

(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  
2017年3月9日(09.03.2017)



(10) 国際公開番号  
WO 2017/038562 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 5/10 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)  
C12N 5/0735 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/074545
- (22) 国際出願日: 2016年8月23日(23.08.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2015-171230 2015年8月31日(31.08.2015) JP
- (71) 出願人: 学校法人東京女子医科大学(TOKYO WOMEN'S MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1628666 東京都新宿区河田町8-1 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 松浦 勝久(MATSUURA, Katsuhisa); 〒1628666 東京都新宿区河田町8番1号 学校法人東京女子医科大学内 Tokyo (JP). 清水 達也(SHIMIZU, Tatsuya); 〒1628666 東京都新宿区河田町8番1号 学校法人東京女子医科大学内 Tokyo (JP). 瀬田 博允(SETA, Hiroyoshi); 〒1628666 東京都新宿区河田町8番1号 学校法人東京女子医科大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 青木 篤, 外(AOKI, Atsushi et al.); 〒1058423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎

ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

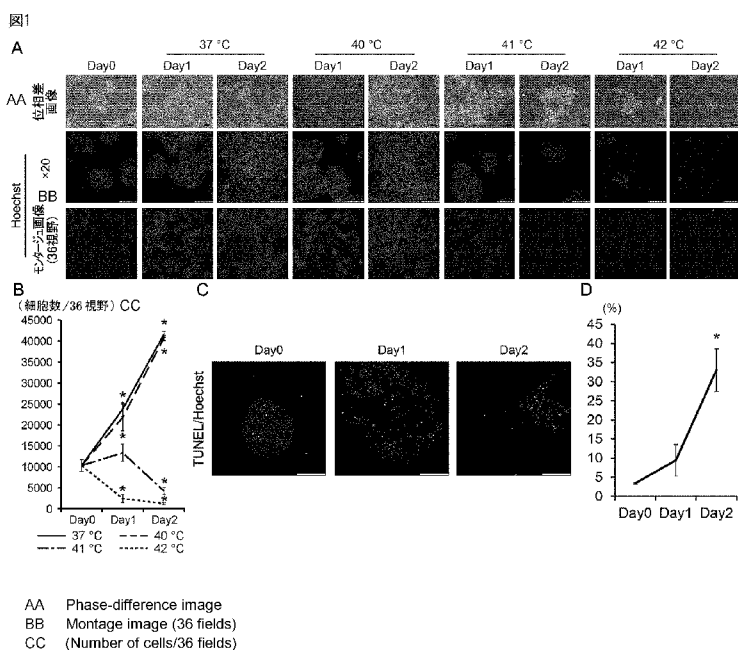
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR REDUCING PLURIPOTENT STEM CELLS, METHOD FOR PRODUCING CELL POPULATION HAVING REDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

(54) 発明の名称: 多能性幹細胞を減少させる方法、多能性幹細胞を減少させた細胞集団の製造方法



(57) Abstract: The present invention pertains to a method for culturing a cell population including pluripotent stem cells and differentiated cells derived from pluripotent stem cells at a temperature of 40.5°C or higher and reducing the pluripotent stem cells included in the cell population. The present invention also pertains to a method for reducing pluripotent stem cells from a cell population including pluripotent stem cells and differentiated cells derived from pluripotent stem cells, wherein the method includes a step for activating the TRPV-1 expressed in the pluripotent stem cells included in the cell population. The present invention makes it possible to reduce the pluripotent stem cells remaining in an undifferentiated state when inducing the differentiation of a pluripotent stem cell population.

(57) 要約: 本発明は、多能性幹細胞と多能性幹細胞由来の分化細胞とを含む細胞集団を、40.5°C以上の温度で培養し、前記細胞集団に含まれる前記多能性幹細胞を減少させる方法に関する。また、本発明は、多能性幹細胞と、多能性幹細胞由来の分化細胞とを含む細胞集団から、多能性幹細胞を減

少させる方法であって、前記細胞集団に含まれる前記多能性幹細胞に発現するTRPV-1を活性化する工程、を含む方法に関する。本発明により、多能性幹細胞集団を分化誘導した際に残存する未分化状態の多能性幹細胞を減少させることが可能となる。

WO 2017/038562 A1

## 明 細 書

発明の名称：

多能性幹細胞を減少させる方法、多能性幹細胞を減少させた細胞集団の製造方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、多能性幹細胞を減少させる方法に関する。また、多能性幹細胞を減少させた細胞集団の製造方法に関する。

### 背景技術

[0002] 近年、細胞を用いた治療技術の開発が活発化しており、国内外の多くの機関において臨床応用が試みられている。患者の生体から採取した細胞を生体外において培養し、再び患者本人に細胞を移植する方法、採取した細胞にある特定の遺伝子を導入して生体に戻す方法や、細胞をスキャフォールドと呼ばれる足場に播種し、三次元的に組織を構築して移植する方法など、様々な方法が開発されている。これらは再生医療分野の医療技術として用いられるものであり、従来の治療では根治が困難であった疾患に対しても治療できる可能性を秘めている。そのため、数多くの疾患に適用できる細胞を用いた根治治療技術の早期実用化が待ち望まれているところである。

[0003] 再生医療では、患者本人の生体から採取した組織や血液等より単離された細胞（自家細胞）、他人の生体から採取した組織や血液等より単離された細胞（他家細胞）、株化された細胞などが治療に用いられる。疾患部位や病態に応じて細胞種は適宜選択される。細胞移植を行う場合に問題となるのが免疫による拒絶反応である。自己の細胞とは異なる細胞（他家細胞）が移植される場合、通常、主要組織適合性遺伝子複合体（MHC）の型が一致せず、拒絶反応が起こり生着しない。一方、自家細胞を用いる場合、元々自分の細胞であるためMHCの型が一致し拒絶反応は起こらない。そのため、免疫拒絶の観点から考えると自家細胞を用いた再生医療の方が好ましいが、自家細胞を用いた場合は患者ごとに細胞又は組織を採取し、オーダーメイドで培養

等の処理を行わなければならない、莫大なコストを要する。一方で他家細胞を用いた治療であれば、あらかじめ必要とする細胞や組織を確保することが可能であり、移植が必要となった時に、保管しておいた他家細胞を用いることが出来、コストを低減させる観点からは他家細胞を用いた方が好ましい。この場合、移植した他家細胞が非移植者の体内で免疫拒絶を受けないようにするために、免疫抑制剤を用いることで免疫拒絶を回避することができる。

[0004] 再生医療に用いられる細胞種の中には、生体外の培養環境において、分裂・増殖しない、又はほとんど増殖しない細胞が存在する。心筋細胞や神経細胞などがそれにあたり、こうした細胞を再生医療に用いることは困難であった。しかし、胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）などの多能性幹細胞が発見されたことにより、分裂・増殖しないような細胞であっても、多能性幹細胞から分化誘導し、心筋細胞や神経細胞を作ることができるようになり、こうした細胞であっても供給可能となった。

[0005] ES細胞やiPS細胞などの多能性幹細胞は、生体を構成するほぼ全ての細胞へと分化できる性質を有している。また、分化前の未分化能を維持したES細胞やiPS細胞は、自己複製能を有していることから、基本的には無限に増殖させることが出来る。そのため、大量の細胞が必要とされる場合であっても、理論的には要求される細胞数まで多能性幹細胞を増殖させることができる。こうして得られた多能性幹細胞を任意の体細胞へと分化誘導させることで必要な細胞数を確保することが可能となった。

[0006] ES細胞やiPS細胞は、無限に増殖させることが出来、任意の体細胞へと分化誘導することが可能である一方、未分化能を維持したままの細胞を生体内へ移植すると、その多分化能のために、腫瘍の一種である奇形種（テラトーマ）を形成してしまう恐れがある。ES細胞やiPS細胞から分化誘導した体細胞集団に、未分化状態のES細胞やiPS細胞が残存していなければ問題無いが、未分化性を維持したままのES細胞やiPS細胞が体細胞集団に残ったまま生体内へ移植されてしまうとテラトーマを形成してしまう危険性があり、安全性の面から課題を抱えていた（非特許文献1）。そのため

、多能性幹細胞から分化誘導した細胞集団から、未分化状態の多能性幹細胞を減少させる技術が求められていた。

[0007] こうした課題を解決するために、分化誘導処理を行った細胞集団から未分化な多能性幹細胞を除去する又は減少させる方法として、セルソーターを用いた方法（非特許文献2）や、自殺遺伝子を組み込む方法（非特許文献3）、化学阻害剤（非特許文献4、非特許文献5）などが開発されている。しかし、セルソーターを用いる方法の場合、細胞表面の抗原を認識するための抗体を大量に用いなければならず、膨大なコストを要し、また、処理に時間がかかるなどの課題を抱えていた。また、自殺遺伝子を組み込む方法は、移植後においても遺伝子を組み込んだ細胞の安全性が不明であり、臨床応用については課題があった。また、化学阻害剤を用いる方法は、多能性幹細胞を除去する又は減少させる効率や安全性について課題があった。

#### 先行技術文献

#### 特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開第13／187359号

#### 非特許文献

[0009] 非特許文献1：Gropp, M., et al. (2012). Standardization of the teratoma assay for analysis of pluripotency of human ES cells and biosafety of their differentiated progeny. PLoS ONE 7, e45532.

非特許文献2：Ben-David, U., et al. (2013). Immunologic and chemical targeting of the tight-junction protein Claudin-6 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells. Nat. Commun. 4, 1992.

非特許文献3: Schuldiner, M., et al. (2003). Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a 'suicide' gene. *Stem Cells* 21, 257-265.

非特許文献4: Ben-David, U., et al. (2013). Selective elimination of human pluripotent stem cells by an oleate synthesis inhibitor discovered in a high-throughput screen. *Cell Stem Cell* 12, 167-179.

非特許文献5: Richards, M., et al. (2014). A new class of pluripotent stem cell cytotoxic small molecules. *PLoS ONE* 9, e85039.

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、上述のような多能性幹細胞集団を分化誘導した際に残存する多能性幹細胞を除去する又は減少させるための問題点を解決することを課題としてなされたものである。すなわち、本発明は、多能性幹細胞を除去する又は減少させる方法、多能性幹細胞を除去した又は減少させた細胞集団の製造方法を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、上記課題を解決するために、種々の角度から検討を加えて研究開発を行ってきた。その結果、驚くべきことに、多能性幹細胞は、培養温度を一定時間上昇させるという極めて簡単、かつ安価な方法によりアポトーシスが誘導され、死滅することを見だし、一方で分化誘導されて体細胞となった多能性幹細胞は、高温に対して耐性であることを見いだした。また、高温感受性のTRPチャンネルである *activates transi*

ent receptor potential vanilloid 1 (TRPV-1) のアゴニストを用いたときも高温での培養と同様、多能性幹細胞にアポトーシスを誘導し、多能性幹細胞集団を分化誘導した際に残存する未分化状態の多能性幹細胞を減少させることができることを見出した。すなわち、本発明は、以下のとおりである。

- [0012] [1] 多能性幹細胞と多能性幹細胞由来の分化細胞とを含む細胞集団を、40.5℃以上の温度で培養し、前記細胞集団に含まれる前記多能性幹細胞を減少させる方法。
- [2] 前記温度が、41℃～43℃である、[1]に記載の方法。
- [3] 前記温度で培養する時間が、10時間～72時間の範囲である、[1]又は[2]に記載の方法。
- [4] 前記多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞及び／又は胚性幹細胞である、[1]～[3]のいずれか1項に記載の方法。
- [5] 前記分化細胞が、心筋細胞、心筋芽細胞、線維芽細胞、壁細胞及び／又は血管内皮細胞を含む、[1]～[4]のいずれか1項に記載の方法。
- [0013] [6] [1]～[5]のいずれか1項に記載の方法によって得られた、前記多能性幹細胞を減少させた細胞集団。
- [0014] [7] 多能性幹細胞と、多能性幹細胞由来の分化細胞とを含む細胞集団から、多能性幹細胞を減少させる方法であって、前記細胞集団に含まれる前記多能性幹細胞に発現するTRPV-1を活性化する工程、を含むことを特徴とする方法。
- [8] 前記TRPV-1を活性化する工程が、40.5℃以上の温度で培養して前記TRPV-1を活性化する工程である[7]に記載の方法。
- [9] 前記温度が、40.5℃～45℃である[8]に記載の方法。
- [10] 前記温度が、41℃～43℃である[8]又は[9]に記載の方法。
- [11] 前記温度で培養して前記TRPV-1を活性化する工程の時間が、10時間～72時間の範囲である[8]～[10]に記載の方法。
- [12] 前記TRPV-1を活性化する工程が、TRPV-1に対するアゴ

ニストを添加する工程である[7]に記載の方法。

[13] 前記アゴニストが、カプサイシン、N-oleoyldopamine (OLDA)、アルバニル、オルバニル、AM404 (アナンダミド)、2-APB、NADA、PPAHV、抗TRPV-1抗体からなる群から選択された1又は2以上のアゴニストである[12]に記載の方法。

[14] 前記多能性幹細胞が人工多能性幹細胞及び／又は胚性幹細胞である[7]～[13]に記載の方法。

[15] 前記分化細胞が、心筋細胞、心筋芽細胞、線維芽細胞、壁細胞及び／又は血管内皮細胞を含む[7]～[14]に記載の方法。

[0015] [16] [7]～[15]のいずれか1項に記載の方法によって得られた、前記多能性幹細胞を減少させた細胞集団。

[0016] [17] 多能性幹細胞と多能性幹細胞由来の分化細胞とを含む細胞集団を、TRPV-1に対するアゴニストを添加した培地で培養し、前記細胞集団に含まれる前記多能性幹細胞を減少させる方法。

[0017] [18] 前記アゴニストが、カプサイシン、N-oleoyldopamine (OLDA)、アルバニル、オルバニル、AM404 (アナンダミド)、2-APB、NADA、PPAHV、抗TRPV-1抗体からなる群から選択された1又は2以上のアゴニストである[17]に記載の方法。

[0018] [19] [17]又は[18]に記載の方法によって得られた、前記多能性幹細胞を減少させた細胞集団。

[0019] [20] 多能性幹細胞と、多能性幹細胞由来の分化細胞とを含む第一細胞集団から、前記多能性幹細胞を減少させた第二細胞集団を製造する方法であって、前記第一細胞集団に含まれる前記多能性幹細胞に発現するTRPV-1を活性化する工程、を含むことを特徴とする方法。

[21] 前記TRPV-1を活性化する工程が、40.5℃以上の温度で培養してTRPV-1を活性化する工程である[20]に記載の方法。

[22] 前記温度が、41℃～43℃である[20]又は[21]に記載の方法。

[23] 前記TRPV-1を活性化する工程が、TRPV-1に対するアゴニストを添加する工程である[20]に記載の方法。

[24] 前記アゴニストが、カプサイシン、N-o-leoyldopamine (OLDA)、アルバニル、オルバニル、AM404 (アナンダミド)、2-APB、NADA、PPAHV、抗TRPV-1抗体からなる群から選択された1又は2以上のアゴニストである[23]に記載の方法。

### 発明の効果

[0020] 本発明によれば、多能性幹細胞を分化誘導して得られた分化誘導された多能性幹細胞と、分化誘導されずに残存した未分化な多能性幹細胞とを含む細胞集団から、未分化な多能性幹細胞を、簡便に除去する又は減少させることが可能となる。また、これにより得られた細胞集団は、未分化な多能性幹細胞の割合が減少しており、移植物として使用した際、腫瘍を形成する確率が低くなる。

### 図面の簡単な説明

[0021] [図1]フィーダーレスで培養したヒトiPS細胞に対する培養温度の影響を示す図である。(A) ラミニンE8フラグメント上で培養したヒトiPS細胞を37℃、40℃、41℃、42℃にて1日間又は2日間培養した。上段列は位相差画像を示す図であり、バーは100μmを示す。中段列はヘキスト染色(青)を示す図であり、バーは200μmを示す。下段列はヘキスト染色画像の36視野(6×6)モンタージュ画像を示す図である。(B) それぞれの温度条件に対する細胞数の変化を示す図である(n=3)。(C) TUNEL陽性細胞(緑)を示す図である。細胞核はヘキスト(青)で示す。(D) TUNEL陽性細胞の数を示す図である(n=3)。

[図2]42℃で培養したフィーダーフリーiPS細胞の細胞数を示す図である。(A) ラミニンE8フラグメントで培養したヒトiPS細胞を37℃又は42℃において、1日及び2日間培養した。上段は位相差画像を示し、バーは100μmを示す。中段はOct4(緑)及びヘキスト(青)染色の画像を示し、バーは200μmを示す。下段はOct4染色の36視野(6×6

) モンタージュ画像を示す。(B) 36視野(6×6)におけるOct 4陽性細胞の数を示す(n=3)。

[図3]フィーダーレスで培養したヒトiPS細胞に対する培養温度の影響を示す図である。ラミニンE8フラグメント上で培養したiPS細胞を1時間、3時間、6時間、9時間、12時間42℃で培養し、続いて培養開始から24時間まで37℃で培養した。(A)上段列は位相差画像を示す図であり、バーは100μmを示す。中段列はヘキスト染色(青)を示す図であり、バーは200μmを示す。下段列はヘキスト染色画像の36視野(6×6)モンタージュ画像を示す図である。(B)それぞれの温度条件に対する細胞数の変化を示す図である。36視野の合計の細胞数を示している。

[図4]iPS細胞と他の細胞との共培養における42℃培養の影響を示す図である。(A)MEF上で培養したヒトiPS細胞を42℃で1日間及び2日間培養した。上段列は位相差画像を示す図であり、バーは100μmを示す。中段列はOct 4(緑)及びヘキスト染色(青)を示す図であり、バーは200μmを示す。下段列はOct 4染色画像の81視野(9×9)モンタージュ画像を示す図である。(B)それぞれの時間における81視野中のOct 4陽性細胞の数を示す図である(n=3)。(C)iPS細胞とiPS細胞由来心筋細胞の共培養実験の結果を示す図である。iPS細胞の細胞凝集塊とiPS細胞由来細胞とを共培養開始2日後、AKO3培地又は10%FBS含有DMEMにて37℃又は42℃で培養した。最上段列は位相差画像を示す図であり、バーは100μmを示す。3段目列はOct 4(緑)の蛍光画像を示す図である。4段目列はcTnT(赤)の蛍光画像を示す図である。最下段はヘキスト(青)で染色した細胞核を示す図である。バーは200μmを表す。2列目はOct 4蛍光画像、cTnT蛍光画像、ヘキスト蛍光画像のマージ画像である。(D)36視野中のOct 4陽性細胞の数の変化を示す図である。

[図5]iPS細胞由来心筋細胞と線維芽細胞に対する温度の影響を確認した図である。(A)心筋細胞を示す図である。1列目はNkx2.5(赤)、c

TnT (緑)、ヘキスト (青) の蛍光画像のマージ画像である。2列目はcTnT染色画像の36視野(6×6)のモタージュ画像である。3列目はNkx2.5染色像である。4列名はNkx2.5染色像の36視野(6×6)モタージュ画像である。バーは200μmを示す。(B) cTnT陽性細胞、及びNkx2.5陽性細胞の数を示す図である(n=2)。(C) 線維芽細胞を示す図である。1列目は位相差画像を示す図であり、バーは100μmを示す。2列目はビメンチン(緑)及びヘキスト染色(青)を示す図である。3列名はビメンチン染色画像の36視野(6×6)モタージュ画像である。4列名はSM22(赤)及びヘキスト染色(青)を示す図である。5列目はSM22染色画像の36視野(6×6)モタージュ画像である。(D) ビメンチン陽性細胞及びSM22陽性細胞の数の変化を示す図である(n=4)。\*p<0.05 vs. Day 0. \*\*p<0.01 vs. Day 0.

[図6]心筋細胞シート作製におけるiPS細胞の除去効果を示す図である。(A) 42℃培養の各時間における心筋分化誘導後のヒトiPS細胞由来心筋細胞mRNAの発現量を示す図である(n=3)。Y軸はGAPDH mRNAの発現量で比較している。\*p<0.05 vs. pre. (B) 42℃培養の各時間における心筋分化誘導後のヒトiPS細胞由来心筋細胞のLin28及びOct4 mRNAの発現量を示す図である(n=3)。Y軸はGAPDH mRNAの発現量で比較している。\*p<0.05 vs. pre. (C) iPS細胞由来心筋細胞のLin28及びOct4 mRNAの相対的発現量を示す図である(n=3)。iPS細胞の発現量を100%としたときの相対値である。(D) 42℃培養が細胞シート作製に与える効果を示す図である。左図は培養スケジュールを示す。右図は、細胞シートの状態を示す図である。

[図7] 42℃培養がTRPV-1を介してiPS細胞を減少させることを示す図である。(A) フィーダーレスiPS細胞(左、n=3)及びiPS細胞由来心筋細胞(右、n=3)のTRPV-1 mRNAの発現量を示す。Y

軸は $\beta$ -アクチンで補正した相対的なTRPV-1遺伝子発現量を示す。\*  $p < 0.05$  vs. pre. \*\*  $p < 0.01$  vs. pre. (B) 培養開始前及び42°C培養24時間後におけるフィーダーレスiPS細胞及びiPS細胞由来心筋細胞のTRPV-1 mRNA発現量の比較を示す図である ( $n=3$ )。 (C) TRPV-1 siRNA又はコントロールsiRNAをトランスフェクトしたiPS細胞のTRPV-1 mRNA発現量を示す図である ( $n=4$ )。 (D) TRPV-1 siRNA又はsiRNAをトランスフェクトしたiPS細胞を37°C又は42°Cで1日間培養した結果を示す図である。上段は位相差画像を示し、バーは100  $\mu\text{m}$ を示す。中段はヘキスト染色の画像を示し、バーは200  $\mu\text{m}$ を示す。下段はヘキスト染色画像の36視野 (6×6) モンタージュ画像である。 (E) それぞれの培養条件における細胞数を示した図である ( $n=3$ )。

[図8] TRPV-1 アゴニストを使用したiPS細胞の除去効果について示す図である。 (A、B) ラミニンE8フラグメント上で培養したiPS細胞をカプサイシンを添加して培養した結果を示す。Vehicle-1は $2 \times 10^{-4}\text{M}$ カプサイシンを添加した実験におけるコントロール、Vehicle-2は $1 \times 10^{-4}\text{M}$ カプサイシンを添加した実験におけるコントロール、Vehicle-3は $1 \times 10^{-5}\text{M}$ カプサイシンを添加した実験におけるコントロールを表す。 (A) 上段は位相差画像を示し、バーは100  $\mu\text{m}$ を示す図である。中段はヘキスト染色画像を示し、バーは200  $\mu\text{m}$ を示す。下段はヘキスト染色画像の36視野 (6×6) モンタージュ画像を示す。 (B) それぞれの条件における36視野分の細胞数を示した図である。 (C、D) ラミニンE8フラグメント上で培養したiPS細胞にカプサイシンを添加して培養したNkx2.5陽性細胞を示す。Vehicle-1は $2 \times 10^{-4}\text{M}$ カプサイシンを添加した実験におけるコントロール、Vehicle-2は $1 \times 10^{-4}\text{M}$ カプサイシンを添加した実験におけるコントロールを表す。 (C) 上段は位相差画像を示し、バーは100  $\mu\text{m}$ を示す図である。下段はヘキスト染色 (青) 及びNkx2.5染色 (緑) のマージ画像を示し、バーは200  $\mu\text{m}$

mを示す。(D)それぞれの条件における36視野分の細胞数を示した図である。

[図9]TRPV-1アゴニストを使用したiPS細胞の除去効果について示す図である。(A、B)ラミニンE8フラグメント上で培養したiPS細胞をOLDAを添加して培養した結果を示す。(A)上段は位相差画像を示し、バーは100 $\mu$ mを示す。中段はヘキスト染色(青)画像を示し、バーは200 $\mu$ mを示す。下段はヘキスト染色画像の36視野(6 $\times$ 6)モタージュ画像を示す。(B)OLDAを添加して培養した条件における36視野分の細胞数を示した図である(n=3)。(C、D)iPS細胞由来心筋細胞をOLDAを添加して培養した結果を示す。(C)上段はcTnT染色(緑)、Nkx2.5染色(赤)、ヘキスト染色(青)のマージ画像を示し、バーは200 $\mu$ mを示す図である。中段はcTnT染色画像の36視野(6 $\times$ 6)モタージュ画像を示す。下段はHkx2.5染色画像の36視野(6 $\times$ 6)モタージュ画像を示す。(D)iPS細胞由来心筋細胞にOLDAを添加して培養した後のcTnT陽性及びNkx2.5陽性細胞の細胞数(36視野分)を示す図である。(E)iPS細胞由来心筋細胞を42 $^{\circ}$ C、又はOLDA(5 $\mu$ M)37 $^{\circ}$ Cで2日間培養した後のLin28 mRNAの発現量を示す図である(n=3)。Y軸は、MEF上で培養した未分化iPS細胞に対するiPS細胞由来心筋細胞の相対的なLin28の遺伝子発現量を示す。

[図10]TRPV-1アゴニストを使用したiPS細胞の除去効果について示す図である。(A、B)ラミニンE8フラグメント上で培養したiPS細胞にアルバニルを添加して1日間培養した結果を示す。(A)上段は位相差画像を示し、バーは100 $\mu$ mを示す。中段はヘキスト染色(青)画像を示し、バーは200 $\mu$ mを示す。下段はヘキスト染色画像の36視野(6 $\times$ 6)モタージュ画像を示す。(B)アルバニルを添加して培養した条件における36視野分の細胞数を示した図である(n=3)。

**発明を実施するための形態**

[0022] 本発明は、多能性幹細胞を除去する又は減少させる方法、多能性幹細胞を除去した又は減少させた細胞集団の製造方法に関するものである。本発明において、多能性幹細胞とは、自己複製能と多分化能を有する細胞であり、体を構成するあらゆる細胞を形成する能力（pluripotent）を備える細胞をいう。自己複製能とは、1つの細胞から自分と同じ未分化な細胞を2つ作る能力のことをいう。本発明で用いられる多能性幹細胞には、胚性幹細胞（embryonic stem cell：ES細胞）、胚性癌腫細胞（embryonic carcinoma cell：EC細胞）、栄養芽幹細胞（trophoblast stem cell：TS細胞）、エピブラスト幹細胞（epiblast stem cell：EpiS細胞）、胚性生殖細胞（embryonic germ cell：EG細胞）、多能性生殖細胞（multipotent germline stem cell：mGS細胞）、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell：iPS細胞）などが含まれる。

[0023] 本発明に用いられる多能性幹細胞とは、（1）未分化状態でアルカリフォスファターゼ活性を有し、及び／又は（2）転写因子であるOct3／4（Oct3、Oct4ともいう）、Nanog若しくはSox2を発現し、及び／又は（3）Stage Specific Embryonic Antigen（SSEA）-3、SSEA-4、Tra-1 60、Tra-1 81若しくはLin28のタンパク質を発現し（これらの抗原は、多能性幹細胞のステージによって発現量に若干の違いがある）、並びに（4）内胚葉、中胚葉、外胚葉の三胚葉由来の組織へと分化する能力を有する細胞と定義することができる。三胚葉由来の組織へと分化する能力があるかどうかは、対象となる細胞をマウスなどの皮下に移植し、テラトーマ（奇形種）を形成する能力を有するかどうかで評価できる。

[0024] 本発明に用いられる多能性幹細胞は、上記の定義を満たす細胞（細胞集団）として予め確認されてストックされている細胞、例えば公的機関（例えば、京都大学iPS細胞研究所、理化学研究所等）又は民間機関（iPSアカ

デミアジャパン株式会社等)が有する細胞バンク等から配布される細胞(細胞集団)であることが好ましく、この場合、アルカリフォスファターゼ、Nanog、Sox2、Oct3/4、TRA-160、TRA-181、SSEA-3、SSEA-4、Lin28などの多能性マーカーのうち、少なくとも1つ以上の多能性マーカーの遺伝子発現量及び/又はタンパク質の発現量が、非多能性幹細胞と比較して高いかどうかを確認するだけで、細胞集団における多能性幹細胞が含まれる割合を簡便に確認することができる。本発明において、多能性幹細胞の多能性マーカーを測定する方法は定法に従えばよく、例えばRT-PCR法、フローサイトメーターによる測定法、ウエスタンブロットによる測定法、免疫組織化学染色による測定法、マイクロアレイ法などの手法を用いることができる。

[0025] 本発明で用いられる多能性幹細胞は、分化した非多能性幹細胞、例えば、体細胞を初期化(リプログラミング)することにより得られる多能性幹細胞であってもよい。例えば、未受精卵の核を除去して体細胞の核を移植する方法、体細胞とES細胞との細胞融合を行う方法、体細胞へ特定のリプログラム(初期化)因子(Oct3/4、Nanog、Sox2、c-Myc、L-Myc、Lin28、Klf4など)を導入して初期化する方法などが挙げられるが限定されない。リプログラム因子を細胞へ導入する方法も特に限定されず、ウイルスベクターを用いた方法、プラスミドベクターを用いた方法、mRNAとして導入する方法、リプログラム因子をタンパク質として導入する方法などを用いてもよい。

[0026] 本発明の実施形態において、非多能性幹細胞とは、上記の多能性幹細胞の定義を満たさない細胞をいうが、具体的には、生体組織を構成する体細胞であって、内胚葉、中胚葉、外胚葉のいずれかの胚葉へと分化する能力を失った分化細胞をいう。例えば、心筋細胞、筋芽細胞、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、線維芽細胞、骨髄由来細胞、脂肪由来細胞、肝実質細胞、類洞内皮細胞、クッパー細胞、星細胞、ピット細胞、胆管上皮細胞、腎細胞、顆粒細胞、集合管上皮細胞、壁側上皮細胞、足細胞、メサンギウ

ム細胞、平滑筋細胞、尿細管細胞、間在細胞、糸球体細胞、副腎髓質細胞、副腎皮質細胞、球状層細胞、束状層細胞、網上層細胞、表皮角化細胞、メラノサイト、立毛筋細胞、毛包細胞、頬側粘膜細胞、胃粘膜細胞、腸管粘膜細胞、嗅上皮細胞、口腔粘膜細胞、子宮粘膜細胞、中脳ドーパミン神経細胞、大脳神経細胞、網膜細胞、小脳細胞、視床下部内分泌細胞、T細胞、B細胞、好中球、好酸球、好塩基球、単球等の生体を構成する細胞、又は、一系統の細胞型を形成し得る能力（multipotent）を有する体性幹細胞が含まれる。体細胞には、生殖細胞は含まれない。

[0027] 本発明に用いられる細胞の動物種の由来は、特に制約されるものではないが、例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、マーモセット、ウサギ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、サル、チンパンジーあるいはそれらの免疫不全動物などの哺乳類動物、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫等が挙げられる。本発明により得られる細胞集団をヒトの治療に用いる場合はヒト、ブタの治療に用いる場合はブタ、サルの治療に用いる場合はサル、チンパンジーの治療に用いる場合はチンパンジー由来の細胞を用いる方が望ましい。また、治療を行うのがヒトである場合、患者本人から採取した細胞であってもよく（自家細胞）、他人の細胞から採取した細胞を用いてもよく（他家細胞）、市販の細胞株であってもよい。

[0028] 本発明において、多能性幹細胞から分化誘導して得られる非多能性幹細胞は特に限定されるものではない。例えば、心筋組織の再生、或いは心筋機能を評価する方法を目的とした場合、多能性幹細胞から分化誘導して得られる細胞としては心筋細胞、心筋芽細胞、筋芽細胞、間葉系幹細胞、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、線維芽細胞、骨髓由来細胞、脂肪由来細胞のいずれか1種、もしくは2種以上の細胞が混合したもの等が挙げられる。肝組織の再生、肝組織を模擬した人工肝臓の作製、或いは肝組織の機能を評価する方法等を目的とした場合、例えば、多能性幹細胞から分化誘導して得られる細胞としては、肝実質細胞、類洞内皮細胞、クッパー細胞、星細胞、ピット細胞、胆管上皮細胞、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、線維芽細胞、骨髓由

来細胞、脂肪由来細胞、間葉系幹細胞のいずれか1種、もしくは2種以上の細胞が混合したもの等が挙げられる。腎組織の再生、腎組織を模擬した人工腎臓の作製、或いは腎機能を評価する方法を目的とした場合、例えば、多能性幹細胞から分化誘導して得られる細胞としては、腎細胞、顆粒細胞、集合管上皮細胞、壁側上皮細胞、足細胞、メサングウム細胞、平滑筋細胞、尿管細胞、間在細胞、糸球体細胞、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、線維芽細胞、骨髄由来細胞、脂肪由来細胞、間葉系幹細胞のいずれか1種、もしくは2種以上の細胞が混合したもの等が挙げられる。副腎組織の再生、副腎を模擬した人工副腎の作製、或いは副腎機能を評価する方法を目的とした場合、例えば、使用する細胞としては、副腎髄質細胞、副腎皮質細胞、球状層細胞、束状層細胞、網上層細胞、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、線維芽細胞、骨髄由来細胞、脂肪由来細胞、間葉系幹細胞のいずれか1種、もしくは2種以上の細胞が混合したもの等が挙げられる。皮膚の再生、或いは皮膚機能を評価する方法を目的とした場合、例えば、多能性幹細胞から分化誘導して得られる細胞としては、表皮角化細胞、メラノサイト、立毛筋細胞、毛包細胞、血管内皮細胞、血管内皮前駆細胞、線維芽細胞、骨髄由来細胞、脂肪由来細胞、間葉系幹細胞のいずれか1種、もしくは2種以上の細胞が混合したもの等が挙げられる。粘膜組織の再生、或いは粘膜組織の機能を評価する方法を目的とした場合、例えば、多能性幹細胞から分化誘導して得られる細胞としては、頬側粘膜、胃粘膜、腸管粘膜、嗅上皮、口腔粘膜、子宮粘膜の細胞のうち、いずれか1種、もしくは2種以上の細胞が混合したもの等が挙げられる。神経系の再生、あるいは神経の機能を評価する細胞を得る目的として場合、例えば、多能性幹細胞から分化誘導して得られる細胞としては、中脳ドーパミン神経細胞、大脳神経細胞、網膜細胞、小脳細胞、視床下部内分泌細胞のうち、いずれか1種、もしくは2種以上の細胞が混合したもの等が挙げられるが特に限定されない。血液を構成する細胞を得る目的とした場合、例えば、多能性幹細胞から分化誘導して得られる細胞としては、T細胞、B細胞、好中球、好酸球、好塩基球、単球、血小板、赤血球、のうち、い

いずれか1種、もしくは2種以上の細胞が混合したものが挙げられるが特に限定されない。

[0029] 本明細書において、「培地」とは、細胞、特に動物細胞を培養するための細胞培養培地のことを指す。培地は、細胞培養液と同義の意味として用いられる。そのため、本発明において用いられる培地とは、液体培地のことを指す。培地の種類は、通常使用される培地を使用することが可能であり、培養する細胞の種類によって適宜決定される。

[0030] 本発明において、分化誘導前の多能性幹細胞の未分化性を維持する培養方法については定法に従えばよく、特に限定されない。また、多能性幹細胞を分化誘導する方法としては目的とする細胞を得るために最適化された分化誘導法を用いればよく、特に限定されない。多能性幹細胞の未分化性を維持するための培養方法や、分化誘導を行うための培養は、平面の細胞培養皿で行ってもよく、浮遊攪拌三次元培養で行ってもよく特に限定されない。

[0031] 本発明において、多能性幹細胞を「減少させる」とは、多能性幹細胞と多能性幹細胞由来の分化細胞とを含む細胞集団（本明細書において、「第一細胞集団」ともいう。）から目的とする多能性幹細胞の全て若しくは一部を除去、又は、全滅若しくは一部を死滅、又は、目的とする多能性幹細胞の細胞増殖を停止若しくは遅延させることにより、細胞集団における多能性幹細胞の相対的な数を減少させることをいう。本発明における多能性幹細胞の減少は、アポトーシス又はネクローシスの誘導、又は、多能性幹細胞の細胞周期のみ停止若しくは遅延により、細胞集団における多能性幹細胞の相対的な数が減少することで引き起こされる。本発明において、多能性幹細胞を「減少させる」とは、本発明の方法を用いない従来の培養方法により、多能性幹細胞を含む細胞集団を培養した場合と比較して、例えば、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、100%の多能性幹細胞が減少することを意味する。本明細書において、本発明の方法によって、多能性幹細胞と多能性幹細胞由来の分化細胞とを

含む細胞集団（第一細胞集団）から、多能性幹細胞を減少させて得られる細胞集団を「第二細胞集団」ともいう。

[0032] 従来、多能性幹細胞や、多能性幹細胞から分化誘導された分化細胞は、恒温動物の体温である37℃前後の温度にて培養される。本発明では、体温よりも高温で培養することで多能性幹細胞を除去する又は減少させることが可能である。本発明において、多能性幹細胞を除去する又は減少させるための培養温度としては、40.5℃以上であればよく、例えば、40.5℃、40.6℃、40.7℃、40.8℃、40.9℃、41.0℃、41.1℃、41.2℃、41.3℃、41.4℃、41.5℃、41.6℃、41.7℃、41.8℃、41.9℃、42.0℃、42.1℃、42.2℃、42.3℃、42.4℃、42.5℃、42.6℃、42.7℃、42.8℃、42.9℃、43.0℃、43.1℃、43.2℃、43.3℃、43.4℃、43.5℃、43.6℃、43.7℃、43.8℃、43.9℃、44.0℃、44.1℃、44.2℃、44.3℃、44.4℃、44.5℃、44.6℃、44.7℃、44.8℃、44.9℃、45.0℃であってもよい。また、多能性幹細胞を除去する又は減少させるための培養温度としては40.5℃～45.0℃であってもよく、40.7℃～43.7℃でもよく、40.8℃～43.5℃でもよく、40.9℃～43.3℃でもよく、41.0℃～43.0℃でもよい。特に、41.0℃～43.0℃の範囲での培養は、多能性幹細胞の細胞増殖が停止し、また、多能性幹細胞が分化誘導された後の分化細胞は傷害をほとんど受けないため、好ましい。本発明において、多能性幹細胞と多能性幹細胞由来の分化細胞とを含む細胞集団を、40.5℃以上の温度で培養する工程は、後述のTRPV-1を活性化して多能性幹細胞を減少させるものであってもよく、また、TRPV-1を活性化する以外の作用によって多能性幹細胞を減少させるものであってもよい。

[0033] 本発明において、多能性幹細胞を除去する又は減少させるために、体温よりも高温の条件にて培養する時間としては、培養温度に応じて適宜選択すれば

よいが、例えば、6時間、7時間、8時間、9時間、10時間、11時間、12時間、13時間、14時間、15時間、16時間、17時間、18時間、19時間、20時間、21時間、22時間、23時間、24時間、25時間、26時間、27時間、28時間、29時間、30時間、31時間、32時間、33時間、34時間、35時間、36時間、37時間、38時間、39時間、40時間、41時間、42時間、43時間、44時間、45時間、46時間、47時間、48時間、49時間、50時間、51時間、52時間、53時間、54時間、55時間、56時間、57時間、58時間、59時間、60時間、61時間、62時間、63時間、64時間、65時間、66時間、67時間、68時間、69時間、70時間、71時間、72時間、73時間、74時間、75時間、76時間、77時間、78時間、79時間、80時間であってもよい。また、6時間～80時間であってもよく、9時間～75時間であってもよく、10時間～72時間であってもよく、11時間～70時間であってもよく、12時間～68時間であってもよい。例えば、41.0℃～43.0℃で培養した場合は、10時間～72時間の範囲で培養すれば、多能性幹細胞の細胞増殖が減少し、また、多能性幹細胞が分化誘導された後の分化細胞の傷害活性が抑えられ、好ましい。

[0034] 本発明において、分化誘導後の残存した多能性幹細胞を評価する方法としては定法に従えばよいが、例えば、Oct 4 (Oct 3又はOct 3/4ともいう)、Lin 28、SSEA-3、SSEA-4、Tra-1 60、Tra-1 81などの発現を指標として評価すれば良く、特に限定されない。評価する方法としては、フローサイトメーターによる確認、ウエスタンブロット法によるタンパク発現の確認、リアルタイムPCR法をもちいたmRNAの発現量を確認する方法などが挙げられるが特に限定されない。また、分化誘導した後の体細胞が含まれる割合を評価する方法としても定法に従えばよい。例えば心筋細胞の割合を評価する場合は、心筋トロポニンT (cTnT) やNkx2.5など心臓を構成する細胞に発現しているタンパク質や遺伝子を発現する細胞の割合を評価すればよい。例えば、線維芽細胞の割合

を評価する場合は、ビメンチンやSM22など、繊維芽細胞に発現しているタンパク質や遺伝子を発現する細胞の割合を評価すれば良い。その他の体細胞が含まれる割合を評価する場合は、目的とする細胞が特異的に発現するタンパク質や遺伝子を発現する細胞の割合を評価すればよく、特に限定されない。

[0035] 本発明において、TRPV-1 (transient receptor potential cation channel subfamily V member 1) とは、カプサイシン受容体としてクローニングされた膜タンパク質のことをいう。内因性及び外因性の物理的及び化学的刺激の幅広い刺激に対して活性化される非選択性陽イオンチャネルとして知られている。43℃より高い温度で活性化したり、カプサイシンやアリルイソチアネートなどに対しても活性化する。TRPV-1が活性化すると、陽イオンが細胞内に流入し、神経細胞を脱分極させて電位作動性Na<sup>+</sup>チャネルの活性化から活動電位の発生をもたらす、痛みが引き起こされる。また、低pHによっても活性化される。TRPV-1は主に感覚神経系に発現しているが、中枢神経系や他の組織においても発現しており、主に痛み刺激の調節や伝達に関与する分子であると考えられている分子である。

[0036] 本発明は、多能性幹細胞と、分化誘導後の多能性幹細胞由来分化細胞のTRPV-1は、温度及び化学物質に感受性の違いがあることを見出し、TRPV-1を活性化することにより、多能性幹細胞と多能性幹細胞由来分化細胞を含む細胞集団から多能性幹細胞を除去する又は減少させる方法に関する。TRPV-1のアゴニスト（作動薬）としては、カプサイシンの他、N-oleoyldopamine (OLDA)、アルバニル、オルバニル、AM404 (アナンダミド)、2-APB、NADA、PPAHV、抗TRPV-1抗体などが挙げられるが、本発明ではTRPV-1に結合し、アゴニスト活性を示すものであればよく、限定されない。本発明において、カプサイシンの濃度は20 μM~100 mMであってもよく、30 μM~50 mMであってもよく、40 μM~20 mMであってもよく、50 μM~10 mM

であってもよい。本発明において、OLD Aの濃度は600 nM~100 mMであってもよく、750 nM~10 mMであってもよく、1  $\mu$ M~1 mMであってもよく、2  $\mu$ M~750  $\mu$ Mであってもよい。本発明において、アルバニルの濃度は7  $\mu$ g/mL (0.016 mM)~10 mg/mL (22.746 mM)であってもよく、10  $\mu$ g/mL (0.023 mM)~5 mg/mL (11.373 mM)であってもよく、15  $\mu$ g/mL (0.034 mM)~3 mg/mL (6.824 mM)であってもよい。

[0037] 本発明において、多能性幹細胞と分化誘導後の多能性幹細胞由来の分化細胞を含む細胞集団から、多能性幹細胞を除去する又は減少させる方法は、分化誘導処理後に得られた細胞集団に上記処理を行ってもよく、細胞シートなどのティッシュエンジニアリングによる加工を行った後の細胞組織に対して行ってもよく、適宜目的に応じて選択すればよい。また、従来の多能性幹細胞を除去する又は減少させる方法と組み合わせて利用してもよく限定されない。また、多能性幹細胞が死滅する温度であり、多能性幹細胞由来の分化細胞が死滅しない温度で処理しつつ、上記TRPV-1のアゴニストを作用させる方法を用いる方法であってもよい。

[0038] 本発明において、細胞集団とは、細胞以外のものも含み、特に限定されない。例えば、細胞と細胞外マトリックスを構成するコラーゲン、プロテオグリカン、ラミニン、ラミニン5、フィブロネクチン、ヒアルロン酸、エンタクチン、テネイシン、エラスチン等が混合された細胞集団であってもよく、細胞とその細胞が産生する細胞外マトリックスを含む組成物であってもよい。また、細胞外マトリックスを構成するタンパク質は、遺伝子組み換えタンパク質であってもよく、それをコードする遺伝子が組み込まれた、又はベクター等により遺伝子導入された細胞から産生されるタンパク質であってもよい。また、細胞集団の形態は、層状の細胞（例えば、細胞シート）が複数積層された形態であってもよく、細胞を細胞外マトリックスを含むゲルに懸濁して、型（モールド）に流し込んで得られた物であってもよい。

[0039] 本発明における細胞シートは、細胞培養器材上で培養し、細胞器材上から

剥離させて得られる1層、または複数層のシート状の細胞層からなる細胞群をいう。細胞シートを得る方法としては特に限定されるものではないが、例えば、温度、pH、光等の刺激によって分子構造が変化する高分子を被覆した細胞培養器材上で細胞を培養し、温度、pH、光等の条件を変えて、細胞培養器材表面を変化させることで、細胞間の接着状態は維持しつつ、細胞培養器材表面から細胞をシート状に剥離する方法、任意の細胞培養器材にて細胞を培養し、細胞培養器材の端部から、物理的にピンセット等により剥離する方法等が挙げられる。特に好ましいのが、0～80℃の温度範囲で水和力が変化するポリマーを表面に被覆した細胞培養支持体上で、ポリマーの水和力が弱い温度域で細胞を培養し、その後、培地をポリマーの水和力が強い状態となる温度に変化させることで培養し、細胞をシート状に剥離させる方法である。その際、細胞は0～80℃の温度範囲で水和力が変化するポリマーを表面に被覆した細胞培養支持体上で、ポリマーの水和力の弱い温度域で培養される。その温度とは通常、細胞を培養する温度である37℃が好ましい。本発明に用いる温度応答性高分子はホモポリマー、コポリマーのいずれであってもよい。このような高分子としては、例えば、特開平2-211865号公報に記載されているポリマーが挙げられる。

[0040] 細胞種によっては、細胞培養器材上に接着しにくいものがあり、そのような場合は、例えば、コラーゲン、ラミニン、ラミニン5、フィブロネクチン、マトリゲル等の単独、もしくは2種以上の混合物を細胞培養器材上に被覆して培養してもよい。これらの細胞接着性タンパク質の被覆方法は常法に従えば良く、通常、細胞接着性タンパク質の水溶液を器材表面に塗布し、その後その水溶液を除去しリンスする方法が挙げられる。

[0041] 本発明の方法において、細胞シートを作製するために播種する細胞数は使用細胞の動物種や細胞種によって異なるが、一般的に $0.3 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^6$ 個/cm<sup>2</sup>が良く、好ましくは $0.5 \times 10^4 \sim 8 \times 10^6$ 個/cm<sup>2</sup>が良く、さらに好ましくは $0.7 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 個/cm<sup>2</sup>が良い。本発明においては、培養した細胞シートを温度応答性培養器材から剥離回収するには、培

養された細胞の付着した培養器材の温度を被覆ポリマーの上限臨界溶解温度以上若しくは下限臨界溶解温度以下にすることによって剥離させることができる。その際、培地中において行うことも、その他の等張液中において行うことも可能であり、目的に合わせて選択することができる。細胞をより早く、より高効率に剥離、回収する目的で、培養器材を軽くたたいたり、ゆらしたりする方法、更にはピペットを用いて培地を攪拌する方法、ピンセットを用いる方法等を単独で、あるいは併用して用いてもよい。温度以外の培養条件は、常法に従えばよく、特に制限されるものではない。例えば、使用する培地については、公知のウシ胎児血清（FBS）等の血清が添加されている培地でもよく、また、このような血清が添加されていない無血清培地でもよい。

[0042] 本発明において用いられる多能性幹細胞由来の心筋細胞を用いた心筋細胞シートは、心筋細胞以外にも多能性幹細胞から分化誘導される線維芽細胞、壁細胞、血管内皮細胞などの非心筋細胞が含まれてもよい。目的に応じて細胞をセルソーターや抗体を用いて不要な細胞を除いたり、逆に必要な細胞を加えることができる。本明細書における実施例中の「心筋細胞シート」は、心筋細胞以外に、線維芽細胞、壁細胞、血管内皮細胞、非心筋細胞などの多能性幹細胞から分化誘導された細胞が含まれる。

[0043] 以上のことを、温度応答性ポリマーとしてポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）を例にとり説明する。ポリ（N-イソプロピルアクリルアミド）は31℃に下限臨界溶解温度を有するポリマーとして知られ、遊離状態であれば、水中で31℃以上の温度で脱水和を起こしポリマー鎖が凝集し、白濁する。逆に31℃以下の温度ではポリマー鎖は水和し、水に溶解した状態となる。本発明では、このポリマーがシャーレなどの器材表面に被覆、固定されたものである。したがって、31℃以上の温度であれば、培養器材表面のポリマーも同じように脱水和するが、ポリマー鎖が培養器材表面に被覆、固定されているため、培養器材表面が疎水性を示すようになる。逆に、31℃以下の温度では、培養器材表面のポリマーは水和するが、ポリマー鎖が培養

器材表面に被覆、固定されているため、培養器材表面が親水性を示すようになる。このときの疎水的な表面は細胞が付着、増殖できる適度な表面であり、また、親水的な表面は細胞が付着できないほどの表面となり、培養中の細胞、もしくは細胞シートも冷却するだけで剥離させられることになる。

[0044] 本発明に用いられる細胞シート作製の細胞培養器材の形状は特に制約されるものではないが、例えばディッシュ、マルチプレート、フラスコ、多孔膜上で培養するセルインサートのような形態のもの、或いは平膜状のものなどが挙げられる。培養する細胞が上皮系の細胞である場合、セルインサートを用いると、細胞の上下に培地が触れさせることができ、細胞が重層化し、好ましい。被覆を施される細胞培養器材としては、通常細胞培養に用いられるガラス、改質ガラス、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等の化合物を初めとして、一般に形態付与が可能である物質、例えば、上記以外の高分子化合物、セラミックス類などが挙げられる。

[0045] 本発明における細胞シートは、培養時にディスパーゼ、トリプシン等で代表される蛋白質分解酵素による損傷を受けていないものである。そのため、細胞培養器材から剥離された細胞シートは接着性蛋白質を有し、細胞をシート状に剥離させた際には細胞-細胞間のデスモソーム構造が保持されている。このことにより、細胞シートを生体患部に貼付したり、細胞シートを積層する場合、接着することができ、効率良く生着できるようになる。一般に蛋白質分解酵素であるディスパーゼに関しては、細胞-細胞間のデスモソーム構造については10~40%保持した状態で剥離させることができることで知られているが、細胞-器材間の基底膜様蛋白質等を殆ど破壊してしまうため、得られる細胞シートは強度の弱いものとなる。これに対して、本発明の細胞シートは、デスモソーム構造、基底膜様蛋白質共に60%以上残存された状態のものであり、上述したような種々の効果を得ることができるものである。

[0046] 本発明における複数の細胞層を有する細胞組成物を作製する方法については、特に限定されるものではないが、例えば、細胞を細胞培養器材に播種し

、その上に細胞外マトリックスタンパクを構成するタンパク（ラミニン、コラーゲン、ゼラチン、カドヘリン、ヒアルロン酸、フィブロネクチン、フィブリン、エラスチン、キチン、キトサン、ビトロネクチン等）を含むゲルを塗布後、さらに細胞を播種して積層し、細胞層を有する細胞組成物を得る方法や、培養細胞をシート状で剥離させ、必要に応じ培養細胞移動治具を用いて培養細胞シート同士を積層化させる方法などにより得られる。その際、培地の温度は、培養器材表面に被覆された前記ポリマーが上限臨界溶解温度を有する場合はその温度以下、また前記ポリマーが下限臨界溶解温度を有する場合はその温度以上であれば特に制限されない。しかし、培養細胞が増殖しないような低温域（例えば、10℃以下）、あるいは培養細胞が死滅するような高温域（例えば50℃以上）における培養が不適切であることは言うまでもない。温度以外の培養条件は、常法に従えばよく、特に制限されるものではない。例えば、使用する培地については、公知のウシ胎児血清（FBS）等の血清が添加されている培地でもよく、また、このような血清が添加されていない無血清培地でもよい。また、必要に応じ、細胞シートを移動させるための治具を利用しても良い。そのような治具としては、剥離した細胞シートを捕捉できるものであれば材質、形状は何ら限定されるものではないが、それらの材質としては、通常、ポリビニリデンジフルオライド（PVDF）、シリコン、ポリビニルアルコール、ウレタン、セルロース及びその誘導体、キチン、キトサン、コラーゲン、ゼラチン、フィブリングルー等の材料を膜状、多孔膜状、不織布状、織布状として細胞シートに接触させて使用される。

## 実施例

[0047] 以下に、本発明を実施例に基づいて更に詳しく説明するが、これらは本発明を何ら限定するものではない。

[0048] (抗体)

本実施例中の免疫細胞化学、フローサイトメトリーに用いた抗体は以下の通りである。

- ・抗心筋トロポニンT (cTnT、サーモサイエンティフィック社、ロックフォード、イリノイ州、米国)
  - ・抗Tra-1 60マウス単クローン抗体 (ミリポア社、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国)
  - ・抗SM22 ウサギポリクローナル抗体 (アバカム社、ケンブリッジ、英国)
  - ・抗心筋トロポニンT ウサギポリクローナル抗体 (アバカム社、ケンブリッジ、英国)
  - ・抗Nkx2.5 ヤギポリクローナル抗体 (サンタクルズ バイオテクノロジー社、サンタクルズ、カリフォルニア州、米国)
  - ・抗Oct4 ヤギポリクローナル抗体 (R&Dシステム社)
- 2次抗体はジャクソン イムノリサーチ ラボラトリー社 (ウエスト グローブ社、ペンシルベニア州、米国) から購入した。特に明記しない限り、試薬はライフ テクノロジーズ社 (カリフォルニア州、米国) より購入したものを使用した。

[0049] (ヒトiPS細胞の培養)

ヒトiPS細胞253G1株及び2017株は、国立研究開発法人理化学研究所 (筑波、日本) より購入した。ヒトiPS細胞1231A3株は京都大学より譲渡を受けた。フィーダー細胞を用いた実験は、マイトマイシンCで処理したマウス線維芽細胞 (MEF) (リプロセル社、東京) 上にiPS細胞を載せ、5 ng/mL塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF、リプロセル社、日本) を含有した霊長類ES/iPS細胞用培地 (リプロセル社、日本) を用いて5%CO<sub>2</sub>、37°Cの加湿雰囲気条件にて維持培養を行った。iPS細胞は3~4日毎にES/iPS細胞剥離液 (CTK溶液) (リプロセル社、日本) を用い、小さな細胞塊として継代を行った。フィーダー細胞を用いない実験では、StemFit AK03 (味の素社、東京、日本) を培地として用い、iMatrix511 (ニッピ社、東京、日本) 上でiPS細胞を培養して適応させ、維持培養を行った。iPS細胞は7~8日毎に

、TrypLE Select (ライフテクノロジー社、カリフォルニア州、米国) を使用してシングルセルとして継代を行った (参考: Nakagawa M., et al. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. Sci Rep. 2014; 4: 3594. )。実験に応じて、iPS細胞は、40℃、41℃、42℃の加湿、5%CO<sub>2</sub>濃度の雰囲気にて培養を行った。試料の写真は倒立顕微鏡 (ニコン社、東京、日本) 及びNIS-Elementsソフトウェア (ニコン社、東京、日本) にて撮影して解析した。

[0050] ( $\alpha$ -MHCプロモーター及びrex-1プロモーター誘導薬剤耐性遺伝子発現ヒトiPS細胞の準備)

マウス $\alpha$ -ミオシン重鎖 ( $\alpha$ -MHC) プロモーター制御ピューロマイシン耐性遺伝子及びrex-1プロモーター制御ネオマイシン耐性遺伝子の両方を含むレンチウイルスベクター ( $\alpha$ -MHC-puro rex-1-neo) はアドジーン社 (ケンブリッジ、マサチューセッツ州、米国) より購入した。当該レンチウイルスベクターを用いることで、ヒトiPS細胞を増殖させるときにG418によって未分化状態のiPS細胞だけを選別することができ、また、心筋へと分化誘導された後は、ピューロマイシンによって分化誘導した心筋細胞を選別することができる。遺伝子組み換えiPS細胞は以下の手順により得た。

[0051] (i) 組み換えレンチウイルスベクターの調整

ベクターの遺伝子導入は、商業的販売されている遺伝子導入キットのリポフェクタミン2000 (インビトロジェン社) にて行い、組み換えレンチウイルスベクターの調整はViraPower (商標) レンチウイルスパッケージングミックス (インビトロジェン社) を用いて行った。

100mmポリスチレン培養皿 (ベクトンディッキンソン アンド カンパニー社、フランクリンレイク、ニュージャージー州、米国) 上に $5 \times 10^4$

細胞／ $\text{cm}^2$ のHEK293FT細胞を播種した。24時間培養後、リポフェクタミン2000キット及びOPTI-MEM（インビトロジェン社）を用い、ベクター（ $3\mu\text{g}$ ／培養皿）を遺伝子導入して8時間 $37^\circ\text{C}$ にて培養した。その後、ベクターを含む培地を除去し、新鮮な培地を加えてさらに培養した。遺伝子導入してから72時間後、遺伝子組み換えレンチウイルスを含む培養上清を回収した。大きな細胞の破片を取り除くために $1700\times\text{g}$ 、5分間、培養上清を遠心分離し、細かい破片を取り除くために上清を $0.45\mu\text{m}$ のフィルター（メルクミリポア社、ビレリカ、マサチューセッツ州、米国）に通した。その後、上清を $87,000\times\text{g}$ 、 $4^\circ\text{C}$ の条件にて1.5時間、超遠心機（CP80 $\beta$ 、日立工機社、東京、日本）にて超遠心処理を行って100倍濃縮を行い、ヒトiPS細胞に感染させるために用いる濃縮ウイルスを得た。

[0052] (ii) レンチウイルス感染手順

レンチウイルスを感染させる方法についてはNakagawaらの方法（Nakagawa M., et al. A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. Sci Rep. 2014; 4: 3594.）に改変を加えた手順で行った。以下にその手順を説明する。

ヒトiPS細胞を6ウェル培養皿（ベクトンディッキンソン アンド カンパニー社）の1つのウェルにてコンフルエントになるまで培養し、CTK溶液を用いて剥離した。小さな細胞凝集塊を1mLの培地（霊長類ES/iPS細胞用培地）にて再懸濁し、15mLの遠沈管（ベクトンディッキンソン アンド カンパニー社）に移して5分間室温にて静置した。500 $\mu\text{L}$ の上清を除いた後、8 $\mu\text{g}$ ポリブレン（シグマアルドリッチ社）を含む400 $\mu\text{L}$ の新鮮な培地を添加した。100 $\mu\text{L}$ の濃縮ウイルス上清を添加し、細胞と混ぜ、 $37^\circ\text{C}$ で6時間保温した。6時間の保温の間、時々細胞とウイルス懸濁液を攪拌した。6ウェル培養皿の2つのウェルに播種したネオマイ

シン耐性フィーダー細胞SL10（リプロセル社）の上に、レトロウイルスを感染させた細胞を播種し、37℃で培養した。一晚培養した後、1 mLの培地を細胞に加え、感染後36時間後に培地交換を行うことでウイルス粒子を洗い流した。感染4日後、G418硫酸塩（400 μg/mL）（インビトロジェン社）にて36時間処理した。その後、G418硫酸塩を洗い流すためにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）にて2回リンスし、さらに数日間培養した。必要に応じてG418硫酸塩で再処理を行った。

[0053] （バイオリアクターを用いた心筋分化誘導及び心筋細胞シートの調整）

iPS細胞の心筋分化誘導は、バイオリアクターシステム（エイブル社、日本）を用いて、Matsuraらの方法（Matsura K., et al. Creation of human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Aug 24; 425 (2) : 321-7.、特許文献1参照）に従って実施した。細胞を播種する前に、温度応答性培養皿（UpCell（登録商標）、セルシード社、東京、日本）、もしくは細胞培養皿（コーニング社、コーニング、ニューヨーク州、米国）の表面をウシ胎児血清（FBS）にて2時間コーティングした。iPS細胞を心筋細胞へ分化誘導した後、0.05%トリプシン/EDTAを用いて剥離し、細胞凝集塊はストレーナー（BDバイオサイエンス社、サンノゼ、カリフォルニア州、米国）を使用してシングルセルとし、10%FBSを含んだDMEM（シグマアルドリッチ社、セントルイス、ミズーリ州、米国）を用いて $2.1 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>の細胞を培養皿に播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、加湿雰囲気下で培養した。いくつかの実験では、ピューロマイシン（シグマアルドリッチ社、1.5 μg/mL）で1日間処理し、iPS細胞（201B7株、αMHC-puro/Rex1-neo）由来の心筋細胞を純化した。

[0054] iPS細胞由来の線維芽細胞は培養皿にあらかじめ播種する技法（プレプレーティング法）によって得た。すなわち、iPS細胞から心筋へと分化誘

導後、10% FBS含有DMEMを用いてコーティングしていない培養皿上に播種し、培養した。その後、培養皿に接着しなかった細胞を捨て、接着している細胞をPBS (-) で3回しっかりと洗浄し、10% FBS含有DMEMを用いて培養した。99%以上の細胞がSM22陽性であり、cTnT陽性の割合は1%未満であった。継代2~3回行ったiPS細胞由来の線維芽細胞を実験に使用した。

[0055] (2次元共培養試験)

ヒトiPS細胞から心筋へ分化誘導した後の細胞は、24ウェル培養皿(コーニング社)にて $2.1 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>で播種し、10% FBS含有DMEMを用いて37℃、5% CO<sub>2</sub>、加湿雰囲気下にて2日間培養した。共培養実験を行う1日前、iMatrix 511上で培養したiPS細胞をTrypLE Selectで剥離し、細胞凝集塊を形成させるためにY27632(化合物一般名)(10 μM)(和光純薬工業社、日本)を含有するAK03培地を用い、シングルセル懸濁液をEZ Sphere(旭硝子社、東京、日本)上で1日間培養した。次の日、24ウェルプレート上でAK03培地を用い、iPS細胞の凝集塊50個とiPS細胞由来の心筋細胞とを1日間、共培養した。続いて、37℃(AK03培地)、42℃(AK03培地)、37℃(10% FBS含有DMEM)、又は42℃(10% FBS含有DMEM)の条件にて、それぞれ2日間培養を行った。

[0056] (バイオリアクターを用いた共培養試験)

MEF上で培養したiPS細胞はAccumax(イノベティブセルテクノロジー社、サンディエゴ、カリフォルニア州、米国)を用いてシングルセルとして剥離した。100 mLバイオリアクターを用い、Y27632(10 μM)を含有したmTeSR1(ステムセルテクノロジー社、カナダ)培地を使用して、 $2 \times 10^7$ 個のiPS細胞(MEFを含む)と心筋分化誘導後12日目の心筋細胞を共培養した(Day 0)。翌日、Y27632を含まないmTeSR1培地へと交換した。共培養開始2日後(Day 2)、mTeSR1培地にて37℃48時間、又は42℃6時間培養後に37℃4

2時間（合計48時間）培養した。培養開始4日後（Day 4）、それぞれの条件の細胞をAccumaxで剥離し、FBSをあらかじめコーティングしていた24ウェル培養皿上に $2.1 \times 10^5$ 細胞/cm<sup>2</sup>で再播種し、10% FBS含有DMEMを用いて37°Cで培養し、FACS解析用に4%パラホルムアルデヒドで固定した。培養皿上の細胞は42°Cで再び2日間培養し（Day 5からDay 7）、その後、37°Cで1日間培養した（Day 7からDay 8）。

[0057]（免疫細胞化学）

細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定し、Matsuuraらの方法（Matsuura K., et al. Creation of human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Aug 24; 425 (2) : 321-7.）に従い免疫染色を行った。TUNEL解析を行うために、Click-iT TUNEL Alexa Fluor 488イメージングキット（ライフテクノロジー社、カリフォルニア州、米国）を用い、説明書に従って染色を行った。細胞核はHoechst 33258（シグマアルドリッチ社）にて染色した。染色した試料は、ImageXpress（モレキュラーデバイス社、サニーベール、カリフォルニア州、米国）及びMetaxpress and AcuityXpressソフトウェア（モレキュラーデバイス社）を用いて撮影した。

[0058]（RNA抽出及び定量的RT-PCR）

全量RNA抽出及びRT-PCRはMatsuura K., Kodama F.らの方法（Matsuura K, Kodama F. et al., Elimination of remaining undifferentiated iPS cells in the process of human cardiac cell sheet fabrication using a methionine-free cu

lture condition, Tissue Eng Part C Methods, 2014 Sep 23.) に従い行った。使用したプライマーペアとTaqman MGBプローブは上記Matsuura K、Kodama F. らの方法と同一のものを使用した。具体的なプライマーの情報は表1に示し、いずれのプライマーもライフ テクノロジーズ社より購入したのものを使用した。定量的PCRは7300リアルタイムPCRシステム (アプライドバイオシステムズ社) を用いて解析した。相対的mRNA発現レベルはGAPDH、または $\beta$ -アクチンmRNA発現レベルの標準曲線を用いて計算した。

[0059] [表1]

プライマーの情報

遺伝子名	ABI No.
POU5F1 (OCT3/4)	Hs00999632_g1
Lin28	Hs00702808_s1
myosin, light chain 2, regulatory, cardiac, slow (MYL2)	Hs00166405_m1
myosin, light chain 7, regulatory (MYL7)	Hs01085598_g1
troponin T type 2 (cardiac) (TNNT2)	Hs00165960_m1
Collagen type I alpha 1 (COL1A1)	Hs00164004_m1
Collagen type III alpha1 (COL3A1)	Hs00943809_m1
natriuretic peptide A (NPPA)	Hs00383230_g1
natriuretic peptide B (NPPB)	Hs01057466_g1
TRPV-1	Hs00218912_m1
GAPDH	Hs00266705_g1
actin, beta	Hs99999903_m1

[0060] (フローサイトメトリー解析)

それぞれの条件の細胞凝集塊は、Accumaxを用いて10分間37℃で剥離し、Matsuuraらの方法(Matsuura K, et al. Creation of human cardiac cell sheets using pluripotent stem cells. Biochem Biophys Res Commun. 2012 Aug 24; 425(2):321-7.)らの方法に従ってTra-1 60または心筋トロポニンT(cTnT)を染色した。細胞の割合はGalios(ベックマンコールター社、ブレア、カリフォルニア州、米国)及びCell Quest Pro version 5.2ソフトウェアを用いて解析した。

[0061] (TRPV-1ノックダウン)

iMatrix 511上で培養したiPS細胞は、説明書に従ってLipofectamine(登録商標) RNAi Max Transfection Reagent(ライフ テクノロジー社)を使用してTRPV-1 siRNA(ライフ テクノロジーズ社、カタログ番号:4392240)、及びネガティブコントロール(ライフ テクノロジーズ社、Silencer(登録商標) Select Negative Control No. 1 siRNA、製品番号:4390843)をトランスフェクトした。

[0062] (TRPV-1アゴニスト)

TRPV-1のアゴニストとしては以下の試薬を用いた。

- ・カプサイシン(シグマアルドリッチ社)
- ・アルバニル(和光純薬工業社)
- ・OLDA(トクリス(Tocris)社)
- ・溶媒(vehicle):エタノール(和光純薬工業社)

[0063] (統計解析)

データは平均値±標準偏差で表している。2つのグループ間を比較した統計学的解析は、Student's t-testを用いて行った。複数グ

ループ間の比較統計解析は一元配置分散分析 (One-way analysis of variance) を行い、続いてDunnett検定にて比較を行った。p値が0.05より小さいものを統計学的に有意であるとした。

[0064] (実施例1)

高い培養温度がiPS細胞へ傷害を与えるかどうかを確かめるために、まず初めにラミニンE8フラグメント上で培養したiPS細胞を37℃、40℃、41℃、又は42℃の条件にて、1日間又は2日間培養した(図1A、B) 37℃及び40℃で培養したiPS細胞は培養時間に依存して有意に細胞数が増加した(37℃; Day 0;  $10311 \pm 1395$ 、Day 1;  $23748 \pm 1611$ 、Day 2;  $41563 \pm 760$ 、40℃; Day 1;  $21758 \pm 3219$ 、Day 2;  $40706 \pm 591$ )。興味深いことに、41℃で培養したiPS細胞はDay 1で細胞増殖が停止されており( $13228 \pm 2037$ )、Day 2では細胞数が減少していた( $4278 \pm 848$ )。しかしながら、42℃で培養したiPS細胞は培養時間依存的に細胞数が有意に減少していた(Day 1;  $2459 \pm 934$ 、Day 2;  $1216 \pm 229$ )。それに伴い、Oct 4を発現するiPS細胞の数は37℃において顕著に増加し(Day 0;  $8834 \pm 2545$ 、Day 1;  $17134 \pm 5731$ 、Day 2;  $31100 \pm 2894$ )、一方、42℃で培養したOct 4を発現するiPS細胞の数は有意に減少した(Day 1;  $2271 \pm 1208$ 、Day 2;  $961 \pm 26$ ) (図2)。42℃での細胞数の減少に伴い、TUNEL陽性の細胞が培養時間依存的に有意に増加した(Day 0;  $3.4 \pm 0.2$ 、Day 1;  $9.4 \pm 4.1$ 、Day 2;  $33.0 \pm 5.6$ ) (図1C、D)。これらの結果から、42℃という温度はヒトiPS細胞がアポトーシスを引き起こす重要な温度であることを示唆している。42℃におけるこれらの細胞傷害効果は、フィーダー細胞無しで培養した異なったiPS細胞株(1231A3株)においても同様の結果が観察された。

[0065] 次に、iPS細胞が死滅する42℃の最小限の培養時間を確かめた。iPS細胞を42℃で1時間、又は3時間培養し、その後、それぞれ培養開始から24時間になるまで37℃で培養した。37℃で24時間培養した時と同様、いずれの培養時間においてもDay 0の細胞数と比較して細胞数は有意に増加した（培養開始前； $11897 \pm 207$ 、37℃24時間； $25721 \pm 3477$ 、42℃1時間+37℃23時間； $23391 \pm 842$ 、42℃3時間+37℃21時間； $20834 \pm 1942$ ）（図3A、B）。42℃で6時間及び9時間培養した場合、細胞数はほとんど変化しなかった（42℃6時間+37℃18時間； $9909 \pm 1714$ 、42℃9時間+37℃15時間； $11934 \pm 2032$ ）。しかし、42℃で12時間以上培養した場合は、Day 0と比較して有意に細胞数が減少していた（42℃12時間+37℃12時間； $5172 \pm 1168$ 、42℃24時間； $2160 \pm 332$ ）。これらの結果から、42℃で12時間以上培養することがiPS細胞を減少させることに重要である可能性が示唆された（図3A、B）。

[0066] フィーダー細胞がiPS細胞との相互作用により細胞を生存させている可能性もあるので、その影響を確認するために、MEF上で培養したiPS細胞に対しても42℃の培養温度が効果的であるかどうかを確かめた。MEF上で培養されたiPS細胞を42℃で培養すると、コロニーを形成した多くの細胞はDay 2までに死滅したが、コロニーの周囲の細胞は残ったままであった（図4A）。共焦点ハイコンテント画像解析（Confocal high content image analysis）の結果より、Oct 4陽性細胞の数は培養時間依存的に有意に減少したが（Day 0； $9931 \pm 250$ 、Day 1； $5250 \pm 1866$ 、Day 2； $767 \pm 215$ ）、Oct 4陰性細胞の数はDay 2までほとんど変化しないことが明らかとなった（Day 0； $11323 \pm 1835$ 、Day 1； $11843 \pm 925$ 、Day 2； $12967 \pm 1440$ ）（図4A、B）。これらのことは、42℃はiPS細胞にとって細胞傷害性を与える温度であるが、フィーダー細胞のような分化した細胞には影響がないことを示唆している。細胞種間で

細胞—細胞間相互作用に違いがある可能性があり、再生医療に用いられる生物工学的に作製される組織において、残存したiPS細胞が42℃で除去されるかどうかを明らかにすることは重要である。iPS細胞の凝集塊をiPS細胞由来の心筋細胞と1日間共培養すると、iPS細胞は心筋細胞と生着した(Day 0;  $7531 \pm 1229$ ) (図4C、D)。これらの共培養した細胞を、37℃でさらに2日間、iPS細胞用培地(AKO3)中、又は心筋細胞用培地(10%FBS含有DMEM)中で培養すると、いずれの条件においても顕著に増殖してコロニーのサイズが増大し、コロニー周辺に心筋細胞が配置するようになった(Day 2 (AKO3);  $15065 \pm 2166$ 、Day 2 (DMEM);  $16984 \pm 3520$ ) (図4C、D)。一方、前述の共培養した細胞を42℃で2日間培養したものは、Oct4陽性細胞の数が減少し、コロニー中のiPS細胞は、まばらな状態で存在していた(Day 2 (AKO3);  $790 \pm 66$ 、Day 2 (DMEM);  $2730 \pm 421$ ) (図4C、D)。これらの結果により、iPS細胞は、様々なタイプの細胞と共培養条件しても、42℃で培養することにより除去できることが示唆された。

[0067] (実施例2)

本発明のiPS細胞を減少させる方法を再生医療の用途で適用するには、42℃の培養条件が、生物工学的に作製する組織に用いる分化した細胞に対して、どのような影響を与えるかを確かめる必要がある。ヒトiPS細胞由来の心筋細胞シートは、主に心筋細胞、線維芽細胞等から構成されているので、42℃培養条件が、iPS細胞由来心筋細胞及び線維芽細胞にどのように影響を及ぼすのかを確認した。

[0068] iPS細胞由来心筋細胞を37℃又は42℃の条件で培養したところ、心筋細胞は自立拍動を示し、37℃及び42℃で2日間培養したいずれの条件においても多くの細胞は生き残ったままであった。37℃及び42℃で1日(Day 1)又は2日(Day 2)培養した場合において、cTnT陽性及びNkx2.5陽性心筋細胞の数はほとんど変わらなかった(cTnT陽性

細胞：37℃ (Day 1)； $11084 \pm 1810$ 、37℃ (Day 2)； $12625 \pm 768$ 、42℃ (Day 1)； $12343 \pm 105$ 、42℃ (Day 2)； $9917 \pm 252$ 、Nkx2.5陽性細胞：37℃ (Day 1)； $11249 \pm 1783$ 、37℃ (Day 2)； $12272 \pm 607$ 、42℃ (Day 1)； $13432 \pm 105$ 、42℃ (Day 2)； $10586 \pm 309$ ) (図5A、B)。これらの結果は、心筋細胞が42℃の培養条件に対しても耐性であることを示唆している。

[0069] 次に、iPS細胞由来の線維芽細胞に対する42℃培養条件の影響を調べた。iPS細胞由来の線維芽細胞を37℃で培養すると、ビメンチン陽性又はSM22陽性iPS細胞由来線維芽細胞は、Day 0と比較して有意に増加した(ビメンチン陽性：Day 0； $10451 \pm 835$ 、Day 1； $12686 \pm 593$ 、Day 2； $16353 \pm 868$ 、SM22陽性：Day 0； $10553 \pm 876$ 、Day 1； $12777 \pm 615$ 、Day 2； $16752 \pm 940$ ) (図5C、D)。一方、iPS細胞由来線維芽細胞の数は、42℃で培養するとDay 1において有意に増加したが(ビメンチン陽性； $11818 \pm 689$ 、SM22陽性； $11895 \pm 693$ ) (図5C、D)、Day 2では有意差は生じなかった(ビメンチン陽性； $11592 \pm 293$ 、SM22陽性； $11738 \pm 278$ ) (図5C、D)。これらのことより、iPS細胞由来線維芽細胞もまた42℃に対して耐性である可能性を示唆している。

[0070] 心筋及び細胞外マトリックス遺伝子のmRNAの発現解析を行い、42℃という温度が、iPS細胞由来の心筋細胞及び線維芽細胞の遺伝子発現においてどのような影響を与えるかを調べた。心筋や線維芽細胞を含むiPS細胞を42℃で培養した場合、MYL2、MYL7、Col1A、Col3A、NPPA及びNPPBのmRNA発現は48時間まで変化しなかったが、TNNT2の発現量は48時間で有意に増加していた(図6A)。このことは、42℃培養条件においても転写活性は維持されていることを示唆していた。これらの結果とは逆に、42℃で培養すると、iPS細胞由来心筋細胞

中のLIN28の発現量は有意に減少し（図6B）、42℃で48時間培養した細胞のLIN28の発現量はiPS細胞の発現量の約0.3%であった（図6C）。これらのことから、42℃での培養はiPS細胞由来の細胞に残存したiPS細胞を減少させるための方法として極めて有用であることを示している。

[0071] iPS細胞由来の心筋細胞に対する42℃での培養はほとんど影響を与えないが、42℃培養法が再生医療に用いられる生体工学的組織の構築においてどのような影響を与えるかを明らかにすることは重要である。心筋分化誘導後のiPS細胞由来心筋細胞は、37℃4日間温度応答性培養皿上で培養すると自立拍動することが確認され、その培養温度を低下させると単層細胞シートが作製された（図6D）。興味深いことに、iPS細胞由来心筋細胞を42℃で2日間（Day1からDay3）又は3日間（Day1からDay4）培養した後に培養温度を下げても細胞シートが得られた（図6D）。これは、細胞-細胞間ジャンクションタンパク質、基底膜タンパク質及び細胞外マトリックスを含む生物工学的に作製される組織を構築するために重要な様々な構成要素が、42℃で培養したとしても維持されることを示唆している。しかしながら、42℃で3日間（Day1からDay4）培養した場合は、心筋拍動が時々弱くなることがあった。一方、42℃で2日間（Day1からDay3）培養した場合は、心筋の拍動に影響は与えなかった。これらのことから、細胞シート作製過程における42℃2日間の培養は、残存しているiPS細胞を除去し、心筋細胞の生存率に影響しない最適な条件である可能性を示唆している。

[0072] （実施例3）

（ヒト心筋組織におけるTRPV-1介在型残存iPS細胞の除去）

高温条件は、温度感受性TRPチャンネルである *activates transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV-1) を活性化することが知られている。我々は、次にiPS細胞やiPS細胞由来心筋細胞におけるTRPV-1の発現を明ら

かにした。iPS細胞のTRPV-1 mRNAの発現量は、42°Cで9時間培養した場合に有意に上昇し、iPS細胞由来心筋細胞のTRPV-1 mRNAの発現は42°Cで12時間培養後に上昇した(図7A)。一方、TRPV-1の発現量は、ベースライン(42°C培養前)のiPS細胞由来心筋細胞及び42°Cで24時間培養したiPS細胞由来心筋細胞よりも、iPS細胞の発現量の方が有意に高かった(図7B)。これらの結果は、42°C培養によるTRPV-1の活性の違いが、42°C培養におけるiPS細胞とiPS細胞由来心筋細胞に対する除去効果の違いを説明しているのかもしれない。

[0073] iPS細胞に対する42°C培養の細胞傷害効果が、TRPV-1の相互作用によるものかを確認するため、iPS細胞に、TRPV-1に対するsiRNAをトランスフェクトした。42°C培養に付随して起こるTRPV-1発現量の上昇が、TRPV-1ノックダウンによって阻害されたことが確認でき(図7C)、そのことと一致して、42°C培養後のiPS細胞の細胞数の減少もTRPV-1 siRNAのトランスフェクトにより阻害されていた(図7D、E)。これらの結果から、TRPV-1は42°C培養におけるiPS細胞の除去に重要な役割を果たしていることが示唆された。

[0074] 最後に、TRPV-1の薬理的活性がiPS細胞には細胞傷害効果を与え、心筋細胞には効果を示さないかどうかを確認した。フィーダーレスのiPS細胞を、カプサイシン(図8)、OLDA(図9)、アルバニル(図10)、を含むTRPV-1アゴニストと一緒に培養したところ、カプサイシンを用いた場合は細胞数が濃度依存的に有意に減少し(図8A、B)、他のTRPV-1アゴニストでの処理もまたiPS細胞に対して細胞傷害活性を示した(図9、図10)。逆に、iPS細胞由来心筋細胞を、iPS細胞では有毒である濃度(200µM及び100µM)のカプサイシンを含む培地で培養したところ、心筋細胞の自立拍動は維持されたままであり、Nkx2.5陽性細胞の数は、溶媒で培養した時と変わらなかった(図8C、D)。これらのことから、TRPV-1のアゴニストは心筋細胞の生存率に影響を

与えることなく、iPS細胞を減少させるのに有効であることが示唆された。

### 産業上の利用可能性

[0075] 本発明に示される方法であれば、多能性幹細胞が含まれる細胞集団を分化誘導して得られた細胞集団から、未分化の多能性幹細胞を減少させることができる。このような細胞集団は、再生医療等の移植材として使用する際の腫瘍化を形成するリスクを低くすることが可能となり、産業上有用である。また、実験等の用途で使用される多能性幹細胞由来の分化細胞集団から、未分化の多能性幹細胞を簡便かつ安価に除去することが出来るようになり、有用である。

## 請求の範囲

- [請求項1] 多能性幹細胞と多能性幹細胞由来の分化細胞とを含む細胞集団を、40.5℃以上の温度で培養し、前記細胞集団に含まれる前記多能性幹細胞を減少させる方法。
- [請求項2] 前記温度が、41℃～43℃である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 前記温度で培養する時間が、10時間～72時間の範囲である、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 前記多能性幹細胞が、人工多能性幹細胞及び／又は胚性幹細胞である、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項5] 前記分化細胞が、心筋細胞、心筋芽細胞、線維芽細胞、壁細胞及び／又は血管内皮細胞を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の方法。
- [請求項6] 請求項1～5のいずれか1項に記載の方法によって得られた、前記多能性幹細胞を減少させた細胞集団。
- [請求項7] 多能性幹細胞と、多能性幹細胞由来の分化細胞とを含む細胞集団から、多能性幹細胞を減少させる方法であって、  
前記細胞集団に含まれる前記多能性幹細胞に発現するTRPV-1を活性化する工程、を含むことを特徴とする方法。
- [請求項8] 前記TRPV-1を活性化する工程が、40.5℃以上の温度で培養して前記TRPV-1を活性化する工程である請求項7に記載の方法。
- [請求項9] 前記温度が、41℃～43℃である請求項8に記載の方法。
- [請求項10] 前記温度で培養して前記TRPV-1を活性化する工程の時間が、10時間～72時間の範囲である請求項8又は9に記載の方法。
- [請求項11] 前記TRPV-1を活性化する工程が、TRPV-1に対するアゴニストを添加する工程である請求項7に記載の方法。
- [請求項12] 前記アゴニストが、カプサイシン、N-o-leoyldopamine (OLD A)、アルバニル、オルバニル、AM404 (アナンダ

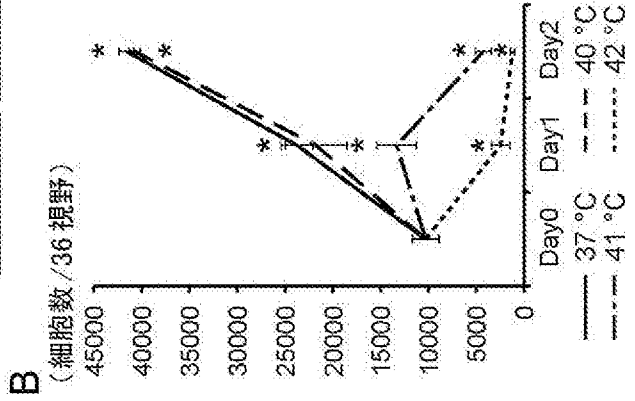
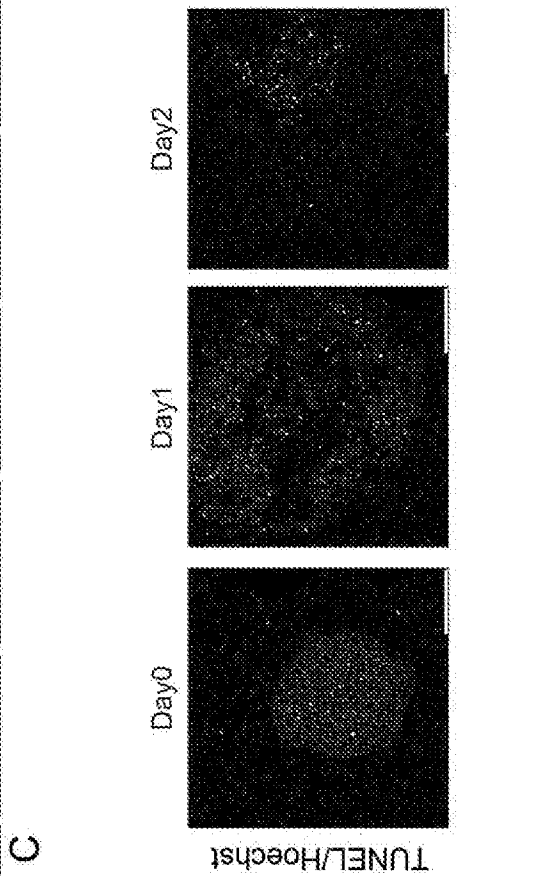
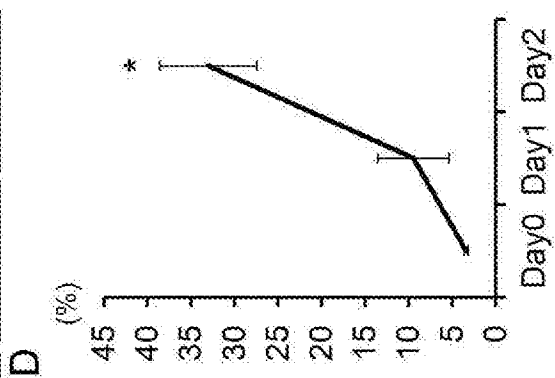
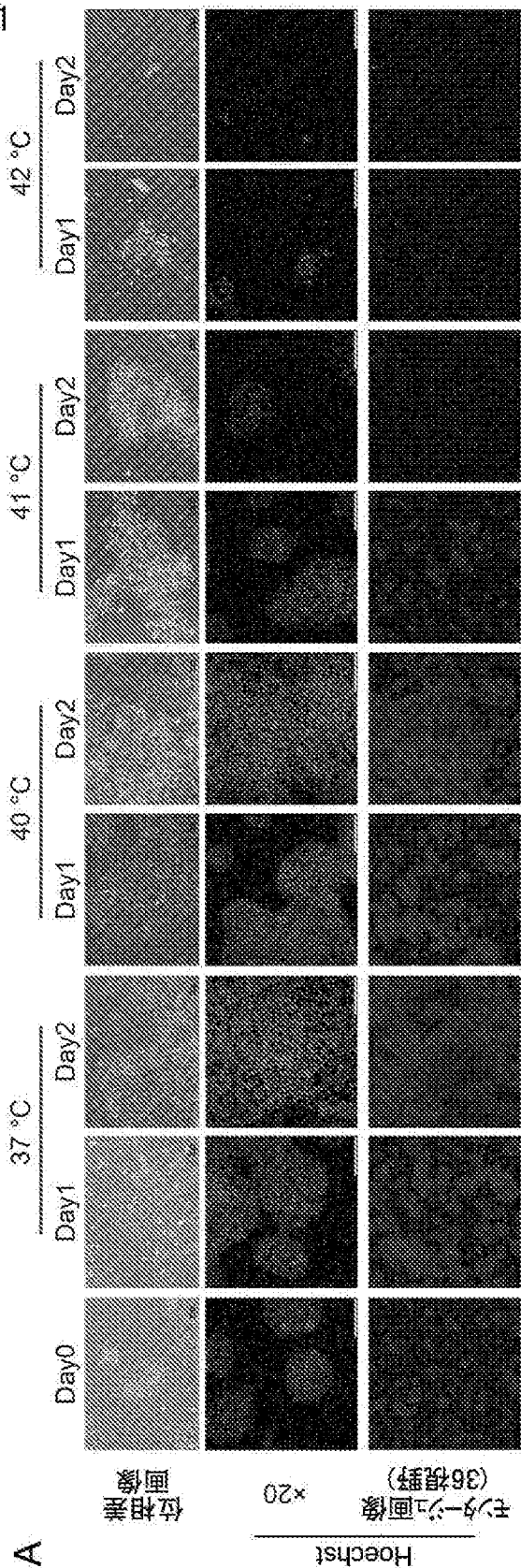
ミド)、2-APB、NADA、PPAHV、抗TRPV-1抗体の  
からなる群から選択された1又は2以上のアゴニストである請求項1  
1に記載の方法。

[請求項13] 前記多能性幹細胞が人工多能性幹細胞及び／又は胚性幹細胞である  
請求項7～12のいずれか1項に記載の方法。

[請求項14] 前記分化細胞が、心筋細胞、心筋芽細胞、線維芽細胞、壁細胞及び  
／又は血管内皮細胞を含む請求項7～13のいずれか1項に記載の方  
法。

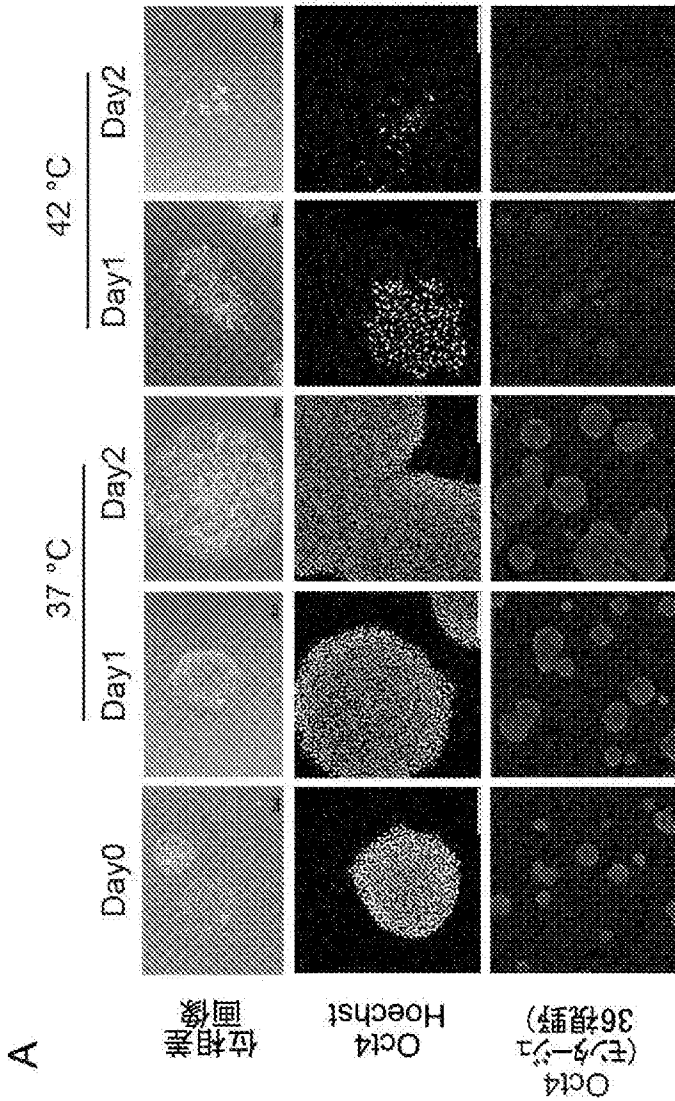
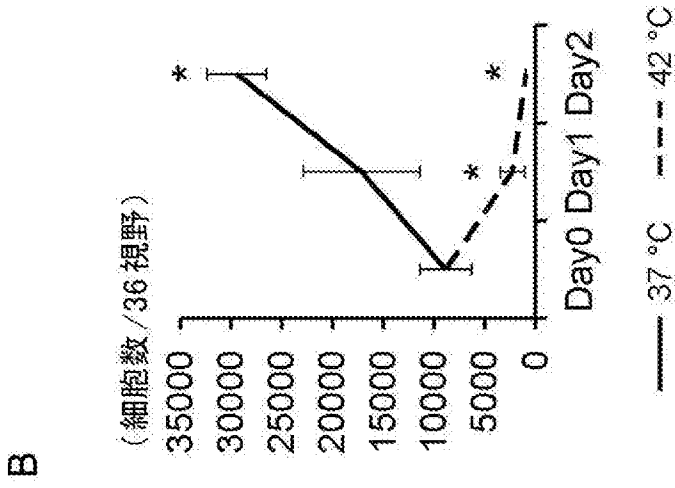
[請求項15] 請求項7～14のいずれか1項に記載の方法によって得られた、前  
記多能性幹細胞を減少させた細胞集団。

図1

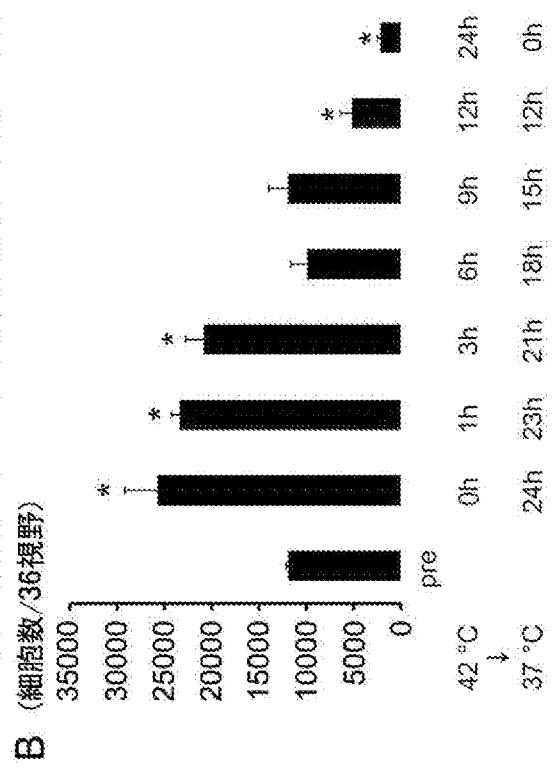
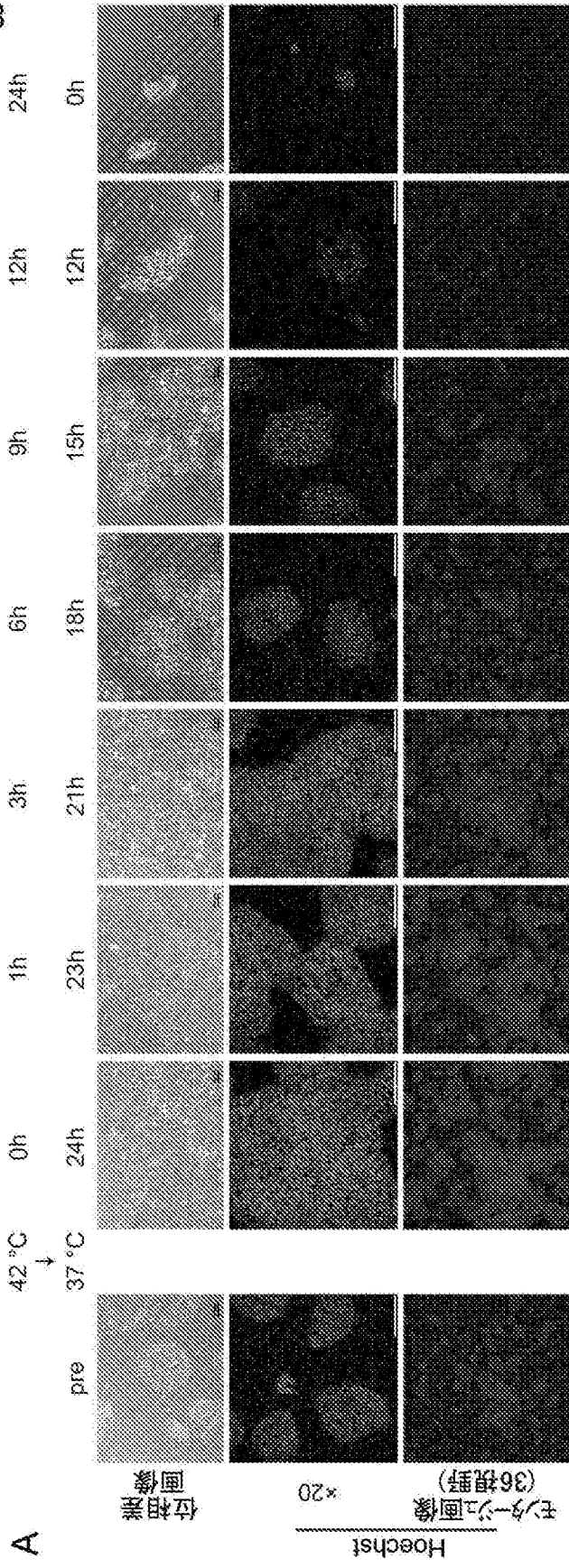


[図2]

図2



[図3]  
図3



[図4]  
図4

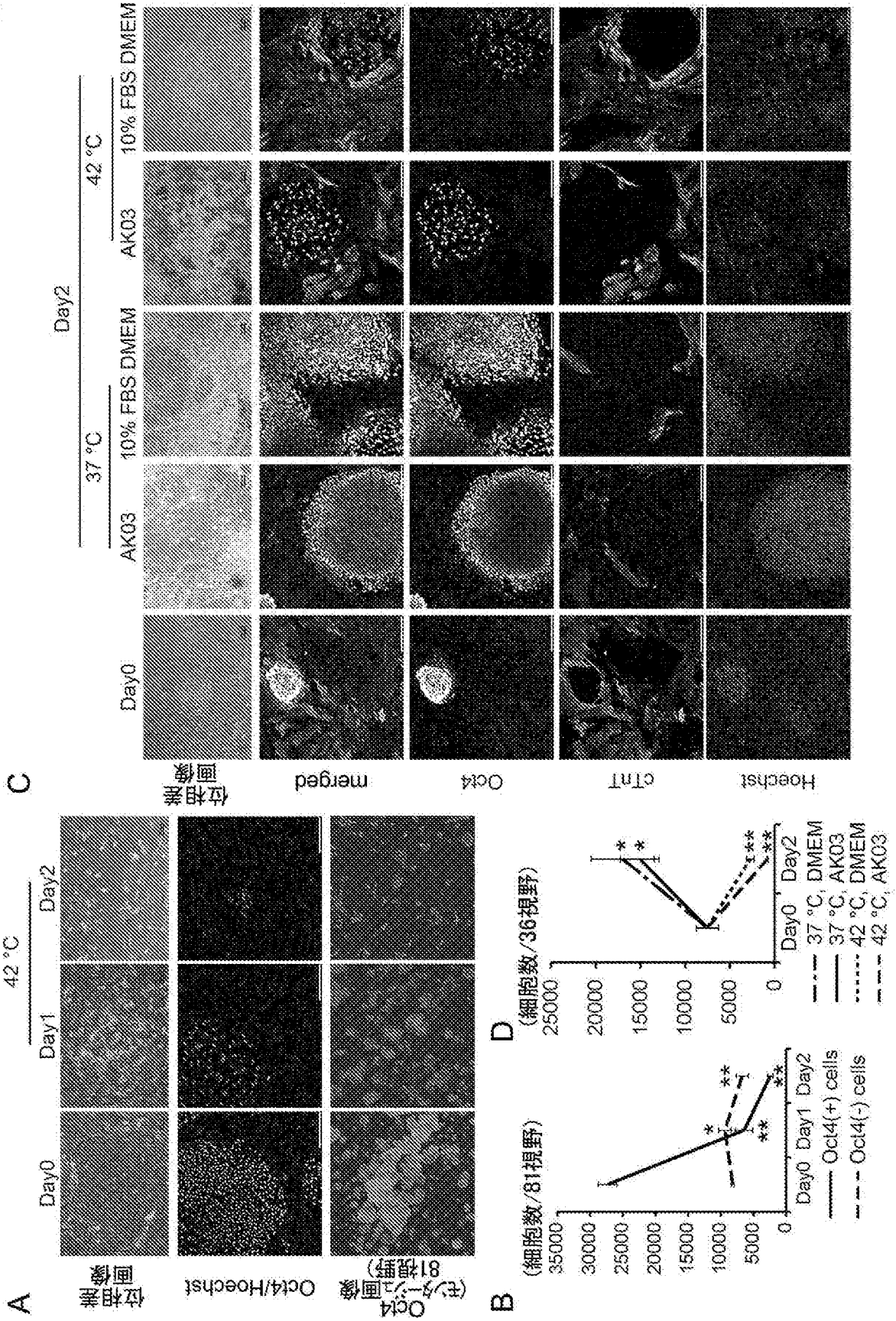
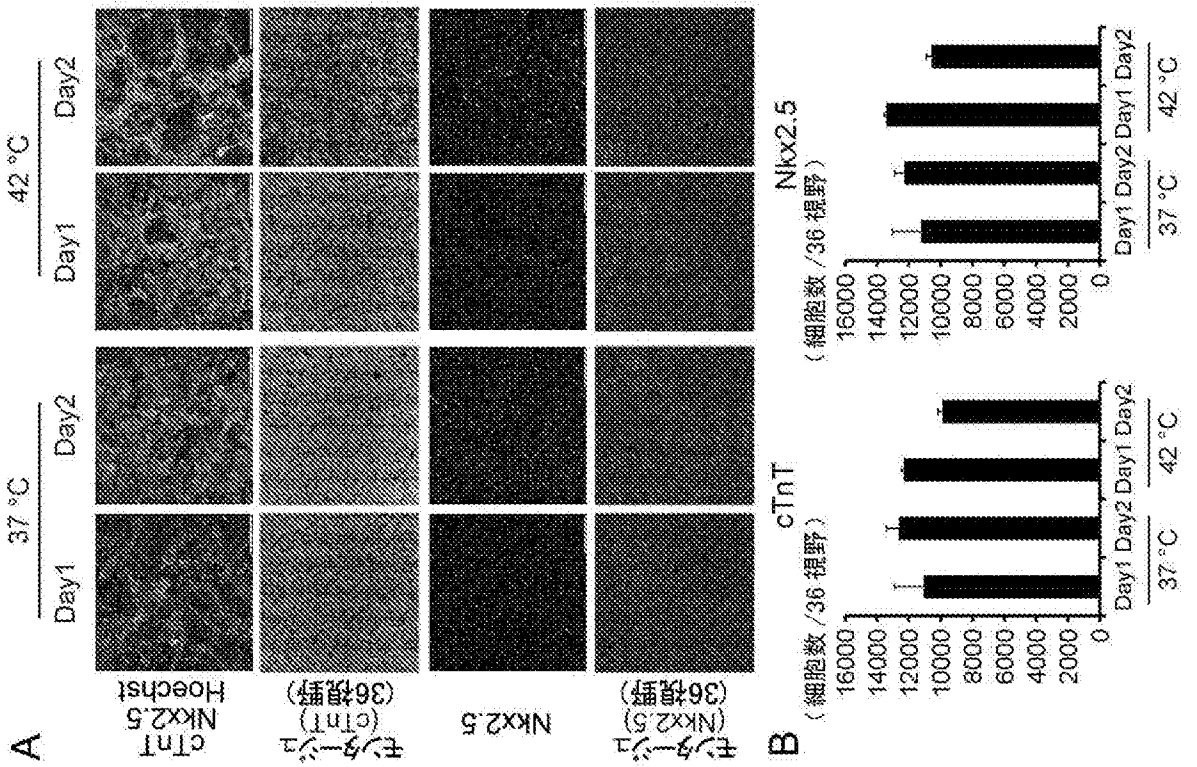
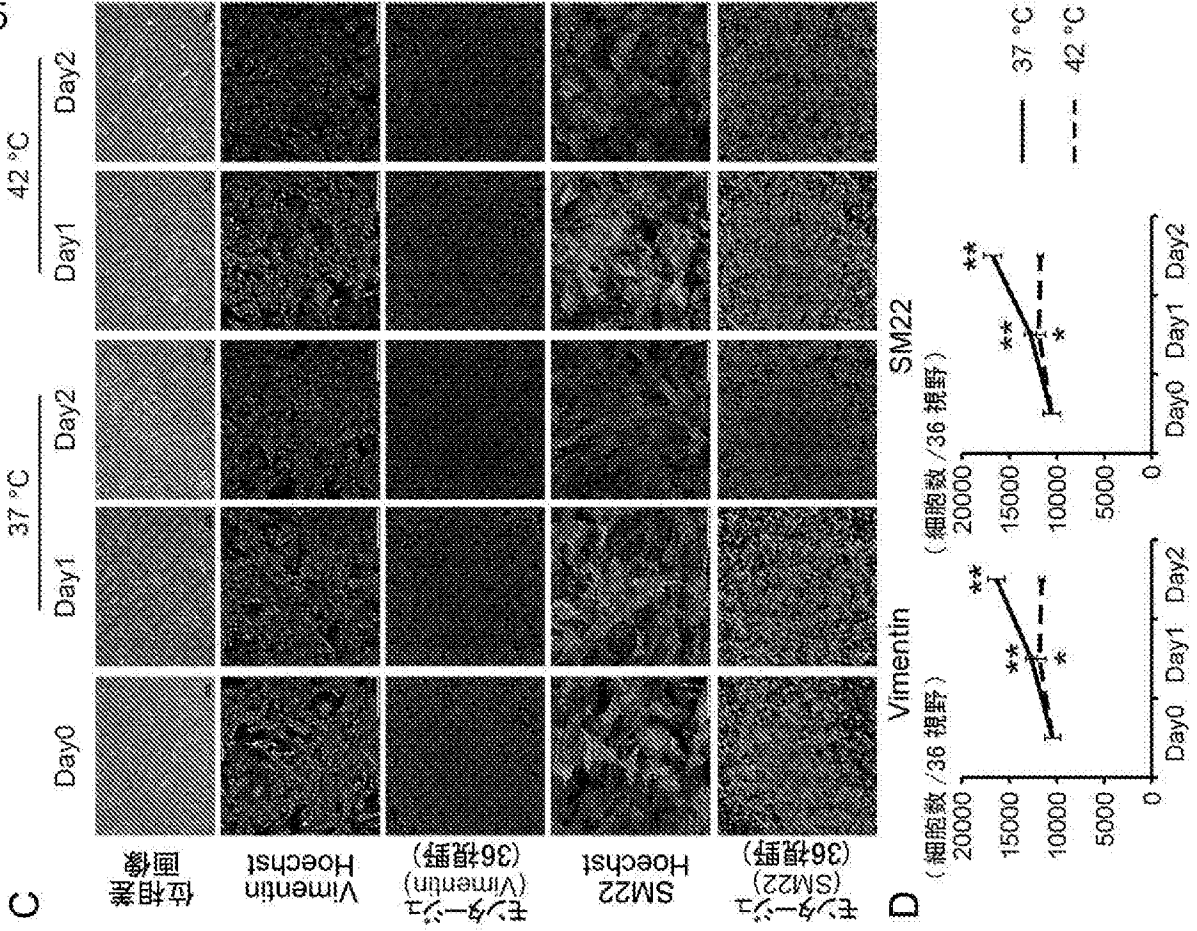


図5



[図6]

図6

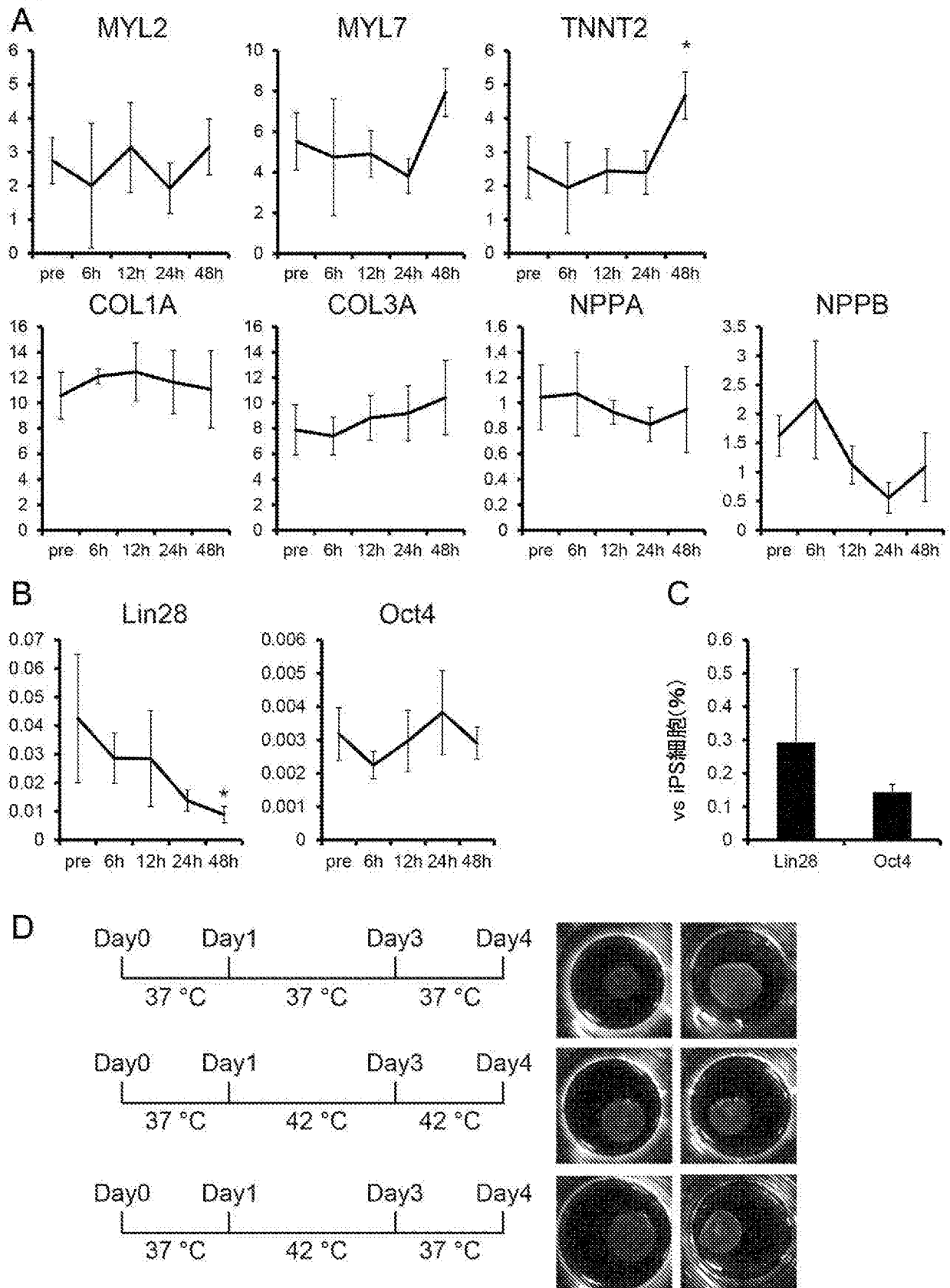


図7  
図7

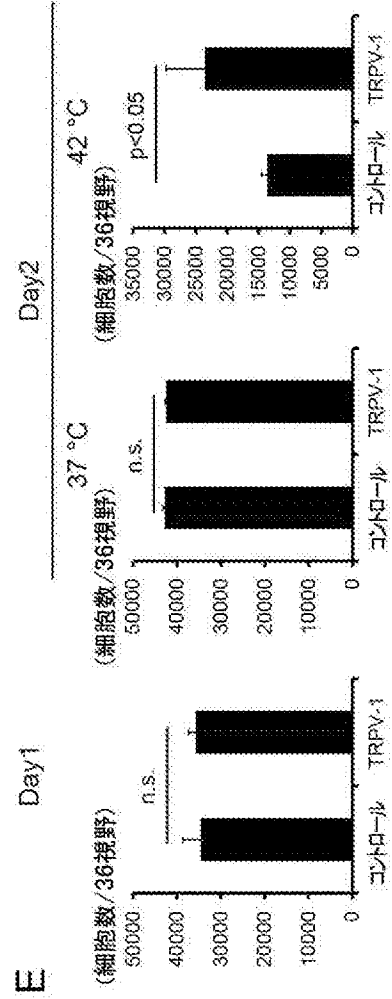
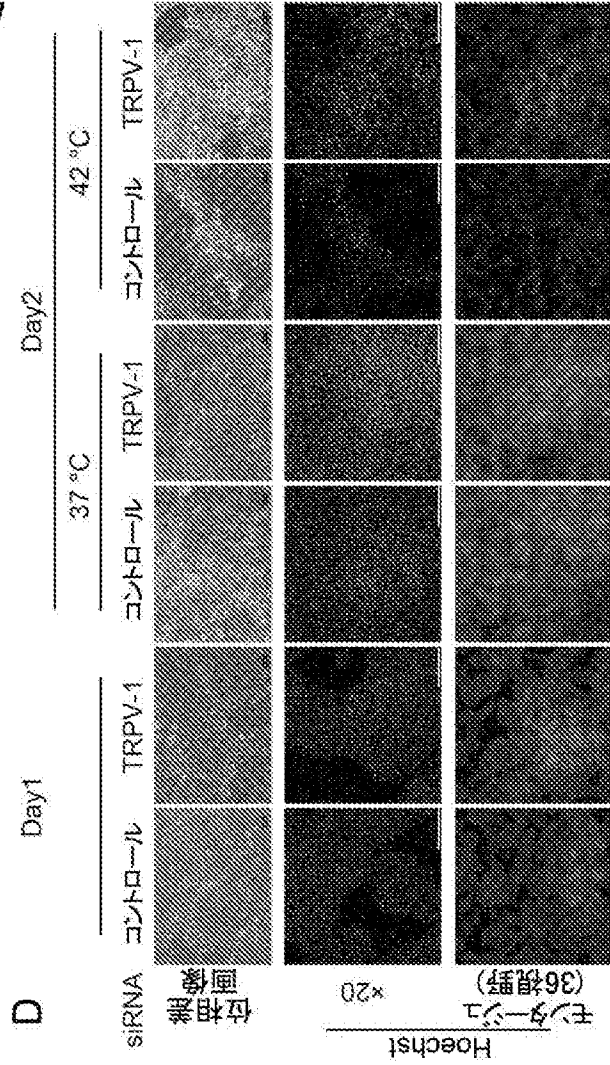
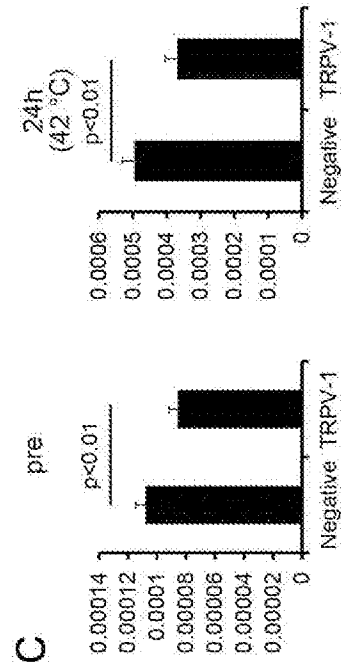
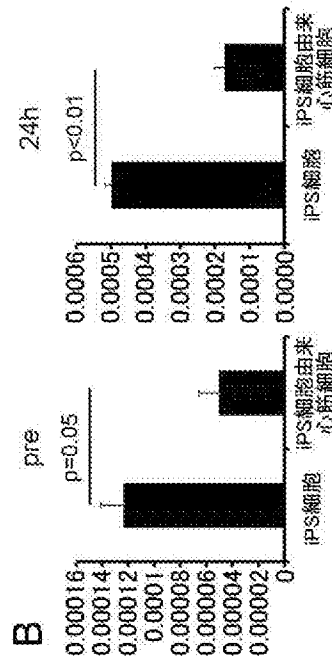
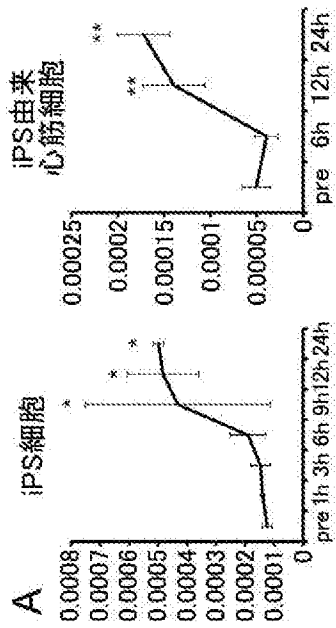


図8  
[8]

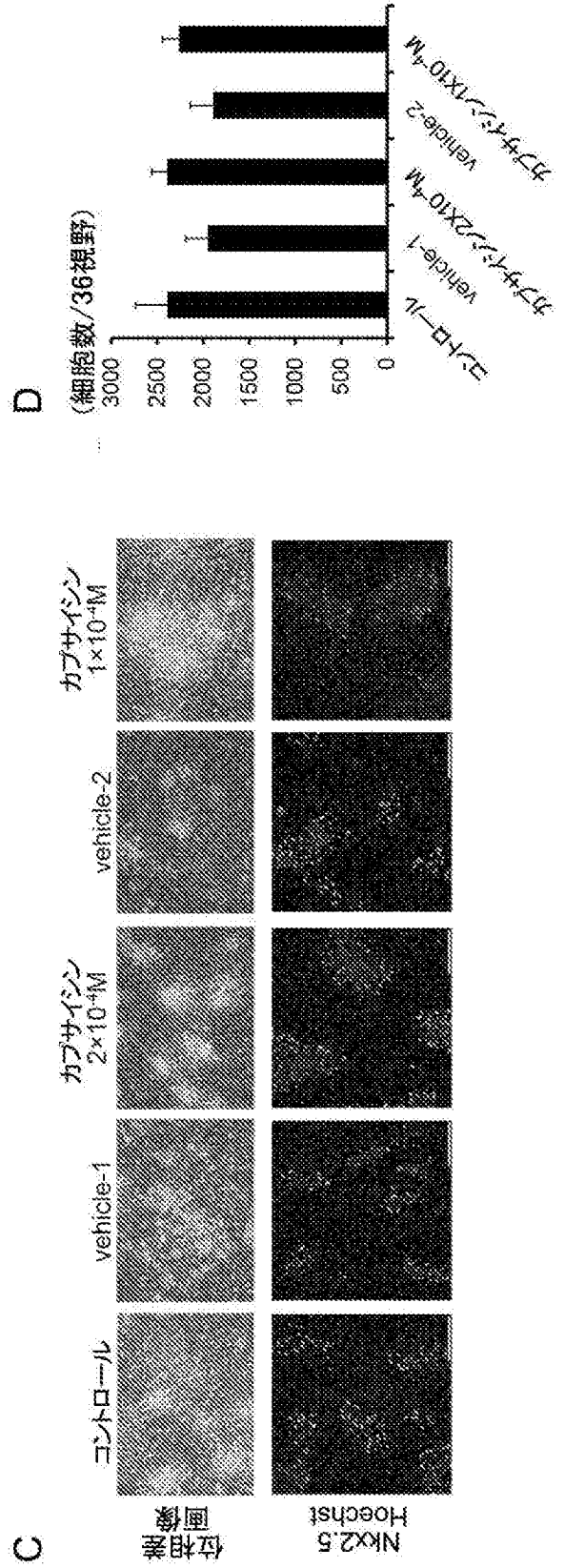
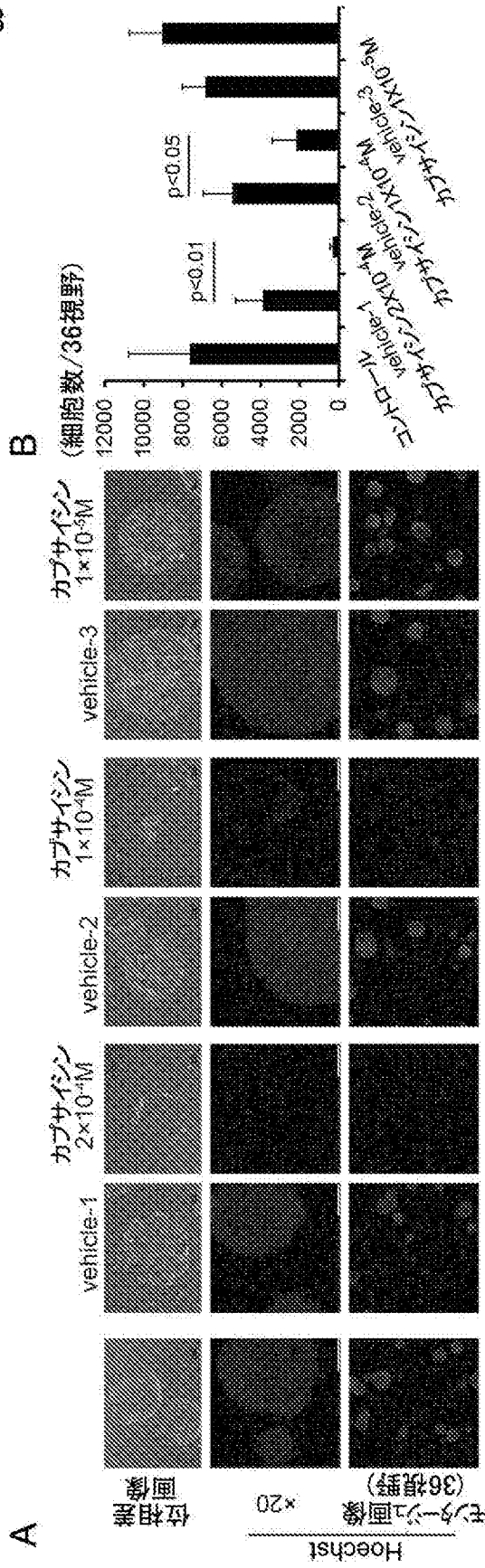
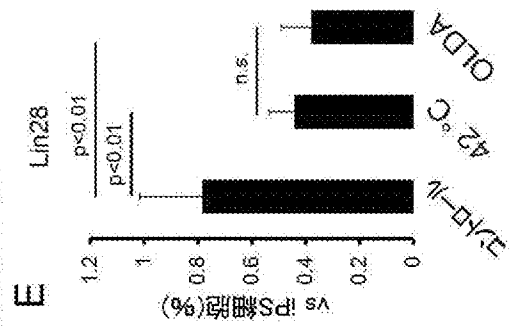
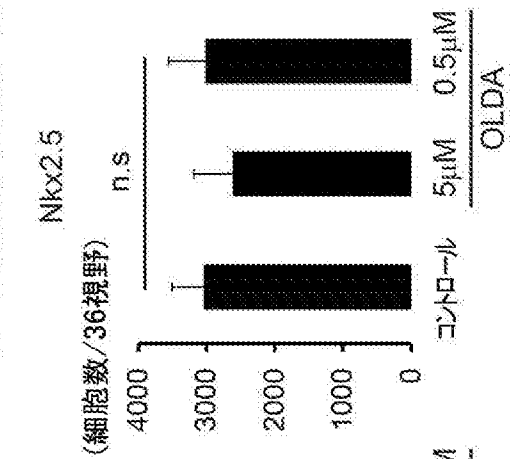
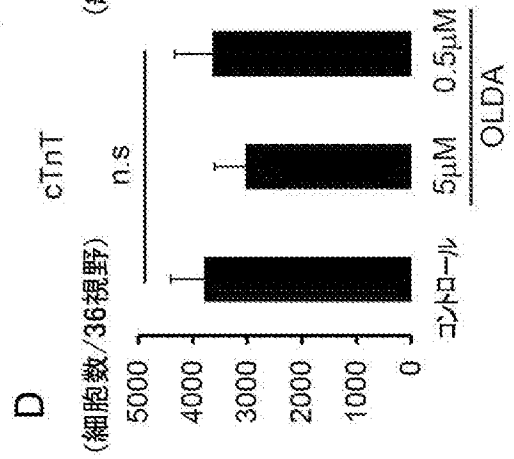
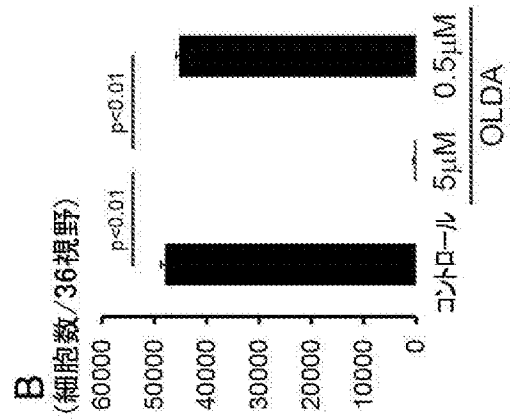
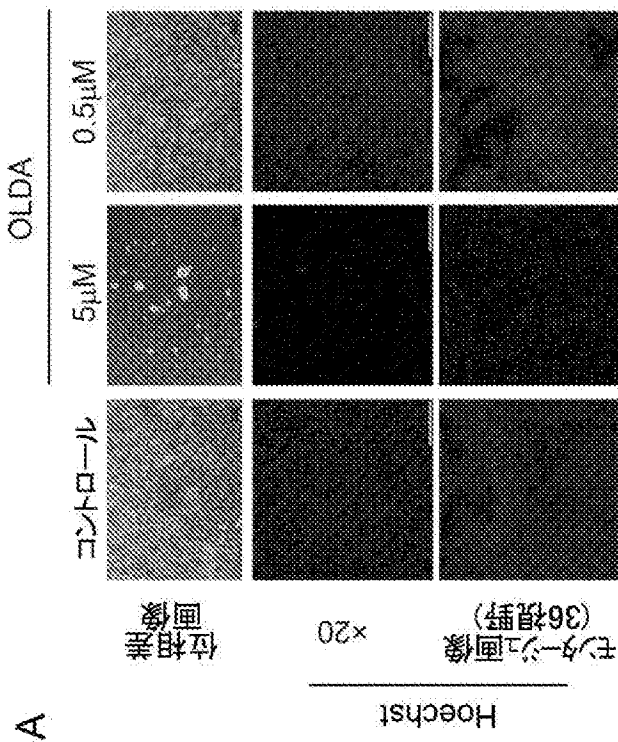
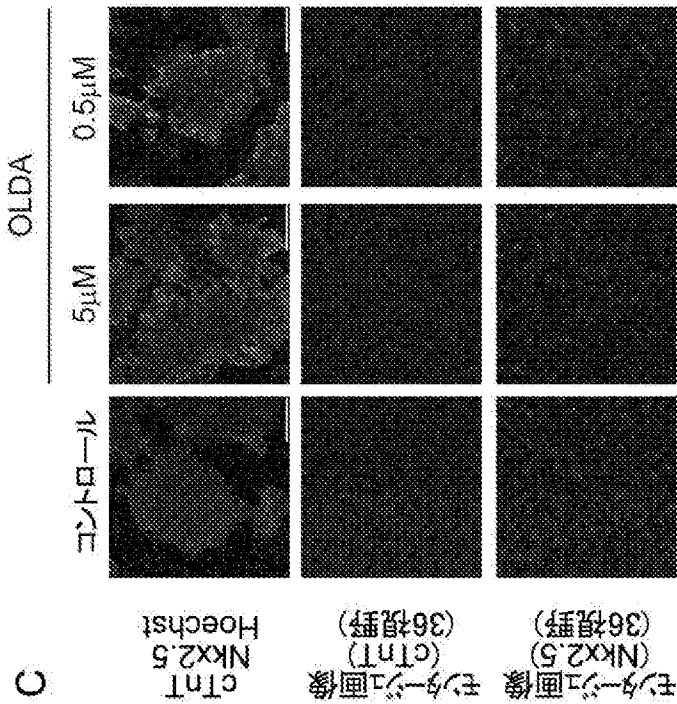


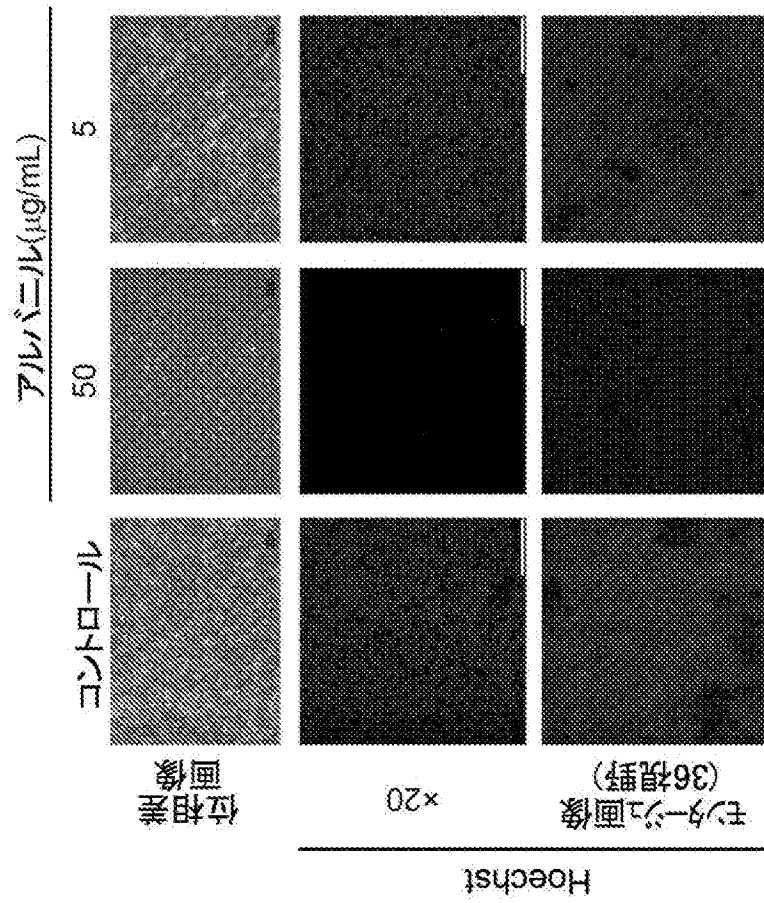
図9  
[9]



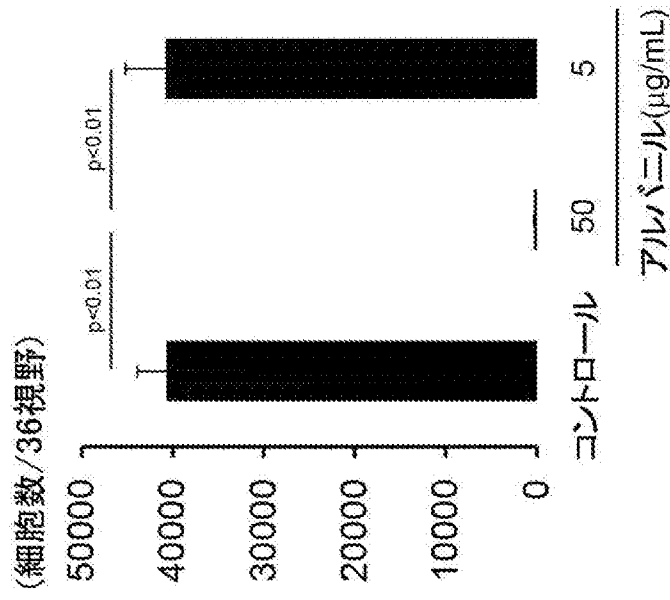
[図10]

図10

A



B



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2016/074545

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

*C12N5/10(2006.01) i, C12N5/0735(2010.01) i, C12N15/09(2006.01) i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/10, C12N5/0735, C12N15/09

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

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

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

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

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	QI Yan et al., Role of TRPV1 in the differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes, PLoS One, 2015.07.24, 10(7), e0133211	1-15
P, X	MATSUURA Katsuhisa, TRPV-1-mediated elimination of residual iPS cells in bioengineered cardiac cell sheet tissues, Scientific Reports, 2016.02.18, 6, 21747	1-15
X	WO 2012/133945 A1 (Tokyo Women's Medical University), 04 October 2012 (04.10.2012), example 7 & JP 2012-210156 A & US 2014/0056859 A1 example 7 & EP 2692859 A1	6, 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  
07 November 2016 (07.11.16)

Date of mailing of the international search report  
22 November 2016 (22.11.16)

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

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2016/074545

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013/137491 A1 (iHeart Japan Corp.), 19 September 2013 (19.09.2013), examples 9, 10 & US 2015/0297794 A1 examples 9, 10 & EP 2826855 A1	6, 15

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2016/074545

**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 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/JP2016/074545

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

(Invention 1) claims 1-6 and 8-10, and the parts of claims 13-15 which refer to claims 8-10

Claims 1-6, which have a special technical feature of a method that comprises culturing a cell population containing pluripotent stem cells and differentiated cells derived from pluripotent stem cells at a temperature of 40.5°C or higher and thus decreasing the pluripotent stem cells contained in the cell population, are referred to as Invention 1.

Further, also the parts of claims 13-15 which refer to claims 8-10 are classified into Invention 1.

(Invention 2) Claims 7, 11 and 12, and the parts of claims 13-15 which refer to claims 7, 11 and 12

The inventions as in the above claims have a technical feature common to claim 1 that is referred to as Invention 1, said technical feature being a method for, from a cell population containing pluripotent stem cells and differentiated cells derived from pluripotent stem cells, decreasing the pluripotent stem cells.

However, the above-said technical feature cannot be considered to be a special technical feature, since the technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in WO 2012/133945 A1 and WO 2013/137491 A1.

Further, there is no other same or corresponding special technical feature between these inventions.

Further, the above-said claims are not dependent on claim 1.

In addition, the above-said claims have no relationship such that these claims are substantially same as or equivalent to any claim classified into Invention 1.

Consequently, claims 7, 11 and 12, and the parts of claims 13-15 which refer to claims 7, 11 and 12 cannot be classified into Invention 1.

Claims 7, 11 and 12 and the parts of claims 13-15 depending on claims 7, 11 and 12, which have a special technical feature of a method for, from a cell population containing pluripotent stem cells and differentiated cells derived from pluripotent stem cells, decreasing the pluripotent stem cells, characterized by comprising a step for activating TRPV-1 expressed in the pluripotent stem cells contained in the cell population, are referred to as Invention 2.

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))                  Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N15/09(2006.01)i</p>												
<p>B. 調査を行った分野                  調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))                  Int.Cl. C12N5/10, C12N5/0735, C12N15/09</p>												
<p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2016年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2016年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2016年	日本国実用新案登録公報	1996-2016年	日本国登録実用新案公報	1994-2016年		
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2016年											
日本国実用新案登録公報	1996-2016年											
日本国登録実用新案公報	1994-2016年											
<p>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)</p> <p>CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)                  JSTPlus/JMEDPlus (JDreamIII)</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>QI Yan et al., Role of TRPV1 in the differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes, PLoS One, 2015.07.24, 10(7), e0133211</td> <td>1-15</td> </tr> <tr> <td>P, X</td> <td>MATSUURA Katsuhisa, TRPV-1-mediated elimination of residual iPS cells in bioengineered cardiac cell sheet tissues, Scientific Reports, 2016.02.18, 6, 21747</td> <td>1-15</td> </tr> </tbody> </table>			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	QI Yan et al., Role of TRPV1 in the differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes, PLoS One, 2015.07.24, 10(7), e0133211	1-15	P, X	MATSUURA Katsuhisa, TRPV-1-mediated elimination of residual iPS cells in bioengineered cardiac cell sheet tissues, Scientific Reports, 2016.02.18, 6, 21747	1-15	
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	QI Yan et al., Role of TRPV1 in the differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes, PLoS One, 2015.07.24, 10(7), e0133211	1-15										
P, X	MATSUURA Katsuhisa, TRPV-1-mediated elimination of residual iPS cells in bioengineered cardiac cell sheet tissues, Scientific Reports, 2016.02.18, 6, 21747	1-15										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&amp;」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「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	「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	「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	「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	「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)	「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	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
「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	「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											
「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	「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											
「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)	「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											
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献											
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願												
<p>国際調査を完了した日 07.11.2016</p>	<p>国際調査報告の発送日 22.11.2016</p>											
<p>国際調査機関の名称及びあて先                  日本国特許庁 (ISA/J P)                  郵便番号100-8915                  東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)                  川口 裕美子                  電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>	<p>4N 9829</p>										

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
X	WO 2012/133945 A1 (学校法人東京女子医科大学) 2012.10.04, 実施例 7 & JP 2012-210156 A & US 2014/0056859 A1 (Example 7) & EP 2692859 A1	6, 15
X	WO 2013/137491 A1 (iHeart Japan株式会社) 2013.09.19, 実施例 9, 10 & US 2015/0297794 A1 (Example 9, 10) & EP 2826855 A1	6, 15

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求項 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2.  請求項 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

## 特別ページ参照

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

## (第 III 欄のつづき)

(発明 1) 請求項 1-6, 8-10, 請求項 13-15 のうち 8-10 を引用する部分

請求項 1-6 は、多能性幹細胞と多能性幹細胞由来の分化細胞とを含む細胞集団を、40.5℃以上の温度で培養し、前記細胞集団に含まれる前記多能性幹細胞を減少させる方法、という特別な技術的特徴を有しているため、発明 1 に区分する。

また、請求項 13-15 のうち 8-10 を引用する部分についても、発明 1 に区分する。

(発明 2) 請求項 7, 11, 12 及び請求項 13-15 のうち請求項 7, 11, 12 を引用する部分

上記の請求項に係る発明は、発明 1 に区分された請求項 1 と、多能性幹細胞と、多能性幹細胞由来の分化細胞とを含む細胞集団から、多能性幹細胞を減少させる方法、という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、W02012/133945 A1, W02013/137491 A1 の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、上記の請求項は、請求項 1 の従属請求項ではない。また、上記の請求項は、発明 1 に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。したがって、請求項 7, 11, 12, 及び請求項 13-15 のうち請求項 7, 11, 12 を引用する部分は、発明 1 に区分できない。

そして、請求項 7, 11, 12, 及び請求項 13-15 のうち請求項 7, 11, 12 を引用する部分は、多能性幹細胞と、多能性幹細胞由来の分化細胞とを含む細胞集団から、多能性幹細胞を減少させる方法であって、前記細胞集団に含まれる前記多能性幹細胞に発現する TRPV-1 を活性化する工程、を含むことを特徴とする方法、という特別な技術的特徴を有しているため、発明 2 に区分する。