

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年5月18日(18.05.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/082294 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 1/00 (2006.01) C12N 5/074 (2010.01)
C12N 5/0735 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/083232
- (22) 国際出願日: 2016年11月9日(09.11.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-222842 2015年11月13日(13.11.2015) JP
- (71) 出願人: 協和発酵キリン株式会社 (KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 中島 義基 (NAKASHIMA, Yoshiki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘2丁目1番地 国立大学法人 大阪大学大学院工学研究科 生命先端工学専攻内 Osaka (JP). 大政 健史 (OMASA, Takeshi); 〒7708506 徳島県徳島市南常三島町2丁目1番地 国立大学法人 徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部内 Tokushima (JP). 塚原 正義 (TSUKAHARA, Masayoshi); 〒1008185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社内 Tokyo (JP). 柿谷 誠 (KAKITA, Makoto); 〒1008185 東京都千代田区大手町一

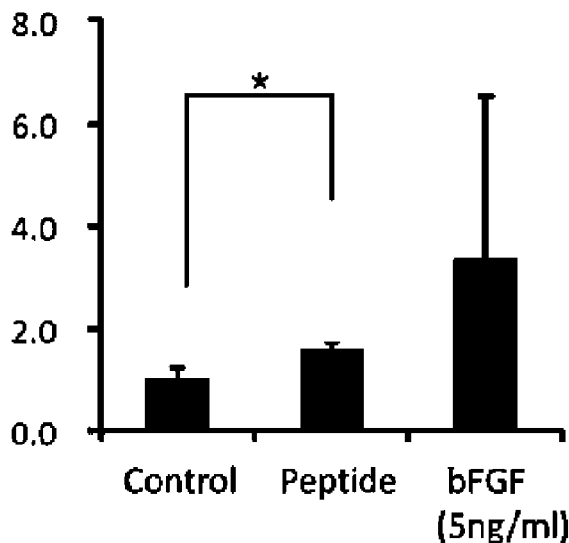
丁目6番1号 協和発酵キリン株式会社内 Tokyo (JP).

- (74) 代理人: 大野 聖二, 外 (OHNO, Seiji 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, 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, JP, KE, KG, 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), ユーロアジア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ユーロッパ (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),

[続葉有]

(54) Title: STEM CELL CULTURE MEDIUM, PROLIFERATION PROMOTER, AND CULTURING METHOD, CELL COMPOSITION COMPRISING STEM CELLS, AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称: 幹細胞の培養用培地、増殖促進剤及び培養方法、並びに幹細胞を含む細胞組成物及びその製造方法



(57) Abstract: Provided, as substances that exhibit an excellent proliferation promoting effect on stem cells, are bFGF fragment peptides, FGF receptor-binding peptides, peptides comprising a bFGF heparin-binding region, bFGF-binding protein fragment peptides, or a low-molecular compound selected from cholinesterase inhibitors, phenothiazine derivatives, steroids, acetylcholine receptor agonists, and prostaglandin receptor agonists; and a stem cell culture medium containing the above.

(57) 要約: 幹細胞に対して優れた増殖促進活性を発揮する物質として、bFGF断片ペプチド、FGFレセプター結合ペプチド、bFGFヘパリン結合領域含有ペプチド、bFGF結合タンパク断片ペプチド、又は、コリンエステラーゼ阻害剤、フェノチアジン誘導体、ステロイド、アセチルコリンレセプターアゴニスト及びプロスタグランジンレセプターアゴニストから選ばれる低分子化合物、並びにこれらを含む幹細胞培養用の培地等を提供する。

WO 2017/082294 A1



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, —
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

幹細胞の培養用培地、増殖促進剤及び培養方法、並びに幹細胞を含む細胞組成物及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、幹細胞の培養用培地、増殖促進剤及び培養方法、並びに幹細胞を含む細胞組成物及びその製造方法に関する。より詳しくは、幹細胞に対して優れた増殖促進活性を発揮する物質を含む、幹細胞培養用の培地等に関する。

背景技術

[0002] 再生医療分野における課題の一つとして、目的の細胞をより効率的に増殖させることが求められている。幹細胞に対する有効な増殖因子の一つとして塩基性線維芽細胞増殖因子（以下bFGFと記載するが、f i b r o b l a s t g r o w t h f a c t o r 2とも称する）が広く用いられている（非特許文献1）。一方で、bFGFは非常に高価であるため、幹細胞を大量に培養する場合には、培地に添加するbFGFのコストが問題となっている。

先行技術文献

特許文献

- [0003] 特許文献1：特開2003-137899号公報
特許文献2：特開2005-154338号公報
特許文献3：特開2009-209064号公報
特許文献4：特開2015-128431号公報
特許文献5：国際公開第2007/032029号
特許文献6：特開昭62-259598号公報

非特許文献

- [0004] 非特許文献1：S t e m C e l l s , 2005, 23, 8, p. 1200-

1 2 1 1

非特許文献2: Proc. Natl. Acad. Sci., 1988, 85, 7, p. 2324-2328

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 上述のとおり、bFGFは非常に高価であるため、その代替物質の開発が行われているが（例えば、特許文献1～4）、幹細胞に対して十分な増殖促進機能を有する物質は得られていない。

[0006] そこで、本発明は、幹細胞に対して優れた増殖促進活性を発揮する物質を提供することを主な目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] [bFGFヘパリン結合領域含有ペプチド]

上記課題解決のため、本発明は、以下の[1]～[40]を提供する。

[1] bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドを含む、幹細胞培養用の培地。

[2] 前記bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドが、以下の(A)、(B)又は(C)のペプチドである、[1]の培地。

(A) 配列番号1, 3, 4, 6～10に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド。

(B) 配列番号1, 3, 4, 6～10に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A)又は(B)に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[3] 前記bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドが、配列番号1のペプチドである、[1]又は[2]の培地。

[4] 前記bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドが、C末端がアミド化された配列番号1のペプチドである、[1]～[3]のいずれかの培地。

[5] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[1

〕～〔４〕のいずれかの培地。

〔６〕 前記幹細胞が、ヒト由来である、〔１〕～〔５〕のいずれかの培地。

〔７〕 前記培地が無血清培地である、〔１〕～〔６〕のいずれかの培地。

〔８〕 b F G Fヘパリン結合領域含有ペプチドを含む、幹細胞の増殖促進剤。

〔９〕 前記b F G Fヘパリン結合領域含有ペプチドが、以下の（Ａ）、（Ｂ）又は（Ｃ）のペプチドである、〔８〕の増殖促進剤。

（Ａ）配列番号１，３，４，６～１０に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド。

（Ｂ）配列番号１，３，４，６～１０に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において１もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

（Ｃ）（Ａ）又は（Ｂ）に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

〔１０〕 前記b F G Fヘパリン結合領域含有ペプチドが、配列番号１のペプチドである、〔８〕又は〔９〕の増殖促進剤。

〔１１〕 前記b F G Fヘパリン結合領域含有ペプチドが、Ｃ末端がアミド化された配列番号１のペプチドである、〔８〕～〔１０〕のいずれかの増殖促進剤。

〔１２〕 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、〔８〕～〔１１〕のいずれかの増殖促進剤。

〔１３〕 前記幹細胞が、ヒト由来である、〔８〕～〔１２〕のいずれかの増殖促進剤。

〔１４〕 b F G Fヘパリン結合領域含有ペプチドを含む培地で幹細胞を培養する手順を含む、幹細胞の培養方法。

〔１５〕 前記b F G Fヘパリン結合領域含有ペプチドが、以下の（Ａ）、（Ｂ）又は（Ｃ）のペプチドである、〔１４〕の培養方法。

（Ａ）配列番号１，３，４，６～１０に示されるいずれか一つのアミノ酸配

列を含むペプチド。

(B) 配列番号 1, 3, 4, 6～10 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A) 又は (B) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[16] 前記 bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドが、配列番号 1 のペプチドである、[14] 又は [15] の培養方法。

[17] 前記 bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドが、C末端がアミド化された配列番号 1 のペプチドである、[14]～[16] のいずれかの培養方法。

[18] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[14]～[17] のいずれかの培養方法。

[19] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[14]～[18] のいずれかの培養方法。

[20] 前記培地が無血清培地である、[14]～[19] のいずれかの培養方法。

[21] bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドを含む培地で幹細胞を培養する工程を含む、幹細胞を含む細胞組成物の製造方法。

[22] 前記 bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドが、以下の (A)、(B) 又は (C) のペプチドである、[21] の製造方法。

(A) 配列番号 1, 3, 4, 6～10 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド。

(B) 配列番号 1, 3, 4, 6～10 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A) 又は (B) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[23] 前記 bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドが、配列番号 1 のペプチドである、[21] 又は [22] の製造方法。

〔24〕 前記bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドが、C末端がアミド化された配列番号1のペプチドである、〔21〕～〔23〕のいずれかの製造方法。

〔25〕 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、〔21〕～〔24〕のいずれかの製造方法。

〔26〕 前記幹細胞が、ヒト由来である、〔21〕～〔25〕のいずれかの製造方法。

〔27〕 前記培地が無血清培地である、〔21〕～〔26〕のいずれかの製造方法。

〔28〕 bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドを含む培地で幹細胞を培養する工程と、幹細胞の分化を誘導する工程、とを含む、分化細胞を含む細胞組成物の製造方法。

〔29〕 前記bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドが、以下の（A）、（B）又は（C）のペプチドである、〔28〕の製造方法。

（A）配列番号1, 3, 4, 6～10に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド。

（B）配列番号1, 3, 4, 6～10に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

（C）（A）又は（B）に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

〔30〕 前記bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドが、配列番号1のペプチドである、〔28〕又は〔29〕の製造方法。

〔31〕 前記bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドが、C末端がアミド化された配列番号1のペプチドである、〔28〕～〔30〕のいずれかの製造方法。

〔32〕 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、〔28〕～〔31〕のいずれかの製造方法。

〔33〕 前記幹細胞が、ヒト由来である、〔28〕～〔32〕のいずれか

の製造方法。

[34] 前記培地が無血清培地である、[28]～[33]のいずれかの製造方法。

[35] bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドと、幹細胞及び／又は幹細胞から誘導された分化細胞と、を含む細胞組成物。

[36] 前記bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドが、以下の(A)、(B)又は(C)のペプチドである、[35]の細胞組成物。

(A) 配列番号1, 3, 4, 6～10に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド。

(B) 配列番号1, 3, 4, 6～10に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A)又は(B)に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[37] 前記bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドが、配列番号1のペプチドである、[35]又は[36]の細胞組成物。

[38] 前記bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドが、C末端がアミド化された配列番号1のペプチドである、[35]～[37]のいずれかの細胞組成物。

[39] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[35]～[38]のいずれかの細胞組成物。

[40] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[35]～[39]のいずれかの細胞組成物。

[0008] [bFGF断片ペプチド]

また、本発明は、以下の[41]～[68]を提供する。

[41] bFGF断片ペプチドを含む、幹細胞培養用の培地。

[42] 前記bFGF断片ペプチドが、以下の(A)、(B)又は(C)のペプチドである、[41]の培地。

(A) 配列番号2, 5, 16に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含む

ペプチド。

(B) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A) 又は (B) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[43] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[41] 又は [42] の培地。

[44] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[41] ～ [43] のいずれかの培地。

[45] 前記培地が無血清培地である、[41] ～ [44] のいずれかの培地。

[46] bFGF 断片ペプチドを含む、幹細胞の増殖促進剤。

[47] 前記 bFGF 断片ペプチドが、以下の (A)、(B) 又は (C) のペプチドである、[46] の増殖促進剤。

(A) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド。

(B) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A) 又は (B) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[48] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[46] 又は [47] の増殖促進剤。

[49] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[46] ～ [48] のいずれかの増殖促進剤。

[50] bFGF 断片ペプチドを含む培地で幹細胞を培養する手順を含む、幹細胞の培養方法。

[51] 前記 bFGF 断片ペプチドが、以下の (A)、(B) 又は (C) のペプチドである、[50] の培養方法。

(A) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド。

(B) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A) 又は (B) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[52] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[50] 又は [51] の培養方法。

[53] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[50] ～ [52] のいずれかの培養方法。

[54] 前記培地が無血清培地である、[50] ～ [53] のいずれかの培養方法。

[55] bFGF 断片ペプチドを含む培地で幹細胞を培養する工程を含む、幹細胞を含む細胞組成物の製造方法。

[56] 前記 bFGF 断片ペプチドが、以下の (A)、(B) 又は (C) のペプチドである、[55] の製造方法。

(A) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド。

(B) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A) 又は (B) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[57] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[55] 又は [56] の製造方法。

[58] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[55] ～ [57] のいずれかの製造方法。

[59] 前記培地が無血清培地である、[55] ～ [58] のいずれかの製造方法。

[60] bFGF断片ペプチドを含む培地で幹細胞を培養する工程と、幹細胞の分化を誘導する工程、とを含む、分化細胞を含む細胞組成物の製造方法。

[61] 前記bFGF断片ペプチドが、以下の(A)、(B)又は(C)のペプチドである、[60]の製造方法。

(A) 配列番号2, 5, 16に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド。

(B) 配列番号2, 5, 16に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A)又は(B)に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[62] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[60]又は[61]の製造方法。

[63] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[60]～[62]のいずれかの製造方法。

[64] 前記培地が無血清培地である、[60]～[63]のいずれかの製造方法。

[65] bFGF断片ペプチドと、幹細胞及び／又は幹細胞から誘導された分化細胞と、を含む細胞組成物。

[66] bFGF断片ペプチドが、以下の(A)、(B)又は(C)のペプチドである、[65]の細胞組成物。

(A) 配列番号2, 5, 16に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド。

(B) 配列番号2, 5, 16に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A)又は(B)に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[67] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[

〔 6 5 〕 又は〔 6 6 〕 の細胞組成物。

〔 6 8 〕 前記幹細胞が、ヒト由来である、〔 6 5 〕 ～〔 6 7 〕 のいずれかの細胞組成物。

[0009] 〔線維芽細胞増殖因子（F G F）レセプター結合ペプチド〕

さらに、本発明は、以下の〔 6 9 〕 ～〔 9 6 〕 を提供する。

〔 6 9 〕 F G Fレセプター結合ペプチドを含む、幹細胞培養用の培地。

〔 7 0 〕 前記F G Fレセプター結合ペプチドが、以下の（A）、（B）又は（C）のペプチドである、〔 6 9 〕 の培地。

（A）配列番号 1 1 ～ 1 4 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド。

（B）配列番号 1 1 ～ 1 4 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

（C）（A）又は（B）に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

〔 7 1 〕 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、〔 6 9 〕 又は〔 7 0 〕 の培地。

〔 7 2 〕 前記幹細胞が、ヒト由来である、〔 6 9 〕 ～〔 7 1 〕 のいずれかの培地。

〔 7 3 〕 前記培地が無血清培地である、〔 6 9 〕 ～〔 7 2 〕 のいずれかの培地。

〔 7 4 〕 F G Fレセプター結合ペプチドを含む、幹細胞の増殖促進剤。

〔 7 5 〕 前記F G Fレセプター結合ペプチドが、以下の（A）、（B）又は（C）のペプチドである、〔 7 4 〕 の増殖促進剤。

（A）配列番号 1 1 ～ 1 4 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド。

（B）配列番号 1 1 ～ 1 4 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A) 又は (B) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[76] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[74] 又は [75] の増殖促進剤。

[77] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[74] ～ [76] のいずれかの増殖促進剤。

[78] FGFレセプター結合ペプチドを含む培地で幹細胞を培養する手順を含む、幹細胞の培養方法。

[79] 前記FGFレセプター結合ペプチドが、以下の(A)、(B)又は(C)のペプチドである、[78]の培養方法。

(A) 配列番号11～14に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド。

(B) 配列番号11～14に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A) 又は (B) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[80] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[78] 又は [79] の培養方法。

[81] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[78] ～ [80] のいずれかの培養方法。

[82] 前記培地が無血清培地である、[78] ～ [81] のいずれかの培養方法。

[83] FGFレセプター結合ペプチドを含む培地で幹細胞を培養する工程を含む、幹細胞を含む細胞組成物の製造方法。

[84] 前記FGFレセプター結合ペプチドが、以下の(A)、(B)又は(C)のペプチドである、[83]の製造方法。

(A) 配列番号11～14に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド。

(B) 配列番号11～14に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において

1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A) 又は (B) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[85] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[83] 又は [84] の製造方法。

[86] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[83] ～ [85] のいずれかの製造方法。

[87] 前記培地が無血清培地である、[83] ～ [86] のいずれかの製造方法。

[88] bFGFレセプター結合ペプチドを含む培地で幹細胞を培養する工程と、幹細胞の分化を誘導する工程、とを含む、分化細胞を含む細胞組成物の製造方法。

[89] 前記FGFレセプター結合ペプチドが、以下の(A)、(B)又は(C)のペプチドである、[88] の製造方法。

(A) 配列番号11～14に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド。

(B) 配列番号11～14に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A) 又は (B) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[90] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[88] 又は [89] のいずれかの製造方法。

[91] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[88] ～ [90] のいずれかの製造方法。

[92] 前記培地が無血清培地である、[88] ～ [91] のいずれかの製造方法。

[93] FGFレセプター結合ペプチドと、幹細胞及び／又は幹細胞から誘導された分化細胞と、を含む細胞組成物。

[9 4] 前記 F G F レセプター結合ペプチドが、以下の (A)、(B) 又は (C) のペプチドである、[9 3] の細胞組成物。

(A) 配列番号 1 1 ~ 1 4 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド。

(B) 配列番号 1 1 ~ 1 4 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A) 又は (B) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[9 5] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[9 3] 又は [9 4] の細胞組成物。

[9 6] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[9 3] ~ [9 5] のいずれかの細胞組成物。

[0010] [b F G F 結合タンパク断片ペプチド]

本発明は、以下の [9 7] ~ [1 2 4] をも提供する。

[9 7] b F G F 結合タンパク断片ペプチドを含む、幹細胞培養用の培地。

[9 8] 前記 b F G F 結合タンパク断片ペプチドが、以下の (A)、(B) 又は (C) のペプチドである、[9 7] の培地。

(A) 配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列を含むペプチド。

(B) 配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A) 又は (B) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[9 9] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[9 7] 又は [9 8] の培地。

[1 0 0] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[9 7] ~ [9 9] のいずれかの培地。

[1 0 1] 前記培地が無血清培地である、[9 7] ~ [1 0 0] のいずれ

かの培地。

[102] bFGF結合タンパク断片ペプチドを含む、幹細胞の増殖促進剤。

[103] 前記bFGF結合タンパク断片ペプチドが、以下の(A)、(B)又は(C)のペプチドである、[102]の増殖促進剤。

(A) 配列番号15に示されるアミノ酸配列を含むペプチド。

(B) 配列番号15に示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A)又は(B)に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[104] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[102]又は[103]の増殖促進剤。

[105] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[102]～[104]のいずれかの増殖促進剤。

[106] bFGF結合タンパク断片ペプチドを含む培地で幹細胞を培養する手順を含む、幹細胞の培養方法。

[107] 前記bFGF結合タンパク断片ペプチドが、以下の(A)、(B)又は(C)のペプチドである、[106]の培養方法。

(A) 配列番号15に示されるアミノ酸配列を含むペプチド。

(B) 配列番号15に示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A)又は(B)に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[108] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[106]又は[107]の培養方法。

[109] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[106]～[108]のいずれかの培養方法。

[110] 前記培地が無血清培地である、[106]～[109]のいずれ

れかの培養方法。

[111] bFGF結合タンパク断片ペプチドを含む培地で幹細胞を培養する工程を含む、幹細胞を含む細胞組成物の製造方法。

[112] 前記bFGF結合タンパク断片ペプチドが、以下の(A)、(B)又は(C)のペプチドである、[111]の製造方法。

(A) 配列番号15に示されるアミノ酸配列を含むペプチド。

(B) 配列番号15に示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A)又は(B)に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[113] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[111]又は[112]の製造方法。

[114] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[111]～[113]のいずれかの製造方法。

[115] 前記培地が無血清培地である、[111]～[114]のいずれかの製造方法。

[116] bFGF結合タンパク断片ペプチドを含む培地で幹細胞を培養する工程と、幹細胞の分化を誘導する工程、とを含む、分化細胞を含む細胞組成物の製造方法。

[117] 前記bFGF結合タンパク断片ペプチドが、以下の(A)、(B)又は(C)のペプチドである、[116]の製造方法。

(A) 配列番号15に示されるアミノ酸配列を含むペプチド。

(B) 配列番号15に示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A)又は(B)に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[118] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[116]又は[117]の製造方法。

[119] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[116]～[118]のいずれかの製造方法。

[120] 前記培地が無血清培地である、[116]～[119]のいずれかの製造方法。

[121] bFGF結合タンパク断片ペプチドと、幹細胞及び／又は幹細胞から誘導された分化細胞と、を含む細胞組成物。

[122] 前記bFGF結合タンパク断片ペプチドが、以下の(A)、(B)又は(C)のペプチドである、[121]の細胞組成物。

(A) 配列番号15に示されるアミノ酸配列を含むペプチド。

(B) 配列番号15に示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A)又は(B)に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[123] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[121]又は[122]の細胞組成物。

[124] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[121]～[123]のいずれかの細胞組成物。

[0011] [低分子化合物]

併せて、本発明は、以下の[125]～[152]を提供する。

[125] コリンエステラーゼ阻害剤、フェノチアジン誘導体、ステロイド、アセチルコリンレセプターアゴニスト、及びプロスタグランジンレセプターアゴニストからなる群より選ばれる1以上の低分子化合物を含む、幹細胞培養用の培地。

[126] 前記低分子化合物が、epiboxidine hydrochlorideである、[125]の培地。

[127] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[125]又は[126]の培地。

[128] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[125]～[127]のい

ずれかの培地。

[129] 前記培地が無血清培地である、[125]～[128]のいずれかの培地。

[130] コリンエステラーゼ阻害剤、フェノチアジン誘導体、ステロイド、アセチルコリンレセプターアゴニスト、及びプロスタグランジンレセプターアゴニストからなる群より選ばれる1以上の低分子化合物を含む、幹細胞の増殖促進剤。

[131] 前記低分子化合物が、*epiboxidine hydrochloride*である、[130]の増殖促進剤。

[132] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[130]又は[131]の増殖促進剤。

[133] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[130]～[132]のいずれかの増殖促進剤。

[134] コリンエステラーゼ阻害剤、フェノチアジン誘導体、ステロイド、アセチルコリンレセプターアゴニスト、及びプロスタグランジンレセプターアゴニストからなる群より選ばれる1以上の低分子化合物を含む培地で幹細胞を培養する手順を含む、幹細胞の培養方法。

[135] 前記低分子化合物が、*epiboxidine hydrochloride*である、[134]の培養方法。

[136] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[134]又は[135]の培養方法。

[137] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[134]～[136]のいずれかの培養方法。

[138] 前記培地が無血清培地である、[134]～[137]のいずれかの培養方法。

[139] コリンエステラーゼ阻害剤、フェノチアジン誘導体、ステロイド、アセチルコリンレセプターアゴニスト、及びプロスタグランジンレセプターアゴニストからなる群より選ばれる1以上の低分子化合物を含む培地で

幹細胞を培養する工程を含む、幹細胞を含む細胞組成物の製造方法。

[140] 前記低分子化合物が、epiboxidine hydrochlorideである、[139]の製造方法。

[141] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[139]又は[140]の製造方法。

[142] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[139]～[141]のいずれかの製造方法。

[143] 前記培地が無血清培地である、[139]～[142]のいずれかの製造方法。

[144] コリンエステラーゼ阻害剤、フェノチアジン誘導体、ステロイド、アセチルコリンレセプターアゴニスト、及びプロスタグランジンレセプターアゴニストからなる群より選ばれる1以上の低分子化合物を含む培地で幹細胞を培養する工程と、幹細胞の分化を誘導する工程、とを含む、分化細胞を含む細胞組成物の製造方法。

[145] 前記低分子化合物が、epiboxidine hydrochlorideである、[144]の製造方法。

[146] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、[144]又は[145]の製造方法。

[147] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[144]～[146]のいずれかの製造方法。

[148] 前記培地が無血清培地である、[144]～[147]のいずれかの製造方法。

[149] コリンエステラーゼ阻害剤、フェノチアジン誘導体、ステロイド、アセチルコリンレセプターアゴニスト、及びプロスタグランジンレセプターアゴニストからなる群より選ばれる1以上の低分子化合物と、幹細胞及び／又は幹細胞から誘導された分化細胞と、を含む細胞組成物。

[150] 前記低分子化合物が、epiboxidine hydrochlorideである、[149]の細胞組成物。

[151] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、
[149] 又は [150] の細胞組成物。

[152] 前記幹細胞が、ヒト由来である、[149]～[151]のいずれかの細胞組成物。

[0012] 本発明において、「bFGFヘパリン結合領域含有ペプチド」は、bFGFのヘパリン結合領域を含有するヒトbFGF全長ペプチド（GenBankアクセッションナンバー：NP_001997）やマウスbFGF全長ペプチド（GenBankアクセッションナンバー：NP_032032）等のbFGFの部分ペプチドを意味する。

「bFGF断片ペプチド」は、bFGFのヘパリン結合領域を含まない、bFGFの部分ペプチドを意味する。

[0013] また、「FGFレセプター結合ペプチド」は、FGFレセプターへ結合するペプチドであって、bFGFに由来しないアミノ酸配列を有するペプチドを意味する。

「bFGF結合タンパク断片ペプチド」は、bFGFと結合してbFGF複合体タンパク質を形成し、bFGFのbFGFレセプターへの結合親和性を高める機能を有するタンパク質（bFGF結合タンパク質）の部分ペプチドを意味する。

[0014] 本発明において、「幹細胞の増殖を促進する活性」とは、ある物質について、当該物質の存在下で培養される幹細胞の生存及び増殖が、当該物質の非存在下で培養される幹細胞の生存及び増殖に比して促進されることを意味する。具体的には、当該物質の存在下で一定期間培養した後の幹細胞数が、当該物質の非存在下で同期間培養した後の幹細胞数に比べて、5%以上、10%以上又は20%以上、好ましくは30%以上、40%以上、50%以上、より好ましくは60%以上、70%以上又は80%以上、さらに好ましくは90%以上、100%以上又はそれ以上増加することを意味する。

発明の効果

[0015] 本発明により、幹細胞に対して優れた増殖促進活性を発揮する物質が提供

される。

図面の簡単な説明

[0016] [図1] b F G F 代替物の候補物質の細胞増殖促進活性を評価した結果を示す図である。縦軸は、陰性コントロール（図中「C o n t r o l」）の平均値を 1 とした細胞数の相対値を示す。

[図2] b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチドの i P S 細胞増殖促進活性を評価した結果を示す図である（実施例 1）。縦軸は、コントロールの平均値を 1 とした細胞数の相対値を示す（* : $P < 0.05$, $n = 3$ ）。

発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明を実施するための好適な形態について説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本発明の代表的な実施形態の一例を示したものであり、これにより本発明の範囲が狭く解釈されることはない。

[0018] 1. b F G F 代替物

本発明に係る幹細胞培養用の培地は、幹細胞の増殖を促進することを目的として、従来用いられている b F G F に替わる物質（以下「b F G F 代替物」と称する）を含有することを特徴とする。ただし、「b F G F 代替物」との用語は、b F G F に代替的に用いることが可能であることを意味するものであり、b F G F 代替物が b F G F とともに用いられることを排除する趣旨ではない。すなわち、b F G F 代替物は、b F G F とともに用いることも可能である。幹細胞に対して優れた増殖促進活性を発揮する b F G F 代替物としては、b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチド、b F G F 断片ペプチド、F G F レセプター結合ペプチド、b F G F 結合タンパク断片ペプチド、又は特定の低分子化合物が挙げられる。これらの b F G F 代替物は、幹細胞に対し、優れた増殖促進活性を発揮し、増殖促進剤として機能し得る。以下、これらの b F G F 代替物について順に説明する。

[0019] (1) b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチド

「b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチド」は、b F G F のヘパリン結合領域を含有する、b F G F の部分ペプチドを意味する。b F G F は、ヘパ

ン硫酸と強く結合するドメイン（ヘパリン結合領域）を有することが知られており、マウス bFGF（GenBank アクセションナンバー：NP_032032）の N 末端から 166～210 番目のアミノ酸の部位及び 235～262 番目のアミノ酸の部位が当該ドメインに相当する（非特許文献 2）。

[0020] 幹細胞自身から分泌される bFGF や培地中に添加された bFGF がヘパリン硫酸に吸着すると、bFGF の幹細胞に対する増殖促進機能が阻害されるおそれがある。bFGF ヘパリン結合領域含有ペプチドは、幹細胞自身から分泌される bFGF や培地中に添加された bFGF がヘパリン硫酸に吸着するのを競合的に阻害することによって、幹細胞の生存及び増殖を促進している可能性が考えられる。

[0021] bFGF ヘパリン結合領域含有ペプチドの由来種は、幹細胞増殖促進活性を有する限り特に限定されず、ヒトの他、ラット、マウス、ハムスター又はモルモット等のげっ歯類、ウサギ等のウサギ目、ブタ、ウシ、ヤギ又はヒツジ等の有蹄目、イヌ又はネコ等のネコ目、サル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン又はチンパンジー等の霊長類であってよい。

[0022] bFGF ヘパリン結合領域含有ペプチドの長さは、アミノ酸残基数で、好ましくは 9～19 であるが、幹細胞増殖促進活性が維持される限りにおいて、9 以下又は 19 以上であってもよく、例えば 4～9 又は 19～50 程度であってよい。bFGF ヘパリン結合領域含有ペプチドは、幹細胞増殖促進活性が維持される限りにおいて、アミノ酸残基の側鎖及び／又はアミノ末端及び／又はカルボキシ末端にアミドなどの従来公知の修飾基や保護基を有していてもよい。

[0023] bFGF ヘパリン結合領域含有ペプチドの具体例としては、例えば、以下の（A）、（B）又は（C）のペプチドが挙げられる。

（A）配列番号 1，3，4，6～10 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、好ましくは配列番号 1，3，4，6～10 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列からなるペプチド。

(B) 配列番号 1, 3, 4, 6~10 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、好ましくは配列番号 1, 3, 4, 6~10 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A) 又は (B) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[0024] 上記 (A) 及び (B) に関し、特に好ましい bFGF ヘパリン結合領域含有ペプチドは、マウス bFGF の mature 体の N 末端から 106~115 番目のアミノ酸配列「YRSRKYSWY」（配列番号 1）からなるペプチドが挙げられる。配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるペプチドは、FGF 拮抗物質（特許文献 6）として報告されており、これを用いた皮膚のシワ低減方法（特許文献 5）が提案されているが、当該ペプチドが幹細胞の増殖を促進することはこれまで知られていない。

[0025] 上記 (B) に関し、欠失、置換、挿入又は付加されるアミノ酸数は、10 個以下、好ましくは 7 個以下、より好ましくは 5 個以下、最も好ましくは 1 又は 2 個である。

[0026] 「1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列」とは、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異ポリペプチド作製法により欠失、置換、挿入又は付加できる程度の数（好ましくは 10 個以下、より好ましくは 7 個以下、さらに好ましくは 5 個以下、最も好ましくは 1 又は 2 個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を意味する。

[0027] タンパク質のアミノ酸配列中のいくつかのアミノ酸が、当該タンパク質の構造又は機能に有意に影響することなく容易に改変され得ることは、当該分野において周知である。さらに、天然に存在するタンパク質において、当該タンパク質の構造又は機能を有意に変化させない多型（ポリモルフィズム）が存在することもまた周知である。従って、「1 または数個のアミノ酸が欠

失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列」には、公知の変異ポリペプチド作製法により人為的に変異を導入して得られる改変配列に加えて、天然に存在する多型配列も含まれる。

[0028] (2) b F G F 断片ペプチド

「b F G F 断片ペプチド」は、b F G F のヘパリン結合領域を含まない、b F G F の部分ペプチドを意味する。

[0029] b F G F 断片ペプチドの由来種は、幹細胞増殖促進活性を有する限り特に限定されず、ヒトの他、ラット、マウス、ハムスター又はモルモット等のげっ歯類、ウサギ等のウサギ目、ブタ、ウシ、ヤギ又はヒツジ等の有蹄目、イヌ又はネコ等のネコ目、サル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン又はチンパンジー等の霊長類であってよい。

[0030] b F G F 断片ペプチドの長さは、アミノ酸残基数で、好ましくは15～25であるが、幹細胞増殖促進活性が維持される限りにおいて、15以下又は25以上であってもよく、例えば9～15又は25～50程度であってよい。b F G F 断片ペプチドは、幹細胞増殖促進活性が維持される限りにおいて、アミノ酸残基の側鎖及び／又はアミノ末端及び／又はカルボキシ末端にアミドなどの従来公知の修飾基や保護基を有していてもよい。

[0031] b F G F 断片ペプチドの具体例としては、例えば、以下の(A)、(B)又は(C)のペプチドが挙げられる。

(A) 配列番号2, 5, 16に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、好ましくは配列番号2, 5, 16に示されるいずれか一つのアミノ酸配列からなるペプチド。

(B) 配列番号2, 5, 16に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、好ましくは配列番号2, 5, 16に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A) 又は (B) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[0032] 上記 (B) に関し、欠失、置換、挿入又は付加されるアミノ酸数は、10 個以下、好ましくは 5 個以下、より好ましくは 3 個以下、最も好ましくは 1 又は 2 個である。

[0033] 「1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列」とは、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異ポリペプチド作製法により欠失、置換、挿入又は付加できる程度の数（好ましくは 10 個以下、より好ましくは 7 個以下、さらに好ましくは 5 個以下、最も好ましくは 1 又は 2 個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を意味する。

[0034] タンパク質のアミノ酸配列中のいくつかのアミノ酸が、当該タンパク質の構造又は機能に有意に影響することなく容易に改変され得ることは、当該分野において周知である。さらに、天然に存在するタンパク質において、当該タンパク質の構造又は機能を有意に変化させない多型（ポリモルフィズム）が存在することもまた周知である。従って、「1 または数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列」には、公知の変異ポリペプチド作製法により人為的に変異を導入して得られる改変配列に加えて、天然に存在する多型配列も含まれる。

[0035] (3) FGF レセプター結合ペプチド

「FGF レセプター結合ペプチド」は、FGF レセプターへ結合するペプチドであって、bFGF に由来しないアミノ酸配列を有するペプチドを意味する。

[0036] FGF レセプター結合ペプチドは、幹細胞増殖促進活性を有する限り特に限定されず、ヒトの FGF レセプターに結合するものの他、ラット、マウス、ハムスター又はモルモット等のげっ歯類、ウサギ等のウサギ目、ブタ、ウシ、ヤギ又はヒツジ等の有蹄目、イヌ又はネコ等のネコ目、サル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン又はチンパンジー等の霊長類などの FGF レセプターに結合するものであってよい。

[0037] FGFレセプター結合ペプチドの長さは、アミノ酸残基数で、好ましくは14～29であるが、幹細胞増殖促進活性が維持される限りにおいて、14以下又は29以上であってもよく、例えば9～14又は29～105程度であってよい。bFGF断片ペプチドは、幹細胞増殖促進活性が維持される限りにおいて、アミノ酸残基の側鎖及び／又はアミノ末端及び／又はカルボキシ末端にアミドなどの従来公知の修飾基や保護基を有していてもよい。

[0038] FGFレセプター結合ペプチドの具体例としては、例えば、以下の（A）、（B）又は（C）のペプチドが挙げられる。

（A）配列番号11～14に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、好ましくは配列番号11～14に示されるいずれか一つのアミノ酸配列からなるペプチド。

（B）配列番号11～14に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、好ましくは配列番号11～14に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

（C）（A）又は（B）に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[0039] 上記（B）に関し、欠失、置換、挿入又は付加されるアミノ酸数は、10個以下、好ましくは5個以下、より好ましくは3個以下、最も好ましくは1又は2個である。

[0040] 「1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列」とは、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異ポリペプチド作製法により欠失、置換、挿入又は付加できる程度の数（好ましくは10個以下、より好ましくは7個以下、さらに好ましくは5個以下、最も好ましくは1又は2個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を意味する。

[0041] タンパク質のアミノ酸配列中のいくつかのアミノ酸が、当該タンパク質の

構造又は機能に有意に影響することなく容易に改変され得ることは、当該分野において周知である。さらに、天然に存在するタンパク質において、当該タンパク質の構造又は機能を有意に変化させない多型（ポリモルフィズム）が存在することもまた周知である。従って、「1または数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列」には、公知の変異ポリペプチド作製法により人為的に変異を導入して得られる改変配列に加えて、天然に存在する多型配列も含まれる。

[0042] (4) bFGF結合タンパク断片ペプチド

「bFGF結合タンパク断片ペプチド」は、bFGFと結合してbFGF複合体タンパク質を形成し、bFGFのbFGFレセプターへの結合親和性を高める機能を有するタンパク質（bFGF結合タンパク質）の部分ペプチドを意味する。

[0043] bFGF結合タンパク断片ペプチドの由来種は、幹細胞増殖促進活性を有する限り特に限定されず、ヒトの他、ラット、マウス、ハムスター又はモルモット等のげっ歯類、ウサギ等のウサギ目、ブタ、ウシ、ヤギ又はヒツジ等の有蹄目、イヌ又はネコ等のネコ目、サル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン又はチンパンジー等の霊長類であってよい。

[0044] bFGF結合タンパク断片ペプチドの長さは、アミノ酸残基数で、好ましくは41～43であるが、幹細胞増殖促進活性が維持される限りにおいて、41以下又は43以上であってもよく、例えば34～41又は43～50程度であってよい。bFGF結合タンパク断片ペプチドは、幹細胞増殖促進活性が維持される限りにおいて、アミノ酸残基の側鎖及び／又はアミノ末端及び／又はカルボキシ末端にアミドなどの従来公知の修飾基や保護基を有していてもよい。

[0045] bFGF結合タンパク質の具体例としては、例えばFGF-BP1タンパク質が挙げられ、bFGF結合タンパク断片ペプチドの具体例としては、例えばヒトFGF-BP1タンパク質の部分ペプチドに由来する以下の(A)、(B)又は(C)のペプチドが挙げられる。

(A) 配列番号 15 に示されるアミノ酸配列を含むペプチド、好ましくは配列番号 15 に示されるアミノ酸配列からなるペプチド。

(B) 配列番号 15 に示されるアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、好ましくは配列番号 15 に示されるアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列からなり、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド。

(C) (A) 又は (B) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド。

[0046] 上記 (B) に関し、欠失、置換、挿入又は付加されるアミノ酸数は、10 個以下、好ましくは 5 個以下、より好ましくは 3 個以下、最も好ましくは 1 又は 2 個である。

[0047] 「1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列」とは、部位特異的突然変異誘発法等の公知の変異ポリペプチド作製法により欠失、置換、挿入又は付加できる程度の数（好ましくは 10 個以下、より好ましくは 7 個以下、さらに好ましくは 5 個以下、最も好ましくは 1 又は 2 個）のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を意味する。

[0048] タンパク質のアミノ酸配列中のいくつかのアミノ酸が、当該タンパク質の構造又は機能に有意に影響することなく容易に改変され得ることは、当該分野において周知である。さらに、天然に存在するタンパク質において、当該タンパク質の構造又は機能を有意に変化させない多型（ポリモルフィズム）が存在することもまた周知である。従って、「1 または数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列」には、公知の変異ポリペプチド作製法により人為的に変異を導入して得られる改変配列に加えて、天然に存在する多型配列も含まれる。

[0049] 以上に説明した各ペプチドは、従来公知の化学的手法又は遺伝子工学的手法により調製することができる。

化学的合成方法としては、例えば、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混合酸無水物法、ジクロロメタン法、活性エステル法、カルボイミダゾール法又は酸化還元法等が挙げられる。合成方法は、固相合成法および液相合成法のいずれをも適用することができ、自動ペプチド合成機が用いられてもよい。

ペプチドへの修飾基又は保護基の結合も従来公知の手法によって行えばよく、ペプチド合成後に化学修飾等する方法、化学修飾等されたアミノ酸を用いてペプチド合成する方法、ペプチド合成の最終脱保護の反応条件を適当に選ぶ方法等を適用できる。

[0050] 遺伝子工学的手法としては、従来公知の手法により、ペプチドをコードするDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入して組換えベクターを作製し、該組換えベクターを適当な宿主細胞に導入し発現させることにより製造できる。

[0051] ペプチドの精製も、従来公知の手法によって行うことができ、例えば、溶媒抽出、蒸留、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー又は再結晶等を必要に応じて組み合わせて行なうことができる。

[0052] (5) 低分子化合物

低分子化合物としては、コリンエステラーゼ阻害剤、フェノチアジン誘導体、ステロイド、アセチルコリンレセプターアゴニスト、及びプロスタグランジンレセプターアゴニストからなる群より選ばれる1以上の化合物が挙げられる。

[0053] コリンエステラーゼ阻害剤としては、例えばethopropazine hydrochloride等が挙げられる。

[0054] フェノチアジン誘導体としては、例えばacepromazine maleate、benzoyl leuco methylene blue、chlorpromazine hydrochloride、mesoridazine benzenesulfonate、perphenazine、promazine hydrochloride、prome

thazine hydrochloride等が挙げられる。

[0055] ステロイドとしては例えば、dexamethasone等が挙げられる。
。

[0056] アセチルコリンレセプターアゴニストとしては、例えばepiboxidine hydrochloride等が挙げられる。

[0057] プロスタグランジンレセプターアゴニストとしては、例えばfluprostenol等が挙げられる。

[0058] これらの低分子化合物のなかで、アセチルコリンレセプターアゴニストが好ましく、特にepiboxidine hydrochlorideが好ましい。

[0059] (6) bFGF代替物のスクリーニング方法

マウス胎児線維芽細胞は、細胞膜表面にFGFR1を発現している。FGFR1はbFGFの結合により活性化されることが知られており、上記細胞はbFGF組換えタンパク質の活性を評価するためのアッセイ系に用いられている(Cancer Res., 1988, Aug 1, 48(15), p. 4266-71)。bFGF代替物のスクリーニング評価においても同アッセイ系を用いることができる。マウス胎児線維芽細胞としては、例えばBALB/3T3 clone A31などが公知である。

[0060] 2. 幹細胞培養用の培地

[基礎培地]

本発明に係る幹細胞培養用の培地の組成は、上記のbFGF代替物を含有する点を除いて、従来幹細胞培養に用いられている培地と同様であってよい。すなわち、本発明に係る培地は、動物組織に由来する細胞の培養に従来用いられている基礎培地にbFGF代替物を添加することにより調製できる。基礎培地として具体的には以下を挙げることができる。

[0061] RPMI-1640培地、EagleのMEM培地、ダルベッコ改変MEM培地、Glasgow's MEM培地、 α -MEM培地、199培地、IMDM培地、DMEM培地、Hybridoma Serum free培地

、Chemically Defined Hybridoma Serum Free培地、Ham's Medium F-12、Ham's Medium F-10、Ham's Medium F12K、ATCC-CRCM30、DM-160、DM-201、BME、Fischer、McCoy's 5A、Leibovitz's L-15、RITC80-7、MCDB105、MCDB107、MCDB131、MCDB153、MCDB201、NCTC109、NCTC135、Waymouth's MB752/1、CMRL-1066、William's medium E、Brinster's BMOC-3 Medium、Essential 8 Medium（以上サーモフィッシャーサイエンティフィック社）、mTeSR1（ステムセルテクノロジーズ社）、TeSR-E8 medium（ステムセルテクノロジーズ社）、StemSure（和光純薬社）、mESF培地（和光純薬社）、StemFit（味の素社）、S-medium（DSファーマ社）、ReproXF（リプロセル社）、PSGro-free Human iPSC/ESC Growth Medium（StemRD社）、hPSC Growth Medium（タカラバイオ社）、ReproFF2（リプロセル社）、EX-CELL 302培地（SAFC社）、EX-CELL-CD-CHO（SAFC社）又はSTEMdiff APEL Medium（ステムセルテクノロジーズ社）など及びこれらの混合物。

[0062] [bFGF代替物の添加]

bFGF代替物は単独で培地に添加されてもよく、複数を組み合わせて培地に添加されてもよい。また、bFGF代替物は、bFGFに加えて添加されてもよい。bFGF代替物の添加濃度は、幹細胞増殖促進活性を示す限り特に限定されないが、例えば1～500 μ M、好ましくは5～250 μ M、より好ましくは10～200 μ Mである。

[0063] bFGF代替物としてbFGFヘパリン結合領域含有ペプチド、bFGF断片ペプチド、あるいはbFGF結合タンパク断片ペプチドを用いる場合、

当該ペプチドの由来種は、培養する幹細胞の由来種に応じて適宜選択することができ、好ましくは培養する幹細胞と同じ種とされる。例えば、ヒト由来の細胞を培養する場合は、ヒト由来のbFGFヘパリン結合領域含有ペプチド等を用いるのが好ましい。また、FGFレセプター結合ペプチドは、培養する幹細胞の由来種に応じて、その種のFGFレセプターに結合するペプチドを適宜選択すればよい。

[0064] [bFGF代替物以外の添加物]

培地には、細胞の生存又は増殖に必要な生理活性物質及び／又は栄養因子等を添加できる。これらの添加物は、培地に予め添加されていてもよく、細胞培養中に添加されてもよい。培養中に添加する方法は、1溶液または2種以上の混合溶液などいかなる形態によってもよく、連続的または断続的な添加であってもよい。

[0065] 生理活性物質としては、インシュリン、IGF-1、トランスフェリン、アルブミンまたは補酵素Q₁₀などが挙げられる。

栄養因子としては、糖、アミノ酸、ビタミン、加水分解物または脂質などが挙げられる。

糖としては、グルコース、マンノースまたはフルクトースなどの中性糖、シアル酸などの酸性糖、アミノ糖又は糖アルコールなどが挙げられ、1種または2種以上を組み合わせ用いられる。

アミノ酸としては、L-アラニン、L-アルギニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-システイン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシンまたはL-バリンなどが挙げられ、1種または2種以上を組み合わせ用いられる。

ビタミンとしては、d-ビオチン、D-パントテン酸、コリン、葉酸、myo-イノシトール、ナイアシンアミド、ピロドキサール、リボフラビン、チアミン、シアノコバラミンまたはDL- α -トコフェロールなどが挙げら

れ、1種または2種以上を組み合わせ用いられる。

加水分解物としては、大豆、小麦、米、えんどう豆、とうもろこし、綿実または酵母抽出物などを加水分解したものが挙げられる。

脂質としては、コレステロール、リノール酸またはリノレイン酸などが挙げられる。

[0066] さらに、培地には、カナマイシン、ストレプトマイシン、ペニシリン又はハイグロマイシンなどの抗生物質を必要に応じて添加してもよい。シアル酸等の酸性物質を培地に添加する場合には、培地のpHを細胞の成育に適した中性域であるpH5～9、好ましくはpH6～8に調整することが望ましい。

[0067] [血清等の添加]

本発明に係る培地は、血清含培地であっても無血清培地であってもよい。異種動物由来成分の混入防止の観点からは血清を含有しないか、培養される幹細胞と同種動物由来の血清が用いられることが好ましい。

[0068] ここで、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。無血清培地は、精製された血液由来成分や増殖因子などの動物組織由来成分や遺伝子組換え技術により生産されたタンパク質、もしくは、合成されたペプチドを含有していてもよい。

[0069] 本発明に係る培地は、血清と同様に、血清代替物を含んでいても含んでいなくともよい。血清代替物としては、例えば、アルブミン、脂質リッチアルブミン及び組換えアルブミン等のアルブミン代替物、植物デンプン、デキストラン、タンパク質加水分解物、トランスフェリン又は他の鉄輸送体、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオグリセロールあるいはこれらの均等物などが挙げられる。

[0070] 血清代替物の具体例としては、例えば、国際公開第98/30679号記載の方法により調製されるものや、市販のknockout Serum Replacement (KSR社)、Chemically-defined Lipid concentrated (Life Technolo

gies社)及びGlutamax(Life Technologies社)などが挙げられる。

[0071] 3. 幹細胞の培養方法等

[幹細胞]

本発明が対象とする「幹細胞」は、自己複成能及び分化増殖能を有する未熟な細胞をいい、分化能力に応じて、多能性幹細胞(pluripotent stem cell)、複能性幹細胞(multipotent stem cell)又は単能性幹細胞(unipotent stem cell)等が含まれる。「幹細胞」は、一般に、未分化状態を保持したまま増殖できる「自己再生能」と、三胚葉系列すべてに分化できる「分化多能性」とを有する未分化細胞と定義されている。

[0072] 多能性幹細胞とは、生体を構成する全ての組織や細胞へ分化し得る能力を有する細胞を意味する。

複能性幹細胞とは、全ての種類ではないが、複数種の組織や細胞へ分化し得る能力を有する細胞を意味する。

単能性幹細胞とは、特定の組織や細胞へ分化し得る能力を有する細胞を意味する。

[0073] 幹細胞の由来種も特に限定されず、例えば、ラット、マウス、ハムスター又はモルモット等のげっ歯類、ウサギ等のウサギ目、ブタ、ウシ、ヤギ又はヒツジ等の有蹄目、イヌ又はネコ等のネコ目、ヒト、サル、アカゲザル、マーモセット、オランウータン又はチンパンジー等の霊長類などの細胞であってもよい。

[0074] 幹細胞の具体例としては、筋芽細胞、血管内皮細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、筋細胞、心筋細胞、軟骨細胞等へ分化する間葉系幹細胞、ニューロンやグリア細胞へ分化する神経幹細胞、白血球、赤血球、血小板、肥満細胞又は樹状細胞等へ分化する造血幹細胞又は骨髓幹細胞、スフェロイド状態から胚様体(EB体)と呼ばれる擬似的な胚の形成を経て様々な組織への分化・誘導のステップに進むことが知られている胚性幹細胞(Embryonic s

tem cell : E S 細胞) や誘導性多能性幹細胞 (induced pluripotent cell : i P S 細胞)、始原生殖細胞に由来する胚性生殖 (E G) 細胞、精巢組織からの G S 細胞の樹立培養過程で単離される multipotent germline stem (m G S) 細胞、骨髓から単離される multipotent adult progenitor cell (M A P C) 等の多能性幹細胞などが挙げられる。

[0075] 多能性幹細胞としては、特に、上述の E S 細胞または i P S 細胞を挙げることができる。体細胞の核を核移植することによって作製された初期胚を培養することによって樹立した幹細胞も、多能性幹細胞としてまた好ましい (Nature, 1997, 385, p. 810、Science, 1998, 280, p. 1256、Nature Biotechnology, 1999, 17, p. 456、Nature, 1998, 394, p. 369、Nature Genetics, 1999, 22, p. 127、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96, p. 14984、Nature Genetics, 2000, 24, p. 109)。

[0076] ヒト E S 細胞株は、例えば W A O 1 (H1) および W A O 9 (H9) は、WiCell Research Institute から、KhES-1、KhES-2 及び KhES-3 は、京都大学再生医科学研究所 (京都、日本) から入手可能である。

[0077] i P S 細胞としては、例えば、皮膚細胞等の体細胞に複数の遺伝子 (初期化因子) を導入して得られる、E S 細胞同様の多分化能を獲得した細胞が挙げられる。例えば Oct 3 / 4 遺伝子、Klf 4 遺伝子、C-Myc 遺伝子及び Sox 2 遺伝子を導入することによって得られる i P S 細胞、Oct 3 / 4 遺伝子、Klf 4 遺伝子及び Sox 2 遺伝子を導入することによって得られる i P S 細胞 (Nature Biotechnology, 2008, 26, p. 101-106) 等が挙げられる。初期化因子に含まれる遺伝子として、例えば、Oct 3 / 4、Sox 2、Sox 1、Sox 3、Sox 15、Sox 17、Klf 4、Klf 2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Na

nog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sal11、Sal14、Esrrb、Nr5a2、Tbx3またはGlis1等が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/007852、WO2009/032194、WO2009/058413、WO2009/057831、WO2009/075119、WO2009/079007、WO2009/091659、WO2009/101084、WO2009/101407、WO2009/102983、WO2009/114949、WO2009/117439、WO2009/126250、WO2009/126251、WO2009/126655、WO2009/157593、WO2010/009015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO2010/111409、WO2010/111422、WO2010/115050、WO2010/124290、WO2010/147395、WO2010/147612、Nat. Biotechnol., 2008, 26, p. 795-797、Cell Stem Cell, 2008, 2, p. 525-528、Stem Cells. 2008, 26, p. 2467-2474、Nat Biotechnol. 2008, 26, p. 1269-1275、Cell Stem Cell, 2008, 3, p. 568-574、Cell Stem Cell, 2008, 3, p. 475-479、Cell Stem Cell, 2008, 3, p. 132-135、Nat Cell Biol., 2009, 11, p. 197-203、Nat. Biotech., 2009, 27, p. 459-461、Proc Natl Acad Sci U S A., 2009, 106, p. 8912-8917、Nature, 2009, 461, p.

643-649、Cell Stem Cell, 2009, 5, p. 491-503、Cell Stem Cell, 2010, 6, p. 167-74、Nature, 2010, 463, p. 1096-100、Stem Cells, 2010, 28, p. 713-720、Nature, 2011, 474, p. 225-9に記載の組み合わせが例示される。iPS細胞は、所定の機関（理研バイオリソースセンター、京都大学など）より入手可能である。

[0078] 複能性幹細胞としては、特に、間葉系幹細胞、造血系幹細胞、神経系幹細胞、骨髄幹細胞及び生殖幹細胞等の体性幹細胞等が挙げられる。複能性幹細胞は、好ましくは間葉系幹細胞である。なお、間葉系幹細胞とは、骨芽細胞、軟骨芽細胞及び脂肪芽細胞等の間葉系の細胞全て又はいくつかへの分化が可能な幹細胞又はその前駆細胞の集団を広義に意味する。間葉系幹細胞としてより具体例には、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（hMSC-BM, Takara）、ヒト臍帯マトリックス由来間葉系幹細胞（hMSC-UC, Takara）、ヒト脂肪組織由来間葉系幹細胞（hMSC-AT, Takara）などを挙げることができる。

[0079] 本発明に係る培地は、いずれの幹細胞の増殖にも好適に使用することができるが、好ましくは、間葉系幹細胞、ES細胞又はiPS細胞の培養に、より好ましくはiPS細胞の培養に、特に好ましくはヒトiPS細胞の培養に使用することができる。ヒトiPS細胞としてより具体的には253G1株（理研セルバンクNo. HPS0002）、201B7株（理研セルバンクNo. HPS0063）、409B2株（理研セルバンクNo. HPS0076）、454E2株（理研セルバンクNo. HPS0077）、HiPS-RIKEN-1A株（理研セルバンクNo. HPS0003）、HiPS-RIKEN-2A株（理研セルバンクNo. HPS0009）、HiPS-RIKEN-12A株（理研セルバンクNo. HPS0029）又はNips-B2株（理研セルバンクNo. HPS0223）などを挙げることができる。

[0080] [培養方法]

本発明に係る幹細胞の培養方法は、bFGF代替物を含む培地で幹細胞を培養する手順を含むことを特徴とする。具体的には、本発明に係る培養方法では、上述のbFGF断片ペプチド、FGFレセプター結合ペプチド、bFGFヘパリン結合領域含有ペプチド、bFGF結合タンパク断片ペプチド及び低分子化合物のいずれか一以上の存在下で、幹細胞をバッチ培養（Batch Culture）、流加培養（Fed-Batch Culture）、連続培養（Continuous Culture）又は灌流培養（Perfusion Culture）等により培養する。

[0081] バッチ培養は、培養中の培養槽にbFGF代替物を含む培地を補給せずに培養する方法である。

流加培養は、培養中の培養槽にbFGF代替物を含む培地を補給しながら培養する方法である。

連続培養は、培養中の培養槽からbFGF代替物を含む培地の一部を引き抜き、引き抜き量相当分の培地を補給しながら培養する方法である。

灌流培養は、培養中の培養槽から液分のみを引き抜き、引き抜き量相当分のbFGF代替物を含む培地を補給しながら培養する方法である。

これらいずれの培養方法においても、bFGF代替物の作用によって、幹細胞の生存と増殖を促進することができる。すなわち、本発明において、bFGF断片ペプチド、FGFレセプター結合ペプチド、bFGFヘパリン結合領域含有ペプチド、bFGF結合タンパク断片ペプチド、並びに、コリンエステラーゼ阻害剤、フェノチアジン誘導体、ステロイド、アセチルコリンレセプターアゴニスト及びプロスタグランジンレセプターアゴニストから選ばれる低分子化合物は、幹細胞の増殖促進剤として機能し得るものである。

[0082] 本発明に係る培養方法に用いられる培養器は、特に限定されないが、フラスコ、ディッシュ、シャーレ、マイクロウエルプレート、マイクロスライド、チャンバースライド、チューブ、トレイ、培養バック又はタンクなどの培養槽などが挙げられる。これらの培養器の基材も、特に限定されず、ガラスや、ポリプロピレン及びポリスチレンなどの各種プラスチック、ステンレス

などの金属又はそれらの組み合わせが挙げられる。

[0083] 本発明に係る幹細胞の培養方法としては、培養器の基材表面への足場依存性細胞の接着を誘導するため、基材表面にコラーゲン、ゼラチン、ポリ-L-リジン、ポリ-D-リジン、ラミニン、ラミニンの一部構造体、フィブロネクチン及びこれら混合物（例えばマトリゲル）並びに溶解細胞膜調製物（Lancet, 2005, 365, p1636-1641）などの足場をコーティングする接着培養や、メチルセルロースなどの高分子ポリマー（Stem Cell Reports, 2014, 2, 5, 734-745）、MFG-E8（Milk fat globule-EGF factor 8）又は該タンパク質の断片を用いた上記足場が不要な浮遊培養が挙げられる。

[0084] 培養される幹細胞は、分散細胞又は非分散細胞であり得る。分散細胞とは、細胞分散を促進するために処理された細胞をいう。分散細胞としては、例えば、2～50個、2～20個、又は2～10個の細胞からなる小さな細胞塊を形成している細胞が挙げられる。分散細胞は、浮遊（懸濁）細胞又は接着細胞であり得る。

[0085] 幹細胞の培養密度は、細胞の生存及び増殖を促進する効果を達成し得るような密度である限り特に限定されない。培養密度は、例えば $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^7$ 細胞/ml、好ましくは $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^7$ 細胞/ml、より好ましくは $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^7$ 細胞/ml、さらに好ましくは $3.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^7$ 細胞/mlである。

[0086] 温度、溶存CO₂濃度、溶存酸素濃度及びpHなどの培養条件は、動物組織に由来する細胞の培養に従来用いられている技術に基づいて適宜設定できる。例えば、培養温度は、特に限定されるものではないが33～39℃、好ましくは36～37℃であり得る。溶存CO₂濃度は、1～10%、好ましくは2～5%であり得る。酸素分圧は、10～22%であり得る。

[0087] 幹細胞の接着培養を行う場合、フィーダー細胞の存在下で培養してもよい。フィーダー細胞には、胎児線維芽細胞等のストローマ細胞を用いることができる（例えば、Manipulating the Mouse Emb

ryo A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, 1993、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1981, 78, 12, p. 7634-7638、Nature, 1981, 292, 5819, p. 154-156、J. Virol., 1969, 4, 5, p. 549-553、Science, 1996, 272, 5262, p. 722-724、J. Cell. Physiol., 1982, 112, 1, p. 89-95、国際公開第01/088100号、同第2005/080554号参照）。

[0088] 幹細胞の浮遊培養とは、培地中において、培養器又はフィーダー細胞を用いる場合に対して非接着性の条件下で幹細胞を培養することをいう。幹細胞の浮遊培養としては、幹細胞の分散培養及び幹細胞の凝集浮遊培養が挙げられる。

幹細胞の分散培養とは、懸濁された幹細胞を培養することをいい、例えば、2～20個の幹細胞からなる小さな細胞塊の分散培養が挙げられる。分散培養を継続した場合、培養された分散細胞がより大きな幹細胞塊を形成し、その後凝集浮遊培養が実行され得る。

凝集浮遊培養としては、胚様体培養法（Curr. Opin. Cell Biol., 1995, 7, 6, p. 862-869参照）、SFEB法（Nature Neuroscience, 2005, 8, 3, p. 288-296、国際公開第2005/123902号）、メッシュフィルターを用いて機械的処理により細胞株を継代させるスフェア培養法（Stem Cell Reports, 2014, 2, 5, p. 734-745）が挙げられる。

[0089] 本発明に係る培養方法では、bFGF代替物の存在下で幹細胞を培養する

手順によって幹細胞の生存と増殖を促進することができるので、幹細胞、特に分散及び分散後の浮遊培養等のストレスに弱いことが知られている i P S 細胞、を効率的に培養するために利用できる。本発明に係る培養方法により得られる b F G F 断片ペプチド、F G F レセプター結合ペプチド、b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチド、b F G F 結合タンパク断片ペプチド、又は、コリンエステラーゼ阻害剤、フェノチアジン誘導体、ステロイド、アセチルコリンレセプターアゴニスト及びプロスタグランジンレセプターアゴニストから選ばれる低分子化合物と、幹細胞と、を含む細胞組成物は、さらなる幹細胞の培養のためあるいは再生医療用の細胞ソースのために利用され得る。

[0090] [幹細胞又は分化細胞を含む細胞組成物の製造方法]

本発明に係る培養方法は、幹細胞を含む細胞組成物の製造方法あるいは幹細胞から誘導される分化細胞を含む細胞組成物の製造方法に適用できる。

[0091] 本発明に係る幹細胞を含む細胞組成物の製造方法は、上述した b F G F 代替物の存在下で幹細胞を培養する工程を含み、必要に応じて幹細胞を継代する工程を含む。また、本発明に係る分化細胞を含む細胞組成物の製造方法は、b F G F 代替物の存在下で幹細胞を培養する工程と幹細胞の分化を誘導する工程を含み、必要に応じて細胞を継代する工程を含む。b F G F 代替物の存在下で幹細胞を培養する工程は、上述の幹細胞の培養方法と同様に実施できる。

[0092] 幹細胞の継代や分化誘導は、従来公知の手法によって行えばよい。分化誘導剤には、B M P 阻害剤、W n t 阻害剤、N o d a l 阻害剤又はレチノイン酸などを用いることができる。分化誘導は、例えば、軟骨細胞の分化誘導プロセスでは、分化誘導培地（90% α M E M 培地、10%牛胎児血清（F B S）、2 m M L - グルタミン、0.1 μ M のデキサメタゾン）中で、間葉系幹細胞を培養することによって行うことができる。

[0093] 幹細胞の心筋細胞への分化誘導プロセスでは、例えば、心筋細胞を S T E M d i f f A P E L M e d i u m (S T E M C E L L 社) に 0.5 n g

／m l BMP-4 を添加した培地で1日培養後、STEMdiff APEL Mediumに10 ng／m l BMP-4、10 ng／m l Activin A、5 ng／m l bFGF代替物をそれぞれ添加した培地に交換して更に4日間培養を継続する。その後、STEMdiff APEL Mediumに10 ng／m l VEGF、150 ng／m l Dkk1をそれぞれ添加した培地に交換して8日間培養後、STEMdiff APEL Mediumに10 ng／m l VEGF、150 ng／m l Dkk1、10 ng／m l bFGF代替物をそれぞれ添加した培地に交換することで自律的な拍動を伴う心筋細胞を確認できる。

幹細胞の血小板への分化誘導プロセスの過程で必要となる巨核球の形成には、血清含有培地（20% FCS）にトロンボポエチン（TPO）、インターロイキン3（IL3）、インターロイキン6（IL6）及び幹細胞因子（SCF）等の因子が添加され得る。

また、レチノイン酸などの分化誘導剤を培地に添加することにより、幹細胞を神経系細胞などに分化させることが可能となる。

[0094] 本発明に係る幹細胞又は分化細胞を含む細胞組成物の製造方法では、bFGF代替物の存在下で幹細胞を培養する工程によって幹細胞の生存と増殖を促進することができるので、幹細胞及びこれから誘導される分化細胞を含む細胞組成物を効率的に製造できる。本発明に係る幹細胞又は分化細胞を含む細胞組成物の製造方法により得られる、bFGF断片ペプチド、FGFレセプター結合ペプチド、bFGFヘパリン結合領域含有ペプチド、bFGF結合タンパク断片ペプチド、又は、コリンエステラーゼ阻害剤、フェノチアジン誘導体、ステロイド、アセチルコリンレセプターアゴニスト、あるいはプロスタグランジンレセプターアゴニストから選ばれる低分子化合物と、幹細胞及び／又は分化細胞とを含む細胞組成物は、さらなる幹細胞の培養のためあるいは再生医療用の細胞ソースのために利用され得る。

[0095] 本発明に係る細胞組成物は、小さな細胞塊のような分散した幹細胞を含む組成物であり得る。本発明に係る細胞組成物は、例えば、凍結保存による幹

細胞の保存、輸送、及び継代に用いられ得る。凍結保存等の保存に用いられる場合、本発明に係る細胞組成物は、血清あるいはその代替物、又はDMSO等の有機溶剤をさらに含んでいてもよい。本発明に係る細胞組成物は、フィーダー細胞を含むものであってもよい。

実施例

[0096] [参考例1：マウス胎児線維芽細胞を用いたbFGF代替物のスクリーニング]

マウス胎児線維芽細胞 (BALB/3T3 clone A31) を用いて、細胞増殖促進活性を有し、bFGF代替物となり得る物質のスクリーニングを行った。

[0097] マウス胎児線維芽細胞 (BALB/3T3 clone A31) は、理化学研究所より入手した。該細胞に添付のマニュアル (Resource No. RBRC-RCB00005) に従い、プラスチック培養皿の上でBALB/3T3細胞を培養した。具体的には、DMEM (Sigma D5796) に最終濃度10%のFBS (Sigma) を添加した培養液を用いて、37℃、5% CO₂下で培養を行った。植え継ぎは3日毎に行い、解離液 (0.25%トリプシン、Life Technologies) を用いて細胞を解離させ、新たなプラスチック培養皿の上に蒔いた。

[0098] 候補物質として、bFGFヘパリン結合領域含有ペプチド (配列番号1)、bFGF断片ペプチド (配列番号2)、FGFレセプター結合ペプチド (配列番号11, 13, 14)、低分子化合物 (Fluprostenol (SANTACRUZ), Epiroxidine hydrochloride (SIGMA), Dexamethasone (和光純薬工業), Perphenazine (東京化成工業), Promazine hydrochloride (SIGMA), Promethazine hydrochloride (和光純薬工業), Mesoridazine benzenesulfonate (SIGMA), Ethopropazine hydrochloride (SIGMA), Benzoyl leuco m

ethylene blue (東京化成工業), Acepromazine maleate (和光純薬工業), Chlorpromazine hydrochloride (和光純薬工業) を用いた。

[0099] 培養したBALB/3T3細胞を解離後、細胞カウントを行い、24ウェル培養プレートを用いて、中程度の密度 (1×10^4 個/0.8 cm²、培地容量1.0 mL中) で播種した。候補物質 (10 μ M) を加えた培養液中で3日間培養後に細胞数を計測した。陽性コントロールには、ヒトbFGF (リプロセル社) を5 ng/mL又は50 ng/mLで添加した培養液を用いた。候補物質及びヒトbFGFのいずれをも加えていない群を、陰性コントロール (図1中「control」) とした。

[0100] その結果、配列番号1のbFGFヘパリン結合領域含有ペプチド添加では、ヒトbFGF添加 (50 ng/mL) と同程度の細胞増殖促進活性を有することが確認された。また、配列番号2のbFGF断片ペプチド、配列番号11のヒトFGFレセプター結合ペプチド、及びEpiboxidine hydrochlorideの添加についても細胞増殖促進活性が確認された (図1)。

[0101] [実施例1: bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドのiPS細胞増殖促進活性の評価]

bFGF代替物としてのbFGFヘパリン結合領域含有ペプチドのiPS細胞増殖促進活性を評価した。bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドには、マウスbFGFに由来する配列番号1に示すアミノ酸配列を有するペプチドを、C末端をアミド化して用いた。

[0102] iPS細胞は、京都大学iPS細胞研究所 山中伸弥教授が樹立したヒト人工多能性幹細胞 (201B7) を、理化学研究所セルバンク (No. HPS0063) より入手した。

[0103] iPS細胞は、Nat. Biotechnol., 2007, 25, p. 681-686に記載の方法に従って、フィーダー層としてマウス胎児線維芽細胞 (マイトマイシン処理で不活化、MEF) を蒔いたプラスチック培

養皿で培養した。

- [0104] 培養液は、D-MEM F12 (SIGMA、D6421) に最終濃度 20 %のKSR (Life Technologies)、最終濃度 1%のNON-ESSENTIAL AMINO ACID (SIGMA)、2 mM L-グルタミン酸及び 80 μ M 2-メルカプトエタノールを添加したものを用いた。
- [0105] 37℃、5%CO₂下で培養し、3～4日毎に継代を行った。解離液（リン酸バッファー緩衝生理学的食塩水に0.25%トリプシン、1 mg/ml コラゲナーゼⅠV液、1 mM CaCl₂を添加したもの、全てLife Technologies）を用いて、iPS細胞をフィーダー層から解離し、ピペティングで小細胞塊（約50～100個）に分散した後、前日にMEFを播種し形成させたフィーダー層の上に蒔いた。
- [0106] 上記のように培養したiPS細胞を、フィーダー細胞から小細胞塊として解離し、さらに混入するフィーダー細胞を除去するために細胞接着性の培養プレート（0.1%ゼラチンコート）の底に吸着させ、培養液で37℃、1時間培養した。その後、Growth Factor Reduced BD Matrigel (BD) 上にiPS細胞塊を播種し、フィーダーレス培養を数継代行い、混入するMEFを完全に取り除いた。
- [0107] iPS細胞に対するbFGFヘパリン結合領域含有ペプチドの細胞増殖促進活性は、下記のように検討した。アッセイ前日に培養液をアッセイ培地（Essential 6、Life Technologies、血清不含）に替え、24時間後培養を行った。iPS細胞を解離後、96ウェル培養プレートを用いて、iMatrix-511（ニッピ）上に、 5×10^4 個/0.32 cm²/培地液量0.2 mlで播種した。10 μ M bFGFヘパリン結合領域含有ペプチド（配列番号1）又は5 ng/ml リコンビナントヒトbFGF（リプロセル社）を添加したアッセイ培地中で4日間培養を行った。培地交換を行って、さらに10 μ M bFGFヘパリン結合領域含有ペプチド又は5 ng/ml リコンビナントヒトbFGFを添加したアッセイ培地

中で4日間培養し、形成されたアルカリフォスファターゼ染色陽性（ALP+）のコロニー面積を生存細胞量として計測した。コントロールには、アッセイ培地のみで培養した細胞を用いた。

- [0108] 結果を図2に示す。bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドを添加した場合（図中「Peptide」）、コントロール（「Control」）に比べてアルカリフォスファターゼ染色陽性細胞数が有意に増加し、bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドがヒトiPS細胞の増殖を促進する活性を有することが明らかとなった。

配列表フリーテキスト

- [0109] 配列番号1：マウスbFGFヘパリン結合領域含有ペプチド
配列番号2：ヒトbFGF断片ペプチド
配列番号3：ヒトbFGFヘパリン結合領域含有ペプチド
配列番号4：ヒトbFGFヘパリン結合領域含有ペプチド
配列番号5：ヒトbFGF断片ペプチド
配列番号6：ヒトbFGFヘパリン結合領域含有ペプチド
配列番号7：ヒトbFGFヘパリン結合領域含有ペプチド
配列番号8：ヒトbFGFヘパリン結合領域含有ペプチド
配列番号9：ヒトbFGFヘパリン結合領域含有ペプチド
配列番号10：ヒトbFGFヘパリン結合領域含有ペプチド
配列番号11：ヒトFGFレセプター結合ペプチド
配列番号12：ヒトFGFレセプター結合ペプチド
配列番号13：ヒトFGFレセプター結合ペプチド
配列番号14：ヒトFGFレセプター結合ペプチド
配列番号15：ヒトbFGF結合タンパク断片ペプチド
配列番号16：ヒトbFGF断片ペプチド

請求の範囲

- [請求項1] (1) 塩基性線維芽細胞増殖因子 (b F G F) ヘパリン結合領域含有ペプチド、(2) b F G F 断片ペプチド、(3) 線維芽細胞増殖因子 (F G F) レセプター結合ペプチド、及び(4) b F G F 結合タンパク断片ペプチドからなるペプチドの群より選ばれる一以上の b F G F 代替物、及び／又は、(5) コリンエステラーゼ阻害剤、フェノチアジン誘導体、ステロイド、アセチルコリンレセプターアゴニスト、及びプロスタグランジンレセプターアゴニストからなる低分子化合物の群より選ばれる一以上の b F G F 代替物を含む、幹細胞培養用の培地。
- [請求項2] (1) 前記 b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチドが、以下の (A 1)、(B 1) 又は (C 1) のペプチドであり、
- (A 1) 配列番号 1, 3, 4, 6～10 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、
- (B 1) 配列番号 1, 3, 4, 6～10 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、
- (C 1) (A 1) 又は (B 1) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、
- (2) 前記 b F G F 断片ペプチドが、以下の (A 2)、(B 2) 又は (C 2) のペプチドであり、
- (A 2) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、
- (B 2) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C 2) (A 2) 又は (B 2) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(3) 前記 F G F レセプター結合ペプチドが、以下の (A 3)、(B 3) 又は (C 3) のペプチドであり、

(A 3) 配列番号 1 1 ~ 1 4 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、

(B 3) 配列番号 1 1 ~ 1 4 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C 3) (A 3) 又は (B 3) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(4) 前記 b F G F 結合タンパク断片ペプチドが、以下の (A 4)、(B 4) 又は (C 4) のペプチドであり、

(A 4) 配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列を含むペプチド、

(B 4) 配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C 4) (A 4) 又は (B 4) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(5) 前記低分子化合物が、epiboxidine hydrochloride である、請求項 1 記載の培地。

[請求項3] (1) 前記 b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチドが、配列番号 1 のペプチドである、請求項 1 又は 2 に記載の培地。

[請求項4] (1) 前記 b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチドが、C 末端がアミド化された配列番号 1 のペプチドである、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の培地。

[請求項5] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、請求

項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の培地。

[請求項6] 前記幹細胞が、ヒト由来である、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の培地。

[請求項7] 前記培地が無血清培地である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の培地。

[請求項8] (1) b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチド、(2) b F G F 断片ペプチド、(3) F G F レセプター結合ペプチド、及び(4) b F G F 結合タンパク断片ペプチドからなるペプチドの群より選ばれる一以上の b F G F 代替物、及び／又は、(5) コリンエステラーゼ阻害剤、フェノチアジン誘導体、ステロイド、アセチルコリンレセプターアゴニスト、及びプロスタグランジンレセプターアゴニストからなる低分子化合物の群より選ばれる一以上の b F G F 代替物を含む、幹細胞の増殖促進剤。

[請求項9] (1) 前記 b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチドが、以下の (A 1)、(B 1) 又は (C 1) のペプチドであり、

(A 1) 配列番号 1, 3, 4, 6 ～ 10 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、

(B 1) 配列番号 1, 3, 4, 6 ～ 10 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C 1) (A 1) 又は (B 1) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(2) 前記 b F G F 断片ペプチドが、以下の (A 2)、(B 2) 又は (C 2) のペプチドであり、

(A 2) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、

(B 2) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸

配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C2) (A2) 又は (B2) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(3) 前記 FGF レセプター結合ペプチドが、以下の (A3)、(B3) 又は (C3) のペプチドであり、

(A3) 配列番号 11～14 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、

(B3) 配列番号 11～14 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C3) (A3) 又は (B3) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(4) 前記 bFGF 結合タンパク断片ペプチドが、以下の (A4)、(B4) 又は (C4) のペプチドであり、

(A4) 配列番号 15 に示されるアミノ酸配列を含むペプチド、

(B4) 配列番号 15 に示されるアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C4) (A4) 又は (B4) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(5) 前記低分子化合物が、Epiboxidine hydrochloride である、請求項8記載の増殖促進剤。

[請求項10] (1) 前記 bFGF ヘパリン結合領域含有ペプチドが、配列番号1のペプチドである、請求項8又は9に記載の増殖促進剤。

[請求項11] (1) 前記 bFGF ヘパリン結合領域含有ペプチドが、C末端がア

ミド化された配列番号 1 のペプチドである、請求項 8 ～ 10 のいずれか一項に記載の増殖促進剤。

[請求項12] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、請求項 8 ～ 11 のいずれか一項に記載の増殖促進剤。

[請求項13] 前記幹細胞が、ヒト由来である、請求項 8 ～ 12 のいずれか一項に記載の増殖促進剤。

[請求項14] (1) b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチド、(2) b F G F 断片ペプチド、(3) F G F レセプター結合ペプチド、及び(4) b F G F 結合タンパク断片ペプチドからなるペプチドの群より選ばれる一以上の b F G F 代替物、及び／又は、(5) コリンエステラーゼ阻害剤、フェノチアジン誘導体、ステロイド、アセチルコリンレセプターアゴニスト、及びプロスタグランジンレセプターアゴニストからなる低分子化合物の群より選ばれる一以上の b F G F 代替物を含む培地で幹細胞を培養する手順を含む、幹細胞の培養方法。

[請求項15] (1) 前記 b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチドが、以下の (A 1)、(B 1) 又は (C 1) のペプチドであり、

(A 1) 配列番号 1, 3, 4, 6 ～ 10 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、

(B 1) 配列番号 1, 3, 4, 6 ～ 10 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C 1) (A 1) 又は (B 1) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(2) 前記 b F G F 断片ペプチドが、以下の (A 2)、(B 2) 又は (C 2) のペプチドであり、

(A 2) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、

(B 2) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C 2) (A 2) 又は (B 2) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(3) 前記 FGF レセプター結合ペプチドが、以下の (A 3)、(B 3) 又は (C 3) のペプチドであり、

(A 3) 配列番号 11 ~ 14 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、

(B 3) 配列番号 11 ~ 14 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C 3) (A 3) 又は (B 3) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(4) 前記 bFGF 結合タンパク断片ペプチドが、以下の (A 4)、(B 4) 又は (C 4) のペプチドであり、

(A 4) 配列番号 15 に示されるアミノ酸配列を含むペプチド、

(B 4) 配列番号 15 に示されるアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C 4) (A 4) 又は (B 4) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(5) 前記低分子化合物が、epiboxidine hydrochloride である、請求項 14 記載の培養方法。

[請求項16]

(1) 前記 bFGF ヘパリン結合領域含有ペプチドが、配列番号 1 のペプチドである、請求項 14 又は 15 に記載の培養方法。

- [請求項17] (1) 前記 b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチドが、C末端がアミド化された配列番号1のペプチドである、請求項14～16のいずれか一項に記載の培養方法。
- [請求項18] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、請求項14～17のいずれか一項に記載の培養方法。
- [請求項19] 前記幹細胞が、ヒト由来である、請求項14～18のいずれか一項に記載の培養方法。
- [請求項20] 前記培地が無血清培地である、請求項14～19のいずれか一項に記載の培養方法。
- [請求項21] (1) b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチド、(2) b F G F 断片ペプチド、(3) F G F レセプター結合ペプチド、及び(4) b F G F 結合タンパク断片ペプチドからなるペプチドの群より選ばれる一以上の b F G F 代替物、及び／又は、(5) コリンエステラーゼ阻害剤、フェノチアジン誘導体、ステロイド、アセチルコリンレセプターアゴニスト、及びプロスタグランジンレセプターアゴニストからなる低分子化合物の群より選ばれる一以上の b F G F 代替物を含む培地で幹細胞を培養する工程を含む、幹細胞を含む細胞組成物の製造方法。
- [請求項22] (1) 前記 b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチドが、以下の(A1)、(B1)又は(C1)のペプチドであり、
(A1) 配列番号1, 3, 4, 6～10に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、
(B1) 配列番号1, 3, 4, 6～10に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、
(C1) (A1) 又は(B1)に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、
(2) 前記 b F G F 断片ペプチドが、以下の(A2)、(B2)又は

(C 2) のペプチドであり、

(A 2) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、

(B 2) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C 2) (A 2) 又は (B 2) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(3) 前記 FGF レセプター結合ペプチドが、以下の (A 3)、(B 3) 又は (C 3) のペプチドであり、

(A 3) 配列番号 11 ~ 14 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、

(B 3) 配列番号 11 ~ 14 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C 3) (A 3) 又は (B 3) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(4) 前記 bFGF 結合タンパク断片ペプチドが、以下の (A 4)、(B 4) 又は (C 4) のペプチドであり、

(A 4) 配列番号 15 に示されるアミノ酸配列を含むペプチド、

(B 4) 配列番号 15 に示されるアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C 4) (A 4) 又は (B 4) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(5) 前記低分子化合物が、epiboxidine hydroc

h l o r i d eである、請求項 2 1 記載の製造方法。

[請求項23] (1) 前記 b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチドが、配列番号 1 のペプチドである、請求項 2 1 又は 2 2 に記載の製造方法。

[請求項24] (1) 前記 b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチドが、C末端がアミド化された配列番号 1 のペプチドである、請求項 2 1 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項25] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、請求項 2 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項26] 前記幹細胞が、ヒト由来である、請求項 2 1 ～ 2 5 のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項27] 前記培地が無血清培地である、請求項 2 1 ～ 2 6 のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項28] (1) b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチド、(2) b F G F 断片ペプチド、(3) F G F レセプター結合ペプチド、及び(4) b F G F 結合タンパク断片ペプチドからなるペプチドの群より選ばれる一以上の b F G F 代替物、及び／又は、(5) コリンエステラーゼ阻害剤、フェノチアジン誘導体、ステロイド、アセチルコリンレセプターアゴニスト、及びプロスタグランジンレセプターアゴニストからなる低分子化合物の群より選ばれる一以上の b F G F 代替物を含む培地で幹細胞を培養する工程と、幹細胞の分化を誘導する工程、とを含む、分化細胞を含む細胞組成物の製造方法。

[請求項29] (1) 前記 b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチドが、以下の (A 1)、(B 1) 又は (C 1) のペプチドであり、

(A 1) 配列番号 1, 3, 4, 6～10 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、

(B 1) 配列番号 1, 3, 4, 6～10 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を

有するペプチド、

(C 1) (A 1) 又は (B 1) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(2) 前記 b F G F 断片ペプチドが、以下の (A 2)、(B 2) 又は (C 2) のペプチドであり、

(A 2) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、

(B 2) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C 2) (A 2) 又は (B 2) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(3) 前記 F G F レセプター結合ペプチドが、以下の (A 3)、(B 3) 又は (C 3) のペプチドであり、

(A 3) 配列番号 11~14 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、

(B 3) 配列番号 11~14 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C 3) (A 3) 又は (B 3) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(4) 前記 b F G F 結合タンパク断片ペプチドが、以下の (A 4)、(B 4) 又は (C 4) のペプチドであり、

(A 4) 配列番号 15 に示されるアミノ酸配列を含むペプチド、

(B 4) 配列番号 15 に示されるアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含

み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C4) (A4) 又は (B4) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(5) 前記低分子化合物が、epiboxidine hydrochlorideである、請求項28記載の製造方法。

[請求項30] (1) 前記bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドが、配列番号1のペプチドである、請求項28又は29に記載の製造方法。

[請求項31] (1) 前記bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドが、C末端がアミド化された配列番号1のペプチドである、請求項28～30のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項32] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、請求項28～31のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項33] 前記幹細胞が、ヒト由来である、請求項28～32のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項34] 前記培地が無血清培地である、請求項28～33のいずれか一項に記載の製造方法。

[請求項35] (1) bFGFヘパリン結合領域含有ペプチド、(2) bFGF断片ペプチド、(3) FGFレセプター結合ペプチド、及び(4) bFGF結合タンパク断片ペプチドからなるペプチドの群より選ばれる一以上のbFGF代替物、及び／又は、(5) コリンエステラーゼ阻害剤、フェノチアジン誘導体、ステロイド、アセチルコリンレセプターアゴニスト、及びプロスタグランジンレセプターアゴニストからなる低分子化合物の群より選ばれる一以上のbFGF代替物を含むと、幹細胞及び／又は幹細胞から誘導された分化細胞と、を含む細胞組成物。

[請求項36] (1) 前記bFGFヘパリン結合領域含有ペプチドが、以下の(A1)、(B1) 又は(C1) のペプチドであり、

(A1) 配列番号1, 3, 4, 6～10に示されるいずれか一つの

アミノ酸配列を含むペプチド、

(B 1) 配列番号 1, 3, 4, 6 ~ 10 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C 1) (A 1) 又は (B 1) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(2) 前記 b F G F 断片ペプチドが、以下の (A 2)、(B 2) 又は (C 2) のペプチドであり、

(A 2) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、

(B 2) 配列番号 2, 5, 16 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C 2) (A 2) 又は (B 2) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(3) 前記 F G F レセプター結合ペプチドが、以下の (A 3)、(B 3) 又は (C 3) のペプチドであり、

(A 3) 配列番号 11 ~ 14 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列を含むペプチド、

(B 3) 配列番号 11 ~ 14 に示されるいずれか一つのアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C 3) (A 3) 又は (B 3) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(4) 前記 b F G F 結合タンパク断片ペプチドが、以下の (A 4)、

(B 4) 又は (C 4) のペプチドであり、

(A 4) 配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列を含むペプチド、

(B 4) 配列番号 1 5 に示されるアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入又は付加されたアミノ酸配列を含み、幹細胞の増殖を促進する活性を有するペプチド、

(C 4) (A 4) 又は (B 4) に記載のペプチドが二量体化されたペプチド、

(5) 前記低分子化合物が、epiboxidine hydrochloride である、請求項 3 5 記載の細胞組成物。

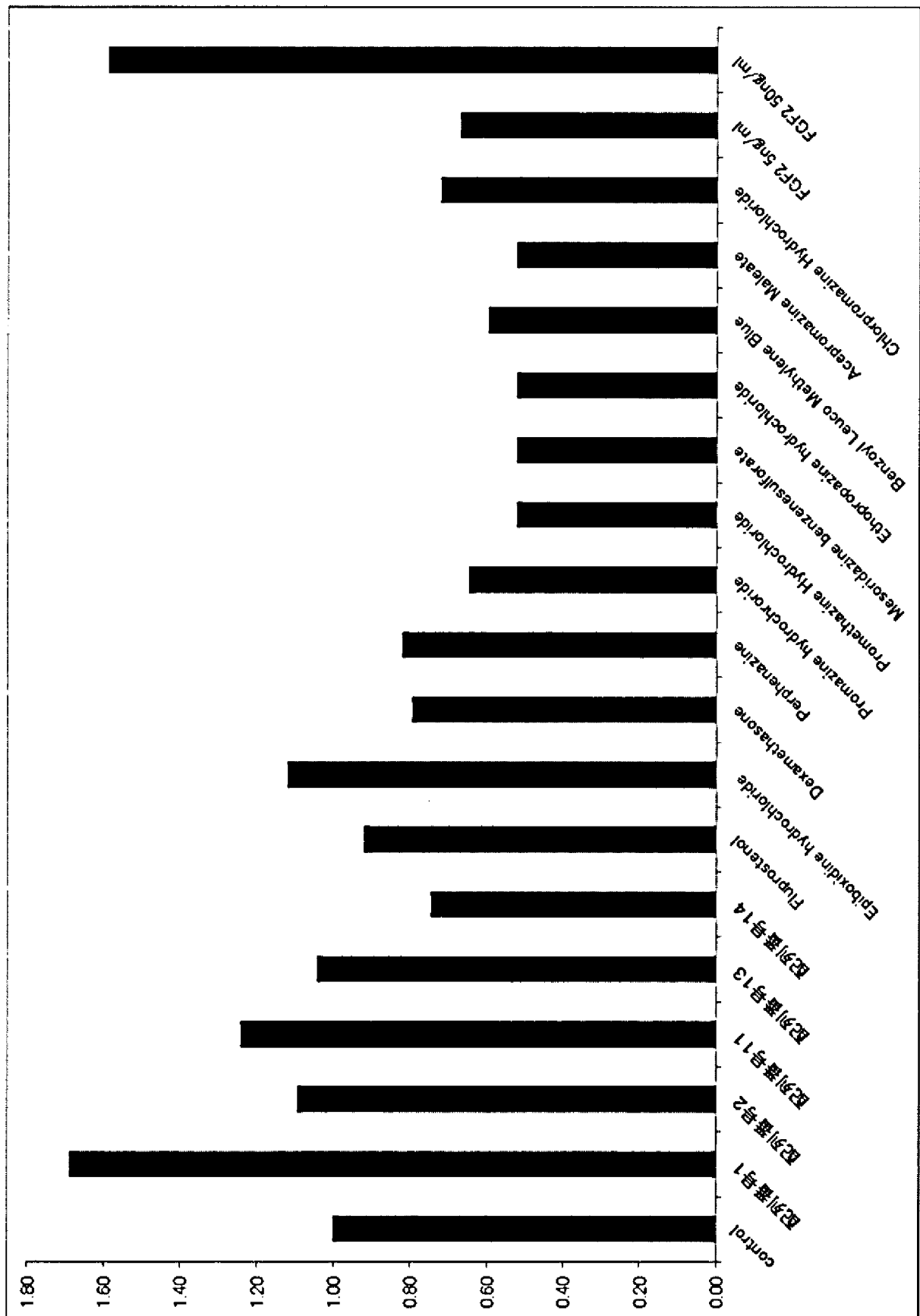
[請求項37] (1) 前記 b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチドが、配列番号 1 のペプチドである、請求項 3 5 又は 3 6 に記載の細胞組成物。

[請求項38] (1) 前記 b F G F ヘパリン結合領域含有ペプチドが、C 末端がアミド化された配列番号 1 のペプチドである、請求項 3 5 ～ 3 7 のいずれか一項に記載の細胞組成物。

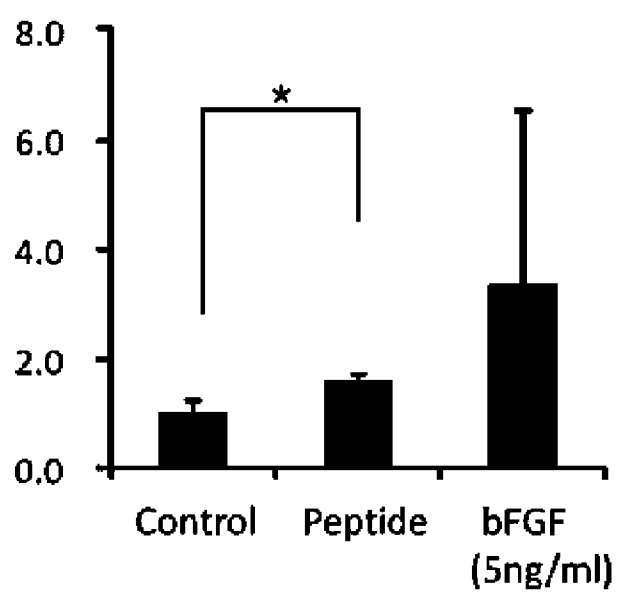
[請求項39] 前記幹細胞が、誘導性多能性幹細胞又は間葉系幹細胞である、請求項 3 5 ～ 3 8 のいずれか一項に記載の細胞組成物。

[請求項40] 前記幹細胞が、ヒト由来である、請求項 3 5 ～ 3 9 のいずれか一項に記載の細胞組成物。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/083232

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N1/00(2006.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/074(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)

C12N1/00, C12N5/0735, C12N5/074

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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/WPIDS (STN), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2009/158238 A2 (UNIVERSITY OF ROCHESTER), 30 December 2009 (30.12.2009), claims; examples; pages 32, 33 & US 2011/0207663 A1 & EP 2310035 A2	1-40
X	JP 2012-502664 A (Wisconsin Alumni Research Foundation), 02 February 2012 (02.02.2012), claims; fig. 4; paragraph [0029] & WO 2010/033925 A2 claims; fig. 4; paragraph [0033] & US 2010/0087004 A1 & EP 2342319 A2	1-40

☐ 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
19 January 2017 (19.01.17)

Date of mailing of the international search report
07 February 2017 (07.02.17)

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/083232

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
See extra sheet.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Parts of the inventions described in claims 1-40, wherein the bFGF alternative is a peptide containing a bFGF heparin-binding region.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/083232

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

[Documents]

1. WO 2009/158238 A2 (UNIVERSITY OF ROCHESTER), 30 December 2009 (30.12.2009), claims; examples; pages 32, 33 & US 2011/0207663 A1 & EP 2310035 A2

2. JP 2012-502664 A (Wisconsin Alumni Research Foundation), 02 February 2012 (02.02.2012), claims; fig. 4; paragraph [0029] & WO 2010/033925 A2 claims; fig. 4; paragraph [0033] & US 2010/0087004 A1 & EP 2342319 A2

(Invention 1) Parts of the inventions described in claims 1-40, wherein the bFGF alternative is a peptide containing a bFGF heparin-binding region.

In documents 1 and 2, a culture medium for culturing a stem cell or a stem cell proliferation promoter, each of which contains a polypeptide containing the sequence represented by SEQ ID NO: 1, is disclosed (claims, Examples, p.32 and p.33 in document 1; and Claims, Fig. 4 and [0029] in document 2). Therefore, parts of the inventions described in claims 1-40 wherein the bFGF alternative is a peptide containing a bFGF heparin-binding region lack novelty over documents 1 and 2, and therefore have no special technical feature.

Consequently, the above invention is classified into Invention 1.

(Invention 2) Parts of the inventions described in claims 1-40, wherein the bFGF alternative is a bFGF fragment peptide.

The above invention is not considered to have a technical feature which is same as or corresponding to the invention classified into Invention 1, and further, has no relationship such that said invention is substantially same as or equivalent to any invention classified into Invention 1.

Consequently, the above invention cannot be classified into Invention 1.

(Invention 3) Parts of the inventions described in claims 1-40, wherein the bFGF alternative is a FGF receptor-binding peptide.

The above invention is not considered to have a technical feature which is same as or corresponding to the invention classified into Invention 1, and further, has no relationship such that said invention is substantially same as or equivalent to any invention classified into Inventions 1, 2.

Consequently, the above invention cannot be classified into either Invention 1 or 2.

(Invention 4) Parts of the inventions described in claims 1-40, wherein the bFGF alternative is a bFGF-binding protein fragment peptide.

The above invention is not considered to have a technical feature which is same as or corresponding to the invention classified into Invention 1, and further, has no relationship such that said invention is substantially same as or equivalent to any invention classified into Inventions 1-3.

Consequently, the above invention cannot be classified into any one of Inventions 1-3.

(Invention 5) Parts of the inventions described in claims 1-40, wherein the bFGF alternative is a choline esterase inhibitor.

The above invention is not considered to have a technical feature which is same as or corresponding to the invention classified into Invention 1, and further, has no relationship such that said invention is substantially same as or equivalent to any invention classified into Inventions 1-4.

(Continued to next extra sheet)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/083232

Consequently, the above invention cannot be classified into any one of Inventions 1-4.

(Invention 6) Parts of the inventions described in claims 1-40, wherein the bFGF alternative is a phenothiazine derivative.

The above invention is not considered to have a technical feature which is same as or corresponding to the invention classified into Invention 1, and further, has no relationship such that said invention is substantially same as or equivalent to any invention classified into Inventions 1-5.

Consequently, the above invention cannot be classified into any one of Inventions 1-5.

(Invention 7) Parts of the inventions described in claims 1-40, wherein the bFGF alternative is a steroid.

The above invention is not considered to have a technical feature which is same as or corresponding to the invention classified into Invention 1, and further, has no relationship such that said invention is substantially same as or equivalent to any invention classified into Inventions 1-6.

Consequently, the above invention cannot be classified into any one of Inventions 1-6.

(Invention 8) Parts of the inventions described in claims 1-40, wherein the bFGF alternative is an acetylcholine receptor agonist.

The above invention is not considered to have a technical feature which is same as or corresponding to the invention classified into Invention 1, and further, has no relationship such that said invention is substantially same as or equivalent to any invention classified into Inventions 1-7.

Consequently, the above invention cannot be classified into any one of Inventions 1-7.

(Invention 9) Parts of the inventions described in claims 1-40, wherein the bFGF alternative is a prostaglandin receptor agonist.

The above invention is not considered to have a technical feature which is same as or corresponding to the invention classified into Invention 1, and further, has no relationship such that said invention is substantially same as or equivalent to any invention classified into Inventions 1-8.

Consequently, the above invention cannot be classified into any one of Inventions 1-8.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N1/00(2006.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/074(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. C12N1/00, C12N5/0735, C12N5/074

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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/WPIDS (STN), UniProt/GeneSeq

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	WO 2009/158238 A2(UNIVERSITY OF ROCHESTER)2009.12.30, Claims, Examples, p.32,33 & US 2011/0207663 A1 & EP 2310035 A2	1-40
X	JP 2012-502664 A (ウィスコンシン・アルムニ・リサーチ・フ ァウンデーション) 2012.02.02, 特許請求の範囲、図4、[00 29] & WO 2010/033925 A2, Claims, Fig.4, [0033] & US 2010/0087004 A1 & EP 2342319 A2	1-40

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19.01.2017

国際調査報告の発送日

07.02.2017

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)

平林 由利子

4 B

3634

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

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

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

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

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

請求項 1 - 4 0 のうち bFGF 代替物が bFGF ヘパリン結合領域含有ペプチドである発明

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

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

第 III 欄の続き

<文献>

1. WO 2009/158238 A2 (UNIVERSITY OF ROCHESTER) 2009. 12. 30, Claims, Examples, p. 32, 33 & US 2011/0207663 A1 & EP 2310035 A2

2. JP 2012-502664 A (ウィスコンシン・アルムニ・リサーチ・ファウンデーション) 2012. 02. 02, 特許請求の範囲、図 4、[0029] & WO 2010/033925 A2, Claims, Fig. 4, [0033] & US 2010/0087004 A1 & EP 2342319 A2

(発明 1) 請求項 1-40 のうち bFGF 代替物が bFGF ヘパリン結合領域含有ペプチドである発明

文献 1, 2 には配列番号 1 を含有するポリペプチドを含有する、幹細胞培養用培地又は幹細胞増殖促進剤が記載されており (文献 1 の Claims, Examples, p. 32, 33、文献 2 の特許請求の範囲、図 4、[0029])、請求項 1-40 のうち bFGF 代替物が bFGF ヘパリン結合領域含有ペプチドである発明は、文献 1, 2 により新規性が欠如しているため、特別な技術的特徴を有しない。

したがって、標記発明を発明 1 に区分する。

(発明 2) 請求項 1-40 のうち bFGF 代替物が bFGF 断片ペプチドである発明

標記発明は、発明 1 に区分された発明と、同一の又は対応する技術的特徴を有しているとはいえず、また、発明 1 に区分されたいずれの発明に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、標記発明は発明 1 に区分できない。

(発明 3) 請求項 1-40 のうち bFGF 代替物が FGF レセプター結合ペプチドである発明

標記発明は、発明 1 に区分された発明と、同一の又は対応する技術的特徴を有しているとはいえず、また、発明 1, 2 に区分されたいずれの発明に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、標記発明は発明 1, 2 のいずれにも区分できない。

(発明 4) 請求項 1-40 のうち bFGF 代替物が bFGF 結合タンパク断片ペプチドである発明

標記発明は、発明 1 に区分された発明と、同一の又は対応する技術的特徴を有しているとはいえず、また、発明 1-3 に区分されたいずれの発明に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、標記発明は発明 1-3 のいずれにも区分できない。

(発明 5) 請求項 1-40 のうち bFGF 代替物がコリンエステラーゼ阻害剤である発明

標記発明は、発明 1 に区分された発明と、同一の又は対応する技術的特徴を有しているとはいえず、また、発明 1-4 に区分されたいずれの発明に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、標記発明は発明 1-4 のいずれにも区分できない。

(発明 6) 請求項 1-40 のうち bFGF 代替物がフェノチアジン誘導体である発明

標記発明は、発明 1 に区分された発明と、同一の又は対応する技術的特徴を有しているとはいえず、また、発明 1-5 に区分されたいずれの発明に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、標記発明は発明 1-5 のいずれにも区分できない。

(発明 7) 請求項 1-40 のうち bFGF 代替物がステロイドである発明

標記発明は、発明 1 に区分された発明と、同一の又は対応する技術的特徴を有しているとはいえず、また、発明 1-6 に区分されたいずれの発明に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、標記発明は発明 1-6 のいずれにも区分できない。

(発明 8) 請求項 1-40 のうち bFGF 代替物がアセチルコリンレセプターアゴニストである発明
標記発明は、発明 1 に区分された発明と、同一の又は対応する技術的特徴を有しているとはいえず、また、発明 1-7 に区分されたいずれの発明に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、標記発明は発明 1-7 のいずれにも区分できない。

(発明 9) 請求項 1-40 のうち bFGF 代替物がプロスタグランジンレセプターアゴニストである発明
標記発明は、発明 1 に区分された発明と、同一の又は対応する技術的特徴を有しているとはいえず、また、発明 1-8 に区分されたいずれの発明に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、標記発明は発明 1-8 のいずれにも区分できない。