

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年10月21日(21.10.2010)

PCT

(10) 国際公開番号

WO 2010/119819 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/07 (2010.01) A61K 35/42 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01) A61P 11/00 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/056447
- (22) 国際出願日: 2010年4月9日(09.04.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-100548 2009年4月17日(17.04.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人東北大学 (TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 Miyagi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 久保 裕司 (KUBO Hiroshi) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 藤野 直也 (FUJINO Naoya) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 鈴木 隆哉 (SUZUKI Takaya) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1

号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 山谷睦雄 (YAMAYA Mutsuo) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).

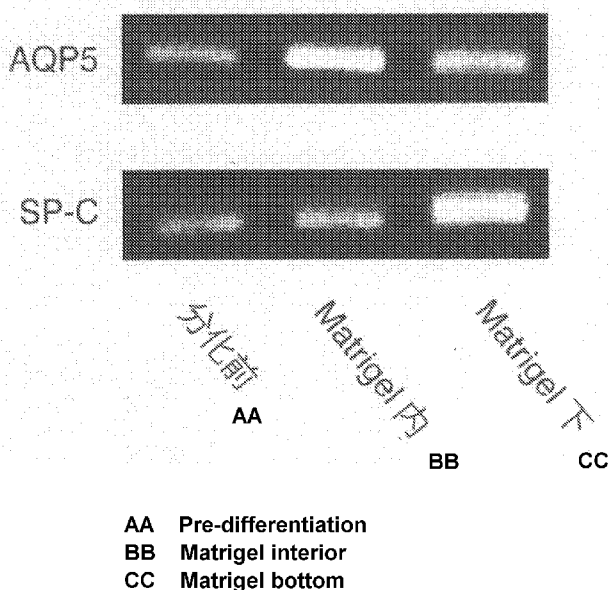
- (74) 代理人: 阿部 正博 (ABE Masahiro); 〒2740825 千葉県船橋市前原西二丁目14番2号 安田ビル10階 Chiba (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ,

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF PREPARING HUMAN LUNG TISSUE STEM CELLS AND METHOD OF INDUCING DIFFERENTIATION INTO HUMAN ALVEOLAR EPITHELIAL CELLS

(54) 発明の名称: ヒト肺組織幹細胞の調製方法及びヒト肺胞上皮細胞への分化誘導方法

[図3]



(57) Abstract: Provided are: a method of preparing cells that simultaneously express a type II alveolar epithelial cell marker and a stem cell marker, said method including a process to isolate and extract constituent cells from human lung tissue, and a process to separate out and culture lung tissue stem cells from the isolated cells; human lung tissue stem cells, obtained by the aforementioned preparation method, that can differentiate into alveolar epithelial cells; a method of inducing differentiation into human lung epithelial cells, said method comprising culturing the aforementioned human lung tissue stem cells; human alveolar epithelial cells prepared by the aforementioned differentiation-induction method; and a screening method characterized by use of the aforementioned human lung tissue stem cells or human alveolar epithelial cells.

(57) 要約: ヒトの肺組織より構成細胞を単離抽出する工程、及び、得られた単離細胞より肺組織幹細胞を分離培養する工程を含む、II型肺胞上皮細胞マーカー及び幹細胞マーカーを同時に発現する細胞の調製方法、該調製方法によって得られた、肺胞上皮細胞に分化することが出来る、ヒト肺胞上皮細胞への分化誘導方法、該分化誘導方法によって調製されたヒト肺胞上皮細胞、該ヒト肺組織幹細胞又はヒト肺胞上皮細胞を用いることを特徴とする、スクリーニング方法。

るヒト肺組織幹細胞、該ヒト肺組織幹細胞を培養することから成る、ヒト肺胞上皮細胞への分化誘導方法、該分化誘導方法によって調製されたヒト肺胞上皮細胞、該ヒト肺組織幹細胞又はヒト肺胞上皮細胞を用いることを特徴とする、スクリーニング方法。



WO 2010/119819 A1

CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, 添付公開書類:
TD, TG).

— 國際調查報告 (條約第 21 條(3))

明 細 書

発明の名称：

ヒト肺組織幹細胞の調製方法及びヒト肺胞上皮細胞への分化誘導方法

技術分野

[0001] 本発明は、ヒト肺組織幹細胞の調製方法及びヒト肺胞上皮細胞への分化誘導方法等に関する。

背景技術

[0002] 近年、人工多能性幹細胞（Induced Pluripotent Stem Cell）、即ち、iPS細胞が開発され、患者固有の遺伝情報を持つ幹細胞樹立が可能となった（特許文献1及び2）。このiPS細胞を用いることにより、難治性疾患に対する新たな病態解明・創薬につなげることが出来るのではないかと大きな期待が持たれている。実際に、筋ジストロフィーなど難治性疾患症例よりiPS細胞が樹立され、病態解明へ向けた研究が世界的に進められている。iPS細胞は遺伝子が主たる要因となる疾患の解明には大きな力を発揮する。

[0003] しかしながら、多くの疾患の発症には「遺伝」的因子の他に、「環境」及び「加齢」の因子が大きくかかわっている。iPS細胞の樹立には所謂「山中因子」導入による細胞の初期化を必要とするために「環境」又は「加齢」によって生じたエピジェネティックな情報は失われてしまう。そのため、各臓器より組織固有の幹細胞を抽出し、このエピジェネティックな情報を残したまま解析することは、高齢者疾患に多い「環境」「加齢」因子による疾患に対する病態解明・創薬に極めて重要である。つまり、このような組織幹細胞はiPS細胞でカバーできない部分を埋める重要な鍵を握るものである。

[0004] ところで、組織の修復・再生には、組織固有の幹細胞・前駆細胞の適切な増殖と分化が必要である。肺胞上皮の修復過程では、II型肺胞上皮細胞（II型細胞）はI型肺胞上皮細胞（I型細胞）の前駆細胞として機能する。すなわち、肺損傷後、増殖したII型細胞は、I型細胞へと分化することによって、損傷を受けた上皮を覆っていくと考えられている（非特許文献1～6）。しかし

ながら、II型細胞は自己複製能と多分化能を有する幹細胞とは考えられていない。

[0005] 近年、マウス肺では自己複製能と細気管支のクララ細胞、I型及びII型細胞への分化能をもつ幹細胞 (Bronchioalveolar Stem Cells, BASCs) が同定された(非特許文献7)。また、本発明者等は、マウス肺損傷モデルにおいて、肺組織幹細胞マーカーを発現する幹細胞群が損傷後に増殖し、肺胞上皮への修復過程に関与することを報告した(非特許文献8及び9)。

[0006] 更に、これまでに、ヒト肺組織由来の幹細胞としては線維芽細胞様の間葉系幹細胞が報告されている(非特許文献10)のみであり、ヒト肺組織から肺胞上皮細胞に分化できる幹細胞の報告はない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特許第4183742号明細書

特許文献2：特開2008-307007号公報

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Adamson, I. Y., and Bowden, D. H. 1974. The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab Invest* 30:35-42.

非特許文献2：Evans, M. J., Cabral, L. J., Stephens, R. J., and Freeman, G. 1975. Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO₂. *Exp Mol Pathol* 22:142-150.

非特許文献3：Aso, Y., Yoneda, K., and Kikkawa, Y. 1976. Morphologic and biochemical study of pulmonary changes induced by bleomycin in mice. *Lab Invest* 35:558-568.

非特許文献4：Anderson, W. R., and Thielen, K. 1992. Correlative study of adult respiratory distress syndrome by light, scanning, and transmission electron microscopy. *Ultrastruct Pathol* 16:615-628.

非特許文献5：Ware, L. B., and Matthay, M. A. 2000. The acute respirator

y distress syndrome. N Engl J Med 342:1334-1349.

非特許文献6 : Kawanami, O., Ferrans, V.J., and Crystal, R.G. 1982. Structure of alveolar epithelial cells in patients with fibrotic lung disorders. Lab Invest 46:39-53.

非特許文献7 : Kim, C.F., Jackson, E.L., Woolfenden, A.E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R.T., and Jacks, T. 2005. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. Cell 121:823-835.

非特許文献8 : Kubo, H., Hegab, A.E., He, M., Ishizawa, K., and Yamada, M. 2008. Endogenous lung stem cells increased after lung injury. Proc Am Thorac Soc 5:362-363.

非特許文献9 : Hegab, A.E., Kubo, H., Yamaya, M., Asada, M., He, M., Fujino, N., Mizuno, S., and Nakamura, T. 2008. Intranasal HGF administration ameliorates the physiologic and morphologic changes in lung emphysema. Mol Ther 16:1417-1426.

非特許文献10 : Lama, V.N., Smith, L., Badri, L., Flint, A., Andrei, A., Murray, S., Wang, Z., Liao, H., Toews, G.B., Krebsbach, P.H., Peters-Golden, M., Pinsky, D.J., Martinez, F.J., and Thannickal, V.J. 2007. Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. J Clin Invest 117:989-996

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 肺胞上皮系に分化できる幹細胞は肺傷害後の組織修復に関与する細胞であるので、再生医療等の臨床上也非常に重要な細胞である。更に、このような細胞はヒト肺組織幹細胞を同定する新たなマーカー発見の材料としても有用であり、この細胞の分化シグナル等を解析することによって、新たな創薬につながると思われる。

課題を解決するための手段

[0010] 今回、本発明者は、ヒトの成人末梢肺組織中に肺胞上皮系への分化を示す幹細胞が存在することを初めて見出し、かかるヒト肺幹細胞の分離同定、培養法、肺胞上皮への分化誘導法を確立することに成功し、本発明を完成した。

[0011] 即ち、本発明は以下の各態様に係るものである。

[0012] (態様1) ヒトの肺組織より構成細胞を単離抽出する工程、及び、得られた単離細胞より肺組織幹細胞を分離培養する工程を含む、II型肺胞上皮細胞マーカー及び幹細胞マーカーを同時に発現する細胞の調製方法。

(態様2) 上記の調製方法によって得られた、ヒト肺胞上皮細胞に分化することが出来るヒト肺組織幹細胞、又は、該細胞を継代培養して得られるヒト肺組織幹細胞。

(態様3) 上記のヒト肺組織幹細胞を培養することから成る、ヒト肺胞上皮細胞への分化誘導方法。

(態様4) 上記の分化誘導方法によって調製されたヒト肺胞上皮細胞、又は、該ヒト肺胞上皮細胞を継代培養して得られるヒト肺胞上皮細胞。

(態様5) 上記のヒト肺組織幹細胞又はヒト肺胞上皮細胞を用いることを特徴とする、スクリーニング方法。

発明の効果

[0013] 本発明は、ヒトの成人末梢肺組織中に肺胞上皮系への分化を示す、II型肺胞上皮細胞マーカー及び幹細胞マーカーを同時に発現する細胞、例えば、SP-C+/CD90+細胞であるヒト肺幹細胞の分離同定・培養等を含む調製方法、及び、該ヒト肺組織幹細胞から肺胞上皮への分化誘導方法を提供するものである。

図面の簡単な説明

[0014] [図1] ヒト肺における肺胞上皮の表現型をもつ間葉系幹細胞様の細胞群の存在を示すグラフ及び写真。

[図2] SP-C+/CD90+細胞はin vitroで自己複製能を有することを示すグラフ及び写真。

[図3] SP-C+/CD90+細胞がin vitroで肺胞上皮細胞への分化能を有することを

示すグラフ及び写真。

[図4] SP-C⁺/CD90⁺細胞が肺胞壁に存在することを示すグラフ及び写真。

発明を実施するための形態

- [0015] 本発明の第一の態様は、ヒトの肺組織より構成細胞を単離抽出する工程、及び、得られた単離細胞より肺組織幹細胞を分離培養する工程を含む、II型肺胞上皮細胞マーカー及び幹細胞マーカーを同時に発現する細胞、例えば、SP-C⁺/CD90⁺細胞の調製方法に係る。本願明細書の実施例で示されるように、このようなSP-C⁺/CD90⁺細胞は、自己複製能に加えて、本発明による分化誘導方法によってI型肺胞上皮細胞及びII型肺胞上皮細胞に分化する分化能を有する、ヒト肺組織幹細胞である。
- [0016] 単離抽出する工程における好適な方法として、ヒトの肺組織から胸膜を剥離除去した後、肺組織内へ、例えば、*Bacillus polymyxa*由来の酵素（EC 3.4.2.4.4）であるDispase II又はDispase I（登録商標：Roche Applied Science, Mannheim, Germany）又はDISPASE（登録商標：合同酒精（株））等の適当な中性プロテアーゼの溶液を注入し、その後、コラゲナーゼ、該中性プロテアーゼ、及び、デオキシリボヌクレアーゼI及びデオキシリボヌクレアーゼII等のエンドヌクレアーゼのような適当なデオキシリボヌクレアーゼを含む溶液中でインキュベートすることを含む方法を挙げることが出来る。特に、肺組織内へ注入する中性プロテアーゼとしてDispase II、細胞を溶解するための中性プロテアーゼとしてはDISPASE、デオキシリボヌクレアーゼとしてはデオキシリボヌクレアーゼIを使用することが好ましい。
- [0017] 更に、肺組織幹細胞を分離培養する工程において、例えば、当業者に公知の任意の方法で調製されるフィーダー細胞、特に、C57BL/6マウス胎児線維芽細胞から成るフィーダー細胞を用いて培養することが好ましい。市販されている適当なフィーダー細胞を使用することも出来る。又、2継代目以降の培養に際しては、フィーダー細胞を用いずに、フィーダー細胞馴化培地を使用することができる。尚、上記分離培養工程の前に、得られた単離細胞から当業者に公知の任意の方法で血球系細胞（例えば、CD45陽性細胞）を除去するこ

とが好ましい。ヒトの肺組織は、患者への事前承諾等を得た上で、手術の際に切除した組織の一部等から入手することが出来る。

[0018] 本発明方法によって調製して得られたヒト肺組織幹細胞は、本明細書の実施例に記載のような、当業者に公知の任意の方法で継代培養することによって、多分化能を維持しつつ、自己複製（増殖）させることが可能である。従って、本発明の第二の態様は、かかる調製方法によって得られた、肺胞上皮細胞に分化することが出来、且つ、自己複製能を有するヒト肺組織幹細胞、例えば、SP-C⁺/CD90⁺細胞、又は、該細胞を適当な期間、継代培養して得られるヒト肺組織幹細胞に係る。

[0019] 本発明の第三の態様としては、上記のヒト肺組織幹細胞を培養することから成る、ヒト肺上皮細胞への分化誘導方法に係る。再構成基底膜組成物を用いて培養することによって、I型肺胞上皮細胞が再構成基底膜組成物内部に、II型肺胞上皮細胞が再構成基底膜組成物下部から得られることができる。

[0020] ここで、「再構成基底膜組成物」とは、in vivoで細胞層下に存在する薄い膜状の細胞外マトリックスに含まれる、ラミニン、コラーゲンIV、ヘパラン硫酸プロテオグリカン等のタンパク質及び糖タンパク質、及び、各種細胞増殖因子、活性化因子等を含む、適当な細胞組織から抽出・調製して得られるものである。例えば、マトリゲル（登録商標）（Matrigel, BD Biosciences）のようなマウス肉腫から抽出した可溶性基底膜調製品を挙げることができる。このような再構成基底膜組成物としては、当業者に公知の物質を使用することが出来る。

[0021] 本発明の第四の態様は、かかる分化誘導方法によって得られた、I型肺胞上皮細胞又はII型肺胞上皮細胞である。尚、本発明方法によって分化誘導されたヒト肺上皮細胞は、当業者に公知の任意の方法で適当な期間、継代培養することができる。従って、本発明は、このように継代培養して得られるヒト肺胞上皮細胞にも係る。

[0022] 尚、本発明の調製方法、分化誘導方法、及び、継代培養におけるその他の条件・手段等は当業者に公知の任意のものを適宜選択することが出来る。

[0023] 本発明の第五の態様は、かかるヒト肺組織幹細胞又はヒト肺胞上皮細胞を用いることを特徴とする、各種のスクリーニング方法に係る。例えば、ヒト肺組織幹細胞の分化誘導を促進・阻害する物質のスクリーニング方法に有利に使用することが出来る。

[0024] 本発明のスクリーニングは当業者に公知の任意の方法で行うことが出来る。

[0025] 本発明のスクリーニング方法は、例えば、以下の工程で実施することが出来る。

(a) ヒト肺組織幹細胞又はヒト肺胞上皮細胞に被検物質を接触させる工程、

(b) 該細胞における分化誘導を観察又は測定する工程、及び

(c) 該分化誘導を促進又は阻害する物質を選択する工程、を含む前記方法。

[0026] 以下、本発明を実施例によって詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例の記載によって何ら限定して解釈されるものではない。又、特に記載のない場合には、以下の実施例は、当該技術分野における常法及び当業者に公知の標準的な方法に従い実施した。又、本明細書中に参考文献などとして引用された文献の記載内容は本明細書の開示内容の一部を構成するものである。

実施例

[0027] [方法]

ヒト肺細胞の分離：ヒト肺細胞は過去の報告(10)に従い、いくつかの改良を加え分離した。本操作はクリーンベンチ内で行い、使用される器具は事前にオートクレーブにて滅菌処理した。提供された肺組織をペニシリン（最終濃度100 単位/ml）、ストレプトマイシン（最終濃度100 μ g/ml）、アンホテリシンB（最終濃度0.25 μ g/ml、Invitrogen、Carlsbad、CA）を含むリン酸緩衝液（PBS、和光純薬、大阪、日本）にて洗浄した。胸膜を鈍的に剥離した後、肺組織を約1 cm x 1 cm x 1 cmに切離し、シリンジと27ゲージの針を用いてDispase II（最終濃度 2.0 U/ml、Roche Applied Science, Mannheim, Germany）2 mlを注入し、8 mlのDispase II、1 mlのCollagenase/Dispase（最終濃度1 mg/ml、Roche Applied Science）、1 mlのDeoxyribonuclease I（最終濃

度0.1 mg/ml、Sigma-Aldrich, St. Luis, MO) をあらかじめ加えた50 mlのコニカルチューブへ移し、37°Cで60分間振盪した。酵素処理した肺組織を剪刀にて鋭的に細切した後、18、20ゲージの針を各々3回通し、アンホテリシンB (最終濃度2.5 μ g/ml) を添加した基本培地を10 ml加え、100 μ mのセルストレイナー (BD Biosciences, San Jose, CA) を通し細胞懸濁液を作成した。基本培地はDulbecco's Modified Eagle Medium、DMEM (Invitrogen)、10% ウシ胎児血清、FBS (Invitrogen)、1% アミノ酸 (Invitrogen)、ペニシリン (最終濃度100 単位/ml)、ストレプトマイシン (最終濃度 100 μ g/ml、Sigma-Aldrich) より構成される。この細胞懸濁液を4°C、1500 rpmで5分遠心分離した後、上清を棄て、赤血球溶血緩衝液 (Roche Applied Science) 3 ml加え、室温で3分間反応させた。アンホテリシンBを添加した基本培地を10 ml加え、4°C、1500 rpmで5分遠心分離し、上清を棄てた後、再度同様の溶血反応を行った。アンホテリシンB添加基本培地を10 ml加え、4°C、1500 rpmで5分遠心分離し上清を棄て、アンホテリシン添加基本培地10 mlを加え、40 μ mのセルストレイナー (BD Biosciences) を通し、単一細胞懸濁液を作成した。

[0028] 全肺細胞からの血球系細胞の除去 : 抗CD45抗体でコートされたマイクロビーズを用い、Magnetic Cell Sorting Systemにて全肺細胞からCD45陽性細胞を除去した (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)。

[0029] マウス胎児線維芽細胞の分離 : 妊娠13または14日の雌マウス (C57BL/6) を頸椎脱臼にて犠牲死させ70%エタノールにて洗浄した。ペニシリン (最終濃度100 単位/ml)、ストレプトマイシン (最終濃度100 μ g/ml)、アンホテリシン B (最終濃度0.25 μ g/ml、Invitrogen, Carlsbad, CA) を含むリン酸緩衝液 (PBS、和光純薬、大阪、日本) を5 ml入れたペトリ皿に、摘出した子宮を移した。胎児を胎盤より分離し、脳と心臓を切離した後、50 mlのコニカルチューブにいれ、0.25% トリプシン/EDTA (Sigma-Aldrich) 2 mlを加え、37°Cで30分振盪した。トリプシンを不活化するため10 mlの基本培地を加え、剪刀にて細切した後、18、20ゲージの針をシリンジにて各々3回通し、100 μ mのセルストレイナー (BD Biosciences) を通し細胞懸濁液を作成した。この細胞

懸濁液を4°C、1500 rpmで5分遠心分離した後、上清を棄て、赤血球溶血緩衝液 (Roche Applied Science) 3 ml加え、室温で3分間反応させた。基本培地を10 ml加え、4°C、1500 rpmで5分遠心分離し、上清を棄てた後、再度同様の溶血反応を行った。基本培地を10 ml加え、4°C、1500 rpmで5分遠心分離し上清を棄て、基本培地10 mlを加え、40 μ mのセルストレイナー (BD Biosciences) に通し、単一細胞懸濁液を作成した。1-2 x 10⁶個の細胞を0.1% (w/v) のゼラチンでコートした10 cmの培養皿に播種し培養した。1-3継代の細胞を液体窒素に凍結保存した。

[0030] フィーダー細胞の作成：フィーダー細胞はマイトマイシンCにて増殖を停止させたマウス胎児線維芽細胞である。2-4継代目のコンフルエントなマウス胎児線維芽細胞に基本培地で希釈した10 μ g/mlのマイトマイシンC (Sigma-Aldrich) を加え、37°Cで2時間培養しフィーダー細胞を作成した。フィーダー細胞は液体窒素に凍結保存した。

[0031] 肺組織幹細胞培養：フィーダー細胞を6ウエルプレート (BD Falcon) に、1 x 10⁴ 個/cm² の密度で播種し24時間培養し、ウエルの底面に接着させた。血球系細胞を除去した肺細胞1-5 x 10⁵ 個/cm² をフィーダー細胞でコートしたプレートに播種し、基本培地にて5% CO₂、37°Cにて培養した。はじめの7日間は0.25 μ g/mlのアンホテリシンBを添加した。紡錘形の細胞がコンフルエントになった後、0.25%トリプシン/EDTA (Sigma-Aldrich) にて細胞を剥離し、フィーダー細胞でコートした10 cmの培養皿へ継代した。また、コロニーをピックアップして継代する場合は、0.01%トリプシン/EDTAを加え、紡錘形の細胞よりなるコロニーを27ゲージの針にて周囲から剥離しピペットにて吸引し、フィーダー細胞でコートした6ウエルプレートへ播種した。2継代目以降は、培養皿をフィーダー細胞でコートせず、培地としてフィーダー細胞馴化培地を使用した。フィーダー細胞馴化培地は、フィーダー細胞を基本培地で3日間培養した上清を0.45 μ mのフィルターで濾過したものと基本培地を1:1で混合したものである。-80°Cで凍結保存した。

[0032] フローサイトメトリー：4~5継代目の細胞について細胞表面または細胞内

抗原をFACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) にて解析した。抗体は以下のものを使用した。 FITC-labeled anti-human CD45, FITC-labeled anti-human CD105 (Biolegend, San Diego, CA), FITC-labeled anti-human CD31, PE-labeled anti-human CD73, APC-labeled anti-human CD90, PE-labeled anti-human c-kit (BD Biosciences, San Jose, CA)、PE-labeled anti-human CD133/1 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)、 rabbit anti-human pro SP-C polyclonal antibody (Millipore Corporation, Billerica, MA) 、及び、 FITC-labeled goat anti-rabbit IgG as second antibody (Vector, Burlingame, CA)。細胞内蛋白を染色する場合は、 fixation and permeabilization kitを使用した (Immunotech sas, Marseille Cedex 9, France)。正常ウサギIgG (1 μ g/ul, Dako, Glostrup, Denmark) をSP-C染色のisotype controlとして用いた。

[0033] 蛍光免疫染色：5～6継代目の細胞をカルチャースライドグラス (BD Falcon) 上にて培養した。ヒト肺組織はOCTコンパウンドに包埋し、凍結切片を作成した。3 μ mの厚さでクライオスタットにて薄切した。いずれも、100% アセトンを用い-20°Cで10分間固定した後、室温で30分間、5% ヤギ血清でブロッキングを行った。 rabbit anti-human pro SP-C polyclonal antibody (1:1000、Millipore Corporation)、mouse anti-human CD90 antibody (1:50、Serotec) を4°Cで一晩反応させ、2次抗体として、FITC-goat anti-rabbit IgG (1:100、Vector)、Alexa Fluora 647-goat anti-mouse IgG (1:100、Molecular Probe) を室温で30分反応させた。

[0034] 限界希釈法：1ウエルあたり、1、10または100個の細胞 (5継代目) を96ウエルプレート (Corning Incorporated, Corning, NY) へ播種し基本培地にて14日間培養した。X軸に1ウエルあたり播種した細胞の個数をプロットし、Y軸にコロニーが形成されなかったウエルの割合をプロットした。回帰直線を引き、Y軸の37%と対応するX軸の値から、1つのコロニー形成細胞を含む細胞の個数を求めた(11)。1ウエルあたり1細胞として播種したウエルより得られたコロニーは、継代しフィーダー馴化培地にて培養を継続した。7継代目の細胞

について細胞表面および細胞内蛋白の表現型を決定し、凍結保存をした。

[0035] 肺胞上皮細胞への分化：肺胞上皮細胞への分化能を検討するため、1ウエルあたり 1×10^6 個の細胞（5～6継代目）を氷冷した基本培地1 mlに浮遊させ、Matrigel（登録商標）（BD Biosciences）1 mlと氷上にてよく混合させ12ウエルプレートに播種し37°Cで30分間かけてゲル化させた。その後、37°Cに温めた基本培地1 mlを静かにMatrigel上に入れ、37°Cで培養を続けた。7日後、Matrigel内とMatrigel下の細胞をそれぞれ分けて回収し、RNAを抽出した。Matrigel内の細胞は、冷却したPBS液でMatrigelを破碎し、そのPBSで洗浄、回収した。この操作では、Matrigel下の細胞は遊離しないため、次にMatrigel下の細胞をEDTA/Trypsin液で浮遊させ、回収した。

[0036] 統計解析：GraphPad Prism Ver 5.0b（GraphPad Software、San Diego、CA）を使用した。限界希釈法は、非線形回帰により回帰式、 R^2 を求めた。年齢とSP-C+/CD90+細胞の割合との相関については、Spearmanの順位相関係数を求めた。

[0037] [結果]

結果1：ヒト肺には、肺胞上皮の表現型をもつ間葉系幹細胞様の細胞群が存在する。

血球系細胞を除去したヒト肺構成細胞をフィーダー上で培養すると、紡錘形の細胞が増殖し、約7日後にコロニーを形成した（Fig. 1a）。これらの細胞は継代することができ、2～3週後にはコンフルエントに達した。これらの細胞表面マーカーの発現をフローサイトメトリーにて解析した（Fig. 1b）。多くの細胞が、ヒト間葉系幹細胞マーカーとして知られているCD73、CD90、CD105を発現していた（12）。血球および血管内皮のマーカーである、CD45、CD34、CD31及びVEGF receptor type 2の発現は認められなかった。また、組織幹細胞マーカーであるc-kit（13）およびCD133（14）の発現も認めなかった。以上のことから、得られた細胞群は間葉系幹細胞様の表面マーカーを有していた。CD90は、Thy-1とも呼ばれ、GPI結合膜蛋白であり、間葉系幹細胞だけでなく、CD34を発現する造血系幹細胞（15）や肝の幹細胞（16）のマーカーとして

知られている。また、surfactant protein-C (SP-C) はII型肺胞上皮細胞に特異的に発現することが知られている(17)。そこで、得られた細胞群が肺胞上皮の表現型を有するかを検討するため、SP-CとCD90の二重染色を免疫蛍光抗体法にて行った (Fig. 1c)。SP-C/CD90両陽性細胞が認められ、SP-C (緑色) は細胞内に顆粒状に染色され、CD90 (赤色) は細胞膜に沿って部分的に染色された。そして、フローサイトメトリーでは、大部分の細胞がSP-C+/CD90+細胞であった (Fig. 1d)。以上の検討から、ヒト肺には、II型肺胞上皮細胞のマーカであるSP-Cと、幹細胞マーカであるCD90を同時に発現する新規細胞群が存在することが明らかになった。

[0038] **結果2** : SP-C+/CD90+細胞はin vitroで自己複製能を示す。

組織幹細胞は、その組織より分離され、自己複製能とより成熟した細胞への分化能を示す細胞と定義される(18)。我々は、SP-C+/CD90+細胞がヒト肺組織幹細胞の候補であると考え、まず自己複製能について検討した。Fig. 2aに示すように、限界希釈により得られた単一細胞から、10日後、コロニー形成が認められた。次に、SP-C+/CD90+細胞を多く含む細胞群に関し、コロニー形成能を有する細胞の頻度を決定するため、限界希釈法を行った (Fig. 2b)。コロニー形成能をもつ細胞は、患者1、2では各々、細胞6、131個に1個の割合で含まれることが明らかになった。1ウエルに1個の細胞を播種したウエルよりできた2次コロニーについてフローサイトメトリーにてSP-C、CD90の発現を解析すると、Fig. 2cに示すように、元の細胞群と同様の発現パターンを示した。以上のことから、SP-C+/CD90+細胞はin vitroで自己複製能を示すことが示された。

[0039] **結果3** : SP-C+/CD90+細胞はin vitroで肺胞上皮細胞への分化を示す。

SP-C+/CD90+細胞の肺胞上皮細胞への分化能を検討するため、SP-C+/CD90+細胞を多く含む細胞群をMatrigelにて7日間培養し、Matrigel内、Matrigel下の各々の細胞からRNAを抽出しRT-PCRにてmRNA発現の変化について検討した。Fig. 3aに示すように、Matrigel内ではI型細胞のマーカであるAQP5の発現が増強し、Matrigel下ではII型細胞のマーカであるSP-Cの発現が増強した。

以上のことから、Matrigel内ではI型細胞へ、Matrigel下ではII型細胞への誘導が認められた。

[0040] **結果4** : SP-C+/CD90+細胞は肺胞壁に存在する。

SP-C+/CD90+細胞の局在を決定するため、ヒト肺組織の凍結切片を作成し蛍光免疫染色を行った。Fig 4aに示すように、SP-C+/CD90+細胞は肺胞壁に存在した。共焦点レーザー顕微鏡による観察では、SP-Cは細胞内に染色され、CD90は細胞表面に部分的に認められ、ヒト肺より分離したSP-C+/CD90+細胞と同一の染色パターンを示した (Fig. 4b)。SP-C+/CD90+細胞の割合を検討するため、血球系細胞を除去した後の肺細胞をフローサイトメトリーで解析した。Fig. 4cに示すように、SP-C+/CD90+細胞は、 $0.45\% \pm 0.34\%$ (mean \pm S.D.) 含まれ、年齢と有意な逆相関を示すことが分かった (Fig. 4d)。以上の検討より、SP-C+/CD90+細胞は、肺胞壁に存在し、年齢とともに数の減少を認めることが明らかになった。

[0041] [参考文献]

1. Adamson, I. Y., and Bowden, D. H. 1974. The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab Invest* 30:35-42.
2. Evans, M. J., Cabral, L. J., Stephens, R. J., and Freeman, G. 1975. Transformation of alveolar type 2 cells to type 1 cells following exposure to NO₂. *Exp Mol Pathol* 22:142-150.
3. Aso, Y., Yoneda, K., and Kikkawa, Y. 1976. Morphologic and biochemical study of pulmonary changes induced by bleomycin in mice. *Lab Invest* 35:558-568.
4. Anderson, W. R., and Thielen, K. 1992. Correlative study of adult respiratory distress syndrome by light, scanning, and transmission electron microscopy. *Ultrastruct Pathol* 16:615-628.
5. Ware, L. B., and Matthay, M. A. 2000. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342:1334-1349.

6. Kawanami, O., Ferrans, V.J., and Crystal, R.G. 1982. Structure of alveolar epithelial cells in patients with fibrotic lung disorders. *Lab Invest* 46:39–53.
7. Kim, C.F., Jackson, E.L., Woolfenden, A.E., Lawrence, S., Babar, I., Vogel, S., Crowley, D., Bronson, R.T., and Jacks, T. 2005. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121:823–835.
8. Kubo, H., Hegab, A.E., He, M., Ishizawa, K., and Yamada, M. 2008. Endogenous lung stem cells increased after lung injury. *Proc Am Thorac Soc* 5:362–363.
9. Hegab, A.E., Kubo, H., Yamaya, M., Asada, M., He, M., Fujino, N., Mizuno, S., and Nakamura, T. 2008. Intranasal HGF administration ameliorates the physiologic and morphologic changes in lung emphysema. *Mol Ther* 16:1417–1426.
10. Bortnick, A.E., Favari, E., Tao, J.Q., Francone, O.L., Reilly, M., Zhang, Y., Rothblat, G.H., and Bates, S.R. 2003. Identification and characterization of rodent ABCA1 in isolated type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L869–878.
11. Tropepe, V., Coles, B.L., Chiasson, B.J., Horsford, D.J., Elia, A.J., McInnes, R.R., and van der Kooy, D. 2000. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 287:2032–2036.
12. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317.
13. Bearzi, G., Rota, M., Hosoda, T., Tillmanns, J., Nascimbene, A., De Angelis, A., Yasuzawa-Amano, S., Trofimova, I., Siggins, R.W.,

Lecapitaine, N., et al. 2007. Human cardiac stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 104:14068-14073.

14. Uchida, N., Buck, D.W., He, D., Reitsma, M.J., Masek, M., Phan, T.V., Tsukamoto, A.S., Gage, F.H., and Weissman, I.L. 2000. Direct isolation of human central nervous system stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 97:14720-14725.

15. Craig, W., Kay, R., Cutler, R.L., and Lansdorp, P.M. 1993. Expression of Thy-1 on human hematopoietic progenitor cells. J Exp Med 177:1331-1342.

16. Herrera, M.B., Bruno, S., Buttiglieri, S., Tetta, C., Gatti, S., Deregibus, M.C., Bussolati, B., and Camussi, G. 2006. Isolation and characterization of a stem cell population from adult human liver. Stem Cells 24:2840-2850.

17. Phelps, D.S., and Floros, J. 1991. Localization of pulmonary surfactant proteins using immunohistochemistry and tissue in situ hybridization. Exp Lung Res 17:985-995.

18. Weiss, D.J., Kolls, J.K., Ortiz, L.A., Panoskaltsis-Mortari, A., and Prockop, D.J. 2008. Stem cells and cell therapies in lung biology and lung diseases. Proc Am Thorac Soc 5:637-667.

産業上の利用可能性

[0042] 本発明より、ヒト肺組織には、SP-C+/CD90+細胞が存在し、自己複製能と肺胞上皮細胞への分化能を示すヒト組織幹細胞であることが明らかになった。また、SP-C+/CD90+細胞は、年齢とともにその数が低下することが分かった。このような肺胞上皮系に分化できる幹細胞は肺傷害後の組織修復に関与する細胞であるので、再生医療等の臨床上も非常に重要な細胞である。更に、このような細胞はヒト肺組織幹細胞を同定する新たなマーカー発見の材料としても有用であり、本発明で得られたヒト組織幹細胞の分化シグナル等を解析す

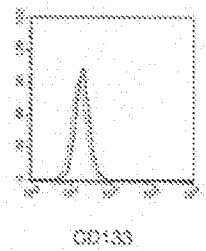
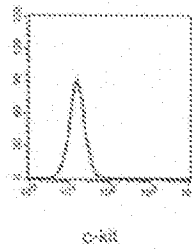
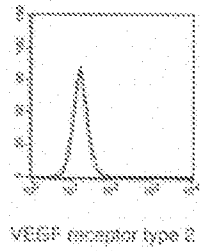
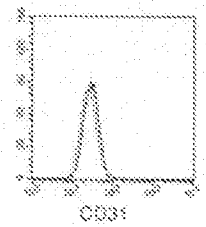
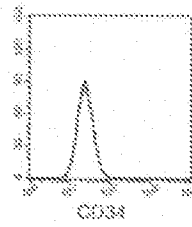
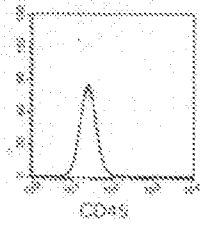
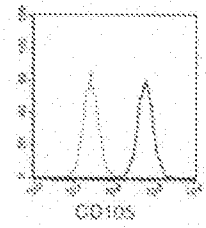
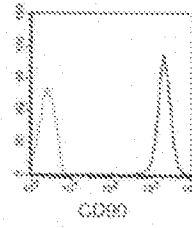
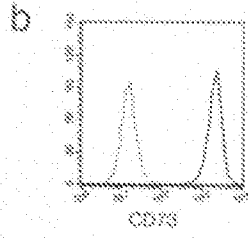
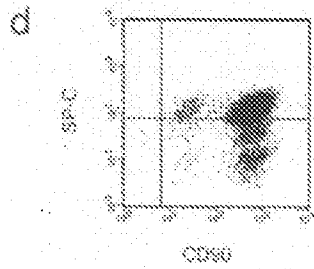
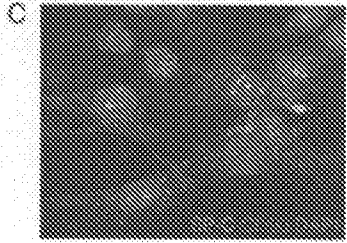
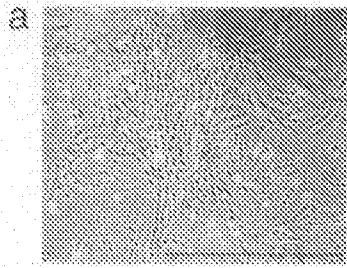
ることによって、新たな創薬を提供することが可能となる。

請求の範囲

- [請求項1] ヒトの肺組織より構成細胞を単離抽出する工程、及び、得られた単離細胞より肺組織幹細胞を分離培養する工程を含む、II型肺胞上皮細胞マーカー及び幹細胞マーカーを同時に発現する細胞の調製方法。
- [請求項2] 該細胞がSP-C⁺/CD90⁺細胞である、請求項1記載の調製方法。
- [請求項3] 該細胞がヒト肺胞上皮細胞に分化することが出来るヒト肺組織幹細胞であることを特徴とする、請求項1又は2記載の調製方法。
- [請求項4] 単離抽出する工程において、ヒトの肺組織から胸膜を剥離除去した後、肺組織内へ中性プロテアーゼ溶液を注入し、その後、コラゲナーゼ、中性プロテアーゼ及びデオキシリボヌクレアーゼを含む溶液中で細胞を溶解することを含む、請求項1ないし3のいずれか一項に記載の調製方法。
- [請求項5] ヒト肺組織幹細胞を分離培養する工程において、マウス胎児線維芽細胞から成るフィーダー細胞を用いて培養することを含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の調製方法。
- [請求項6] 請求項1～5のいずれか一項に記載の調製方法によって得られた、ヒト肺胞上皮細胞に分化することが出来るヒト肺組織幹細胞、又は、該細胞を継代培養して得られるヒト肺組織幹細胞。
- [請求項7] 請求項6記載のヒト肺組織幹細胞を培養することから成る、ヒト肺上皮細胞への分化誘導方法。
- [請求項8] 再構成基底膜組成物を用いる培養によって、I型肺胞上皮細胞が再構成基底膜組成物内部に、II型肺胞上皮細胞が再構成基底膜組成物下部から得られることを特徴とする、請求項7記載の分化誘導方法。
- [請求項9] 再構成基底膜組成物がマウス肉腫から抽出した可溶性基底膜調製品である、請求項7又は8記載の分化誘導方法。
- [請求項10] 請求項7～9のいずれか一項に記載の分化誘導方法によって調製されたヒト肺胞上皮細胞、又は、該ヒト肺胞上皮細胞を継代培養して得られるヒト肺胞上皮細胞。

[請求項11] 請求項5記載のヒト肺組織幹細胞又は請求項9記載のヒト肺胞上皮細胞を用いることを特徴とする、スクリーニング方法。

[1]

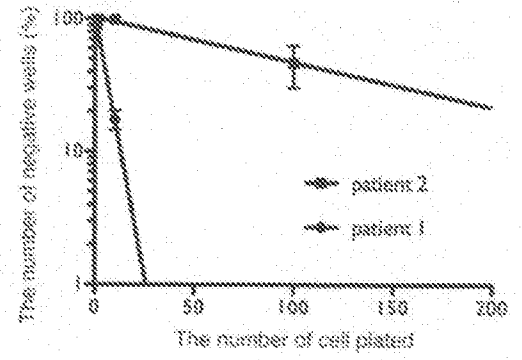


[図2]

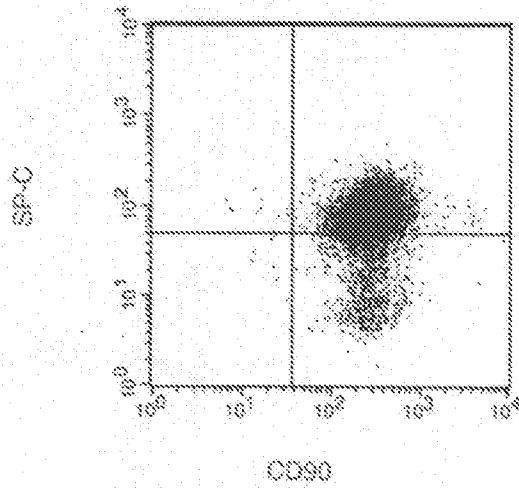
a



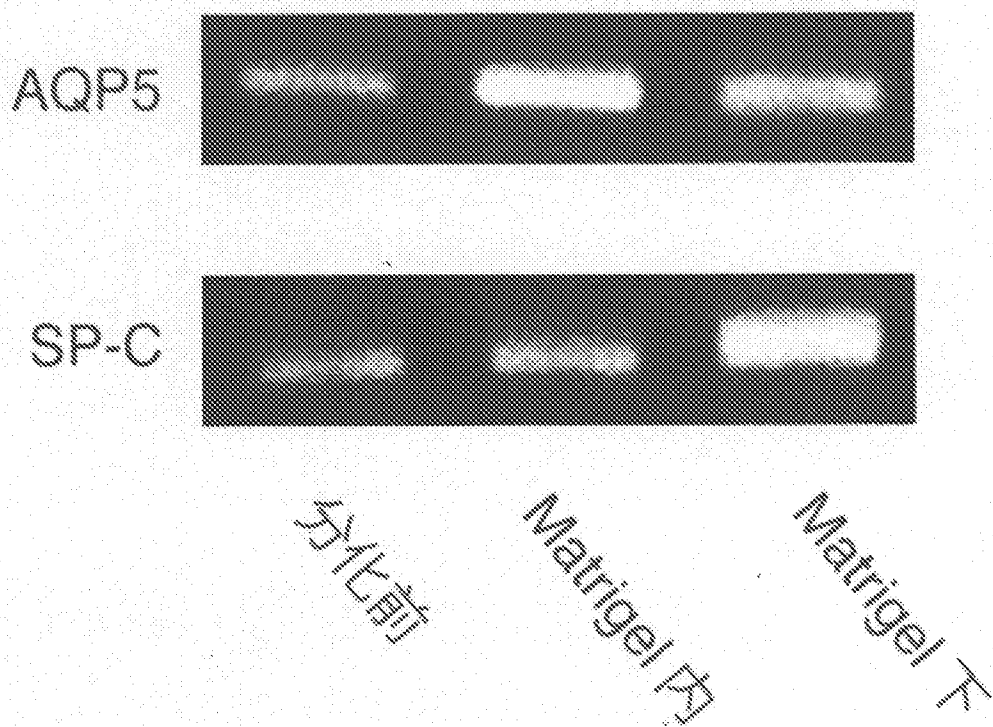
b



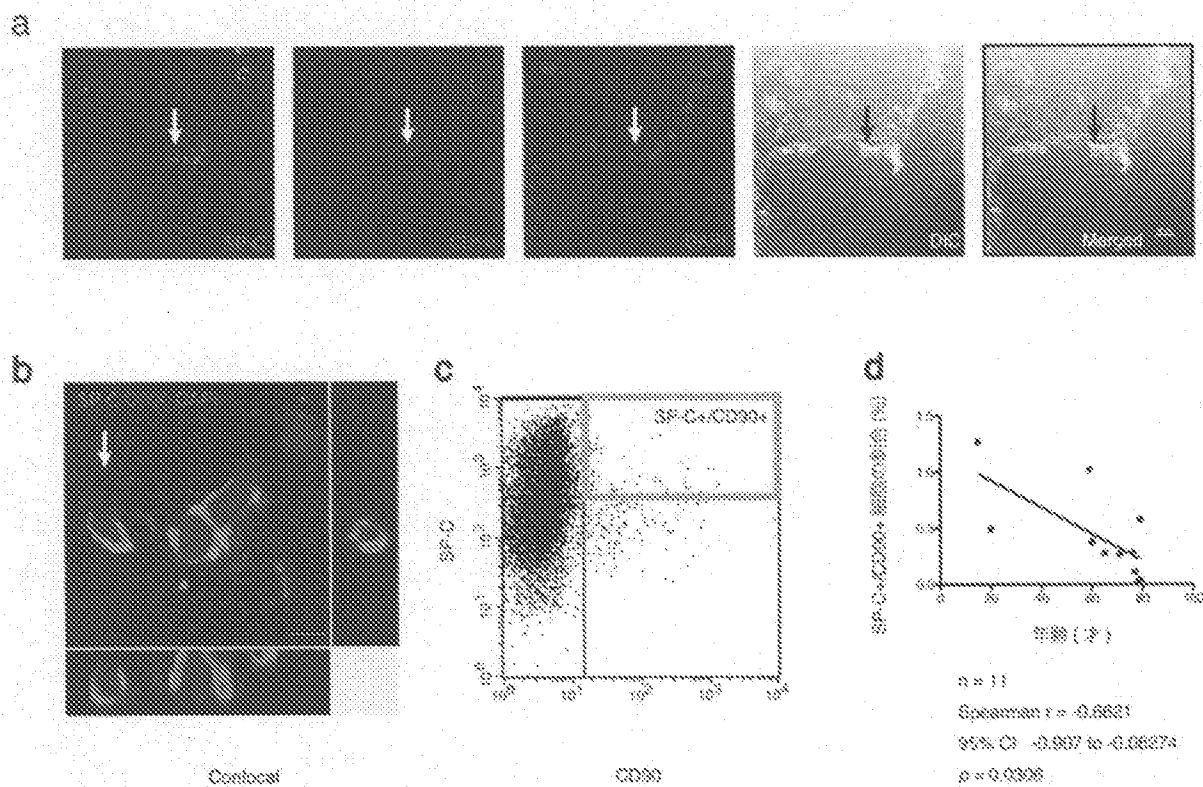
c



[图3]



[图4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/056447

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/07(2010.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)n, A61K35/42(2006.01)n, A61P11/00(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N5/07, C12Q1/02, A61K35/12, A61K35/42, A61P11/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), Science Direct, Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	Naoya FUJINO et al., "Haiho Johi Saibo Marker no Hatsugen o Shimesu Hito Hai Soshiki Kan'yokei Saibo no Tanri", Regenerative Medicine, 2009, vol.8, page 187, O-27-6	1, 3, 5-7, 10-11/2, 4/8-9
Y/A	Yuji KUBO, "Shikkan no Byoin to Byotai 7. Hai Sonsho to Shufuku no Mechanism", Annual Review Kokyuki, 2008, pages 113 to 119	2/1, 3-11
Y/A	Yuji KUBO, "Hai no Saisei to Kansaibo", Kokyu to Junkan, 2008, vol.56, no.3, pages 285 to 291	2/1, 3-11
Y/A	Kazuhiro SUGAHARA et al., "Effector Saibo kara Mita Kokyuki Shikkan no Byotai Haiho Johi Saibo -Kino to Byohen Shufuku-", Lung Perspect, 10 April 2009 (10.04.2009), vol.17, no.2, pages 162 to 165	2/1, 3-11

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 June, 2010 (16.06.10)

Date of mailing of the international search report
29 June, 2010 (29.06.10)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/056447

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	LAMA VN, et al., Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. J Clin Invest. 2007, Vol.117, No.4, p.989-96.	2/1,3-11
Y/A	BORTNICK AE, et al., Identification and characterization of rodent ABCA1 in isolated type II pneumocytes. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003, Vol.285, No.4, p.L869-78.	4/1-3,5-11
Y/A	DOBBS LG, et al., An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. Am Rev Respir Dis. 1986, Vol.134, No.1, p.141-5.	4/1-3,5-11
Y/A	SUMMER R, et al., Isolation of an adult mouse lung mesenchymal progenitor cell population. Am J Respir Cell Mol Biol. 2007, Vol.37, No.2, p.152-9.	4/1-3,5-11
A	JP 2009-514509 A (Academia Sinica), 09 April 2009 (09.04.2009), entire text & WO 2007/047581 A2 & EP 1960553 A2 & AU 2006304390 A1 & TW 200732475 A	1-11
A	KIM CF, et al., Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. Cell. 2005, Vol.121, No.6, p.823-35.	1-11
P,X	Naoya FUJINO et al., "Hito Haiho Johi II-gata Zenku Saibo no Bunri", Regenerative Medicine, 05 February 2010 (05.02.2010), vol.9, page 253, O-43-2	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N5/07(2010.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)n, A61K35/42(2006.01)n, A61P11/00(2006.01)n

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N5/07, C12Q1/02, A61K35/12, A61K35/42, A61P11/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), Science Direct, 医学・薬学予稿集全文データベース

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y/A	藤野直也 他, 肺胞上皮細胞マーカーの発現を示すヒト肺組織間葉系細胞の単離, 再生医療, 2009, Vol.8, p.187, 0-27-6	1, 3, 5-7, 10-11/2, 4/8-9
Y/A	久保裕司, 疾患の病因と病態 7. 肺損傷と修復のメカニズム, Annual Review 呼吸器, 2008, p.113-119	2/1, 3-11
Y/A	久保裕司, 肺の再生と幹細胞, 呼吸と循環, 2008, Vol.56, No.3, p.285-291	2/1, 3-11

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

<p>* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献</p>
--	---

国際調査を完了した日 16.06.2010	国際調査報告の発送日 29.06.2010
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 山本 匡子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y/A	須加原一博 他, エフェクター細胞からみた呼吸器疾患の病態 肺胞 上皮細胞-機能と病変修復- , Lung Perspect, 2009.04.10, Vol.17, No.2, p.162-165	2/1,3-11
Y/A	LAMA VN, et al., Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. J Clin Invest. 2007, Vol.117, No.4, p.989-96.	2/1,3-11
Y/A	BORTNICK AE, et al., Identification and characterization of rodent ABCA1 in isolated type II pneumocytes. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2003, Vol.285, No.4, p.L869-78.	4/1-3,5-11
Y/A	DOBBS LG, et al., An improved method for isolating type II cells in high yield and purity. Am Rev Respir Dis. 1986, Vol.134, No.1, p.141-5.	4/1-3,5-11
Y/A	SUMMER R, et al., Isolation of an adult mouse lung mesenchymal progenitor cell population. Am J Respir Cell Mol Biol. 2007, Vol.37, No.2, p.152-9.	4/1-3,5-11
A	JP 2009-514509 A (アカデミア シニカ) 2009.04.09, 全文 & WO 2007/047581 A2 & EP 1960553 A2 & AU 2006304390 A1 & TW 200732475 A	1-11
A	KIM CF, et al., Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. Cell. 2005, Vol.121, No.6, p.823-35.	1-11
P, X	藤野直也 他, ヒト肺胞上皮 II 型前駆細胞の分離 , 再生医療, 2010.02.05, Vol.9, p.253, 0-43-2	1-11