

(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10月20日(20.10.2011)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 2011/129446 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/059429
- (22) 国際出願日: 2011年4月15日(15.04.2011)
- (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 2010-095404 2010年4月16日(16.04.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾(KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目15番45号 Tokyo (JP). ダイナベック株式会社(DNAVEC CORPORATION) [JP/JP]; 〒3002611 茨城県つくば市大久保6番 Ibaraki (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 福田 恵一(FUKUDA, Keichi) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 湯浅 慎介(YUASA, Shinsuke) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 関 倫久(SEKI, Tomohisa) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学医学部内 Tokyo (JP). 長谷川 護(HASEGAWA, Mamoru) [JP/JP]; 〒3002611 茨城県つくば市大久保6番 ダイナベック株式会社内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 一色国際特許業務法人(ISSHIKI & CO.); 〒1050004 東京都港区新橋2丁目12番7号 労金新橋ビル 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))
— 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))



WO 2011/129446 A1

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

(54) 発明の名称: 人工多能性幹細胞の製造方法

(57) Abstract: Provided is a method for producing iPS cells with low invasivity and high efficiency. iPS cells can be produced with high efficiency by means of a method comprising a step for culture of a peripheral blood mononuclear cell population for 3 to 14 days in the presence of anti-CD3 antibody, and a step for dedifferentiation of the cultured mononuclear cell population.

(57) 要約: 本発明の目的は、侵襲性が低く、かつ、高い効率でiPS細胞を製造する方法を提供することである。末梢血由来の単核球集団を、抗CD3抗体の存在下で3~14日間培養する工程と、培養した単核球集団に脱分化処理する工程とを含む方法によって、高い効率でiPS細胞を製造することができる。

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、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（iPS細胞）は、様々な疾患に対する移植療法において有用であり、再生医療への応用が期待されている。近年、繊維芽細胞や肝細胞等の体細胞に、Oct 3/4 遺伝子、Sox 2 遺伝子、Klf 4 遺伝子、およびc-Myc 遺伝子を導入し発現させた細胞からFbx 15 遺伝子を発現する細胞を選択することによってiPS細胞を作製できることが報告されている（例えば、WO 2007/069666 国際公開公報、Takahashi K, Yamanaka S. (2006). “Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors”. Cell 126: 663-676、Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Yamanaka S. (2007). “Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures”. Nature Protocols 2: 3081-3089、Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. (2008). “Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells”. Science 321(5889): 699-702 参照）。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0003] しかしながら、従来のiPS細胞作製方法では、皮膚や肝臓等の組織を採取する必要があるため患者の負担が大きく、また、iPS細胞作製効率も低かった。そこで、侵襲性が低く、かつ、高い効率でiPS細胞を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

[0004] 本発明に係る人工多能性幹細胞（iPS細胞）の製造方法は、末梢血由来

の単核球集団を材料とすることを特徴とする。

[0005] 上記 i P S 細胞の製造方法は、(イ)末梢血由来の単核球集団を抗 C D 3 抗体およびインターロイキン 2 の存在下で 3 ~ 1 4 日間培養する工程と、(ロ)培養後の前記単核球集団に対して脱分化処理を行う工程とを含むことが好ましい。

[0006] また、工程 (ロ)において、前記単核球集団に脱分化因子の導入操作を行うことがさらに好ましい。前記脱分化因子の導入操作において、前記脱分化因子を発現する組み換え発現ベクターの導入操作を行ってもよい。

[0007] ここで、脱分化因子が S o x 2、O c t 3 / 4、K l f 4 および c - M y c であることが好ましく、組み換え発現ベクターがセンダイウイルスベクターであることがより好ましい。

[0008] 本発明に係る i P S 細胞の製造方法は、(ハ)脱分化処理を行った前記単核球集団を、増殖因子の存在下で 1 4 ~ 2 5 日間培養する工程をさらに含むことが好ましい。また、末梢血がヒト由来であることが好ましい。

[0009] なお、本明細書で「遺伝子」、「c D N A」などが付加されず、「S o x 2」、「O c t 3 / 4」、「K l f 4」、「c - M y c」というように因子名のみで用いられた場合、これらの遺伝子の遺伝子産物であるタンパク質を指すこととする。

[0010] ==クロスリファレンス==

本出願は、2010年4月16日付で出願した日本国特許出願2010-95404に基づく優先権を主張するものであり、当該基礎出願を引用することにより、本明細書に含めるものとする。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]本発明の一実施例において、C D 3 抗体存在下で培養した単核球集団の培地に M O I 1 ~ 2 0 でウイルスを添加して単核球集団を脱分化処理することにより得られたアルカリフォスファターゼ陽性幹細胞のコロニー率を示したグラフである。

[図2]本発明の一実施例において、アルカリフォスファターゼ染色および D A

P I 染色により染色した、末梢血由来単核球から製造された i P S 細胞の顕微鏡写真である。

[図3]本発明の一実施例において、末梢血由来単核球から製造された i P S 細胞における幹細胞マーカータンパク質の免疫組織化学的染色の写真である。

[図4]本発明の一実施例において、末梢血単核球から製造された i P S 細胞における幹細胞マーカー遺伝子の発現を R T - P C R により解析した結果である。

[図5]本発明の一実施例において、F A C S により選別した T 細胞に対し M O I 20 でウイルスを添加して単核球集団を脱分化処理することにより得られたアルカリフォスファターゼ陽性幹細胞のコロニー数（比較例）と、実施例において M O I 20 で脱分化処理して得られたコロニー数（実施例）を比較したグラフである。

[図6]本発明の一実施例において、単核球集団を抗 C D 3 抗体およびインターロイキン 2 の存在下で培養し、i P S 細胞を作製した場合（抗 C D 3 + I L 2 + 群）と、単核球集団を抗 C D 3 抗体およびインターロイキン 2 の非存在下で培養し、i P S 細胞を作製した場合（抗 C D 3 - I L 2 - 群）における、i P S 樹立効率を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、上記知見に基づき完成した本発明の実施の形態を、実施例を挙げながら詳細に説明する。

[0013] 実施の形態及び実施例に特に説明がない場合には、J. Sambrook, E. F. Fritsch & T. Maniatis (Ed.), *Molecular cloning, a laboratory manual* (3rd edition), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, K. Struhl (Ed.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Ltd. 等の標準的なプロトコール集に記載の方法、あるいはそれを修飾したり、改変した方法を用いる。また、市販の試薬キットや測定装置を用いる場合には、特に説明が無い場合、それらに添付のプロ

トコールを用いる。

[0014] なお、本発明の目的、特徴、利点、及びそのアイデアは、本明細書の記載により、当業者には明らかであり、本明細書の記載から、当業者であれば、容易に本発明を再現できる。以下に記載された発明の実施の形態及び具体的な実施例等は、本発明の好ましい実施態様を示すものであり、例示又は説明のために示されているのであって、本発明をそれらに限定するものではない。本明細書で開示されている本発明の意図ならびに範囲内で、本明細書の記載に基づき、様々に修飾ができることは、当業者にとって明らかである。

[0015] 以下に、末梢血由来の単核球集団を材料としてiPS細胞を製造する方法を詳述する。

[0016] 末梢血は、哺乳動物に由来することが好ましく、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ウマ、ブタ、ネコ、イヌ、サル等の動物に由来してもよいが、ヒトに由来することがより好ましい。これらの動物の成長段階は、成体、仔、胎児、胚のいずれであってもよく、単核球の含まれる末梢血が得られる範囲内で制限されない。採血方法は、動物のサイズや採血量を考慮して当業者が周知の方法から適宜選択すればよく、特に制限されないが、動物の負担を軽減するためには注射器で採血することが好ましい。

[0017] なお、本発明に係る方法で製造したiPS細胞を何らかの疾病に罹患した患者あるいは患獣の治療に用いる場合には、末梢血は、患者や患獣と同種の動物に由来することが好ましく、患者や患獣自身に由来することがより好ましい。

[0018] 単核球集団は、単核球以外の末梢血由来の細胞や成分と混在していても、単核球のみが含まれてもよいが、iPS細胞の製造効率を考慮すると、単核球が高い割合で含まれていることが好ましい。末梢血から単核球集団を調製する方法は、周知の方法から当業者が適宜選択することができ、例えば、密度勾配遠心法、リンフォクイック法（One Lambda社）、免疫磁気ビーズ法等を用いてもよい。密度勾配遠心法の比重液としては、例えば、シヨ糖溶液や

フィコール溶液、または、フィコール・コンレイ、フィコール・ハイパック等のショ糖とエピクロロヒドリンとの水溶性共重合体の溶液、あるいは、パーコール等のポリビニルピロリドンで被覆したコロイドシリカの溶液等の周知の溶液から当業者が適宜選択すればよい。なお、末梢血は、新鮮なものであることが好ましいが、冷蔵・冷凍保存されたものであっても構わない。

[0019] ==末梢血由来の単核球集団の培養==

まず、末梢血から調製した単核球集団を、抗CD3抗体およびインターロイキンの存在下で3～14日間、好ましくは3～7日間培養する。この培養により、単核球のうち、CD3陽性T細胞の増殖が特異的に促進されると考えられる。

[0020] 培養条件は、当業者が適宜選択すればよく、例えば5%CO₂存在下で35～40℃、好ましくは37℃で培養すればよい。培地は単核球の培養に通常用いられる培地から当業者が適宜選択でき、例えば、KBM502、DMEM/F12、DMEM、KBM530、KBM540、KBM560、RPM1640であってもよいが、KBM502であることが好ましい。

[0021] ここで、抗CD3抗体は、培養皿や培養管に固定されていても、あるいは、液体培地中に浮遊した状態であってもよい。抗CD3抗体が固定化されている場合、例えば、共有結合、または、静電相互作用等の非共有結合を介して、培養皿や培養管を構成するプラスチック等に固定化されていてもよいが、固定化方法は特に制限されず、当業者に周知の方法から適宜選択できる。また、抗CD3抗体の固定化された培養皿等は、BD BioCoat社等から購入することもできる。液体培地中の抗CD3抗体の濃度は、当業者が最適濃度を設定すればよいが、最終的なiPS細胞の収率を考慮すると、1～100μg/mlであることが好ましい。なお、抗CD3抗体は、材料となる単核球のCD3抗原に対して特異的に刺激を与え、CD3抗原陽性単核球の増殖を促進することのできる抗体であればよく、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよく、また、何れの動物から得られた抗体であっても特に制限されない。ここで、抗体は、可変領域を含む抗原結合部位

を含む抗体の一部であってもよく、例えば、F a bフラグメント、F (a b ')₂フラグメント等であってもよい。

[0022] インターロイキンは、周知のいずれのインターロイキンであってもよく、例えば、インターロイキン1、インターロイキン2、インターロイキン4、インターロイキン6、インターロイキン8、インターロイキン11、インターロイキン12等が挙げられるが、取り扱いや調製の容易さを考慮すると、市販されているインターロイキン2を用いることが好ましい。

[0023] なお、上記抗体やインターロイキンに加え、単核球の培養に通常添加される1種類以上の物質が、培地に含まれていてもよい。このような物質として、例えば、繊維芽細胞増殖因子 (F G F) や上皮成長因子 (E G F) 等の増殖因子、F B S やknockout serum replacement (Invitrogen 社)、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ペニシリンやストレプトマイシン等の抗生物質、メルカプトエタノール等が挙げられるが、これらに限定されない。

[0024] ==単核球集団の脱分化処理==

次に、単核球集団に対して脱分化処理を行う。

[0025] 単核球集団の脱分化処理は、当業者に周知の方法によって行うことができ、所望のi P S細胞が作製できる範囲で制限されない。例えば、脱分化因子を用いても、あるいは、単核球の脱分化を促進する周知の薬剤を投与してもよい。脱分化因子を用いる場合、i P S細胞を作製する際に通常用いられる脱分化因子(初期化因子)を用いることができる。例えばTakahashiらの論文(Cell 2007 vol. 131 : 861-872)に記載された初期化方法を用いることができ、本刊行物を引用することにより、本明細書に含めるものとする。特に、O c t 遺伝子群、K l f 遺伝子群、S o x 遺伝子群のそれぞれから選択された遺伝子産物の組み合わせを含むことが好ましく、M y c 遺伝子群の遺伝子産物をさらに含むことが好ましい。O c t 遺伝子群に属する遺伝子としては、O c t 3 / 4、O c t 1 A、O c t 6等の各遺伝子が挙げられる。K l f 遺伝子群に属する遺伝子としては、K l f 1、K l f 2、K l f 4、K l f 5等の各遺伝子が挙げられる。S o x 遺伝子群に属する遺伝子としては、S o

x 1、S o x 2、S o x 3、S o x 7、S o x 15、S o x 17、S o x 18等の各遺伝子が挙げられる。M y c 遺伝子群に属する遺伝子としては、c-M y c、N-M y c、L-M y c等の各遺伝子が挙げられる。さらに、これら遺伝子の組み合わせに加え、サイトカインや化合物を補助因子として培地に添加しても良い。

[0026] 上記以外の脱分化因子の組み合わせとして、O c t 遺伝子群の遺伝子産物、S o x 遺伝子群の遺伝子産物に加え、N a n o g 遺伝子の遺伝子産物、I i n - 2 8 遺伝子の遺伝子産物等を含む組み合わせが例示できる。また、これらの脱分化因子の組み合わせに加え、例えば、S V 4 0 L a r g e T 抗原遺伝子産物、およびT E R T 遺伝子産物、不死化誘導因子等を用いてもよい。

[0027] なお、脱分化因子により脱分化される単核球において、上記の脱分化因子のいずれか、または複数がすでに発現している場合には、その脱分化因子を省略することもできる。また、特定の脱分化因子の機能を代替できる化合物があれば、その脱分化因子の代わりに用いてもよい。例えば、M y c 遺伝子群の遺伝子産物は、サイトカインや化合物で置換できる場合があり、この場合のサイトカインとして、S C F や b F G F 等が挙げられる。また、c-M y c 遺伝子やK l f 4 遺伝子を代替できる化合物として、例えばバルプロ酸などが挙げられる。

[0028] 脱分化因子をコードする遺伝子は、いずれも脊椎動物で高度に保存されている遺伝子であり、本明細書では特に動物名を示さない限り、ホモログを含めた遺伝子を表すものとする。また、遺伝子多型を含め、変異を有する遺伝子の遺伝子産物であっても野生型の遺伝子産物と同等の機能を有する遺伝子産物、例えば、野生型遺伝子産物の1~10、好ましくは1~6、より好ましくは1~4、さらに好ましくは1~3、特に好ましくは1~2アミノ酸が置換、挿入、または欠失した変異遺伝子産物もまた、含まれるものとする。

[0029] 以上のような脱分化因子を用いた、単核球集団の脱分化処理方法は特に制限されないが、例えば、単核球集団に対し、脱分化因子の導入操作を行うこ

とによって脱分化処理することができる。具体的には、SAINT-PhD（コスモ・バイオ株式会社）やCellvader（GE Healthcare 社）等の陽イオン性脂質試薬と脱分化因子との複合体、あるいは、Protein Transduction Domain (PTD) と呼ばれるペプチドと脱分化因子との複合体等を調製する。これらの複合体を単核球集団の培地に添加し、単核球集団に接触させることにより、脱分化因子を単核球に導入することができる。こうして脱分化因子が導入された単核球は脱分化し、多能性を獲得する。なお、添加する脱分化因子の量は、当業者が適宜決定できる。

[0030] 一方、単核球集団に対し、脱分化因子を発現させることのできる発現ベクターの導入操作を行うことによって、単核球集団の脱分化処理を行ってもよい。DNAベクターの場合、脱分化因子をコードする遺伝子（脱分化因子遺伝子）を、単核球で発現させるための適切なプロモーターの下流に導入し、組み換え発現ベクターを調製する。あるいはセンダイウイルスのようなマイナス鎖RNAウイルスの場合は、ウイルス由来のプロモーターを利用して脱分化因子遺伝子を発現させるが、このようなウイルス由来のRNAベクターの場合、脱分化因子をコードするRNAをゲノムに有する組み換えウイルスベクターを調製する。この時、1つのベクターに2種類以上の脱分化因子遺伝子を挿入してもよい。ここで、使用する発現ベクターは、所望の脱分化誘導機能を有する範囲で特に制限されず、野生型、変異型、天然型、人為的改変型等のいずれであっても制限されないが、ウイルスベクターであることが好ましい。例えば、センダイウイルス由来、レトロウイルス由来、アデノウイルス由来、アデノ随伴ウイルス由来、ボックスウイルス由来等のウイルスベクターであってもよいが、宿主染色体への転移による融合を起こさないという特徴を有するセンダイウイルス由来のベクターであることが好ましい。

[0031] このようなセンダイウイルスベクターは、単核球における脱分化の誘導機能を果たすために、Nタンパク質、Pタンパク質、およびLタンパク質等の、ゲノム複製に必要なタンパク質をコードする遺伝子を有することが好ましい。ここで、人為的改変型のセンダイウイルスベクターは、細胞傷害性や温

度感受性についての変異を有するセンダイウイルスベクターであってもよい。例えば、マイナス鎖RNAウイルス由来のF遺伝子、H遺伝子、HN遺伝子、またはG遺伝子等のウイルスのエンベロープタンパク質や外殻タンパク質をコードする遺伝子に変異または欠損を有しているセンダイウイルスベクターであってもよい（WO00/70055、WO00/70070、Li, H. -0. et al., J. Virol. 74(14) 6564-6569 (2000) 参照）。このようなセンダイウイルスベクターは、単核球においてゲノムを複製できるが感染性ウイルス粒子を形成できないため、安全性が高い。特に、F遺伝子欠失型センダイウイルスベクターを用いることが好ましい。

[0032] このように調製した組み換え発現ベクターやウイルス粒子を単核球に導入する。この際、プラスミド等の組み換え発現ベクター、あるいは、ウイルス粒子を培地に添加することにより、単核球に目的遺伝子を導入することができる。プラスミド等の組み換え発現ベクターを添加した場合、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法等の周知の遺伝子導入方法に従って処理することによって組み換え発現ベクターを単核球に導入することができる。一方、組み換えセンダイウイルスなどのウイルス粒子を添加した場合、単核球にウイルスが感染することによって単核球に目的遺伝子が導入される。

[0033] 組み換え発現ベクターが導入された単核球では脱分化因子が発現するため、その単核球は発現した脱分化因子によって脱分化する。なお、添加する組み換え発現ベクターの量は、当業者が適宜決定できる。

[0034] なお、単核球集団に対する脱分化因子導入操作の間、無血清培地中で1～5日、好ましくは2日間、5%CO₂存在下、35℃～40℃、好ましくは37℃で培養する。無血清培地は、DMEM/F12、VP-SFM、DMEM、KBM530、KBM540、KBM560、ROM1640、あるいはKBM502であってもよいが、KBM502であることが好ましい。この際、MEF（マウス胚性繊維芽細胞）やSNL（株化マウス胚性繊維芽細胞）等で作製したフィーダー細胞を用いてもよい。

[0035] ==脱分化処理後の培養==

以上のようにして脱分化処理した単核球集団を10～30日、好ましくは14～25日、より好ましくは20日間、iPS細胞を培養する一般的な条件下で培養する。例えば、増殖因子含有DMEM/F12を用い、5%CO₂存在下、35℃～40℃、好ましくは37℃で培養すればよい。あるいは、DMEM等の培地を用いてもよく、MEFやSNL等で作製したフィーダー細胞を用いてもよい。また、増殖因子は特に制限されず、周知の増殖因子から当業者が適宜選択できるが、例えば、繊維芽細胞増殖因子（FGF）や上皮成長因子（EGF）であってもよい。

[0036] なお、上記増殖因子に加え、単核球の培養に通常添加される1種類以上の物質が、培地に含まれていてもよい。このような物質として、FBS等の血清やknockout serum replacement（Invitrogen社）、L-グルタミン、非必須アミノ酸、ペニシリンやストレプトマイシン等の抗生物質、メルカプトエタノール等が挙げられるがこれらに限定されない。

実施例

[0037] 本実施例では、本発明に係るiPS細胞製造方法によって、末梢血由来単核球集団から効率的にiPS細胞を製造できることを示す。なお、培養は全て37℃、5%CO₂条件下で行った。

[0038] ==単核球分画の調製==

慶應大学病院倫理委員会で承認されたプロトコールに従って、インフォームドコンセントを行った各健常人ボランティア（11歳～66歳、男女、計5名）から、1～20mlの末梢血を採血した。フィコール・ハイパック（GE Healthcare社）を比重液とし、遠心分離（30分間、400×g）を行い、末梢血から単核球分画を単離した。

[0039] ==組み換えセンダイウイルスベクター==

以下（1）～（4）の脱分化因子遺伝子を公知の方法（WO2010/08054）に従って、SeV18+/TSΔFベクター（WO2010/08054）に導入したセンダイウイルスの調製を行った。

- (1) Oct 3 / 4 遺伝子
- (2) Klf 4 遺伝子
- (3) c-Myc 遺伝子
- (4) Sox 2 遺伝子

具体的には、(1) ~ (4) の遺伝子を含む、マイナス鎖RNAウイルスゲノムRNA (マイナス鎖) またはその相補鎖 (プラス鎖) をコードするcDNAの組み換えウイルスゲノムを発現するプラスミドベクター、及びウイルスの自己複製に必要な蛋白質 (F、N、P、L、T7RNAポリメラーゼ) を発現するプラスミドベクターを293T/17細胞に導入し、さらにFタンパク質を発現するLLC-MK2/F/A細胞を重層して培養を行い、生成したウイルスを含む培養上清を回収することにより製造した。

[0040] ==フィーダー細胞の調製==

(株化マウス胚性繊維芽細胞、SNL)

ディッシュに0.1%ゼラチンを加え、37°Cで約1時間静置し、ディッシュをコーティングした。SNL (EGACC社) を 1.5×10^5 細胞/mlの密度に調製し、1ディッシュ (直径10cm) あたり10mlを加え、一晩培養し、フィーダー細胞を調製した。

[0041] ==抗CD3抗体を用いた単核球集団の培養==

抗CD3抗体 (BD Biosciences 社) をPBSで $10 \mu\text{g/ml}$ に調製した。この抗体希釈液で6ウェルディッシュの底面を覆い、37°Cで30分間~3時間インキュベートした。使用直前に抗体希釈液を取り除き、PBSで洗浄して抗CD3抗体結合ディッシュとした。

[0042] 末梢血由来単核球集団を、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/mlの密度で抗CD3抗体結合ディッシュに播種し、含有KBM502培地 (20U/ml組み換えインターロイキン2が含有されている) 10mlにおいて5日間培養した。

[0043] ==単核球の脱分化処理==

(脱分化処理1日目)

抗CD3抗体を用いて培養した単核球集団を 7.5×10^5 細胞/mlの密度に調製し、ここにMOI 1、3、5、10、あるいは20でセンダイウイルスを添加することによって、組み換えベクターを導入した後、KBM502培地中で24時間培養した。

[0044] (脱分化処理2日目)

セルスクレーパーで細胞を剥がし取り、細胞を含む培地を、ウェル毎にチューブに回収した。20°C、800~1000rpmで5分間遠心した後、ペレットにKBM502培地2mlを加え、数回ピペティングし、ペレットをシングルセルにならない程度に破壊し、懸濁した。この懸濁液を、元のディッシュのウェルに戻し、KBM502培地中で24時間培養した。

[0045] (脱分化処理3日目)

セルスクレーパーで細胞を剥がし取り、細胞を含む培地をウェル毎にチューブに回収した。ピペティングによって、細胞をシングルセルにし、細胞数を計数した。20°C、800~1000rpmで5分間遠心した後、ペレットに適量のKBM502培地を加えた。ピペティングによって、ペレットをシングルセルにし、10cmディッシュに調製したフィーダー細胞(SNL)上に、 5×10^4 、 5×10^5 、 5×10^6 /ディッシュの密度で単核球を播種し、KBM502培地中で24時間培養した。

[0046] ==脱分化処理後の培養==

上記のように脱分化処理した細胞を、フィーダー細胞(SNL)上に播種し、培地を10ng/mlヒト塩基性繊維芽細胞増殖因子(bFGF、和光純薬工業)添加iPS細胞培地(10ml/10cmディッシュ)に交換した。その後、48時間毎に培地を交換し、20日間培養を続けた。なお、iPS細胞培地は、DMEM/F12(Invitrogen社)、20%knockout serum replacement(Invitrogen社)、2mM L-グルタミン、(Invitrogen社)、 1×10^{-4} M 非必須アミノ酸(Invitrogen社)、 1×10^{-4} M 2-メルカプトエタノール(Invitrogen社)、0.5%ペニシリン-ストレプトマイシン(和光純薬工業)から成る。

[0047] ==アルカリフォスファターゼ染色およびクリスタルバイオレット染色==
脱分化処理により得られたコロニーに対し、アルカリフォスファターゼ染色、および、クリスタルバイオレット染色を行った。まず、コロニーを10%中性緩衝ホルマリン液（和光純薬工業）で固定した後、1-Step NBT/BCIP（Pierce 社）で染色した。さらに、クリスタルバイオレットをメタノールに溶解して4%クリスタルバイオレット溶液を調製し、細胞に添加して30分間染色した。なお、アルカリフォスファターゼは幹細胞で発現することが知られており、幹細胞のマーカーとして用いられている（例えば、Riekstina U. et al., Stem Cell Rev. 2009 Dec 5(4): 378-386 参照）。また、クリスタルバイオレット染色により生細胞のみが染色される。さらに、DAPI（Molecular Probes 社）を用いて適宜核の対比染色を行った。

[0048] 図1に示すように、MOI 3~20のいずれで脱分化処理を行った場合でも、生細胞の80~90%のコロニーがアルカリフォスファターゼ陽性であった

[0049] ==免疫組織化学的染色による幹細胞マーカータンパク質発現の解析==
上記アルカリフォスファターゼ陽性細胞のコロニーのうち、3コロニーをランダムにクローニングし、これらの細胞がiPS細胞であることを確認するため、DAPI染色およびアルカリフォスファターゼ染色を行い形態学的観察を行ったところ、3つのクローンとも、胚性幹細胞あるいはiPS細胞に典型的な形態を有し、アルカリフォスファターゼ陽性であった。

[0050] 次に、脱分化処理により得られたクローンのコロニーを、10%中性緩衝ホルマリン液（和光純薬工業）で固定した後、抗Nano g抗体（リプロセル社、1000倍希釈）、抗Oct 3/4抗体（Santa Cruz 社、100倍希釈）、抗SSEA 3抗体（Millipore 社、200倍希釈）、抗SSEA 4抗体（Millipore 社、200倍希釈）、抗Tra160抗体（Millipore 社、200倍希釈）、抗Tra181抗体（Millipore 社、200倍希釈）と反応させた。その後、Alexa 488またはAlexa 568で標識された抗ウサギIgG抗体、抗マウスIgG抗体あるいは抗マウスIgM抗体を二

次抗体（全てMolecular Probes社）として適宜用いた。染色した細胞を蛍光顕微鏡（IX70、オリンパス株式会社）下で観察したところ、図3に示すように、3つのクローン全てにおいて、調べた全ての幹細胞マーカーのタンパク質が検出された。

[0051] ==RT-PCR法による幹細胞マーカー遺伝子発現の解析==

さらに、各クローンの細胞について各種幹細胞マーカーのタンパク質および遺伝子発現を、免疫組織学的染色および逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）法により解析した。RT-PCR法では、脱分化処理前の単核球、および、脱分化処理後の単核球について同様に解析を行い、陽性コントロール細胞としてヒト胚性幹細胞を用いた（KHES-2、京都大学より入手）。

[0052] 各クローンの細胞から、TRIzol（Invitrogen社）を用いて全RNAを単離した。この全RNAから、Superscript First-Strand Synthesis System（Invitrogen社）を用いてcDNAを調製した。このcDNAを鋳型とし、下記のプライマーを用いてKOD plus（DNAポリメラーゼ、東洋紡社）によるRT-PCRを行ったところ、図4に示すように、ヒト胚性幹細胞に発現する幹細胞マーカー遺伝子が、3クローン全ての細胞において検出された。

プライマー：

Nanog-F: CAGCCCGATTCTTCCACCAGTCCC（配列番号1）

Nanog-R: CGGAAGATTCCCAGTCGGGTTCCACC（配列番号2）

Oct 3/4-F: GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG（配列番号3）

Oct 3/4-R: CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC（配列番号4）

Sox 2-F: GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG（配列番号5）

Sox 2-R: TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG（配列番号6）

Klf 4-F: ACGATCGTGGCCCCGAAAAGGACC（配列番号7）

Klf 4-R: TGATTGTAGTGCTTTCTGGCTGGGCTCC（配列番号8）

cMyc-F: GCGTCCTGGGAAGGGAGATCCGGAGC（配列番号9）

cMyc-R: TTGAGGGGCATCGTCGCGGGAGGCTG (配列番号 10)
GDF 3-F: CTTATGCTACGTAAAGGAGCTGGG (配列番号 11)
GDF 3-R: GTGCCAACCCAGGTCCCGGAAGTT (配列番号 12)
Rex 1-F: CAGATCCTAACAGCTCGCAGAAT (配列番号 13)
Rex 1-R: GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA (配列番号 14)
DPPA 4-F: GGAGCCGCCTGCCCTGGAAAATTC (配列番号 15)
DPPA 4-R: TTTTTCCTGATATTCTATTCCCAT (配列番号 16)
DPPA 2-F: CCGTCCCGCAATCTCCTTCCATC (配列番号 17)
DPPA 2-R: ATGATGCCAACATGGCTCCCGGTG (配列番号 18)
GAPDH-F: CAGAACATCATCCCTGCCTCTAG (配列番号 19)
GAPDH-R: TTGAAGTCAGAGGAGACCACCTG (配列番号 20)

[0053] これらの結果は、本実施例において作製した細胞は i P S 細胞であることを示している。

[0054] このように、末梢血由来単核球集団から F A C S などを用いて抗 C D 3 陽性 T 細胞を単離せず、末梢血由来単核球集団を抗 C D 3 抗体の存在下で培養した後、脱分化処理することにより、高い効率で i P S 細胞が作製できる。

[0055] [比較例 1]

比較例では、F A C S により末梢血単核球分画から T 細胞を選別し、i P S 細胞を製造する。

[0056] まず、実施例で用いたのと同量の末梢血由来単核球分画から、F A C S により C D 3 陽性 T 細胞を選別した。この選別により末梢血由来単核球分画の約 30 ~ 40 % が C D 3 陽性 T 細胞として得られた。選別された T 細胞を抗 C D 3 抗体結合ディッシュに播種し、組み換えインターロイキン 2 (20 U / m l) 含有 K B M 5 0 2 培地 10 m l において 5 日間培養した。

[0057] 培養後の T 細胞を 7.5×10^5 細胞 / m l の密度に調製し、実施例と同様に M O I 3 あるいは 20 で組み換えセンダイウイルスを添加することによって、組み換えベクターを導入し、C D 3 陽性 T 細胞の脱分化処理を行った。

[0058] 脱分化処理により得られたコロニーの細胞において、アルカリフォスファ

ターゼ染色、および、クリスタルバイオレット染色を行った。

[0059] 本比較例でMOI 20で脱分化処理を行った場合のコロニー数を、実施例でMOI 20で脱分化処理を行った場合のコロニー数と比較したグラフを図5に示す。比較例で得られたコロニーは、アルカリフォスファターゼ陽性、陰性を含めても数コロニーであった。

[0060] 比較例の結果を実施例の結果と比較すると、実施例の方法では、比較例の方法に比較して、iPS細胞樹立の効率が約100倍高いことが示された。

[0061] [比較例2]

本比較例では、実施例に記載の単核球集団からiPS細胞を作製する際、抗CD3抗体およびインターロイキン2の存在下で単核球集団を培養する工程が必要であることを示す。

[0062] まず、実施例の記載に従い、末梢血から取得した単核球集団を抗CD3抗体結合ディッシュに播種し、インターロイキン2存在下で5日間培養した細胞を脱分化させてiPS細胞を樹立した(抗CD3+IL2+群)。一方、末梢血から取得した単核球集団を、抗CD3抗体の結合していないディッシュに播種し、インターロイキン2を含有しないKBM502培地を用いて5日間培養した細胞を脱分化させてiPS細胞を樹立した(抗CD3-IL2-群)。なお、抗CD3+IL2+群、抗CD3-IL2-群共に、単核球の脱分化処理は、単核球集団に、MOI 3で、初期化因子を発現するセンダイウイルスを添加して行った。

[0063] 以上のiPS樹立工程において、センダイウイルスを添加した単核球数に対するアルカリフォスファターゼ陽性コロニー数の割合(%)をiPS細胞樹立効率として算出したところ、図6に示すように、iPS細胞樹立効率は抗CD3-IL2-群では0%であったが、抗CD3+IL2+群では0.016%であった。

[0064] このように、単核球集団からiPS細胞を作製するためには、抗CD3抗体およびインターロイキン2の存在下での培養工程が必要である。

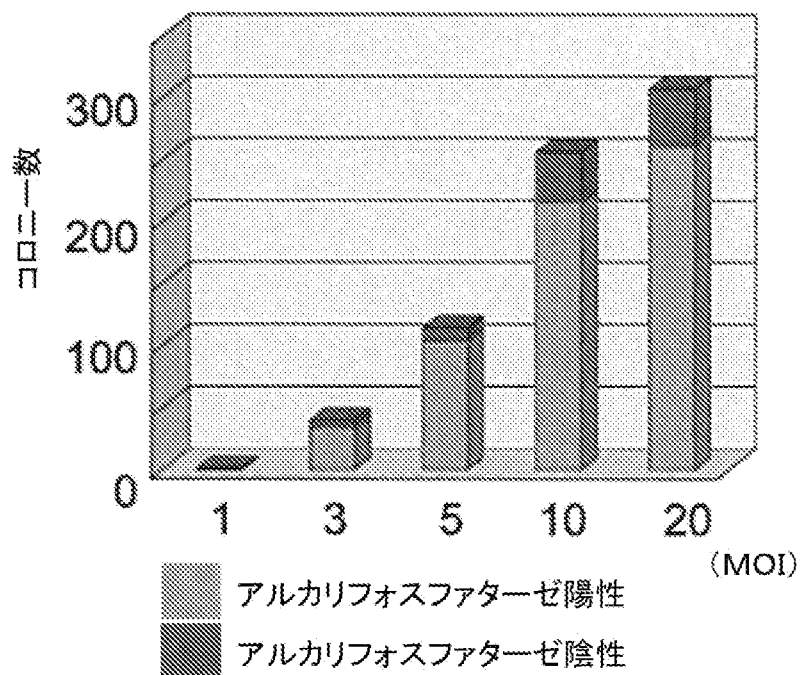
産業上の利用可能性

[0065] 本発明により、末梢血由来の単核球から高効率でiPS細胞を製造することが可能になった。

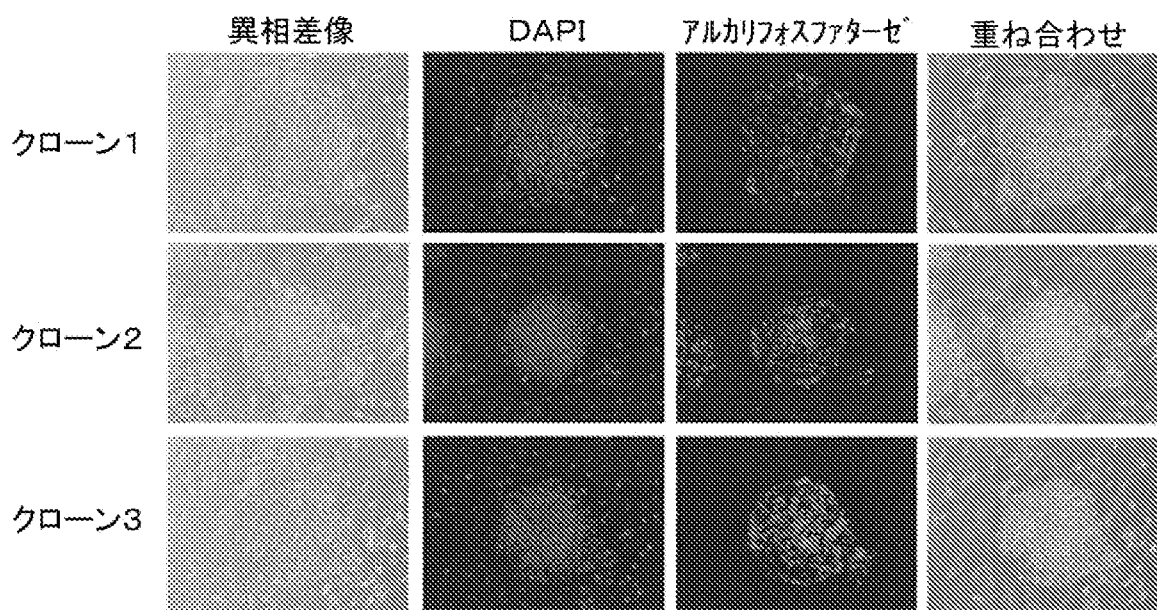
請求の範囲

- [請求項1] 人工多能性幹細胞の製造方法であって、末梢血由来の単核球集団を材料とすることを特徴とする方法。
- [請求項2] 請求項1に記載の人工多能性幹細胞の製造方法であって、
(イ) 末梢血由来の単核球集団を抗CD3抗体およびインターロイキン2の存在下で3～14日間培養する工程と、
(ロ) 培養後の前記単核球集団に対して脱分化処理を行う工程とを含むことを特徴とする方法。
- [請求項3] 請求項2に記載の人工多能性幹細胞の製造方法であって、前記工程(ロ)において、前記単核球集団に脱分化因子の導入操作を行うことを特徴とする方法。
- [請求項4] 請求項3に記載の人工多能性幹細胞の製造方法であって、前記脱分化因子の導入操作において、前記脱分化因子を発現する組み換え発現ベクターの導入操作を行うことを特徴とする方法。
- [請求項5] 請求項3または4に記載の人工多能性幹細胞の製造方法であって、前記工程(ロ)において、前記脱分化因子がSox2、Oct3/4、Klf4およびc-My cであることを特徴とする方法。
- [請求項6] 請求項4または5に記載の人工多能性幹細胞の製造方法であって、前記組み換え発現ベクターがセンダイウイルスベクターであることを特徴とする方法。
- [請求項7] 請求項2～6のいずれかに記載の人工多能性幹細胞の製造方法であって、
(ハ) 脱分化処理を行った前記単核球集団を、増殖因子の存在下で14～25日間培養する工程をさらに含むことを特徴とする方法。
- [請求項8] 請求項1～7のいずれかに記載の人工多能性幹細胞の製造方法であって、前記末梢血がヒト由来であることを特徴とする方法。

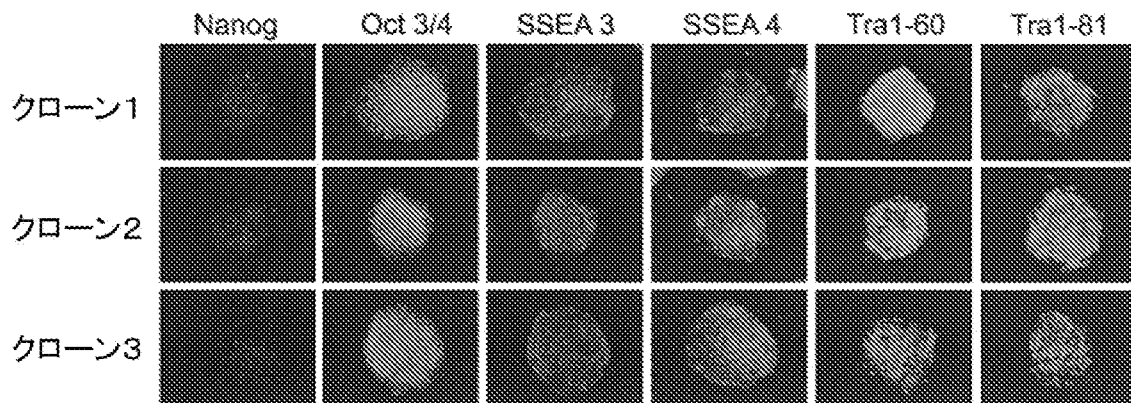
[図1]



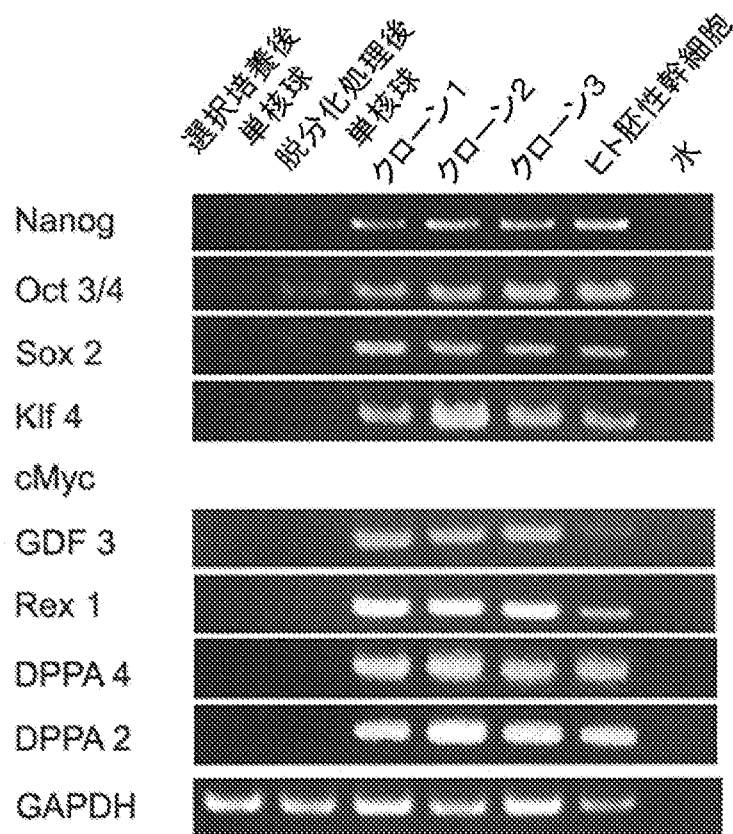
[図2]



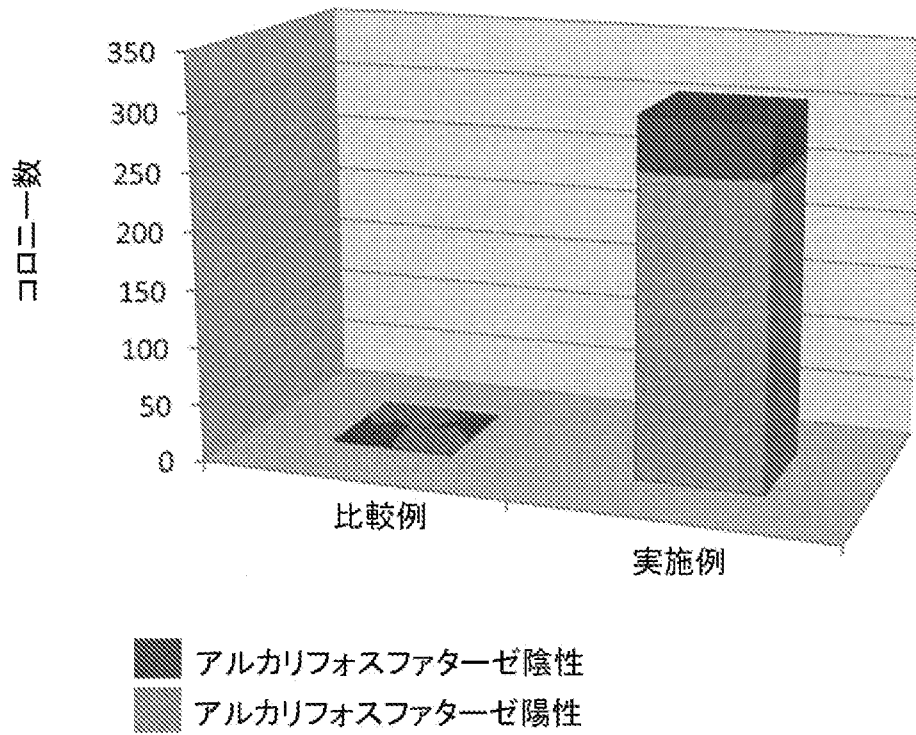
[図3]



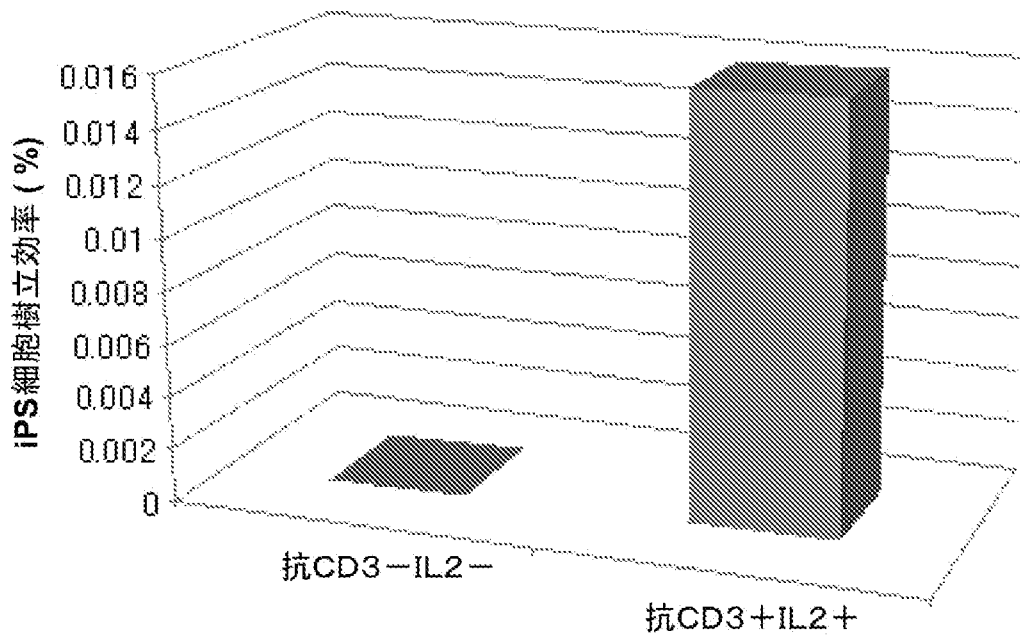
[図4]



[図5]



[図6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/059429

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N5/10(2006.01) i, C12N15/09(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) C12N5/10, C12N15/09		
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) CAplus/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTplus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, WPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2009/148057 A1 (Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.), 10 December 2009 (10.12.2009), (Family: none)	1, 8 2-7
X A	LOH, Y.H. et al., Generation of induced pluripotent stem cells from human blood, Blood, 2009, 113(22), p.5476-9	1, 8 2-7
X A	HANNA, J. et al., Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency, Cell, 2008, 133(2), p.250-64	1, 8 2-7
A	HAASE, A. et al., Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood, Cell Stem Cell, 2009, 5(4), p.434-41	1-8
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 12 July, 2011 (12.07.11)		Date of mailing of the international search report 19 July, 2011 (19.07.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/059429

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GIORGETTI, A. et al., Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2, <i>Cell Stem Cell</i> , 2009, 5(4), p.353-7	1-8
A	YE, Z. et al., Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders, <i>Blood</i> , 2009, 114(27), p.5473-80	1-8
A	FUSAKI, N. et al., Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome, <i>Proc.Jpn.Acad.Ser.B Phys.Biol.Sci.</i> , 2009, 85(8), p.348-62	1-8
A	ANDERSON, P.M. et al., Anti-CD3 + interleukin-2 stimulation of marrow and blood: comparison of proliferation and cytotoxicity, <i>Blood</i> , 1992, 80(7), p.1846-53	1-8
P,X	SEKI, T. et al., Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells, <i>Cell Stem Cell</i> , 2010-JUL, 7(1), p.11-4	1-8
E,X E,A	WO 2010/131747 A1 (The University of Tokyo), 18 November 2010 (18.11.2010), (Family: none)	1,8 2-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(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. C12N5/10, C12N15/09		
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) Cplus/BIOSIS/MEDLINE(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, WPI		
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	WO 2009/148057 A1 (協和発酵キリン株式会社) 2009.12.10, (ファミリーなし)	1, 8 2-7
X A	LOH, Y. H. et al., Generation of induced pluripotent stem cells from human blood, Blood, 2009, 113(22), p. 5476-9	1, 8 2-7
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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 12.07.2011	国際調査報告の発送日 19.07.2011	
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) 名和 大輔 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 4433

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 A	HANNA, J. et al., Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency, Cell, 2008, 133(2), p. 250-64	1, 8 2-7
A	HAASE, A. et al., Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood, Cell Stem Cell, 2009, 5(4), p. 434-41	1-8
A	GIORGETTI, A. et al., Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2, Cell Stem Cell, 2009, 5(4), p. 353-7	1-8
A	YE, Z. et al., Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders, Blood, 2009, 114(27), p. 5473-80	1-8
A	FUSAKI, N. et al., Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome, Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci., 2009, 85(8), p. 348-62	1-8
A	ANDERSON, P. M. et al., Anti-CD3 + interleukin-2 stimulation of marrow and blood: comparison of proliferation and cytotoxicity, Blood, 1992, 80(7), p. 1846-53	1-8
P, X	SEKI, T. et al., Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells, Cell Stem Cell, 2010-JUL, 7(1), p. 11-4	1-8
E, X E, A	WO 2010/131747 A1 (国立大学法人 東京大学) 2010.11.18, (ファミリーなし)	1, 8 2-7