

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02013/077428

発行日 平成27年4月27日 (2015. 4. 27)

(43) 国際公開日 平成25年5月30日 (2013. 5. 30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/0775 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 H	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/077 (2010.01)	C 1 2 N 5/00 2 O 2 G	4 C O 8 1
A 6 1 L 27/00 (2006.01)	A 6 1 L 27/00 G	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

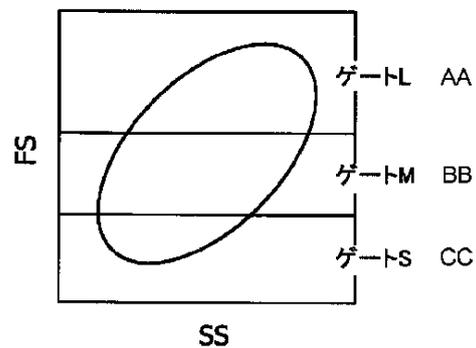
出願番号 特願2013-545972 (P2013-545972)	(71) 出願人 305060567 国立大学法人富山大学 富山県富山市五福3190
(21) 国際出願番号 PCT/JP2012/080375	
(22) 国際出願日 平成24年11月22日 (2012.11.22)	
(31) 優先権主張番号 特願2011-257419 (P2011-257419)	(74) 代理人 100099623 弁理士 奥山 尚一
(32) 優先日 平成23年11月25日 (2011.11.25)	(74) 代理人 100096769 弁理士 有原 幸一
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 100107319 弁理士 松島 鉄男
	(74) 代理人 100180231 弁理士 水島 亜希子
	(72) 発明者 二階堂 敏雄 富山県富山市杉谷2630 国立大学法人 富山大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 羊膜間葉系幹細胞の調製方法および単離された羊膜間葉系幹細胞集団

(57) 【要約】

(A) 哺乳動物の羊膜から間葉系細胞の細胞集団を採取するステップと、(B) 前記間葉系細胞の細胞集団を、フローサイトメトリーで作成されるスクアッタグラムに特定のゲートを設けて細胞を分取するステップと、(C) 分取された細胞を継代培養するステップとを含む方法により、高い増殖能と分化能を有する羊膜間葉系幹細胞集団を得ることができる。または、(D) 哺乳動物の羊膜から間葉系細胞の細胞集団を採取するステップと、(E) 前記採取された細胞集団を2～3日間初期培養するステップと、(F) 低細胞濃度において継代培養を3～4回繰り返すステップと、(G) 前記継代培養において紡錘状の形態を有する細胞のコロニーが形成されたとき、細胞がコンフルエントになるまで同一の培養皿で培養を維持するステップとを含む方法によっても、高い増殖能と分化能を有する羊膜間葉系幹細胞集団を得ることができる。



AA Gate L
BB Gate M
CC Gate S

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(A) 哺乳動物の羊膜から間葉系細胞の細胞集団を採取するステップと、
 (B) 前記間葉系細胞の細胞集団について、
 (b1) フローサイトメーターを用いて前方散乱光および側方散乱光を検出し、二次元分布図を作成し、
 (b2) 前記二次元分布図上に、四角形の3分割ゲートを設定することにより選択された細胞を分取するステップと、
 (C) 前記分取された細胞を継代培養するステップと
 を含む、羊膜間葉系幹細胞集団を調製する方法。

10

【請求項 2】

前記ステップ(B)における(b1)において、前記二次元分布図に示された細胞は、前記間葉系細胞の細胞集団全体の85~95%である請求項1に記載の方法。

【請求項 3】

前記ステップ(B)における(b2)において、前記四角形の3分割ゲートは、前方散乱光の強度に基づいて3分割したものである請求項1または2に記載の方法。

【請求項 4】

前記四角形の3分割ゲートは、
 (i) 側方散乱光の検出上限を右辺、側方散乱光の検出限界を左辺とし、前方散乱光の検出限界を底辺として、前記二次元分布図に示された細胞集団の5~15%が含まれるように上辺を設定した第1のゲートと、
 (ii) 側方散乱光の検出上限を右辺、側方散乱光の検出限界を左辺とし、前記第1のゲートの上辺を底辺として、前記二次元分布図に示された細胞集団の35~45%が含まれるように上辺を設定した第2のゲートと、
 (iii) 側方散乱光の検出上限を右辺、側方散乱光の検出限界を左辺とし、前記第2のゲートの上辺を底辺として、前記二次元分布図に示された細胞集団の35%以上が含まれるように上辺を設定した第3のゲートと
 からなる請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記ステップ(C)における継代培養は、
 (c1) 前記分取された細胞を $400 \sim 3500 / \text{cm}^2$ の細胞濃度において播種し、2~3日間初期培養するステップと、
 (c2) 前記初期培養の $1/500$ 以上 $1/10$ 未満の細胞濃度において播種し、1週間に2回の培地交換を行う継代培養を3~4回繰り返すステップと、
 (c3) 前記継代培養において紡錘状の形態を有する細胞のコロニーが形成されたとき、細胞がコンフルエントになるまで同一の培養皿で培養を維持するステップと
 を含む、請求項1~4のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 6】

前記ステップ(c2)における細胞濃度は、前記初期培養の $1/200$ 以上 $1/50$ 未満である請求項5記載の方法。

40

【請求項 7】

(D) 哺乳動物の羊膜から間葉系細胞の細胞集団を採取するステップと、
 (E) 前記採取された細胞集団を $400 \sim 35000 / \text{cm}^2$ の細胞濃度において播種し、2~3日間初期培養するステップと、
 (F) 前記初期培養の $1/5000$ 以上 $1/10$ 未満の細胞濃度において播種し、1週間に2回の培地交換を行う継代培養を3~4回繰り返すステップと、
 (G) 前記継代培養において紡錘状の形態を有する細胞のコロニーが形成されたとき、細胞がコンフルエントになるまで同一の培養皿で培養を維持するステップと
 を含む、羊膜間葉系幹細胞集団を調製する方法。

【請求項 8】

50

前記ステップ(F)における細胞濃度は、前記初期培養の1/2000以上1/50未満である請求項7記載の方法。

【請求項9】

請求項1～8のいずれか1項に記載の方法により調製された、哺乳動物の羊膜間葉系幹細胞集団。

【請求項10】

前記哺乳動物は、ヒトである請求項9に記載の羊膜間葉系幹細胞集団。

【請求項11】

紡錘状の形態を有する細胞を含み、かつ、50回以上の細胞分裂(population doublings)が可能である請求項9または10に記載の羊膜間葉系幹細胞集団。

10

【請求項12】

軟骨または骨への分化能を有する請求項9～11のいずれか1項に記載の羊膜間葉系幹細胞集団。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、哺乳動物の羊膜由来の間葉系細胞から、間葉系幹細胞集団を調製する方法および単離された羊膜間葉系幹細胞集団に関するものである。

20

【背景技術】

【0002】

再生医療の分野においては、幹細胞に関する研究が進められている。特に、胚性幹細胞(ES細胞)は、すべての細胞系譜に分化することができる能力(分化万能性)を有するため、非常に有用である。しかしながら、ヒトES細胞を作成するには、ヒト初期胚を破壊する工程が必須となるため、倫理的な面で問題があった。また、ES細胞は、臓器移植と同様に、ドナーの確保、他家移植による免疫拒絶反応といった様々な問題があり、臨床へ応用する際の障壁となっていた。

【0003】

近年、ES細胞に近い細胞として、人工多能性幹細胞(iPS細胞)が樹立され、注目を集めている。iPS細胞は、Oct3/4、Klf4、c-Myc、及びSox2の4種の遺伝子を体細胞に導入することにより、ES細胞と類似の分化万能性を持たせた細胞である。iPS細胞は、採取に差し支えない組織由来の体細胞から樹立できるため、ES細胞の抱える倫理的問題を回避でき、また、患者自身の分化した体細胞を利用することで免疫拒絶を防ぐことができることから、臨床への応用が期待されている。しかし、iPS細胞は、その作製にがん原遺伝子であるc-Mycを使用しており、また、レトロウイルスを用いて染色体内のランダムな位置に遺伝子を導入することから、細胞ががん化し、腫瘍を形成しやすいという問題があり、臨床応用のためには、さらなる研究が必要とされている。

30

【0004】

これらの問題を解決するために、最近、羊膜が注目されている。羊膜は、外胚葉由来の上皮細胞と中胚葉由来の間葉系細胞から構成される胚体外組織であり、多能性幹細胞としての特性を有する細胞群を含有することが確認されている。羊膜は、出産後の排泄物として廃棄されるものであるため、生体材料として使用する上での倫理的問題が少ない。また、羊膜は、免疫学的にも特殊な性質を有しており、免疫原性が低いため、他家移植による免疫拒絶反応も比較的穏やかであることが期待されている。

40

【0005】

これまでに本発明者らは、ヒト羊膜上皮由来幹細胞が肝細胞やインスリン産生細胞へと分化する可能性や、ヒト羊膜由来間葉系幹細胞が軟骨細胞や心筋細胞へ分化する可能性を報告している(特許文献1)。

50

【 0 0 0 6 】

したがって、羊膜由来間葉系幹細胞を効率よく簡便に単離・調製することが望まれている。しかし、羊膜由来間葉系細胞の細胞集団から、選択的に間葉系幹細胞を得ることは困難であった。

【 0 0 0 7 】

一方、フローサイトメトリーにより細胞にレーザー光を照射し、その照射光の前方散乱光および側方散乱光を測定し、その測定値に基づいて神経幹細胞を分離・分取する方法が知られている（特許文献2）。

【 0 0 0 8 】

しかしながら、羊膜由来間葉系幹細胞の場合には、従来一般的に行われている培養方法や、フローサイトメトリーによる通常のソーティングゲートの組み合わせでは、羊膜由来間葉系細胞の細胞集団から、高い分化能と増殖能を兼ね備えた間葉系幹細胞を選択的に取得することは困難であった。

10

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 9 】

特許文献1 特開2003-231639号公報

特許文献2 特開2003-304867号公報

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

20

【 0 0 1 0 】

本発明は、哺乳動物の羊膜由来の間葉系細胞から、効率よく簡便に、長期間にわたり継代培養可能な増殖能と高い分化能を兼ね備えた間葉系幹細胞集団を調製する方法を提供することを目的とする。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、採取した羊膜間葉系細胞から、長期間にわたり継代培養可能な増殖能と高い分化能を有する羊膜由来間葉系幹細胞集団を容易に得ることができる方法を見出すに至った。

30

【 0 0 1 2 】

すなわち、第一発明は、(A)哺乳動物の羊膜から間葉系細胞の細胞集団を採取するステップと、(B)前記間葉系細胞の細胞集団について、(b1)フローサイトメーターを用いて前方散乱光および側方散乱光を検出し、二次元分布図を作成し、(b2)前記二次元分布図上に、四角形の3分割ゲートを設定することにより選択された細胞を分取するステップと、(C)前記分取された細胞を継代培養するステップとを含む、羊膜間葉系幹細胞集団を調製する方法を提供するものである。

【 0 0 1 3 】

前記ステップ(B)における(b1)において、前記二次元分布図に示された細胞は、間葉系細胞の細胞集団全体の85~95%であることが望ましい。

【 0 0 1 4 】

40

前記ステップ(B)における(b2)において、前記四角形の3分割ゲートは、前方散乱光の強度に基づいて3分割したものであることが望ましい。

【 0 0 1 5 】

前記四角形の3分割ゲートは、(i)側方散乱光の検出上限を右辺、側方散乱光の検出限界を左辺とし、前方散乱光の検出限界を底辺として、前記二次元分布図に示された細胞集団の5~15%が含まれるように上辺を設定した第1のゲートと、(ii)側方散乱光の検出上限を右辺、側方散乱光の検出限界を左辺とし、前記第1のゲートの上辺を底辺として、前記二次元分布図に示された細胞集団の35~45%が含まれるように上辺を設定した第2のゲートと、(iii)側方散乱光の検出上限を右辺、側方散乱光の検出限界を左辺とし、前記第2のゲートの上辺を底辺として、前記二次元分布図に示された細胞集団

50

の35%以上が含まれるように上辺を設定した第3のゲートとからなることが望ましい。

【0016】

前記ステップ(C)における継代培養は、(c1)前記分取された細胞を400~3500/cm²の細胞濃度において播種し、2~3日間初期培養するステップと、(c2)前記初期培養の1/500以上1/10未満の細胞濃度において播種し、1週間に2回の培地交換を行う継代培養を3~4回繰り返すステップと、(c3)前記継代培養において紡錘状の形態を有する細胞のコロニーが形成されたとき、細胞がコンフルエントになるまで同一の培養皿で培養を維持するステップとを含むことが望ましい。

【0017】

前記ステップ(c2)における細胞濃度は、前記初期培養の1/200以上1/50未満であることが望ましい。

10

【0018】

また、第二発明は、(D)哺乳動物の羊膜から間葉系細胞の細胞集団を採取するステップと、(E)前記採取された細胞集団を400~35000/cm²の細胞濃度において播種し、2~3日間初期培養するステップと、(F)前記初期培養の1/5000以上1/10未満の細胞濃度において播種し、1週間に2回の培地交換を行う継代培養を3~4回繰り返すステップと、(G)前記継代培養において紡錘状の形態を有する細胞のコロニーが形成されたとき、細胞がコンフルエントになるまで同一の培養皿で培養を維持するステップを含む、羊膜間葉系幹細胞集団を調製する方法を提供するものである。

【0019】

前記ステップ(F)における細胞濃度は、前記初期培養の1/2000以上1/50未満であることが望ましい。

20

【0020】

さらに、本発明は、上記第一発明の方法および/または第二発明の方法により調製された、哺乳動物の羊膜間葉系幹細胞集団を提供する。

【0021】

前記哺乳動物は、ヒトであることが望ましい。

【0022】

前記羊膜間葉系幹細胞集団は、紡錘状の形態を有する細胞を含み、かつ、50回以上の細胞分裂(population doublings)が可能であることが望ましい。

30

【0023】

前記羊膜間葉系幹細胞集団は、軟骨、骨、心筋、神経、肝臓、膵臓などへの高い分化能を有する。

【発明の効果】

【0024】

本発明に係る羊膜間葉系幹細胞集団の調製方法は、高い分化能と増殖能を有する羊膜間葉系幹細胞集団を、哺乳動物の羊膜由来間葉系細胞から効率よく簡便に調製することを可能とする。また、本発明に係る方法により調製された羊膜間葉系幹細胞集団を用いることにより、倫理的問題が少なく、かつ、他家移植による免疫拒絶反応が少ない安全な再生医療が可能となる。さらに本発明の羊膜間葉系幹細胞集団は、肝硬変時に起こる肝小葉の線維化を軽減する効果も有する。

40

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1】フローサイトメーターによって細胞を分取する為の二次元分布図(スキャッタグラム)およびゲートを示す図である。

【図2】スキャッタグラムおよびゲートの模式図である。

【図3】第2の発明に係る培養方法の模式図である。

【図4】羊膜間葉系細胞集団の顕微鏡像および増殖曲線。(a)は、単離直後の羊膜間葉系細胞集団(fresh HAM: fHAM)の顕微鏡像を示す。(b)は、通常の培養条件により継代培養された羊膜間葉系細胞集団の顕微鏡像を示す。(c)は、低濃度条件

50

により継代培養された羊膜間葉系細胞集団 (HAM) の顕微鏡像を示す。(d)は、HAM の典型的な増殖曲線であり、縦軸が細胞分裂回数、横軸が培養日数を示す。

【図5】フローサイトメーターにより分取された細胞から作成された羊膜間葉系幹細胞 (sorted HAM : sHAM) の顕微鏡像。(a)および(b)は、ゲートSから採取され、継代培養された羊膜間葉系幹細胞 (sHAM - S) の顕微鏡像を示す。(c)は、通常の培養条件により継代培養された羊膜間葉系細胞集団の顕微鏡像を示す。

【図6】HAM における幹細胞マーカーの発現を、免疫細胞化学染色により示した図である。

【図7】HAM における、軟骨で発現される遺伝子と細胞外マトリックス遺伝子の発現パターンを示す図である。

【図8】HAM における、骨で発現される遺伝子と細胞外マトリックス遺伝子の発現パターンを示す図である。

【図9】HAM、および、フローサイトメーターによりゲートS、M、Lから採取され、継代培養された羊膜間葉系幹細胞(それぞれ、sHAM - S、sHAM - M、sHAM - L)における、幹細胞転写因子(山中4因子: Oct3/4、Sox2、KLF、c-My c)および神経幹細胞マーカー(Nestin、Musashi)の発現を、免疫細胞化学染色により示した図である。

【図10】HAM、sHAM - S、sHAM - M、およびsHAM - Lにおける、幹細胞マーカー(CD44、SSEA-1、SSEA-3、SSEA-4、Tra?1?60)および間葉系細胞マーカー(Vimentin)の発現を、免疫細胞化学染色により示した図である。

【図11】HAM、sHAM - S、sHAM - Lにおける、心筋組織に特異的な転写因子(GATA4)の発現を、RT-PCR法により示した図である。

【図12】sHAM - Sにおける心筋組織マーカーの発現を、免疫細胞化学染色により示した図である。

【図13】肝硬変の線維化に対するHAM の効果を示す図である。

【図14】肝細胞特異的マーカー遺伝子の発現を、RT-PCR法により示した図である。

【図15】肝細胞への分化誘導後の細胞について、肝細胞特異的マーカーの発現を免疫細胞化学染色により示した図である。

【発明を実施するための形態】

【0026】

第一発明は、(A)哺乳動物の羊膜から間葉系細胞の細胞集団を採取するステップと、(B)前記間葉系細胞の細胞集団について、(b1)フローサイトメーターを用いて前方散乱光および側方散乱光を検出し、二次元分布図を作成し、(b2)前記二次元分布図上に、四角形の3分割ゲートを設定することにより選択された細胞を分取するステップと、(C)前記分取された細胞を継代培養するステップとを含む、羊膜間葉系幹細胞集団を調製する方法である。

【0027】

「羊膜」とは、哺乳動物の発生過程において形成される、胎子と羊水を包む膜である。哺乳動物には、ヒトをはじめとする霊長類の他、ウシ、ウマ、ブタ、ヤギ、イヌ、ウサギ、モルモット、ラット、マウスなどが含まれる。本発明で使用される羊膜は、好ましくはヒトの羊膜である。

【0028】

羊膜は、通常の外科的手法により得ることができる。または、分娩後に廃棄される胎盤から得ることも可能である。ヒト羊膜は、例えばインフォームドコンセントを得た妊婦から、帝王切開により採取することができる。

【0029】

第一発明の方法では、ステップ(A)として、哺乳動物の羊膜から間葉系細胞の細胞集団を採取する。羊膜は、上皮細胞と間葉系細胞とから構成されており、羊膜から間葉系細胞

10

20

30

40

50

胞の細胞集団を採取するには、羊膜から上皮細胞を取り除き、分離操作を行えばよい。間葉系細胞の細胞集団の採取は、例えば特開2003-231639号公報に記載される方法に準じて行うことができる。

【0030】

「細胞集団」とは、当該技術分野において通常理解される意味であり、複数の細胞の集まりのことである。採取された羊膜間葉系細胞の細胞集団には、種々の増殖能、寿命、性質を有する細胞が混在している。そのため、一般的な培養条件において間葉系細胞の細胞集団について維持培養を行った場合には、間葉系細胞の細胞集団に含まれる細胞のうち、培養開始初期に接着し、増殖を開始する上皮様の細胞が培養面の大半を占拠してしまうことにより、それよりも遅れて増殖を開始する羊膜間葉系幹細胞は、増殖できずに駆逐されてしまい、単離することができない。

10

【0031】

そこで、第一発明の方法では、採取された羊膜間葉系細胞の細胞集団から羊膜間葉系幹細胞集団を調製するために、ステップ(B)として、前記間葉系細胞の細胞集団を、(b1)フローサイトメーターを用いて前方散乱光および側方散乱光を検出し、二次元分布図を作成し、(b2)前記二次元分布図上に、四角形の3分割ゲートを設定することにより、細胞集団を分取する。このステップにより、分化能および増殖能の異なる細胞集団を分離し、羊膜間葉系幹細胞集団を採取することが可能となる。

【0032】

「羊膜間葉系幹細胞集団」とは、羊膜間葉系幹細胞以外の細胞が実質的に分離除去された細胞集団を意味し、細胞集団のうち少なくとも80%、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上が羊膜間葉系幹細胞である細胞集団を意味する。

20

【0033】

第一発明において使用するフローサイトメーターは、特に限定されず、例えばFACS-Aria(日本BD社)、MoFlo-XP(ベックマン・コールター社)、EPICS-Altura(ベックマン・コールター社)などを用いることができる。

【0034】

第一発明の方法では、フローサイトメーターを用いて前方散乱光(Forward Scatter: FS)および側方散乱光(Side Scatter: SS)を検出することにより、二次元分布図(スキャッタグラム)を作成する。前方散乱光は、レーザー光の軸に対して前方向の小さい角度で散乱する光であり、細胞の大きさに関連して強度が変化する。すなわち、細胞のサイズが大きいほど前方散乱光の強度の値は大きくなる。一方、側方散乱光は、レーザー光の軸に対して約90度で散乱する光であり、核や顆粒などの細胞の内部構造に応じて強度が変化する。すなわち、細胞の内部密度が高いほど側方散乱光の強度の値は大きくなる。

30

【0035】

検出された前方散乱光および側方散乱光に基づいて作成されたスキャッタグラムの模式図を図2に示す。細胞集団は、スキャッタグラムにおいて、楕円で示す領域に分布して表示される。この楕円領域内に、間葉系細胞の細胞集団全体の85~95%が表示されることが好ましい。また、楕円領域は、右斜め方向に展開することが好ましい。

40

【0036】

第一発明の方法では、上記二次元分布図(スキャッタグラム)上に、四角形の3分割ゲートを設定する。このとき、四角形の3分割ゲートは、(i)側方散乱光の検出上限を右辺、側方散乱光の検出限界を左辺とし、前方散乱光の検出限界を底辺として、前記二次元分布図に示された細胞集団の5~15%が含まれるように上辺を設定した第1のゲート(ゲートS)、(ii)側方散乱光の検出上限を右辺、側方散乱光の検出限界を左辺とし、前記第1のゲートの上辺を底辺として、前記二次元分布図に示された細胞集団の35~45%が含まれるように上辺を設定した第2のゲート(ゲートM)、(iii)側方散乱光の検出上限を右辺、側方散乱光の検出限界を左辺とし、前記第2のゲートの上辺を底辺として、前記二次元分布図に示された細胞集団の35%以上が含まれるように上辺を設定し

50

た第3のゲート(ゲートL)とすることができる。特に好ましくは、上記四角形の3分割ゲートは、(i)側方散乱光の検出上限を右辺、側方散乱光の検出限界を左辺とし、前方散乱光の検出限界を底辺として、前記二次元分布図に示された細胞集団の10%が含まれるように上辺を設定した第1のゲート(ゲートS)、(ii)側方散乱光の検出上限を右辺、側方散乱光の検出限界を左辺とし、前記第1のゲートの上辺を底辺として、前記二次元分布図に示された細胞集団の40%が含まれるように上辺を設定した第2のゲート(ゲートM)、(iii)側方散乱光の検出上限を右辺、側方散乱光の検出限界を左辺とし、前記第2のゲートの上辺を底辺として、前記二次元分布図に示された細胞集団の40%以上が含まれるように上辺を設定した第3のゲート(ゲートL)とすることができる。このようにゲートを3分割することにより、羊膜間葉系幹細胞を多く含む細胞集団と、それ以外の細胞集団とを分離することが可能となる。羊膜間葉系幹細胞を多く含む細胞集団は、特に、第1のゲート(ゲートS)から高効率で得ることができる。

10

20

30

40

50

【0037】

第一発明の方法では、次に、ステップ(C)として、上記ゲートごとに分取された細胞について、継代培養を行う。ステップ(C)の継代培養は、通常の培養条件により行うことができるが、好ましくは、(c1)前記分取された細胞を $400 \sim 3500 / \text{cm}^2$ の細胞濃度において播種し、2~3日間初期培養するステップを行った後、(c2)前記初期培養の $1/500$ 以上 $1/10$ 未満、特に好ましくは $1/200$ 以上 $1/50$ 未満の細胞濃度において播種し、1週間に2回の培地交換を行う継代培養を3~4回繰り返し、(c3)前記継代培養において紡錘状の形態を有する細胞のコロニーが形成されたとき、細胞がコンフルエントになるまで同一の培養皿で培養を維持することができる。ここで、(c2)の細胞濃度が初期培養の $1/500$ 未満であると、細胞増殖不良の原因となる。また、(c2)の細胞濃度が初期培養の $1/10$ 以上であると、羊膜由来間葉系幹細胞以外の細胞が優位に増殖してしまい、羊膜由来間葉系幹細胞を得ることができない。その他の具体的な条件(培地、温度、二酸化炭素濃度など)は、特に限定されるものではなく、適宜設定することが可能である。

【0038】

また、ステップ(C)の継代培養は、成長因子(例えばbFGF、EGF、PDGF)などのサイトカインを培地に添加することにより、さらに効率よく羊膜由来間葉系幹細胞を得ることができる。

【0039】

第二発明は、(D)哺乳動物の羊膜から間葉系細胞の細胞集団を採取するステップと、(E)前記採取された細胞集団を $400 \sim 35000 / \text{cm}^2$ の細胞濃度において播種し、2~3日間初期培養するステップと、(F)前記初期培養の $1/5000$ 以上 $1/10$ 未満、特に好ましくは $1/2000$ 以上 $1/50$ 未満の細胞濃度において播種し、1週間に2回の培地交換を行う継代培養を3~4回繰り返すステップと、(G)前記継代培養において紡錘状の形態を有する細胞のコロニーが形成されたとき、細胞がコンフルエントになるまで同一の培養皿で培養を維持するステップとを含む、羊膜間葉系幹細胞を調製する方法である。すなわち、第二発明の方法では、第一発明のステップ(A)と同様の手順であるステップ(D)により哺乳動物の羊膜から間葉系細胞の細胞集団を採取した後、フローサイトメーターを用いた細胞集団の分離を行うことなく、第一発明のステップ(c1)~(c3)と同様の手順であるステップ(E)~(G)の培養を行うことにより、羊膜間葉系幹細胞集団を調製する。第二発明の培養方法の模式図を図3に示す。

【0040】

本発明は、上記第一発明の方法および/または第二発明の方法により調製された羊膜間葉系幹細胞集団を提供する。本発明に係る羊膜間葉系幹細胞集団は、羊膜間葉系幹細胞以外の細胞が実質的に分離除去された細胞集団であり、細胞集団のうち少なくとも80%、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上が羊膜間葉系幹細胞である細胞集団である。また、本発明に係る羊膜間葉系幹細胞集団は、好ましくはヒト羊膜間葉系幹細胞集団である。

【0041】

上記第一発明の方法および/または第二発明の方法により調製された羊膜間葉系幹細胞集団は、紡錘状の形態を有する細胞を含み、かつ、高い増殖能を有し、好ましくは50回以上の細胞分裂 (population doublings) が可能である。

【0042】

上記第一発明の方法および/または第二発明の方法により調製された羊膜間葉系幹細胞集団は、軟骨、骨、心筋、神経、肝臓、膵臓などへの高い分化能を有し、好ましくは軟骨、骨、心筋、肝臓への分化能を有する。また、肝硬変時に起こる肝小葉の線維化を軽減する効果を有する。

【0043】

第二発明の方法により調製された羊膜間葉系幹細胞集団は、FERM P - 22119 および FERM P - 22125 として、独立行政法人製品評価技術基盤機構に寄託されている。

【実施例】

【0044】

以下に製造例、試験例及び実施例を挙げ、本発明について更に説明する。なお、これらは本発明を何ら限定するものではない。

【0045】

< 羊膜間葉系細胞の細胞集団の調製 >

インフォームドコンセントを得たヒト妊婦を帝王切開し、ヒト羊膜を入手した。得られた羊膜から血液などを除去した後、直ちに0.03%ヒアルロニダーゼと0.025%デオキシリボヌクラーゼIが入ったリン酸塩緩衝液に浸し、手術用ハサミにより断片化した。その後、0.25% trypsin / DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 溶液中、37℃で30分間インキュベートすることにより羊膜組織断片を消化し、消化溶液をガーゼで濾過する操作を6~8回繰り返した。この工程により、羊膜組織断片からヒト羊膜上皮細胞 (Human amnion epithelial cells : HAEC) が除去される。

【0046】

HAECが取り除かれ、ガーゼに残った羊膜組織断片を、0.075%コラゲナーゼ - 0.0075% DNアーゼI / DMEM 溶液中、37℃で15分間インキュベートすることにより消化した。得られた消化溶液をガーゼで濾過し、ヒト羊膜間葉系細胞 (Human amnion mesenchymal cells : HAMC) を含む細胞集団を採取した。

【0047】

得られたHAMCは、 $1.5 \sim 2 \times 10^6 / 10 \text{ cm}$ ディッシュとなるように、10% FBS (Biosolutions 社製) - DMEM (SIGMA Aldrich Japan 社製、D5671) にて、37℃、5% CO₂ の条件下で5~6日培養した。

【0048】

< フローサイトメーターによる細胞の分取 >

培養された細胞を、0.1% trypsin - 0.008% EDTA / PBS 溶液によりディッシュから剥離回収し、10% FBS - DMEM により2回洗浄した。得られた細胞は、 $1 \times 10^7 / \text{ml}$ の濃度になるように、10% FBS - DMEM により希釈された。

【0049】

得られた細胞溶液をフローサイトメーターに供し、二次元分布図 (スキャッタグラム) を取得した。図1に示すように、細胞集団全体の90%の細胞がスキャッタグラム上で検出され、かつ、楕円形状の細胞集団がスキャッタグラム上において中心よりやや左に位置するように、前方散乱光 (Forward Scatter : FS) および側方散乱光 (Side Scatter : SS) の感度を設定した。FSおよびSSの感度は、光電子増倍管 (Photo multiplier tube , PMT) の電圧と増幅率を調節する

10

20

30

40

50

ことにより調整した。

【0050】

次いで、スキッタグラムに対し、以下の3分割ゲートを設定した。

(1)ゲートS：側方散乱光の検出上限を右辺、側方散乱光の検出限界を左辺とし、前方散乱光の検出限界を底辺として、前記二次元分布図に示された細胞集団の10%が含まれるように上辺を設定。

(2)ゲートM：側方散乱光の検出上限を右辺、側方散乱光の検出限界を左辺とし、ゲートSの上辺を底辺として、前記二次元分布図に示された細胞集団の40%が含まれるように上辺を設定。

(3)ゲートL：側方散乱光の検出上限を右辺、側方散乱光の検出限界を左辺とし、ゲートMの上辺を底辺として、前記二次元分布図に示された細胞集団の40%以上が含まれるように上辺を設定。

10

【0051】

各ゲートから分取された細胞集団は、 $2580/cm^2$ 濃度により初期培養された。(この培養を継代数(P)=1とし、それぞれ、sorted HAM-S (sHAM-S)、sorted HAM-M (sHAM-M)、sorted HAM-L (sHAM-L)とした。

【0052】

<羊膜間葉系幹細胞の調製>

sHAM-Sでは、P=1の初期培養の時点で、周囲の細胞と異なるコロニーが観察された(図5aおよび5b)。通常の培養条件で培養を行った場合に観察される上皮様細胞(図5c)とは異なり、紡錘状の細胞(図5a)や、培養神経細胞様の細胞(図5b：細胞-細胞間に大きな空間が存在し、細胞同士がネットワークを構築する)が、コロニーを形成した。

20

【0053】

また、別の培養条件として、上記「羊膜間葉系細胞の細胞集団の調製」で得られたHAM細胞を含む細胞集団を、フローサイトメーターに供することなく、低濃度条件下に継代培養を実施した。低濃度条件下による継代培養は、 $517/cm^2$ の濃度で細胞を播種し、一週間維持した後、新たなディッシュに再播種することにより行った。培地は、週に2回交換した。この継代培養を3~4回繰り返した場合にも、ゲートSから分取された細胞集団の継代培養で観察されたものと同様のコロニー形成が確認された。

30

【0054】

上記コロニーが観察された培養を、細胞がコンフルエントになるまで継続し、ヒト羊膜間葉系幹細胞集団(以下、HAMと称する)を得た。このHAMについて継代培養を継続した結果を図4に示す。HAMは、紡錘状の形態を有し(図4a~c)、50回以上の細胞分裂が可能であった(図4d)。

【0055】

<羊膜間葉系幹細胞の性質についての検討>

HAMが羊膜間葉系幹細胞の性質を有するかどうかを確認するために、種々の幹細胞マーカーに対する抗体を用いて免疫細胞化学的解析を行った。一次抗体には、抗Oct3/4 (Santa Cruz Biotechnology社製)、抗OctA (Santa Cruz Biotechnology社製)、抗c-Myc (Santa Cruz Biotechnology社製)、抗Sox2 (R&D System社製)、抗Nanog (Santa Cruz Biotechnology社製)、抗KLF4 (Santa Cruz Biotechnology社製)、抗CD44 (Abcam社製)、抗SSEA-3 (Millipore社製)、抗SSEA-4 (Millipore社製)、抗TRA-1-60 (Millipore社製)、抗TRA-1-81 (Millipore社製)を使用した。一次抗体反応は、4にて一晩行った。二次抗体反応は、ビオチン標識二次抗体(ニチレイバイオサイエンス社製)を用いて、室温にて30分を行った。その後、FITC標識ストレプトアビジン(Vector Laborato

40

50

r i e s社製)を室温にて30分反応させて染色を行った。また、核染色は、H o e c h s t 3 3 3 4 2 (同仁化学研究所製)により行った。染色した標本は、蛍光顕微鏡により観察した。

【0056】

結果を図6に示す。HAM は、O c t 3 / 4、c - M y c、S o x 2、N a n o g、S S E A - 3、S S E A - 4などの多能性幹細胞マーカーを強く発現していることが明らかになった。

【0057】

また、HAM についてF A C S解析を行った結果では、間葉系幹細胞マーカー(C D 7 3、C D 9 0、C D 1 0 5、C D 4 4)の発現が確認された。一方で、血液幹細胞マーカー(C D 3 4、C D 1 4、C D 4 5、H L A - D R)の発現は認められなかった。この結果から、HAM は間葉系の幹細胞集団であることが示された。

10

【0058】

<羊膜間葉系幹細胞の分化能の検討>

H A M の分化能について検討を行った。まず、H A M の軟骨分化能について検討を行った。2 × 1 0 ⁵個のHAM 細胞を15ml遠沈管に回収し、150gで5分間遠心分離することにより、HAM のペレットを得た。得られたHAM のペレットを、以下の4種類の培地を用いて28日間培養した。(1)ヒト間葉系幹細胞軟骨細胞分化培地キット(h M S C D i f f e r e n t i a t i o n B u l l e t K i t、C h o n d r o g e n i c社製)の基本培地、(2)基本培地に10ng/mlのr T G F - 3 (R & D S y s t e m s社製)を添加したもの、(3)基本培地に10ng/mlのr T G F - 3および500ng/mlのr B M P - 2 (A s t e l l a s P h a r m a社製)を添加したもの、(4)基本培地に500ng/mlのr B M P - 2を添加したもの。

20

【0059】

培養後の細胞を回収して得られたペレットについて、R T - P C R法により、軟骨細胞マーカー遺伝子の発現解析を行った。RNAの抽出は、R N e a s y M i c r o k i t (Q I A G E N社製)を用いて行った。R T - P C R反応は、O n e - S t e p R T - P C R k i t (Q I A G E N社製)を用いて行った。

【0060】

結果を図7に示す。分化したHAM は、軟骨細胞マーカーであるS O X 9、アグリカン、C O L 2 A 1、C O L 1 A 1を発現していた。この結果から、HAM は軟骨への分化能を有していることが明らかになった。

30

【0061】

続いて、HAM の骨分化能について検討を行った。骨分化誘導は、10% F B S - D M E Mの基本培地に、10mMのβ-グリセロリン酸二ナトリウム、50μg/mlのアスコルビン酸、100nMのデキサメタゾンを添加した分化培地中で培養することにより行った。独立したHAM 細胞集団(HAM 1~3)を上記分化培地中で3週間培養した後、培養物からRNAを抽出し、R T - P C R法により、骨形成マーカー遺伝子の発現解析を行った。

【0062】

結果を図8に示す。分化誘導を行ったHAM は、骨形成マーカーであるオステオカルシンを発現していた(図8、レーンI)。この結果から、HAM は骨への分化能を有していることが明らかになった。

40

【0063】

<羊膜間葉系幹細胞の性質についての検討・2>

H A M、s H A M - S、s H A M - Mおよびs H A M - Lについて、幹細胞マーカーに対する抗体を用いて免疫細胞化学的解析を行った。一次抗体には、抗O c t 3 / 4 (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y社製)、抗c - M y c (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y社製)、抗S o x 2 (R & D S y s t e m社製)、抗N a n o g (S a n t a C r u z B i o t e c h n o l o g y社製)、

50

抗KLF4 (Santa Cruz Biotechnology社製)、Nestin (Santa Cruz Biotechnology社製)、Musashi (Abcam社製)、抗CD44 (Abcam社製)、抗SSEA-1 (Millipore社製)、抗SSEA-3 (Millipore社製)、抗SSEA-4 (Millipore社製)、抗TRA-1-60 (Millipore社製)、抗TRA-1-81 (Millipore社製)、抗Vimentin (ダコ・ジャパン社製)を使用した。一次抗体反応は、4 にて一晩行った。二次抗体反応は、Alexa Fluor 594またはAlexa Fluor 488 標識二次抗体 (Invitrogen社製)を用いて、室温にて1時間行った。核染色は、Hoechst 33342 (同仁化学研究所製)あるいはDapi (Fluomount-G: Southern Biotech社製)により行った。染色した標本は、蛍光顕微鏡により観察した。

10

【0064】

結果を図9および図10に示す。HAM、sHAM-S、sHAM-MおよびsHAM-Lのすべてについて、Oct3/4、c-Myc、Sox2およびKLF4 (山中4因子)の顕著な発現が認められた(図9A~D)。また、HAM、sHAM-S、sHAM-MおよびsHAM-Lのすべてについて、間葉系細胞マーカーであるVimentinの強い発現が認められた(図10F)。これらの結果から、HAM、sHAM-S、sHAM-MおよびsHAM-Lは、いずれも間葉系幹細胞の集団であることが示された。特に、sHAM-Sは、M-MおよびsHAM-Lに比較して、山中4因子の発現が顕著であり、このことから、sHAM-Sが、幹細胞としての強い特性を有することが示された。また、HAM、sHAM-S、sHAM-MおよびsHAM-Lのすべてについて、神経幹細胞マーカーであるNestinおよびMusashiの発現が認められた(図9E、F)。

20

【0065】

<羊膜間葉系幹細胞の分化能の検討・2>

HAM、sHAM-SおよびsHAM-Lについて、心筋分化能の検討を行った。HAM、sHAM-SおよびsHAM-Lを、 1×10^4 個/cm²の密度になるように100mmディッシュに播種し、心筋分化培地(20%FBS-DMEMに10μMの5-アザシチジンを添加したもの)中において24時間培養した。その後、培地を20%FBS-DMEMに交換し、1週間に2回新しい20%FBS-DMEMに培地交換することにより、4週間培養した。

30

【0066】

(RNA抽出)

培養後、100mmディッシュをリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で1回洗浄し、RNA抽出用試薬(ISOGEN、和光純薬株式会社)1mLを加え、細胞溶解液を回収した。回収した細胞溶解液に0.2mLのクロロホルムを加えて混合した後、5分間、1000rpmで遠心分離した。回収した上清に、2-プロパノールを加えて混合した後、5分間、1000rpmで遠心分離した。上清を捨て、得られた沈殿物を70%エタノールによりリンスし、5分間、1000rpmで遠心分離した。上清を捨て、得られた沈殿物に滅菌水(RNase/DNaseフリー)を加え、溶解した。

40

【0067】

(RT-PCR)

cDNA合成には、TOYOBO ReverTra Aceキット(東洋紡株式会社)を使用し、以下の反応条件により行った。

- (1) 各RNA 1μgを5分間、65℃で処理し変性させた。
- (2) 緩衝液、プライマーミックス、エンザイムミックスを規定量添加した。
- (3) 15分間、37℃で処理し逆転写させた。
- (4) 5分間、95℃で処理し逆転写酵素を失活させ、反応を終了させた。

続いて、PCR反応には、QIAGEN PCR COREキット(株式会社キアゲン)を使用し、以下の反応条件により行った。

50

(1) 各 cDNA 1 μg、各 500 nM プライマー、緩衝液、dNTP を規定量混合させた。

(2) 95 °C で 1 分間処理。

(3) 95 °C で 1 分間、60 °C (または 55 °C) で 1 分間、72 °C で 1 分間の処理を 40 サイクル。

(4) 72 °C で 7 分間処理。

【0068】

得られた PCR 産物は、2% アガロース / TAE ゲルに供され、電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイドで 15 分間染色し、ルミノ・イメージアナライザー (LAS 3000 : GEヘルスケア・ジャパン株式会社) により解析した。

10

【0069】

結果を図 11 に示す。sHAM - S のみが、分化誘導前から心筋特異的転写因子である GATA 4 を発現しており、分化誘導によりその発現量が増加した。それ以外の細胞集団については、分化誘導の前後を通じて GATA 4 の発現は見られなかった。

【0070】

(免疫細胞化学染色)

HAM、sHAM - S、sHAM - M および sHAM - L の心筋組織への分化度を検討するために、心筋組織マーカーであるミオシン軽鎖に対する抗体 (抗 Myc 2、Proteintech 社製)、および心筋ミオシン重鎖に対する抗体 (抗 cardiac MHC、Abcam 社製) を用いて免疫細胞化学的解析を行った。

20

【0071】

結果を図 12 に示す。sHAM - S におけるミオシン軽鎖の発現が確認された。この結果から、sHAM - S は他の分画に比べ、心筋への分化能が高いことが示された。

【0072】

< HAM の肝硬変に対する効果 >

肝硬変モデルマウスに HAM を投与した場合の、肝硬変における線維化に対する効果について検討した。

(1) 肝硬変モデルマウスの作成

6 ~ 8 週齢の ICR マウスに、四塩化炭素 / オリーブオイル溶液 (オリーブオイル : 四塩化炭素 = 4 : 1) を腹腔内に 4 週間投与し、肝硬変モデルを作成した。

30

(2) HAM の投与

肝硬変モデルマウス一匹あたり 10^6 個の HAM を、脾臓あるいは静脈内に投与した。投与から 2 週間後、肝臓を摘出し、組織学的検討を行った。

(3) 組織標本の作成

摘出した肝臓は、4% パラホルムアルデヒド溶液にて固定後、常法により脱水し、パラフィン包埋を行った。パラフィン包埋された肝臓は、マイクロームによる薄切の後、脱パラフィンされた。脱パラフィン後のサンプルをシリウスレッドにより染色した。

(4) 画像解析

染色後の標本について、一枚の標本から無作為に 5 視野を抽出し、Image J による画像解析を実施し、その結果について統計処理を行った。

40

【0073】

結果を図 13 に示す。HAM 投与群の肝臓では、非投与群の肝臓と比較して、線維化領域の有意な減少が見られた。この結果から、HAM は肝硬変による線維化を減少させる効果があることが示された。

【0074】

< 羊膜間葉系幹細胞の分化能の検討・2 >

HAM、sHAM - S、sHAM - M および sHAM - L について、肝分化能の検討を行った。HAM、sHAM - S、sHAM - M および sHAM - L を、 3×10^4 個 / cm^2 の密度になるように、コラーゲンでコートされた 100 mm ディッシュに播種した。分化培地には、10% FBS - DMEM に 20 ng / mL の肝細胞増殖

50

因子 (HGF)、10 ng/mL の繊維芽細胞増殖因子 2 (FGF-2)、10 ng/mL のオンコスタチン M (OSM)、100 nM のデキサメタゾン (Dex)、10 units/mL のヘパリンを添加したものをを用い、3 日ごとに培地を交換して、10 日間培養した。

【0075】

(RT-PCR)

上記の方法に準じて、培養後の細胞から RNA を抽出し、RT-PCR を行った。結果を図 14 に示す。肝細胞への分化誘導前の sHAM-S および sHAM-L にはアルブミンの発現が見られないが、チトクローム 450 に対する mRNA はすべての群で発現が認められた。この結果から、HAM は肝細胞への分化能が高い間葉系細胞集団であることが示された。

10

【0076】

(免疫細胞化学染色)

HAM、sHAM-S、sHAM-M および sHAM-L の肝細胞への分化度を検討するために、免疫細胞化学的解析を行った。一次抗体には、肝細胞マーカーに対する以下の抗体：抗アルブミン抗体 (Abcam 社製)、抗 Alpha-1-antitrypsin 抗体 (Dako 社製)、抗ヒトサイトケラチン 18 (CK18) 抗体 (ダコ・ジャパン社製)、未分化細胞マーカーに対する抗体 (抗サイトケラチン 5 (CK5) ポリクローナル抗体、Convance 社製)、および、間葉系細胞マーカーに対する抗体 (抗 Vimentin、ダコ・ジャパン社製) を使用した。二次抗体には、Alexa Fluor 594 または Alexa Fluor 488 標識二次抗体 (invitrogen 社製) を使用した。核染色は、Hoechst 33342 (同仁化学研究所製) あるいは Dapi (Fluomount-G: Southern Biotech 社製) により行った。染色した標本は、蛍光顕微鏡により観察した。

20

【0077】

結果を図 15 に示す。上記の RT-PCR 解析では sHAM-L にはアルブミンの発現が見られなかったが、免疫細胞化学染色解析では強いアルブミンの発現が確認された。また、sHAM-L には、他の肝細胞マーカーである CK18 の発現も認められた。一方、sHAM-S には、いずれの肝細胞マーカーについてもわずかな発現しか見られなかった。このことから、sHAM-L が特に強い肝分化能を有する細胞集団であることが示された。

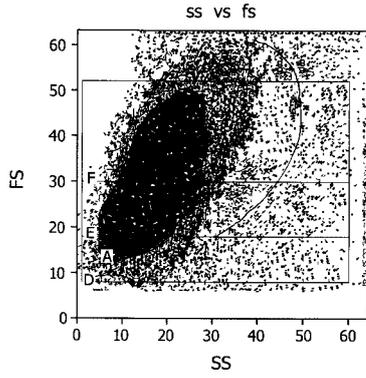
30

【産業上の利用可能性】

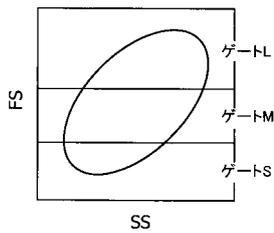
【0078】

実施例の結果より、本発明の方法は、長期間にわたり継代培養することができ、かつ、軟骨、骨、心筋および肝細胞への高い分化能を有する羊膜由来間葉系幹細胞を調製できるものであることが示された。また、本発明方法より調製した羊膜由来間葉系肝細胞には肝硬変で生じる肝臓の線維化を軽減する効果があることが明らかである。本発明は、再生医療分野などにおいて利用される羊膜由来間葉系幹細胞の効率的な調製に極めて有用な手段を提供するものである。

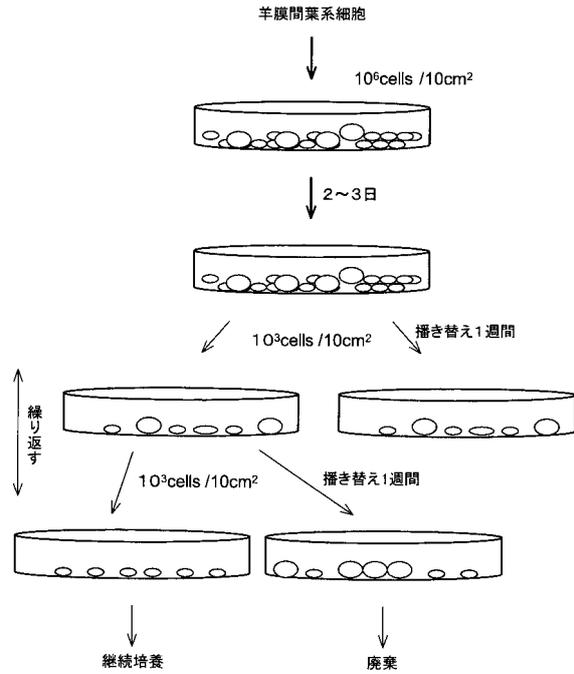
【 図 1 】



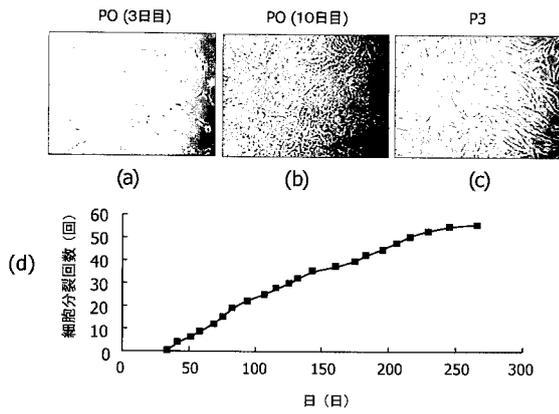
【 図 2 】



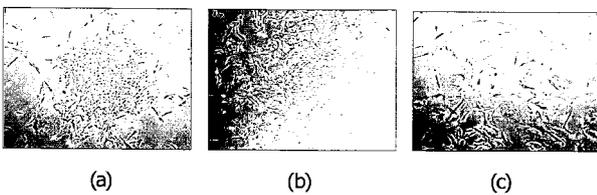
【 図 3 】



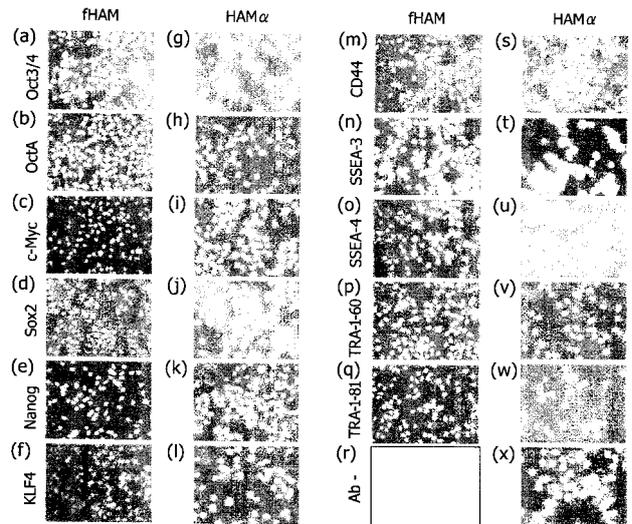
【 図 4 】



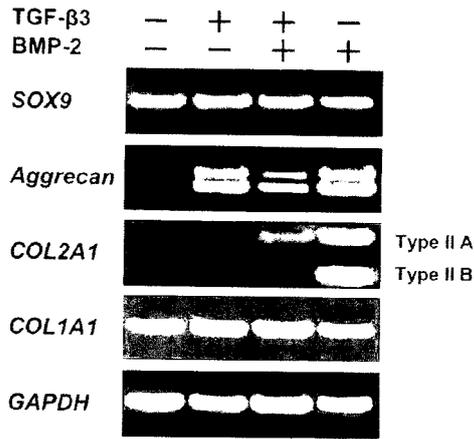
【 図 5 】



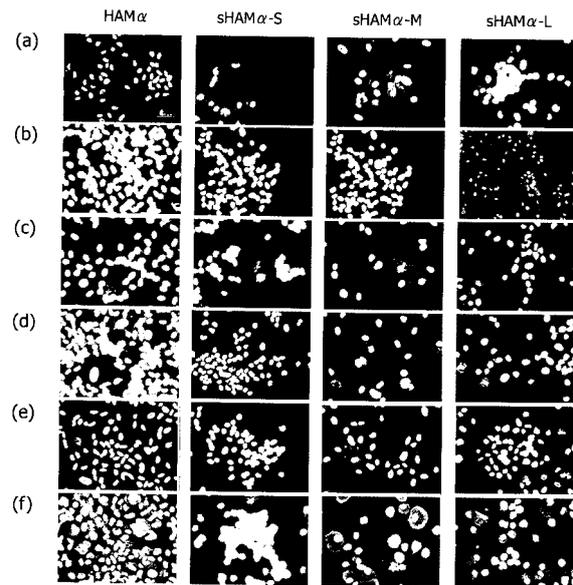
【 図 6 】



【 図 7 】

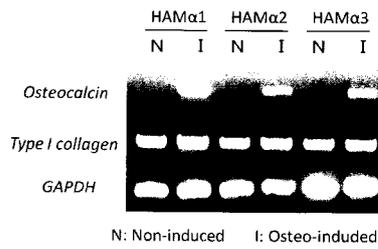


【 図 9 】

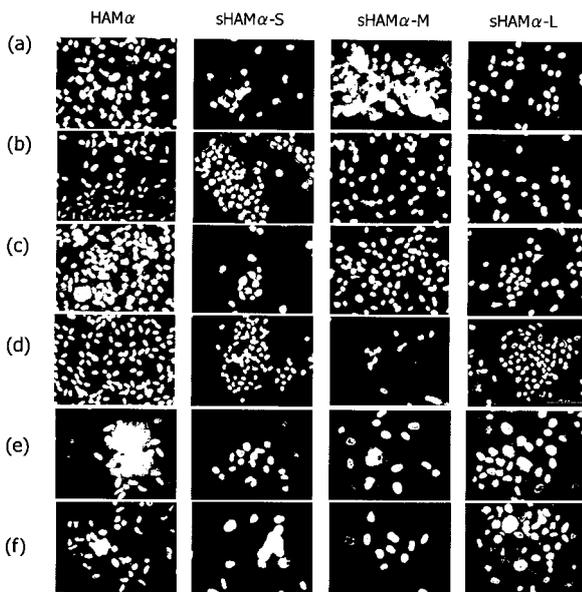


A: CD44, B: SSEA-1, C: SSEA-3, D: SSEA-4 E: Tra-1-60, F: Vimentin

【 図 8 】

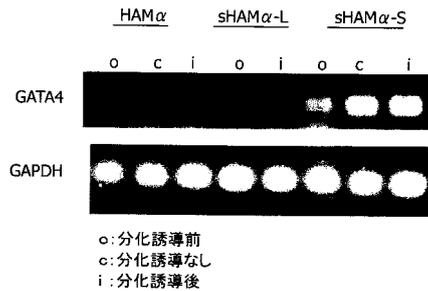


【 図 1 0 】

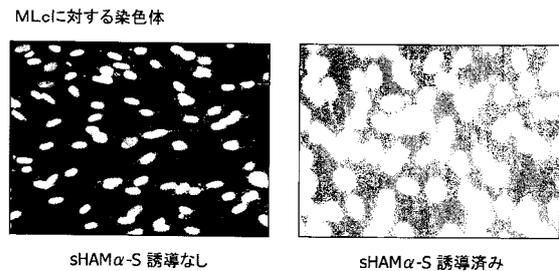


A: Oct3/4, B: Sox2, C: KLF, D: C-Myc, E: Nestin, F: Musashi

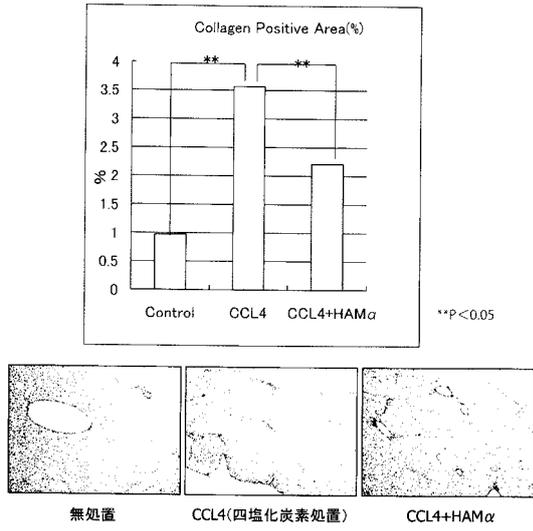
【 図 1 1 】



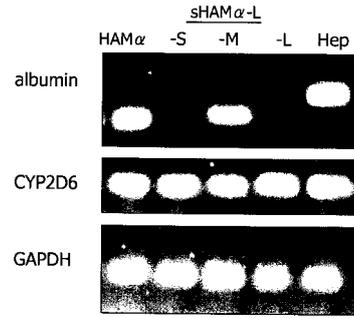
【 図 1 2 】



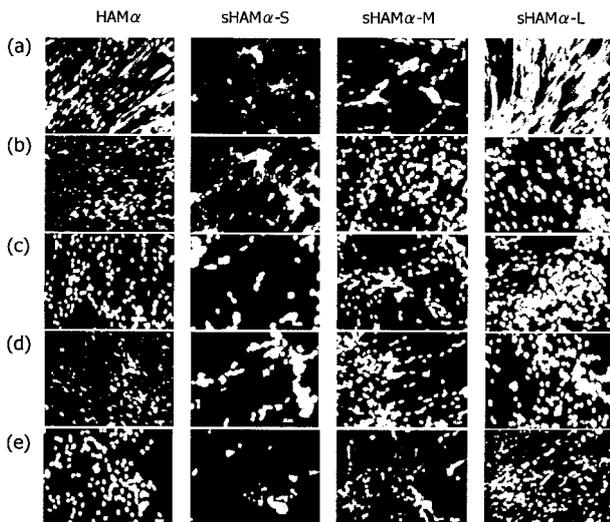
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



A: Albumin, B: α1anti trypsin, C: CK18, D: CK5, E: Vimentin

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2012/080375
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N5/0775(2010.01) i, C12N5/077(2010.01) 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) C12N1/00-7/08		
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) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	DIAZ-PRADO, S., et al., "Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane" Tissue Engineering, 2011.01, Vol.17, No.1, p.49-59	9-12/1-8
X/Y	Makiko NOGAMI et al., "Yomaku Kan'yokei Kansaibo no Tanri Dotei to Nankotsu Bunka ni Yuko na Seicho Inshi no Kento", The Journal of the Japanese Orthopaedic Association, 25 August 2011 (25.08.2011), vol.85, no.8, page S1232	9-12/1-8
X/Y	Hiroaki TSUNO et al., "Hito Yomaku Kan'yokei Saibo no Hone Saisei Iryo eno Oyo", Regenerative Medicine, 2010, vol.9, special extra issue, page 297	9-12/1-8
<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	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"
"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	
Date of the actual completion of the international search 22 January, 2013 (22.01.13)		Date of mailing of the international search report 05 February, 2013 (05.02.13)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/080375

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 2003-304867 A (Tama-TLO Ltd.), 28 October 2003 (28.10.2003), (Family: none)	1-12
Y	JP 2009-55866 A (Kinki University), 19 March 2009 (19.03.2009), (Family: none)	1-12
Y	OHNUMA, K., et al., "Sorting of cells of the same size, shape, and cell cycle stage for a single cell level assay without staining" BMC Cell Biology, 2006, Vol.7:25, p.1-12	1-12
A	JP 2003-231639 A (Sankyo Co., Ltd.), 19 August 2003 (19.08.2003), (Family: none)	1-12
A	Chika KOIKE et al., "Yomaku Yurai Saibo", HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY, 2009, vol.16, no.3, pages 57 to 64	1-12
A	DIAZ-PRADO, S., et al., "Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrane" J.Cell. Biochem., 2010, Vol.111, p.846-857	1-12
A	Hiroaki TSUNO et al., "Hito Yomaku Kan'yokei Saibo no Gakukotsu Saisei Iryo eno Oyo ni Tsuite no Kento", Regenerative Medicine, 2009, Vol.8, special extra issue, page 234	1-12

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2012/080375									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/0775(2010.01)i, C12N5/077(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. C12N1/00 - 7/08											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2013年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2013年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2013年</td> </tr> </table>				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
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										
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)											
C. 関連すると認められる文献											
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号									
X/Y	DIAZ-PRADO, S., et al., " Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human amniotic membrane" Tissue Engineering, 2011.01, Vol.17, No.1, p.49-59	9-12/1-8									
X/Y	野上真紀子、他、「羊膜間葉系幹細胞の単離・同定と軟骨分化に有効な成長因子の検討」 日本整形外科薬器雑誌, 2011.08.25, Vol.85, No.8, p.S1232	9-12/1-8									
X/Y	津野宏彰、他、「ヒト羊膜間葉系細胞の骨再生医療への応用」 再生	9-12/1-8									
<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 22.01.2013		国際調査報告の発送日 05.02.2013									
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) 水落 登希子	4 B 3 5 4 1								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3448									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 2 / 0 8 0 3 7 5
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
	医療, 2010, Vol.9, 増刊号, p.297	
Y	JP 2003-304867 A (タマティーエルオー株式会社) 2003.10.28, (ファミリーなし)	1-12
Y	JP 2009-55866 A (学校法人近畿大学) 2009.03.19, (ファミリーなし)	1-12
Y	OHNUMA, K., et al., "Sorting of cells of the same size, shape, and cell cycle stage for a single cell level assay without staining" BMC Cell Biology, 2006, Vol.7:25, p.1-12	1-12
A	JP 2003-231639 A (三共株式会社) 2003.08.19, (ファミリーなし)	1-12
A	小池千加、他、「羊膜由来細胞」 HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY, 2009, Vol.16, No.3, p.57-64	1-12
A	DIAZ-PRADO, S., et al., "Multilineage differentiation potential of cells isolated from the human amniotic membrnae" J.Cell. Biochem., 2010, Vol.111, p.846-857	1-12
A	津野宏彰、他、「ヒト羊膜間葉系細胞の顎骨再生医療への応用についての検討」 再生医療, 2009, Vol.8, 増刊号, p.234	1-12

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, 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 吉田 淑子
富山県富山市杉谷 2 6 3 0 国立大学法人富山大学内

(72) 発明者 岡部 素典
富山県富山市杉谷 2 6 3 0 国立大学法人富山大学内

(72) 発明者 小池 千加
富山県富山市杉谷 2 6 3 0 国立大学法人富山大学内

(72) 発明者 野上 真紀子
富山県富山市杉谷 2 6 3 0 国立大学法人富山大学内

(72) 発明者 木村 友厚
富山県富山市杉谷 2 6 3 0 国立大学法人富山大学内

(72) 発明者 野口 誠
富山県富山市杉谷 2 6 3 0 国立大学法人富山大学内

(72) 発明者 津野 宏彰
富山県富山市杉谷 2 6 3 0 国立大学法人富山大学内

(72) 発明者 竹田 裕治
富山県富山市杉谷 2 6 3 0 国立大学法人富山大学内

Fターム(参考) 4B065 AA93X AC20 BA21 BC50 BD14 CA44
4C081 AB02 BA17 EA13

(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。