

(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15日(15.10.2009)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2009/125877 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 5/06 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)  
A61L 27/00 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/057809
- (22) 国際出願日: 2009年4月13日(13.04.2009)
- (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 2008-103867 2008年4月11日(11.04.2008) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾(KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目15番45号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 丸山哲夫 (MARUYAMA, Tetsuo) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地慶應義塾大学 医学部内 Tokyo (JP). 小野政徳 (ONO, Masanori) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町35番地慶應義塾大学 医学部内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 平木祐輔, 外 (HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1050001 東京都港区虎ノ門4丁目3番20号 神谷町 MTビル19階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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))



WO 2009/125877 A1

(54) Title: METHOD FOR ISOLATION OF SMOOTH MUSCLE STEM CELL

(54) 発明の名称: 平滑筋幹細胞の単離方法

(57) Abstract: Disclosed is a method for isolating a smooth muscle stem cell derived from a mammalian smooth muscle. The method comprises the steps of: contacting a mammalian smooth muscle cell with an anti-CD45 antibody, an anti-CD34 antibody and an anti-CD49f antibody each of which is labeled with a fluorescent dye; and isolating a cell which is not bound to the anti-CD45 antibody but is bound to the anti-CD34 antibody and the anti-CD49f antibody.

(57) 要約: 本発明は、哺乳動物平滑筋由来の平滑筋幹細胞を単離する方法であって、哺乳動物平滑筋細胞を蛍光色素で標識した抗 CD45 抗体、抗 CD34 抗体および抗 CD49f 抗体と接触させ、抗 CD45 抗体と結合せず、抗 CD34 抗体および抗 CD49f 抗体と結合する細胞を単離することを含む、平滑筋幹細胞を単離する方法である。

## 明 細 書

## 平滑筋幹細胞の単離方法

## 技術分野

本発明は、特定の表面マーカーを有する平滑筋由来の組織幹細胞、その新しい単離方法および培養方法ならびにその利用に関する。

## 背景技術

様々な器官・組織に存在する固有の生体（組織）幹細胞が、それぞれの器官・組織の維持と再生を担っていることが、近年明らかになってきた。現在までに種々の組織由来の幹細胞について報告され、また幹細胞が単離されている。

現在までに単離された幹細胞として、例えば、骨格筋幹細胞、心筋幹細胞、肝臓幹細胞、神経幹細胞、膵臓幹細胞、表皮幹細胞、脂肪組織幹細胞等が挙げられる。その単離方法として、side population (SP) 法が用いられることが多く、本発明者は以前に SP 法を用いてヒト子宮の平滑筋幹細胞を単離した(特許文献 1 を参照)。

再生医療は、疾患や外傷などで損傷し、または喪失した人体の細胞や組織を修復し、その機能を回復させる医療として現在大きな注目を受けている。上記の組織幹細胞を単離同定し、複製増殖させることが可能になれば、再生医療が可能になると考えられている。

特許文献 1 特開 2007-202435 号公報

## 発明の開示

本発明は、平滑筋幹細胞、特に子宮筋幹細胞の提供を目的とし、さらにそれらの幹細胞の利用の提供を目的とする。

平滑筋の 1 種である子宮筋は年の単位で、妊娠による著明な細胞サイズの増大 (hypertrophy) と細胞数の増加 (hyperplasia) を起こすことが可能であり、その劇的な変化を女性の一生において 20 回以上も反復し得る。妊娠・分娩時には著明な

増大と細胞数の増加を示し、産褥期には急激にアポトーシスを起こすことが知られている非常にユニークな組織である。

本発明者は、妊娠から産褥期における細胞数の増加およびアポトーシスという一連のイベントに着目し、子宮筋の主な構成組織である子宮平滑筋において、組織幹細胞が存在している可能性を考えた。本発明者は以前に SP 法でヒト子宮の平滑筋幹細胞を単離する方法を発明した（特開 2007-202435 号公報）。しかし、SP 法では、DNA 色素との反応後に UV レーザーを照射し選別する過程を経るため、細胞のダメージも含め、単離した幹細胞の安全性・無菌性が担保されない。

そこで、本発明者は、細胞のダメージが少なく、且つ単離細胞の安全性や無菌性が担保できる方法として、表面マーカーを用いた単離を試みた。すなわち、正常子宮筋層を採取し、酵素処理により分散細胞を得て、フローサイトメトリーにより Lin (CD31, CD45, Glycophorin A) 陰性細胞を選別した後、CD34 陽性 /CD49f 陽性細胞 (Double Positive 細胞; DP/Lin-) とそれ以外の細胞 (nonDP) に分別した。最終的に該分散細胞から CD31、CD45 および Glycophorin A が陰性であり、CD34 および CD49f が陽性であることを特徴とする Double Positive 細胞; DP/Lin- を子宮筋 DP/Lin- (DP/Lin-) として、FACS により単離した。

一方、本発明者は、CD34 および CD49f のみの発現を指標として、CD34 および CD49f が陽性であることを特徴とする Double Positive 細胞; DP を子宮筋 DP として単離できることを見出した。この際あらかじめ、CD45 が陰性の細胞を選択し、その中から CD34 および CD49f が陽性であることを特徴とする Double Positive 細胞; DP を子宮筋 DP として単離できることも見出した。

次いで、DP/Lin-、DP および DP/Lin- 以外の子宮筋細胞の発現遺伝子を解析し、幹細胞の特徴を有していることを確認した。さらに、DP/Lin- および DP が *in vitro* で骨・脂肪・軟骨細胞へ分化誘導され得ること、DP/Lin- および DP を免疫不全マウスに移植した場合に、子宮筋様組織を再構築し得ることを見出し、単離した細胞が子宮平滑筋幹細胞であることを確認した。

すなわち、本発明は以下の通りである。

[1] 哺乳動物平滑筋由来の平滑筋幹細胞を単離する方法であって、哺乳動物平滑筋細胞を蛍光色素で標識した抗 CD31 抗体、抗 CD45 抗体、抗 Glycophorin A 抗

体、抗 CD34 抗体および抗 CD49f 抗体と接触させ、抗 CD31 抗体、抗 CD45 抗体および抗 Glycophorin A 抗体と結合せず、抗 CD34 抗体および抗 CD49f 抗体と結合する細胞を単離することを含む、平滑筋幹細胞を単離する方法。

[2] 哺乳動物平滑筋由来の平滑筋幹細胞を単離する方法であって、哺乳動物平滑筋細胞を蛍光色素で標識した抗 CD34 抗体および抗 CD49f 抗体と接触させ、抗 CD34 抗体および抗 CD49f 抗体と結合する細胞を単離することを含む、平滑筋幹細胞を単離する方法。

[3] 哺乳動物平滑筋由来の平滑筋幹細胞を単離する方法であって、哺乳動物平滑筋細胞を蛍光色素で標識した抗 CD45 抗体、抗 CD34 抗体および抗 CD49f 抗体と接触させ、抗 CD45 抗体と結合せず、抗 CD34 抗体および抗 CD49f 抗体と結合する細胞を単離することを含む、[2]の平滑筋幹細胞を単離する方法。

[4] フローサイトメトリーを用いて、細胞をソーティングする、[1]~[3]のいずれかの平滑筋幹細胞を単離する方法。

[5] 哺乳動物平滑筋細胞をフローサイトメトリーにより Lin (CD31, CD45, Glycophorin A) 陽性細胞 (Lin+) と Lin 陰性細胞 (Lin-) に選別し Lin 陰性細胞を採取し、さらに CD34 陽性かつ CD49f 陽性細胞を採取することを含む、[1]の平滑筋幹細胞を単離する方法。

[6] 哺乳動物平滑筋細胞からフローサイトメトリーにより CD34 陽性かつ CD49f 陽性細胞を採取することを含む、[2]の平滑筋幹細胞を単離する方法。

[7] 哺乳動物平滑筋細胞からフローサイトメトリーにより CD45 陰性細胞を採取し、さらに CD34 陽性かつ CD49f 陽性細胞を採取することを含む、[3]の平滑筋幹細胞を単離する方法。

[8] 平滑筋が子宮筋である[1]~[7]のいずれかの平滑筋幹細胞を単離する方法。

[9] 哺乳動物がヒトである[1]~[8]のいずれかの平滑筋幹細胞を単離する方法。

[10] [1]~[9]のいずれかの方法により単離された CD31、CD45 および Glycophorin A が陰性であり、CD34 および CD49f が陽性である平滑筋幹細胞。

[11] [1]~[9]のいずれかの方法により単離された、CD34 および CD49f が陽

性である平滑筋幹細胞。

[1 2] [1]～[9]のいずれかの方法により単離された CD45 が陰性であり、CD34 および CD49f が陽性である平滑筋幹細胞。

[1 3] さらに、ABCG2 が陽性である[1 0]～[1 2]のいずれかの平滑筋幹細胞。

[1 4] 平滑筋に移植することにより平滑筋に分化する能力を有する[1 0]～[1 3]の平滑筋幹細胞。

[1 5] 子宮筋に移植することにより子宮筋に分化する能力を有する子宮筋由来の[1 4]の平滑筋幹細胞。

[1 6] [1 0]～[1 5]のいずれかの平滑筋幹細胞を含む平滑筋組織再生用組成物。

本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願 2008-103867 号の明細書および／または図面に記載される内容を包含する。

#### 図面の簡単な説明

図 1-1 は、蛍光標識された抗体による染色を施した子宮筋分散細胞のフローサイトメトリー解析の結果を示した図である。

図 1-2 は、DP/Lin<sup>-</sup>、nonDP/Lin<sup>-</sup>および Lin<sup>+</sup>における ABCG2 の RT-PCR による発現解析の結果を示す図である。図中、Tissue とは、機械的・酵素的処理により分散した時点での子宮筋細胞のことをいい (DP/Lin<sup>-</sup>、nonDP/Lin<sup>-</sup>および Lin<sup>+</sup>)、NC は蒸留水をテンプレートにしたもので陰性コントロールを示す。

図 2 は、通常酸素濃度 20% または低酸素濃度 2% 下で培養した DP/Lin<sup>-</sup> およびそれ以外の分画の増殖に関して細胞増殖活性を指標に表したグラフである。

図 3 は、骨細胞誘導培地下で培養した DP/Lin<sup>-</sup> (図 3 A) および nonDP/Lin<sup>-</sup> (図 3 B) のアルカリホスファターゼ染色顕微鏡像を示す写真である。

図 4 は、脂肪細胞誘導培地下で培養した DP/Lin<sup>-</sup> (図 4 A) および nonDP/Lin<sup>-</sup> (図 4 B) のオイルレッド O 染色顕微鏡像を示す写真である。

図 5 は、軟骨細胞誘導培地下で培養した DP/Lin<sup>-</sup> のトルイジンブルー染色顕微鏡像を示す写真である。

図 6 は、DP/Lin<sup>-</sup> を移植した NOG 妊娠マウス子宮の蛍光免疫染色像を示す写真で

ある。

図7は、nonDP/Lin<sup>-</sup>を移植したエストロゲン (E<sub>2</sub>) 徐放ペレット移植 NOG マウス子宮の蛍光免疫染色像を示す写真である。

図8は、DP/Lin<sup>-</sup>、DP/Lin<sup>-</sup>および Lin<sup>+</sup>を移植した NOG マウス子宮のエストロゲン (E<sub>2</sub>) 徐放ペレット移植、妊娠によるヒト細胞の割合を表現したグラフである。

図9は、蛍光標識された抗体による染色を施した、Lin マーカーを用いた前選別をしない子宮筋分散細胞のフローサイトメトリー解析の結果を示した図である。

図10は、DP (Double positive; CD49f(+)CD34(+))分画中の CD31 の発現を指標にした細胞亜分画の細胞分布を示す図である。

図11は、DP 分画、CD49f(-)CD34(+)分画および CD34(-)分画における分化マーカー遺伝子の発現解析の結果を示す図である。

図12は、DP 分画の細胞のコロニー形成の状態を示す写真である。

図13は、DP 分画、CD49f(-)CD34(+)分画、CD34(-)分画、DP 分画中の CD31(+) 亜分画 (DP 31+) および DP 分画中の CD31(-) 亜分画 (DP 31-) のコロニー形成能を示す図である。

図14は、DP 分画を重度免疫不全マウス子宮内へ移植した結果を示す写真である。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の幹細胞は、平滑筋から単離される平滑筋由来組織幹細胞である。本発明の幹細胞が由来する平滑筋として、子宮平滑筋、内臓平滑筋、血管平滑筋が挙げられ、好ましくは子宮平滑筋である。これらの組織片を採取し、細胞を分散させ、分散させた細胞から幹細胞を単離することができ、例えば、子宮筋腫片を用いることができる。平滑筋を採取する動物種は限定されず、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル、ヒト等の哺乳動物を用いることができる。

本発明において、「幹細胞」とは、自己複製能を有し、多能性を有する細胞をいう。幹細胞は通常、組織が傷害を受けたときにその組織を再生することができる。

組織幹細胞は、胚性幹細胞とは異なり、分化の方向が限定されている細胞であり、組織中の特定の位置に存在し、未分化な細胞内構造をしている。従って、組織幹細胞は多能性のレベルが低い。組織幹細胞は、核／細胞質比が高く、細胞内小器官が乏しい。組織幹細胞は、概して、多分化能を有し、細胞周期が遅く、個体の一生以上に増殖能を維持する。本発明において、幹細胞というときは、幹細胞を少なくとも一定量含む細胞集団をいい、例えば、幹細胞を 90%以上、好ましくは 95%以上含む細胞集団が含まれる。

本発明の平滑筋幹細胞は、Lin<sup>-</sup>であり、CD34 陽性かつ CD49f 陽性の細胞である。Lin<sup>-</sup>細胞とは、分化抗原が陰性であり幹細胞から特定系統の細胞への分化に対応して出現する表面抗原を有していない細胞、すなわちこれらの表面抗原を細胞表面に発現していない細胞をいう。本発明においては、CD31、CD45 および Glycophorin A (GPA) が陰性である細胞をいう。CD31 はほとんど全ての単球、血小板および顆粒球に発現している抗原であり、CD45 は末梢血のリンパ球、単球、顆粒球、好酸球、好塩基球を含むすべての白血球に発現している抗原であり、GPA は赤血球と関連を有する抗原である。CD34 は未分化の幹細胞に発現する細胞であり、CD49f は血小板や巨核球に発現する細胞である。本発明において、CD34 陽性かつ CD49f 陽性の細胞をダブルポジティブ (DP) 細胞と呼び、Lin<sup>-</sup>であり、CD34 陽性かつ CD49f 陽性の細胞を DP/Lin<sup>-</sup>細胞と呼ぶ。本発明の平滑筋幹細胞は、さらに幹細胞マーカーである ABCG2 (ATP-binding cassette transporter G2) を発現している。

さらに、本発明の平滑筋幹細胞は、CD34 陽性かつ CD49f 陽性の細胞である。該細胞においては、CD45、CD31 および Glycophorin A は陰性であっても、陽性であってもよい。本発明においては、該細胞をもダブルポジティブ (DP) 細胞と呼ぶ。

本発明の幹細胞は、平滑筋細胞の細胞表面の抗原特性に基づいて単離することができる。すなわち、平滑筋細胞から Lin<sup>-</sup>であり、CD34 陽性かつ CD49f 陽性である細胞を単離すればよい。

一方、本発明の幹細胞は、平滑筋細胞から、CD34 および CD49f のみの発現を指標として、CD34 陽性かつ CD49f 陽性である細胞を単離してもよい。さらに、この際、あらかじめ CD45 陰性細胞を選択し、その中から CD34 陽性かつ CD49f 陽性で

ある細胞を単離してもよい。

最初に平滑筋から細胞を分散させる。細胞の分散は、組織片を細切し、コラゲナーゼ等の酵素で処理することにより行うことができる。分散した細胞は、単一細胞の状態まで分散させることが望ましく、例えば、セルストレーナ等を通し、さらに Ficoll-Paque（登録商標）等の比重液を用いて密度勾配遠心分離し、さらにトリプシン処理等を行うことにより単一細胞として分散させることができる。

次いで、それぞれ異なる蛍光色素で標識した CD31、CD45、Glycophorin A、CD34 および CD49f あるいはさらに ABCG2 に対する抗体を、分散した平滑筋細胞と接触させ表面抗原を有する平滑筋細胞を染色し、フローサイトメトリーや FACS を用いて、DP/Lin<sup>-</sup>細胞をソーティングすることにより本発明の平滑筋幹細胞を単離することができる。この際、平滑筋細胞から直接フローサイトメトリーで単離してもよいし、フローサイトメトリーでソーティングする前に CD31、CD45 および Glycophorin A からなる分化抗原のうちの 1 種類以上の抗原に対する抗体を結合させた磁気ビーズを用いて、分化抗原を有する細胞を除去し、残った細胞から FACS を用いて本発明の細胞を単離してもよい。

また、それぞれ異なる蛍光色素で標識した CD34 および CD49f、あるいは CD45、CD34 および CD49f に対する抗体を、分散した平滑筋細胞と接触させ表面抗原を有する平滑筋細胞を染色し、フローサイトメトリーや FACS を用いて、DP 細胞をソーティングすることにより本発明の平滑筋幹細胞を単離することができる。この際、平滑筋細胞から直接フローサイトメトリーで CD34 および CD49f 陽性細胞を単離してもよいし、フローサイトメトリーでソーティングする前に CD45 に対する抗体を結合させた磁気ビーズを用いて、CD45 を有する細胞を除去し、残った細胞から FACS を用いて本発明の細胞を単離してもよい。

標識に用いる蛍光色素としては、Cy（商標）3、Cy5、Texas Red（登録商標）、APC(allophycocyanin)、PE(phycoerythrin)、PE-Cy5、FITC(fluorescein isothiocyanate)、PerCP 等が挙げられる。フローサイトメトリー、FACS としては例えば FACS vantage(ベクトン・ディッキンソン社製)、FACS Calibur(ベクトン・ディッキンソン社製)等を用いることができる。

単離した本発明の幹細胞は、培養により増殖させることができる。この際、用



いる培地は限定されず、公知の培地（例えば、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培地) を用いることができる。特に、公知の幹細胞培養用培地を用いることが望ましい。例えば、間葉系幹細胞培養用培地 mesenchymal stem cell basal medium (MSCBM) (Cambrex Bio Science 社、現 Poietics 社)、mesenchymal stem cell growth medium (MSCGM) (Cambrex Bio Science 社、現 Poietics 社)、等を用いることができる。培地には、適宜ウシ胎児血清等の血清やペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質および種々の生理活性物質を添加してもよい。また、本発明の幹細胞を培養する場合、培養酸素濃度が通常の培養時の 20%より低い条件下で行う。好ましくは5%以下、さらに好ましくは、2.5%以下、特に好ましくは2%で行う。この方法で培養することにより、幹細胞を増殖させることができる。組織培養用培養皿に細胞を播種して培養すればよい。

さらに、単離した本発明の幹細胞を *in vitro* で特定の組織細胞へ分化誘導することができる。本発明の幹細胞は多能性を有するため、基本的には任意の組織細胞に分化誘導することができる。種々の組織への分化誘導培地が市販されており、これらの市販培地を用いて分化誘導することができる。例えば、骨細胞へ分化誘導する場合、プレートキット骨芽細胞分化培地 (Cambrex Bio Science 社、現 Poietics 社) を用いればよく、脂肪細胞へ分化誘導する場合、プレートキット脂肪細胞分化培地 (Cambrex Bio Science 社、現 Poietics 社) を用いればよく、軟骨細胞へ分化誘導する場合、プレートキット軟骨細胞分化培地 (Cambrex Bio Science 社) を用いて培養を行えばよい。また、本発明の平滑筋幹細胞を子宮筋組織細胞等の平滑筋組織細胞に分化誘導することもできる。この際、酸素濃度は通常の細胞培養条件、すなわち約 20%で行う。これらの組織細胞へと分化した細胞をさらに培養し、組織を構築させることができる。

幹細胞が組織細胞へ分化誘導したか否かは、各組織細胞に特有なマーカーの発現を調べることにより決定することができる。例えば、骨細胞への分化はアルカリフォスファターゼ染色陽性細胞の有無で調べることができ、脂肪細胞への分化はオイルレッド O 染色陽性細胞の有無で調べればよい。さらに軟骨細胞への分化はトルイジンブルー染色陽性軟骨ペレットの有無で調べることができる。

さらに、本発明は本発明の平滑筋幹細胞の不活化させた株細胞を包含する。該

株細胞は増殖能および多能性を併せ持ち、必要な数だけ増殖させて、利用することができる。樹立した株細胞は、平滑筋の分化、発生等の研究用ツールとして利用することが可能である。ヒトの細胞では放射線や突然変異誘発物質やウイルスで不死化細胞（ある場合はがん細胞）になるが、特に最近では、腫瘍化や染色体異常を引き起こすことなく、オリジナルの細胞特性を比較的保持させたまま不死化させる方法として、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子（hTERT）やSV40T 遺伝子などを細胞に導入することが行われている。

本発明の平滑筋幹細胞は再生医療等に用いることができる。例えば、本発明の平滑筋幹細胞を損傷した平滑筋部位にシリンジを用いた注入により移植投与することにより、幹細胞が平滑筋細胞に分化し、損傷した平滑筋を再生することができる。また、上記のように本発明の幹細胞を *in vitro* で分化誘導し、組織を構築させ、該組織を移植してもよい。これらの再生医療において、移植した細胞または組織のレシピエントによる拒絶を避けるためには、再生医療を受けようとする患者から組織片を採取し、該組織片から本発明の平滑筋幹細胞を単離し、利用することが望ましい。例えば、子宮肉腫等の疾患により、子宮の一部を切除した患者の残存している部分の子宮筋から組織片を採取し、該組織片から子宮筋幹細胞を単離し、前記患者の子宮の再生に利用することが可能である。また、上述のように、本発明の平滑筋幹細胞は他の組織へと分化させることもできる。例えば、平滑筋以外の特定の組織を損傷した患者から、子宮筋等の平滑筋から組織片を取り出し、平滑筋幹細胞を単離し、該平滑筋幹細胞を損傷した組織に分化誘導することにより、平滑筋以外の組織の再生医療に用いることが可能である。本発明は本発明の幹細胞を含む再生医療用組成物、すなわち再生医療用製剤をも包含する。

さらに、ヒト由来の本発明の幹細胞をヒト以外の動物であって免疫不全動物に移植することにより、ヒトの平滑筋組織を部分的に有するモデル動物を得ることができる。例えば、免疫不全動物の平滑筋に本発明の平滑筋幹細胞を移植することにより、本発明の幹細胞が平滑筋に分化し、動物体内に部分的にヒト平滑筋組織が構築される。動物体内にヒト平滑筋組織が構築されたことは、細胞が発現するヒト平滑筋に特有なタンパク質を測定し、形態的に平滑筋の特徴を有していることを確認すればよい。例えば、平滑筋が子宮筋の場合、vimentin 陽性すなわち

ヒト由来であり（赤色）、かつ $\alpha$ SMA陽性細胞（緑色）で形態的にも子宮平滑筋であることを確認すればよい。このようにして得られた部分的にヒト平滑筋組織を有する動物は、ヒト平滑筋組織を有するモデル動物として利用することができる。例えば、平滑筋が子宮筋の場合、子宮を収縮させ、または子宮を弛緩させる薬剤のスクリーニングに用いることができる。また、本発明の平滑筋幹細胞を癌化させて移植した場合、ヒト子宮癌等を有するモデル動物を作出することができ、治療剤のスクリーニングに用いることができる。免疫不全動物として、scidマウス、NOGマウス等の免疫不全マウスが挙げられる。

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

#### 実施例1 子宮筋 Double Positive 細胞; DP/Lin<sup>-</sup>細胞の調製

##### (1) 単一分散子宮筋細胞の調製

ヒト子宮から単離された子宮筋腫片を、ハサミで約2 mm<sup>3</sup>の小片にまで細切し、0.2% (w/v)のコラゲナーゼ（和光純薬、大阪）、0.05% (w/v)のDNaseI（GIBCO、米国カリフォルニア州）を含有するDMEM培地（1%の抗生物質-抗真菌剤 [GIBCO]、10%のウシ胎児血清[BioWest、米国フロリダ州]を含有するダルベッコ変法イーグル培地 [DMEM、Sigma-Aldrich、米国ミズーリ州]）中に、組織片1gに対して10 mlの割合で移し、37℃にて16時間振盪して酵素的に細胞分散処理を行った。続いて、400  $\mu$ m孔径のポリエチレンメッシュで濾過後、さらに40  $\mu$ m孔径セルストレーナ（BD Biosciences、米国マサチューセッツ州）に細胞を通すことにより、単一細胞の状態にまで分散させた。続いて、これら分散した細胞をFicoll-Paque PLUS（Amersham Biosciences、米国ニュージャージー州）上に重層して780 $\times$ gにて15分間の密度勾配遠心を実施し、界面層から単一細胞の分散液を回収した。これを、0.05% (w/v)トリプシン-EDTA（Sigma-Aldrich） $\cdot$ 0.05% (w/v)DNaseI溶液による酵素処理とピペッティングにより完全に分散した細胞集団にした。

##### (2) 蛍光標識抗体による細胞染色

上記の分散した単一子宮筋細胞集団を、2%胎児ウシ血清、10 mM HEPES、および1%ペニシリン並びにストレプトマイシン含有のハンクス平衡化緩衝液（カルシウムおよびマグネシウム無含有、HBSS<sup>+</sup>）に $2 \times 10^6$ の濃度で浮遊させ、蛍光標

識抗体を加えて、4°Cで30分間反応させた。続いて4°Cで遠心した後、2 mlの上記のハンクス液に浮遊させ、死細胞の選別のため Propidium Iodide (PI) で染色した。

用いた蛍光標識抗体は、PE 結合抗 CD31 抗体 (IgG1、BD Biosciences)、PE 結合抗 CD45 抗体 (IgG1、BD Biosciences)、PE 結合抗 Glycophorin A 抗体 (IgG2b、BD Biosciences)、APC 結合抗 CD34 抗体 (IgG1、BD Biosciences) および FITC 結合抗 CD49f 抗体 (IgG2a、BD Biosciences) であった。

### (3) 子宮筋 Double Positive 細胞; DP/Lin<sup>-</sup>の分離

蛍光強度に基づいてフローサイトメトリーにより細胞集団を2次元に展開した。上記の染色した分散細胞を、フローサイトメトリー (FACS Vantage SE, Becton Dickinson 社) および解析ソフトウェア (Cell-Quest, Becton Dickinson 社) を用いて解析した。

図1にその細胞分布図を示す。このように2次元展開をしながら  $1 \times 10^5$  の細胞を収集して、Lin (CD31, CD45, Glycophorin A) 陽性細胞 (Lin<sup>+</sup>) と陰性細胞 (Lin<sup>-</sup>) を選別した後 (図1-1A および B)、CD34 陽性/CD49f 陽性細胞 (Double Positive 細胞; DP/Lin<sup>-</sup>) とそれ以外の細胞 (nonDP/Lin<sup>-</sup>) に分別した (図1-1C)。最終的に Double Positive 細胞; DP/Lin<sup>-</sup> 分画を分取し、子宮筋 DP/Lin<sup>-</sup> 細胞とした。

### (4) 分化マーカー遺伝子の発現解析

上記の分離した DP/Lin<sup>-</sup>、nonDP/Lin<sup>-</sup> および Lin<sup>+</sup> からトリゾール (Invitrogen, カリフォルニア州) を用いて全 RNA を抽出し、ABCG2 のメッセンジャー RNA の発現を reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) によって解析した。図1-2がその結果である。なお、内部標準である GAPDH の発現レベルは両方で差が無かった。これは、DP/Lin<sup>-</sup> が他の分画に比べて幹細胞マーカーである ABCG2 を高発現しており分化度がより低い未熟な段階にあることを示しており、DP/Lin<sup>-</sup> は組織幹細胞の特性に合致した性質を有している。

### 実施例2 子宮筋 Double Positive 細胞; DP/Lin<sup>-</sup> 細胞の培養

通常の培養の酸素濃度である 20% ではなく、2% という低酸素濃度下においてマルチガスインキュベーター (アステック社、福岡) で培養した。

その結果、20%酸素濃度下で培養した場合は、3週間しても細胞は他の分画に比較して増殖しなかったのに対して、2%の低酸素濃度下では培養1週間の時点で、細胞コロニーが形成され、2週間の時点で、ほぼコンフルエントになるまで細胞が増殖した（図2）。

### 実施例3 子宮筋 Double Positive 細胞; DP/Lin<sup>-</sup>細胞の分化誘導アッセイ

上記の培養 DP/Lin<sup>-</sup>が、幹細胞特性のひとつである多分化能を有しているかについて検討するため、DP/Lin<sup>-</sup>を脂肪細胞、骨細胞および軟骨細胞にそれぞれ分化誘導可能な培地下で培養し、異なる細胞系譜へ分化しうるかを調べた。

骨細胞への分化誘導培地としてプレキット骨芽細胞分化培地（Cambrex Bio Science 社製、三光純薬販売、製品番号 PT-3002）を用い、脂肪細胞への分化誘導培地として、プレキット脂肪細胞分化培地（Cambrex Bio Science 社製、三光純薬販売、製品番号 PT-3004）を使用した。軟骨細胞への分化誘導培地として、プレキット軟骨細胞分化培地（Cambrex Bio Science 社製、三光純薬販売、製品番号 PT-4121）を使用した。上記培養した DP/Lin<sup>-</sup>と DP/Lin nonDP/Lin<sup>-</sup>を 96well プレートに約  $5 \times 10^3$ /well の濃度で蒔き、MSCGM 培地下でコンフルエントになるまで2%（低酸素濃度）の酸素濃度下で約2~3週間培養した。以下の分化誘導のための培養開始に際しては、酸素濃度を通常の20%に戻して分化誘導を行った。

#### 骨への分化

上記の培養 DP/Lin<sup>-</sup>の骨細胞への分化誘導を行った。上記の骨細胞誘導培地を3~4日毎に交換して、2~3週間培養した。骨細胞への分化はアルカリフォスファターゼ染色陽性細胞の出現で評価した。その結果、DP/Lin<sup>-</sup>ではアルカリフォスファターゼ染色陽性細胞（紫色）が多数出現したのに対して（図3A）、non DP/Lin<sup>-</sup>ではほとんど認められなかった（図3B）。

#### 脂肪への分化

上記の培養 DP/Lin<sup>-</sup>の脂肪細胞への分化誘導を行った。まず、上記の脂肪細胞基礎培地で3日間培養してから、脂肪細胞分化誘導培地で1~3日間培養した。これを1サイクルとして3サイクル行い、最後は、基礎培地で最大1週間培養してから、洗浄・固定して、脂肪滴を染色するためにオイルレッドO染色を行った。

その結果、DP/Lin<sup>-</sup>ではオイルレッドO染色陽性細胞（赤色）が出現したのに対して（図4A）、nonDP/Lin<sup>-</sup>では、ほとんど全く認められなかった（図4B）。

#### 軟骨への分化

上記の培養 DP/Lin<sup>-</sup>の軟骨細胞への分化誘導を行った。上記の軟骨細胞誘導培地を3~4日毎に交換して、2~3週間15 ml遠心管内において3次元培養した。軟骨細胞への分化はトルイジンブルー染色陽性軟骨ペレットの出現で評価した。その結果、DP/Lin<sup>-</sup>ではトルイジンブルー染色陽性軟骨ペレット（紫色）が出現したのに対して（図5）、non DP/Lin<sup>-</sup>では軟骨ペレットが認められなかった。

#### 実施例4 重度免疫不全マウスへの子宮筋 Double Positive 細胞; DP/Lin<sup>-</sup>細胞の移植実験

NOG (NOD/SCID/ $\gamma_c^{null}$ ) マウス (財団法人 実験動物中央研究所、川崎市) に10%ペントバルビタール (大日本薬品製) 含有リン酸緩衝液 (Sigma) を350  $\mu$ l 腹腔内注射して麻酔した。上記の分離した約  $5 \times 10^4$  個の DP/Lin<sup>-</sup>および DP/Lin<sup>-</sup>を、NOG マウスのそれぞれの子宮角に29ゲージの注射針を用いて注入し、その後約4~5週間飼育した。上記の移植をしてから4~5週間後より移植後NOGマウスを3つのグループに分けて幹細胞の生体内での動態解析を行った。まず、1つ目のグループは高エストロゲン環境にするために、エストロゲン ( $E_2$ ) 徐放ペレット (Innovative Research of America、米国フロリダ州) を2錠皮下移植した。次に、2つ目のグループには何もしなかった。最後に、3つ目のグループは雄マウスと交配させ妊娠18.5日目に解析に供した。

#### 蛍光組織染色

子宮を摘出し、Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetech、米国カリフォルニア州) に包埋して凍結し、クライオスタット (Leica Microsystems、ドイツ・ウェツラー市) を用いて6  $\mu$ m厚にて連続薄切した。得られた凍結切片については、4%パラホルムアルデヒドにて室温で20分間固定後、リン酸緩衝液で洗浄した。0.2% Triton X-100 含有リン酸緩衝液で10分間細胞膜透過処理を行った後、10%ウシ血清アルブミン溶液中に30分間浸漬してブロッキング処理を施行した。続いて、これらの処理をした切片を、子宮平滑筋マーカーである  $\alpha$ -smooth muscle

actin ( $\alpha$ SMA) に対する抗体 (clone 1A4, 200 倍希釈、DAKO Cytomatio、デンマーク) と 4°C オーバーナイトで反応させてから、Alexa Fluor 488 (緑色蛍光用) 標識二次抗体 (Molecular Probes、米国オレゴン州) (1000 倍希釈, 37°C, 1 時間) を用いて一次抗体を検出した。続いて、赤色蛍光色素である Cy3 (Sigma-Aldrich) によって直接標識された、ヒトの細胞にのみ反応する vimentin 抗体 (clone V9) と反応させて、蛍光二重染色を行った。さらに切片は核染色剤 TOTO-3 (Molecular Probes) で対比染色した。各染色後の切片を、TCS SP2 共焦点顕微鏡 (Leica Microsystems) で検鏡した。

その結果、図 6 に示すように、DP/Lin<sup>-</sup>を移植した子宮では、vimentin 陽性すなわちヒト由来であり (赤色)、かつ  $\alpha$ SMA 陽性細胞 (緑色) で形態的にも子宮平滑筋である組織 (黄色) が出現した。一方、nonDP/Lin<sup>-</sup>および Lin<sup>+</sup>を移植した子宮では、上記の DP/Lin<sup>-</sup>でみられたヒト由来の組織は認められず、図 7 に示すように、ヒト由来の細胞は存在するが (赤色)、それらはマウス平滑筋組織 (緑色) の間隙に分布した。

また、DP/Lin<sup>-</sup>の増殖はエストロゲンペレットや妊娠により刺激され、定量的にヒト由来細胞の割合が高くなっていることがわかる (図 8)。

以上は、DP/Lin<sup>-</sup>が子宮平滑筋を構築する能力を有している一方、nonDP/Lin<sup>-</sup>および Lin<sup>+</sup>はその能力を持っていないことを示しており、DP/Lin<sup>-</sup>は子宮筋の組織幹細胞特性を特異的に有している。また、DP/Lin<sup>-</sup>の増殖はエストロゲン ( $E_2$ ) 徐放ペレットや妊娠により刺激されることが判明した。

実施例 5 子宮筋 CD34 陽性/CD49f 陽性細胞の調製 (Lin マーカーによる前選別がない場合)

さらに単離した各々の細胞分画について 200 cells/cm<sup>2</sup> という低細胞密度で培養皿で培養し、コロニー形成能について解析した。解析するにあたり、培養皿に 29G 針にて擦過し、一つ一つの培養細胞の挙動を把握できるようにした。

#### (1) 単一分散子宮筋細胞の調整

ヒト子宮から単離された子宮筋腫片を、ハサミで約 2 mm<sup>3</sup> の小片にまで細切し、0.2% (w/v) のコラゲナーゼ (和光純薬、大阪)、0.05% (w/v) の DNaseI (GIBCO、

米国カリフォルニア州)を含有する DMEM 培地(1%の抗生物質-抗真菌剤 [GIBCO]、10%のウシ胎児血清[BioWest、米国フロリダ州]を含有するダルベッコ変法イーグル培地 [DMEM、Sigma-Aldrich、米国ミズーリ州]) 中に、組織片 1 g に対して 10 ml の割合で移し、37°Cにて 16 時間振盪して酵素的に細胞分散処理を行った。続いて、400  $\mu$ m 孔径のポリエチレンメッシュで濾過後、さらに 40  $\mu$ m 孔径セルストレーナ (BD Biosciences、米国マサチューセッツ州) に細胞を通すことにより、単一細胞の状態にまで分散させた。続いて、これら分散した細胞を Ficoll-Paque PLUS (Amersham Biosciences、米国ニュージャージー州) 上に重層して 780 $\times$ g にて 15 分間の密度勾配遠心を実施し、界面層から単一細胞の分散液を回収した。これを、0.05% (w/v) トリプシン-EDTA (Sigma-Aldrich)  $\cdot$  0.05% (w/v) DNaseI 溶液による酵素処理とピペッティングにより完全に分散した細胞集団にさせた。

## (2) 蛍光標識抗体による細胞染色

上記の分散した単一子宮筋細胞集団を、2%胎児ウシ血清、10 mM HEPES、ならびに 1%ペニシリンおよびストレプトマイシン含有のハンクス平衡化緩衝液 (カルシウムおよびマグネシウム無含有、HBSS<sup>+</sup>) に  $2 \times 10^6$  の濃度で浮遊させ、蛍光標識抗体を加えて、4°Cで 30 分間反応させた。続いて 4°Cで遠心した後、2 ml の上記のハンクス液に浮遊させ、死細胞の選別のため Propidium Iodide (PI) で染色した。蛍光標識抗体は、実施例 1 で用いたものを用いた。

## (3) 子宮筋 CD34 陽性/CD49f 陽性細胞の分離

PI(-) (生細胞)、CD45 陰性および FSC (Forward scatter (前方散乱光) ; 細胞の大きさを示す) 150~500 の細胞について、蛍光強度に基づいてフローサイトメトリーにより細胞集団を 2 次元に展開した。上記の染色した分散細胞を、フローサイトメトリー (FACS Vantage SE, Becton Dickinson 社) および解析ソフトウェア (Cell-Quest, Becton Dickinson 社) を用いて解析した。分画した細胞の分化マーカー遺伝子の発現解析は実施例 1 と同様の方法で行った。さらに、実施例 2 と同様の方法でコロニー形成能を調べた。さらに、実施例 4 と同様の方法で重度免疫不全マウスに移植した。

図 9 に細胞分布を示す。図 9 A に細胞集団全体の細胞分布を示し、図 9 B、C および D にそれぞれ DP (Double positive; CD49f(+)CD34(+)) 分画、CD49f(-)CD34(+)



分画および CD34(-)分画の各画分の細胞分布を示す。横軸が CD49f の強度を、縦軸が CD34 の強度を示す。PI(-)の生細胞のうちの DP(Double positive)分画は 9.8%、49f(-)34(+)分画は 13.7%、34(-)分画は 43.8%であった。この中から、DP (CD49f(+)/CD34(+)) 分画を分取した。

図 1 0 に DP 分画中の CD31 の発現を指標にした細胞重分画の細胞分布を示す。図に示すように、DP 分画は CD31 の発現の有無でさらに 2 つの重分画 (DP 31+および DP 31-)に分けることができた。図 1 0 A は細胞集団全体の細胞分布を、図 1 0 B は DP 分画の細胞分画を示す。図 1 0 C は DP 分画の CD31 の発現パターンを示し、図 1 0 D は CD31(+)分画の細胞分布を、図 1 0 E は CD31(-)分画の細胞分布を示す。単一子宮筋細胞集団の PI(-)の細胞の中に CD31 陽性細胞は 3.6%存在し、CD31 陰性細胞は 3.7%存在した。

図 1 1 に DP 分画、CD49f(-)CD34(+)分画および CD34(-)分画における分化マーカー遺伝子の発現解析の結果を示す。図 1 1 に示すように、DP 分画は他の分画に比べて、ER $\alpha$ 、ER $\beta$  および平滑筋分化マーカーの発現レベルが低かった。その一方で、ABCG2 は強発現していた。

図 1 2 に DP 分画の細胞の 1 日目 (A)、7 日目 (B)、14 日目 (C)および 21 日目 (D)のコロニー形成の状態を示す。図 1 2 E および F は増殖中のコロニーの状態を示す。また、図 1 3 に DP 分画、CD49f(-)CD34(+)分画、CD34(-)分画、DP 分画中の CD31(+)重分画 (DP 31+)および DP 分画中の CD31(-)重分画 (DP 31-)のコロニー形成能を示す。図に示すように、DP 分画は他の分画 (CD49f(-)CD34(+)分画、CD34(-)分画)と比較したコロニー形成能が高かった。また、DP 分画中の CD31(+)重分画と CD31(-)重分画の間ではコロニー形成能に差は認められなかった。

図 1 4 に DP 分画を重度免疫不全マウス子宮内へ移植した結果を示す。図に示すように、DP 分画を移植した子宮では、vimentin 陽性すなわちヒト由来であり (赤色)、かつ  $\alpha$  SMA 陽性細胞 (緑色) で形態的にも子宮平滑筋である組織 (黄色) が出現した。このことは、DP 分画の細胞が子宮筋様組織を構築する能力を有していることを示す。

以上より、lineage マーカーによる選別をせずに、CD34 および CD49f の発現を指標にして子宮平滑筋幹細胞を単離し得ることがわかった。

## 産業上の利用可能性

実施例に示すように、本発明の CD31、CD45 および Glycophorin A が陰性であり、CD34 および CD49f が陽性であることを特徴とする DP/Lin<sup>-</sup> および CD45 が陰性であり、CD34 および CD49f が陽性であることを特徴とする DP が、1) 未分化状態、2) 多分化能、3) 自己組織構築能、といった組織幹細胞特性を有することから、DP/Lin<sup>-</sup> および DP は子宮筋の組織幹細胞であり、本法により世界で初めて子宮筋の組織幹細胞の単離に成功した。単離した DP/Lin<sup>-</sup> および DP は、子宮筋の発生機構、妊娠・分娩における子宮筋の増殖・退縮・機能発現を担う細胞メカニズム、更に子宮筋腫などの子宮筋由来疾患の病因解析やそれに対する薬剤開発をするうえで、有用な生物資源となる。また DP/Lin<sup>-</sup>細胞 および DP 細胞は他臓器治療における細胞マテリアルとしても臨床応用が期待される。

本明細書で引用した全ての刊行物、特許および特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

## 請求の範囲

1. 哺乳動物平滑筋由来の平滑筋幹細胞を単離する方法であって、哺乳動物平滑筋細胞を蛍光色素で標識した抗 CD31 抗体、抗 CD45 抗体、抗 Glycophorin A 抗体、抗 CD34 抗体および抗 CD49f 抗体と接触させ、抗 CD31 抗体、抗 CD45 抗体および抗 Glycophorin A 抗体と結合せず、抗 CD34 抗体および抗 CD49f 抗体と結合する細胞を単離することを含む、平滑筋幹細胞を単離する方法。

2. 哺乳動物平滑筋由来の平滑筋幹細胞を単離する方法であって、哺乳動物平滑筋細胞を蛍光色素で標識した抗 CD34 抗体および抗 CD49f 抗体と接触させ、抗 CD34 抗体および抗 CD49f 抗体と結合する細胞を単離することを含む、平滑筋幹細胞を単離する方法。

3. 哺乳動物平滑筋由来の平滑筋幹細胞を単離する方法であって、哺乳動物平滑筋細胞を蛍光色素で標識した抗 CD45 抗体、抗 CD34 抗体および抗 CD49f 抗体と接触させ、抗 CD45 抗体と結合せず、抗 CD34 抗体および抗 CD49f 抗体と結合する細胞を単離することを含む、請求項 2 記載の平滑筋幹細胞を単離する方法。

4. フローサイトメトリーを用いて、細胞をソーティングする、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の平滑筋幹細胞を単離する方法。

5. 哺乳動物平滑筋細胞をフローサイトメトリーにより Lin (CD31, CD45, Glycophorin A) 陽性細胞 (Lin+) と Lin 陰性細胞 (Lin-) に選別し Lin 陰性細胞を採取し、さらに CD34 陽性かつ CD49f 陽性細胞を採取することを含む、請求項 1 記載の平滑筋幹細胞を単離する方法。

6. 哺乳動物平滑筋細胞からフローサイトメトリーにより CD34 陽性かつ CD49f 陽性細胞を採取することを含む、請求項 2 記載の平滑筋幹細胞を単離する方法。

7. 哺乳動物平滑筋細胞からフローサイトメトリーにより CD45 陰性細胞を採取し、さらに CD34 陽性かつ CD49f 陽性細胞を採取することを含む、請求項 3 記載の平滑筋幹細胞を単離する方法。

8. 平滑筋が子宮筋である請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の平滑筋幹細胞を単離する方法。

9. 哺乳動物がヒトである請求項1～8のいずれか1項に記載の平滑筋幹細胞を単離する方法。

10. 請求項1～9のいずれか1項に記載の方法により単離されたCD31、CD45およびGlycophorin Aが陰性であり、CD34およびCD49fが陽性である平滑筋幹細胞。

11. 請求項1～9のいずれか1項に記載の方法により単離された、CD34およびCD49fが陽性である平滑筋幹細胞。

12. 請求項1～9のいずれか1項に記載の方法により単離されたCD45が陰性であり、CD34およびCD49fが陽性である平滑筋幹細胞。

13. さらに、ABCG2が陽性である請求項10～12のいずれか1項に記載の平滑筋幹細胞。

14. 平滑筋に移植することにより平滑筋に分化する能力を有する請求項10～13のいずれか1項に記載の平滑筋幹細胞。

15. 子宮筋に移植することにより子宮筋に分化する能力を有する子宮筋由来の請求項14記載の平滑筋幹細胞。

16. 請求項10～15のいずれか1項に記載の平滑筋幹細胞を含む平滑筋組織再生用組成物。

図 1 - 1

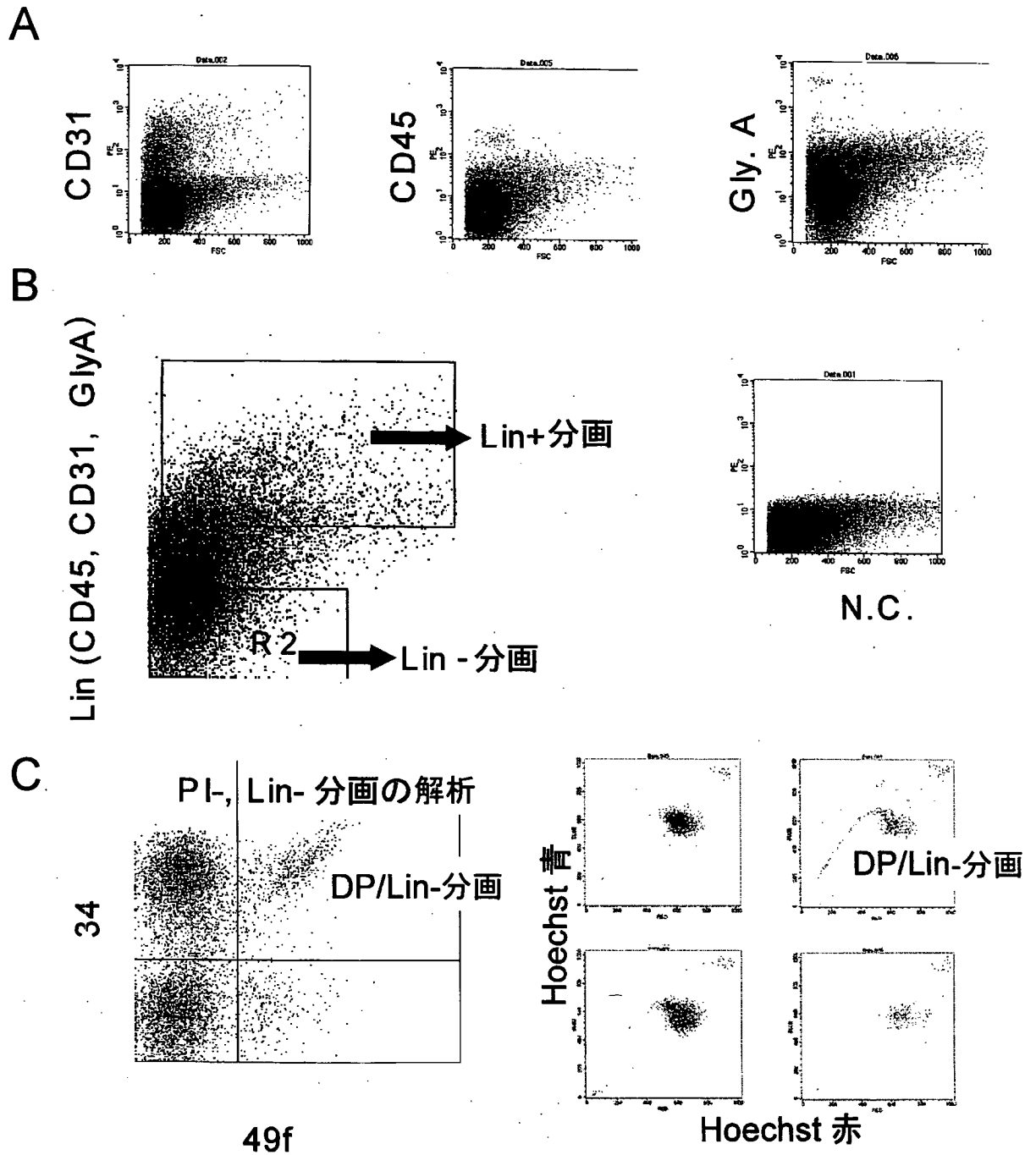


図 1 - 2

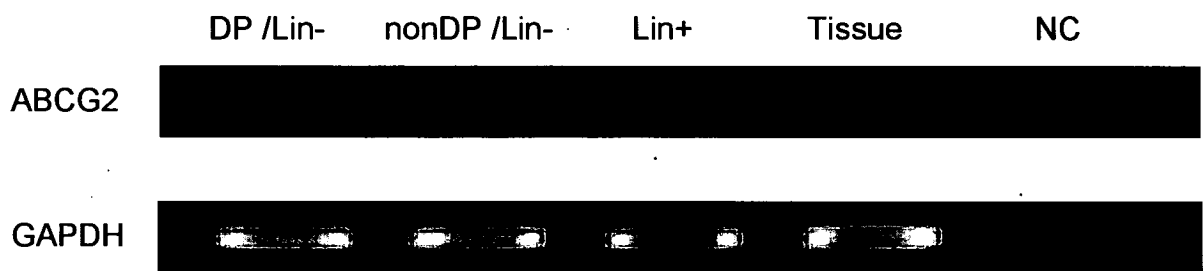


図 2

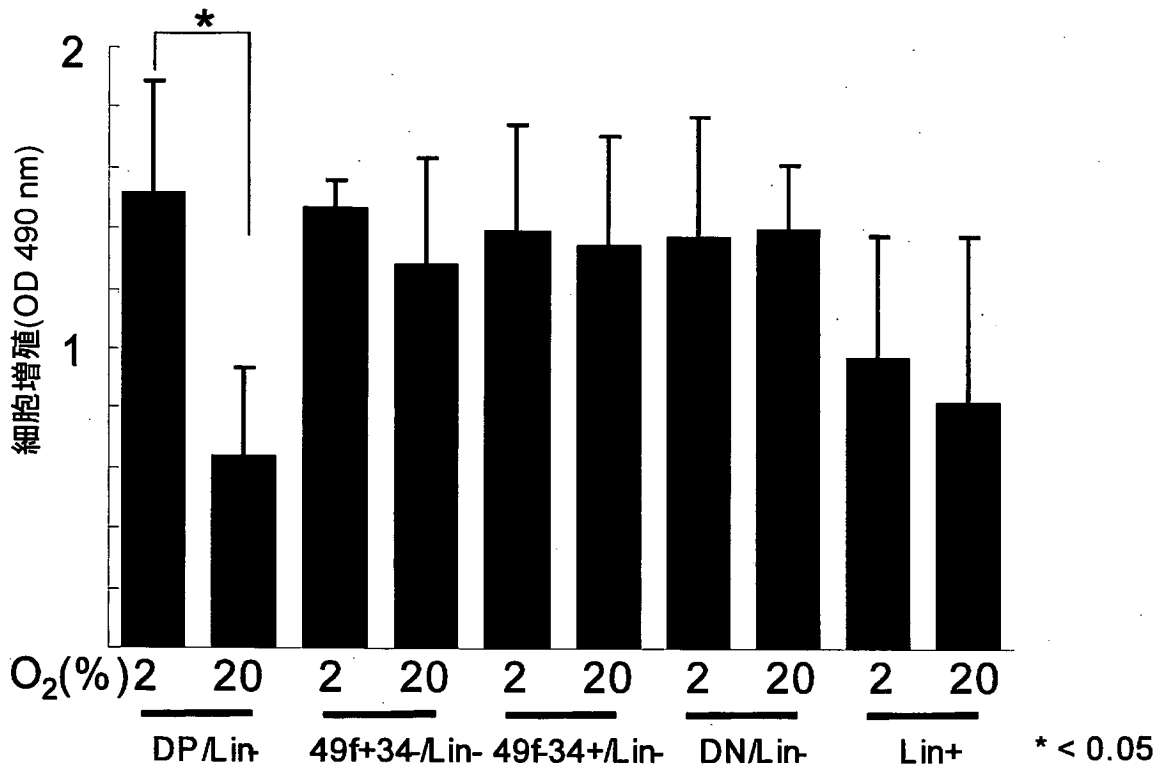


図 3

A



DP /Lin-

B



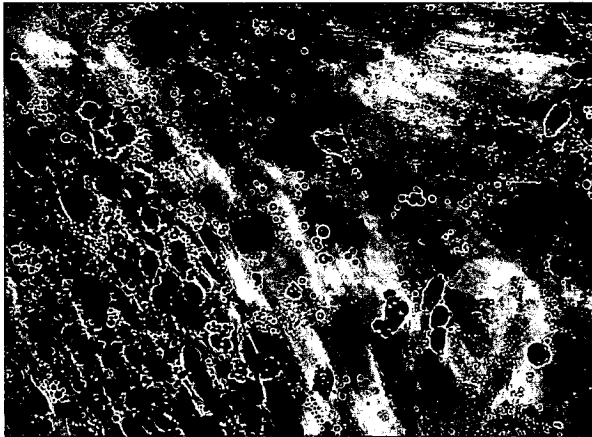
nonDP /Lin-

スケールバー=50 $\mu$ m



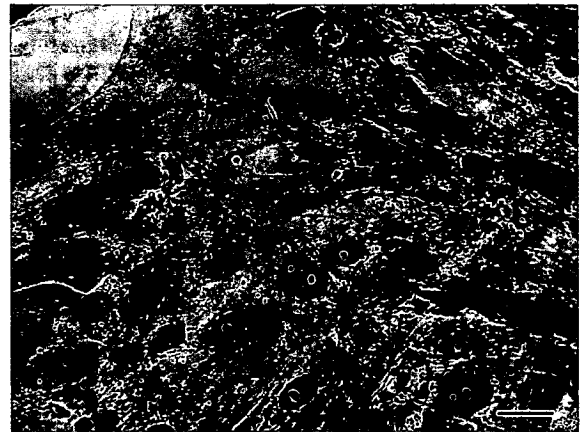
図 4

A



DP /Lin-

B

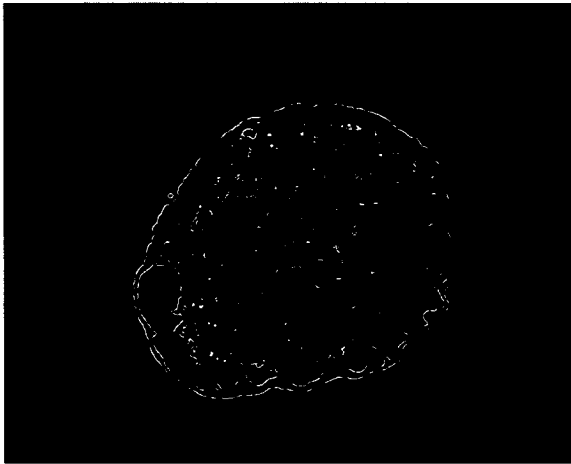


nonDP /Lin-

スケールバー=30μm

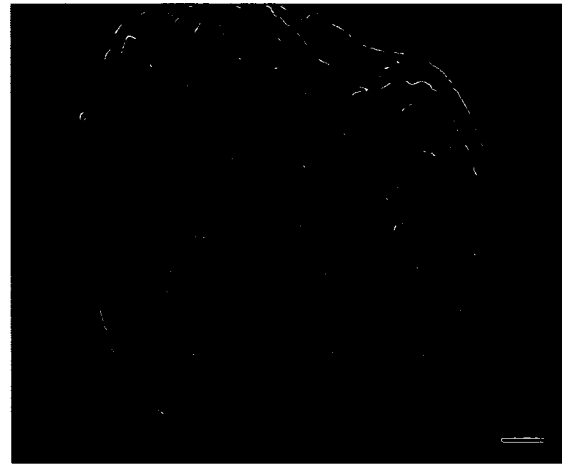
図 5

A



スケールバー=100μm

B



スケールバー=50μm

図 6

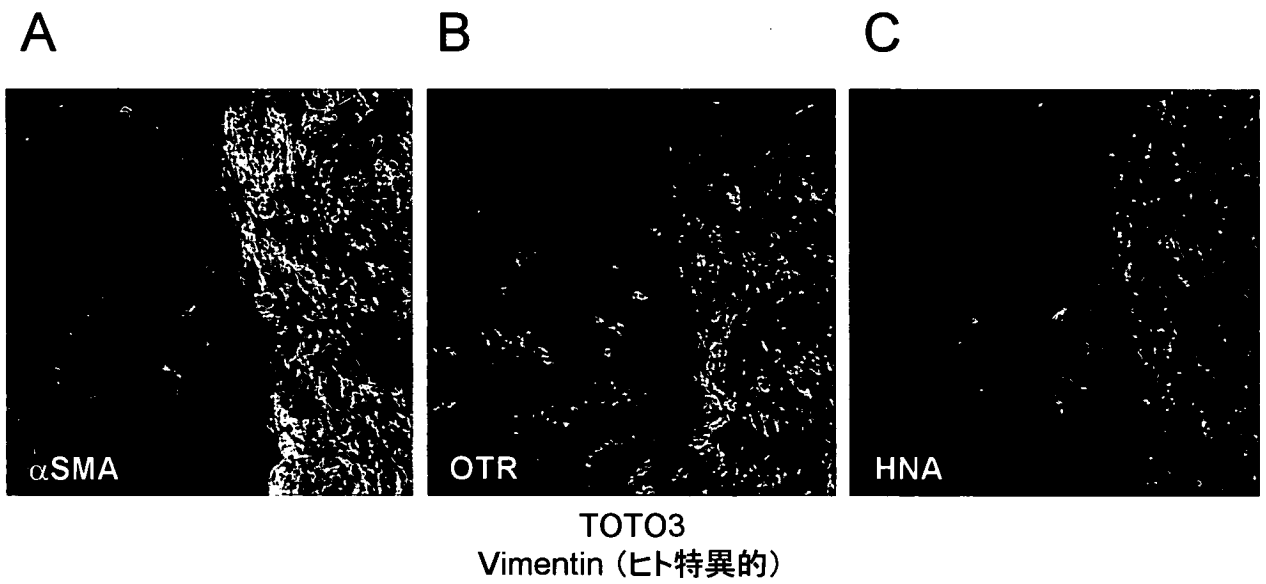


図 7



E2 ペレット (+)

図 8

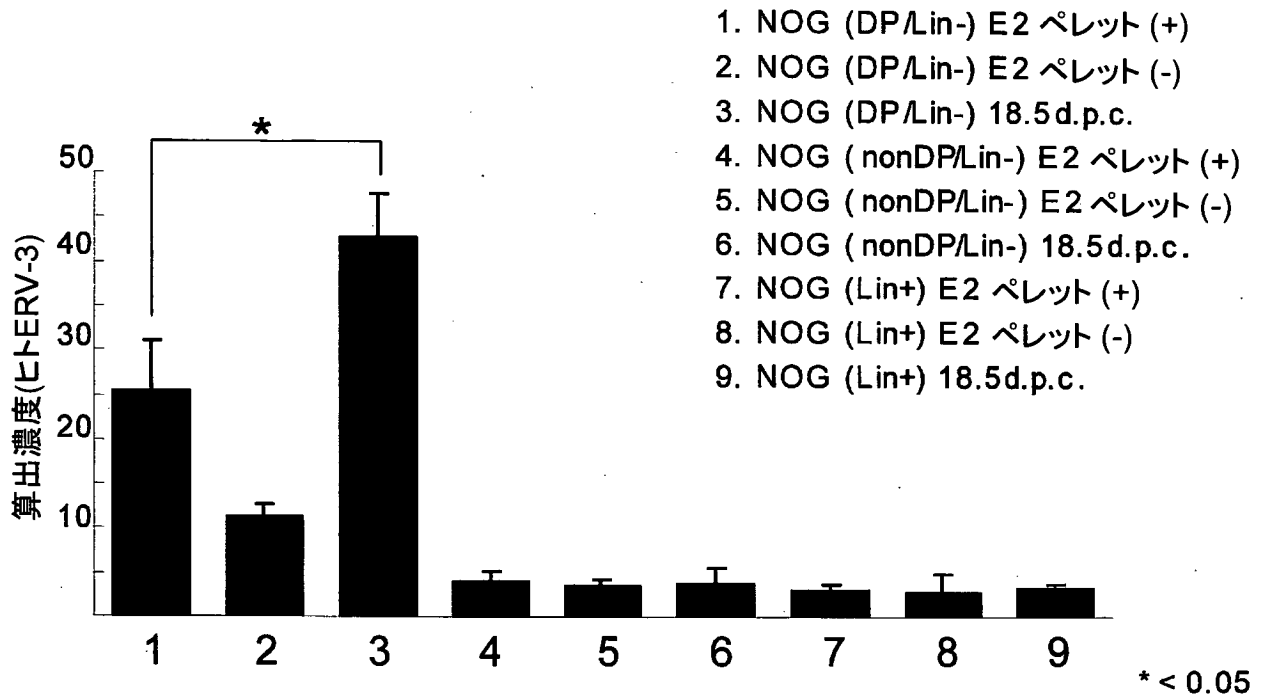
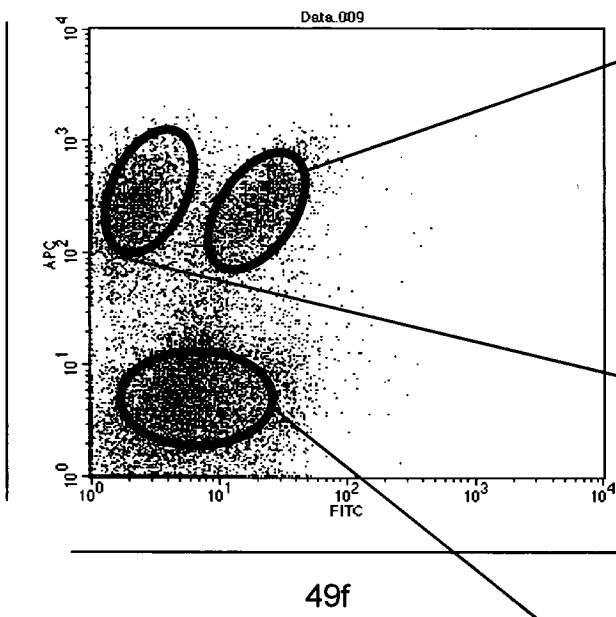


図 9

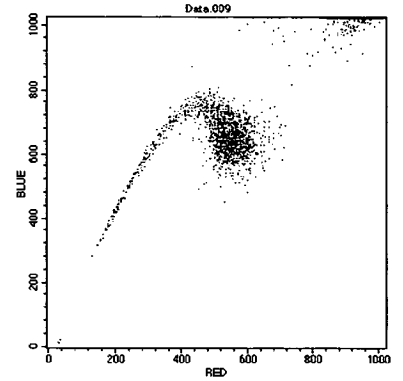
A

PI(-), CD45(-), FSC150~500

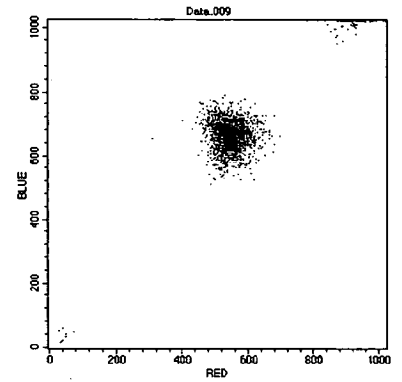
34



B



C



D

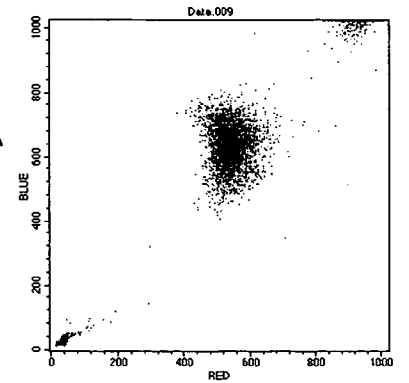
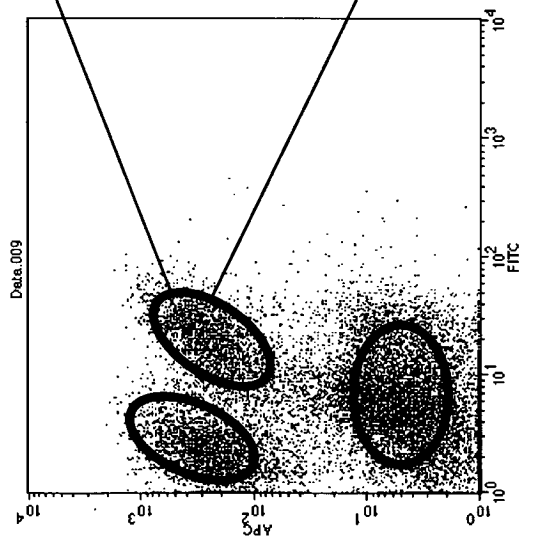


図 10

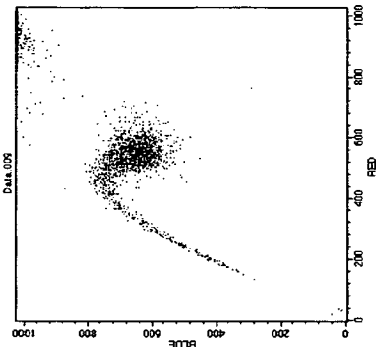
A PI(-), CD45(-), FSC150~500



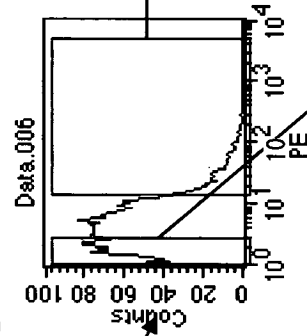
34

49f

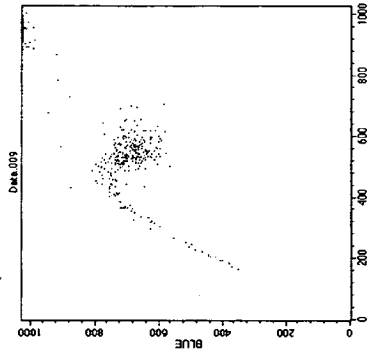
B



C



D



E

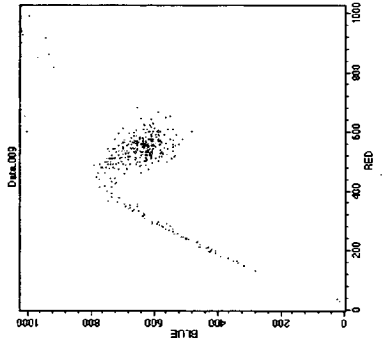


図 1 1

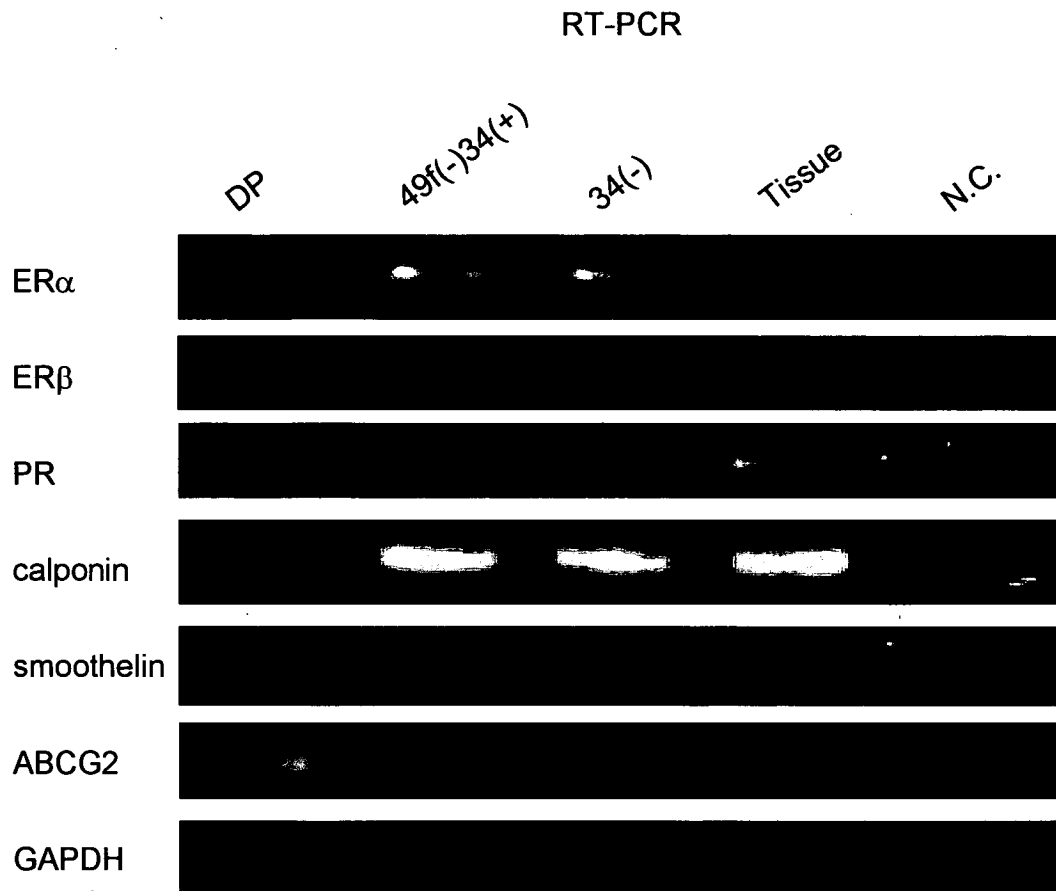
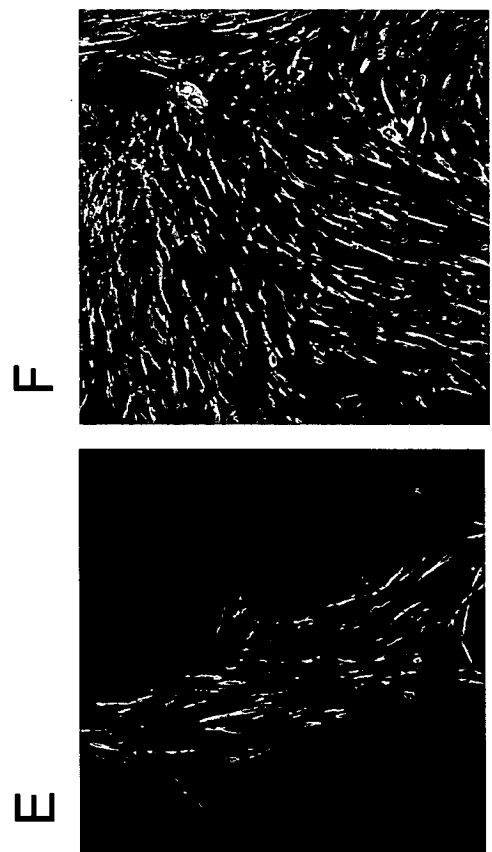
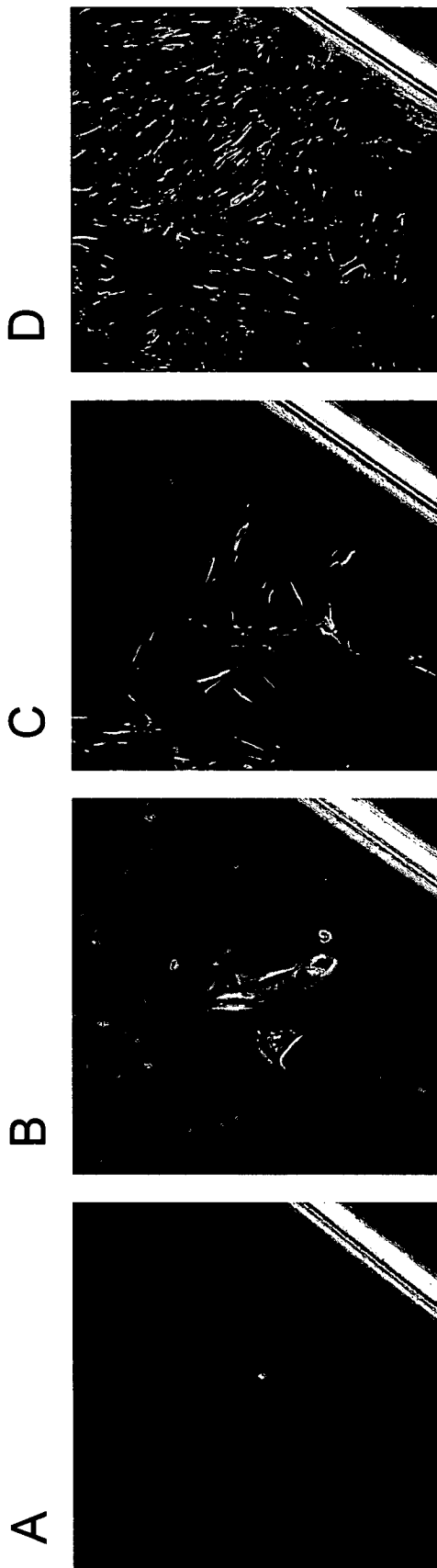




図 12



A; after 1 d  
B; after 7 d  
C; after 14 d  
D; after 21 d

E and F; a colony continued to grow

図 13

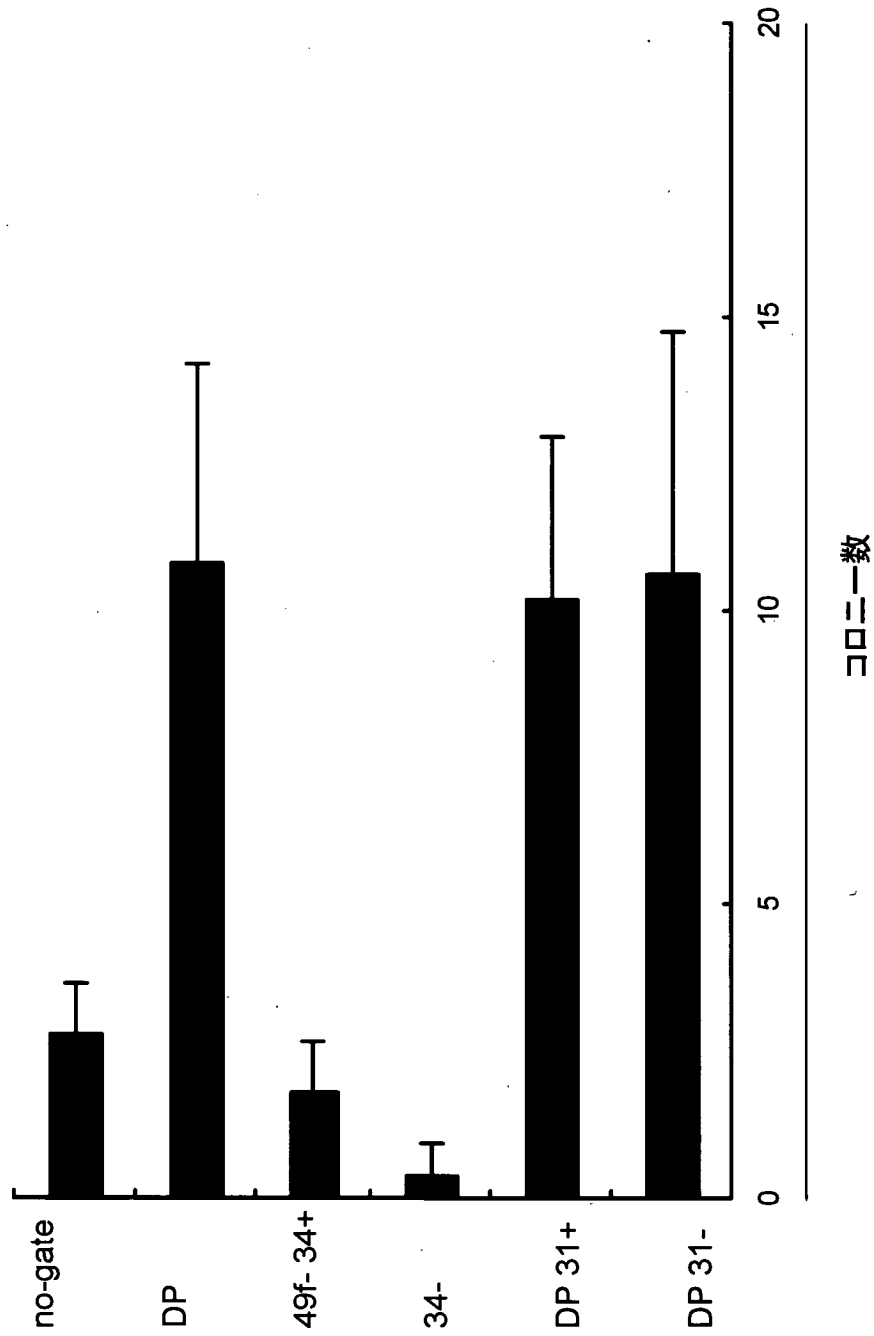
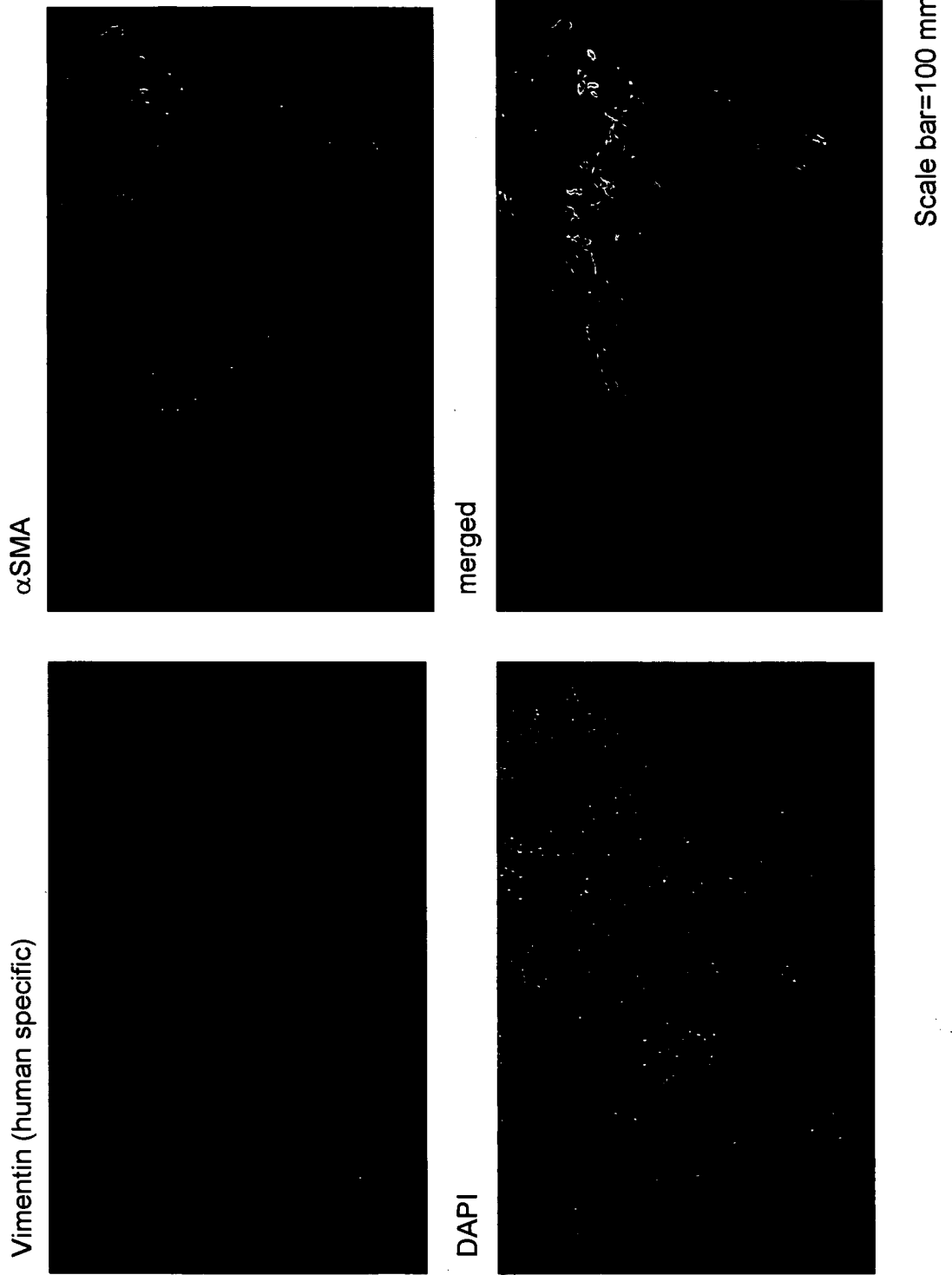


図 14



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/057809

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N5/06(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)n, G01N33/53(2006.01)n  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) C12N5/00-5/10, A61L27/00, G01N33/48, G01N33/53  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/EMBASE/SCISEARCH/DISSABS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus (JDreamII), Igaku·Yakugaku Yokoshu Zenbun Database		
<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/A	ONO M et al., Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007, vol. 104, p. 18700-18705	10-16/1-9
X/A	JP 2007-202435 A (Keio University), 16 August, 2007 (16.08.07), (Family: none)	10-16/1-9
X/A	SZOTEK P P et al., Adult mouse myometrium label-retaining cells divide in response to gonadotropin stimulation., Stem Cells, 2007, vol. 25, p. 1317-1325	10-16/1-9
<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 07 July, 2009 (07.07.09)		Date of mailing of the international search report 14 July, 2009 (14.07.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer  Telephone No.
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/057809

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	Masanori ONO et al., "Hyomen Kogen o Mochiita Hito Shikyu Heikatsukin Kansaibo no Atarashii Bunriho no Kaihatsu to sono Ninshin Shikyu Remodeling ni Okeru Yakuwari", Regenerative Medicine, 05 February, 2009 (05.02.09), Vol.8, suppl., page 187 (Abstract O-27-7)	1-16
P,X	Masanori ONO et al., "Atarashii Hoho de Tanri sareta Shikyu Heikatsukin Kansaibo no Ninshin Shikyu Remodeling ni Okeru Yakuwari", Acta Obstetrica et Gynaecologia Japonica, 01 February, 2009 (01.02.09), Vol.61, No.2, page 428 (Abstract Y-6)	1-16
P,X	Masanori ONO et al., "Shikyu Heikatsukin Kansaibo no Atarashii Bunriho to sono Kino Kaiseki", Folia endocrinologica Japonica, 20 April, 2008 (20.04.08), Vol.84, No.1, page 221 (Abstract O2-65)	1-16
A	Tetsuo MARUYAMA, "Hito Shisei Seishoku Kikan no Saisei to Kansaibo System", Acta Obstetrica et Gynaecologia Japonica, 2007, Vol.59, No.8, pages 1644 to 1653	1-16

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, A61L27/00(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)n, G01N33/53(2006.01)n		
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. C12N5/00 - 5/10, A61L27/00, G01N33/48, G01N33/53		
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/EMBASE/SCISEARCH/DISSABS/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII), 医学・薬学予稿集全文データベース		
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/A	ONO M et al., Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007, vol. 104, p. 18700-18705	10-16/1-9
X/A	JP 2007-202435 A（学校法人慶應義塾）2007.08.16, （ファミリーなし）	10-16/1-9
<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 07.07.2009	国際調査報告の発送日 14.07.2009	
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） 中村 正展 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3537

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
X/A	SZOTEK P P et al., Adult mouse myometrium label-retaining cells divide in response to gonadotropin stimulation., Stem Cells, 2007, vol. 25, p. 1317-1325	10-16/1-9
P X	小野 政徳、他, 表面抗原を用いたヒト子宮平滑筋幹細胞の新しい分離法の開発とそ の妊娠子宮リモデリングにおける役割, 再生医療, 2009.02.05, vol. 8, suppl., p. 187 (Abstract 0-27-7)	1-16
P X	小野 政徳、他, 新しい方法で単離された子宮平滑筋幹細胞の妊娠子宮リモデリング における役割, 日本産科婦人科学会雑誌, 2009.02.01, vol. 61, no. 2, p. 428 (Abstract Y-6)	1-16
P X	小野 政徳、他, 子宮平滑筋幹細胞の新しい分離法とその機能解析, 日本内分泌学会雑誌, 2008.04.20, vol. 84, no. 1, p. 221 (Abstract 02-65)	1-16
A	丸山 哲夫, ヒト雌性生殖器官の再生と幹細胞システム, 日本産科婦人科学会雑誌, 2007, vol. 59, no. 8, p. 1644-1653	1-16