

(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
2021年3月4日(04.03.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/039943 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 14/78 (2006.01) C12N 5/0775 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2020/032514
- (22) 国際出願日: 2020年8月28日(28.08.2020)
- (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 2019-156537 2019年8月29日(29.08.2019) JP
特願 2020-012333 2020年1月29日(29.01.2020) JP
- (71) 出願人: 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒1048315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 原田 育恵 (HARATA, Ikue); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 原田 英里 (HARADA, Eri); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). ▲高▼橋 和雅 (TAKAHASHI, Kazuma); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP). 本河 史恵 (HONKAWA, Fumie); 〒2108681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime); 〒5410044 大阪府大阪市中央区伏見町四丁目1番1号 明治安田生命大阪御堂筋ビル Osaka (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 一 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING MESENCHYMAL STEM CELLS FROM LIVING BODY-DERIVED CELL SAMPLE CONTAINING MESENCHYMAL STEM CELLS

(54) 発明の名称: 間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料から間葉系幹細胞を製造する方法

(57) Abstract: The present invention provides a method for producing mesenchymal stem cells from a living body-derived cell sample containing mesenchymal stem cells, the method comprising: (1) a step for culturing a living body-derived cell sample containing mesenchymal stem cells in a serum - free medium in the presence of vitronectin or a partial peptide of the vitronectin capable of bonding mesenchymal stem cells; and (2) a step for collecting a cell aggregate of the mesenchymal stem cells.

(57) 要約: 本発明は、以下の工程を含む、間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料から間葉系幹細胞を製造する方法を提供する。(1) ビトロネクチンまたは間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下、無血清培地中で間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料を培養する工程、(2) 間葉系幹細胞の細胞凝集体を回収する工程。



WO 2021/039943 A1

明 細 書

発明の名称：

間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料から間葉系幹細胞を製造する方法

技術分野

[0001] 本発明はビトロネクチンまたは間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下、無血清培地または異種由来成分不含培地中で間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料を培養する工程を含む、間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料から間葉系幹細胞を製造する方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、生体の細胞又は組織を利用した医薬品の開発や再生医療の研究が進み、注目されている。このうち、臓器再生技術又は創薬スクリーニングツールとして、多能性を備える胚性幹細胞や人工多能性幹細胞を使用した研究が加速している。しかし、胚性幹細胞の作製は受精卵から発生した胚の破壊を必要とし、倫理的課題がある。また、人工多能性幹細胞は体細胞を初期化することによって得られるため上記の問題は生じないが、初期化因子としてc-mycの使用、レトロウイルスベクターによる染色体へのランダムな遺伝子導入、分化後に残存する未分化細胞などが原因となり、人工多能性幹細胞から癌細胞が生じることが懸念される。一方、間葉系幹細胞は、複数の間葉系（骨芽細胞、脂肪細胞、軟骨細胞）だけでなく、非間葉系（神経前駆細胞、肝細胞）の系譜の細胞に分化可能な多分化能を有し、胚性幹細胞や人工多能性幹細胞で生じる課題もないことから、再生医療や細胞治療の細胞源としての利用が期待されている。

[0003] 間葉系幹細胞は、骨髄、脂肪、滑膜、歯槽骨、歯根膜等の成人の組織からだけでなく、胎盤、臍帯血、臍帯の種々の組織等から製造することができ、しかも生体外で培養し増幅できる。従来の間葉系幹細胞の取得方法として、骨髄から製造される骨髄単核球は間葉系幹細胞を少量含むことから、骨髄から製造される骨髄単核球をウシ胎児血清(FBS)含有培地中で培養し、間葉系幹

細胞の培養容器への接着性を利用することによって、間葉系幹細胞を製造していた。しかし、間葉系幹細胞を再生医療のための細胞源として使用する場合、異種由来成分が間葉系幹細胞に混入することは不都合であった。そこで、無血清培地を用いて間葉系幹細胞を培養する方法が考案されてきた（特許文献1）。しかし、そもそも間葉系幹細胞を増殖するためには間葉系幹細胞を含む骨髓単核球から間葉系幹細胞を製造する必要がある、無血清培地を用いて間葉系幹細胞を含む骨髓単核球から間葉系幹細胞を効率よく製造して行く方法は未だに開発されていないままである。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2011/111787号

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、間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料から間葉系幹細胞を効率よく製造する方法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、上記の目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、無血清培地中、ビトロネクチンで被覆した培養容器上で間葉系幹細胞を含む骨髓単核球を培養した場合、ビトロネクチンを介して培養容器に接着した間葉系幹細胞によって形成される細胞凝集体を製造することに成功した。その製造した凝集体を解離させ、単一の間葉系幹細胞の集団を得た。その上で再度、ビトロネクチン存在下、無血清培地で得られた間葉系幹細胞を培養したところ、最初のビトロネクチンの代わりにフィブロネクチンを使用した以外は同条件で培養した間葉系幹細胞に比べて、細胞数が顕著に多いことが確認できた。また、TGF β 受容体阻害剤が間葉系幹細胞の製造効率をさらに上昇させることを確認した。さらに、間葉系幹細胞を含む脂肪細胞からもビトロネクチンとTGF β 受容体阻害剤を用いることによって、間葉系幹細胞を製造できることが

分かった。以上の発見から、本発明を完成するに至った。

[0007] 即ち、本発明は以下の通りである。

[1] 以下の工程を含む、間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料から間葉系幹細胞を製造する方法。

(1) ビトロネクチンまたは間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下、無血清培地中で間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料を培養する工程、

(2) 間葉系幹細胞の細胞凝集体を回収する工程。

[2] ビトロネクチンまたは間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下における培養が、ビトロネクチンまたは間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドが固相化された培養容器上での培養である、[1]に記載の方法。

[3] 以下の工程をさらに含む、[1]または[2]に記載の方法。

(3) 回収された細胞凝集体を解離させる工程、

(4) 細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下、無血清培地中で、解離した間葉系幹細胞を培養する工程、

(5) 細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドを介して培養容器上で増殖した間葉系幹細胞を回収する工程。

[4] 細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下における培養が、細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドが固相化された培養容器上での培養である、[3]に記載の方法。

[5] ビトロネクチンの部分ペプチドがRGDドメインを含む、[1]～[4]のいずれか1つに記載の方法。

[6] ビトロネクチンの部分ペプチドがさらにソマトメジンBドメインを含む、[5]に記載の方法。

[7] ビトロネクチンの部分ペプチドが配列番号：1で表されるアミノ酸配

列のアミノ酸番号1~379からなるポリペプチドである、[6]に記載の方法。

[8] 工程(1)における無血清培地がTGF- β 受容体阻害剤を含む、[1]~[7]のいずれか1つに記載の方法。

[9] 以下の工程を含む、間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料から間葉系幹細胞を製造する方法。

(1) ビトロネクチンまたは間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下、異種由来成分不含培地中で間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料を培養する工程、

(2) 間葉系幹細胞の細胞凝集体を回収する工程。

[10] ビトロネクチンまたは間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下における培養が、ビトロネクチンまたは間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドが固相化された培養容器上での培養である、[9]に記載の方法。

[11] 以下の工程をさらに含む、[9]または[10]に記載の方法。

(3) 回収された細胞凝集体を解離させる工程、

(4) 細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下、異種由来成分不含培地中で、解離した間葉系幹細胞を培養する工程、

(5) 細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドを介して培養容器上で増殖した間葉系幹細胞を回収する工程。

[12] 細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下における培養が、細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドが固相化された培養容器上での培養である、[11]に記載の方法。

[13] ビトロネクチンの部分ペプチドがRGDドメインを含む、[9]~[12]のいずれか1つに記載の方法。

[14] ビトロネクチンの部分ペプチドがさらにソマトメジンBドメインを含

む、[13]に記載の方法。

[15] ビトロネクチンの部分ペプチドが配列番号：1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1~379からなるポリペプチドである、[14]に記載の方法。

[16] 工程(1)における異種由来成分不含培地がTGF- β 受容体阻害剤を含む、[9]~[15]のいずれか1つに記載の方法。

[17] 異種由来成分不含培地が同種血清を含む、[9]~[16]のいずれか1つに記載の方法。

[18] 同種血清が自己血清である、[17]に記載の方法。

[19] 間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料が骨髓由来細胞である、[1]~[18]のいずれか1つに記載の方法。

[20] 培養される骨髓由来細胞の細胞数が $0.5 \times 10^5 \sim 25 \times 10^5$ 細胞/cm²である、[19]に記載の方法。

[21] 骨髓由来細胞の培養期間が4日~14日である、[19]または[20]に記載の方法。

[22] 間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料が脂肪組織由来細胞である、[1]~[18]のいずれか1つに記載の方法。

[23] 培養される脂肪組織由来細胞の細胞数が $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/cm²である、[22]に記載の方法。

[24] 脂肪組織由来細胞の培養期間が1日~14日である、[22]または[23]に記載の方法。

発明の効果

[0008] ビトロネクチンまたはその部分ペプチドの存在下、無血清培地または異種由来成分不含培地中で間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料を培養することによって、間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料から間葉系幹細胞を効率的に製造できる。本方法を採用することによって、得られた間葉系幹細胞はそのまま再生医療用の細胞ソースとして使用することができる。

図面の簡単な説明

- [0009] [図1]MNCの播種後5日目のMSCの凝集体の写真を示す図である。
- [図2]MNCの播種後13日目の細胞数の測定結果を示す図である。
- [図3]MNCの播種後13日目の細胞の写真を示す図である。
- [図4]異なるVitronectinを用いた場合におけるMNCの播種後13日目のMSC数の測定結果を示す図である。
- [図5]異なるVitronectinを用いた場合におけるMNCの播種後12日目のMSC数の測定結果を示す図である。
- [図6]TGF β 阻害剤を用いた場合におけるMNCの播種後15日目のMSC数の測定結果を示す図である。
- [図7]異なるTGF β 受容体阻害剤を用いた場合におけるMNCの播種後12日目のMSC数の測定結果を示す図である。
- [図8]マウス脂肪組織から単離した細胞の播種後5日目の細胞数の測定結果を示す図である。
- [図9]マウス脂肪組織から単離した細胞の播種後5日目の細胞の写真を示す図である。

発明を実施するための形態

- [0010] 本発明は、間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料から間葉系幹細胞を製造する方法（以下、本発明の製造方法）を提供する。
- [0011] 本明細書において間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料とは、間葉系幹細胞が含まれる生体組織から分離された細胞試料である。間葉系幹細胞が含まれる生体組織としては、骨髓、脂肪、滑膜、歯槽骨、歯根膜、胎盤、臍帯血、臍帯等の組織が挙げられる。
- [0012] 本明細書において細胞試料とは、生体組織に含まれる細胞集団である。細胞集団とは、同じ種類又は異なる種類の2以上の細胞を意味する。また、細胞集団は、同じ種類又は異なる種類の細胞の一塊（mass）をも意味する。該細胞集団は生体組織から直接分離した初代細胞であってもよいし、初代細胞から継代培養された細胞であってもよい。ここで、直接とは、生体外での培養および/または増殖を行う工程を介さないことをいう。

[0013] 本明細書において間葉系幹細胞とは、中胚葉性組織（間葉）に由来する体性幹細胞である。間葉系幹細胞は細胞表面に陽性マーカーを発現し、陰性マーカーを発現していない。細胞表面の両マーカーを検出することによって、当該細胞が間葉系幹細胞であるかどうかを判定することができる。陽性マーカーとしては、CD73、CD90、CD105が挙げられる。陰性マーカーとしては、CD11b、CD14、CD19、CD34、CD45、CD79a、HLA-Class II (DR) が挙げられる。これらのマーカーの発現は、公知の免疫学的方法（例えば、抗体を用いたフローサイトメトリー）等で調べることができる。

[0014] 本発明の製造方法は、一実施態様として、以下の工程を含む。

（1 a）ビトロネクチンまたは間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下、無血清培地中で間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料を培養する工程（本発明の工程（1 a））。

（2 a）間葉系幹細胞の細胞凝集体を回収する工程（本発明の工程（2 a））。

。

また、本発明の製造方法は、別の実施態様として、以下の工程を含む。

（1 b）ビトロネクチンまたは間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下、異種由来成分不含培地中で間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料を培養する工程（本発明の工程（1 b））。

（2 b）間葉系幹細胞の細胞凝集体を回収する工程（本発明の工程（2 b））。

。

[0015] 本発明の工程（1 a）または（1 b）において、培養はビトロネクチンまたは間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチド（以下、「ビトロネクチンの部分ペプチド」と記載する。）の存在下において実施される。

ビトロネクチンは、例えば、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、チンパンジーなど）の細胞、あるいはそれらの細胞が存在するあらゆる組織もしくは臓器等から単離および精製されるタンパク質であってもよい。また、化学合成もしくは無細胞翻訳系で生化学的に合成されたタンパク質であってもよいし、ある

いはビトロネクチンをコードする塩基配列を有する核酸を導入された形質転換体から産生される組換えタンパク質であってもよい。

[0016] ビトロネクチンのアミノ酸配列は公知のデータベースに開示されており、例えば、NCBI Reference Sequence No.としてNP_000629（ヒトビトロネクチン）、NP_035837（マウスビトロネクチン）などが開示されている。本発明の製造方法によって製造される間葉系幹細胞は異種由来成分を含まないことが好ましいため、ビトロネクチンは培養される細胞試料が由来する生体由来のビトロネクチンが好ましい。従って、培養される細胞試料がヒト由来である場合、本発明の製造方法に用いられるビトロネクチンは、好ましくは、配列番号：1と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含むタンパク質である。

[0017] 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上の相同性を有するアミノ酸配列などが挙げられる。ここで「相同性」とは、当該技術分野において公知の数学的アルゴリズムを用いて2つのアミノ酸配列をアラインさせた場合の、最適なアラインメント（好ましくは、該アルゴリズムは最適なアラインメントのために配列の一方もしくは両方へのギャップの導入を考慮し得るものである）における、オーバーラップする全アミノ酸残基に対する同一アミノ酸および類似アミノ酸残基の割合（%）を意味する。

本明細書におけるアミノ酸配列の相同性は、相同性計算アルゴリズムNCBI BLAST (National Center for Biotechnology Information Basic Local Alignment Search Tool) を用い、以下の条件（期待値=10；ギャップを許す；マトリクス=BLOSUM62；フィルタリング=OFF）にて計算することができる。

より好ましくは、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列とは、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と約60%以上、好ましくは約70%以上、さらに好ましくは約80%以上、特に好ましくは約90%以上の同一性を有するアミノ酸配列である。

[0018] 配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質としては、例えば、前記の配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含み、配列番号：1で表されるアミノ酸配列を含むタンパク質と実質的に同質の活性を有するタンパク質などが好ましい。

[0019] 実質的に同質の活性としては、例えば、間葉系幹細胞接着活性が挙げられる。「実質的に同質」とは、それらの活性が定性的（例えば、生理学的または薬理的）に同じであることを示す。したがって、間葉系幹細胞接着活性は同等（例えば、約0.5～約2倍）であることが好ましいが、これらの活性の程度やタンパク質の分子量などの量的要素は異なってもよい。

[0020] また、ヒトビトロネクチンとしては、例えば、(1)配列番号：1で表されるアミノ酸配列のうち1または2個以上（好ましくは1～10個程度）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、(2)配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは1～10個程度）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、(3)配列番号：1で表されるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは1～10個程度）のアミノ酸が挿入されたアミノ酸配列、(4)配列番号：1で表されるアミノ酸配列のうち1または2個以上（好ましくは1～10個程度）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または(5)それらを組み合わせたアミノ酸配列を含有するタンパク質なども含まれる。

上記のようにアミノ酸配列が挿入、欠失または置換されている場合、その挿入、欠失または置換の位置は、タンパク質の活性が保持される限り特に限定されない。

[0021] ビトロネクチンの部分ペプチドは、上記したビトロネクチンの部分アミノ酸配列を有するペプチドであり、且つビトロネクチンと実質的に同質の活性を有する限り、何れのものであってもよい。ここで「実質的に同質の活性」とは上記と同意義を示す。また、「実質的に同質の活性」の測定はビトロネクチンの場合と同様に行なうことができる。そのような、ビトロネクチンの部分ペプチドとしては、RGDドメインを含むタンパク質が挙げられる。より好

ましくは、ビトロネクチンの部分ペプチドはソマトメジンBドメインおよびRGDドメインを含むタンパク質である。

具体的には、ソマトメジンBドメインとして、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号1~40で示される領域が用いられる。また、RGDドメインとして、例えば、配列番号：1で表されるアミノ酸配列のうち、アミノ酸番号41~52で示される領域が用いられる。ビトロネクチンの部分ペプチドは、間葉系幹細胞接着活性を有する限りそのサイズに特に制限はないが、好ましくは100個以上の部分アミノ酸配列を含むもの、より好ましくは200個以上の部分アミノ酸配列を含むもの、さらに好ましくは300個以上の部分アミノ酸配列を含むものが挙げられる。該部分アミノ酸配列は一個の連続した部分アミノ酸配列であってもよく、あるいは不連続な複数の部分アミノ酸配列が連結されたものであってもよい。このような条件を満たす最も好ましいビトロネクチンの部分ペプチドとしては、配列番号：1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1~379からなるポリペプチドが挙げられる。

また、ビトロネクチンの部分ペプチドは、市販されているビトロネクチンの部分ペプチドを使用してもよい。市販されているビトロネクチンの部分ペプチドとしては、例えば、Vitronectin (20-398 aa) (wako)、Vitronectin(VTN-N, 62-478 aa)(Thermo Fisher Scientific製)、Vitronectin (Full length, 20-478 aa) (Sigma)、synthemax II(Corning Incorporated製)等が挙げられる。

[0022] 本発明の工程(1a)または(1b)において、ビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドの存在下における間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料の培養は、間葉系幹細胞とビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドとが接触するどのような方法で実施してもよい。例えば、培養液中または培養容器の表面のいずれかにビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドが存在する状態で培養する方法が挙げられる。ビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドが培養液中に存在するとは、培養液中に直接含有されている態様をいう。ビトロネクチンまたはビトロネクチン

の部分ペプチドが培養液中に含有される場合、培養液中のビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドの濃度は、 $0.1 \mu\text{g/ml} \sim 4.0 \mu\text{g/ml}$ 、好ましくは、 $1.0 \mu\text{g/ml} \sim 4.0 \mu\text{g/ml}$ である。

[0023] また、ビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドが培養容器の表面に存在するとは、培養容器の表面に固相化されている態様をいう。ビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドが培養容器の表面に固相化される場合、培養容器としては、例えば細胞培養に使用される容器又は担体（マイクロビーズ等）が使用される。培養容器は、細胞の維持、生存、分化、成熟、自己複製を阻害するものでなければいかなる素材、形状のものを用いることが出来る。培養容器の素材としては、例えばガラス、不織布を含む合成樹脂や天然樹脂又は金属等がある。また、培養容器の形状としては、三角柱、立方体、直方体などの多角柱や円柱、三角錐、四角錐などの多角錘や円錐、ひょうたんのような任意の形状、球形、半球形、円形、楕円形、半円形等がある。市販の培養フラスコ、培養皿（培養ディッシュ）、培養バッグ、中空糸型の培養装置などを用いる事も出来る。なお、培養バッグとしては、ガス透過性を有するものが好適である。大量の細胞を必要とする場合には、大型培養槽を使用してもよい。培養は開放系又は閉鎖系のどちらでも実施することができるが、得られた間葉系幹細胞のヒトへの投与等を目的とする場合には、閉鎖系で培養を実施することが好ましい。

[0024] ビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドの培養容器への固相化は、公知の手段に基づいて実施することができる。例えば、ビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドを溶媒（例えば、滅菌蒸留水、緩衝液または生理食塩水等）に溶解させ、培養容器に添加した後、 4°C で一晩静置することによって、ビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドを培養容器に固相化することができる。ビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドを培養容器へ固相化させる際のビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチド溶液の濃度は、当業者が適宜決定してよい。例えば、培養容器の単位面積当たり、通常、 $0.5 \mu\text{g} \sim 10.0 \mu\text{g}$ のビトロネクチンま

たはビトロネクチンの部分ペプチドが固相化されるように濃度を設定すればよい。

[0025] ビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドが固相化された培養容器は、使用時まで低温、例えば4°Cで保存することができる。使用直前にはこれらの培養容器からビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチド含有溶液を吸引除去し、PBSで1回、次いで培養用培地で1回洗浄してから培養に供する。

[0026] 本発明の工程（1 a）において、無血清培地とは、血清を含有していなければ特に制限されない。従って、無血清培地は、血清を含まない限り、培養される間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料が由来する種と同じ種由来の成分（同種由来成分）または異なる種由来の成分（異種由来成分）を含んでよい。同種由来成分としては、血小板溶解物、血清由来タンパク質（例えば、アルブミンなど）などが挙げられる。異種由来成分としては動物由来脂質などが挙げられる。

[0027] 本発明の工程（1 b）において、異種由来成分不含培地とは、異種由来成分を含有していなければ特に制限されない。従って、異種由来成分不含培地は、異種由来成分を含まない限り、同種血清を含んでよい。同種血清は、自己血清が好ましい。ここで自己血清、並びに後述の自己血漿とは、培養される生体由来細胞試料と同一のドナーより採取された血液から得られた血清および血漿をそれぞれ意味する。

[0028] 血漿は血清の成分を含有していることから、自己血漿を含有する培地を使用してもよい。好ましくは非働化した自己血漿が培地に添加される。例えば、10%（V/V）以下、好ましくは5%（V/V）以下、さらに好ましくは2%（V/V）以下の非働化した自己血漿を含む培養液中で細胞を培養する。自己血漿を使用することによって、本発明の製造方法から異種由来成分を排斥し、安全性が高い間葉系幹細胞の製造方法が提供される。

[0029] 無血清培地または異種由来成分不含培地は、通常の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

例えば、ダルベッコ培地（例：IMDM）、イーグル培地（例：DMEM、EMEM、BME、MEM、 α MEM）、ハム培地（例：F10培地、F12培地）、RPMI培地（例：RPMI-1640培地、RPMI-1630培地）、MCDB培地（例：MCDB104、107、131、151、153培地）、フィッシャー培地、199培地、霊長類ES細胞用培地（霊長類ES/iPS細胞用培養液、リプロセル社）、マウスES細胞用培地（TX-WES培養液、トロンボX社）、無血清培地（mTeSR、Stemcell Technology者）、ReproFF、StemSpan（登録商標）SFEM、StemSpan（登録商標）H3000、StemlineII、ESF-B培地、ESF-C培地、CSTI-7培地、Neurobasal培地（ライフテクノロジー社）、StemPro-34培地、StemFit（登録商標）（例：StemFit AK03N、StemFit AK02N）などが挙げられるがこれに限定されるものではない。さらに、これらの培地は、必要に応じて、混合等して使用することもでき、例えば、DMEM/F12培地等が挙げられる。また、無血清培地または異種由来成分不含培地は、公知の培地や市販の培地をそのまま、あるいは改変して使用してもよい。市販の異種由来成分不含培地としては、例えばDEF-CS500 XF（Cellartis社製）、DXF（PromoCell社製）を使用することができる。

[0030] 本発明の工程（1a）または（1b）において、無血清培地または異種由来成分不含培地はTGF- β 受容体阻害剤を含んでよい。TGF- β は、ほとんど全ての正常細胞から不活性型として分泌され、特定の条件下で活性化され、上皮細胞やリンパ球の増殖抑制などの様々な機能を示すペプチド因子である。さらに、骨芽細胞の分化を誘導する骨形成因子（BMP）や、卵胞刺激ホルモンの分泌や赤血球の分化を促進するアクチビンなどが、TGF- β と類似構造を有するTGF- β ファミリー分子として挙げられる。本明細書においては、TGF- β はTGF- β ファミリー分子も含む。具体的には、TGF- β としては、TGF- β 、アクチビン、Nodal、BMP、GDF（growth/differentiation factor）、AMH（anti-Müllerian hormone）、MIS（Müllerian inhibitory substance）が挙げられ、TGF- β が好ましい。TGF- β 受容体は、細胞膜上に存在するI型受容体とII型受容体から構成される。I型受容体とII型受容体は共にセリン/スレオニンキナーゼ活性を有し、II型受容体の基質はI型受容体である。TGF- β ファミリー分子がTGF- β

受容体に結合すると、II型受容体によってI型受容体がリン酸化され、活性化されたI型受容体はさらに細胞内シグナル伝達分子であるSmadをリン酸化し、細胞内にシグナルを伝える。具体的には、TGF- β 受容体のI型受容体とII型受容体の組み合わせとしては、TGF- β に対してはTGF- β I型受容体(TGFBR1、アクチビン様受容体キナーゼ(ALK5))またはALK1とTGF- β II型受容体(TGFBR2)の組み合わせが挙げられ、アクチビン、Nodalに対しては、ALK4またはALK7とActR-IIまたはActR-IIBの組み合わせが挙げられ、BMPに対しては、ALK2、ALK3またはALK6とBMPRIIの組み合わせが挙げられ、GDFに対しては、ALK2、ALK3またはALK6とActR-IIまたはActR-IIBの組み合わせが挙げられ、AMHまたはMISに対しては、ALK2、ALK3またはALK6とActR-IIまたはActR-IIBの組み合わせが挙げられる。好ましいTGF- β 受容体のI型受容体とII型受容体の組み合わせとしては、ALK5またはALK1とTGFBR2の組み合わせが挙げられる。上記のTGF- β 受容体に対する阻害剤は、TGF- β 受容体の上記の機能を抑制する限り、いかなるものであってもよく、例えば、TGF- β とTGF- β 受容体との複合体形成を阻害する物質等が挙げられる。

[0031] 具体的には、TGF- β 受容体阻害剤として、例えば、TGF- β 受容体に対する中和抗体が挙げられる。該抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体の何れであってもよい。これらの抗体は、自体公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。抗体のアイソタイプは特に限定されないが、好ましくはIgG、IgMまたはIgA、特に好ましくはIgGが挙げられる。また、該抗体は、標的抗原を特異的に認識し結合するための相補性決定領域(CDR)を少なくとも有するものであれば特に制限はなく、完全抗体分子の他、例えばFab、Fab'、F(ab')₂等のフラグメント、scFv、scFv-Fc、ミニボディー、ダイアボディー等の遺伝子工学的に作製されたコンジュゲート分子、あるいはポリエチレングリコール(PEG)等のタンパク質安定化作用を有する分子等で修飾されたそれらの誘導体などであってもよい。なお、中和抗体は無血清培地または異種由来成分不含培地に含まれる中和抗体であることから、生体由来細胞試料がヒト由来である場合、(i)ヒト抗体産生動物(例:マウス)

を免疫してヒト抗体を得る、(ii)キメラ抗体、ヒト化抗体もしくは完全ヒト抗体を作製する、あるいは(iii)体外免疫法とウイルスによる細胞不死化、ヒト-ヒト（もしくはマウス）ハイブリドーマ作製技術、ファージディスプレイ法等とを組み合わせることでヒト抗体を得ることが好ましい。TGF- β 受容体に対する中和抗体の無血清培地または異種由来成分不含培地中における濃度は、TGF- β 受容体の細胞内シグナル伝達を阻害し得る濃度であれば制限されないが、例えば、0.01 $\mu\text{g/mL}$ ~10 $\mu\text{g/mL}$ 、好ましくは0.05 $\mu\text{g/mL}$ ~5 $\mu\text{g/mL}$ 、より好ましくは0.1 $\mu\text{g/mL}$ ~2.5 $\mu\text{g/mL}$ である。

[0032] 別の好ましい態様においては、TGF- β 受容体阻害剤は、TGF- β 受容体に対してアンタゴニスト活性を示す低分子化合物である。ここで「アンタゴニスト活性」とは、TGF- β 受容体に結合してTGF- β とTGF- β 受容体との結合を阻害する活性を意味する。そのような化合物は、例えば、SB431542(Stemgent)、sc-203294、RepSox、Vactosertib(TEW-7197)、SB525334、GW788388、SB505124、SD-208、LDN-193189、Galunisertib(LY2157299)、LY2109761、LY364947、K02288、LDN-214117、ML347、LDN-212854、DMH1、Pirfenidone、LY 320082、Alantolactone、SIS3、Hesperetin、A-83-01などが挙げられる。TGF- β 受容体に対してアンタゴニスト活性を示す低分子化合物の無血清培地または異種由来成分不含培地中における濃度は、TGF- β 受容体の細胞内シグナル伝達を阻害し得る濃度であれば制限されないが、例えば、0.1 μM ~100 μM 、好ましくは1 μM ~50 μM 、より好ましくは5 μM ~25 μM である。

[0033] 無血清培地または異種由来成分不含培地にはさらに、インスリン、トランスフェリン、セレン、各種ビタミン、L-グルタミン、非必須アミノ酸等の各種アミノ酸、2-メルカプトエタノール、各種サイトカイン（インターロイキン類（IL-2、IL-7、IL-15等）、幹細胞因子（SCF（Stem cell factor））、アクチビンなど）、各種ホルモン、各種増殖因子（白血病抑制因子（LIF）、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）等）、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン等の抗生物質、フェノールレッド等のpH指示薬などを適宜添加することができる。

- [0034] 本発明の工程（1 a）または（1 b）において培養される間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料は、間葉系幹細胞が含まれる細胞試料である限り特に制限されない。本発明の一実施態様として、間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料は骨髓由来細胞である。骨髓から骨髓由来細胞を分離する方法は公知の手段に従ってよい。例えば、密度を調整した分離媒体を用いた密度勾配遠心法によって、採取した骨髓液から間質細胞を除去することで実施することができる。具体的には、生理食塩水で希釈した骨髓液をチューブ内の分離媒体の上部に重層し、遠心することによって、分離媒体と骨髓液の境界面に間葉系幹細胞と単核球を含む骨髓由来細胞の層を得ることができる。このようにして得られた骨髓由来細胞は、微量の間葉系幹細胞を含む。骨髓由来細胞に含まれる間葉系幹細胞の割合は、特に制限されないが、骨髓由来細胞数の約0.01%～約1%、好ましくは約0.01%～約0.1%である。
- [0035] 本発明の工程（1 a）または（1 b）において培養される間葉系幹細胞を含む骨髓由来細胞の数は特に制限はないが、通常、培養容器に対して 0.5×10^5 細胞/cm²～ 25×10^5 細胞/cm²であってよく、 2×10^5 細胞/cm²～ 13×10^5 細胞/cm²が好ましい。
- [0036] 間葉系幹細胞を含む骨髓由来細胞の培養条件には特に限定はなく、通常の細胞培養条件を採用できる。前記培養条件として、温度37℃、湿度95%、CO₂濃度5%での培養が例示されるが、本発明はこのような条件に限定されるものではない。例えば、温度30～40℃、湿度90～98%、CO₂濃度3～7%、での培養が例示されるが、所望の細胞の増殖が達成できる温度であれば前記の範囲以外の温度、湿度、CO₂濃度で実施してもよい。
- [0037] 培養中は適切な間隔で培地の交換を実施することが好ましい。培地の交換は、培地の全量交換、培地の一部交換、培地の追加およびそれらの組み合わせなどが挙げられる。本発明の好適な態様において、培養を開始した翌日に同じ組成の培地で培地の全量交換を行い、さらに培養の開始から3日目および5日目に20%の培地の追加を行いながら培養される。
- [0038] 培養期間は例えば4～14日間、好ましくは7日間培養される。この培養によ

り、骨髓由来細胞に含まれる間葉系幹細胞を選択的にビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドを介して培養容器上に接着させることができる。接着した間葉系幹細胞は、細胞凝集体を形成する。ここで細胞凝集体は、培養容器の接着表面に平行に広がるように増殖した細胞集団、培養容器の接着表面に垂直に重なるように増殖した細胞集団、その両者の特徴を持つ細胞集団のいずれの細胞集団も包含する。培養期間が4日未満の場合、形成される細胞凝集体の数が少なく、後述する本発明の工程（4）で培養するための細胞数を確保できない。また、培養期間が14日を超える場合、細胞凝集体が崩れて細胞が減ってしまうため、同じく本発明の工程（4）で培養するための細胞数を確保できない。

[0039] また、別の実施態様において、本発明の工程（1a）または（1b）において培養される間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料は脂肪組織由来細胞である。脂肪組織から脂肪組織由来細胞を分離する方法は公知の手段に従ってよい。例えば、脂肪組織から間葉系幹細胞を含む脂肪組織由来細胞を分離する方法としては、採取した脂肪組織を細断し、コラゲナーゼ溶液中でインキュベートし、メッシュシートで濾すことによって、間葉系幹細胞を含む脂肪組織由来細胞を得ることができる。このようにして得られた脂肪組織由来細胞は、微量の間葉系幹細胞を含む。脂肪組織由来細胞に含まれる間葉系幹細胞の割合は、特に制限されないが、脂肪組織由来細胞数の約0.01%～約1%、好ましくは約0.1%～約1%である。

[0040] 本発明の工程（1a）または（1b）において培養される間葉系幹細胞を含む脂肪組織由来細胞の数は特に制限はないが、通常、培養容器に対して 1×10^3 細胞/cm²～ 1×10^6 細胞/cm²であってよく、 1×10^4 細胞/cm²～ 1×10^5 細胞/cm²が好ましい。

[0041] 間葉系幹細胞を含む脂肪組織由来細胞の培養条件には特に限定はなく、間葉系幹細胞を含む骨髓由来細胞の培養条件と同様の培養条件を採用できる。

[0042] 培養中は適切な間隔で培地の交換を実施することが好ましい。培地の交換は、培地の全量交換、培地の一部交換、培地の追加およびそれらの組み合わせ

せなどが挙げられる。本発明の好適な態様において、培養を開始した翌日および2日目に同じ組成の培地で培地の全量交換を行いながら培養される。

[0043] 培養期間は例えば1~14日間、好ましくは5日間培養される。この培養により、脂肪組織由来細胞に含まれる間葉系幹細胞を選択的にビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドを介して培養容器上に接着させることができる。接着した間葉系幹細胞は、細胞凝集体、特に培養容器の接着表面に平行に広がるように増殖した細胞集団を形成する。

[0044] 本発明の工程(2a)または(2b)において、ビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドを介して培養容器上に接着した間葉系幹細胞によって形成される細胞凝集体は公知の手段で回収される。例えば、生体由来細胞試料に含まれる間葉系幹細胞以外の細胞は、ビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドを介して培養容器上に接着しないため、全量培地交換によって無血清培地または異種由来成分不含培地と共に培養容器から除去される。結果として、全量培地交換以降の培養では間葉系幹細胞の細胞凝集体が培養容器中に残る。間葉系幹細胞の細胞凝集体は、ビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドを介して培養容器に接着するが、細胞凝集体は細胞間の接着も弱く、容易に細胞凝集体から分離して培地中に浮遊する。従って、間葉系幹細胞の細胞凝集体の回収は、(i) 無血清培地または異種由来成分不含培地に浮遊する間葉系幹細胞の細胞凝集体の回収および(ii) 培養容器上に接着した間葉系幹細胞の細胞凝集体の回収の2工程を含んでよい。(i) 無血清培地または異種由来成分不含培地に浮遊する間葉系幹細胞の細胞凝集体の回収は、例えば、無血清培地または異種由来成分不含培地を全量回収し、遠心分離することによって実施できる。(ii) 培養容器上に接着した間葉系幹細胞の細胞凝集体の回収は、例えば、ピペティングだけで容易に培養容器から剥離し、培地やPBSと共に全量回収し、遠心分離することによって実施できる。また別の実施態様としては、培養容器上に接着した間葉系幹細胞の細胞凝集体の回収は、剥離剤で処理することによりビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドと間葉系幹細胞の細胞凝集体との接

着を分解し、単細胞化された間葉系幹細胞を回収することができる。剥離剤としては、トリプシンとEDTAの混合溶液（通常0.001-0.5%トリプシン/0.1-5 mM EDTA、好ましくは約0.1%トリプシン/1 mM EDTA）を用いてもよいし、市販品（例えば、TrypLE(Thermo Fisher Scientific)）を使用してもよい。

[0045] ビトロネクチンまたはビトロネクチンの部分ペプチドは、その他の細胞外マトリクスに比べて間葉系幹細胞に対する接着活性が高く、効率的に生体由来細胞試料に含まれる間葉系幹細胞を接着することができるため、以上の通りにして、生体由来細胞試料から間葉系幹細胞を効率よく製造することができる。しかし、本発明の工程（1a）または（1b）で接着した間葉系幹細胞の細胞凝集体を長期間培養し続けた場合、細胞試料の由来によっては間葉系幹細胞の増殖は見られない。例えば、本発明の工程（1a）または（1b）で骨髄由来細胞を培養し、接着した間葉系幹細胞の細胞凝集体を長期間培養し続けた場合、間葉系幹細胞の増殖は見られない。一方、本発明の工程（1a）または（1b）で脂肪組織由来細胞を培養し、接着した間葉系幹細胞の細胞凝集体は増殖が確認できる。これは、骨髄由来細胞に間葉系幹細胞の増殖を妨げる細胞が存在しているためと考えられる。そこで、本発明の工程（1a）および（2a）、または工程（1b）および（2b）によって間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料から製造された間葉系幹細胞を大量に取得したい場合、当該製造された間葉系幹細胞を再播種し、増殖させて、再度回収することが好ましい。従って、本発明の製造方法は、さらに以下の工程を含んでよい。即ち、本発明の工程（1a）および（2a）を含む製造方法は、さらに以下の工程を含んでよい。

（3a）回収された細胞凝集体を解離させる工程（本発明の工程（3a））。

（4a）細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下、無血清培地中で、解離した間葉系幹細胞を培養する工程（本発明の工程（4a））。

（5a）細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドを介して培養容器上で増殖した間葉系幹細胞を回収する工程（本

発明の工程（5 a））。

また、本発明の工程（1 b）および（2 b）を含む製造方法は、さらに以下の工程を含んでよい。

（3 b）回収された細胞凝集体を解離させる工程（本発明の工程（3 b））。

（4 b）細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下、異種由来成分不含培地中で、解離した間葉系幹細胞を培養する工程（本発明の工程（4 b））。

（5 b）細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドを介して培養容器上で増殖した間葉系幹細胞を回収する工程（本発明の工程（5 b））。

[0046] 本発明の工程（3 a）または（3 b）において、回収された細胞凝集体の解離は公知の手段で実施される。細胞凝集体は細胞間の接着が弱いため、例えば、ピペッティングのみで細胞凝集体の細胞間接着が容易に解消され、単一の間葉系幹細胞の細胞集団を調製できる。あるいは、上記の剥離剤で処理することによっても実施できる。

[0047] 本発明の工程（4 a）または（4 b）において、培養に使用される培養容器、無血清培地、異種由来成分不含培地、培養において間葉系幹細胞と細胞外マトリクスタンパク質とが接触する態様等は、本発明の工程（1 a）または（1 b）と同様であってよい。

[0048] 本発明の工程（4 a）または（4 b）において、培養は細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチド（以下、「細胞外マトリクスタンパク質の部分ペプチド」と記載する。）の存在下において実施される。細胞外マトリクスタンパク質は、間葉系幹細胞を培養容器に接着できるものであれば、特に制限されない。そのような細胞外マトリクスタンパク質としては、例えば、ビトロネクチン、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンなどが挙げられる。また、細胞外マトリクスタンパク質の部分ペプチドとしては、例えば、iMatrix-511（ラミニン-511の部分ペプチド）などが挙げられる。

- [0049] ビトロネクチンと同様、細胞外マトリクスタンパク質は哺乳動物の細胞等から単離および精製されるタンパク質、生化学的に合成されたタンパク質、または細胞外マトリクスタンパク質をコードする塩基配列を有する核酸を導入された形質転換体から産生される組換えタンパク質のいずれであってもよい。
- [0050] また、細胞外マトリクスタンパク質の部分ペプチドは、細胞外マトリクスタンパク質の部分アミノ酸配列を有するペプチドであり、且つ間葉系幹細胞接着活性を有する限り、何れのものであってもよい。そのような、細胞外マトリクスタンパク質の部分ペプチドとしては、RGDドメイン及びヘパリン結合ドメインからなる群より選択される少なくとも一つのドメインを含むタンパク質が挙げられる。
- [0051] 本発明の工程（4 a）または（4 b）において播種される間葉系幹細胞の由来する組織は特に制限されないが、本発明の工程（1 a）または（1 b）では細胞凝集体の間葉系幹細胞が十分に増殖しないような組織が好ましい。そのような組織としては、例えば、骨髄、臍帯血などが挙げられる。また、本発明の工程（1 a）または（1 b）で細胞凝集体の間葉系幹細胞が増殖する場合であっても、さらに間葉系幹細胞の数を増やすことを目的として、本発明の工程（4 a）または（4 b）において間葉系幹細胞を培養してもよい。
- [0052] 本発明の工程（4 a）または（4 b）において播種される間葉系幹細胞の数は特に制限はないが、通常、培養容器に対して 2×10^5 細胞/cm²～ 26×10^5 細胞/cm²であってよく、 8×10^5 細胞/cm²～ 13×10^5 細胞/cm²が好ましい。
- [0053] 間葉系幹細胞の培養条件には特に限定はなく、間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料の培養条件と同様であってよい。通常の細胞培養条件を採用できる。
- [0054] 培養中は適切な間隔で培地の交換を実施することが好ましい。培地の交換は、培地の全量交換、培地の一部交換、培地の追加およびそれらの組み合わせなどが挙げられる。本発明の好適な態様において、培養を開始した日から2又は3日ごとに同じ組成の培地で培地の全量交換を行いながら培養される。

[0055] 培養期間は例えば1~14日間、好ましくは1~8日間培養される。この培養により、間葉系幹細胞の増殖が開始される。

[0056] 本発明の工程(5a)または(5b)において、細胞外マトリクスタンパク質または細胞外マトリクスタンパク質の部分ペプチドを介して培養容器上で増殖した間葉系幹細胞は公知の手段で回収される。回収手段は、本発明の工程(2a)または(2b)に記載の方法と同様であってよい。

[0057] 以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、これらは単なる例示であって本発明はこれらに限定されない。

実施例

[0058] 実施例1: Vitronectinによる間葉系幹細胞(MSC)製造促進効果の検討

精製技術の限界のため、骨髄から分離された骨髄単核球(MNC)には僅かに間葉系幹細胞(MSC)が混入する。本実施例では無血清培地を用いてMNCからMSCを製造する方法を検証する。骨髄単核球(MNC)(Lonza)を、下記の播種用培地を用いて起眠した。Fibronectin(Sigma)またはVitronectin(wako)を用いてそれぞれ1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度でコーティングされた24ウェルプレートに 2.6×10^6 細胞/ウェルの濃度で上記細胞を播種し、37°C、5%CO₂条件下で培養した。播種した翌日に播種用培地でプレート中の培地を全量交換し、播種後3日目及び5日目には、プレート中の培地量の20%に相当する量の播種用培地をさらに添加した。

播種用培地: StemFit(登録商標)AK03N培地(味の素(株))A液、StemFit(登録商標)AK03N培地(味の素(株))B液、3 ng/mL bFGF(peprotech)、10 μM SB431542(Stemgent)、1/100 Lipid Concentrate(ライフテクノロジーズ)、10 nM Dexamethasone(Sigma-Aldrich)、10 ng/mL PDGF-BB(富士フィルム和光純薬)、1 mM Lithium Chloride(Sigma-Aldrich)

図1に播種後5日目の細胞の写真を示す。Vitronectinでコーティングされたウェルプレートでは、Fibronectinでコーティングされたウェルプレートよりも細胞の凝集体が多く形成された。

播種後7日目に凝集体を回収し、下記の増殖用培地を用いて細胞を再播種し

た。具体的には、培養上清を回収した後、DPBS(ナカライテスク)をプレートに添加し、ピペティングを行うことによって凝集体をプレートから剥離し、DPBSと共に凝集体を全て回収した。その後、回収した培養上清とDPBSをまとめて遠心して凝集体のみを回収した。増殖用培地で回収した凝集体を再懸濁することによって、凝集体を単一細胞に解離させた。Fibronectin (Sigma)、Vitronectin (wako) 及びiMatrix-511(ニッピ)を用いて、Fibronectin及びVitronectinは $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度、iMatrix-511は $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度でそれぞれコーティングされた24ウェルプレートに回収した細胞の全量を播種し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 条件下で培養した。その後、細胞がサブコンフルエントとなるまで2~3日毎に増殖用培地でプレート中の培地を全量交換した。

増殖用培地：StemFit (登録商標) AK03N培地 (味の素(株)) A液、 $1/4$ StemFit (登録商標) AK03N培地 (味の素(株)) B液、StemFit (登録商標) AK03N培地 (味の素(株)) C液、 $1/100$ Lipid Concentrate(ライフテクノロジーズ)、 10 nM Dexamethasone(Sigma-Aldrich)、 10 ng/mL PDGF-BB(富士フィルム和光純薬)、 1 mM Lithium Chloride(Sigma-Aldrich)

細胞がサブコンフルエントとなったことを確認し、播種後13日目に継代を行い、細胞数を測定した。図2に細胞数の測定結果を示す。また、図3に細胞の写真を示す。再播種において培養容器をコーティングする細胞外マトリクスの違いは得られる細胞数に影響しないことが分かった。

以上の結果から、細胞の播種時にVitronectinでコーティングされた培養容器を使用した場合、Fibronectinでコーティングされた培養容器を使用する場合よりも、得られる細胞凝集体の数およびその後の再播種によって得られる細胞数が多いことが分かった。

さらに、Vitronectinでコーティングされたプレートから剥離された細胞を拡大培養し、表面抗原解析を実施した。FACSを用いて、MSCポジティブマーカーを3種類(CD105、CD90、CD73)、MSCネガティブマーカーを2種類(CD45、CD34)の表面抗原解析を実施した。表1に解析結果を示す。得られた細胞は、CD105、CD90、CD73がポジティブ、CD45、CD34はネガティブであり、MSCであるこ

とが確認できた。

[0059] [表1]

		無血清培地 +Vitronectinで 単離したMSC	一般的なMSC
MSCマーカー	CD105	+	+
	CD90	+	+
	CD73	+	+
血球マーカー	CD34	-	-
	CD45	-	-

[0060] 実施例2 : Vitronectinの種類によるMSC製造促進効果の差異の検討

MNC (Lonza) を、下記の播種用培地 (無血清) を用いて起眠し、Vitronectin (20-398 aa) (wako) (配列番号: 1 のアミノ酸番号 1 ~ 379 に対応する)、Vitronectin(VTN-N, 62-478 aa) (ライフテクノロジーズ) (配列番号: 1 のアミノ酸番号 43 ~ 459 に対応する) 及び Vitronectin (Full length, 20-478 aa) (Sigma) (配列番号: 1 に対応する) を用いてそれぞれ $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度でコーティングした24ウェルプレートに 2.6×10^6 細胞/ウェルの濃度で上記細胞を播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下で培養した。また、Vitronectin(20-398 aa) (wako) 及び Synthemax II (CORNING) を用いてそれぞれ $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 及び $5.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 濃度でコーティングした24ウェルプレートに 1.6×10^6 細胞/ウェルの濃度で細胞を播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 条件下で培養した。Synthemax II は RGD モチーフとフランキング配列を含むビトロネクチンベースの合成ペプチドである。播種した翌日に播種用培地でプレート中の培地を全量交換し、播種後3日目及び5日目には、プレート中の培地量の20%に相当する量の播種用培地をさらに添加した。

播種用培地: StemFit (登録商標) AK03N培地 (味の素(株)) A液, 1/4 StemFit (登録商標) AK03N培地 (味の素(株)) B液, 3 ng/mL bFGF(peprotech), 10 μM SB431542(Stemgent), 1/100 Lipid Concentrate(ライフテクノロジーズ), 10 nM Dexamethasone(Sigma-Aldrich), 10 ng/mL PDGF-BB(富士フィルム和光純薬), 1 mM Lithium Chloride(Sigma-Aldrich)

播種後7日目に凝集体を回収し、下記の増殖用培地を用いて細胞を再播種し

た。具体的には、培養上清を回収した後、DPBS(ナカライテスク)をプレートに添加し、ピペティングを行うことによって凝集体をプレートから剥離し、DPBSと共に凝集体を全て回収した。その後、回収した培養上清とDPBSをまとめて遠心して凝集体のみを回収した。増殖用培地で回収した凝集体を再懸濁することによって、凝集体を単一細胞に解離させた。24ウェルプレートに回収した細胞の全量を播種し、37℃、5%CO₂条件下で培養した。その後、細胞がサブコンフルエントとなるまで2~3日毎に増殖用培地でプレート中の培地を全量交換した。

増殖用培地：StemFit（登録商標） AK03N培地（味の素(株)）A液，1/4 StemFit（登録商標） AK03N培地（味の素(株)）B液，StemFit（登録商標） AK03N培地（味の素(株)）C液，1/100 Lipid Concentrate(ライフテクノロジーズ)，10 nM Dexamethasone(Sigma-Aldrich)，10 ng/mL PDGF-BB(富士フィルム和光純薬)，1 mM Lithium Chloride(Sigma-Aldrich)，0.2 μg/mL iMatrix 511(ニッピ)

細胞がサブコンフルエントとなったことを確認し、播種後13及び12日目に継代を行い、細胞数を測定した。図4にVitronectin (20-398 aa) (wako)、Vitronectin (VTN-N, 62-478aa) (ライフテクノロジーズ)及びVitronectin (Full length, 20-478 aa) (Sigma)を用いた場合の細胞数の測定結果を示す。MNCの播種時にいずれのビトロネクチンを用いてもMSCを製造できたが、Vitronectin (20-398 aa) (wako) が最も効率よくMNCからMSCを製造できた。図5にVitronectin (20-398 aa) (wako) 及びSynthemax II(CORNING)を用いた場合の細胞数の測定結果を示す。MNCの播種時にSynthemax II(CORNING)を用いても、効率よくMNCからMSCを製造できた。

[0061] 実施例3：TGFβ受容体阻害剤によるMSC製造促進効果の検討

MNC (Lonza) を、下記の播種用培地(1)または(2)を用いて起眠した。Vitronectin (VTN-N, 62-478 aa) (ライフテクノロジーズ)を用いて1.5 μg/cm²の濃度でコーティングした24ウェルプレートに2.6×10⁶細胞/ウェルの濃度で上記細胞を播種し、37℃、5%CO₂条件下で培養した。播種した翌日に播種

用培地（1）または（2）でプレート中の培地を全量交換し、播種後3日目及び5日目には、プレート中の培地量の20%に相当する量の播種用培地（1）または（2）をさらに添加した。

播種用培地（1）（TGF β 阻害剤(-)）：StemFit（登録商標）AK03N培地（味の素(株)）A液、StemFit（登録商標）AK03N培地（味の素(株)）B液、3 ng/mL bFGF(peprotech)、1/100 Lipid Concentrate(ライフテクノロジーズ)、10 nM Dexamethasone(Sigma-Aldrich)、10 ng/mL PDGF-BB(富士フィルム和光純薬)、1 mM Lithium Chloride(Sigma-Aldrich) 播種用培地（2）（TGF β 阻害剤(+))：StemFit（登録商標）AK03N培地（味の素(株)）A液、StemFit（登録商標）AK03N培地（味の素(株)）B液、3 ng/mL bFGF(peprotech)、10 μ M SB431542(Stemgent)、1/100 Lipid Concentrate(ライフテクノロジーズ)、10 nM Dexamethasone(Sigma-Aldrich)、10 ng/mL PDGF-BB(富士フィルム和光純薬)、1 mM Lithium Chloride(Sigma-Aldrich)

播種後7日目に凝集体を回収し、下記の増殖用培地を用いて細胞を再播種した。具体的には、培養上清を回収した後、DPBS(ナカライテスク)をプレートに添加し、ピペティングを行うことによって凝集体をプレートから剥離し、DPBSと共に凝集体を全て回収した。その後、回収した培養上清とまとめて遠心して凝集体のみを回収した。増殖用培地で回収した凝集体を再懸濁することによって、凝集体を単一細胞に解離させた。24ウェルプレートに回収した細胞の全量を播種し、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下で培養した。その後、細胞がサブコンフルエントとなるまで2~3日毎に増殖用培地でプレート中の培地を全量交換した。

増殖用培地：StemFit（登録商標）AK03N培地（味の素(株)）A液、1/4 StemFit（登録商標）AK03N培地（味の素(株)）B液、StemFit（登録商標）AK03N培地（味の素(株)）C液、1/100 Lipid Concentrate(ライフテクノロジーズ)、10 nM Dexamethasone(Sigma-Aldrich)、10 ng/mL PDGF-BB(富士フィルム和光純薬)、1 mM Lithium Chloride(Sigma-Aldrich)、0.2 μ g/mL iMatrix 511(ニッピ)

細胞がサブコンフルエントとなったことを確認し、播種後15日目に継代を行い、細胞数を測定した。図6に細胞数の測定結果を示す。MNCの播種時に播種用培地にTGF β 阻害剤を含有させることで、効率よくMNCからMSCを製造できた。

[0062] 実施例4：TGF β 受容体阻害剤の種類によるMSC製造促進効果の差異の検討

MNC (Lonza) を、下記の播種用培地 (1)、(2) 及び (3) を用いて起眠した。Vitronectin (20-398 aa) (wako) を用いて1.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度でコーティングした24ウェルプレートに 2.6×10^6 細胞/ウェルの濃度で上記細胞を播種し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%CO $_2$ 条件下で培養した。播種した翌日に播種用培地 (1)、(2) または (3) でプレート中の培地を全量交換し、播種後3日目及び5日目には、プレート中の培地量の20%に相当する量の播種用培地 (1)、(2) または (3) をさらに添加した。

播種用培地 (1) : StemFit (登録商標) AK03N培地 (味の素(株)) A液、1/4 StemFit (登録商標) AK03N培地 (味の素(株)) B液、3 ng/mL bFGF(peprotech)、10 μM SB431542(Stemgent)、1/100 Lipid Concentrate(ライフテクノロジーズ)、10 nM Dexamethasone(Sigma-Aldrich)、10 ng/mL PDGF-BB(富士フィルム和光純薬)、1 mM Lithium Chloride(Sigma-Aldrich)

播種用培地 (2) : StemFit (登録商標) AK03N培地 (味の素(株)) A液、1/4 StemFit (登録商標) AK03N培地 (味の素(株)) B液、3 ng/mL bFGF(peprotech)、0.5 μM A-83-01(wako)、1/100 Lipid Concentrate(ライフテクノロジーズ)、10 nM Dexamethasone(Sigma-Aldrich)、10 ng/mL PDGF-BB(富士フィルム和光純薬)、1 mM Lithium Chloride(Sigma-Aldrich)

播種用培地 (3) : StemFit (登録商標) AK03N培地 (味の素(株)) A液、1/4 StemFit (登録商標) AK03N培地 (味の素(株)) B液、3 ng/mL bFGF(peprotech)、0.5 μM LDN-193189(Stemgent)、1/100 Lipid Concentrate(ライフテクノロジーズ)、10 nM Dexamethasone(Sigma-Aldrich)、10 ng/mL PDGF-BB(富士フィルム和光純薬)、1 mM Lithium Chloride(Sigma-Aldrich)

播種後7日目に凝集体を回収し、下記の増殖用培地を用いて細胞を再播種し

た。具体的には、培養上清を回収した後、DPBS(ナカライテスク)をプレートに添加し、ピペッティングを行うことによって凝集体をプレートから剥離し、DPBSと共に凝集体を全て回収した。その後、回収した培養上清とDPBSをまとめて遠心して凝集体のみを回収した。増殖用培地で回収した凝集体を再懸濁することによって、凝集体を単一細胞に解離させた。24ウェルプレートに回収した細胞の全量を播種し、37°C、5%CO₂条件下で培養した。その後、細胞がサブコンフルエントとなるまで、2~3日毎に増殖用培地でプレート中の培地を全量交換した。

増殖用培地：StemFit（登録商標） AK03N培地（味の素(株)）A液、1/4 StemFit（登録商標） AK03N培地（味の素(株)）B液、StemFit（登録商標） AK03N培地（味の素(株)）C液、1/100 Lipid Concentrate(ライフテクノロジーズ)、10 nM Dexamethasone(Sigma-Aldrich)、10 ng/mL PDGF-BB(富士フィルム和光純薬)、1 mM Lithium Chloride(Sigma-Aldrich)、0.2 μg/mL iMatrix 511(ニッピ)

細胞がサブコンフルエントとなったことを確認し、播種後12日目に継代を行い、細胞数を測定した。図7に細胞数の測定結果を示す。TGFβ受容体阻害剤であるSB431542(ALK5阻害)、A-83-01(ALK4、ALK5、ALK7阻害)及びLDN-193189(ALK2、ALK3阻害)のいずれを用いても、効率よくMNCからMSCを製造できた。

[0063] 実施例5：脂肪組織からのMSC製造検討

C57BL/6Jマウス(11週齢、雄)から採取した精巢上体周囲脂肪組織をコラゲナーゼ処理し、下記の播種用培地(1)及び(2)を用いて細胞を得た。24ウェルプレートに 6.0×10^4 細胞/ウェルの濃度で上記細胞を播種し、37°C、5%CO₂条件下で培養した。なお、播種用培地(1)を用いて播種される細胞には、Vitronectin(VTN-N, 62-478 aa)(ライフテクノロジーズ)を用いて1.5 μg/cm²の濃度でコーティングした24ウェルプレートを使用した。播種した翌日及び2日目に播種用培地(1)または(2)でプレート中の培地を全量交換した。

播種用培地（1）：StemFit（登録商標） AK03N培地（味の素(株)）A液、1/4 StemFit（登録商標） AK03N培地（味の素(株)）B液、3 ng/mL bFGF(peprotech)、10 μ M SB431542(Stemgent)、1/100 Lipid Concentrate(ライフテクノロジー)、10 nM Dexamethasone(Sigma-Aldrich)、10 ng/mL PDGF-BB(富士フィルム和光純薬)、1 mM Lithium Chloride(Sigma-Aldrich)

播種用培地（2）：DMEM培地（sigma）、10% 牛胎児血清（ライフテクノロジー）

細胞がサブコンフルエントとなったことを確認し、播種後5日目に継代を行い、細胞数を測定した。図8に細胞数の測定結果を示す。図9に細胞の写真を示す。TGF β 受容体阻害剤を含む培地及びビトロネクチンを用いることで、効率よく脂肪組織からMSCを製造できた。

産業上の利用可能性

[0064] ビトロネクチンまたは間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下、無血清培地または異種由来成分不含培地中で間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料を培養することによって、生体由来細胞試料から間葉系幹細胞を効率的に製造できる。本方法を採用することによって、得られた間葉系幹細胞はそのまま再生医療用の細胞ソースとして使用することができる。本出願は、日本で出願された特願2019-156537（出願日：令和1年8月29日）および特願2020-012333（出願日：令和2年1月29日）を基礎としており、その内容はすべて本明細書に包含されるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 以下の工程を含む、間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料から間葉系幹細胞を製造する方法。
- (1) ビトロネクチンまたは間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下、無血清培地中で間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料を培養する工程、
- (2) 間葉系幹細胞の細胞凝集体を回収する工程。
- [請求項2] ビトロネクチンまたは間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下における培養が、ビトロネクチンまたは間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドが固相化された培養容器上での培養である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 以下の工程をさらに含む、請求項1または2に記載の方法。
- (3) 回収された細胞凝集体を解離させる工程、
- (4) 細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下、無血清培地中で、解離した間葉系幹細胞を培養する工程、
- (5) 細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドを介して培養容器上で増殖した間葉系幹細胞を回収する工程。
- [請求項4] 細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下における培養が、細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドが固相化された培養容器上での培養である、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] ビトロネクチンの部分ペプチドがRGDドメインを含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] ビトロネクチンの部分ペプチドがさらにソマトメジンBドメインを含む、請求項5に記載の方法。
- [請求項7] ビトロネクチンの部分ペプチドが配列番号：1で表されるアミノ酸

配列のアミノ酸番号1～379からなるポリペプチドである、請求項6に記載の方法。

[請求項8] 工程(1)における無血清培地がTGF- β 受容体阻害剤を含む、請求項1～7のいずれか1項に記載の方法。

[請求項9] 以下の工程を含む、間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料から間葉系幹細胞を製造する方法。

(1) ビトロネクチンまたは間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下、異種由来成分不含培地中で間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料を培養する工程、

(2) 間葉系幹細胞の細胞凝集体を回収する工程。

[請求項10] ビトロネクチンまたは間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下における培養が、ビトロネクチンまたは間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドが固相化された培養容器上での培養である、請求項9に記載の方法。

[請求項11] 以下の工程をさらに含む、請求項9または10に記載の方法。

(3) 回収された細胞凝集体を解離させる工程、

(4) 細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下、異種由来成分不含培地中で、解離した間葉系幹細胞を培養する工程、

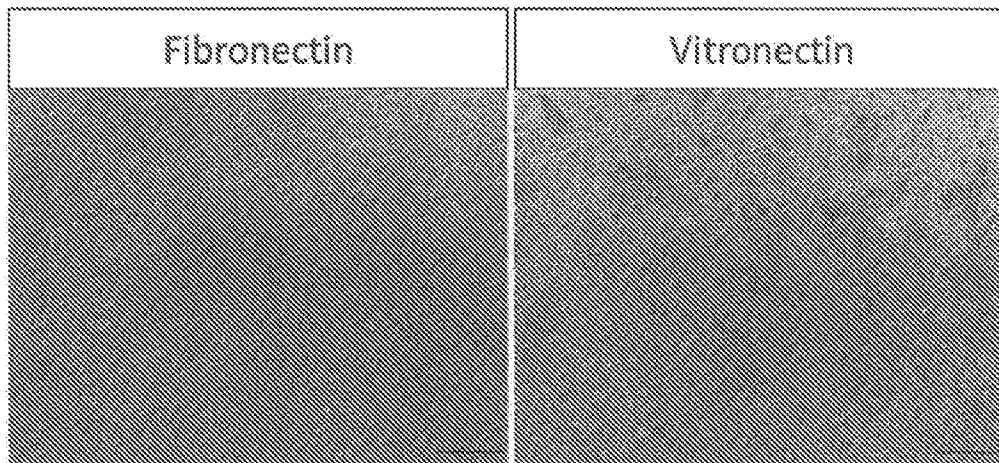
(5) 細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドを介して培養容器上で増殖した間葉系幹細胞を回収する工程。

[請求項12] 細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドの存在下における培養が、細胞外マトリクスタンパク質または間葉系幹細胞を接着できるその部分ペプチドが固相化された培養容器上での培養である、請求項11に記載の方法。

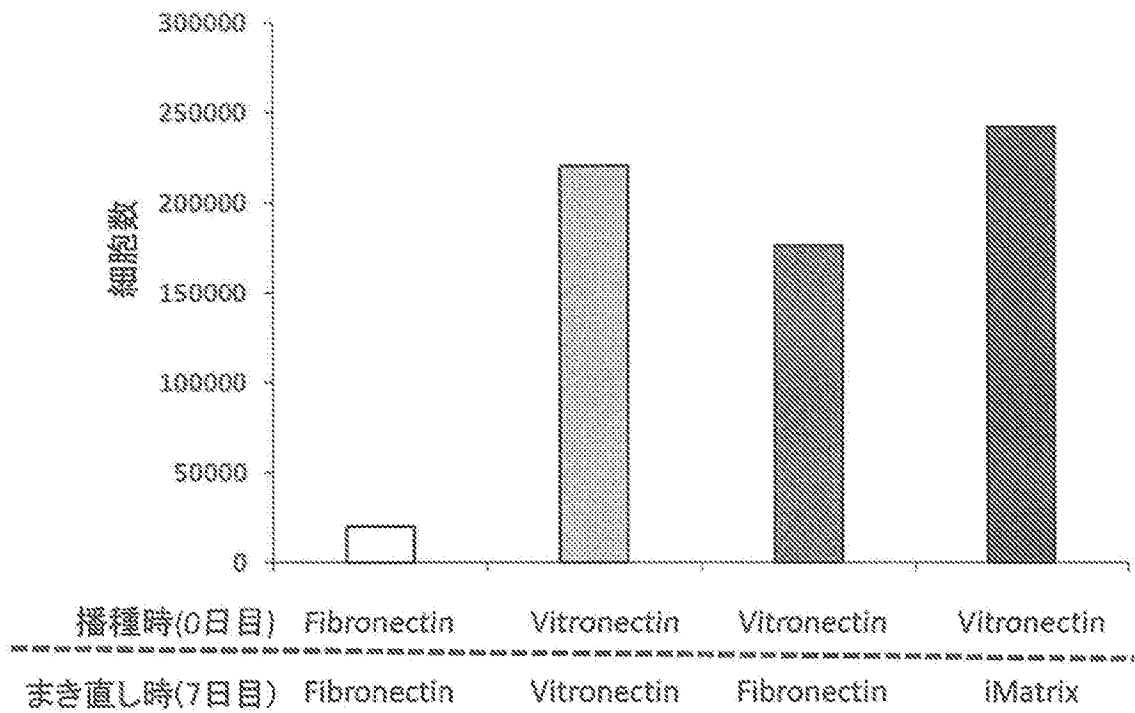
[請求項13] ビトロネクチンの部分ペプチドがRGDドメインを含む、請求項9～12のいずれか1項に記載の方法。

- [請求項14] ビトロネクチンの部分ペプチドがさらにソマトメジンBドメインを含む、請求項13に記載の方法。
- [請求項15] ビトロネクチンの部分ペプチドが配列番号：1で表されるアミノ酸配列のアミノ酸番号1～379からなるポリペプチドである、請求項14に記載の方法。
- [請求項16] 工程（1）における異種由来成分不含培地がTGF- β 受容体阻害剤を含む、請求項9～15のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項17] 異種由来成分不含培地が同種血清を含む、請求項9～16のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項18] 同種血清が自己血清である、請求項17に記載の方法。
- [請求項19] 間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料が骨髓由来細胞である、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項20] 培養される骨髓由来細胞の細胞数が $0.5 \times 10^5 \sim 25 \times 10^5$ 細胞/cm²である、請求項19に記載の方法。
- [請求項21] 骨髓由来細胞の培養期間が4日～14日である、請求項19または20に記載の方法。
- [請求項22] 間葉系幹細胞を含む生体由来細胞試料が脂肪組織由来細胞である、請求項1～18のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項23] 培養される脂肪組織由来細胞の細胞数が $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ 細胞/cm²である、請求項22に記載の方法。
- [請求項24] 脂肪組織由来細胞の培養期間が1日～14日である、請求項22または23に記載の方法。

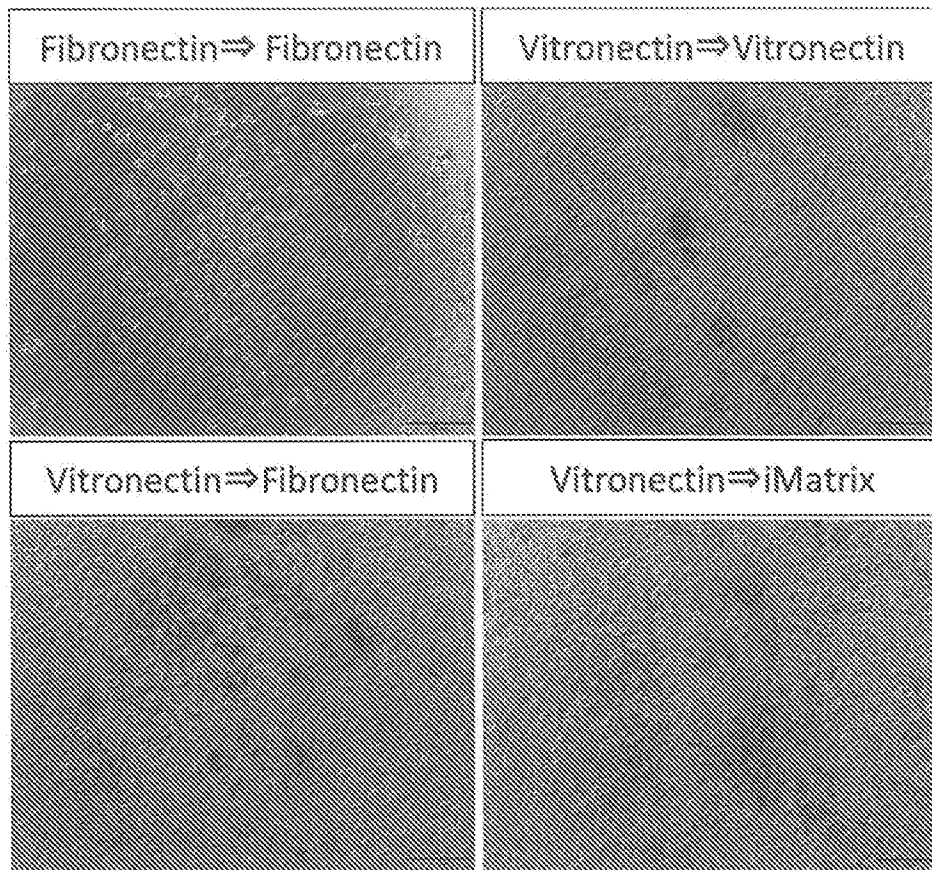
[図1]



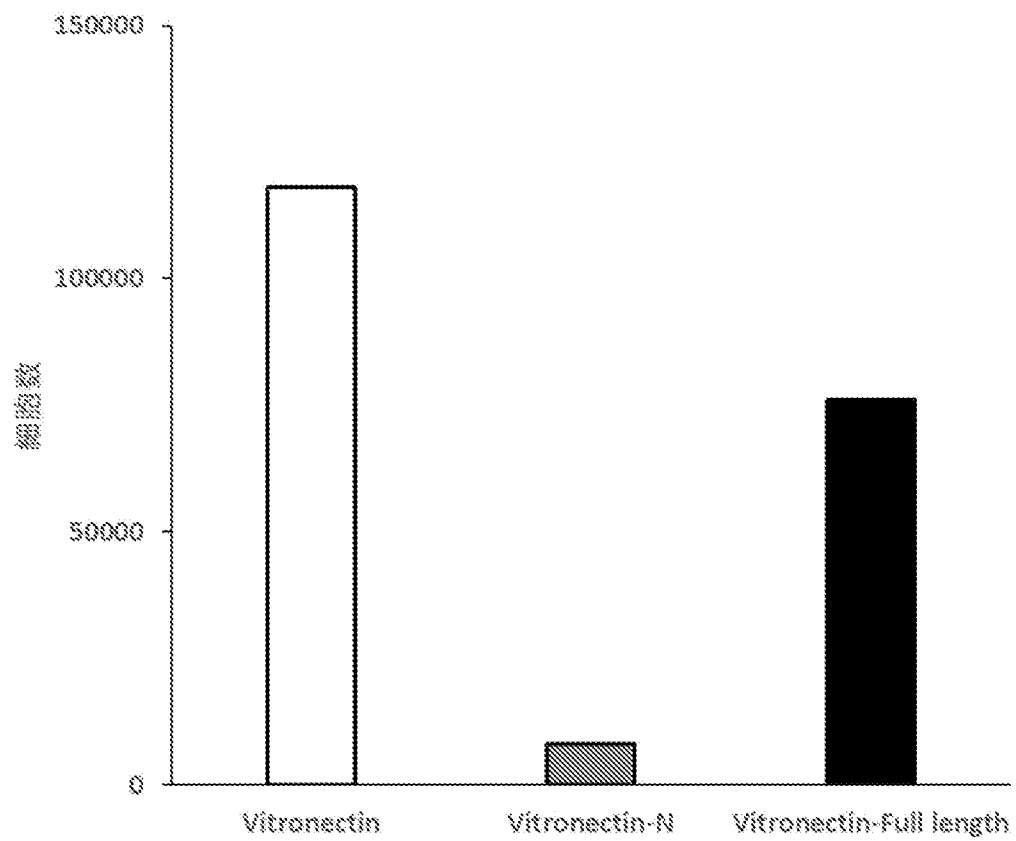
[図2]



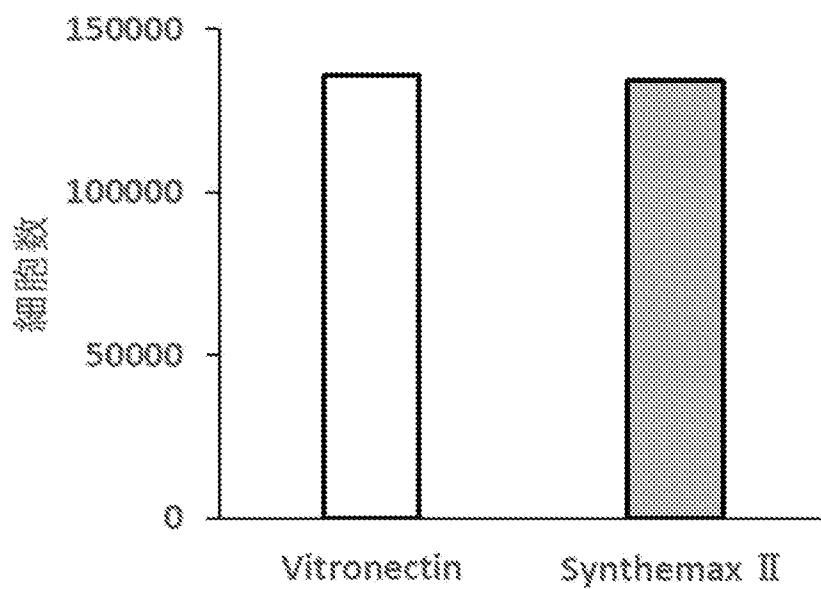
[図3]



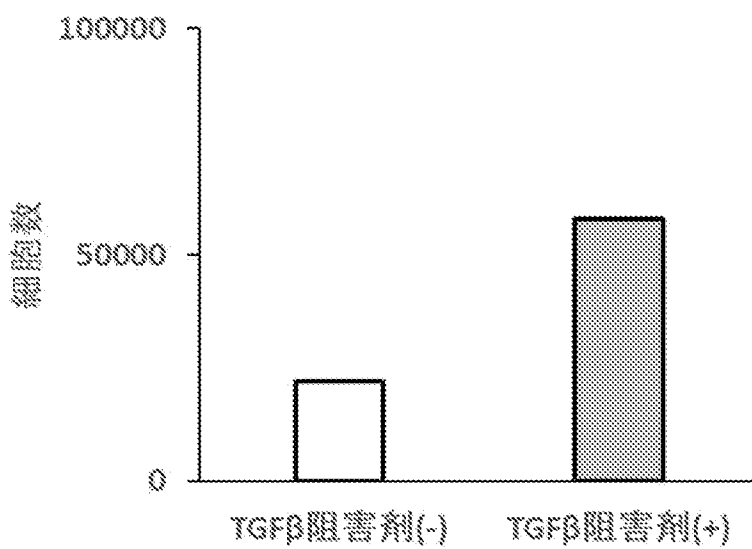
[図4]



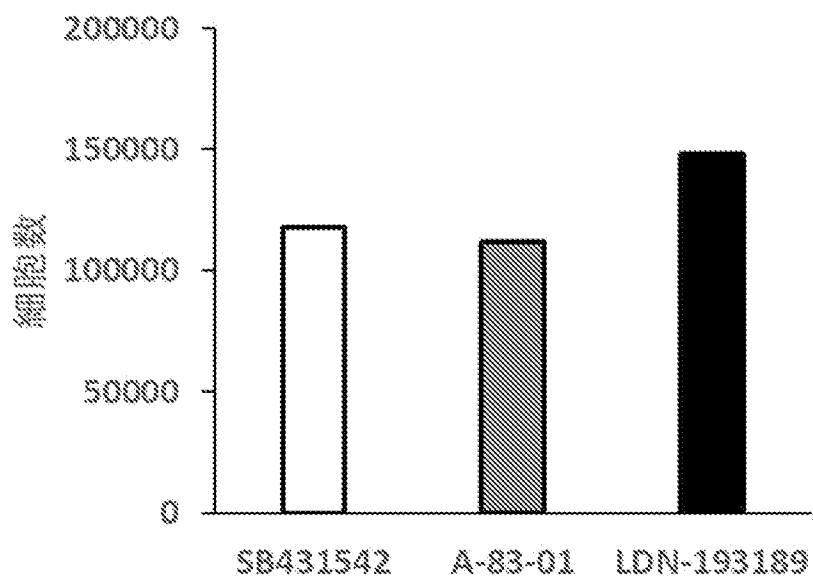
[図5]



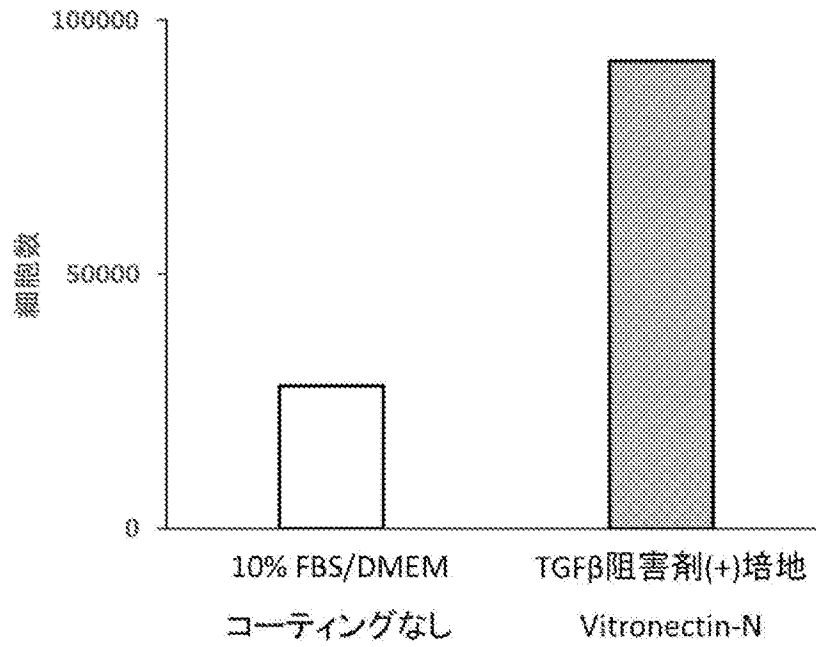
[図6]



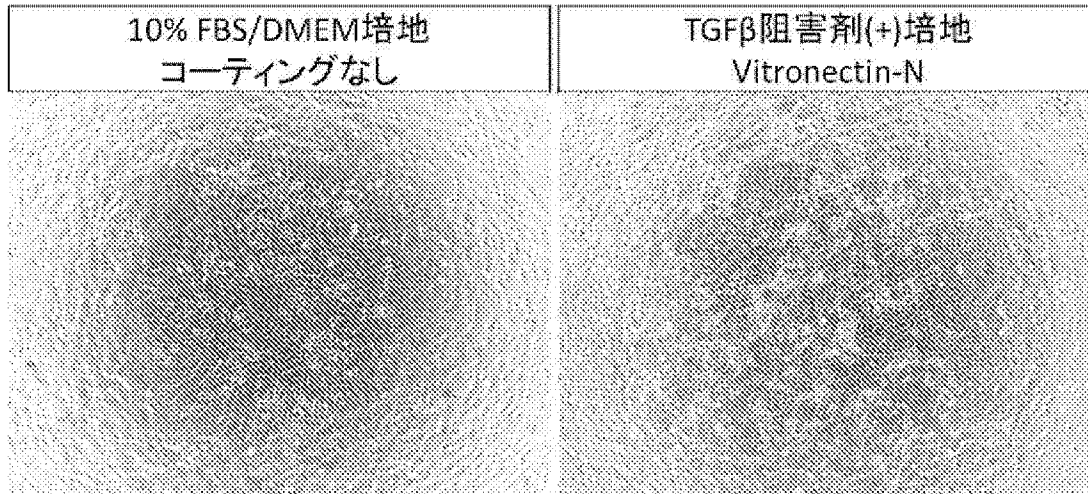
[図7]



[図8]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/032514

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 C07K 14/78(2006.01)i; C12N 5/0775(2010.01)i
 FI: C12N5/0775 ZNA; C07K14/78
 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)
 C07K14/78; C12N5/0775

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	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2017/094879 A1 (TAKARA BIO INC.) 08.06.2017 (2017-06-08) in particular, claims 1-13, paragraphs [0029]-[0034], [0049]-[0050], examples	1-7, 9-15, 17-24
A	in particular, claims 1-13, paragraphs [0029]-[0034], [0049]-[0050], examples	8, 16
Y	JP 2017-506511 A (NATIONAL UNIVERSITY OF IRELAND, GALWAY) 09.03.2017 (2017-03-09) in particular, examples, fig. 1	1-7, 9-15, 17-24
A	in particular, examples, fig. 1	8, 16
Y	WO 2015/064661 A1 (FUJIFILM CORPORATION) 07.05.2015 (2015-05-07) in particular, claim 1, paragraph [0026]	6, 14
A	in particular, claim 1, paragraph [0026]	1-5, 7-13, 15-24
A	JP 2012-500792 A (ANTHROGENESIS CORPORATION) 12.01.2012 (2012-01-12) entire text	1-24

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 01 October 2020 (01.10.2020)	Date of mailing of the international search report 13 October 2020 (13.10.2020)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.
--	---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/032514

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2007-528702 A (ETHICON INC.) 18.10.2007 (2007-10-18) entire text	1-24
A	US 2012/0301962 A1 (THOMSON, J. A.) 29.11.2012 (2012-11-29) entire text	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/032514

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2017/094879 A1	08 Jun. 2017	US 2018/0362933 A1 in particular, claims 1-13, paragraphs [0033]-[0038], [0053]-[0054], examples EP 3385368 A1 CN 108495924 A	
JP 2017-506511 A	09 Mar. 2017	US 2017/0044489 A1 in particular, examples, fig. 1 WO 2015/121471 A1 EP 3074505 A1 CN 106062179 A	
WO 2015/064661 A1	07 May 2015	US 2016/0272945 A1 in particular, claim 1, paragraph [0098] EP 3064576 A1 CN 105874058 A	
JP 2012-500792 A	12 Jan. 2012	US 2010/0047214 A1 entire text WO 2010/021756 A1 EP 2331109 A1 CN 102176919 A	
JP 2007-528702 A	18 Oct. 2007	US 2005/0019865 A1 entire text WO 2012/112576 A1 EP 1649013 A2 CA 2530255 A	
US 2012/0301962 A1	29 Nov. 2012	US 2015/0368610 A1 entire text	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C07K 14/78(2006.01)i; C12N 5/0775(2010.01)i FI: C12N5/0775 ZNA; C07K14/78		
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）） C07K14/78; C12N5/0775 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 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020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); CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN); Japio-GPG/FX		
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	WO 2017/094879 A1 (タカラバイオ株式会社) 08.06.2017 (2017-06-08) 特に、請求項1-13、[0029]-[0034]、[0049]-[0050]、実施例	1-7, 9-15, 17-24
A	特に、請求項1-13、[0029]-[0034]、[0049]-[0050]、実施例	8, 16
Y	JP 2017-506511 A (ナショナル ユニバーシティー オブ アイルランド, ゴールウェイ) 09.03.2017 (2017-03-09) 特に、実施例、図1	1-7, 9-15, 17-24
A	特に、実施例、図1	8, 16
Y	WO 2015/064661 A1 (富士フイルム株式会社) 07.05.2015 (2015-05-07) 特に、請求項1、[0026]	6, 14
A	特に、請求項1、[0026]	1-5, 7-13, 15-24
A	JP 2012-500792 A (アンスロジェネシス コーポレーション) 12.01.2012 (2012-01-12) 全文	1-24
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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抵触するものではなく、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 01.10.2020	国際調査報告の発送日 13.10.2020	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員（特許庁審査官） 伊達 利奈 4N 3960 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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 2007-528702 A (エチコン、インコーポレイテッド) 18.10.2007 (2007 - 10 - 18) 全文	1-24
A	US 2012/0301962 A1 (THOMSON J.A.) 29.11.2012 (2012 - 11 - 29) 全文	1-24

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b. 国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c. 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2. さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/032514

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2017/094879	A1	08.06.2017	US	2018/0362933	A1	
				特に、請求項1-13、 [0033]-[0038]、 [0053]-[0054]、 実施例			
				EP	3385368	A1	
				CN	108495924	A	

JP	2017-506511	A	09.03.2017	US	2017/0044489	A1	
				特に、実施例、図1			
				WO	2015/121471	A1	
				EP	3074505	A1	
				CN	106062179	A	

WO	2015/064661	A1	07.05.2015	US	2016/0272945	A1	
				特に、請求項1、[0098]			
				EP	3064576	A1	
				CN	105874058	A	

JP	2012-500792	A	12.01.2012	US	2010/0047214	A1	
				全文			
				WO	2010/021756	A1	
				EP	2331109	A1	
				CN	102176919	A	

JP	2007-528702	A	18.10.2007	US	2005/0019865	A1	
				全文			
				WO	2012/112576	A1	
				EP	1649013	A2	
				CA	2530255	A	

US	2012/0301962	A1	29.11.2012	US	2015/0368610	A1	
				全文			
