

(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
2016年7月21日(21.07.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/114341 A1

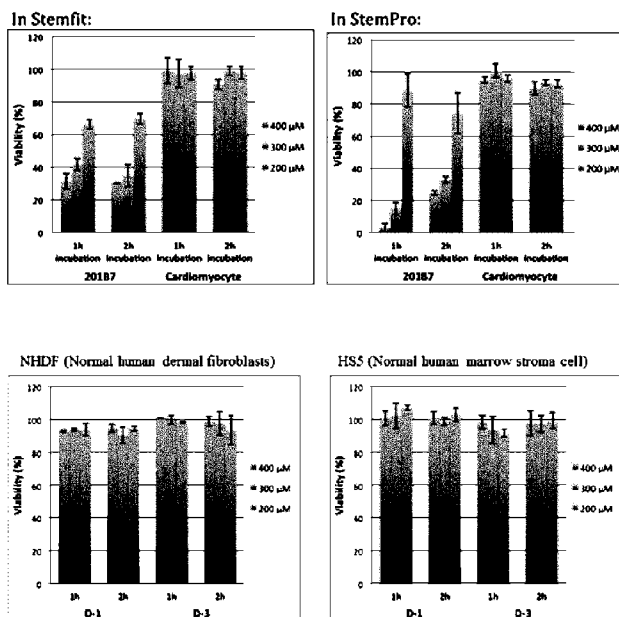
- (51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01) C07K 5/087 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) C07K 5/107 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/050946
- (22) 国際出願日: 2016年1月14日(14.01.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-005107 2015年1月14日(14.01.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 齊藤 博英(SAITO, Hirohide); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). クアン・イー(KUANG, Yi); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 奥山 尚一, 外(OKUYAMA, Shoichi et al.); 〒1000014 東京都千代田区永田町2丁目1番5号赤坂エイトワンビル7階 Tokyo (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, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: COMPOUND FOR IDENTIFYING PLURIPOTENT CELLS

(54) 発明の名称: 多能性細胞識別化合物



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing a compound for removing pluripotent cells from a cell population potentially including pluripotent cells. This problem is solved by bringing a polyphenylalanine derivative into contact with a target cell population.

(57) 要約: 多能性細胞を含有する可能性がある細胞集団より、当該多能性細胞を除去させる化合物を提供することが本発明の課題である。ポリフェニルアラニン誘導体を対象細胞集団と接触させることにより上記課題を解決する。

明 細 書

発明の名称：多能性細胞識別化合物

技術分野

[0001] 本発明は、多能性幹細胞と当該多能性幹細胞から分化した細胞とを含む細胞試料から、多能性細胞を選択的に除去するために使用する化合物に関する。

背景技術

[0002] ヒト胚性幹（ES）細胞（非特許文献1）および人工多能性幹（iPS）細胞（非特許文献2）などの多能性幹細胞は、無限に増殖し、種々の細胞型へと分化する細胞であることから再生医療のための材料として期待されている。しかし、少量の未分化な細胞を含む細胞試料を移植した際に、動物モデルにおいて奇形腫が発生したことにより、安全性に対する懸念が提起されている。従って、このような未分化な細胞すなわち多能性を保持している細胞を除去することが必要である。

[0003] このような、ヒト多能性幹細胞の検出のため、SSEA-4（stage-specific embryonic antigen 4）に対する抗体が広く使用されてきた（非特許文献3）。このSSEA-4を指標として、多能性細胞を細胞集団から除去するためには、当該SSEA-4に対する抗体を使用して、フローサイトメーター等を用いてソーティングを行う必要がある。このとき抗体を使用することから、移植材料に抗体の混入が懸念されることから、他の方法によって選択的に多能性細胞を除去する方法が望まれている。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Thomson, J. A. et al. Science 1998, 282, 1145-1147

非特許文献2：Takahashi, K. et al. Cell 2007, 131, 861-872

非特許文献3：Shevinsky, L. H. et al. Cell 1982, 30, 697-705

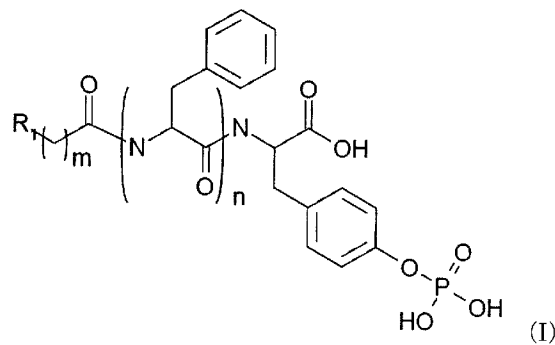
発明の概要

[0005] 多能性細胞を選択的に細胞死に至らしめる化合物について、本願発明者らは鋭意研究を行い、その結果、ポリフェニルアラニン誘導体が多能性幹細胞のみを選択的に細胞死させることが可能であることを発見し、本発明を完成させるに至った。

[0006] 本発明は以下の特徴を有する。

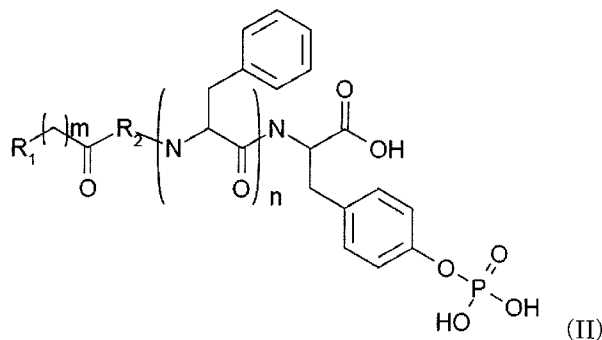
[1] 式 (I) :

[化1]



(式中、 R_1 はアリール基またはヘテロアリール基であり、 m は1から6の整数であり、 n は2以上の整数である)、または、式 (II) :

[化2]



(式中、 R_1 はアリール基またはヘテロアリール基であり、 R_2 は、アラニン残基またはグリシン残基であり、 m は1から6の整数であり、 n は2以上の整数である) で表される化合物と対象細胞集団とを接触させる工程を含む、多能性細胞を除去する方法。

[2] 前記化合物が、式 (I) で表される化合物であって、式中、 R_1 がナフチル

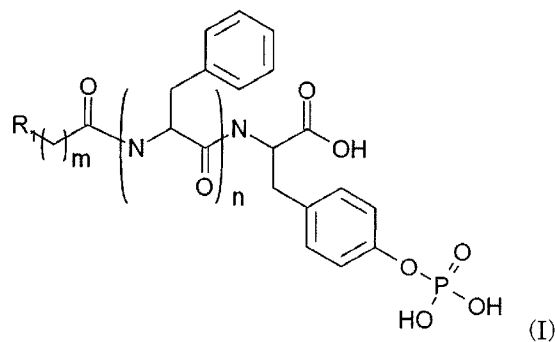
基であり、 m が1である、[1]に記載の方法。

[3] 前記化合物が、式 (I) で表される化合物であって、式中、 n が3である、[2]に記載の方法。

[4] 前記対象細胞集団が、多能性幹細胞から分化誘導された細胞集団である [1] から [3] のいずれか1項に記載の方法。

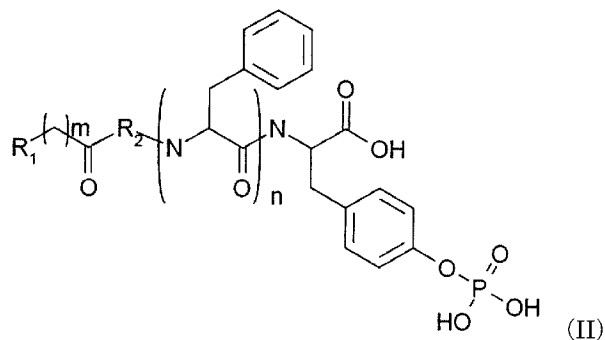
[5] 式 (I) :

[化3]



(式中、 R_1 はアリール基またはヘテロアリール基であり、 m は1から6の整数であり、 n は2以上の整数である)、または、式 (II) :

[化4]



(式中、 R_1 はアリール基またはヘテロアリール基であり、 R_2 は、アラニン残基またはグリシン残基であり、 m は1から6の整数であり、 n は2以上の整数である) で表される化合物を含む多能性細胞を除去するためのキット。

[6] 前記化合物が、式 (I) で表される化合物であって、式中、 R_1 がナフチル基であり、 m が1である、[5]に記載のキット。

[7] 前記化合物が、式 (I) で表される化合物であって、式中、 n が3である、[6] に記載のキット。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、ポリフェニルアラニン誘導体は、多能性細胞を細胞死させる作用を有することから、対象細胞群から含有される多能性細胞を除去することへの適用が可能となる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]図1は、201B7または心筋細胞株 (cardiomyocyte) へD-3を1時間 (1h) または2時間 (2h) 接触後、Stemfit (上左図) およびStemPro (上右図) 中で1日間培養した細胞の生存率を示すグラフである。また、正常細胞株であるNHDF (Normal human dermal fibroblasts) (下左図) または、HS-5(normal human marrow stroma cell) (下右図) へ D-3を1時間 (1h) または2時間 (2h) 接触後、DMEM中で1日間培養した細胞の生存率を示すグラフである。D-3を接触させずに同様の実験を行った結果を100%として算出した値を細胞生存率として縦軸に示す。

[図2]図2は、1231A3へD-3を1時間 (1h) または2時間 (2h) 接触後、Stemfit (上図) およびDMEM (下図) 中で1日間培養した細胞の生存率を示すグラフである。D-3を接触させずに同様の実験を行った結果を100%として算出した値を細胞生存率として縦軸に示す。

[図3]図3は、201B7 (上図) または1231A3 (下図) へフォスファターゼ阻害剤およびD-3 (inhibitor + D-3)、フォスファターゼ阻害剤 (inhibitor)、およびD-3を1時間 (1h) 接触後、1日間培養した細胞の生存率を示すグラフである。薬剤を接触させずに同様の実験を行った結果を100%として算出した値を細胞生存率として縦軸に示す。

[図4]図4は、各細胞をTRA-1-60抗体 (上図) またはSSEA-4抗体 (下図) で染色した後のヒストグラムを示す。左図は、201B7を分化誘導後の細胞 (201B7d16) をD-3と1時間 (1h) 接触後、1日間培養した細胞の結果であり、中央図は、201B7を分化誘導後の細胞 (201B7d16) の結果であり、右図は、201B7の結

果である。図中、数字は、TRA-1-60陽性細胞（上図）またはSSEA-4陽性細胞（下図）の含有率を示す。

[図5]図5は、各細胞をTRA-1-60抗体で染色しFACS測定した結果のドットプロットを示す。上図は、自然分化201B7（201B7をbFGF を添加しないStemfitで16日培養する）をD-3と接触後、23時間培養した細胞の結果であり、下図は、自然分化201B7（201B7d16）の結果である。下図の右側の図は、201B7を分化誘導後の細胞をisotype controlであるIgGにより染色した結果を示す。図中、数字は、TRA-1-60陽性細胞の含有率（右上図、左上図、左下図）または偽陽性細胞の含有率（右下図）を示す。

[図6]図6は、201B7および201B7を分化誘導後の細胞（201B7d16）を混合した細胞をD-3と接触後、24時間（24h）、8時間（8h）、4時間（4h）、2時間（2h）、または1時間（1h）培養した細胞、もしくは、201B7および201B7d16を混合した細胞（control）をTRA-1-60抗体で染色しFACS測定した結果のヒストグラムを示す。図中、数字は、TRA-1-60陽性細胞の含有率を示す。

[図7]図7は、1231A3および1231A3を分化誘導後の細胞（1231A3d18）を混合した細胞をD-3と接触後、24時間（24h）、8時間（8h）、4時間（4h）、2時間（2h）、または1時間（1h）培養した細胞、もしくは、201B7および1231A3d18を混合した細胞（control）をTRA-1-60抗体で染色しFACS測定した結果のヒストグラムを示す。図中、数字は、TRA-1-60陽性細胞の含有率を示す。

[図8]図8は、201B7および201B7を分化誘導後の細胞（201B7d16）を2:8（上図）または3:7（下図）で混合した細胞を400 μ M（左図）または300 μ M（中央図）のD-3と接触またはD-3と非接触（control）した細胞（右図）をTRA-1-60抗体で染色しFACS測定した結果のドットプロットを示す。図中、数字は、TRA-1-60陽性細胞の含有率を示す。

[図9]図9は、ジフェニルアラニンベースのホスホルDペプチドの抗iPS細胞効果を評価した結果を示すグラフである。D-1は二つのフェニルアラニンを、D3は三つのフェニルアラニンを持つ。D-7は、D-3に対し、さらにナフチル基とトリフェニルアラニンの間に、リンカーとなるグリシンを持つ。

[図10]図 1 0 は、異なる濃度のD-3で、3種のiPS細胞株（201B7、1231A、1383D7）を、1～4時間処理した際の致死率を示すグラフである。上の2枚のパネルは、細胞の濃度が異なり、コロニーの大きさが異なる201B7に対する毒性を比較したものである。

[図11]図 1 1 は、D-3による繰り返し処理により、コンフルエントに近い段階における201B7を除去することができることを示すグラフである。グラフは、D-3による各日の処理後の201B7の、毎日培地を交換したコントロールと比較した生存率を示す。201B7は異なる濃度で播種し、小コロニー、大コロニー、コンフルエントに近い段階を形成させた。NHDF細胞は、コントロールとして用い、毎日同様のD-3処理をした。

[図12]図 1 2 は、D-3が非iPS細胞である、正常皮膚繊維芽細胞(NHDF)、ヒト初代肝細胞、ヒト初代腎臓近位尿細管上皮細胞、自然分化201B7、201B7由来の神経細胞、及び201B7由来の心筋細胞に対しては、毒性がほとんどないことを示すグラフである。

[図13]図 1 3 は、D-3がヒトES細胞（khES1）に対しても毒性があることを示す。

[図14]図 1 4 は、D-3及び、市販の抗iPS細胞物質である rBC2LCN-PE23の201B7に対する毒性を比較するグラフであり、D-3がrBC2LCN-PE23よりも効能が高いことを示す。

[図15]図 1 5 は、D-3の毒性が、細胞に導入したP-ALP mRNA の量と関連することを示す（図 1 5 中のALPPは、P-ALPと同じものを表す）。

[図16]図 1 6 は、D-3を用いることにより、分化細胞群に混在するiPS細胞を除去することに成功したことを示す。201B7及びMHY6-EGFP を発現する201B7由来の心筋細胞を、400 μ M のD-3による1時間の培養後、あるいはそのような培養せずにフローサイトメトリー分析した。未処理の201B7及び未処理の心筋細胞をコントロールとして用いた。

[図17]図 1 7 は、D-3による繰り返し処理により、多量のiPS細胞と少量の分化細胞を含む細胞群から、少量の分化細胞を精製することに成功したことを

示す。

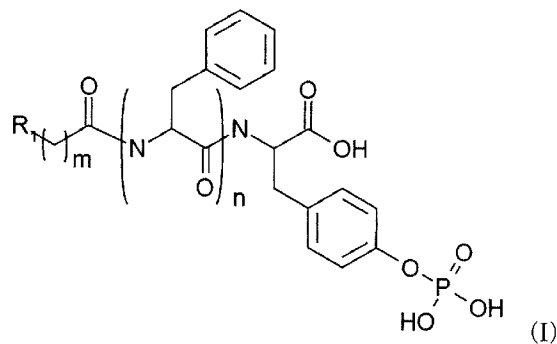
[図18]図18は、15日間自然に分化させた201B7の分化抵抗性クローンから、D-3を用いて残存iPS細胞を除去することに成功したことを示す。

[図19]図19は、D-3を用いることで、iPS細胞と分化細胞との共培養から、残存したiPS細胞を除去することに成功したことを示し、D-3処理をしておらず、iPS細胞を含有する試料を示す上左、上中央のパネルでは、iPS細胞の存在を示す染色が視認でき、D-3処理を実施した試料を示す下左、下右、並びにiPS細胞を入れていない上右のパネルでは、iPS細胞の存在が確認できない。

発明を実施するための形態

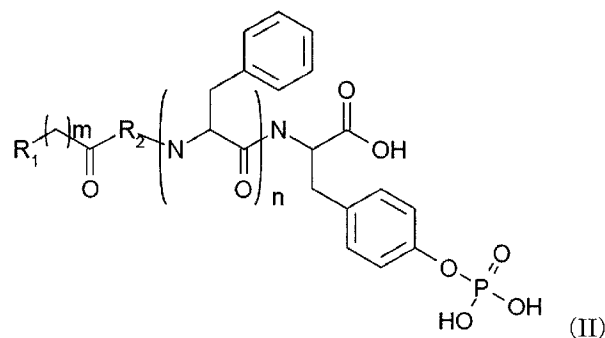
[0009] 本発明は、式(I)：

[化5]



(式中、 R_1 はアリール基またはヘテロアリール基であり、 m は1から6の整数であり、 n は2以上の整数である)、または、式(II)：

[化6]



(式中、 R_1 はアリール基またはヘテロアリール基であり、 R_2 は、アラニン残基

またはグリシン残基であり、mは1から6の整数であり、nは2以上の整数である）で表されるポリフェニルアラニン誘導体と対象細胞集団とを接触させる工程を含む、多能性細胞を除去する方法、または、当該ポリフェニルアラニン誘導体を含む多能性細胞を除去するためのキットを提供する。

[0010] 本発明において、アリール基とは、一価の6-炭素単環式、10-炭素二環式、14-炭素三環式芳香族環系を指す。アリール基の例には、フェニル基、ナフチル基、アントラセニル基が含まれるが、これらに限らない。

[0011] 本発明において、ヘテロアリール基とは、1個以上のヘテロ原子（O、N、S、またはSeなど）を有する、一価の芳香族5～8員単環系、8～12員二環系、または11～14員三環系を指す。ヘテロアリール基の例には、ピリジル基、フリル基、イミダゾリル基、ベンズイミダゾリル基、ピリミジニル基、チエニル基、キノリニル基、インドリル基、チアゾリル基が含まれる。

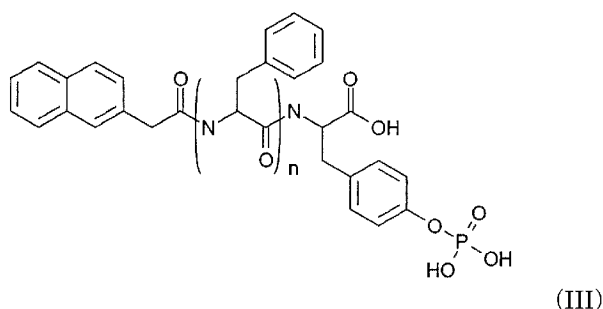
[0012] 別段の記載がない限り、本明細書でいうアリール基は、置換若しくは非置換両方の部分を含む。用語「置換」とは、1つ以上の置換基（同じまたは異なるものとできる）を指し、それぞれが水素原子を置換する。置換基の例には、ハロゲン基（例：F、Cl、Br、I）、ヒドロキシ基、アミノ基、シアノ基、ニトロ基、メルカプト基、アルコキシカルボニル基、アシルオキシ基、アミド基、カルボキシ基、アルカンスルホニル基、アルキルカルボニル基、カルバミド基、カルバミル基、カルボキシ基、チオウレイド基、チオシアナート基、スルホンアミド基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルキルオキシ基、アリール基、ヘテロアリール基、シクロアルキル基、ヘテロシクリルアルキル基が含まれるが、これらに限らず、そのうち、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルキルオキシ基、アリール基、ヘテロアリール基、ヘテロアリールオキシ基、アルキルアミノ基、アリールアミノ基、オキソ基（O=）、チオキソ基（S=）、チオ基、シリル基、アルキルチオ基、アリールチオ基、アルキルスルホニル基、アリールスルホニル基、アシルアミノ基、アミノアシル基、アミノチオアシル基（aminothioacyl）、アミジノ基、チオウレイド基、チオシアナート基、スルホンアミド基、グアニ

ジン基、ウレイド基、アシル基、チオアシル基、カルバミル基 ($-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$)、カルボキシル基 ($-\text{COOH}$)、カルボン酸エステル、そのうちアルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルキルオキシカルボニル基、アリール基、ヘテロアリール基、シクリル基、ヘテロシクリル基がさらに置換され得る。またシクロアルキル基、シクロアルケニル基、ヘテロシクロアルキル基、ヘテロシクロアルケニル基、アリール基、ヘテロアリール基は相互に縮環され得る。置換基は合成の過程において保護基とすることができる。ここで言う「保護基」とは、プロセス工程中に不要な反応をする官能性を保護または遮蔽するために用いられる基または部分を指す。

保護基はその工程で反応を防止するが、その後取り除いて本来の官能性を現すことができる。保護基の例には、トリメチルシリル基 (TES)、tert-ブチルオキシカルボニル基 (tBoc)、ベンジルオキシカルボニル基 (CBZ)、9-フルオレニルメチルオキシカルボニル基 (Fmoc) が含まれるが、これらに限らない。

[0013] 本発明において、好ましいポリフェニルアラニン誘導体は、式 (I) 中の R_1 がナフチル基であり、 m は 1 である、式 (III)

[化7]



で表される化合物である。

[0014] 本発明において、さらに好ましいポリフェニルアラニン誘導体は、式 (III) 中の n が、3 である化合物である。

[0015] 本発明のポリフェニルアラニン誘導体に含有される、アラニン残基、グリシン残基、フェニルアラニン残基および O -フォスホ-D-チロシンは、D 体で

あってもL体であっても良く、分解され難いとの観点から、好ましくはD体である。

[0016] 本発明のポリフェニルアラニン誘導体は、事態公知の固相ペプチド合成法によって、アミノ酸またはカルボン酸を適宜用いて合成することが可能である。

[0017] 本発明において、多能性細胞とは、生体に存在するすべての細胞に分化可能である性質を有し、アルカリホスファターゼ、Oct-3/4、Nanog、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60およびTRA-1-81から成る群の少なくとも一つのマーカー遺伝子が陽性である細胞である。多能性細胞には、多能性幹細胞が含有される。

[0018] 本発明において、対象細胞集団は、多能性細胞を含有するおそれのある細胞集団であれば、特に限定されないが、例えば、多能性幹細胞から分化誘導した細胞集団が挙げられる。

[0019] 本発明において、多能性幹細胞とは、生体に存在するすべての細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ。該多能性幹細胞の例としては、胚性幹（ES）細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹細胞（「ntES細胞」）、生殖幹細胞（「GS細胞」）、胚性生殖細胞（「EG細胞」）、および人工多能性幹（iPS）細胞が挙げられるが、これらに限定されない。好ましい前記多能性幹細胞の例として、ES細胞、ntES細胞、およびiPS細胞が挙げられる。

[0020] (A) 胚性幹細胞

ES細胞は、ヒトやマウスなどの哺乳動物の初期胚（例えば胚盤胞）の内部細胞塊から樹立された、多能性と自己複製による増殖能とを有する幹細胞である。

[0021] ES細胞は、受精卵の8細胞期、桑実胚期後の胚である、胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚由来幹細胞であり、成体を構成するあらゆる細胞に分化する能力、いわゆる分化多能性と、自己複製による増殖能とを有している。ES細胞は、マウスで1981年に発見され（M. J. Evans and M. H. Kaufman (1981), N

ature 292:154-156)、その後、ヒト、サルなどの霊長類でもES細胞株が樹立された(J. A. Thomson et al. (1998), Science 282:1145-1147; J. A. Thomson et al. (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:7844-7848; J. A. Thomson et al. (1996), Biol. Reprod., 55:254-259; および J. A. Thomson and V. S. Marshall (1998), Curr. Top. Dev. Biol., 38:133-165)。

[0022] ES細胞は、対象動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取出し、内部細胞塊をフィーダー細胞である線維芽細胞の上で培養することによって樹立することができる。また、継代培養による細胞の維持は、白血病抑制因子(LIF)、塩基性線維芽細胞成長因子(bFGF)などの物質を添加した培地を用いて行うことができる。ヒトおよびサルのES細胞の樹立と維持の方法については、例えば、H. Suemori et al. (2006), Biochem. Biophys. Res. Commun., 345:926-932; M. Ueno et al. (2006), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:9554-9559; H. Suemori et al. (2001), Dev. Dyn., 222:273-279; および H. Kawasaki et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:1580-1585などに記載されている。

[0023] ヒトES細胞は、例えば0.1mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM 非必須アミノ酸、2mM L-グルタミン酸、20% KSR及び4ng/ml bFGFを補充したDMEM/F-12培地を使用し、37℃、5% CO₂湿潤雰囲気下で維持することができる。また、ES細胞は、3~4日おきに継代する必要がある、このとき、継代は、例えば1mM CaCl₂及び20% KSRを含有するPBS中の0.25% トリプシン及び0.1mg/ml コラゲナーゼIVを用いて行うことができる。

[0024] ES細胞の選択は、一般に、アルカリホスファターゼ、Oct-3/4、Nanogなどの遺伝子マーカーの発現を指標にして行うことができる。特に、ヒトES細胞の選択では、OCT-3/4、NANOG、などの遺伝子マーカーの発現をReal-Time PCR法で検出したり、細胞表面抗原であるSSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81を免疫染色法にて検出することで行うことができる(Klimanskaya I, et al. (2006), Nature. 444:481-485)。

[0025] ヒトES細胞株である例えばKhES-1、KhES-2及びKhES-3は、京都大学再生医

科学研究所（京都、日本）から入手可能である。

[0026] (B) 生殖幹細胞

生殖幹細胞は、精巣由来の多能性幹細胞であり、精子形成のための起源となる細胞である。この細胞は、ES細胞と同様に、種々の系列の細胞に分化誘導可能であり、例えばマウス胚盤胞に移植するとキメラマウスを作出できる性質をもつ (M. Kanatsu-Shinohara et al. (2003) Biol. Reprod., 69:612-616 ; K. Shinohara et al. (2004), Cell, 119:1001-1012)。生殖幹細胞は、神経膠細胞系由来神経栄養因子 (GDNF) を含む培地で自己複製可能であるし、またES細胞と同様の培養条件下で継代を繰り返すことによって、生殖幹細胞を得ることができる (竹林正則ら (2008), 実験医学, 26巻, 5号 (増刊), 41~46頁, 羊土社 (東京、日本))。

[0027] (C) 胚性生殖細胞

胚性生殖細胞は、胎生期の始原生殖細胞から樹立される、ES細胞と同様な多能性をもつ細胞であり、LIF、bFGF、幹細胞因子などの物質の存在下で始原生殖細胞を培養することによって樹立しうる (Y. Matsui et al. (1992), Cell, 70:841-847 ; J.L. Resnick et al. (1992), Nature, 359:550-551)。

[0028] (D) 人工多能性幹細胞

人工多能性幹 (iPS) 細胞は、ある特定の核初期化物質を、DNAまたはタンパク質の形態で体細胞に導入することまたは薬剤によって当該核初期化物質の内在性のmRNAおよびタンパク質の発現を上昇させることによって作製することができる、ES細胞とほぼ同等の特性、例えば分化多能性と自己複製による増殖能、を有する体細胞由来の人工の幹細胞である (K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) Cell, 126: 663-676 ; K. Takahashi et al. (2007) Cell, 131: 861-872 ; J. Yu et al. (2007) Science, 318: 1917-1920 ; M. Nakagawa et al. (2008) Nat. Biotechnol., 26: 101-106 ; WO 2007/069666 ; およびWO 2010/068955)。核初期化物質は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子またはES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子もしくはそれらの遺伝子産物であればよく、特に限定されないが、例えば、Oct3/4、Klf4、Kl

f1、Klf2、Klf5、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Sox18、c-Myc、L-Myc、N-Myc、TERT、SV40 Large T antigen、HPV16 E6、HPV16 E7、Bmi1、Lin28、Lin28b、Nanog、Esrrb、Esrrg、およびGlis1が例示される。これらの初期化物質は、iPS細胞樹立の際には、組み合わされて使用されてもよい。例えば、上記初期化物質を、少なくとも1つ、2つもしくは3つ含む組み合わせであり、好ましくは4つを含む組み合わせである。

[0029] 上記の各核初期化物質のマウスおよびヒトcDNAのヌクレオチド配列並びに当該cDNAにコードされるタンパク質のアミノ酸配列情報は、WO 2007/069666に記載のNCBIアクセッション番号を参照することにより得られる。また、L-Myc、Lin28、Lin28b、Esrrb、Esrrg、およびGlis1のマウスおよびヒトのcDNA配列およびアミノ酸配列の情報については、それぞれ下記NCBIアクセッション番号を参照することにより取得できる。当業者は、当該cDNA配列またはアミノ酸配列情報に基づいて、常法により所望の核初期化物質を調製することができる。

遺伝子名	マウス	ヒト
L-Myc	NM_008506	NM_001033081
Lin28	NM_145833	NM_024674
Lin28b	NM_001031772	NM_001004317
Esrrb	NM_011934	NM_004452
Esrrg	NM_011935	NM_001438
Glis1	NM_147221	NM_147193

[0030] これらの核初期化物質は、タンパク質の形態で、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチドとの結合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよいし、あるいは、DNAの形態で、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクターの使用、リポフェクション、リポソームの使用、またはマイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよい。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベク

ター、レンチウイルスベクター（以上、Cell, 126, pp.663-676, 2006 ; Cell, 131, pp.861-872, 2007 ; Science, 318, pp.1917-1920, 2007）、アデノウイルスベクター（Science, 322, 945-949, 2008）、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター（Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 85, 348-62, 2009）などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC、PAC）などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる（Science, 322:949-953, 2008）。ベクターには、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができる。使用されるプロモーターとしては、例えばEF1 α プロモーター、CAGプロモーター、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニー Maus 白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどが用いられる。なかでも、EF1 α プロモーター、CAGプロモーター、MoMuLV LTR、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどが好ましい。さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子（例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子など）、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列；緑色蛍光タンパク質（GFP）、 β グルクロニダーゼ（GUS）、FLAGなどのレポーターの遺伝子配列；などを含むことができる。また、上記ベクターには、体細胞への導入後、核初期化物質をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合する核初期化物質をコードする遺伝子を共に切除するために、それらの前後にLoxP配列を有してもよい。別の好ましい一実施態様においては、トランスポゾンを用いて染色体に導入遺伝子を組み込んだ後に、プラスミドベクターもしくはアデノウイルスベクターを用いて細胞に転移酵素を作用させ、導入遺伝子を完全に染色体から除去する方法が用いられ得る。好ましいトランスポゾンとしては、例えば、鱗翅目昆虫由来のトランスポゾンであるpiggyBa

c等が挙げられる (Kaji, K. et al., (2009), Nature, 458: 771-775 ; Woltjen et al., (2009), Nature, 458: 766-770 ; WO 2010/012077) 。さらに、ベクターには、染色体への組み込みがなくとも複製されて、エピソームに存在するように、リンパ指向性ヘルペスウイルス (lymphotrophic herpes virus) 、BKウイルスまたは牛乳頭腫ウイルス (Bovine papillomavirus) の起点とそれらの複製に係る配列を含んでいてもよい。例えば、EBNA-1およびoriP配列、またはLarge TおよびSV40ori配列を含むことが挙げられる (WO 2009/115295、WO 2009/157201、およびWO 2009/149233) 。また、複数の核初期化物質を同時に導入するために、ポリシストロニックに発現させる発現ベクターを用いてもよい。ポリシストロニックに発現させるためには、遺伝子をコードする配列の間は、IRESまたは口蹄病ウイルス (FMDV) 2Aコード領域により結合されていてもよい (Science, 322:949-953, 2008およびWO 2009/092042 2009/152529) 。

- [0031] 核初期化に際して、iPS細胞の誘導効率を高めるために、上記の因子の他に、例えば、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 [例えば、バルプロ酸 (VPA) (Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA (例、HDAC1 siRNA Smartpool (登録商標) (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene) 等) 等の核酸性発現阻害剤など]、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば5'-azacytidine) (Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、G9aヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 [例えば、BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2: 525-528 (2008)) 等の低分子阻害剤、G9aに対するsiRNAおよびshRNA (例、G9a siRNA (human) (Santa Cruz Biotechnology) 等) 等の核酸性発現阻害剤など]、L-channel calcium agonist (例えばBayk8644) (Cell Stem Cell, 3, 568-574 (2008))、p53阻害剤 (例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA) (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、Wnt Signaling activator (例えばsoluble Wnt3a) (Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008))、LIFまたはbFGFなどの

増殖因子、ALK5阻害剤（例えば、SB431542）（Nat. Methods, 6: 805-8 (2009)）、mitogen-activated protein kinase signalling阻害剤、glycogen synthase kinase-3阻害剤（PLoS Biology, 6(10), 2237-2247 (2008)）、miR-291-3p、miR-294、miR-295などのmiRNA（R.L. Judson et al., Nat. Biotech., 27:459-461 (2009)）、等を使用することができる。

[0032] 核初期化物質の内在性のタンパク質の発現上昇に使用する薬剤としては、6-ブロモインジルビン-3'-オキシム、インジルビン-5-ニトロ-3'-オキシム、バルプロ酸、2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1, 5-ナフチリジン、1-(4-メチルフェニル)-2-(4, 5, 6, 7-テトラヒドロ-2-イミノ-3 (2H)-ベンゾチアゾリル) エタノン HBr（ピフィスリン-アルファ）、プロスタグランジンJ2およびプロスタグランジンE2等が例示される（WO 2010/068955）。

[0033] iPS細胞誘導のための培地としては、例えば（1）10～15%FBSを含有するDMEM、DMEM/F12またはDME培地（これらの培地にはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）、（2）bFGFまたはSCFを含有するES細胞用培地、例えばマウスES細胞用培地（例えばTX-WES培地、トロンボX社）または霊長類ES細胞用培地（例えば霊長類（ヒト&サル）ES細胞用培地（リプロセル、京都、日本）、mTeSR-1）、などが含まれる。

[0034] 培養法の例としては、たとえば、37℃、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DME MまたはDMEM/F12培地中で体細胞と核初期化物質（DNAまたはタンパク質）を接触させ約4～7日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞（たとえば、マイトマイシンC処理ST0細胞、SNL細胞等）上にまきなおし、体細胞と核初期化物質の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞用培地で培養し、該接触から約30～約45日またはそれ以上ののちにES細胞様コロニーを生じさせることができる。また、iPS細胞の誘導効率を高めるために、5-10%と低い酸素濃度の条件下で培養してもよい。

[0035] あるいは、その代替培養法として、体細胞は、フィーダー細胞（たとえば

、マイトマイシンC処理ST0細胞、SNL細胞等）上で10%FBS含有DMEM培地（これにはさらに、LIF、ペニシリン／ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）で培養し、培養から約25～約30日またはそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。

[0036] 上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培地と培地交換を行う。また、核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ100cm²あたり約 5×10^3 ～約 5×10^6 細胞の範囲である。

[0037] マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子を用いた場合は、対応する薬剤を含む培地（選択培地）で培養を行うことによりマーカー遺伝子発現細胞を選択することができる。またマーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合は蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、また発色酵素遺伝子の場合は発色基質を加えることによって、マーカー遺伝子発現細胞を検出することができる。

[0038] 本明細書中で使用する「体細胞」は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、サル、ブタ、ラット等）由来の生殖細胞以外のいかなる細胞であってもよく、例えば、角質化する上皮細胞（例、角質化表皮細胞）、粘膜上皮細胞（例、舌表層の上皮細胞）、外分泌腺上皮細胞（例、乳腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例、副腎髄質細胞）、代謝・貯蔵用の細胞（例、肝細胞）、境界面を構成する内腔上皮細胞（例、I型肺胞細胞）、内鎖管の内腔上皮細胞（例、血管内皮細胞）、運搬能をもつ繊毛のある細胞（例、気道上皮細胞）、細胞外マトリックス分泌用細胞（例、線維芽細胞）、収縮性細胞（例、平滑筋細胞）、血液と免疫系の細胞（例、Tリンパ球）、感覚に関する細胞（例、桿細胞）、自律神経系ニューロン（例、コリン作動性ニューロン）、感覚器と末梢ニューロンの支持細胞（例、随伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、およびそれらの前駆細胞（組織前駆細胞）等が挙げられる。細胞の分化の程度や細胞を採取する動物の齢などに特に制限はなく、未分化な前駆細胞（体性幹細胞

も含む)であっても、最終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における体細胞の起源として使用することができる。ここで未分化な前駆細胞としては、たとえば神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞(体性幹細胞)が挙げられる。本発明において、体細胞を採取する由来となる哺乳動物個体は特に制限されないが、好ましくはヒトである。

[0039] (E) 核移植により得られたクローン胚由来のES細胞

nt ES細胞は、核移植技術によって作製されたクローン胚由来のES細胞であり、受精卵由来のES細胞とほぼ同じ特性を有している(T. Wakayama et al. (2001), *Science*, 292:740-743; S. Wakayama et al. (2005), *Biol. Reprod.*, 72:932-936; J. Byrne et al. (2007), *Nature*, 450:497-502)。すなわち、未受精卵の核を体細胞の核と置換することによって得られたクローン胚由来の胚盤胞の内部細胞塊から樹立されたES細胞がnt ES (nuclear transfer ES) 細胞である。nt ES細胞の作製のためには、核移植技術(J. B. Cibelli et al. (1998), *Nat. Biotechnol.*, 16:642-646)とES細胞作製技術(上記)との組み合わせが利用される(若山清香ら(2008), 実験医学, 26巻, 5号(増刊), 47~52頁)。核移植においては、哺乳動物の除核した未受精卵に、体細胞の核を注入し、数時間培養することで再プログラム化することができる。

[0040] (F) 融合幹細胞

体細胞と卵子もしくはES細胞とを融合させることにより、融合させたES細胞と同様な多能性を有し、さらに体細胞に特有の遺伝子も有する幹細胞である(Tada M et al. *Curr Biol.* 11:1553-8, 2001; Cowan CA et al. *Science*. 2005 Aug 26;309(5739):1369-73)。

[0041] 本発明において、多能性幹細胞から分化誘導するとは、特定の臓器細胞およびその前駆細胞へ分化を誘導されるのみでなく、内胚葉細胞、中胚葉細胞および外胚葉細胞等の広範な細胞型を含む細胞集団へと分化を誘導されることを包含する。臓器細胞の例としては、皮膚、血管、角膜、腎臓、心臓、肝

臓、臍帯、腸、神経、肺、胎盤、脾臓、脳、四肢末梢、および網膜等に含まれる細胞が挙げられるが、これらに限定されない。当業者に自明の任意の分化誘導法を用いることができる。例としては、特開2002-291469またはW02011/019092に記載される神経幹細胞への分化誘導法、特開2004-121165に記載される脾幹様細胞への分化誘導法、および特表2003-505006に記載される造血細胞への分化誘導法、W02014/185358に記載される心筋細胞への分化誘導法が挙げられる。さらに、胚様体の形成による分化誘導法の例として、特表2003-523766等に記載される方法等が挙げられる。

- [0042] 本発明のポリフェニルアラニン誘導体は、対象細胞集団の培養液へ添加することによって、当該対象細胞集団に含有される多能性細胞の細胞死を誘導することによって、除去することができる。対象細胞集団とポリフェニルアラニン誘導体の接触の時間は、特に限定されないが、1時間、2時間、3時間、4時間、5時間、6時間、12時間、24時間が例示される。また、ポリフェニルアラニン誘導体の培養液中の濃度は、特に限定されないが、100 μ Mから1mM、より好ましくは、200 μ M、300 μ M、または400 μ Mが例示される。

実施例

- [0043] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はそれらの実施例によって制限されないものとする。

実施例 1

- [0044] <iPS細胞>

ヒトiPS細胞(201B7)は、京都大学の山中教授(Takahashi K, et al. Cell. 131:861-72, 2007)より供与されたものを、Nakagawa, et al. Sci Rep. 4:3594, 2014に記載の方法で培養した。

- [0045] ヒトiPS細胞(1231A3)は、京都大学の中川講師より供与されたものを、Nakagawa, et al. Sci Rep. 4:3594, 2014に記載の方法で培養した。

- [0046] ヒトiPS細胞(MYH6-EIP4-201B7)は、前記201B7へMYH6プロモーターに作動可能に結合したEGFPのカセット(MYH6-EIP4)を導入して作製した。MYH6-EIP4導入iPS細胞株の作製は、PiggyBacトランスポゾンシステムを用いて、MYH(m

yosin heavy chain)-promoterの下流にEGFPカセットを作動可能に連結したベクターを201B7に導入することにより行われた。

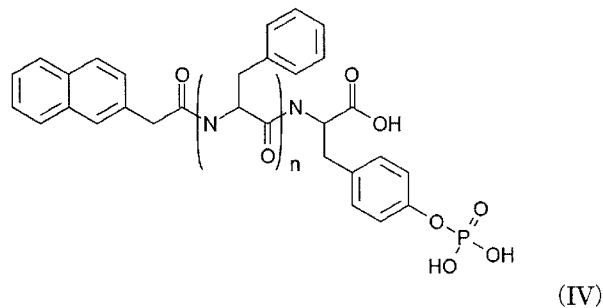
[0047] <心筋細胞株>

心筋細胞株は、MYH6-EIP4-201B7をCTK solution (ReproCELL) で2分処理後、溶液を除去し、続いてAccumax (Innovative Cell Technologies) で5分処理後、ピペッティングによりシングルセルへと解離した。遠心分離により細胞を回収し、低接着6 wellディッシュ (Corning) へ移し、2mM L-Glutamine、150 μ g/mL Transferrin、50 μ g/mL Ascorbic Acid (sigma)、 4×10^{-4} M monothioglycerol (MTG)および2ng/mL BMP4 (R&D) を添加した1.5 ml/well STEM PRO 34 (Invitrogen) 中、37°C、5%酸素条件下にて培養して、EBを形成させた。翌日、1% L-Glutamine、150 μ g/mL Transferrin、50 μ g/mL Ascorbic Acid、 4×10^{-4} M MTG、18ng/mL BMP4、10ng/mL bFGFおよび12ng/mL Activin Aを添加したSTEM PRO 34を等量、EBの培養を行っている6 wellプレート中に加え、37°C、5%酸素条件にて3日間培養した。得られたEBをIMDM (Invitrogen) にて洗浄し、1%L-Glutamine、150 μ g/mL Transferrin、50 μ g/mL Ascorbic Acid、 4×10^{-4} M MTG、10ng/mL VEGFおよび1 μ M IWP-3を添加したSTEM PRO 34をディッシュに加えて、37°C、5%酸素条件下で、4日間培養した。培地を、1% L-Glutamine、150 μ g/mL Transferrin、50 μ g/mL Ascorbic Acid、 4×10^{-4} M MTG、10ng/mL VEGFおよび5ng/mL bFGFを添加したSTEM PRO 34に交換し、4日間、37°C、5%酸素条件下で培養した。この時、2 日に1度同じ条件の培地に交換した。続いて、通常の酸素濃度にて、2 日に1度同じ条件の培地に交換しながら8日間培養し、MYH-6を代替するEGFPを指標として、FACSを用いてEGFP陽性細胞を単離して、心筋細胞株として用いた。

[0048] <D-1およびD-3>

化合物D-1は下記の式 (IV) (式中、 $n=2$) の構造式、および化合物D-3は下記の式 (IV) (式中、 $n=3$) の構造式を有するものを使用した。

[化8]



(IV)

[0049] D-1およびD-3は、Ottinger, E.A., et al., Biochemistry, 32, 1993に記載の固相ペプチド合成法により作製した。詳細には、2-chlorotrityl chloride resin、N-Fmoc-protected amino acidsおよび2-Naphthaleneacetic acidをN,N-diisopropylethylamine (DIPEA)およびO-benzotriazole-N,N,N',N'-tetramethyl-uronium-hexafluoro-phosphate (HBTU)を用いて活性化することで合成した。O-phospho-D-tyrosineは、Alewood, P. F., et al., Synthesis, 30-31 1983に記載の方法に従って、D-tyrosineおよびphosphorus pentoxideをリン酸存在下で一昼夜反応させることで合成した。N-Fmoc-O-phospho-D-tyrosineは、水とCH₃CNを1:1で混合した溶媒中にて、O-phospho-D-tyrosineおよびFmoc-OSuを溶解させ、Et₃Nを加えpHを8~9に調整し、30分間反応することで得られた (Ottinger, E.A., et al., Biochemistry, 32, 1993)。

実施例 2

[0050] 201B7細胞は、ラミニン被覆した24wellプレート上の、Rock inhibitor を含有するStemfit (味の素) に、 2×10^4 /well (24 wellプレート) となるように播種した(day 0)。24時間後、培地を、Stemfitのみのものに取り換え、24時間培養を続けた。または 1×10^4 /well (24 wellプレート) の心筋細胞株を播種し、StemPro (Life Technologies) 中で1日間培養した。続いて、 $0 \mu\text{M}$ 、 $200 \mu\text{M}$ 、 $300 \mu\text{M}$ または $400 \mu\text{M}$ のD-3を培養液に添加し、1時間または2時間培養した。D-3を含まない培地へ交換し、1日間培養後、WST-1アッセイにより細

胞死を評価し、 $0\mu\text{M}$ のD-3を添加した場合と比較して細胞生存率を算出した。その結果、 $300\mu\text{M}$ 以上のD-3を培養液に添加し、1時間以上培養した場合、201B7は細胞死を引き起こすことが確認された（図1）。一方、心筋細胞株は、D-3による細胞障害性は見出せなかった。

以上より、D-3は、多能性幹細胞に特異的に細胞死を引き起こすことが示唆された。同様に、NHDF（正常ヒト真皮線維芽細胞）またはHS5（正常ヒト髄基質細胞）へ $0\mu\text{M}$ 、 $200\mu\text{M}$ 、 $300\mu\text{M}$ または $400\mu\text{M}$ のD-3を培養液に添加し、1時間または2時間培養した。D-3を含まない培地へ交換し、1日間培養後、WST-1アッセイにより細胞死を評価し、 $0\mu\text{M}$ のD-3を添加した場合と比較して細胞生存率を算出した。その結果、いずれの細胞に対してもD-3による細胞障害性は見いだせなかった。

実施例 3

[0051] 1231A3細胞は、ラミニン被覆した24wellプレート上の、Rock inhibitor を含有するStemfit（味の素）に、 $2 \times 10^4/\text{well}$ （24 wellプレート）となるように播種した（day 0）。24時間後、StemfitまたはDMEM（Life Technologies）中で1日間培養した。 $0\mu\text{M}$ 、 $200\mu\text{M}$ 、 $300\mu\text{M}$ または $400\mu\text{M}$ のD-1もしくは $0\mu\text{M}$ 、 $200\mu\text{M}$ 、 $300\mu\text{M}$ または $400\mu\text{M}$ のD-3を培養液に添加し、1時間または2時間培養した。続いて、D-1およびD-3を含まない培地へ交換し、1日間培養後、WST-1アッセイにより、D-1またはD-3を添加しなかった場合（ $0\mu\text{M}$ ）の細胞と比較して各細胞生存率を算出した。その結果、D-3は、培地の影響を受けず、多能性幹細胞への毒性を発揮することが確認された（図2）。

実施例 4

[0052] 201B7または1231A3細胞は、ラミニン被覆した24wellプレート上の、Rock inhibitor を含有するStemfit（味の素）に、 $2 \times 10^4/\text{well}$ （24 wellプレート）となるように播種した（day 0）。24時間後、培地を、Stemfitのみのものに取り換え、24時間培養を続けた。続いて、 $0\mu\text{M}$ または $400\mu\text{M}$ のD-3、およびフォスファターゼ阻害剤（ 5mM L-フェニルアラニン（和研薬株式会社）および 2mM L-ホモアルギニン（和研薬株式会社）の混合物）を培養液に添加し、1時

間または2時間培養した。D-3を含まない培地へ交換し、1日間培養後、WST-1アッセイにより細胞死を評価し、D-3およびフォスファターゼ阻害剤を添加しなかった場合と比較して細胞生存率を算出した。その結果、フォスファターゼ阻害剤によりD-3の細胞障害性が抑制されることから、D-3による細胞死には、フォスファターゼが介在することが示唆された（図3）。

実施例 5

[0053] 201B7をbFGF を添加しないStemfitで16日培養する、細胞を自然分化させた。続いて、細胞は、ラミニン被覆した24wellプレート上の、Rock inhibitor を含有する、bFGF を添加しないStemfit（味の素）に、 2×10^4 /well（24 wellプレート）となるように播種した（day 0）。24時間後、培地を、bFGF を添加しないStemfitのみのものに取り換え、24時間培養を続けた。続いて、 $0 \mu\text{M}$ または $400 \mu\text{M}$ のD-3を培養液に添加し、1時間培養した。D-3を含まない培地へ交換し、1日間培養後、細胞を分離回収し、TRA-1-60（BD Pharmingen）またはSSEA4（BD Pharmingen）に対する抗体により染色した。7-Amino-ActinomycinD（7-AAD）によって染色されなかった生細胞についてFACSを用いて、TRA-1-60またはSSEA4陽性細胞の含有率を評価した。なお、陽性対照として、201B7を分化させないものを用いた。その結果、D-3を添加して培養することで、TRA-1-60またはSSEA4陽性細胞を除去または低減させることが確認された（図4）。

[0054] 同様に、201B7をbFGF を添加しないStemfitで16日培養する、細胞を自然分化させた。続いて、細胞は、ラミニン被覆した24wellプレート上の、Rock inhibitor を含有する、bFGF を添加しないStemfit（味の素）に、 2×10^4 /well（24 wellプレート）となるように播種した（day 0）。24時間後、培地を、bFGF を添加しないStemfitのみのものに取り換え、24時間培養を続けた。続いて、 $0 \mu\text{M}$ （対照）または $400 \mu\text{M}$ のD-3を培養液に添加し、1時間培養した。D-3を含まない培地へ交換し、23時間培養後、細胞を分離回収し、TRA-1-60に対する抗体により染色した。7-ADDによって染色されなかった生細胞についてFACSを用いて、TRA-1-60陽性細胞の含有率を評価した。なお、このとき陰性

対照としてIgM, κ isotype (BD Pharmingen)による染色により非特異的な陽性細胞をわずかながら検出した。その結果、上記と同様に、D-3を添加して培養することで、TRA-1-60陽性細胞を除去または低減させることが確認された(図5)。

実施例 6

[0055] 201B7をbFGF を添加しないStemfitで16日培養する、細胞を自然分化させた。 0.7×10^5 の201B7および 0.7×10^5 の自然分化の201B7を混合し、ラミニン被覆した6wellプレート上の、Rock inhibitor を含有する、bFGF を添加しないStemfit (味の素) に播種した(day 0)。24時間後、培地を、bFGF を添加しないStemfitのみのものに取り換え、24時間培養を続けた。続いて、 $400 \mu\text{M}$ のD-3を添加したbFGFを含有しないStemfit中で1時間培養した。D-3を含まない培地へ交換し、さらに、1時間、2時間、4時間、8時間または24時間培養した。培養後の細胞をそれぞれ分離回収し、TRA-1-60に対する抗体により染色した。7-ADDによって染色されなかった生細胞についてFACSを用いて、TRA-1-60陽性細胞の含有率を評価した。なお、陽性対照として、201B7および201B7をbFGFを含有しないStemfit中で16日間培養することで分化誘導した細胞の混合直後の細胞を用いた。その結果、D-3との接触1時間後より細胞障害が起こり、時間経過とともに多能性幹細胞の細胞死が起きることが確認された(図6)。

[0056] 同様に、1231A3をbFGF を添加しないStemfitで16日培養する、細胞を自然分化させた。 0.5×10^5 の1231A3および 0.7×10^5 の自然分化の201B7を混合し、ラミニン被覆した6wellプレート上の、Rock inhibitor を含有する、bFGF を添加しないStemfit (味の素) に播種した(day 0)。24時間後、培地を、bFGF を添加しないStemfitのみのものに取り換え、24時間培養を続けた。続いて、 $400 \mu\text{M}$ のD-3を添加したbFGFを含有しないStemfit中で1時間培養した。D-3を含まない培地へ交換し、さらに、1時間、2時間、4時間、8時間または24時間培養した。培養後の細胞をそれぞれ分離回収し、TRA-1-60に対する抗体により染色した。7-ADDによって染色されなかった生細胞についてFACSを用い

て、TRA-1-60陽性細胞の含有率を評価した。なお、陽性対照として、1231A3および1231A3をbFGFを含有しないStemfit中で18日間培養することで分化誘導した細胞の混合直後の細胞を用いた。その結果、D-3に接触後より細胞障害性が起こり、時間経過とともに多能性幹細胞の細胞死が起きることが確認された（図7）。

[0057] 同様に、201B7をbFGF を添加しないStemfitで16日培養する、細胞を自然分化させた。201B7および自然分化の201B7を2:8または3:7で混合し、ラミニン被覆した6wellプレート上の、Rock inhibitor を含有する、bFGF を添加しないStemfit（味の素）に播種した(day 0)。24時間後、培地を、bFGF を添加しないStemfitのみのものに取り換え、24時間培養を続けた。続いて、0 μ M、300 μ Mまたは400 μ MのD-3を添加したbFGFを含有しないStemfit中で1時間培養した。D-3を含まない培地へ交換し、さらに、23時間培養した。培養後の細胞をそれぞれ分離回収し、TRA-1-60に対する抗体により染色した。7-ADDによって染色されなかった生細胞についてFACSを用いて、TRA-1-60陽性細胞の含有率を評価した。その結果、D-3との接触によりTRA-1-60陽性細胞選択的に細胞死が起きていることが確認された（図8）。

[0058] [実施例7]

201B7は、ラミニン被覆した24wellプレート上の、Rock inhibitor を含有するStemfitに、 2.6×10^4 cell/cm²となるように播種した。24時間後、培地を、Stemfitのみのものに取り換え、培養を続けた。さらに24時間後、培地を、D-1、D-3、D-7の各分子を異なる濃度で含むStemfit、あるいはコントロールとしてのStemfitに取り換えた。2時間の培養後に、培地をStemfitのみのものに取り換えた。翌日、細胞を100 μ LのAccumaxを用いて採取した。次いで、300 μ LのStemfitを加え、Accumax反応を停止した。各サンプルの100 μ L中の生細胞の数をフローサイトメトリーを用いて測定した。死細胞を判別するための分析の前に、各サンプルに7-AADを加えた。その結果、D-3のみならず、D-1及びD-7を用いた場合でも、201B7を細胞死させることができることが示された（図9）。

[0059] [実施例 8]

ラミニン被覆した24wellプレート上の、Rock inhibitor を含有するStemfitに、3種のiPS細胞株（201B7、1231A、1383D7）は 2.6×10^4 cell/cm² となるように播種した。201B7については、他に 5.3×10^4 /cm²となるように播種し、大きなコロニーを生成させたサンプルも作製した。なお、ヒトiPS細胞（1383D7）は、京都大学 森実 飛鳥博士より供与されたものを培養して用いた。24時間後、培地を、Stemfitのみのものに取り換え、培養を続けた。さらに24時間後、培地を、D-3を異なる濃度で含むStemfit、あるいはコントロールとしてのStemfitに取り換えた。1～4時間の培養後に、培地をStemfitのみのものに取り換えた。翌日、細胞を100 μ L のAccumaxを用いて採取した。次いで、300 μ Lの Stemfitを加え、Accumax反応を停止した。各サンプルの100 μ L中の生細胞の数を、フローサイトメトリーを用いて測定した。死細胞を判別するための分析の前に、各サンプルに7-AADを加えた。その結果、D-3を加えることで、201B7、1231A、1383D7のいずれのiPS細胞株も、細胞死させることが可能であることが示された（図10）。また、同一の細胞株については、高濃度での播種により大きなコロニーを形成した201B7よりも、低濃度で播種した201B7に対し、D-3による細胞死の効率がより高いことがわかった。これは、高濃度播種の場合はD-3と細胞が接触しない領域が生じるため、D-3と細胞との接触面積による影響が強いと考えられる。

[0060] [実施例 9]

201B7細胞は、ラミニン被覆した24wellプレート上の、Rock inhibitor を含有するStemfitに、 2.6×10^4 cell/cm²、 5.3×10^4 cell/cm²、 10.5×10^4 cell/cm²となるように播種した(day 0)。24時間後、培地を、Stemfitのみのものに取り換え、培養を続けた。さらに24時間後、培地を、D-3を400 μ Mの濃度で含むStemfitに取り換えた。2時間の培養後に、培地をStemfitのみのものに取り換えた。それぞれの細胞は、D3により一度（day 2のみ）、二度（day 2 及び day 3）、三度（day 2-4）にわたって処理した。次いで、day5に、細胞を100 μ L のAccumaxを用いて採取し、300 μ Lの Stemfitを加え、Accum

ax反応を停止した。各サンプルの100 μ L中の生細胞の数を、フローサイトメトリーを用いて測定した。死細胞を判別するための分析の前に、各サンプルに7-AADを加えた。NHDFは、24wellプレート上の、FGM fibroblast培地に、 5.3×10^4 cell/cm²となるように播種した。細胞は、day 2-4に、FGM fibroblast培地中の400 μ Mの D-3で 2時間インキュベーションすることにより処理した。次いで、day5に、細胞を上記201B7細胞と同様の方法により採取し、Accumax反応を停止し、各サンプルの100 μ L中の生細胞の数を、フローサイトメトリーを用いて同様に測定した。死細胞を判別するための分析の前に、各サンプルに7-AADを加えた。その結果、D-3による繰り返し処理により、コンフルエントに近い段階における201B7であっても高精度に除去できることがわかった（図11）。

[0061] [実施例10]

正常皮膚繊維芽細胞(NHDF)は、ATCC (American Type Culture Collection) から購入した。ヒト初代肝細胞及び肝細胞培地はコスモバイオから購入した。ヒト初代腎臓近位尿細管上皮細胞及びREGMTM BulletKit培地は、Lonzaから購入した。自然分化201B7は、201B7をbFGF を添加しないStemfitで2週間培養することにより調製した。201B7由来の神経細胞は、前出の論文Nakagawa, et al. Sci Rep. 4:3594, 2014に記載の方法に従って調製した。201B7由来の心筋細胞は、先に示した方法により調製した。すべての細胞は、37 °C, 5% CO₂で維持した。各細胞は、24wellプレート上のそれぞれの培地に、 5.3×10^4 cell/cm²となるように播種した。24時間後、培地を、D-3分子を異なる濃度で含む培地、あるいはコントロールとしての培地のみに取り換えた。1～4時間の培養後に、培地のみのものに取り換えた。翌日、細胞を100 μ L のAccumaxを用いて採取した。次いで、300 μ Lの Stemfitを加え、Accumax反応を停止した。各サンプルの100 μ L中の生細胞の数を、フローサイトメトリーを用いて測定した。死細胞を判別するための分析の前に、各サンプルに7-AADを加えた。その結果、D-3がiPS 細胞ではない各種の細胞に対しては、毒性がほとんどないことが示された（図12）。

[0062] [実施例 1 1]

khES1は、京都大学の吉田善紀博士より供与されたものを培養して用いた。khES1を、 5.3×10^4 cell/cm²となるように播種した以外は、実施例 8 に示す方法と同様にして、D-3のkhES1に対する毒性を調べた。その結果、D-3がヒトES細胞 (khES1) に対しても毒性であることが示された (図 1 3)。

[0063] [実施例 1 2]

ラミニン被覆した24wellプレート上の、Rock inhibitor を含有するStemfit に、iPS細胞株 (201B7) は 5.3×10^4 cell/cm² となるように播種した。24時間後、培地を、Stemfitのみのものに取り換え、培養を続けた。さらに24時間後、培地を、D-3を400 μ Mで含むStemfit、rBC2LCN-PE23 を 10 μ g/mLで含むStemfit、あるいはコントロールとしてのStemfitに取り換えた。D-3については1時間または2時間の培養後に、rBC2LCN-PE23については2時間または24時間の培養後に、培地をStemfitのみのものに取り換えた。翌日、細胞を100 μ L のAccumaxを用いて採取した。次いで、300 μ Lの Stemfitを加え、Accumax反応を停止した。各サンプルの100 μ L中の生細胞の数を、フローサイトメトリーを用いて測定した。死細胞を判別するための分析の前に、各サンプルに7-AADを加えた。その結果、D-3が、市販の抗iPS細胞物質である rBC2LCN-PE23よりも効能が高いことが示された (図 1 4)。D-3は、iPS細胞の除去効果が高いだけでなく、除去のための処理時間の短縮も可能とする。短いペプチド分子であるD-3は、経済的に、大容量で容易に合成できる点においても優れている。

[0064] [実施例 1 3]

293FT は、invitrogenから購入した。24 wellプレート上のDMEM 培地 (10% FBS, 1% non essential amino acids)に、293FTを 5.3×10^4 cell/cm²となるように播種した。24時間後、標準的なプロトコルに従って、Stemfect試薬を用い、異なる濃度の野生型胎盤型アルカリフォスファターゼのmRNA (P-ALP mRNA) で293FT をトランスフェクトした。4時間後、培地を培養培地のみに交換した。コントロールとしては、293FT をD-3処理をすることなく、処理した

ものと同じタイミングで培地交換のみを行ったものを用いた。24時間後、培地を、D-3を異なる濃度で含むものに取り換え、コントロールについては培地だけのものに取り換えた。1時間の培養後に、培地をStemfitのみのものに取り換えた。翌日、細胞を100 μ L のAccumaxを用いて採取した。次いで、300 μ Lの Stemfitを加え、Accumax反応を停止した。各サンプルの100 μ L中の生細胞の数をフローサイトメトリーを用いて測定した。死細胞を判別するための分析の前に、各サンプルに7-AADを加えた。その結果、D-3の毒性が、P-A LP mRNA のトランスフェクション量と関連することが示された（図15）。

[0065] [実施例14]

201B7及びMHY6-EGFP を発現する201B7由来の心筋細胞は、細胞数比が1:9となり、合計で、 5.3×10^4 cell/cm²となるように、ラミニン被覆した24wellプレート上の、Rock inhibitor を含有するStemfitに播種した。24時間後、培地を、MHY6-EGFP を発現する201B7由来の心筋細胞の懸濁液を含有するStemfitに交換した。さらに24時間後、培地を、D-3 を 400 μ Mの濃度で含むStemfitと交換し、コントロールについてはStemfitのみの培地と交換した。1時間の培養後に、培地をStemfitのみのものに取り換えた。翌日、細胞を100 μ L のAccumaxを用いて採取した。次いで、400 μ Lの Stemfitを加え、Accumax反応を停止した。各サンプルの100 μ L中の生細胞の数を、フローサイトメトリーを用いて測定した。死細胞を判別するための分析の前に、各サンプルに7-AADを加えた。201B7を判別するために、Alexa 647 fluorophoreを備えるTra-1-60抗体を用いた。また、分化後20日もしくは21日の心筋細胞はEGFP陽性細胞を選択することにより選別した。その結果、D-3を用いることにより、分化細胞群からiPS細胞を除去することができることが示された（図16）。

[0066] [実施例15]

201B7及びMHY6-EGFP を発現する201B7由来の心筋細胞は、細胞数比が7:3となり、合計で、 5.3×10^4 cell/cm²となるように、ラミニン被覆した24wellプレート上の、Rock inhibitor を含有するStemfitに播種した(day 0)。24時間後、培地を、MHY6-EGFP を発現する201B7由来の心筋細胞の懸濁液を含有

するStemfitに交換した (day 1) 。 さらに24時間後、培地を、D-3 を 400 μ Mの濃度で含むStemfitと交換し、コントロールについてはStemfitのみの培地と交換した。2時間の培養後に、培地をStemfitのみのものに取り換えた。細胞は一度 (day 2のみ) 、二度 (day 2 及び day 3) 、または三度 (day 2-4) にわたってD-3で処理した。翌日、細胞を100 μ L のAccumaxを用いて採取した。次いで、300 μ Lの Stemfitを加え、Accumax反応を停止した。各サンプルの100 μ L中の生細胞の数を、フローサイトメトリーを用いて測定した。死細胞を判別するための分析の前に、各サンプルに7-AADを加えた。201B7を判別するために、Alexa 647 fluorophoreを備えるTra-1-60抗体を用いた。また、分化後20日もしくは21日の心筋細胞はEGFP陽性細胞を選択することにより選別した。その結果、D-3により、多量のiPS細胞と少量の分化細胞を含む細胞群から、少量の分化細胞を精製することに成功したことが示された (図 17) 。

[0067] [実施例 16]

201B7の自然分化に対する抵抗性クローンを用いて、bFGFを含まないStemfitで培養して、自然分化を誘導した。day 15に、 5.3×10^4 cell/cm²となるように、ラミニン被覆した24wellプレート上の、Rock inhibitor を含有するStemfitに細胞を播種した(day 0)。24時間後、培地をStemfitに交換した。さらに24時間後、培地を、D-3を400 μ Mで含むStemfit、あるいはコントロールとしてのStemfitに取り換えた。2時間の培養後に、培地をStemfitのみのものに取り換えた。それぞれの細胞は、一度 (day 2のみ) 、二度 (day 2 及び day 3) 、三度 (day 2-4) にわたって処理した。次いで、day5に、細胞を100 μ L のAccumaxを用いて採取し、300 μ Lの Stemfitを加え、Accumax反応を停止した。各サンプルの100 μ L中の生細胞の数をフローサイトメトリーを用いて測定した。死細胞を判別するための分析の前に、各サンプルに7-AADを加えた。201B7を判別するために、Alexa 647 fluorophoreを備えるTra-1-60抗体を用いた。その結果、D-3 により、15日間自然分化を誘導した場合の分化抵抗性(differentiation deficient)を示す201B7由来iPS細胞由来細胞集団から

、残存するiPS細胞を除去することができたことが示された（図18）。

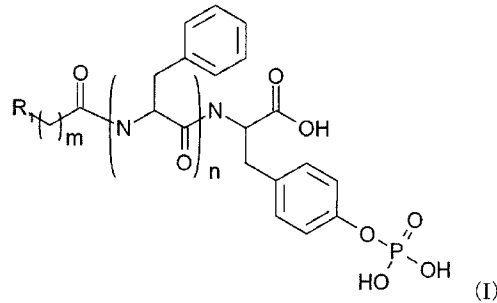
[0068] [実施例17]

5 x 10⁴個の自然分化させた201B7と、50個、20個、0個の201B7を混合し、ラミニン被覆した24 wellプレート上の、Rock inhibitor を含有するStemfit（味の素）に播種した（day 0）。24時間後、培地をStemfitに交換した（day 1）。さらに24時間後、培地を、D-3を400 μMで含むStemfit、あるいはコントロールとしてのStemfitに取り換えた（day 2）。2時間の培養後に、培地をStemfitのみのものに取り換えた。そして、細胞をStemfitでさらに7日間培養した。ALP染色により、201B7コロニーを赤紫色に染色した。その結果、D-3を用いることで、iPS細胞と分化細胞との共培養から、残存したiPS細胞を除去することができたことが示された（図19）。

請求の範囲

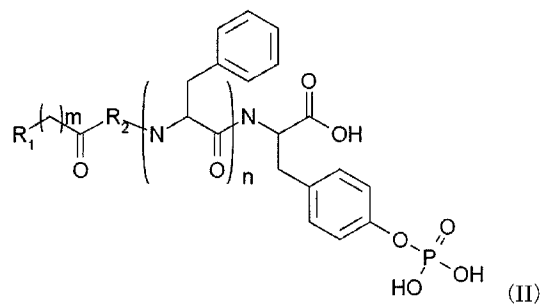
[請求項1] 式 (I) :

[化1]



(式中、 R_1 はアリール基またはヘテロアリール基であり、 m は1から6の整数であり、 n は2以上の整数である)、または、式 (II) :

[化2]



(式中、 R_1 はアリール基またはヘテロアリール基であり、 R_2 は、アライン残基またはグリシン残基であり、 m は1から6の整数であり、 n は2以上の整数である) で表される化合物と対象細胞集団とを接触させる工程を含む、多能性細胞を除去する方法。

[請求項2] 前記化合物が、式 (I) で表される化合物であって、式中、 R_1 がカルボニル基であり、 R_2 が、ナフチル基であり、 m は1である、請求項1に記載の方法。

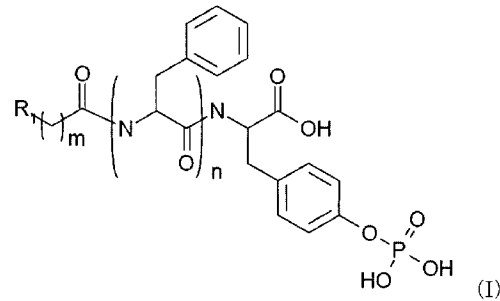
[請求項3] 前記化合物が、式 (I) で表される化合物であって、式中、 n は3で

ある、請求項2に記載の方法。

[請求項4] 前記対象細胞集団が、多能性幹細胞から分化誘導された細胞集団である請求項1から請求項3のいずれか1項に記載の方法。

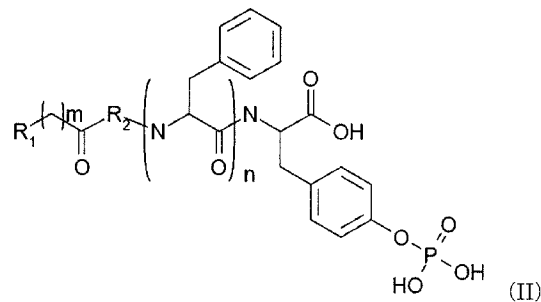
[請求項5] 式 (I) :

[化3]



(式中、 R_1 はアリール基またはヘテロアリール基であり、 m は1から6の整数であり、 n は2以上の整数である)、または、式 (II) :

[化4]



(式中、 R_1 はアリール基またはヘテロアリール基であり、 R_2 は、アミノ残基またはグリシン残基であり、 m は1から6の整数であり、 n は2以上の整数である)で表される化合物を含む、多能性細胞を除去するためのキット。

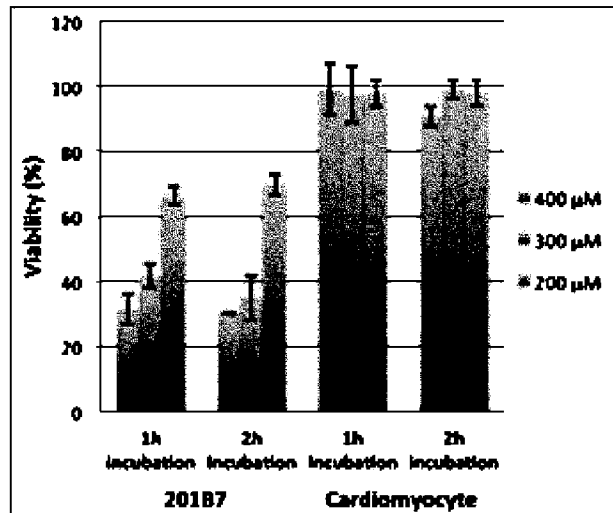
[請求項6] 前記化合物が、式 (I) で表される化合物であって、式中、 R_1 がナフチル基であり、 m が1である、請求項5に記載のキット。

[請求項7] 前記化合物が、式 (I) で表される化合物であって、式中、 n が3で

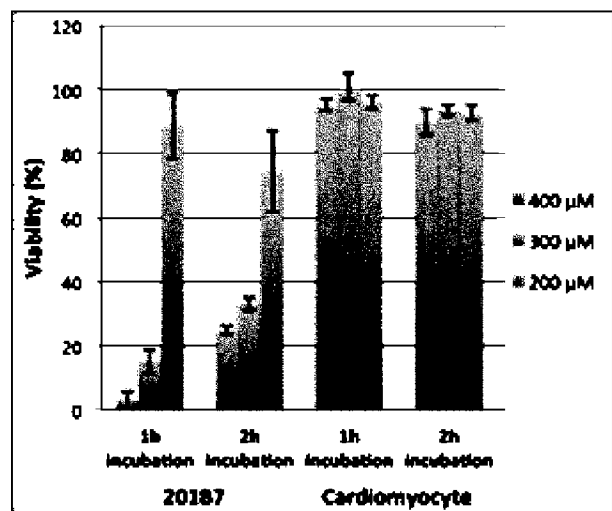
ある、請求項6に記載のキット。

[図1]

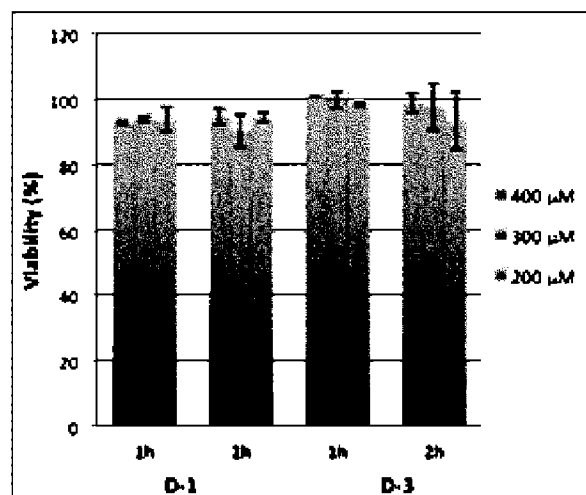
In Stemfit:



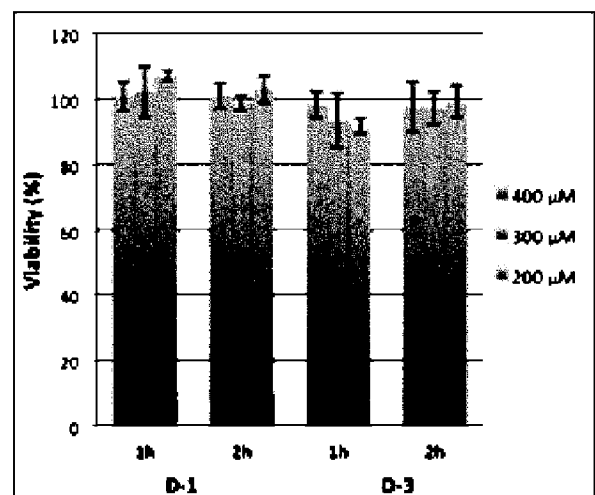
In StemPro:



NHDF (Normal human dermal fibroblasts)

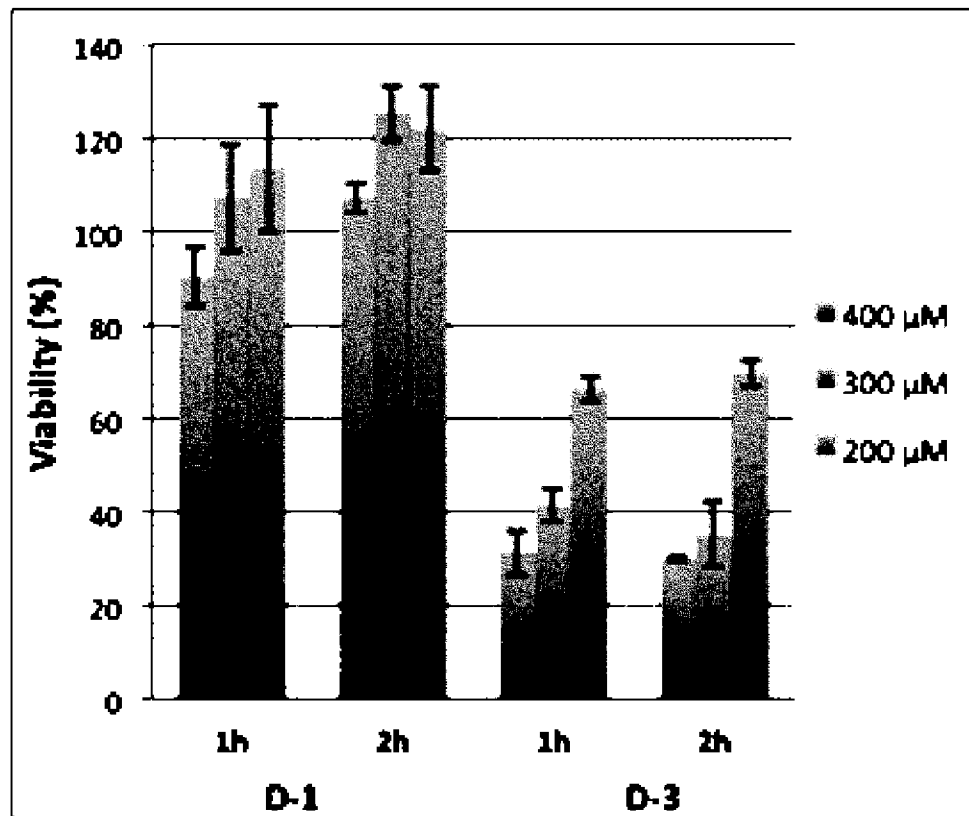


HS5 (Normal human marrow stroma cell)

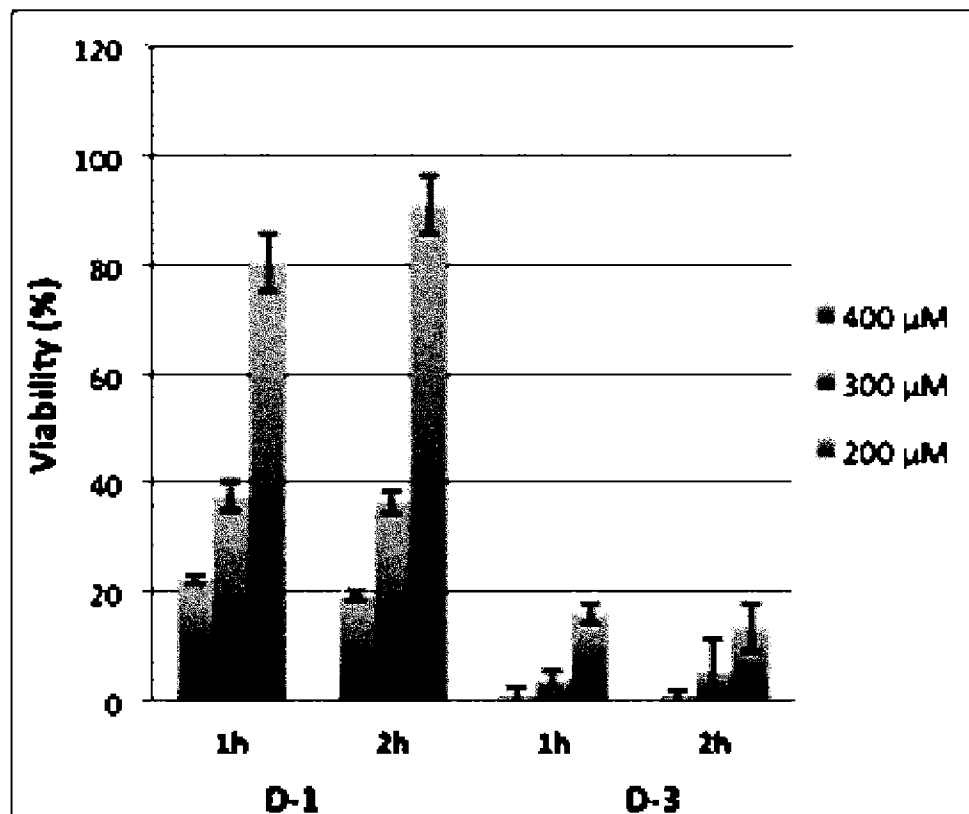


[図2]

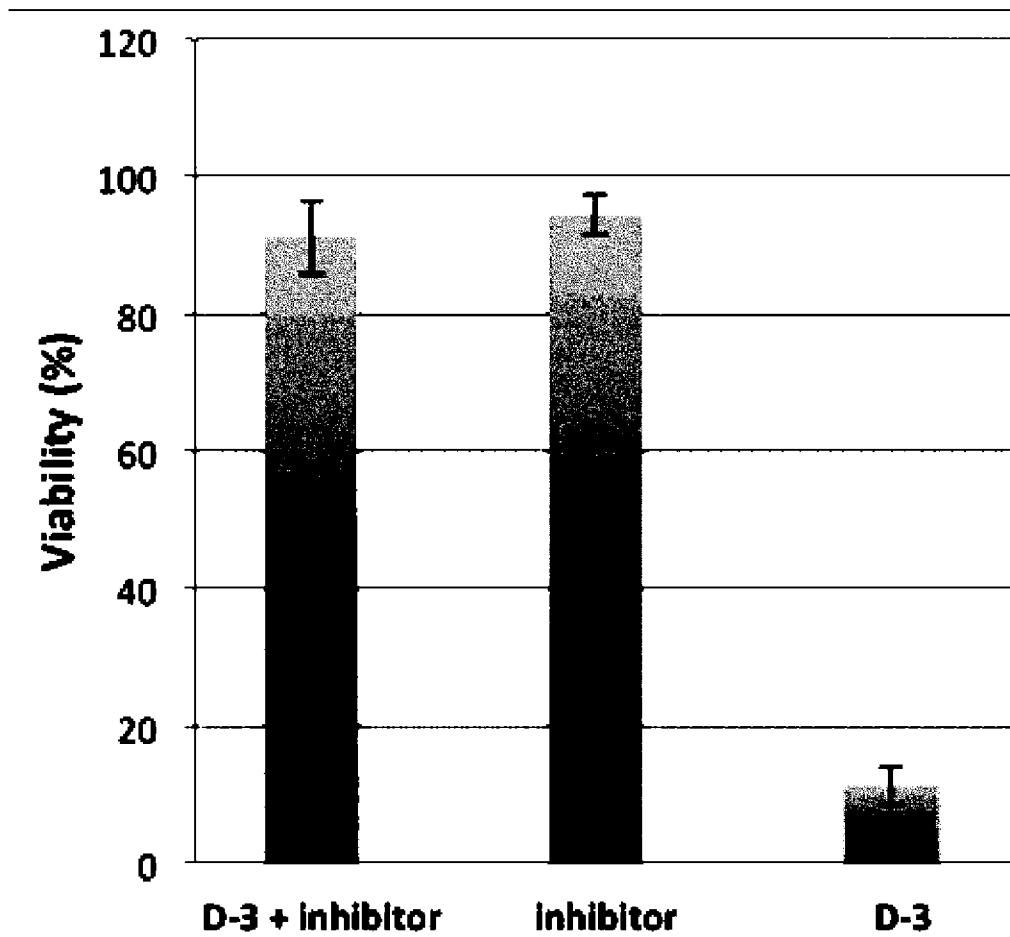
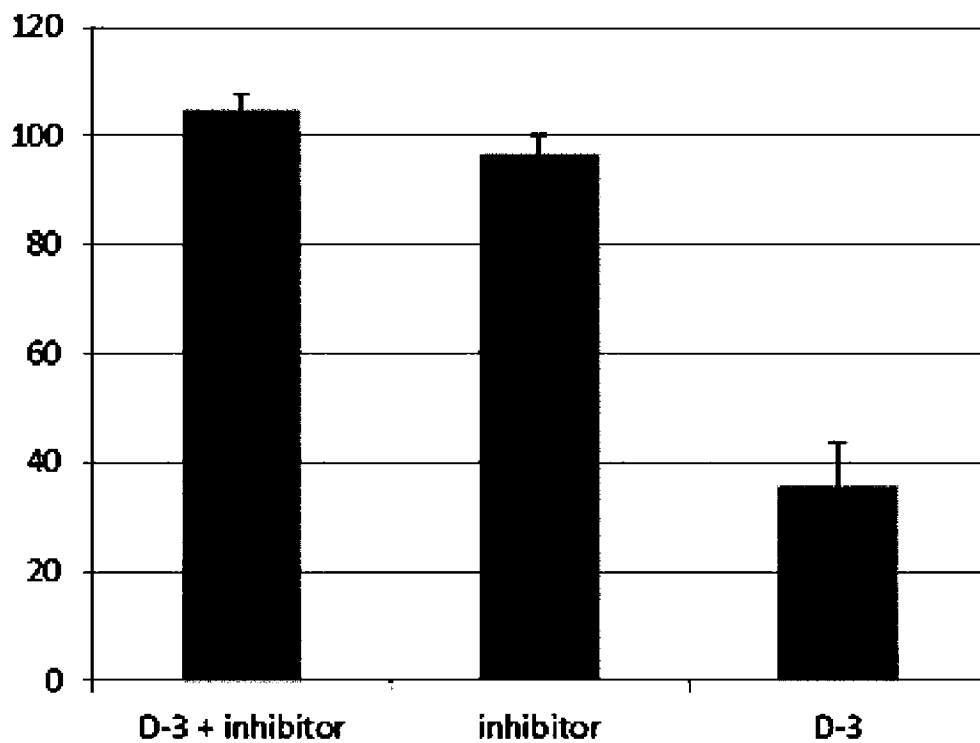
in Stemfit



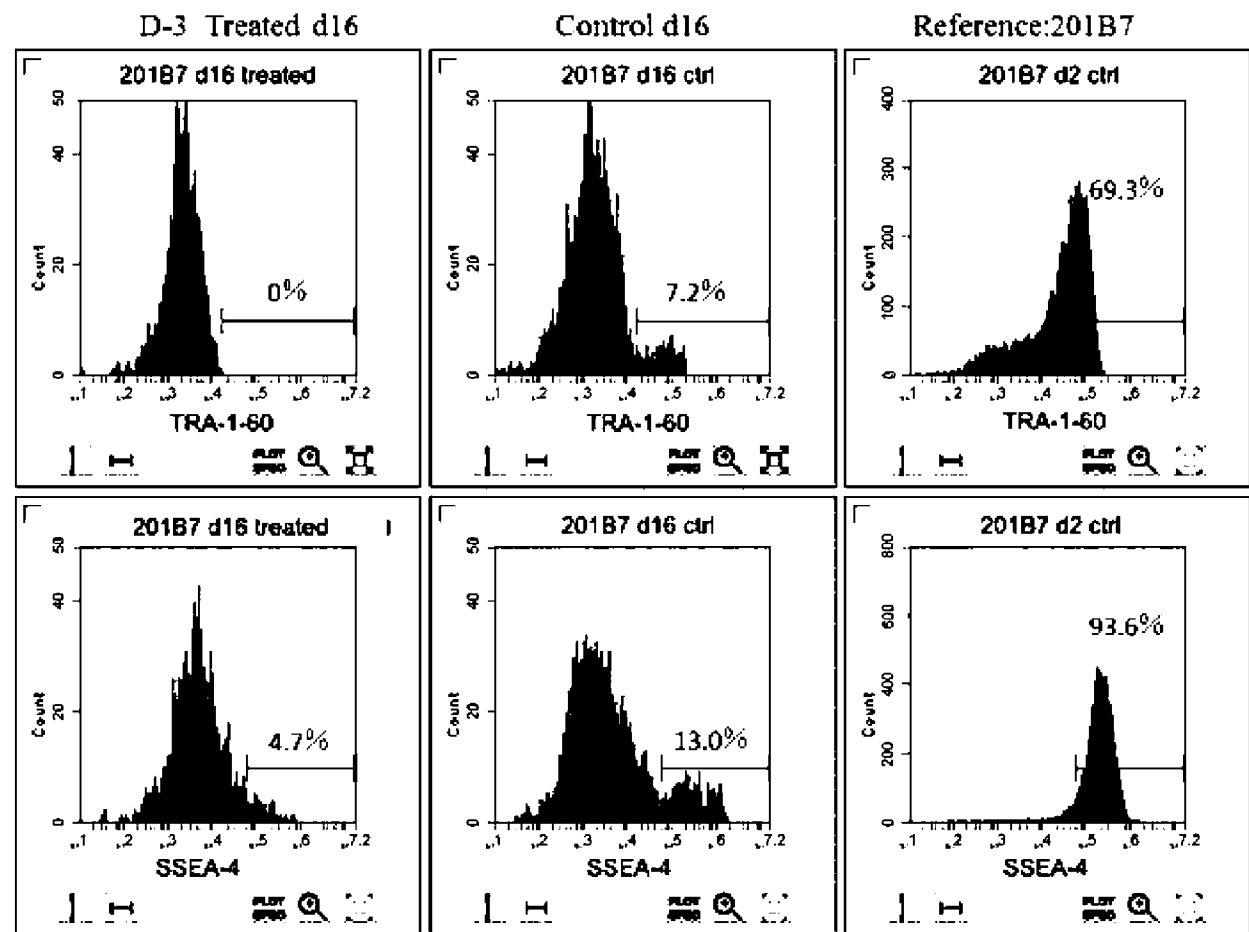
in DMEM



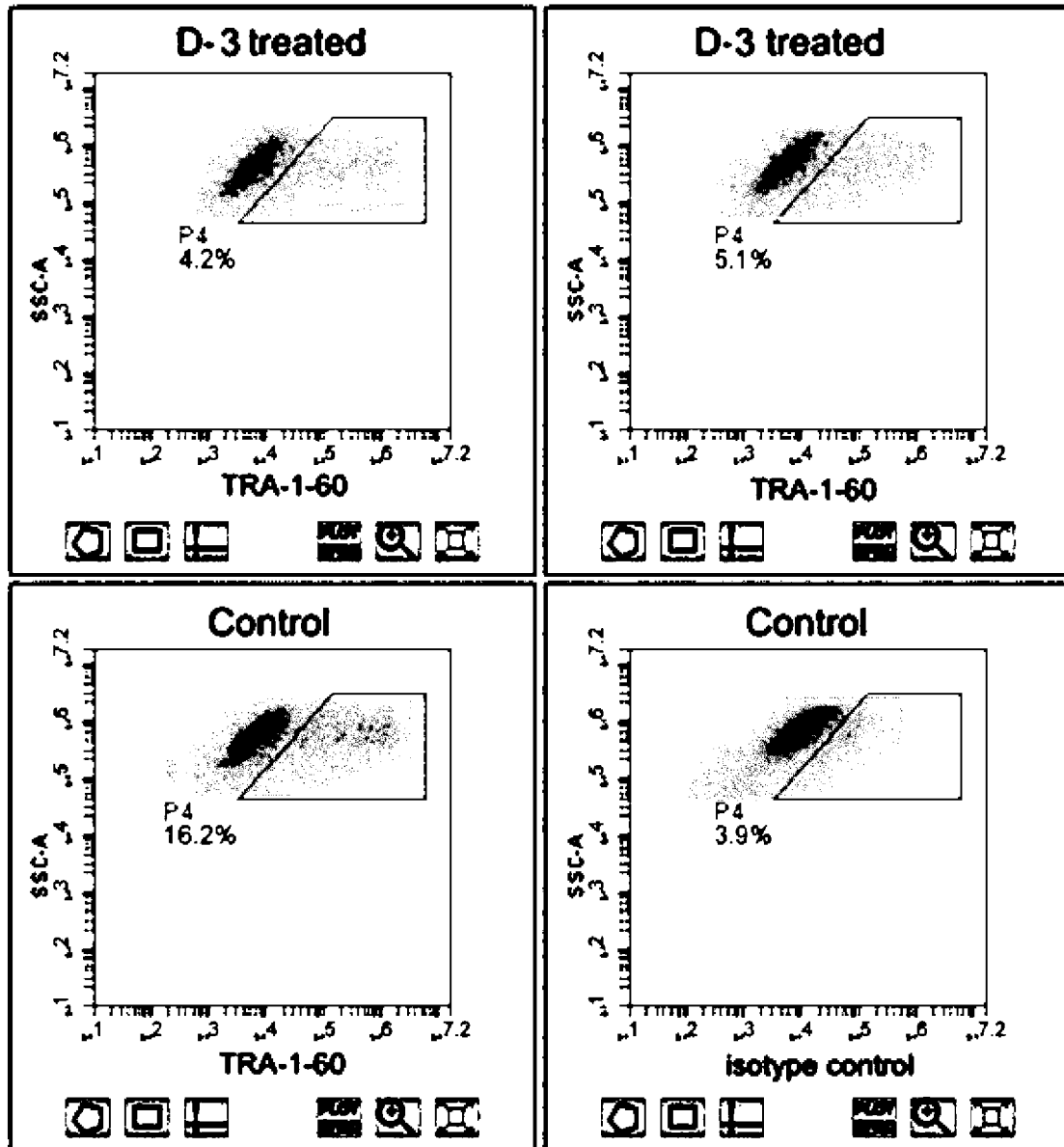
[図3]

201B7**1231A3**

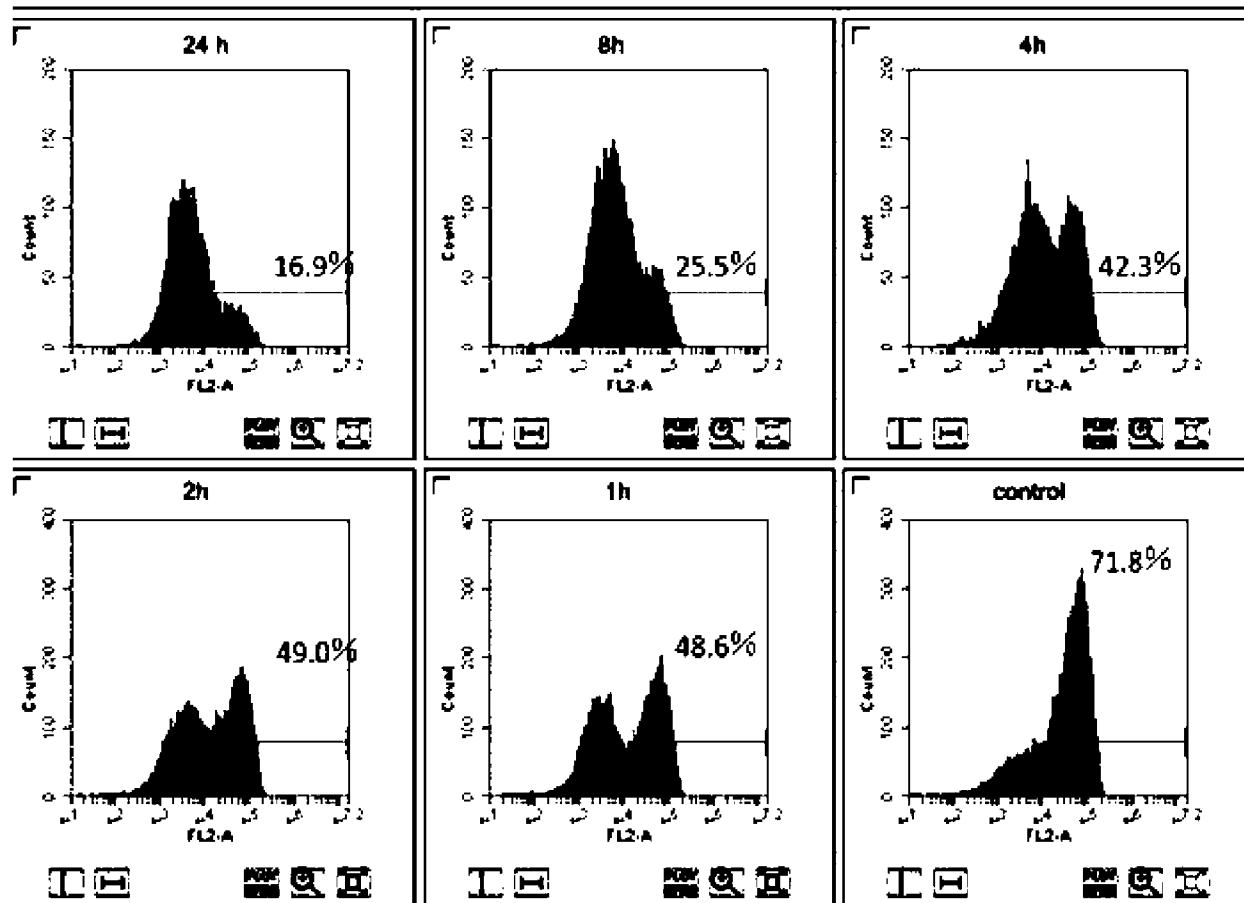
[図4]



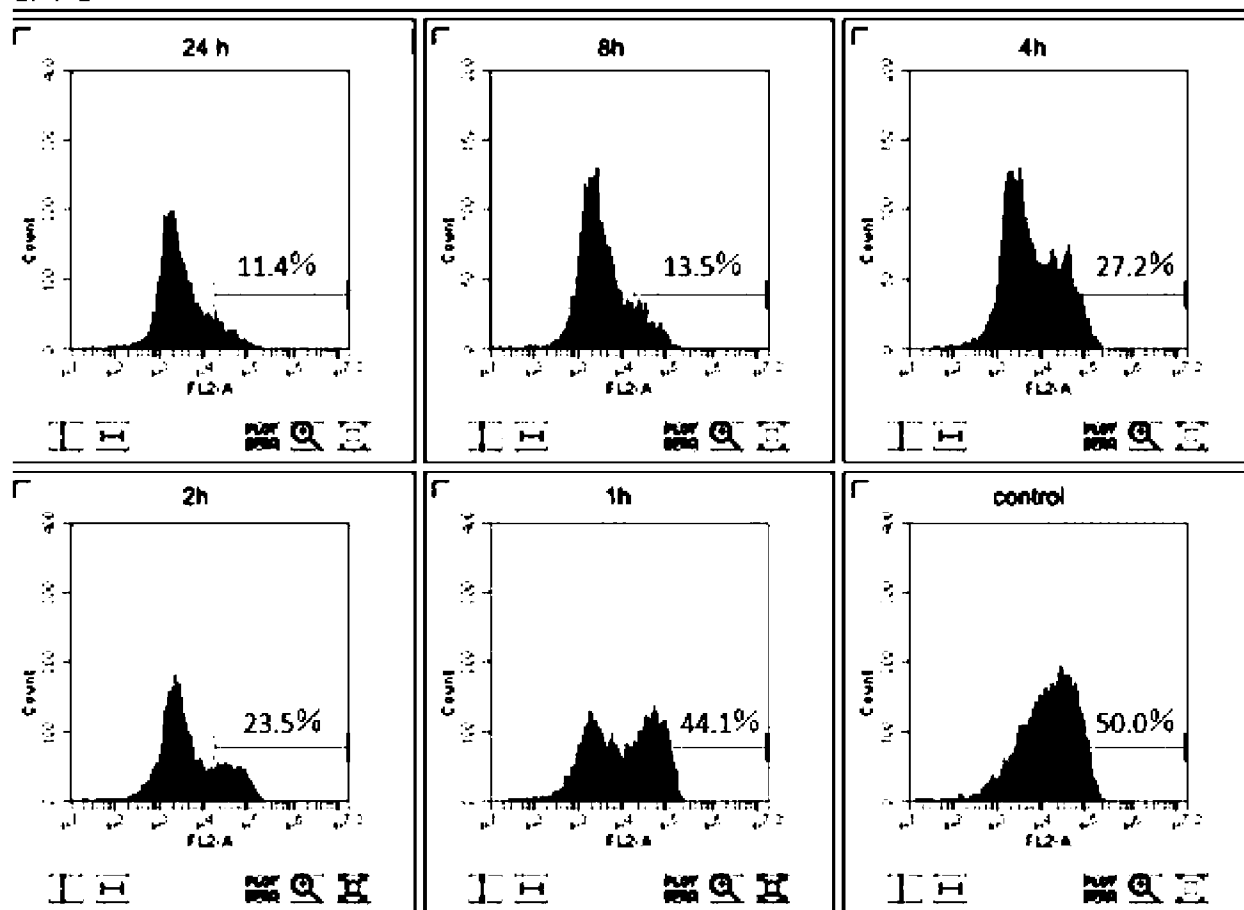
[図5]



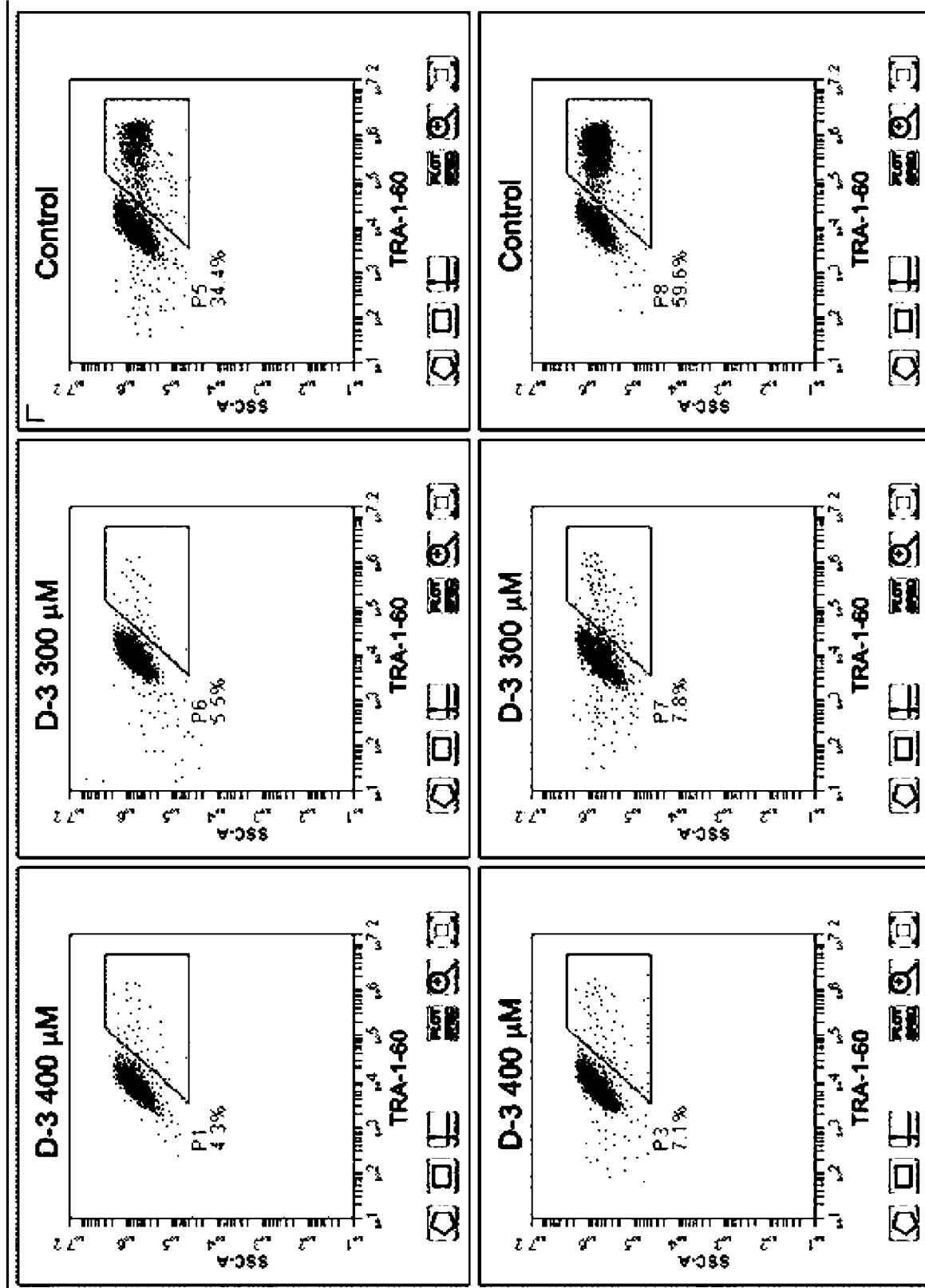
[図6]



[図7]



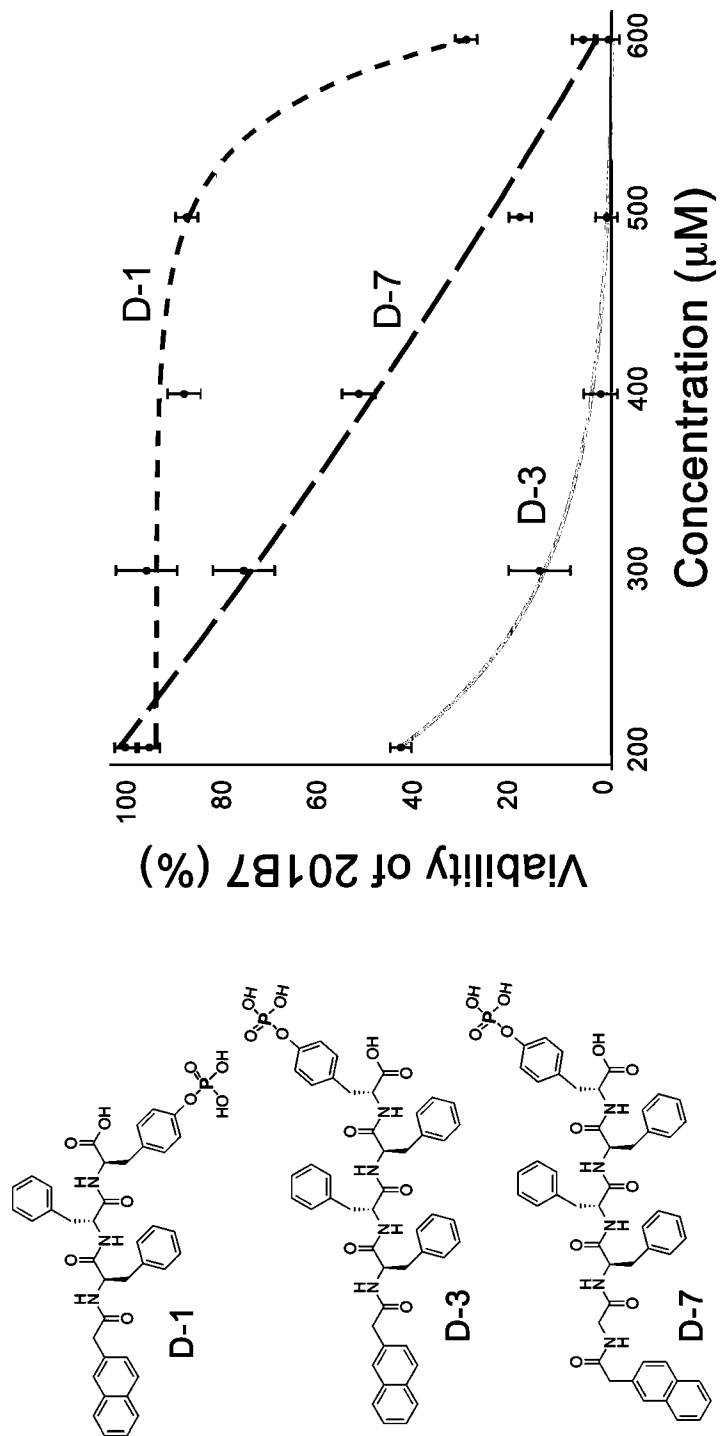
[図8]



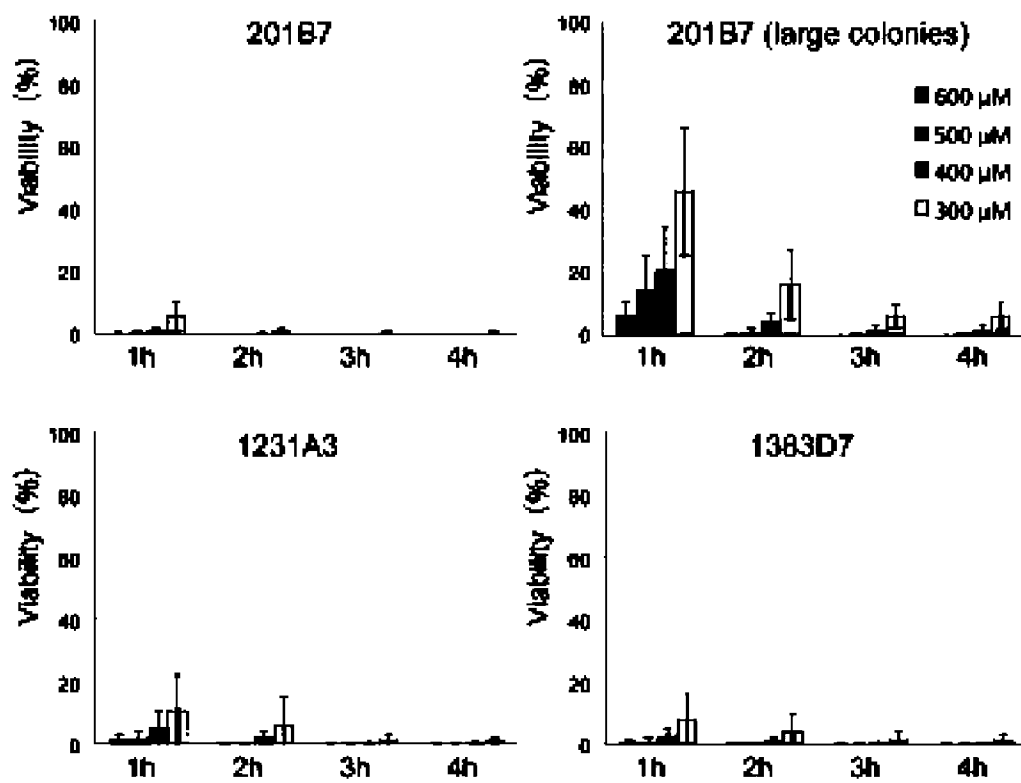
Seeding density:
201B7 20%
201B7d15 80%

201B7 30%
201B7d15 70%

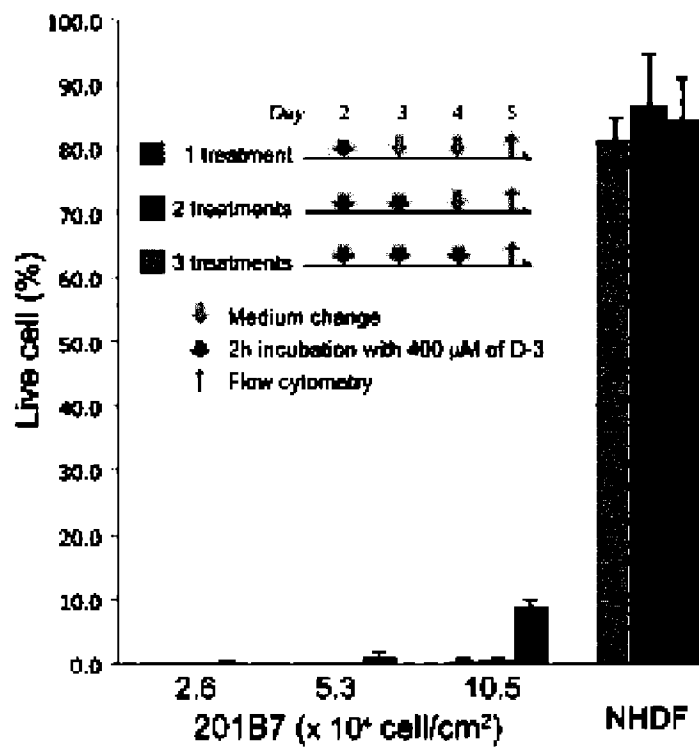
[図9]



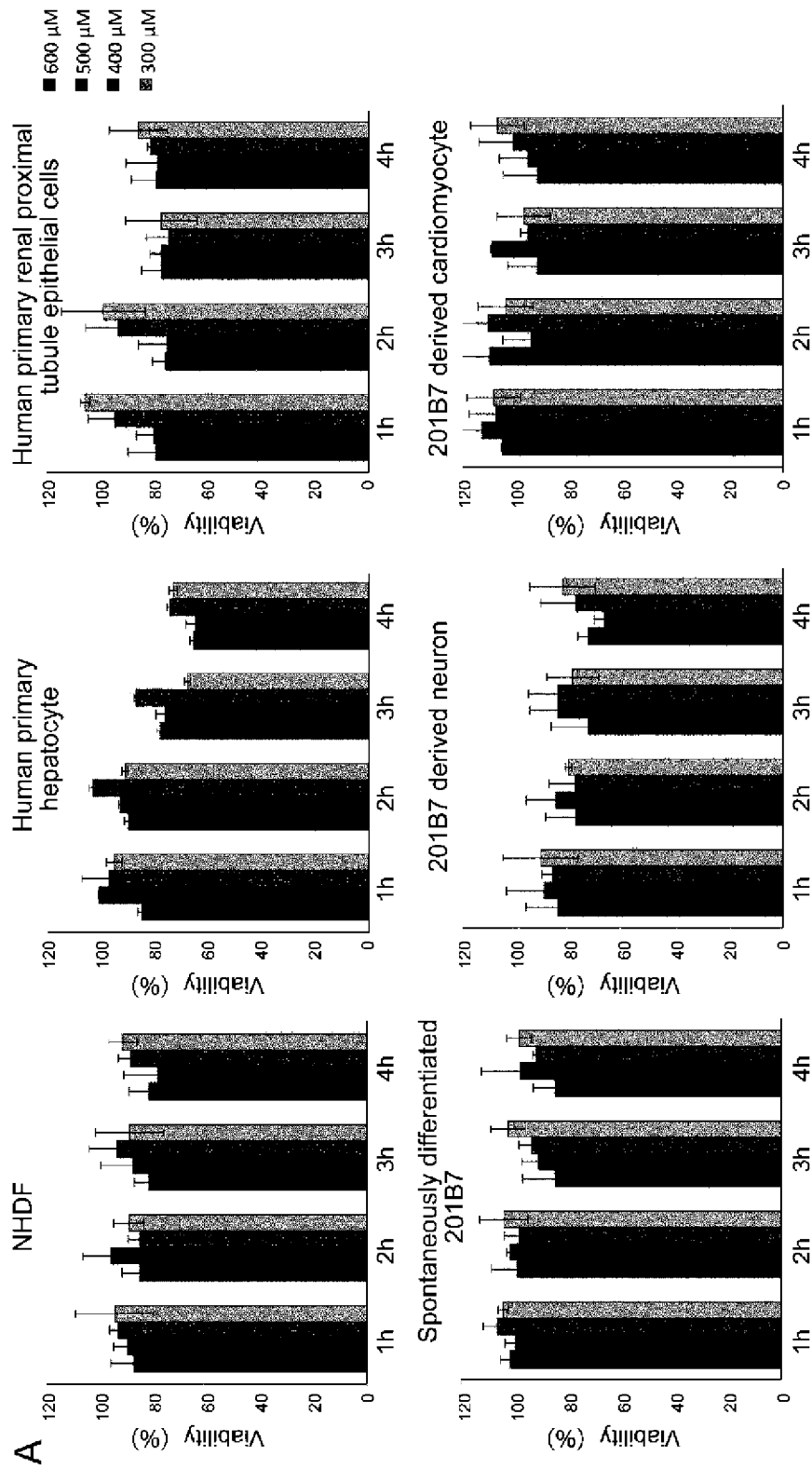
[図10]



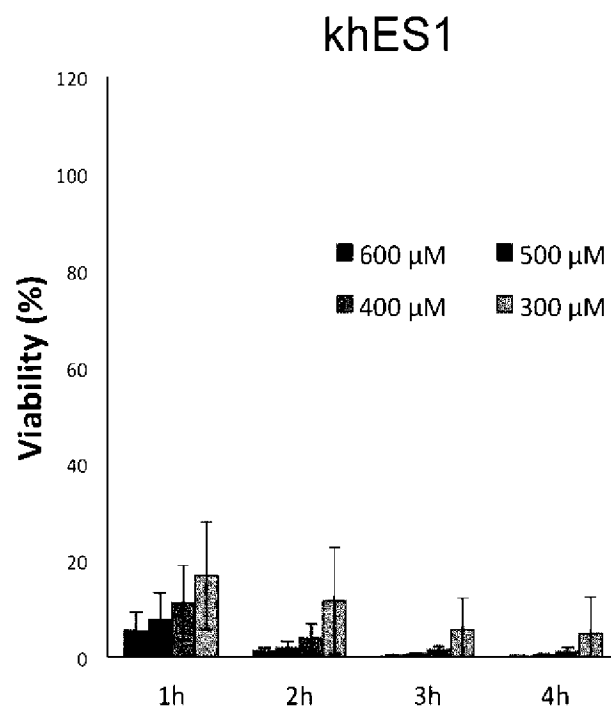
[図11]



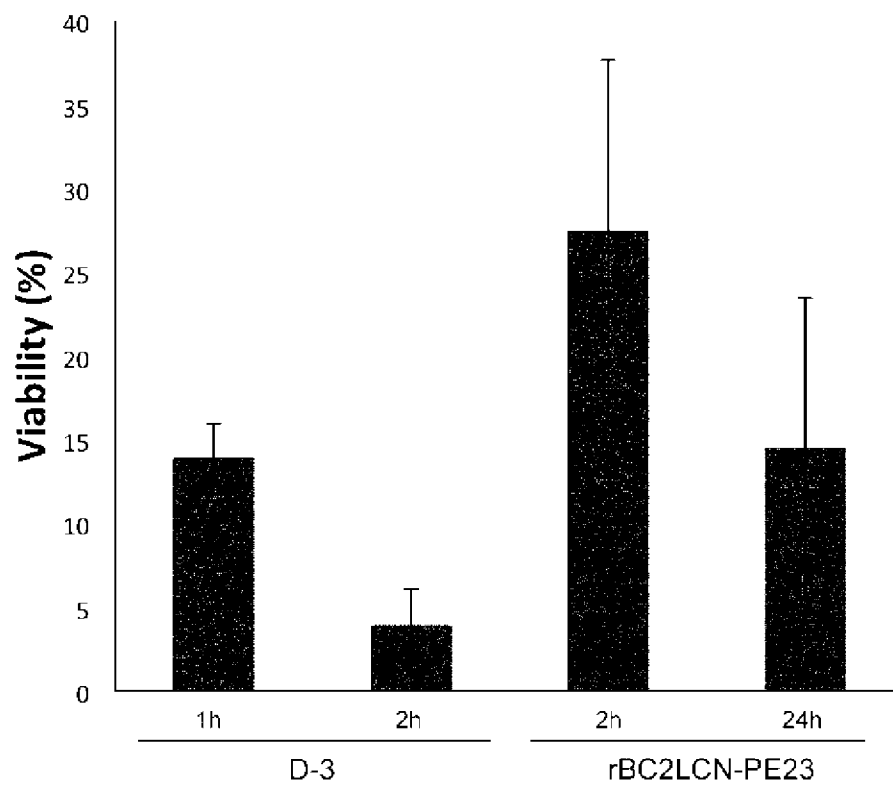
[12]



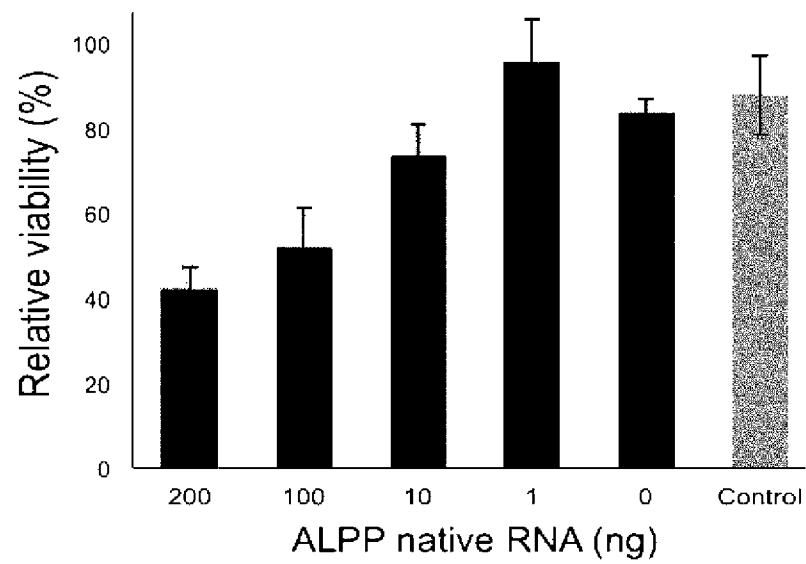
[図13]



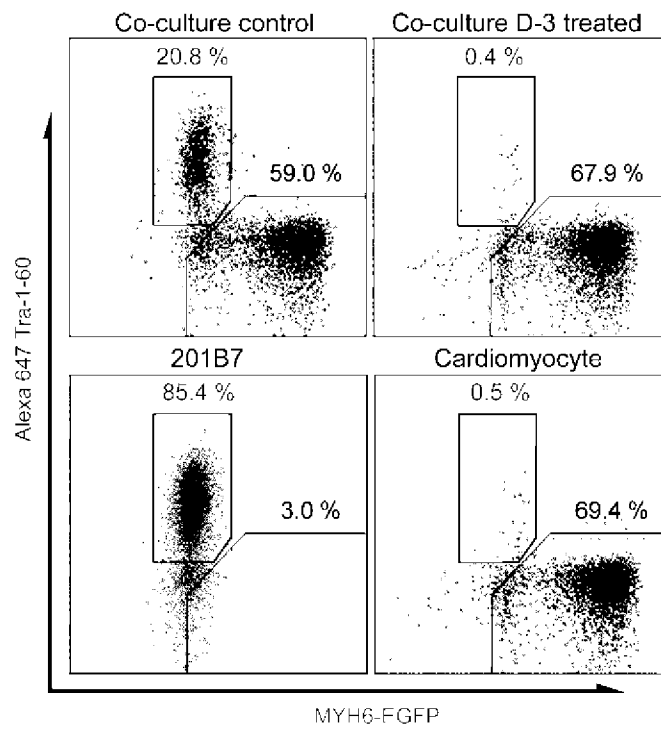
[図14]



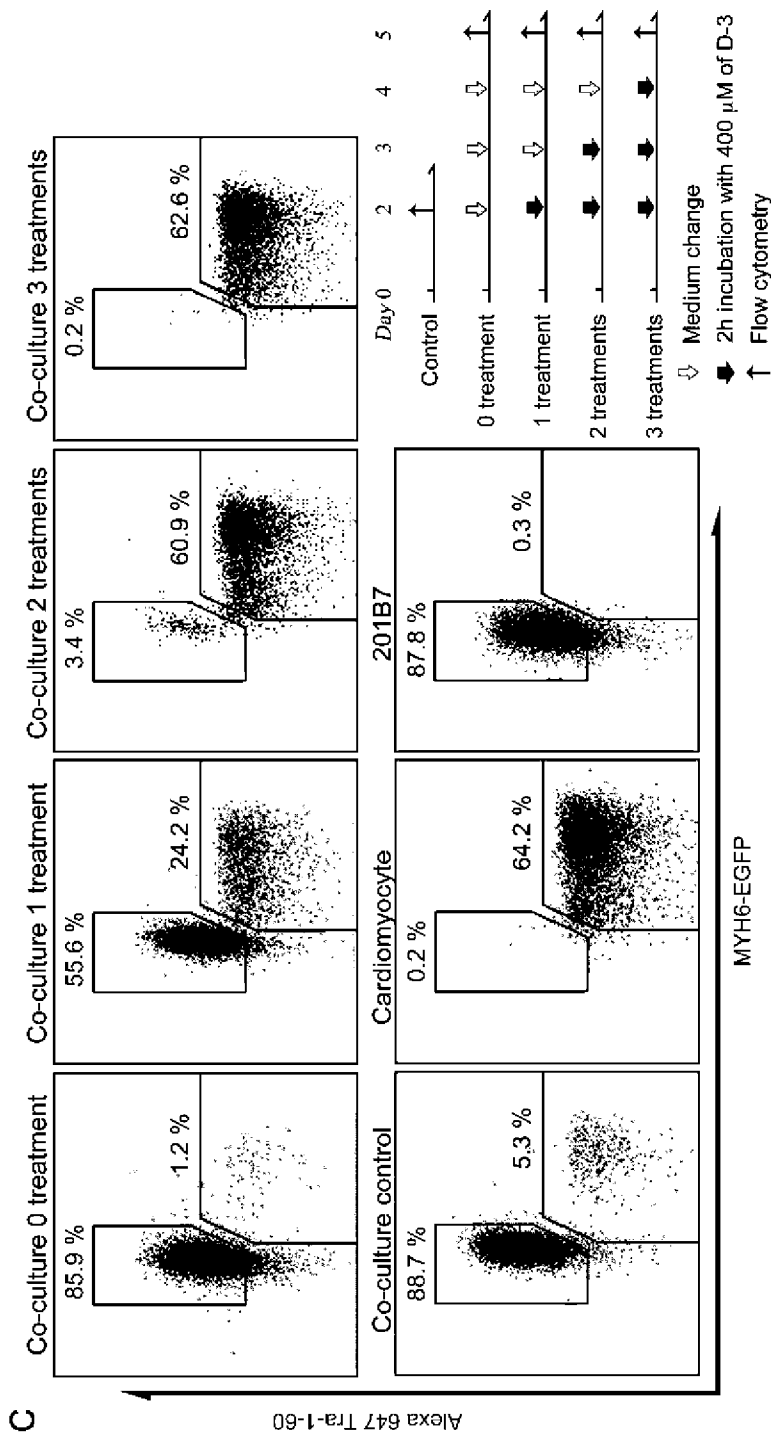
[図15]



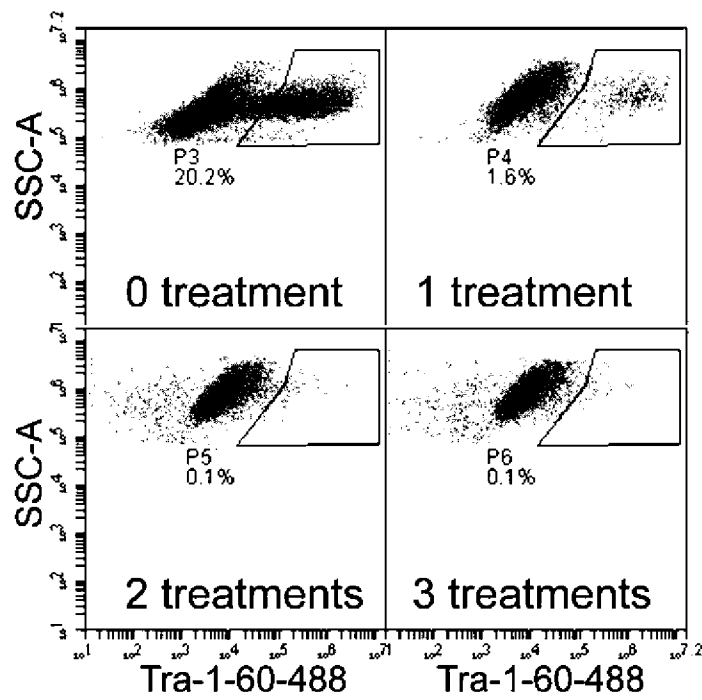
[図16]



[Figure 17]



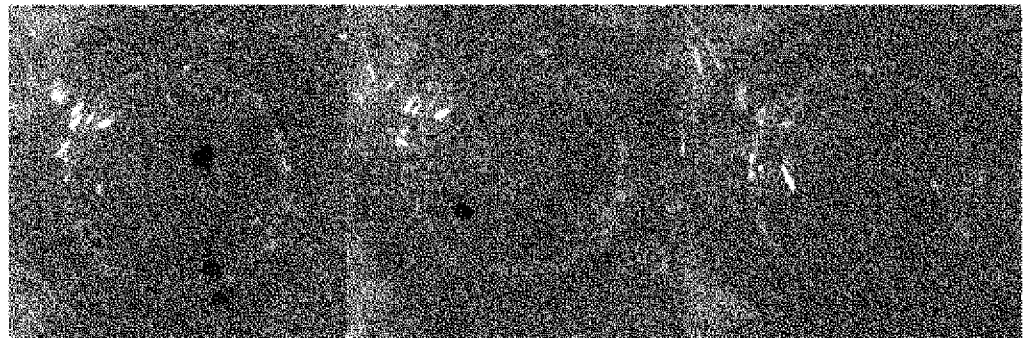
[圖18]



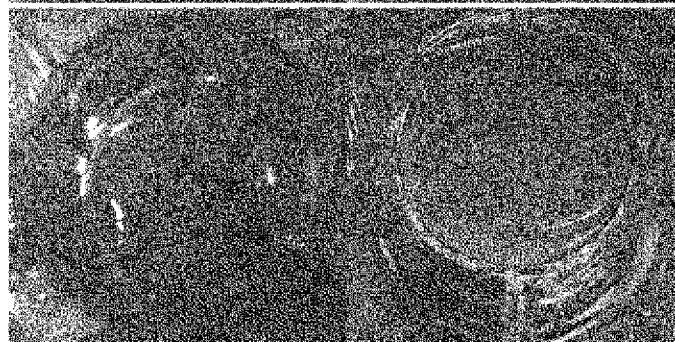
[圖19]

Differentiated cells: 5×10^4 cells 5×10^4 cells 5×10^4 cells
201B7: 50 cells 20 cells --

Control



Treated with
400 μ M D-3
for 1h on Day 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/050946

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/071(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C07K5/087(2006.01)n, C07K5/107(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)

C12N5/071, C12N5/10, C07K5/087, C07K5/107

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-9742 A (Nagoya City University), 17 January 2013 (17.01.2013), (Family: none)	1-7
A	WO 2013/186946 A1 (National University Corporation Hokkaido University), 19 December 2013 (19.12.2013), (Family: none)	1-7
A	LI, X., et al., Supramolecular Nanofibers and Hydrogels of Nucleopeptides, Angew. Chem. Int. Ed., 2011, 50, pp.9365-9369	1-7
A	MURAMATSU, T., et al., Carbohydrate markers of ES cells, Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2009, 21(120), pp.197-206	1-7

☐ 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
30 March 2016 (30.03.16)

Date of mailing of the international search report
12 April 2016 (12.04.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/071(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C07K5/087(2006.01)n, C07K5/107(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. C12N5/071, C12N5/10, C07K5/087, C07K5/107

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

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

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)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII),
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

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
A	JP 2013-9742 A (公立大学法人名古屋市立大学) 2013.01.17 (ファミリーなし)	1-7
A	WO 2013/186946 A1 (国立大学法人北海道大学) 2013.12.19 (ファミリーなし)	1-7

☒ 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。

* 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

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

国際調査を完了した日

30.03.2016

国際調査報告の発送日

12.04.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
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)

荒木 英 則

4B

9736

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
A	LI, X., et al., Supramolecular Nanofibers and Hydrogels of Nucleopeptides, Angew. Chem. Int. Ed., 2011, 50, pp.9365-9369	1 - 7
A	MURAMATSU, T., et al., Carbohydrate markers of ES cells, Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 2009, 21(120), pp.197-206	1 - 7