

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/069661

発行日 平成27年4月2日 (2015.4.2)

(43) 国際公開日 平成25年5月16日 (2013.5.16)

(51) Int.Cl.			F I			テーマコード (参考)	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	1 O 2	4 B O 2 9	
C 1 2 M	3/04	(2006.01)	C 1 2 M	3/04	Z N A A	4 B O 6 5	
A 6 1 L	27/00	(2006.01)	A 6 1 L	27/00	Q	4 C O 8 1	
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	35/12		4 C O 8 7	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00		4 H O 4 5	
			審査請求 未請求 予備審査請求 未請求			(全 25 頁) 最終頁に続く	

出願番号 特願2013-542997 (P2013-542997)
 (21) 国際出願番号 PCT/JP2012/078787
 (22) 国際出願日 平成24年11月7日 (2012.11.7)
 (31) 優先権主張番号 特願2011-244046 (P2011-244046)
 (32) 優先日 平成23年11月8日 (2011.11.8)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

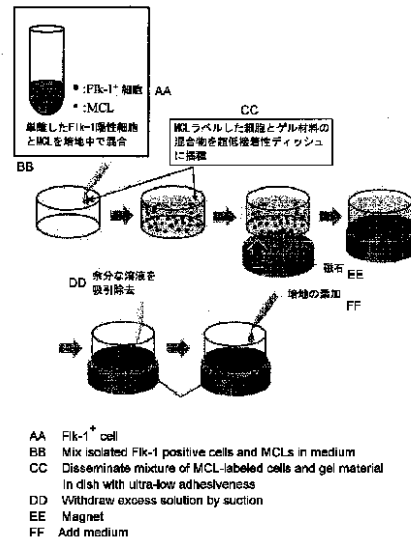
(71) 出願人 504139662
 国立大学法人名古屋大学
 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番
 (74) 代理人 100114362
 弁理士 萩野 幹治
 (72) 発明者 室原 豊明
 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大
 学法人名古屋大学内
 (72) 発明者 本多 裕之
 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大
 学法人名古屋大学内
 (72) 発明者 柴田 玲
 愛知県名古屋市千種区不老町 1 番 国立大
 学法人名古屋大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 i P S 細胞由来血管前駆細胞シート及びその作製方法

(57) 【要約】

実用に耐える強度を有し、且つ高い治療効果を発揮し得る i P S 細胞由来血管前駆細胞シートを提供すること課題とする。(1)磁気ラベルした i P S 細胞由来 F I k - 1 陽性細胞を用意するステップ ; (2) I 型コラーゲン、ラミニン、IV 型コラーゲン及びエンタクチンを有効成分として含むゲル材料と前記 F I k - 1 陽性細胞との混合物を調製した後、該混合物を培養容器に播種するステップ ; (3) 磁力を作用させることによって、前記混合物中の前記 F I k - 1 陽性細胞を前記培養容器の培養面に引き寄せ、多層の細胞層を形成させるステップ ; 及び (4) 前記ゲル材料をゲル化させるステップを行い、i P S 細胞由来血管前駆細胞シートを作製する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下のステップ(1)～(4)を含む、iPS細胞由来血管前駆細胞シートの作製方法：

- (1)磁気ラベルしたiPS細胞由来Flk-1陽性細胞を用意するステップ；
- (2)I型コラーゲン、ラミニン、IV型コラーゲン及びエンタクチンを有効成分として含むゲル材料と前記Flk-1陽性細胞との混合物を培養容器に播種するステップ；
- (3)磁力を作用させることによって、前記混合物中の前記Flk-1陽性細胞を前記培養容器の培養面に引き寄せ、多層の細胞層を形成させるステップ；
- (4)前記ゲル材料をゲル化させるステップ。

【請求項 2】

ステップ(1)が以下のステップ(1-1)～(1-4)を含む、請求項 1 に記載の作製方法：

- (1-1)iPS細胞を用意するステップ；
- (1-2)前記iPS細胞をFlk-1陽性細胞へ分化誘導するステップ；
- (1-3)Flk-1陽性細胞を分取するステップ；
- (1-4)分取したFlk-1陽性細胞を磁気ラベルするステップ。

【請求項 3】

ステップ(1-3)において、Nanog陽性細胞とNanog陰性細胞を選別し、Nanog陰性のFlk-1陽性細胞が分取される、請求項 2 に記載の作製方法。

【請求項 4】

ステップ(2)における前記混合物が、I型コラーゲンを有効成分とした第1ゲル要素と、ラミニン、IV型コラーゲン及びエンタクチンを有効成分とした第2ゲル要素と、前記Flk-1陽性細胞とを混合することによって得られる、請求項 1～3のいずれか一項に記載の作製方法。

【請求項 5】

ステップ(2)における前記培養容器の培養面上には、着脱可能な仕切りによる、上方が開放された区画が形成されており、該区画内に前記混合物が播種される、請求項 1～4のいずれか一項に記載の作製方法。

【請求項 6】

前記培養面が低接着性である、請求項 1～5のいずれか一項に記載の作製方法。

【請求項 7】

ステップ(3)と(4)の間に以下のステップ(3')を行う、請求項 1～6のいずれか一項に記載の作製方法：

- (3')前記細胞層の上方に存在する余分なゲル材料を除去するステップ。

【請求項 8】

ステップ(4)の後に以下のステップ(5)を行う、請求項 1～7のいずれか一項に記載の作製方法：

- (5)前記培養容器に培地を添加し、ステップ(4)によって形成されたシート状構造物を培地中に維持するステップ。

【請求項 9】

ステップ(5)の後に以下のステップ(6)を行う、請求項 8 に記載の作製方法：

- (6)前記Flk-1陽性細胞が増殖可能な温度条件下で培養するステップ。

【請求項 10】

請求項 1～9のいずれか一項に記載の作製方法によって得られた細胞シート。

【請求項 11】

I型コラーゲン、ラミニン、IV型コラーゲン及びエンタクチンを含むゲルに包埋された状態でiPS細胞由来Flk-1陽性細胞が多層を形成する細胞シート。

【請求項 12】

前記多層を形成する細胞間に前記ゲルが存在する、請求項 11 に記載の細胞シート。

【請求項 13】

前記多層が少なくとも10層である、請求項 11 又は 12 に記載の細胞シート。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

前記多層が10～20層である、請求項 11 又は 12 に記載の細胞シート。

【請求項 15】

前記多層を含む細胞成分がiPS細胞由来Flk-1陽性細胞のみからなる、請求項 11～14のいずれか一項に記載の細胞シート。

【請求項 16】

前記多層を含む細胞成分がiPS細胞由来Flk-1陽性細胞及び該細胞に由来する細胞のみからなる、請求項 11～14のいずれか一項に記載の細胞シート。

【請求項 17】

前記多層を形成するiPS細胞由来Flk-1陽性細胞が磁気ラベルされている、請求項 11～16のいずれか一項に記載の細胞シート。

10

【請求項 18】

前記iPS細胞由来Flk-1陽性細胞がNanog陰性の細胞である、請求項 11～17のいずれか一項に記載の細胞シート。

【請求項 19】

請求項 10～18のいずれか一項に記載の細胞シートを患部又は創部に移植するステップを含む、血管新生療法。

【請求項 20】

虚血性心疾患、脳血管障害、閉塞性動脈硬化症、重症下肢虚血又は創傷の治癒、或いは術後の創部の回復に用いられる、請求項 19に記載の血管新生療法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は細胞シートに関する。詳しくは、人工多能性幹細胞（iPS細胞）由来血管前駆細胞シート及びその作製方法等に関する。本出願は、2011年11月8日に出願された日本国特許出願第2011-244046号に基づく優先権を主張するものであり、当該特許出願の全内容は参照により援用される。

【背景技術】

【0002】

高齢化社会の到来により、虚血性心疾患・閉塞性動脈硬化症などの患者数は顕著に増加している。通常はバイパス手術やカテーテルによる血管内治療を行うが、このような治療が不可能な重症例も増加している。このような症例に対して、虚血部周辺の組織から血管再生や側副血行路の発達を促し、虚血領域とその周辺組織の血流を改善し、組織障害や壊死を軽減させる新しい治療に「血管新生療法」がある。本発明者らの研究グループは、2000年より世界に先駆けて骨髄単核球細胞（骨髄幹細胞）移植による重症下肢虚血治療（Therapeutic Angiogenesis by Cell Transplantation; TACT）を開始し、その有効性に関して報告してきた（非特許文献1）。

30

【0003】

骨髄幹細胞を用いた血管新生療法は、虚血性心疾患、閉塞性動脈硬化症などの心血管病に対して有効性を示しているが、骨髄幹細胞の採取に全身麻酔を必要とするため、患者の負担が多いこと、再移植が困難である等、克服すべき課題も多い。また、血管再生が困難な症例や血管グラフトが閉塞する症例も多々見受けられる。そこで、骨髄幹細胞に代わる新たな細胞源を見出し、効率性の高い細胞移植術を確立することが求められている。

40

【0004】

本発明者らの研究グループでは上記の要望に応えるべく、iPS細胞から誘導したFlk-1（Fetal liver kinase-1）陽性細胞に注目して研究を進めてきた。iPS細胞由来Flk-1陽性細胞は血管内皮細胞、血管平滑筋細胞及び心筋細胞に分化できるため（非特許文献2）、血管前駆細胞（Vascular progenitor cell: VPC）とも呼ばれている。これまでの研究成果として、iPS細胞から誘導したFlk-1（Fetal liver kinase-1）陽性細胞が血管新生を促すことを報告し、当該細胞の有用性を示した（非特許文献3）。一方、効率的且つ効果的な

50

細胞移植を可能にするという観点から細胞シートに着目し、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞のシートを構築することを試みた。具体的には、Flk-1陽性細胞に磁性粒子を取り込ませ、磁力を印加しつつ培養する方法や、MACS（磁気細胞分離）若しくはFCM（フローサイトメトリー）を利用してFlk-1陽性細胞を単離した後に培養する方法等を試したが、実用に耐える細胞シートは得られなかった。一方、細胞源として注目されている脂肪組織由来幹細胞（ADRC）を併用した結果、2層構造（ADRCのシート上にiPS細胞由来Flk-1陽性細胞のシートが重層している）のシートの構築には成功したものの、ADRCとiPS細胞由来Flk-1陽性細胞をモザイク状に混合した場合には非常に脆弱なシートしか得られなかった。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Tateishi-Yuyama E. et al., Lancet. 2002 Aug 10; 360 (9331):427-35.

【非特許文献2】Narazaki G. et al., Circulation. 2008 Jul 29; 118 (5):498-506.

【非特許文献3】Suzuki et al. BMC Cell Biology 2010, 11:72

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

移植術を可能にするため、また、高い治療効果を発揮するためにも、細胞シートには十分な強度が要求される。上記の通り、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞は血管新生を促す作用を有し（非特許文献3等）、虚血性疾患の治療や創傷治癒等への適用が大いに期待されるが、細胞シートへの応用は困難を極め、十分な強度を有する細胞シートの構築には至っていない。そこで本発明は、実用に耐える強度を有し、且つ高い治療効果を発揮し得るiPS細胞由来Flk-1陽性細胞（血管前駆細胞）シートを提供すること課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0007】

検討を重ねる中で本発明者らは、磁気工学技術とコラーゲン包埋法に着目し、細胞シートの構築方法として、これらを組み合わせた独自の手法を考案した。即ち、コラーゲンに加え基底膜成分を用いたゲルと、磁気ラベルしたiPS細胞由来Flk-1陽性細胞を混合し、磁力を利用して細胞を移動させることで細胞層を形成させるという方法を創出した。当該方法の有効性を検討した結果、十分な強度を有するiPS細胞由来Flk-1陽性細胞単独シートの作製に成功した。当該シートはFlk-1陽性細胞が多層（約10～15層）を形成した構造を有し、移植に耐える十分な強度を示した。また、下肢虚血モデルに移植しその治療効果を検証したところ、良好な接着性及び生着性を示し、著明な虚血の改善をもたらした。即ち、高い治療効果を発揮することが確認された。尚、当該細胞シートでは、細胞間に適度な間隔が形成されており（細胞間をゲルが介在する）、移植後にシート内での血管形成を可能にする。この特徴が移植効率や生着率の向上等に寄与すると考えられる。

以上の通り、本発明者らは、独自の視点に基づく検討の末、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞の臨床応用を図る上で重要となる「細胞シート」の構築を可能にする画期的な方法の開発に成功した。以下に示す発明は、主として当該成果に基づく。

[1] 以下のステップ(1)～(4)を含む、iPS細胞由来血管前駆細胞シートの作製方法：

- (1) 磁気ラベルしたiPS細胞由来Flk-1陽性細胞を用意するステップ；
- (2) I型コラーゲン、ラミニン、IV型コラーゲン及びエンタクチンを有効成分として含むゲル材料と前記Flk-1陽性細胞との混合物を培養容器に播種するステップ；
- (3) 磁力を作用させることによって、前記混合物中の前記Flk-1陽性細胞を前記培養容器の培養面に引き寄せ、多層の細胞層を形成させるステップ；
- (4) 前記ゲル材料をゲル化させるステップ。

[2] ステップ(1)が以下のステップ(1-1)～(1-4)を含む、[1]に記載の作製方法：

- (1-1) iPS細胞を用意するステップ；
- (1-2) 前記iPS細胞をFlk-1陽性細胞へ分化誘導するステップ；

10

20

30

40

50

(1-3) Fik-1陽性細胞を分取するステップ；

(1-4) 分取したFik-1陽性細胞を磁気ラベルするステップ。

[3] ステップ(1-3)において、Nanog陽性細胞とNanog陰性細胞を選別し、Nanog陰性のFik-1陽性細胞が分取される、[2]に記載の作製方法。

[4] ステップ(2)における前記混合物が、I型コラーゲンを有効成分とした第1ゲル要素と、ラミニン、IV型コラーゲン及びエンタクチンを有効成分とした第2ゲル要素と、前記Fik-1陽性細胞とを混合することによって得られる、[1] ~ [3]のいずれか一項に記載の作製方法。

[5] ステップ(2)における前記培養容器の培養面上には、着脱可能な仕切りによる、上方が開放された区画が形成されており、該区画内に前記混合物が播種される、[1] ~ [4]のいずれか一項に記載の作製方法。

[6] 前記培養面が低接着性である、[1] ~ [5]のいずれか一項に記載の作製方法。

[7] ステップ(3)と(4)の間に以下のステップ(3')を行う、[1] ~ [6]のいずれか一項に記載の作製方法：

(3') 前記細胞層の上方に存在する余分なゲル材料を除去するステップ。

[8] ステップ(4)の後に以下のステップ(5)を行う、[1] ~ [7]のいずれか一項に記載の作製方法：

(5) 前記培養容器に培地を添加し、ステップ(4)によって形成されたシート状構造物を培地中に維持するステップ。

[9] ステップ(5)の後に以下のステップ(6)を行う、[8]に記載の作製方法：

(6) 前記Fik-1陽性細胞が増殖可能な温度条件下で培養するステップ。

[10] [1] ~ [9]のいずれか一項に記載の作製方法によって得られた細胞シート。

[11] I型コラーゲン、ラミニン、IV型コラーゲン及びエンタクチンを含むゲルに包埋された状態でiPS細胞由来Fik-1陽性細胞が多層を形成する細胞シート。

[12] 前記多層を形成する細胞間に前記ゲルが存在する、[11]に記載の細胞シート。

[13] 前記多層が少なくとも10層である、[11]又は[12]に記載の細胞シート。

[14] 前記多層が10~20層である、[11]又は[12]に記載の細胞シート。

[15] 前記多層が含む細胞成分がiPS細胞由来Fik-1陽性細胞のみからなる、[11] ~ [14]のいずれか一項に記載の細胞シート。

[16] 前記多層が含む細胞成分がiPS細胞由来Fik-1陽性細胞及び該細胞に由来する細胞のみからなる、[11] ~ [14]のいずれか一項に記載の細胞シート。

[17] 前記多層を形成するiPS細胞由来Fik-1陽性細胞が磁気ラベルされている、[11] ~ [16]のいずれか一項に記載の細胞シート。

[18] 前記iPS細胞由来Fik-1陽性細胞がNanog陰性の細胞である、[11] ~ [17]のいずれか一項に記載の細胞シート。

[19] [10] ~ [18]のいずれか一項に記載の細胞シートを患部又は創部に移植するステップを含む、血管新生療法。

[20] 虚血性心疾患、脳血管障害、閉塞性動脈硬化症、重症下肢虚血又は創傷の治療、或いは術後の創部の回復に用いられる、[19]に記載の血管新生療法。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】 iPS細胞由来Fik-1陽性細胞シートの作成法の一例。

【図2】 iPS細胞から分化誘導したFik-1陽性Nanog陰性(Fik-1⁺Nanog⁻)細胞のFCM(フローサイトメトリー)解析結果。Fik-1⁺Nanog⁻細胞を分取し、各種細胞表面マーカーの発現を検出した。

【図3】 作製に成功したiPS細胞由来Fik-1陽性細胞シート。断面を光学顕微鏡及び蛍光顕

10

20

30

40

50

微鏡で観察した。左は明視野像、右は蛍光顕微鏡像 (Flk-1/DAPI)。Flk-1陽性の細胞が10~15層の細胞層を形成していることがわかる。一部の細胞にCD31又は SMAの発現を認めた (データ示さず)。

【図4】作製されたiPS細胞由来Flk-1陽性細胞シート (A,B)と移植後のiPS細胞由来Flk-1陽性細胞シート (C)。細胞シートは柔軟且つ十分な強度を有していた (B)。また、良好な接着性を示した (C)。

【図5】iPS細胞由来Flk-1陽性細胞シートの血管新生能の評価。下肢虚血モデルに細胞シートを移植後、レーザドップラー法によって経時的に血流を検出した。iPS細胞由来Flk-1陽性細胞シート移植群 (Flk+)ではiPS細胞由来Flk-1陰性細胞シート移植群 (Flk-)やコントロール群 (CNT)に比して有意な下肢虚血側の血流改善を認めた。尚、下のグラフは健常側に対する虚血側の血流比 (縦軸)を比較したものの。

【図6】移植後21日目のiPS細胞由来Flk-1陽性細胞シートの特徴。蛍光顕微鏡像 (左)、明視野像 (中央)及び二つの合成 (右)を示す。多数の新生血管 (矢印)を認める。

【図7】iPS細胞由来Flk-1陽性細胞シートの治療効果。下肢虚血モデルに細胞シートを移植後、レーザドップラー法によって経時的に血流を検出した。PS細胞由来Flk-1陽性細胞シート移植群では、細胞移植群に比して有意に下肢虚血側の血流改善を認めた (A)。*は有意差ありを表す。VEGF mRNAレベル (B)、bFGF mRNAレベル (C)、TUNEL陽性率 (D)も比較した。

【図8】iPS細胞由来Flk-1陽性細胞シートによる拒絶反応の検討。C57/BL6系統の野生型マウスの下肢内転筋にiPS細胞由来Flk-1陽性細胞シートを移植し、拒絶反応の有無を調べた。Aはヘマトキシリンエオジン (HE)染色の結果。左はSham群、右はiPS細胞由来Flk-1陽性細胞シート移植群。スケールバーは50.0µm。炎症性サイトカイン (B:IL-6、C: MCP-1)の発現レベルをリアルタイムRT-PCR法で比較した。相対値 (対GAPDH mRNAレベル)で各サイトカインのmRNAレベルを示した。N.S.は有意差なしを表す。

【図9】トレパンブルー染色を利用して、磁気ラベルしたiPS細胞由来Flk-1陽性細胞 (MCL+)と磁気ラベル前のiPS細胞由来Flk-1陽性細胞 (MCL-)の間で死細胞数を比較した。各細胞をBSOで処理した後、トレパンブルー染色に供した。

【発明を実施するための形態】

【0009】

1. iPS細胞由来血管前駆細胞シートの作製方法

本発明の第1の局面はiPS細胞由来血管前駆細胞シートの作製方法に関する。「iPS細胞 (人工多能性幹細胞)」とは、初期化因子の導入などにより体細胞をリプログラミングすることによって作製される、多能性 (多分化能)と増殖能を有する細胞である。iPS細胞は胚性幹細胞 (ES細胞)に近い性質を示す。

【0010】

「iPS細胞由来血管前駆細胞」とは、iPS細胞を分化誘導して得られるFlk-1陽性の細胞である。本発明の作製方法によれば、Flk-1陽性細胞が多層を形成した細胞シートが得られる。

【0011】

本発明の作製方法では以下のステップ(1)~(4)を行う。

- (1)磁気ラベルしたiPS細胞由来Flk-1陽性細胞を用意するステップ
- (2)I型コラーゲン、ラミニン、IV型コラーゲン及びエンタクチンを有効成分として含むゲル材料と前記Flk-1陽性細胞との混合物を培養容器に播種するステップ
- (3)磁力を作用させることによって、前記混合物中の前記Flk-1陽性細胞を前記培養容器の培養面に引き寄せ、多層の細胞層を形成させるステップ
- (4)前記ゲル材料をゲル化させるステップ

【0012】

<ステップ(1):磁気ラベルした細胞の調製>

ステップ(1)では、磁気ラベルしたiPS細胞由来Flk-1陽性細胞を用意する。「磁気ラベル」とは「磁性化」と同義であり、細胞に磁性粒子を導入したり、付着したりすること等

10

20

30

40

50

によって、細胞を磁力で操作可能な状態にすることをいう。細胞の磁気ラベルは、好ましくは磁性粒子の導入又は付着によって行う。磁性粒子は、細胞が保持可能であり且つ細胞が保持した際に細胞に磁性を付加するものであればどのようなものでもよい。例えば、フェライトやマグネタイトなどの酸化鉄、酸化クロム、コバルトなどの磁性材料の粒子を磁性粒子として用いることができる。二種類以上の磁性粒子を組み合わせることもよい。磁性粒子の粒径は特に限定しないが、例えば粒径が5nm~100µmの磁性粒子を用いることができる。後述するリポソーム封入型の磁性粒子の場合は特に粒径が5nm~25nmの磁性粒子を用いることが好ましい。この範囲の粒径の磁性粒子を用いることにより、リポソームの分散安定性を高めることができる。

【0013】

磁性粒子の導入により細胞を磁気ラベルする場合は、細胞への導入に適した形態に調製した磁性粒子を使用する。このような形態の磁性粒子の具体例は、リポソーム等の脂質膜に封入(内包)された磁性粒子である。例えば、磁性粒子をリポソームに封入した磁性粒子封入リポソーム(ML: MagnetoliposomeあるいはMagnetite liposome)や磁性粒子を正電荷リポソームに封入した磁性粒子封入正電荷リポソーム(MCL: Magnetite cationic liposome)を用いることができる。これらのリポソーム封入型の磁性粒子では、リポソームの有する細胞親和性によって、細胞への付着及び取り込みが可能となる。特に、磁性粒子封入正電荷リポソームは、細胞表面との疎水性相互作用や電氣的相互作用によって効率的に細胞内へと取り込まれる。尚、細胞に磁性粒子を取り込ませることによって、より確実に細胞を磁気ラベルすることができ、また多くの磁性粒子を細胞に保持させることができるため磁力の作用による細胞のコントロールが容易になる。

【0014】

MCLの具体例として、マグネタイト等の磁性粒子が、正電荷脂質を含有するリポソームに封入された構造を備えるものを挙げることができる。当該MCLは表面に正電荷を帯びているために細胞への接着性に優れるとともに、リポソームを構成成分とするために細胞内へと取り込まれやすい。このような特性を備えるMCLは様々な細胞の磁気ラベルに適する。MCLは、例えばJpn.J. Cancer Res. 第87巻第1179~1183頁(1996年)に記載された磁性粒子封入正電荷リポソームの製造方法を参照して調製することができる。

【0015】

一方、磁性粒子を付着することで細胞を磁気ラベルする場合には、細胞接着性物質と複合体を形成した磁性粒子を使用するとよい。例えば、細胞接着性物質が直接又は間接的に磁性粒子に結合して構成される複合体や、細胞接着性物質を含有する材料(多糖類や脂質など)で磁性粒子を被覆ないし封入して構成される複合体を使用することによって細胞に磁性粒子を付着することができる。尚、上記のリポソーム封入型の磁性粒子も細胞接着性であり、これを磁性粒子の付着による磁気ラベルに使用することもできる。

【0016】

細胞接着性物質は、幅広い細胞に対して接着性を有する物質と、特定の細胞に対して選択的な接着性を示す物質とに分類することができる。前者の例として細胞膜の構成成分に結合性又は接着性を有する化合物を挙げることができる。このような化合物として、フィブロネクチン、フィブロネクチンの一部であって例えばアミノ酸配列RGD(Arg-Gly-Asp、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸)、KQAGDV(Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val、リシン-グルタミン-アラニン-グリシン-アスパラギン酸-バリン)(配列番号1)、若しくはREDV(Arg-Glu-Asp-Val、アルギニン-グルタミン酸-アスパラギン酸-バリン)(配列番号2)を含むペプチド、同じく細胞接着性タンパク質であるラミニン、又はラミニンの一部であって例えばアミノ酸配列YIGSR(Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg、チロシン-イソロイシン-グリシン-セリン-アルギニン)(配列番号3)、若しくはIKVAV(Ile-Lys-Val-Ala-Val、イソロイシン-リシン-バリン-アラニン-バリン)(配列番号4)を含むペプチドなどを例示することができる。このような細胞接着性ペプチドの長さは、特に限定されるものではないが、好ましくはアミノ酸数個~10数個程度、さらに好ましくは10個以下程度である。例えば、アミノ酸配列RGDを有するペプチドあるいはアミノ酸配列YIGSR(配列

10

20

30

40

50

番号3)を有するペプチドであってアミノ酸残基数が10個以下のペプチドを好適に用いることができる。このような細胞接着性ペプチドは、好ましくは、ペプチドの末端側にこれらの特定アミノ酸配列を有し、より好ましくはそのN末端側にこれらのアミノ酸配列を有する状態でそのC末端で磁性粒子等の表面に結合されており、さらに好ましくは、そのN末端にこれらのアミノ酸配列のN末端残基が位置する。

【0017】

一方、特定の細胞に対して選択的な接着性を示す物質の例として、特定の細胞がその表面に発現する分子(マーカー分子)に対する抗体を挙げることができる。ここでの抗体としてFab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFvなどの抗体断片を用いることもできる。低分子化合物やタンパク質、標識物質などを融合又は結合させて構成される融合抗体又は標識化抗体を使用してよい。標識物質としては¹²⁵I等の放射性物質、ペルオキシダーゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、マイクロペルオキシダーゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ローダミンイソチオシアネート(RITC)、アルカリホスファターゼ、ビオチンなどを用いることができる。

10

【0018】

細胞接着性物質を直接又は間接的に磁性粒子に結合することによって、細胞接着性磁性粒子を構築することができる。例えば、市販の磁性粒子Dynabeads(登録商標)に対して、ビオチンとストレプトアビジンの結合反応を利用して抗体を結合することによって、細胞接着性磁性粒子を得ることができる。その他、市販の磁性粒子リゾビスト(登録商標)、フェリデックス等をアミノシランカップリングして、細胞接着性物質が結合した磁性粒子を調製することができる。また、表面に細胞接着性物質を有するリポソーム(即ち、細胞接着性物質を含有したリポソーム又は細胞接着性物質が表面に付着ないし結合したリポソーム)に磁性粒子を封入することによっても細胞接着性磁性粒子を構築することができる。細胞接着性物質の種類に応じた各種の結合形成反応を利用することによって、このような磁性粒子封入リポソームを作製することが可能である。必要に応じて適切なリンカーを用いることもできる。例えば、リポソームへRGDペプチドを結合させるためには、ジスルフィド結合の形成による方法が好適である。この方法では、RGD配列のC末端側にシステインが付加されたRGDC配列(配列番号5)からなるペプチドを用いることが好ましい。かかるペプチドを使用することによって、SH基を有するリポソーム側との間に容易にジスルフィド結合を形成させることができる。尚、細胞接着性ペプチドをリポソームに結合させるためのリンカーはシステインに限られるものではなく、他のアミノ酸やペプチドを用いてもよい。

20

30

【0019】

細胞接着性物質との複合体を形成した磁性粒子(細胞接着性磁性粒子)の具体例として、MCLのリポソーム表面にアミノ酸配列RGDC(配列番号5)からなるペプチドを結合した磁性粒子封入リポソームを挙げることができる。細胞接着性磁性粒子の他の具体例として、MCLのリポソーム表面に抗体を結合して得られる抗体固定化磁性粒子封入リポソーム(AML: Antibody-immobilized magnetite liposome)を挙げることができる。AMLは、マグネタイト等の磁性粒子がリポソームで封入されるとともに、リポソームに抗体が固定化された構造を備える。抗体としては磁性ラベルの対象の細胞に特異的に結合するものが選択される。これによって、細胞特異的に磁気ラベルすることが可能となる。AMLは、例えばJ. Chem. Eng. Jpn. 第34巻第66~72頁(2001年)に記載された方法を参照して調製すればよい。

40

【0020】

磁気ラベルしたiPS細胞由来Fik-1陽性細胞は、iPS細胞をFik-1陽性細胞へと分化誘導した後、Fik-1陽性細胞を分取し、磁気ラベルに供するという方法や、iPS細胞をFik-1陽性細胞へと分化誘導した後に磁気ラベルし、そしてFik-1陽性細胞を分取するという方法、或いはiPS細胞を磁気ラベルした後にFik-1陽性細胞へと分化誘導し、そしてFik-1陽性細胞を分取するという方法、などによって調製することができる。以下、磁気ラベルしたiPS細胞由来Fik-1陽性細胞の調製方法の具体例を示す。この例では、以下のステップ、即ち

50

、(1-1) iPS細胞を用意するステップ；(1-2) 前記iPS細胞をFlk-1陽性細胞へ分化誘導するステップ；(1-3) Flk-1陽性細胞を分取するステップ；及び(1-4) 分取したFlk-1陽性細胞を磁気ラベルするステップ、を行う。

【0021】

まず、iPS細胞を用意する(ステップ(1-1))。iPS細胞は、これまでに報告された各種iPS細胞作製法によって作製することができる。また、今後開発されるiPS細胞作製法を適用することも当然に想定される。iPS細胞作製法の最も基本的な手法は、転写因子であるOct3/4、Sox2、Klf4及びc-Mycの4因子を、ウイルスを利用して細胞へ導入する方法である(Takahashi K, Yamanaka S: Cell 126 (4), 663-676, 2006; Takahashi, K, et al: Cell 131 (5), 861-72, 2007)。ヒトiPS細胞についてはOct4、Sox2、Lin28及びNonogの4因子の導入による樹立の報告がある(Yu J, et al: Science 318(5858), 1917-1920, 2007)。c-Mycを除く3因子(Nakagawa M, et al: Nat. Biotechnol. 26 (1), 101-106, 2008)、Oct3/4及びKlf4の2因子(Kim J B, et al: Nature 454 (7204), 646-650, 2008)、或いはOct3/4のみ(Kim J B, et al: Cell 136 (3), 411-419, 2009)の導入によるiPS細胞の樹立も報告されている。また、遺伝子の発現産物であるタンパク質を細胞に導入する手法(Zhou H, Wu S, Joo JY, et al: Cell Stem Cell 4, 381-384, 2009; Kim D, Kim C H, Moon JI, et al: Cell Stem Cell 4, 472-476, 2009)も報告されている。一方、ヒストンメチル基転移酵素G9aに対する阻害剤BIX-01294やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤バルプロ酸(VPA)或いはBayK8644等を使用することによって作製効率の向上や導入する因子の低減などが可能であるとの報告もある(Huangfu D, et al: Nat. Biotechnol. 26 (7), 795-797, 2008; Huangfu D, et al: Nat. Biotechnol. 26 (11), 1269-1275, 2008; Silva J, et al: PLoS. Biol. 6 (10), e 253, 2008)。遺伝子導入法についても検討が進められ、レトロウイルスの他、レンチウイルス(Yu J, et al: Science 318(5858), 1917-1920, 2007)、アデノウイルス(Stadtfield M, et al: Science 322 (5903), 945-949, 2008)、プラスミド(Okita K, et al: Science 322 (5903), 949-953, 2008)、トランスポゾンベクター(Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al: Nature 458, 766-770, 2009; Kaji K, Norrby K, Pac a A, et al: Nature 458, 771-775, 2009; Yusa K, Rad R, Takeda J, et al: Nat Methods 6, 363-369, 2009)、或いはエピソーマルベクター(Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, et al: Science 324, 797-801, 2009)を遺伝子導入に利用した技術が開発されている。

【0022】

iPS細胞への形質転換、即ち初期化(リプログラミング)が生じた細胞はFbxo15、Nanog、Oct/4、Fgf-4、Esg-1及びCript等の多能性幹細胞マーカー(未分化マーカー)の発現などを指標として選択することができる。選択された細胞をiPS細胞として回収する。

【0023】

ステップ(1-1)に続くステップ(1-2)では、用意したiPS細胞をFlk-1陽性細胞へ分化誘導する。iPS細胞のFlk-1陽性細胞への分化誘導は既報の方法(Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, Okita K, Kim B, Matsuoka S, Yamanaka S, Yamashita J: Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. Circulation 2008,118:498-506。)に準じて行うことができる。概要を説明すれば、分化誘導培地(例えば10%FBS及び 5×10^{-5} mol/L 2-メルカプトエタノールを添加したMEM(minimum essential medium))を用い、IV型コラーゲンでコートした培養皿でiPS細胞を所定時間(例えば96時間~108時間)培養する。尚、使用するiPS細胞の由来や状態などに応じて分化誘導条件は適宜修正ないし変更される。適切な分化誘導条件は、本願明細書及び引用文献の内容を参考にしつつ予備実験等を通して設定可能である。

【0024】

続いて、分化誘導によって生じたFlk-1陽性細胞を分取する(ステップ(1-3))。Flk-1陽性細胞の分取は、これに限定されるものではないが、フローサイトメトリー(FCM)を利用するとよい。フローサイトメトリーのための装置(セルソーター)は例えばベックマン・コールター株式会社、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社などから販売されてお

り、本発明ではこれらを利用することができる。基本的な操作法、解析条件などは装置に添付の取扱説明書に従えばよい。また、フローサイトメトリーに関する論文や成書も数多く存在し、例えば、Darzynkiewicz Z, Crissman HA, Robinson JP (Eds.): Flow Cytometry. 3rd Edition. Methods in Cell Biology, Volumes 63 (Part A) and 64 (Part B). San Diego, Academic Press, 2000.; Givan AL: Flow Cytometry: First Principles. 2nd Edition. New York, Wiley-Liss, 2001.; Ormerod MG (Ed.): Flow Cytometry - A Practical Approach. 3rd edition. Oxford, Oxford University Press, 2000.; Robinson JP, Darzynkiewicz Z, Dean P, Dressler L, Rabinovitch P, Stewart C, Tanke H, Wheelers L, (Eds.): Current Protocols in Cytometry, New York, John Wiley & Sons (continuing updates)等が参考になる。

10

【0025】

Flk-1陽性細胞を分取する際、Nanog陽性細胞とNanog陰性細胞を選別し、Nanog陰性のFlk-1陽性細胞のみを分取するとよい。未分化マーカーであるNanogの発現を認めない細胞を選抜することは、本発明の作製方法で得られる細胞シートの安全性向上の観点から好ましい。即ち、Nanog陰性のFlk-1陽性細胞のみを用いることは、細胞シートの移植に伴う腫瘍形成の防止に有効である。尚、Nanog陽性細胞とNanog陰性細胞の選別及びNanog陰性且つFlk-1陽性の細胞の分取には例えばセルソーターを利用すればよい。

【0026】

分取したFlk-1陽性細胞は磁気ラベルされる(ステップ(1-4))。磁気ラベルの方法は上記の通りである。例えば、分取したFlk-1陽性細胞を懸濁させて浮遊状態とし、培養液中へMCLを添加して所定時間(例えば2~4時間)インキュベートすれば、MCLを内包するFlk-1陽性細胞、即ち磁気ラベルされたFlk-1陽性細胞が得られる。

20

【0027】

<ステップ(2):細胞とゲル材料との混合>

ステップ(1)に続くステップ(2)では、ゲル材料とFlk-1陽性細胞との混合物を培養容器に播種する。本発明ではゲル材料として、間質の主成分であるI型コラーゲンと、基底膜を構成する成分であるラミニン、IV型コラーゲン及びエンタクチンを用いる。ゲル材料を構成する各有効成分(I型コラーゲン、ラミニン、IV型コラーゲン、エンタクチン)の由来としてはウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、サル、チンパンジー、及びヒトを例示できる。また、遺伝子組換え技術で調製した(リコンビナント)ものを使用してもよい。

30

【0028】

ゲル材料を構成する各有効成分の含有比率は特に限定されない。各有効成分の含有比率(重量比)を例示すれば、コラーゲンI:ラミニン:コラーゲンIV:エンタクチン=1:10~200:5~100:1~50である。好ましくは、コラーゲンI:ラミニン:コラーゲンIV:エンタクチン=1:20~100:10~50:2~25とする。

【0029】

ゲル材料は細胞の生存、維持に必要な培地成分を含有する。培地の例を挙げると、ダルベッコ変法イーグル(DMEM)培地(ナカライテスク株式会社、シグマ社、ギブコ社等)、RPMI 1640培地(ナカライテスク株式会社、シグマ社、ギブコ社等)、SmGM培地(CAMBREX社)である。培地成分の他、他のゲル化成分(III型コラーゲン、VIII型コラーゲンなど)、細胞接着因子(フィブロネクチンなど)、血清(FBS、ヒト血清等)、細胞増殖因子(EGF、PDGF、IGF-1、TGF- など)、分化誘導因子、無機塩類、ビタミン類、保存剤、防腐剤等がゲル材料に添加されていてもよい。

40

【0030】

好ましい一態様では、I型コラーゲンを有効成分とした第1ゲル要素と、ラミニン、IV型コラーゲン及びエンタクチンを有効成分とした第2ゲル要素を予め用意しておき、これらのゲル要素とFlk-1陽性細胞とを混合することによって、ゲル材料とFlk-1陽性細胞との混合物を得る。例えば、第1ゲル要素はI型コラーゲンを培地や緩衝液(例えばリン酸緩衝液)、或いは生理食塩水等に溶解・希釈することによって調製すればよい。第2ゲル要素についても同様の方法で調製することができるが、上記有効成分(ラミニン、IV型コラ

50

ーゲン及びエンタクチン)を含む市販の試薬(例えば、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社が販売するBDマトリゲル™基底膜マトリックス等)を用いることにしてもよい。尚、第2ゲル中の有効成分の含有比率は特に限定されないが、好ましくは含有比率(重量比)をラミニン:IV型コラーゲン:エンタクチン=3~15:2~8:1とする。

【0031】

ゲル成分による適度な間隔が細胞間に形成されるようにFlk-1陽性細胞の密度を設定することによって、移植効率や生着率の高い細胞シートを得ることが可能となる。そこで、混合物における細胞密度が例えば 1.0×10^5 細胞/cm³~ 1.0×10^7 細胞/cm³、好ましくは 1.0×10^6 細胞/cm³~ 5.0×10^6 細胞/cm³となるように、使用するFlk-1陽性細胞の数を設定するとよい。

10

【0032】

ゲル材料とFlk-1陽性細胞との混合物が播種される培養容器は特に限定されない。即ち、各種培養容器を使用可能である。好ましくは、培養皿(ペトリ皿、マルチウェルプレートなど)のように、上方が開放した培養容器を用いる。一方、形成される細胞シートの回収を容易にすべく、低接着性の培養面を備える培養容器を採用することが好ましい。「低接着性の培養面」とは、細胞の接着性を高めるためにポリリジン等で表面処理(コート)された培養面とは対照的に、表面無処理(ノンコート)或いは非接着性又は低接着性材料による表面処理(コート)等によって細胞が接着し難い培養面をいう。低接着性の培養面を備える培養容器は各種市販されており、例えば、超低接着性細胞培養皿であるUltra Low Attachment Culture Dish(コーニング社)、アガロースゲルやアルギン酸ゲルをコートした培養皿、浮遊細胞を培養する培養皿を用いることができる。

20

【0033】

本発明の一態様では、着脱可能な仕切りによる、上方が開放された区画が培養面上に形成されており、当該区画内にゲル材料とFlk-1陽性細胞との混合物が播種される。この態様の場合、限定された領域内に細胞が封じ込められることになり、最終的に得られる細胞シートのサイズが培養面のサイズに依存しなくなる。従って、培養面のサイズの如何に拘わらず、自由に細胞シートのサイズを設計可能になる。また、細胞シートの形状は区画(例えばリング状)の形状に依存し、様々な形状で細胞シートを提供可能となる。即ち、細胞シートの形状についても、その設計自由度が飛躍的に高まる。更には、区画の使用によれば、細胞シートを構成する細胞層の細胞密度も調整可能である。

30

【0034】

<ステップ(3):磁力による細胞層の形成>

ゲル材料とFlk-1陽性細胞との混合物を培養容器に播種した後、例えば、培養面の後方(即ち培養面の裏面側)から磁力を作用させ、混合物中のFlk-1陽性細胞を培養面に引き寄せる。具体的には例えば、培養面の後方に磁石を配置して当該操作を行う。培養容器として培養皿を使用する場合、典型的には、磁石の上に培養皿を設置することになる。培養皿の場合は通常、内底面が培養面となるが、容器の種類や形態の如何によっては容器の内底面以外の内壁面が培養面に設定される場合がある。

【0035】

使用する磁石の種類は特に限定されない。例えば、永久磁石又は電磁石を用いることができる。電磁石を使用すれば、通電状態の操作によって磁力を制御可能である。永久磁石として、鑄造磁石(アルニコ磁石、鉄・クロム・コバルト磁石を含む)、塑性加工磁石(Fe-Mn系、Fe-Cr-Co系を含む)、フェライト磁石(Ba系、Sr系を含む)、希土類磁石(Sm-Co系、Nd-Fe-B系を含む)、ボンド磁石(Sm-Co系、Nd-Fe-B系、Sm-Fe-N系を含む)などを使用することができる。

40

【0036】

磁力を作用させる時間は、多層の細胞層が形成される限りにおいて特に限定されない。使用する磁石の種類、磁気ラベルに使用する磁性粒子の種類、磁気ラベルされた細胞の量や密度などを考慮して作用時間を設定すればよいが、例えば30分~2時間にわたって磁力を作用させる。最適な作用時間は予備実験を通して設定可能である。尚、磁力の強さ及び

50

作用時間を調節することによって、所望の厚さ及び/又は所望の細胞密度の細胞層を形成することが可能である。

【0037】

磁石から放出される磁力を直接利用するのではなく、磁石から放出される磁力を他の部材に伝搬させた後に利用することにしてもよい。例えば、Fe、Co、Ni、Fe-C、Fe-Ni、Fe-Co、Fe-Ni-Co-Al、Fe-Ni-Cr、SmCo₅、Nd₂Fe₁₄B、Fe₃O₄、 γ -Fe₂O₃、BaFe₁₂O₁₉等のように磁力を伝搬する特性の部材を磁石に接触又は近接させることにすれば、当該部材の表面（端面など）から磁力を放出させることが可能である。

【0038】

本発明の一態様では、形成された細胞層の上方に存在する余分なゲル材料（即ち上澄み液）を除去する（ステップ(3')）。当該操作を行った場合には、細胞層の上に余分なゲル層のない細胞シートが得られることになる。当該細胞シートは取り扱いの面はもとより、治療効果の点でも有利である。尚、ゲル材料の除去は、例えば、スポイトなどの吸引器を用いて行うことができる。

10

【0039】

<ステップ(4)：ゲル化>

次に、ゲル材料をゲル化させる。典型的には、培養容器ごと、ゲル化に必要な温度（例えば37℃）でインキュベートする。ゲル化に必要な時間はゲル材料の組成や実施スケール等によって変動し得るが、例えば30分～1時間である。

【0040】

ゲル化によって形成されたシート状構造物を直ちに回収することにしてもよいが、培養容器に培地を添加し、シート状構造物を培地中に維持することが好ましい。当該操作（ステップ(5)）を加えることによって、シート状構造物、即ち細胞シートの品質劣化を防止できる。ここでの培地は、シート状構造物内の細胞の維持に適したものが好ましく、例えばMEM培地等が使用できる。この操作の後、更に、Flk-1陽性細胞が増殖可能な温度条件下で培養することにしてもよい（ステップ(6)）。この操作はシート状構造物（細胞シート）内のFlk-1陽性細胞の維持、増殖に有効であり、品質劣化を防止する。ここでの温度条件の例として35℃～38℃を挙げることができる。好ましくは37℃で培養する。尚、培養容器から回収されたシート状構造物（細胞シート）は、通常、必要に応じて別容器に移された後、使用直前まで保存される。保存は低温（例えば4℃～15℃）で行うとよい。このような保存を経ることなく移植に供する（即ち用時調製）ことにしてもよい。

20

30

【0041】

2. iPS細胞由来血管前駆細胞シート

上記の通り、本発明者らはiPS細胞由来血管前駆細胞（Flk-1陽性細胞）シートの構築に成功した。得られたシートは特有の構造を備え、その利用価値は高い。そこで本発明の第2の局面は、特有の構造によって規定されるiPS細胞由来血管前駆細胞シート（以下、省略して「本発明の細胞シート」と呼称する）を提供する。本発明の細胞シートでは、I型コラーゲン、ラミニン、IV型コラーゲン及びエンタクチンを含むゲルに包埋された状態でiPS細胞由来Flk-1陽性細胞が多層を形成している。特に特徴的な構造として、細胞層を構成する細胞間に上記ゲルが存在する。即ち、基本的には、細胞同士が接着ないし接しておらず、間にゲルが介在した状態で細胞が配列している。このような特徴的な構造が細胞層の少なくとも50%以上、好ましくは70%以上、更に好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上において認められる。

40

【0042】

一態様では、細胞層を構成する細胞がNanog陰性の細胞である。即ち、iPS細胞由来Flk-1陽性且つNanog陰性の細胞によって細胞層が構成されている。このように未分化マーカーNanogが陰性の細胞を使用することは、移植後の腫瘍形成を防止する上で重要である。

【0043】

本発明の細胞シートの特徴の一つは多層の細胞層を備えることである。典型的には10層以上の細胞層が備えられている。具体的には例えば10層～20層の細胞層が備えられる。

50

【 0 0 4 4 】

典型的には、細胞層における細胞成分がiPS細胞由来Flk-1陽性細胞のみからなる。即ち、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞単独で細胞層を構成する。一態様では、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞とそれに由来する細胞、即ちiPS細胞由来Flk-1陽性細胞が増殖或いは分化することによって生ずる細胞（例えば血管内皮前駆細胞、血管内皮細胞、血管平滑筋前駆細胞、血管平滑筋細胞）が細胞層を構成する。当該細胞シートは、例えば、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞によって構成された細胞層を備える細胞シートを得た後、これを培養に供することによって得られる。

【 0 0 4 5 】

本発明の細胞シートは、例えば、上記本発明の作製方法によって得ることができる。本発明の作製方法によって得られた細胞シートの場合、細胞層を形成する細胞は磁気ラベルされている。但し、培養操作を含む作製方法を適用し、細胞の増殖が生じた場合には、磁気ラベルされていない細胞も存在することになる。

10

【 0 0 4 6 】

3 . iPS細胞由来血管前駆細胞シートの用途

本発明は更に、iPS細胞由来血管前駆細胞シートの用途として、血管新生療法を提供する。本発明の血管新生療法では、上記第1の局面の作製方法で得られる細胞シート又は上記第2の局面における細胞シートを患部又は創部に移植するステップが行われる。細胞シートを移植すると患部又は創部において血管新生が促される。血管新生が治療効果をもたらす各種疾患、例えば、虚血性心疾患（狭心症、心筋梗塞など）、脳血管障害（脳梗塞、脳虚血など）、閉塞性動脈硬化症、重症下肢虚血等の治療に本発明を適用可能である。また、創傷の治癒や、術後の創部の回復を促す目的にも本発明を適用可能である。移植の際には、必要に応じて、縫合したり、或いは生体適合性の接着剤（フィブリン糊など）等を使用したりすることによって、細胞シートと患部又は創部との接着性及び/又は細胞シートの生着性を高めることにしてもよい。但し、本発明で使用する細胞シートは、生体成分であるゲル材料によって細胞が包埋された構造を有し、接着性に優れ且つ高い生着性も期待できる。従って、縫合や接着剤の使用は必須ではない。

20

【 0 0 4 7 】

治療対象は特に限定されず、ヒト、及びヒト以外の哺乳動物（ペット動物、家畜、実験動物を含む。具体的には例えばマウス、ラット、モルモット、ハムスター、サル、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ニワトリ、ウズラ等である）を含む。好適には、治療対象はヒトである。

30

【 実施例 】

【 0 0 4 8 】

マウスiPS細胞から血管前駆細胞（Vascular progenitor cell: VPC）を分化誘導し、更に、これらの細胞から内皮前駆細胞（Endothelial progenitor cell: EPC）および血管平滑筋前駆細胞（Vascular smooth muscle progenitor cell: SMPC）の分化誘導を試みた。また、新規な血管再生/血管新生療法を実現すべく、iPS細胞由来血管前駆細胞シートの作製を試みた。

【 0 0 4 9 】

40

1 , iPS細胞由来血管前駆細胞(iPS VPC)の分化誘導方法の検討

マウス胎児繊維芽細胞由来iPS細胞（iPS-MEF-Ng-20D-17）（Takahashi K, Yamanaka S, Cell 2006,126:663-676.; Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S, Nature 2007, 448:313-317.）を分化誘導培地にて培養したところ、Flk-1陽性細胞を認め、再現性をもってFlk-1が発現することを確認した。また、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞の内皮細胞及び平滑筋細胞への分化を確認した。これらの細胞の単独培養にて血管内皮細胞様の管腔形成網を構築し得た。尚、iPS細胞からFlk-1陽性細胞への分化誘導は既報（Circulation 2008,118:498-506.）の条件で行った。

【 0 0 5 0 】

2 . iPS細胞由来血管前駆細胞(iPS VPC)の安全性と血管新生能の検討

50

ヌードマウスを用いて下肢虚血モデルを作製した。iPS細胞由来Flk-1陽性細胞を虚血側に移植し、下肢虚血後の虚血改善効果を評価した。結果、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞移植群ではコントロール群に比して有意に下肢虚血側の血流改善を認めた。また、いずれの細胞移植群においても移植後60日間までに奇形種の形成は認められなかった。

【0051】

3. iPS細胞由来血管前駆細胞シートの作製

上記1.及び2.で示したごとく、iPS細胞から得たFlk-1陽性細胞に血管新生効果を確認できた。そこで、次の段階として、より効率的且つ効果的な細胞移植法の開発に着手した。検討を重ねる中で、磁気工学技術とコラーゲン包埋法に着目し、これらを組み合わせた下記方法(図1を参照)を考案した。

(1)磁気ラベル

マイクロチューブにiPS細胞由来Flk-1陽性細胞を懸濁させて浮遊状態にし、磁性ナノ微粒子(MCL)を添加する。37℃で2時間インキュベートし、MCLを細胞に取り込ませる。

(2)ゲル材料の用意

I型コラーゲン(3mg/ml)、10xMEM、緩衝液(NaHCO₃)及びFBSを7:1:1:1の比率(重量比)で混合し、コラーゲングル(1ml中にI型コラーゲンを2.1mg含有する)とする。一方、ラミニン(560mg/ml)、IV型コラーゲン(310mg/ml)及びエンタクチン(80mg/ml)を含む基底膜ゲルを用意する。尚、以下の実験では基底膜ゲルとしてBDマトリゲル(日本ベクトン・ディッキンソン株式会社)(組成比率はラミニン56%、IV型コラーゲン31%、エンタクチン8%であり、bFGFを0~0.1 pg/ml、EGFを0.5~1.3 ng/ml、IGF-1を15.6 ng/ml、PDGFを12 pg/ml、NGFを0.2 ng/ml未満、TGF-βを2.3 ng/ml含有する)を使用した。

(3)細胞とゲル材料の混合及び播種

磁気ラベルした細胞(細胞数 1.7×10^6 (100 μl))、コラーゲングル(170 μl)及び基底膜ゲル(30 μl)を混和し、低接着性ディッシュ(Ultra Low Attachment Culture Dish: コーニング社)に播種する。

(4)磁力による細胞層の形成

ディッシュの底面に磁石を配置して磁力を印加し、細胞を培養面に引き寄せさせる。細胞層が形成された段階で余分な上澄み液を除く。

(5)ゲル化

37℃で1時間インキュベートし、ゲルを固める。その後、培地を添加する。

【0052】

(1)におけるiPS細胞由来Flk-1陽性細胞として、FCMによって分取したFlk-1陽性且つNanog陰性の細胞を使用した。当該細胞の特性(細胞表面マーカーの発現プロファイル)を解析した結果を図2に示す。

【0053】

上記方法の有効性を検証した結果、十分な強度を有するiPS細胞由来Flk-1陽性細胞単独シートの構築に成功した。得られた細胞シートを抗Flk-1抗体にて免疫染色したところ、10~15層の細胞層を形成したFlk-1陽性細胞を確認できた(図3)。

【0054】

4. iPS細胞由来血管前駆細胞シートの安全性と血管新生能の検討

ヌードマウスを用いて下肢虚血モデルを作製した。iPS細胞由来Flk-1陽性細胞シートを虚血側に移植し(図4を参照)、下肢虚血後の虚血改善効果をレーザドップラー法で評価した。比較対照として、iPS細胞由来Flk-1陰性細胞を用いて作製した細胞シート(作製方法は上記(1)~(5)に準ずる)を移植した。

【0055】

図5に示すようにiPS細胞由来Flk-1陽性細胞シート移植群では、iPS細胞由来Flk-1陰性細胞シート移植群やコントロール群に比して術後3、7、14、21日目まで有意に下肢虚血側の血流改善を認めた。iPS細胞由来Flk-1陰性細胞シートでは移植後、高率に奇形種の形成を認めたが、対照的にiPS細胞由来Flk-1陽性細胞シート移植群では、移植後90日間までに奇形種の形成は認められなかった。また、移植後のiPS細胞由来Flk-1陽性細胞シート内に

10

20

30

40

50

は豊富な血管の形成が認められた(図6)。磁気工学技術とコラーゲン包埋法を組み合わせることにより、細胞間に適度な間隔を形成でき、多層細胞層内への血管形成を可能とした。移植後の細胞シート内への血液供給が、移植細胞の細胞死を防止し、移植効率や生着率の向上に寄与したと考えられる。

【0056】

5. iPS細胞由来血管前駆細胞シートの治療効果の検証

ヌードマウスを用い下肢虚血モデルを作製した。iPS細胞由来Flk-1陽性細胞シートを虚血側に移植し、下肢虚血後の虚血改善効果をレーザドップラー法で評価した。比較対照として、シートの形成に用いた細胞(iPS細胞由来Flk-1陽性細胞)を移植(筋肉内注射)した。

10

【0057】

図7Aに示すようにiPS細胞由来Flk-1陽性細胞シート移植群では、細胞移植群に比して術後3、7、14、21日目で有意に下肢虚血側の血流改善を認めた。移植部の組織を採取し、各種サイトカインの発現レベルを測定した結果、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞シート移植群では、血管新生に重要なVEGF及びbFGFの発現が有意に高いことが明らかとなった(図7B)。また、TUNELアッセイによって、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞シート移植群では細胞死も有意に抑制されていることが示された(図7C)。

【0058】

6. 拒絶反応の検討

C57/BL6系統の野生型マウスを用いて、移植時の拒絶反応の有無を評価した。マウスの下肢内転筋にiPS細胞由来Flk-1陽性細胞シートを移植し、Sham群との間で組織学的比較を行った。また、炎症性サイトカインの発現レベルも比較した。

20

【0059】

移植21日目に移植部の組織の一部を採取し、ヘマトキシリンエオジン染色に供したところ、iPS細胞由来Flk-1陽性細胞シート移植群においても拒絶反応を示す所見を認めなかった(図8A)。また、炎症性サイトカインIL-6及びMCP-1の発現レベルも、Flk-1陽性細胞シート移植群とSham群との間で有意な差は認められない(図8B、C)。以上の結果より、Flk-1陽性細胞シートの移植が拒絶反応を惹起しないことが示された。

【0060】

7. 磁気ラベルのアポトーシス抑制作用

磁気ラベルしたiPS細胞由来Flk-1陽性細胞と磁気ラベル前のiPS細胞由来Flk-1陽性細胞を用意し、BSOで処理した後、トリパンブルー染色に供した。磁気ラベルした細胞ではトリパンブルー陽性細胞の割合が低く、磁気ラベル(磁性粒子自体)にアポトーシス抑制作用があることが判明した。

30

【産業上の利用可能性】

【0061】

本発明の作製方法によれば、iPS細胞由来血管前駆細胞単独の細胞シートを形成することが可能である。現在、iPS細胞の臨床応用が多くの研究者によって試みられているが、iPS細胞を利用することの利点の一つは、ES細胞等と異なり自家移植を実現可能なことである。iPS細胞由来血管前駆細胞単独の細胞シートは、iPS細胞特有ともいえる当該利点を活かすことができる。また、脂肪細胞由来幹細胞を併用して構築された細胞シートとの比較でいえば、脂肪の採取が不要である点や作製過程が簡便である点などにおいて格段に優位といえる。

40

【0062】

本発明の作製方法によって得られた細胞シートは十分な強度を有し且つ細胞間に適度な間隔が存在する多層細胞層を備え、移植効率及び生着率の高い移植術を可能とする。血管新生が治療効果をもたらす各種疾患、病態の治療への利用が想定される。

【0063】

この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこ

50

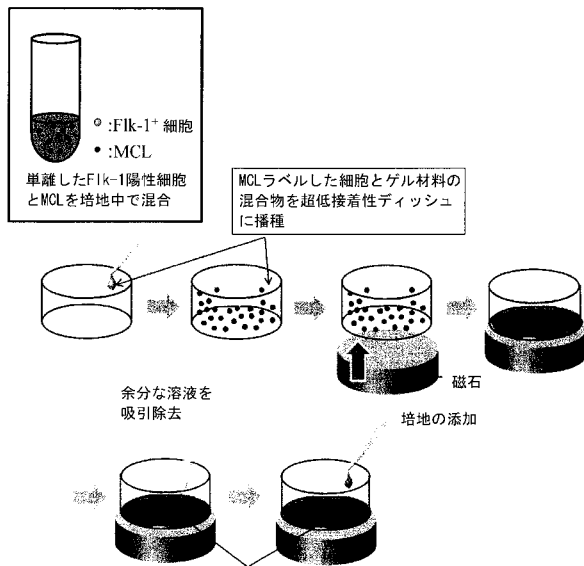
の発明に含まれる。本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

【配列表フリーテキスト】

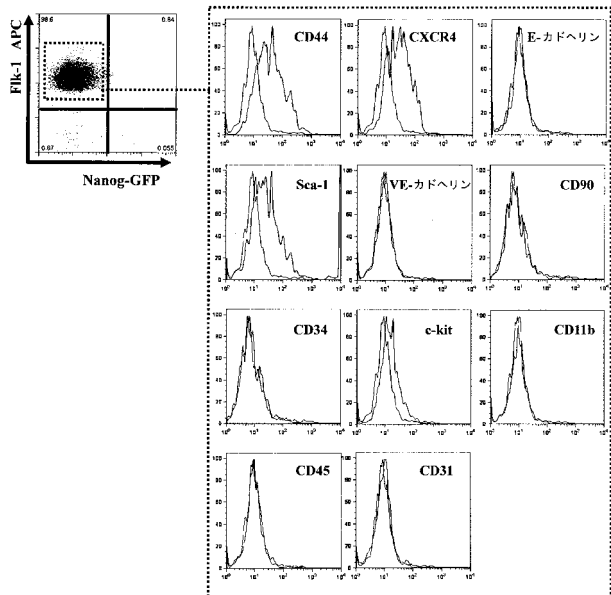
【0064】

配列番号1～5：人工配列の説明：接着性ペプチド

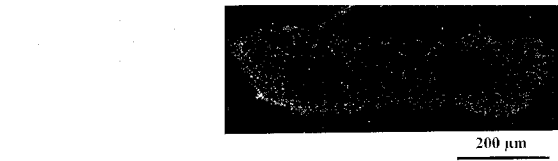
【図1】



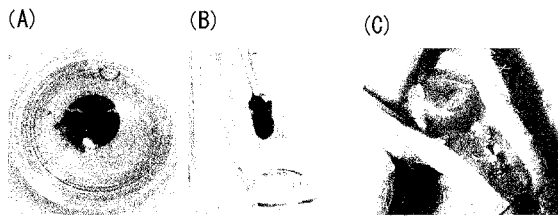
【図2】



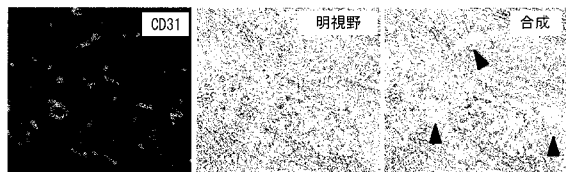
【 図 3 】



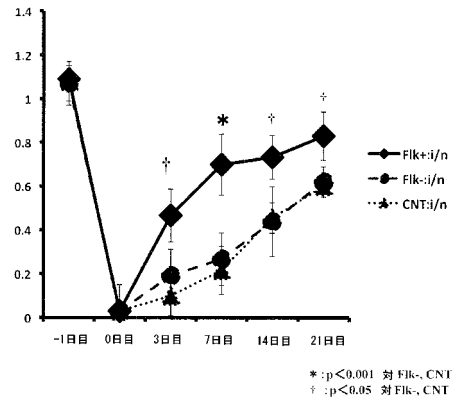
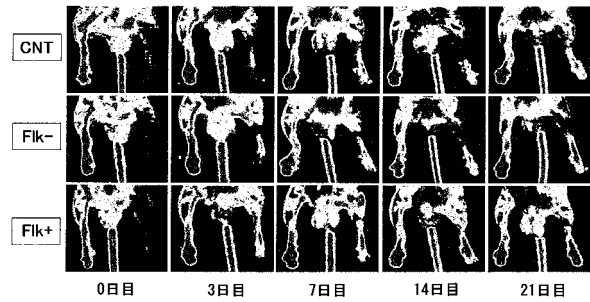
【 図 4 】



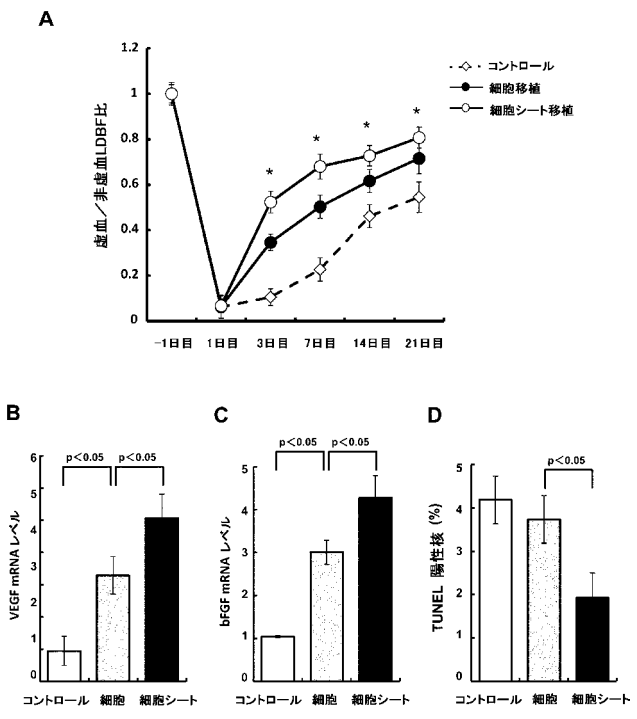
【 図 6 】



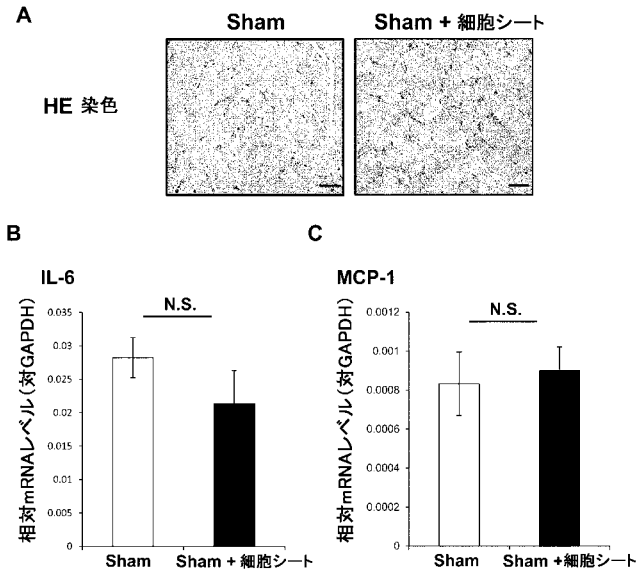
【 図 5 】



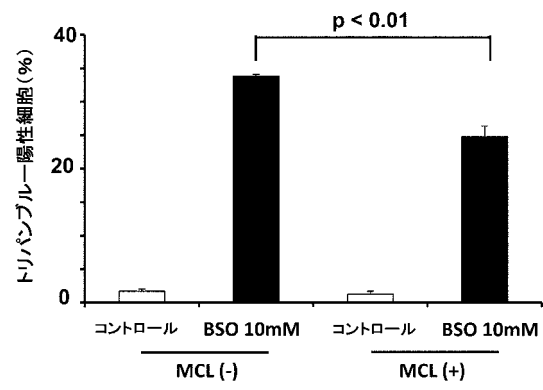
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



【 配列表 】

2013069661000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/078787

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N5/10(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M3/04(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) C12N5/10, A61K35/12, A61L27/00, A61P9/00, A61P9/10, A61P17/02, C12M1/00, C12M3/04		
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 1996-2013 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2013 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2013		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, WPI		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/083412 A1 (Japan Tissue Engineering Co., Ltd.), 30 September 2004 (30.09.2004), entire text & US 2006/0063252 A1 & EP 1605038 A1 & CN 1761743 A	1-18
A	SHIMIZU, K. et al., Construction of multi-layered cardiomyocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force., Biotechnol. Bioeng., 2007.03.01, Vol.96, No.4, pp.803-9	1-18
A	ISHII, M. et al., Enhanced angiogenesis by transplantation of mesenchymal stem cell sheet created by a novel magnetic tissue engineering method., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2011.10, Vol.31, No.10, pp.2210-5	1-18
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input 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 04 February, 2013 (04.02.13)		Date of mailing of the international search report 12 February, 2013 (12.02.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/078787

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NARAZAKI, G. et al., Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells., Circulation, 2008.07.29, Vol.118, No.5, pp.498-506	1-18
A	SUZUKI, H. et al., Therapeutic angiogenesis by transplantation of induced pluripotent stem cell-derived Flk-1 positive cells., BMC Cell Biol., 2010.09.22, 11:72	1-18
A	HIRASHIMA, M. et al., Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an in vitro model of vasculogenesis., Blood, 1999. 02.15, Vol.93, No.4, pp.1253-63	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/078787

Box No. II	Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <p>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: 19-20 because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: The inventions of claims 19-20 pertain to method for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy (see PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines 9.08).</p> <p>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</p> <p>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</p>	
Box No. III	Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <p>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</p> <p>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.</p> <p>3. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p>4. <input type="checkbox"/> 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.:</p> <p>Remark on Protest</p> <p><input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.</p> <p><input type="checkbox"/> 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.</p> <p><input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.</p>	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 7 8 7 8 7	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, A61P17/02(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M3/04(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. C12N5/10, A61K35/12, A61L27/00, A61P9/00, A61P9/10, A61P17/02, C12M1/00, C12M3/04			
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 1971-2013年 日本国実用新案登録公報 1996-2013年 日本国登録実用新案公報 1994-2013年			
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用了用語) CA/BIOSIS/MEDLINE (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed, WPI			
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	WO 2004/083412 A1 (株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング) 2004.09.30, 全文 & US 2006/0063252 A1 & EP 1605038 A1 & CN 1761743 A	1-18	
A	SHIMIZU, K. et al., Construction of multi-layered cardiomyocyte sheets using magnetite nanoparticles and magnetic force., Biotechnol. Bioeng., 2007.03.01, Vol.96, No.4, pp.803-9	1-18	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input 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 04.02.2013		国際調査報告の発送日 12.02.2013	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 幸田 俊希	4 N 4 6 7 1
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2012/078787
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
A	ISHII, M. et al., Enhanced angiogenesis by transplantation of mesenchymal stem cell sheet created by a novel magnetic tissue engineering method., Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 2011.10, Vol.31, No.10, pp.2210-5	1-18
A	NARAZAKI, G. et al., Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells., Circulation, 2008.07.29, Vol.118, No.5, pp.498-506	1-18
A	SUZUKI, H. et al., Therapeutic angiogenesis by transplantation of induced pluripotent stem cell-derived Flk-1 positive cells., BMC Cell Biol., 2010.09.22, 11:72	1-18
A	HIRASHIMA, M. et al., Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an in vitro model of vasculogenesis., Blood, 1999.02.15, Vol.93, No.4, pp.1253-63	1-18

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2012/078787

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 19-20 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求項19-20に係る発明は、手術又は治療による人体又は動物の体の処置方法を対象としている (PCT国際調査及び予備審査ガイドライン9.08を参照。)
2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であって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。

様式PCT/ISA/210 (第1ページの続葉(2)) (2009年7月)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
C 0 7 K 5/10 (2006.01)	A 6 1 P	17/02	
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K	5/10	
	C 0 7 K	7/06	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC

(72) 発明者 石井 正和

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

(72) 発明者 鬼頭 哲太郎

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

(72) 発明者 鈴木 博彦

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

F ターム(参考) 4B029 AA03 AA08 AA21 AA27 BB11 CC02 CC04 CC07 DF10 DG08
GA01 GB04
4B065 AA90X BC31 BD22 BD25 BD39 CA44
4C081 AB13 AB14 BA12 CD34 DA02
4C087 AA01 AA02 AA03 BB64 CA04 MA01 MA65 NA14 ZA36 ZA45
ZA89 ZB21
4H045 AA20 AA30 BA13 BA14 EA20 EA34 FA10

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。