

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2013-126412

(P2013-126412A)

(43) 公開日 平成25年6月27日(2013.6.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/0789 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 Q	4 B 0 6 5
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5	

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 38 頁)

(21) 出願番号 特願2012-252371 (P2012-252371)	(71) 出願人 503092180 学校法人関西学院 兵庫県西宮市上ヶ原一番町1番155号
(22) 出願日 平成24年11月16日(2012.11.16)	
(31) 優先権主張番号 特願2011-251004 (P2011-251004)	(74) 代理人 110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所
(32) 優先日 平成23年11月16日(2011.11.16)	(72) 発明者 関 由行 兵庫県三田市学園二丁目一番地 関西学院 大学理工学部内
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	Fターム(参考) 4B024 AA20 CA04 CA11 DA03 FA01 GA11 4B065 AA90Y AA93X AA93Y AB01 BA02 CA44 4C084 AA13 NA14 ZB21

(54) 【発明の名称】 DNA脱メチル化誘導法及びその用途

(57) 【要約】

【課題】(1)細胞内においてDNA脱メチル化を誘導する方法を提供すること。

(2)より品質の向上したiPS細胞を提供すること。

【解決手段】細胞内においてDNA脱メチル化を誘導する方法であって、TET1活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及びPRDM14活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドの細胞内含量を増加させる工程を含む、方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞内において DNA 脱メチル化を誘導する方法であって、

(1) TET1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び

PRDM14 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドの細胞内含量を増加させる工程を含む、方法。

【請求項 2】

前記細胞が培養細胞である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

核初期化物質を用いて体細胞から iPS 細胞を製造する方法であって、

(1) TET1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び

PRDM14 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドの細胞内含量を増加させる工程を含む方法。

【請求項 4】

前記工程 (1) が、

TET1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び

20

PRDM14 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

を細胞内において過剰発現させる工程である、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

(A-1) TET1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び

(A-2) PRDM14 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド

を含有する、組成物。

30

【請求項 6】

(-1) TET1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び

(-2) PRDM14 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

を含有する、組成物。

【請求項 7】

(a-1) TET1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター；及び

(a-2) PRDM14 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター

40

を含有する、組成物。

【請求項 8】

(b) TET1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び

PRDM14 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

を含む共発現ベクター。

【請求項 9】

DNA 脱メチル化誘導剤として用いられる、請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の組成物、又

50

は請求項 8 に記載の共発現ベクター。

【請求項 10】

医薬として用いられる、請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の組成物、又は請求項 8 に記載の共発現ベクター。

【請求項 11】

i P S 細胞の品質改善剤として用いられる、請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の組成物、又は請求項 8 に記載の共発現ベクター。

【請求項 12】

i P S 細胞の初期化完成度向上剤として用いられる、請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の組成物、又は請求項 8 に記載の共発現ベクター。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、DNA 脱メチル化誘導法及びその用途に関する。

【背景技術】

【0002】

C p G 配列のシトシンのメチル化は、遺伝子発現制御において極めて重要な役割を担っており、異常な DNA メチル化が癌などの様々な疾患の要因になっていることが分かっている。精子又は卵の起源である始原生殖細胞は、分化全能性の獲得や異常メチル化の蓄積を防ぐために、ゲノム全体の DNA のメチル化を脱メチル化する活性を持っている。このようなゲノム全体の脱メチル化は、生殖系列の細胞のみで起こる極めてユニークな現象であり、生殖系列特異的な DNA 脱メチル化機構の存在が示唆されている。しかしながら、そのような DNA 脱メチル化機構の詳細は明らかになっていない（非特許文献 1）。

20

【0003】

また、核初期化物質を用いて体細胞から i P S 細胞を製造する方法が知られている。i P S 細胞は再生医療への応用等が期待されているが、未分化性維持の不安定さや、分化能の不均一性等の様々な問題が指摘されている。具体的には、i P S 細胞はメチル化の状態が正常な E S 細胞とは大きく異なり（非特許文献 2）、さらにこの DNA メチル化の異常が、i P S 細胞の品質に悪影響を与えることが知られている。例えば、多くの i P S 細胞において異常なメチル化が原因で D l k 1 - D i o 3 遺伝子クラスターの発現が抑制されていることが知られている。そして、かかる発現抑制に起因して、これらの i P S 細胞はキメラを作成したり、i P S 細胞だけに由来する動物を作成しようとする際に十分に機能しないことが指摘されている（非特許文献 3）。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献 1】 Science Vol. 324, 15 May, 2009, pp. 930 - 935

【非特許文献 2】 Nature Vol 471, 3 March, 2011, pp. 68 - 73

40

【非特許文献 3】 Nature Vol 465, 13 May, 2010, pp. 175 - 183

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の課題は以下の通りである。

(1) 細胞内において DNA 脱メチル化を誘導する方法を提供すること。

(2) より品質の向上した i P S 細胞を提供すること。

【課題を解決するための手段】

【0006】

50

本発明者は、鋭意検討を重ね、TET1活性を介したDNA脱メチル化が、PRDM14活性により促進されることを見出した。本発明者は、さらに、TET1活性単独では脱メチル化できない領域であっても、PRDM14活性を併用することで脱メチル化できることを見出した。かかる新しい知見に基づいて本発明者は、TET1及びPRDM14の細胞内含量を増加させる工程を用いることにより、細胞内においてDNA脱メチル化を誘導できることを見出した。

【0007】

これに加えて、本発明者は、分化させたES細胞にPRDM14を発現させることで、ES細胞への脱分化を誘導できることを見出した。

【0008】

さらに、本発明者は、iPS細胞の品質に悪影響を与えることが知られているDNAメチル化の異常を、本発明のDNA脱メチル化誘導方法によって正常化できることを見出した。かかる新しい知見に基づいて本発明者は、DNA脱メチル化誘導方法を、核初期化物質を用いて体細胞からiPS細胞を製造する方法に適用することにより、より品質の向上したiPS細胞を提供できることを見出した。

【0009】

本発明はかかる知見に基づきさらに検討を重ねた結果完成されたものであり、下記に掲げるものである。

[1. DNA脱メチル化誘導方法]

[1.] 細胞内においてDNA脱メチル化を誘導する方法であって、

(1) TET1活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び

PRDM14活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドの細胞内含量を増加させる工程を含む、方法。

[1.1.1] 前記細胞がヒト細胞である、1.に記載の方法。

[1.1.2] 前記細胞がマウス細胞である、1.に記載の方法。

[1.1.3] 前記細胞が培養細胞である、1.～1.1.2のいずれかに記載の方法。

[1.1.3.1] 前記培養細胞が体細胞である、1.1.3に記載の方法。

[1.1.4] 前記細胞が生体内の細胞である、1.～1.1.2のいずれかに記載の方法。

[1.1.4.1] 前記生体内の細胞がエピゲノム変異を修復するDNAメチル化の異常を有する細胞である、1.1.4に記載の方法。

[1.1.4.2] 前記生体内の細胞ががん細胞である、1.1.4に記載の方法。

[1.2.1] 前記工程(1)が、

TET1活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及びPRDM14活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドを細胞内に導入する工程である、1.～1.1.4.2のいずれかに記載の方法。

[1.2.2] 前記工程(1)が、

TET1活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及びPRDM14活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞内に導入する工程である、1.～1.1.4.2のいずれかに記載の方法。

[1.2.2.1] 前記工程(1)が、

TET1活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及びPRDM14活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

10

20

30

40

50

を細胞内で過剰発現させる工程である、1.2.2に記載の方法。

[1.3.1] TET1活性ドメインの改変体、並びにTET1活性ドメインを含む融合ポリペプチド及びTET1活性ドメインの改変体を含む融合ポリペプチドが、TET1活性を有する、1.~1.2.2.1のいずれかに記載の方法。

[1.3.1.1] TET1活性が、5-メチルシトシン(5mC)を5-ヒドロキシメチルシトシン(hmC)へと変換する活性である、1.3.1に記載の方法。

[1.4.1] PRDM14活性ドメインの改変体、並びにPRDM14活性ドメインを含む融合ポリペプチド及びPRDM14活性ドメインの改変体を含む融合ポリペプチドが、PRDM14活性を有する、1.~1.3.1.1のいずれかに記載の方法。

[1.4.1.1] PRDM14活性が、TET1活性を促進する活性である、1.4.1.1に記載の方法。

[1.5] TET1活性ドメイン又はその改変体を含む融合ポリペプチドが、

(i)メチル化シトシン結合ドメイン；及び

(ii)TET1活性ドメイン又はその改変体からなる活性ドメイン

を含む、1.~1.4.1.1のいずれかに記載の方法。

[1.6] PRDM14又はその改変体を含む融合ポリペプチドが、

(i)標的遺伝子領域に結合するDNA結合ドメイン；及び

(ii)PRDM14又はその改変体からなる活性ドメイン

を含む、1.~1.5のいずれかに記載の方法。

[1.6.1] 標的遺伝子領域が標的遺伝子のプロモーター領域である、1.6に記載の方法。

[1.6.1.1] 標的遺伝子のがん抑制遺伝子である、1.6.1に記載の方法。

[1.6.1.1.1] がん抑制遺伝子がp16、p53又はE-cadherinである、1.6.1.1に記載の方法。

[1.7.1] TET1活性ドメインが、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、1.~1.6.1.1.1のいずれかに記載の方法。

[1.7.1.1] TET1活性ドメインの改変体が、1.7.1に記載のポリペプチドと同一性が80%以上のポリペプチドからなる、1.7.1に記載の方法。

[1.7.1.2] TET1活性ドメインの改変体が、1.7.1に記載のポリペプチドと同一性が85%以上のポリペプチドからなる、1.7.1に記載の方法。

[1.7.1.3] TET1活性ドメインの改変体が、1.7.1に記載のポリペプチドと同一性が90%以上のポリペプチドからなる、1.7.1に記載の方法。

[1.7.1.4] TET1活性ドメインの改変体が、1.7.1に記載のポリペプチドと同一性が95%以上のポリペプチドからなる、1.7.1に記載の方法。

[1.7.1.5] TET1活性ドメインの改変体が、1.7.1に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、1.7.1に記載の方法。

[1.7.2] TET1活性ドメインが、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、1.~1.6.1.1.1のいずれかに記載の方法。

[1.7.2.1] TET1活性ドメインの改変体が、1.7.2に記載のポリペプチドと同一性が80%以上のポリペプチドからなる、1.7.2に記載の方法。

[1.7.2.2] TET1活性ドメインの改変体が、1.7.2に記載のポリペプチドと同一性が85%以上のポリペプチドからなる、1.7.2に記載の方法。

[1.7.2.3] TET1活性ドメインの改変体が、1.7.2に記載のポリペプチドと同一性が90%以上のポリペプチドからなる、1.7.2に記載の方法。

[1.7.2.4] TET1活性ドメインの改変体が、1.7.2に記載のポリペプチドと同一性が95%以上のポリペプチドからなる、1.7.2に記載の方法。

[1.7.2.5] TET1活性ドメインの改変体が、1.7.2に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、1.7.2に記載の方法。

10

20

30

40

50

[1 . 7 . 3] T E T 1 活性ドメインが、配列番号 3 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、1 . ~ 1 . 6 . 1 . 1 . 1 のいずれかに記載の方法。

[1 . 7 . 3 . 1] T E T 1 活性ドメインの改変体が、1 . 7 . 3 に記載のポリペプチドと同一性が 8 0 % 以上のポリペプチドからなる、1 . 7 . 3 に記載の方法。

[1 . 7 . 3 . 2] T E T 1 活性ドメインの改変体が、1 . 7 . 3 に記載のポリペプチドと同一性が 8 5 % 以上のポリペプチドからなる、1 . 7 . 3 に記載の方法。

[1 . 7 . 3 . 3] T E T 1 活性ドメインの改変体が、1 . 7 . 3 に記載のポリペプチドと同一性が 9 0 % 以上のポリペプチドからなる、1 . 7 . 3 に記載の方法。

[1 . 7 . 3 . 4] T E T 1 活性ドメインの改変体が、1 . 7 . 3 に記載のポリペプチドと同一性が 9 5 % 以上のポリペプチドからなる、1 . 7 . 3 に記載の方法。

[1 . 7 . 3 . 5] T E T 1 活性ドメインの改変体が、1 . 7 . 3 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、1 . 7 . 3 に記載の方法。

[1 . 8 . 1] P R D M 1 4 活性ドメインが、配列番号 4 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、1 . ~ 1 . 7 . 3 . 5 のいずれかに記載の方法。

[1 . 8 . 1 . 1] P R D M 1 4 活性ドメインの改変体が、1 . 8 . 1 に記載のポリペプチドと同一性が 8 0 % 以上のポリペプチドからなる、1 . 8 . 1 に記載の方法。

[1 . 8 . 1 . 2] P R D M 1 4 活性ドメインの改変体が、1 . 8 . 1 に記載のポリペプチドと同一性が 8 5 % 以上のポリペプチドからなる、1 . 8 . 1 に記載の方法。

[1 . 8 . 1 . 3] P R D M 1 4 活性ドメインの改変体が、1 . 8 . 1 に記載のポリペプチドと同一性が 9 0 % 以上のポリペプチドからなる、1 . 8 . 1 に記載の方法。

[1 . 8 . 1 . 4] P R D M 1 4 活性ドメインの改変体が、1 . 8 . 1 に記載のポリペプチドと同一性が 9 5 % 以上のポリペプチドからなる、1 . 8 . 1 に記載の方法。

[1 . 8 . 1 . 5] P R D M 1 4 活性ドメインの改変体が、1 . 8 . 1 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、1 . 8 . 1 に記載の方法。

[1 . 8 . 2] P R D M 1 4 活性ドメインが、配列番号 5 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、1 . ~ 1 . 7 . 3 . 5 のいずれかに記載の方法。

[1 . 8 . 2 . 1] P R D M 1 4 活性ドメインの改変体が、1 . 8 . 2 に記載のポリペプチドと同一性が 8 0 % 以上のポリペプチドからなる、1 . 8 . 2 に記載の方法。

[1 . 8 . 2 . 2] P R D M 1 4 活性ドメインの改変体が、1 . 8 . 2 に記載のポリペプチドと同一性が 8 5 % 以上のポリペプチドからなる、1 . 8 . 2 に記載の方法。

[1 . 8 . 2 . 3] P R D M 1 4 活性ドメインの改変体が、1 . 8 . 2 に記載のポリペプチドと同一性が 9 0 % 以上のポリペプチドからなる、1 . 8 . 2 に記載の方法。

[1 . 8 . 2 . 4] P R D M 1 4 活性ドメインの改変体が、1 . 8 . 2 に記載のポリペプチドと同一性が 9 5 % 以上のポリペプチドからなる、1 . 8 . 2 に記載の方法。

[1 . 8 . 2 . 5] P R D M 1 4 活性ドメインの改変体が、1 . 8 . 2 に記載のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、1 . 8 . 2 に記載の方法。

[1 . 8 . 3] P R D M 1 4 活性ドメインが、配列番号 6 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、1 . ~ 1 . 7 . 3 . 5 のいずれかに記載の方法。

[1 . 8 . 3 . 1] P R D M 1 4 活性ドメインの改変体が、1 . 8 . 3 に記載のポリペプチドと同一性が 8 0 % 以上のポリペプチドからなる、1 . 8 . 3 に記載の方法。

[1 . 8 . 3 . 2] P R D M 1 4 活性ドメインの改変体が、1 . 8 . 3 に記載のポリペプチドと同一性が 8 5 % 以上のポリペプチドからなる、1 . 8 . 3 に記載の方法。

[1 . 8 . 3 . 3] P R D M 1 4 活性ドメインの改変体が、1 . 8 . 3 に記載のポリペプチドと同一性が 9 0 % 以上のポリペプチドからなる、1 . 8 . 3 に記載の方法。

[1 . 8 . 3 . 4] P R D M 1 4 活性ドメインの改変体が、1 . 8 . 3 に記載のポリペプチドと同一性が 9 5 % 以上のポリペプチドからなる、1 . 8 . 3 に記載の方法。

[1 . 8 . 3 . 5] P R D M 1 4 活性ドメインの改変体が、1 . 8 . 3 に記載のアミノ

10

20

30

40

50

酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、1.8.3に記載の方法。

[1.9] TET1 活性ドメイン又はその改変体を含む融合ポリペプチドが、それぞれTET1及びその改変体である、1.~1.6.1.1.1、及び1.8.1~1.8.3.5のいずれかに記載の方法。

[1.9.1] TET1が、配列番号7で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、1.9に記載の方法。

[1.9.1.1] TET1の改変体が、1.9.1に記載のポリペプチドと同一性が80%以上のポリペプチドからなる、1.9.1に記載の方法。

[1.9.1.2] TET1の改変体が、1.9.1に記載のポリペプチドと同一性が85%以上のポリペプチドからなる、1.9.1に記載の方法。

[1.9.1.3] TET1の改変体が、1.9.1に記載のポリペプチドと同一性が90%以上のポリペプチドからなる、1.9.1に記載の方法。

[1.9.1.4] TET1の改変体が、1.9.1に記載のポリペプチドと同一性が95%以上のポリペプチドからなる、1.9.1に記載の方法。

[1.9.1.5] TET1の改変体が、1.9.1に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、1.9.1に記載の方法。

[1.9.2] TET1が、配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、1.9に記載の方法。

[1.9.2.1] TET1の改変体が、1.9.2に記載のポリペプチドと同一性が80%以上のポリペプチドからなる、1.9.2に記載の方法。

[1.9.2.2] TET1の改変体が、1.9.2に記載のポリペプチドと同一性が85%以上のポリペプチドからなる、1.9.2に記載の方法。

[1.9.2.3] TET1の改変体が、1.9.2に記載のポリペプチドと同一性が90%以上のポリペプチドからなる、1.9.2に記載の方法。

[1.9.2.4] TET1の改変体が、1.9.2に記載のポリペプチドと同一性が95%以上のポリペプチドからなる、1.9.2に記載の方法。

[1.9.2.5] TET1の改変体が、1.9.2に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、1.9.2に記載の方法。

[1.9.3] TET1が、配列番号9で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、1.9に記載の方法。

[1.9.3.1] TET1の改変体が、1.9.3に記載のポリペプチドと同一性が80%以上のポリペプチドからなる、1.9.3に記載の方法。

[1.9.3.2] TET1の改変体が、1.9.3に記載のポリペプチドと同一性が85%以上のポリペプチドからなる、1.9.3に記載の方法。

[1.9.3.3] TET1の改変体が、1.9.3に記載のポリペプチドと同一性が90%以上のポリペプチドからなる、1.9.3に記載の方法。

[1.9.3.4] TET1の改変体が、1.9.3に記載のポリペプチドと同一性が95%以上のポリペプチドからなる、1.9.3に記載の方法。

[1.9.3.5] TET1の改変体が、1.9.3に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、1.9.3に記載の方法。

[1.10] PRDM14 活性ドメイン又はその改変体を含む融合ポリペプチドが、それぞれPRDM14及びその改変体である、1.~1.7.3.5、及び1.9~1.9.3.5のいずれかに記載の方法。

[1.10.1] PRDM14が、配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、1.10に記載の方法。

[1.10.1.1] PRDM14の改変体が、1.10.1に記載のポリペプチドと

10

20

30

40

50

同一性が80%以上のポリペプチドからなる、1.10.1に記載の方法。

[1.10.1.2] PRDM14の改変体が、1.10.1に記載のポリペプチドと同一性が85%以上のポリペプチドからなる、1.10.1に記載の方法。

[1.10.1.3] PRDM14の改変体が、1.10.1に記載のポリペプチドと同一性が90%以上のポリペプチドからなる、1.10.1に記載の方法。

[1.10.1.4] PRDM14の改変体が、1.10.1に記載のポリペプチドと同一性が95%以上のポリペプチドからなる、1.10.1に記載の方法。

[1.10.1.5] PRDM14の改変体が、1.10.1に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、1.10.1に記載の方法。

[1.10.2] PRDM14が、配列番号11で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、1.10に記載の方法。

[1.10.2.1] PRDM14の改変体が、1.10.2に記載のポリペプチドと同一性が80%以上のポリペプチドからなる、1.10.2に記載の方法。

[1.10.2.2] PRDM14の改変体が、1.10.2に記載のポリペプチドと同一性が85%以上のポリペプチドからなる、1.10.2に記載の方法。

[1.10.2.3] PRDM14の改変体が、1.10.2に記載のポリペプチドと同一性が90%以上のポリペプチドからなる、1.10.2に記載の方法。

[1.10.2.4] PRDM14の改変体が、1.10.2に記載のポリペプチドと同一性が95%以上のポリペプチドからなる、1.10.2に記載の方法。

[1.10.2.5] PRDM14の改変体が、1.10.2に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、1.10.2に記載の方法。

[1.10.3] PRDM14が、配列番号12で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである、1.10に記載の方法。

[1.10.3.1] PRDM14の改変体が、1.10.3に記載のポリペプチドと同一性が80%以上のポリペプチドからなる、1.10.3に記載の方法。

[1.10.3.2] PRDM14の改変体が、1.10.3に記載のポリペプチドと同一性が85%以上のポリペプチドからなる、1.10.3に記載の方法。

[1.10.3.3] PRDM14の改変体が、1.10.3に記載のポリペプチドと同一性が90%以上のポリペプチドからなる、1.10.3に記載の方法。

[1.10.3.4] PRDM14の改変体が、1.10.3に記載のポリペプチドと同一性が95%以上のポリペプチドからなる、1.10.3に記載の方法。

[1.10.3.5] PRDM14の改変体が、1.10.3に記載のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる、1.10.3に記載の方法。

【0010】

[2.治療方法]

[2.] ヒトを治療する方法であって、

(1) TET1活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び

PRDM14活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドの細胞内含量を増加させる工程を含む方法。

[2.1.1] エピゲノム変異を修復するDNAメチル化の異常に起因する疾患を治療する方法である、2.に記載の方法。

[2.1.1.1] がんを治療する方法である、2.1.1に記載の方法。

[2.1.1.2] 神経精神疾患を治療する方法である、2.1.1に記載の方法。

[2.1.1.2.1] 神経精神疾患が、躁うつ病又は反復うつ病である、2.1.1.2に記載の方法。

10

20

30

40

50

[2 . 2] 前記工程 (1) が、 1 . 1 . 1 ~ 1 . 1 0 . 3 . 5 のいずれかに記載の工程 (1) である、 2 . ~ 2 . 1 . 1 . 2 . 1 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 1 1 】

[3 . i P S 細胞製造方法]

[3 A .] 核初期化物質を用いて体細胞から i P S 細胞を製造する方法であって、 (1) T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド ; 及び

P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドの細胞内含量を増加させる工程を含む方法。

10

[3 A . 1 . 1] 前記体細胞がヒト細胞である、 3 A . に記載の方法。

[3 A . 1 . 2] 前記体細胞がマウス細胞である、 3 A . に記載の方法。

[3 A . 1 . 3] 前記体細胞がイヌ細胞である、 3 A . に記載の方法。

[3 A . 2] 前記工程 (1) が、 1 . 1 . 1 ~ 1 . 1 0 . 3 . 5 のいずれかに記載の工程 (1) である、 3 A . ~ 3 A . 1 . 3 のいずれかに記載の方法。

[3 A . 3] 前記工程 (1) を体細胞に対して行う、 3 A ~ 3 A . 2 のいずれかに記載の方法。

[3 A . 3 . 1] 前記工程 (1) が、

(1 A - 1) T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド ; 及び

20

P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドの体細胞内含量を増加させ、かつ

核初期化物質を体細胞に接触させることにより体細胞を i P S 細胞に変換する工程である、 3 A . 3 に記載の方法。

[3 A . 3 . 2] 前記工程 (1) が、

(1 A - 1) T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド ; 及び

P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドの体細胞内含量を増加させ、かつ

核初期化物質を体細胞に接触させることにより体細胞を初期化完成度の高い i P S 細胞に変換する工程である、 3 A . 3 に記載の方法。

30

[3 A . 4] (I) 核初期化物質を体細胞に接触させることにより体細胞を高品質 i P S 細胞、低品質 i P S 細胞及び p r e - i P S 細胞に変換する工程 ;

(I I) 工程 (I) で得られた細胞の評価を行い、高品質 i P S 細胞、低品質 i P S 細胞及び p r e - i P S 細胞に選別する工程 ; 及び

(I I I) 工程 (I I) で選別された低品質 i P S 細胞及び p r e - i P S 細胞に対して、工程 (1) を行う工程

を含む、 3 A . ~ 3 A . 2 のいずれかに記載の方法。

[3 A . 4 . 1] 前記工程 (1) が、

(1 A - 2) T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド ; 及び

40

P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドの低品質 i P S 細胞及び p r e - i P S 細胞における細胞内含量を増加させ、かつ

核初期化物質を低品質 i P S 細胞及び p r e - i P S 細胞に接触させる工程である、 3 A . 4 に記載の方法。

[3 A . 4 . 2] 前記工程 (I) が、 3 A . 3 . 1 に記載の工程 (1 A - 1) である、 3 A . 4 に記載の方法。

[3 A . 4 . 3] 工程 (I I I) における細胞の評価を、 G T L 2 遺伝子の D N A 発現又は D N A メチル化を E S 細胞との間で比較することにより低品質 i P S 細胞を選別する工程、及び内在性の N A N O G 遺伝子の発現を E S 細胞との間で比較することにより p r

50

e - i P S 細胞を選別する工程を含む方法により行う、3 A . 4 ~ 3 A . 4 . 2 のいずれかに記載の方法。

[3 B .] pre - i P S 細胞に対して工程 (1) を行うことにより、i P S 細胞を得る方法。

[3 B . 1] 前記工程 (1) が、

(1 B) T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び

P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドの pre - i P S 細胞内含量を増加させ、かつ

核初期化物質を pre - i P S 細胞に接触させる工程

である、3 B . に記載の方法。

[3 C .] 低品質 i P S 細胞に対して工程 (1) を行うことにより、高品質 i P S 細胞を得る方法。

[3 C . 1] 前記工程 (1) が、

(1 C) T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び

P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドの低品質 i P S 細胞内含量を増加させ、かつ

核初期化物質を低品質 i P S 細胞に接触させる工程

である、3 C . に記載の方法。

[3 . 1] 核初期化物質が、O C T 4、S O X 2、K L F 4 及び M Y C からなる群より選択される少なくとも 1 種である、3 A . ~ 3 C . 1 のいずれかに記載の方法。

[3 . 2] 核初期化物質が、O C T 4、S O X 2 及び K L F 4 からなる群より選択される少なくとも 1 種である、3 A . ~ 3 C . 1 のいずれかに記載の方法。

[3 . 3] 核初期化物質が、O C T 4 及び S O X 2 からなる群より選択される少なくとも 1 種である、3 A . ~ 3 C . 1 のいずれかに記載の方法。

[3 . 4] 核初期化物質が、O C T 4 である、3 A . ~ 3 C . 1 のいずれかに記載の方法。

【 0 0 1 2 】

[4 . ポリペプチド含有組成物]

[4 .] (A - 1) T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び

(A - 2) P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド

を含有する、組成物。

[4 . 1] T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドが、1 . 3 . 1 ~ 1 . 1 0 . 3 . 5 のいずれかに記載のポリペプチドである、4 . に記載の組成物。

[4 . 2] P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドが、1 . 3 . 1 ~ 1 . 1 0 . 3 . 5 のいずれかに記載のポリペプチドである、4 . 又は 4 . 1 に記載の組成物。

[4 . 3 . 1] D N A 脱メチル化誘導剤として用いられる、4 ~ 4 . 2 のいずれかに記載の組成物。

[4 . 3 . 2] 医薬として用いられる、4 ~ 4 . 2 のいずれかに記載の組成物。

[4 . 3 . 2 . 1] エピゲノム変異を修復する D N A メチル化の異常に起因する疾患に対する治療剤として用いられる、4 . 3 . 2 に記載の組成物。

[4 . 3 . 2 . 2] 抗がん剤として用いられる、4 . 3 . 2 に記載の組成物。

[4 . 3 . 2 . 3] 神経精神疾患治療剤として用いられる、4 . 3 . 2 に記載の組成物。

[4 . 3 . 2 . 4] 躁うつ病治療剤又は反復うつ病治療剤として用いられる、4 . 3 .

10

20

30

40

50

2 に記載の組成物。

[4 . 3 . 3] i P S 細胞の品質改善剤として用いられる、4 ~ 4 . 2 のいずれかに記載の組成物。

[4 . 3 . 4] i P S 細胞の初期化完成度向上剤として用いられる、4 ~ 4 . 2 のいずれかに記載の組成物。

【 0 0 1 3 】

[5 . ポリヌクレオチド含有組成物]

[5 .] (- 1) T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び

(- 2) P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

を含有する、組成物。

[5 . 1] T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドが、1 . 3 . 1 ~ 1 . 1 0 . 3 . 5 のいずれかに記載のポリペプチドである、5 . に記載の組成物。

[5 . 2] P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドが、1 . 3 . 1 ~ 1 . 1 0 . 3 . 5 のいずれかに記載のポリペプチドである、5 . 又は 5 . 1 に記載の組成物。

[5 . 3 . 1] ポリヌクレオチドが D N A である、5 ~ 5 . 2 のいずれかに記載の組成物。

[5 . 3 . 2] ポリヌクレオチドが R N A である、5 ~ 5 . 2 のいずれかに記載の組成物。

[5 . 4 . 1] D N A 脱メチル化誘導剤として用いられる、5 ~ 5 . 3 . 2 のいずれかに記載の組成物。

[5 . 4 . 2] 医薬として用いられる、5 ~ 5 . 3 . 2 のいずれかに記載の組成物。

[5 . 4 . 2 . 1] エピゲノム変異を修復する D N A メチル化の異常に起因する疾患に対する治療剤として用いられる、5 . 4 . 2 に記載の組成物。

[5 . 4 . 2 . 2] 抗がん剤として用いられる、5 . 4 . 2 に記載の組成物。

[5 . 4 . 2 . 3] 神経精神疾患治療剤として用いられる、5 . 4 . 2 に記載の組成物。

[5 . 4 . 2 . 4] 躁うつ病治療剤又は反復うつ病治療剤として用いられる、5 . 4 . 2 に記載の組成物。

[5 . 4 . 3] i P S 細胞の品質改善剤として用いられる、5 ~ 5 . 3 . 2 のいずれかに記載の組成物。

[5 . 4 . 4] i P S 細胞の初期化完成度向上剤として用いられる、5 ~ 5 . 3 . 2 のいずれかに記載の組成物。

【 0 0 1 4 】

[6 . 発現ベクター含有組成物]

[6 .] (a - 1) T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター；及び

(a - 2) P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター

を含有する、組成物。

[6 . 1] T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドが、1 . 3 . 1 ~ 1 . 1 0 . 3 . 5 のいずれかに記載のポリペプチドである、6 . に記載の組成物。

[6 . 2] P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドが、1 . 3 . 1 ~ 1 . 1 0 . 2 . 5 のいずれかに記載のポリペプチドである、6 . 又は 6 . 1 に記載の組成物。

[6 . 3 . 1] ポリヌクレオチドが D N A である、6 ~ 6 . 2 のいずれかに記載の組成

10

20

30

40

50

物。

[6 . 3 . 2] ポリヌクレオチドがRNAである、6 ~ 6 . 2 のいずれかに記載の組成物。

[6 . 4 . 1] DNA脱メチル化誘導剤として用いられる、6 ~ 6 . 3 . 2 のいずれかに記載の組成物。

[6 . 4 . 2] 医薬として用いられる、6 ~ 6 . 3 . 2 のいずれかに記載の組成物。

[6 . 4 . 2 . 1] エピゲノム変異を修復するDNAメチル化の異常に起因する疾患に対する治療剤として用いられる、6 . 4 . 2 に記載の組成物。

[6 . 4 . 2 . 2] 抗がん剤として用いられる、6 . 4 . 2 に記載の組成物。

[6 . 4 . 2 . 3] 神経精神疾患治療剤として用いられる、6 . 4 . 2 に記載の組成物

10

[6 . 4 . 2 . 4] 双極性障害（躁うつ病）治療剤、反復うつ病治療剤、統合失調症として用いられる、6 . 4 . 2 に記載の組成物。

[6 . 4 . 3] iPS細胞の品質改善剤として用いられる、6 ~ 6 . 3 . 2 のいずれかに記載の組成物。

[6 . 4 . 4] iPS細胞の初期化完成度向上剤として用いられる、6 ~ 6 . 3 . 2 のいずれかに記載の組成物。

【 0 0 1 5 】

[7 . 共発現ベクター]

[7 .] (b) T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び

20

P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

を含む共発現ベクター。

[7 . 1] T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドが、1 . 3 . 1 ~ 1 . 1 0 . 3 . 5 のいずれかに記載のポリペプチドである、7 . に記載の共発現ベクター。

[7 . 2] P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドが、1 . 3 . 1 ~ 1 . 1 0 . 3 . 5 のいずれかに記載のポリペプチドである、7 . 又は7 . 1 に記載の共発現ベクター。

30

[7 . 3 . 1] ポリヌクレオチドがDNAである、7 ~ 7 . 2 のいずれかに記載の共発現ベクター。

[7 . 3 . 2] ポリヌクレオチドがRNAである、7 ~ 7 . 2 のいずれかに記載の共発現ベクター。

[7 . 4 . 1] DNA脱メチル化誘導剤として用いられる、7 ~ 7 . 3 . 2 のいずれかに記載の共発現ベクター。

[7 . 4 . 2] 医薬として用いられる、7 ~ 7 . 3 . 2 のいずれかに記載の共発現ベクター。

[7 . 4 . 2 . 1] エピゲノム変異を修復するDNAメチル化の異常に起因する疾患に対する治療剤として用いられる、7 . 4 . 2 に記載の共発現ベクター。

40

[7 . 4 . 2 . 2] 抗がん剤として用いられる、7 . 4 . 2 に記載の共発現ベクター。

[7 . 4 . 2 . 3] 神経精神疾患治療剤として用いられる、7 . 4 . 2 に記載の共発現ベクター。

[7 . 4 . 2 . 4] 躁うつ病治療剤又は反復うつ病治療剤として用いられる、7 . 4 . 2 に記載の共発現ベクター。

[7 . 4 . 3] iPS細胞の品質改善剤として用いられる、7 ~ 7 . 3 . 2 のいずれかに記載の共発現ベクター。

[7 . 4 . 4] iPS細胞の初期化完成度向上剤として用いられる、7 ~ 7 . 3 . 2 のいずれかに記載の共発現ベクター。

【 発明の効果 】

50

【0016】

本発明のDNA脱メチル化誘導方法を利用することにより、人為的にDNA脱メチル化を行うことができる。また、このDNA脱メチル化誘導方法をiPS細胞の製造方法に適用することにより、品質の向上したiPS細胞を得ることができる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】実施例1の結果を示す図面である。なお、上図はLINE-1を示している。

【図2】実施例2の結果を示す、PRDM14高発現ES細胞及びDnmts TKO ES細胞で遺伝子発現上昇が観察された遺伝子のVenn diagramである。

【図3】メチル化シトシンのヒドロキシル化を引き金としたDNA脱メチル化経路を示した図面である。

10

【図4】実施例3の結果を示す図面である。

【図5】実施例4の結果を示す図面である。

【図6】山中ファクター(OCT4、SOX2、KLF4、MYC:OSKM)を繊維芽細胞に導入することでiPS細胞を樹立する過程において、リプログラミングが不完全なpre-iPS細胞や低品質iPS細胞が出現する経路を示した図面である。

【図7】実施例5の結果を示す図面である。

【図8】実施例6の結果を示す図面である。縦軸はLINE-1領域内CCGG配列のメチル化量を、横軸はそれぞれの細胞名を表している。

【図9】実施例7の結果を示す図面である。

20

【図10】実施例7の結果を示す図面である。

【図11】実施例7の結果を示す図面である。

【図12】実施例8の結果を示す図面である。

【図13】実施例9の結果を示す図面である。

【図14】実施例9の結果を示す図面である。

【図15】実施例9の結果を示す図面である。

【発明を実施するための形態】

【0018】

[1. DNA脱メチル化誘導方法]

本発明のDNA脱メチル化誘導方法は、細胞内においてDNA脱メチル化を誘導する方法であって、

30

(1) TET1活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド(以下、「TET1活性ドメイン等」ということがある。);及び

PRDM14活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド(以下、「PRDM14活性ドメイン等」ということがある。)

の細胞内含量を増加させる工程

を含む、方法である。

【0019】

細胞の由来は特に限定されないが、例えばヒト細胞、マウス細胞、イヌ細胞、等が挙げられる。

40

【0020】

細胞は培養細胞であってもよく、生体内の細胞であってもよい。

【0021】

培養細胞は、体細胞であってもよく、幹細胞等の未分化の細胞であってもよい。

【0022】

体細胞としては、特に限定されないが、例えば、角質化する上皮細胞、湿潤かつ多層構造をとり境界面を構成する上皮細胞(粘膜上皮細胞)、外分泌腺に専門化した上皮細胞、ホルモン分泌用に専門化した細胞、消化管、外分泌腺及び尿生殖路の吸収上皮細胞、代謝と貯蔵用に専門化した細胞、主に境界面を構成し、肺、消化管、外分泌腺及び尿生殖路の内腔に面する上皮細胞、体内で閉じた管腔の内面を形成している上皮細胞、運搬機能をも

50

つ繊毛のある細胞、細胞外マトリックスの分泌用に特化した細胞、収縮性細胞、血液細胞、免疫細胞、感覚に關与する細胞、自律神経系のニューロン、感覚器官及び抹消ニューロンの支持細胞、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞、レンズ（水晶体）細胞、色素細胞、並びに哺育細胞等が挙げられる。

【 0 0 2 3 】

角質化する上皮細胞としては、特に限定されないが、例えば、表皮の角化細胞、爪の角化細胞、毛幹の細胞、毛根鞘細胞等が挙げられる。

【 0 0 2 4 】

湿潤かつ多層構造をとり境界面を構成する上皮細胞（粘膜上皮細胞）としては、特に限定されないが、例えば、表面が重層扁平上皮である上皮細胞（角膜、舌、口腔、食道、肛門、遠位尿道及び膣等の上皮細胞）等が挙げられる。

10

【 0 0 2 5 】

外分泌腺に専門化した上皮細胞としては、特に限定されないが、例えば、だ液腺細胞、舌のフォンエブナー腺細胞、乳腺細胞、涙腺細胞、耳動腺細胞、エクリン汗腺細胞、アポクリン汗腺細胞等が挙げられる。

【 0 0 2 6 】

ホルモン分泌用に専門化した細胞としては、特に限定されないが、例えば、脳下垂体前葉細胞、脳下垂体中葉細胞、脳下垂体後葉細胞、消化管及び気道の細胞、甲状腺の細胞、副甲状腺（上皮小体）細胞、副腎の細胞、生殖腺細胞、腎臓の傍系球体装置の細胞等が挙げられる。

20

【 0 0 2 7 】

消化管、外分泌腺及び尿生殖路の吸収上皮細胞としては、特に限定されないが、例えば、腸の刷子縁細胞、外分泌腺の線条管細胞、胆嚢上皮細胞等が挙げられる。

【 0 0 2 8 】

代謝と貯蔵用に専門化した細胞としては、特に限定されないが、例えば、肝細胞、脂肪細胞等が挙げられる。

【 0 0 2 9 】

主に境界面を構成し、肺、消化管、外分泌腺及び尿生殖路の内腔に面する上皮細胞としては、特に限定されないが、例えば、I型肺胞細胞、膀胱導管細胞、腺房中心細胞、汗腺、だ液腺、乳腺等の導管細胞、腎系球体の壁細胞、腎系球体のタコ足細胞等が挙げられる。

30

【 0 0 3 0 】

体内で閉じた管腔の内面を形成している上皮細胞としては、特に限定されないが、例えば、血管とリンパ管の内皮細胞、滑液細胞、漿膜細胞等が挙げられる。

【 0 0 3 1 】

運搬機能をもつ繊毛のある細胞としては、特に限定されないが、例えば、気道の上皮細胞、卵管と子宮内膜の上皮細胞、中枢神経系の細胞等が挙げられる。

【 0 0 3 2 】

細胞外マトリックスの分泌用に特化した細胞としては、特に限定されないが、例えば、造エナメル細胞、繊維芽細胞、毛細血管の周細胞、椎間板の髓核細胞、セメント芽細胞、象牙芽細胞、軟骨細胞、骨芽細胞、目のガラス体の形成細胞等が挙げられる。

40

【 0 0 3 3 】

収縮性細胞としては、特に限定されないが、例えば、骨格筋細胞、心筋細胞、平滑筋細胞、筋上皮細胞等が挙げられる。

【 0 0 3 4 】

血液細胞としては、特に限定されないが、例えば、赤血球、巨核球、マクロファージと類縁細胞、好中球、好酸球、好塩基球等が挙げられる。

【 0 0 3 5 】

免疫細胞としては、特に限定されないが、例えば、肥満細胞（マスト細胞）、Tリンパ球（T細胞）、Bリンパ球、K（キラー）細胞等が挙げられる。

50

【0036】

感覚に關与する細胞としては、特に限定されないが、例えば、桿体細胞、錐体細胞、コルチ器官の内側有毛細胞、コルチ器官の外側有毛細胞、II型味蕾細胞、嗅覚神経細胞、嗅上皮の基底細胞、頸動脈小体の細胞、表皮のメルケル細胞、触覚用に特殊化した一次感覚ニューロン、温度感覚用に専門化した一次感覚ニューロン、痛覚用に特殊化した一次感覚ニューロン、深部一次感覚ニューロン等が挙げられる。

【0037】

感覚器官及び抹消ニューロンの支持細胞としては、特に限定されないが、例えば、コルチ器官の支持細胞、前庭の支持細胞、味蕾の支持細胞、嗅上皮の支持細胞、シュワン細胞、随伴細胞、腸管のグリア細胞等が挙げられる。

10

【0038】

体細胞として、好ましくはT細胞が用いられる。T細胞はCD4陽性若しくはCD8陽性、又はCD4/CD8両陽性であってもよい。T細胞は、特に限定されないが、例えば、脾臓、リンパ節、末梢血又は臍帯血等から、公知の方法により単離できる。公知の単離方法としては、特に限定されないが、例えば、セルソーターを用い、CD4、CD8及びCD3等の細胞表面マーカーに対する抗体を利用してフローサイトメトリーにより単離する方法等が挙げられる。

【0039】

体細胞には通常TET1が発現していない。本発明者は、TET1活性を介したDNA脱メチル化が、PRDM14活性により促進されることを見出した。かかる新規の知見に基づいて本発明者は、体細胞においてはTET1活性ドメイン等及びPRDM14活性ドメイン等の細胞内含量を同時に増加させることによりDNA脱メチル化が顕著に促進されることを見出した。

20

【0040】

生体内の細胞は、正常な細胞であってもよく、異常な細胞であってもよい。異常な細胞は特に限定されないが、例えば、DNAメチル化の異常を有する細胞等が挙げられる。そのような細胞に本発明を適用してDNA脱メチル化を誘導することによって、DNAメチル化を正常な状態に近づけることができる。DNAメチル化の異常を有する細胞としては、特に限定されないが、例えば、がん細胞、精神神経疾患の細胞、エピゲノム変異を修復するDNAメチル化の異常を有する細胞等が挙げられる。

30

【0041】

工程(1)の具体例としては、例えば、次のような工程が挙げられる。
 (1A) TET1活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び
 PRDM14活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドを細胞内に導入する工程。
 (1B) TET1活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び
 PRDM14活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞内に導入する工程。

40

【0042】

工程(1B)の具体例としては、例えば、
 (1b) TET1活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び
 PRDM14活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞内で過剰発現させる工程が挙げられる。

【0043】

工程(1A)において、後述する4.ポリペプチド含有組成物を用いることができる。

50

工程(1B)において、5.ポリヌクレオチド含有組成物、6.発現ベクター含有組成物、及び7.共発現ベクターを用いることができる。また、工程(1b)において、6.発現ベクター含有組成物、及び7.共発現ベクターを用いることができる。

【0044】

ポリヌクレオチドの過剰発現は、一過的であってもよいし、恒常的であってもよい。一過的に過剰発現させる場合は、特に限定されないが、発現系として、CMVプロモーター及びCAGGSプロモーターを用いることができる。恒常的に過剰発現させる場合は、特に限定されないが、発現系として、CMVプロモーター及びCAGGSプロモーターを用いることができる。

【0045】

TET1は、急性骨髄性白血病(*acute myeloid leukemia*)において、H3K4メチル化酵素MLL(*mixed lineage leukemia*)の融合パートナーとして発見されたタンパク質である。TET1は、特に限定されないが、ヒト由来、マウス由来、イヌ、ラット由来のものが挙げられる。ヒト由来のTET1としては、例えば、配列番号7で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。マウス由来のTET1としては、例えば、配列番号8で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。イヌ由来のTET1としては、例えば、配列番号9で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。ラット由来のTET1としては、例えば、配列番号13で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。

【0046】

TET1活性ドメインとは、TET1を構成するポリペプチドのうち、TET1活性を担う領域を含む部分ポリペプチドをいう。例えば、ヒト由来のTET1の場合、TET1活性を担う領域とは、配列番号7において1418~2136番目のアミノ酸配列からなる領域をいう。マウス由来のTET1の場合、TET1活性を担う領域とは、配列番号8において1367~2039番目のアミノ酸配列からなる領域をいう。イヌ由来のTET1の場合、TET1活性を担う領域とは、配列番号9において1419~2137番目のアミノ酸配列からなる領域をいう。

【0047】

TET1活性ドメインは、TET1の中でTET1活性を担う領域を取り囲んでいるアミノ酸又はポリペプチドであって、TET1活性とは無関係なものが付加したものであってもよい。そのようなTET1活性ドメインは、例えばTET1からTET1活性を担う領域を含んだ部分ポリペプチドを切り出すこと等によって得ることができる。TET1活性ドメインは、好ましくはCpG islandを認識するCxxCモチーフを欠いたTET1の部分ポリペプチドである。ヒト由来TET1活性ドメインは、好ましくは、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである。マウス由来TET1活性ドメインは、好ましくは、配列番号2で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである。イヌ由来TET1活性ドメインは、好ましくは、配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドである。

【0048】

TET1活性は、5-メチルシトシン(5mC)を5-ヒドロキシメチルシトシン(hmC)へと変換する活性である。細胞としてHEK293細胞を用い、被検体を細胞内に導入することにより5mCからhmCへの変換が促進される場合は、かかる被検体がTET1活性を有すると判定する。5mCから5hmCへの変換は、5hmCに対する特異的抗体を用いたDot-blot法により検出する。

【0049】

TET1活性ドメインの改変体、並びにTET1活性ドメインを含む融合ポリペプチド及びTET1活性ドメインの改変体を含む融合ポリペプチド(以下、「TET1活性ドメイン改変体等」ということがある。)は、TET1活性を有する。

【0050】

TET1活性ドメインの改変体は、特に限定されないが、TET1活性ドメインとアミ

10

20

30

40

50

ノ酸の同一性が好ましくは80%以上、85%以上、90%以上、又は95%以上のポリペプチドからなる。左記においてアミノ酸の同一性は高ければ高いほど好ましい。あるいは、TET1活性ドメインの改変体は、TET1活性ドメインのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加(以下、「改変等」ということがある。)されたアミノ酸配列からなる。

【0051】

TET1活性ドメインにおいて、改変等を加えることによってTET1活性が消失してしまうアミノ酸としては、1671番目、1673番目のもの等が知られている。TET1活性を有するTET1活性ドメインの改変体は、例えば上記のようなアミノ酸への改変等を避けながら他のアミノ酸への改変等を加えることによって得ることができる。

10

【0052】

TET1活性ドメイン又はその改変体を含む融合ポリペプチド(以下、「TET1活性ドメイン等融合ポリペプチド」ということがある。)は、TET1活性ドメイン等のC末端、N末端又は両端にアミノ酸又はポリペプチドがそれぞれ付加されてなるものである。特に限定されないが、例えばTET1活性ドメイン等に、TET1活性とは無関係な機能を有するか、あるいは特にそれ自体何ら機能を有さず、かつTET1活性ドメイン等のTET1活性を阻害しないか、あるいは阻害したとしても著しく阻害しないアミノ酸又はポリペプチドが融合されてなるものである。TET1活性とは無関係な機能としては、特定の塩基配列又は核酸の三次構造に結合する機能等が挙げられる。そのような機能を有するポリペプチドとしては、特に限定されないが、例えば、メチル化シトシン結合ドメイン(MBD)等が挙げられる。MBDとしては、特に限定されないが、例えば、MECP2の部分配列が挙げられる。ヒト由来MECP2の場合は、例えば、配列番号14で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチド等を挙げることができる。配列番号14で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドは、ヒトMECP2の62~169番目のアミノ酸配列からなるポリペプチドである。そのような機能を有するポリペプチドが融合されてなるTET1活性ドメイン等融合ポリペプチドを用いることによって、特定の塩基配列又は核酸の三次構造を有するポリヌクレオチド領域のみに選択的にTET1活性を発現させることができる。TET1活性とは無関係な機能を有するか、あるいは特にそれ自体何ら機能を有さず、かつTET1活性ドメイン等のTET1活性を阻害しないか、あるいは阻害したとしても著しく阻害しないポリペプチドの長さとしては、特に限定されないが、TET1活性ドメイン等の20%以下、好ましくは10%以下、より好ましくは5%以下等が挙げられる。

20

30

【0053】

TET1活性ドメイン等融合ポリペプチドは、TET1そのものであってもよいし、TET1の改変体であってもよい。あるいは、TET1活性ドメイン等融合ポリペプチドは、TETファミリーに属するタンパク質そのものであってもよいし、TETファミリーに属するタンパク質の改変体であってもよい。TETファミリーに属するタンパク質としては、TET1のほかにTET2、TET3が挙げられる。ここでいう改変体とは、特に限定されないが、例えば、元となるポリペプチドとアミノ酸の同一性が好ましくは80%以上、85%以上、90%以上、又は95%以上のポリペプチドからなるものであってもよい。左記においてアミノ酸の同一性は高ければ高いほど好ましい。あるいは、ここでいう改変体は、元となるポリペプチドのアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が改変等されたアミノ酸配列からなるものであってもよい。

40

【0054】

PRDM14は、始原生殖細胞の形成及び初期分化に必須である転写制御因子として本発明者により発見されたタンパク質である。PRDM14は、特に限定されないが、ヒト由来、マウス由来、イヌ由来、ラット由来のものが挙げられる。ヒト由来のPRDM14としては、例えば、配列番号10で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。マウス由来のPRDM14としては、例えば、配列番号11で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。イヌ由来のPRDM14としては、例えば、配列

50

番号 12 で表されるアミノ酸配列からなるポリペプチドが挙げられる。

【0055】

PRDM14 活性ドメインとは、PRDM14 を構成するポリペプチドのうち、PRDM14 活性を担う領域を含む部分ポリペプチドをいう。例えば、ヒト由来の PRDM14 の場合、PRDM14 活性を担う領域とは、配列番号 10 において 254 ~ 571 番目のアミノ酸配列からなる領域をいう。マウス由来の PRDM14 の場合、PRDM14 活性を担う領域とは、配列番号 11 において 244 ~ 561 番目のアミノ酸配列からなる領域をいう。イヌ由来の PRDM14 の場合、PRDM14 活性を担う領域とは、配列番号 12 において 254 ~ 571 番目のアミノ酸配列からなる領域をいう。

【0056】

PRDM14 活性ドメインは、PRDM14 の中で PRDM14 活性を担う領域を取り囲んでいるアミノ酸又はポリペプチドであって、PRDM14 活性とは無関係なものが付加したものであってもよい。そのような PRDM14 活性ドメインは、例えば PRDM14 から PRDM14 活性を担う領域を含んだ部分ポリペプチドを切り出すこと等によって得ることができる。PRDM14 活性ドメインは、例えば、C 末端に存在する Zing finger ドメインを欠いた PRDM14 の部分ポリペプチドである。Zing finger ドメインを欠く場合、ヒト PRDM14 活性ドメインは、好ましくは、配列番号 10 において 254 ~ 488 番目、より好ましくは 254 ~ 373 番目のアミノ酸配列からなる領域をいう。Zing finger ドメインを欠く場合、マウス PRDM14 活性ドメインは、好ましくは、配列番号 11 において 244 ~ 478 番目、より好ましくは 244 ~ 363 番目のアミノ酸配列からなる領域をいう。

【0057】

PRDM14 活性は、TET1 と相互作用し、TET1 活性を促進する活性である。細胞として HEK293 細胞を用い、被検体を TET1 と共に細胞に導入した場合に TET1 活性を介した DNA 脱メチル化が促進される場合は、かかる被検体が PRDM14 活性を有すると判定する。

【0058】

PRDM14 活性ドメインの改変体、並びに PRDM14 活性ドメインを含む融合ポリペプチド及び PRDM14 活性ドメインの改変体を含む融合ポリペプチド（以下、「PRDM14 活性ドメイン改変体等」ということがある。）は、PRDM14 活性を有する。

【0059】

PRDM14 活性ドメインの改変体は、特に限定されないが、PRDM14 活性ドメインとアミノ酸の同一性が好ましくは 80% 以上、85% 以上、90% 以上、又は 95% 以上のポリペプチドからなる。左記においてアミノ酸の同一性は高ければ高いほど好ましい。あるいは、PRDM14 活性ドメインの改変体は、PRDM14 活性ドメインのアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が改変等されたアミノ酸配列からなる。

【0060】

PRDM14 活性を有する PRDM14 活性ドメインの改変体は、PRDM14 活性ドメインにおいて、改変等を加えることによって PRDM14 活性が消失してしまうアミノ酸への改変等を避けながら他のアミノ酸への改変等を加えることによって得ることができる。

【0061】

PRDM14 活性ドメイン又はその改変体を含む融合ポリペプチド（以下、「PRDM14 活性ドメイン等融合ポリペプチド」ということがある。）は、PRDM14 活性ドメイン等の C 末端、N 末端又は両端にアミノ酸又はポリペプチドがそれぞれ付加されてなるものである。特に限定されないが、例えば PRDM14 活性ドメイン等に、PRDM14 活性とは無関係な機能を有するか、あるいは特にそれ自体何ら機能を有さず、かつ PRDM14 活性ドメイン等の PRDM14 活性を阻害しないか、あるいは阻害したとしても著しく阻害しないアミノ酸又はポリペプチドが融合されてなるものである。PRDM14 活性とは無関係な機能としては、特定の塩基配列又は核酸の三次構造に結合する機能等が挙

10

20

30

40

50

げられる。そのような機能を有するポリペプチドとしては、特に限定されないが、例えば、標的遺伝子領域に結合するDNA結合ドメイン等が挙げられる。そのような機能を有するポリペプチドが融合されてなるPRDM14活性ドメイン等融合ポリペプチドを用いることによって、特定の塩基配列又は核酸の三次構造を有するポリヌクレオチド領域のみにおいて選択的にTET1活性を促進させることができる。PRDM14活性とは無関係な機能を有するか、あるいは特にそれ自体何ら機能を有さず、かつPRDM14活性ドメイン等のPRDM14活性を阻害しないか、あるいは阻害したとしても著しく阻害しないポリペプチドの長さとしては、特に限定されないが、PRDM14活性ドメイン等の20%以下、好ましくは10%以下、より好ましくは5%以下等が挙げられる。

【0062】

標的遺伝子領域は、標的遺伝子のプロモーター領域であってもよい。標的遺伝子は特に限定されないが、例えば、がん抑制遺伝子等が挙げられる。がん抑制遺伝子としては、特に限定されないが、例えば、p16、p53、E-cadherin等が挙げられる。

【0063】

標的遺伝子領域に結合するDNA結合ドメインとしては、特に限定されないが、例えば、転写因子のDNA結合ドメイン、又はそれを改変したものをを用いることができる。そのような転写因子のDNA結合ドメインとしては、例えば、p16のプロモーター領域に結合することが知られているCTCFs等が挙げられる。

【0064】

PRDM14活性ドメイン等融合ポリペプチドは、PRDM14そのものであってもよいし、PRDM14の改変体であってもよい。ここでいうPRDM14の改変体とは、特に限定されないが、例えば、PRDM14とアミノ酸の同一性が好ましくは80%以上、85%以上、90%以上、又は95%以上のポリペプチドからなるものであってもよい。左記においてアミノ酸の同一性は高ければ高いほど好ましい。あるいは、ここでいうPRDM14の改変体は、PRDM14のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が改変等されたアミノ酸配列からなるものであってもよい。

【0065】

[2. 治療方法]

本発明の治療方法は、ヒトを治療する方法であって、

(1) TET1活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び

PRDM14活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドの細胞内含量を増加させる工程を含む方法である。

【0066】

工程(1)は、1.において説明したのと同様である。

【0067】

本発明の治療方法は、好ましくは、エピゲノム変異を修復するDNAメチル化の異常に起因する疾患を治療する方法である。より好ましくは、がん、又は神経精神疾患を治療する方法である。神経精神疾患としては、エピゲノム変異を修復するDNAメチル化の異常に起因するものであれば特に限定されないが、例えば、双極性障害(躁うつ病)、反復うつ病、統合失調症等が挙げられる。

【0068】

本発明の治療方法においては、後述する4.ポリペプチド含有組成物、5.ポリヌクレオチド含有組成物、6.発現ベクター含有組成物及び7.共発現ベクターを用いることができる。本発明の治療方法においては、4.~7.のそれぞれを、医薬目的での使用方法として後述されるところに従って使用することができる。

【0069】

[3. iPS細胞の製造方法]

本発明のiPS細胞の製造方法としては、

10

20

30

40

50

[3 A - 1 .] 核初期化物質を用いて体細胞から i P S 細胞を製造する方法であって、
(1) T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及
び

P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド
の細胞内含量を増加させる工程
を含む方法が挙げられる。

【 0 0 7 0 】

工程 (1) は、 1 . において説明したのと同様である。

【 0 0 7 1 】

本発明の i P S 細胞の製造方法は、

(i) 核初期化物質を体細胞に接触させることにより体細胞を i P S 細胞に変換する工程
を含む。かかる変換工程としては、公知のものを用いることができる。公知の変換工程と
しては、特に限定されないが、例えば、レトロウイルスを用いた感染、リボソーム法によ
るエピソーマルベクターの遺伝子導入等が挙げられる。

【 0 0 7 2 】

核初期化物質を用いて体細胞から i P S 細胞を製造する工程においては、高品質 i P S
細胞、低品質 i P S 細胞及び p r e - i P S 細胞からなる群より選択される少なくとも 1
種の細胞が得られることが知られている。ここで、高品質 i P S 細胞とは DNA メチル化
の異常がみられない i P S 細胞であると定義される。p r e - i P S 細胞とはリプログラ
ミングが不完全な細胞であると定義される。p r e - i P S 細胞におけるリプログラミン
グ不全は、ドナー細胞のエピゲノム情報が未だ維持されていることが原因であると考えら
れている。p r e - i P S 細胞とは、より詳細には、i P S 細胞作成過程で出現する i P
S 細胞様細胞であって、形態的には i P S 細胞に似ているが、外来遺伝子の発現抑制は起
きておらず、また内在性の多能性関連遺伝子 (N a n o g 、 O c t 3 / 4 、 R e x - 1 等
) の発現上昇も観察されない細胞である。また、低品質 i P S 細胞とは DNA メチル化に
異常がみられる i P S 細胞であると定義される。低品質 i P S 細胞とは、より詳細には、
G T L 2 遺伝子領域に異常なメチル化が付加されており、テトラプロイドキメラ胚の作製
を行うことができない i P S 細胞である。本発明者は、i P S 細胞の品質に悪影響を与え
ることが知られている DNA メチル化の異常を、本発明の DNA 脱メチル化誘導方法によ
って正常化できることを見出した。具体的には、低品質 i P S 細胞にみられる DNA メチ
ル化の異常を、本発明の DNA 脱メチル化誘導方法によって正常化でき、低品質 i P S 細
胞を高品質 i P S 細胞に改良できることを見出した。さらに本発明者は、本発明の DNA
脱メチル化誘導方法によって p r e - i P S 細胞におけるリプログラミングを完全なもの
とできることを見出した。具体的には、p r e - i P S 細胞において維持されているドナ
ー細胞のエピゲノム情報を本発明の DNA 脱メチル化誘導方法によって消失せしめ、p r
e - i P S 細胞を i P S 細胞へと変換できることを見出した。したがって、低品質 i P S
細胞及び p r e - i P S 細胞に対して工程 (1) を行うことによって、それぞれを高品質
i P S 細胞及び i P S 細胞に変換できる。また、同様の効果を得るためには必ずしも低品
質 i P S 細胞及び p r e - i P S 細胞に直接工程 (1) を行う必要はない。例えば、体細
胞に対して工程 (1) を工程 (i) と併せて行うことによっても同様の効果が得られる。

【 0 0 7 3 】

以上の通り、工程 (1) では、体細胞、低品質 i P S 細胞及び p r e - i P S 細胞から
なる群より選択される少なくとも 1 種の細胞において、T E T 1 活性ドメイン等融合ポリ
ペプチド及び P R D M 1 4 活性ドメイン等融合ポリペプチドの細胞内含量を増加させる。

【 0 0 7 4 】

したがって、変換工程 (i) は、工程 (1) の前に行ってもよいし、工程 (1) と同時
に行ってもよいし、あるいは工程 (1) の後に行ってもよい。工程 (i) を工程 (1) の
前に行う場合は、工程 (1) を少なくとも低品質 i P S 細胞又は p r e - i P S 細胞に対
して行うことになる。工程 (i) を工程 (1) と同時に、又は後に行う場合は、工程 (1
) を少なくとも体細胞に対して行うことになる。工程 (i) を工程 (1) と同時に行う場

10

20

30

40

50

合、工程（１）は、言い換えれば、

（１Ａ－１）ＴＥＴ１活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び

ＰＲＤＭ１４活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドの体細胞内含量を増加させ、かつ

核初期化物質を体細胞に接触させることにより体細胞をｉＰＳ細胞に変換する工程である。

【００７５】

本発明のｉＰＳ細胞の製造方法としては、

[３Ａ－２．] （Ｉ）核初期化物質を体細胞に接触させることにより体細胞を高品質ｉＰＳ細胞、低品質ｉＰＳ細胞及びpre-iPＳ細胞に変換する工程；

（ＩＩ）工程（Ｉ）で得られた細胞の評価を行い、高品質ｉＰＳ細胞、低品質ｉＰＳ細胞及びpre-iPＳ細胞に選別する工程；及び

（ＩＩＩ）工程（ＩＩ）で選別された低品質ｉＰＳ細胞及びpre-iPＳ細胞に対して、工程（１）を行う工程を含む方法が挙げられる。

【００７６】

ＧＴＬ２遺伝子領域はゲノム刷り込み領域であり、通常父由来のゲノムのみがメチル化を受けている。しかしながら、低品質ｉＰＳ細胞では母由来・父由来の両ゲノム共にメチル化を受けており、この異常なメチル化がｉＰＳ細胞の品質低下の原因となっていると考えられている。また、本発明者はＰＲＤＭ１４が、ＧＴＬ２遺伝子領域の異常なメチル化を消去する活性を持つことを見出した。本発明においては、ＧＴＬ２遺伝子領域に８０％以上メチル化が付加されているｉＰＳ細胞を低品質と定義し、ＰＲＤＭ１４を導入することで６０％以下に減少した場合品質が改善したと判断する。また、ＧＴＬ２に異常なメチル化があると、ＧＴＬ２の遺伝子発現が抑制される。そこで、低品質ｉＰＳ細胞にＰＲＤＭ１４を導入することで、野生型ＥＳ細胞と同レベルまでＧＴＬ２の発現が回復したかどうかで、ＰＲＤＭ１４による品質改善効果を迅速に検証できる。

【００７７】

したがって、工程（ＩＩ）においては、工程（Ｉ）で得られた細胞についてＧＴＬ２遺伝子領域のメチル化の程度を調べ、８０％以上メチル化が付加されているｉＰＳ細胞を低品質と判定することにより、低品質ｉＰＳ細胞を選別することができる。

【００７８】

別の方法として、工程（ＩＩ）においては、工程（Ｉ）で得られた細胞についてＧＴＬ２遺伝子の発現の程度を調べ、野生型ＥＳ細胞における同遺伝子の発現の程度との比較を行い、発現の程度がより低いｉＰＳ細胞を低品質と判定することにより、低品質ｉＰＳ細胞を選別することができる。

【００７９】

また、工程（ＩＩ）においては、工程（Ｉ）で得られた細胞について内在性のＮＡＮＯＧ遺伝子の発現の程度を調べ、発現が観察されないｉＰＳ細胞をpre-iPＳ細胞と判定することにより、pre-iPＳ細胞を選別することができる。

これらpre-iPＳ細胞及び低品質ｉＰＳ細胞、並びにそれらの中間的な細胞、例えば、Nanogが弱陽性であり、かつGtl2が高メチル化されている細胞等、はいずれも初期化が不完全なｉＰＳ細胞といえ、再生医療などに適用する際には、排除すべきｉＰＳ細胞である。工程（ＩＩ）において、高品質ｉＰＳ細胞、低品質ｉＰＳ細胞及びpre-iPＳ細胞に加えて、さらに上記のような中間的な細胞を選別してもよい。このように選別された中間的な細胞は、さらに工程（ＩＩＩ）において低品質ｉＰＳ細胞及びpre-iPＳ細胞に対するのと同様の処理を受ける。これにより、ｉＰＳ細胞群の中からこのような初期化が不完全なｉＰＳ細胞の数を低減することができ、高品質なｉＰＳ細胞など初期化の完成度の高いｉＰＳ細胞を樹立することが可能となる。

【００８０】

10

20

30

40

50

工程 (I I) における細胞の評価及び選別は、特に限定されないが、例えば、細胞をコロニー化した上で行うことができる。具体的には、単一の細胞からそれぞれ派生した個々のコロニーから一部の細胞をサンプリングし、その細胞を評価することによってその細胞が属するコロニーの評価を行い、かかる評価結果に基づいてコロニー単位での選別を行うことができる。

【 0 0 8 1 】

工程 (I I I) においては、工程 (I I) で選別された *pre-iPS* 細胞及び低品質 *iPS* 細胞に対して、工程 (1) を行う。工程 (I I) で選別された低品質 *iPS* 細胞は DNA メチル化に異常がみられ、同様に選別された *pre-iPS* 細胞はリプログラミングが不完全である。工程 (I I I) においてこれらの低品質 *iPS* 細胞及び *pre-iPS* 細胞に対して工程 (1) を行うことにより、低品質 *iPS* 細胞及び *pre-iPS* 細胞をそれぞれ高品質 *iPS* 細胞及び *iPS* 細胞へと変換することができる。工程 (I I) 及び (I I I) は、必要な数の高品質 *iPS* 細胞が得られるまで、繰り返し行うことができる。繰り返し行う場合、工程 (I I) における「工程 (I) で得られた細胞」なる記載は「工程 (I I I) で得られた細胞」に読み替える。繰り返し行うことにより、より多くの低品質 *iPS* 細胞及び *pre-iPS* 細胞をそれぞれ高品質 *iPS* 細胞及び *iPS* 細胞へと変換することができ、ひいてはより多くの高品質 *iPS* 細胞を得ることができる。

10

【 0 0 8 2 】

工程 3 A - 2 . においては、工程 (I I I) における工程 (1) を工程 (i) と同時に行ってもよい。この場合は、工程 (I I I) における工程 (1) を、
(1 A - 2) T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び
P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドの低品質 *iPS* 細胞及び *pre-iPS* 細胞における細胞内含量を増加させ、かつ核初期化物質を低品質 *iPS* 細胞及び *pre-iPS* 細胞に接触させる工程
であると言い換えることができる。

20

【 0 0 8 3 】

工程 3 A - 2 . においては、工程 (1) をまず体細胞に対して行い、続いて工程 (I I) で選別された低品質 *iPS* 細胞及び *pre-iPS* 細胞に対して工程 (1) を行ってもよい。この場合は、最初の工程 (1) を工程 (i) と同時に行ってもよい。この場合も、工程 (I) を前記工程 (1 A - 1) であると言い換えることができる。

30

【 0 0 8 4 】

本発明の *iPS* 細胞の製造方法としては、
[3 B .] *pre-iPS* 細胞に対して工程 (1) を行うことにより、*iPS* 細胞を得る方法が挙げられる。この場合、工程 (1) は核初期化物質の存在下で行ってもよく、工程 (1) を、
(1 B) T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び
P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドの *pre-iPS* 細胞内含量を増加させ、かつ核初期化物質を *pre-iPS* 細胞に接触させる工程
であると言い換えることができる。

40

【 0 0 8 5 】

本発明の *iPS* 細胞の製造方法としては、
[3 C .] 低品質 *iPS* 細胞に対して工程 (1) を行うことにより、高品質 *iPS* 細胞を得る方法が挙げられる。この場合、工程 (1) は核初期化物質の存在下で行ってもよく、工程 (1) を、
(1 C) T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド；及び
P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド

50

の低品質 i P S 細胞内含量を増加させ、かつ核初期化物質を低品質 i P S 細胞に接触させる工程であると言い換えることができる。

【 0 0 8 6 】

本発明の i P S 細胞の製造方法において、体細胞としては、特に限定されないが、例えば、ヒト細胞、マウス細胞、サル等が挙げられる。

【 0 0 8 7 】

本発明の i P S 細胞の製造方法において、核初期化物質は、公知のものを用いることができる。核初期化物質としては、特に限定されないが、例えば、O C T 4、S O X 2、K L F 4、M Y C 等が挙げられる。

10

【 0 0 8 8 】

[4 . ポリペプチド含有組成物]

本発明のポリペプチド含有組成物は、

(A - 1) T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド ; 及び

(A - 2) P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチド

を含有する、組成物である。

【 0 0 8 9 】

T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドは、 1 . において説明したのと同様である。

20

【 0 0 9 0 】

P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドは、 1 . において説明したのと同様である。

【 0 0 9 1 】

本発明のポリペプチド含有組成物は、例えば、 1 . で説明した通り、細胞内において D N A 脱メチル化を誘導するという用途に用いることができる。

【 0 0 9 2 】

本発明のポリペプチド含有組成物は、具体的には、例えば、D N A メチル化の異常を有する細胞等に対して適用することによって、D N A メチル化を正常化するという用途に用いることができる。D N A メチル化の異常が何らかの疾患に関連しており、その正常化がかかる疾患の治療に結びつく場合は、本発明のポリペプチド含有組成物は、医薬として用いることができる。本発明のポリペプチド含有組成物は、より具体的には、例えば、エピゲノム変異を修復する D N A メチル化の異常に起因する疾患に対する治療剤として用いることができる。

30

なお、現在、抗癌剤として臨床試験されているアザシチジン（ビダーザ（登録商標））のような D N A 脱メチル化剤は、D N M T 1 によるメチル化の維持を阻害することで、D N A 複製依存的（受動的）に脱メチル化を誘導するものであり、D N M T 1 はゲノム全体のメチル化を維持しているので、領域の選択性がなく、ゲノム全体を脱メチル化する結果、副作用が避けられない。これに対し、本発明のポリペプチド含有組成物を治療剤として用いる場合は、塩基除去修復を介して領域選択的に D N A 脱メチル化を誘導することができるので、副作用の少ない治療剤を提供し得る。また上記既知 D N A 脱メチル化剤は分裂細胞に対して効果を有するに止まるが、本発明のポリペプチド含有組成物を治療剤として用いる場合は、非分裂細胞に対しても有効であるという優位性もある。

40

上記の治療剤としては、特に限定されないが、例えば、抗がん剤、神経精神疾患治療剤等が挙げられる。神経精神疾患治療剤としては、特に限定されないが、例えば、躁うつ病（双極性障害）治療剤、反復うつ病治療剤、統合性失調症等を挙げることができる。

【 0 0 9 3 】

医薬として用いられる場合、本発明のポリペプチド含有組成物（この場合、以下「医薬用途ポリペプチド含有組成物」ということがある。）は、ポリペプチド（ A - 1 ）及び（

50

A - 2) をそれぞれ有効成分として含有する。本発明のポリペプチド含有組成物は、さらにこれら有効成分に加えて必要に応じてさらに他の成分を含んでいてもよい。そのような成分としては例えば、剤型に応じて製剤化のために必要となる製剤成分、保存安定のために必要となる保存安定成分、及びその他の有効成分等が挙げられる。その他の有効成分としては、例えば、抗炎症剤及び抗菌剤等が挙げられる。

【0094】

本発明の医薬用途ポリペプチド含有組成物におけるポリペプチド(A - 1)及び(A - 2)の含有割合は、投与形態、剤型、投与量及び投与頻度等に応じて決められる。

【0095】

本発明の医薬用途ポリペプチド含有組成物の投与形態は、適用対象患部等に応じて適宜設定される。全身的投与であってもよいし、局所的投与であってもよい。全身的投与としては、経口投与又は非経口投与が挙げられる。さらに非経口投与としては、静脈内注射、皮下注射及び筋肉内注射等が挙げられる。局所的投与としては、皮膚、粘膜、鼻内又は眼内等に対する投与を挙げることができる。

10

【0096】

本発明の医薬用途ポリペプチド含有組成物の剤型は、投与形態等に応じて適宜設定される。例えば、経口投与する場合、錠剤、顆粒、散剤、坐剤及びカプセル剤等の固形製剤や液状等が挙げられる。非経口投与する場合、クリーム剤、ゲル剤及び軟膏剤等の半固形状、並びに液剤及びローション剤等の液剤等が挙げられる。通常注射剤として投与するのが好ましい場合が多い。

20

【0097】

本発明の医薬用途ポリペプチド含有組成物の投与量及び投与頻度は、投与形態、投与方法及び剤型その他、被投与者の状態、並びにポリペプチド(A - 1)及び(A - 2)のDNA脱メチル化活性の程度等に応じて適宜設定される。適切な投与量及び投薬法は、当業者に公知の通常の投与量決定技術に従い決定することができる。

【0098】

一回あたりの投与量は治療有効量であればよい。

【0099】

本発明のポリペプチド含有組成物は、3.で説明した通り、iPS細胞を製造するという用途に用いることができる。言い換えれば、本発明のポリペプチド含有組成物は、iPS細胞の初期化完成度の向上剤又は品質改善剤として用いることができる。この場合、本発明のポリペプチド含有組成物は、ポリペプチド(A - 1)及び(A - 2)をそれぞれ有効成分として含有する。本発明のポリペプチド含有組成物は、さらにこれら有効成分に加えて必要に応じてさらに他の成分を含んでいてもよい。そのような成分としては例えば、剤型に応じて製剤化のために必要となる製剤成分、保存安定のために必要となる保存安定成分、及びその他の有効成分等が挙げられる。その他の有効成分としては、例えば、核初期化物質等が挙げられる。

30

核初期化物質としては、公知のものを用いることができる。

【0100】

[5.ポリヌクレオチド含有組成物]

本発明のポリヌクレオチド含有組成物は、

(- 1) TET1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド；及び

(- 2) PRDM14 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

を含有する、組成物である。

40

【0101】

TET1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドは、1.において説明したのと同様である。

【0102】

50

PRDM14 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドは、1.において説明したのと同様である。

【0103】

ポリヌクレオチドは、DNA又はRNAである。ポリヌクレオチドは、好ましくはDNAである。

【0104】

本発明のポリヌクレオチド含有組成物は、4.で説明した本発明のポリペプチド含有組成物と同じ用途に用いることができる。

【0105】

医薬として用いられる場合、本発明のポリヌクレオチド含有組成物(この場合、以下「医薬用途ポリヌクレオチド含有組成物」ということがある。)は、ポリヌクレオチド(-1)及び(-2)をそれぞれ有効成分として含有する。本発明のポリヌクレオチド含有組成物は、さらにこれら有効成分に加えて必要に応じてさらに他の成分を含んでもよい。そのような成分としては例えば、剤型に応じて製剤化のために必要となる製剤成分、保存安定のために必要となる保存安定成分、及びその他の有効成分等が挙げられる。その他の有効成分としては、例えば、抗炎症剤及び抗菌剤等が挙げられる。

10

【0106】

本発明の医薬用途ポリヌクレオチド含有組成物におけるポリヌクレオチド(-1)及び(-2)の含有割合は、投与形態、剤型、投与量及び投与頻度等に応じて決められる。

20

【0107】

本発明の医薬用途ポリヌクレオチド含有組成物の投与形態は、適用対象患部等に応じて適宜設定される。全身的投与であってもよいし、局所的投与であってもよい。全身的投与としては、経口投与又は非経口投与が挙げられる。さらに非経口投与としては、静脈内注射、皮下注射及び筋肉内注射等が挙げられる。局所的投与としては、皮膚、粘膜、鼻内又は眼内等に対する投与を挙げることができる。

【0108】

本発明の医薬用途ポリヌクレオチド含有組成物の剤型は、投与形態等に応じて適宜設定される。例えば、経口投与する場合、錠剤、顆粒、散剤、坐剤及びカプセル剤等の固形製剤や液状等が挙げられる。非経口投与する場合、クリーム剤、ゲル剤及び軟膏剤等の半固形状、並びに液剤及びローション剤等の液剤等が挙げられる。通常注射剤として投与するのが好ましい場合が多い。

30

【0109】

本発明の医薬用途ポリヌクレオチド含有組成物の投与量及び投与頻度は、投与形態、投与方法及び剤型その他、被投与者の状態、並びにポリヌクレオチド(-1)及び(-2)のDNA脱メチル化活性の程度等に応じて適宜設定される。適切な投与量及び投薬法は、当業者に公知の通常の投与量決定技術に従い決定することができる。

【0110】

一回あたりの投与量は治療有効量であればよい。

【0111】

本発明のポリヌクレオチド含有組成物は、3.で説明した通り、初期化の完成度がより向上したiPS細胞、とりわけ高品質のiPS細胞を製造するという用途に用いることができる。言い換えれば、本発明のポリヌクレオチド含有組成物は、iPS細胞の初期化完成度の向上剤又は品質改善剤として用いることができる。より具体的には、実施例で示されるように、pre-iPS細胞、低品質iPS細胞及びそれらの中間的な細胞などの、初期化が不完全なiPS細胞にPRDM14を発現させることでNanog領域の脱メチル化や異常メチル化の低減といったiPS細胞の初期化の完成度を高め、品質改善が達成される。この場合、本発明のポリペプチド含有組成物は、ポリヌクレオチド(-1)及び(-2)をそれぞれ有効成分として含有する。本発明のポリヌクレオチド含有組成物は、さらにこれら有効成分に加えて必要に応じてさらに他の成分を含んでもよい。そ

40

50

のような成分としては例えば、剤型に応じて製剤化のために必要となる製剤成分、保存安定のために必要となる保存安定成分、及びその他の有効成分等が挙げられる。その他の有効成分としては、例えば、核初期化物質等が挙げられる。核初期化物質としては、公知のものを用いることができる。

【 0 1 1 2 】

[6 . 発現ベクター含有組成物]

本発明の発現ベクター含有組成物は、

(a - 1) T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター；及び

(a - 2) P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクター

を含有する、組成物である。

【 0 1 1 3 】

T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドは、 1 . において説明したのと同様である。

【 0 1 1 4 】

P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドは、 1 . において説明したのと同様である。

【 0 1 1 5 】

ポリヌクレオチドは、 D N A 又は R N A である。ポリヌクレオチドは、好ましくは D N A である。

【 0 1 1 6 】

本発明の発現ベクター含有組成物は、例えば、 1 . で説明した通り、細胞内において D N A 脱メチル化を誘導するという用途に用いることができる。この場合、発現ベクター (a - 1) 及び (a - 2) は、それぞれ併用したときに D N A 脱メチル化を誘導するという作用を有していればよい。言い換えると、発現ベクター (a - 1) は、 T E T 1 活性ドメイン等融合ポリペプチドに、 T E T 1 活性及び P R D M 1 4 活性を阻害しないか、あるいは著しく阻害しないアミノ酸又はポリペプチドがさらに付加されてなるポリペプチドを発現するベクターであってもよい。このような発現ベクターは、発現ベクター (a - 2) と併用した際に T E T 1 活性を発現し得、かつ発現ベクター (a - 2) が発現する P R D M 1 4 活性を阻害しないので、本発明の効果を奏しうる。同様に、発現ベクター (a - 2) は、 P R D M 1 4 活性ドメイン等融合ポリペプチドに、 T E T 1 活性及び P R D M 1 4 活性を阻害しないか、あるいは著しく阻害しないアミノ酸又はポリペプチドがさらに付加されてなるポリペプチドを発現するベクターであってもよい。このような発現ベクターは、発現ベクター (a - 1) と併用した際に P R D M 1 4 活性を発現し得、かつ発現ベクター (a - 1) が発現する T E T 1 活性を阻害しないので、本発明の効果を奏しうる。上述のように、 T E T 1 活性ドメイン等融合ポリペプチドに付加されていてもよいポリペプチドとしては、例えば、シグナルペプチド等が挙げられる。 T E T 1 活性ドメイン等融合ポリペプチドに付加されていてもよいポリペプチドの長さとしては、特に限定されないが、例えば、 2 ~ 3 0 個のアミノ酸、好ましくは 2 ~ 1 0 個のアミノ酸、より好ましくは 2 ~ 7 個のアミノ酸が挙げられる。また、上述のように、 P R D M 1 4 活性ドメイン等融合ポリペプチドに付加されていてもよいポリペプチドとしては、例えば、シグナルペプチド等が挙げられる。 P R D M 1 4 活性ドメイン等融合ポリペプチドに付加されていてもよいポリペプチドの長さとしては、特に限定されないが、例えば、 2 ~ 3 0 個のアミノ酸、好ましくは 2 ~ 1 0 個のアミノ酸、より好ましくは 2 ~ 7 個のアミノ酸が挙げられる。

【 0 1 1 7 】

発現ベクターとしては、特に限定されず、公知のものを適宜用いることができる。例えば、 p C A G G S - 1 v e c t o r 、 p C D N A 3 . 1 v e c t o r 等が挙げられる。

【 0 1 1 8 】

10

20

30

40

50

プロモーターとしては、特に限定されないが、一過的発現を企図する場合には例えばCMV、CAGGS等が挙げられる。また、恒常的発現を企図する場合にはpstein-Barr Virus (EBV)由来の複製起点OriPを持ち、かつEBV Nuclear Antigen 1 (EBNA1)遺伝子を発現するエピソーマルベクターが挙げられる。

【0119】

本発明の発現ベクター含有組成物は、4.で説明した本発明のポリペプチド含有組成物と同じ用途に用いることができる。

【0120】

医薬として用いられる場合、本発明の発現ベクター含有組成物(この場合、以下「医薬用途発現ベクター含有組成物」ということがある。)は、発現ベクター(a-1)及び(a-2)をそれぞれ有効成分として含有する。本発明の発現ベクター含有組成物は、さらにこれら有効成分に加えて必要に応じてさらに他の成分を含んでもよい。そのような成分としては例えば、剤型に応じて製剤化のために必要となる製剤成分、保存安定のために必要となる保存安定成分、及びその他の有効成分等が挙げられる。その他の有効成分としては、例えば、抗炎症剤及び抗菌剤等が挙げられる。

【0121】

本発明の医薬用途発現ベクター含有組成物における発現ベクター(a-1)及び(a-2)の含有割合は、投与形態、剤型、投与量及び投与頻度等に応じて決められる。

【0122】

本発明の医薬用途発現ベクター含有組成物の投与形態は、適用対象患部等に応じて適宜設定される。全身的投与であってもよいし、局所的投与であってもよい。全身的投与としては、経口投与又は非経口投与が挙げられる。さらに非経口投与としては、静脈内注射、皮下注射及び筋肉内注射等が挙げられる。局所的投与としては、皮膚、粘膜、鼻内又は眼内等に対する投与を挙げることができる。

【0123】

本発明の医薬用途発現ベクター含有組成物の剤型は、投与形態等に応じて適宜設定される。例えば、経口投与する場合、錠剤、顆粒、散剤、坐剤及びカプセル剤等の固形製剤や液状等が挙げられる。非経口投与する場合、クリーム剤、ゲル剤及び軟膏剤等の半固形状、並びに液剤及びローション剤等の液剤等が挙げられる。通常注射剤として投与するのが好ましい場合が多い。

【0124】

本発明の医薬用途発現ベクター含有組成物の投与量及び投与頻度は、投与形態、投与方法及び剤型その他、被投与者の状態、並びに発現ベクター(a-1)及び(a-2)のDNA脱メチル化活性の程度等に応じて適宜設定される。適切な投与量及び投薬法は、当業者に公知の通常の投与量決定技術に従い決定することができる。

【0125】

一回あたりの投与量は治療有効量であればよい。

【0126】

本発明の発現ベクター含有組成物は、3.で説明した通り、iPS細胞を製造するという用途に用いることができる。言い換えれば、本発明の発現ベクター含有組成物は、iPS細胞の初期化完成度の向上剤又は品質改善剤として用いることができる。この場合、本発明の発現ベクター含有組成物は、発現ベクター(a-1)及び(a-2)をそれぞれ有効成分として含有する。本発明の発現ベクター含有組成物は、さらにこれら有効成分に加えて必要に応じてさらに他の成分を含んでもよい。そのような成分としては例えば、剤型に応じて製剤化のために必要となる製剤成分、保存安定のために必要となる保存安定成分、及びその他の有効成分等が挙げられる。その他の有効成分としては、例えば、核初期化物質等が挙げられる。

核初期化物質としては、公知のものを用いることができる。

【0127】

10

20

30

40

50

[7 . 共発現ベクター]

本発明の共発現ベクターは、

(b) T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド ; 及び

P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

を含む共発現ベクターである。

【 0 1 2 8 】

T E T 1 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドは、 1 . において説明したのと同様である。

10

【 0 1 2 9 】

P R D M 1 4 活性ドメイン若しくはその改変体、又はそれを含む融合ポリペプチドは、 1 . において説明したのと同様である。

【 0 1 3 0 】

ポリヌクレオチドは、 D N A 又は R N A である。ポリヌクレオチドは、好ましくは D N A である。

【 0 1 3 1 】

本発明の共発現ベクター含有組成物は、例えば、 1 . で説明した通り、細胞内において D N A 脱メチル化を誘導するという用途に用いることができる。この場合、共発現ベクター (b) は、 D N A 脱メチル化を誘導するという作用を有していればよい。言い換えると、共発現ベクター (b) は、 T E T 1 活性ドメイン等融合ポリペプチドに、 T E T 1 活性及び P R D M 1 4 活性を阻害しないか、あるいは著しく阻害しないアミノ酸又はポリペプチドがさらに付加されてなるポリペプチドを発現し、かつ、 P R D M 1 4 活性ドメイン等融合ポリペプチドに、 T E T 1 活性及び P R D M 1 4 活性を阻害しないか、あるいは著しく阻害しないアミノ酸又はポリペプチドがさらに付加されてなるポリペプチドを発現するベクターであってもよい。このような共発現ベクターは、 T E T 1 活性及び P R D M 1 4 活性を発現しうるので、本発明の効果を奏しう。上述のように、 T E T 1 活性ドメイン等融合ポリペプチドに付加されていてもよいポリペプチドとしては、例えば、シグナルペプチド等が挙げられる。 T E T 1 活性ドメイン等融合ポリペプチドに付加されていてもよいポリペプチドの長さとしては、特に限定されないが、例えば、 2 ~ 3 0 個のアミノ酸、好ましくは 2 ~ 1 0 個のアミノ酸、より好ましくは 2 ~ 7 個のアミノ酸が挙げられる。また、上述のように、 P R D M 1 4 活性ドメイン等融合ポリペプチドに付加されていてもよいポリペプチドとしては、例えば、シグナルペプチド等が挙げられる。 P R D M 1 4 活性ドメイン等融合ポリペプチドに付加されていてもよいポリペプチドの長さとしては、特に限定されないが、例えば、 2 ~ 3 0 個のアミノ酸、好ましくは 2 ~ 1 0 個のアミノ酸、より好ましくは 2 ~ 7 個のアミノ酸が挙げられる。

20

30

【 0 1 3 2 】

発現ベクターとしては、特に限定されず、公知のものを適宜用いることができる。例えば、 p C A G G S - 1 v e c t o r 、 p C D N A 3 . 1 v e c t o r 等が挙げられる。

40

【 0 1 3 3 】

プロモーターとしては、特に限定されないが、一過的発現を企図する場合には例えば C M V 、 C A G G S 等が挙げられる。また、恒常的発現を企図する場合には p s t e i n - B a r r V i r u s (E B V) 由来の複製起点 O r i P を持ち、かつ E B V N u c l e a r A n t i g e n 1 (E B N A 1) 遺伝子が発現するエピソーマルベクターが挙げられる。

【 0 1 3 4 】

本発明の共発現ベクター含有組成物は、 4 . で説明した本発明のポリペプチド含有組成物と同じ用途に用いることができる。

【 0 1 3 5 】

50

医薬として用いられる場合、本発明の共発現ベクター含有組成物（この場合、以下「医薬用途共発現ベクター含有組成物」ということがある。）は、共発現ベクター（b）を有効成分として含有する。本発明の共発現ベクター含有組成物は、さらにこの有効成分に加えて必要に応じてさらに他の成分を含んでもよい。そのような成分としては例えば、剤型に応じて製剤化のために必要となる製剤成分、保存安定のために必要となる保存安定成分、及びその他の有効成分等が挙げられる。その他の有効成分としては、例えば、抗炎症剤及び抗菌剤等が挙げられる。

【0136】

本発明の医薬用途共発現ベクター含有組成物における共発現ベクター（b）の含有割合は、投与形態、剤型、投与量及び投与頻度等に応じて決められる。

10

【0137】

本発明の医薬用途共発現ベクター含有組成物の投与形態は、適用対象患部等に応じて適宜設定される。全身的投与であってもよいし、局所的投与であってもよい。全身的投与としては、経口投与又は非経口投与が挙げられる。さらに非経口投与としては、静脈内注射、皮下注射及び筋肉内注射等が挙げられる。局所的投与としては、皮膚、粘膜、鼻内又は眼内等に対する投与を挙げることができる。

【0138】

本発明の医薬用途共発現ベクター含有組成物の剤型は、投与形態等に応じて適宜設定される。例えば、経口投与する場合、錠剤、顆粒、散剤、坐剤及びカプセル剤等の固形製剤や液状等が挙げられる。非経口投与する場合、クリーム剤、ゲル剤及び軟膏剤等の半固形状、並びに液剤及びローション剤等の液剤等が挙げられる。通常注射剤として投与するのが好ましい場合が多い。

20

【0139】

本発明の医薬用途共発現ベクター含有組成物の投与量及び投与頻度は、投与形態、投与方法及び剤型その他、被投与者の状態、並びに共発現ベクター（b）のDNA脱メチル化活性の程度等に応じて適宜設定される。適切な投与量及び投薬法は、当業者に公知の通常の投与量決定技術に従い決定することができる。

【0140】

一回あたりの投与量は治療有効量であればよい。

【0141】

本発明の共発現ベクター含有組成物は、3.で説明した通り、iPS細胞を製造するという用途に用いることができる。言い換えれば、本発明の共発現ベクター含有組成物は、iPS細胞の初期化完成度の向上剤又は品質改善剤として用いることができる。この場合、本発明の共発現ベクター含有組成物は、共発現ベクター（b）を有効成分として含有する。本発明の共発現ベクター含有組成物は、さらにこの有効成分に加えて必要に応じてさらに他の成分を含んでもよい。そのような成分としては例えば、剤型に応じて製剤化のために必要となる製剤成分、保存安定のために必要となる保存安定成分、及びその他の有効成分等が挙げられる。

30

その他の有効成分としては、例えば、核初期化物質等が挙げられる。核初期化物質としては、公知のものを用いることができる。

40

【実施例】

【0142】

1. PRDM14によるLINE-1領域のDNA脱メチル化

PRDM14をES細胞に高発現させることで、ゲノム全体の脱メチル化を誘導できるかどうか検証するために、PRDM14高発現ES細胞におけるLINE-1のメチル化解析を行った。

【0143】

LINE-1とはトランスポゾン配列（外来性配列）であり、マウスのゲノムの約2割を占めているが（図1）、通常DNAのメチル化により発現が抑制されている。

【0144】

50

DNAのメチル化解析は、Bisulfite-Sequencing法により行った。ゲノムをBisulfite処理するとシトシンはウラシルへ変換されるが、メチル化シトシンは、メチル化シトシンとして残るため、シーケンスで配列を確認することで、ゲノム中のメチル化シトシンレベルを定量することができる。本実験では、LINE-1の5'UTRに存在する9つのCpG siteのメチル化状態を解析した。図1において、青の棒グラフはそれぞれのCpG siteのメチル化量を、赤の棒グラフはCpG site全体のメチル化率を表している。

【0145】

実験方法、並びに結果及び考察は以下の通りである。

[実験方法]

(1) PRDM14高発現ES細胞の作製

CAGGSプロモーターの下流にPrdm14-ires-puroの遺伝子を挿入したプラスミドをリポフェクション法によりES細胞に遺伝子導入を行った。遺伝子導入48時間後ピューロマイシンで選別を行い、単一コロニーをピックアップし継代・培養を行った。ピックアップ細胞からRNAを抽出し、定量的RT-PCR法によりPrdm14の発現を確認し、コントロール(空ベクター導入)ES細胞と比較し50倍以上発現している細胞をPrdm14高発現ES細胞とした。

(2) DNAのメチル化解析

コントロールES細胞及びPRDM14高発現ES細胞からゲノムDNAを単離し、亜硫酸処理により非メチル化シトシンのウラシルへの変換を行った。このDNAを鋳型としてLINE-1の配列に対するプライマーを用いてPCRを行い、増幅産物をTAベクターにクローニングした後に、シーケンスで配列を確認した。非メチル化シトシンは最終的にはTへと置換されるがメチル化シトシンはシトシンとして残るため、CG部位がTGの場合非メチル化、CGの場合メチル化と判定した。

[結果及び考察]

野生型ES細胞で約8割程度のCpG siteがメチル化されていたのに対して、PRDM14高発現ES細胞(PRDM14 O.E.)では、約3割程度しかメチル化されておらず、PRDM14をES細胞に高発現させることで、LINE-1領域の顕著な脱メチル化を誘導できることが明らかとなった。

2. PRDM14による広範囲にわたる遺伝子領域のDNA脱メチル化

PRDM14によるDNA脱メチル化でどの程度の遺伝子領域が影響を受けるのか検証するために、ゲノムにDNAのメチル化をほとんど持たない、DNAメチル化酵素の欠損ES細胞(Dnmts TKO)と遺伝子発現プロファイルの比較をマイクロアレイにより解析した。

【0146】

実験方法、並びに結果及び考察は以下の通りである。

[実験方法]

(1) マイクロアレイによる解析

コントロールES細胞、PRDM14高発現ES細胞及びDnmts TKO ES細胞よりRNAを抽出して、Agilent社のマウスwhole genome マイクロアレイプラットフォームを用いて解析を行った。PRDM14高発現ES細胞及びDnmts TKO ES細胞において、野生型ES細胞より2倍以上発現している遺伝子群を抽出し、Biovennを用いてVenn diagramを作製した。

[結果及び考察]

Dnmts TKO ES細胞で発現が上昇した遺伝子の約35%が、PRDM14 O.E. ES細胞でも発現が上昇しており(図2)、この結果は、PRDM14が約35%の遺伝子領域のDNA脱メチル化を誘導していることを示唆している。

3. PRDM14とヒドロキシメチル化を介したDNA脱メチル化

メチル化シトシンのヒドロキシ化を引き金としたDNA脱メチル化経路を図3に示す。DNAメチル化酵素の働きによって生じたメチル化シトシンは、TETタンパク質によ

10

20

30

40

50

リヒドロキシル化を受けヒドロキシメチル化シトシンへ変換される。ヒドロキシメチル化シトシンは、脱アミノ化酵素によってヒドロキシメチル化ウラシルへと変換され、最終的には塩基除去修復経路によりシトシンへと脱メチル化される。PRDM14が、この経路を促進することでDNA脱メチル化を誘導している可能性を検証するために、PRDM14高発現ES細胞におけるゲノム全体のメチル化シトシン、及びヒドロキシメチル化シトシンの量を定量した。

【0147】

それぞれのゲノムをニトロセルロース膜に吸着させ、その後抗メチル化シトシン抗体もしくは抗ヒドロキシメチル化シトシン抗体を用いてDot blotを行った。

【0148】

実験方法、並びに結果及び考察は以下の通りである。

[実験方法]

(1) ゲノムの調製

ゲノムDNAは、Promega社のWizard SV Genomic DNA purification systemを用いてプロトコールに従って調製した。

(2) Dot blot

ゲノムDNAを95℃で変性させた後に、ニトロセルロース膜に吸着させ、その後抗メチル化シトシン抗体もしくは抗ヒドロキシメチル化シトシン抗体を用いてDot blotを行った。検出にはHRP標識した2次抗体を用いた。

[結果及び考察]

Dnmts KO ES細胞では、メチル化シトシン、ヒドロキシメチル化シトシン共にゲノム中の量が減少していたのに対して、PRDM14 O.E. ES細胞では、メチル化シトシンは減少していたが、ヒドロキシメチル化シトシンの量は反対に上昇していた(図4)。したがってPRDM14はメチル化シトシンのヒドロキシメチル化を促進することで、DNA脱メチル化を誘導している可能性が考えられる。

4. PRDM14によるDNA脱メチル化における塩基除去修復

PRDM14が、図3の経路を促進することでDNA脱メチル化を誘導しているならば、PRDM14によるDNA脱メチル化は塩基除去修復阻害剤でキャンセルされるはずである。そこで、PRDM14によるDNA脱メチル化による遺伝子発現上昇が、塩基除去修復阻害投与により阻害されるか否か検証した。塩基除去修復阻害剤には、塩基除去修復の主要な因子であるPARP1及びAPE1の阻害剤を用いた(それぞれ3AB及びCRT)。

【0149】

実験方法、並びに結果及び考察は以下の通りである。

[実験方法]

Empty vector及びPrdm14発現VectorをES細胞に導入し、薬剤選別によりPrdm14陽性細胞濃縮させ、6日間培養する。6日間培養したES細胞からRNAを回収し、定量的RT-PCR法を用いて標的遺伝子の発現変化を、Empty vector導入細胞とPrdm14 vector導入細胞間で比較した。

[結果及び考察]

3AB及びCRTをそれぞれ投与することにより、PRDM14により発現誘導を受ける遺伝子の大部分の発現誘導が抑制されることが明らかになった(図5)。本実験の結果から、PRDM14が、図3の経路を促進することでDNA脱メチル化を誘導していることが示された。一方、体細胞は本来TET1を有しないことが知られているが、TET1を体細胞において過剰発現させることによって、5-メチルシトシン(5-mC)から5-ヒドロキシメチルシトシンへの変換が起こることが報告されている(Science Vol. 324, 15 May, 2009, pp. 930-935)。3.の実験結果と考え合わせると、体細胞においてTET1とPRDM14の細胞内含量を増加させることによって、TET1だけの細胞内含量を増加させた場合に比べて5-ヒドロキシメチルシトシンへの変換がより促進され、ひいてはDNA脱メチル化がより促進されること

10

20

30

40

50

が示された。

5. PRDM14によるDNA脱メチル化を介した多能性幹細胞の誘導

iPS細胞は山中ファクター(OCT4、SOX2、KLF4及びMYC; 総称して「OSKM」ということがある。)を繊維芽細胞に導入することで樹立することができる。樹立の過程でリプログラミングが不完全なpre-iPS細胞や、低品質iPS細胞が出現するが、これらの細胞におけるリプログラミング不全は、ドナー細胞(繊維芽細胞等)のエピゲノム情報の維持が原因であると考えられている(図6)。

【0150】

本実験では、ES細胞を分化させて作製するエピプラスト様細胞(EpiLC)にPRDM14を発現させることによる、ES細胞への影響を調べた。ES細胞は、サイトカインであるLIF存在下では自己複製を行うことができるが、0.1%KSR、bFGF及びACTIVIN A存在下で培養することで、in vitroのエピプラスト(胎生6.5日胚)に性質の近いEpiLCsへ分化誘導することができる。EpiLCsを再びES細胞培養液で培養すると細胞はさらに分化するが、本実験では、EpiLCsにPRDM14を発現させた後にES細胞培養液で培養するとEpiLCsにどのような変化が観察されるかを確認した。

10

【0151】

実験方法、並びに結果及び考察は以下の通りである。

[実験方法]

テトラサイクリン非存在下でPRDM14を発現するPRDM14誘導性ES細胞を用いた。ES細胞をフィブロネクチンコートシャーレ上で、0.1%KSR、bFGF及びACTIVIN A存在下で2日間培養する。その後、テトラサイクリン存在下・非存在下でさらに2日間培養し、ES細胞培養液(LIF存在下)に懸濁し継代した。培養開始0、2、4日後にRNAを回収し、Oct3/4, Sox2, Klf2の遺伝子発現変化を定量的RT-PCRにて定量した。また、ES細胞培地で継代した細胞を3日間培養し、4%PFAで固定後アルカリフォスファターゼ染色によりES細胞を判定した。

20

[結果及び考察]

EpiLCsにPRDM14を発現させた後にES細胞培養液で培養するとES細胞様コロニー(アルカリフォスファターゼ陽性: AP陽性)が出現した。また多能性関連遺伝子であるKlf2の発現量が増加することが確認された。(図7)。したがって、PRDM14には多能性を消失した細胞に多能性を付与する活性があることが示された。また、EpiLCsからES細胞に脱分化する過程において、Klf2領域の5hmCが上昇し、5mCが減少していた。これらの結果から、PRDM14がTET1と協調して5hmCを介したDNA脱メチル化を行うことで、EpiLCsからES細胞への脱分化を誘導していることが示唆された。

30

6. 体細胞におけるTET1・PRDM14共発現によるDNA脱メチルの誘導

[実験方法]

Empty vector、Tet1発現Vector、Prdm14発現VectorをHEK293細胞に導入し、薬剤選別によりPrdm14陽性細胞を濃縮させ、4日間培養した。4日間培養したHEK293細胞からゲノムDNAを回収し、その後メチル化感受性酵素HpaIIの処理を行った。HpaIIは、CCGG部位を認識して切断する制限酵素であるが、メチル化されていると切断することができない。HpaII未処理、処理のゲノムDNAを鋳型として、LINE-1領域に対するプライマーを設計して定量的PCRを行った。HpaII未処理のPCR増幅曲線からHpaII処理の増幅曲線のThreshold Cycle (Ct)を引くことで、それぞれの細胞におけるLINE-1領域のメチル化状態を定量した。

40

[結果及び考察]

TET1単独及びPRDM14単独ではLINE-1領域の脱メチル化は誘導できなかったが、TET1とPRDM14を共に発現させることで、有意な脱メチル化が観察された(図8)。

50

7. PRDM14とTET1の共発現によるDNA脱メチル化誘導

ES細胞にPRDM14を発現させることで、LINE-1領域の脱メチル化が観察された。ES細胞は内在性のTET1を高発現しているが、ヒト胎児腎臓由来の細胞株であるHEK293細胞はTET1の発現がほとんど観察されない。そこで、HEK293細胞において、PRDM14又はTET1をそれぞれ単独で発現させ、あるいはPRDM14とTET1を共発現させ、それぞれの細胞においてLINE-1領域のメチル化変動を調べることにより、PRDM14とTET1の併用効果を検証した。

[実験方法]

(1) DNAのメチル化解析

コントロール細胞、PRDM14を高発現する細胞、TET1を高発現する細胞、PRDM14及びTET1を高発現する細胞(全てHEK293細胞)からゲノムDNAを単離し、亜硫酸処理により非メチル化シトシンのウラシルへの変換を行った。このDNAを鋳型としてLINE-1の配列に対するプライマーを用いてPCRを行い、増幅産物をTaqベクターにクローニングした後に、シーケンスで配列を確認した。非メチル化シトシンは最終的にはTへと置換されるがメチル化シトシンはシトシンとして残るため、CG部位がTGの場合非メチル化、CGの場合メチル化と判定した。また、上記の亜硫酸処理によるDNAメチル化解析では、5-メチルシトシンと5-ヒドロキシメチルシトシンを区別することができない。そこで、グルコース転移酵素を用いた検出方法で5-メチルシトシンと5-ヒドロキシメチルシトシンの識別を行った。

それぞれの細胞からゲノムDNAを回収した後に、ゲノムDNAをグルコシルトランスフェラーゼと基質のグルコースと反応させる。5-メチルシトシンにはグルコースは転移しないが、5-ヒドロキシメチルシトシンにはグルコースが転移される。グルコースが転移された5-ヒドロキシメチルシトシンを含むCCGG配列は制限酵素であるMspIで切断することができない。HpaIIとMspIで切断後、CCGG配列を挟んで増幅するプライマーを用いて定量的PCRを行い、5-メチルシトシンおよび5-ヒドロキシメチルシトシンの量を定量した(この定量的PCRのことを以下、「GlucMS-qPCR」と呼ぶ。)

(2) 定量的RT-PCR

コントロール細胞、PRDM14を高発現する細胞、TET1を高発現する細胞、PRDM14及びTET1を高発現する細胞(全てHEK293細胞)から、mRNAを抽出し逆転写反応によりcDNAを作製した。このcDNAを鋳型としてLINE-1に対するプライマーを用いて定量的PCRを行い、それぞれの細胞におけるLINE-1の転写量を測定した。

[結果及び考察]

コントロール細胞、PRDM14を高発現する細胞、TET1を高発現する細胞、PRDM14及びTET1を高発現する細胞のLINE-1領域のメチル化状態を解析した結果、PRDM14を高発現する細胞、TET1を高発現する細胞と比較して、PRDM14及びTET1を高発現する細胞において顕著な脱メチル化が観察された(図9)。また、5-メチルシトシンと5-ヒドロキシメチルシトシンの量を比較したところ、PRDM14及びTET1を高発現する細胞では5-メチルシトシンのみの脱メチル化が観察された(図10)。さらに、PRDM14及びTET1を高発現する細胞ではLINE-1の顕著な発現誘導も観察された(図11)。これらの結果から、PRDM14とTET1を組み合わせることで、LINE-1領域の脱メチル化を誘導できることが明らかとなった。

8. PRDM14によるDNA脱メチル化におけるTet1及びTet2(以下Tet1/2と記載する)の機能解析

ES細胞には内在的なTet1/2が高発現している。PRDM14によるDNA脱メチル化にTet1/2が機能的に必要なか否か検証するために、Tet1/2ダブルノックダウンES細胞にPRDM14を発現させ、脱メチル化によって発現上昇する遺伝子の発現と、プロモーター領域のメチル化変化を解析した。

10

20

30

40

50

[実験方法]

(1) P r d m 1 4 誘導的発現 E S 細胞の樹立

E S 細胞にドキシサイクリン存在下で活性を持つ t T A をコードしたプラスミドと、t T A の制御領域の下流に P r d m 1 4 の遺伝子を挿入したプラスミドをトランスフェクションし、薬剤選別を行うことでドキシサイクリン誘導性 P r d m 1 4 発現 E S 細胞の樹立を行った。

(2) T e t 1 / 2 ノックダウン / ドキシサイクリン誘導性 P r d m 1 4 発現 E S 細胞の樹立

(1) で作製したドキシサイクリン誘導性 P r d m 1 4 発現 E S 細胞に、T e t 1 / 2 に対する s h R N A を発現するレンチウイルスを感染させ、T e t 1 / 2 ノックダウン / ドキシサイクリン誘導性 P r d m 1 4 発現 E S 細胞を樹立した。

10

[結果及び考察]

結果を図 1 2 に示す。コントロール E S 細胞及び T e t 1 / 2 ノックダウン E S 細胞に P r d m 1 4 を誘導的に発現させ、S l c 2 5 a 3 1 および P i w i l 2 の発現変化を定量的 R T - P C R で解析した。その結果、コントロール細胞では S l c 2 5 a 3 1 および P i w i l 2 とともに顕著な発現上昇が観察されたのに対して、T e t 1 / 2 ノックダウン細胞では発現上昇の抑制が観察された。また、S l c 2 5 a 3 1 および P i w i l 2 のプロモーター領域の 5 - メチルシトシン、5 - ヒドロキシメチルシトシンの量を解析したところ、コントロール細胞では 5 - メチルシトシンの減少が観察されたが、T e t 1 / 2 ノックダウン E S 細胞では脱メチル化が不完全であった。これらの結果から、P R D M 1 4 による DNA 脱メチル化誘導には T E T 1 / 2 の機能が必須であり、P R D M 1 4 と T E T の組み合わせが効率的な脱メチル化誘導に必要であることが示された。

20

9 . P R D M 1 4 による低品質 i P S 細胞の品質改善

P R D M 1 4 による DNA 脱メチル化誘導活性を i P S 細胞の品質改善への応用の可能性を検証した。i P S 細胞は株間ごとに性質が大きく異なり、分化の方向性の偏りや分化抵抗性などの問題が報告されている。今回、多能性誘導因子である N a n o g 遺伝子の発現が低い低品質 i P S 細胞に P r d m 1 4 を発現させることで、品質改善の可能性を検証した。

[実験方法]

O c t 4 、S o x 2 、K l f 4 及び c - m y c をレトロウイルスを用いて、N a n o g の発現を G F P で可視化することができる、N a n o g - E G F P - I r e s - P u r o トランスジェニックマウスから樹立した胎児繊維芽細胞に発現させた。培養後、E S 細胞と形態が酷似しているが、E G F P の発現が低い細胞 (低品質 i P S 細胞) を樹立した。その後、ドキシサイクリン誘導性 P r d m 1 4 高発現低品質 i P S 細胞を作製し、P r d m 1 4 の発現誘導に伴う E G F P の発現変動、遺伝子発現変動を解析した。また、N a n o g 遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態は、G l u c M S - q P C R で定量した。

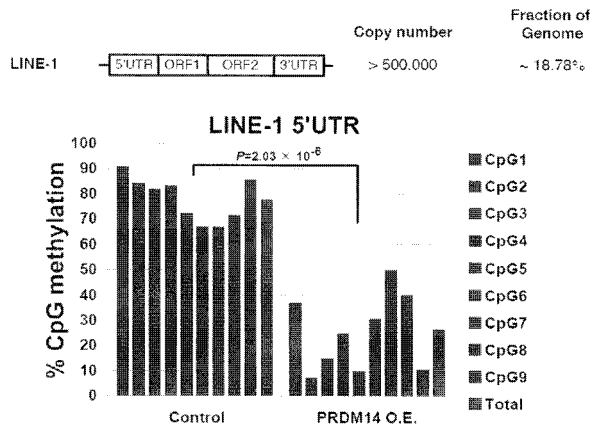
30

[結果及び考察]

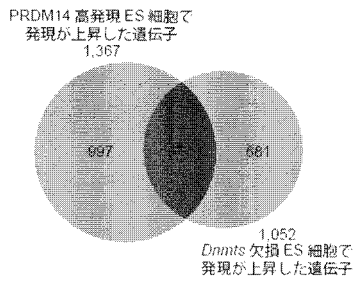
結果を図 1 3 ~ 1 5 に示す。P r d m 1 4 の発現誘導に伴い、多能性誘導因子 N a n o g および K l f 2 の発現上昇が観察された (図 1 4) 。また、低品質 i P S 細胞では T e t 1 / 2 の高発現が観察されたため、P r d m 1 4 が T e t 1 / 2 と協調して DNA 脱メチル化誘導を行っている可能性が考えられた。そこで、N a n o g プロモーター領域のメチル化解析を行った結果、P r d m 1 4 の発現誘導に伴い DNA メチル化の減少が観察された (図 1 5) 。これらの結果は、P R D M 1 4 と T E T を組み合わせることで、低品質 i P S 細胞の異常メチル化を修復できることを示している。

40

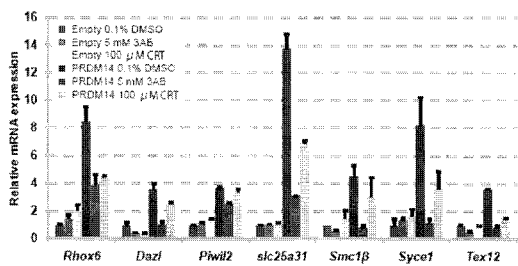
【 図 1 】



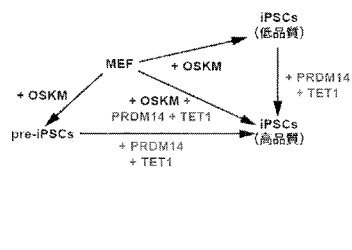
【 図 2 】



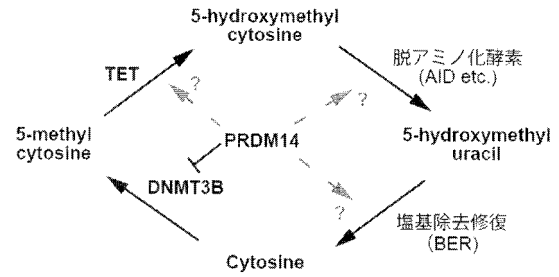
【 図 5 】



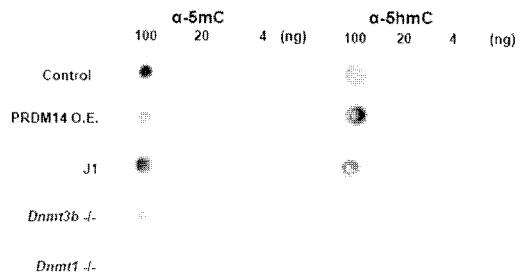
【 図 6 】



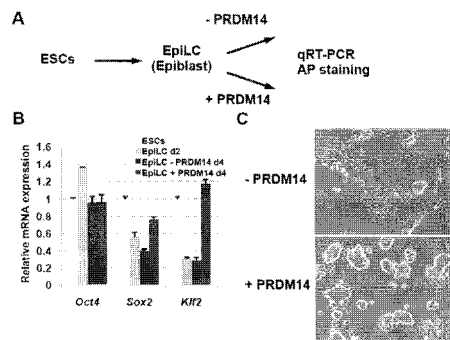
【 図 3 】



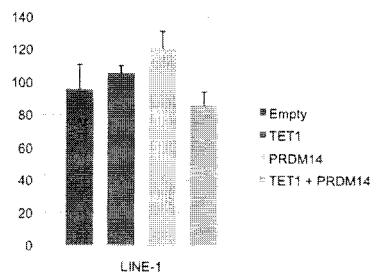
【 図 4 】



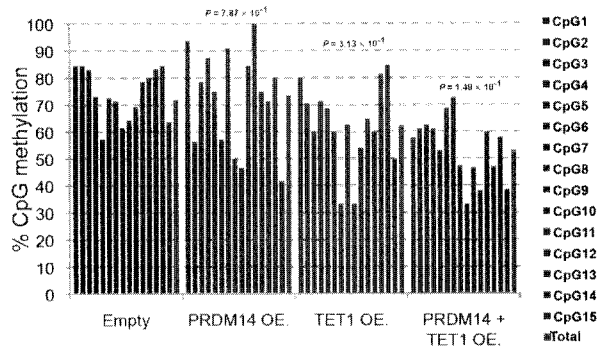
【 図 7 】



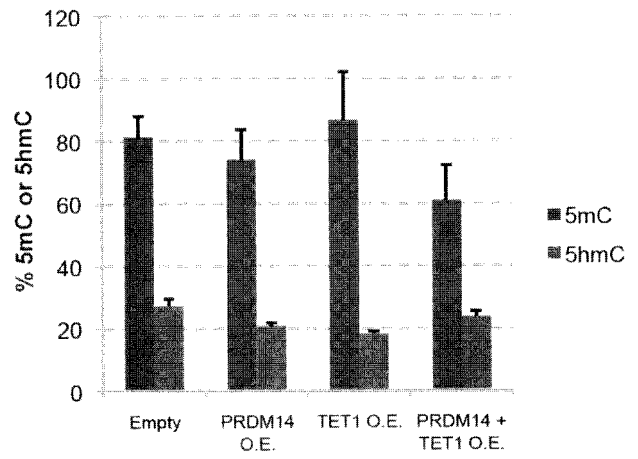
【 図 8 】



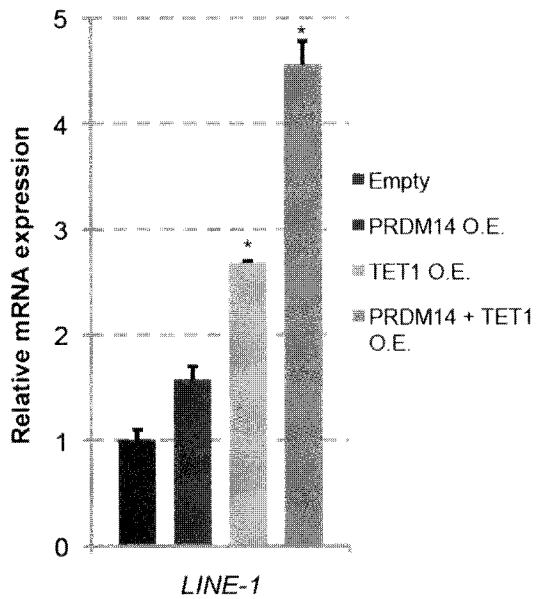
【 図 9 】



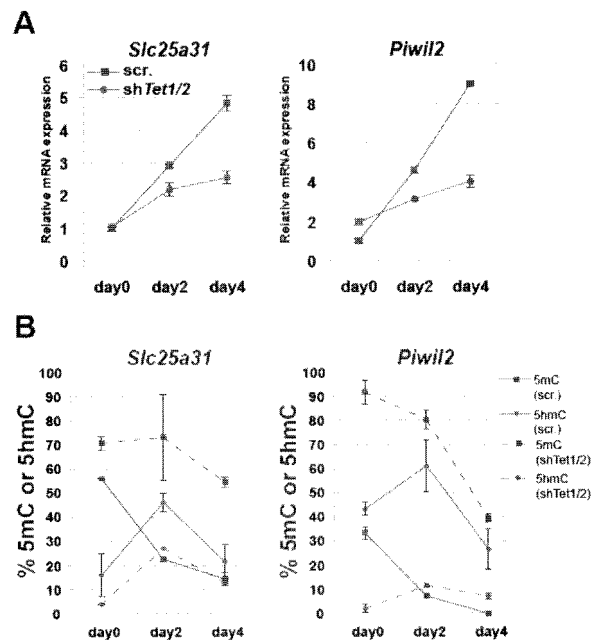
【 図 10 】



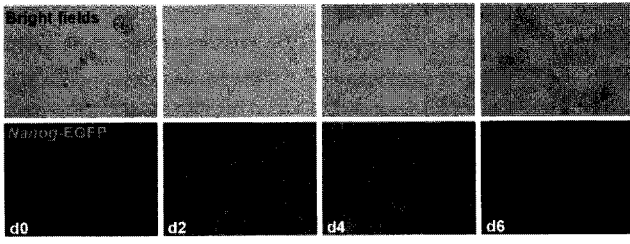
【 図 11 】



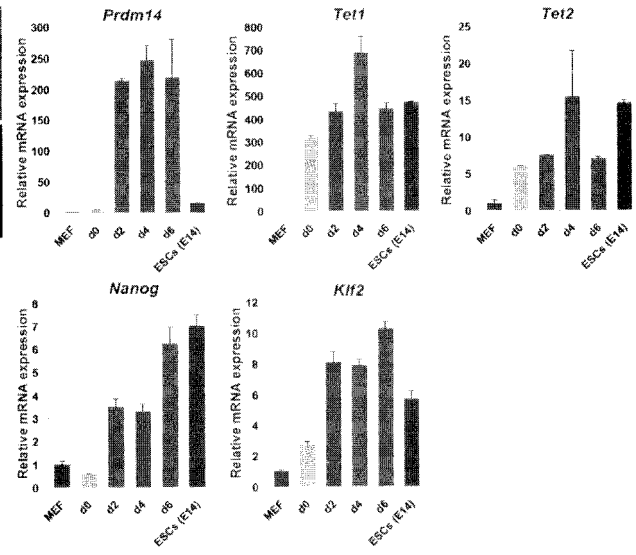
【 図 12 】



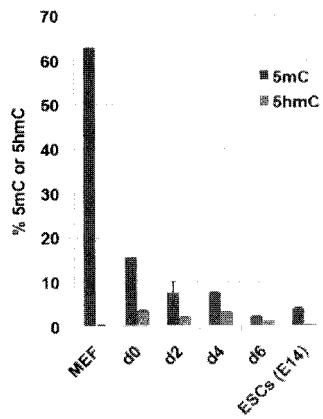
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【配列表】

2013126412000001.app