

明 細 書

発明の名称： ナイーブ型多能性幹細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、ナイーブ型多能性幹細胞の製造方法に関する。本発明は、特に、高い効率で、プライム型多能性幹細胞から、移植可能な安全性を備えたナイーブ型多能性幹細胞を製造する方法に関する。

背景技術

[0002] ヒトiPS/ES細胞は通常プライム型と呼ばれる着床後エピブラストに似た状態である。一方、ナイーブ型iPS/ES細胞は、より未分化な状態であり、例えば、胎盤などの胚体外組織への分化が可能と考えられる。そのため、ナイーブ型iPS/ES細胞は、ヒトの初期胚の研究や移植医療に有用であると考えられている。また、ナイーブ型iPS/ES細胞を用いることで、現在のプライム型iPS細胞が抱える分化抵抗性の課題の克服が期待できると考えられている。

[0003] 従来、プライム型多能性幹細胞中で遺伝子KLF2、NANOGを発現させることで、プライム型からナイーブ型へ変換できることが知られている（例えば、非特許文献1）。また、近年、プライム型多能性幹細胞に、所定の低分子化合物を加えることによるプライム型からナイーブ型へ変換する方法が開発されている（例えば、非特許文献2、3）。これらの低分子化合物を加える方法は、ケミカルリセッティング法とも呼ばれており、遺伝子を導入する必要がなくゲノムへの変異のリスクが低い点ヒトへの応用へつなげやすい点、培地に加えるだけで済むため手法が簡便である点、低分子化合物は大量に作製しやすい点コストと入手性に優れる点で、有利である。しかし、非特許文献2、3に開示された方法はナイーブ化に数回の継代を必要とするため長期間がかかり、ナイーブ化の効率が著しく悪いという問題がある。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Takashima et al., Cell, 158, 1254-1269 (2014).

非特許文献2: Guo et al., Development. 144, 2748-2763 (2017).

非特許文献3: Szczerbinska et al., Stem Cell Rep. 13, 612-626 (2019).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 今後、研究のみならず、移植医療などの用途を念頭に、より効率的に、より安全にナীব型多能性幹細胞を得る方法が必要とされている。

[0006] 本発明者らは鋭意検討の結果、遺伝子導入や、従来技術によるケミカルリセティング法で用いられるバルプロ酸などの低分子化合物を使用することなく、ナীব型多能性幹細胞を製造することが可能な新規の方法を見出した。また、この新規の方法で用いる物質が、従来のケミカルリセティング法によるナীব型多能性幹細胞の産生を促進することも見出した。そして、フィーダー細胞を用いることなく、かつ比較的短期間で、プライム型多能性幹細胞から、より多くのナীব型多能性幹細胞株を製造することに想到し、本発明を完成するに至った。

[0007] すなわち、本発明は、以下の態様を含む。

[1] ナীব型多能性幹細胞の製造方法であって、以下の工程：

(1) プライム型多能性幹細胞を、プライム型多能性幹細胞培養培地で培養する工程；

及び

(2) 前記工程(1)で得られた細胞を、ナীব型多能性幹細胞培養培地で培養する

工程

を含み、以下の工程：

(i) 前記工程(1)または(2)で培養される細胞に、let-7 miRNA familyに属するmiRNA 及びその類似配列から選択されるmiRNAを導入し、もしくは当該細胞で当該miRNAを発現させる工程；または、

前記工程(1)または(2)で培養される細胞に、let-7 miRNA familyの標的タンパク質の活性抑制物質を導入し、もしくは当該細胞で当該活性抑制

物質を発現させる工程；及び

(i i) 前記工程 (1) または (2) で培養される細胞に骨形成タンパク質を導入し、当該細胞で当該骨形成タンパク質を発現させ、もしくは、 (1) または (2) の培地に当該骨形成タンパク質を添加する工程；または、

前記工程 (1) または (2) の培地に、骨形成タンパク質活性化物質を添加する工程

の少なくとも一方を含む、方法。

[2] 前記工程 (i i) の前または同時に、 (1) または (2) の培地に、Wnt阻害剤を添加する工程をさらに含む、[1] に記載の方法。

[3] (A) 前記工程 (2) のナイーブ型多能性幹細胞培養培地がヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を含まず、前記工程 (i) を含む、[1] に記載の方法。

[4] 前記工程 (i i) をさらに含む、[3] に記載の方法。

[5] (B) 前記工程 (2) のナイーブ型多能性幹細胞培養培地がヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を含み、前記工程 (i) または工程 (i i) を含む、[1] に記載の方法。

[6] 前記ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が、バルプロ酸を含む、[1] に記載の方法。

[7] 前記工程 (i) において、前記let-7 miRNA familyに属するmiRNA及びその類似配列が、miR-98-5p, let-7a-5p, let-7b-5p, let-7c-5p, let-7e-5p, let-7f-5p, let-7g-5p, let-7i-5p、またはこれらと80%以上の配列同一性を有するmiRNAから選択される、[1] に記載の方法。

[8] 前記工程 (i i) において、前記骨形成タンパク質が、BMP2、またはBMP4から選択される、[1] に記載の方法。

[9] 前記工程 (i i) において、前記骨形成タンパク質活性化物質が、SB-4、及びイソリキリチゲニンから選択される、[5] に記載の方法。

[1 0] 前記工程 (i) において、前記let-7 miRNA familyに属するmiRNAの標的タンパク質が、NR6A1及び／またはTRIM71である、[1] に記載の方法

。

〔11〕 前記工程（2）で得られた細胞を、Tankyrase/Wnt/ β -catenin 阻害剤、及びPKC阻害剤を含むナイーブ型多能性幹細胞培養培地でさらに培養する工程（3）をさらに含む、〔1〕に記載の方法。

〔12〕 前記工程（3）で得られた細胞を、〔11〕に記載のナイーブ型多能性幹細胞培養培地で継代培養する工程をさらに含む、〔11〕に記載の方法。

発明の効果

〔0008〕 本発明に係るナイーブ型多能性幹細胞の製造方法によれば、マウス由来であるfeeder細胞を用いることなく、安全に、かつ短期間で、プライム型多能性幹細胞からナイーブ型多能性幹細胞を製造することができる。また、従来、非特許文献2、3等から知られているケミカルリセティング法によるナイーブ化効率（2％程度）と比較して、2週間程度のナイーブ化処理で、最大で80％と劇的にナイーブ型多能性幹細胞の割合を増大させることができる。本発明に係る製造方法では、遺伝子導入を必須とする工程を避けて、RNA分子や、タンパク質、低分子化合物を用いて、ナイーブ化の促進を達成することも可能である。これにより、ヒトの初期胚の研究促進に寄与することができる。また、ナイーブ型多能性幹細胞が胎盤などの多様な細胞に分化可能であると考えられることから、現在のプライム型多能性幹細胞を用いた細胞治療よりも、より幅広い細胞治療を実現できるようになる。

図面の簡単な説明

〔0009〕〔図1〕図1は、プライム型及びナイーブ型のH9 EOS細胞に、miRNA-responsive RNA OFF switchを導入し、フローサイトメトリーにより分析した翻訳活性（Translation Efficacy：TE）の結果を示す図である。矢印で示すドットがmiR-98-5pであり、破線に囲まれた領域は、プライム型に比べナイーブ型の翻訳活性の減少幅が $2^{(1.1)}$ 倍以内の差を示す領域である。

〔図2〕図2は、実施例におけるナイーブ細胞の製造方法における、ケミカルリセティングの培養スキームを説明した図である。ナイーブ細胞特異的にGFP

を発現するH9E0S の模式図と、Day 0からDay 14における培地を示す。

[図3]図3は、図2のDay 1において、候補miRNA mimicをプライム型H9E0Sにトランスフェクションした場合の、候補miRNA mimicによるリセッティング効率を示す。候補miRNA mimicは、図1においてプライム型とナীব型の間で $2^{(1.1)}$ 倍以上の活性差を示すmiRNAとして抽出されたmiRNA mimicであり、ctrl_mimicはいずれのとも反応しないmimicであり、chemicalはDay 1においてmiRNAを添加しなかった（ケミカルリセッティングのみ）結果である。

[図4]図4は、miR-98-5pの類似配列をプライム型H9E0Sにトランスフェクションした場合の類似配列によるリセッティング効率を示す。

[図5]図5は、図2のDay 1において、22種類の遺伝子をそれぞれコードするドキシサイクリン誘導可能なpiggyBacベクターを13.6ng/wellずつ合計 300ng/wellと、トランスポザーゼ200ng/wellとを、H9E0Sにトランスフェクションした場合（all mix）のリセッティング効率、tagBFPをトランスフェクションした場合（tagBFP）のリセッティング効率、及びトランスフェクションを行わなかった場合（untransfected）のリセッティング効率を示す。

[図6]図6は、図2のDay 1において、22種のベクターから、1種類ずつ除いてH9E0Sにトランスフェクションした場合のリセッティング効率を、トランスフェクションを行わなかった場合のリセッティング効率に対して規格化した値を示す。

[図7]図7は、図2のDay 1において、hBMP2をコードするプラスミドベクターのH9E0Sへの導入量を変化させた場合のリセッティング効率を示す。

[図8]図8は、hBMP2をコードするプラスミドベクターのH9E0Sへの導入量を300ngとした場合（上段）及び15ngとした場合（下段）の、Day 2、Day 5、Day 7、及びDay 14の位相差顕微鏡によるイメージである。

[図9A]図9Aは、hBMP2をコードするプラスミドベクターのH9E0Sへの導入量を300ngとした場合（上段）及び15ngとした場合（下段）の、Day 1、Day 2、Day 3、及びDay 5の位相差顕微鏡によるイメージである。

[図9B]図9Bは、hBMP2をコードするプラスミドベクターのH9E0Sへの導入量

を300ngとした場合（上段）及び15ngとした場合（下段）の、Day 7、Day 12、及びDay 14 の位相差顕微鏡によるイメージである。

[図10]図10は、図2のDay 3-5において、SB-4、4-ヒドロキシカルコン（HyCh）、及びイソリキリチゲニン（IsoLiq）を、1 μ M、5 μ M、または10 μ Mとなるように培地に添加した場合のH9E0Sのリセッティング効率を、これらの小分子添加を行わなかった場合（Chemical only）のH9E0Sのリセッティング効率に対して規格化した値を示す。

[図11]図11は、図2のDay 3-5において、SB-4を10 μ Mとなるように培地に1日1回、添加した場合のDay 14における、H9E0Sの位相差顕微鏡によるイメージ（上左）及び蛍光イメージ（上右）、SB-4を添加しなかった場合（Chemical only）のDay 14における、H9E0Sの位相差顕微鏡によるイメージ（下左）及び蛍光イメージ（下右）を示す。

[図12]図12は、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤であるバルプロ酸（valproic acid: VPA）をcRM-1に加えた場合（VPA+）及び加えなかった場合（VPA-）において、H9E0Sにトランスフェクションした物質、または培地に添加した物質と添加のタイミングによる、リセッティング効率の相違を表すグラフである。miR-98-5p、またはctrl_mimic の添加のタイミングは、図2のDay 1とした。組み換えヒト骨形成タンパク質（BMP2（rhBMP2）またはBMP4（rhBMP4））の培地への添加のタイミングは、Day 0（0）、Day 1（1）、Day 2（2）、Day 3（3）、及び／またはDay 4（4）とし、グラフ中、カッコ内の数字0～4の併記は、当該数字に対応するタイミング（Day）で複数回にわたって、BMPを添加したことを示す。

[図13]図13は、図2のDay 1において、miR-98-5p、またはctrl_mimicをH9E0Sにトランスフェクションした場合、及びDay 2において、rhBMP4を培地に添加した場合の、Day 14におけるH9E0Sの位相差イメージ（左パネル）及び蛍光イメージ（右パネル）を示す。

[図14]図14は、図2のDay 1において、let-7 miRNA familyの標的となる細胞内在性のタンパク質に対するsiRNAをH9E0Sにトランスフェクションした場

合のリセッティング効率を、EGFP positive細胞の割合で示したグラフである。All siRNAは、20種全てのsiRNAをトランスフェクションした場合を示し、miR-98-5p、ctrl_mimicは、それぞれ、図2のDay 1において、miR-98-5p、またはctrl_mimicをH9E0Sにトランスフェクションした場合、chemicalは、siRNAやmiR-98-5p、ctrl_mimicをトランスフェクションしなかった場合を表す。いずれも、Day 2において、VPAを含む培地に交換し、VPAの存在下で培養した。[図15]図15は、siRNAについてNR6A1を詳細に検討した結果であって、図2のDay 1において、miR-98-5p、ctrl_mimic、siRNA_NR6A1をH9E0Sにトランスフェクションした場合のリセッティング効率、何も添加しなかった場合（Chemical only）のリセッティング効率を示す。24-well plateでn=3で実施した。

[図16]図16は、AdiPSのiPS細胞、及びH1、H9E0S、H9の各ES細胞を用い、VPAを含有するcRM-1を用いて培養を行った場合のリセッティング効率を示すグラフである。

[図17]図17は、BMP及び／またはWnt阻害剤を添加した場合のリセッティング効率を示すグラフである。Day 2において、VPAを含むcRM-1に交換し、VPAの存在下で培養した。BMP及び／またはWnt阻害剤の培地への添加のタイミングは、Day 0 (0)、Day 1 (1)、及び／またはDay 2 (2)とし、グラフ中、カッコ内の数字0～2の併記は、当該数字に対応するタイミング（Day）で複数回にわたって、BMP及び／またはWnt阻害剤を培地に添加したことを意味する。

[図18]図18は、Day1に、miRNA、siRNA、またはBMPを添加した場合のリセッティング効率を示すグラフである。Day 2において、VPAを含むcRM-1に交換し、VPAの存在下で培養した。

[図19]図19は、Day1に、miRNA、siRNA、及び／またはBMPを添加した場合のリセッティング効率を示すグラフである。Day 2において、VPAを含まないcRM-1に交換し、VPAの非存在下で培養した。

発明を実施するための形態

[0010] 以下に、本発明の実施の形態を説明する。ただし、本発明は、以下に説明する実施の形態によって限定されるものではない。

[0011] 本発明は、一実施形態によれば、ナীব型多能性幹細胞の製造方法に関する。ナীব型多能性幹細胞の製造方法は、以下の工程を含む。

(1) プライム型多能性幹細胞を、プライム型多能性幹細胞培養培地で培養する工程；及び

(2) 前記工程(1)で得られた細胞を、ヒストン脱アセチル化酵素(Histone Deacetylase: HDAC)阻害剤を含まない、もしくはHDAC阻害剤を含むナীব型多能性幹細胞培養培地で培養する工程。

前記工程(1)または(2)は、さらに、以下の工程：

(i) 前記工程(1)または(2)で培養される細胞に、let-7 miRNA familyに属するmiRNA 及びその類似配列から選択されるmiRNAを導入し、もしくは当該細胞で当該miRNAを発現させる工程；または、

前記工程(1)または(2)で培養される細胞に、let-7 miRNA familyの標的タンパク質の活性抑制物質を導入し、もしくは当該細胞で当該活性抑制物質を発現させる工程；

及び

(ii) 前記工程(1)または(2)で培養される細胞に骨形成タンパク質を導入し、当該細胞で当該骨形成タンパク質を発現させ、もしくは、(1)または(2)の培地に当該骨形成タンパク質を添加する工程；または、

前記工程(1)または(2)の培地に、骨形成タンパク質活性化物質を添加する工程

から選択される少なくとも一方の工程を含む。

[0012] 本実施形態により製造されるナীব型多能性幹細胞は、基底状態と呼ばれる未分化で安定した状態にある多能性幹細胞であり、リセット細胞とも呼ばれる。ナীব型多能性幹細胞は、胎盤を含めた種々の細胞への分化能を有する。製造された細胞が、ナীব型多能性幹細胞であることは、ナীব型多能性幹細胞のマーカーにより確認することができる。マーカーとして

は、例えば、SUSD2、Klf17、CD75、Nanogが挙げられるが、これらには限定されない。また、qPCR及び免疫染色により確認することもできる。本発明の工程を実施した結果、得られる多能性幹細胞集団の中には、ナীব型多能性幹細胞以外の細胞が含まれている場合もある。

[0013] 工程（１）

本実施形態による製造方法の出発物質は、プライム型多能性幹細胞であってよい。プライム型多能性幹細胞は、特には、霊長類の多能性幹細胞であってよく、ヒト、サル、オランウータン、チンパンジー等が挙げられるがこれらには限定されない。再生医療における移植用細胞を製造する目的では、好ましくはヒト多能性幹細胞を用いることができる。創薬や実験用の細胞を製造する目的では、任意の霊長類の多能性幹細胞を用いることができる。プライム型多能性幹細胞は、ヒトなどの霊長類の体細胞由来、または生体分泌由来の細胞であってよく、体細胞としては、通常の体細胞のほか、血液に含まれる細胞、尿に含まれる細胞（尿細管や尿道由来の細胞）が挙げられる。

[0014] 多能性幹細胞としては、胚性幹（ES）細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹（ntES）細胞、精子幹細胞（「GS細胞」）、胚性生殖細胞（「EG細胞」）、人工多能性幹（iPS）細胞などが挙げられる。好ましくは、人工多能性幹（iPS）細胞である。

[0015] 従来、一般的な製造方法により得られる霊長類の多能性幹細胞は、プライム型を示す。出発物質として使用する多能性幹細胞が、プライム型多能性幹細胞であることは、アルカリホスファターゼ染色や、一般的な多能性幹細胞のマーカーにより確認することができる。マーカーとしては、例えば、Nanog、Sox2、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81などが挙げられるが、これらには限定されない。使用するプライム型多能性幹細胞の集団中に、ナীব型多能性幹細胞が含まれていても、本発明の実施上は問題がない。

[0016] 工程（１）のプライム型多能性幹細胞培養培地は、多能性を維持したまま、当該プライム型多能性幹細胞の増殖を可能にする培地を用いることができ

る。このような多能性幹細胞培養培地としては、基礎培地に対し、さらにbFGF（塩基性繊維芽細胞成長因子）を含む培地であってよい。基礎培地とは、動物細胞の培養に通常用いられる培地であって、例えば、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、Glasgow's Minimal Essential 培地（GMEM）、Improved MEM Zin Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle MEM培地、 α MEM培地、DMEM培地、F-12培地、DMEM/F12培地、IMDM/F12培地、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、Neurobasal培地及びこれらの混合培地を挙げることができる。例えば、基礎培地に対し、bFGFと20種の必須アミノ酸、10種のビタミン（L-Ascorbic Acid, Cobalamin, Biotin, Folic Acid, I-inositol, Niacinamide, D-Calcium Pantothenate, Pyridoxine Hydrochloride, Riboflavin and Thiamine Hydrochloride）、5つのミネラル（Cupric Sulfate, Ferric Sulfate, Ferric Nitrate, Zinc Sulfate and Sodium selenite）を含む培地を用いることが好ましい（Scientific Reports volume 4, Article number: 3594（2014））。特に、ヒトへの移植用途のナイーブ型多能性幹細胞を製造する場合には、フィーダー細胞を含まないことが好ましい。マウス由来のフィーダー細胞の混入を避けるためである。フィーダーフリーでの培養に適した市販の多能性幹細胞培養培地としては、StemFit（登録商標）AK02N、またはAK03N（味の素株式会社製）を用いることができるが、特定の培地には限定されない。

- [0017] プライム型多能性幹細胞培養培地には、細胞死を抑制するため、ROCK阻害剤を添加することができる。ROCK阻害剤は、Rho-キナーゼ（ROCK）の機能を抑制できるものである限り特に限定されず、例えば、Y-27632（例、Ishizaki et al., Mol. Pharmacol. 57, 976-983（2000）；Narumiya et al., Methods Enzymol. 325, 273-284（2000）参照）、Fasudil/HA1077（例、Uenata et al., Nature 389: 990-994（1997）参照）、H-1152（例、Sasaki et al., Pharmacol. Ther. 93: 225-232（2002）参照）、Wf-536（例、Nakajima et al., Cancer Chemother Pharmacol. 52(4): 319-324（2003）参照）およびそれらの誘導体、ならびにROCKに対するアンチセンス核酸、RNA干渉誘導性核酸（例、si

RNA)、ドミナントネガティブ変異体、およびそれらの発現ベクターが挙げられる。また、ROCK阻害剤としては他の公知の低分子化合物も使用できる(例えば、米国特許出願公開第2005/0209261号、同第2005/0192304号、同第2004/0014755号、同第2004/0002508号、同第2004/0002507号、同第2003/0125344号、同第2003/0087919号、国際公開第2003/062227号、同第2003/059913号、同第2003/062225号、同第2002/076976号、同第2004/039796号参照)。本発明では、1種または2種以上のROCK阻害剤が使用され得る。好ましいROCK阻害剤としては、Y-27632が挙げられる。ROCK阻害剤の濃度は、使用するROCK阻害剤に応じて当業者により適宜選択可能であるが、例えば、ROCK阻害剤としてY-27632を用いる場合、0.1 μ Mから100 μ M、好ましくは1 μ Mから50 μ M、さらに好ましくは5 μ Mから20 μ Mである。ROCK阻害剤を含む培地で一定期間培養した後、ROCK阻害剤を含まない培地で一定期間培養することが好ましい。

[0018] 工程(1)は、例えば1日から4日程度、好ましくは1日から3日程度、さらに好ましくは2日程度にわたって行うことができる。最も好ましい態様においては、ROCK阻害剤を添加したプライム型多能性幹細胞培養培地で約1日培養する工程と、ROCK阻害剤を添加しないプライム型多能性幹細胞培養培地で約1日培養する工程とをこの順に含む。しかし、ROCK阻害剤を添加しないプライム型多能性幹細胞培養培地で約1日培養する工程は、省略することができる。

[0019] 工程(2)

次いで、前記工程(1)で得られた細胞を、HDAC阻害剤を含まない、もしくはHDAC阻害剤を含むナイーブ型多能性幹細胞培養培地で培養する。以下、工程(2)においてHDAC阻害剤を含まないナイーブ型多能性幹細胞培養培地で培養する製造方法を方法(A)、工程(2)においてHDAC阻害剤を含むナイーブ型多能性幹細胞培養培地で培養する製造方法を方法(B)として説明する。

[0020] 方法(A)、及び(B)において、工程(2)で使用されるナイーブ型多能性幹細胞培養培地は、プライム型多能性幹細胞からナイーブ型多能性幹細胞

を誘導する際に使用する誘導培地と、誘導後の細胞を維持する維持培地の両者を含む概念である。本明細書において、HDAC阻害剤を含むナイーブ型多能性幹細胞培養培地を「ナイーブ型多能性幹細胞誘導培地」と指称し、HDAC阻害剤を含まないナイーブ型多能性幹細胞培養培地を「ナイーブ型多能性幹細胞維持培地」と指称することがある。

[0021] ナイーブ型多能性幹細胞培養培地は、基礎培地に対し、LIF (Leukemia inhibitory factor)、MEK阻害剤、GSK3阻害剤、cAMP産生促進剤、TGF- β 阻害剤、およびPKC阻害剤、Tankyrase/Wnt/ β -catenin 阻害剤から選択される1以上の化合物を含めた培地を用いることができる。ナイーブ用培地は、特にLIFを含むことが好ましく、さらにLIFおよびGSK3阻害剤を含むことが好ましい。LIFは、hLIFであることが好ましい。ナイーブ用培地はまた、bFGFを実質的に含まないことが好ましい。培地中のLIFの濃度は、1 ng/mlから100 ng/ml、または5 ng/mlから50 ng/mlであってよく、例えば約10 ng/mlである。工程(2)では、特に、基礎培地に対し、LIF、MEK阻害剤を含む培地を用いることが好ましい。

[0022] ナイーブ型多能性幹細胞培養培地の基礎培地としては、特に限定されず、例えば、神経分化培地であるNDiff 227培地や、N2B27培地(DMEM/F12培地にN2サプリメントを添加したN2培地と、Neurobasal培地にB27サプリメントを添加したB27培地とを1:1に混合した培地)に、非必須アミノ酸(NEAA)、L-グルタミン、2-メルカプトエタノール、抗生物質(例えば、ストレプトマイシン、ペニシリン、ピューロマイシン、マイトマイシン)、ウシ血清アルブミン(BSA)等の添加成分を任意に組み合わせて添加した培地が挙げられる。

[0023] MEK阻害剤としては、特に限定されないが、例えば、PD0325901(N-[(2R)-2,3-ジヒドロキシプロポキシ]-3,4-ジフルオロ-2-[(2-フルオロ-4-ヨードフェニル)アミノ]-ベンズアミド;CAS登録番号:391210-10-9)、UO126(1,4-ジアミノ-2,3-ジシアノ-1,4-ビス[2-アミノフェニルチオ]ブタジエン;CAS登録番号:1

09511-58-2)、PD98059 (2-(2-アミノ-3-メトキシフェニル)-4 H-1-ベンゾピラン-4-オン; C A S登録番号: 167869-21-8)、PD184352 (2-(2-クロロ-4-ヨードフェニルアミノ)-N-シクロプロピルメトキシ-3, 4-ジフルオロベンズアミド; C A S登録番号: 212631-79-3が挙げられる。なかでも、PD0325901が好ましい。M E K阻害剤としてPD0325901を用いる場合、その培地中の濃度は、50 nMから100 μ M、または100 nMから10 μ Mであり得、例えば約1 μ Mである。

[0024] GSK3阻害剤としては、特に限定されないが、例えば、CHIR99021 (6-[2-[4-(2, 4-ジクロロフェニル)-5-(5-メチル-1 H-イミダゾール-2-イル)-2-ピリミジニル]アミノ]エチル]アミノ)-3-ピリジンカルボニトリル; C A S登録番号: 252917-06-9)、BI0 (6-ブロモインジルピン-3'-オキシム; C A S登録番号: 667463-62-9)、Kenpauillone (9-ブロモ-7, 12-ジヒドロインドロ[3, 2-d][1]ベンズアゼピン-6 (5 H)-オン; C A S登録番号: 142273-20-9)、IM-16 (3-(4-フルオロフェニルエチルアミノ)-1-メチル-4-(2-メチル-1 H-インドール-3-イル)-1 H-ピロール-2, 5-ジオン; C A S登録番号: 1129669-05-1)が挙げられる。なかでも、CHIR99021が好ましい。GSK3阻害剤としてCHIR99021を用いる場合、その培地中の濃度は、50 nMから100 μ M、または100 nMから10 μ Mであり得、例えば約1 μ Mである。

[0025] cAMP産生促進剤としては、特に限定されないが、例えば、フォルスコリンが挙げられる。cAMP産生促進剤としてフォルスコリンを用いる場合、その培地中の濃度は、50 nMから100 μ M、または100 nMから10 μ Mであり得、例えば約1 μ Mである。

[0026] TGF- β 阻害剤としては、特に限定されないが、例えば、A83-01 (3-(6-メチル-2-ピリジニル)-N-フェニル-4-(4-キノリニル)-1 H-ピラゾール-1-カルボチオアミド)、SB431542 (4-[4-(1, 3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジニル)-1 H-イミダゾール-2-イル]-ベンズアミド)が挙げられる。なかでも、A83-01が

好ましい。TGF- β 阻害剤としてA83-01を用いる場合、その培地中の濃度は、10 nMから100 μ M、または100 nMから10 μ Mであり得、例えば約1 μ Mである。

[0027] PKC阻害剤としては、特に限定されないが、例えば、Go6983 (3- [1- [3- (ジメチルアミノ) プロピル] -5-メトキシ-1 H-インドール-3-イル] -4- (1 H-インドール-3-イル) -1 H-ピロール-2, 5-ジオン; C A S登録番号: 133053-19-7)、GF109203X (3- (1- (3-ジメチルアミノ) プロピル) -1 H-インドール-3-イル) -4- (1 H-インドール-3-イル) -1 H-ピロール-2, 5-ジオン; C A S登録番号: 133052-90-1) が挙げられる。なかでも、Go6983が好ましい。PKC阻害剤としてGo6983を用いる場合、その培地中の濃度は、50 nMから100 μ M、または100 nMから10 μ Mであり得、例えば約1 μ Mから3 μ Mである。

[0028] Tankyrase/Wnt/ β -catenin 阻害剤としては、特に限定されないが、例えば、XAV939 (2-(4-トリフルオロメチルフェニル)-7,8-ジヒドロ-5H-チオピラノ [4,3-d]ピリミジン-4(3H)-オン; C A S登録番号: 284028-89-3)、IWT-2、IWP-3、IWP-4が挙げられる。Tankyrase/Wnt/ β -catenin 阻害剤としてXAV939を用いる場合、その培地中の濃度は、0.5 μ Mから100 μ Mであり得、例えば約2 μ Mである。

[0029] ナイーブ型多能性幹細胞培養培地は市販の培地を使用してもよく、例えばt2iLGo (N2B27+PD0325901(1 μ M)+CHIR99021(1 μ M)+LIF+Go6983(2-3 μ M))、5iLAF (N2B27+PD0325901(1 μ M)+CHIR99021(1 μ M)+SB590885 (0.5 μ M)+WH-4-023 (1 μ M)+Y-27632(10 μ M)+LIF+Activin A) またはtt2iLGo (N2B27+PD0325901(1 μ M)+LIF+Go6983(2 μ M)+XAV939(2 μ M)) を好適に用いることができる。

[0030] なお、ナイーブ型多能性幹細胞培養培地とプライム型多能性幹細胞培養培地とは、プライム型多能性幹細胞培養培地はLIFを実質的に含有しない点、及びナイーブ型多能性幹細胞培養培地はbFGFを実質的に含有しない点で、区別することができる。

[0031] 方法（B）では、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤を含むナイーブ型多能性幹細胞誘導培地を使用する。本明細書において、HDAC阻害剤とは、ヒストン脱アセチル化酵素を阻害する、またはその遺伝子を抑制するmiRNA、siRNA、mRNA、及び／または小分子をいう。HDAC阻害剤の具体例としては、バルプロ酸（VPA、別名：2-Propylvaleric acid）、sodium butyrate、suberoylanilide hydroxamic acid、BRD4884（N-（4-アミノ-4'-フルオロ[1, 1'-ビフェニル]-3-イル）テトラヒドロ-2H-ピラン-4-カルボキサミド；CAS登録番号：1404559-91-6）、BRD6688（N-[2-アミノ-5-（4-ピリジニル）フェニル]-1-ピロリジンカルボキサミド；CAS登録番号：1404562-17-9）が挙げられるが、これらには限定されない。HDAC阻害剤が、バルプロ酸などの小分子である場合、培地中の濃度は、例えば、0.1 mMから10 mM程度であってよく、0.5 mMから5 mM程度であることが好ましい。

[0032] 工程（2）における、HDAC阻害剤を含まない、または含むナイーブ型多能性幹細胞培養培地を用いた培養は、例えば、1～5日間行うことができ、特に、3日間行うことが好ましい。以下、HDAC阻害剤を含まないナイーブ型多能性幹細胞維持培養培地で培養する方法（A）と、HDAC阻害剤を含むナイーブ型多能性幹細胞培養培地で培養する方法（B）を、それぞれ詳細に説明する。

[0033] [（A）HDAC阻害剤を用いない製造方法]

以下、HDAC阻害剤を（2）の培地に含めることなく、ナイーブ型多能性幹細胞を製造する方法（A）について、より詳細に説明する。当該方法は、以下の工程を含む。

（1）多能性幹細胞培養培地で、プライム型多能性幹細胞を培養する工程；及び

（2）前記工程（1）で得られた細胞を、HDAC阻害剤を含まないナイーブ型多能性幹細胞培養培地で培養する工程を含み、以下の工程（i）を含む。

（i）前記工程（1）または（2）で培養される細胞に、let-7 miRNA fami

yに属するmiRNA 及びその類似配列から選択されるmiRNAを導入し、もしくは当該細胞で当該miRNAを発現させる工程；または

前記工程（１）または（２）で培養される細胞に、let-7 miRNA familyの標的タンパク質の活性抑制物質を導入し、もしくは当該細胞で当該活性抑制物質を発現させる工程

[0034] 工程（i）に加え、任意選択的に、以下の工程（ii）を含んでもよい。

（ii）前記工程（１）または（２）で培養される細胞に骨形成タンパク質を導入し、当該細胞で当該骨形成タンパク質を発現させ、もしくは、（１）または（２）の培地に当該骨形成タンパク質を添加する工程；または、

前記工程（１）または（２）の培地に、骨形成タンパク質活性化物質を添加する工程を含む。

[0035] 工程（１）、（２）については、上記したとおりであり、（２）で使用するナীব型多能性幹細胞培養培地には、VPA等のHDAC阻害剤を含める必要が無い。

[0036] 工程（i）では、工程（１）または（２）において培養される細胞に、let-7 miRNA familyに属するmiRNA 及びその類似配列から選択されるmiRNAを導入し、もしくは、工程（１）または（２）において培養される細胞において、let-7 miRNA familyに属するmiRNA 及びその類似配列から選択されるmiRNAを発現させる工程を含む。かかる工程に加えて、またはかかる工程に変えて、工程（１）または（２）において培養される細胞に、let-7 miRNA familyの標的タンパク質の活性抑制物質を導入し、もしくは、工程（１）または（２）において培養される細胞において、let-7 miRNA familyの標的タンパク質の活性抑制物質を発現させる工程を含んでもよい。

[0037] let-7 miRNA familyに属するmiRNAとしては、miR-98-5p、let-7a-5p、let-7b-5p、let-7c-5p、let-7e-5p、let-7f-5p、let-7g-5p、let-7i-5pが挙げられる。これらのmiRNA の配列を下記表１に示す。これらの類似配列、特に、これらの配列と、８０％以上、８５％以上、９０％以上、または９５％以上の配列同一性を持つ配列も、let-7 miRNA familyに属するmiRNAと機能の同

一性を維持するため、用いることができる。これらのうち、1種類を添加することもでき、2種類以上を組み合わせで添加することもできる。以下、本明細書において、let-7 miRNA familyに属するmiRNA 及びその類似配列から選択されるmiRNAを、「リセットmiRNA」という場合がある。表1に、リセットmiRNAの具体的な配列を示す。

[0038] [表1]

配列名	配列	配列番号
miR-98-5p	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU	1
let-7a-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	2
let-7b-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	3
let-7c-5p	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	4
let-7e-5p	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	5
let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	6
let-7g-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	7
let-7i-5p	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU	8

[0039] let-7 miRNA familyの標的タンパク質の活性抑制物質は、let-7 miRNA familyの標的タンパク質の発現を抑制し、及び／または標的タンパク質の活性を低減させることができる物質であってよい。let-7 miRNA familyの標的タンパク質としては、NR6A1 (Nuclear Receptor Subfamily 6 Group A Member 1)、TRIM71 (Tripartite Motif Containing 71、別名LIN41)、IGF2BP1 (Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1)、VASH2 (Vasohibin-2)、DPH3 (Diphthamide Biosynthesis 3) が挙げられる。中でも、NR6A1及び／またはTRIM71の活性を抑制することが特には好ましい。

[0040] 活性抑制物質は、特には限定されないが、ロックダウン方法によりタンパク質の発現を抑制することができる物質や、ロックアウト方法によりこれらのタンパク質をコードする遺伝子を改変することができる物質が挙げられる。ロックダウン方法に用いられる物質としては、当該細胞に、標的タンパク質に対するsiRNAや、shRNAをコードするDNA構築物が挙げられる。shRNAをコードするDNA構築物としては、shRNAをコードするプラスミドを用いることが好ましく、薬物による発現誘導可能な、shRNAをコードするプラスミドを用いることが好ましい。ロックアウト方法に用いられる物質としては、CRISPR/Ca

s9によるゲノム編集技術により、標的タンパク質をノックアウトする物質が挙げられる。好ましい態様において、活性抑制物質は、NR6A1をノックダウン可能なsiRNA、及び／またはTRIM71をノックダウン可能なsiRNAであってよい。NR6A1をノックダウン可能なsiRNAは、例えば、NR6A1遺伝子の複数の部位に作用しうる複数種のsiRNAの組み合わせであってよく、例えば、NR6A1遺伝子に対する、4種以上のsiRNAの組み合わせであってよい。このようなsiRNAとしては、市販品を使用することもでき、当業者がNR6A1遺伝子の配列に基づいて、siRNAを適宜設計、合成することもできる。TRIM71についても同様である。

- [0041] 先のリセットmiRNAと、これらのノックダウン可能なsiRNA、及び標的タンパク質の活性抑制物質を総称して、リセットRNAという場合がある。
- [0042] リセットRNAは、人工的に合成し、合成RNA分子の形態で、培養細胞に導入することができる。RNA分子導入法としては、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、遺伝子銃法などが挙げられるが、これらには限定されない。合成RNA分子の導入による利点は、ゲノムへの組み込みがなく、リセットRNAを導入した後の細胞を医療応用などに使用しやすいことが挙げられる。
- [0043] リセットRNAは、ベクターなどのDNA構築物の形態で培養細胞に添加し、リセットRNAを細胞内で生合成させることもできる。リセットRNAの配列をコードする発現ベクターは、当該分野において周知慣用のものを用いることができ、例えば、ウイルスベクター、人工染色体ベクター、プラスミドベクター、トランスポゾンを用いた発現システム（トランスポゾンベクターと呼ばれる場合がある）等が挙げられる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター等が例示される。人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC、PAC）等が挙げられる。プラスミドベクターとし

ては、哺乳動物用プラスミド全般を使用することができ、例えば、エピソーマルベクターであってもよい。トランスポゾンベクターとしては、piggyBacトランスポゾンを用いた発現ベクター等が例示される。DNA構築物の導入法は、RNA分子導入法と概ね同じであってよい。

- [0044] リセットRNAを培養細胞に導入し、もしくはリセットRNAを培養細胞で発現させる時期は、次工程（2）を行う48時間前から工程（2）の培地交換のタイミングと実質的に同時であってよく、（2）を行う48時間前から12時間前とすることが好ましい。したがって、リセットRNAからなるRNA分子を添加する場合には、次工程（2）を行う48時間前から12時間前に培地にRNA分子を導入することができる。リセットRNAをコードするDNA構築物を添加する場合には、それよりもさらに、72時間前から24時間前に培地にDNA構築物を添加することができる。DNA構築物が、薬剤誘導型のshRNAである場合には、事前にDNA構築物を細胞に導入し、miRNA、siRNA、またはshRNAを培養細胞で発現させるべき所望の時点で薬剤を添加することもできる。なお、工程（1）が、ROCK阻害剤を添加しないプライム型多能性幹細胞培養培地で約1日培養する工程を含まない場合、ROCK阻害剤を添加したプライム型多能性幹細胞培養培地にプライム型多能性幹細胞を播種する段階で、リセットRNAを培養細胞にトランスフェクションすることが好ましい。
- [0045] 好ましい実施形態においては、工程（1）が、ROCK阻害剤を添加した多能性幹細胞培養培地で約1日培養する工程（Day 0）と、ROCK阻害剤を添加しない多能性幹細胞培養培地で約1日培養する工程（Day 1）とを順に実施する場合に、ROCK阻害剤を添加しない多能性幹細胞培養培地に交換直後から約5時間後までの間に、リセットRNAを培養細胞に導入し、あるいはリセットRNAを培養細胞で発現させる。この場合の導入量は、例えば、 8×10^4 細胞に対し、1 pmolから10 pmolとすることができる。
- [0046] 方法（A）においては、少なくとも工程（i）を実施し、少なくとも、リセットmiRNA、siRNA、またはshRNAのいずれかを細胞に導入することにより、HDAC阻害剤を使用しなくても、プライム型多能性幹細胞から、ナイーブ型多能

性幹細胞を製造することができる。

- [0047] 任意選択的な工程である工程（i i）は、前記工程（1）または（2）で培養される細胞に、骨形成タンパク質を導入し、もしくは当該細胞で骨形成タンパク質を発現させる、または前記工程（1）または（2）において、培地に、骨形成タンパク質を添加する工程を含む。かかる工程に加えて、またはかかる工程に変えて、前記工程（1）または（2）の培地に、骨形成タンパク質活性化物質を添加する工程を含んでもよい。
- [0048] 骨形成タンパク質（Bone Morphogenetic Proteins：BMP）としては、BMP2、BMP4、またはこれらの類似体もしくは誘導体が挙げられるが、これらには限定されない。好ましくは、BMPは、ヒトBMPであってよい。培地に添加するBMPは、組み換えタンパク質であってもよい。
- [0049] BMPの導入方法は、合成タンパク質分子を直接細胞にトランスフェクションする方法のほか、BMPをコードするmRNAを合成RNA分子の形態で細胞に導入する方法、BMPをコードするDNA構築物を細胞に導入して細胞中で発現させる方法、及びBMPを培地に添加する方法が挙げられる。合成タンパク質分子を直接細胞にトランスフェクションする方法は、任意のトランスフェクション試薬を用いることができる。また、合成RNA分子の導入、DNA構築物の導入については、先の工程（i）と同様であってよい。
- [0050] BMPを導入し、発現させ、または培地に添加する時期は、工程（1）または（2）の任意の時期であってよい。ある実施形態においては、培養開始から、1日から3日以内とすることができ、工程（2）の培養開始から、24時間以内とすることが好ましく、工程（2）の開始と同時にBMPを導入し、発現させ、または培地に添加することがさらに好ましい。導入する物質の形態により、導入時期は異なってもよいが、好ましくは工程（2）の培養開始から、24時間以内に、培地内または培養細胞内においてBMPが活性を持つ状態で存在することが好ましい。この場合の導入量は、例えば、5 ng/mLから100 ng/mLとすることができ、5 ng/mLから10 ng/mLとすることが好ましい。
- [0051] 別の実施形態においては、BMPの導入は、工程（1）の任意の時期、及び工

程（２）の培養開始から２４時間以内とすることができる。特に、工程（１）を２日間にわたって実施する場合は、工程（１）の培養開始直後から３日までの任意の時期とすることができる。この期間に１回のみ、BMPを導入することもでき、２回以上BMPを導入することもでき、複数回にわたって導入する場合には、工程（１）と工程（２）の両方の段階で導入することもできる。

[0052] 工程（１）においてBMPを導入し、発現させ、もしくは添加する場合には、事前にまたは同時に、培地にWnt阻害剤を添加することが好ましい。BMPによる分化誘導を抑制するためである。なお、工程（１）の培養時に少なくとも１回のBMPを導入し、かつ、複数回にわたってBMPを導入する場合には、最初の導入前に、または最初の導入と同時にWnt阻害剤を添加すればよく、それ以降の導入時には、Wnt阻害剤を添加しても、しなくてもよい。Wnt阻害剤の具体例は、ナイーブ型多能性幹細胞培養培地の任意成分として記載したWnt阻害剤と同一の選択肢から選択することができる。特に、IWT-2、IWP-3、IWP-4、またはこれらの任意の組み合わせとすることが好ましいが、これらには限定されない。Wnt阻害剤の添加量は、 $0.1\ \mu\text{M}$ から $100\ \mu\text{M}$ とすることができ、 $0.25\ \mu\text{M}$ から $5\ \mu\text{M}$ とすることが好ましい。Wnt阻害剤を複数回添加する場合も、その添加量は、上記範囲内の濃度を満たすことが好ましい。

[0053] HDAC阻害剤を培地に含めない条件であっても、BMPを添加することで、BMPを添加しない場合と比較して、約７倍程度のリセッティング効率の向上が得られる。

[0054] 工程（１）または（２）の培地に、骨形成タンパク質（BMP）活性化物質を添加する工程では、細胞内在性のBMPもしくは、上記のように外部から添加するBMPの活性を向上させる物質を培地に添加する。BMP活性化物質は、典型的には低分子化合物であってよい。好ましいBMP活性化物質としては、SB-4（C A S登録番号：100874-08-6）、イソリキリチゲニン（C A S登録番号：961-29-5）が挙げられるが、これらには限定されない。

[0055] BMP活性化物質は、工程（１）または（２）の培地に直接添加して用いることができる。添加時期は、任意であってよく、BMPの導入または添加時期、及

び回数と同様であってよい。ある実施形態において、添加時期は、工程（2）の培養開始から、1日から3日以内とすることが好ましく、工程（2）の開始から、3日間連続とすることがさらに好ましい場合がある。また、工程（1）の培地にBMP活性化物質を添加する場合には、事前にまたは同時に、培地にWnt阻害剤を添加することが好ましい。Wnt阻害剤の添加時期及び回数については、BMPの導入、添加の態様と同様であってよい。この場合のBMP活性化物質の導入量は、例えば、7 μ Mから50 μ Mとすることができる。BMP活性化物質を添加する工程を実施することにより、ナイーブ型多能性幹細胞の産生効率を有意に改善することができ、短い培養期間にて、従来と比較して、ナイーブ型多能性幹細胞の産生量を向上させることができる。

[0056] BMPの導入工程、またはBMP活性化物質の添加工程は、いずれか一方の工程のみを行ってもよく、両方の工程を行ってもよい。工程（i i）は、細胞のBMPシグナル伝達経路を活性化させる工程ということもできる。これらの工程を実施することで、細胞のBMPシグナル伝達経路を活性化させ、リセッティング効率を向上させることができる。

[0057] 方法（A）では、HDAC阻害剤、特にVPAを培地に実質的に含めることなく、リセットRNA、及び任意選択的にBMPもしくはBMP活性化物質を、培養の工程中の所定のタイミングで細胞に導入することにより、ナイーブ型多能性幹細胞を製造することができる。特に、リセットRNAと、BMPもしくはBMP活性化物質の両方を導入する実施形態においては、リセットRNAを用いず、及びBMPもしくはBMP活性化物質を用いず、VPAに代表されるHDAC阻害剤を用いた従来の培養を行う場合と比較して、短い培養期間で、ナイーブ型多能性幹細胞の産生量を約2倍から20倍程度向上させることができる。従来、ナイーブ型多能性幹細胞の製造には、遺伝子KLF2、NANOGの導入、またはVPAなどの低分子化合物であるHDAC阻害剤の存在下での培養が必須と考えられてきた。方法（A）によれば、HDAC阻害剤を使用せず、より安価で効率よくナイーブ型多能性幹細胞を産生することができるといった利点がある。

[0058] [(B) HDAC阻害剤を用いる製造方法]

以下、HDAC阻害剤を培地を含め、ナイーブ型多能性幹細胞を製造する方法（方法（B））について、より詳細に説明する。当該方法は、以下の工程を含む。

（１）多能性幹細胞培養培地で、プライム型多能性幹細胞を培養する工程；及び

（２）前記工程（１）で得られた細胞を、HDAC阻害剤を含むナイーブ型多能性幹細胞培養培地で培養する工程を含み、以下の工程（ｉ）または（ｉｉ）を含む。

（ｉ）前記工程（１）または（２）で培養される細胞に、let-7 miRNA familyに属するmiRNA 及びその類似配列から選択されるmiRNAを導入し、もしくは当該細胞で当該miRNAを発現させる工程；または、

前記工程（１）または（２）で培養される細胞に、let-7 miRNA familyの標的タンパク質の活性抑制物質を導入し、もしくは当該細胞で当該活性抑制物質を発現させる工程；

（ｉｉ）前記工程（１）または（２）で培養される細胞に骨形成タンパク質を導入し、当該細胞で当該骨形成タンパク質を発現させ、もしくは、（１）または（２）の培地に当該骨形成タンパク質を添加する工程；または、

前記工程（１）または（２）の培地に、骨形成タンパク質活性化物質を添加する工程

[0059] 任意選択的に、工程（ｉ）及び（ｉｉ）の両方を含んでもよい。

[0060] 方法（B）の工程（ｉ）は、方法（A）の工程（ｉ）と同様にして実施することができ、リセットmiRNAまたは標的タンパク質の活性抑制物質のいずれか一方または両方を、細胞に導入する。

[0061] 方法（B）において、工程（ｉ）のリセットmiRNAを導入する工程を、工程（ｉｉ）を行うことなく単独で実施する場合であっても、ナイーブ型多能性幹細胞の産生効率を有意に改善することができ、短い培養期間にて、従来と比較して、ナイーブ型多能性幹細胞の産生量を少なくとも2倍から20倍近く向上させることができる。また、工程（ｉ）の、標的タンパク質の活性抑制物

質、例えばsiRNAを導入する工程も、工程（i i）を行うことなく単独で実施する場合であっても、ナীব型多能性幹細胞の産生効率を有意に改善することができ、短い培養期間にて、従来と比較して、ナীব型多能性幹細胞の産生量を向上させることができる。

[0062] 方法（B）の工程（i i）は、方法（A）の工程（i i）と同様にして実施することができ、BMPを細胞に導入し、もしくは培地に添加する工程、またはBMP活性化物質を培地に添加する工程のいずれか一方または両方を実施することができる。工程（i i）の、BMP導入工程は、工程（i）を行うことなく単独で実施する場合であっても、ナীব型多能性幹細胞の産生効率を有意に改善することができ、短い培養期間にて、骨形成タンパク質を用いず、VPAを含む培地で行った従来のケミカルリセッティング法と比較して、ナীব型多能性幹細胞の産生量を24倍程度向上させることができる。また、工程（i i）の、BMP活性化物質添加工程も、工程（i）を行うことなく単独で実施する場合であっても、ナীব型多能性幹細胞の産生効率を有意に改善することができ、短い培養期間にて、従来と比較して、ナীব型多能性幹細胞の産生量を3倍程度向上させることができる。

[0063] 方法（B）の工程（i）と（i i）を組み合わせを行ってもよい。特に、工程（i）と（i i）の組み合わせにより、これらの工程を実施しないときと比較して、2倍から20倍程度の産生量の増加が期待できる。

[0064] （A）HDAC阻害剤を用いない製造方法、及び（B）HDAC阻害剤を用いる製造方法の両者において、工程（1）または（2）を実施した後、工程（2）で得られた細胞を、HDAC阻害剤を含まないナীব型多能性幹細胞培養培地（ナীব型多能性幹細胞維持培地）でさらに培養する工程（3）を任意選択的にさらに含んでもよい。工程（3）で用いるナীব型多能性幹細胞維持培地は、基礎培地に対し、LIF、MEK阻害剤、Tankyrase/Wnt/ β -catenin 阻害剤、PKC阻害剤を含むことが好ましい。より具体的には、hLIF、PD0325901、XAV939、Go6983を含むことが好ましい。工程（3）で用いるナীব型多能性幹細胞維持培地は、VPA等のHDAC阻害剤を実質的に含まない。

- [0065] 工程（３）は、例えば、８日から130日間行うことができ、特に、９日間行うことが好ましい。工程（３）を行うことで、Day 5でナীব化が進行し、Day 14でナীব様の細胞塊の形成が観察され、その後培養を続けるとナীব細胞の成熟が進むと考えられる。
- [0066] 工程（１）と（２）、及び任意選択的に工程（３）とのトータル培養期間は、少なくとも14日であって、最大で135 日程度であってよく、約25～30日、例えば28日とすることが最も好ましい。
- [0067] 工程（２）または工程（３）で得られた細胞を、継代培養する工程をさらに含んでもよい。継代培養する場合は、HDAC阻害剤を含まないナীব型多能性幹細胞培養培地（ナীব型多能性幹細胞維持培地）を用いて、1 継代から10～20継代以上程度にわたって培養することができる。これにより、ナীব型多能性幹細胞の含有割合が90 %程度にまで増加した細胞集団を得ることができる。

実施例

- [0068] 以下に、本発明の実施例を用いてより詳細に説明する。以下の実施例は、本発明を限定するものではない。

[0069] [実験方法]

[miRNA-responsive OFF switch ライブラリによる活性測定]

・miRNA-responsive OFF switch ライブラリの作製

T7 promoterを含む合成オリゴDNA (KEC879)、miRNAの相補配列を含む合成オリゴDNA (723種類)、TagBFPのORF、および poly-T を含むリバースプライマー (KEC883) を用いてTOYOBO KOD Plus Neo polymerase でPCR増幅しライブラリのテンプレートを作製した。テンプレートはSpeedBeads magnetic carboxylate modified particles または、Monarch DNA Cleanup Columns, MinElute Reaction Cleanup Kit を用いて精製した。内部標準（リファレンス）となるmRNAはUTRの配列を含む合成オリゴDNA (KEC001、KEC062、KEC063、KEC065)、hmAG1のORF、poly-Tを含むリバースプライマー (KEC883) を TOYOBO KOD Plus Neo polymerase でPCR増幅して作製した。または、pUC19 ベクター

にUTRとhmAG1をクローニングしたプラスミドに対し、T7 promoterとUTRを含む合成オリゴDNA（YF0771）と poly-Tを含むリバープライマー（KEC883）を用いて作製した。実験で使用したプライマーを下記表2に示す。

[0070] [表2]

配列名	配列	配列番号
KEC001_Rev5UTR	CATGGTGGCGACCGGTGTCTTATATTTCTTCTTACTC	9
KEC062_1VT_5prime_UTR	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTAAGAGAGAA AAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACACCGGTCGCCACCATG	10
KEC876_TAP_T7_1G	CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAG	11
KEC063_1VT_3prime_UTR	TCTAGACCTTCTGCGGGGCTTGCCTTCTGGCCATGCCCTTCTTCT CTCCCTTGACCTGTACCTCTTGGTCTTTGAATAAAGCCTGAGTAGG	12
KEC065_Rev3UTR2T20	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTACTCAGGCTTTATTCAAAGACCAAG	13
KEC883_3UTR120A	TT TT TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTACTCAGGCTTTATTCA	14
YF0771-T7_5UTR_fw	ATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAG	15

[0071] mRNAの合成はThermo Fisher ScientificのMEGAscript T7 Transcription Kit（Catalog No. AMB13345）を用いて行った。転写反応はUTPとCTPの代わりに、それぞれPseudouridine-5’-Triphosphate（TriLink, N-1019-10, Ψ）と 5-Methylcytidine-5’-Triphosphate（TriLink, N-1014-10）を用いた。また GTPとCAPアナログ（TriLink, N-7003-10, ARCA）を1:4の割合で混合し、Cap構造を付加した。転写後はTURBO DNase（Thermo Fisher Scientific, AM2238）でテンプレートを分解し、脱リン酸化した後、SpeedBeads magnetic carboxylate modified particles、RNAClean XP（Bechman Coulter, A63987、FavorPrep total RNA extraction column（FAVORGEN, FARBC-C50）のいずれかを用いてmRNAを精製した。

[0072] ・miRNA-responsive OFF switch の導入及び蛍光測定

H9 細胞にEOS(Early Transposon promoter and Oct-4 (Pou5f1) and Sox2 enhancers) を上流に持つGFPと、doxycycline誘導可能なKlf2とNanogをゲノムに挿入した安定株（H9EOS（NK））を用いた。プライム型とナীব型のH9 EOS（NK）細胞を96 well plateに播種し、翌日、miRNA-responsive OFF swit

ch と内部標準となるhmAG1蛍光タンパク質をコードしたmRNAをLipofectamine MessengerMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, LMRNA015) を用いて共導入した。トランスフェクションの翌日にAccumax (Nacalai tesque, 17087-54) を加え37° Cでインキュベートし細胞をプレートから分離し、フローサイトメトリー (LSR fortessa, BD) により分析した。スイッチのtagBFP蛍光値を内部標準hmAG1で割った値を通常のtagBFP mRNAのtagBFP蛍光値を内部標準のhmAG1の蛍光値で割った値で正規化することで、細胞内のmiRNAの活性を定量した。候補miRNAとしては、プライム型細胞と比較して、ナイーブ型細胞において活性が2^{1.1}以上変化しているmiRNAを選別した。

[0073] [細胞培養]

H9E0S、H9E0S、H9、H1の各ES細胞および AdiPSの各iPS細胞はAK02N (Ajino moto, AK02N) でFeeder freeの条件で培養し、数日毎に培地を交換し維持した。継代はPBSで1回洗浄後、Accutase (Fujifilm, 12679-54) を加え10分程度37° Cでインキュベートした後、ピペティングで剥離させた。細胞懸濁液を遠心後、上清を除去しAK02Nに再懸濁した後、細胞数をCountess Automated Cell Counter 等で計測し、Y-27632 (Nacalai tesque, 08945-84) とiMatrix-511 silk (nippi, 387-10131) を含むAK02N培地中に16,000-30,000 cells/well で播種し継代した。

[0074] [ケミカルリセッティング]

継代と同様の手法でH9E0S 及び H9E0S (NK) 細胞を回収し細胞数を計測した後、Y-27632 (Nacalai tesque, 08945-84) とiMatrix-511 silk (nippi, 387-10131) を含むAK02N培地 (プライム型多能性幹細胞培養培地) で希釈しマルチウェルプレートに播種した (G. Guo, et.al., 144, 2748-2763 (2017) の手法を改変)。Day 1でAK02Nで交換し、Day 2 からDay 5までcRM-1 (1 μM PD0325901, 10 ng/mL hLIF, 1 mM VPAを含むNDiff 227 (Takara, Y40002))、またはVPAを含まないcRM-1 (ナイーブ型多能性幹細胞培養培地) で培養し、その後cRM-2 (1 μM PD0325901, 10 ng/mL hLIF, 2 μM Go6983, 2 μM XAV939を含むNDiff 227) でDay 14まで培養した。リセッティング効率率はEGFP

の発現している細胞をnaive細胞とし、フローサイトメーターで細胞数をカウントして定量した。概要を図2に示す。

[0075] [miRNAによるリセッティング効率化]

各miRNAに対応するmimicはmirVana miRNA Mimic (Thermo Fisher Scientific) を用いた。また、コントロールとして、mirVana miRNA Mimic, Negative Control (Thermo Fisher Scientific, 4464058) を用いた。通常のリセッティングの過程のDay 1、2、3、4のいずれかまたは組み合わせで、miRNA mimic をLipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, 13778075) を用いて導入した。その後、通常のリセッティングプロトコルと同様に培養し、Day 14 でEGFP positive細胞をフローサイトメーターで定量した。

[0076] [scRNA-seq]

single cell RNA-seq はChromium Next GEM シングルセル3'ライブラリ&ゲルビーズキットv3.1 for Single Index (10 x Genomics, 1000128) を用い、添付のプロトコルに従って行った。Day 1 でmiRNA mimic (miR-98-5p またはNegativ control) を導入したH9E0S細胞を Day 3、Day 8、Day 14 で回収した。細胞はPBSで2回洗浄した後、Accumax を添加し15 min インキュベート後に、ピペティングで細胞を剥離してPBS (0.04% BSA) に懸濁した。300xg, 5 minで遠心後、上清を除去しさらにPBS (0.04% BSA) にゆっくり懸濁し、洗浄を2-3回繰り返した。細胞懸濁液の細胞数はCountessで測定し、Target cell recovery が5,000 cellsとなるように希釈してscRNA-seqに用いた。ライブラリはAgilent High Sensitivity DNA キット (Agilent, 5067-4626) または、QSepを用いて平均サイズを測定しQubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Q32851) を用いて濃度を測定した。ライブラリはNextSeq 500 (Illumina) またはNovaSeq (Illumina) を用いてシーケンスを行った。解析はCell Rangerを用いて行い、miR-98-5p 導入細胞で特異的に発現量が増大または減少している遺伝子を選別した。

[0077] [プラスミド構築]

リセッティング開始後Day 3の細胞のtotal RNAをmirVana miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, AM1561) を用いて回収した。total RNAからcDNAをReverTra Ace qPCR RT Master Mix(TOYOBO, FSQ-201) を用いて作製した。miR-98-5pで発現量が増大した遺伝子はcDNAからKOD Plus Net DNA polymerase を用いPCRによって増幅した後、InFusion cloning kit (takara, Z9650N) を用い、doxycycline-inducible piggyBac vector (pPB-TRE2-PshAI-HygR) にクローニングした。配列はシーケンサーを用いて確認し、プラスミドはPureYield Plasmid Midiprep System (Promega, A2495) で精製した。pPB-TRE2-ANGPT1-HygR、pPB-TRE2-ANXA2-HygR、pPB-TRE2-BAMBI-HygR、pPB-TRE2-BMP2-HygR、pPB-TRE2-FTL-HygR、pPB-TRE2-GATA2-HygR、pPB-TRE2-HPGD-HygR、pPB-TRE2-ID1-HygR、pPB-TRE2-ID3-HygR、pPB-TRE2-LAYN-variant1-HygR、pPB-TRE2-PCAT14-HygR、pPB-TRE2-PCDH17-HygR、pPB-TRE2-SHISA9-HygR、pPB-TRE2-SLC6A8-HygR、pPB-TRE2-SLC7A3-HygR、pPB-TRE2-SOX2-OT-HygR、pPB-TRE2-SOX4-HygR、pPB-TRE2-SPP1-HygR、pPB-TRE2-TAGLN-HygR、pPB-TRE2-TFAP2A-HygR、pPB-TRE2-TWIST1-HygR、pPB-TRE2-VIM-HygR の22種類の強制発現ベクターを作製した。

[0078] [プラスミドによるリセッティング効率化]

図2のリセッティングプロトコルのDay 1に、22種類のプラスミドを個別または、22種類のプラスミドから1種類ずつ除いて混合し、transposase を発現するプラスミド (pCAG-PBase) と共に、Lipofectamine Stem Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, STEM00003) を用いてトランスフェクションを行った。Day 2-5 の cRM-1 に終濃度 250 ng/mL doxycycline を加え遺伝子発現を誘導した。その後、通常のリセッティングプロトコルと同様に培養し、Day 14 でEGFP positive細胞をフローサイトメーターで定量した。

[0079] [小分子BMPアクチベーターによるリセッティング効率化]

図2のリセッティングプロトコルのDay 2-5 の VPAを含むcRM-1 にSB-4 (Tocris, 6881/50)、4-Hydroxychalcone (富士フイルムワコーケミカル, 320-75521) または、Isoliquiritigenin (Fluorochem, 462708) を加えた。その

後、通常のリセッティングプロトコルと同様に培養し、Day 14 でEGFP positive細胞をフローサイトメーターで定量した。

[0080] [rhBMP4 によるリセッティング効率化]

図2のリセッティングプロトコルのDay 1-5 のいずれかまたは複数について VPAを含む、または含まないcRM-1 に10-100 ng/mL のrhBMP4 (Reprocell, 314-BP-010) を添加した。その後、通常のリセッティングプロトコルと同様に培養し、Day 14 でEGFP positive細胞をフローサイトメーターで定量した。

[0081] [siRNAによるリセッティング効率化]

図2のリセッティングプロトコルのDay 1に、NR6A1、TRIM71、LRIG1、DNMT 3B、IGF2BP1、CACHD1、PCDH8、L1TD1、SFRP1、VASH2、LIN28B、USP44、MAPK1 0、DICER1、DPH3、PRTG、MAPK6、HMGA2、LINC01356 (n491112)、LINC01356 (n549768) のいずれかのsiRNA (いずれもHorizon Discovery/Dharmaconより購入) をLipofectamine RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, 13778075) を用いて導入した。その後、通常のリセッティングプロトコルと同様に培養し、Day 14 でEGFP positive細胞をフローサイトメーターで定量した。

[0082] [SUSD2 染色のプロトコル]

図2のリセッティングプロトコルのDay 14 の細胞にAccuMax を添加し、10~15分程度37℃でインキュベーションし、剥離した。抗体の非特異的な結合を抑えるため1% BSA-PBSに懸濁し、氷上で30分ブロッキングを行い、SUSD2抗体の最終濃度が1:500になるように細胞懸濁液と混ぜて氷上で30分反応を行い、PBSで洗浄後、フローサイトメーターで測定した。

[0083] [結果]

図1は、プライム型及びナイーブ型のH9 EOS (NK2)細胞に、miRNA-responsive RNA OFF switchを導入し、フローサイトメトリーにより分析した翻訳活性 (Translation Efficacy: TE) の結果を示す図である。翻訳活性TEは以下の式により得た。

$$TE = (\text{Switch tagBFP} / \text{hmAG1}) / (\text{Ctrl tagBFP} / \text{hmAG1})$$

ここで、Switch tagBFPは、tagBFP をコードするmiRNA-responsiveRNA OFF switchのtagBFP発現量であり、hmAG1はmiRNA標的部位をもたずhmAG1をコードするmRNAからのhmAG1発現量であり、 Ctrl tagBFPは、miRNA標的部位をもたずtagBFPをコードするmRNAからのtagBFP発現量である。Switch tagBFP/hmAG1の値、及びCtrl tagBFP/hmAG1の値は、フローサイトメーターで測定した。図1に示すように、過去の報告で知られていたmiRNA (naive関連miRNA) に加え、ナイーブ細胞で活性の高い複数の新規のmiRNAが発見された(図1の右下の領域のmRNA)。

[0084] 図3は、図2のDay 1において、候補miRNA mimicをプライム型H9E0Sにトランスフェクションし、cRM-1がVPAを含有する場合の、候補miRNA mimicによるリセッティング効率を、EGFP positive細胞により示す。図3より、候補miRNA A mimicの中で、miR-98-5pのリセッティング効率が有意に大きいことが確認された。図3中、chemicalは、miRNA mimicや、ctrl_mimicによるトランスフェクションを行わず、VPAを含有するcRM-1で培養を行った場合のリセッティング効率を示す。

[0085] 図4は、図2のDay 1において、miR-98-5pの類似配列をプライム型H9E0Sにトランスフェクションし、cRM-1にVPAを含有する場合の類似配列によるリセッティング効率を示す。類似配列としては、let-7a-5p、let-7b-5p、let-7c-5p、let-7e-5p、let-7f-5p、let-7g-5p、let-7i-5p、miR-4500を用いた。図4から、miR-98-5pとシード配列が100%一致する配列は、miR-98-5pと同程度に高いリセッティング効率を示した。同様に、トランスフェクション時期を図2のDay 2、Day 3、またはDay 4とした場合のリセッティング効率も確認した(図示せず)。これらの時期にlet-7 miRNA familyをトランスフェクションした場合のリセッティング効率は、Day 1でトランスフェクションした場合のリセッティング効率よりは低いものの、miRNA mimicや、ctrl_mimicによるトランスフェクションを行わず、VPAを含有するcRM-1で培養を行った場合であるchemicalのリセッティング効率よりは高かった。

- [0086] 図5は、22種類の遺伝子を全て、H9E0Sにおいて発現させた場合のリセッティング効率、tagBFPをトランスフェクションした場合のリセッティング効率、及びトランスフェクションを行わなかった場合のリセッティング効率を示す。いずれの場合も、cRM-1にVPA酸を含有させて培養を行った。トランスフェクションによる影響を確認するためにtagBFP発現プラスミドを導入した場合でも導入しない場合に比べリセッティング効率が上昇する傾向がみられたが、有意差は得られなかった。一方、22遺伝子を導入した場合、リセッティング効率が上昇した。tagBFP 単独の導入で割合が増える理由は、トランスフェクションの毒性によりトータルの細胞数が減る一方、ナイーブ細胞は増殖し、[ナイーブ細胞/トータル細胞]の分母が優先的に小さくなるためであると推定される。
- [0087] 図6は、図2のDay 1において、図5で用いた22種のベクターから、1種類ずつ除いてH9E0Sにトランスフェクションし、cRM-1にVPAを含有する場合のリセッティング効率を、トランスフェクションを行わなかった場合のリセッティング効率に対して規格化した値を示す。図6から、hBMP2を除いた場合に、リセッティング効率（規格値）が大きく低減したことが確認された。
- [0088] 図7は、図2のDay 1において、hBMP2をコードするプラスミドベクターのH9E0Sへの導入量を変化させ、cRM-1にVPAを含有する場合のリセッティング効率を示す。また、図8は、hBMP2をコードするプラスミドベクターのH9E0Sへの導入量を300ngとした場合（上段）及び15ngとした場合（下段）の、Day 2、Day 5、Day 7、及びDay 14の位相差イメージである。リセッティング効率は、hBMP2発現プラスミドの導入量が15 ng程度でピークとなった。また、過剰のhBMP2ではDay 14の段階で細胞がほぼすべて死滅した。
- [0089] 図9 A、図9 Bは、hBMP2をコードするプラスミドベクターのH9E0Sへの導入量を300ngとした場合（上段）及び15ngとした場合（下段）の、Day 1、Day 2、Day 3、Day 5、Day 7、Day 12、及びDay 14の位相差イメージである。hBMP2の導入量が300 ngの場合、Day 14の段階で細胞がほとんど死滅してしまい、EGFP positive細胞もほぼ観察されなくなった。

- [0090] 図10は、図2のDay 3-5において、SB-4、4-ヒドロキシカルコン (HyCh)、及びイソリキリチゲニン (IsoLiq) を、1、5、または10 μ Mとなるように培地に添加し、cRM-1にVPAを含有する場合のリセッティング効率を、これらの小分子添加を行わず、VPAを含有するcRM-1で培養した場合 (Chemical only) のH9E0Sのリセッティング効率に対して規格化した値を示す。また、図11は、図2のDay 3-5において、SB-4を10 μ Mとなるように培地に添加した場合のDay 14における、位相差イメージ (上左) 及び蛍光イメージ (上右)、SB-4等の小分子を添加しなかった場合 (Chemical only) のDay 14における、H9E0Sの位相差イメージ (下左) 及び蛍光イメージ (下右) を示す。図10、11より、SB-4、イソリキリチゲニンが、BMPの活性化が可能な小分子化合物として確認された。
- [0091] 図12は、図2に示すプロトコルにおいて、VPAを含むcRM-1 (VPA+)、またはVPAを含まないcRM-1 (VPA-) で培養した場合における、H9E0Sにトランスフェクションした物質、または培地に添加した物質と添加のタイミングによる、リセッティング効率の相違を示す。chemicalは、miR-98-5pやctrl_mimic、BMPを添加せずにリセッティングを行ったことを意味する。図12から、VPAを含むcRM-1を用いた培養においては、Day 2にBMP2またはBMP4を添加することで、chemicalと比較して、リセッティング効率の極めて大きな向上がみられた。この条件で、Day1にmiR-98-5pをトランスフェクションすることで、さらにリセッティング効率が向上する傾向がみられた。また、VPAを含まないcRM-1を用いた培養でも、Day 1にmiR-98-5pのトランスフェクションを行い、Day 2にBMP2またはBMP4を添加することで、chemicalと比較して、リセッティング効率の向上がみられ、HDAC阻害剤を用いないケミカルリセッティングによるナイーブ細胞の誘導が確認された。
- [0092] 図13は、図2のDay 1において、miR-98-5p、またはctrl_mimicをH9E0Sにトランスフェクションした場合、及びDay 2において、rhBMP4またはrhBMP2を培地に添加した場合の、Day 14におけるH9E0Sのリセッティング効率と位相差イメージ (左パネル) 及び蛍光イメージ (右パネル) をそれぞれ示す。図1

2、13より、組み換え骨形成タンパク質の培地への添加時期を、ナイーブ型多能性幹細胞培養培地で培養を開始する時点とすることで、最も高いリセッティング効率を示すことが確認された。一方でDay 0 にrhBMP4を添加するとリセッティング効率が低下した。これは通常iPS細胞にrhBMP4を作用させると中胚葉誘導が始まるため、VPAを含むcRM-1の添加によるリセッティング前に中胚葉へ分化が開始され、多能性が失われるためであると推定される。一度分化方向へ進み始めると、既に多能性は失われているため、VPAを含むcRM-1を加えてもリセッティングしないと思われる。rhBMP4は中胚葉分化とリセッティング促進の2つの作用を持ち、VPA存在の有無により、分化か脱分化（リセッティング）のいずれに進むかが決定されると推定される。

[0093] siRNAにより特定のタンパク質をノックダウンし、タンパク質の活性（発現）を抑制したことによるEGFP positive細胞の％を、図14に示す。Mimic N. C.は、いずれのmiRNAとも無関係な negative control mimic である。NR6A1及びTRIM71をノックダウンすることで活性を抑制した場合に、ノックダウンを行わずに、VPAを含むcRM-1で培養した場合（chemical）と比較してリセッティング効率が有意に向上した。また、IGF2BP1、VASH2、DPH3のノックダウンが、コントロール（ctrl_mimic）と比較してリセッティング効率を向上させる傾向が見られた。図15は、siRNAについてNR6A1を詳細に検討した結果である。NR6A1をsiRNAによりノックダウンすることで、chemicalに比べてリセッティング効率が向上した。

[0094] 図16は、AdiPSのiPS細胞、及びH1、H9E0S、H9の各ES細胞を用い、VPAを含有するcRM-1を用いて培養を行った場合のリセッティング効率を示すグラフである。mimic_ctrl及びmimic-98-5pは、Day 1において、control mimic またはmiR-98-5p mimicを各細胞にトランスフェクションし、Day 2からDay 4までVPAを含有するcRM-1で培養し、Day 5からDay 14までcRM-2で培養した。BMP-4は、各細胞にcontrol mimic またはmiR-98-5p mimic によるトランスフェクションを行わず、Day 2においてVPAを含有するcRM-1にBMP4を添加してDay 4まで培養し、Day 5からDay14までcRM-2で培養した。これらの細胞をAccumax

により剥離し、1%BSA-PBSに懸濁して氷上で30分ブロッキングを行い、SUSD2抗体溶液の最終濃度が1:500になるように細胞懸濁液と混ぜて氷上で30分反応を行い、PBSで洗浄後、フローサイトメトリーで測定したものである。いずれの細胞種でも、miR-98-5p または BMP4 処理によりSUSD2陽性細胞の割合が増加する傾向にある。

[0095] 図17は、H9E0S細胞を用い、VPAを含有するcRM-1を用いて培養を行った場合のリセッティング効率に与える、BMP及びWnt阻害剤の影響を示すグラフである。Day 0 にH9E0S細胞をAK02N (lock inhibitor, iMatrix-511含む) で播種し、Day 1で、培地をAK02N に交換後に、miR-98-5pをRNAiMaxでトランスフェクションした。Day 2 でVPAを含有するcRM-1に交換し、Day 5で培地をcRM-2に交換し、cRM-2でDay14 まで培養を続けたのち、GFP陽性細胞をカウントした。Day 0、Day 1、Day2のいずれか1回以上の時点で、培地にBMP4、及び／またはIWP mixを添加した。IWP mixは、IWP-2、IWP-3、及びIWP-4のカクテルであり、添加量は、1 μ Mとした。グラフ中、IWP+BMP4は、IWP mixとBMP4を同時に培地に添加したことを意味する。BMP4と同時に、またはBMP4よりも前にWnt阻害剤を培地に添加することにより、リセッティング効率を維持したまま、BMP4の添加時期を早めることができ、プライム型多能性幹細胞培養培地による培養工程においてBMPを添加しても、高いリセッティング効率を得ることができるようになった。

[0096] 図18は、H9E0S細胞を用い、VPAを含有するcRM-1を用いて培養を行った場合のリセッティング効率を示すグラフである。Day 0 にH9E0S細胞をAK02N(lock inhibitor, iMatrix-511 含む) で播種し、Day 1で培地をAK02Nに交換後に、各種siRNAまたはmiR-98-5pをRNAiMaxでトランスフェクションした。Day 2でVPAを含有するcRM-1に交換した。BMP4処理したサンプルはDay 2のcRM-1培地にBMP4を予め添加しておいた。Day 5で培地をcRM-2に交換し、cRM-2でDay 14まで培養を続けたのち、GFP陽性細胞をカウントした。図18中、all mix は、miR-98-5p、siNR6A1、及びsiTRIM71の混合物を意味する。リセットmiRNA、リセットsiRNA、BMPのいずれも、単独で、リセッティング効率を大幅に向

上させることができた。

[0097] 図19は、H9E0S細胞を用い、VPAを含有しないcRM-1を用いて培養を行った場合のリセッティング効率を示すグラフである。VPAを含有するcRM-1に替えて、VPAを含有しないcRM-1を用いたこと以外は、図18と同様のプロトコルで行った。図19中、Chemical onlyは、VPAを含有せず、リセットmiRNA、リセットsiRNA、BMPのいずれも、含有しない培養の結果を表し、all mixは、miR-98-5p、siNR6A1、及びsiTRIM71の混合物を意味する。VPAを含有しない培地で培養した場合でも、リセットmiRNA、リセットsiRNA、及び／またはBMPにより、リセッティング効率を向上させることができた。

[0098] miR-98-5pのターゲットであるNR6A1やTRIM71をノックダウンする実験を行った結果、ナীব型多能性幹細胞の製造において、NR6A1ノックダウンが、プライム型多能性幹細胞からナীব型多能性幹細胞への誘導を促進し、TRIM71ノックダウンがナীব型多能性幹細胞以外に分化した細胞を除去していることが示された（データは示さず）。また、NR6A1を過剰発現させる実験を行った結果、NR6A1が、プライム型多能性幹細胞からナীব型多能性幹細胞への誘導を阻害していることが確認された（データは示さず）。さらに、BMP阻害剤を添加する実験を行った結果、ナীব型多能性幹細胞の誘導効率が低下したことから、BMPシグナルがナীব型多能性幹細胞の誘導を促進していることが示された（データは示さず）。

請求の範囲

- [請求項1] ナイーブ型多能性幹細胞の製造方法であって、以下の工程：
- (1) プライム型多能性幹細胞を、プライム型多能性幹細胞培養培地で培養する工程；
- 及び
- (2) 前記工程(1)で得られた細胞を、ナイーブ型多能性幹細胞培養培地で培養する工程
- を含み、以下の工程：
- (i) 前記工程(1)または(2)で培養される細胞に、let-7 miRNA familyに属するmiRNA 及びその類似配列から選択されるmiRNAを導入し、もしくは当該細胞で当該miRNAを発現させる工程；または、
- 前記工程(1)または(2)で培養される細胞に、let-7 miRNA familyの標的タンパク質の活性抑制物質を導入し、もしくは当該細胞で当該活性抑制物質を発現させる工程；及び
- (ii) 前記工程(1)または(2)で培養される細胞に骨形成タンパク質を導入し、当該細胞で当該骨形成タンパク質を発現させ、もしくは、(1)または(2)の培地に当該骨形成タンパク質を添加する工程；または、
- 前記工程(1)または(2)の培地に、骨形成タンパク質活性化物質を添加する工程
- の少なくとも一方を含む、方法。
- [請求項2] 前記工程(ii)の前または同時に、(1)または(2)の培地に、Wnt阻害剤を添加する工程をさらに含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] (A) 前記工程(2)のナイーブ型多能性幹細胞培養培地がヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を含まず、前記工程(i)を含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 前記工程(ii)をさらに含む、請求項3に記載の方法。

- [請求項5] (B) 前記工程 (2) のナীব型多能性幹細胞培養培地がヒストン脱アセチル化酵素阻害剤を含み、前記工程 (i) または工程 (i i) を含む、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項6] 前記ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤が、バルプロ酸を含む、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項7] 前記工程 (i) において、前記 let-7 miRNA family に属する miRNA 及びその類似配列が、miR-98-5p, let-7a-5p, let-7b-5p, let-7c-5p, let-7e-5p, let-7f-5p, let-7g-5p, let-7i-5p、またはこれらと 80% 以上の配列同一性を有する miRNA から選択される、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項8] 前記工程 (i i) において、前記骨形成タンパク質が、BMP2、または BMP4 から選択される、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項9] 前記工程 (i i) において、前記骨形成タンパク質活性化物質が、SB-4、及びイソリキリチゲニンから選択される、請求項 5 に記載の方法。
- [請求項10] 前記工程 (i) において、前記 let-7 miRNA family に属する miRNA の標的タンパク質が、NR6A1 及び／または TRIM71 である、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項11] 前記工程 (2) で得られた細胞を、Tankyrase/Wnt/ β -catenin 阻害剤、及び PKC 阻害剤を含むナীব型多能性幹細胞培養培地でさらに培養する工程 (3) をさらに含む、請求項 1 に記載の方法。
- [請求項12] 前記工程 (3) で得られた細胞を、請求項 11 に記載のナীব型多能性幹細胞培養培地で継代培養する工程をさらに含む、請求項 11 に記載の方法。