明　細　書

発明の名称 ： 効率的な人工多能性幹細胞の樹立方法

技術分野

[0001] 本発明は、効率的な人工多能性幹（以下、iPSという）細胞の樹立方法およびそのための薬剤などに関する。より詳細には、本発明は、（１）核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクター；および（２）（１）とは別の、EBNA-1をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクター、さらに所望によりp53の機能阻害物質をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターを体細胞に導入する工程を含む、iPS細胞の製造方法に関する。本発明はまた、EBNA-1をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターを含む、iPS細胞樹立効率改善剤などに関する。

背景技術

[0002] 近年、マウスおよびヒトのiPS細胞が相次いで樹立された。Yamanakaらは、マウスおよびヒト由来の線維芽細胞に、Oct3/4、Sox2、Klf4およびc-Myc遺伝子を導入し強制発現させることによって、iPS細胞を誘導した（特許文献1ならびに非特許文献1および2）。一方、Thomsonらのグループは、Klf4とc-Mycの代わりにNanogとLin28を使用してヒトiPS細胞を作製した（特許文献2および非特許文献3）。

[0003] iPS細胞の樹立効率を高めるために様々な試みがなされている。その1つは初期化因子の組合せの最適化である。本発明者らは、初期化因子としてOct3/4、Sox2、Klf4、L-MycおよびLin28の5因子の組合せを用い、さらにRNAi技術によりp53の発現をノックダウンすることにより、iPS細胞の樹立効率を顕著に改善し得ることを報告した（特許文献3および非特許文献4）。しかし、一過的とはいえ、がん抑制遺伝子であるp53を抑制することは、特にヒトiPS細胞の再生医療への応用を考慮すれば、腫瘍化リスクを最小限にするという意味で避ける方が望ましいとの見方もある。一方、Maekawaらは、Glis1をOct3/4、Sox2およびKlf4（OSK）とともに体細胞に導入することにより、OSKの3因

子を用いた場合よりも顕著にiPS細胞樹立効率を改善できることを報告している（特許文献4および非特許文献5）。さらに、Maekawaらは、Oct3/4、Sox2、Klf4、L-MycおよびLin28（OSKUL）の5因子にp53 shRNAを組み合わせるよりも、Oct3/4、Sox2、Klf4、L-Myc、Lin28およびGlis1（OSKULG）の6因子を用いた方が、約2倍の効率でヒトiPS細胞が樹立されることを報告している（米国仮特許出願第61/521,153号）。

[0004] ところで、レトロウイルスやレンチウイルスなどのウイルス性ベクターは、非ウイルス性ベクターに比べて遺伝子導入効率が高く、そのためiPS細胞を容易に作製することができるという点で優れたベクターである。しかし、レトロウイルスやレンチウイルスは染色体中に組み込まれてしまうため、iPS細胞の臨床応用を考慮すると安全面で問題がある。そのため、アデノウイルスベクターやプラスミドなどの非ウイルス性ベクターを用いて染色体への組込みがないiPS細胞が報告されているが（非特許文献6-8）、レトロウイルスやレンチウイルスに比べると樹立効率は低い。また、iPS細胞の選択下では初期化因子の持続的な高発現が要求されるためか、一般的に組込みが起こりにくいとされているエピソーマルベクターを用いても、ある頻度で初期化因子が染色体に組み込まれた安定発現株が得られる場合がある（非特許文献7および9）。

[0005] 一方、染色体外で安定に自律複製可能なエピソーマルベクターを用いる方法では、上記したiPS細胞樹立効率の低さに加え、薬剤選択の中止によるベクターの自然消失効率も低頻度で、かつ時間を要するため（非特許文献8）、iPS細胞の樹立効率の改善とともに、短時間で効率よくベクターを除去する方法が求められる。これに関して本発明者らは、速やかに細胞から脱落する早期自己消失型ベクターを見出し、既に報告している（特許文献3、非特許文献4および米国仮特許出願第61/521,153号）。

[0006] しかしながら、エピソーマルベクターを用いる方法においては、他のベクターを用いる方法と比較して、特定の細胞、例えば血液細胞からのiPS細胞樹立効率が極めて低いという問題が存在する。血液細胞はiPS細胞バンクを構築

する上で極めて有用な体細胞ソースの1つであることから、エピソーマルベクター法において、細胞の種類にかかわりなく、効率よくiPS細胞を樹立できる手法がなおも求められている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：WO 2007/069666

特許文献2：WO 2008/118820

特許文献3：WO 2011/016588

特許文献4：WO 2011/102531

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Takahashi, K. and Yamanaka, S., Cell, 126: 663-676 (2006)

非特許文献2：Takahashi, K. et al., Cell, 131: 861-872 (2007)

非特許文献3：Yu, J. et al., Science, 318: 1917-1920 (2007)

非特許文献4：Okita, K. et al., Nature Methods, 8(5), 409-412 (2011)

非特許文献5：Maekawa, M. et al., Nature, 474: 225-229 (2011)

非特許文献6：Stadtfeld, M. et al., Science, 322: 945-949 (2008)

非特許文献7：Okita, K. et al., Science, 322: 949-953 (2008)

非特許文献8：Yu, J. et al., Science, 324: 797-801 (2009)

非特許文献9：Kaji, K. et al., Nature, 458: 771-775 (2009)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 上述した実情に鑑み、本発明は、臨床応用に適した安全なヒトiPS細胞を効率よく樹立することを目的とする。したがって、本発明の第一の課題は、iPS細胞、特にヒトiPS細胞の樹立効率を改善する手段を提供することであり、それを用いた効率的なiPS細胞の製造方法を提供することである。また、本発明の第二の課題は、再生医療応用へ向けた非侵襲的な体細胞ソースの取得を可

能にするために、血液細胞からiPS細胞を樹立する効率的な方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、iPS細胞の樹立工程において、核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターと共に、該ベクターとは別個のEBNA-1をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクター（以下、「Extra EBNA-1ベクター」ともいう）を用いることで、iPS細胞の樹立効率が飛躍的に高められることを初めて見出した。また、本発明者らは、従来の方法ではiPS細胞の樹立が極めて困難であった血液細胞からの樹立が当該方法を用いることにより効率的に行えることを初めて見出した。本発明は、そのような知見に基づいて完成に至ったものである。

[0011] すなわち、本発明は、以下を包含する。

[1]以下の(1)および(2)：

(1)核初期化因子をコードする核酸を搭載した１以上のエピソーマルベクター；および

(2)(1)とは別のEBNA-1をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクター

を体細胞に導入する工程を含む、iPS細胞の製造方法。

[2]さらに、p53の機能阻害物質をコードする核酸をエピソーマルベクターの形態で導入する、[1]に記載の方法。

[3]前記p53の機能阻害物質が、p53 shRNAまたはp53のドミナントネガティブ変異体である、[2]に記載の方法。

[4]前記p53のドミナントネガティブ変異体がp53DDである、[3]に記載の方法。

[5]前記核初期化因子が、Octファミリー、Klfファミリー、Soxファミリー、Mycファミリー、Linファミリーおよびglisファミリーのメンバーからなる群から選択される１以上である、[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

[6]前記核初期化因子が、Oct3/4、Klf4、Sox2、L-MycおよびLin28である、[5

]に記載の方法。

[7]前記核初期化因子が、Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、Lin28およびGlis1である、[6]に記載の方法。

[8]前記核初期化因子をコードする核酸が、2つまたは3つのエピソーマルベクターに分かれて搭載されている、[1]～[7]のいずれかに記載の方法。

[9]前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターが、pCEB-hSK-OおよびpCEB-hUL-Gである、[1]に記載の方法。

[10]前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターが、pCXLE-hOCT3/4、pCXLE-hSKおよびpCXLE-hULである、[1]に記載の方法。

[11]前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターが、pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSKおよびpCXLE-hULである、[2]に記載の方法。

[12]前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルプラスミドベクターが、pCE-hOCT3/4-shp53、pCE-hSKおよびpCE-hULである、[2]に記載の方法。

[13]前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルプラスミドベクターが、pCE-hOCT3/4、pCE-hSKおよびpCE-hULであり、前記p53の機能阻害物質をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターがpCE-mp53DDである、[2]に記載の方法。

[14]前記EBNA-1をコードする核酸を搭載したプラスミドベクターが、pCXWB-EBNA1である、[9]～[11]のいずれかに記載の方法。

[15]前記EBNA-1をコードする核酸を搭載したプラスミドベクターが、pCXB-EBNA1である、[12]または[13]に記載の方法。

[16]前記体細胞が、ヒト線維芽細胞（HDF）または血液細胞から選択される、[1]～[15]のいずれかに記載の方法。

[17]前記血液細胞が、末梢血単核球細胞（PMNC）である、[16]に記載の方法。

[18]前記末梢血単核球細胞（PMNC）が、T細胞である、[17]に記載の方法。

[19]iPS細胞の樹立効率改善法であって、核初期化因子をコードする核酸を搭載した1以上のエピソーマルベクターを体細胞に導入する工程において、該ベクターとともに、EBNA-1をコードする核酸を搭載した別のエピソーマルベクターを体細胞に導入することを特徴とする、方法。

[20]さらに、p53の機能阻害物質をコードする核酸をエピソーマルベクターの形態で導入する、[19]に記載の方法。

[21]前記p53の機能阻害物質が、p53 shRNAまたはp53のドミナントネガティブ変異体である、[20]に記載の方法。

[22]前記p53のドミナントネガティブ変異体がp53DDである、[21]に記載の方法。

[23]EBNA-1をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターを含む、iPS細胞樹立効率改善剤。

[24]iPS細胞を製造するためのキットであって、以下の(1)および(2)：

(1)核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクター；および

(2)(1)とは別のEBNA-1をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクター

を含む、キット。

[25]さらに、p53の機能阻害物質をコードする核酸Aを、エピソーマルベクターの形態で含む、[24]に記載のキット。

[26]前記p53の機能阻害物質が、p53 shRNAまたはp53のドミナントネガティブ変異体である、[25]に記載のキット。

[27]前記p53のドミナントネガティブ変異体がp53DDである、[26]に記載のキット。

[28]前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターが、pCEB-hSK-OおよびpCEB-hUL-Gである、[24]に記載のキット。

[29]前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターが、pCXLE-hOCT3/4、pCXLE-hSKおよびpCXLE-hULである、[24]に記載のキット。

[30]前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターが、pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSKおよびpCXLE-hULである、[25]に記載の

キット。

[31]前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルプラスミドベクターが、pCE-hOCT3/4-shp53、pCE-hSKおよびpCE-hULである、[25]に記載のキット。

[32]前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルプラスミドベクターが、pCE-hOCT3/4、pCE-hSKおよびpCE-hULであり、前記p53の機能阻害物質をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターがpCE-mp53DDである、[25]に記載のキット。

[33]前記EBNA-1をコードする核酸を搭載したプラスミドベクターが、pCXWB-EBNA1である、[28]～[30]のいずれかに記載のキット。

[34]前記EBNA-1をコードする核酸を搭載したプラスミドベクターが、pCXB-EBNA1である、[31]または[32]に記載のキット。

[35][1]～[18]のいずれかに記載の方法により得られるiPS細胞に分化処理を行い、体細胞に分化させることを含む、体細胞の製造方法。

発明の効果

[0012] 体細胞の核初期化工程におけるExtra EBNA-1ベクターの使用は、iPS細胞の樹立効率を飛躍的に高めることができるので、より効率よくヒトiPS細胞を提供することが可能となる。また、Extra EBNA-1ベクターを使用することで、従来の方法ではiPS細胞の樹立が極めて困難であった血液細胞からの樹立が効率的に行えるようになり、その結果非侵襲的な形態での体細胞ソースの取得が可能となることから、本発明はヒトiPS細胞の再生医療への応用において極めて有用である。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1Aは、pCEB-hSK-O、図1BはpCEB-hUL-Gの構造を示す。

[図2]図2A～Eは、各種エピソーマルプラスミド（pCE-hOCT3/4、pCE-hOCT3/4-shp53、pCE-hSK、pCE-hULおよびpCE-mp53DD）の構造を示す。

[図3]図3Aは、Extra EBNA-1ベクタープラスミド（pCXWB-EBNA-1）の構造を示す。図3Bは、Extra EBNA-1ベクタープラスミド（pCXB-EBNA-1）の構造を示す

。

[図4]図4は、ヒト線維芽細胞（HDF1419）からのiPS細胞の樹立を示す。プラスミドの組み合わせである2 vec.（pCEB-hSK-OおよびpCEB-hUL-G）、ならびにそれらとpCXWB-EBNA1との組み合わせを用いて、ヒト線維芽細胞（HDF1419）からiPS細胞の樹立を行った。フィーダー細胞としては、マイトマイシンC処理をしたMEF、またはマイトマイシンC処理をしたSNLを使用した。

[図5]図5は、ヒト線維芽細胞（HDF1388）からのiPS細胞の樹立を示す。プラスミドの組み合わせY4（pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSKおよびpCXLE-hUL）、ならびにそれらとpCXWB-EBNA1との組み合わせを用いて、ヒト線維芽細胞（HDF1388）からiPS細胞の樹立を行った。フィーダー細胞としては、マイトマイシンC処理をしたMEF、またはマイトマイシンC処理をしたSNLを使用した。

[図6]図6は、ヒト末梢血単核球細胞（PMNC)からのiPS細胞の樹立を示す。(A)： プラスミドを用いたPMNCからのiPS細胞誘導プロトコール。(B)および(C)：プラスミドの組み合わせY4（pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSKおよびpCXLE-hUL）を用いて樹立されたiPS細胞コロニーの写真を示す。(D)：TRB遺伝子座におけるサザンブロット解析の結果を示す。2人のドナー（#1および#3）由来のiPS細胞クローン（585A1、585B1、604A1および604B1）のTRB遺伝子座においてV(D)J再編成が生じていた。(E)～(G)：iPS細胞からのテラトーマ形成を示す。

[図7]図7は、Extra EBNA-1ベクタープラスミドによるiPS細胞の樹立促進効果を示す。(A)および(B)：プラスミドの組み合わせY4（pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSKおよびpCXLE-hUL）、ならびにそれらとpCXWB-EBNA1との組み合わせを用いて、PMNCからiPS細胞の樹立を行った結果を示す。培地には、T細胞用培地(A)または非T細胞用培地(B)を用いた。(C)：樹立されたiPS細胞中に残存するエピソーマルベクターのコピー数を示す。

発明を実施するための形態

発明の詳細な説明

[0014] 本発明は、(1)核初期化因子をコードする核酸を搭載した1以上のエピソーマルベクター；および(2)(1)とは別のEBNA-1を搭載したエピソーマルベクター、所望によりさらにp53の機能阻害物質をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクター（該エピソーマルベクターにおいて、p53の機能阻害物質をコードする核酸は単独で搭載されていてもよいし、前記(1)のエピソーマルベクターのいずれかに、核初期化因子をコードする核酸とともに搭載されていてもよい）を体細胞に導入する工程を含む、iPS細胞の製造方法を提供する。本発明はまた、EBNA-1をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターを含む、iPS細胞樹立効率改善剤などを提供する。

[0015] (A) 体細胞ソース

iPS細胞作製のための出発材料として用いることのできる体細胞は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、サル、ブタ、ラット等）由来の生殖細胞以外のいかなる細胞であってもよく、例えば、角質化する上皮細胞（例、角質化表皮細胞）、粘膜上皮細胞（例、舌表層の上皮細胞）、外分泌腺上皮細胞（例、乳腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例、副腎髄質細胞）、代謝・貯蔵用の細胞（例、肝細胞）、境界面を構成する内腔上皮細胞（例、I型肺胞細胞）、内鎖管の内腔上皮細胞（例、血管内皮細胞）、運搬能をもつ繊毛のある細胞（例、気道上皮細胞）、細胞外マトリックス分泌用細胞（例、線維芽細胞）、収縮性細胞（例、平滑筋細胞）、血液と免疫系の細胞（例、Tリンパ球）、感覚に関する細胞（例、桿細胞）、自律神経系ニューロン（例、コリン作動性ニューロン）、感覚器と末梢ニューロンの支持細胞（例、随伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、およびそれらの前駆細胞(組織前駆細胞)等が挙げられる。細胞の分化の程度や細胞を採取する動物の齢などに特に制限はなく、未分化な前駆細胞（体性幹細胞も含む）であっても、最終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における体細胞の起源として使用することができる。ここで未分化な前駆細胞としては、たとえば神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）が挙げられる。特に血

液細胞（末梢血単核球細胞（T細胞および非T細胞（CD34陽性細胞および幹・前駆細胞を含む）を含む）、末梢血リンパ球、臍帯血細胞など）は、入手が容易でありかつ侵襲を伴わないため、今後iPS細胞バンクのための体細胞ソースとしての利用が期待される。また歯髄幹細胞も、智歯や歯周病等で抜いた歯から単離、調製することができるため、入手が容易であり、同様にiPS細胞バンクのための体細胞ソースとしての利用が期待される。

体細胞として末梢血単核球細胞を用いる場合、T細胞受容体（TCR）遺伝子座がV(D)J組み換えを生じていても生じていなくてもよい。好ましい末梢血単核球細胞は、T細胞受容体（TCR）遺伝子座がV(D)J組み換えを生じているT細胞であるが、これに限定されない。

[0016] 体細胞を採取するソースとなる哺乳動物個体は特に制限されないが、得られるiPS細胞がヒトの再生医療用途に使用される場合には、拒絶反応が起こらないという観点から、患者本人またはHLAの型が同一もしくは実質的に同一である他人から体細胞を採取することが好ましい。ここでHLAの型が「実質的に同一」とは、免疫抑制剤などの使用により、該体細胞由来のiPS細胞から分化誘導することにより得られた細胞を患者に移植した場合に移植細胞が生着可能な程度にHLAの型が一致していることをいう。たとえば主たるHLA（例えばHLA-A、HLA-BおよびHLA-DRの3遺伝子座、さらにHLA-Cwを含む4遺伝子座）が同一である場合などが挙げられる（以下同じ）。また、ヒトに投与（移植）しない場合、例えば、患者の薬剤感受性や副作用の有無を評価するためのスクリーニング用の細胞のソースとしてiPS細胞を使用する場合には、同様に患者本人または薬剤感受性や副作用と相関する遺伝子多型が同一である他人から体細胞を採取することが望ましい。

[0017] 体細胞を採取するソースとなる哺乳動物個体がヒトの場合、その年齢は、通常20代～60代、好ましくは、20代～40代であるがこれらに限定されない。

哺乳動物から分離した体細胞は、核初期化工程に供するに先立って、細胞の種類に応じてその培養に適した自体公知の培地で前培養することができる。そのような培地としては、例えば、約5～20%の胎仔ウシ血清（FCS）を含む

最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、RPMI1640培地、199培地、F12培地などが挙げられるが、それらに限定されない。例えば、体細胞として歯髄幹細胞を用いる場合には、Mesenchymal stem cells basal medium（Lonza社）などの間葉系幹細胞用培地を用いることが好ましい。また、血液細胞を用いる場合には、T細胞を濃縮して用いるために、IL-2、抗CD3抗体および抗CD28抗体を培養液に添加して用いてもよい。同様に、非T細胞を濃縮して用いるために、IL-3、IL-6、G-CSFおよびGM-CSFを培養液に添加して用いてもよい。尚、細胞の濃縮は、上記(1)および(2)の本発明のエピソーマルベクター（さらにp53の機能阻害物質をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターを含む場合がある；以下、「本発明のベクターセット」ともいう）を導入前であっても導入後であってもよい。本発明のベクターセット、および、必要に応じてiPS細胞の樹立効率改善物質との接触に際し、例えば、カチオニックリポソームなど導入試薬を用いる場合には、導入効率の低下を防ぐため、無血清培地に交換しておくことが好ましい場合がある。

[0018] ヒト臨床応用に適した完全xeno-freeのヒトiPS細胞を得る目的においては、FCSなどの非ヒト動物由来成分を含有しない培地を用いることがより望ましい。基本培地に種々の体細胞の培養に適したヒト由来成分（特に、増殖因子などの組換えヒトタンパク質）や非必須アミノ酸、ビタミン類等を補充した培地が市販されており、当業者は体細胞ソースに応じて適切なxeno-free培地を選択することができる。xeno-free培地で前培養された体細胞は、適当なxeno-freeの細胞剥離液を用いて培養容器から剥離し、回収後、本発明のベクターセットとの接触に供される。

[0019] (B) 核初期化因子因子（単に「初期化因子」ともいう）

本発明において「核初期化因子」とは、体細胞からiPS細胞を誘導することができるタンパク性因子（群）を意味する。本発明に用いられる核初期化因子は、それらをコードする核酸を体細胞に導入することによりiPS細胞を誘導しうる限り、いかなるタンパク性因子（群）であってもよく、例えば、Octファミリー、Klfファミリー、Soxファミリー、Mycファミリー、Linファミリー

およびGlisファミリーのメンバーからなる群より選択される１以上のタンパク性因子であり得る。好ましくは、本発明に用いられる核初期化因子は、少なくともOct3/4、Klf4およびSox2を含み（但し、Klf4および／またはSox2はそれらの機能を代替し得ることが報告されている他の因子に置換してもよい）、p53の機能阻害物質を併用しない場合は、核初期化因子としてさらにL-MycおよびLin28もしくはLin28bを組み合わせることが好ましい。また、本発明に用いられる核初期化因子は、Nanogを含まないことを特徴とする。具体的には、核初期化因子として、以下の組み合わせが例示される。

(1) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc（ここで、Sox2はSox1, Sox3, Sox15, Sox17またはSox18で置換可能である。また、Klf4はKlf1, Klf2またはKlf5で置換可能である。）

(2) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, SV40 Large T antigen（以下、SV40 LT）

(3) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, HPV16 E6

(4) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, HPV16 E7

(5) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, HPV16 E6, HPV16 E7

(6) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, TERT, Bmi1

(7) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, Lin28

(8) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, Lin28, Glis1

(9) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, Lin28, SV40LT

(10) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, Lin28, TERT, SV40LT

(11) Oct3/4, Klf4, Sox2, L-Myc, SV40LT

(12) Oct3/4, Esrrb, Sox2, L-Myc（EsrrbはEsrrgで置換可能である。）

(13) Oct3/4, Klf4, Sox2

(14) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, SV40LT

(15) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, HPV16 E6

(16) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, HPV16 E7

(17) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, HPV16 E6, HPV16 E7

(18) Oct3/4, Klf4, Sox2, TERT, Bmil

(19) Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28

(20) Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28, SV40LT

(21) Oct3/4, Klf4, Sox2, Lin28, TERT, SV40LT

(22) Oct3/4, Klf4, Sox2, SV40LT

(23) Oct3/4, Esrrb, Sox2 (EsrrbはEsrrgで置換可能である。)

[0020] 上記において、Lin28に代えてLin28bを用いることもできる。また、Esrrbもしくは Esrrgを用いる場合 (上記(12)および(23))、Klf4を併用してもよい。

また、上記(1)-(23)には該当しないが、それらのいずれかにおける構成要素をすべて含み、且つ任意の他の物質をさらに含む組み合わせも、本発明における「核初期化因子」の範疇に含まれ得る。また、核初期化の対象となる体細胞が上記(1)-(23)のいずれかにおける構成要素の一部を、核初期化のために十分なレベルで内在的に発現している条件下にあっては、当該構成要素を除いた残りの構成要素のみの組み合わせもまた、本発明における「核初期化因子」の範疇に含まれ得る。

[0021] これらの組み合わせの中で、Oct3/4 (「O」と略記する場合がある)、Sox2 (「S」と略記する場合がある)、Klf4 (「K」と略記する場合がある)、Lin28 (「L」と略記する場合がある) およびL-Myc (「U」と略記する場合がある) の5因子、ならびにOct3/4、Sox2、Klf4、Lin28、L-MycおよびGlis1 (「G」と略記する場合がある) の6因子が好ましい例として挙げられる。

上記の各核初期化因子のマウスおよびヒトcDNA配列情報は、WO 2007/069666に記載のNCBI accession numbersを参照することにより取得することができ (Nanogは当該公報中では「ECAT4」との名称で記載されている。尚、Lin28、Lin28b、Esrrb、Esrrg、L-MycおよびGlis1のマウスおよびヒトcDNA配列情報は、それぞれ下記NCBI accession numbersを参照することにより取得できる。)、当業者は容易にこれらのcDNAを単離することができる。

遺伝子名 マウス ヒト

Lin28	NM_145833	NM_024674
Lin28b	NM_001031772	NM_001004317
Esrrb	NM_011934	NM_004452
Esrrg	NM_011935	NM_001438
L-Myc	NM_008506	NM_001033081
Glis1	NM_147221	NM_147193

[0022] (C) p53の機能阻害物質

本発明は、上記の核初期化因子に加えて、p53の機能阻害物質を体細胞と接触させることがより好ましい。本明細書において「p53の機能阻害物質」とは、a)p53タンパク質の機能もしくはb)p53遺伝子の発現を阻害し得る限り、いかなる物質であってもよい。すなわち、p53タンパク質に直接作用してその機能を阻害する物質や、p53遺伝子に直接作用してその発現を阻害する物質のみならず、p53のシグナル伝達に関与する因子に作用することにより、結果的にp53タンパク質の機能やp53遺伝子の発現を阻害する物質も、本明細書における「p53の機能阻害物質」に含まれる。

[0023] p53タンパク質の機能を阻害する物質としては、例えば、p53の化学的阻害物質、p53のドミナントネガティブ変異体、抗p53アンタゴニスト抗体、p53応答エレメントのコンセンサス配列を含むデコイ核酸、p53経路を阻害する物質などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、p53の化学的阻害物質、p53のドミナントネガティブ変異体、p53経路阻害物質が挙げられ、より好ましくはp53のドミナントネガティブ変異体が挙げられる。一方、p53遺伝子の発現を阻害する物質としては、好ましくはp53に対するsiRNAやshRNAが挙げられる。

p53の機能阻害物質の具体例、それらの取得方法および体細胞との接触方法については、WO 2009/157593に詳細に記載されている。

[0024] 本発明の好ましい実施態様においては、p53の機能阻害物質として、p53 shRNAもしくはp53のドミナントネガティブ変異体を、それをコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターの形態で体細胞に導入することにより、体細

胞と接触させる。

本発明において特に好ましいp53のドミナントネガティブ変異体は、マウスp53の14-301位（ヒトp53では11-304位に対応）のアミノ酸を欠失させたp53DD（Bowman, T., Genes Develop., 10, 826-835 (1996)）である。

p53のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸は、例えば、以下の手法により得ることができる。まず、マウスまたはヒトのp53 cDNA配列情報に基づいて適当なオリゴヌクレオチドをプローブもしくはプライマーとして合成し、マウスまたはヒトの細胞・組織由来のmRNA、cDNAもしくはcDNAライブラリーから、ハイブリダイゼーション法や(RT-)PCR法を用いてマウスまたはヒトp53 cDNAをクローニングし、適当なプラスミドにサブクローニングする。p53DDのような欠失変異体の場合には、欠失させる部位の外側にプライマーを設計し、これを用いてp53 cDNAを挿入したプラスミドを鋳型とするインバースPCRを行うことにより、目的のドミナントネガティブ変異体をコードするcDNAを取得する。

単離されたcDNAは、前記核初期化因子をコードする核酸の場合と同様に、後述のエピソーマルベクターに挿入され、体細胞に導入され得る。

[0025] 一方、p53に対するshRNAは、マウスまたはヒトのp53 cDNA配列情報に基づいて、例えば、Elbashirら（Genes Dev., 15, 188-200 (2001)）の提唱する規則に従って設計することができる。当該規則に基づいて選択された標的配列の候補群について、標的以外のmRNAにおいて16-17塩基の連続した配列に相同性がないかどうかを、BLAST（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）等のホモロジー検索ソフトを用いて調べ、選択した標的配列の特異性を確認する。特異性の確認された標的配列について、19-21塩基のセンス鎖と、これに相補的なアンチセンス鎖とからなる2本鎖RNAを、ループ構造を形成しうる任意のリンカー配列（例えば、8-25塩基程度）を介して連結することにより設計することができる。

具体的には、配列5’-GACTCCAGTGGTAATCTACTGctcgagCAGTAGATTACCACTGGAGTC-3’（配列番号1；下線部がp53のターゲット配列。大文字がdsRNAを形成す

る部分）を有するヒトp53に対するshRNA等が、本発明における特に好ましいshRNAとして使用され得る。

[0026] shRNAをコードするDNAを発現するベクターには、プロモーターとして、polII系プロモーター（例えば、CMV前初期プロモーター）を使用することもできるが、短いRNAの転写を正確に行わせるために、polIII系プロモーターを使用するのが一般的である。polIII系プロモーターとしては、マウスおよびヒトのU6-snRNAプロモーター、ヒトH1-RNase P RNAプロモーター、ヒトバリン-tRNAプロモーターなどが挙げられる。また、転写終結シグナルとして4個以上T残基が連続した配列が用いられる。

このようにして構築したshRNA発現カセットは、前記核初期化因子をコードする核酸の場合と同様に、後述のエピソーマルベクターに挿入され、体細胞に導入され得る。

[0027] (D) 発現カセット

上記の核初期化因子をコードする核酸（およびp53の機能阻害物質をコードする核酸）は、単独でもしくは任意の組み合わせで発現カセットを構成することができ、これらの発現カセットは任意の組み合わせでエピソーマルベクターに搭載され得る。例えば、Oct3/4、Sox2、Klf4、Lin28およびL-Mycを初期化因子として用いる場合、これらの初期化因子をコードする5つの核酸は、以下の3つの発現カセットとしてエピソーマルベクターに搭載される。

(a) Oct3/4をコードする核酸（O）を含む発現カセット；

(b) Sox2をコードする核酸（S）とKlf4をコードする核酸（K）とが5’から3’方向にこの順序（S-K）でジシストロニックな発現を可能にする介在配列を介して連結された発現カセット；および

(c) L-Mycをコードする核酸（U）とLin28をコードする核酸（L）とが5’から3’方向にこの順序（U-L）でジシストロニックな発現を可能にする介在配列を介して連結された発現カセット

[0028] 本発明の好ましい態様においては、上記5つの初期化因子に加えて、さらにGlis1が初期化因子として用いられる。この場合、6つの初期化因子をコード

する核酸は、上記(a)～(c)の3つの発現カセットと、

(d) Glis1をコードする核酸（G）を含む発現カセット

との4つの発現カセットとしてエピソーマルベクターに搭載される。

[0029] 他の態様においては、Oct3/4、Sox2、Klf4、Lin28およびL-Mycの5つの初期化因子を、p53 shRNAもしくはp53DDと組み合わせて用いるが、この場合、5つの初期化因子とp53 shRNAもしくはp53DDとをコードする6つの核酸は、以下の4つの発現カセットとしてエピソーマルベクターに搭載される。

(a) Oct3/4をコードする核酸（O）を含む発現カセット；

(b) Sox2をコードする核酸（S）とKlf4をコードする核酸（K）とが5’から3’方向にこの順序（S-K）でジシストロニックな発現を可能にする介在配列を介して連結された発現カセット；

(c) L-Mycをコードする核酸（U）とLin28をコードする核酸（L）とが5’から3’方向にこの順序（U-L）でジシストロニックな発現を可能にする介在配列を介して連結された発現カセット；および

(d’) p53 shRNAもしくは(d”)p53DDをコードする核酸を含む発現カセット

[0030] ここで「ジシストロニックな発現を可能にする介在配列」としては、例えば、口蹄疫ウイルスの2A配列（PLoS ONE 3, e2532, 2008、Stem Cells 25, 1707, 2007）、IRES配列（U.S. Patent No. 4,937,190）など、好ましくは2A配列を用いることができる。「発現カセット」は初期化因子および／またはp53の機能阻害物質をコードする核酸（O、S-K、U-L、Gなど）に加えて、少なくとも該核酸に機能的に連結するプロモーターを含む。該プロモーターとしては、初期化因子またはp53のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸の場合、例えばEF1αプロモーター、CAGプロモーター、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどが用いられる。なかでも、EF1αプロモーター、CAGプロモーター、MoMuLV LTR、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどが好ましい。さら

に該発現カセットはbasalなプロモーター配列に加えて、初期化因子の発現を増強するためのエンハンサー配列（例えば、CMV前初期エンハンサー等）を含んでいてもよい。また、p53 shRNAをコードする核酸の場合、プロモーターとして、上述の通りU6プロモーター等のpolIII系プロモーターが好ましく用いられる。

[0031] 好ましくは、本発明の発現カセットは、プロモーターの他に、初期化因子またはp53のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸の3’下流にpolyA付加シグナルを含有する。一方、p53 shRNAをコードする核酸の場合は、該核酸の3’下流に転写終結シグナルとして4個以上T残基が連続した配列を含むことが好ましい。また、本発明の発現カセットには、初期化因子やp53のドミナントネガティブ変異体のmRNAの安定性を向上させる目的で、例えば、初期化因子やドミナントネガティブ変異体のコーディング領域とpolyA付加シグナルとの間に、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（WPRE）配列を挿入してもよい。

[0032] (E) エピソーマルベクター

本発明に用いられるエピソーマルベクターとしては、例えば、EBV、SV40等に由来する、哺乳動物細胞内での自律複製に必要な配列をベクター要素として含むベクターが挙げられる。哺乳動物細胞内での自律複製に必要なベクター要素としては、具体的には、哺乳動物細胞で機能的な複製開始点と、該複製開始点に結合して複製を制御するタンパク質をコードする遺伝子であり、例えば、EBVにあっては複製開始点oriPとEBNA-1遺伝子、SV40にあっては複製開始点oriとSV40 large T antigen遺伝子が挙げられる。より好ましくはoriPとEBNA-1遺伝子が使用される。

[0033] また、エピソーマルベクターは、所望により、大腸菌などの細菌や酵母での大量増幅を可能にするために、細菌や酵母の複製起点（例えば、pUC ori、ColE1 ori、2μ ori等）と選択マーカー遺伝子（例えば、アンピシリン耐性遺伝子、栄養要求性相補遺伝子）などをさらに含有していてもよい。また、所望により、哺乳動物細胞での選択マーカー遺伝子として、例えば、ジヒド

ロ葉酸還元酵素遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等をさらに含むこともできる。さらに、初期化因子をコードする核酸の発現カセットを簡便に挿入できるように、エピソーマルベクターはマルチクローニングサイトを含むことができる。一実施態様においては、上記発現カセットにおけるプロモーター、エンハンサー、polyA付加シグナル、WPRE配列等は、予めエピソーマルベクター上に含まれており、プロモーターとpolyA付加シグナル（ベクターがWPRE配列を含む場合はWPRE配列）との間に初期化因子をコードする核酸を挿入することにより、遺伝子導入ベクターを構築し得るようにエピソーマルベクターをデザインすることもできる。そのような場合、エピソーマルベクターは、プロモーターとpolyA付加シグナル（ベクターがWPRE配列を含む場合はWPRE配列）との間に、マルチクローニングサイトを含むことが好ましい。

[0034] 本発明のベクターセットは、複数（好ましくは、2、3もしくは4つ）のエピソーマルベクターに、上記(a)～(c)、あるいは(a)～(d)、(d’)もしくは(d”)の発現カセットをそれぞれ1もしくは2つずつ搭載することにより構築される。この点に関して、我々は以前に、複数の発現カセットの組み合わせおよびエピソーマルベクター上におけるそれらの配置がiPS細胞樹立効率を著しく変化させることを示した（米国仮特許出願第61/521,153号）。

本発明では、Extra EBNA-1ベクターの併用により著しくiPS細胞樹立効率が改善されるので、本発明のベクターセットは、上記(a)～(c)、あるいは(a)～(d)、(d’)もしくは(d”)の発現カセットがそれぞれ1もしくは2つずつ、2、3もしくは4つのエピソーマルベクター上に、任意の組み合わせで、任意の順序で、任意の位置に搭載され得る。

[0035] しかしながら、好ましい一実施態様においては、本発明のベクターセットは、上記(a)～(d)の発現カセットをそれぞれ2つずつ、以下の規則に従って2つのエピソーマルベクターに搭載することにより構築される（米国仮特許出願第61/521,153号）。

哺乳動物細胞で機能的な複製開始点に結合して該ベクターの哺乳動物細胞内での複製を制御するタンパク質（例えば、EBNA-1、SV40 large T antigen

等、好ましくはEBNA-1）をコードする遺伝子（センス鎖）の3’側を起点として（以下、発現カセットのエピソーマルベクター上での位置を示す場合は、すべてこの起点を用いる。）、5’から3’方向に［発現カセットA］－［発現カセットB］の順序で発現カセットが配置されるとした場合、

1）上記(a)の発現カセット（Oct3/4をコードする核酸（O）を含む）は発現カセットBの位置に配置される；好ましくは、

2）上記(b)の発現カセット（Sox2をコードする核酸（S）とKlf4をコードする核酸（K）とが5’から3’方向にこの順序（S-K）でジシストロニックな発現を可能にする介在配列を介して連結されている）は発現カセットAの位置に配置される。

[0036] ここで、上記(a)の発現カセットと上記(b)の発現カセットとは、（i）同一のエピソーマルベクター上に搭載されてもよいし（第1のエピソーマルベクター上に(b)-(a)の順序で配置される）、（ii）異なるエピソーマルベクター上に搭載されてもよい（第1のエピソーマルベクター上に(c)もしくは(d)-(a)の順序で配置され、第2のエピソーマルベクター上に(b)-(d)もしくは(c)の順序で配置される）。即ち、上記(i)の場合には、(ia) 第1のエピソーマルベクター：(b)-(a)（初期化因子の配置としてはSK-O）と、第2の発現ベクター：(c)-(d)（初期化因子の配置としてはUL-G）との組合せ、及び(ib) 第1のエピソーマルベクター：(b)-(a)（初期化因子の配置としてはSK-O）と、第2の発現ベクター：(d)-(c)（初期化因子の配置としてはG-UL）との組合せの2通りの組合せであり、上記(ii)の場合には、(iia) 第1のエピソーマルベクター：(c)-(a)（初期化因子の配置としてはUL-O）と、第2の発現ベクター：(b)-(d)（初期化因子の配置としてはSK-G）との組合せ、及び(iib) 第1のエピソーマルベクター：(d)-(a)（初期化因子の配置としてはG-O）と、第2の発現ベクター：(b)-(c)（初期化因子の配置としてはSK-UL）との組合せの2通りの組合せである。

[0037] なかでも、特に好ましい組合せとして、上記(ia)の組合せ、即ち、第1のエピソーマルベクター：(b)-(a)（初期化因子の配置としてはSK-O）と、第2の

発現ベクター：(c)-(d) （初期化因子の配置としてはUL-G）との組合せが挙げられる。より具体的には、後述の実施例および図1に示されるpCEB-hSK-OとpCEB-hUL-Gとの組み合わせが挙げられる。

上記の発現カセットの配置において、各発現カセットの転写方向は特に制限されず、2つの発現カセットが同一方向に転写されるように挿入されていてもよいし（head-to-tail）、反対方向に転写されるように挿入されていてもよい（head-to-headまたはtail-to-tail）。また、各発現カセットの転写方向は、哺乳動物細胞で機能的な複製開始点に結合して該ベクターの哺乳動物細胞内での複製を制御するタンパク質をコードする遺伝子の転写方向と同一方向であってもよいし、反対方向であってもよい。好ましい一実施態様においては、すべての発現カセットが該遺伝子と同一方向に転写されるようにベクター上に搭載される。

別の好ましい実施態様においては、本発明のベクターセットは、上記(a)～(c)の発現カセットがそれぞれ1つずつ、3つのエピソーマルベクター上に搭載されたものである。より具体的には、このような3つのエピソーマルベクターとして、pCXLE-hOCT3/4（Addgene#27076）、pCXLE-hSK（Addgene#27078）およびpCXLE-hUL（Addgene#27080）（Nat. Methods, 8(5): 409-412 (2011)参照）や、後述の実施例および図2に示されるpCE-hOCT3/4、pCE-hSKおよびpCE-hULが例示される。

[0038] 該ベクターセットがさらにp53の機能阻害物質の発現カセット（即ち、上記(d’)もしくは(d”)の発現カセット）を含む場合、該発現カセットは、単独で別個のエピソーマルベクターに搭載されていてもよい（計4つのエピソーマルベクター）。具体例としては、後述の実施例および図2に示されるpCE-mp53DDなどが挙げられる。

あるいは、p53の機能阻害物質の発現カセットは、上記(a)～(c)の発現カセットがそれぞれ搭載された3つのエピソーマルベクターのいずれかに一緒に搭載されていてもよい。好ましくは、上記(a)の発現カセットとともにエピソーマルベクターに搭載され得るが、それに限定されない。初期化因子をコード

する核酸とともにエピソーマルベクターに搭載される場合、その順序は特に制限されないが、例えば、p53の機能阻害物質の発現カセット－初期化因子の発現カセットの順に配置することができる。具体例としては、pCXLE-hOCT3/4-shp53-F（Addgene#27077）（「pCXLE-hOCT3/4-shp53」ともいう。Nat. Methods, 8(5): 409-412 (2011)参照）や、後述の実施例および図2に示されるpCE-hOCT3/4-shp53-F（「pCE-hOCT3/4-shp53」ともいう）が挙げられる。

[0039] 本発明におけるエピソーマルベクターは、該ベクターの哺乳動物細胞内での複製に必要なベクター要素の5’側および3’側にloxP配列を含んでいても、含んでいなくてもよい。好ましくは、該ベクター要素の5’側および3’側にloxP配列を同方向に配置したエピソーマルベクターが使用され得る。エピソーマルベクターは染色体外で自律複製可能なため、ゲノムに組み込まれなくとも宿主細胞内での安定な発現を提供し得るが、いったんiPS細胞が樹立された後は、当該ベクターは速やかに除かれることが望ましい。エピソーマルベクターの哺乳動物細胞内での複製に必要なベクター要素を2つのloxP配列で挟み、これにCreリコンビナーゼを作用させて当該ベクター要素を切り出すことにより、エピソーマルベクターの自律複製能を喪失させることができ、該ベクターを早期にiPS細胞から脱落させることができる。

[0040] 本発明で使用されるloxP配列としては、バクテリオファージP1由来の野生型loxP配列の他、エピソーマルベクターの哺乳動物細胞内での複製に必要なベクター要素を挟む位置に同方向で配置された場合に、組換えを起こしてloxP配列間の配列を欠失させ得る任意の変異loxP配列が挙げられる。変異loxP配列としては、例えば、5’側反復配列に変異のあるlox71、3’側反復配列に変異のあるlox66、スペーサー部分に変異のあるlox2272やlox511などが挙げられる。該ベクター要素の5’側および3’側に配置される2つのloxP配列は、同一であっても異なっていてもよいが、スペーサー部分に変異のある変異loxP配列の場合は同一のもの（例、lox2272同士、lox511同士）が用いられる。好ましくは、5’側反復配列に変異のある変異loxP配列（例、lox71）と3’側反復配列に変異のある変異loxP配列（例、lox66）との組合せが挙げられる。こ

の場合、組換えの結果染色体上に残るloxP配列は5’側および3’側の反復配列に二重変異を有するため、Creリコンビナーゼに認識されにくく、不必要な組換えにより染色体の欠失変異を起こすリスクが低減される。lox71とlox66とを用いる場合、前記ベクター要素の5’側および3’側にいずれの変異loxP配列を配置してもよいが、変異部位がloxP配列の外端に配置されるような向きで変異loxP配列を挿入する必要がある。尚、本発明の好ましいエピソーマルベクターはCreリコンビナーゼを作用させなくても、早期に細胞から脱落する自己消失型ベクターであるが、例外的に細胞からの脱落に時間がかかる場合も想定されるので、Creリコンビナーゼ処理による不必要な組換えなどのリスクに備えてloxP配列を設計しておくことが好ましい場合もある。

[0041] 2つのloxP配列は、エピソーマルベクターの哺乳動物細胞内での複製に必要なベクター要素（即ち、哺乳動物細胞で機能的な複製開始点（例えば、EBV oriP、SV40 ori等、好ましくはoriP）、または該複製開始点に結合して複製を制御するタンパク質（例えば、EBNA-1、SV40 large T antigen等、好ましくはEBNA-1）をコードする遺伝子配列）の5’側および3’側に、同方向に配置される。loxP配列が挟むベクター要素は、複製開始点、または複製開始点に結合して複製を制御するタンパク質をコードする遺伝子配列のいずれか一方だけであってもよいし、両方であってもよい。

[0042] 本発明で用いられるエピソーマルベクターは、loxP配列の存在の有無にかかわらず、体細胞に導入した際に、該ベクターを構成する外来核酸因子（初期化因子またはp53の機能阻害物質をコードする核酸を含む）が一過的にも細胞のゲノム中に組み込まれないというエピソーマルベクター本来の効果だけでなく、Creリコンビナーゼ処理を施すことなく、早い段階でエピソームとして存在する該ベクターがiPS細胞から脱落するという予期せぬ効果を奏するものである。即ち、本発明はまた、iPS細胞の樹立に十分な初期化因子およびp53機能阻害物質の発現を提供した後、早期に細胞から脱落する自己消失型のエピソーマルベクターを提供する。ここで「脱落する」とは、WO 2011/016588 A1の実施例6もしくは10に記載されるPCR分析または実施例11に記載されるRT-

PCR分析において、該ベクターの存在または該ベクターに搭載された初期化因子またはp53機能阻害物質の発現が検出されない（検出限界以下である）ことを意味する。かかるベクターは、その導入により樹立されるiPS細胞クローンの50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上のクローンにおいて、10継代までにiPS細胞から脱落することを特徴とする。あるいは、該自己消失型エピソーマルベクターは、導入後1週間以内における$1x10^4$細胞あたりのコピー数が10^6個のオーダーであるのに対し、iPS細胞樹立時（例えば、ベクター導入から約4週間後）における$1x10^4$細胞あたりのコピー数が100個以下、好ましくは50個以下、より好ましくは30個以下にまで減衰する程度に細胞内で不安定であることを特徴とする。

[0043] 具体的には、本発明の早期自己消失型ベクターは以下の(i)～(vii)のうちの少なくと1つ、好ましくは2つ以上、より好ましくは3つ以上、特に好ましくは4つ以上の構造的特徴を有するものである。

(i) エピソーマルベクターの哺乳動物細胞内での複製に必要なベクター要素（例えば、EBNA-1遺伝子やSV40 Large T antigen遺伝子、好ましくはEBNA-1遺伝子）の5’側および3’側にloxP配列が同方向に配置されている。

(ii) 初期化因子をコードする核酸がCAGプロモーターの制御下にある。

(iii) 初期化因子またはp53のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸がCMV前初期エンハンサーの制御下にある。

(iv) 初期化因子またはp53のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸がウサギβ-グロビンpolyA付加シグナルの制御下にある。

(v) 初期化因子またはp53のドミナントネガティブ変異体をコードする核酸とpolyA付加シグナルとの間にWPRE配列を含む。

(vi) p53 shRNAをコードする核酸がU6プロモーターの制御下にある。

(vii) 細菌で機能的な複製起点（例えば、pUC ori、ColE1 ori、好ましくはpUC ori）、および細菌での選択を可能にするマーカー遺伝子（例えば、アンピシリン耐性遺伝子）を含む。

（viii） エピソーマルベクターの哺乳動物細胞内での複製に必要なベクター

要素（例えば、EBNA-1遺伝子やSV40 Large T antigen遺伝子、好ましくはEBNA-1遺伝子）と、ベクター上に搭載される各初期化因子またはp53機能阻害物質をコードする核酸とが、同一方向に転写される。

[0044] 尚、米国仮特許出願第61/521,153の実施例6に示されるとおり、4つの発現カセットを1つのエピソーマルベクター上に搭載した遺伝子導入ベクターを体細胞に導入した場合でも、iPS細胞を樹立することができる。この場合についても、発現カセットの配置順を検討することにより、さらに樹立効率が改善される可能性がある。

[0045] (F) Extra EBNA-1ベクタープラスミド

EBNA-1 (Epstein-Barr virus nuclear antigen 1)タンパク質は、EBV(Epstein-Barr virus)が細胞内に潜伏感染するに際して、そのエピソームの複製、維持、さらにはウイルス遺伝子群の転写発現に極めて重要な役割を果たすタンパク質であり、そのような機能は、当該タンパク質がEBVゲノムDNAのOriP領域に結合することにより達成されることが知られている（Frappier, L., and O'Donnell, M. (1991) J. Biol. Chem. 266, 7819-7826）。本発明におけるExtra EBNA-1ベクタープラスミドは、そのようなEBNA-1の機能を利用してOriP領域を有するエピソーマルベクターの自律複製を可能にするものである。本発明におけるExtra EBNA-1ベクタープラスミドは、EBNA-1タンパク質をコードする遺伝子を搭載しており、哺乳動物細胞内においてEBNA-1タンパク質を一過的もしくは構成的に発現し得る。

[0046] 本発明におけるExtra EBNA-1ベクタープラスミドは、プロモーターの制御下にEBNA-1コード領域が挿入された構造をとり、EBNA-1コード領域の発現を可能にする構造を有するプラスミドであればすべて本発明の範囲に含まれる。例えば、本発明におけるExtra EBNA-1ベクタープラスミドは、プロモーターの他に所望によりエンハンサー、ポリＡ付加シグナル、選択マーカー遺伝子などを含有していてもよい。選択マーカー遺伝子としては、例えば、アンピシリン耐性遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子などが挙げられる。EBNA-1コード領域を制

御するプロモーターとしては、例えば、EF1αプロモーター、CAGプロモーター、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどが用いられる。なかでも、CAGプロモーター、CMVプロモーターなどが好ましい。本発明におけるExtra EBNA-1ベクタープラスミドは、例えば、pCX-EGFP（FEBS Letters, 407, 313-319, 1997）を用いて下記の手順により作製することができる。

・pCX-EGFPのpA配列の5’側にWPRE配列を挿入し、さらに制限酵素BamHI処理によりSV40oriを取り除く。

・次いで、このベクターのEGFP部分をEcoRIで取り除き、代わりにEBNA-1コード領域を挿入する。

そのようにして得られたExtra EBNA-1ベクタープラスミドは、本明細書において別名「pCXWB-EBNA-1」と呼ばれる。

[0047] 他の態様において、本発明におけるExtra EBNA-1ベクタープラスミドは、例えば、pCX-EGFP（FEBS Letters, 407, 313-319, 1997）を用いて下記の手順により作製することができる。

・pCX-EGFPを制限酵素BamHIにより処理し、self ligationさせる（pCXB-EGFP）。

・次いで、このベクターを制限酵素EcoRIで処理し、pCXWB-EBNA1のEcoRIフラグメント（EBNA-1コード領域）を挿入する。

そのようにして得られたExtra EBNA-1ベクタープラスミドは、本明細書において別名「pCXB-EBNA1」と呼ばれる。

[0048] Extra EBNA-1ベクタープラスミドの使用態様としては、例えば、iPS細胞の樹立工程において核初期化因子を搭載したエピソーマルベクターと同時に細胞に接触させ得る。また別の態様では、Extra EBNA-1ベクタープラスミドは、核初期化因子を搭載したエピソーマルベクターを細胞に接触させる前に、または接触させた後に、当該細胞に接触させ得る。前者の態様が本発明を実

施する上でより好ましい。

[0049] Extra EBNA-1ベクタープラスミドによるiPS細胞の樹立効率改善効果のメカニズムとしては、例えば、従来の方法ではoriPに結合するEBNA-1の量が十分ではなく、その結果、核初期化因子を搭載したエピソーマルベクターの複製が十分に行えず、核初期化因子の発現量が不十分であったところ、Extra EBNA-1ベクタープラスミドによりEBNA-1の不足分を補償し得たことが考えられるが、他のメカニズムでiPS細胞の樹立効率が改善していたとしても何ら本発明に影響を与えるものではないことは明らかである。

以下、本明細書において、エピソーマルベクターを用いて樹立されたiPS細胞を「epi-iPS cells」または「epi-iPSCs」と略することがある。また、本発明における導入遺伝子の組み合わせを「C1, T1, T2, Y3, Y3+EBNA1, Y4, Y4+EBNA1, Y5+EBNA1, Y6+EBNA1」と略する場合、これらの組合せは以下の表1に示すとおりである。

[0050]

[表1]

Mixture name	Plasmid name	Amount (μg)	Genes
C1	pEB-C5	2.5	OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC, LIN28
	pEB-Tg	0.5	SV40LT
T1	pEP4EO2SEN2K	1.05	OCT3/4, SOX2, NANOG, KLF4
	pEP4EO2SET2K	1.12	OCT3/4, SOX2, SV40LT, KLF4
	pCEP4-M2L	0.83	C-MYC, LIN28
T2	pEP4EO2SET2K	0.91	OCT3/4, SOX2, SV40LT, KLF4
	pEP4EO2SCK2MEN2L	2.09	OCT3/4, SOX2, KLF4, c-MYC, NANOG, LIN28
Y3	pCXLE-hOCT3/4	1	OCT3/4
	pCXLE-hSK	1	SOX2, KLF4
	pCXLE-hUL	1	L-MYC, LIN28
Y3 + EBNA1	pCXLE-hOCT3/4	0.83	OCT3/4
	pCXLE-hSK	0.83	SOX2, KLF4
	pCXLE-hUL	0.83	L-MYC, LIN28
	pCXWB-EBNA1	0.5	CAG::EBNA1
Y4	pCXLE-hOCT3/4-shp53	1	OCT3/4, p53 shRNA
	pCXLE-hSK	1	SOX2, KLF4
	pCXLE-hUL	1	L-MYC, LIN28
Y4 + EBNA1	pCXLE-hOCT3/4-shp53	0.83	OCT3/4, p53 shRNA
	pCXLE-hSK	0.83	SOX2, KLF4
	pCXLE-hUL	0.83	L-MYC, LIN28
	pCXWB-EBNA1	0.5	CAG::EBNA1
Y5 + EBNA1	pCE-hOCT3/4-shp53	0.83	OCT3/4, p53 shRNA
	pCE-hSK	0.83	SOX2, KLF4
(- WPRE)	pCE-hUL	0.83	L-MYC, LIN28
	pCXB-EBNA1	0.5	CAG::EBNA1
Y6 + EBNA1	pCE-hOCT3/4	0.625	OCT3/4
	pCE-hSK	0.625	SOX2, KLF4
(- WPRE)	pCE-hUL	0.625	L-MYC, LIN28
(- shRNA)	pCE-mp53DD	0.625	mouse p53 dominant negative
	pCXB-EBNA1	0.5	CAG::EBNA1

[0051] (G) ベクターセットの体細胞への導入方法

上記のエピソーマルベクターの組合せからなるベクターセットは、例えばリポフェクション法、リポソーム法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム共沈殿法、DEAEデキストラン法、マイクロインジェクション法、遺伝子銃法などを用いて体細胞に導入することができる。具体的には、例えばScience, 324: 797-801 (2009)、WO 2011/016588 A1またはNature Methods, 8 (5), 409-412 (2011)等に記載される方法を用いることができる。

iPS細胞からエピソーマルベクターの哺乳動物細胞内での複製に必要なベクター要素が除去されたか否かの確認は、該ベクター要素内部および／または（loxP配列を用いた場合には）loxP配列近傍の塩基配列を含む核酸をプロー

ブまたはプライマーとして用い、該iPS細胞から単離したエピソーム画分を鋳型としてサザンブロット分析またはPCR分析を行い、バンドの有無または検出バンドの長さを調べることにより実施することができる（WO 2011/016588 A1、Nature Methods, 8(5), 409-412 (2011)参照）。エピソーム画分の調製は当該分野で周知の方法と用いて行えばよく、例えば、Science, 324: 797-801 (2009)、WO 2011/016588 A1またはNature Methods, 8(5), 409-412 (2011)等に記載される方法を用いることができる。

[0052] (H) iPS細胞の樹立効率改善物質

公知のiPS細胞樹立効率改善物質を体細胞に接触させることにより、iPS細胞の樹立効率をさらに高めることが期待できる。そのようなiPS細胞の樹立効率改善物質としては、例えば、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）阻害剤［例えば、バルプロ酸（VPA)(Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA（例、HDAC1 siRNA Smartpool(登録商標)（Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等）等の核酸性発現阻害剤など］、G9aヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤［例えば、BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2: 525-528 (2008))等の低分子阻害剤、G9aに対するsiRNAおよびshRNA（例、G9a siRNA(human)（Santa Cruz Biotechnology)等）等の核酸性発現阻害剤など］、L-calcium channel agonist（例えばBayk 8644) (Cell Stem Cell, 3, 568-574 (2008))、UTF1(Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、細胞内シグナル伝達の修飾剤［例えば、Wnt Signaling活性化剤（例えばsoluble Wnt3a) (Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008))、TGF-βの阻害剤、MEK阻害剤、2i/LIF (2iはmitogen-activated protein kinase signallingおよびglycogen synthase kinase-3の阻害剤、PloS Biology, 6(10), 2237-2247 (2008))］、他の天然もしくは合成低分子化合物（例、5’-azacytidine、thiazovivin、ビタミンC等）、ES細胞特異的miRNA（例えば、miR-302-367クラスター（Mol. Cell. Biol. doi:10.1128/MCB.00398-08、WO2009/075119)、miR-302 (RNA (2008) 14: 1-10)、miR-291-3p, miR-294およびmiR

-295（以上、Nat. Biotechnol. 27: 459-461 (2009)）等が挙げられるが、それらに限定されない。前記において核酸性の発現阻害剤はsiRNAもしくはshRNAをコードするDNAを含む発現ベクターの形態であってもよい。

[0053] これらiPS細胞樹立効率改善物質の体細胞への接触は、該物質が(a) タンパク性因子である場合、(b) 該タンパク性因子をコードする核酸である場合、あるいは(c) 低分子化合物である場合に応じて、それぞれ周知慣用の方法により、実施することができる。

iPS細胞の樹立効率改善物質は、該物質の非存在下と比較して体細胞からのiPS細胞樹立効率が有意に改善される限り、本発明のベクターセットと同時に体細胞に接触させてもよいし、また、どちらかを先に接触させてもよい。

[0054] (I) 培養条件による樹立効率の改善

体細胞の核初期化工程において低酸素条件下で細胞を培養することにより、iPS細胞の樹立効率をさらに改善することができる。本明細書において「低酸素条件」とは、細胞を培養する際の雰囲気中の酸素濃度が、大気中のそれよりも有意に低いことを意味する。具体的には、通常の細胞培養で一般的に使用される5-10% CO_2/95-90%大気の雰囲気中の酸素濃度よりも低い酸素濃度の条件が挙げられ、例えば雰囲気中の酸素濃度が18%以下の条件が該当する。好ましくは、雰囲気中の酸素濃度は15%以下（例、14%以下、13%以下、12%以下、11%以下など）、10%以下（例、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下など）、または5%以下（例、4%以下、3%以下、2%以下など）である。また、雰囲気中の酸素濃度は、好ましくは0.1%以上（例、0.2%以上、0.3%以上、0.4%以上など）、0.5%以上（例、0.6%以上、0.7%以上、0.8%以上、0.95以上など）、または1%以上（例、1.1%以上、1.2%以上、1.3%以上、1.4%以上など）である。

[0055] 細胞の環境において低酸素状態を創出する手法は特に制限されないが、酸素濃度の調節可能なCO_2インキュベーター内で細胞を培養する方法が最も容易であり、好適な例として挙げられる。酸素濃度の調節可能なCO_2インキュベーターは、種々の機器メーカーから販売されている（例えば、Thermo scientific社、池本理化学工業、十慈フィールド、和研薬株式会社などのメーカー製

の低酸素培養用CO_2インキュベーターを用いることができる）。

低酸素条件下で細胞培養を開始する時期は、iPS細胞の樹立効率が正常酸素濃度（20%）の場合に比して改善されることを妨げない限り特に限定されず、体細胞への本発明ベクターセットの接触より前であっても、該接触と同時であっても、該接触より後であってもよいが、例えば、体細胞に該ベクターセットを接触させた直後から、あるいは接触後一定期間（例えば、1ないし10（例、2,3,4,5,6,7,8または9）日）おいた後に低酸素条件下で培養することが好ましい。

[0056] 低酸素条件下で細胞を培養する期間も、iPS細胞の樹立効率が正常酸素濃度（20%）の場合に比して改善されることを妨げない限り特に限定されず、例えば3日以上、5日以上、7日以上または10日以上で、50日以下、40日以下、35日以下または30日以下の期間等が挙げられるが、それらに限定されない。低酸素条件下での好ましい培養期間は、雰囲気中の酸素濃度によっても変動し、当業者は用いる酸素濃度に応じて適宜当該培養期間を調整することができる。また、一実施態様において、iPS細胞の候補コロニーの選択を、薬剤耐性を指標にして行う場合には、薬剤選択を開始する迄に低酸素条件から正常酸素濃度に戻すことが好ましい。

[0057] さらに、低酸素条件下で細胞培養を開始する好ましい時期および好ましい培養期間は、正常酸素濃度条件下でのiPS細胞樹立効率などによっても変動する。

本発明のベクターセット（さらに必要に応じてiPS細胞の樹立効率改善物質）を接触させた後、細胞を、例えばES細胞の培養に適した条件下で培養することができる。マウス細胞の場合、通常の培地に分化抑制因子としてLeukemia Inhibitory Factor（LIF）を添加して培養を行う。一方、ヒト細胞の場合には、LIFの代わりに塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）および／または幹細胞因子（SCF）を添加することが望ましい。また、細胞は、フィーダー細胞として、放射線や抗生物質で処理して細胞分裂を停止させたマウス胎仔由来の線維芽細胞の共存下で培養されてもよく、これらのフィーダー細胞の代わり

に細胞外マトリックスをコートした培養皿を用いて培養されてもよい。マウス胎仔由来の線維芽細胞としては、通常STO細胞株（ATCC CRL-1503）等がフィーダーとしてよく使われるが、iPS細胞の誘導には、STO細胞にネオマイシン耐性遺伝子とLIF遺伝子を安定に組み込んだSNL細胞（SNL76/7 STO細胞; ECACC 07032801）（McMahon, A. P. & Bradley, A. Cell 62, 1073-1085（1990））等がよく使われている。また、マウス胎仔由来の初代線維芽細胞（MEF）も用いることができる。マイトマイシンC処理済のMEFは、ミリポア社やリプロセル社から市販されている。これらのフィーダー細胞との共培養は、本発明のベクターセットの接触より前から開始してもよいし、該接触時から、あるいは該接触より後（例えば1-10日後）から開始してもよい。

[0058] 培養培地は、Rhoキナーゼ(ROCK)阻害剤を含んでいてもよい。特に、培養工程がヒトiPS細胞を単一細胞へ分散させる工程を含む場合には、培地にROCK阻害剤が含まれていることが好ましい。フィーダー細胞としてMEF細胞やSNL細胞が用いられる場合、一緒に用いられる培地中にROCK阻害剤が含まれていても含まれていなくてもよいが、含まれていないのが好ましい。ROCK阻害剤としては、例えば、Y-27632が使用されるが、これに限定されない。

[0059] 本発明のベクターセットの使用により、体細胞への該ベクターセットの導入から、iPS細胞を樹立し、さらにiPS細胞として維持するまでの間、非ヒト動物由来成分を一切用いずに培養して（即ち、完全xeno-freeの条件下で）、ヒトiPS細胞を作製することが可能である。xeno-freeの条件下でヒトiPS細胞を誘導する場合、本発明のベクターセット（さらに必要に応じてiPS細胞の樹立効率改善物質）を接触させた後、細胞は、FCSや他の非ヒト動物由来成分を含まない培地中で培養される。分化抑制因子として培地に添加される物質（例、bFGF、SCF等）としては、ヒト由来の精製されたタンパク質、好ましくは組換えタンパク質が使用される。フィーダー細胞としては、ヒト由来の任意の体細胞を用いることができるが、例えばヒト皮膚線維芽細胞（HDF）やヒト歯髄幹細胞などが好ましく用いられ得る。また、フィーダー細胞を用いることなくヒトiPS細胞を誘導することも可能であり、この場合、細胞容器のコー

ティング剤として、細胞外マトリックスを用いることもできる、細胞外マトリックスとは、細胞の外に存在する超分子構造体であり、天然由来であっても、人工物（組換え体）であってもよい。例えば、コラーゲン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ヒアルロン酸、テネイシン、エンタクチン、エラスチン、フィブリリンおよびラミニンといった物質またはこれらの断片が挙げられる。これらの細胞外基質は、組み合わせて用いられてもよく、例えば、BD Matrigel(TM)などの細胞からの調製物であってもよい。この他にも市販のxeno-freeのコーティング剤を用いることができる。市販のxeno-freeのコーティング剤としては、例えば、CellStart, Coat1, VTN-N, Synthemax2, Retronectinが挙げられるが、これらに限定されない。

[0060] エピソーマルベクターを用いて、末梢血単核球細胞（T細胞および非T細胞（CD34陽性細胞および幹・前駆細胞を含む）からiPS細胞を樹立する方法は、例えば、京都大学iPS細胞培養プロトコル（http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/protocol.html）に詳述されている。

iPS細胞の候補コロニーの選択は、薬剤耐性とレポーター活性を指標とする方法と目視による形態観察による方法とが挙げられる。前者としては、例えば、分化多能性細胞において特異的に高発現する遺伝子（例えば、Fbx15、Nanog、Oct3/4など、好ましくはNanogまたはOct3/4）の遺伝子座に、薬剤耐性遺伝子および／またはレポーター遺伝子をターゲッティングした組換え体細胞を用い、薬剤耐性および／またはレポーター活性陽性のコロニーを選択するというものである。そのような組換え体細胞としては、例えばFbx15遺伝子座にβgeo（β-ガラクトシダーゼとネオマイシンホスホトランスフェラーゼとの融合タンパク質をコードする）遺伝子をノックインしたマウス由来のMEF（Takahashi & Yamanaka, Cell, 126, 663-676 (2006)）、あるいはNanog遺伝子座に緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子とピューロマイシン耐性遺伝子を組み込んだトランスジェニックマウス由来のMEF（Okita et al., Nature, 448, 313-317 (2007)）等が挙げられる。一方、目視による形態観察で候補コロニーを選択する方法としては、例えばTakahashi et al., Cell, 131, 861-87

2 (2007)に記載の方法が挙げられる。レポーター細胞を用いる方法は簡便で効率的ではあるが、iPS細胞がヒトの治療用途を目的として作製される場合、安全性の観点から目視によるコロニー選択が望ましい。

[0061] 選択されたコロニーの細胞がiPS細胞であることの確認は、上記したNanog（もしくはOct3/4）レポーター陽性（ピューロマイシン耐性、GFP陽性など）および目視によるES細胞様コロニーの形成によっても行い得るが、より正確を期すために、アルカリフォスファターゼ染色や、各種ES細胞特異的遺伝子の発現を解析したり、選択された細胞をマウスに移植してテラトーマ形成を確認する等の試験を実施することもできる。

このようにして樹立されたiPS細胞は、種々の目的で使用することができる。例えば、ES細胞で報告されている分化誘導法を利用して、iPS細胞から種々の細胞（例、心筋細胞、血液細胞、神経細胞、血管内皮細胞、インスリン分泌細胞等）への分化を誘導することができる。したがって、患者本人やHLAの型が同一もしくは実質的に同一である他人から採取した体細胞を用いてiPS細胞を誘導すれば、そこから所望の細胞（即ち、該患者が罹病している臓器の細胞や疾患に対する治療効果を発揮する細胞など）に分化させて該患者に移植するという、自家もしくは同種異系移植による幹細胞療法が可能となる。さらに、iPS細胞から分化させた機能細胞（例、肝細胞）は、対応する既存の細胞株よりも実際の生体内での該機能細胞の状態をより反映していると考えられるので、医薬候補化合物の薬効や毒性のin vitroスクリーニング等にも好適に用いることができる。

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明の範囲はそれら実施例に限定されないものとする。

実施例

[0062] 実施例1：初期化に用いる各種エピソーマルプラスミドの作製

pCXLE-hOCT3/4、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL、およびpCXLE-hOCT3/4-shp53-Fの4種のプラスミドは以前に作製したものを用いた（Okita et al., Nature Methods, 8(5), 409-412(2011)、国際公報WO2011/016588）。各プラスミドの構成

の概要は、下記のとおりである。

1）pCXLE-hOCT3/4（Addgene#27076）：

ヒトOct3/4の翻訳領域をCAGプロモーターの制御下に配置した発現カセット（翻訳領域の下流にWPRE配列とウサギβ-グロビンpolyA付加シグナルを含む。以下同じ）を、EBNA-1遺伝子（センス鎖）の3’側を起点にして（以下同じ）、5’から3’方向にこの順序で配置したプラスミド。

2）pCXLE-hSK（Addgene#27078）：

ヒトSox2およびヒトKlf4の各翻訳領域を口蹄疫ウイルス（FMV）2A配列（PLoS ONE 3, e2532, 2008、Stem Cells 25, 1707, 2007)をはさんで繋げたコンストラクトを、CAGプロモーターの制御下に配置した発現カセットを、EBNA-1遺伝子（センス鎖）の3’側を起点にして、5’から3’方向にこの順序で配置したプラスミド。

3）pCXLE-hUL（Addgene#27080）：

ヒトL-MycおよびヒトLin28の各翻訳領域を口蹄疫ウイルス（FMV）2A配列をはさんで繋げたコンストラクトを、CAGプロモーターの制御下に配置した発現カセットを、EBNA-1遺伝子（センス鎖）の3’側を起点にして、5’から3’方向にこの順序で配置したプラスミド。

4）pCXLE-hOCT3/4-shp53-F（Addgene#27077）：

p53shRNAをコードする核酸領域とヒトOct3/4の翻訳領域とを、それぞれU6プロモーターとCAGプロモーターの制御下に配置した発現カセットを、5’から3’方向にこの順序で配置したプラスミド。

[0063] pCEB-hSK-O、pCEB-hUL-G、pCE-EGFP、pCXLE-hGLIS1、pCE-hOCT3/4、pCE-hOCT3/4-shp53-F、pCE-hSK、pCE-hULおよびpCE-mp53DDについては、下記のとおり作製した。

1）pCEB-hSK-O：

pCX-EGFP（大阪大学、岡部勝博士より供与された，FEBS Letters, 407, 313-319, 1997）のpA配列の5’側にWPRE配列を挿入し、さらに制限酵素BamHI処理によりSV40oriを取り除いた。このベクターをpCXWBとした。このベクター

のEGFP部分をEcoRIで取り除き、換わりにpCXLE-hOCT3/4より同様にEcoRIで切り出したヒト遺伝子の翻訳領域を挿入した。これをpCXWB-hOCT3/4と名付けた。このベクターをSalIで処理して、そこに同様にSalI処理したpCXLE-hSKを挿入することによりpCEB-hSK-Oを作製した（図1A）。

2）pCXLE-hGLIS1：

pMXs-hGLIS1からhGLIS1部分をPCRで増幅して、pCR2.1に挿入した。次いで、制限酵素EcoRIで処理してhGLIS1フラグメントを切り出し、それを制限酵素EcoRIで処理しておいたpCXLE-EGFPに挿入した。

3）pCEB-hUL-G：

pCXWBのEGFP部分をEcoRIで取り除き、換わりにpCXLE-hGLIS1より同様にEcoRIで切り出したヒト遺伝子の翻訳領域を挿入した。これをpCXWB-hGLIS1と名付けた。このベクターをSalIで処理して、そこに同様にSalI処理したpCXLE-hULを挿入することによりpCEB-hUL-Gを作製した（図1B）。

4）pCE-EGFP:

pBluescriptII KS-を制限酵素BamHI/XhoIで処理して、そこにリンカーを挿入し、pBS-XhoBamを作製した。次いで、pBS-XhoBamを制限酵素SalI/MfeIで処理して、そこにpCEP4のSalI/EcoRIフラグメントを挿入し、pBS-CEPcassetteを作製した。次いで、pCX-EGFPを制限酵素BamHIで処理して、そこにpBS-CEPcassetteのBamHI/BglIIフラグメントを挿入することにより、pCE-EGFPを作製した。

5）pCE-hOCT3/4（図2A）：

上記pCE-EGFPを制限酵素EcoRIで処理して、そこにpCXLE-hOCT3/4のEcoRIフラグメントを挿入した。

6）pCE-hOCT3/4-shp53-F（図2B）：

上記pCE-hOCT3/4を制限酵素BamHIで処理して、そこにpCXLE-hOCT3/4-shp53-FのBamHIフラグメントを挿入した。

7）pCE-hSK（図2C）：

上記pCE-EGFPを制限酵素EcoRIで処理して、そこにpCXLE-hSKのEcoRIフラグ

メントを挿入した。

8）pCE-hUL（図2D）：

上記pCE-EGFPを制限酵素EcoRIで処理して、そこにpCXLE-hULのEcoRIフラグメントを挿入した。

9）pCE-mp53DD（図2E）：

pENTR-p53DDからmp53DD部分をPCRで増幅して、pCR2.1に挿入し、pTopo-mp53DDを作製した。次いで、pCXLE-EGFPを制限酵素EcoRIで処理して、そこにpTopo-mp53DDのEcoRIフラグメントを挿入し、pCXLE-mp53DDを作製した。次いで、上記pCE-EGFPを制限酵素EcoRIで処理して、そこにpCXLE-mp53DDのEcoRIフラグメントを挿入することにより、pCE-mp53DDを作製した。

[0064] 実施例2：Extra EBNA-1ベクタープラスミドの作製

効率的にトランスジーンを発現させるために、pCX-EGFP（大阪大学、岡部勝博士より供与された，FEBS Letters，407，313-319，1997）のpA配列の5'側にWPRE配列を挿入し、さらに制限酵素BamHI処理によりSV40oriを取り除いた。このベクターをpCXWBとした。次いで、pCXWBのEGFP部分をEcoRIで取り除き、代わりにpCEP4（Invitrogen）からPCR増幅させたEBNA-1コード領域を挿入した。このベクターを「pCXWB-EBNA1」と名付けて、以下の実験において使用した（図3A）。

また、別のExtra EBNA-1ベクタープラスミドであるpCXB-EBNA1を下記のとおり作製した。最初に、pCX-EGFPを制限酵素BamHIにより処理し、self ligationさせた。このベクターをpCXB-EGFPとした。次いで、pCXB-EGFPを制限酵素EcoRIで処理し、pCXWB-EBNA1のEcoRIフラグメント（EBNA-1コード領域）を挿入することにより、pCXB-EBNA1を得た（図3B）。

[0065] 実施例3：ヒト線維芽細胞（HDF1419）由来のiPS細胞の樹立

プラスミドの組み合わせ（pCEB-hSK-OおよびpCEB-hUL-G）、ならびにそれとpCXWB-EBNA1の組み合わせを用いて、ヒト線維芽細胞（HDF1419）からiPS細胞の樹立を行った。

ヒト線維芽細胞（HDF1419）を、Cell Applications，Incから購入した。こ

の線維芽細胞を、10% ウシ胎児血清(FCS, Invitrogen)を補充したDMEM (Nacalai Tesque, Japan)を培養液として使用し、100 mm 培養ディッシュで37℃、5% CO_2の条件で培養し、維持した。プラスミド導入時には、培地を除き、PBS 5 mLを加えて細胞を洗浄した。PBSを除いた後、0.25% Trypsin/1 mM EDTA (Invitrogen) を加えて、37℃で5分間程度反応させた。細胞が浮き上がったらDMEM/10% FCSを加えて懸濁し、6x10^5細胞を15 mL遠心チューブに回収した。800 rpmで5分間遠心して上清を除いた。各プラスミド1.5 μg (pCXLE-hSK-OおよびpCEB-hUL-G) を、Microporator (エアブラウン) を用いて細胞に導入した。導入時の条件は100 μLチップを用い、1650 V, 10 ms, 3回のパルスで行った。導入後の細胞はあらかじめDMEM/10% FCSを3 mL入れておいた6 well培養プレート (Falcon) へ移し、37℃、5% CO_2の条件で6日間培養した。その後培地を除き、PBS 2 mLを加えて細胞を洗浄した。PBSを除いた後、0.25% Trypsin/1 mM EDTA (Invitrogen) を加えて、37℃で5分間程度反応させた。細胞が浮き上がったらDMEM/10% FCSを加えて懸濁し、1x10^5の細胞を、あらかじめフィーダー細胞を蒔いておいた100 mm dishに蒔いた。フィーダー細胞としては、マイトマイシンC処理をしたMEF、またはマイトマイシンC処理をしたSNL76/7を使用した。翌日に霊長類ES細胞用培地 (リプロセル) に4 ng/mLとなる様にbFGF (Wako) を加えた培地に交換し、以後2日おきに培地交換を続けた。プラスミド導入から24日目にES様コロニーおよび非ES様コロニーの数を数えた結果を図4に示す。

pCEB-hSK-OおよびpCEB-hUL-GをpCXWB-EBNA1と組み合わせて用いることで、iPS細胞樹立効率が上昇することが明らかとなった。

[0066] 実施例4：ヒト線維芽細胞 (HDF1388) 由来のiPS細胞の樹立

実施例3と同様の方法により、プラスミドの組み合わせY4 (pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSKおよびpCXLE-hUL) 、ならびにそれとpCXWB-EBNA1の組み合わせを用いて、ヒト線維芽細胞 (HDF1388) からiPS細胞の樹立を行った。

その結果、Y4をpCXWB-EBNA1と組み合わせて用いることで、iPS細胞樹立効率が上昇することが明らかとなった (図5) 。

[0067] 実施例5：ヒト末梢血単核球細胞（PMNC)由来のiPS細胞の樹立

プラスミドの組み合わせT2（pEP4E02SET2KおよびpEP4E02SCK2MEN2L）、Y3（pCXLE-hOCT3/4、pCXLE-hSKおよびpCXLE-hUL）およびY4（pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSKおよびpCXLE-hUL）、ならびにそれらとpCXWB-EBNA1の組み合わせを用いて、ヒト末梢血単核球細胞（PMNC)からiPS細胞の樹立を行った。

血液は、治験審査委員会（Institutional Review Board）の指針に基づき、インフォームドコンセントを得た健常なドナーより採取したものを使用した。この血液より、Ficoll-paque Plus（GE Healthcare)またはBD Vacutainer CPT（BD)を用いて、密度勾配遠心法にてPMNCを回収した。NucleofectorII（Lonza）を用いて、3 μgの発現プラスミド混合物を3-5 × 10^6 PMNCに導入した。導入にはAmaxa(R) Human T Cell Nucleofector(R) Kitを用いた。導入後の細胞を、あらかじめMEFフィーダー細胞（マイトマイシンC処理済）を播種しておいた6 well培養プレート（Falcon）へ移し、37℃、5% CO_2の条件下で培養した。培地には、30 U/ml IL-2（PeproTech)および 5 μl/well Dynabeads Human T-activator CD3/CD28を添加したX-vivo10培地(Lonza)（T細胞からの誘導用）または10% FCS, 10 ng/ml IL-3, 10 ng/ml IL-6, 10 ng/ml G-CSFおよび10 ng/ml GM-CSFを添加したαMEM培地またはStemSpan H3000（StemCell Technologies)（非T細胞からの誘導用）を用いた。プラスミド導入2日目に、培地を交換することなく、4 ng/mL bFGFおよび10 μM Y27632を添加した等量の霊長類ES細胞用培地（リプロセル）を各ウェルに加えた。次いで、プラスミド導入4日目に、培養培地を、4 ng/mL bFGFおよび10 μM Y27632を添加した霊長類ES細胞用培地（リプロセル）に交換した。プラスミド導入20～25日目にES様コロニー（iPS細胞コロニー）数を計測した。

[0068] その結果、Y3およびY4をpCXWB-EBNA1と組み合わせて用いることで、iPS細胞樹立効率が上昇することが明らかとなった（図6および7、表２AおよびB）。同様に、Y5（pCE-hOCT3/4-shp53、pCE-hSKおよびpCE-hUL）およびY6（pCE-hOCT3/4、pCE-hSK、pCE-hULおよびpCE-mp53DD）、ならびにpCXB-EBNA1の組み

合わせを用いた場合にも、PMNCからiPS細胞を樹立することに成功し（表２Ｂ）、またY5およびY6をpCXB-EBNA1と組み合わせて用いることで、iPS細胞樹立効率が上昇することが明らかとなった。また、この時、Y6およびpCXB-EBNA1の組み合わせを用いた場合において、MEFフィーダー細胞の代わりに20 μg/ml RetroNectin (Takara) をコートした培養皿を用いて同様の工程を行うことでも、iPS細胞を樹立できることが確認された。

[0069] [表2]

A

medium[a]	cell number ($\times 10^5$)	Plasmid mixtures and conditions: C1 (n=3)	T1 (n=3)	T2 (n=6)	Y3 (n=3)	Y3 + EBNA1 (n=3)	Y4 (n=6)	Y4 + EBNA1 (n=3)	Y4 + EBNA1 with freezed PMNC (n=3)
NTm	10	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.6	1.3 ± 1.2	2.5 ± 1.0	4.7 ± 3.8	9.7 ± 2.1
	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.7 ± 0.6	0.7 ± 0.8	4.3 ± 2.1	2.3 ± 1.2
Tm	10	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	15.7 ± 8.1	51.7 ± 64.4	42.2 ± 8.4	ND[b]	ND[b]
	3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.0 ± 3.5	9.0 ± 9.6	18.8 ± 6.1	184.0 ± 11.3	241.0 ± 77.7
	1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.7 ± 2.1	5.3 ± 3.1	9.5 ± 2.7	82.7 ± 11.6	101.0 ± 26.5
	0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.6	0.7 ± 1.2	1.2 ± 0.8	19.3 ± 9.6	31.3 ± 12.9

Note; [a]NTm, medium for non-T cell population; Tm, medium for T cells. [b]ND, not determined because of too many colony formation.

B

medium[a]	cell number ($\times 10^5$)	Plasmid mixtures and conditions: Y4+EBNA1 (n=1)	Y5+EBNA1 (n=1)	Y6+EBNA1 (n=1)
Tm	10	ND	184	268
	3	242	43	145
	1	66	9	46
	0.3	64	8	18

Note: [a]Tm, medium for T cells. [b]ND, not determined because of too many colony formation.

[0070] 本発明により、iPS細胞の樹立効率を飛躍的に高めることができるので、より効率よくヒトiPS細胞を提供することが可能となる。また、本発明により、従来の方法ではiPS細胞の樹立が極めて困難であった血液細胞からの樹立が効率的に行えるようになったため、本発明はヒトiPS細胞の再生医療への応用において極めて有用である。

[0071] 本発明を好ましい態様を強調して説明してきたが、好ましい態様が変更され得ることは当業者にとって自明であろう。本発明は、本発明が本明細書に詳細に記載された以外の方法で実施され得ることを意図する。したがって、本発明は添付の「請求の範囲」の精神及び範囲に包含されるすべての変更を

含むものである。

[0072] ここで述べられた特許及び特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

[0073] 本出願は米国で出願された米国仮特許出願第 61/650,694号（出願日：２０１２年５月２３日）を基礎としており，その内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

[請求項1] 以下の(1)および(2)：

(1)核初期化因子をコードする核酸を搭載した１以上のエピソーマルベクター；および

(2)(1)とは別のEBNA-1をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクター

を体細胞に導入する工程を含む、iPS細胞の製造方法。

[請求項2] さらに、p53の機能阻害物質をコードする核酸をエピソーマルベクターの形態で導入する、請求項1に記載の方法。

[請求項3] 前記p53の機能阻害物質が、p53 shRNAまたはp53のドミナントネガティブ変異体である、請求項2に記載の方法。

[請求項4] 前記p53のドミナントネガティブ変異体がp53DDである、請求項3に記載の方法。

[請求項5] 前記核初期化因子が、Octファミリー、Klfファミリー、Soxファミリー、Mycファミリー、LinファミリーおよびGlisファミリーのメンバーからなる群から選択される１以上である、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。

[請求項6] 前記核初期化因子が、Oct3/4、Klf4、Sox2、L-MycおよびLin28である、請求項5に記載の方法。

[請求項7] 前記核初期化因子が、Oct3/4、Klf4、Sox2、L-Myc、Lin28およびGlis1である、請求項6に記載の方法。

[請求項8] 前記核初期化因子をコードする核酸が、2つまたは3つのエピソーマルベクターに分かれて搭載されている、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

[請求項9] 前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターが、pCEB-hSK-OおよびpCEB-hUL-Gである、請求項1に記載の方法。

[請求項10] 前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターが、pCXLE-hOCT3/4、pCXLE-hSKおよびpCXLE-hULである、請求項1に記

載の方法。

[請求項11] 前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターが、pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSKおよびpCXLE-hULである、請求項2に記載の方法。

[請求項12] 前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルプラスミドベクターが、pCE-hOCT3/4-shp53、pCE-hSKおよびpCE-hULである、請求項2に記載の方法。

[請求項13] 前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルプラスミドベクターが、pCE-hOCT3/4、pCE-hSKおよびpCE-hULであり、前記p53の機能阻害物質をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターがpCE-mp53DDである、請求項2に記載の方法。

[請求項14] 前記EBNA-1をコードする核酸を搭載したプラスミドベクターが、pCXWB-EBNA1である、請求項9～11のいずれか1項に記載の方法。

[請求項15] 前記EBNA-1をコードする核酸を搭載したプラスミドベクターが、pCXB-EBNA1である、請求項12または13に記載の方法。

[請求項16] 前記体細胞が、ヒト線維芽細胞（HDF）または血液細胞から選択される、請求項1～15のいずれか1項に記載の方法。

[請求項17] 前記血液細胞が、末梢血単核球細胞（PMNC）である、請求項16に記載の方法。

[請求項18] 前記末梢血単核球細胞（PMNC）が、T細胞である、請求項17に記載の方法。

[請求項19] iPS細胞の樹立効率改善法であって、核初期化因子をコードする核酸を搭載した1以上のエピソーマルベクターを体細胞に導入する工程において、該ベクターとともに、EBNA-1をコードする核酸を搭載した別のエピソーマルベクターを体細胞に導入することを特徴とする、方法。

[請求項20] さらに、p53の機能阻害物質をコードする核酸をエピソーマルベクターの形態で導入する、請求項19に記載の方法。

[請求項21] 前記p53の機能阻害物質が、p53 shRNAまたはp53のドミナントネガティブ変異体である、請求項20に記載の方法。

[請求項22] 前記p53のドミナントネガティブ変異体がp53DDである、請求項21に記載の方法。

[請求項23] EBNA-1をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターを含む、iPS細胞樹立効率改善剤。

[請求項24] iPS細胞を製造するためのキットであって、以下の(1)および(2)：

(1)核初期化因子をコードする核酸を搭載した１以上のエピソーマルベクター；および

(2)(1)とは別のEBNA-1をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクター

を含む、キット。

[請求項25] p53の機能阻害物質をコードする核酸を、エピソーマルベクターの形態で含む、請求項24に記載のキット。

[請求項26] 前記p53の機能阻害物質が、p53 shRNAまたはp53のドミナントネガティブ変異体である、請求項25に記載のキット。

[請求項27] 前記p53のドミナントネガティブ変異体がp53DDである、請求項26に記載のキット。

[請求項28] 前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターが、pCEB-hSK-OおよびpCEB-hUL-Gである、請求項24に記載のキット。

[請求項29] 前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターが、pCXLE-hOCT3/4、pCXLE-hSKおよびpCXLE-hULである、請求項24に記載のキット。

[請求項30] 前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターが、pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSKおよびpCXLE-hULである、請求項25に記載のキット。

[請求項31] 前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルプラスミドベクターが、pCE-hOCT3/4-shp53、pCE-hSKおよびpCE-hULである、

請求項25に記載のキット。

[請求項32] 前記核初期化因子をコードする核酸を搭載したエピソーマルプラスミドベクターが、pCE-hOCT3/4、pCE-hSKおよびpCE-hULであり、前記p53の機能阻害物質をコードする核酸を搭載したエピソーマルベクターがpCE-mp53DDである、請求項25に記載のキット。

[請求項33] 前記EBNA-1をコードする核酸を搭載したプラスミドベクターが、pCXWB-EBNA1である、請求項28～30のいずれか1項に記載のキット。

[請求項34] 前記EBNA-1をコードする核酸を搭載したプラスミドベクターが、pCXB-EBNA1である、請求項31または32に記載のキット。

[請求項35] 請求項1～18のいずれか1項に記載の方法により得られるiPS細胞に分化処理を行い、体細胞に分化させることを含む、体細胞の製造方法。