(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
2023年1月19日(19.01.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/286772 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/077 (2010.01) *C12N 1/00* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/027420

(22) 国際出願日： 2022年7月12日(12.07.2022)

(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 2021-114913 2021年7月12日(12.07.2021) JP

(71) 出願人: 三菱ケミカル株式会社(**MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1008251 東京都千代田区丸の内一丁目１番１号 Tokyo (JP). 株式会社マイオリッジ(**MYORIDGE CO. LTD.**) [JP/JP]; 〒6068305 京都府京都市左京区吉田河原町１４番地 公益財団法人京都技術科学センター本館Ｂ５号室 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 南 一成(**MINAMI Itsunari**); 〒6068305 京都府京都市左京区吉田河原町１４番地 公益財団法人京都技術科学センター本館Ｂ５号室 Kyoto (JP). 庄司 和磨(**SHOJI Kazuma**); 〒6068305 京都府京都市左京区吉田河原町１４番地 公益財団法人京都技術科学センター本館Ｂ５号室 Kyoto (JP). 山崎 倫子(**YAMAZAKI Michiko**); 〒1008251 東京都千代田区丸の内一丁目１番１号 三菱ケミカル株式会社内 Tokyo (JP). 川端 潤(**KAWABATA Hiroshi**); 〒1008251 東京都千代田区丸の内一丁目１番１号 三菱ケミカル株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 梅田 慎介, 外(**UMEDA Shinsuke** et al.); 〒1000005 東京都千代田区丸の内一丁目６番５号 丸の内北口ビル２１階 大野総合法律事務所 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, 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)）

(54) **Title:** CARDIOMYOCYTE PRODUCTION METHOD

(54) 発明の名称： 心筋細胞の製造方法

(57) **Abstract:** The present invention pertains to a cardiomyocyte production method. More particularly, the present invention pertains to a method for producing a cell population containing cardiomyocytes, said method including a process for inducing the differentiation of cells, which are capable of differentiating into cardiomyocytes, into cardiomyocytes, wherein, in the differentiation induction process, the cells are cultured in a serum-free medium containing α-fetoprotein to obtain the cardiomyocytes.

(57) 要約: 本発明は心筋細胞の製造方法に関する。より詳細には、本発明は、心筋細胞を含む細胞集団の製造方法であって、心筋細胞に分化可能な細胞から心筋細胞への分化誘導プロセスを含み、前記分化誘導プロセスにおいて、αフェトプロテインを含む無血清培地で細胞を培養し、心筋細胞を得ることを含む、前記方法等に関する。

WO 2023/286772 A1

明　細　書

発明の名称 ： 心筋細胞の製造方法

技術分野

[0001] 関連出願：

本出願は日本特許出願２０２１－１１４９１３（２０２１年７月１２日出願）に基づく優先権を主張しており、この内容は本明細書に参照として取り込まれる。

技術分野：

本発明は心筋細胞の製造方法に関する。より詳細には、多能性幹細胞から成熟型の心筋細胞を高い割合で含む細胞集団を製造する方法に関する。

背景技術

[0002] 心移植に代わる治療法として、幹細胞由来の心筋細胞移植の実現が望まれている。心筋細胞をヒトに移植するためには、少なくとも10^9個の細胞が必要と言われており、成熟した質の高い心筋細胞を高純度で含む細胞集団を調製することが心臓再生医療の実現のためには重要である。公知の方法で得られた心筋細胞をマーカー等を利用して濃縮し、高純度化することも可能ではあるが、従来の心筋細胞誘導法は多数のサイトカインを必要とするため、生産コストが高くなるという問題がある。

[0003] 発明者らは、低分子化合物を利用して安価かつ高効率で心筋細胞を分化誘導する方法を開発している（特許文献１～３）。この方法はサイトカインなどのタンパク質を低分子化合物に置き換えたプロテインフリー分化誘導法である。しかしながら、iPS細胞由来の心筋細胞は一般的に胎児性心筋細胞に類似した未熟な段階に留まり、成熟化には時間がかかる。これに対し、特定の低分子化合物を添加することで成熟化を図る方法も提案されているが、内因性のTNNI3遺伝子の発現上昇が示されているのみで、細胞の質や収量の改善は明らかではない（特許文献４）。

[0004] αフェトプロテインはウシ胎児血清に含有される成分であり、血清代替物

として培地に添加されることがある（特許文献５～８）。αフェトプロテインは血清代替物として幹細胞の増殖を促進すること（特許文献５）や未分化性維持に使用されること（特許文献８）は知られているが、細胞の特定の細胞への分化誘導因子として利用する方法は知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：ＷＯ２０１２／０２６４９１

特許文献2：ＷＯ２０１３／１１１８７５

特許文献3：ＷＯ２０１５／１８２７６５

特許文献4：ＷＯ２０１９／１８９５５４

特許文献5：ＷＯ２００８／１４８９３８（特表２０１０－５２８６４２号）

特許文献6：ＷＯ２０１１／１２５８６０

特許文献7：ＷＯ２０１３／０４７７６３

特許文献8：ＷＯ２０１１／０６７４６５（特表２０１３－５１２６６７号）

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の課題は、成熟した心筋細胞を短時間に効率よく誘導できる方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 発明者らは、心筋細胞への分化途中でαフェトプロテインを添加することにより、心筋細胞の収量が向上し、細胞骨格が発達した成熟型心筋細胞や心房型の心筋細胞の割合が向上することを見出した。本発明は、かかる知見に基づくものであり、下記の［１］～［２４］を提供する。

［１］ 心筋細胞を含む細胞集団の製造方法であって、心筋細胞に分化可能な細胞から心筋細胞への分化誘導プロセスを含み、前記分化誘導プロセスにおいて、αフェトプロテインを含む無血清培地で細胞を培養し、心筋細胞を得ることを含む、前記方法。

［２］　心筋細胞に分化可能な細胞が、多能性幹細胞又は多能性細胞由来の中胚葉細胞である、［１］に記載の方法。

［３］　多能性幹細胞がiPS細胞である、［２］に記載の方法。

［４］　得られる心筋細胞がhERG、KCNJ2、SCN5AまたはMYL7が高発現している心筋細胞である、［１］～［３］のいずれかに記載の方法。

［５］　得られる心筋細胞が成熟型の心筋細胞である、［１］～［４］のいずれかに記載の方法。

［６］　分化誘導開始後から細胞の拍動が確認されるまで、αフェトプロテインを含む無血清培地で細胞を培養する、［１］～［５］のいずれかに記載の方法。

［７］　細胞の拍動が確認された後、αフェトプロテインを含む無血清培地で細胞を培養する、［１］～［６］のいずれかに記載の方法。

［８］　得られる細胞集団が、フローサイトメトリーで測定される細胞の割合として、80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上の心筋細胞を含む、［１］～［７］のいずれかに記載の方法。

［９］　αフェトプロテインがヒトαフェトプロテインである、［１］～［８］のいずれかに記載の方法。

［１０］　無血清培地が5～100 μg/mLのαフェトプロテインを含む、［１］～［９］のいずれかに記載の方法。

［１１］　無血清培地が、ゼノフリー及び／又はサイトカインフリーである、［１］～［１０］のいずれかに記載の方法。

［１２］　αフェトプロテインを除いて、無血清培地がプロテインフリーである、［１］～［１０］のいずれかに記載の方法。

［１３］　αフェトプロテイン、好ましくは5～100 μg/mLのαフェトプロテイン、及び心筋細胞への分化誘導因子を含む、無血清培地。

［１４］　無血清培地が、ゼノフリー及び／又はサイトカインフリーである、［１３］に記載の培地。

［１５］　αフェトプロテインを除いて、無血清培地がプロテインフリーで

ある、［１３］又は［１４］に記載の培地。

［１６］　心筋細胞への分化誘導因子が、CHIR99021、prostratin、KY03-I、XAV939、A419259、及びAG1478のいずれかを含む、［１３］～［１５］のいずれかに記載の培地。

［１７］　心筋細胞への分化誘導因子が後述するWntシグナル活性化剤（GSK3β阻害剤）、PKC活性化剤、Src阻害剤、及びEGF受容体阻害剤からなる群より選ばれる１以上である、［１３］～［１６］のいずれかに記載の培地。

［１８］　心筋細胞を含む細胞集団の培養物であって、αフェトプロテインを含み、血清を含まず、好ましくは、前記細胞集団が、フローサイトメトリーで測定される細胞の割合として、80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上の心筋細胞を含む、前記培養物。

［１９］　αフェトプロテインを有効成分として含む心筋細胞成熟化促進剤。

［２０］　心筋細胞の成熟を促進する方法であって、心筋細胞への分化誘導工程において、αフェトプロテインを培地に添加することを特徴とする方法。

［２１］　心筋細胞の収量を向上させる方法であって、心筋細胞への分化誘導工程において、αフェトプロテインを培地に添加することを特徴とする方法。好ましくは、心筋細胞の収量は、αフェトプロテインを添加しない場合に比較して、少なくとも5%、より好ましくは10%以上、30%以上、あるいは50%以上向上する。

［２２］　心房型の心筋細胞の割合を向上させる方法であって、心筋細胞への分化誘導工程において、αフェトプロテインを培地に添加することを特徴とする方法。好ましくは、FACSで測定されるMYL7陽性細胞の割合が60%以上になるか、あるいはRT-PCRで測定されるMYL7遺伝子の発現量が、αフェトプロテインを添加しない場合に比較して、50%以上、好ましくは70%以上、80%以上、90%以上、より好ましくは100%向上する。あるいは、イオンチャネルの発現量が、未熟な心筋細胞に比較して、50%以上、好ましくは、100%、

より好ましく200%、さらに好ましくは400%以上向上する。

［２３］　成熟型の心筋細胞の割合を向上させる方法であって、心筋細胞への分化誘導工程において、αフェトプロテインを培地に添加することを特徴とする方法。好ましくは、成熟型の心筋細胞の割合は、αフェトプロテインを添加しない場合に比較して、少なくとも5%以上、より好ましくは10%以上、あるいは20%以上向上する。

［２４］　上記［１］～［１２］のいずれかに記載の方法で得られる細胞集団と、薬理学的に許容しうる担体を含む心疾患治療用の医薬組成物であって、前記細胞集団が、フローサイトメトリーで測定される細胞の割合として、80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の心筋細胞を含み、成熟型の心筋細胞及び／又は心房型の心筋細胞が富化されている、医薬組成物。

発明の効果

[0008]　本発明によれば、成熟した心筋細胞を短期間で効率よく誘導することができる。本発明の方法は無血清培地を用いるため培地成分をより安定的に制御することができ、臨床使用に適した成熟型心筋細胞を高純度で含む細胞集団を安価かつ短期間で調製することができる。さらに、本発明の方法は、PFCD法を組みわせることで、ゼノフリー、サイトカインフリーで多能性幹細胞を心筋細胞に誘導することが可能である。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図１AはAFP（50 μg/mL）添加期間を示す。図1Bは、各条件で培養後Day19に得られた心筋細胞（cTnT陽性細胞）率を示す。

[図2]図2AはAFP（10 μg/mL）添加期間を示す。図2Bは、各条件で培養後Day28に得られた心筋細胞（cTnT陽性細胞）率を示す。図2CはMYL7遺伝子発現量を示す。図2Cの縦軸は、relative mRNA expression（コントロール(A)の発現量を1とした時の相対的mRNA発現量）を示す。

[図3]図3は、心筋細胞にAFPを終濃度10 μg/mLと1 μg/mLとなるように添加し、培養したときのファロイジン蛍光量を示す。縦軸は、ファロイジン-FITC

のFITC総蛍光量を示す。

[図4]図4は、心筋細胞に各種AFP試料を添加し、培養したときのファロイジン蛍光量を示す。縦軸は、ファロイジン-FITCのFITC総蛍光量を示す。

[図5]図5Aは、α-MHC、β-MHC、MYL7の発現量を示す。図5Bは、電位依存性Kチャネルマーカーであるh ERG、Kir2.1、及び電位依存性NaチャネルマーカーであるNav1.5、ペースメーカー特異的イオンチャネルであるhHCN4の発現量を示す。 各グラフの縦軸は、relative mRNA expression（コントロールの条件をN=3で実施し、A-1の発現量を1とした時の相対的mRNA発現量）を示す。

[図6]図6は、2%FBS、HSA、臍帯血由来AFP、HEK組換えAFP、及び臍帯血由来AFP+HSAをそれぞれ添加したときの、A:ファロイジン輝度（細胞骨格の発達）、B:cTnT輝度（心筋繊維の発達）、及びC:DAPI個数（細胞の個数）を示す。

発明を実施するための形態

[0010] １．心筋細胞を含む細胞集団の製造方法

本発明は、心筋細胞に分化可能な細胞から心筋細胞への分化誘導プロセスにおいて、αフェトプロテインを含む無血清培地で細胞を培養し、心筋細胞を得ることを含む、心筋細胞を含む細胞集団の製造方法に関する。

[0011] 本発明において、「心筋細胞」とは、心筋を構成する細胞であって、例えば、心筋トロポニン（cTnT）の発現と拍動で特徴づけられる。心筋細胞には、洞結節型、心室型、心房型などのサブタイプが存在する。後述するように心房型の心筋細胞はMYL7遺伝子等の高発現によって特徴づけられる。成熟した心筋細胞はイオンチャネルの高発現によっても特徴づけられる。

[0012] 本発明において、「心筋細胞に分化可能な細胞」とは、心筋細胞への分化可能な細胞であれば特に限定されず、例えば、多能性幹細胞（pluripotent stem cell）、間葉系幹細胞、心筋前駆細胞、多能性幹細胞から分化された中胚葉系細胞が含まれる。好ましくは、「心筋細胞に分化可能な細胞」は、多能性幹細胞または多能性幹細胞から分化された中胚葉系細胞である。

[0013] 本発明において、「多能性幹細胞（pluripotent stem cell）」とは、３胚葉（内胚葉、中胚葉、外胚葉）のいずれの系統の細胞にも分化する能力をも

った幹細胞を意味する。多能性幹細胞としては、例えば、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）、精子幹細胞、胚性生殖細胞などが挙げられる。

[0014] 「iPS細胞」としては、京都大学Yamanakaらにより、Oct3/4・Sox2・Klf4・c-Mycの4因子をマウス又はヒト細胞（線維芽細胞、末梢血細胞、臍帯血細胞等）に導入して樹立されたiPS細胞や、Oct3/4・Sox2・Klf4の3因子をマウス又はヒト細胞に導入して樹立されたiPS細胞；Wisconsin大のThomsonらにより、OCT3/4, SOX2, NANOG, LIN28の4遺伝子をマウス又はヒト細胞に導入して樹立されたiPS細胞、Harvard大のDaleyらにより、マウス又はヒト細胞にOCT3/4, SOX2, KLF4, C-MYC, hTERT, SV40 large Tの6遺伝子を導入して樹立されたiPS細胞が挙げられる。iPS細胞は臨床グレードのヒトiPS細胞が好ましく、必要に応じて移植を受ける対象とHLA型が一致する細胞を使用する。

[0015] 「ES細胞」は特に限定されないが、倫理的な側面から、樹立されたES細胞株を使用することが好ましい。ES細胞株としては、理研、京都大学、NIHから提供されているES細胞株のほか、Cellartis社が販売しているES細胞株等を利用することができる。

[0016] 本発明において、「心筋前駆細胞」とは、心筋細胞への分化指向性を有する前駆細胞・幹細胞を意味する。心筋前駆細胞には、c-kit陽性の心筋前駆細胞とc-kit陰性の心筋前駆細胞があり、心臓組織から公知の方法により単離することができる（WO2003/035838、WO2006/093276等）。

[0017] 本発明において、「多能性幹細胞由来の中胚葉細胞」とは、上記した「多能性幹細胞」から分化誘導された中胚葉細胞である。中胚葉とは、動物の発生初期において、内胚葉と外胚葉の間に形成される細胞群である。具体的には、「多能性幹細胞由来の中胚葉細胞」は、多能性幹細胞から心筋細胞への分化誘導途中で得られる細胞群であり、例えば、中胚葉系マーカーであるT、MIXL1、NODAL、MSX1、αSMA、NKX2.5、又はαMHCの発現によって特徴づけられる。本発明においては、細胞骨格が発達していない心筋細胞、トロポニンTやトロポニンI、βMHCの発現量が低い心筋細胞、NKX2.5の発現量が高い心筋

細胞のように、未成熟な心筋細胞も「多能性幹細胞由来の中胚葉細胞」に含まれるものとする。

[0018] 本発明で使用される細胞は、好ましくは哺乳類細胞であり、より好ましくはヒトの細胞である。

[0019] 本発明においては、上述した心筋細胞に分化可能な細胞を、αフェトプロテインを含む無血清培地で培養する。

[0020] 「αフェトプロテイン」は、胎児の肝細胞や卵黄嚢で産生される糖タンパク質である。「αフェトプロテイン」は内胚葉系である初期肝細胞のマーカーであり、肝細胞癌などの腫瘍細胞で産生されるため、腫瘍マーカーとしても知られている。「αフェトプロテイン」はウシ胎児血清（FBS）に豊富に含まれているが、組換え型のαフェトプロテインも利用可能であり、血清代替物として利用されることもある。

[0021] 本発明で使用されるαフェトプロテインは、ウシαフェトプロテイン又はヒトαフェトプロテインが好ましく、ヒトαフェトプロテインがより好ましい。また臨床使用を考慮すると、αフェトプロテインは組換え型αフェトプロテイン、特に組換え型ヒトαフェトプロテインが好ましい。

[0022] 無血清培地に添加するαフェトプロテインの量は、使用する細胞の特性に応じて適宜設定される。αフェトプロテインの量は、例えば、少なくとも1 μg/mL以上、2 μg/mL以上、3 μg/mL以上、好ましくは5 μg/mL以上、より好ましくは10 μg/mL以上である。上限は、多くとも500μg/mLが好ましく、より好ましくは300μg/mL、さらに好ましくは200 μg/mL、特に好ましくは100 μg/mL、より好ましくは50 μg/mLである。例えば、1～200 μg/mLの範囲、好ましくは5～100 μg/mLの範囲、より好ましくは10～50μg/mLの範囲で使用される。

[0023] 本発明で使用されるαフェトプロテインは、αフェトプロテインの他に薬理学的に許容しうる他の成分を含む組成物を用いてもよい。αフェトプロテインを含む組成物は、限定されず公知の試薬などが使用できる。例えば、Bio Vision AFP（カタログナンバーP1585）、LEE BIOSOLUTIONS AFP（カタログナ

ンバー105-11），HyTest AFP（カタログナンバー8F8）などがあり、なかでも、HyTest AFP（カタログナンバー8F8）が溶媒部分に含まれる毒性が低いという理由で好ましい。また、BioVision AFPおよびLEE BIOSOLUTIONS AFPを使用する場合はバッファー置換してAFP以外の他の成分を減少したり、除去したりして用いることが好ましい。

[0024] 本発明で使用する「無血清培地」とは、無調整又は未精製の血清を含まない培地を意味する。無血清培地の構成については、「３．培地」において詳述する。

[0025] αフェトプロテインを含む無血清培地での細胞の培養は、細胞が中胚葉系細胞、好ましくは未成熟な心筋細胞まで分化した段階で実施することが好ましい。未成熟な心筋細胞は、例えば、分化途中において、心筋細胞が拍動を開始してから0～7日後の細胞、あるいは中胚葉系マーカーであるT、MIXL1、NODAL、MSX1、αSMA、NKX2.5、又はαMHCの発現によって特徴づけられる。多能性幹細胞を出発材料とする場合の方法は、次項において詳述する。

[0026] 本発明の方法で得られる「心筋細胞」は、好ましくは「成熟型の心筋細胞」である。「成熟型の心筋細胞」とは、細胞骨格が発達した心筋細胞を意味する。細胞骨格の発達は、例えば、ファロイジンなどを用いて細胞のアクチンフィラメントを染色することにより、確認することができる。例えば、免疫染色でファロイジンとcTnTの二重染色を行うことにより、細胞骨格が発達した「成熟型の心筋細胞」の量（割合）を決定することができる。

[0027] また、「成熟型の心筋細胞」は、心筋細胞が成熟すると発現量が上がることが知られている電位依存性Kチャネル（Kv11.1、Kir2.1）や電位依存性Naチャネル（Nav1.5）の高発現によっても特徴づけられる。例えば、RT-PCRによってKv11.1をコードするhERG、 Kir2.1をコードするKCNJ2、あるいはNav1.5をコードするSCN5AのRNA（mRNA）量を測定することで、比較対象（例えば、コントロール）に対する成熟型心筋細胞の量を知ることができる。なおイオンチャネル遺伝子（hERG、KCNJ2、SCN5A）が「高発現」とは、未熟な心筋細胞に比較して、50％以上発現量が高いことを意味する。好ましくは、イオン

チャネル遺伝子の発現量は100%、より好ましく200%、さらに好ましくは400%以上、未熟な心筋細胞に比較して高い。あるいは、FACSによってイオンチャネルタンパク陽性細胞の数（割合）を測定することで「成熟型の心筋細胞」の量（割合）をより明確に知ることができる。その場合、イオンチャネル陽性細胞が60%以上であれば、イオンチャネルが高発現の（成熟型）心筋細胞」を含む細胞集団と言える。

[0028] 本発明の方法で得られる「心筋細胞」は、好ましくは「心房型の心筋細胞」である。「心房型の心筋細胞」は、心房筋が成熟すると発現量が上がることが知られているMYL7の高発現によって特徴づけられる。例えば、RT-PCRによってMYL遺伝子（mRNA）量を測定することで、比較対象（例えば、コントロール）に対する心房型心筋細胞の量を知ることができる。なおMYL7遺伝子が「高発現」とは、未熟な心筋細胞に比較して、50%以上発現量が高いことを意味する。好ましくは、MYL7遺伝子の発現量は100%、より好ましく200%、さらに好ましくは400%以上、未熟な心筋細胞に比較して高い。あるいは、FACSによってMYLタンパク陽性細胞の数（割合）を測定することで「心房型の心筋細胞」の量（割合）をより明確に知ることができる。その場合、MYL7陽性細胞が60%以上であれば、MYL7が高発現の（心房型）心筋細胞」を含む細胞集団と言える。

[0029] 本発明の方法で得られる「心筋細胞を含む細胞集団」は、上記した心房型の心筋細胞が富化されている。

[0030] 本発明の方法で得られる「心筋細胞を含む細胞集団」は、上記した成熟型の心筋細胞が富化されている。

[0031] ここで、「富化」又は「富化されている」とは、細胞集団における当該細胞の割合が高められていることを意味する。例えば、本発明の方法を使用することにより、使用しない場合に比較して、心房型の心筋細胞が、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%又は99%富化される。あるいは、本発明の方法を使用することにより、使用しない場合に比較して、成熟型の心筋細胞が、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%

、70%、80%、85%、90%、95%、97%、98%又は99%富化される。

[0032] 一般に心臓再生医療に利用するためには、心筋細胞を少なくとも70%、好ましくは80%以上含む必要がある。したがって、本発明の方法で得られる高純度の心筋細胞を含む細胞集団は再生医療に好適に利用できる。

[0033] 本明細書において、「心筋細胞を含む細胞集団（population）」は、上記した心筋細胞を含む細胞集団である。細胞集団は、複数の細胞であって形態は限定されない。例えば、複数の細胞が分散するものであっても、複数の細胞が結合して塊を形成するものであってもよい。シート状、塊状、細胞を含む懸濁液などがある。

[0034] 細胞の特定には、当該細胞に特異的な「マーカー」を利用することができる。「マーカー」には、「マーカータンパク質」と「マーカー遺伝子」の両方を含み、所定の細胞型において細胞表面、細胞質内、及び／又は核内等に特異的に発現されるか、あるいは特異的に欠失しているタンパク質又は遺伝子を意味する。好ましくは、マーカータンパク質は細胞表面タンパク質である。

[0035] なお、cTnTなどのマーカータンパク質の検出は、当該マーカータンパク質に特異的な抗体を用いた免疫学的アッセイ、例えば、ELISA、免疫染色、フローサイトメトリーを利用することができる。MYL7などのマーカー遺伝子の検出は、例えば、RT-PCR、マイクロアレイ、バイオチップ等を利用して行うことができる。

[0036] 本明細書において、「発現している」又は「発現陽性」とは、タンパク質又は遺伝子が当該分野で公知の手法による検出可能量（またはバックグラウンドの強度よりも高い量）で発現していることを意味する。本明細書において、「発現していない」又は「発現陰性」とは、タンパク質又は遺伝子の発現量が、上記のような公知手法の全てあるいはいずれかによる検出限界以下であることを意味する。

[0037] ２．多能性幹細胞からの心筋細胞の製造

本発明は、多能性幹細胞から心筋細胞への分化誘導プロセスにおいて、α

フェトプロテインを添加することを特徴とする、心筋細胞を含む細胞集団の製造方法を提供する。

[0038] 本発明において、「分化誘導プロセス」とは、分化誘導の開始時点以降を意味する。分化誘導の開始時点は、具体的には分化誘導用の培地に変更する時点を意味する。例えば、心筋細胞に分化可能な細胞の未分化性を維持するための培地から、分化誘導用の培地に切り替える時点である。また、「分化誘導プロセス」の終点は限定されないが、十分に成熟が認められる段階まで、例えば成人心筋細胞と同様に成熟する時点までが好ましい。したがって、「分化誘導プロセス」には、心筋トロポニン（cTnT）の発現や拍動で特徴づけられる心筋細胞に対して更なる成熟を促す成熟化工程（後に説明）を含む。

[0039] αフェトプロテインを添加する回数は制限されず、用いる方法や目的とする心筋細胞集団の特性によって適宜設定される。

[0040] ２．１ 公知の心筋分化誘導方法への適用

具体的に言えば、本発明の方法は、

１）αフェトプロテインを含む培地で多能性幹細胞を心筋細胞に分化誘導する工程と、

２）分化誘導後の細胞をαフェトプロテインを含む無血清培地で培養し、心筋細胞を得る工程とを含む。

（ここで、αフェトプロテインを含まない培地とは、αフェトプロテインが作用を発揮しない程度であることを意味し、例えば1 μg/mL未満のごく微量のαフェトプロテインが含まれる場合は排除しない。）

[0041] 多能性幹細胞から心筋細胞への分化誘導は、培地に心筋細胞への分化誘導因子を添加することで実施できる。分化誘導因子は限定されず、当該分野で公知のものを使用できる。心筋細胞への分化誘導因子として、例えば、サイトカインが用いられる。前記サイトカインとしては、Activin A, BMP4, FGF2, DKK1, VEGFなどがある。また、サイトカインを用いない方法として、例えばWntシグナル活性化剤（GSK3β阻害剤）、PKC活性化剤、Wntシグナル阻害剤

、Src阻害剤、及びEGF受容体阻害剤が挙げられ、後述するPFCD法を記載した文献などに記載されている。分化誘導は、これらの因子を用いて公知の方法にしたがって実施でき、例えば、J Zhang（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3482164/）らの方法や、WO2005/033298、WO2007/002136、WO2007/126077、WO2009/017254、WO2009/118928、US20200407687A1、US9453201などに記載される方法、及び後述する発明者らが開発したPFCD法等が挙げられる。

[0042] αフェトプロテインの添加時期は、用いる方法や目的とする心筋細胞集団の特性によって異なり、分化誘導開始後であれば制限されず、例えば、分化誘導プロセスの早い段階で添加する方法（方法１）、分化誘導プロセスの遅い段階で添加する方法（方法２）、分化誘導プロセスの早い段階と遅い段階の両方で添加する方法（方法３）がある。成熟した心筋細胞の収率という点からは、分化誘導プロセスの初期の段階において、期間を限定せずにAFPを添加し続けることが好ましい。

[0043] 方法１：

１）分化誘導開始後から細胞の拍動が確認されるまで、αフェトプロテインを含まない培地で細胞を培養し、２）細胞の拍動確認後、αフェトプロテインを含む無血清培地で細胞を培養する。具体的に言えば、分化誘導開始から約3日間、αフェトプロテインを含まない培地で細胞を培養し、その後、少なくとも3日以上、好ましくは4日以上、αフェトプロテインを含む無血清培地で細胞を培養する。

[0044] 方法２：

１）分化誘導開始後から細胞の拍動が確認されるまで、αフェトプロテインを含む無血清培地で細胞を培養し、２）細胞の拍動確認後、αフェトプロテインを含まない培地で細胞を培養する。具体的に言えば、分化誘導開始から約3日間、αフェトプロテインを含む無血清培地で細胞を培養し、その後、少なくとも3日以上、好ましくは4日以上、αフェトプロテインを含まない培地で細胞を培養する。

[0045] 方法３：

１）分化誘導開始後から細胞の拍動が確認されるまで、αフェトプロテインを含まない培地で細胞を培養し、２）細胞の拍動確認後も、αフェトプロテインを含む無血清培地で細胞を培養する。具体的に言えば、分化誘導開始から約3日間、αフェトプロテインを含む無血清培地で細胞を培養し、その後も、少なくとも3日以上、好ましくは4日以上、αフェトプロテインを含む無血清培地で細胞を培養する。

[0046] ２．２ PFCD法への適用

発明者らは低分子化合物を利用した多能性幹細胞からの心筋細胞の誘導方法（PFCD法）を開発しており、この方法を本発明に好適に利用することができる（WO2012/026491、WO2013/111875、WO2015/182765、US2013/0183753、US2014/0127807）。以下、PFCD法に本発明の方法を適用する場合について具体的に説明する。

[0047] ［多能性幹細胞の維持・増殖］

多能性幹細胞は、分化誘導工程に先立って、適当な培地で培養し、訓化・維持、必要に応じて拡張（増殖）させてもよい。そのような訓化・維持・拡張のための培地としては、mTeSR™1、mTeSR™2、StemFit（登録商標）、CTS KnockOut SR XenoFree、Essential 8、CTS Essential 8、hESF9、CDM、STEMPRO、DMEM、IMDM、RMPI、DMEM/F12、αMEM等の市販の培地を使用することができる。

[0048] ［分化誘導工程］

PFCD法にしたがい、多能性幹細胞から心筋細胞への分化誘導を行う。分化誘導工程の日数は少なくとも4日以上、好ましくは5日以上、より好ましくは4～7日、最も好ましくは4～6日、例えば5又は6日である。

[0049] 分化誘導工程は、2つの工程：（１）Wntシグナル活性化剤（GSK3β阻害剤）及びPKC活性化剤を含む培地で多能性幹細胞を培養する工程、及び（２）前記工程で得られた細胞をWntシグナル阻害剤、Src阻害剤、及びEGF受容体阻害剤を含む培地中で培養する工程、に分けられる。

[0050] 「Wntシグナル活性化剤」としては、例えば、BIO、CHIR99021、CHIR98014、TDZD-8、SB216763 、TWS-119 、1-azakenpaullone、 SB216763 、SB415286 、AR-AO144-18、CT99021、CT20026,及びTWS119などのGSK3β阻害剤を使用することができる。好ましくは、BIO又はCHIR99021であり、より好ましくはCHIR99021である。

[0051] 「PKC活性化剤」としては、Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)、prostratin、Bryostatin 1、Bryostatin 2、FR236924、(-)-Indolactam V、PEP005、Phorbol 12,13-dibutyrate、SC-9、SC-10、1-Oleoyl-2-acetyl-sn-glycerol、 1-O-Hexadecyl-2-O-arachidonyl-sn-glycerol, 1-O-Hexadecyl-2-O-arachidonyl-sn-glycerol、1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol、PIP2、Resiniferatoxin、Phorbol 12,13-Dihexanoate、Mezerein、Ingenol 3-Angelate、RHC-80267、DCP-LA、Lipoxin A4が挙げられる。好ましくはPMA又はprostratinであり、より好ましくはprostratinである。

[0052] 「Wntシグナル阻害剤」としては、IWP2、IWP4、XAV939、IWR1、及びWO2012/026491に記載される化合物：KY02111、KY010104、T61164、KY02114、KY01045、KY01040、KY02109、KY010104、KY01043、KY01046、PB2852、N11474、PB2572、PB2570、KY02104、SO087、SO102、SO096、SO094、SO3031 (KY01-I)、SO2031 (KY02-I)、SO3042 (KY03-I)、SO2077等が挙げられる。好ましくは、Wntシグナル阻害剤はXAV939及びWO2012/026491に記載される化合物である。

[0053] 「Src阻害剤」としては、A419259、SU6656、PP1、1-Naphthyl PP1、PP2、Indirubin-3′-(2,3-dihydroxypropyl)-oximether、TX-1123、Src Kinase Inhibitor I (CAS 179248-59-0)、AZM475271、Bosutinib、Herbimycin A、KB SRC 4、MNS、PD166285、及びTC-S7003等が挙げられる。好ましくはA419259又はSU6656であり、より好ましくはA419259である。

[0054] 「EGF受容体阻害剤」としては、AG1478、gefitinib、afatinib、ARRY334543、AST1306、AZD8931、BIBU1361、BIBX1382、BPDQ、BPIQ-I、BPIQ-II、canertinib、CL-387,785、CUDC101、dacomitinib、vandetanib、EGFR inhibitor III (N-(4-((3,4-dichloro-6-fluorophenyl)amino)-quinazoline-6-yl)-2-chl

oroacetamide、CAS 733009-42-2)、EGFR/ErbB-2 inhibitor (4-(4-benzyloxy anilino)-6,7-dimethoxyquinazoline、CAS 179248-61-4)、erlotinib、GW583 340、GW2974、HDS029、lapatinib、WHI-P154、OSI-420、PD153035、PD168393 、PD174265、pelitinib、Compound 56、XL657、PP3、AG-490、AG555、tyrpho stin B42、tyrphostin B44、AG556、AG494、AG825、RG-13022、DAPH、EGFR I nhibitor (cyclopropanecarboxylic acid (3-(6-(3-trifluoromethyl-phenyl amino)-pyrimidin-4-ylamino)-phenyl)-amide、CAS 879127-07-8)、erbstati n analog (methyl 2,5-dihydroxycinnamate、CAS 63177-57-1)、JNJ28871063 、tyrphostin 47、lavendustin A、lavendustin C、lavendustin C methylat e、LFM-A12、TAK165、TAK285、tyrphostin 51、tyrphostin AG183、tyrphost in AG528、tyrphostin AG99、tyrphostin RG14620、WZ3146、WZ4002、WZ8040 、butein、及びtyrphostin AG112.等が挙げられる。好ましくは、AG1478又は gefitinibであり、より好ましくはAG1478である。

[0055] 上記したWntシグナル活性化剤（GSK3β阻害剤）、PKC活性化剤、Wntシグナル阻害剤、Src阻害剤、及びEGF受容体阻害剤は、それぞれ1種でもよいし、2種以上を組み合わせて使用してもよい。

[0056] 本発明の方法において、工程（１）および工程（２）の期間、および工程（１）の終了から工程（２）の開始までの期間は、細胞の種類等に応じて適宜変更されうる。工程（２）は、工程（１）の終了直後から開始してもよいし、工程（１）の終了から一定期間後に開始してもよい。例えば、工程（１）の終了後、Wntシグナル活性化剤、PKC活性化剤、Wntシグナル阻害剤、Src阻害剤、及びEGF受容体阻害剤のいずれも含まない培地中で細胞を1～2日間、好ましくは1日間培養した後、培地をWntシグナル阻害剤、Src阻害剤、およびEGF受容体阻害剤を含む培地に交換し、工程（２）を開始してもよい。

[0057] 工程（１）の培養期間は、使用する細胞に応じて適宜設定されるが、例えば、工程（１）を1～3日間実施し、次いで、工程（２）を、工程（１）の終了直後または工程（１）の終了の1～2日後から、2～13日間、好ましくは3～10日間、より好ましくは4～10日間、さらに好ましくは4～8日間、実施する。

[0058] 工程（１）は、多能性幹細胞から中胚葉への分化誘導期である心筋分化誘導の前期段階にあたることから、工程（１）の期間は、中胚葉関連遺伝子の発現に基づき決定することもできる。中胚葉関連遺伝子としては、T、MIXL1、NODAL等が挙げられる。工程（２）は中胚葉から心筋細胞へ分化する心筋分化誘導の後期段階にあたり、その期間は、心筋細胞への分化を確認することによって決定することができる。心筋細胞への分化は、拍動心筋細胞の数、心筋マーカーの発現、イオンチャネルの発現、電気生理学的刺激に対する反応等により確認することができる。心筋マーカーとしては、αMHC、βMHC、cTnT、αアクチニン、およびNKX2.5が挙げられる。また、イオンチャネルとしては、HCN4、Nav1.5、Cav1.2、Cav3.2、hERG、及びKCNQ1が挙げられる。

[0059] 分化誘導工程で使用する培地も無血清培地であることが好ましく、「３．心筋細胞成熟化用培地」に記載するような基本培地を使用することができ、培地には上記した低分子化合物以外に各種ビタミン類、アミノ酸類等を添加してもよい。また培養は、低接着性の容器（ディッシュ）を用いて浮遊培養することが好ましい。その他、培養条件の詳細はWO2015/182765の記載に従う。

[0060] 分化誘導工程で得られる細胞は基本的に未熟な心筋細胞であり、心筋細胞マーカーの発現はみられても、成熟型心筋細胞の特徴である細胞骨格の発達や、心房型新規細胞マーカーであるMYL7の発現は低い。

[0061] ［成熟化工程］

成熟化工程では、「１．心筋細胞を含む細胞集団の製造方法」に記載した方法にしたがって、αフェトプロテインを含む無血清培地を用いて分化誘導工程で得られた細胞を培養する。成熟化工程で使用する培地は分化誘導工程で使用した低分子化合物は含まない。

[0062] αフェトプロテインを含む培地での培養時期は、分化誘導開始後であれば特に限定されない。前述のとおり、分化誘導プロセスの早い段階で添加しても、遅い段階で添加してもよい。すなわち、上記工程１で添加してもよいし、上記工程２で添加してもよいし、その両方で添加してもよい。αフェトプ

ロテインの添加のタイミングは、心筋マーカーの発現で決定してもよい。具体的に言えば、αフェトプロテインを含む培地での培養は、分化誘導開始後から心筋マーカーが発現し始めるまでの間でもよいし、心筋マーカーが発現し始めるタイミングで開始してもよい。心筋マーカーが発現し始めたとしても、そこで心筋分化が完了するわけではなく、そこから１～2週間程度かけてゆっくりと分化が進む。そのため、一部の細胞が心筋マーカーを発現し始めても、他の大部分の細胞はまだ中胚葉細胞の段階にあり、そのようなタイミングでαフェトプロテインを含む培地で培養することで、心筋細胞への分化が促進される。

[0063] αフェトプロテインを含む培地での培養を、分化誘導プロセスの早い段階（分化培養後前期）、例えば分化培養の終了後約1～6日の間に行う場合と、分化誘導プロセスの遅い段階（分化培養後後期）、例えば分化培養の終了後約7～18日の間に行う場合とでは、心筋細胞の収量に大きな差異はないが、心房型の心筋細胞の割合は後期の方が多い。

[0064] 成熟化工程では、所望の量の心筋細胞、あるいは所望の量の成熟型心筋細胞や心房型心筋細胞が得られるまで、適宜培地を交換しながら培養を継続する。一般に、工程（２）の日数は1日以上、好ましくは3日以上、より好ましくは5日以上である。例えば、2～4日、好ましくは、4～7日、より好ましくは7～14日である。

[0065] ３．心筋細胞成熟化用培地

本発明は心筋細胞分化用の培地も提供する。本発明の培地は、5～100 μg/mLのαフェトプロテインを含み、血清を含まず、心筋細胞への分化誘導因子を含む。心筋細胞への分化誘導因子については、上記したとおりである。

[0066] 「無血清培地」とは、無調整又は未精製の血清を含まない培地を意味し、精製された血液由来成分や動物組織由来成分（例えば、増殖因子）が混入している培地は無血清培地に該当する。

[0067] 基本培地としては、DMEM培地、BME培地、αMEM培地、無血清DMEM/F12培地、BGJb培地、CMRL1066培地、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Option培

地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle MEM培地、ハム培地、RPMI 1640培地、Fischer’s培地、McCoy’s培地、ウイリアムスE培地など、動物細胞の培養に用いることのできる培地であればいずれも用いることができるが、KnockOut™DMEM、Medium154、StemPro（登録商標）hESC SFM、Essential8、Stemfit等の幹細胞用培地も使用できる。

[0068] 培地は、「血清代替物」を含んでいてもよい。血清代替物としては、例えば、アルブミン（例えば、脂質リッチアルブミン）、トランスフェリン、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素（例えば亜鉛、セレン）、B-27（登録商標）サプリメント、N2サプリメント、knockout serum replacement（KSR：Invitrogen）、2-メルカプトエタノール、3’チオールグリセロール等が挙げられる。なお、本明細書における「血清代替物」には、αフェトプロテインは含まないものとする。

[0069] 培地には、細胞の維持増殖に必要な各種栄養源や分化誘導に必要な各成分を適宜添加してもよい。例えば、栄養源としては、グリセロール、グルコース、果糖、ショ糖、乳糖、ハチミツ、デンプン、デキストリン等の炭素源、また、脂肪酸、油脂、レシチン、アルコール類等の炭化水素類、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、尿素、硝酸ナトリウム等の窒素源、食塩、カリウム塩、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等の無機塩類、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、モリブデン酸ナトリウム、タングステン酸ナトリウム及び硫酸マンガン、各種ビタミン類、アミノ酸類等を含むことができる。

[0070] 無血清培地は、好ましくはゼノフリー及び／又はサイトカインフリーである。ある実施形態では、無血清培地は、αフェトプロテイン以外にタンパク質性成分（例えば、アルブミンなど）を含まないプロテインフリーである。

[0071] αフェトプロテインは、ウシαフェトプロテイン又はヒトαフェトプロテインが好ましく、ヒトαフェトプロテインがより好ましい。またαフェトプロテインは組換え型αフェトプロテイン、特に組換え型ヒトαフェトプロテ

インが好ましい。

[0072] 無血清培地に添加するαフェトプロテインの量は、5～100 μg/mLである。下限は好ましくは、6 μg/mL、7 μg/mL、8 μg/mL、9 μg/mL、より好ましくは10 μg/mLである。上限は、好ましくは90 μg/mL、80 μg/mL、70 μg/mL、60 μg/mL、より好ましくは50 μg/mLである。より好ましくは10～50 μg/mLの範囲である。

[0073] ４．心筋細胞成熟化促進剤

本発明は、αフェトプロテインを有効成分として含む心筋細胞成熟化促進剤も提供する。本発明の心筋細胞成熟化促進剤は、αフェトプロテインのほかに細胞培養に許容し得る担体を含んでいてもよい。

[0074] 本明細書において、「促進」又は「促進する」とは、コントロールなどの比較対象よりも高い結果を生じさせることを意味する。例えば、比較対象に対して、1.1倍、1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、あるいはそれ以上の結果を生じさせることを意味し、統計的に有意に高い結果を生じさせることが好ましい。

[0075] ５．心疾患治療用医薬組成物又は心筋シート

本発明の方法によれば、心筋細胞の割合が高い細胞集団が得られる。とくに、成熟型の心筋細胞やMYL7陽性の心房型心筋細胞の割合が高い細胞集団が得られる。例えば、本発明の方法で得られる細胞集団は、フローサイトメトリーで測定されるcTnT陽性細胞の割合として、80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、例えば、91%、92%、93%、94%以上、さらに好ましくは95%以上の心筋細胞を含む。心筋細胞、特に成熟型又は心房型の心筋細胞を高い割合で含む本発明の細胞集団は、心疾患の治療に有用であり、本発明はそのような心疾患治療用医薬組成物又は心筋シートや、その製造方法を提供する。

[0076] 例えば、本発明の方法で得られる心筋細胞を含む細胞集団は、薬理学上許容しうる担体とともに、患部への投与（注入）用の医薬組成物を調製することができる。

[0077] 薬理学上許容しうる担体としては、滅菌水や生理食塩水、培地（とくに、RPMI等の哺乳動物細胞の培養に用いられる培地）、PBSなどの生理緩衝液が挙げられる。医薬組成物には、必要に応じて、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、賦形剤、防腐剤、結合剤を添加してもよい。

[0078] 注射用の水溶液としては、例えば、生理食塩水、培地、PBSなどの生理緩衝液、ブドウ糖やその他の補助剤を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム等が挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールや非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80、HCO-50等と併用してもよい。

[0079] あるいは、本発明の方法で得られる心筋細胞を含む細胞集団又は心筋細胞を重層化し、シート状に加工することで、心筋シートを調製することもできる。

[0080] 対象となる心疾患としては、心筋梗塞や狭心症などの虚血性心疾患、心不全を挙げることができる。

[0081] ７．心筋細胞を含む細胞集団の培養物

本発明は、心筋細胞を含む細胞集団も提供する。前記培養物は、αフェトプロテインを含み、血清を含まない。培養物中の細胞集団は心筋細胞、好ましくは成熟した心筋細胞について富化されており、フローサイトメトリーで測定される細胞の割合として、80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上の心筋細胞、好ましくは成熟した心筋細胞を含む。そのため、本発明の培養物は、再生医療に好適に使用することができる。

[0082] ８．その他

本発明は、心筋細胞への分化誘導工程において、αフェトプロテインを培地に添加することにより、心筋細胞の成熟を促進する方法も提供する。

[0083] また本発明は、心筋細胞への分化誘導工程において、αフェトプロテインを培地に添加することにより、心筋細胞の収量を向上させる方法も提供する。好ましくは、心筋細胞の収量は、αフェトプロテインを添加しない場合に

比較して、少なくとも5%、より好ましくは10%以上、30%以上、あるいは50%以上向上する。

[0084] 本発明は、心筋細胞への分化誘導工程において、αフェトプロテインを培地に添加することにより、心房型の心筋細胞の割合を向上させる方法も提供する。好ましくは、FACSで測定されるMYL7陽性細胞の割合が60%以上になるか、あるいはRT-PCRで測定されるMYL7遺伝子の発現量が、αフェトプロテインを添加しない場合に比較して、50%以上、より好ましくは100%以上向上する。

[0085] 本発明は、心筋細胞への分化誘導工程において、αフェトプロテインを培地に添加することにより、成熟型の心筋細胞の割合を向上させる方法も提供する。好ましくは、成熟型の心筋細胞の割合は、αフェトプロテインを添加しない場合に比較して、少なくとも5%以上、より好ましくは10%以上、あるいは20%以上向上する。

実施例

[0086] 以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

[0087] 実施例１：

方法（AFP50 μg/mL添加）

ヒトiPS細胞（253G1株）をiMatrix-511(マトリクソーム）でコートした10cmディッシュ（Falcon, 353003)でEssential8培地を用いて接着培養した。80～90%コンフルエントになったところでEDTAを用いて剥離し、低接着の6ウェルプレート（Corning, 3471）に約1x10^{6}個細胞/ウェルで播種し、2日間培養してiPS細胞スフェロイドを形成した。

[0088] 心筋細胞への分化誘導方法は、基本的にWO2015／182765に記載の方法にしたがった。すなわち、抗生物質及びアミノ酸を含むIMDM：DMEM 1：1の培地（表1）に、CHIR99021 2 μM、prostratin 1 μMを添加し、低接着ディッシュを用いて2日間浮遊培養した。Day 3にKY03-I 4 μM、XAV939 2 μM、A419259 0.3 μM、AG1478 8 μMを添加した培地（表1）に変えて、Day6まで浮

遊培養した。

[0089] [表1]

Formulation	Amount
IMDM	242 mL
DMEM	242 mL
MEM non-essential amino acid	5 mL
Penicillin-Streptomycin	5 mL
0.2 M L-glutamine	5 mL
1 M L-carnitine	100 μL
Ascorbic acid	50 mg
0.5 M creatine	1 mL

[0090] Day 6以降は、低分子化合物を含まない培地（表1）を用いて、以下のA～Cの条件（各々n=3）にしたがい、AFP存在又は非存在下で浮遊培養を行った。AFPを含む組成物として、ヒト臍帯血由来AFP（BioVision、P1585-1000）を使用した。

（A）AFP無添加（コントロール）

（B）分化誘導開始後day0～6までの期間AFPを終濃度50 μg/mLで添加

（C）day7～13までの期間AFPを終濃度50 μg/mLで添加

[0091] day19で細胞を回収し、トリプシン処理でシングルセル化し、セルカウントした。その後FACS解析で心筋細胞率（cTnT陽性細胞の割合）を調べた。FACSにはAccuri C6 plus（BD）を使用した。図1Aにおいて、「d0」「d1」等は、分化誘導開始後day0、day1等を意味する。また、「d3」「d5」等の色付セルは培地交換を行った日を示す。

[0092] 結果

条件B（day0～6までAFPを添加）は細胞死を起こし、解析不能であった。条件C（day7～13にAFP添加）ではコントロールに比べてcTnT陽性細胞率が高く、心筋純度の向上が見られた（表2、図1）。

[0093] [表2]

		シングル化後細胞数			cTnT 陽性率(%)
		Total(x10e5)	Live(x10e5)	生細胞率(%)	
A. コントロール	A-1	22.5	8.01	35.6	18.2
	A-2	7.08	3.46	48.9	11.8
	A-3	6.62	3.21	48.5	29.4
B.未分化～心筋分化	B-1	-	-	-	-
	B-2	-	-	-	-
	B-3	-	-	-	-
C.心筋分化後～	C-1	18.2	5.84	32.1	93.6
	C-2	19.8	7.58	38.3	96.1
	C-3	19.9	4.79	24.1	91.8

[0094] 実施例２：

方法（AFP10 μg/mL添加）

iPS細胞（253G1株）をiMatrix-511（マトリクソーム）でコートした10 cmディッシュ（Falcon, 353003）でEssential8を用いて接着培養した。80～90%コンフルエントになったところでEDTAで剥離し、低接着の6ウェルプレート（Corning, 3471）に約1x10^{6}個細胞/ウェルで播種し、2日間培養してiPS細胞スフェロイドを形成した。

[0095] 心筋細胞への分化誘導方法は、基本的にWO2015／182765に記載の方法にしたがった（実施例１参照）。実施例１にしたがい、以下のA～Dの条件（各々n=3）でiPS細胞の分化誘導を行った。αフェトプロテイン（AFP）を含む組成物は、ヒト臍帯血由来AFP（BioVision、P1585-1000）を使用した。

（A）AFP無添加（コントロール）、

（B）分化誘導開始後day0～6までの期間AFPを終濃度10 μg/mLで添加、

（C）day7～12までの期間AFPを終濃度10 μg/mLで添加

（D）day13～18までの期間AFPを終濃度10 μg/mLで添加

[0096] day28で細胞を回収し、半量をmiRNeasy Mini Kit（キアゲン）を用いてRNAを回収し定量的PCR法（PowerUp SYBR Green Master Mix、サーモフィッシャ

ー）を用いて、心房筋マーカー遺伝子であるHuman myosin light chain 7（MYL7）遺伝子の発現量を、TATA-Box Binding Protein （TBP）遺伝子を内部標準として解析した。残り半量をトリプシン処理でシングルセル化し、セルカウントした。その後FACS解析で心筋率（cTnT陽性率）を調べた。FACSにはAcc uri C6 plus（BD）を使用した。図2Aにおいて、「d0」「d1」等は、分化誘導開始後day0、day1等を意味する。また、「d3」「d5」等の色付セルは培地交換を行った日を示す。

[0097] 結果

10 μg/mL添加濃度では、50 μg/mL添加濃度の時と同様に、条件B（d0～6添加）では細胞死が起こり分化の評価が出来なかった。条件C（d7～12添加）、条件D（d13～18添加）ではコントロールに比べてcTnT陽性細胞率が高く、心筋純度の向上が見られた（表3、図2B）。また心房筋マーカーであるMYL7については、AFP添加の条件C，Dで、心筋純度の向上傾向よりも顕著な増加が見られた（図2C）。心房筋型の心筋細胞に分化していると考えられる。

[0098] [表3]

		シングル化後細胞数			cTnT 陽性率(%)	cTnT 陽性率(NC, %)
		Total(x10e5)	Live(x10e5)	生細胞率(%)		
A. コントロール	A-1	99.6	61.9	62.2	53.4	0.2
	A-2	74.9	45.9	61.3	53.5	0.2
	A-3	68.3	48.3	70.7	42.4	0.1
B. 未分化～心筋分化	B-1	-	-	-	-	-
	B-2	34.3	30.1	87.7	0.3	0.0
	B-3	-	-	-	-	-
C. 心筋分化後(前期)	C-1	65.4	43.4	66.4	94.6	0.1
	C-2	54.2	37.9	70.0	59.0	0.0
	C-3	54.4	32.7	60.1	94.2	0.0
D. 心筋分化後(後期)	D-1	25.4	11.2	44.0	97.2	0.2
	D-2	18.7	14.1	75.1	98.4	0.4
	D-3	36.7	13.6	37.0	46.9	0.0

NC: Negative Control

[0099] 実施例３：

マイオリッジ社の分化誘導法（プロテインフリー分化誘導法：WO2015／182765参照）で作成した凍結心筋細胞（マイオリッジ、H-011106：誘導開始後30日）を解凍し、2%FBSを含む培地で96ウェルプレート（Corning）に播種した。細胞数は1 x10^4 個細胞/ウェルで5ウェルずつ播種した。4日間培養した後、血清フリーのDMEM（Gibco）培地で交換した。コントロールのウェルはAFPを添加せず、他のウェルには10 μg/mL、1 μg/mLの濃度でAFPを添加した。さらに7日間培養した後、4% パラホルムアルデヒド（Nacalai）50 μLで固定し、0.01% Tween 20/PBS溶液 150 μL/ウェルで1回ウォッシュ後、200 nMのファロイジン-FITC（Sigma），1 μMのDAPI（Nacalai）を添加し、アクチンフィラメントと細胞核を染色した。その後、各ウェルのファロイジンとDAPIの蛍光画像を共焦点定量イメージサイトメーターCQ1（横河電機）で撮影し、1ウェルあたりの蛍光量を算出した。

[0100] 結果

コントロールと比べ、AFPを添加したウェルではDAPIの蛍光量に差はなかったが、ファロイジンの蛍光量が有意に増加していた（図3）。ファロイジンはアクチンフィラメントを染色するため、コントロールと比べて細胞骨格が発達した心筋細胞に成熟していることが示唆される。

[0101] 実施例４：

１．各種AFP試料の細胞に対する影響

分化後の体細胞と比較して、分化前の発生初期の未分化細胞は毒性への感受性が高いことが知られているため、各種AFP試料を用いて、実施例１及び２で生じた心筋分化前の細胞死に対するAFPの影響を検証した。

方法

a. AFPのバッファー置換

Amicon 10KカラムにBioVision, LeeBioのAFP溶液をそれぞれ添加し、4℃, 14,000 x g, 20分で遠心した。この時落ちたろ液は回収し、添加試験に用いた（一次ろ液）。30 μl程度まで濃縮されたので、最大容量の500 μlになるように470 μlの血清フリーのDMEM（Gibco）培地を添加し、4℃, 14,000 x g

，20分で遠心した。この操作を2回繰り返した。再度470 μlの血清フリーのDMEM（Gibco）培地を添加して軽く混ぜ、カラムをひっくり返して遠心して回収した。この時の遠心条件は4℃，14,000 x g，2分。0.22 μmフィルターを用いて滅菌し、添加試験へ進んだ。

[0102] b．心筋細胞への添加

マイオリッジ社の分化誘導法（プロテインフリー分化誘導法：WO2015／182765参照）で作製した凍結心筋細胞（マイオリッジ、H-011106：誘導開始後30日）を解凍し、24ウェルプレート（Corning）に播種した。細胞数は1x10^{6}個細胞/ウェル。5日間培養した後にAccumax（Nacalai）で剥離し、96ウェルプレート（Corning）に播種した。細胞数は8 x10^{3}個細胞/ウェルで5ウェルずつ播種した。4日間培養した後、血清フリーのDMEM（Gibco）培地で交換した。条件は次の通り。

1．Control： 添加無し

2．HT-AFP： HyTest製AFP（粉末）

3．BV-AFP原液： BioVision製AFP（液体）1mg/mLを10ug/mLとなるよう添加（1%と同じ割合）

4．BV-AFP置換： バッファー置換したもの

5．BV-AFろ液： バッファー置換の際に得られた一次ろ液を1%となるよう添加

6．PBS： PBSを1%となるよう添加

[0103] さらに5日間培養した後、4% パラホルムアルデヒド（Nacalai）50 μLで固定し、0.01% Tween 20/PBS溶液 150 μL/ウェルで1回ウォッシュ後、200 nMのファロイジン-FITC（Sigma）を添加し、アクチンフィラメントを染色した。4℃で一晩静置した後、染色液を全量除いてPBSに置換し、各ウェルのファロイジンの蛍光画像を共焦点定量イメージサイトメーターCQ1（横河電機）で撮影し、1ウェルあたりのファロイジンの蛍光面積を算出した。

[0104] 結果

BV-AFPを原液のまま用いると、何も添加しない条件とほぼ同じファロイジン面積値（細胞面積値を示す）となり添加効果が見られなかったが、置換し

た場合は細胞面積値が上昇し、HT-AFPの値に近づいた（図4）。また、ろ液を添加した場合は細胞死が起こった。以上のことから、BV-AFPは製品のバッファーに細胞毒性がある可能性が非常に高いと考えられる。一方でHT-AFPは粉末をそのまま希釈して添加しても、何も添加しない条件と比べて高い値を示したことから、毒性はほとんど含まれていないことが示唆された（図4）。以上の結果から、HT-AFPを用いて、分化誘導開始後day0～6におけるAFP添加の影響を再度試験した。

[0105] ２．分化誘導開始後day0～6におけるAFP添加の心筋分化に与える影響

方法（AFP 30 μg/mL添加）

iPS細胞（253G1株）をiMatrix-511（マトリクソーム）でコートした10 cmディッシュ（Falcon, 353003）でEssential8を用いて接着培養した。80～90%コンフルエントになったところでEDTAを用いて剥離し、低接着の6 cmディッシュ（Corning, 3261）10枚に約2 x10^6個細胞/ディッシュで播種し、1日培養してiPS細胞スフェロイドを形成した。得られたiPS細胞スフェロイドを回収し、全量を低接着の6ウェルプレート（Corning, 3471）の21ウェルに均等になるように再播種した。

[0106] 心筋細胞への分化誘導方法は、基本的にWO2015／182765に記載の方法にしたがった（実施例１参照）。実施例１にしたがい、以下のA～Dの条件（各々n=3）でiPS細胞の分化誘導を行った。αフェトプロテイン（AFP）を含む組成物は、ヒト臍帯血由来AFP（HyTest、8F8）を使用した。

（A）AFP無添加（コントロール）

（B）分化誘導開始後day0～2までの期間AFPを終濃度30 μg/mLで添加

（C）day3～6までの期間AFPを終濃度30 μg/mLで添加

（D）day0～6までの期間AFPを終濃度30 μg/mLで添加

[0107] day18で細胞を回収し、半量をmiRNeasy Mini Kit（キアゲン）を用いてRNAを回収し定量的PCR法（PowerUp SYBR Green Master Mix、サーモフィッシャー）を用いて、各種遺伝子の発現量を、TATA-Box Binding Protein（TBP）遺伝子を内部標準として解析した。残り半量をトリプシン処理でシングルセル

化し、セルカウントした。その後FACS解析で心筋率（cTnT陽性率）を調べた。FACSにはAccuri C6 plus（BD）を使用した。

[0108] 結果

得られた心筋細胞について、コントロールと比較して細胞数の大きな変動はどの条件でも起こらなかった。一方で、条件B-Dでは心筋率が優位に増加していた。また、定量的PCR法を用いた解析では、条件Dで数種類のチャネル系遺伝子とα,β-MHC、MYL7の発現量が増加しており、コントロールや他のAFP条件と比べて発達した心筋細胞になっていたことが示唆される（図5）。細胞数と心筋率、遺伝子発現を総合的に評価すると、条件Dが最も良い結果を示していた。このことから、少なくとも分化誘導初期の段階において、期間を限定せずにAFPを添加し続けることで、心筋細胞の分化や成熟に有用に働く可能性が示された。

[0109] [表4]

		シングル化後細胞数			cTnT 陽性率(%)	cTnT 陽性率(NC, %)
		Total(x10e5)	Live(x10e5)	生細胞率(%)		
A AFP 無添加	A1	11.3	9.0	79.8	88.4	0.7
	A2	13.6	12.5	92.0	88.7	0.8
	A3	10.2	8.6	84.7	90.1	0.6
B day0～2 30 μg/mL	C1	10.9	9.3	85.4	94.2	0.5
	C2	13.7	12.3	89.5	90.7	0.3
	C3	11.8	10.1	85.0	94.1	0.2
C day3～6 30 μg/mL	E1	13.6	10.9	80.5	89.8	0.2
	E2	11.1	9.2	82.7	83.4	0.0
	E3	12.3	10.6	85.9	88.6	0.2
D day0～6 30 μg/mL	G1	9.5	9.0	94.6	92.0	0.1
	G2	9.2	8.6	94.4	92.3	0.1
	G3	13.0	10.6	81.1	92.9	0.1

NC：Negative Control

[0110] 実施例５：

方法（AFP 30 μg/mL添加）

マイオリッジ社の分化誘導法（プロテインフリー分化誘導法：WO2015／182765参照）で作製した凍結心筋細胞（マイオリッジ、H-011106：誘導開始後30日）を解凍し、血清を含まない培地で96ウェルプレート（Corning）に播種した。細胞数は2 x10^4 個細胞/ウェルで5ウェルずつ播種した。8日間培養した後、血清フリーのDMEM（Gibco）培地で交換した。αフェトプロテイン（AFP）を含む組成物は、ヒト臍帯血由来AFP（HyTest、8F8）を使用した。条件は次の通り。

（A）無添加（コントロール）

（B）2% FBS

（C）HSA　30 μg/mL

（D）AFP（臍帯血由来）　30 μg/mL

（E）AFP（HEK組換え）　30 μg/mL

（F）AFP（臍帯血由来）+ HSA　各15 μg/mL

[0111] さらに7日間培養した後、4% パラホルムアルデヒド（Nacalai）50 μLで固定し、0.01% Tween 20/PBS溶液 150 μL/ウェルで1回ウォッシュ後、200 nMのファロイジン-FITC（Sigma）、400 ng/mlのcTnT一次抗体（Santa Cruz） 1 μMのDAPI（Nacalai）を添加し、アクチンフィラメントと細胞核を染色した。4℃で一晩静置した後、染色液を全量除いてcTnT二次抗体-Alexa Flour 647（Thermo Fisher）を添加し、室温で30分反応させて心筋トロポニンTを染色した。その後PBSに置換し、各ウェルのファロイジン、cTnT及びDAPIの蛍光画像を共焦点定量イメージサイトメーターCQ1（横河電機）で撮影し、1ウェルあたりのファロイジン、cTnTの蛍光量及びDAPIの個数を算出した。

[0112] 結果

コントロールやFBS添加条件と比べ、AFPを添加したウェルではcTnTの蛍光量とDAPIの個数が有意に増加していた（図6）。このことから、AFPを添加した心筋細胞は心筋線維が発達し、成熟化が進んだ細胞になっていることが示唆される。またその細胞数も多く、心筋細胞を生存させる効果も示された。

産業上の利用可能性

[0113] 本発明は、再生医療のための心筋細胞の調製に有用である。

[0114] 本明細書中で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書中にとり入れるものとする。

請求の範囲

[請求項1] 心筋細胞を含む細胞集団の製造方法であって、心筋細胞に分化可能な細胞から心筋細胞への分化誘導プロセスを含み、前記分化誘導プロセスにおいて、αフェトプロテインを含む無血清培地で細胞を培養し、心筋細胞を得ることを含む、前記方法。

[請求項2] 心筋細胞に分化可能な細胞が、多能性幹細胞又は多能性細胞由来の中胚葉細胞である、請求項１に記載の方法。

[請求項3] 多能性幹細胞がiPS細胞である、請求項２に記載の方法。

[請求項4] 得られる心筋細胞がhERG、KCNJ2、SCN5AまたはMYL7が高発現している心筋細胞である、請求項１に記載の方法。

[請求項5] 得られる心筋細胞が成熟型の心筋細胞である、請求項１に記載の方法。

[請求項6] 分化誘導開始後から細胞の拍動が確認されるまで、αフェトプロテインを含む無血清培地で細胞を培養する、請求項１に記載の方法。

[請求項7] 細胞の拍動が確認された後、αフェトプロテインを含む無血清培地で細胞を培養する、請求項１に記載の方法。

[請求項8] 得られる細胞集団が、フローサイトメトリーで測定される細胞の割合として、80%以上の心筋細胞を含む、請求項１に記載の方法。

[請求項9] αフェトプロテインがヒトαフェトプロテインである、請求項１に記載の方法。

[請求項10] 無血清培地が5～100 μg/mLのαフェトプロテインを含む、請求項１に記載の方法。

[請求項11] 無血清培地が、ゼノフリー及び／又はサイトカインフリーである、請求項１に記載の方法。

[請求項12] αフェトプロテインを除いて、無血清培地がプロテインフリーである、請求項１に記載の方法。

[請求項13] αフェトプロテイン、及び心筋細胞への分化誘導因子を含む、無血清培地。

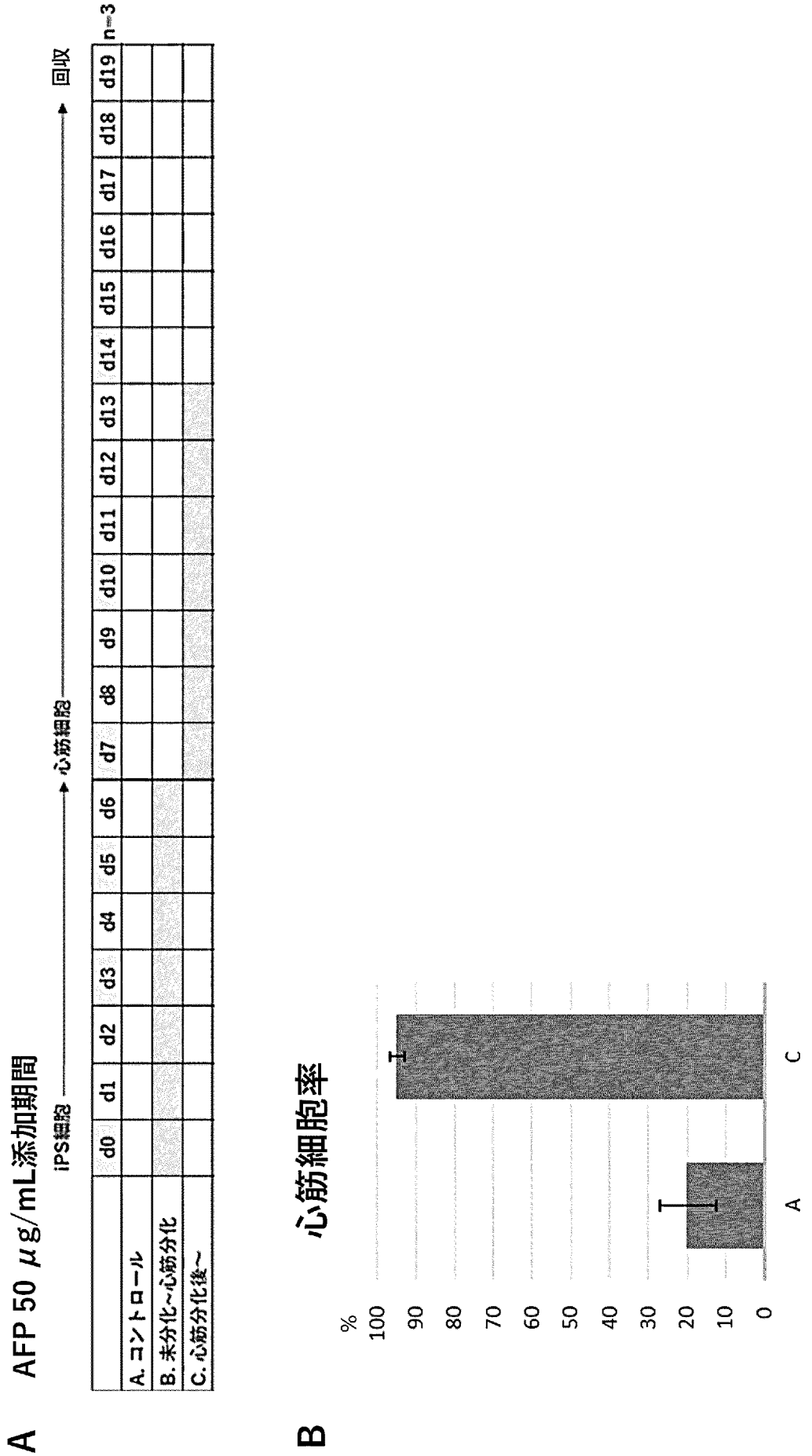
[請求項14] 無血清培地が、ゼノフリー及び／又はサイトカインフリーである、請求項１３に記載の培地。

[請求項15] αフェトプロテインを除いて、無血清培地がプロテインフリーである、請求項１３又は１４に記載の培地。

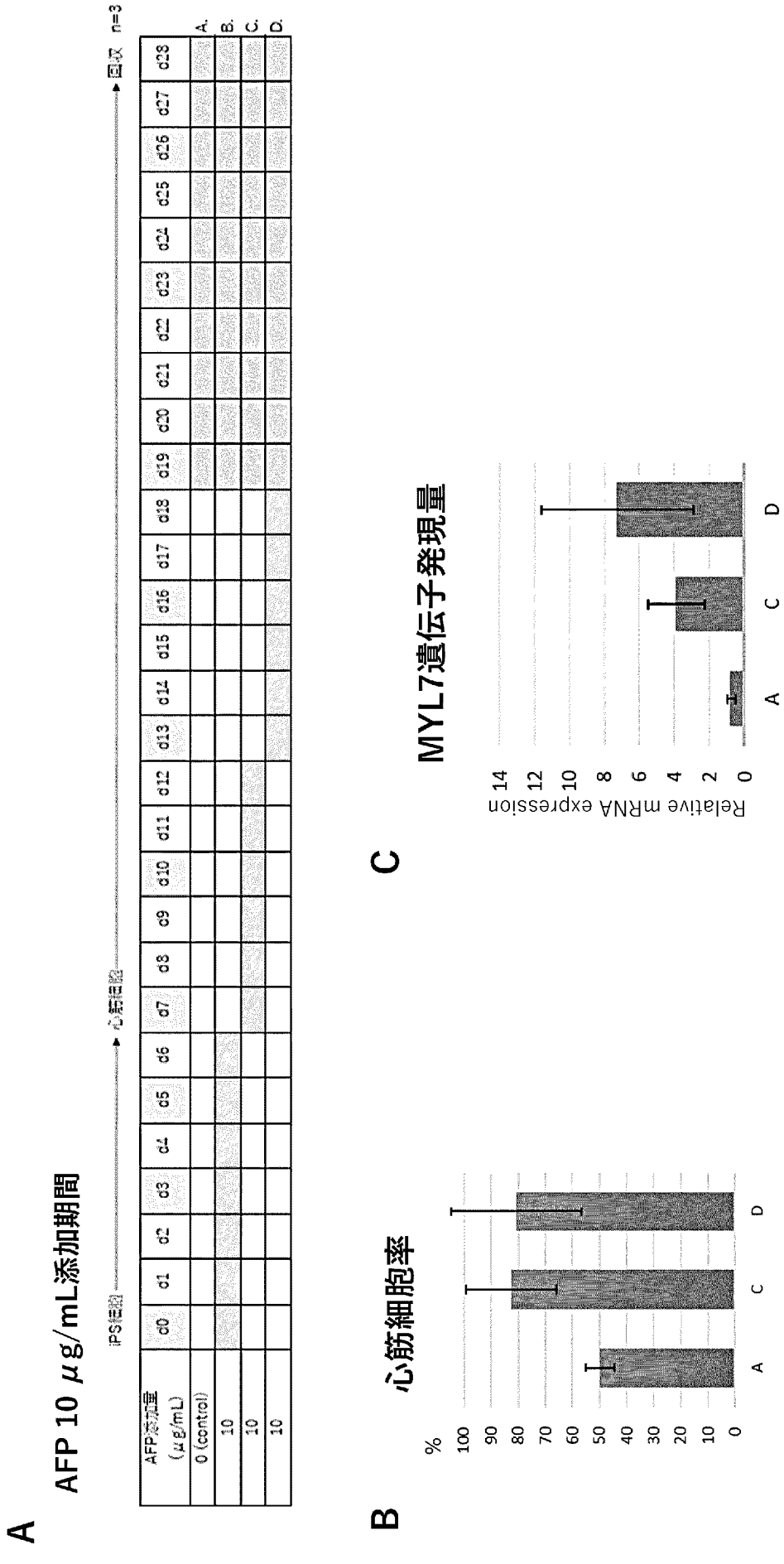
[請求項16] αフェトプロテインを有効成分として含む心筋細胞成熟化促進剤。

[請求項17] 心筋細胞を含む細胞集団の培養物であって、αフェトプロテインを含み、血清を含まない、前記培養物。

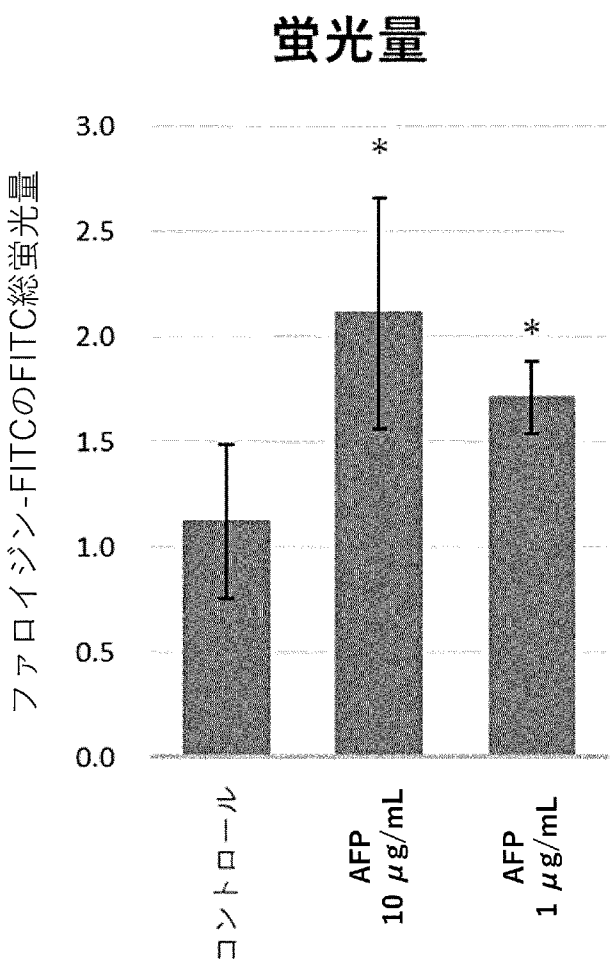
[図1]


A
AFP 50 μg/mL添加期間
iPS細胞
心筋細胞
回収
d0 d1 d2 d3 d4 d5 d6 d7 d8 d9 d10 d11 d12 d13 d14 d15 d16 d17 d18 d19 n=3
A. コントロール
B. 未分化~心筋分化
C. 心筋分化後~
B
心筋細胞率
%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
A
C

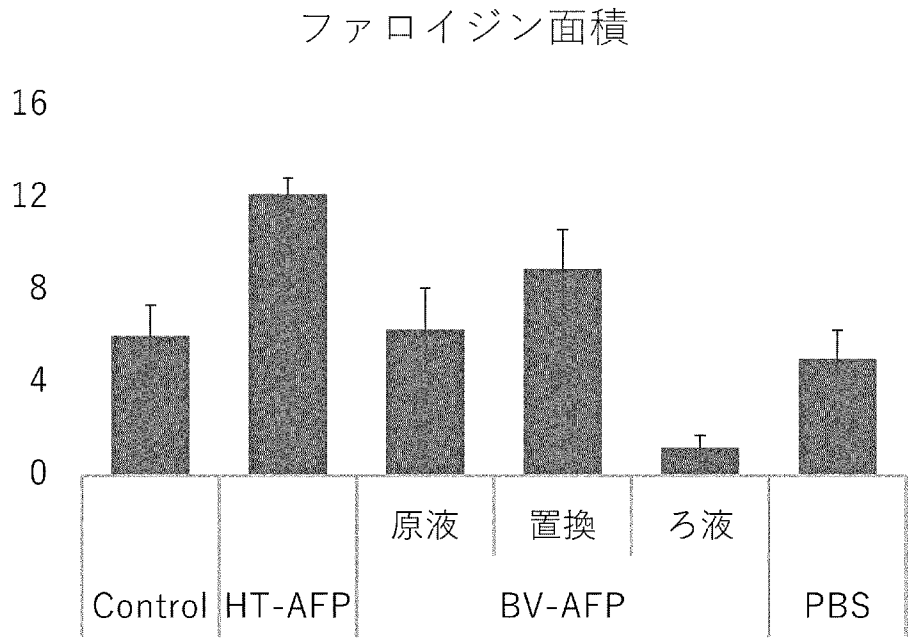
[図2]


A
AFP 10 μg/mL添加期間
AFP添加濃度 (μg/mL)
0 (control)
10
10
10
d0
d1
d2
d3
d4
d5
d6
d7
d8
d9
d10
d11
d12
d13
d14
d15
d16
d17
d18
d19
d20
d21
d22
d23
d24
d25
d26
d27
d28
n=3
A.
B.
C.
D.
B
心筋細胞率
%
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
A
C
D
C
MYL7遺伝子発現量
Relative mRNA expression
14
12
10
8
6
4
2
0
A
C
D

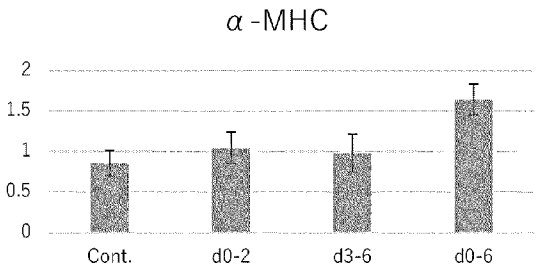
[図3]

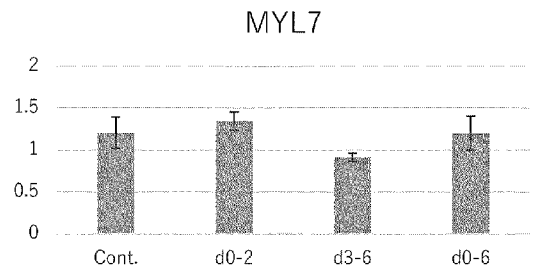

蛍光量
ファロイジン-FITCのFITC総蛍光量
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
コントロール
AFP 10 μg/mL
AFP 1 μg/mL

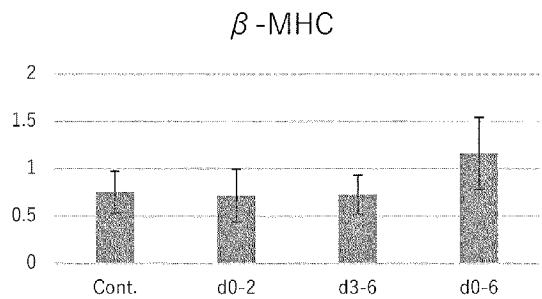
[図4]


ファロイジン面積
16
12
8
4
0
原液
置換
ろ液
Control
HT-AFP
BV-AFP
PBS

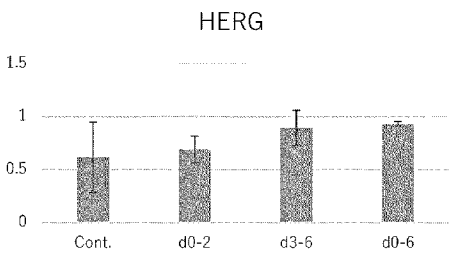
[図5A]

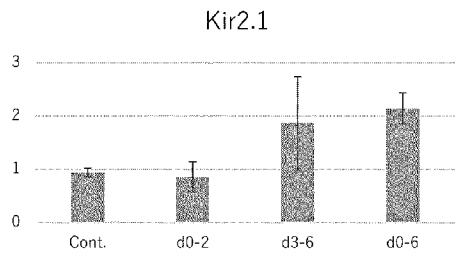

α-MHC
2
1.5
1
0.5
0
Cont.
d0-2
d3-6
d0-6

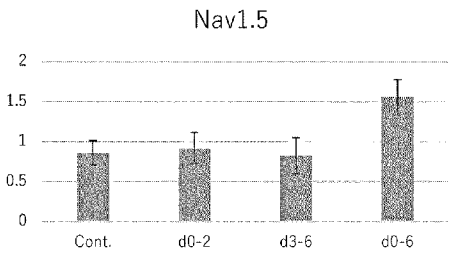

MYL7
2
1.5
1
0.5
0
Cont.
d0-2
d3-6
d0-6

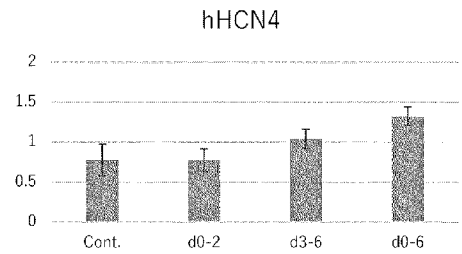

β-MHC
2
1.5
1
0.5
0
Cont.
d0-2
d3-6
d0-6

[図5B]

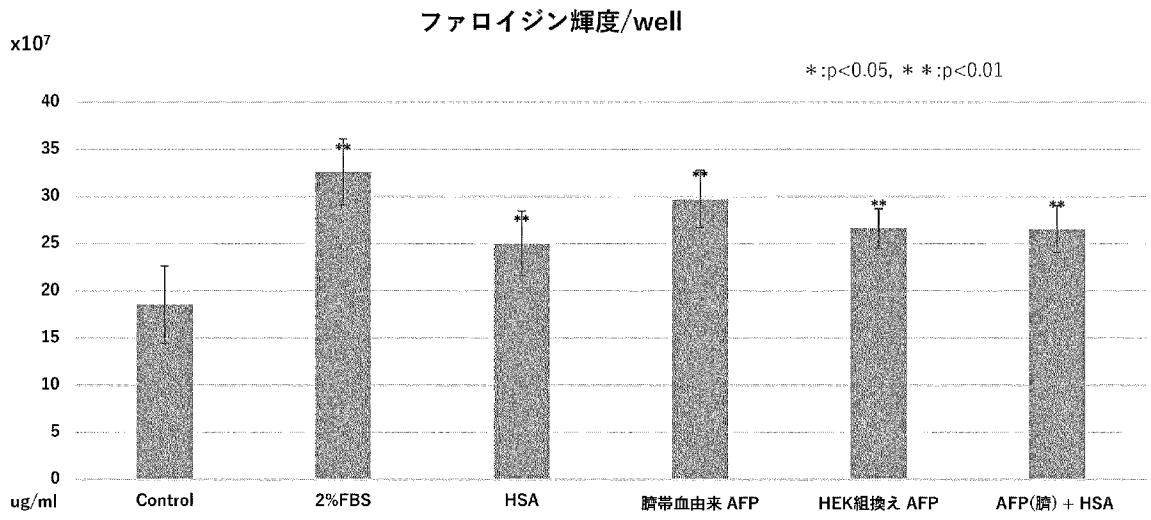

HERG
1.5
1
0.5
0
Cont.
d0-2
d3-6
d0-6


Kir2.1
3
2
1
0
Cont.
d0-2
d3-6
d0-6

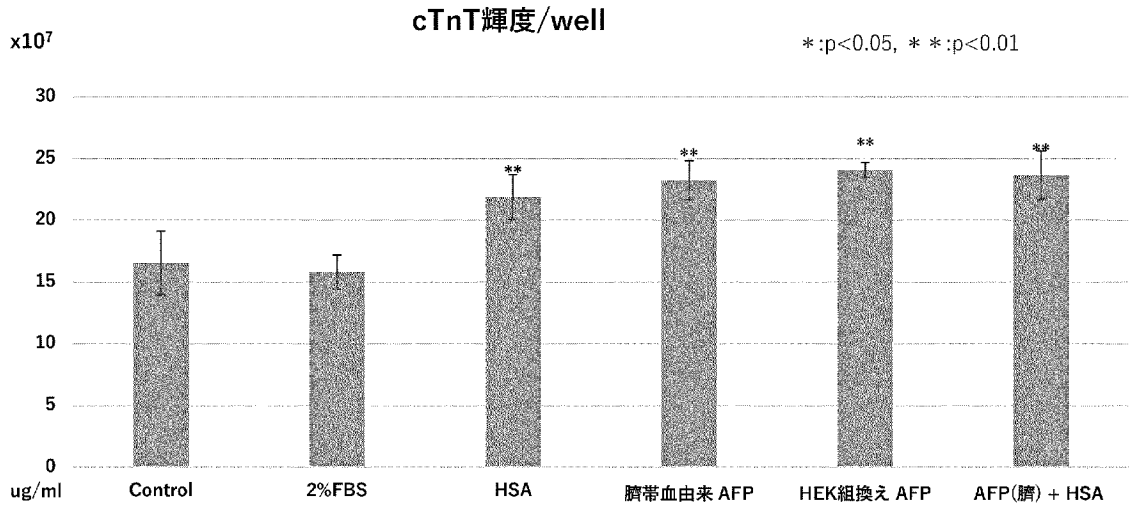

Nav1.5
2
1.5
1
0.5
0
Cont.
d0-2
d3-6
d0-6


hHCN4
2
1.5
1
0.5
0
Cont.
d0-2
d3-6
d0-6

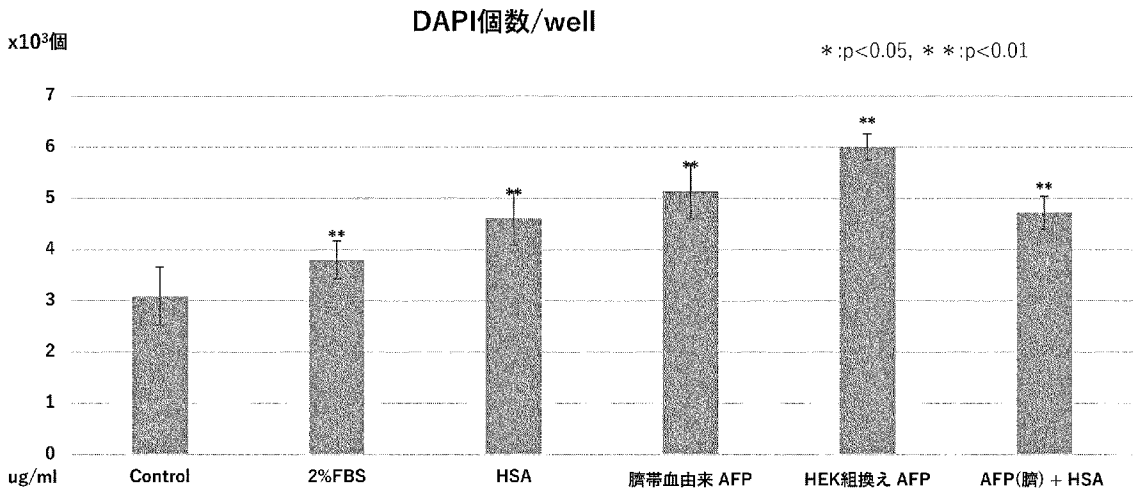
[図6A]


ファロイジン輝度/well
x10^7
*:p<0.05, **:p<0.01
40
35
30
25
20
15
10
5
0
ug/ml
Control
2%FBS
HSA
臍帯血由来 AFP
HEK組換え AFP
AFP(臍) + HSA

[図6B]


cTnT輝度/well
x10^7
*:p<0.05, **:p<0.01
30
25
20
15
10
5
0
ug/ml
Control
2%FBS
HSA
臍帯血由来 AFP
HEK組換え AFP
AFP(臍) + HSA

[図6C]


DAPI個数/well
x10^3個
*:p<0.05, **:p<0.01
7
6
5
4
3
2
1
0
ug/ml
Control
2%FBS
HSA
臍帯血由来 AFP
HEK組換え AFP
AFP(臍) + HSA

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/027420

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/077(2010.01)i; ***C12N 5/10***(2006.01)i; ***C12N 1/00***(2006.01)i; ***C07K 14/47***(2006.01)i
FI: C12N5/077; C07K14/47; C12N5/10; C12N1/00 G

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)

C12N5/077; C12N5/10; C12N1/00; C07K14/47

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 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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 (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/0081200 A1 (RAJALA, Kristiina) 01 April 2010 (2010-04-01) particularly, fig. 12F-H, paragraphs [0001], [0015], [0033], [0056], [0057], [0081], tables 2, 3, example 9, claims 1-17	1-7, 9-11, 13, 14, 17
Y	particularly, fig. 12F-H, paragraphs [0001], [0015], [0033], [0056], [0057], [0081], tables 2, 3, example 9, claims 1-17	1-15, 17
A	particularly, fig. 12F-H, paragraphs [0001], [0015], [0033], [0056], [0057], [0081], tables 2, 3, example 9, claims 1-17	16
X	US 2010/0317104 A1 (AUSTRALIAN STEM CELL CENTRE LIMITED) 16 December 2010 (2010-12-16) particularly, fig. 3h, 3i, 8, paragraphs [0006]-[0010], [0013], [0018], [0072], [0088], [0089], table 2, claims 1-34	1, 2, 6, 7, 9, 11, 13, 14, 17
Y	particularly, fig. 3h, 3i, 8, paragraphs [0006]-[0010], [0013], [0018], [0072], [0088], [0089], table 2, claims 1-34	1-15, 17
A	particularly, fig. 3h, 3i, 8, paragraphs [0006]-[0010], [0013], [0018], [0072], [0088], [0089], table 2, claims 1-34	16

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

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 September 2022	**20 September 2022**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2015/182765 A1 (KYOTO UNIVERSITY) 03 December 2015 (2015-12-03) particularly, claims 1-31, examples	1-15, 17
A	particularly, claims 1-31, examples	16
A	JP 2013-512667 A (RAJALA, Kristiina) 18 April 2013 (2013-04-18) entire text	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/027420

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2010/0081200 A1	01 April 2010	WO 2008/148938 A1 particularly, page 1, line 1 to page 4, line 17, page 8, lines 3-25, tables 2, 3, claims 1-22 EP 2155859 A1 JP 2010-528642 A	
US 2010/0317104 A1	16 December 2010	(Family: none)	
WO 2015/182765 A1	03 December 2015	US 2017/0152485 A1 particularly, claims 1-30, examples EP 3150705 A1	
JP 2013-512667 A	18 April 2013	WO 2011/067465 A1 entire text EP 2507360 A1 CN 102906247 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/027420

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 5/077(2010.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 1/00(2006.01)i; C07K 14/47(2006.01)i
FI: C12N5/077; C07K14/47; C12N5/10; C12N1/00 G

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））

C12N5/077; C12N5/10; C12N1/00; C07K14/47

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	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２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); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	US 2010/0081200 A1 (RAJALA Kristiina) 01.04.2010 (2010-04-01) 特に、FIG12F-H, [0001], [0015], [0033], [0056]-[0057], [0081], TABLE2, TABLE3, EXAMPLE9, Claims1-17	1-7, 9-11, 13, 14, 17
Y	特に、FIG12F-H, [0001], [0015], [0033], [0056]-[0057], [0081], TABLE2, TABLE3, EXAMPLE9, Claims1-17	1－15、17
A	特に、FIG12F-H, [0001], [0015], [0033], [0056]-[0057], [0081], TABLE2, TABLE3, EXAMPLE9, Claims1-17	16
X	US 2010/0317104 A1 (AUSTRALIAN STEM CELL CENTRE LIMITED) 16.12.2010 (2010-12-16) 特に、FIGURE3h-i, FIGURE8, [0006]-[0010], [0013], [0018], [0072], [0088]-[0089], TABLE2, Claims1-34	1, 2, 6, 7, 9, 11, 13, 14, 17
Y	特に、FIGURE3h-i, FIGURE8, [0006]-[0010], [0013], [0018], [0072], [0088]-[0089], TABLE2, Claims1-34	1-15, 17
A	特に、FIGURE3h-i, FIGURE8, [0006]-[0010], [0013], [0018], [0072], [0088]-[0089], TABLE2, Claims1-34	16

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と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	国際調査報告の発送日
01.09.2022	20.09.2022

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 2015/182765 A1 (国立大学法人京都大学) 03.12.2015 (2015-12-03) 特に、請求項１－３１、実施例	1-15, 17
A	特に、請求項１－３１、実施例	16
A	JP 2013-512667 A (クリスティーナ、ラジャラ) 18.04.2013 (2013-04-18) 全文	1-17

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/JP2022/027420

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 2010/0081200 A1	01.04.2010	WO 2008/148938 A1 特に、第１頁１行－第４頁１７行，第８頁３行－２５行、TABLE2、TABLE3、Claims1-22 EP 2155859 A1 JP 2010-528642 A	
US 2010/0317104 A1	16.12.2010	（ファミリーなし）	
WO 2015/182765 A1	03.12.2015	US 2017/0152485 A1 特に、請求項１－３０、実施例 EP 3150705 A1	
JP 2013-512667 A	18.04.2013	WO 2011/067465 A1 全文 EP 2507360 A1 CN 102906247 A	