

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02016/013352

発行日 平成29年4月27日 (2017. 4. 27)

(43) 国際公開日 平成28年1月28日 (2016. 1. 28)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 1/00 (2006.01)</b>	C 1 2 N 1/00 B	4 B 0 6 5
<b>C 1 2 N 5/0775 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/0775	

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 17 頁)

出願番号	特願2016-520701 (P2016-520701)	(71) 出願人	899000057 学校法人日本大学 東京都千代田区九段南四丁目8番24号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2015/068658	(74) 代理人	110000774 特許業務法人 もえぎ特許事務所
(22) 国際出願日	平成27年6月29日 (2015. 6. 29)	(72) 発明者	本田 雅規 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内
(11) 特許番号	特許第5991687号 (P5991687)	(72) 発明者	鶴町 仁奈 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内
(45) 特許公報発行日	平成28年9月14日 (2016. 9. 14)	(72) 発明者	秋田 大輔 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内
(31) 優先権主張番号	特願2014-149676 (P2014-149676)		
(32) 優先日	平成26年7月23日 (2014. 7. 23)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

最終頁に続く

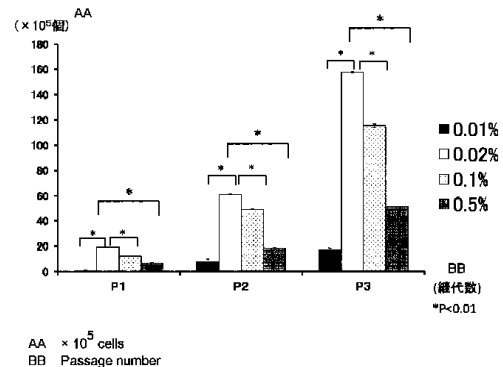
(54) 【発明の名称】 脱分化脂肪細胞の製造方法

(57) 【要約】

高効率に脂肪組織から成熟脂肪細胞を単離し、該成熟脂肪細胞より脱分化脂肪細胞を製造する方法の提供を課題とする。

次のAの工程を含む、脱分化脂肪細胞の製造方法を提供する。

A. 脂肪組織を0.02w/v%のコラゲナーゼで処理することにより、成熟脂肪細胞を単離する工程



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

次の A の工程を含む、脱分化脂肪細胞の製造方法。

A . 脂肪組織を 0 . 0 1 w / v % より高く、かつ、0 . 1 w / v % より低い濃度のコラゲナーゼで処理することにより、成熟脂肪細胞を単離する工程

## 【請求項 2】

コラゲナーゼの濃度が 0 . 0 2 w / v % 以上であり、かつ、0 . 0 5 % 以下である請求項 1 に記載の製造方法。

## 【請求項 3】

成熟脂肪細胞が 6 0 μ m 未満の大きさである請求項 1 または 2 に記載の方法。

10

## 【請求項 4】

さらに次の B の工程を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の脱分化脂肪細胞の製造方法。

B . 上記 A の工程により単離された成熟脂肪細胞より、脱分化脂肪細胞を取得する工程

## 【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれかの方法によって製造された脱分化脂肪細胞を分化誘導する工程を含む、間葉系細胞の製造方法

## 【請求項 6】

間葉系細胞が、骨芽細胞、筋芽細胞、心筋細胞、内皮細胞、軟骨細胞または脂肪細胞から選ばれるいずれかである請求項 5 に記載の方法。

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、脱分化脂肪細胞 ( D e d i f f e r e n t i a t e d f a t c e l l s ; D F A T c e l l s ) の製造方法に関する。さらに詳しくは、脂肪組織を特定の濃度のコラゲナーゼで処理することにより成熟脂肪細胞を単離し、該成熟脂肪細胞より脱分化脂肪細胞を製造する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

従来、脂肪組織から成熟脂肪細胞を単離するために、脂肪組織をコラゲナーゼで処理して組織中の細胞外マトリックスから細胞を切り離し、成熟脂肪細胞のみを採取する方法が行われてきた。この方法において、一般的に 0 . 1 w / v % の濃度でコラゲナーゼが使用されている。

30

この 0 . 1 w / v % というコラゲナーゼの濃度は、R o d b e l l が 1 9 6 4 年に報告したものであり ( 非特許文献 1、2 )、現在に至るまで、この濃度のままコラゲナーゼを使用するのが一般的である。しかし、コラゲナーゼはトリプシンと同様に細胞への障害作用があるため、濃度が高いほど細胞に与える傷害が大きくなるという問題がある。

## 【0003】

本発明者らは脂肪組織から成熟脂肪細胞を単離し、該成熟脂肪細胞より脱分化脂肪細胞を製造している。脱分化脂肪細胞は、単離した成熟脂肪細胞を天井培養法によって培養することで、成熟脂肪細胞が自発的に脱分化を開始することによって得られる多分化能を再獲得した細胞であるため、再生医療の細胞源として有用視されている。

40

このような脱分化脂肪細胞を大量に製造するには、細胞に極力障害を与えない条件で、脂肪組織より成熟脂肪細胞を効率的に単離することが重要となる。そこで、本発明者らは本発明において、脱分化脂肪細胞を大量に製造するための、脂肪組織の処理にあたり最適なコラゲナーゼ濃度を検討した。

## 【0004】

なお、脂肪組織のコラゲナーゼによる処理について、特許文献 1 において、ウシ科動物組織を 0 . 2 5 v / v % のコラゲナーゼ濃度で消化させたこと、また、ヒト、イヌ科動物

50

等の脂肪組織が通常の濃度（0.02%または0.05%）のコラゲナーゼで全て消化されたことが開示されている。しかし、この文献は、脱分化脂肪細胞を大量に製造することを目的とする、本発明とは異なるものである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特表2014-511827号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】LOCALIZATION OF LIPOPROTEIN LIPASE IN FAT CELLS OF RAT ADIPOSE TISSUE. RODBELL M J Biol Chem. 1964 Mar; 239: 753-5

10

【非特許文献2】METABOLISM OF ISOLATED FAT CELLS. I. EFFECTS OF HORMONES ON GLUCOSE METABOLISM AND LIPOLYSIS. RODBELL M. J Biol Chem. 1964 Feb; 239: 375-80

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

脱分化脂肪細胞の効率的な製造方法の提供を課題とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、脂肪組織からの成熟脂肪細胞の単離において、従来、0.1w/v%の濃度で用いられてきたコラゲナーゼの濃度を0.01w/v%より高く、かつ、0.1w/v%より低い濃度にした場合に従来の濃度と比較して約3倍の高効率で成熟脂肪細胞が採取でき、脱分化脂肪細胞を製造できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明は次の(1)~(6)の脱分化脂肪細胞の製造方法等に関する。

30

(1) 次のAの工程を含む、脱分化脂肪細胞の製造方法。

A. 脂肪組織を0.01w/v%より高く、かつ、0.1w/v%より低い濃度のコラゲナーゼで処理することにより、成熟脂肪細胞を単離する工程

(2) コラゲナーゼの濃度が0.02w/v%以上であり、かつ、0.05%以下である上記(1)に記載の製造方法。

(3) 成熟脂肪細胞が60μm未満の大きさである上記(1)または(2)に記載の方法。

(4) さらに次のBの工程を含む、上記(1)~(3)のいずれかに記載の脱分化脂肪細胞の製造方法。

B. 上記Aの工程により単離された成熟脂肪細胞より、脱分化脂肪細胞を取得する工程

40

(5) 上記(1)~(4)のいずれかの方法によって製造された脱分化脂肪細胞を分化誘導する工程を含む、間葉系細胞の製造方法

(6) 間葉系細胞が、骨芽細胞、筋芽細胞、心筋細胞、内皮細胞、軟骨細胞または脂肪細胞から選ばれるいずれかである上記(5)に記載の方法。

【発明の効果】

【0010】

本発明の提供により、単離する成熟脂肪細胞に損傷を与えることなく、高効率で成熟脂肪細胞を採取することが可能となる。また、処理に使用するコラゲナーゼの量を減らすことでコストを抑えることも可能となる。

【図面の簡単な説明】

50

## 【 0 0 1 1 】

【図 1】脱分化脂肪細胞の各継代培養時における細胞数を示した図である（実施例 1）。

【図 2】脱分化脂肪細胞の各継代培養時における細胞数を示した図である（実施例 1）。

【図 3】脱分化脂肪細胞の各継代培養時における細胞数を示した図である（実施例 1）。

【図 4】採取された成熟脂肪細胞の細胞数を示した図である（実施例 2）。

【図 5】採取された成熟脂肪細胞を蛍光染色した結果を示した図である（実施例 2）。

【図 6】脱分化脂肪細胞の細胞数を示した図である（実施例 2）。

【図 7】アルカリフォスファターゼ活性を示した図である（実施例 3）。

【図 8】アリザリンレッド S 染色の結果を示した図である（実施例 3）。

【図 9】カルシウム沈着量を示した図である（実施例 3）。

10

【発明を実施するための形態】

## 【 0 0 1 2 】

本発明の「脱分化脂肪細胞の製造方法」は、次の A の工程を含む、脱分化脂肪細胞の製造方法であれば良く、脱分化脂肪細胞の効率的な製造にあたり有用なその他の工程を含んでいても良い。

A．脂肪組織を 0.01 w/v % より高く、かつ、0.1 w/v % より低い濃度のコラゲナーゼで処理することにより、成熟脂肪細胞を単離する工程

## 【 0 0 1 3 】

例えば、「成熟脂肪細胞を単離する工程」には、皮下や内臓等から得られた脂肪組織を 0.01 w/v % より高く、かつ、0.1 w/v % より低い濃度のコラゲナーゼで処理することに加えて、このコラゲナーゼ処理によって得られた成熟脂肪細胞を含む酵素液を孔径 100 および 150  $\mu\text{m}$  のメッシュでフィルトレーションし、成熟脂肪細胞である単胞性脂肪細胞のみからなる単一の画分として成熟脂肪細胞を単離すること等が挙げられる。

20

## 【 0 0 1 4 】

コラゲナーゼの濃度は 0.01 w/v % より高く、かつ、0.1 w/v % より低い濃度であれば良く、特に 0.02 w/v % 以上であり、かつ、0.05 % 以下であることが好ましい。

## 【 0 0 1 5 】

製造される成熟脂肪細胞は、60 ~ 100  $\mu\text{m}$  程度の通常の大きさであっても良いが、60  $\mu\text{m}$  未満であることが好ましく、特に 40  $\mu\text{m}$  未満であることが好ましい。

30

## 【 0 0 1 6 】

また、本発明の「脱分化脂肪細胞の製造方法」は、さらに、次の B の工程を含むものであっても良い。

B．上記 A の工程により単離された成熟脂肪細胞より、脱分化脂肪細胞を取得する工程

この「脱分化脂肪細胞を取得する工程」には、単離された成熟脂肪細胞を天井培養法によって培養することが挙げられる。

これらの工程を行うにあたり、本発明者らの先願発明（特許第 5055611 号、特許第 5055613 号）を参照して行っても良い。

## 【 0 0 1 7 】

本発明の「間葉系細胞の製造方法」は、「脱分化脂肪細胞の製造方法」によって得られた脱分化脂肪細胞を分化誘導する工程を含む、間葉系細胞の製造方法であれば良く、間葉系細胞の製造にあたり有用なその他の工程を含んでいても良い。

40

「間葉系細胞」には、骨芽細胞、筋芽細胞、心筋細胞、内皮細胞、軟骨細胞または脂肪細胞等が挙げられる。脱分化脂肪細胞を分化誘導する工程では、分化誘導する各細胞に合わせて分化誘導に有用な剤、方法等の従来知られているいずれの方法も用いることができる。

## 【 0 0 1 8 】

以下、実施例、試験例をあげて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【実施例】

50

## 【0019】

本発明の実施例、比較例では、特に記載がない限り、次の試料を使用した。

## 1) 酵素

コラゲナーゼ (Type II ; C 6 8 8 5 - 1 G , S I G M A ) を使用した。

## 2) 脂肪組織

顎変形症の手術の際に得られたヒト頬脂肪体から脂肪組織を得た。

## 【0020】

## 〔実施例1〕

## 脱分化脂肪細胞の製造方法 ( 1 )

## 工程 A . 脂肪組織から成熟脂肪細胞を単離する工程

ヒト頬粘膜下に位置する頬脂肪体より採取した脂肪組織 5 g を、コラゲナーゼ ( T y p e I I ; S I G M A ) 添加の Na H C O <sub>3</sub> 含有ダルベッコ変法イーグル培地 ( D M E M ; S I G M A ) に入れ、コラゲナーゼ処理を行った。本発明において該培地におけるコラゲナーゼの濃度を 0 . 0 2 w / v % とし、比較として 0 . 0 1 w / v % 、 0 . 1 0 w / v % または 0 . 5 0 w / v % の濃度としたものも作成した。

各濃度のコラゲナーゼ処理を行った後、ナイロンメッシュにて濾過し、細胞懸濁液を得た。得られた細胞懸濁液を 1 分間、7 0 0 G で遠心分離し、上層に分離される単胞性脂肪画分を新鮮な 1 0 % F B S 添加 D M E M 培地に加え、1 分間、7 0 0 G の遠心分離を 3 回繰り返すことで、単胞性脂肪細胞として成熟脂肪細胞を得た。

## 【0021】

## 工程 B . 成熟脂肪細胞より、脱分化脂肪細胞を取得する工程

工程 A によって得られた単胞性脂肪細胞を組織培養フラスコ ( F a l c o n , 3 1 0 7 ) に移し、2 0 % F B S 、 1 % ペニシリン / ストレプトマイシンを添加した D M E M 培地でフラスコ内を完全に満たし、3 7 ° C 、 5 % C O <sub>2</sub> 、 9 5 % 空気の気相に調節した炭酸ガス培養装置内にフラスコ底面が上となるように静置して 7 日間培養した。

培養 4 日後には大部分の細胞がフラスコ天井面にしっかりと接着し、大型の脂肪滴の周辺に種々の大きさの脂肪滴を有する多胞性脂肪細胞へと形態変化した。培養 6 日後には脂肪滴がさらに小さくなり、脂肪滴をまったく持たない線維芽細胞様の形態に変化する細胞が多数観察された。

培養 7 日後にフラスコ内の培地を 2 0 % F B S 添加 D M E M 培地に交換し、細胞接着面が底面になるようにして炭酸ガス培養装置内で 1 0 日間培養を続けた。培地交換は 4 日毎に行った。脂肪滴を持たない細胞は活発に増殖し、培養 1 0 日後にはフラスコ内の細胞は線維芽細胞様の細胞のみとなり、コンフルエントに達した。

この線維芽細胞様の細胞は、活発な増殖能を有し、また D E X 、 I N S 、 I B M X 等の分化誘導剤により、脂肪滴を有する脂肪細胞に再分化する分化能を有することから、単胞性脂肪細胞由来の脱分化脂肪細胞として作出された。

## 【0022】

作出された脱分化脂肪細胞を  $1 \times 10^4$  c e l l s / m l とするようになり、2 0 % F B S 添加した D M E M 培地に再浮遊させた。その後、コラーゲンタイプ II を塗布した組織培養用の培養フラスコ ( F a l c o n , 3 0 0 1 ) 中に播種し、3 7 ° C 、 5 % C O <sub>2</sub> 、 9 5 % 空気の気相に調節した炭酸ガス培養装置内に静置して培養した。なお、培地の交換は 4 日ごとに行った。培養 8 日後、本発明の脱分化脂肪細胞がコンフルエントに到達した段階で細胞数を数えた ( 図 1 ~ 3 、 P 1 ) 。

その後、2 回目の継代培養を行い、同様に細胞数を数えた ( 図 1 ~ 3 、 P 2 ) 後、さらに 3 回目の継代培養を行い、同様に細胞数を数えた ( 図 1 ~ 3 、 P 3 ) 。

## 【0023】

その結果、図 1 ~ 3 に示されるように、コラゲナーゼの濃度を 0 . 0 2 w / v % とし、脂肪組織から単離した成熟脂肪細胞を用いた場合、コラゲナーゼの濃度を 0 . 0 1 w / v % 、 0 . 1 0 w / v % 、 0 . 5 0 w / v % とした場合と比べて、有意に大量の脱分化脂肪細胞が製造できることが確認された。図 1 ~ 3 以外にも同様の試験を複数回行ったが、い

10

20

30

40

50

ずれもコラゲナーゼの濃度を0.02 w/v%とした場合に、有意に大量の脱分化脂肪細胞を製造することができ、同様の結果であった。

【0024】

〔実施例2〕

脱分化脂肪細胞の製造方法(2)

#### 1. 成熟脂肪細胞数の比較

実施例1と同様の方法に、ヒトの類脂肪体より採取した脂肪組織をコラゲナーゼ処理した。各濃度のコラゲナーゼ処理を1時間行った後、100 $\mu$ mのセルストレーナー(BDFALCON)を用いて細胞外基質成分を除去した後、濾過および低速遠心分離を行い、成熟脂肪細胞分画を得た。この各コラゲナーゼ濃度の浮遊細胞分画200 $\mu$ l中に含まれる細胞数をコールターカウンター:Coulter Counter(登録商標) Multisizer 3(Beckman Coulter, Miami, FL, USA)を用いて測定し、採取された成熟脂肪細胞数を比較した。この測定は各濃度それぞれ3回行った。

10

【0025】

#### 2. 成熟脂肪細胞分画の大きさによる分取

上記1において低速遠心分離後に単離した浮遊細胞分画を、40 $\mu$ mのセルストレーナー(BDFALCON)で濾過し、得られた細胞分画を40 $\mu$ m未満の細胞分画とした。また、同じく100 $\mu$ mのセルストレーナーで濾過後、さらに40 $\mu$ mのセルストレーナーで40 $\mu$ m未満の細胞分画を排除して得た細胞分画を40 $\mu$ m以上100 $\mu$ m未満の細胞分画とした。

20

【0026】

上記1、2により得られた成熟脂肪細胞数を図4に示した。図4に示されるように、60 $\mu$ m以上100 $\mu$ m未満の範囲の大きさの成熟脂肪細胞は、いずれのコラゲナーゼ濃度であっても同程度の数の成熟脂肪細胞が採取された。一方で、60 $\mu$ m未満の大きさの成熟脂肪細胞は、コラゲナーゼ濃度を0.02 w/v%とした場合に、他の濃度と比較して有意に大量に採取できることが示された。さらに、40 $\mu$ m未満の大きさの成熟脂肪細胞は、コラゲナーゼ濃度を0.02 w/v%とした場合に、他の濃度とした場合と比べて6倍以上採取できることが確認できた。

30

【0027】

#### 3. 蛍光染色

上記2.において分取した40 $\mu$ m未満の細胞分画または40 $\mu$ m以上100 $\mu$ m未満の細胞分画について、脂肪滴(トリグリセリド)に陽性を示すAdipored(Lonza, Walkerslive, MD, USA)および核に陽性を示すHoechst 33342(Sigma-Aldrich, 5 $\mu$ g/ml)にて20分染色を行い、蛍光顕微鏡(KEYENCE)にて観察を行った。

その結果、図5に示されるように、40 $\mu$ m未満の細胞分画(図5、A)も40 $\mu$ m以上100 $\mu$ m未満の細胞分画(図5、B)のいずれもトリグリセリドおよび核が染色されたことから、成熟脂肪細胞であることが確認できた。

40

【0028】

#### 4. 脱分化脂肪細胞数の比較

40 $\mu$ m未満の細胞分画または40 $\mu$ m以上100 $\mu$ m未満の細胞分画の成熟脂肪細胞を1フラスコあたり、 $1 \times 10^4$ 個ずつ播種し、天井培養を行った。天井培養開始後6日目の細胞数を測定した後、その後7日目にフラスコを反転し、10日目、14日目、18日目の脱分化脂肪細胞の数を測定した。

その結果、図6に示されるように、40 $\mu$ m未満の成熟脂肪細胞の方が40 $\mu$ m以上100 $\mu$ m未満の成熟脂肪細胞に比較して、天井培養開始6日目から有意に多く、脱分化脂肪細胞へ脱分化することが確認できた。

【0029】

#### 5. 細胞表面抗原の確認

50

上記4.にて得られた40 $\mu$ m未満の成熟脂肪細胞または40 $\mu$ m以上100 $\mu$ m未満の成熟脂肪細胞から得られた脱分化脂肪細胞をそれぞれ継代培養し、1継代目の細胞を $1 \times 10^5$ 個ずつ10cm dishに播種し、60%コンフルエントの細胞を回収した。これを $5 \times 10^5$ /tubeに分注した。

それぞれの脱分化脂肪細胞について、CD13 (PE-CD13)、CD44 (FITC-CD44)、CD45 (FITC-CD45)、CD73 (PE-CD73)、CD90 (APC-CD90)、CD105 (APC-CD105)、CD146 (PE-CD146)、CD271 (PE-CD271)、STRO-1 (FITC-STRO1) (いずれもBD Biosciences, San Jose, CA, USA)で20分間反応させた。その後、反応後の細胞をPBSで洗浄し、フローサイトメーターにて陽性細胞の割合を計測した。

その結果、表1に示されるように、40 $\mu$ m未満の細胞分画から得られた脱分化脂肪細胞は40 $\mu$ m以上100 $\mu$ m未満の細胞分画から得られた脱分化脂肪細胞に対して間葉系幹細胞のマーカであるCD146陽性細胞の割合が約1.5~2倍多いことが確認できた。

【0030】

【表1】

(%)

	Size	CD13	CD44	CD45	CD73	CD90	CD105	CD146	CD271	STRO-1
1症 例目	40 $\mu$ m未満	98.9	95.1	0.24	93.9	82.0	98.4	15.5	0	0.05
	40 $\mu$ m以上	99.9	92.0	0.02	95.3	88.5	98.9	8.56	0.03	0.01
	100 $\mu$ m未満									
2症 例目	40 $\mu$ m未満	98.8	99.8	0.10	99.4	92.7	97.7	36.5	0.01	0.02
	40 $\mu$ m以上	98.5	99.0	0	97.5	93.8	96.2	27.0	0.01	0
	100 $\mu$ m未満									

【0031】

従って、これら1.~5.の結果より、40 $\mu$ m未満の成熟脂肪細胞を得ることにより、効率的に脱分化脂肪細胞が製造できることが示された。また、脂肪組織より40 $\mu$ m未満の成熟脂肪細胞を得るには、コラゲナーゼ濃度を0.02w/v%として採取することが特に好ましいことも確認できた。

【0032】

〔実施例3〕

間葉系細胞の製造方法

実施例2において得た40 $\mu$ m未満の細胞分画から得られた脱分化脂肪細胞と40 $\mu$ m以上100 $\mu$ m未満の細胞分画から得られた脱分化脂肪細胞を継代培養し、1継代目の細胞を $1 \times 10^4$ 個ずつ12ウェルプレートに播種した、コンフルエントになったら、骨芽細胞誘導培地にて21日間誘導培養を行った。

分化誘導培地 (DIFFERENTIATION-INDUCING CULTURE MEDIUM (図面においてIMまたはOsteogenic mediumと示す場合がある))の組成は増殖培地 (Growth medium (図面においてGMと示す場合がある)) [DMEM、10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; 13B103, Sigma-Aldrich), 1% antibiotics] に100nM dexamethasone (Sigma-Aldrich), 10mM  $\beta$ -glycerophosphate (Sigma-Aldrich), 50mM L-ascorbic acid-2-phosphate (Sigma-Aldrich) を添加したものである。

この骨芽細胞誘導の評価は、アルカリフォスファターゼ活性、アリザリンレッドS染色、カルシウム定量試験にて行った。

【0033】

1. アルカリフォスファターゼ活性

誘導開始0、3、5、7、10、14日目の細胞を回収し、Pierce BCA protein Assay Reagent Kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)を用いてタンパク量を測定およびアルカリフォスファターゼ活性の測定を行った。

その結果、図7に示すように、40 $\mu$ m未満の細胞分画から得た脱分化脂肪細胞(図7、under 40 $\mu$ m IM)の方が、40 $\mu$ m以上100 $\mu$ m未満の細胞分画から得た脱分化脂肪細胞(図7、40-100 $\mu$ m IM)に比較して、誘導開始3、5、7日目に有意に高いアルカリフォスファターゼ活性を示した。

10

【0034】

2. アリザリンレッドS染色

誘導開始0、7、14、21日目の細胞を10%中性ホルマリン緩衝液で固定し、アリザリンレッドS染色液(Wako)を用いて10分染色を行った。

その結果、図8に示すように、40 $\mu$ m未満の細胞分画から得た脱分化脂肪細胞(図8、under 40 $\mu$ m Osteogenic medium)は40 $\mu$ m以上100 $\mu$ m未満の細胞分画から得た脱分化脂肪細胞(図8、40-100 $\mu$ m Osteogenic medium)に比較して、誘導開始7日目に有意に強いアリザリンレッドS染色を示した。

20

【0035】

3. カルシウム定量試験

誘導開始0、7、14、21日目のカルシウム沈着量をCa-Eテストキットを用いて測定した。

その結果、図9に示すように、40 $\mu$ m未満の成熟脂肪細胞から得た脱分化脂肪細胞(図9、under 40 $\mu$ m IM)は、40 $\mu$ m以上100 $\mu$ m未満の成熟脂肪細胞から得た脱分化脂肪細胞(図9、40-100 $\mu$ m IM)に比較して、誘導開始7および21日目に有意に多いカルシウム沈着量を示した。なお、増殖培地にて培養した脱分化脂肪細胞(図9、under 40 $\mu$ m GMおよび40-100 $\mu$ m GM)は、いずれも誘導開始21日までカルシウムの沈着は見られなかった。

30

【0036】

従って、これら1.~3.の結果より、40 $\mu$ m未満の細胞分画から得られた脱分化脂肪細胞も、40 $\mu$ m以上100 $\mu$ m未満の細胞分画から得られた脱分化脂肪細胞もいずれも間葉系細胞に分化誘導できることが確認できた。そして、40 $\mu$ m未満の細胞分画から得られた脱分化脂肪細胞の方が、間葉系細胞の誘導に有用であることが確認できた。

【産業上の利用可能性】

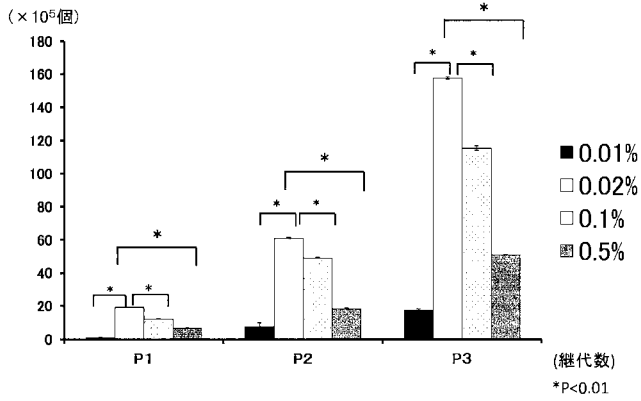
【0037】

本発明の提供により、単離する成熟脂肪細胞に損傷を与えることなく、効率的に成熟脂肪細胞を採取することが可能となる。本発明の提供により、大量に脱分化脂肪細胞を製造できるため、再生医療の細胞源として幅広く使用することも可能となる。

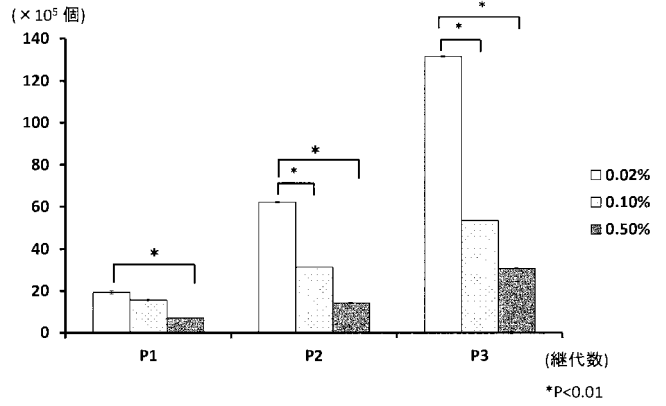
40



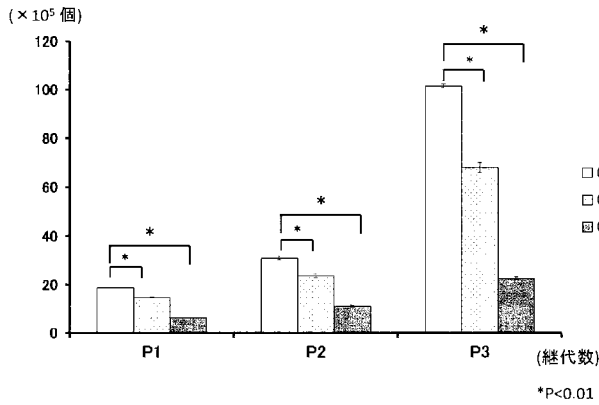
【 図 1 】



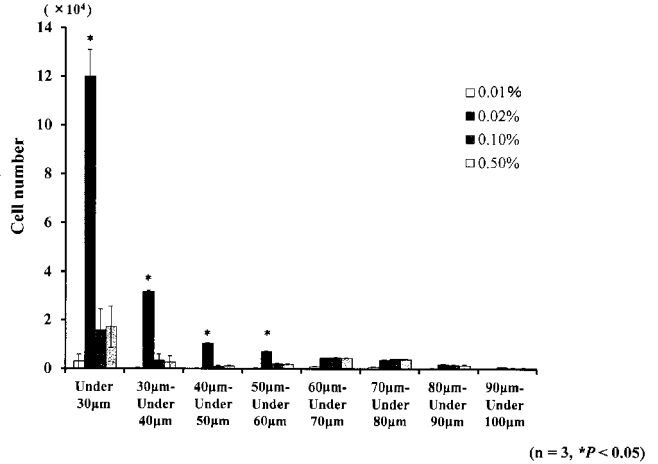
【 図 3 】



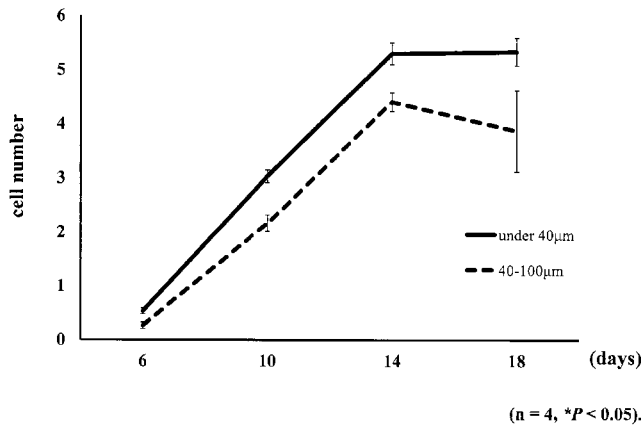
【 図 2 】



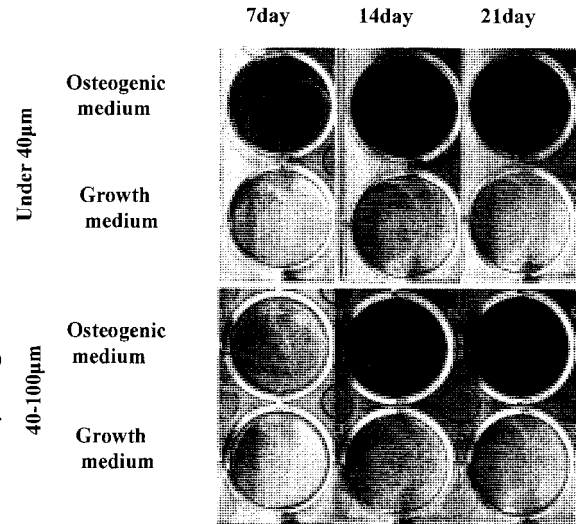
【 図 4 】



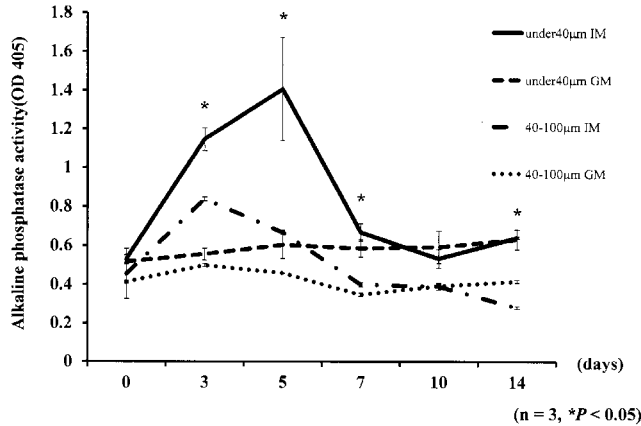
【 図 6 】



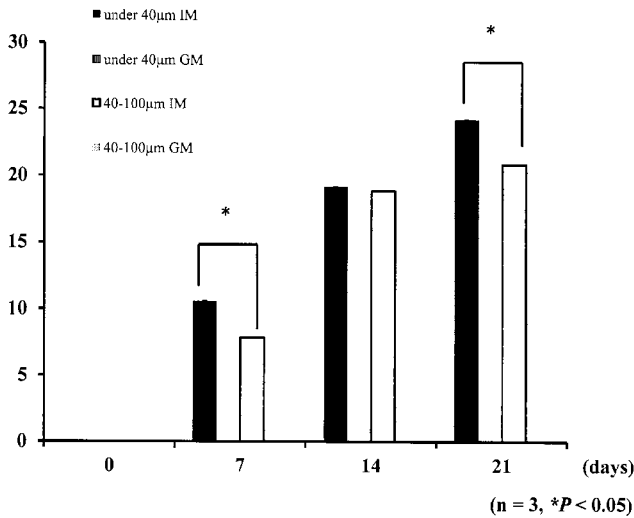
【 図 8 】



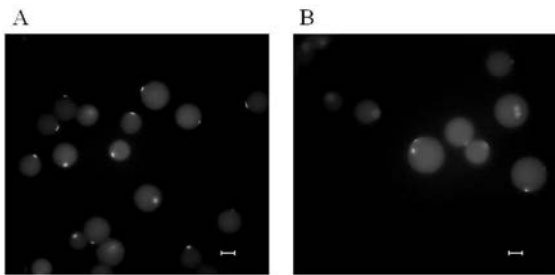
【 図 7 】



【 図 9 】



【 図 5 】



スケールバー:40µm

【 手続補正書 】

【 提出日 】平成28年1月27日(2016.1.27)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】特許請求の範囲

【 補正対象項目名 】全文

【 補正方法 】変更

【 補正の内容 】

【 特許請求の範囲 】

【 請求項 1 】

次の A の工程及び B の工程を含む、脱分化脂肪細胞の製造方法。

A . 脂肪組織を 0 . 0 2 w / v % のコラゲナーゼで処理することにより、成熟脂肪細胞を単離する工程

B . 上記 A の工程により単離された成熟脂肪細胞より、脱分化脂肪細胞を取得する工程

【 請求項 2 】

( 削除 )

【 請求項 3 】

( 削除 )

【 請求項 4 】

( 削除 )

【 請求項 5 】

次の A、B および C の工程を含む、間葉系細胞の製造方法。

A . 脂肪組織を 0 . 0 2 w / v % のコラゲナーゼで処理することにより、成熟脂肪細胞を単離する工程

B . 上記 A の工程により単離された成熟脂肪細胞より、脱分化脂肪細胞を取得する工程

C . 上記 B の工程によって製造された脱分化脂肪細胞を分化誘導する工程

## 【請求項6】

間葉系細胞が、骨芽細胞、筋芽細胞、心筋細胞、内皮細胞、軟骨細胞または脂肪細胞から選ばれるいずれかである請求項5に記載の方法。

## 【請求項7】

次のAの工程を含む、脱分化脂肪細胞の製造方法。

A．脂肪組織を0.02w/v%のコラゲナーゼで処理することにより、40μm未満の成熟脂肪細胞を単離する工程

## 【請求項8】

さらに次のBの工程を含む、請求項7に記載の脱分化脂肪細胞の製造方法。

B．上記Aの工程により単離された成熟脂肪細胞より、脱分化脂肪細胞を取得する工程

## 【請求項9】

次のA、BおよびCの工程を含む、間葉系細胞の製造方法。

A．脂肪組織を0.02w/v%のコラゲナーゼで処理することにより、40μm未満の成熟脂肪細胞を単離する工程

B．上記Aの工程により単離された成熟脂肪細胞より、脱分化脂肪細胞を取得する工程

C．上記Bの工程によって製造された脱分化脂肪細胞を分化誘導する工程

## 【請求項10】

間葉系細胞が、骨芽細胞、筋芽細胞、心筋細胞、内皮細胞、軟骨細胞または脂肪細胞から選ばれるいずれかである請求項9に記載の方法。

## 【手続補正書】

【提出日】平成28年4月6日(2016.4.6)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

次のAの工程及びBの工程を含む、脱分化脂肪細胞の製造方法。

A．脂肪組織を0.02~0.05w/v%のコラゲナーゼで処理することにより、成熟脂肪細胞を単離する工程

B．上記Aの工程により単離された成熟脂肪細胞より、脱分化脂肪細胞を取得する工程

## 【請求項2】

次のA、BおよびCの工程を含む、間葉系細胞の製造方法。

A．脂肪組織を0.02~0.05w/v%のコラゲナーゼで処理することにより、成熟脂肪細胞を単離する工程

B．上記Aの工程により単離された成熟脂肪細胞より、脱分化脂肪細胞を取得する工程

C．上記Bの工程によって製造された脱分化脂肪細胞を分化誘導する工程

## 【請求項3】

間葉系細胞が、骨芽細胞、筋芽細胞、心筋細胞、内皮細胞、軟骨細胞または脂肪細胞から選ばれるいずれかである請求項2に記載の方法。

## 【請求項4】

次のAの工程を含む、脱分化脂肪細胞の製造方法。

A．脂肪組織を0.02~0.05w/v%のコラゲナーゼで処理することにより、40μm未満の成熟脂肪細胞を単離する工程

## 【請求項5】

さらに次のBの工程を含む、請求項4に記載の脱分化脂肪細胞の製造方法。

B．上記Aの工程により単離された成熟脂肪細胞より、脱分化脂肪細胞を取得する工程

## 【請求項6】

次のA、BおよびCの工程を含む、間葉系細胞の製造方法。

A．脂肪組織を0.02～0.05 w/v %のコラゲナーゼで処理することにより、40 μm未満の成熟脂肪細胞を単離する工程

B．上記Aの工程により単離された成熟脂肪細胞より、脱分化脂肪細胞を取得する工程

C．上記Bの工程によって製造された脱分化脂肪細胞を分化誘導する工程

【請求項7】

間葉系細胞が、骨芽細胞、筋芽細胞、心筋細胞、内皮細胞、軟骨細胞または脂肪細胞から選ばれるいずれかである請求項6に記載の方法。

【手続補正書】

【提出日】平成28年6月21日(2016.6.21)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

次のAの工程及びBの工程を含む、脱分化脂肪細胞の製造方法。

A．脂肪組織を0.02～0.05 w/v %のコラゲナーゼで処理することにより、成熟脂肪細胞を単離する工程

B．上記Aの工程により単離された成熟脂肪細胞より、脱分化脂肪細胞を取得する工程

【請求項2】

次のA、BおよびCの工程を含む、間葉系細胞の製造方法。

A．脂肪組織を0.02～0.05 w/v %のコラゲナーゼで処理することにより、成熟脂肪細胞を単離する工程

B．上記Aの工程により単離された成熟脂肪細胞より、脱分化脂肪細胞を取得する工程

C．上記Bの工程によって製造された脱分化脂肪細胞を分化誘導する工程

【請求項3】

間葉系細胞が、骨芽細胞、筋芽細胞、心筋細胞、内皮細胞、軟骨細胞または脂肪細胞から選ばれるいずれかである請求項2に記載の方法。

【請求項4】

次のAの工程及びBの工程を含む、脱分化脂肪細胞の製造方法。

A．脂肪組織を0.02～0.05 w/v %のコラゲナーゼで処理することにより、40 μm未満の成熟脂肪細胞を単離する工程

B．上記Aの工程により単離された成熟脂肪細胞より、脱分化脂肪細胞を取得する工程

【請求項5】

次のA、BおよびCの工程を含む、間葉系細胞の製造方法。

A．脂肪組織を0.02～0.05 w/v %のコラゲナーゼで処理することにより、40 μm未満の成熟脂肪細胞を単離する工程

B．上記Aの工程により単離された成熟脂肪細胞より、脱分化脂肪細胞を取得する工程

C．上記Bの工程によって製造された脱分化脂肪細胞を分化誘導する工程

【請求項6】

間葉系細胞が、骨芽細胞、筋芽細胞、心筋細胞、内皮細胞、軟骨細胞または脂肪細胞から選ばれるいずれかである請求項5に記載の方法。

## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/JP2015/068658
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N5/077(2010.01)i, C12N5/0775(2010.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/077, C12N5/0775  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 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Ken YAGI et al., "Seijuku Shibo Saibo Yurai no Zenku Shibo Saibokabu DFAT-D1 no Juritsu", Journal of Japan Society for the Study of Obesity, 2005, vol.11, no.3, pages 92 to 94	5,6 1-6
Y	JP 2010-124814 A (Olympus Corp.), 10 June 2010 (10.06.2010), paragraphs [0003], [0007] (Family: none)	1-6
Y	JP 2013-017434 A (National University Corporation Kanazawa University), 31 January 2013 (31.01.2013), paragraph [0023] (Family: none)	1-6
<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 17 July 2015 (17.07.15)		Date of mailing of the international search report 28 July 2015 (28.07.15)
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/JP2015/068658

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2000-157260 A (Toyobo Co., Ltd.), 13 June 2000 (13.06.2000), paragraph [0011] (Family: none)	1-6
Y	JP 2013-223504 A (Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc.), 31 October 2013 (31.10.2013), example 5 & US 2013/0260461 A1 & WO 2012/063870 A1 & EP 2639296 A1 & CN 103298926 A & KR 10-2013-0129382 A	1-6
Y	JP 2014-509517 A (Inserm (Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale)), 21 April 2014 (21.04.2014), paragraph [0078] & US 2013/0336937 A1 & WO 2012/126824 A1 & EP 2686435 A1	1-6
Y	JP 2011-116715 A (Josai University Corp.), 16 June 2011 (16.06.2011), paragraph [0040] (Family: none)	1-6
Y	WO 2008/153179 A1 (Akifumi MATSUYAMA), 18 December 2008 (18.12.2008), example 1 & US 2010/0151574 A1 & EP 2166084 A1	1-6
Y	WO 2008/150001 A1 (Biomaster, Inc.), 11 December 2008 (11.12.2008), example 5 & JP 5388297 B	1-6
A	JP 2014-511827 A (CELL IDEAS PTY LTD.), 19 May 2014 (19.05.2014), examples 5, 9 & US 2014/0087001 A1 & WO 2012/122604 A1 & EP 2685993 A1 & CN 103596577 A	1-6
P,X	Niina TSURUMACHI et al., "Hito Hoho Shibotai kara Datsubunka Shibo Saibo o Kakutoku suru Koso Shori Joken no Kento", Regenerative Medicine, 2015.02, vol.14, Suppl 2015, page 219, O-23-5	1-6

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2015/068658	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/077(2010.01)i, C12N5/0775(2010.01)i			
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/077, C12N5/0775			
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 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015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、調査に使用した用語) CPlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)			
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	八木研他, 成熟脂肪細胞由来の前駆脂肪細胞株 DFAT-D1 の樹立, 肥満研究, 2005, Vol. 11, No. 3, p. 92-94	5, 6 1-6	
Y	JP 2010-124814 A (オリンパス株式会社) 2010.06.10, [0003] [0007] (ファミリーなし)	1-6	
Y	JP 2013-017434 A (国立大学法人金沢大学) 2013.01.31, [0023] (ファミリーなし)	1-6	
<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		の日の後に公表された文献	
「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		「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	
「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		「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	
「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)		「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	
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献	
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
国際調査を完了した日 17.07.2015		国際調査報告の発送日 28.07.2015	
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) 原 大樹	4 N 5 2 7 8
		電話番号 03-3581-1101 内線 3488	

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2015/068658
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	JP 2000-157260 A (東洋紡績株式会社) 2000.06.13, [0011] (ファミリーなし)	1-6
Y	JP 2013-223504 A (株式会社大塚製薬工場) 2013.10.31, [実施例 5] & US 2013/0260461 A1 & WO 2012/063870 A1 & EP 2639296 A1 & CN 103298926 A & KR 10-2013-0129382 A	1-6
Y	JP 2014-509517 A (アンセルム (アンスチチュ ナショナル ドウ ラ サンテ エ ドウ ラ ルシエルシュ メディカル) ) 2014.04.21, [0078] & US 2013/0336937 A1 & WO 2012/126824 A1 & EP 2686435 A1	1-6
Y	JP 2011-116715 A (学校法人城西大学) 2011.06.16, [0040] (ファミリーなし)	1-6
Y	WO 2008/153179 A1 (松山晃文) 2008.12.18, [実施例 1] & US 2010/0151574 A1 & EP 2166084 A1	1-6
Y	WO 2008/150001 A1 (株式会社バイオマスター) 2008.12.11, [実施例 5] & JP 5388297 B	1-6
A	JP 2014-511827 A (セル・アイディアズ・ピーティールワイ・リミテ ッド) 2014.05.19, [実施例 5] [実施例 9] & US 2014/0087001 A1 & WO 2012/122604 A1 & EP 2685993 A1 & CN 103596577 A	1-6
PX	鶴町仁奈他, ヒト類脂肪体から脱分化脂肪細胞を獲得する酵素処理 条件の検討, 再生医療, 2015.02, Vol.14, Suppl 2015, p.219, 0-23-5	1-6



## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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, KM, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 外木 守雄

東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内

(72)発明者 加野 浩一郎

東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内

(72)発明者 松本 太郎

東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内

Fターム(参考) 4B065 AA90X BD44

(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。