

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014年11月13日(13.11.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/181682 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/061378
- (22) 国際出願日: 2014年4月23日(23.04.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-100311 2013年5月10日(10.05.2013) JP
特願 2013-100312 2013年5月10日(10.05.2013) JP
- (71) 出願人: 学校法人埼玉医科大学(SAITAMA MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 Saitama (JP).
- (72) 発明者: 伊関 大敬(ISEKI, Hiroyoshi); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP). 岡崎 康司(OKAZAKI, Yasushi); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP). 奥田 晶彦(OKUDA, Akihiko); 〒3500495 埼玉県入間郡毛呂山町毛呂本郷38 学校法人埼玉医科大学内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 廣田 浩一, 外(HIROTA, Koichi et al.); 〒1510053 東京都渋谷区代々木1-24-10 T Sビル4階 山の手合同国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: COMPOSITION FOR MANUFACTURING INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL AND METHOD FOR MANUFACTURING INDUCED PLURIPOTENT STEM CELL

(54) 発明の名称: 人工多能性幹細胞製造用組成物、及び人工多能性幹細胞の製造方法

(57) Abstract: A method for manufacturing induced pluripotent stem cells comprising a process for introducing (A) Oct3/4 gene or a gene product thereof, (B) Sox2 gene or a gene product thereof, (C) Klf4 gene or a gene product thereof, (D) c-Myc gene or a gene product thereof, and (E) at least one selected from a group consisting of a Jarid2 mutant gene and gene products thereof, Prdm14 gene and gene products thereof, Esrrb gene and gene products thereof, and Sall4a gene and gene products thereof into a somatic cell. The Jarid2 mutant gene or gene product thereof is a gene or gene product that codes for the first to the 551st N-terminal amino acid of the Jarid2 protein.

(57) 要約: (A) Oct3/4 遺伝子乃至その遺伝子産物と、(B) Sox2 遺伝子乃至その遺伝子産物と、(C) Klf4 遺伝子乃至その遺伝子産物と、(D) c-Myc 遺伝子乃至その遺伝子産物と、(E) Jarid2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、Prdm14 遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb 遺伝子乃至その遺伝子産物、及び Sall4a 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種とを体細胞に導入する工程を含み、前記 Jarid2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物が、Jarid2 タンパク質のN末端の1番目から551番目のアミノ酸をコードする遺伝子乃至その遺伝子産物である人工多能性幹細胞の製造方法である。



WO 2014/181682 A1

明 細 書

発明の名称：

人工多能性幹細胞製造用組成物、及び人工多能性幹細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、人工多能性幹細胞製造用組成物、及び人工多能性幹細胞の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 人工多能性幹細胞（以下、「iPS (induced pluripotent stem) 細胞」、又は「誘導多能性幹細胞」と称することがある）は、多能性、自己複製、及び高い増殖能といった性質を有しており、分化を誘導することにより、心筋細胞、血液細胞、網膜色素上皮細胞、神経細胞などに分化できることが知られている。そのため、例えば、細胞移植治療などの再生医療、薬剤スクリーニング、疾患の原因解明のためのツールなどとして用いることが期待されている。

[0003] 前記人工多能性幹細胞の製造方法としては、例えば、Oct 3/4 遺伝子、Sox 2 遺伝子、Klf 4 遺伝子、及びc-Myc 遺伝子を体細胞に導入することにより製造する方法が提案されている（例えば、特許文献1参照）。前記提案の方法によれば、人工多能性幹細胞を製造することができるものの、（1）製造効率が低い、（2）製造期間が長い、（3）ヒト人工多能性幹細胞では、Leukemia inhibitory factor（以下、「LIF」と称することがある）依存性を有するナীব型的人工多能性幹細胞が得られず、品質面で不十分である、という大きな問題がある。

[0004] したがって、製造効率に優れ、短期間で製造することができ、品質面にも優れた人工多能性幹細胞の製造方法の速やかな開発が強く求められているのが現状である。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第4183742号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、前記従来における諸問題を解決し、以下の目的を達成することを課題とする。即ち、本発明は、製造効率に優れ、短時間で製造することができ、品質面にも優れた人工多能性幹細胞の製造方法、及び人工多能性幹細胞製造用組成物を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 前記課題を解決するための手段としては、以下の通りである。即ち、

<1> (A) Oct3/4 遺伝子乃至その遺伝子産物と、

(B) Sox2 遺伝子乃至その遺伝子産物と、

(C) Klf4 遺伝子乃至その遺伝子産物と、

(D) c-Myc 遺伝子乃至その遺伝子産物と、

(E) Jarid2 (Jumonji, AT rich interactive domain 2) 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、Prdm14 (PR domain containing 14) 遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb (Estrogen-related receptor beta) 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSalil4a (Salilike 4, transcript variant a) 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種とを体細胞に導入する工程を含み、

前記Jarid2変異体遺伝子乃至その遺伝子産物が、Jarid2タンパク質のN末端の1番目から551番目のアミノ酸をコードする遺伝子乃至その遺伝子産物であることを特徴とする人工多能性幹細胞の製造方法である。

<2> Jarid2変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、Prdm14遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSalil4a遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1

種を含み、

前記 J a r i d 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物が、J a r i d 2 タンパク質の N 末端の 1 番目から 5 5 1 番目のアミノ酸をコードする遺伝子乃至その遺伝子産物であることを特徴とする人工多能性幹細胞製造用組成物である。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、従来における前記諸問題を解決し、前記目的を達成することができ、製造効率に優れ、短期間で製造することができ、品質面にも優れた人工多能性幹細胞の製造方法、及び人工多能性幹細胞製造用組成物を提供することができる。

図面の簡単な説明

- [0009] [図1-1]図 1 - 1 は、試験例 1 - 1 の結果を示すグラフである。
[図1-2]図 1 - 2 は、試験例 1 - 2 の結果を示すグラフである。
[図1-3]図 1 - 3 は、試験例 1 - 3 の結果を示すグラフである。
[図1-4]図 1 - 4 は、試験例 1 - 4 の結果を示すグラフである。
[図1-5]図 1 - 5 は、試験例 1 - 5 の結果を示すグラフである。
[図1-6]図 1 - 6 は、試験例 1 - 6 の結果を示すグラフである。
[図2-1]図 2 - 1 は、試験例 2 - 1 の結果を示すグラフである。
[図2-2]図 2 - 2 は、試験例 2 - 2 の結果を示すグラフである。
[図2-3]図 2 - 3 は、試験例 2 - 3 の結果を示すグラフである。
[図3A]図 3 A は、試験例 3 - 1 における (1) のウイルス液を用いた場合の結果の一例を示す写真である。
[図3B]図 3 B は、試験例 3 - 1 における (1) のウイルス液を用いた場合の結果の他の一例を示す写真である。
[図3C]図 3 C は、試験例 3 - 1 における (2) のウイルス液を用いた場合の結果の一例を示す写真である。
[図3D]図 3 D は、試験例 3 - 1 における (2) のウイルス液を用いた場合の結果の他の一例を示す写真である。

[図3E]図3 Eは、試験例3-2における(1)のウイルス液を用いた場合の結果の一例を示す写真である。

[図3F]図3 Fは、試験例3-2における(1)のウイルス液を用いた場合の結果の他の一例を示す写真である。

[図3G]図3 Gは、試験例3-2における(2)のウイルス液を用いた場合の結果の一例を示す写真である。

[図3H]図3 Hは、試験例3-2における(2)のウイルス液を用いた場合の結果の他の一例を示す写真である。

発明を実施するための形態

[0010] (人工多能性幹細胞の製造方法)

本発明の人工多能性幹細胞の製造方法は、(A) Oct 3 / 4 遺伝子乃至その遺伝子産物と、(B) Sox 2 遺伝子乃至その遺伝子産物と、(C) Klf 4 遺伝子乃至その遺伝子産物と、(D) c-Myc 遺伝子乃至その遺伝子産物と、(E) Jarid 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、Prdm 14 遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSal14a 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種とを体細胞に導入する工程(以下、「遺伝子乃至その遺伝子産物導入工程」と称することがある)を少なくとも含み、必要に応じて更にその他の工程を含む。

[0011] <遺伝子乃至その遺伝子産物導入工程>

前記遺伝子乃至その遺伝子産物導入工程は、少なくとも(A) Oct 3 / 4 遺伝子乃至その遺伝子産物と、(B) Sox 2 遺伝子乃至その遺伝子産物と、(C) Klf 4 遺伝子乃至その遺伝子産物と、(D) c-Myc 遺伝子乃至その遺伝子産物と、(E) Jarid 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、Prdm 14 遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSal14a 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種とを体細胞に導入する工程である。

前記各遺伝子乃至その遺伝子産物を体細胞に導入することにより、体細胞

から人工多能性幹細胞を製造することができる。

前記遺伝子産物とは、遺伝子から転写されるmRNA（メッセンジャーRNA）、前記mRNAから翻訳されるタンパク質をいう。

[0012] 前記（E）Jarid2変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、Prdm14遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSa114a遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、（1）Jarid2変異体遺伝子乃至その遺伝子産物を含む態様、（2）Prdm14遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSa114a遺伝子乃至その遺伝子産物を含む態様、（3）Jarid2変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、Prdm14遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSa114a遺伝子乃至その遺伝子産物を含む態様が好ましく、（3）Jarid2変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、Prdm14遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSa114a遺伝子乃至その遺伝子産物を含む態様がより好ましい。

前記より好ましい態様であると、人工多能性幹細胞の製造効率により優れ、かつ、より短期間で製造することができ、また、品質面にも優れる点で、有利である。

[0013] - Oct 3 / 4 遺伝子 -

前記Oct 3 / 4 遺伝子の由来としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒト、マウス、などが挙げられる。

前記Oct 3 / 4 遺伝子の配列情報は、公知のデータベースから得ることができ、例えば、NCBIでは、アクセッション番号NM_002701（ヒト）、NM_013633（マウス）で入手することができる。

[0014] - Sox 2 遺伝子 -

前記Sox 2 遺伝子の由来としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒト、マウス、などが挙げられる。

前記 Sox2 遺伝子の配列情報は、公知のデータベースから得ることができ、例えば、NCBIでは、アクセッション番号NM_003106（ヒト）、NM_011443（マウス）で入手することができる。

[0015] - Klf4 遺伝子 -

前記 Klf4 遺伝子の由来としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒト、マウス、などが挙げられる。

前記 Klf4 遺伝子の配列情報は、公知のデータベースから得ることができ、例えば、NCBIでは、アクセッション番号NM_004235（ヒト）、NM_010637（マウス）で入手することができる。

[0016] - c-Myc 遺伝子 -

前記 c-Myc 遺伝子の由来としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒト、マウス、などが挙げられる。

前記 c-Myc 遺伝子の配列情報は、公知のデータベースから得ることができ、例えば、NCBIでは、アクセッション番号NM_002467（ヒト）、NM_010849（マウス）で入手することができる。

[0017] - Jarid2 変異体遺伝子 -

前記 Jarid2 変異体遺伝子は、Jarid2 タンパク質のN末端の1番目から551番目のアミノ酸をコードする遺伝子（配列番号12参照）である。

前記 Jarid2 遺伝子の由来としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒト、マウス、などが挙げられる。

前記 Jarid2 遺伝子の配列情報は、公知のデータベースから得ることができ、例えば、NCBIでは、アクセッション番号NM_004973（ヒト）、NM_021878（マウス）で入手することができる。

[0018] - Prdm14 遺伝子 -

前記 Prdm14 遺伝子の由来としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒト、マウス、などが挙げられる。

前記 Prdm14 遺伝子の配列情報は、公知のデータベースから得ること

ができ、例えば、NCBIでは、アクセッション番号NM_024504（ヒト）、NM_001081209（マウス、配列番号19参照）で入手することができる。

[0019] - E s r r b 遺伝子 -

前記 E s r r b 遺伝子の由来としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒト、マウス、などが挙げられる。

前記 E s r r b 遺伝子の配列情報は、公知のデータベースから得ることができ、例えば、NCBIでは、アクセッション番号NM_004452（ヒト）、NM_011934（マウス、配列番号20参照）で入手することができる。

[0020] - S a l l 4 a 遺伝子 -

前記 S a l l 4 a 遺伝子の由来としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒト、マウス、などが挙げられる。

前記 S a l l 4 a 遺伝子の配列情報は、公知のデータベースから得ることができ、例えば、NCBIでは、アクセッション番号NM_020436（ヒト）、NM_175303（マウス、配列番号21参照）で入手することができる。

[0021] 前記 O c t 3 / 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、 S o x 2 遺伝子乃至その遺伝子産物、 K l f 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、 c - M y c 遺伝子乃至その遺伝子産物、 J a r i d 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、 P r d m 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、 E s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物、及び S a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物の配列は、本発明の効果を損なわない限り特に制限はなく、前記各遺伝子の配列のうち、タンパク質に翻訳される部分のみであってもよいし、それ以外の部分を含んでもよい。また、前記各遺伝子乃至その遺伝子産物の配列は、変異が含まれていてもよい。

前記変異としては、例えば、前記各遺伝子のタンパク質のアミノ酸配列に影響を与えない変異、前記各遺伝子のタンパク質のアミノ酸配列において、1個又は数個（2個～5個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入、又は付加され

る変異、などが挙げられる。

前記各遺伝子乃至その遺伝子産物の変異を有する場合の野生型との相同性としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、タンパク質に翻訳される部分の塩基配列において、70%以上が好ましく、80%以上がより好ましく、90%以上が特に好ましい。

[0022] ー体細胞ー

前記体細胞としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、胎児期の体細胞、成熟した体細胞、などが挙げられる。

前記成熟した体細胞の具体例としては、脂肪組織由来間質（幹）細胞、神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、精子幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）；組織前駆細胞；リンパ球、上皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞等の既に分化した細胞、などが挙げられる。

[0023] 前記体細胞は、人工多能性幹細胞の選択を容易にするために、組み換えたものであってもよい。

前記組換え体細胞の具体例としては、分化多能性細胞において特異的に高発現する遺伝子の遺伝子座に、レポーター遺伝子、及び薬剤耐性遺伝子の少なくともいずれかを組み込んだ組換え体細胞が挙げられる。

前記分化多能性細胞において特異的に高発現する遺伝子としては、例えば、Fbx15 遺伝子、Nanog 遺伝子、Oct3/4 遺伝子、などが挙げられる。

前記レポーター遺伝子としては、例えば、緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、などが挙げられる。

前記薬剤耐性遺伝子としては、ピューロマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、などが挙げられる。

[0024] 前記体細胞を採取する個体としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、得られる人工多能性幹細胞を再生医療用途に用いる場合には、拒絶反応の観点から、個体自身、又はMHCの型が同一若しくは実質的に同一の他個体が好ましい。

ここで、前記MHCの型が実質的に同一とは、免疫抑制剤などの使用により、前記体細胞由来の人工多能性幹細胞から分化誘導して得られた細胞を個体に移植した場合に移植細胞が生着可能な程度にMHCの型が一致していることをいう。

[0025] 前記体細胞の培養条件としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、培養温度は約37℃、CO₂濃度は約2%~5%、などが挙げられる。

前記体細胞の培養に用いる培地としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、5質量%~20質量%の血清を含む、最小必須培地(MEM)、ダルベッコ改変培地(DMEM)、RPMI1640培地、199培地、F12培地、などが挙げられる。

[0026] ー導入方法ー

前記各遺伝子乃至その遺伝子産物を体細胞に導入方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ベクターを用いる方法、合成したmRNAを用いる方法、組換えタンパク質を用いる方法、などが挙げられる。

[0027] ーベクターー

前記ベクターとしては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ウイルスベクター、人工染色体ベクター、プラスミドベクター、エピソーマルベクター、などが挙げられる。

前記ウイルスベクターの具体例としては、レトロウイルス(レンチウイルスを含む)ベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、ポリオウイルスベクター、シルビスウイルスベクター、ラブドウイルスベクター、パラミクソウイルスベクター、オルソミクソウイルスベクター、などが挙げられる。

前記人工染色体ベクターの具体例としては、YAC(Yeast artificial chromosome)ベクター、BAC(Bacter

ial artificial chromosome) ベクター、PAC (P1-derived artificial chromosome) ベクター、などが挙げられる。

前記ベクターを前記体細胞に導入する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、リポフェクション法、マイクロインジェクション法、DEAEデキストラン法、遺伝子銃法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、などが挙げられる。

[0028] 前記ウイルスベクターを用いる場合には、パッケージング細胞を用いて得られたウイルス粒子を用いてもよい。

前記パッケージング細胞は、ウイルスの構造タンパク質をコードする遺伝子を導入した細胞であり、該細胞に目的遺伝子を組み込んだ組換えウイルスベクターを導入すると、該目的遺伝子を組み込んだ組換えウイルス粒子を産生する。

前記パッケージング細胞としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ヒト腎臓由来のHEK293細胞やマウス繊維芽細胞由来のNIH3T3細胞をベースとしたパッケージング細胞、Ectropic virus由来エンベロップ糖タンパク質を発現するよう設計されているPLAT-E細胞（以下、「PLAT-E細胞」と称することがある）、Amphotropic virus由来エンベロップ糖タンパク質を発現するよう設計されているPLAT-A細胞、水疱性口内炎ウイルス由来エンベロップ糖タンパク質を発現するよう設計されているPLAT-GP細胞（以下、「PLAT-GP細胞」と称することがある）、などが挙げられる。これらの中でも、ヒト体細胞に対して組換えウイルスベクターを導入する場合にはPLAT-A細胞、PLAT-GP細胞が、宿主指向性の点で、好ましい。

前記パッケージング細胞へのウイルスベクターの導入方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、などが挙げられ

る。

前記得られたウイルス粒子を前記体細胞へ感染させる方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、ポリブレン法が挙げられる。

[0029] 前記ベクターは、前記各遺伝子の導入を確認するためのマーカー遺伝子を含んでいてもよい。

前記マーカー遺伝子とは、該マーカー遺伝子を細胞に導入することにより、細胞の選別や選択を可能とするような遺伝子をいう。前記マーカー遺伝子の具体例としては、薬剤耐性遺伝子、蛍光タンパク質遺伝子、発光酵素遺伝子、発色酵素遺伝子、などが挙げられる。これらは、1種単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。

前記薬剤耐性遺伝子の具体例としては、ネオマイシン耐性遺伝子、テトラサイクリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子、などが挙げられる。

前記蛍光タンパク質遺伝子の具体例としては、GFP遺伝子、黄色蛍光タンパク質（YFP）遺伝子、赤色蛍光タンパク質（RFP）遺伝子、などが挙げられる。

前記発光酵素遺伝子の具体例としては、ルシフェラーゼ遺伝子、などが挙げられる。

前記発色酵素遺伝子の具体例としては、 β ガラクトシターゼ遺伝子、 β グルクロニダーゼ遺伝子、アルカリフォスファターゼ遺伝子、などが挙げられる。

[0030] 前記ベクターを用いて前記各遺伝子を体細胞に導入する方法では、1つのベクターに1つの遺伝子を組み込んでもよいし、2つ以上の遺伝子を組み込んでもよい。前記1つのベクターに2つ以上の遺伝子を組み込むことにより、該2つ以上の遺伝子を同時に発現（以下、「共発現」と称することがある）させることができる。

本発明の人工多能性幹細胞の製造方法では、前記c-Myc遺伝子と、前

記 J a r i d 2 変異体遺伝子とが共発現されるように導入することが好ましい。

[0031] 前記1つのベクターに2つ以上の遺伝子を組み込む方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、前記2つ以上の遺伝子を、連結配列を通じて組み込むことが好ましい。

前記連結配列としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、口蹄疫ウイルス (P i c o r n a v i r i d a e A p h t h o v i r u s) 由来2Aペプチドをコードする遺伝子配列、IRES (i n t e r n a l r i b o s o m e e n t r y s i t e s)、などが挙げられる。

[0032] 前記mRNAを前記体細胞に導入する方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択して用いることができる。

前記組換えタンパク質を前記体細胞に導入する方法としては、特に制限はなく、公知の方法を適宜選択して用いることができる。

[0033] 前記各遺伝子乃至その遺伝子産物の体細胞への導入回数は、1回であってもよいし、2回以上であってもよい。

前記各遺伝子乃至その遺伝子産物の体細胞への導入時期としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、前記各遺伝子乃至その遺伝子産物の全てを同時期に導入してもよいし、異なる時期に導入してもよい。

前記遺伝子乃至その遺伝子産物は、1種単独で使用してもよいし、2種以上を併用してもよい。また、遺伝子のみを用いる態様であってもよいし、遺伝子産物のみを用いる態様であってもよいし、前記各遺伝子のうち、ある遺伝子は遺伝子産物を用い、他の遺伝子は遺伝子を用いる態様であってもよい。

[0034] 前記各遺伝子乃至その遺伝子産物の体細胞への導入量としては、全ての遺伝子乃至その遺伝子産物を等量ずつ導入してもよいし、異なる量で導入してもよい。前記各遺伝子乃至その遺伝子産物として、遺伝子を用いる場合の例

としては、Oct 3 / 4 遺伝子が Sox 2 遺伝子、Klf 4 遺伝子、又は c-Myc 遺伝子に対して多量、例えば約 3 倍量、導入するのが (PNAS 106 (31) : 12759-12764, 2009, J. Biol. Chem. 287 (43) : 36273-36282, 2012) 好ましい。

[0035] 前記遺伝子乃至その遺伝子産物導入工程では、本発明の効果を損なわない限り、前記各遺伝子乃至その遺伝子産物以外の遺伝子乃至その遺伝子産物を導入してもよい。

前記各遺伝子乃至その遺伝子産物以外の遺伝子乃至その遺伝子産物としては、例えば、Oct ファミリー (Oct 1 A、及び Oct 6) 遺伝子乃至その遺伝子産物、Klf ファミリー (Klf 1、Klf 2、Klf 4、及び Klf 5) 遺伝子乃至その遺伝子産物、Myc ファミリー (N-Myc、及び L-Myc) 遺伝子乃至その遺伝子産物、Sox ファミリー (Sox 1、Sox 3、Sox 7、Sox 15、Sox 17、及び Sox 18) 遺伝子乃至その遺伝子産物、TERT 遺伝子乃至その遺伝子産物、SV40 Large T antigen 遺伝子乃至その遺伝子産物、HPV 16 E6 遺伝子乃至その遺伝子産物、HPV 16 E7 遺伝子乃至その遺伝子産物、Bmi 1 遺伝子乃至その遺伝子産物、Fbx 15 遺伝子乃至その遺伝子産物、Nanog 遺伝子乃至その遺伝子産物、Eras 遺伝子乃至その遺伝子産物、ECAT 15-2 遺伝子乃至その遺伝子産物、Tcl 1 遺伝子乃至その遺伝子産物、 β -catenin 遺伝子乃至その遺伝子産物、ECAT 1 遺伝子乃至その遺伝子産物、Esg 1 遺伝子乃至その遺伝子産物、Dnmt 3L 遺伝子乃至その遺伝子産物、ECAT 8 遺伝子乃至その遺伝子産物、Gdf 3 遺伝子乃至その遺伝子産物、ECAT 15-1 遺伝子乃至その遺伝子産物、Fthl 17 遺伝子乃至その遺伝子産物、Rex 1 遺伝子乃至その遺伝子産物、UTF 1 遺伝子乃至その遺伝子産物、Stella 遺伝子乃至その遺伝子産物、Stat 3 遺伝子乃至その遺伝子産物、Grb 2 遺伝子乃至その遺伝子産物 (特開 2011-188860 号公報参照) ; GLIS 1 遺伝子乃至その遺伝子産物 (Nature 474 (7350) : 225-229,

2011) ;
Tbx3 遺伝子乃至その遺伝子産物 (Nature 463 (7284) : 1096-100, 2010) ; TET (Ten-eleven translocation) ファミリー (TET1、TET2、及びTET3) 遺伝子乃至その遺伝子産物 (Nature 488 (7413) : 652-655, 2012、Nature 495 (7441) : 370-374, 2013) ; Parp1 遺伝子乃至その遺伝子産物 (Nature 488 (7413) : 652-655, 2012) ; Kdm2a 遺伝子乃至その遺伝子産物、Kdm2b 遺伝子乃至その遺伝子産物 (Cell Stem Cell 9 (6) : 575-587, 2011、Nat. Cell Biol. 14 (5) : 457-466, 2012) ; Nr5a2 遺伝子乃至その遺伝子産物、Rar ファミリー 遺伝子乃至その遺伝子産物 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108 (45) : 18283-18288, 2011) ; Utx 遺伝子乃至その遺伝子産物、Mdm2 遺伝子乃至その遺伝子産物、Ring1b 遺伝子乃至その遺伝子産物、Wdr5 遺伝子乃至その遺伝子産物、などが挙げられる。

[0036] 前記遺伝子乃至その遺伝子産物導入工程では、本発明の効果を損なわない限り、低分子化合物を投与してもよい。

前記低分子化合物としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、GSK-3 阻害剤、アデニル酸シクラーゼ活性化剤、などが挙げられる。

前記GSK-3 阻害剤の具体例としては、CHIR99021 などが挙げられる。

前記アデニル酸シクラーゼ活性化剤の具体例としては、Forskolin などが挙げられる。

前記低分子化合物の投与量としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0037] <その他の工程>

前記その他の工程としては、本発明の効果を損なわない限り特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、前記各遺伝子乃至その遺伝子産物が導入された体細胞を培養する遺伝子乃至その遺伝子産物導入細胞培養工程、などが挙げられる。

[0038] ー遺伝子乃至その遺伝子産物導入細胞培養工程ー

前記遺伝子乃至その遺伝子産物導入細胞培養工程は、前記各遺伝子乃至その遺伝子産物が導入された体細胞を培養する工程である。

前記遺伝子乃至その遺伝子産物導入細胞の培養条件としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、培養温度は約37℃、CO₂濃度は約2%～5%、などが挙げられる。

前記遺伝子乃至その遺伝子産物導入細胞の培養に用いる培地としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、LIF、20% Knockout Serum Replacement (以下、「KSR」と称することがある)、1×NEAA、2-メルカプトエタノール、GlutaMaxを含むDMEM、などが挙げられる。

前記遺伝子乃至その遺伝子産物導入細胞培養工程の期間としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

[0039] <人工多能性幹細胞>

前記人工多能性幹細胞の製造方法により製造される人工多能性幹細胞は、分化多能性、及び自己複製能を有する。前記分化多能性とは、三胚葉系列すべてに分化できることを意味する。また、前記自己複製能とは、未分化状態を保持したまま増殖できる能力を意味する。

[0040] 前記人工多能性幹細胞の製造方法により製造された細胞が人工多能性幹細胞であるか否かを確認する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる。

例えば、前記体細胞として、分化多能性細胞において特異的に高発現する遺伝子の遺伝子座に、レポーター遺伝子、及び薬剤耐性遺伝子の少なくともいずれかを組み込んだ組換え体細胞を用いた場合には、前記レポーター遺伝

子、及び薬剤耐性遺伝子を利用して確認することができる。具体的には、前記レポーター遺伝子として、GFP遺伝子を用いた場合には、例えば、フローサイトメーターによりGFP陽性の細胞を確認する方法が挙げられる、また、前記薬剤耐性遺伝子として、ピューロマイシン耐性遺伝子を用いた場合には、細胞にピューロマイシンを投与することにより確認することができる。

[0041] 前記人工多能性幹細胞の型としては、プライム型であってもよいし、ナイーブ型であってもよいが、品質に優れる点で、ナイーブ型が好ましい。

前記人工多能性幹細胞がナイーブ型であるか否かを確認する方法としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、コロニーの形態、bFGF (basic fibroblast growth factor) を含まないLIF添加培地で増殖できるか否か、2i添加培地 (MEK阻害剤とGSK阻害剤とを添加した培地) で増殖できるか否か、単一細胞に分散して継代することができるか否かを指標とすることにより確認することができる。具体的には、コロニーの形態がドーム状であり、bFGF を含まないLIF添加培地で増殖することができ、2i添加培地で増殖することができ、単一細胞に分散して継代することができる細胞である場合には、ナイーブ型であると判断することができる。

[0042] 前記人工多能性幹細胞の種としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、ヒトが好ましい。

[0043] (人工多能性幹細胞製造用組成物)

本発明の人工多能性幹細胞製造用組成物は、Jarid2変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、Prdm14遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSalil4a遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種を含み、必要に応じて更にその他の構成を含む。

[0044] 前記Jarid2変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、Prdm14遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSalil

4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、(1) J a r i d 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物を含む態様、(2) P r d m 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、E s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びS a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物を含む態様、(3) J a r i d 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、P r d m 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、E s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びS a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物を含む態様が好ましく、(3) J a r i d 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、P r d m 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、E s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びS a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物を含む態様がより好ましい。

前記より好ましい態様であると、人工多能性幹細胞の製造効率により優れ、かつ、より短時間で製造することができ、また、品質面にも優れる点で、有利である。

[0045] <J a r i d 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物>

前記J a r i d 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物は、J a r i d 2 タンパク質のN末端の1番目から551番目のアミノ酸をコードする遺伝子乃至その遺伝子産物であり、前記人工多能性幹細胞の製造方法で記載したものと同様である。また、前記J a r i d 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物は、前記人工多能性幹細胞の製造方法で記載したものと同様の変異が含まれていてもよい。

前記人工多能性幹細胞製造用組成物における前記J a r i d 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物の態様としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、遺伝子がベクターに組み込まれている態様、合成mRNAの態様、組換えタンパク質の態様、などが挙げられる。

前記ベクターとしては、前記人工多能性幹細胞の製造方法で記載したものと同様のものが挙げられる。

前記合成mRNA、前記組換えタンパク質は、公知の方法により製造する

ことができる。

[0046] <P r d m 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物>

前記P r d m 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物は、前記人工多能性幹細胞の製造方法で記載したものと同様である。また、前記P r d m 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物は、前記人工多能性幹細胞の製造方法で記載したものと同様の変異が含まれていてもよい。

前記人工多能性幹細胞製造用組成物における前記P r d m 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物の態様としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる、遺伝子がベクターに組み込まれている態様、合成mRNAの態様、組換えタンパク質の態様、などが挙げられる。

前記ベクターとしては、前記人工多能性幹細胞の製造方法で記載したものと同様のものが挙げられる。

前記合成mRNA、前記組換えタンパク質は、公知の方法により製造することができる。

[0047] <E s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物>

前記E s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物は、前記人工多能性幹細胞の製造方法で記載したものと同様である。また、前記E s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物は、前記人工多能性幹細胞の製造方法で記載したものと同様の変異が含まれていてもよい。

前記人工多能性幹細胞製造用組成物における前記E s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物の態様としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができる、遺伝子がベクターに組み込まれている態様、合成mRNAの態様、組換えタンパク質の態様、などが挙げられる。

前記ベクターとしては、前記人工多能性幹細胞の製造方法で記載したものと同様のものが挙げられる。

前記合成mRNA、前記組換えタンパク質は、公知の方法により製造することができる。

[0048] <S a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物>

前記 S a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物は、前記人工多能性幹細胞の製造方法で記載したものと同様である。また、前記 S a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物は、前記人工多能性幹細胞の製造方法で記載したものと同様の変異が含まれていてもよい。

前記人工多能性幹細胞製造用組成物における前記 S a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物の態様としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、遺伝子がベクターに組み込まれている態様、合成 m R N A の態様、組換えタンパク質の態様、などが挙げられる。

前記ベクターとしては、前記人工多能性幹細胞の製造方法で記載したものと同様のものが挙げられる。

前記合成 m R N A、前記組換えタンパク質は、公知の方法により製造することができる。

[0049] <その他の構成>

前記その他の構成としては、本発明の効果を損なわない限り特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができるが、O c t 3 / 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、S o x 2 遺伝子乃至その遺伝子産物、K l f 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、及び c - M y c 遺伝子乃至その遺伝子産物を含むことが好ましい。

[0050] 前記 O c t 3 / 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、S o x 2 遺伝子乃至その遺伝子産物、K l f 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、及び c - M y c 遺伝子乃至その遺伝子産物は、前記人工多能性幹細胞の製造方法で記載したものと同様のものである。また、前記各遺伝子乃至その遺伝子産物は、前記人工多能性幹細胞の製造方法で記載したものと同様の変異が含まれていてもよい。

前記人工多能性幹細胞製造用組成物における前記 O c t 3 / 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、S o x 2 遺伝子乃至その遺伝子産物、K l f 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、及び c - M y c 遺伝子乃至その遺伝子産物の態様としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、遺伝子がベクターに組み込まれている態様、合成 m R N A の態様、組換えタンパク

質の態様、などが挙げられる。

前記ベクターとしては、前記人工多能性幹細胞の製造方法で記載したものと同様のものが挙げられる。

前記合成 mRNA、前記組換えタンパク質は、公知の方法により製造することができる。

[0051] 前記人工多能性幹細胞製造用組成物における前記 c-Myc 遺伝子と、前記 Jarid2 変異体遺伝子とは共発現できる態様であることが好ましい。前記共発現できる態様としては、前記人工多能性幹細胞の製造方法で記載したように前記連結配列を通じて、前記 c-Myc 遺伝子と、前記 Jarid2 変異体遺伝子とを連結することが好ましい。

[0052] 前記人工多能性幹細胞製造用組成物は、前記各遺伝子乃至その遺伝子産物が、個別の容器に分けられているものであってもよいし、1つの容器にまとめられているものであってもよいし、任意の数ごとに容器にまとめられているものであってもよい。

前記人工多能性幹細胞製造用組成物における前記各遺伝子乃至その遺伝子産物の量としては、特に制限はなく、全ての遺伝子乃至その遺伝子産物を等量としてもよいし、異なる量としてもよい。

[0053] 前記人工多能性幹細胞製造用組成物は、前記各遺伝子乃至その遺伝子産物以外の遺伝子乃至その遺伝子産物を含んでいてもよく、また、前記ウイルスベクターを用いる場合には、例えば、パッケージング細胞を含んでいてもよい。

前記各遺伝子乃至その遺伝子産物以外の遺伝子乃至その遺伝子産物、前記パッケージング細胞としては、前記人工多能性幹細胞の製造方法で記載したものと同様のものが挙げられる。

実施例

[0054] 以下、製造例、試験例を挙げて、本発明を説明するが、本発明は、以下の製造例、試験例に何ら限定されるものではない。

[0055] (製造例 1-1 : Oct3/4 遺伝子含有ウイルスベクター)

マウス由来野生型O c t 3 / 4 タンパク質の全長をコードする遺伝子が p M X s - g w のマルチクローニングサイトに組み込まれている、O c t 3 / 4 遺伝子含有ウイルスベクターを使用した（国立大学法人京都大学 i P S 細胞研究所より入手、C e l l 1 2 6 (4) : 6 6 3 - 6 7 6 , 2 0 0 6 ）。

[0056]（製造例 1 - 2 : S o x 2 遺伝子含有ウイルスベクター）

マウス由来野生型S o x 2 タンパク質の全長をコードする遺伝子が p M X s - g w のマルチクローニングサイトに組み込まれている、S o x 2 遺伝子含有ウイルスベクターを使用した（国立大学法人京都大学 i P S 細胞研究所より入手、C e l l 1 2 6 (4) : 6 6 3 - 6 7 6 , 2 0 0 6 ）。

[0057]（製造例 1 - 3 : K l f 4 遺伝子含有ウイルスベクター）

マウス由来野生型K l f 4 タンパク質の全長をコードする遺伝子が p M X s - g w のマルチクローニングサイトに組み込まれている、K l f 4 遺伝子含有ウイルスベクターを使用した（国立大学法人京都大学 i P S 細胞研究所より入手、C e l l 1 2 6 (4) : 6 6 3 - 6 7 6 , 2 0 0 6 ）。

[0058]（製造例 1 - 4 : c - M y c 遺伝子含有ウイルスベクター）

マウス由来野生型c - M y c タンパク質の全長をコードする遺伝子が p M X s - g w のマルチクローニングサイトに組み込まれている、c - M y c 遺伝子含有ウイルスベクターを使用した（国立大学法人京都大学 i P S 細胞研究所より入手、C e l l 1 2 6 (4) : 6 6 3 - 6 7 6 , 2 0 0 6 ）。

[0059]（製造例 1 - 5 : J a r i d 2 変異体遺伝子含有ウイルスベクター）

B 6 マウス由来胚性幹細胞（以下、「E S C」と称することがある、国立大学法人筑波大学生命科学動物資源センターより入手）よりRNAを抽出し、c D N A を合成後、下記配列番号 3 及び 4 で表されるプライマーを用い、P C R 法にて J a r i d 2 変異体遺伝子（J a r i d 2 タンパク質の N 末端の 1 番目から 5 5 1 番目のアミノ酸をコードする遺伝子（配列番号 1 2 参照））を増幅、回収し、p M X s ベクター（国立大学法人東京大学医科学研究所より入手）のマルチクローニングサイトに組み込み、J a r i d 2 変異体

遺伝子含有ウイルスベクターを得た。

<プライマー>

(1) 5' → 3' : AGTTAATTAAGGATCCACCATGAGC
AAGGAAAGACCCAAG (配列番号3)

(2) 5' → 3' : TTATTTTATCGTCGACTCACGCTGC
CCACC (配列番号4)

[0060] (製造例1-6 : c-Myc 遺伝子、及び Jarid2 変異体遺伝子含有ウイルスベクター)

鋳型として、前記 c-Myc 遺伝子含有ウイルスベクターを用い、プライマーとして下記配列番号5及び6で表されるプライマーを用いて、c-Myc 遺伝子と、Picornaviridae Aphthovirus由来2Aペプチドの一部とをコードする遺伝子(以下、「c-Myc__2A 遺伝子」と称することがある)を増幅、回収した。

また、鋳型として、前記 Jarid2 変異体遺伝子含有ウイルスベクターを用い、プライマーとして下記配列番号9及び10で表されるプライマーを用いて、Picornaviridae Aphthovirus由来2Aペプチドの一部と、Jarid2 変異体遺伝子(Jarid2タンパク質のN末端の1番目から551番目のアミノ酸をコードする遺伝子(以下、「2A__Jarid2ΔC 遺伝子」と称することがある))を増幅、回収した。

前記 c-Myc__2A 遺伝子と、前記 2A__Jarid2ΔC 遺伝子とを pMXs ベクター(国立大学法人東京大学医科学研究所より入手)のマルチクローニングサイトに組み込み、c-Myc 遺伝子と、Jarid2 変異体遺伝子とが、Picornaviridae Aphthovirus由来2Aペプチドをコードする遺伝子で連結された c-Myc 遺伝子、及び Jarid2 変異体遺伝子含有ウイルスベクターを得た。

<プライマー>

(1) 5' → 3' : GGTGGTACGGGAATTCCACCATGCC
CCTCAACGTG (配列番号5)

(2) 5' → 3' : GTTCAGGAGCTGCTTTCACAGGGGCC
ACGATCTTCTGCTTGTGGCCGCTGCCTCCGCCGC
CTGCACCAGAGTTTTCGAAG (配列番号6)

(3) 5' → 3' : AAGCAGCTCCTGAACTTCGACCTGC
TCAAGCTGGCCGGCGACGTGGAGCCTAACCCCTGG
CCCTATGAGCAAGGAAAGACCCAAG (配列番号9)

(4) 5' → 3' : TTATTTTATCGTCGACTCACGCTGC
CCACC (配列番号10)

前記配列番号6中、「1番目から51番目(GTTCAGGAGCTGCTTTCACAGGGGCCACGATCTTCTGCTTGTGGCCGCTGCC)」は、前記2Aペプチドをコードする遺伝子に対応し、「52番目から60番目(TCCGCCGCC)」は、リンカー(GGG)に対応する。

前記配列番号9中、「1番目から63番目(AAGCAGCTCCTGAACTTCGACCTGCTCAAGCTGGCCGGCGACGTGGAGCCTAACCCCTGGCCCT)」は、前記2Aペプチドをコードする遺伝子に対応する。

[0061] (比較製造例1-1: Jarid2 遺伝子含有ウイルスベクター)

B6マウス由来胚性幹細胞(国立大学法人筑波大学生命科学動物資源センターより入手)よりRNAを抽出し、cDNAを合成後、下記配列番号1及び2で表されるプライマーを用い、PCR法にてJarid2 遺伝子(Jarid2タンパク質の全長をコードする遺伝子(配列番号11参照))を増幅、回収し、pMXsベクター(国立大学法人東京大学医科学研究所より入手)のマルチクローニングサイトに組み込み、Jarid2 遺伝子含有ウイルスベクターを得た。

<プライマー>

(1) 5' → 3' : GTTAATTAAGGATCCACCATGAGCA
AGGAAAGACCCAAG (配列番号1)

(2) 5' → 3' : TTATTTTATCGTCGACTCATGAGGATGGGAGCCGAG (配列番号2)

[0062] (比較製造例1-2 : c-Myc遺伝子、及びJarid2遺伝子含有ウイルスベクター)

鋳型として、前記c-Myc遺伝子含有ウイルスベクターを用い、プライマーとして下記配列番号5及び6で表されるプライマーを用いて、c-Myc__2A遺伝子を増幅、回収した。

また、鋳型として、前記Jarid2遺伝子含有ウイルスベクターを用い、プライマーとして下記配列番号7及び8で表されるプライマーを用いて、Picornaviridae Apthovirus由来2Aペプチドの一部と、Jarid2遺伝子(Jarid2タンパク質の全長をコードする遺伝子(以下、「2A__Jarid2WT遺伝子」と称することがある))を増幅、回収した。

前記c-Myc__2A遺伝子と、前記2A__Jarid2WT遺伝子とをpMXsベクター(国立大学法人東京大学医科学研究所より入手)のマルチクロニングサイトに組み込み、c-Myc遺伝子と、Jarid2遺伝子とが、Picornaviridae Apthovirus由来2Aペプチドをコードする遺伝子で連結されたc-Myc遺伝子、及びJarid2遺伝子含有ウイルスベクターを得た。

<プライマー>

(1) 5' → 3' : GGTGGTACGGGAATTCCACCATGCCCTCAACGTG (配列番号5)

(2) 5' → 3' : GTTCAGGAGCTGCTTTCACAGGGGCCACGATCTTCTGCTTGTGGCCGCTGCCTCCGCCGCCTGCACCAGAGTTTTCGAAG (配列番号6)

(3) 5' → 3' : AAGCAGCTCCTGAACTTCGACCTGCTCAAGCTGGCCGGCGACGTGGAGCCTAACCTGGCCCTATGAGCAAGGAAAGACCCAAG (配列番号7)

(4) 5' → 3' : TTATTTTATCGTCGACTCATGAGGATGGGAGCCGAG (配列番号8)

前記配列番号6中、「1番目から51番目(GTTCAGGAGCTGCTTCACAGGGGCCACGATCTTCTGCTTGTGGCCGCTGCC)」は、前記2Aペプチドをコードする遺伝子に対応し、「52番目から60番目(TCCGCCGCC)」は、リンカー(GGG)に対応する。

前記配列番号7中、「1番目から63番目(AAGCAGCTCCTGAACCTTCGACCTGCTCAAGCTGGCCGGCGACGTGGAGCCTAACCTGGCCCT)」は、前記2Aペプチドをコードする遺伝子に対応する。

[0063] (製造例1-7: Prdm14 遺伝子含有ウイルスベクター)

B6マウス由来胚性幹細胞(国立大学法人筑波大学生命科学動物資源センターより入手)よりRNAを抽出し、cDNAを合成後、下記配列番号13及び14で表されるプライマーを用い、PCR法にてPrdm14 遺伝子(Prdm14 タンパク質の全長をコードする遺伝子(配列番号19参照))を増幅、回収し、pMXsベクター(国立大学法人東京大学医科学研究所より入手)のマルチクローニングサイトに組み込み、Prdm14 遺伝子含有ウイルスベクターを得た。

<プライマー>

(1) 5' → 3' : AGTTAATTAAGGATCCACCATGGCCTTACCGCCCTCTG (配列番号13)

(2) 5' → 3' : TTATTTTATCGTCGACCTAGCAGGT TTTATGAAGCCTC (配列番号14)

[0064] (製造例1-8: Esrrb 遺伝子含有ウイルスベクター)

B6マウス由来胚性幹細胞(国立大学法人筑波大学生命科学動物資源センターより入手)よりRNAを抽出し、cDNAを合成後、下記配列番号15及び16で表されるプライマーを用い、PCR法にてEsrrb 遺伝子(E

s r r bタンパク質の全長をコードする遺伝子（配列番号20参照）を増幅、回収し、pMXsベクター（国立大学法人東京大学医科学研究所より入手）のマルチクローニングサイトに組み込み、Esrrb遺伝子含有ウイルスベクターを得た。

<プライマー>

(1) 5' → 3' : AGTTAATTAAGGATCCACCATGGACGTGTCCGAACTCTG（配列番号15）

(2) 5' → 3' : TTATTTTATCGTCGACTCACACCTTGGCCTCCAGCA（配列番号16）

[0065]（製造例1-9：Sa114a遺伝子含有ウイルスベクター）

B6マウス由来胚性幹細胞（国立大学法人筑波大学生命科学動物資源センターより入手）よりRNAを抽出し、cDNAを合成後、下記配列番号17及び18で表されるプライマーを用い、PCR法にてSa114a遺伝子（Sa114aタンパク質の全長をコードする遺伝子（配列番号21参照））を増幅、回収し、pMXsベクター（国立大学法人東京大学医科学研究所より入手）のマルチクローニングサイトに組み込み、Sa114a遺伝子含有ウイルスベクターを得た。

<プライマー>

(1) 5' → 3' : AGTTAATTAAGGATCCACCATGTGCGAGGCGCAAGCAGG（配列番号17）

(2) 5' → 3' : TTATTTTATCGTCGACTAGCTGACAGCAATCTTATTTTC（配列番号18）

[0066]（製造例2-1：Oct3/4遺伝子含有ウイルス液-1）

トランスフェクション前日にパッケージング細胞PLATE（国立大学法人東京大学医科学研究所より入手）を10cmのゼラチンコートディッシュ1枚あたり 3.6×10^6 個播種した。なお、培地としては、10%血清を含むDMEMを用い、培養温度37℃、CO₂濃度5%で培養した。

前記PLATE細胞に、FuGene 6（プロメガ社製）を用いて前

記製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターをトランスフェクションした。

前記トランスフェクション翌日に前記 PLAT-E 細胞の培地を交換し、前記培地を交換した翌日に、前記 PLAT-E 細胞の培養上清を回収し、次いで、0.45 μm フィルターを用いて濾過し、Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 とした。

[0067] (製造例 2-2 : Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1)

前記製造例 2-1 において、製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記製造例 1-2 で得られた Sox 2 遺伝子含有ウイルスベクターに代えた以外は、製造例 2-1 と同様にして、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 を得た。

[0068] (製造例 2-3 : Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1)

前記製造例 2-1 において、製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記製造例 1-3 で得られた Klf 4 遺伝子含有ウイルスベクターに代えた以外は、製造例 2-1 と同様にして、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 を得た。

[0069] (製造例 2-4 : c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-1)

前記製造例 2-1 において、製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記製造例 1-4 で得られた c-Myc 遺伝子含有ウイルスベクターに代えた以外は、製造例 2-1 と同様にして、c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-1 を得た。

[0070] (製造例 2-5 : Jarid 2 変異体遺伝子含有ウイルス液-1)

前記製造例 2-1 において、製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記製造例 1-5 で得られた Jarid 2 変異体遺伝子含有ウイルスベクターに代えた以外は、製造例 2-1 と同様にして、Jarid 2 変異体遺伝子含有ウイルス液-1 を得た。

[0071] (製造例 2-6 : c-Myc 遺伝子、及び Jarid 2 変異体遺伝子含有ウイルス液-1)

前記製造例 2-1 において、製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記製造例 1-6 で得られた c-My c 遺伝子、及び J a r i d 2 変異体遺伝子含有ウイルスベクターに代えた以外は、製造例 2-1 と同様にして、c-My c 遺伝子、及び J a r i d 2 変異体遺伝子含有ウイルス液-1 を得た。

[0072] (比較製造例 2-1 : J a r i d 2 遺伝子含有ウイルス液-1)

前記製造例 2-1 において、製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記比較製造例 1-1 で得られた J a r i d 2 遺伝子含有ウイルスベクターに代えた以外は、製造例 2-1 と同様にして、J a r i d 2 遺伝子含有ウイルス液-1 を得た。

[0073] (比較製造例 2-2 : c-My c 遺伝子、及び J a r i d 2 遺伝子含有ウイルス液-1)

前記製造例 2-1 において、製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記比較製造例 1-2 で得られた c-My c 遺伝子、及び J a r i d 2 遺伝子含有ウイルスベクターに代えた以外は、製造例 2-1 と同様にして、c-My c 遺伝子、及び J a r i d 2 遺伝子含有ウイルス液-1 を得た。

[0074] (製造例 2-7 : P r d m 1 4 遺伝子含有ウイルス液-1)

前記製造例 2-1 において、製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記製造例 1-7 で得られた P r d m 1 4 遺伝子含有ウイルスベクターに代えた以外は、製造例 2-1 と同様にして、P r d m 1 4 遺伝子含有ウイルス液-1 を得た。

[0075] (製造例 2-8 : E s r r b 遺伝子含有ウイルス液-1)

前記製造例 2-1 において、製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記製造例 1-8 で得られた E s r r b 遺伝子含有ウイルスベクターに代えた以外は、製造例 2-1 と同様にして、E s r r b 遺伝子含有ウイルス液-1 を得た。

[0076] (製造例 2-9 : S a l l 4 a 遺伝子含有ウイルス液-1)

前記製造例 2-1 において、製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記製造例 1-9 で得られた Sa114a 遺伝子含有ウイルスベクターに代えた以外は、製造例 2-1 と同様にして、Sa114a 遺伝子含有ウイルス液-1 を得た。

[0077] (比較製造例 2-3 : 外来遺伝子不含有ウイルス液-1)

前記製造例 2-1 において、製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記 pMXs ベクターのみに代えた以外は、製造例 2-1 と同様にして、外来遺伝子不含有ウイルス液-1 を得た。

[0078] (製造例 3-1 : Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-2)

トランスフェクション前日にパッケージング細胞 PLAT-GP (国立大学法人東京大学医科学研究所より入手) を 10cm のゼラチンコートディッシュ 1 枚あたり 3.6×10^6 個播種した。なお、培地としては、10% 血清を含む DMEM を用い、培養温度 37°C、CO₂ 濃度 5% で培養した。

前記 PLAT-GP 細胞に、FuGene 6 (プロメガ社製) を用いて前記製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターを、VSV-G 発現ベクター (GIBCO 社製) と共にトランスフェクションした。

前記トランスフェクション翌日に前記 PLAT-GP 細胞の培地を交換し、前記培地を交換した翌日に、前記 PLAT-GP 細胞の培養上清を回収し、次いで、0.45 μm フィルターを用いて濾過し、Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-2 とした。

[0079] (製造例 3-2 : Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-2)

前記製造例 3-1 において、製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記製造例 1-2 で得られた Sox 2 遺伝子含有ウイルスベクターに代えた以外は、製造例 3-1 と同様にして、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-2 を得た。

[0080] (製造例 3-3 : Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-2)

前記製造例 3-1 において、製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記製造例 1-3 で得られた Klf 4 遺伝子含有ウイルスベクターに代えた以外は、製造例 3-1 と同様にして、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-2 を得た。

[0081] (製造例 3-4 : c-My c 遺伝子含有ウイルス液-2)

前記製造例 3-1 において、製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記製造例 1-4 で得られた c-My c 遺伝子含有ウイルスベクターに代えた以外は、製造例 3-1 と同様にして、c-My c 遺伝子含有ウイルス液-2 を得た。

[0082] (製造例 3-5 : c-My c 遺伝子、及び J a r i d 2 変異体遺伝子含有ウイルス液-2)

前記製造例 3-1 において、製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記製造例 1-6 で得られた c-My c 遺伝子、及び J a r i d 2 変異体遺伝子含有ウイルスベクターに代えた以外は、製造例 3-1 と同様にして、c-My c 遺伝子、及び J a r i d 2 変異体遺伝子含有ウイルス液-2 を得た。

[0083] (製造例 3-6 : P r d m 1 4 遺伝子含有ウイルス液-2)

前記製造例 3-1 において、製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記製造例 1-7 で得られた P r d m 1 4 遺伝子含有ウイルスベクターに代えた以外は、製造例 3-1 と同様にして、P r d m 1 4 遺伝子含有ウイルス液-2 を得た。

[0084] (製造例 3-7 : E s r r b 遺伝子含有ウイルス液-2)

前記製造例 3-1 において、製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記製造例 1-8 で得られた E s r r b 遺伝子含有ウイルスベクターに代えた以外は、製造例 3-1 と同様にして、E s r r b 遺伝子含有ウイルス液-2 を得た。

[0085] (製造例 3-8 : S a l l 4 a 遺伝子含有ウイルス液-2)

前記製造例 3-1 において、製造例 1-1 で得られた Oct 3/4 遺伝子

含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記製造例 1-9 で得られた S a l l 4 a 遺伝子含有ウイルスベクターに代えた以外は、製造例 3-1 と同様にして、S a l l 4 a 遺伝子含有ウイルス液-2 を得た。

[0086] (比較製造例 3-1 : 外来遺伝子不含有ウイルス液-2)

前記製造例 3-1 において、製造例 1-1 で得られた O c t 3 / 4 遺伝子含有ウイルスベクターを用いていた点を、前記 p M X s ベクターのみに代えた以外は、製造例 3-1 と同様にして、外来遺伝子不含有ウイルス液-2 を得た。

[0087] (試験例 1-1 : 製造効率試験-1)

—細胞—

細胞として、N a n o g 遺伝子プロモーター依存的に G F P 及びピューロマイシン耐性遺伝子を発現するマウス胎仔線維芽細胞 (以下、「N G - M E F」と称することがある、理化学研究所バイオリソースセンターに寄託されているトランスジェニックマウス S T O C K T g (N a n o g - G F P , P u r o) 1 Y a m (N o . R B R C O 2 2 9 0) を入手、交配し、13.5 日胚からトリプシンを用いて単離、調製した) を用いた。前記 N G - M E F の培養には、10% 血清を含む D M E M を用い、培養温度 37°C、CO₂ 濃度 5% で培養した。

[0088] —ウイルス感染—

下記 (1) から (3) のそれぞれのウイルス液に、最終濃度 4 μg / mL のポリブレンを加えて調製したウイルス液を、それぞれ前記 N G - M E F に感染させた。

前記感染の翌日に、上清を L I F (L I F タンパク質を発現するベクター p C A G G S - L I F (理化学研究所 発生・再生科学より入手) を C o s - 7 細胞にリン酸カルシウム法により導入し、その培養上清を用いた)、20% K S R (G I B C O 社製)、1×N E A A (G I B C O 社製)、2-メルカプトエタノール (G I B C O 社製)、G l u t a M a x (G I B C O 社製) を含む D M E M に置き換え、その後は、1 日おきに培地交換を行った

。

〔ウイルス液〕

(1) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、及び外来遺伝子不含有ウイルス液-1 600 μ L

(2) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、及びJarid 2 遺伝子含有ウイルス液-1 600 μ L

(3) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、及びJarid 2 変異体遺伝子含有ウイルス液-1 600 μ L

[0089] ー人工多能性幹細胞の割合ー

前記ウイルス感染後6日目 (Day 6)、又は8日目 (Day 8) に、前記NG-MEFをトリプシンで剥離し、フローサイトメーター (BD FACSCalibur (登録商標)、日本ベクトン・ディッキンソン社製) で10万個あたりのGFP陽性細胞数を計測した。結果を図1-1に示した。

図1-1中、(1) から (3) は、それぞれ前記 (1) から (3) のウイルス液を用いた場合の結果を示す。

図1-1の結果から、前記 (3) の場合には、ウイルス感染後6日目、及び8日目のいずれの場合にも全細胞に対する人工多能性幹細胞の割合が、前記 (1) 及び (2) の場合よりも高く、Jarid 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物を用いることにより、人工多能性幹細胞の製造効率を高めることができることが示された。

[0090] (試験例1-2: 製造効率試験-2)

－細胞－

細胞は、前記試験例 1-1 と同様に、NG-MEF を用いた。

[0091] －ウイルス感染－

前記試験例 1-1 において、ウイルス液を下記 (1) から (3) のいずれかのウイルス液に代えた以外は、前記試験例 1-1 と同様にして、前記 NG-MEF にウイルスを感染させた。

[ウイルス液]

(1) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 300 μ L、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 300 μ L、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 300 μ L、及び c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-1 300 μ L

(2) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 300 μ L、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 300 μ L、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 300 μ L、並びに c-Myc 遺伝子、及び Jarid 2 遺伝子含有ウイルス液-1 300 μ L

(3) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 300 μ L、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 300 μ L、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 300 μ L、並びに c-Myc 遺伝子、及び Jarid 2 変異体遺伝子含有ウイルス液-1 300 μ L

[0092] －人工多能性幹細胞のコロニー数の計測－

前記ウイルス感染後 8 日目から 12 日目までピューロマイシン（最終濃度 1.5 μ g/mL）に曝露し、ウイルス感染後 12 日目に蛍光顕微鏡下で GFP 陽性コロニー数を計測した。結果を図 1-2 に示した。

図 1-2 中、(1) から (3) は、それぞれ前記 (1) から (3) のウイルス液を用いた場合の結果を示す。

図 1-2 の結果から、前記 (3) の場合には、人工多能性幹細胞のコロニー数（「iPS コロニー数」と称することもある）が、前記 (1) 及び (2) の場合よりも高く、Jarid 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物を用いることにより、人工多能性幹細胞の製造効率を高めることができることが示

された。

[0093] (試験例 1-3 : 製造効率試験-3)

—細胞—

細胞は、前記試験例 1-1 と同様に、NG-MEF を用いた。

[0094] —ウイルス感染—

前記試験例 1-1 において、ウイルス液を下記 (1) から (3) のいずれかのウイルス液に代えた以外は、前記試験例 1-1 と同様にして、前記 NG-MEF にウイルスを感染させた。

[ウイルス液]

(1) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、及び外来遺伝子不含有ウイルス液-1 600 μ L

(2) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c-Myc 遺伝子、及び Jarid 2 変異体遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、並びに外来遺伝子不含有ウイルス液-1 600 μ L

(3) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c-Myc 遺伝子、及び Jarid 2 変異体遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Prdm 14 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Esrrb 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、並びに Sal 14 a 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L

[0095] —人工多能性幹細胞の割合—

前記ウイルス感染後 8 日目に、前記 NG-MEF をトリプシンで剥離し、フローサイトメーター (BD FACSCalibur (登録商標)、日本ベクトン・ディッキンソン社製) で 10 万個あたりの GFP 陽性細胞数を計

測した。結果を図1-3に示した。

図1-3中、(1)から(3)は、それぞれ前記(1)から(3)のウイルス液を用いた場合の結果を示す。

図1-3の結果から、前記(2)及び(3)の場合には、全細胞に対する人工多能性幹細胞の割合が、前記(1)の場合よりも高く、また、Jarid2変異体遺伝子乃至その遺伝子産物と、Prdm14遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSalil4a遺伝子乃至その遺伝子産物と用いた前記(3)の場合には、より人工多能性幹細胞の製造効率を高めることができることが示された。

[0096] (試験例1-4：製造効率試験-4)

—細胞—

細胞として、Nanog遺伝子プロモーター依存的にGFP及びピューロマイシン耐性遺伝子を発現するNG-MEF（理化学研究所バイオリソースセンターに寄託されているトランスジェニックマウスSTOCK Tg(Nanog-GFP, Puro)1Yam(No. RBRC02290)を入手、交配し、13.5日胚からトリプシンを用いて単離、調製した)を用いた。前記NG-MEFの培養には、10%血清を含むDMEMを用い、培養温度37℃、CO₂濃度5%で培養した。

[0097] —ウイルス感染—

下記(1)から(8)のそれぞれのウイルス液に、最終濃度4μg/mLのポリブレンを加えて調製したウイルス液を、それぞれ前記NG-MEFに感染させた。

前記感染の翌日に、上清をLIF(LIFタンパク質を発現するベクターpCAGGS-LIF(理化学研究所 発生・再生科学より入手)をCos-7細胞にリン酸カルシウム法により導入し、その培養上清を用いた)、20% KSR(GIBCO社製)、1×NEAA(GIBCO社製)、2-メルカプトエタノール(GIBCO社製)、GlutaMax(GIBCO社製)を含むDMEMに置き換え、その後は、1日おきに培地交換を行った

。

〔ウイルス液〕

(1) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、及び外来遺伝子不含有ウイルス液-1 600 μ L

(2) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Prdm 14 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、及び外来遺伝子不含有ウイルス液-1 400 μ L

(3) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Esrrb 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、及び外来遺伝子不含有ウイルス液-1 400 μ L

(4) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Salil 4a 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、及び外来遺伝子不含有ウイルス液-1 400 μ L

(5) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Prdm 14 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Salil 4a 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、及び外来遺伝子不含有ウイルス液-1 200 μ L

(6) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sox 2 遺伝

子含有ウイルス液-1 200 μ L、K l f 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c - M y c 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、P r d m 1 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、E s r r b 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、及び外来遺伝子不含有ウイルス液-1 200 μ L
(7) O c t 3 / 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、S o x 2 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、K l f 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c - M y c 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、S a l l 4 a 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、E s r r b 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、及び外来遺伝子不含有ウイルス液-1 200 μ L
(8) O c t 3 / 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、S o x 2 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、K l f 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c - M y c 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、P r d m 1 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、S a l l 4 a 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、及びE s r r b 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L

[0098] ー人工多能性幹細胞のコロニー数の計測ー

前記ウイルス感染後8日目から12日目までピューロマイシン（最終濃度1.5 μ g / mL）に曝露し、ウイルス感染後12日目に蛍光顕微鏡下でGFP陽性コロニー数を計測した。結果を図1-4に示した。

図1-4中、(1)から(8)は、それぞれ前記(1)から(8)のウイルス液を用いた場合の結果を示す。

図1-4の結果から、前記(8)の場合には、iPSコロニー数が、前記(1)から(7)の場合よりも高く、P r d m 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、S a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びE s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物を用いることにより、人工多能性幹細胞の製造効率を高めることができることが示された。

[0099] (試験例1-5：製造効率試験-5)

ー細胞ー

細胞は、前記試験例 1-4 と同様に、NG-MEF を用いた。

[0100] -ウイルス感染-

前記試験例 1-4 において、ウイルス液を下記 (1) 及び (2) のいずれかのウイルス液に代えた以外は、前記試験例 1-4 と同様にして、前記 NG-MEF にウイルスを感染させた。

[ウイルス液]

(1) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、及び外来遺伝子不含有ウイルス液-1 600 μ L

(2) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Prdm 14 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sal14a 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、及びEsrrb 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L

[0101] -人工多能性幹細胞の割合-

前記ウイルス感染後 8 日目に、前記 NG-MEF をトリプシンで剥離し、フローサイトメーター (BD FACSCalibur (登録商標)、日本ベクトン・ディッキンソン社製) で 10 万個あたりの GFP 陽性細胞数を計測した。結果を図 1-5 に示した。

図 1-5 中、(1) 及び (2) は、それぞれ前記 (1) 及び (2) のウイルス液を用いた場合の結果を示す。

図 1-5 の結果から、前記 (2) の場合には、全細胞に対する人工多能性幹細胞の割合が、前記 (1) の場合よりも高く、Prdm 14 遺伝子乃至その遺伝子産物、Sal14a 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びEsrrb 遺伝子乃至その遺伝子産物を用いることにより、人工多能性幹細胞の製造効率を高めることができることが示された。

[0102] (試験例 1-6 : 製造効率試験-6)

—細胞—

細胞として、ヒト皮膚線維芽細胞（以下、「HDF」と称することがある、東洋紡株式会社製）を用いた。前記HDFの培養には、ヒト皮膚線維芽細胞基本培地（東洋紡株式会社製）を用い、培養温度37℃、CO₂濃度5%で培養した。

[0103] —ウイルス感染—

前記試験例 1-4 において、細胞をNG-MEFから前記HDFに代え、ウイルス液を下記(1)及び(2)のいずれかのウイルス液に代えた以外は、前記試験例 1-4 と同様にして、前記HDFにウイルスを感染させた。

[ウイルス液]

(1) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μL、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μL、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μL、c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μL、及び外来遺伝子不含有ウイルス液-2 600 μL

(2) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μL、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μL、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μL、c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μL、Prdm 14 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μL、Sal 14 a 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μL、及びEsrrb 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μL

[0104] —人工多能性幹細胞のコロニー数の計測—

前記ウイルス感染後15日目にAlexa Fluor 488 標識されたTRA-1-60抗体(BD Biosciences社)を用いて染色し、蛍光顕微鏡下で陽性コロニー数を計測した。結果を図1-6に示した。

図1-6中、(1)及び(2)は、それぞれ前記(1)及び(2)のウイルス液を用いた場合の結果を示す。

図1-6の結果から、前記(2)の場合には、TRA-1-60陽性コロ

ニ一数が、前記(1)の場合よりも多く、Prdm14遺伝子乃至その遺伝子産物、Sal14a遺伝子乃至その遺伝子産物、及びEsrrb遺伝子乃至その遺伝子産物を用いることにより、人工多能性幹細胞の製造効率を高めることができることが示された。

[0105] (試験例2-1: 製造期間試験-1)

—細胞—

細胞は、前記試験例1-1と同様に、NG-MEFを用いた。

[0106] —ウイルス感染—

前記試験例1-1において、ウイルス液を下記(1)及び(2)のいずれかのウイルス液に代えた以外は、前記試験例1-1と同様にして、前記NG-MEFにウイルスを感染させた。

[ウイルス液]

(1) Oct3/4遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sox2遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Klf4遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c-Myc遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、及び外来遺伝子不含有ウイルス液-1 600 μ L

(2) Oct3/4遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sox2遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Klf4遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c-Myc遺伝子、及びJarid2変異体遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、並びに外来遺伝子不含有ウイルス液-1 600 μ L

[0107] —人工多能性幹細胞のコロニー数の計測—

前記ウイルス感染後1日目、2日目、3日目、4日目、5日目、又は6日目から12日目までピューロマイシン(最終濃度1.5 μ g/mL)に曝露し、ウイルス感染後12日目に蛍光顕微鏡下でGFP陽性コロニー数を計測した。結果を図2-1に示した。

図2-1中、D1からD6は、それぞれピューロマイシンの曝露開始日(ウイルス感染後1日目から6日目)を示し、「◆」は、前記(1)のウイル

ス液を用いた場合の結果を示し、「■」は、前記（２）のウイルス液を用いた場合の結果を示す。

図２－１に示すように、前記（２）の場合には、ウイルス感染後４日目にピューロマイシンを曝露した場合でも３回の実験で安定的に人工多能性幹細胞が確認された（人工多能性幹細胞のコロニー数：平均３個）のに対し、前記（１）の場合には、ウイルス感染後６日目にピューロマイシンを曝露した場合に初めて３回の実験で安定的に人工多能性幹細胞が確認された（人工多能性幹細胞のコロニー数：平均８個）。

したがって、Jarid2変異体遺伝子乃至その遺伝子産物を用いることにより、人工多能性幹細胞を短期間で製造することができることが示された。

[0108] （試験例２－２：製造期間試験－２）

－細胞－

細胞は、前記試験例１－１と同様に、NG-MEFを用いた。

[0109] －ウイルス感染－

前記試験例１－１において、ウイルス液を下記（１）及び（２）のいずれかのウイルス液に代えた以外は、前記試験例１－１と同様にして、前記NG-MEFにウイルスを感染させた。

[ウイルス液]

（１）Oct3/4遺伝子含有ウイルス液－１ 200 μ L、Sox2遺伝子含有ウイルス液－１ 200 μ L、Klf4遺伝子含有ウイルス液－１ 200 μ L、c-Myc遺伝子含有ウイルス液－１ 200 μ L、及び外来遺伝子不含有ウイルス液－１ 600 μ L

（２）Oct3/4遺伝子含有ウイルス液－１ 200 μ L、Sox2遺伝子含有ウイルス液－１ 200 μ L、Klf4遺伝子含有ウイルス液－１ 200 μ L、c-Myc遺伝子、及びJarid2変異体遺伝子含有ウイルス液－１ 200 μ L、Prdm14遺伝子含有ウイルス液－１ 200 μ L、Esrrb遺伝子含有ウイルス液－１ 200 μ L、並びにSal14

a 遺伝子含有ウイルス液－1 200 μ L

[0110] －人工多能性幹細胞のコロニー数の計測－

前記ウイルス感染後1日目、2日目、3日目、4日目、5日目、又は6日目から12日目までピューロマイシン（最終濃度1.5 μ g/mL）に曝露し、ウイルス感染後12日目に蛍光顕微鏡下でGFP陽性コロニー数を計測した。結果を図2-2に示した。

図2-2中、D1からD6は、それぞれピューロマイシンの曝露開始日（ウイルス感染後1日目から6日目）を示し、「◆」は、前記（1）のウイルス液を用いた場合の結果を示し、「■」は、前記（2）のウイルス液を用いた場合の結果を示す。

図2-2に示すように、前記（2）の場合には、ウイルス感染後2日目にピューロマイシンを曝露した場合でも3回の実験で安定的に人工多能性幹細胞が確認された（人工多能性幹細胞のコロニー数：平均3個）のに対し、前記（1）の場合には、ウイルス感染後6日目にピューロマイシンを曝露した場合に初めて3回の実験で安定的に人工多能性幹細胞が確認された（人工多能性幹細胞のコロニー数：平均8個）。

したがって、Jarid2変異体遺伝子乃至その遺伝子産物と、Prdm14遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSal14a遺伝子乃至その遺伝子産物とを用いることにより、人工多能性幹細胞をより短期間で製造することができることが示された。

[0111] （試験例2-3：製造期間試験-3）

－細胞－

細胞は、前記試験例1-4と同様に、NG-MEFを用いた。

[0112] －ウイルス感染－

前記試験例1-4において、ウイルス液を下記（1）及び（2）のいずれかのウイルス液に代えた以外は、前記試験例1-4と同様にして、前記NG-MEFにウイルスを感染させた。

〔ウイルス液〕

(1) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、及びc-Myc 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、及び外来遺伝子不含有ウイルス液-1 600 μ L

(2) Oct 3/4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sox 2 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Klf 4 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Prdm 14 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Sal14a 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、及びEsrrb 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L

[0113] ー人工多能性幹細胞のコロニー数の計測ー

前記ウイルス感染後1日目、2日目、3日目、4日目、5日目、又は6日目から12日目までピューロマイシン（最終濃度1.5 μ g/mL）に曝露し、ウイルス感染後12日目に蛍光顕微鏡下でGFP陽性コロニー数を計測した。結果を図2-3に示した。

図2-3中、D1からD6は、それぞれピューロマイシンの曝露開始日（ウイルス感染後1日目から6日目）を示し、「◆」は、前記（1）のウイルス液を用いた場合の結果を示し、「■」は、前記（2）のウイルス液を用いた場合の結果を示す。

図2-3に示すように、前記（2）の場合には、ウイルス感染後2日目にピューロマイシンを曝露した場合でも3回の実験で安定的に人工多能性幹細胞が確認された（人工多能性幹細胞のコロニー数：平均9個）のに対し、前記（1）の場合には、ウイルス感染後6日目にピューロマイシンを曝露した場合に初めて3回の実験で安定的に人工多能性幹細胞が確認された（人工多能性幹細胞のコロニー数：平均8個）。

したがって、Prdm 14 遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSal14a 遺伝子乃至その遺伝子産物を用いることにより、人工多能性幹細胞を短期間で製造することができることが示さ

れた。

[0114] (試験例3-1:品質試験-1)

—細胞—

細胞として、HDF (東洋紡株式会社製) を用いた。前記HDFの培養には、ヒト皮膚線維芽細胞基本培地 (東洋紡株式会社製) を用い、培養温度37℃、CO₂濃度5%で培養した。

[0115] —ウイルス感染—

下記(1)及び(2)のそれぞれのウイルス液に、最終濃度4μg/mLのポリブレンを加えて調製したウイルス液を、それぞれ前記HDFに感染させた。

前記感染の翌日に、上清をLIF (LIFタンパク質を発現するベクターpCAGGS-LIF (理科学研究所 発生・再生科学より入手) をCos-7細胞にリン酸カルシウム法により導入し、その培養上清を用いた)、20% KSR (GIBCO社製)、1×NEAA (GIBCO社製)、2-メルカプトエタノール (GIBCO社製)、GlutaMax (GIBCO社製) を含むDMEMに置き換え、その後は、1日おきに培地交換を行った。

[ウイルス液]

(1) Oct3/4 遺伝子含有ウイルス液-2 200μL、Sox2 遺伝子含有ウイルス液-2 200μL、Klf4 遺伝子含有ウイルス液-2 200μL、c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-2 200μL、及び外来遺伝子不含有ウイルス液-2 600μL

(2) Oct3/4 遺伝子含有ウイルス液-2 200μL、Sox2 遺伝子含有ウイルス液-2 200μL、Klf4 遺伝子含有ウイルス液-2 200μL、c-Myc 遺伝子、及びJarid2 変異体遺伝子含有ウイルス液-2 200μL、Prdm14 遺伝子含有ウイルス液-2 200μL、Esrrb 遺伝子含有ウイルス液-2 200μL、並びにSalil4a 遺伝子含有ウイルス液-2 200μL

[0116] ー人工多能性幹細胞ー

前記ウイルス感染後18日目の細胞、及びクローン化した細胞を倒立顕微鏡 (Zeiss Axiovert 200M) で撮影した結果を図3Aから3Dに示した。

図3A及び3Bは、前記(1)のウイルス液を用いた場合の写真の一例であり、図3C及び3Dは、前記(2)のウイルス液を用いた場合の写真の一例である。図3Aから3D中、スケールバーは、200 μ mを表す。

前記(1)のウイルス液を用いて得られた人工多能性幹細胞は、コロニーの形態が扁平状であり、bFGF添加培地で増殖することができ、2i添加培地では増殖できず、単一細胞に分散すると死んでしまう細胞であり、プライム型人工多能性幹細胞であることがわかった。

一方、前記(2)のウイルス液を用いて得られた人工多能性幹細胞は、コロニーの形態がドーム状であり、bFGFを含まないLIF添加培地で増殖することができ、2i添加培地で増殖することができ、単一細胞に分散して継代することができる細胞であり、ナイーブ型人工多能性幹細胞であることがわかった。

したがって、Jarid2変異体遺伝子乃至その遺伝子産物と、Prdm14遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSal14a遺伝子乃至その遺伝子産物とを用いることにより、高品質の人工多能性幹細胞を製造することができることが示された。

[0117] (試験例3-2:品質試験-2)

ー細胞ー

細胞として、HDF (東洋紡株式会社製) を用いた。前記HDFの培養には、ヒト皮膚線維芽細胞基本培地 (東洋紡株式会社製) を用い、培養温度37 $^{\circ}$ C、CO₂濃度5%で培養した。

[0118] ーウイルス感染ー

下記(1)及び(2)のそれぞれのウイルス液に、最終濃度4 μ g/mLのポリブレンを加えて調製したウイルス液を、それぞれ前記HDFに感染さ

せた。

前記感染の翌日に、上清をLIF（LIFタンパク質を発現するベクターpCAGGS-LIF（理科学研究所 発生・再生科学より入手）をCos-7細胞にリン酸カルシウム法により導入し、その培養上清を用いた）、20% KSR（GIBCO社製）、1×NEAA（GIBCO社製）、2-メルカプトエタノール（GIBCO社製）、GlutaMax（GIBCO社製）を含むDMEMに置き換え、その後は、1日おきに培地交換を行った。

〔ウイルス液〕

(1) Oct3/4 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μ L、Sox2 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μ L、Klf4 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μ L、c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μ L、及び外来遺伝子不含有ウイルス液-2 600 μ L

(2) Oct3/4 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μ L、Sox2 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μ L、Klf4 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μ L、c-Myc 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μ L、Prdm14 遺伝子含有ウイルス液-1 200 μ L、Esrrb 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μ L、及びSal14a 遺伝子含有ウイルス液-2 200 μ L

[0119] ー人工多能性幹細胞ー

前記ウイルス感染後18日目の細胞、及びクローン化した細胞を倒立顕微鏡（Zeiss Axiovert 200M）で撮影した結果を図3Eから3Hに示した。

図3E及び3Fは、前記（1）のウイルス液を用いた場合の写真の一例であり、図3G及び3Hは、前記（2）のウイルス液を用いた場合の写真の一例である。図3Eから3H中、スケールバーは、200 μ mを表す。

前記（1）のウイルス液を用いて得られた人工多能性幹細胞は、コロニーの形態が扁平状であり、bFGF添加培地で増殖することができ、2i添加

培地では増殖できず、単一細胞に分散すると死んでしまう細胞であり、プライム型人工多能性幹細胞であることがわかった。

一方、前記(2)のウイルス液を用いて得られた人工多能性幹細胞は、コロニーの形態がドーム状であり、bFGFを含まないLIF添加培地で増殖することができ、2i添加培地で増殖することができ、単一細胞に分散して継代することができる細胞であり、ナイーブ型人工多能性幹細胞であることがわかった。

したがって、Prdm14遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSal14a遺伝子乃至その遺伝子産物を用いることにより、高品質の人工多能性幹細胞を製造することができることが示された。

[0120] 本発明の人工多能性幹細胞の製造方法によれば、人工多能性幹細胞を高効率で製造することができるので、少数の体細胞からの人工多能性幹細胞の樹立が可能となり、また、希少な細胞や組織の採取量を軽減することができると考えられる。更に、非人工多能性幹細胞の増殖を抑え、人工多能性幹細胞を選択的に増やすことが可能であるため、人工多能性幹細胞クローンの樹立が容易になると考えられる。

また、本発明の人工多能性幹細胞の製造方法によれば、人工多能性幹細胞を短時間で製造することができるので、早期に細胞移植が必要な脊髄損傷などの疾患への自己由来の人工多能性幹細胞の利用を可能とし、また、長期間の人工多能性幹細胞誘導過程によるゲノム損傷リスクを軽減したり、一過性の遺伝子導入による人工多能性幹細胞の作製方法を容易にしたりするなど、安全な人工多能性幹細胞の作製が可能となると考えられる。

更に、本発明の人工多能性幹細胞の製造方法によれば、人工多能性幹細胞を効率良く短時間で製造することができるので、従来の方法と比べてコストを軽減することができる。

また、本発明の人工多能性幹細胞の製造方法によれば、ヒト細胞の場合でもナイーブ型の人工多能性幹細胞を製造することができるので、人工多能性

幹細胞の取扱いを簡便化することができ、分化誘導効率を向上させることができると考えられる。

[0121] 本発明の態様としては、例えば、以下のものなどが挙げられる。

<1> (A) Oct 3 / 4 遺伝子乃至その遺伝子産物と、

(B) Sox 2 遺伝子乃至その遺伝子産物と、

(C) Klf 4 遺伝子乃至その遺伝子産物と、

(D) c-Myc 遺伝子乃至その遺伝子産物と、

(E) Jarid 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、Prdm 14 遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSal 14 a 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種とを体細胞に導入する工程を含み、

前記 Jarid 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物が、Jarid 2 タンパク質のN末端の1番目から551番目のアミノ酸をコードする遺伝子乃至その遺伝子産物であることを特徴とする人工多能性幹細胞の製造方法である。

<2> (E) Jarid 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、Prdm 14 遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSal 14 a 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種が、Jarid 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物を含む前記<1>に記載の人工多能性幹細胞の製造方法である。

<3> (E) Jarid 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、Prdm 14 遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSal 14 a 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種が、更に、Prdm 14 遺伝子乃至その遺伝子産物、Esrrb 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSal 14 a 遺伝子乃至その遺伝子産物を含む前記<2>に記載の人工多能性幹細胞の製造方法である。

<4> c-Myc 遺伝子と、Jarid 2 変異体遺伝子とが共発現される前記<2>から<3>のいずれかに記載の人工多能性幹細胞の製造方法で

ある。

<5> (E) *Jarid2* 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、*Prdm14* 遺伝子乃至その遺伝子産物、*Esrrb* 遺伝子乃至その遺伝子産物、及び *Sall4a* 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種が、*Prdm14* 遺伝子乃至その遺伝子産物、*Esrrb* 遺伝子乃至その遺伝子産物、及び *Sall4a* 遺伝子乃至その遺伝子産物を含む前記<1>に記載の人工多能性幹細胞の製造方法である。

<6> 人工多能性幹細胞が、ナイーブ型である前記<1>から<5>のいずれかに記載の人工多能性幹細胞の製造方法である。

<7> 人工多能性幹細胞が、ヒト人工多能性幹細胞である前記<1>から<6>のいずれかに記載の人工多能性幹細胞の製造方法である。

<8> *Jarid2* 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、*Prdm14* 遺伝子乃至その遺伝子産物、*Esrrb* 遺伝子乃至その遺伝子産物、及び *Sall4a* 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種を含み、

前記 *Jarid2* 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物が、*Jarid2* タンパク質のN末端の1番目から551番目のアミノ酸をコードする遺伝子乃至その遺伝子産物であることを特徴とする人工多能性幹細胞製造用組成物である。

<9> *Jarid2* 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、*Prdm14* 遺伝子乃至その遺伝子産物、*Esrrb* 遺伝子乃至その遺伝子産物、及び *Sall4a* 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種が、*Jarid2* 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物を含む前記<8>に記載の人工多能性幹細胞製造用組成物である。

<10> *Jarid2* 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、*Prdm14* 遺伝子乃至その遺伝子産物、*Esrrb* 遺伝子乃至その遺伝子産物、及び *Sall4a* 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種が、更に、*Prdm14* 遺伝子乃至その遺伝子産物、*Esrrb* 遺伝子

乃至その遺伝子産物、及びS a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物を含む前記<9>に記載の人工多能性幹細胞製造用組成物である。

<11> J a r i d 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、P r d m 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、E s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びS a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種が、P r d m 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、E s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びS a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物を含む前記<8>に記載の人工多能性幹細胞製造用組成物である。

<12> 更に、O c t 3 / 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、S o x 2 遺伝子乃至その遺伝子産物、K l f 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びc - M y c 遺伝子乃至その遺伝子産物を含む前記<8>から<11>のいずれかに記載の人工多能性幹細胞製造用組成物である。

<13> c - M y c 遺伝子と、J a r i d 2 変異体遺伝子とが共発現される前記<12>に記載の人工多能性幹細胞製造用組成物である。

産業上の利用可能性

[0122] 本発明の人工多能性幹細胞の製造方法によれば、製造効率に優れ、短期間で製造することができ、品質面にも優れた人工多能性幹細胞を製造することができるので、細胞移植治療などの再生医療、薬剤スクリーニング、疾患の原因解明のためのツールなどとして用いる人工多能性幹細胞の製造方法に好適に利用可能である。

請求の範囲

- [請求項1] (A) Oct 3 / 4 遺伝子乃至その遺伝子産物と、
(B) Sox 2 遺伝子乃至その遺伝子産物と、
(C) Klf 4 遺伝子乃至その遺伝子産物と、
(D) c-Myc 遺伝子乃至その遺伝子産物と、
(E) Jarid 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、 Prdm 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、 Esrrb 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSal 1 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種とを体細胞に導入する工程を含み、
前記 Jarid 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物が、 Jarid 2 タンパク質のN末端の1番目から551番目のアミノ酸をコードする遺伝子乃至その遺伝子産物であることを特徴とする人工多能性幹細胞の製造方法。
- [請求項2] (E) Jarid 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、 Prdm 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、 Esrrb 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSal 1 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種が、 Jarid 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物を含む請求項1に記載の人工多能性幹細胞の製造方法。
- [請求項3] (E) Jarid 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、 Prdm 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、 Esrrb 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSal 1 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種が、更に、 Prdm 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、 Esrrb 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びSal 1 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物を含む請求項2に記載の人工多能性幹細胞の製造方法。
- [請求項4] c-Myc 遺伝子と、 Jarid 2 変異体遺伝子とが共発現される請求項2から3のいずれかに記載の人工多能性幹細胞の製造方法。
- [請求項5] (E) Jarid 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、 Prdm 1

4 遺伝子乃至その遺伝子産物、E s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びS a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種が、P r d m 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、E s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びS a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物を含む請求項1に記載の人工多能性幹細胞の製造方法。

[請求項6] 人工多能性幹細胞が、ナイーブ型である請求項1から5のいずれかに記載の人工多能性幹細胞の製造方法。

[請求項7] 人工多能性幹細胞が、ヒト人工多能性幹細胞である請求項1から6のいずれかに記載の人工多能性幹細胞の製造方法。

[請求項8] J a r i d 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、P r d m 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、E s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びS a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種を含み、

前記J a r i d 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物が、J a r i d 2 タンパク質のN末端の1番目から551番目のアミノ酸をコードする遺伝子乃至その遺伝子産物であることを特徴とする人工多能性幹細胞製造用組成物。

[請求項9] J a r i d 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、P r d m 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、E s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びS a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種が、J a r i d 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物を含む請求項8に記載の人工多能性幹細胞製造用組成物。

[請求項10] J a r i d 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、P r d m 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、E s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びS a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種が、更に、P r d m 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、E s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物、及びS a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物を含む請求項9に記載の人工多能性幹細胞製造用組成物

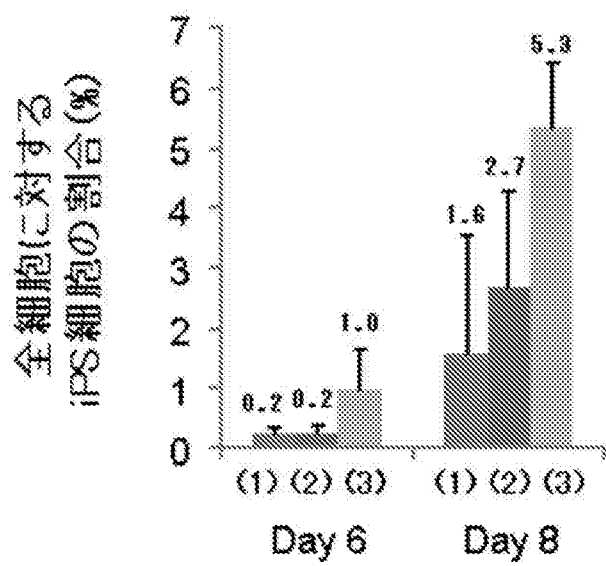
。

[請求項11] J a r i d 2 変異体遺伝子乃至その遺伝子産物、P r d m 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、E s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物、及び S a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物からなる群から選択される少なくとも1種が、P r d m 1 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、E s r r b 遺伝子乃至その遺伝子産物、及び S a l l 4 a 遺伝子乃至その遺伝子産物を含む請求項8に記載の人工多能性幹細胞製造用組成物。

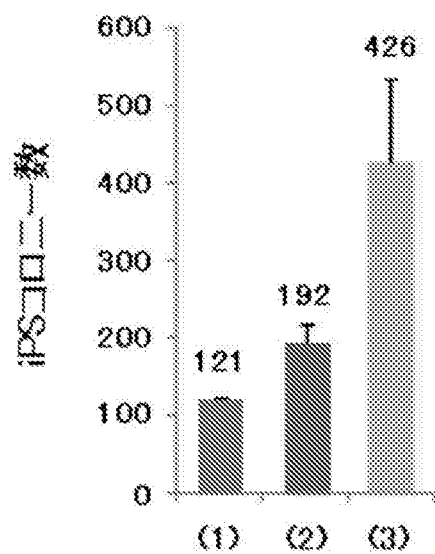
[請求項12] 更に、O c t 3 / 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、S o x 2 遺伝子乃至その遺伝子産物、K l f 4 遺伝子乃至その遺伝子産物、及び c - M y c 遺伝子乃至その遺伝子産物を含む請求項8から11のいずれかに記載の人工多能性幹細胞製造用組成物。

[請求項13] c - M y c 遺伝子と、J a r i d 2 変異体遺伝子とが共発現される請求項12に記載の人工多能性幹細胞製造用組成物。

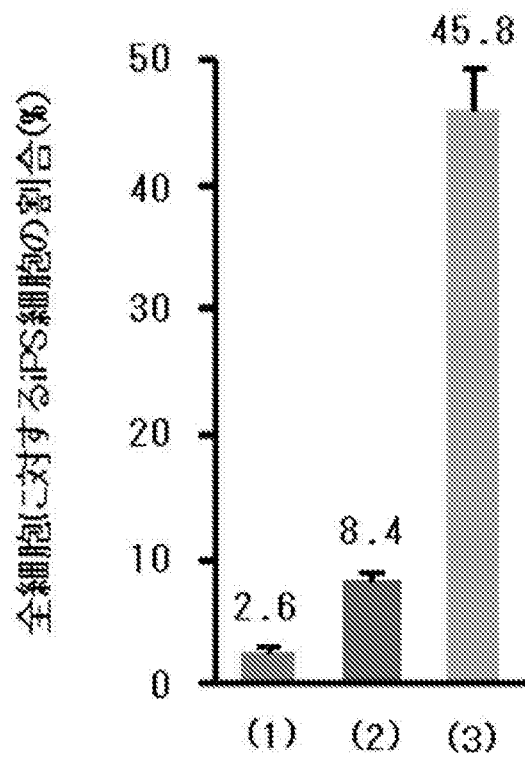
[図1-1]



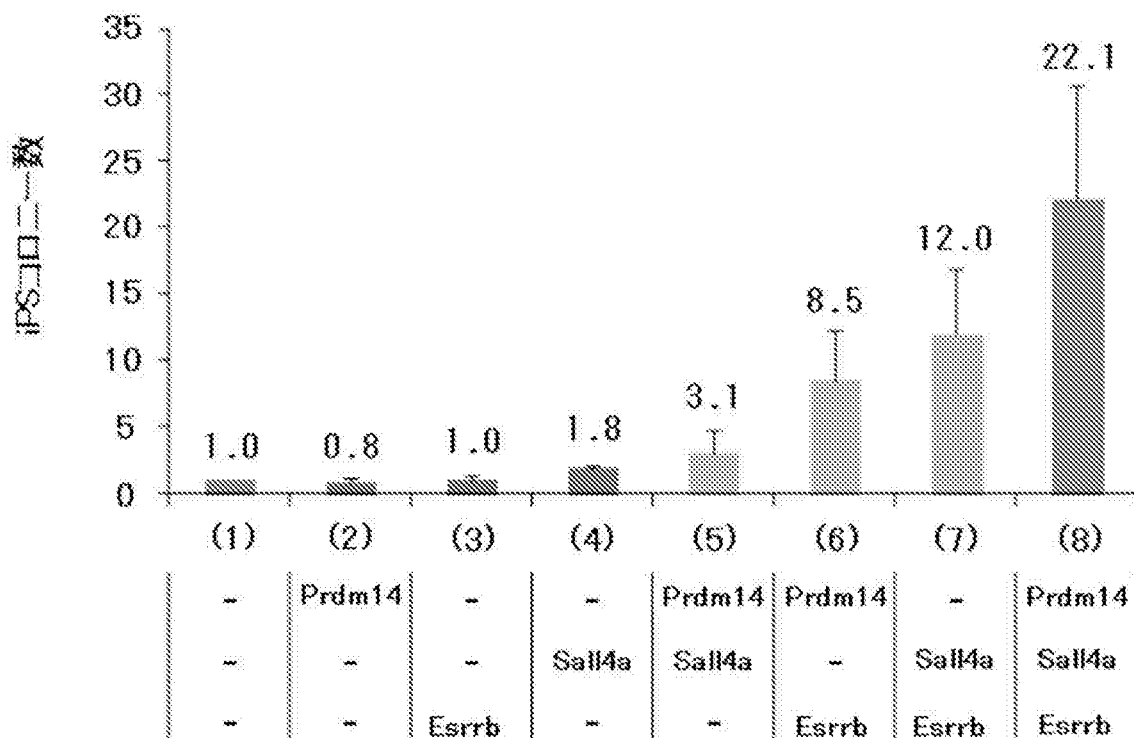
[図1-2]



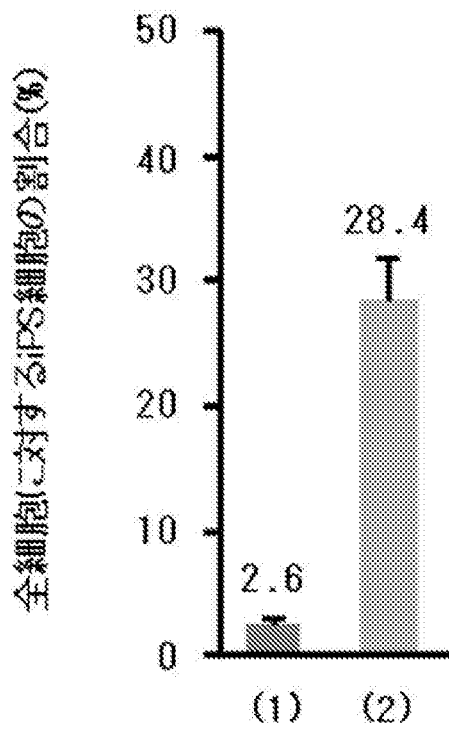
[図1-3]



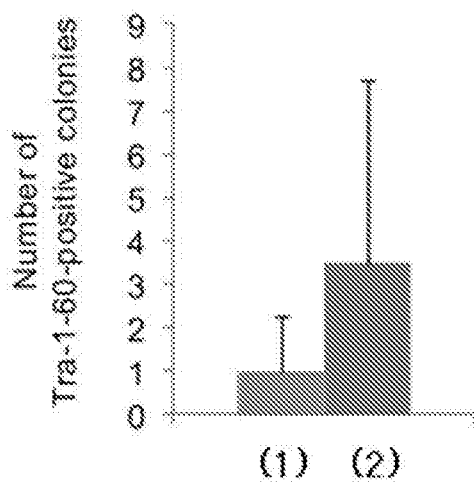
[図1-4]



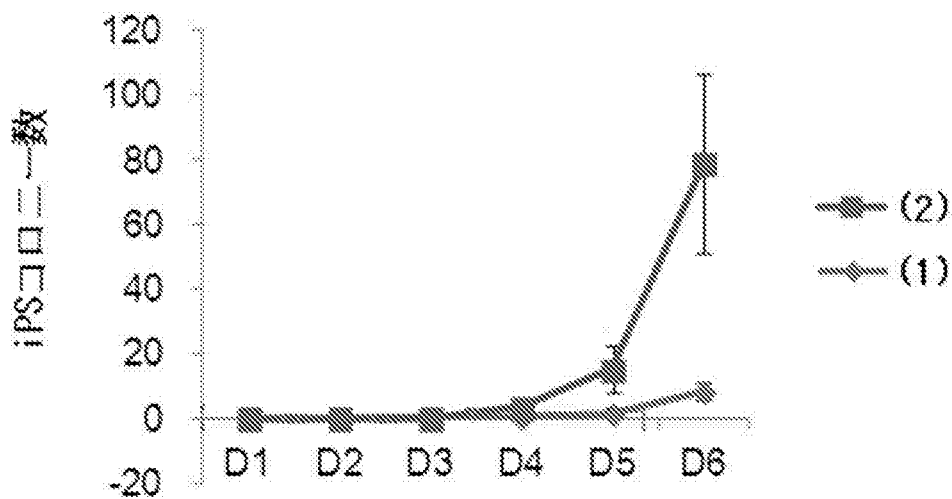
[図1-5]



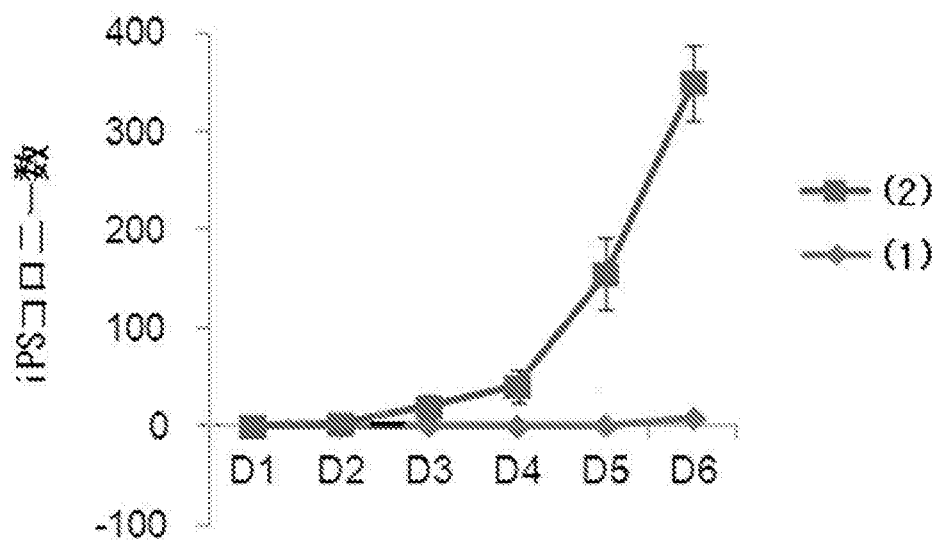
[図1-6]



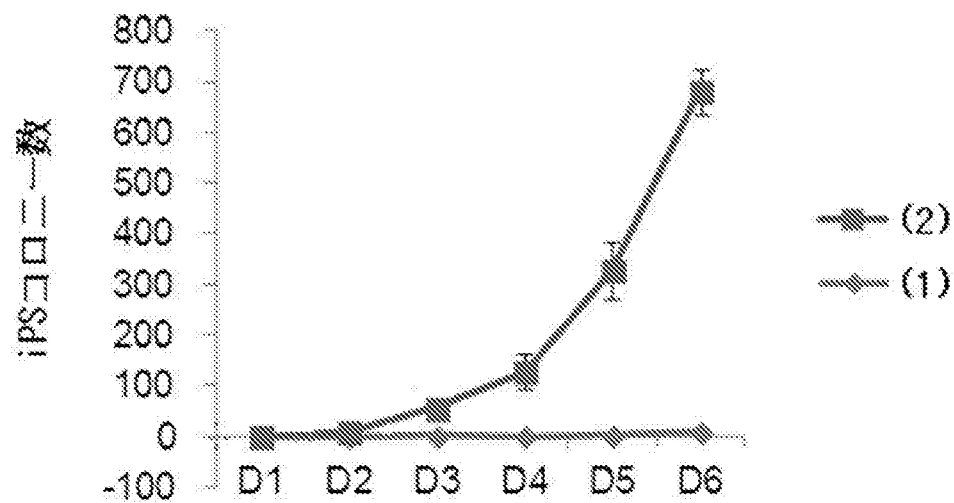
[図2-1]



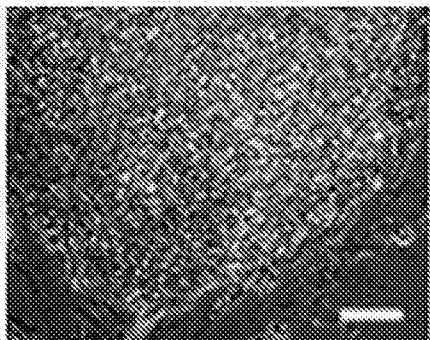
[図2-2]



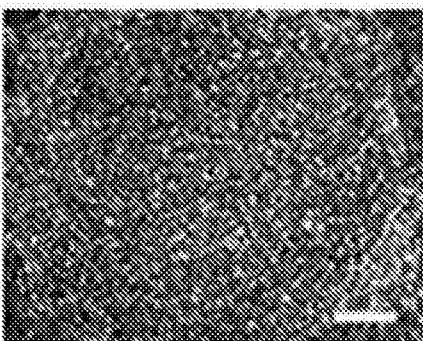
[図2-3]



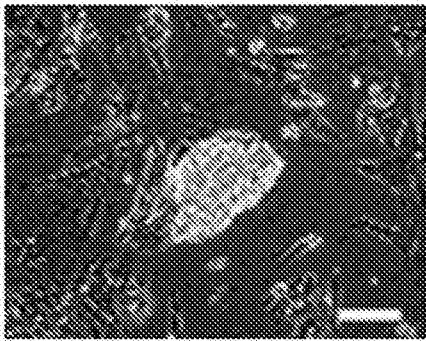
[図3A]



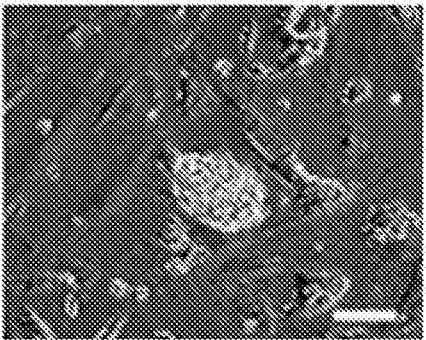
[図3B]



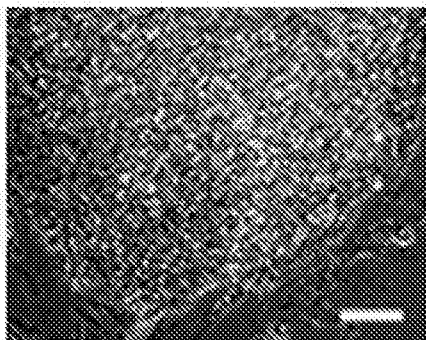
[図3C]



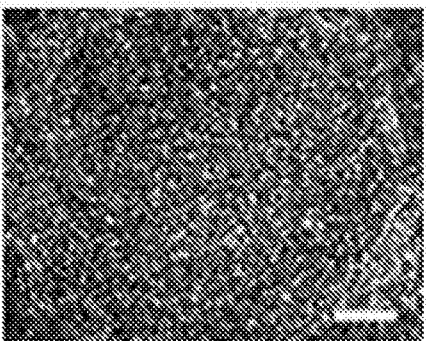
[図3D]



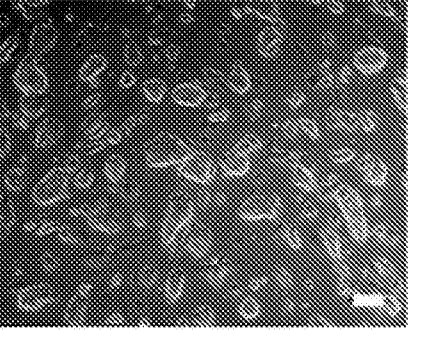
[図3E]




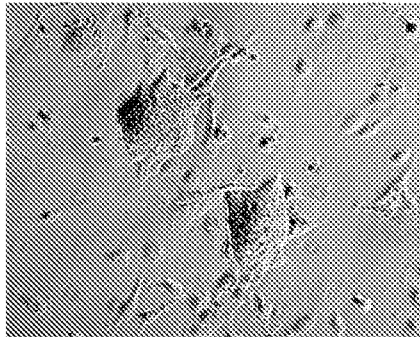
[図3F]



[図3G]



[3H]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/061378

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

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N15/09, C12N5/10

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

| | | | |
|---------------------------|-----------|----------------------------|-----------|
| Jitsuyo Shinan Koho | 1922-1996 | Jitsuyo Shinan Toroku Koho | 1996-2014 |
| Kokai Jitsuyo Shinan Koho | 1971-2014 | Toroku Jitsuyo Shinan Koho | 1994-2014 |

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-------------------------|
| X/Y | ZHANG Z., et al., PRC2 complexes with JARID2, MTF2, and esPRC2p48 in ES cells to modulate ES cell pluripotency and somatic cell reprogramming, Stem Cells, 2011.02, Vol.29, No.2, p.229-240, fig. 5A, B | 1-2, 4, 6-9, 12-13/1-13 |
| X/Y | CHIA N.Y., et al., A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity, Nature, 2010.11.11, Vol.468, No.7321, p.316-320, abstract, fig. 3a | 1, 6-8, 12/1-13 |
| X/Y | FENG B., et al., Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb, Nat. Cell. Biol., 2009.02, Vol.11, No.2, p.197-203, fig. S1 | 1, 6-8, 12/1-13 |

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

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "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 |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "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 |
| "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date | "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 |
| "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) | "&" document member of the same patent family |
| "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 | |

| | |
|---|--|
| Date of the actual completion of the international search 01 July, 2014 (01.07.14) | Date of mailing of the international search report 22 July, 2014 (22.07.14) |
|---|--|

| | |
|--|--------------------|
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/061378

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X/Y | WO 2009/057831 A1 (Kyoto University), 07 May 2009 (07.05.2009), examples 21 to 24; fig. 32 to 34 & US 2009/0047263 A1 & EP 2096169 A1 & JP 2008-283972 A | 1, 6-8, 12/ 1-13 |
| X/Y | TSUBOOKA N., et al., Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts, Genes Cells, 2009.06, Vol.14, No.6, p.683-694, abstract, fig. 4 to 5 | 1, 6-8, 12/ 1-13 |
| Y | YAMAJI M., et al., PRDM14 ensures naive pluripotency through dual regulation of signaling and epigenetic pathways in mouse embryonic stem cells, Cell Stem Cell, 2013.03.07, Vol.12, No.3, p.368-382, abstract | 1-13 |
| Y | GILLICH A., et al., Epiblast stem cell-based system reveals reprogramming synergy of germline factors, Cell Stem Cell, 2012.04.06, Vol.10, No.4, p.425-439, abstract, fig. 4 | 1-13 |
| P,X | Hiroyoshi ISEKI et al., "Jarid2 wa Mouse Oyobi Hito iPS Saibo Yudo o Sokushin suru", Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan Program Yoshishu, 20 November 2013 (20.11.2013), vol.36th, 3P-0650 | 1-13 |
| A | TAKAHASHI K. and YAMANAKA S., Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, Cell, 2006.08.25, Vol.126, No.4, p.663-676, table S1 | 1-13 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

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

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

| | |
|-------------|------------|
| 日本国実用新案公報 | 1922-1996年 |
| 日本国公開実用新案公報 | 1971-2014年 |
| 日本国実用新案登録公報 | 1996-2014年 |
| 日本国登録実用新案公報 | 1994-2014年 |

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

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
|-----------------|---|--------------------------------|
| X/ Y | ZHANG Z., et al., PRC2 complexes with JARID2, MTF2, and esPRC2p48 in ES cells to modulate ES cell pluripotency and somatic cell reprogramming, Stem Cells, 2011.02, Vol.29, No.2, p.229-240, 図 5A, B | 1-2, 4, 6-9, 12-13/ 1-13 |
| X/ Y | CHIA N.Y., et al., A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity, Nature, 2010.11.11, Vol.468, No.7321, p.316-320, 要約, 図 3a | 1, 6-8, 12/ 1-13 |

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.07.2014

国際調査報告の発送日

22.07.2014

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小金井 悟

4 N

3 9 6 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|---------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求項の番号 |
| X/ Y | FENG B., et al., Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb, Nat. Cell. Biol., 2009.02, Vol.11, No.2, p.197-203, 図 S1 | 1, 6-8, 12/ 1-13 |
| X/ Y | WO 2009/057831 A1 (国立大学法人京都大学) 2009.05.07, 例 21-24, 図 32-34 & US 2009/0047263 A1 & EP 2096169 A1 & JP 2008-283972 A | 1, 6-8, 12/ 1-13 |
| X/ Y | TSUBOOKA N., et al., Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts, Genes Cells, 2009.06, Vol.14, No.6, p.683-694, 要約, 図 4-5 | 1, 6-8, 12/ 1-13 |
| Y | YAMAJI M., et al., PRDM14 ensures naive pluripotency through dual regulation of signaling and epigenetic pathways in mouse embryonic stem cells, Cell Stem Cell, 2013.03.07, Vol.12, No.3, p.368-382, 要約 | 1-13 |
| Y | GILLICH A., et al., Epiblast stem cell-based system reveals reprogramming synergy of germline factors, Cell Stem Cell, 2012.04.06, Vol.10, No.4, p.425-439, 要約, 図 4 | 1-13 |
| P, X | 伊関大敬, 外, Jarid2 はマウスおよびヒト iPS 細胞誘導を促進する, 日本分子生物学会年会プログラム・要旨集, 2013.11.20, Vol.36th, 3P-0650 | 1-13 |
| A | TAKAHASHI K. and YAMANAKA S., Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, Cell, 2006.08.25, Vol.126, No.4, p.663-676, 表 S1 | 1-13 |