明　細　書

発明の名称 ： 体細胞からのナイーブ型ヒトｉＰＳ細胞製造方法

技術分野

[0001] 本願は、ヒト体細胞からナイーブ型人工多能性幹細胞を製造する方法に関する。

背景技術

[0002] マウスの人工多能性幹（iPS）細胞および胚性幹（ES）細胞は、着床前ブラストシストの状態に近く、高度に未分化な状態であるナイーブ型であるのに対し、常法で製造されるヒトiPS細胞およびヒトES細胞は、着床後胚の状態に近く、ナイーブ型よりも発生が進んだ状態であるプライム型の特徴を持つことが知られている。

[0003] ヒトiPS細胞はナイーブ型であるマウスiPS細胞と比較して、多分化能が限定されていること、遺伝子操作が困難であること、細胞株間における遺伝子発現や多分化能などの質のばらつきが大きいことなどが指摘されているが、それらの主な原因の一つとしてヒトiPS細胞がナイーブ型よりも発生の進んだプライム型であることが指摘されている。そのため、再生医療の発展のために、ナイーブ型の性質を有するヒト多能性幹細胞の製造方法が切望されている。

[0004] これまでにヒトナイーブ型多能性幹細胞の製造方法として、（１）プライム型多能性幹細胞に、特定遺伝子を発現させ、特定成分を含有する培地で培養することでナイーブ型多能性幹細胞に変換する方法（特許文献１、非特許文献１）、（２）プライム型多能性幹細胞を、特定成分を含有する培地で培養することで、ナイーブ型多能性幹細胞に変換する方法（特許文献２～４）、（３）体細胞（線維芽細胞）を初期化する際に、途中から特定成分を含有する培地で培養することで、ナイーブ型iPS細胞を製造する方法（非特許文献２～４）が報告されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：WO2016/148253

特許文献2：特開2015-136349

特許文献3：WO2016/179243

特許文献4：WO2017/170849

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Takashima Y et al., Cell, 158:1254-1269, 2014

非特許文献2：Theunissen T et al., Cell Stem Cell, 15:471-487, 2014

非特許文献3：Kilens S et al., Nature Communications, 9:360-, 2018

非特許文献4：Liu X et al., Nature Methods, 14:1055-, 2017

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本願は、ヒト体細胞からナイーブ型人工多能性幹細胞を製造する方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本願は、下記の実施形態を提供する。

［１］

下記工程（１）～（３）を含む、ヒト体細胞からナイーブ型人工多能性幹細胞を製造する方法；

（１）ヒト体細胞に、初期化因子を含む1つ以上のベクターを導入する工程、

（２）前記体細胞をナイーブ用培地の存在下で培養する工程、および

（３）工程（２）の後、得られた細胞をナイーブ用培地の存在下、前記体細胞当たりの前記ベクター量が工程３開始時と比して30％以下に減少する条件下で培養する工程。

［２］

前記1つ以上のベクターが、マイナス鎖RNAウイルスベクターである、前記

［１］に記載の方法。

［３］

前記1つ以上のベクターが、パラミクソウイルスベクターである、前記［２］に記載の方法。

［４］

前記1つ以上のベクターが、センダイウイルスベクターである、前記［３］に記載の方法。

［５］

工程（１）の1～10日後に工程（２）を開始する、前記［１］～［４］のいずれかに記載の方法。

［６］

工程（２）を1～20日間行う、前記［１］～［５］のいずれかに記載の方法。

［７］

前記1つ以上のベクターが、温度感受性を示すベクター、人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクター、および温度感受性を示し、かつ人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクターからなる群から選択される、前記［１］～［６］のいずれかに記載の方法。

［８］

前記1つ以上のベクターが、温度感受性を示すベクターである、前記［７］に記載の方法。

［９］

前記1つ以上のベクターが、ナイーブ型多能性幹細胞を樹立する細胞培養環境下で温度感受性を示すベクターである、前記［８］に記載の方法。

［１０］

前記1つ以上のベクターが、TS7変異（TS変異（M蛋白質のG69E/T116A/A183S変異、HN蛋白質のA262T/G264R/K461G変異、P蛋白質のL511F変異、およびL蛋白質のN1197S/K1795E変異）に加えて、L蛋白質のY942H/L1361C/L1558I変異）

、TS12変異（TS変異に加えて、P蛋白質のD433A/R434A/K437A変異）またはTS15変異（TS変異に加えて、P蛋白質のD433A/R434A/K437A変異およびL蛋白質のL1361C/L1558I）を含むセンダイウイルスベクターである、前記［９］に記載の方法。

［１１］

工程（３）が、得られた細胞を３８℃以上で培養することを含む、前記［７］～［１０］のいずれかに記載の方法。

［１２］

人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクターがマイナス鎖RNAウイルスベクターであって、前記マイクロRNAの標的配列が、NP遺伝子またはP遺伝子の、翻訳領域、5’UTR、または3’UTRに存在する、前記［７］～［１１］のいずれかに記載の方法。

［１３］

前記マイクロRNAが、miR-367である、前記［１２］に記載の方法。

［１４］

初期化因子が、OCT遺伝子、SOX遺伝子、MYC遺伝子および／またはKLF遺伝子を含む、前記［１］～［１３］のいずれかに記載の方法。

［１５］

前記1つ以上のベクターが、OCT遺伝子、SOX遺伝子およびKLF遺伝子を含むベクター、MYC遺伝子を含むベクター、およびKLF遺伝子を含むベクターを含む、前記［１４］に記載の方法。

［１６］

MYC遺伝子を含むベクターが、TS15変異を含むセンダイウイルスベクターである、前記［１５］に記載の方法。

［１７］

OCT遺伝子、SOX遺伝子およびKLF遺伝子を含むベクター、およびKLF遺伝子を含むベクターが、TS12変異を含むセンダイウイルスベクターである、前記［１５］または[１６]に記載の方法。

［１８］

工程（３）において、前記体細胞当たりの前記ベクター量が、工程３開始時から12日以内に工程３開始時と比して30％以下に減少する、前記［１］～［１７］のいずれかに記載の方法。

［１９］

前記ナイーブ用培地が、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阻害剤から選ばれる１以上の化合物を含む、前記［１］～［１８］のいずれかに記載の方法。

［２０］

前記ナイーブ用培地が、t2iLGo、5iLAF、およびtt2iLGoからなる群から選ばれる培地である、前記［１９］に記載の方法。

［２１］

工程（２）および（３）をフィーダー細胞の非存在下で行う、前記［１］～［２０］のいずれかに記載の方法。

［２２］

前記ヒト体細胞が、単核球または線維芽細胞である、前記［１］～［２１］のいずれかに記載の方法。

[0009] ［２３］

下記を含む、ヒト体細胞からナイーブ型人工多能性幹細胞を製造するためのキット：

初期化因子を含む1つ以上のベクター、ここで前記1つ以上のベクターは、温度感受性を示すベクター、人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクター、および温度感受性を示し、かつ人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクターからなる群から選択される；および

ナイーブ用培地。

［２４］

前記1つ以上のベクターが、マイナス鎖RNAウイルスベクターである、前記［２３］に記載のキット。

［２５］

前記1つ以上のベクターが、パラミクソウイルスベクターである、前記［２４］に記載のキット。

［２６］

前記1つ以上のベクターが、センダイウイルスベクターである、前記［２５］に記載のキット。

［２７］

前記1つ以上のベクターが、温度感受性を示すベクターである、前記［２３］～［２６］のいずれかに記載のキット。

［２８］

前記1つ以上のベクターが、ナイーブ型多能性幹細胞を樹立する細胞培養環境下で温度感受性を示すベクターである、前記［２７］に記載のキット。

［２９］

前記1つ以上のベクターが、TS7変異（TS変異（M蛋白質のG69E/T116A/A183S変異、HN蛋白質のA262T/G264R/K461G変異、P蛋白質のL511F変異、およびL蛋白質のN1197S/K1795E変異）に加えて、L蛋白質のY942H/L1361C/L1558I変異）、TS12変異（TS変異に加えて、P蛋白質のD433A/R434A/K437A変異）またはTS15変異（TS変異に加えて、P蛋白質のD433A/R434A/K437A変異およびL蛋白質のL1361C/L1558I）を含むセンダイウイルスベクターである、前記［２８］に記載のキット。

［３０］

人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクターがマイナス鎖RNAウイルスベクターであって、前記マイクロRNAの標的配列が、NP遺伝子またはP遺伝子の、翻訳領域、5’UTR、または3’UTRに存在する、前記［２３］～［２９］のいずれかに記載のキット。

［３１］

前記マイクロRNAが、miR-367である、前記［３０］に記載のキット。

［３２］

初期化因子が、OCT遺伝子、SOX遺伝子、MYC遺伝子および／またはKLF遺伝子を含む、前記［２３］～［３１］のいずれかに記載のキット。

［３３］

前記1つ以上のベクターが、OCT遺伝子、SOX遺伝子およびKLF遺伝子を含むベクター、MYC遺伝子を含むベクター、およびKLF遺伝子を含むベクターを含む、前記［３２］に記載のキット。

［３４］

MYC遺伝子を含むベクターが、TS15変異を含むセンダイウイルスベクターである、前記［３３］に記載のキット。

［３５］

OCT遺伝子、SOX遺伝子およびKLF遺伝子を含むベクター、およびKLF遺伝子を含むベクターが、TS12変異を含むセンダイウイルスベクターである、前記［３３］または[３４]に記載のキット。

［３６］

前記ナイーブ用培地が、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阻害剤から選ばれる１以上の化合物を含む、前記［２３］～［３５］のいずれかに記載のキット。

［３７］

前記ナイーブ用培地が、t2iLGo、5iLAF、およびtt2iLGoからなる群から選ばれる培地である、前記［３６］に記載のキット。

［３８］

前記ヒト体細胞が、単核球または線維芽細胞である、前記［２３］～［３７］のいずれかに記載のキット。

［３９］

前記［１］～［２２］のいずれかに記載の方法で製造されたナイーブ型人

工多能性幹細胞の培養上清。

［４０］

前記［１］～［２２］のいずれかに記載の方法で製造されたナイーブ型人工多能性幹細胞の培養上清を原料として含む化粧品。

発明の効果

[0010] 本願によって、ヒト体細胞からナイーブ型人工多能性幹細胞を製造する方法が提供される。また、ヒト体細胞からナイーブ型人工多能性幹細胞を製造するためのベクターセットおよびキットが提供される。本願の方法により得られるナイーブ型人工多能性幹細胞は、初期化因子を含むベクターを実質的に含まず、形質安定性が高い。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]体細胞からナイーブ型iPS細胞を製造するために従来使用されているセンダイウイルスベクター（CytoTune-iPS2.0L）の構造。

[図2]ヒト皮膚線維芽細胞（HDF）からナイーブ型iPS細胞を製造するためのプロトコール。縦方向のバーは培地交換のタイミングの一例を示している。

[図3A]45回継代したHDF由来ナイーブ型iPS細胞の位相差顕微鏡による画像。

[図3B]45回継代したHDF由来ナイーブ型iPS細胞の多能性マーカーによる免疫染色像。横並びの3枚の画像はそれぞれ同視野の画像である。

[図4]高温培養がセンダイウイルスベクターのゲノム量に及ぼす効果。

[図5]ヒト末梢血単核球（PBMC）からナイーブ型iPS細胞を製造するためのプロトコール。縦方向のバーは培地交換のタイミングの一例を示している。

[図6]PBMC由来ナイーブ型iPS細胞中におけるセンダイウイルスベクターのゲノム量のday14からの継代毎の定量評価。

[図7]各細胞種のシングルセルデータを統合した主成分分析。

[図8]各細胞種における刷り込み遺伝子およびX染色体関連遺伝子の発現パターン。

[図9A]各細胞種のグローバルなメチル化を示すDensity bean plot。

[図9B]各細胞種のグローバルなメチル化を示す主成分分析。

[図9C]本実施例で得られたHDF由来ナイーブ型iPS細胞における、5-メチルシトシンの全シトシンに占める割合。

[図10]長期継代後（P16～45）のHDFまたはPBMC由来ナイーブ型iPS細胞の三胚葉成分の初期分化能。コントロールとして、Reset Naive ESC（in-house）を用いた。

[図11A]SeV感染から94日後のCytoTune-iPS 2.0L(nCT2.0L_1)で初期化されたナイーブ型ヒトiPSCにおける位相差画像およびSeVでの免疫蛍光染色。スケールバーは100μmを示す。

[図11B]CytoTune 2.0または2.0L SeV初期化キットを用いて初期化したナイーブ型iPSCにおけるSeVゲノム発現のqRT-PCR解析。値をGAPDH発現量で正規化し、平均値±s.d.で示す。各点についてn=3である。

[図11C]CytoTune2.0または2.0Lで初期化されたナイーブ型ヒトiPSCにおける、GAPDH発現で正規化した各SeVベクターゲノム発現のqRT-PCR解析。データを平均値±s.d.で示す。各点についてn=3である。本実験では各SeVベクターを特異的に検出するように設計されたプライマーおよびSYBR Greenを用いた。

[図11D]SeVベクターおよび改変型初期化カクテルの模式図。CytoTune-2.0または2.0L初期化キットにおけるSeV18+KLF4/TSΔF(KLF4/TS)ベクターを以下の3つの改変型ベクターのうち1つに変更した：SeV18+KLF4/TS12ΔF(KLF4/TS12)、SeV18+KLF4/PmiR367T2/TSΔF(KLF4/miR/TS)、またはSeV18+KLF4/PmiR367T2/TS12ΔF(KLF4/miR/TS12)。KLF4/miR/TS12は本実施例において新規に開発された。

[図11E]hsa-miRNA423-3p発現で正規化したHDFおよびPSCにおけるhsa-miRNA367-3p発現のqRT-PCR解析。データを平均値±s.d.で示す。n=3である。NDは40回の増幅サイクル後においても検出されなかったことを示す。

[図11F]改変型SeV-OSKLカクテルを用いたHDFまたはPBMCからのナイーブ型ヒトiPSCの誘導、およびナイーブ型ヒトiPSCが生成した後のインキュベーション温度の変化についての実験計画。

[図11G]CytoTune-iPS 2.0 SeVベクター感染から14日後のPBMCの代表的な位相

差画像。スケールバーは200μmを示す。

[図12A]day14におけるHDFから作製したナイーブ型ヒトiPSCコロニーの数。SeV-KLF4/TSおよび3つの改変型SeV-KLF4ベクターを、それぞれSeV-KOSおよびSeV-LMYCと共感染させた。データを平均値±s.d.で示す。n=3であり、*はP<0.05を示す。

[図12B]qRT-PCRによって解析された、SeVベクター感染から14日後の細胞におけるSeVゲノムの検出感度。X軸は、SeV陰性細胞におけるSeV陽性細胞の割合を示す。

[図12C]SeV-KOS、SeV-LMYCおよび各SeV-KLF4ベクターで初期化したHDF由来のナイーブ型iPSCにおけるSeVゲノム発現のqRT-PCR解析。データを平均値±s.d.で示す。各点についてn=3である。

[図12D]day14およびday34におけるSeV-KOS、SeV-LMYCおよびSeV-KLF4/miR/TS12ベクターで初期化したHDF由来のナイーブ型iPSC(nOSKL_1、2)およびPBMC由来のナイーブ型iPSC(nOSKL_3、4)におけるSeVゲノム発現のqRT-PCR解析。データを平均値±s.d.で示す。n=3である。

[図12E]SeV-KOS、SeV-LMYCおよびSeV-KLF4/miR/TS12ベクターで初期化したiMEFフィーダー細胞上のナイーブ型iPSCおよびフィーダーフリーのナイーブ型iPSCの代表的な位相差画像。スケールバーは200μmを示す。

[図12F]樹立したnOSKL_1-4の細胞増殖速度。

[図13A]GAPDH発現で正規化し、qRT-PCRによって解析したナイーブ型多能性マーカーの相対的発現。nH9の値を1.0としている。データを平均値±s.d.で示す。n=3である。

[図13B]GAPDH発現で正規化し、qRT-PCRによって解析したプライム型多能性マーカーの相対的発現。データを平均値±s.d.で示す。n=3である。

[図13C]ナイーブ型およびプライム型ヒトPSCにおける共通、プライム型およびナイーブ型の多能性関連マーカー遺伝子の発現レベルを示すRNA-seqデータのヒートマップ。

[図13D]各文献 (Takashima, Y. et al. Resetting transcription factor co

ntrol circuitry toward ground-state pluripotency in human. Cell 158, 1254-1269, doi:10.1016/j.cell.2014.08.029 (2014).; Theunissen, T. W. et al. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. Cell stem cell 15, 471-487, doi:10.1016/j.stem.2014.07.002 (2014).; Yan, L. et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. Nature structural & molecular biology 20, 1131-1139, doi:10.1038/nsmb.2660 (2013).）のリセットナイーブ型ヒトiPSCおよび着床前胚試料と比較した本実施例におけるプライム型およびナイーブ型ヒトPSCのRNA-seqデータのPCA。

[図14A]DNAメチル化アレイを用いて解析したプライム型およびナイーブ型ヒトPSCにおけるグローバルなDNAメチル化レベルのビーンプロット。ビーンプロット中の横線はメチル化ベータ値の平均値を表す。

[図14B]DNAメチル化アレイを用いたプライム型およびナイーブ型ヒトPSCにおけるグローバルなDNAメチル化のPCA。

[図14C]X連鎖遺伝子UTX(X染色体の不活性化を回避する)、HUWE1(X染色体の不活性化を受ける)およびXISTを検出するナイーブ型およびプライム型ヒトiPSCの代表的なRNA-FISH画像。正常なX染色体を持つPSCのみが定量化に含まれていることを保証するために、UTXを解析した。スケールバーは20μmを示す。

[図14D]両アレルUTX発現を有する細胞におけるXISTおよびHUWE1のRNA-FISHパターンの定量化。各細胞株において100個の細胞を解析した。ほとんどのナイーブ型ヒトiPSCは、両アレルHUWE1発現によって示されるX再活性化を示した。nOSKL_3および4のいくつかの細胞は両アレルHUWE1発現に加えて両アレルXIST発現を示し、これは着床前エピブラストの発現パターンに類似している。

[図15A]ミトコンドリアの内膜に存在する電子伝達系のタンパク質をコードする遺伝子のヒートマップ。これらの遺伝子は酸化的リン酸化の活性を反映しており、ミトコンドリア複合体によって分類され、階層的にクラスター化される。

[図15B]細胞外フラックスアナライザーを用いたナイーブ型iPSCおよびプライム型iPSCの代謝能の比較。

[図15C]ナイーブ型iPSCおよびプライム型iPSCの予備呼吸能の定量化。

[図15D]ナイーブ型iPSCおよびプライム型iPSCにおける細胞外酸性化速度（ECAR）および酸素消費速度（OCR）。

[図16A]原始内胚葉への分化の模式図。

[図16B]プライム型ESC(H9；左図)およびSeV(-)ナイーブ型iPSC(nOSKL_4；右図)由来の原始内胚葉の代表的な位相差画像。スケールバーは100μmを示す。

[図16C]フローサイトメトリーによる、プライム型ESC(H9)、ナイーブ型ESC(nH9)、SeV(-)ナイーブ型iPSC(nOSKL_4)、およびSeV(+)ナイーブ型iPSC(nCT2.0L_4)におけるPDGFRAおよびANPEP発現の定量化。

[図16D]フローサイトメトリーによる、PDGFRA/ANPEP共陽性細胞におけるシグナル値の中央値。

[図17A]栄養外胚葉への分化の模式図。

[図17B]プライム型ESC(H9；左図)およびSeV(-)ナイーブ型iPSC(nOSKL_4；右図)由来の栄養外胚葉の代表的な位相差画像。スケールバーは200μmを示す。

[図17C]フローサイトメトリーによる、プライム型ESC(H9)、ナイーブ型ESC(nH9)、SeV(-)ナイーブ型iPSC(nOSKL_4)、およびSeV(+)ナイーブ型iPSC(nCT2.0L_4)におけるTACSTD2、ENPEP、HAVCR1およびHLA-ABC発現の定量化。

[図17D]フローサイトメトリーによるTACSTD2(+)/ENPEP(+)およびHAVCR1(+)細胞の割合。各プロットは一回の実験を示す。

発明を実施するための形態

[0012] 本明細書および特許請求の範囲においては、数値が「約」の用語を伴う場合、その値の±１０％の範囲を含むことを意図する。例えば、「約２０」は、「１８～２２」を含むものとする。数値の範囲は、両端点の間の全ての数値および両端点の数値を含む。範囲に関する「約」は、その範囲の両端点に適用される。従って、例えば、「約２０～３０」は、「１８～３３」を含むものとする。

[0013] ［ベクター］

本願において、ベクターは体細胞に遺伝子を導入できるベクターであればよく、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターであり得、例えばウイルスベクターである。本開示において、ウイルスベクターは、当該ウイルスに由来するゲノム核酸を有し、該核酸に導入遺伝子を組み込むことにより、該遺伝子を発現させることができるベクターである。本願のベクターは、例えば染色体非組み込み型ウイルスベクターである。染色体非組み込み型ウイルスベクターとは、ウイルスに由来し、遺伝子を標的細胞に導入することができるウイルスベクターであって、導入された遺伝子が宿主の染色体（核由来染色体）に組み込まれる危険性のない運搬体のことをいう。本願において、ウイルスベクターには、感染性ウイルス粒子の他、非感染性ウイルス粒子、ウイルスコア、またはウイルスゲノムとウイルス蛋白質との複合体などからなる複合体であって、細胞に導入することにより搭載する遺伝子を発現する能力を持つ複合体が含まれる。例えばRNAウイルスにおいて、ウイルスゲノムとそれに結合するウイルス蛋白質からなるリボヌクレオ蛋白質（ウイルスのコア部分）は、細胞に導入することにより細胞内で導入遺伝子を発現することができる（WO00/70055）。細胞への導入は、適宜トランスフェクション試薬等を用いて行えばよい。このようなリボヌクレオ蛋白質（RNP）も本願においてウイルスベクターに含まれる。

[0014] 本明細書において、宿主の染色体に組み込まれる危険性がないとは、ウイルスベクターを導入した場合に、宿主染色体に組み込まれる頻度が十分に低いことを意味する。好ましくは、宿主の染色体への組み込み頻度は、例えばヒト線維肉腫由来細胞株HT1080(ATCC CCL121) に10 PFU/cellで感染させた場合に5×10^{-4}以下であり、より好ましくは10^{-4}以下であり、より好ましくは10^{-5}以下であり、より好ましくは10^{-6}以下であり、より好ましくは10^{-7}以下である。染色体非組み込み型ウイルスベクターは、好ましくはRNAウイルスである。本開示において、RNAウイルスとは、RNAゲノムを有し、ライフサイクルにおいてDNAのフェーズを持たないウイルスを意味する。本開示においてRNA

ウイルスは、逆転写酵素を持たない（すなわちレトロウイルスは含まれない）。すなわちウイルス増殖において、ウイルスゲノムはDNAを介さずに、RNA依存性RNAポリメラーゼにより複製される。RNAウイルスはDNAフェーズを持たないため、RNAウイルスベクターを用いることにより、宿主染色体への組み込みのリスクを最小限に抑えることが可能となる。RNAウイルスには、一本鎖RNAウイルス（プラス鎖RNAウイルスおよびマイナス鎖RNAウイルスを含む）、および二本鎖RNAウイルスを含む。またエンベロープを有するウイルス（エンベロープウイルス； enveloped virus）およびエンベロープを有さないウイルス（非エンベロープウイルス； non-enveloped virus）を含むが、好ましくはエンベロープウイルスに由来するベクターが用いられる。本願においてRNAウイルスには、具体的には以下の科に属するウイルスが含まれる。

ラッサウィルスなどのアレナウイルス科（Arenaviridae）

インフルエンザウイルスなどのオルソミクソウイルス科（Orthomyxoviridae）

SARSウイルスなどのコロナウイルス科（Coronaviridae）

風疹ウイルスなどのトガウイルス科（Togaviridae）

ムンプスウイルス、麻疹ウイルス、センダイウイルス、RSウイルスなどのパラミクソウイルス科（Paramyxoviridae）

ポリオウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルスなどのピコルナウイルス科（Picornaviridae）

マールブルグウイルス、エボラウイルスなどのフィロウイルス科（Filoviridae）

黄熱病ウイルス、デング熱ウイルス、C型肝炎ウイルス、G型肝炎ウイルスなどのフラビウイルス科（Flaviviridae）

ブンヤウイルス科（Bunyaviridae; Bunyavirus, Hantavirus, Nairovirus, およびPhlebovirus属等を含む）

狂犬病ウイルスなどのラブドウイルス科（Rhabdoviridae）

レオウイルス科（Reoviridae）

[0015] 染色体非組み込み型ウイルスベクターは、例えばマイナス鎖RNAウイルスベクターである。マイナス鎖RNAウイルスベクターとは、マイナス鎖（ウイルス蛋白質をコードするセンス鎖に対するアンチセンス鎖）のRNAをゲノムとして含むウイルスからなるベクターである。マイナス鎖RNAはネガティブ鎖RNAとも呼ばれる。マイナス鎖RNAウイルスは、例えば一本鎖マイナス鎖RNAウイルス（非分節型（non-segmented）マイナス鎖RNAウイルスとも言う）である。「一本鎖ネガティブ鎖RNAウイルス」とは、一本鎖ネガティブ鎖［すなわちマイナス鎖］RNAをゲノムに有するウイルスを意味する。このようなウイルスとしては、パラミクソウイルス（Paramyxoviridae; Paramyxovirus, Morbillivirus, Rubulavirus, およびPneumovirus属等を含む）、ラブドウイルス（Rhabdoviridae; Vesiculovirus, Lyssavirus, およびEphemerovirus属等を含む）、フィロウイルス（Filoviridae）などの科に属するウイルスが含まれ、分類学上モノネガウイルス目(Mononegavirales)に属している（ウイルス 第57巻 第1号、pp29-36、2007; Annu. Rev. Genet. 32, 123-162, 1998; Fields virologyfourth edition, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1305-1340, 2001; Microbiol. Immunol. 43, 613-624, 1999; Field Virology, Third edition pp1205-1241 1996）。

[0016] マイナス鎖RNAウイルスベクターは、例えばパラミクソウイルスベクターである。パラミクソウイルスベクターは、パラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)ウイルスに由来するウイルスベクターである。例えばパラミクソウイルス科(Paramyxoviridae)ウイルスのセンダイウイルス(Sendai virus)を挙げることができる。他の例としては、ニューカッスル病ウイルス(Newcastle disease virus)、おたふくかぜウイルス(Mumps virus)、麻疹ウイルス(Measles virus)、RSウイルス(Respiratory syncytial virus)、牛疫ウイルス(rinderpest virus)、ジステンパーウイルス(distemper virus)、サルパラインフルエンザウイルス（SV5）、ヒトパラインフルエンザウイルス1,2,3型、オルトミクソウイルス科(Orthomyxoviridae)のインフルエンザウイルス(Influenza virus)、ラブドウイルス科(Rhabdoviridae)の水疱性口内炎ウイルス(Vesicular

stomatitis virus)、狂犬病ウイルス(Rabies virus)等が挙げられる。

[0017] 本願において使用され得るウイルスをさらに例示すれば、例えばSendai virus (SeV)、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)、phocine distemper virus (PDV)、canine distemper virus (CDV)、dolphin molbillivirus (DMV)、peste-des-petits-ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)、rinderpest virus (RPV)、Hendra virus (Hendra)、Nipah virus (Nipah)、human parainfluenza virus-2 (HPIV-2)、simian parainfluenza virus 5 (SV5)、human parainfluenza virus-4a (HPIV-4a)、human parainfluenza virus-4b (HPIV-4b)、mumps virus (Mumps)、およびNewcastle disease virus (NDV)などが含まれる。より好ましくは、Sendai virus (SeV)、human parainfluenza virus-1 (HPIV-1)、human parainfluenza virus-3 (HPIV-3)、phocinedistemper virus (PDV)、canine distemper virus (CDV)、dolphin molbillivirus (DMV)、peste-des-petits-ruminants virus (PDPR)、measles virus (MV)、rinderpest virus(RPV)、Hendra virus (Hendra)、およびNipah virus (Nipah)からなる群より選択されるウイルスが挙げられる。

[0018] 本願において用いられるベクターは、例えば、パラミクソウイルス亜科（レスピロウイルス属、ルブラウイルス属、およびモルビリウイルス属を含む）に属するウイルスまたはその誘導体であり、例えばレスピロウイルス属（genus Respirovirus）（パラミクソウイルス属（Paramyxovirus）とも言う）に属するウイルスまたはその誘導体である。誘導体には、ウイルスによる遺伝子導入能を損なわないように、ウイルス遺伝子が改変されたウイルス、および化学修飾されたウイルス等が含まれる。本発明を適用可能なレスピロウイルス属ウイルスとしては、例えばヒトパラインフルエンザウイルス１型（HPIV-1）、ヒトパラインフルエンザウイルス３型（HPIV-3）、ウシパラインフルエンザウイルス３型（BPIV-3）、センダイウイルス(Sendai virus; マウスパラインフルエンザウイルス１型とも呼ばれる)、およびサルパラインフルエンザウイルス10型（SPIV-10）などが含まれる。パラミクソウイルスは、最も

好ましくはセンダイウイルスである。

[0019] マイナス鎖RNAウイルスは、一般に、エンベロープの内部にRNAとタンパク質からなる複合体（リボヌクレオプロテイン; RNP）を含んでいる。RNPに含まれるRNAはマイナス鎖RNAウイルスのゲノムである（－）鎖（ネガティブ鎖）の一本鎖RNAであり、この一本鎖RNAが、NPタンパク質、Pタンパク質、およびLタンパク質と結合し、RNPを形成している。このRNPに含まれるRNAがウイルスゲノムの転写および複製のための鋳型となる（Lamb, R.A., and D. Kolakofsky, 1996, Paramyxoviridae: The viruses and their replication. pp. 1177-1204. In Fields Virology, 3rd edn. Fields, B. N., D. M. Knipe, and P. M. Howley et al. (ed.), Raven Press, New York, N. Y.）。

[0020] マイナス鎖RNAウイルスの「NP、P、M、F、HN、およびL遺伝子」とは、それぞれヌクレオキャプシド、ホスホ、マトリックス、フュージョン、ヘマグルチニン-ノイラミニダーゼ、およびラージタンパク質をコードする遺伝子のことを指す。ヌクレオキャプシド（NP）タンパク質は、ゲノムRNAに結合し、ゲノムRNAが鋳型活性を有するために不可欠なタンパク質である。一般に、NP遺伝子は「N遺伝子」と表記されることもある。ホスホ（P）タンパク質は、RNAポリメラーゼの小サブユニットであるリン酸化タンパク質である。マトリックス（M）タンパク質は、ウイルス粒子構造を内側から維持する機能を果たす。フュージョン（F）タンパク質は、宿主細胞への侵入にかかわる膜融合タンパク質であり、ヘマグルチニン－ノイラミニダーゼ（HN）タンパク質は宿主細胞との結合にかかわるタンパク質である。ラージ（L）タンパク質は、RNAポリメラーゼの大サブユニットである。上記各遺伝子は個々の転写制御ユニットを有し、各遺伝子から単独のmRNAが転写され、タンパク質が転写される。P遺伝子からは、Pタンパク質以外に、異なるORFを利用して翻訳される非構造タンパク質（C）と、Pタンパク質mRNAを読み取り途中のRNA編集により作られるタンパク質（V）が翻訳される。例えばパラミクソウイルス亜科に属する各ウイルスにおける各遺伝子は、一般に、3’から順に、次のように表記される。

レスピロウイルス属 N P/C/V M F HN - L

ルブラウイルス属 N P/V M F HN (SH) L

モービリウイルス属 N P/C/V M F H - L

[0021] 例えばセンダイウイルスの各遺伝子の塩基配列のデータベースのアクセッション番号は、N遺伝子については M29343, M30202, M30203, M30204, M51331, M55565, M69046, X17218、P遺伝子については M30202, M30203, M30204, M55565, M69046, X00583, X17007, X17008、M遺伝子については D11446, K02742, M30202, M30203, M30204, M69046, U31956,X00584, X53056、F遺伝子については D00152, D11446, D17334, D17335, M30202, M30203, M30204, M69046, X00152, X02131、HN遺伝子については D26475, M12397, M30202, M30203, M30204, M69046, X00586, X02808, X56131、L遺伝子については D00053, M30202, M30203, M30204, M69040, X00587, X58886を参照のこと。またその他のウイルスがコードするウイルス遺伝子を例示すれば、N遺伝子については、CDV, AF014953; DMV, X75961; HPIV-1, D01070; HPIV-2, M55320; HPIV-3, D10025; Mapuera, X85128; Mumps, D86172; MeV, K01711; NDV, AF064091; PDPR, X74443; PDV, X75717; RPV, X68311; SeV, X00087;SV5, M81442; および Tupaia, AF079780、P遺伝子については、CDV, X51869; DMV, Z47758; HPIV-l, M74081; HPIV-3, X04721; HPIV-4a, M55975; HPIV-4b, M55976; Mumps, D86173; MeV, M89920; NDV, M20302; PDV, X75960; RPV, X68311; SeV, M30202; SV5, AF052755; および Tupaia, AF079780、C遺伝子については CDV, AF014953; DMV, Z47758; HPIV-1, M74081; HPIV-3, D00047; MeV, AB016162; RPV, X68311; SeV, AB005796; および Tupaia, AF079780、M遺伝子については CDV, M12669; DMV Z30087; HPIV-1, S38067; HPIV-2, M62734; HPIV-3, D00130; HPIV-4a, D10241; HPIV-4b, D10242; Mumps, D86171; MeV,AB012948; NDV, AF089819; PDPR, Z47977; PDV, X75717; RPV, M34018; SeV, U31956; および SV5, M32248、F遺伝子については CDV, M21849; DMV, AJ224704; HPN-1, M22347; HPIV-2, M60182; HPIV-3, X05303, HPIV-4a, D49821; HPIV-4b, D49822; Mumps, D86169;MeV, AB003178; NDV, AF048763; PDPR, Z37017; PDV,

AJ224706; RPV, M21514; SeV, D17334; および SV5, AB021962、HN（HまたはG）遺伝子については CDV, AF112189; DMV, AJ224705; HPIV-1, U709498; HPIV-2. D000865; HPIV-3, AB012132; HPIV-4A, M34033; HPIV-4B, AB006954; Mumps, X99040; MeV, K01711; NDV, AF204872; PDPR, X74443; PDV, Z36979; RPV, AF132934; SeV, U06433; および SV-5, S76876 、L遺伝子についてはCDV, AF014953; DMV, AJ608288; HPIV-1, AF117818; HPIV-2, X57559; HPIV-3, AB012132; Mumps, AB040874; MeV, K01711; NDV, AY049766; PDPR, AJ849636; PDV, Y09630; RPV,Z30698;およびSV-5, D13868が例示できる。但し、各ウイルスは複数の株が知られており、株の違いにより上記に例示した以外の配列からなる遺伝子も存在する。これらのいずれかの遺伝子に由来するウイルス遺伝子を持つセンダイウイルスベクターは、本願のベクターとして有用である。また、P蛋白質に関してはその機能部位がC末端側のN結合部位、L結合部位、オリゴマー形成部位を含む領域であり（SeVの場合はP蛋白質のC末端側の320-568）（Blanchard L. et al., Virology. (2004) 319, 201-211.）、本願においてP蛋白質は少なくともこの領域を含むものが好ましい。例えば本願のベクターは、上記のいずれかのウイルス遺伝子のコード配列（SeVのP遺伝子に関しては例えばC末端側の配列でもよく、例えば479番目～568番目のアミノ酸配列または320番目～568番目のアミノ酸配列）と、90%以上、好ましくは95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上の同一性を持つ塩基配列を含む。また、本願のベクターは、例えば上記のいずれかのウイルス遺伝子のコード配列がコードするアミノ酸配列（SeVのP蛋白質に関しては例えばC末端側の配列でもよく、例えば479番目～568番目のアミノ酸配列または320番目～568番目のアミノ酸配列）と、90%以上、好ましくは95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上の同一性を持つアミノ酸配列をコードする塩基配列を含む。また、本願のベクターは、例えば上記のいずれかのウイルス遺伝子のコード配列がコードするアミノ酸配列（SeVのP遺伝子に関しては例えばC末端側の配列でもよく、例えば479番目～568番目のアミノ酸配列または320番目～568番目のアミノ酸配列）において、10

個以内、好ましくは9個以内、8個以内、7個以内、6個以内、5個以内、4個以内、3個以内、2個以内、または1個のアミノ酸が置換、挿入、欠失、および/または付加されたアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする塩基配列を含む。

[0022] なお本明細書に記載した塩基配列およびアミノ酸配列などのデータベースアクセッション番号が参照された配列は、例えば本願の出願日および優先日における配列を参照するものであって、本願の出願日および優先日のいずれの時点における配列としても特定することができ、好ましくは本願の出願日における配列として特定される。各時点での配列はデータベースのリビジョンヒストリーを参照することにより特定することができる。

[0023] また本願のマイナス鎖RNAウイルスは、天然株、野生株、変異株、ラボ継代株、および人為的に構築された株などに由来してもよい。例えばセンダイウイルスZ株が挙げられる（Medical Journal of Osaka University Vol.6, No. 1, March 1955 p1-15）。つまり、当該ウイルスは天然から単離されたウイルスと同様の構造を持つウイルスベクターであっても、遺伝子組み換えにより人為的に改変したウイルスであってもよい。例えば、野生型ウイルスが持ついずれかの遺伝子に変異や欠損があるものであってよい。例えば、ウイルスのエンベロープ蛋白質または外殻蛋白質をコードする少なくとも１つの遺伝子に変異または欠損を有するウイルスを好適に用いることができる。このようなウイルスベクターは、例えば感染細胞においてはゲノムを複製することはできるが、感染性ウイルス粒子を形成できないウイルスベクターである。このような伝播能欠損型のウイルスベクターは、周囲に感染を拡大する懸念がないので安全性が高い。例えば、Fおよび/またはHNなどのエンベロープ蛋白質またはスパイク蛋白質をコードする少なくとも１つの遺伝子、あるいはそれらの組み合わせが含まれていないマイナス鎖RNAウイルスを用いることができる（WO00/70055およびWO00/70070; Li, H.-O. et al., J. Virol. 74(14) 6564-6569 (2000)）。ゲノム複製に必要な蛋白質（例えばN、P、およびL蛋白質）をゲノムRNAにコードしていれば、感染細胞においてゲノムを増幅する

ことができる。欠損型ウイルスを製造するには、例えば、欠損している遺伝子産物またはそれを相補できる蛋白質をウイルス産生細胞において外来的に供給する（WO00/70055およびWO00/70070; Li, H.-O. et al., J. Virol. 74(14) 6564-6569 (2000)）。また、欠損するウイルス蛋白質を完全に相補することなく、非感染性のウイルス粒子（VLP）としてウイルスベクターを回収する方法も知られている（WO00/70070）。また、ウイルスベクターをRNP（例えばN、L、P蛋白質、およびゲノムRNAからなるRNP）として回収する場合は、エンベロープ蛋白質を相補することなくベクターを製造することができる。

[0024] また本願のウイルスは、天然のウイルスに限定されず、例えば人工的に作製したウイルスも含まれる。例えば本願のウイルスには、コドンを最適化するために核酸配列に変異を導入したものや、キメラウイルス（例えば同種ウイルス間のキメラ、および他種ウイルス間のキメラウイルス(例えばPIVとSeVのキメラなど)を含む）なども含まれる（J. Virol. 1995, 69, 849-855）。

[0025] また本願においてN、L、P蛋白質などのウイルス蛋白質は、導入細胞において遺伝子を発現する機能を保持する限り野生型でなくてもよい。例えばタグなどのペプチドを適宜付加した改変蛋白質や、コドンを改変した蛋白質や、機能を失わないように野生型蛋白質のアミノ酸配列の一部を欠失させた蛋白質などを適宜用いることができる。本願において、N、L、P蛋白質には、そのような改変蛋白質や欠失型蛋白質も包含される。例えば、P蛋白質はC末端の一部があれば、その他の領域はウイルスベクターの発現に必須ではない。

[0026] ウイルスベクターは、例えば、当該ウイルスの（－）鎖一本鎖RNAゲノムに由来するRNA、および、当該ウイルスの（－）鎖一本鎖RNAと結合するウイルスタンパク質に由来し、当該RNAに結合する蛋白質の複合体であって、細胞に導入することで搭載遺伝子を発現するベクターである。（－）鎖一本鎖RNAと結合するタンパク質とは、該（－）鎖一本鎖RNAと直接および/または間接に結合し、該（－）鎖一本鎖RNAと複合体を形成するタンパク質を意味する。複合体には、マイナス鎖RNAウイルスに由来する（－）鎖一本鎖RNAおよびそれに結合するマイナス鎖RNAウイルスに由来するタンパク質（例えばNP、P、お

よびLタンパク質）からなる複合体が含まれる。本願において、「マイナス鎖RNAウイルスに由来する」とは、マイナス鎖RNAウイルスの構成物（タンパク質、RNAを含む）がそのままの状態で、または一部を改変された状態であることを意味する。例えば、マイナス鎖RNAウイルスのタンパク質またはRNAを改変して調製されたタンパク質またはRNAは、「マイナス鎖RNAウイルスに由来する」タンパク質またはRNAである。本願のベクターは、例えばエンベロープタンパク質（F、HN、およびMタンパク質）等を有し、ウイルス粒子の構造をとるウイルスベクターであってもよい。また、ウイルスエンベロープを有さない、RNP自体であるRNPベクターであってもよい。

[0027] マイナス鎖RNAウイルスにおいてNP、P、Lタンパク質は、（－）鎖一本鎖RNAと結合し、ゲノムRNA複製およびタンパク質発現に不可欠な機能を果たす（以下において、場合により、NP、P、Lタンパク質を、「ゲノムRNA結合タンパク質」と称す）。NPタンパク質は、ゲノムRNAと非常に強固に結合し、ゲノムRNAに鋳型活性を付与するタンパク質である。ゲノムRNAは、NPタンパク質との結合状態においてのみRNA合成の鋳型活性を有し、NPタンパク質と結合しない状態では鋳型活性は全く有しない。Pタンパク質はRNAポリメラーゼの小サブユニットとして、Lタンパク質はRNAポリメラーゼの大サブユニットとして、ゲノムRNAに結合する。そのためマイナス鎖RNAウイルスでは、NP、P、Lタンパク質のうち一つでも欠ければ、ゲノムRNA複製は起こらない。

[0028] 本願のベクターのゲノムRNAに含まれている遺伝子は、ウイルス由来の遺伝子配列そのままであってもよいが、何らかの変異が導入されていてもよい。例えば、当業者であれば、各タンパク質の機能を損なわないような軽微な変異を、公知方法によってゲノムRNA上の各遺伝子に導入することができる。例えば、PCR法やカセット変異法等により部位特異的に変異を導入したり、化学試薬やランダムヌクレオチド等によりランダム変異を導入したりすることが可能である。

[0029] 例えば、エンベロープ蛋白質やスパイク蛋白質において弱毒化変異や温度感受性変異を含む多数の変異が知られている。これらの変異蛋白質遺伝子を

有するウイルスを本願において好適に用いることができる。本願においては、望ましくは細胞傷害性を減弱したベクターを用い得る。ベクターの細胞傷害性は、例えばベクター感染細胞からの乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）の放出を定量することにより測定することができる。LDH放出量が少ないほど細胞傷害性は低い。例えば細胞傷害性が野生型に比べ有意に減弱化したベクターを用いることができる。細胞傷害性の減弱化の程度は、例えば、ヒト由来HeLa細胞（ATCC CCL-2）またはサル由来CV-1細胞（ATCC CCL 70）にMOI（感染価）3で感染させて、35～37℃（例えば37℃）で３日間培養した培養液中のLDH放出量が野生型に比べ有意に低下したもの、例えば20％以上、25％以上、30％以上、35％以上、40％以上、または50％以上低下したベクターを用いることができる。また細胞傷害性を低下させる変異には、温度感受性変異も含まれる。

[0030] 低温(例えば30～36.5℃)に比べ、通常の温度（例えば37～38℃）において有意に活性が低下する温度感受性は、ウイルス宿主の通常の温度におけるウイルスの増殖速度または搭載遺伝子の発現レベルを測定することにより決定することができる。変異を有さないものに比べ、ウイルスの増殖速度および/または搭載遺伝子の発現レベルが低下するほど、温度感受性は高いと判断される。

[0031] 本願において使用され得るウイルスベクターは、好ましくは少なくとも１つ、より好ましくは少なくとも２、３、４、５、またはそれ以上のウイルス遺伝子に欠失または変異を有する。欠失と変異は、各遺伝子に対して任意に組み合わせ導入してよい。ここで変異とは、機能低下型の変異または温度感受性変異であってよい。このような改変ウイルスベクターを用いることは、特に宿主細胞における細胞傷害性を低減したり、ベクターの除去を促進したりできる点で有用であり得る。例えば本願において好適に用いられるウイルスベクターは、少なくとも２つのウイルス遺伝子が、欠失または変異している。このようなウイルスには、少なくとも２つのウイルス遺伝子が欠失しているもの、少なくとも２つのウイルス遺伝子が変異しているもの、少なくと

も１つのウイルス遺伝子が変異しており少なくとも１つのウイルス遺伝子が欠失しているものが含まれる。変異または欠失している少なくとも２つのウイルス遺伝子は、好ましくはエンベロープ構成蛋白質をコードする遺伝子である。例えば本願のマイナス鎖RNAウイルスベクターは、少なくともF遺伝子またはM遺伝子を欠損していることが好ましい。例えば、F遺伝子を欠失し、Mおよび／またはHN遺伝子をさらに欠失するか、Mおよび／またはHN遺伝子に変異（例えば温度感受性変異）をさらに有するベクターは、本願において好適に用いられる。また、本願において用いられるベクターは、より好ましくは、少なくとも３つのウイルス遺伝子（好ましくはエンベロープ構成蛋白質をコードする少なくとも３つの遺伝子；F、HN、およびM）が、欠失または変異している。このようなウイルスベクターには、少なくとも３つの遺伝子が欠失しているもの、少なくとも３つの遺伝子が変異しているもの、少なくとも１つの遺伝子が変異しており少なくとも２つの遺伝子が欠失しているもの、少なくとも２つの遺伝子が変異しており少なくとも１つの遺伝子が欠失しているものが含まれる。より好ましい態様を挙げれば、例えばF遺伝子を欠失し、MおよびHN遺伝子をさらに欠失するか、MおよびHN遺伝子に変異（例えば温度感受性変異）をさらに有するベクターは、本願において好適に用いられる。また例えばF遺伝子を欠失し、MあるいはHN遺伝子をさらに欠失し、残るMあるいはHN遺伝子に変異（例えば温度感受性変異）をさらに有するベクターは、本願において好適に用いられる。このような変異型のウイルスは、公知の方法に準じて作製することが可能である。

[0032] 例えば、M遺伝子の温度感受性変異としては、センダイウイルスM蛋白質における69位（G69）、116位（T116）、および183位（A183）からなる群より任意に選択される部位、あるいはマイナス鎖RNAウイルスM蛋白質の相当部位のアミノ酸置換が挙げられる（Inoue, M. et al., J. Virol. 2003, 77: 3238-3246）。M蛋白質に上記の３つの部位のいずれか、好ましくは任意の２部位の組み合わせ、さらに好ましくは３つの部位全てのアミノ酸が他のアミノ酸に置換された変異M蛋白質をコードするゲノムを有するウイルスは、本願におい

て好適に用いられる。

[0033] アミノ酸変異は、側鎖の化学的性質の異なる他のアミノ酸への置換が好ましく、例えばBLOSUM62マトリックス（Henikoff, S. and Henikoff, J. G. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919）の値が３以下、好ましくは２以下、より好ましくは１以下、より好ましくは０のアミノ酸に置換する。具体的には、センダイウイルスM蛋白質であれば、G69、T116、およびA183を、それぞれGlu(E)、Ala(A)、およびSer(S)へ置換することができる。他のマイナス鎖RNAウイルスM蛋白質についても、相当部位のアミノ酸をそれぞれGlu(E)、Ala(A)、およびSer(S)へ置換することができる。また、麻疹ウイルス温度感受性株P253-505（Morikawa, Y. et al., Kitasato Arch. Exp. Med. 1991: 64; 15-30）のM蛋白質の変異と相同な変異を利用することも可能である。変異の導入は、例えばオリゴヌクレオチド等を用いて、公知の変異導入方法に従って実施すればよい。

[0034] 本明細書において、センダイウイルスのアミノ酸配列は、GenBank ACCESSION番号：AB855655に記載のZ株由来のF遺伝子欠損型センダイウイルスのアミノ酸配列を基準とする。したがって、センダイウイルスのX番目のアミノ酸残基とは、GenBank ACCESSION番号：AB855655に記載のアミノ酸配列におけるX番目のアミノ酸残基に相当するアミノ酸残基を意味する。本明細書において、あるアミノ酸配列の所定の位置に「相当する位置」とは、あるアミノ酸配列と他のアミノ酸配列とのアラインメントにおいて、あるアミノ酸配列の所定の位置に相当する他のアミノ酸配列の位置を意味する。アラインメントは、例えば公知の遺伝子解析ソフトウェアを利用して実施できる。具体的な遺伝子解析ソフトウェアとしては、日立ソリューションズ製のDNASIS、ゼネティックス製のGENETYX、DDBJが公開しているFASTA、BLAST、ClustalWなどが挙げられる。

[0035] また、HN遺伝子の温度感受性変異としては、例えばセンダイウイルスのHN蛋白質の262位（A262）、264位（G264）、および461位（K461）からなる群より任意に選択される部位、あるいはマイナス鎖RNAウイルスHN蛋白質の相当部

位のアミノ酸置換が挙げられる（Inoue, M. et al., J. Virol. 2003, 77: 3238-3246）。３つの部位のいずれか１つ、好ましくは任意の２部位の組み合わせ、さらに好ましくは３つの部位全てのアミノ酸が他のアミノ酸に置換された変異HN蛋白質をコードするゲノムを有するウイルスは、本願において好適に用いられる。上記と同様に、アミノ酸の置換は、側鎖の化学的性質の異なる他のアミノ酸への置換が好ましい。好ましい一例を挙げれば、センダイウイルスHN蛋白質のA262、G264、およびK461を、それぞれThr(T)、Arg(R)、およびGly(G)へ置換する。他のマイナス鎖RNAウイルスHN蛋白質についても、相当部位のアミノ酸をそれぞれThr(T)、Arg(R)、およびGly(G)へ置換することができる。また、例えば、ムンプスウイルスの温度感受性ワクチン株Urabe AM9を参考に、HN蛋白質の464及び468番目のアミノ酸に変異導入することもできる（Wright, K. E. et al., Virus Res. 2000: 67; 49-57）。

[0036] また本願のベクターは、P遺伝子および／またはL遺伝子に変異を有していてもよい。このような変異としては、具体的には、SeV P蛋白質の86番目のGlu（E86）の変異、SeV P蛋白質の511番目のLeu（L511）の他のアミノ酸への置換が挙げられる。他のマイナス鎖RNAウイルスP蛋白質についても相当部位の置換が挙げられる。上記と同様に、アミノ酸の置換は、側鎖の化学的性質の異なる他のアミノ酸への置換が好ましい。具体的には、86番目のアミノ酸のLysへの置換、511番目のアミノ酸のPheへの置換などが例示できる。またL蛋白質においては、SeV L蛋白質の1197番目のAsn（N1197）および／または1795番目のLys（K1795）の他のアミノ酸への置換、および他のマイナス鎖RNAウイルスL蛋白質の相当部位の置換が挙げられ、上記と同様に、アミノ酸の置換は、側鎖の化学的性質の異なる他のアミノ酸への置換が好ましい。具体的には、1197番目のアミノ酸のSerへの置換、1795番目のアミノ酸のGluへの置換などが例示できる。P遺伝子およびL遺伝子の変異は、持続感染性、２次粒子放出の抑制、または細胞傷害性の抑制の効果を顕著に高めることができる。さらに、エンベロープ蛋白質遺伝子の変異および／または欠損を組み合わせることで、これらの効果を劇的に上昇させることができる。またL遺伝子は、SeV L

蛋白質の1214番目のTyr（Y1214）および／または1602番目のMet（M1602）の他のアミノ酸への置換、および他のマイナス鎖RNAウイルスL蛋白質の相当部位の置換が挙げられ、上記と同様に、アミノ酸の置換は、側鎖の化学的性質の異なる他のアミノ酸への置換が好ましい。具体的には、1214番目のアミノ酸のPheへの置換、1602番目のアミノ酸のLeuへの置換などが例示できる。以上に例示した変異は、任意に組み合わせることができる。

[0037] 例えば、SeV M蛋白質の少なくとも69位のG、116位のT、及び183位のA、SeV HN蛋白質の少なくとも262位のA、264位のG、及び461位のK、SeV P蛋白質の少なくとも511位のL、SeV L蛋白質の少なくとも1197位のN及び1795位のKが、それぞれ他のアミノ酸に置換されており、かつF遺伝子を欠損または欠失するセンダイウイルスベクター、ならびに、細胞傷害性がこれらと同様またはそれ以下、および/または温度感受性がこれらと同様またはそれ以上のF遺伝子欠損または欠失センダイウイルスベクターは特に好適である。他のマイナス鎖RNAウイルスについても、相当部位を同様に置換し、F遺伝子を欠損または欠失するベクター、ならびに、細胞傷害性がこれらと同様またはそれ以下、および/または温度感受性がこれらと同様またはそれ以上のF遺伝子欠損または欠失ベクターが好ましい。具体的な置換例を例示すれば、例えばM蛋白質についてはG69E、T116A、及びA183Sの置換を、HN蛋白質についてはA262T、G264R、及びK461Gの置換を、P蛋白質についてはL511Fの置換を、そしてL蛋白質についてはN1197S及びK1795Eの置換を挙げることができる。

[0038] アミノ酸変異は、所望の他のアミノ酸への置換であってよいが、好ましくは、上記と同様に側鎖の化学的性質の異なるアミノ酸への置換である。例えばアミノ酸は、塩基性アミノ酸（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性アミノ酸(例えばアスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性アミノ酸(例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン)、非極性アミノ酸(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、β分岐アミノ酸(例えばスレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香

族アミノ酸(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)などのグループに分類することができるが、あるアミノ酸について、そのアミノ酸が属するグループのアミノ酸以外のアミノ酸に置換することなどが挙げられる。具体的には、塩基性アミノ酸であれは、酸性または中性アミノ酸への置換、極性アミノ酸であれは非極性アミノ酸への置換、20種の天然のアミノ酸の平均分子量より大きい分子量を持つアミノ酸であれば、その平均分子量より小さいアミノ酸への置換、逆にその平均分子量より小さいアミノ酸であれば、それより大きいアミノ酸への置換などが挙げられるが、それに限定されない。

[0039] また、L蛋白質の変異としては、SeV L蛋白質の942位（Y942）、1361位（L1361）、および1558位（L1558）から任意に選択される部位、あるいはマイナス鎖RNAウイルスL蛋白質の相当部位のアミノ酸の他のアミノ酸への置換も挙げられる。上記と同様に、アミノ酸の置換は、側鎖の化学的性質の異なる他のアミノ酸への置換が好ましい。具体的には、942番目のアミノ酸のHisへの置換、1361番目のアミノ酸のCysへの置換、1558番目のアミノ酸のIleへの置換などが例示できる。特に少なくとも942位または1558位が置換されたL蛋白質を好適に用いることができる。例えば1558位に加え、1361位も他のアミノ酸に置換された変異L蛋白質も好適である。また、942位に加え、1558位および/または1361位も他のアミノ酸に置換された変異L蛋白質も好適である。これらの変異により、L蛋白質の温度感受性を上昇させることができる。

またP蛋白質の変異としては、SeV P蛋白質の433位（D433）、434位（R434）、および437位（K437）から任意に選択される部位、あるいはマイナス鎖RNAウイルスP蛋白質の相当部位のアミノ酸の他のアミノ酸への置換が挙げられる。上記と同様に、アミノ酸の置換は、側鎖の化学的性質の異なる他のアミノ酸への置換が好ましい。具体的には、433番目のアミノ酸のAla(A)への置換、434番目のアミノ酸のAla(A)への置換、437番目のアミノ酸のAla(A)への置換などが例示できる。特にこれら３つの部位全てが置換されたP蛋白質を好適に用いることができる。これらの変異により、P蛋白質の温度感受性を上昇さ

せることができる。

[0040] 本願のベクターに含まれ得る温度感受性変異はWO2012/029770、WO2010/008054、WO2003/025570に詳述されている。好ましくは、P蛋白質については少なくとも433位のD、434位のR、および437位のKの3箇所が、他のアミノ酸に置換された変異P蛋白質である。加えて、L蛋白質については少なくとも1558位のLが置換された変異L蛋白質（好ましくは少なくとも1361位のLも他のアミノ酸に置換された変異L蛋白質）をコードする、F遺伝子を欠損または欠失するセンダイウイルスベクター、ならびに、細胞傷害性がこれと同様またはそれ以下、および/または温度感受性がこれと同様またはそれ以上のF遺伝子を欠損または欠失するセンダイウイルスベクターも、本願において好適に用いられる。各ウイルス蛋白質は、上記の変異以外に他のアミノ酸（例えば10以内、5以内、4以内、3以内、2以内、または1アミノ酸）に変異を有していてもよい。上記に示した変異を有するベクターは高い温度感受性を示す。

[0041] 本願のベクターに含まれるゲノムRNAは、エンベロープタンパク質遺伝子を全て含んでいてもよく、一部または全部のエンベロープタンパク質遺伝子を含んでいなくてもよい。ゲノムRNAに含まれるエンベロープタンパク質遺伝子（M遺伝子、F遺伝子、HN遺伝子）は野生型であってもよいが、温度感受性変異が導入されていてもよい。エンベロープタンパク質の温度感受性変異は、WO2012/029770、WO2010/008054、WO2003/025570に詳述されている。

[0042] ウイルスベクターを製造する際に、所望の外来性エンベロープ蛋白質をウイルス産生細胞で発現させることにより、これを含むウイルスベクターを製造することができる。このような蛋白質に特に制限はなく、哺乳動物細胞への感染能を付与する所望の接着因子、リガンド、受容体等の蛋白質が用いられる。具体的には、例えば水疱性口内炎ウイルス（vesicular stomatitis virus; VSV）のG蛋白質（VSV-G）を挙げることができる。VSV-G蛋白質は、任意のVSV株に由来するものであってよく、例えばIndiana血清型株（J. Virology 39: 519-528 (1981)）由来のVSV-G蛋白を用いることができるが、これに限定されない。本願のウイルスベクターは、他のウイルス由来のエンベロープ蛋

白質を任意に組み合わせて含むことができる。

[0043] 本願において温度感受性とは、培養温度によって活性が変化することを意味する。例えば発現ベクターの場合、温度感受性ベクターとは、培養温度によって発現量が変わるベクターであって、30～36.5℃の範囲内のある温度での発現量が、かかる温度より0.5～5℃、好ましくは1～4℃、例えば約3℃高い温度での発現量より有意に高いものが好適に用いられる。例えばWO2012/029770、WO2010/008054に詳述のセンダイウイルスのTS7（M蛋白質のG69E/T116A/A183S変異、HN蛋白質のA262T/G264R/K461G変異、P蛋白質のL511F変異、およびL蛋白質のN1197S/K1795E変異（以上を「TS変異」という）に加えて、L蛋白質のY942H/L1361C/L1558I変異）、TS12（TS変異に加えて、P蛋白質のD433A/R434A/K437A変異）、TS13（TS変異に加えて、P蛋白質のD433A/R434A/K437A変異およびL蛋白質のL1558I変異）、TS14（TS変異に加えて、P蛋白質のD433A/R434A/K437A変異およびL蛋白質のL1361C）、TS15（TS変異に加えて、P蛋白質のD433A/R434A/K437A変異およびL蛋白質のL1361C/L1558I）などの変異は、好ましい温度感受性変異である。

[0044] 具体的なベクターを例示すれば、例えばTS7変異、TS12変異、TS13変異、TS14変異、またはTS15変異を持つF遺伝子欠失型センダイウイルスベクター（例えばZ strain）であり得る。具体的には、SeV18+/TSΔF（WO2010/008054、WO2003/025570）やSeV(PM)/TSΔFにおいて、TS変異に加えてさらにTS7、TS12、TS13、TS14、またはTS15の変異を導入したベクターなどが挙げられるが、これらに限定されない。

なお「TSΔF」は、M蛋白質にG69E、T116A、及びA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T、G264R、及びK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、そしてL蛋白質にN1197S及びK1795E変異を持ち、F遺伝子を欠失することを言う。

[0045] 好ましくは、本願のベクターはセンダイウイルスZ株に由来するセンダイウイルスベクターである。Z株のゲノム配列は知られており、例えばZ株由来のF遺伝子欠損型センダイウイルスベクターのゲノム配列としてはACCESSION：AB855655が挙げられる。ここでZ株に由来するとは、ベクターのゲノム中にある

センダイウイルスゲノムの配列のうち、Z株の配列が最も高い割合を占めることを言う。すなわち、ベクターのゲノム配列のうち、非センダイウイルス性の配列（制限酵素認識部位や単なるスペーサー配列、他の種のウイルス由来の配列、導入する遺伝子の配列等）を除外し、センダイウイルスの配列だけを集めた場合に、その中でSeV Z株の配列が最も高い割合を占めることを言う。より好ましくは、Z株に由来するとは、ベクターのゲノム中にあるマイナス鎖RNAウイルス由来の配列のうち、SeV Z株の配列が最も高い割合を占めることを言う。すなわち、ベクターのゲノム配列のうち、マイナス鎖RNAウイルスからとった配列ではない配列（制限酵素認識部位や単なるスペーサー配列、マイナス鎖RNAウイルス以外のウイルス由来の配列、導入する遺伝子の配列等）を除外し、マイナス鎖RNAウイルスの配列だけを集めた場合に、その中でSeVZ株の配列が最も高い割合を占めることを言う。その割合は、好ましくは30％以上、より好ましくは40％以上、50％以上、60％以上、70％以上、80％以上、90％以上、95％以上、96％以上、97％以上、98％以上、または99％以上である。また好ましくは、Z株に由来するセンダイウイルスベクターは、Z株ではないセンダイウイルスのゲノム配列（Z株と同じ配列を除く）を、連続して例えば1000塩基以下、500塩基以下、300塩基以下、200塩基以下、100塩基以下、50塩基以下、30塩基以下、または20塩基以下しかゲノム中に含まない。より好ましくは、Z株に由来するセンダイウイルスベクターは、Z株ではないセンダイウイルスのゲノム配列（Z株と同じ配列を除く）をゲノム中に含まない。

[0046] 本願のベクターの製造は、公知の方法を利用して行えばよい。例えば、マイナス鎖RNAウイルスの場合、具体的な手順として、典型的には、（ａ）マイナス鎖RNAウイルスゲノムRNA（マイナス鎖）またはその相補鎖（プラス鎖）をコードするcDNAを、ウイルス粒子形成に必要なウイルス蛋白質（NP、P、およびL）を発現する細胞で転写させる工程、（ｂ）生成したウイルスを回収する工程、により製造することができる。ウイルスとしては感染性粒子に限定されず、細胞に導入することによって遺伝子を発現する能力を保持している

限り、非感染性粒子やRNPなども含まれる。ウイルスの形成に必要なウイルス蛋白質は、転写させたウイルスゲノムRNAから発現されてもよいし、ゲノムRNA以外から供給されてもよい。例えば、NP、P、およびL蛋白質をコードする発現プラスミドを細胞に導入して供給することができる。ゲノムRNAにおいてウイルスの形成に必要なウイルス遺伝子が欠損している場合は、そのウイルス遺伝子をウイルス産生細胞で別途発現させ、ウイルス形成を相補することもできる。ウイルス蛋白質やRNAゲノムを細胞内で発現させるためには、該蛋白質やゲノムRNAをコードするDNAを宿主細胞で機能する適当なプロモーターの下流に連結したベクターを宿主細胞に導入する。転写されたゲノムRNAは、ウイルス蛋白質の存在下で複製されビリオンが形成される。エンベロープ蛋白質などの遺伝子を欠損する欠損型ウイルスを製造する場合は、欠損する蛋白質またはその機能を相補できる他のウイルス蛋白質などをウイルス産生細胞において発現させることもできる。本願においては、少なくともF遺伝子を欠失したベクターまたはF遺伝子に変異を有するベクターを好適に用いることができる。

[0047] 本願のベクターに含まれるゲノムRNA（ポジティブ鎖またはネガティブ鎖）を、NP、P、およびLタンパク質の存在下で転写させることにより、本願のRNPを製造することができる。RNPの形成は、例えばBHK-21またはLLC-MK2細胞などで行わせることができる。NP、P、およびLタンパク質の供給は、ウイルスベクターにより供給されてもよいし、それ以外にも種々の方法により行うことができる。例えば、上述の通り各遺伝子を含む発現ベクターを細胞に導入することにより行われ得る。また、各遺伝子は宿主細胞の染色体に組み込まれていてもよい。RNPを形成させるために発現させるNP、P、およびL遺伝子は、ベクターのゲノムにコードされるNP、P、およびL遺伝子と完全に同一である必要はない。すなわち、これらの遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列は、RNPゲノムがコードするタンパク質のアミノ酸配列そのままでなくとも、ゲノムRNAと結合し、細胞内でゲノムへの転写複製活性を持つ限り、変異を導入してもよく、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい

。また、野生型タンパク質（野生型NP、P、および/またはLタンパク質）を発現させてもよい。

[0048] 例えば、本願のマイナス鎖RNAウイルスの製造は、以下の従来の方法を利用して実施することができる（WO97/16539; WO97/16538; WO00/70055; WO00/70070; WO01/18223; WO03/025570 ; WO2005/071092; WO2006/137517; WO2007/083644; WO2008/007581; Hasan, M. K. et al., J. Gen. Virol. 78: 2813-2820, 1997、Kato, A. et al., 1997, EMBO J.16: 578-587 及び Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466; Durbin, A. P. et al., 1997, Virology 235: 323-332; Whelan, S. P. et al., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8388-8392; Schnell. M. J. et al., 1994, EMBO J. 13: 4195-4203; Radecke, F. et al., 1995, EMBO J. 14: 5773-5784; Lawson, N. D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 4477-4481; Garcin, D. et al., 1995, EMBO J. 14: 6087-6094; Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579; Baron, M. D. and Barrett, T., 1997, J. Virol. 71: 1265-1271; Bridgen, A. and Elliott, R. M., 1996, Proc. Natl. Acad.Sci. USA 93: 15400-15404; Tokusumi, T. et al. Virus Res. 2002: 86; 33-38、Li, H.-O. et al., J. Virol. 2000: 74; 6564-6569）。またウイルスの増殖方法および組み換えウイルスの製造方法については、ウイルス学実験学 各論、改訂二版（国立予防衛生研究所学友会編、丸善、1982）も参照のこと。

[0049] ［初期化因子］

本願において初期化因子とは、単独で、または複数の因子と共同して、ある細胞の分化状態をより未分化な状態に誘導するために用いられる遺伝子またはその産物を言い、例えば分化した細胞の脱分化を誘導するために用いられる遺伝子またはその産物が含まれる。本願において初期化因子には、核の初期化に必須の因子、および核初期化の効率を上昇させる補助的な因子（補助因子）が含まれる。本願においては、核初期化に用いるための所望の遺伝子をベクターに搭載してよい。例えば多能性幹細胞の製造に用いるための遺伝子を搭載することができる。多能性幹細胞を誘導するための初期化因子と

しては、具体的には、例えばES細胞や初期胚などで発現するが、分化した多くの体細胞では発現しないか、発現が低下する遺伝子（ES細胞特異的遺伝子など）を用いることができる。このような遺伝子は、好ましくは転写因子や核蛋白質等をコードする遺伝子である。核初期化遺伝子を同定する方法は既に知られており（WO2005/80598）、実際、この方法を用いて同定された遺伝子は、多能性幹細胞への初期化（reprogramming）に有用であることが示されている（WO2007/69666）。

[0050] そのような遺伝子の例を挙げれば、DPPA5 (developmental pluripotency associated 5, ES cell specific gene 1 (ESG1); accession numbers NM_001025290, NM_025274, XM_236761) 、F-box protein 15 (Fbx15, NM_152676, NM_015798)、Nanog (NM_024865, AB093574) 、ECAT1 (ES cell associated transcript 1 ; AB211062, AB211060) 、ERAS (EScell expressed Ras; NM_181532, NM_181548)、DNMT3L (DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3-like; NM_013369, NM_019448)、ECAT8 (AB211063, AB211061) 、GDF3 (growth differentiation factor 3; NM_020634, NM_008108) 、SOX15 (SRY (sex determining region Y)-box 15; NM_006942, NM_009235) 、DPPA4 (developmental pluripotency associated 4; NM_018189, NM_028610) 、DPPA2 (NM_138815, NM_028615) 、FTHL17 (ferritin, heavy polypeptide-like 17; NM_031894, NM_031261) 、SALL4 (sal-like 4; NM_020436, NM_175303) 、Oct3/4 (POU5F1とも呼ばれる; NM_002701, NM_203289, NM_013633, NM_001009178) 、Sox2 (NM_003106, NM_011443, XM_574919) 、Rex-1 (ZFP42 (zinc fingerprotein 42 homolog); NM_174900, NM_009556) 、Utf1 (undifferentiated embryonic cell transcription factor 1; NM_003577, NM_009482) 、TCL1A (T-cell leukemia/lymphoma 1A; NM_021966, NM_009337) 、DPPA3 (Stellaとも呼ばれる, NM_199286, NM_139218,XM_216263)、KLF4 (Kruppel-like factor 4; NM_004235, NM_010637) 、cateninβ1 (cadherin-associated protein beta 1; NM_001904, NM_007614; S33Y変異体を含む) 、c-Myc (NM_002467, NM_010849; T58A変異体を含む) 、STAT3 (signal transducer and activator of transcr

iption 3; NM_139276, NM_213659）、GRB2（growth factor receptor-bound protein 2; NM_002086, NM_008163）、ならびにこれらの遺伝子が属するファミリーの他のメンバーの遺伝子などが挙げられる。これらの遺伝子は、細胞に導入することにより多能性幹細胞を誘導できることが示されている（WO2007/69666）。これらの遺伝子は、１つずつ別のベクターに組み込んでもよいし、複数の遺伝子をまとめて１つのベクターに組み込むこともできる。また、それぞれの遺伝子を一種類のベクターに組み込んでもよく、あるいは異なる種類のベクター（染色体組み込み型ウイルスベクターおよび／または非ウイルスベクターを含む）を、染色体非組込み型ウイルスベクターと組み合わせて用いてもよい。また、本願の初期化された細胞の製造方法は、全ての遺伝子導入をウイルスベクターを用いて行う方法に限定されない。すなわち本願の方法は、少なくとも一つの染色体非組み込み型ウイルスベクターを用いればよく、初期化因子を発現する他のベクター（染色体組込み型ウイルスベクターおよび／または非ウイルスベクター）および／または初期化を誘導する化合物等を併用することが含まれる。

[0051] ここで初期化は、例えば分化した細胞からの多能性幹細胞の誘導であってよい。ベクターは、初期化のための因子をコードする遺伝子を組み込んで使用される。初期化因子としては、例えば上記、あるいは以下に例示したいずれかの遺伝子が挙げられる。

[0052] 細胞の初期化を誘導するために特に好ましい遺伝子を例示すれば、F-box protein 15（Fbx15, NM_152676, NM_015798）、Nanog（NM_024865, AB093574）、ERAS（ES cell expressed Ras; NM_181532, NM_181548）、DPPA2（NM_138815, NM_028615）、Oct3/4（POU5F1とも呼ばれる; NM_002701, NM_203289, NM_013633, NM_001009178）、Sox2（NM_003106, NM_011443, XM_574919）、TCL1A（T-cell leukemia/lymphoma 1A; NM_021966, NM_009337）、KLF4（Kruppel-like factor 4; NM_004235, NM_010637）、cateninβ1（cadherin-associated protein beta 1; NM_001904, NM_007614; S33Y変異体を含む）、およびc-Myc（NM_002467, NM_010849; T58A変異体を含む）、ならびにこれらの遺伝子

が属するファミリーの他のメンバーの遺伝子などが挙げられる。個々のウイルスベクターは、使用時に組み合わせて用いることができる。

[0053] 特に好ましい遺伝子の組み合わせの１つは、Sox遺伝子、KLF遺伝子、Myc遺伝子、およびOct遺伝子の４種類の遺伝子を少なくとも含む組み合わせである（Takahashi, K. and Yamanaka S., Cell 126, 663-676, 2006; Lowry WE et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 105(8):2883-8, 2008; Masaki, H. et al., Stem Cell Res. 1:105-115, 2008; WO2007/69666）。ここでSox蛋白質、KLF蛋白質、Myc蛋白質、およびOct蛋白質、ならびにそれらの遺伝子とは、それぞれSoxファミリー、KLFファミリー、Mycファミリー、およびOctファミリーに属するメンバーの蛋白質および遺伝子を言う。これらの４つのファミリーのメンバーをそれぞれ１つ以上発現するように調整すればよい。例えばSoxファミリーの遺伝子については、Sox1、Sox2、Sox3、Sox15、Sox17のいずれの遺伝子を用いてもよい。またKLFファミリーについては、KLF4またはKLF2を使用すればよい。Mycファミリーについては、野生型c-Mycのみならず、T58A変異体や、N-Myc、L-Mycが使用できる。このように、ファミリーの遺伝子を様々に選択して使用することが可能であるので、上記の４種のファミリー遺伝子を適宜選択して、初期化を誘導することができる。

[0054] 例えば野生型c-MycはセンダイウイルスベクターなどのRNAウイルスベクターからの発現量が少ないことが判明している。しかし野生型c-Mycに、a378g、t1122c、t1125c、a1191g、およびa1194gから選択される１つ以上、好ましくは２以上、３以上、４以上、または５つ全ての変異を導入することにより、ベクターから遺伝子を安定して高発現させることが可能となる。遺伝子のベクター中の挿入位置は所望の部位を選択することができる。

[0055] 例えばMyc遺伝子は、マイナス鎖RNAゲノムの後方（5'側）、すなわちゲノム上に配置される複数の蛋白質コード配列において、3'側から数えるよりも5'側から数えた方が早い位置に配置してもよい。Myc遺伝子は、例えば最も5'側（すなわち5'側から1番目）、あるいは5'側から2または3番目に配置することができる。Myc遺伝子は、例えばゲノムの5'側から2番目、具体的には、ゲ

ノムの最も5'側にL遺伝子があり、その次にHN遺伝子がある場合に、その間に配置してもよい。Myc遺伝子は、コードされるアミノ酸配列を変えないように適宜サイレント変異を導入し、連続したAまたはTの塩基配列を置換することができる。

[0056] Myc遺伝子をマイナス鎖RNAゲノムの後方（5'側）に配置したマイナス鎖RNAウイルスベクターは、他の初期化因子を含むマイナス鎖RNAウイルスベクターと組み合わせて用いることができる。この場合、他の初期化因子を含むマイナス鎖RNAウイルスベクターにおいては、それらの初期化因子は、それぞれのベクターのマイナス鎖RNAゲノムにおいて前方（3'側）、すなわちゲノム上に配置される複数の蛋白質コード配列において、5'側から数えるよりも3'側から数えた方が早い位置に配置することができる。例えば最も3'側（すなわち3'側から1番目）、あるいは3'側から2または3番目に配置してよい。例えば、Myc以外の初期化因子（例えばOct遺伝子、Klf遺伝子およびSox遺伝子）は、それぞれのマイナス鎖RNAウイルスベクターにおいて、ゲノムの3'側から1番目または2番目、より好ましくは1番目に配置される。具体的には、ゲノムのNP遺伝子の3'側の、最も3'端側に初期化因子を配置することができる。

[0057] 具体的には、KLFファミリーとしては、Klf1（NM_006563, NM_010635）、Klf2（NM_016270, NM_008452）、Klf4（NM_004235, NM_010637）、Klf5（NM_001730, NM_009769）が含まれ、Mycファミリーとしては、c-Myc（NM_002467, NM_010849, T58A変異体を含む）、NMyc（NM_005378, NM_008709）、L-Myc（NM_005376, NM_005806）が含まれ、Octファミリーとしては、Oct1A（NM_002697, NM_198934）、Oct3/4（NM_002701, NM_203289, NM_013633, NM_001009178）、Oct6（NM_002699, NM_011141）が含まれ、Soxファミリーとしては、Sox1（NM_005986, NM_009233）、Sox2（NM_003106, NM_011443, XM_574919）、Sox3（NM_005634, NM_009237）、Sox7（NM_031439, NM_011446）、Sox15（NM_006942, NM_009235）、Sox17（NM_022454, NM_011441）、Sox18（NM_018419, NM_009236）が含まれる。これらの遺伝子のいずれかを搭載する染色体非組み込み型ウイルスベクターは、本願において細胞の脱分化の誘導に用いるため

に有用である。

[0058] Sox遺伝子、KLF遺伝子、およびOct遺伝子の各遺伝子のいずれか、あるいはSox遺伝子、Myc遺伝子、およびOct遺伝子の各遺伝子のいずれか、あるいはSox遺伝子、Myc遺伝子、およびKlf遺伝子の組み合わせを搭載する１つ以上のウイルスベクターは、本願において細胞の初期化の誘導に用いるために有用である。Myc遺伝子を発現させない場合は、代わりに例えばp53 siRNAおよびUTF1を使用してもよい。それぞれの遺伝子を含むウイルスベクターは別々に単体として準備されてもよい。それらは、使用時に組み合わせて用いることができる。

[0059] なお、もともとの分化した細胞において、上記の遺伝子のうち１つまたは幾つかが、例えば内在的に既に発現している場合は、その遺伝子の導入を省略することができる。初期化因子を含むウイルスベクターは、適宜、必要なものだけを使用してもよい。また、内在性の初期化因子の内在性の発現が、別の遺伝子の発現または化合物処理等により誘導されるのであれば、当該別の遺伝子を発現するベクターの導入や化合物処理を組み合わせて、それだけでは誘導できない初期化因子を含むウイルスベクターのみを導入してもよい。本願において、少なくともOct遺伝子、Klf遺伝子およびSox遺伝子の３種、少なくともOct遺伝子、Klf遺伝子、Sox遺伝子およびMyc遺伝子の４種、あるいは少なくともOct遺伝子、Sox遺伝子、Nanog遺伝子、Lin28遺伝子の４種が内在性または外来性に発現するようにベクターを組み合わせることは、例えばある初期化因子が自然の状態で内在性に発現している状態だけでなく、他の遺伝子を発現するベクターの導入や化合物、蛋白質処理等により、内在性の初期化因子の発現を誘導できる場合に、その処理を組み合わせて、不足する因子のみを外来的に発現するようにウイルスベクターを組み合わせる場合を包含する。

[0060] また、上記４種類または３種類の組み合わせ以外に、Oct遺伝子、Sox遺伝子、NANOG遺伝子（NM_024865, AB093574）、およびLIN28遺伝子(NM_024674)の４種類の各遺伝子を含む組み合わせも有用である。また、これらにMyc遺伝

子およびKLF遺伝子をさらに組み合わせたものも好適である。これらのいずれかの遺伝子を搭載するウイルスベクターは、本願において細胞の脱分化の誘導に用いるために有用である。これらの遺伝子の任意の組み合わせ（または全て）を含む、１つ以上のウイルスベクターも、細胞の初期化において好適に用いることができる。なお上記と同様に、対象とする細胞が既にこれらの遺伝子のうち一部を発現している場合には、その遺伝子を発現するベクターは導入してもしなくてもよい。

[0061] 以上に記載した遺伝子の組み合わせに、さらに別の遺伝子を組み合わせて、初期化の誘導効率を上昇させることもできる。このような遺伝子としては、TERT (NM_198253, NM_009354) および／またはSV40 large T antigen (NC_001669.1, Fiers,W. (05-11-1978) Nature 273:(5658)113-120) が挙げられる。また、HPV16 E6、HPV16 E7、Bmil (NM_005180, NM_007552) からなる群より選択される１つ以上の遺伝子をさらに組み合わせてもよい。また、Fbx15 (Mol Cell Biol. 23(8):2699-708, 2003) 、Nanog (Cell 113: 631-642, 2003) 、ERas (Nature 423, 541-545, 2003) 、DPPA2 (Development 130: 1673-1680, 2003) 、TCL1A (Development 130: 1673-1680, 2003) 、β-Catenin (Nat Med 10(1): 55-63, 2004) からなる群より選択される１つまたは任意の組み合わせを発現させてもよい。さらに、ECAT1 (AB211062, AB211060) 、DPPA5(NM_001025290, NM_025274, XM_236761) 、DNMT3L (NM_013369, NM_019448)、ECAT8 (AB211063, AB211061) 、GDF3 (NM_020634, NM_008108) 、SOX15 (NM_006942, NM_009235) 、DPPA4 (NM_018189, NM_028610) 、FTHL17 (NM_031894, NM_031261) 、SALL4 (NM_020436, NM_175303) 、Rex-1 (NM_174900, NM_009556) 、Utf1 (NM_003577, NM_009482) 、DPPA3 (NM_199286, NM_139218, XM_216263)、STAT3 (NM_139276, NM_213659) 、およびGRB2 (NM_002086, NM_008163) からなる群より選択される１つ以上の遺伝子を組み合わせてもよい。これらの因子も、本願における染色体非組み込み型ウイルスベクターを用いて発現させることができる。

[0062] なお、導入する因子は、初期化したい細胞の由来に合わせて適宜選択すれ

ばよく、ヒト由来であっても、その他の哺乳動物由来、例えばマウス、ラット、ウサギ、ブタ、サル等の霊長類由来であってもよいが、好ましくはヒト由来である。また、遺伝子および蛋白質の配列は必ずしも野生型の配列でなくてもよく、初期化を誘導できる限り、いかなる変異を有していてもよい。例えば、１または少数（例えば数個、３個以内、５個以内、１０個以内、１５個以内、２０個以内、２５個以内）のアミノ酸が付加、欠失、置換、および／または挿入されたアミノ酸配列をコードする遺伝子であって、初期化を誘導できる遺伝子は、本願において使用することができる。また生物学的活性（初期化の誘導能）を維持している限り、例えばＮ末端および／またはＣ末端の１～数残基（例えば２、３、４、５、６、１０、１５または２０残基）のアミノ酸が欠失または付加されたポリペプチド、及び１～数残基（例えば２、３、４、５、６、１０、１５または２０残基）のアミノ酸が置換されたポリペプチドなども使用できる。使用し得るバリアントとしては、例えば天然の蛋白質の断片、アナログ、派生体、及び他のポリペプチドとの融合蛋白質（例えば異種シグナルペプチドまたは抗体断片を付加したもの等）が含まれる。具体的には、野生型のアミノ酸配列の１またはそれ以上のアミノ酸を置換、欠失、および／または付加した配列を含み、野生型蛋白質と同等の生物学的活性（例えば初期化を誘導する活性）を有するポリペプチドが含まれる。野生型蛋白質の断片を用いる場合は、通常、野生型ポリペプチド（分泌蛋白質の場合は成熟型の形態）の70％以上、好ましくは80%以上、85%以上、より好ましくは90％以上、95％以上または98％以上の連続領域を含む。

[0063] アミノ酸配列のバリアントは、例えば天然のポリペプチドをコードするDNAに変異を導入することにより調製することができる（Walker and Gaastra, eds. Techniques in Molecular Biology (MacMillan Publishing Company, New York, 1983); Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492, 1985; Kunkel et al., Methods Enzymol. 154:367-382, 1987; Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.), 1989; U.S. Pat. No. 4,873,192）。生物学的活性

に影響を与えないようにアミノ酸を置換するためのガイダンスとしては、例えばDayhoffら（Dayhoff et al., in Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), 1978）が挙げられる。

[0064] 改変されるアミノ酸数に特に制限はないが、例えば天然の成熟型ポリペプチドの全アミノ酸の30%以内、好ましくは25%以内、より好ましくは20%以内、より好ましくは15%以内、より好ましくは10%以内、5%以内、または3%以内であり、例えば15アミノ酸以内、好ましくは10アミノ酸以内、より好ましくは8アミノ酸以内、より好ましくは5アミノ酸以内、より好ましくは3アミノ酸以内である。アミノ酸を置換する場合は、側鎖の性質が似たアミノ酸に置換することにより蛋白質の活性を維持することが期待できる。このような置換は、本願において保存的置換という。保存的置換は、例えば塩基性アミノ酸（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性アミノ酸(例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性アミノ酸(例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性アミノ酸(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分岐アミノ酸(例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族アミノ酸(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）などの各グループ内のアミノ酸間の置換などが挙げられる。また、例えば、BLOSUM62置換マトリックス（S. Henikoff and J.G. Henikoff, Proc. Acad. Natl. Sci. USA 89: 10915-10919, 1992）において、正の値の関係にあるアミノ酸間の置換が挙げられる。

[0065] 改変された蛋白質は、野生型蛋白質のアミノ酸配列と高いホモロジーを示す。高いホモロジーとは、例えば70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、93%以上、95%以上、または96%以上の同一性を有するアミノ酸配列である。アミノ酸配列の同一性は、例えばBLASTPプログラム（Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990）を用いて決定することができる

。例えばNCBI (National Center for Biothchnology Information) のBLASTのウェブページにおいて、デフォルトのパラメータを用いて検索を行うことができる (Altschul S.F. et al., Nature Genet. 3:266-272, 1993; Madden, T.L. et al., Meth. Enzymol. 266:131-141, 1996; Altschul S.F. et al., Nucleic Acids Res.25:3389-3402, 1997; Zhang J. & Madden T.L., Genome Res. 7:649-656, 1997) 。例えば２つの配列の比較を行うblast2sequencesプログラム (Tatiana A et al., FEMS Microbiol Lett. 174:247-250, 1999) により、２配列のアライメントを作成し、配列の同一性を決定することができる。ギャップはミスマッチと同様に扱い、例えば天然型サイトカイン（分泌後の成熟型の形態）のアミノ酸配列全体に対する同一性の値を計算する。具体的には、野生型蛋白質(分泌蛋白質の場合は成熟型)の全アミノ酸数における一致するアミノ酸数の割合を計算する。

[0066] また遺伝子は、コードされるアミノ酸配列を変えないようにサイレント変異を導入することができる。特にAT richな遺伝子においては、5個以上の連続したAまたはTの塩基について、コードされるアミノ酸配列を変えないようにGまたはCに置換することにより、安定して遺伝子の高発現を得ることができる。

[0067] また改変蛋白質あるいは初期化に用いるタンパク質は、野生型蛋白質をコードする遺伝子のコード領域の一部または全部とストリンジェントな条件でハイブリダイズする核酸がコードする蛋白質であって、野生型蛋白質と同等の活性（初期化を誘導する活性）を有する蛋白質が挙げられる。ハイブリダイゼーションにおいては、例えば野生型蛋白質遺伝子のコード領域の配列またはその相補配列を含む核酸、またはハイブリダイズの対象とする核酸のどちらかからプローブを調製し、それが他方の核酸にハイブリダイズするかを検出することにより同定することができる。ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件は、例えば5xSSC、7%(W/V) SDS、100μg/ml変性サケ精子DNA、5xデンハルト液（１xデンハルト溶液は0.2%ポリビニールピロリドン、0.2%牛血清アルブミン、及び0.2%フィコールを含む）を含む溶液中、60℃、好

ましくは65℃、より好ましくは68℃でハイブリダイゼーションを行い、その後ハイブリダイゼーションと同じ温度で2xSSC中、好ましくは1xSSC中、より好ましくは0.5xSSC中、より好ましくは0.1xSSC中で、振蕩しながら２時間洗浄する条件である。

[0068] ［ナイーブ型人工多能性幹細胞の製造方法］

本願は、下記工程（１）～（３）を含む、ヒト体細胞からナイーブ型人工多能性幹細胞を製造する方法を提供する；

（１）ヒト体細胞に、初期化因子を含む1つ以上のベクターを導入する工程、

（２）前記体細胞をナイーブ用培地の存在下で培養する工程、および

（３）工程（２）の後、得られた細胞をナイーブ用培地の存在下、前記体細胞当たりの前記ベクター量が工程３開始時と比して30％以下に減少する条件下で培養する工程。

[0069] 本開示において、体細胞としては、特に限定されず、任意の体細胞を利用できる。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、末梢血単核球、臍帯血、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、同様に本願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。好ましくはヒト由来の体細胞である。

[0070] 本開示において、人工多能性幹細胞とは、体細胞を公知の方法等によって初期化（reprogramming）することで多能性を誘導した細胞である。具体的には、線維芽細胞、又は末梢血単核球等の分化した体細胞を、Oct3/4、Sox2、Klf4、Myc（c-Myc、N-Myc、L-Myc）、Glis1、Nanog、Sall4、lin28、Esrrb等を含む初期化遺伝子群から選ばれる複数の遺伝子の組合せのいずれかの発現によって初期化して、多分化能を誘導した細胞が挙げられる。

[0071] 本開示において、ナイーブ型人工多能性幹細胞とは、着床前胚に類似した性質を持つ人工多能性幹細胞を意味し、着床前胚の内細胞塊と同等の遺伝子発現パターン（具体的には、１以上のナイーブ型特異的マーカーの発現、または、１以上の特定遺伝子産物のナイーブ型特異的細胞内局在）、全ゲノムに渡る広範なDNA脱メチル化、X染色体の再活性化、重層でドーム状のコロニー形態のいずれか１以上の特徴を呈する人工多能性幹細胞と定義され得る。ここで、ナイーブ型特異的マーカーとしては、例えば、TCFP2L1、KLF17、TBX3、PRDM14、SSEA1、CD7、CD75、CD77、CD130、DPPA3、ESRRB、KLF4、およびKLF5が挙げられる。また、特定の遺伝子産物のナイーブ型特異的な細胞内局在としては、例えば、TFE3タンパク質の核内局在が挙げられる。

[0072] 製造された人工多能性幹細胞がナイーブ型であることは、前記特徴を１以上備えることで確認してもよく、好ましくは、前記ナイーブ型特異的マーカーの発現および／または特定の遺伝子産物のナイーブ型特異的な細胞内局在を確認してもよい。さらに、迅速性と簡便性から、ドーム状のコロニー形態で確認してもよい。

[0073] 遺伝子発現パターンを確認する方法としては、RNA-seq、qPCR、免疫染色、FCMなど自体公知の方法を使用でき、好ましくはRNA-seqが使用され得る。

[0074] 一方で、プライム型人工多能性幹細胞とは、着床後胚のエピブラストに類似した性質を持つ人工多能性幹細胞を意味し、着床後胚のエピブラストと同

等の遺伝子発現パターン（具体的には、１以上のプライム型特異的マーカーの発現、または、１以上の特定遺伝子産物のプライム型特異的細胞内局在）、単層で扁平なコロニー形態のいずれか１以上の特徴を呈する人工多能性幹細胞と定義され得る。ここで、プライム型特異的マーカーとしては、例えばOTX2またはZIC2が挙げられ、特定の遺伝子産物のプライム型特異的な細胞内局在としては、例えば、TFE3タンパク質の細胞質局在が挙げられる。

[0075] 製造された人工多能性幹細胞がプライム型であることは、前記特徴を１以上備えることで確認してもよく、好ましくは、前記プライム型特異的マーカーの発現および／または特定の遺伝子産物のプライム型特異的な細胞内局在の確認である。さらに、迅速性と簡便性から、単層で扁平なコロニー形態で確認してもよい。

[0076] 工程（１）において、ヒト体細胞に、初期化因子を含む1つ以上のベクターを導入する。

[0077] 初期化因子としては、上記の初期化因子が使用できる。例えば、初期化因子は、OCT遺伝子、SOX遺伝子、MYC遺伝子およびKLF遺伝子を含んでいてもよい。

[0078] 1つ以上のベクターとしては、上記のベクターが使用できる。例えば、1つ以上のベクターは、例えば染色体非組み込み型ウイルスベクターであり、好ましくはパラミクソウイルスベクターであり、より好ましくはセンダイウイルスベクターであってもよい。

[0079] 初期化因子を含む1つ以上のベクターは、例えば、OCT遺伝子、SOX遺伝子およびKLF遺伝子を含むベクター、MYC遺伝子を含むベクター、およびKLF遺伝子を含むベクターを含んでいてもよい。

[0080] 細胞を初期化させるには、上記の組み合わせのベクターを細胞に導入する。複数のベクターを組み合わせて導入する場合、導入は同時に行うことが好ましく、具体的には、最初のベクターまたは化合物等を添加してから４８時間以内、好ましくは３６時間以内、より好ましくは２４時間以内、１８時間以内、１２時間以内、１０時間以内、８時間以内、６時間以内、３時間以内

、２時間以内、または１時間以内に初期化因子を含む全てのベクターの添加を完了することが好ましい。ベクターの用量は適宜調製することができるが、好ましくはMOI 0.3～100、より好ましくはMOI 0.5～50、より好ましくはMOI 1～30、より好ましくはMOI 1～10、より好ましくはMOIを約5で感染させる。

[0081] ある態様において、工程（１）の1～15日、1～10日、例えば3～9日後に工程（２）が開始される。工程（２）が開始されるまで、ヒト体細胞は適切な培養条件下で培養され得る。

[0082] 本願において、培地は動物細胞の培養に用いられる基礎培地に必要な因子を適宜添加して調製され得る。基礎培地としては、例えば、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、αMEM培地、MEM Zinc Option培地、IMEM Zinc Option培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、DMEM/F12培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地などが包含される。基礎培地には、血清（例えば、ウシ胎児血清（FBS））が含有されていてもよいし、または無血清でもよい。必要に応じて、例えば、アルブミン、インスリン、トランスフェリン、セレン、KnockOut Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時の血清代替物) (Invitrogen)、N2サプリメント (Invitrogen)、B27サプリメント (Invitrogen)、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの１つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、GlutaMAX (Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、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）、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、サイトカインおよびこれらの同等物などの1つ以上の物質も含有しうる。１つの実施形態において、基礎培地は、DMEM培地またはDMEM/F12培地である。基礎培地として市販の培地を使用してもよく、例えばヒト造血細胞を培養する場合、StemSpan ACF (STEMCELL Technologies社）などの培地を使用できる。ヒト造血細胞を培養する場合、基礎培地に

さらに幹細胞因子（SCF）、トロンボポエチン（TPO）、Flt3/Flk2、IL-6およびIL-3などの因子を追加してもよい。

[0083] ある態様において、体細胞は、フィーダー細胞と共に培養され得る。本明細書において、フィーダー細胞とは、体細胞を培養する際に共存させる前記体細胞以外の細胞を意味する。フィーダー細胞としては、特に限定されないが、例えば、線維芽細胞（NIH-3T3細胞、MEF細胞、STO細胞、SNL細胞など）、胎児腎臓細胞（HEK293細胞など）、間質細胞（ST2細胞、OP9細胞、PA6細胞、MS-5細胞など）、上皮細胞（HeLa細胞など）、胎盤細胞、骨髄細胞、子宮内膜細胞などが挙げられる。フィーダー細胞は、例えばMEF細胞である。フィーダー細胞は、体細胞と同一の種に由来する細胞であってもよく、異なる種に由来する細胞であってもよい。また、フィーダー細胞は、増殖抑制剤（例えばマイトマイシンC）または放射線（例えばX線またはγ線）照射などにより細胞増殖を抑止するように処理されていてもよい。本願で使用されるフィーダー細胞の濃度は、前記体細胞の増殖が可能である限り特に限定されないが、例えば約5×10^3細胞/cm^2～約1×10^5細胞/cm^2である。体細胞は、培養の最初からフィーダー細胞と共に培養されてもよく、培養の途中からフィーダー細胞と共に培養されてもよい。例えば、体細胞は、培養の2～10日目、または2～5日目からフィーダー細胞と共に培養され得る。別の態様において、体細胞は、フィーダー細胞の非存在下で培養され得る。

[0084] 体細胞の培養において、培養温度は、以下に限定されないが、約30～40℃の範囲内でベクターの特性に合わせて決定すればよい。培養は、CO_2含有空気の雰囲気下で行われ、CO_2濃度は、約2～8%、好ましくは約3～7%、さらに好ましくは約4～6%、最も好ましくは約5%である。また、（１）の工程の後、培養は低酸素条件下で行ってもよく、酸素濃度は、約3～10%、好ましくは約4～8%、さらに好ましくは約4～6%、最も好ましくは約5%である。

[0085] ある態様において、体細胞は2次元培養により培養される。フィーダー細胞存在下において培養を行う場合、例えばフィーダー細胞を培養容器底面または培養基質などにあらかじめ播種および培養し、培養容器の底面または培養

基質の表面を埋め尽くす程度に増殖させた後、体細胞をこのフィーダー細胞上に播種し、培養してもよい。

[0086] 体細胞を培養するための培養容器は、例えばコーティング剤で処理されたものが使用される。コーティング剤としては、例えば、ゼラチン、マトリゲル（BD）、Synthemax（Corning）、コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン、これらの断片およびこれらの組み合わせが例示される。

[0087] （２）の工程において、前記体細胞をナイーブ用培地の存在下で培養する。

[0088] （２）の工程において、培養温度は、以下に限定されないが、約30～40℃の範囲内でベクターの特性に合わせて決定すればよい。培養は、CO_2含有空気の雰囲気下で行われ、CO_2濃度は、約2～8%、好ましくは約3～7%、さらに好ましくは約4～6%、最も好ましくは約5%である。また、培養は低酸素条件下で行ってもよく、酸素濃度は、約3～10%、好ましくは約4～8%、さらに好ましくは約4～6%、最も好ましくは約5%である。

[0089] 本願において、ナイーブ用培地は、体細胞からナイーブ型人工多能性幹細胞を誘導する際に使用される培地を意味する。ナイーブ用培地の基礎培地としては、上記に記載される基礎培地を使用することができ、例えば、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。

[0090] ある態様において、ナイーブ用培地は、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阻害剤から選ばれる１以上の化合物を含む。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。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。

[0091] 培地中のＬＩＦの濃度は、1ng/ml～100ng/ml、または5ng/ml～50ng/mlであり得、例えば約10ng/mlである。

[0092] 本願において、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）、Ｕ０１２６（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：１０９５１１－５８－２）、ＰＤ９８０５９（２－（２－アミノ－３－メトキシフェニル）－４Ｈ－１－ベンゾピラン－４－オン；ＣＡＳ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；ＣＡＳ登録番号：２１２６３１－７９－３が挙げられる。なかでも、ＰＤ０３２５９０１が好ましい。ＭＥＫ阻害剤としてＰＤ０３２５９０１を用いる場合、その培地中の濃度は、50nM～100μM、または100nM～10μMであり得、例えば約1μMである。

[0093] 本願において、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－１Ｈ－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；ＣＡＳ登録番号：２５２９１７－０６－９）、ＢＩＯ（６－ブロモインジルビン－３’－オキシム；ＣＡＳ登録番号：６６７４６３－６２－９）、Ｋｅｎｐａｕｌｌｏｎｅ（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（５Ｈ）－オン；ＣＡＳ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－１Ｈ－インドール－３－イル)－１Ｈ－ピロール－２，５－ジオン；ＣＡＳ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、50nM～100μM、または100nM～10μMであり得、例えば約1μMである。

[0094] 本願において、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、50nM～100μM、または100nM～10μMであり得、例えば約1μMである。

[0095] 本願において、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）－１Ｈ－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）－１Ｈ－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、10nM～100μM、または100nM～10μMであり得、例えば約1μMである。

[0096] 本願において、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－１Ｈ－インドール－３－イル］－４－（１Ｈ－インドール－３－イル）－１Ｈ－ピロール－２，５－ジオン；ＣＡＳ登録番号：１３３０５３－１９－７）、ＧＦ１０９２０３Ｘ（３－（１－（３－ジメチルアミノ）プロピル）－１Ｈ－インドール－３－イル）－４－（１Ｈ－インドール－３－イル）－１Ｈ－ピロール－２，５－ジオン；ＣＡＳ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、50nM～100μM、または100nM～10μMであり得、例えば約1μM～3μMである。

[0097] ナイーブ用培地は市販の培地を使用してもよく、例えばt2iLGo（N2B27＋PD0325901(1μM)＋CHIR99021(1μM)＋LIF＋Go6983(2-3μM)）、5iLAF（N2B27＋PD0325901(1μM)＋CHIR99021(1μM)＋SB590885（0.5μM)＋WH-4-023（1μM）

＋Y-27632(10μM)＋LIF＋Activin A）またはtt2iLGo（N2B27＋PD0325901(1μM)＋LIF＋Go6983(2μM)＋XAV939(2μM)）が使用できる。

[0098] 細胞がフィーダー細胞の非存在下で培養される場合、ナイーブ用培地は、特定の細胞で予め馴化され得る。特定の細胞としては、上述のフィーダー細胞として使用可能な細胞が使用され得、例えば放射線照射後マウス胎児線維芽細胞（iMEF）であり得る。馴化のための培養の期間は、例えば約12時間～約2日間であり得る。培地は、馴化のための培養後に常法により細胞成分を除去することによって取得され得る。ある実施形態において、細胞がフィーダー細胞の非存在下で培養される場合、ナイーブ用培地は、iMEFで馴化されたt2iLGoであり得る。

[0099] 工程（２）において、体細胞の培養期間は、1日～20日、3日～10日、例えば4～6日であり得る。

[0100] 工程（３）において、得られた細胞をナイーブ用培地の存在下、前記体細胞当たりの前記ベクター量が工程３開始時と比して30％以下に減少する条件下で培養する。

[0101] ある態様において、得られた細胞はフィーダー細胞と共に培養され得る。フィーダー細胞としては上述した細胞が使用できる。別の態様において、得られた細胞は、フィーダー細胞の非存在下で培養され得る。

[0102] 工程（３）において、ナイーブ用培地は工程（２）で使用したナイーブ用培地と同じものを使用することができる。ナイーブ用培地は、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阻害剤から選ばれる１以上の化合物を含み得る。例えば、t2iLGo、5iLAF、またはtt2iLGoを含み得る。

[0103] 細胞がフィーダー細胞の非存在下で培養される場合、ナイーブ用培地は、特定の細胞で予め馴化され得る。特定の細胞としては、上述のフィーダー細胞として使用可能な細胞が使用され得、例えば放射線照射後マウス胎児線維芽細胞（iMEF）であり得る。馴化のための培養の期間は、例えば約12時間～約2日間であり得る。培地は、馴化のための培養後に常法により細胞成分を除

去することによって取得され得る。ある実施形態において、細胞がフィーダー細胞の非存在下で培養される場合、ナイーブ用培地は、iMEFで馴化されたt2iLGoであり得る。

[0104] （３）の工程において、培養温度は、以下に限定されないが、約30～40℃の範囲内でベクターの特性に合わせて決定すればよい。培養は、CO_2含有空気の雰囲気下で行われ、CO_2濃度は、約2～8%、好ましくは約3～7%、さらに好ましくは約4～6%、最も好ましくは約5%である。また、培養は低酸素条件下で行ってもよく、酸素濃度は、約3～10%、好ましくは約4～8%、さらに好ましくは約4～6%、最も好ましくは約5%である。

[0105] ある態様において、前記体細胞当たりの前記ベクター量は、例えば工程３開始時から30日以内、20日以内、15日以内、12日以内、10日以内、8日以内、5日以内、3日以内、または1日以内に、工程３開始時と比して50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または3%以下に減少し得る。例えば、前記体細胞当たりの前記ベクター量は、工程３開始時から12日以内に工程３開始時と比して30%以下に減少し得る。

[0106] ある態様において、前記1つ以上のベクターを、温度感受性を示すベクター、人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクター、または温度感受性を示し、かつ人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクターとし、得られた細胞をナイーブ用培地の存在下で培養することにより、前記体細胞当たりの前記ベクター量が工程３開始時と比して50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または3%以下に減少し得、例えば工程３開始時から30日以内、20日以内、15日以内、12日以内、10日以内、8日以内、5日以内、3日以内、または1日以内に、工程３開始時と比して50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または3%以下に減少し得る。

[0107] 温度感受性を示すベクターとしては上記のベクターが使用できる。例えば、温度感受性を示すベクターは、上記の温度感受性変異を含むベクターであり得る。ある態様において、温度感受性を示すベクターは、ナイーブ型多能

性幹細胞を樹立する細胞培養環境下で温度感受性を示すベクターである。ナイーブ型多能性幹細胞を樹立する細胞培養環境下で温度感受性を示すベクターとしては、例えば、TS7変異（M蛋白質のG69E/T116A/A183S変異、HN蛋白質のA262T/G264R/K461G変異、P蛋白質のL511F変異、およびL蛋白質のN1197S/K1795E変異（以上を「TS変異」という）に加えて、L蛋白質のY942H/L1361C/L1558I変異）、TS12変異（TS変異に加えて、P蛋白質のD433A/R434A/K437A変異）、またはTS15変異（TS変異に加えて、P蛋白質のD433A/R434A/K437A変異およびL蛋白質のL1361C/L1558I）変異を含むセンダイウイルスベクター、ならびに相当部位を同様に置換した他のマイナス鎖RNAウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。

[0108] 初期化因子を含む1つ以上のベクターは、例えば、OCT遺伝子、SOX遺伝子およびKLF遺伝子を含むベクター、MYC遺伝子を含むベクター、およびKLF遺伝子を含むベクターを含み得る。OCT遺伝子、SOX遺伝子およびKLF遺伝子を含むベクター、MYC遺伝子を含むベクター、およびKLF遺伝子を含むベクターは、センダイウイルスベクターであり得、例えばTS7、TS12またはTS15変異を含むセンダイウイルスベクターであり得る。ある実施形態において、MYC遺伝子を含むベクターはTS15変異を含むセンダイウイルスベクターであり得、OCT遺伝子、SOX遺伝子およびKLF遺伝子を含むベクター、およびKLF遺伝子を含むベクターは、TS12変異を含むセンダイウイルスベクターであり得る。

[0109] ある態様において、前記1つ以上のベクターが温度感受性を示すベクターである場合、工程（１）および（２）では当該ベクターの発現量が高い温度、工程（３）では当該ベクターの発現量が低い温度で培養すればよい。例えば、上記に例示したベクターの場合、工程（１）および（２）を30～36.5℃、34～36℃、例えば約35℃、工程（３）を37℃以上、38℃以上、37℃～45℃、37℃～40℃、例えば約38℃で培養すればよい。一例として、工程（１）および（２）を約35℃、工程（３）を約38℃で培養する態様が挙げられる。

[0110] 人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列としては、人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAが標的として結合する配列であれば特に限定さ

れない。人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAとしては、例えばmiR-367、miR-302、miR-371、miR-372、miR-373、miR-512、miR-517、miR-518、miR-519、miR-520、miR-525、miR-187、miR-299、miR-499、miR-628、およびmiR-888が挙げられる。

[0111] マイクロRNA標的配列とは、マイクロRNAが標的として結合する配列を言う。本願においてマイクロRNA標的配列は、マイクロRNAの結合により発現が抑制される限り、天然のマイクロRNA標的配列やその変異体を用いることができる。またマイクロRNA標的配列は、マイクロRNAに完全に相補的な配列であってもなくてもよく、例えばマイクロRNAに対して、少なくとも10塩基、例えば11塩基以上、12塩基以上、13塩基以上、14塩基以上、15塩基以上、16塩基以上、17塩基以上、18塩基以上、19塩基以上、20塩基以上、21塩基以上、22塩基以上の相補的な塩基を連続または非連続に含む。マイクロRNA標的配列の配列の長さに上限は特にないが、例えば約30塩基である。好ましくは、該相補的な塩基は連続しているか、あるいは数個、例えば5塩基以下、4塩基以下、3塩基以下、2塩基以下、または1塩基の対合しない塩基を有していてもよい。対合しない塩基は、マイクロRNA標的配列側および/またはマイクロRNA側に含まれていてよい。

[0112] マイクロRNA標的配列は、好ましくは、マイクロRNAと生理的条件下でハイブリダイズする配列である。生理的条件下とは、例えば150mM NaCl、15mM sodium citrate、pH7.0、37℃である。より好ましくは、マイクロRNA標的配列は、マイクロRNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする配列である。ストリンジェントな条件とは、例えば1×SSC（1×SSCは150mM NaCl、15mM sodium citrate、pH7.0）または0.5×SSC、42℃の条件であり、より好ましくは1×SSCまたは0.5×SSC、45℃の条件であり、より好ましくは1×SSCまたは0.5×SSC、50℃の条件である。ハイブリダイゼーションにおいては、例えばマイクロRNA配列を含むRNAまたはマイクロRNA標的配列を含むRNAのどちらかを標識し、必要に応じて他方を膜等に固定して両者をハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションの条件は、例えば5xSSC、7%(W/V)SDS、100μg/m

l 変性サケ精子DNA、5xデンハルト液（１xデンハルト溶液は0.2%ポリビニールピロリドン、0.2%牛血清アルブミン、及び0.2%フィコールを含む）を含む溶液中、例えば37℃、または45℃、または50℃で行えばよい。十分な時間（例えば3、4、5または6時間以上）インキュベートした後、上記の条件で洗浄を行い、標識した核酸がハイブリダイズしているかを検出することにより、当該条件で核酸がハイブリダイズするか否かを決定することができる。

[0113] あるいはマイクロRNA標的配列は、好ましくは、マイクロRNA配列の相補配列と高いホモロジーを示す。高いホモロジーとは、例えば70%以上、75%以上、76%以上、77%以上、78%以上、79%以上、80%以上、81%以上、82%以上、83%以上、84%以上、85%以上、86%以上、87%以上、88%以上、89%以上、90%以上、93%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、または99%以上の同一性を有する塩基配列である。塩基配列の同一性は、例えばBLASTプログラム（Altschul, S. F. et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410, 1990）を用いて決定することができる。例えばNCBI（National Center for Biothchnology Information）のBLASTのウェブページにおいて、デフォルトのパラメータを用いて検索を行うことができる（Altschul S.F. et al., Nature Genet. 3:266-272, 1993; Madden, T.L. et al., Meth.Enzymol. 266:131-141, 1996; Altschul S.F. et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997; Zhang J. & Madden T.L., Genome Res. 7:649-656, 1997）。例えば２つの配列の比較を行うblast2sequencesプログラム（Tatiana A et al., FEMS Microbiol Lett. 174:247-250, 1999）により、２配列のアライメントを作成し、配列の同一性を決定することができる。マイクロRNA配列の相補配列の塩基配列の外側のギャップは無視し、内側のギャップは例えばミスマッチと同様に扱い、アライメントにおけるマイクロRNA配列の相補配列の塩基配列全体（配列の内側に入れたギャップを加算したトータルの塩基の長さ）に対する同一性の値を計算する。

[0114] あるいはマイクロRNA標的配列は、好ましくは、マイクロRNA配列の相補配列に対して、1または数個の塩基を挿入、置換、および/または欠失させた配列からなる。好ましくは、マイクロRNA標的配列は、マイクロRNA配列の相補

配列に対して8塩基以内、7塩基以内、6塩基以内、5塩基以内、4塩基以内、3塩基以内、2塩基以内、または1塩基の挿入、置換、および/または欠失を有する配列を含む。

[0115] 一般に、マイクロRNA標的配列に変異を導入するほどマイクロRNAとの結合が抑制され、発現抑制効果は低下する。変異を適宜導入することによって抑制効果を調節することが可能である。

[0116] ある態様において、本願のベクターがマイナス鎖RNAウイルスベクターである場合、マイクロRNA標的配列は、NPまたはP遺伝子に付加される。NPまたはP遺伝子にマイクロRNA標的配列を付加する場合、付加する位置に特に制限はなく、各遺伝子の翻訳領域または非翻訳領域に付加することができる。翻訳領域に付加する場合、N末端部位あるいはC末端部位のいずれかの位置に付加してよいが、例えばC末端に続けて付加することが好ましい。非翻訳領域としては、ゲノムにおける5'非翻訳領域でも3'非翻訳領域でもよいが、5'非翻訳領域が好ましい。非翻訳領域に付加する場合、その位置は任意に選択してよいが、例えばNP遺伝子および/またはP遺伝子のゲノムにおける5'非翻訳領域にマイクロRNA標的配列を付加する場合は、付加する遺伝子の翻訳領域の終止コドンとE（End）配列の間であればどの位置でもよい。ゲノムにおける3'非翻訳領域に付加する場合は、例えば付加する遺伝子のS（Start）配列と翻訳開始コドンとの間の所望の位置に付加することができる。マイクロRNA標的配列は、１コピーまたは複数コピー付加することができる。また、1種類のマイクロRNA標的配列だけでなく、複数種のマイクロRNA標的配列を付加してもよい。一例としては、例えば1種または複数種のマイクロRNA標的配列をタンデムに2個以上、例えば3個以上、4個以上、5個以上並べた配列を付加することができる。タンデムに付加するマイクロRNA標的配列の数に上限は特にないが、例えば約10個までである。

[0117] P遺伝子を改変する場合、P蛋白質のコード領域中の核酸にコードされるC蛋白質の発現が阻害される場合は、ベクターからC蛋白質を別途、発現させればよい。

[0118] なお、P蛋白質は全長でなくても、適宜断片を用いることができる。P蛋白質として必須なのはC末端の一部だけであって、その他の領域はウイルスベクターの発現に必須ではない。P蛋白質は、具体的には、L蛋白質の結合部位とN蛋白質：RNAへの結合部位とを保持する断片であってもよい。L蛋白質の結合部位としては、例えばSeV P蛋白質の411番目～445番目のアミノ酸配列が挙げられ、N蛋白質：RNA結合部位としては、例えばSeV P蛋白質（例えばaccession番号AAB06197.1, P04859.1, P14252.1, AAB06291.1, AAX07439.1, BAM62828.1, BAM62834.1, P04860.1, BAM62840.1, BAD74220.1, P14251.1, BAM62844.1, BAM62842.1, BAM62842.1, BAF73480.1, BAD74226.1, BAF73486.1, Q9DUE2.1, BAC79134.1, NP_056873.1, ABB00297.1等）の479番目～568番目のアミノ酸配列が挙げられる。より具体的には、例えばSeV P蛋白質の320番目～568番目のアミノ酸配列を含む断片は、本願において機能的なP蛋白質として好適に用いることができる。欠失型のP蛋白質を用いることで、ベクターのサイズを小型化できると共に、宿主の免疫反応の影響も受けにくくなることが期待できる。

[0119] C蛋白質のコード領域を欠失するP蛋白質を用いる場合は、上述の通り、適宜C蛋白質を別途発現させてもよい。ここでC蛋白質には、C'、C、Y1、およびY2蛋白質が含まれる（Irie T. et al.,PLoS One. (2010) 5:e10719.）。C蛋白質を発現させるには、C蛋白質のコード配列を適宜ベクター中に挿入すればよい。挿入位置に特に制限はないが、P蛋白質の直前（ゲノムにおけるP蛋白質のコード配列の3'側）あるいはP蛋白質の直後（ゲノムにおけるP蛋白質のコード配列の5'側）に挿入することができる。挿入にあたっては、適宜E-I-S配列を付加してよい。

[0120] NP遺伝子またはP遺伝子にマイクロRNA標的配列を付加した場合、ベクターを導入した細胞においてこのマイクロRNAが発現すると、それに合わせてベクターの発現は低下し、ベクターの除去が促進される。例えば、ベクターの導入時には発現していないが、ある分化状態（または未分化状態）になった時に特異的に発現するマイクロRNAの標的配列をベクターに付加しておくことに

より、当該ベクターが、目的が達成された時に自動的に発現が抑制され、除去される。

[0121] 別の態様において、前記1つ以上のベクターを、P遺伝子にデグロンが付加されたベクターとし、得られた細胞をナイーブ用培地の存在下で培養してもよい。これにより、前記体細胞当たりの前記ベクター量が工程３開始時と比して50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または3%以下に減少し得、例えば工程３開始時から30日以内、20日以内、15日以内、12日以内、10日以内、8日以内、5日以内、3日以内、または1日以内に、工程３開始時と比して50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または3%以下に減少し得る。

[0122] 本願において、デグロンとは蛋白質に付加することにより該蛋白質を不安定化させるポリペプチドを意味する。デグロンには、低分子との融合によって安定化する配列、低分子との結合によって不安定化する配列、低分子の有無に関わらず不安定化する配列が挙げられる。具体的には、mTOR蛋白として知られるFKBP12由来のDD-tag（US2009/0215169）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）由来のDDG-tag（US2012/0178168）、TetR変異体（WO2007/032555）、植物由来のauxin-inducible degron（AID）システム（WO2010/125620）、分解促進配列として知られるPEST配列（WO99/54348）、CL1（WO2004/025264）、カルパイン由来配列（特開2009-136154）、NDS（特開2011-101639）などが挙げられる。FKBP12はmammalian target of rapamycin (mTOR)として知られ、rapamycinやshield1などの低分子と結合することで安定化され、除去することで不安定化し、プロテアソームによって分解される。DHFRはtrimethoprimによって安定化し、TetR変異体はdoxycyclineによって安定化する。PEST配列はPro, Glu, Ser, Thrに富む配列であり、例えばmouse ornithine decarboxylase（mODC）のC末端側422-461を付加することで不安定化させることができる。PEST配列は蛋白質の半減期を調節しているが、所望の半減期短縮配列を用いることができる（Rechsteiner M, et al., Trends Biochem. Sci. 21, 267-271,1996）。PEST配列は例えば両端が塩基性アミノ酸（H、KまたはR

）で囲まれており、(i)P、(ii)DおよびE、または(iii)SおよびEを含みユビキチン化酵素E3と結合する配列であり、例えばGENETYX（ゼネティックス社）により同定することができる。PESTと同様の効果が得られる配列としてCL1、カルパイン部分配列、NDSなどが挙げられる。AID配列は植物のユビキチンリガーゼであるTIR1とオーキシン（IAA）が結合することで不安定化される。

[0123] 本願において、P遺伝子にデグロンが付加されたとは、当該P遺伝子が、デグロンが付加されたP蛋白質をコードすることを意味する。本願においては上記のデグロンをP蛋白質に付加することができ、好ましいデグロンとしては、具体的にはmTORデグロン、DHFRデグロン、TetRデグロン、PEST、およびAIDが挙げられる。なおこれらのデグロンには天然の配列およびそれに由来するものが含まれる。特に好ましいデグロンとしては、mTORデグロン、DHFRデグロン、TetRデグロン、およびPESTが挙げられ、中でもAID配列以外のデグロンが好適であり、具体的にはFKBP12デグロン（DD）、DHFRデグロン（DDG）、TetRデグロン、およびmODC PESTが好ましい。PESTには天然の配列に由来するd2やその改変体であるd1やd4などが知られているが（WO99/54348）、これらはいずれもPESTに含まれ、本願において使用できる。デグロンをコードする核酸は、DNA合成により適宜作製することができる。

[0124] デグロンは、適宜P蛋白質の所望の位置に付加することができ、例えばP蛋白質のN末端またはC末端に付加することができる。P蛋白質のN末端に付加する場合であって、P蛋白質のコード領域中の核酸にコードされるC蛋白質の発現が阻害される場合は、ベクターからC蛋白質を別途、発現させればよい。P蛋白質として全長P蛋白質ではなく断片を用いる場合であって、C蛋白質のコード領域を含まない断片である場合は、N末端でもC末端でも任意の位置にデグロンを付加することができる。本発明においてデグロンは、好ましくはP蛋白質のC末端側に付加される。デグロンが付加された改変P蛋白質は周知の方法により作製することができる。具体的には、P蛋白質をコードするウイルスゲノムの配列に、読み枠が一致するようにデグロンをコードする配列を挿入すればよい。

[0125] 本願のP遺伝子にデグロンが付加されたベクターを細胞に導入し、目的の遺伝子を発現させた後は、デグロンの性質に合わせて適宜ベクターを除去することができる。例えばDDやDDG、TetR変異体などのようにリガンド制御性のデグロン（ligand controllable degron）を用いる場合、リガンドを添加しなければ除去を促進するが、Shield-1などのリガンドを添加することによりベクターの発現を延長することができる。また、PEST配列などのようにリガンドがなくても機能を発揮するデグロンであれば、ベクターを導入した細胞の培養を継続することによりベクターの除去を促進することができる。

[0126] 本願のP遺伝子にデグロンが付加されたベクターは、上述の温度感受性を示すベクター、人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクター、または温度感受性を示し、かつ人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクターであってもよい。

[0127] さらに別の態様において、前記1つ以上のベクターを、自殺遺伝子を搭載したベクターとし、得られた細胞をナイーブ用培地の存在下で培養してもよい。これにより、前記体細胞当たりの前記ベクター量が工程３開始時と比して50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または3%以下に減少し得、例えば工程３開始時から30日以内、20日以内、15日以内、12日以内、10日以内、8日以内、5日以内、3日以内、または1日以内に、工程３開始時と比して50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、または3%以下に減少し得る。

[0128] 例えば本発明のベクターに搭載される自殺遺伝子としては、細胞死の誘導や細胞毒性を示す所望の薬剤のプロドラッグの変換酵素遺伝子が含まれる。プロドラッグと自殺遺伝子の組み合わせの例としては、具体的には、

・5-フルオロシトシンとシトシンデアミナーゼ

・シクロホスファミドとチトクロームP450

・フルダラビンと大腸菌PNP（プリンヌクレオシドホスホリラーゼ）

・CB1954とニトロレダクターゼ

・カペシタビンとカルボキシエステラーゼ

などが挙げられる。また自殺遺伝子としては、非活性型から活性型へ変換することにより細胞死の誘導や細胞毒性を示す所望の蛋白質をコードする遺伝子が挙げられ、例えば細胞死を誘導するカスパーゼをコードする遺伝子を好適に利用することができる。具体的には、所望の二量体化剤とその結合ドメインを付加したカスパーゼの組み合わせを利用することができ、二量体化剤とカスパーゼの組み合わせの一例としては、

・AP20187とiCaspase-9

を挙げることができる。

[0129] 例えば、本願の自殺遺伝子を搭載したベクターを細胞に導入して培養した後に、プロドラッグを添加する。これにより、ベクターが残存している細胞を死滅させ、ベクターが消失している細胞のみを取得できる。

[0130] 本願の自殺遺伝子を搭載したベクターは、上述の温度感受性を示すベクター、人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクター、または温度感受性を示し、かつ人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクターであってもよい。本願の自殺遺伝子を搭載したベクターはまた、上述のP遺伝子にデグロンが付加されたベクターであってもよい。

[0131] 工程（３）において、培養期間は特に限定されないが、例えば4週間以内、3週間以内、2週間以内、または1週間以内、例えば20日以内、15日以内、10日以内、5日以内、または3日以内であり得る。培養期間の下限は特にないが、例えば約1日である。ベクター量の減少は、レポーター遺伝子の検出や、抗体やPCRを用いたウイルスの検出により、そのレベルを工程（３）の開始時と比較することにより確認できる。

[0132] 本願に係る方法で製造したナイーブ型人工多能性幹細胞は、初期化因子を含むベクターの残存量が非常に低いため、長期にわたって培養してもナイーブ型の性質が安定に維持され得る。本願に係る方法では、初期化因子を含むベクターは、当該ベクター導入から約３０日後には実質的に細胞内から消失し得る。従って、本願の方法により得られるナイーブ型人工多能性幹細胞は、初期化因子を含むベクターを実質的に含まず、形質安定性が高い。

[0133] ［ベクターセット］

本願はまた、ヒト体細胞からナイーブ型人工多能性幹細胞を製造するためのベクターセットであって、

初期化因子を含む1つ以上のベクターを含み、

前記1つ以上のベクターが、温度感受性を示すベクター、人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクター、および温度感受性を示し、かつ人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクターからなる群から選択される、ベクターセットを提供する。本態様で用いられる初期化因子およびベクターの例は、上述したとおりである。

[0134] ［組成物］

本願はまた、ヒト体細胞からナイーブ型人工多能性幹細胞を製造するための組成物であって、

初期化因子を含む1つ以上のベクターを含み、

前記1つ以上のベクターが、温度感受性を示すベクター、人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクター、および温度感受性を示し、かつ人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクターからなる群から選択される、組成物を提供する。本態様で用いられる初期化因子およびベクターの例は、上述したとおりである。

[0135] 本願の組成物は、必要に応じて蒸留水、pH調整剤、懸濁化剤、溶解補助剤、安定化剤、等張化剤、抗酸化剤、保存剤などを添加することにより、液状製剤として製造することができる。pH調整剤としては、塩酸、水酸化ナトリウム、乳糖、乳酸、ナトリウム、リン酸一水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウムなどが例示される。懸濁化剤としては、メチルセルロース、ポリソルベート８０、ヒドロキシエチルセルロース、アラビアゴム、トラガント末、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートなどが例示される。溶解補助剤としては、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリソルベート８０、ニコチン酸アミド、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレートなどが例示される。安定化剤としては、亜硫

酸ナトリウム、メタ亜硫酸ナトリウム、エーテルなどが例示される。等張剤としては、塩化ナトリウム、ブドウ糖などが例示される。保存剤としては、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、ソルビン酸、フェノール、クレゾール、クロロクレゾールなどが例示される。

[0136] ［キット］

本願はさらに、ヒト体細胞からナイーブ型人工多能性幹細胞を製造するためのキットであって、

初期化因子を含む1つ以上のベクター、および

ナイーブ用培地を含み、

前記1つ以上のベクターが、温度感受性を示すベクター、人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクター、および温度感受性を示し、かつ人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクターからなる群から選択される、キットを提供する。本態様で用いられる初期化因子およびベクターの例は、上述したとおりである。

[0137] 本願のキットにおいて、前記1つ以上のベクターは別々にパッケージされていてもよく、まとめてパッケージされていてもよい。本願のキットはまた、緩衝液、取扱説明書などを含んでいてもよい。

[0138] ［培養上清］

本願はまた、本願の方法で製造されたナイーブ型人工多能性幹細胞の培養上清を提供する。培地には上述のナイーブ用培地を使用することができる。ナイーブ用培地は、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阻害剤から選ばれる１以上の化合物を含み得る。例えば、t2iLGo、5iLAF、またはtt2iLGoを含み得る。

[0139] 培養上清を得るための培養期間は、3～72日間であり得、例えば12～48日間である。培養開始時のナイーブ型人工多能性幹細胞の濃度は、例えば3×10^{3}～1×10^{5}細胞/cm^{2}であり得、例えば1×10^{4}～3×10^{4}細胞/cm^{2}である。

[0140] 培養上清を得るための培養温度は、以下に限定されないが、約30～40℃、

好ましくは約37℃である。培養は、CO_2含有空気の雰囲気下で行われ、CO_2濃度は、約2～8%、好ましくは約3～7%、さらに好ましくは約4～6%、最も好ましくは約5%である。また、培養は低酸素条件下で行ってもよく、酸素濃度は、約3～10%、好ましくは約4～8%、さらに好ましくは約4～6%、最も好ましくは約5%である。

[0141] 培養後に細胞成分を分離除去することによって、ナイーブ型人工多能性幹細胞の培養上清を得ることができる。本開示において、培養上清は、培養液から細胞成分を分離除去した培養上清だけでなく、各種処理（例えば、遠心処理、濃縮、溶媒の置換、透析、凍結、乾燥、凍結乾燥、希釈、脱塩、保存など）を適宜施した培養上清も含む。

[0142] ［化粧品］

本願はまた、本願の方法で製造されたナイーブ型人工多能性幹細胞の培養上清を原料として含む化粧品を提供する。本願の方法で製造されたナイーブ型人工多能性幹細胞の培養上清は、上述した通りである。本願の化粧品は、使用時に皮膚と接触させて用いるものであればどのような剤型、形態であってもよい。具体的には、例えば、スキンミルク、スキンクリーム、ファンデーションクリーム、マッサージクリーム、クレンジングクリーム、シェービングクリーム、クレンジングフォーム、化粧水、ローション、パック、口紅、頬紅、アイシャドー、マニキュア、石鹸、ボディーシャンプー、ハンドソープ、シャンプー、リンス、ヘアトニック、トリートメント、ヘアクリーム、ヘアスプレー、育毛剤、養毛剤、染毛剤、整髪料、脱毛剤、ふけ防止剤、歯磨、義歯接着剤、うがい剤、パーマネントウェーブ剤、カーリング剤、スタイリング剤、軟膏剤、パップ剤、テープ剤入浴剤、制汗剤、日焼け防止剤等が広義には含まれ、使用時に皮膚に接触させるものなら種類を問わないが、特に化粧品として使用できる形態であることが好ましい。さらにヒトの他に、動物類の皮膚に接触させるものも含む。また、本願の化粧品は、どのような形状であってもよく、固体、液体、半固体、気体のほか、粉体、顆粒、錠形、ゲル状、泡状など多数の形態が挙げられるが、特にこれに限定される

ものではない。

[0143] 本願の化粧品は、製剤上許容される担体、賦形剤、崩壊剤、緩衝剤、乳化剤、懸濁剤、無痛化剤、安定剤、保存剤、防腐剤、及び生理食塩水等を含んでいてもよい。賦形剤の例としては、乳糖、デンプン、ソルビトール、Ｄ－マンニトール、及び白糖が挙げられる。崩壊剤の例としては、カルボキシメチルセルロース、及び炭酸カルシウムが挙げられる。緩衝剤の例としては、リン酸塩、クエン酸塩、及び酢酸塩が挙げられる。乳化剤の例としては、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、及びトラガントが挙げられる。懸濁剤の例としては、モノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、及びラウリル硫酸ナトリウムが挙げられる。無痛化剤の例としては、ベンジルアルコール、クロロブタノール、及びソルビトールが挙げられる。安定剤の例としては、プロピレングリコール、及びアスコルビン酸が挙げられる。保存剤の例としては、フェノール、塩化ベンザルコニウム、ベンジルアルコール、クロロブタノール、及びメチルパラベンが挙げられる。防腐剤の例としては、塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、及びクロロブタノールが挙げられる。

実施例

[0144] 以下に実施例を示してさらに詳細に説明するが、本発明は実施例により何ら限定されるものではない。

[0145] ［材料および方法］

細胞培養

インフォームドコンセントに基づいて採取されたヒト皮膚線維芽細胞(HDF)を東京都老人総合研究所(Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology)から入手した。HDFおよび放射線照射後マウス胎児線維芽細胞(iMEF)を、10%ウシ胎仔血清(FBS、Japan Bio Serum)を添加したダルベッコ改変イーグル培地(DMEM、Nacalai Tesque)中で維持した。Cellular Technology Limited(CTL)から購入したPBMCを、製造者が推奨する条件下で維持した。プライム型および

ナイーブ型ES細胞(ESC)クローンを、WiCELLおよび京都大学から入手した。プライム型多能性幹細胞(PSC)を、ラミニン511-E8フラグメント(iMatrix-511、Nippi)でコーティングされたプレート上でStemFit AK02N培地(Ajinomoto)中において維持した。ナイーブ型PSCをiMEF上で培養し、1μM CHIR99021(Merck)、1μM PD0325901(Merck)、10μg/mL ヒトLIF(Peprotech)および2.5μM Go6983(Merck)を含むN2B27培地(NDiff227、Takara Bio)で構成されるt2iLGo²培地中で維持した。フィーダーフリーのナイーブ型人工多能性幹細胞(iPSC)をマトリゲル(hESC-qualified、Corning)上で維持した。1日おきに培地を交換し、毎回培地を交換する直前に10μM Y27632(Wako)を添加した。ナイーブ型iPSCを、Accutase(Innovative Cell Technologies)を用いて3～4日ごとに継代し、常に5%O_2下で培養した。本実施例における組換えDNA実験を京都大学の承認下で行った。

[0146] 改変型SeV-KLF4ベクターの構築

ヒトKLF4遺伝子のオープンリーディングフレームを含む挿入配列を、SeV特異的な転写制御シグナル配列を含むNotIタグ付きの遺伝子特異的な順方向および逆方向プライマーを用いてcDNAからPCRにより作製した。増幅された断片をSeV/TS12ΔF、SeV/PmiR367T2/TSΔFおよびSeV/PmiR367T2/TS12ΔFベクターのゲノム配列を含むプラスミドの18+領域に挿入し、プラスミドpSeV18+KLF4/TS12ΔF、pSeV18+KLF4/PmiR367T2/TSΔF、およびpSeV18+KLF4/PmiR367T2/TS12ΔF(総称して「SeV-KLF4ベクタープラスミド」)をそれぞれ作製した。miR367T2の配列は、TCACCATTGCTAAAGTGCAATTcgatTCACCATTGCTAAAGTGCAATT（配列番号１）であった。SeV-KLF4ベクターの回収および増殖を以下のように行った。最初に、SeV-KLF4ベクタープラスミドならびにT7 RNAポリメラーゼ、NP、P、F5RおよびL遺伝子を有するプラスミドを293T細胞に遺伝子導入した。細胞を10%の熱不活化ウシ胎仔血清(FBS)を添加したDMEM中で維持し、1～3日間培養してSeV-KLF4ベクターのシードを生成させた。シードをクローニングし、トリプシン(2.5μg/ml)を含むMEM中でSeV F発現LLC-MK2/F7/A細胞を用いて増殖させた。回収したSeV-KLF4ベクターの力価(細胞感染単位/mL)を、従前に記

載されているように抗SeVウサギポリクローナル血清を用いた免疫染色法により決定した(Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K. & Hasegawa, M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. Proceedings of the Japan Academy, Series B 85, 348-362, doi:10.2183/pjab.85.348 (2009).)。

[0147] ヒト体細胞からナイーブ型iPSCへの初期化

従来の方法では、CytoTune-iPS 2.0または2.0L初期化キットを用いてHDFまたはPBMCを初期化した。新規の方法では、キットに含まれていたKLF4/TSベクターを新規のSeV-KLF4ベクター（KLF4/TS12、KLF4/PmiR367T2/TS、またはKLF4/PmiR367T2/TS12など）に置換した。ナイーブ型iPSCのコロニーが生成されるまでインキュベーション温度を35℃に維持した。生成したiPSCの1回目の継代の後(通常、day14)、インキュベーション温度を38℃に変更し、SeVベクターを除去した。SeVベクターを除去した後(SeV-KLF4/PmiR367T2/TS12を使用した場合、day34)、温度を37℃に変更した。SeVベクターを感染させた後、インキュベーターを5%O_2に設定した。

[0148] 最初に、HDFを10%FBSを添加したDMEM(Nacalai Tesque)中で維持した。day0に細胞を計数し、3つのSeVベクターを感染させた：1）ポリシストロニックなKLF4-OCT4-SOX2、2）CMYCまたはLMYC、および3）KLF4（それぞれ感染多重度は5であった）。day1から培地を1日おきに交換した。day5に、細胞をiMEFフィーダー細胞上に再播種した。翌日に培地をナイーブ用培地に交換した。

[0149] PBMCの初期化では、SeVベクター感染の5日前に、PBMCの培養を100ng/mL ヒトSCF(R&D)、100ng/mL ヒトTPO(R&D)、100ng/mL ヒトFlt3/Flk2(R&D)、50ng/mL ヒトIL-6(R&D)および20ng/mL ヒトIL-3(R&D)を含むStemSpan ACF(STEMCELL)中で開始した。day0に細胞を計数し、HDFと同じ初期化手順を用いて3つのSeVベクターを感染させた。day1に細胞を計数し、HDFの初期化と同じ条件で再播種した。day2から、PBMC培地と同量のPSC培地を1日おきに添加した。day8に、培地をナイーブ用培地に完全に交換した。

[0150] RNA、DNAおよびmiRNAの抽出ならびに定量的リアルタイムPCR(qRT-PCR)

核酸抽出のための試料採取の前に、ナイーブ型PSCをゼラチンでコーティングされたディッシュ上で37℃において2時間インキュベートすることによってiMEFを除去した。全RNAおよびDNAを細胞溶解物からAllPrep DNA/RNA Mini Kit(QIAGEN)を用いて抽出し、RNAをRNase-Free DNase Set(QIAGEN)とともにインキュベートしてゲノムDNAを除去した。マイクロRNA(miRNA)をNucleoSpin miRNA(MACHEREY-NAGEL)を用いて抽出した。qRT-PCRのために、オリゴdTプライマーおよびランダムな6塩基を含むPrimeScript RT Master Mix(Takara)を用いて、DNaseで処理された1μgのRNAの逆転写反応を行った。cDNAをTaqMan Advanced miRNA Assays(Applied Biosystems)を用いて合成した。qRT-PCRを、Fast SYBR Green Master Mix(Applied Biosystems)またはTaqMan Fast Advanced Master Mix(Applied Biosystems)を用いてStepOne Plus(Applied Biosystems)またはQuantStudio3(Applied Biosystems)上で行った。

[0151] RNAシークエンシングおよびデータ解析

RNAシークエンシングライブラリーを、100ngの全RNAを出発物質として製造者のプロトコールに従ってTruSeq Stranded Total RNA Library Prep Gold(illumina)を用いて作成した。Hiseq2500のために、illumina cBotを用いてHiSeq PE Cluster Kit v4-cBot(illumina)によりクラスターを生成した。シークエンシングを、HiSeq2500(2x126 PEモード)を用いてHiSeq SBS Kit v4により行った。また、シークエンシングのために、NovaSeq 6000 S1 Reagent Kit v1.5(illumina)を伴ってNovaSeq 6000(2x101 PEモード)、およびNextSeq 500/550 High Output Kit v2.5を伴ってNextSeq 500(76 SEモード) を使用した。FASTQファイルをbcl2fastq v2.17.1.14(illumina)を用いてbclファイルから生成し、ENCODE long-rna-seq-pipeline v2.3.4を用いて処理した。簡潔に述べると、シークエンシングされた読み取りデータをGENCODE v24の遺伝子アノテーションを用いてSTAR 2.5.1bによりヒト参照ゲノム(GRCh38)にマッピングし、RSEM 1.2.23を用いて正規化された遺伝子発現データを算出し、Subread 1.5.1内に付属されているfeatureCountsを用いて遺伝子数データを取得した

。本発明者らのPSC株の特性評価のために、GEOから入手したGSE59435およびGSE75868のデータセットならびにL. Yan et al.(Yan, L. et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. Nature structural & molecular biology 20, 1131-1139, doi:10.1038/nsmb.2660 (2013).)およびY. Takashima et al.(Takashima, Y. et al. Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. Cell 158, 1254-1269, doi:10.1016/j.cell.2014.08.029 (2014).)の補足データを用いた。全データに含まれる4,720遺伝子の発現値を試料間の分位数で正規化し、各遺伝子のzスコアをPCAに用いた。PSCマーカーおよび酸化的リン酸化関連遺伝子の発現ヒートマップのために、分位数により正規化したFPKM値をLog2スケールで用いた。

[0152] DNAメチル化解析

500ngのゲノムDNAのバイサルファイト変換をEZ DNA Methylation Kit(Zymo Research)を用いて行い、製造者のプロトコールに従ってInfinium Human Methylation 450KまたはEPIC BeadChip Kit(illumina)を用いてグローバルDNAメチル化状態をプロファイリングした。GenomeStudio V2011.1を用いてDNAメチル化の値をエクスポートした後、R 3.6.3の「minfi」パッケージを用いてデータ処理を行った。450KとEPICとの間で共通しており、公知のSNP部位に位置しない合計で424,444個のプローブをPSC試料のPCAに用いた。

[0153] RNA-FISH

解離させたナイーブ型iPSCをゼラチンでコーティングされたディッシュ上で37℃において2時間インキュベートし、iMEFフィーダー細胞を除去した。次いで、細胞をMatrigelでコーティングされたスライド上のPSC培地中に播種した。翌日、細胞を4%パラホルムアルデヒド中で15分間、室温で固定した。スライドを0.2M HClで20分間処理し、0.2% Triton X-100で10分間透過処理し、ペプシン溶液(0.1M HCl中0.005%)で37℃において2～6分間消化し、脱水した。バクテリア人工染色体(BAC)RP11-155024およびRP11-256P2を用いて、それぞれHUWE1およびUTX RNA FISHプローブを生成した。BAC DNAをCy5-dUTP(RP11

-155024)およびCy3-dUTP(RP11-256P2)を用いたニックトランスレーションによって標識した。標識したプローブおよびXIST RNA FISHプローブ(Chromosome Science Labo)を、超音波処理したサケ精子DNAおよびCot-1 DNAとともにハイブリダイゼーション溶液中で混合した。プローブを85℃で10分間変性させ、前処理したスライドに適用し、カバーガラスで覆い、37℃で一晩ハイブリダイズさせた。次いで、スライドを50%ホルムアミド/2xSSCで37℃において20分間、1xSSCで室温において15分間洗浄し、DAPIを用いて対比染色し、マウントした。FISH画像を、Leica DMRA2顕微鏡上に取り付けた冷却CCDカメラを用いてCW4000 FISHアプリケーションプログラム(Leica Microsystems Imaging Solution)により撮影した。

[0154] ナイーブ型PSC由来の原始内胚葉分化

原始内胚葉分化のために、ナイーブ型PSCを解離させ、iMEFフィーダー細胞を上述のように除去した。500,000個の細胞を、初期原始内胚葉分化培地(Ndiff227、25ng/ml FGF4(Peprotech)、1ug/ml Heparin (Wako)、 10ng/ml BMP4 (R&D)、10ng/ml PDGFAA (Peprotech), 1uM XAV939 (Sigma)、3μM A83-01(Wako)、0.1μM RA (Sigma))を含むラミニン511-E8 (0.4μg/cm² iMatrix 511; Nippi)でコーティングされた6ウェル中に播種した。翌日上記と同じ培地で培地交換を行った。翌々日、上記培地に10ng/ml IL-6 (R&D)を加えた培地に交換した。day3にTrypsin/EDTA (Nacalai)を5分間用いて細胞を剥離回収し、フローサイトメトリーによってPDGFRAおよびANPEPの発現を解析した。

[0155] ナイーブ型PSC由来の栄養外胚葉(TE)分化

TE分化のために、ナイーブ型PSCを解離させ、iMEFフィーダー細胞を上述のように除去した。500,000個の細胞を、初期TE分化培地(Ndiff227、2μM A83-01(Wako)、2μM PD0325921(Sigma)および10ng/mL BMP4(R&D))を含むラミニン511-E8(0.15μg/cm² iMatrix 511; Nippi)でコーティングされた6ウェル中に播種した。翌日、培地をNdiff227、2μM A83-01(Wako)、2μM PD0325921(Sigma)および1μg/ml JAK阻害剤I(Merck)に交換した。翌日、培地を再度交換した。day3にAccutase(Innovative Cell Technologies)を30分間用いて細胞を

回収し、フローサイトメトリーによってTACSTD2、ENPEP、HAVCR1およびHLA-ABCの発現を解析した。

[0156] フローサイトメトリー

解離させた細胞を、Alexa Fluor 488標識TROP-2(TACSTD2)、PE標識CD249(ENPEP)、Tim-1(HAVCR1)ビオチン化抗体、およびPacific Blue標識HLA-ABC抗体を用いて氷上で20分間染色した。洗浄後、APCストレプトアビジンを適用し、氷上で20分間インキュベートした。解析を、FACS Divaソフトウェア(BD Biosciences)を備えたBD LSR Fortessa(BD Biosciences)およびFACSAria II(BD Biosciences)フローサイトメーターを用いて行った。データを、FlowJoソフトウェア(LLC)を用いて解析した。

[0157] 統計および再現性

正確なnの値を関連する図の説明に記載している。統計的有意性を、Prismソフトウェア(GraphPad)を用いた対応のないスチューデントの両側t検定により決定した。$P<0.05$を有意であるとみなし、図中にアスタリスクで示している。エラーバーは平均値±s.d.を示す。

[0158] データの入手可能性

シークエンシングおよびアレイのデータはGEOに登録されており、アクセッション番号はGSE179476である。

[0159] ［実施例１］本実施例で使用されるセンダイウイルスベクター（SeV）の製造

本実施例で使用されるセンダイウイルスベクターの構造を以下に示す。尚、本明細書において「18+」とはNP遺伝子の前に初期化因子を挿入することを表し、「PM」とは、P遺伝子とM遺伝子の間に初期因子を挿入することを表し、「HNL」とは、HN遺伝子とL遺伝子の間に初期化因子を挿入することを表す。また本明細書において「TS」とは、M蛋白質にG69E、T116AおよびA183Sの変異を、HN蛋白質にA262T、G264RおよびK461Gの変異を、P蛋白質にL511F変異を、ならびにL蛋白質にN1197SおよびK1795E変異を持つことを表す。また本実施例において「TS7」とは、TS変異に加えてL蛋白質にY942H、L1361CおよびL1558Iの変異をさらに持つことを表し、「TS12」とは、TS変異に加えてP蛋白にD4

33A、R434AおよびK437Aの変異をさらに持つことを表し、「TS15」とは、TS12変異に加えてL蛋白にL1361CおよびL1558Iの持つことを表す。「ΔF」とは、F遺伝子を欠失していることを表す。また、「KOS」とは、KLF4、Oct4およびSox2の同時搭載を表す。例えば、P遺伝子とM遺伝子の間にKLF4、Oct4およびSox2を搭載するTS12変異を有するF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターはPM/KOS/TS12ΔFと記載する。同様に、NP遺伝子の前にKLF4を搭載するTS変異を有するF遺伝子欠失型センダイウイルスベクターは18+/KLF4/TSΔFと記載する。

[0160] 体細胞からナイーブ型多能性幹細胞を製造するために従来使用されているセンダイウイルスベクター（CytoTune-iPS2.0L）を図１に示す。搭載しているcDNAを白色で示している。本実施例で使用されるセンダイウイルスベクターは、図１に記載のセンダイウイルスベクターのうち、KLF4ベクターとして「18+/KLF4/TSΔF」の代わりに「18+/KLF4/TS7ΔF」、「18+/KLF4/TS12ΔF」または「18+/KLF4/PmiR367T2/TSΔF」のいずれかを用いたシステムである。ここで、「PmiR367T2」とは、miR367認識配列をP遺伝子の5’側にタンデムに搭載していることを表す。

[0161] KOSベクター「PM/KOS/TS12ΔF」およびLMYCベクター「HNL/LMYC/TS15ΔF」を常法により作製した（WO2012/029770およびWO2010/008054）。また、「18+/KLF4/TS7ΔF」および「18+/KLF4/TS12ΔF」はそれぞれTS7,TS12ベクター骨格を使用して「18+/KLF4/TSΔF」（WO2010/008054）と同様の方法で作製した。また「18+/KLF4/PmiR367T2/TSΔF」は、常法により作製した（WO2017/082174）。

[0162] ［実施例２］ヒト皮膚線維芽細胞（HDF）からのナイーブ型iPS細胞の製造

ヒト皮膚線維芽細胞（HDF）からナイーブ型iPS細胞を製造するためのプロトコールを図２に示す。

[0163] 工程（１）

ヒト皮膚線維芽細胞を、センダイウイルスベクターを感染させる1日前にゼラチンコート済みの12wellプレートまたは6wellプレートにSeV感染用および細胞数計測用として同じ細胞数播種し、Fibroblast用培地（Fibroblast medi

um:DMEM+10%FBS）を用いて37℃で通常酸素条件下（約20%）にて培養した。翌日（day0）に細胞数カウント用に播種した細胞を、細胞剥離液を用いて剥離し細胞数計測を行い、細胞数に応じた量のセンダイウイルスベクターを感染させ、以後は35℃低酸素(5%O_2)環境でインキュベートした。感染させるセンダイウイルスベクターの量は一つの目安としてKOS:MOI5, LMYC:MOI5, KLF4:MOI5であるが、細胞に応じて適宜条件検討を行った。24時間後（day1）およびday2、day4に新しいFibroblast用培地に培地交換を行った。day4にiMEF（放射線照射後マウス胎児線維芽細胞）を播種した細胞培養容器を準備した。day5で細胞剥離液を用いて細胞を剥離し、細胞数計測を行った後iMEFが播種されている細胞培養容器上に任意の細胞数を播種した。本実施例では、5%のCO_2濃度条件下にて培養を行った。

[0164] 工程（２）

day6よりナイーブ用培地（t2iLGo+Y）に変更し、以後1日おきに培地交換を行った。

[0165] t2iLGo+Y培地の組成を以下に示す。記載している濃度は全て終濃度である：

NDiff227（タカラバイオ社製）

CHIR99021(Sigma-Aldrich社製）1μM

PD0325901（Sigma-Aldrich社製）1μM

Go6983（Sigma-Aldrich社製）1.25μMまたは2.5μM

Human recombinant leukemia inhibitory factor（富士フィルム和光純薬社製）10ng/ml

Y27632（富士フィルム和光純薬社製） 10uM。

ここで、Y27632は継代翌日以降は添加しなくてもよい。

[0166] day10頃より、重層でドーム型のコロニー（ナイーブ型iPS細胞コロニー）が出現した。

[0167] 工程（３）

Day10以降、前記重層でドーム型のコロニーが十分な大きさ（直径50～200

μm程度）になった時点で継代を行い、翌日より高温培養（基本的に38℃）を開始した。

[0168] t2iLGo+Y培地を1日おきに交換し、酸素濃度5%のインキュベーターで培養を行った。また3～4日毎に継代を行った。継代時の細胞剥離は培地を除去後D-PBS（ナカライテスク 社製）で1回洗浄し、Accutase（Innovative Cell Technologies社製）を加えて7～10分37℃でインキュベートして行った。維持のみが目的の場合、一つの目安として剥離して得られた細胞数の1/5程度を同面積の培養容器に播種した。

[0169] 45回継代後の細胞の位相差顕微鏡イメージを図３Aに示す。重層でドーム状のコロニーが多数認められ、単層で扁平なコロニーはほとんど確認されなかった。また、図３Ｂに、図３Ａのドーム状コロニーをナイーブ型特異的マーカー（NANOG、KLF17）およびナイーブ型とプライム型とで細胞内局在が異なる遺伝子産物（TFE3）で免疫染色した画像を示す。Hoechstは核染色、PCは位相差顕微鏡像を示す。図３Bに示されるように、前記ドーム状コロニーの構成細胞はNANOGおよびKLF17について強染色され、TFE3は核が濃染していた。すなわち、ナイーブ型特異的マーカーを発現し、特定遺伝子産物がナイーブ型特異的な細胞内局在を示し（着床前胚の内部細胞塊と同等の遺伝子発現パターン）、さらに、重層でドーム型のコロニー（ナイーブ型の特徴的なコロニー形態）を形成する人工多能性幹細胞が得られた。

よって、前記工程（１）～（３）を備える方法により、ヒト線維芽細胞からナイーブ型iPS細胞が製造されることが示された。

[0170] 次に、使用したセンダイウイルスベクターの細胞内残存量を解析した。比較対象として、従来型ベクター（CytoTune-iPS2.0L）を用いた。センダイウイルスベクターの細胞内ゲノム量を定量的PCRで測定し、Day14の時点でのゲノム量を1.0として、各々相対値で表した結果を図４に示す。「Conv. Cocktail」はCytoTune-iPS2.0Lを表し、「KLF4/TS7ΔF」は、CytoTune-iPS2.0LのKLF4ベクターを「18+/KLF4/TS7ΔF」に置き換えたものを表す。

[0171] 図４に示されるように、本実施例で使用したベクターは、Day38には既に検

出限界以下にまで減少していた。すなわち、38℃の高温培養により急速に消失したことが示された（KLF4/TS7ΔF_1～3）。また、KLFベクターとして、「18+/KLF4/TS12」または「18+/KLF4/TS12/miR367T2」を用いて38℃培養を行った場合は、更に8～12日早く検出限界未満となった（データ示さず）。

[0172] これに対し、従来型ベクターは、Day80の時点でもDay14と同程度残存していた（Conv. Cocktail_1～3）。当該ベクターは、通常のプライム型人工多能性幹細胞製造用培地を用いた培養条件下では一般的な培養温度（37℃）でも徐々に減少し、Day80にはほぼ消失することが知られているため、異なる細胞培養環境によってベクターの消失速度が影響を受ける可能性が強く示唆された。

[0173] よって、ベクター由来の初期化因子が存在しないナイーブ型多能性幹細胞を早期に得るには、ナイーブ用培地を用いた培養下で温度感受性を示すベクター、または、人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクター等を用いればよく、前記温度感受性を示すベクターの例として、TS7、TS12またはTS15変異を含むセンダイウイルスベクターを使用できることが示された。

[0174] ［実施例３］ヒト末梢血単核球（PBMC）からのナイーブ型iPS細胞の製造

ヒト末梢血単核球（PBMC）からナイーブ型iPS細胞を製造するためのプロトコールを図５に示す。

[0175] 工程（１）

センダイウイルスベクター感染の5日前からPBMCをPBMC用培地を用いて37℃で通常酸素条件下（約20%）にて培養した。培地交換は行わなかった。PBMC用培地（PBMC medium）の組成を以下に示す。記載している濃度は全て終濃度である：

StemSpan ACF（STEMCELL Technologies社製）

Recombinant Human SCF（R&D Systems社製）100ng/ml

Recombinant Human TPO（R&D Systems社製）100ng/ml

Recombinant Human Flt3/Flk2（R&D Systems社製）100ng/ml

Recombinant Human IL-6 (R&D Systems社製) 50ng/ml

Recombinant Human IL-3 (R&D Systems社製) 20ng/ml。

[0176] 感染当日（day0）に細胞数を計測し細胞数に応じた量のセンダイウイルスを感染させ、以後は35℃低酸素(5%O_2)環境でインキュベートした。感染させるセンダイウイルスの量は一つの目安としてKOS:MOI5, LMYC:MOI5, KLF4:MOI5であるが、細胞に応じて適宜条件検討を行った。感染時はウイルスの密度を上げるため基本的に24wellもしくはそれよりも小さなウェルで感染させた。また同日にiMEFを播種した細胞培養容器（基本は6well）を準備した。感染24時間後（day1）に細胞を回収しウイルス入り培地を除去し、細胞数計測を行った後任意の細胞数を、iMEFを播種した細胞培養容器へ播種した。本実施例では、5%のCO_2濃度条件下にて培養を行った。

[0177] 工程（２）

day2にPBMC用培地を半量除去し、半量のナイーブ用培地（t2iLGo+Y）を添加した。以後1日おきに同様にして培地を半量除去し新たな培地を半量添加した。day8で完全に培地を吸引し、全量ナイーブ用培地へと交換した。ナイーブ用培地（t2iLGo+Y）の組成は、実施例２においてヒト皮膚線維芽細胞からナイーブ型iPS細胞を製造した際に使用したものと同じである。

[0178] 工程（３）

day10頃より重層でドーム状のコロニー（ナイーブ型iPS細胞コロニー）が出現し、Day10以降コロニーが十分な大きさ（直径50～200μm程度）になった時点で継代を行い、翌日より高温培養（基本的に38℃）を開始した。維持培養および継代方法は実施例２においてヒト皮膚線維芽細胞からナイーブ型iPS細胞を製造した際に行った方法と同じである。

[0179] 38℃での培養を開始したday14から継代毎にセンダイウイルスベクターのゲノム量をqPCRで定量評価した（図６）。KLF4ベクターとして18+/KLF4/TS7ΔFを用いた場合、ベクター量はday38で検出限界未満となったが、18+/KLF4/TS12ΔFまたは18+/KLF4/PmiR367T2/TSΔFを用いた場合にはday30で検出限界未満となった。

[0180] よって、前記工程（１）～（３）を備える方法により、ヒト末梢血単核球からもナイーブ型人工多能性幹細胞が製造されること、さらに、約３０～３８日後には初期化因子を実質的に含まないナイーブ型iPS細胞が得られることが示された。

[0181] 従って、本願に係る方法を用いることにより、ヒトの様々な体細胞からナイーブ型人工多能性幹細胞（さらに詳細には、初期化因子を実質的に含まないナイーブ型iPS細胞）が迅速に製造できることが明らかになった。

[0182] ［実施例４］ナイーブ型人工多能性幹細胞の形質安定性

実施例２、３で得られたナイーブ型人工多能性幹細胞に対し、長期継代後の形質安定性について解析した。

ナイーブ型人工多能性幹細胞のスタンダードであるリセットナイーブ型ES細胞（Reset Naive ESC（in-house））、本発明者が樹立したHDF由来プライム型iPS細胞8クローン、本発明を用いて得られた長期継代後（P16～P45）のHDF由来ナイーブ型iPS細胞計4クローン、PBMC由来ナイーブ型iPS細胞計2クローンと、既報ナイーブ型ES細胞（Reset Naive ESC, 6/5/4iLA Naive ESC）およびヒト胚のシングルセルデータを統合し主成分分析を行った（図７）。赤枠で囲った部分に本発明者が樹立したナイーブ型iPS細胞が存在し、同じ群内にReset Naive ESC(in-house)も存在しており、グローバルな遺伝子発現はReset Naive ESCと同等であることが示された。

[0183] 図７と同じRNA-seqから得られたデータを元に、各細胞種における刷り込み遺伝子およびX染色体関連遺伝子の発現様式をSNP解析で比較検証した（図８）。HDF、プライム型およびナイーブ型iPS細胞は全て同一女性のHDF由来である。HDFおよびプライム型iPS細胞では、MEG3に代表されるような刷り込み遺伝子の発現は原則として片側アレルのみからの発現パターンを示したが、ナイーブ型では刷り込みが消失し両側アレルからの発現パターンを示した。また本検証で用いた女性由来HDFおよびプライム型iPS細胞では一方のX染色体の不活性化により、X染色体関連遺伝子の発現は片側アレルのみからの発現パターンを示すが、ナイーブ型ではX染色体再活性化に伴い両側アレルからの発現

パターンを示した。

[0184] 図７のRNA-seqで用いた同じ細胞からRNAと同時に得られたDNAを用いてHDF由来およびPBMC由来ナイーブ型iPS細胞のグローバルなメチル化を、メチル化アレイを用いてDensity bean plot（図９Ａ）および主成分分析（図９Ｂ）で表した。Primedは申請者が樹立したプライム型iPS細胞、Naiveはナイーブ型iPS細胞を示す。図９Ａにおいて本発明で得られたナイーブ型はプライム型と比較してどれもBeta valueが低い（＝Hypomethylated:低メチル化）傾向にあり、かつReset Naive ESC(in-house)と同等の低メチル化を示していた。図９Ｂにおいてプライム型とナイーブ型は明確に分かれており、異なるメチル化パターンを有することが示された。また、本実施例で得られたHDF由来ナイーブ型iPS細胞の5-メチルシトシンが全シトシンに占める割合をLC-MS/MSを用いて解析した（図９Ｃ）。ナイーブ型iPS細胞はReset Naive ESCと同等の低い割合を示し、ゲノムにおけるメチル化シトシンの割合が低下していることが示唆された。

[0185] RNA-seqおよびメチル化アレイで用いた長期継代後（P16～45）のHDF由来ナイーブ型iPS細胞計2クローン、PBMC由来ナイーブ型iPS細胞計2クローン、およびコントロールとしてReset Naive ESC（in-house）について、三胚葉成分の初期分化能を比較解析した（図１０）。96wellプレートにES細胞/iPS細胞を10×10^{6}個播種し、分化培地（DMEM+20%FBS）を用いて低酸素（5%O2）環境下で24日間培養し、形成された胚様体を回収した。回収検体からRNAを抽出して逆転写によりcDNAを得た上で、TaqMan hPSC Scorecard Panel（ThermoFisher Scientific社製 ）を用いて半網羅的に三胚葉初期分化能を評価した。図の左端から順に多能性マーカー、外胚葉マーカー、中胚葉マーカー、内胚葉マーカーの発現量を示す。また灰色のプロットはReset Naive ESC、赤色のプロットは本発明で得られたナイーブ型iPS細胞を示す。いずれのクローンもReset Naive ESCと同等もしくは特に中胚葉においてはより良好な多分化能を示した。

[0186] このように、本願に係る方法で得られるナイーブ型人工多能性幹細胞は、1

80日を超える長期継代後であっても、ナイーブ型人工多能性幹細胞のスタンダードと同様のグローバルな遺伝子発現パターン、全ゲノムに渡る広範なDNA脱メチル化、X染色体の再活性化、および三胚葉成分の初期分化能を示すことが確認された。

従って、本願に係る方法により、真のナイーブ型人工多能性幹細胞が迅速に製造できることが明らかになった。

[0187] ［実施例５］改変型OSKL-SEVベクター初期化システムの開発

市販されているCytoTune-iPS 2.0L SeV初期化キット（SeV(PM)KOS/TS12ΔF(SeV-KOS)、SeV(HNL)LMYC/TS15ΔF(SeV-LMYC)およびSeV18+KLF4/TSΔF(SeV-KLF4)ベクターを含む）を用いてヒト皮膚線維芽細胞（HDF）からナイーブ型ヒトiPS細胞（nCT2.0L_1-4）を樹立した。SeV導入からday94において、樹立したナイーブ型ヒトiPSC中に残存するSeVの存在を免疫染色によって検証した（図１１Ａ）。図１１Ａの右上図に示されているように、ほとんどの細胞が強陽性を示しており、SeVの高度な残存が示唆された。次に、各継代において細胞を採取し、残存するSeVゲノムの量を定量的RT-PCR(qRT-PCR)によって測定した。市販のCytoTune-iPS 2.0（SeV-KOS、SeV(HNL)CMYC/TS15ΔF(SeV-CMYC)およびSeV-KLF4ベクターを含む; OSKM）またはCytoTune-iPS 2.0L（OSKL）のいずれを用いても、HDFまたはヒト末梢血単核球（PBMC）において継代を重ねるごとにSeVの量は一旦減少するが、その後再度増加する傾向にあるため、継代を繰り返してもSeVは消失しなかった(図１１Ｂ)。また、SeVゲノムの発現はすべてのクローンで残存しており、いくつかの細胞株ではハウスキーピング遺伝子GAPDHと同等またはそれ以上の発現レベルであった。残存する3つのSeVベクターゲノムの各発現レベルを定量化した結果、SeV-KOSおよびSeV-CMYC/LMYCベクターはすべてのクローン中で特に高いレベルで残存しており、SeV-KLF4ベクターは半数以上のクローン中で特に高いレベルで残存していた(図１１Ｃ)。

[0188] これらのベクターが残存する理由を検討した。SeVベクターは混合感染においてウイルスタンパク質を共有するが、SeV-KLF4/TSベクターの骨格を形成す

るSeV-TSΔFベクターはSeV-TS12ΔFまたはSeV-TS15ΔFベクターとは異なり温度感受性が非常に低いため、温度の上昇によって感染細胞から除去することが困難であることが知られている。SeV-TSΔF、SeV-TS12ΔFまたはSeV-TS15ΔFベクター中の各遺伝子における点変異の有無を表１に示す。

[表1]

SeV gene	Mutation	TSΔF	TS12ΔF	TS15ΔF
P	D433A		●	●
	R434A		●	●
	K437A		●	●
	L511F	●	●	●
M	G69E	●	●	●
	T116A	●	●	●
	A183S	●	●	●
HN	A262T	●	●	●
	G264R	●	●	●
	K461G	●	●	●
L	N1195S	●	●	●
	K1361C			●
	L1558I			●
	K1796E	●	●	●

したがって本発明者らは、初期化カクテル中のSeV18+KLF4/TSΔF(KLF4/TS)ベクターの存在が、すべてのSeVベクターゲノムの持続の主要な原因であると仮定した。

[0189] この仮説を検証するために、SeV-KLF4/TSベクターの代替物として以下の3種の改変SeV-KLF4ベクターを適用した(図１１Ｄ)：SeV18+KLF4/TS12ΔF(SeV-KLF4/TS12)、SeV18+KLF4/PmiR367T2/TSΔF(SeV-KLF4/miR/TS)、およびSeV18+KLF4/PmiR367T2/TS12(SeV-KLF4/miR/TS12)ベクター。SeV-KLF4/TS12ベクターは、温度感受性を増強するためにP遺伝子により多くの点変異を有するSeV-TS12ΔFベクターに基づいて形成されている(図１１Ｄ)。SeV-KLF4/miR/TSベクターは、SeVベクターゲノムのP遺伝子の5'側にタンデムに挿入されたhsa-microRNA-367(miR-367) 標的配列（すなわち、miR-367そのものではなく、miR-3

67の標的配列）を有している(図１１Ｄ)。miR-367はプライム型ヒト多能性幹細胞(PSC)において特異的に大量発現していることが確認されているが、本発明者らはmiR-367がナイーブ型ヒトPSCにおいてもHDFと比較して大量発現していることを確認した(図１１Ｅ)。したがって、miR-367の受容性は、ナイーブ型ヒトPSCにおける迅速なSeVベクターの除去に有用であると考えられた。SeV-KLF4/miR/TS12ベクターはSeV-KLF4/TS12およびSeV-KLF4/miR/TSの両方の特徴を組み込んでおり、ベクターの除去をさらに迅速化し得ることが示唆された(図１１Ｄ)。

[0190] これらのベクターの組合せによる初期化の効率を比較した。ヒト線維芽細胞からのiPSC作製においてKLF4遺伝子を有する温度感受性SeVベクターを使用した場合、（おそらく初期化が完了する前にほとんどのベクターが消失するため）感染多重度が高かった場合を除いて37℃ではiPSCを作製できなかったことが報告されている。したがって、感染時から十分なナイーブ型iPSCコロニーが出現するday14まで細胞を35℃で培養し、1回目の継代を行った。1回目の継代後、培養温度を38℃に上げ、SeVベクターを除去した(図１１Ｆ)。SeV-KOS、SeV-LMYCおよび改変型SeV-KLF4ベクターを用いたHDFの初期化は、およそday10にナイーブ型iPSCコロニーの出現をもたらし、これはSeV-KLF4/TSベクターを用いる従来の方法と一致していた。

[0191] ヒト末梢血単核球(PBMC)からナイーブ型ヒトiPSCを樹立したという報告はない。実際に本発明者らもCytoTune-iPS 2.0を使用してPBMCからナイーブ型ヒトiPSCを樹立することはできなかった(図１１Ｇ)。

[0192] ［実施例６］SeV消失速度の検証、フィーダーフリーのナイーブ型iPSCへの応用

各KLF4ベクターを用いてHDFからナイーブ型ヒトiPS細胞を樹立した場合の樹立効率を比較した（図１２Ａ）。いずれのベクターも従来のベクター（SeV-KLF4/TS）と比較して樹立効率の低下はなく、SeV-KLF4/TS12またはSeV-KLF4/miR/TS12を含むOSKL(CMYCをLMYCに置換したOSKM)カクテルは従来のベクターと比較して樹立効率が著しく向上した。

[0193] 次に、これらのベクターによって作製されたナイーブ型iPSC中に残存するSeVベクターを検出した。iPSC由来の分化細胞を再生医療に応用するためには、少なくとも$1x10^5$個の細胞から外来性多能性遺伝子の残存に起因する単一の未分化細胞を検出する感度が必要となる。qRT-PCR解析は$1x10^6$個のSeV陰性細胞から単一のSeV陽性細胞を検出できる感度を有することを確認した(図１２Ｂ)。計算上では1,638,400個のSeV陰性細胞中に1個でもSeV陽性細胞があれば検出可能であり、免疫染色などの方法よりもはるかに感度が高い。このqRT-PCR解析により、SeVゲノムの残存量を定量的に評価した。day14に温度を変化させた後、SeV-KLF4/TS12、SeV-KLF4/miR/TSおよびSeV-KLF4/miR/TS12ベクターはSeVゲノムの著しいクリアランスを示したが、SeV-KLF4/TSレベルの低下は非常に遅かった。特に、SeV-KLF4/miR/TS12はday34にqRT-PCRの検出限界に達し、これはSeV-KLF4ベクターの中で最も速かった(図１２Ｃ)。これらの結果から、SeV-KLF4/miR/TS12ベクターが初期化効率およびベクターのクリアランス速度に関して最も優れたSeV-KLF4ベクターであると結論付けた。

[0194] SeV-KLF4/miR/TS12ベクターを用いた初期化についてさらに検証した。SeV-KOS、SeV-LMYCおよびSeV-KLF4/miR/TS12ベクターを用いて、HDF(nOSKL_1、2)だけでなくPBMC(nOSKL_3、4)からもナイーブ型iPSCクローンを作製できた。day34に、すべてのnOSKL-iPSCクローンにおいてSeVが消失したことが確認された(図１２Ｄ)。興味深いことに、t2iLGo培地に放射線照射後マウス胎児線維芽細胞(iMEF)を接触させた馴化培地を初期化の最初から用いることにより、HDFからフィーダーフリーのナイーブ型iPSCを樹立および維持することに成功した(nOSKL_FF_1、2)(図１２Ｅ)。次に、nOSKL_1-4の細胞増殖速度を計測した。すべてのクローンにおいて継代を重ねても細胞増殖速度の明らかな低下は認められなかった（図１２Ｆ）。

[0195] ［実施例７］樹立したナイーブ型iPSCの遺伝子発現

次に、作製したnOSKL-iPSCのナイーブ型多能性に特異的な特性を検証した。比較のために、nOSKL-iPSCと同じ体細胞から誘導したプライム型ヒトiPSC(OSKL_1-4)、プライム型WA09 H9胚性幹細胞(ESC; H9)、プライム型201B7 iPSC

(201B7)、ならびにKLF2およびNANOGを過剰発現させることによってプライム型からナイーブ型にリセットし、nOSKL-iPSCと同じ条件で維持したリセットナイーブ型H9 ESC(nH9)を採取した。ナイーブ型iPSC特異的なマーカーの発現をqRT-PCRで検証した（図１３Ａ）。ここで、NANOGはプライム型iPSCでも発現しているがナイーブ型iPSCでは著増することが知られている。いずれのナイーブ型iPSC株もプライム型iPSC株と比べてナイーブ型iPSC特異的なマーカーを優位に高く発現していた。同様に、プライム型iPSC特異的なマーカーの発現をqRT-PCRで検証した（図１３Ｂ）。いずれのナイーブ型iPSC株もプライム型iPSC株と比べてプライム型iPSC特異的なマーカーを優位に低く発現していた。これら細胞株についてRNA-seqを行い代表的な多能性マーカーの発現を比較した（図１３Ｃ）。nOSKL-iPSCはnH9とほとんど同等の多能性マーカー発現を示した。次に、nOSKL-iPSCのトランスクリプトームを、プライム型PSCならびに以前に公開されたリセットナイーブ型PSCおよびヒト内細胞塊のデータセットと比較した（Takashima, Y. et al. Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. Cell 158, 1254-1269, doi:10.1016/j.cell.2014.08.029 (2014).; Theunissen, T. W. et al. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. Cell stem cell 15, 471-487, doi:10.1016/j.stem.2014.07.002 (2014).; Yan, L. et al. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. Nature structural & molecular biology 20, 1131-1139, doi:10.1038/nsmb.2660 (2013).）。主成分分析(PCA)により、nOSKL-iPSCがプライム型PSCとは明確に区別され、nH9とほとんど同じ特徴を有することが明らかとなった(図１３Ｄ)。本発明者らが樹立したナイーブ型ヒトiPSCが最もエピブラストに近かった。

[0196] ［実施例８］樹立したナイーブ型iPSCのメチル化およびX染色体の再活性化の検証

実施例７のRNA-seqで使用した細胞株においてメチル化アレイを行った（図

１４Ａ）。フィーダーフリーのナイーブ型iPSC(FF_1-2)を含むnOSKL-iPSCは、プライム型PSCと比較してグローバルなDNA脱メチル化状態を示した。また、メチル化アレイデータのPCAでは、プライム型iPSCとナイーブ型iPSCが明確に分離された（図１４Ｂ）。

[0197] RNA-FISHによりX染色体再活性化を検証した（図１４Ｃ）。HUWE1は活性化X染色体で発現が認められる遺伝子である。XISTは本来X染色体を不活性化させる方向に働くlncRNAであるが、Naive型iPSCと類似の特徴を有する着床前エピブラストでは両方の活性化X染色体においてXISTが陽性となるという一見矛盾した所見を認める（図１４Ｃの左端の図）。プライム型iPSCに近づくにつれて図１４Ｃの右側の図に遺伝子発現パターンが変化し、プライム型iPSCでは基本的にほとんどの細胞が図１４Ｃの右端の図の遺伝子発現パターンを示した（HUWEI+/-、XIST-/-）。さらに、樹立したクローンにおいてRNA-FISHを行った（図１４Ｄ）。クローンによってばらつきはあるが、nOSKL-iPSCはプライム型PSCと比較して明らかに着床前エピブラストに類似したパターンを示した。これらの観察により、nOSKL-iPSCがナイーブ型状態であることが確認された。

[0198] ［実施例９］樹立したナイーブ型iPSCのミトコンドリア機能の評価

実施例７のRNA-seqのデータに基づいて、酸化的リン酸化に関連するミトコンドリア遺伝子の発現を比較した（図１５Ａ）。ナイーブ型iPSCはプライム型iPSCと比較してミトコンドリア遺伝子の発現量が高く、これは好気性代謝などのミトコンドリア機能が活性化されていることを示唆している。次に、細胞外フラックスアナライザーを用いてナイーブ型iPSCとプライム型iPSCの代謝能を比較した（図１５Ｂ）。ナイーブ型iPSCはプライム型iPSCと比較してFCCP投与後に酸素消費速度（OCR）が著しく上昇しており、これはナイーブ型iPSCの優れた予備呼吸能を示唆している。ナイーブ型iPSCとプライム型iPSCについて、好気性代謝能の指標の一つである予備呼吸能を定量比較した（図１５Ｃ）。nOSKL-iPSCはnH9と同様にプライム型iPSCと比較して高い値を示した。さらに、解糖系代謝機能の指標である細胞外酸性化速度（ECAR）および

好気性代謝機能の指標であるOCRを調べた（図１５Ｄ）。ナイーブ型iPSCは、プライム型iPSCと比較してECARおよびOCRがともに高値であり、高エネルギー代謝状態であることが示唆された。

[0199] ［実施例１０］樹立したナイーブ型iPSCの原始内胚葉への分化能の検証

ナイーブ型PSCは着床前エピブラストに類似しており、胚外組織に分化する能力を有する。この特徴はプライム型PSCとは異なる。原始内胚葉は、プライム型iPSCから分化させることが殆どできないが、ナイーブ型iPSCからであれば分化可能である。したがって、本発明者らは、nOSKL-iPSCが規定の分化培地においてナイーブ型PSC由来の原始内胚葉に分化する能力を調べた(図１６Ａ)。分化誘導開始後day3のプライム型ESCおよびnOSKL-iPSCの光顕像を図１６Ｂに示す。nOSKL-iPSCは、プライム型ESCと比較して明らかに内胚葉系細胞に類似した形態を示した。次に、フローサイトメトリーを用いて原始内胚葉特異的マーカーであるPDGFRAおよびANPEPの発現量を比較検証した（図１６Ｃ）。n9およびnOSKL-iPSCは、原始内胚葉特異的なマーカーであるPDGFRAおよびANPEPを高発現しており、原始内胚葉への良好な分化能を示した。プライム型PSCおよび従来のSeV-KLF4/TSベクター(CytoTune-iPS 2.0L)を用いて樹立したSeVが残存しているナイーブ型iPSCは、PDGFRAおよびANPEPの発現レベルが非常に低く、これは原始内胚葉への分化能が著しく低いことを示している。PDGFRA/ANPEP共陽性細胞におけるシグナル値の中央値を調べた（図１６Ｄ）。プライム型iPSCおよびSeVが残存しているナイーブ型iPSCは図１６Ｄの左下側に分布しているのに対し、nH9および本法で樹立したナイーブ型iPSCは右上側に分布しており、これは本法で樹立したナイーブ型iPSCがnH9に類似した優れた分化能を有することを示唆している。

[0200] ［実施例１１］樹立したナイーブ型iPSCの栄養外胚葉への分化能の検証

栄養外胚葉（TE）もまた、プライム型iPSCから分化させることが殆どできないが、ナイーブ型iPSCからであれば分化可能である。本発明者らは、nOSKL-iPSCが規定の分化培地においてナイーブ型PSC由来の栄養外胚葉(TE)に分化する能力を調べた(図１７Ａ)。分化誘導開始後day3のプライム型ESCおよびnO

SKL-iPSCの光顕像を図１７Ｂに示す。分化誘導開始後day3の両者の形態は明確に異なっていた。次に、フローサイトメトリーを用いて栄養外胚葉特異的マーカーであるTACSTD2、ENPEP、HAVCR1および陰性マーカーであるHLA-ABCの発現量を比較検証した（図１７Ｃ）。n9およびnOSKL-iPSCは、TE特異的なマーカーであるHAVCR1を高発現しており、HLA-ABCを発現していないため、TEへの良好な分化能を示していた。プライム型PSCはHAVCR1を全く発現せず、半数近くがHLA-ABC陽性であったため、殆どTEに分化していないことが示唆された。従来のSeV-KLF4/TSベクター(CytoTune-iPS 2.0L)を用いて樹立したSeVが残存しているナイーブ型iPSCはTACSTD2、ENPEPおよびHAVCR1の発現レベルが非常に低く、これはプライム型PSCと同様にTEへの分化能が著しく低いことを示している。フローサイトメトリーにより、TACSTD2/ENPEP共陽性およびHAVCR1陽性細胞の割合を調べた（図１７Ｄ）。プライム型iPSCおよびSeVが残存しているナイーブ型iPSCは図１７Ｄの左側に分布しているのに対し、nH9および本法で樹立したナイーブ型iPSCは図１７Ｄの右側に分布しており、これは本法で樹立したナイーブ型iPSCがnH9に類似した優れた分化能を有することを示唆している。また、興味深いことに、nOSKL-iPSCのいくつかのクローンはnH9よりも高いレベルでTACSTD2およびENPEPを発現していた。

[0201] 以上をまとめると、本発明者らは、SeV-KLF4ベクターの構成を改良することによって体細胞からナイーブ型ヒトiPSCを作製するための著しく高速なSeVゲノム除去システムを開発した。その結果、従来の方法で作製したナイーブ型iPSCと比較して、初期継代において強固な導入遺伝子非依存性を有し、優れたナイーブ型特異的な分化能を有するナイーブ型ヒトiPSCを取得できた。さらに、初期化因子の組合せをSeV-OSKLに変更することによってPBMCからナイーブ型ヒトiPSCへの初期化に成功した。本発明者らはまた、iMEF馴化培地を用いてフィーダーフリー環境において皮膚線維芽細胞からナイーブ型ヒトiPSCを樹立した。これらの技術革新は、ナイーブ型ヒトiPSCを用いた初期発生の研究および臨床応用を大きく発展させる。

請求の範囲

[請求項1] 下記工程（１）～（３）を含む、ヒト体細胞からナイーブ型人工多能性幹細胞を製造する方法；

（１）ヒト体細胞に、初期化因子を含む1つ以上のベクターを導入する工程、

（２）前記体細胞をナイーブ用培地の存在下で培養する工程、および

（３）工程（２）の後、得られた細胞をナイーブ用培地の存在下、前記体細胞当たりの前記ベクター量が工程３開始時と比して30％以下に減少する条件下で培養する工程。

[請求項2] 前記1つ以上のベクターが、マイナス鎖RNAウイルスベクターである、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記1つ以上のベクターが、パラミクソウイルスベクターである、請求項２に記載の方法。

[請求項4] 前記1つ以上のベクターが、センダイウイルスベクターである、請求項３に記載の方法。

[請求項5] 工程（１）の1～10日後に工程（２）を開始する、請求項１～４のいずれかに記載の方法。

[請求項6] 工程（２）を1～20日間行う、請求項１～５のいずれかに記載の方法。

[請求項7] 前記1つ以上のベクターが、温度感受性を示すベクター、人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクター、および温度感受性を示し、かつ人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクターからなる群から選択される、請求項１～６のいずれかに記載の方法。

[請求項8] 前記1つ以上のベクターが、温度感受性を示すベクターである、請求項７に記載の方法。

[請求項9] 前記1つ以上のベクターが、ナイーブ型多能性幹細胞を樹立する細

胞培養環境下で温度感受性を示すベクターである、請求項８に記載の方法。

[請求項10] 前記1つ以上のベクターが、TS7変異（TS変異（M蛋白質のG69E/T116A/A183S変異、HN蛋白質のA262T/G264R/K461G変異、P蛋白質のL511F変異、およびL蛋白質のN1197S/K1795E変異）に加えて、L蛋白質のY942H/L1361C/L1558I変異）、TS12変異（TS変異に加えて、P蛋白質のD433A/R434A/K437A変異）またはTS15変異（TS変異に加えて、P蛋白質のD433A/R434A/K437A変異およびL蛋白質のL1361C/L1558I）を含むセンダイウイルスベクターである、請求項９に記載の方法。

[請求項11] 工程（３）が、得られた細胞を３８℃以上で培養することを含む、請求項７～１０のいずれかに記載の方法。

[請求項12] 人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクターがマイナス鎖RNAウイルスベクターであって、前記マイクロRNAの標的配列が、NP遺伝子またはP遺伝子の、翻訳領域、5’UTR、または3’UTRに存在する、請求項７～１１のいずれかに記載の方法。

[請求項13] 前記マイクロRNAが、miR-367である、請求項１２に記載の方法。

[請求項14] 初期化因子が、OCT遺伝子、SOX遺伝子、MYC遺伝子および／またはKLF遺伝子を含む、請求項１～１３のいずれかに記載の方法。

[請求項15] 前記1つ以上のベクターが、OCT遺伝子、SOX遺伝子およびKLF遺伝子を含むベクター、MYC遺伝子を含むベクター、およびKLF遺伝子を含むベクターを含む、請求項１４に記載の方法。

[請求項16] MYC遺伝子を含むベクターが、TS15変異を含むセンダイウイルスベクターである、請求項１５に記載の方法。

[請求項17] OCT遺伝子、SOX遺伝子およびKLF遺伝子を含むベクター、およびKLF遺伝子を含むベクターが、TS12変異を含むセンダイウイルスベクターである、請求項１５または１６に記載の方法。

[請求項18] 工程（３）において、前記体細胞当たりの前記ベクター量が、工程３開始時から12日以内に工程３開始時と比して30％以下に減少する、

請求項１～１７のいずれかに記載の方法。

[請求項19] 前記ナイーブ用培地が、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阻害剤から選ばれる１以上の化合物を含む、請求項１～１８のいずれかに記載の方法。

[請求項20] 前記ナイーブ用培地が、t2iLGo、5iLAF、およびtt2iLGoからなる群から選ばれる培地である、請求項１９に記載の方法。

[請求項21] 工程（２）および（３）をフィーダー細胞の非存在下で行う、請求項１～２０のいずれかに記載の方法。

[請求項22] 前記ヒト体細胞が、単核球または線維芽細胞である、請求項１～２１のいずれかに記載の方法。

[請求項23] 下記を含む、ヒト体細胞からナイーブ型人工多能性幹細胞を製造するためのキット：

初期化因子を含む1つ以上のベクター、ここで前記1つ以上のベクターは、温度感受性を示すベクター、人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクター、および温度感受性を示し、かつ人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクターからなる群から選択される；および

ナイーブ用培地。

[請求項24] 前記1つ以上のベクターが、マイナス鎖RNAウイルスベクターである、請求項２３に記載のキット。

[請求項25] 前記1つ以上のベクターが、パラミクソウイルスベクターである、請求項２４に記載のキット。

[請求項26] 前記1つ以上のベクターが、センダイウイルスベクターである、請求項２５に記載のキット。

[請求項27] 前記1つ以上のベクターが、温度感受性を示すベクターである、請求項２３～２６のいずれかに記載のキット。

[請求項28] 前記1つ以上のベクターが、ナイーブ型多能性幹細胞を樹立する細

胞培養環境下で温度感受性を示すベクターである、請求項２７に記載のキット。

[請求項29] 前記1つ以上のベクターが、TS7変異（TS変異（M蛋白質のG69E/T116A/A183S変異、HN蛋白質のA262T/G264R/K461G変異、P蛋白質のL511F変異、およびL蛋白質のN1197S/K1795E変異）に加えて、L蛋白質のY942H/L1361C/L1558I変異）、TS12変異（TS変異に加えて、P蛋白質のD433A/R434A/K437A変異）またはTS15変異（TS変異に加えて、P蛋白質のD433A/R434A/K437A変異およびL蛋白質のL1361C/L1558I）を含むセンダイウイルスベクターである、請求項２８に記載のキット。

[請求項30] 人工多能性幹細胞に特異的なマイクロRNAの標的配列を含むベクターがマイナス鎖RNAウイルスベクターであって、前記マイクロRNAの標的配列が、NP遺伝子またはP遺伝子の、翻訳領域、5’UTR、または3’UTRに存在する、請求項２３～２９のいずれかに記載のキット。

[請求項31] 前記マイクロRNAが、miR-367である、請求項３０に記載のキット。

[請求項32] 初期化因子が、OCT遺伝子、SOX遺伝子、MYC遺伝子および／またはKLF遺伝子を含む、請求項２３～３１のいずれかに記載のキット。

[請求項33] 前記1つ以上のベクターが、OCT遺伝子、SOX遺伝子およびKLF遺伝子を含むベクター、MYC遺伝子を含むベクター、およびKLF遺伝子を含むベクターを含む、請求項３２に記載のキット。

[請求項34] MYC遺伝子を含むベクターが、TS15変異を含むセンダイウイルスベクターである、請求項３３に記載のキット。

[請求項35] OCT遺伝子、SOX遺伝子およびKLF遺伝子を含むベクター、およびKLF遺伝子を含むベクターが、TS12変異を含むセンダイウイルスベクターである、請求項３３または３４に記載のキット。

[請求項36] 前記ナイーブ用培地が、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阻害剤から選ばれる１以上の化合物を含む、請求項２３～３５のいずれかに記載のキット。

[請求項37] 前記ナイーブ用培地が、t2iLGo、5iLAF、およびtt2iLGoからなる群から選ばれる培地である、請求項３６に記載のキット。

[請求項38] 前記ヒト体細胞が、単核球または線維芽細胞である、請求項２３～３７のいずれかに記載のキット。

[請求項39] 請求項１～２２のいずれかに記載の方法で製造されたナイーブ型人工多能性幹細胞の培養上清。

[請求項40] 請求項１～２２のいずれかに記載の方法で製造されたナイーブ型人工多能性幹細胞の培養上清を原料として含む化粧品。