

(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
2016年9月15日(15.09.2016)



(10) 国際公開番号

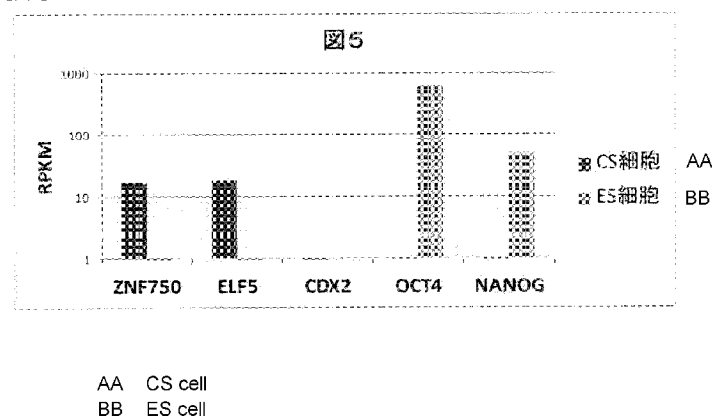
WO 2016/143866 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/074 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/057625
- (22) 国際出願日: 2016年3月10日(10.03.2016)
- (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 2015-047236 2015年3月10日(10.03.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人東北大学(TOHOKU UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 Miyagi (JP).
- (72) 発明者: 岡江 寛明(OKAE, Hiroaki); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 有馬 隆博(ARIMA, Takahiro); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目1番1号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所(SAEGUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜T N Kビル 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, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (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), 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))
— 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))

(54) Title: MAMMALIAN UNDIFFERENTIATED PROGENITOR CELL HAVING CAPABILITY OF BEING DIFFERENTIATED INTO PLACENTA-CONSTITUTING CELL, AND METHOD FOR PRODUCING SAME

(54) 発明の名称: 胎盤を構成する細胞への分化能を有する哺乳動物の未分化前駆細胞及びその製造方法

【図5】



(57) Abstract: The problem to be solved by the present invention is to provide a mammalian undifferentiated progenitor cell having a capability of being differentiated into a placenta-constituting cell, said mammalian undifferentiated progenitor cell being able to be subcultured while maintaining the undifferentiated state thereof. The present invention provides a mammalian undifferentiated progenitor cell having a capability of being differentiated into a placenta-constituting cell, in which both of ZNF750 and ELF5 are positive.

(57) 要約: 本発明が解決すべき課題は、胎盤を構成する細胞への分化能を有する哺乳動物の未分化前駆細胞であって、未分化の状態を維持したまま継代培養することができるものを提供することである。本発明は胎盤を構成する細胞への分化能を有する哺乳動物の未分化前駆細胞であって、ZNF750 及び ELF5 が共に陽性である、細胞を提供する。

WO 2016/143866 A1

明 細 書

発明の名称：

胎盤を構成する細胞への分化能を有する哺乳動物の未分化前駆細胞及びその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、胎盤を構成する細胞への分化能を有する哺乳動物の未分化前駆細胞及びその製造方法に関する。

背景技術

[0002] 胎盤組織は、栄養膜組織（トロホブラスト）が主要な構成成分である。栄養膜細胞における分化制御機構の解明には栄養膜幹細胞（TS細胞）が非常に有益であると考えられる。しかし、そのようなTS細胞は樹立されていない。

[0003] 本発明者らはヒトTS細胞を分離し、これを報告している（非特許文献1）。しかし、ヒトTS細胞を分離（初代培養）することはできたものの、これを継代培養すると胎盤を構成する細胞に分化してしまい、未分化の状態を維持することができなかった。従って、係るTS細胞を株化することができていなかった。分化制御機構の解明等のための試験には、株化したTS細胞が非常に有用であるため、その開発が所望されている。

[0004] また、本発明者ら以外でも胎盤組織中の未分化な細胞の探索と分離は試みられている。非特許文献2では栄養膜細胞へ分化する前駆細胞（TBPC）が記載されている。この中で、胎盤組織中にOct4を発現する細胞の存在が確認されているとともに、胎盤組織から得た細胞懸濁液をFGF2およびSB431542を含む培地で培養することを経て得られたTBPCはOct4およびZ0-1を発現する。しかしながら当該TBPCは8-10回の継代後は分化してしまうと記載されており、この点ではTBPCは未分化状態を維持できる細胞株ということとはできない。トリプシン処理によって継代可能な細胞株が得られることも記載されているが、この処理で得られる細胞は前述のOct4及びZ0-1は発現していないこともまた記載されていることから、この処理で得られる細胞が当該TBPCと同様の細

胞と表現できるかについては議論のある結果と言える。特にZ0-1は上皮系マーカーであるため、胎盤組織中の前駆細胞である細胞性栄養膜細胞（CT細胞）に由来する細胞株の場合は、CT細胞が上皮系細胞であることからZ0-1が発現していると推察されるため、TBPCは上皮系の細胞ではないことが予想される。加えて細胞形態の観点から、例えば非特許文献2の図2に示される通り、上皮系の細胞であれば観察される隣接細胞間の接着が見られないことから、TBPCが非上皮系の細胞に由来するものであることが示唆される。胎盤由来の未分化状態の細胞（幹細胞又は前駆細胞と表現されるものを含む）を記載する文献では、同様に当該細胞がOct4を発現していることをもって特徴づけている（たとえば特許文献1、2）。

[0005] 非特許文献3では、ELF5がヒト胎盤栄養膜細胞で発現し、妊娠初期であるほど高発現であることに注目するとより初期胎盤段階のTS細胞株を得るのに資するとの記載を含む。但し、この文献はTS細胞株取得に向けては、高増殖性で、ELF5およびCDX2が二重陽性のCT細胞を得ることが有望であると記載している。ちなみに、非特許文献2のTBPC細胞は、ELF5は発現していないことが記載されている。

[0006] このようにさまざまなTS細胞株取得の試みはなされているが、候補となる細胞のマーカー発現、その分化を観察した結果等を記載するに留まり、TS細胞株はいまだ樹立されていない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2005-151907

特許文献2：特表2004-529621

非特許文献

[0008] 非特許文献1：有馬ほか（2005）日本産科婦人科学雑誌 57, 755

非特許文献2：Genbacev et al (2011) Stem Cells 29, 1427-1436.

非特許文献3：Hembergr et al (2010) Hum Mol Genet 19, 2456-2467.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明が解決すべき課題は、胎盤を構成する細胞への分化能を有する哺乳動物の未分化前駆細胞であって、未分化の状態を維持したまま継代培養することができるものを提供することである。

課題を解決するための手段

- [0010] かかる状況の下、本発明者らは鋭意研究した結果、哺乳動物の胎盤組織から得た細胞懸濁液に対し所定の処理をすることにより、未分化の状態を維持したまま継代培養することのできる未分化前駆細胞を得ることができることを見出した。そして、本発明者らは、かかる未分化前駆細胞の遺伝子発現を解析したところ遺伝子ZNF750及びELF5が共に陽性であるという、従来の報告されていない特徴を見出したほか、従来報告されているマーカー遺伝子の発現パターンとは一致しない特徴があることも明らかにした。本発明はかかる新規の知見に基づくものである。

- [0011] 従って、本発明は、以下の項を提供する：

項 1. 胎盤を構成する細胞への分化能を有する哺乳動物の未分化前駆細胞であって、ZNF750及びELF5が共に陽性である、細胞。

- [0012] 項 2. CDX2が陰性である、項 1 に記載の細胞。

- [0013] 項 3. Oct4及び／又はNanogが陰性である、項 1 又は 2 に記載の細胞。

- [0014] 項 4. CD49fが陽性である、項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の細胞。

- [0015] 項 5. 霊長類の細胞である、項 1 ～ 4 のいずれか 1 項に記載の細胞。

- [0016] 項 6. 胎盤を構成する細胞が、合胞体栄養膜細胞又は絨毛外栄養膜細胞である、項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の細胞。

- [0017] 項 7. 継代培養後も未分化の状態が維持されている、項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の細胞。

- [0018] 項 8. 以下の工程を含む、胎盤を構成する細胞への分化能を有する哺乳動物の未分化前駆細胞の製造方法：

(1) 哺乳動物の胎盤組織から得た細胞懸濁液から、CD49f抗体陽性細胞を回

収する工程；

(2) 上記工程(1)により得られた細胞懸濁液を、成長因子およびROCK阻害剤を含む培地で培養する工程。

[0019] 項9. 成長因子がEGFであり、かつROCK阻害剤がtrans-N-(4-ピリジル)-4-(1-アミノエチル)-シクロヘキサンカルボキサミド又はその塩である、項8に記載の方法。

[0020] 項10. 上記工程(2)において培地が、さらに4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジル)-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミド又はその塩および6-[[2-[[4-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(4-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-2-ピリミジニル]アミノ]エチル]アミノ]ニコチノニトリルを含む、項8又は9に記載の方法。

[0021] 項11. 項8～10のいずれか1項に記載の方法により得られる、胎盤を構成する細胞への分化能を有する哺乳動物の未分化前駆細胞。

発明の効果

[0022] 本発明にかかる未分化前駆細胞は、未分化の状態を維持したまま継代培養することができ、かつ所定の条件では胎盤を構成する細胞への分化能も示すという特徴を有する。従って、胎盤を構成する細胞における分化制御機構を解明するための試験に非常に有用である。

図面の簡単な説明

[0023] [図1]実施例の、[2]で得られたGS細胞の顕微鏡写真を示す。

[図2]実施例の、[3]で測定した遺伝子発現のグラフを示す。

[図3]実施例の、[4]で分化誘導した細胞の顕微鏡写真を示す。

[図4]実施例の、[5]で測定した遺伝子発現のグラフを示す。

[図5]実施例の、[6]で測定したGS細胞とES細胞との遺伝子発現のグラフを示す。

[図6]ZNF750の塩基配列を示す。

[図7]ELF5の塩基配列を示す。

[図8]CDX2の塩基配列を示す。

[図9]Oct4の塩基配列を示す。

[図10]Nanogの塩基配列を示す。

[図11]CD45の塩基配列を示す。

[図12]CD49fの塩基配列を示す。

[図13]CD49fの塩基配列を示す。

発明を実施するための形態

[0024] 未分化前駆細胞

本発明は、胎盤を構成する細胞への分化能を有する哺乳動物の未分化前駆細胞であって、ZNF750及びELF5が共に陽性である、細胞を提供する。

[0025] 本発明において、「胎盤を構成する細胞」としては、例えば、合胞体栄養膜（ST）細胞、絨毛外栄養膜（EVT）細胞等が挙げられる。本発明の未分化前駆細胞は、胎盤を構成するこれらの細胞への分化能を有する。

[0026] また、本明細書において、CT細胞とは、胎盤組織中の前駆細胞である細胞性栄養膜細胞を意味する。CT細胞は、TS細胞（栄養膜幹細胞）を包含する概念である。また、本明細書において、CS細胞とは、CT細胞から誘導される細胞であって一定条件下での継代培養後も未分化状態が維持されるような細胞を示す。

[0027] 本願明細書において、ある遺伝子が陽性であるとは、当該遺伝子が発現していることを意味する。より具体的には、例えば、本発明において、ある遺伝子のRNAが細胞当たり1コピー以上存在する場合に当該遺伝子を陽性とし、細胞当たり1コピー未満の場合、陰性とすることができる。遺伝子の発現レベルは、常套的方法により測定すればよい。発現レベルの測定方法としては、次世代シーケンサを用いた方法、PCR法（Q-PCR法等）などが挙げられるが、なかでも次世代シーケンサを用いた方法が好適である。例えば、ある遺伝子についてRPKM値（per kilobase of exon per million mapped sequence reads）が1以上の場合に陽性とし、RPKM値が1未満の場合に陰性とすることができる。RPKM値は次世代シーケンサを用いて得ることができる値であり、転写物tのRPKMは下記の式で求めることができる：

$$RPKM = 10^9 \times X_t / (l_t N)$$

[式中、 X_t は転写物 t にマッピングされたショートリードの本数を示す。 l_t は転写物 t の長さ(bp)を示す。 N はマッピングされたショートリードの総数を示す]。

- [0028] 哺乳動物としては、例えば、霊長類、げっ歯類、食肉類、等が挙げられ、好ましくは霊長類である。また、霊長類としては、例えば、ヒト、チンパンジー、アカゲザル、マーモセット等が挙げられ、好ましくはヒトである。本発明の未分化前駆細胞はこれらの哺乳動物の細胞に由来し、好ましくは、胎盤を構成する細胞に由来する。
- [0029] 本発明の未分化前駆細胞は、ZNF750及びELF5の遺伝子発現が陽性であることを特徴とする。ここで、ZNF750としては、GenBankアクセッション番号BC109037で示されるもの（配列番号1）が挙げられる。また、ELF5としては、GenBankアクセッション番号AK075197で示されるもの（配列番号2）が挙げられる。これらの塩基配列を図6及び7に示す。
- [0030] また、本発明の未分化前駆細胞のうち、CDX2の遺伝子発現が陰性であるものが好ましい。ここで、CDX2としては、GenBankアクセッション番号BC014461で示されるもの（配列番号3）が挙げられる。その塩基配列を図8に示す。また本発明者らが従来分離したTS細胞は、CDX2陽性であった。従って、本発明のうち、CDX2遺伝子発現が陰性である未分化前駆細胞は、この点からも従来のものと異なることは明らかであり、またかかる細胞が未分化能を維持することも従来の知見から予想し得ることではない。
- [0031] さらに、本発明の未分化前駆細胞においては、Oct4及びNanogの少なくとも一方が陰性であることが好ましく、これらの両方が陰性であることがより好ましい。Oct4は未分化マーカーとして知られているものであり、GenBankアクセッション番号Z11898で示されるもの（配列番号4）が挙げられる。Nanogも未分化マーカーとして知られており、GenBankアクセッション番号AB093576で示されるもの（配列番号5）が挙げられる。これらの塩基配列を図9及び10に示す。尚、さらに、本発明の未分化前駆細胞においては、CD49fが陽性で

あることが好ましい。また、本発明の未分化前駆細胞は、CD45が陰性であってもよい。CD45としては、GenBankアクセッション番号AY567999で示されるもの（配列番号6）が挙げられる。CD49fとしては、GenBankアクセッション番号AB208842で示されるもの（配列番号7）が挙げられる。これらの塩基配列を図11及び12に示す。

[0032] 本発明の未分化前駆細胞は、継代培養をした後も未分化状態を維持することができるという特徴を有する。本発明の未分化前駆細胞には、少なくとも1回以上（例えば、1～10回、2～5回等、または少なくとも8回以上、少なくとも10回以上等）の継代培養後も未分化状態が維持されているものも包含される。また、本発明の未分化前駆細胞には、継代培養後に未分化状態が維持されるという特徴を有しているものであれば、実際に継代培養を経ていないものも包含される。従って、実際には継代培養を経ていない細胞であって、当該細胞を少なくとも1回以上（例えば、1～10回、2～5回等、または少なくとも8回以上、少なくとも10回以上等）継代培養した場合に、未分化状態が維持されるものも本発明の未分化前駆細胞に含まれ得る。また、本発明の未分化前駆細胞は、例えば、後述する製造方法により得られたものが包含される。

[0033] 未分化前駆細胞の製造方法

本発明は、以下の工程を含む、胎盤を構成する細胞への分化能を有する哺乳動物の未分化前駆細胞の製造方法を提供する：

（1）哺乳動物の胎盤組織から得た細胞懸濁液から、CD49f抗体陽性細胞を回収する工程；

（2）上記工程（1）により得られた細胞懸濁液を、成長因子およびROCK阻害剤を含む培地で培養する工程。

[0034] 哺乳動物の胎盤組織から細胞懸濁液を得る方法は特に限定されず、自体公知の機械的及び／又は酵素的処理を適宜使用することができる。例えば、胎盤組織を細かく刻み、任意選択で生理食塩水等で洗浄したものを、細胞分散液に漬けること等により行うことができる。

- [0035] 細胞分散液としては、蛋白分解酵素液、細胞接着剥離液と呼ばれるものを用いてもよい。また、細胞分散液の具体的な例としては、製品名Accumax、TrypLE等で市販されているものが挙げられる。これらの細胞分散液は1種単独で、又は2種以上を混合して用いることができる。上記細胞分散液に対し、赤血球を除去する工程を施してもよい。赤血球を除去する方法としては、ポリビニルピロリドンでコートされたケイ酸コロイド粒子（Percoll（登録商標）として市販されているもの等）での処理等が挙げられる。
- [0036] 次に、上記細胞懸濁液からCD49f抗体陽性細胞を回収する。CD49f抗体陽性細胞の回収方法としては、自体公知の方法に準じて行うことができる。
- [0037] 本発明においては、CD49f抗体陽性細胞の回収工程の後又は前に、CD45抗体陽性細胞を除去する工程を行ってもよい。としては、CD45抗体陽性細胞の除去も、自体公知の方法に準じて行うことができる。
- [0038] 本発明においては、CD49f抗体陽性細胞の回収工程を経た細胞懸濁液を、成長因子およびROCK阻害剤を含む培地で培養する。当該培養工程により、本発明の細胞の特徴である、経代培養後も未分化状態が維持されるという性質を獲得する。
- [0039] 本工程に用いる培地としては、特に限定されないが、例えば、製品名DMEM、MEM、RPMI 1640等を挙げることができる。当該培地には、血清、成長因子、ピルビン酸塩、アミノ酸、抗生物質等を適宜添加することができる。
- [0040] 培養温度は特に限定されないが、例えば、32～40℃、好ましくは36～38℃の範囲で適宜設定できる。培養時間は特に限定されないが、例えば、12～240時間、好ましくは48～96時間の範囲で適宜設定できる。
- [0041] 成長因子としては、特に限定されないが、例えば、上皮成長因子（EGF）、インスリン、トランスフォーミング成長因子（TGF）等が挙げられる。培地への成長因子の添加量は特に限定されないが、例えば、0.1～1000 ng/ml、好ましくは10～100 ng/mlの範囲で適宜設定できる。
- [0042] またROCK（Rho結合キナーゼ）阻害剤としては、特に限定されないが、例えば、trans-N-(4-ピリジル)-4-(1-アミノエチル)-シクロヘキサンカルボキサ

ミド、1-(5-イソキノリニルスルホニル)ホモピペラジン(1-(5-Isoquinolinylsulfonyl)homopiperazine)またはこれらの塩等が挙げられる。

[0043] trans-N-(4-ピリジル)-4-(1-アミノエチル)-シクロヘキサンカルボキサミド又はその塩の市販品としては、和光純薬より商品名Y27632として販売されている(R)-(+)-trans-N-(4-ピリジル)-4-(1-アミノエチル)-シクロヘキサンカルボキサミド((R)-(+)-trans-N-(4-pyridyl)-4-(1-aminoethyl)-cyclohexanecarboxamide)の二塩酸塩((R)-(+)-trans-N-(4-pyridyl)-4-(1-aminoethyl)-cyclohexanecarboxamide · 2HCl · H₂O)等が挙げられる。培地へのROCK阻害剤の添加量は特に限定されないが、例えば、0.1~50 μM、好ましくは1~10 μMの範囲で適宜設定できる。

[0044] また、上記培養工程において、培地に、さらに4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジル)-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミド又はその塩、および／又は6-[[2-[[4-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(4-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-2-ピリミジニル]アミノ]エチル]アミノ]ニコチノニトリルを添加してもよい。

4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジル)-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミド又はその塩の市販品としては、商品名SB431542として販売されているもの等があげられる。また、6-[[2-[[4-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(4-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-2-ピリミジニル]アミノ]エチル]アミノ]ニコチノニトリルの市販品としては、商品名CHIR99021として販売されているもの等が挙げられる。

実施例

[0045] 実施例

[1] ヒト胎盤からのCT細胞の単離

まず下記試薬及び手法によりヒト胎盤からCT細胞を単離した：

[試薬類]

- ・Accumax (Innovative cell technology, 製品番号：AM105)
- ・TrypLE (Life technology, 製品番号：12605036)

- ・ DMEM (Life technology, 製品番号 : 11995-065)
- ・ 血清 (Life technology, 製品番号 : 16141-079)
- ・ PBS (Wako, 製品番号 : 166-23555)
- ・ 抗CD49f-PE抗体 (MACS, 製品番号 : 130-100-096)
- ・ PE Selection Kit (EasySep, 製品番号 : ST-18551)
- ・ 細胞分離用磁石 (EasySep, 製品番号 : ST-18000)
- ・ 細胞分散液 : AccumaxとTrypLEを1 : 1で混合
- ・ 中和液 : 10%ウシ血清を含むDMEM
- ・ PBS-EDTA : 1 mM EDTAおよび2%ウシ血清を含むPBS

[0046] [手法]

1. ヒト胎盤 (5~15週) を細かく刻み、生理食塩水で2-3回洗う
2. 細胞分散液20 mlを添加する
3. 37℃で20分間振とうする
4. 中和液5 mlを加える
5. 400 gで3分遠心し、上清を除去する
6. 中和液5 mlを加え、ピペットで分散させる
7. 70 μ mフィルターを通し、分散した細胞を回収する
8. 3-7の操作を2回 (計3回) 繰り返す
9. 回収した細胞を1本のチューブにまとめ、400 gで3分遠心し、上清を除去する
10. PBS-EDTAを1 x 10⁸細胞/mlとなるように加える
11. 抗CD49f-PE抗体を1 x 10⁸細胞につき100 μ l加える
12. PE selection cocktailを1 x 10⁸細胞につき100 μ l加える
13. Magnetic particleを1 x 10⁸細胞につき50 μ l加える
14. PBS-EDTAを加えて液量を5 mlとする
15. 細胞分離用磁石を用い、細胞を回収する
16. 14-15の操作を2回 (計3回) 繰り返す
17. CD49f陽性細胞 (純度90-95%) が10⁶-10⁷細胞得られる。

上記手法により得られたCD49f陽性細胞を以下の実施例においてCT細胞と示す。
。

[0047] [2] CS細胞株の樹立・培養方法

上記 [1] で得られたCT細胞を用い、下記の試薬及び手法によってCS細胞株を樹立、培養した：

 [試薬類]

- ・ DMEM (Life technology, 製品番号：11995-065)
- ・ 血清 (Life technology, 製品番号：16141-079)
- ・ NEAA (Life technology, 製品番号：11140-050)
- ・ Sodium pyruvate (Life technology, 製品番号：11360-070)
- ・ 2-Mercaptoethanol (Life technology, 製品番号：21985-023)
- ・ PBS (Wako, 製品番号：166-23555)
- ・ TrypLE (Life technology, 製品番号：12605036)
- ・ EGF (Wako, 製品番号：053-07871)
- ・ Y27632 (Wako, 製品番号：253-00513)
- ・ CHIR99021 (Wako, 製品番号：039-20831)
- ・ SB435142 (Wako, 製品番号：194-15521)
- ・ 35 mmディッシュ (Nunc, 製品番号：153066) 。

[0048] [増殖培地の作製]

1. 以下を混合し、基礎培地を作製する (1 L用)

DMEM	800 ml
血清	200 ml
NEAA	10 ml
Sodium pyruvate	10 ml
2-Mercaptoethanol	1.8 ml

2. 使用直前に、EGF (終濃度：100 ng/ml)、Y27632 (終濃度：5 μ M)、SB431542 (終濃度：5 μ M)、CHIR99021 (終濃度：3 μ M) を基礎培地に加え、増殖培地として使用する。

[0049] [手法]

1. 単離したCT細胞に、増殖培地を 5×10^5 細胞/mlとなるように加える
2. 35 mmディッシュに細胞懸濁液2 mlを加え、インキュベーター（37℃, 5 % CO₂）で培養する
3. 2日毎に培地交換を行い、細胞が70～80% コンフルエントになるまで培養する
4. プレートでPBSで洗い、1 mlのTrypLEを加えて、37℃で10分静置する
5. 増殖培地5 mlを加える
6. 400 gで3分遠心し、上清を除去する
7. 増殖培地6 mlを加え（3倍希釈）、ピペティングにより細胞を分散させる
8. 35 mmディッシュに細胞懸濁液を2 mlずつ加え、培養を続ける。

[0050] 上記で得られたCS細胞を11代、55日間継代培養した細胞の顕微鏡写真（顕微鏡（KEYENCE, 製品番号：BZ-X710））を図1に示す。[4]で後述する多核化した分化細胞であるST細胞とは形態が全く異なることが分かる。

[0051] [3] 遺伝子発現のリアルタイムPCR測定

前記[1]で単離したCT細胞、上記[2]に記載の方法で得、継代培養したCS細胞及び前記[1]に記載の方法においてCT単離に使用したヒト胎盤（8週）について、ELF5、HLA-G及びCGBの発現量を下記に記載の試薬、機器を用い、下記方法に従いリアルタイムPCRにより測定した。

[試薬・機器類]

- ・PrimeScript™II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara, 製品番号：6210A)
- ・サーマルサイクラー TProfessional (BM機器, 製品番号：070-000)
- ・SYBR(R) Premix Ex Taq™ II (Takara, 製品番号：RR820S)
- ・StepOnePlus™リアルタイムPCRシステム (Life technology, 製品番号：StepOnePlus-01)
- ・プライマー（下表）

[0052] [表1]

遺伝子	プライマー配列 (Forward)	プライマー配列 (Reverse)
ELF5	ACCACTCAGCAAAACTTCCACA (配列番号8)	AGGGGGAATAAACTCAGCAACA (配列番号9)
HLA-G	CCACCACCCTGTCTTTGACTAT (配列番号10)	ACGTCCTGGGTCTGGTCCT (配列番号11)
CGB	CAGCATCCTATCACCTCCTGGT (配列番号12)	CTGGAACATCTCCATCCTTGGT (配列番号13)

[0053] [方法]

1. RNeasy mini kitを用いて、細胞よりRNAを抽出・精製する

2. アニーリング反応液を以下のように調製する

Oligo dT (50 μ M)	0.5 μ l
dNTPs (10 mM)	0.5 μ l
精製RNA (1 μ g/ml)	1 μ l
H ₂ O	3 μ l

3. サーマルサイクラーを用い、65°Cで5分アニーリング反応を行う

4. 上記液に以下を加える

5 × PrimeScript™ Buffer	2 μ l
PrimeScript™ Reverse Transcriptase	1 μ l
RNase Inhibitor	0.5 μ l
H ₂ O	1.5 μ l

5. サーマルサイクラーを用い[42°C 60分 → 95°C 5分]で逆転写反応を行う

6. リアルタイムPCR用の反応液を以下のように調製する

逆転写反応液 (10倍希釈)	2 μ l
SYBR(R) Premix Ex Taq II	10 μ l
Forwardプライマー (10 μ M)	1 μ l
Reverseプライマー (10 μ M)	1 μ l
H ₂ O	6 μ l

7. リアルタイムPCRシステムを用いて以下の反応を行う

(1) [95°C 30秒]

(2) [95℃ 5秒 → 62℃ 30秒]を40サイクル。

[0054] 結果を図2に示す。図2から明らかなように、上記[2]で得られたCS細胞株は、HLA-G及びCGBといった分化マーカーが発現していないことを含め、CT細胞と同様のマーカー発現プロファイルを示した。このことはCS細胞株がCT細胞の特徴および機能を維持したまま株化できていることを示している。また、図1の写真からも明らかなように、CS細胞株は継代培養を繰り返した後も未分化の状態が維持されており、上皮系由来である場合に観察される隣接細胞間の接着も観察された。

[0055] [4] CT細胞株の分化誘導方法

[2]で得られたCS細胞に対し、以下の試薬及び方法により、分化誘導を行った：

[試薬類]

- ・DMEM (Life technology, 製品番号：11995-065)
- ・血清 (Life technology, 製品番号：16141-079)
- ・NEAA (Life technology, 製品番号：11140-050)
- ・Sodium pyruvate (Life technology, 製品番号：11360-070)
- ・2-Mercaptoethanol (Life technology, 製品番号：21985-023)
- ・Y27632 (Wako, 製品番号：253-00513)
- ・Forskolin (Wako, 製品番号：067-02191)
- ・35 mmディッシュ (Nunc, 製品番号：153066)。

[0056] [分化培地の作製]

1. 以下を混合し、基礎培地を作製する(1 L用)。

[0057]	DMEM	800 ml
	血清	200 ml
	NEAA	10 ml
	Sodium pyruvate	10 ml
	2-Mercaptoethanol	1.8 ml

2. EVT分化誘導には、使用直前にY27632(終濃度：5 μ M)を基礎培地に加え

、EVT分化培地として使用する

3. ST分化誘導には、使用直前にY27632（終濃度：5 μ M）およびForskolin（終濃度：1 μ M）を基礎培地に加え、ST分化培地として使用する。

[0058] [手法]

1. 増殖培地で培養しているCT細胞より、培地を吸引除去する
2. プレートにPBSで洗う
3. 分化培地2 mlを加え、5日間培養する。

[0059] 分化誘導した細胞の顕微鏡写真（顕微鏡（KEYENCE，製品番号：BZ-X710））を図3に示す。図3から明らかなように、[2]で得られたCS細胞は、STへの分化能も、EVTへの分化能も有している。

[0060] [5] CS細胞の未分化維持と分化能

前記[3]でリアルタイムPCR測定したCS細胞、前記[2]で得られたヒトCS細胞を[4]でY27632及びForskolinの存在下で培養したもの（分化（ST））、前記[2]で得られたヒトCS細胞を[4]でY27632の存在下で培養したもの（分化（EVT））、及び前記[1]記載の方法においてCT単離に使用したヒト胎盤（8週）について、ELF5、HLA-G及びCGBの発現量をリアルタイムPCRにより測定した。測定方法は、前記[3]に記載の方法に準じて行った。結果を図4に示す。

[0061] 図4から明らかなように、CS細胞はHLA-G及びCGBといった分化マーカーが発現していないのに対し、分化（ST）は、分化マーカーであるCGBが発現しており、分化（EVT）は、分化マーカーであるHLA-Gが発現している。従って、遺伝子発現の点からも、[2]で得られたCS細胞が分化能を有していることが分かる。

[6] CS細胞とES細胞の発現比較

前記[2]で得られたCS細胞及びES細胞（H1株）について、下記試薬、機器及び方法で遺伝子の発現解析を行いRPKM値を算出した：

遺伝子の発現解析方法

[試薬・機器類]

- ・ RNeasy mini kit (Qiagen, 製品番号 : 74104)
- ・ TruSeq RNA Sample Prep Kit (Illumina, 製品番号 : RS-122-2001)
- ・ 次世代シーケンサー (IlluminaのHiSeq2500を使用)
- ・ 次世代シーケンサー解析ソフト Strand NGS (Digital Biology)。

[0062] [手法]

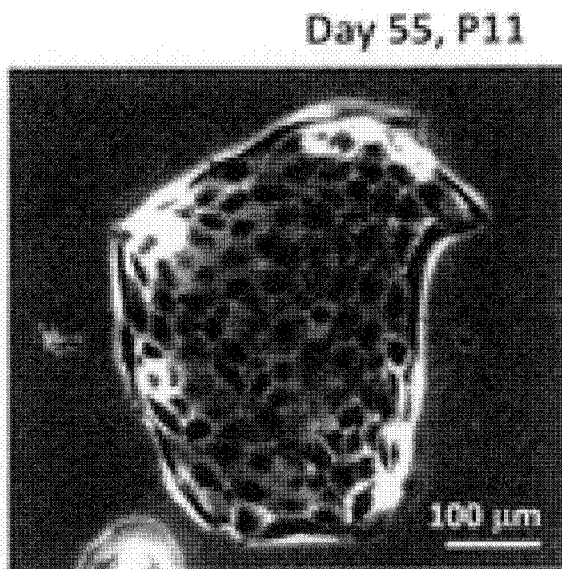
1. RNeasy mini kitを用いて、細胞よりRNAを抽出・精製する
2. TruSeq RNA Sample Prep Kitを用い次世代シーケンサー用ライブラリーを作製する
3. 次世代シーケンサーを用い、シーケンス解析を行う
4. 次世代シーケンサー解析ソフト Strand NGSを用い、遺伝子の発現量 (RPKM値 : Reads per million mapped reads) を計算する。

[0063] 結果を図5に示す。図5から明らかなように、CS細胞は、ZNF750及びELF5が共に陽性である。ES細胞とも異なる細胞であることも明らか（互いに区別できる）となった。また、本発明の細胞はELF5が高発現である一方でCDX2はほとんど発現していないこと、また多くの文献で記載されてきたOct4の発現については驚くべきことにほとんど発現していないこと、という従来報告されてきた細胞とは異なる独自の特徴があることが明らかになった。

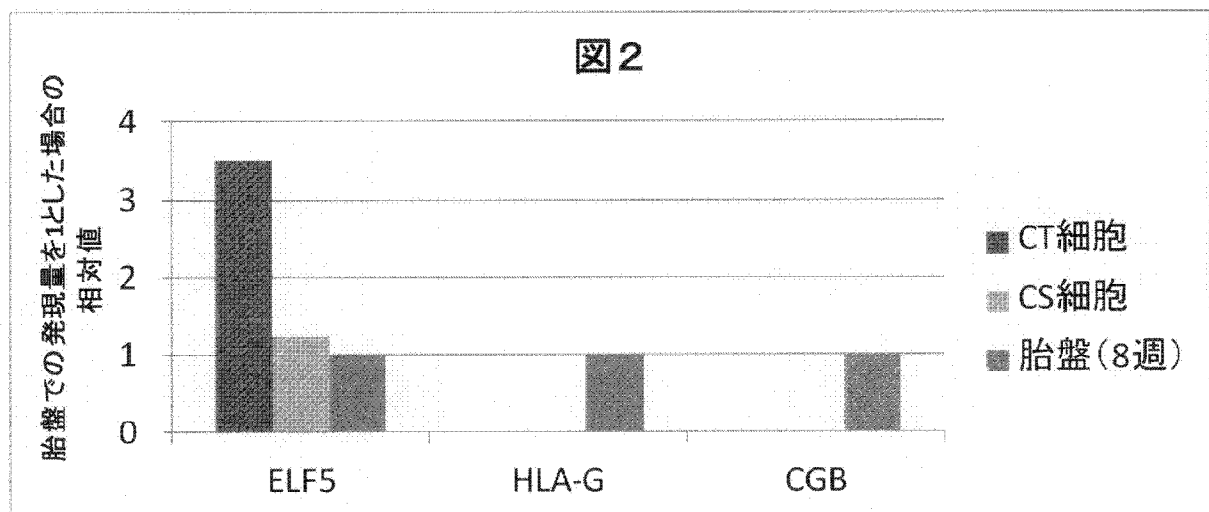
請求の範囲

- [請求項1] 胎盤を構成する細胞への分化能を有する哺乳動物の未分化前駆細胞であって、ZNF750及びELF5が共に陽性である、細胞。
- [請求項2] CDX2が陰性である、請求項1に記載の細胞。
- [請求項3] Oct4及び／又はNanogが陰性である、請求項1又は2に記載の細胞。
- [請求項4] CD49fが陽性である、請求項1～3のいずれか1項に記載の細胞。
- [請求項5] 霊長類の細胞である、請求項1～4のいずれか1項に記載の細胞。
- [請求項6] 胎盤を構成する細胞が、合胞体栄養膜細胞又は絨毛外栄養膜細胞である、請求項1～5のいずれか1項に記載の細胞。
- [請求項7] 継代培養後も未分化の状態が維持されている、請求項1～6のいずれか1項に記載の細胞。
- [請求項8] 以下の工程を含む、胎盤を構成する細胞への分化能を有する哺乳動物の未分化前駆細胞の製造方法：
（1）哺乳動物の胎盤組織から得た細胞懸濁液から、CD49f抗体陽性細胞を回収する工程；
（2）上記工程（1）により得られた細胞懸濁液を、成長因子およびROCK阻害剤を含む培地で培養する工程。
- [請求項9] 成長因子がEGFであり、かつROCK阻害剤がtrans-N-(4-ピリジル)-4-(1-アミノエチル)-シクロヘキサンカルボキサミド又はその塩である、請求項8に記載の方法。
- [請求項10] 上記工程（2）において培地が、さらに4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)-5-(2-ピリジル)-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミド又はその塩および6-[[2-[[4-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(4-メチル-1H-イミダゾール-2-イル)-2-ピリミジニル]アミノ]エチル]アミノ]ニコチノニトリルを含む、請求項8又は9に記載の方法。
- [請求項11] 請求項8～10のいずれか1項に記載の方法により得られる、胎盤を構成する細胞への分化能を有する哺乳動物の未分化前駆細胞。

[図1]

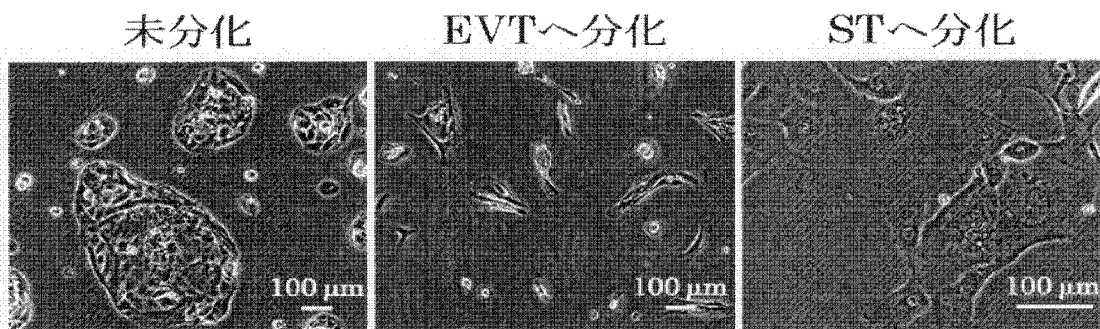


[図2]

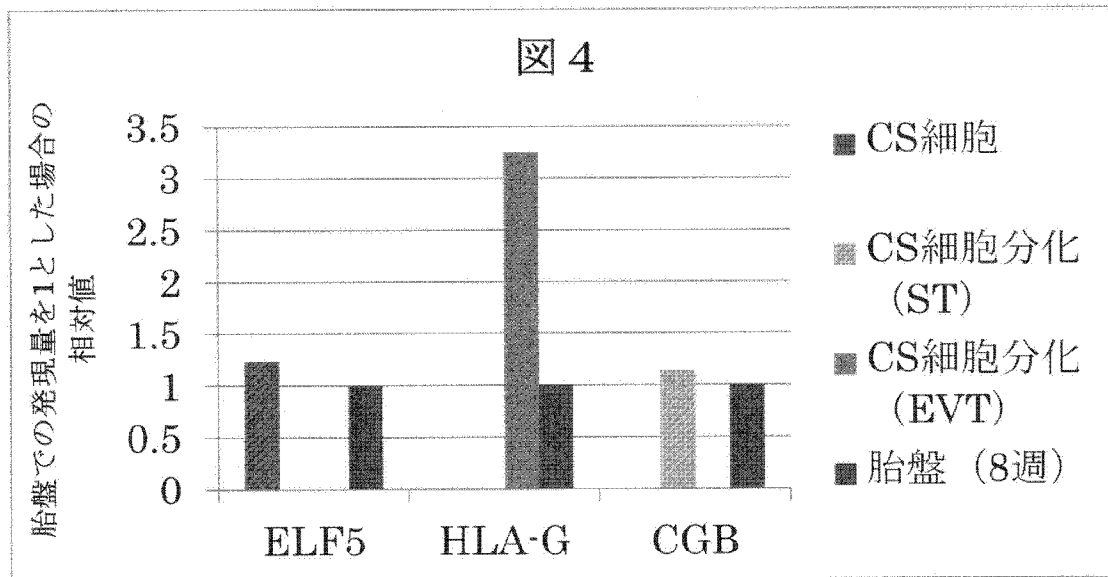


[図3]

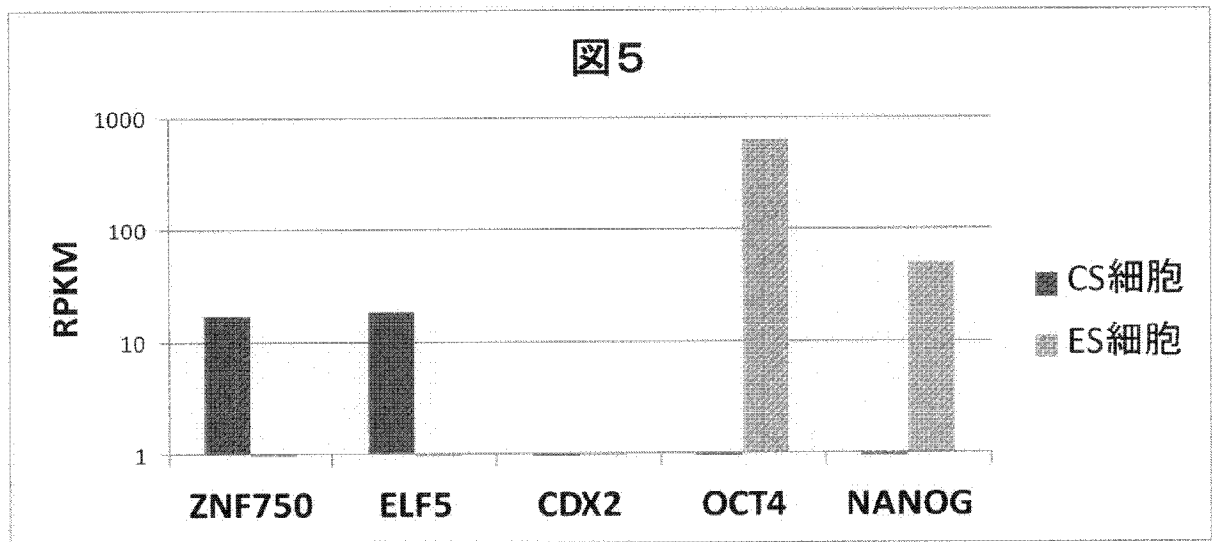
CT細胞株の形態



[図4]



[図5]



[図6]

ZNF750 塩基配列

```

1  ccagcaagcg tgagaacagg tactgcttcc tgagcaccgc cagccaccgg caccaagacc
61  ggccacatcc cagcactgcc caccctctgt cccagccgcc agatgacgga ggctctcgcc
121 agaccctcag cagcagagc tggcttctga tagaagtgtc cgggaaagaa agcaaagcgg
181 gaggtgcctc tttagaaacc acgaagtgcg cgcggcgtcg acagtgatca cgccacctgg
241 acagccagag tccaaggcat aaggaggaaa atgagtctcc tcaaagagcg gaagccaaaa
301 aagccacatt acatccccag gcctccagga aagcccttca agtataaatg tttccaatgt
361 cccctttactt gcaatgagaa gtcacatctt tttaatcaca tgaagtatgg tctttgtaaa
421 aactcgatta ctttagtatc agagcaggat cgagttccca agtgccctaa atctaactca
481 ctagacccca agcaaaccaa ccagcccgat gccacggcga agccagcctc ttccaagtct
541 gtcgcaaatg gactctctgc ctgcactcgc aagcttcagc acagctctgc cagggaagac
601 atcaaggaaa acctggagct gcaagcccgg ggaaccacac ggtgcctggg acagaagcca
661 gccctccaca gggcatcacc ctgcaagagc ccagctccgg aagccgccct cggtgcccag
721 cctgctctgg aaggcgcagc tcggccttct gcatttggtc cagtcggcga gcacagactc
781 aaggggcccag acaacgccga ggccgccgag acactggctt tacacaaccc cactgccaag
841 gccgtgtctt tccacaccaa gtcggccttc cacactcctg gctacccctg gaaagccggc
901 tcacctttcc ttccaccaga gtttccacat aaaatctcat ctacaaaggg gcttggggcc
961 atttccccctt acatgcaccc cacaatccca gagtaccgcg ctactttta cacagagcac
1021 gggctggcca ccatctactc gccttacctg ctggctggga gctgcctga gtgtgacgca
1081 cccctgtctg cagtctacgg aacccaagac ccgagacact tctgcctca cccggggccg
1141 atccctaagc acctggctcc atctccagcc acatacgatc actacaggtt tttccagcaa
1201 tatccctota acctgccgat tccttacgga ttttacaggc cagagtctgc attttctcc
1261 tatggtctca gactcccacc tgtaactggc ctaccccgag atcagagctc tcacctgctt
1321 gaagaagcca ccctggtcta tccagcctcg agtcttcca ggttaaacc ttcggacccc
1381 aacagaaaac acgtcgagtt cgaaggtcca attcctgagg ctaaagactc ctccaaggct
1441 gggcagagag acacggaagg gtccaaaatg agcccccgcg caggagtgcc agccacgggc
1501 tccccaggga ggccgagccc caccgacttc atgcagacga gccagacctg cgaaggcctg
1561 tacgacctct ccaacaaggc agcctccagc gcaactggga gactctaccc gccagagcaa
1621 agcctcacag ccttcaggcc tgtaagaaa agcacagaat gcctacctgc ccaggctgct
1681 gagaccacag cagagtctcc agtaagctc aatgttgtga acggagacct tctgtctccg
1741 accggaagcg cctctctcgt ctccggaggc gcgccttcca gtccggacga cagctccggg
1801 atgggcccc tcaacctctc caagaaatca gagataaacc tggcagccac ccacgaacct
1861 acgtaccaag gcagccccc ggcggaaaacc gccagcttct cagagctgca ggaccttcca
1921 ctcaatctct cgggtgaagga cccctgtaac acccaggctc cgaggcccg cttccccggt
1981 cgaccacgag ctgcggaacc tgctgtctgt gttccacaga agactgggac agaaggttct
2041 gaggatgggc ccagccaccc tgagaccaag ccaggcagcc tcgacggtga cggggcccca
2101 cccacaggcc ccggcgagga ggctccagac gcatgcgcgg tggacagcag cgaggagcag
2161 aagcagacgg cagccgtggc cctgtgccag ctggcggcct acagccccag gaacatccgg
2221 gtgggcatg gggatgctgc ggccccggaa cctgcctgcc ggcaagacac acccacactg
2281 agctccatgg agagccaaga ggcccagtgt gacctcagac ccaaaggaca aaagaggaca
2341 agtctaaggg atgctggaaa atcccagcaa ggagctaaga aggcgaagct gcaggacacg
2401 gccagagtgt tcacactacg aaggaggggc cgggtgtcct aacgccgggt tcacacgtgt
2461 gttcacagag ctacggccac acacacgcct tccaaggtgg caagctacaa cacctctgaa
2521 ctggcacttt cacattttta caaatgcagc tgctgttct caaaaaaca aacaaacaaa
2581 caaacaacaaa accctccaat tcagttttta taaatattaa gcatgaatat taaaaggtgc
2641 ttctactttt ggttgtaaaa acacctgaat gactctaaga ctgatatgta ttttcaagtc
2701 taagctgtct tacagaagat cttttataaa tgtttcctta taaatatctc accattacaa
2761 caaatgtgtt taactgtttt totattagct ctagctgcat atttgatgta aatgacaatt
2821 actgaaaaaa tgcagaaaaa aacattttca gtactaacat taaagtgcc tttgtaaaaa
2881 agaaaaatgt gatttgtata actaaataac acacaaacat caagaggcta tttatacaaa
2941 taatttattt ccactaggga aagtgcatta ctggtgaagg tattatcaat ttattctact
3001 tgcttataat gttacagtga atgttctggc ttactctgcc tcactttcca ttcccc

```

[図7]

ELF5 塩基配列

```

1  actgcacgct ggtgctggga ggcctgcct tctcttgcct tgaaagcctc ctctttggac
61  ctagccaccg ctgccctcac ggtaatgttg gactcgggtga cacacagcac cttcctgcct
121 aatgcatcct tctgcgatcc cctgatgtcg tggactgato tgttcagcaa tgaagagtac
181 taccctgcct ttgagcatca gacagcctgt gactcatact ggacatcagt ccaccctgaa
241 tactggacta agcgccatgt gtgggagtggt cctcagttct gctgcgacca gtacaagttg
301 gacaccaatt gcatctcctt ctgcaacttc aacatcagtg gcctgcagct gtgcagcatg
361 acacaggagg agttcgtcga ggcagctggc cctctcggcg agtacctgta cttcatcctc
421 cagaacatcc gcacacaagg ttactccttt tttaatgacg ctgaagaaag caaggccacc
481 atcaaagact atgctgattc caactgcctt aaaacaagtg gcatcaaaag tcaagactgt
541 cacagtcata gtagaacaag cctccaaagt tctcatctat gggaatttgt acgagacctg
601 cttctatctc ctgaagaaaa ctgtggcatt ctggaatggg aagataggga acaaggaatt
661 tttcgggtgg ttaaactcga agccctggca aagatgtggg gacaaaggaa gaaaaatgac
721 agaatgacat atgaaaagtt gagcagagcc ctgagatact actataaaac aggaattttg
781 gagcgggttg accgaaggtt agtgtacaaa tttggaaaaa atgcacacgg gtggcaggaa
841 gacaagctat gatctgctcc aggcatacag ctcattttat ggattttctgt cttttaaaac
901 aatcagattg caatagacat tcgaaaggct tcattttctt ctcttttttt ttaacctgca
961 aacatgctga taaaatttct ccacatctca gcttacattt ggattcagag ttgttgtcta
1021 cggagggtga gagcagaaac tcttaagaaa tcctttcttc tccctaaggg gatgagggga
1081 tgatcttttg tgggtgtctt atcaaacttt attttcctag agttgtggaa tgacaacagc
1141 ccatgccatt gatgctgac agagaaaaac tattcaattc tgccattaga gacacatcca
1201 atgctcccat cccaaaggtt caaaagtttt caaataactg tggcagctca ccaaagggtg
1261 gggaaagcat gattagtttg caggttatgg taggagaggg tgagatataa gacatacata
1321 ctttagattt taaattatta aagtcaaaaa tccatagaaa agtatccctt tttttttttt
1381 tgagacgggt tctcactatg ttgccagggt ctggtcttga actcctatgc tcaagtgatc
1441 ctcccacctc ggccctccaa agtactgtga ttacaagcgt gagccacggc acctgggcag
1501 aaaagtatct taattaatga aagagctaag ccatcaagct gggacttaat tggatttaac
1561 ataggttcac agaaagtttc ctaaccagag catctttttg accactcagc aaaacttcca
1621 cagacatcct tctggactta aacacttaac attaaccaca ttattaattg ttgctgagtt
1681 tattccccct tctaactgat ggctggcatc tgatatgcag agttagtcaa cagacactgg
1741 catcaattac aaaatcactg ctgtttctgt gattcaagct gtcaacacaa taaaatcgaa
1801 attcattgat tccatctctg gtccagatgt taaacgttta taaaaccgga aatgtcctaa
1861 caactctgta atggcaaatt aaattgtgtg tcttttttgt tttgtcttct tacctgatgt
1921 gtattcaagt gctataacac gtatttctt gacaaaaata gtgacagtga attcacacta
1981 ataaatgttc ataggttaaa gtctgcactg acattttctc atcaatcact ggtatgtaag
2041 ttatcagtga ctgacagcta ggtggactgc ccctaggact tctgtttcac cagagcagga
2101 atcaagtggg gaggcactga atcgtgttac aggcgtgaaga cctccttatt agagttgaac
2161 ttcaaagtaa cttgttttaa aaaatgtgaa ttactgtaaa ataatctatt ttggattcat
2221 gtgttttcca ggtggatata gtttgtaaac aatgtgaata aagtatttaa catgttc

```

[図8]

CDX2 塩基配列

```

1  gggaccgcct cggaggcaga agagccgcga ggagccagcg gagcaccgcg ggctggggcg
61  cagccacccg ccgctcctcg agtccctcgc cccctttccc ttcgtgcccc ccggcagcct
121 ccagcgctcg tccccaggca gcatgggtgag gtctgctccc ggaccctcgc caccatgtac
181 gtgagctacc tcctggacaa ggacgtgagc atgtacccta gctccgtgcg ccactctggc
241 ggctcaacc tggcgccgca gaacttcgtc agccccccgc agtaccggga ctacggcggt
301 taccacgtgg cggccgcagc tgcagcggca gcgaacttgg acagcgcgca gtccccgggg
361 ccatcctggc cggcagcgta tggcgcccca ctccgggagg actggaatgg ctacgcgccc
421 ggaggcgccg cggccgcgcg caacgcctgt gctcacggcc tcaacggtgg ctccccggcc
481 gcagccatgg gctacagcag ccccgagac taccatccgc accaccacc gcataccac
541 ccgcaccacc cggccgcgcg gccttcctgc gcttctgggc tgcgcaaac gctcaacccc
601 ggccctcctg ggcccgccgc caccgctgcc gccgagcagc tgtctcccg cggccagcgg
661 cggaacctgt gcgagtggat gcggaagccg gcgcagcagt cctcggcag ccaagtgaag
721 accaggacga aagacaaata tcgagtgggtg tacacggacc accagcggct ggagctggag
781 aaggagtttc actacagtcg ctacatcacc atccggagga aagccgagct agccgccacg
841 ctggggctct ctgagaggca ggtaaaaatc tggtttcaga accgcagagc aaaggagagg
901 aaaatcaaca agaagaagtt gcagcagcaa cagcagcagc agccaccaca gccgcctccg
961 ccgccaccac agcctcccca gcctcagcca ggtcctctga gaagtgtccc agagcccttg
1021 agtccggtgt ctccctgca agcctcagtg tctggctctg tccctgggggt tctggggcca
1081 actggggggg tgctaaaccc caccgtcacc cagtgaccca ccgggggtctg cagcggcaga
1141 gcaattccag gctgagccat gaggagcgtg gactctgcta gactcctcag gagagacccc
1201 tccctcccca cccacagcca tagacctaca gacctggctc tcagaggaaa aatgggagcc
1261 aggagtaaga caagtgggat ttggggcctc aagaaatata ctctcccaga tttttacttt
1321 ttcccatctg gctttttctg ccactgagga gacagaaaagc ctccgctggg ctctattccg
1381 gactggcaga agcattgcct ggactgacca caccaaccag gccttcattc tcctccccag
1441 ctcttctctt cctagatctg caggctacac ctctggctag agccgagggg agagagggac
1501 tcaagggaaa ggcaagcttg aggccaagat ggctgctgcc tgcctatggc cctcggaggt
1561 ccagctgggc ctctgcctc cgggcaggca aggtttacac tgcggaagcc aaaggcagct
1621 aagatagaaa gctggactga ccaaagactg cagaaccccc aggtggcctg cgtctttttt
1681 ctcttccctt cccagaccag gaaaggcttg gctgggtgtat gcacaggggtg tggatatgagg
1741 ggggtggttat tggactccag gcctgaccag ggggcccga cagggacttg tttagagagc
1801 ctgtcaccag agcttctctg ggctgaatgt atgtcagtcg tataaatgcc agagccaacc
1861 tggacttctt gtcattttca caatcttggg gctgatgaag aagggggtgg ggggagtttg
1921 tgttggtgtt gctgctgttt gggttgttgg tctgtgtaac atccaagcca gagtttttaa
1981 agccttcttg atccatgggg ggagaagtga tatggtgaag ggaagtgggg agtatttgaa
2041 cacagttgaa ttttttctaa aaagaaaaag agataaatga gctttccaga aaaaaaaaaa
2101 aaaaaaaa

```

[図9]

Oct4 塩基配列

```

1  ctcatTTTcaC  caggccccCG  gctTggggCG  cctTcctTcc  ccatggcggg  acacctggct
61  tcggattTcg  cctTctcgcc  cctccaggt  ggtggaggTg  atgggccagg  ggggccggag
121 ccgggctggg  ttgatcctcg  gacctggcta  agcttccaag  gccctcctgg  agggccagga
181 atcgggccgg  gggTtgggCC  aggctctgag  gtgtggggga  Tcccccatg  cccccgccg
241 tatgagttct  gtggggggat  ggcgtactgt  gggccccagg  ttggagtggg  gctagtgcCC
301 caaggcggct  tggagacctc  tcagcctgag  ggcgaagcag  gagtcggggT  ggagagcaac
361 tccgatgggg  cctccccgga  gccctgcacc  gtcacccctg  gtgccgtgaa  gctggagaag
421 gagaagctgg  agcaaaacCC  ggaggagtcc  caggacatca  aagctctgca  gaaagaactc
481 gagcaatttg  ccaagctcct  gaagcagaag  aggatcaccC  tgggatatac  acaggccgat
541 gtggggctca  cctTgggggt  tctattTggg  aaggTattca  gccaaacgac  catctgccgc
601 tttgaggctc  tgcagcttag  cttcaagaac  atgtgtaagc  Tcgggccctt  gctgcagaag
661 tgggtggagg  aagctgacaa  caatgaaaat  cttcaggaga  tatgcaaagc  agaaaccctc
721 gtgcaggccc  gaaagagaaa  gcgaaccagt  atcgagaacc  gagtgagagg  caacctggag
781 aatttgTtcc  tgcagtgcCC  gaaaccCaca  ctgcagcaga  tcagccacat  cggccagcag
841 ctTgggctcg  agaaggatgt  ggtccgagtG  tggTtctgta  accggcgcca  gaagggcaag
901 cgatcaagca  gcgactatgc  acaacgagag  gatTttgagg  ctgctgggtc  tcctttctca
961 gggggaccag  tgtcctTtcc  tctggcccca  gggcccccatt  ttggtacccc  aggctatggg
1021 agccctcact  tcactgcact  gtactcctcg  gtccctTtcc  ctgaggggga  agcctttccc
1081 cctgtctctg  tcaccactct  gggctctccc  atgcattcaa  actgaggTgc  ctgcccttct
1141 aggaatgggg  gacaggggga  ggggaggagc  tagggaaaaga  aaacctggag  tttgtgccag
1201 ggTttttgga  ttaagTtctt  cattcactaa  ggaagggaatt  gggaacacaa  agggTggggg
1261 caggggagTt  tggggcaact  ggtTggaggG  aaggTgaagt  tcaatgatgc  tcttgatttt
1321 aatcccacat  catgtatcac  ttttttctta  aataaagaag  ctTgggacac  a

```

[図10]

Nanog 塩基配列

```

1 attataaatc tagagactcc aggattttaa cgttctgctg gactgagctg gttgcctcat
61 gttattatgc aggcaactca ctttatccca atttcttgat acttttcctt ctggaggtcc
121 tatttctcta acatcttcca gaaaagtctt aaagctgcct taaccttttt tccagtccac
181 ctcttaaat ttttcctcct ctctctctat actaacatga gtgtggatcc agcttgtccc
241 caaagcttgc cttgctttga agcatccgac tgtaaagaat cttcacctat gcctgtgatt
301 tgtgggcctg aagaaaacta tccatccttg caaatgtctt ctgctgagat gcctcacacg
361 gagactgtct ctctcttcc ctctccatg gatctgctta ttcaggacag ccctgattct
421 tccaccagtc ccaaaggcaa acaacccact tctgcagaga atagtgtcgc aaaaaaggaa
481 gacaaggctc cagtcaagaa acagaagacc agaactgtgt tctcttccac ccagctgtgt
541 gtactcaatg atagatttca gagacagaaa tacctcagcc tccagcagat gcaagaactc
601 tccaacatcc tgaacctcag ctacaaacag gtgaagacct ggttccagaa ccagagaatg
661 aaatctaaga ggtggcagaa aaacaactgg ccgaagaata gcaatggtgt gacgcagaag
721 gcctcagcac ctacctacc cagcctctac tcttctacc accagggatg cctggtgaac
781 ccgactggga accttccaat gtggagcaac cagacctgga acaattcaac ctggagcaac
841 cagaccaga acatccagtc ctggagcaac cactcctgga aactcagac ctggtgcacc
901 caatcctgga acaatcaggc ctggaacagt ccttctata actgtggaga ggaatctctg
961 cagtcctgca tgcagttcca gccaaattct cctgccagtg acttgagggc tgctttggaa
1021 gctgctgggg aaggccttaa tgtaatacag cagaccacta ggtattttag tactccacaa
1081 accatggatt tattcctaaa ctactccatg aacatgcaac ctgaagacgt gtgaagatga
1141 gtgaaactga tattactcaa ttctagctg gacactggct gaatccttcc tctccctcc
1201 tcccatccct cataggattt ttcttgttt gaaaccacgt gttctggtt ccatgatgcc
1261 tatccagtc atctcatgga ggttgaggta tggttggagc ctaatcagcg aggtttcttt
1321 ttttttttt cctattggat ctctctggag aaaatacttt ttttttttt tttgagacgg
1381 agtcttgctc tgtcgcccag gctggagtgc agtggcgcgg tcttggtca ctgcaagctc
1441 cgctcccgg gttcacgcca ttctcctgcc tcagcctccc gagcagctgg gactacaggc
1501 gcccgccacc tcgcccggct aatattttgt attttttagta gagacagggt ttcactgtgt
1561 tagccaggat ggtctcgatc tcctgacctt gtgatccgcc cgctcggcc tccctaacag
1621 ctgggattac aggcgtgagc caccgcgccc tgcctagaaa agacatttta ataaccttgg
1681 ctgctaagga caacattgat agaagccgtc tctggctata gataagtaga tctaatacta
1741 gtttgatat ctttagggtt tagaatctaa cctcaagaat aagaaataga agtacgaatt
1801 ggtgatgaag atgtattcgt attgtttggg attgggaggc tttgcttatt tttttaaac
1861 tattgaggta aagggttaag ctgtaacata cttaattgat ttcttaccgt ttttggtctt
1921 gttttgctat atccccta atgttggttg tgctaactct ttagaaaaga ggtcttgtat
1981 ttgctgcac gtaatgacat gactactact ttagttggtt taagttcaaa tgaatgaaac
2041 aaatattttt cctttagttg attttaccct gatttcaccg agtgtttcga tgagtaaata
2101 tacagcttaa acat

```

[図11]

CD45 塩基配列

```
1  gctgacttcc agatatgacc atgtatttgt ggottaaact ctiggcattt ggctttgcct
61  ttctggacac agaagtatit gtgacagggc aaagcccaac accttcccc actggccatc
121 tgcaagctga ggagcaagga agccaatcca agtcaccaa cctcaaaagt aggggaagctg
181 acagttcagc cttcagttgg tggccaaagg cccgagagcc cctcacaaac cactggagat
241 tgactacagc aaagatgccc agtgttccac ttccaagtga ccccttacct actcacacca
301 ctgcattctc acccgcaagc acctttgaaa gagaaaatga cttctcagag accacaactt
361 ctcttagtcc agacaatact tccaccaag tatccccgga ctctttggat aatgctagtg
421 cttttaatac cacaggtgtt tcatcagtac agacgcctca ccttcccacg cacgcagact
481 cgcagacgcc ctctgctgga actgacacgc agacattcag cggctccgcc gccaatgcaa
541 aactcaaccc taccacagc agcaatgcta tctcagatgt cccaggagag aggagtacag
601 ccagcacctt tcttacagac ccagtttccc cattgacaac caccctcagc cttgcacacc
661 acagctctgc tgccttacct gcacgcacct ccaacaccac catcacagcg aacacctcag
721 atgcctacct taatgcctct ga
```

[図12]

CD49f 塩基配列

```

1  gatccggaaa tatggagacc ccgggagcct cttcggcttc tcgctggcca tgcactggca
61  actgcagccc gaggacaagc ggctgttgct cgtggggggc ccgoggggcag aagcgccttc
121 actgcagaga gccaacagaa cgggagggct gtacagctgc gacatcaccg cccggggggc
181 atgcacgcgg atcgagtttg ataacgatgc tgacccacg tcagaaagca aggaagatca
241 gtggatgggg gtcaccgtcc agagccaagg tccagggggc aaggctctga catgtgtca
301 ccgatatgaa aaaaggcagc atgttaatac gaagcaggaa tcccgagaca tctttggcg
361 gtgttatgtc ctgagtcaga atctcaggat tgaagacgat atggatgggg gagattggag
421 cttttgtgat gggcgattga gaggccatga gaaatttggc tcttgccagc aagggtgtagc
481 agctactttt actaaagact ttcatcacat tgtatttggg gccccgggta cttataactg
541 gaaagggatt gttcgtgtag agcaaaagaa taacactttt ttgacatga acatctttga
601 agatgggcct tatgaagttg gtggagagac tgagcatgat gaaagtctcg ttccgtgttc
661 tgctaacagt tacttaggtt ttcttttggg ctcagggaaa ggtattgttt ctaaagatga
721 gatcacattt gtatctgggt ctcacagagc caatcacagt ggagccgtgg ttttgcctga
781 gagagacatg aagtcctgcac atctctccc tgagcacata ttgatggag aaggctctggc
841 ctcttcattt ggctatgatg tggcgggtgt ggacctcaac aaggatgggt ggcaagatat
901 agttatttga gcccacagt attttgatag agatggagaa gttggagggt cagtgtatgt
961 ctacatgaac cagcaaggca gatggaataa tgtgaagcca attcgtctta atggaaccaa
1021 agattctatg tttggcattg cagtaaaaaa tattggagat attaatcaag atggctaccc
1081 agatattgca gttggagctc cgtatgatga cttgggaaag gtttttatct atcatggatc
1141 tgcaaatgga ataaatacca aaccaacaca gtttctcaag ggtatatcac cttatttttg
1201 atattcaatt gctggaaaca tggaccttga tcgaaattcc taccctgatg ttgctgttgg
1261 ttccctctca gattcagtaa ctattttcag atcccggcct gtgattaata ttcagaaaac
1321 catcacagta actcctaaca gaattgacct ccgccagaaa acagcgtgtg ggccgcctag
1381 tgggatatgc ctccaggtta aatcctgttt tgaatatact gtaaccccg ctggtataa
1441 tccttcaata tcaattgttg gcacacttga agctgaaaag aaagaagaaa atctgggcta
1501 tcctcaagag ttcagtttgc aaaccaaggt tctgagccca aatatactca agaactaact
1561 ctgaagaggc agaaacagaa agtgtgcatg gaggaaccc tgtggctaca ggataatatc
1621 agagataaac tgcgtcccat tcccataact gcctcagttg agatccaaga gccaaagctc
1681 cgtaggcgag tgaattcact tccagaagtt cttccaattc tgaattcaga tgaacccaag
1741 acagctcata ttgatgttca cttcttaaaa gagggatgtg gagacgacaa tgtatgtaac
1801 agcaacctta aactagaata taaattttgc acccgagaag gaaatcaaga caaattttct
1861 tatttaccaa ttcaaaaagg tgtaccagaa ctagtcttaa aagatcagaa ggatattgct
1921 ttagaaataa cagtgacaaa cagcccttcc aacccaagga atcccacaaa agatggcgat
1981 gacgcccatt aggctaaact gattgcaacg ttccagaca ctttaacctt ttctgcatat
2041 agagaactga gggctttccc tgagaaacag ttgagttgtg ttgccaacca gaatggctcg
2101 caagctgact gtgagctcgg aaatcctttt aaaagaaatt caaatgtcac tttttatttg
2161 gttttaagta caactgaagt cacccttgac accccagatc tggatattaa tctgaagtta
2221 gaaacaacaa gcaatcaaga taatttggct ccaattacag ctaaagcaaa agtgggtatt
2281 gaactgcttt tatcggtctc gggagtgtct aaaccttccc aggtgtatit tggaggatca
2341 gttgttggcg agcaagctat gaaatctgaa gatgaagtgg gaagttaa atagatgtaa
2401 ttccagggtaa taaacttagg taaacctctt acaaacctcg gcacagcaac cttgaacatt
2461 cagtggccaa aagaaattag caatgggaaa tggttgcttt atttggigaa agtagaatcc
2521 aaaggatttg aaaaagtaac ttgtgagcca caaaaggaga taaactccct gaacctaacg
2581 gagtctcaca actcaagaaa gaaacgggaa attactgaaa aacagataga tgataacaga
2641 aaattttctt tatttgcctga aagaaaatac cagactctta actgtagcgt gaacgtgaac
2701 tgtgtgaaca tcagatgccc gctgcggggg ctggacagca aggcgtctct tattttgogc
2761 tcgaggttat ggaacagcac atttctagag gaatattcca aactgaacta cttggacatt
2821 ctcatgagag ccttcattga tgtgactgct gctgccgaaa atatcaggct gccaaatgca
2881 ggcactcagg ttocagtgac tgtgtttccc tcaaagactg tagctcagta ttogggagta
2941 ccttgggtgga tcatactagt ggctattctc gctgggatct tgatgcttgc tttatttagt
3001 tttatactat ggaagtgtgg attcttttaa cgctctaggt acgatgacag tgttcccga
3061 tattacgtct taaggatccg gaaagaagag cgagagatca aagatgaaaa gtatattgat
3121 aaccttgaaa aaaaaacagt gatcacaagg tggaaacgaa atgaaagcta ctcatagcgg
3181 gggcctaaaa aaaaaagct tcacagtacc caaactgctt ttccaactc agaaattcaa
3241 tttggattta aaagcctgct caatccctga ggaactgatt cagagtgaac acacacagta
3301 cgaacctaca gttttaactg tggatattgt tacgtagcct aaggctcctg ttttgcacag
3361 ccaaatttaa aactgttggg atggattttt ctttaactgc cgtaatttaa ctttctgggt

```

[図13]

CD49f 塩基配列 (つづき)

```

3421 tgccttttatt tttggcgtgg ctgacttaca tcatgtgttg gggaagggcc tgcccagttg
3481 cactcaggtg acatcctcca gatagtgtag ctgaggaggo acctacactc acctgcacta
3541 acagagtggc cgtcctaacc tcgggcctgc tgcgcagacg tccatcacgt tagctgtccc
3601 acatcacaag actatgccat tggggtagtt gtgtttcaac ggaaagtgcg gtcttaaaact
3661 aaatgtgcaa tagaaggtga tgttgccatc ctaccgtctt ttccgtgttc cttagctgtgt
3721 gaatacctgc tcacgtcaaa tgcatacaag tticattctc cttttcacta aaacacacag
3781 gtgcaacaga cttgaatgct agttataact atttgtatat ggtattttatt ttttcttttc
3841 tttaaaaacc attttgttat tgactaacag gccaaagagt ctccagttta cccttcaggt
3901 tggtttaatc aatcagaatt agagcatggg aggtcatcac tttagacctaa attattttact
3961 gcaaaaagaa aatctttata aatgtaccag agagagttgt ttttaataact tatctataaaa
4021 ctataacctc tccttcatga cagcctccac cccacaaccc aaaaggttta agaaatagaa
4081 ttataactgt aaagatgttt atttcaggca ttggatatatt ttacttttag aagcctgcat
4141 aatgtttctg gatttcatac tgtaacattc aggaattctt ggagaaaatg ggtttattca
4201 ctgaactcta gtgcggttta ctactgctg caaatactgt atattcagga cttgaaagaa
4261 atggtgaatg cctatggttg atccaaactg atccagtata agactactga atctgctacc
4321 aaaacagtta atcagtgagt cgatgttcta ttttttgttt tgtttcctcc cctatctgta
4381 ttcccaaaaa ttactttggg gctaatttaa caagaacttt aaattgtgtt ttaattgtaa
4441 aaatggcagg ggggtggaatt attactctat acattcaaca gagactgaat agatatgaaa
4501 gctgattttt tttaattacc atgcttcaca atgttaagtt atatggggag caacagcaaa
4561 caggtgctaa tttgttttgg atatagtata agcagtgtct gtgttttgaa agaatagaac
4621 acagtttgta gtgccactgt tgttttgggg gggctttttt cttttcgtaa atcttaaacc
4681 ttaagatact aaggacgttg ttttggttgt actttggaat tcttagtcac aaaatatatt
4741 ttgtttacaa aaatttctgt aaaacaggtt ataacagtgt ttaaagtcct agtttcttgc
4801 ttgggggaact tgtgtcccta atgtgttttag attgctagat tgctaaggag ctgatacttt
4861 gacagtgttt ttagacctgt gttactaaaa aaaagatgaa tgtcctgaaa aggggtgttg
4921 gaggtgtggt caacaaagaa acaaagatgt tatggtgttt agatttatgg ttgttaaaaa
4981 tgtcatctca agtcaagtca ctggtctgtt tgcatttgat acatttttgt actaactagc
5041 attgtaaaaa tatttcatga ttagaaatta cctgtggata tttgtataaa agtgtgaaat
5101 aaatttttta taaaagtgtt cattgtttcg taacacagca ttgtatatgt gaagcaaaact
5161 ctaaaattat aaatgacaac ctgaattatc tatttcatc

```

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/057625

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER 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) 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 1996-2016 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	OHINATA Yasuhide, et al., "Establishment of Trophoblast Stem Cells under Defined Culture Conditions in Mice", PLoS ONE, 2014, Vol.9, No.9, e107308, particularly, Abstract, pp.6-8	1, 5-7, 11/ 1-11
X/Y	CHEN Ying, et al., "Roles of CDX2 and EOMES in human induced trophoblast progenitor cells", Biochem. Biophys. Res. Commun., 2013, Vol.431, No.2, pp.197-202, particularly, Abstract	1, 5-7, 11/ 1-11
Y	GENBACEV Olga, et al, "Establishment of Human Trophoblast Progenitor Cell Lines from the Chorion", Stem Cells, 2011, Vol.29, pp.1427-1436, particularly, pp.1427-1428	1-11
☒ 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 May 2016 (19.05.16)		Date of mailing of the international search report 31 May 2016 (31.05.16)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/057625

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2005-204590 A (National University Corporation Kumamoto University), 04 August 2005 (04.08.2005), paragraph [0020] (Family: none)	1-11
Y	PARK Tea Soon, et al., "Placental Perivascular Cells for Human Muscle Regeneration", Stem Cells and Development, 2011, Vol.20, No.3, pp.451-463, particularly, pp.458-461	1-11
Y	FUKUSHIMA Kotaro, et al., "TNF α -Induced Apoptosis and Integrin Switching in Human Extravillous Trophoblast Cell Line", Biology of Reproduction, 2003, Vol.68, pp.1771-1778, particularly, Abstract	1-11
A	ODA Mayumi, et al, "Establishment of trophoblast stem cell lines from somatic cell nuclear-transferred embryos", Pros. Natl. Acad. Sci. USA, 2009, Vol.106, No.38, pp.16293-16297	1-11
A	WU Tong, et al., "Reprogramming of Trophoblast Stem Cells into Pluripotent Stem Cells by Oct4", Stem Cells, 2011, Vol.29, pp.755-763	1-11
A	Yusuke HOSOI et al., "Mouse Haibanho karano Eiyomaku Kansaibokabu Oyobi Haitaigai Naihaiyo Saibokabu no Juritsu to Idenshi Hatsugen Kaiseki", Tohoku Journal of Animal Science and Technology, 2010, vol.60, no.1, pages 6 to 12	1-11
A	Momo NAKANISHI et al., "Jumo to Taiban o Meguru Shinchiken Eiyomaku Kansaibo", Clinical Gynecology and Obstetrics, 2011, vol.65, no.3, pages 260 to 265	1-11
A	COHEN Idan, et al., "ZNF750 Is Expressed in Differentiated Keratinocytes and Regulates Epidermal Late Differentiation Genes", PLoS ONE, 2012, Vol.7, No.8. e42628	1-11
A	WO 2012/083023 A1 (ANTHROGENESIS CORP.), 21 June 2012 (21.06.2012), & JP 2014-507389 A & US 2012/0201787 A1 & EP 2651452 A1 & CN 103379921 A & KR 10-2014-0003473 A	1-11

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. 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（I P C））

Int.Cl. 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	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	OHINATA Yasuhide, et al., "Establishment of Trophoblast Stem Cells under Defined Culture Conditions in Mice", PLoS ONE, 2014, Vol.9, No.9, e107308, 特に Abstract, pp.6-8	1,5-7,11/1-11
X/Y	CHEN Ying, et al., "Roles of CDX2 and EOMES in human induced trophoblast progenitor cells", Biochem. Biophys. Res. Commun., 2013, Vol.431, No.2, pp.197-202, 特に Abstract	1,5-7,11/1-11

☒ 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

19.05.2016

国際調査報告の発送日

31.05.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A/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）

鳥居 敬司

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4 B

4 0 4 5

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
Y	GENBACEV Olga, et al, "Establishment of Human Trophoblast Progenitor Cell Lines from the Chorion", Stem Cells, 2011, Vol.29, pp.1427-1436, 特に pp.1427-1428	1-11
Y	JP 2005-204590 A (国立大学法人 熊本大学) 2005.08.04, [0020] (ファミリーなし)	1-11
Y	PARK Tea Soon, et al., "Placental Perivascular Cells for Human Muscle Regeneration", Stem Cells and Development, 2011, Vol.20, No.3, pp.451-463, 特に pp.458-461	1-11
Y	FUKUSHIMA Kotaro, et al., "TNF α -Induced Apoptosis and Integrin Switching in Human Extravillous Trophoblast Cell Line", Biology of Reproduction, 2003, Vol.68, pp.1771-1778, 特に Abstract	1-11
A	ODA Mayumi, et al, "Establishment of trophoblast stem cell lines from somatic cell nuclear-transferred embryos", Pros. Natl. Acad. Sci. USA, 2009, Vol.106, No.38, pp.16293-16297	1-11
A	WU Tong, et al., "Reprogramming of Trophoblast Stem Cells into Pluripotent Stem Cells by Oct4", Stem Cells, 2011, Vol.29, pp.755-763	1-11
A	細井勇輔, 他, "マウス胚盤胞からの栄養膜幹細胞株および胚体外内胚葉細胞株の樹立と遺伝子発現解析", 東北畜産学会報, 2010, Vol.60, No.1, pp.6-12	1-11
A	中西もも, 他, "絨毛と胎盤をめぐる新知見 栄養膜幹細胞", 臨床婦人科産科, 2011, Vol.65, No.3, pp.260-265	1-11
A	COHEN Idan, et al., "ZNF750 Is Expressed in Differentiated Keratinocytes and Regulates Epidermal Late Differentiation Genes", PLoS ONE, 2012, Vol.7, No.8. e42628	1-11
A	WO 2012/083023 A1 (ANTHROGENESIS CORPORATION) 2012.06.21, & JP 2014-507389 A & US 2012/0201787 A1 & EP 2651452 A1 & CN 103379921 A & KR 10-2014-0003473 A	1-11