

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2021-175401

(P2021-175401A)

(43) 公開日 令和3年11月4日(2021.11.4)

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 1 2 N 5/074 (2010.01) C 1 2 N 5/074 4 B 0 6 5
 C 1 2 N 15/12 (2006.01) C 1 2 N 15/12

審査請求 有 請求項の数 12 O L (全 30 頁)

| | |
|--|---|
| <p>(21) 出願番号 特願2021-119920 (P2021-119920)</p> <p>(22) 出願日 令和3年7月20日(2021.7.20)</p> <p>(62) 分割の表示 特願2019-501813 (P2019-501813) の分割</p> <p>原出願日 平成30年2月22日(2018.2.22)</p> <p>(31) 優先権主張番号 62/463,420</p> <p>(32) 優先日 平成29年2月24日(2017.2.24)</p> <p>(33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)</p> | <p>(71) 出願人 515238909 田邊 剛士 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94303, パロアルト, サンアントニオロード 809, スイート 7</p> <p>(71) 出願人 517123221 アイピース, インコーポレイテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94303, パロアルト, サンアントニオロード 809, スイート 7</p> <p>(74) 代理人 100079108 弁理士 稲葉 良幸</p> <p>(74) 代理人 100109346 弁理士 大貫 敏史</p> |
|--|---|

最終頁に続く

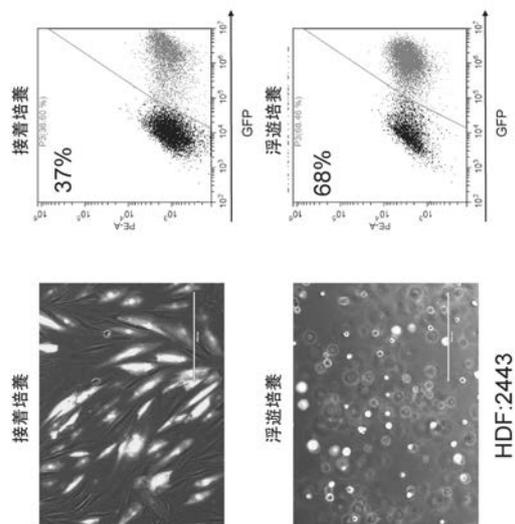
(54) 【発明の名称】 人工多能性幹細胞の作製方法

(57) 【要約】

【課題】臨床利用に適した安全な人工多能性幹細胞の効率的な作製方法を提供する。

【解決手段】本開示によれば、体細胞を用意することと、体細胞に初期化因子RNAを含むセンダイウイルスを導入することと、を含む、人工多能性幹細胞の作製方法が提供される。また、本開示によれば、体細胞を用意することと、体細胞にRNAトランスフェクション試薬を用いて初期化因子RNAを導入することと、ゲル培地中で体細胞を初期化することと、を含む、人工多能性幹細胞の作製方法が提供される。

【選択図】 図 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

体細胞を用意することと、
前記体細胞に初期化因子 RNA を含むセンダイウイルスを導入することと、
を含む、人工多能性幹細胞の作製方法。

【請求項 2】

ゲル培地で浮遊培養されている前記体細胞に前記初期化因子 RNA を含むセンダイウイルスを導入する、請求項 1 に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【請求項 3】

接着培養されている前記体細胞に前記初期化因子 RNA を含むセンダイウイルスを導入する、請求項 1 に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

10

【請求項 4】

ゲル培地中で前記体細胞を初期化することをさらに含む、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【請求項 5】

前記体細胞が繊維芽細胞である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【請求項 6】

前記体細胞が血液細胞である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

20

【請求項 7】

赤血球分離剤を用いて、前記体細胞として単核球細胞を分離することをさらに含む、請求項 6 に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【請求項 8】

フィルターを用いて、前記体細胞として単核球細胞を分離することをさらに含む、請求項 6 に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【請求項 9】

免疫磁気ビーズを用いて、前記体細胞として単核球細胞を分離することをさらに含む、請求項 6 に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【請求項 10】

前記初期化因子 RNA が、M₃O 又は OCT 3 / 4 の mRNA、SOX 2 の mRNA、KLF 4 の mRNA、及び c - MYC の mRNA を含む、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

30

【請求項 11】

前記ゲル培地が攪拌されない、請求項 2 又は 4 に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【請求項 12】

前記ゲル培地が、成長因子を含まない、請求項 2 又は 4 に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【請求項 13】

前記ゲル培地が、成長因子を 40 質量 % 以下の濃度で含む、請求項 2 又は 4 に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

40

【請求項 14】

前記ゲル培地が、bFGF を含まない、請求項 2 又は 4 に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【請求項 15】

体細胞を用意することと、
前記体細胞に RNA トランスフェクション試薬を用いて初期化因子 RNA を導入することと、
ゲル培地中で前記体細胞を初期化することと、
を含む、人工多能性幹細胞の作製方法。

50

- 【請求項 16】
前記体細胞が繊維芽細胞である、請求項 15 に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。
- 【請求項 17】
前記体細胞が血液細胞である、請求項 15 に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。
- 【請求項 18】
赤血球分離剤を用いて、前記体細胞として単核球細胞を分離することをさらに含む、請求項 17 に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。
- 【請求項 19】
フィルターを用いて、前記体細胞として単核球細胞を分離することをさらに含む、請求項 17 に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。 10
- 【請求項 20】
免疫磁気ビーズを用いて、前記体細胞として単核球細胞を分離することをさらに含む、請求項 17 に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。
- 【請求項 21】
前記初期化因子 RNA が、M₃O 又は OCT 3 / 4 の mRNA、SOX 2 の mRNA、KLF 4 の mRNA、及び c - MYC の mRNA を含む、請求項 15 から 20 のいずれか 1 項に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。
- 【請求項 22】
前記ゲル培地が攪拌されない、請求項 15 から 21 のいずれか 1 項に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。 20
- 【請求項 23】
前記ゲル培地が、成長因子を含まない、請求項 15 から 22 のいずれか 1 項に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。
- 【請求項 24】
前記ゲル培地が、成長因子を 40 質量%以下の濃度で含む、請求項 15 から 23 のいずれか 1 項に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。
- 【請求項 25】
前記ゲル培地が、bFGF を含まない、請求項 15 から 24 のいずれか 1 項に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。
- 【請求項 26】
前記初期化因子 RNA の導入を複数回行う、請求項 15 から 25 のいずれか 1 項に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。 30
- 【発明の詳細な説明】
- 【技術分野】
- 【0001】
本発明は、細胞技術に関し、人工多能性幹細胞の作製方法に関する。
- 【背景技術】
- 【0002】
人工多能性幹 (iPS) 細胞とは、二つの特徴的な能力を有する細胞である。一つは、体を構成するあらゆる細胞へと変化することができる能力である。もう一つは、半永久的な増殖能を有することである。iPS 細胞はこの二つの能力を有するため、自己の体細胞から iPS 細胞を作製し、目的の体細胞へ変化させることで、拒絶反応のない移植治療へと応用することができる。そのため iPS 細胞は、再生医療の有力な技術になると考えられている。 40
- 【0003】
iPS 細胞の誕生から現在までに、数多くのその作製方法が確立された。代表的な iPS 細胞の作製方法としては、レトロウイルス/レンチウイルスを用いた方法、及びエプソーマルベクターを用いた方法が挙げられる。
- 【0004】
レトロウイルス/レンチウイルスを用いた方法について説明する。体細胞をレトロウイ 50

ルスやレンチウイルスに感染させて、初期化因子をコードしている遺伝子を細胞内に導入することができる。さらに、レトロウイルスやレンチウイルスは、体細胞のゲノムに初期化因子を挿入することができ、初期化因子の細胞内での安定的な発現を誘導する。

【0005】

しかし、レトロウイルス/レンチウイルスを用いた方法には、以下の問題点がある。まず、体細胞のゲノムへの初期化因子の挿入は、既存の遺伝子やプロモーターを傷つけるため、細胞の癌化の原因になり得る。また、ゲノム上に挿入された初期化因子は、iPS細胞を体細胞に変化させた後に再度活性化するおそれがある。そのため、iPS細胞由来の移植用細胞には癌化のリスクがある。実際、マウスモデルにおいては、導入された初期化因子の再活性化が体細胞で見られ、癌化することが確認されている（例えば、非特許文献1参照。）。

10

【0006】

エピソーマルベクターは環状DNAであり、核内で自己増幅する。エピソーマルベクターは、原理的にはゲノムに組み込まれないと考えられてきたが、最近の研究では、エピソーマルで作成されたiPS細胞のゲノム上に、エピソーマルベクターの断片が散在して挿入されることが報告されている。そのため、リプログラミング遺伝子が細胞内に残存するという問題がある。例えばc-MYCやKLF4が細胞内に残存すると、癌化の原因になる。リプログラミング遺伝子が細胞内に残存しているか否かを検査するには膨大な費用が必要である。移植細胞プール中の全ての細胞にエピソーマルプラスミドのゲノムへの挿入がなく、残存がないことを示すことは不可能である。

20

【0007】

レトロウイルス/レンチウイルスを用いた方法、及びエピソーマルベクターを用いた方法には、上述した問題があるため、RNAを用いたiPS細胞の作製方法が提案されている（例えば、非特許文献2参照。）。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Nature 448, 313-317

【非特許文献2】Nature Biotechnol 26(3): 313-315, 2008.

【発明の概要】

30

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

初期化因子RNAを効率的に体細胞に導入する方法が求められている。本発明は、臨床利用に適した安全な人工多能性幹細胞の効率的な作製方法を提供することを目的の一つとする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の態様によれば、体細胞を用意することと、体細胞に初期化因子RNAを含むセンダイウイルスを導入することと、を含む、人工多能性幹細胞の作製方法が提供される。

【0011】

40

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、ゲル培地で浮遊培養されている体細胞に初期化因子RNAを含むセンダイウイルスを導入してもよい。

【0012】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、接着培養されている体細胞に初期化因子RNAを含むセンダイウイルスを導入してもよい。

【0013】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法が、ゲル培地中で体細胞を初期化することをさらに含んでいてもよい。

【0014】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、体細胞が繊維芽細胞であってもよい。

50

【0015】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、体細胞が血液細胞であってもよい。

【0016】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法が、赤血球分離剤を用いて、体細胞として単核球細胞を分離することをさらに含んでいてもよい。

【0017】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、フィルターを用いて、体細胞として単核球細胞を分離することをさらに含んでいてもよい。

【0018】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、免疫磁気ビーズを用いて、体細胞として単核球細胞を分離することをさらに含んでいてもよい。

10

【0019】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、初期化因子RNAが、M₃O又はOCT 3/4のmRNA、SOX2のmRNA、KLF4のmRNA、及びc-MYCのmRNAを含んでいてもよい。

【0020】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、ゲル培地が攪拌されなくともよい。ゲル培地が、成長因子を含まなくともよい。ゲル培地が、成長因子を40質量%以下の濃度で含んでいてもよい。ゲル培地が、bFGFを含まなくともよい。

【0021】

また、本発明の態様によれば、体細胞を用意することと、体細胞にRNAトランスフェクション試薬を用いて初期化因子RNAを導入することと、ゲル培地中で体細胞を初期化することと、を含む、人工多能性幹細胞の作製方法が提供される。

20

【0022】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、体細胞が繊維芽細胞であってもよい。

【0023】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、体細胞が血液細胞であってもよい。

【0024】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法が、赤血球分離剤を用いて、体細胞として単核球細胞を分離することをさらに含んでいてもよい。

30

【0025】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、フィルターを用いて、体細胞として単核球細胞を分離することをさらに含んでいてもよい。

【0026】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、免疫磁気ビーズを用いて、体細胞として単核球細胞を分離することをさらに含んでいてもよい。

【0027】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、初期化因子RNAが、M₃O又はOCT 3/4のmRNA、SOX2のmRNA、KLF4のmRNA、及びc-MYCのmRNAを含んでいてもよい。

40

【0028】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、ゲル培地が攪拌されなくともよい。ゲル培地が、成長因子を含まなくともよい。ゲル培地が、成長因子を40質量%以下の濃度で含んでいてもよい。ゲル培地が、bFGFを含まなくともよい。

【0029】

上記の人工多能性幹細胞の作製方法において、初期化因子RNAの導入を複数回行ってよい。

【発明の効果】

【0030】

本発明によれば、臨床利用に適した安全な人工多能性幹細胞の効率的な作製方法を提供

50

可能である。

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】第1実施形態の実施例1の結果を示す蛍光顕微鏡の写真と、フローサイトメーターによるドットプロットである。

【図2】第1実施形態の実施例1の結果を示す蛍光顕微鏡の写真と、フローサイトメーターによるドットプロットである。

【図3】第1実施形態の実施例3に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

【図4】第1実施形態の実施例3に係る免疫染色された細胞の写真である。

【図5】第1実施形態の実施例4に係る免疫染色された細胞の写真である。

10

【図6】第1実施形態の実施例5に係る免疫染色された細胞の写真である。

【図7】第1実施形態の実施例6に係る免疫染色された細胞の写真である。

【図8】第1実施形態の実施例7から9の結果を示すフローサイトメーターによるドットプロットである。

【図9】第1実施形態の実施例10、11に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

【図10】第1実施形態の実施例10に係る免疫染色された細胞の写真であるである。

【図11】第1実施形態の実施例11に係る免疫染色された細胞の写真であるである。

【図12】第1実施形態の実施例12に係る10mL血液当たりの平均単核球細胞数を示すグラフである。

【図13】第1実施形態の実施例12の結果を示すフローサイトメーターによるドットプロットである。

20

【図14】第1実施形態の実施例13の結果を示す蛍光顕微鏡の写真である。

【図15】第1実施形態の実施例13の結果を示すフローサイトメーターによるドットプロットである。

【図16】第1実施形態の実施例14に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

【図17】第2実施形態の実施例で用いた初期化因子mRNAのマスターミックスの成分を示す表である。

【図18】第2実施形態の実施例で用いたキットの内容物を示す表である。

【図19】第2実施形態の実施例に係るiPS細胞のコロニーの写真である。

【図20】第2実施形態の参考例に係る蛍光顕微鏡写真である。

30

【図21】第2実施形態の参考例に係る蛍光活性化フローサイトメーターによる分析結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0032】

以下、本発明の実施形態について詳細に説明する。なお以下の示す実施形態は、この発明の技術的思想を具体化するための装置や方法を例示するものであって、この発明の技術的思想は構成部材の組み合わせ等を下記のものに特定するものではない。この発明の技術的思想は、特許請求の範囲において種々の変更を加えることができる。

【0033】

(第1実施形態)

40

第1実施形態に係る人工多能性幹細胞(iPS細胞)の作製方法は、体細胞を用意することと、体細胞に初期化因子RNAを含むセンダイウイルスを導入することと、を含む。

【0034】

体細胞の例としては、繊維芽細胞、血液細胞、歯髄幹細胞、ケラチノサイト、毛乳頭細胞、口腔上皮細胞、及び体性幹前駆細胞等が挙げられる。

【0035】

血液細胞は、血液から分離される。血液は、例えば末梢血及び臍帯血であるが、これらに限定されない。血液は、成年から採取されてもよいし、未成年から採取されてもよい。採血の際には、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ヘパリン、及び生物学的製剤基準血液保存液A液(ACD-A)液等の抗凝固剤を用いる。

50

【0036】

血液細胞は、例えば、単核球細胞 (Monocyte)、好中球、好酸球、好塩基球、及びリンパ球等の有核細胞であり、赤血球、顆粒球、及び血小板を含まない。血液細胞は、例えば血管内皮前駆細胞、血液幹・前駆細胞、T細胞、又はB細胞であってもよい。T細胞は、例えば T細胞である。

【0037】

単核球細胞は、血液細胞の分離用媒体、及び遠心分離装置等を用いて、血液から分離される。血液細胞の分離用媒体として Ficoll (GEヘルスケア)を使用する場合の、単核球細胞の分離方法は、以下のとおりである。

【0038】

低温では単核球細胞の分離精度が悪くなる傾向にあるため、遠心機を4 から42 好ましくは18 に設定する。成年又は未成年のヒトから10 µLから50 mLの血液を採血し、血液が固まらないように血液にEDTAを含むキレート剤を加えて優しく混ぜる。また、ヒトリンパ球分離用の媒体 (Ficoll-Paque PREMIUM、GEヘルスケアジャパン)を5 mLずつ2本の15 mLチューブに分注する。5 mLの血液に対して5 mLのPBSを加えて希釈し、チューブ中のヒトリンパ球分離用の媒体の上に5 mLずつ重層する。この時、界面を乱さないように、希釈血液をチューブの管壁を伝わらせてゆっくりと媒体上加える。

【0039】

チューブ中の溶液を、10 × gから1000 × g、好ましくは400 × gで、4 から42 好ましくは18 で5分から2時間、好ましくは30分間遠心する。遠心後、チューブ中に白く濁った中間層が現れる。この白く濁った中間層は、単核球細胞を含んでいる。チューブ中の白く濁った中間層をピペットマンでゆっくりと回収し、新しい15 mLチューブに移す。この際、下層は吸い取らないようにする。白く濁った中間層は、1本のチューブより1 mL程度回収できる。2本分の中間層をまとめて1本のチューブに移す。

【0040】

回収した単核球細胞に対し、1 mLから48 mL、好ましくは12 mLのPBSを加えて、溶液をさらに10 × gから1000 × g、好ましくは200 × g、4 から42 、好ましくは18 で1分から60分、好ましくは10分間遠心する。その後、アスピレータを用いて溶液の上清を吸引して除去し、1 mLから12 mL、好ましくは3 mLの既知組成無血清造血細胞培地 (X-VIVO (登録商標) 10、ロンザ)を加えて懸濁し、単核球細胞懸濁液を得る。そのうち10 µLの単核球細胞懸濁液をトリパンブルーで染色して血球計算盤でカウントする。

【0041】

採血管としてバキュティナ (登録商標、BD)を使用する場合の、単核球細胞の分離方法は、以下のとおりである。

【0042】

低温では単核球細胞の分離精度が悪くなる傾向にあるため、遠心機を4 から42 、好ましくは18 に設定する。成年又は未成年のヒトから、採血管 (バキュティナ (登録商標)、BD)を用いて8 mL採血し、転倒混和して抗凝固剤と混和する。その後、バランスを調整し、溶液を4 から42 、好ましくは18 、100 × gから3000 × g、好ましくは1500 × gから1800 × gでシングロータで1分から60分、好ましくは20分間遠心する。遠心後、血漿層である上層を取り除き、ピペティングして単核球層とゲルに張り付いている血球を懸濁して懸濁液を得る。得られた懸濁液を、別の15 mLチューブに移す。

【0043】

15 mLチューブの懸濁液に1 mLから14 mL、好ましくは12 mLのPBSを加えて、懸濁液を4 から42 、好ましくは18 、100 × gから3000 × g、好ましくは200 × gで1分から60分、好ましくは5分間遠心する。遠心後、上清をアスピレータで除去する。また、溶血剤 (PharmLyse (登録商標)、10倍濃度、BD)

10

20

30

40

50

を滅菌水で1倍濃度に希釈する。15 mLチューブ中のペレットをタッピングでほぐし、1 mLから14 mL、好ましくは1 mLの溶血剤を加える。その後、室温で遮光し、1分から60分間、好ましくは1分間溶液を静置する。

【0044】

次に、15 mLチューブに1 mLから14 mL、好ましくは12 mLのPBSを加えて、4 から42 、好ましくは室温で、100×gから3000×g、好ましくは200×gで1分から60分、5分間遠心する。遠心後、上清をアスピレータで除去し、1 mLから15 mL、好ましくは3 mLの既知組成無血清造血細胞培地(X-VIVO(登録商標)10、ロンザ)を加えて懸濁し、単核球細胞懸濁液を得る。そのうち10 μLの単核球細胞懸濁液をトリパンプルーで染色して血球計算盤でカウントする。

10

【0045】

血液から単核球細胞を分離する方法は、上記の方法に限られず、例えば、透析膜を使用して、血液から単核球を分離してもよい。また、全血単核球濃縮用ピュアセルセレクトシステム(登録商標、PALL)、血球細胞除去用浄化器(セルソーバE、登録商標、旭化成)、及び血小板製剤用白血球除去フィルター(セパセルPL、登録商標、PLX-5B-SCD、旭化成)等のフィルターも使用可能である。

【0046】

単核球細胞は、赤血球を重力沈降又は遠心分離することにより有核細胞を分離することが可能な赤血球分離剤を用いて分離されてもよい。赤血球分離剤の例としては、HetaSep(登録商標、STEMCELL Technologies)及びHES40(NIPRO)が挙げられる。

20

【0047】

また、単核球細胞としては、Cellular Technology Limited社から販売されているCTL-UP1や、Sanguine Biosciences社のPBMC-001等を使用してもよい。

【0048】

あるいは、血液細胞としては、セルバンカー1、ステムセルバンカー GMPグレード、及びステムセルバンカー DMSOフリー GMPグレード(ゼノアック)等の細胞凍結保存液を用いて凍結保存された血液細胞を解凍して用いてもよい。

【0049】

単核球細胞を解凍する際には、まず、15 mLチューブに1 mLから15 mL、好ましくは8 mLの既知組成無血清造血細胞培地(X-VIVO(登録商標)10、ロンザ)を入れておき、凍結した単核球細胞の入ったチューブを4 から42 、好ましくは37の温浴槽に置いて、単核球細胞を溶かし始める。その後、少し氷が残っている状態で、単核球細胞の入ったチューブを温浴槽から引きあげ、単核球細胞を既知組成無血清造血細胞培地の入ったチューブに移す。そのうち10 μLの単核球細胞懸濁液をトリパンプルーで染色して血球計算盤でカウントする。

30

【0050】

血液細胞は、細胞表面マーカーに基づいて分離されてもよい。血液幹・前駆細胞は、CD34が陽性である。T細胞は、CD3、CD4、CD8のいずれかが陽性である。B細胞は、CD10、CD19、CD20のいずれかが陽性である。血液幹・前駆細胞、T細胞、又はB細胞は、例えば、自動磁気細胞分離装置及び免疫磁気ビーズを用いて、血液細胞から分離される。あるいは、予め分離された単核球細胞を用意してもよい。ただし、細胞表面マーカーに基づいて分離されていない血液細胞を用いてもよい。

40

【0051】

CD34陽性細胞は、幹・前駆細胞であり、リプログラミングされやすい傾向にある。また、CD3陽性細胞であるT細胞を用いてiPS細胞を作製すると、T細胞由来のiPS細胞はTCRリコンビネーションの型を保持しているので、T細胞に効率的に分化誘導できる傾向にある。

【0052】

50

CD34陽性細胞の分離方法は、以下のとおりである。

【0053】

10 mLの無血清培地 (StemSpan H3000、STEMCELL Technologies) に、10 μ LのIL-6 (100 μ g/mL)、10 μ LのSCF (300 μ g/mL)、10 μ LのTPO (300 μ g/mL)、10 μ LのFLT3リガンド (300 μ g/mL)、及び10 μ LのIL-3 (10 μ g/mL) を加えて血球培地 (血液幹・前駆細胞培地) を調製する。

【0054】

6ウェルプレートの1ウェルに1 mLから6 mL、好ましくは2 mLの血球培地を入れる。また、培地の蒸発を防ぐために、他の5ウェルのそれぞれに1 mLから6 mL、2 mLのPBSを入れる。その後、6ウェルプレートを4 から42、好ましくは37のインキュベーターに入れて温める。

【0055】

20 mLのPBSに対し、10 μ Lから1 mL、好ましくは80 μ LのEDTA (50 mmol/L) 及び10 μ Lから1 mL、好ましくは200 μ LのFBSを加えたカラムバッファを用意する。1 \times 10⁴から1 \times 10⁹個、好ましくは2 \times 10⁷個の単核球細胞を含有する単核球細胞懸濁液を15 mLチューブに分注し、単核球細胞懸濁液を、4 から42、好ましくは4、100 \times gから3000 \times g、好ましくは300 \times gで10分間遠心する。遠心後、上清を除き、単核球細胞を100 μ Lから1 mL、好ましくは300 μ Lのカラムバッファで懸濁する。

【0056】

15 mLチューブ中の単核球細胞懸濁液に、10 μ Lから1 mL、好ましくは100 μ LのFcRブロック試薬 (Miltenyi Biotec) 及び10 μ Lから1 mL、好ましくは100 μ LのCD34マイクロビーズキット (Miltenyi Biotec) を加える。FcRブロック試薬は、マイクロビーズ標識の特異性を高めるために用いられる。その後、単核球細胞懸濁液を混和して、4 から42、好ましくは4で1分から2時間、好ましくは30分間静置する。

【0057】

次に、15 mLチューブ中の単核球細胞懸濁液に1 mLから15 mL、好ましくは10 mLのカラムバッファを加えて希釈し、4 から42、好ましくは4、100 \times gから1000 \times g、好ましくは300 \times gで1分から2時間、好ましくは10分間遠心する。遠心後、15 mLチューブ中の上清をアスピレータで除き、10 μ Lから10 mL、好ましくは500 μ Lのカラムバッファを加えて再懸濁する。

【0058】

自動磁気細胞分離装置用のカラム (MSカラム、Miltenyi Biotec) を自動磁気細胞分離装置 (MiniMACS Separation Unit、Miltenyi Biotec) に取り付け、カラムに10 μ Lから10 mL、好ましくは500 μ Lのカラムバッファを入れて洗浄する。次に、単核球細胞をカラムに入れる。さらに、カラムに10 μ Lから10 mL、好ましくは500 μ Lのカラムバッファを入れて、カラムを1回から10回、好ましくは3回洗浄する。その後、カラムを自動磁気細胞分離装置から外し、15 mLチューブに入れる。次に、カラムに10 μ Lから10 mL、好ましくは1000 μ Lのカラムバッファを入れ、速やかにシリンジを押してCD34陽性細胞を15 mLチューブに流出させる。

【0059】

10 μ LのCD34陽性細胞懸濁液をトリパンブルーで染めて、細胞数を血球計算版でカウントする。また、15 mLチューブ中のCD34陽性細胞懸濁液を、4 から42、好ましくは4、100 \times gから1000 \times g、好ましくは300 \times gで1分から2時間、好ましくは10分間遠心する。遠心後、上清をアスピレータで除く。さらに、温めておいた血球培地でCD34陽性細胞を再懸濁し、CD34陽性細胞を培養プレートにまく。その後、4 から42、好ましくは37、1%から20%、好ましくは5% CO₂

10

20

30

40

50

でCD34陽性細胞を6日間培養する。この間、培地交換はしなくてもよい。

【0060】

CD34以外のマーカーで細胞を単離する方法は、CD34陽性細胞を単離する方法と同様である。

【0061】

接着培養されている体細胞に、初期化因子RNAを含むセンダイウイルスを導入する。あるいは、ゲル培地で浮遊培養されている体細胞に、初期化因子RNAを含むセンダイウイルスを導入する。

【0062】

初期化因子RNAを導入される体細胞は、Matrigel (Corning)、CELLstart (登録商標、ThermoFisher)、あるいはLaminin511 (iMatrix-511、nippi)等の基底膜マトリックスを用いて、フィーダーフリーで培養する。

【0063】

初期化因子RNAを導入される体細胞が培養される培地としては、例えば、Primate ES Cell Medium (ReproCELL)等のヒトES/iPS培地等の幹細胞培地を使用可能である。

【0064】

ただし、幹細胞培地は、これに限定されず、種々の幹細胞培地が使用可能である。例えばPrimate ES Cell Medium、Reprostem、ReproFF、ReproFF2、ReproXF (Reprocell)、mTeSR1、TeSR2、TeSRE8、ReproTeSR (STEMCELL Technologies)、PluriSTEM (登録商標) Human ES/iPS Medium (Merck)、NutriStem (登録商標) XF/FF Culture Medium for Human iPS and ES Cells、Pluriton reprogramming medium (Stemgent)、PluriSTEM (登録商標)、Stemfit AK02N、Stemfit AK03 (Ajinomoto)、ESC-Sure (登録商標) serum and feeder free medium for hESC/iPS (Applied StemCell)、L7 (登録商標) hPSC Culture System (LONZA)、及びPluriQ (MTI-GlobalStem)等を利用してもよい。幹細胞培地は、例えば、ディッシュ、ウェル、又はチューブ等に入れられる。

【0065】

ゲル培地は、例えば、幹細胞培地にゼランガムを終濃度が0.001質量%から0.5質量%、0.005質量%から0.1質量%、あるいは0.01質量%から0.05質量%となるよう添加することにより調製される。

【0066】

ゲル培地は、ゼランガム、ヒアルロン酸、ラムザンガム、ダイユータンガム、キサンタンガム、カラギーナン、フコイダン、ペクチン、ペクチン酸、ペクチニン酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ヘパリチン硫酸、ケラト硫酸、コンドロイチン硫酸、デルタマン硫酸、ラムナン硫酸、及びそれらの塩からなる群から選択される少なくとも1種の高分子化合物を含んでいてもよい。また、ゲル培地は、メチルセルロースを含んでいてもよい。メチルセルロースを含むことにより、細胞同士の凝集がより抑制される。

【0067】

あるいは、ゲル培地は、poly(glycerol monomethacrylate) (PGMA)、poly(2-hydroxypropyl methacrylate) (PHPMA)、Poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)、amine terminated、carboxylic acid terminated、maleimide terminated、N-hydroxysuccinimide (NHS) ester terminated、triethoxysilane terminated、Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-butylacrylate)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid)、Poly

10

20

30

40

50

(N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid-co-octadecyl acrylate)、及びN-Isopropylacrylamideから選択される少なくとも1種の温度感受性ゲルを含んでいてもよい。

【0068】

ゲル培地は、例えば、basic fibroblast growth factor (bFGF)等の成長因子を含まない。あるいは、ゲル培地は、bFGF等の成長因子を、400 µg/L以下、40 µg/L以下、あるいは10 µg/L以下の低濃度で含む。

【0069】

また、ゲル培地は、TGF-βを含まないか、TGF-βを600 ng/L以下、300 ng/L以下、あるいは100 ng/L以下の低濃度で含む。

10

【0070】

ゲル培地は、攪拌されなくともよい。また、ゲル培地は、フィーダー細胞を含まなくともよい。

【0071】

ゲル培地は、カドヘリン、ラミニン、フィブロネクチン、及びビトロネクチンからなる群から選択される少なくとも1種の物質を含んでいてもよい。

【0072】

体細胞に導入される初期化因子RNAは、例えば、OCT3/4のmRNA、SOX2のmRNA、KLF4のmRNA、及びc-MYCのmRNAを含む。初期化因子RNAとして、OCT3/4を改良したM₃Oを使用してもよい。また、初期化因子RNAは、LIN28A、FOXH1、LIN28B、GLIS1、p53-dominant negative、p53-P275S、L-MYC、NANOG、DPPA2、DPPA4、DPPA5、ZIC3、BCL-2、E-RAS、TPT1、SALL2、NAC1、DAX1、TERT、ZNF206、FOXD3、REX1、UTF1、KLF2、KLF5、ESRRB、miR-291-3p、miR-294、miR-295、NR5A1、NR5A2、TBX3、MBD3sh、TH2A、TH2B、及びP53DDからなる群から選択される少なくとも一つの因子のmRNAをさらに含んでいてもよい。これらのmRNAは、TriLinkから入手可能である。なお、ここでは遺伝子記号はヒトで記載しているが、大文字・小文字表記によって、種を制限することを意図するものではない。例えば、全て大文字表記していても、マウス又はラットの遺伝子を含むことを排除するものではない。ただし、実施例においては、実際に使用した生物種に則って、遺伝子記号を表記している。

20

30

【0073】

mRNAは、プソイドウリジン(Ψ)、5-メチルウリジン(5meU)、N1-メチルシュードウリジン(m₁Ψ)、5-メトキシウリジン(5moU)、5-ヒドロキシメチルウリジン(5hmU)、5-フォーミルウリジン(5fU)、5-カルボキシメチルエステルウリジン(5camU)、チエノグアノシン(thG)、N4-メチルシチジン(m₄C)、5-メチルシチジン(m₅C)、5-メチオキシシチジン(5moC)、5-ヒドロキシメチルシチジン(5hmC)、5-ヒドロキシシチジン(5hoC)、5-フォルムシチジン(5fC)、5-カルボキシシチジン(5caC)、N6-メチル-2-アミノアデノシン(m₆DAP)、ジアミノプリン(DAP)、5-メチルウリジン(m₅U)、2'-O-メチルウリジン(U_mまたはm₂'-OU)、2-チオウリジン(s₂U)、及びN6-メチルアデノシン(m₆A)からなる群から選択される少なくとも1つで修飾されていてもよい。

40

【0074】

mRNAは、ポリアデニル化されていてもよい。

【0075】

mRNAは、インビトロで転写される(IVT)RNAのポリアデニル化によって調製されてもよい。mRNAは、ポリ(A)末端をコードするDNAテンプレートをを用いることによって、IVTの間にポリアデニル化されてもよい。mRNAがキャッピングされて

50

もよい。細胞における発現の効率性を最大化するために、大部分のmRNA分子がキャップを含有することが好ましい。mRNAは5' cap [m7G (5') ppp (5') G] 構造を有していてもよい。当該配列はmRNAを安定化させ、転写を促進させる配列である。5' triphosphateをもつmRNAからは、脱リン酸化処理により5' triphosphateを取り除いてもよい。mRNAはAnti-Reverse Cap Analog (ARCA)として[3' O-Me-m7G (5') ppp (5') G]を有していてもよい。ARCAは転写開始点より前に挿入される配列であり、転写されるmRNAの効率は二倍となる。mRNAはPoly Aテールを有していてもよい。

【0076】

また、mRNAは、自己増殖能を持つリブリケイティブRNAであってもよい。リブリケイティブRNAとは、自己増殖能を持つRNAであり、通常のRNAと異なり、RNAの複製に必要なタンパク質を発現させる能力を併せ持っている。リブリケイティブRNAはアルファウイルスの一種であるベネズエラ馬脳炎(VEE)ウイルス由来である。リブリケイティブRNAを細胞にトランスフェクションすると、リプログラミング因子を作り続けるRNAを細胞に発現させることができるため、初期化因子RNAを細胞に複数回導入することを省くことが可能となる。

【0077】

リブリケイティブRNAの配列は、アルファウイルスレプリコンRNA、東部ウマ脳炎ウイルス(EEE)、ベネズエラウマ脳炎ウイルス(VEE)、エバーグレーズ(Everglades)ウイルス、ムカンボ(Mucambo)ウイルス、ピクスナ(Pixuna)ウイルス、及び西部ウマ脳炎ウイルス(WEE)からなる群から選択されるアルファウイルスから得られる配列を含んでいてよい。

【0078】

また、リブリケイティブRNAは、シンドビス(Sindbis)ウイルス、セムリキ森林(Semliki Forest)ウイルス、ミデルブルグ(Middelburg)ウイルス、チクングニア(Chikungunya)ウイルス、オニヨンニヨン(O'nyong-nyong)ウイルス、ロスリバー(Ross River)ウイルス、バーマフォレスト(Barmah Forest)ウイルス、ゲタ(Getah)ウイルス、サギヤマ(Sagiyama)ウイルス、ベバル(Bebaru)ウイルス、マヤロ(Mayaro)ウイルス、ウナ(Una)ウイルス、アウラ(Aura)ウイルス、ワタロア(Whataroa)ウイルス、ババンキ(Babanki)ウイルス、Kyzylagachウイルス、ハイランドJ(Highlands J)ウイルス、フォートモーガン(Fort Morgan)ウイルス、ヌドゥム(Ndumu)ウイルス、及びバギー Creek(Buggy Creek)ウイルスからなる群から選択されるアルファウイルスから得られる配列を含んでいてよい。

【0079】

リブリケイティブRNAは、例えば、5'から3'に向かって、(VEE RNAレプリカーゼ) - (プロモーター) - (RF1) - (自己切断型ペプチド) - (RF2) - (自己切断型ペプチド) - (RF3) - (IRESもしくはコアプロモーター) - (RF4) - (IRESもしくは任意のプロモーター) - (任意に選択可能なマーカー) - (VEE 3' UTR及びポリAテール) - (任意に選択可能なマーカー) - プロモーターを含んでいる。上記のRF1-4は、多能性細胞への体細胞の脱分化を誘導する因子である。上記のRF2-3、RF3-4、RF4は任意である。上記のRF1-4は、OCT3/4、KLF4、SOX-2、c-MYC、LIN28A、LIN28B、GLIS1、FOXH1、p53-dominant negative、p53-P275S、L-MYC、NANOG、DPPA2、DPPA4、DPPA5、ZIC3、BCL-2、ERAS、TPT1、SALL2、NAC1、DAX1、TERT、ZNF206、FOXD3、REX1、UTF1、KLF2、KLF5、ESRRB、miR-291-3p、miR-294、miR-295、NR5A1、NR5A2、TBX3、MBD3sh、TH2A、及びTH2Bからなる群から選択されてもよい。

10

20

30

40

50

【0080】

初期化因子RNAは、センダイウイルスを用いて体細胞に導入される。初期化因子RNAを搭載したセンダイウイルスとしては、Cytotune（登録商標、Invitrogen）が使用可能である。センダイウイルスの力価（タイター）の指標としては、感染多重度（MOI）が挙げられる。センダイウイルスのMOIは、例えば、0.1から100.0、あるいは1.0から50.0である。

【0081】

センダイウイルスを用いて、体細胞へ初期化因子RNAの導入を行った後、ゲル培地ではない液体培地あるいはゲル培地中で、体細胞を初期化させる。

【0082】

体細胞が人工多能性幹細胞に誘導（リプログラミング）されたか否かは、例えば、細胞の形態から確認することができる。あるいは、体細胞が人工多能性幹細胞に誘導されたか否かは、サイトフローメータで、未分化であることを示す細胞表面マーカーであるTRA-1-60、TRA-1-81、SSEA-1、及びSSEA5から選択される少なくとも一つの表面マーカーが陽性であるか否かを分析することにより行う。TRA-1-60は、iPS/ES細胞に特異的な抗原であり、体細胞では検出されない。iPS細胞はTRA-1-60陽性画分からのみできることから、TRA-1-60陽性細胞はiPS細胞の種と考えられる。

【0083】

以上説明した第1実施形態に係る人工多能性幹細胞の作製方法によれば、初期化因子RNAを発現させることができるRNAを体細胞に効率的に導入して、初期化因子RNAを発現させ、人工多能性幹細胞を作製することが可能である。

【0084】

（第1実施形態の実施例1）

ゲル培地ではない液体培地である、10%FBS（Gibco）を含む2mLのDMEM（Gibco）に懸濁した 1×10^5 個の繊維芽細胞（HDF2443又はHDF2802、Cell Applications, Inc.）を、ウェルディッシュの各ウェルに播種し、ウェルディッシュを37°CのCO₂インキュベーター中に静置して、繊維芽細胞を接着培養した。24時間後、蛍光タンパク質EGFPを発現させることのできるセンダイウイルス（Cytotune、登録商標、EmGFP Sendai Fluorescence Reporter、Invitrogen）を、感染多重度（MOI）が3.0となるよう液体培地に添加した。24時間後、蛍光顕微鏡を利用して、図1（HDF2443）及び図2（HDF2802）に示すように、繊維芽細胞の蛍光強度を観察した。また、フローサイトメータを利用して蛍光強度を測定した。その結果、繊維芽細胞がセンダイウイルスに感染していることが確認された。

【0085】

（第1実施形態の実施例2）

10%FBSを含むDMEM（Gibco）にゼランガム（日産化学）が0.02質量%になるよう添加した2mLのゲル培地に懸濁した 1×10^5 個の繊維芽細胞（HDF2443又はHDF2802）をチューブに播種し、チューブを37°CのCO₂インキュベーター中に静置して、繊維芽細胞を浮遊培養した。24時間後、蛍光タンパク質EGFPを発現させることのできるセンダイウイルス（Cytotune、登録商標、EmGFP Sendai Fluorescence Reporter、Invitrogen）を、MOIが3.0となるようゲル培地に添加した。24時間後、蛍光顕微鏡を利用して、図1（HDF2443）及び図2（HDF2802）に示すように、繊維芽細胞の蛍光強度を観察した。また、フローサイトメータを利用して蛍光強度を測定した。その結果、繊維芽細胞がセンダイウイルスに感染していることが確認された。

【0086】

また、第1実施形態の実施例1、2の結果から、液体培地中で接着培養したときより、ゲル培地中で浮遊培養したときのほうが、蛍光タンパク質EGFPが多く発現していた。

10

20

30

40

50

これは、液体培地中で接着培養したときより、ゲル培地中で浮遊培養したときのほうが、センダイウイルスを細胞に効率的に導入できたことを示している。

【0087】

(第1実施形態の実施例3)

bFGF (Gibco) を 4 ng/mL 含有している hES 培地 (Primate ES Cell Medium、リプロセル) にジェランガム (日産化学) が 0.02 質量% になるよう添加した 2 mL のゲル培地に懸濁した 1×10^5 個の繊維芽細胞 (HDF 1419、Cell Applications, Inc.) をチューブに播種し、チューブを 37 °C の CO₂ インキュベーター中に静置し、繊維芽細胞を浮遊培養した。24 時間後、初期化因子 OSKM (OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC) を発現させることのできるセンダイウイルス (Invitrogen) をゲル培地に添加した。センダイウイルスは、hKOS (KLF4、OCT3/4、SOX2) の MOI が 5.0、c-MYC の MOI が 5.0、及び hKLF の MOI が 5.0 となるようゲル培地に添加した。

10

【0088】

以降、37 °C の CO₂ インキュベーター中にチューブを静置した。23 日間、細胞を培養し続けた。その間、48 時間毎に、500 µL の bFGF 含有ゲル培地をチューブに加えた。

【0089】

その結果、bFGF 含有ゲル培地中において、iPS 細胞のクランプの形成が認められた。また、bFGF 含有ゲル培地で作製された iPS 細胞をフィーダー上にまきなおし、コロニーの形態を確認したところ、図3に示すように、未分化な iPS 細胞コロニーの形態であった。さらに、細胞を多能性幹細胞のマーカーである OCT3/4 に対する抗体で免疫染色したところ、図4に示すように、細胞は、OCT3/4 陽性を示した。

20

【0090】

(第1実施形態の実施例4)

センダイウイルスを、hKOS (KLF4、OCT3/4、SOX2) の MOI が 2.5、c-MYC の MOI が 2.5、及び hKLF の MOI が 2.5 となるようゲル培地に添加した以外は、第1実施形態の実施例3と同様にして、繊維芽細胞 (HDF 1419、Cell Applications, Inc.) を初期化した。

30

【0091】

その結果、bFGF 含有ゲル培地中において、iPS 細胞のクランプの形成が認められた。また、bFGF 含有ゲル培地で作製された iPS 細胞をフィーダー上にまきなおし、コロニーの形態を確認したところ、図3に示すように、未分化な iPS 細胞コロニーの形態であった。さらに、細胞を多能性幹細胞のマーカーである OCT3/4 に対する抗体で免疫染色したところ、図5に示すように、細胞は、OCT3/4 陽性を示した。

【0092】

(第1実施形態の実施例5)

bFGF を含有しないゲル培地を用いた以外は、第1実施形態の実施例3と同様にして、繊維芽細胞 (HDF 1419、Cell Applications, Inc.) を初期化した。

40

【0093】

その結果、bFGF 非含有ゲル培地中において、iPS 細胞のクランプの形成が認められた。また、bFGF 非含有ゲル培地で作製された iPS 細胞をフィーダー上にまきなおし、コロニーの形態を確認したところ、図3に示すように、未分化な iPS 細胞コロニーの形態であった。さらに、細胞を多能性幹細胞のマーカーである OCT3/4 に対する抗体で免疫染色したところ、図6に示すように、細胞は、OCT3/4 陽性を示した。

【0094】

(第1実施形態の実施例6)

繊維芽細胞 (HDF 2802、Cell Applications, Inc.) を

50

用いた以外は、第1実施形態の実施例5と同様にして、繊維芽細胞（HDF2802、Cell Applications, Inc.）を初期化した。

【0095】

その結果、bFGF非含有ゲル培地中において、iPS細胞のクランプの形成が認められた。また、bFGF非含有ゲル培地で作製されたiPS細胞をフィーダー上にまきなおし、コロニーの形態を確認したところ、図3に示すように、未分化なiPS細胞コロニーの形態であった。さらに、細胞を多能性幹細胞のマーカであるOCT3/4に対する抗体で免疫染色したところ、図7に示すように、細胞は、OCT3/4陽性を示した。

【0096】

第1実施形態の実施例3から6の結果は、複数種類の繊維芽細胞から、bFGF含有ゲル培地及びbFGF非含有ゲル培地を用いて、センダイウイルスによってiPS細胞を誘導できたことを示している。

10

【0097】

（第1実施形態の実施例7）

ゲル培地ではない液体培地である、750 μ LのStemspanACF（Stemcell Technologies）に懸濁した 5×10^4 個の血液細胞（単核球細胞、スタンフォード大学血液センター）をウェルディッシュの各ウェルに播種し、ウェルディッシュを37 $^{\circ}$ CのCO₂インキュベーター中に静置して、血液細胞を培養した。なお、StemspanACFには、成長因子として、20ng/mLのFLT3、10ng/mLのTPO、50ng/mLのIL6、10ng/mLのGCSF、50ng/mLのSCF、及び20ng/mLのIL3を添加した。StemspanACFを使用する以下の実施例においても、同様である。

20

【0098】

24時間後、蛍光タンパク質EGFPを発現させることのできるセンダイウイルス（CytoTune、登録商標、EmGFP Sendai Fluorescence Reporter、Invitrogen）を、MOIが3.0となるよう液体培地に添加した。24時間後、蛍光顕微鏡を利用して、血液細胞の蛍光強度を観察した。また、図8に示すように、フローサイトメーターを利用して蛍光強度を測定した。その結果、血液細胞がセンダイウイルスに感染していることが確認された。

【0099】

30

（第1実施形態の実施例8）

StemspanACF（Stemcell Technologies）に脱アシル化ゼランガム（日産化学）が0.02質量%になるよう添加した750 μ Lのゲル培地に懸濁した 5×10^4 個の血液細胞（単核球細胞、スタンフォード大学血液センター）をチューブに播種し、チューブを37 $^{\circ}$ CのCO₂インキュベーター中に静置して、血液細胞を培養した。

【0100】

24時間後、蛍光タンパク質EGFPを発現させることのできるセンダイウイルス（CytoTune、登録商標、EmGFP Sendai Fluorescence Reporter、Invitrogen）を、MOIが3.0又は30.0となるようゲル培地に添加した。24時間後、蛍光顕微鏡を利用して、血液細胞の蛍光強度を観察した。また、図8に示すように、フローサイトメーターを利用して蛍光強度を測定した。その結果、血液細胞がセンダイウイルスに感染していることが確認された。また、MOIが高いほうが、細胞にセンダイウイルスを効率的に導入できることが確認された。

40

【0101】

（第1実施形態の実施例9）

StemspanACF（Stemcell Technologies）にゼランガム（日産化学）が0.02質量%になるよう添加した100 μ Lのゲル培地に懸濁した 5×10^4 個の血液細胞（単核球細胞、スタンフォード大学血液センター）をチューブに播種し、チューブを37 $^{\circ}$ CのCO₂インキュベーター中に静置して、血液細胞を浮遊培養

50

した。

【0102】

24時間後、蛍光タンパク質EGFPを発現させることのできるセンダイウイルス(CytoTune、登録商標、EmGFP Sendai Fluorescence Reporter、Invitrogen)を、MOIが30.0となるようゲル培地に添加した。24時間後、蛍光顕微鏡を利用して、血液細胞の蛍光強度を観察した。また、図8に示すように、フローサイトメーターを利用して蛍光強度を測定した。その結果、血液細胞がセンダイウイルスに感染していることが確認された。

【0103】

(第1実施形態の実施例10)

750 μ LのStemspanACF(Stemcell Technologies)に懸濁した 1×10^6 個の血液細胞(単核球細胞、スタンフォード大学血液センター)をウェルディッシュの各ウェルに播種し、ウェルディッシュを37 $^{\circ}$ CのCO₂インキュベーター中に静置して、血液細胞を接着培養した。3日後、750 μ LのStemspanACFを各ウェルに添加し、37 $^{\circ}$ CのCO₂インキュベーター中に静置して、引き続き血液細胞を培養した。

【0104】

さらに3日後、各ウェル中の血液細胞を回収し、遠心分離機を利用して280gで血液細胞を遠心し、bFGFを含有していないhES培地(Primate ES Cell Medium、リプロセル)にゼランガムが0.02質量%となるよう添加したゲル培地2mLに血液細胞を懸濁し、血液細胞が懸濁されたゲル培地をチューブに入れた。

【0105】

初期化因子OSKM(OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC)を発現させることのできるセンダイウイルス(Invitrogen)をゲル培地に添加した。センダイウイルスは、hKOS(KLF4、OCT3/4、SOX2)のMOIが10.0、c-MYCのMOIが10.0、及びhKLFのMOIが10.0となるようゲル培地に添加した。

【0106】

以降、37 $^{\circ}$ CのCO₂インキュベーター中にチューブを静置した。30日間、細胞を培養し続けた。その間、48時間毎に、500 μ LのbFGF非含有ゲル培地をチューブに加えた。

【0107】

その結果、bFGF非含有ゲル培地中において、iPS細胞のクランプの形成が認められた。また、bFGF非含有ゲル培地で作製されたiPS細胞をフィーダー上にまきなおし、コロニーの形態を確認したところ、図9に示すように、未分化なiPS細胞コロニーの形態であった。さらに、細胞を多能性幹細胞のマーカであるOCT3/4に対する抗体で免疫染色したところ、図10に示すように、細胞は、OCT3/4陽性を示した。

【0108】

(第1実施形態の実施例11)

センダイウイルスを、hKOS(KLF4、OCT3/4、SOX2)のMOIが5.0、c-MYCのMOIが5.0、及びhKLFのMOIが2.5となるようゲル培地に添加した以外は、第1実施形態の実施例10と同様にして、血液細胞(単核球細胞、スタンフォード大学血液センター)を初期化した。

【0109】

その結果、bFGF非含有ゲル培地中において、iPS細胞のクランプの形成が認められた。また、bFGF非含有ゲル培地で作製されたiPS細胞をフィーダー上にまきなおし、コロニーの形態を確認したところ、図9に示すように、未分化なiPS細胞コロニーの形態であった。さらに、細胞を多能性幹細胞のマーカであるOCT3/4に対する抗体で免疫染色したところ、図11に示すように、細胞は、OCT3/4陽性を示した。

【0110】

10

20

30

40

50

(第1実施形態の実施例12)

8 mLの全血に対して2 mLのHetaSep (登録商標、ステムセルテクノロジーズ)又はHES40 (NIPRO)を添加し、37 °CのCO₂インキュベーターで30分から1時間インキュベートし、赤血球を沈降させた。その後、血漿成分をチューブに移し、単核球細胞数を計測した。結果を図12に示す。Ficoll (GE Healthcare)を用いた場合と同等以上に、単核球細胞を分離できた。

【0111】

分離された単核球細胞をCD3コンジュゲート抗体で免疫染色をし、FACSでT細胞画分の濃縮率を確認した。結果を図13に示す。赤血球分離剤を用いて、単核球細胞を効率的に分離できることが示された。

10

【0112】

(第1実施形態の実施例13)

ゲル培地ではない液体培地である、750 µLのStemspanACF (Stemcell Technologies)に、第1実施形態の実施例12で分離した5 × 10⁴個の単核球細胞を懸濁させた。当該懸濁液をウェルディッシュの各ウェルに播種し、ウェルディッシュを37 °CのCO₂インキュベーター中に静置して、単核球細胞を培養した。

【0113】

24時間後、蛍光タンパク質EGFPを発現させることのできるセンダイウイルス (CytoTune、登録商標、EmGFP Sendai Fluorescence Reporter、Invitrogen)を、MOIが3.0となるよう液体培地に添加した。24時間後、蛍光顕微鏡を利用して、図14に示すように、細胞の蛍光強度を観察した。また、図15に示すように、フローサイトメーターを利用して蛍光強度を測定した。その結果、単核球細胞がセンダイウイルスに感染していることが確認された。

20

【0114】

(第1実施形態の実施例14)

ゲル培地ではない液体培地である、750 µLのStemspanACF (Stemcell Technologies)に、第1実施形態の実施例12で分離した1 × 10⁶個の単核球細胞を懸濁させた。当該懸濁液をウェルディッシュの各ウェルに播種し、ウェルディッシュを37 °CのCO₂インキュベーター中に静置して、単核球細胞を培養した。3日後、750 µLのStemspanACFを各ウェルに添加し、37 °CのCO₂インキュベーター中に静置した。

30

【0115】

さらに3日後、各ウェル中の細胞を回収し、遠心分離機を用いて、280 gで単核球細胞を単離した。単離した単核球細胞をゲル培地ではない液体培地であるhES細胞培地 (Primate ES Cell Medium、リプロセル)、又はbFGF非含有StemspanACF (Stemcell Technologies)に懸濁し、当該懸濁液をウェルディッシュの各ウェルに入れた。

【0116】

初期化因子OSKM (OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC)を発現させることのできるセンダイウイルス (Invitrogen)を培地に添加した。センダイウイルスは、hKOS (KLF4、OCT3/4、SOX2)のMOIが10.0、c-MYCのMOIが10.0、及びhKLFのMOIが10.0となるよう培地に添加した。

40

【0117】

単核球細胞をセンダイウイルスに感染させた2日後、bFGFを含有hES細胞培地 (Primate ES Cell Medium、リプロセル)をウェルに加え、さらに2日後、細胞をフィーダー細胞上に播種した。その後、19日間、フィーダー細胞上で細胞を培養したところ、図16に示すように、未分化なiPS細胞コロニーの形成が確認された。したがって、Ficoll (GE Healthcare)を用いて単離された単核球細胞と同様に、HetaSep (登録商標、ステムセルテクノロジーズ)を用いて単

50

離された単核球細胞、及びHES40(NIPRO)を用いて単離された単核球細胞から、iPS細胞を誘導できることが確認された。

【0118】

(第2実施形態)

第2実施形態に係る人工多能性幹細胞の作製方法は、体細胞を用意することと、体細胞にRNAトランスフェクション試薬を用いて初期化因子RNAを導入することと、ゲル培地中で体細胞を初期化することと、を含む。

【0119】

体細胞の例としては、繊維芽細胞、血液細胞、歯髄幹細胞、ケラチノサイト、毛乳頭細胞、口腔上皮細胞、及び体性幹前駆細胞が挙げられる。

10

【0120】

血液細胞の詳細は、第1実施形態で説明したとおりである。初期化因子RNAの詳細も、第1実施形態で説明したとおりである。

【0121】

初期化因子RNAを導入される体細胞は、Matrigel(Corning)、CELLstart(登録商標、ThermoFisher)、あるいはLaminin511(iMatrix-511、nippi)等の基底膜マトリックスを用いて、フィーダーフリーで培養する。

【0122】

初期化因子RNAを導入される体細胞が培養される培地としては、例えば、Pluriqu(MTI-GlobalStem)、及びPrimate ES Cell Medium(ReproCELL)等のヒトES/iPS培地等の幹細胞培地を使用可能である。

20

【0123】

ただし、幹細胞培地は、これに限定されず、種々の幹細胞培地が使用可能である。例えばPrimate ES Cell Medium、Reprostem、ReproFF、ReproFF2、ReproXF(Reprocell)、mTeSR1、TeSR2、TeSRE8、ReproTeSR(STEMCELL Technologies)、PluriSTEM(登録商標)Human ES/iPS Medium(Merck)、NutriStem(登録商標)XF/FF Culture Medium for Human iPS and ES Cells、Pluriton reprogramming medium(Stemgent)、PluriSTEM(登録商標)、Stemfit AK02N、Stemfit AK03(Ajinomoto)、ESC-Sure(登録商標)serum and feeder free medium for hESC/iPS(Applied StemCell)、及びL7(登録商標)hPSC Culture System(LONZA)等を利用してよい。幹細胞培地は、例えば、ディッシュ、ウェル、又はチューブ等に入れられる。

30

【0124】

初期化因子RNAは、RNAトランスフェクション試薬を用いて体細胞に導入される。RNAトランスフェクション試薬としては、リポフェクタミン メッセンジャーマックス(登録商標)が使用可能である。

40

【0125】

あるいは、RNAトランスフェクション試薬としては、例えば、mRNA-In(登録商標、Molecular Transfer, Inc.)が用いられる。さらに、RNAトランスフェクション試薬としては、Lipofectamine(登録商標)RNAiMAX(Thermo Fisher Scientific)、Lipofectamin(登録商標)2000、Lipofectamin(登録商標)3000、NonTransfection System(Thermo Fisher scientific)、Stemfect RNA transfection reagent(Stemfect)、NextFect(登録商標)RNA Transfection Reagent(BiooScientific)、Amaxa(登録商品)Hum

50

an T cell Nucleofector (登録商品) kit (Lonza社、VAPA-1002)、Amaza (登録商品) Human CD34 cell Nucleofector (登録商品) kit (Lonza社、VAPA-1003)、及び ReproRNA (登録商標) トランスフェクション試薬 (STEMCELL Technologies) 等のリポフェクション試薬を利用してもよい。

【0126】

体細胞への初期化因子RNAの導入は、複数回行ってよい。体細胞への初期化因子RNAの導入は、例えば、2日に1回、あるいは1日に1回、5日間以上15日間以内、7日間以上13日間以内、あるいは10日間繰り返して行う。ただし、mRNAがリブリケイティブRNAである場合、体細胞への初期化因子RNAの導入は1回でもよい。

10

【0127】

体細胞への初期化因子RNAの導入を行った後、体細胞をゲル培地に入れ、体細胞を初期化させる。

【0128】

ゲル培地は、例えば、幹細胞培地にゼランガムを終濃度が0.001質量%から0.5質量%、0.005質量%から0.1質量%、あるいは0.01質量%から0.05質量%となるよう添加することにより調製される。

【0129】

ゲル培地は、ゼランガム、脱アシル化ゼランガム、ヒアルロン酸、ラムザンガム、ダイユータンガム、キサントガム、カラギーナン、フコイダン、ペクチン、ペクチン酸、ペクチニン酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ヘパリチン硫酸、ケラト硫酸、コンドロイチン硫酸、デルタマン硫酸、ラムナン硫酸、及びそれらの塩からなる群から選択される少なくとも1種の高分子化合物を含んでいてもよい。また、ゲル培地は、メチルセルロースを含んでいてもよい。メチルセルロースを含むことにより、細胞同士の凝集がより抑制される。

20

【0130】

あるいは、ゲル培地は、poly(glycerol monomethacrylate) (PGMA)、poly(2-hydroxypropyl methacrylate) (PHPMA)、Poly (N-isopropylacrylamide) (PNIPAM)、amine terminated、carboxylic acid terminated、maleimide terminated、N-hydroxysuccinimide (NHS) ester terminated、triethoxysilane terminated、Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylamide)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-butylacrylate)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid)、Poly (N-isopropylacrylamide-co-methacrylic acid-co-octadecyl acrylate)、及びN-Isopropylacrylamideから選択される少なくとも1種の温度感受性ゲルを含んでいてもよい。

30

【0131】

ゲル培地は、例えば、basic fibroblast growth factor (bFGF) 等の成長因子を含まない。あるいは、ゲル培地は、bFGF等の成長因子を、400 µg/L以下、40 µg/L以下、あるいは10 µg/L以下の低濃度で含む。

【0132】

また、ゲル培地は、TGF- β を含まないか、TGF- β を600 ng/L以下、300 ng/L以下、あるいは100 ng/L以下の低濃度で含む。

40

【0133】

ゲル培地は、攪拌されなくともよい。また、ゲル培地は、フィーダー細胞を含まなくともよい。

【0134】

ゲル培地は、カドヘリン、ラミニン、フィブロネクチン、及びビトロネクチンからなる群から選択される少なくとも1種の物質を含んでいてもよい。

【0135】

体細胞が人工多能性幹細胞に誘導 (リプログラミング) されたか否かは、第1実施形態

50

で説明した方法により確認することができる。

【0136】

以上説明した第2実施形態に係る人工多能性幹細胞の作製方法によれば、初期化因子を発現させることができるRNAを体細胞に効率的に導入して、ゲル培地中で体細胞を効率的に初期化して、人工多能性幹細胞を作製することが可能である。

【0137】

(第2実施形態の実施例)

ウェルプレートの各ウェルに、1.5 mLのPBSに対し、iMatrix-511 (nippi)を $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ となるように希釈した基底膜マトリックスの希釈液を入れた。その後、ウェルプレートを37°Cのインキュベーターに1時間以上入れた。次に、ウェルプレートの各ウェルから基底膜マトリックスの希釈液を取り除き、ウェルプレートの各ウェルに10% FBS培地に懸濁した繊維芽細胞を約 1×10^5 個播種し、繊維芽細胞を接着培養した。

10

【0138】

図17に示す初期化因子mRNAのマスターミックスを用意した。また、ウェルプレートの各ウェル中の培地を2 mLのPluriQ (登録商標、MTI-GlobalStem)に交換した。さらに、図18に示す内容物をいれたチューブAとチューブBを用意した。次に、チューブAとチューブBの内容物を混合し、RNAトランスフェクション試薬であるmRNA-In (登録商標、Molecular Transfer, Inc.)と、mRNAマスターミックスと、の混合物を作製し、10分間静置した。その後、RNA-InとmRNAマスターミックスの混合物を各ウェルに加え、ウェルプレートを揺らして、培地中にRNA-InとmRNAマスターミックスの混合物を拡散させた。次に、繊維芽細胞を37°C、5% CO₂で一晩インキュベートして初期化因子RNAを細胞にトランスフェクトとした。

20

【0139】

翌日以降、9日間連続で、上記と同様に、初期化因子RNAを細胞にトランスフェクトとした。したがって、合計10回、初期化因子RNAを細胞にトランスフェクトとした。

【0140】

初期化因子RNAを細胞に10回トランスフェクトした後、各ウェルから培地を取り除き、細胞をPBSで洗浄した。次に、300 μL の細胞剥離液 (TrypLE Select、登録商標、ライフテクノロジーズ)を各ウェルに加え、ウェルプレートを37°Cインキュベーターに10分間置いた。その後、各ウェルに700 μL のPluriQを加え、ピペティングにより細胞塊をシングルセルに解離して、細胞懸濁液を作製した。

30

【0141】

ヒトES培地 (Primate ES Cell Medium、リプロセル)に0.02質量%の濃度でポリマーFP001を配合して、ゲル培地を作製した。ゲル培地には、bFGFを含めなかった。FP001は、ジェランガムを主体とする培地用添加剤である。次に、細胞懸濁液を15 mLチューブに移し、5分間1000 rpmで遠心した。さらに、15 mLチューブから上清を取り除き、2 mLのゲル培地に細胞を再懸濁した。その後、1日おきに、1 mLのゲル培地を15 mLチューブに加えた。細胞をゲル培地に移行させて10日後、ゲル培地で作製されたiPS細胞をフィーダー上にまきなおし、コロニーの形態を確認したところ、図19に示すように、未分化なiPS細胞コロニーの形態であった。

40

【0142】

(第2実施形態の参考例)

ヒト血液細胞は健康な成人男性から入手した。また、修飾化mRNA (TriLink社)、非接着ディッシュ、15 mLチューブ、50 mLチューブ、フィコール、サイトフロメータ (BD)、CD34に対する抗体 (Miltenyi Biotec)、CD3に対する抗体 (Miltenyi Biotec)、MACS (登録商標) バッファ (Miltenyi Biotec)、T細胞培地、低血清培地 (Opti-MEM (登録

50

商標)、Gibco)、siRNA導入試薬(Lipofectamine(登録商標) RNAiMAX、ThermoFisher Science)、及びTRA-1-60に対する抗体(BD)を用意した。

【0143】

T細胞(CD3陽性細胞)培地は、以下A培地とB培地の混合液であった。A培地は、15mLのX vivo-10(Lonza社、04-743Q)及びIL-2(10ug/mL)の混合液であった。B培地は1.5mLチューブにX vivo-10及びDynabeads CD3/CD28(Life Technologies社、111-31D)50μLを混合し、5秒間ボルテックス後、スピンドウンし、DynaMag-2(ThermoFisher Science)に静置し、一分静置後、上清を取り除いたものであった。

10

【0144】

また、10mLの無血清培地(StemSpan H3000、STEMCELL Technologies)に、10μLのIL-6(100ug/mL)、10μLのSCF(300ug/mL)、10μLのTPO(300ug/mL)、10μLのFLT3リガンド(300ug/mL)、及び10μLのIL-3(10ug/mL)を加えて血球培地(血液幹・前駆細胞培地)を調製した。

【0145】

また、それぞれ濃度が100ng/μLのOCT3/4のmRNA含有液、SOX2のmRNA含有液、KLF4のmRNA含有液、c-MYCのmRNA含有液、LIN28AのmRNA含有液、及び緑色蛍光タンパク質(GFP)のmRNA含有液を用意した。次に、385μLのOCT3/4のmRNA含有液、119μLのSOX2のmRNA含有液、156μLのKLF4のmRNA含有液、148μLのc-MYCのmRNA含有液、83μLのLIN28AのmRNA含有液、及び110μLのGFPのmRNA含有液を混合し、初期化因子混合液を得た。得られた初期化因子混合液を50μLずつ容量1.5mLのRNase-Freeのチューブ(エッペンドルフチューブ(登録商標)、エッペンドルフ)に分注し、-80の冷凍庫に保存した。

20

【0146】

遠心機を18に設定した。5mLから50mLの血液を採血し、血液にEDTAを加えて優しく混ぜた。また、ヒトリンパ球分離用の媒体(Ficoll-Paque PREMIUM、GEヘルスケアジャパン)を5mLずつ2本の15mLチューブに分注した。5mLのPBSを血液に加えて希釈し、チューブ中のヒトリンパ球分離用の媒体の上に5mLずつ重層した。この時、界面を乱さないように、希釈血液をチューブの管壁を伝わらせてゆっくりと媒体上加えた。

30

【0147】

チューブ中の溶液を、400×g、18で30分間遠心した。この際、加速、減速ともゆっくり行った。遠心後、チューブ中に白く濁った中間層が現れた。この白く濁った中間層は、単核球細胞を含んでいる。チューブ中の白く濁った中間層をピペットマンでゆっくりと回収し、新しい15mLチューブに移した。この際、下層は吸い取らないようにした。白く濁った中間層は、1本のチューブより1mL程度回収できた。2本分の中間層をまとめて1本のチューブに移した。

40

【0148】

回収した単核球細胞に対し、12mLのPBSを加えて、溶液をさらに200×g、18で10分間遠心した。その後、アスピレータを用いて溶液の上清を吸引して除去し、3mLの既知組成無血清造血細胞培地(X-VIVO(登録商標)10、ロンザ)を加えて懸濁し、単核球細胞懸濁液を得た。そのうち10μLの単核球細胞懸濁液をトリパンブルーで染色して血球計算盤でカウントした。

【0149】

1×10⁷個の単核球細胞と、CD34抗体又はCD3抗体と、を、4の溶液100μL中で15分反応させた。反応後、溶液に5mLのMACS(登録商標)バッファ(M

50

iltenyi Biotec)を加え、270gで遠心した。遠心後、上清を除去し、1mLのMACSバッファを添加した。その後、自動磁気細胞分離装置(autoMACS、Miltenyi Biotec)の分離プログラムを利用して、単核球細胞のうち、CD34陽性細胞又はCD3陽性細胞を分離した。

【0150】

分離した 5×10^6 個の単核球細胞を1mLのT細胞培地、又は血液幹・前駆細胞培地に懸濁し、12ウェルプレートに播種し、培養した。培養条件は、CO₂濃度が5%、酸素濃度が19%、及び温度が37であった。

【0151】

100μLの低血清培地(Opti-MEM(登録商標)、Gibco)と25μLの初期化因子混合液を混合し、第1の混合液とした。また、112.5μLの低血清培地(Opti-MEM(登録商標)、Gibco)と12.5μLのsiRNA導入試薬(Lipofectamine(登録商標)RNAlMAX、ThermoFisherScience)を混合し、第2の混合液とした。その後、第1の混合液と、第2の混合液と、を混合し、15分室温で静置してリポフェクション反応液とした。

10

【0152】

得られたリポフェクション反応液のうち60μLを単核球細胞を培養している12ウェルプレートに穏やかに添加し、引き続き、37で18時間、単核球細胞をフィーダーフリーで培養した。培養条件は、CO₂濃度が5%、酸素濃度が19%、及び温度が37であった。リポフェクション反応液を添加した時の単核球細胞の密度は 3×10^6 であった。18時間後、単核球細胞を15mLチューブに回収し、300gで遠心し、上清を除去した。その後、1.25mのCD34用血球培地を15mLチューブに添加して、単核球細胞懸濁液を同じ12ウェルプレートに戻し、一晚37度で単核球細胞をフィーダーフリーで培養した。培養条件は、CO₂濃度が5%、及び酸素濃度が19%であった。上記工程を2日に1回、7日間繰り返した。

20

【0153】

リポフェクションを開始してから7日目に、リポフェクションを合計4回した細胞の密度は、 3×10^6 であった。細胞の一部を12ウェルプレートから取り出し、蛍光顕微鏡でGFPの発現を確認したところ、図20に示すように、GFPの発現が確認された。これにより、単核球細胞にmRNAがトランスフェクションし、トランスフェクトされたmRNAからタンパク質が合成されていることが確認された。

30

【0154】

(TRA-1-60の発現の確認)

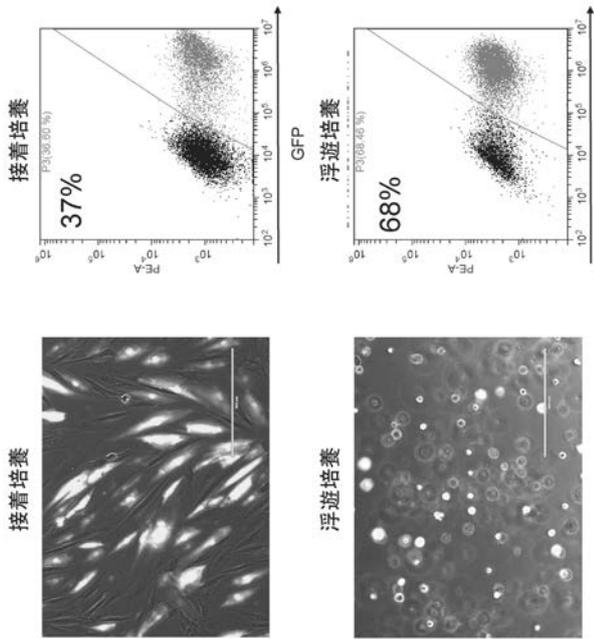
リポフェクションを開始してから7日目に、細胞の一部を12ウェルプレートから取り出し、取り出した細胞を初期化され始めた細胞で特異的に発現する表面抗原であるTRA-1-60に対する抗体であって、Allophycocyanin(APC)蛍光色素で標識された抗体で染色した。その後、蛍光活性化セルソータ(FACS(登録商標)、BD)で、TRA-1-60陽性細胞の割合を確認することによって、細胞においてリプログラミングが開始され、iPS細胞遺伝子が発現し、iPS細胞ができる事を確認した。

40

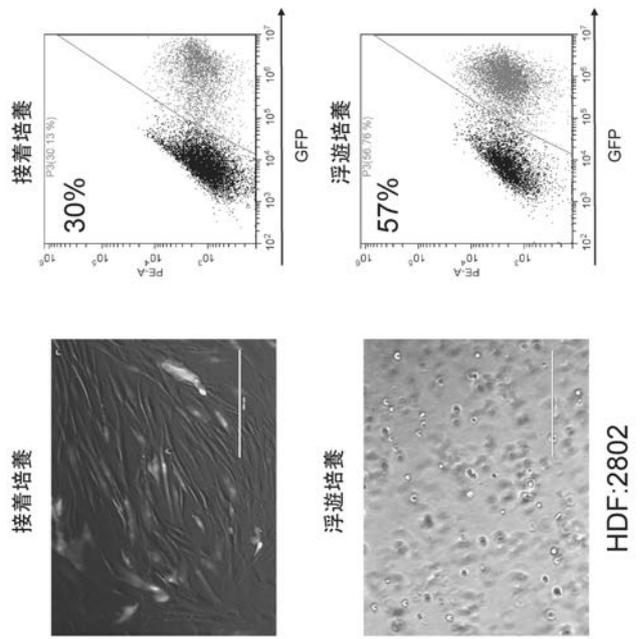
【0155】

図21に示すように、自家蛍光の強度をx軸に、蛍光標識抗TRA-1-60抗体の蛍光強度をy軸にとったドットプロットを作成した。遺伝子を導入しなかったネガティブコントロールでは、TRA-1-60陽性細胞は検出されなかった。これに対し、実験1、2及び3において、TRA-1-60陽性細胞が検出された。なお、実験1では、マーカーによる分離をしていない単核球全体から誘導した結果であり、実験2は、CD3陽性で分離した細胞から誘導した結果であり、実験3は、CD34陽性で分離した細胞から誘導した結果である。したがって、初期化因子RNAのリポフェクションを用いて、血液由来の細胞に初期化因子を導入し、iPS細胞を誘導できることが示された。

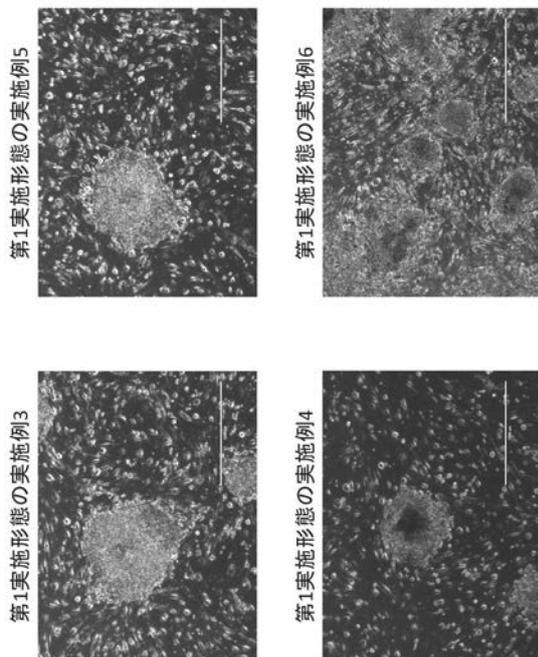
【 図 1 】



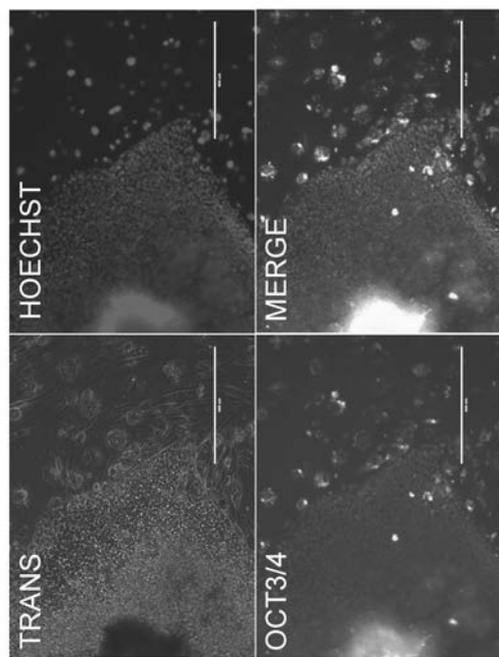
【 図 2 】



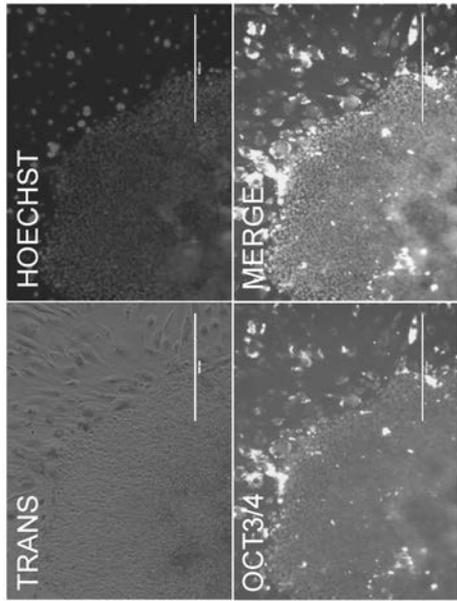
【 図 3 】



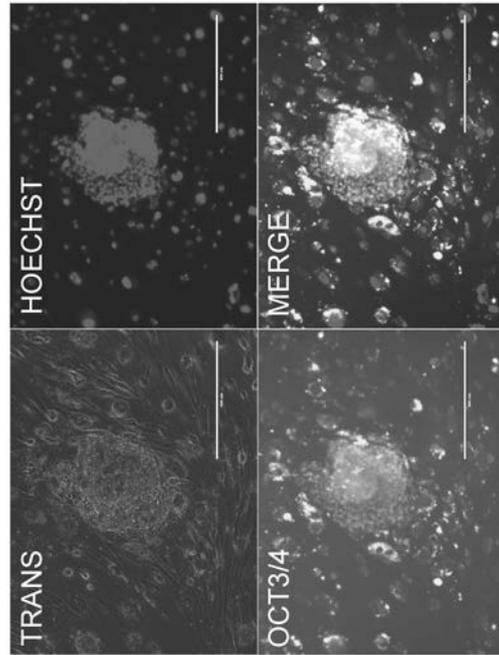
【 図 4 】



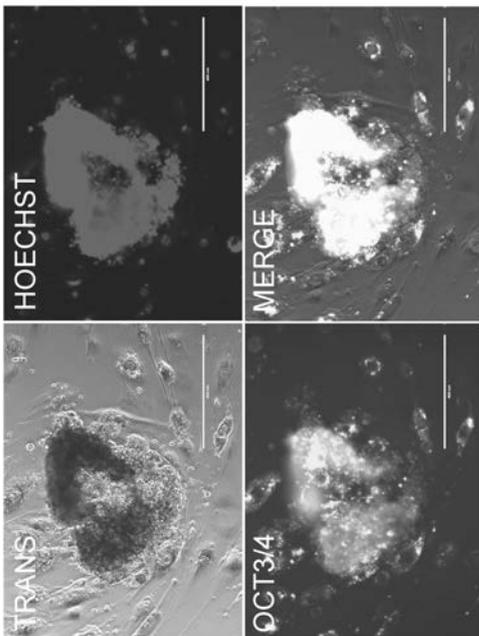
【 図 5 】



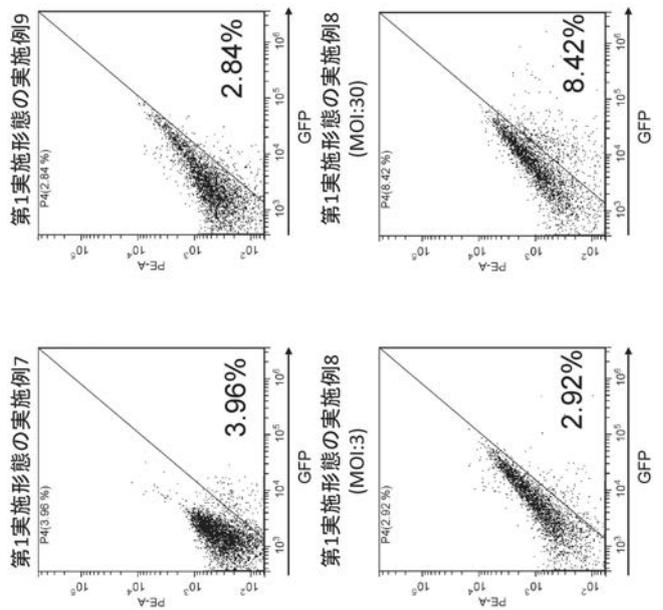
【 図 6 】



【 図 7 】

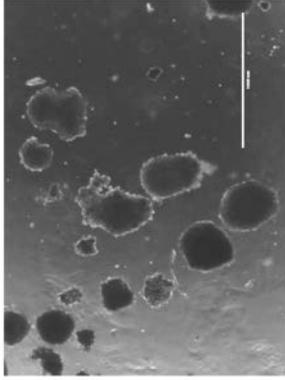


【 図 8 】

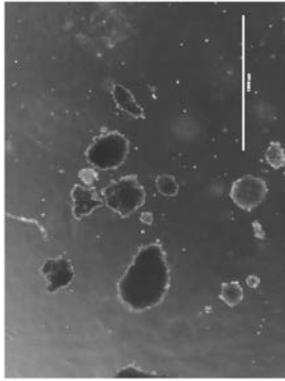


【 図 9 】

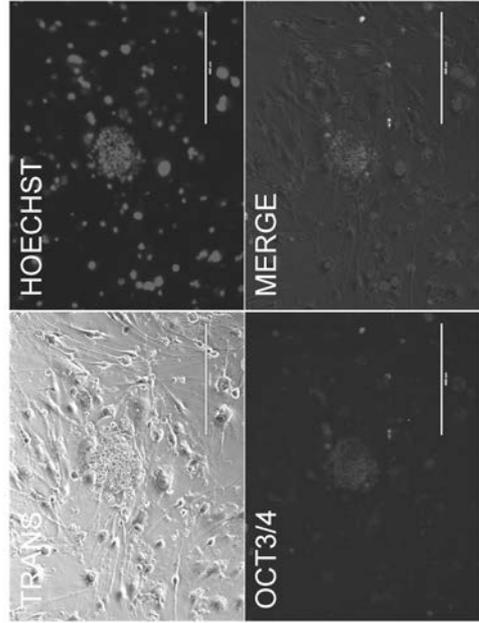
第1実施形態の実施例11



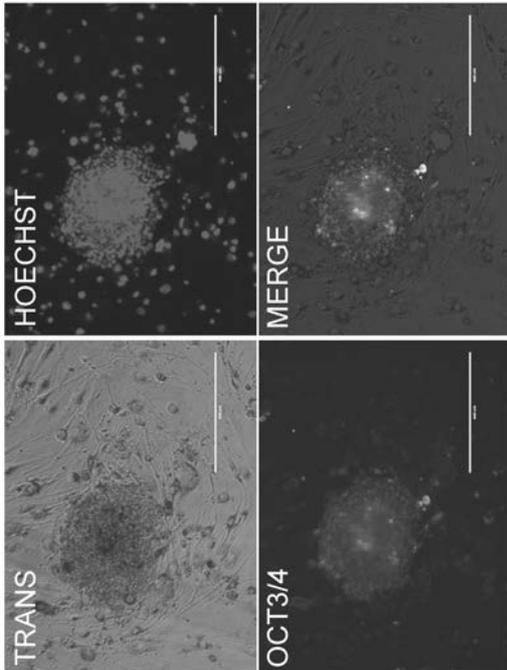
第1実施形態の実施例10



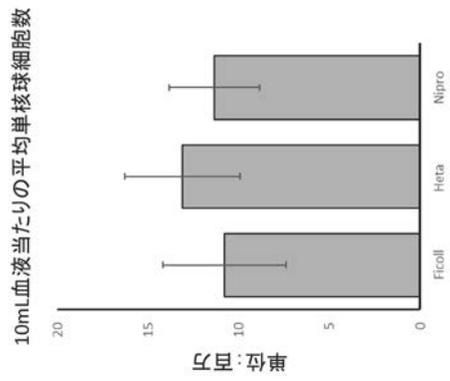
【 図 1 0 】



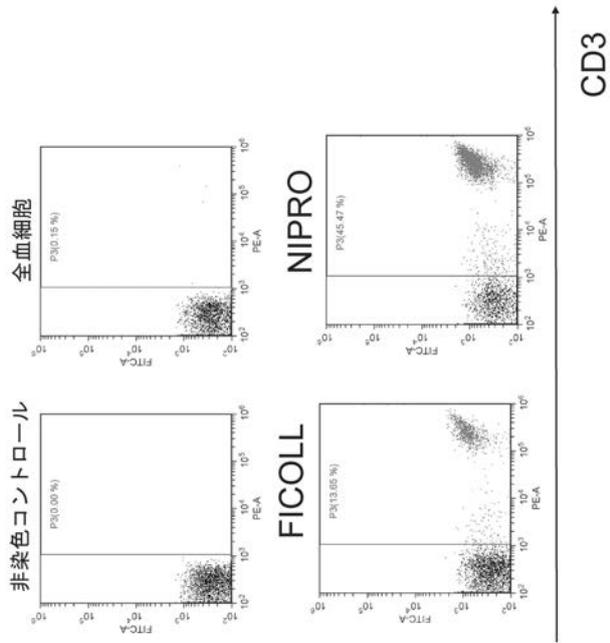
【 図 1 1 】



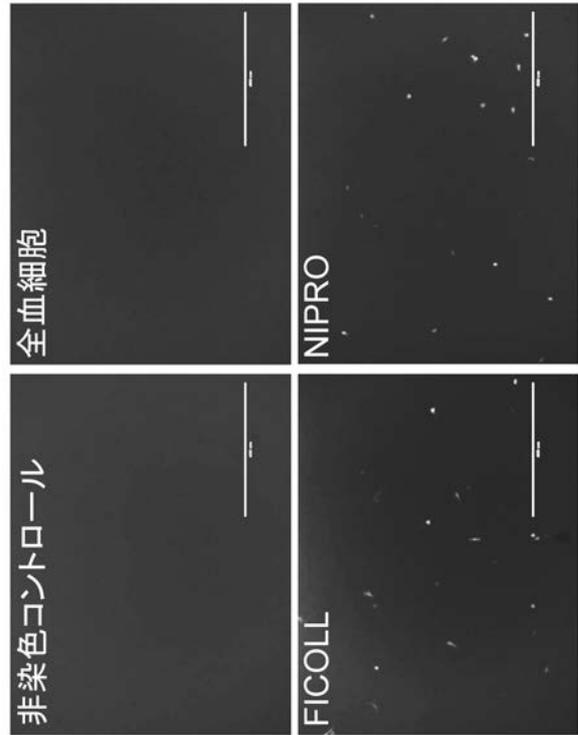
【 図 1 2 】



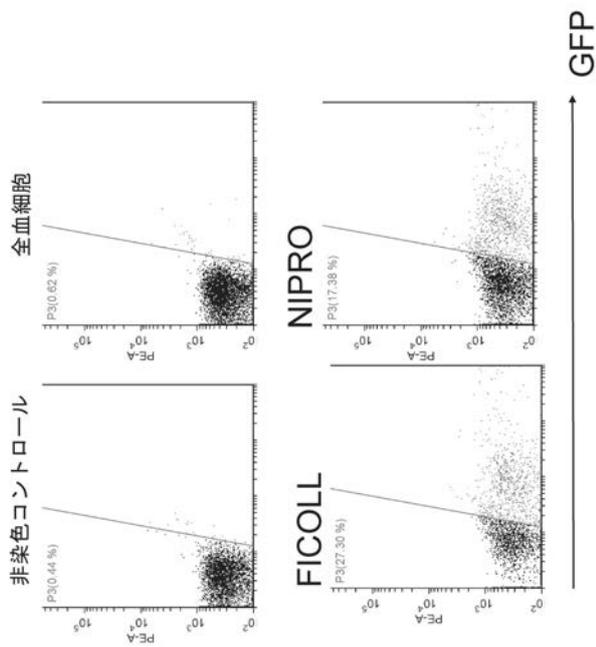
【 図 1 3 】



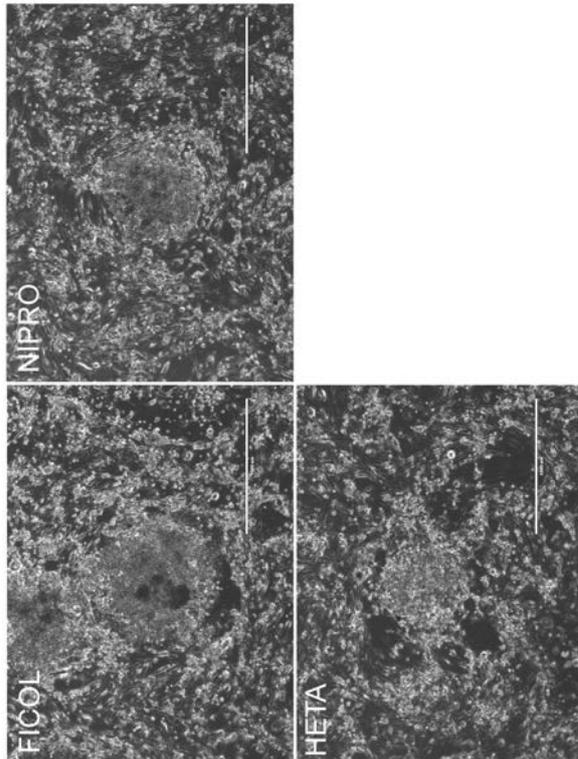
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】

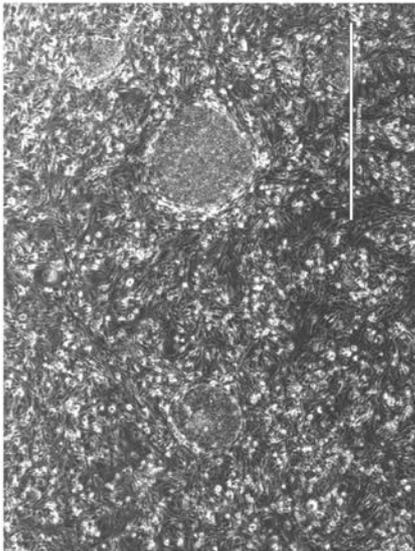
| mRNA ストック (1 µg/µL) | 量 (µL) |
|---------------------|--------|
| M ₃ O | 11.5 |
| SOX2 | 3.1 |
| KLF4 | 4.3 |
| c-MYC | 4.0 |
| LIN28 | 2.4 |
| RNase-free water | 224.7 |

【 図 1 8 】

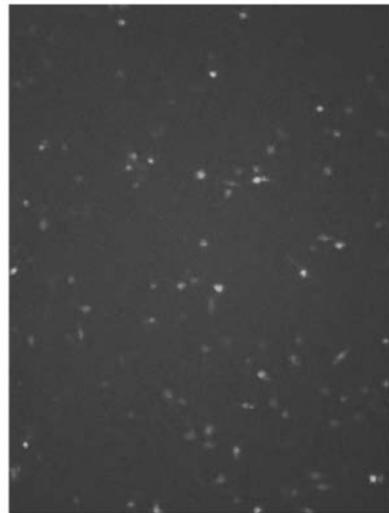
| | チューブ A | チューブ B |
|---------------|--------|--------|
| PBS | 125 µL | 125 µL |
| mRNA-In | | 1.5 µL |
| mRNA マスターミックス | 1 µL | |

1ウェルあたりの量

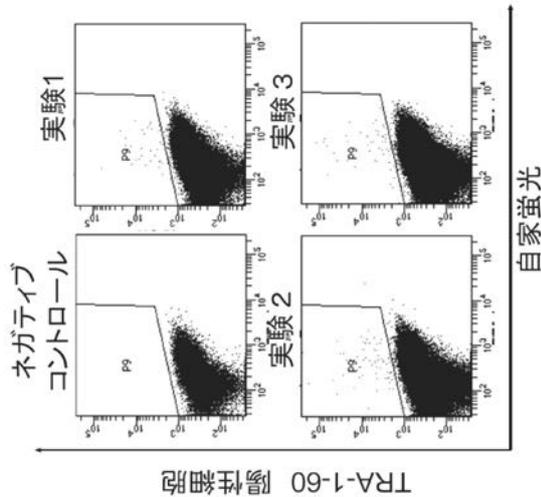
【 図 1 9 】



【 図 2 0 】



【 図 2 1 】



【 手続補正書 】

【 提出日 】 令和3年7月21日 (2021.7.21)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】 全文

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

ヒト体細胞を用意することと、
前記ヒト体細胞にRNAトランスフェクション試薬を用いて初期化因子RNAを導入することと、

ゲル培地で浮遊培養されている前記ヒト体細胞を初期化することと、
を含む、人工多能性幹細胞の作製方法。

【 請求項 2 】

前記ヒト体細胞がヒト繊維芽細胞である、請求項1に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【 請求項 3 】

前記ヒト体細胞がヒト血液細胞である、請求項1に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【 請求項 4 】

前記ヒト体細胞としてヒト単核球細胞を分離することをさらに含む、請求項3に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【 請求項 5 】

フィルターを用いて、前記ヒト体細胞としてヒト単核球細胞を分離することをさらに含

む、請求項3に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【請求項6】

免疫磁気ビーズを用いて、前記ヒト体細胞としてヒト単核球細胞を分離することをさらに含む、請求項3に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【請求項7】

前記初期化因子RNAが、M₃O又はOCT3/4のmRNA、SOX2のmRNA、KLF4のmRNA、及びc-MYCのmRNAを含む、請求項1から6のいずれか1項に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【請求項8】

培地が攪拌されない、請求項1から7のいずれか1項に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【請求項9】

培地が、成長因子を含まない、請求項1から8のいずれか1項に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【請求項10】

培地が、成長因子を40質量%以下の濃度で含む、請求項1から9のいずれか1項に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【請求項11】

培地が、bFGFを含まない、請求項1から10のいずれか1項に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

【請求項12】

前記初期化因子RNAの導入を複数回行う、請求項1から11のいずれか1項に記載の人工多能性幹細胞の作製方法。

フロントページの続き

(74)代理人 100117189

弁理士 江口 昭彦

(74)代理人 100134120

弁理士 内藤 和彦

(72)発明者 田邊 剛士

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 3 0 3 , パロ アルト , サン アントニオ ロード 8
0 9 , スイート 7

(72)発明者 須藤 健太

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 3 0 3 , パロ アルト , サン アントニオ ロード 8
0 9 , スイート 7

(72)発明者 下田 英範

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 3 0 3 , パロ アルト , サン アントニオ ロード 8
0 9 , スイート 7

(72)発明者 ケリー ブランダン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 3 0 3 , パロ アルト , サン アントニオ ロード 8
0 9 , スイート 7

Fターム(参考) 4B065 AA93X AB01 AC14 AC20 BA02 BA05 BB19 CA44 CA46