

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-527872

(P2015-527872A)

(43) 公表日 平成27年9月24日 (2015.9.24)

(51) Int.Cl.		F I				テーマコード (参考)
C 1 2 N	5/071	(2010.01)	C 1 2 N	5/00	2 0 2 A	4 B 0 2 4
C 1 2 Q	1/02	(2006.01)	C 1 2 Q	1/02		4 B 0 6 3
C 1 2 N	15/09	(2006.01)	C 1 2 N	15/00	A	4 B 0 6 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2015-503601 (P2015-503601)	(71) 出願人	504132272
(86) (22) 出願日	平成25年7月16日 (2013.7.16)		国立大学法人京都大学
(85) 翻訳文提出日	平成27年3月11日 (2015.3.11)		京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1
(86) 国際出願番号	PCT/JP2013/069721	(74) 代理人	100100549
(87) 国際公開番号	W02014/014119		弁理士 川口 嘉之
(87) 国際公開日	平成26年1月23日 (2014.1.23)	(74) 代理人	100126505
(31) 優先権主張番号	61/672, 637		弁理士 佐貫 伸一
(32) 優先日	平成24年7月17日 (2012.7.17)	(74) 代理人	100131392
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 丹羽 武司
		(72) 発明者	山中 伸弥
			日本国京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内
		(72) 発明者	吉田 善紀
			日本国京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内

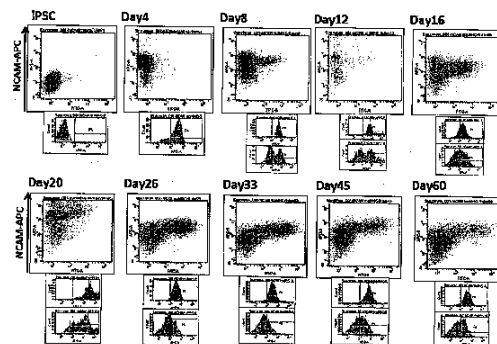
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規心筋細胞マーカー

(57) 【要約】

本発明は、心筋細胞を含有する細胞集団よりNCAM1、SSEA3、SSEA4またはCD340が陽性であることを指標として心筋細胞を抽出または検出する工程を含む、心筋細胞の製造方法または検出方法を提供する。

Fig. 2



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

- a) 心筋細胞を含む細胞集団を提供する工程、および
b) NCAM1、SSEA3、SSEA4およびCD340からなる群から選択される少なくとも一つが陽性であることを指標として心筋細胞を含有する細胞集団から心筋細胞を抽出する工程を含む、心筋細胞の製造方法。

【請求項 2】

前記心筋細胞がヒト心筋細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記心筋細胞を含有する細胞集団が、多能性幹細胞から分化誘導された細胞集団または摘出組織細胞からなる細胞集団である、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 4】

前記多能性幹細胞が、ES細胞またはiPS細胞である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記心筋細胞への分化誘導が、胚様体を形成する工程を含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記心筋細胞への分化誘導が、サイトカインを含有する培地で胚様体を培養する工程を含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 7】

前記サイトカインが、activin A、BMP4、b-FGF、およびVEGFからなる群から選択される少なくとも一つのサイトカインである、請求項 6 に記載の方法。 20

【請求項 8】

前記培地が、さらにWnt阻害剤を含有する、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記Wnt阻害剤がDKK-1である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

NCAM1、SSEA3、SSEA4およびCD340からなる群から選択される少なくとも一つが陽性であることを指標として心筋細胞を含有する細胞集団から心筋細胞を抽出する工程を含む、心筋細胞の検出方法。

【請求項 11】

前記心筋細胞がヒト心筋細胞である、請求項 10 に記載の方法。 30

【請求項 12】

前記心筋細胞を含有する細胞集団が、多能性幹細胞から分化誘導された細胞集団または摘出組織細胞からなる細胞集団である、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 13】

前記多能性幹細胞が、ES細胞またはiPS細胞である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

NCAM1、SSEA3、SSEA4およびCD340からなる群から選択される少なくとも一つを検出する試薬を含む、心筋細胞抽出用または検出用キット。

【請求項 15】

前記心筋細胞がヒト心筋細胞である、請求項 14 に記載のキット。 40

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、心筋細胞を含有する細胞集団より心筋細胞を抽出または検出するための新規心筋細胞マーカーに関する。

【背景技術】**【0002】**

心筋細胞は出生と同時にその分裂能を喪失し、再生が困難であることから、心筋梗塞、心筋炎または老化等を原因とする傷害心組織に対して、胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能 50

性幹細胞（iPS細胞）など多能性を有する細胞（特許文献1）を分化誘導して得られる心筋細胞を移植する補充療法が注目されている。これら多能性幹細胞からの心筋細胞への分化誘導法は多数報告されているが（特許文献2および3、非特許文献1）、移植用細胞として用いるためにはソーティング等により心筋細胞の純度を高める必要がある。現在、心筋細胞に対する表面マーカーとして、CD166(ALCM)（非特許文献2）やN-cadherin（特許文献4または非特許文献3）やVCAM1（特許文献5）などが報告されているが、心筋細胞の純度を高めるためにはさらに多くのマーカーが必要であると考えられる。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

10

【特許文献1】国際公開第2007/069666号

【特許文献2】国際公開第2007/002136号

【特許文献3】国際公開第2009/118928号

【特許文献4】特開2010-158206号公報

【特許文献5】PCT/JP2012/059617号

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Yan P, et al, Biochem Biophys Res Commun. 379:115-20 (2009)

【非特許文献2】Rust W, et al, Regen Med. 4, 225-37 (2009)

【非特許文献3】Honda M, et al, Biochem Biophys Res Commun. 29, 351, 877-82 (2006)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、心筋細胞を含有する細胞集団から当該心筋細胞を抽出することである。したがって、本発明の課題は、心筋細胞に特異的なマーカーを提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明者らは、上記の課題を解決すべく、NCAM1、SSEA3、SSEA4およびCD340に着目し、これらのうちの少なくとも一つが陽性であることを指標として、多能性幹細胞より分化誘導した心筋細胞を含む細胞集団から、高率で心筋細胞が得られることを見出した。

【0007】

当該知見に基づき、本発明者らは、NCAM1、SSEA3、SSEA4およびCD340からなる群から選択される少なくとも一つが陽性であることを指標として用いることで心筋細胞を単離精製することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0008】

本発明の一態様は、

a) 心筋細胞を含む細胞集団を提供する工程

b) NCAM1、SSEA3、SSEA4およびCD340からなる群から選択される少なくとも一つが陽性であることを指標として心筋細胞を含有する細胞集団から心筋細胞を抽出する工程を含む、心筋細胞の製造方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記心筋細胞がヒト心筋細胞である、上記に記載の方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記心筋細胞を含有する細胞集団が、多能性幹細胞から分化誘導された細胞集団または摘出組織細胞からなる細胞集団である、上記に記載の方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記多能性幹細胞が、ES細胞またはiPS細胞である、上記に記載の方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記心筋細胞への分化誘導が、胚様体を形成する工程を含む、上記に記載の方法を提供することである。

50

本発明の他の態様は、前記心筋細胞への分化誘導が、サイトカインを含有する培地で胚様体を培養する工程を含む、上記に記載の方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記サイトカインが、activin A、BMP4、b-FGF、およびVEGFからなる群から選択される少なくとも一つのサイトカインである、上記に記載の方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記培地がさらにWnt阻害剤を含む、上記に記載の方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記Wnt阻害剤がDKK-1である、上記に記載の方法を提供することである。

本発明の他の態様は、NCAM1、SSEA3、SSEA4およびCD340からなる群から選択される少なくとも一つが陽性であることを指標として心筋細胞を含有する細胞集団から心筋細胞を抽出する工程を含む、心筋細胞の検出方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記心筋細胞がヒト心筋細胞である、上記に記載の方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記心筋細胞を含有する細胞集団が、多能性幹細胞から分化誘導された細胞集団または摘出組織細胞からなる細胞集団である、上記に記載の方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記多能性幹細胞が、ES細胞またはiPS細胞である、上記に記載の方法を提供することである。

本発明の他の態様は、NCAM1、SSEA3、SSEA4およびCD340からなる群から選択される少なくとも一つを検出する試薬を含む、心筋細胞抽出キットを提供することである。

本発明の他の態様は、前記心筋細胞がヒト心筋細胞である、上記に記載のキットを提供することである。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】多能性細胞から心筋細胞を分化誘導するプロトコールを示す。

【図2】201B7-M6GIP4株の分化誘導開始から0日目、4日目、8日目、12日目、16日目、20日目、26日目、33日目、45日目および60日目におけるフローサイトメトリの結果を示す。図中、縦軸はNCAM1の強度、横軸はEGFPの強度を示す。

【図3】606A1株の分化誘導開始から30日目におけるフローサイトメトリの結果を示す。左図では、横軸にNCAM1の強度、右図では、横軸にTroponin Tの強度を示す。

【図4】201B7-M6GIP4株の分化誘導開始から0日目、4日目、8日目、12日目、16日目、20日目、26日目、33日目、45日目および60日目におけるフローサイトメトリの結果を示す。図中、縦軸はSSEA3の強度、横軸はEGFPの強度を示す。

【図5】201B7-M6GIP4株の分化誘導開始から0日目、4日目、8日目、12日目、16日目、20日目、26日目、33日目、45日目および60日目におけるフローサイトメトリの結果を示す。図中、縦軸はSSEA4の強度、横軸はEGFPの強度を示す。

【図6】201B7-M6GIP4株の分化誘導開始から0日目、4日目、8日目、12日目、16日目、20日目、26日目、33日目および45日目におけるフローサイトメトリの結果を示す。図中、縦軸はCD340の強度、横軸はEGFPの強度を示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本発明を以下に詳細に説明する。

【0011】

本発明は、下記のとおり、NCAM1、SSEA3、SSEA4およびCD340からなる群から選択される少なくとも一つが陽性であることを指標として心筋細胞を含有する細胞集団から心筋細胞を抽出する工程を含む、心筋細胞の製造方法、またはNCAM1、SSEA3、SSEA4およびCD340からなる群から選択される少なくとも一つが陽性であることを指標として心筋細胞を含有する細胞集団から心筋細胞を抽出する工程を含む、心筋細胞の検出方法に関する。

【0012】

心筋細胞を含有する細胞集団とは、心筋細胞を含有している細胞の集合体であれば、その由来は特に問わない。例えば、任意の方法で得られた末梢血、心臓、骨髓組織、脂肪組織、骨格筋組織、羊膜組織、胎盤組織、臍帯血などに含まれる細胞であってもよいし、また、多能性幹細胞から分化誘導された細胞であってもよい。

【0013】

心筋細胞の抽出とは、他の細胞種と比して心筋細胞の割合を多くすることを意味し、好ましくは、心筋細胞を50%、60%、70%、80%または90%以上含有するよう濃縮させることである。より好ましくは、100%心筋細胞からなる細胞集団を得ることである。

【0014】

NCAM1とは、neural cell adhesion molecule 1、CD56、NCAMまたはMSK39として知られる細胞接着に関連する遺伝子である。例えば、ヒトの場合、NCBI (National Center for Biotechnology Information) のアクセッション番号NM_000615、NM_001076682、NM_001242607またはNM_181351に記載された遺伝子または遺伝子によってコードされるタンパク質である。NCAM1には、選択的スプライシングによるアイソフォームも含まれる。

10

【0015】

SSEA3、SSEA4とは、GL-5およびGL-70と名付けられた、関連するスフィンゴ糖脂質上のエピトープであって、それぞれAnti-Stage-Specific Embryonic Antigen-3、Anti-Stage-Specific Embryonic Antigen-4として知られる。また、SSEA3、SSEA4は、MC631抗体とMC813-70抗体によってそれぞれ認識されることが知られている (Brimble SN et al., Stem Cells. 2007 Jan;25(1):54-62.)。SSEA3、SSEA4は、幹細胞の表面に特異的に発現することから、幹細胞マーカーとして一般に利用されている。

20

【0016】

CD340とは、v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (ERBB2)、HER-2/neuなどとして知られるEGF受容体ファミリーのメンバーである。例えば、ヒトの場合、NCBIのアクセッション番号NM_001005862またはNM_004448に記載された遺伝子または当該遺伝子によってコードされるタンパク質である。

【0017】

NCAM1、SSEA3、SSEA4および/またはCD340を指標として心筋細胞を含有する細胞集団から心筋細胞を抽出する場合、これらの遺伝子またはこれらの遺伝子によってコードされるタンパク質は、単独で、またはそれらを2つ以上任意に組み合わせて使用され得る。NCAM1、SSEA3、SSEA4およびCD340を組み合わせて使用する場合、好ましくは、単独で使用する場合と比較して心筋細胞の濃縮率は高められる。

30

【0018】

心筋細胞とは、自己拍動の特性を有する心筋の細胞を意味する。心筋細胞は、心筋マーカーである心筋トロポニン (cTnTまたはtroponin T type 2) 陽性および/または α MHC (α myosin heavy chain) 陽性であることによって特徴づけられる。

【0019】

< 多能性幹細胞 >

本発明で使用可能な多能性幹細胞は、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幹細胞である。多能性幹細胞の例としては、以下のものに限定されないが、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)、精子幹細胞 (「GS細胞」)、胚性生殖細胞 (「EG細胞」)、人工多能性幹 (iPS) 細胞などが含まれる。好ましい多能性幹細胞は、ES細胞、ntES細胞、およびiPS細胞である。

40

【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、桑実胚後の胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚由

50

来の幹細胞であり、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), *Nature* 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; J.A. Thomson and V.S. Marshall (1998), *Curr. Top. Dev. Biol.*, 38:133-165)。

【 0 0 2 2 】

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、内部細胞塊を線維芽細胞のフィーダー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(leukemia inhibitory factor (LIF))、および/または塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor (bFGF))などの物質を添加した培養液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US5,843,780B; Thomson JA, et al. (1995), *Proc Natl. Acad. Sci. U S A*. 92:7844-7848; Thomson JA, et al. (1998), *Science*. 282:1145-1147; 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; H. Kawasaki et al. (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:1580-1585; Klimanskaya I, et al. (2006), *Nature*. 444:481-485などに記載されている。

【 0 0 2 3 】

ES細胞作製のための培養液として、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を添加したDMEM/F-12培養液を使用し、37℃、2% CO₂/98% 空気の湿潤雰囲気下でヒトES細胞を維持することができる(O. Fumitaka et al. (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26:215-224)。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。

【 0 0 2 4 】

ES細胞の選択は、一般に、アルカリホスファターゼ、Oct-3/4、および/またはNanogなどの遺伝子マーカーの発現を指標にしてReal-Time PCR法で行うことができる。特に、ヒトES細胞の選択では、OCT-3/4、NANOG、および/またはECADなどの遺伝子マーカーの発現を指標とすることができる(E. Kroon et al. (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26:443-452)。

【 0 0 2 5 】

ヒトES細胞株は、例えばWA01(H1)およびWA09(H9)は、WiCell Reserch Instituteから、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。

【 0 0 2 6 】

(B) 精子幹細胞

精子幹細胞は、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などの性質をもつ(M. Kanatsu-Shinohara et al. (2003) *Biol. Reprod.*, 69:612-616; K. Shinohara et al. (2004), *Cell*, 119:1001-1012)。神経膠細胞系由来神経栄養因子(glia cell line-derived neurotrophic factor (GDNF))を含む培養液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、精子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))。

【 0 0 2 7 】

(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(stem cell factor)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)。

【 0 0 2 8 】

(D) 人工多能性幹細胞

人工多能性幹(iPS)細胞は、特定の初期化因子を、DNA又はタンパク質の形態で体細胞に導入す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; Nakagawa, M.ら, Nat. Biotechnol. 26:101-106 (2008); 国際公開WO 2007/069666)。初期化因子は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNA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、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNA、あるいは低分子化合物によって構成されてもよい。初期化因子に含まれる遺伝子として、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3等が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/007852、WO2009/032194、WO2009/058413、WO2009/057831、WO2009/075119、WO2009/079007、WO2009/091659、WO2009/101084、WO2009/101407、WO2009/102983、WO2009/114949、WO2009/117439、WO2009/126250、WO2009/126251、WO2009/126655、WO2009/157593、WO2010/009015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO 2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO 2010/111409、WO 2010/111422、WO2010/115050、WO2010/124290、WO2010/147395、WO2010/147612、Huangfu D, et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), Stem Cells. 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), Nat Biotechnol. 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), Cell Stem Cell, 3:475-479、Marson A, (2008), Cell Stem Cell, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), Nat Cell Biol. 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), Nat. Biotech., 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010), Nature. 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28:713-720に記載の組み合わせが例示される。

【 0 0 2 9 】

上記初期化因子には、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)阻害剤[例えば、バルプロ酸(VPA)、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、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]、MEK阻害剤(例えば、PD184352、PD98059、U0126、SL327およびPD0325901)、Glycogen synthase kinase-3阻害剤(例えば、BioおよびCHIR99021)、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤(例えば、5-azacytidine)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤(例えば、BIX-01294等の低分子阻害剤、Suv39hl、Suv39h2、SetDBIおよびG9aに対するsiRNAおよびshRNA等の核酸性発現阻害剤など)、L-channel calcium agonist(例えばBayk8644)、酪酸、TGFβ阻害剤またはALK5阻害剤(例えば、LY364947、SB431542、616453およびA-83-01)、p53阻害剤(例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA)、ARID3A阻害剤(例えば、ARID3Aに対するsiRNAおよびshRNA)、miR-291-3p、miR-294、miR-295およびmir-302などのmiRNA、Wnt Signaling(例えばsoluble Wnt3a)、神経ペプチドY、プロスタグランジン類(例えば、プロスタグランジンE2およびプロスタグランジンJ2)、hTERT、SV40LT、UTF1、IRX6、GLIS1、PITX2、DMRTBI等の樹立効率を高めることを目的として用いられる因子も含まれており、本明細書においては、これらの樹立効率の改善目的にて用いられた因子についても初期化因子と別段の区別をしないものとする。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 0 】

初期化因子は、タンパク質の形態の場合、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチド（例えば、HIV由来のTATまたはポリアルギニン）との融合、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。

【 0 0 3 1 】

一方、初期化因子がDNAの形態の場合、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リボソーム、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することができる。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（WO 2010/008054）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、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボソーム結合配列、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し、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、初期化因子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初期化因子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。

【 0 0 3 2 】

また、初期化因子がRNAの形態の場合、例えばリポフェクション、マイクロインジェクションなどの手法によって各初期化因子を体細胞内に導入しても良く、分解を抑制するため、5-メチルシチジンおよびpseudouridine（TriLink Biotechnologies）を取り込ませたRNAを用いても良い（Warren L, (2010) Cell Stem Cell. 7:618-630）。

【 0 0 3 3 】

iPS細胞誘導のための培養液としては、例えば、10～15%FBSを含有するDMEM、DMEM/F12およびDME培養液（これらの培養液にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、puromycin、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。）および市販の培養液[例えば、マウスES細胞培養用培養液（TX-WES培養液、トロンボX社）、霊長類ES細胞培養用培養液（霊長類ES/iPS細胞培養液、リプロセル社）、無血清培地（mTeSR、Stemcell Technology社）]などが含まれる。

【 0 0 3 4 】

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DMEM又はDMEM/F12培養液中で体細胞と初期化因子とを接触させ約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STO細胞、SNL細胞等）上にまきなおし、体細胞と初期化因子の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培養液で培養し、該接触から約30～約45日又はそれ以上ののちにiPS様コロニーを生じさせることができる。

【 0 0 3 5 】

あるいは、37℃、5% CO₂存在下にて、フィーダー細胞（たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等）上で10%FBS含有DMEM培養液（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、約25～約30日又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。望ましくは、フィーダー細胞の代わりに、初期化される体細胞そのものを用いる（Takahashi K, et al. (2009), PLoS One. 4:e8067またはWO2010/137746）、もしくは細胞外基質（例えば、Laminin-5（WO2009/123349）およびマトリゲル（BD社））を用いる方法が例示される。

【0036】

この他にも、血清を含有しない培地を用いて培養する方法も例示される (Sun N, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:15720-15725)。さらに、樹立効率を上げるため、低酸素条件 (0.1%以上、15%以下の酸素濃度) によりiPS細胞を樹立しても良い (Yoshida Y, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:237-241またはWO2010/013845)。

【0037】

上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培養液と培養液交換を行う。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。

【0038】

iPS細胞は、形成したコロニーの形状により選択することが可能である。一方、体細胞が初期化された場合に発現する遺伝子 (例えば、Oct3/4、Nanog) と連動して発現する薬剤耐性遺伝子をマーカー遺伝子として導入した場合は、対応する薬剤を含む培養液 (選択培養液) で培養を行うことにより樹立したiPS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、iPS細胞を選択することができる。

【0039】

本明細書中で使用する「体細胞」なる用語は、卵子、卵母細胞、ES細胞などの生殖系列細胞または分化全能性細胞を除くあらゆる動物細胞 (好ましくは、ヒトを含む哺乳動物細胞) をいう。体細胞には、非限定的に、胎児(仔)の体細胞、新生児(仔)の体細胞、及び成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含されるし、また、初代培養細胞、継代細胞、及び株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば (1) 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)、(2) 組織前駆細胞、(3) リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞 (皮膚細胞等)、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞 (膵外分泌細胞等)、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分化した細胞などが例示される。

【0040】

また、iPS細胞を移植用細胞の材料として用いる場合、拒絶反応が起こらないという観点から、移植先の個体のHLA遺伝子型が同一もしくは実質的に同一である体細胞を用いることが望ましい。ここで、「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であり、例えば、HLA-A、HLA-BおよびHLA-DRの3遺伝子座あるいはHLA-Cを加えた4遺伝子座が一致するHLA型を有する体細胞である。

【0041】

(E) 核移植により得られたクローン胚由来のES細胞

ntES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。ntES細胞の作製のためには、核移植技術 (J.B. Cibelli et al. (1998), Nature 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初期化することができる。

【0042】

< 多能性幹細胞から心筋細胞を製造する方法 >

多能性幹細胞から心筋細胞への分化誘導方法は特に限定されないが、例えば、以下の方法を用いることができる。

【0043】

多能性幹細胞を任意の方法で分離し、浮遊培養またはコーティング処理された培養皿を用いて接着培養を行ってもよい。ここで、分離の方法としては、力学的、EDTA溶液（例えば、0.5mM EDTA溶液またはVersene（Invitrogen社）が挙げられる）、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液（例えば、Accutase(TM)およびAccumax(TM)が挙げられる）またはコラゲナーゼ活性のみを有する分離液を用いても良い。ここで、浮遊培養においては、培養皿の表面が、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理）されていないもの、もしくは、人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸（poly-HEMA）によるコーティング処理）したものを使用できる。接着培養においては、例えば、マトリゲル（BD）、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、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせを用いてコーティング処理された培養皿を使用できる。

10

【0044】

ここで、浮遊培養および接着培養を組み合わせを行っても良い。本発明の態様において、組み合わせた場合、浮遊培養後、そのまま接着培養を行っても良く、もしくは浮遊培養により作製された中胚葉系の細胞を選択した後、接着培養を行っても良い。ここで、中胚葉とは、発生過程で体腔およびそれを裏打ちする中皮、筋肉、骨格、皮膚真皮、結合組織、心臓・血管（血管内皮も含む）、血液（血液細胞も含む）、リンパ管や脾臓、腎臓および尿管、性腺（精巣、子宮、性腺上皮）をつくる能力を有した細胞から構成される胚葉を包含する。例えば、T、KDR、FOXF1、FLK1およびBMP4と言ったマーカーの発現により示される。好ましくは、KDRまたはFLK1を発現する細胞である。

20

【0045】

接着培養はフィーダー細胞と共培養を行っても良い。ここで、共培養に用いられるフィーダー細胞は、OP9細胞(Nishikawa, S.I. et al, Development 125, 1747-1757 (1998))またはEND-2細胞(Mummary C, et al, Circulation. 107:2733-40 (2003))が例示されるが、移植用細胞の材料として用いる場合、他種の細胞の混入を防ぐ観点から、共培養を行わないことが望まれる。

【0046】

また、他の態様として、任意の方法で分離された多能性幹細胞から胚様体（EB）を形成した後、任意の培地中コーティング処理された培養皿で接着培養する。また他の態様として、任意の方法で分離された多能性幹細胞から胚様体（EB）を形成し、次に任意の培地中コーティング処理された培養皿で接着培養した後、再びEBを形成する。これらの方法によって心筋細胞を誘導することができる。EBの形成は、通常、浮遊培養により行われるがこれに限定されない。

30

【0047】

本工程における培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えばIMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、αMEM培地、Doulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地などが包含される。好ましくは、StemPro34培地である。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清でもよい。必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement(KSR)(ES細胞培養時のFBSの血清代替物)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロール、ITS-サプリメントなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、B27-サプリメント、N2-サプリメント、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax (Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、サイトカイン、Wnt阻害剤、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有しうる。サイトカインとして、activinA、BMP4、b-FGF、VEGFが例示される。Wnt阻害剤の例としては、DKK1(NCBI Accession No. NM_012242(ヒト))、スクレロスチン (Sclerostin: NCBI Accession No. NM_02

40

50

5237(ヒト))、IWR-1(メルクミリボア)、IWP-2(シグマアルドリッチ)、IWP-3(シグマアルドリッチ)、IWP-4(シグマアルドリッチ)、PNU-74654(シグマアルドリッチ)、XAV939(シグマアルドリッチ)、およびそれらの誘導体が包含される。

【0048】

上記の物質を培地に添加する場合、培養時期ごとに加える薬剤を変えてもよい。また、上記の物質の濃度は、適用される細胞の種類に応じて任意に設定することが可能である。

【0049】

培養温度は、以下に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは約2~5%である。培養時間は、心筋トロポニンおよび/またはαMHCが発現するために必要な日数であり、例えば8日以上である。

10

【0050】

心筋細胞への分化誘導工程は、低酸素条件下で行われてもよい。低酸素条件下における酸素濃度は、例えば、1~10%であり、好ましくは、5%であるが、これらに限定されない。低酸素条件の期間は、心筋細胞への分化誘導を達成し得る限り特に限定されるものではないが、例えば、1~20日間であり、好ましくは、12日間である。

【0051】

たとえば、多能性幹細胞から心筋細胞を製造する方法として、低酸素条件にて、BMP4およびROCK阻害薬を添加したStemPro34中で24時間培養してEBを形成し、次に、activin A、BMP4およびbFGFを添加した培地で3日間、続いてVEGFおよびDKK-1を添加した培地で4日間培養、さらにVEGFおよびb-FGFを添加した培地で数日間培養する条件が例示される。最後の培養工程は、心筋細胞マーカーによる細胞評価を行うために任意の期間行うことが可能である。

20

【0052】

このように製造された心筋細胞は、単一の種類の細胞集団であってもよいし、他の種類の細胞が含有された細胞集団であってもよい。

【0053】

<心筋細胞の抽出または検出方法>

心筋細胞を含有する細胞集団より心筋細胞の抽出または検出のために、NCAM1、SSEA3、SSEA4またはCD340に特異的親和性を有する試薬であれば何でもよく、抗体、アプタマー、ペプチドまたはそのような蛋白質を特異的に認識する化合物などを用いることができ、好ましくは、抗体もしくはその断片である。

30

【0054】

抗体はポリクローナルまたはモノクローナル抗体であってよい。これらの抗体は、当業者に周知の技術を用いて作成することが可能である(Current protocols in Molecular Biology edit.Ausubel et al.(1987) Publish.John Wiley and Sons.Section 11.12-11.13)。具体的には、本発明の抗体がポリクローナル抗体の場合には、常法に従って大腸菌等で発現し精製したNCAM1、SSEA3、SSEA4またはCD340がコードするタンパク質、あるいはそれら蛋白質の部分アミノ酸配列を有するオリゴペプチドを合成して、家兎等の非ヒト動物に免疫し、該免疫動物の血清から常法に従って当該抗体を得ることが可能である。一方、モノクローナル抗体の場合には、上述の免疫された非ヒト動物から得られた脾臓細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマ細胞の中から得ることができる(Current protocols in Molecular Biology edit.Ausubel et al.(1987) Publish.John Wiley and Sons.Section 11.4-11.11)。抗体の断片としては、抗体の一部(たとえばFab断片)または合成抗体断片(たとえば、一本鎖Fv断片「ScFv」)が例示される。FabおよびF(ab)₂断片などの抗体の断片もまた、遺伝子工学的に周知の方法によって作製することができる。

40

【0055】

親和性を有する試薬が結合した細胞を区別、分離するため、当該試薬は、たとえば、蛍光標識、放射性標識、化学発光標識、酵素、ビオチンまたはストレプトアビジン等の検出

50

可能な物質、またはプロテインA、プロテインG、ビーズまたは磁気ビーズ等の細胞の単離抽出を可能とさせる物質と、結合または接合されていてもよい。

【0056】

当該親和性を有する試薬は、間接的に標識してもよい。当該標識は、当業者に公知の様々な方法を使用して行い得るが、例えば、NCAM1、SSEA3、SSEA4またはCD340に対する抗体に特異的に結合する予め標識された抗体（二次抗体）を用いる方法が挙げられる。

【0057】

心筋細胞を検出する方法には、たとえば、フローサイトメーター、または心筋細胞を単離精製した後、別途細胞を検出する方法（例えば、プロテインチップ）を用いることが含まれる。

10

【0058】

心筋細胞を抽出する方法には、当該親和性を有する試薬へ親和大きな粒子を接合させ沈降させる方法、磁気ビーズを用いて磁性により細胞を選別する方法（例えば、MACS）、蛍光標識を用いてセルソーターを用いる方法、または抗体等が固定化された担体（例えば、細胞濃縮カラム）を用いる方法等が例示される。

【0059】

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

【実施例】

【0060】

20

実施例 1

多能性幹細胞株の作製

心筋細胞特異的にEGFPを発現する201B7-M6GIP4株および606A1株を、下記の通り作製した。201B7-M6GIP4株および606A1株は、従来の方法で培養した(Takahashi K, et al. Cell . 131: 861-72, 2007およびNakagawa M, et al. Nat Biotechnol. 26: 101-6, 2008)。

【0061】

(1) 201B7-M6GIP4株

ヒト線維芽細胞にレトロウイルスでOCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYCを遺伝子導入し、マイトマイシン処理したSNLフィーダー細胞上で培養することによりiPS細胞を樹立した(201B7株)。この201B7株にヒトMYH6遺伝子のプロモーター領域とEGFP遺伝子の配列を遺伝子導入した細胞株を作製した(201B7-M6GIP4株)。この201B7-M6GIP4株は分化誘導により心筋細胞特異的にGFP発現が認められることが確認されている。

30

【0062】

(2) 606A1株

ヒト臍帯血細胞に対してOCT3/4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC, p53 shRNAiを発現させるエピソーマルベクターセット(pCXLE-hOct3/4-shp53-F, pCXLE-hSK, pCXLE-hUL)を電気穿孔法で遺伝子導入し、マイトマイシン処理したマウス胎仔線維芽細胞フィーダー上で培養することにより、iPS細胞株(606A1株)を作製した。

【0063】

上記(1)、(2)の細胞を6cmディッシュ上で80-90%コンフルエントになるまで培養した。当該培養細胞からフィーダー細胞を除去した後の細胞を、Trypsin/EDTAを用いてマトリゲルコートしたディッシュ上に播種し、さらに3-4日培養して、Collagenase BおよびTrypsin/EDTA液の添加により剥離させた。

40

【0064】

実施例 2

心筋細胞誘導法

ヒトiPS細胞を1ウェルあたり $1.5-2.0 \times 10^6$ の濃度でディッシュへ播種し、低酸素条件(5%)にて、10ng/ml BMP4および $10 \mu\text{M}$ ROCK阻害薬を添加したStemPro34培地中で24時間培養して、EBを形成させた。翌日、6ng/ml activin A(R & D Systems)、10ng/ml BMP4(R & D Systems)および5ng/ml bFGF(R & D Systems)を添加した培地へ交換し3日間

50

培養した。次いで、10ng/ml VEGF (R & D Systems) および150ng/ml DKK-1 (R & D Systems) を添加した培地へ交換し4日間培養した後、10ng/ml VEGF (R & D Systems) および5ng/ml bFGF (R & D Systems) を添加した培地へ交換してさらに52日間培養し続けた。iPS細胞から心筋細胞への各分化段階における細胞を、下記にて述べる心筋細胞マーカーによる細胞評価に用いた。

【0065】

実施例 3

心筋細胞マーカー-NCAM1による細胞評価

実施例2の方法で誘導したヒトiPS細胞(201B7-M6GIP4株および606A1株)由来の心筋細胞を、誘導0日目、4日目、8日目、12日目、16日目、20日目、26日目、33日目、45日目および60日目に抗NCAM1抗体(BD)にて染色し、フローサイトメトリーを用いて評価した(図2)。30日目にNCAM1の発現差異を利用して心筋細胞純化を行ったところ、トロポニンT陽性心筋細胞の比率は、純化しなかった場合には58.5%であったのに対し、NCAM1高度発現、中等度発現細胞をフローサイトメトリーにて選別すると、それぞれ88.6%、71.3%と高純度の心筋細胞を得ることができた(図3)。

10

【0066】

以上より、NCAM1を心筋細胞分化の指標として用いることで、心筋細胞の識別が可能であることが示された。

【0067】

実施例 4

心筋細胞マーカー-SSEA3による細胞評価

実施例2の方法で誘導したヒトiPS細胞(201B7-M6GIP4株および606A1株)由来の心筋細胞を、誘導0日目、4日目、8日目、12日目、16日目、20日目、26日目、33日目、45日目および60日目に抗SSEA3抗体(BD)にて染色し、フローサイトメトリーを用いて評価したところ、8日目の未熟な心筋細胞ではマーカーが陰性であったが、16~26日目にMYH6陽性心筋細胞の一部で高発現を認めた(図4)。

20

【0068】

16日目にSSEA3の発現差異を利用して心筋純化を行ったところ、純化前はMYH6陽性細胞率が69.7%であったのに対し、純化後は81.5%と高値を示した。

【0069】

以上より、SSEA3を心筋細胞分化の指標として用いることで、心筋細胞の識別が可能であることが示された。

30

【0070】

実施例 5

心筋細胞マーカー-SSEA4による細胞評価

実施例2の方法で誘導したヒトiPS細胞(201B7-M6GIP4株および606A1株)由来の心筋細胞を、誘導0日目、4日目、8日目、12日目、16日目、20日目、26日目、33日目、45日目および60日目に抗SSEA4抗体(BD)にて染色し、フローサイトメトリーを用いて評価したところ、8日目の未熟心筋細胞ではマーカーが陰性であったが、12日目以降にMYH6陽性心筋細胞の多くで高発現を認め、特に12~33日目ではMYH6陽性心筋細胞の大部分に高発現を認めた(図5)。

40

【0071】

16日目にSSEA4の発現差異を利用して心筋純化を行ったところ、純化前はMYH6陽性細胞率が69.7%であったのに対し、純化後は84.0%と高値を示した。

【0072】

以上より、SSEA4を心筋細胞分化の指標として用いることで、心筋細胞の識別が可能であることが示された。

【0073】

実施例 6

心筋細胞マーカー-CD340による細胞評価

50

実施例 2 の方法で誘導したヒト iPS 細胞 (201B7-M6GIP4 株および 606A1 株) 由来の心筋細胞を、誘導 0 日目、4 日目、8 日目、12 日目、16 日目、20 日目、30 日目および 45 日目に抗 CD340 抗体 (BD) にて染色し、フローサイトメトリーを用いて評価したところ、誘導 8 日目以降 MYH6 陽性心筋細胞は CD340 陽性であった (図 6)。16 日目および 30 日目に CD340 の発現差異を利用して心筋純化を行ったところ、16 日目においては純化前の MYH6 陽性細胞率が 35.7% であったのに対し、純化後には 71.2% となり、また 30 日目においては純化前が 36.7% であったのに対し純化後には 65.7% となった。

【0074】

以上より、CD340 を心筋細胞分化の指標として用いることで、心筋細胞の識別が可能であることが示された。

【産業上の利用可能性】

【0075】

本発明によれば、心筋細胞を含む細胞集団から心筋細胞を効率的に抽出または検出することができる。

【0076】

本発明は、好ましい態様を記載しているが、好ましい態様が改変可能であることは、当業者にとり明らかである。本発明は、本明細書において詳述された方法以外によって、具体的に表現され得るものであることを意図している。したがって、本発明は、特許請求の範囲の要旨と範囲に含まれる全ての改変を包含する。

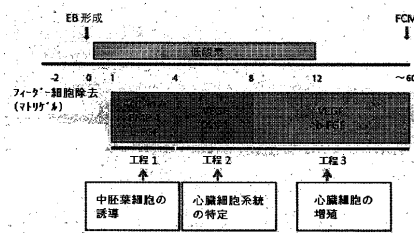
【0077】

本明細書において引用された特許明細書および特許出願明細書を含む刊行物に記載の内容は、参照により、本明細書に開示される範囲で、その全体が本明細書に援用される。

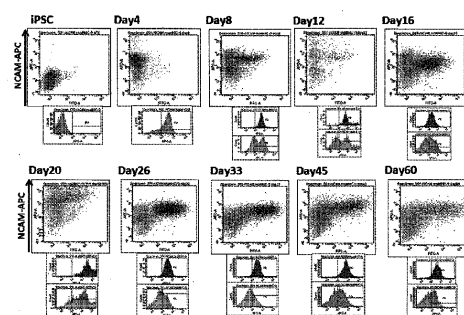
10

20

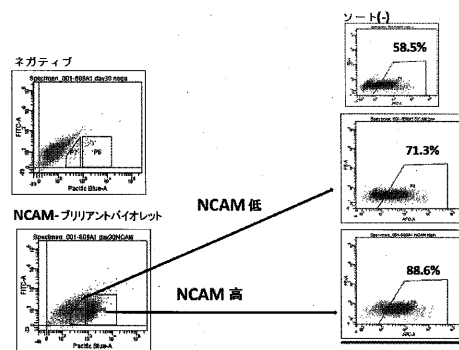
【図 1】



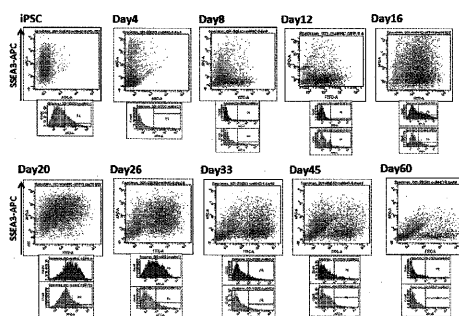
【図 2】



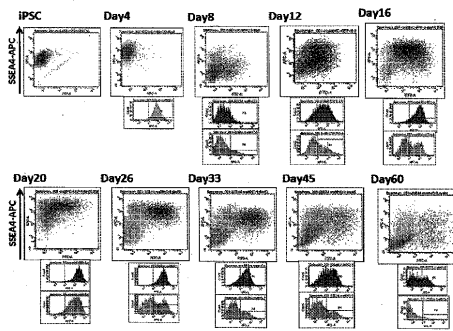
【図 3】



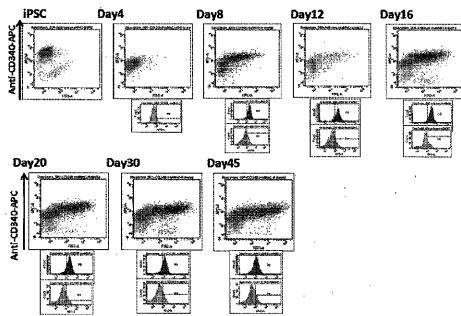
【図 4】



【 図 5 】



【 図 6 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2013/069721	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. C12Q1/02(2006.01)i, C12N5/077(2010.01)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) Int.Cl. C12Q1/02, C12N5/077 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2013 Registered utility model specifications of Japan 1996-2013 Published registered utility model applications of Japan 1994-2013 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS(STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST/580(JDREAMIII), WPI			
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
Y	Hideki Uosaki 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	1-15	
Y	Nicole C. Dubois et al., SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells., Nature Biotechnology, 2011, 29(11), pp.1011-1018	1-15	
Y	JP 2010-517578 A (The General Hospital Corporation) 2010.05.27, & US 2011/0033430 A1 & EP 2222837 A & WO 2008/098184 A2	1-15	
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 15.10.2013		Date of mailing of the international search report 22.10.2013	
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Yuichi Ito Telephone No. +81-3-3581-1101 Ext. 3488	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/069721

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2007-528755 A (Kabushikikaisha Cardio) 2007.10.18, & US 2007/0092492 A1 & EP 1659979 A & WO 2005/011524 A1	1-15
A	WO 2012/162741 A1 (Monash University) 2012.12.06, (No family)	1-15
A	JP 2009-542237 A (Cellartis AB) 2009.12.03, & US 2010/0009399 A1 & EP 2044196 A & WO 2008/006605 A2	1-15
A	JP 2004-535199 A (Geron Corporation) 2004.11.25, & US 2003/0022367 A1 & EP 1412479 A & WO 2003/006950 A2	1-15
P, X	WO 2012/024782 A1 (University Health Network) 2012.03.01, & EP 2609194 A	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/069721

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See the extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/069721

<Lack of unity of inventions>

Claims 1-15 comprise 4 inventions relating to NCAM1, SSEA3, SSEA4 and CD340, and these inventions involve a common technical feature, i.e., producing or detecting a cardiomyocyte using positivity of each molecule as an index. However, the said technical feature does not make any contribution over the prior art in light of the content disclosed by D1 or D2, and therefore does not constitute a special technical feature. In addition, the said claims involve no other same or corresponding special technical features. Thus, claims of this application are divided into 4 inventions with respective special technical features as shown below:

- (Invention 1) claims 1-15 relating to NCAM1.
- (Invention 2) claims 1-15 relating to SSEA3.
- (Invention 3) claims 1-15 relating to SSEA4.
- (Invention 4) claims 1-15 relating to CD340.

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72)発明者 船越 俊介

日本国京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA20 CA01 CA11 EA04 GA11

4B063 QA01 QA05 QA08 QA18 QQ08 QR41 QR48 QS36 QX01

4B065 AA90X AC20 BD14 BD39 CA44 CA46