

(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  
2009年10月22日(22.10.2009)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2009/128533 A1

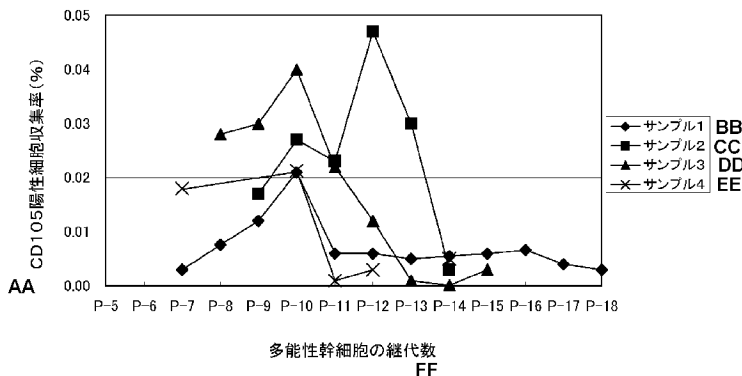
- (51) 国際特許分類:  
C12N 5/06 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/057766
- (22) 国際出願日: 2009年4月17日(17.04.2009)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2008-109002 2008年4月18日(18.04.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人名古屋大学(NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION NAGOYA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒4648603 愛知県名古屋市千種区不老町1番 Aichi (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 鳥橋 茂子 (TORIHASHI, Shigeko) [JP/JP]; 〒4648603 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP). 蛭川 菜々 (NINAGAWA, Nana) [JP/JP]; 〒4648603 愛知県名古屋市千種区不老町1番 国立大学法人名古屋大学内 Aichi (JP).
- (74) 代理人: 安部 誠(ABE, Makoto); 〒4600002 愛知県名古屋市中区丸の内3丁目17番13号CR
- (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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: MESENCHYMAL STEM CELL AND METHOD FOR PRODUCTION THEREOF

(54) 発明の名称: 間葉系幹細胞およびその生産方法

【図3】

FIG.3



AA RATE OF COLLECTION OF CD105-POSITIVE CELLS (%)  
 BB SAMPLE 1  
 CC SAMPLE 2  
 DD SAMPLE 3  
 EE SAMPLE 4  
 FF NUMBER OF SUBCULTURES OF PLURIPOTENT STEM CELL

(57) Abstract: Disclosed is a method for producing a mesenchymal stem cell capable of being differentiated into a myoblast by culturing a pluripotent stem cell derived from a human body or an animal. The method comprises the following steps i) to iv): i) providing the pluripotent stem cell which has been cryopreserved; ii) subculturing the pluripotent stem cell for a predetermined number of times while keeping the pluripotent stem cell in an undifferentiated state; iii) culturing the subcultured pluripotent stem cell under conditions which enable the induction of the differentiation of the pluripotent stem cell into a fat cell *in vitro*; and iv) separating and collecting a CD105-positive cell in the culturing step.

(57) 要約: 本発明は、ヒト又は動物由来の多能性幹細胞を培養して筋芽細胞へ分化する能力を有する間葉系幹細胞を生産する方法であって、i) 凍結保存された前記多能性幹細胞を用意すること、ii) 前記用意した多能性幹細胞を未分化の状態です定回数継代すること、iii) 前記継代した前記多能性幹細胞を、生体

外で脂肪細胞へ分化誘導可能な条件で培養すること、及び iv) 前記培養過程において、CD105陽性である細胞を分離回収すること、を包含する。

WO 2009/128533 A1

## 明 細 書

**発明の名称**： 間葉系幹細胞およびその生産方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、多能性幹細胞から脂肪細胞への分化誘導過程において得られる間葉系幹細胞とその生産方法に関する。詳しくは、高率に筋芽細胞へ分化し得るCD105陽性の間葉系幹細胞とその生産方法に関する。

なお、本国際出願は2008年4月18日に出願された日本国特許出願第2008-109002号に基づく優先権を主張しており、その出願の全内容は本明細書中に参照として組み入れられている。

### 背景技術

[0002] 再生医療において、人工的に培養した細胞や組織を用いて、病気や事故などによって失われた細胞、組織、器官の再生や機能の回復させる取り組みが進められている。特に、動脈硬化症・心筋梗塞・肝硬変・糖尿病等の生活習慣病や、有効な治療薬のないパーキンソン病・筋ジストロフィーなどの難病に対する治療として、移植に適合する安全且つ効果的な細胞の探索が行われている。

間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem cells; MSC) は、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、線維芽細胞、及び筋芽細胞等の、種類の異なるさまざまな間葉系の細胞へ分化する能力を持つ細胞で、自家移植が可能であることから、再生医療への応用が期待されている細胞の一つとして挙げられる。

間葉系幹細胞としては、ヒトの骨髄中に骨髄由来の間葉系幹細胞として存在しているものが知られているが、骨髄から分離して精製される量が非常に少ないため、他の生体組織から、特に脂肪組織から間葉系幹細胞 (Adipose-derived Stem Cells; 以下「ADSCs」という。) を大量に得る方法が注目されている。脂肪組織から分離されたADSCsは、脂肪細胞や骨細胞への多分化能力を持ち、また、免疫寛容性を持つこ

とが報告されている（非特許文献1～4）。

## 先行技術文献

### 非特許文献

- [0003] 非特許文献1 : Zuk, P. A. et al. Mol. Biol. Cell. 13: 4279-4295, 2002  
非特許文献2 : Zuk, P. A. et al. Tissue Eng. 7: 211-228, 2001  
非特許文献3 : Rodriguez, A. M. et al. J. Exp. Med. 201: 1397-1405, 2005  
非特許文献4 : Qu-Petersen. et al. J. Cell Biol. 157: 851-864, 2002

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0004] しかしながら、ヒトの脂肪組織中には、ADSCsの他にも神経、血管、及び脂肪細胞等のさまざまな細胞種が混在しており、その中からADSCsを効率良く分離することは困難である。

また、脂肪組織中から分離したADSCsは、多分化能力を有するものの、ADSCsから脂肪細胞又は骨細胞へと分化誘導するのに比べて、筋芽細胞には極めて分化誘導され難いことが知られている。筋芽細胞は、筋芽細胞同士が融合して管状の筋管を形成し、さらに分化を続けると最終的に骨格筋を形成する前駆細胞であり、再生医療において有用な細胞である。

従って、ADSCsに代わって、如何にして筋芽細胞へと分化する間葉系幹細胞を効率良く大量に分離回収するかが本発明の課題として挙げられる。

- [0005] 本発明はかかる課題に鑑みてなされたものであり、その主な目的は、多能性幹細胞から脂肪細胞への分化誘導過程において、筋芽細胞へ分化し得る間葉系幹細胞を効率良く且つ大量に生産する方法を提供することである。また、当該生産方法により得られる細胞培養物であって、筋芽細胞へ分化し得る間葉系幹細胞を高率に含有する細胞培養物を提供することを他の目的とする。また、そのような方法及び／又は細胞培養物の利用により、多能性幹細胞から効率よく目的の形態に分化した細胞（例えば、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、或いは筋芽細胞）を生産する方法を提供することを他の目的とする。

## 課題を解決するための手段

[0006] 上記課題を解決すべく本発明によって提供される細胞培養物は、ヒト又は動物由来の多能性幹細胞から分化したCD105陽性の間葉系幹細胞を含む細胞培養物であって、該培養物に含まれる細胞の少なくとも一部は、上記多能性幹細胞を脂肪細胞へ分化誘導可能な条件での培養によって筋芽細胞へ分化する能力を有する細胞であることを特徴とする。

[0007] なお、本明細書において「多能性幹細胞」とは、成体を構成する種々の組織に分化できる多能性と自己複製能を有する未分化細胞をいい、例えば、EC細胞（Embryonal Carcinoma cell；胚性癌種細胞）、ES細胞（Embryonic Stem cell；胚性幹細胞）、EG細胞（Embryonic Germ cell；胚性生殖細胞）、及びiPS細胞（induced Pluripotent Stem cell；人工多能性幹細胞）等は、ここでいう多能性幹細胞の典型例である。また、本明細書においては、ヒト又は動物（典型的には哺乳動物）に由来する多能性幹細胞をいう。

また、本明細書において「間葉系幹細胞」とは、未分化な細胞で、脂肪細胞、軟骨細胞、骨細胞、筋芽細胞、線維芽細胞、ストローマ細胞、及び腱細胞等のさまざまな間葉系の細胞へ分化する能力を持ち、且つ自己複製の能力を持つ細胞をいう。生体内においては骨髄に存在する間葉系幹細胞がその代表的なものであるが、他の組織、例えば脂肪組織、臍帯血、歯髄等から分離されたさまざまな組織由来の間葉系幹細胞が存在する。

また、本明細書において「CD105」とは、成長及び分化因子であるTGF- $\beta$ のレセプターであって、ADSCsの細胞表面や、血管や血球の前駆細胞、骨髄由来幹細胞等で発現する糖タンパク質である。

[0008] 本発明者らは、多能性幹細胞のさまざまな間葉系の細胞へと分化する多能性と自己複製能を利用することによって、ヒト又は動物由来の多能性幹細胞から、脂肪細胞へ分化誘導する過程において、CD105陽性の間葉系幹細胞を含む細胞培養物を生産したところ、上記間葉系幹細胞には筋芽細胞に分

化する能力を有する細胞が含まれることを見出し、本発明を完成するに至った。従って、上記間葉系幹細胞を分離回収し、目的の細胞（例えば、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、或いは筋芽細胞、典型的には筋芽細胞）への分化誘導可能なそれぞれの条件で更に培養すると、目的の形態に分化した細胞（例えば、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、或いは筋芽細胞、典型的には筋芽細胞）が得られる。例えば、上記CD105陽性の細胞培養物を筋芽細胞への分化誘導可能な条件で培養することにより、紡錘形状の筋芽細胞が得られる。

高度な機能を有する骨格筋の前駆体である筋芽細胞は、脂肪細胞や骨細胞へ分化誘導するのと比較して、間葉系幹細胞から分化誘導するのが困難である。しかしながら、ここで開示される本発明によると、ヒト又は動物由来の多能性幹細胞から脂肪細胞への分化誘導過程において、筋芽細胞に分化する能力を有する細胞を高率に含む細胞培養物を容易且つ大量に得ることができる。

即ち、本発明は、筋芽細胞へ分化する能力を有する細胞を移植細胞として提供する。本発明によると、再生医療において、広範な筋肉の欠損部位や機能損傷部位の機能改善や組織形成に寄与し得る細胞培養物を好適に提供することができる。

[0009] ここで開示される細胞培養物の好ましい一態様では、上記ヒト又は動物由来の多能性幹細胞はES細胞である。

かかるES細胞は、高い増殖能とさまざまな細胞へと分化できる多能性を持つことから本発明に係る多能性幹細胞として有用であり好ましい。

また、ここで開示される細胞培養物の他の好ましい一態様では、上記ヒト又は動物由来の多能性幹細胞はiPS細胞である。iPS細胞は、ES細胞と同様の特性を持ちつつ、且つ体細胞から作製され倫理的な問題が絡まない点において、本発明にかかる目的を達成する上で特に好ましい多能性幹細胞である。

[0010] また、ここで開示される細胞培養物の他の好ましい一態様では、上記間葉系幹細胞から分化した筋芽細胞を含むことを特徴とする。かかる態様の細胞

培養物により、上記幹細胞から分化した筋芽細胞を提供することができる。

また、ここで開示される細胞培養物の他の好ましい一態様では、少なくとも50%以上（特に好ましくは80%以上）の細胞が上記間葉系幹細胞であることを特徴とする。かかる態様の細胞培養物によると、高率に上記幹細胞から分化した筋芽細胞を提供することができる。

[0011] さらに、本発明は、上記目的を実現する他の側面として、ヒト又は動物由来の多能性幹細胞を培養して筋芽細胞へ分化する能力を有する間葉系幹細胞を生産する方法を提供する。

ここで開示される方法は、i) 凍結保存された上記多能性幹細胞を用意すること、ii) 上記用意した多能性幹細胞を未分化の状態ですべて回数継代すること、iii) 上記継代した上記多能性幹細胞を、生体外で脂肪細胞へ分化誘導可能な条件で培養すること、及びiv) 上記培養過程において、CD105陽性である細胞を分離回収すること、を包含する。

本発明に係る生産方法では、ヒト又は動物由来の多能性幹細胞から脂肪細胞へ分化誘導する過程において、脂肪細胞の形成以前に出現する細胞の中から、CD105を発現した間葉系幹細胞のみを分離回収する。従って、ADSCsのように、神経、血管、及び脂肪細胞等のさまざまな細胞種が混在する脂肪組織の中からADSCsのみを取り出すような複雑な処理を伴わない。即ち、多能性幹細胞を脂肪細胞に分化誘導する培養の過程の中で、効率的且つ大量に間葉系幹細胞を生産することができる。

[0012] 本発明の生産方法では上記凍結保存された多能性幹細胞は、脂肪細胞への分化誘導を行う前に自己複製、即ち未分化の状態ですべて回数継代する。これにより、間葉系幹細胞から筋芽細胞への分化誘導効率を向上させることができる。

例えば、ES細胞の場合、凍結保存されたES細胞（胞胚内の内部細胞塊より新たに樹立したES細胞、或いは、既に樹立されたES細胞のいずれも限定しない）を白血病抑制因子であるLIF（Leukemia Inhibitory Factor）の存在下で継代を繰り返した後、脂肪細胞へ

の分化誘導を行う。このように未分化の状態に継代を行うことにより、凍結保存された多能性幹細胞を分化誘導に適する細胞数まで増やすことができる。

また、ここで開示される方法の好ましい一態様では、上記継代は未分化の状態に8～12回（特に好ましくは9～11回）行うことを特徴とする。8～12回継代した多能性幹細胞を用いて脂肪細胞へ分化誘導する条件の培養を行うことによって、得られるCD105陽性の間葉系幹細胞の筋芽細胞への分化能力を顕著に向上させることができる。

即ち、本態様の生産方法によると、凍結解凍後の多能性幹細胞の継代を8～12回（特に好ましくは9～11回）行うことによって、筋芽細胞へと分化誘導することができる能力を有する間葉系幹細胞を大量に得ることができる。その結果、かかる態様の方法では、再生医療において非常に有用な医療材料としての役割を担い得る間葉系幹細胞を提供することができる。

[0013] ここで開示される方法の他の好ましい一態様では、生体外で脂肪細胞へ分化誘導可能な条件下で培養を行う。典型的な分化誘導可能な条件として、レチノイン酸を添加した培養液で浮遊培養した後、インシュリンおよびトリヨードサイロニン（T3）を添加した培養液で培養することが挙げられる。例えば、レチノイン酸を添加した培養液での浮遊培養は、数日間（例えば、2～3日間、特に好ましくは2日間）行うことが好ましい。生体外で上記培養液を用いて分化誘導を行うと、多能性幹細胞の分化が促進され、培養過程において間葉系幹細胞を高率に発現させることができる。

また、ここで開示される方法の他の好ましい一態様では、上記継代した後の上記多能性幹細胞の分化誘導可能な条件での培養は、21日を超えない期間行うことを特徴とする。21日以上期間培養すると多能性幹細胞のうち脂肪細胞に分化する確率が高まるため、脂肪細胞の分化以前に発現する間葉系幹細胞の分離回収効率が低下するため好ましくない。従って、継代後の培養開始から21日を超えない期間（典型的には7～21日間、好ましくは7～14日間、特に好ましくは12～14日間）培養し、後述するCD105

陽性である細胞を分離させる処理を行うことが好ましい。

[0014] さらに、ここで開示される方法の他の好ましい態様では、CD105陽性である細胞を分離する手段として、種々のセルソーティング法が用いられる。特に、好ましい態様として、マグネティックセルソーティング法（MACS法）が挙げられる。例えば、かかる方法の一例として、抗CD105抗体にあらかじめ磁気を帯びたビーズを担持させた修飾分子を用意し、細胞表面にCD105を発現している細胞に抗原抗体反応により該修飾分子を結合させて、該修飾分子が結合したCD105陽性の細胞のみを磁石により分離するという方法が挙げられる。このように、本態様の方法によると、煩雑で手間のかかる操作を行うことなく、CD105を細胞表面に発現しているCD105陽性の細胞（即ち間葉系幹細胞）を効率良く大量に得る（分離回収する）ことができる。

[0015] また、本発明は、上記目的を実現する他の側面として、ヒト又は動物由来の多能性幹細胞を培養して目的の形態に分化した細胞（例えば、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、或いは筋芽細胞、典型的には筋芽細胞）を生産する方法を提供する。

この方法は、i) 凍結保存された上記多能性幹細胞を用意すること、ii) 上記用意した多能性幹細胞を未分化の状態ですべて回数継代すること、iii) 上記継代した上記多能性幹細胞を、生体外で脂肪細胞へ分化誘導可能な条件で培養すること、iv) 上記培養過程において、CD105陽性である間葉系幹細胞を分離回収すること、及び、v) 上記分離回収したCD105陽性細胞を、生体外で目的の細胞（例えば、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、或いは筋芽細胞、典型的には筋芽細胞）へ分化誘導可能なそれぞれの条件で更に培養すること、を包含する。

好ましくは、上記多能性幹細胞としてES細胞を使用する。

また、好ましくは、上記多能性幹細胞を未分化の状態ですべて8～12回（特に好ましくは9～11回）継代する。

## 図面の簡単な説明



[0016] [図1] 図1は、多能性幹細胞を脂肪細胞に分化誘導可能な条件下で培養し、培養後13日目の細胞をCD105蛍光免疫染色した蛍光顕微鏡写真である。

[図2] 図2は、多能性幹細胞を脂肪細胞に分化誘導可能な条件下で培養し、培養後13日目の細胞をCD105蛍光免疫染色した位走査顕微鏡写真である。

[図3] 図3は、多能性幹細胞の継代数に対するCD105陽性細胞の収率を示したグラフである。

[図4] 図4は、MACS法による分離を行っていない細胞群のFACSによる解析結果を示す。

[図5] 図5は、MACS法により分離した細胞群（CD105陽性細胞群）のFACSによる解析結果を示す。

[図6] 図6は、MACS法により分離した細胞群を位走査顕微鏡で観察した写真である。

[図7] 図7は、脂肪細胞へ分化誘導したCD105陽性細胞をOil Red O染色した細胞の観察写真である。

[図8] 図8は、脂肪細胞へ分化誘導したCD105陰性細胞をOil Red O染色した細胞の観察写真である。

[図9] 図9は、骨細胞へ分化誘導したCD105陽性細胞をAlizarin red染色した細胞の観察写真である。

[図10] 図10は、骨細胞へ分化誘導したCD105陰性細胞をAlizarin red染色した細胞の観察写真である。

[図11] 図11は、軟骨細胞へ分化誘導したCD105陽性細胞をAlcian blue染色した細胞の観察写真である。

[図12] 図12は、軟骨細胞へ分化誘導したCD105陰性細胞をAlcian blue染色した細胞の観察写真である。

[図13] 図13は、筋芽細胞へ分化誘導したCD105陽性細胞をM-cadherin免疫蛍光染色した細胞の観察写真である。

[図14] 図14は、筋芽細胞へ分化誘導したCD105陽性細胞をMHC免疫

蛍光染色した細胞の観察写真である。

### 発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明の好適な実施形態を説明する。なお、本明細書において特に言及している事項（例えば、間葉系幹細胞を生産する方法）以外の事柄であって本発明の実施に必要な事柄（例えば、多能性幹細胞の継代方法、脂肪細胞への分化誘導条件、骨細胞への分化誘導条件、軟骨細胞への分化誘導条件、筋芽細胞への分化誘導条件）は、医学、薬学、生化学、有機化学、タンパク質工学、分子生物学、獣医学、衛生学等の分野における従来技術に基づく当業者の設計事項として把握され得る。本発明は、本明細書によって開示されている技術内容と当該分野における技術常識とに基づいて実施することができる。

[0018] ここで開示される方法は、上述のとおり、多能性幹細胞から脂肪細胞への分化誘導過程において、筋芽細胞へ分化し得る間葉系幹細胞を効率良く且つ大量に生産する方法であり、以下の工程を含む。

本発明に係る間葉系幹細胞の生産方法は、i) 凍結保存された上記多能性幹細胞を用意すること、ii) 上記用意した多能性幹細胞を未分化の状態です定回数継代すること、iii) 上記継代した前記多能性幹細胞を、生体外で脂肪細胞へ分化誘導可能な条件で培養すること、iv) 上記培養過程において、CD105陽性である間葉系幹細胞を分離回収すること、を含む。

さらに、v) 上記分離回収したCD105陽性細胞を生体外で目的の細胞（例えば、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、或いは筋芽細胞、典型的には筋芽細胞）へ分化誘導可能なそれぞれの条件で更に培養することによって、目的の形態に分化した細胞（例えば、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、或いは筋芽細胞、典型的には筋芽細胞）を生産することができる。

以下、本発明に係る間葉系幹細胞の生産方法、及び該間葉系幹細胞を分化誘導させて筋芽細胞その他の目的の細胞を生産する方法について詳細に説明する。

[0019] 本発明の目的を実現する限り、使用する多能性幹細胞は特に制限されない

。成体を構成する種々の組織に分化できる多能性と自己複製能を有する細胞であって、例えば、EC細胞、ES細胞、EG細胞、及びiPS細胞等が挙げられるが、ここに開示される技術が好ましく適用される典型例として、ヒト又は動物由来のES細胞またはiPS細胞が挙げられる。

ES細胞としては、内部細胞塊（哺乳動物における受胎後14日以内の胚）から多能性幹細胞を取り出し、生体外で培養できるように株化したものが挙げられる。ES細胞の培養については、例えばLIFの存在下では未分化性を維持し増殖させることができる。その一方、LIFの非存在下では初期胚同様の細胞分化誘導を起こすことができる。本発明において使用されるES細胞は、胞胚内の内部細胞塊より新たに樹立したES細胞、又は既に樹立されたES細胞のいずれに限定するものではない。

また、ES細胞の由来としては、ヒト又は動物に由来するものであることが好ましい。例えば、ヒト、サル、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、イヌ、ネコ、ヒツジ、ブタなどの哺乳動物由来のものが好ましく使用され得る。動物由来ES細胞としては、細胞バンクに登録されたES細胞株又は市販のES細胞株を使用することができる。しかしながら、ヒトの治療には、ヒト由来のES細胞を用いることが好ましい。尚、ヒト由来ES細胞としては、胚が人の生命の萌芽であること及びヒト由来ES細胞がすべての細胞に分化する可能性があることに配慮し、人の尊厳を侵すことのないよう誠実かつ慎重に取扱いを行うことが要請される。

本発明の実施に好適な他の多能性幹細胞として、iPS細胞が挙げられる。iPS細胞は、ES細胞のように受精卵を用いることなく、いずれかの体組織（例えば皮膚組織）に由来する体細胞（典型的には線維芽細胞）から多能性を有する細胞へと人工的に構築された細胞である。即ち、患者本人の細胞から作れるため、拒絶反応を生じずに組織の欠損部位や機能損傷部位の機能改善や組織再生を目的とする治療の一つとして、再生医療への応用が期待される細胞である。

[0020] また、本発明に係る多能性幹細胞としては、凍結保存された上記ES細胞

、iPS細胞等の多能性幹細胞を好適に用いることができる。そして、用意した多能性幹細胞は、脂肪細胞への分化誘導を行う前に未分化の状態に継代することが好ましい。所定回数継代することによって、凍結保存された多能性幹細胞を分化誘導に適する細胞数まで増殖させることができる。また、所望する細胞種への分化誘導効率を向上させることができる。

継代の回数としては、5～17回が一般的に広く行われている継代回数であるが、本発明においては継代を8～12回（特に好ましくは9～11回）行うことが好ましい。凍結保存された多能性幹細胞を解凍後に8～12回（特に好ましくは9～11回）継代した多能性幹細胞を用いて脂肪細胞へ分化誘導する条件の培養を行うとよい。このことによって、得られるCD105陽性の間葉系幹細胞の筋芽細胞への分化能力（確率）を顕著に向上させることができる。

[0021] 生体外での脂肪細胞への分化誘導方法としては、従来から用いられている如何なる誘導方法を用いてもよく、特に限定されないが、典型的には、レチノイン酸を添加した培養液で数日間（例えば2～3日間、特に好ましくは2日間）浮遊培養した後、インシュリンおよびトリヨードサイロニン（T3）を添加した培養液で培養する。以下の実施例に記載される培養液組成は、好適な一例である。

また、本発明の目的を実現する限り、従来この種の細胞の培養に用いられる培養条件を利用することができ、例えば、培地の種類、組成物の内容、組成物の濃度、及び培養温度等に関して特に制限はない。

また、培養期間は、典型的には21日を超えない期間培養をするのが好ましい。脂肪細胞へと分化誘導させた多能性幹細胞は、21日以上のような長期間培養を続けると脂肪細胞へ分化した細胞が大勢を占めるため好ましくない。従って、培養開始から21日を超えない期間（典型的には7～21日間、好ましくは7～14日間、特に好ましくは12～14日間）のうちに、後述する分離方法を用いて、CD105陽性の細胞を分離回収するのが好ましい。

[0022] 発現したCD105陽性細胞を分離回収する手段としては、従来知られた種々の方法が採用され得るが、好ましい手法として種々のセルソーティング法を用いることができる。例えば、FACS法（Fluorescence Activated Cell Sorting）を用いたセルソーターやフローサイトメーターによる分離法や、MACS法（Magnetic Cell Sorting）、等が挙げられる。本発明においては、多能性幹細胞から分化誘導させる方法を用いているため、生体組織から単離するような方法と異なり、細胞培養物中における間葉系幹細胞の発現量は比較的多い。従って、大量に発現した間葉系幹細胞（即ちCD105陽性細胞）を簡易かつ効率良く分離するためMACS法を好ましく用いることができる。

具体的には、CD105に特異的に結合する抗CD105抗体（或いは該抗体に特異的に結合する二次抗体）に磁気ビーズを担持させたものを利用することにより、MACS法によりCD105陽性細胞を選択的に分離・回収することができる。

また、MACS法によって分離収集した細胞の精製率を上げるために、MACS法によって分離した細胞を、さらにセルソーターやフローサイトメーター等のFACS法を用いて精製することができる。

[0023] また、ここで開示される生産方法により得られる細胞培養物は、ヒト又は動物由来の多能性幹細胞から脂肪細胞に分化誘導する条件の培養によって発現するCD105陽性の間葉系幹細胞を含む（好ましくは総細胞数の50%以上の割合で含む）細胞培養物であればよく、その他の細胞を含有していてもよい。例えば、好適な一態様では、当該培養物中の細胞の少なくとも一部として筋芽細胞へ分化する能力を有する細胞を含む。この態様においても、細胞培養物には、筋芽細胞への分化誘導を阻害しない限りにおいて、上記細胞以外の種々の細胞が含まれていてもよい。

当該細胞培養物に含まれる上記CD105陽性の間葉系幹細胞は、例えばCD105蛍光免疫染色によって確認することができる。細胞培養物中の全細胞（生存細胞）のうち少なくとも50%以上（特に好ましくは80%以上

）がCD105陽性の間葉系幹細胞として観察される細胞培養液は、本発明に係る細胞培養液として好適な一態様であって、間葉系幹細胞を目的の細胞（例えば、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、或いは筋芽細胞、典型的には筋芽細胞）へ分化誘導可能なそれぞれの条件の下で培養することにより、高率に目的の形態に分化した細胞（例えば、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、或いは筋芽細胞、典型的には筋芽細胞）を提供することができる。

[0024] 上記細胞培養物中に目的の細胞へと分化誘導し得る細胞が存在することは、上記のようにしてCD105陽性細胞を分離・回収した後、当該分離した細胞をそれぞれの培養条件下で培養を続ける過程において種々の生化学的アプローチ或いは形態観察により確認することができる。

例えば、顕微鏡による細胞観察、種々の細胞染色法、ハイブリダイゼーションを用いたノーザンブロット法、RT-PCR法等のさまざまな確認方法によって分化した細胞の種類を特定することができる。特に、筋芽細胞は、細胞の外形が紡錘形であり、且つ、その形状が特徴的であることから、細胞の形状を観察することによっても容易に判定することができる。或いは、細胞を抗M-cadherin抗体を使用する免疫蛍光染色および抗Myosin Heavy Chain (MHC) 抗体を使用する免疫蛍光染色を行うことにより筋芽細胞の存在を確認することができる。

一方、脂肪細胞、骨細胞及び軟骨細胞は、その細胞の形状からは判定が困難であるが、細胞内脂質を染色する（例えばOil Red O染色法により赤く染色できる。）ことにより脂肪細胞の存在を確認することができる。また、細胞をアリザリンレッド (Alizarin red) 染色を行うことにより骨細胞の存在を確認することができる。また、細胞をアルシアンブルー (Alcian blue) 染色を行うことにより軟骨細胞の存在を確認することができる。

[0025] 以下の実施例によって、本発明に係る筋芽細胞へ分化する能力を有する間葉系幹細胞を効率的に生産し得る方法（換言すれば筋芽細胞を効率的に生産する方法）の好例を詳細に説明するが、本発明を以下の実施例に限定するこ

とを意図したものではない。

[0026] [多能性幹細胞の継代]

本実施例では、多能性幹細胞としてマウス由来のES細胞を用いた。

ES細胞の培養液(ES-DMEM)は、4500mg/lグルコースを含むDulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; D-5796、Sigma社製品)に、10% fetal bovine serum(FBS; VMS1500、Vitromex社製品)、1% non-essential amino acids(NEAA; 11140-50、GIBCO社製品)、1% sodium pyruvate(11360-070、GIBCO社製品)、 $7 \times 10^{-6}\%$  2-mercaptoethanol(M3148、Sigma社製品)、0.5% antibiotic antimycotic(15240-096、GIBCO社製品)を添加して調製した。

ES細胞の培養には、0.1% gelatin(G-1890、Sigma社製品)を含むDulbecco's Phosphate Buffered Saline(PBS; D5652-10XIL、Sigma社製品)でコートされた直径100mm培養皿(353003、FALCON社製品)を用いた。未分化を維持したES細胞の培養のために、ES-DMEMに $10^3$  unitsのLeukemia Inhibitory Factor(LIF; ESGRO ESG1107、Chemicon社製品)を添加した培養液を使用した。

凍結保存されたマウス由来のES細胞を解凍後、培養皿に播種し、ES-DMEMにLIFを添加した培養液を加えて培養した。未分化のES細胞が培養皿の7割程度に増殖したところでPBSで2回洗浄し、PBSで3倍希釈した0.25% Trypsin/1mM-EDTA(L7K5399、Nakalai社製品)を加えて細胞を剥離した。1200rpmで5分間遠心分離し、細胞数をカウントして、細胞数が約 $5 \times 10^5$  cells/dishの濃度になるように新しい培養皿に播種した。継代の培養は、37°C、5%CO<sub>2</sub>の条件下で行った。これを継代1回目とし、この継代を7~18回繰り返した。詳しくは、サンプル1の未分化の多能性幹細胞は7~18回継代し、サンプル2は9~14回継代し、サンプル3は8~15回継代し、サンプル4は7、10~12、14回継代した。

[0027] [脂肪細胞へ分化誘導可能な条件下での培養]

上記継代した未分化ES細胞を、脂肪細胞へ分化誘導可能な条件下で培養を行った。

まず、分化を開始するために、LIFを含まないES-DMEM培養液を使用し、径100mmの培養皿の蓋に100 cells/ $\mu$ lの濃度で細胞を含む細胞混濁液を10 $\mu$ lずつ滴下するHanging drop法により、胚様体 (embryoid body; EB) を作製した。

その後2日間、ES-DMEMに、0.02% all-trans retinoic acid (レチノイン酸の一種である全トランス型レチノイン酸: R2625、Sigma社製品) を添加した培養液で浮遊培養させ、さらに2日間、ES-DMEMで浮遊培養させた。

その後、細胞をgelatinでコートされた培養皿に播種し、ES-DMEMに0.005%インシュリン (I-1882、Sigma社製品) と、0.007%3,3,5-Triiodo-L-thyronine (トリヨードサイロニン (T3); T5516、Sigma社製品) を添加した培養液で培養した。培養液は2日おきに交換した。

[0028] 上記培養13日目に、培養された細胞をCD105蛍光免疫染色することによって、CD105陽性細胞の発現を確認した。

まず、培養細胞をPBSで2回洗浄したあと、PBSで100倍に希釈したラット抗マウスCD105モノクローナル抗体 (clone: 209701、R&D社製品) を培養細胞に添加し、37°Cで、15分間の抗原抗体反応を行った。反応終了後、供試細胞をPBSで2回洗浄し、4%Paraformaldehydeに15分間浸漬することにより、供試細胞を固定した。固定後の供試細胞をPBSで10分間の洗浄を計5回行い、次いで、400倍希釈した二次抗体であるAlexa Fluor (登録商標) 色素標識ヤギ抗ラットIgG抗体 (A-11007、Molecular Probes社製品) を供試細胞に添加し、室温で1時間の抗原抗体反応を行った。かかる反応後、供試細胞をPBSで30分間の洗浄を計2回行った。こうして得られた細胞を、蛍光退色を防止する水溶性封入剤である「PermaFluor (登録商標) (43499, Thermo社製品)」で封入し、次いで、蛍光顕微鏡により観察した。



かかる観察時に撮影した写真を図1及び図2にそれぞれ示す。図1は、蛍光顕微鏡で撮影した写真である。また、図2は、位走査顕微鏡で撮影した写真であって、いずれも同一視野を撮影したものである。

図1及び図2に示されるように、球形の細胞が赤く染色されていることが確認された。また、染色された細胞は、全体の50%以上存在することを確認した。従って、培養13日目の細胞培養物中には、全細胞中の50%以上の割合でCD105陽性細胞が存在していることが確認された。

[0029] [マグネティックセルソーティング法によるCD105陽性細胞の分離]

上記確認後、培養皿に接着させて脂肪誘導培地で培養した細胞をMACS (Magnetic Cell Sorting) 法を用いて分離・回収した。

まず、培養皿をPBSで2回洗浄した後、PBSで希釈した5mMのethylene diamine tetra acetic acid (EDTA : E-7889、Sigma社製品) を培地に加え、37°Cで15分間反応させ、細胞を剥離した。次に、細胞を4°CのPBS中に0.5% bovine serum albumin (BSA : A2934-25G、Sigma社製品) と2mMのEDTA (E-7889、Sigma社製品) を加えたMACS Buffer 中に移し、該細胞懸濁液を1000rpmで5分間遠心分離し、上澄みをアスピレーターで吸い、細胞数をカウントした。

さらに、該細胞に対して、一次抗体としてPBSで100倍希釈したラット抗マウスCD105モノクローナル抗体 (clone : 209701、R&D社製品) を加え、4°Cで5分間の抗原抗体反応を行った。次に、供試細胞に上記MACS Buffer を加え、1000rpmで5分間遠心することによって洗浄し、余剰の一次抗体を除去した。その後、二次抗体としてPBSで400倍希釈したヤギ抗ラットIgG結合マイクロビーズ (130-048-501、Miltenyi Biotec社製品) を上記洗浄後の供試細胞に添加し、4°Cで15分間の抗原抗体反応を行った。その後、上記一次抗体との反応後と同様の洗浄を行い、余剰の二次抗体を除去した。

こうして得られた上記マイクロビーズでラベルされた細胞を含む細胞懸濁液を、製造元が供給しているマニュアルに従ってmini-MACS sep

aration column (Miltenyi Biotech社製品)に通した。これにより、CD105陽性細胞の選択的な分離を行った。なお、mini-MACS separation columnによる分離は、細胞の純度を高めるために連続して二度行った。

[0030] [CD105陽性細胞の収率]

上記MACS法を用いて分離収集したCD105陽性細胞の収率について、多能性幹細胞の継代数との相関を調べた。即ち、凍結保存された未分化の多能性幹細胞を解凍後、7~18回継代したサンプル1、9~14回継代したサンプル2、8~15回継代したサンプル3、及び7、10~12、14回継代したサンプル4のそれぞれについて、上記脂肪細胞へ分化誘導を行い、培養過程においてCD105陽性である細胞を分離し収率を求めた。図3は、各サンプルの継代数に対するCD105陽性細胞の収率を示したグラフである。横軸は継代数を、縦軸は分離したCD105陽性細胞の収率を表す。

図3から明らかなように、サンプル1、3、及び4は、継代10回の多能性幹細胞を用いた場合、分離したCD105陽性細胞の収率が最も高く、サンプル2では、12回継代した多能性幹細胞を用いた場合、分離したCD105陽性細胞の収率が最も高かった。また、いずれのサンプルでも継代数8~12回の多能性幹細胞を用いた場合、高収率でCD105陽性細胞を分離することができることが確認された。

[0031] [CD105陽性細胞のFACS解析]

次いで、蛍光標識された抗マウスCD105モノクローナル抗体を用いて、MACS法により分離したCD105陽性細胞の純度をFACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) により解析し、分離性能を評価した。

[0032] 即ち、CD105陽性細胞の収率の最も高い継代数10回の多能性幹細胞を脂肪細胞へ分化誘導し、培養皿に接着させて脂肪誘導培地で培養した細胞を剥離した。そして、上記MACS Bufferで懸濁した懸濁培養液から上澄みを除去し細胞を得た。

そして、該細胞に対して、一次抗体として蛍光物質フィコエリスリン（PE）標識された抗マウスCD105モノクローナル抗体（clone：209701、FAB1320P、R&D社製品）をPBSで10倍希釈して加え、4℃で10分間の抗原抗体反応を行った。次に、供試細胞に上記MACS Bufferを加え、1000rpmで10分間遠心することによって洗浄し、余剰の一次抗体を除去した。その後、二次抗体としてPBSで8倍希釈した抗PEマイクロビーズ（130-048-801, Miltenyi Biotech社製品）を上記洗浄後の供試細胞に添加し、4℃で15分間の抗原抗体反応を行った。上記一次抗体との反応後と同様の洗浄を行い、余剰の二次抗体を除去した。

こうして得られた上記マイクロビーズでラベルされた細胞を含む細胞懸濁液を、製造元が供給しているマニュアルに従ってmini-MACS separation column（Miltenyi Biotech社製品）に通した。これにより、CD105陽性細胞の選択的な分離を行った。なお、mini-MACS separation columnによる分離は、細胞の純度を高めるために連続して二度行い、CD105陽性細胞を分離した。

[0033] 上記蛍光標識された抗マウスCD105モノクローナル抗体を用いてMACS法により分離した細胞群（CD105陽性細胞群）およびMACS法による分離を行っていない細胞群を、FACSCalibur フローサイトメーター（BD社製品）を用いて、PE陽性の細胞について解析した。図4は、MACS法による分離を行っていない細胞群を示し、図5は、MACS法で分離したCD105陽性細胞群を示す。なお、EGFP (Enhanced GFP) の波長で定量解析に必要な画像の補正を行った。

FACS解析の結果、図4に示されるように、MACS法による分離を行っていない細胞群には、PE陽性のCD105陽性細胞が34.4%含むことが確認された。また、図5に示されるように、MACS法による分離を行った細胞群は、91.4%がPE陽性のCD105陽性細胞であることが確認された。以上の結果から、MACS法を用いることにより、培養細胞からCD105陽性細胞を高純度で分離し、収集できることが示された。

[0034] さらに、上記MACS法により分離した細胞群を位走査顕微鏡で観察した。図6は、位走査顕微鏡で撮影したCD105陽性細胞の写真である。

図6に示されるように、CD105陽性細胞は、脂肪組織中から分離したADSCsの細胞形状と極めてよく似た紡錘状の形状を有することが確認された。

[0035] [分化誘導で発現した細胞の確認]

上記MACS法によって分離したCD105陽性細胞を、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞または筋芽細胞に分化誘導可能なそれぞれの条件下で培養することにより、該CD105陽性細胞が目的の形態に分化した脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞または筋芽細胞へ分化誘導される否かを確認した。

[0036] 即ち、上記MACS法によって分離したCD105陽性細胞を、gelatinでコートされた培養皿に低密度 ( $1 \times 10^3 \sim 2.5 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>) で播種し、それぞれの細胞への分化誘導可能なES-DMEM培養液で2~3週間培養した。ES-DMEM培養液は2日おきに交換し、それぞれ以下の組成のものを使用した。

なお、MACS法により分離されない細胞群（以下、「CD105陰性細胞」という）を同様の方法を用いて、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞または筋芽細胞に分化誘導可能なそれぞれの条件下で2~3週間培養することにより、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞または筋芽細胞へ分化誘導される否かを確認した。

[0037] 脂肪細胞への分化誘導は、従来公知の種々の脂肪細胞分化誘導用の培養液を採用することができるが、ここでは、ES-DMEMに0.005%インシュリン (I-1882、Sigma社製品)、0.007%3,3,5-Triiodo-L-thyronine (トリヨードサイロニン (T3) ; T5516、Sigma社製品)、1  $\mu$ M Dexamethasone (D4902-25MG、Sigma社製品)、500  $\mu$ M 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (IBMX ; I5879-100MG、Sigma社製品)を加えたES-DMEM培養液を用いた。

骨細胞への分化誘導は、従来公知の種々の骨細胞分化誘導用の培養液を採

用することができるが、ここでは、ES-DMEMに0.1  $\mu$ MのDexamethasone (D4902-25MG、Sigma社製品)、10 mM  $\beta$ -glycerol phosphate (37177-30、KANTO CHEMICAL社製品)、200  $\mu$ M ascorbic acid (A4544-25G、Sigma社製品)を加えたES-DMEM培養液を用いた。

軟骨細胞への分化誘導は、従来公知の種々の軟骨細胞分化誘導用の培養液を採用することができるが、ここでは、無血清のES-DMEMに10 ng/mL TGF $\beta$ 3 (243-B3、Sigma社製品)、100 nM PTH (parathyroid hormone、12583-68-5、Sigma社製品)、1% FBSを加えた培養液を用いた。

筋芽細胞への分化誘導は、従来公知の種々の筋芽細胞分化誘導用の培養液を採用することができるがここでは、無血清のES-DMEMに5%血清代替物 (KSR: KNOCKOUT (登録商標) Serum Replacement (10828-028、Invitrogen社製品)を加えた培養液を用いた。

[0038] そして、分化誘導により生じた細胞を観察し、細胞の種類を判定した。細胞の種類判定は、以下の方法により行った。

[0039] 脂肪細胞へ分化誘導された細胞は、Oil Red O染色により判定を行った。0.3% Oil Red O (115K0683、Sigma社製品)、1-Propanol (24-6070-5、Sigma社製品)溶液を保存液とし、保存液を蒸留水と6:4の割合で希釈し、ろ過したものをOil Red O染色液として使用した。また、同時に細胞の核を染色するためにHematoxylin液を使用した。

まず、培養細胞をPBSで2回洗浄し、PBSに溶解した4% Paraformaldehyde (24-0630-5、Sigma社製品)に30分間浸漬することにより細胞を固定した。次に、固定された供試細胞をPBSで30分間洗浄し、次に60% 1-Propanolで1分間反応させた。上記Oil Red O染色液を添加後、37°Cで15分間反応させた。その後、60% 1-Propanolで2分間反応させ、次いで蒸留水で2分間洗浄した。

その後、Hematoxylin液で5分間核を染色し、蒸留水で2分間洗浄した。最後にPBSで希釈した80% Glycerol (12-1120-5、Sigma社製品)で封入し

た。

上記 Oil Red O 染色した細胞の観察写真を図 7 および図 8 に示す。

図 7 は、CD 105 陽性細胞を、図 8 は、CD 105 陰性細胞を示す。

[0040] 骨細胞へ分化誘導し発現した細胞は、Alizarin red 染色を用いて確認した。まず、1% Alizarin red S 水溶液 (A5533-25G、Sigma 社製品) に 28% アンモニア水溶液 (MKD1711、米山薬品工業株式会社製品) をゆっくりと加え、pH 6.36~6.40 に調整したものを Alizarin red 染色液として使用した。そして、細胞を PBS で 2 回洗浄し、4% Paraformaldehyde (24-0630-5, Sigma 社製品) で 30 分間固定した。これをさらに蒸留水で数回洗浄し、Alizarin red 染色液を加え、5 分間反応させた。最後に蒸留水で数回洗浄後、Glycerol で封入した。

上記 Alizarin red 染色した細胞の観察写真を図 9 および図 10 に示す。図 9 は、CD 105 陽性細胞を、図 10 は、CD 105 陰性細胞を示す。

[0041] また、軟骨細胞へ分化誘導し発現した細胞は、Alcian blue 染色を用いて確認した。まず PBS で 2 回洗浄したのち、PBS に 4% Paraformaldehyde (24-0630-5, Sigma 社製品) を含む固定液で 15 分間固定した。その後、PBS で 15 分間洗浄し、さらに 3% 酢酸水溶液で 5 分間洗浄した。洗浄後、Alcian blue 8GX 1g を 3% 酢酸水溶液 100ml に溶解したものを Alcian blue 染色液として調製し、該染色液を添加して 30 分間染色した。そして、3% 酢酸水溶液で 5 分間洗浄し、さらに蒸留水で 5 分間洗浄した。最後に PBS で希釈した 80% Glycerol (12-1120-5, Sigma 社製品) で封入した。

上記 Alcian blue 染色した細胞の観察写真を図 11 および図 12 に示す。図 11 は、CD 105 陽性細胞を、図 12 は、CD 105 陰性細胞を示す。

[0042] さらに、筋芽細胞へ分化誘導し発現した細胞は、抗 M-cadherin 抗体を使用する免疫蛍光染色および抗 Myosin Heavy Chain (

MHC) 抗体を使用する免疫蛍光染色によりそれぞれ確認した。まず、PBSで2回洗浄したのち、PBSに4%Paraformaldehyde (24-0630-5, Sigma社製品) を含む固定液で15分間固定した。その後、PBSで15分間洗浄し、正常ヤギ血清 (G9023, Sigma社製品) を0.1%Triton PBSで10%に希釈したブロッキング液を加えて、37°Cで30分間非特異反応を抑制した。次いで、一次抗体である抗Myosin Heavy Chain抗体 (MHC: clone A4.1025, Upstate社製品) および抗M-cadherin抗体 (clone 12G4, Nanotools社製品) を0.1%Triton PBSでそれぞれ200倍、100倍希釈したものを加え、37°Cで1時間の抗原抗体反応を行った。かかる反応後、PBSで15分間洗浄した。さらに、二次抗体であるヤギのAlexa594標識抗マウスIgG抗体 (A11001, Molecular Probes社製品) を0.1%Triton PBSで200倍希釈したものを添加し、37°Cで1時間抗原抗体反応を行った。その後、室温でPBSにより15分間洗浄し、蛍光退色防止封入剤PermaFluor (登録商標) (43499, Thermo社製品) で封入した。上記M-cadherin免疫蛍光染色およびMHC免疫蛍光染色したCD105陽性細胞の観察写真を、それぞれ、図13および図14に示す。

[0043] 上記目的の脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞または筋芽細胞へ分化誘導可能な条件で発現した各細胞の判定結果を以下に述べる。

まず、脂肪細胞への分化誘導においては、図7および図8に示されるように、図7のCD105陽性細胞は、Oil Red O染色により脂肪細胞が確認された。一方、図8のCD105陰性細胞は、脂肪細胞へ分化誘導を行っても脂肪細胞は発現していないことが確認された。

また、骨細胞への分化誘導では、図9および図10に示されるように、図9のCD105陽性細胞は、Alizarin red染色により骨細胞が確認された。一方、図10のCD105陰性細胞は、骨細胞へ分化誘導を行っても骨細胞は発現していないことが確認された。

また、軟骨細胞への分化誘導では、図11および図12に示されるように、図11のCD105陽性細胞は、Alcian blue染色により軟骨

細胞が確認された。一方、図12のCD105陰性細胞は、軟骨細胞へ分化誘導を行っても軟骨細胞は発現していないことが確認された。

さらに、筋芽細胞への分化誘導では、図13および図14に示されるように、図13のM-cadherin免疫蛍光染色および図14のMyosin Heavy Chain (MHC) 免疫蛍光染色ともに、CD105陽性細胞は筋芽細胞が確認された。また、図示しないが、CD105陰性細胞は、筋芽細胞へ分化誘導を行っても筋芽細胞は発現していないことが確認された。

[0044] [RT-PCR解析]

次いで、上記MACS法によって分離したCD105陽性細胞を、脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞または筋芽細胞に分化誘導可能なそれぞれの条件下で培養することにより、該CD105陽性細胞が目的の細胞へ分化誘導されたか否かをRT-PCR法を用いて解析した。

[0045] RT-PCR解析は、従来公知の一般的な方法を採用することができるが、ここでは、以下の方法により行った。

即ち、培養皿に接着している分化誘導した細胞をCell Scraperを用いて剥離し、超音波破砕機 (Handy Sonic, TOMY SEIKO社製品) によって細胞を破砕した。RNA抽出キット (RNeasy, Quiagen社製品) を用いてmRNAのみを収集し、吸光度計 (Nanodrop社製品) により計量した。そして、収集したRNAから、Oligo (dT) Primer (18418-012, Invitrogen社製品) を用いて、逆転写酵素Superscript reverse transcriptase II (Invitrogen社製品) によりテンプレートとなるcDNAを合成した。PCRでは、Taq DNA polymeraseとしてBlend Taq (登録商標) (Toyobo社製品) と、付属のBuffer (BTQ-101, Toyobo)、及び各細胞の遺伝子に特異的な以下のプライマーをそれぞれ使用した。脂肪細胞のプライマーとしては、PPAR $\gamma$ およびLPLを使用し、骨細胞のプライマーとしては、Runx 2およびOsterixを使用した。また、軟骨細胞のプライマーとしては、Collagen 2a1およびAgglicanを使用し、筋芽細胞のプライマーとしては、M-cadhe



rin、MHC、MyoD、およびMyf5を使用した。また、PCR反応のサイクル条件は、95°C 60秒間、60°C 30秒間、70°C 30秒間で合計36サイクル行った。サイクル後、PCR産物を2%アガロースゲル(800171、NIPPON GENE社製品)に装填し、Mupid-2plus(100V、45分;ADVANCE社製品)で電気泳動した。電気泳動したアガロースゲルは、CYBR safe DNA gel stain(54022A、invitrogen社製品)を用いて染色し、FAS-III(Toyobo社製品)でそれぞれの特異的バンドを検出した。

[0046] RT-PCR解析の結果、脂肪細胞へ分化誘導された細胞には、脂肪細胞で特異的に発現するPPAR $\gamma$ およびLPLのmRNAのバンド(図示しない)を確認した。また、骨細胞へ分化誘導された細胞には、骨細胞で特異的に発現するRunx 2およびOsterixのmRNAのバンド(図示しない)を確認した。軟骨細胞へ分化誘導された細胞には、軟骨細胞で特異的に発現するCollagen 2a1およびAgglicanのmRNAのバンド(図示しない)を確認した。さらに、筋芽細胞へ分化誘導された細胞には、筋芽細胞で特異的に発現するM-cadherin、MHC、MyoD、およびMyf5のmRNAバンドのバンド(図示しない)を確認した。

[0047] 以上の結果から、上記MACS法によって分離したCD105陽性細胞は、目的の形態に分化した細胞(脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞、または筋芽細胞)を高効率に発現する能力を備えた間葉系幹細胞であることが示された。また、ここで開示される生産方法および細胞培養物によって、多能性幹細胞由来の脂肪細胞、骨細胞、軟骨細胞または筋芽細胞を提供することができることが確認された。

[0048] [継代数の異なる多能性幹細胞による分化能の確認]

さらに、継代数の異なる多能性幹細胞を用いて脂肪細胞への分化誘導を行い、CD105陽性細胞を分離した。そして、それぞれ分離したCD105陽性細胞を、脂肪細胞または筋芽細胞へ分化誘導し細胞を観察した。

[0049] <サンプルA>

多能性幹細胞として、上記実施の形態と同様に未分化の凍結保存されたマ

ウス由来のES細胞を用いて10回継代した。これをサンプルAとし、ES細胞を10回継代した後、上述と同様の方法を用いて生体外で脂肪細胞への分化誘導を行い、MACS法を用いてCD105陽性細胞を分離した。さらに、分離したCD105陽性細胞を生体外で筋芽細胞へ分化誘導可能な条件でさらに20日間培養し、分化誘導により生じた細胞を観察した。

[0050] <サンプルB>

サンプルBでは、上述のサンプルAと同様の凍結保存されたマウス由来のES細胞を多能性幹細胞として用いて継代した。ただし、継代回数を5回と変更した。

それ以外は、サンプルAと同様の手順で、継代した多能性幹細胞を用いて脂肪細胞への分化誘導を行い、MACS法を用いてCD105陽性細胞を分離した。

さらに、分離したCD105陽性細胞をサンプルAと同様に生体外で筋芽細胞へ分化誘導可能な条件でさらに20日間培養し、分化誘導により生じた細胞を観察した。

[0051] <サンプルC>

サンプルCでは、上述のサンプルAと同様の凍結保存されたマウスのES細胞を多能性幹細胞として用いて継代した。ただし、継代回数を17回と変更した。

それ以外は、サンプルAと同様の手順で、継代した多能性幹細胞を用いて脂肪細胞への分化誘導を行い、MACS法を用いてCD105陽性細胞を分離した。

さらに、分離したCD105陽性細胞をサンプルAと同様に生体外で筋芽細胞へ分化誘導可能な条件でさらに20日間培養し、培養過程で分化した細胞を観察した。

[0052] 而して、顕微鏡による観察の結果、サンプルAでは、筋芽細胞へ分化誘導した細胞は、紡錘形の筋芽細胞（図示しない）が確認された。従って、サンプルAに係る細胞培養物に含まれるCD105陽性の細胞は高効率に筋芽細

胞へ分化し得る能力を備えた間葉系幹細胞であることが示された。また、ここで開示される生産方法および細胞培養物によって、多能性幹細胞由来の筋芽細胞を提供することができることが確認された。

一方、サンプルB及びサンプルCでは、筋芽細胞へ分化誘導した細胞を顕微鏡観察したが、紡錘形の細胞の存在が確認されなかった。そこで、サンプルBおよびサンプルCの多能性幹細胞を脂肪細胞へ分化誘導し、Oil Red O染色を行ったところ、サンプルBおよびサンプルC（図示しない）の分化誘導後に生じた細胞は赤く染まったことから、脂肪細胞であることが確認された。従って、サンプルAと継代回数の異なるサンプルB及びサンプルCに係るCD105陽性の細胞は、高確率で脂肪細胞へ分化し得る間葉系幹細胞であることが示された。このことから、継代回数が10回の多能性幹細胞を脂肪細胞へ分化誘導し分離したCD105陽性細胞は、高効率で筋芽細胞へ分化誘導することが確認された。また、継代回数が5回または17回の多能性幹細胞を脂肪細胞へ分化誘導すると、CD105陽性細胞を僅かに収集することはできた。しかしながら、筋芽細胞へ分化誘導した細胞は顕微鏡観察では筋芽細胞を確認できなかったが、脂肪細胞へ分化誘導すると脂肪細胞を発現することが確認された。

### 産業上の利用可能性

[0053] 以上の実施の形態から明らかなように、本発明よると、多能性幹細胞から脂肪細胞への分化誘導過程において、筋芽細胞或いはその他の目的の細胞へ分化し得る間葉系幹細胞を効率良く且つ大量に生産する方法を提供することができる。従って、本発明の実施によって、従来は間葉系幹細胞から分化誘導され難い細胞種であった筋芽細胞を多能性幹細胞から大量に生産することができる。

## 請求の範囲

- [請求項1] ヒト又は動物由来の多能性幹細胞から分化したCD105陽性の間葉系幹細胞を含む細胞培養物であって、  
該培養物に含まれる細胞の少なくとも一部は、前記多能性幹細胞を脂肪細胞へ分化誘導可能な条件での培養によって筋芽細胞へ分化する能力を有する細胞であることを特徴とする、細胞培養物。
- [請求項2] 前記多能性幹細胞はES細胞またはiPS細胞である、請求項1に記載の細胞培養物。
- [請求項3] 少なくとも50%以上の細胞が前記間葉系幹細胞である、請求項1又は2に記載の細胞培養物。
- [請求項4] 前記間葉系幹細胞から分化した筋芽細胞を含む、請求項1～3のいずれかに記載の細胞培養物。
- [請求項5] ヒト又は動物由来の多能性幹細胞を培養して筋芽細胞へ分化する能力を有する間葉系幹細胞を生産する方法であって、  
i) 凍結保存された前記多能性幹細胞を用意すること、  
ii) 前記用意した多能性幹細胞を未分化の状態です所定回数継代すること、  
iii) 前記継代した前記多能性幹細胞を、生体外で脂肪細胞へ分化誘導可能な条件で培養すること、及び  
iv) 前記培養過程において、CD105陽性である細胞を分離回収すること、  
を包含する生産方法。
- [請求項6] 前記多能性幹細胞としてES細胞またはiPS細胞を使用する、請求項5に記載の方法。
- [請求項7] 前記多能性幹細胞を未分化の状態です8～12回継代する、請求項5又は6に記載の方法。
- [請求項8] 前記分化誘導可能な条件として、レチノイン酸を添加した培養液で浮遊培養した後、インシュリンおよびトリヨードサイロニンを添加し

た培養液で培養する、請求項 5～7 のいずれかに記載の方法。

[請求項9] 前記継代した後の前記多能性幹細胞の分化誘導可能な条件での培養は、21日を超えない期間行う、請求項 5～8 のいずれかに記載の方法。

[請求項10] セルソーティング法を用いて前記 CD105 陽性である細胞を分離回収する、請求項 5～9 のいずれかに記載の方法。

[請求項11] ヒト又は動物由来の多能性幹細胞を培養して目的の形態に分化した細胞を生産する方法であって、

i) 凍結保存された前記多能性幹細胞を用意すること、

ii) 前記用意した多能性幹細胞を未分化の状態です所定回数継代すること、

iii) 前記継代した前記多能性幹細胞を、生体外で脂肪細胞へ分化誘導可能な条件で培養すること、

iv) 前記培養過程において、CD105 陽性である間葉系幹細胞を分離回収すること、及び

v) 前記分離回収した CD105 陽性細胞を、生体外で以下のいずれかの目的の細胞：

1) 脂肪細胞；

2) 骨細胞；

3) 軟骨細胞；又は

4) 筋芽細胞

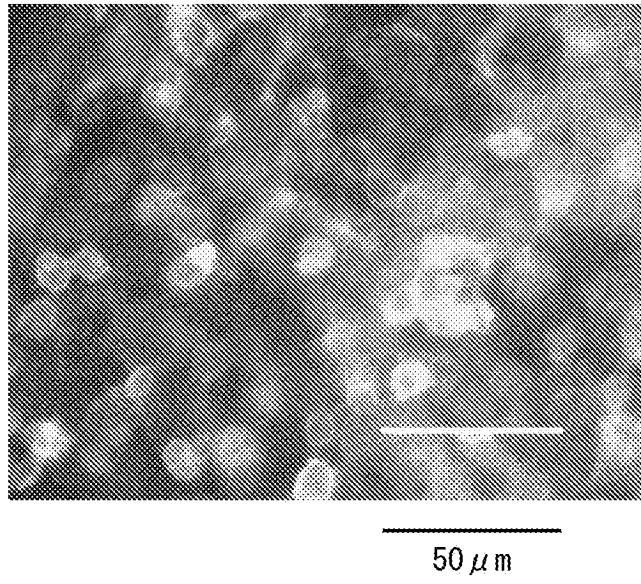
へ分化誘導可能なそれぞれの条件で更に培養すること、を包含する生産方法。

[請求項12] 前記多能性幹細胞として ES 細胞または iPS 細胞を使用する、請求項 11 に記載の方法。

[請求項13] 前記多能性幹細胞を未分化の状態です 8～12 回継代する、請求項 11 又は 12 に記載の方法。

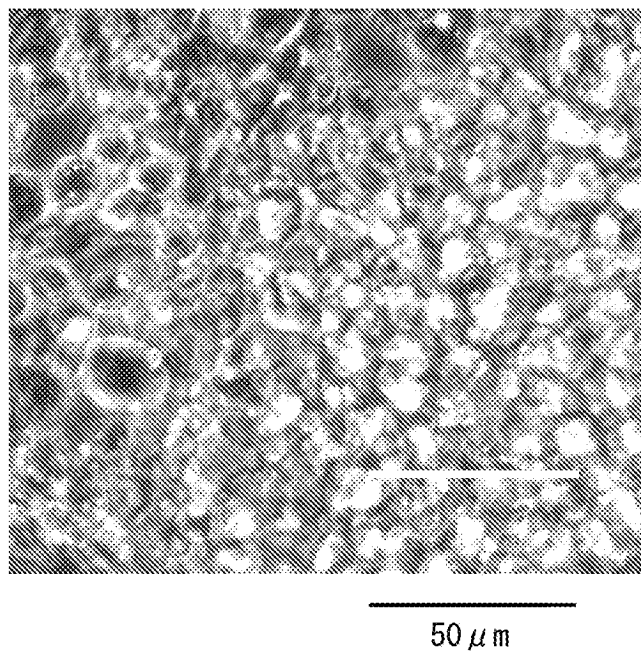
[図1]

FIG.1



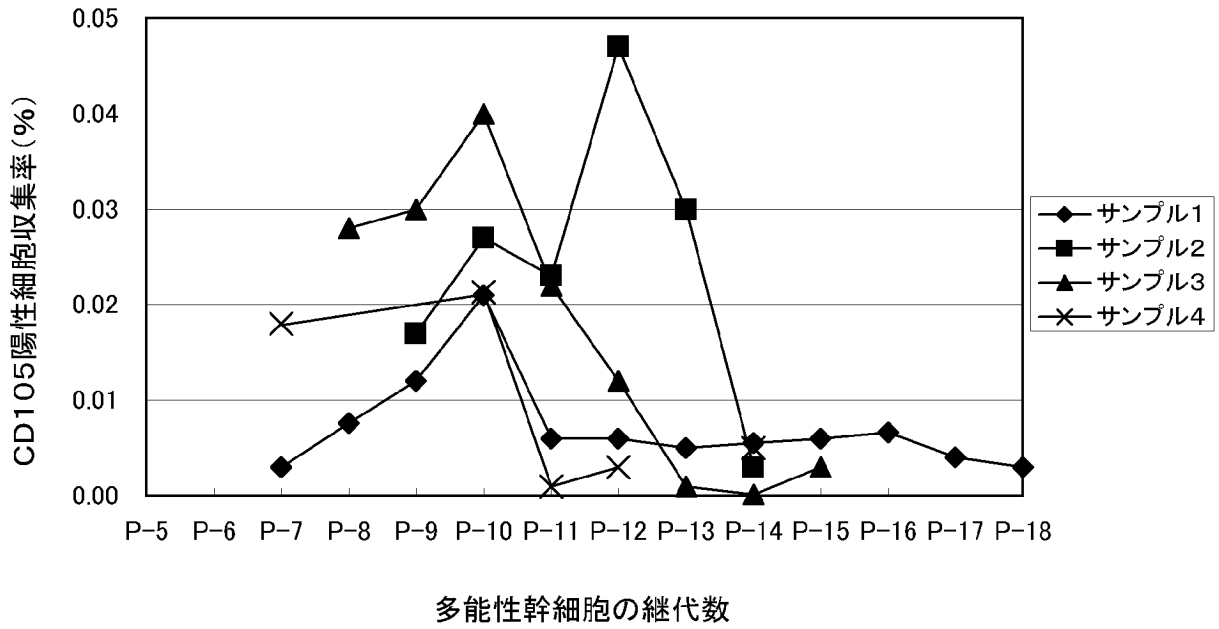
[図2]

FIG.2



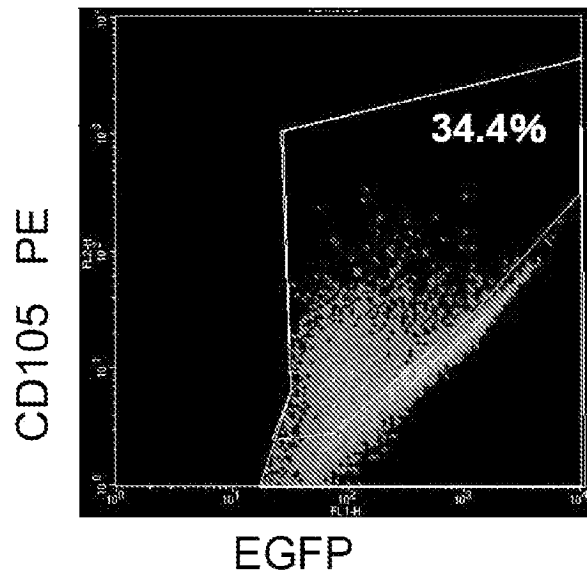
[図3]

FIG.3



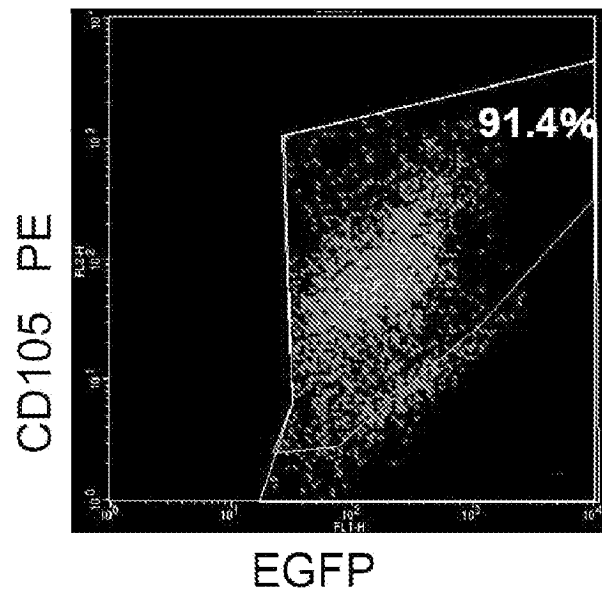
[図4]

FIG.4



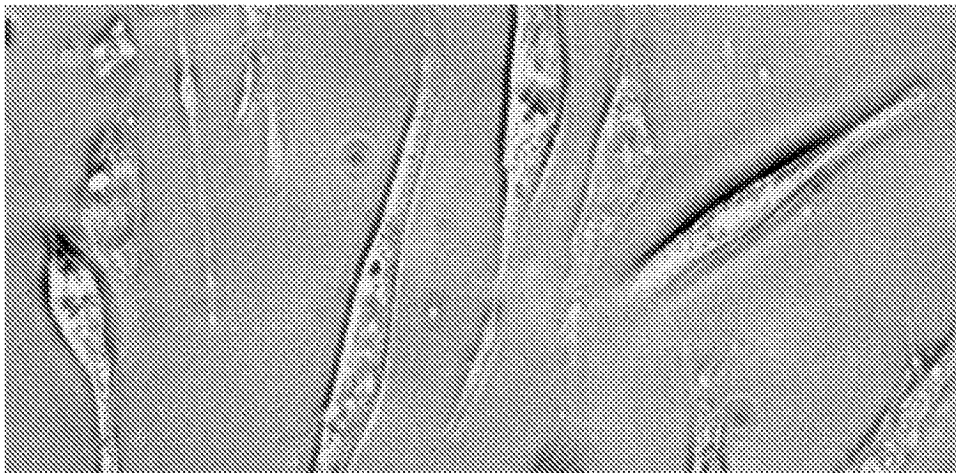
[図5]

FIG.5



[図6]

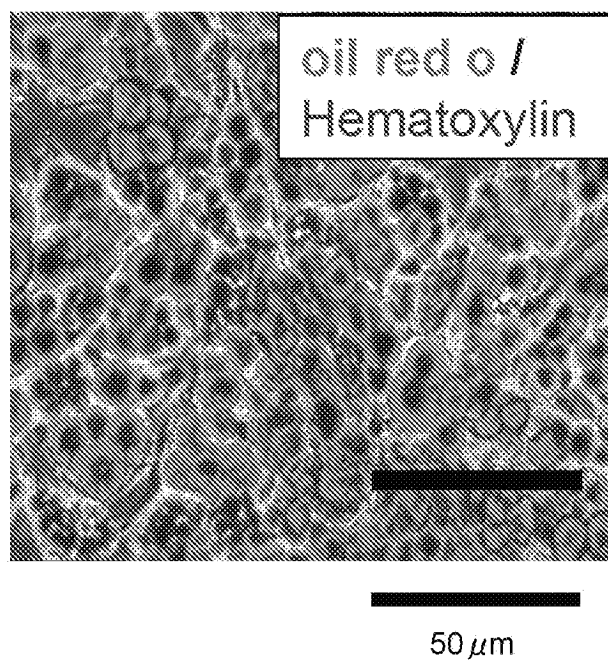
FIG.6





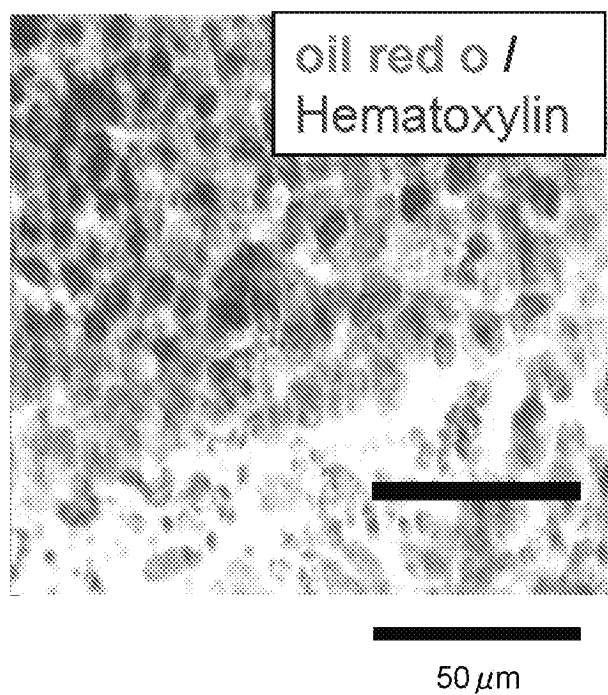
[図7]

FIG.7



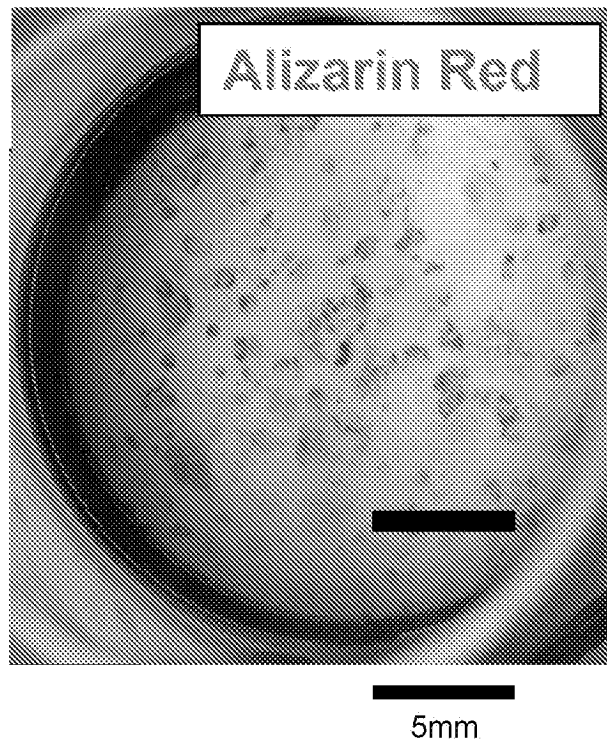
[図8]

FIG.8



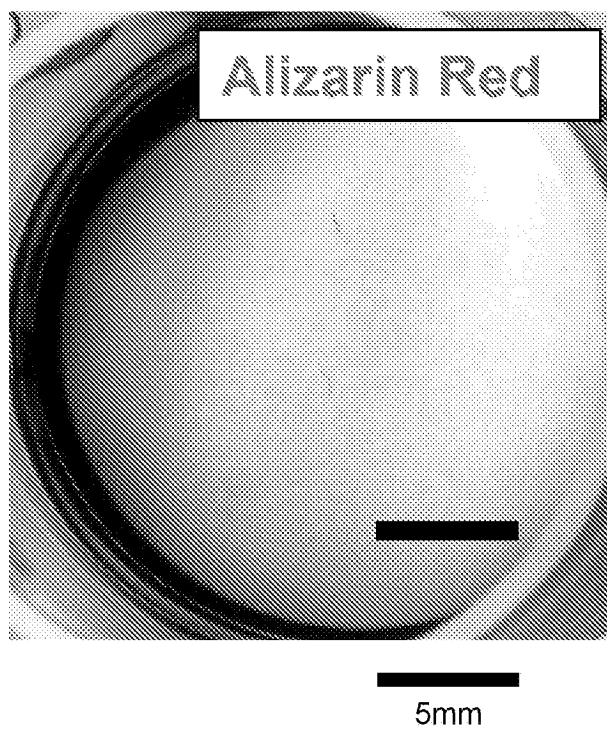
[図9]

FIG.9



[図10]

FIG.10



[11]

FIG.11

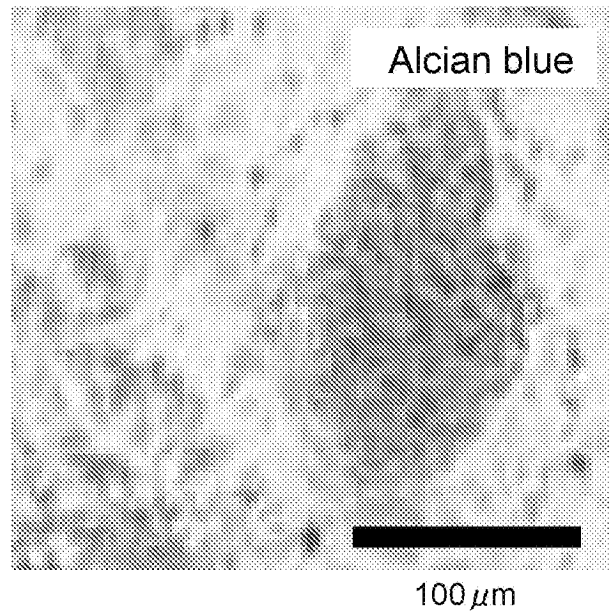
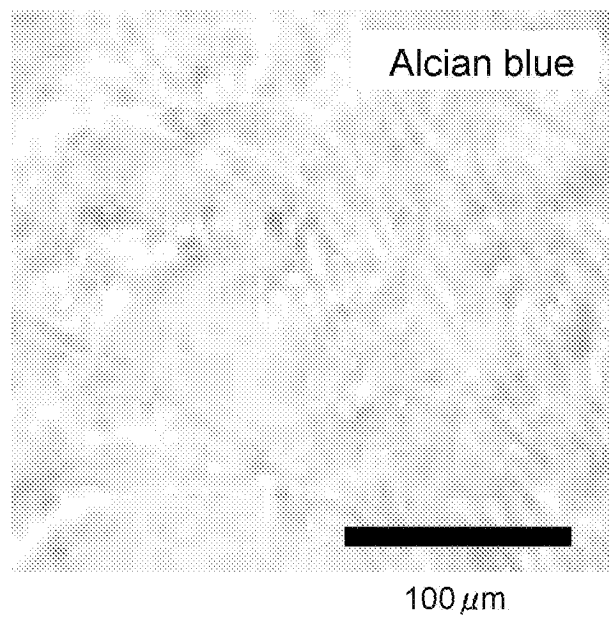
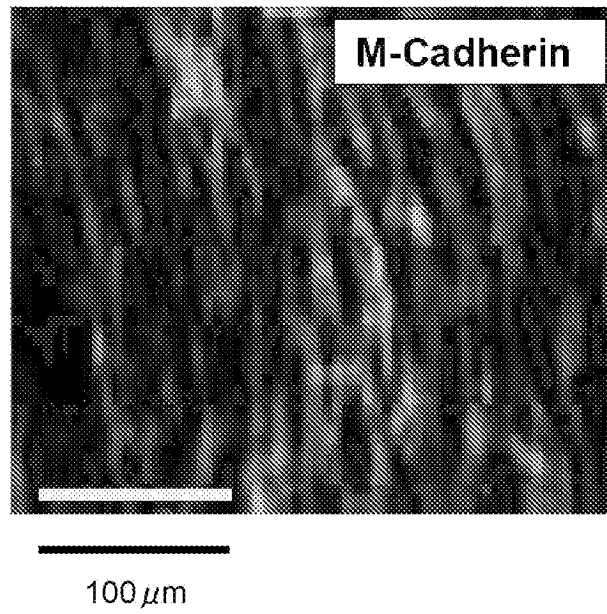
[12]

FIG.12



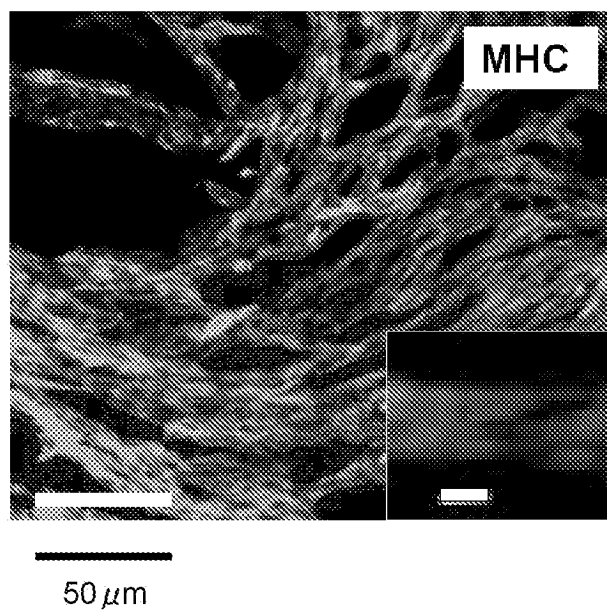
[図13]

FIG.13



[図14]

FIG.14



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2009/057766

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
C12N5/06(2006.01) i, C12N5/10(2006.01) 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)  
C12N5/06, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, Science Direct

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2004/106502 A1 (Riken, Japan), 09 December, 2004 (09.12.04), Full text & US 2007/0053885 A1 & EP 1627913 A1	5-7,9-13 8
X Y	Takumi ERA et al., "Kan'yokei Kansaibo no Hassei to Bunka", Medical Bio, 2007.11, Vol.4, No.7, pages 84 to 88	5-7,9-13 8
X Y	TAKASHIMA Y. et al., Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation., Cell, 2007, Vol.129, pp.1377-1388	5-7,9-13 8

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	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"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
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 13 May, 2009 (13.05.09)	Date of mailing of the international search report 26 May, 2009 (26.05.09)
--------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/057766

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PHILLIPS BW. et al., Differentiation of embryonic stem cells for pharmacological studies on adipose cells. Pharmacol. Res., 2003, Vol.47, pp.263-268	8
Y	DANI C. et al., Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro., J. Cell Sci., 1997, Vol.110, pp.1279-1285	8
A	WO 2005/083061 A1 (STEMCO BIOMEDICAL, INC.), 09 September, 2005 (09.09.05), Background of the Invention & JP 2007-521831 A & US 2008/0241171 A1 & EP 1718735 A	5-13
A	WO 2003/106492 A1 (CARTELA AB.), 24 December, 2003 (24.12.03), Background of the Invention & JP 2006-511201 A & US 2005/0221327 A1 & EP 1513877 A & EP 1990350 A1	5-13
A	ASLAN H. et al., Osteogenic differentiation of noncultured immunisolated bone marrow-derived CD105+ cells., Stem Cells, 2006, Vol.24, pp.1728-1737	5-13
A	WO 2007/027156 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH), 08 March, 2007 (08.03.07), Claims & JP 2009-506769 A & JP 2009-506770 A & US 2008/0219957 A1 & US 2008/0199849 A1 & EP 1937801 A & EP 1943334 A & WO 2008/020815 A1 & WO 2007/027157 A1	5-13
A	OLIVIER EN. et al., Differentiation of human embryonic stem cells into bipotent mesenchymal stem cells., Stem Cells, 2006, Vol.24, pp.1914-1922	5-13
A	BARBERI T. et al., Derivation of Multipotent Mesenchymal Precursors from Human Embryonic Stem Cells., PLoS Medicine, 2005, Vol.2, pp.0554-0560	5-13
A	US 2007/0128727 A1 (CHEN TL, US), 07 June, 2007 (07.06.07), Claims (Family: none)	5-13
P,X	Nana NINAGAWA et al., "Mouse ES Saibo Yurai no Kan'yokei Kansaiho to sono Bunkano", Kaibogaku Zasshi, 2009.03, Vol.84, No.Suppl., page 176	5-13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/057766

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Nana NINAGAWA et al., "Mouse ES Saibo Yurai no Kan'yokei Kansaibo", Regenerative Medicine, 05 February, 2009 (05.02.09), Vol.8, Extra Issue, page 222	5-13
P,X	Nana NINAGAWA et al., "Es Saibo o Mochiita Kan'yokei Kansaibo no Keisei to Shibo·Kotsu Saibo eno Bunka Yudo", Rigaku Ryohogaku, 20 April, 2008 (20.04.08), Vol.35, No.Suppl.2, page 45	5-13
P,A	Yota MIZUNO et al., "ES Saibo wa Keidai no Kaisu ni yori Kokkakukin Saibo eno Bunka Keiko ga Kotonaru", Rigaku Ryohogaku, 20 April, 2008 (20.04.08), Vol.35, No.Suppl.2, page 44	5-13

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2009/057766

**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.: 1 - 4  
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:  
See extra sheet .
  
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:

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.:

**Remark on Protest**  
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, 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/JP2009/057766

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet (2)

Claims 1-4 describe a cell culture containing "a cell capable of being differentiated into a myoblast by culturing the cell under conditions in which the differentiation of a pluripotent stem cell into a fat cell can be induced".

However, in the description of the present application, only a description relating to a mesenchymal stem cell capable of being differentiated into a myoblast by culturing the mesenchymal stem cell under conditions in which the differentiation into a myoblast can be induced is found, and the description does not describe or suggest about a cell capable of being differentiated into "a myoblast" by culturing the cell under conditions in which the differentiation of a pluripotent stem cell into "a fat cell" can be induced.

Further, it cannot be considered that a cell capable of being differentiated into "a myoblast" by culturing the cell under conditions in which the differentiation of a pluripotent stem cell into "a fat cell" is obvious at the time of filing the present application.

Consequently, the inventions of claims 1-4 are not fully supported by the description.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/06(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/06, C12N5/10

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

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)

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, Science Direct

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	WO 2004/106502 A1 (独立行政法人理化学研究所) 2004.12.09, 全文 & US 2007/0053885 A1 & EP 1627913 A1	5-7, 9-13 8
X Y	江良択実 他, 間葉系幹細胞の発生と分化, Medical Bio, 2007.11, Vol.4, No.7, pp.84-88	5-7, 9-13 8
X Y	TAKASHIMA Y. et al., Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation., Cell, 2007, Vol.129, pp.1377-1388	5-7, 9-13 8

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

13.05.2009

国際調査報告の発送日

26.05.2009

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉森 晃

4B

3633

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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	PHILLIPS BW. et al., Differentiation of embryonic stem cells for pharmacological studies on adipose cells. Pharmacol. Res., 2003, Vol.47, pp.263-268	8
Y	DANI C. et al., Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro., J. Cell Sci., 1997, Vol.110, pp.1279-1285	8
A	WO 2005/083061 A1 (STEMCO BIOMEDICAL, INC.) 2005.09.09, 発明の背景 & JP 2007-521831 A & US 2008/0241171 A1 & EP 1718735 A	5-13
A	WO 2003/106492 A1 (CARTELA AB) 2003.12.24, 発明の背景 & JP 2006-511201 A & US 2005/0221327 A1 & EP 1513877 A & EP 1990350 A1	5-13
A	ASLAN H. et al., Osteogenic differentiation of noncultured immunisolated bone marrow-derived CD105+ cells., Stem Cells, 2006, Vol.24, pp.1728-1737	5-13
A	WO 2007/027156 A1 (AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH) 2007.03.08, 特許請求の範囲 & JP 2009-506769 A & JP 2009-506770 A & US 2008/0219957 A1 & US 2008/0199849 A1 & EP 1937801 A & EP 1943334 A & WO 2008/020815 A1 & WO 2007/027157 A1	5-13
A	OLIVIER EN. et al., Differentiation of human embryonic stem cells into bipotent mesenchymal stem cells., Stem Cells, 2006, Vol.24, pp.1914-1922	5-13
A	BARBERI T. et al., Derivation of Multipotent Mesenchymal Precursors from Human Embryonic Stem Cells., PLoS Medicine, 2005, Vol.2, pp.0554-0560	5-13
A	US 2007/0128727 A1 (CHEN TL, US) 2007.06.07, 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	5-13
P X	蜷川菜々 他, マウス ES 細胞由来の間葉系幹細胞とその分化能, 解剖学雑誌, 2009.03, Vol.84, No.Suppl., p.176	5-13

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
P X	蜷川菜々 他, マウス ES 細胞由来の間葉系幹細胞, 再生医療, 2009.02.05, Vol.8 増刊号, p.222	5-13
P X	蜷川菜々 他, ES 細胞を用いた間葉系幹細胞の形成と脂肪・骨細胞への 分化誘導, 理学療法学, 2008.04.20, Vol.35, No.Suppl.2, p.45	5-13
P A	水野陽太 他, ES 細胞は継代の回数により骨格筋細胞への分化傾向が 異なる, 理学療法学, 2008.04.20, Vol.35, No.Suppl.2, p.44	5-13

## 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 (PCT17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 1-4 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、  
特別ページを参照
  
3.  請求項 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT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。

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。

## 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。

請求項1-4には、「多能性幹細胞を脂肪細胞へ分化誘導可能な条件での培養によって筋芽細胞へ分化する能力を有する細胞」を含む細胞培養物が記載されている。

しかし、本願明細書には、筋芽細胞へ分化誘導可能な条件で更に培養することによって筋芽細胞へ分化する能力を有する間葉系幹細胞に関する記載があるだけで、多能性幹細胞を「脂肪細胞」へ分化誘導可能な条件での培養によって「筋芽細胞」へ分化する能力を有する細胞に関しては記載も示唆もされていない。

そして、本願出願時において、多能性幹細胞を「脂肪細胞」へ分化誘導可能な条件での培養によって「筋芽細胞」へと分化する能力を有する細胞が自明のものであったとも認められない。

したがって、請求項1-4に係る発明は、明細書によって十分に裏付けされていない。