

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-530919
(P2023-530919A)

(43)公表日 令和5年7月20日(2023.7.20)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	Z N A 4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 C 0 8 7
C 1 2 N 1/00 (2006.01)	C 1 2 N 1/00	B
A 6 1 K 35/545 (2015.01)	A 6 1 K 35/545	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全83頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-576374(P2022-576374)
 (86)(22)出願日 令和3年6月16日(2021.6.16)
 (85)翻訳文提出日 令和5年2月3日(2023.2.3)
 (86)国際出願番号 PCT/US2021/037594
 (87)国際公開番号 WO2021/257679
 (87)国際公開日 令和3年12月23日(2021.12.23)
 (31)優先権主張番号 63/040,398
 (32)優先日 令和2年6月17日(2020.6.17)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 (31)優先権主張番号 63/040,397
 (32)優先日 令和2年6月17日(2020.6.17)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)
 (31)優先権主張番号 63/040,392

(71)出願人 509087759
 ヤンセン バイオテック, インコーポレ
 ーテッド
 アメリカ合衆国ペンシルベニア州 1 9 0
 4 4 ホーシャム・リτζビユードライブ
 8 0 0 / 8 5 0
 (74)代理人 100092783
 弁理士 小林 浩
 (74)代理人 100095360
 弁理士 片山 英二
 (74)代理人 100093676
 弁理士 小林 純子
 (74)代理人 100120134
 弁理士 大森 規雄
 (74)代理人 100196966

最終頁に続く

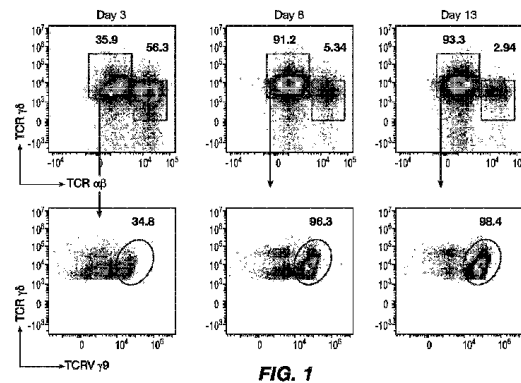
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 多能性幹細胞の製造のための材料及び方法

(57)【要約】

本明細書において、人工多能性幹細胞(iPSC)を作製する方法及び作製された人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団が提供される。また、本明細書において、作製されたiPSC又は作製されたiPSCを含む医薬組成物を使用して、治療することを必要とする対象を治療する方法が提供される。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

人工多能性幹細胞 (i P S C) を作製する方法であって、

(a) 単離された細胞集団を活性化培養物と接触させることであって、前記活性化培養物は、 I L - 1 5 及びゾレドロン酸を含む、接触させることと、

(b) 前記単離された細胞集団を前記活性化培養物中で培養して、前記単離された細胞集団中の T 細胞を濃縮及び / 又は活性化することと、

(c) 前記 T 細胞を、 1 つ以上の再プログラミング因子をコードするウイルスベクターを用いて形質導入することと、

(d) 形質導入された前記 T 細胞を、哺乳動物体細胞を多能性状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、を含む、方法。 10

【請求項 2】

前記活性化培養物は、 I L - 2 を更に含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ウイルスベクターは、センダイウイルス (S e V) ベクターである、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記方法は、対象から前記単離された細胞集団を得ることを更に含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

前記単離された細胞集団は、末梢血単核細胞 (P B M C) である、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。 20

【請求項 6】

前記単離された細胞集団は、最終分化細胞である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

前記単離された細胞集団は、哺乳動物細胞である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 8】

前記単離された細胞集団は、ヒト細胞である、請求項 7 に記載の方法。 30

【請求項 9】

前記単離された細胞集団は、最大で 1 3 日間、最大で 1 0 日間、最大で 9 日間、最大で 8 日間、最大で 7 日間、最大で 6 日間、最大で 5 日間、最大で 4 日間、最大で 3 日間、最大で 2 日間、又は最大で 1 日間、前記活性化培養物中で培養される、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0】

前記単離された細胞集団は、最大で 3 日間、前記活性化培養物中で培養される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

前記単離された細胞集団は、前記活性化培養物中で 3 日間培養される、請求項 9 に記載の方法。 40

【請求項 1 2】

前記活性化培養物中で培養された後、前記単離された細胞集団は、 9 0 % 未満、 8 0 % 未満、 7 0 % 未満、 6 0 % 未満、 5 0 % 未満、 4 5 % 未満、 4 0 % 未満、 3 5 % 未満、又は 3 0 % 未満の T 細胞を含む、請求項 1 ~ 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記活性化培養物中で培養した後、前記単離された細胞集団は、 3 5 % 未満の T 細胞を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 4】

工程 (b) の後に、前記単離された細胞集団中の前記 T 細胞を濃縮することを更に 50

含む、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 15】

前記 T 細胞は、細胞間凝集塊濃縮によって濃縮される、請求項 14 に記載の方法。

【請求項 16】

前記 T 細胞の少なくとも一部は、工程 (b) において V_{9+} T 細胞に活性化される、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 17】

前記 T 細胞の少なくとも一部は、工程 (b) において V_{9+2+} T 細胞に活性化される、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 18】

前記 1 つ以上の再プログラミング因子は、OCT3/4、SOX2、KLF4、LIN28、及び c-Myc からなる群から選択される、請求項 1 ~ 17 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 19】

工程 (d) において、形質導入された前記 T 細胞は、1 つ以上の支持細胞層の存在下で培養される、請求項 1 ~ 18 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 20】

工程 (d) において、形質導入された前記 T 細胞は、支持細胞層の単層の存在下で培養される、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記支持細胞層は、マウス胚性線維芽細胞 (MEF) を含む、請求項 19 又は 20 に記載の方法。

【請求項 22】

作製された前記 iPSC を単離及び / 又は精製することを更に含む、請求項 1 ~ 21 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 23】

単離された前記 iPSC を対象に投与することを更に含む、請求項 22 に記載の方法。

【請求項 24】

前記 iPSC を生体外で所望の細胞型の細胞に分化させることを更に含む、請求項 1 ~ 23 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 25】

前記分化された細胞を対象に投与することを更に含む、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

作製された前記 iPSC は、センダイウイルス (SeV) ベクターに対して陰性である、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

作製された前記 iPSC は、T 細胞に由来する、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

作製された前記 iPSC は、TRG 遺伝子座及び TRD 遺伝子座の再配置遺伝子を有し、任意選択で、作製された前記 iPSC は、 V_{9} 遺伝子配置及び V_{2} 遺伝子配置を有する、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 29】

作製された前記 iPSC は、T 細胞に由来しない、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

作製された前記 iPSC は、TCRA 遺伝子座及び TCRB 遺伝子座からポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 生成物を作製しない、請求項 1 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

作製された前記 iPSC は、染色体の喪失を伴わずにゲノム的に安定している、請求項

10

20

30

40

50

1 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

作製された前記 i P S C の前記ゲノム安定性は、核型分析によって決定される、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

作製された前記 i P S C は、採用後に支持細胞を含まない培地中で増殖することができる、請求項 1 ~ 32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法に従って作製された人工多能性幹細胞 (i P S C) 。

10

【請求項 35】

請求項 34 に記載の i P S C と、医薬的に許容される賦形剤と、を含む、医薬組成物。

【請求項 36】

請求項 24 に記載の方法に従って作製される、分化細胞。

【請求項 37】

請求項 36 に記載の分化細胞と、医薬的に許容される賦形剤と、を含む、医薬組成物。

【請求項 38】

治療することを必要とする対象を治療する方法であって、

(i) 対象から、末梢血単核細胞 (P B M C) を含む細胞集団を得ることと、

(i i) 請求項 1 ~ 33 のいずれか一項に記載の方法に従って、前記細胞集団中の T 細胞を再プログラムして i P S C を作製することと、

20

(i i i) 任意選択で、前記 i P S C を 1 つ以上の所望の細胞型に分化させた後に、作製された前記 i P S C 又は作製された前記 i P S C を含む医薬組成物を前記対象に投与することと、を含む、方法。

【請求項 39】

前記対象は、ヒトである、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

前記対象は、過剰増殖性障害又は造血系の癌を有する、請求項 38 又は 39 に記載の方法。

【請求項 41】

人工多能性幹細胞 (i P S C) の単離された集団であって、前記 i P S C の単離された集団は、多能性細胞を含み、前記多能性細胞は、1 つ以上の再プログラミング因子を発現させ、かつ / 又は前記多能性細胞は、T R G 遺伝子及び T R D 遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含み、任意選択で、前記 i P S C は、V 9 遺伝子配置及び V 2 遺伝子配置を有する、単離された集団。

30

【請求項 42】

人工多能性幹細胞 (i P S C) を作製する方法であって、

(a) 単離された細胞集団中の T 細胞を濃縮及び / 又は活性化する機能を実施するためのステップと、

(b) 前記 T 細胞を多能性状態に再プログラムする機能を実施するためのステップと、を含む、方法。

40

【請求項 43】

請求項 42 に記載の方法に従って作製された人工多能性幹細胞 (i P S C) 。

【請求項 44】

多能性細胞を含む人工多能性幹細胞 (i P S C) の単離された集団であって、前記多能性細胞は、1 つ以上の再プログラミング因子を発現させるための手段を含み、かつ / 又は前記多能性細胞は、T R G 遺伝子及び T R D 遺伝子の再配置をコードするための手段を含む、単離された集団。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

(関連出願への相互参照)

本出願は、2020年6月17日に出願された米国特許出願第63/040,373号、2020年6月17日に出願された米国特許出願第63/040,374号、2020年6月17日に出願された米国特許出願第63/040,392号、2020年6月17日に出願された米国特許出願第63/040,397号、2020年6月17日に出願された米国特許出願第63/040,398号の利益を主張し、各々が参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

(電子的に提出された配列表の参照)

本出願は、ASCII形式の配列表としてEFS-Webを介して電子的に提出され、ファイル名が「14620-526-228_SEQ_LISTING」で、2021年5月30日に作成され、21,884バイトのサイズを有する配列表を含む。EFS-Webを介して提出された配列表は、本明細書の一部であり、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

1. 発明の分野

【0003】

本明細書では、とりわけ、人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell、iPSC)を作製する方法及び作製された人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団、並びにその使用が提供される。

【背景技術】

【0004】

2. 背景技術

胚性幹(embryonic stem、ES)細胞及び人工多能性幹細胞(iPSC)などの多能性幹細胞は、体内で分化して複数の細胞型を生成する増殖能及び発生能を有する。したがって、これらの細胞の治療的及び科学的可能性は、不確かではあるが、特に、研究により体細胞における遺伝子発現プロファイルを変化させて、それらを多能性幹細胞に後成的に再プログラムできることが明らかになったと言われていることから、並外れたものである(例えば、Takahashi, K., & Yamanaka, S, Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2016, 17(3): 183-93を参照のこと)。

【0005】

胚性幹細胞は、哺乳動物の胚盤胞の内部細胞塊に由来することができる、例えば、Human Genes and Genomes: Science, Health, Society (Rosenberg, L.E. & Rosenberg, D.D., 1st ed. 2012)を参照のこと。加えて、体細胞核移植(somatic cell nuclear transfer、SCNT)媒介再プログラミングもまた、多能性ES細胞を生成するために利用されており、いくつかの例では、クローン動物が利用されている(Wilmot, I., et al., Nature, 1997, 385: 810-813、Wakayama, T., et al., Nature, 1998, 394: 369-374)。それにもかかわらず、SCNTは、胚の破壊及び未受精卵への哺乳動物の遺伝情報の導入が論争の対象であるので、様々な技術的な(例えば、後成的な)障壁に悩まされてきた(Matoba, S. & Zhang, Y., supra; Kastenberger, Z.J. & Odorico, J.S., Transplant Rev., 2008, 22(3): 215-22)。

【0006】

体細胞を多能性幹細胞に再プログラムするための代替的な技術は、依然として関心を集めている。人工多能性幹細胞(iPSC)技術は、Yamanakaらが、転写因子Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Mycが成体体細胞に多能性を付与し得ること、及びiPSCを生成するための多能性を付与し得ることを報告したときに、このような選択肢の1つとして出現した(Takahashi, K., & Yamanaka, S, C

10

20

30

40

50

e l l , 2 0 0 6 , 1 2 6 (4) : 6 6 3 - 7 6 ; W e r n i g , M . , e t a l . ,
N a t u r e , 2 0 0 7 , 4 4 8 : 3 1 8 - 3 2 4 ; M a h e r a l i , N . , e t a
l . , C e l l S t e m C e l l , 2 0 0 7 , 1 (1) : 5 5 - 7 0) 。

【発明の概要】

【0007】

3. 発明の概要

こうした背景を踏まえ、体細胞を多能性状態（複数可）に再プログラミングするための改善された材料及び方法が依然として必要とされている。一態様において、人工多能性幹細胞（iPSC）を作製する方法であって、（a）単離された細胞集団を活性化培養物と接触させることであって、活性化培養物は、IL-15及びゾレドロン酸を含む、接触させることと、（b）単離された細胞集団を活性化培養物中で培養して、単離された細胞集団中のT細胞を濃縮及び/又は活性化することと、（c）T細胞を、1つ以上の再プログラミング因子をコードするウイルスベクターを用いて形質導入することと、（d）形質導入されたT細胞を、哺乳動物体細胞を多能性状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、を含む、方法が本明細書で提供される。

10

【0008】

ある特定の実施形態では、活性化培養物は、IL-2を更に含む。

【0009】

ある特定の実施形態では、ウイルスベクターは、センダイウイルス（Sendai virus、SeV）ベクターである。

20

【0010】

ある特定の実施形態では、本方法は、対象から、単離された細胞集団を得ることを更に含む。

【0011】

ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、末梢血単核細胞（peripheral blood mononuclear cell、PBMC）である。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、最終分化細胞である。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は哺乳動物細胞である。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団はヒト細胞である。

【0012】

ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で1～20日間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で1～17日間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で1～15日間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で1～13日間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で1～11日間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で1～9日間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で1～7日間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で1～5日間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で1～3日間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で12～72時間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で12～60時間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で12～48時間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で12～36時間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で12～24時間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で8～16時間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で4～8時間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で2～4時間培養される。

30

40

【0013】

ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で最大で13日間、

50

最大で10日間、最大で9日間、最大で8日間、最大で7日間、最大で6日間、最大で5日間、最大で4日間、最大で3日間、最大で2日間、又は最大で1日間培養される。

【0014】

ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で最大で3日間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で約3日間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で50時間～80時間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で55時間～75時間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で60時間～75時間培養される。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で70時間～75時間培養される。

10

【0015】

ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～100%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～95%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～90%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～85%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～80%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～75%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～70%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～65%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～60%の

20

T細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～55%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～50%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～45%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～40%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～35%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、15%～35%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、25%～35%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、30%～35%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～30%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～25%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～20%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～15%のT細胞を含む。

30

40

【0016】

ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、45%未満、40%未満、35%未満、又は30%未満のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、35%未満のT細胞を含む。

【0017】

ある特定の実施形態では、本方法は、単離された細胞集団中のT細胞を濃縮することを更に含む。

【0018】

ある特定の実施形態では、T細胞は、細胞間凝集塊濃縮によって濃縮される。ある

50

特定の実施形態では、 T 細胞の少なくとも一部は、工程 (b) において V_{9+} T 細胞に活性化される。

【 0 0 1 9 】

ある特定の実施形態では、 T 細胞の少なくとも一部は、工程 (b) において V_{2+} T 細胞に活性化される。

【 0 0 2 0 】

ある特定の実施形態では、1つ以上の再プログラミング因子は、 $OCT3/4$ 、 $SOX2$ 、 $KLF4$ 、 $LIN28$ 、及び $c-Myc$ からなる群から選択される。

【 0 0 2 1 】

ある特定の実施形態では、工程 (d) において、形質導入された T 細胞は、1つ以上の支持細胞層の存在下で培養される。ある特定の実施形態では、工程 (d) において、形質導入された T 細胞は、支持細胞層の単層の存在下で培養される。ある特定の実施形態では、支持細胞層は、マウス胚性線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast、 MEF) を含む。

【 0 0 2 2 】

ある特定の実施形態では、本方法は、作製された $iPSC$ を単離及び / 又は精製することを更に含む。ある特定の実施形態では、方法は、単離された $iPSC$ を対象に投与することを更に含む。

【 0 0 2 3 】

ある特定の実施形態では、本方法は、 $iPSC$ を生体外で所望の細胞型の細胞に分化させることを更に含む。

【 0 0 2 4 】

ある特定の実施形態では、本方法は、分化細胞を対象に投与することを更に含む。ある特定の実施形態では、対象は、哺乳動物である。ある特定の実施形態では、対象はヒトである。ある特定の実施形態では、対象は、過剰増殖性障害又は造血系の癌を有する。

【 0 0 2 5 】

ある特定の実施形態では、作製された $iPSC$ は、センドライウイルス (SeV) ベクターに対して陰性である。ある特定の実施形態では、作製された $iPSC$ は T 細胞に由来する。ある特定の実施形態では、作製された $iPSC$ は、 TRG 遺伝子座及び TRD 遺伝子座の再配置遺伝子を有する。ある特定の実施形態では、作製された $iPSC$ は、 T 細胞に由来しない。

【 0 0 2 6 】

ある特定の実施形態では、作製された $iPSC$ は、 $TCRA$ 遺伝子座及び $TCRB$ 遺伝子座からポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction、 PCR) 生成物を作製しない。いくつかの実施形態では、作製された $iPSC$ は、 V_9 遺伝子配置及び V_2 遺伝子配置を有する。ある特定の実施形態では、作製された $iPSC$ は、染色体の喪失を伴わずにゲノム的に安定している。ある特定の実施形態では、作製された $iPSC$ のゲノム安定性は、核型分析によって決定される。ある特定の実施形態では、作製された $iPSC$ は、採用後に支持細胞を含まない培地中で増殖することができる。

【 0 0 2 7 】

別の態様では、本明細書に提供される方法に従って作製された人工多能性幹細胞 ($iPSC$) が本明細書で提供される。

【 0 0 2 8 】

別の態様では、本明細書に提供される $iPSC$ と、医薬的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物が本明細書で提供される。

【 0 0 2 9 】

別の態様では、本明細書に提供される方法に従って作製された分化細胞が本明細書で提供される。

【 0 0 3 0 】

別の態様では、本明細書に提供される分化細胞と、医薬的に許容される賦形剤とを含む

医薬組成物が本明細書で提供される。

【0031】

更に別の態様では、本明細書において、治療することを必要とする対象を治療する方法であって、(i)対象から、末梢血単核細胞(PBMC)を含む細胞集団を得ることと、(ii)本明細書に提供されるiPSCを作製する方法に従って、細胞集団中のT細胞を再プログラムしてiPSCを作製することと、(iii)任意選択で、iPSCを1つ以上の所望の細胞型に分化させた後に、作製されたiPSC又は作製されたiPSCを含む医薬組成物を対象に投与することと、を含む、方法が提供される。ある特定の実施形態では、対象は、ヒトである。特定の実施形態では、対象は、過剰増殖性障害又は造血系の癌を有する。

10

【0032】

更に別の態様では、人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団であって、iPSCの単離された集団は、多能性細胞を含み、多能性細胞は、1つ以上の再プログラミング因子を発現させ、かつ/又は多能性細胞は、TRG遺伝子及びTRD遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含む、人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団が本明細書で提供される。

【0033】

更に別の態様では、人工多能性幹細胞(iPSC)を作製する方法であって、(a)単離された細胞集団中のT細胞を濃縮及び/又は活性化する機能を実施するための工程と、(b)T細胞を多能性状態に再プログラミングする機能を実施するための工程と、を含む、方法が本明細書で提供される。別の態様では、本明細書に提供される方法に従って作製された人工多能性幹細胞(iPSC)が本明細書で提供される。

20

【0034】

更に別の態様では、多能性細胞を含む人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団であって、多能性細胞は、1つ以上の再プログラミング因子を発現させるための手段を含み、かつ/又は多能性細胞は、TRG遺伝子及びTRD遺伝子の再配置をコードするための手段を含む、人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団が本明細書で提供される。

【図面の簡単な説明】

【0035】

【図1】Zol+IL-2+IL-15とのPBMC培養物の様々な日における、濃縮された細胞間凝集塊の中のTCRV₉₊T細胞の存在量を示す。代表的なFACSプロット中の数字は、Zol+IL-2+IL-15で刺激されたPBMCの3日目(左列)、8日目(中央列)、及び13日目(右列)における、全PBMC中のTCR及びT細胞(上段)並びにT細胞中のTCRV₉₊細胞(下段)の頻度を示す。矢印は、親及び子孫ゲートを表す。

30

【図2A】Zol+IL-2+IL-15で3日間刺激されたPBMC培養物に由来するiPSCコロニーの顕微鏡観察を示す。図2Aは、MEF支持細胞層上のiPSCを、緊密で滑らかな境界及び緻密な細胞内部境界を有する丸いコロニーとして示す代表的な顕微鏡画像を示す。背景の細長い細胞は、マイトマイシンC処理MEF支持細胞層である。

40

【図2B】Zol+IL-2+IL-15で3日間刺激されたPBMC培養物に由来するiPSCコロニーの顕微鏡観察を示す。図2Bは、様々な継代、すなわち、継代3、4、5、及び7における3つの個々のクローンからのiPSCコロニーを示す代表的な顕微鏡画像を示す。iPSCコロニーは、照射されたMEF支持細胞層上にあった。

【図3】Identiclone(商標)TCRG遺伝子再配置アッセイを使用したTRG遺伝子座における遺伝子再配置の評価を示す。ゲノムDNAを5つのコロニー全てから単離した。Identiclone(商標)TCRG遺伝子再配置アッセイキットからのプライマーを使用して、製造業者のプロトコールに従ってゲノムPCRを実施した。代表的なピークは、クローンA、B、C、D、及びEのゲノムPCRからのアンプリコンのサイズを(塩基対で)示す。

50

【図4】iPSCコロニー間のTRG遺伝子座及びTRD遺伝子座の遺伝子再配置の評価を示す。代表的なアガロースゲル画像は、様々な連結領域プライマー（joining region primer）と組み合わせたV₉又はV₂順方向プライマーのいずれかによって媒介されたクローンA、B、及びC由来のゲノムDNAの増幅を示す。陰性対照として、22Rv1細胞株ゲノムDNAを使用した。

【図5-1】（クローンBからの）アンプリコンから得られた配列とヒトTCRV₉配列及びV₂配列との間の類似性を示す代表的な配列アラインメントを示す。

【図5-2】図5-1の続きである。

【図6A-1】5つのiPSCクローンについてのゲノムDNA増幅アンプリコンとTRGV₉及びTRDV₂との間の配列相同性の評価を示す。ゲノムDNAを5つ全てのiPSCクローンから単離し、TCRV₉（FP）、JP1/JP2、JP又はJ1/J2（RV）及びTCRV₂（FP）、J₁（RP）又はJ₃（RP）に対するプライマーを用いてゲノムPCRを実施した。増幅生成物をゲル溶出し、トップクローン化し（top cloned）、配列決定した。配列を、全ヒトゲノムに対するBLASTに供した。図6Aは、クローンAである。代表的な配列アラインメントは、アンプリコンとTRGV₉及びTRDV₂遺伝子配列との間の配列相同性を示す。

【図6A-2】図6A-1の続きである。

【図6B】5つのiPSCクローンについてのゲノムDNA増幅アンプリコンとTRGV₉及びTRDV₂との間の配列相同性の評価を示す。ゲノムDNAを5つ全てのiPSCクローンから単離し、TCRV₉（FP）、JP1/JP2、JP又はJ1/J2（RV）及びTCRV₂（FP）、J₁（RP）又はJ₃（RP）に対するプライマーを用いてゲノムPCRを実施した。増幅生成物をゲル溶出し、トップクローン化し、配列決定した。配列を、全ヒトゲノムに対するBLASTに供した。図6Bは、クローンCである。代表的な配列アラインメントは、アンプリコンとTRGV₉及びTRDV₂遺伝子配列との間の配列相同性を示す。

【図6C-1】5つのiPSCクローンについてのゲノムDNA増幅アンプリコンとTRGV₉及びTRDV₂との間の配列相同性の評価を示す。ゲノムDNAを5つ全てのiPSCクローンから単離し、TCRV₉（FP）、JP1/JP2、JP又はJ1/J2（RV）及びTCRV₂（FP）、J₁（RP）又はJ₃（RP）に対するプライマーを用いてゲノムPCRを実施した。増幅生成物をゲル溶出し、トップクローン化し、配列決定した。配列を、全ヒトゲノムに対するBLASTに供した。図6Cは、クローンDである。代表的な配列アラインメントは、アンプリコンとTRGV₉及びTRDV₂遺伝子配列との間の配列相同性を示す。

【図6C-2】図6C-1の続きである。

【図6D-1】5つのiPSCクローンについてのゲノムDNA増幅アンプリコンとTRGV₉及びTRDV₂との間の配列相同性の評価を示す。ゲノムDNAを5つ全てのiPSCクローンから単離し、TCRV₉（FP）、JP1/JP2、JP又はJ1/J2（RV）及びTCRV₂（FP）、J₁（RP）又はJ₃（RP）に対するプライマーを用いてゲノムPCRを実施した。増幅生成物をゲル溶出し、トップクローン化し、配列決定した。配列を、全ヒトゲノムに対するBLASTに供した。図6Dは、クローンEである。代表的な配列アラインメントは、アンプリコンとTRGV₉及びTRDV₂遺伝子配列との間の配列相同性を示す。

【図6D-2】図6D-1の続きである。

【図7A】T細胞由来iPSCの特徴付けを示す。図7Aは、A、B、及びCのiPSCクローン由来のOct3/4、Nanog、Sox2、Lin28、センダイウイルス（SeV）、GAPDH、TCR_β及びCD3_εについてのRT-PCRアンプリコンを示す代表的なアガロースゲル画像を示す。

【図7B】T細胞由来iPSCの特徴付けを示す。図7Bは、iPSCクローン間でDAPI（青色のみ）、マーカー（Nanog/Oct3/4/Sox2 赤色のみ）、又はDAPI+マーカー（ピンク色）について陽性の細胞を可視化したオーバーレイ免疫

組織化学 (immunohistochemistry、IHC) 画像を示す。

【図7C】 T細胞由来 iPSCの特徴付けを示す。図7Cは、iPSCクローンA、B、C、D、及びEの間のSSEA-4及びTRA1-60表面発現並びにOct-3及びSox2細胞内発現について陽性である細胞の頻度を示す代表的なヒストグラムを示す。

【図8A】核型分析を介した iPSCクローンB、C、D、及びEのゲノム安定性の評価を示す。図8Aは、クローンBである。

【図8B】核型分析を介した iPSCクローンB、C、D、及びEのゲノム安定性の評価を示す。図8Bは、クローンDである。

【図8C】核型分析を介した iPSCクローンB、C、D、及びEのゲノム安定性の評価を示す。図8Cは、クローンCである。 10

【図8D】核型分析を介した iPSCクローンB、C、D、及びEのゲノム安定性の評価を示す。図8Dは、クローンEである。

【図9】異なるマトリックス及び培地の組み合わせの存在下で、支持細胞を含まない条件に採用された5つ全てのクローン(クローンA~E)からの支持細胞ベースの iPSCコロニーを示す代表的な明視野顕微鏡画像を示す。

【発明を実施するための形態】

【0036】

5. 発明を実施するための形態

本開示は、部分的に、T細胞、特に T細胞から iPSCを作製するための改善された方法を提供する。 20

【0037】

T細胞は、ヒト末梢血中のTリンパ球の主要部分集合である T細胞によって発現されるものとは異なるTCRを発現するTリンパ球の部分集合である(Kalyan, S. & Kabelitz, D., Cell Mol. Immunol., 2013, 10(1): 21-29)。V9V2T細胞は、 T細胞の主要な部分集合であり、腫瘍細胞に対して有意なエフェクター機能を示す(Tyler, C. J., et al., Cellular Immunology, 2015, 296(1): 10-21; Silva-Santos, B., Nat Rev Immunol., 2015, 15: 683-91)。更に、 T細胞とは異なり、V9V2T細胞の抗原認識及び抗腫瘍効率は、主要組織適合性複合体(major histocompatibility complex、MHC)無制限である(Kalyan, S. & Kabelitz, D., supra)。これらの理由のために、V9V2T細胞は、癌免疫療法の魅力的な選択肢と考えられ、臨床的に探索され活用されてきた(Kakimi, K., et al., Transl Lung Cancer Res., 2014, 3(1): 23-33)。 30

【0038】

5.1. 定義

本明細書で使用されるとき、「約」又は「およそ」という用語は、量、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、サイズ、量、重量、又は長さに対して15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、又は1%も変動する量、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、サイズ、量、重量、又は長さを指す。量、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、サイズ、量、重量、又は長さの範囲は、量、レベル、値、数、頻度、割合、寸法、サイズ、量、重量、又は長さについて±15%、±10%、±9%、±8%、±7%、±6%、±5%、±4%、±3%、±2%、又は±1%とすることができる。 40

【0039】

「細胞培養培地」(本明細書では「培養培地」又は「培養物」又は「培地」とも呼ばれる)は、細胞生存率を維持し、増殖を支持する栄養素を含有する細胞を培養するための培地である。細胞培養培地は、塩(複数可)、緩衝液(複数可)、アミノ酸、グルコース又は他の糖(複数可)、抗生物質、血清又は血清代替物、及びペプチド増殖因子などの他の 50

成分のいずれかを適切な組合せで含有し得る。特定の細胞型に通常使用される細胞培養培地は、当業者には既知である。いくつかの非限定的な例が本明細書に提供される。

【0040】

本明細書で使用されるとき、「細胞株」とは、典型的には、単一の祖先細胞に由来するか、又は祖先細胞の規定された集団及び/若しくは実質的に同一の集団に由来する、大部分が又は実質的に同一の細胞の集団を指す。細胞株は、長期間（例えば、数ヶ月間、数年間、無制限の期間）にわたって、培養物中で維持されていてもよいし、又は維持されることが可能であってもよい。それは、細胞に無制限の培養寿命を付与する形質転換の自発的プロセス又は誘導プロセスを受けていてもよい。細胞株は、当該技術分野においてそのように認識されている全ての細胞株を含む。細胞は、細胞株の個々の細胞の少なくともいくつかの特性が互いに対して異なり得るように、経時的に変異及び場合によっては後成的変化を獲得することが理解されよう。

10

【0041】

本明細書で使用されるとき、「分化する」「分化」などという用語は、特殊化されていない（又は決定付けられていない）又は比較的特殊化されていない細胞が、例えば、血液細胞又は筋細胞などの特殊化された細胞の特徴を獲得するプロセスを指す。分化細胞又は分化誘導された細胞は、細胞系内でより特殊化された（又は決定付けられた）位置にある細胞である。細胞は、通常的环境下で、特定の細胞型又は細胞型の部分集合への分化を続け、かつ、通常的环境下で、異なる細胞型に分化するか、又は比較的分化されていない細胞型に戻ることができない地点まで、分化経路において進行したときに決定付けられる。

20

【0042】

本明細書で使用するとき、「コード（すること）」という用語は、ヌクレオチドの定義された配列（例えば、rRNA、tRNA、及びmRNA）又はアミノ酸の定義された配列のいずれかを有する、生物学的プロセスにおける他のポリマー及び巨大分子の合成のための鋳型として機能する、遺伝子、cDNA、又はmRNAなどのポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特定配列の固有の特性、並びにそれから生じる生物学的特性を指す。したがって、細胞又は他の生物系において、遺伝子に対応するmRNAの転写及び翻訳がタンパク質を生成する場合、その遺伝子は、タンパク質をコードする。ヌクレオチド配列がmRNA配列と同一であり、配列表に通常提供されるコード鎖と、遺伝子又はcDNAの転写の鋳型として使用される非コード鎖とはいずれも、その遺伝子又はcDNAのタンパク質又は他の生成物をコードするとして言及することができる。

30

【0043】

本明細書で使用されるとき、「外因性」という用語は、参照される分子又は参照される活性が宿主細胞に導入されることを意味することが意図される。この分子は、例えば、宿主染色体への組込みなどによる宿主遺伝物質へのコード核酸の導入によって、又はプラスミドなどの非染色体遺伝物質として導入することができる。したがって、この用語は、コード核酸の発現に関して使用されるとき、発現可能な形態のコード核酸の細胞への導入を指す。「内因性」という用語は、宿主細胞中に存在する参照分子又は活性を指す。同様に、この用語は、コード核酸の発現に関して使用されるとき、細胞内に含有され、外因的でないコード核酸の発現を指す。

40

【0044】

本明細書で使用されるとき、「発現」という用語は、RNA及びタンパク質の生成、並びに必要に応じてタンパク質の分泌に關与する細胞プロセスを指し、適用可能な場合、例えば、転写、翻訳、折り畳み、改変、及び処理が挙げられるが、これらに限定されない。「発現生成物」は、遺伝子から転写されたRNA、及び遺伝子から転写されたmRNAの翻訳によって得られるポリペプチドを含む。

【0045】

本明細書で使用されるとき、「人工多能性幹細胞」又は「iPSC」という用語は、3つ全ての胚又は皮層である中胚葉、内胚葉、及び外胚葉の組織に分化することができる細胞

50

胞に誘導又は変更された（すなわち、再プログラムされた）分化した成体細胞から作製された幹細胞を指す。

【0046】

本明細書で使用される時、「単離された」などの用語は、細胞に関して使用される時、言及される細胞が自然界で見出されるように、少なくとも1つの成分を実質的に含まない細胞を意味することが意図される。この用語は、その自然環境において見出されるようないくつか又は全ての成分から取り出された細胞を含む。この用語はまた、細胞が自然に発生しない環境において見出されるように、少なくとも1つ、いくつか、又は全ての成分から取り出された細胞を含む。したがって、単離された細胞は、それが自然界で見出されるように、又はそれが自然に発生しない環境において増殖、貯蔵、若しくは存在するように、他の物質から部分的又は完全に分離されている。単離された細胞の具体例としては、部分的に純粋な細胞、実質的に純粋な細胞、及び自然に発生しない培地中で培養された細胞が挙げられる。

10

【0047】

本明細書で使用される時、「精製する」などという用語は、純度を増加させることを指す。例えば、純度は、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、又は100%まで増加させることができる。

【0048】

本明細書で使用される時、「多能性」という用語は、身体又は細胞体の全ての系統を形成するための細胞の能力を指す（すなわち、胚本体）。例えば、胚性幹細胞は、3つの胚葉である外胚葉、中胚葉、及び内胚葉の各々から細胞を形成することができる多能性幹細胞の一種である。多能性とは、完全な生物を生み出すことができない不完全な又は部分的な多能性細胞（例えば、エピプラスト幹細胞又はEpiSC）から、完全な生物を生み出すことができる、より原始的でより多能性の細胞（例えば、胚性幹細胞）までの発生能の連続体である。

20

【0049】

本明細書で使用される時、「集団」という用語は、Tリンパ球に関して使用される時、2つ以上のTリンパ球を含む細胞の群を指す。Tリンパ球の単離された集団は、Tリンパ球の1つの型のみ、又はTリンパ球の2つ以上の型を有することができる。Tリンパ球の単離された集団は、Tリンパ球の1つの型の均質集団又はTリンパ球の2つ以上の型の異種集団とすることができる。Tリンパ球の単離された集団はまた、Tリンパ球、及び少なくとも、Tリンパ球以外の細胞、例えば、B細胞、マクロファージ、好中球、赤血球、肝細胞、内皮細胞、上皮細胞、筋細胞、脳細胞などを有する異種集団とすることができる。異種集団は、0.01%～約100%のTリンパ球を有することができる。したがって、Tリンパ球の単離された集団は、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、又は99%のTリンパ球を有することができる。Tリンパ球の単離された集団は、Tリンパ球の1つの型のみ、又は2つ以上の型のTリンパ球の混合物を含むことができる。Tリンパ球の単離された集団は、本明細書に開示されるものを含むがこれらに限定されない、Tリンパ球の異なる型のうちの1つ以上、又は全てを含むことができる。Tリンパ球の単離された集団は、Tリンパ球の全ての既知の型を含むことができる。2つ以上の型のTリンパ球を含むTリンパ球の単離された集団では、Tリンパ球の各型の比率は、0.01%～99.99%の範囲とすることができる。単離された集団はまた、集団の全てのTリンパ球が単一のTリンパ球のクローンである、Tリンパ球のクローン集団とすることができる。

30

40

【0050】

「組み換え」ポリヌクレオチドとは、その天然状態にないポリヌクレオチドであり、例えば、そのポリヌクレオチドが、自然界で見出されないヌクレオチド配列を含んでいるか、又は、そのポリヌクレオチドが、自然に見出される状況以外の状況にあること、例えば、そのポリヌクレオチドが天然では通常近接しているヌクレオチド配列から離れているか、又はそのポリヌクレオチドが通常近接していないヌクレオチド配列と隣接（若しくは連

50

続)していることなどである。例えば、問題の配列は、ベクターにクローン化され得るか、又はそうでなければ、1つ以上の更なる核酸と組み換えられ得る。

【0051】

本明細書で使用されるとき、「再プログラミング」とは、体細胞の分化状態を変化させるか、又は逆転させるプロセスを指す。細胞は、再プログラミングの前に部分的又は最終分化させることができる。再プログラミングは、体細胞(例えば、T細胞)の分化状態の多能性状態への完全な復帰を含む。再プログラミングはまた、本明細書に記載されるような更なる操作に供されたときに、多能性状態への完全な再プログラミングに対して細胞をより感受性にする状態への、体細胞の分化状態の部分的な逆転を含む。このような接触は、細胞による特定の遺伝子の発現をもたらし得、この発現は、再プログラミングに寄与する。本発明のある特定の実施形態では、体細胞の再プログラミングは、体細胞を多能性及びES様状態にする。得られた細胞は、本明細書において、再プログラムされた多能性体細胞又は人工多能性幹細胞(iPSC)と呼ばれる。いくつかの実施形態では、再プログラミングはまた、体細胞の分化状態の、多分化能(multipotent)状態への部分的な逆転を含む。

10

【0052】

再プログラミングは、既に多能性である細胞の既存の未分化状態を単に維持すること、又は既に多分化能細胞(例えば、造血幹細胞)である細胞の既存の完全には分化していない状態を維持することとは異なる。再プログラミングはまた、既に多能性又は多分化能性である細胞の自己再生又は増殖を促進することとは異なる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される方法は、再プログラミングによって多能性状態を確立することに寄与する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の方法は、既に多分化能性又は多能性である細胞ではなく、完全に分化した細胞及び/又は特定の種類の細胞(例えば、T細胞)で実施されてもよい。

20

【0053】

本明細書で使用されるとき、「再プログラミング因子」とは、細胞再プログラミング、(例えば、インビトロで)を促進するか、又はそれに寄与する遺伝子、RNA、又はタンパク質を指す。体細胞をインビトロで多能性に再プログラムするための対象の再プログラミング因子の例は、Oct3/4、Klf4、c-Mye、Nanog、Sox2、及びLin28、並びに体細胞を、例えば、インビトロで再プログラミングする方法においてこれらのうちの1つ以上を置換することができる任意の遺伝子/タンパク質である。

30

【0054】

本明細書で使用されるとき、「Tリンパ球」及び「T細胞」という用語は、互換的に使用され、胸腺において成熟を完了し、体内の特定の外来抗原の同定並びに他の免疫細胞の活性化及び非活性化を含む免疫系において様々な役割を有する白血球の主要な種類を指す。Tリンパ球は、培養Tリンパ球、例えば、初代Tリンパ球、又は培養T細胞株からのTリンパ球、例えば、Jurkat、SupT1などからのTリンパ球、又は哺乳動物から得られたTリンパ球などの任意のTリンパ球とすることができる。Tリンパ球は、CD3+細胞とすることができる。Tリンパ球は、任意の種類とすることができる。CD4+/CD8+二重陽性T細胞、CD4+ヘルパーT細胞(例えば、Th1及びTh2細胞)、CD8+T細胞(例えば、細胞傷害性T細胞)、末梢血単核細胞(PBMC)、末梢血白血球(peripheral blood leukocyte、PBL)、腫瘍浸潤リンパ球(tumor infiltrating lymphocyte、TIL)、メモリーT細胞、ナイーブT細胞、調節性T細胞、ガンマデルタT細胞(gamma delta、T cells)、などを含むがこれらに限定されない任意の発生段階とすることができる。Tリンパ球は、nTreg(天然Treg)、iTreg(誘導性Treg)、CD8+Treg、Tr1調節性細胞、及びTh3細胞を含むT調節性細胞であってもよい。ヘルパーT細胞の更なる種類としては、Th3(Treg)、Th17、Th9、又はTfh細胞などの細胞が挙げられる。メモリーT細胞の更なる種類としては、セントラルメモリーT細胞(TCM細胞)、エフェクターメモリーT細胞(TEM細胞及びTEMRA細胞)などの細胞が挙げられる。T

40

50

リンパ球はまた、T細胞受容体 (T cell receptor、TCR) 又はキメラ抗原受容体 (chimeric antigen receptor CAR) を発現するように改変されたTリンパ球など、遺伝子操作されたTリンパ球を指すこともできる。また、Tリンパ球は、幹細胞、最終的な血管芽細胞、CD34+細胞、HSC (造血幹細胞及び前駆細胞)、造血多分化能前駆細胞、又はT細胞前駆細胞から分化させることもできる。

【0055】

本明細書で使用されるとき、「T細胞」という用語は、それらの表面上に鎖及び鎖を含むT細胞受容体を有するT細胞を指す。

【0056】

本明細書で使用されるとき、「選択マーカー」という用語は、発現されたときに、細胞に、細胞毒性剤又は細胞分裂阻害剤に対する耐性 (例えば、抗生物質耐性)、栄養原栄養性 (nutritional prototrophy)、又は特定のタンパク質であって、そのタンパク質を発現する細胞を発現しない細胞と区別するための基礎として使用することができるものの発現など、選択可能な表現型を付与する遺伝子、RNA、又はタンパク質を指す。蛍光若しくは発光タンパク質、又は基質に作用して有色、蛍光、若しくは発光物質を生成する酵素など、発現を容易に検出することができるタンパク質 (「検出可能なマーカー」) は、選択マーカーの部分集合を構成する。多能性細胞において選択的又は排他的に通常発現される遺伝子に対してネイティブな発現制御要素に連結された選択マーカーの存在は、多能性状態に再プログラムされた体細胞を同定及び選択することを可能にする。ネオマイシン耐性遺伝子 (neo)、ピューロマイシン耐性遺伝子 (puro)、グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (guanine phosphoribosyl transferase、gpt)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (dihydrofolate reductase、DHFR)、アデノシンデアミナーゼ (adenosine deaminase、ada)、ピューロマイシン-N-アセチルトランスフェラーゼ (puromycin-N-acetyltransferase、PAC)、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (hyg)、多剤耐性遺伝子 (multidrug resistance gene、mdr)、チミジンキナーゼ (thymidine kinase、TK)、ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase、HPR T)、及びhisD遺伝子など、様々な選択マーカー遺伝子を使用することができる。検出可能なマーカーとしては、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein、GFP) 青色、サファイア、黄色、赤色、オレンジ色、及びシアン蛍光タンパク質、並びにこれらのいずれかの変種が挙げられる。ルシフェラーゼ (例えば、ホタル又はウミシイタケルシフェラーゼ) などの発光タンパク質もまた有用である。当業者に明らかであるように、本明細書で使用されるとき、「選択マーカー」という用語は、遺伝子又は遺伝子の発現生成物、例えば、コードされたタンパク質を指すことができる。

【0057】

いくつかの実施形態では、選択マーカーは、それを発現しない細胞又はそれを有意に低いレベルで発現する細胞と比較して、それを発現する細胞に増殖及び/又は生存の利益を付与する。このような増殖及び/又は生存の利益は、典型的には、細胞がある特定の条件下、すなわち、「選択的条件」下で維持されるときに生じる。有効な選択を確実にするために、細胞集団は、マーカーを発現しない細胞が増殖せず、かつ/又は生存せず、集団から排除されるか、又はそれらの数が集団の非常に小さな割合のみに減少するような条件下及び十分な期間にわたって維持されることができる。マーカーを発現しない細胞を大部分又は完全に排除するように選択的条件下で細胞集団を維持することによって、増殖及び/又は生存の利益を付与するマーカーを発現する細胞を選択するプロセスは、本明細書では「ポジティブ選択」と呼ばれ、マーカーは「ポジティブ選択に有用」とあると言われる。ネガティブ選択及びネガティブ選択に有用なマーカーもまた、本明細書に記載されるある特定の方法において興味深いものである。このようなマーカーの発現は、マーカーを発現しない細胞又はそれを有意に低いレベルで発現する細胞と比較して、マーカーを発現する細胞に増殖及び/又は生存の不利益を付与する (又は、別の方法で考えると、マーカーを発現しない細胞は、マーカーを発現する細胞と比較して、増殖及び/又は生存の利益を有

10

20

30

40

50

する)。したがって、マーカーを発現する細胞は、選択的条件下で十分な期間維持される
とき、細胞集団から大部分又は完全に排除することができる。

【0058】

本明細書で使用されるとき、「支持細胞 (feeder cell、feeder)」は、第2の型の
細胞と共培養される1つの型の細胞であって、支持細胞が第2の細胞型の支持のための刺
激、増殖因子、及び栄養素を提供することで、第2の型の細胞が増殖、拡大、又は分化す
ることができる環境が提供されるものを指す用語である。支持細胞は、任意選択で、それ
らが支持している細胞とは異なる種に由来する。例えば、幹細胞を含むある特定の種のヒ
ト細胞は、マウス胚性線維芽細胞又は不死化マウス胚性線維芽細胞の初代培養物によって
支持されることができる。別の例では、末梢血由来細胞又は形質転換白血病細胞は、ナチ
ュラルキラー細胞の拡大及び成熟を支持する。支持細胞は、典型的には、他の細胞と共培
養されるときに、支持している細胞を上回る増殖を防止するために、放射線照射又はマイ
トマイシンなどの抗有糸分裂剤での処理によって不活性化され得る。支持細胞には、内皮
細胞、間質細胞 (例えば、上皮細胞又は線維芽細胞)、及び白血病細胞が含まれ得る。上
記に限定されないが、1つの特定の支持細胞の細胞型は、ヒト皮膚の線維芽細胞などのヒ
ト支持細胞であり得る。別の支持細胞の細胞型は、マウス胚性線維芽細胞 (mouse emb
ryonic fibroblast、MEF) であり得る。一般に、様々な支持細胞を部分的に使用し
て、多能性を維持し、分化をある特定の系統に向け、増殖能力を増強し、エフェクター細
胞などの特殊化した細胞型への成熟を促進することができる。

【0059】

本明細書で使用されるとき、「支持細胞を含まない」(feeder-free、FF)環境と
は、支持細胞又は間質細胞を本質的に含まない、かつ/又は支持細胞の培養によって事前
調整されていない培養条件、細胞培養、又は培養培地などの環境を指す。「事前調整され
ている」培地とは、支持細胞が培地内で少なくとも1日間など一定期間培養された後に採
取された培地を指す。事前調整されている培地は、培地中で培養された支持細胞によって
分泌される増殖因子及びサイトカインを含む多くのメディエーター物質を含有する。いく
つかの実施形態では、支持細胞を含まない環境は、支持細胞及び間質細胞の両方を含まず
、支持細胞の培養によって事前調整もされない。

【0060】

「多能性関連遺伝子」という用語は、正常な条件下 (例えば、遺伝子発現を変化させる
ように設計された遺伝子工学又は他の操作の不在下) での発現が、多能性幹細胞において
生じ、典型的には多能性幹細胞に限定され、それ自体の機能的同一性にとって重要である
遺伝子を指す。多能性と機能的に関連する遺伝子によってコードされるポリペプチドは、
卵母細胞中の母性因子として存在し得ることが理解される。この遺伝子は、胚の少なくと
もいくつかの細胞によって、例えば、着床前期間の少なくとも一部分にわたって、かつ/
又は成体の生殖細胞前駆体において発現され得る。

【0061】

「多能性因子」という用語は、多能性関連遺伝子の発現生成物、例えば、遺伝子によ
ってコードされたポリペプチドを指すために使用される。いくつかの実施形態では、多能性
因子は、成体動物の身体を構成する体細胞型 (生殖細胞又はその前駆体を除く) において
通常は実質的に発現されないものである。例えば、多能性因子は、ES細胞におけるその
平均レベルが、成体哺乳動物の体内に存在する最終分化細胞型におけるその平均レベルよ
りも少なくとも50倍又は100倍大きいものであり得る。いくつかの実施形態では、多
能性因子は、生体内でのES細胞及び/又は従来の方法を使用して誘導されたES細胞の
生存率又は多能性状態を維持するために必須であるものである。したがって、因子をコー
ドする遺伝子がノックアウト又は阻害される (すなわち、その発現が排除又は実質的に低
減される) 場合、ES細胞は形成されず、死滅するか、又はいくつかの実施形態では分化
する。いくつかの実施形態では、ES細胞における多能性と関連する機能を有する遺伝子
の発現を阻害すること (例えば、遺伝子によってコードされたRNA転写物及び/又はタ
ンパク質の平均定常状態レベルの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、

10

20

30

40

50

95%、又はそれ以上の低減をもたらす)は、生存可能であるがもはや多能性ではない細胞をもたらす。いくつかの実施形態では、遺伝子は、細胞が最終分化細胞に分化するときに、ES細胞におけるその発現が減少する(例えば、遺伝子によってコードされたRNA転写物及び/又はタンパク質の平均定常状態レベルの少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、又はそれ以上の減少をもたらす)ことを特徴とする。

【0062】

本明細書で使用されるとき、「多能性誘導遺伝子」とは、その発現が体細胞を多能性状態に再プログラムすることに寄与する遺伝子を指す。「多能性誘導因子」とは、多能性誘導遺伝子の発現産物を指す。多能性誘導因子は、多能性因子であってもよいが、そうである必要はない。外因的に導入された多能性誘導因子の発現は、一過性であってもよい、すなわち、多能性を誘導し、かつ/又は安定な多能性状態を確立するために、再プログラミングプロセスの少なくとも一部分の間に必要とされてもよいが、その後、多能性を維持するために必要とされなくてもよい。例えば、この因子は、多能性と関連する機能を有する内因性遺伝子の発現を誘導し得る。次いで、これらの遺伝子は、再プログラムされた細胞を多能性状態に維持し得る。

10

【0063】

「ポリヌクレオチド」は、本明細書では「核酸」と互換的に使用され、ヌクレオシドのポリマーを示す。典型的には、本発明のポリヌクレオチドは、ホスホジエステル結合によって連結された、DNA又はRNAにおいて自然に見出されるヌクレオシド(例えば、アデノシン、チミジン、グアノシン、シチジン、ウリジン、デオキシアデノシン、デオキシチミジン、デオキシグアノシン、及びデオキシシチジン)から構成される。しかしながら、この用語は、自然に発生する核酸において見出されるか否かにかかわらず、化学的又は生物学的に修飾された塩基、修飾された主鎖などを含有するヌクレオシド又はヌクレオシド類似体を含む分子を含み、このような分子は、ある特定の適用のために好ましくあり得る。本出願がポリヌクレオチドに言及する場合、DNA、RNAの両方、及び各々の場合における一本鎖及び二本鎖型の両方(及び各一本鎖分子の相補体)が提供されることが理解される。本明細書で使用されるとき、「ポリヌクレオチド配列」とは、ポリヌクレオチドという物質自体及び/又は特定の核酸を生化学的に特徴付ける配列情報(すなわち、塩基の略記として使用される文字の連続)を指すことができる。本明細書に提示されるポリヌクレオチド配列は、別段の指示がない限り、5'から3'の方向で提示される。

20

30

【0064】

「ポリペプチド」とは、アミノ酸のポリマーを指す。「タンパク質」及び「ポリペプチド」という用語は、本明細書では互換的に使用される。ペプチドは比較的短いポリペプチドであり、典型的には約2~60アミノ酸の長さである。本明細書で使用されるポリペプチドは、典型的には、タンパク質中に最も一般的に見出される20種類のL-アミノ酸などのアミノ酸を含有する。しかしながら、当該技術分野で既知の他のアミノ酸及び/又はアミノ酸類似体を使用することができる。ポリペプチド中のアミノ酸のうちの1つ以上は、例えば、炭水化物基、リン酸基、脂肪酸基、接合、官能化のためのリンカーなどの化学成分の付加によって修飾されてもよい。ポリペプチドに非ポリペプチド部分が共有結合的又は非共有結合的に会合している場合も、依然として「ポリペプチド」とみなされる。例示的な修飾には、グリコシル化及びパルミトイル化が含まれる。ポリペプチドは、天然源から精製され、組み換えDNA技術を使用して生成され、従来の固相ペプチド合成などの化学的手段を通じて合成され得る。本明細書で使用されるとき、「ポリペプチド配列」又は「アミノ酸配列」という用語は、ポリペプチド材料自体及び/又はポリペプチドを生化学的に特徴付ける配列情報(すなわち、アミノ酸名の略記として使用される文字又は3文字コードの連続)を指すことができる。本明細書に提示されるポリペプチド配列は、別段の指示がない限り、N末端からC末端の方向に提示される。

40

【0065】

単離された細胞に適用されるとき、「処理する」、「処理すること」、「処理」などの用語は、細胞を任意の種類のプロセス若しくは条件に供すること、又は細胞に対して任意

50

の種類、操作若しくは手順を実施することを含む。対象に適用されるとき、これらの用語は、医学的若しくは外科的処置、ケア、又は管理を個人に提供することを指す。

【 0 0 6 6 】

5 . 2 . 略記

本開示で使用される略記のリストを以下の表 1 に提供する。

【 0 0 6 7 】

【表 1】

表 1 . 略記

略記	定義
bFGF	塩基性線維芽細胞増殖因子
bp	塩基対
完全RPMI培地	RPMI+10%のFBS+1倍のPen/Strep
DAPI	4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール
ddH ₂ O	再蒸留水
DMEM	ダルベッコ変法イーグル培地
DPBS	ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水
ECM	細胞外マトリックス
FACS	蛍光活性化細胞選別
FACS緩衝液	DPBS+2%のFBS
6-FAM	6-カルボキシフルオレセイン
FBS	ウシ胎児血清
FMO	蛍光マイナス1
FP/F	順方向プライマー
IU	国際単位
KLF4	Kruppel様因子4
mAb	モノクローナル抗体
MEF	マウス胚性線維芽細胞
Oct-3	オクタマー結合転写因子-3
PCR	ポリメラーゼ連鎖反応
Pen/Strep	ペニシリン及びストレプトマイシン
PBMC	末梢血単核細胞
rhIL-2	組み換えヒトインターロイキン-2
rhIL-15	組み換えヒトインターロイキン-15
rpm	分当たりの回転数
RPMI	ロズウェルパーク記念研究所培地
RV/R	逆方向プライマー
SeV	センダイウイルス
SSEA-4	段階特異的胚抗原(stage-specific embryonic antigen)-4
MOI	感染の多重化
SOX2	性決定領域Y-box2
TRG	T細胞受容体ガンマ遺伝子座
TRD	T細胞受容体デルタ遺伝子座
Tg	トランスジェニック
Xg	重力(又はg力)
V	電圧
Zol	ゾレドロン酸一水和物

10

20

30

40

【 0 0 6 8 】

5 . 3 . 人工多能性幹細胞(iPSC)を作製する方法

一態様では、体細胞(例えば、T細胞)を低分化状態に再プログラムするための方法が本明細書で提供される。得られた細胞は、本明細書では再プログラムされた体細胞と呼ばれる。再プログラムされた体細胞は、様々な分化状態の、再プログラムされた体細胞であってもよい。いくつかの実施形態では、再プログラムされた体細胞は、人工多能性幹細胞である。本開示は、様々な因子の組み合わせ、例えば、ゾレドロン酸とインターロイキン-15(Interleukin-15、IL-15)との組み合わせが、T細胞を活性化することができ、したがって、転写因子で形質転換された非多能性哺乳動物T細胞における多

50

能性の誘導効率を改善することができるという驚くべき発見に部分的に基づく。したがって、一態様では、本開示は、非多能性哺乳動物 T 細胞（例えば、V₉⁺ T 細胞）における多能性を誘導する方法であって、末梢血単核細胞（P B M C）を、I L - 1 5 及びゾレドロン酸を含む活性化培養物と接触させることを含む、方法を提供する。

【0069】

いくつかの実施形態では、体細胞を再プログラムする方法であって、(a) 単離された細胞集団を活性化培養物と接触させることであって、活性化培養物は、I L - 1 5 及びゾレドロン酸を含む、接触させることと、(b) 単離された細胞集団を活性化培養物中で培養して、単離された細胞集団中の T 細胞を濃縮及び/又は活性化することと、(c) T 細胞を、1つ以上の再プログラミング因子をコードする1つ以上のウイルスベクター（複数可）を用いて形質導入することと、(d) 形質導入された T 細胞を、哺乳動物体細胞を低分化状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、を含む、方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、低分化状態は、多分化能状態である。いくつかの実施形態では、低分化状態は、多能性状態である。

10

【0070】

いくつかのより具体的な実施態様では、人工多能性幹細胞（i P S C）を作製する方法であって、(a) 単離された細胞集団を活性化培養物と接触させることであって、活性化培養物は、I L - 1 5 及びゾレドロン酸を含む、接触させることと、(b) 単離された細胞集団を活性化培養物中で培養して、単離された細胞集団中の T 細胞を濃縮及び/又は活性化することと、(c) T 細胞を、1つ以上の再プログラミング因子をコードする1つ以上のウイルスベクター（複数可）を用いて形質導入することと、(d) 形質導入された T 細胞を、哺乳動物体細胞を多能性状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、を含む、方法が本明細書で提供される。

20

【0071】

ある特定の実施形態では、活性化培養物は、例えば、活性化又は誘導の効率を改善するために、1つ以上の追加の薬剤又は化合物を更に含む。一実施形態では、活性化培養物は、インターロイキン - 2（Interleukin-2、I L - 2）を更に含む。

【0072】

したがって、いくつかの実施形態では、体細胞を再プログラムする方法であって、(a) 単離された細胞集団を活性化培養物と接触させることであって、活性化培養物は、I L - 1 5、ゾレドロン酸、及び I L - 2 を含む、接触させることと、(b) 単離された細胞集団を活性化培養物中で培養して、単離された細胞集団中の T 細胞を濃縮及び/又は活性化することと、(c) T 細胞を、1つ以上の再プログラミング因子をコードする1つ以上のウイルスベクター（複数可）を用いて形質導入することと、(d) 形質導入された T 細胞を、哺乳動物体細胞を低分化状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、を含む、体細胞を再プログラムする方法が本明細書で提供される。

30

【0073】

いくつかのより具体的な実施態様では、人工多能性幹細胞（i P S C）を作製する方法であって、(a) 単離された細胞集団を活性化培養物と接触させることであって、活性化培養物は、I L - 1 5、ゾレドロン酸、及び I L - 2 を含む、接触させることと、(b) 単離された細胞集団を活性化培養物中で培養して、単離された細胞集団中の T 細胞を濃縮及び/又は活性化することと、(c) T 細胞を、1つ以上の再プログラミング因子をコードする1つ以上のウイルスベクター（複数可）を用いて形質導入することと、(d) 形質導入された T 細胞を、哺乳動物体細胞を多能性状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、を含む、方法が本明細書で提供される。

40

【0074】

ある特定の実施形態では、本方法は、対象から、単離された細胞集団を得ることを更に含む。ある特定の実施形態では、対象は、哺乳動物である。ある特定の実施形態では、対象は、ヒトである。

【0075】

50

ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、末梢血細胞、臍帯血細胞、又は骨髓細胞である。一実施形態では、単離された細胞集団は、末梢血単核細胞（P B M C）である。

【0076】

低分化状態又は多能性状態を有する再プログラムされた哺乳動物体細胞を同定するための方法は、当該技術分野において既知である。例えば、いくつかの実施形態では、再プログラムされた体細胞は、適切な選択マーカーを発現する細胞を選択することによって同定される。いくつかの実施形態では、再プログラムされた体細胞は、多能性特性について更に評価される。多能性特性の存在は、体細胞が多能性状態に再プログラムされたことを示す。

10

【0077】

細胞の分化状態は連続スペクトルであり、このスペクトルの一端に最終分化状態があり、他端に脱分化状態（多能性状態）がある。再プログラミングとは、本明細書で使用されるとき、部分的又は最終分化することができる体細胞の分化状態を変化又は逆転させるプロセスを指す。再プログラミングには、体細胞の分化状態の、完全な逆転、並びに部分的な逆転が含まれる。言い換えれば、「再プログラミング」という用語は、本明細書で使用されるとき、細胞の分化状態のスペクトルに沿った低分化状態への任意の移行を含む。例えば、再プログラミングは、多分化能細胞を多能性細胞に戻すこと、最終分化細胞を多分化能細胞又は多能性細胞のいずれかに戻すこと、を含む。一実施形態では、体細胞の再プログラミングは、体細胞を多能性状態に戻す。別の実施形態では、体細胞の再プログラミングは、体細胞を多分化能状態に戻す。したがって、本明細書で使用されるとき、「低分化状態」という用語は、相対的な用語であり、完全な脱分化状態及び部分的な分化状態を含む。

20

【0078】

「多能性特性」という用語は、例えば、全ての種類の細胞に分化する能力、並びに多能性遺伝子の発現、他のES細胞マーカーの発現、及び全体的なレベルでは「幹細胞分子サイン」又は「幹細胞性」として知られる特徴的な発現プロファイルを含む、多能性細胞に特徴的な発現パターンを含む、多能性と関連する多くの特性を指す。

【0079】

したがって、再プログラムされた体細胞を多能性特性について評価するために、このような細胞を様々な増殖特性及びES細胞様形態について分析してもよい。いくつかの実施形態では、細胞を免疫無防備状態のSCIDマウスに皮下注射して、テラトーマを誘導してもよい（ES細胞の標準アッセイ）。ES様細胞は、胚様体に分化することができる（別のES特異的特徴）。更に、ES様細胞は、特定の細胞型への分化を駆動することが知られている、ある特定の増殖因子を添加することによってインビトロで分化させることができる。テロメラーゼ活性の誘導によってマークされる自己再生能は、監視することができる別の多能性特性である。

30

【0080】

いくつかの実施形態では、再プログラムされた体細胞の機能アッセイは、細胞が全ての細胞型を生じさせることができるかどうかを決定するために、再プログラムされた体細胞を胚盤胞に導入することによって行われてもよい。再プログラムされた細胞が身体のいくつかの細胞型を形成することができる場合、それらは多分化能性であり、再プログラムされた細胞が、生殖細胞を含む身体の全ての細胞型を形成することができる場合、それらは多能性である。

40

【0081】

他の実施形態では、再プログラムされた体細胞における個々の多能性遺伝子の発現を調べて、それらの多能性特性を評価してもよい。

【0082】

加えて、他のES細胞マーカーの発現を評価してもよい。段階特異的胚1 5抗原 - 1、- 3、及び - 4（SSEA - 1、SSEA - 3、SSEA - 4）は、初期胚発生におい

50

て特異的に発現される糖タンパク質であり、ES細胞のマーカーである (Solter and Knowles, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 5565 - 5569; Kannagi et al., 1983, EMBO J 2: 2355 - 2361)。

【0083】

酵素アルカリホスファターゼ (Alkaline Phosphatase、AP) の高度発現は、未分化胚性幹細胞と関連する別のマーカーである (Wobus et al., 1984, Exp. Cell Res 152: 212 - 219; Pease et al., 1990, Dev. Biol. 141: 322 - 352)。他の幹/前駆細胞マーカーとしては、中間神経フィラメントネスチン (Lendahl et al., 1990, Cell 60: 585 - 595; Dah-Istrand et al., 1992, J. Cell Sci. 103: 589 - 597)、膜糖タンパク質プロミン/AC133 (Weigmann et al., 1997, Proc. Natl. Acad. USA 94: 12425 - 12430; Corbeil et al., 1998, Blood 91: 2625 - 2626)、転写因子Tcf-4 (Korinek et al., 1998, Nat. Genet. 19: 379 - 383; Lee et al., 1999, J. Biol. Chem. 274: 1566 - 1572)、及び転写因子Cdx1 (Dupre et al., 1988, Genes Dev. 2: 1647 - 1654; Subramania et al., 1998, Differentiation 64: 11 - 18) が挙げられる。

【0084】

いくつかの実施形態では、再プログラムされた体細胞の発現プロファイリングを使用して、それらの多能性特性を評価してもよい。胚性幹細胞などの多能性細胞、及び成体幹細胞などの多分化能細胞は、全体的な遺伝子発現プロファイルの特徴的なパターンを有することが知られている。この特徴的なパターンは、「幹細胞分子サイン」又は「幹細胞性」と呼ばれる。例えば、Ramalho-Santos et al., Science 298: 597 - 600 (2002); Ivanova et al., Science 298: 601 - 604 を参照。

【0085】

体細胞は、多能性特性の完全な集合のいずれかを得るように再プログラムされ得、したがって、多能性である。あるいは、体細胞は、多能性特性の部分集合のみを得るように再プログラムされ得る。別の選択肢では、体細胞は、多分化能性であるように再プログラムされ得る。

【0086】

活性化培養

ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養される。ある特定の実施形態では、第1の期間は、1~20日である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、1~17日である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、1~15日である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、1~13日である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、1~11日である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、1~9日である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、1~7日である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、1~5日である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、1~3日である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、12~72時間である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、12~60時間である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、12~48時間である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、12~36時間である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、12~24時間である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、8~16時間である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、4~8時間である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、2~4時間である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、4~8時間である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、50~80時間である。ある特定の実施形態では

、第1の期間は、4～8時間である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、55～75時間である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、4～8時間である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、60～75時間である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、4～8時間である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、70～75時間である。ある特定の実施形態では、第1の期間は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20日である。

【0087】

ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、ある特定の期間以下、活性化培養物中で培養される。例えば、単離された細胞集団は、活性化培養物中で最大で13日間、最大で12日間、最大で11日間、最大で10日間、最大で9日間、最大で8日間、最大で7日間、最大で6日間、最大で5日間、最大で4日間、最大で3日間、最大で2日間、又は最大で1日間培養される。特定の実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で最大で5日間培養される。特定の好ましい実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で最大で3日間培養される。特定の好ましい実施形態では、単離された細胞集団は、活性化培養物中で約3日間培養される。

10

【0088】

ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～100%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～95%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～90%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～85%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～80%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～75%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～70%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～65%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～60%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～55%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～50%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～45%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～40%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～35%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、15%～35%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、25%～35%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、30%～35%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～30%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～25%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～20%のT細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～15%のT細胞を含む。

20

30

40

50

定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団中の T細胞は、5%~25%のTCRV₉₊ T細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団中の T細胞は、5%~20%のTCRV₉₊ T細胞を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団中の T細胞は、5%~15%のTCRV₉₊ T細胞を含む。

【0092】

ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団中の T細胞は、約100%、約95%、約90%、約85%、約80%、約75%、約70%、約65%、約60%、約55%、約50%、約45%、約40%、約35%、約30%、約25%、約20%、約15%、約10%、約5%のTCRV₉₊ T細胞（別名V₉₊ T細胞）を含む。ある特定の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団中の T細胞は、約90%未満、約80%未満、約70%未満、約60%未満、約50%未満、約45%未満、約40%未満、約35%未満、又は約30%未満のTCRV₉₊ T細胞を含む。

10

【0093】

一実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団中の T細胞は、約60%未満のTCRV₉₊ T細胞を含む。一実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団中の T細胞は、約55%未満のTCRV₉₊ T細胞を含む。更に別の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団中の T細胞は、約50%未満のTCRV₉₊ T細胞を含む。更に別の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団中の T細胞は、約45%未満のTCRV₉₊ T細胞を含む。更に別の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団中の T細胞は、約40%未満のTCRV₉₊ T細胞を含む。更に別の実施形態では、第1の期間にわたって活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団中の T細胞は、約35%未満のTCRV₉₊ T細胞を含む。

20

【0094】

ある特定の実施形態では、本方法は、単離された細胞集団中の T細胞を濃縮することを更に含む。特定の実施形態では、 T細胞は、細胞間凝集塊濃縮によって濃縮される。

30

【0095】

ある特定の実施形態では、工程(b)における活性化 T細胞の少なくとも一部は、V₉₊ T細胞である。

【0096】

ある特定の実施形態では、工程(b)における活性化 T細胞の少なくとも一部は、V_{9 2+} T細胞である。

【0097】

細胞

40

本開示は、単離された細胞集団、例えば、単離された T細胞集団が、活性化（例えば、ゾレドロン酸及びIL-15の存在下で）及び転写因子の導入（例えば、センダイウイルスベクターによる）によって活性化され、多能性に再プログラムされることができるといふ発見に基づいている。

【0098】

本開示の単離された細胞集団は、幹細胞、生殖細胞、又はiPSCではない、身体の任意のT細胞を含む。非iPSCの非限定的な例は、内臓、皮膚、骨、血液、神経組織、及び結合組織を含む、身体の任意の組織に由来するT細胞である。

【0099】

ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、血液細胞である。ある特定の実施形

50

態では、血液細胞は、好適には末梢血単核細胞（P M B C）であり、造血幹細胞から末梢血への最終分化までの全分化プロセスに存在する全ての種類の血液細胞を含み得る。一実施形態では、血液細胞は、例えば、造血幹細胞、リンパ系幹細胞、リンパ系樹状細胞前駆細胞、リンパ系樹状細胞、Tリンパ球前駆細胞、T細胞、Bリンパ球前駆細胞、B細胞、形質細胞、NK前駆細胞、NK細胞、単球、及びマクロファージを含む。

【0100】

いくつかの実施形態では、単離された細胞集団は、末梢血単核細胞（P B M C）、末梢血白血球（P B L）、腫瘍浸潤リンパ球（T I L）、又はそれらの組合せとすることができる。いくつかの実施形態では、単離された細胞集団は、末梢血単核（P B M C）細胞である。

10

【0101】

ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、T細胞である。いくつかの実施形態では、単離されたT細胞集団は、C D 4 + / C D 8 + 二重陽性T細胞、細胞傷害性T細胞、T h 3 (T r e g) 細胞、T h 9 細胞、T h ヘルパー細胞、T f h 細胞、幹メモリーT S C M 細胞、セントラルメモリーT C M 細胞、エフェクターメモリーT E M 細胞、エフェクターメモリーT E M R A 細胞、ガンマデルタT細胞、及びそれらの任意の組み合わせからなる群より選択することができる。

【0102】

いくつかの実施形態では、単離された細胞集団は、線維芽細胞、皮膚細胞、臍帯血細胞、末梢血細胞、及び腎上皮細胞などの、容易にアクセス可能であり、最小限の侵襲しか必要としない細胞型に由来する。

20

【0103】

ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、最終分化細胞である。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、最終分化T細胞である。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、最終分化P B M C 細胞である。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、最終分化 T 細胞である。

【0104】

本開示の単離された細胞集団は、哺乳動物、好ましくはヒトに由来し得るが、非ヒト霊長類、ネズミ（すなわち、マウス及びラット）、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギなどを含み、これらに限定されない。

30

【0105】

ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は哺乳動物細胞である。

【0106】

ある特定の実施形態では、単離された細胞集団はヒト細胞である。

【0107】

いくつかの実施形態では、単離された細胞集団は、ヒトP B M C 細胞である。

【0108】

多能性関連遺伝子の導入

本開示はまた、活性化された細胞集団に、多能性関連遺伝子である内因性遺伝子座を導入することに関する。いくつかの実施形態では、このような多能性関連遺伝子は、発現ベクターを使用して導入することができる。いくつかの実施形態では、このような多能性関連遺伝子は、所望の遺伝子座を標的とする少なくとも1つのs g R N A を有するC R I S P R 活性化系を使用して導入することができる。いくつかの実施形態では、このような多能性関連遺伝子は、標的細胞に導入された組み換え発現カセットからの発現によって導入することができる。いくつかの実施形態では、このような多能性関連遺伝子は、外因性再プログラミング転写因子ポリペプチドの存在下で細胞をインキュベートすることによって導入することができる。

40

【0109】

ある特定の実施形態では、多能性関連遺伝子を導入するために使用される発現ベクターは、アデノウイルス、センダイウイルス、ヘルペスウイルス、又はレトロウイルス（レン

50

チウイルスベクターなど)などに由来する改変ウイルスポリヌクレオチドを含む。発現ベクターは、組み換えウイルスに限定されず、DNAプラスミド及びインビトロで転写されたmRNAなどの非ウイルスベクターを含む。好ましい一実施形態では、センダイウイルスベクターが使用される。

【0110】

組み込まれた外因性配列を保有する標的細胞ゲノムから生じる安全性の問題に対処するために、いくつかの改変された遺伝子プロトコルが開発されており、本明細書に記載の作製方法において使用することができる。これらのプロトコルは、潜在的にリスクが低減されたiPS細胞を作製し、再プログラミング遺伝子を送達するための非組み込み型アデノウイルス(Stadtfield, M., et al., Science, 2008, 322: 945-949)、再プログラミングプラスミドの一過性トランスフェクション(Okita, K., et al., Science, 2008, 322: 949-953)、piggyBac転位系(Woltjen, K., et al., Nature, 2009, 458: 766-770; Yusa, et al., Nat. Methods, 2009, 6: 363-369; Kajii, K., et al. (2009))、Cre切除可能ウイルス(Soldner, F., et al., Cell, 2009, 136: 964-977)、及びoriP/EBNA1ベースのエピソーム発現系(Yu, J., et al., Science, 2009, 324(5928): 797-801)を含む。

10

【0111】

多能性関連遺伝子(再プログラミング転写因子をコードする遺伝子)の非限定的な例は、Oct3/4、Sox2、Nanog、Klf4、c-Myc、Nanog、Lin28、Nr5a2、Glis1、Cebpa、Esrrb、及びRex1である。いくつかの実施形態では、内因性遺伝子座は、Oct4又はSox2である。

20

【0112】

特定の実施形態では、単離された細胞集団は、Oct3/4ポリペプチド、Klf4ポリペプチド、c-Mycポリペプチド、Sox2ポリペプチド、Nanogポリペプチド、Lin28ポリペプチド、Nr5a2ポリペプチド、Glis1ポリペプチド、Cebpaポリペプチド、Esrrbポリペプチド、及びRex1ポリペプチドからなる群からの少なくとも1つ以上のタンパク質を内因的に発現する。ある特定の実施形態では、単離された細胞集団は、いかなる再プログラミング転写因子も内因的に発現しない。

30

【0113】

ある特定の実施形態では、再プログラミング因子は、Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Mycを含む。

【0114】

ある特定の実施形態では、再プログラミング因子は、Oct3/4、Sox2、KLF4、c-Myc、及びLin28である。

【0115】

ある特定の実施形態では、再プログラミング因子は、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycである。

40

【0116】

外因的に導入された多能性遺伝子は、いくつかの方法で行われ得る。一実施形態では、外因的に導入された多能性遺伝子は、多能性遺伝子の内因性染色体座とは異なる染色体座から発現され得る。このような染色体座は、オープンクロマチン構造を有する遺伝子座であってもよく、体細胞に必須ではない遺伝子(複数可)を含んでいてもよい。言い換えれば、望ましい染色体座は、その破壊が細胞死を引き起こさない遺伝子(複数可)を含む。例示的な染色体座としては、例えば、マウスROSA26遺伝子座及びII型コラーゲン(Col2a1)遺伝子座が挙げられる(Zambrowicz et al., 1997を参照)。

【0117】

50

外因的に導入された多能性遺伝子は、それらの発現が所望のとおり調節され得るよう
に、誘導性プロモーターから発現され得る。

【0118】

代替の実施形態では、外因的に導入された多能性遺伝子は、個々に、又は多能性細胞か
ら調製されたcDNA発現ライブラリーの一部としてのいずれかで、細胞に一時的にトラ
ンスフェクトされ得る。このような多能性細胞は、胚性幹細胞、卵母細胞、割球、内部細
胞塊細胞、胚性生殖細胞、胚様体(胚性)細胞、桑実胚由来細胞、奇形腫(奇形癌)細胞
、及び胚発生プロセスのより後の段階で採取された多分化能性の部分分化した胚性幹細胞
であり得る。

【0119】

cDNAライブラリーは、従来技術によって調製される。簡単に説明すると、mRNA
を対象の生物から単離する。RNA依存性DNAポリメラーゼは、mRNAを鋳型とし
て使用する第1の鎖合成のために使用される。第2の鎖合成は、cDNA生成物を生じる
DNA依存性DNAポリメラーゼを使用して行われる。cDNAのクローニングを容易に
するための従来処理に続いて、cDNAが少なくとも1つの調節性配列に動作可能に連
結されるように、cDNAを発現ベクターに挿入する。cDNAライブラリーに関連して
使用するための発現ベクターの選択は、特定のベクターに限定されるものではない。マウ
ス細胞における使用に適した任意の発現ベクターが適切である。一実施形態では、cDN
A発現構築物からの発現を駆動するプロモーターは、誘導性プロモーターである。調節性
配列という用語は、プロモーター、エンハンサー、及び他の発現制御要素を含む。例示的
な調節性配列は、Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press,
San Diego, Calif. (1990)に記載されている。例えば、動作可能に
連結されたときにDNA配列の発現を制御する多種多様な発現制御配列のいずれかが、c
DNAを発現するためにこれらのベクターにおいて使用され得る。このような有用な発現
制御配列としては、例えば、SV40の初期及び後期プロモーター、tetプロモーター
、アデノウイルス若しくはサイトメガロウイルス最初期プロモーター、lac系、trp
系、TAC若しくはTRC系、発現がT7 RNAポリメラーゼによって指向されるT7
プロモーター、ファージの主要オペレーター及びプロモーター領域、fdコートタンパ
ク質の制御領域、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ又は他の解糖酵素のプロモーター、酸
性ホスファターゼ、例えば、Pho5のプロモーター、酵母接合因子のプロモーター、
バキュロウイルス系のポリヘドロンプロモーター、及び原核生物細胞若しくは真核生物細
胞又はそれらのウイルスの遺伝子の発現を制御することが知られている他の配列、並びに
これらの様々な組み合わせが挙げられる。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細
胞の選択及び/又は発現されることが所望されるタンパク質の種類などの因子に依存し得
ることが理解されるべきである。更に、ベクターのコピー数、そのコピー数を制御する能
力、及び抗生物質マーカーなどの、ベクターによってコードされる任意の他のタンパク質
の発現もまた、考慮されるべきである。

【0120】

外因的に導入された多能性遺伝子は、誘導性プロモーターから発現され得る。本明細書
で使用されるとき、「誘導性プロモーター」という用語は、誘導因子(化学薬剤及び/又
は生物学的製剤など)の不在下で、動作可能に連結された遺伝子(cDNAを含む)の発
現を指向しないか、又は低レベルの発現を指向し、そして誘導因子に応答して、発現を指
向するその能力が増強されるプロモーターを指す。例示的な誘導性プロモーターとしては
、例えば、重金属(CRC Boca Raton, Fla. (1991), 167-2
20; Brinster et al. Nature (1982), 296, 39-42
)、熱ショック、ホルモン(Lee et al. P.N.A.S. USA (1988)
, 85, 1204-1208; (1981), 294, 228-232; Klocke
et al. Nature (1987), 329, 734-736; Israel and
Kaufman, Nucleic Acids Res. (1989), 17, 2589

10

20

30

40

50

- 2604) に応答するプロモーター、グルコース、ラクトース、ガラクトース又は抗生物質などの化学薬剤に応答するプロモーターが挙げられる。

【0121】

テトラサイクリン誘導性プロモーターは、抗生物質に応答する誘導性プロモーターの一例である。Gossen et al., 2003を参照。テトラサイクリン誘導性プロモーターは、1つ以上のテトラサイクリンオペレーター（複数可）に動作可能に連結された最小プロモーターを含む。テトラサイクリン又はその類似体の1つが存在すると、転写アクチベーターがテトラサイクリンオペレーター配列に結合し、これが最小プロモーターを活性化し、したがって関連するcDNAの転写を活性化する。テトラサイクリン類似体は、テトラサイクリンとの構造的相同性を示し、テトラサイクリン誘導性プロモーターを活性化することができる任意の化合物を含む。例示的なテトラサイクリン類似体としては、例えば、ドキシサイクリン、クロロテトラサイクリン、及びアンヒドロテトラサイクリンが挙げられる。

10

【0122】

したがって、一実施形態では、本開示は、誘導性プロモーター下で導入遺伝子として発現される少なくとも1つの多能性遺伝子を保有する体細胞を提供する。このような誘導性多能性導入遺伝子（複数可）を有する体細胞は、再プログラムされる傾向がより高い可能性がある。

【0123】

本開示の遺伝子操作された体細胞はいずれも、本方法において使用され得る。一実施形態では、本方法で使用される体細胞は、第1の選択マーカーに連結された内因性多能性遺伝子を1つのみ含み、選択工程は、第1の選択マーカーの発現について選択するために行われる。代替の実施形態では、本方法で使用される体細胞は、任意の数の内因性多能性遺伝子を含み、その各々は、別個の選択マーカーにそれぞれ連結され、選択工程は、選択マーカーの、少なくとも部分集合について選択するために行われる。例えば、選択工程は、様々な内因性多能性遺伝子に連結された全ての選択マーカーについて選択するために行われてもよい。

20

【0124】

代替の実施形態では、本方法で使用される体細胞は、内因性多能性遺伝子に連結された選択マーカー、及び誘導性プロモーター下で導入遺伝子として発現される更なる多能性遺伝子を含む。これらの細胞について、再プログラミングの方法は、多能性導入遺伝子の発現を誘導し、選択マーカーの発現について選択することを含み得る。

30

【0125】

ある特定の実施形態では、上記の方法に記載される工程(d)において、形質導入されたT細胞は、1つ以上の支持細胞層の存在下で培養される。ある特定の実施形態では、工程(d)において、形質導入されたT細胞は、支持細胞層の単層の存在下で培養される。ある特定の実施形態では、支持細胞層は、マウス胚性線維芽細胞(mouse embryonic fibroblast、MEF)を含む。ある特定の実施形態では、工程(d)において、形質導入されたT細胞は、支持細胞層の単層の存在下で培養される。ある特定の実施形態では、工程(d)において、形質導入されたT細胞は、有糸分裂的に不活性化されたマウス胚性線維芽細胞(MEF)の存在下で培養される。ある特定の実施形態では、工程(d)において、形質導入されたT細胞は、支持細胞を含まない条件下で培養される。ある特定の実施形態では、工程(d)において、形質導入されたT細胞は、iMatrix-511コーティングプレート内で培養される。

40

【0126】

ある特定の実施形態では、工程(d)に続いて、本方法は、工程(e)作製されたiPSCを単離及び/又は精製することを更に含む。

【0127】

ある特定のより具体的な実施形態では、人工多能性幹細胞(iPSC)を作製する方法であって、単離された細胞集団を活性化培養物と接触させることであって、活性化培養物

50

は、IL-15、ゾレドロン酸、及びIL-2を含む、接触させることと、単離された細胞集団を活性化培養物中で培養して、単離された細胞集団中のT細胞を濃縮及び/又は活性化することと、T細胞を、1つ以上の再プログラミング因子をコードするセンダイウイルス(SeV)ベクターを用いて形質導入することと、形質導入されたT細胞を、哺乳動物体細胞を多能性状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、を含む、方法が本明細書で提供される。

【0128】

ある特定のより具体的な実施形態では、人工多能性幹細胞(iPSC)を作製する方法であって、対象(例えば、ヒト)から単離された細胞集団(例えば、末梢血単核細胞(PBMC)などの最終分化細胞)を得ることと、単離された細胞集団を活性化培養物と接触させることと、活性化培養物は、IL-15、ゾレドロン酸、及びIL-2を含む、接触させることと、単離された細胞集団を活性化培養物中で培養して、単離された細胞集団中のT細胞を濃縮及び/又は活性化することと、T細胞を、1つ以上の再プログラミング因子をコードするセンダイウイルス(SeV)ベクターを用いて形質導入することと、形質導入されたT細胞を、哺乳動物体細胞を多能性状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、を含む、方法が本明細書で提供される。

10

【0129】

他のより具体的な実施形態では、人工多能性幹細胞(iPSC)を作製する方法であって、対象(例えば、ヒト)から単離された細胞集団(例えば、末梢血単核細胞(PBMC)などの最終分化細胞)を得ることと、単離された細胞集団を活性化培養物と接触させることと、活性化培養物は、IL-15、ゾレドロン酸、及びIL-2を含む、接触させることと、単離された細胞集団を活性化培養物中で約3日間培養して、単離された細胞集団中のT細胞を濃縮及び/又は活性化することと、T細胞を、1つ以上の再プログラミング因子をコードするセンダイウイルス(SeV)ベクターを用いて形質導入することと、形質導入されたT細胞を、哺乳動物体細胞を多能性状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、を含む、方法が本明細書で提供される。

20

【0130】

他のより具体的な実施形態では、人工多能性幹細胞(iPSC)を作製する方法であって、対象(例えば、ヒト)から単離された細胞集団(例えば、末梢血単核細胞(PBMC)などの最終分化細胞)を得ることと、単離された細胞集団を活性化培養物と接触させることと、活性化培養物は、IL-15、ゾレドロン酸、及びIL-2を含む、接触させることと、単離された細胞集団を活性化培養物中で約3日間培養することと、活性化培養物中での培養後、単離された細胞集団が35%未満のT細胞を含むように、培養することと、T細胞を、1つ以上の再プログラミング因子をコードするセンダイウイルス(SeV)ベクターを用いて形質導入することと、形質導入されたT細胞を、哺乳動物体細胞を多能性状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、を含む、方法が本明細書で提供される。

30

【0131】

他のより具体的な実施形態では、人工多能性幹細胞(iPSC)を作製する方法であって、対象(例えば、ヒト)から単離された細胞集団(例えば、末梢血単核細胞(PBMC)などの最終分化細胞)を得ることと、単離された細胞集団を活性化培養物と接触させることと、活性化培養物は、IL-15、ゾレドロン酸、及びIL-2を含む、接触させることと、単離された細胞集団を活性化培養物中で約3日間培養することと、活性化培養物中での培養後、単離された細胞集団が35%未満のT細胞を含むように、培養することと、細胞間凝集塊濃縮によってT細胞を更に濃縮することと、T細胞を、1つ以上の再プログラミング因子をコードするセンダイウイルス(SeV)ベクターを用いて形質導入することと、形質導入されたT細胞を、哺乳動物体細胞を多能性状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、を含む、方法が本明細書で提供される。

40

【0132】

50

他のより具体的な実施形態では、人工多能性幹細胞（iPSC）を作製する方法であって、対象（例えば、ヒト）から単離された細胞集団（例えば、末梢血単核細胞（PBMC）などの最終分化細胞）を得ることと、単離された細胞集団を活性化培養物と接触させることであって、活性化培養物は、IL-15、ゾレドロン酸、及びIL-2を含む、接触させることと、単離された細胞集団を活性化培養物中で約3日間培養することであって、活性化培養物中での培養後、単離された細胞集団が35%未満のT細胞を含むように、培養することと、任意選択で、細胞間凝集塊濃縮によってT細胞を更に濃縮することと、T細胞を、OCT3/4、SOX2、KLF4、LIN28、及びc-Mycからなる群から選択される1つ以上の再プログラミング因子をコードするセンダイウイルス（SeV）ベクターを用いて形質導入することと、形質導入されたT細胞を、哺乳動物体細胞を多能性状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、を含む、方法が本明細書で提供される。

10

【0133】

他のより具体的な実施形態では、人工多能性幹細胞（iPSC）を作製する方法であって、対象（例えば、ヒト）から単離された細胞集団（例えば、末梢血単核細胞（PBMC）などの最終分化細胞）を得ることと、単離された細胞集団を活性化培養物と接触させることであって、活性化培養物は、IL-15、ゾレドロン酸、及びIL-2を含む、接触させることと、単離された細胞集団を活性化培養物中で約3日間培養することであって、活性化培養物中での培養後、単離された細胞集団が35%未満のT細胞を含むように、培養することと、任意選択で、細胞間凝集塊濃縮によってT細胞を更に濃縮することと、T細胞を、OCT3/4、SOX2、KLF4、LIN28、及びc-Mycからなる群から選択される1つ以上の再プログラミング因子をコードするセンダイウイルス（SeV）ベクターを用いて形質導入することと、形質導入されたT細胞を、支持細胞層のうちの1つ以上の層の存在下で哺乳動物体細胞を多能性状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、を含む、方法が本明細書で提供される。

20

【0134】

他のより具体的な実施形態では、人工多能性幹細胞（iPSC）を作製する方法であって、対象（例えば、ヒト）から単離された細胞集団（例えば、末梢血単核細胞（PBMC）などの最終分化細胞）を得ることと、単離された細胞集団を活性化培養物と接触させることであって、活性化培養物は、IL-15、ゾレドロン酸、及びIL-2を含む、接触させることと、単離された細胞集団を活性化培養物中で約3日間培養することであって、活性化培養物中での培養後、単離された細胞集団が35%未満のT細胞を含むように、培養することと、任意選択で、細胞間凝集塊濃縮によってT細胞を更に濃縮することと、T細胞を、OCT3/4、SOX2、KLF4、LIN28、及びc-Mycからなる群から選択される1つ以上の再プログラミング因子をコードするセンダイウイルス（SeV）ベクターを用いて形質導入することと、形質導入されたT細胞を、マウス胚性線維芽細胞（MEF）を含む支持細胞層の単層の存在下で哺乳動物体細胞を多能性状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、を含む、方法が本明細書で提供される。

30

【0135】

T細胞に由来するiPSC

ある特定の実施形態では、作製されたiPSCはT細胞に由来する。ある特定の実施形態では、作製されたiPSCは、TRG遺伝子座及びTRD遺伝子座の再配置遺伝子を有する。ある特定の実施形態では、作製されたiPSCは、TCRG遺伝子座及びTCRD遺伝子座からポリメラーゼ連鎖反応（polymerase chain reaction、PCR）生成物を作製しない。

40

【0136】

ある特定の実施形態では、作製されたiPSCは、T細胞に由来しない。

【0137】

ある特定の実施形態では、作製されたiPSCは、センダイウイルス（SeV）ベクタ

50

ーに対して陰性である。

【0138】

ある特定の実施形態では、作製されたiPSCは、染色体の喪失を伴わずにゲノム的に安定している。一実施形態では、作製されたiPSCのゲノム安定性は、核型分析によって決定される。

【0139】

ある特定の実施形態では、作製されたiPSCは、採用後に支持細胞を含まない培地中で増殖及び維持することができる。

【0140】

ある特定の実施形態では、本方法は、作製されたiPSCをインビトロ又は生体外で所望の細胞型に分化させることを更に含む。ある特定の実施形態では、本方法は、作製されたiPSCをインビトロで所望の細胞型に分化させることを更に含む。ある特定の実施形態では、本方法は、作製されたiPSCを生体外で所望の細胞型に分化させることを更に含む。

10

【0141】

ある特定の実施形態では、本方法は、作製されたiPSCを対象に投与することを更に含む。

【0142】

ある特定の実施形態では、本方法は、本明細書で作製されたiPSCから分化した分化細胞を対象に投与することを更に含む。

20

【0143】

5.4. T細胞由来人工多能性幹細胞(iPSC)

また、新規な特性を有する人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団も本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、iPSCの単離された集団は、1つ以上の再プログラミング因子を発現する多能性細胞を含み、TRG遺伝子及びTRD遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含む。

【0144】

ある特定の実施形態では、iPSCの単離された集団は、本明細書に(例えば、第5.3節に)記載の方法に従って作製される。

【0145】

ある特定の実施形態では、再プログラミング因子は、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-My c、及びLin28からなる群から選択される。

30

【0146】

ある特定の実施形態では、再プログラミング因子は、Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-My cを含む。

【0147】

ある特定の実施形態では、再プログラミング因子は、Oct3/4、Sox2、KLF4、c-My c、及びLin28である。

【0148】

ある特定の実施形態では、再プログラミング因子は、Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-My cである。

40

【0149】

ある特定の実施形態では、iPSCの単離された集団は、T細胞に由来する。ある特定の実施形態では、iPSCの単離された集団は、TRG遺伝子座及びTRD遺伝子座の再配置遺伝子を有する。ある特定の実施形態では、iPSCの単離された集団は、TCRG遺伝子座及びTCRD遺伝子座からPCR生成物を作製しない。

【0150】

ある特定の実施形態では、iPSCの単離された集団は、T細胞に由来しない。ある特定の実施形態では、iPSCの単離された集団は、TRA遺伝子座及びTRB遺伝子座の再配置遺伝子を有していない。ある特定の実施形態では、iPSCの単離された集団

50

は、TCRA遺伝子座及びTCRB遺伝子座からPCR生成物を作製しない。

【0151】

ある特定の実施形態では、iPSCの単離された集団は、センダイウイルス(SeV)ベクターに対して陰性である。

【0152】

ある特定の実施形態では、iPSCの単離された集団は、染色体の喪失を伴わずにゲノム的に安定している。一実施形態では、iPSCの単離された集団のゲノム安定性は、核型分析によって決定される。

【0153】

ある特定の実施形態では、iPSCの単離された集団は、採用後に支持細胞を含まない培地中で増殖及び維持することができる。 10

【0154】

いくつかの実施形態では、1つ以上の再プログラミング因子を発現する多能性細胞を含む人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団であって、(i)多能性細胞は、TRG遺伝子及びTRD遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含むか、又はTRG遺伝子座及びTRD遺伝子座の再配置遺伝子を有し、(ii)再プログラミング因子は、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、及びLin28からなる群から選択され、(iii)iPSCの単離された集団は、センダイウイルス(SeV)ベクターに対して陰性であり、(iv)iPSCの単離された集団は、T細胞に由来するが、T細胞に由来せず、(v)iPSCの単離された集団は、TCRA遺伝子座及びTCRB 20 遺伝子座からPCR生成物を作製せず、(vi)iPSCの単離された集団は、例えば、核型分析によって決定されるように、染色体の喪失を伴わずにゲノム的に安定しており、かつ/又は(vii)iPSCの単離された集団は、採用後に支持細胞を含まない培地中で増殖及び維持することができる、人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団が本明細書で提供される。

【0155】

具体的な実施形態では、1つ以上の再プログラミング因子を発現する多能性細胞を含む人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団であって、多能性細胞は、TRG遺伝子及びTRD遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含み、再プログラミング因子は、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、及びLin28からなる群から選 30 択される、人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団が本明細書で提供される。

【0156】

別の具体的な実施形態では、1つ以上の再プログラミング因子を発現する多能性細胞を含む人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団であって、多能性細胞は、TRG遺伝子及びTRD遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含み、再プログラミング因子は、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、及びLin28である、人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団が本明細書で提供される。

【0157】

更に別の具体的な実施形態では、1つ以上の再プログラミング因子を発現する多能性細胞を含む人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団であって、多能性細胞は、TR 40 G遺伝子及びTRD遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含み、再プログラミング因子は、Oct3/4、Sox2、Klf4、及びc-Mycである、人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団が本明細書で提供される。

【0158】

更に別の具体的な実施形態では、1つ以上の再プログラミング因子を発現する多能性細胞を含む人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団であって、多能性細胞は、TRG遺伝子及びTRD遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含み、iPSCの単離された集団は、センダイウイルス(SeV)ベクターに対して陰性である、人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団が本明細書で提供される。

【0159】

更に別の具体的な実施形態では、1つ以上の再プログラミング因子を発現する多能性細胞を含む人工多能性幹細胞 (iPSC) の単離された集団であって、多能性細胞は、TRG 遺伝子及びTRD 遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含み、再プログラミング因子は、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、及びLin28 からなる群から選択され、iPSC の単離された集団は、センダイウイルス (SeV) ベクターに対して陰性である、人工多能性幹細胞 (iPSC) の単離された集団が本明細書で提供される。

【0160】

更に別の具体的な実施形態では、1つ以上の再プログラミング因子を発現する多能性細胞を含む人工多能性幹細胞 (iPSC) の単離された集団であって、多能性細胞は、TRG 遺伝子及びTRD 遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含み、iPSC の単離された集団は、T細胞に由来するが、T細胞に由来しない、人工多能性幹細胞 (iPSC) の単離された集団が本明細書で提供される。

10

【0161】

更に別の具体的な実施形態では、1つ以上の再プログラミング因子を発現する多能性細胞を含む人工多能性幹細胞 (iPSC) の単離された集団であって、多能性細胞は、TRG 遺伝子及びTRD 遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含み、iPSC の単離された集団は、TCRA 遺伝子座及びTCRB 遺伝子座からPCR生成物を作製しない、人工多能性幹細胞 (iPSC) の単離された集団が本明細書で提供される。

【0162】

更に別の具体的な実施形態では、1つ以上の再プログラミング因子を発現する多能性細胞を含む人工多能性幹細胞 (iPSC) の単離された集団であって、多能性細胞は、TRG 遺伝子及びTRD 遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含むか、又はTRG 遺伝子座及びTRD 遺伝子座の再配置遺伝子を有し、iPSC の単離された集団は、例えば、核型分析によって決定されるように、染色体の喪失を伴わずにゲノム的に安定している、人工多能性幹細胞 (iPSC) の単離された集団が本明細書で提供される。

20

【0163】

更に別の具体的な実施形態では、1つ以上の再プログラミング因子を発現する多能性細胞を含む人工多能性幹細胞 (iPSC) の単離された集団であって、多能性細胞は、TRG 遺伝子及びTRD 遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含むか、又はTRG 遺伝子座及びTRD 遺伝子座の再配置遺伝子を有し、iPSC の単離された集団は、採用後に支持細胞を含まない培地中で増殖及び維持することができる、人工多能性幹細胞 (iPSC) の単離された集団が本明細書で提供される。

30

【0164】

更に別の具体的な実施形態では、1つ以上の再プログラミング因子を発現する多能性細胞を含む人工多能性幹細胞 (iPSC) の単離された集団であって、多能性細胞は、TRG 遺伝子及びTRD 遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含むか、又はTRG 遺伝子座及びTRD 遺伝子座の再配置遺伝子を有し、再プログラミング因子は、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、及びLin28 からなる群から選択され、iPSC の単離された集団は、センダイウイルス (SeV) ベクターに対して陰性であり、iPSC の単離された集団は、T細胞に由来するが、T細胞に由来せず、iPSC の単離された集団は、TCRA 遺伝子座及びTCRB 遺伝子座からPCR生成物を作製せず、iPSC の単離された集団は、例えば、核型分析によって決定されるように、染色体の喪失を伴わずにゲノム的に安定しており、iPSC の単離された集団は、採用後に支持細胞を含まない培地中で増殖及び維持することができる、人工多能性幹細胞 (iPSC) の単離された集団が本明細書で提供される。

40

【0165】

更に別の具体的な実施形態では、1つ以上の再プログラミング因子を発現する多能性細胞を含む人工多能性幹細胞 (iPSC) の単離された集団であって、多能性細胞は、TRG 遺伝子及びTRD 遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含むか、又はTRG

50

遺伝子座及びT R D 遺伝子座の再配置遺伝子を有し、再プログラミング因子は、O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、c - M y c、及びL i n 2 8 からなる群から選択され、i P S C の単離された集団は、センダイウイルス (S e V) ベクターに対して陰性であり、i P S C の単離された集団は、T C R A 遺伝子座及びT C R B 遺伝子座からP C R 生成物を作製せず、i P S C の単離された集団は、例えば、核型分析によって決定されるように、染色体の喪失を伴わずにゲノム的に安定しており、i P S C の単離された集団は、採用後に支持細胞を含まない培地中で増殖及び維持することができる、人工多能性幹細胞 (i P S C) の単離された集団が本明細書で提供される。

【 0 1 6 6 】

更に別の具体的な実施形態では、多能性細胞を含む人工多能性幹細胞 (i P S C) の単離された集団であって、多能性細胞は、T R G 遺伝子及びT R D 遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含むか、又はT R G 遺伝子座及びT R D 遺伝子座の再配置遺伝子を有し、i P S C の単離された集団は、センダイウイルス (S e V) ベクターに対して陰性であり、i P S C の単離された集団は、T 細胞に由来するが、T 細胞に由来せず、i P S C の単離された集団は、T C R A 遺伝子座及びT C R B 遺伝子座からP C R 生成物を作製せず、i P S C の単離された集団は、例えば、核型分析によって決定されるように、染色体の喪失を伴わずにゲノム的に安定しており、i P S C の単離された集団は、採用後に支持細胞を含まない培地中で増殖及び維持することができる、人工多能性幹細胞 (i P S C) の単離された集団が本明細書で提供される。

【 0 1 6 7 】

更に別の具体的な実施形態では、多能性細胞を含む人工多能性幹細胞 (i P S C) の単離された集団であって、多能性細胞は、T R G 遺伝子及びT R D 遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含むか、又はT R G 遺伝子座及びT R D 遺伝子座の再配置遺伝子を有し、i P S C の単離された集団は、センダイウイルス (S e V) ベクターに対して陰性であり、i P S C の単離された集団は、T C R A 遺伝子座及びT C R B 遺伝子座からP C R 生成物を作製せず、i P S C の単離された集団は、例えば、核型分析によって決定されるように、染色体の喪失を伴わずにゲノム的に安定しており、i P S C の単離された集団は、採用後に支持細胞を含まない培地中で増殖及び維持することができる、人工多能性幹細胞 (i P S C) の単離された集団が本明細書で提供される。

【 0 1 6 8 】

更に別の具体的な実施形態では、多能性細胞を含む人工多能性幹細胞 (i P S C) の単離された集団であって、多能性細胞は、T R G 遺伝子及びT R D 遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含むか、又はT R G 遺伝子座及びT R D 遺伝子座の再配置遺伝子を有し、i P S C の単離された集団は、T C R A 遺伝子座及びT C R B 遺伝子座からP C R 生成物を作製せず、i P S C の単離された集団は、例えば、核型分析によって決定されるように、染色体の喪失を伴わずにゲノム的に安定しており、i P S C の単離された集団は、採用後に支持細胞を含まない培地中で増殖及び維持することができる、人工多能性幹細胞 (i P S C) の単離された集団が本明細書で提供される。

【 0 1 6 9 】

更に別の具体的な実施形態では、多能性細胞を含む人工多能性幹細胞 (i P S C) の単離された集団であって、多能性細胞は、T R G 遺伝子及びT R D 遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含むか、又はT R G 遺伝子座及びT R D 遺伝子座の再配置遺伝子を有し、i P S C の単離された集団は、T C R A 遺伝子座及びT C R B 遺伝子座からP C R 生成物を作製せず、i P S C の単離された集団は、例えば、核型分析によって決定されるように、染色体の喪失を伴わずにゲノム的に安定している、人工多能性幹細胞 (i P S C) の単離された集団が本明細書で提供される。

【 0 1 7 0 】

5 . 5 . 医薬組成物

また、本明細書に記載の方法に従って作製されたi P S C、又はそれらからの分化細胞、及び1つ以上の医薬的に許容される担体を含む「医薬組成物」も本明細書で提供される

10

20

30

40

50

。特定の実施形態では、作製された i P S C 又はそれらからの分化細胞は、治療的に有効な量で存在する。特定の実施形態では、作製された i P S C 又はそれらからの分化細胞は、予防的に有効な量で存在する。医薬組成物は、本明細書で提供される方法及び使用に従って使用することができる。したがって、例えば、医薬組成物は、本明細書で提供される治療又は予防方法及び使用を実施するために対象に投与することができる。本明細書で提供される医薬組成物は、意図される投与の方法又は経路に適合するように製剤化することができ、例示的な投与経路は、本明細書に記載されている。

【 0 1 7 1 】

医薬組成物は、典型的には、治療的に有効な量の作製された i P S C 又はそれらからの分化細胞のうち少なくとも 1 つと、医薬的に許容される担体と、を含む。適切な医薬的に許容される担体としては、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸）、防腐剤（例えば、ベンジルアルコール、メチルパラベン、p - ヒドロキシベンゾエート）、乳化剤、懸濁剤、分散剤、溶媒、緩衝剤、潤滑剤、充填剤、及び / 又は希釈剤が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、適切なビヒクルは、生理食塩水であってもよい。使用することができる典型的な緩衝剤としては、医薬的に許容される弱酸、弱塩基、又はそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。また、緩衝剤成分は、リン酸、酒石酸、コハク酸、クエン酸、酢酸、及びそれらの塩などの水溶性試薬も含むことができる。

10

【 0 1 7 2 】

ビヒクルは、医薬組成物の pH、モル浸透圧濃度、粘度、又は安定性を改変又は維持するための他の医薬的に許容される賦形剤を含有していてもよい。具体的な実施形態では、ビヒクルは、水性緩衝液である。具体的な実施形態では、ビヒクルは、例えば、塩化ナトリウムを含む。

20

【 0 1 7 3 】

本明細書で提供される医薬組成物は、本明細書に記載の作製された i P S C 又はそれらからの分化細胞の投与速度を改変又は維持するための、更なる他の医薬的に許容される製剤を含有し得る。このような製剤としては、例えば、持続放出又は制御放出製剤を調製する際に当業者に既知の物質が挙げられる。医薬的に許容される製剤に関しては、例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042) 1435 ~ 1712 ページ、及び The Merck Index, 12th Ed. (1996, Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ) を参照のこと。

30

【 0 1 7 4 】

具体的な実施形態では、医薬組成物は、単回使用容器（例えば、単回使用バイアル、アンプル、シリンジ、又は自己注射器）で提供される。具体的な実施形態では、医薬組成物は、複数回使用容器（例えば、複数回使用バイアル又はカートリッジ）で提供される。静脈内注入を含む、任意の薬物送達装置を使用して、本明細書に記載の i P S C 又は医薬組成物を送達してもよい。

【 0 1 7 5 】

医薬組成物は、本明細書に記載されるように、その意図される投与経路に適合するように配合することができる。

40

【 0 1 7 6 】

医薬組成物はまた、組成物を分解又は身体からの排除から保護するための担体を含むことができる。様々な抗菌剤及び抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、アスコルビン酸、チメロサルが、医薬組成物中に含まれ得る。

【 0 1 7 7 】

5 . 6 . 治療方法及び使用

また、本開示の方法によって作製される、i P S C などの再プログラムされた多能性体細胞を含む再プログラムされた体細胞も本明細書で提供される。所望の細胞型の細胞の生成に有用なこれらの方法は、広範な用途を有する。一例として、これらの方法は、状態の

50

治療又は予防での医療用途を有する。

【0178】

したがって、一態様では、哺乳動物における疾患又は障害の治療又は予防のための方法が本明細書で提供される。一実施形態では、本方法は、個体から体細胞を得ること、本発明の方法によってそのようにして得られた体細胞を再プログラムしてiPSCを得ることから始まる。次いで、iPSCを、所望の細胞型の細胞へのiPSCの発生に適した条件下で培養する。所望の細胞型の発生した細胞を採取し、個体に導入して疾患又は障害を治療する。代替の実施形態では、本方法は、個体から体細胞を得ること、本方法に従って体細胞を再プログラムすることから始まる。次いで、iPSCを所望の臓器へのiPSCの発生に適した条件下で培養し、これを採取し、個体に導入して疾患又は障害を治療する。

10

【0179】

いくつかの実施形態では、本発明の再プログラムされた体細胞は、ES様細胞であり、したがって、ES細胞を分化させるための既知の方法に従って、所望の細胞型を得るために分化するように誘導され得る。例えば、iPSCは、造血幹細胞、筋細胞、心筋細胞、肝細胞、軟骨細胞、上皮細胞、尿路細胞などに分化するように、このような細胞を分化培地中で、細胞分化をもたらす条件下で培養することによって誘導され得る。適切な培養条件である、胚性幹細胞の分化をもたらす培地及び方法は、当該技術分野において公知である。

【0180】

いくつかの具体的な実施形態では、iPSCは、例えば、Palacios et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 92:7530-37 (1995)に記載されるように、造血幹細胞に分化されるように誘導され、この文献は、幹細胞をある誘導手順に供することによる、胚細胞株からの造血幹細胞の作製を教示しており、この手順は、レチノイン酸を欠く懸濁培養培地中でこのような細胞の凝集体を最初に培養し、続いてレチノイン酸を含む同じ培地中で培養し、続いて細胞附着を提供する基質に細胞凝集体を移植することを含む。

20

【0181】

他の具体的な実施形態では、iPSCは、Pedersen, J. Reprod. Fert., 6:543-52 (1994)に記載されているような方法に従って分化させるように誘導され、これは、とりわけ、造血細胞、筋肉、心筋、神経細胞を含む様々な分化細胞型を作製するための胚性幹細胞のインビトロ分化のための方法を開示する多数の論文を参照している。

30

【0182】

他の具体的な実施形態では、iPSCは、Bain et al., Dev. Biol., 168:342-357 (1995)に従って分化させるように誘導され、これは、神経特性を有する神経細胞を作製するための胚性幹細胞のインビトロ分化を教示する。

【0183】

これらの参考文献は、胚細胞又は幹様細胞から分化細胞を得るための、報告された例示的な方法である。これらの参考文献及び特に胚性幹細胞を分化させるための方法に関するその中の開示は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0184】

したがって、既知の方法及び培養培地を使用して、当業者は、所望の分化細胞型、例えば、神経細胞、筋細胞、造血細胞などを得るために、対象の胚細胞又は幹様細胞を培養し得る。加えて、誘導性Bcl-2又はBcl-x1の使用は、特定の細胞系統のインビトロ発生を増強するために有用であり得る。生体内では、Bcl-2は、リンパ系及び神経発生の際に生じるアポトーシス細胞死の多くの形態を防止しているが、全てではない。ドナー細胞のトランスフェクション後に関連する細胞系統のアポトーシスを阻害するためにBcl-2発現がどのように使用され得るかについての徹底的な考察は、米国特許第5,646,008号に開示され、これは、参照により本明細書に組み込まれる。

【0185】

50

本明細書で提供される i P S C は、任意の所望の分化細胞型を得るために使用され得る。このような分化したヒト細胞の治療的使用は、比類のないものである。例えば、ヒト造血幹細胞は、骨髄移植を必要とする医学的処置において使用され得る。このような手順は、多くの疾患、例えば、卵巣癌及び白血病のような進行期癌、並びに免疫系を損なう疾患を治療するために使用される。造血幹細胞は、例えば、癌又は A I D S 患者の成体体細胞、例えば、上皮細胞又はリンパ球を除核卵母細胞、例えば、ウシ卵母細胞と融合し、上述のように胚細胞又は幹様細胞を得、造血幹細胞が得られるまで、分化に有利な条件下でこのような細胞を培養することによって得ることができる。このような造血細胞は、癌及び A I D S を含む疾患の治療において使用され得る。

【 0 1 8 6 】

本発明の方法はまた、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、若しくは A L S、リソソーム蓄積症、多発性硬化症、又は脊髄損傷などの神経疾患を治療、予防、又は安定化するために使用することができる。例えば、体細胞は、治療を必要とする個体から得られ、多能性を獲得するために再プログラムされ、疾患組織又は損傷組織の正常な機能を置換又は補助するために使用され得る神経外胚葉細胞を誘導するために培養され得る。

【 0 1 8 7 】

内分泌状態の治療又は予防のために、増殖因子、甲状腺ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、副甲状腺ホルモン、ステロイド、セロトニン、エピネフリン、又はノルエピネフリンなどのホルモンを作製する再プログラムされた細胞を哺乳動物に投与してもよい。加えて、再プログラムされた上皮細胞は、体腔又は肺、腸、外分泌腺、又は尿生殖路などの、体腔又は臓器の内層に対する損傷を修復するために投与されてもよい。また、i P S C を哺乳動物に投与して、膀胱、脳、食道、卵管、心臓、腸、胆嚢、腎臓、肝臓、肺、卵巣、膵臓、前立腺、脊髄、脾臓、胃、精巣、胸腺、甲状腺、気管、尿管、尿道、又は子宮などの臓器における細胞の損傷又は欠損を治療し得ることも企図される。

【 0 1 8 8 】

本開示の大きな利点は、移植に適したアイソジェニック又はシンジェニックなヒト細胞の本質的に無限の供給を提供することである。したがって、それは、現在の移植方法と関連する重要な問題、すなわち、宿主対移植片又は移植片対宿主拒絶のために起こり得る移植組織の拒絶を未然に防ぐ。従来、拒絶反応は、シクロスポリンなどの抗拒絶反応薬の投与によって予防又は低減される。しかしながら、このような薬物は、顕著な有害副作用、例えば、免疫抑制、発癌性特性を有し、また非常に高価である。本発明は、シクロスポリン、イムラン、F K - 5 0 6、グルココルチコイド、及びラパマイシン、並びにこれらの誘導体などの抗拒絶反応薬の必要性を排除するか、又は少なくとも大幅に低減するものである。

【 0 1 8 9 】

また、i P S C をマトリックスと組み合わせて、レシピエント哺乳動物における組織又は臓器を修復又は置換するために使用され得る組織又は臓器をインビトロ又は生体内で形成し得る。例えば、i P S C は、膀胱、陰核、海綿体、腎臓、睾丸、尿管、尿管弁、又は尿道などの泌尿生殖器系の組織又は臓器を作製するために、マトリックスの存在下でインビトロで培養されてもよく、これは、次いで、哺乳動物に移植されてもよい (A t a l a , C u r r . O p i n . U r o l . 9 (6) : 5 1 7 - 5 2 6 , 1 9 9 9) 。別の移植用途では、再プログラムされた細胞を適切なマトリックスの存在下で培養することによって人工血管をインビトロで形成し、次いで、この血管を心血管又は循環状態の治療又は予防のために哺乳動物に移植する。ドナー軟骨又は骨組織の生成のために、軟骨細胞又は骨細胞などの i P S C は、軟骨又は骨の形成を可能にする条件下でマトリックスの存在下でインビトロで培養され、次いで、ドナー組織を含有するマトリックスが哺乳動物に投与される。あるいは、細胞とマトリックスとの混合物は、所望の組織の生体内での形成のために哺乳動物に投与され得る。好ましくは、細胞は、マトリックスの表面に付着しているか、又はマトリックスによって封入されている。ドナー組織又は臓器の形成のために使用され

10

20

30

40

50

得るマトリックスの例としては、コラーゲンマトリックス、炭素繊維、ポリビニルアルコールスポンジ、アクリル酸アミドスポンジ、フィブリン-トロンビンゲル、ヒアルロン酸ベースのポリマー、及びポリ酸無水物、ポリオルトエステル、ポリグリコール酸、又はこれらの組み合わせを含有する合成ポリマーマトリックスが挙げられる（例えば、米国特許第4,846,835号、同第4,642,120号、同第5,786,217号、及び同第5,041,138号を参照）。

【0190】

本開示に従って作製されたiPSCは、遺伝子操作された分化細胞又はトランスジェニック分化細胞を作製するために使用され得る。本質的に、これは、所望の遺伝子又は複数の遺伝子を導入するか、又は本発明に従って作製されたiPSCの内因性の1つ又は複数の遺伝子の全て若しくは一部を除去し、このような細胞を所望の細胞型に分化させることによってもたらされる。このような改変を達成するための好ましい方法は、相同組み換えによるものであり、なぜなら、このような技術は、幹様細胞ゲノム中の特定の部位又は複数の部位で遺伝子又は複数の遺伝子を挿入、欠失、又は改変するために使用することができるからである。

10

【0191】

この方法論は、欠陥遺伝子、例えば、欠陥のある免疫系遺伝子、嚢胞性線維症遺伝子を置換するために、又は増殖因子、リンパカイン、サイトカイン、酵素などの治療上有益なタンパク質の発現をもたらす遺伝子を導入するために使用することができる。例えば、脳由来増殖因子をコードする遺伝子をヒト胚細胞又は幹様細胞に導入し、その細胞を神経細胞に分化させ、その細胞をパーキンソン病患者に移植して、このような病気の中の神経細胞の喪失を遅らせることも可能である。これらの方法を使用して救助され得る変異の例としては、嚢胞性線維症遺伝子における変異、ラミンA遺伝子におけるR482W、R482Q、及びR584H変異などのDunnigan病と関連する変異、並びにラミンA遺伝子におけるR249Q、R453W、及びQ6STOP変異などのEmery Deyfus筋ジストロフィーの常染色体優性型と関連する変異が挙げられる。Q6STOP変異では、Gln6のコドンが停止コドンに変異される。

20

【0192】

これまでは、BDNFでトランスフェクトされた細胞型は、初代細胞から不死化細胞株、神経由来細胞又は非神経（筋芽細胞及び線維芽細胞）由来細胞のいずれかまで変化した。例えば、星状細胞を、レトロウイルスベクターを使用してBDNF遺伝子でトランスフェクトし、この細胞をパーキンソン病のラットモデルに移植した（Yoshimoto et al., Brain Research, 691:25-36, (1995)）。この生体外治療は、移植後の32日目にラットにおけるパーキンソン様症状を最大45%減少させた。また、チロシンヒドロキシラーゼ遺伝子が星状細胞に導入され、同様の結果が得られた（Lundberg et al., Develop. Neurol., 139:39-53 (1996)）及びその中で引用される文献を参照）。

30

【0193】

しかしながら、このような生体外系には問題がある。特に、現在使用されているレトロウイルスベクターは生体内でダウンレギュレートされ、導入遺伝子は、一時的にのみ発現される（Mulligan, Science, 260:926-932 (1993)）によるレビュー）。また、このような研究では、寿命が有限であり、緩和に複製する初代細胞である星状細胞を使用した。このような特性は、トランスフェクションの速度に悪影響を及ぼし、安定してトランスフェクトされた細胞の選択を妨げる。更に、相同組み換え技術において使用される遺伝子標的化初代細胞の大きな集団を増殖させることはほとんど不可能である。

40

【0194】

対照的に、レトロウイルス系と関連する困難は、ES様細胞である本開示のiPSCの使用によって排除されるはずである。ES細胞に所望の遺伝子/変異を導入するための既知の方法を使用して、iPSCを遺伝子操作し、得られた遺伝子操作済の細胞を所望の細

50

胞型、例えば、造血細胞、神経細胞、膵臓細胞、軟骨細胞などに分化させてもよい。i P S Cに導入され得る遺伝子としては、例えば、表皮成長因子、塩基性線維芽細胞増殖因子、グリア由来神経栄養増殖因子、インスリン様増殖因子（I及びII）、ニューロトロフィン3、ニューロトロフィン4/5、繊毛神経栄養因子、A F T - 1、サイトカイン遺伝子（インターロイキン、インターフェロン、コロニー刺激因子、腫瘍壊死因子（アルファ及びベータ）など。）、治療用酵素をコードする遺伝子、コラーゲン、ヒト血清アルブミンなどが挙げられる。

【0195】

加えて、必要に応じて患者から治療用細胞を排除するために、当技術分野で現在知られているネガティブ選択系のうちの1つを使用することも可能である。例えば、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子でトランスフェクトされたドナー細胞は、TK遺伝子を含む胚細胞の作製を導く。これらの細胞の分化は、TK遺伝子もまた発現する対象の治療用細胞の単離を導く。このような細胞は、ガンシクロビル投与の際に患者からいつでも選択的に排除され得る。このようなネガティブ選択系は、米国特許第5,698,446号に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる。

10

【0196】

治療又は予防され得る疾患、障害、又は状態の例としては、神経疾患、内分泌疾患、器質性疾患、骨格系疾患、血管疾患、泌尿器系疾患、消化器系疾患、外皮疾患、血液疾患、免疫疾患、自己免疫疾患、炎症疾患、内分泌疾患、腎臓疾患、膀胱疾患、心血管疾患、癌、循環器疾患、消化器系疾患、造血器疾患、及び筋疾患、障害、並びに状態が挙げられる。加えて、再プログラムされた細胞は、組織又は臓器を修復又は置換するためなど、再建的な用途に使用され得る。

20

【0197】

本開示の治療方法に関して、哺乳動物へのi P S Cの投与は、特定の投与様式、投与量、又は投与頻度に限定されることは意図されておらず、本開示は、筋肉内、静脈内、関節内、病巣内、皮下、又は疾患を予防若しくは治療するのに適切な投与量を提供するのに十分な任意の他の経路を含む、全ての投与様式を企図する。i P S Cは、単回投与又は複数回投与で哺乳動物に投与されてもよい。複数回投与が施されるとき、これらの投与は、例えば、1週間、1ヶ月、1年、又は10年間隔を空けられてもよい。1つ以上の増殖因子、ホルモン、インターロイキン、サイトカイン、又は他の細胞はまた、細胞の投与前、投与中、又は投与後に投与されて、それらを特定の細胞型に更に偏らせ得る。

30

【0198】

本開示のi P S Cは、分化のインビトロモデルとして、特に初期発生の調節に関与する遺伝子の研究のために使用され得る。i P S Cを使用する分化細胞組織及び臓器は、薬物研究において使用され得る。

【0199】

更に、本開示に従って作製されたi P S Cは、動物、例えば、SCIDマウス、ウシ、ブタに、例えば、腎被膜下又は筋肉内に導入され、その中で奇形腫を作製するために使用され得る。この奇形腫を使用して、様々な組織型を誘導することができる。また、X種核移植によって作製された内部細胞塊は、3次元組織の形成を提供する生分解性、生体適合性ポリマーマトリックスと一緒に導入され得る。組織形成後、ポリマーは分解し、理想的にはドナー組織、例えば、心臓、膵臓、神経、肺、肝臓のみを残す。場合によっては、血管形成を促進する増殖因子及びタンパク質を含むことが有利であり得る。あるいは、組織の形成は、適切な培養培地及び条件、増殖因子、並びに生分解性ポリマーマトリックスを用いて完全にインビトロで達成することができる。

40

【0200】

ある特定のより具体的な実施形態では、治療することを必要とする対象を治療する方法であって、（a）対象から単離された細胞集団を得ることと、（b）本明細書に記載のi P S Cを作製する方法に従って単離された細胞集団中のT細胞を再プログラムしてi P S Cを作製することと、（c）任意選択で、i P S Cを1つ以上の所望の細胞型に分化

50

させた後に、作製された i P S C 又は作製された i P S C を含む医薬組成物を対象に投与することと、を含む、方法が本明細書で提供される。

【0201】

ある特定の実施形態では、作製された i P S C は、i P S C を1つ以上の所望の細胞型に分化させ、対象に投与される。

【0202】

例えば、いくつかの実施形態では、それらの顕著な多系列分化及び自己再生能を考慮すると、i P S C は、T細胞に分化して、若返ったT細胞のほぼ無制限の供給源を提供することができ、腫瘍に対するT細胞の有効性を制限する重要な問題（すなわち、T細胞の疲弊）に対処する（Schietinger, A. & Greenberg, P. D., *Trends Immunol.*, 2015, 35(2): 51-60）。T細胞は、T細胞受容体（TCR）を介して抗原に結合することによってエフェクター機能を発揮する。それにもかかわらず、時には、TCR結合は、特に慢性感染条件下でエフェクター活性を生じさせず、T細胞の疲弊をもたらすことがある（Karagiannis, P., et al., *Seminars in Immunology*, 2015, 28(1): 35-44）。このような状況では、養子細胞療法（adoptive cellular therapy、ACT）を代償機構として利用することができ、これは、患者の腫瘍微小環境から単離されたT細胞の生体外拡大、又は免疫応答を誘発するための自己T細胞受容体の遺伝子改変のいずれかを含む（Id.）。疲弊したT細胞を、それらを i P S C に再プログラムすることによって若返らせることは、TCR再配置がある特定の特異的抗原の遺伝子座を保存するので、T細胞の疲弊に対する有力な解決策を表す（Id.）。

【0203】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される方法に従って作製された i P S C から分化した、機能的に増強された派生免疫細胞の単離された集団又は亜集団を含む組成物が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、i P S C は、i P S C 由来免疫細胞において保持可能な1つ以上の標的遺伝子編集を含み、遺伝子操作された i P S C 及びその派生細胞は、細胞ベースの養子療法に適している。一実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞の単離された集団又は亜集団は、i P S C 由来プロT細胞又はT細胞を含む。一実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞の単離された集団又は亜集団は、i P S C 由来プロNK細胞又はNK細胞を含む。一実施形態では、遺伝子操作された免疫細胞の単離された集団又は亜集団は、i P S C 由来免疫調節性細胞又は骨髄系由来サプレッサー細胞（myeloid derived suppressor cell、MDS C）を含む。いくつかの実施形態では、i P S C 由来の遺伝子操作された免疫細胞は、改善された治療可能性のために生体外で更に調節される。

【0204】

ある特定の実施形態では、作製された i P S C は、更なる分化を伴わずに対象に投与される。

【0205】

ある特定の実施形態では、対象は、ヒトである。

【0206】

ある特定の実施形態では、対象は、過剰増殖性障害又は造血系の癌を有する。いくつかの実施形態では、対象は、固形腫瘍を有する。いくつかの実施形態では、造血系の過剰増殖性障害は、真性赤血球増加症、本態性血小板血症、骨髄化生を伴う骨髄線維症、又は慢性骨髄性白血病である。

【0207】

ある特定の実施形態では、本明細書に記載の作製された i P S C 又は作製された i P S C を含む医薬組成物は、癌を治療するために使用することができる。治療することができる癌には、血管新生されていないか、又はまだ実質的に血管新生されていない腫瘍、並びに血管新生された腫瘍が含まれる。いくつかの実施形態では、癌は、非固形腫瘍（血液腫瘍、例えば、白血病及びリンパ腫など）とすることができるか、又は固形腫瘍とすること

10

20

30

40

50

ができる。いくつかの実施形態では、癌の種類としては、癌腫、芽細胞腫、及び肉腫、並びにある特定の白血病又はリンパ性悪性腫瘍、良性及び悪性腫瘍、並びに悪性腫瘍、例えば、肉腫、癌腫、及び黒色腫が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、成人腫瘍/癌及び小児腫瘍/癌もまた含まれる。

【0208】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の作製されたiPSC又は作製されたiPSCを含む医薬組成物は、血液の癌を治療するために使用される。血液の癌は、血液又は骨髄の癌である。血液（又は血液原性）の癌の例としては、急性白血病（急性リンパ性白血病、急性骨髄性白血病（acute myelocytic leukemia）、急性骨髄性白血病（acute myelogenous leukemia）及び骨髄芽球、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性及び赤白血病など）、慢性白血病（慢性骨髄球（顆粒球）白血病、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄白血病（chronic myeloid leukemia）、及び慢性リンパ性白血病など）、若年性骨髄単球性白血病、真性赤血球増加症、リンパ種、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫（低悪性度及び高悪性度型）、多発性骨髄腫、ワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症、重鎖病、骨髄異形成症候群、原因不明骨髄様化生、家族性血球貪食性リンパ組織球症、ヘアリー細胞白血病、及び脊髄形成異常症を含む白血病が挙げられる。

10

【0209】

いくつかの実施形態では、対象は、骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性骨髄性白血病（chronic myeloid leukemia）、慢性骨髄性白血病（chronic myelogenous leukemia）、慢性顆粒球性白血病、急性リンパ性白血病、急性非リンパ性白血病、又は前白血病を有する。

20

【0210】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の作製されたiPSC又は作製されたiPSCを含む医薬組成物は、固形腫瘍を治療するために使用される。固形腫瘍は、通常嚢胞又は液体領域を含有しない組織の異常な塊である。固形腫瘍は、良性又は悪性であり得る。異なる種類の固形腫瘍は、それらを形成する細胞の種類にちなんで命名される（肉腫、癌腫、及びリンパ腫など）。肉腫及び癌腫などの固形腫瘍の例としては、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉種、及び他の肉腫、滑膜腫、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、リンパ系腫瘍、膵臓癌、乳癌、肺癌、卵巣癌、前立腺癌、肝細胞癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、甲状腺髄様癌、甲状腺乳頭癌、褐色細胞腫脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、髄様癌、気管支原性肺癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、絨毛癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、精巣腫瘍、精上皮腫、膀胱癌、メラノーマ、及びCNS腫瘍（グリオーマ（脳幹グリオーマ及び混合グリオーマなど）、グリア芽細胞腫（多形性グリア芽細胞腫としても知られる）、アストロサイトーマ、CNSリンパ種、胚細胞腫、髄芽細胞腫、神経鞘腫頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽腫、聴神経腫瘍、乏突起神経膠腫、髄膜腫（menangioma）、神経芽細胞腫、網膜芽腫、及び脳転移など）が挙げられる。

30

【0211】

いくつかの実施形態では、対象は、乳癌、卵巣癌、脳癌、前立腺癌、肺癌、結腸癌、皮膚癌、肝臓癌、膵臓癌、肉腫、又は慢性肉芽腫性疾患を有する。

40

【0212】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるiPSCなどの細胞、及び1つ以上の追加の薬剤を含む併用療法が本明細書で提供される。

【0213】

治療における使用のための、本明細書に記載のiPSC又は本明細書に記載のiPSCを含む医薬組成物も提供される。また、このような治療を必要とする対象における過剰増殖性障害又は造血系の癌を治療する方法において使用するための、本明細書に記載のiPSC又は本明細書に記載のiPSCを含む医薬組成物も提供される。

【0214】

5.7. 体細胞を再プログラムするか、又は再プログラミングに寄与する薬剤を同定

50

するための方法

別の態様では、単独で又は1つ以上の他の薬剤と組み合わせて、体細胞（例えば、T細胞）を低分化状態に再プログラムする薬剤を同定するための方法が本明細書で提供される。本開示は、本明細書で提供される方法に従って同定される薬剤を更に提供する。

【0215】

一実施形態では、本方法は、体細胞を、IL-15、ゾレドロン酸、及び/又はIL-2を含む活性化培養物と接触させることと、体細胞を候補薬剤と接触させ、次いで、候補薬剤の存在が、細胞を候補薬剤と接触させなかった場合に生じるであろう再プログラミングと比較して、増強された再プログラミング（例えば、増加した再プログラミング速度及び/又は効率）をもたらすかどうかを決定することと、を含む。

10

【0216】

いくつかの実施形態では、単独で又は1つ以上の他の薬剤と組み合わせて、体細胞（例えば、T細胞）を低分化状態に再プログラムする薬剤を同定するための方法であって、（a）単離された細胞集団を活性化培養物と接触させることであって、活性化培養物は、IL-15及びゾレドロン酸を含む、接触させることと、（b）単離された細胞集団を活性化培養物中で培養して、単離された細胞集団中のT細胞を濃縮及び/又は活性化することと、（c）単離された細胞集団を候補薬剤と接触させることと、（d）T細胞を、1つ以上の再プログラミング因子をコードする1つ以上のウイルスベクター（複数可）を用いて形質導入することと、（e）形質導入されたT細胞を、哺乳動物体細胞を低分化状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、（f）体細胞の少なくとも一部が低分化状態に再プログラムされているかどうかを判定することと、を含む、方法が本明細書で提供される。いくつかの実施形態では、低分化状態は、多分化能状態である。いくつかの実施形態では、低分化状態は、多能性状態である。特定の実施形態では、活性化培養物は、例えば、活性化又は誘導の効率を改善するために、1つ以上の追加の薬剤又は化合物を更に含む。一実施形態では、活性化培養物は、インターロイキン-2（Interleukin-2、IL-2）を更に含む。

20

【0217】

いくつかの実施形態では、IL-15、ゾレドロン酸、及び/又はIL-2並びに候補薬剤は、細胞培養培地中に一緒に存在しているが、他の実施形態では、IL-15、ゾレドロン酸、及び/又はIL-2並びに候補薬剤は、一緒に存在しない（例えば、細胞は薬剤に順次曝露される）。ある特定の実施形態では、細胞は、培養物中で1~20日間維持される。ある特定の実施形態では、細胞は、培養物中で1~17日間維持される。ある特定の実施形態では、細胞は、培養物中で1~15日間維持される。ある特定の実施形態では、細胞は、培養物中で1~13日間維持される。ある特定の実施形態では、細胞は、培養物中で1~11日間維持される。ある特定の実施形態では、細胞は、培養物中で1~9日間維持される。ある特定の実施形態では、細胞は、培養物中で1~7日間維持される。ある特定の実施形態では、細胞は、培養物中で1~5日間維持される。ある特定の実施形態では、細胞は、培養物中で1~3日間維持される。ある特定の実施形態では、細胞は、培養物中で12~72時間維持される。ある特定の実施形態では、細胞は、培養物中で12~60時間維持される。ある特定の実施形態では、細胞は、培養物中で12~48時間維持される。ある特定の実施形態では、細胞は、培養物中で12~36時間維持される。ある特定の実施形態では、細胞は、培養物中で12~24時間維持される。ある特定の実施形態では、細胞は、培養物中で8~16時間維持される。ある特定の実施形態では、細胞は、培養物中で4~8時間維持される。ある特定の実施形態では、細胞は、培養物中で2~4時間維持される。細胞は、例えば、最大で13日間、最大で10日間、最大で9日間、最大で8日間、最大で7日間、最大で6日間、最大で5日間、最大で4日間、最大で3日間、最大で2日間、又は最大で1日間など、培養物中で維持され得、その間、それらは、時間の全て又は一部の間、IL-15、ゾレドロン酸、及び/又はIL-2並びに候補薬剤と接触させられる。いくつかの実施形態では、薬剤は、細胞が薬剤と接触していない場合よりも、当該期間後に少なくとも2、5、又は10倍多くの再プログラムされた細胞

30

40

50

胞又は再プログラムされた細胞を主に含むコロニーが存在する場合に、細胞を再プログラムする薬剤として同定される。

【0218】

候補薬剤は、任意の分子又は超分子複合体、例えば、ペプチド、有機小分子又は無機小分子、多糖類、ポリヌクレオチドなどとすることができ、これらは、細胞を再プログラムするか、又は再プログラムすることを容易にするか、又は増強する能力について試験される。候補薬剤は、当業者によって理解されるように、合成化合物又は天然化合物のライブラリーを含む多種多様な供給源から得られてもよい。いくつかの実施形態では、候補薬剤は、合成化合物である。多種多様な有機化合物及び生体分子のランダムかつ指向性の合成のための多数の技術が利用可能である。いくつかの実施形態では、候補モジュレーターは、利用可能であるか又は容易に作製される、細菌、真菌、植物及び動物抽出物、発酵プロセス、馴化培地などの形態の天然化合物の混合物として提供される。

10

【0219】

いくつかの実施形態では、化合物のライブラリーがスクリーニングされる。ライブラリーは、典型的には、化合物がスクリーニングアッセイにおいて同定され得るよう提示又は表示され得る化合物の収集体である。いくつかの実施形態では、ライブラリー中の化合物は、個々のウェル（例えば、マイクロタイプレート）、容器、チューブなどに収容されて、細胞との接触、無細胞アッセイの実施などのための個々のウェル又は容器への簡便な移動を容易にする。ライブラリーは、主構造に結合する基の数又は種類が異なる共通の構造的特徴を有する分子から構成されていてもよいし、又は完全にランダムであってもよい。ライブラリーとしては、例えば、ファージディスプレイライブラリー、ペプチドライブラリー、ポリソームライブラリー、アダマーライブラリー、合成小分子ライブラリー、天然化合物ライブラリー、及び化学ライブラリーが挙げられるが、これらに限定されない。分子のライブラリーを調製するための方法は、当該分野で周知であり、多くのライブラリーは、商業的供給源又は非商業的供給源から入手可能である。対象のライブラリーとしては、合成有機コンビナトリアルライブラリーが挙げられる。合成小分子ライブラリー及び化学ライブラリーなどのライブラリーは、化学分子の構造的に多様な収集体を含むことができる。小分子には、多くの場合、複数の炭素間結合を有する有機分子が含まれる。ライブラリーは、環状炭素若しくは複素環構造、及び/又は1つ以上の官能基で置換された芳香族若しくは多芳香族構造を含むことができる。いくつかの実施形態では、小分子は、5～50個の炭素原子、例えば、7～30個の炭素を有する。いくつかの実施形態では、化合物は、大環状である。対象のライブラリーはまた、ペプチドライブラリー、ランダム化されたオリゴヌクレオチドライブラリーなどを含む。ライブラリーは、ペプチド及び非ペプチド合成部分から合成することができる。天然起源の対応物と比較して酵素分解を受けにくい非ペプチド合成部分を含有するこのようなライブラリーを更に合成することができる。小分子コンビナトリアルライブラリーも生成され得る。有機小化合物のコンビナトリアルライブラリーは、多様性の1つ以上の点で互いに異なり、多段階プロセスを使用する有機技術によって合成される密接に関連した類似体のコレクションを含み得る。コンビナトリアルライブラリーは、膨大な数の有機小化合物を含むことができる。本明細書で使用されるとき、「化合物アレイ」とは、デカルト座標におけるそれらの空間アドレスによって特定可能であり、各化合物が共通の分子コア及び1つ以上の可変構造多様性要素を有するように配置された化合物のコレクションである。このような化合物アレイ中の化合物は、別々の反応容器中で並行して作製され、各化合物は、その空間アドレスによって特定及び追跡される。いくつかの実施形態では、2つ以上の化合物を含有する混合物、天然源から得られた抽出物又は他の調製物（数十以上の化合物を含み得る）、及び/又は無機化合物などがスクリーニングされる。

20

30

40

【0220】

一実施形態では、本発明の方法は、「承認薬」をスクリーニングするために使用される。「承認薬」は、任意の目的のために、FDA又は別の国の同様の政府機関によってヒトにおける使用が承認されている任意の化合物（この用語は、タンパク質及び核酸などの生

50

体分子を含む)である。これは、安全であり、少なくともFDA承認薬の場合、少なくとも1つの目的に対して治療効果があると考えられる化合物の集合体を表すので、スクリーニングするのに特に有用なクラスの化合物であり得る。したがって、これらの薬物は、少なくとも他の目的に対して安全である可能性が高い。

【0221】

スクリーニングされ得るライブラリーの代表例としては、ChemBridge Corporation, 16981 Via Tazon, San Diego, Calif. 92127から入手可能なDIVERSet(商標)が挙げられる。DIVERSetは、10,000~50,000個の薬物様の手動合成された小分子を含有する。化合物は、最小数の化合物で最大限のファーマコフォア多様性をカバーし、ハイスループット又はより低いスループットスクリーニングのいずれかに適している「ユニバーサル」ライブラリーを形成するように予め選択される。更なるライブラリーの説明については、例えば、Tan, et al., Am. Chem. Soc. 120, 8565-8566, 1998; Floyd C D, Leblanc C, Whittaker M, Prog Med Chem 36: 91-168, 1999を参照のこと。多数のライブラリーは、例えば、AnalytiCon USA Inc., P.O. Box 5926, Kingwood, Tex. 77325、3-Dimensional Pharmaceuticals, Inc., 665 Stockton Drive, Suite 104, Exton, PA. 19341-1151、Tripos, Inc., 1699 Hanley Rd., St. Louis, Mo., 63144-2913などから市販されている。例えば、キナ酸及びシキミ酸に基づくライブラリー、ヒドロキシプロリン、サントニン、ジアンヒドロ-D-グルシトール、ヒドロキシピペコリン酸、アンドログラホリド、ピペラジン-2-カルボン酸ベースのライブラリー、シトシンなどが市販されている。

10

20

【0222】

いくつかの実施形態では、候補薬剤は、細胞、例えば、多能性細胞から調製されたcDNA発現ライブラリー由来のcDNAである。このような細胞は、胚性幹細胞、卵母細胞、割球、奇形癌、胚性生殖細胞、内部細胞塊細胞などであり得る。

【0223】

試験される候補再プログラミング剤は、典型的には、標準培養培地中に存在しないものであるか、又は存在する場合、本発明において使用されるときよりも少ない量で存在するものであることが理解されるであろう。有用な再プログラミング剤又は他の形態の再プログラミング処理は、全ての型の体細胞を再プログラムすることができる必要はなく、所与の細胞型の全ての体細胞を再プログラムすることができる必要はないことも理解されるであろう。限定するものではないが、2倍、5倍、10倍、50倍、100倍又はそれ以上、再プログラムされた細胞について濃縮された集団をもたらす候補薬剤(すなわち、集団中の再プログラムされた細胞の割合が、同じ方法であるが候補薬剤と接触させずに処理された細胞の出発集団中に存在するよりも2、5、10、50、又は100倍多い)が有用である。

30

【0224】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるスクリーニング方法は、細胞を多能性状態に再プログラムする際にKlf4を置換する薬剤又は薬剤の組み合わせを同定するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を多能性状態に再プログラムする際にSox2を置換する薬剤を同定するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を多能性状態に再プログラムする際にOct3/4を置換する薬剤を同定するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を多能性状態に再プログラムする際にc-Mycを置換する薬剤を同定するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、細胞を多能性状態に再プログラムする際にLin28を置換する薬剤を同定するために使用される。いくつかの実施形態では、本方法は、ヒト細胞を使用して実施される。いくつかの実施形態では、本方法は、マウス細胞を使用して実施される

40

50

。いくつかの実施形態では、本方法は、非ヒト霊長類細胞を使用して実施される。

【0225】

別の態様では、体細胞（例えば、T細胞）における内因性多能性遺伝子の発現を活性化
する遺伝子を同定するための方法が本明細書で提供される。

【0226】

いくつかの実施形態では、本方法は、（a）単離された細胞集団を活性化培養物と接触
させることであって、活性化培養物は、IL-15及びゾレドロン酸を含む、接触させる
ことと、（b）単離された細胞集団を活性化培養物中で培養して、単離された細胞集団中
の T細胞を濃縮及び/又は活性化することと、（c） T細胞を、1つ以上の候補
再プログラミング因子をコードする1つ以上のウイルスベクター（複数可）を用いて形質
導入することと、（d）形質導入された T細胞を、哺乳動物体細胞を低分化状態に再
プログラムするのに適した条件下で培養することと、（e）体細胞の少なくとも一部が低
分化状態に再プログラムされているかどうかを判定することと、を含む。いくつかの実施
形態では、低分化状態は、多分化能状態である。いくつかの実施形態では、低分化状態は
、多能性状態である。

10

【0227】

いくつかのより具体的な実施形態では、本方法は、（a）単離された細胞集団を活性化
培養物と接触させることであって、活性化培養物は、IL-15及びゾレドロン酸を含む
、接触させることと、（b）単離された細胞集団を活性化培養物中で培養して、単離され
た細胞集団中の T細胞を濃縮及び/又は活性化することと、（c） T細胞を、1
つ以上の候補再プログラミング因子をコードする1つ以上のウイルスベクター（複数可）
を用いて形質導入することと、（d）形質導入された T細胞を、哺乳動物体細胞を多
能性状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、（e）体細胞の少な
くとも一部が多能性状態に再プログラムされているかどうかを判定することと、を含む。

20

【0228】

ある特定の実施形態では、活性化培養物は、例えば、活性化又は誘導の効率を改善する
ために、1つ以上の追加の薬剤又は化合物を更に含む。一実施形態では、活性化培養物は
、インターロイキン-2（Interleukin-2、IL-2）を更に含む。

【0229】

したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に提供される本方法は、（a）単離さ
れた細胞集団を活性化培養物と接触させることであって、活性化培養物は、IL-15、
ゾレドロン酸、及びIL-2を含む、接触させることと、（b）単離された細胞集団を活
性化培養物中で培養して、単離された細胞集団中の T細胞を濃縮及び/又は活性化す
ることと、（c） T細胞を、1つ以上の候補再プログラミング因子をコードする1つ
以上のウイルスベクター（複数可）を用いて形質導入することと、（d）形質導入された
 T細胞を、哺乳動物体細胞を低分化状態に再プログラムするのに適した条件下で培養
することと、（e）体細胞の少なくとも一部が低分化状態に再プログラムされているかど
うかを判定することと、を含む。

30

【0230】

いくつかのより具体的な実施形態では、本明細書に提供される本方法は、（a）単離さ
れた細胞集団を活性化培養物と接触させることであって、活性化培養物は、IL-15、
ゾレドロン酸、及びIL-2を含む、接触させることと、（b）単離された細胞集団を活
性化培養物中で培養して、単離された細胞集団中の T細胞を濃縮及び/又は活性化す
ることと、（c） T細胞を、1つ以上の候補再プログラミング因子をコードする1つ
以上のウイルスベクター（複数可）を用いて形質導入することと、（d）形質導入された
 T細胞を、哺乳動物体細胞を多能性状態に再プログラムするのに適した条件下で培養
することと、（e）体細胞の少なくとも一部が多能性状態に再プログラムされているかど
うかを判定することと、を含む。

40

【0231】

他の実施形態では、本方法は、本明細書で提供されるような体細胞を、例えば、IL-

50

15、ゾレドロン酸、及び/又はIL-2の存在下で培養することと、次いで、本開示の体細胞を、ES細胞又は卵母細胞から調製されたcDNAライブラリーでトランスフェクトすることと、第1の選択マーカーを発現する細胞を選択することと、第1の選択マーカーを発現するトランスフェクトされた細胞における第1の内因性多能性遺伝子の発現を評価することと、を含む。第1の内因性多能性遺伝子の発現は、cDNAが、体細胞において内因性多能性遺伝子の発現を活性化する遺伝子をコードすることを示す。

【0232】

本方法は、体細胞において少なくとも2つの内因性多能性遺伝子の発現を活性化する遺伝子を同定するために適用可能である。本方法で使用される体細胞は、第2の選択マーカーに連結された第2の内因性多能性遺伝子を更に含む。本方法は、両方の選択マーカーを発現するトランスフェクトされた細胞を選択するように改変されることができ、これらの中で、第1及び第2の内因性多能性遺伝子の発現が評価される。第1及び第2の内因性多能性遺伝子の両方の発現は、cDNAが、体細胞において少なくとも2つの多能性遺伝子の発現を活性化する遺伝子をコードすることを示す。

10

【0233】

本方法は、体細胞において少なくとも3つの内因性多能性遺伝子の発現を活性化する遺伝子を同定するために更に適用可能である。本方法で使用される体細胞は、第3の選択マーカーに連結された第3の内因性多能性遺伝子を更に含む。本方法は、3つ全ての選択マーカーを発現するトランスフェクトされた細胞を選択するように改変され、これらの中で、3つ全ての内因性多能性遺伝子の発現が評価される。3つ全ての内因性多能性遺伝子の発現は、cDNAが、体細胞において少なくとも3つの多能性遺伝子の発現を活性化する遺伝子をコードすることを示す。

20

【0234】

本発明の実施は、他に示されない限り、マウス遺伝学、発生生物学、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組み換えDNA、及び免疫学の従来技術を使用し、これらは、当該分野の技術の範囲内である。このような技術は、文献に記載されている。例えば、Current Protocols in Cell Biology, ed. by Bonifacino, Dasso, Lippincott-Schwartz, Harford, and Yamada, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1999、Manipulating the Mouse Embryos, A Laboratory Manual, 3rd Ed., by Hogan et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2003、Gene Targeting: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, 1993、及びGene Targeting Protocols, Human Press, Totowa, N.J., 2000を参照のこと。本明細書に引用される全ての特許、特許出願及び参考文献は、その全体が参照により組み込まれる。

30

【0235】

6. 実施形態

本発明は、以下の非限定的な実施形態を提供する。

40

【0236】

1つのセットの実施形態(実施形態セットA)では、以下が提供される。

A1. 人工多能性幹細胞(iPSC)を作製する方法であって、

(a) 単離された細胞集団を活性化培養物と接触させることであって、活性化培養物は、IL-15及びゾレドロン酸を含む、接触させることと、

(b) 単離された細胞集団を活性化培養物中で培養して、単離された細胞集団中のT細胞を濃縮及び/又は活性化することと、

(c) T細胞を、1つ以上の再プログラミング因子をコードするウイルスベクターを用いて形質導入することと、

50

(d) 形質導入された T 細胞を、哺乳動物体細胞を多能性状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、を含む、方法。

A 2 . 活性化培養物は、IL - 2 を更に含む、実施形態 A 1 に記載の方法。

A 3 . ウイルスベクターは、センダイウイルス (SeV) ベクターである、実施形態 A 1 又は A 2 に記載の方法。

A 4 . 対象から単離された細胞集団を得ることを更に含む、実施形態 A 1 ~ A 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 5 . 単離された細胞集団は、末梢血単核細胞 (P B M C) である、実施形態 A 1 ~ A 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 6 . 単離された細胞集団は、最終分化細胞である、実施形態 A 1 ~ A 5 のいずれか 1 つに記載の方法。 10

A 7 . 単離された細胞集団は、哺乳動物細胞である、実施形態 A 1 ~ A 6 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 8 . 単離された細胞集団は、ヒト細胞である、実施形態 A 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 9 . 単離された細胞集団は、活性化培養物中で 1 ~ 20 日間、1 ~ 17 日間、1 ~ 15 日間、1 ~ 13 日間、1 ~ 11 日間、1 ~ 9 日間、1 ~ 7 日間、1 ~ 5 日間、1 ~ 3 日間、12 ~ 72 時間、12 ~ 60 時間、12 ~ 48 時間、12 ~ 36 時間、12 ~ 24 時間、8 ~ 16 時間、4 ~ 8 時間、又は 2 ~ 4 時間培養される、実施形態 A 1 ~ A 8 のいずれか 1 つに記載の方法。 20

A 10 . 単離された細胞集団は、活性化培養物中で最大で 13 日間、最大で 10 日間、最大で 9 日間、最大で 8 日間、最大で 7 日間、最大で 6 日間、最大で 5 日間、最大で 4 日間、最大で 3 日間、最大で 2 日間、又は最大で 1 日間培養される、実施形態 A 9 に記載の方法。

A 11 . 単離された細胞集団は、活性化培養物中で最大で 3 日間培養される、実施形態 A 10 に記載の方法。

A 12 . 単離された細胞集団は、活性化培養物中で 3 日間培養される、実施形態 A 10 に記載の方法。

A 13 . 活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5 % ~ 100 % の T 細胞、5 % ~ 95 % の T 細胞、5 % ~ 90 % の T 細胞、5 % ~ 85 % の T 細胞、5 % ~ 80 % の T 細胞、5 % ~ 75 % の T 細胞、5 % ~ 70 % の T 細胞、5 % ~ 65 % の T 細胞、5 % ~ 60 % の T 細胞、5 % ~ 55 % の T 細胞、5 % ~ 50 % の T 細胞、5 % ~ 45 % の T 細胞、5 % ~ 40 % の T 細胞、5 % ~ 35 % の T 細胞、5 % ~ 30 % の T 細胞、5 % ~ 25 % の T 細胞、5 % ~ 20 % の T 細胞、又は 5 % ~ 15 % の T 細胞を含む、実施形態 A 1 ~ A 12 のいずれか 1 つに記載の方法。 30

A 14 . 活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、90 % 未満、80 % 未満、70 % 未満、60 % 未満、50 % 未満、45 % 未満、40 % 未満、35 % 未満、又は 30 % 未満の T 細胞を含む、実施形態 A 13 に記載の方法。 A 15 . 活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、35 % 未満の T 細胞を含む、実施形態 A 14 に記載の方法。 40

A 16 . 工程 (b) の後に、単離された細胞集団中の T 細胞を濃縮することを更に含む、実施形態 A 1 ~ A 15 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 17 . T 細胞は、細胞間凝集塊濃縮によって濃縮される、実施形態 A 16 に記載の方法。

A 18 . T 細胞の少なくとも一部は、工程 (b) において V 9 + T 細胞に活性化される、実施形態 A 1 ~ A 17 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 19 . T 細胞の少なくとも一部は、工程 (b) において V 9 2 + T 細胞に活性化される、実施形態 A 1 ~ A 17 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 20 . 1 つ以上の再プログラミング因子は、OCT 3 / 4、SOX 2、KLF 4、L 50

I N 2 8、及び c - M y c からなる群から選択される、実施形態 A 1 ~ A 1 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 2 1 . 工程 (d) において、形質導入された T 細胞は、1 つ以上の支持細胞層の存在下で培養される、実施形態 A 1 ~ A 2 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 2 2 . 工程 (d) において、形質導入された T 細胞は、支持細胞層の単層の存在下で培養される、実施形態 A 2 1 に記載の方法。

A 2 3 . 支持細胞層は、マウス胚性線維芽細胞 (M E F) を含む、実施形態 A 2 1 又は A 2 2 に記載の方法。

A 2 4 . 作製された i P S C を単離及び / 又は精製することを更に含む、実施形態 A 1 ~ A 2 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 2 5 . 単離された i P S C を対象に投与することを更に含む、実施形態 A 2 4 に記載の方法。

A 2 6 . i P S C を生体外で所望の細胞型の細胞に分化させることを更に含む、実施形態 A 1 ~ A 2 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 2 7 . 分化細胞を対象に投与することを更に含む、実施形態 A 2 6 に記載の方法。

A 2 8 . 作製された i P S C は、センダイウイルス (S e V) ベクターに対して陰性である、実施形態 A 1 ~ A 2 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 2 9 . 作製された i P S C は、T 細胞に由来する、実施形態 A 1 ~ A 2 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 3 0 . 作製された i P S C は、T R G 遺伝子座及び T R D 遺伝子座の再配置遺伝子を有し、任意選択で、作製された i P S C は、V 9 遺伝子配置及び V 2 遺伝子配置を有する、実施形態 A 1 ~ A 2 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 3 1 . 作製された i P S C は、T 細胞に由来しない、実施形態 A 1 ~ A 2 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 3 2 . 作製された i P S C は、T C R A 遺伝子座及び T C R B 遺伝子座からポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 生成物を作製しない、実施形態 A 1 ~ A 2 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 3 3 . 作製された i P S C は、染色体の喪失を伴わずにゲノム的に安定している、実施形態 A 1 ~ A 3 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 3 4 . 作製された i P S C のゲノム安定性は、核型分析によって決定される、実施形態 A 3 3 に記載の方法。

A 3 5 . 作製された i P S C は、採用後に支持細胞を含まない培地中で増殖することができる、実施形態 A 1 ~ A 3 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

A 3 6 . 実施形態 A 1 ~ A 3 5 のいずれか 1 つに記載の方法に従って作製された人工多能性幹細胞 (i P S C) 。

A 3 7 . 実施形態 A 3 6 に記載の i P S C と、医薬的に許容される賦形剤と、を含む、医薬組成物。

A 3 8 . 実施形態 A 2 6 に記載の方法に従って作製される、分化細胞。

A 3 9 . 実施形態 A 3 8 に記載の分化細胞と、医薬的に許容される賦形剤と、を含む、医薬組成物。

【 0 2 3 7 】

別のセットの実施形態 (実施形態セット B) では、以下が提供される。

B 1 . 治療することを必要とする対象を治療する方法であって、

(i) 対象から、末梢血単核細胞 (P B M C) を含む細胞集団を得ることと、

(i i) 細胞集団中の T 細胞を、作製された i P S C に再プログラムすることと

(i i i) 任意選択で、i P S C を 1 つ以上の所望の細胞型に分化させた後に、作製された i P S C 又は作製された i P S C を含む医薬組成物を対象に投与することと、を含み、

工程 (i i) は、

10

20

30

40

50

(a) 細胞集団を活性化培養物と接触させることであって、活性化培養物は、 I L - 1 5 及びゾレドロン酸を含む、接触させることと、

(b) 細胞集団を活性化培養物中で培養して、細胞集団中の T 細胞を濃縮及び / 又は活性化することと、

(c) T 細胞を、 1 つ以上の再プログラミング因子をコードするウイルスベクターを用いて形質導入することと、

(d) 形質導入された T 細胞を、哺乳動物体細胞を多能性状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、を含む、方法。

B 2 . 活性化培養物は、 I L - 2 を更に含む、実施形態 B 1 に記載の方法。

B 3 . ウイルスベクターは、センダイウイルス (S e V) ベクターである、実施形態 B 1 又は B 2 に記載の方法。 10

B 4 . 細胞集団は、活性化培養物中で 1 ~ 2 0 日間、 1 ~ 1 7 日間、 1 ~ 1 5 日間、 1 ~ 1 3 日間、 1 ~ 1 1 日間、 1 ~ 9 日間、 1 ~ 7 日間、 1 ~ 5 日間、 1 ~ 3 日間、 1 2 ~ 7 2 時間、 1 2 ~ 6 0 時間、 1 2 ~ 4 8 時間、 1 2 ~ 3 6 時間、 1 2 ~ 2 4 時間、 8 ~ 1 6 時間、 4 ~ 8 時間、又は 2 ~ 4 時間培養される、実施形態 B 1 ~ B 3 のいずれか 1 つに記載の方法。

B 5 . 細胞集団は、活性化培養物中で最大で 1 3 日間、最大で 1 0 日間、最大で 9 日間、最大で 8 日間、最大で 7 日間、最大で 6 日間、最大で 5 日間、最大で 4 日間、最大で 3 日間、最大で 2 日間、又は最大で 1 日間培養される、実施形態 B 4 に記載の方法。

B 6 . 細胞集団は、活性化培養物中で最大で 3 日間培養される、実施形態 B 5 に記載の方法。 20

B 7 . 細胞集団は、活性化培養物中で 3 日間培養される、実施形態 B 5 に記載の方法。

B 8 . 活性化培養物中で培養された後、細胞集団は、 5 % ~ 1 0 0 % の T 細胞、 5 % ~ 9 5 % の T 細胞、 5 % ~ 9 0 % の T 細胞、 5 % ~ 8 5 % の T 細胞、 5 % ~ 8 0 % の T 細胞、 5 % ~ 7 5 % の T 細胞、 5 % ~ 7 0 % の T 細胞、 5 % ~ 6 5 % の T 細胞、 5 % ~ 6 0 % の T 細胞、 5 % ~ 5 5 % の T 細胞、 5 % ~ 5 0 % の T 細胞、 5 % ~ 4 5 % の T 細胞、 5 % ~ 4 0 % の T 細胞、 5 % ~ 3 5 % の T 細胞、 5 % ~ 3 0 % の T 細胞、 5 % ~ 2 5 % の T 細胞、 5 % ~ 2 0 % の T 細胞、又は 5 % ~ 1 5 % の T 細胞を含む、実施形態 B 1 ~ B 7 のいずれか 1 つに記載の方法。 30

B 9 . 活性化培養物中で培養された後、細胞集団は、 9 0 % 未満、 8 0 % 未満、 7 0 % 未満、 6 0 % 未満、 5 0 % 未満、 4 5 % 未満、 4 0 % 未満、 3 5 % 未満、又は 3 0 % 未満の T 細胞を含む、実施形態 B 8 に記載の方法。

B 1 0 . 活性化培養物中で培養された後、細胞集団は、 3 5 % 未満の T 細胞を含む、実施形態 B 9 に記載の方法。

B 1 1 . 工程 (b) の後に、細胞集団中の T 細胞を濃縮することを更に含む、実施形態 B 1 ~ B 1 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

B 1 2 . T 細胞は、細胞間凝集塊濃縮によって濃縮される、実施形態 B 1 1 に記載の方法。

B 1 3 . T 細胞の少なくとも一部は、工程 (b) において V 9 + T 細胞に活性化される、実施形態 B 1 ~ B 1 2 のいずれか 1 つに記載の方法。 40

B 1 4 . T 細胞の少なくとも一部は、工程 (b) において V 9 2 + T 細胞に活性化される、実施形態 B 1 ~ B 1 2 のいずれか 1 つに記載の方法。

B 1 5 . 1 つ以上の再プログラミング因子は、 O C T 3 / 4 、 S O X 2 、 K L F 4 、 L I N 2 8 、及び c - M y c からなる群から選択される、実施形態 B 1 ~ B 1 4 のいずれか 1 つに記載の方法。

B 1 6 . 工程 (d) において、形質導入された T 細胞は、 1 つ以上の支持細胞層の存在下で培養される、実施形態 B 1 ~ B 1 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

B 1 7 . 工程 (d) において、形質導入された T 細胞は、支持細胞層の単層の存在下で培養される、実施形態 B 1 6 に記載の方法。 50

B 1 8 . 支持細胞層は、マウス胚性線維芽細胞 (M E F) を含む、実施形態 B 1 6 又は B 1 7 に記載の方法。

B 1 9 . 作製された i P S C を単離及び / 又は精製することを更に含む、実施形態 B 1 ~ B 1 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

B 2 0 . i P S C を生体外で所望の細胞型の細胞に分化させることを更に含む、実施形態 B 1 ~ B 1 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

B 2 1 . 作製された i P S C は、センダイウイルス (S e V) ベクターに対して陰性である、実施形態 B 1 ~ B 2 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

B 2 2 . 作製された i P S C は、T 細胞に由来する、実施形態 B 1 ~ B 2 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

B 2 3 . 作製された i P S C は、T R G 遺伝子座及び T R D 遺伝子座の再配置遺伝子を有し、任意選択で、作製された i P S C は、V 9 遺伝子配置及び V 2 遺伝子配置を有する、実施形態 B 1 ~ B 2 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

B 2 4 . 作製された i P S C は、T 細胞に由来しない、実施形態 B 1 ~ B 2 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

B 2 5 . 作製された i P S C は、T C R A 遺伝子座及び T C R B 遺伝子座からポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) 生成物を作製しない、実施形態 B 1 ~ B 2 0 のいずれか 1 つに記載の方法。

B 2 6 . 作製された i P S C は、染色体の喪失を伴わずにゲノム的に安定している、実施形態 B 1 ~ B 2 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

B 2 7 . 作製された i P S C のゲノム安定性は、核型分析によって決定される、実施形態 B 2 6 に記載の方法。

B 2 8 . 作製された i P S C は、採用後に支持細胞を含まない培地中で増殖することができる、実施形態 B 1 ~ B 2 7 のいずれか 1 つに記載の方法。

B 2 9 . 対象が、ヒトである、実施形態 B 1 ~ B 2 8 のいずれか 1 つに記載の方法。

B 3 0 . 対象は、過剰増殖性障害又は造血系の癌を有する、実施形態 B 1 ~ B 2 9 のいずれか 1 つに記載の方法。

【 0 2 3 8 】

別のセットの実施形態 (実施形態セット C) では、以下が提供される。

C 1 . 人工多能性幹細胞 (i P S C) の単離された集団であって、i P S C の単離された集団は、多能性細胞を含み、多能性細胞は、1 つ以上の再プログラミング因子を発現させ、かつ / 又は多能性細胞は、T R G 遺伝子及び T R D 遺伝子の再配置をコードするヌクレオチド配列を含む、i P S C の単離された集団。

C 2 . 再プログラミング因子は、O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、c - M y c、及び L i n 2 8 からなる群から選択される、実施形態 C 1 に記載の i P S C の単離された集団。

C 3 . i P S C の単離された集団は、センダイウイルス (S e V) ベクターに対して陰性である、実施形態 C 1 又は C 2 に記載の i P S C の単離された集団。

C 4 . i P S C の単離された集団は、T 細胞に由来する、実施形態 C 1 ~ C 3 のいずれか 1 つに記載の i P S C の単離された集団。

C 5 . i P S C の単離された集団は、T R G 遺伝子座及び T R D 遺伝子座の再配置遺伝子を有し、任意選択で、i P S C の単離された集団は、V 9 遺伝子配置及び V 2 遺伝子配置を有する、実施形態 C 1 ~ C 3 のいずれか 1 つに記載の i P S C の単離された集団。

C 6 . i P S C の単離された集団は、T 細胞に由来しない、実施形態 C 1 ~ C 3 のいずれか 1 つに記載の i P S C の単離された集団。

C 7 . i P S C の単離された集団は、T C R A 遺伝子座及び T C R B 遺伝子座から P C R 生成物を作製しない、実施形態 C 1 ~ C 3 のいずれか 1 つに記載の i P S C の単離された集団。

C 8 . i P S C の単離された集団は、染色体の喪失を伴わずにゲノム的に安定している

10

20

30

40

50

、実施形態 C 1 ~ C 7 のいずれか 1 つに記載の i P S C の単離された集団。

C 9 . i P S C の単離された集団のゲノム安定性は、核型分析によって決定される、実施形態 C 8 に記載の i P S C の単離された集団。

C 1 0 . i P S C の単離された集団は、採用後に支持細胞を含まない培地中で増殖及び維持することができる、実施形態 C 1 ~ C 9 のいずれか 1 つに記載の i P S C の単離された集団。

【 0 2 3 9 】

更に別のセットの実施形態（実施形態セット D ）では、以下が提供される。

D 1 . 人工多能性幹細胞（ i P S C ）を作製する方法であって、

（ a ）単離された細胞集団中の T 細胞を濃縮及び / 又は活性化する機能を実施する
10 ための工程と、

（ b ） T 細胞を多能性状態に再プログラムする機能を実施するための工程と、を
含む、方法。

D 2 . 単離された細胞集団中の T 細胞を濃縮及び / 又は活性化する機能を実施する
ための工程は、単離された細胞集団を活性化培養物と接触させることであって、活性化培
養物は、 I L - 1 5 及びゾレドロン酸を含む、接触させることと、単離された細胞集団を
活性化培養物中で培養して、単離された細胞集団中の T 細胞を濃縮及び / 又は活性化
することと、を含む、実施形態 D 1 に記載の方法。

D 3 . 活性化培養物は、 I L - 2 を更に含む、実施形態 D 2 に記載の方法。

D 4 . 本方法は、対象から単離された細胞集団を得る機能を実施するための工程を更に
含む、実施形態 D 1 ~ D 3 のいずれか 1 つに記載の方法。
20

D 5 . 単離された細胞集団は、末梢血単核細胞（ P B M C ）である、実施形態 D 1 ~ D
4 のいずれか 1 つに記載の方法。

D 6 . 単離された細胞集団は、最終分化細胞である、実施形態 D 1 ~ D 5 のいずれか 1
つに記載の方法。

D 7 . 単離された細胞集団は、哺乳動物細胞である、実施形態 D 1 ~ D 6 のいずれか 1
つに記載の方法。

D 8 . 単離された細胞集団は、ヒト細胞である、実施形態 D 7 に記載の方法。

D 9 . 単離された細胞集団は、活性化培養物中で 1 ~ 2 0 日間、 1 ~ 1 7 日間、 1 ~ 1
5 日間、 1 ~ 1 3 日間、 1 ~ 1 1 日間、 1 ~ 9 日間、 1 ~ 7 日間、 1 ~ 5 日間、 1 ~ 3 日
30 間、 1 2 ~ 7 2 時間、 1 2 ~ 6 0 時間、 1 2 ~ 4 8 時間、 1 2 ~ 3 6 時間、 1 2 ~ 2 4 時
間、 8 ~ 1 6 時間、 4 ~ 8 時間、又は 2 ~ 4 時間培養される、実施形態 D 2 ~ D 8 のい
ずれか 1 つに記載の方法。

D 1 0 . 単離された細胞集団は、活性化培養物中で最大で 1 3 日間、最大で 1 0 日間、
最大で 9 日間、最大で 8 日間、最大で 7 日間、最大で 6 日間、最大で 5 日間、最大で 4 日
間、最大で 3 日間、最大で 2 日間、又は最大で 1 日間培養される、実施形態 D 9 に記載の
方法。

D 1 1 . 単離された細胞集団は、活性化培養物中で最大で 3 日間培養される、実施形態
D 1 0 に記載の方法。

D 1 2 . 単離された細胞集団は、活性化培養物中で 3 日間培養される、実施形態 D 1 0
40 に記載の方法。

D 1 3 . 活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、 5 % ~ 1 0 0 % の
T 細胞、 5 % ~ 9 5 % の T 細胞、 5 % ~ 9 0 % の T 細胞、 5 % ~ 8 5 % の
T 細胞、 5 % ~ 8 0 % の T 細胞、 5 % ~ 7 5 % の T 細胞、 5 % ~ 7 0 % の T
細胞、 5 % ~ 6 5 % の T 細胞、 5 % ~ 6 0 % の T 細胞、 5 % ~ 5 5 % の T 細胞、
5 % ~ 5 0 % の T 細胞、 5 % ~ 4 5 % の T 細胞、 5 % ~ 4 0 % の T 細胞
、 5 % ~ 3 5 % の T 細胞、 5 % ~ 3 0 % の T 細胞、 5 % ~ 2 5 % の T 細胞、
5 % ~ 2 0 % の T 細胞、又は 5 % ~ 1 5 % の T 細胞を含む、実施形態 D 2 ~ D 1
2 のいずれか 1 つに記載の方法。

D 1 4 . 活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、 9 0 % 未満、 8 0 %
50

未満、70%未満、60%未満、50%未満、45%未満、40%未満、35%未満、又は30%未満の T細胞を含む、実施形態 D13 に記載の方法。

D15 . 活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、35%未満の T細胞を含む、実施形態 D14 に記載の方法。

D16 . T細胞の少なくとも一部は、V₉⁺ T細胞に活性化される、実施形態 D1 ~ D15 のいずれか1つに記載の方法。

D17 . T細胞の少なくとも一部は、V₉²⁺ T細胞に活性化される、実施形態 D1 ~ D15 のいずれか1つに記載の方法。

D18 . T細胞を多能性状態に再プログラムする機能を実施するための工程は、T細胞を、1つ以上の再プログラミング因子をコードするウイルスベクターを用いて形質導入することと、形質導入された T細胞を、哺乳動物体細胞を多能性状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、を含む、実施形態 D1 ~ D17 のいずれか1つに記載の方法。

D19 . ウイルスベクターは、センダイウイルス (SeV) ベクターである、実施形態 D18 に記載の方法。

D20 . 1つ以上の再プログラミング因子は、OCT3/4、SOX2、KLF4、LIN28、及び c-Myc からなる群から選択される、実施形態 D18 又は D19 に記載の方法。

D21 . 形質導入された T細胞は、1つ以上の支持細胞層の存在下で培養される、実施形態 D18 ~ D20 のいずれか1つに記載の方法。

D22 . 形質導入された T細胞は、支持細胞層の単層の存在下で培養される、実施形態 D21 に記載の方法。

D23 . 支持細胞層は、マウス胚性線維芽細胞 (MEF) を含む、実施形態 D21 又は D22 に記載の方法。

【0240】

更に別のセットの実施形態 (実施形態セット E) では、以下が提供される。

E1 . 方法に従って作製された人工多能性幹細胞 (iPSC) であって、方法は、

(a) 単離された細胞集団中の T細胞を濃縮及び/又は活性化する機能を実施するための工程と、

(b) T細胞を多能性状態に再プログラムする機能を実施するための工程と、を含む、iPSC。

E2 . 単離された細胞集団中の T細胞を濃縮及び/又は活性化する機能を実施するための工程は、単離された細胞集団を活性化培養物と接触させることであって、活性化培養物は、IL-15 及びゾレドロン酸を含む、接触させることと、単離された細胞集団を活性化培養物中で培養して、単離された細胞集団中の T細胞を濃縮及び/又は活性化することと、を含む、実施形態 E1 に記載の iPSC。

E3 . 活性化培養物は、IL-2 を更に含む、実施形態 E2 に記載の iPSC。

E4 . 本方法は、対象から単離された細胞集団を得る機能を実施するための工程を更に含む、実施形態 E1 ~ E3 のいずれか1つに記載の iPSC。

E5 . 単離された細胞集団は、末梢血単核細胞 (PBMC) である、実施形態 E1 ~ E4 のいずれか1つに記載の iPSC。

E6 . 単離された細胞集団は、最終分化細胞である、実施形態 E1 ~ E5 のいずれか1つに記載の iPSC。

E7 . 単離された細胞集団は、哺乳動物細胞である、実施形態 E1 ~ E6 のいずれか1つに記載の iPSC。

E8 . 単離された細胞集団は、ヒト細胞である、実施形態 E7 のいずれか1つに記載の iPSC。

E9 . 単離された細胞集団は、活性化培養物中で1~20日間、1~17日間、1~15日間、1~13日間、1~11日間、1~9日間、1~7日間、1~5日間、1~3日間、12~72時間、12~60時間、12~48時間、12~36時間、12~24時

10

20

30

40

50

間、8～16時間、4～8時間、又は2～4時間培養される、実施形態E2～E8のいずれか1つに記載のiPSC。

E10．単離された細胞集団は、活性化培養物中で最大で13日間、最大で10日間、最大で9日間、最大で8日間、最大で7日間、最大で6日間、最大で5日間、最大で4日間、最大で3日間、最大で2日間、又は最大で1日間培養される、実施形態E9に記載のiPSC。

E11．単離された細胞集団は、活性化培養物中で最大3日間培養される、実施形態E10に記載のiPSC。

E12．単離された細胞集団は、活性化培養物中で3日間培養される、実施形態E10に記載のiPSC。

E13．活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、5%～100%のT細胞、5%～95%のT細胞、5%～90%のT細胞、5%～85%のT細胞、5%～80%のT細胞、5%～75%のT細胞、5%～70%のT細胞、5%～65%のT細胞、5%～60%のT細胞、5%～55%のT細胞、5%～50%のT細胞、5%～45%のT細胞、5%～40%のT細胞、5%～35%のT細胞、5%～30%のT細胞、5%～25%のT細胞、5%～20%のT細胞、又は5%～15%のT細胞を含む、実施形態E2～E12のいずれか1つに記載のiPSC。

E14．活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、90%未満、80%未満、70%未満、60%未満、50%未満、45%未満、40%未満、35%未満、又は30%未満のT細胞を含む、実施形態E13に記載のiPSC。

E15．活性化培養物中で培養された後、単離された細胞集団は、35%未満のT細胞を含む、実施形態E14に記載のiPSC。

E16．T細胞の少なくとも一部は、V9+ T細胞に活性化される、実施形態E1～E15のいずれか1つに記載のiPSC。

E17．T細胞の少なくとも一部は、V9²+ T細胞に活性化される、実施形態E1～E15のいずれか1つに記載のiPSC。

E18．T細胞を多能性状態に再プログラムする機能を実施するための工程は、T細胞を、1つ以上の再プログラミング因子をコードするウイルスベクターを用いて形質導入することと、形質導入されたT細胞を、哺乳動物体細胞を多能性状態に再プログラムするのに適した条件下で培養することと、を含む、実施形態E1～E17のいずれか1つに記載のiPSC。

E19．ウイルスベクターは、センダイウイルス(SeV)ベクターである、実施形態E18に記載のiPSC。

E20．1つ以上の再プログラミング因子は、OCT3/4、SOX2、KLF4、LIN28、及びc-Mycからなる群から選択される、実施形態E18又はE19に記載のiPSC。

E21．形質導入されたT細胞は、1つ以上の支持細胞層の存在下で培養される、実施形態E18～E20のいずれか1つに記載のiPSC。

E22．形質導入されたT細胞は、支持細胞層の単層の存在下で培養される、実施形態E21に記載のiPSC。

E23．支持細胞層は、マウス胚性線維芽細胞(MEF)を含む、実施形態E21又はE22に記載のiPSC。

E24．多能性細胞を含む人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団であって、多能性細胞は、1つ以上の再プログラミング因子を発現させるための手段を含み、かつ/又は多能性細胞は、TRG遺伝子及びTRD遺伝子の再配置をコードするための手段を含む、人工多能性幹細胞(iPSC)の単離された集団。

E25．再プログラミング因子は、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、及びLin28からなる群から選択される、実施形態E24に記載のiPSCの単離された集団。

10

20

30

40

50

E 2 6 . i P S C の単離された集団は、センダイウイルス (S e V) ベクターに対して陰性である、実施形態 E 2 4 又は E 2 5 に記載の i P S C の単離された集団。

E 2 7 . i P S C の単離された集団は、 T 細胞に由来する、実施形態 E 2 4 ~ E 2 6 のいずれか 1 つに記載の i P S C の単離された集団。

E 2 8 . i P S C の単離された集団は、 T R G 遺伝子座及び T R D 遺伝子座の再配置遺伝子を有し、任意選択で、 i P S C の単離された集団は、 V 9 遺伝子配置及び V 2 遺伝子配置を有する、実施形態 E 2 4 ~ E 2 7 のいずれか 1 つに記載の i P S C の単離された集団。

E 2 9 . i P S C の単離された集団は、 T 細胞に由来しない、実施形態 E 2 4 ~ E 2 8 のいずれか 1 つに記載の i P S C の単離された集団。

10

E 3 0 . i P S C の単離された集団は、 T C R A 遺伝子座及び T C R B 遺伝子座から P C R 生成物を作製しない、実施形態 E 2 4 ~ E 2 9 のいずれか 1 つに記載の i P S C の単離された集団。

E 3 1 . i P S C の単離された集団は、染色体の喪失を伴わずにゲノム的に安定している、実施形態 E 2 4 ~ E 3 0 のいずれか 1 つに記載の i P S C の単離された集団。

E 3 2 . i P S C の単離された集団のゲノム安定性は、核型分析によって決定される、実施形態 E 3 1 に記載の i P S C の単離された集団。

E 3 3 . i P S C の単離された集団は、採用後に支持細胞を含まない培地中で増殖及び維持することができる、実施形態 E 2 4 ~ E 3 2 のいずれか 1 つに記載の i P S C の単離された集団。

20

【実施例】

【 0 2 4 1 】

7 . 実施例

以下は、研究において使用される様々な方法及び材料の記載である。これらは、当業者が本発明の作製及び使用方法の完全な開示及び説明を提供するように記載されており、本発明者らがその発明とみなす範囲を限定することを意図しておらず、また、以下の実験が実施され、実施可能な実験の全てであることを表すことを意図していない。現在形で書かれた例示的な記述は、必ずしも実行されたものではなく、むしろ記述は、本発明の教示と関連するデータなどを生成するために実行され得るものであることを理解されたい。使用される数値 (例えば、量、割合など) についての正確度を保証するための努力はなされているが、多少の実験誤差及び偏差が考慮に入れられるべきである。

30

【 0 2 4 2 】

7 . 1 . 実施例 1 : P B M C 培養物からの T 細胞の選択的活性化及び濃縮

T 細胞由来 i P S C を生成するために、健常個体由来の全 P B M C をゾレドロン酸 1 水和物 (Z o l) 、インターロイキン - 2 、及びインターロイキン - 1 5 (Z o l + I L - 2 + I L - 1 5) を用いて様々な期間 (3 日間、 8 日間、及び 1 3 日間) 培養した。 Z o l 刺激された P B M C から i P S C を誘導するための理想的な時点を見出すために、 3 日目、 8 日目、又は 1 3 日目の P B M C 培養物から細胞間凝集塊を濃縮した (図 1 、上列) 。 P B M C の Z o l 刺激後 3 日目から、活性化細胞を含有する細胞間凝集塊又は芽細胞を観察することができた。

40

【 0 2 4 3 】

V 9 + T 細胞の活性化及び / 又は拡大における Z o l の選択的性質のために、細胞間凝集塊又は芽細胞は、大部分が V 9 + T 細胞から構成されると仮定された。フローサイトメトリー分析は、細胞間凝集塊が、培養期間の 3 日目、 8 日目、及び 1 3 日目にそれぞれ全 P B M C のうち約 3 5 % 、 9 1 % 、及び 9 3 % の T 細胞からなることを明らかにした (図 1 、上列) 。 T 細胞のうち、 T C R V 9 + 細胞は、培養期間の 3 日目、 8 日目、及び 1 3 日目にそれぞれ T 細胞の約 3 5 % 、 9 6 % 、及び 9 8 % を構成した (図 1 、下列) 。しかしながら、全ての健常ドナーが Z o l 媒介刺激に同様に応答するわけではない。したがって、 Z o l 媒介刺激に迅速に応答するドナーをスクリーニング及び同定することは、再プログラミングのための最適なドナーを見出すのに役立つ。

50

【0244】

7.1.1. 全PBMCからのV₉₊ T細胞の選択的活性化
 - 3日目、- 8日目、及び- 13日目に、凍結PBMCのバイアルを迅速に解凍し、50 mLのファルコンチューブ中の温かい完全RPMI培地49 mLに添加して凍結培地を希釈した。完全RPMI培地は、RPMI (カタログ番号61870-036、Gibco)、10%のFBS (カタログ番号10099-141、Gibco)、及び1倍のPen/Strep (カタログ番号15070-063、Gibco)を含む。1500 rpmで5分間、PBMCsを遠心分離した。35 mLの完全RPMI培地 (RPMI + 10%のFBS + 1倍のPen/Strep) に再懸濁させることによって、細胞を1回洗浄した。完全RPMI培地中に細胞ペレットを再懸濁させ、細胞を計数した。あるいは、密度勾配遠心分離によって全血サンプルからPBMCを単離し、血球計数器を使用して細胞を計数した。細胞密度を、完全RPMI培地中で 1.0×10^6 細胞/mLまで調整した。

【0245】

一方、調製した T細胞培養培地 (RPMI - 10%、10%のFBS及び1倍のPen/Strepを補充したRPMI) に、組み換えヒトIL-2 (rhIL-2) (カタログ番号202-IL、R&D Systems) を1000 IU/mLの最終濃度まで、組み換えヒトrhIL-15 (カタログ番号247-ILB-025、R&D Systems) を10 ng/mLの最終濃度まで、及びゾレドロン酸を5 μ Mの最終濃度まで補充した。調製した T細胞培養培地で、細胞密度を 1×10^6 細胞/mLまで調整した。 1.0×10^6 個の細胞を、T-75フラスコ中の10 mLの培養培地中に播種した。

(1) - 3日目のZol活性化PBMCについては、- 3日目と0日目との間に追加の培地なしで細胞濃縮を実施した。

(2) - 8日目のZol活性化PBMCについては、2倍濃度のIL-2 (200 IU) 及びIL-15 (20 ng/mL) を含有する10 mLの培養培地を- 5日目に補充して、IL-2及びIL-15の最終濃度をそれぞれ100 IU及び10 ng/mLに到達させた。細胞芽形成を顕微鏡下で観察した。更に- 3日目に、細胞を室温で5分間、1500 rpmでスピンドウンした。細胞ペレットを、培養の- 3日目に、100 IUのIL-2及び10 ng/mLのIL-15を含有する40 mLの培養培地 (RPMI + 10%のFBS + 1倍のPen/Strep) に再懸濁した。

(3) - 13日目のZol活性化PBMCについては、2倍濃度のIL-2 (200 IU) 及びIL-15 (20 ng/mL) を含有する10 mLの培養培地を- 11日目に補充した。細胞芽形成を顕微鏡下で観察した。更に- 7日目に、細胞を室温で5分間、1500 rpmでスピンドウンした。細胞ペレットを、培養の- 7日目に、100 IUのIL-2及び10 ng/mLのIL-15を含有する40 mLの培養培地 (RPMI + 10%のFBS + 1倍のPen/Strep) に再懸濁した。更に- 5日目に、細胞を室温で5分間、1500 rpmでスピンドウンした。細胞ペレットを、培養の- 5日目に、100 IUのIL-2及び10 ng/mLのIL-15を含有する40 mLの培養培地 (RPMI + 10%のFBS + 1倍のPen/Strep) に再懸濁した。更に- 3日目に、細胞を室温で5分間、1500 rpmでスピンドウンした。細胞ペレットを、培養の- 3日目に、100 IUのIL-2及び10 ng/mLのIL-15を含有する40 mLの培養培地 (RPMI + 10%のFBS + 1倍のPen/Strep) に再懸濁した。

【0246】

7.1.2. T細胞の濃縮

活性化 T細胞を、細胞間凝集塊濃縮を介して間接的に濃縮した。0日目に、Zol培養されたPBMC (それぞれ3日間、8日間、及び13日間) を含有するT-75 cm² 細胞培養フラスコを45度の角度で傾け、10 mLの無菌ピペットを使用して、沈降した細胞を乱すことなく上清培地を吸引した。残りの沈降集団は、大部分が活性化細胞の塊からなる。全PBMC中のV₉₊ T細胞をZolによって選択的に活性化した。活

性化された細胞は、細胞間凝集塊又は芽細胞を形成した。これらの細胞凝集塊は、単一細胞と比較してより高い沈降速度を有していたが、上清培地は主に単一細胞からなっていた。

【0247】

Easy Sep (商標) Human T細胞単離キット (Stemcell Technologies) を製造業者の指示に従って使用して、T細胞の純粋な集団の濃縮を実施した。

【0248】

3日目又は8日目にZol培養したPBMCを採取し、1500rpmで5分間、室温でスピンドウンした。3日目又は8日目のZol刺激PBMCから濃縮されたT細胞をSeVベクター形質導入に使用した。

【0249】

細胞を、単純な (plain) RPMI (FBSなし、又は1倍のPen/Strep) 培地に再懸濁することによって1回洗浄し、1500rpmで5分間スピンドウンした。細胞ペレットを1mLのEasy Sep (商標) 緩衝液 (カタログ番号20144、STEMCELL Technologies) に再懸濁し、細胞を血球計数器によって計数した。

【0250】

沈降した細胞凝集塊の細胞密度を、5mLのポリスチレン丸底チューブ中に入れた1mLのEasy Sep 緩衝液で 50×10^6 細胞に調整した。50 μ Lのビオチン化カクテルを再懸濁した細胞に添加し、混合し、室温で15分間インキュベートした。インキュベーション期間の終了前に、Easy Sep 磁性粒子を30秒間ボルテックスして、それらを均一に分散させた。インキュベーション期間後、50 μ LのEasy Sep 磁性粒子を1mLの再懸濁細胞に添加し、混合し、室温で10分間インキュベートした。

【0251】

インキュベーション期間後、1.5mLのEasy Sep (商標) 緩衝液を添加して、細胞を含有するチューブを満たし、細胞を上下に穏やかに混合することによって再懸濁した。チューブを磁石スタンド上に置き、室温で5分間インキュベートした。

【0252】

インキュベーション期間の終わりに、濃縮された細胞懸濁液を含有する培地を、チューブを含む磁石を1回の連続動作で反転させることによって収集した。複数のチューブシナリオでは、チューブが磁石スタンド上にある間に、1mLのピペットハンドを使用することによって、結合した磁性粒子を乱すことなく、上清をチューブから収集した。

【0253】

37 μ Lのボルテックスした磁性粒子を濃縮された細胞懸濁液に添加し、次いで、これを混合し、室温で5分間インキュベートした。細胞懸濁液を含むチューブを磁石スタンド上に置き、室温で5分間インキュベートした。チューブを含む磁石を1回の連続動作で反転させることにより、細胞懸濁液を新しい15mLのチューブに移すことによって、濃縮された細胞を収集した。次いで、チューブに10mLの完全RPMI培地 (RPMI + 10%のFBS + 1倍のPen/Strep) を補充した。

【0254】

細胞を室温で5分間1500rpmでスピンドウンし、10mLの完全RPMI培地を添加することによってもう1回洗浄した。細胞を1500rpmで5分間、室温でスピンドウンし、1mLの完全RPMI培地に再懸濁し、血球計数器によって計数した。濃縮されたT細胞の純度を、細胞をTCR、TCR、及びTCR V₉に対するmAbで染色することによってフローサイトメーターでチェックした。

【0255】

7.2. 実施例2: PBMC培養物からのヒトT細胞由来iPSCの生成
細胞間凝集塊 (又は芽細胞) を、OCT3/4、SOX2、KLF4、及びc-Myc再プログラミング因子をコードするセンダイウイルス (SeV) ベクターによる形質導入

10

20

30

40

50

に供した。S e Vベクター形質導入細胞を、以下の第7.2.1節～第7.2.5節に記載されるように、有糸分裂的に不活性化されたM E F支持細胞層、T細胞枯渇自己P B M C、及び/又は支持細胞を含まない条件で増殖させた。

【0256】

S e V形質導入後20日目頃からコロニーが観察され始め、26日目頃にコロニー数が最大となった。驚くべきことに、Z o l + I L - 2 + I L - 15によって3日間刺激されたP B M C培養物のみが、S e V形質導入の20日後にかなりの数のコロニーを生じた。対照的に、Z o l + I L - 2 + I L - 15によって8日間又は13日間刺激されたP B M C培養物は、S e V形質導入後にかなりの数のコロニーを生じなかった。

【0257】

この驚くべき観察は、より濃縮された細胞(8日間又は13日間)と比較して、より濃縮されていない細胞(3日間)が再プログラミングを非常に起こしやすいことを示す。

【0258】

図2A及び図2Bに示されるように、M E F支持細胞層上の異なるクローン(クローンA～C)の未分化i P S Cコロニーは、滑らかで密な境界を有する丸いコロニー、及び従属栄養中心を有さない密な境界内の緻密な細胞として同定された。クローンA～Cは、同じドナー由来であった。

【0259】

対照的に、ラミニン-511コーティングプレート上で増殖させた(支持細胞を含まない培養)又は有糸分裂的に不活性化されたT細胞枯渇自己P B M Cと共培養した(支持細胞ベースの培養)S e V形質導入P B M Cの実験群(3日間、8日間、又は13日間濃縮)のいずれも、コロニーを生じなかった。M E F支持細胞層上で増殖させた8日目のP B M C培養物由来の濃縮されたT細胞もまた、コロニーを全く生じなかった。

【0260】

更に、m R N A又はエピソーム媒介再プログラミングを、センダイウイルス(S e V)媒介再プログラミングの代替として調べた。Z o l活性化P B M Cは、繰り返しの電気穿孔媒介m R N Aトランスフェクションに対して耐性がなかったため、m R N A媒介再プログラミングに関する研究を更に進めることはできなかった。エピソーム媒介再プログラミングは、非常に少ないコロニーを生じた。したがって、S e V媒介再プログラミングは、Z o l活性化T細胞を再プログラムするための最も効率的な方法であることが観察された。

【0261】

7.2.1. 細胞外マトリックスでの細胞培養プレートのコーティング
ゼラチンコーティング

2 mLの0.1%ゼラチン溶液(カタログ番号E S - 006 - B、M e r c k)を6ウェル細胞培養プレートのウェルに添加し、室温で2時間又は37℃で1時間のいずれかでインキュベートした。

【0262】

インキュベーション期間の終わりに、ウェルの表面領域がアスピレーターと接触しないように注意しながら、真空ベースのアスピレーターを使用してゼラチン溶液を吸引した。細胞(例えば、マウス胚性線維芽細胞)を遅滞なくウェルに添加した。

【0263】

i M a t r i x - 511コーティング

0.5 mg / mLのストック濃度のi M a t r i x - 511(カタログ番号892011、N i p p i / M a t r i x o m e)溶液を滅菌D P B S(カタログ番号14190-136、G i b c o)で希釈した。ディッシュを、0.5 μ g / c m²の濃度の希釈i M a t r i x - 511でコーティングした。6ウェルプレートの1つのウェル(9.6 c m² / ウェル)について、9.6 μ Lのi M a t r i x - 511(4.8 μ g)を1.99 mLの滅菌D P B Sに添加し、4℃で一晩、37℃で1時間、又は室温で3時間インキュベートした。

10

20

30

40

50

【0264】

インキュベーション期間後、希釈した *iMatrix-511* を、ウェルの表面領域がアスピレーターと接触しないように、かつウェルが空気乾燥しないように注意しながら、ウェルから吸引した。

【0265】

プレートが乾燥しないように、必要な培地を直ちにウェルに添加した。培地は、壁に沿ってウェルに滴下する必要がある。吸引と細胞播種との間にすすぎは必要ない。細胞を所望の密度で直ちにプレーティングした。プレートをインキュベーターに戻した。

【0266】

ビトロネクチンコーティング

0.5 mg/mL のストック濃度のビトロネクチン（カタログ番号 A14700、Gibco）のバイアルを室温で解凍した。60 μ L のビトロネクチンアリコートポリプロピレンチューブ中で調製した。これらのアリコートを直ちに使用するか、又は -80 で凍結した。

【0267】

6 ウェルプレートのウェルをコーティングするために、ビトロネクチンの 2 つの 60 μ L のアリコートを -80 の貯蔵庫から取り出し、室温で解凍した。6 ウェルプレートごとに 2 つの 60 μ L のアリコートが必要であった。

【0268】

120 μ L の解凍したビトロネクチンを、カルシウム又はマグネシウムを含まない 12 mL の滅菌 DPBS を含有する 15 mL のコニカルチューブに室温で添加し、希釈したビトロネクチンを上下にピペッティングすることによって穏やかに再懸濁した。これは、5 μ g/mL のビトロネクチンの作業濃度（すなわち、1:100 希釈）をもたらした。

【0269】

2 mL の希釈したビトロネクチン溶液を、6 ウェルプレートの各ウェルに添加した。6 ウェルプレート（10 cm^2 / ウェル）を 2 mL / ウェルでコーティングするために使用されるとき、ビトロネクチンの最終濃度は、0.5 μ g/ cm^2 である。コーティングしたプレートを 37 で 3 時間（又はビトロネクチンの製造業者に従って室温で 1 時間）インキュベートした。

【0270】

コーティングされたプレートは、実験室用フィルムに包まれて 2 ~ 8 で最大 1 週間使用又は保存することができる。しかし、コーティングされたプレートは、乾燥させることができない。使用前に、コーティングされたプレートを室温まで少なくとも 1 時間予熱した。

【0271】

ビトロネクチン溶液を吸引し、廃棄した。ビトロネクチンの除去後にコーティングされたプレートをすすぐ必要はない。細胞をビトロネクチンコーティングプレート上に直接継代することができる。

【0272】

7.2.2. 有糸分裂的に不活性化されたマウス胚性線維芽細胞（MEF）細胞培養物の調製

マウス胚性線維芽細胞（MEF）蘇生

MEF（CF-1）（カタログ番号 SCRC-1040、ATCC）細胞株を、凍結バイアルとして ATCC から入手した。MEF 細胞の凍結バイアルを 37 の水浴中で迅速に解凍した。解凍した内容物を、DMEM（カタログ番号 11965-092、Gibco）、15% の FBS、及び 1% の Pen/Strep を含む、40 mL の 37 に予熱した MEF 培地を含有する 50 mL のファルコンチューブに滴下方式で添加した。MEF 細胞を室温で 5 分間 1500 rpm でスピンドウンし、上清を廃棄した。細胞を 30 mL の MEF 培地（DMEM + 15% の FBS + 1% の Pen/Strep）で 1 回洗浄し、1500 rpm で 5 分間、室温でスピンドウンした。次いで、細胞を、トリパンブルー（

10

20

30

40

50

カタログ番号 T C L 0 4 6、H i m e d i a) を使用して血球計数器で計数した。

【 0 2 7 3 】

M E F 播種及び培養

M E F を T - 7 5 c m ² のフラスコに 0 . 8 × 1 0 ⁶ 細胞の密度で 2 0 ~ 2 5 m L の M E F 培地 (D M E M + 1 5 % の F B S + 1 % の P e n / S t r e p) 中に播種した。あるいは、M E F を T - 1 5 0 のフラスコに 1 × 1 0 ⁶ 細胞の密度で 4 0 m L の M E F 培地中に播種した。M E F を、7 . 5 ~ 1 0 % の C O ₂ を有する加湿インキュベーター中、3 7 でインキュベートした。M E F を 7 . 5 ~ 1 0 % の C O ₂ で増殖させるために、培地は 3 . 7 g / L の重炭酸ナトリウムを含有すべきである。細胞培養物が 6 0 ~ 7 0 % の集密度に達したときに、細胞を継代培養した (下記のように) 。

10

【 0 2 7 4 】

M E F 継代培養

M E F 培養培地を除去し、廃棄した。次いで、細胞層を 2 0 m L (T - 7 5 フラスコ) 又は 4 0 m L (T - 1 7 5 フラスコ) の滅菌 D P B S ですすいだ。4 m L (T - 7 5 フラスコ) 又は 1 0 m L (T - 1 7 5 フラスコ) の予熱したトリプシン - E D T A (カタログ番号 2 5 2 0 0 - 0 5 6、G i b c o) を添加し、混合物を 2 ~ 5 分間インキュベートした。M E F を、顕微鏡下で観察されるようにフラスコから分離し、解離して単一細胞懸濁液を形成した。トリプシンを、2 倍量の完全 M E F 培養培地 (D M E M + 1 5 % の F B S + 1 % の P e n / S t r e p) をフラスコに添加することによって中和した。

【 0 2 7 5 】

全ての細胞を遠心管に移し、1 5 0 0 r p m で 5 分間、室温で遠心分離した。上清を捨てた後、1 0 m L の完全増殖培地を細胞ペレットに添加した。細胞を 1 0 m L のピペットで穏やかに懸濁して、単一細胞懸濁液を作製した。更なる M E F 培養培地を、継代培養のために必要に応じて単一細胞懸濁液に添加した。

20

【 0 2 7 6 】

継代培養のために、M E F 細胞を、必要に応じて 1 : 2 又は 1 : 3 の比で分割した。細胞を、7 . 5 ~ 1 0 % の C O ₂ を含有する 3 7 の加湿インキュベーターのフラスコ中でインキュベートした。M E F が i P S C の支持細胞層として使用されている場合、継代数 6 (P 6) を過ぎてそれらを使用することは推奨されない。

【 0 2 7 7 】

M E F 凍結

M E F 細胞を、1 m L の凍結培地 (追加の 4 0 % の F B S 及び 1 0 % の (v / v) D M S O (カタログ番号 D 2 6 5 0、S i g m a) を補充した完全 M E F 培地) 中、5 0 0 万 / クライオバイアルの細胞密度で凍結した。

【 0 2 7 8 】

クライオバイアルをステップクーラー内で - 8 0 で一晩保存し、翌日液体窒素に移した。

【 0 2 7 9 】

M E F 細胞の有糸分裂不活性化

凍結 M E F (< 継代数 5) のバイアルを 3 7 の水浴中で迅速に解凍し、5 0 m L のファルコンチューブ中の 4 9 m L の予熱した完全 M E F 培地 (D M E M + 1 5 % の F B S + 1 倍の P e n S t r e p) に滴下して加えた。細胞を室温で 5 分間 1 5 0 0 r p m で遠心分離し、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline、P B S) で 1 回洗浄した。1 0 0 万個の M E F を、T - 1 5 0 c m ² のフラスコ中の 4 0 m L の M E F 培地 (D M E M + 1 5 % の F B S + 1 % の P e n / S t r e p) に播種し、7 . 5 % の C O ₂ を有する加湿インキュベーター中、3 7 でインキュベートした。M E F を 7 . 5 % の C O ₂ で増殖させるために、D M E M 培地は、3 . 7 g / L の重炭酸ナトリウムを含有すべきである。培養 2 日目に、培地を新鮮な M E F 培地と交換した。3 ~ 3 . 5 日間の培養後、M E F 細胞はサブコンフルエント段階 (およそ 7 0 % の集密度) に達した。

40

【 0 2 8 0 】

50

マイトマイシンCマスターストックを、再蒸留H₂O (dd H₂O) 中で1 mg / mLの濃度で調製した。MEF培養培地 (DMEM + 15%のFBS + 1倍のPen / Strep) 1ミリリットル当たり10 µg (10 µl)の最終作業濃度になるようにマイトマイシンCを添加した。対数期継代3のMEFを含有するT - 150 cm²のフラスコについて、400 µLのマイトマイシンC (1 mg / mLストック濃度)を40 mLのMEF培養培地 (DMEM + 15%のFBS + 1倍のPen / Strep)に添加した。混合物を、7.5%のCO₂を有する加湿インキュベーター中、37 °Cで2時間、フラスコ中でインキュベートした。インキュベーション期間後、マイトマイシンCを含有する培地を吸引した。細胞を40 mLの単純DMEM培地で10回繰り返し洗浄した。マイトマイシンCの残りが存在すると共培養細胞の増殖が妨げられるので、残存するマイトマイシンCを除去するために激しい洗浄が必要である。最後の洗浄として、細胞を40 mLのDPBSで1回洗浄した。

【0281】

10 mLの1 × トリプシン - EDTAを、MEF細胞を含有する洗浄したT - 150 cm²のフラスコに添加した。7.5%のCO₂を有する加湿インキュベーター中、37 °Cで3 ~ 5分間インキュベートした。インキュベーション期間後、20 mLの完全MEF培地 (DMEM + 15%のFBS + Pen / Strep)を添加することによってトリプシンを中和した。細胞を室温で5分間、1500 rpmでスピンドウンした。洗浄後、マイトマイシンC処理したMEFを直接使用するか、又は下流側の適用のために凍結した。

【0282】

7.2.3. T細胞のセンダイウイルス (SeV) ベクター媒介再プログラミング
0日目：センダイウイルス感染

細胞は、トリパンブルーを使って計数した。50万個の細胞間凝集塊濃縮PBMC又はT細胞を、低接着性24ウェルプレートのウェルにピペットで移した。低接着性プレートは、SeV感染中又は後に、PBMCを含む任意の細胞が互いに付着するのを防止するために重要である。

【0283】

T細胞の純粋な集団は、Zol + IL - 2 + IL - 15培養によるPBMC培養の8日目及び13日目に採取されたPBMCからのみ、いかなるT細胞又は他の細胞の混入もなく濃縮された。

【0284】

Cytotune (商標) 2.0チューブ (カタログ番号A16517、Thermo Fischer Scientific)を-80 °Cから取り出し、37 °Cの水浴中で1つずつ5 ~ 10秒間急速に解凍した。解凍したら、これらのチューブを氷上に置いた。

【0285】

KOS、hc - Myc、及びhK1f4を含有するセンダイウイルス粒子の計算された体積を、それぞれ5、5及び3の感染多重度 (MOI、Cytotune (商標) 2.0キットの各ロットに特異的な力価に基づいて計算される)で、0.3 mLの完全RPMI培地 (RPMI + 10%のFBS)中の細胞に添加した。完全培養培地に100 IUのIL - 2及び10 ng / mLのIL - 15を補充した。ポリブレン (カタログ番号TR - 1003 - G、Millipore)を、4 µg / mLの濃度でウイルスを含有する細胞懸濁液に添加した。

【0286】

1日目：培地を交換し、細胞を培養する

細胞及び培地を培養プレートから除去し、15 mLのファルコンチューブに移した。プレート中のウェルを、1 mLの完全RPMI培地 (RPMI + 10%のFBS + 1倍のPen / Strep)で穏やかにすすいで、細胞の大部分が採取されたことを確実にした。完全培養培地に100 IUのIL - 2及び10 ng / mLのIL - 15を補充した。

【0287】

Cytotune (商標) 2.0センダイウイルスを、200 × gで10分間、室温で

細胞を回転させることによって細胞懸濁液から除去した。培地を吸引し、細胞ペレットを低接着性24ウェルプレート中の0.5 mLの完全RPMI培地に再懸濁した。

【0288】

細胞を、完全RPMI培地(RPMI+10%のFBS+1%のPen/Strep)中、5%のCO₂の加湿インキュベーター中、37℃で2日間培養した。

【0289】

3日目：形質導入細胞の移し換え - 支持細胞層(MEF)条件

支持細胞層を、マイトマイシンC(カタログ番号M4287、Millipore)を使用して有糸分裂的に停止させた。MEFをマイトマイシンCで処理するための詳細なプロトコールは、第7.2.2節に記載されている。有糸分裂的に停止させたMEFを、6ウェルプレートのゼラチンコーティングウェル上にプレーティングした。形質導入細胞をMEF上に播種する1日又は2日前に、有糸分裂停止MEFをプレーティングすることが望ましい。マイトマイシンCがMEFの細胞周期を停止させたかどうかを、37℃、5%のCO₂で7日間にわたって有糸分裂的に停止させたMEFによる培地消費を測定することによってチェックした。マイトマイシンCが実際にMEFの細胞周期を停止させたかどうかは、常にチェックされるべきである。

10

【0290】

SeV形質導入細胞間凝集塊濃縮PBMC又はT細胞を計数し、6ウェルプレート中の2 mLの完全RPMI培地中のMEF単層上に様々な細胞密度(6ウェルプレート中10,000~100,000細胞/ウェル)で播種した。完全培養培地に100 IUのIL-2及び10 ng/mLのIL-15を補充した。

20

【0291】

3日目：形質導入細胞の移し換え - 支持細胞なしの条件(iMatrix-511コーティングプレート上へ)

SeV形質導入細胞間凝集塊濃縮PBMC又はT細胞が播種される日に、6ウェルプレートをラミニン511-E8断片でコーティングした(iMatrix-511でプレートをコーティングするための詳細なプロトコールは第7.2.1節に記載されている)。

【0292】

SeV形質導入PBMC又はT細胞を、2 mLの完全RPMI培養培地中のラミニン511-E8断片でコーティングされたウェル上に、様々な細胞密度(6ウェルプレート中10,000~100,000細胞/ウェル)で播種した。

30

【0293】

5日目、7日目、9日目、及び11日目：培地変更

使用した完全RPMI培地の半分(1 mL)を、細胞を乱すことなく取り出し、100 ng/mLの塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)(カタログ番号AMS-480-100、Amsbio)を含有する1 mLの新鮮なStemFit Basic 2.0(カタログ番号SFB500、AJINOMOTO)をウェルに補充した。bFGFの最終作業濃度は、50 ng/mLであった。

【0294】

7、9、及び11日目に新鮮な培地を培地に補充しながら、bFGFを2倍濃度、すなわち、100 ng/mLで添加した。

40

【0295】

13、15、17、19、及び21日目：培地の完全な補充

1.5 mLの古い培地を除去し、ウェルに、50 ng/mLのbFGFを含有する2 mLのStemFit Basic 2.0培地を補充した。コロニーを毎日観察し、発生中のコロニーをマーカーペンでマークし、追跡した。

【0296】

7.2.4. コロニーのピックアップ及び増殖

コロニーが顕著になったら、すなわち、23日目頃に、手作業でのコロニーのピックア

50

ップを準備した。i P S Cコロニーを含む6ウェルプレートをインキュベーターから取り出し、細胞を顕微鏡下で観察した。

【0297】

未分化コロニーをマーカーペンでマークした。参考のために、これらのコロニーの写真を1枚又は2枚撮った。コロニーの特定が完了したら、プレートをラミナーフード (laminar hood) に移した。

【0298】

使用済み培地を、真空ポンプを使用してウェルから吸引した。支持細胞ベースの培養のために、滅菌DPBSで1:1の希釈で予め希釈した800 μ LのTrypLE (カタログ番号12563-029、Gibco) 解離試薬を6ウェルプレート中のウェルに添加した。プレートを、5%のCO₂を含有する加湿インキュベーター中、37 $^{\circ}$ Cで4分間インキュベートした。

10

【0299】

支持細胞を含まない培養のために、滅菌DPBSで1:1の希釈で予め希釈した800 μ LのTrypLE解離試薬を、6ウェルプレート中のウェルに添加した。プレートを、5%のCO₂を含有する加湿インキュベーター中、37 $^{\circ}$ Cで1分間インキュベートした。

【0300】

インキュベーション期間の終わりに、プレートをインキュベーターから取り出し、穏やかに傾けた。ウェル中に存在するTrypLE試薬の全部を1mLのピペットで吸引した。10 μ MのROCK阻害剤 (カタログ番号SCM075、Merck Millipore) を含有する2mLのStemFit Basic 2.0培地及びbFGFをウェルに添加した。

20

【0301】

支持細胞を含まない培養のために、10 μ MのROCK阻害剤を含有する2mLのmTeSR培地 (カタログ番号85850、STEMCELL Technologies) をウェルに添加した (bFGFなし)。

【0302】

コロニーのピックアップのために、StemFit Basic 2.0 (支持細胞ベースの培養) 又はmTeSR (支持細胞を含まない) 培地を含有するプレートを倒立顕微鏡 (OLYMPUS、モデルCKX53SF、シリアル番号8M44621) に移した。その間に、倒立顕微鏡をラミナーフード内に移動させた。顕微鏡をラミナーフード内に移動させる前に、顕微鏡が清潔で消毒されていることを確認することが重要である。200 μ Lのピペッターに取り付けた細長い口を有するゲルローディングチップを使用して前後に掻き取った、予めマークしたコロニー上に焦点を合わせて顕微鏡を調整した。コロニーを小さな正方形の塊に掻き取ることによって分割した。

30

【0303】

コロニーは、隣接するコロニーからの汚染を防止するためにほとんど廃棄する (scraping) ことなく収集することができるか、又はコロニー全体を200 μ Lのチップによって収集することができるか、支持細胞ベースの培養については、ROCK阻害剤及びbFGFを含有する200 μ LのStemFit Basic 2.0培地、又は支持細胞を含まない培養については、ROCK阻害剤を含有しbFGFを含まないmTeSR培地のいずれかを含む96ウェルプレート中のウェルに移すことができる。

40

【0304】

200 μ Lのピペッターを使用して廃棄した (scrapped) 塊を収集し、直ちに、10 μ MのROCK阻害剤及び100ng/mLのbFGFを含有するStemFit Basic 2.0培地中の照射MEF単層播種プレート (支持細胞ベースの培養) 又は10 μ MのROCK阻害剤を含有するmTeSR培地中のラミニン-511/ビトロネクチンコーティングプレート (支持細胞を含まない培養) のいずれかに、0日目に24時間だけ移し、その後はROCK阻害剤を加えなかった。

【0305】

50

照射されたMEFを、凍結バイアル(カタログ番号SCRC-1040.1、ATCC)としてATCCから入手し、ATCCによって記載されるように解凍した。解凍した細胞を計数し、iPSCコロニーをそれらの上に移す1日前に、MEF培養培地中の6ウェルプレートにおいて50万細胞/ウェルの密度でゼラチンコーティングプレート上に播種した(この密度は、異なる条件に従って変動し得る)。マイトマイシンC処理されたMEF単層とは異なり、照射されたMEF単層は5~7日間しか持続しなかった。

【0306】

コロニーのピックアップの全手順を迅速に行う必要があった。コロニーの外部環境への長時間の曝露は、コロニー中の細胞の不適切な付着及び/又は分化をもたらし得る。

【0307】

プレートは8の字パターンであり、5%のCO₂を含有する37℃の加湿インキュベーターに移した。コロニーを、次の48時間、いかなる妨害もなく培養した。48時間の細胞培養中、2mLの新鮮な培地を使用して、次の継代まで24時間毎に6ウェルプレートの1つのウェル中の使用済み培地を交換した。

【0308】

継代間隔は、ドナーごとに異なり得るiPSCコロニーの増殖に依存した。典型的には、各継代は3~5日かかった。多数の分化細胞が、最初の4継代の終わりまで観察された。第5継代以降、未分化コロニーが観察された。

【0309】

上述の手順は、新しい継代周期に対して繰り返すことができる。プレートを毎日観察した。

【0310】

7.2.5. iPSCコロニーの凍結及び解凍

iPSCコロニーの凍結

プレートをインキュベーターから取り出し、細胞を倒立顕微鏡下で観察した。未分化コロニー(滑らかで密な境界を有するコロニー、及び従属栄養中心を有さない密な境界内の緻密な細胞)をマーカーペンでマークした。参考のために、これらのコロニーの写真を1枚又は2枚撮った。コロニーの特定が完了したら、プレートをラミナーフードに移した。

【0311】

使用済み培地を、真空ポンプを使用してウェルから吸引した。支持細胞ベースの培養のために、滅菌DPBSで1:1の希釈で予め希釈した800µLのTrypLE解離試薬を、6ウェルプレート中のウェルに添加した。プレートを、5%のCO₂を含有する加湿インキュベーター中、37℃で2~4分間(支持細胞ベースの培養の場合)又は1分間(支持細胞を含まない培養の場合)インキュベートした。

【0312】

インキュベーション期間の終わりに、プレートをインキュベーターから取り出し、穏やかに傾けた。ウェル中に存在するTrypLE試薬の全部を真空ポンプで吸引した。ウェルを単純培地で洗浄した。2mLのStemFit Basic 2.0培地(支持細胞ベースの培養の場合)又はmTeSR培地(支持細胞を含まない培養の場合)をウェルに添加した。

【0313】

コロニーのピックアップのためにプレートを顕微鏡下に置いた。全ての分化コロニーを、200µLのピペッターに取り付けた細長い口を有するゲルローディングチップを使用して選択的に除去した。プレートを2mLのStemFit Basic 2.0培地(支持細胞ベースの培養の場合)又はmTeSR培地(支持細胞を含まない培養の場合)で洗浄した後、培地を真空ポンプで吸引した。洗浄工程をもう1回繰り返した。これら2回の洗浄後、除去された分化コロニーの大部分がプレートから除去された。

【0314】

支持細胞ベースの培養では、第7.2.4節に記載したように、未分化コロニーをエッペンドルフチューブに採取した。支持細胞なしの培養では、スクラッパー(scrapper)

10

20

30

40

50

を使用して残りの未分化コロニーをウェルから掻き取り、1.5 mLのエピペンドルフチューブに収集した。

【0315】

細胞を室温で30秒間、100 × gでスピンドウンした。上清を、1 mLのピペッターを使用して廃棄した。細胞ペレットを、1 mLの凍結培地 (ES-FBS + 10%のDMSO) 又は代わりに、10%のDMSOを凍結培地として有するノックアウト血清代替物 (Knock Out (商標) SR、カタログ番号10828028、Thermo Fisher Scientific) に穏やかに再懸濁した。

【0316】

バイアルをステップクーラーに保存し、-80 に一晩置き、翌日液体窒素中での保存に移した。 10

【0317】

iPSCコロニーの解凍

凍結iPSC (支持細胞ベース又は支持細胞を含まない培養由来) のバイアルを、37の水浴中で迅速に解凍した。バイアルの内容物を、10 μMのROCK阻害剤を含有する25 mLのStemFit Basic 2.0培地 (支持細胞ベースの培養の場合) 又はmTeSR培地 (支持細胞を含まない培養の場合) を含有する50 mLコニカルチューブに滴下して加えた。培地への細胞の突然の添加は浸透圧ショックを引き起こすので、細胞が一滴ずつ添加されることを確実にすることが重要である。

【0318】

細胞を室温で5分間、1200 rpmでスピンドウンした。上清を廃棄し、細胞を、10 μMのROCK阻害剤及び100 ng/mLのbFGFを含有する2 mLのStemFit Basic 2.0培地 (支持細胞ベースの培養の場合) 又は10 μMのROCK阻害剤を含有するmTeSR培地 (支持細胞を含まない培養の場合) に穏やかに再懸濁した。培養培地中のROCK阻害剤は、iPSCの自然分化を防止し、解凍中のそれらの生存を改善するのに役立つ。 20

【0319】

再懸濁したiPSCの塊を、それぞれ支持細胞ベースの培養及び支持細胞を含まない培養のために、照射したMEFを予め播種した (第7.2.4節に記載) か、又はビトロネクチンで予めコーティングした (第7.2.1節に記載) 6ウェルプレートに播種した。 30

【0320】

プレートを、5%のCO₂を含有する加湿インキュベーター中、37 で24時間インキュベートした。24時間のインキュベーション後、ROCK阻害剤を含有する培養培地を、ROCK阻害剤を含まないがbFGFを含む新鮮な培地と交換したが、ROCK阻害剤を培養全体を通して使用し続けても実質的な差異は観察されなかった。

【0321】

使用した培地を、次の継代まで24時間毎に6ウェルプレートの1ウェルについて2 mLの新鮮な培地と交換した。

【0322】

継代間隔は、iPSCコロニーの回収及び増殖に依存した。コロニーの増殖は、ドナーごとに異なる。しかしながら、コロニーの回収は、iPSCコロニーがどの程度良好に凍結及び解凍されたかに依存する。典型的には、各継代は平均で3~5日かかる。 40

【0323】

損なわれたコロニーは、回収するためにより長い時間 (7~10日) を要し得る。培養培地は、iPSCが完全に回復するまで、24時間毎に新鮮な培地と交換する必要がある。

【0324】

回収されたコロニーは、最初に多くの分化細胞を作製した (継代4又は5まで)。第5継代以降、顕著な未分化コロニーを観察することができる。

【0325】

7.3. 実施例3: T細胞由来iPSCにおけるTRG遺伝子再配置及びTRD遺伝子再配置の特徴付け

3日目のZol活性化PBMCに由来するiPSCコロニーを、TRG遺伝子座及びTRD遺伝子座における再配置について調べた。第1の工程として、5つ全てのiPSCコロニー及び22Rv1細胞株由来のゲノムDNAを、第7.3.1節に記載のように単離した。Identiclone(商標)T細胞受容体ガンマ遺伝子再配置アッセイキット(カタログ番号1-207-0101、Invivoscribe)からのプライマー(TRG遺伝子座に対する)を用いてゲノムPCRを行い、第7.3.2節に記載の手順に従ってTRG遺伝子座における遺伝子再配置を評価した。

【0326】

第7.3.2節に詳述するように、ゲノムPCRから得られたアンプリコンをキャピラリー電気泳動に供すると、およそ191及び192bpの所望のサイズのアンプリコンが全てのクローンにおいて観察され、これにより、TRG遺伝子座における特異的V9遺伝子再配置が確認された(図3)。しかしながら、図3は、クローンA、B、及びCにおいておよそ180及び182bpのサイズの更なるアンプリコンも示しており、これらのクローンにおいて他のV遺伝子再配置を有する可能性を示している。

【0327】

T細胞受容体ガンマ遺伝子再配置アッセイが確証的な結果及びABI検出系と関連するアーチファクトの可能性(第7.3.2節に詳述)を生じなかったことを考慮して、TRG遺伝子座の可変領域(V9)及び連結領域(JP1/JP2、JP)並びにTRD遺伝子座の可変領域(V2)及び連結領域(J1及びJ3)に特異的な公開されたプライマーを使用してゲノムPCRを実施した。TRG遺伝子再配置及びTRD遺伝子再配置のゲノムPCR分析のための公開されたプライマー配列を以下の表2に示す。

【0328】

【表2】

表2. TCR遺伝子配列

	TCR遺伝子	ヌクレオチド配列(5'→3')
センスプライマー	Vγ9	CGGCACTGTCAGAAAGGAATC(配列番号27)
	Vδ2	ATACCGAGAAAAGGACATCTATG(配列番号28)
アンチセンスプライマー	JP1/JP2	GAAGTTACTATGAGCTTAGTCCCTT(配列番号29)
	JP	AAGCTTTGTTCCGGGACCAAATAC(配列番号30)
	J1/J2	TACCTGTGACAACAAGTGTTGTTC(配列番号31)
	Jδ1	GTTCCACAGTCACACGGGTTC(配列番号32)
	Jδ3	CTCACGGGGCTCCACGAAGAG(配列番号33)

【0329】

実施されたゲノムPCT分析では、クローンA、B、及びCからのiPSCコロニーはすべて、TRG遺伝子及びTRD遺伝子の再配置を示した。遺伝子再配置は、V9-JP及びV2-J1又はJ3組み換えを表す単一バンドとして同定され、これらのコロニーが再配置されたV9-V2-TCR遺伝子を保有することを示した。3つ全てのクローンについて、TRG遺伝子の再配置が、V9-JPを表す単一バンドとして検出された。クローンAについては、TCR遺伝子再配置がV2-J1として検出された。クローンB及びCについては、V2-J3組み換えが検出され、これは、これらのクローンがV9遺伝子再配置及びV2遺伝子再配置を保有することを示した(図4)。GAPDH増幅は、ハウスキーピング対照遺伝子として3つのクローン全てにおいて観察された。

【0330】

22Rv1細胞株から単離されたゲノムDNAでは増幅は観察されず、このことは、本研究で使用されたゲノムプライマーの特異的性質を再確認した(図4)。更に、図4はまた、TCR及びTCRに対するプライマーを用いて増幅したとき、クローンA、B、及びCのゲノムDNAから増幅が観察されなかったことを示し、これらのコロニーが

10

20

30

40

50

T細胞由来ではないことを確認した。更に、アンプリコンの配列決定及び全ヒトゲノムに対する配列のBLASTにより、TRG遺伝子座及びTRD遺伝子座における全てのクローン（クローンBについては図5、並びにクローンA、C、D、及びEについては図6A～図6D）におけるV₉遺伝子配置及びV₂遺伝子配置の成功が確認された。アンプリコンをクローンA、B、及びCについてのみ1%のアガロースゲル上で泳動したが、5つのクローン全てを特異的プライマーを用いたゲノムPCR及び配列決定に供した（図5及び図6A～図6D）。

【0331】

7.3.1. ゲノムDNAの単離

iPSCコロニー及び22Rv1細胞からのゲノムDNAを、GenElute（商標）哺乳動物ゲノムDNAミニプレップキット（カタログ番号G1N70-1Kt、Sigma）を使用して、以下のプロトコールに詳細に記載されるように単離した。

【0332】

未分化iPSCコロニーを第7.2.4節に記載したようにピックアップした。細胞を室温で30秒間、200×gでペレット化した。チューブ内に培地が残らなくなるまで、1mLのピペッターを使用して培養培地を注意深く除去した。細胞を液体窒素の中で急速冷凍し、将来使用するまで-80で保存した。

【0333】

細胞ペレットを氷上で10～20分間かけて緩徐に解凍し、200μLの再懸濁溶液に完全に再懸濁した。20μLのRNase A溶液を添加し、混合物を室温で2分間インキュベートした。20μLのプロテイナーゼK溶液をサンプルに添加し、続いて200μLの溶解溶液C（B8803）を添加した。混合物を約15秒間十分にボルテックスし、70で10分間インキュベートした。均質な混合物は、効率的な溶解に必須である。

【0334】

膜へのDNAの結合を最大化し、より一貫した収率をもたらす500μLのカラム調製溶液を、各々予め組み立てられたGenElute（商標）Miniprep Binding Columnに添加した。カラムを、卓上エッペンドルフ遠心分離機で12,000×gで1分間遠心分離した。フロースルー液を廃棄した。

【0335】

200μLのエタノール（95～100%）を溶解物混合物に添加し、混合物を5～10秒間ボルテックスすることによって完全に混合した。均質な溶液が必須である。

【0336】

移動中のDNAの剪断を低減するために、広口径ピペットチップを使用して、チューブの全内容物を処理済み結合カラムに移した。カラムを6,500×gで1分間遠心分離した。フロースルー液を含有する収集チューブを廃棄した。結合カラムを新しい2mLの収集チューブに入れた。

【0337】

最初の使用の前に、洗浄溶液濃縮物を製造業者の指示に従ってエタノールで希釈した。500μLの洗浄溶液を結合カラムに添加し、これを6,500×gで1分間遠心分離した。フロースルー液を含有する収集チューブを廃棄した。結合カラムを新しい2mLの収集チューブに入れた。

【0338】

別の500μLの洗浄溶液を結合カラムに添加し、これを最大速度（12,000～16,000×g）で3分間遠心分離して結合カラムを乾燥させた。結合カラムは、DNAを溶出する前にエタノールを含まないものでなければならない。残留エタノールが観察された場合、カラムを最大速度で更に1分間遠心分離した。フロースルー液を含有する収集チューブを廃棄した。結合カラムを新しい2mLの収集チューブに入れた。

【0339】

200μLの溶出溶液を結合カラムの中心に直接ピペットで移し、これを6,500×gで1分間遠心分離してDNAを溶出した。溶出効率を増加させるために、溶出溶液を

添加した後、結合カラムを室温で5分間インキュベートし、次いで遠心分離した。

【0340】

7.3.2. T細胞受容体ガンマ遺伝子再配置アッセイ2.0

Identicalone (商標) T細胞受容体ガンマ遺伝子再配置アッセイ2.0 PCRアッセイは、T細胞受容体ガンマ鎖遺伝子内の保存された遺伝子領域を標的とする複数のコンセンサスDNAプライマーを使用する。ゲノムDNAを所与のクローンから単離し、続いてIdenticalone (商標) T細胞受容体ガンマ遺伝子再配置アッセイ2.0キットを使用してその領域を増幅させた。このキットは、V₂、V₃、V₄、V₅、V₈、V₉、V₁₀、及びV₁₁並びにJ₁/J₂、J_P及びJ_{P1}/J_{P2}領域を標的化するプライマー(6-FAM蛍光色素に結合された)を含む単一のマスターミックスからなる。これに続いて、キャピラリー電気泳動による分画及びGeneMapperソフトウェア(Eurofins)による分析を行った。PCRアンプリコンは、159~207塩基対の予想サイズ範囲を有する。

10

【0341】

iPSCコロニーから単離したゲノムDNAを使用して、以下のPCR条件でPCRを実施した。まず、95の温度を3分間適用した。次に、以下のサイクルを25回適用した：95で30秒間、65で30秒間、及び72で45秒間。最後に、温度を72で5分間保持し、次いで混合物を取り出すまで25で維持した。PCR混合物(30μL)は、以下の成分からなっていた：15μLの2xPwo Master(カタログ番号03789403001、Roche)、100ngのDNA鋳型、0.5μLの2つのプライマー(100μM)の各々、及び30μLにするための水。

20

【0342】

最初に、クローンB由来のゲノムDNAのみを、系が機能していることを確認するための試験として、PCRに使用した。PCRサンプルを、キット製造業者のプロトコールに従って分析及び処理するために、Eurofins(Bengaluru, India)という名称の会社に提出した。このサンプルの詳細を下記表3にまとめる。

【0343】

【表3】

表3. 試験サンプルBに対するT細胞受容体ガンマ遺伝子再配置PCR

サンプル番号	サンプル内容
サンプル1	試験サンプルB+TRG 6-FAMマスターミックス
サンプル2	キット+TRG 6-FAMマスターミックスからの陽性対照
サンプル3	キット+TRG 6-FAMマスターミックスからの陰性対照
サンプル4	水+TRG 6-FAMマスターミックス
サンプル5	試験サンプルB+検体対照DNAラダーマスターミックス
サンプル6	キット+検体対照DNAラダーマスターミックスからの陽性対照
サンプル7	水+検体対照DNAラダーマスターミックス

30

【0344】

結果の分析において、DNAフラグメントの特定のサイズにおけるピークの存在に基づいて、試験サンプルB(クローンB)がV₉V₂遺伝子についての再配置について陽性であることが決定された。

40

【0345】

残りのゲノムDNAサンプルを使用して、クローンBについて行ったのと同様にPCRを実施し、再びEurofinsへの分析に供した。このサンプルの詳細を下記表4にまとめる。

【0346】

50

【表 4】

表 4. 試験サンプル A、C、D、E に対する T 細胞受容体ガンマ遺伝子再配置 PCR

サンプル番号	サンプル内容
サンプル1	試験サンプルA+TRG 6-FAMマスターミックス
サンプル2	試験サンプルC+TRG 6-FAMマスターミックス
サンプル3	試験サンプルD+TRG 6-FAMマスターミックス
サンプル4	試験サンプルE+TRG 6-FAMマスターミックス
サンプル5	試験サンプルA+検体対照DNAラダーマスターミックス
サンプル6	試験サンプルC+検体対照DNAラダーマスターミックス
サンプル7	試験サンプルD+検体対照DNAラダーマスターミックス
サンプル8	試験サンプルE+検体対照DNAラダーマスターミックス
サンプル9	キット+TRG 6-FAMマスターミックスからの陽性対照
サンプル10	キット+検体対照DNAラダーマスターミックスからの陽性対照
サンプル11	キット+TRG 6-FAMマスターミックスからの陰性対照
サンプル12	水+TRG 6-FAMマスターミックス
サンプル13	水+検体対照DNAラダーマスターミックス

10

【0347】

分析に際して、試験サンプル(クローン)のいくつかは、V₉ V₂再配置について陽性であることが示されたが、これは予備的結果としてのみ採用された。これらのクローンを確認するために配列決定を行った。配列決定のために、領域及び領域をそれぞれ増幅するための2対のプライマーを使用してPCRを実施した。このプライマーの配列を下記表5にまとめる。

20

【0348】

【表 5】

表 5. 配列決定のためのPCRプライマー

プライマー対	プライマー名	配列
	TRGV9for	GCAGGTCACCTAGAGCAACC(配列番号34)
	TRGJPrev	TGTAATGATAAGCTTTGTTC(配列番号35)
P10	TCRV δ 2_Fwd	ATACCGAGAAAAGGACATCTATG(配列番号36)
	TCRJ δ 1_Rev	GTTCCACAGTCACACGGGTTC(配列番号37)

30

【0349】

サンプルの処理及び分析は、キット製造業者の指示に従ってEurofin(Bengaluru, India)で実施した。PCR生成物を6-FAMで標識した。サイズ標準(ROX又はLIZ)及びHi-Diフォルムアミドを、連結前のプロトコールに従って添加した。

【0350】

ABI蛍光検出については、先行するピークが観察されることが多く、ABIプラットフォームが使用する検出方法に起因するアーチファクトであった。先行するピークは時にゆがんでおり、真のピークに向かって右側に傾斜した塩基を有していた。これは、96bpピークが84bpに先行ピークを有していた検体対照サイズラダーマスターミックスにおいて特に明らかであった。

40

【0351】

新しいマイクロ遠心分離チューブにおいて、適切な量(ROXサイズ標準について10 μ L及びLIZサイズ標準について9.5 μ L)のPCR反応生成物を、Hi-Diフォルムアミド及びROX又はLIZサイズ標準と、混合物をよくボルテックスすることによって混合した。

【0352】

新しい96ウェルPCRプレートにおいて、ROX又はLIZサイズ標準を有する10 μ LのHi-Diフォルムアミドを各PCRのために個々のウェルに添加した。

【0353】

50

1 μLの各PCR反応生成物を、Hi-Diフォームアミド及びROX又はLIZサイズ標準を含むウェルに移した。ウェル当たり1つのサンプルのみを添加し、上下にピペティングすることによって混合した。次いで、PCRプレートに蓋をするか又はカバーをした。

【0354】

サンプルを95℃で2分間熱変性させ、次いで氷上で5分間急冷した。

【0355】

サンプルシート及び注入リストをサンプルについて調製した。サンプルを、ABI3100/3130キャピラリー電気泳動装置で、そのユーザーマニュアルに従って泳動した。データは、サイズ及び色特異的ピークとして自動的に表示された。

10

【0356】

7.3.3. ゲノムPCR

ゲノムPCRを実施して、TRG遺伝子座及びTRD遺伝子座における再配置を評価した。(上述のように) iPSCクローンから単離されたゲノムDNAを鋳型として使用した。

【0357】

アンプリコンを1%のアガロースゲル電気泳動で同定した。第2の一連の実験では、DNAをアガロースゲル上の優勢なバンドから抽出し、Topoベクターにクローニングし、3730x1 DNAアナライザー(カタログ番号3730XL、Thermo Fisher Scientific)で配列決定した。アンプリコン配列を、BLASTプログラム(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>)を使用して、配列ホモロジーについてヒト全ゲノムに対して分析した。

20

【0358】

7.4. 実施例4: T細胞由来 iPSCにおけるSeVトランスジェニックの存在の評価

5つのクローン全てにおいてTRG遺伝子座及びTRD遺伝子座での再配置を確認した後、センドライウイルス導入遺伝子(SeV Tg)の存在を、以下に記載されるようにRT-PCRによって全てのクローンにおいて調べた。継代10代目付近では、ほとんど全てのコロニーがSeVベクターに対して陰性であった。この観察は、高継代コロニーがSeV導入遺伝子を含まないという事実と一致した。RT-PCRプライマー配列を下記表6にまとめる。

30

【0359】

【表6】

表6. 使用したRT-PCRプライマー配列のリスト

プライマー対	プライマー名	配列
OCT3/4	順方向(F)	GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG(配列番号38)
	逆方向(R)	CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC(配列番号39)
NANOG	順方向(F)	CAGCCCCGATTCTTCCACCAGTCCC(配列番号40)
	逆方向(R)	CGGAAGATTCCCAGTCGGGTTCCACC(配列番号41)
SOX2	順方向(F)	GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAGAGG(配列番号42)
	逆方向(R)	TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG(配列番号43)
LIN28	順方向(F)	TGCACCAGAGTAAGCTGCAC(配列番号44)
	逆方向(R)	CTCCTTTTGATCTGCGCTTC(配列番号45)
TCR-Vγ9	順方向(Vγ9)	CGGCACTGTCAGAAAGGAATC(配列番号46)
	逆方向(Cγ)	GGCACCGTTAACCAGCTAAA(配列番号47)
TCR-Vδ2	順方向(Vδ2)	ATACCGAGAAAAGGACATCTATG(配列番号48)
	逆方向(Cδ)	GACAAAACGGATGGTTTGG(配列番号49)
GAPDH	順方向(F)	ACCACAGTCCATGCCATCAC(配列番号50)
	逆方向(R)	TCCACCACCCTGTTGCTGTA(配列番号51)
SeV-Tg	順方向(F)	GGATCACTAGGTGATATCGAGC(配列番号52)

40

50

【0360】

7.4.1. RT-PCR

多能性遺伝子 (Oct3/4、Nanog、Sox2、Lin28) の発現を評価し、5つ全てのiPSCクローンの中でセンダイウイルス導入遺伝子 (Sev-Tg) の存在又は不在を検証するために、上記の表6に列挙されたプライマーを使用してRT-PCRを実施した。製造業者の指示に従ってRNeasy Plusミニキット (カタログ番号74134、Qiagen) を使用して、iPSCコロニー及び全PBMCから全RNAを単離した。単離されたRNAをナノドロップで定量した。cDNA合成は、製造業者の指示に従ってPrimescript 1st strand cDNA合成キット (カタログ番号6110B、Takara) を使用して実施された。

10

【0361】

得られたcDNAを鋳型として使用し、上記表6に列挙されたプライマーを使用してRT-PCRを行った。RT-PCRの終わりに、アンプリコンを1%アガロースゲル電気泳動にかけて、一端にDNAラダーを有するバンドを可視化した。全PBMCから調製されたcDNAを鋳型陰性対照として使用し、TCR 及びTCR に対するプライマーを陰性プライマー対照として使用した。

【0362】

7.5. 実施例5: T細胞由来iPSCにおける多能性マーカーの評価

T細胞由来iPSCコロニーの多能性マーカーを、上記第7.4.1節に記載されたようにRT-PCRによって (図7A)、第7.5.1節に記載されたように免疫組織化学によって (図7B)、及び第7.5.2節に記載されたようにフローサイトメトリーによって (図7C) 評価した。RT-PCRの結果は、これらのコロニーが、多能性転写因子Oct3/4、Nanog、Sox2、及びLin28をコードするmRNAを発現することを示した。全PBMCを陰性対照として使用して、プライマーが多能性マーカーに対して特異的であることを示した (RT-PCRプライマーリスト及び配列を表6に示す)。

20

【0363】

これらの結果を更に支持するものとして、免疫組織化学データにより、5つ全てのiPSCコロニーにおけるマスター転写因子 (Nanog、Oct3/4、Sox2) の存在を確認した (図7Bを参照)。図7Bによれば、Nanog及びOct3/4の発現は、全てのクローン間で均一であった。しかしながら、Sox2は、5つのクローン全てにおいて異なって発現された (20~40%で変動)。更に、図7Cに示されるように、iPSCクローンの単一懸濁液からのフローサイトメトリーデータは、それらが高レベルの表面SSEA-4及びTRA1-60並びに核内Oct-3を発現することを示し、IHC観察を再確認した。興味深いことに、IHCデータと一致して、フローサイトメトリー分析もまた、5つのクローン全ての間でSox2の異なる発現レベルを示した (図7C)。

30

【0364】

7.5.1. 免疫組織化学 (IHC)

カバーガラス上へのiPSCの播種

カバーガラスを所望のサイズに切断し、24ウェルプレートのウェルに入れた。次いで、カバーガラスを、ビトロネクチンを含む1mLのPBS中に浸漬することによってビトロネクチンでコーティングし、iPSCを支持細胞条件から支持細胞を含まない条件に適応させた。したがって、ビトロネクチンを使用してカバーガラスをコーティングした。

40

【0365】

24ウェルプレートを37 で2時間インキュベートした。インキュベーション期間後、ビトロネクチンを含むPBSを吸引し、ウェルをDPBSで1回洗浄した。iPSC塊を、10µMのROCK阻害剤を含むmTESR培養培地中のビトロネクチンコーティングカバーガラス上に直ちにプレーティングした。

【0366】

50

24ウェルプレートを、5%のCO₂を含有する37℃の加湿インキュベーター中でインキュベートした。24時間の培養後、ROCK阻害剤を含有する培養培地を、ROCK阻害剤を含まない新鮮なmTESR培地と交換した。この段階で、コロニーがカバーガラスに付着し始めた。ROCK阻害剤が培養中に使用され続けた場合であっても、実質的な差は観察されなかった。

【0367】

新鮮な培地を補充した培養培地で更に2日間、又はコロニーが所望のサイズに増殖するまで培養を更に続けた。

【0368】

核内染色

IHC染色の日に、iPSCコロニーを播種したカバーガラスを含む24ウェルプレートから培養培地を吸引し、0.5mLのDPBSで2回洗浄した。

【0369】

iPSCを播種したカバーガラスを、200μLの4.2%のPFA中で正確に2分間室温でインキュベートすることによって固定した。インキュベーション期間後、iPSCコロニーを播種したカバーガラスを含有するウェルからPFAを吸引した。固定された細胞を含有するカバーガラスを、400μLの1倍のBD Perm洗浄緩衝液（カタログ番号51-2091KZ、BD Biosciences）で2回洗浄した。

【0370】

ブロッキングは、400μLのブロッキング緩衝液（10%のロバ血清及び0.35%のTriton X-100）中で固定細胞を含有するカバーガラスを室温で1時間インキュベートすることによって実施した。インキュベーション期間後、細胞を400μLの1倍のBD Perm洗浄緩衝液で1回洗浄した。

【0371】

次いで、細胞を、400μLの1倍の固定/透過処理溶液中で、冷蔵庫内で4℃で1時間インキュベートすることによって透過処理した。固定/透過処理溶液は、eBioscience（商標）Foxp3/転写因子染色緩衝液セットからのものであった。1部の固定/透過化濃縮物を、3部の固定/透過化希釈剤を使用して希釈した。Nanog、Oct3/4、及びSox2は転写因子であるため、核内透過処理を使用して上記試薬を用いてこれらを検出した。eBioscience（商標）Foxp3/転写因子染色緩衝液セットからの透過化緩衝液の代わりに、1倍のBD Perm洗浄を、前者における穏やかな洗剤の存在のために使用した。

【0372】

細胞を400μLの1倍のBD Perm洗浄緩衝液で2回洗浄した。ヒトNanog（カタログ番号AF1997、R&D Systems）、Oct3/4（蛍光色素結合抗体についてカタログ番号130-117-821、Miltényi Biotech及び非結合抗体についてカタログ番号AF1759）、並びにSox2（カタログ番号130-121-129、Miltényi Biotech）に対する非結合又は蛍光色素結合一次抗体のいずれかを含有する400μLの洗浄緩衝液中で、透過処理細胞を染色した。

【0373】

細胞を暗所で室温にて1時間インキュベートした。インキュベーション期間後、抗体を含有する洗浄緩衝液を吸引除去し、ウェルを400μLの洗浄緩衝液で2回洗浄した。細胞を非結合一次抗体でプローブした場合、蛍光色素標識二次抗体を使用してシグナルを検出した。ヤギ抗ヒトOct3/4、Nanog抗体は非結合であり、一方、抗Sox2はフルオレセインイソチオシアネート（fluorescein isothiocyanate、FITC）結合であった。

【0374】

次いで、細胞を、二次抗体を含有する400μLの洗浄緩衝液中で、暗所で室温にて1時間染色した。

10

20

30

40

50

【0375】

抗ヤギIgG Northern Lights (商標) 蛍光557結合抗体(カタログ番号NL001、R&D Systems)を、IHC研究において二次抗体として使用した。それらは、光退色に耐性があり、したがって、多重化IHC研究に理想的である。

【0376】

インキュベーション期間後、プローブされた細胞を含有するカバーガラスを400µLの1倍のBD Perm洗浄緩衝液中で2回洗浄した。固定及び染色された細胞を含むカバーガラスを、細いピンセットを使用して24ウェルプレートから回収した。

【0377】

カバーガラスの一角をペーパータオルに押し付けることによって、あらゆる残留洗浄緩衝液をカバーガラスから排出した。カバーガラス上に洗浄緩衝液の液滴がないことを確実にする必要があった。

10

【0378】

DAPI(カタログ番号H-1200、Vector Laboratories)を有するVECATSHIELD Antifade封入剤の液滴を、固定及び染色された細胞を含有するカバーガラス上に添加した。カバーガラスの角をピンセットで保持し、1回の動作で反転させ、顕微鏡スライド上に載せた。カバーガラスを載せたスライドを暗所にて、室温で30分間静置した。ペーパータオルを使用して過剰な滲出封入剤を除去した。カバーガラスの縁をマニキュア液で密封した。

【0379】

スライドを蛍光顕微鏡(Carl-Zeiss Vert. A1 AXIO)で画像化した。画像化後、密封したスライドを-20の冷凍庫に保存した。それらを再び画像化する必要がある場合、スライドを暗所で室温にて1時間解凍する。凝縮により形成された水滴を拭き取り、画像化を実施することができる。

20

【0380】

分析

免疫組織化学(IHC)画像を蛍光顕微鏡で撮影した。画像中の個々のチャンネルを保存し、TIFFフォーマットファイルとしてエクスポートした。TIFFファイルを、Image Jソフトウェアを含む異なるコンピュータにエクスポートした。オーバーレイ画像を生成するためにImage Jソフトウェアを使用した。簡単に説明すると、TIFF画像を8ビットフォーマットに変換し、オーバーレイする画像を適切なR、G、及びBチャンネルで選択した。合成画像をRGBカラーで生成し、画像をTIFF/JPEGフォーマットファイルとして保存した。

30

【0381】

7.5.2. フローサイトメトリー

フローサイトメトリーによって媒介される多能性マーカーの特徴付けのために、iPSCコロニーを最初に単細胞に分離した。細胞を、V底96ウェルプレートで、1800rpmにて5分間、室温でスピンドウンした。上清を吸引し、細胞ペレットを、5µLのLive/Dead fixable violet dead細胞株(カタログ番号L34955、Thermo Fisher Scientific)及び抗Fc抗体を含有する200µLのDPBSに再懸濁した。

40

【0382】

細胞を30分間4でインキュベートした。インキュベーション期間後、細胞を室温で5分間、1800rpmでスピンドウンし、200µLのFACS緩衝液で1回洗浄した。

【0383】

表面染色について

細胞を、SSEA-4(カタログ番号330418、BioLegend)、Tra1-60(カタログ番号A25617、Thermo Fisher Scientific)に対する蛍光色素結合抗体を含有する100µLのFACS緩衝液(DPBS+2%

50

の F B S) 中、4 で 30 分間表面染色した。インキュベーション期間後、細胞をスピンドウンし、m A b を含有する F A C S 緩衝液 (D P B S + 2 % の F B S) を吸引した。細胞を 200 μ L の F A C S 緩衝液で穏やかに 2 回洗浄した。

【 0 3 8 4 】

次いで、細胞を 100 μ L の B D C y t o f i x (カタログ番号 5 5 4 6 5 5、B D B i o s c i e n c e s) 中に 30 分間 4 で冷蔵庫内で再懸濁することによって固定した。インキュベーション期間後、細胞を室温で 5 分間、1800 r p m でスピンドウンし、150 μ L の F A C S 緩衝液に再懸濁した。

【 0 3 8 5 】

フローサイトメトリーデータを、同じ日又は固定後の日に細胞から得た。

10

【 0 3 8 6 】

細胞内染色について

細胞を、200 μ L の固定 / 透過処理溶液で、4 で 30 分間インキュベートすることによって透過処理した。固定 / 透過処理溶液は、e B i o s c i e n c e (商標) F o x p 3 / 転写因子染色緩衝液セットからのものであった。1 部の固定 / 透過化濃縮物を、3 部の固定 / 透過化希釈剤を使用して希釈した。

【 0 3 8 7 】

インキュベーション期間後、固定 / 透過処理溶液を吸引した。細胞を 200 μ L の 1 倍の B D P e r m 洗浄緩衝液で 2 回洗浄した。

【 0 3 8 8 】

次いで、細胞を、O c t 3 / 4 及び S o x 2 に対する蛍光色素結合抗体を含有する 100 μ L の洗浄緩衝液で細胞内にプローブし、暗所にて 4 で 30 分間インキュベートした。

20

【 0 3 8 9 】

インキュベーション期間後、100 μ L の洗浄緩衝液を染色された細胞に添加して、200 μ L の総体積にした。細胞を室温で 5 分間、1800 r p m でスピンドウンした。上清を廃棄し、細胞を 200 μ L の洗浄緩衝液で 1 回洗浄した。次いで、細胞を 150 μ L の F A C S 緩衝液 (D P B S + 2 % の F B S) に再懸濁した。フローサイトメトリーデータを、同じ日又は固定後の日に細胞から得た。

【 0 3 9 0 】

30

分析

表面表現型プロファイリング実験のために、細胞を最初に、F S C - H (前方散乱 - 高さ) 対 S S C - H (側方散乱 - 高さ) に基づいて選別した。生細胞をゲートインし、他の細胞を排除した。次に、F S C - A (前方散乱 - 面積) 対 F S C - H (前方散乱 - 高さ) パラメータで細胞をゲーティングすることによって、生細胞からダブレットを排除した。生細胞を、S S E A - 4 及び T r a 1 - 6 0 の表面発現並びに O c t 3 及び S o x 2 の細胞内発現のような多能性マーカーについてゲーティングした。蛍光マイナス 1 (F l u o r e s c e n c e m i n u s o n e、F M O) 対照を各マーカーに使用して、特異的ゲートを定義した。

【 0 3 9 1 】

7 . 6 . 実施例 6 : i P S C クローンのゲノム安定性の評価

40

これらの i P S C コロニーのゲノム安定性を調べるために、このような i P S C コロニーを、以下に記載されるように、クローン A、B、及び C については継代 19 において、クローン D 及び E については継代 9 において核型分析に供した。図 8 A ~ 図 8 D に示されるように、クローン B、C、D、及び E の核型分析は、G バンド技術による正常な染色体バンディングパターンを有し、コロニーが任意の異常なパターンなしに正常であったことを確認した。クローン A についての核型分析データは得られなかった。

【 0 3 9 2 】

i P S C コロニーのゲノム安定性を評価するために、核型分析を実施した。未分化 i P S C コロニーを、上述のように、コロニー A、B、及び C 並びに D 及び E について、それぞれ継代 19 及び 9 から採取した。単一細胞をコロニーから単離し、S t e m F i t B

50

asic 02 培地に添加し、核型分析のために Human Health (Bengaluru, India) に送った。

【 0393 】

7.7. 実施例7： T細胞由来 iPSC の支持細胞を含まない培養条件への採用
実施例2で上述されたように、支持細胞を含まない条件における iPSC コロニーは、
T細胞再プログラミング実験のいずれにおいても観察されなかった。V 9 遺伝子再配置
及び V 2 遺伝子再配置並びに多能性マーカーのコロニーを検証した後、iPSC コロニー
(クローン A、B、及び C については継代数 14、クローン D 及び E については継代数
4) を、マトリックス及び培地の様々な組み合わせを試験することによって支持細胞を
含まない条件に採用した。驚くべきことに、採用後、全てのコロニーは、mTeSR (商標
) 培地と組み合わせたビトロネクチン中で支持細胞を含まない条件下で維持及び増殖する
ことが見出された (図9を参照)。

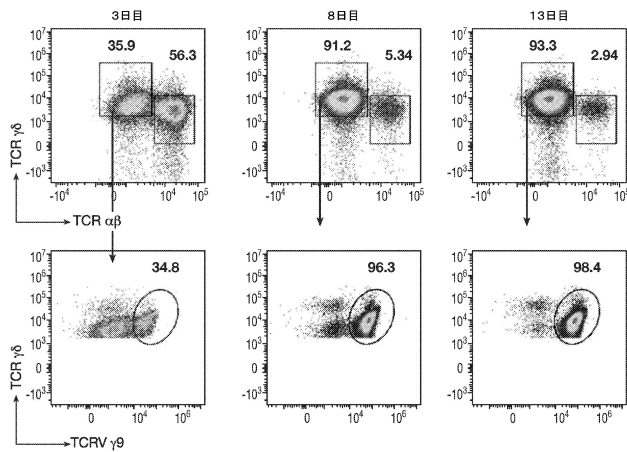
10

【 0394 】

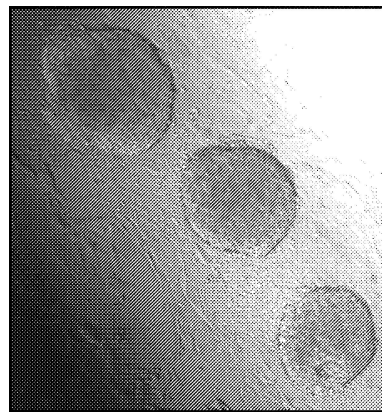
上記から、例示の目的で具体的な実施形態が本明細書に記載されているが、本明細書で
提供されるものの趣旨及び範囲から逸脱することなく、様々な修正を行うことができる
ことが理解されよう。上記で言及された全ての参考文献は、その全体が参照により本明細書
に組み込まれる。

【 図面 】

【 図 1 】



【 図 2 A 】



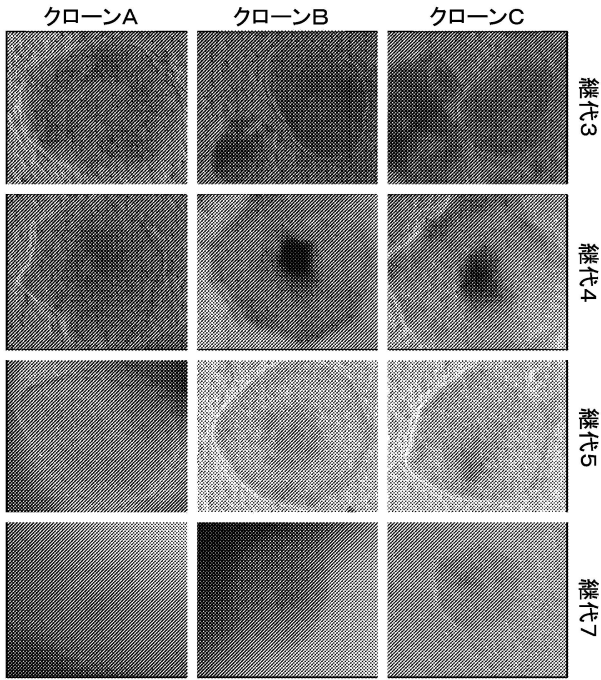
20

30

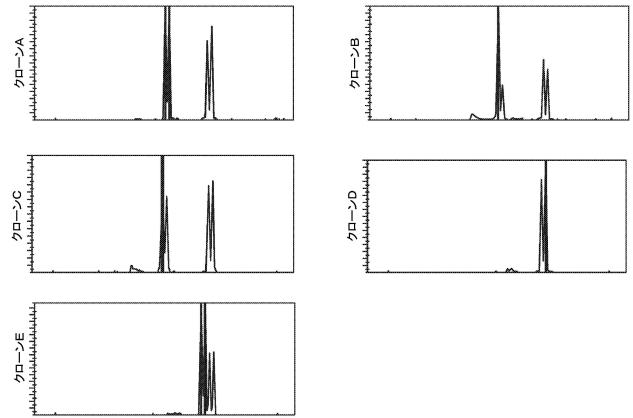
40

50

【 図 2 B 】



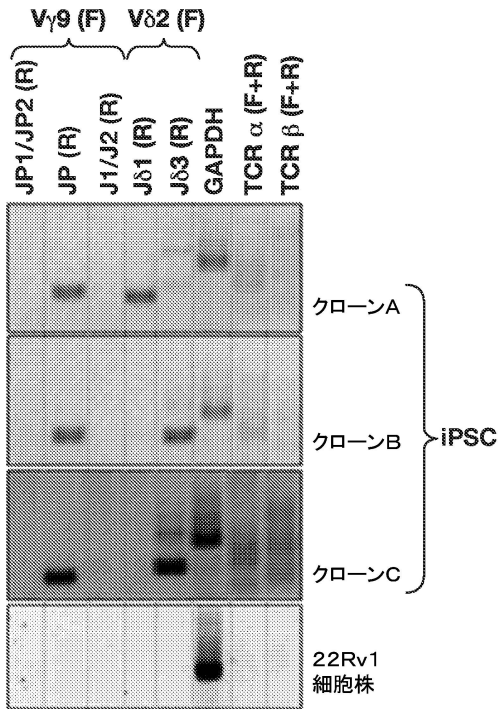
【 図 3 】



10

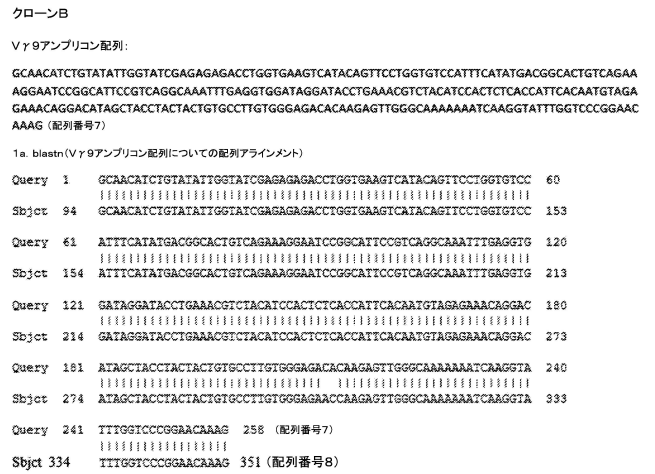
20

【 図 4 】



F: 順方向プライマー
R: 逆方向プライマー

【 図 5 - 1 】



30

40

50

【 図 5 - 2 】

Vδ2アンプリコン配列:

GCCTTATACCGAAAAGGACATCTATGGCCCTGTTTCAAAGCAATTTCCAAGGTGACATTTGATATTGCAAGAACCCTGGCT
GTACTTAAGATACTGGACCATCAGAGAGAGATGAAGGGCTTACTACTGTGCTGTGACACCGTAAATGGGGGATACCGGCT
ACCGATAAATCTCTTTGAAAAGGAACCCGTGTGACTGTGGAACAAGGC (配列番号9)

2a. blastn(Vδ2アンプリコン配列についての配列アラインメント)

Query 6 TATACCGAAAAGGACATCTATGGCCCTGTTTCAAAGCAATTTCCAAGGTGACATTTG 65
Sbjct 146 TATACCGAAAAGGACATCTATGGCCCTGTTTCAAAGCAATTTCCAAGGTGACATTTG 205
Query 66 ATATTGCCAAGAACCTGGCTGTACTTAAGATACTTGCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGT 125
Sbjct 206 ATATTGCCAAGAACCTGGCTGTACTTAAGATACTTGCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGT 265
Query 126 CTTACTACTGTGCTGTGACACCGTAA-A-TGGGGGATACGGG-STCACCGATAAACTCA 182
Sbjct 266 CTTACTACTGTGCTGTGACACCGTAACTACTGGGGGATACGGCTGCACACCGATAAACTCA 325
Query 183 TCTTTGGAAAAGAACCCGTGTGACTGTGGAAC-AG 218 (配列番号10)
Sbjct 326 TCTTTGGAAAAGAACCCGTGTGACTGTGGAACAG 362 (配列番号11)

(続き)

【 図 6 A - 2 】

Vδ2アンプリコン配列:

AGAAGGGGGGCGGGCCCTATGAATGATGCCAGCTTTGGTGCATACAACTCGGCTATGCATCAAGCTTGTACCG
ATTTGGATCCACTAGTAACGGCCCGCAGTGTCTGGAATTCCTCTATACCGAGAAAAGGACATCTATGGCCCTGTTACAAA
GACAATTTCAAAGGTGACATTTGATATGCCAGAACCTGGCTGTACTTAAGATACTTGCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGCTCT
ACTACTGTGCTGTGACACCGTGGGGGAACAACCGATAAATCTCTTTGAAAAGGAACCCGTGTGACTGTGGAACAAGGG
CGAATTCGCAGATATCCATCACACTGGCGCCCTGAGCATGCACTAGAGGGCCCAAT (配列番号4)

2a. blastn(Vδ2アンプリコン配列についての配列アラインメント)

Query 192 TATACCGAAAAGGACATCTATGGCCCTGTTTCAAAGCAATTTCCAAGGTGACATTTG 191
Sbjct 161 TATACCGAAAAGGACATCTATGGCCCTGTTTCAAAGCAATTTCCAAGGTGACATTTG 220
Query 192 ATATTGCCAAGAACCTGGCTGTACTTAAGATACTTGCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGT 251
Sbjct 221 ATATTGCCAAGAACCTGGCTGTACTTAAGATACTTGCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGT 280
Query 252 CTTACTACTGTGCTGTGACACCGTAA-A-ACCGATAAACTCACTTTGGAA 308
Sbjct 281 CTTACTACTGTGCTGTGACACCGTAACTACTGGGGGATACGGCTGCACACCGATAAACTCACTTTGGAA 340
Query 309 AAGGAACCCGTGTGACTGTGGAAC-AG 336 (配列番号5)
Sbjct 341 AAGGAACCCG-TGTGACTGTGGAACAG 368 (配列番号6)

(続き)

【 図 6 A - 1 】

クローンA

Vγ9アンプリコン配列:

ATGCATGCTCGAGCGGCGCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTTGTAATGATAAGCTTTGCCGGGACCAAAATAC
CTTGATTTTTGCCCAACTCCAGCACCTCCCAAGGCACAGTAGTAGGTAGCTATGTCTGTTTTCTACATGTGAATGGTGA
GAGTGGATGTAGACGTTTCAGTATCTTCCACCTCAATTTGCCTCAGGGAATGCCGGATTCCTTCTGACAGTGCCTGAT
GAAATGGACACCCAGGACTGTATGACTTCCAGGCTCTCTCGATACCAATATACAGATGTTGCAGAAATTTGTTATCCAGACA
CCACAAATTCAGGGCGGGCTTTTTGACAGCGTTTTAGTACTGAAATTTAGGTTGCTCTAGGTGACTGCAAGGGCGAATTC
CAGCACACTGGCGCGTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTGATGCATAGCTGAGTA (配列番号1)

1a. blastn(Vγ9アンプリコン配列についての配列アラインメント)

Query 53 TGTAAATGATAAGCTTTGTTCCGGGACCAAAATACCTTGAATTTTTCGCCCACTCCAGCAC 112
Sbjct 363 TGTAAATGATAAGCTTTGTTCCGGGACCAAAATACCTTGAATTTTTCGCCCACTCCAGCAC 304
Query 113 CTCCACAGGCACAGTAGTAGTAGCTATGCTCTGTTTCTCTACATTTGTAATGGTGG 172
Sbjct 303 CTCCACAGGCACAGTAGTAGTAGCTATGCTCTGTTTCTCTACATTTGTAATGGTGG 244
Query 173 AGTGGATGTAGAGCTTTCAGGTATCCTATCCACTCAAAATTTGCCCTGACGGAAATGCCGGA 232
Sbjct 243 AGTGGATGTAGAGCTTTCAGGTATCCTATCCACTCAAAATTTGCCCTGACGGAAATGCCGGA 184
Query 233 TTCCTTTCTGACAGTGCCTCATATGAAATGGACACCCAGGAATGTATGACTTCCACGAG 292
Sbjct 185 TTCCTTTCTGACAGTGCCTCATATGAAATGGACACCCAGGAATGTATGACTTCCACGAG 124
Query 293 TCTCTCTGATACCAATATACAGATGTTGCAGAAATTTGTTATCCAGACACCAACATTC 352
Sbjct 123 TCTCTCTGATACCAATATACAGATGTTGCAGAAATTTGTTATCCAGACACCAACATTC 64
Query 353 CAGGGCGGCTGTTTTGACAGCGTTTTAGTACTGGAATTTGAGGTTGCTCTAGGTGACC 412
Sbjct 63 CAGGGCGGCTGTTTTGACAGCGTTTTAGTACTGGAATTTGAGGTTGCTCTAGGTGACC 4
Query 413 TGC 415 (配列番号2)
Sbjct 3 TGC 1 (配列番号3)

10

20

【 図 6 B 】

クローンC

Vγ9アンプリコン配列:

CCAGCTGGCGAAAAGGGGATGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGA
CGGCCAGTGAATTTGAATACGACTCACTATAGGGCGAATTTGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCCAAGTGTGATGGAT
ATCTGCAGAAATCAGGCTGAAATTCGCCCTTTGTAATGATAAGCTTTGCCGGACCAAAATACCTTGATTTTTTGGCCAACTCTT
GTGTCTCCCAAGGCACAGTAGTAGTAGCTATGCTCTGTTTCTCTACATTTGTAATGGTGGAGTGCAGAGTGGATGAGAGCTTCAGG
TATCCTATCCACTCAAAATTTGCCTCAGCGAATGCCGGATCTTCTGACAGTGCCTCATATGAAATGGACACCCAGGAATGTA
TGACTTCCACAGGCTCTCTCGATACCAATATACAGATGTTGCAGAAATTTGTTATCCAGACACCAACATTCAGGCGGGCTGTT
TTTGACAGCGTTTTAGTACTGGAATTTGAGGTTGCTCTAGGTGACTGCAAGGGCGAATTCAGACACACTGGCGCGTACTA
GTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTGCATGATGCTGAGTATCTATAGTGTCACTAAATAGCTTGGCGTAATCATGTTGAT
AGCTGTTTTCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCAAAATCCACACAACATACGAGCGGGAAGCATAAAGTGAAGCTGGGGT
CCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTCGGTTCGCTCACTGCCGCTTCC (配列番号12)

1a. blastn(Vγ9アンプリコン配列についての配列アラインメント)

Query 199 TGTAAATGATAAGCTTTGTTCCGGGACCAAAATACCTTGAATTTTTCGCCCACTCTTGTGT 258
Sbjct 363 TGTAAATGATAAGCTTTGTTCCGGGACCAAAATACCTTGAATTTTTCGCCCACTCTTGTGT 304
Query 259 CTCCACAGGCACAGTAGTAGTAGCTATGCTCTGTTTCTCTACATTTGTAATGGTGG 318
Sbjct 303 CTCCACAGGCACAGTAGTAGTAGCTATGCTCTGTTTCTCTACATTTGTAATGGTGG 244
Query 319 AGTGGATGTAGAGCTTTCAGGTATCCTATCCACTCAAAATTTGCCCTGACGGAAATGCCGGA 378
Sbjct 243 AGTGGATGTAGAGCTTTCAGGTATCCTATCCACTCAAAATTTGCCCTGACGGAAATGCCGGA 184
Query 379 TTCCTTTCTGACAGTGCCTCATATGAAATGGACACCCAGGAATGTATGACTTCCACGAG 438
Sbjct 183 TTCCTTTCTGACAGTGCCTCATATGAAATGGACACCCAGGAATGTATGACTTCCACGAG 124
Query 439 TCTCTCTGATACCAATATACAGATGTTGCAGAAATTTGTTATCCAGACACCAACATTC 498
Sbjct 123 TCTCTCTGATACCAATATACAGATGTTGCAGAAATTTGTTATCCAGACACCAACATTC 64
Query 499 CAGGGCGGCTGTTTTGACAGCGTTTTAGTACTGGAATTTGAGGTTGCTCTAGGTGACC 558
Sbjct 63 CAGGGCGGCTGTTTTGACAGCGTTTTAGTACTGGAATTTGAGGTTGCTCTAGGTGACC 4
Query 559 TGC 561 (配列番号13)
Sbjct 3 TGC 1 (配列番号14)

30

40

50

【 図 6 C - 1 】

クローンD

Vγ9アンプリコン配列:

ATAGGGCGAATTGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCCGCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGACAGTCCAC
CTAGAGCAACCTCAAAATTCAGTACTAAAACGCTGCAAAAACAGCCCGCTGGAATGTGTGGTGTCTGGAATAACAATTTCTG
CAACAATCTGTATTTGGTATCGAGAGAGACCTGGTGAAGTACATACAGTCTCTGGTGTCCATTTCCATATGACGGCAGCTGTCAGAAA
GGAATCCGGCATTCCGTCAGCAAAATTTAGGTGGATAGGATACCTGAAACGCTACATCCACTCTCACCAATTCACAATGTAGAG
AAACAGGACATAGCTACCTACTCTGCTTGGGAGTACACAGAGTTGGGCAAAAATCAAGGTATTTGGTCCCGGAACA
AAGCTTATCATTACAAAGGGCGAATTCGCGACACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTGGTACCAAGCTTGATGCATA
GCTTGAGTATTCTATAG (配列番号15)

1a. blastn (Vγ9アンプリコン配列についての配列アラインメント)

Query 76 SCAGGTCACCTAGAGCAACCTCAAATTTCCAGTACTAAAACGCTGCAAAAACAGCCCGC 136
Sbjct 1 SCAGGTCACCTAGAGCAACCTCAAATTTCCAGTACTAAAACGCTGCAAAAACAGCCCGC 60
Query 136 CTGGAAATGTGTGGTGTCTGGAATAACAAATTTCTGCAACATCTGTATATTTGGTATCGAGAG 196
Sbjct 61 CTGGAAATGTGTGGTGTCTGGAATAACAAATTTCTGCAACATCTGTATATTTGGTATCGAGAG 120
Query 196 AGACCTGGTGAAGTACACAGTCTGGTGTCCAAATTCATATGACGGCAGCTGTCAGAAAG 255
Sbjct 121 AGACCTGGTGAAGTACACAGTCTGGTGTCCAAATTCATATGACGGCAGCTGTCAGAAAG 180
Query 256 GAATCCGGCAATCCGTCAGGCCAAATTTGAGTGGATAGGATACTGAAACGCTCTACATCC 315
Sbjct 181 GAATCCGGCAATCCGTCAGGCCAAATTTGAGTGGATAGGATACTGAAACGCTCTACATCC 240
Query 316 ACTCTCACCAATTCACAATGTAGAGAAACAGGACATAGCTACCTACTACTGTGCGCTTGTGG 375
Sbjct 241 ACTCTCACCAATTCACAATGTAGAGAAACAGGACATAGCTACCTACTACTGTGCGCTTGTGG 300
Query 376 GAG-TCACAGAGTGTGGC*****TCAAGGTATTTGGTCCCGAACAAGGCTTATCAT 434
Sbjct 301 GAGATC-CAAGAGTGTGGC*****TCAAGGTATTTGGTCCCGAACAAGGCTTATCAT 359
Query 435 IACA 458 (配列番号16)
Sbjct 360 IACA 363 (配列番号17)

【 図 6 D - 1 】

クローンE

Vγ9アンプリコン配列:

GGGGAATTTGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCCGCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTTGTAAATGATAGCT
TTGTTCCGGGACCAAAATCTTGATTTTTTGGCCAACCTCTGTAGCTCCCAAGGCACAGTAGTAGGTATGTTCTGTTTCT
CTACATTTGGAAGTGTGAGAGTGGATGTAGACGTTTCAGGTATCTCTATCCACTCAAATTTGCCWGCAGGAATGCCGGATTCCIT
TCTGACAGTGGCCTCATATGAAATGGACACAGGAGCTGTATGACTTCACAGGCTCTCTCTCGATACCAATATACAGATGTTGCA
GAAATGTTATTCAGACACCAACATCCAGGCGGGCTGTTTTGACAGCGTTTTAGTACTGGAATTTGAGGTTGCTCTAGGT
GACCTGCAAGGGCGAATTCAGGCTGAAATTCAGCAGCACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAAGCTTATG
CATAGCTTGAATTTCTATAGTGTCACTAAATAGCTTTGGCGTAAATCATGGTCTAGACTGTTCTGTGTGAAATTTGATCCGC
TCACAAATTCACACACATACGAGCGGGAAGCATAAAGCTGAAAGCTGGGGTGCCTAATGA (配列番号21)

1a. blastn (Vγ9アンプリコン配列についての配列アラインメント)

Query 72 TGTAAATGATAAGCTTTGTTCCGGGACCCAAATACCTTGA*****GCCCACTCTTTGAG 131
Sbjct 363 TGTAAATGATAAGCTTTGTTCCGGGACCCAAATACCTTGAATTTTTTGGCCAACCTCTTTGAG 304
Query 132 CTCCCAAGGACAGTAGTAGGTAGCTATGCTGTTTCTCTACATTTGGAATGTTGAG 191
Sbjct 303 CTCCCAAGGACAGTAGTAGGTAGCTATGCTGTTTCTCTACATTTGGAATGTTGAG 244
Query 192 AGTGGATGTAGACGTTTCAGGATACCTATCCACTCAAATTTGCCWGCAGGAATGCCGGA 251
Sbjct 243 AGTGGATGTAGACGTTTCAGGATACCTATCCACTCAAATTTGCCWGCAGGAATGCCGGA 184
Query 252 TTCCCTTCTGACAGTGGCGTCATATGAAATGGACACCAAGGACTGTATGACTTCACCAAG 311
Sbjct 183 TTCCCTTCTGACAGTGGCGTCATATGAAATGGACACCAAGGACTGTATGACTTCACCAAG 124
Query 312 TCTCTCTCGATACCAATATACAGATGTTGCGAATAATTTGTAITCCAGACACCCACATTC 371
Sbjct 123 TCTCTCTCGATACCAATATACAGATGTTGCGAATAATTTGTAITCCAGACACCCACATTC 64
Query 372 CAGGCGGGCTGTTTTTGGACAGGTTTTAGTACTGGAATTTGAGGTTGCTTAGGTGACC 431
Sbjct 63 CAGGCGGGCTGTTTTTGGACAGGTTTTAGTACTGGAATTTGAGGTTGCTTAGGTGACC 4
Query 432 TGC 434 (配列番号22)
Sbjct 3 TGC 1 (配列番号23)

【 図 6 C - 2 】

Vδ2アンプリコン配列:

TTGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCCGCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCAGCCCTTATACCGAGAAAAGGACATCT
ATGGCCCTGGTTTCAAAGACAATTTCAAAGTGCATTTGATGATTTCAAAGAACCTGGCTGTACTTAAAGATCTGCACCATCAGA
GAGAGATGAAGGGTCTACTACTGTCCCTGTACACCTACTCTCTGGGGACCGTACACCGATAAATCTATTTGAAAAGGA
ACCCGTGTGACTGTGGAACAAGGGCGAATTCAGCAGACTGGCGGCCGTTACTAGTGGATCCGAGCTCGTACCAAGCTTGTG
CATAGCTTGAATTTCTATAG (配列番号18)

2a. blastn (Vδ2アンプリコン配列についての配列アラインメント)

Query 65 TATACCGAAGAAAGGCATCTATGGCCCTGGTTTCAAAGACAATTTCAAAGGTGCATTC 124
Sbjct 237 TATACCGAAGAAAGGCATCTATGGCCCTGGTTTCAAAGACAATTTCAAAGGTGCATTC 296
Query 125 ATATTGCAAAAGACCTGGCTGTACTTAAAGTACTTGCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGT 184
Sbjct 297 ATATTGCAAAAGACCTGGCTGTACTTAAAGTACTTGCACCATCAGAGAGAGATGAAGGGT 356
Query 185 CTTACTACTGTGCGCTGTGACACCTACTTCTCTGGGGAC--C--CTACACCGATTAAGTCA 241
Sbjct 357 CTTACTACTGTGCGCTGTGACACCTACTTCTCTGGGGACCGATCTACACCGATTAAGTCA 416
Query 242 TCTTTGGAAAAGGAAACCGGTGTGACTGTGGAAAC-AG 277 (配列番号19)
Sbjct 417 TCTTTGGAAAAGGAAACCGGTGTGACTGTGGAAACAG 453 (配列番号20)

(続き)

【 図 6 D - 2 】

Vδ2アンプリコン配列:

TGGGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCGGCCCGCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCAGCCCTGAAATTCGCCCTTGTTCACAG
TCACACGGTTCCTTTCAAAGATGAGTATTCGGTGTACTTCTACCCCGAGAGTAGCAGGCACAGTATTAAGACCTTCAT
CTCTCTGATGGTGAAGTATCTTAAAGTACAGCCAGTCTTTTGAATATCAATGTACACTTGGAAATTTGCTTTGAAACAGGG
CCATAGATGTCCTTTCTGG (配列番号24)

2a. blastn (Vδ2アンプリコン配列についての配列アラインメント)

Query 74 CTT-GTTCACAGTCCACAGGTTCTTTTCCAAAGATGAGTTTATCGGGT-ACTTCTA 131
Sbjct 356 CTTGGTCCACAGTCCACAGGTTCTTTTCCAAAGATGAGTTTATCGGGTCTCCCTT 297
Query 132 -CCCCCATAGAGTAGCAGGACAGATTAAGACCGCTTCATCTCTCTCTGATGGTGCAG 190
Sbjct 296 TCCCCCATTA-TGTACAGGACAGTAGTAGACCGCTTCATCTCTCTCTGATGGTGCAG 238
Query 191 TATCTTAAAGTACAGCCAGGTTCTTTGCAATATCAATGTCACTTGGAAATTTGCTTTGAA 250
Sbjct 237 TATCTTAAAGTACAGCCAGGTTCTTTGCAATATCAATGTCACTTGGAAATTTGCTTTGAA 178
Query 251 ACCAGGGCCATAGATGCTCTTTTCTCG 278 (配列番号25)
Sbjct 177 ACCAGGGCCATAGATGCTCTTTTCTCG 180 (配列番号26)

(続き)

10

20

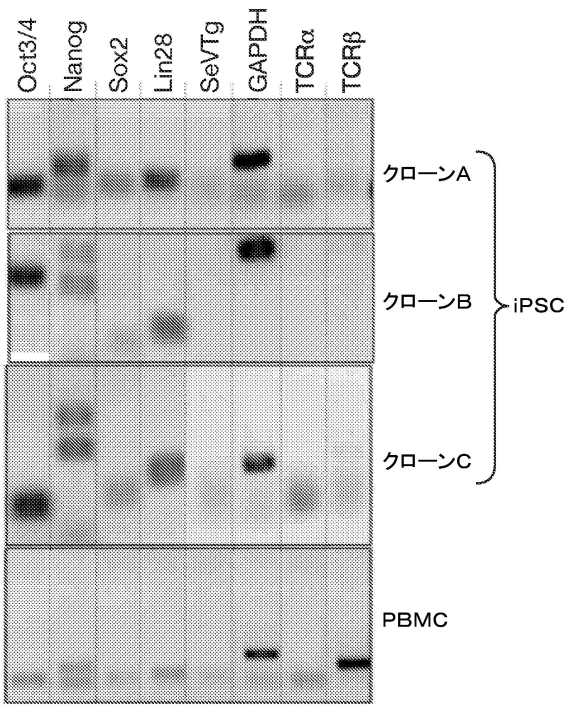
30

40

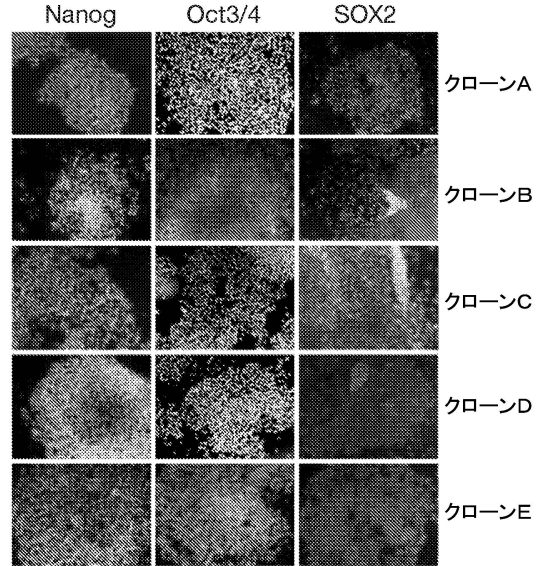
50

【 図 7 A 】

多能性マーカーについてのRT PCR



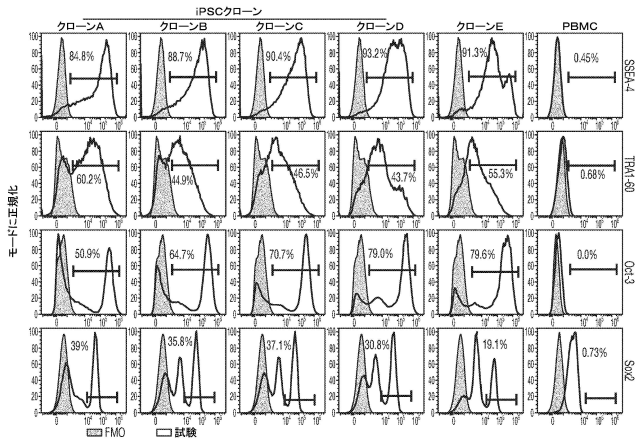
【 図 7 B 】



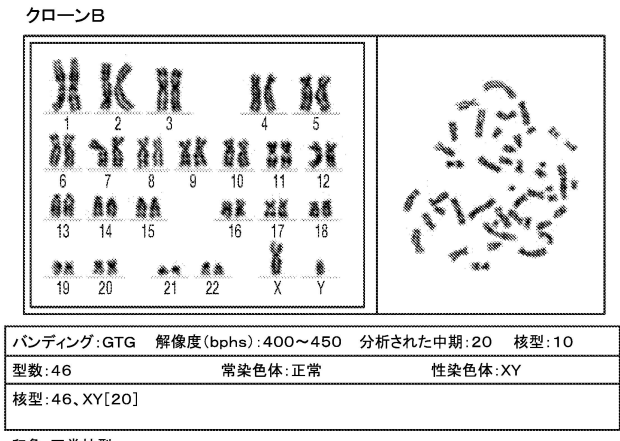
10

20

【 図 7 C 】



【 図 8 A 】



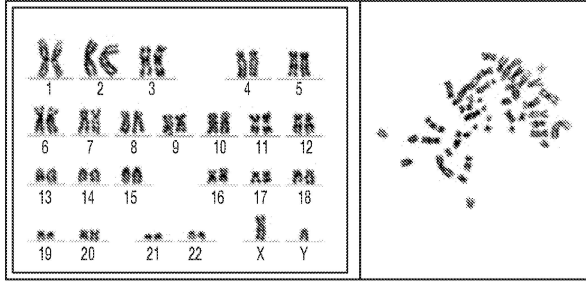
30

40

50

【 図 8 B 】

クローンD

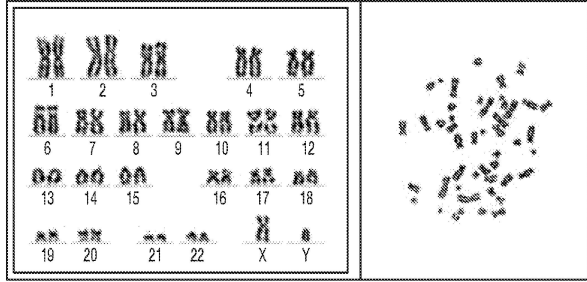


バンディング:GTG	解像度(bphs):400~450	分析された中期:20	核型:10
型数:46	常染色体:正常	性染色体:XY	
核型:46,XY[20]			

印象:正常核型

【 図 8 C 】

クローンC



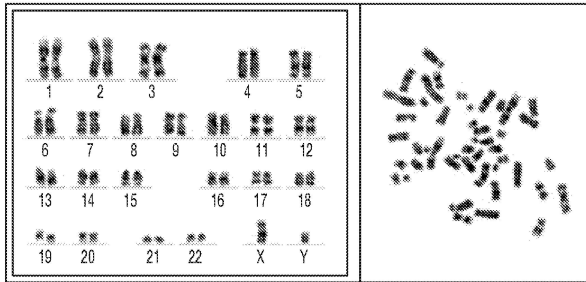
バンディング:GTG	解像度(bphs):400~450	分析された中期:20	核型:10
型数:46	常染色体:正常	性染色体:XY	
核型:46,XY[20]			

印象:正常核型

10

【 図 8 D 】

クローンE

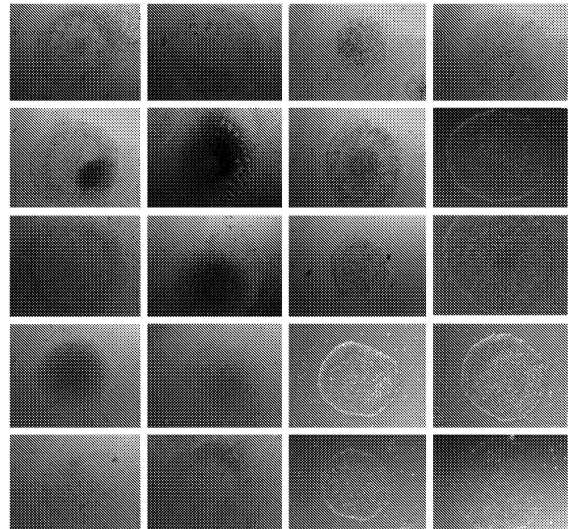


バンディング:GTG	解像度(bphs):400~450	分析された中期:10	核型:08
型数:46	常染色体:正常	性染色体:XY	
核型:46,XY[10]			

印象:低い分裂指数を有する正常核型

【 図 9 】

マトリックス:	ラミニン-511	ビトロネクチン	ラミニン-511	ビトロネクチン
培地:	Stem Fit	Stem Fit	mTeSR 1	mTeSR 1



クローンA
クローンB
クローンC
クローンD
クローンE

20

30

【 配列表 】

2023530919000001.app

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2021/037594

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - C07K 14/54; C12N 5/00 (2021.01)
CPC - C12N 5/0636; C12N 5/0696; C12N 2501/2315; C12N 2501/60; C12N 2501/999; C12N 2506/45 (2021.08)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

10

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
see Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2020/0017837 A1 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION KOBE UNIVERSITY et al) 16 January 2020 (16.01.2020) entire document	1-3, 42, 43
X	US 2018/0170982 A1 (BIOTIME INC. et al) 21 June 2018 (21.06.2018) entire document	41, 44
A	WATANABE et al., The Generation of Human γ 6T Cell-Derived Induced Pluripotent Stem Cells from Whole Peripheral Blood Mononuclear Cell Culture, Stem Cells and Translational Medicine, 21 November 2017 (21.11.2017), Vol. 7, No. 1, Pgs. 34-44, entire document	1-3, 41-44

20

30

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

* Special categories of cited documents:

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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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 14 September 2021	Date of mailing of the international search report NOV 05 2021
--	--

40

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Harry Kim Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300
---	---

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/037594

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a. forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2021/037594

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
- 3. Claims Nos.: 4-40
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

20

30

- Remark on Protest
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

A 6 1 P 35/02 (2006.01)
C 1 2 N 15/86 (2006.01)

F I

A 6 1 P 35/02
C 1 2 N 15/86

テーマコード (参考)

(32)優先日 令和2年6月17日(2020.6.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/040,373

(32)優先日 令和2年6月17日(2020.6.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(31)優先権主張番号 63/040,374

(32)優先日 令和2年6月17日(2020.6.17)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON

弁理士 植田 渉

(72)発明者 グレウォル, イクバル, エス.

アメリカ合衆国 1 9 4 7 7 ペンシルベニア州, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1 4 0 0

(72)発明者 ジェーンサン, ラジクマール

アメリカ合衆国 1 9 4 2 2 ペンシルベニア州, ブルー ベル, ファーンビュー サークル 5 9 7

(72)発明者 シン, サンジャヤ

アメリカ合衆国 1 9 4 7 7 ペンシルベニア州, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1 4 0 0

F ターム (参考) 4B065 AA94X AB01 BA02 CA44

4C087 AA01 AA02 AA03 BB64 NA14 ZB26 ZB27