

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2011年8月25日(25.08.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/102333 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/00 (2006.01) C12N 5/0789 (2010.01)
A61L 27/00 (2006.01)
 - (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/053110
 - (22) 国際出願日: 2011年2月15日(15.02.2011)
 - (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 2010-030830 2010年2月16日(16.02.2010) JP
 - (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 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; および
 - (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 菱田 友昭 (HISHIDA, Tomoaki) [JP/JP]; 〒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) [JP/JP]; 〒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). 加藤 英政(KATO, Hidemasa) [JP/JP]; 〒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: 南条 雅裕, 外(NANJO, Masahiro et al.); 〒1070052 東京都港区赤坂9-7-2-1416 東京ACTi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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
 - (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCTION OF ARTIFICIAL PLURIPOTENT STEM CELL

(54) 発明の名称: 人工多能性幹細胞の製造方法

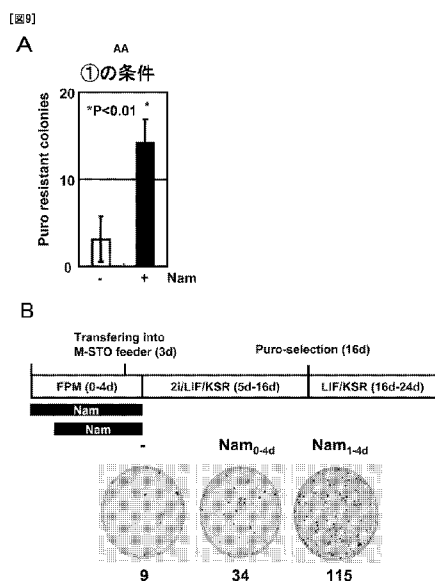


FIG. 9:
AA CONDITION 1

(57) Abstract: Disclosed is a method for producing an iPS cell having a very similar gene expression pattern to that of an ES cell with high efficiency. Specifically disclosed is a method for producing an artificial pluripotent stem cell (an iPS cell), which comprises the steps of: introducing a pluripotency-inducing factor comprising at least a Myc family gene or an Myc family protein into a somatic cell; and culturing the somatic cell in the presence of a sirtuin inhibitor and/or a poly-ADP ribose polymerase (PARP) inhibitor.

(57) 要約: 【課題】本発明は、ES細胞と遺伝子発現パターンがよく類似したiPS細胞を効率的に製造する方法を提供することを目的とする。【解決手段】本発明は、少なくともMycファミリー遺伝子又はMycファミリータンパク質を含む多能性誘導因子を体細胞に導入する工程と、サーチユイン阻害剤及び/又はポリADPリボースポリメラーゼ(PARP)阻害剤の存在下で前記体細胞を培養する工程と、を含む人工多能性幹細胞(iPS細胞)の製造方法を提供する。

明 細 書

発明の名称：人工多能性幹細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、真の人工多能性幹細胞を製造する方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、再生医療等に供することを目的として、多能性、即ち個体を構成するあらゆる細胞に分化し得る能力を有する細胞の研究が進められている。多能性を有する細胞として、初期胚から得られる胚性幹細胞（ES細胞）がある。ES細胞は、理論上すべての組織に分化する多能性を維持したまま、ほぼ無限に増殖させることができる。

[0003] しかしながら、ES細胞を再生医療に利用する場合、他人の受精卵から作られたものを患者に移植することになるため、拒絶反応が惹起され得る。また、ヒトの胚を破壊して樹立するため、倫理的な問題がある。そこで、いったん特定の細胞に分化した体細胞を脱分化させ、ES細胞に匹敵する多能性を獲得させるリプログラミング技術が求められていた。

[0004] 近年、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycなどの多能性誘導因子を体細胞に導入し強制的に発現させることにより、ES細胞とほぼ同等の自己増殖性と分化多能性を有する人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell；iPS細胞）を作製する技術が開発された（例えば、非特許文献1～3を参照）。非特許文献1及び2に記載の方法では、多能性誘導因子として、Oct3/4、Sox2、c-Myc、及びKlf4の4つを導入し、マウス胚性繊維芽細胞及びヒトの成熟した皮膚細胞からiPS細胞を得ている。一方、非特許文献3の方法では、多能性誘導因子として、Oct4、Sox2、Nanog、及びLin28の4つを導入し、ヒトの皮膚細胞からiPS細胞を得ている。

[0005] iPS細胞は、患者自身の体細胞から作製することができるので、これを培養して必要な細胞や組織、臓器を製造すれば、免疫拒絶の問題を生じることなく患者に移植できる。また、ES細胞の実用化において障害となっていた倫理

的な問題も解消できるものと期待されている。

[0006] iPS細胞がリプログラミングされたこと、即ち多能性を回復したことを判断する手段として、ES細胞特異的に発現する遺伝子が発現するか否か確認する方法がある。

Silvaらが、比較的リプログラミングされやすい神経幹細胞に、Oct4、Sox2、c-Myc、Klf4の4つの多能性誘導因子をレトロウイルスによって導入したところ、3日後にはES細胞に似た外観を呈するようになり、さらに2日後には、ES細胞様の細胞でプレートがコンフルエントになり継代が必要となった。しかしながら、これらの細胞において、Fgf4、Rex1、Nanog、内因性Oct4の4つのES細胞マーカーの発現を転写レベルで確認したところ、いずれも発現はしていたものの、ES細胞に比較すると発現レベルは低いことを見出した。また、免疫染色により、Nanogタンパク質は一部の細胞でしか発現していないことを確認した（非特許文献4を参照）。

[0007] このように、従来の方法で作製したiPS細胞は、リプログラミングが不十分と判断される細胞コロニー（以下、「partial iPS細胞」という。）が多く含まれるため、真のiPS細胞を得るためには、数多くの細胞コロニーからスクリーニングする必要がある。しかしながら、現在の技術水準では、真のiPS細胞のみならず、partial iPS細胞の樹立効率も極めて低いため、多数のコロニーを得てスクリーニングをすることも困難である。

[0008] 最近、複数の研究室から、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycの4つの多能性誘導因子を導入した細胞に、癌抑制遺伝子のp53に対するshRNAを導入することにより、iPS細胞の誘導効率が上昇することが報告された（非特許文献5及び6を参照）。しかしながら、この方法で得られるiPS細胞は、腫瘍産生に最も抑制的に働くp53遺伝子がノックダウンされていることから、移植後の腫瘍化の危険性が高い可能性が高く、実用化は難しいものと考えられる。

[0009] また、Valproic acid等、様々な薬剤がiPS細胞誘導の効率を上昇させることも報告されている（非特許文献7及び8を参照）。しかしながら、これらの薬剤は、細胞内で極めて広い分子群に作用することが予想され、移植に用

いるためには、これらの薬剤を用いたことによる副作用などについて詳細な検討が必要であると考えられる。

- [0010] 一方、従来の方法では、上記多能性誘導因子はウイルスベクターを用いて細胞に導入される。当該方法では、癌原遺伝子であるc-Myc遺伝子が宿主DNAに取り込まれる結果、細胞内で再活性化される可能性が高い。そこで、c-Myc遺伝子をプラスミドベクターや非挿入型組換えウイルスベクターで導入する方法によって、あるいは、タンパク質を細胞に直接導入する方法によってiPS細胞を誘導することも提案されている。これらの方法によれば、c-Myc遺伝子が宿主のゲノムに取り込まれず、癌原性を抑制することができる。しかしながら、これらの方法では、iPS細胞誘導の効率が著しく低下するという問題があった（非特許文献9～11を参照）。

先行技術文献

非特許文献

- [0011] 非特許文献1：Takahashi K, Yamanaka S. (2006) Cell 126: 663-676.
非特許文献2：Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. (2007) Cell 131: 861-872.
非特許文献3：Yu J, et al. (2007) Science 318: 1917-1920.
非特許文献4：Silva J. et al. (2008) PLoS Biology 6(10): e253
非特許文献5：Kawamura T, et al. (2009) nature 460: 1140-1144.
非特許文献6：Hong H, et al. (2009) nature 460: 1132-1135.
非特許文献7：Huangfu D, et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26:795-797.
非特許文献8：Shi Y, et al. (2008) Cell Stem Cell 3: 568-574.
非特許文献9：Okita K, et al. (2008) Science. 322:949-953.
非特許文献10：Stadtfield M, et al. (2008) Science 322: 945-949.
非特許文献11：Zhou H, et al. (2009) Cell Stem Cell 4: 381-384.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明は、ES細胞と遺伝子発現パターンがよく類似したiPS細胞を効率的に製造する方法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

[0013] 本発明者らは、上記課題を解決するために研究を重ねた結果、多能性誘導因子を導入した体細胞をニコチンアミドの存在下で培養すると、誘導効率が著しく上昇すること；当該効果は、多能性誘導因子としてMycファミリーを含む場合に得られること；ニコチンアミドはサーチュイン又はポリADPリボースポリメラーゼの機能を抑制することによってiPS細胞の誘導効率を上昇させていること；ニコチンアミド処理は、多能性誘導因子を体細胞に導入してから数日以内、即ち誘導初期に行うことが望ましいこと、を見出した。

さらに、これらの方法に、従来、partial iPS細胞を真のiPS細胞に転換することが知られる2i法 (Silva, J. et al. (2008) PLoS Biology 6(10): e253) を組み合わせたところ、真のiPS細胞の誘導効率を飛躍的に上昇させることを見出した。

また、2i法を行う場合、多能性誘導因子を体細胞に導入してから、MEK阻害剤及びGSK-3 β 阻害剤による処理を開始するまでの時間を、所定の日数より長くすることによって、真のiPS細胞への転換効率を上昇させられることを確認した。

即ち、本発明は、

〔1〕少なくともMycファミリー遺伝子又はMycファミリータンパク質を含む多能性誘導因子を体細胞に導入する工程と、サーチュイン阻害剤及び/又はポリADPリボースポリメラーゼ (PARP) 阻害剤の存在下で前記体細胞を培養する工程と、を含む人工多能性幹細胞 (iPS細胞) の製造方法；

〔2〕前記サーチュイン阻害剤及び/又はPARP阻害剤の存在下で前記体細胞を培養する工程は、前記多能性誘導因子を体細胞に導入する工程を行った日を0日目として、10日目未満で終了する、上記〔1〕に記載の方法；

〔3〕前記サーチュイン阻害剤及び/又はPARP阻害剤の存在下で前記体細胞を培養する工程は、前記多能性誘導因子を体細胞に導入する工程を行った日

を0日目として、1日目以降に開始する、上記〔1〕又は〔2〕に記載の方法；

〔4〕前記サーチュイン阻害剤及び／又はPARP阻害剤が、ニコチンアミドである、上記〔1〕から〔3〕のいずれか1項に記載の方法；

〔5〕前記サーチュイン阻害剤及び／又はPARP阻害剤の存在下で前記体細胞を培養する工程は、前記ニコチンアミドを1mM～10mMの濃度で前記体細胞の培地に添加することを含む、上記〔4〕に記載の方法；

〔6〕前記サーチュイン阻害剤及び／又はPARP阻害剤の存在下で前記体細胞を培養する工程の後、GSK-3阻害剤及びMEK阻害剤の存在下で前記体細胞をさらに培養する工程を含む、上記〔1〕から〔5〕のいずれか1項に記載の方法；

〔7〕前記GSK-3阻害剤及びMEK阻害剤の存在下で前記体細胞をさらに培養する工程は、前記多能性誘導因子を体細胞に導入する工程を行った日を0日目として、5日目以降に開始する、上記〔6〕に記載の方法；

〔8〕前記Mycファミリー遺伝子又はMycファミリータンパク質が、c-Myc遺伝子若しくはL-Myc遺伝子、又はc-Mycタンパク質若しくはL-Mycタンパク質である、上記〔1〕～〔7〕に記載の方法；

〔9〕前記多能性誘導因子が、Oct3/4遺伝子、Klf4遺伝子、Sox2遺伝子、Nanog遺伝子及びLin28遺伝子からなる群より選択される1以上の遺伝子をさらに含む、上記〔1〕から〔8〕のいずれか1項に記載の方法；

〔10〕多能性誘導因子を体細胞に導入する工程と、GSK-3阻害剤及びMEK阻害剤の存在下で前記体細胞をさらに培養する工程と、を含み、前記GSK-3阻害剤及びMEK阻害剤の存在下で前記体細胞をさらに培養する工程は、前記多能性誘導因子を体細胞に導入する工程を行った日を0日目として、5日目以降に開始する、人工多能性幹細胞（iPS細胞）の製造方法；

〔11〕前記多能性誘導因子が、Oct3/4遺伝子、Klf4遺伝子、Sox2遺伝子、c-Myc遺伝子、L-Myc遺伝子、Nanog遺伝子、及びLin28遺伝子からなる群より選択される1以上の遺伝子である、上記〔10〕に記載の方法；

〔12〕前記人工多能性幹細胞（iPS細胞）が、マウス又はヒト由来の細胞である〔1〕～〔11〕に記載の方法；

〔13〕上記〔1〕から〔12〕のいずれか1項に記載の方法で製造された人工多能性幹細胞（iPS細胞）；及び

〔14〕サーチェイン阻害剤又はポリADPリボースポリメラーゼ（PARP）阻害剤と、GSK-3阻害剤と、MEK阻害剤と、を含む人工多能性幹細胞（iPS細胞）の培養キット、

に関する。

発明の効果

[0014] 本発明のiPS細胞の製造方法によれば、ES細胞と遺伝子発現パターンがよく類似した真のiPS細胞を効率よく得ることができる。

サーチェイン阻害剤及び／又はPARP1阻害剤としてビタミンの一種であるニコチンアミドを用いれば、細胞に対する副作用が極めて低く、移植しても安全なiPS細胞を得ることができる。また、ニコチンアミドは安価なので、実用化しやすい。

さらに、ニコチンアミドと2i法を組み合わせた方法によると、真のiPS細胞の産生率をより一層上昇させることができ、スクリーニングの必要性を低下させることができる。また、誘導速度も著しく改善されるので、誘導効率を上昇させるために用いられる他種由来のフィーダー細胞の使用を控えることができ、iPS細胞の安全性をさらに高めることができるものと考えられる。

図面の簡単な説明

[0015] [図1] 図1は、ニコチンアミド存在下でマウスiPS細胞を誘導した結果を示す。Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycの4因子を導入した細胞（4F(c-Myc)）では、iPS細胞の誘導効率が著しく上昇したが（図1A、B）、c-Mycを除く3因子を導入した細胞（3F）では、誘導効率の改善は見られなかった（図1C）。

[図2] 図2は、ニコチンアミド存在下及び非存在下で誘導したマウスiPS細胞のGFP検出の結果を示す。ピューロマイシンによる選択の前（上段）は、緑色が薄く、partial iPS細胞が多く含まれることを示す。

[図3] 図3は、ニコチンアミドの投与時期を変えて、マウスiPS細胞誘導への影響を確認した結果である。誘導効率は、誘導初期にニコチンアミド存在下で培養することによって著しく上昇することが確認された。

[図4] 図4は、誘導初期にニコチンアミド存在下又は非存在下で培養したときの、誘導4日目の様子を示す写真である。ニコチンアミド存在下で培養すると、4日目で既にマウスiPS細胞様コロニーが観察された。

[図5] 図5は、図4のそれぞれの場合において細胞数とAP陽性コロニー数を計測した結果である。ニコチンアミド処理群では、細胞数の増加、並びにAP陽性コロニー数の顕著な増加が認められた。

[図6] 図6は、サーチュインを活性化するレズベラトロール存在下でマウスiPS細胞を誘導した結果を示す。誘導初期にレズベラトロール存在下で培養すると、誘導効率は著しく低下した。

[図7] 図7は、ニコチンアミド処理後又は非処理後において、2i法を行ってマウスiPS細胞を誘導した結果を示す。ニコチンアミド処理と2i法を組み合わせることにより、真のiPS細胞の誘導効率が著しく上昇することが確認された（図7D）。

[図8] 図8は、2i法を開始する時期を変えて、マウスiPS細胞誘導への影響を確認した結果である。誘導後13日目に開始した場合に最も誘導効率が高いことがわかった。

[図9] 図9は、ニコチンアミド処理後に2i法を行って、iPS細胞誘導への影響を確認した結果である。2つの方法を組み合わせると、従来法に比較して約10倍の誘導効率を得られることがわかった。また、ニコチンアミドを誘導後0日目から加えた場合に比較して、1日目から加えると誘導効率が3倍以上増加することが確認された（図9Aおよび9B）。

[図10] 図10は、ニコチンアミド存在下又は非存在下でヒトiPS細胞を誘導した結果を示す。Mycファミリー遺伝子として、c-MycおよびL-Mycのいずれを用いた際にも、iPS細胞の誘導効率が上昇した。

発明を実施するための形態

[0016] 以下、本発明の実施形態を説明する。

(iPS細胞の製造方法の第一の態様)

本発明のiPS細胞の製造方法の第一の態様は、少なくともMycファミリー遺伝子又はMycファミリータンパク質を含む多能性誘導因子を体細胞に導入する工程と、体細胞をサーチェイン阻害剤及び／又はポリADPリボースポリメラーゼ (PARP) 阻害剤の存在下で培養する工程とを含むことを特徴とする。

[0017] (多能性誘導因子の導入工程)

本明細書において、用語「iPS細胞」は、その最も広い意味で用いられ、体細胞に多能性誘導因子を導入することにより、所望の細胞への分化能と所望の自己増殖性を獲得した細胞を意味するものとする。iPS細胞の分化多能性と自己増殖性はES細胞とほぼ同等であることが好ましいが、それ以下であっても、所望の細胞への分化能と所望の自己増殖性を有する限り、本発明においてはiPS細胞に含まれる。

なお、本明細書においては、体細胞に多能性誘導因子を導入して得られたすべての細胞をiPS細胞と呼ぶ場合もある。この場合、iPS細胞には、リプログラミングが不十分なpartial iPS細胞が含まれる。partial iPS細胞と、リプログラミングが十分な状態のiPS細胞とを区別するために、後者を「真のiPS細胞」と呼ぶ場合があるが、これらは相対的な用語であって、絶対的な特定の状態を意味するものではない。

所定の目的を達成するのに十分なリプログラミング状態にあるiPS細胞は、真のiPS細胞とみなされる。例えば、所定の臓器を構成する細胞に分化させることが目的である場合、当該細胞への分化能を有するiPS細胞である限り、他のあらゆる細胞への分化能を有するものでなくても、本発明においては真のiPS細胞とみなされる。

[0018] ある細胞がiPS細胞であるか否かは、当業者が公知の方法に従って判定することができる。例えば、当該細胞が形態学的にES細胞に同等であることを確認してiPS細胞と判定することもできるし、公知の分化誘導方法を適用して当該細胞をin vitroで培養し、所望の細胞に分化できることを確認してiPS細胞

と判定してもよい。

当該細胞がマウス細胞の場合、受精卵に当該細胞を注入し、キメラマウスを作製できることを確認してiPS細胞であると判定してもよい。

また、当該細胞を免疫不全マウスの皮下に移植し、所定の期間経過後に形成される腫瘍組織を解析して、神経、皮膚、筋肉等様々な組織が混在する奇形腫（テラトーマ）であることを確認して、iPS細胞であると判定することもできる。

当該細胞においてES細胞で特異的に発現しているマーカー遺伝子等、未分化マーカーが発現していることを確認してiPS細胞であると判定してもよい。ES細胞で特異的に発現しているマーカー遺伝子としては、例えば、Fbx15、Nanog、Fgf4、Rex1、Oct4等が挙げられる。未分化マーカーとしては、アルカリフォスファターゼも挙げられ、アルカリフォスファターゼ染色が陽性となることを確認して、細胞が未分化状態であることを判定することもできる。

また、ゲノムワイドな遺伝子の発現パターンをマイクロアレイ等で検出し、ES細胞の発現パターンと相関の高いものをiPS細胞と判定してもよい。

細胞の表面抗原の発現特性をES細胞と比較し、相関の高いものをiPS細胞と判定することもできる。

さらに、当該細胞におけるDNAのメチル化を検出してES細胞と比較し、ES細胞との類似性を確認してもよい。

iPS細胞であるか否かの判定は、上記方法の少なくとも一つによって行うことができるが、2つ以上を組み合わせることもできる。例えば、形態がES細胞と同様であること、未分化マーカーの発現が認められること、*in vitro*で分化する能力を有していること、及びテラトーマ形成能を有することの4つをもってiPS細胞であると判定することが好ましい。また、これら4つに加え、胚盤胞に直接注入してキメラマウスを作製できるか否かを確認することがより好ましい。

[0019] ES細胞により近いiPS細胞を選択する具体的な例として、Nanog遺伝子の発現を指標とする方法が挙げられる (Okita et al., (2007) Nature 448, doi:

10. 1038/nature05934)。この方法では、Nanog遺伝子を中央に配置したバクテリア人工染色体 (Bacterial Artificial Chromosome: BAC) を単離し、緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein: GFP) 遺伝子、配列内リボソーム進入部位 (internal ribosome entry site: IRES)、及びピューロマイシン耐性遺伝子 (Puro^r) を、Nanog遺伝子の5' 非翻訳領域に挿入する。

このような構築物をES細胞に導入するとGFPが発現するが、分化した細胞では発現しない。同様に、マウス胎児繊維芽細胞に多能性誘導因子を導入し、同時に当該構築物を導入すると、Nanog遺伝子が発現する細胞、即ち、十分にリプログラミングされたiPS細胞はGFP陽性を呈し、ピューロマイシン耐性を獲得する。従って、培地にピューロマイシンを添加することにより、iPS細胞を選択することができる。この方法によれば、ES細胞と同等の増殖能、遺伝子発現、DNAメチル化を示すiPS細胞を得ることができる。

[0020] 本明細書において、多能性誘導因子とは、体細胞に導入することにより、当該体細胞に多能性を回復させることができる因子である。多能性誘導因子としては、例えば、Oct3/4、Klfファミリー遺伝子 (Klf1、Klf2、Klf4、Klf5等)、Mycファミリー遺伝子 (c-Myc、N-Myc、L-Myc等)、Soxファミリー遺伝子 (Sox1、Sox2、Sox3等)、Nanog遺伝子、Lin28遺伝子を挙げることができる。

後述するとおり、本発明に係るiPS細胞の製造方法の第一の態様では、多能性誘導因子としてMycファミリー遺伝子又はMycファミリータンパク質を用いることが必須であるが、その他の多能性誘導因子としては、Oct3/4、Klf4、Sox2の3遺伝子のうち少なくとも2つを含む組み合わせを導入することが好ましい。

また、Mycファミリー以外に、Oct4、Sox2、Nanog、Lin28の4遺伝子の組み合わせを導入することも好ましい。

[0021] その他、多能性誘導因子として、Fbx15、E-Ras、ECAT15-2、Tcl1、 β -catenin、ECAT1、Esg1、Dnmt3L、ECAT8、Gdf3、Sox15、ECAT15-1、Fthl17、Sal14、Rex1、UTF1、Stella、Stat3、Grb2からなる群より選択される1以上の遺伝

子を導入してもよい。

多能性誘導因子は遺伝子に限定されず、上記遺伝子が発現したタンパク質（例えば、Mycファミリー遺伝子（c-Myc、N-Myc、L-Myc等）が発現したMycファミリータンパク質）や、その他の化合物であってもよく、遺伝子、タンパク質及び／又は化合物を組み合わせ用いてもよい。

[0022] 本発明において、多能性誘導因子の体細胞への導入方法は特に限定されないが、多能性誘導因子が遺伝子の場合、宿主となる体細胞に適したベクターを使用することができる。例えばレトロウイルスやレンチウイルスなどのウイルスベクター、プラスミドベクター、非挿入型組換えウイルスベクター、人工染色体ベクター（Yeast artificial chromosome; YAC、bacterial artificial chromosome; BAC、P1-derived artificial chromosome; PAC等）が挙げられるが、これらに限定されない。

ウイルスベクターによれば、ウイルスを細胞に感染させることにより、効率よく遺伝子を導入することができる。しかしながら、外来遺伝子がランダムに宿主DNAに組み込まれる結果、再活性化されることがある。従って、多能性誘導因子として癌原遺伝子等を導入する場合には、プラスミドベクター、トランスポゾン、非挿入型組換えウイルスベクターを用いて導入する方法や、タンパク質を導入する方法が好ましい。これらのベクターやタンパク質は、公知の方法によって細胞内に導入することができる。

[0023] なお、本明細書において、体細胞とは、生体を構成している全細胞のうち生殖細胞以外の細胞の総称である。本発明の方法に用いられる体細胞の種類は特に限定されず、胎児期の体細胞であっても成人の体細胞であってもよい。上皮細胞、繊維芽細胞、軟骨細胞、筋細胞、心筋細胞、肝細胞等の分化した細胞であっても、造血幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、皮膚幹細胞、筋幹細胞、生殖管細胞等の成体幹細胞であってもよい。臍帯血や臍帯、胎盤等の組織由来の細胞を用いることもできる。これらの細胞は、生体から採取した後、適当な培地において、公知の方法で樹立することができる。

体細胞は、あらゆる哺乳動物に由来するものを用いることができるが、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、ウシ、ウマ、ヒツジ等に由来するものが好ましい。

[0024] 本発明の方法で得られるiPS細胞を疾患の治療に用いる場合、患者から採取した体細胞を用いることが好ましく、例えば、採取しやすい皮膚から樹立した繊維芽細胞を用いることができる。

また、特定の疾患の患者から採取した体細胞を用いて、疾患特異的iPS細胞を樹立することもできる。疾患特異的iPS細胞は、発症のメカニズムの研究や治療薬の開発に有用である。

[0025] 本発明に係るiPS細胞の製造方法では、多能性誘導因子として、少なくともMycファミリー遺伝子又はMycファミリータンパク質を体細胞に導入する。Mycファミリー遺伝子のうち、c-Myc遺伝子およびN-Mycは、細胞の分化及び増殖に関与する転写制御因子であり、多能性維持に関与することが報告されている。

c-Myc遺伝子を多能性誘導因子として細胞に導入すると、宿主DNAに組み込まれて再活性化され、腫瘍が形成されることがあるが、c-Myc遺伝子を用いないとiPS細胞の誘導効率が著しく低下することが知られている（例えば、Silva, J. et al, PLoS Biology 2008 Oct 21;6(10):e253）。

[0026] c-Myc遺伝子の再活性化は、c-Myc遺伝子を体細胞に導入するとき、体細胞のゲノムDNAに組み込まれない方法を用いることによって防ぐことができる。かかる方法としては、ベクターとして、プラスミドベクター、トランスポゾン、非挿入型組換えウイルスベクター等を用いる方法が挙げられるが、これらのベクターを使用するとiPS細胞の誘導効率は低下する。また、c-Myc遺伝子ではなく、c-Mycタンパク質を導入してiPS細胞を誘導することもできるが、この方法も誘導効率は低い。

しかしながら、本発明の方法によれば、低下した誘導効率を著しく上昇させることが可能であり、安全で十分にリプログラミングされたiPS細胞を効率よく得ることができる。

または、Mycファミリー遺伝子として、N-MycもしくはL-Myc遺伝子を多能性誘導因子として体細胞に導入することもできる。特にL-Myc遺伝子は、c-Myc遺伝子に比べて発癌性を有しないと報告されており、c-Myc遺伝子の導入によるiPS細胞誘導に対して、発癌性を抑えた安全なiPS細胞を誘導することができる。さらに、L-Myc遺伝子は発癌性が低いことから、導入効率の高い方法で宿主DNAへ組み込ませることができ好ましい。このような、誘導効率の高い多能性誘導因子導入法を採用し、本発明のiPS細胞誘導法を実施すると、さらに高いiPS細胞の誘導効率を得ることができる。

[0027] (サーチュイン阻害剤及び／又はPARP阻害剤の存在下での培養工程)

本発明に係るiPS細胞の製造方法は、多能性誘導因子の導入工程の後、体細胞をサーチュイン阻害剤及び／又はPARP阻害剤の存在下で培養する工程を含む。

サーチュインはNAD依存性脱アセチル化酵素群であり、例えばSIRT1が挙げられる。SIRT1は、DNA修復や転写制御に関与する酵素であり、ヒストンやp53、NF κ Bなどを基質とする。また、PARPは、DNA修復や転写制御において重要な役割を果たすポリADPリボース化反応を触媒する酵素である。

サーチュイン阻害剤及び／又はPARP阻害剤は、多能性誘導因子の導入後、比較的早い時期に添加することが好ましい。例えば、導入した日を0日として、導入後10日未満、好ましくは8日未満、さらに好ましくは4日未満、毎日培地に添加する。また、例えば、多能性誘導因子導入後、最初にコンフルエントになってトリプシン処理を行うまでの間、毎日サーチュイン阻害剤及び／又はPARP阻害剤を添加することも好ましい。

一方で、サーチュイン阻害剤及び／又はPARP阻害剤は、多能性誘導因子を導入した日を0日として、1日目以降に開始することが好ましい。1日目以降に開始することにより、iPS細胞の誘導効率を著しく高くすることができる。

[0028] 本発明に係る方法において、サーチュイン阻害剤及び／又はPARP阻害剤としては、例えば、サーチュイン阻害剤であるSirtinol、Cambinol、AGK2、Splitomicin、PARP阻害剤である3-Aminobenzamide、DPQ、NU1025、サーチュイン

及びPARP阻害剤であるニコチンアミドが挙げられ、特にニコチンアミドが好ましく用いられる。

ニコチンアミドは、ビタミンB3の一つであり、酸化還元反応の補酵素であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) の前駆物質である。本来生体内で利用される物質であるため、細胞に対する副作用が極めて低いと考えられ、移植しても安全なiPS細胞を得ることができる。また、安価な薬剤であるため、量産にも適する。

[0029] サーチュイン阻害剤及び／又はPARP阻害剤は、多能性誘導因子を導入した細胞の培地に添加すればよい。添加するサーチュイン阻害剤及び／又はPARP阻害剤の濃度は特に限定されないが、例えば、ニコチンアミドであれば、約1mM～約10mM、好ましくは約3mM～約5mM、最も好ましくは4mM程度であり、その他のサーチュイン阻害剤及び／又はPARP阻害剤の濃度についても、当業者が適宜選択することができる。

[0030] 本工程におけるその他の培養条件（培地の組成、温度等）は、当業者が適宜選択することができる。

[0031] (GSK-3阻害剤及びMEK阻害剤の存在下での培養工程)

本発明に係るiPS細胞の製造方法では、サーチュイン阻害剤及び／又はPARP阻害剤の存在下での培養工程後、GSK-3阻害剤及びMEK阻害剤の存在下で細胞をさらに培養することも好ましい。

[0032] GSK-3阻害剤とは、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3 (glycogen synthase kinase 3; GSK-3) ファミリーの一以上のメンバーを対象とする阻害剤をいう。GSK3ファミリーのメンバーとしてはGSK-3 α 及びGSK-3 β がよく知られているが、これらに限定されない。本発明に用いられるGSK-3阻害剤としては、GSK-3 β の阻害剤が特に好ましい。

GSK-3阻害剤としては、例えば、CHIR98014、CHIR99021、AR-A0144-18、TDZD-8、SB216763及びSB415286が挙げられる。GSK-3に対する特異性から、CHIR99021及びCHIR98014が特に好ましい。添加するGSK-3阻害剤の濃度は特に限定されないが、例えば、CHIR99021であれば、0.01 μ M-100 μ Mの濃度で培地に添

加することが好ましく、より好ましくは、 $0.1\mu\text{M}$ – $20\mu\text{M}$ 、さらに好ましくは $0.3\mu\text{M}$ – $10\mu\text{M}$ である。その他のGSK-3阻害剤の濃度についても、当業者が適宜選択することができる。

GSK-3阻害剤として、siRNA、アンチセンス、リボザイム等の核酸を用いてもよい。例えば、GSK-3遺伝子の一部と相補的なRNA鎖を含むsiRNAを細胞に導入すれば、GSK-3のmRNAを分解し、GSK-3タンパク質の発現を阻害することができる。

[0033] MEK阻害剤とは、MAPキナーゼキナーゼ (mitogen activated protein kinase/ERK kinase; MEK) ファミリーの1以上のメンバーを対象とする阻害剤をいう。MEKファミリーのメンバーとしてはMEK1、MEK2及びMEK3が挙げられる。MEK阻害剤としては、例えば、MEK1を阻害するPD184352及びPD98059、MEK1及びMEK2を阻害するPD0325901、U0126及びSL327等が挙げられるがこれらに限定されない。この中で、PD184352及びPD0325901は、MEKに対する特異性が高く、阻害剤として効果も高いので特に好ましい。

MEK阻害剤として、siRNA、アンチセンス、リボザイム等の核酸を用いてもよい。例えば、MEK遺伝子の一部と相補的なRNA鎖を含むsiRNAを細胞に導入すれば、MEKのmRNAを分解し、MEKタンパク質の発現を阻害することができる。

MEK阻害剤は、 $0.1\mu\text{M}$ – $25\mu\text{M}$ の濃度で培地に添加することが好ましく、より好ましくは、 $0.1\mu\text{M}$ – $5\mu\text{M}$ 、さらに好ましくは $0.2\mu\text{M}$ – $2\mu\text{M}$ である。

[0034] GSK-3阻害剤及びMEK阻害剤の存在下で細胞を培養する工程では、さらに、繊維芽細胞成長因子レセプター (fibroblast growth factor receptor, FGFR) のアンタゴニスト (例えば、SU5402、PD173074等) を、 $0.1\mu\text{M}$ – $20\mu\text{M}$ 、好ましくは $0.5\mu\text{M}$ – $10\mu\text{M}$ 、さらに好ましくは 1 – $5\mu\text{M}$ の濃度で培地に添加することも好ましい。

[0035] GSK-3阻害剤及びMEK阻害剤の存在下で細胞を培養する工程は、上述したサータンチン阻害剤及び/又はPARP阻害剤の存在下で体細胞を培養する工程の後行われる。GSK-3阻害剤及びMEK阻害剤の存在下で細胞を培養する工程は、体細胞に多能性誘導因子を導入する工程の後、好ましくは5日目以降、より好

ましくは7日目以降、さらに好ましくは9日目以降、最も好ましくは11日目以降である。

一方で、GSK-3阻害剤及びMEK阻害剤の添加は、15日目より前に開始することが好ましい。

[0036] 本工程におけるその他の培養条件（培地の組成、温度等）は、当業者が適宜選択することができる。

（iPS細胞の製造方法の第二の態様）

本発明のiPS細胞の製造方法の第二の態様は、多能性誘導因子を体細胞に導入する工程と、GSK-3阻害剤及びMEK阻害剤の存在下で体細胞をさらに培養する工程と、を含み、GSK-3阻害剤及びMEK阻害剤の存在下で体細胞をさらに培養する工程が、多能性誘導因子を体細胞に導入する工程の後、5日目以降を開始することを特徴とする。

[0037] GSK-3阻害剤及びMEK阻害剤の存在下で細胞を培養する工程は、体細胞に多能性誘導因子を導入する工程の後、好ましくは5日目以降、より好ましくは7日目以降、さらに好ましくは10日目以降、最も好ましくは12日目以降で15日目より前に開始する。

通常の細胞にとって、GSK-3阻害剤及びMEK阻害剤存在下での培養は比較的過酷な条件であるため、GSK-3阻害剤及びMEK阻害剤の誘導初期における添加は、細胞死を惹起すると考えられる。

なお本態様について用いられる他の用語は、上述した第一の態様と同義であり、ここでは説明を省略する。

[0038] 本工程におけるその他の培養条件（培地の組成、温度等）は、当業者が適宜選択することができる。

[0039] （培養キット）

本発明のiPS細胞培養キットは、少なくともサーチュイン阻害剤又はポリADプリボースポリメラーゼ（PARP）阻害剤と、GSK-3阻害剤と、MEK阻害剤と、を含む。これらを適当な濃度で個別の容器に収納したキットを用いれば、多能性誘導因子を導入した体細胞の培地に各試薬を順に添加していくことができ

、iPS細胞の培養を簡便に行うことができる。

当該キットは、培地の他の成分、培養容器、使用説明書等を備えることも好ましい。

なお、本明細書において用いられる用語は、特定の実施態様を説明するために用いられるのであり、発明を限定する意図ではない。

[0040] また、本明細書において用いられる「含む」との用語は、文脈上明らかに異なる理解をすべき場合を除き、記述された事項（部材、ステップ、要素、数字など）が存在することを意図するものであり、それ以外の事項（部材、ステップ、要素、数字など）が存在することを排除しない。

異なる定義が無い限り、ここに用いられるすべての用語（技術用語及び科学用語を含む。）は、本発明が属する技術の当業者によって広く理解されるのと同じ意味を有する。ここに用いられる用語は、異なる定義が明示されていない限り、本明細書及び関連技術分野における意味と整合的な意味を有するものとして解釈されるべきであり、理想化され、又は、過度に形式的な意味において解釈されるべきではない。

本発明の実施態様は模式図を参照しつつ説明される場合があるが、模式図である場合、説明を明確にするために、誇張されて表現されている場合がある。

[0041] 以下において、本発明を、実施例を参照してより詳細に説明する。しかしながら、本発明はいろいろな態様により具現化することができ、ここに記載される実施例に限定されるものとして解釈されてはならない。

実施例

[0042] 試験 1. ニコチンアミド存在下でのマウスiPS細胞の誘導

レトロウイルス導入にあたり、各多能性誘導因子(Oct-3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) を発現するレトロウイルスベクターをパッケージング細胞であるPLAT-E細胞 (Kitamura T, et al. (2003) Exp Hematol 31:1007-1014) に導入した。遺伝子導入より2日後にPLAT-E細胞の培養上清をそれぞれ回収し、0.45 μ m セルロースアセテートフィルターに通した。その後、終濃度4 mg/mlになるよ

うにポリブレンを加え、各培養上清を等量混合し、その混合液をNanog-GFP MEF (Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. (2007) nature 448:313-317) に添加することで、ウィルス感染を行った。Nanog-GFP MEFは、マウスNanog遺伝子を有するBACにGFP-IRES-Puro^rカセットを挿入し、このBACをマウス胎仔線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast; MEF) に導入した細胞である。Nanog-GFP MEFは、多能性を有する細胞においてはGFPを発現するが、分化するとGFPを発現しない。

レトロウィルス感染後4日目にマイトマイシンC (SIGMA:M4287) 処理を行い増殖能を抑制したST0フィーダー細胞上に播種し(4F(c-Myc)を感染させた細胞では 2×10^3 個/ml、3Fでは 3.5×10^4 個/mlとなるように播種)、翌日マウスES細胞培地 (Nishimoto M, et al. (1999) Mol Cell Biol 19:5453-5465) で培養した。その後、培地を2日毎に置換し、感染後17日目にピューロマイシン (Puro) 含有マウスES細胞培地 (Puroは終濃度1.2 mg/ml) に置換し、さらに8日間培養した。その後、アルカリフォスファターゼ (AP) 染色を行った。ニコチンアミドについてはレトロウィルスの感染と同時に終濃度4mMとなるように添加し、その後培地交換毎に同濃度で添加した。

図1 Aに4F(c-Myc)を感染させた細胞 2×10^4 個を10cm² dishに播種した際のPuro耐性AP陽性コロニーの結果を示し、図1 Bに4F(c-Myc)感染細胞 4×10^3 個を3.5 cm² dishに3枚播種した後のPuro耐性AP陽性コロニーの平均数を示す。エラーバーは標準偏差を示している。4F(c-Myc)を感染させた細胞では、ニコチンアミドの投与により、ピューロマイシンに耐性を示すコロニー数が著しく増加した。

図1 Cに3F感染細胞 7×10^4 個を3.5 cm² dishに3枚播種した後のPuro耐性AP陽性コロニーの平均数を示す。エラーバーは標準偏差を示している。3Fを感染させた細胞では、ニコチンアミドによる誘導効率の上昇が見られなかった。

以上より、ニコチンアミドによりiPS細胞の誘導効率が上昇すること、ニコチンアミドの効果を得るためにはc-Myc遺伝子の導入が必要であることを確認した。

図2では、4F(c-Myc)を感染させたNanog-GFP MEFを蛍光顕微鏡で観察した結果を示す。実験方法については試験1に準ずるが、上段のGFPを観察した写真ではPuroによる薬剤選択をしていないコロニーを示しており、下段のGFPを観察した写真ではPuroによる薬剤選択後のコロニーを示している。図2上段に示すように、多能性誘導因子導入後の細胞は、ニコチンアミド存在下で培養したもの(Nam)のほうがわずかに強い発色を示したが、いずれも弱い発色であった。しかしながら、ピューロマイシンを加えるとニコチンアミド投与群において、非投与群よりも強い発色が観察された。このことから、ニコチンアミドを加えるとコロニー数が著しく増え、それにつれて真のiPS細胞も増加するものの、増えたコロニーの中には、不完全なリプログラミング状態であるpartial iPS細胞も含まれることがわかった。

[0043] 試験2. ニコチンアミド処理の最適化

ニコチンアミドの最適処理時間を検討するため、レトロウイルス感染後24日目まで(Nam0-24d)、レトロウイルス感染後4日目まで(Nam0-4d)、レトロウイルス感染後4日目から24日目まで(Nam4-24d)のそれぞれの条件でニコチンアミドを添加し、4F(c-Myc)によるiPS細胞誘導を行った。ニコチン処理時間以外の実験方法は試験1に準じた。

結果を図3に示す。ニコチンアミドを多能性誘導因子導入後0日目から24日目まで添加した場合には、Puro耐性コロニーは著しく増加しており、また、0日目から4日目まで添加した場合においても、0日から24日目まで添加した場合と比べ、Puro耐性コロニーの数には大きな違いが見られず、同様に著しく増加していた。一方で、多能性誘導因子導入後4日目以降にニコチンアミドを添加した場合、ニコチンアミドによるPuro耐性コロニー数の増加効果はほとんど得られなかった。これらの結果から、iPS細胞の誘導初期にニコチンアミドを処理することにより、Puro耐性コロニー数増加の促進効果を得られることが明らかとなった。

ニコチンアミドの影響がiPS細胞誘導初期に限局されることから、レトロウイルス感染後4日目にニコチンアミドの影響が認められるか否かを検討するた

め、感染後0日目から4日目までニコチンアミド (Nam) 処理をしたものと、非処理のものにおける、感染後4日目の細胞を観察した。その結果、Nam処理群においてiPS細胞様のコロニーが認められた (図4及び図5A)。

次に感染後4日目におけるニコチンアミドの影響を検討するため、細胞数の計測とAP染色を行った。その結果、感染4日目の段階で無処理の細胞群と比較し、ニコチンアミド処理群では、細胞数の増加 (図5B)が認められ、AP陽性コロニー数においては、顕著な増加が認められた (図5C)。さらに、各種未分化マーカーの発現を検討した結果、ニコチンアミド処理により、未分化マーカーの発現が無処理に比べて上昇していることが明らかとなった (data not shown)。以上のことから、感染後4日目において、ニコチンアミド処理により、すでにiPS細胞誘導が促進されていることが明らかとなった。

[0044] 試験3. ニコチンアミドによるiPS細胞誘導効果のメカニズムの検討

ニコチンアミドはPARPやサーチュインを抑制することが知られている。そこで、サーチュイン (SIRT1) を活性化するレズベラトールをニコチンアミドの代わりに培地に添加して、iPS細胞の誘導効果を検討した。実験方法は、試験2に準じた。ただし、レズベラトール (Res) は終濃度10 mMとなるように培地に添加した。

結果を図6に示す。レズベラトールを多能性誘導因子導入後0日目から17日目まで添加した場合と、0日目から4日目まで添加した場合は、レズベラトールの溶媒であるDMSOを等量加えたコントロールと比較してPuro耐性コロニーの数が著しく減少した。一方、多能性誘導因子導入後4日目に添加した場合は、比較的多くのPuro耐性コロニーが誘導された。このことから、ニコチンアミドによるiPS細胞の誘導促進効果は、サーチュインの抑制が関わっていることが強く示唆された。

[0045] 試験4. MEK阻害剤及びGSK-3阻害剤の存在下でのiPS細胞の誘導 (2i法)

次に、partial iPS細胞のリプログラミングを促進することが知られるMEK阻害剤及びGSK-3阻害剤存在下で培養する方法 (2i法) を、ニコチンアミド存在下での培養と組み合わせた。

Nanog-GFP MEFに対して4F(c-Myc)をレトロウイルスにより強制発現させた。レトロウイルス感染後4日目にフィーダー細胞上に播種し、その翌日よりマウスES細胞培地で培養した。感染後12日目よりPD0325901 (1 μ M) 及びCHIR99021 (3 μ M) を含む無血清マウスES細胞培地 (2i培地) に置換した。その後、4日間培養を継続し、培養後の細胞を、蛍光顕微鏡を用いて観察した。また、対照区として、感染後12日よりPD0325901及びCHIR99021を含まない無血清マウスES細胞培地で4日間培養させた。結果を図7に示す。2i法により、真のiPS細胞が増加することが確認された(図7Aおよび図7B)。また、ニコチンアミドで処理した後、2i法を行うと、まずpartial iPS細胞も含めたコロニー数がニコチンアミドにより増加し、ニコチンアミドと、MEK阻害剤及びGSK-3阻害剤とによりpartial iPSが真のiPS細胞に転換される結果、真のiPS細胞が飛躍的に増加することが確認された(図7Cおよび図7D)。

[0046] 試験5. 2i法の条件の最適化

2i法による効果を最適化するため、MEK阻害剤及びGSK-3阻害剤を培地に添加する時期について検討した。

Nanog-GFP MEFに対して4F(c-Myc)をレトロウイルスにより強制発現させた。レトロウイルス感染後4日目にフィーダー細胞上に播種し、その翌日より2i培地に置換するまでマウスES細胞培地で培養した。2i培地での培養(1)レトロウイルス感染後5日目、(2)7日目、(3)9日目、(4)11日目、(5)13日目、(6)15日目より開始し、感染後17日目まで行った。感染後17日目より8日間Puroにより薬剤選択を行い、その後AP染色を行った。結果を図8に示す。13日目((5))から17日目まで2i法を行ったときに、もっともPuro耐性AP陽性コロニー数が多く得られた(図8)。

[0047] 試験6. ニコチンアミド及び2i法の組み合わせによるiPS細胞の誘導

試験5の(1)と同様の条件で2i法を行い、且つレトロウイルスの感染後0日目から4日目までニコチンアミド(終濃度4mM)を加えて培養したところ、真のiPS細胞の割合が著しく増加した(図9A)。

次にニコチンアミド処理をレトロウイルス感染と同時にを行った場合と感染

後1日後より行う場合と比較するため、試験5の(1)の条件に準じて検討を行った。その結果、図9Bに示すとおり、レトロウィルスの感染後0日目から4日目までニコチンアミドを添加するよりも、1日目から4日目まで添加したほうが、誘導効率が3倍以上高いことを確認した。

[0048] 試験7. ニコチンアミド存在下でのヒトiPS細胞の誘導

レトロウィルス導入にあたり、各多能性誘導因子(Oct-3/4, Sox2, KLF4, c-Myc)を発現するレトロウィルスベクターをパッケージング細胞であるPLAT-GP細胞(Morita S, et al. (2000) Gene Therapy 7:1063-1066)に導入した。遺伝子導入より2日後にPLAT-GP細胞の培養上清をそれぞれ回収し、0.45 μ mセルロースアセテートフィルターに通した。その後、終濃度4 mg/mlになるようにポリブレンを加え、各培養上清を等量混合し、その混合液をヒト繊維芽細胞に添加することで、ウィルス感染を行った。レトロウィルス感染後6日目にフィーダー細胞上に播種し(4F(c-Myc): 2.5x10⁴個; 4F(L-Myc):5.0x10⁴個)、その翌日ヒトES細胞培地(Takahashi K, et al (2007) Cell 131:861-872)で培養した。その後、培地を2日毎に交換し、感染後30日間まで培養した。その後、アルカリフォスファターゼ(AP)染色を行い、AP陽性コロニー数を計測した。ニコチンアミドについてはレトロウィルスの感染と同時に終濃度4mMとなるように添加し、その後感染6日目まで、培地交換毎に同濃度で添加した。なお、対照区は、ニコチンアミドを添加せずに感染後30日まで培養した。結果を図10に示す。

図10に示すように、ニコチンアミドを添加した区では、ニコチンアミドを添加していない区と比較して、AP陽性コロニー数が、増加した。

このように、ヒト繊維芽細胞においても、マウス繊維芽細胞と同様に、サーチュイン阻害剤及び/又はPARP阻害剤の存在下における培養によりAP陽性コロニー誘導の効率を向上させることができた(図10A)。また、Mycファミリー遺伝子として、L-Myc遺伝子を多能性誘導因子として用いた場合にも、サーチュイン阻害剤及び/又はPARP阻害剤の存在下における培養によりAP陽性コロニーの誘導効率を向上させることができた(図10B)。

ンパク質である請求項 1～7に記載の方法。

[請求項9] 前記多能性誘導因子が、Oct3/4遺伝子、Klf4遺伝子、Sox2遺伝子、Nanog遺伝子及びLIN28遺伝子からなる群より選択される1以上の遺伝子をさらに含む、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項10] 多能性誘導因子を体細胞に導入する工程と、
GSK-3阻害剤及びMEK阻害剤の存在下で前記体細胞をさらに培養する工程と、
を含み、
前記GSK-3阻害剤及びMEK阻害剤の存在下で前記体細胞をさらに培養する工程は、前記多能性誘導因子を体細胞に導入する工程を行った日を0日目として、5日目以降に開始する、人工多能性幹細胞（iPS細胞）の製造方法。

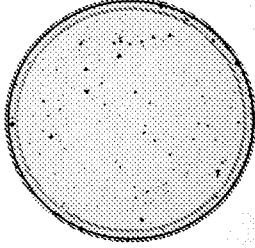
[請求項11] 前記多能性誘導因子が、Oct3/4遺伝子、Klf4遺伝子、Sox2遺伝子、c-Myc遺伝子、L-Myc遺伝子、Nanog遺伝子、及びLin28遺伝子からなる群より選択される1以上の遺伝子である、請求項 10に記載の方法。

[請求項12] 前記人工多能性幹細胞（iPS細胞）が、マウス又はヒト由来の細胞である請求項 1～11に記載の方法。

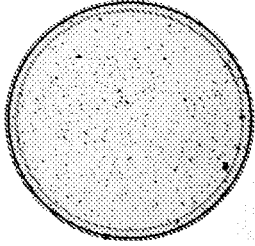
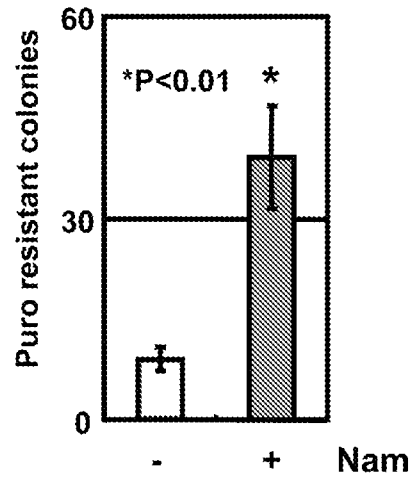
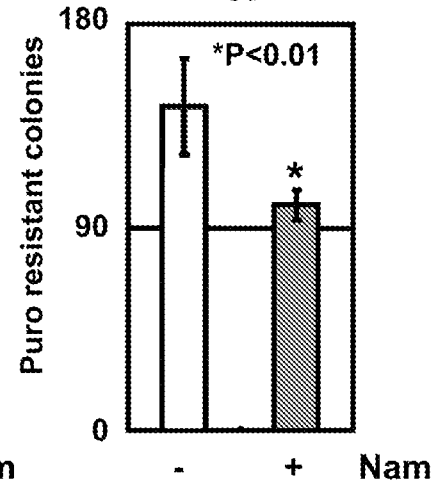
[請求項13] 請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載の方法で製造された人工多能性幹細胞（iPS細胞）。

[請求項14] サーチュイン阻害剤又はポリADPリボースポリメラーゼ（PARP）阻害剤と、
GSK-3阻害剤と、
MEK阻害剤と、
を含む人工多能性幹細胞（iPS細胞）の培養キット。

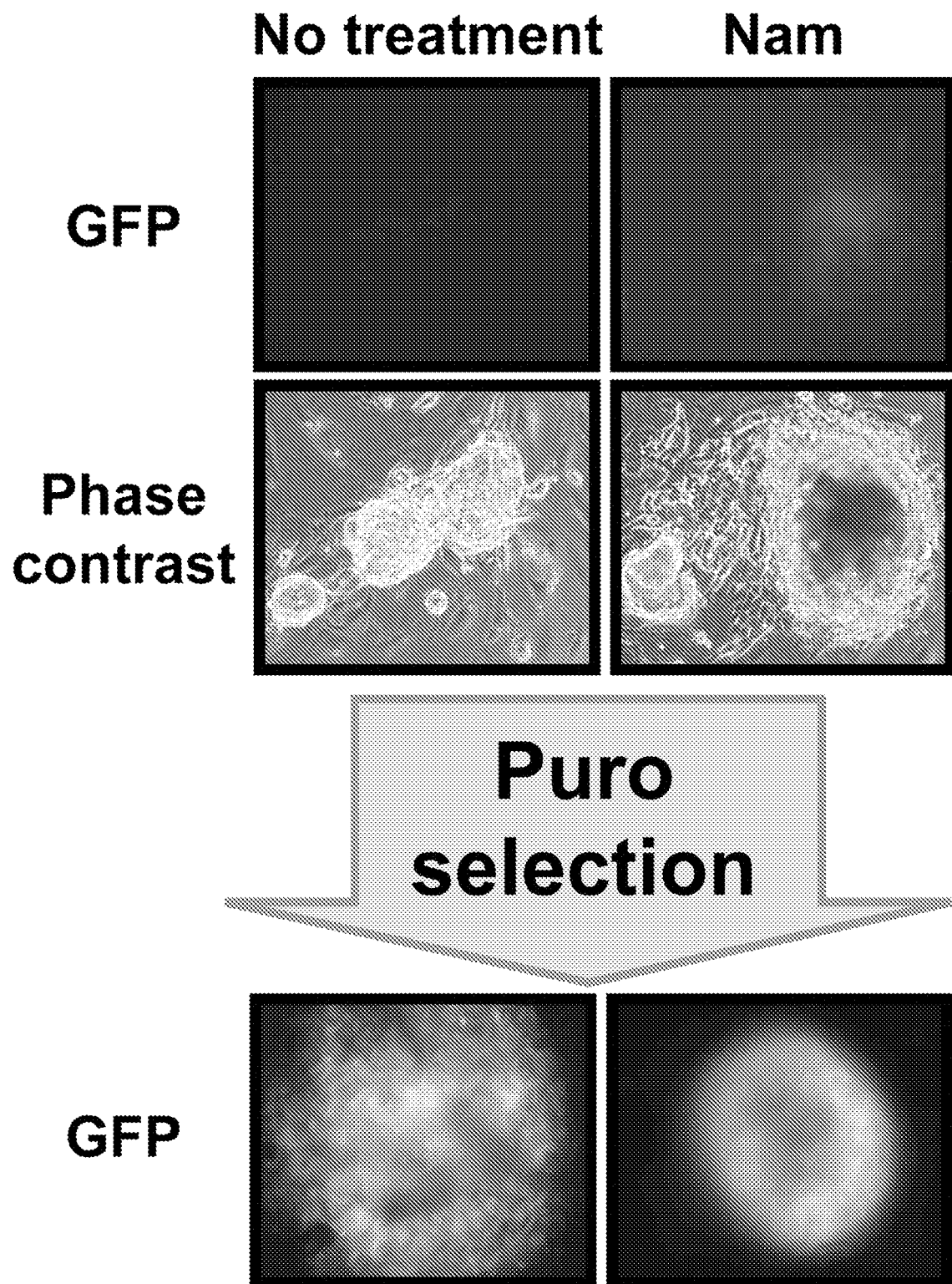
[Fig 1]

A No treatment

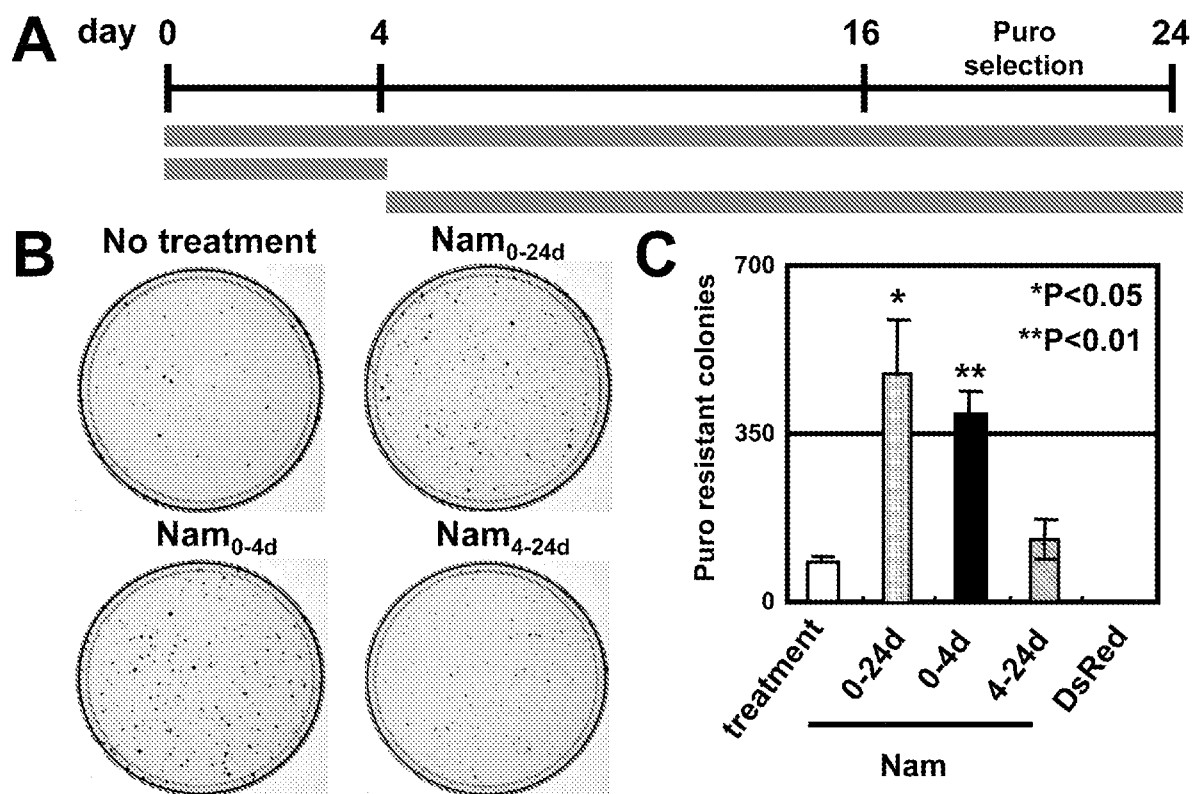
Nam

**B** 4F**C** 3F

[図2]

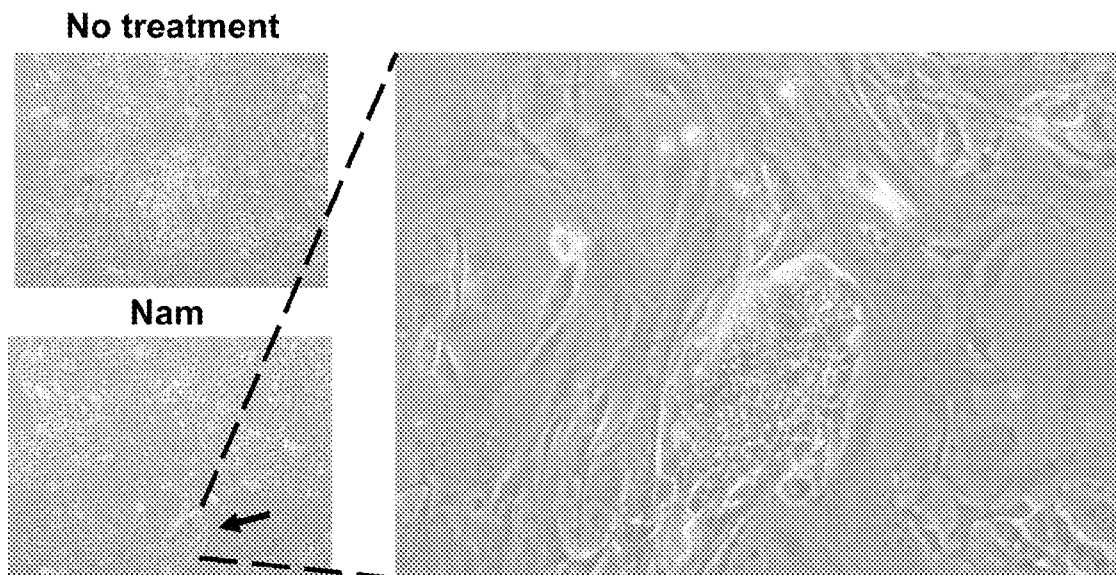


[図3]



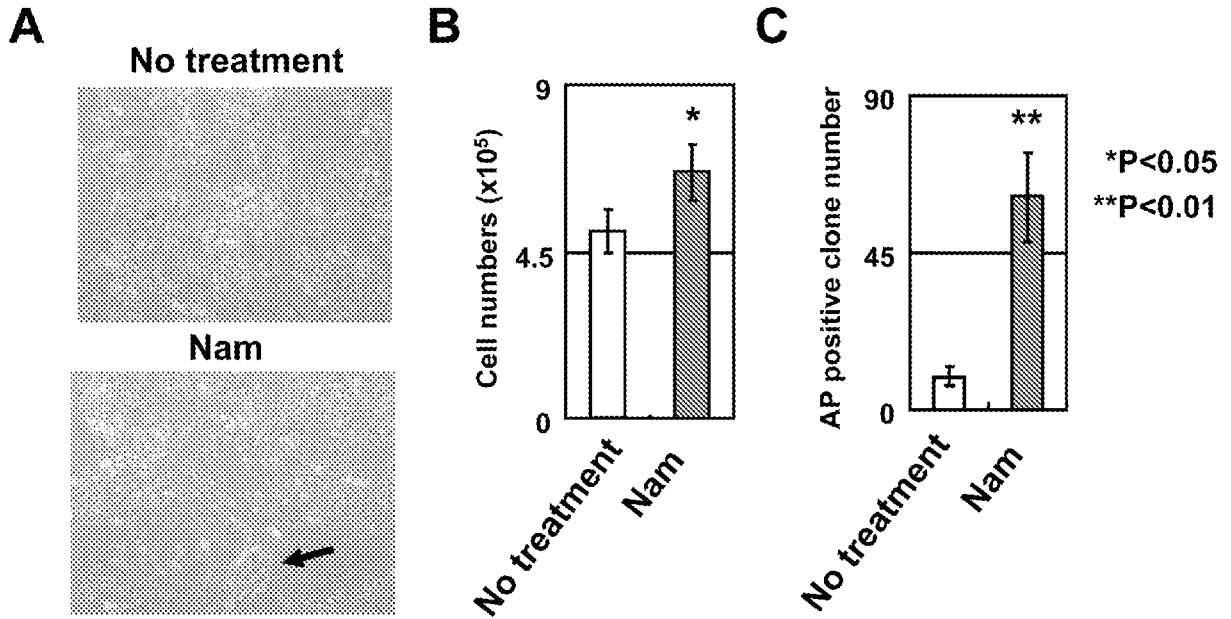
[図4]

インフェクション4日目

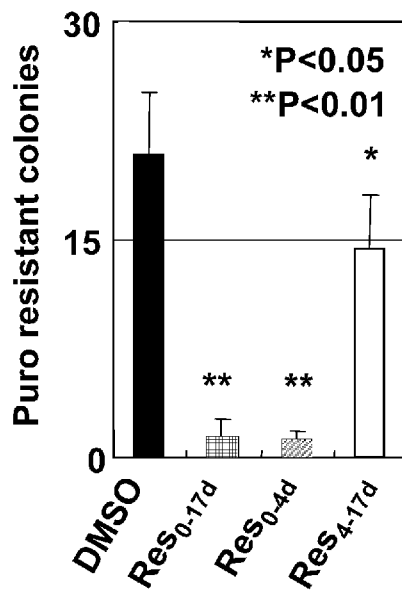
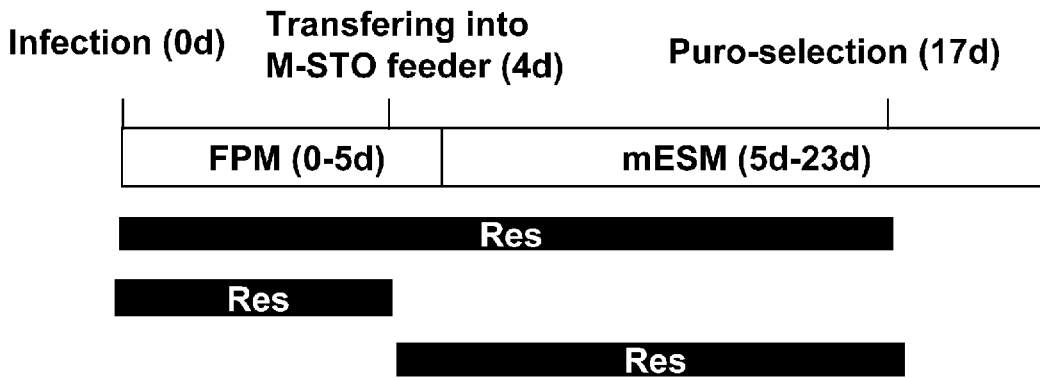


[図5]

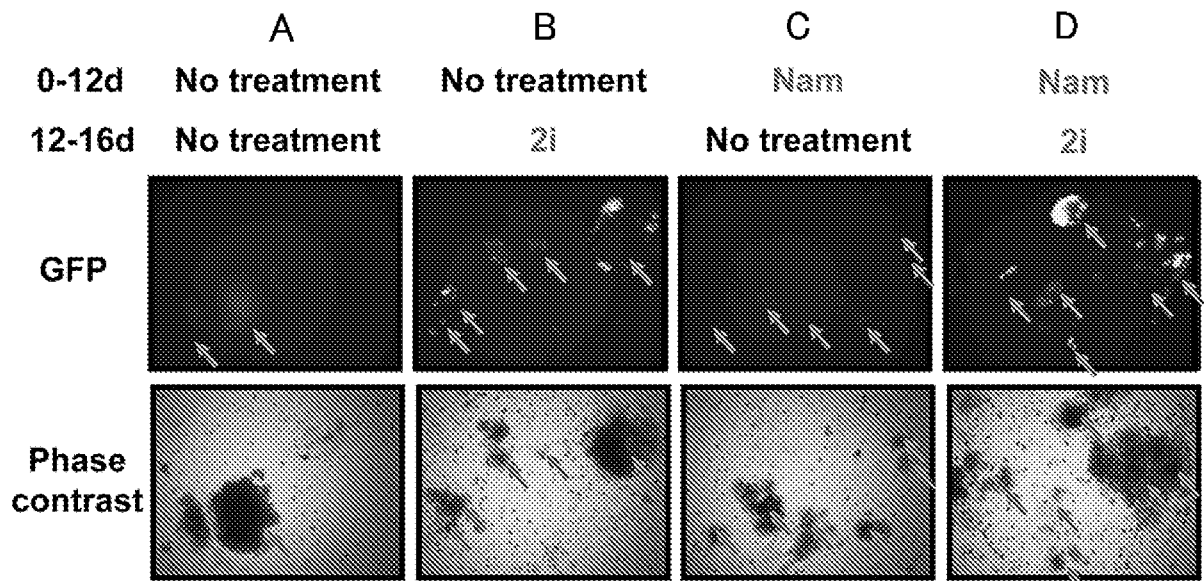
インフェクション4日目



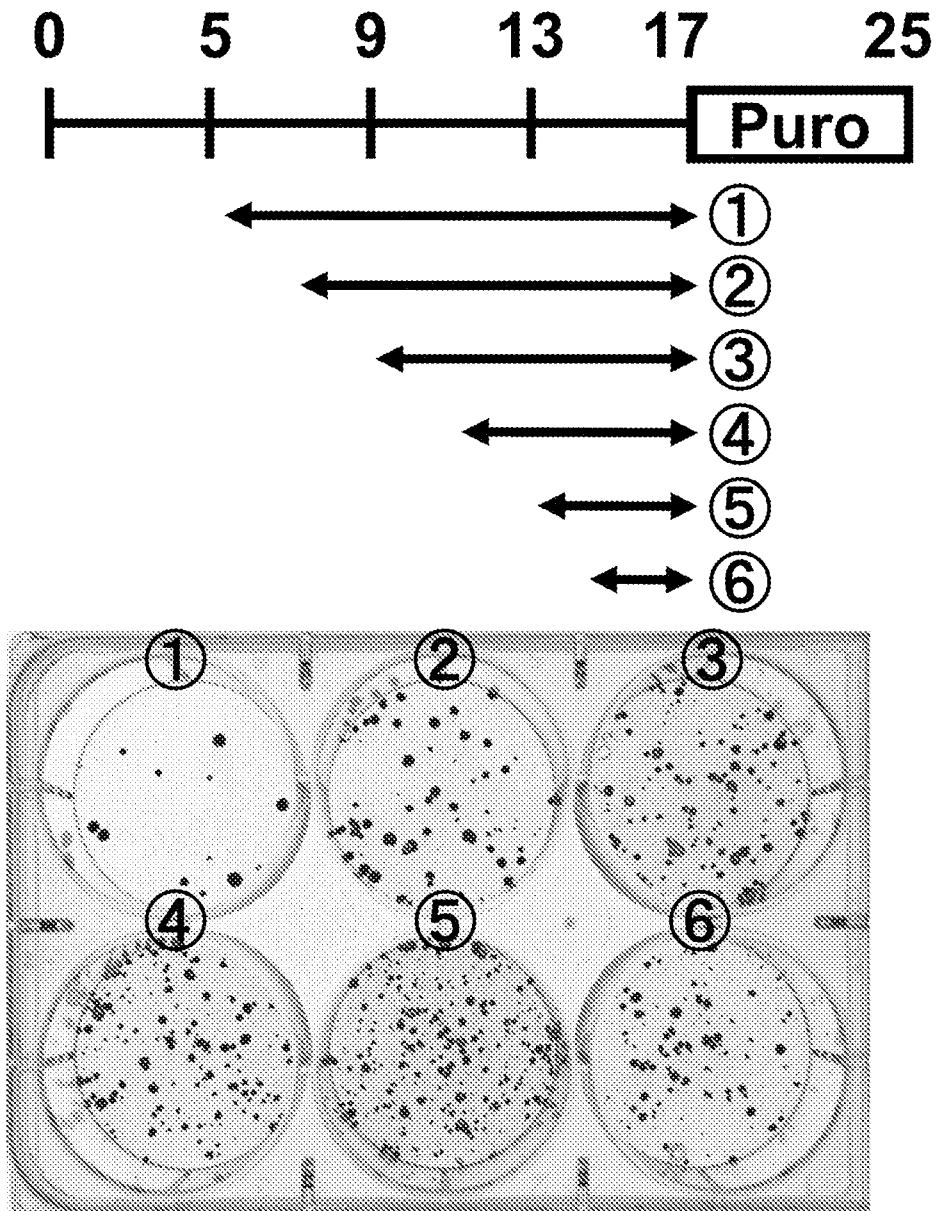
[図6]



[Fig 7]

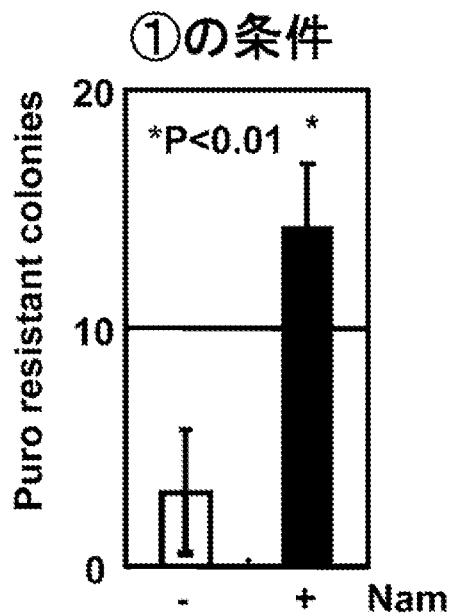


[図8]

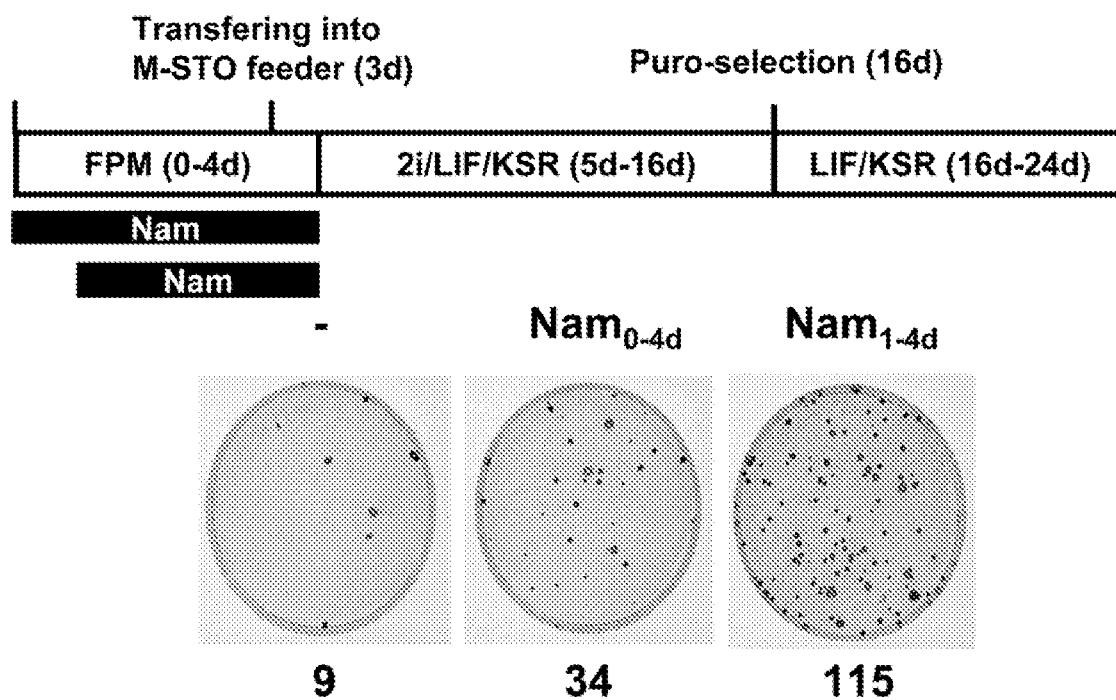


[図9]

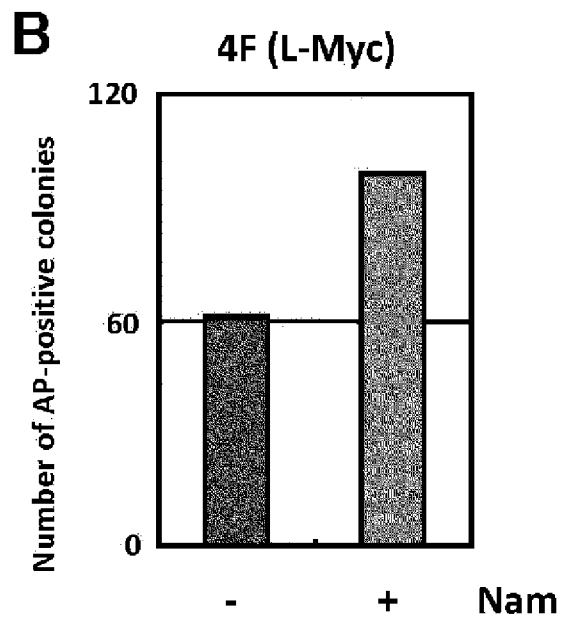
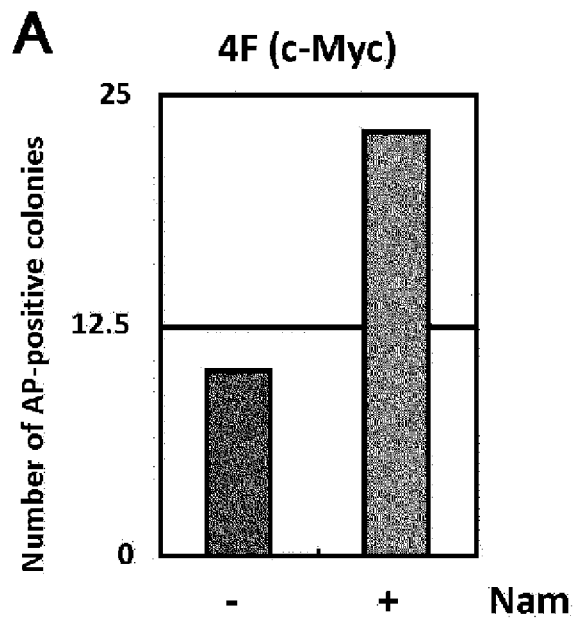
A



B



[10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/053110

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/00(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, C12N5/0789(2010.01)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)

C12N5/00, A61L27/00, C12N5/0789

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

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

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII),
Igaku Yakugaku Yokoshu Zenbun Database

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	SILVA, J et al., Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. PLoS Biol. 2008 Oct 21, vol.6(10), e253	10-13/1-9, 14
A	LIN, T et al., A chemical platform for improved induction of human iPSCs. Nat Methods. 2009 Nov, vol.6(11), pp.805-808	1-14
A	ESTEBAN, MA et al., Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2010 Jan 8, vol.6(1), pp.71-79	1-14
A	MARSON, A et al., Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. Cell Stem Cell. 2008 Aug 7, vol.3(2), pp.132-135	1-14

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

* Special categories of cited documents:

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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
18 April, 2011 (18.04.11)Date of mailing of the international search report
26 April, 2011 (26.04.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/053110

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MAHERALI, N et al., A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2008 Sep 11, vol.3(3), pp.340-345	1-14
A	LI, H et al., The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. Nature. 2009 Aug 27, vol.460(7259), pp.1136-1139	1-14

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N5/00(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, C12N5/0789(2010.01)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. C12N5/00, A61L27/00, C12N5/0789

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 1971-2011年
 日本国実用新案登録公報 1996-2011年
 日本国登録実用新案公報 1994-2011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)
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), 医学・薬学予稿集全文データベース

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/ A	SILVA, J et al., Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. PLoS Biol. 2008 Oct 21, vol.6(10), e253	10-13/ 1-9, 14
A	LIN, T et al., A chemical platform for improved induction of human iPSCs. Nat Methods. 2009 Nov, vol.6(11), pp.805-808	1-14

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、一般的な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 18.04.2011	国際調査報告の発送日 26.04.2011
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 長井 啓子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N 9123

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
A	ESTEBAN, MA et al., Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2010 Jan 8, vol.6(1), pp.71-79	1-14
A	MARSON, A et al., Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. Cell Stem Cell. 2008 Aug 7, vol.3(2), pp.132-135	1-14
A	MAHERALI, N et al., A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 2008 Sep 11, vol.3(3), pp.340-345	1-14
A	LI, H et al., The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. Nature. 2009 Aug 27, vol.460(7259), pp.1136-1139	1-14