

(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2014-42493

(P2014-42493A)

(43) 公開日 平成26年3月13日(2014.3.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 O 2	4 B 0 6 5
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	4 C 0 8 4
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 O 5	
審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 46 頁)		

(21) 出願番号	特願2012-187212 (P2012-187212)	(71) 出願人	504171134
(22) 出願日	平成24年8月28日 (2012.8.28)		国立大学法人 筑波大学
			茨城県つくば市天王台一丁目1番1
		(74) 代理人	100102668
			弁理士 佐伯 憲生
		(74) 代理人	100147289
			弁理士 佐伯 裕子
		(72) 発明者	柳澤 純
			茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立
			大学法人筑波大学内
		Fターム(参考)	4B024 AA01 CA11 CA12 CA20 DA03
			FA02 GA11 HA08
			4B065 AA93X AA93Y AB01 BA02 CA44
			4C084 AA13 NA14 ZB21
			4C086 AA01 AA02 AA03 MA01 MA04
			NA14 ZB21

(54) 【発明の名称】 標的遺伝子の発現制御方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 特定の遺伝子発現を選択的に一時的に活性化するための有効かつ安全な手段を提供し、当該遺伝子発現活性化手段を用いて再生医療に不可欠な効率的かつ安全な幹細胞の分化誘導方法及びiPS樹立方法を提供する。

【解決手段】 標的遺伝子上流の1部領域に相同な1本鎖ヌクレオチドと、2本鎖の転写因子結合領域とをリンカーで繋いだオリゴヌクレオチド（ジーンジャックオリゴヌクレオチド）。当該オリゴヌクレオチドを細胞内に導入することで、標的遺伝子を選択的にかつ効率よく発現させることができ、速やかに消失する。当該オリゴヌクレオチドを幹細胞の分化の方向性を決定する転写因子発現に用いて、特定の臓器細胞に分化させることに成功し、また、iPS細胞の樹立に必要な山中因子（Oct3/4、Sox2、KLF4及びc-Myc）の発現に用いて、未分化マーカーの発現誘導に成功した。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的遺伝子上流域の塩基配列と相同な 1 本鎖ヌクレオチドからなるアンカー部位がリンカーを介して、任意の転写因子結合配列もしくは転写抑制因子結合配列を含む 2 本鎖ヌクレオチドからなる転写因子結合部位と結合されたオリゴヌクレオチドを有効成分として含む、標的遺伝子の転写制御用試薬。

【請求項 2】

前記アンカー部位が、標的遺伝子のプロモーターの上流域の塩基配列と連続して 10 ～ 50 塩基共通した塩基配列からなることを特徴とする、請求項 1 に記載の転写制御用試薬。

10

【請求項 3】

前記転写因子結合部位が、転写因子結合配列もしくは転写抑制因子結合配列をタンデムに繋いだ塩基配列を含むことを特徴とする、請求項 1 又は 2 に記載の転写制御用試薬。

【請求項 4】

前記標的遺伝子が分化の方向性を決定する転写因子遺伝子であって、かつ前記転写因子結合部位が転写因子結合配列を含むことを特徴とする、幹細胞における分化誘導剤として用いるための、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の転写制御用試薬。

【請求項 5】

前記標的遺伝子が、Oct3/4、Sox2 及び KLF4 遺伝子の 3 遺伝子、又はさらに c-Myc 遺伝子を含む 4 遺伝子のそれぞれである 3 又は 4 種類のオリゴヌクレオチドからなり、かつ前記転写因子結合部位が転写因子結合配列を含むことを特徴とする、iPS 細胞樹立のための脱分化剤として用いるための、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の転写制御用試薬。

20

【請求項 6】

前記オリゴヌクレオチドとして、アンカー部位が、生体内で不足又は欠損していることで疾病を引き起こす原因遺伝子上流域を標的とし、かつ前記転写因子結合部位が転写因子結合配列を含むことを特徴とする、前記原因遺伝子の転写を活性化もしくは誘導することで、疾病を改善又は治療するための、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の転写制御用試薬。

【請求項 7】

細胞内で、標的遺伝子の転写を誘導する、又は転写を活性化させるための方法であって、

30

(1) 標的遺伝子上流域の配列と相同な塩基配列からなる 1 本鎖ヌクレオチドを、リンカーを介して、転写因子結合領域配列を含む 2 本鎖ヌクレオチドと結合させたオリゴヌクレオチドを構築し、

(2) 当該オリゴヌクレオチドを、標的遺伝子を含む細胞内に導入することを特徴とする、方法。

【請求項 8】

細胞が幹細胞であり、標的遺伝子が分化の方向性を決定する転写因子遺伝子であることを特徴とする、幹細胞を特定の臓器細胞に分化させるための方法である、請求項 7 に記載の方法。

40

【請求項 9】

細胞が体細胞であり、標的遺伝子が、Oct3/4、Sox2、KLF4 及び c-Myc 遺伝子から選択された 1 つ以上の転写因子遺伝子であることを特徴とする、細胞を初期化させるための方法である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】

幹細胞を特定の臓器細胞に分化させるための方法であって、下記 (1) ～ (4) の工程を含む方法；

(1) 当該臓器への分化の方向性を決定する転写因子を標的として選択する工程、

(2) 当該転写因子遺伝子上流域の配列と相同な塩基配列からなる 1 本鎖ヌクレオチドを、リンカーを介して、転写因子結合領域配列を含む 2 本鎖ヌクレオチドと結合させたオ

50

リゴヌクレオチドを構築する工程、

(3) 工程(2)で構築したオリゴヌクレオチドを、幹細胞内に導入する工程、

(4) 工程(3)で得られた幹細胞を、前記特定の臓器への分化に適した培地内で培養する工程。

【請求項11】

転写因子遺伝子の上流域の配列と相同な塩基配列からなる1本鎖ヌクレオチドを、リンカーを介して、転写因子結合領域配列を含む2本鎖ヌクレオチドと結合させたオリゴヌクレオチドを有効成分として含有する幹細胞の分化誘導剤。

【請求項12】

iPS細胞を樹立する方法であって、下記(1)～(3)の工程を含む方法；

10

(1) Oct3/4、Sox2及びKLF4遺伝子の3遺伝子、又はさらにc-Myc遺伝子を含む4遺伝子のそれぞれの上流域の配列と相同な塩基配列からなる1本鎖ヌクレオチドを、それぞれリンカーを介して、転写因子結合領域配列を含む2本鎖ヌクレオチドと結合させたオリゴヌクレオチドを構築する工程、

(2) 工程(1)で構築した3種類又は4種類のオリゴヌクレオチドを、体細胞内に導入する工程、

(3) 工程(2)で得られた体細胞を、細胞の初期化に適した培地内で培養する工程。

【請求項13】

Oct3/4、Sox2及びKLF4遺伝子の3遺伝子、又はさらにc-Myc遺伝子を含む4遺伝子のそれぞれの上流域の配列と相同な塩基配列からなる1本鎖ヌクレオチドを、それぞれリンカーを介して、転写因子結合領域配列を含む2本鎖ヌクレオチドと結合させたオリゴヌクレオチドを有効成分として含有する体細胞の脱分化剤。

20

【請求項14】

生体内で不足又は欠損していることで疾病を引き起こす原因遺伝子に対して、その遺伝子の転写を活性化又は誘導するための方法であって、下記(1)～(3)の工程を含む方法；

(1) 疾病を引き起こす原因遺伝子を特定して標的遺伝子として選択する工程、

(2) 当該標的遺伝子の上流域の配列と相同な塩基配列からなる1本鎖ヌクレオチドを、リンカーを介して、転写因子結合領域配列を含む2本鎖ヌクレオチドと結合させたオリゴヌクレオチドを構築する工程、

30

(3) 工程(2)で構築したオリゴヌクレオチドを、培養細胞又は生体内の細胞もしくは組織内に導入する工程。

【請求項15】

生体内で不足又は欠損していることで疾病を引き起こす原因遺伝子の上流域の配列と相同な塩基配列からなる1本鎖ヌクレオチドを、リンカーを介して、転写因子結合領域配列を含む2本鎖ヌクレオチドと結合させたオリゴヌクレオチドを有効成分として含有する、遺伝子治療用医薬組成物。

【請求項16】

下記の(a)～(c)のヌクレオチドがこの順序で化学結合されていることを特徴とする、標的遺伝子の転写活性化機能を有するオリゴヌクレオチド；

40

(a) 標的遺伝子の上流域の配列と相同な塩基配列からなる1本鎖ヌクレオチド、

(b) (a)の隣接領域のヌクレオチド配列とは相補性を示さない塩基配列からなる1本鎖ヌクレオチド、

(c) 転写因子結合領域配列を含む塩基配列からなる2本鎖ヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、オリゴヌクレオチドを用いた標的遺伝子の転写を制御する方法、及び当該手法を用いて生体内の特定の転写因子の発現を活性化し、当該転写因子が関与する細胞の分化、初期化、細胞増殖、ホルモン分泌などの生命現象を効果的に引き起こす方法に関する

50

。特に、間葉系幹細胞を、その分化に係る転写因子を発現させることで、筋肉細胞、脂肪細胞又は骨細胞に分化誘導する方法、及び体細胞を初期化するための転写因子を発現させてiPS細胞を作製する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

生命の設計図であるゲノム情報は、遺伝子発現という過程を経て最終的な機能実行分子であるタンパク質に翻訳される。転写反応はその第一義的な調節段階であり、これまでに様々な転写調節方法が確立されている。転写を抑制する方法として核酸を用いた方法があり、その一つとして、アンチセンス法が挙げられる。mRNAをセンス鎖とし、その標的配列に相補的なアンチセンス分子をWatson-Crick型の水素結合により2本鎖を形成させると当該mRNAに対応するタンパク質への翻訳が阻害される。アンチセンス鎖がDNAの場合には、RNase HがmRNAを切断し翻訳阻害を引き起こす（非特許文献1）。また、標的2本鎖DNAに対して第3鎖をHoogsteen型水素結合で結合させ、転写阻害を引き起こすアンチジーン法も存在する（非特許文献2）。酵素活性を持つRNA又はDNAであるリボザイムを用いるリボザイム法では、リボザイムが標的のmRNAを加水分解し翻訳阻害を引き起こす（非特許文献3）。

10

また、転写因子結合配列を利用した転写調節法も開発されている。遺伝子の転写は、転写因子がそのプロモーター領域中の転写因子結合配列を認識して結合することにより、転写が開始される。そこで、標的遺伝子の転写因子結合配列と同一配列を有する短鎖おとりDNA2本鎖（デコイDNA）を高濃度に共存させておくことで、転写因子をデコイDNAでトラップしてしまい、標的遺伝子の転写阻害を起こさせる技術がある（非特許文献4）。

20

さらに近年、短い2本鎖RNA（siRNA）により標的遺伝子の発現を抑制するRNA干渉法（RNAi）（非特許文献5）の研究開発が飛躍的に進み、siRNAの実用化はほぼ確立されてきており（非特許文献6）、細胞内でプロセッシングを受けることによりsiRNAとなるショートヘアピン型RNA（shRNA）を用いることでもRNA干渉による標的遺伝子の翻訳阻害が誘導可能であることが見出されている。

このように、従来の標的遺伝子の発現制御方法において、用いられた短鎖ヌクレオチドは全て抑制的に働くものである。生体内で内在的に遺伝子発現の抑制に働くmiRNAなどの抑制因子の機能を阻害することで、結果的に標的遺伝子の発現を活性化させるという間接的な技術はあっても、標的遺伝子プロモーターに直接的に働きかけて、標的遺伝子の転写活性を促進する短鎖ヌクレオチドを用いる技術は存在しなかった。

30

【0003】

一方、標的遺伝子を細胞内で発現させる方法としては、ベクターを用いる方法が確立されており、ベクターを用いる方法としては、ウイルスベクター及び非ウイルスベクターを用いる方法が存在する（非特許文献7、8）。ウイルスベクターの場合、導入効率や標的遺伝子の発現誘導能は非常に高い。しかしながら、生体内に導入した遺伝子はゲノムにインテグレートすることがあるため、発現が永続的に続き癌化を引き起こす問題があり、レトロウイルスベクターを用いた遺伝子治療における白血病の発症などが報告されている（非特許文献9）。また、宿主ゲノムにインテグレートされないアデノウイルスベクター投与でも死亡事例が報告されているため、ウイルスベクターの場合は、安全性の面で解決しなければならない課題が多い。これに対し、プラスミドDNAに代表される非ウイルスベクターの場合は、安全性の面では優れているが、導入効率が低い（非特許文献10）欠点がある。

40

したがって、標的遺伝子の転写を効率よく確実に活性化することができ、かつ癌化の可能性が極めて低く、安全に活性化できる標的遺伝子の転写活性化方法が望まれていた。

【0004】

幹細胞は、再生医療を実現させる際の細胞供給源としてきわめて重要な役割を果たす。幹細胞を特定の組織細胞に分化させて、望みどおりの組織や臓器を再生したり、病気や欠損を治療したりする試みが盛んに行われている。特に、自らの体から採取した幹細胞の活用は免疫的な拒絶反応の問題を心配する必要が無いと、転写調節による各種幹細胞から

50

特定の細胞への分化誘導は再生医療への応用が期待されている。このように分化誘導した細胞の再生医療への期待も大きく、すでに血管、神経、心筋などを中心にした細胞移植治療も多数試みられている。細胞の分化や脱分化における、各種転写因子の転写調節の解明が進んできており、なかでも間葉系幹細胞の分化については、マスターレギュレーターと呼ばれる転写因子のMyoD、Runx2及びPPAR γ 2などが特定されて、転写機構の解明が進んでいる。これまでに、間葉系幹細胞から筋細胞への分化には、MyoDと共にMyf5やmyogeninが関与していることが知られており（非特許文献11）、骨芽細胞への分化にはRunx2と共に、Osterixの発現が必須なことが知られている（非特許文献12）。また、脂肪細胞への分化には、PPAR γ 2と共に、C/EBP α が関与するとされている（非特許文献13）。これらの因子のうち、マスターレギュレーターであるMyoD、Runx2及びPPAR γ 2については、ウイルスベクターなどにより発現誘導することで間葉系幹細胞を筋細胞、骨芽細胞及び脂肪細胞への3方向へ分化誘導させることが確かめられている（非特許文献14など）。

10

【0005】

また、再生医療への応用が期待される多能性を持ち合わせた幹細胞の一つとして、受精卵から作成した胚性幹細胞（Embryonic Stem Cells; ES細胞）が挙げられるが、ヒト胚を扱うために生命倫理上の問題を有する。これに対して、人工多能性幹細胞（Induced Pluripotent Stem Cells; iPS細胞）は、ヒトの皮膚などの体細胞から作製可能であるため、ES細胞の課題であった倫理的問題をクリアし、実用への可能性が高いと考えられている（非特許文献15, 16）上に、iPS細胞は、患者自身の細胞から調製することができるため、移植の際の免疫適合性の観点でES細胞よりも有利である。しかし、効率よくiPS細胞を樹立する方法としてウイルスベクターが用いられるため、ホストゲノムDNAへの導入遺伝子の挿入に起因する発癌などの有害事象が問題となっている（非特許文献17, 18）。しかも、ウイルスベクターを用いたiPS細胞樹立方法では、導入した遺伝子の恒常的な発現（異所性発現）が続くことで、iPS細胞からの分化誘導を阻害し、癌を誘発することが報告されている（非特許文献19）。

20

以上のように、再生医療を実用化させるために必須である幹細胞の分化誘導方法及びiPS細胞樹立方法において、最も大きな障害となっている点は、発現が永続的に続き、癌化を引き起こす危険性のあるウイルスベクターなどのベクターを使用せざるを得ない点であるということができる。

したがって、再生医療の臨床応用への実現のためにも、ウイルスベクターと同等の標的遺伝子の発現効率が達成できる標的遺伝子の転写活性化方法であって、しかも短時間で速やかに消失して、癌化の可能性が極めて低い、安全な標的遺伝子の転写活性化方法が切望されていた。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】Frank Bennett C. and Swayze E. E., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 50, 259-293 (2010)

【非特許文献2】Jain A. K. and Bhattacharya S., Bioconjugate Chem., 21, 1389-1403 (2010)

40

【非特許文献3】Mulhbach J., St-Pierre P. and Lafontaine D. A., Curr. Opin. Pharmacol., 10, 551-556 (2010)

【非特許文献4】Gambari R., et al., Biochem. Pharmacol., 80, 1887-1894 (2010)

【非特許文献5】Elbashir S. M. et al., Nature., 411, 494-498 (2001)

【非特許文献6】Jackson A. L. and Linsley P. S., Nat. Rev. Drug Discov., 9, 57-67 (2010)

【非特許文献7】Xia H. et al., Nat. Biotechnol., 20, 1006-1010 (2002)

【非特許文献8】Miyagishi M. and Taira K., Nat. Biotechnol., 20, 497-500 (2002)

【非特許文献9】Marshall E., Science, 298, 34-35 (2002)

【非特許文献10】Okita K. et al., Science, 322, 949-953 (2008)

50

- 【非特許文献 1 1】Perdiguerro E. et al., Epigenetics, 4, 541-550 (2009)
- 【非特許文献 1 2】Marie P. J., Archiv. Biohem. Biophys., 473, 98-105 (2008)
- 【非特許文献 1 3】Cristancho A. G. and Lazar M. A., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 12, 722-734 (2011)
- 【非特許文献 1 4】Byers B. A. et al., J. Bone Mineral Res., 17, 1931-1944 (2002)
- 【非特許文献 1 5】Okita K. and Yamanaka S., Phil. Trans. R. Soc. B, 366, 2198-2207 (2011)
- 【非特許文献 1 6】Liu S. et al., Cell Transplant., 20, 15-19 (2011)
- 【非特許文献 1 7】Okita K. et al., Nature, 448, 313-317 (2007)
- 【非特許文献 1 8】Lai M. I. et al., J. Assist. Reprod. Genet., 28, 291-301 (2011)

10

【非特許文献 1 9】Hochedlinger K. et al., Cell, 121, 465-477 (2005)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、遺伝子発現を一時的に活性化するための有効かつ安全な手段として、生体内で速やかにその活性が消失するオリゴヌクレオチドを用い、かつ標的遺伝子の高い発現効率が達成できる転写活性化方法を提供するものである。また、当該転写活性化方法を用いた再生医療に不可欠な効率的かつ安全な幹細胞の分化誘導方法及びiPS細胞樹立方法を提供しようというものである。

20

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、転写因子によるプロモーターの転写制御機構について研究する中で、プロモーター上で転写因子と結合する領域である転写因子結合領域が、転写因子をファンデルワールス力で引き寄せ水素結合で結合する点に着目し、転写因子結合領域を含むオリゴヌクレオチドであって、転写誘導活性を有するオリゴヌクレオチドを作成することを着想した。しかし、転写因子結合領域がプロモーター領域から切り離された状態で、果たして転写因子を引き寄せるか否かも不明であり、活性化しようとするプロモーターの転写開始領域に転写因子を選択的に、かつ確実に到達させるための方法論が不明であった。本発明者らは、鋭意研究の結果、標的となる遺伝子上流側の1部領域に相同な1本鎖ヌクレオチドと、転写因子結合領域とをリンカーで繋いだオリゴヌクレオチドを構築し、当該オリゴヌクレオチドを用いることで、任意の標的遺伝子を選択的な転写の活性化に成功した。

30

すなわち、詳細には、転写を活性化しようとする標的遺伝子に対して、その上流側の1部配列に相同な1本鎖ヌクレオチド（アンカー部位：Anchor sequence）を作製し、当該1本鎖ヌクレオチドをスペーサー配列（リンカー部）により、任意の転写因子結合領域配列を含む2本鎖ヌクレオチド（転写因子結合部位）と繋いで、1本鎖のアンカー部位と2本鎖の転写因子結合部位とを含むオリゴヌクレオチド（「ジーンジャックオリゴヌクレオチド」という。）を創製する。次いで、当該「ジーンジャックヌクレオチド」をリポフェクション法等により細胞内に導入すると、標的遺伝子の転写が誘発又は活性化される。この現象は、ゲノム上の標的遺伝子上流域の配列が、当該配列に相当するアンカー部位を含むジーンジャックヌクレオチドを標的遺伝子のプロモーターにリクルートし、当該アンカー部とリンカー部を介して繋がれた転写因子結合部位が、細胞内の転写因子をプロモーター付近に引きつけ、当該転写因子の作用で標的遺伝子の転写が誘発又は活性化されるためであると考えられる。当該転写活性化手法は、細胞内の標的遺伝子のみを選択的に効率よく活性化することができる画期的な新規手法である。反対に、転写因子結合領域配列に代えて転写抑制因子結合領域を含む2本鎖ヌクレオチドと繋げば、特異的に標的遺伝子の転写抑制に用いることもできる、汎用性のある転写制御技術であることから、本発明者らは、当該標的遺伝子の転写制御方法を、「ジーンジャックオリゴヌクレオチド法」と命名した。本発明の「ジーンジャックオリゴヌクレオチド法」では、「ジーンジャックオリゴヌクレオチド（本明細書中では、単に「オリゴヌクレオチド」ということもある。）」を

40

50

ベクターに挿入することなく、そのままりポフェクション法などで細胞中に導入する。そのため、ゲノム内に安定に取り込まれてしまうことはなく、転写制御の効果は一過的である。そのため、ウイルスベクター法のような恒常的な転写活性化による癌化の危険性を孕まない安全性の高い技術である。

本発明においては、前記「ジーンジャックオリゴヌクレオチド法」の有効性を検証するために、まず、間葉系幹細胞の多方向への分化能を利用した実験系を利用した。間葉系幹細胞の分化の方向性を決定づけるマスターレギュレーター（転写因子）であるMyoDを標的とするジーンジャックオリゴヌクレオチドを、間葉系幹細胞C3H10T1/2株にリポフェクションでトランスフェクションしたところ、MyoDが選択的に活性化され、筋肉への分化が誘導されることが確認できた。同様に、他のマスターレギュレーターRunx2を標的とした場合も、それぞれ骨芽細胞への分化誘導が起こることが確認できた。

10

次いで、本発明のさらなる目標である、iPS細胞の新規樹立方法の開発にジーンジャックオリゴヌクレオチド法を適用することを試みた。マウス胎児線維芽細胞（Mouse embryonic fibroblast; MEF）に対して、iPS細胞を作製するための山中因子と呼ばれる4つの転写因子（Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc）を導入し、各々の転写因子の活性化を行うことで、未分化マーカーの発現を確認することができた。これら転写因子のうち、c-Myc因子は、樹立されたiPS細胞に対し癌化を引き起こす原因の1つと考えられている。そのため、c-Myc因子を省いたiPS細胞の樹立も検討されているが、樹立効率が低いことが問題となっている。一方、ジーンジャックオリゴヌクレオチド法の場合は、転写誘導が一過性で、ゲノム中ヘインテグレーションされないため、c-Myc因子を含めた4因子を用いることができる。このように、当該方法が、樹立効率も損なわずに癌化の可能性が極めて低い安定なiPS細胞樹立が可能であることを予見させる結果を得た。

20

これらの知見を得たことで、本発明を完成するに至った。

【0009】

即ち、本発明は以下の発明を包含する。

〔1〕 標的遺伝子の上流域の塩基配列と相同な1本鎖ヌクレオチドからなるアンカー部位がリンカーを介して、任意の転写因子結合配列もしくは転写抑制因子結合配列を含む2本鎖ヌクレオチドからなる転写因子結合部位と結合されたオリゴヌクレオチドを有効成分として含む、標的遺伝子の転写制御用試薬。

〔2〕 前記アンカー部位が、標的遺伝子のプロモーターの上流域の塩基配列と連続して10～50塩基共通した塩基配列からなることを特徴とする、前記〔1〕に記載の転写制御用試薬。

30

〔3〕 前記転写因子結合部位が、転写因子結合配列もしくは転写抑制因子結合配列をタンデムに繋いだ塩基配列を含むことを特徴とする、前記〔1〕又は〔2〕に記載の転写制御用試薬。

〔4〕 前記標的遺伝子が分化の方向性を決定する転写因子遺伝子であって、かつ前記転写因子結合部位が転写因子結合配列を含むことを特徴とする、幹細胞における分化誘導剤として用いるための、前記〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の転写制御用試薬。

〔5〕 前記標的遺伝子が、Oct3/4、Sox2及びKLF4遺伝子の3遺伝子、又はさらにc-Myc遺伝子を含む4遺伝子のそれぞれである3又は4種類のオリゴヌクレオチドからなり、かつ前記転写因子結合部位が転写因子結合配列を含むことを特徴とする、iPS細胞樹立のための脱分化剤として用いるための、前記〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の転写制御用試薬。

40

〔6〕 前記オリゴヌクレオチドとして、アンカー部位が、生体内で不足又は欠損していることで疾病を引き起こす原因遺伝子の上流域を標的とし、かつ前記転写因子結合部位が転写因子結合配列を含むことを特徴とする、前記原因遺伝子の転写を活性化もしくは誘導することで、疾病を改善又は治療するための、前記〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の転写制御用試薬。

〔7〕 細胞内で、標的遺伝子の転写を誘導する、又は転写を活性化させるための方法であって、

50

〔１〕 標的遺伝子上流域の配列と相同な塩基配列からなる１本鎖ヌクレオチドを、リンカーを介して、転写因子結合領域配列を含む２本鎖ヌクレオチドと結合させたオリゴヌクレオチドを構築し、

〔２〕 当該オリゴヌクレオチドを、標的遺伝子を含む細胞内に導入することを特徴とする、方法。

〔８〕 細胞が幹細胞であり、標的遺伝子が分化の方向性を決定する転写因子遺伝子であることを特徴とする、幹細胞を特定の臓器細胞に分化させるための方法である、前記〔７〕に記載の方法。

〔９〕 細胞が体細胞であり、標的遺伝子が、Oct3/4、Sox2、KLF4及びc-Myc遺伝子から選択された１つ以上の転写因子遺伝子であることを特徴とする、細胞を初期化させるための方法である、前記〔７〕に記載の方法。

〔１０〕 幹細胞を特定の臓器細胞に分化させるための方法であって、下記（１）～（４）の工程を含む方法；

（１）当該臓器への分化の方向性を決定する転写因子を標的として選択する工程、

（２）当該転写因子遺伝子上流域の配列と相同な塩基配列からなる１本鎖ヌクレオチドを、リンカーを介して、転写因子結合領域配列を含む２本鎖ヌクレオチドと結合させたオリゴヌクレオチドを構築する工程、

（３）工程（２）で構築したオリゴヌクレオチドを、幹細胞内に導入する工程、

（４）工程（３）で得られた幹細胞を、前記特定の臓器への分化に適した培地内で培養する工程。

〔１１〕 転写因子遺伝子上流域の配列と相同な塩基配列からなる１本鎖ヌクレオチドを、リンカーを介して、転写因子結合領域配列を含む２本鎖ヌクレオチドと結合させたオリゴヌクレオチドを有効成分として含有する幹細胞の分化誘導剤。

〔１２〕 iPS細胞を樹立する方法であって、下記（１）～（３）の工程を含む方法；

（１）Oct3/4、Sox2及びKLF4遺伝子の３遺伝子、又はさらにc-Myc遺伝子を含む４遺伝子のそれぞれの上流域の配列と相同な塩基配列からなる１本鎖ヌクレオチドを、それぞれリンカーを介して、転写因子結合領域配列を含む２本鎖ヌクレオチドと結合させたオリゴヌクレオチドを構築する工程、

（２）工程（１）で構築した３種類又は４種類のオリゴヌクレオチドを、体細胞内に導入する工程、

（３）工程（２）で得られた体細胞を、細胞の初期化に適した培地内で培養する工程。

〔１３〕 Oct3/4、Sox2及びKLF4遺伝子の３遺伝子、又はさらにc-Myc遺伝子を含む４遺伝子のそれぞれの上流域の配列と相同な塩基配列からなる１本鎖ヌクレオチドを、それぞれリンカーを介して、転写因子結合領域配列を含む２本鎖ヌクレオチドと結合させたオリゴヌクレオチドを有効成分として含有する体細胞の脱分化剤。

〔１４〕 生体内で不足又は欠損していることで疾病を引き起こす原因遺伝子に対して、その遺伝子の転写を活性化又は誘導するための方法であって、下記（１）～（３）の工程を含む方法；

（１）疾病を引き起こす原因遺伝子を特定して標的遺伝子として選択する工程、

（２）当該標的遺伝子上流域の配列と相同な塩基配列からなる１本鎖ヌクレオチドを、リンカーを介して、転写因子結合領域配列を含む２本鎖ヌクレオチドと結合させたオリゴヌクレオチドを構築する工程、

（３）工程（２）で構築したオリゴヌクレオチドを、培養細胞又は生体内の細胞もしくは組織内に導入する工程。

〔１５〕 生体内で不足又は欠損していることで疾病を引き起こす原因遺伝子上流域の配列と相同な塩基配列からなる１本鎖ヌクレオチドを、リンカーを介して、転写因子結合領域配列を含む２本鎖ヌクレオチドと結合させたオリゴヌクレオチドを有効成分として含有する、遺伝子治療用医薬組成物。

〔１６〕 下記の（ａ）～（ｃ）のヌクレオチドがこの順序で化学結合されていることを特徴とする、標的遺伝子の転写活性化機能を有するオリゴヌクレオチド；

10

20

30

40

50

- (a) 標的遺伝子上流域の配列と相同な塩基配列からなる1本鎖ヌクレオチド、
- (b) (a)の隣接領域のヌクレオチド配列とは相補性を示さない塩基配列からなる1本鎖ヌクレオチド、
- (c) 転写因子結合領域配列を含む塩基配列からなる2本鎖ヌクレオチド。

【発明の効果】

【0010】

本発明で用いる「ジーンジャックオリゴヌクレオチド」は、標的遺伝子の転写活性効率が非常に高い上に、その転写活性化は一過的であるから、ウイルスベクターを用いた遺伝子導入法で問題となる導入遺伝子のゲノムへのインテグレートによる癌化などの副作用の危険性が無い。

また、本発明は、哺乳動物細胞におけるどのような遺伝子発現に対しても適用可能な汎用性の高い技術であり、望みの遺伝子を高発現させることが可能であるため、各種遺伝子治療に用いることができる。また、間葉系幹細胞等の各種幹細胞の分化の方向性を決定づける転写因子の発現誘導に適用することで、各種幹細胞を望みの臓器へ分化させることができ、体細胞の初期化のための山中因子と呼ばれる転写因子の発現誘導に適用すれば、癌化の心配のないiPS細胞の樹立が可能であるから、再生医療分野にとっての大きな福音となる。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】上図：ジーンジャックオリゴヌクレオチド作用の模式的図を示した。下図：実験に用いたジーンジャックオリゴヌクレオチドの例を表した。[Anchor sequence]C (Controlオリゴヌクレオチド)：Luciferase遺伝子配列の一部 (Blast検索によりマウスゲノム内に存在しない配列であることを確認)を用いている。T (Targetedオリゴヌクレオチド)：標的とする遺伝子であるMyoDのプロモーターの正鎖配列 (転写開始点から上流側の-77位~-96位の20塩基配列)を用いている。[TF (Transcription Factor) binding elements]WT CMV (CMV minimal promoter)：CMV (Cytomegalovirus)のminimalプロモーター由来配列を用いている。SC CMV (Scramble mutated CMV)：CMV minimalプロモーターの塩基配列をランダムに入れ替え、変異させた配列を用いている。Linker：Anchor sequenceとTF binding elementsの間に5塩基Tを挿入している。

【図2】図1 (下図)で示したC&WT CMV、T&SC CMV及びT&WT CMVのオリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収し、抽出したMyoDのmRNAを定量的PCR法で測定した。インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正し、C&WT CMVにおける発現レベルの補正值を1とした相対的発現量を示した。

【図3】標的遺伝子をRunx2に変え、T&SC CMV及びT&WT CMVのAnchor sequenceをRunx2のプロモーター配列 (-1469~-1488)の正鎖配列に変更した。これらのC&WT CMV、T&SC CMV及びT&WT CMVのオリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収し、抽出したRunx2のmRNAを定量的PCR法で測定した。インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正し、図2と同様、C&WT CMVを1とする相対値で示した。

【図4】標的遺伝子をPreproinsulin gene II (Insulin-II)又はリボソームRNA (rRNA)に変え、Targeted オリゴヌクレオチド (Targeted)のAnchor sequenceをInsulin-II又はrRNAの上流域の正鎖配列に変更した。それらのオリゴヌクレオチドをマウス肝癌細胞株Hepa 1-6細胞にトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収した。それらの細胞から抽出したInsulin-II (図左)又はrRNA (図右)遺伝子のmRNAを定量的PCR法で測定した。コントロール (Cont.)は図1と同じAnchor sequenceをLuciferase由来の遺伝子配列としたものを用いており、TF binding elementsは、全て図1のCMVプロモーター由来配列を用いている。インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正し、rRNAはレーン1 (Cont.)の値を1として相対値を示した。

【図5】Anchor sequenceの塩基の長さをこれまでの実験で用いている20塩基から10、14、16、18、20、25、30塩基に変化させたオリゴヌクレオチドを用いた。なお、それぞれの塩基長ごとにTargetedの場合と同様の塩基長にそろえたControlを用意した。これらのオ

10

20

30

40

50

リゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収し、抽出したMyoDのmRNAを定量的PCR法で測定した。インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正し、レーン5の発現レベルの補正値を1とした相対的発現量を示した。

【図6】標的遺伝子をRunx2に変え、Anchor sequenceの塩基長をこれまでの実験で用いている20塩基から16、18に変化させたTargeted及びControlのオリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションした。24時間後に細胞を回収し、抽出したRunx2のmRNAを定量的PCR法で測定した。インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正し、レーン1の発現レベルの補正値を1とした相対的発現量を示した。

【図7】Anchor sequenceに4塩基の変異を導入したオリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収し、抽出したMyoDのmRNAを定量的PCR法で測定した。4塩基変異させたオリゴヌクレオチドはそれぞれ変異導入場所を3種類作製し実験に用いている。図中、WTは、図1の下図で示した「T&WT CMV」であり、Cont.は、同「C&WT CMV」である。インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正し、レーン1 (Cont.) の発現レベルの補正値を1とした相対的発現量を示した。

【図8】MyoDを標的遺伝子とした場合について、Linkerの塩基数を0、3、5、又は10塩基にしたTargeted及びControlのオリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションした。24時間後に細胞を回収し、抽出したMyoDのmRNAを定量的PCR法で測定した。インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正し、レーン3 (T5のCont.) の発現レベルの補正値を1とした相対的発現量を示した。

【図9】Runx2を標的遺伝子とした場合について、Linkerの塩基数を0、3、5、又は10塩基に変化させたTargeted及びControlのオリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収し、抽出したRunx2のmRNAを定量的PCR法で測定した。インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正し、レーン3 (T5のCont.) の発現レベルの補正値を1とした相対的発現量を示した。

【図10】MyoD遺伝子の上流域の転写開始点から-5、-25、-96、-322、-790、-953、-23321、又は-23414位までの20塩基配列をAnchor sequenceとしたオリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションした。なお、図中、Cont.は図1の「C&WT CMV」と同じである。24時間後に細胞を回収し、抽出したMyoDのmRNAを定量的PCR法で測定した。インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正し、レーン1 (Cont.) の発現レベルの補正値を1とした相対的発現量を示した。

【図11】CMV minimal promoter由来の転写因子結合配列の3'末端にビオチン修飾したオリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収、ストレプトアビジンビーズを用いてクロマチン免疫沈降実験を行った。Anchor sequenceは図1と同様であり、ControlではLuciferase遺伝子由来配列、TargetedではMyoDのプロモーター領域由来配列を用いている。標的としているMyoDの上流-77から-96の近傍を含むクロマチン断片が沈降したことが検出可能なPCRプライマーセット (-375から-545を増幅)、及び負の対照群として標的配列より遠位の位置に設計したPCRプライマーセット (-8539から-8779を増幅) を用いて沈降産物を定量的PCR法で測定した。

【図12】TF binding elementsとして用いたCMVプロモーターの配列に存在する転写因子結合配列に変異を導入したオリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収し、抽出したMyoDのmRNAを定量的PCR法で測定した。Anchor sequenceは図1と同様であり、ControlではLuciferase遺伝子由来配列、TargetedではMyoDのプロモーター領域由来配列を用いている。WT CMVは野生型のminimal CMVプロモーター由来のTF配列 (図1と同じ) を、MT CMVはTF結合配列に変異を加えたminimal CMVプロモーター由来配列を用いたオリゴヌクレオチドを示す。インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正し、レーン1 (Cont.) の発現レベルの補正値を1とした相対的発現量を示した。

【図13】TF binding elementsとして用いたCMVプロモーターの配列に存在する転写因子結合配列に変異を導入したオリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収し、抽出したRunx2のmRNAを定量的PCR法で測定した。Control

10

20

30

40

50

はAnchor sequenceを図1と同じLuciferase遺伝子由来配列としたもの、Targetedは図3と同じRunx2のプロモーター領域由来配列としたものを用いている。WT CMV及びMT CMVは図12と同様に、野生型のminimal CMVプロモーター領域由来のTF配列及び変異型のCMVプロモーター由来配列である。インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正し、レーン1 (Cont.) の発現レベルの補正值を1とした相対的発現量を示した。

【図14】 MyoD遺伝子を標的とした場合について、TF binding elementsとして、図1のCMVプロモーター由来の配列に代えて、タンデムに配置したAP1結合配列を8個又はSp/KLFファミリー結合配列のGTbox及びGCbox (GC/GT box) をそれぞれ3個ずつ結合させたオリゴヌクレオチドを用いた。C3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収し、抽出したMyoDのmRNAを定量的PCR法で測定した。Anchor sequenceについては図1と同様であり、ControlではLuciferase遺伝子由来配列、TargetedではMyoDのプロモーター領域由来配列を用いている。インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正し、レーン1 (Cont.) の値を1として相対値を示した。

10

【図15】 Runx2遺伝子を標的とした場合についても図14と同様の実験を、TF binding elementsとしてCMVプロモーター由来の配列と共に、タンデムにAP1結合配列を結合させたオリゴヌクレオチドを用いて行った。C3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収し、抽出したRunx2のmRNAを定量的PCR法で測定した。Anchor sequenceについては、Controlでは図1と同じLuciferase由来の遺伝子配列を、Targetedでは図3と同じRunx2のプロモーター由来配列としたものを用いている。インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正し、レーン1 (Cont.) の値を1として相対値を示した。

20

【図16】 MyoD遺伝子を標的とするオリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、24時間後、72時間後、又は120時間後に細胞を回収し、抽出したMyoDのmRNAを定量的PCR法で測定した。Anchor sequenceは図1と同様であり、ControlはLuciferase遺伝子由来配列、TargetedはMyoDのプロモーター領域由来配列を用いている。インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正し、レーン1、レーン3又はレーン5 (Cont.) の値を1として相対値を示した。

【図17】 Runx2遺伝子を標的とするオリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、24時間後、72時間後、又は120時間後に細胞を回収し、抽出したRunx2のmRNAを定量的PCR法で測定した。Anchor sequenceについては、Controlは図1と同じLuciferase由来の遺伝子配列、Targetedは図3と同じRunx2のプロモーター由来配列を用いている。インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正し、レーン1、レーン3又はレーン5 (Cont.) の値を1として相対値を示した。

30

【図18】 これまでの実験で用いているオリゴDNAの一部を人工核酸であるLNA (Locked Nucleic Acid) に置き換えたオリゴヌクレオチドを用いた。なお、Targetedの場合と同様にLNAに置き換えたコントロール (Cont.) を用意した。これらのオリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収し、抽出したMyoDのmRNAを定量的PCR法で測定した。インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正し、レーン1の発現レベルの補正值を1とした相対的発現量を示した。

【図19】 マウス間葉系幹細胞株 (C3H10T1/2) のKey transcription factorによる選択的な分化誘導の図である。間葉系幹細胞は、Key transcription factorであるMyoD又はRunx2の発現により、それぞれ筋細胞又は骨細胞へと分化誘導される。

40

【図20】 オリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、筋肉細胞及び骨細胞の各方向に分化誘導を行った後に細胞を回収し、MyoD及びRunx2遺伝子並びに各分化マーカー遺伝子のmRNAを定量的PCR法で測定した。Controlは図1と同じAnchor sequenceをLuciferase由来の遺伝子配列としたもの、MyoD及びRunx2はそれぞれの遺伝子のプロモーター由来配列をAnchor sequenceとしたもの (図1又は図3と同様) を用いており、TF binding elementsは、全て図1のCMVプロモーター由来配列を用いている。インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正し、それぞれのレーン1 (Control) の値を1として相対値を示した。筋肉分化マーカー遺伝子としてMyogenin及びMHC遺伝子、骨細胞分化マーカー遺伝子としてALP及びOC遺伝子転写量を観察した。

50

【図 2 1】 MyoD遺伝子又はRunx遺伝子を標的としたオリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、72時間後に培地を筋肉分化培地に変更した。3日間の培養後に筋分化を評価するためミオシン重鎖（MHC）を用いた免疫染色を行った（緑色）。それと同時に、DAPIによる核染色を行った（青）。用いたオリゴヌクレオチドは、図 2 0 と同じである。

【図 2 2】 図 2 1 と同様に、図 2 0 と同じオリゴヌクレオチドを用いてC3H10T1/2細胞にトランスフェクションした後、24時間後に培地を骨分化培地に変更した。29日間培養後に骨分化を評価するためAlizarin red染色を行った。

【図 2 3】 iPS細胞誘導に關与する転写因子を標的としたオリゴヌクレオチドを1種類ずつマウス胎児線維芽細胞（Mouse embryonic fibroblast; MEF）にトランスフェクションした後、約24時間後に細胞を回収し、各遺伝子のmRNA量を定量的PCR法で測定した。Controlは図 1 と同じLuciferase由来配列をAnchor sequenceとしたもの、Oct3/4, Sox2, KLF4 及びc-Mycはそれぞれの遺伝子のプロモーター由来配列をAnchor sequenceとしたものを用いており、TF binding elementsは、全て図 1 のCMVプロモーター由来配列を用いている。図はそれぞれ、Oct3/4遺伝子、Sox2遺伝子、KLF4遺伝子又はc-Myc遺伝子を標的とした場合のCont.を1とした相対的発現量を示す。なお、インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正している。

10

【図 2 4】 図 2 3 と同じ4種類のオリゴヌクレオチド（Targeted Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc; Targeted OSKM）をMEF細胞に同時にトランスフェクションし、約24時間後に細胞を回収し、各遺伝子のmRNA量を定量的PCR法で測定した。Controlも図 2 3 と同じである。図はそれぞれ、左からOct3/4遺伝子、Sox2遺伝子、KLF4遺伝子又はc-Myc遺伝子を標的とした場合の相対的発現量を示す。なお、インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正している。

20

【図 2 5】 図 2 3 と同じ4種類のオリゴヌクレオチド（Targeted Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc; Targeted OSKM）をMEF細胞に同時にトランスフェクションし、約3日後にアルカリフォスファターゼ（AP）染色を行った（右図）。Controlも図 2 3 と同じである。左図はAP染色量を定量化し、Cont.を1とした相対的発現量を示す。

【発明を実施するための形態】

【0012】

1. ジーンジャックオリゴヌクレオチド法

30

（1）ジーンジャックオリゴヌクレオチド法とは

転写を活性化しようとする標的遺伝子に対して、その上流域の配列と相同な1本鎖ヌクレオチド（アンカー部位）を作製し、当該1本鎖ヌクレオチドをスパーサー配列（リンカー部）により、任意の転写因子結合領域配列を含む2本鎖ヌクレオチド（転写因子結合部位）と繋いで、1本鎖のアンカー部位と2本鎖の転写因子結合部位とを含むオリゴヌクレオチドを創製する。このオリゴヌクレオチドを、本発明では、「ジーンジャックオリゴヌクレオチド」という。当該「ジーンジャックオリゴヌクレオチド」をリポフェクション法などにより細胞内に導入することにより、標的遺伝子の転写が誘発又は活性化される。この現象は、ジーンジャックオリゴヌクレオチド中のアンカー部位が標的遺伝子上流域の1部を選択的に認識してリクルートされ、リンカー部に繋がれた転写因子結合部位が、細胞内の転写因子を標的遺伝子転写開始部位付近に引きつけ、当該転写因子の作用により標的遺伝子の転写が誘発又は活性化されるためであると考えられる。このような標的遺伝子の転写を特異的に誘発又は活性化させる方法を、「ジーンジャックオリゴヌクレオチド法」と呼ぶ。当該転写活性化手法により、細胞内の標的遺伝子のみを選択的に効率よく活性化することができる。また反対に、本発明の「ジーンジャックオリゴヌクレオチド法」においては、転写因子結合部位に対応する2本鎖ヌクレオチドに代えて、転写抑制因子結合領域を含む2本鎖ヌクレオチドを用いることで、標的遺伝子の転写を選択的に抑制することができる。したがって、本発明の「ジーンジャックオリゴヌクレオチド法」とは、標的遺伝子上流域の配列に相同な1本鎖のアンカー部位と2本鎖の転写因子結合部位又は転写抑制因子結合部位がリンカーで繋がれたオリゴヌクレオチドを用いた、標的遺伝子の転

40

50

写制御方法である、と定義できる。

【0013】

(2) ジーンジャックオリゴヌクレオチドの設計

(2-1) 標的遺伝子

選択する標的遺伝子は、細胞のゲノム内に存在する遺伝子であれば、どのような遺伝子であってもよい。ジーンジャックオリゴヌクレオチドの設計にあたり、該標的遺伝子の上流域における10～60塩基、好ましくは17～50塩基、より好ましくは18～40塩基の配列情報を利用する。該上流域の配列情報は、GenBank等のデータベース、学術文献、特許文献など、公知の情報源から入手できる。仮に公知の情報がないければ、該標的遺伝子の上流域の配列情報は該標的遺伝子の配列情報と当業者の慣用技術に基づいて適宜同定することができる。ここで、細胞というとき、生体内の細胞又は生体外の培養細胞のいずれの場合であってもよく、典型的にはヒト細胞など哺乳類細胞を指すが、プロモーターの転写因子による制御機構が原核生物から真核生物まで共通していることからみて、哺乳動物細胞に限らず、細菌、酵母、昆虫細胞なども含まれる。

10

標的遺伝子は、生体内での正常に発現している遺伝子、発現量が低下している遺伝子、休眠している遺伝子のいずれもが対象となる。すなわち、生体内でその発現量が低すぎるのが原因で起こる疾病治療として患部に投与する遺伝子治療、または生体内で発現量を高めて健康増進もしくは疾病予防などのために投与する遺伝子治療用のツールとして用いることができる。例えば、従来、遺伝子治療が検討されていた、心筋梗塞患者の梗塞巣に血管再生を促すためのVEGF遺伝子発現増強の他、遺伝病であるアデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症の治療、前立腺癌、乳癌、食道癌等の癌患者に対する癌抑制遺伝子の活性化、生体内で必須の酵素などの生理活性タンパク質の発現が弱いことに起因した疾患の患者に対して当該遺伝子発現の増強などに用いることができる。

20

また、幹細胞に対する分化の方向性を決定づける転写因子の遺伝子を標的遺伝子として選択すれば、当該標的遺伝子の転写を活性化させることで、幹細胞の特定方向への分化を誘導することができる。例えば、間葉系幹細胞のマスターレギュレーター(転写因子)であるMyoD, Runx2を標的とすることで、筋肉細胞、骨芽細胞への分化誘導が起こすことができる。

さらに、体細胞の初期化に必要な転写因子(山中因子と呼ばれるOct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc)を標的遺伝子として選択すれば、当該標的遺伝子の転写を活性化させることで、iPS細胞を創製できる。

30

【0014】

(2-2) ジーンジャックオリゴヌクレオチドの設計方法

本発明のジーンジャックオリゴヌクレオチドは、1本鎖の「アンカー部位」及び2本鎖の「転写因子結合部位」が、「リンカー部(1本鎖)」で繋がれた構造である。

本発明のジーンジャックオリゴヌクレオチドで用いられるヌクレオチドの種類としては、デオキシリボヌクレオチド(DNA)の他、リボヌクレオチド(RNA)、その他の各種人工ヌクレオチドを用いることができる。典型的には入手性や合成のしやすさからDNAが用いられるが、生体内に投与するための試薬としては、架橋化ヌクレオチド(BNA)などの人工ヌクレオチドを用いることで、半減期を延ばすことができ、好ましい。

40

「アンカー部位」は、標的遺伝子の上流域において、プロモーター領域などの転写開始領域近傍から選択された1本鎖のヌクレオチドである。具体的には、転写開始領域からみて、30～950塩基、好ましくは90～900塩基程度上流側の塩基配列に対して相補する17～60塩基、好ましくは18～40塩基の1本鎖のヌクレオチドである。

「転写因子結合部位」は、発現させたい標的遺伝子を有する対象細胞内に存在することが既知の転写因子に対して結合活性を示す任意の「転写因子結合領域」から選択された2本鎖ヌクレオチドである。その好ましい「転写因子結合領域」の塩基長は、20～100塩基、好ましくは40～60塩基程度の塩基長である。仮に、「転写因子結合領域」が短い場合、例えばAP1結合配列の場合などは、タンデムに繋いで、20～100塩基長になるように調製すればよい。

50

一般に、「転写因子結合領域」とは、転写因子が結合するプロモーター領域中の塩基配列であって、従来はTATA結合タンパク質(TBP)と呼ばれる転写因子群の共通の結合領域(「TATAAAA」又はその類似配列)を有している場合が典型的であるとされていたが、CGリッチの配列など様々な配列が報告されており、データベース化されている。そして、いずれの「転写因子結合領域」も、それぞれに対応する転写因子に対して特異的な塩基配列を有している。すなわち、本発明のジーンジャックオリゴヌクレオチドの構成要素となる転写因子結合領域と、当該転写因子結合領域により引き寄せられる転写因子との間には特異性が存在するが、当該転写因子によって活性化される遺伝子及びそのプロモーター配列に対する転写誘導活性には普遍性が存在する。本発明においては、その点を、MyoD遺伝子の転写活性を、MyoDプロモーターとは本来無関係なCMVプロモーター由来転写因子結合領域及びタンデムに配置したAP1結合配列、及びGC/GTbox配列を用いて確認している。

10

「リンカー部」は、一般的にリンカーとして用いられるスペーサー配列であり、アンカー部位の隣接領域のヌクレオチド配列とは相補性を示さない任意の塩基配列からなる1本鎖ヌクレオチドであって、3～15塩基、好ましくは4～12塩基、より好ましくは5～10塩基で構成される。

【0015】

(2-3) ジーンジャックオリゴヌクレオチドの製造方法

本発明のジーンジャックオリゴヌクレオチドは、短い配列であるので、1本鎖の「アンカー部位」及び「リンカー部(1本鎖)」並びに2本鎖の「転写因子結合部位」をそれぞれ別個に合成し、両者を結合することで製造することも可能であるが、ジーンジャックオリゴヌクレオチドの全長に対応する「Forwardオリゴヌクレオチド」と2本鎖ヌクレオチドの領域のみに対応する相補鎖である「Reverseオリゴヌクレオチド」を等量混合してアニリングさせることで調製する方法が好ましい。

20

【0016】

(3) ジーンジャックオリゴヌクレオチドの細胞内への導入方法

本実施例では、リポフェクション法を用いているが、それには限られず、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法など様々な核酸導入法を用いることもできる。

リバーストランスフェクション法を用いて細胞に本発明のジーンジャックオリゴヌクレオチドを導入する際には、トランスフェクション試薬と混合させた当該オリゴヌクレオチドに対して、導入しようとする対象細胞を懸濁液の状態で作作用させるため、当該対象細胞は、懸濁培養により増殖させるか、又は固定培地で増殖させた後であらかじめ培地から剥離して懸濁状態としておく必要がある。

30

エレクトロポレーション法の場合もまた予め培養しておいた細胞を剥離して懸濁状態としておいたものとMEF Nucleofector solution 1(Lonza)等の緩衝液を混合し、その後のサンプル液をキュベットに移し、エレクトロポレーションを行う。

【0017】

(4) 標的遺伝子の転写活性化の確認方法

標的遺伝子の転写が活性化されたことは、細胞内で転写された全mRNA中の標的遺伝子のmRNA量を測定すればよく、典型的には定量的PCR法が用いられるが、競合的PCR法、HiCEP法、マイクロアレイやノーザンブロット法などを用いてもよい。また、転写された遺伝子産物を目的とする場合は、最終的な目的遺伝子産物量、例えば生理活性タンパク質であれば、当該生理活性タンパク質を認識する抗体によるアッセイ系を用いることができる。また、分化誘導のための転写因子もしくは転写因子群が標的遺伝子であるなど細胞の形態が明確に変化する場合は、形態変化自体の観察の他、分化後の細胞表面マーカーを検出することでも確認できる。

40

定量的PCRは常法で実施した。即ち、細胞から全RNAをRNA抽出用試薬であるSepasol-RNA I SuperG(nacalai tesque)で調製し、これらをDNaseで処理し、RTase(Takara Bio)を用いて、一本鎖cDNAを合成し、蛍光色素を含むPCR用プレミックス試薬であるSYBR Premix Ex taq(Takara Bio)を用いてPCRを実施した。

50

【0018】

2. 幹細胞の分化誘導法

(1) 対象幹細胞

ES細胞、iPS細胞、間葉系幹細胞などの多能性幹細胞の他、体性幹細胞と呼ばれる骨髄系幹細胞、神経系幹細胞、造血幹細胞、脂肪幹細胞、精原細胞、赤芽細胞などいずれの分化レベルの幹細胞であってもよく、少なくとも当該幹細胞の分化の方向性を決定づける遺伝子もしくは遺伝子群が明らかとなっていれば、当該遺伝子もしくは遺伝子群を標的遺伝子もしくは標的遺伝子群とすれば、本発明が適用できるので、本発明の対象とする幹細胞である。特に、マスターレギュレーターとよばれる単一の転写因子によって分化の方向性が決定づけられている幹細胞の場合がより好ましい。

10

【0019】

(2) 間葉系幹細胞の分化誘導

(2-1) 間葉系幹細胞の分化誘導のためのジーンジャックオリゴヌクレオチドの設計

本発明の実施態様の1つとしては、分化の方向性を決定づけるマスターレギュレーター(転写因子)が明確となっている間葉系幹細胞をそのモデル系として選択した。間葉系幹細胞のマスターレギュレーターとなる転写因子は、MyoD、Runx2、及びPPAR γ 2があり、それぞれの転写因子の発現によって、筋肉細胞、骨芽細胞、及び脂肪細胞への3方向への分化誘導が起こることが知られている。

具体的には、例えばMyoD発現を活性化させるためには、MyoDプロモーター領域の転写開始配列の上流域特異的な塩基配列に相同な1本鎖のヌクレオチドを「アンカー部位」とし、アンカー部位の隣接領域のヌクレオチド配列とは相補性を示さない1本鎖ヌクレオチドからなるリンカー部により、適宜の2本鎖の転写因子結合領域と繋がれたジーンジャックオリゴヌクレオチドを、間葉系幹細胞内に導入する。

20

In vitro培養の場合には、間葉系幹細胞内にジーンジャックオリゴヌクレオチドを導入後、通常の幹細胞培養培地中で十分にMyoD発現を活性化させた後に、培地を周知の筋肉細胞分化誘導培地に変更してもよいが、間葉系幹細胞内にジーンジャックオリゴヌクレオチドを導入と同時に、筋肉細胞分化誘導培地内で培養することで、間葉系幹細胞を筋肉細胞へ迅速かつ効率よく確実に分化させることができる。

このように分化させた筋肉細胞は、フローサイトメトリー、磁気ビーズなどにより幹細胞から分離し、周知の方法により筋肉細胞を補うための細胞移植に供される。

30

また、本発明のジーンジャックオリゴヌクレオチドは、生体の移植を要する患部に対して間葉系幹細胞と共に本発明のMyoDを標的としたジーンジャックオリゴヌクレオチドを含む分化誘導剤を、直接、または静注や外用薬などとして間接的に導入することができるが、その際には、生体内での安定性を高めるために、ヌクレオチドの種類としてBNA等のヌクレオチドアナログを用いることが好ましい。

他のRunx2遺伝子又はPPAR γ 2遺伝子を標的遺伝子とした場合も同様である。

【0020】

(2-2) 分化誘導の確認方法

分化誘導を確認するためには、分化された細胞が明確な形態変化を起こすため、形態変化自体の観察でも確認可能であるが、より正確には、分化後の細胞に特有な表面マーカーを検出することで確認できる。

40

例えば、MyoDにより分化させた筋細胞の場合であれば、Myogenin又はMHCなどの周知の筋細胞分化マーカーを、蛍光などの標識抗体を用いて確認することができ、当該マーカーを指標にフローサイトメトリー、磁気ビーズなどで分化した筋細胞のみを単離することもできる。

【0021】

3. iPS細胞誘導法

(1) iPS細胞への分化誘導因子

山中因子(Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc)の4遺伝子それぞれに、または、Oct3/4, KLF4, Sox2の3遺伝子のそれぞれに対して、本発明のジーンジャックオリゴヌクレオチド法

50

を適用する。創製した4種類（又は3種類）のジーンジャックオリゴヌクレオチドを、初期化（脱分化）させたい体細胞（例えば、患者由来の繊維芽細胞など）に対し、同時にもしくは順次にリポフェクション法などにより導入する。

通常の細胞培養培地中で十分に各遺伝子の転写を活性化させた後に、脱分化誘導剤を添加した幹細胞用培地に変更してもよいが、ジーンジャックオリゴヌクレオチドを導入と同時に、脱分化誘導培地内で培養することで、迅速かつ効率よく初期化しiPS細胞にさせることができる。

【0022】

（2）体細胞の初期化の確認

体細胞が初期化したことを確認するためには、多能性幹細胞が明確な形態変化を起こすため、形態変化自体の観察でも確認可能であるが、より正確には、初期化後の幹細胞に特有な表面マーカーを検出することで確認できる。さらに初期化後の幹細胞の分化能を試験することでも確認できる。

また、当該未分化細胞マーカーを認識する抗体又はレクチンを表面に設けた磁気ビーズまたはフローサイトメトリーなどで、iPS細胞を単離することができる。

【0023】

4. 遺伝子治療用医薬組成物

本発明のジーンジャックオリゴヌクレオチドの標的遺伝子として、生体内で不足もしくは欠損していることで疾病を引き起こす原因遺伝子を選択するか、又は癌抑制遺伝子など生体内で疾病を治療するために発現増強させたい遺伝子を選択することで、これら遺伝子の転写を活性化又は誘導することができるから、本発明のためのジーンジャックオリゴヌクレオチドは、周知の薬学的に許容される担体などを適宜配合することで遺伝子治療用医薬組成物とすることができる。前者の標的遺伝子としては、生体内で必須の酵素などの生理活性タンパク質の発現が弱いことに起因した疾患治療のための当該酵素遺伝子、例えば遺伝病であるアデノシンデアミナーゼ(ADA)欠損症治療のためのADA遺伝子などが挙げられる。後者の標的遺伝子としては、心筋梗塞患者の梗塞巣に血管再生を促すためのVEGF遺伝子などが、また前立腺癌、乳癌、食道癌等の癌患者に対する各種癌抑制遺伝子などが挙げられる。

これら遺伝子を標的遺伝子として作製した本発明のジーンジャックオリゴヌクレオチドを含む医薬品組成物の投与経路としては、原則として活性化させたい標的遺伝子が存在する細胞、組織、臓器に速やかに到達できる投与経路が好ましい。そのため、直接当該組織などに導入する投与方法が最も好ましく、他に点滴を含む静脈内投与、貼布剤等による経皮投与等の非経口投与が適している。本発明の医薬組成物は、必要に応じて薬理的に許容されるキャリア、賦形剤、希釈剤、添加剤、可溶化剤、溶剤、ゲル化剤等を添加することができる。

ここで、投与の対象は、典型的にはヒトであるが、愛玩動物、実験動物、家畜など非ヒト動物である場合も含む。

本発明の医薬組成物の量・頻度・期間としては、そもそも標的遺伝子の特性により異なり、しかも対象となる疾病の種類、重篤度によっても異なるため、一概には言えない。また、患者の年齢、体重、症状等により異なるが、好ましい投与量の例としては、オリゴヌクレオチド換算で、成人一人当たり、0.001~100mg/日、好ましくは、0.1~10mg/日、より好ましくは1~10mg/日を挙げることができる。もっとも、上記、好ましい投与量の範囲は、例示であって、限定するものではない。

投与頻度としては、一日一回~複数回の投与又は点滴等による連続的投与を例示することができる。投与期間は、診断可能な指標に基づいて当該技術分野の薬理学者や臨床医が既知の方法により決定することもできる。

本発明の医薬組成物は、他の既存の治療剤及び/又は予防剤と組み合わせて使用することもできる。既存の薬剤と本発明の医薬品組成物の作用機序は根本的に異なると考えられるため、相加的な、また、場合によっては、相乗的な効果が期待できる。

【実施例】

【0024】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

本発明におけるその他の用語や概念は、当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものであり、本発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。また、各種の分析などは、使用した分析機器又は試薬、キットの取り扱い説明書、カタログなどに記載の方法を準用して行った。

なお、本明細書中に引用した技術文献、特許公報及び特許出願明細書中の記載内容は、本発明の記載内容として参照されるものとする。

10

【0025】

(実施例で用いられた測定方法、条件など)

定量的PCR

本発明における遺伝子の転写活性の測定には、定量的PCR (Real Time RT-PCR法: Murayama et al., (2008) Cell 133, 627-639) に基づいて、RNA抽出に関する改変を加えて実施した。

まず、細胞を1mlのRNA抽出用試薬であるセパゾール (nacalai tesque) 中でホモジナイズし、添付の使用説明書に従って全RNAを抽出した。cDNAは、逆転写酵素であるRevatrac (東洋紡) 及びオリゴdTプライマーを使用して全RNAから合成した。

定量的PCRは、サーマルサイクラーであるThermal Cycler Dice (商標) TP800 (Takara Bio) 及び定量的PCR用プレミックス試薬であるPlatinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen)を用いて行った。

20

【0026】

オリゴヌクレオチドの細胞への導入法

増殖中のC3H10T1/2細胞又はMEF細胞をトリプシン処理により培養ディッシュから剥離させたのち、 2×10^5 cells/mlの濃度になるようにDMEM (高グルコース培地) で細胞懸濁液を調製し、リポフェクション試薬である「Lipofectamine LTX (Invitrogen)」を用い、リバーストランスフェクション法によりオリゴヌクレオチドをメーカーのプロトコルに従ってトランスフェクションした。

30

【0027】

筋肉細胞への分化

セミコンフルエント状態の細胞を増殖培地 (DMEM、10%牛血清及び抗生物質-抗真菌剤混合溶液 (nacalai tesque) 含有) から分化培地 (DMEM、2%ウマ血清含有) に交換し、24時間ごとに培地交換を行った。分化誘導から5日後に免疫染色を行い、核 (DNA) とミオシン重鎖 (MHC) の発現を免疫染色により観察した。

【0028】

骨細胞への分化

オリゴヌクレオチド導入の翌日、細胞の培養液を $0.5 \mu\text{M}$ のデキサメタゾン、 $25 \mu\text{g/ml}$ のアスコルビン酸、及び 2.5mM のグリセロールホスフェートを添加した10%牛血清及び抗生物質-抗真菌剤混合溶液 (nacalai tesque) 含有DMEMに交換した。約30日後、骨芽細胞への分化を誘導したC3H10T1/2細胞を10%ホルマリンで固定した。次に2% Alizarin Red 溶液 (Sigma) を添加し、石灰化している細胞を赤褐色に染色して、骨化の指標であるカルシウム沈着を確認した。

40

【0029】

AP染色

培養後の細胞をRED-Color AP Staining Kit (SBI) によりメーカーのプロトコルに従い、未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ (AP) 染色を行った。

【0030】

(実施例1) ジーンジャックオリゴヌクレオチドによる標的遺伝子の転写活性化

(1-1) MyoD mRNAの転写活性化

50

本実施例では、ジーンジャックオリゴヌクレオチドの作用を検討するため、間葉系幹細胞で骨格筋細胞への分化方向性を決定づけるマスターレギュレーターと呼ばれる転写因子の「MyoD」をターゲットとし、MyoD遺伝子の転写活性を選択的に増強させるか否かを検証することとした。

そこで、MyoDプロモーター配列の1部領域と相同な1本鎖ヌクレオチド（アンカー配列）と、CMV minimal promoter由来の転写因子結合領域（TF（Transcriptional Factor）binding elements）を含む2本鎖ヌクレオチド配列を、リンカー（5塩基のT）で繋いだジーンジャックオリゴヌクレオチドを構築した（図1下部）。ここで、アンカー配列に関し、それぞれについての本来の配列をTargeted Oligo(T)、そのコントロールとして用いたランダム配列は、Control Oligo(C)として表記した。Anchor sequence(C)は、Luciferase 10
遺伝子配列の一部配列であり、Blast検索によりマウスゲノム内に存在しない配列であることを確認している。TF binding elements (WT CMV) は、CMV minimal promoter由来の転写因子結合領域を含む配列であり、TF binding elements (SC CMV) は、当該WT CMV配列をランダムに入れ替え、変異させた配列である。なお、図1上部では、ジーンジャックオリゴヌクレオチドの作用を模式的に表した。図1下部のように設計したジーンジャックオリゴヌクレオチドは、下記の等量の合成オリゴヌクレオチドのForwardとReverseを、TE緩衝液（トリス-EDTA緩衝液）で100 μ Mに溶解混合し、アニーリングにより調製した。

【0031】

Forward Oligo ヌクレオチド

C&WT CMV

5'-TGAAGTTCCCGCCGCCGTTGTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGACGGTGGGAGGTC-3'
(配列番号1)

T&SC CMV

5'-ATTGGCTTGAGGCGCCCCCGTTTTGACGCCTCACGCTGGGTGCTCGCCGGTGAGGCGATGCGTTGCAAAGGTA-3'
(配列番号2)

T&WT CMV

5'-ATTGGCTTGAGGCGCCCCCGTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGACGGTGGGAGGTC-3'
(配列番号3)

【0032】

Reverse Oligo ヌクレオチド

Targeted CMV minimal _R (WT CMV)

5'-GACCTCCCACCGTACACGCCTACCGCCCATTTGCGTCAATGGGGCGGAG-3'
(配列番号4)

Mutated CMV minimal _R (SC CMV)

5'-TACCTTTGCAACGCATCGCCTCACCGGCGAGCACCCAGCGTGAGGCGTC-3'
(配列番号5)

【0033】

増殖中のC3H10T1/2細胞（間葉系幹細胞）をトリプシン処理により培養ディッシュから剥離させたのち、 2×10^5 cells/mlの濃度になるようにDMEM（高グルコース培地）で細胞懸濁液を調製し、「Lipofectamine LTX（Invitrogen）」を用い、リバーストランスフェクション法によりオリゴヌクレオチドをメーカーのプロトコルに従いトランスフェクションした。24時間後に細胞を回収、MyoDのmRNA量を定量的PCR法で測定し（インターナルコントロールとしてGAPDHを用いて補正した。以下同様。）、標的のMyoD遺伝子の転写活性化効果を検討した。

なお、本実施例で用いたC3H10T1/2細胞は、（財）ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンクから得たものであり、C3H10T1/2細胞は、10%牛血清及び抗生物質-抗真菌剤混合溶液（nacalai tesque）含有DMEM（ダルベッコ改変イーグル培地、Sigma）で、37℃、5% CO₂条件下で維持した。これら細胞の培養条件は、以下の実施例でも同様である。

次いで、下記プライマーを用いて定量的PCRにより、MyoDのmRNA量を測定した。

MyoD fw: 5'-TGACCAAAGTGAATGAGGCCCTTCG-3' (配列番号6)

10

20

30

40

50

MyoD rv: 5'-TGCAGACCTTCGATGTAGCGGAT-3' (配列番号 7)

なお、コントロールのGAPDH増幅用には、下記のプライマーを用いている。

GAPDH fw: 5'-CAGAACTACATCCCTGCATCC-3' (配列番号 8)

GAPDH rv: 5'-CCACCTTCCTGATGTCATCA-3' (配列番号 9)

【0034】

MyoD遺伝子の転写活性化の結果は、Anchor sequence、TF binding elementsの両方を標的配列かつCMV minimal promoter由来の転写因子結合領域配列にしたオリゴヌクレオチド (T&WT CMV) のみがMyoDのmRNA量を増加させた。

このことから、本発明のジーンジャックオリゴヌクレオチドによって標的遺伝子のmRNA量を増加させられることが示された (図2)。

【0035】

(1-2) Runx2 mRNAの転写活性化

上記(1-1)と同様の実験を、標的遺伝子をRunx2遺伝子に代えて設計したオリゴヌクレオチドを用いて行った。具体的には、標的遺伝子をRunx2に変え、T&SC CMV及び T&WT CMVで用いたAnchor sequenceは、Runx2の上流域の配列 (-1469~-1488) に相当する配列であり、下記の等量の合成オリゴヌクレオチドのForwardとReverseを、TE緩衝液 (トリス-EDTA緩衝液) で100 μ Mに溶解混合し、アニーリングにより調整した。

Forward Oligo ヌクレオチド (なお、C&WT CMVとしては、配列番号1に示される配列を用い、Targeted CMV minimal _R (WT CMV) は、配列番号4、Mutated CMV minimal _R (SC CMV)は、配列番号5に示される配列を用いた。)

T&SC CMV

5'-CCATCGCTCCCAACTAATGATTTTTGACGCCTCACGCTGGGTGCTCGCCGGTGAGGCGATGCGTTGCAAAGGTA-3'

(配列番号10)

T&WT CMV

5'-CCATCGCTCCCAACTAATGATTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC-3'

(配列番号11)

【0036】

これらC&WT CMV、T&SC CMV及びT&WT CMVのオリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収し、Runx2のmRNAを下記のプライマーを用いて定量的PCR法で測定した。

Runx2 fw: 5'-ACAACCACAGAACCAAG-3' (配列番号12)

Runx2 rv: 5'-TCTCGGTGGCTGGTAGTGA-3' (配列番号13)

【0037】

その結果、Runx2を標的遺伝子として設計したオリゴヌクレオチドによってRunx2のmRNA量は増加させられることが示された (図3)。このことから、オリゴヌクレオチドによる標的遺伝子の活性化機構はMyoDに限定されることが示された。

【0038】

(1-3) InsulinII又はrRNAの転写活性化

上記(1-1)と同様の実験を、標的遺伝子をPreproinsulin gene II (Insulin-II) 又はrRNA遺伝子に代えて設計したオリゴヌクレオチドを用いて行った。具体的には、Targetedは標的遺伝子をInsulin-II又はrRNA遺伝子に変えたAnchor sequenceに実施例1のWT CMVとリンカー配列を繋げたオリゴヌクレオチド、コントロール (Cont.) は実施例1のC&WT CMVに相当する。下記の等量の合成オリゴヌクレオチドのForwardとReverseを、TE緩衝液 (トリス-EDTA緩衝液) で100 μ Mに溶解混合し、アニーリングにより調整した。

Targeted (Insulin-II)

5'-AACTGGTTCATCAGGCCATCTTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC-3'

(配列番号14)

Targeted (rRNA)

5'-GGTATGACTTCCAGGCGTCGTTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTC-3'

(配列番号 1 5)

【0039】

これら Insulin-II 及び rRNA のオリゴヌクレオチドを Hepa1-6 細胞にトランスフェクションし、24 時間後に細胞を回収し、Insulin-II RNA 及び rRNA を下記のプライマーを用いて定量的 PCR 法で測定した。

Insulin-II fw: 5'-GGAGACCTTAATGGGCCCCAACAG-3' (配列番号 1 6)

Insulin-II rv: 5'-GCCCAACAGCTTTATAGTCCAAA-3' (配列番号 1 7)

rRNA fw: 5'-TTTTTGGGGAGGTGGAGAGTC-3' (配列番号 1 8)

rRNA rv: 5'-CTGATACGGGCAGACACAGAAC-3' (配列番号 1 9)

10

【0040】

その結果、ホルモンの一種である Insulin-II 又は翻訳を担うリボソームを構成する rRNA を標的遺伝子として設計したオリゴヌクレオチドによってそれぞれの mRNA 量は増加させることが示された (図 4)。このことから、オリゴヌクレオチドによる標的遺伝子の活性化機構は転写因子に限定されないことが示された。

【0041】

(実施例 2) 「アンカー部位」の長さについての検討

(2-1) MyoD の場合

本実施例では、標的遺伝子の活性化に必要な標的遺伝子上流域特異的なヌクレオチド配列 (Anchor sequence) の長さについて検討を行った。

20

実施例 1 と同様に、リンカー部及び 2 本鎖の転写因子結合部の配列は変化させずに、Anchor sequence の長さを、Targeted 及び Cont. それぞれ 30~10 塩基 (30, 25, 20, 18, 16, 14 及び 10 塩基) に調製したジーンジャックオリゴヌクレオチドを合成した。このうち、「20 塩基」に対応する Targeted 及び Cont. は実施例 1 の T&WT CMV 及び C&WT CMV に相当する。下記に 30 及び 25 塩基の場合について、用いた Forward オリゴヌクレオチドを示す。なお、「20 塩基」の Targeted 及び Cont. は配列番号 3 及び配列番号 1 に相当し、「18, 16, 14 及び 10 塩基」の場合は、配列番号 3 及び配列番号 1 の 5' 末端側から順次 2 塩基もしくは 4 塩基ずつ削除した塩基配列である。以下、特に断らない限りジーンジャックオリゴヌクレオチドの配列というとき、Forward オリゴヌクレオチドの塩基配列を指す。(なお、30 塩基、25 塩基の Cont. については、Luciferase 由来配列ではなく、Targeted の配列をランダムに並べ替えたものを用いた。)

30

実施例 1 と同様の条件で MyoD mRNA の転写活性を測定した。

【0042】

30 塩基

Cont.

5'-CTGTGGCCCGGTCTACGCCAGCTATACTCCTTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGAGGTC-3' (配列番号 2 0)

Targeted

5'-CTACACTCCTATTGGCTTGAGGCGCCCCCGTTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGAGGTC-3' (配列番号 2 1)

40

25 塩基

Cont.

5'-CTAGCCGGTCTCTCGCTGCGATCGCTTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTC-3' (配列番号 2 2)

Targeted

5'-CTCCTATTGGCTTGAGGCGCCCCCGTTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTC-3' (配列番号 2 3)

【0043】

その結果、MyoD の場合は、Anchor sequence の長さは 18 塩基以上で、MyoD の mRNA 量を増

50

加させることが明らかとなった。このことから標的遺伝子の転写活性化には18塩基以上のAnchor sequenceが好ましい可能性が示唆された(図5)。

【0044】

(2-2) Runx2の場合

実施例(2-1)の結果を、Runx2を標的遺伝子として検証するため、実施例(1-2)で用いたT&WT CMV及びC&WT CMVに相当する20塩基のAnchor sequenceのTargeted及びCont.の長さを、5'末端側から順次2塩基ずつ削除して18及び16塩基になるように調製したジーンジャックオリゴヌクレオチドを合成した。図6中、「20塩基」に対応するTargeted及びCont.は、配列番号11及び配列番号1を用いている。

これらのジーンジャックオリゴヌクレオチドを用いて、上記実施例(2-1)と同様に転写活性を測定した。

【0045】

その結果、Runx2の場合もまた、Anchor sequenceの長さは18塩基以上で、Runx2のmRNA量を増加させることが明らかとなった。

これらの結果から標的遺伝子の転写活性化には18塩基以上のAnchor sequenceが好ましい可能性が示唆された(図6)。

【0046】

(2-3) MyoDの場合の「アンカー部位」配列の検証

上記(2-1)で、MyoDの場合には、少なくとも「アンカー部位」として、Anchor sequence中の18塩基の配列が必要であることが示されたことから、「18塩基」という長さがあることが重要なのか、または、Anchor sequence中の少なくとも連続した18塩基分に相補することが重要なのかを検証することにした。最も転写活性の高かった実施例1のT&WT CMVに相当する20塩基の場合のAnchor sequenceを用いて、4塩基分の変異を導入したジーンジャックオリゴヌクレオチドを調製し(Forwardオリゴヌクレオチドを下記に示す)、上記(2-1)と同様にMyoD遺伝子転写量を測定した。なお、20塩基の場合(Targeted)は、配列番号3、Cont.は配列番号1を用いている。

【0047】

4MT(下線は配列番号3に対して変異を導入した箇所。)

#1

5'-ATTGGCTTGAGGCGCCGGGCTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTC-3'
(配列番号24)

#2

5'-ATTGGCTTCTCCCGCCCCCGTTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTC-3'
(配列番号25)

#3

5'-TAACGCTTGAGGCGCCCCCGTTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTC-3'
(配列番号26)

【0048】

その結果、変異導入したオリゴヌクレオチドではいずれもMyoDのmRNA量を増加させることはできなかった。このことから、標的遺伝子の転写活性化のためには、「アンカー部位」配列として、Anchor sequence中のある長さ以上の配列と完全に相補することが重要であると解される。そして、MyoDの場合は、少なくとも連続した18塩基分に完全に相補する配列であることが重要なことが示された(図7)。

【0049】

(実施例3) 転写活性化に有効なLinkerの長さの検討

(3-1) MyoDの場合

前記実施例1の(1-1)で構築したMyoDをターゲットとするジーンジャックオリゴヌクレオチド(T&WT CMV:配列番号3)では、リンカー部のスペーサー配列として5塩基のチミン(T)配列を用いた。転写活性化にとってLinkerが必要か、また、必要であればどの程度の長さが最適かを、0~10塩基に変化させて検討した(図8中、T5のTargetedが配

10

20

30

40

50

列番号 3 を用いた場合に相当し、T5のCont.が配列番号 1 に相当する）。

その結果、Linkerの長さは5塩基で最も高く、5塩基以上あればMyoDのmRNA量を増加させるが、反対に3塩基以下の短いLinkerでは、転写活性化効果がないことが明らかとなった。このことからLinkerは必須であり、少なくとも4塩基以上が必要であることが示唆された（図8）。

【0050】

（3-2）Runx2の場合

Linkerの有効性について、Runx2でも検討を行った。前記実施例（1-2）で構築したRunx2をターゲットとするジーンジャックオリゴヌクレオチド（T&WT CMV：配列番号 11）のLinkerの長さを0~10塩基に変化させて調製して用いた（図9中、T5のTargetedが配列番号 11を用いた場合に相当し、T5のCont.が配列番号 1 に相当する）。

その結果、上記（3-1）での結果と同様に、Linkerの長さは5又は10塩基のみがRunx2のmRNA量を増加させることが明らかとなり、Runx2を標的とした場合でも、Linkerは必須であり、少なくとも4塩基以上が必要であることが示された（図9）。

【0051】

（実施例4）「アンカー部位」として選択する上流域の最適位置についての検討

MyoDをターゲットとした場合をモデルとして、標的遺伝子に対するAnchor sequenceを決定する場合の最適な上流域における位置を検討した。実施例1の（1-1）でジーンジャックオリゴヌクレオチド（T&WT CMV：配列番号 3）を構築した際に用いたAnchor sequenceは、MyoDの転写開始点の上流96位から20塩基（~77位）の配列を使用した。本実施例では、そのさらに下流の5位、25位、上流の322位、790位、953位、23321位及び23414位からの20塩基配列1本鎖の「Anchor sequence」とした。用いたMyoDプロモーター配列はデータベース（DBTSS）から取得（NM_010866）し、その配列情報をもとに位置をカウントした。

下記にそれぞれの塩基配列を、-5、-25、-322、-790、-953、-23321及び-23414として示す。なお、-96は配列番号 3 であり、Cont.は、配列番号 1 である。

【0052】

-5

5'-AAGCTAGGGGCCAGGACGCCTTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC-3'
（配列番号 27）

-25

5'-AGCCCAGGGCGCCTGGCGCGTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC-3'
（配列番号 28）

-322

5'-GGTCAGCTCCGAAGTGAGCATTCTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC-3'
（配列番号 29）

-790

5'-CGGTAGAAACAGATCAACCTTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC-3'
（配列番号 30）

-953

5'-GGGAAGAGGTCATCTCAACATTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC-3'
（配列番号 31）

-23321

5'-CCTGGAGTCCGGCGCTTCACTTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC-3'
（配列番号 32）

-23414

5'-AGCCGCCTCCAAACGTGGCGTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC-3'
（配列番号 33）

【0053】

その結果、ジーンジャックオリゴヌクレオチドの「Anchor sequence」の配列として、

標的 (MyoD) 遺伝子上流-96から-790位の位置までであれば、MyoDのmRNAをジーンジャックオリゴヌクレオチドにより上昇させられることが明らかとなった。このことから、標的遺伝子上流域においてAnchor sequence配列として最適な位置が存在することが示唆された (図10)。

【0054】

(実施例5) クロマチン免疫沈降法を用いた検証

オリゴヌクレオチドが標的とした遺伝子プロモーター上に確かにリクルートされているのかを検討するために、クロマチン免疫沈降法を用いて検討を行った。

具体的には、前記実施例1の(1-1)で構築したジーンジャックオリゴヌクレオチド (T&WT CMV: 配列番号3) において、「転写因子結合領域」のCMV minimal promoter配列末端をビオチン修飾した。Cont.は配列番号1であり、それぞれのReverse オリゴヌクレオチド (配列番号4) に対しても5'末端側をビオチン修飾して用いた。

上記ビオチン修飾したオリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収、ストレプトアビジンビーズを用いてクロマチン免疫沈降実験を行った。クロマチン免疫沈降法は、Murayamaらの方法 (Murayama et al., (2008) Cell 133, 627-639) に準じ、一部改変を加えて実施した。

アビジン含有試薬であるTetraLink (商標) Tetrameric. Avidin Resin (プロメガ) を用いてビオチン化修飾されたオリゴヌクレオチド複合体を免疫沈降させた。

次いで、沈降産物を定量的PCRによって検出した。ジーンジャックオリゴヌクレオチドのリクルートを検出可能であるMyoD遺伝子上流-375から-545領域を標的としたプライマー及び、負の対照群として標的配列から免疫沈降に用いたDNA断片長 (約0.5kb) 以上に離れている-8539から-8779領域を標的としたプライマーを用いた。

【0055】

本実施例の定量的PCRで用いたプライマー配列は以下の通りである。

-375 ~ -545 fw:

5'-CGCCCCCAGCCTCCCTTTCCAG-3' (配列番号34)

-375 ~ -545 rv:

5'-TGTCAGAGGTGTGGTGAAGAAA-3' (配列番号35)

-8539 ~ -8779 fw:

5'-GTCAGCGCTCTACATAGGGT-3' (配列番号36)

-8539 ~ -8779 rv:

5'-TAGCTTCCCTCATGCTCTG-3' (配列番号37)

【0056】

その結果、MyoD遺伝子上流域を「Anchor sequence」の塩基配列とした「Targeted」として示されるジーンジャックオリゴヌクレオチド (T&WT CMV) の場合にのみ、MyoDの転写開始点近傍の-375から-545領域を標的としたプライマーで有意な沈降産物に由来する増幅産物の検出が可能であった。一方、当該沈降産物をTargetedの「Anchor sequence」としたMyoD遺伝子の-96~-77位の位置から8000塩基以上も上流の領域を標的としたプライマーを用いて検出した場合、Cont.に対して有意な差は見られなかった。このことから、ジーンジャックオリゴヌクレオチドは標的遺伝子上流域に設計した「Anchor sequence」に対応する領域に特異的にリクルートされていることが示唆された (図11)。

【0057】

(実施例6) 「転写因子結合部位」配列の検討-1

(6-1) MyoDの場合

前記各実施例で用いたジーンジャックオリゴヌクレオチドの2本鎖の「転写因子結合部位」には、CMV minimal promoter由来の転写因子結合配列が含まれている。当該「転写因子結合部位」に対して、実際に転写因子が結合する事でMyoDの転写量が増加していることを検証するために、CMV minimal promoter由来の転写因子結合配列 (WT CMV) を含むオリゴヌクレオチドを用いた場合と、当該配列に変異を導入した配列 (MT CMV) を含むオリゴヌクレオチド (Targeted) を用いた場合でのMyoDのmRNA転写量の増加効果を検討した。

5'-TGAAGTTCCTCCGCGCCGTTGTTTTGGTGTGGGGGGGGCGGGGGGTGTGGGGGGGGCGGGGGGTGTGGGGGGGGCGG
GG-3' (配列番号 4 3)

Targeted

5'-ATTGGCTTGAGGCGCCCCCGTTTTGGTGTGGGGGGGGCGGGGGGTGTGGGGGGGGCGGGGGGTGTGGGGGGGGCGG
GG-3' (配列番号 4 4)

Reverse Oligoヌクレオチド

Targeted AP1 R

5'-TGAGTCATGAGTCATGAGTCATGAGTCATGAGTCATGAGTCATGAGTCATGAGTCA-3' (配列番号 4 5)

Targeted GC/GT box R

5'-CCCCGCCCCCCCCACACCCCCCGCCCCCCCCACACCCCCCGCCCCCCCCACACC-3' (配列番号 4 6)

【0063】

その結果、AP-1結合配列又はSp/KLFファミリー結合配列を転写活性化配列として用いても、オリゴヌクレオチドが標的遺伝子のmRNA量を増加させることが明らかとなった(図14)。

以上のことから、オリゴヌクレオチドにおけるTF binding elementsはCMV minimal promoter由来に限定されず、転写因子結合配列であれば、標的遺伝子のmRNAの増加を誘導することが可能であることが示された。

【0064】

(7-2) Runx2の場合

上記(7-1)と同様の実験を、Runx2を標的遺伝子として検討したところ、図14のMyoDの場合の結果と同様にAP-1配列をつなげたオリゴヌクレオチドによりRunx2の転写は活性化された。以上の結果から、MyoDに限定されず、オリゴヌクレオチドにおけるTF binding elementsはCMV minimal promoter由来以外でも、転写因子結合配列であれば標的遺伝子のmRNAの増加を誘導することが可能であることが示された(図15)。

【0065】

(実施例8) ジーンジャックオリゴヌクレオチドの転写活性の持続時間

(8-1) MyoDの場合

本実施例では、本発明のジーンジャックオリゴヌクレオチドの転写活性効果がどれだけの期間持続するものなのかを検討した。

前記実施例1の(1-1)で構築したMyoDプロモーターをターゲットとしたジーンジャックオリゴヌクレオチド(図16中Targetedは配列番号3、Cont.は配列番号1)をC3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、24時間後、72時間後、及び120時間後に回収し、MyoDのmRNAを定量的PCR法で測定した。

その結果、本発明のオリゴヌクレオチドによる転写活性化能は24時間後が最も高く、その後減少してゆき、120時間後には完全に消失した。この結果は、オリゴヌクレオチドによる効果は一過性のものであることを示している(図16)。

【0066】

(8-2) Runx2の場合

上記(8-1)と同様の実験を、Runx2を標的遺伝子として検討した。用いたジーンジャックオリゴヌクレオチドは配列番号11(Cont.は配列番号1)である。

その結果、図16のMyoDの場合と同様の結果が得られた。このことはMyoDを標的としたオリゴヌクレオチドに限らず、本発明のジーンジャックオリゴヌクレオチドによる転写活性化能は一過性のものであることを示している(図17)。

【0067】

(8-3) BNA(LNA)によるMyoDの転写活性化

上記実施例1の(1-1)と同様の実験を、DNAから架橋化核酸(BNA)である2',4'-BNA(LNA(ジーンデザイン社))に置き換え、MyoDを標的として設計したオリゴヌクレオチドを用いて行った。具体的には、Targetedは実施例1のT&WT CMVの3か所、コントロール(Cont.)は実施例1のC&WT CMVの3か所を2',4'-BNA(LNA)に置き換えたオリゴヌクレ

10

20

30

40

50

オチドを用いた。これらのオリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収し、抽出したMyoD mRNA量を定量的PCR法で測定した。

Control

5'-TGAAGTTCCTCCGCGCCGTTGt(L)Tt(L)Tt(L)GACGCCTCACGCTGGGTGCTCGCCGGTGAGGCGATGCGTTGCA
AAGGTA-3' (配列番号 47)

Targeted

5'-ATTGGCTTGAGGCGCCCCCGt(L)Tt(L)Tt(L)GACGCCTCACGCTGGGTGCTCGCCGGTGAGGCGATGCGTTGCA
AAGGTA-3' (配列番号 48)

n(L) = LNA

【0068】

その結果、2',4'-BNA (LNA) オリゴヌクレオチドによってMyoD mRNA量は増加させられることが示された(図18)。このことから、オリゴヌクレオチドによる標的遺伝子の活性化は人工核酸により誘導可能なことが示唆された。

【0069】

(実施例9) 間葉系幹細胞の選択的な分化

(9-1) 分化マーカー発現の観察

前記各実施例の結果から、本発明のジーンジャックオリゴヌクレオチドにより、間葉系幹細胞(C3H10T1/2株)中での転写活性の増加効果が実証されたが、その際に標的として選択されたMyoD及びRunx2は、間葉系幹細胞の分化の方向性を決定するマスターレギュレーターとなる転写因子である(図19)。

本実施例では、ジーンジャックオリゴヌクレオチドにより標的のMyoD又はRunx2を発現させることで、実際に間葉系幹細胞(C3H10T1/2株)を筋細胞又は骨細胞にそれぞれ選択的に分化できることを実証する。

そのために、まず、それぞれの遺伝子を標的としたオリゴヌクレオチドをC3H10T1/2細胞にトランスフェクションし、24時間後にMyoD、Runx2のmRNA量を定量的PCR法で測定した(図20、左列)。なお、図中、Cont.は配列番号1、TargetedのMyoDは配列番号3、Runx2は配列番号11を用いている。

その結果、それぞれの遺伝子を標的としたオリゴヌクレオチドはその標的とした遺伝子のみを選択的に活性化させることが示された。

次いで、C3H10T1/2細胞にオリゴヌクレオチドをトランスフェクションし、24時間後に該細胞の培養培地をそれぞれの分化培地に変え、分化マーカー遺伝子の発現を観察した。具体的には、MyoD発現増大細胞では、選択的に筋細胞分化マーカーである「Myogenin」及び「MHC」遺伝子を、またRunx2発現増大細胞では、選択的に骨芽細胞分化マーカーである「ALP」及び「OC」遺伝子の発現誘導を観察した(図20、中列、右列)。ここで、「MHC」遺伝子は、筋細胞特有の「ミオシン重鎖」遺伝子であり、「Myogenin」遺伝子は、筋管細胞の指標となる遺伝子である。

その結果、それぞれの遺伝子を標的としたオリゴヌクレオチドは、その標的とした遺伝子が関係する幹細胞の分化を特異的に誘導することが明らかとなった。

なお、これら分化マーカー遺伝子の発現誘導は、下記のプライマーセットを用いて定量的PCR法で測定した。

Myogenin fw: 5'-CAACCAGGAGGAGCGCGATCTCCG-3' (配列番号 49)

Myogenin rv: 5'-AGGCGGCTGTGGGAGTTGCATTCACT-3' (配列番号 50)

MHC fw: 5'-CATCGTCCAGGAAGCCC-3' (配列番号 51)

MHC rv: 5'-TTCGCTTATGATTTTGGTGTGAACC-3' (配列番号 52)

ALP fw: 5'-ATCTTTGGTCTGGCTCCCATG-3' (配列番号 53)

ALP rv: 5'-TTTCCCGTTACCGTCCAC-3' (配列番号 54)

OC fw: 5'-GACAAGTCCCACACAGCAAC-3' (配列番号 55)

OC rv: 5'-GGACATGAAGGCTTTGTCAG-3' (配列番号 56)

【0070】

(9-2) 筋肉細胞への分化

10

20

30

40

50

本実施例では、オリゴヌクレオチドが標的遺伝子の活性化により、細胞の分化や形態変化等の変化を引き起こすことができるのかどうかの検討を行った。

MyoDを標的としたオリゴヌクレオチド (T&W CMV: 配列番号 3) をC3H10T1/2細胞にトランスフェクション後、24時間後にセミコンフルエント状態の細胞を増殖培地 (DMEM、10%牛血清及び抗生物質-抗真菌剤混合溶液 (nacalai tesque) 含有) から分化培地 (DMEM、2%ウマ血清含有) に交換し、24時間ごとに培地交換を行った。分化誘導から5日後に免疫染色を行い、核 (DNA) とミオシン重鎖 (MHC) の発現を免疫染色により観察した (図 2 1)。あわせて、比較のためにControl (配列番号 1) 及びRunx2 (配列番号 1 1) のオリゴヌクレオチドを用いて同様の実験を行ったが、MyoDを標的としたオリゴヌクレオチドを用いた場合のみ、ミオシン重鎖 (MHC) を発現誘導し、筋細胞に特徴的な多核化した細胞が観察され、筋細胞に分化誘導が起こることが確認できた。

10

【0071】

(9-3) 骨細胞への分化

本実施例では、オリゴヌクレオチドにより骨分化が誘導されるかどうかを、実施例 (9-2) と同じオリゴヌクレオチド (配列番号 1, 3, 1 1) を用いて検討した。

各オリゴヌクレオチドC3H10T1/2細胞にトランスフェクション後、24時間後に、細胞の培養液を0.5 μ Mのデキサメタゾン、25 μ g/mlのアスコルビン酸、及び2.5mMのグリセロールホスフェートを添加した10%牛血清及び抗生物質-抗真菌剤混合溶液 (nacalai tesque) 含有DMEMに交換した。約30日後、骨化の指標であるカルシウム沈着をアリザリンレッドS (Sigma) 染色により確認したところ、Runx2を標的としたオリゴヌクレオチドを細胞に導入した場合にのみ、Alizarin redによる染色を観察することができた (図 2 2)。このことから、Runx2を標的としたオリゴヌクレオチドが選択的に骨分化を誘導することが明らかとなった。

20

【0072】

(実施例 10) iPS細胞誘導

(10-1)

iPS細胞誘導転写因子を標的としたオリゴヌクレオチド (Targeted Oct3/4, Sox2, KLF4 及びc-Myc) をMEF細胞にトランスフェクションした。その際に用いたオリゴヌクレオチドの塩基配列を下記に示す。なお、Cont.は、実施例 1 と同様に、配列番号 1 を用いている。また、マウス胚性線維芽細胞 (MEF) は、実施例 1 などを用いたC3H10T1/2細胞の場合と同様、10%牛血清及び抗生物質-抗真菌剤混合溶液 (nacalai tesque) 含有DMEM (ダルベッコ改変イーグル培地、Sigma) で、37℃、5%CO₂条件下で維持した後に用いた (以下の実験でも同様である。)

30

トランスフェクションの24時間後に細胞を回収し、Oct3/4, Sox2, KLF4及びc-MycのmRNA量を定量的PCR法で測定した。その結果、それぞれのオリゴヌクレオチドはその標的とした遺伝子の転写を活性化させることが示された (図 2 3)。

Targeted Oct3/4

5'-CGAAGCAGGGTATCTCCATCTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGGGAGGTC-3'

(配列番号 5 7)

Targeted Sox2

5'-TTGTTTGACTCCGTGTAGCGTTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGGGAGGTC-3'

(配列番号 5 8)

Targeted KLF4

5'-GCGTACCGGACGAGGGGTAGTTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGGGAGGTC-3'

(配列番号 5 9)

Targeted c-Myc

5'-CGCCCCGGGACGTGCGTGACGTTTTTCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGGGAGGTC-3'

(配列番号 6 0)

40

【0073】

Oct3/4, Sox2, KLF4及びc-MycのmRNA量を定量的PCR法で測定する際には、下記のプライ

50

マーを用いた。

Oct3/4 fw: 5'-TTCATGTCCTGGGACTCCTC-3' (配列番号 6 1)
 Oct3/4 rv: 5'-CACGAGTGGAAAGCAACTCA-3' (配列番号 6 2)
 Sox2 fw: 5'-GGCAGCTACAGCTAGATGCAGGAGC-3' (配列番号 6 3)
 Sox2 rv: 5'-CTGCTCATGCAGTTGTAAGTCCAGG-3' (配列番号 6 4)
 KLF4 fw: 5'-TCACACAGGCGAGAAACCTT-3' (配列番号 6 5)
 KLF4 rv: 5'-GAGCGGGCGAATTTCCA-3' (配列番号 6 6)
 c-Myc fw: 5'-TGACCTAACTCGAGGAGGAGCTG-3' (配列番号 6 7)
 c-Myc rv: 5'-AAGTTTGAGGCAGTTAAAATTATGGCTGAAGC-3' (配列番号 6 8)

【0074】

10

(10-2)

(10-1) で用いた 4 種類のオリゴヌクレオチド (Targeted Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc; Targeted OSKM) を同一の MEF 細胞内にトランスフェクションし、その 24 時間後に細胞を回収して、Oct3/4, Sox2, KLF4 及び c-Myc のそれぞれの mRNA 量を定量的 PCR 法で測定した。その結果、各オリゴヌクレオチドにより、各々が標的とする 4 種類の標的遺伝子の転写を同時に活性化させられることが示された (図 2 4)。

【0075】

(10-3)

(10-1) で用いた 4 種類のオリゴヌクレオチド (Targeted Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc; Targeted OSKM) を MEF 細胞にトランスフェクションし、3 日後に未分化の指標であるアルカリフォスファターゼ (AP) の染色量を定量化し (図 2 5 左)、タンパク質の蓄積量を AP 染色により検討した (図 2 5 右)。その結果、Oct3/4, Sox2, KLF4 及び c-Myc を標的としたオリゴヌクレオチドをトランスフェクションした細胞では、AP タンパク質の高発現が見られた (図 2 5)。

20

以上の結果から、オリゴヌクレオチドにより、MEF 細胞において 4 種類の転写因子 (Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc) を同時に活性化させることにより、MEF 細胞を脱分化させることに成功し、本発明のオリゴヌクレオチドが iPS 細胞の樹立にも有効であることが示唆された。

【産業上の利用可能性】

【0076】

30

本発明の「ジーンジャックオリゴヌクレオチド法」は、癌化の危険性や細胞毒性などの副作用の危険性がなく望みの標的遺伝子発現を誘導可能な技術であるので、各種の遺伝子発現低下などにより引き起こされる疾患などの遺伝子治療ツールとして従来のウイルスベクターや非ウイルスベクターなどの遺伝子発現を制御するシステムに代替して用いることができる。また、間葉系幹細胞をはじめ各種幹細胞を特定の方向への分化能を有する転写因子を発現誘導させることで、各種幹細胞を特定の臓器細胞へと分化誘導でき、反対に、患者の体細胞における初期化に関わる転写因子の発現誘導に適用することで、iPS 細胞を樹立することができるから、癌化の心配のない臓器移植を可能にする。このように、今後の遺伝子治療分野、及び再生医療分野での大きな貢献が期待される。

【配列表フリーテキスト】

40

【0077】

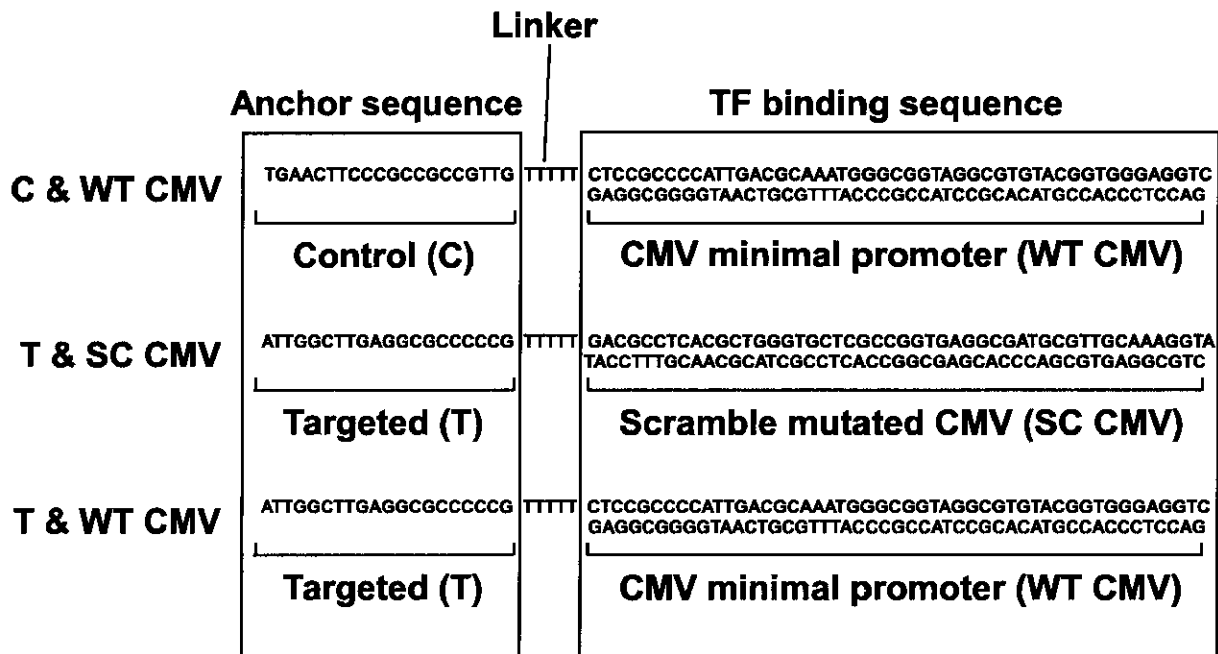
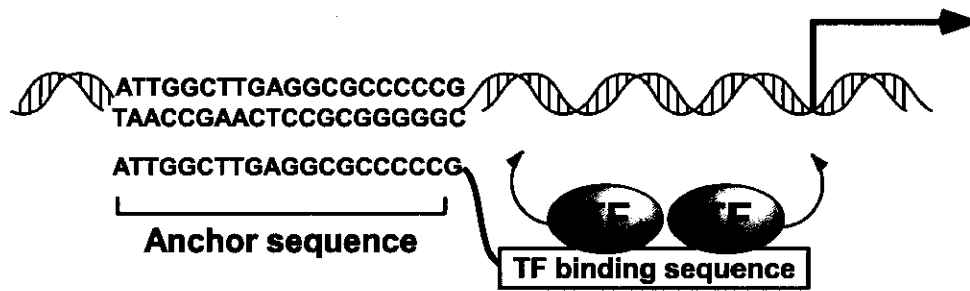
配列番号 1 : C&WT CMV
 配列番号 2 : T&SC CMV
 配列番号 3 : T&WT CMV
 配列番号 4 : Targeted CMV minimal _R (WT CMV)
 配列番号 5 : Mutated CMV minimal _R (SC CMV)
 配列番号 6 : MyoD fw
 配列番号 7 : MyoD rv
 配列番号 8 : GAPDH fw
 配列番号 9 : GAPDH rv

50

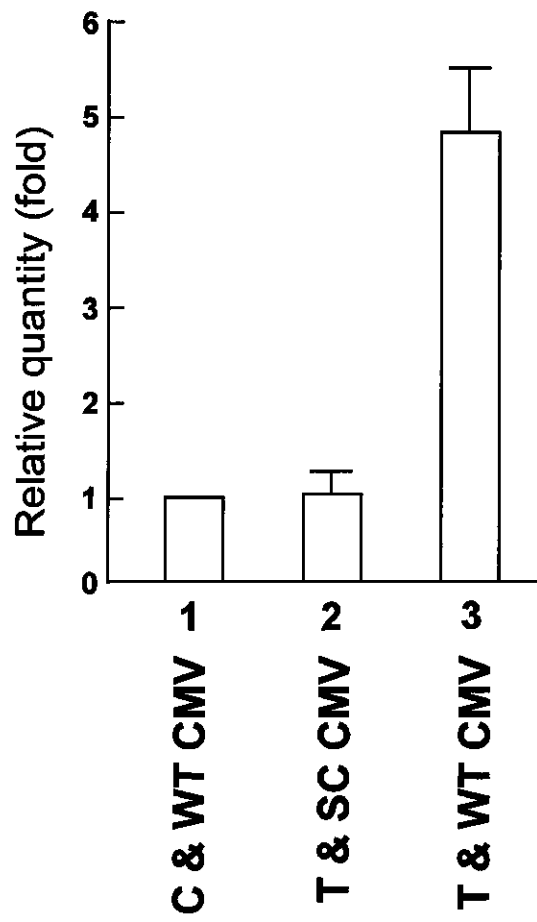
配列番号 1 0 : T&SC CMV	
配列番号 1 1 : T&WT CMV	
配列番号 1 2 : Runx2 fw	
配列番号 1 3 : Runx2 rv	
配列番号 1 4 : Targeted (Insulin-II)	
配列番号 1 5 : Targeted (rRNA)	
配列番号 1 6 : Insulin-II fw	
配列番号 1 7 : Insulin-II rv	
配列番号 1 8 : rRNA fw	
配列番号 1 9 : rRNA rv	10
配列番号 2 0 : MyoD 30b-Cont.	
配列番号 2 1 : MyoD 30b-Targeted	
配列番号 2 2 : MyoD 25b-Cont.	
配列番号 2 3 : MyoD 25b-Targeted	
配列番号 2 4 : 4MT#1	
配列番号 2 5 : 4MT#2	
配列番号 2 6 : 4MT#3	
配列番号 2 7 : MyoD (-5)	
配列番号 2 8 : MyoD (-25)	
配列番号 2 9 : MyoD (-322)	20
配列番号 3 0 : MyoD (-790)	
配列番号 3 1 : MyoD (-953)	
配列番号 3 2 : MyoD (-23321)	
配列番号 3 3 : MyoD (-23414)	
配列番号 3 4 : -375 to -545 fw	
配列番号 3 5 : -375 to -545 rv	
配列番号 3 6 : -8539 to -8779 fw	
配列番号 3 7 : -8539 to -8779 rv	
配列番号 3 8 : MT CMV Cont. (MyoD)	
配列番号 3 9 : MT CMV Targeted (MyoD)	30
配列番号 4 0 : MT CMV Targeted (Runx2)	
配列番号 4 1 : AP1 Control (MyoD)	
配列番号 4 2 : AP1 Targeted (MyoD)	
配列番号 4 3 : GC/GT box Control (MyoD)	
配列番号 4 4 : GC/GT box Targeted (MyoD)	
配列番号 4 5 : Targeted AP1 R	
配列番号 4 6 : Targeted GC/GT box R	
配列番号 4 7 : LNA Control	
配列番号 4 8 : LNA Targeted	
配列番号 4 9 : Myogenin fw	40
配列番号 5 0 : Myogenin rv	
配列番号 5 1 : MHC fw	
配列番号 5 2 : MHC rv	
配列番号 5 3 : ALP fw	
配列番号 5 4 : ALP rv	
配列番号 5 5 : OC fw	
配列番号 5 6 : OC rv	
配列番号 5 7 : Targeted Oct3/4	
配列番号 5 8 : Targeted Sox2	
配列番号 5 9 : Targeted KLF4	50

配列番号 6 0 : Targeted c-Myc
配列番号 6 1 : Oct3/4 fw
配列番号 6 2 : Oct3/4 rv
配列番号 6 3 : Sox2 fw
配列番号 6 4 : Sox2 rv
配列番号 6 5 : KLF4 fw
配列番号 6 6 : KLF4 rv
配列番号 6 7 : c-Myc fw
配列番号 6 8 : c-Myc rv

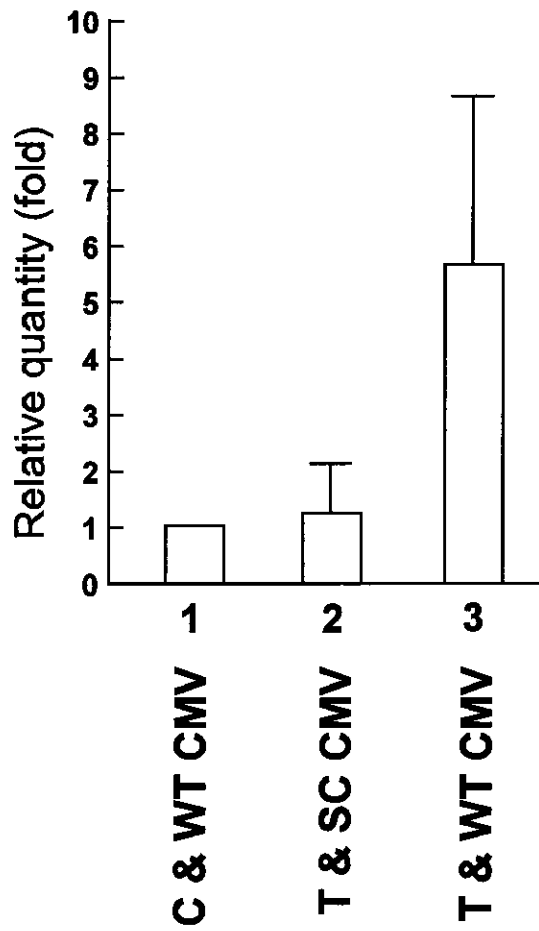
【 図 1 】



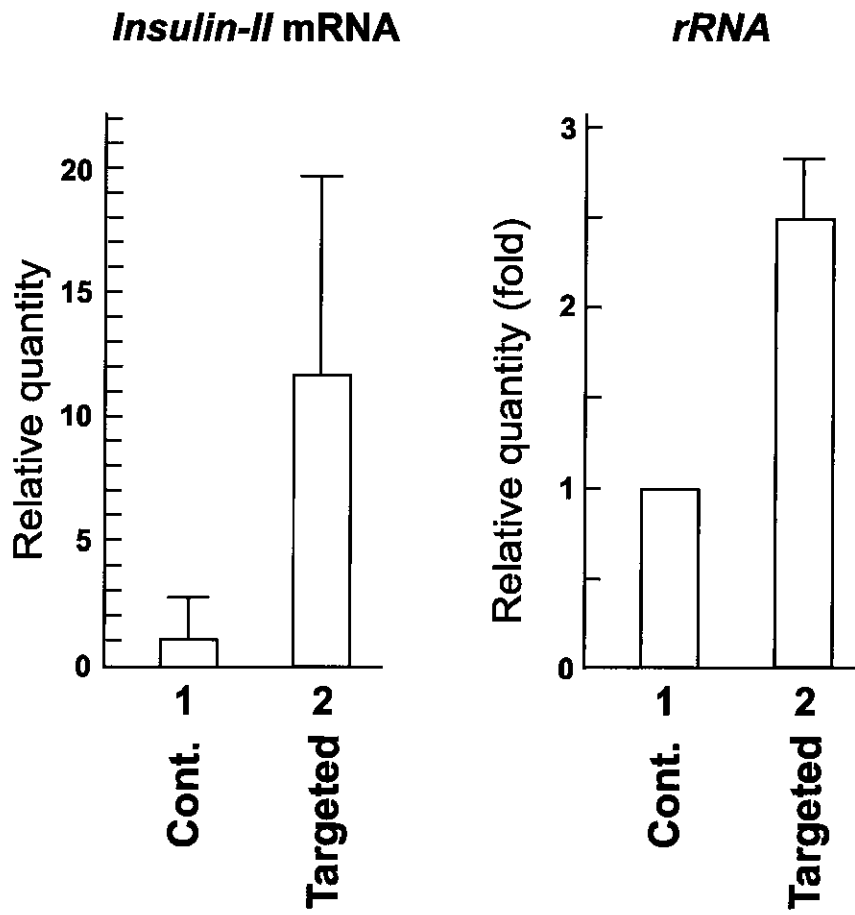
【図 2】



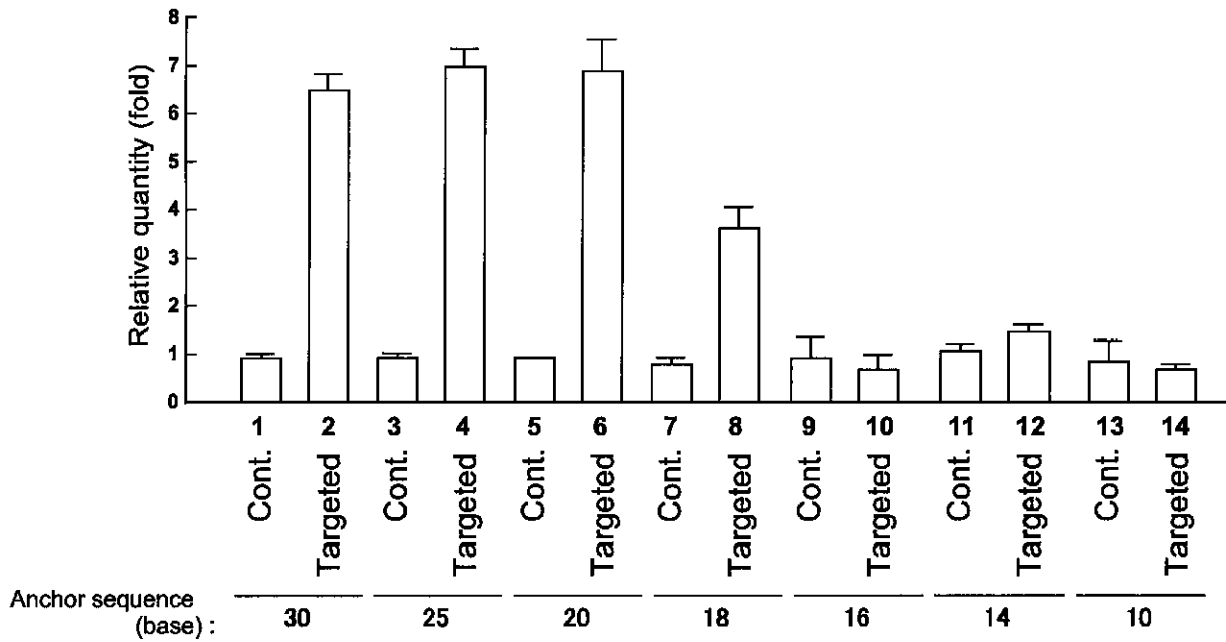
【図 3】



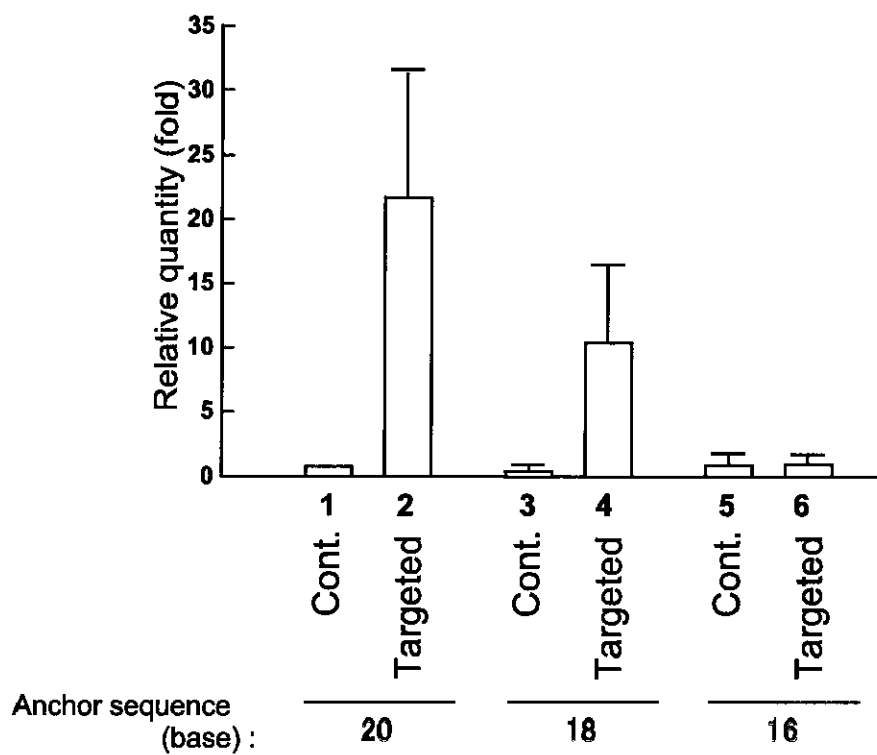
【 図 4 】



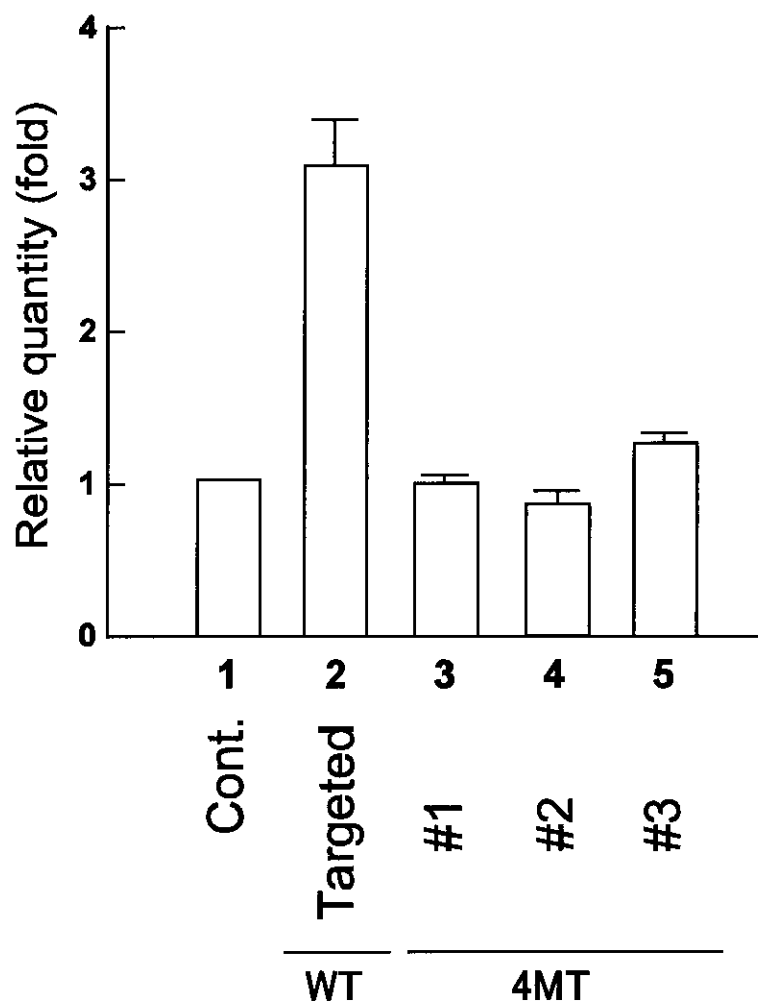
【 図 5 】



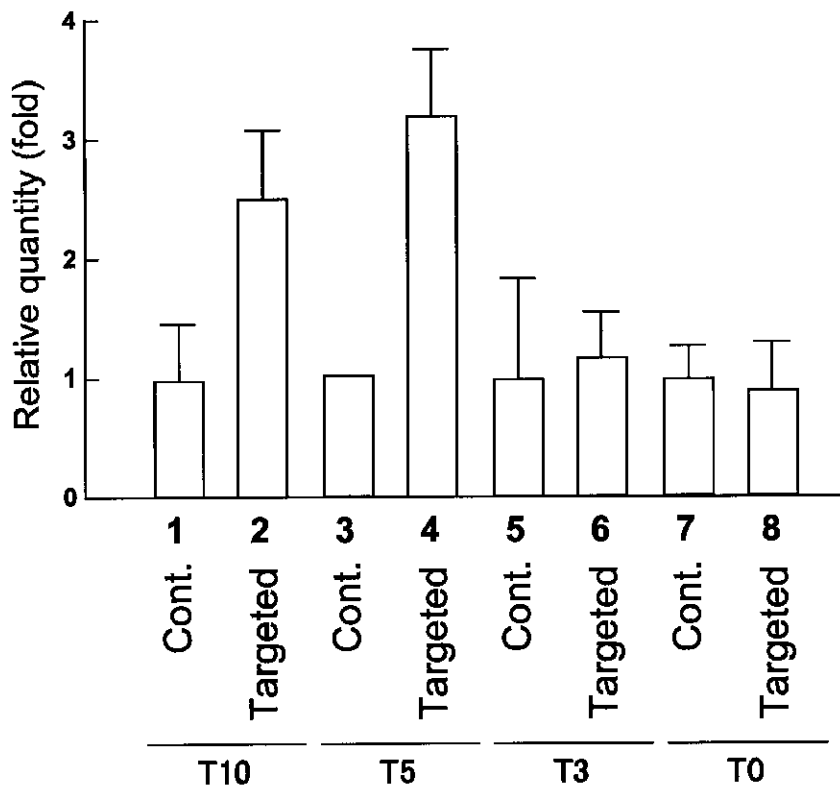
【 図 6 】



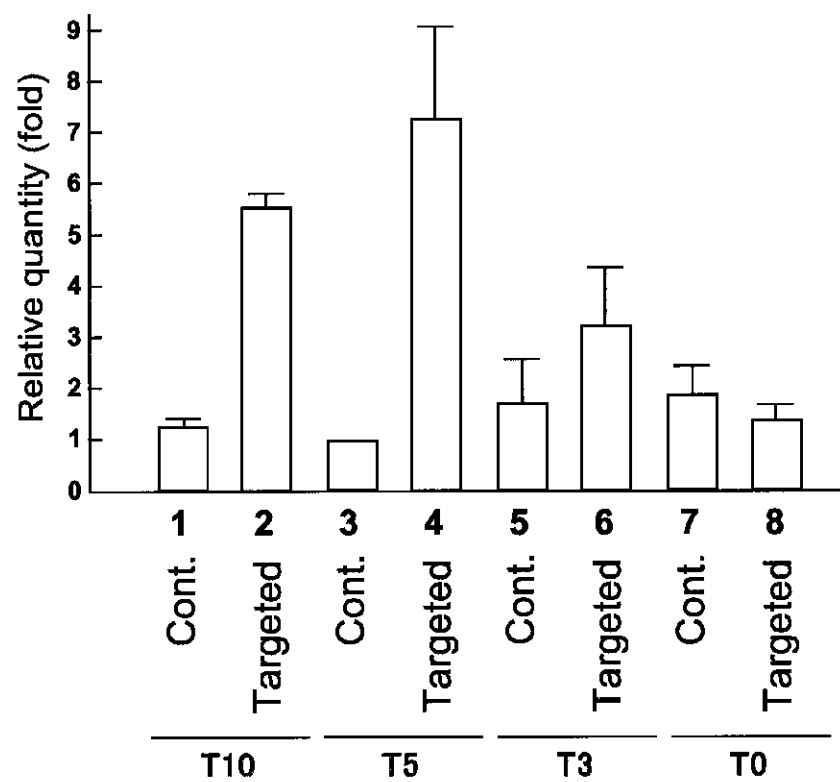
【 図 7 】



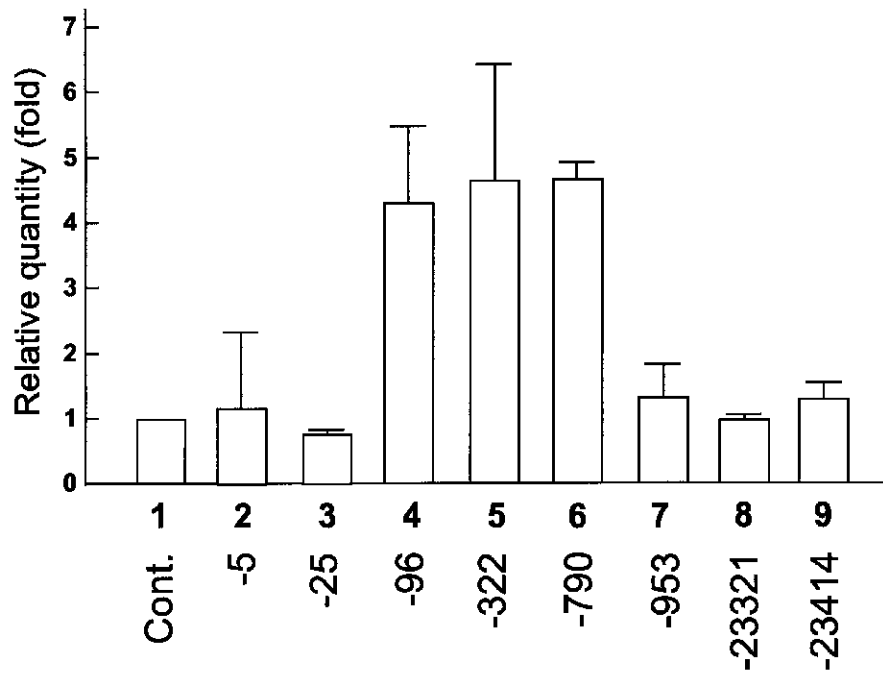
【図 8】



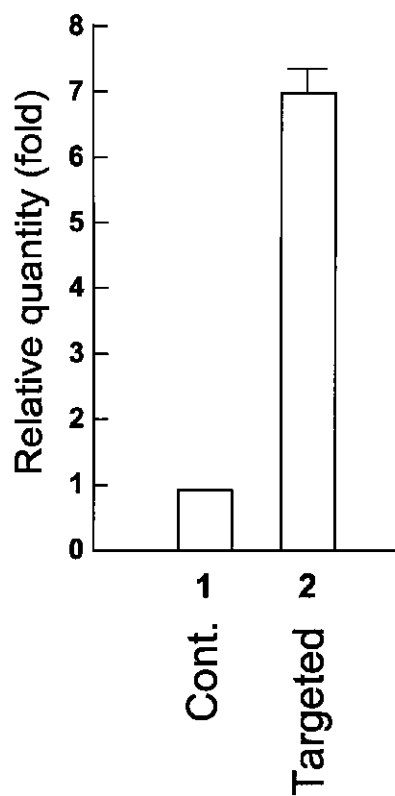
【図 9】



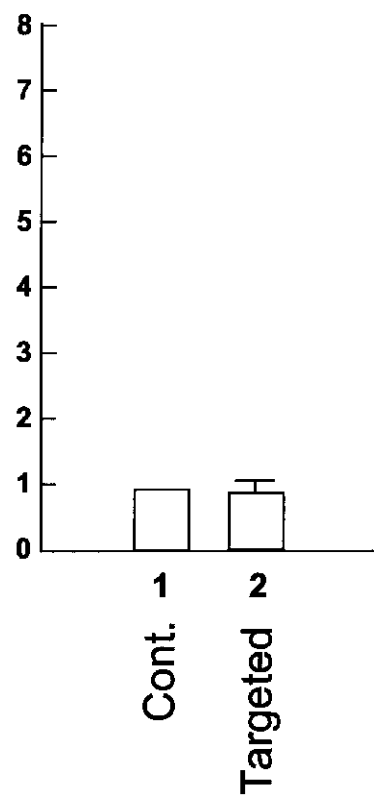
【図 10】



【図 11】

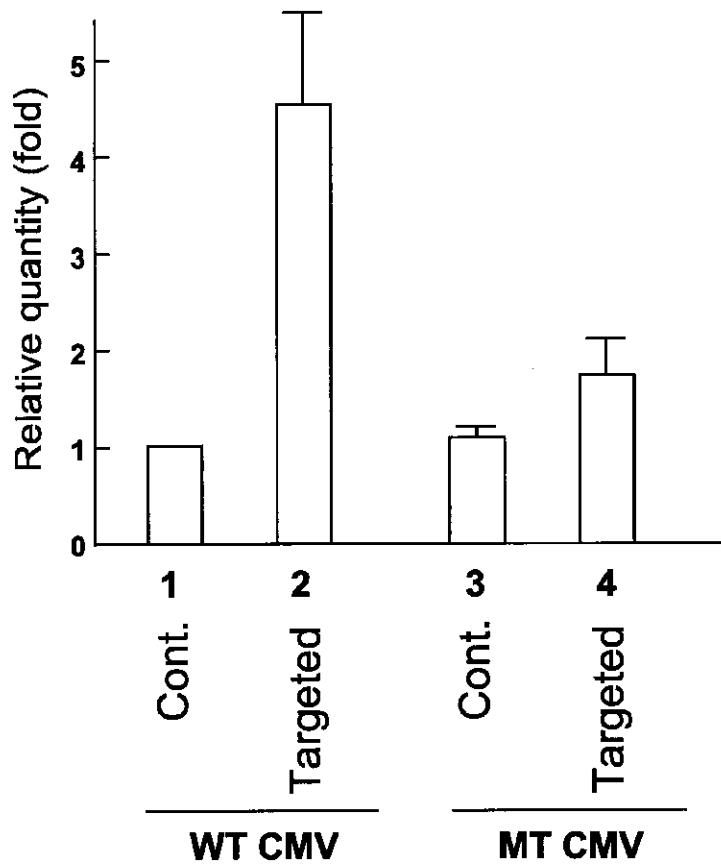


-375 ~ -545

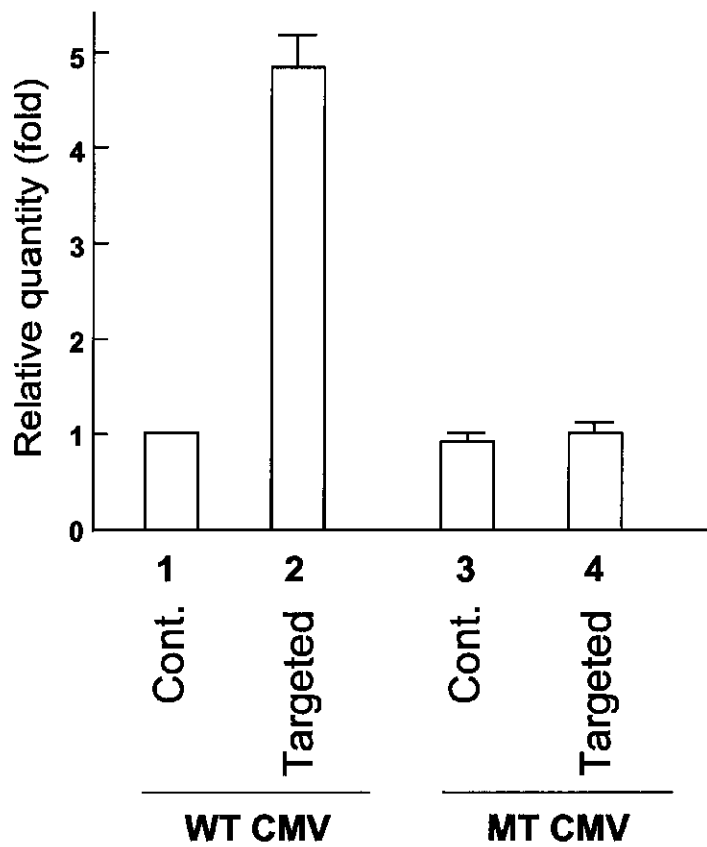


-8539 ~ -8779

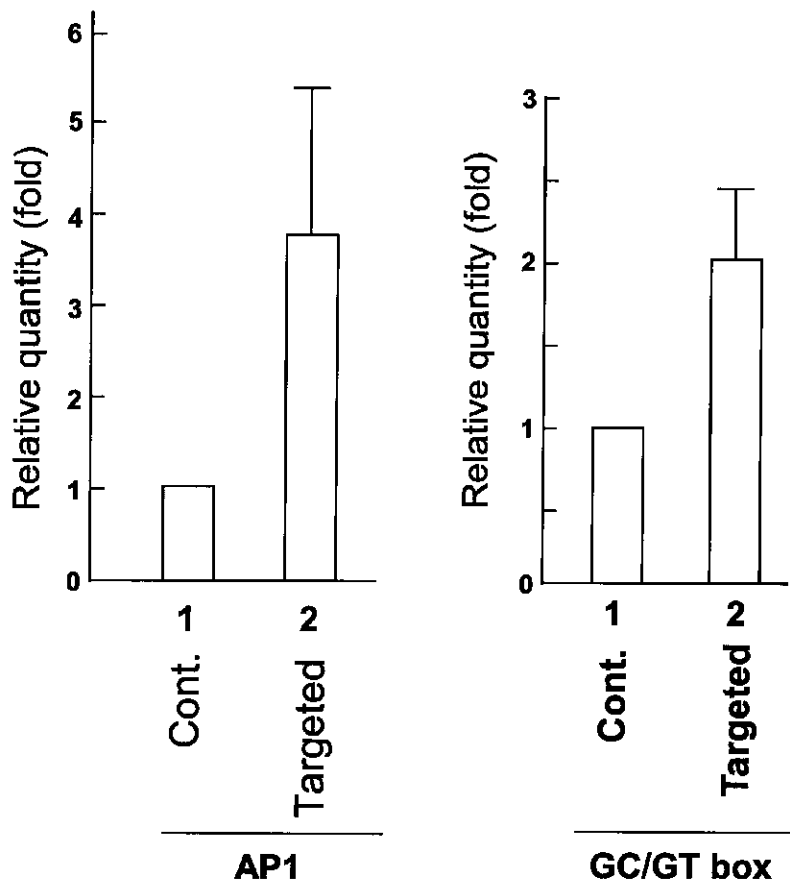
【図 1 2】



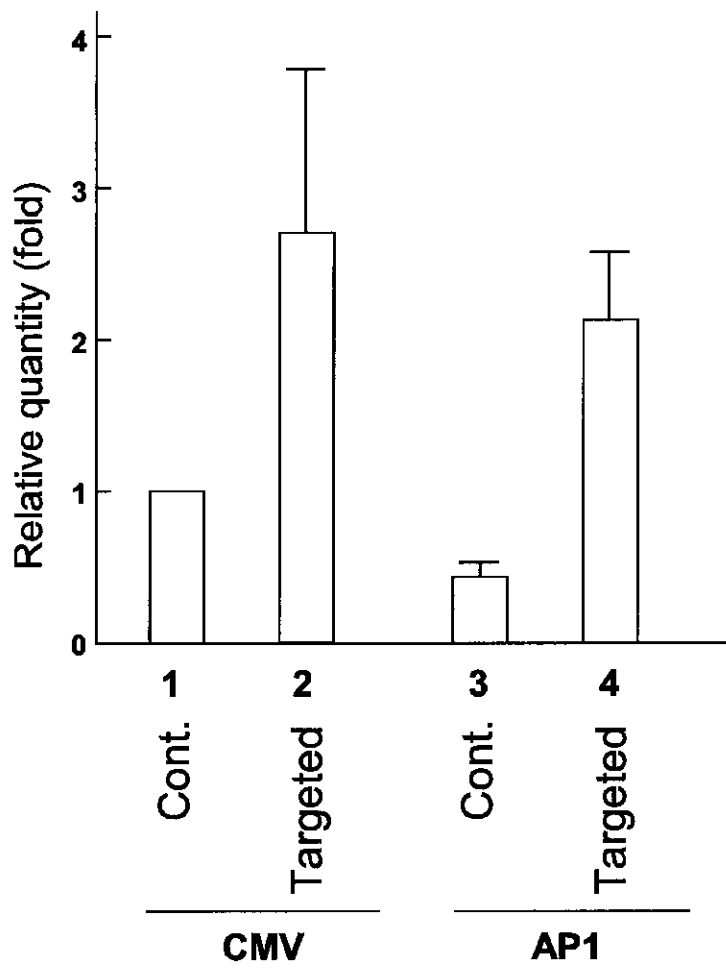
【図 1 3】



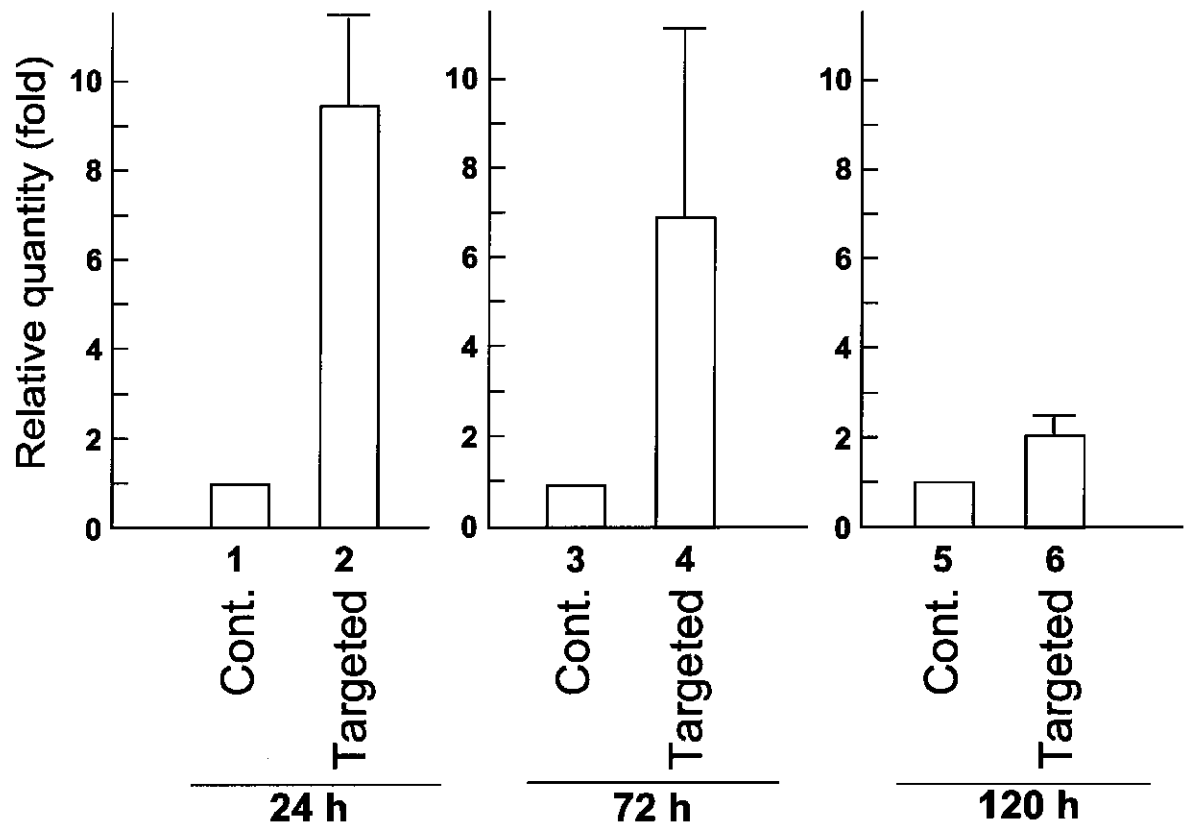
【図 14】



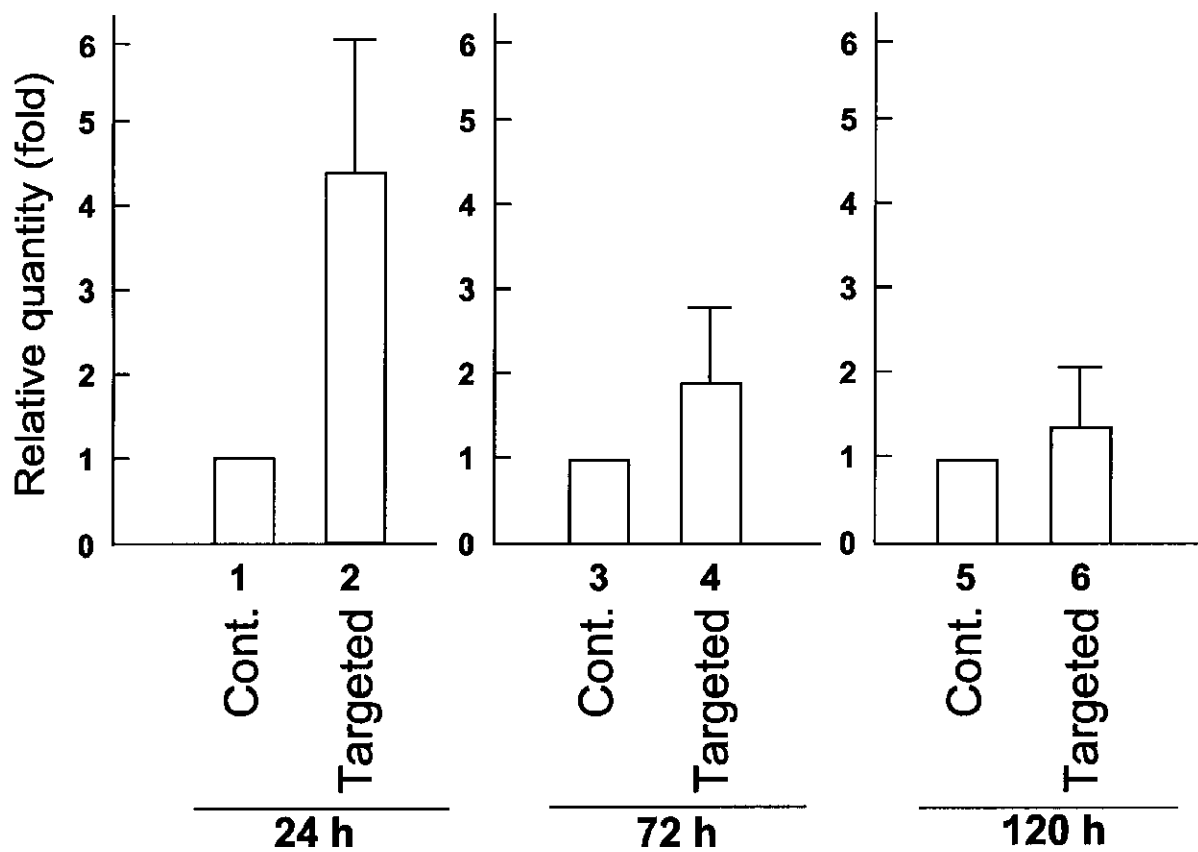
【図 15】



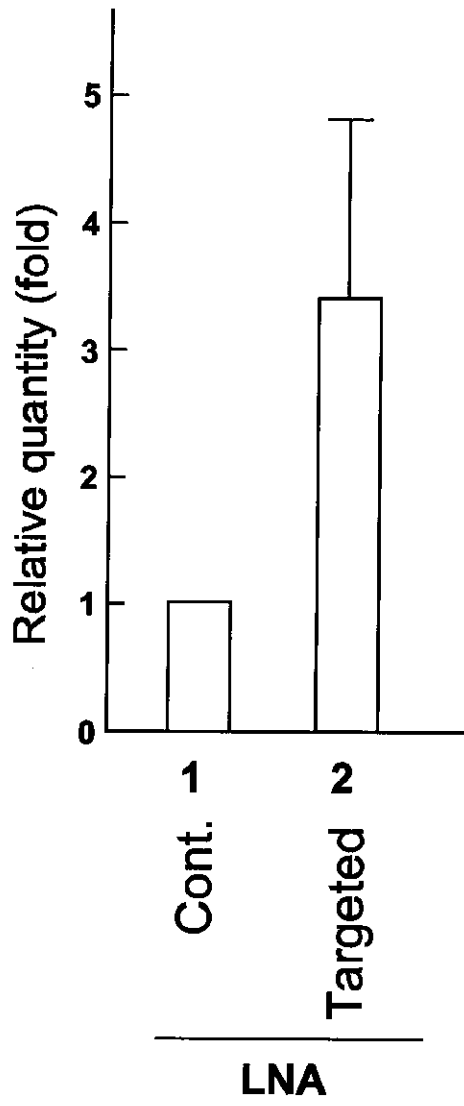
【図 16】



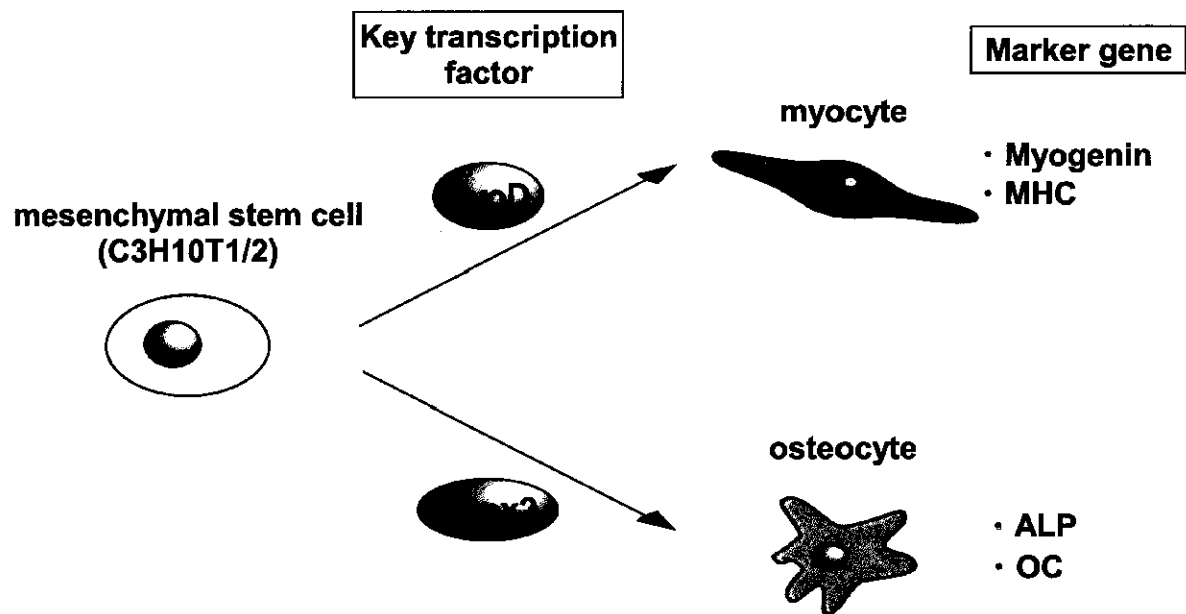
【図 17】



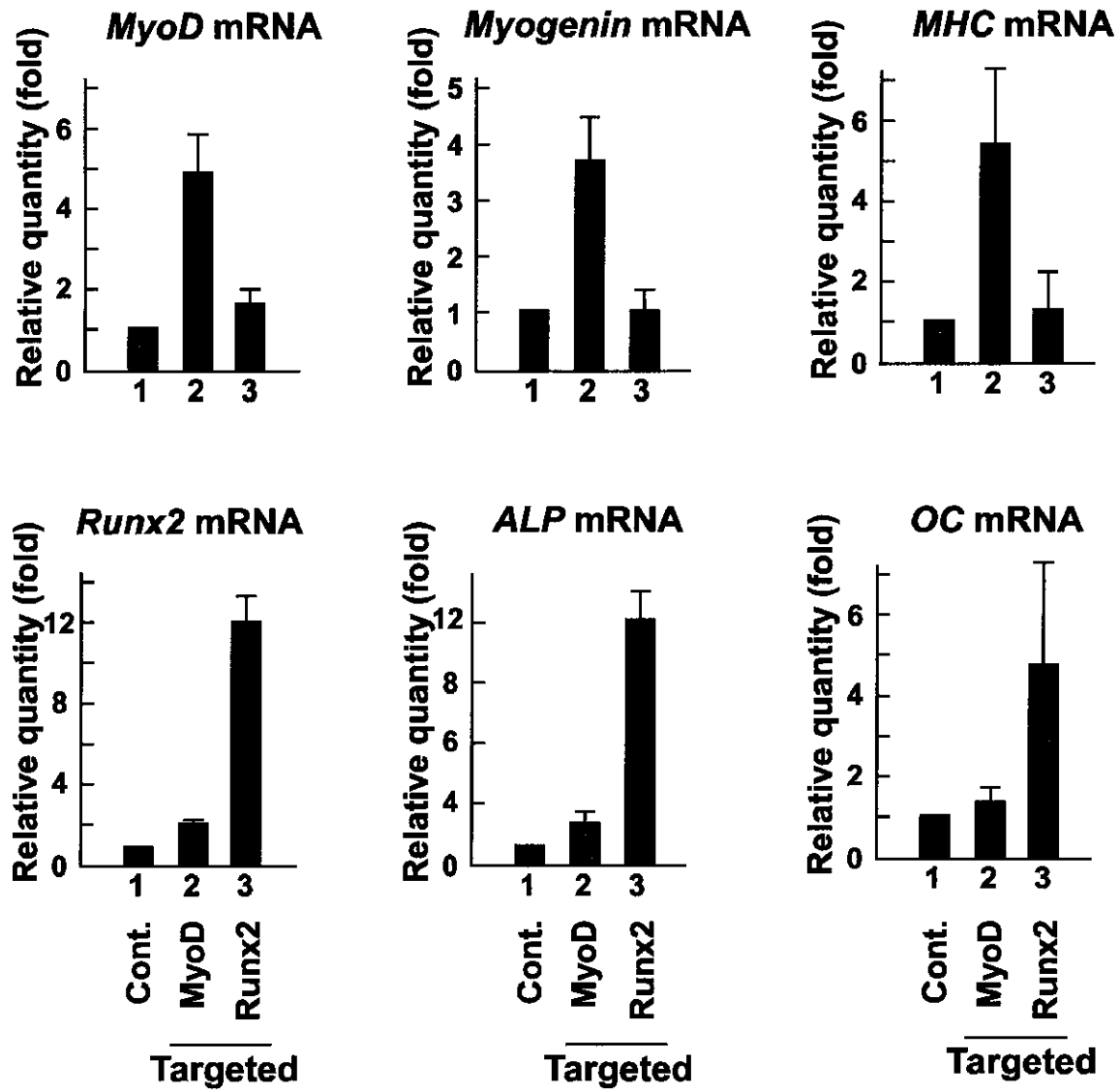
【図 18】



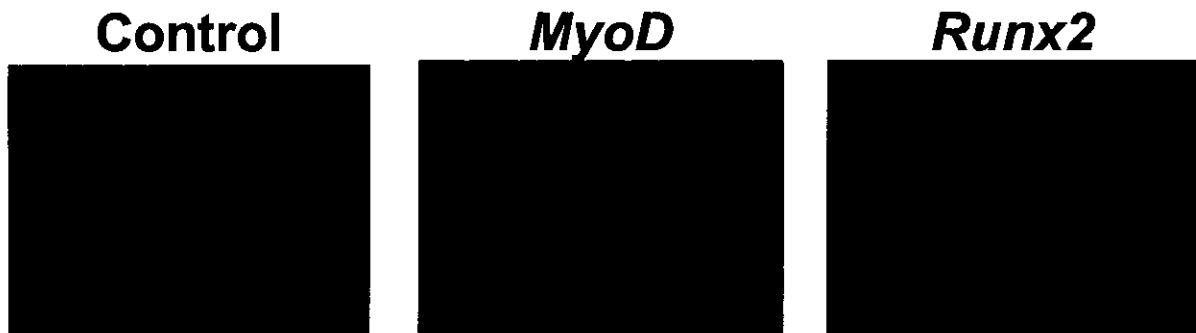
【図 19】



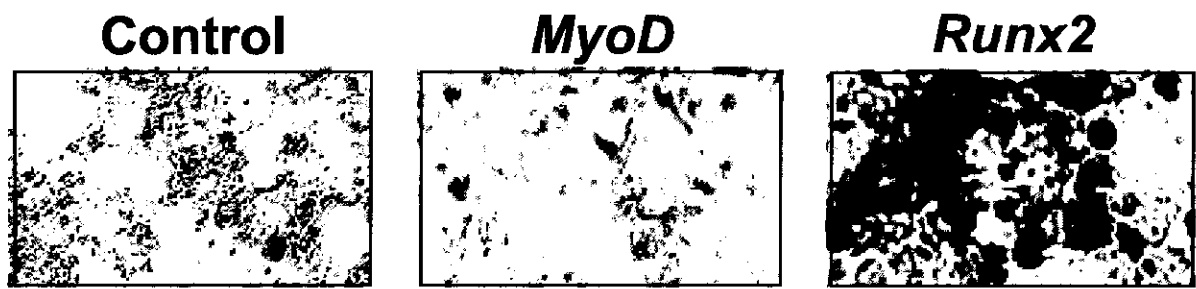
【図 20】



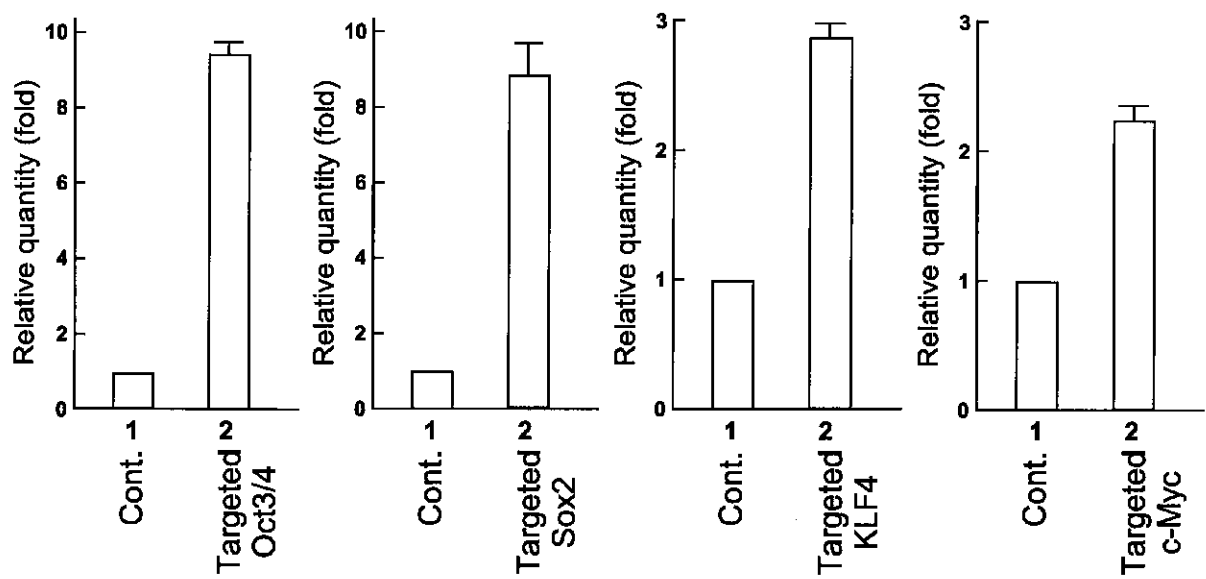
【図 21】



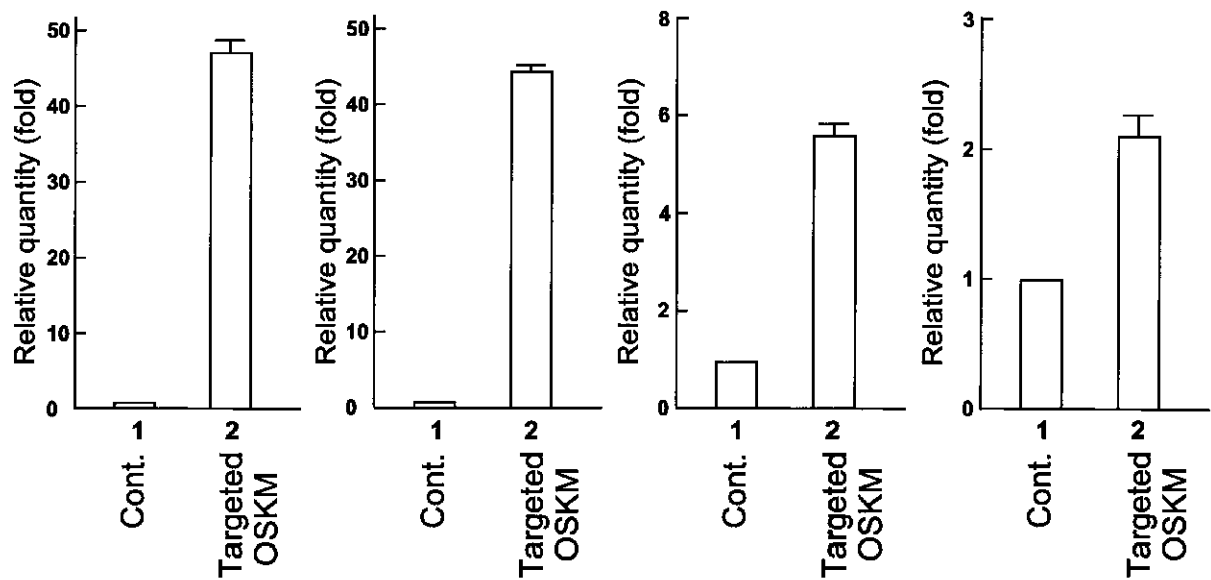
【 図 2 2 】



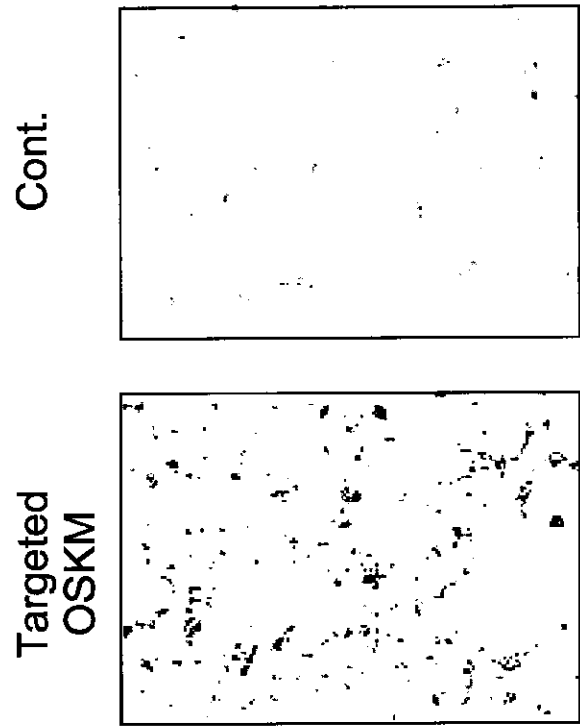
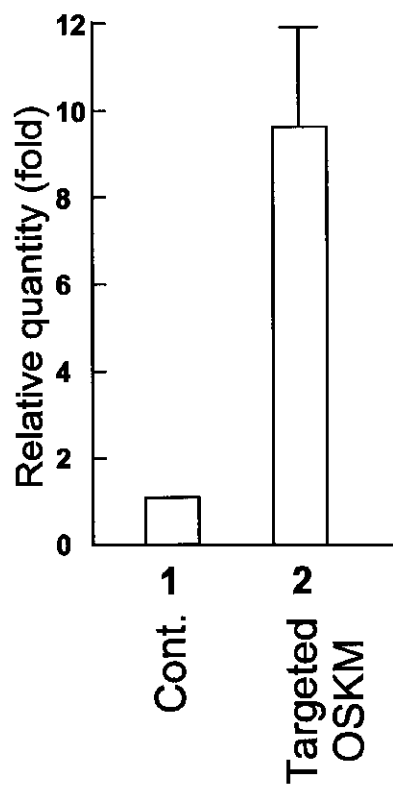
【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



【図 25】



【配列表】

2014042493000001. app