(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
2015 年 11 月 5 日(05.11.2015)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2015/166638 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/10 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2015/002107

(22) 国際出願日: 2015 年 4 月 16 日(16.04.2015)

(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 2014-094775 2014 年 5 月 1 日(01.05.2014) JP

(71) 出願人: ｉＨｅａｒｔ　Ｊａｐａｎ株式会社 (IHEART JAPAN CORPORATION) [JP/JP]; 〒6068507 京都府京都市左京区聖護院川原町５３ 京都大学メディカルイノベーションセンター Kyoto (JP).

(72) 発明者: 山下　潤 (YAMASHITA, Jun); 〒6068507 京都府京都市左京区聖護院川原町５３　国立大学法人京都大学　ｉＰＳ細胞研究所内 Kyoto (JP). 武田　匡史 (TAKEDA, Masafumi); 〒6068507 京都府京都市左京区聖護院川原町５３　国立大学法人京都大学　ｉＰＳ細胞研究所内 Kyoto (JP).

(74) 代理人: 廣田　雅紀 (HIROTA, Masanori); 〒1070052 東京都港区赤坂二丁目２番１９号　アドレスビル６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)）

WO 2015/166638 A1

(54) **Title**: CD82-POSITIVE CARDIAC PROGENITOR CELLS

(54) 発明の名称 : ＣＤ８２陽性心筋前駆細胞

(57) **Abstract**: The present invention addresses the problem of providing cardiac progenitor cells that can be specifically induced to differentiate into cardiac cells and of providing a method for preparing said cardiac progenitor cells. A method for preparing CD82-positive cells, the method comprising, in order, a step (a) wherein stem cells are obtained, a step (b) wherein the stem cells are induced to differentiate into cardiovascular cells, and a step (c) wherein CD82-positive cells that are negative for at least one cell surface marker selected from CD73, CD44, CD105, CD121a, CD18, and CD120a are isolated from the stem cells that are induced to differentiate in step (b). CD82-positive cells that are for use as cardiac progenitor cells can be prepared using said method.

(57) 要約:　本発明は、心筋細胞へ特異的に分化誘導される心筋前駆細胞や、かかる心筋前駆細胞を調製する方法を提供することを課題とする。　幹細胞を取得する工程（ａ）、幹細胞に対して心血管系細胞への分化誘導処理を行う工程（ｂ）、及び工程（ｂ）で分化誘導処理した幹細胞の中からＣＤ７３、ＣＤ４４、ＣＤ１０５、ＣＤ１２１ａ、ＣＤ１８、及びＣＤ１２０ａから選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性であるＣＤ８２陽性細胞を分離する工程（ｃ）を順次備えたＣＤ８２陽性細胞の調製方法を用いると、心筋前駆細胞として使用するためのＣＤ８２陽性細胞を調製することができる。

明　細　書

発明の名称 ： ＣＤ８２陽性心筋前駆細胞

技術分野

[0001] 本発明は、ＣＤ７３、ＣＤ４４、ＣＤ１０５、ＣＤ１２１ａ、ＣＤ１８、及びＣＤ１２０ａから選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性である、心筋前駆細胞として使用するためのＣＤ８２陽性細胞や、かかるＣＤ８２陽性細胞を含む心疾患治療剤や、上記ＣＤ８２陽性細胞の調製方法や、かかる調製方法により得られた、心筋前駆細胞として使用するためのＣＤ８２陽性細胞に関する。

背景技術

[0002] 心疾患は、先進諸国において死因の上位を占めており、例えば、２０１１～２０１３年の厚生労働省の死因統計資料によると、日本における死因は心疾患が２番目に高いことが報告されている。

[0003] 狭心症及び心筋梗塞の虚血性心疾患は、冠動脈の中が狭くなったり、冠動脈に血栓が詰まったりすることで心筋への血流が滞ることが原因で発症する。この虚血性心疾患を治療するために、カテーテルを用いて血流を改善させるインターベンション治療が行われているが、一旦壊死に陥った心筋は、インターベンション治療により再生することはできない。このため、虚血解除後の生存心筋の減少によりもたらされる重症心不全といった病態や、虚血を原因としないが慢性進行性に心筋細胞が徐々に失われ心不全へ移行する病態等の心疾患において、有効な治療法がないことが臨床的な問題とされている。

[0004] 多能性幹細胞は、生体に存在する全ての細胞へと分化できる能力を有する細胞であり、胚性幹細胞（ＥＳ細胞）はその代表例である。ヒトＥＳ細胞はこの性質を利用して心筋再生医療等の再生医療への応用が期待されているが、分化させたＥＳ細胞の移植により、拒絶反応が惹起してしまうという問題がある。

[0005] 近年、山中らのグループにより、マウス体細胞を用いて４因子（Ｏｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、及びｃ－ｍｙｃ）の発現により脱分化を誘導し、ＥＳ細胞に近い多能性や増殖能を有する誘導多能性幹細胞、いわゆるｉＰＳ細胞（Induced pluripotent stem cell）の開発が報告され（非特許文献１）、その後、ヒトの分化細胞からもｉＰＳ細胞を作製できることが報告されている（非特許文献２）。かかるヒトｉＰＳ細胞は、治療対象となる患者由来の細胞を用いて作製できることから、拒絶反応のない心筋組織調製のためのツールとして期待される。このため、一日も早いヒトｉＰＳ細胞を用いた心筋再生療法の確立が望まれている。

[0006] ヒトｉＰＳ細胞を用いた心筋再生療法において、供給源となる細胞は、ヒトｉＰＳ細胞から分化誘導した心筋細胞と、その分化前段階にあたる心筋前駆細胞が候補として考えられる。

[0007] ヒトｉＰＳ細胞から分化誘導した心筋細胞を用いて心筋再生療法を行う場合、心筋細胞はほとんど増殖せず、また、レシピエントの心臓への生着効率も低いため、移植に十分な数の心筋細胞をヒトｉＰＳ細胞から分化誘導し、心臓への生着効率を高めた心筋細胞シートを作製した後、投与することが考えられる。

[0008] 他方、心筋前駆細胞を用いて心筋再生療法を行う場合、まずは心筋に特異的に分化する前駆細胞を単離することが鍵となる。心筋前駆細胞として、例えば、Gordon KellerらによりＫＤＲ陽性ＰＤＧＦＲα陽性細胞が報告されている（非特許文献３、４）。しかし、ＫＤＲ及びＰＤＧＦＲαは、早期の中胚葉においても発現が認められることから、心筋特異的分化能を有した細胞群を特定できる細胞表面マーカーとはいえない。また最近では、Irving L.Weissmanらにより ＣＤ１３及びＲＯＲ２が心筋及び血管の前駆細胞（心血管前駆細胞）の細胞表面マーカーとして報告されている（非特許文献５）。確かに、ＣＤ１３陽性ＲＯＲ２陽性細胞には、心筋に分化しうる細胞は含まれるものの、心筋以外の血管内皮や血管壁にも分化しうる細胞も含まれる。また、原始線条（primitive streak）期の早期の中胚葉においてもＣＤ１３及び

ＲＯＲ２の発現が認められることから、ＣＤ１３及びＲＯＲ２は心筋特異的分化能を有した細胞群を特定できる細胞表面マーカーとはいえない。その他、Ｎｋｘ２．５、ｉｓｌｅｔ１、Ｔｂｘ５、Ｔｂｘ２０、ＧＡＴＡ４、ＭＥＦ２Ｃ等が心筋前駆細胞のマーカーとして報告されているが（非特許文献６）、これらはいずれも細胞表面マーカーではなく、転写因子であることから、これら転写因子が発現する心筋前駆細胞を単離する場合、遺伝子改変等が必要となり、そのままの状態の心筋前駆細胞を単離することができない。また、心筋組織を採取し、その中に含まれる心筋細胞への分化能に優れた多能性幹細胞を直接選択・単離する方法が報告されているが（特許文献１）、心筋組織を供給源としている点で、治療に十分な細胞数が得られる保証はなく、臨床応用できるか疑問である上に、心筋組織のドナーを得る必要がある点で汎用性に優れているとはいい難い。このため、心筋特異的分化能を有する心筋前駆細胞の細胞表面マーカーを同定することが必要とされていた。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第２００６／０９３２７６号パンフレット

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Takahashi, K. et al., Cell 126: 663-676 (2006)

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

非特許文献3：Abbott, G.W. et al., Nature 453: 524-528 (2008)

非特許文献4：Kattman, S.J. et al., Cell Stem Cell 8: 228-240 (2011)

非特許文献5：Ardehali, R. et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 110: 3405-3410 (2013)

非特許文献6：Burridge, P.W. et al., Cell Stem Cell 10: 16-28 (2012)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明の課題は、心筋細胞へ特異的に分化誘導される心筋前駆細胞や、か

かる心筋前駆細胞を調製する方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を続けている。その過程において、ヒトｉＰＳ細胞から心筋細胞への分化誘導処理後、４日目から５日目にかけて、心筋細胞に特異的に分化する心筋前駆細胞が出現し始めることを見いだした。また、かかる心筋前駆細胞がＣＤ８２陽性細胞であることも見いだした。さらに、かかるＣＤ８２陽性細胞は、インビトロ及びインビボでの解析により、様々な培養条件や組織・臓器への移植においても常に効率よく心筋細胞に分化誘導されることを確認した。本発明はこれらの知見に基づいて完成するに至ったものである。

[0013] すなわち、本発明は、（１）以下の［細胞表面マーカーＡ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性である、心筋前駆細胞として使用するためのＣＤ８２陽性細胞に関する。

［細胞表面マーカーＡ群］

ＣＤ７３、ＣＤ４４、ＣＤ１０５、ＣＤ１２１ａ、ＣＤ１８、ＣＤ１２０ａ

[0014] また本発明は、（２）単離された上記（１）記載のＣＤ８２陽性細胞や、（３）以下の［細胞表面マーカーＢ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性、及び／又は、以下の［細胞表面マーカーＣ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陽性である、上記（１）又は（２）記載のＣＤ８２陽性細胞に関する。

［細胞表面マーカーＢ群］

ＣＤ７、ＣＤ３７、ＣＤ４３、ＣＤ１４４、ＳＴＲＯ－１、ＣＤ１７７、ＣＤ１６３

［細胞表面マーカーＣ群］

ＣＤ１３７Ｌ、ＣＤ１４０ｂ、ＣＤ１８０、ＣＤ２５２、ＣＤ３４４、ＣＤ１１８、ＣＤ９９Ｒ

[0015] また本発明は、（４）以下の［細胞表面マーカーＤ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性、及び／又は、以下の［細胞表面マ

ーカーＥ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陽性である、上記（１）～（３）のいずれか記載のＣＤ８２陽性細胞に関する。

［細胞表面マーカーＤ群］

ＣＤ４９ａ、ＣＤ１１７、ＣＤ３１、ＣＤ１０６、ＣＤ４５、ＣＤ１４、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ３８、ＣＤ１２１ｂ、ＣＤ１２２、ＣＤ１２４、ＣＤ１２６、ＣＤ１２７、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１０４、ＣＤ６２ｅ、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ６２ｐ、ＣＤ１２０ｂ、ＣＤ３４、ＣＤ４

［細胞表面マーカーＥ群］

ＣＤ１６６、ＣＤ３０４、ＣＤ９０

[0016] また本発明は、（５）以下の［細胞表面マーカーＦ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陽性である、上記（１）～（４）のいずれか記載のＣＤ８２陽性細胞に関する。

［細胞表面マーカーＦ群］

ＲＯＲ２、ＣＤ１３、ＰＤＧＦＲα、ＫＤＲ

[0017] また本発明は、（６）凍結保存された上記（１）～（５）のいずれか記載のＣＤ８２陽性細胞に関する。

[0018] また本発明は、（７）上記（１）～（６）のいずれか記載のＣＤ８２陽性細胞を含む心疾患治療剤に関する。

[0019] また本発明は、（８）以下の工程（ａ）～（ｃ）を備えたＣＤ８２陽性細胞の調製方法に関する。

（ａ）幹細胞を取得する工程；

（ｂ）幹細胞に対して心血管系細胞への分化誘導処理を行う工程；

（ｃ）工程（ｂ）で分化誘導処理した幹細胞の中から、以下の［細胞表面マーカーＡ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性であるＣＤ８２陽性細胞を分離する工程；

［細胞表面マーカーＡ群］

ＣＤ７３、ＣＤ４４、ＣＤ１０５、ＣＤ１２１ａ、ＣＤ１８、ＣＤ１２０ａ

[0020] また本発明は、（９）幹細胞がヒト多能性幹細胞である上記（８）記載の

調製方法や、（１０）ヒト多能性幹細胞がヒト誘導多能性幹細胞である上記（９）記載の調製方法や、（１１）心血管系細胞への分化誘導処理が心筋前駆細胞への分化誘導処理である上記（８）～（１０）のいずれか記載の調製方法や、（１２）ＣＤ８２陽性細胞が、以下の［細胞表面マーカーＢ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性、及び／又は、以下の［細胞表面マーカーＣ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陽性である、上記（８）～（１１）のいずれか記載の調製方法に関する。

［細胞表面マーカーＢ群］

ＣＤ７、ＣＤ３７、ＣＤ４３、ＣＤ１４４、ＳＴＲＯ－１、ＣＤ１７７、ＣＤ１６３

［細胞表面マーカーＣ群］

ＣＤ１３７Ｌ、ＣＤ１４０ｂ、ＣＤ１８０、ＣＤ２５２、ＣＤ３４４、ＣＤ１１８、ＣＤ９９Ｒ

[0021] また本発明は、（１３）ＣＤ８２陽性細胞が、以下の［細胞表面マーカーＤ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性、及び／又は、以下の［細胞表面マーカーＥ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陽性である、上記（８）～（１２）のいずれか記載の調製方法に関する。

［細胞表面マーカーＤ群］

ＣＤ４９ａ、ＣＤ１１７、ＣＤ３１、ＣＤ１０６、ＣＤ４５、ＣＤ１４、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ３８、ＣＤ１２１ｂ、ＣＤ１２２、ＣＤ１２４、ＣＤ１２６、ＣＤ１２７、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１０４、ＣＤ６２ｅ、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ６２ｐ、ＣＤ１２０ｂ、ＣＤ３４、ＣＤ４

［細胞表面マーカーＥ群］

ＣＤ１６６、ＣＤ３０４、ＣＤ９０

[0022] また本発明は、（１４）ＣＤ８２陽性細胞が、以下の［細胞表面マーカーＦ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陽性である、上

記（８）～（１３）のいずれか記載の調製方法に関する。

［細胞表面マーカーＦ群］

ＲＯＲ２、ＣＤ１３、ＰＤＧＦＲα、ＫＤＲ

[0023] また本発明は、（１５）工程（ｃ）において、工程（ｂ）で分化誘導処理後４～８日目にＣＤ８２陽性細胞を分離する上記（８）～（１４）のいずれか記載の調製方法に関する。

[0024] また本発明は、（１６）上記（８）～（１５）のいずれか記載の調製方法により得られた、心筋前駆細胞として使用するためのＣＤ８２陽性細胞に関する。

[0025] また本発明の実施の他の形態として、上記ＣＤ８２陽性細胞からなる心筋前駆細胞、上記ＣＤ８２陽性細胞を含む心筋前駆細胞含有組成物の他、上記心疾患治療剤を、心疾患患者に投与することにより、心疾患を治療する方法や、心疾患の治療において使用するための上記ＣＤ８２陽性細胞や、心疾患を治療するための医薬を製造するための上記ＣＤ８２陽性細胞の使用を挙げることができる。

[0026] また本発明の実施の他の形態として、蛍光物質で標識した抗ＣＤ８２抗体と、蛍光物質で標識した、上記［細胞表面マーカーＡ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーに対する抗体とを用いた蛍光活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）、或いは、標識物質で標識した抗ＣＤ８２抗体と、標識物質で標識した、上記［細胞表面マーカーＡ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーに対する抗体と、前記標識物質に対する抗体とＭＡＣＳビーズ（磁性ビーズ）とのコンジュゲート抗体とを用いた自動磁気細胞分離装置（ａｕｔｏＭＡＣＳ）により、細胞集団の中から上記ＣＤ８２陽性細胞を単離することを含む、ＣＤ８２陽性細胞の調製方法を挙げることができる。

発明の効果

[0027] 本発明の心筋前駆細胞として使用するための、ＣＤ７３陰性、ＣＤ４４陰性、ＣＤ１０５陰性、ＣＤ１２１ａ陰性、ＣＤ１８陰性、又はＣＤ１２０ａ

陰性で、かつＣＤ８２陽性細胞（以下「調製心筋前駆細胞」ということがある）は、心筋細胞に特異的に分化誘導されるため、肥大型閉塞性心筋症、肥大型非閉塞性心筋症、拘束型心筋症、不整脈原性右室異形成症、分類不能型心筋症、特発性心筋症、拡張型心筋症、拡張型心筋症様病態を呈する虚血性心筋症、高血圧性心筋症、弁膜症性心筋症、肥大型心筋症拡張相、膠原病や自己免疫性疾患に関連する心サルコイドーシスやアミロイドーシス、遺伝性心筋症、後天性心筋症、心筋炎、心筋炎後心筋症、薬剤や中毒性に引き起こされる薬剤誘発性心筋症、アルコール性心筋症、放射線性心筋症、左室緻密化障害、筋ジストロフィーに伴う心筋症、ミトコンドリア心筋症、代謝異常により起因する心筋症、産褥性心筋症等の心筋症や、急性心筋梗塞、慢性心筋梗塞、亜急性期心筋梗塞、難治性狭心症などの虚血性心疾患・心筋梗塞、慢性心不全、急性心不全、重症心不全、先天性心疾患に起因する心不全などの心不全、先天性心疾患、心室性不整脈、上室性不整脈、頻脈性不整脈、徐脈性不整脈、致死性不整脈などの不整脈等の心疾患の治療に有用である。例えば、心筋細胞を用いた心疾患治療の場合、心筋細胞はほとんど増殖せず、また心臓への生着効率が低いため、通常移植に十分な数の心筋細胞を確保するとともに、心臓への生着効率を高めた心筋細胞シートを作製する必要があるが、本発明の調製心筋前駆細胞は、高い自己増殖能と高い心筋分化能と高い心筋への生着効率を有するため、細胞シートや細胞懸濁液として移植する際、必要な細胞数を少なく抑えることができ、また、本発明の調製心筋前駆細胞を細胞懸濁液として移植する場合、心筋細胞シートを作製する必要はなく、費用対効果や時間対効果の面で優れている上に、心疾患患者の患部（心臓）にカテーテルを利用して注入する方法を用いて調製心筋前駆細胞を投与できるため、低侵襲で繰り返し投与が可能な心疾患治療への貢献が期待される。

[0028] また本発明によると、調製心筋前駆細胞は、凍結・融解処理を行った後でも高い生存率と、心筋細胞への高い分化能を有するため、凍結保存することができる。

図面の簡単な説明

[0029] [図1]図１Ａは、改良ＤＤプロトコール（Modified DD protocol）を模式的に示した図である。図１Ｂは、Modified DD protocolをさらに改変した本実施例で使用のプロトコール（以下、「本件プロトコール」という）を模式的に示した図である。

[図2]ヒトｉＰＳ細胞（Induced pluripotent stem cell）を心筋細胞へ分化誘導後４日目及び５日目にＫＤＲ陽性ＰＤＧＦＲα陽性細胞を、蛍光活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）を用いて純化し、血清存在下で培養したときの心筋細胞（ｃＴｎＴ［Cardiac toroponin T］陽性細胞）への分化効率を解析した結果を示す図である。縦軸は全細胞に対する心筋細胞（ｃＴｎＴ陽性細胞）の割合（％）を示す（平均値±標準偏差、［ｎ＝４］）。また、図中「＊」は、統計的に有意差（Ｐ＜０．０００１）があることを示す。

[図3]ヒトｉＰＳ細胞を心筋細胞へ分化誘導後３～１１日目にＣＤ８２（縦軸）とＰＤＧＦＲα（横軸）の発現をフローサイトメーターで解析した結果を示す図である。図中の四角で囲った「Ｑ１」、「Ｑ２」、「Ｑ３」、及び「Ｑ４」の領域は、それぞれ「ＣＤ８２陽性ＰＤＧＦＲα陰性細胞群（集団）」、「ＣＤ８２陽性ＰＤＧＦＲα陽性細胞群」、「ＣＤ８２陰性ＰＤＧＦＲα陰性細胞群」、及び「ＣＤ８２陰性ＰＤＧＦＲα陽性細胞群」を示し、これら４種細胞群の全細胞数に対する各細胞群の細胞数の割合（％）をそれぞれの領域に示す。

[図4]ヒトｉＰＳ細胞を心筋細胞へ分化誘導後４～６日目にＣＤ８２（横軸）とＣＤ１３（縦軸）の発現をフローサイトメーターで解析した結果を示す図である。図中の四角で囲った「Ｑ１」、「Ｑ２」、「Ｑ３」、及び「Ｑ４」の領域は、それぞれ「ＣＤ８２陰性ＣＤ１３陽性細胞群」、「ＣＤ８２陽性ＣＤ１３陽性細胞群」、「ＣＤ８２陰性ＣＤ１３陰性細胞群」、及び「ＣＤ８２陽性ＣＤ１３陰性細胞群」を示し、これら４種細胞群の全細胞数に対する各細胞群の細胞数の割合（％）をそれぞれの領域に示す。

[図5]ヒトｉＰＳ細胞を心筋細胞へ分化誘導後９日目及び１５日目にＣＤ８２

（横軸）とｃＴｎＴ（縦軸）の発現をフローサイトメーターで解析した結果を示す図である。図中の四角で囲った「Ｑ１」、「Ｑ２」、「Ｑ３」、及び「Ｑ４」の領域は、それぞれ「ＣＤ８２陰性ｃＴｎＴ陽性細胞群」、「ＣＤ８２陽性ｃＴｎＴ陽性細胞群」、「ＣＤ８２陰性ｃＴｎＴ陰性細胞群」、及び「ＣＤ８２陽性ｃＴｎＴ陰性細胞群」を示し、これら４種細胞群の全細胞数に対する各細胞群の細胞数の割合（％）をそれぞれの領域に示す。

[図6]ヒトｉＰＳ細胞を心筋細胞へ分化誘導後５日目にＣＤ８２陽性ＣＤ１３陽性細胞（図中、「ＣＤ８２陽性細胞」）及びＣＤ８２陰性ＣＤ１３陽性細胞（図中、「ＣＤ８２陰性細胞」）をそれぞれ純化し、血清存在下で培養したときの心筋細胞（ｃＴｎＴ陽性細胞［ｃＴｎＴ陽性ＶＣＡＭ１陰性細胞＋ｃＴｎＴ陽性ＶＣＡＭ１陽性細胞］）への分化効率を解析した結果を示す図である。図中の四角で囲った「Ｑ１」、「Ｑ２」、「Ｑ３」、及び「Ｑ４」の領域は、それぞれ「ｃＴｎＴ陽性ＶＣＡＭ１陰性細胞群」、「ｃＴｎＴ陽性ＶＣＡＭ１陽性細胞群」、「ｃＴｎＴ陰性ＶＣＡＭ１陰性細胞群」、及び「ｃＴｎＴ陰性ＶＣＡＭ１陽性細胞群」を示し、これら４種細胞群の全細胞数に対する各細胞群の細胞数の割合（％）をそれぞれの領域に示す。図中の、８２．６％及び２６．４％は、それぞれＣＤ８２陽性細胞及びＣＤ８２陰性細胞を血清存在下で培養したときの、ｃＴｎＴ陽性細胞（ｃＴｎＴ陽性ＶＣＡＭ１陽性細胞群とｃＴｎＴ陽性ＶＣＡＭ１陰性細胞群を合わせたもの）を示す。

[図7]ヒトｉＰＳ細胞を心筋細胞へ分化誘導後６日目にＣＤ８２陽性細胞を単離し、重度複合免疫不全様C.B-17/lcr-scid/scidJcl（日本クレア社製）（ＳＣＩＤ；Sevefe Combined ImmunoDeficiency）マウスの腎被膜下に移植後２週間目に腎被膜の組織切片を作製し、免疫組織染色法を用いた解析を行った結果を示す図である。（ａ）ＤＡＰＩ（細胞核）染色画像、（ｂ）ＨＮＡ（Human Nuclear Antigen）（移植したＣＤ８２陽性細胞由来の細胞）染色画像、（ｃ）ｃＴｎＴ（心筋細胞）染色画像、（ｄ）ＤＡＰＩ染色画像とＨＮＡ染色画像とを重ねた画像、及び（ｅ）ＤＡＰＩ染色画像と、ＨＮＡ染色画像

と、ｃＴｎＴ染色画像とを重ねた画像を示す。

[図8]ヒトｉＰＳ細胞を心筋細胞へ分化誘導後６日目にＣＤ８２陽性細胞（ＣＤ８２陽性ＣＤ１３陽性ＰＤＧＦＲα陽性細胞）を単離し、心筋梗塞モデルラットF344 N-Jcl rnu/rnuの心臓に移植後４週間目に心臓の組織切片を作製し、免疫組織染色法を用いた解析を行った結果を示す図である。図８Ｂは、梗塞を起こした領域（Infarcted Area）の位相差画像を示し、図８Ａは、図８Ｂの四角で囲った領域におけるｃＴｎＴ及びＨｏｅｃｈｓｔ３３２５８染色画像を示す。

[図9]凍結保存したＣＤ８２陽性細胞を、血清存在下で培養したときの心筋細胞（ｃＴｎＴ陽性細胞［ｃＴｎＴ陽性ＶＣＡＭ１陰性細胞＋ｃＴｎＴ陽性ＶＣＡＭ１陽性細胞］）への分化効率を解析した結果を示す図である。図中の四角で囲った「Ｑ１」、「Ｑ２」、「Ｑ３」、及び「Ｑ４」の領域は、それぞれ「ｃＴｎＴ陽性ＶＣＡＭ１陰性細胞群」、「ｃＴｎＴ陽性ＶＣＡＭ１陽性細胞群」、「ｃＴｎＴ陰性ＶＣＡＭ１陰性細胞群」、及び「ｃＴｎＴ陰性ＶＣＡＭ１陽性細胞群」を示し、これら４種細胞群の全細胞数に対する各細胞群の細胞数の割合（％）をそれぞれの領域に示す。図中の、９４．４％は、凍結保存したＣＤ８２陽性細胞を血清存在下で培養した時のｃＴｎＴ陽性細胞（ｃＴｎＴ陽性ＶＣＡＭ１陽性細胞群とｃＴｎＴ陽性ＶＣＡＭ１陰性細胞群を合わせたもの）を示す。

[図10]ヒトｉＰＳ細胞を心筋細胞へ分化誘導後４日目及び６．５日目にＰＤＧＦＲα（縦軸）と、９種類の細胞表面マーカー（ＣＤ１０５、ＣＤ１２１ａ、ＣＤ１８、ＣＤ１２０ａ、ＣＤ４５、ＣＤ１４、ＣＤ３１、ＨＬＡ－ＤＲ、及びＣＤ３８）（横軸）の発現をフローサイトメーターで解析した結果を示す図である。図中の四角で囲った「Ｑ１」、「Ｑ２」、「Ｑ３」、及び「Ｑ４」の領域は、それぞれ「各種細胞表面マーカー陰性ＰＤＧＦＲα陽性細胞群」、「各種細胞表面マーカー陽性ＰＤＧＦＲα陽性細胞群」、「各種細胞表面マーカー陰性ＰＤＧＦＲα陰性細胞群」、及び「各種細胞表面マーカー陽性ＰＤＧＦＲα陰性細胞群」を示し、これら４種細胞群の全細胞数に

対する各細胞群の細胞数の割合（％）をそれぞれの領域に示す。

[図11]ヒトｉＰＳ細胞を心筋細胞へ分化誘導後４日目及び６．５日目にＰＤＧＦＲα（縦軸）と、９種類の細胞表面マーカー（ＣＤ１２１ｂ、ＣＤ１２２、ＣＤ１２４、ＣＤ１２６、ＣＤ１２７、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１０４、ＣＤ６２ｅ、及びＣＤ６２Ｉ）（横軸）の発現をフローサイトメーターで解析した結果を示す図である。図中の四角で囲った「Ｑ１」、「Ｑ２」、「Ｑ３」、及び「Ｑ４」の領域は、それぞれ「各種細胞表面マーカー陰性ＰＤＧＦＲα陽性細胞群」、「各種細胞表面マーカー陽性ＰＤＧＦＲα陽性細胞群」、「各種細胞表面マーカー陰性ＰＤＧＦＲα陰性細胞群」、及び「各種細胞表面マーカー陽性ＰＤＧＦＲα陰性細胞群」を示し、これら４種細胞群の全細胞数に対する各細胞群の細胞数の割合（％）をそれぞれの領域に示す。

[図12]ヒトｉＰＳ細胞を心筋細胞へ分化誘導後４日目及び６．５日目にＰＤＧＦＲα（縦軸）と、４種類の細胞表面マーカー（ＣＤ６２ｐ、ＣＤ１２０ｂ、ＣＤ３４、及びＣＤ４）（横軸）の発現をフローサイトメーターで解析した結果を示す図である。図中の四角で囲った「Ｑ１」、「Ｑ２」、「Ｑ３」、及び「Ｑ４」の領域は、それぞれ「各種細胞表面マーカー陰性ＰＤＧＦＲα陽性細胞群」、「各種細胞表面マーカー陽性ＰＤＧＦＲα陽性細胞群」、「各種細胞表面マーカー陰性ＰＤＧＦＲα陰性細胞群」、及び「各種細胞表面マーカー陽性ＰＤＧＦＲα陰性細胞群」を示し、これら４種細胞群の全細胞数に対する各細胞群の細胞数の割合（％）をそれぞれの領域に示す。

[図13]ヒトｉＰＳ細胞を心筋細胞へ分化誘導後６日目にＣＤ８２と、１５種類の細胞表面マーカー（ＣＤ７、ＣＤ３７、ＣＤ４３、ＣＤ４９ａ、ＣＤ１８、ＣＤ１０５、ＣＤ１４４、ＳＴＲＯ－１、ＣＤ１７７、ＣＤ７３、ＣＤ４４、ＣＤ１１７［c-kit］、ＣＤ１６３、ＣＤ３１、及びＣＤ１０６）の発現をフローサイトメーターで解析した結果を示す図である。図中の上から１及び２段落目と、３段目の左から１～３番目において、四角で囲った「Ｑ１」、「Ｑ２」、「Ｑ３」、及び「Ｑ４」の領域は、それぞれ「各種細胞表面マーカー陰性ＣＤ８２陽性細胞群」、「各種細胞表面マーカー陽性ＣＤ８２

陽性細胞群」、「各種細胞表面マーカー陰性ＣＤ８２陰性細胞群」、及び「各種細胞表面マーカー陽性ＣＤ８２陰性細胞群」を示し、これら４種細胞群の全細胞数に対する各細胞群の細胞数の割合（％）をそれぞれの領域に示す。また、図中の上から３段目の右から１及び２番目において、四角で囲った「Ｑ１」、「Ｑ２」、「Ｑ３」、及び「Ｑ４」の領域は、それぞれ「ＣＤ８２陰性各種細胞表面マーカー陽性細胞群」、「ＣＤ８２陽性各種細胞表面マーカー陽性細胞群」、「ＣＤ８２陰性各種細胞表面マーカー陰性細胞群」、及び「ＣＤ８２陽性各種細胞表面マーカー陰性細胞群」を示し、これら４種細胞群の全細胞数に対する各細胞群の細胞数の割合（％）をそれぞれの領域に示す。

[図14]ヒトｉＰＳ細胞を心筋細胞へ分化誘導後６日目にＣＤ８２（縦軸）と、１１種類の細胞表面マーカー（ＲＯＲ２、ＣＤ１３７Ｌ、ＣＤ１４０ｂ［ＰＤＧＦＲｂ］、ＣＤ１６６［ＡＬＣＡＭ］、ＣＤ１８０、ＣＤ２５２［ＯＸ４０Ｌ］、ＣＤ３４４［Frizzled4］、ＣＤ３０４［Neurophilin-1］、ＣＤ１１８［ＬＩＦ－Ｒ］、ＣＤ９９Ｒ、及びＣＤ９０）（横軸）の発現をフローサイトメーターで解析した結果を示す図である。図中の四角で囲った「Ｑ１」、「Ｑ２」、「Ｑ３」、及び「Ｑ４」の領域は、それぞれ「各種細胞表面マーカー陰性ＣＤ８２陽性細胞群」、「各種細胞表面マーカー陽性ＣＤ８２陽性細胞群」、「各種細胞表面マーカー陰性ＣＤ８２陰性細胞群」、及び「各種細胞表面マーカー陽性ＣＤ８２陰性細胞群」を示し、これら４種細胞群の全細胞数に対する各細胞群の細胞数の割合（％）をそれぞれの領域に示す。

発明を実施するための形態

[0030] 本発明の調製心筋前駆細胞は、「心筋前駆細胞として用いるため」という用途が限定されたＣＤ７３陰性、ＣＤ４４陰性、ＣＤ１０５陰性、ＣＤ１２１ａ陰性、ＣＤ１８陰性、又はＣＤ１２０ａ陰性で、かつＣＤ８２陽性細胞であり、ここで「ＣＤ８２陽性」とは、ＣＤ（cluster of differentiation）８２抗原を細胞表面上に発現することを意味する。ＣＤ８２の発現は、定

量ＲＴ－ＰＣＲ（Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction）法、ＲＴ－ＰＣＲ法、サザンブロティング法等のＣＤ８２遺伝子のｍＲＮＡの発現を解析する方法や、ウエスタンブロッティング法、フローサイトメトリー、ＥＬＩＳＡ法、ＥＩＡ法、ＲＩＡ法等のＣＤ８２タンパク質の発現を解析する方法を用いて確認することができる。

[0031] 本発明において、「心筋前駆細胞」とは、様々な培養条件や組織・臓器への移植において、心筋細胞に特異的に分化する細胞を意味する。

[0032] 上記［細胞表面マーカーＡ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性であるＣＤ８２陽性細胞としては、具体的には、ＣＤ７３が陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ４４が陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ１０５が陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ１２１ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ１８が陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ１２０ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ７３及びＣＤ４４が陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ７３及びＣＤ１０５が陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ７３及びＣＤ１２１ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ７３及びＣＤ１８が陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ７３及びＣＤ１２０ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ４４及びＣＤ１０５が陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ４４及びＣＤ１２１ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ４４及びＣＤ１８が陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ４４及びＣＤ１２０ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ１０５及びＣＤ１２１ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ１０５及びＣＤ１８が陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ１０５及びＣＤ１２０ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ１２１ａ及びＣＤ１８が陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ１２１ａ及びＣＤ１２０ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ１８及びＣＤ１２０ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ７３、ＣＤ４４、及びＣＤ１０５が陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ７３、ＣＤ４４、及びＣＤ１２１ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ７３、ＣＤ４４、及びＣＤ１８が陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ７３、ＣＤ４４、及びＣＤ１２０ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ４

４、ＣＤ１０５、及びＣＤ１２１ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ４４、ＣＤ１０５、及びＣＤ１８が陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ４４、ＣＤ１０５、及びＣＤ１２０ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ１０５、ＣＤ１２１ａ、及びＣＤ１８が陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ１０５、ＣＤ１２１ａ、及びＣＤ１２０ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ１２１ａ、ＣＤ１８、及びＣＤ１２０ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ７３、ＣＤ４４、ＣＤ１０５、及びＣＤ１２１ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ７３、ＣＤ４４、ＣＤ１０５、及びＣＤ１８が陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ７３、ＣＤ４４、ＣＤ１０５、及びＣＤ１２０ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ４４、ＣＤ１０５、ＣＤ１２１ａ、及びＣＤ１８が陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ４４、ＣＤ１０５、ＣＤ１２１ａ、及びＣＤ１２０ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ１０５、ＣＤ１２１ａ、ＣＤ１８、及びＣＤ１２０ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ７３、ＣＤ４４、ＣＤ１０５、ＣＤ１２１ａ、及びＣＤ１８が陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ７３、ＣＤ４４、ＣＤ１０５、ＣＤ１２１ａ、及びＣＤ１２０ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、ＣＤ４４、ＣＤ１０５、ＣＤ１２１ａ、ＣＤ１８、及びＣＤ１２０ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞、並びにＣＤ７３、ＣＤ４４、ＣＤ１０５、ＣＤ１２１ａ、ＣＤ１８、及びＣＤ１２０ａが陰性であるＣＤ８２陽性細胞を挙げることができる。

[0033] 本発明の調製心筋前駆細胞は、ＣＤ７３陰性、ＣＤ４４陰性、ＣＤ１０５陰性、ＣＤ１２１ａ陰性、ＣＤ１８陰性、又はＣＤ１２０ａ陰性で、かつＣＤ８２陽性細胞が、ＣＤ８２陰性細胞等の他の細胞集団中に含まれた状態のものであってもよく、ここで他の細胞集団中に含まれる調製心筋前駆細胞の割合としては、少なくとも４％、少なくとも１０％、少なくとも３０％、少なくとも４０％、少なくとも５０％、少なくとも６０％、少なくとも７０％、少なくとも８０％、少なくとも８５％、少なくとも８８％、少なくとも９０％、少なくとも９３％、少なくとも９５％、少なくとも９８％等を挙げることができる。

[0034] 本発明の調製心筋前駆細胞を用いて高純度な心筋細胞集団を調製する場合、単離処理が施された“ＣＤ７３陰性、ＣＤ４４陰性、ＣＤ１０５陰性、ＣＤ１２１ａ陰性、ＣＤ１８陰性、又はＣＤ１２０ａ陰性で、かつＣＤ８２陽性細胞”、すなわち高純度な調製心筋前駆細胞を用いることが好ましい。上記「高純度な心筋細胞集団」又は「高純度な調製心筋前駆細胞」とは、細胞集団中に含まれる心筋細胞又は調製心筋前駆細胞数の割合が少なくとも８０％、好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも８８％、さらに好ましくは少なくとも９０％、さらにより好ましくは少なくとも９３％、特に好ましくは少なくとも９５％、最も好ましくは少なくとも９８％であることを意味する。

[0035] 調製心筋前駆細胞は、蛍光物質で標識した抗ＣＤ８２抗体を用いた蛍光活性化セルソーター（ＦＡＣＳ）や、蛍光物質やビオチン、アビジン等の標識物質で標識した抗ＣＤ８２抗体と、かかる標識物質に対する抗体とＭＡＣＳビーズ（磁性ビーズ）とのコンジュゲート抗体とを用いた自動磁気細胞分離装置（ａｕｔｏＭＡＣＳ）により単離処理を施すことができる。上記蛍光物質としては、アロフィコシアニン（ＡＰＣ）、フィコエリトリン（ＰＥ）、ＦＩＴＣ（fluorescein isothiocyanate）、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６４７、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ７００、ＰＥ－Ｔｅｘａｓ Ｒｅｄ、ＰＥ－Ｃｙ５、ＰＥ－Ｃｙ７等を挙げることができる。

[0036] 調製心筋前駆細胞の純度は、上記蛍光物質で標識した抗ＣＤ８２抗体を用いてＣＤ８２陽性細胞を染色し、Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３３４２、Ｈｏｅｃｈｓｔ ３３２５８等の細胞核染色蛍光物質を用いて生細胞の染色、又はＤＡＰＩ（4',6-diamidino-2-phenylindole）、TO-PRO-3 Iodide Quinolinium, 4-[3-(3-methyl-2(3H)-benzothiazolylidene)-1-propenyl]-1-[3-(trimethylammonio)propyl]-, diiodide、LIVE/DEAD Fixable Dead Cell Stain (Life Technology社製）等の細胞核染色蛍光物質を用いて死細胞の染色を行い、ＦＡＣＳ解析により生細胞数とＣＤ８２陽性細胞数を解析し、生細胞数とＣＤ８２陽性細胞の比として算出することができる。

[0037] 本発明の調製心筋前駆細胞は、上記［細胞表面マーカーＢ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性、及び／又は、上記［細胞表面マーカーＣ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陽性であることや、上記［細胞表面マーカーＤ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性、及び／又は、上記［細胞表面マーカーＥ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陽性であることや、上記［細胞表面マーカーＦ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陽性であることにより、より特徴付けられる。

[0038] 上記［細胞表面マーカーＡ群］、［細胞表面マーカーＢ群］、［細胞表面マーカーＣ群］、［細胞表面マーカーＤ群］、［細胞表面マーカーＥ群］、及び［細胞表面マーカーＦ群］に含まれる細胞表面マーカーの発現は、定量ＲＴ－ＰＣＲ法、ＲＴ－ＰＣＲ法、サザンブロティング法等のｍＲＮＡの発現を解析する方法や、ウエスタンブロッティング法、フローサイトメトリー、ＥＬＩＳＡ法、ＥＩＡ法、ＲＩＡ法等のタンパク質の発現を解析する方法を用いて検出することにより、確認することができる。

[0039] 本発明の調製心筋前駆細胞は、通常液体中に存在させた状態又は液体で湿った（濡れた）状態で使用する。かかる液体としては、ＣＤ８２陽性細胞が生存・維持できるものであれば特に制限されず、血清含有又は無血清培養液、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水、トリス緩衝化生理食塩水、ＨＥＰＥＳ緩衝化生理食塩水、リンゲル液（乳酸リンゲル液、酢酸リンゲル液、重炭酸リンゲル液等）、５％グルコース水溶液等の生理的水溶液が含まれる。上記血清含有培養液としては、０．１～３０（ｖ／ｖ）％の血清（ウシ胎児血清［Fetal bovine serum；ＦＢＳ］、子牛血清［Calf bovine serum；ＣＳ］等）を含有する動物細胞培養用培養液（ＤＭＥＭ、ＥＭＥＭ、ＩＭＤＭ、ＲＰＭＩ１６４０、αＭＥＭ、Ｆ－１２、Ｆ－１０、Ｍ－１９９、ＡＩＭ－Ｖ等）を挙げることができ、また、上記無血清培養液としては、市販のＢ２７サプリメント（－インスリン）（Life Technologies社製）、Ｎ２サプリメント（Life Technologies社製）、Ｂ２７サプリメント（Life Technologies

社製）、Knockout Serum Replacement（Invitrogen社製）等の血清代替物を適量（例えば、１～３０％）添加した上記動物細胞培養用培養液などを挙げることができる。

[0040] また、上記血清含有又は無血清培養液には、例えば、還元剤（例えば、２－メルカプトエタノール、ジチオトレイトール［dithiothreitol；ＤＴＴ］等）、細胞増殖因子（例えば、インスリン、上皮成長因子［ＥＧＦ；Epidermal growth factor］、インスリン様成長因子［ＩＧＦ；Insulin-like growth factor］、塩基性線維芽細胞増殖因子［ｂＦＧＦ；basic fibroblast growth factor］、血小板由来成長因子［ＰＤＧＦ；Platelet-derived growth factor］、血管内皮細胞増殖因子［ＶＥＧＦ；Vesicular endothelial growthfactor］、肝細胞増殖因子［ＨＧＦ；Hepatocyte growth factor］、ＦＧＦ９、骨形成タンパク質４［ＢＭＰ４；bone morphogenetic protein 4］、ＢＭＰ５、アクチビンＡ、幹細胞因子［ＳＣＦ］、Ｄｋｋ１［Dickkopf-1］、Ｗｎｔ阻害剤［ＸＡＶ、ＩＷＰ４等］、Ｗｎｔ活性化剤［ＣＨＩＲ、Kenpaullone等］、白血病抑制因子［ＬＩＦ；Leukemia Inhibitory Factor］、Ｗｎｔ、ＴＧＦ－β等）、鉄源（例えば、トランスフェリン等）、ミネラル（例えば、亜セレン酸ナトリウム）、アミノ酸（例えば、グルタミン、アラニン、アスパラギン、セリン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、プロリン、チロシン等の非必須アミノ酸）、ビタミン類（例えば、塩化コリン、パントテン酸、葉酸、ニコチンアミド、塩酸ピリドキサル、リボフラビン、塩酸チアミン、アスコルビン酸、ビオチン、イノシトール等）、糖類（例えば、グルコース等）、有機アミン類（例えば、プトレシン等）、ステロイド（例えば、プロゲステロン、β-エストラジオール等）、抗生物質（例えば、ペニシリン、ストレプトマイシン等）、インターロイキン類（例えば、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－６等）、接着因子（例えば、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コラーゲン、フィブロネクチン等）、有機酸（例えば、ピルビン酸、コハク酸、乳酸等）若しくはその塩、緩衝剤（例えば、ＨＥＰＥＳ等）及びこれらの組合せを必要に応じて適宜補充してもよい。

[0041] 本発明の調製心筋前駆細胞は、凍結・融解処理を行った後でも高い生存率と、心筋細胞への高い分化能を有する。このため、本発明の調製心筋前駆細胞を長期保存する場合、凍結保存することが好ましい。通常凍結保存液中に凍結保存されるが、かかる凍結保存液としては、グリセロール、ジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）、ケラチン加水分解物、加水分解ゼラチン、血清、血清アルブミン等の凍結保護剤を含む上記生理的水溶液を挙げることができる。また、上記凍結保存液として、セルバンカー１、セルバンカー１プラス、セルバンカー２、セルバンカー３（すべて十慈フィールド社製）、ＴＣプロテクター（DSファーマバイオメディカル社製）、バンバンカーｈＲＭ（日本ジェネティックス社製）、Freezing Medium for human ES/iPS Cells（リプロセル社製）、クライオスカーレスDMSOフリー（バイオベルデ社製）、ステムセルキープ（バイオベルデ社製）等の市販品を挙げることもできる。

[0042] 本発明の調製心筋前駆細胞は、コーティング剤で処理された培養容器に接着した状態や、上記生理的水溶液中又は上記凍結保存液中に懸濁された状態や、細胞ペレットの状態や、単層又は多層（例えば２～３００層、２０～３００層）のＣＤ８２陽性細胞シートの状態で用いることができる。上記コーティング剤としては、例えば、マトリゲル、Ｉ型コラーゲン、ＩＶ型コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、エンタクチン、フィブロネクチン、温度応答性ポリマー（ＰＩＰＡＡｍ）及びこれらの組み合わせを挙げることができる。

[0043] 本発明の心疾患治療剤は、本発明の調製心筋前駆細胞、すなわち、様々な培養条件や組織・臓器への移植において、心筋細胞に特異的に分化する細胞を有効成分として含む、好ましくは高純度で含むものであり、心筋症や心疾患を治療又は予防する作用を有する。かかる心筋症や心疾患には、遺伝性や炎症やストレス等の後天的要因の負荷による、又はその混合する要因で起こる様々な心筋症や心疾患が含まれ、心筋症としては、例えば、肥大型閉塞性心筋症、肥大型非閉塞性心筋症、拘束型心筋症、不整脈原性右室異形成症、分類不能型心筋症、特発性心筋症、拡張型心筋症、拡張型心筋症様病態を呈

する虚血性心筋症、高血圧性心筋症、弁膜症性心筋症、肥大型心筋症拡張相、膠原病や自己免疫性疾患に関連する心サルコイドーシスやアミロイドーシス、遺伝性心筋症、後天性心筋症、心筋炎、心筋炎後心筋症、薬剤や中毒性に引き起こされる薬剤誘発性心筋症、アルコール性心筋症、放射線性心筋症、左室緻密化障害、筋ジストロフィーに伴う心筋症、ミトコンドリア心筋症、代謝異常により起因する心筋症、産褥性心筋症を挙げることができ、心疾患としては、例えば、急性心筋梗塞、慢性心筋梗塞、亜急性期心筋梗塞、難治性狭心症などの虚血性心疾患・心筋梗塞、慢性心不全、急性心不全、重症心不全、先天性心疾患に起因する心不全などの心不全、先天性心疾患、心室性不整脈、上室性不整脈、頻脈性不整脈、徐脈性不整脈、致死性不整脈などの不整脈を挙げることができる。調製心筋前駆細胞は、高い自己増殖能と高い心筋分化能と高い心筋への生着効率を有する。したがって、調製心筋前駆細胞を有効成分として含有する本発明の心疾患治療剤は、特に重症（難治性）心疾患の治療又は予防に有利に用いることができる。

[0044] 本発明の心疾患治療剤に含まれる本発明の調製心筋前駆細胞の細胞数としては、心疾患による心筋細胞の損傷レベルや、本発明の調製心筋前駆細胞の形態により異なるため、一概に特定することはできないが、通常1×10^{4}～1×10^{9}であり、好ましくは1×10^{5}～1×10^{8}であり、より好ましくは1×10^{6}～1×10^{7}である。

[0045] 本発明の心疾患治療剤を上記心疾患に罹患した患者に投与する方法としては、本発明の心疾患治療剤に含まれる調製心筋前駆細胞の形態を考慮し適宜選択することができ、例えば、本発明の心疾患治療剤に含まれる調製心筋前駆細胞の使用形態が細胞シートである場合、外科的処理により、かかる細胞シートを心外膜面に貼付することにより、上記患者の心臓に移植する方法を挙げることができ、また、本発明の心疾患治療剤に含まれる調製心筋前駆細胞の使用形態がコーティング剤で処理された培養容器に接着した状態である場合、細胞分散液（トリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロナーゼ、ペプシン、エラスターゼ、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ等）で処理する

ことにより細胞を培養容器から剥離させ、上記生理的水溶液中に再懸濁し、カテーテルを用いて挿入する、冠動静脈内や直接心臓へ注入する、静脈に注射する等の方法により、上記患者に投与する方法を挙げることができ、また、本発明の心疾患治療剤に含まれる調製心筋前駆細胞の使用形態が細胞ペレットの状態である場合、上記生理的水溶液中に懸濁し、カテーテルを用いて挿入する、冠動静脈内や直接心臓へ注入する、静脈に注射する等の方法により、上記患者に投与する方法を挙げることができ、また、本発明の心疾患治療剤に含まれる調製心筋前駆細胞の使用形態が上記凍結保存液中に凍結保存された状態である場合、３５～３８℃の恒温槽内で細胞を凍結融解した後、上記生理的水溶液中に再懸濁し、カテーテルを用いて挿入する、冠動静脈内や直接心臓へ注入する、静脈に注射する等の方法により、上記患者に投与する方法を挙げることができ、また、本発明の心疾患治療剤に含まれる調製心筋前駆細胞の使用形態が上記生理的水溶液中に懸濁された状態である場合、必要に応じて上記生理的水溶液中に再懸濁し、カテーテルを用いて挿入する、冠動静脈内や直接心臓へ注入する、静脈に注射する等の方法により、上記患者に投与する方法を挙げることができる。

[0046] なお、本発明の調製心筋前駆細胞は、心疾患治療剤の他、心筋モデル細胞を作製するための材料として用いることもできる。

[0047] 本発明の調製心筋前駆細胞は、以下の手順にしたがって調製することができる。まず、幹細胞を取得する。かかる幹細胞の生物種としては、特に制限されず、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類、ウサギ等のウサギ目、ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ等の有蹄目、イヌ、ネコ等のネコ目、ヒト、サル、アカゲザル、カニクイザル、マーモセット、オランウータン、チンパンジー等の霊長類を挙げることができ、これらの中でもマウス、ブタ、又はヒトが好ましく、本発明の調製心筋前駆細胞を心疾患治療に用いる場合、特にヒトを好適に例示することができる。

[0048] 上記幹細胞には、分化能力に応じて、多能性幹細胞（pluripotent stem ce11）、複能性幹細胞（multipotent stem ce11）等の亜集団が含まれる。多能

性幹細胞とは、それ自体では個体になることができないが、生体を構成する全ての組織や細胞へ分化し得る能力を有する細胞を意味する。複能性幹細胞とは、全ての種類ではないが、複数種の組織や細胞へ分化し得る能力を有する細胞を意味する。

[0049] 多能性幹細胞としては、初期胚より単離される胚性幹細胞（embryonic stem cells：ＥＳ細胞）や、胎児期の始原生殖細胞から単離される胚性生殖細胞（embryonic germ cells：ＥＧ細胞）（例えばProc Natl Acad Sci U S A. 1998, 95:13726-31参照）や、出生直後の精巣から単離される生殖細胞系列幹細胞（germline stem cells：ＧＳ細胞）（例えば、Nature. 2008, 456:344-9参照）や、腸骨骨髄、顎骨骨髄等の骨髄由来の幹細胞や、脂肪組織由来の幹細胞などの間葉系幹細胞や、リンパ球等の体細胞に細胞刺激を与えることで、体細胞の脱分化を誘導し、ＥＳ細胞同様の多能性を有する体細胞由来の刺激惹起性多能性獲得細胞（ＳＴＡＰ細胞；Stimulus-Triggered Acquisition of Pluripotency cells）や、皮膚、骨髄等の間葉系組織から選択して得られた多能性を有する細胞（Ｍｕｓｅ細胞［Multi-lineage differentiating Stress Enduring cell］）や、皮膚細胞等の体細胞に複数の遺伝子を導入することで、被検体自身の体細胞の脱分化を誘導し、ＥＳ細胞同様の多能性を有する体細胞由来の誘導多能性幹細胞（ｉＰＳ；induced pluripotent stemcell）を挙げることができ、これらの中でもｉＰＳ細胞が好ましく、本発明の調製心筋前駆細胞を心疾患治療に用いる場合、移植による拒絶反応のリスクを考慮すると、心疾患に罹患した患者由来の体細胞から得られたｉＰＳ細胞や、心疾患に罹患した患者とヒト白血球抗原（ＨＬＡ；Human leukocyte antigen）遺伝子型が同一又は実質的に同一である対象（ヒト）由来の体細胞から得られたｉＰＳ細胞を好適に例示することができる。ここで「ＨＬＡ遺伝子型が実質的に同一」とは、移植した細胞に対して免疫抑制剤により免疫反応が抑制できる程度にＨＬＡ遺伝子型が一致していることを意味する。したがって、上記ＨＬＡ遺伝子型が実質的に同一である対象（ヒト）由来の体細胞としては、具体的には、ＨＬＡ－Ａ、ＨＬＡ－Ｂ及びＨＬＡ－ＤＲのＨＬＡ

遺伝子型３種、或いはかかるＨＬＡ遺伝子型３種にＨＬＡ－Ｃを加えたＨＬＡ遺伝子型４種が一致するＨＬＡ遺伝子型が同一である対象（ヒト）由来の体細胞を挙げることができる。

[0050] ＥＳ細胞は、内部細胞塊を、マイトマイシンＣ処理済のマウス胎仔由来の初代線維芽細胞［ＭＥＦ］、ＳＴＯ細胞、ＳＮＬ細胞等のフィーダー細胞上で上記血清含有又は無血清培養液中に培養することにより製造することができる。ＥＳ細胞の製造方法は、例えば、ＷＯ９６／２２３６２、ＷＯ０２／１０１０５７、ＵＳ５，８４３，７８０、ＵＳ６，２００，８０６、ＵＳ６，２８０，７１８等に記載されている。ＥＧ細胞は、始原生殖細胞をｍＳＣＦ、ＬＩＦ及びｂＦＧＦを含む上記血清含有又は無血清培養液中で培養することにより製造することができる（例えば、Ce11. 1992, 70:841-847参照）。ＳＴＡＰ細胞は、体細胞（例えば、リンパ球等）を酸性溶液（ｐＨ４．５～６．０）で処理することにより製造することができる（国際公開第２０１３／１６３２９６号パンフレット、Obokata,H. et al., Nature 505: 676-680 (2014)）。Ｍｕｓｅ細胞は、皮膚、骨髄等の間葉系組織を、トリプシンや低酸素処理などのストレスを与えることによりストレス耐性の細胞を選択したり、あるいは多能性幹細胞の表面抗原であるＳＳＥＡ－３の発現を指標として細胞を選択し、さらに単一細胞の状態で浮遊培養を重ねることにより、細胞を単離することにより製造することができる（特許第５１８５４４３号公報、Proc Natl Acad Sci ＵＳＡ. 2010, 107: 8639-8643）。ｉＰＳ細胞は、体細胞（例えば線維芽細胞、皮膚細胞等）にＯｃｔ３／４、Ｓｏｘ２及びＫｌｆ４（必要に応じて更にｃ－Ｍｙｃ又はｎ－Ｍｙｃ）等のリプログラミング因子を導入することにより製造することができる（例えば、Ce11. 2006, 126:663-676、Nature. 2007, 448:313-317、Nat Biotechno1. 2008, 26;101-106、Cell. 2007, 131:861－872、Science. 2007, 318:1917-1920、Ce11 Stem Cells. 2007, 1:55-70、Nat Biotechnol. 2007, 25:1177-1181、Nature. 2007, 448:318-324、Cell Stem Cells. 2008, 2:10-12、Nature. 2008, 451:141-146、Science. 2007, 318:1917-1920参照）。体細胞の核を核移植するこ

とによって作製された初期胚を培養することによって樹立した幹細胞も、多能性幹細胞としてまた好ましい（例えば、Nature. 1997, 385:810-813、Science. 1998, 280:1256-1258、Nature Biotechnology. 1999, 17:456-461、Nature. 1998, 394:369-374、Nature Genetics. 1999, 22:127-128、Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999, 96:14984-14989参照）、Rideout IIIら（NatureGenetics. 2000, 24:109-110）。多能性幹細胞としては、具体的に、ヒトＥＳ細胞Ｈ９株（ＷＡ０９）、ヒトＥＳ細胞Ｈ１（ＷＡ０１）株（National Stem Cell bank、WISC Bank）や、ＫｈＥＳ－１、ＫｈＥＳ－２及びＫｈＥＳ－３（いずれも京大再生研付属幹細胞医学研究センター）や、ＨＥＳ３、ＨＥＳ４、及びＨＥＳ６（National Stem Cell bank、モナッシュ大学）等のヒトＥＳ細胞や、Ｏｃｔ３／４遺伝子、Ｋｌｆ４遺伝子、Ｃ－Ｍｙｃ遺伝子及びＳｏｘ２遺伝子を導入することによって得られるｉＰＳ細胞（理研バイオリソースセンター、京都大学）や、Ｔｉｃ(ＪＣＲＢ１３３１株)、Ｄｏｔｃｏｍ（ＪＣＲＢ１３２７株)、Ｓｑｕｅａｋｙ(ＪＣＲＢ１３２９株)、及びＴｏｅ（ＪＣＲＢ１３３８株)、Ｌｏｌｌｉｐｏｐ（ＪＣＲＢ１３３６株）(以上成育医療センター、医薬基盤研究所難病・疾患資源研究部・ＪＣＲＢ細胞バンク）や、ＵＴＡ－１株及びＵＴＡ－１－ＳＦ－２－２株（いずれも東京大学）や、Ｏｃｔ３／４遺伝子、Ｋｌｆ４遺伝子及びＳｏｘ２遺伝子を導入することによって得られるｉＰＳ細胞（Nat Biotechnol. 2008, 26: 101-106）等のｉＰＳ細胞を例示することができる。

[0051] 複能性幹細胞としては、例えば、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、脂肪細胞等の細胞に分化可能な間葉系幹細胞、白血球、赤血球、血小板等の血球系細胞に分化可能な造血系幹細胞、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト等の細胞に分化可能な神経系幹細胞等の体性幹細胞を挙げることができる。複能性幹細胞は、自体公知の方法により、生体から単離することができる。例えば、間葉系幹細胞は、哺乳動物の骨髄、脂肪組織、末梢血、臍帯血等から公知の一般的な方法で採取することができる。例えば、骨髄穿刺後の造血幹細胞等の培養、継代によりヒト間葉系幹細胞を単離することがで

きる（Journal ofAutoimmunity, 30 (2008) 163-171）。また、造血系幹細胞は、骨髄、臍帯血、脾臓、肝臓、末梢血等の生体試料から、細胞分離装置（フローサイトメトリー等）と、造血系幹細胞表面抗原（例えば、ＣＤ３４）に対する抗体とを用いて単離することができる。また、上記複能性幹細胞は、上記多能性幹細胞を適切な誘導条件下で培養することによっても得ることができる。なお、本発明の幹細胞には、本願出願後に新たな方法により作製された幹細胞も含まれる。

[0052] 続いて、取得した幹細胞に対して心血管系細胞への分化誘導処理を行う。ここで心血管系細胞への分化誘導処理する方法としては、少なくとも心筋前駆細胞へ分化誘導できれば特に制限されず、心筋前駆細胞へ分化誘導処理する方法の他、心筋前駆細胞へ分化誘導した後、さらにＶＥＧＦを含有する培養液で培養することにより、心筋前駆細胞、内皮細胞及び壁細胞から構成される混合細胞を調製する方法（国際公開第２０１３／１３７４９１号パンフレット）も含まれる。

[0053] 具体的には、例えば、文献（Yamashita, J. et al., Nature 408: 92-96 (2000)、Yamashita, J.K. et al., FASEB J. 19: 1534-1536 (2005)、Narazaki, G., Circulation 118: 498-506 (2008))に記載の方法に従って、幹細胞をコラーゲンＩＶコーティングディッシュ（ＬＩＦ不含、フィーダー細胞無し）上で培養することにより、中胚葉前駆細胞であるＦｌｋ１（血管内皮増殖因子受容体－２［ＶＥＧＦＲ２］とも呼ばれる）陽性細胞へ分化誘導し、さらに、Ｆｌｋ１陽性細胞を、シクロスポリン－Ａ（ＣＳＡ）を含有する培養液中で培養することにより、心筋前駆細胞へ分化誘導する方法（特表２０１１－５１５０６４号公報）や、幹細胞をＥＧＦ及びｂＦＧＦを含有する培養液中で浮遊培養させることにより、心筋前駆細胞へ分化誘導する方法（国際公開第２００６／０９３２７６号パンフレット）や、幹細胞をノギン、コーディン等のＢＭＰアンタゴニストを含有する培養液中で接着培養又は浮遊培養させることにより、心筋前駆細胞へ分化誘導する方法（国際公開第２００５／０３３２９８号パンフレット）や、幹細胞を、Ｗｎｔ－１、Ｗｎｔ－

３ａ若しくはＷｎｔ－５ａ、ＧＳＫ３β阻害剤、又はアミノピリミジン誘導体であるＷｎｔアゴニストを含有する培養液中で培養することにより、Ｗｎｔシグナル経路を活性化させ、心筋前駆細胞へ分化誘導する方法（国際公開第２００７／１２６０７７号パンフレット）や、幹細胞を、アクチビンＡを含有する培養液中で培養後、ＢＭＰ４を含有する培養液中で培養させることにより、心筋前駆細胞へ分化誘導する方法（特開２０１３－２１５２０６号公報、Laflamme, M.A. et al., Nat Biotechnol, 25: 1015-1024 (2007)）や、幹細胞を上記コーティング剤（好ましくは、マトリゲル）で処理された培養容器上で接着培養させ、さらに上記コーティング剤（好ましくは、マトリゲル）を添加することで、幹細胞全体を上記コーティング剤でコーティング（マトリゲルサンドイッチ処理）し、アクチビンＡを含有する培養液中で培養後、ＢＭＰ４及びｂＦＧＦを含有する培養液中で培養させることにより、心筋前駆細胞へ分化誘導する方法（国際公開第２０１３／１３７４９１号パンフレット）や、幹細胞を上記コーティング剤（好ましくは、マトリゲル）で処理された培養容器上で接着培養させ、さらに上記コーティング剤（好ましくは、マトリゲル）を添加することで、幹細胞全体を上記コーティング剤でコーティング（マトリゲルサンドイッチ処理）し、アクチビンＡを含有する培養液中で培養後、ＢＭＰ４及びｂＦＧＦを含有する培養液中で培養し、さらにＤｋｋ１を含有する培養液中で培養させることにより、心筋前駆細胞へ分化誘導する方法（Uosaki H, et al, PLoS One 2011; 6: e23657、以下の実施例に示す［本件プロトコール］）を挙げることができる。

[0054] 幹細胞の培養は、上記コーティング剤で処理された培養容器上や、上記フィーダー細胞を接着させた培養容器上で接着培養することにより行うことができる。幹細胞の培養に用いる培養液としては、０．１～３０（ｖ／ｖ）％の血清（ＦＢＳ、ＣＳ等）を含有する動物細胞培養用培養液（ＤＭＥＭ、ＥＭＥＭ、ＩＭＤＭ、ＲＰＭＩ１６４０、αＭＥＭ、Ｆ－１２、Ｆ－１０、Ｍ－１９９、ＡＩＭ－Ｖ等）や、市販のＢ２７サプリメント（－インスリン）（Life Technologies社製）、Ｎ２サプリメント（Life Technologies社製）

、Ｂ２７サプリメント（Life Technologies社製）、Knockout Serum Replacement（Invitrogen社製）等の血清代替物を適量（例えば、１～３０％）添加した上記動物細胞培養用培養液や、これら培養液にさらにＬＩＦ、ｂＦＧＦ、ＳＣＦ等の分化抑制因子を添加したものなどを挙げることができる。

[0055] 幹細胞の培養に用いる培養液には、還元剤（例えば、２－メルカプトエタノール、ジチオトレイトール［dithiothreitol；ＤＴＴ］等）、鉄源（例えば、トランスフェリン等）、ミネラル（例えば、亜セレン酸ナトリウム）、アミノ酸（例えば、グルタミン、アラニン、アスパラギン、セリン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グリシン、プロリン、チロシン等の非必須アミノ酸）、ビタミン類（例えば、塩化コリン、パントテン酸、葉酸、ニコチンアミド、塩酸ピリドキサル、リボフラビン、塩酸チアミン、アスコルビン酸、ビオチン、イノシトール等）、糖類（例えば、グルコース等）、有機アミン類（例えば、プトレシン等）、ステロイド（例えば、プロゲステロン、β-エストラジオール等）、抗生物質（例えば、ペニシリン、ストレプトマイシン等）、インターロイキン類（例えば、ＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－６等）、接着因子（例えば、ヘパリン、ヘパラン硫酸、コラーゲン、フィブロネクチン等）、有機酸（例えば、ピルビン酸、コハク酸、乳酸等）若しくはその塩、緩衝剤（例えば、ＨＥＰＥＳ等）などの添加物を必要に応じて適宜補充してもよい。

[0056] 幹細胞の培養温度は、通常約３０～４０℃の範囲内であり、好ましくは３７℃である。培養時のCO_2濃度は、通常約１～１０％の範囲内であり、好ましくは約５％である。また、培養時の湿度は、通常約７０～１００％の範囲内であり、好ましくは約９５～１００％の範囲内である。また、培養時のO_2濃度は、正常酸素濃度（１８～２２％O_2）であっても、低酸素濃度（０～１０％O_2）であってもよい。

[0057] 次いで、心筋前駆細胞への分化誘導処理した幹細胞の中からＣＤ８２陽性細胞を分離する。ここで、「分離」とは、ＣＤ８２陽性細胞を培養容器から物理的に取り出すことを意味する。ＣＤ８２陽性細胞が接着培養している場

合、２０～３７℃の範囲内の温度条件下で上記細胞分散液による処理を行うことによりＣＤ８２陽性細胞を培養容器から剥離させ、培養容器からＣＤ８２陽性細胞を含む培養液を、デカンテーションで別の容器へ分離したり、ピペットやピペットマンを用いて別の容器へ分離することができ、また、ＣＤ８２陽性細胞が培養液中に浮遊培養している場合、培養容器からＣＤ８２陽性細胞を含む培養液を、デカンテーションで別の容器へ分離したり、ピペットマンを用いて別の容器へ分離することができる。

[0058] 分離したＣＤ８２陽性細胞について、上記［細胞表面マーカーＡ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性であることや、上記［細胞表面マーカーＢ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性、及び／又は上記［細胞表面マーカーＣ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陽性であるであることや、上記［細胞表面マーカーＤ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性、及び／又は、上記［細胞表面マーカーＥ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陽性であることや、上記［細胞表面マーカーＦ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陽性であることを確認する。分離したＣＤ８２陽性細胞における、上記［細胞表面マーカーＡ群］、［細胞表面マーカーＢ群］及び［細胞表面マーカーＣ群］に含まれる細胞表面マーカーの発現は、定量ＲＴ－ＰＣＲ法、ＲＴ－ＰＣＲ法、サザンブロティング法等のｍＲＮＡの発現を解析する方法や、ウエスタンブロッティング法、フローサイトメトリー、ＥＬＩＳＡ法、ＥＩＡ法、ＲＩＡ法等のタンパク質の発現を解析する方法を用いて検出することにより、確認することができる。

[0059] かかる分離したＣＤ８２陽性細胞を用いて高純度な心筋細胞を調製する場合、高純度なＣＤ８２陽性細胞として単離処理を施したＣＤ８２陽性細胞を用いることが好ましい。ＣＤ８２陽性細胞の単離は、前述したように、蛍光物質で標識した抗ＣＤ８２抗体を用いたＦＡＣＳや、蛍光物質やビオチン、アビジン等の標識物質で標識した抗ＣＤ８２抗体と、かかる標識物質に対す

る抗体とＭＡＣＳビーズ（磁性ビーズ）とのコンジュゲート抗体とを用いた自動磁気細胞分離装置（ａｕｔｏＭＡＣＳ）により行うことができる。上記蛍光物質としては、ＡＰＣ、ＰＥ、ＦＩＴＣ、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６４７、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ７００、ＰＥ－Ｔｅｘａｓ Ｒｅｄ、ＰＥ－Ｃｙ５、ＰＥ－Ｃｙ７等を挙げることができる。

[0060] 幹細胞がＣＤ８２陽性細胞へ分化誘導される時期は、分化誘導後の各時間の細胞サンプルを、上記ＣＤ８２遺伝子のｍＲＮＡの発現を解析する方法や、上記ＣＤ８２タンパク質の発現を解析する方法を用いて、ＣＤ８２陽性細胞を検出することにより確認することができる。

[0061] 分化誘導処理した幹細胞の中からＣＤ８２陽性細胞を分離する時期としては、分化誘導処理方法や培養条件により異なるため、一概に特定することはできないが、通常分化誘導処理後１～２０日目であり、好ましくは２～１４日目であり、より好ましくは３～１１日目であり、さらに好ましくは４～１１日目であり、さらにより好ましくは４～８日目である。

[0062] 分離したＣＤ８２陽性細胞（調製心筋前駆細胞）が心筋細胞へ分化誘導されることは、インビトロ又はインビボでの実験によりＣＤ８２陽性細胞を心筋細胞へ分化誘導し、心筋細胞特異的マーカー（ｃＴｎＴ、αＭＨＣ等）の発現を、定量ＲＴ－ＰＣＲ法、ＲＴ－ＰＣＲ法、サザンブロティング法等の心筋細胞特異的マーカー遺伝子のｍＲＮＡの発現を解析する方法や、ウエスタンブロッティング法、フローサイトメトリー、ＥＬＩＳＡ法、ＥＩＡ法、ＲＩＡ法等の心筋細胞特異的マーカータンパク質の発現を解析する方法を用いて検出することにより、確認することができる。

[0063] ＣＤ８２陽性細胞を調製する方法における各工程は、埃や細菌等の混入（コンタミネーション）を避けるため、クリーンベンチ等を用いて無菌的に行うことが好ましい。

[0064] 以下に実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

実施例 1

[0065] ［ヒトｉＰＳ細胞の継代培養］

ヒトｉＰＳ細胞（２０１Ｂ６）（京都大学山中教授より分与）の継代培養は、４ｎｇ／ｍＬ ｂＦＧＦ（basic fibroblast growth factor）（WAKO社製）を含有するマウス胚性線維芽細胞馴化培養液（ＭＥＦ－ＣＭ；Mouse embryonic fibroblast-conditioned medium）（Knockout ＳＲ［Gibco社製］と２－ＭＥ［Gibco社製］を含有するKnockout ＤＭＥＭ［Gibco社製］）（以下、「本件ＭＥＦ馴化培養液」という）中で、マトリゲル（1：60希釈、Invitrogen社製）でコートした培養皿（１０ｃｍディッシュ［Falcon社製］）に接着させ、３７℃、５％CO_2条件下で行った。

[0066] ［本件プロトコール］

１）心筋細胞への分化誘導は、Modified DD protocol (Uosaki H, et al, PLoS One 2011; 6: e23657)（図１Ａ）をさらに改変した本件プロトコール（図１Ｂ）を用いて行った。本件プロトコールの詳細を、以下の２）～５）に示す。

２）接着培養したヒトｉＰＳ細胞を、細胞分散液（Versene［Invitrogen社製］）を用いて３７℃で３～５分間インキュベーションすることで培養皿から剥離し、マトリゲルでコートした６ウェルプレート（Growth Factor Reduced Matrigel、BD Biosciences社製）へ１×１０^{5}cells／$ｃｍ^{2}$の濃度で播種し、約１００％コンフルエントとなるまで本件ＭＥＦ馴化培養液中で２～３日間培養した。

３）マトリゲル（1：60希釈、Invitrogen社製）を培養液に添加し（マトリゲルサンドイッチ処理）、２４時間培養した後、培養液を１００ｎｇ／ｍＬ アクチビンＡ（R&D Systems社製）を含有する「ＲＰＭＩ＋Ｂ２７－インスリン」（２ｍＭ Ｌ－グルタミン及びＢ２７サプリメント［インスリン不含］［Life Technologies社製］を含有するＲＰＭＩ１６４０［Life Technologies社製］；以下、「本件無血清培養液（Ａ）」という）培養液と交換し、心筋細胞への分化誘導を行った。なお、アクチビンＡを含有する本件無血清培養液

へ培養液を交換した時点を、分化誘導後０日（時間）とした。

４）２４時間培養後、培養液を１０ｎｇ／ｍＬヒトｂＦＧＦ（ｈｂＦＧＦ）（WAKO社製）及び１０ｎｇ／ｍＬ ヒトＢＭＰ４（ｈＢＭＰ４；Human bone morphogenetic protein 4）（R&D Systems社製）を含有する本件無血清培養液（Ａ）と交換し、分化誘導後５日目まで培養を行った。

５）分化誘導後５日目に、培養液を１００ｎｇ／ｍＬ Ｄｋｋ１（R&D Systems社製）を含有する「ＲＰＭＩ＋Ｂ２７」（２ｍＭ Ｌ－グルタミン及びＢ２７サプリメント［Life Technologies社製］を含有するＲＰＭＩ１６４０［Life Technologies社製］；以下、「本件無血清培養液（Ｂ）」という）培養液に交換し、さらに４８時間（分化誘導後７日目まで）培養した。

[0067] ［セルソーティング及びフローサイトメトリー解析］

細胞を、細胞分散液（AccuMax［Innovative Cell Technologies社製］）を用いて３７℃で３～５分間インキュベーションすることで培養皿から剥離し、５％ ＦＢＳ及び５ｍＭ ＥＤＴＡを含むＰＢＳ溶液中に細胞を懸濁した後、標識物質で標識した５種類の細胞表面マーカー（ＫＤＲ、ＰＤＧＦＲα、ＣＤ８２、ＣＤ１３、及びＶＣＡＭ１）に対する抗体（表１参照）を用いて３０分間、４℃条件下で抗原抗体反応を行った。また、細胞質に発現するＴｎＴに関しては、４％ＰＦＡ溶液を用いて１５分間固定化処理し、界面活性剤（０．７５％サポニン溶液［Sigma社製］）で処理した後、抗ｃＴｎＴ抗体（１次抗体）（表１参照）と、蛍光物質で標識した２次抗体（表１参照）とのコンジュゲートを上記細胞懸濁液に加え、３０分間、４℃条件下で抗原抗体反応を行った。それぞれの細胞は、ＦＡＣＳ（FACS Aria II［BD biosciences社製］）を用いて上記抗体で検出される細胞の純化（選別）を行った。また、上記抗体で検出される細胞表面マーカーの発現は、フローサイトメーター（FACS Aria II［BD biosciences社製］）を用いて解析した。

[0068]

[表1]

細胞表面マーカー	抗体
ＫＤＲ	抗体：CD309 (VEGFR-2/KDR)-PE (ES8-20E6、Miltenyi Biotec 社製)
ＰＤＧＦＲα	抗体：human PDGFRα-APC (PRa292、R&D Systems 社製)
ＣＤ８２	抗体：human CD82-PE (ASL-24、Biolegend 社製)
ＣＤ１３	抗体：CD13-Biotin (22A5、Abcam 社製)
ｃＴｎＴ	１次抗体：cTnT (11-33、Thermo 社製)
	２次抗体：Zenon Alexa Fluor 488 (Life Technologies 社製)
ＶＣＡＭ１	抗体：human VCAM1-APC (STA、Biolegend 社製)

[0069] ［インビトロでの心筋細胞への分化能の評価法］

上記［セルソーティング及びフローサイトメトリー解析］の項目に記載の方法にしたがって細胞を純化した後、マトリゲルでコートした６ウェルプレート（Growth Factor Reduced Matrigel、BD Biosciences社製）へ１～１．５×１０^{5}cells／ｃｍ^{2}の濃度で播種し、１０％ＦＢＳを含有する「ＲＰＭＩ」（２ｍＭ Ｌ－グルタミン及びＢ２７サプリメント［Life Technologies社製］を含有するＲＰＭＩ１６４０［Life Technologies社製］）培養液（以下、「本件血清含有培養液」という）中で培養した。なお、ここで血清を含む本件血清含有培養液存在下で細胞を培養することにより、心筋細胞以外の細胞へも分化し得る条件下で培養し、心筋細胞へ特異的に分化するかどうかを検討した。また、播種後４８時間までは、播種後の細胞死を防ぐために、Rho結合リン酸化酵素（Rho-associated protein kinase：ＲＯＣＫ）阻害剤であるＹ－２７６３２(Wako社製)存在下で培養した。培養液は、２日毎新しい本件血清含有培養液に交換した。本件血清含有培養液中で培養を行ってから２週間後に、上記［セルソーティング及びフローサイトメトリー解析］の項目に記載の方法にしたがってフローサイトメトリー解析を行い、心筋細胞（ｃＴｎＴ陽性細胞）の割合を解析した。なお、心筋細胞の表面マーカーとして我々のグループが同定したＶＣＡＭ１（ＣＤ１０６）陽性細胞（Uosaki H, et al, PLoS One 2011; 6: e23657）の割合も解析した。

[0070] ［ＲＮＡマイクロアレイ解析］

上記［本件プロトコール］の項目に記載の方法にしたがってヒトｉＰＳ細胞から心筋細胞への分化誘導を行い、分化誘導後４日目及び５日目に、上記［セルソーティング及びフローサイトメトリー解析］の項目に記載の方法にしたがって中胚葉由来の細胞（ＫＤＲ陽性ＰＤＧＦＲα陽性細胞）を純化・単離し、RNeasy Mini kit (QIAGEN社製) を用いて全ＲＮＡの精製を行った後、Superscript II Reverse Transcriptase (Lifetechnology社製) を用いてｃＤＮＡを合成した。合成したｃＤＮＡを、Bioarray HighYield RNA transcript labeling kit(T7) (Enzo Life Science社製) を用いてＣｙ３で蛍光標識した後、蛍光標識したｃＤＮＡをHuman Genome U133 Plus2.0 Array (Affymetrix社製) にハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは、GeneChip Hybridization Control Kit (Affymetrix社製) 及びGeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix社製) を用いて４５℃にて１６時間の条件下で行った。蛍光シグナルのスキャニングは、GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix社製) を用いて行い、取得した蛍光シグナルの画像解析は、GeneChip Operating Software (Affymetrix社製) を用いて行った。その後の統計学的解析は、GeneSpring GX (アジレント・テクノロジー社製)を用いてＲＭＡ法にて行った。選択基準 (Fold-change＞２．０、Ｐ値＜０．０５）を基に、分化誘導後４日目から５日目にかけて発現の増減が認められる細胞表面マーカーを同定した。

[0071] ［インビボでの心筋細胞への分化能の評価法１］

上記［本件プロトコール］の項目に記載の方法にしたがってヒトｉＰＳ細胞から心筋細胞への分化誘導を行い、分化誘導後６日目に細胞を、細胞分散液 (AccuMax [Innovative Cell Technologies社製]) を用いて３７℃で３～５分間インキュベーションすることで培養皿から剥離し、１％ ＰＢＳ、５ｍＭ ＥＤＴＡ及び５％ ＦＢＳを含む溶液中に懸濁した後、抗ＣＤ８２－ＰＥ抗体 (Biolegend社製) を加えて、室温で３０分間インキュベートした。続いて、抗ＰＥ－ＭＡＣＳビーズ (Miltenyi Biotec社製) を加えて、４℃で２０

分間インキュベートした。１％ ＰＢＳ、５ｍＭ ＥＤＴＡ及び５％ ＦＢＳを含む溶液で２回洗浄後、自動磁気細胞分離装置（ａｕｔｏＭＡＣＳ［Miltenyi Biotec社製］）を用いてＣＤ８２陽性細胞を単離した。なお、コントロールとして用いるために、ＣＤ１３陽性細胞及びＤＧＦＲα陽性細胞を単離した。単離したＣＤ８２陽性細胞約５×１０^{6}個を、本件血清含有培養液１０μＬとマトリゲル（1：60希釈、Invitrogen社製）１０μＬとの混合液中に懸濁し、C.B-17/Icr-scid/scidJclマウス（日本クレア社より入手）の腎被膜下に移植した。ここで、移植を心臓ではなく、腎被膜下に行うことにより、心臓とは関係のない環境下でも心筋細胞へ分化し得るかどうかを検討した。移植後２週間目に、マウスを安楽死させ、腎臓を切断して４％ ＰＦＡにて固定し、３０％ スクロースにて脱水処理を行った後、ＯＣＴ化合物（Sakura Finetek社製）に包埋し、クリオスタット（Carl Zeiss社製）を用いて厚さ６μｍの腎被膜凍結切片を作製した。作製した腎被膜凍結切片を、０．１％ Triton X-100／ＰＢＳ溶液で透過処理を行った後、２％スキムミルクでブロッキング処理を行った。続いて、１次抗体（抗ｃＴｎＴ抗体［abcam社製］にて室温で１時間又は一晩抗原抗体反応処理を行った後、２次抗体（Alexa Fluor 488抗マウスIgG抗体）にて室温で１時間抗体反応処理を行い、その後、抗ヒト核抗原［ＨＮＡ；Human Nuclear Antigen］抗体［stem cells社製］）と、Zenon Alexa Fluor 564（Life Technologies社製）とのコンジュゲート抗体にて室温で２．５時間抗体反応処理を行い、細胞核を、１０μｇ／ｍＬ ＤＡＰＩ（Life Technologies社製）で染色した。共焦点蛍光画像は、Zeiss LSM 710 laser scanning microscope（Carl Zeiss社製）を用いて取得した。

[0072] ［インビボでの心筋細胞への分化能の評価法２］

上記［本件プロトコール］の項目に記載の方法にしたがってヒトｉＰＳ細胞から心筋細胞への分化誘導を行い、分化誘導後６日目に細胞を、細胞分散液（AccuMax［Innovative Cell Technologies社製］）を用いて３７℃で１０～１５分間インキュベーションすることで培養皿から剥離し、１％ ＰＢＳ、５ｍＭ ＥＤＴＡ及び５％ ＦＢＳを含む溶液中に懸濁した後、抗ＣＤ８２－

ＰＥ抗体（Biolegend社製）、抗ＣＤ１３－ＦＩＴＣ抗体（abcam社製）、及び抗ＰＤＧＦＲα－ＡＰＣ抗体（R&D Systems社製）を加えて、室温で３０分間インキュベートした。１％ ＰＢＳ、５ｍＭ ＥＤＴＡ及び５％ ＦＢＳを含む溶液で２回洗浄後、セルソーターを用いてＣＤ８２陽性細胞（ＣＤ８２陽性ＣＤ１３陽性ＰＤＧＦＲα陽性細胞）を単離し、約３×１０^{6}個の細胞にＨｏｅｃｈｓｔ３３２５８（Invitrogen社製）を加えて３７℃１５分インキュベートし、細胞核の染色を行った後、冠動脈結紮した心筋梗塞モデルラットF344 N-Jcl rnu/rnuの心臓に移植した。移植後４週間目に、ラットを安楽死させ、心臓を切断して４％ ＰＦＡにて固定し、３０％ スクロースにて脱水処理を行った後、ＯＣＴ化合物（Sakura Finetek社製）に包埋し、クリオスタット（Carl Zeiss社製）を用いて厚さ６～１０μｍの心臓凍結切片を作製した。作製した心臓凍結切片を、０．２％ Tween20／ＰＢＳ溶液で透過処理を行った後、２％ スキムミルクでブロッキング処理を行った。続いて、１次抗体（抗ｃＴｎＴ抗体［abcam社製］にて室温で１時間又は一晩抗原抗体反応処理を行った後、２次抗体（Alexa Fluor 488抗マウスＩｇＧ抗体）にて室温で１時間抗体反応処理を行いで染色した。画像は、BIOREVO BZ-9000(KEYENCE社製）を用いて取得した。

[0073] ［凍結保存したＣＤ８２陽性細胞の心筋細胞への分化能の評価法］

上記［インビボでの心筋細胞への分化能の評価法１］の項目に記載の方法にしたがって、ＣＤ８２陽性細胞を単離し、細胞凍結保存液（セルバンカー３［十慈フィールド社製］）を１．０×１０^{6}細胞／ｍＬとなるように加え、CryoELITE Cyogenic vials（WHEATON社製、W985866）に１．０×１０^{6}細胞／チューブとなるように分注した。Cryo Box（Thermo社製、5025-0505）に入れ、－８０℃フリーザーに保存した。その後、凍結したチューブを液体窒素中に移して保存した。ＣＤ８２陽性細胞ストックを液体窒素から取り出し、３７℃の湯浴器中で迅速に融解し、遠心処理により上清（細胞凍結保存液）を除き、細胞をＰＢＳで洗浄した後、マトリゲルでコートした６ウェルプレート（Growth Factor Reduced Matrigel、BD Biosciences社製）へ１～１．５

×１０^{5}cells／ｃｍ^{2}の濃度で播種し、上記［インビトロでの心筋細胞への分化能の評価法］の項目に記載の方法にしたがって、心筋細胞への分化能を評価した。

[0074] ［結果１：心筋前駆細胞が誘導される時期の特定］

ヒトｉＰＳ細胞から心筋細胞への分化誘導過程において、心筋細胞への分化能を有する細胞、すなわち心筋前駆細胞が誘導される時期を特定するために、上記［本件プロトコール］の項目に記載の方法にしたがってヒトｉＰＳ細胞から心筋細胞への分化誘導を行い、分化誘導後４日目及び５日目に、上記［セルソーティング及びフローサイトメトリー解析］の項目に記載の方法にしたがって中胚葉由来の細胞（ＫＤＲ陽性ＰＤＧＦＲα陽性細胞）を純化し、上記［インビトロでの心筋細胞への分化能の評価法］の項目に記載の方法にしたがって心筋細胞（ｃＴｎＴ陽性細胞）の割合を解析した（図２参照）。

[0075] その結果、分化誘導後４日目のＫＤＲ陽性ＰＤＧＦＲα陽性細胞のｃＴｎＴ陽性細胞への分化効率は、２．６％であったのに対して、分化誘導後５日目のＫＤＲ陽性ＰＤＧＦＲα陽性細胞のｃＴｎＴ陽性細胞への分化効率は、６９．０％と２７倍も高いことが明らかとなった（図２参照）。この結果は、種々の条件においても心筋細胞にのみ分化する、分化運命が心筋へと決定された特異的な前駆細胞（以下、「心筋特異的前駆細胞」ということがある）が誘導されることを示している。

[0076] ［結果２：心筋前駆細胞が誘導される時期に発現が増加するＣＤ８２の同定］

上記結果１により、ヒトｉＰＳ細胞から心筋細胞への分化誘導後４日目から５日目にかけて、心筋特異的前駆細胞が誘導されることが示されたので、かかる時期で発現の増減が認められる細胞表面マーカーを有する細胞が、心筋特異的前駆細胞である可能性が高いと考えた。そこで、分化誘導後４日目から５日目にかけて、発現の増減が認められる細胞表面マーカーを探索するために、上記［ＲＮＡマイクロアレイ解析］の項目に記載の方法にしたがっ

て分化誘導後４日目から５日目にかけて発現の増減が認められる細胞表面マーカーを解析した。その結果、ＣＤ８２が同定された。この結果は、ＣＤ８２を発現する細胞、すなわちＣＤ８２陽性細胞は心筋特異的前駆細胞であることを示唆している。

[0077] ［結果３：心筋細胞への分化誘導過程におけるＣＤ８２陽性細胞の継持的変化］

上記結果２により、ヒトｉＰＳ細胞から心筋細胞への分化誘導後４日目から５日目にかけて、ＣＤ８２陽性細胞が誘導されることが示されたので、分化誘導後のＣＤ８２陽性細胞の継持的変化を解析した。上記［本件プロトコール］の項目に記載の方法にしたがってヒトｉＰＳ細胞から心筋細胞への分化誘導を行い、分化誘導後３～１１日目に、上記［セルソーティング及びフローサイトメトリー解析］の項目に記載の方法にしたがってＣＤ８２及びＰＤＧＦＲαの発現を、フローサイトメーターを用いて解析した（図３参照）。

[0078] その結果、ＣＤ８２陽性細胞は、分化誘導後４日目にＰＤＧＦＲα陽性細胞群（集団）から誘導され始め、その数を増やし、６日目でＰＤＧＦＲα陽性細胞群の約８０％がＣＤ８２陽性細胞となり、７日目でＣＤ８２陽性細胞数がピーク（全細胞数に対して６２．２％）となり、その後急速に（９日目で全細胞数に対して２２．２％、１１日目で全細胞数に対して５．２５％）ＣＤ８２陽性細胞数が減少することが示された（図３参照）。

[0079] また、分化誘導後４～６日目のＣＤ８２及びＣＤ１３の発現についても同様に、フローサイトメーターを用いて解析したところ、ＣＤ８２陽性細胞は、分化誘導後４日目にＰＤＧＦＲα陽性細胞群（集団）から誘導され始めることが示された（図４参照）。

これらの結果は、ＣＤ８２陽性細胞はこれまで報告されていた心血管前駆細胞群であるＰＤＧＦＲα陽性細胞やＣＤ１３陽性細胞よりも心筋細胞への分化が進行した細胞であることを示している。

[0080] さらに、分化誘導後９日目及び１５日目のＣＤ８２及びｃＴｎＴの発現に

ついても同様に、フローサイトメーターを用いて解析したところ、９日目のＣＤ８２陽性細胞ではｃＴｎＴの発現は検出されず（図５の左図参照）、また、１５日目のｃＴｎＴ陽性細胞ではＣＤ８２は検出されなかった（図５の右図参照）。

この結果は、ＣＤ８２は心筋細胞（ｃＴｎＴ陽性細胞）へ分化が完了すると発現しないことを示している。

[0081] ［結果４：インビトロでのＣＤ８２陽性細胞の心筋細胞へ分化能の評価］

上記結果２及び３より、ＣＤ８２陽性細胞は心筋特異的前駆細胞であることが示唆されたので、ＣＤ８２陽性細胞が心筋細胞へ特異的に分化するかどうかを解析した。上記［本件プロトコール］の項目に記載の方法にしたがってヒトｉＰＳ細胞から心筋細胞への分化誘導を行い、分化誘導後５日目に、上記［セルソーティング及びフローサイトメトリー解析］の項目に記載の方法にしたがってＣＤ８２陽性ＣＤ１３陽性細胞及びＣＤ８２陰性ＣＤ１３陽性細胞をそれぞれ純化し、上記［インビトロでの心筋細胞への分化能の評価法］の項目に記載の方法にしたがって心筋細胞（ｃＴｎＴ陽性細胞）の割合を解析した（図６参照）。

[0082] その結果、ＣＤ８２陰性ＣＤ１３陽性細胞の血清存在下におけるｃＴｎＴ陽性細胞への分化効率は、２６．４％であったのに対して、ＣＤ８２陽性ＣＤ１３陽性細胞のｃＴｎＴ陽性細胞への分化効率は、８２．８％と３．１倍も高いことが明らかとなった（図６参照）。この結果により、ＣＤ８２陽性細胞は、心筋細胞（ｃＴｎＴ陽性細胞）へ特異的に分化誘導する心筋前駆細胞、すなわち心筋特異的前駆細胞であることがインビトロでの実験により示された。

[0083] ［結果５：インビボでのＣＤ８２陽性細胞の心筋細胞へ分化能の評価］

上記結果４により、ＣＤ８２陽性細胞は、心筋細胞へ特異的に分化誘導する心筋前駆細胞であることがインビトロでの実験により示されたので、インビボでも同様に心筋細胞へ特異的に分化誘導するかどうかを検討した。上記［インビボでの心筋細胞への分化能の評価法１］の項目に記載の方法にした

がってＣＤ８２陽性細胞をマウスの腎被膜下に移植したところ、移植したＣＤ８２陽性細胞に由来するＨＮＡ陽性細胞のうち、ほぼすべての細胞（９５％以上）がｃＴｎＴ陽性細胞（心筋細胞）であることが明らかとなった（図７参照）。他方、ＣＤ１３陽性細胞やＰＤＧＦＲα陽性細胞をマウスの腎被膜下に移植した場合、腎被膜下での生着は認められなかった。

さらに、上記［インビボでの心筋細胞への分化能の評価法２］の項目に記載の方法にしたがってＣＤ８２陽性細胞（ＣＤ８２陽性ＣＤ１３陽性ＰＤＧＦＲα陽性細胞）を、心筋梗塞モデルラットの心臓に移植したところ、移植したＣＤ８２陽性細胞に由来するＨｏｅｃｈｓｔ３３２５８陽性細胞のうち、ほぼすべての細胞（９５％以上）がｃＴｎＴ陽性細胞（心筋細胞）であることが明らかとなった（図８参照）。

これらの結果は、上記インビトロの結果を支持するとともに、ＣＤ８２陽性細胞は、これまで報告のあるＣＤ１３陽性細胞やＰＤＧＦＲα陽性細胞等の心血管前駆細胞群よりも、心臓へ効果的に生着でき、かつ心臓において特異的に心筋細胞へ分化できる心筋前駆細胞であることを示している。

[0084] ［結果６：ＣＤ８２陽性細胞の凍結保存の評価］

上記結果５により、心筋細胞へ特異的に分化誘導する心筋前駆細胞を治療に用いるにあたり、ＣＤ８２陽性細胞を凍結保存可能かどうかについて検討した。上記［凍結保存したＣＤ８２陽性細胞の心筋細胞への分化能の評価法］の項目に記載の方法にしたがって、凍結保存したＣＤ８２陽性細胞の心筋細胞への分化能の評価を行ったところ、ｃＴｎＴ陽性細胞（心筋細胞）の割合は９４．４％と高いことが明らかとなった（図９参照）。この結果は、ＣＤ８２陽性細胞は、凍結・融解処理を行った後でも心筋細胞への高い分化能を有することを示しており、凍結保存が可能であることを示している。

[0085] ［結果７：細胞表面マーカーの発現解析］

上記［本件プロトコール］の項目に記載の方法にしたがってヒトｉＰＳ細胞から心筋細胞への分化誘導を行い、分化誘導後４日目及び６．５日目に、上記［セルソーティング及びフローサイトメトリー解析］の項目に記載の方

法にしたがって、細胞を培養皿から剥離し、human PDGFRα-PE（PRa292、R&D Systems社製）を用いて３０分間、４℃条件下で反応させた。その後、細胞表面マーカーの発現を網羅的に解析するために、抗体ライブラリー（BD Lyoplate Screening Panels、BD biosciences社製）を用いて３０分間、４℃条件下で反応させた。検出される細胞表面マーカーの発現は、フローサイトメーター（BD LSRFortessa セルアナライザー［BD biosciences社製］）を用いて解析した。

[0086] その結果、分化誘導後６．５日目のＰＤＧＦＲα陽性細胞において、２２種類の細胞表面マーカー（ＣＤ１０５、ＣＤ１２１ａ、ＣＤ１８、ＣＤ１２０ａ、ＣＤ４５、ＣＤ１４、ＣＤ３１、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ３８、ＣＤ１２１ｂ、ＣＤ１２２、ＣＤ１２４、ＣＤ１２６、ＣＤ１２７、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１０４、ＣＤ６２ｅ、ＣＤ６２ｌ、ＣＤ６２ｐ、ＣＤ１２０ｂ、ＣＤ３４、及びＣＤ４）は陰性であることが明らかとなった（図１０～１２参照）。この結果と、分化誘導後６日目のＰＤＧＦＲα陽性細胞の約５０％はＣＤ８２陽性細胞であること示す図３の結果とを総合すると、ＣＤ８２陽性細胞における上記２２種類の細胞表面マーカーは陰性であることを示している。

[0087] さらに、上記［本件プロトコール］の項目に記載の方法にしたがってヒトｉＰＳ細胞から心筋細胞への分化誘導を行い、分化誘導後６日目に、上記［セルソーティング及びフローサイトメトリー解析］の項目に記載の方法にしたがって、細胞を培養皿から剥離し、human CD82-PE（ASL-24、Biolegend社製）又はhuman CD82-APC（ASL-24、Biolegend社製）を用いて３０分間、４℃条件下で反応させた。その後、２６種類の細胞表面マーカー（ＣＤ７、ＣＤ３７、ＣＤ４３、ＣＤ４９ａ、ＣＤ１８、ＣＤ１０５、ＣＤ１４４、ＳＴＲＯ－１、ＣＤ１７７、ＣＤ７３、ＣＤ４４、ＣＤ１１７［c-kit］、ＣＤ１６３、ＣＤ３１、ＣＤ１０６、ＲＯＲ２、ＣＤ１３７Ｌ、ＣＤ１４０ｂ［ＰＤＧＦＲｂ］、ＣＤ１６６［ＡＬＣＡＭ］、ＣＤ１８０、ＣＤ２５２［ＯＸ４０Ｌ］、ＣＤ３４４［Frizzled4］、ＣＤ３０４［Neurophilin-1］、ＣＤ１１８［ＬＩＦ－Ｒ］、ＣＤ９９Ｒ、及びＣＤ９０）に対する抗体（表２参照

）を用いて３０分間、４℃条件下で反応させた。検出される細胞表面マーカーの発現は、フローサイトメーター（ＦＡＣＳ（FACS Aria II [BD biosciences社製]））を用いて解析した。

[0088]

[表2]

細胞表面マーカー	抗体
ＣＤ７	抗体：CD7-FITC（CD7-6B7、Biolgend 社製）
ＣＤ３７	抗体：CD37-FITC（M-B371、Biolegend 社製）
ＣＤ４３	抗体：CD43-FITC（1G10、Biolegend 社製）
ＣＤ４９ａ	抗体：CD49a-FITC（TS2/7、Biolegend 社製）
ＣＤ１８	抗体：CD18-FITC（TS1/18、Biolegend 社製）
ＣＤ１０５	抗体：CD105-FITC（43A3、Biolegend 社製）
ＣＤ１４４	抗体：CD144-PE（55-7H1、BD Parmingen 社製）
ＳＴＲＯ－１	抗体：STRO-1-FITC（STRO-1、Biolegend 社製）
ＣＤ１７７	抗体：CD177-FITC（MEM-166、Biolegend 社製）
ＣＤ７３	抗体：CD73-FITC（AD2、Biolegend 社製）
ＣＤ４４	抗体：CD44-FITC（BJ18、Biolegend 社製）
ＣＤ１１７	抗体：CD117-PE（47233、R and D System 社製）
ＣＤ１６３	抗体：CD163-PE（GH1/61、BD Bioscience 社製）
ＣＤ３１	抗体：CD31-APC（WM-59、eBioscience 社製）
ＣＤ１０６	抗体：CD106-APC（STA、Biolegend 社製）
ＲＯＲ２	抗体：ROR2-APC（231509、R and D System 社製）
ＣＤ１３７Ｌ	抗体：CD137-PE（TKS-1、Biolegend 社製）
ＣＤ１４０ｂ	抗体：CD140-PE（28D4、BD Parmingen 社製）
ＣＤ１６６	抗体：CD166-PE（3A6、Biolegend 社製）
ＣＤ１８０	抗体：CD180-PE（MHR73-11、Biolegend 社製）
ＣＤ２５２	抗体：CD252-PE（11C3.1、Biolegend 社製）
ＣＤ３４４	抗体：CD344-PE（CH3A4A7、Biolegend 社製）
ＣＤ３０４	抗体：CD304-PE（446921、R and D System 社製）
ＣＤ１１８	抗体：CD118-PE（32953、R and D System 社製）
ＣＤ９９Ｒ	抗体：CD99R-PE（MEM-1310、abcam 社製）
ＣＤ９０	抗体：CD90-APC（5E10、Biolegend 社製）

[0089] その結果、ＣＤ８２陽性細胞における、１５種類の細胞表面マーカー（Ｃ

Ｄ７、ＣＤ３７、ＣＤ４３、ＣＤ４９ａ、ＣＤ１８、ＣＤ１０５、ＣＤ１４４、ＳＴＲＯ－１、ＣＤ１７７、ＣＤ７３、ＣＤ４４、ＣＤ１１７、ＣＤ１６３、ＣＤ３１、及びＣＤ１０６）は陰性であり（図１３参照）、１１種類の細胞表面マーカー（ＲＯＲ２、ＣＤ１３７Ｌ、ＣＤ１４０ｂ、ＣＤ１６６、ＣＤ１８０、ＣＤ２５２、ＣＤ３４４、ＣＤ３０４、ＣＤ１１８、ＣＤ９９Ｒ、及びＣＤ９０）は陽性であることが示された（図１４参照）。

産業上の利用可能性

[0090] 本発明によると、心筋特異的分化能を有し、且つ、高い自己増殖能と高い心筋への生着効率を有する心筋前駆細胞を調製できるため、心疾患の治療、特に低侵襲の心疾患治療に資するものである。

請求の範囲

[請求項1] 以下の［細胞表面マーカーＡ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性である、心筋前駆細胞として使用するためのＣＤ８２陽性細胞。

［細胞表面マーカーＡ群］

ＣＤ７３、ＣＤ４４、ＣＤ１０５、ＣＤ１２１ａ、ＣＤ１８、ＣＤ１２０ａ

[請求項2] 単離された請求項１記載のＣＤ８２陽性細胞。

[請求項3] 以下の［細胞表面マーカーＢ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性、及び／又は、以下の［細胞表面マーカーＣ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陽性である、請求項１又は２記載のＣＤ８２陽性細胞。

［細胞表面マーカーＢ群］

ＣＤ７、ＣＤ３７、ＣＤ４３、ＣＤ１４４、ＳＴＲＯ－１、ＣＤ１７７、ＣＤ１６３

［細胞表面マーカーＣ群］

ＣＤ１３７Ｌ、ＣＤ１４０ｂ、ＣＤ１８０、ＣＤ２５２、ＣＤ３４４、ＣＤ１１８、ＣＤ９９Ｒ

[請求項4] 以下の［細胞表面マーカーＤ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性、及び／又は、以下の［細胞表面マーカーＥ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陽性である、請求項１～３のいずれか記載のＣＤ８２陽性細胞。

［細胞表面マーカーＤ群］

ＣＤ４９ａ、ＣＤ１１７、ＣＤ３１、ＣＤ１０６、ＣＤ４５、ＣＤ１４、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ３８、ＣＤ１２１ｂ、ＣＤ１２２、ＣＤ１２４、ＣＤ１２６、ＣＤ１２７、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１０４、ＣＤ６２ｅ、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ６２ｐ、ＣＤ１２０ｂ、ＣＤ３４、ＣＤ４

［細胞表面マーカーＥ群］

ＣＤ１６６、ＣＤ３０４、ＣＤ９０

[請求項5] 以下の［細胞表面マーカーＦ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陽性である、請求項１～４のいずれか記載のＣＤ８２陽性細胞。

［細胞表面マーカーＦ群］

ＲＯＲ２、ＣＤ１３、ＰＤＧＦＲα、ＫＤＲ

[請求項6] 凍結保存された請求項１～５のいずれか記載のＣＤ８２陽性細胞。

[請求項7] 請求項１～６のいずれか記載のＣＤ８２陽性細胞を含む心疾患治療剤。

[請求項8] 以下の工程（ａ）～（ｃ）を備えたＣＤ８２陽性細胞の調製方法。

（ａ）幹細胞を取得する工程；

（ｂ）幹細胞に対して心血管系細胞への分化誘導処理を行う工程；

（ｃ）工程（ｂ）で分化誘導処理した幹細胞の中から、以下の［細胞表面マーカーＡ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性であるＣＤ８２陽性細胞を分離する工程；

［細胞表面マーカーＡ群］

ＣＤ７３、ＣＤ４４、ＣＤ１０５、ＣＤ１２１ａ、ＣＤ１８、ＣＤ１２０ａ

[請求項9] 幹細胞がヒト多能性幹細胞である請求項８記載の調製方法。

[請求項10] ヒト多能性幹細胞がヒト誘導多能性幹細胞である請求項９記載の調製方法。

[請求項11] 心血管系細胞への分化誘導処理が心筋前駆細胞への分化誘導処理である請求項８～１０のいずれか記載の調製方法。

[請求項12] ＣＤ８２陽性細胞が、以下の［細胞表面マーカーＢ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性、及び／又は、以下の［細胞表面マーカーＣ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陽性である、請求項８～１１のいずれか記載の調製方法。

［細胞表面マーカーＢ群］

ＣＤ７、ＣＤ３７、ＣＤ４３、ＣＤ１４４、ＳＴＲＯ－１、ＣＤ１７７、ＣＤ１６３

［細胞表面マーカーＣ群］

ＣＤ１３７Ｌ、ＣＤ１４０ｂ、ＣＤ１８０、ＣＤ２５２、ＣＤ３４４、ＣＤ１１８、ＣＤ９９Ｒ

［請求項13］ ＣＤ８２陽性細胞が、以下の［細胞表面マーカーＤ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陰性、及び／又は、以下の［細胞表面マーカーＥ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陽性である、請求項８～１２のいずれか記載の調製方法。

［細胞表面マーカーＤ群］

ＣＤ４９ａ、ＣＤ１１７、ＣＤ３１、ＣＤ１０６、ＣＤ４５、ＣＤ１４、ＨＬＡ－ＤＲ、ＣＤ３８、ＣＤ１２１ｂ、ＣＤ１２２、ＣＤ１２４、ＣＤ１２６、ＣＤ１２７、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１０４、ＣＤ６２ｅ、ＣＤ６２Ｌ、ＣＤ６２ｐ、ＣＤ１２０ｂ、ＣＤ３４、ＣＤ４

［細胞表面マーカーＥ群］

ＣＤ１６６、ＣＤ３０４、ＣＤ９０

［請求項14］ ＣＤ８２陽性細胞が、以下の［細胞表面マーカーＦ群］から選択される少なくとも１つの細胞表面マーカーが陽性である、請求項８～１３のいずれか記載の調製方法。

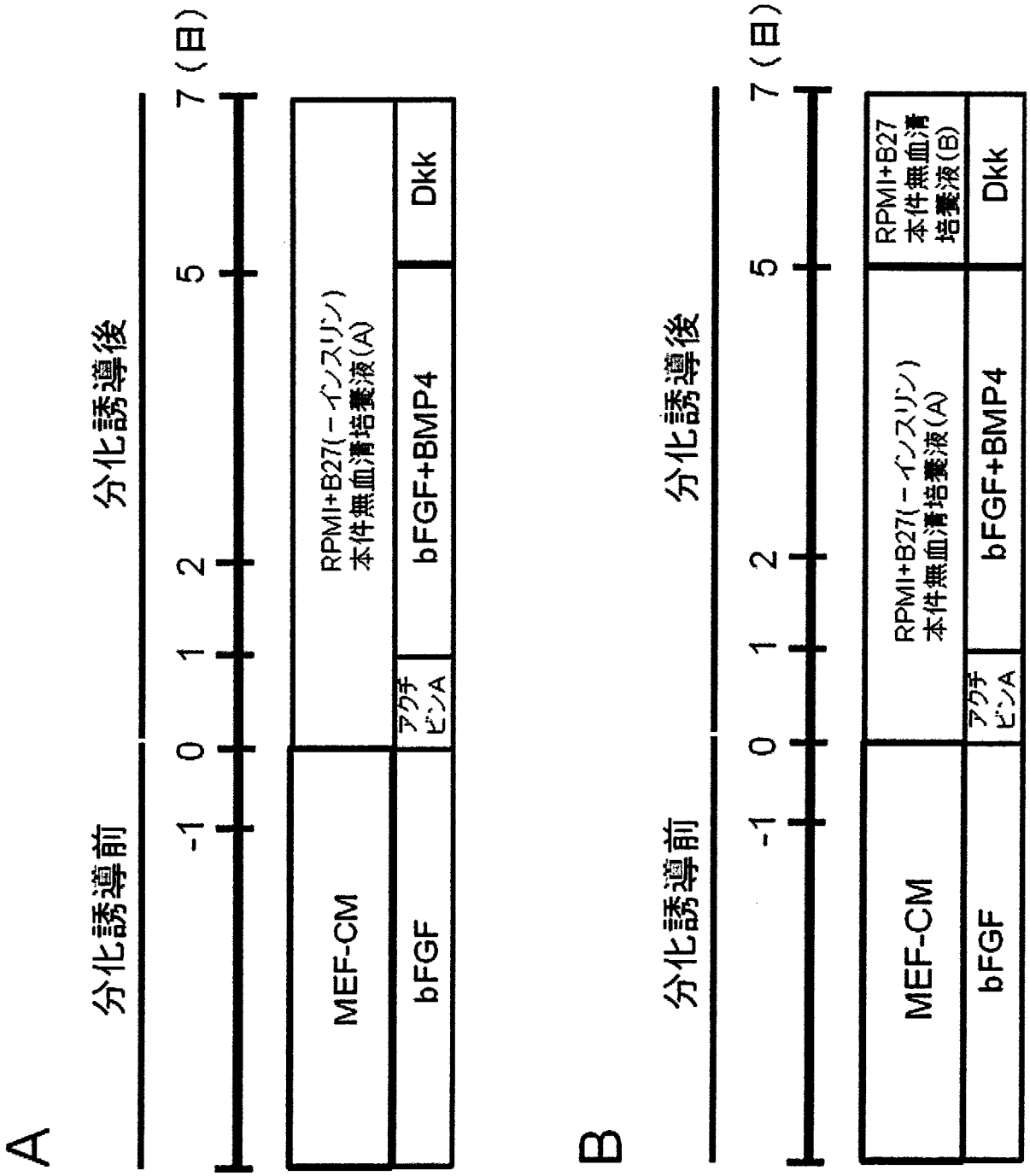
［細胞表面マーカーＦ群］

ＲＯＲ２、ＣＤ１３、ＰＤＧＦＲα、ＫＤＲ

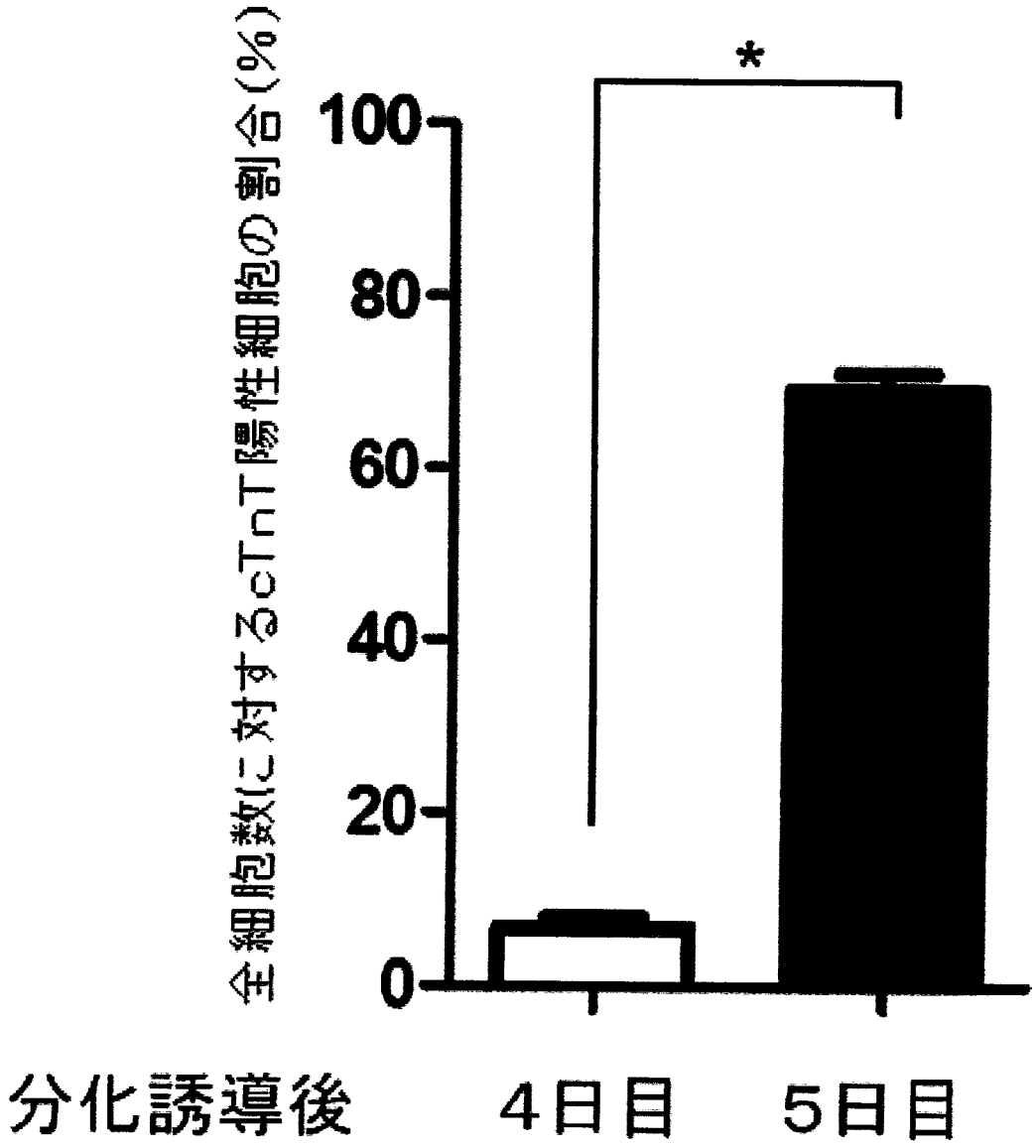
［請求項15］ 工程（ｃ）において、工程（ｂ）で分化誘導処理後４～８日目にＣＤ８２陽性細胞を分離する請求項８～１４のいずれか記載の調製方法。

［請求項16］ 請求項８～１５のいずれか記載の調製方法により得られた、心筋前駆細胞として使用するためのＣＤ８２陽性細胞。

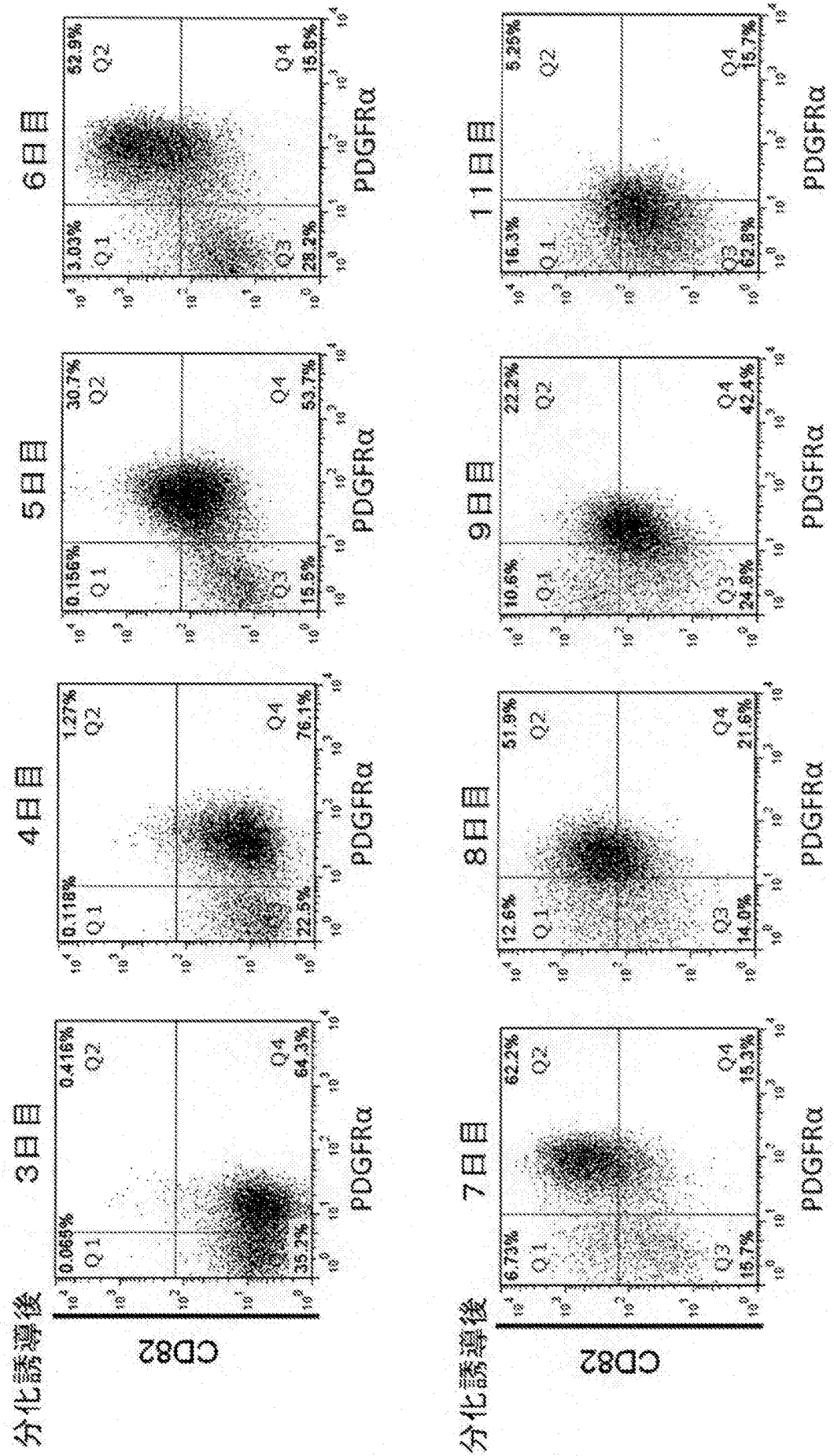
[図1]


A
分化誘導前
分化誘導後
-1
0
1
2
5
7（日）
MEF-CM
bFGF
アクチビンA
RPMI+B27(－インスリン)
本件無血清培養液(A)
bFGF+BMP4
Dkk
B
分化誘導前
分化誘導後
-1
0
1
2
5
7（日）
MEF-CM
bFGF
アクチビンA
RPMI+B27(－インスリン)
本件無血清培養液(A)
bFGF+BMP4
RPMI+B27
本件無血清
培養液(B)
Dkk

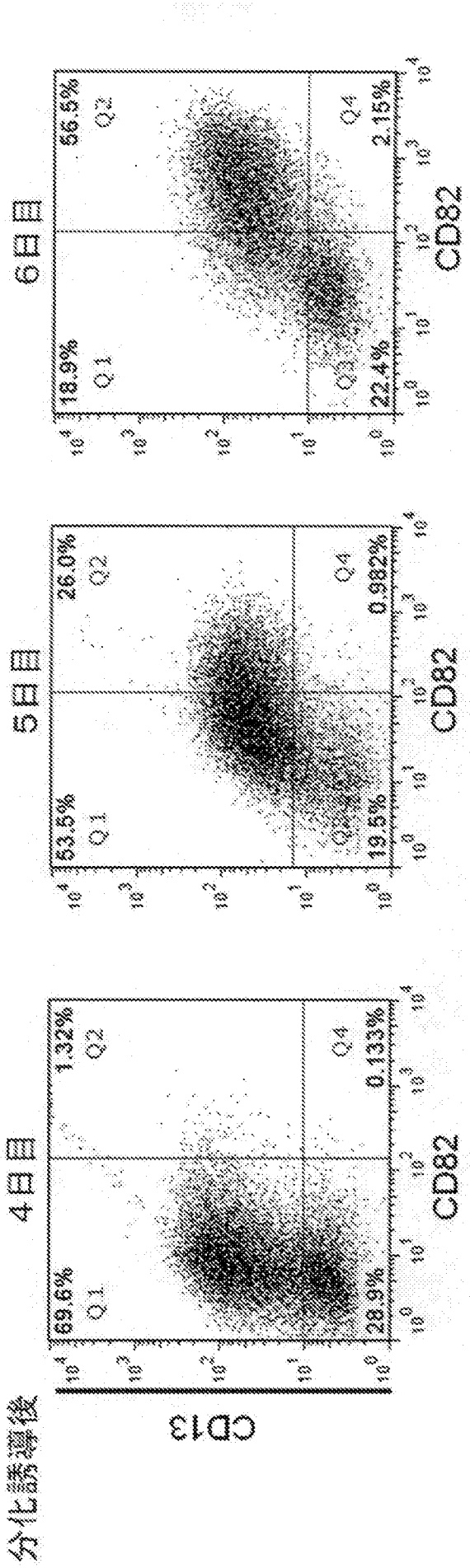
[図2]



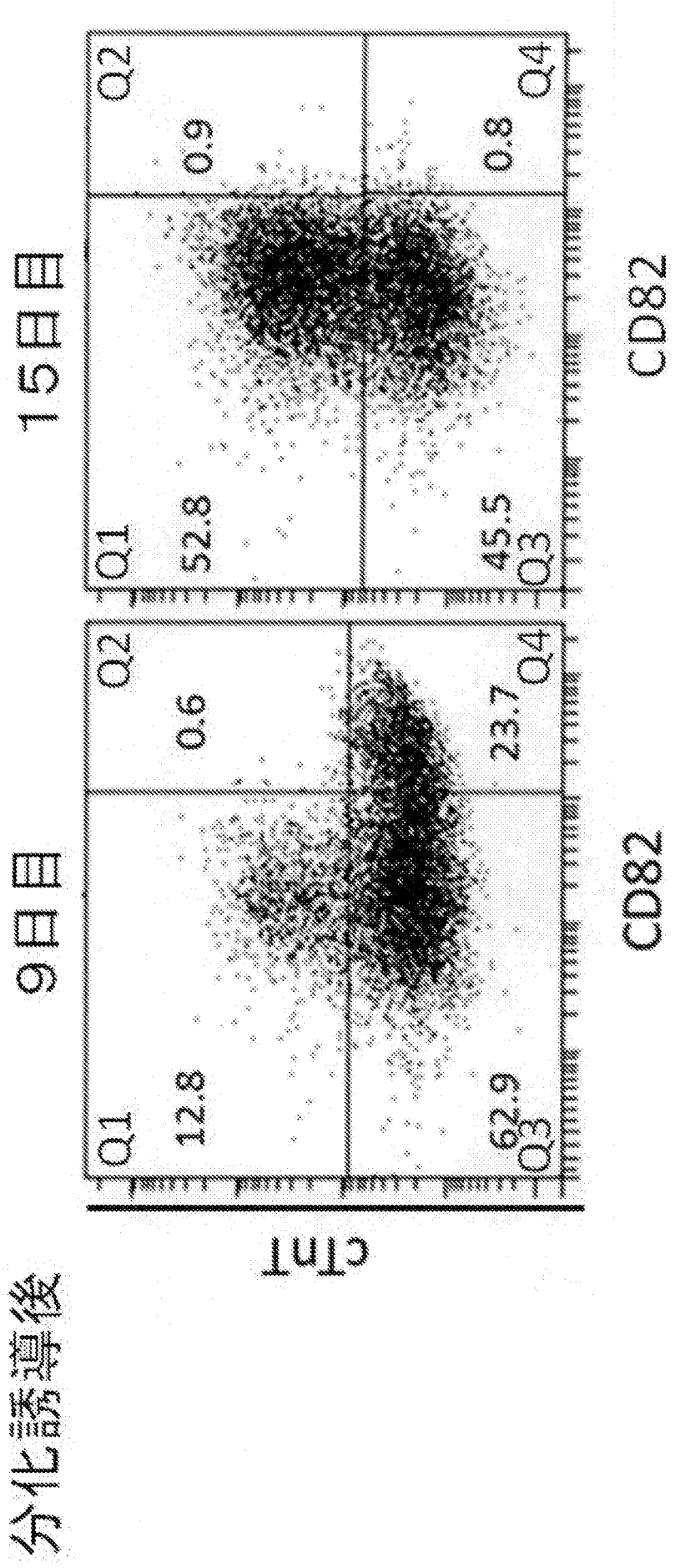
[図3]


分化誘導後
3日目
4日目
5日目
6日目
7日目
8日目
9日目
11日目
CD82
PDGFRα
Q1
Q2
Q3
Q4
0.065%
0.416%
35.2%
64.3%
0.118%
1.27%
22.5%
76.1%
0.156%
30.7%
15.5%
53.7%
3.03%
52.9%
28.2%
15.8%
6.73%
62.2%
15.7%
15.3%
12.6%
51.9%
14.0%
21.6%
10.6%
22.2%
24.8%
42.4%
16.3%
5.25%
62.8%
15.7%

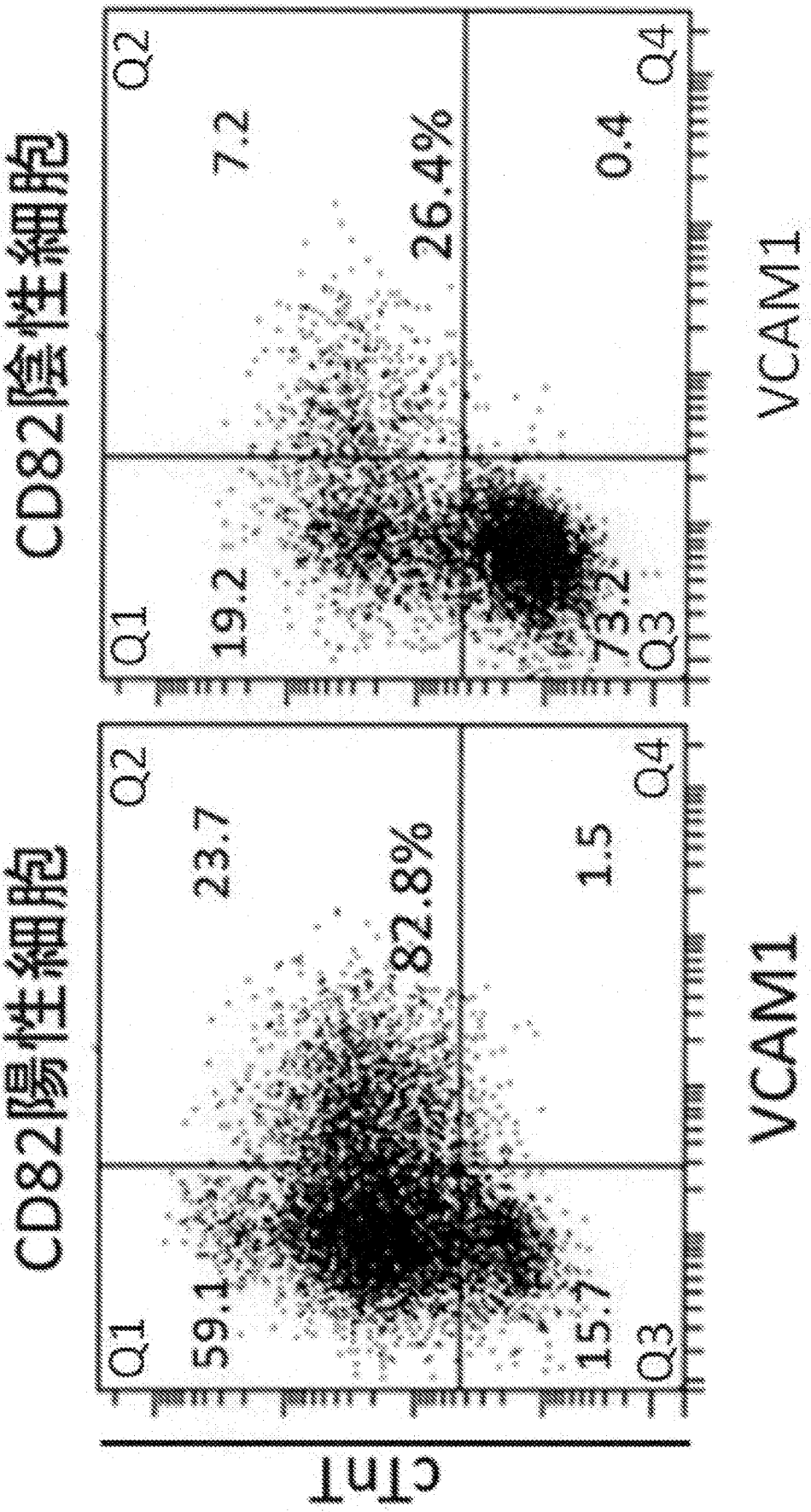
[図4]


分化誘導後
4日目
5日目
6日目
CD13
CD82
69.6%
Q1
1.32%
Q2
28.9%
Q3
0.133%
Q4
53.5%
Q1
26.0%
Q2
19.5%
Q3
0.982%
Q4
18.9%
Q1
56.5%
Q2
22.4%
Q3
2.15%
Q4

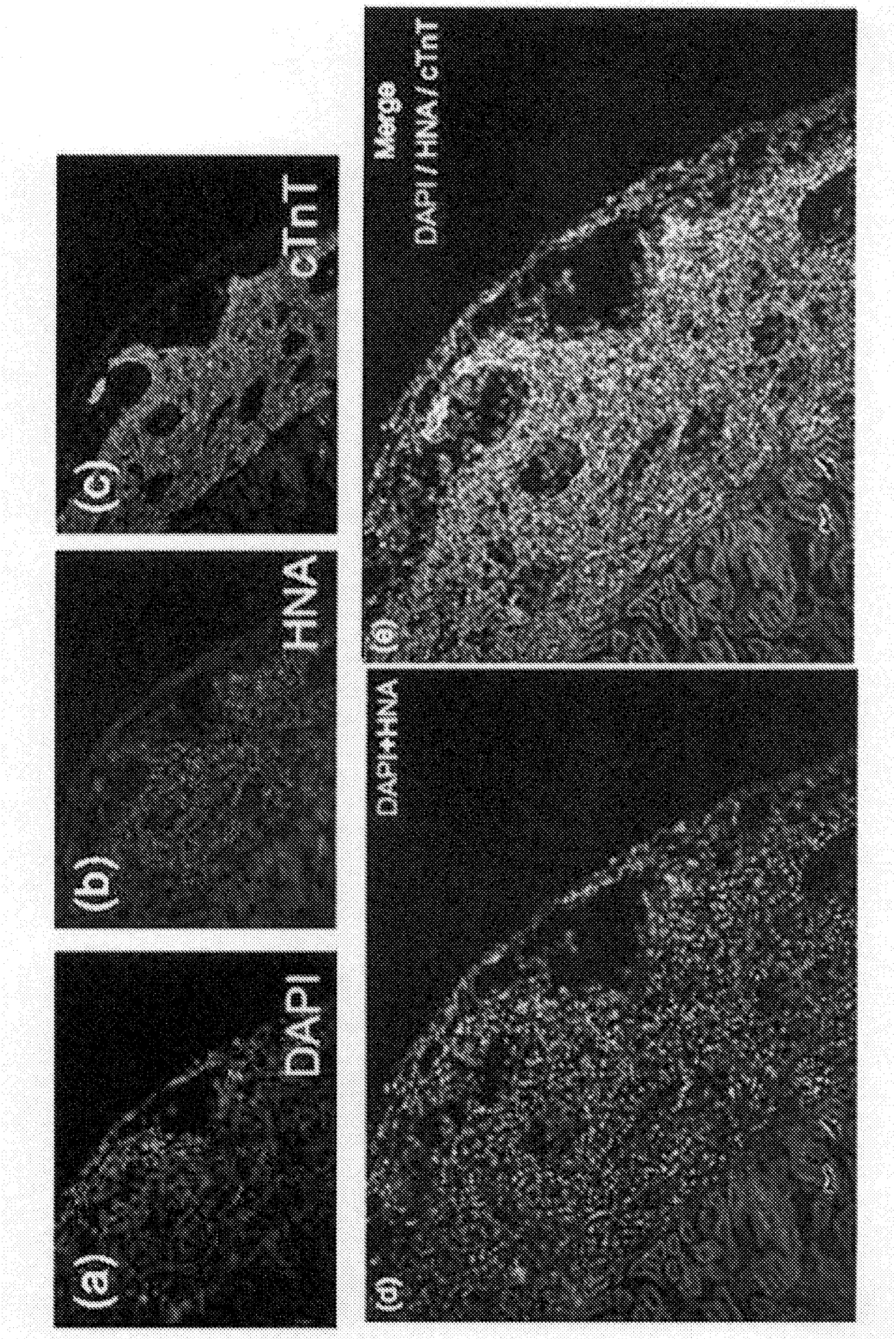
[図5]


分化誘導後
9日目
15日目
ctnT
CD82
CD82
Q1
Q2
Q3
Q4
12.8
0.6
62.9
23.7
52.8
0.9
45.5
0.8

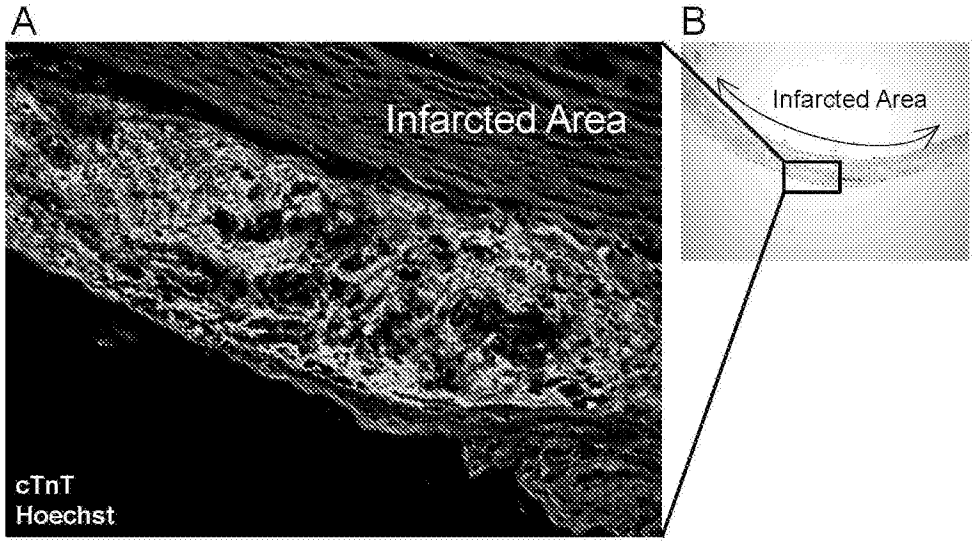
[図6]


CD82陽性細胞
CD82陰性細胞
Q1
Q2
Q3
Q4
59.1
23.7
82.8%
1.5
15.7
19.2
7.2
26.4%
0.4
73.2
cTnT
VCAM1
VCAM1

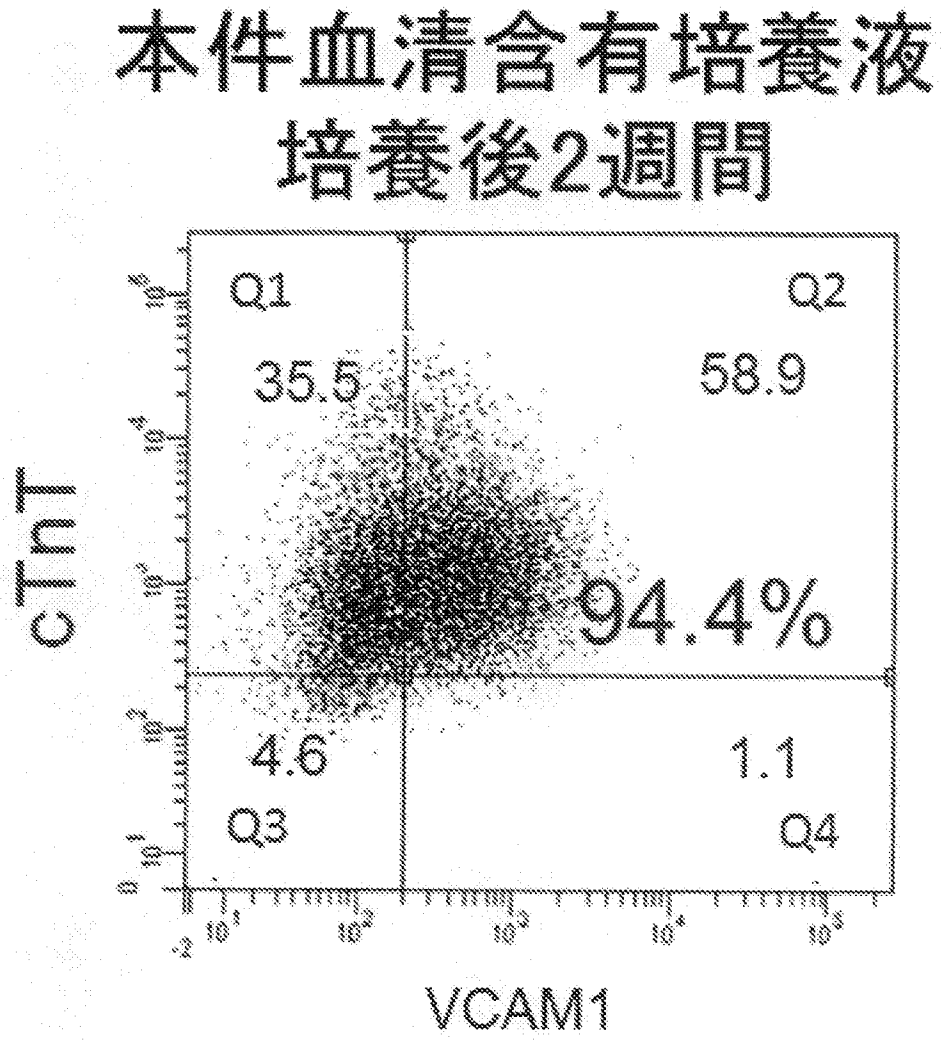
[図7]



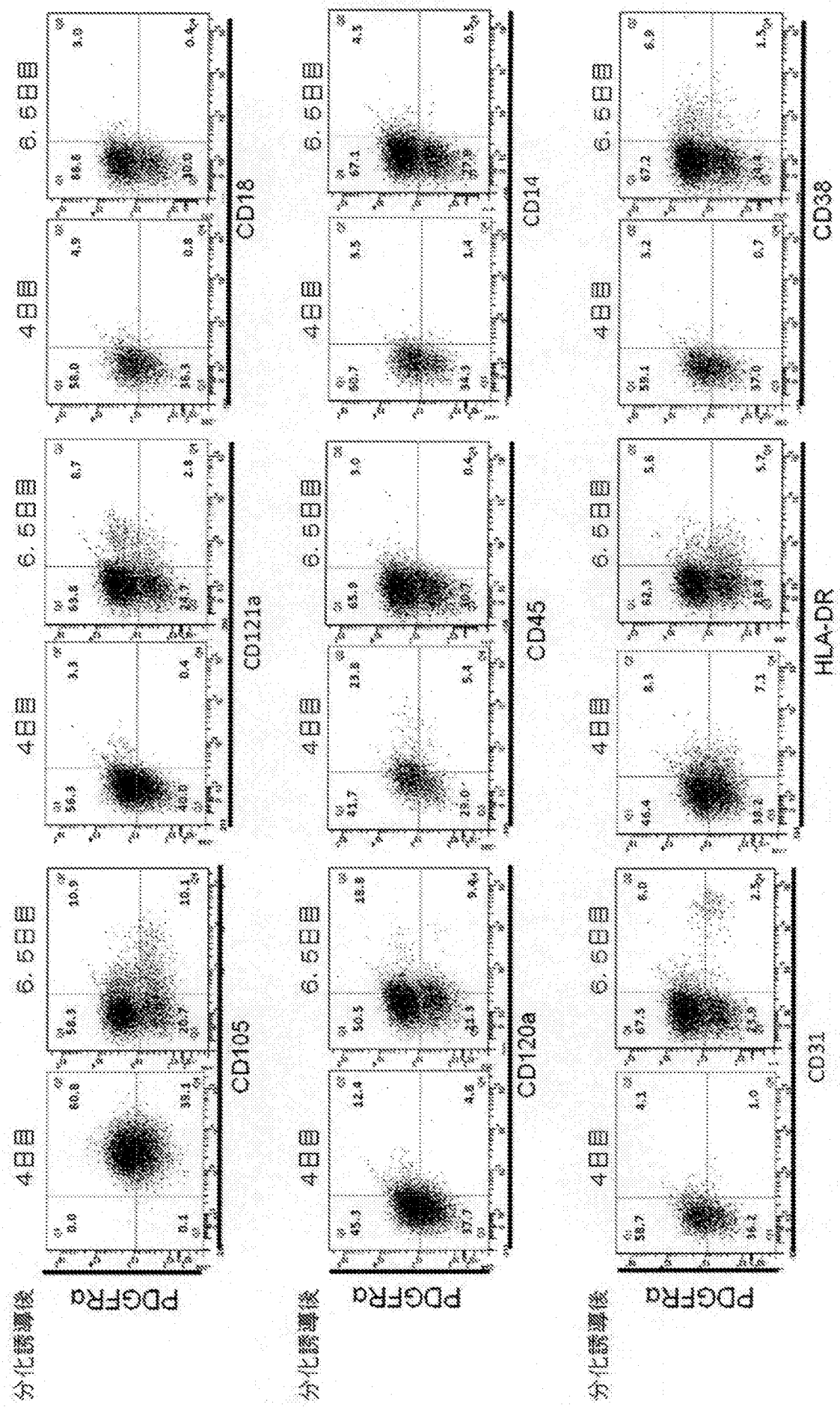
[図8]


A
B
Infarcted Area
Infarcted Area
cTnT
Hoechst

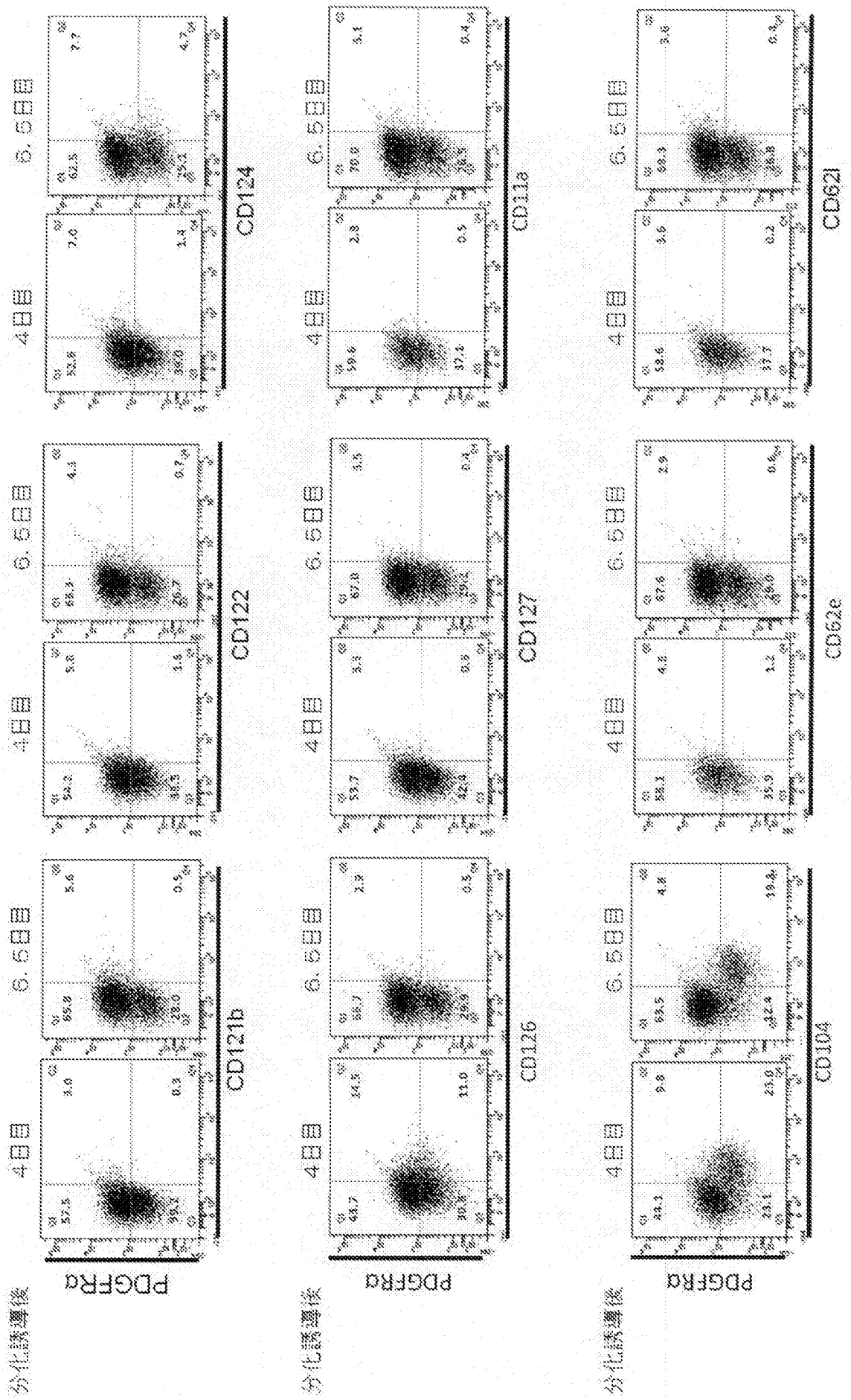
[図9]


本件血清含有培養液
培養後2週間
Q1
Q2
35.5
58.9
94.4%
4.6
1.1
Q3
Q4
cTnT
VCAM1

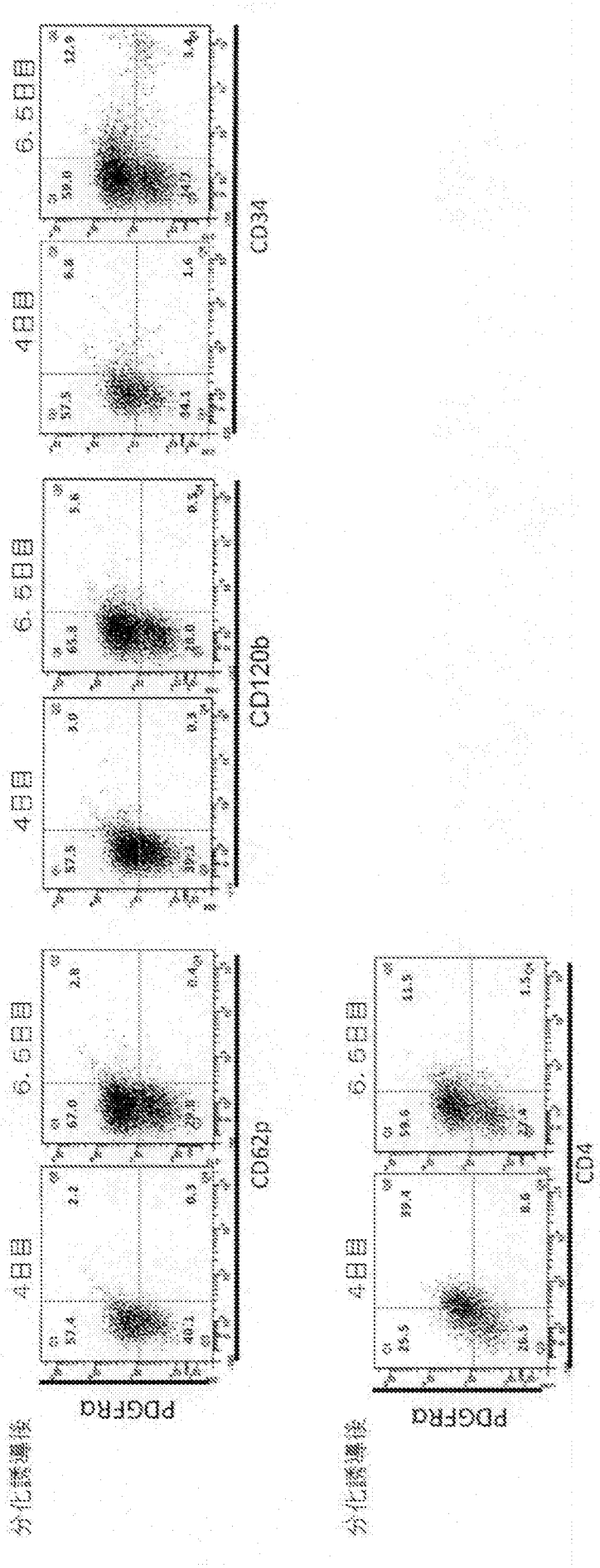
[図10]


分化誘導後
PDGFRα
CD105
CD121a
CD18
CD120a
CD45
CD14
CD31
HLA-DR
CD38

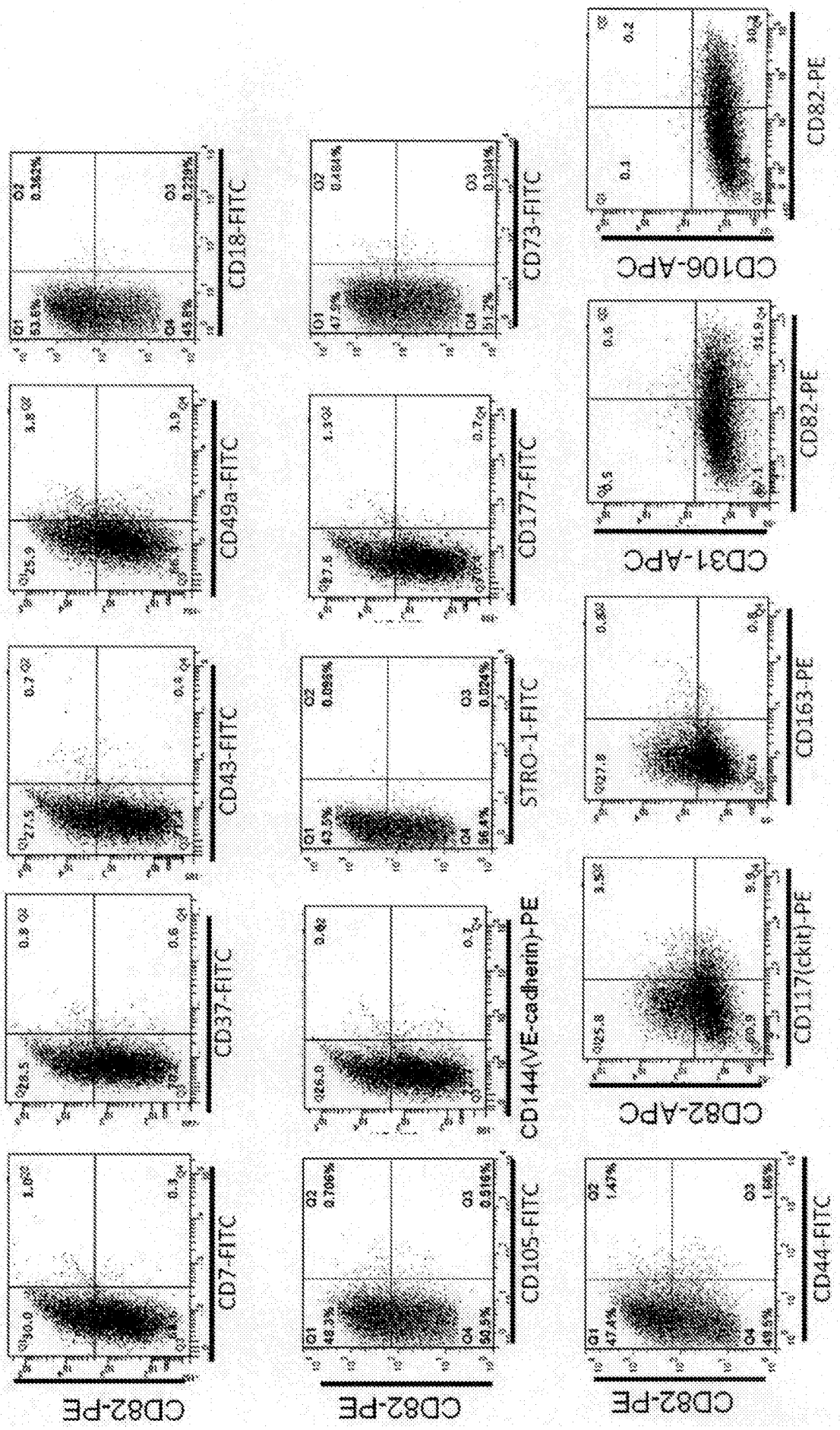
[図11]


分化誘導後
PDGFRα
4日目
6.5日目
CD121b
CD122
CD124
CD126
CD127
CD11a
CD104
CD62e
CD62l

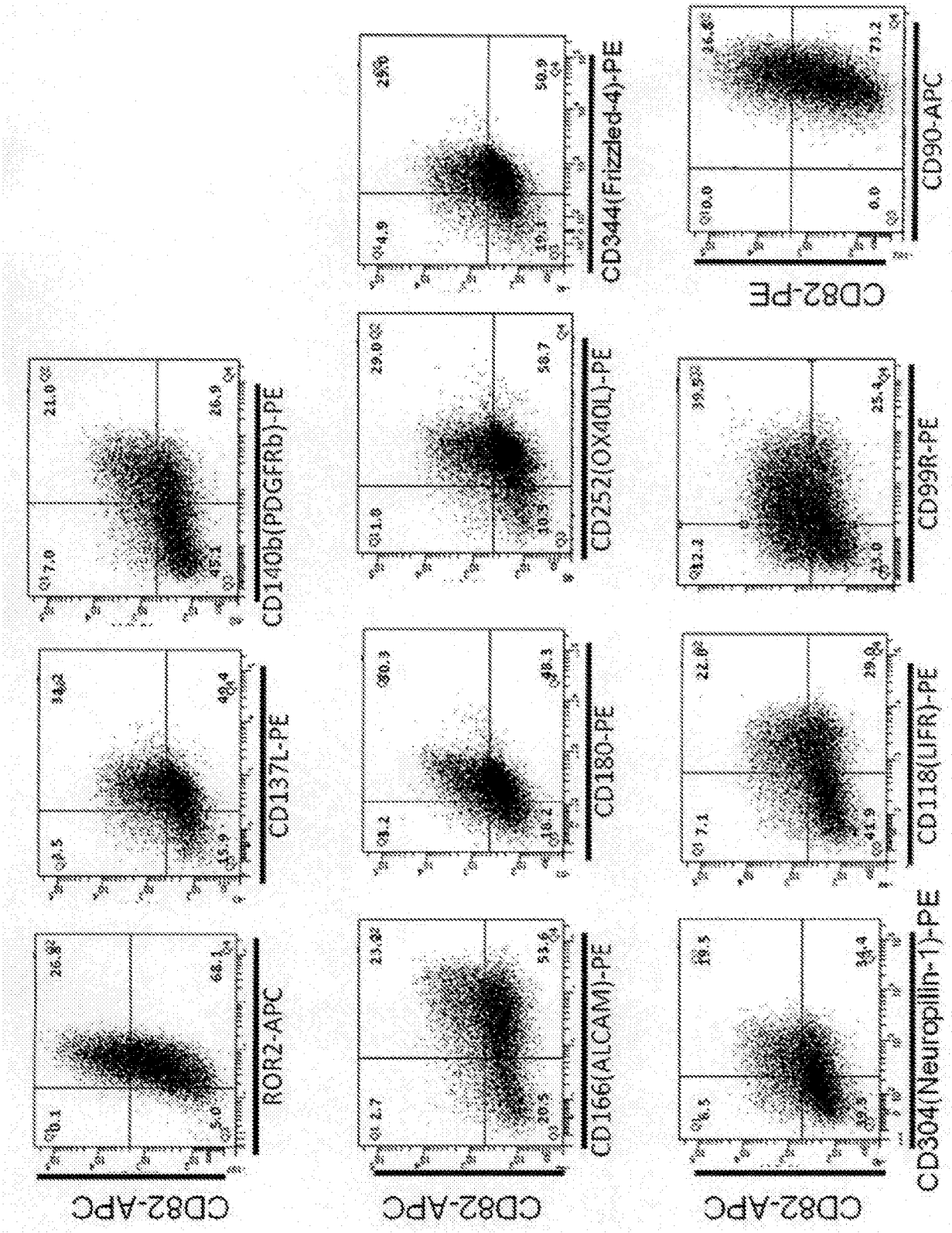
[図12]



[図13]


CD82-PE
CD7-FITC
CD82-PE
CD37-FITC
CD82-PE
CD43-FITC
CD82-PE
CD49a-FITC
CD82-PE
CD18-FITC
CD82-PE
CD105-FITC
CD82-PE
CD144(VE-cadherin)-PE
CD82-PE
STRO-1-FITC
CD82-PE
CD177-FITC
CD82-PE
CD73-FITC
CD82-APC
CD44-FITC
CD82-APC
CD117(ckit)-PE
CD82-APC
CD163-PE
CD31-APC
CD82-PE
CD106-APC
CD82-PE

[図14]


CD82-APC
ROR2-APC
CD137L-PE
CD140b(PDGFRb)-PE
CD82-APC
CD166(ALCAM)-PE
CD180-PE
CD252(OX40L)-PE
CD344(Frizzled-4)-PE
CD82-APC
CD304(Neuropilin-1)-PE
CD118(LIFR)-PE
CD99R-PE
CD82-PE
CD90-APC

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/002107

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/10(2006.01)i, *A61K35/12*(2015.01)i, *A61P9/00*(2006.01)i

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)
C12N5/10, A61K35/12, A61P9/00

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 1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	BARTOSH TJ. et al., Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties, Proc Natl Acad Sci USA, 2010.08.03, Vol.107 No.31, Page.13724-13729	1-2,4,6-7/3, 5,8-16
Y/A	JP 2009-254271 A (Asahi Kasei Corp.), 05 November 2009 (05.11.2009), entire text (Family: none)	1-2,4,6-7/3, 5,8-16
Y/A	WO 2005/063967 A1 (Kanazawa University Technology Licensing Organization Ltd.), 14 July 2005 (14.07.2005), entire text & JP 4336821 B & US 2007/0212676 A1 & EP 1712616 A1	1-2,4,6-7/3, 5,8-16

☒ 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	Date of mailing of the international search report
25 June 2015 (25.06.15)	07 July 2015 (07.07.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3,Kasumigaseki,Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915,Japan	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2015/002107

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	UOSAKI H, et al., Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression., PLoS One., 2011, 6(8), e23657.	1-16
A	WO 2013/137491 A1 (Kyoto University), 19 September 2013 (19.09.2013), entire text & EP 2826855 A	1-16
A	Masafumi TAKEDA et al., "iPS Saibo Yurai Shinkin Tokuiteki Zenku Saibogun no Tansaku", Regenerative Medicine, 27 January 2014 (27.01.2014), vol.13, special extra issue, page 314	1-16
T	Masafumi TAKEDA et al., "iPS Saibo Yurai Shinki Shinkin Tokuiteki Zenku Saibo Hyomen Marker no Dotei", Regenerative Medicine, 01 February 2015 (01.02.2015), vol.14, special extra issue, page 205	1-16

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１５／００２１０７

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/10(2006.01)i, A61K35/12(2015.01)i, A61P9/00(2006.01)i

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.　C12N5/10, A61K35/12, A61P9/00

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

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１５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), WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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
Y/A	BARTOSH TJ. et al., Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties, Proc Natl Acad Sci USA, 2010.08.03, Vol.107 No.31, Page.13724-13729	1-2,4,6-7/3,5,8-16
Y/A	JP 2009-254271 A (旭化成株式会社) 2009.11.05, 全文 (ファミリーなし)	1-2,4,6-7/3,5,8-16

☑　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	国際調査報告の発送日
２５．０６．２０１５	０７．０７．２０１５

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）　４Ｂ　３０３８
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	WO 2005/063967 A1 (有限会社金沢大学ティ・エル・オー) 2005.07.14, 全文 & JP 4336821 B & US 2007/0212676 A1 & EP 1712616 A1	1-2,4,6-7/3,5,8-16
A	UOSAKI H, et al., Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression., PLoS One., 2011, 6(8), e23657.	1-16
A	WO 2013/137491 A1 (国立大学法人京都大学) 2013.09.19, 全文 & EP 2826855 A	1-16
A	武田匡史 他, iPS 細胞由来心筋特異的前駆細胞群の探索, 再生医療, 2014.01.27, Vol.13 増刊号, Page.314	1-16
T	武田匡史 他, iPS 細胞由来新規心筋特異的前駆細胞表面マーカーの同定, 再生医療, 2015.02.01, Vol.14 増刊号, Page.205	1-16