(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
2013 年 10 月 3 日(03.10.2013)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2013/146972 A1

(51) 国際特許分類:
C12Q 1/02 (2006.01) *C12N 5/0775* (2010.01)
C12N 15/115 (2010.01) *C12N 5/0789* (2010.01)
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 5/079* (2010.01)
C12N 5/074 (2010.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/059173

(22) 国際出願日: 2013 年 3 月 28 日(28.03.2013)

(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 2012-077207 2012 年 3 月 29 日(29.03.2012) JP

(71) 出願人: 公益財団法人神奈川科学技術アカデミー(KANAGAWA ACADEMY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [JP/JP]; 〒2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸三丁目２番１号 Kanagawa (JP). 一般社団法人オンチップ・セロミクス・コンソーシアム(ON-CHIP CELLOMICS CONSORTIUM) [JP/JP]; 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目３番１号 東京銀行協会ビル１５階 Tokyo (JP). 国立大学法人東京医科歯科大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION TOKYO MEDICAL AND DENTAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 安田 賢二(YASUDA Kenji); 〒1138510 東京都文京区湯島一丁目５番４５号 国立大学法人東京医科歯科大学内 Tokyo (JP). 寺薗 英之(TERAZONO Hideyuki); 〒2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸三丁目２番１号 財団法人神奈川科学技術アカデミー内 Kanagawa (JP). 金 賢徹(KIM Hyonchol); 〒2130012 神奈川県川崎市高津区坂戸三丁目２番１号 財団法人神奈川科学技術アカデミー内 Kanagawa (JP). 服部 明弘(HATTORI Akihiro); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目３番１号 一般社団法人オンチップ・セロミクス・コンソーシアム内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目８番７号 福岡ビル９階 阿部・井窪・片山法律事務所 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, IS, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, 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, 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, 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, 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 2013/146972 A1

(54) **Title**: METHOD FOR REGULATING FUNCTION OF CELL

(54) 発明の名称 : 細胞機能制御方法

(57) **Abstract**: The purpose of the present invention is to purify and collect a nucleic acid strand, such as a DNA strand, that can bind specifically to a target protein present on the surface of a given cell. For achieving the purpose, a nucleic acid strand, such as a DNA strand, is bound to a protein or the like present on the surface of a cell. In this manner, multiple different types of function-regulated cells are produced, and the cells are spatially arranged on a substrate to thereby allow the different cells to co-exist spatially.

(57) 要約: 特定の細胞表面の標的タンパク質に特異的に結合するＤＮＡ鎖等の核酸鎖を精製回収するために、細胞表面のタンパク質等にＤＮＡ鎖等の核酸鎖を結合させ、異なる複数種の機能を制御した細胞を作成し、これらを基板状に空間配置してことなる細胞を空間的に共存させる。

明　細　書

発明の名称 ： 細胞機能制御方法

技術分野

[0001] 本発明は、標的細胞表面の標的分子に特異的に結合する核酸鎖を用いて、細胞の機能を制御した細胞を製造し利用する方法に関する。

背景技術

[0002] 一本鎖核酸はその高次構造により、特定の標的分子に対して結合能を有することが、１９９０年にC. Tuerkらのグループによって報告（非特許文献１：Science, 249, 505-510 (1990)）され、それらの核酸は「アプタマー」と命名された。これまでイオンや糖鎖、タンパク質、生細胞表面上の分子に親和性のあるアプタマー、さらにはタンパク質のリン酸化状態を判別するアプタマーなどが先行研究により多数報告されている。アプタマーは大別して一本鎖ＤＮＡまたは一本鎖ＲＮＡから成るが、他にもペプチドアプタマーなどが報告されている。またそれらの中には人工塩基を用いたアプタマー、ポリエチレングリコールなどの有機分子により修飾されたアプタマーなど、使用目的に合わせた修飾アプタマーも開発されている。

[0003] これらアプタマーは、C. Tuerkらによって提案されたＳＥＬＥＸ（Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment）という、目的の核酸分子の選別と、それら分子の増幅という２つのステップによって選択される。

[0004] 一般的には、まず、10^{14}～10^{16}分子種の、両端が１８～３８塩基ほどのプライマー配列に挟まれた３０～１００塩基のランダム配列からなる全長が約６０～１４０塩基の核酸プールを準備する。次に、この核酸プールから、標的分子に親和性をもつ配列を選別するが、この操作にはこれまで様々な方法が開発されている。一般に、標的分子のみを用いて親和性をもつ核酸を選別する場合、最終的に得られたアプタマーの中には、非標的分子にも親和性を持つ（抗体で言う“cross reactivity”）アプタマーが存在することも

珍しくない。そのため、用いることが想定される多種類の分子が混合されているようなサンプルにおいて、標的分子には親和性をもつが非標的分子に親和性を持たないというアプタマーを、対向選別法（Counter Selection）によって選別することも行われている。

[0005] その例として、２０００年にScott D Seiwertらによって報告（非特許文献２：Chemistry & Biology, 7, 833-843 (2000)）された、同じタンパク質のリン酸化状態を１０倍の親和性の違いで識別するアプタマーがある。これは、はじめリン酸化状態のタンパク質ppERK2に結合するＲＮＡを選別し、同時に非標的タンパク質として、リン酸化されていないタンパク質ERK2に選別されたＲＮＡを導入して、それに結合しなかったＲＮＡを回収する、という目的のＲＮＡアプタマーを取得するものである。

[0006] 他方、ヒト幹細胞を用いた分化細胞の製造も、ヒトiPS細胞の発明によって大きく前進したが、そこでの課題として、化学物質による分化誘導で産生した分化細胞は、決して同一の細胞の集団ではなく、発現しているイオンチャンネルや細胞表面タンパク質等の物質が少しずつ異なるヘテロな細胞集団であり、現状におけるこのような分化誘導の手法での細胞分化制御についての限界が課題となっている。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Science, 249, 505-510 (1990)

非特許文献2：Chemistry & Biology, 7, 833-843 (2000)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] このように、従来の核酸から作成したアプタマーは、細胞表面の標識抗原物質の同定をするためのマーカーとして用いたり、あるいは、この標的物質をターゲットにした細胞精製のためのプローブとして用いられて来たが、in vitro 計測で用いる細胞の機能を制御するためのツールとしての利用はなさ

れていない。

[0009] また、分化誘導によって作成したヘテロな細胞集団の状態を制御する技術として、従来は、たとえばイオンチャンネルの機能制御には、特定のイオンチャンネルに結合する薬剤を用いてイオンチャンネルの動作、機能を制御することがなされて来たが、この手法を用いると、薬剤が添加された細胞培養液中のすべての細胞の状態を同一にブロックする等の制御となってしまい、異なる制御操作によって異なる状態に制御された細胞を同じ培養液中で用いることは難しかった。

[0010] あるいは、上記特定のイオンチャンネル等をブロックする薬物による同一の機能を発現している細胞の状態をそれぞれ異なる細胞表面のターゲット分子の機能制御手法によって同一培養環境内で、異なる機能を示す細胞として共存させることは難しかった。

[0011] したがって、本発明の目的は、従来の手法では困難であった、細胞の機能状態をさまざまな状態に制御して、この制御された細胞を同一の環境内で、異種の機能細胞として共存させて利用する方法を提案することである。

また、細胞培養中に、細胞の状態を変化させる手法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0012] したがって、本発明は、以下を提供する。

［１］（ｉ）標的細胞または標的細胞の集団を準備し、上記標的細胞の細胞表面に発現している標的分子に特異的に結合する核酸または核酸誘導体もしくは核酸修飾体を上記標的細胞の表面に発現している上記標的分子に特異的に結合させて、核酸修飾細胞を作製する工程、

（ｉｉ）上記標的細胞の表面に発現している上記標的分子に特異的に結合しなかった核酸を除去する工程、

（ｉｉｉ）上記工程（ｉｉ）からの核酸修飾細胞に対して、上記標的細胞の細胞表面に発現している、上記標的分子とは異なる標的分子に特異的に結合する核酸または核酸誘導体あるいは核酸修飾体を用いて、上記工程（ｉ）

および（ｉｉ）を行う工程、

（ｉｖ）上記工程（ｉ）および（ｉｉ）の操作、または上記工程（ｉｉｉ）の操作を繰り返すことによって作製した２種類以上の異なる核酸修飾細胞を、共通の細胞培養環境中の培養基板上で、上記各核酸修飾細胞の空間配置を制御して配列して細胞ネットワークを構築する工程、

を含む、細胞機能制御方法。

［２］さらに、

（ｖ）上記工程（ｉｖ）で培養している上記核酸修飾細胞の上記標的分子に特異的に結合する上記核酸または上記核酸誘導体もしくは上記核酸修飾体を分解させる核酸分解酵素を上記細胞培養環境中に導入する工程、を含む、上記［１］に記載の方法。

［３］上記核酸が一本鎖核酸またはアプタマーである、上記［１］または［２］に記載の細胞機能制御方法。

［４］上記標的細胞が、心筋細胞、神経細胞、線維芽細胞、グリア細胞、肝臓細胞、膵臓細胞、または幹細胞である、上記［１］～［３］のいずれかに記載の細胞機能制御方法。［５］上記［１］～［４］のいずれか一項に記載の細胞機能制御方法により作製された核酸修飾細胞を含む細胞ネットワーク。

［６］上記［５］に記載の細胞ネットワークを使用して細胞機能を検査する方法。

発明の効果

［0013］ 本発明によれば、特定の細胞の特定のターゲット分子に結合するＤＮＡ鎖等の核酸鎖を短時間で修飾する事で、機能制御を行った細胞を簡便に得ることができる。また、異なる機能を持った標的細胞を基板上に配置し、配置後に細胞表面の機能制御に用いたＤＮＡ鎖等の核酸鎖を任意の時間にヌクレアーゼにより除去することができる。

発明を実施するための形態

［0014］ 図１は本発明の細胞表面の特定の標的分子に特異的に結合する機能を有す

る１本鎖ＤＮＡ等の核酸または核酸誘導体あるいは核酸修飾体を用いた細胞機能制御方法を説明するフロー図である。本発明において対象とする細胞には、心筋細胞、神経細胞、線維芽細胞、グリア細胞、肝臓細胞、膵臓細胞、幹細胞等種々の細胞が含まれるがこれらに限定されない。また、本発明において対象とする細胞表面に発現する分子には、受容体タンパク質、表面抗原、イオンチャンネルタンパク質等種々の分子が存在するがこれらに限定されない。ここではイオンチャンネルタンパク質を例に説明する。すなわち、細胞１０１表面の標的イオンチャンネルタンパク質１０２１，１０２２，１０２３等の分子に特異的に結合する１本鎖ＤＮＡ等の核酸または核酸誘導体あるいは核酸修飾体１０３１，１０３２，１０３３を、それぞれの細胞に修飾して、標的イオンチャンネルタンパク質１０２１，１０２２，１０２３等の分子の機能を制御した後、これら異なる細胞１０１１，１０１２，１０１３を、同一の細胞培養基板１０４上に配置して、簡便に機能の異なる細胞を同一の細胞培養環境に空間分布を制御して配置する本発明の方法の過程の一例を示している。本明細書中、「核酸」は、ＤＮＡおよびＲＮＡを含むものとする。ここで核酸鎖については、主にＤＮＡ鎖を例に説明を行うが、対象はＤＮＡ鎖、ＲＮＡ鎖、または核酸誘導体あるいは核酸修飾体などのタンパク質分解酵素によって分解されないが核酸鎖分解酵素（ヌクレアーゼ）によって分解することができるものである。

[0015] なお、アプタマーのような核酸鎖は、生体中に存在する核酸分解酵素の作用を受けて分解しやすいことから、核酸鎖を修飾して核酸鎖に分解耐性を与える方法が種々開発されている（例：特開２０１０－１１５１７７）。例えば、ヌクレアーゼ耐性の向上については、SELEX法でアプタマーを得た後で化学修飾（例：フッ素化、PEG化、etc.）を施すという方法、あるいは予め核酸分子に化学修飾を施した人工核酸のライブラリの中からアプタマーを選別する方法等が開発されている（特開２００４－２３８３５３；ＷＯ２０１０／０２１３４４；Kuwahara et al., Nucleic Acids Res., (2008), 36, 4257）。あるいは、核酸鎖の主鎖の五員環や5'または3'末端での主鎖の一部をSやN

で置換することによってヌクレアーゼ耐性を付与することもできる（例：DNAやRNAの糖部分のO（酸素）をS（硫黄）で置き換えた4'-チオDNAやRNA）（松田　彰「ヌクレアーゼ抵抗性化学修飾核酸の開発研究」薬学雑誌, 2011, 131, 285-298. DOI:10.1248/yakushi.131.285）。

[0016] 本明細書中、「核酸誘導体」または「核酸修飾体」とは、ヌクレアーゼ耐性を向上させるための化学修飾が施された核酸鎖のことをいうものとする。

[0017] 本明細書中、ある核酸があるタンパク質またはその断片に「特異的に結合する」とは、その核酸が、そのタンパク質またはその断片の特定のアミノ酸配列に対して、他の（タンパク質またはその断片の）アミノ酸配列に対する親和性よりも、実質的に高い親和性で不可逆的に結合することを意味し、これは抗原抗体反応において抗体分子が抗原分子に結合する事と同意である。ここで、「実質的に高い親和性」とは、当業者に利用可能な所望の測定装置または方法によって、その特定のアミノ酸配列を他のアミノ酸配列から区別して検出することが可能な程度に高い親和性を意味し、典型的には、結合定数（K_a）が少なくとも10^7M^{-1}、好ましくは、少なくとも10^8M^{-1}、より好ましくは、10^9M^{-1}、さらにより好ましくは、$10^{10}M^{-1}$、$10^{11}M^{-1}$、$10^{12}M^{-1}$または
それより高い、例えば、最高で$10^{13}M^{-1}$またはそれより高いものであるような結合親和性を意味する。

[0018] 図１に示すように、本発明の方法によれば、細胞１０１の表面に発現した複数の異なる種類の分子１０２１，１０２２，１０２３に対してそれぞれ特異的に結合する核酸鎖（以降アプタマーと呼ぶ）１０３１，１０３２，１０３３を結合させて、機能が異なる細胞１０１１，１０１２，１０１３を作ることができる。ここで、本実施例では、細胞にそれぞれ１種類のアプタマーを結合させ、異なる一種類の細胞表面分子が機能制御された細胞を作成しているが、それぞれの細胞について別の種類の核酸鎖を用いて同様の工程を繰り返す事で、たとえば分子１０２１と１０２２にそれぞれ特異的に結合する核酸鎖を結合させて２つの分子をともに機能制御した細胞を作成して用いて

も良い。

[0019] 次に、この工程によって細胞１０１から作成した細胞１０１１，１０１２，１０１３をチップ１０４上に、たとえばそれぞれの種類の細胞を帯状に配置して異なる機能細胞の領域とこれらの境界が存在する細胞シートあるいは細胞ネットワークを作成することができる。また、本手法では、アプタマーの核酸分解酵素を添加することで、細胞の機能を制御していたアプタマーを分解して、細胞の機能をもとの状態に戻す事ができる。

[0020] このように本手法の特徴は同一のチップ１０４上に異なる機能制御を行われた細胞を共存させることができることにある。特定のイオンチャンネルを特異的にブロックする薬剤等を用いても、特定のイオンチャンネル分子のブロックは実現できるが、その場合には、この溶液と接するすべての細胞が等しくイオンチャンネルブロックをされてしまい、図１のチップ１０４に示したような、１つのチップ上に機能状態の異なる細胞を共存させることはできない。

[0021] 図１のチップ１０４では、細胞１０１１、１０１２、１０１３をシート状に分布させた状態を模式的に示したが、図２では、その他の細胞の配置技術の例として、図２（ａ）、（ｂ）、および（ｃ）では、心室筋型に分化した心筋細胞２０１１と、心筋細胞２０１１のK１イオンチャンネルに特異的に結合するアプタマーによってK１イオンチャンネルをブロックした膜電位が上昇して不安定化した心筋細胞２０１２を組み合わせて１細胞単位でネットワークを構築したものである。このように一般の心室筋細胞では豊富に発現しているK１イオンチャンネルをブロックする事で、擬似的にプルキンエ細胞あるいはＨｉｓ細胞のような細胞膜のインピーダンスが高く自律拍動能を持つ異なる特性を持った細胞２０１２を、同一の心室筋細胞２０１１から作り、かつ、同一の細胞ネットワークの中で擬似的に異種細胞として用いることができる。

[0022] 図３は、本手法を神経細胞ネットワークに用いたものである。神経細胞ネットワークにおいて細胞間の化学物質の伝導の機能を構成的に解明する事は

重要であるが、特定の分泌物質だけを伝達させることは難しかった。図３では、模式的に、本課題を解決する手法を説明する。たとえば結合した２つの神経細胞３０１、３０２について、その２つの細胞を結合するシナプス３０３の表面に存在する２つの伝達物質３０４、３０５を放出する機能を有しているとき、培養液中に伝達物質３０５をブロックするアプタマーを混入させて神経伝達の実験を行い、伝達物質３０４のみの伝達特性を計測した後、アプタマー分解酵素を導入することによって、本来、分泌されるはずであった伝達物質３０５がリリースされ、その応答を計測することができる。

[0023] 以上、本発明の例示的実施形態を説明したが、種々の変更、改変、および改良が当業者に容易に想起される。上記は、本発明の原理を例示的に示したものに過ぎず、当業者であれば、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、様々な改変を為し得る。

産業上の利用可能性

[0024] 本発明によれば細胞表面の標的分子に特異的に結合するＤＮＡ鎖等の核酸鎖を修飾する事で容易に異種細胞を得ることができるので、創薬、医療分野の研究発展に貢献することができる。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]細胞表面のさまざまな標的分子に特異的に結合するＤＮＡ鎖等の核酸鎖を用いて機能的に異種細胞を製作し、これを空間配置する手法の手順を示した模式図である。

[図2]アプタマーによるイオンチャンネルブロックによって異種心筋細胞を空間配置した例を示した図である。

[図3]神経細胞ネットワークを用いた例を示した模式図である。

符号の説明

[0026] １０１、１０１１、１０１２、１０１３…細胞

１０２１、１０２２、１０２３…細胞表面の標的分子

１０３１，１０３２，１０３３…標的分子に結合するＤＮＡ鎖等の核酸鎖

２０１１、２０１２…心筋細胞

３０１、３０２…神経細胞

３０３…シナプス結合

３０４、３０５…神経伝達物質

請求の範囲

[請求項1] （ｉ）標的細胞または標的細胞の集団を準備し、前記標的細胞の細胞表面に発現している標的分子に特異的に結合する核酸または核酸誘導体もしくは核酸修飾体を前記標的細胞の表面に発現している前記標的分子に特異的に結合させて、核酸修飾細胞を作製する工程、

（ｉｉ）前記標的細胞の表面に発現している前記標的分子に特異的に結合しなかった核酸を除去する工程、

（ｉｉｉ）前記工程（ｉｉ）からの核酸修飾細胞に対して、前記標的細胞の細胞表面に発現している、前記標的分子とは異なる標的分子に特異的に結合する核酸または核酸誘導体あるいは核酸修飾体を用いて、前記工程（ｉ）および（ｉｉ）を行う工程、

（ｉｖ）前記工程（ｉ）および（ｉｉ）の操作、または前記工程（ｉｉｉ）の操作を繰り返すことによって作製した２種類以上の異なる核酸修飾細胞を、共通の細胞培養環境中の培養基板上で、前記各核酸修飾細胞の空間配置を制御して配列して細胞ネットワークを構築する工程、

を含む、細胞機能制御方法。

[請求項2] さらに、

（ｖ）前記工程（ｉｖ）で培養している前記核酸修飾細胞の前記標的分子に特異的に結合する前記核酸または前記核酸誘導体もしくは前記核酸修飾体を分解させる核酸分解酵素を前記細胞培養環境中に導入する工程、を含む、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 前記核酸が一本鎖核酸またはアプタマーである、請求項１または２に記載の細胞機能制御方法。

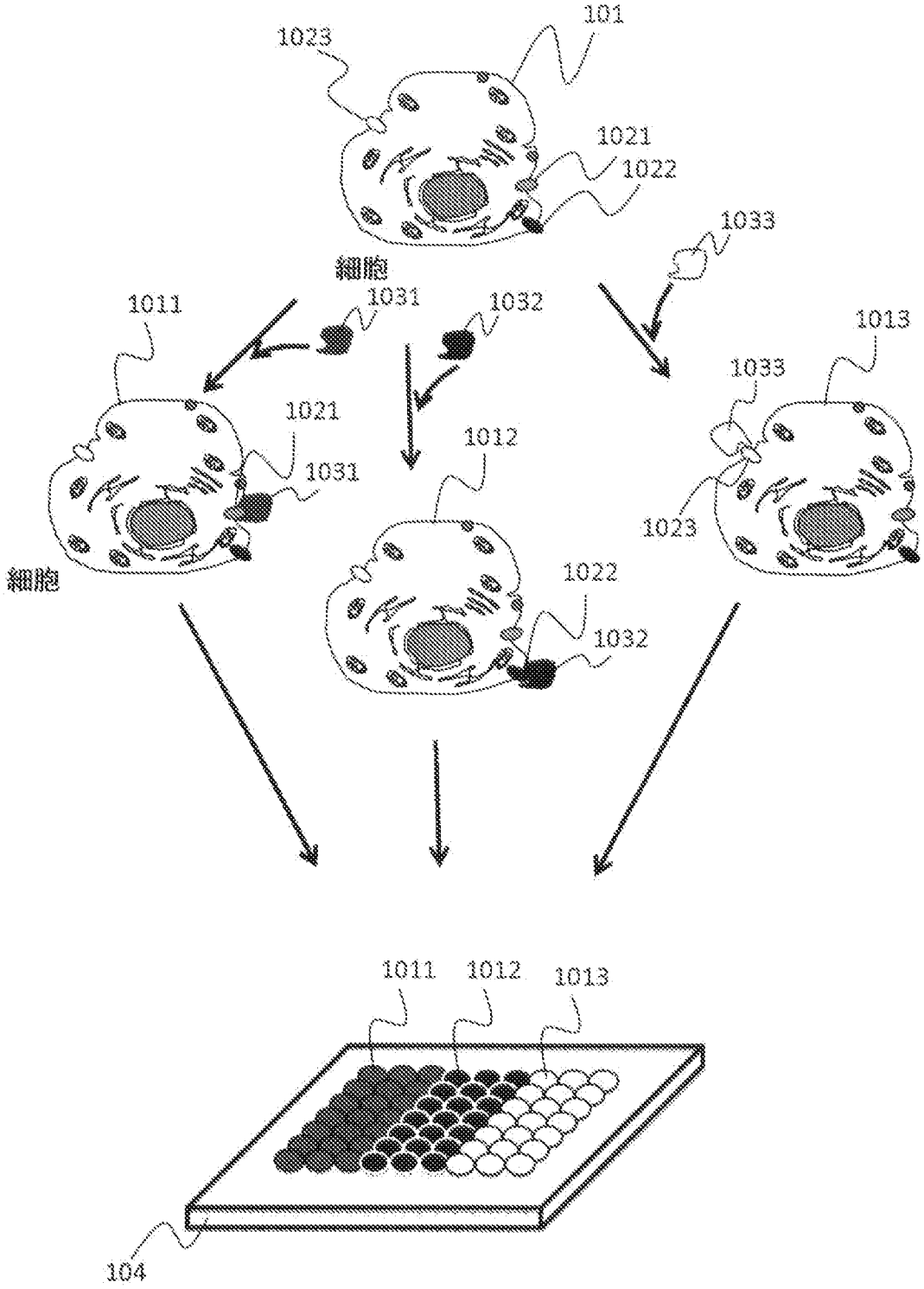
[請求項4] 前記標的細胞が、心筋細胞、神経細胞、線維芽細胞、グリア細胞、肝臓細胞、膵臓細胞、または幹細胞である、請求項１～３のいずれかに記載の細胞機能制御方法。

[請求項5] 請求項１～４のいずれか一項に記載の細胞機能制御方法により作製

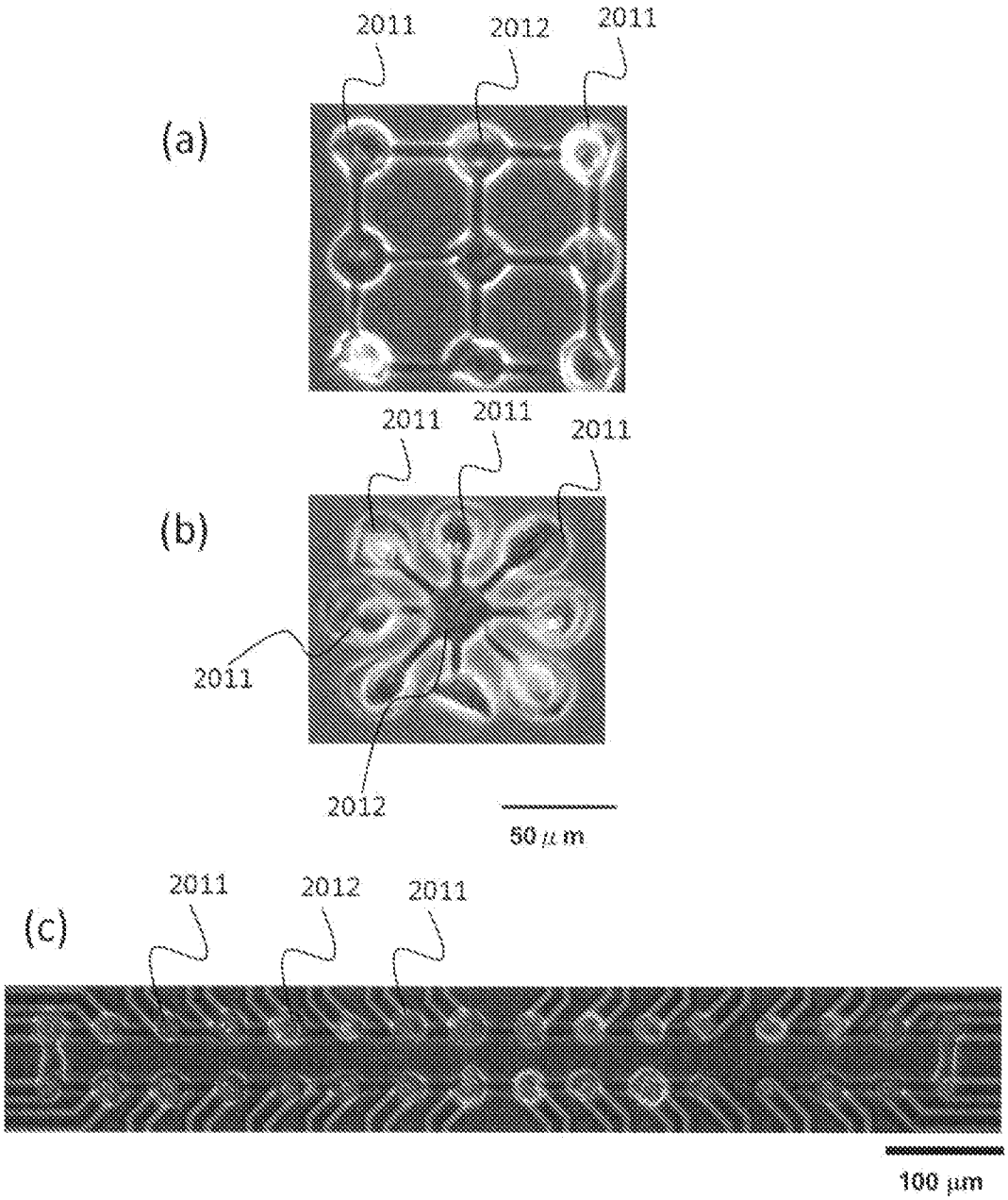
された核酸修飾細胞を含む細胞ネットワーク。

［請求項6］ 請求項５に記載の細胞ネットワークを使用して細胞機能を検査する方法。

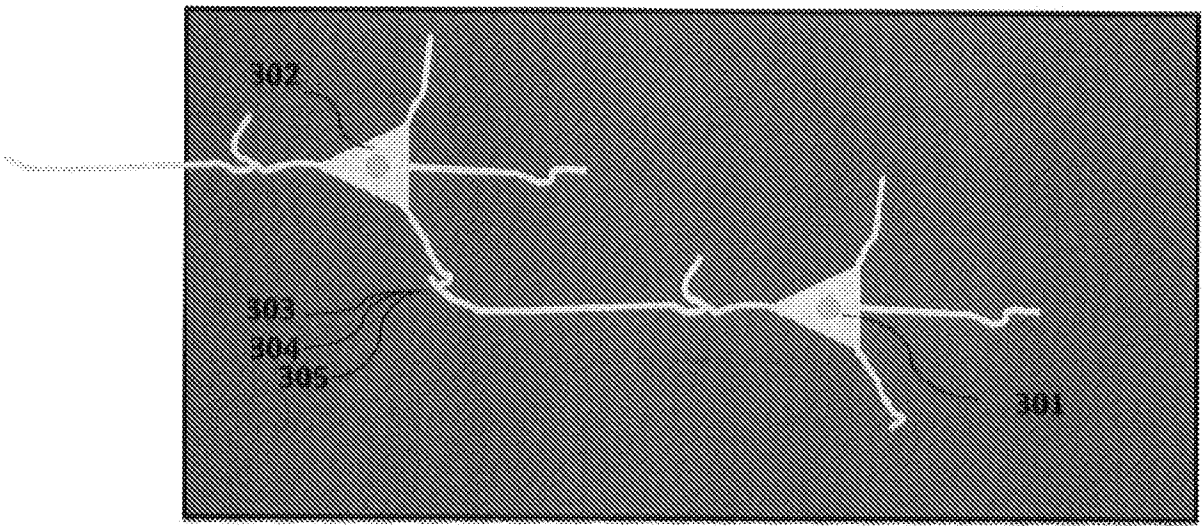
[図1]


101
1023
1021
1022
細胞
1033
1011
1031
1032
1013
1033
1021
1031
1012
1023
細胞
1022
1032
1011
1012
1013
104

[図2]


2011
2012
2011
(a)
2011
2011
2011
(b)
2011
2012
50 μm
2011
2012
2011
(c)
100 μm

[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/059173

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12Q1/02(2006.01)i, *C12N15/115*(2010.01)i, *C12N5/071*(2010.01)n, *C12N5/074*(2010.01)n, *C12N5/0775*(2010.01)n, *C12N5/0789*(2010.01)n, *C12N5/079*(2010.01)n
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12Q1/02, C12N15/115, C12N5/071, C12N5/074, C12N5/0775, C12N5/0789, C12N5/079

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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	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/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Kenji YASUDA, "On-chip Cellomics Technology for Drug Screening System Using Cardiomyocyte Cells from Human Stem Cell", Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 2010, vol.130, no.4, pages 545 to 557	1-6
A	Kenji YASUDA, "Development of on-chip cell sorting system for small number of target cells", Cytometry Research, 2007, vol.17, no.1, pages 51 to 57	1-6
A	JP 2008-5749 A (On-chip Biotechnologies Co., Ltd.), 17 January 2008 (17.01.2008), & US 2008/0003678 A1	1-6

☒ 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
19 June, 2013 (19.06.13)	02 July, 2013 (02.07.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/059173

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2008/108006 A1 (Onchip Cellomics Consortium), 12 September 2008 (12.09.2008), & US 2010/0092969 A1 & EP 2133418 A1	1-6
A	WO 2008/108004 A1 (Onchip Cellomics Consortium), 12 September 2008 (12.09.2008), & US 2010/0105104 A1 & EP 2130913 A1	1-6
A	WO 2011/105507 A1 (Kanagawa Academy of Science and Technology), 01 September 2011 (01.09.2011), & US 2013/0029407 A1	1-6
P,X	JP 2012-196197 A (Kanagawa Academy of Science and Technology), 18 October 2012 (18.10.2012), (Family: none)	1-6

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０５９１７３

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/02(2006.01)i, C12N15/115(2010.01)i, C12N5/071(2010.01)n, C12N5/074(2010.01)n, C12N5/0775(2010.01)n, C12N5/0789(2010.01)n, C12N5/079(2010.01)n

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12Q1/02, C12N15/115, C12N5/071, C12N5/074, C12N5/0775, C12N5/0789, C12N5/079

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	１９７１－２０１３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１３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）

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

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	安田 賢二, オンチップ・セロミクス・テクノロジーのヒト幹細胞由来心筋細胞を用いた創薬スクリーニングシステムへの展開 On-chip Cellomics Technology for Drug Screening System Using Cardiomyocyte Cells from Human Stem Cell, 薬学雑誌, 2010, Vol. 130, No. 4, p. 545-557	1-6

☑　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 １９．０６．２０１３	国際調査報告の発送日 ０２．０７．２０１３
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　３７６３ 濱田　光浩 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４４８

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	安田賢二, 微量細胞対応型オンチップセルソーターシステムの開発 Development of on-chip cell sorting system for small number of target cells, Cytometry Research, 2007, Vol. 17, No. 1, p. 51-57	1-6
A	JP 2008-5749 A (株式会社オンチップ・バイオテクノロジーズ) 2008.01.17, & US 2008/0003678 A1	1-6
A	WO 2008/108006 A1 (有限責任中間法人オンチップ・セロミクス・コンソーシアム) 2008.09.12, & US 2010/0092969 A1 & EP 2133418 A1	1-6
A	WO 2008/108004 A1 (有限責任中間法人オンチップ・セロミクス・コンソーシアム) 2008.09.12, & US 2010/0105104 A1 & EP 2130913 A1	1-6
A	WO 2011/105507 A1 (財団法人神奈川科学技術アカデミー) 2011.09.01, & US 2013/0029407 A1	1-6
P.X	JP 2012-196197 A (財団法人神奈川科学技術アカデミー) 2012.10.18, (ファミリーなし)	1-6