

(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
2018年8月16日(16.08.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/147257 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 5/071 (2010.01) C12Q 1/02 (2006.01)
A61K 35/12 (2015.01) C12Q 1/6851 (2018.01)
C12N 5/10 (2006.01)

(74) 代理人: 鮫島 睦, 外 (SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町 8 番 1 号 梅田阪急ビル オフィスタワー 青山特許事務所 Osaka (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2018/003946

(22) 国際出願日: 2018年2月6日(06.02.2018)

(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 2017-020519 2017年2月7日(07.02.2017) JP

(71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 Kyoto (JP).

(72) 発明者: 長船 健二 (OSAFUNE, Kenji); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 曾根 正勝 (SONE, Masakatsu); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 稲垣 暢也 (INAGAKI, Nobuya); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 中尾 一和 (NAKAO, Kazuwa); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 松尾 浩司 (MATSUO, Koji); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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, 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 PRODUCING STEROIDOGENIC CELLS

(54) 発明の名称: ステロイド産生細胞の製造方法

(57) Abstract: The present invention provides: a method for producing steroidogenic cells, the method comprising treating intermediate mesoderm cells with a dopamine D1 receptor agonist to induce differentiation into steroidogenic cells; a kit for producing steroidogenic cells from intermediate mesoderm cells, the kit containing a dopamine D1 receptor agonist; a method for screening a substance that induces differentiation into steroidogenic cells from intermediate mesoderm cells, the method comprising using the expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase as an indicator; a steroidogenic cell culture obtained by the production method; and a pharmaceutical composition comprising steroidogenic cells obtained by the production method.

(57) 要約: 本発明は、中間中胚葉細胞をドパミン D 1 受容体アゴニストで処理してステロイド産生細胞に分化誘導することを含む、ステロイド産生細胞の製造方法、ドパミン D 1 受容体アゴニストを含む、中間中胚葉細胞からステロイド産生細胞を製造するためのキット、3 β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの発現を指標とすることを含む、中間中胚葉細胞からステロイド産生細胞を分化誘導する物質のスクリーニング方法、上記製造方法にて得られたステロイド産生細胞培養物、ならびに上記製造方法にて得られたステロイド産生細胞を含む医薬組成物を提供する。

WO 2018/147257 A1

明 細 書

発明の名称：ステロイド産生細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、ステロイド産生細胞の製造方法に関する。詳細には、本発明の方法は、中間中胚葉細胞をドパミンD1受容体アゴニスト等で処理してステロイド産生細胞を分化誘導することを特徴とする。

背景技術

[0002] ステロイドホルモンは生存に必要不可欠なものである。副腎皮質から十分な量のステロイドホルモンが産生されないと、副腎機能不全となり、生存の危機に瀕することとなる。このような場合には、緊急の処置が必要となる。かかる処置としてはグルココルチコイド補充療法が標準的なものであるが、副腎の損傷、肥満、骨粗鬆症、高血圧およびグルコース不耐症などの重大な副作用があり、患者の負担も非常に大きい。

[0003] このような処置に代わるものとして、多能性幹細胞を用いる再生医療に期待が寄せられている。多能性幹細胞からのステロイド産生細胞の製造例としては、マウス胚性幹細胞からステロイド産生細胞を誘導した例（非特許文献1）、間葉系幹細胞（MSC）においてSF-1を強制発現させてステロイド産生細胞を得た例（非特許文献2～6）、ヒト多能性幹細胞からステロイド産生細胞を誘導した例（非特許文献7）などがある。しかしながら、これらの研究においては、ステロイド産生が限定的である、あるいはステロイド産生細胞の特徴付けが十分でないといった問題があった。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Crawford, P.A., Sadovsky, Y. & Milbrandt, J. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 directs embryonic stem cells toward the steroidogenic lineage. Mol Cell Biol. 17, 3997-4006 (1997).

非特許文献2：Yanase, T. et al. Differentiation and regeneration of ad

renal tissues: An initial step toward regeneration therapy for steroid insufficiency. *Endocr. J.* 53, 449-459 (2006).

非特許文献3: Tanaka, T. et al. Steroidogenic factor 1/adrenal 4 binding protein transforms human bone marrow mesenchymal cells into steroidogenic cells. *J. Mol. Endocrinol* 39, 343-350 (2007).

非特許文献4: Yazawa, T. et al. Differentiation of adult stem cells derived from bone marrow stroma into Leydig or adrenocortical cells. *Endocrinology* 147, 4104-4111 (2006).

非特許文献5: Gondo, S. et al. Adipose tissue-derived and bone marrow-derived mesenchymal cells develop into different lineage of steroidogenic cells by forced expression of steroidogenic factor 1. *Endocrinology* 149, 4717-4725 (2008).

非特許文献6: Gondo, S. et al. SF-1/Ad4BP transforms primary long-term cultured bone marrow cells into ACTH-responsive steroidogenic cells. *Genes Cells* 9, 1239-1247 (2004).

非特許文献7: Sonoyama, T. et al. Differentiation of human embryonic stem cells and human induced pluripotent stem cells into steroid-producing cells. *Endocrinology* 153, 4336-4345 (2012).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] ステロイド産生量が多く、十分に特徴付けされたステロイド産生細胞を、中間中胚葉細胞から大量かつ効率的に分化誘導する必要がある。

課題を解決するための手段

- [0006] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ね、中間中胚葉細胞をドパミンD1受容体アゴニスト等で処理すると、ステロイド産生細胞に分化誘導されることを見出し、本発明を完成させるに至った。併せて、 3β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼを指標とすることにより、ステロイドを産生する中間中胚葉細胞のスクリーニングを行うことができることも

見出した。

[0007] したがって、本発明は、以下に関するものである：

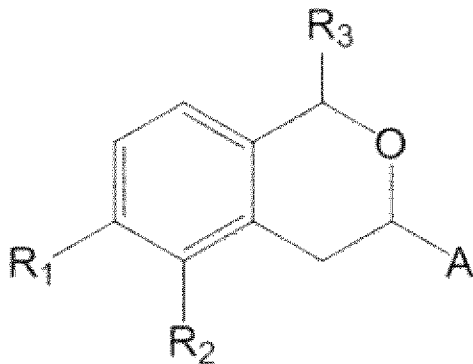
(1) 中間中胚葉細胞をドパミンD1受容体アゴニスト、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) およびドパミンからなる群より選択される1またはそれ以上の物質で処理してステロイド産生細胞に分化誘導することを含む、ステロイド産生細胞の製造方法；

(2) 該物質がドパミンD1受容体アゴニストを含むものである、(1)記載の方法；

(3) 該物質がドパミンD1受容体アゴニストおよびACTHを含むものである、(1)または(2)記載の方法；

(4) ドパミンD1受容体アゴニストが下式(1)～(111)：

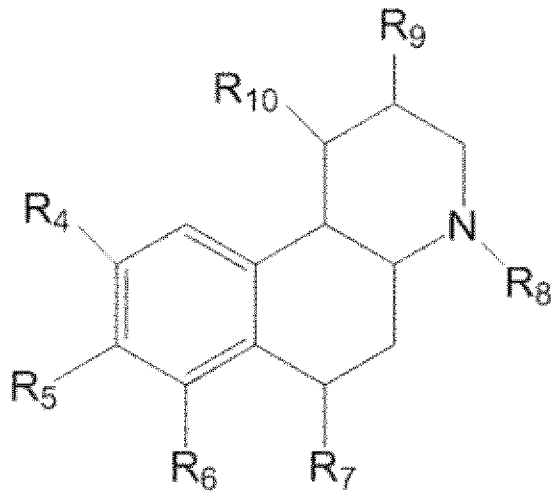
[化1]



(1)

[式中、R₁およびR₂は独立して水素、ヒドロキシ、C₁₋₆アルキルまたはハロゲンであり、R₃は(CH₂)_mNR_xR_yであり(ここに、R_xおよびR_yは独立して水素またはC₁₋₃アルキルである)、mは1～3の整数であり、Aは不飽和結合を有していてもよく、ヒドロキシ、C₁₋₆アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよい飽和または不飽和の炭素環式の基を意味する]、

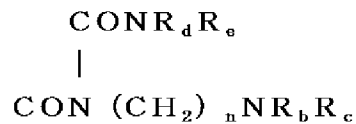
[化2]



(I I)

[式中、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 は独立して水素、ヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンであるか、あるいは R_6 と R_7 は一緒になってヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよいピロール環を形成し、 R_8 は水素、 C_{1-6} アルキルまたは CH_2CHCH_2 であり、 R_9 は水素、ヒドロキシ、 C_{1-6} アルキル、ハロゲン、 CH_2-S-R_a （ここに、 R_a は C_{1-6} アルキルである）、または

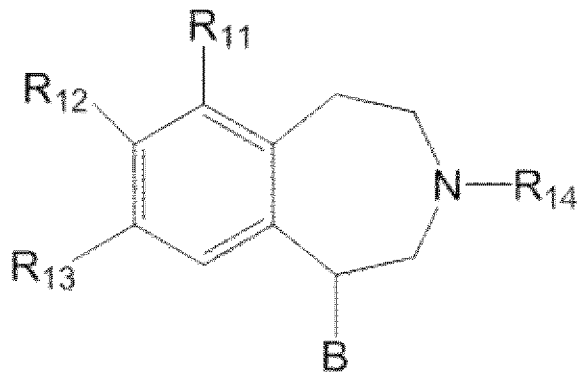
[化3]



(式中、 R_b 、 R_c 、 R_d 、 R_e は独立して水素または C_{1-6} アルキルであり、 n は1～3の整数である)

であり、 R_{10} は水素、ヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンであるか、あるいは R_9 と R_{10} は一緒になってヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよいベンゼン環を形成する]、

[化4]



(I I I)

[式中、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} は独立して水素、ヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンであり、 R_{14} は水素、 C_{1-6} アルキルまたは CH_2CHCH_2 であり、 B はヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよいベンゼン環である]

で示される化合物、ならびにこれらの塩および溶媒和物からなる群より選択される1種またはそれ以上のものである、(1)～(3)のいずれかに記載の方法；

(5) ドパミンD1アゴニストがA68930、A77636、カベルゴリン、CY208-243、ペルゴリド、フェノルドパム、SKF38393、SKF77434、SKF83822、SKF83959、SKF81297、SKF82958、ならびにこれらの塩および水和物からなる群より選択される1種またはそれ以上のものである、(1)～(4)のいずれかに記載の方法；

(6) 中間中胚葉細胞が多能性幹細胞を分化誘導して得られたものである、(1)～(5)のいずれかに記載の方法；

(7) 中間中胚葉細胞がヒト由来のものである、(1)～(6)のいずれかに記載の方法；

(8) 中間中胚葉細胞が、SF-1遺伝子を強制発現されているものである、(1)～(7)のいずれかに記載の方法；

(9) ドパミンD1受容体アゴニストを含む、中間中胚葉細胞からステロ

イド産生細胞を製造するためのキット；

(10) 3β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの発現を指標とすることを含み、中間中胚葉細胞からステロイド産生細胞を分化誘導する物質のスクリーニング方法；

(11) (1)～(8)のいずれかに記載の方法で得られたステロイド産生細胞培養物；ならびに

(12) (1)～(8)のいずれかに記載の方法で得られたステロイド産生細胞を含む医薬組成物。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、中間中胚葉細胞からステロイド産生細胞を大量かつ効率的に分化誘導することができる。したがって、多能性幹細胞からステロイド産生細胞に大量かつ効率的に分化誘導することができる。さらに、本発明によれば、ステロイドを産生する中間中胚葉細胞のスクリーニングを容易に行うことができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1 aは、OSR1⁺細胞におけるステロイド産生酵素のmRNA発現について調べた結果を示す。図1 bは、ヒトiPS細胞由来の中間中胚葉細胞のステロイド産生細胞への分化を促進する称分子化合物のスクリーニング法を模式的に示す。図1 cは、カベルゴリン処理された培養物およびコントロールの 3β -HSD陽性細胞の割合を示す。図1 dは、カベルゴリン濃度依存的な 3β -HSD mRNA発現を示す。

[図2]図2 aは、OSR1⁺細胞におけるドパミンD2受容体発現について調べた結果を示す。図2 bは、ドパミンD2受容体アゴニストにてOSR1⁺細胞を処理した場合の 3β -HSD発現を調べた結果を示す。図2 cは、ドパミンD2受容体アンタゴニストであるメトクロプラミドをOSR1⁺細胞に与えた影響を調べた結果を示す。

[図3]図3 aは、OSR1⁺細胞におけるドパミンD1受容体発現について調べた結果を示す。図3 bは、ドパミンD1受容体アゴニストにてOSR1⁺細胞

胞を処理した場合の 3β -HSD発現を調べた結果を示す。図3cは、D1受容体アンタゴニスト（SKF83566）によって、カベルゴリンの促進効果がブロックされたことが示す。図3dは、カベルゴリンとSKF83566との同時投与がカベルゴリンによるcAMP増加に及ぼす影響について調べた結果を示す。

[図4]図4は、SF-1をトランスフェクションしなかったOSR1+IM細胞およびSF-1をトランスフェクションしたOSR1+IM細胞におけるステロイド合成酵素遺伝子のmRNA発現について調べた結果を示す。

[図5]図5は、SF-1をトランスフェクションしたIM細胞におけるステロイド合成酵素のmRNA発現に対するドパミンD1受容体アゴニストおよびACTHの効果を調べた結果を示す。

発明を実施するための形態

[0010] 以下において本発明を説明するが、特に断らない限り、用語は再生医療や生化学分野において通常に理解されている意味に解される。

[0011] 本発明は、1の態様において、中間中胚葉細胞をドパミンD1受容体アゴニスト、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）およびドパミンからなる群より選択される1またはそれ以上の物質で処理してステロイド産生細胞に分化誘導することを含む、ステロイド産生細胞の製造方法を提供する。上記方法において、ドパミンD1受容体アゴニスト、ACTHまたはドパミンをそれぞれ単独で用いてもよく、あるいはこれらのうち2つまたはこれらすべてを組み合わせて用いてもよい。上記物質およびそれらの組み合わせ以外の物質を併用して中間中胚葉細胞を処理してもよい。

[0012] 本発明の上記態様の1具体例において、上記物質はドパミンD1受容体アゴニストを含む。かかる具体例において、中間中胚葉細胞をドパミンD1受容体アゴニストのみで処理してもよく、ドパミンD1受容体アゴニスト以外の物質を併用して中間中胚葉細胞を処理してもよい。

[0013] 本発明の上記態様のさらなる具体例において、上記物質はドパミンD1受容体アゴニストおよびACTHを含む。かかる具体例において、中間中胚葉

細胞をドパミンD1受容体アゴニストおよびACTHのみで処理してもよく、ドパミンD1受容体アゴニストおよびACTH以外の物質を併用して中間中胚葉細胞を処理してもよい。ドパミンD1受容体アゴニストおよびACTHにて中間中胚葉細胞を処理することについては、後ほど説明する。

[0014] 中間中胚葉細胞は、前腎、中腎、中腎管、後腎、副腎皮質および生殖腺へ分化しうる細胞である。中間中胚葉細胞の由来は特に限定されないが、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒト由来である。

[0015] 本発明に用いられる中間中胚葉細胞は、すでに確立されている細胞（例えば研究機関などから分譲されたもの）であってもよく、あるいは多能性幹細胞から分化誘導されたものであってもよい。

[0016] 多能性幹細胞は、生体に存在するすべての細胞に分化可能であり、かつ、増殖能を併せ持つ幹細胞である。多能性幹細胞は当業者に公知であり、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）、核移植によって得られたクローン胚由来のES細胞（nt ES細胞）、精子幹細胞（GS細胞）、胚性生殖細胞（EG細胞）などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましい多能性幹細胞は、iPS細胞、ES細胞およびnt ES細胞である。

[0017] 多能性幹細胞の作成方法も公知である。iPS細胞は、体細胞に核初期化因子を導入することにより得ることができる。核初期化因子は、基本的にはOctファミリー遺伝子または当該遺伝子産物、Klfファミリー遺伝子または当該遺伝子産物、Soxファミリー遺伝子または当該遺伝子産物、およびMyfファミリー遺伝子または当該遺伝子産物を含む。これらの因子に加えて、Lin28遺伝子または当該遺伝子産物、nanog遺伝子または当該遺伝子産物など体細胞に導入して、iPS細胞の誘導効率を高めてもよい。核初期化因子の体細胞への導入方法も公知である。また、核初期化因子導入後にヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤で細胞を処理することで、iPS細胞の樹立効率を高めてもよい。核初期化因子を導入した体細胞の培養方法、iPS細胞の検出・選択方法についても公知である。iPS細胞

胞は、例えば京都大学 i P S 細胞研究所 (C i R A) などから入手することもできる。

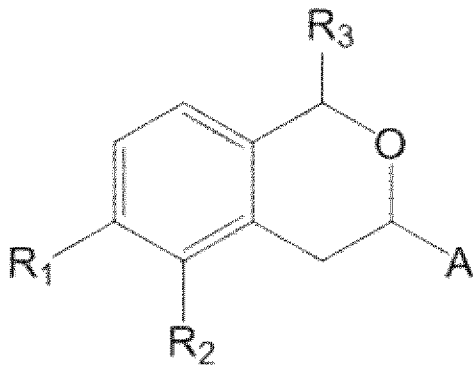
[0018] E S 細胞は、対象動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取り出して培養することにより得ることができる。そのための手技や培養方法も公知である。ヒト E S 細胞は、例えば京都大学再生医科学研究所などから入手することもできる。

[0019] 多能性幹細胞から中間中胚葉細胞への分化誘導方法も公知である。例えば A raoka ら、PLoS One: 9(1)(e84881) に記載された方法、Mae ら、Nat. Commun. 4, 1367 (2013) に記載された方法などを用いることができる。多能性幹細胞から中間中胚葉細胞への好ましい分化誘導方法として、日本国特許第 5 8 9 6 3 6 0 に記載された方法を用いてもよい。中間中胚葉細胞の好ましいマーカーとしては、Odd-skipped related 1 (O S R 1) を用いることができる。例えば、O S R 1 遺伝子に G F P 遺伝子を連結したものをヒト i P S 細胞に導入し、分化誘導し、セルソーターを用いて分取することにより、中間中胚葉細胞を得てもよい。

[0020] ドパミン受容体は主に中枢神経系に分布しており、神経伝達物質であるドパミンと結合することにより様々な生理作用を引き起こす。ドパミン D 1 受容体は、現在知られている 5 つのドパミン受容体の 1 つである。D 1 受容体アゴニストは、ドパミン D 1 受容体に作用して、ドパミンと同様の機能を示す作動薬である。本発明において使用されるドパミン D 1 受容体アゴニストは、ドパミン D 1 受容体のみならずドパミン D 2 ~ D 5 受容体に作用するものであってもよい。また、本発明において使用されるドパミン D 1 受容体アゴニストは、1 種類であってもよく、2 種類以上であってもよい。

[0021] 本発明において好ましく用いられるドパミン D 1 受容体アゴニストは下式 (I) ~ (III) :

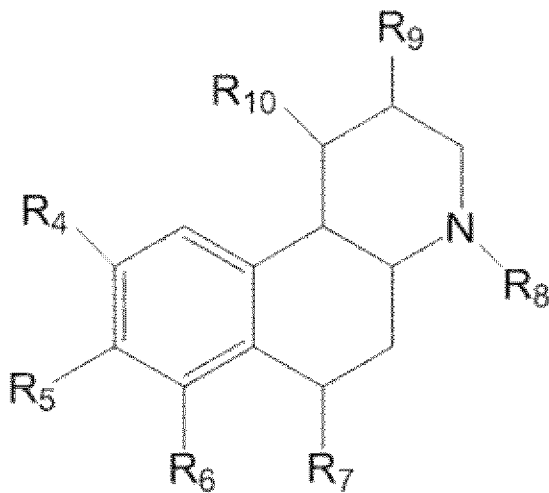
[化5]



(I)

[式中、式中、 R_1 および R_2 は独立して水素、ヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンであり、 R_3 は $(CH_2)_mNR_xR_y$ であり（ここに、 R_x および R_y は独立して水素または C_{1-3} アルキルである）、 m は1～3の整数であり、 A は不飽和結合を有していてもよく、ヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよい飽和または不飽和の炭素環式の基を意味する]

[化6]

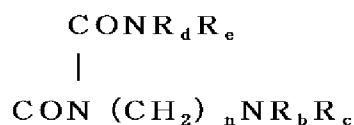


(II)

[式中、式中、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 は独立して水素、ヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンであるか、あるいは R_6 と R_7 は一緒になってヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよいピロール環を形成し、 R_8 は水素、 C_{1-6} アルキルまたは CH_2CHCH_2 であり、 R_9 は水素、

ヒドロキシ、 C_{1-6} アルキル、ハロゲン、 CH_2-S-R_a （ここに、 R_a は C_{1-6} アルキルである）、または

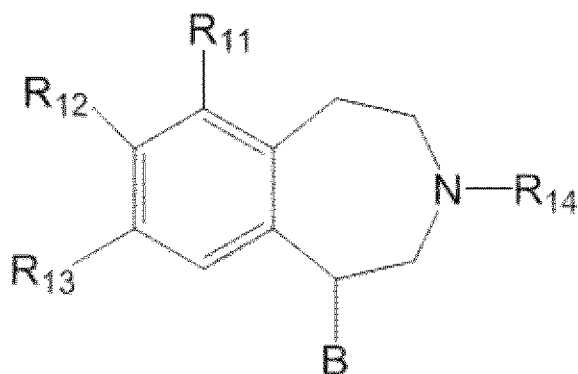
[化7]



（式中、 R_b 、 R_c 、 R_d 、 R_e は独立して水素または C_{1-6} アルキルであり、 n は1～3の整数である）

であり、 R_{10} は水素、ヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンであるか、あるいは R_9 と R_{10} は一緒になってヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよいベンゼン環を形成する]

[化8]



(I I I)

[式中、式中、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} は独立して水素、ヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンであり、 R_{14} は水素、 C_{1-6} アルキルまたは CH_2CHCH_2 であり、 B はヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよいベンゼン環である]

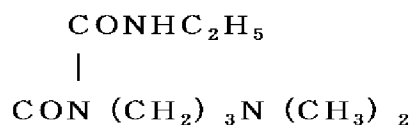
で示される化合物、ならびにこれらの塩および溶媒和物からなる群より選択される1種またはそれ以上のものであるが、これらに限定されない。

[0022] 式（I）で示される好ましい化合物の例としては、 R_1 が水素またはヒドロキシ、 R_2 が水素またはヒドロキシ、 R_3 が CH_3NH_2 、 A がヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよいベンゼン環またはアダマ

ンチル環である化合物が挙げられる。式（１）で示される好ましい化合物の具体例としては、A 6 8 9 3 0 および A 7 7 6 3 6 などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0023] 式（１１）で示される好ましい化合物の例としては、 R_4 が水素またはヒドロキシ、 R_5 が水素またはヒドロキシ、 R_6 が水素、 R_7 が水素、あるいは R_6 と R_7 が一緒になってヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよいピロール環を形成、 R_8 が素または CH_2CHCH_2 、 R_9 が CH_2-S-CH_3 または

[化9]



であり、 R_{10} が水素、あるいは R_9 と R_{10} が一緒になってヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよいベンゼン環を形成する化合物が挙げられる。式（１１）で示される好ましい化合物の具体例としては、カベルゴリン、CY 2 0 8 - 2 4 3、ペルゴリド、ジヒドレキシジンなどが挙げられるが、これらに限定されない。

[0024] 式（１１１）で示される好ましい化合物の例としては、 R_{11} が水素またはハロゲン、 R_{12} が水素またはヒドロキシ、 R_{13} が水素またはヒドロキシ、 R_{14} が水素、メチルまたは CH_2CHCH_2 である化合物が挙げられる。式（１１１）で示される好ましい化合物の具体例としては、フェノルドパム、SKF 3 8 3 9 3、SKF 7 7 4 3 4、SKF 8 3 8 2 2、SKF 8 3 9 5 9、SKF 8 1 2 9 7、SKF 8 2 9 5 8 などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0025] 上記化合物の塩または溶媒和物を用いてもよい。上記化合物の塩としては、塩酸塩、臭化水素塩、マレイン酸塩、メシル酸塩などが挙げられるが、これらに限定されない。上記化合物の溶媒和物としては水和物などが挙げられるが、これに限定されない。

- [0026] 本発明で用いられる式 (I) ~ (III) の化合物において、ハロゲンは塩素、臭素およびヨウ素を含む。C₁₋₆アルキルは炭素数1個ないし6個のアルキル基を意味する。本発明で用いられる式 (I) ~ (III) の化合物は、すべての構造異性体および立体異性体を含む。
- [0027] ドパミンD1受容体アゴニストにて処理される中間中胚葉細胞は純化された細胞集団として提供されてもよく、他の種類の細胞を含む細胞集団として提供されてもよい。
- [0028] 中間中胚葉細胞をドパミンD1受容体アゴニストで処理するとは、中間中胚葉細胞のドパミンD1受容体とドパミンD1アゴニストが相互作用しうる状態に置くことを意味する。典型的には、中間中胚葉細胞とドパミンD1アゴニストを接触させることにより、より典型的には、ドパミンD1受容体アゴニストを含む培地にて中間中胚葉細胞を培養することにより、中間中胚葉細胞をドパミンD1受容体アゴニストで処理することができる。
- [0029] 中間中胚葉細胞をドパミンD1受容体アゴニストで処理してステロイド産生細胞に分化誘導する際の培地は、ドパミンD1受容体アゴニストを含んでいれればいずれの動物細胞培養用培地であってもよく、EMEM培地、DMEM培地、RPMI 1640培地、Ham's F12培地、Medium 199培地、およびこれらの改変培地、ならびにこれらの混合培地などが例示されるが、これらに限定されない。接着培養を行う場合は、コーティング剤で処理された培養容器を用いることができる。コーティング剤としては、マトリゲルTM、コラーゲン、ゼラチンなど、およびこれらの組み合わせが挙げられるが、これらに限定されない。
- [0030] 培地中のドパミンD1受容体アゴニストの量は、細胞のステロイド合成酵素遺伝子の発現および／または酵素活性、ならびに／あるいは細胞から生成されるステロイド類の量を測定することによって、適宜決定することができる。一般的には、培地中のドパミンD1受容体アゴニストの量は約0.1 μM~数十μMとすることができる。
- [0031] ドパミンD1受容体アゴニストを含む培地にて中間中胚葉細胞を培養して

ステロイド産生細胞に分化誘導するための諸条件も適宜定めうる。例えばドパミンD1受容体アゴニストを含む培地中、37℃、5～10%二酸化炭素の存在下、約2日～約30日培養してもよい。さらに、必要に応じて細胞を継代培養してもよい。

[0032] 本発明において、1種類のドパミンD1受容体アゴニストを用いてもよく、2種類以上のドパミンD1受容体アゴニストを用いてもよい。

[0033] 細胞におけるステロイド合成酵素遺伝子の発現は、例えば定量的リアルタイムPCR（qRT-PCR）などの方法を用いて測定することができる。ステロイド合成酵素の例としては、ステロイド産生急性調節タンパク質（StAR）、CYP11A1、CYP21A2、CYP11B1、CYP17および3β-ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ（3β-HSD）などが挙げられるが、これらに限定されない。ステロイド合成酵素の活性測定方法も公知である。培地に分泌されたステロイド類は、例えばエンザイムイムノアッセイによって測定することができる。かかるエンザイムイムノアッセイ用のキットも市販されている。

[0034] 本発明におけるステロイド産生細胞は、ドパミンD1受容体アゴニストで処理されて分化誘導された中間中胚葉細胞であって、ドパミンD1受容体アゴニストで処理されずに分化誘導された場合と比較して、ステロイド類の産生能が全体として上昇している細胞である。ステロイド類の例としては、コルチゾールなどの糖質コルチコイド、アルドステロンなどの鉱質コルチコイド、デヒドロエピアンドロステロン（DHEA）、テストステロンなどのアンドロゲンなどが挙げられるが、これらに限定されない。

[0035] 本発明のステロイド産生細胞の製造方法において、ドパミンD1受容体アゴニストおよびACTHにて中間中胚葉細胞を処理することによって、細胞からのステロイド産生量をさらに増大させることができる。中間中胚葉細胞をドパミンD1受容体アゴニストで処理すると同時、あるいはその前または後に、中間中胚葉細胞をACTHで処理してもよい。通常は、ドパミンD1受容体アゴニストとACTHを含有する培地にて中間中胚葉細胞を培養して

、ステロイド産生細胞へ分化誘導する。

[0036] 培地に添加するACTHの量は、例えば分化誘導された細胞が産生するステロイド類の量を測定することにより、適宜定めうるが、一般的には、約0.1 μ M～数十 μ Mとすることができる。

[0037] また、本発明のステロイド産生細胞の製造方法において、SF-1を強制発現された中間中胚葉細胞を用いることにより、ステロイド産生量をさらに増大させることができる。SF-1はステロイド合成遺伝子の転写における主たるレギュレーターである。SF-1の強制発現は、発現ベクターを用いるトランスフェクションなどの公知の方法にて行うことができる。

[0038] 本発明は、もう1つの態様において、ドパミンD1受容体アゴニストを含む、中間中胚葉細胞からステロイド産生細胞を製造するためのキットを提供する。本発明のキットは、ドパミンD1受容体アゴニストのほかに、中間中胚葉細胞、培養容器、培地などを含んでいてもよい。通常は、取扱説明書がキットに添付される。

[0039] 本発明は、さらにもう1つの態様において、 3β -HSDの発現量を指標とすることを含む、中間中胚葉細胞からステロイド産生細胞を分化誘導する物質のスクリーニング方法を提供する。 3β -HSDは副腎皮質ホルモン合成に必須の酵素であるので、この酵素の発現量と、細胞のステロイド生成能との間に相関関係がある。この酵素の発現量は、例えばqRT-PCRなどを用いて測定することができる。

[0040] 本発明は、さらにもう1つの態様において、 3β -HSDの発現量を測定するための手段を含む、中間中胚葉細胞からステロイド産生細胞を分化誘導する物質のスクリーニング用キットを提供する。該キットは、例えば 3β -HSDの発現量を測定するためのqRT-PCRに必要なプライマー等を含んでいてもよい。通常は、取扱説明書がキットに添付される。

[0041] 本発明は、さらにもう1つの態様において、本発明の製造方法で得られたステロイド産生細胞培養物を提供する。当業者は、培養方法および培養条件を適宜選択して、ステロイド産生細胞の培養を行うことができる。

[0042] 本発明は、さらにもう1つの態様において、本発明の製造方法で得られたステロイド産生細胞を含む医薬組成物を提供する。当業者は、担体や賦形剤、添加剤等を適宜選択して、本発明の医薬組成物を製造することができる。本発明の医薬組成物を、副腎機能不全の治療に用いてもよい。したがって、本発明は、この態様の一具体例において、副腎機能不全の治療のための、本発明の製造方法で得られたステロイド産生細胞を含む医薬組成物を提供する。

[0043] 本発明は、さらなる態様において、本発明の製造方法で得られたステロイド産生細胞を副腎機能不全の患者に投与することを含む、該患者における副腎機能不全の治療方法を提供する。

[0044] 本発明は、さらなる態様において、副腎機能不全の治療のための医薬の製造における、本発明の製造方法で得られたステロイド産生細胞の使用を提供する。

[0045] 本発明は、さらなる態様において、副腎機能不全の治療のために使用される、本発明の製造方法で得られたステロイド産生細胞を提供する。

[0046] 以下に実施例を示して本発明をさらに詳細かつ具体的に説明するが、実施例は本発明を限定するものではない。

実施例 1

[0047] 1. 中間中胚葉細胞（IM細胞）の 3β -HSD陽性度を上昇させる小分子化合物のスクリーニング

この実験は、ヒトiPS細胞由来のIM細胞のステロイド産生細胞への分化を促進する小分子化合物をスクリーニングするためのものであった。この目的のために、GFP遺伝子と一緒にOSR1遺伝子がノックインされたヒトiPS細胞株（3D45）を用いた。ヒトiPS細胞から、Maeら、Nat. Commun. 4, 1367 (2013)に記載された方法に従って、胚様体（EB）形成を経由してOSR1陽性（OSR1⁺）IM細胞を誘導した。まず、IM細胞がステロイド産生細胞へと誘導されたことを示す適切なマーカーを決定するために、上記OSR1⁺細胞におけるステロイド産生酵素のmRNA発現について

調べた。逆転写PCR (RT-PCR) 分析により、StARおよび 3β -HSDのmRNA発現が示されたが、シトクロムP450 (CYP) 11A1、CYP21A2、CYP11B1、CYP11B2、CYP17などの他のステロイド合成酵素のmRNA発現はIM細胞において示されなかった (図1a)。 3β -HSDは副腎皮質ホルモンの生成に必須の酵素であるので、これを適切なマーカーであると考えた。そして 3β -HSDの免疫染色を用いて、ヒトiPS細胞由来のIM細胞のステロイド産生細胞への分化を促進する小分子化合物の1次スクリーニングを行った。図1bにその概要を示す。

[0048] このスクリーニングのための出発材料を集めるために、Maeら、Nat. Commun. 4, 1367 (2013)に記載された方法に従って、胚様体 (EB) 形成を経由してIM細胞を誘導した。単離されたOSR1-GFP⁺細胞を348ウェルプレートに播き (8000個/ウェル)、翌日に各化合物を各ウェルに添加した。化合物添加から4日後に、細胞を 3β -HSD抗体にて染色した。担体 (1% DMSO) で処理した細胞よりも10倍以上の 3β -HSD陽性度 (%) を示したウェルを、1次スクリーニングでのヒットと見なした。3648種の化合物を調べた結果、8種の化合物がヒットした。次に、自己蛍光を有する化合物および細胞毒性を有する化合物を除外した。その結果、カベルゴリンだけが残った。カベルゴリン処理された培養物の 3β -HSD陽性細胞の割合は1.59%で、DMSO処理されたコントロール (0.07 ± 0.01%) よりも高かった (図1c)。qRT-PCR分析によっても、試験した濃度 (カベルゴリン1 nM ~ 20 μ M) において用量依存的に 3β -HSD mRNA発現が増加したことが示された (図1d)。

[0049] 2. カベルゴリンが 3β -HSD mRNA発現をアップレギュレートする機構

カベルゴリンは、ドパミンD2受容体の有効かつ高親和性アゴニストとして知られている。したがって、OSR1⁺細胞においてドパミンD2シグナリングが 3β -HSD mRNA発現をアップレギュレートしたと考えられた。

そこで、RT-PCRを用いて、OSR1+細胞におけるドパミンD2受容体の発現について調べたところ、その発現レベルはヒト副腎と同等であることがわかった(図2a)。次に、他のドパミンD2受容体アゴニスト(10 μ M キンピロール、1 μ M ブロモクリプチンおよび10 μ M プロピルノルアポモルフィン)にてOSR1+細胞を4日間処理することにより、それらの効果について調べた。しかしながら、いずれのアゴニストもOSR1+細胞のステロイド産生細胞への分化を促進しなかった(図2b)。さらに、カベルゴリンの分化促進効果は、10 μ Mのメクロプラミド(ドパミンD2受容体アンタゴニスト)を毎日細胞に与えるによっては影響を受けなかった(図2c)。これらの結果から、カベルゴリンによるステロイド産生細胞への分化促進は、そのドパミンD2受容体アゴニスト活性によるものではないと考えられた。さらに、カベルゴリンは、ドパミンD2受容体に対して非常に高い親和性を有するにもかかわらず、比較的高濃度で分化を改善したことも考えると、カベルゴリンの分化促進活性は、ドパミンD1受容体に対して低い親和性を有するアゴニストとして作用することによるものと考えられた。

[0050] 上記の考えを証明するために、OSR1+細胞におけるドパミンD1受容体発現について調べた。まず、RT-PCR分析を行ったところ、ドパミンD1受容体は未分化ヒトiPS細胞において発現されていなかったが、OSR1+細胞において発現されていた(図3a)。次に、3種類のドパミンD1受容体アゴニスト(10 μ M ペルゴリド、10 μ M A68930、1 μ M SKF83822)でOSR1+細胞を4日間処理し、いずれもが3 β -HSD mRNA発現をアップレギュレートすることを確認した(図3b)。さらに、qRT-PCR分析を行ったところ、D1受容体アンタゴニスト(10 μ M SKF83566)によって、カベルゴリン(20 μ M)の促進効果がブロックされたことが示され(図3c)、カベルゴリンがドパミンD1受容体を活性化することによって3 β -HSD mRNA発現を促進することが示唆された。次に、カベルゴリンがドパミンD1受容体活性化によって作用することを確認するために、カベルゴリンおよびSKF83566にて細

胞を処理した後、ドパミンD1受容体の第2のメッセンジャーとして知られる細胞内サイクリックAMP (cAMP) のアッセイを行った。カベルゴリンは細胞内cAMPを有意に増加させたが、SKF83566との同時投与によって、カベルゴリンによるcAMP増加は見られなくなった(図3d)。これらの結果を総合すると、ドパミンD1受容体シグナリングによって細胞内cAMPが増加して、ステロイド産生細胞への分化が促進されることがわかった。

[0051] 3. OSR1+細胞へのSF-1トランスフェクション

これまでの実験において、ドパミンD1受容体アゴニストを用いて分化誘導されたOSR1+細胞では3 β -HSD以外のステロイド合成酵素のmRNA発現の促進は見られなかった(データ示さず)。その理由として、これらの細胞におけるステロイド合成酵素の発現が全般的に低いので検出できなかったことが考えられた。本発明者らは、ステロイド合成遺伝子の転写における主たるレギュレーターであるSF-1が、ヒトES細胞およびヒトiPS細胞由来の中胚葉細胞をステロイド産生細胞に分化誘導することを見出している。そこで、SF-1をOSR1+細胞にトランスフェクションし、ドパミンD1受容体アゴニストの効果を調べることにした。

[0052] トランスフェクションは、サイトメガロウイルスプロモーターにより駆動されるSH-F-1をコードする発現プラスミド(pCMFlag-hsNR5A1;RIKEN BRC, Saitama, Japan) 2 μ gを、約 5×10^5 個のOSR1+IM細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションは、Nucleofector™ (Lonza, Basel, Switzerland) によるエレクトロポレーションを用いて行った。トランスフェクション効率は約60%であった。

[0053] SF-1をトランスフェクションしなかったOSR1+IM細胞およびSF-1をトランスフェクションしたOSR1+IM細胞におけるステロイド合成酵素遺伝子のmRNA発現について調べた結果を図4に示す。SF-1をトランスフェクションしなかったOSR1+IM細胞において、カベルゴリン(20 μ M)は3 β -HSDおよびStARのmRNA発現レベルを上昇させ

た。SF-1をトランスフェクションしなかったOSR1+IM細胞において、SKF83822 (1 μ M) は3 β -HSD、StARおよびCYP11B1のmRNA発現レベルを上昇させた。SF-1をトランスフェクションしたOSR1+IM細胞では、様々なステロイド合成酵素のmRNA発現レベルが上昇していた。また、RT-PCR分析により、これらのIM細胞においてACTH (副腎皮質刺激ホルモン) 受容体が発現していることも確認された (データ示さず)。

[0054] 4. SF-1をトランスフェクションしたIM細胞におけるステロイド合成酵素のmRNA発現に対するドパミンD1受容体アゴニストおよびACTHの効果

上記の実験結果に基づいて、ドパミンD1受容体アゴニストであるSKF83822の効果について、ACTH刺激の存在下において調べた。SF-1をトランスフェクションしたOSR1+IM細胞を、1 μ MのSKF83822、2.4 μ MのACTH、10 μ MのSKF83566の組み合わせにて24時間処理した。qRT-PCR分析により、StAR、CYP11A1、CYP21A2、CYP11B1、CYP11B2、CYP17および3 β -HSDのmRNA発現レベルがSKF83822によりアップレギュレートされたことが示された。そして、これらの効果はACTH刺激によって相乗的に促進されたことが示された。さらに、SKF83822の促進効果は、ドパミンD1受容体アンタゴニストであるSKF83566によって完全にブロックされた。ACTHのみで処理された細胞においてもStAR、3 β -HSDおよびCYP11B1の発現が有意にアップレギュレートされた。これらの結果を図5に示す。

[0055] SF-1をトランスフェクションしたOSR1+IM細胞を、1 μ MのSKF83822、2.4 μ MのACTHの組み合わせとともに2日間培養を行った後培地中に分泌されたステロイドホルモンを測定した。実験は5系で行った (n=5)。有意な量のコルチゾール、アルドステロンおよびデヒドロエピアンドロステロン (DHEA) の産生が見られた。コルチゾールの分泌

は、S K F 8 3 8 2 2 および A C T H の両用に応答して有意に増加した。S K F 8 3 8 2 2 と A C T H の組み合わせにて処理された細胞は、アルドステロンおよび D H E A の産生を有意に増加させた。これらの結果を表 1 に示す。

[表1]

表 1. 培地中に分泌されたステロイドホルモンのレベル (数値は pg/ml 、
平均値 $\pm$ 標準偏差)

	コントロール	A C T H	A C T H および S K F 8 3 8 2 2
コルチゾール	415 $\pm$ 19.9	**560 $\pm$ 26.2	*+1136 $\pm$ 215
アルドステロン	14.5 $\pm$ 0.9	19.5 $\pm$ 2.0	*27.1 $\pm$ 3.5
D H E A	2139 $\pm$ 278	2291 $\pm$ 274	*3059 $\pm$ 126

*コントロールに対して $P < 0.05$

**コントロールに対して $P < 0.01$

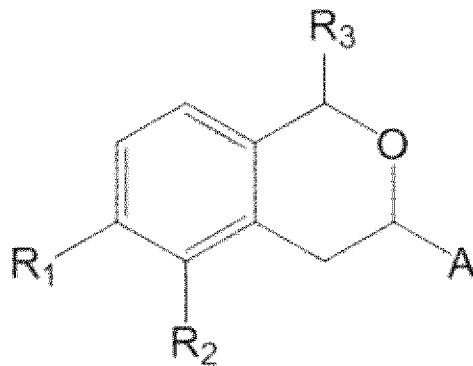
+A C T H に対して $P < 0.05$

産業上の利用可能性

[0056] 本発明は、再生医療や疾病の研究に用いる細胞の製造の分野などにおいて非常に有用である。

請求の範囲

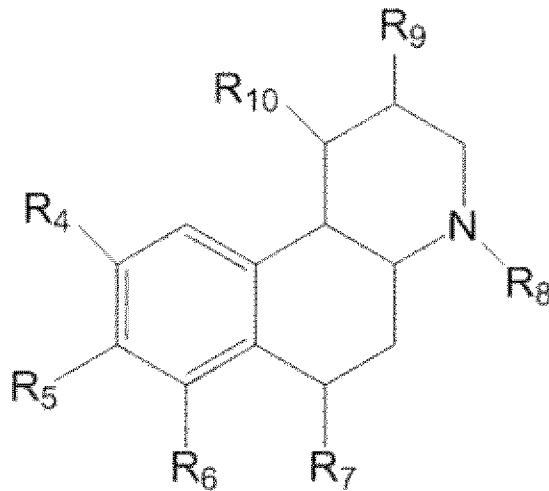
- [請求項1] 中間中胚葉細胞をドパミンD 1 受容体アゴニスト、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）およびドパミンからなる群より選択される1またはそれ以上の物質で処理してステロイド産生細胞に分化誘導することを含む、ステロイド産生細胞の製造方法。
- [請求項2] 該物質がドパミンD 1 受容体アゴニストを含むものである、請求項1記載の方法。
- [請求項3] 該物質がドパミンD 1 受容体アゴニストおよびACTHを含むものである、請求項1または2記載の方法。
- [請求項4] ドパミンD 1 受容体アゴニストが下式（I）～（III）：



(I)

[式中、R₁およびR₂は独立して水素、ヒドロキシ、C₁₋₆アルキルまたはハロゲンであり、R₃は(CH₂)_mNR_xR_yであり（ここに、R_xおよびR_yは独立して水素またはC₁₋₃アルキルである）、mは1～3の整数であり、Aは不飽和結合を有していてもよく、ヒドロキシ、C₁₋₆アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよい飽和または不飽和の炭素環式の基を意味する]、

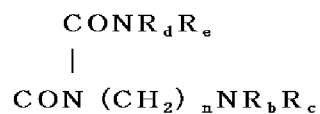
[化2]



(11)

[式中、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_7 は独立して水素、ヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンであるか、あるいは R_6 と R_7 は一緒になってヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよいピロール環を形成し、 R_8 は水素、 C_{1-6} アルキルまたは CH_2CHCH_2 であり、 R_9 は水素、ヒドロキシ、 C_{1-6} アルキル、ハロゲン、 CH_2-S-R_a （ここに、 R_a は C_{1-6} アルキルである）、または

[化3]

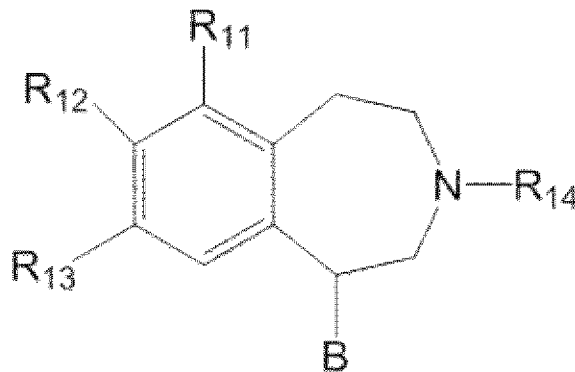


(式中、 R_b 、 R_c 、 R_d 、 R_e は独立して水素または C_{1-6} アルキルであり、 n は1～3の整数である)

であり、 R_{10} は水素、ヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンであるか、あるいは R_9 と R_{10} は一緒になってヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよいベンゼン環を形成する]

、

[化4]



(I 1 1)

[式中、 R_{11} 、 R_{12} 、 R_{13} は独立して水素、ヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンであり、 R_{14} は水素、 C_{1-6} アルキルまたは C_6H_5 であり、 B はヒドロキシ、 C_{1-6} アルキルまたはハロゲンで置換されていてもよいベンゼン環である]

で示される化合物、ならびにこれらの塩および溶媒和物からなる群より選択される1種またはそれ以上のものである、請求項1～3のいずれか1項記載の方法。

[請求項5] ドパミンD1アゴニストがA68930、A77636、カベルゴリン、CY208-243、ペルゴリド、フェノルドパム、SKF38393、SKF77434、SKF83822、SKF83959、SKF81297、SKF82958、ならびにこれらの塩および水和物からなる群より選択される1種またはそれ以上のものである、請求項1～4のいずれか1項記載の方法。

[請求項6] 中間中胚葉細胞が多能性幹細胞を分化誘導して得られたものである、請求項1～5のいずれか1項記載の方法。

[請求項7] 中間中胚葉細胞がヒト由来のものである、請求項1～6のいずれか1項記載の方法。

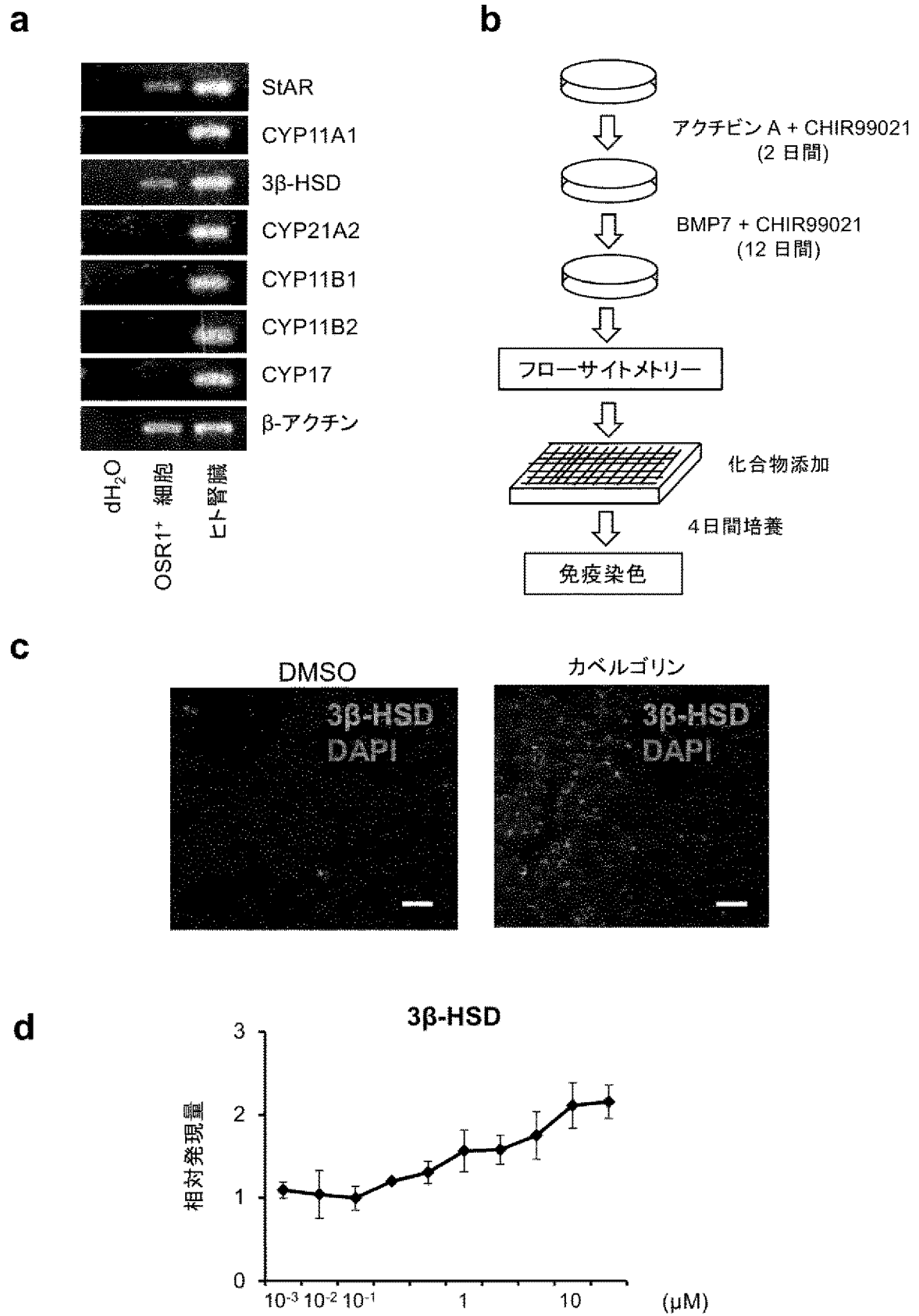
[請求項8] 中間中胚葉細胞が、SF-1遺伝子を強制発現されているものである、請求項1～7のいずれか1項記載の方法。

[請求項9] ドパミンD1受容体アゴニストを含む、中間中胚葉細胞からステロ

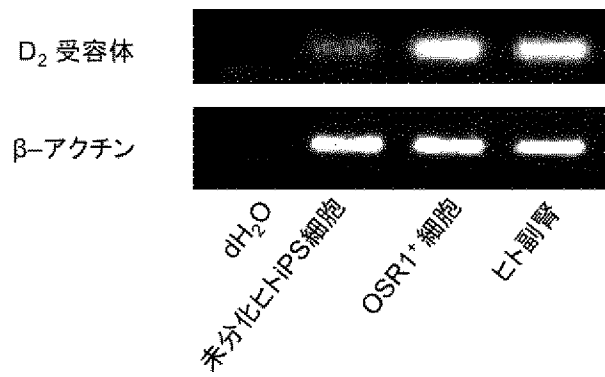
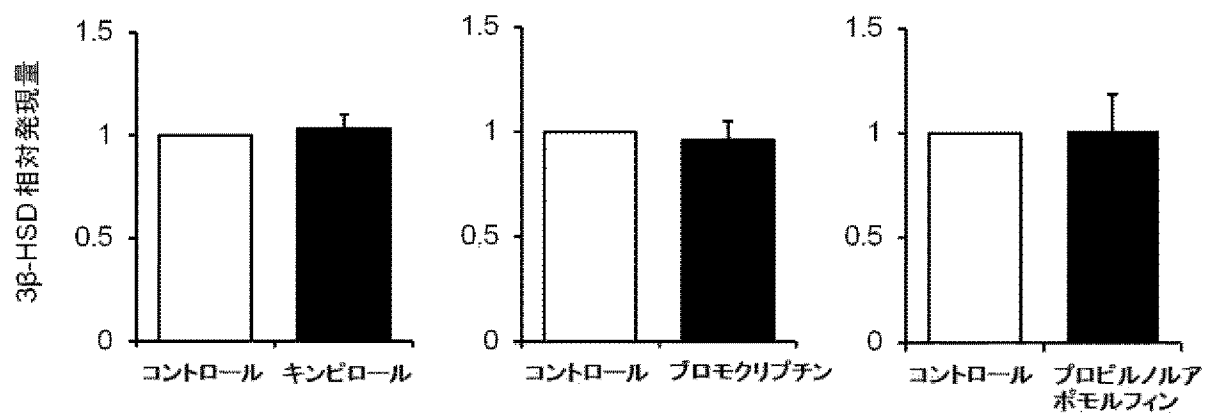
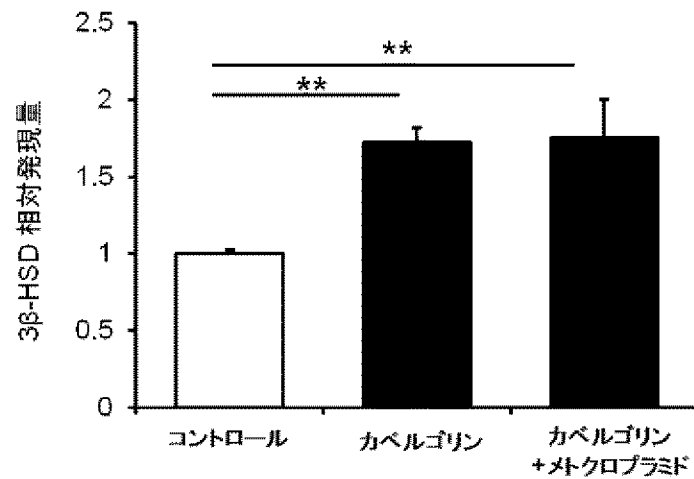
イド産生細胞を製造するためのキット。

- [請求項10] 3β -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼの発現を指標とすることを含む、中間中胚葉細胞からステロイド産生細胞を分化誘導する物質のスクリーニング方法。
- [請求項11] 請求項1～8のいずれか1項記載の方法で得られたステロイド産生細胞培養物。
- [請求項12] 請求項1～8のいずれか1項記載の方法で得られたステロイド産生細胞を含む医薬組成物。

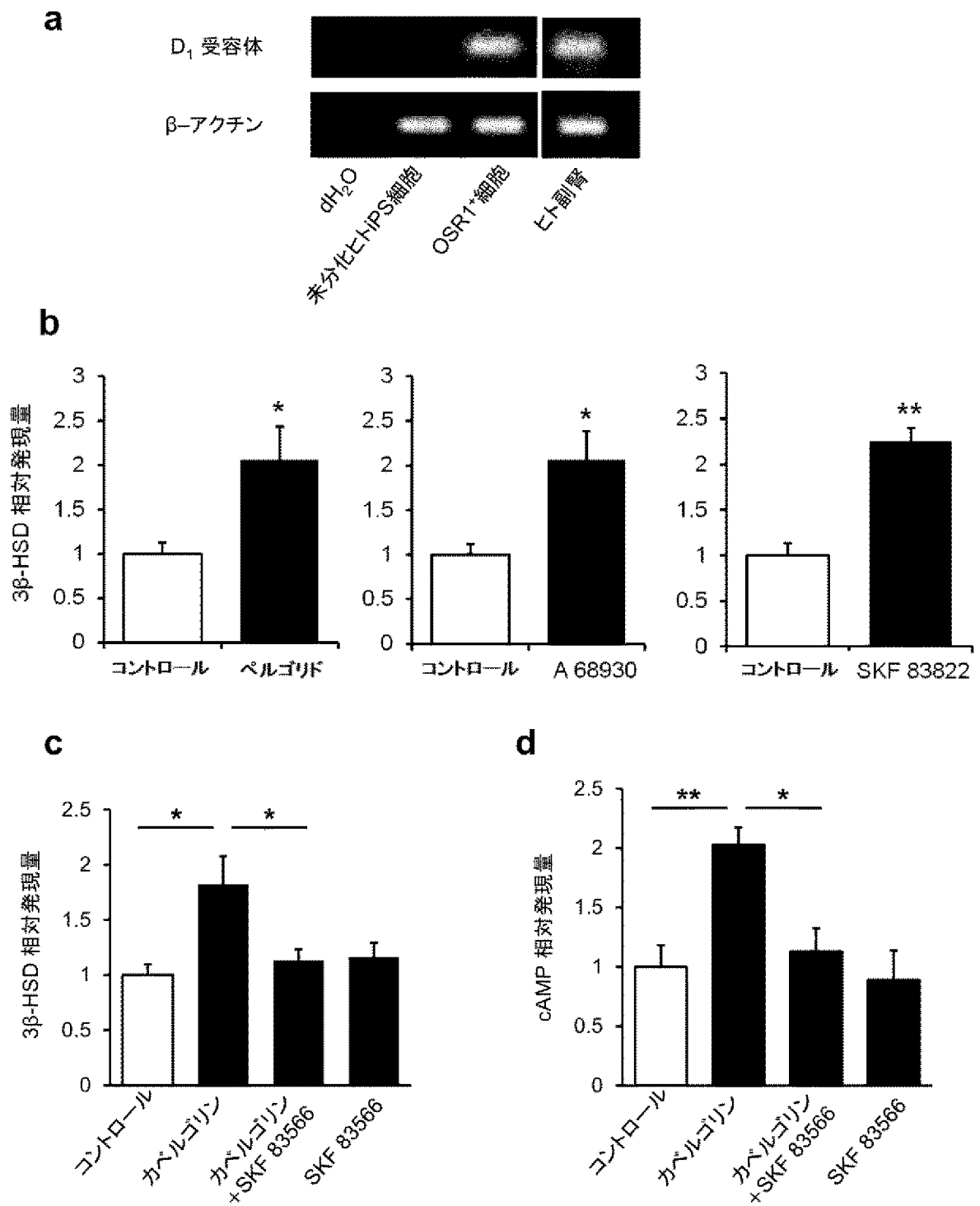
[図1]

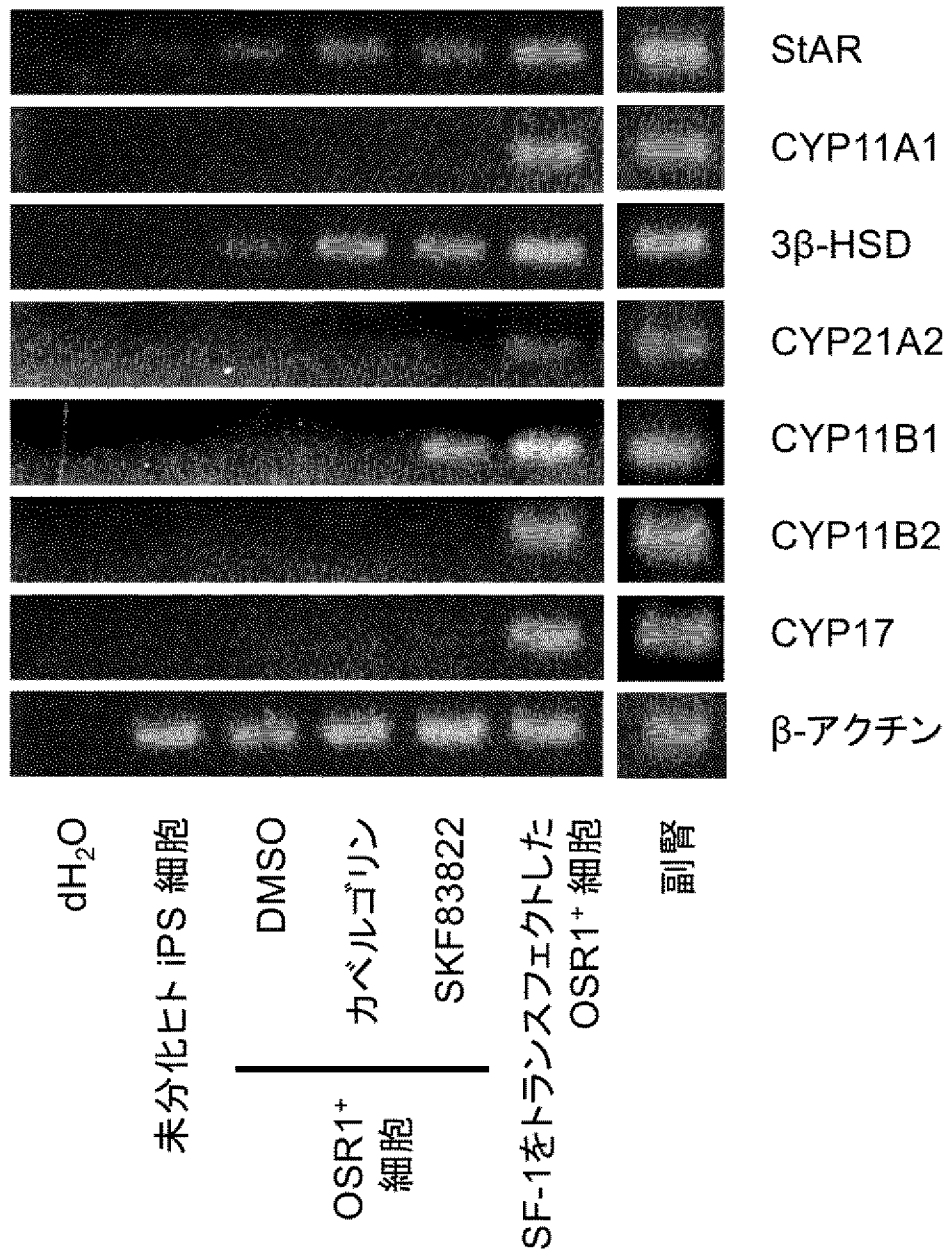


[図2]

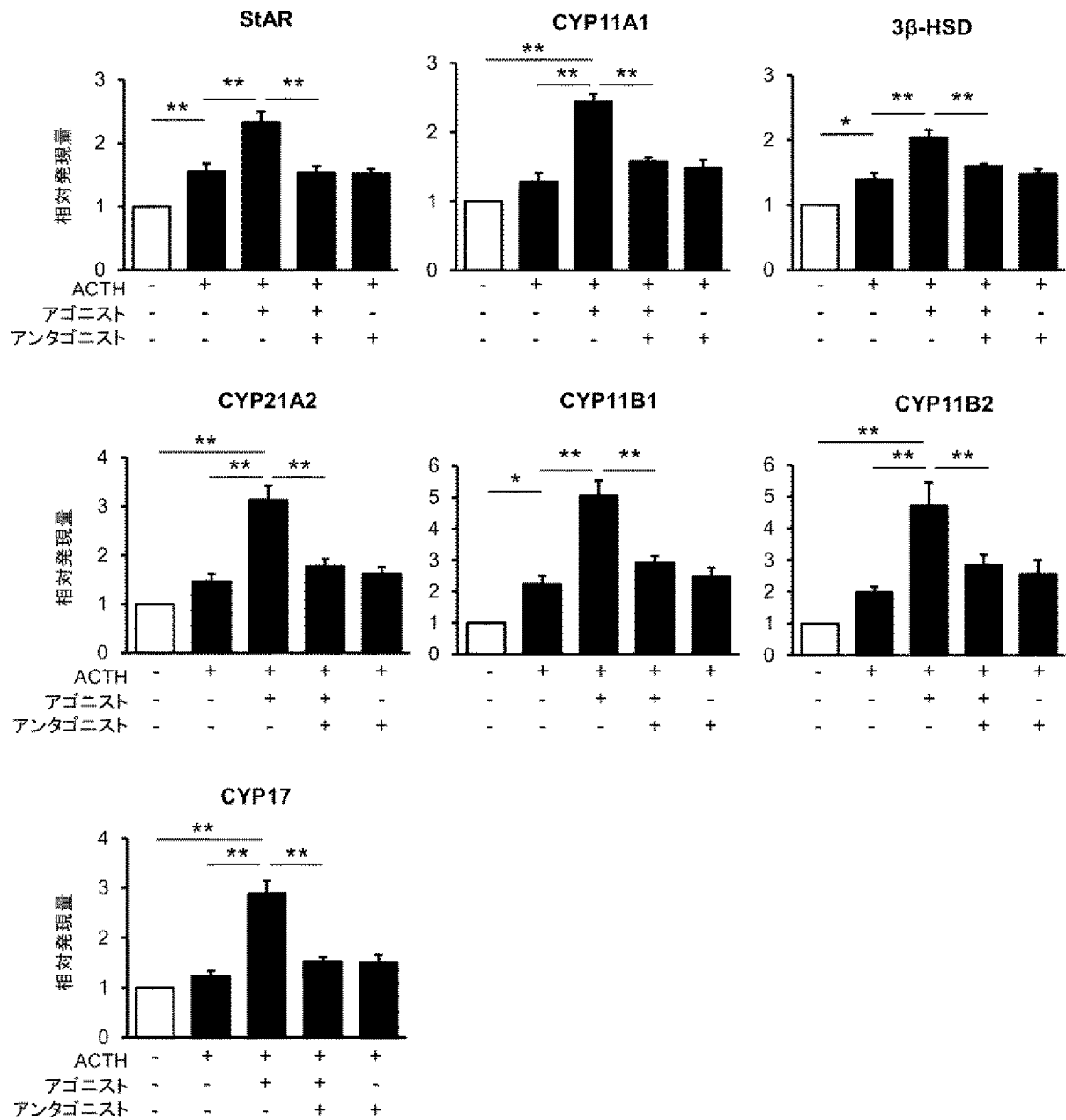
a**b****c**

[図3]





[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2018/003946

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. C12N5/071 (2010.01) i, A61K35/12 (2015.01) i, C12N5/10 (2006.01) i,
C12Q1/02 (2006.01) i, C12Q1/6851 (2018.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl. C12N1/00-7/08, A61K35/12, C12Q1/02, C12Q1/6851

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 1971-2018

Registered utility model specifications of Japan 1996-2018

Published registered utility model applications of Japan 1994-2018

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN),
DWPI (Derwent Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	曾根正勝ほか, ヒト iPS/ES 細胞からのステロイド産生細胞分化とケミカルスクリーニング, ACTH RELATED PEPTIDES, 2015, vol. 26, pp. 41-42, ISSN 1340-4512, see entire text, non-official translation (SONE, Masakatsu et al., "Steroid-producing cell differentiation in human iPS/ES cells, and chemical screening")	10-12 1-9



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
23 April 2018 (23.04.2018)

Date of mailing of the international search report
01 May 2018 (01.05.2018)

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/JP2018/003946

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	SONOYAMA T. et al., "Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Human Induced Pluripotent Stem Cells into Steroid-Producing Cells", Endocrinology, 2012, vol. 153, no. 9, pp. 4336-4345, ISSN 0013-7227, abstract, page 4337, right column, line 33 to page 4339, left column, line 7, page 4341, right column, line 5 to page 4342, left column, line 35, page 4344, left column, lines 1-12, fig. 3, 5, table 2	11-12 1-10
X A	園山拓洋ほか, ヒト ES 細胞/iPS 細胞のステロイド産生細胞への分化誘導法の開発, 再生医療, 2012, vol. 11, suppl., p. 153 (YIA-2), ISSN 1347-7919, see entire text, (REGENERATIVE MEDICINE), non-official translation (SONOYAMA, Takuhiro)	11-12 1-10
X A	園山拓洋, ヒト ES 細胞/iPS 細胞のステロイド産生細胞への分化誘導法の開発, 日本応用酵素協会誌, no. 48 (2013), 01 March 2014, pp. 78-79, ISSN 0913-3348, see entire text, non-official translation (SONOYAMA, Takuhiro)	11-12 1-10
A	JP 2011-15630 A (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION UNIVERSITY OF FUKUI) 27 January 2011, claims (Family: none)	1-12
A	JP 2006-122040 A (KYUSHU UNIVERSITY) 18 May 2006, claims, paragraphs [0048]-[0074] & WO 2006/038462 A1	1-12
A	WO 2005/085425 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) 15 September 2005, claims, paragraphs [0014]-[0028] & US 2008/0313752 A1, claims, paragraphs [0043]-[0075]	1-12
P, X	MATSUO K. et al., "Significance of dopamine D1 receptor signaling for steroidogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells", Scientific Reports, 09 November 2017, vol. 7, article number 15120, ISSN 2045-2322, see entire text	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/071(2010.01)i, A61K35/12(2015.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/6851(2018.01)i

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. C12N1/00-7/08, A61K35/12, C12Q1/02, C12Q1/6851

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	1971-2018年
日本国実用新案登録公報	1996-2018年
日本国登録実用新案公報	1994-2018年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), DWPI (Derwent Innovation)

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 A	曾根正勝ほか, ヒト iPS/ES細胞からのステロイド産生細胞分化とケミカルスクリーニング, ACTH RELATED PEPTIDES, 2015, Vol. 26, p. 41-42, ISSN 1340-4512, 全文参照	10-12 1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23.04.2018

国際調査報告の発送日

01.05.2018

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

特許庁審査官 (権限のある職員)

小林 薫

4N

6114

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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 A	SONOYAMA T. et al., Differentiation of Human Embryonic Stem Cells and Human Induced Pluripotent Stem Cells into Steroid-Producing Cells, Endocrinology, 2012, Vol.153, No.9, p.4336-4345, ISSN 0013-7227, Abstract, 第4337ページ右欄第33行-第4339ページ左欄第7行、第4341ページ右欄第5行-第4342ページ左欄第35行、第4344ページ左欄第1-12行、FIG. 3, 5, TABLE 2	11-12 1-10
X A	園山拓洋ほか, ヒト ES 細胞/iPS 細胞のステロイド産生細胞への分化誘導法の開発, 再生医療, 2012, Vol.11 suppl., p.153 (YIA-2), ISSN 1347-7919, 全文参照	11-12 1-10
X A	園山拓洋, ヒト ES 細胞/iPS 細胞のステロイド産生細胞への分化誘導法の開発, 日本応用酵素協会誌, No.48 (2013), 2014.03.01 発行, p.78-79, ISSN 0913-3348, 全文参照	11-12 1-10
A	JP 2011-15630 A (国立大学法人福井大学) 2011.01.27, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1-12
A	JP 2006-122040 A (国立大学法人九州大学) 2006.05.18, 特許請求の範囲、段落[0048]-[0074] & WO 2006/038462 A1	1-12
A	WO 2005/085425 A1 (独立行政法人科学技術振興機構) 2005.09.15, 請求の範囲、段落[0014]-[0028] & US 2008/0313752 A1, Claims, 段落[0043]-[0075]	1-12
P, X	MATSUO K. et al., Significance of dopamine D ₁ receptor signaling for steroidogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells, Scientific Reports, 2017.11.09, Vol.7, Article number 15120, ISSN 2045-2322, 全文参照	1-12