

(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
2021年4月15日(15.04.2021)



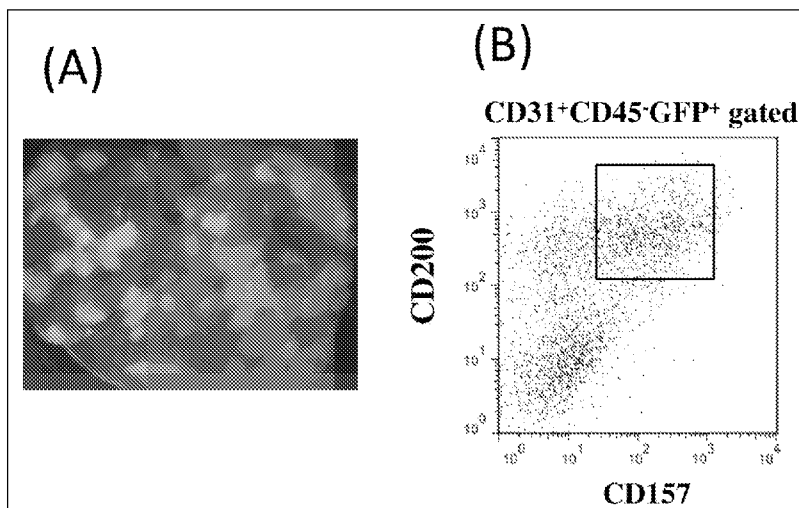
(10) 国際公開番号
WO 2021/070874 A1

- (51) 国際特許分類:
CI2N 5/074 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2020/038029
- (22) 国際出願日: 2020年10月7日(07.10.2020)
- (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 2019-186035 2019年10月9日(09.10.2019) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: ▲高▼倉 伸幸(TAKAKURA Nobuyuki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 岩谷 龍(IWATANI Ryo); 〒5300003 大阪府大阪市北区堂島2丁目1番31号 京阪堂島ビル6階 Osaka (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,

(54) Title: PRODUCTION METHOD FOR VASCULAR ENDOTHELIAL STEM CELL

(54) 発明の名称: 血管内皮幹細胞の製造方法

[図6]



(57) Abstract: The present invention provides a method for artificially producing vascular endothelial stem cells from cells other than vascular endothelial stem cells. The method for producing vascular endothelial stem cells according to the present invention comprises a step for bringing vascular endothelial cells that do not have stem-cell properties into contact with a factor that is secreted from an organ of a neonatal or infant mammal, wherein the step may be (1) a step for transplanting the vascular endothelial cells that do not have stem-cell properties into an organ of a non-human mammal, or (2) a step for culturing the vascular endothelial cells that do not have stem-cell properties using a culture system containing the factor that is secreted from an organ of a neonatal or infant mammal.



WO 2021/070874 A1

EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

(57) 要約: 本発明は血管内皮幹細胞以外の細胞から人工的に血管内皮幹細胞を製造する方法を提供する。本発明の血管内皮幹細胞の製造方法は、幹細胞性を有しない血管内皮細胞と、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子とを接触させる工程を含み、当該工程は、(1) 幹細胞性を有しない血管内皮細胞を非ヒト哺乳動物の臓器に移植する工程、または、(2) 新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子を含む培養系を用いて幹細胞性を有しない血管内皮細胞を培養する工程であってもよい。

明 細 書

発明の名称：血管内皮幹細胞の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、血管内皮幹細胞の製造方法に関するものである。

背景技術

[0002] 血管に関連する疾患は血管病と総称され、例えば、悪性腫瘍、網膜症、慢性炎症性疾患、動脈硬化症、虚血性疾患など、多くの疾患が存在する。このような疾患に対し、血管形成を制御することで疾患を改善する治療法の開発が旺盛に行われている。中でも血管を再生することで疾患を改善する治療は therapeutic angiogenesis (治療的血管新生) と呼ばれ、種々の原因で血管数の低下や、血管機能の低下した疾患に対し、血管を再生して、病態の改善をはかる治療方法である。例えば、1) 心筋虚血や脳虚血、下肢虚血などへ新規血管を誘導して虚血を改善する治療、つまり血管の元来の機能である血液運搬を改善する治療法、2) 通常血管内皮細胞から分泌される因子が、遺伝的な要因や、後天的な要因により、血管内皮細胞からの分泌が抑制されて疾患に至るような疾患（例えば、血管内皮細胞での凝固因子の産生が低下して発症する血友病等）に対する血管再生の治療法、3) 疾患臓器の血管を正常化して臓器の機能を回復させる血管再生（例えば、肝線維症、肝硬変、無気肺、骨粗鬆症、腎機能障害等に対する血管再生）などが挙げられる。

[0003] 以上のような疾患に対して治療的血管再生が有効であることは基礎医学的にも証明され始めているが、実際に臨床で応用されたのが、細胞治療、サイトカイン（遺伝子）治療である。例えば、細胞治療として、骨髄に存在する血管内皮前駆細胞を用いて血管を再生する方法がある。しかし、この前駆細胞は幹細胞ではないので、この前駆細胞で形成された血管は長期間維持されないと考えられる。また、脂肪組織等の間葉系幹細胞を注入して血管再生を誘導する方法がある。この方法は、間葉系幹細胞から分泌される血管形成を誘導する物質により、既存の血管の血管内皮細胞を増殖させて血管を再生す

る方法であると考えられている。しかし、血管再生能力が減弱している患者には使用できない。

[0004] 細胞治療以外に、血管内皮細胞を増殖させる成長因子を投与する方法も実施された。血管内皮細胞成長因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) は血管内皮細胞の増殖を最も強く誘導できるサイトカインである。この VEGF をコードする遺伝子を発現するプラスミドを虚血に陥った領域に注入して、血管を再生する治療が2000年頃に実施された。しかし、VEGFは血管透過性を亢進させて、おびただしい血液成分の組織内貯留による浮腫を生じさせた。この副作用のために、現在ではVEGFを用いた治療は行われなくなっている。一方、肝細胞増殖因子 (Hepatocyte growth factor: HGF) 遺伝子を用いた血管再生の治療も臨床使用されている。その有効性を示すデータも紹介されつつあるが、長期的な効果については未だ言及されていない。

[0005] 例えば、骨髄移植で他人の骨髄によって骨髄を再構築させるためには造血幹細胞が必要であるように、再生した血管を長期に維持させるためには、幹細胞性を有した細胞で血管を再構築する必要がある。本発明者らは、既存の血管の血管内皮細胞の中に、非常に少ない割合であるが、極めて血管内皮細胞を産生する能力が高い細胞が存在することを見出した (非特許文献1、2)。この血管内皮細胞は、骨髄に存在する血管内皮前駆細胞とは異なり、長期にわたり血管内皮細胞として貢献しうる細胞であることが明らかになった。本発明者らは、このような極めて血管内皮細胞を産生する能力が高い細胞は、薬剤排出能が高い血管内皮細胞として既存の血管の中に存在していることを見出した。

[0006] さらに、本発明者らは、この血管内皮細胞を産生する能力が極めて高い血管内皮細胞の幹細胞としての特徴を詳細に解析するために、この血管内皮細胞に発現する表面マーカーの単離を行い、血管内皮幹細胞にCD157とCD200が発現していることを見出した (非特許文献2、特許文献1)。CD200陽性CD157陽性の血管内皮細胞集団は、未分化性を維持して分裂 (自己複製) するとともに、最終的にCD200陰性CD157陰性の分化した血管内皮細胞を大量に産生す

る能力を有していた。また、一旦この血管内皮細胞で再生された血管は退縮することなく長期に血管として維持されることが明らかになった。具体的には、血液運搬機能だけでなく、血管内皮細胞から分泌されるべき分子（例えば凝固第VIII因子など）の長期的な産生機能も維持された。以下、本発明者らが発見した幹細胞性を有する血管内皮細胞を、「血管内皮幹細胞」と称する。

[0007] 血管再生を誘導する際には、このような幹細胞性を持ち合わせた血管内皮細胞による血管再生が必要であり、血管内皮幹細胞を移植することで、血管再生の予備能のない患者にも治療効果をもたらす治療となりうる。しかし、血管内皮幹細胞は生体内に極僅かしか存在せず、血管再生を行う患者ごとに患者自身の血管内皮幹細胞を採取することは非常に効率が悪い。また、患者の血管内皮幹細胞機能が障害を受けている可能性もある。それゆえ、何らかの細胞から人工的に血管内皮幹細胞を製造する方法の開発が望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0008] 特許文献1：国際公開W02019/098264 A1

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Naito H. et al., Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels, *EMBO J.* 2012 Feb 15;31(4):842-55.

非特許文献2：Wakabayashi T. et al., CD157 Marks Tissue-Resident Endothelial Stem Cells with Homeostatic and Regenerative Properties, *Cell Stem Cell.* 2018 Mar 1;22(3):384-397.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は、血管内皮幹細胞以外の細胞から、人工的に血管内皮幹細胞を製造する方法を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明は、上記課題を解決するために、以下の各発明を包含する。

[1] 幹細胞性を有しない血管内皮細胞と、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子とを接触させる工程を含むことを特徴とする、血管内皮幹細胞の製造方法。

[2] 前記工程が、以下の(1)または(2)のいずれかにより行われることを特徴とする、前記[1]に記載の製造方法：

(1) 前記幹細胞性を有しない血管内皮細胞を非ヒト哺乳動物の臓器に移植する、または

(2) 新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子を含む培養系を用いて前記幹細胞性を有しない血管内皮細胞を培養する。

[3] 前記新生児期または幼若期の哺乳動物が、新生児期の哺乳動物である、前記[1]または[2]に記載の製造方法。

[4] 前記幹細胞性を有しない血管内皮細胞が、新生児期または幼若期の哺乳動物から取得した細胞である、前記[1]～[3]のいずれかに記載の製造方法。

[5] 前記幹細胞性を有しない血管内皮細胞が、新生児期の哺乳動物から取得した細胞である、前記[4]に記載の製造方法。

[6] 前記臓器が肝臓である、前記[1]～[5]のいずれかに記載の製造方法。

[7] 新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子を含有する、血管内皮幹細胞誘導剤。

[8] 前記因子を含む新生児期もしくは幼若期の哺乳動物の臓器から調製した細胞の培養上清、または、前記因子を含む新生児期もしくは幼若期の哺乳動物の臓器抽出液を含有する、前記[7]に記載の血管内皮幹細胞誘導剤。

[9] 前記新生児期または幼若期の哺乳動物が、新生児期の哺乳動物である、前記[7]または[8]に記載の血管内皮幹細胞誘導剤。

[10] 前記臓器が肝臓である、前記[7]～[9]のいずれかに記載の血

管内皮幹細胞誘導剤。

発明の効果

[0012] 本発明により、幹細胞性を有しない血管内皮細胞から人工的に血管内皮幹細胞を製造する方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]マウスの生体からフローサイトメトリーにより取得した血管内皮細胞（CD31陽性CD45陰性細胞）を、OP9ストローマ細胞をフィーダー細胞に用いた培養系で培養した結果を示す図であり、（A）は胎生15日目の胎児マウスから取得した血管内皮細胞の結果、（B）は8週齢の成体マウス肝臓から取得した血管内皮細胞の結果である。

[図2]胎生15日目の胎児マウス、出生後1日目、7日目、14日目および21日目の新生児～幼若マウスからそれぞれ肝臓を摘出し、凍結切片を作製して抗CD31抗体を用いて免疫染色した結果を示す図である。

[図3]胎生15日目の胎児マウス、出生後7日目、14日目、21日目、28日目の新生児～幼若マウスの肝臓からフローサイトメトリーにより取得した血管内皮細胞（CD31陽性CD45陰性細胞）にヘキスト染色を行い、フローサイトメトリー解析した結果を示す図であり、（A）はヘキスト染色のフローサイトメトリー解析結果であり、（B）は薬剤排出能が高い画分（SP細胞画分）の割合を表したグラフである。

[図4]出生後1日目のグリーンマウス（C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)）肝臓から取得した薬剤排出能が低い画分（MP細胞画分）の血管内皮細胞（CD31陽性CD45陰性細胞）を、出生後7日齢の肝臓障害モデルマウス（C57BL/6）の肝臓に移植し、2か月後の肝臓障害モデルマウスの肝臓を解析した結果を示す図であり、（A）は開腹した肝臓を蛍光実体顕微鏡で観察した結果、（B）は（A）の肝臓におけるCD31陽性GFP陽性細胞の存在をフローサイトメトリーにより解析した結果、（C）は（B）のCD31陽性GFP陽性細胞におけるSP細胞の存在をフローサイトメトリーにより解析した結果である。

[図5]胎生13日目、15日目、18日目の胎児マウス、出生後1日目、4日目、7日

目、14日目の新生児マウス、および8週目の成体マウスの肝臓からフローサイトメトリーにより取得した血管内皮細胞（CD31陽性CD45陰性細胞）における、CD200陽性CD157陽性細胞の存在をフローサイトメトリー解析した結果を示す図である。

[図6]胎生15日目のグリーンマウス（C57BL/6-Tg(CAG-EGFP)）肝臓から取得したCD200陰性CD157陰性の血管内皮細胞（CD31陽性CD45陰性細胞）を、出生後7日目のマウスの肝臓に移植し、2か月後のマウスの肝臓を解析した結果を示す図であり、（A）は開腹した肝臓を蛍光実体顕微鏡で観察した結果、（B）は（A）の肝臓中のCD31陽性CD45陰性GFP陽性細胞におけるCD200陽性CD157陽性細胞の存在をフローサイトメトリーにより解析した結果である。

[図7]ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）と、出生後4日目の新生児マウスの肝臓から調製した細胞を共培養し、共培養前後のHUVECにおけるCD157の発現をフローサイトメトリーで解析した結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0014] 〔血管内皮幹細胞の製造方法〕

本発明は、血管内皮幹細胞の製造方法を提供する。本発明の血管内皮幹細胞の製造方法（以下、「本発明の製造方法」と記す）は、幹細胞性を有しない血管内皮細胞と、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子とを接触させる工程を含むことを特徴とする。新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器は、新生児期の哺乳動物の臓器であってもよい。

[0015] 本明細書において、血管内皮幹細胞は未分化な状態で分裂する能力（自己複製能）と血管内皮細胞に分化する能力を有する細胞を意味する。本発明の製造方法により血管内皮幹細胞が得られたことは、単一細胞からコロニーを形成できる血管内皮細胞の存在を確認することにより明らかになる。すなわち、高いコロニー形成能を有する血管内皮細胞は、血管内皮幹細胞であると判断することができる。これに加えて、本発明の製造方法により得られた細胞が、薬剤排出能が高い細胞であること、および、CD200陽性CD157陽性細胞であること、の少なくとも一方の特性を有することを確認してもよい。薬剤

排出能の確認は、例えばヘキスト染色法等を用いることができる。CD200陽性CD157陽性細胞であるか否かは、抗CD200抗体および抗CD157抗体で細胞を染色すること等により行うことができる。

[0016] 血管内皮細胞は血管内腔を裏打ちする一層の扁平状の細胞であり、CD31陽性CD45陰性細胞として特定することができる。定法によりCD31陽性CD45陰性細胞として取得した血管内皮細胞は、本発明の製造方法に供する幹細胞性を有しない血管内皮細胞として、好適に用いることができる。

[0017] 幹細胞性を有しない血管内皮細胞は、哺乳動物の血管内皮細胞であればよい。哺乳動物は特に限定されないが、例えばヒト、サル、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ等が挙げられる。哺乳動物がヒトである場合、本発明の製造方法で製造した血管内皮幹細胞をヒトの細胞治療等に安全に利用することができる。

[0018] 幹細胞性を有しない血管内皮細胞は、任意の臓器から調製することができる。臓器は、例えば肝臓、網膜、脳、心臓、皮膚、筋肉（骨格筋）、肺、腎臓、胎盤、臍帯、脂肪組織等であってもよい。好ましくは、肝臓、臍帯である。幹細胞性を有しない血管内皮細胞の調製方法は特に限定されないが、例えば、単離した臓器を市販の細胞分散用試薬で消化・分散して細胞懸濁液を調製し、この細胞懸濁液を抗CD31抗体および抗CD45抗体で染色した後、フローサイトメトリー技術を用いてCD31陽性CD45陰性細胞を回収する方法などが挙げられる。

[0019] 幹細胞性を有しない血管内皮細胞は、哺乳動物から取得した血管内皮細胞であればよく、取得時期は特に限定されない。新生児期または幼若期の哺乳動物から取得した血管内皮細胞であってもよく、好ましくは新生児期の哺乳動物から取得した血管内皮細胞である。本明細書において、新生児期は出生から離乳時までを意味し、幼若期は離乳時から生殖能力を獲得するまでを意味する。本発明者らは、成体マウスの血管内皮細胞と比較して、新生児期の血管内皮細胞が血管内皮幹細胞ヘリプログラミングされやすいことを確認している。

[0020] 幹細胞性を有しない血管内皮細胞と、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子とを接触させる工程は、例えば、新生児期または幼若期の非ヒト哺乳動物の臓器に移植することにより行ってもよい。非ヒト哺乳動物は特に限定されないが、例えば、サル、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ等が挙げられる。好ましくは、ブタまたはヒツジである。臓器は特に限定されないが、例えば、肝臓、網膜、脳、心臓、皮膚、筋肉（骨格筋）、肺、腎臓、胎盤、脂肪組織等が挙げられる。好ましくは、肝臓である。移植は、例えばホスト動物を麻酔下で開腹し、対象臓器に注射等により幹細胞性を有しない血管内皮細胞を接種する方法などにより行うことができる。

[0021] 幹細胞性を有しない血管内皮細胞と、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子とを接触させる工程は、例えば、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子を含む培養系を用いて幹細胞性を有しない血管内皮細胞を培養することにより行ってもよい。具体的には、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から調製した細胞と幹細胞性を有しない血管内皮細胞とを共培養してもよい。臓器からの細胞の調製は、例えば単離した臓器を市販の細胞分散用試薬で消化・分散する方法などが挙げられる。共培養は、幹細胞性を有しない血管内皮細胞と臓器から調製した細胞とを、同一の培養容器内で培養すればよい。この際、幹細胞性を有しない血管内皮細胞と臓器から調製した細胞とが直接接触しないように、カルチャーインサート等の器具を培養容器に装着して共培養を行ってもよい。

[0022] また、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から調製した細胞を適当な培地を用いて培養し、その培養上清を回収して幹細胞性を有しない血管内皮細胞の培地に添加してもよい。また、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器抽出液を調製し、この抽出液を幹細胞性を有しない血管内皮細胞の培地に添加してもよい。新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器抽出液として、例えば臓器のホモジネート上清を好適に用いることができる。

[0023] 幹細胞性を有しない血管内皮細胞と、新生児期または幼若期の哺乳動物の

臓器から分泌される因子とを接触させる期間は特に限定されず、目的とする血管内皮幹細胞が得られる適切な期間を、予備検討等で設定すればよい。例えば、新生児期または幼若期の非ヒト哺乳動物の臓器に移植する場合、1日以上、2日以上、3日以上、4日以上であってもよく、100日以下、50日以下、10日以下、5日以下であってもよい。例えば、新生児期または幼若期の非ヒト哺乳動物の臓器から調製した細胞と共培養する場合、1日以上、2日以上、3日以上、4日以上であってもよく、100日以下、50日以下、10日以下、5日以下であってもよい。

[0024] 幹細胞性を有しない血管内皮細胞を、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子と一定期間接触させることにより、幹細胞性を有しない血管内皮細胞がリプログラミングされ、血管内皮幹細胞に変化する。非ヒト哺乳動物の臓器に移植する方法で製造した場合は、移植部位を摘出し、市販の細胞分散用試薬で消化・分散する方法などを用いて細胞懸濁液を調製し、高いコロニー形成能を有する血管内皮細胞（CD31陽性CD45陰性細胞）が存在することを確認することにより、血管内皮幹細胞が製造されたと判断することができる。新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子を含む培養系を用いる方法で製造した場合は、培養後の細胞中に高いコロニー形成能を有する血管内皮細胞（CD31陽性CD45陰性細胞）が存在することを確認することにより、血管内皮幹細胞が製造されたと判断することができる。さらに、高いコロニー形成能を有する血管内皮細胞が、薬剤排出能が高い細胞であること、および／または、CD200陽性CD157陽性細胞であることを確認してもよい。得られた血管内皮幹細胞は、例えば、コロニーを形成した細胞を単離して増殖させることにより回収することができる。また、薬剤排出能が高い細胞やCD200陽性CD157陽性細胞を指標に回収してもよい。

[0025] 〔血管内皮幹細胞誘導剤〕

本発明は、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子を含有する血管内皮幹細胞誘導剤を提供する。新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器は、新生児期の哺乳動物の臓器であってもよい。

[0026] 哺乳動物は特に限定されないが、例えばヒト、サル、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウサギ等が挙げられる。哺乳動物はヒトであってもよい。臓器は特に限定されないが、例えば、肝臓、網膜、脳、心臓、皮膚、筋肉（骨格筋）、肺、腎臓、胎盤、脂肪などが挙げられる。臓器は肝臓であってもよい。

[0027] 本発明の血管内皮幹細胞誘導剤は、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子を含有する形態であればどのような形態であってもよい。本発明の血管内皮幹細胞誘導剤は、例えば、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から調製した細胞の培養上清を含有するものであってもよく、新生児期もしくは幼若期の哺乳動物の臓器抽出液を含有するものであってもよい。このような培養上清や臓器抽出液には、臓器から分泌される因子が含まれている。上記培養上清は、例えば単離した臓器を市販の細胞分散用試薬で消化・分散して得られた細胞を適当な培地を用いて培養することにより取得することができる。上記臓器抽出液は、例えば臓器をホモジナイズおよび遠心分離することにより取得することができる。

[0028] 本発明の血管内皮幹細胞誘導剤は、幹細胞性を有しない血管内皮細胞を培養する際に、培地に添加して用いることができる。その添加量は、培養条件等に応じて、適宜設定することが推奨される。

[0029] 本発明には、以下の各発明が含まれる。

新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子を含む培地を用いて、幹細胞性を有しない血管内皮細胞を培養する工程を含む、血管内皮幹細胞の誘導方法。

血管内皮幹細胞を誘導するための、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子の使用。

血管内皮幹細胞を誘導するための、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から調製した細胞の培養上清の使用。

血管内皮幹細胞を誘導するための、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器抽出液の使用。

血管内皮幹細胞誘導剤を製造するための、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子の使用。

血管内皮幹細胞誘導剤を製造するための、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から調製した細胞の培養上清の使用。

血管内皮幹細胞誘導剤を製造するための、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器抽出液の使用。

実施例

[0030] 以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0031] [実施例 1 : 胎児期と出生後の血管内皮細胞における幹細胞性の検討]

1-1 実験方法

C57BL/6マウス（日本エスエルシー）の胎生15日目（E15）の胎児マウスと、出生後8週目（8W）の成体マウスを用いた。E15胎児は全胎児を、8Wマウスは摘出した肝臓を、眼科用はさみを用いてできる限り細切し、細切組織をDispase II（Roche Applied Science社製）、collagenase（Wako社製）およびtype II collagenase（Worthington Biochemical社製）の混合溶液に浸漬し、37°Cで振盪して細胞外マトリックスを消化した。消化後の細胞を含む溶液を孔径40 μ mのフィルターに通し、分散した細胞懸濁液を得た。ACK（Ammonium-Chloride-Potassium）溶液（0.15M NH₄Cl, 10mM KHCO₃, and 0.1mM Na₂-EDTA）で赤血球を溶血させ、残りの細胞を以下の実験に供した。

[0032] 調製した細胞に免疫蛍光染色を行い、フローサイトメトリー解析を行った。モノクローナル抗体として、抗CD31抗体（clone MEC13.3, BD Biosciences社製）、抗CD45抗体（Clone 30-F11, BD Biosciences社製）を使用した。染色した細胞にPropidium iodide（PI, 2 μ g/mL, Sigma-Aldrich社製）を加え、死細胞の核を染色して死細胞を除去した。フローサイトメトリー解析には、SOAP FACSAria（BD Bioscience社製）およびFlowJo Software（Treestar Software社製）を使用した。フローサイトメトリーにより得られたCD31陽性CD45陰性の血管内皮細胞を、OP9ストローマ細胞（RIKEN cell bank）をフィー

ダー細胞に用いた培養系で、それぞれ5000個を直径3cmの培養プレートに播種し、7日間培養した。

[0033] 1-2 結果

結果を図1に示した。(A)は胎児マウスから得られた血管内皮細胞を培養した結果、(B)は成体マウスの肝臓から得られた血管内皮細胞を培養した結果である。胎児から得られた血管内皮細胞には、増殖してコロニーを形成する能力がある細胞が少数存在していた。一方、成体肝臓から回収した血管内皮細胞には、非常に大きなコロニーを形成する血管内皮細胞が存在することが判明した。この結果から、血管内皮幹細胞は胎児期には存在せず、出生後に発生する可能性が考えられた。

[0034] [実施例2：肝臓における類洞血管の形成の検討]

2-1 実験方法

C57BL/6マウス(日本エスエルシー)の胎生15日目の胎児マウス、出生後1日目、7日目、14日目および21日目の新生児～幼若マウスからそれぞれ肝臓を摘出し、定法に従い肝臓の凍結切片を作製した。凍結切片に抗CD31抗体(clone MEC13.3, BD Biosciences社製)を用いて免疫染色を行った。2次抗体としてPEラベルした抗ラットIgG(BD Biosciences社製)を用いた。

[0035] 2-2 結果

結果を図2に示した。出生後21日目の幼若マウスの肝臓では、中心静脈を中心にして、そこから放射状に類洞血管が形成されていた。この放射状に形成される肝臓特異的な血管構造は、胎児期のマウスの肝臓内では形成されておらず、出生後に徐々に形成されてくることが判明した。本発明者らは、肝臓に特有の血管構造である類洞血管は、血管内皮幹細胞により誘導されることを解明していることから(Wakabayashi T. et al., Cell Stem Cell, 2018 Mar 1;22(3):384-397)、血管内皮幹細胞は胎児期には存在せず、出生後に発生する可能性が考えられた。

[0036] [実施例3：薬剤排出能が高いことを利用して単離できる血管内皮幹細胞を含む画分(SP細胞画分)の発生様式に関する解析]

3-1 実験方法

C57BL/6マウス（日本エスエルシー）の胎生15日目（E15）の胎児マウス、出生後1日目（P1）、7日目（P7）、14日目（P14）、21日目（P21）、28日目（P28）の新生児～幼若マウスマウス、および8週目（8W）の成体マウスから、それぞれ肝臓を摘出した。実施例1と同様に、摘出した肝臓を、眼科用はさみを用いてできる限り細切し、細切組織をDispase II（Roche Applied Science社製）、collagenase（Wako社製）およびtype II collagenase（Worthington Biochemical社製）の混合溶液に浸漬し、37℃で振盪して細胞外マトリックスを消化した。消化後の細胞を含む溶液を孔径40 μ mのフィルターに通し、分散した細胞懸濁液を得た。得られた細胞懸濁液にヘキスト染色を行った。ヘキスト染色は、 1×10^6 個の細胞を、1mlのヘキスト含有培地（2% FBS（Sigma-Aldrich）、1mM HEPES（Gibco）、5 μ g/mL Hoechst33342（Sigma-Aldrich）含有DMEM（Sigma-Aldrich））に懸濁して、37℃で90分間行った。免疫蛍光染色には、実施例1と同じ抗CD31抗体および抗CD45抗体を使用した。染色した細胞にPropidium iodide（PI、2 μ g/mL、Sigma-Aldrich社製）を加え、死細胞の核を染色して死細胞を除去した。フローサイトメトリーにより、CD31陽性CD45陰性PI陰性細胞（死細胞を除去した血管内皮細胞）におけるヘキスト染色解析を行った。フローサイトメトリー解析には、SOAP FACS Aria（BD Bioscience社製）およびFlowJo Software（Treestar Software社製）を使用した。

[0037] 3-2 結果

結果を図3に示した。（A）は胎児期、新生児～幼若期の代表的なフローサイトメトリー解析結果を示す図であり、（B）はSP細胞画分の割合を表したグラフである。胎児期の血管内皮細胞には血管内皮幹細胞を含むSP細胞画分の細胞（SP細胞）が観察されず、非血管内皮幹細胞であるMP細胞画分の細胞（MP細胞）のみが観察された。SP細胞は出生後に徐々に出現し、21日齢（P21）の幼若マウスでは、SP細胞の割合が8週齢（8W）の成体マウスに匹敵する約1%程度になることが判明した。この結果から、血管内皮幹細胞は、出生後の

体内環境中で発生することが示唆された。

[0038] 〔実施例4：MP細胞は肝臓の環境でSP細胞に変化する〕

4-1 実験方法

C57BL/6マウスおよびC57BL/6-Tg(CAG-EGFP)マウス（以下「グリーンマウス」と記す）を日本エスエルシーから購入して使用した。出生後1日目（1日齢）および8週目（8週齢）のグリーンマウスから肝臓を摘出し、実施例3と同じ方法で細胞懸濁液を調製した。実施例3と同じ方法でヘキスト染色および免疫蛍光染色（抗CD31抗体、抗CD45抗体、PI）を行い、フローサイトメトリーにより、血管内皮細胞のMP細胞を回収した。回収したMP細胞（ 1×10^5 個）を肝障害モデルマウスに移植した。肝血管障害モデルマウスは、出生後7日（7日齢）および8週（8週齢）のC57BL/6マウスに、モノクロタリン（Sigma-Aldrich社製）を300mg/kgの用量で腹腔内投与し、同日に30rads/gの放射線を全身照射して作製した。MP細胞の移植から2か月後に、麻酔下でマウスを開腹し、肝臓を蛍光実体顕微鏡（Leica社製）で観察した。さらに、肝臓を摘出して実施例3と同じ方法で細胞懸濁液を調製し、ヘキスト染色および免疫蛍光染色（抗CD31抗体、抗CD45抗体、PI）を行い、フローサイトメトリーにより、SP細胞の存在を解析した。

[0039] 4-2 結果

1日齢のグリーンマウス肝臓のMP細胞を7日齢の肝臓障害モデルマウスに移植した結果を図4に示した。（A）は移植2ヶ月後の肝臓障害モデルマウスの肝臓を観察した結果であり、（B）は（A）のマウス肝臓におけるCD31陽性GFP陽性細胞の存在をフローサイトメトリーにより解析した結果であり、（C）は（B）のCD31陽性GFP陽性細胞におけるSP細胞の存在をフローサイトメトリーにより解析した結果である。（A）に示されるように、肝臓障害モデルマウスの肝臓中に移植されたグリーンマウス由来のGFP陽性細胞が観察された。また、（B）に示されるように、多数のCD31陽性GFP陽性細胞が検出されたことから、グリーンマウスの血管内皮細胞がホストの肝臓で血管を形成していることが判明した。さらに、（C）に示されるように、CD31陽性GFP陽性細

胞中にSP細胞が1.5%存在することが判明した。この結果は、MP細胞は適切な環境下でSP細胞にリプログラミングできることを示す。

[0040] 新生児マウス（1日齢）および成体マウス（8週齢）のGFP陽性MP細胞を、それぞれ新生児肝臓障害モデルマウス（7日齢）および成体肝臓障害モデルマウス（8週齢）に移植した結果のまとめを表1に示した。成体マウスの肝臓に移植されたMP細胞はSP細胞にリプログラミングされなかったが、新生児マウスの肝臓に移植されたMP細胞はSP細胞にリプログラミングされることが明らかになった。また、成体マウスのMP細胞より新生児マウスのMP細胞の方がSP細胞にリプログラミングされやすいことが示された。この結果は、新生児の肝臓においては、MP細胞をSP細胞にリプログラミングさせる因子が多く含まれており、成体の肝臓にはそのような因子がほとんど存在しないことを示唆するものである。また、新生児の肝臓内のMP細胞は、成体のMP細胞よりもリプログラミング因子の影響を受けやすく、SP細胞にリプログラミングされやすいと考えられた。

[0041] [表1]

血管内皮細胞の細胞源	移植された組織	血管内皮細胞からの血管内皮幹細胞へのリプログラミングの程度
成体肝臓	成体肝臓	ほぼなし
成体肝臓	新生児肝臓	わずか
新生児肝臓	成体肝臓	ほぼなし
新生児肝臓	新生児肝臓	高頻度

[0042] [実施例5：CD157陽性CD200陽性の血管内皮幹細胞の発生過程の解析]

5-1 実験方法

C57BL/6マウス（日本エスエルシー）の胎生13日目（E13）、15日目（E15）、18日目（E18）の胎児マウス、出生後1日目（P1）、4日目（P4）、7日目（P7）、14日目（P14）の新生児マウス、および8週目（8W）の成体マウスからそれぞれ肝臓を摘出し、実施例1、3と同様に細胞懸濁液を調製した。モノク

ローナル抗体として抗CD31抗体 (clone MEC13.3, BD Biosciences社製)、抗CD45抗体 (Clone 30-F11, BD Biosciences社製)、抗CD157抗体 (clone BP3, Biolegend社製)、抗CD200抗体 (clone OX90, Biolegend社製) を使用した。染色した細胞にPropidium iodide (PI, 2 μ g/mL, Sigma-Aldrich社製) を加え、死細胞の核を染色して死細胞を除去した。フローサイトメトリー解析には、SOAP FACSAria (BD Bioscience社製) およびFlowJo Software (Treestar Software社製) を使用した。

[0043] 5-2 結果

結果を図5に示した。肝臓内のCD31陽性CD45陰性細胞を肝臓の血管内皮細胞としてゲートし、CD200およびCD157の発現をフローサイトメトリーで解析すると、E15までは血管内皮細胞はすべてCD200陰性CD157陰性の細胞であるのに対して、E18でわずかにCD200陽性CD157陰性細胞が出現した。出生後になると、P1でCD200陽性CD157陰性細胞集団がCD200陰性CD157陰性細胞集団ときれいに分画され始めたが、CD200陽性CD157陽性細胞集団はほとんど現れていない。P4になるとCD200陽性CD157陽性細胞がわずかに現れ、P7、P14ではCD200陽性CD157陽性細胞が徐々に増加し、8Wの成体マウスでは全体の血管内皮細胞中の4~6%がCD200陽性CD157陽性細胞となった。データを示していないが、それ以降はほぼ同じ割合でCD200陽性CD157陽性細胞の血管内皮幹細胞が肝臓内に存在した。この結果は、実施例3のヘキスト排除法によるSP細胞中の血管内皮幹細胞と同じであった。すなわち、胎児期の肝臓内には血管内皮幹細胞は存在せず、出生直前に幹細胞性を一部持ち合わせているが幹細胞より分化の進んだ血管内皮前駆細胞が一部出現し、出生後の肝臓内で血管内皮幹細胞が発生してくることが明らかになった。

[0044] [実施例6：CD157陰性CD200陰性細胞血管内皮細胞は新生児肝臓内環境で血管内皮幹細胞に変化する]

6-1 実験方法

胎生15日目 (E15) グリーンマウスの肝臓を摘出し、実施例3と同じ方法で細胞懸濁液を調製し、実施例5と同じ抗CD31抗体、抗CD45抗体、抗CD157抗体

、抗CD200抗体で染色してフローサイトメトリーに供し、CD200陰性CD157陰性の血管内皮細胞（CD31陽性CD45陰性細胞）を回収した。回収した細胞を実施例4と同様に、出生後7日目（7日齢）の肝障害モデルマウス（C57BL/6）の肝臓に移植した。肝障害モデルマウスは、実施例4と同じ方法で作製した。移植から2か月後に麻酔下でマウスを開腹し、肝臓を蛍光実体顕微鏡（Leica社製）で観察した。さらに、肝臓を摘出して実施例3と同じ方法で細胞懸濁液を調製し、実施例5と同じ抗CD31抗体、抗CD45抗体、抗CD157抗体で染色してフローサイトメトリー解析を行った。

[0045] 6-2 結果

結果を図6に示した。（A）は移植2ヶ月後のホストマウスの肝臓を観察した結果であり、（B）は（A）のホストマウス肝臓におけるCD31陽性CD45陰性GFP陽性細胞中のCD200陽性CD157陽性細胞の存在をフローサイトメトリーにより解析した結果である。（A）に示されるように、ホストマウスの肝臓中に、グリーンマウス由来のGFP陽性細胞が多数存在することが観察され、グリーンマウス胎児のCD200陰性CD157陰性の血管内皮細胞（CD31陽性CD45陰性GFP陽性細胞）は、新生児の肝臓環境下で類洞血管への貢献性を獲得することが判明した。また、（B）に示されるように、移植されたグリーンマウス胎児のCD200陰性CD157陰性血管内皮細胞の一部が、CD200陽性CD157陽性の血管内皮幹細胞にリプログラミングしていることが判明した。

[0046] [実施例7：ヒト血管内皮細胞から血管内皮幹細胞への変化]

7-1 実験方法

出生直後のヒトの血管内皮細胞として、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（human umbilical vein endothelial cells; HUVEC）（ロンザ社）を使用した。HUVECはHuMedia-EG2（KURABO, Osaka, Japan）培養液を用いて培養した。HUVECを6ウェルプレートに 1.0×10^5 個/ウェルで播種し、ポアサイズ $1.0 \mu\text{m}$ のカルチャーインサート（Corning, NY, USA）をウェルにセットした。出生後4日目の新生児マウス（C57BL/6）の肝臓を摘出し、実施例1と同じ方法で細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液中の細胞 2.0×10^6 個をカルチャーインサートに播種し

、HUVECと新生児マウス由来細胞が直接接触しない状態で5日間共培養した。共培養後のHUVECを回収し、CD157抗体で染色した後にフローサイトメトリーで解析した。

[0047] 7-2 結果

結果を図7に示した。共培養前のHUVECはCD157陰性であったが、新生児マウス肝臓由来の細胞との共培養により、CD157の発現が陽性に誘導された。この結果から、新生児の肝臓内の細胞には、CD157を誘導し、内皮細胞から内皮幹細胞に分化誘導する能力があることが実証され、また肝臓から分泌される液性因子がこの分化転換に関わっていることが示唆された。

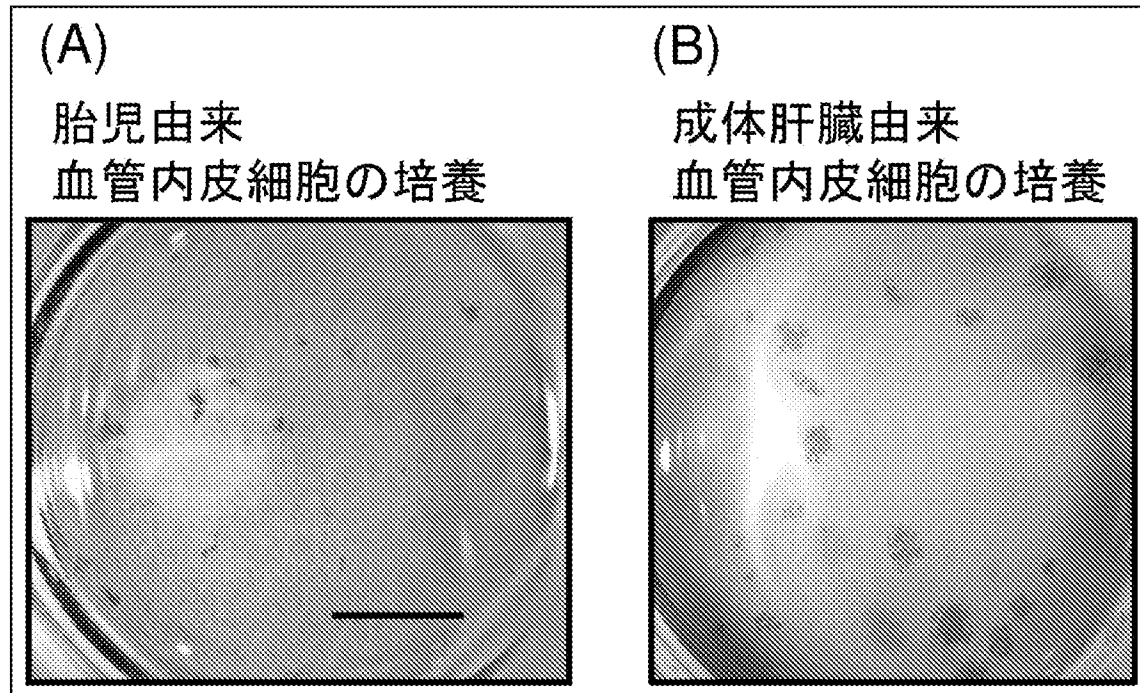
[0048] なお本発明は上述した各実施形態および実施例に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された学術文献および特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

請求の範囲

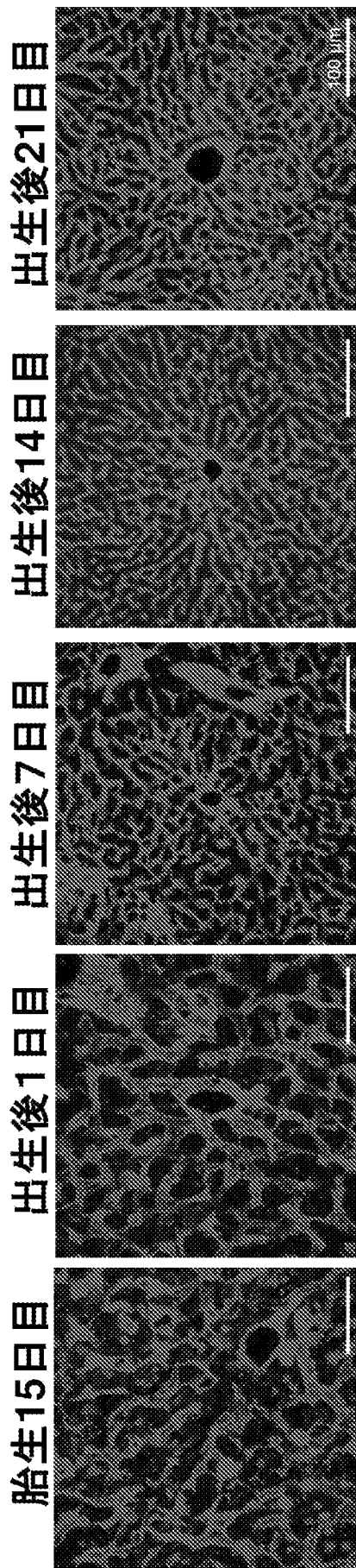
- [請求項1] 幹細胞性を有しない血管内皮細胞と、新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子とを接触させる工程を含むことを特徴とする、血管内皮幹細胞の製造方法。
- [請求項2] 前記工程が、以下の（１）または（２）のいずれかにより行われることを特徴とする、請求項１に記載の製造方法：
- （１）前記幹細胞性を有しない血管内皮細胞を非ヒト哺乳動物の臓器に移植する、または
- （２）新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子を含む培養系を用いて前記幹細胞性を有しない血管内皮細胞を培養する。
- [請求項3] 前記新生児期または幼若期の哺乳動物が、新生児期の哺乳動物である、請求項１または２に記載の製造方法。
- [請求項4] 前記幹細胞性を有しない血管内皮細胞が、新生児期または幼若期の哺乳動物から取得した細胞である、請求項１～３のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項5] 前記幹細胞性を有しない血管内皮細胞が、新生児期の哺乳動物から取得した細胞である、請求項４に記載の製造方法。
- [請求項6] 前記臓器が肝臓である、請求項１～５のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項7] 新生児期または幼若期の哺乳動物の臓器から分泌される因子を含有する、血管内皮幹細胞誘導剤。
- [請求項8] 前記因子を含む新生児期もしくは幼若期の哺乳動物の臓器から調製した細胞の培養上清、または、前記因子を含む新生児期もしくは幼若期の哺乳動物の臓器抽出液を含有する、請求項７に記載の血管内皮幹細胞誘導剤。
- [請求項9] 前記新生児期または幼若期の哺乳動物が、新生児期の哺乳動物である、請求項７または８に記載の血管内皮幹細胞誘導剤。

[請求項10] 前記臓器が肝臓である、請求項7～9のいずれかに記載の血管内皮幹細胞誘導剤。

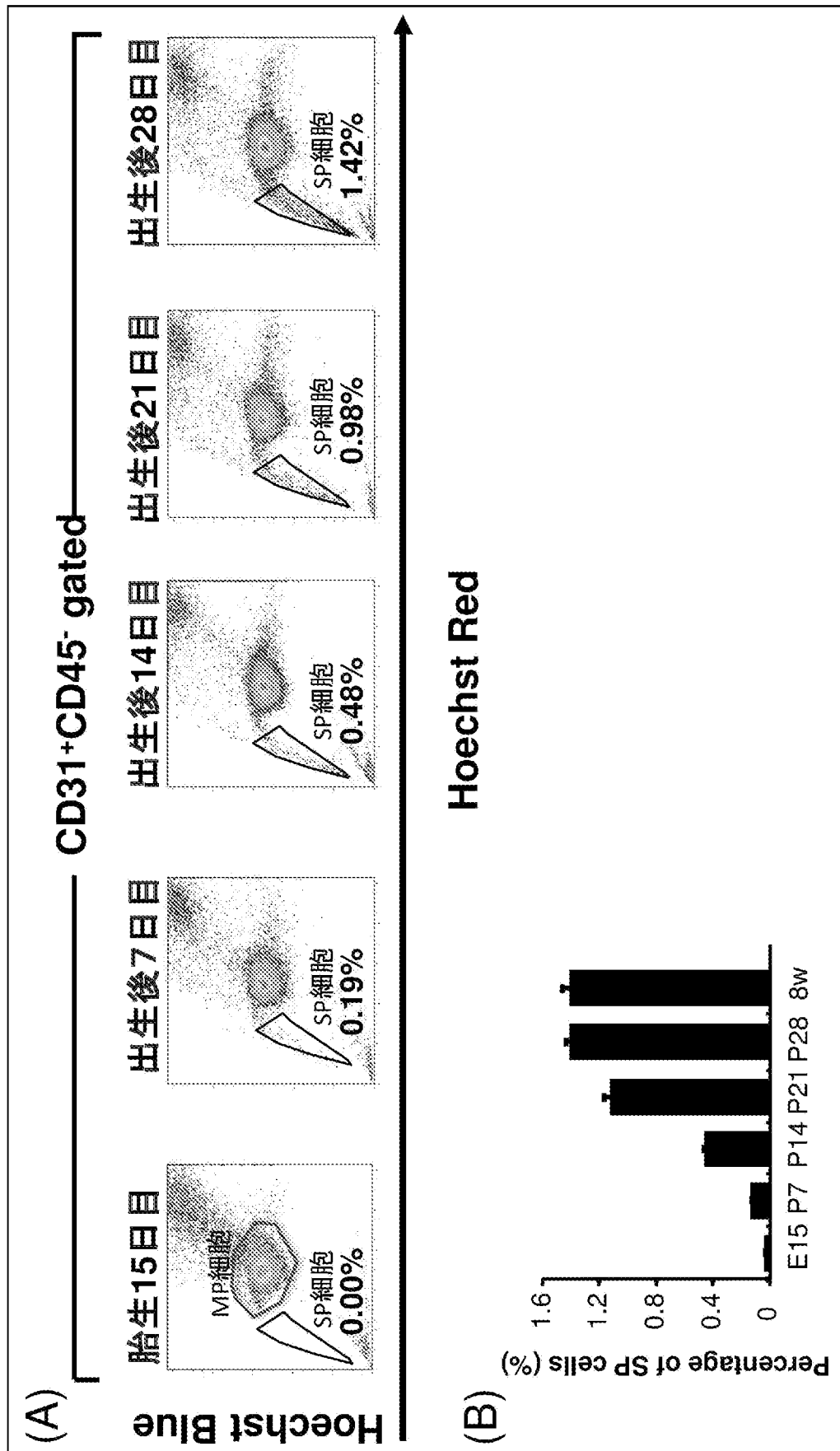
[図1]



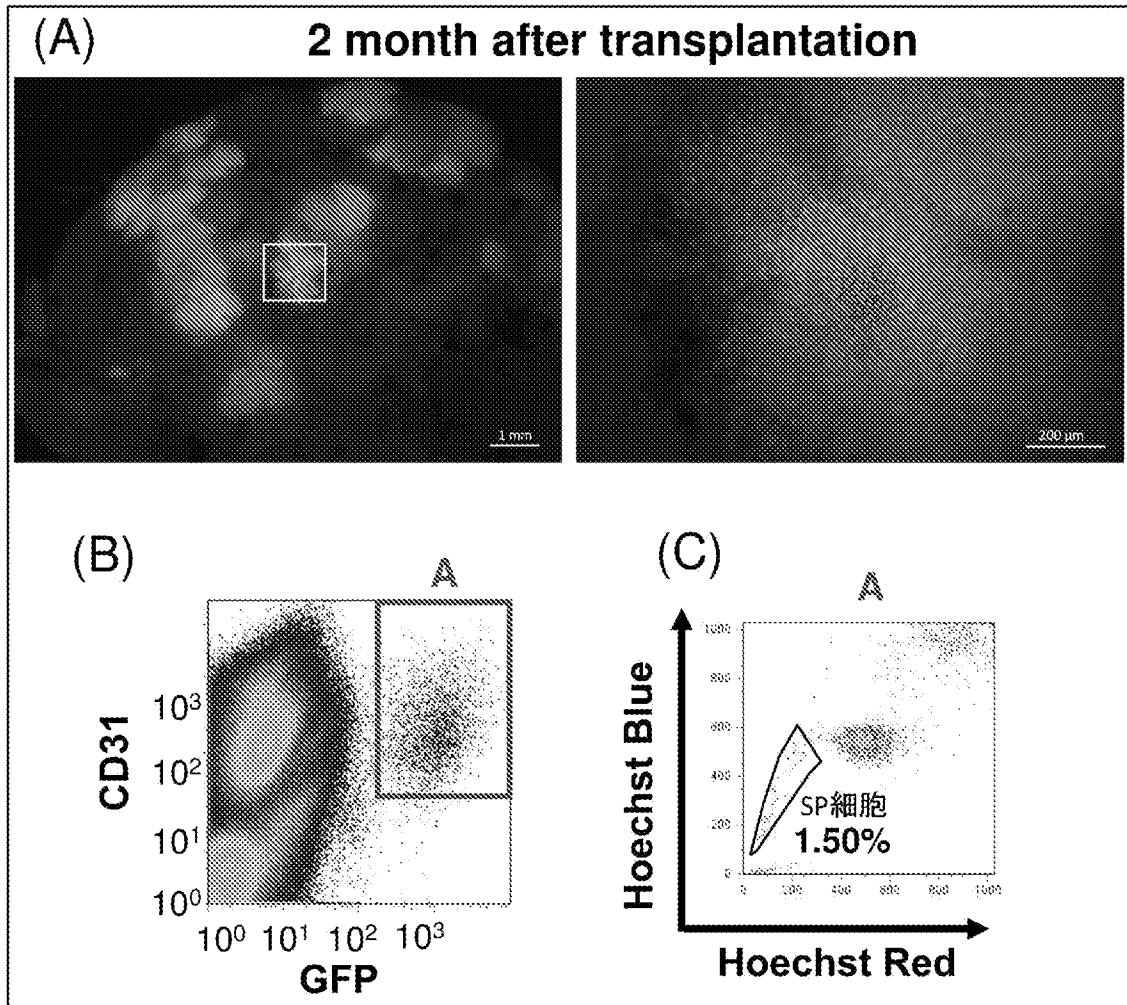
[図2]



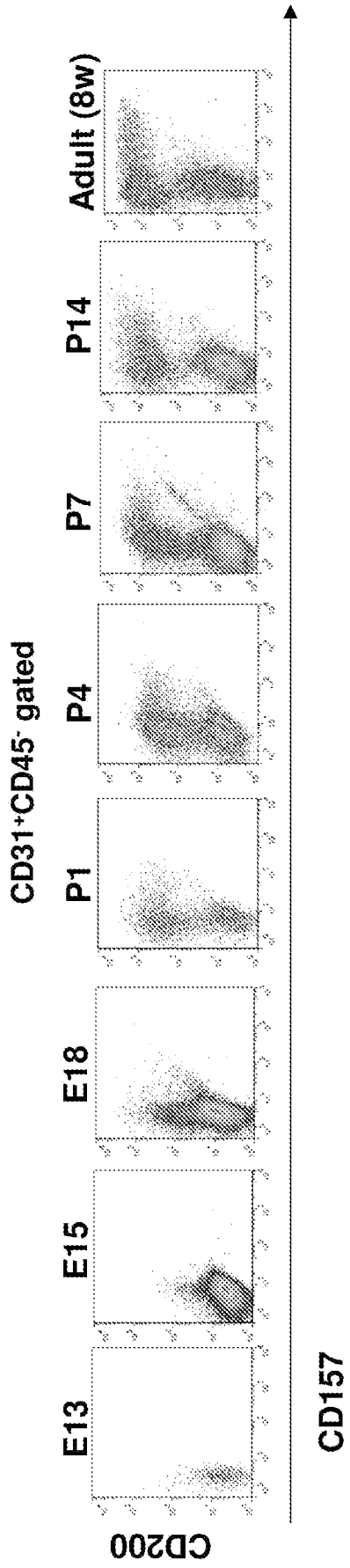
[図3]



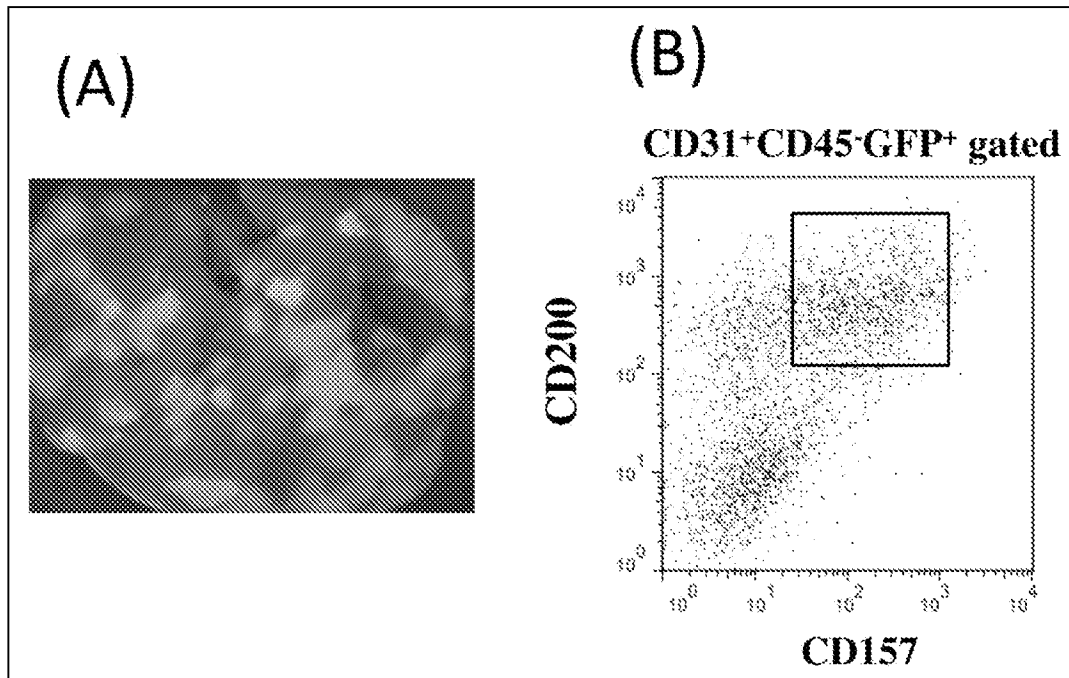
[図4]



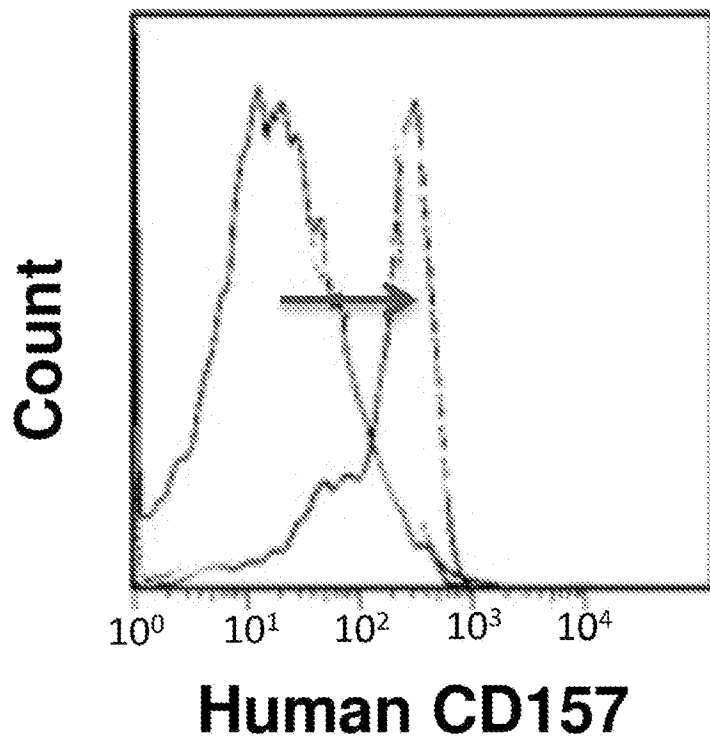
[5]



[圖6]



[圖7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/038029

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 5/074 (2010.01) i FI: C12N5/074 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 Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2020 Registered utility model specifications of Japan 1996-2020 Published registered utility model applications of Japan 1994-2020 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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	高倉伸幸, 戦略的創造研究推進事業 CREST 研究領域「人工多能性幹細胞(iPS 細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」研究課題「生理的細胞リプログラミング機構の解明とその応用」研究終了報告書 [オンライン], 2017 [retrieval date 28 October 2020], Internet: < https://web.archive.org/web/20171119013145/https://www.jst.go.jp/kisoken/crest/research/s-houkoku/JST_1111057_09154542_EE.pdf >, pp. 1-21, in particular, pp. 5-10, non-official translation (TAKAKURA, Nobuyuki, "JST Strategic Basic Research Programs, CREST Research area, 'Basic medical technology such as production and control of induced pluripotent stem cells (iPS cells)', research subject 'Structural elucidation of Physiological cellular reprogramming and its application'", Research completion reports[online])	1-10
<input checked="" type="checkbox"/>	Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> 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 28 October 2020 (28.10.2020)	Date of mailing of the international search report 10 November 2020 (10.11.2020)	
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/JP2020/038029

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	舘田知実, 血管内皮細胞の脱分化に及ぼす微小環境の影響 - ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)と胎盤抽出物を用いた検討 -, ヒューマンサイエンス, 2011, no. 14, pp. 88-90, in particular, p. 89, right column, non-official translation (TATEDA, Tomomi, "Effect of microenvironment on dedifferentiation of vascular endothelial cells -A study using human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and placenta extract-", Human sciences)	1-10
A	WO 2019/098264 A1 (OSAKA UNIVERSITY) 23 May 2019 (2019-05-23) entire text	1-10
A	WO 2008/066630 A2 (CARITAS ST. ELIZABETH MEDICAL CENTER OF BOSTON, INC.) 05 June 2008 (2008-06-05) claims	1-10
A	JP 2008-528059 A (PRIMEGEN BIOTECH, LLC) 31 July 2008 (2008-07-31) claims	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2020/038029

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2019/098264 A1	23 May 2019	(Family: none)	
WO 2008/066630 A2	05 Jun. 2008	US 2010/0135970 A1 claims	
JP 2008-528059 A	31 Jul. 2008	WO 2006/084229 A2 claims	

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) C12N 5/074(2010.01)i FI: C12N5/074		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) C12N5/074 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 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (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	
A	高倉伸幸, 戦略的創造研究推進事業 CREST 研究領域「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」研究課題「生理的細胞リプログラミング機構の解明とその応用」研究終了報告書 [オンライン], 2017 [検索日 2020.10.28], インターネット: < https://web.archive.org/web/20171119013145/https://www.jst.go.jp/kisoken/crest/research/s-houkoku/JST_1111057_09154542_EE.pdf >, p. 1-21 特にp. 5-10	1-10
A	館田知実, 血管内皮細胞の脱分化に及ぼす微小環境の影響 ―ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) と胎盤抽出物を用いた検討―, ヒューマンサイエンス, 2011, No. 14, p. 88-90 特にp. 89右欄	1-10
A	WO 2019/098264 A1 (国立大学法人大阪大学) 23.05.2019 (2019-05-23) 全文	1-10
A	WO 2008/066630 A2 (CARITAS ST. ELIZABETH MEDICAL CENTER OF BOSTON, INC.) 05.06.2008 (2008-06-05) 請求の範囲	1-10
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献	“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 28.10.2020	国際調査報告の発送日 10.11.2020	
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	権限のある職員 (特許庁審査官) 山内 達人 4N 3348 電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

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
A	JP 2008-528059 A (プライムジェン バイオテック エルエルシー) 31, 07, 2008 (2008 - 07 - 31) 特許請求の範囲	1-10

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
 PCT/JP2020/038029

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2019/098264 A1	23.05.2019	(ファミリーなし)	
WO 2008/066630 A2	05.06.2008	US 2010/0135970 A1 請求の範囲	
JP 2008-528059 A	31.07.2008	WO 2006/084229 A2 請求の範囲	