Rho結合キナーゼ(ROCK)阻害剤は、ROCKに関連するシグナル伝達経路の阻害剤、例えば、Rho特異的阻害剤、ROCK特異的阻害剤またはミオシンII-特異的阻害剤である。本発明の特定の側面では、多能性幹細胞の培養および継代および/または幹細胞の分化にROCK阻害剤を使用してもよい。そのため、ROCK阻害剤は、多能性幹細胞を育てる、分離する、凝集を形成する、または分化する培地、例えば接着培養または懸濁培養用の培地のいずれにも含まれていてもよい。特にことわりがない限り、本明細書においては、ミオシンII阻害剤、例えばブレビスタチンを、実験用に使用するROCK阻害剤の変わりに使用することができる。

20

30

【0123】

ROCKシグナル伝達経路には、RhoファミリーGTPアーゼ；ROCK、Rhoの下流の主要なエフェクターキナーゼ；ミオシンII、ROCKの下流の優勢なエフェクター(Harbet al., 2008)；および中間、上流、または下流のシグナル処理因子のいずれもが含まれ得る。ROCKは、ミオシンホスファターゼ標的サブユニット1(MYP1)をリン酸化および不活性化させ得る。ミオシンホスファターゼ標的サブユニット1は、ミオシン制御軽鎖(MRLC)の脱リン酸化を介してミオシンの機能を負に制御するROCKの下流にある主要な標的の1つである。

【0124】

ROCKは、Rho(RhoA、RhoBおよびRhoCの3種類のイソ型が存在する)の標的タンパク質となるセリン/トレオニンキナーゼである。これらのキナーゼは最初、RhoA遊走性の張力線維および接着斑の形成の仲介因子として特徴付けられた。ROCKの2種類のイソ型、つまりROCK1(p160ROCK、ROCK1とも呼ばれている)およびROCK2(ROCK)は、N末端キナーゼドメインと、それに続く、Rho結合ドメインとプレクストリン相同性ドメイン(PH)を含むコイルドコイルドメインから構成されている。このROCKは両方とも、細胞骨格系の制御因子であり、張力線維の形成、平滑筋の収縮、細胞接着、膜ラフリングおよび細胞運動に及ぼすRhoAの効果の仲介する。ROCKは、下流の分子、例えばミオシンII、ミオシン軽鎖(MLC)、MLCホスファターゼ(MLCP)およびホスファターゼ・テンシンホモログ(PTEN)を標的とすることで、その生物活性を発揮し得る。

40

50

【0125】

R O C K 阻害剤の非限定的な例としては、H A - 1 0 0、Y - 2 7 6 3 2、H - 1 1 5 2、ファスジル（H A 1 0 7 7 と呼ばれている）、Y - 3 0 1 4 1（米国特許第 5、4 7 8、8 3 8 号に記載されている）、W f - 5 3 6、H A - 1 0 7 7、ヒドロキシル - H A - 1 0 7 7、G S K 2 6 9 9 6 2 A、S B - 7 7 2 0 7 7 - B、およびその誘導体、ならびに R O C K に対するアンチセンス核酸、R N A 干渉を誘導する核酸（例えば、s i R N A）、競合ペプチド、アンタゴニストペプチド、阻害的抗体、抗体 - S c F V 断片、優性阻害変異体およびその発現ベクターが挙げられる。さらに、他の低分子化合物も R O C K 阻害剤であることが知られており、そのような化合物またはその誘導体も態様において使用することができる（例えば、参照により組み込まれる米国特許公開第 2 0 0 5 0 2 0 9 2 6 1 号、同第 2 0 0 5 0 1 9 2 3 0 4 号、同第 2 0 0 4 0 0 1 4 7 5 5 号、同第 2 0 0 4 0 0 0 2 5 0 8 号、同第 2 0 0 4 0 0 0 2 5 0 7 号、同第 2 0 0 3 0 1 2 5 3 4 4 号および同第 2 0 0 3 0 0 8 7 9 1 9 号、および国際特許公開第 2 0 0 3 / 0 6 2 2 2 7 号、同第 2 0 0 3 / 0 5 9 9 1 3 号、同第 2 0 0 3 / 0 6 2 2 2 5 号、同第 2 0 0 2 / 0 7 6 9 7 6 号および同第 2 0 0 4 / 0 3 9 7 9 6 号を参照のこと）。本発明の特定の側面では、1 つまたは 2 つまつ以上の R O C K 阻害剤の組み合わせも使用することができる。

10

【0126】

R h o 特異的阻害剤、例えばボツリヌス菌 C 3 細胞外酵素、および / またはミオシン I I 特異的阻害剤もまた、本発明の特定の側面では、R O C K 阻害剤として使用してもよい。

20

V I I . リプログラミングした細胞の培養

【0127】

出発細胞および最終的な、リプログラミングされた細胞が培地に必要とするものや条件は通常、異なる。同様に、改変構築物の組み込みに関して、細胞を同時に選択する場合には、リプログラミング過程の特定の期間に、培地に選択薬剤を添加してもよい。このことを、細胞のリプログラミングを行いながらも可能にするためには、リプログラミング因子の導入後、培養の少なくとも初期の時期に、培地の存在下で、かつ、出発細胞の成長に適していることが知られている条件で、これは通常行われる。しかしながら、この早い時期には、耐性マーカーを含む細胞だけがこの初期成長段階で増殖するように、選択薬剤を含めてもよい。

30

【0128】

この後、続く期間では、リプログラミング培地（選択薬剤を含まないまたは含む）存在下で、多能性細胞に適していることが分かっている条件で、すなわち血清を含むフィーダー上でまたは化学的に規定された培地を使ってまたはフィーダーを含まない条件で、培養を行う。好適なフィーダーとしては（使用する場合には）、初代のまたは不死化した線維芽細胞株、典型的には、不活性化されており、リプログラミングする細胞の成長を超えて成長することのない細胞株が挙げられる。十分な期間のリプログラミングの後、リプログラミングされた細胞を、i P S 細胞の選択を行う前または行った後に、増殖培地中でさらに培養して i P S 細胞を増殖させてもよい。そのような増殖培地は、上述した 1 つまたは複数のシグナル伝達阻害剤を含んでいても、あるいは、これら阻害剤を本質的に含まない培地を含んでいてもよい。

40

【0129】

培養の初期の段階とは、好ましくは 6 日までの期間、より好ましくは 4 日まで、以下に記載する特定の態様では、3 日以内、より具体的には、1 日未満、またはおよそ 1 日である。1 つまたは複数のシグナル伝達阻害剤を含むリプログラミング培地中での続く期間とは、好適には、少なくともまたは約 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33 日の期間またはそこから導き出される任意の範囲の期間であり、120 までの期間、好ましくは 10 日まで、または i P S 細胞および / または改変した i P S 細胞が検出されるまでの期間である。リプログラミングされた

50

ヒト細胞を生成するために使用される、以下に記載する特定の態様では、培養の初期の段階を約 1 日とし、MEK 阻害剤、aTGF- 受容体阻害剤、および aGSK3 阻害剤を含むリプログラミング培地の存在下で、リプログラミング条件で培養することで、続く段階を約 9 ~ 28 日間とした。リプログラミング条件は、フィーダー細胞を本質的に含まないものであってもよい。さらなる側面では、リプログラミング培地は化学的に規定されていてもよい。リプログラミングを向上させるために、リプログラミング培地は、高濃度の FGF をさらに含んでいてもよく、本質的に TGF を含まないものであってもよい。

【0130】

MEK 阻害剤、TGF- 受容体阻害剤、および GSK3 阻害剤の併用は、リプログラミング効率およびリプログラミング時間の短縮を含むリプログラミング過程を促進し得る。LIF は gp130 シグナル伝達の活性化因子の一例であり、別の例としては IL-6 と可溶性 IL-6 受容体との組み合わせがあるが、リプログラムされる過程にそれが含まれることで、細胞の成長および生存を促進する。リプログラミングの間に、細胞を LIF 存在下で培養してもよく、LIF の使用は、本発明の特定の側面では、リプログラムされる細胞を助け、細胞の生存率とクローン形成能を向上させ得る。

A. 一般的な幹細胞培養の条件

【0131】

本発明による培養条件は、使用する培地や幹細胞に応じて、適切に定義される。本発明の特定の側面による培地は、その基本培地として動物細胞の培養に使用される培地、例えば TeSR、必須 8 培地、BME、BGJb、CMRL 1066、Glasgow MEM、Improved MEM Zinc Option、IMDM、199 培地、Eagle MEM、MEM、DMEM、Ham、RPMI 1640、およびフィッシャー培地のうちのいずれか、ならびにその任意の組み合わせを使用して調製することができるが、培地は、動物細胞の培養に使用することが可能な限り、これらに特に限定されるものではない。

【0132】

本発明による培地は、血清を含むものであっても、または血清を含まないものであってもよい。血清を含まない培地とは、未処理のまたは未精製の血清を含まない培地を指し、従って、この培地は、精製した血液由来の成分または動物組織に由来する成分（成長因子など）を含む場合がある。異種の動物由来成分の混入を避けるという側面から、血清は、幹細胞を誘導したのと同じ動物に由来するものである場合がある。

【0133】

本発明による培地は、任意の血清代替物を含んでいても、または含んでいなくてもよい。血清代替物としては、アルブミンを適切に含む物質（例えば、脂質に富むアルブミン、組換えアルブミンなどのアルブミン代用品、植物デンプン、デキストランおよびタンパク質加水分解物）、トランスフェリン（または他の鉄輸送体）、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオグリセロール（thioglycerol）、またはそれらの均等物を挙げることができる。血清代替物は、例えば、国際公開第 98/30679 号パンフレットに開示されている方法によって調製することができる。あるいは、より簡便に、市販されている任意の物質を使用することができる。市販されている物質には、ノックアウト血清代用品（KSR）、化学的に規定された脂質濃縮物（Gibco）、および Glutamax（Gibco）がある。

【0134】

本発明の培地は、脂肪酸または脂質、アミノ酸（例えば非必須アミノ酸）、ビタミン、成長因子、サイトカイン、酸化防止剤、2-メルカプトエタノール、ビルビン酸、緩衝剤、および無機塩を含んでいる場合もある。2-メルカプトエタノールの濃度は、例えば、約 0.05 ~ 1.0 mM、特に約 0.1 ~ 0.5 mM であってよいが、濃度は、幹細胞の培養に適している限り、それらに特に限定されるものではない。

【0135】

幹細胞の培養に使用される培養容器としては、その中で幹細胞を培養することができる

限り、フラスコ、組織培養用フラスコ、ディッシュ、シャーレ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウェルプレート、マルチプレート、マルチウェルプレート、マイクロスライド、チャンバースライド、チューブ、トレイ、CellSTACK（登録商標）チャンパー、培養バッグ、およびローラーボトルを挙げることができるが、特にこれらに限定されるものではない。幹細胞は、培養のニーズに応じて、少なくともまたは約0.2、0.5、1、2、5、10、20、30、40、50ml、100ml、150ml、200ml、250ml、300ml、350ml、400ml、450ml、500ml、550ml、600ml、800ml、1000ml、1500mlの用量、またはここから導き出される任意の範囲の容量中で、培養してもよい。特定の態様では、培養容器はバイオリアクターであってよく、バイオリアクターとは、生物学的に活性な環境を支持するいずれもの装置またはシステムを指し得る。バイオリアクターは、少なくともまたは約2、4、5、6、8、10、15、20、25、50、75、100、150、200、500リットル、1、2、4、6、8、10、15立方メートル、またはここから導き出される任意の範囲の容量を保持し得る。

10

20

30

40

50

【0136】

培養容器は細胞接着性であってもまたは非接着性であってもよく、目的に応じて選択される。細胞接着性の培養容器を細胞接着のための任意の基質、例えば細胞外マトリックス（ECM）でコーティングして、細胞に対する容器表面の接着性を高めることができる。細胞接着のための基質は、幹細胞またはフィーダー細胞（使用する場合）を結合することを目的としたいかなる物質であってもよい。細胞接着のための基質としては、コラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リシン、ポリ-D-リシン、ビトロネクチン、ラミニン、フィブロネクチン、およびRetroNectinおよびその混合物例えばMatrigel（商標）、ならびに溶解した細胞膜調製物（Klimanskaya et al., 2005）が挙げられる。

【0137】

他の培養条件も適切に定義することができる。例えば、培養温度は、約30 to 40、例えば、少なくともまたは約31、32、33、34、35、36、37、38、39であってよいが、特にこれらには限定されない。CO₂濃度は約1~10%、例えば、約2~5%、またはここから導き出される任意の範囲であってよい。酸素圧は、少なくともまたは約1、5、8、10、20%、またはここから導き出される任意の範囲であってよい。

【0138】

本発明の方法は、特定の側面では、例えば、幹細胞の接着培養に使用することができる。この場合、細胞は、フィーダー細胞の存在下で培養することができる。本発明の方法において、フィーダー細胞が使用される例では、ストローマ細胞、例えば胎性線維芽細胞をフィーダー細胞として使用することができる（例えば、Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual (1994); Gene Targeting, A Practical Approach (1993); Martin (1981); Evans and Kaufman (1981); Jainchill et al., (1969); Nakano et al. (1996); Kodama et al. (1982); および、国際公開第01/088100号パンフレットおよび同第2005/080554号パンフレットを参照のこと）。

【0139】

本発明の方法は、特定の側面では、幹細胞の懸濁培養、例えば担体上での懸濁培養（Fernandes et al., 2004）またはゲル/生体高分子封入（米国特許出願第2007/0116680号）にも使用することができる。幹細胞の懸濁培養という用語は、培養容器または培地中のフィーダー細胞（使用する場合）に幹細胞が接着しない条件で幹細胞を培養することを意味する。幹細胞の懸濁培養には、幹細胞の分離培養と幹細胞の集合体の懸濁培養が含まれる。幹細胞の分離培養という用語は、懸濁した幹細胞を

培養することを意味し、幹細胞の分離培養には、単一の幹細胞の培養または複数の幹細胞から構成されている（例えば、約2～400個の細胞から構成されている）小さい細胞集合体の培養が含まれる。前述した分離培養を継続すると、培養され、分離した細胞は幹細胞のより大きな集合体を形成し、その後、集合体の懸濁培養を実施することができる。集合体の懸濁培養は、胚様体培養法（Keller et al., 1995を参照のこと）、およびSFEF方法（Watanabe et al., 2005；国際公開第2005/123902号パンフレット）を含む。

B．多能性幹細胞の培養

【0140】

培養条件によって、多能性幹細胞は分化した細胞または未分化の細胞のコロニーを生成することができる。「分化する」という用語は、発達経路の後期に至る、細胞の進行を意味する。「分化した」という用語は、別の細胞と比較して、発達経路の後期に至る細胞の進行を記述している、相対的な用語である。例えば、多能性細胞は、体のいずれの細胞をも生じることができるが、より分化した細胞、例えば造血細胞は、より少ない細胞型しか生じない。

【0141】

多能性幹細胞の培養は、集団に含まれている幹細胞およびその誘導体の大部分が、それらと、分化した胚細胞または成体起源が明確に区別される未分化細胞の形態的な特徴を示している場合に、「未分化な」として記述される。未分化なES細胞または未分化なiPS細胞は当業者によって確認され、大抵は、細胞コロニーの顕微鏡像において、核/細胞質の比が高いことと核小体が目立つことの2種類の測定値として現れる。未分化細胞のコロニーの近傍に、分化した細胞がある場合があることも理解される。

【0142】

ES細胞は、血清およびフィーダー細胞層、通常はマウス胎性線維芽細胞存在下で細胞を培養することで、未分化の状態に維持することができる。幹細胞を未分化状態に維持するための他の方法も知られている。例えば、マウスES細胞は、LIFの存在下およびフィーダー細胞層の非存在下で培養することで、未分化状態に維持することができる。しかしながら、マウスES細胞とは異なり、既存のヒトES細胞はLIFには応答しない。ヒトES細胞は、塩基性線維芽細胞増殖因子の存在下で、線維芽細胞のフィーダー細胞層上でES細胞を培養することによって（Amit et al., 2000）、または線維芽細胞馴化培地と塩基性線維芽細胞増殖因子の存在下、タンパク質マトリックス、例えばMatrigel（商標）またはラミニン上で、かつ、フィーダー細胞層を使用せずに培養することで（Xu et al., 2001；米国特許第6,833,269号）、未分化状態に維持することができる。

【0143】

ES細胞の調製および培養するための方法は、細胞生物学、組織培養、および奇形腫や胚性幹細胞を含む発生学の標準的な教科書および総説、例えば参照することによって全てが本明細書に組み込まれる、A practical approach（1987）；Guide to Techniques in Mouse Development（1993）；Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro（1993）；Properties and uses of Embryonic Stem Cells：Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy（1998）の中に見ることができる。組織培養に使用される標準的な方法は、概して、Animal Cell Culture（1987）；Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells（1987）；およびCurrent Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology（1987 & 1995）に記載されている。

【0144】

リプログラミング因子を体細胞に導入した、またはリプログラミング因子を体細胞に接触させた後、これらの細胞を、多能性および未分化状態を維持するのに効果的な培地中で培養してもよい。本発明で生成された人工多能性幹 (iPS) 細胞の培養では、ここで参照することにより組み込まれる、米国特許公開第 20070238170 号、同第 20030211603 号、および同第 20080171385 号に記載されている、様々な培地や、霊長類の多能性幹細胞、より具体的には、胚性幹細胞を培養するために開発された技術を使用することができる。当然のことながら、当業者によって理解されるように、多能性幹細胞を培養および維持するためのさらなる方法を本発明と併せて使用してもよい。

【0145】

特定の態様では、規定されていない培地を使用してもよい。例えば、多能性細胞を、線維芽細胞のフィーダー細胞上で培養しても、または幹細胞を未分化状態に維持するために線維芽細胞のフィーダー細胞に曝露した培地上で培養してもよい。

【0146】

あるいは、規定された、フィーダーを使用しない培養システム、例えば TeSR 培地 (Ludwig et al., 2006a; Ludwig et al., 2006b) または必須 8 培地を使用して多能性細胞を培養し、本質的に未分化の状態に維持してもよい。フィーダーを使用しない培養システムおよび培地を使用して、多能性細胞を培養および維持してもよい。これらの方法によって、マウス線維芽細胞の「フィーダー細胞層」を必要とせずに、誘導したヒト iPS 細胞ならびにヒト胚性幹細胞を本質的に未分化の状態に保持することができる。本明細書に記載したように、要望通りに費用を削減するために、これらの方法に様々な変更を行っても良い。

【0147】

ヒト多能性幹細胞の培養および維持には、多種多様なマトリックス成分を使用してもよい。例えば、Matrigel (商標)、コラーゲン IV、フィブロネクチン、ラミニン、およびビトロネクチンを組み合わせて、参照によりその全体は本明細書に組み込まれる Ludwig et al. (2006a; 2006b) に記載されているように、多能性細胞の成長のための固体支持層を提供する手段として、培養表面をコーティングするために使用してもよい。特に、Matrigel (商標) を使用して、ヒト多能性幹細胞の培養および維持のための基質を提供することができる。Matrigel (商標) はマウス腫瘍細胞から分泌されるゼラチン状のタンパク質混合物で、BDBiosciences (ニュージャージー、米国) から上市されている。この混合物は、多くの組織中に見られる複雑な細胞外環境に類似しており、細胞生物学者が細胞培養用の基質として使用しているものである。

C. 細胞の継代

【0148】

本発明の特定の側面はさらに、幹細胞を分離させる工程を含む場合がある。幹細胞の分離は、既知のいずれの方法によっても実施することができる。これらの方法には、キレート剤 (例えば EDTA)、酵素 (例えばトリプシン、コラゲナーゼ) などによる処理、および機械的な分離のような操作 (例えばピペット操作) が含まれる。分離の前および/または後に、幹細胞を ROCK 阻害剤で処理することもできる。例えば、幹細胞を分離の後にのみ、処理することができる。

【0149】

多能性幹細胞培養のいくつかのさらなる態様では、培養容器がいっぱいになったら、分離させるのに適した任意の方法によって、コロニーを凝集した細胞とまだ単一な細胞とに分けてもよく、それらの細胞は、その後、継代用の新しい培養容器に入れられる。細胞の継代は、長期間、培養条件下で、細胞を生存していて、かつ、成長している状態に維持することを可能にする技術である。細胞は一般的に、約 70% ~ 100% のコンフルエントに達した時に継代される。

【0150】

細胞増殖、セルソーティング、および分化のための限定した播種の促進すること、なら

10

20

30

40

50

びに培養方法およびクローナルな増殖の自動化を可能にすることなどのいくつかの利点を有する多能性幹細胞の単一細胞の分離と、それに続く単一細胞の継代を、本方法において使用してもよい。例えば、単一細胞からクローナルに誘導可能な後代の細胞は、遺伝子構造が均一でおよび/または細胞周期が同調している可能性があり、これによって、標的とする分化が高まる可能性がある。単一細胞を継代するための方法の例は、参照することによって本明細書に組み込まれる米国特許出願第20080171385号に記載されている方法であってもよい。

【0151】

特定の態様では、多能性幹細胞を、個別の単一な細胞に、または個別で単一な細胞の組み合わせに、および2、3、4、5、6、7、8、9、10個もしくはそれ以上の細胞を含む細胞の小集団に分離してもよい。分離は、機械的な力によって達成しても、または細胞分離剤、例えばクエン酸ナトリウムもしくは酵素、例えば、トリプシン、トリプシン-EDTA、TrypLE Selectなどによって達成してもよい。

10

【0152】

多能性幹細胞の由来や増殖のニーズに基づいて、分離した細胞を、少なくとももしくはおよそ1:2、1:4、1:5、1:6、1:8、1:10、1:20、1:40、1:50、1:100、1:150、1:200、またはここから導き出される任意の範囲の分割比で、それぞれ別々にまたは小集団として、新しい培養容器に移すことができる。懸濁細胞株の分割比は、培養細胞の懸濁液の容量によって決めることができる。継代の間隔は、少なくとももしくはおよそ1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20日毎、またはここから導き出される任意の範囲毎であってもよい。例えば、異なる酵素的な継代プロトコールについて達成可能な分割比は、3~7日毎に1:2、4~7日毎に1:3、およびおよそ7日毎に1:5~1:10、7日毎に1:50~1:100であってもよい。分割比が高い場合には、継代間隔を少なくとも12~14日または、過度の自発的な分化もしくは細胞死による細胞の消失を伴わない任意の期間に長くすることができる。

20

【0153】

特定の側面では、単一細胞の継代を、クローン形成効率および細胞の生存率を高めるのに有効な低分子、例えば上述したROCK阻害剤存在下で行ってもよい。そのようなROCK阻害剤、例えば、Y-27632、HA-1077、H-1152、HA-100、またはプレシタチンは、有効な濃度、例えば、少なくとももしくは約0.02、0.05、0.1、0.2、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50~約100 μ M、またはここから導き出される任意の範囲で用いることができる。

30

VII. iPSおよび改変したiPS細胞の選択

【0154】

本発明の特定の側面では、組み込むための1つまたは複数の染色体外の遺伝要素および1つまたは複数の核酸分子を体細胞に導入した後、細胞を増殖させるために培養してもよく(必要に応じて、陽性選択またはスクリーニング可能なマーカーなどのベクター要素の存在に関して選択してもよく)およびこれらの遺伝要素は、これらの細胞中でリプログラミング因子を発現し、細胞分裂に伴って複製および分配される。発現したこれらのリプログラミング因子は体細胞のゲノムをリプログラムし、持続した多能性状態を確立し、ベクターの存在に関する陽性選択の除去の間にまたはその後、外生の遺伝要素は徐々に失われる。これらの人工多能性幹細胞は多能性胚性幹細胞と実質的に同一であると予測されるため、胚性幹細胞の特徴に基づいて、これらの体細胞に由来する後代から選択することができるだろう。本質的に染色体外の遺伝要素を含まないiPS細胞の選択を促進または補助するために、リプログラミングベクターDNAがないことを試験することによるまたは選択マーカーを使用することによる、さらなる陰性選択の工程も使用してもよいだろう。

40

A. 胚性幹細胞の特徴に関する選択

【0155】

50

これまでの研究から上手く生成された i P S C は、以下の点において、天然に単離された多能性幹細胞（例えばマウスおよびヒト胚性幹細胞、それぞれ、m E S C および h E S C）と非常に類似していた。よって、i P S C の独自性、確実性、および多能性を天然に単離された多能性幹細胞に対して確認するものである。従って、本発明で開示する方法によって生成される人工多能性幹細胞も、以下の胚性幹細胞の特徴のうちの 1 つまたは複数に基づいて、選択することができると考えられる。

i . 細胞の生物学的特性

【 0 1 5 6 】

形態：i P S C と E S C は形態学的に類似している。それぞれの細胞は、丸い形、大きな核小体および不十分な細胞質を有し得る。i P S C のコロニーは E S C のコロニーとも類似していると考えられる。ヒト i P S C は h E S C と同様に、輪郭がはっきりとしていて、扁平で、密にパッキングされたコロニーを形成し、マウス i P S C は m E S C と同様に、h E S C よりも扁平ではなく、より凝集したコロニーを形成する。特定の態様では、本方法では、直径が少なくともまたは約 1 . 5、1 . 6、1 . 7、1 . 8、1 . 9、2 . 0、2 . 1、2 . 2、2 . 3、2 . 4、2 . 5 mm、またはここから導き出される任意の範囲の大きなヒト i P S 細胞が生成することができ、これらは非 i P S 細胞とは容易に区別され得る。

10

【 0 1 5 7 】

成長特性：幹細胞は、その定義の一環として自己再生しなくてはならないため、倍加時間および有糸分裂の活性は E S C の要である。i P S C は、有糸分裂が活性化されており、積極的に自己再生・増殖し、かつ、E S C と同様の速度で分裂していると考えられる。

20

【 0 1 5 8 】

幹細胞マーカー：i P S C は、E S C 上で発現している、細胞表面抗原マーカーを発現し得る。ヒト i P S C は、S S E A - 3、S S E A - 4、T R A - 1 - 6 0、T R A - 1 - 8 1、T R A - 2 - 4 9 / 6 E、および N a n o g を含むがこれらには限定されない、h E S C に特異的なマーカーを発現した。マウス i P S C は m E S C と同様に、S S E A - 1 を発現したが、S S E A - 3 および S S E A - 4 は発現しなかった。

【 0 1 5 9 】

幹細胞遺伝子：i P S C は、O c t - 3 / 4、S o x 2、N a n o g、G D F 3、R E X 1、F G F 4、E S G 1、D P P A 2、D P P A 4、および h T E R T などの未分化な E S C で発現している遺伝子が発現し得る。

30

【 0 1 6 0 】

テロメラーゼ活性：テロメラーゼは、およそ 5 0 回の細胞分裂に限定されるヘイフリック限界によって制限されていない、細胞分裂の維持に必要なものである。ヒト E S C が発現しているテロメラーゼ活性は高く、自己再生および増殖を維持しており、i P S C もまた高いテロメラーゼ活性を示し、テロメラーゼタンパク質複合体に必須の成分である h T E R T（ヒトテロメラーゼ逆転写酵素）を発現している。

【 0 1 6 1 】

多能性：i P S C は E S C と同様な方法で、完全に分化した組織に分化することができる。

40

【 0 1 6 2 】

神経の分化：i P S C は、I I I - チューブリン、チロシン水酸化酵素、A A D C、D A T、C h A T、L M X 1 B、および M A P 2 を発現しているニューロンに分化すると考えられている。カテコラミン関連酵素が存在するということは、i P S C が h E S C と同様に、ドパミン作動性ニューロンに分化し得ることを示している可能性がある。幹細胞関連遺伝子は、分化の後、ダウンレギュレートされる。

【 0 1 6 3 】

心臓の分化：i P S C は、自発的に拍動し始める心筋細胞へと分化すると考えられている。心筋細胞は、T n T c、M E F 2 C、M Y L 2 A、M Y H C、T N N T 2 および N K X 2 . 5 を発現している。幹細胞関連遺伝子は分化の後に、ダウンレギュレートされる

50

。

【0164】

テラトーマ形成：免疫不全マウスにiPSCを注入すると、一定の期間、例えば9週間の後に、自発的に奇形腫が形成され得る。奇形腫とは、三胚葉、すなわち、内胚葉、中胚葉および外胚葉に由来する組織を含む、複数の細胞系統の腫瘍である。このことは、通常、1種類の細胞型である他の腫瘍とは異なる。テラトーマ形成は多能性に関する試験の指標である。

【0165】

胚様体：培養中のヒトESCは、「胚様体」と呼ばれる、球状の胚様構造を自発的に形成する。胚様体は、その中心部には、有糸分裂が活性化されている分化しているhESCを含み、周辺部には三胚葉全てに由来する、完全に分化した細胞を含んでいる。iPSCも胚様体を形成する場合があります、かつ、周辺には分化した細胞を有している場合がある。

10

【0166】

胚盤胞の注入：ヒトESCは、天然では、胚盤胞の内部細胞塊（胚結節）および胚結節の中に存在し、胚盤胞の殻（栄養芽層）が胚外組織に分化する間に、胚へと分化する。中空の栄養芽層は生きた胚を形成することはできないため、胚結節中の胚性幹細胞が分化して胚を形成することが必要である。胚盤胞を生成するように栄養芽層へとマイクロピペットで注入し、メスのレシピエントに移植すると、iPSCは、生きたキメラのマウス幼獣、体全体に10～90%のキメラ化でiPSC誘導体が組み込まれたマウスを生じ得る。

ii. 後成的なリプログラミング

20

【0167】

プロモーターの脱メチル化：メチル化は、メチル基のDNA塩基への転移、一般的には、CpG部位（シトシン/グアニン配列の近傍）中のシトシン分子へのメチル基の転移である。広く見られる遺伝子のメチル化は、発現するタンパク質の活性を抑制すること、または発現を干渉する酵素を補充することによって、発現を干渉する。従って、遺伝子のメチル化は、転写を防止することによって、効果的に遺伝子を抑制する。Oct-3/4、Rex1、およびNanogなどの多能性関連遺伝子のプロモーターはiPSCでは脱メチル化されている場合があります、それによって、それらのプロモーター活性ならびにiPSCでの多能性関連遺伝子の積極的な促進および発現が現れる。

【0168】

30

ヒストンの脱メチル化：ヒストンは、様々なクロマチンに関連する修飾を介してその活性を発揮することができるDNA配列に構造的に局在している、密集しているタンパク質である。Oct-3/4、Sox2、およびNanogと関連があるH3ヒストンは、Oct-3/4、Sox2、およびNanogの発現を活性化するために脱メチル化される場合がある。

B. 残基に無関係な特性の選択

【0169】

本発明に含まれるリプログラミングベクター、例えばoriPを利用したベクターは、染色体外で複製され、かつ、世代を追う毎に宿主細胞から消失すると考えられている。しかしながら、後代の細胞に関する、染色体外のベクター要素とは本質的に無関係のさらなる選択工程によって、この過程を促進してもよい。例えば、後代細胞の試料を抽出して、当該分野において知られているように、染色体外のベクター要素の有無を試験することができる（Leighton and Sugden, 2001）。

40

【0170】

リプログラミングベクターは、選択マーカーを、より具体的には、選択マーカーを本質的に含まない後代細胞を選択するためのチミジンキナーゼをコードしている遺伝子などの陰性選択マーカーをさらに含んでもよい。ヒト単純ヘルペスウイルス1型チミジンキナーゼ遺伝子（HSVtk）は、ある条件では、哺乳類細胞中で致死マーカーとして機能する。HSVtkによってコードされている酵素は、特定のヌクレオシド類似体（例えば、ガンシクロビル、抗ヘルペス薬）をリン酸化することができ、その結果、それらを有毒

50

なDNA複製阻害剤へと変換する。別のまたは補完的なアプローチとしては、RT-PCR、PCR、FISH（蛍光in situハイブリダイゼーション）、遺伝子アレイ、またはハイブリダイゼーション（例えば、サザンブロット）などの標準的な方法を用いて、後代細胞中に染色体外の遺伝要素がないことを試験することが挙げられる。

IX．核酸分子の構築と送達

【0171】

特定の態様では、リプログラミング因子および/またはゲノムへ組み込むための核酸分子を含む遺伝要素を、機能的な遺伝要素、例えばコード配列を発現させるためのエレメントを含むように、構築する。これらベクター成分および送達方法の詳細を以下に開示する。

10

A．調節エレメント

【0172】

ベクターに含まれる真核生物の発現カセットは、好ましくは、（5' - から - 3' の方向に）タンパク質のコード配列に操作可能に連結された真核生物の転写プロモーター、介在配列を含むスプライシングシグナル、および転写終結配列/ポリアデニル化配、を含む。

i．プロモーター/エンハンサー

【0173】

「プロモーター」は、核酸配列の領域である制御配列であり、ここで転写の開始および速度が制御される。プロモーターには、特定の核酸配列の転写を開始するために、RNAポリメラーゼや他の転写因子などの調節タンパク質や分子が結合する遺伝要素が含まれ得る。「操作可能に位置している」、「操作可能に接続されている」、「制御下にある」、および「転写制御されている」という句は、核酸配列の転写の開始および/または発現を制御するために、プロモーターがその配列に対して機能的に正しい位置および/または方向にあることを意味している。

20

【0174】

本発明のEBNA-1をコードしているベクターに使用するのに好適なプロモーターとしては、EBNA-1タンパク質をコードしている発現カセット発現を誘導し、EBV oriP含有ベクターを安定に維持するためにEBNA-1タンパク質のレベルを効果的に一定に保つプロモーターが挙げられる。プロモーターを、リプログラミング因子をコードしている発現カセットを効率的に発現させるために使用してもよい。

30

【0175】

プロモーターは一般的に、RNA合成の開始部位を正しい場所に配置する機能をもつ配列を含む。このような配列の最もよく知られている例としてはTATAボックスがあるが、いくつかのプロモーター、例えば、哺乳類の末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ遺伝子のプロモーターや、開始位置を固定するのを補助するために、開始部位そのものに重なっている分散した要素であるSV40後期遺伝子のプロモーターはTATAボックスを含まない。その他のプロモーターエレメントは転写開始の頻度を調節する。いくつかの往路モーターが機能エレメントを開始部位の下流に含むことも示されているが、一般的に、これらは開始部位の30～110bp上流の領域に位置している。コード配列をプロモーターの「制御下」にあるようにするには、転写読み枠の転写開始部位の5'末端を、選択したプロモーターの「下流」（つまりその3'に）配置する。「上流の」プロモーターはDNAの転写を刺激し、コードされているRNAの発現を促進する。

40

【0176】

プロモーター間の距離は、要素が逆向きになっても、または互いに対して位置が移動してもプロモーターの機能が保存されるように、大抵の場合は柔軟である。tkプロモーターでは、プロモーター要素間の距離は、活性の低下が始まるまでは、50bpと大きい場合がある。プロモーターによって、個々の要素は互いに強調してまたは独立して機能し、転写を活性化すると考えられている。プロモーターを「エンハンサー」と組み合わせ使用しても、または組み合わせないで使用してもよく、エンハンサーは、核酸配列の転写活

50

性化に關与するシス作動性の調節配列を指す。

【0177】

プロモーターは、コードセグメントおよび/またはエクソンの上流に位置する5'非コード領域を単離することによって得られる可能性があることから、核酸配列に天然に関連があるものであってよい。そのようなプロモーターは、「内生の」と呼ぶことができる。同様に、エンハンサーも、その配列の下流または上流に位置する、核酸配列と天然に関連があるものであってよい。あるいは、その天然の環境では核酸配列に通常は関連のないプロモーターを指す、組換えプロモーターまたは異種プロモーターの制御下にコード核酸セグメントを配置することで、特定の利点を得られる。組換えエンハンサーまたは異種エンハンサーもまた、その天然の環境中では、核酸配列に通常は関連のないエンハンサーを指す。そのようなプロモーターもしくはエンハンサーには、他の遺伝子のプロモーターもしくはエンハンサー、および他の任意のウイルスまたは原核細胞もしくは真核細胞から単離されたプロモーターもしくはエンハンサー、ならびに「天然に存在する」ものではないプロモーターもしくはエンハンサー、つまり、異なる転写制御領域の異なるエレメント、および/または発現を変化させる突然変異を含むプロモーターもしくはエンハンサーが含まれ得る。例えば、組換えDNA構築物に最も一般的に使用されるプロモーターとしては、

- ラクタマーゼ(ペニシリナーゼ)、ラクトースおよびトリプトファン(trp)プロモーター系が挙げられる。人工的にプロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を製造することに加えて、配列は、組換えクローニング技術および/または、本発明で開示する組成物に関連したPCR(商標)などの増幅技術によって製造してもよい(各々が参照することによって本明細書に組み込まれる、米国特許第4,683,202号および同第5,928,906号を参照のこと)。さらに、核以外の小器官、例えばミトコンドリアや葉緑体などに含まれている、配列の転写および/または発現を誘導する制御配列を使用することができることも想定される。

【0178】

当然のことながら、発現のために選択した小器官、細胞型、組織、器官、または生物中で、DNAセグメントの発現を効果的に誘導するプロモーターおよび/またはエンハンサーを使用することが重要となる。分子生物学の当業者は通常、タンパク質を発現させるために使用するプロモーター、エンハンサー、および細胞型の組み合わせを理解している(例えば参照することによって本明細書に組み込まれる、Sambrook et al., 1989を参照のこと)。使用されるプロモーターは、構成的であっても、組織特異的であっても、誘導可能であっても、ならびに/または、適切な条件で導入したDNAセグメントを高レベルで発現させるのに有用なものであってもよく、これは、組換えタンパク質および/もしくはペプチドの大規模な生産に好都合である。プロモーターは異種のものであっても内生のものであってもよい。

【0179】

加えて、発現を誘導するためには、任意のプロモーター/エンハンサーの組み合わせ(例えば、epd.isb-sib.ch/にあるワールドワイドウェブのEukaryotic Promoter Data Base EPDBに則って)を使用することもできる。T3、T7またはSP6細胞質発現システムの使用は、実現可能な別の態様である。真核細胞は、適切な細菌性ポリメラーゼが提供されていれば、送達複合体の一部分としてまたはさらなる遺伝的発現構築物として、特定の細菌性プロモーターの細胞質での転写を補助することができる。

【0180】

プロモーターの非限定的な例としては、初期または後期ウイルスプロモーター、例えばSV40初期もしくは後期プロモーター、サイトメガロウイルス(CMV)最初期プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)初期プロモーター;真核細胞のプロモーター、例えば、ベータアクチンプロモーター(Ng, 1989、Quitsche et al., 1989)、GADPHプロモーター(Alexander et al., 1988、Ercolani et al., 1988)、メタロチオネインプロモーター(Ka

rin et al., 1989; Richards et al., 1984); および連鎖状反応要素プロモーター、例えばサイクリックAMP反応要素プロモーター(c re)、血清反応要素プロモーター(s re)、ホルボールエステルプロモーター(TPA)およびミニマルTATAボックスの近傍にある反応要素プロモーター(t re)が挙げられる。ヒト成長ホルモンプロモーターの配列(例えば、ジェンバンク、受託番号X05244、ヌクレオチド283~341に記載されている、ヒト成長ホルモンミニマルプロモーター)またはマウス乳癌プロモーター(ATCCから、カタログ番号ATCC45007で入手可能)などを使用することもできる。特定の例としては、ホスホグリセリン酸キナーゼ(PGK)プロモーターを挙げることができる。

ii. 開始シグナルならびに配列内リボソーム結合部位およびプロテアーゼ開裂部位 / 自己切断型ペプチド

【0181】

コード配列の効率的な翻訳には、特定の開始シグナルも必要とされる場合がある。これらのシグナルとしては、ATG開始コドンまたは隣接配列が含まれる。ATG開始コドンを含む外生の翻訳制御シグナルを提供する必要がある場合もある。当業者であれば、これを容易に判断することができ、必要なシグナルを提供することができる。挿入断片全体の翻訳を確実にするために、開始コドンは、所望のコード配列の読み枠と「インフレーム」でなくてはならないことがよく知られている。外生の翻訳制御シグナルおよび開始コドンは、天然のものであっても合成されたものであってもよい。発現効率は、適切な転写エンハンサーエレメントを含めることによって高められ得る。

【0182】

本発明の特定の態様では、多重遺伝子、またはポリシストロニックなメッセージを作成するために、配列内リボソーム進入部位(IRES)のエレメントを使用する。IRESエレメントは、5'がメチル化されたCap依存性の翻訳のリボソームスキニングモデル(ribosome scanning model)を回避し、翻訳を内部部位で開始することができる(Pelletier and Sonenberg, 1988)。ピコルナウイルスファミリーの2種類のメンバー(ポリオおよび脳心筋炎ウイルス)に由来するIRESエレメント(Pelletier and Sonenberg, 1988)、および哺乳類のメッセージに由来するIRES(Macejak and Sarnow, 1991)について記述されているIRESエレメントを異種のオープンリーディングフレームに連結することができる。IRESによって分断されている複数のオープンリーディングフレームをそれぞれ一緒に転写し、それによってポリシストロニックなメッセージを生成することができる。IRESエレメントのおかげで、各オープンリーディングフレームは、効果的な翻訳のために、リボソームに接近することができる。多重遺伝子は、単一のメッセージを転写するための単一のプロモーター/エンハンサーを使用して、効率的に発現させることができる(それぞれ参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第5,925,565号および同第5,935,819号を参照のこと)。

【0183】

本発明の特定の態様では、マーカーまたは他のタンパク質をコードしている遺伝子を、プロテアーゼ開裂部位(つまり、プロテアーゼの認識部位を含む配列)または少なくとも1つの(2つ以上であってもよい)自己切断型ペプチドをコードしている配列によって、互いに連結させてもよい。

【0184】

好適なプロテアーゼ開裂部位および自己切断型ペプチドは、当業者に知られている(例えば、Ryan et al., 1997; Scymczak et al., 2004を参照のこと)。プロテアーゼ開裂部位の好ましい例は、ポティウイルスNIaプロテアーゼ(例えば、タバコetchウイルスプロテアーゼ)、ポティウイルスHCプロテアーゼ、ポティウイルスP1(P35)プロテアーゼ、ピオウイルス(byovirus)N1aプロテアーゼ、ピオウイルスRNA-2-コード化プロテアーゼ、アフトウイルスLプロテアーゼ、エンテロウイルス2Aプロテアーゼ、ライノウイルス2Aプロテアーゼ、

10

20

30

40

50

ピコルナ 3 C プロテアーゼ、コモウイルス 2 4 K プロテアーゼ、ネボウイルス 2 4 K プロテアーゼ、R T S V (イネツング口球状ウイルス) 3 C 様プロテアーゼ、P Y / I F (アメリカボウフウ黄色斑点ウイルス) 3 C 様プロテアーゼ、トロンピン、X a 因子およびエンテロキナーゼの開裂部位である。

【 0 1 8 5 】

好ましい自己切断型ペプチド (「シス作動性加水分解エレメント」、C H Y S E L とも呼ばれる。de Felipe (2 0 0 2) を参照のこと) は、ポティウイルスおよびカルジオウイルス 2 A ペプチド由来のものである。特に好ましい自己切断型ペプチドは、F M D V (口蹄疫ウイルス) 由来 2 A ペプチド、アフトウイルス (equine rhinitis A ウイルス) 、トセアアシグナ (Thosea asigna) ウイルスおよびブタテッシュウイルスから選択される。

10

i i i . マルチブルクローニングサイト

【 0 1 8 6 】

ベクターは、複数の制限酵素部位、そのいずれもが、ベクターを消化するために標準的な組換え技術と併せて使用することができる制限酵素部位を含む核酸領域であるマルチブルクローニングサイト (M C S) を含む場合がある (例えば、参照することによって本明細書に組み込まれる Carbone et al . , 1 9 9 9 、Levenson et al . , 1 9 9 8 、および Cocea , 1 9 9 7 を参照のこと) 。「制限酵素消化」は、核酸分子の特定の部位のみで機能する酵素による、核酸分子の触媒開裂を指す。これら制限酵素の多くが市販されている。そのような酵素の使用については、当業者によって広く理解されている。ベクターに外生の配列をライゲーションすることができるように、M C S の中に含まれる配列を切断する制限酵素を使用して、ベクターはしばしば、直線化または断片化される。「ライゲーション」とは、互いに連続していてもまたは連続していなくてもよい 2 つの核酸断片の間にホスホジエステル結合を形成する過程をさす。制限酵素反応およびライゲーション反応を含む技術は、組換え技術の当業者にはよく知られている。

20

i v . スプライシング部位

【 0 1 8 7 】

転写された真核生物の R N A 分子の大部分は、最初の転写産物からイントロンを除去するための R N A スプライシングを受ける。真核生物のゲノム配列を含むベクターは、タンパク質を発現するために、転写産物を正確に処理することを保障するため、スプライス供与部位および / またはスプライス受容部位を必要とする場合がある (例えば、参照により本明細書に組み込まれる Chandler et al . , 1 9 9 7 を参照のこと) 。

30

v . 終結シグナル

【 0 1 8 8 】

本発明のベクターまたは構築物は通常、少なくとも 1 つの終結シグナルを含む。「終結シグナル」または「ターミネーター」は、R N A ポリメラーゼによる R N A の転写物の、特異的な終結に関わる D N A 配列からなる。従って、特定の態様では、R N A 転写物の生産を終わらせる終結シグナルが想定される。望ましいメッセージレベルを達成するために、インピボではターミネーターが必要とされる場合もある。

40

【 0 1 8 9 】

真核生物の系では、ターミネーター領域には、新しい転写産物の部位特異的な開裂を許容し、ポリアデニル化部位に曝す、特定の D N A 配列をも含み得る。このシグナルによって、特殊な内生ポリメラーゼが、約 2 0 0 個の長さの A 残基 (ポリ A) を転写産物の 3 ' 末端に付加する。このポリ A 尾部を有する修飾された R N A 分子はより安定で、かつ、より効率的に翻訳されると考えられている。従って、真核生物を伴う他の態様では、ターミネーターが R N A を開裂させるためのシグナルを含むことが好ましく、ターミネーターシグナルがメッセージのポリアデニル化を促進することがより好ましい。ターミネーターおよび / またはポリアデニル化部位エレメントは、メッセージレベルの亢進およびカセットから他の配列へのリードスルーを最小限に抑えるのに役立つ可能性がある。

50

【0190】

本発明での使用が想定されるターミネーターとしては、本明細書に記載の、または当業者に知られている、既知の転写ターミネーターのいずれもが、例えば、遺伝子の終結配列、例えばウシ成長ホルモンターミネーターまたはウイルス終結配列、例えばSV40ターミネーターが含まれるがこれらには限定されない。特定の態様では、終結シグナルは、例えば配列のランケーションによって、転写可能な配列または翻訳可能な配列を欠いたものであってもよい。

v i . ポリアデニル化シグナル

【0191】

発現、特に真核生物の発現では、ベクターは通常、転写産物を正確にポリアデニル化するためのポリアデニル化シグナルを含む。ポリアデニル化シグナルの性質は、本発明を上手く実施するのには重要でないと考えられており、かつ、そのような配列のいずれを用いてもよい。好ましい態様には、簡便で、様々な標的細胞中で機能することが知られているSV40ポリアデニル化シグナルまたはウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナルが含まれる。ポリアデニル化によって、転写産物の安定性が向上するか、または細胞質への輸送が促進される可能性がある。

v i i . 複製の起点

【0192】

ベクターを宿主細胞中で増殖させるために、ベクターは、複製の起点となる部位（多くの場合、「ori」と呼ばれる）、例えば、そこから複製が始まる特定の核酸配列である、上述したEBVのoriPに対応する核酸配列、を1つまたは複数含み得る。あるいは、上述した、染色体外で複製する他のウイルスの複製起点、または自律複製（ARS）を使用することもできる。

v i i i . 選択およびスクリーニング可能なマーカー

【0193】

本発明の特定の態様では、発現カセットにマーカーを含めることで、本発明の核酸構築物を含む細胞を、インピット口でまたはインピボで、同定または選択してもよい。そのようなマーカーによって、同定可能な変化が細胞に起こり、その結果、発現カセットを含む細胞を容易に同定することが可能になるだろう。通常、選択マーカーとは、選択を可能にする特定を付与するマーカーである。陽性選択マーカーは、マーカーが存在することが選択を可能にするマーカーであり、陰性選択マーカーは、存在することが選択を阻害するマーカーである。陽性選択マーカーの一例としては、薬剤耐性マーカーがある。

【0194】

一般に、薬剤選択マーカーを含めることによって、形質転換体のクローニングおよび同定が補助され、例えば、ネオマイシン、ピューロマイシン、ブラストサイジン（blastocidin）、ジェネティシン、ハイグロマイシン、DHFR、GPT、ゼオシンおよびヒスチジノールに対する耐性を付与する遺伝子が有用な選択マーカーである。方法の条件に基づいて、形質転換体の区別を可能にする表現型を付与するマーカーに加えて、スクリーニング可能なマーカー、例えばGFPなどの、その原理が比色分析である、他の種類のマーカーも想定される。あるいは、陰性選択マーカーとしてのスクリーニング可能な酵素、例えば単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（tk）またはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）を使用してもよい。当業者であれば、免疫性マーカーを、おそらくFACS解析と併せて、どのように使用するかも分かるだろう。使用されるマーカーは、遺伝子産物をコードしている核酸と同時に発現することができる限り、重要ではないと考えられている。選択マーカーおよびスクリーニング可能なマーカーのさらなる例も、当業者にはよく知られている。

【0195】

本発明の特定の態様では、細胞の特定の特性を示すために、例えば、レポーターマーカー遺伝子の発現を制御する条件応答性制御要素を活性化することによって、決まった細胞系列に沿った分化を示すために、スクリーニング可能なレポーター遺伝子が使用される。

【 0 1 9 6 】

そのようなレポーターの例としては、細胞表面タンパク質（例えば、C D 4、H A エピトープ）をコードしている遺伝子、蛍光タンパク質、抗原決定基および酵素（例えば、 β -ガラクトシダーゼまたはニトロレダクターゼ）が挙げられる。ベクターを含有している細胞は、例えば、蛍光標識した、細胞表面タンパク質に対する標的化抗体またはベクターによってコードされている酵素によって、蛍光産物へと変換され得る基質を使った F A C S によって単離することができる。特定の側面では、細胞透過性の色素を使用して、レポーターを発現している細胞を同定することができる。例えば、N F A T ニトロレダクターゼ遺伝子の発現は、細胞透過性の蛍光前基質、例えば C y t o C y 5 S を使って、検出することができる（例えば、それぞれ参照によって本明細書に組み込まれる、米国特許第 5, 6 3 3, 1 5 8 号、同第 5, 7 8 0, 5 8 5 号、同第 5, 9 7 7, 0 6 5 号および欧州特許第 1 2 5 2 5 2 0 号明細書を参照のこと）。

10

【 0 1 9 7 】

特定の態様では、レポーター遺伝子は蛍光タンパク質である。可視光スペクトルのほぼ全域にわたる蛍光発光のスペクトルプロファイルを特徴とする、多種多様な蛍光タンパク質の遺伝的変異体が開発されている（非限定的な例に関する表 1 を参照のこと）。元々のオワンクラゲ（*Aequorea victoria*）の緑色蛍光タンパク質に突然変異を加えたことによって、青色から黄色の範囲で発光する新しい蛍光プローブが得られており、これらは、生物学の研究において最も広く使用されているインビボのレポーター分子である。波長がより長く、橙色から赤色のスペクトル領域で発光する蛍光タンパク質がイソギンチャク（*Discosoma striata*）および花中類に属す造礁サンゴから作られた。さらに、シアン、緑、黄、橙、および深紅の蛍光発光を有する同様のタンパク質を生産するために、他の種についても調査が行われた。蛍光タンパク質の輝度および安定性を向上させ、それらの総体的な有効性を向上させるための開発研究は現在も行われている。

20

【表 1】

表 1：蛍光タンパク質の特性

タンパク質 (頭字語)	最大励起 波長 (nm)	最大蛍光 波長 (nm)	モル吸光 係数	量子収 量	インビボで の構造	相対輝度 (EGFP に 対す
----------------	-----------------	-----------------	------------	----------	--------------	-----------------------

30

						る%)
GFP (wt)	395/475	509	21,000	0.77	単量体*	48
緑色蛍光タンパク質						
EGFP	484	507	56,000	0.60	単量体*	100
AcGFP	480	505	50,000	0.55	単量体*	82
TurboGFP	482	502	70,000	0.53	単量体*	110
Emerald	487	509	57,500	0.68	単量体*	116
Azami Green	492	505	55,000	0.74	単量体	121
ZsGreen	493	505	43,000	0.91	四量体	117
青色蛍光タンパク質						
EBFP	383	445	29,000	0.31	単量体*	27
Sapphire	399	511	29,000	0.64	単量体*	55
T-Sapphire	399	511	44,000	0.60	単量体*	79
シアン蛍光タンパク質						
ECFP	439	476	32,500	0.40	単量体*	39
mCFP	433	475	32,500	0.40	単量体	39
Cerulean	433	475	43,000	0.62	単量体*	79
CyPet	435	477	35,000	0.51	単量体*	53
AmCyan1	458	489	44,000	0.24	四量体	31
Midori-Ishi	472	495	27,300	0.90	二量体	73
Cyan						
mTFP1 (Teal)	462	492	64,000	0.85	単量体	162
黄色蛍光タンパク質						
EYFP	514	527	83,400	0.61	単量体*	151
Topaz	514	527	94,500	0.60	単量体*	169
Venus	515	528	92,200	0.57	単量体*	156
mCitrine	516	529	77,000	0.76	単量体	174
YPet	517	530	104,000	0.77	単量体*	238
PhiYFP	525	537	124,000	0.39	単量体*	144
ZsYellow1	529	539	20,200	0.42	四量体	25

10

20

30

40

mBanana	540	553	6,000	0.7	単量体	13	
橙および赤色蛍光タンパク質							
Kusabira	548	559	51,600	0.60	単量体	92	
Orange							
mOrange	548	562	71,000	0.69	単量体	146	
dTomato	554	581	69,000	0.69	二量体	142	10
dTomato-							
Tandem	554	581	138,000	0.69	単量体	283	
DsRed	558	583	75,000	0.79	四量体	176	
DsRed2	563	582	43,800	0.55	四量体	58	
DsRed-							
Express (T1)	555	584	38,000	0.51	四量体	58	
DsRed-単量							20
体	556	586	35,000	0.10	単量体	10	
mTangerine	568	585	38,000	0.30	単量体	34	
mStrawberry	574	596	90,000	0.29	単量体	78	
AsRed2	576	592	56,200	0.05	四量体	8	
mRFP1	584	607	50,000	0.25	単量体	37	
JRed	584	610	44,000	0.20	二量体	26	30
mCherry	587	610	72,000	0.22	単量体	47	
HcRed1	588	618	20,000	0.015	二量体	1	
mRaspberry	598	625	86,000	0.15	単量体	38	
HcRed-Tandem	590	637	160,000	0.04	単量体	19	
mPlum	590	649	41,000	0.10	単量体	12	
AQ143	595	655	90,000	0.04	四量体	11	
*弱い二量体							40

B. 核酸の送達

【0198】

核酸（リプログラミングベクターまたはゲノムに組み込むための他の分子）を本発明に従って体細胞に導入するには、本明細書に記載したようにまたは当業者であれば分かるように、細胞を形質転換するために核酸を送達する、任意の適した方法を使用してもよい。そのような方法としては、例えば、エキスピボトランスフェクション（Wilson et al., 1989、Nabel et al., 1989）；インジェクション（米国特許第5,994,624号、同第5,981,274号、同第5,945,100号、同第5,780,448号、同第5,736,524号、同第5,702,932号、

同第5,656,610号、同第5,589,466号および同第5,580,859号。それぞれ参照することによって本明細書に組み込まれる)、例えばマイクロインジェクションなど(Harland and Weintroub、1985;米国特許第5,789,215号。参照することによって本明細書に組み込まれる);エレクトロポレーション(米国特許第5,384,253号。参照することによって本明細書に組み込まれる;Tur-Kaspa et al.,1986;Potter et al.,1984);リン酸カルシウム沈殿(Graham and VanDerEb、1973;Chen and Okayama、1987;Rippe et al.,1990);DEAE-デキストランとその後のポリエチレングリコールの使用(Gopal、1985);直接的な音波負荷(direct sonic loading)(Fechheimer et al.,1987);リボソーム介在性トランスフェクション(NicolauおよびSene、1982;Fraleley et al.,1979;Nicolau et al.,1987;Wong et al.,1980;Kaneda et al.,1989;Kato et al.,1991)および受容体介在性トランスフェクション(Wu and Wu、1987;Wu and Wu、1988);微粒子銃(国際公開第94/09699号パンフレットおよび同第95/06128号パンフレット;米国特許第5,610,042号;同第5,322,783号、同第5,563,055号、同第5,550,318号、同第5,538,877号、および同第5,538,880号。それぞれ参照することによって本明細書に組み込まれる);炭化ケイ素線維との攪拌(Kaeppler et al.,1990;米国特許第5,302,523号および同第5,464,765号。それぞれ参照することによって本明細書に組み込まれる);乾燥/阻害介在性DNA取り込み(Potrykus et al.,1985)、およびそのような方法の任意の組み合わせによるDNAの直接的な送達が挙げられるがこれらには限定されない。このような技術を適用することを介して、小器官、細胞、組織または生物を、安定的にまたは一過的に形質転換することができる。

i. リボソーム介在性トランスフェクション

【0199】

本発明の特定の態様では、核酸を脂質複合体、例えばリボソームの中に捕捉してもよい。リボソームは、リン脂質の二重膜と内側の水性媒体によって特徴付けられる小胞構造である。多重膜リボソームは、水性媒体によって隔てられている、複数の脂質層を有している。これらは、水溶性の溶液にリン脂質が過剰に懸濁している場合、自発的に形成される。脂質成分は自己再編成し、その後、閉じた構造が形成されて、脂質二重層の間に、水と溶けた溶質が捕捉される(Ghosh and Bachhawat、1991)。Lipofectamine(GibcoBRL)またはSuperfect(Qiagen)と複合体を形成した核酸もまた想定される。使用されるリボソームの量は、使用されるリボソームや細胞の性質によって変わってもよく、例えば、細胞1~1000万個当たり、約5~約20 μ gのベクターDNAを使用してもよい。

【0200】

リボソーム介在性の核酸送達と外生DNAのインビトロでの発現は、非常にうまくいっている(NicolauおよびSene、1982;Fraleley et al.,1979;Nicolau et al.,1987)。培養したニワトリ胚、HeLaおよび肝癌細胞でのリボソーム介在性送達および外生DNA発現の実現可能性もまた示された(Wong et al.,1980)。

【0201】

本発明の特定の態様では、リボソームとセンダイウイルス(HVJ)とで複合体を形成させてもよい。これによって細胞膜との融合が促進され、リボソームに封入されたDNAの細胞への進入が促進されることが分かっている(Kaneda et al.,1989)。他の態様では、リボソームと核の非ヒストン染色体タンパク質(HMG-1)とで複合体を形成させても、またはこれらを併せて使用してもよい(Kato et al.,1991)。さらなる態様では、リボソームとHVJおよびHMG-1の両方とで複合

体を形成させても、あるいはこれらを全て併せて使用してもよい。他の態様では、送達媒体には、リガンドおよびリポソームが含まれ得る。

i i . エレクトロポレーション

【0202】

本発明の特定の態様では、核酸は、エレクトロポレーションによって、小器官、細胞、組織または生物へと導入される。エレクトロポレーションの型の1つとしてヌクレオフェクションがあり、この方法では、ヌクレオフェクター (Nucleofector) と呼ばれる装置と細胞に特異的な試薬との併用によって (例えば Amaxa システム; Lonza Cologne AG)、核酸を細胞に形質導入する。エレクトロポレーションは、細胞懸濁液と DNA を高電位放電に曝露することを含む。機械的な損傷によって、受容細胞をより形質転換しやすくすることができる。使用するベクターの量もまた、使用される細胞の性質によって変わっても良く、例えば、細胞 1 ~ 1000 万個あたり、約 5 ~ 約 20 μ g のベクター DNA が想定され得る。

10

【0203】

エレクトロポレーションを使用した真核細胞の形質導入はかなりうまくいく。この様式で、ヒトカップ免疫グロブリン遺伝子がマウス B リンパ球前駆細胞に導入され (Potter et al., 1984)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子がラット肝細胞に導入された (Tur-Kaspa et al., 1986)。

i i i . リン酸カルシウム

【0204】

本発明の他の態様では、核酸を、リン酸カルシウム沈殿を使って、細胞に導入する。ヒト KB 細胞は、この技術によって、アデノウイルス DNA を導入された (Graham and Van Der Eb, 1973)。この様式ではまた、マウス L (A9)、マウス C127、CHO、CV-1、BHK、NIH3T3 および HeLa に、ネオマイシンマーカー遺伝子が導入されており (Chen および Okayama, 1987)、また、ラット肝細胞には様々なマーカー遺伝子が導入された (Rippe et al., 1990)。

20

i v . DEAE - デキストラン

【0205】

別の態様では、核酸を、DEAE - デキストランとそれに続くポリエチレングリコールによって、細胞に送達する。この様式によって、レポータープラスミドがマウス骨髄腫細胞および赤血球病細胞に導入された (Gopal, 1985)。

30

v . 超音波処理 負荷 (sonication loading)

【0206】

本発明の代替的な態様には、直接的な超音波負荷 (direct sonic loading) による核酸の導入が含まれる。超音波処理負荷によって、チミジンキナーゼ遺伝子が LTK 線維芽細胞に導入された (Fechheimer et al., 1987)。

v i . 受容体介在性トランスフェクション

【0207】

その上さらに、核酸を、受容体介在性送達媒体を介して、標的細胞に送達してもよい。これらは、標的細胞で生じる受容体介在性エンドサイトーシスによる巨大分子の選択的な取り込みを利用するものである。様々な受容体の細胞型に特異的な分布を考慮すると、この送達方法は本発明に、別の特性を付加する。

40

【0208】

特定の受容体介在性遺伝子ターゲティング媒体は、細胞受容体特異的リガンドと核酸結合剤を含む。その他のものは、送達される核酸に操作可能に接続されている細胞受容体特異的リガンドを含む。複数のリガンドが受容体介在性移入に使用されてきており (Wu and Wu, 1987; Wagner et al., 1990; Perales et al., 1994; Myers, EPO 0273085)、これらによって、技術の

50

実施可能性が確立されている。別の哺乳類の細胞型に関する特定の送達についても記述されている (Wu and Wu, 1993; 参照することによって本明細書に組み込まれる)。本発明の特定の側面では、リガンドは、対応する標的細胞集団上で特異的に発現している受容体に応じて選択される。

【0209】

他の態様では、細胞特異的核酸ターゲティング媒体の核酸送達媒体の成分は、リボソームと併せて特異的な結合リガンドを含んでいてもよい。送達される核酸は、リボソームの中に収容され、かつ、特異的な結合リガンドは、リボソーム膜の中に機能的に組み込まれる。従ってリボソームは、標的細胞の受容体に特異的に結合し、内容物を細胞へと送達する。このような系が機能的であることは、例えば、EGF受容体のアップレギュレーションを示す細胞への核酸の受容体介在性送達に上皮成長因子 (EGF) が使用される系を用いて示された。

10

【0210】

その上さらなる態様ではターゲティング送達媒体の核酸送達媒体の成分は、リボソーム自体であってもよく、リボソームは、好ましくは1種もしくは複数種の脂質、または細胞特異的に直接結合する糖タンパク質を含む。例えば、ラクトシルセラミド、ガラクトース末端をもつアシアロガングリオシド (asialganglioside) がリボソーム中に組み入れられ、肝細胞によるインスリン遺伝子の取り込みの増加が観察された (Nicolaulet al., 1987)。本発明の組織特異的な形質転換構築物が、同様の様式で、標的細胞に特異的に送達できることが想定される。

20

vii. 微粒子銃

【0211】

微粒子銃の技術を、核酸を少なくとも1つの、小器官、細胞、組織または生物へ導入するために使用することができる (米国特許第5,550,318号; 同第5,538,880号; 同第5,610,042号; および国際公開公報第94/09699号パンフレット。それぞれ参照することによって本明細書に組み込まれる)。この方法は、微粒子が細胞膜を貫通し、そして細胞を殺すことなくその中に進入することを可能にする高速に、DNAでコーティングした微粒子を加速する能力に基づいている (Kleinet al., 1987)。多くの微粒子技術が当該分野において知られており、その多くを本発明に適用することができる。

30

【0212】

この微粒子銃では、1つ以上の粒子を少なくとも1種の核酸でコーティングし、推進力によって細胞内に送達してもよい。小さい粒子を加速させるための複数の装置が開発されている。そのような装置の1つは、電流を発生させるための高圧放電に基づいており、電流が次いで機動力を生じる (Yang et al., 1990)。使用される微粒子は、生物学的に不活性な基質、例えばタングステン粒子もしくは金粒子またはビーズからなっていた。粒子の例としては、タングステン、白金、および好ましくは金から構成されている粒子が挙げられる。いくつかの例では、微粒子銃を使ったDNAの受容細胞への送達には、DNAを金属粒子表面に沈降させる必要は必ずしもないことが想定される。しかしながら、粒子は、DNAでコーティングされるのではなく、DNAを含み得ることが想定される。DNAでコーティングした粒子は、微粒子銃を介したDNA送達のレベルを高める可能性があるが、必ずしもそれら自体の送達を高めはしない。

40

【0213】

微粒子を照射するには、懸濁液中の細胞を、フィルターまたは固体培地上に集める。あるいは、未熟胚または他の標的細胞を固体培地上に配置してもよい。微粒子の照射を受ける細胞は、微粒子停止プレート (stopping plate) の下に、適切な距離をおいて置かれる。

【実施例】

【0214】

X. 実施例

50

以下に示す実施例は、本発明の好ましい態様を示すために包含されるものである。当業者にとっては当然のことであるが、実施例中で開示されている技術は、本願発明者らによって、本発明を実施する上でよく機能することが分かった技術を表すものであり、そのため、本発明を実施するための好ましい形態を構成していると思ふことができる。しかしながら、本開示を踏まえると、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、開示されている特定の態様に多くの変更を施すことができ、それでもなお、同様のまたは類似した結果をえることができることを、当業者は理解すべきである。

【0215】

実施例1ーゲノムの改変および、ジンクフィンガーヌクレアーゼを用いたヒト包皮線維芽細胞のエピソームリプログラミング

10

最初の細胞の調製

生きた状態の、正常ヒト新生児皮膚線維芽細胞 (HNDF) を All Cells、LLC から購入した (エメリービル、カリフォルニア、ID 番号 NF090119、カタログ番号 HN006002)。線維芽細胞を、サプリメントを補った、All Cells、LLC の新生児ヒト皮膚線維芽細胞培地 (HNDF 基本培地 + サプリメント) (エメリービル、カリフォルニア、カタログ番号 HN006006 および HN006007) 中で培養した。T75 フラスコからの細胞を、標準的なトリプシン/EDTA 方法で 1:10 に分割し、細胞のうちのいくつかを 12 ウェルプレートにプレーティングして、ピューロマイシンを用いた殺菌曲線の生成に使用した。6 つのウェルに 1:5 に希釈した細胞を播種し、さらに 6 つのウェルに 1:10 に希釈した細胞を播種した。バイアル 1 本あたりおよそ 1 M の細胞が入ったバイアルを 6 本凍結した。凍結は 2 回目の継代の時点で行った。

20

【0216】

細胞の改変

分割の 6 日後、コンフルエントに達した線維芽細胞を、トリプシン/EDTA 分離によって回収した。血球計算板を使って細胞を計数し、400 万個の細胞をペレットにし、リン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄し、Lonza からの Amaxa HNDF ヌクレオフェクション溶液 (ウォーカーズビル、メリーランド、カタログ番号 VPD-1001) 200 μ l に再懸濁し、その後、100 μ l チューブ 2 本に分けた。15 μ g のプラスミド 1024 (図 2。AAVS1 遺伝子遺伝子座のホモロジーアームの間にクローニングされている、トロポニン 2 プロモーターと、それによって誘導されている緑色蛍光タンパク質および常に発現している PGK -ピューロマイシンカセットをコードしている。ベクター 1024) を 100 μ l の線維芽細胞溶液に加えた。AAVS1 遺伝子座を標的とするジンクフィンガーヌクレアーゼをコードしているメッセンジャー RNA (Sigma、セントルイス、ミズーリ、カタログ番号 CTI1-KT) 5 μ l を加え、この混合物をエレクトロポレーション用キュベットに移し、Lonza (ウォーカーズビル、メリーランド) の Amaxa Nucleofector II 装置を使用し、プログラム U-20 でヌクレオフェクションを行った。細胞を素早く、14 ml の新生児ヒト皮膚線維芽細胞培地に再懸濁し、このうちの 12 ml を、1 枚の 6 ウェルプレートにプレーティングし、残りの 2 ml を培地 10 ml を加えて希釈し、2 枚目の 6 ウェルプレートにプレーティングした。ヌクレオフェクションの効率をモニタリングするために、残りの 100 μ l の線維芽細胞に、緑色蛍光タンパク質遺伝子を恒常的に発現しているプラスミドを 5.5 μ g 加え、ジンクフィンガーヌクレアーゼ非存在下で 2 回目のヌクレオフェクションを行った。ジンクフィンガーヌクレアーゼを導入した後、細胞を 3 日間維持し、その後、薬剤による選択を開始した (0 日目)。

30

40

【0217】

ピューロマイシン陰性 HNDF での細胞死の割合をモニタリングするために、GFP を導入した HNDF のうちの 1 つのウェルに、0.5 μ g/ml のピューロマイシンを曝露させた。トランスフェクトした AAVS1 HNDF の高密度プレートの 5 つのウェルのうちの 4 つに、0.5 μ g/ml のピューロマイシンを曝露した。1、3、および 4 日目に培地を交換した。5 日目に、培地を非選択培地に交換した。ピューロマイシンで選択した

50

細胞を粉砕し、死んだ接着性の細胞を除去した。トランスフェクトされた G F P 細胞は全て除かれたが、トランスフェクトされた A A V S 1 細胞はおよそ 15 % が除去された。6 日目、N H D F を導入した A A V S 1 細胞は、選択から回復し、増殖し始めた。選択しなかった N H D F を導入した A A V S 1 を 6 ウェルプレート上で増殖させた。8 日目、選択しなかった N H D F を導入した A A V S 1 細胞のうちの 5 つのウェルを回収し、ゲノム D N A を精製した。1 つのウェルは、新しい 6 ウェルプレートへの継代に使用した。10 日目、組み入れられたおよび野生型の A A V S 1 遺伝子座を検出するためのプライマーを用い、選択しなかった N H D F を導入した A A V S 1 細胞について P C R を行った。陽性対照としては、G F P を恒常的に発現している細胞を、陰性対照としては、i P S C から誘導した心筋細胞を使用した。以下の指標および試薬を P C R 反応に用いた。P C R : 98 30 秒、[98 10 秒、68 20 秒、72 60 秒] × 35 サイクル、72 2 分。反応成分は下記表 2 に示す。P C R プライマーは以下のものを使用した。

10

【 0 2 1 8 】

ターゲティングした A A V S 1 遺伝子座の検出：

「 M J M 3 2 」 A A V S 1 - F 1 - A C C A C T T T G A G C T C T A C T G G C T T C T G (配列番号 1)

「 M J M 1 5 」 S V 4 0 p A - F o r - T G G A C A A A C C A C A A C T A G A A T G C A G (配列番号 2)

【 0 2 1 9 】

組み込まれていない A A V S 1 遺伝子座の検出。

20

「 M J M 3 2 」 A A V S 1 - F 1 - A C C A C T T T G A G C T C T A C T G G C T T C T G (配列番号 3)

「 M J M 4 4 」 A A V S 1 - R 1 - A C C C A A A A G G C A G C C T G G T A G A C (配列番号 4)

【 0 2 2 0 】

【表 2】

表 2 : P C R 反応の成分

P C R 反応の成分	容量
5 × P h u s i o n 緩衝液 G C	5 μ l
d N T P s	0.5
M J M 3 2 プライマー	1.25
M J M 1 5 プライマー	1.25
D N A (1 0 0 n g - ゲノム D N A)	1
D M S O	1
P h u D N A ポリメラーゼ	0.125
滅菌水	14.875

30

40

【 0 2 2 1 】

P C R 産物のアガロースゲル電気泳動によって、線維芽細胞の A A V S 1 部位に、組換えプラスミドが正しく導入されたことが分かった。

【 0 2 2 2 】

ヌクレオフェクションを行った後に使用するための培地も準備した。N 2 B 2 7 培地の成分を表 3 に示す。いずれの例においても、培地成分を混合し、0.22 μ m フィルター

50

を通した。

【 0 2 2 3 】

【 表 3 】

表 3 : N 2 B 2 7 培地 (5 0 0 m l)

成分	量	メーカー	パーツ番号	ロット番号	注意事項
DMEM/ F 1 2	477.5ml	Invitrogen	11330-057	829387	
N-2 サプリメント (100 ×)	5.0ml	Invitrogen	17502-048	903988	
B-27 サプリメント	10ml	Invitrogen	0080085-SA	907983	

(50×)					
NEAA (100×)	5ml	Invitrogen	11140-050	738001	
Gluta max (100×)	2.5ml	Invitrogen	35050-061	794979	
β-ME	3.4ml	Sigma	M7522	105K01041	
PD032 5901	25 μl	Stemgent	04-0006-2mg	1768	2mgを415 μlのDMSOで希釈し、10mMのストックを調整した。
CHIR9 9021	150 μl	Stemgent	04-0004-2mg	2172	2mgを430 μlのDMSOで希釈し、10mMのストックを調整した。
A-83- 01	25 μl	Stemgent	04-0014-2mg	2010	2mgを475 μlのDMSOで希釈し、10mMのストックを調整した。
hLIF	500 μl	Millipore	LIF1010	DAM1770440	
HA-10 0	500 μl	Santa Cruz	Sc-203072	J1410	水で2.78mg / mlに希釈した。
zbFGF	50 μl	Promega	X608X	28608702	

10

20

30

40

50

【0224】

細胞のヌクレオフェクション、改変した細胞のリプログラミング、および、同時に行う野生型細胞の改変とリプログラミング

上述した、ジンクフィンガーヌクレアーゼで修飾したNHDF（正常ヒト胎児線維芽細胞）をリプログラミングDNAベクターでヌクレオフェクションした。

【0225】

簡単に説明すると、3種類のリプログラミングベクター（#34 - 図3、#36 - 図4および#123 - 図5）を2本の1.5 mLチューブ内で混合した。4枚の6ウェルプレートからMatrigelを吸引し、2 mLの回復培地（NHDF基本培地にAll Cellsからのサプリメントを加えたもの。zbFGFが4 ng/mL、HA-100が10 μ M）と交換した。線維芽細胞をトリプシンで分離し、計数し、 1×10^6 個の細胞を、Amara NHDF Nucleofectionキット（Lonza: VPD-001）のヌクレオフェクション緩衝液（100 μ L）に再懸濁した。再懸濁した、AAVS1挿入断片を含有するNHDF細胞をリプログラミングベクターに加え、その後、キュベットに移した。細胞を、AmaraプログラムU-20によるエレクトロポレーションに用いた。キュベットに温めた回復培地を加え、キュベットの中身を、6 mLの回復培地の入った15 mLの円錐管に移した。細胞を、2枚の6ウェルプレートにまいた。

【0226】

リプログラミングプラスミドの入った2本目の1.5 mLに、8.1 μ gのプラスミド1036を加えた（図6を参照のこと。1036は、ZsGreen蛍光タンパク質の発現を誘導する、恒常的に発現しているEF1プロモーターと、恒常的に発現しているPGK-ピューロマイシンカセットを含み、これらは両方とも、AAVS1遺伝子座のホモロジーマーの間にクローニングした）。野生型NHDF細胞（ZFNによって、これまでにターゲティングされていない）をトリプシン分離によって回収し、100 μ Lのヌクレオフェクション溶液に再懸濁し、その後、リプログラミングプラスミドおよびプラスミド1036を加えた。AAVS1遺伝子座を標的としているジンクフィンガーヌクレアーゼをコードしているメッセンジャーRNA（5 μ L）（シグマ、セントルイス、ミズーリ、カタログ番号CTI1-KT）を加え、この細胞をAmaraプログラムU-20でのヌクレオフェクションに用い、その後プレーティングした。プレーティングに続いて、順次および同時リプログラミング/改変実験からの細胞を以下のように維持した。

【0227】

2日目 - 細胞をリプログラミング培地（N2B27、表5を参照のこと）に移した。いくつかは蛍光を示した。

【0228】

4日目 - 細胞にリプログラミング培地を与えた

【0229】

6日目 - 細胞にリプログラミング培地を与えた

【0230】

8日目 - 細胞にリプログラミング培地を与えた

【0231】

10日目 - 細胞にリプログラミング培地を与えた。画像を取得した。

【0232】

12日目 - 細胞にリプログラミング培地を与えた

【0233】

13日目 - 細胞にTeSRを与えた

【0234】

15日目 - 細胞にTeSRを与えた

【0235】

17日目 - 細胞にTeSRを与えた

【0236】

20日目 - 細胞にTeSRを与えた

【0237】

21日目 - 生きたままの状態での染色を行い、コロニーを採取した

【0238】

27日目 - P2クローンの採取

【0239】

10

20

30

40

50

線維芽細胞における、ジンクフィンガーヌクレアーゼ介在性組換えとそれに続く細胞のリプログラミングを使用した実験からの結果を以下に要約し、また、細胞全ての表現型を図1および図9で説明する。

連続した、改変とそれに続くリプログラミング用の出発細胞：増殖させた400万個の初代ヒト線維芽細胞

- 薬剤耐性をもち、選択された、上手く改変された細胞のパーセンテージ：およそ15%
- 薬剤耐性をもち、リプログラミング用の出発細胞：200万個 - T r a - 1 6 0 に対する免疫染色が陽性（赤色）のリプログラミングされたコロニー（多能性）の数：> 100
- 染色されなかったコロニーの数（部分的にリプログラミングされたと考えられる）：およそ20

10

【0240】

線維芽細胞における同時の、ジンクフィンガーヌクレアーゼ介在性組換えとリプログラミング因子を含むベクターによるゲノム改変を使用した実験からの結果を以下に要約する。

- 同時の改変およびリプログラミング用の出発細胞：増殖させた200万個の初代ヒト線維芽細胞

- 抗 T r a 1 6 0 陽性（赤色）かつ緑色 z s G F P を発現している初期細胞コロニーの数：14（注意：1回継代した後、6コロニーが赤色かつ緑色で、3コロニーが赤色のみ、および5コロニーが選択過程で生存しなかった）
- 抗 T r a 1 6 0 陽性の初期細胞コロニー（赤色のみ）の数：およそ40
- 緑色のみの細胞の数：計数できないほど多かった（これらは改変した線維芽細胞であると考えられる）。
- 染色されなかったコロニーの数：およそ20（これらは部分的にリプログラミングされたコロニーであると考えられる）
- 無色の線維芽細胞の数：計数できないほど多かった（これらは修飾されなかった出発線維芽細胞であった）。

20

【0241】

本明細書で例示したエピソームリプログラミングおよびゲノム改変の方法を図1、図8、および図10で提供する。

【0242】

実施例2 - エピソームリプログラミングおよび P i g g y B a c を使った P B M C のゲノム改変

実験用の試薬を最初に準備した。それら試薬の一覧を表4中に提供する。

30

【0243】

【表 4】

表 4：試薬一覧

物質/試薬	特性／濃度	メーカー	パーツ番号	ロット番号／製造番号	その他
EB 増殖培地	下記表 5 を参照のこと。				
PBMC	下記参照				
ゲンタマイシン		Gibco	15750-060	780801	
StemSpan SFEM		StemCell Technologies	09650		
Matrigel		BD	354230	82895	
DMEM/F12		Gibco	11330	891768	
リプログラミング培地			AD1-4-1;1		
RetroNectin	1 m g / m l	Takara	T100A	AA601	P B S で 5 μ g / m l に希釈した。1 m l でプレート进行コーティングした。
PBS +/+		Gibco	14040	764950	
PBS -/-		Gibco	14190-144	872284	
トリプシン 0.5%		Gibco	15400	860083	P B S - / - で 0 . 0

10

20

30

40

					5 %に希釈した。
Amaya Human CD34 Cell Nucleofecto r Kit	1 m g / m l	Lonza	VPA-1003	F07990	
リプログラ ミングベク ター#34 pEP4E02SEN2 K	1 m g / m l				2. 9 6 μ gを使用し た。
リプログラ ミングベク ター#36 pEP4E02SET2 K	1 m g / m l				3. 2 μ g を使用し た。
リプログラ ミングベク ター#123 pCEP4-LM2L aka (L-myc Tres Lin28)	1 m g / m l				2. 2 8 μ gを使用し た。
1038 pPBm1-PP- pEFxZsGreen (FIG. 3)	1. 2 9 m g / m l		1038 pPBm1- 1 PP- pEFxZsGreen		4 μ gを使 用した。
PBacase	1 m g / m l				4 μ gを使 用した。
TeSR		Stemcell	05850 (サブ リメント)	10H35844D 10K36588D	

10

20

30

40

			05857 (基本)		
TeSR2		Stemcell	05861 (基本) 05862 (5×サ プリメント) 05863 (25×サ プリメント)	10J36713 10L37035 10H36234	
抗-h TRA-1-61		R&D Systems	MAB4770		
Alexa Fluor594 ヤ ギ抗マウス IgM		Invitroge n	A21044		

10

20

【 0 2 4 4 】

最初の細胞培養

成体 P B M C を 6 日間培養し、その後、改変 / リプログラミングを行った。

【 0 2 4 5 】

E B (赤芽球) 増殖培地を表 5 に示すように調製した。それぞれのサイトカインを、製造業者による推奨に従って溶解する。滅菌 P B S + 2 m g / m l B S A でストック溶液を調製する。溶解したサイトカインの分割量は、4 で 2 週間までは保存可能である。初代細胞培養の初期には、抗生物質を使用するのが望ましい。ゲンタマイシン (最終濃度 1 0 μ g / m l) を使用した (I n v i t r o g e n) 。

【 0 2 4 6 】

30

【表 5】

表 5 : E B 増殖培地

名称	販売業者	カタログ 番号	ストック	保存	最終濃 度	D F	100 ml
StemSpan SFEM	StemCell Technologies	09650	500 ml	4℃	—	—	100 ml
ExCyte 培地 サプリメント	Millipore	81-129-N	10 ml	4℃	—	1/1000	100 μ l
GlutaMax	Invitrogen	35050-061	100 ml	-20℃	—	1/100	1 ml
SCF	Peprotech	300-07	500 μ g/ml	-80℃	250 ng/ml	1/2000	50 μ l
IL-3	Peprotech	200-03	100 μ g/ml	-80℃	20 ng/ml	1/5000	20 μ l
EPO					2 U/ml		
IGF-1					40 ng/ml		
デキサメタ ゾン					1 μ M		

10

20

30

【 0 2 4 7 】

10 × 10⁷ P B M C のバイアルを 1 本液体窒素から取り出し、37℃ の水浴中で融解した。細胞を、30 ml の S t e m S p a n (登録商標) S F E M が入った 50 ml の円錐管に一滴ずつ移した。円錐管を 1200 R P M で 5 分間遠心した。細胞を 10 ml の S t e m S p a n (登録商標) S F E M に再懸濁し、次いで、血球計算板を使って計数した。9.4 × 10⁷ 個の細胞を回収した。細胞を、再度 1200 R P M で遠心し、94 ml の E B 増殖培地 + 10 μ g/ml ゲンタマイシンに、最終的な細胞密度が 1 × 10⁶ 細胞/ml になるように再懸濁した。6 ウェルプレートそれぞれのウェルに (合計 44 ウェル)、2 ml の細胞を加えた。細胞を 37℃、5% C O₂ で週末の間インキュベートし、その後、それぞれのウェルに 2 ml の E B 増殖培地を加えた。

40

ヌクレオフェクション

【 0 2 4 8 】

ヌクレオフェクション (0 日目)、懸濁している細胞を回収し、血球計算板を使用して計数した。1.8 × 10⁷ 個の細胞が回収された。少数の細胞試料について、フローサイトメトリーを行った。

【 0 2 4 9 】

この実験には R e t r o N e c t i n でコーティングしたプレートを使用した。R e t r o N e c t i n のストック (1 mg/ml) を標準的な 1 × P B S で 5 μ g/ml に希釈し、穏やかに転倒混和した。希釈した R e t r o N e c t i n (1 ml) を、組織で処理していない 6 ウェルプレートのそれぞれのウェルに加えた。確実に一定に分散するよう

50

に、プレート軽く叩いた。プレートを2時間、室温でインキュベートした。あるいは、プレートをパラフィルムで覆って、平らな場所に4で一晚置き、翌日使用することもできる。処理したウェルは1×PBSで洗浄し、2mLの2%BSA溶液を加え、プレートを30分間室温でインキュベートした。ウェルを1×PBSで洗浄し、すぐに使用した。

【0250】

それぞれの実験条件に合わせて、DNAマスターミックスを以下のように作成した。

【0251】

ウェル1.1~1.6:トランスポサゼによって挿入されるzsGreenを発現させるための、PiggybackトランスポサゼDNAベクター+リプログラミングDNAベクター(#34、#36 & #123;それぞれ、図3、4および5)+ベクターDNA#1038(図7に示す)。ウェル1.1~1.6用のマスターミックス(6ウェルプレートの全てのウェル)。15.5μLのマスターミックス+100個の細胞を、表6に示すように、1ウェル当たりの1回のヌクレオフェクションに使用する。基本的な計画を図8に示す。

10

【0252】

【表6】

表6:ヌクレオフェクションプレート1

ベクター	$\mu\text{L}/\text{R} \times \text{N}$	7つのR×N用、 μL
#34	2.96	20.72
#36	3.2	22.4
#123	2.28	15.96
#1038	3.1	21.7
8		
Pbacase	4	28

20

30

【0253】

対照ウェル3.1~3.2:リプログラミングDNAベクター(#34、#36 & #123;それぞれ、図3、4および5)+PB転移DNAベクター#1038(shown in 図7)、PBトランスポサゼなし。11.5μLのマスターミックス+100万個細胞を、下記表7に示すように、1ウェル当たりの1回のヌクレオフェクションに使用する。

【0254】

【表 7】

表 7：ヌクレオフェクションプレート 3

ベクター	$\mu\text{l} / \text{R}$ $\times \text{N}$	3.5つのR x N用、 μl
# 3 4	2.96	20.72
# 3 6	3.2	22.4
# 1 2 3	2.28	15.96
# 1 0 3	3.1	21.7
8		

10

【 0 2 5 5 】

適当量のマスターミックスをそれぞれのキュベットのそばに置いた。細胞を、 1×10^7 個細胞 / $100 \mu\text{l}$ の密度でヌクレオフェクション溶液と混合した。 $100 \mu\text{l}$ の細胞をエレクトロポレーション用キュベットに加え、何回か指先ではじいて、マスターミックスを混ぜ合わせた。細胞をエレクトロポレーション処理した（ウェル 1.5 には Arc. c. 1 のエラーが起きた）。エレクトロポレーションを行った直後に、 $500 \mu\text{l}$ のリプログラミング培地を、電気穿孔処理した後の各キュベットに加えた。キュベットの中身を 2 ml のリプログラミング培地が入った 6 ウェルプレートの 1 つのウェルに移した。プレートを 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ でインキュベートした。

20

【 0 2 5 6 】

2 日目 - 培地をリプログラミング培地に交換する。各ウェルの細胞を短時間遠心し、 2 ml のリプログラミング培地に細胞を再懸濁した

【 0 2 5 7 】

4 日目 - 2 ml のリプログラミング培地を加えた

【 0 2 5 8 】

6 日目 - 培地 1 ml を除去し、 2 ml の新しいリプログラミング培地と交換した。

30

【 0 2 5 9 】

8 日目 - 培地 2 ml を除去し、 2 ml の新しいリプログラミング培地と交換した。

【 0 2 6 0 】

11 日目 - 培地 1.5 ml を除去し、 2 ml の TeSR2 と交換した。各ウェル中の蛍光緑色のコロニーの数を大ざっぱに数えた。

【 0 2 6 1 】

13 日目 - 培地の 75% を除去した。 2 ml の TeSR2 を与えた。

【 0 2 6 2 】

15 日目 - TeSR2 を与えた

40

【 0 2 6 3 】

18 日目 - TeSR2 を与えた

【 0 2 6 4 】

19 日目 - 生きている細胞の染色、コロニー採取 (AS)

【 0 2 6 5 】

20 日目 - 生きている細胞の染色とコロニー採取 (SD)

【 0 2 6 6 】

piggyc Bac ベクターによる組み込みを使用した実験からの結果を以下に要約する。

- 同時の改変およびリプログラミング用の出発細胞：増殖させた 600 万個のヒト PBM

50

C (計6ウェル)

- 抗 T r a l 6 0 陽性 (赤色) かつ 緑色 z s G F P を発現している初期細胞コロニーの数 : 1 0 0 個代

- 抗 T r a l 6 0 陽性の初期細胞コロニー (赤色のみ) の数 : およそ 5 0

- 緑色のみの細胞の数 : 2

- p i g g y B a c に関する対照ウェル (トランスポサーゼを加えなかった) : 2 0 0 万個のヒト P B M C (計2ウェル)

- 抗 T r a l 6 0 陽性 (赤色) かつ 緑色 z s G F P を発現している初期細胞コロニーの数 : 0

- 抗 T r a l 6 0 陽性の初期細胞コロニー (赤色のみ) の数 : 1 0 0 個代

- 緑色のみの細胞の数 : 0

10

【0267】

実施例3 - エピソームリプログラミングおよびジンクフィンガーヌクレアーゼを使った P B M C ゲノムの改変

以下の実験条件以外は、実施例2で説明したのと同じ過程を使用した。

【0268】

ウェル2 . 1 ~ 2 . 6 : ジンクフィンガーヌクレアーゼによって導入される Z s G r e e n 遺伝子を発現させるための、ジンクフィンガーヌクレアーゼをコードしている R N A + リプログラミングベクター + ベクター 1 0 3 6。DNA は A A V S 1 ジンクフィンガー切断部位に挿入される。1 2 . 0 μ l のマスターミックス + 5 μ l の Z F N R N A + 1 0 0 万個の細胞を、下記表8に示すように、1ウェル当たりの1回のヌクレオフェクションに使用した。基本的な計画を図9に示す。

20

【0269】

【表8】

表8 : ジンクフィンガーヌクレオフェクションプレート

ベクター	μ l / R x N	7つの R x N 用、 μ l
# 3 4	2.96	20.72
# 3 6	3.2	22.4
# 1 2 3	2.28	15.96
# 1 0 3 6	3.6	25.2

30

【0270】

対照ウェル4 . 2 ~ 4 . 3 : これらののは汚染され、結果が出なかった。ジンクフィンガーヌクレアーゼをコードしている R N A なし + リプログラミング D N A ベクター + ベクター # 1 0 3 6。1 2 . 0 μ l のマスターミックス + 1 0 0 万個の細胞を、下記表9に示すように、1ウェル当たりの1回のヌクレオフェクションに使用した。

40

【0271】

【表 9】

表 9：対照スクレオフェクションプレート

ベクター	μ l / R x N	3.5つのR x N用、 μ l
# 3 4	2.96	20.72
# 3 6	3.2	22.4
# 1 2 3	2.28	15.96
# 1 0 3 6	3.6	25.2

10

【 0 2 7 2 】

適当量のマスターミックスをそれぞれのキュベットのそばに置いた（ジンクフィンガー m R N A を使用直前にマスターミックスに加えた）。以降の方法は実施例 2 で記載したものと同一とした。

20

【 0 2 7 3 】

ジンクフィンガーヌクレアーゼを使用した実験からの結果を以下に要約する。

【 0 2 7 4 】

- 同時の改変およびリプログラミング用の出発細胞：増殖させた 6 0 0 万個のヒト P B M C （ 6 ウェル）

【 0 2 7 5 】

- 抗 T r a 1 6 0 陽性（赤色）かつ緑色 z s G F P を発現している初期細胞コロニーの数： 1 5

【 0 2 7 6 】

- 抗 T r a 1 6 0 陽性の初期細胞コロニー（赤色のみ）の数：およそ 2 0 0

30

【 0 2 7 7 】

- 緑色のみの細胞の数： 1

【 0 2 7 8 】

- ジンクフィンガー実験に関する対照ウェル（ジンクフィンガーヌクレアーゼを加えなかった）：ウェルは両方とも汚染され、データが得られなかった。

【 0 2 7 9 】

- 抗 T r a 1 6 0 陽性（赤色）かつ緑色 z s G F P を発現している初期細胞コロニーの数： 0

【 0 2 8 0 】

- 抗 T r a 1 6 0 陽性の初期細胞コロニー（赤色のみ）の数： 1 0 0 個代

40

【 0 2 8 1 】

- 緑色のみの細胞の数： 0

【 0 2 8 2 】

実施例 4 - 連続的な方法と比べて、ゲノム改変と細胞リプログラミングを同時に行った場合の効率は明かである

図 1 0 に示すように、本発明の同時に行う細胞リプログラミングとゲノム改変過程は（図 1 0 の過程 3 ）、ゲノム改変の後に細胞リプログラミングを行った場合（図 1 0 の過程 2 ）と比較して、必要とされた時間が有意に短縮され、また、細胞リプログラミングの後にゲノム改変を行った場合（図 1 0 の過程 1 ）と比較すると、さらに時間が短縮された。かかった時間が短縮されたことに加えて、細胞のリプログラミングと改変を同時に行うと

50

、使用される材料（培養プレートなど）も有意に少なく済んだ。つまり、過程3は現在行われている最もよい実施方法と比較して、時間および材料の点で有意に効率的である。過程2を用いると、過程1よりもかかる時間が19%短縮され、プレートは60%少なくて済む。過程3を用いると、過程1よりもかかる時間が34%短縮され、プレートは61%少なくて済む。過程3を用いると、過程2よりもかかる時間が19%短縮され、使用するプレートの枚数はほぼ同じである。

【0283】

以下の記載は、細胞リプログラミングおよびゲノム改変工程を行っている間に使用されるマイクロプレートおよびフラスコに関する、詳細な事例解析である。

【0284】

単一提供源の試料に関するコロニー採取およびリプログラミング後の増殖：計44枚のプレートを使用して、3つのコロニーを得た。

【0285】

単一提供源の試料に関するコロニー採取およびゲノム改変後のiPSCの増殖：計69枚のプレートを使用して、3つのコロニーを得た。

【0286】

単一提供源に関する、初代細胞のゲノム改変とそれに続く薬剤選択と増殖：1枚のプレートと2T-フラスコを使用した、コロニーは採取されなかった。

【0287】

単一提供源の試料に関する初代細胞の同時のゲノム改変とリプログラミング：44プレートを使用して、3つのコロニーを得た。

【0288】

まとめると、過程1では、1つの提供源につき、113枚のプレート（69+44）が使用され、3つのコロニーが選択・解析された（さらに3つのコロニーを凍結した）。過程2および3では、それぞれ44枚または45枚のプレートが使用され、1つの提供源につき、およそ68枚のプレートが保存された。提供源試料の準備に高処理系を使用する場合、過程2または3のどちらかを行うことで、過程1と比べて、材料を有意に削減することができ、過程3ではさらに、時間も大きく短縮される（過程2と比較して19%の短縮）。つまり、細胞のリプログラミングとゲノムの改変を同時に行う過程3を使用すると、ゲノム改変したiPSCの生産の産業化に関する、現在行われている最もよい形態が有意に向上される。

【0289】

実施例5：MYH6遺伝子をターゲティングするTALEヌクレアーゼの設計

天然のMYH6プロモーターの制御下で融合タンパク質を生産するために、ヒトMYH6遺伝子の最後のイントロンを相同的組換えの標的とする。標的とするヒト配列染色体14（マイナス鎖）、イントロン38~39、位置23、851、273~23、851、636、は、364bpの長さである。Iowa State University websiteで提供されているソフトウェアプログラム（boglabx.plp.iastate.edu/TAL-ENT/）を使用して、TALEエフェクター結合部位（プラス鎖）の可能性があり、16~30bpのDNAを認識する部位を27カ所同定した。この配列のうちの16種類を下記表10に例示する。最適なDNA結合ドメインを選択するため、ヒトゲノムおよび転写された配列対する各配列の一意性を、BLAST相同性解析を使用して調査する。最適な配列とは、可能な限り長く、それでもなお、独自性を有し、かつ、最適な結合親和性のための適切な長さ（16~25bp）をもつものである。例えば、294番目にあるTALEN、HDはCに結合し、NGはTに結合し、NNはGに結合する。

【0290】

一般的に、複数のTALENを構築し、二本鎖に切断を導入する場合には、効率および特異性を試験する。それぞれのTALENについて、DNA切断部位におよび、隣接した相同的なアームの対を同定する。これらのアームは通常、500~1500bpの長さで

あるが、様々な範囲の長さのものを使用することができる。

【 0 2 9 1 】

設計した T A L E N を使った、体細胞の同時に行うゲノム改変とリプログラミングは、実施例 1 ～ 3 で概要を示したように達成することができる。しかしながら、この例における組み込み用ベクターは、M Y H 6 遺伝子の T A L E N 部位に隣接する M Y H 6 配列を含む。

【 0 2 9 2 】

【表 1 0】

表 1 0 : T A L エフェクター結合ドメインおよび M Y H 6 遺伝子における部位

TAL 開 TAL

始位置 長 RVD 配列(配列番号 5~20)

標的配列(配列番号 21~36)

294	17	HD NG NN NI NI NN NN NN HD NI HD HD HD NI NG NI NG	CTGAAGGGCACCCATAT
134	18	HD HD HD NI HD NN NG NG NI NN NI NN NN HD NI HD NG NG	CCCACGTTAGAGGCACTT
179	18	HD NG HD NG NN HD NI NN NI NI NN NG NG HD HD NI NN NG	CTCTGCAGAAGTTCCAGT
231	19	HD NG HD NI NN NN NG NG NI NG NN NG NI NI NN HD NG NI NG	CTCAGGTTATGTAAGCTAT
134	20	HD HD HD NI HD NN NG NG NI NN NI NN NN HD NI HD NG NG NN NG	CCCACGTTAGAGGCACTTGT
181	20	HD NG NN HD NI NN NI NI NN NG NG HD HD NI NN NG HD NI NN NG	CTGCAGAAGTTCCAGTCAGT
248	21	NI NG NN NN NN NI HD HD HD NG HD NI NN NI NI HD NG NN HD HD NG	ATGGGACCCTCAGAACTGCCT
179	22	HD NG HD NG NN HD NI NN NI NI NN NG NG HD HD NI NN NG HD NI NN NG	CTCTGCAGAAGTTCCAGTCAGT
287	22	NN HD HD HD NI HD NG HD NG NN NI NI NN NN NN HD NI HD HD HD NI NG	GCCCACTCTGAAGGGCACCCAT
250	23	NN NN NN NI HD HD HD NG HD NI NN NI NI HD NG NN HD HD NG NI HD NI NG	GGGACCCTCAGAACTGCCTACAT
226	24	NN NN NI NG NG HD NG HD NI NN NN NG NG NI NG NN NG NI NI NN HD NG NI NG	GGATTCTCAGGTTATGTAAGCTAT
241	24	NN NG NI NI NN HD NG NI NG NN NN NN NI HD HD HD NG HD NI NN NI NI HD NG	GTAAGCTATGGGACCCTCAGAACT
287	24	NN HD HD HD NI HD NG HD NG NN NI NI NN NN NN HD NI HD HD HD NI NG NI NG	GCCCACTCTGAAGGGCACCCATAT
248	25	NI NG NN NN NN NI HD HD HD NG HD NI NN NI NI HD NG NN HD HD NG NI HD NI NG	ATGGGACCCTCAGAACTGCCTACAT
250	25	NN NN NN NI HD HD HD NG HD NI NN NI NI HD NG NN HD HD NG NI HD NI NG NI NG	GGGACCCTCAGAACTGCCTACATAT
269	25	NI HD NI NG NI NG NI NN NN NN HD NI NI NN HD NI NN NG NN HD HD HD NI HD NG	ACATATAGGGCAAGCAGTGCCCACT

【 0 2 9 3 】

本明細書で開示し、請求する全ての方法は、本開示を踏まえて、過度の実験なしに、作成および実行することができる。本発明の組成物および方法を好ましい態様の観点から説明してきたが、本発明の概念、精神および範囲から逸脱することなく、本明細書に記載の方法および工程または方法の工程の順序に、変更を適用してもよいことは、当業者には明かである。より具体的には、化学および生理学の両面で関連のある特定の薬剤を、本明細書に記載の薬剤と置き換えてもよく、同時に、同じまたは同様の結果が達成されるであろうことも明かである。そのような、当業者に明かな類似する置換および変更は、添付の請求項によって定義される本発明の精神、範囲および概念の内にあると見なされる。

【 0 2 9 4 】

参考文献

以下の参考文献は、例示となる方法の詳細または本明細書に示すものへの捕捉となる他

の詳細を提供する範囲で、参照することによって本明細書に組み込まれる。

U . S .	P a t e n t	4 , 6 8 3 , 2 0 2	
U . S .	P a t e n t	5 , 3 0 2 , 5 2 3	
U . S .	P a t e n t	5 , 3 2 2 , 7 8 3	
U . S .	P a t e n t	5 , 3 8 4 , 2 5 3	
U . S .	P a t e n t	5 , 4 6 4 , 7 6 5	
U . S .	P a t e n t	5 , 4 7 8 , 8 3 8	
U . S .	P a t e n t	5 , 5 3 8 , 8 7 7	
U . S .	P a t e n t	5 , 5 3 8 , 8 8 0	
U . S .	P a t e n t	5 , 5 5 0 , 3 1 8	10
U . S .	P a t e n t	5 , 5 6 3 , 0 5 5	
U . S .	P a t e n t	5 , 5 8 0 , 8 5 9	
U . S .	P a t e n t	5 , 5 8 9 , 4 6 6	
U . S .	P a t e n t	5 , 6 1 0 , 0 4 2	
U . S .	P a t e n t	5 , 6 5 6 , 6 1 0	
U . S .	P a t e n t	5 , 7 0 2 , 9 3 2	
U . S .	P a t e n t	5 , 7 3 6 , 5 2 4	
U . S .	P a t e n t	5 , 7 8 0 , 4 4 8	
U . S .	P a t e n t	5 , 7 8 9 , 2 1 5	
U . S .	P a t e n t	5 , 9 2 5 , 5 6 5	20
U . S .	P a t e n t	5 , 9 2 8 , 9 0 6	
U . S .	P a t e n t	5 , 9 3 5 , 8 1 9	
U . S .	P a t e n t	5 , 9 4 5 , 1 0 0	
U . S .	P a t e n t	5 , 9 8 1 , 2 7 4	
U . S .	P a t e n t	5 , 9 9 4 , 6 2 4	
U . S .	P a t e n t	6 , 8 3 3 , 2 6 9	
U . S .	A p p l n .	1 2 / 4 7 8 , 1 5 4	
U . S .	P a t e n t	P u b l n . 2 0 0 2 / 0 0 7 6 9 7 6	
U . S .	P a t e n t	P u b l n . 2 0 0 3 / 0 0 5 9 9 1 3	
U . S .	P a t e n t	P u b l n . 2 0 0 3 / 0 0 6 2 2 2 5	30
U . S .	P a t e n t	P u b l n . 2 0 0 3 / 0 0 6 2 2 2 7	
U . S .	P a t e n t	P u b l n . 2 0 0 3 / 0 0 8 7 9 1 9	
U . S .	P a t e n t	P u b l n . 2 0 0 3 / 0 1 2 5 3 4 4	
U . S .	P a t e n t	P u b l n . 2 0 0 3 / 0 2 1 1 6 0 3	
U . S .	P a t e n t	P u b l n . 2 0 0 4 / 0 0 0 2 5 0 7	
U . S .	P a t e n t	P u b l n . 2 0 0 4 / 0 0 0 2 5 0 8	
U . S .	P a t e n t	P u b l n . 2 0 0 4 / 0 0 1 4 7 5 5	
U . S .	P a t e n t	P u b l n . 2 0 0 4 / 0 0 3 9 7 9 6	
U . S .	P a t e n t	P u b l n . 2 0 0 5 / 0 1 9 2 3 0 4	
U . S .	P a t e n t	P u b l n . 2 0 0 5 / 0 2 0 9 2 6 1	40
U . S .	P a t e n t	P u b l n . 2 0 0 5 / 1 2 3 9 0 2	
U . S .	P a t e n t	P u b l n . 2 0 0 7 / 0 1 1 6 6 8 0	
U . S .	P a t e n t	P u b l n . 2 0 0 7 / 0 2 3 8 1 7 0	
U . S .	P a t e n t	P u b l n . 2 0 0 8 / 0 0 4 2 8 7	
U . S .	P a t e n t	P u b l n . 2 0 0 8 / 0 1 7 1 3 8 5	
A p r a c t i c a l a p p r o a c h , 1 9 8 7 .			
A d a m s , J . V i r o l . , 6 1 (5) : 1 7 4 3 - 1 7 4 6 , 1 9 8 7 .			
A i y a r e t a l . , E M B O J . , 1 7 (2 1) : 6 3 9 4 - 6 4 0 3 , 1 9 9 8 .			50

- Alexander et al. , Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5092-5096, 1988.
- Altmann et al, Proc. Natl. Acad. Sci. US A, 103(38): 14188-14193, 2006.
- Amit et al. , Dev Biol., 227(2):271-8, 2000.
- Animal Cell Culture, 1987.
- Aravind and Landsman, Nucleic Acids Res., 26(19):4413-4421, 1998.
- Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1994.
- Baer e/ tf/. , Biochemistry, 39:7041-7049, 2000.
- Baer e/ / . , Nature, 310(5974):207-211, 1984.
- Bain et al , Biochem. J., 408(3):297-315, 2007.
- Bennett et al, J. Biol. Chem., 277:34, 2002.
- Bertrand et al, J. Mol Biol, 333(2):393-407, 2003.
- Bingham, Cell, 90(3):385-387, 1997.
- Bochkarev et al, Cell, 84(5):791-800, 1996.
- Bode et . , i . Chem., 381:801-813, 2000.
- Bode et al, Gene Ther. Mol. Biol., 6:33-46, 2001.
- Bode et al, Science, 255(5041):195-197, 1992.
- Buecker et al, Cell Stem Cell, 6:535-546, 2010.
- Buehr et al , Cell, 135:1287, 2008.
- Carbonelli et al , FEMS Microbiol. Lett., 177(1):75-82, 1999.
- Cermak et al, Nucleic Acids Res., 39(12):e82, 2011.
- Chandler e/ al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(8):3596-601, 1997.
- Chang, et al , Frontiers in Bioscience, 12:4393-4401, 2007.
- Chaudhuri et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98(18):10085-10089, 2001.
- Chen and Okayama, Mol. Cell Biol, 7(8):2745-2752, 1987.
- Chen et al, Nature Methods, 8:424-429, 2011.
- Chen et al , Cell Stem Cell, 7:240-248, 2010.

- Chen et al, Gene Ther., 11 : 856 - 864, 2004.
- Chin et al, Molecular Brain Res., 137 (1-2) : 193 - 201, 2005.
- Chow et al, Cytometry Commun. Clinical Cytometry, 46 : 72 - 78, 2001.
- Christian et al, Genetics, 186 (2) : 757 - 761, 2010.
- Cocea, Biotechniques, 23 (5) : 814 - 816, 1997. 10
- Current Protocols in Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 1987; 1995.
- DaCosta et al., Molec. Pharmacol, 65 (3) : 744 - 752, 2004.
- Davies et al, Biochem J., 351 : 95 - 105, 2000.
- deFelipe, Curr. Gene Ther., 2 : 355 - 378, 2002. 20
- de Gouvillle et al, Drug News Perspective, 19 (2) : 85 - 90, 2006.
- Dhar et al, Cell, 106 (3) : 287 - 296, 2001.
- Downey et al, J. Biol. Chem., 271 (35) : 21005 - 21011, 1996.
- Embryonic Stem Cell Differentiation in vitro, 1993.
- English et al, Trends in Pharmac. Sci., 23 (1) : 40 - 45, 2002.
- Ercolani et al, J. Biol. Chem., 263 : 15335 - 15341, 1988. 30
- Ermakova et al, J. Biol. Chem., 271 (51) : 33009 - 33017, 1996.
- Esteban et al, J. Biol. Chem., 284 : 17634 - 17640, 2009.
- European Appln. EPO 0273085
- Evans and Kaufman, Nature, 292 : 154 - 156, 1981.
- Evans, et al, In: Cancer Principles and Practice of Oncology, Devita et al. (Eds.), Lippincott-Raven, NY, 1054 - 1087, 1997. 40
- Fechheimer et al, Proc Natl. Acad. Sci. USA, 84 : 8463 - 8467, 1987.
- Fernandes et al, Nature Cell Biology, 6 : 1082 - 1093, 2004.
- Fischer et al, J. Virol, 71 : 5148 - 5146, 1997.
- Fraley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76 : 3348 - 3352, 1979. 50

- Frame et al, Biochemical J, 359: 1 - 16, 2001.
- Frappier and O'Donnell, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 88(23): 10875 - 10879, 1991.
- Fusaki et al., Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci., 85 : 348 - 362, 2009.
- Gahn and Schildkraut, Cell, 58(3): 527 - 535, 1989.
- Gahn and Sugden, J. Virol, 69(4): 2633 - 2636, 1995. 10
- Garrick et al, Nat. Genet., 18: 56 - 59, 1998.
- Gellibert, et al., J. Med. Chem., 49(7): 2210 - 2221, 2006.
- Gene Targeting, A Practical Approach, 1993.
- Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, 1987.
- Ghosh and Bachhawat, In: Liver Diseases, Targeted Diagnosis and Therapy Using Specific Receptors and Ligands, Wu et al. (Eds.), Marcel Dekker, NY, 87 - 104, 1991. 20
- Gopal, Mol. Cell Biol, 5 : 1188 - 1190, 1985.
- Gould et al, Intl. J. Neuropsychopharmacology, 7: 387 - 390, 2004.
- Gould et al, Pharmacological Res., 48: 49 - 53, 2003.
- Graham and Van Der Eb, Virology, 52: 456 - 467, 1973. 30
- Guide to Techniques in Mouse Development (1993)
- Hanna et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 107: 9222 - 9227, 2010.
- Harb et al, PLoS One, 3(8): e3001, 2008.
- Harland and Weintraub, J. Cell Biol, 101(3): 1094 - 1099, 1985.
- Hegde et al, Nature, 359(6395): 505 - 512, 1992. 40
- Hogan et al, In: Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
- Hung et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 98(4): 1865 - 1870, 2001.
- Inman et al, Molec. Pharmacol, 62(1): 65 - 74, 2002.
- Jainchille et al., J. Virol, 4(5): 549 - 553, 50

- 1969.
- Jenke et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101 (31), 11322-11327, 2004.
- Jia et al, Nat. Methods, 7: 197-199, 2010.
- Julien et al, Virology, 326(2):317-328, 2004.
- Kaepplere/tf/, Plant Cell Reports, 9:415-418, 1990.
- Kahn et al, Molecular Therapy, 18(6): 1192-1199, 2010. 10
- Kaji et al, Nature, 458:771-775, 2009.
- Kameda et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 349:1269-1277, 2006.
- Kaminska et al., Acta Biochimica Polonica, 52(2):329-337, 2005.
- Kandae/a/, Mol. Cell. Biol, 21(10):3576-3588, 2001.
- Kaneda et al., Science, 243:375-378, 1989. 20
- Karin et al. Cell, 36:371-379, 1989.
- Kato et al, J. Biol. Chem., 266:3361-3364, 1991.
- Keller et al, Curr. Opin. Cell Biol, 7(6):862-9, 1995.
- Kennedy and Sugden, Mol. Cell. Biol, 23(19):6901-6908, 2003.
- Kennedy et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100:14269-14274, 2003.
- Kim et al, Cell Stem Cell, 4:472, 2009. 30
- Kim et al, J. Biol. Chem., 275(40):31245-31254, 2000.
- Kim et al, Virology, 239(2):340-351, 1997.
- Kim et al., Xenobiotica, 38(3):325-339, 2008.
- Kirchmaier and Sugden, J. Virol, 69(2):1280-1283, 1995.
- Kirchmaier and Sugden, J. Virol, 72(6):4657-4666, 1998. 40
- Klein et al, Neoplasia, 8:1-8, 2006.
- Klein et al, Nature, 327:70-73, 1987.
- Klimanskaya et al, Lancet., 365(9471): 1636-41, 2005.
- Kodama et al. J. Cell Physiol, 112(1):89-95, 1982.
- Langley-Rouault et al, J. Virol, 72(7):6181-6185, 1998.
- Leight and Sugden, Mol. Cell Bio., 21:4149-61, 2001. 50

- Levenson et al, Hum. Gene Ther., 9(8):1233-1236, 1998.
- Levitskaya et al, Nature, 375(6533):685-688, 1995.
- Levitskaya et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(23):12616-12621, 1997.
- Li et al, Cell Stem Cell, 4:16, 2009.
- Li et al, Cell Stem Cell, 4:16-19, 2009.
- Li et al, Cell, 135:1299, 2008.
- Li et al, Nucleic Acids Res., 39(1):359-372, 2011. 10
- Lin et al, Nat. Methods, 6:805-808, 2009.
- Lindner and Sugden, Plasmid, 58:1-12, 2007.
- Lindner et al. J. Virol., 82(12):5693-702, 2008.
- Liu et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 346:131-139, 2006.
- Liu et al, Cell Stem Cell 3, 587-590, 2008. 20
- s et al, Blood, 113:5476-5479, 2009.
- Lowry et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105:2883, 2008.
- Ludwig et al, Nat. Biotechnol, 24(2):185-187, 2006b.
- Ludwig et al, Nat. Methods, 3(8):637-46, 2006a.
- Ludwig et al, Nat. Methods, 3:637-646, 2006c. 30
- Macejak and Sarnow, Nature, 353:90-94, 1991.
- Mackey and Sugden, Mol. Cell Biol, 19(5):3349-3359, 1999.
- Mackey et al, J. Virol, 69(10):6199-6208, 1995.
- Maniatis, et al, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988. 40
- Manzini et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 103(47):17672-17677, 2006.
- Marechal et al, J. Virol, 73(5):4385-4392, 1999.
- Martin, et al, Nature Immunology, 6:111-184, 2005.
- Martin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78(12):7634-8, 1981.
- Mattingly et al, J. Pharmacol. Experimen. Therap., 316:456-465, 2006. 50

- Middleton and Sugden, J. Virol., 66(1): 489-495, 1992.
- Middleton and Sugden, J. Virol., 68: 4067-4071, 1994.
- Miller et al, Nat. Biotechnol., 29(2): 143-148, 2011.
- Nabel et al, Science, 244(4910): 1342-1344, 1989.
- Nakagawa et al. Proc. Natl Acad. Sci. USA, 107(32): 14152-7, 2010. Nakano et al, Science, 272(5262): 722-4, 1996.
- Nanbo et al., EMBO J, 26: 4252-62, 2007.
- Ng, Nuc. Acid Res., 17: 601-615, 1989.
- Nicolau and Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721: 185-190, 1982.
- Nicolau et al, Methods Enzymol, 149: 157-176, 1987.
- et al, J. Biol. Chem., 270(21): 12864-12868, 1995.
- Noble et al, Proc. Natl. Acad. Science, USA, 102: 6990-6995, 2005.
- Okita et al, Nature, 448: 313, 2007.
- Okita et al, Nature, 448: 313-317, 2007.
- Okita et al, Science, 322: 949, 2008.
- Okita et al, Science, 322: 949-953, 2008.
- Park et al., Nature, 451: 141, 2008.
- PCT Appln. WO 2007/113505
- PCT Appln. WO 2008/006583
- PCT Appln. WO 2008/094597
- PCT Appln. WO 94/09699
- PCT Appln. WO 95/06128
- PCT Publn. PCT 2005/080554
- PCT Publn. WO 01/088100
- PCT Publn. WO 98/30679
- Pelletier and Sonenberg, Nature, 334(6180): 320-325, 1988.
- Perales et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 4086-4090, 1994.
- Piechaczek et al, Nucleic Acids Res., 27(2): 426-428, 1999.
- Potrykus et al, Mol. Gen. Genet., 199(2): 169-177, 1985.
- Potter et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81: 7161-7165, 1984.
- Properties and uses of Embryonic Stem Cells: Prospects for Application to Human Biology and Gene Therapy (1998)
- Quitsche et al, J. Biol. Chem., 264: 9539

- 9545, 1989.

Rawlins et al, Cell, 42((3):859-868, 1985.

Reisman and Sugden, Mol. Cell. Biol, 6(1):3838-3846, 1986.

Reisman et al, Mol. Cell. Biol, 5(8):1822-1832, 1985.

Richards et al, Cell, 37:263-272, 1984.

Rinehart et al., J. Clinical Oncol, 22:4456-4462, 2004.

Ring et al, Diabetes, 52:588-595, 2003.

Rippe, et al, Mol. Cell Biol, 10:689-695, 1990.

Ritzi et al, J. Cell Set, 116(Pt 19):3971-3984, 2003.

Ryan et al, J. Gener. Virol, 78:699-722, 1997.

Sambrook et al, In: Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor

Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Schaarschmidt et al, EMBO J., 23(1):191-201, 2004.

Schaffer et al, Gene, 302(1-2):73-81, 2003.

Schepers et al, EMBO J., 20(16):4588-4602, 2001.

Scymczak et al, Nature Biotech., 5:589-594, 2004.

Sears et al, J. Virol, 77(21):11767-11780, 2003.

Sears et al, J. Virol, 78(21):11487-11505, 2004.

Shi et al, Cell Stem Cell, 3:568, 2008.

Shimada et al, Mol Reprod. Dev, 77:2, 2010.

Shire et al, J. Virol, 73(4):2587-2595, 1999.

Silva et al, PLoS Biol, 6:e253, 2008.

Stadtfield et al, Cell Stem Cell, 2:230-240, 2008.

Stadtfield et al, Science, 322:945, 2008.

Stadtfield et al, Science, 322:945-949, 2008.

Su et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88(23):10870-10874, 1991.

Sugden and Warren, J. Virol, 63(6):2644

10

20

30

40

50

- 2649, 1989.
- Sun et al, Proc. Natl Acad. Sci. USA, 106: 15720-15725, 2009.
- Suzuki et al, Cancer Res., 67(5): 2351-2359, 2007.
- Takahashi et al, Cell, 126(4): 663-676, 2006.
- Takahashi et al, Cell, 131: 861, 2007.
- Thomson et al, Science, 282: 1145, 1998.
- Tojo, et al, Cancer Science, 96(11): 791-800, 2005,
- Tur-Kaspa et al, Mol. Cell Biol, 6: 716-718, 1986.
- Wagman, Current Pharmaceutical Design, 10: 1105-1137, 2004.
- Wagner et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87(9): 3410-3414, 1990.
- Wang et al, Mol. Cell. Biol, 26(3): 1124-1134, 2006.
- Watanabe et al, Nat. Biotechnol, 25: 681-686, 2007.
- Watanabe et al, Nat. Neurosci., 8(3): 288-96, 2005.
- Weber et al, PLoS One, 6(5): e19722, 2011.
- Wernig et al, Nature, 448(7151): 318-24, 2007.
- Wilson et al, Science, 244: 1344-1346, 1989.
- Woltjen et al, Nature, 458: 766, 2009.
- Woltjen et al, Nature, 458: 766-770, 2009.
- Wong et al, Gene, 10: 87-94, 1980.
- Wrzesinski et al, Clinical Cancer Res., 13(18): 5262-5270, 2007. Wu and Wu, Adv. Drug Delivery Rev., 12: 159-167, 1993.
- Wu and Wu, Biochemistry, 27: 887-892, 1988.
- Wu and Wu, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432, 1987.
- Wu et al, J. Virol, 76(5): 2480-2490, 2002.
- Wysokenski and Yates, J. Virol, 63(6): 2657-2666, 1989.
- Xu et al., Nat. Biotechnol, 19: 971, 2001.
- Xu et al, Nat. Biotechnol, 19: 971-974, 2001.
- Yamanaka et al, Cell, 131(5): 861-72, 2002.

007.

Yang and Russell, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:4144-4148, 1990.

Yates and Guan, J. Virol., 65(1):483-488, 1991.

Yates and Guan, J. Virol., 65:483-488, 1991.

Yates et al., J. Virol., 74(10):4512-4522, 2000.

Yates et al, Nature, 313:812-815, 1985. 10

Yates et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3806-3810, 1984.

Yates, Cancer Cells, (6) 197-205, 1988.

Yin et al, Science, 301(5638):1371-1374, 2003.

Ying, Nature, 453:519-23, 2008.

Yu et al, Science, 318:1917, 2007.

Yu et al, Science, 324:797, 2009.

Yu et al, Science, 324:797-801, 2009.

Zhang et al, Bioorganic Med. Chem. Letters; 10:2825-2828, 2000. Zhang et al, Nat. Biotechnol, 29(2):149-153, 2011. 20

Zhou and Freed, Stem Cells, 2009 (Ahead of Epub Print).

Zhou et al, Cell Stem Cell, 4:381-384, 2009.

Zhou et al, EMBO J., 24(7):1406-1417, 2005.

【図 1】

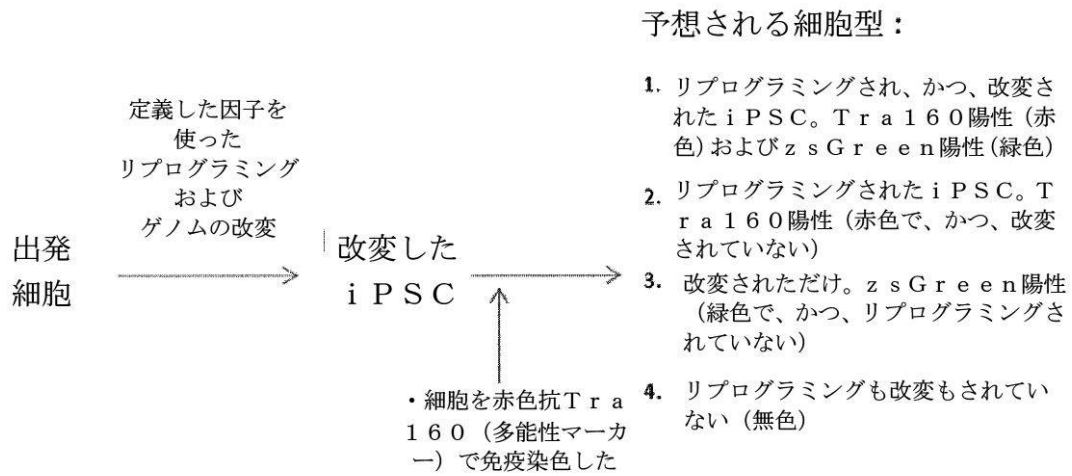


図 1

アンピシリン耐性

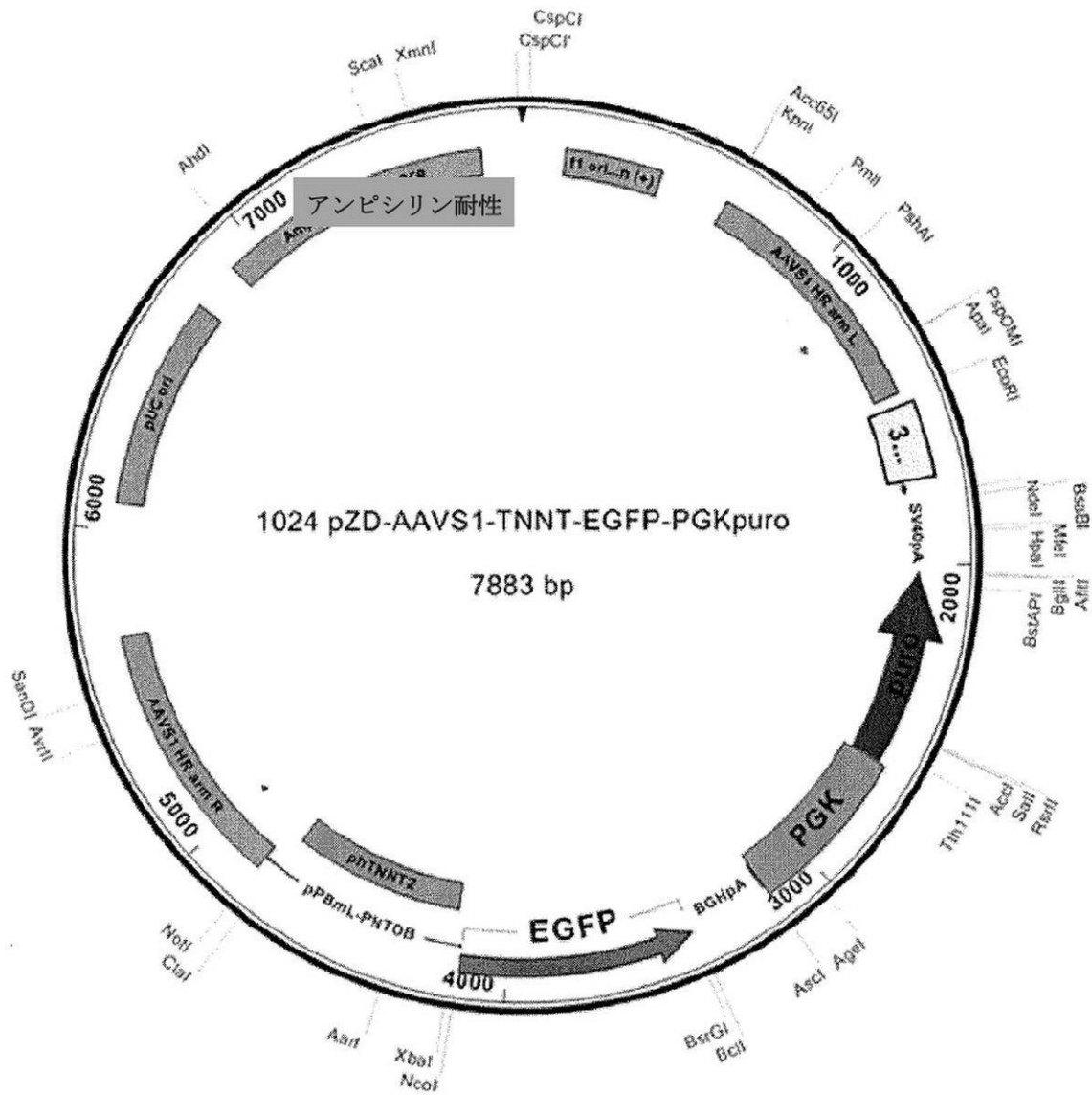


图 2

【 図 3 】

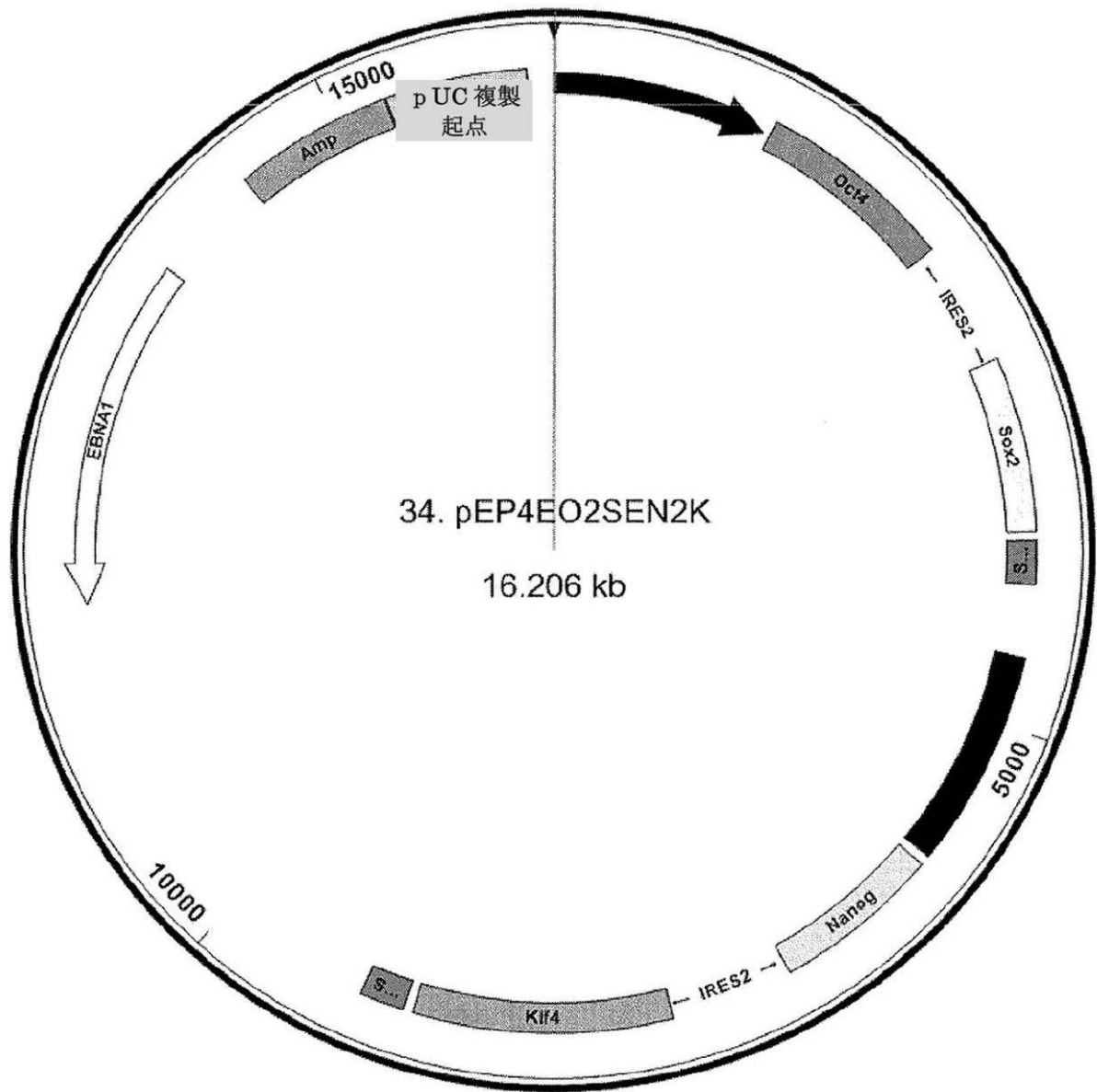


図 3

【 図 4 】

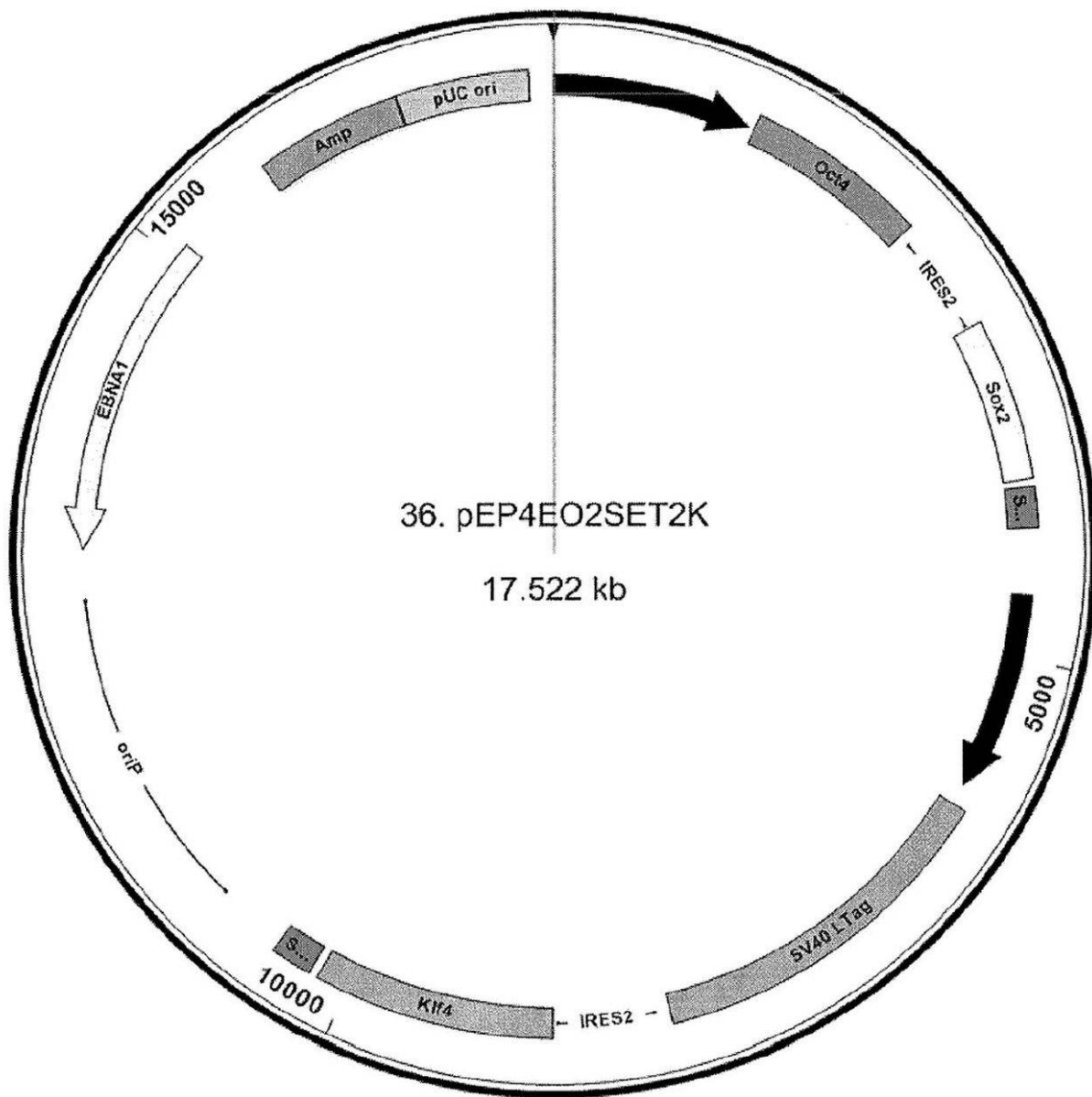


図 4

【 図 5 】

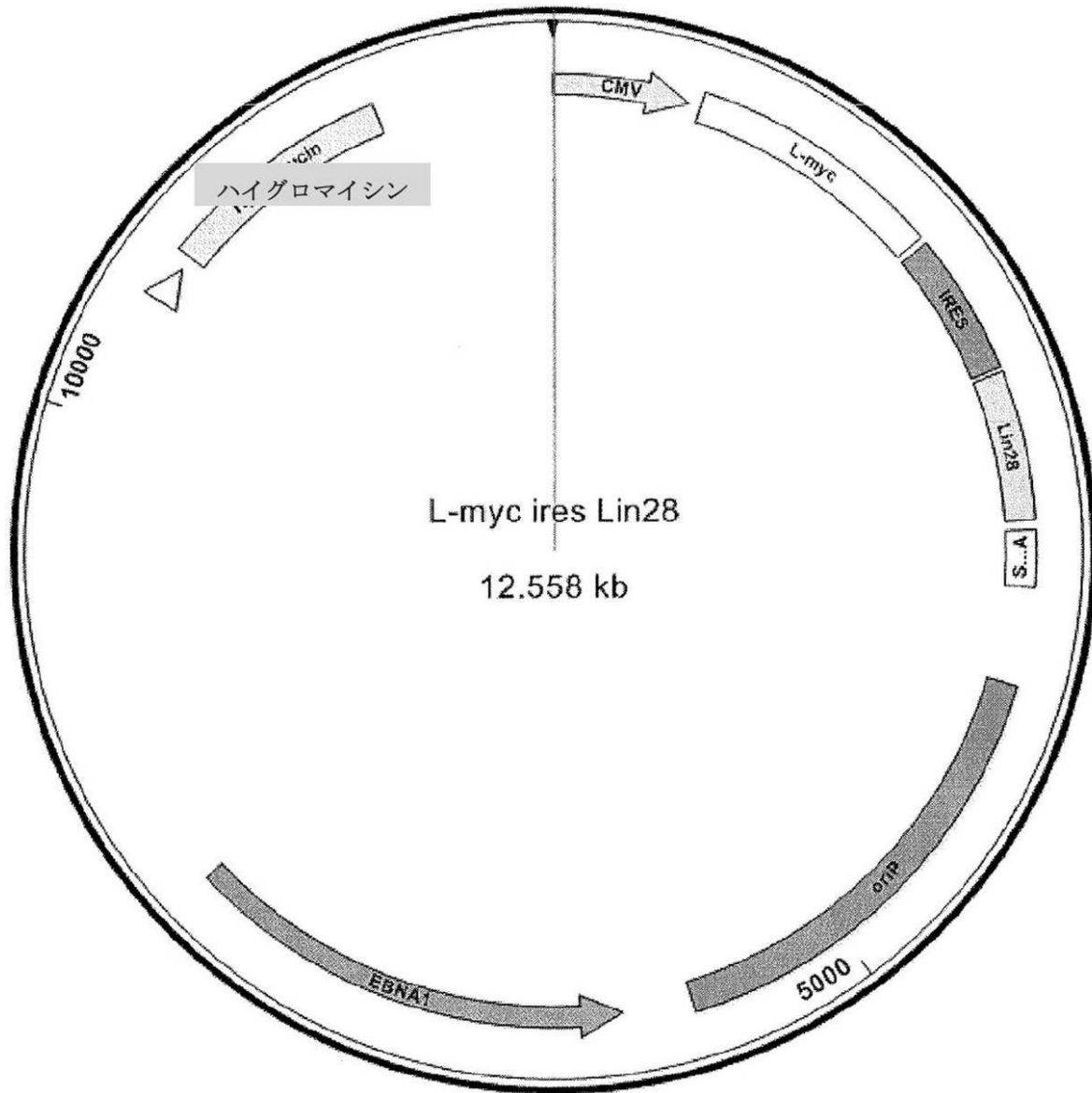


図 5

アンピシリン耐性

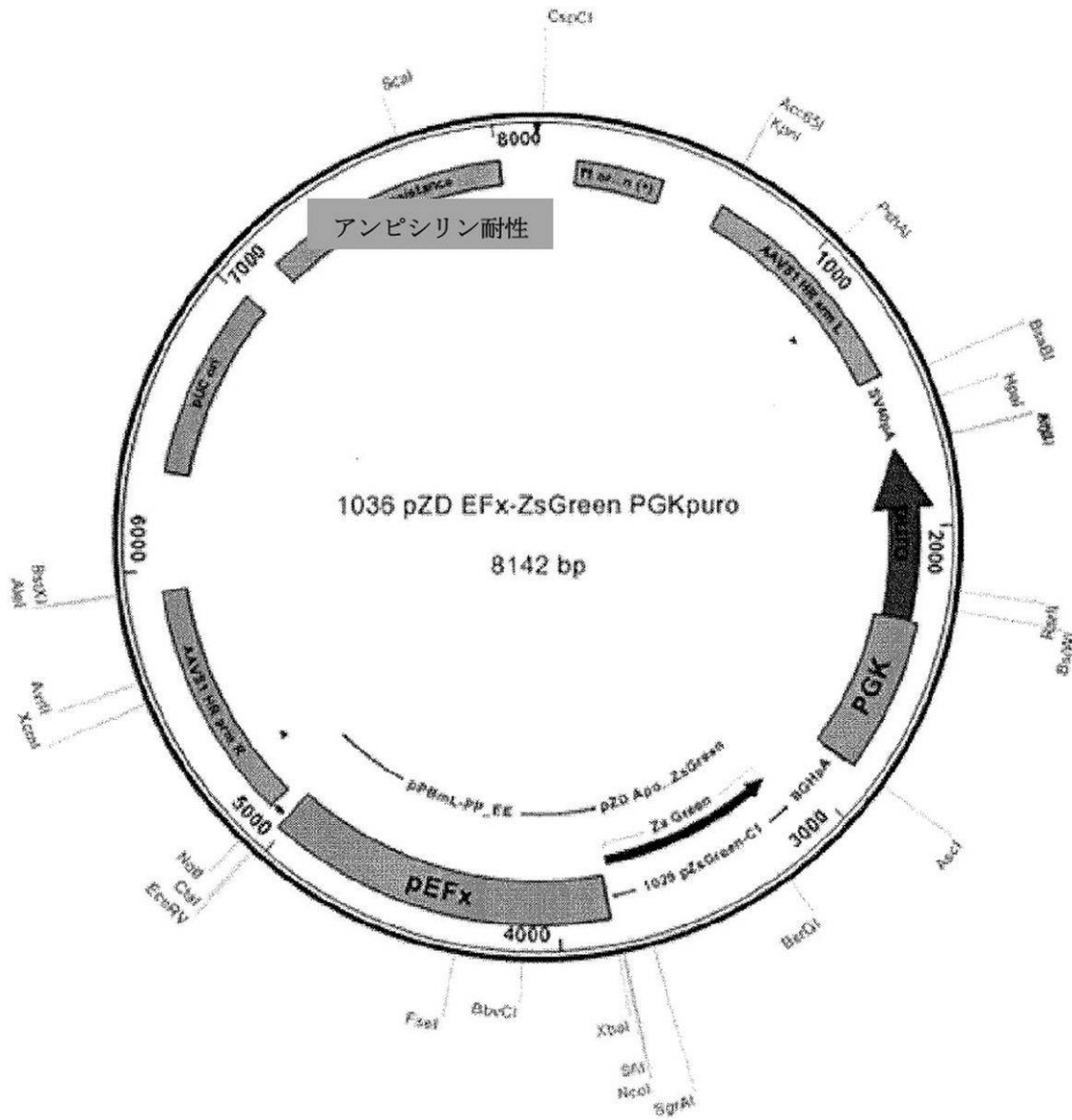


图 6

【 図 7 】

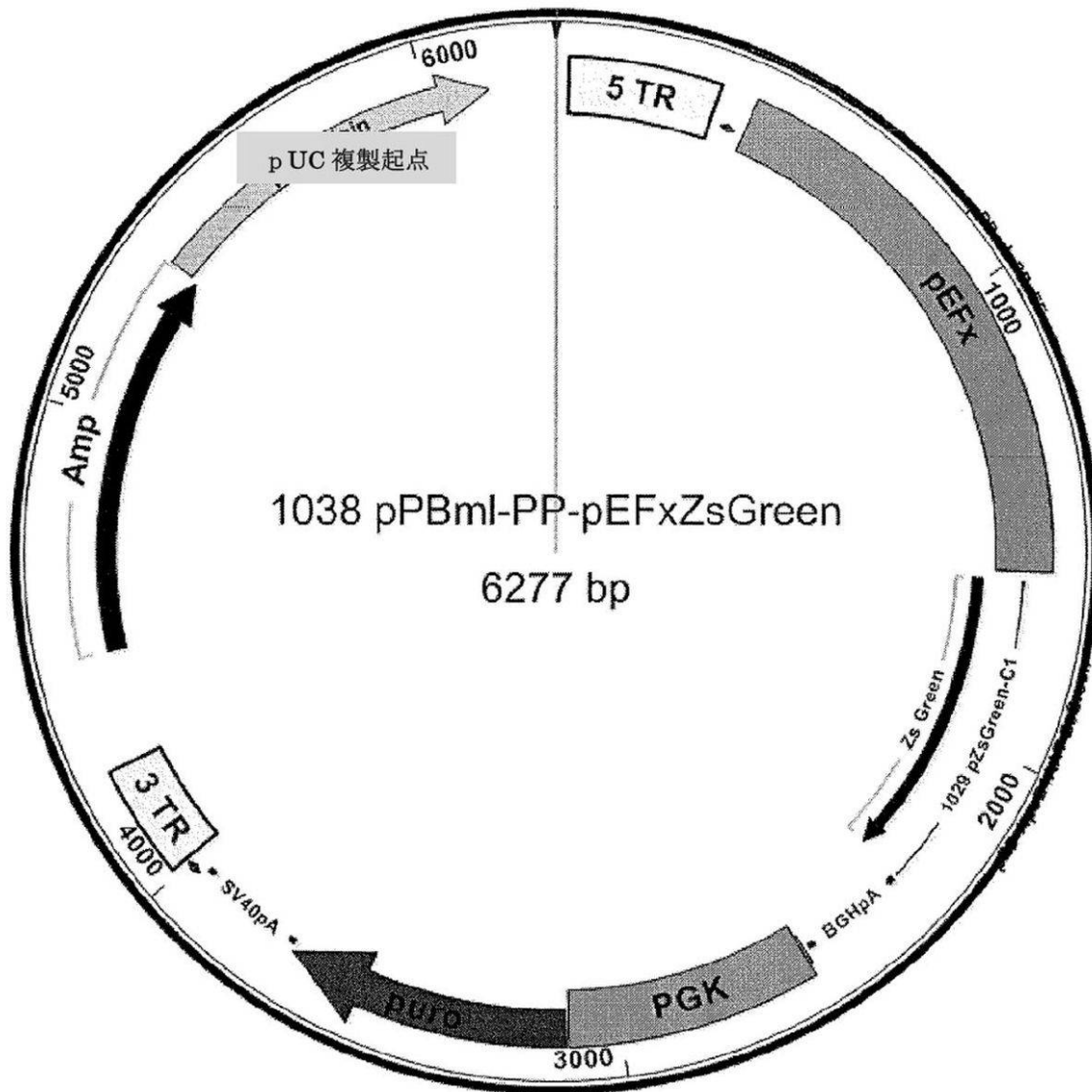


図 7

【図 8】

予想される細胞型:

1. リプログラミングされ、かつ、改変された iPSC。Tra160 陽性 (赤色) および zsGreen 陽性 (緑色)

2. リプログラミングされた iPSC。Tra160 陽性 (赤色で、かつ、改変されていない)

3. 改変されただけ。zsGreen 陽性 (緑色で、かつ、リプログラミングされていない)

4. リプログラミングも改変もされていない (無色)

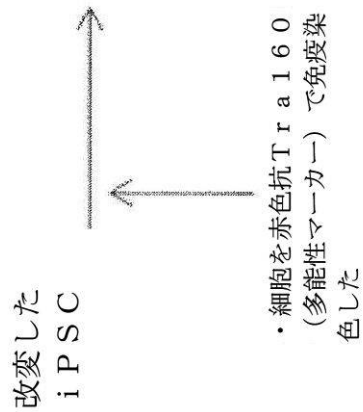


図 8

【図 9】

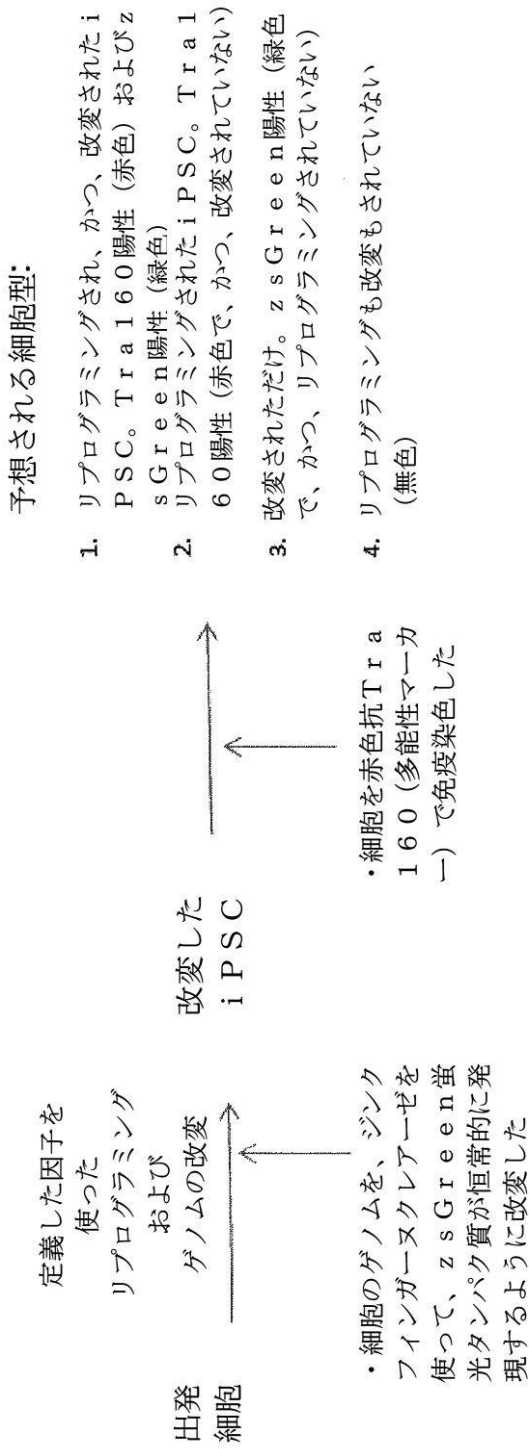


図 9

【図 10】

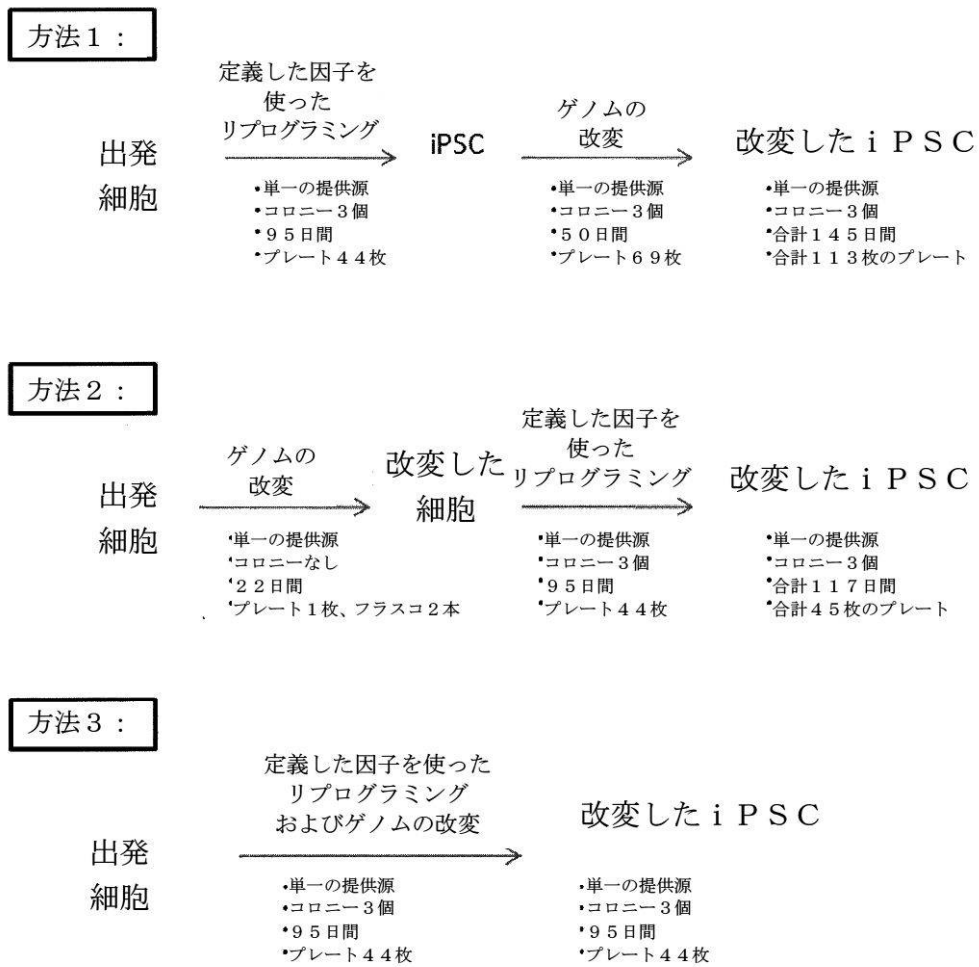


図 10

【配列表】

2014520551000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/046194

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N5/073 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) EP0-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/042490 A1 (BOSTON MEDICAL CT CORP [US]; MOSTOSLAVSKY GUSTAVO [US]; SOMMER CESAR A) 15 April 2010 (2010-04-15) example 2	1-41
X	WOLTJEN KNUT ET AL: "piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells", NATURE: INTERNATIONAL WEEKLY JOURNAL OF SCIENCE, NATURE PUBLISHING GROUP, UNITED KINGDOM, vol. 458, no. 7239, 9 April 2009 (2009-04-09), pages 766-770, XP009139776, ISSN: 0028-0836 figure 1 ----- -/--	1-41
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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
12 October 2012		26/10/2012
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Trommsdorff, Marion

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/046194

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	AKITSU HOTTA ET AL: "Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency", NATURE METHODS, vol. 6, no. 5, 1 May 2009 (2009-05-01), pages 370-376, XP55040636, ISSN: 1548-7091, DOI: 10.1038/nmeth.1325 figure 3 -----	1-41
X	OKITA KEISUKE ET AL: "Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, WASHINGTON, DC; US, vol. 322, no. 5903, 7 November 2008 (2008-11-07), pages 949-953, XP002531346, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/SCIENCE.1164270 figure 2 -----	1-41
X	STADTFELD MATTHIAS ET AL: "Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, WASHINGTON, DC; US, vol. 322, no. 5903, 7 November 2008 (2008-11-07), pages 945-949, XP002531345, ISSN: 0036-8075, DOI: 10.1126/SCIENCE.1162494 the whole document -----	1-41
X	J. ZOU ET AL: "Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting", BLOOD, vol. 117, no. 21, 26 May 2011 (2011-05-26), pages 5561-5572, XP55040721, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2010-12-328161 the whole document ----- -/--	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2012/046194

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>YU JUNYING ET AL: "Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences", SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 324, no. 5928, 8 May 2009 (2009-05-08), pages 797-801, XP002596377, ISSN: 1095-9203, DOI: 10.1126/SCIENCE.1172482 [retrieved on 2009-03-26] figure 2</p> <p>-----</p>	1-41
X	<p>HOCKEMEYER DIRK ET AL: "Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 27, no. 9, 1 September 2009 (2009-09-01), pages 851-857, XP009143038, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT.1562 the whole document</p> <p>-----</p>	1-41

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/046194

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010042490 A1	15-04-2010	US 2011236966 A1	29-09-2011
		WO 2010042490 A1	15-04-2010

フロントページの続き

(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, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 パーク, トーマス

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53711, マディソン, サイエンス ドライブ 525, スイート 200, ユニバーシティ リサーチ パーク, セルラー ダイナミクス インターナショナル, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ミラー, マイケル

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53711, マディソン, サイエンス ドライブ 525, スイート 200, ユニバーシティ リサーチ パーク, セルラー ダイナミクス インターナショナル, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 マクラクラン, マイケル

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53711, マディソン, サイエンス ドライブ 525, スイート 200, ユニバーシティ リサーチ パーク, セルラー ダイナミクス インターナショナル, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ディカーソン, サラ

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53711, マディソン, サイエンス ドライブ 525, スイート 200, ユニバーシティ リサーチ パーク, セルラー ダイナミクス インターナショナル, インコーポレイテッド 気付

(72)発明者 ストラウス, アン

アメリカ合衆国 ウィスコンシン 53711, マディソン, サイエンス ドライブ 525, スイート 200, ユニバーシティ リサーチ パーク, セルラー ダイナミクス インターナショナル, インコーポレイテッド 気付

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA01 DA02 GA11 HA20

4B065 AA90X AA90Y AB01 BA01 BB34 BB40 CA44