(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
2015 年 6 月 25 日(25.06.2015)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2015/093402 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 5/0775 (2010.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2014/082974

(22) 国際出願日: 2014 年 12 月 12 日(12.12.2014)

(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 2013-263058 2013 年 12 月 19 日(19.12.2013) JP

(71) 出願人: ピアス株式会社(PIAS CORPORATION) [JP/JP]; 〒5310072 大阪府大阪市北区豊崎３丁目１９番３号 Osaka (JP). 国立大学法人大阪大学(OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 古元 義(FURUMOTO, Tadashi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 仲尾次 浩一(NAKAOJI, Koichi); 〒5310072 大阪府大阪市北区豊崎３丁目１９番３号 ピアス株式会社内 Osaka (JP). 濱田 和彦(HAMADA, Kazuhiko); 〒5310072 大阪府大阪市北区豊崎３丁目１９番３号 ピアス株式会社内 Osaka (JP). 豊島 美咲(TOYOSHIMA, Misaki); 〒5310072 大阪府大阪市北区豊崎３丁目１９番３号 ピアス株式会社内 Osaka (JP). 藤田 浩祐(FUJITA, Kosuke); 〒5310072 大阪府大阪市北区豊崎３丁目１９番３号 ピアス株式会社内 Osaka (JP). 前田 明人(MAEDA, Akito); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 金田 安史(KANEDA, Yasufumi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 玉井 克人(TAMAI, Katsuto); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘１番１号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 藤本 昇(FUJIMOTO, Noboru); 〒5420081 大阪府大阪市中央区南船場１丁目１５番１４号 堺筋稲畑ビル２階 Osaka (JP).

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

WO 2015/093402 A1

(54) **Title**: MYELOID STEM CELL ATTRACTANT AND MYELOID STEM CELL-ATTRACTING METHOD

(54) 発明の名称 : 骨髄幹細胞の誘引剤及び骨髄幹細胞の誘引方法

(57) **Abstract**: The present invention addresses the problem of providing a myeloid stem cell attractant with excellent myeloid stem cell-attracting ability, and a myeloid stem cell-attracting method. Provided are: a myeloid stem cell attractant comprising at least one of volkensii flavone, morelloflavone, kaempferitrin, and quercetin-3,7-dirhamnoside; and a myeloid stem cell-attracting method for attracting myeloid stem cells using said attractant.

(57) 要約: 骨髄幹細胞の誘引性能に優れた骨髄幹細胞の誘引剤、及び、骨髄幹細胞の誘引方法を提供することを課題とする。ボルケンシフラボン、モレロフラボン、ケンフェリトリン、及び、ケルセチン－３，７－ジラムノシドのうちの少なくとも１種を含む骨髄幹細胞の誘引剤、及び、該誘引剤により骨髄幹細胞を誘引する骨髄幹細胞の誘引方法を提供する。

明　細　書

発明の名称 ： 骨髄幹細胞の誘引剤及び骨髄幹細胞の誘引方法

関連出願の相互参照

[0001] 本願は、日本国特願２０１３－２６３０５８号の優先権を主張し、該出願が引用によって本願明細書の記載に組み込まれる。

技術分野

[0002] 本発明は、骨髄幹細胞の誘引剤及び骨髄幹細胞の誘引方法に関する。

背景技術

[0003] 骨髄幹細胞は、骨髄において生じた未だ分化していない細胞であり、様々な体内組織の細胞へ分化し得るものとして知られている。また、分化を誘導する分化誘導剤の影響を受けて、機能が失われた組織においてその組織細胞に分化することにより組織の機能を回復させ得るものとして注目されている。

[0004] 具体的には、骨髄幹細胞は、例えば、炎症のある組織又は損傷を受けた組織へ血流にのって骨髄から移動した後に、分化誘導剤の影響を受けてその組織細胞へ分化し得るものとして注目されている。

[0005] ところで、従来、骨髄幹細胞を各種の細胞に分化させ得る分化誘導剤としては、様々なものが知られており、例えば、骨髄幹細胞を心臓の筋肉細胞に分化させ得る線維芽細胞増殖因子（Fibroblast Growth Factor　ＦＧＦ）や血小板由来成長因子（Platelet-Derived Growth Factor　ＰＤＧＦ）などが知られている（特許文献１）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第２００５／０６３９６７号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] この種の分化誘導剤は、骨髄幹細胞を所定の組織細胞へと分化させる性能

を有するものの、骨髄幹細胞を誘引する性能、具体的には例えば、血流にのって体内を循環している骨髄幹細胞を所定の体内組織へ誘引する性能が、必ずしも十分なものではないという問題がある。

[0008] 本発明は、上記の問題点等に鑑み、骨髄幹細胞の誘引性能に優れた骨髄幹細胞の誘引剤を提供することを課題とする。また、骨髄幹細胞の誘引性能に優れた骨髄幹細胞の誘引方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明に係る骨髄幹細胞の誘引剤は、ボルケンシフラボン、モレロフラボン、ケンフェリトリン、及び、ケルセチン－３，７－ジラムノシドのうちの少なくとも１種を含む。

[0010] 本発明に係る骨髄幹細胞の誘引方法は、前記誘引剤により骨髄幹細胞を誘引するものである。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]生体外における細胞誘引試験の様子を模式的に示した図。

[図2]生体外における細胞誘引試験の結果を示す図。

[図3]生体外における細胞誘引試験の結果を示す図。

[図4]生体外における細胞誘引試験の結果を示す図。

発明を実施するための形態

[0012] 以下に、本発明に係る骨髄幹細胞の誘引剤の実施形態について説明する。

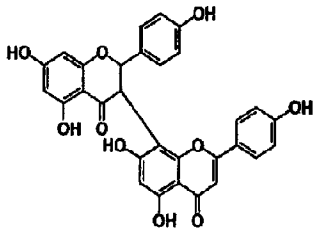
[0013] 本実施形態の骨髄幹細胞の誘引剤は、ボルケンシフラボン、モレロフラボン、ケンフェリトリン、及び、ケルセチン－３，７－ジラムノシドのうちの少なくとも１種を含むものである。

本実施形態の骨髄幹細胞の誘引剤及び骨髄幹細胞の誘引方法は、骨髄幹細胞の誘引性能に優れるという効果を奏する。

[0014] 前記ボルケンシフラボン（タルボタフラボン）［Volkensiflavone（Talbotaflavone）］は、下記式（１）の分子構造を有する化合物である。

[0015]

[化1]



・・・ 式（1）

[0016] 前記骨髄幹細胞の誘引剤に含まれるボルケンシフラボンの濃度は、特に限定されず、該濃度としては、例えば、０．００１～１００重量％が挙げられる。

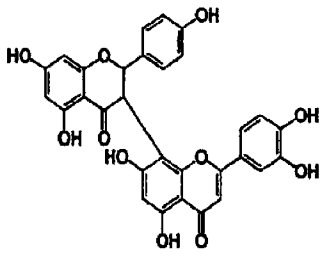
[0017] 前記骨髄幹細胞の誘引剤は、ボルケンシフラボン以外に、ｐＨ緩衝剤、水などの溶媒、界面活性剤、防腐剤、油類、多価アルコール類、水溶性高分子化合物などを含み得る。

[0018] 前記ボルケンシフラボンを含む骨髄幹細胞の誘引剤は、例えば、市販されているボルケンシフラボンを適当な溶媒に溶解させることにより製造することができる。

[0019] また、前記ボルケンシフラボンを含む骨髄幹細胞の誘引剤は、例えば、Garcinia vilersianaなどの植物におけるボルケンシフラボンを含む部分を抽出処理することにより製造することができる。

[0020] 前記モレロフラボン「Morelloflavone」は、下記式（２）の分子構造を有する化合物である。

[0021] [化2]



・・・ 式（2）

[0022] 前記骨髄幹細胞の誘引剤に含まれるモレロフラボンの濃度は、特に限定さ

れず、該濃度としては、例えば、０．００１～１００重量％が挙げられる。

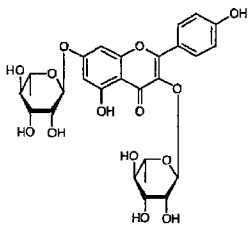
[0023] 前記骨髄幹細胞の誘引剤は、モレロフラボン以外に、ｐＨ緩衝剤、水などの溶媒、界面活性剤、防腐剤、油類、多価アルコール類、水溶性高分子化合物などを含み得る。

[0024] 前記モレロフラボンを含む骨髄幹細胞の誘引剤は、例えば、市販されているモレロフラボンを適当な溶媒に溶解させることにより製造することができる。

[0025] また、前記モレロフラボンを含む骨髄幹細胞の誘引剤は、例えば、Garcinia vilersianaなどを抽出処理することにより製造することができる。

[0026] 前記ケンフェリトリン［Kaempferitrin］（又は、ケンフェロール－３，７－ジラムノシドともいう）は、下記式（３）の分子構造を有する化合物である。

[0027] [化3]



・・・ 式（3）

[0028] 前記骨髄幹細胞の誘引剤に含まれるケンフェリトリンの濃度は、特に限定されず、該濃度としては、例えば、０．００１～１００重量％が挙げられる。

[0029] 前記骨髄幹細胞の誘引剤は、ケンフェリトリン以外に、ｐＨ緩衝剤、水などの溶媒、界面活性剤、防腐剤、油類、多価アルコール類、水溶性高分子化合物などを含み得る。

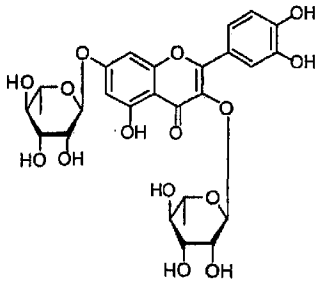
[0030] 前記ケンフェリトリンを含む骨髄幹細胞の誘引剤は、例えば、市販されているケンフェリトリンを適当な溶媒に溶解させることにより製造することができる。

[0031] また、前記ケンフェリトリンを含む骨髄幹細胞の誘引剤は、例えば、ゲン

ノショウコ（Geranium thunbergii）、セイロンニッケイ（Cinnamomum osmophloeum）、キャッツクロー（Uncaria guianensis）、フユボダイジュ（Tilia cordata）などの植物におけるケンフェリトリンを含む部分を抽出処理することにより製造することができる。

[0032] 前記ケルセチン－３，７－ジラムノシド［Quercetin-3,7,-di-O-α-L-rhamnoside］は、下記式（４）の分子構造を有する化合物である。

[0033] [化4]



・・・ 式（4）

[0034] 前記骨髄幹細胞の誘引剤に含まれるケルセチン－３，７－ジラムノシドの濃度は、特に限定されず、該濃度としては、例えば、０．００１～１００重量％が挙げられる。

[0035] 前記骨髄幹細胞の誘引剤は、ケルセチン－３，７－ジラムノシド以外に、ｐＨ緩衝剤、水などの溶媒、界面活性剤、防腐剤、油類、多価アルコール類、水溶性高分子化合物などを含み得る。

[0036] 前記ケルセチン－３，７－ジラムノシドを含む骨髄幹細胞の誘引剤は、例えば、市販されているケルセチン－３，７－ジラムノシドを適当な溶媒に溶解させることにより製造することができる。

[0037] また、前記ケルセチン－３，７－ジラムノシドを含む骨髄幹細胞の誘引剤は、例えば、ハマカヅラ（Bauhinia forficata）、エジプトイチジク（Ficus sycomorus）、Siparuna guianensis、フユボダイジュ（Tilia cordata）などの植物におけるケルセチン－３，７－ジラムノシドを含む部分を抽出処理することにより製造することができる。

[0038] なお、前記骨髄幹細胞の誘引剤は、ボルケンシフラボン、モレロフラボン

、ケンフェリトリン、及び、ケルセチン－３，７－ジラムノシドのうちのいずれか１つを含んでいてもよく、いずれか２つ又は３つを含んでいてもよい。前記骨髄幹細胞の誘引剤は、ボルケンシフラボン、モレロフラボン、ケンフェリトリン、及び、ケルセチン－３，７－ジラムノシドのいずれも含み得る。

[0039] 続いて、本発明の骨髄幹細胞の誘引方法の実施形態について説明する。本実施形態の骨髄幹細胞の誘引方法は、前記骨髄幹細胞の誘引剤により骨髄幹細胞を誘引するものである。

[0040] 骨髄幹細胞は、骨髄組織に含まれており、さらに骨髄組織内で分化したり又は血流にのって骨髄組織から他の体内組織へ移動したりし得る。

前記骨髄幹細胞としては、軟骨細胞、脂肪細胞、筋肉細胞などの中胚葉性組織の細胞へ分化し得る骨髄間葉系幹細胞、赤血球や白血球などの血液細胞へ分化し得る造血幹細胞などが挙げられる。

前記骨髄幹細胞のなかでも骨髄間葉系幹細胞は、中胚葉性組織の細胞に分化するだけでなく、神経などの外胚葉性組織、肝臓などの内胚葉性組織の細胞へも分化し得る。本実施形態の誘引方法において誘引される骨髄幹細胞としては、誘引された後に、より多様な細胞に分化し得るという点で、骨髄間葉系幹細胞が好ましい。

[0041] 前記骨髄幹細胞の誘引方法においては、例えば、生体外において又は生体において、前記骨髄幹細胞の誘引剤により骨髄幹細胞を誘引することができる。

[0042] 具体的には、生体外での骨髄幹細胞の誘引方法においては、例えば、厚み方向に貫通する微細孔を有するメンブレン（膜）を備えた装置を用い、メンブレンの一方側に骨髄幹細胞を配し、他方側に前記骨髄幹細胞の誘引剤を配し、所定時間をおいて骨髄幹細胞をメンブレンの他方側へ誘引する方法などを実施することができる。

また、生体外での骨髄幹細胞の誘引方法においては、例えば、スライドグラス上に播種した骨髄幹細胞の一部を掻き取り、掻き取った部分に骨髄幹細

胞の誘引剤を含む培地を塗布して骨髄幹細胞の培養条件下におくことにより、掻き取った部分へ骨髄幹細胞を誘引する方法などを実施することができる。

[0043] このような生体外での骨髄幹細胞の誘引方法は、比較的簡便に実施できることから、例えば、後述する生体での骨髄幹細胞の誘引方法における誘引剤の最適濃度を決定する目的で予備実験的に実施することができる。

[0044] なお、上記のような骨髄幹細胞の誘引方法における骨髄幹細胞の誘引の程度は、骨髄幹細胞を染色し、染色度を測定することにより評価できる。また、誘引された骨髄幹細胞を目視にて確認することにより評価できる。

[0045] 一方、生体での骨髄幹細胞の誘引方法においては、例えば、前記骨髄幹細胞の誘引剤を含む水性ゲルを通常のマウスの皮下に埋め込み、マウスの骨髄幹細胞をこのマウスの静脈に注入し、所定期間マウスを飼育することにより、骨髄幹細胞を水性ゲルに誘引する方法などを実施することができる。

また、生体での骨髄幹細胞の誘引方法においては、例えば、マウスの骨髄幹細胞を、創傷モデルマウスの骨髄に移植するとともに、該マウスの創傷部に前記骨髄幹細胞の誘引剤を塗布することにより、創傷部に骨髄幹細胞を誘引する方法などを実施することができる。

[0046] なお、上記のような骨髄幹細胞の誘引方法における骨髄幹細胞の誘引の程度は、骨髄幹細胞として、緑色蛍光タンパク質（Green Fluorescent Protein，以下ＧＦＰともいう）を発現させたマウスの骨髄幹細胞を用いて、誘引された骨髄幹細胞における蛍光の強度を測定することにより評価できる。

[0047] さらに、生体での骨髄幹細胞の誘引方法においては、例えば、所定の体内組織に骨髄幹細胞の誘引剤を含有させる処置を施し、その体内組織に骨髄幹細胞を誘引する方法などを実施することができる。

具体的には、誘引剤を皮膚に塗布することにより、骨髄幹細胞を表皮組織に誘引する方法などを実施することができる。より具体的には、例えば、皮膚の表皮組織（角質層など）に前記骨髄幹細胞の誘引剤を塗布などにより含有させて、血液中に存在する骨髄間葉系幹細胞を表皮組織に誘引する方法な

どを実施することができる。

なお、生体での誘引方法において骨髄幹細胞が誘引されて来る体内組織としては、表皮組織の他に、筋肉組織、軟骨組織、肝臓組織などの各種組織が挙げられる。

[0048] 生体での骨髄幹細胞の誘引方法は、例えば、骨髄幹細胞を各種の組織細胞へ分化させる前に、骨髄幹細胞をその組織へ集積させる目的で実施することができる。

[0049] 前記骨髄幹細胞の誘引方法は、ヒトの生体又はヒト以外の動物の生体において実施することができる。好ましくは、前記骨髄幹細胞の誘引方法は、ヒトの生体において、具体的には例えば美容上の目的で、非治療的に実施する。

[0050] 前記骨髄幹細胞の誘引方法においては、ボルケンシフラボン、モレロフラボン、ケンフェリトリン、及び、ケルセチン－３，７－ジラムノシドのうちの少なくとも１種が適当な濃度に希釈された誘引剤を用いることができる。希釈するための液としては、特に限定されるものではなく、例えば、水、生理食塩水、骨髄幹細胞の培養液などを用いることができる。

例えば、ボルケンシフラボンを含む骨髄幹細胞の誘引剤は、好ましくは、１０～１，０００μｇ／ｍＬのボルケンシフラボン濃度、より好ましくは、１００～５００μｇ／ｍＬのボルケンシフラボン濃度にて使用される。

また、例えば、モレロフラボンを含む骨髄幹細胞の誘引剤は、好ましくは、１０～１，０００μｇ／ｍＬのモレロフラボン濃度、より好ましくは、１００～５００μｇ／ｍＬのモレロフラボン濃度にて使用される。

また、例えば、ケンフェリトリンを含む骨髄幹細胞の誘引剤は、好ましくは、１０～１，０００μｇ／ｍＬのケンフェリトリン濃度、より好ましくは、１００～４００μｇ／ｍＬのケンフェリトリン濃度にて使用される。

また、例えば、ケルセチン－３，７－ジラムノシドを含む骨髄幹細胞の誘引剤は、好ましくは、１０～１，０００μｇ／ｍＬのケルセチン－３，７－ジラムノシド濃度、より好ましくは、１００～４００μｇ／ｍＬのケルセチ

ン－３，７－ジラムノシド濃度にて使用される。

[0051] 本実施形態の骨髄幹細胞の誘引剤及び骨髄幹細胞の誘引方法は、上記例示の通りであるが、本発明は、上記例示の骨髄幹細胞の誘引剤及び骨髄幹細胞の誘引方法に限定されるものではない。また、本発明の作用効果は、上述した作用効果に限定されない。また、本発明の骨髄幹細胞の誘引剤及び骨髄幹細胞の誘引方法は、本発明の要旨を逸脱しない範囲で種々の変更が可能である。

実施例

[0052] 次に、実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0053]（実施例１）

ボルケンシフラボン（Garcinia vilersianaから単離精製したもの）を５００μｇ／ｍＬ濃度となるように溶媒（ダルベッコ変法イーグル培地　ＤＭＥＭ）に溶解させ、ボルケンシフラボンを含む誘引剤を製造した。

[0054]（実施例２）

ボルケンシフラボンの濃度が２００μｇ／ｍＬ濃度となるようにした点以外は、実施例１と同様にして誘引剤を製造した。

[0055]（実施例３）

ボルケンシフラボンの濃度が１００μｇ／ｍＬ濃度となるようにした点以外は、実施例１と同様にして誘引剤を製造した。

[0056]（実施例４）

モレロフラボン（Garcinia vilersianaから単離精製したもの）を５００μｇ／ｍＬ濃度となるように溶媒（ＤＭＥＭ）に溶解させ、モレロフラボンを含む誘引剤を製造した。

[0057]（実施例５）

モレロフラボンの濃度が２００μｇ／ｍＬ濃度となるようにした点以外は、実施例４と同様にして誘引剤を製造した。

[0058]（実施例６）

モレロフラボンの濃度が１００μｇ／ｍＬ濃度となるようにした点以外は、実施例４と同様にして誘引剤を製造した。

[0059]（実施例７）

ケンフェリトリン（フユボダイジュ（Tilia cordata）から単離精製したもの）を４００μｇ／ｍＬ濃度となるように溶媒（ＤＭＥＭ）に溶解させ、ケンフェリトリンを含む誘引剤を製造した。

[0060]（実施例８）

ケンフェリトリンの濃度が２００μｇ／ｍＬ濃度となるようにした点以外は、実施例７と同様にして誘引剤を製造した。

[0061]（実施例９）

ケンフェリトリンの濃度が１００μｇ／ｍＬ濃度となるようにした点以外は、実施例７と同様にして誘引剤を製造した。

[0062]（実施例１０）

ケルセチン－３，７－ジラムノシド（フユボダイジュ（Tilia cordata）から単離精製したもの）を４００μｇ／ｍＬ濃度となるように溶媒（ＤＭＥＭ）に溶解させ、ケルセチン－３，７－ジラムノシドを含む誘引剤を製造した。

[0063]（実施例１１）

ケルセチン－３，７－ジラムノシドの濃度が２００μｇ／ｍＬ濃度となるようにした点以外は、実施例７と同様にして誘引剤を製造した。

[0064]（実施例１２）

ケルセチン－３，７－ジラムノシドの濃度が１００μｇ／ｍＬ濃度となるようにした点以外は、実施例７と同様にして誘引剤を製造した。

[0065] 製造した各実施例の骨髄幹細胞の誘引剤を使用し、生体外における細胞誘引試験による評価を行った。図１は、該評価方法の様子を模式的に示したものである。以下、図１を参照しながら評価方法の詳細を説明する。

[0066]＜生体外における細胞誘引試験＞

各実施例の骨髄幹細胞の誘引剤を試験用サンプルとして用意した。

一方、陰性対照サンプルとして、ＤＭＥＭ「ＦＢＳ（－）、Ｐ／Ｓ（－）」を用意した。

また、陽性対照サンプルとして、２０ｎｇ／ｍＬ　ＰＤＧＦ－ＢＢ（血小板由来成長因子　ＰＥＰＲＯ　ＴＥＣＨ社製）濃度のＤＭＥＭ溶液を用意した。

また、マウス骨髄間葉系幹細胞（以下、ｍＭＳＣともいう）をコンフルエントまで培養して回収し、１０％　ＦＢＳ／ＤＭＥＭ「Ｐ／Ｓ（－）」で１×１０^{7}ｃｅｌｌｓ／ｍｌとなるように懸濁し、細胞懸濁液を用意した。

なお、ＦＢＳは、１０％ウシ胎児血清を示し、Ｐ／Ｓは、１００ユニットペニシリン及び０．１ｍｇ／ｍＬストレプトマイシンを示している。また（－）の記号は、配合していないことを示している。

次に、複数の独立したウェルを備え、図１（ａ）に示すようにメンブレンＭによりウェルが上部ウェルＰと下部ウェルＱとに仕切られているボイデンチャンバーＢ（Ｎｅｕｒｏ　Ｐｒｏｂｅ社製）を用意した。各試験用サンプルのいずれか１種と陰性対照サンプル及び陽性対照サンプルとが同一のボイデンチャンバーＢにおいて試験できるように設定し、該チャンバーＢの各下部ウェルに各サンプルをそれぞれ２８μＬずつアプライした。なお、ボイデンチャンバーＢのメンブレンＭとしては、商品名「Ｐｏｌｙｃａｒｂｏｎａｔｅ　Ｍｅｍｂｒａｎｅｓ」（Ｎｅｕｒｏ　Ｐｒｏｂｅ社製　細孔サイズ８μｍ）を用いた。

続いて、上部ウェルＰに上記細胞懸濁液を５０μＬずつ播種し、３７℃、５％CO_2の条件下で４時間培養した（図１（ｂ）を参照）。

４時間培養後、図１（ｃ）に示すように、移動していないｍＭＳＣを付属のフィルターワイパーＲではぎ取り、メンブレンＭの下側へ移動したｍＭＳＣのみをディフ・クイック染色（Ｓｙｓｍｅｘ社製キットを使用）により染色した。

そして、染色像をデジタル化してコンピュータに取り込み、画像を黒と白に２値化すべく青色に染色された部分が白色になるように変換したうえで、

各ウェル範囲内の輝度の平均値を画像編集ソフトウェア（商品名「フォトショップ」）の機能を用いて測定した。陰性対照サンプルおよび陽性対照サンプルにおける輝度を各試験用サンプルにおける輝度と比較することにより、骨髄幹細胞の誘引剤のｍＭＳＣ誘引活性を評価した。

なお、各試験サンプル、陽性対照サンプル、陰性対照サンプルについては、２回の測定結果を平均することにより、それぞれ測定値を算出した。

[0067] 実施例１～６の誘引剤における評価結果を輝度のグラフによって図２に示す。また、実施例７～９の誘引剤における評価結果を同様に図３に示す。また、実施例１０～１２の誘引剤における評価結果を同様に図４に示す。

図２～図４から把握できるように、実施例の骨髄幹細胞の誘引剤は、骨髄幹細胞を十分に誘引することができる。

産業上の利用可能性

[0068] 本発明の骨髄幹細胞の誘引剤及び骨髄幹細胞の誘引方法は、例えば、所定の体内組織において骨髄幹細胞を分化させる前に、骨髄で生じた骨髄幹細胞を所定の体内組織に誘引するために使用される。即ち、本発明の骨髄幹細胞の誘引剤及び骨髄幹細胞の誘引方法は、例えば、所定の体内組織に誘引剤を含ませる処置をすることにより、血流にのって体内を循環している骨髄幹細胞をその体内組織に誘引して集積させる目的で好適に使用される。

符号の説明

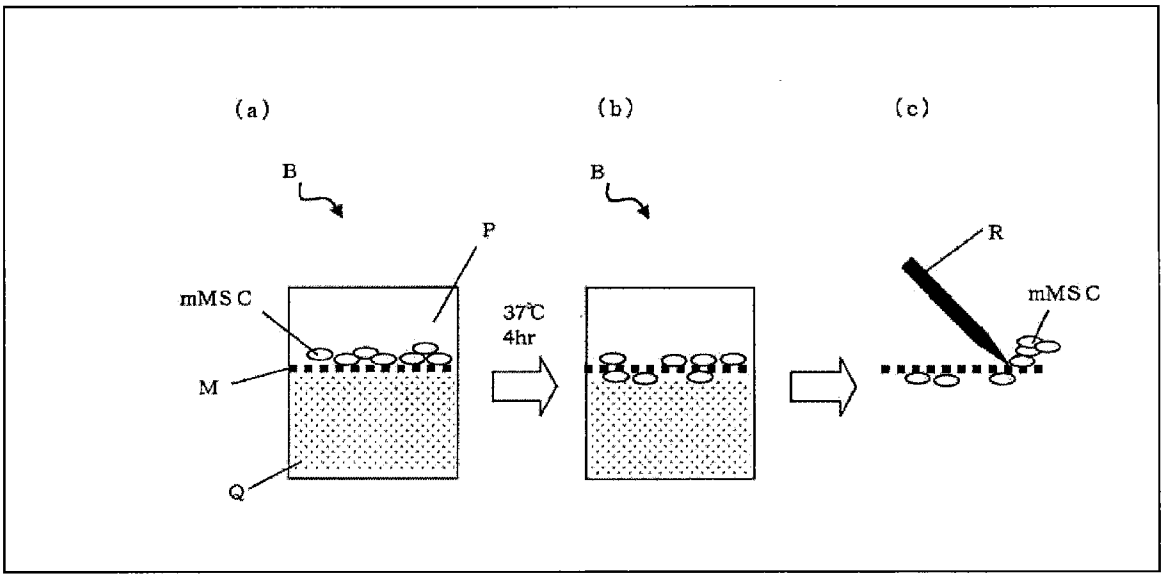
[0069] Ｂ：ボイデンチャンバー、 Ｐ：上部ウェル、 Ｑ：下部ウェル、 Ｍ：メンブレン、 Ｒ：フィルターワイパー。

請求の範囲

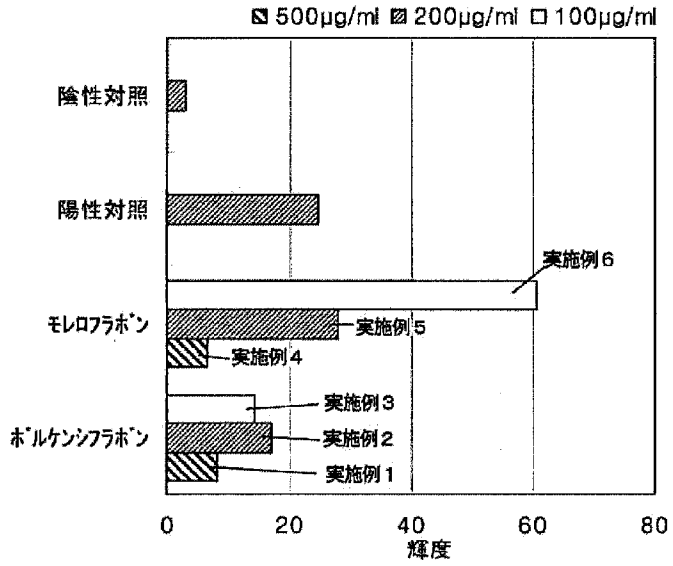
[請求項1] ボルケンシフラボン、モレロフラボン、ケンフェリトリン、及び、ケルセチン－３，７－ジラムノシドのうちの少なくとも１種を含む、骨髄幹細胞の誘引剤。

[請求項2] 請求項１記載の骨髄幹細胞の誘引剤により骨髄幹細胞を誘引する、骨髄幹細胞の誘引方法。

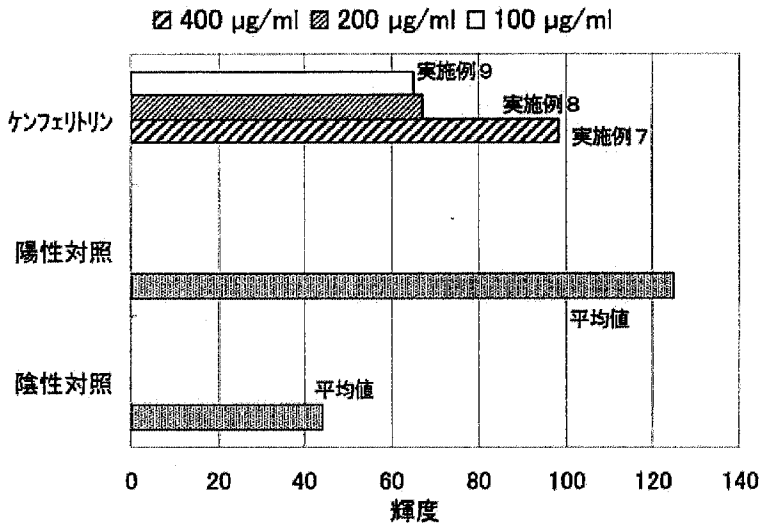
[図1]


(a)
(b)
(c)
B
B
P
mMSC
M
Q
37℃
4hr
R
mMSC

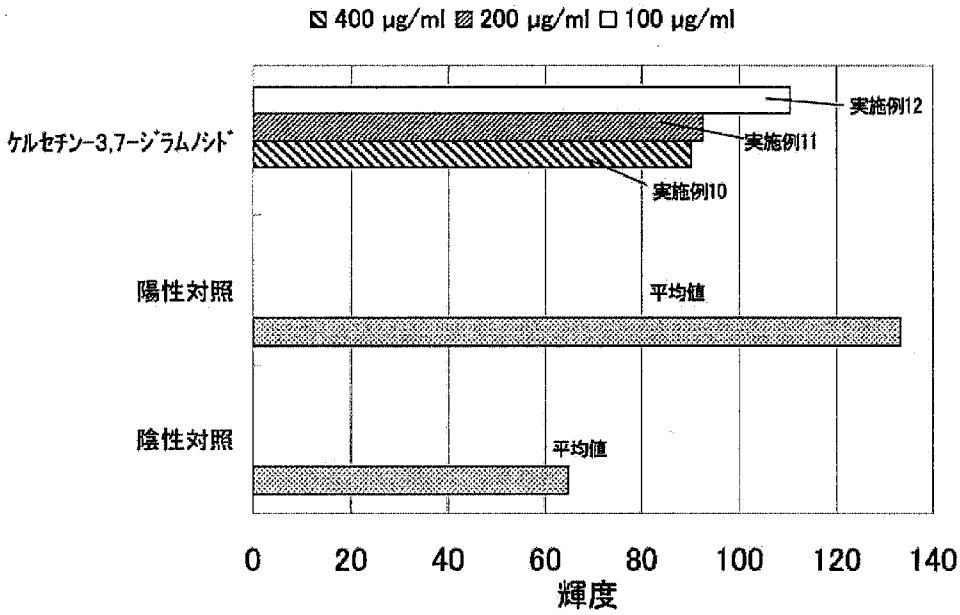
[図2]


500μg/ml
200μg/ml
100μg/ml
陰性対照
陽性対照
モレロフラボン
ボルケンシフラボン
実施例6
実施例5
実施例4
実施例3
実施例2
実施例1
0
20
40
60
80
輝度

[図3]


400 μg/ml 200 μg/ml 100 μg/ml
ケンフェリトリン
実施例9
実施例8
実施例7
陽性対照
平均値
陰性対照
平均値
0 20 40 60 80 100 120 140
輝度

[図4]


400 μg/ml 200 μg/ml 100 μg/ml
ケルセチン-3,7-ジラムノシド
実施例12
実施例11
実施例10
陽性対照
平均値
陰性対照
平均値
0 20 40 60 80 100 120 140
輝度

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/082974

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/0775(2010.01)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)
C12N5/0775

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	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS(STN),
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2011-251925 A (Pias Corp.), 15 December 2011 (15.12.2011), claims; paragraphs [0013], [0033], [0043], [0050], [0051] & US 2013/0071920 A1 & WO 2011/152100 A1 & CN 102917718 A & KR 10-2013-0112724 A	1,2
A	WO 2012/063514 A1 (Pias Corp.), 18 May 2012 (18.05.2012), (Family: none)	1,2

☐ 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
27 February 2015 (27.02.15)	10 March 2015 (10.03.15)

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

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１４／０８２９７４

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　C12N5/0775(2010.01)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.　C12N5/0775

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１５年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１５年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１５年

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

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

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2011-251925 A（ピアス株式会社）2011.12.15, 特許請求の範囲、第【００１３】、【００３３】、【００４３】、【００５０】、【００５１】段落 & US 2013/0071920 A1 & WO 2011/152100 A1 & CN 102917718 A & KR 10-2013-0112724 A	1,2
A	WO 2012/063514 A1（ピアス株式会社）2012.05.18, (ファミリーなし)	1,2

☐　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	国際調査報告の発送日
２７．０２．２０１５	１０．０３．２０１５

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｎ　３４３４
千葉　直紀
電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４８８