

(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
2021年12月2日(02.12.2021)



(10) 国際公開番号

WO 2021/241524 A1

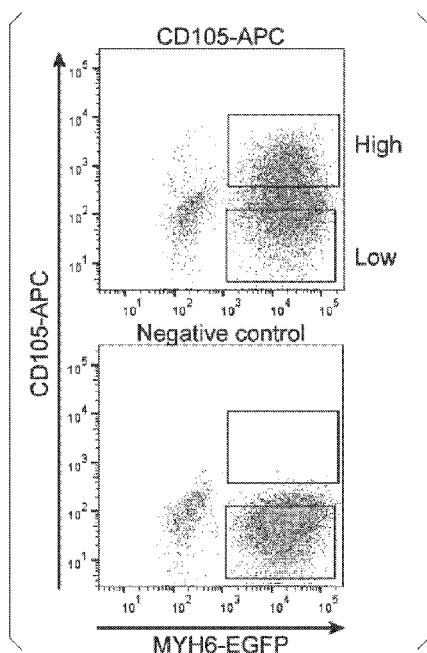
- (51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2021/019678
- (22) 国際出願日: 2021年5月24日(24.05.2021)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
63/029,564 2020年5月25日(25.05.2020) US
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学 (KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 吉田 善紀 (YOSHIDA Yoshinori); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 大久保 周子 (OKUBO Chikako); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).

- (74) 代理人: 棚井 澄雄, 外 (TANAI Sumio et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目9番2号 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ,

(54) Title: METHOD FOR SELECTING CARDIOMYOCYTES HAVING HIGH PROLIFERATION ABILITY

(54) 発明の名称: 増殖能が高い心筋細胞を選別する方法

[図5]



(57) Abstract: A method for producing cardiomyocytes that comprises a step for collecting cardiomyocytes highly expressing CD105 from a population of cardiomyocytes and a step for extensively culturing the cardiomyocytes thus collected.

(57) 要約: 心筋細胞集団から、CD105を高発現する心筋細胞を回収する工程と、回収した前記心筋細胞を拡大培養する工程と、を含む、心筋細胞の製造方法。

[続葉有]

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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類：

- 一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明 細 書

発明の名称： 増殖能が高い心筋細胞を選別する方法

技術分野

[0001] 本発明は、増殖能が高い心筋細胞を選別する方法に関する。より具体的には、本発明は、心筋細胞集団から増殖能が高い心筋細胞を選別する方法、心筋細胞集団から細胞周期が活性化している心筋細胞を選別する方法、心筋細胞の製造方法及び心臓組織の製造方法に関する。本願は、2020年5月25日に米国に仮出願された米国特許出願第63／029, 564号明細書に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 心機能が著しく低下した患者にとって、多くの場合、心臓移植が唯一の治療の選択肢である。しかしながら、ドナーの心臓は慢性的に不足している。このため、心臓移植に代わる治療法が求められている。心臓細胞治療は、心臓移植に代わる治療法の1つとして期待されている。

[0003] しかしながら、成体の心臓組織の心筋細胞は増殖能を有さず、インビトロで分化誘導した心筋細胞も培養を続けることにより増殖能を失うことが知られている。そこで、心筋細胞の増殖能を上昇させる技術の開発が活発に行われている（例えば、非特許文献1を参照。）

[0004] ところで、転写因子であるHAND1及びHAND2をコードする遺伝子のノックアウトマウスは、それぞれ、左心室及び右心室の形成不全を示すことが知られている。しかしながら、ヒトの心臓発生におけるこれらの転写因子の機能及び発現は十分に解明されていない。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Mohamed T. M. A., et al. Regulation of Cell Cycle to Stimulate Adult Cardiomyocyte Proliferation and Cardiac Regeneration, Cell, 173 (1), 104-116, 2018.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 非特許文献1の方法では、心筋細胞の増殖能を上昇させるために、遺伝子導入により、心筋細胞に、*cyclin-dependent kinase 1* (CDK1)、CDK4、*cyclin B1*及び*cyclin D1*を過剰発現させる必要がある。そこで、本発明は、遺伝子導入を行うことなく、増殖能が高い心筋細胞を得る技術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

[0007] 本発明は以下の態様を含む。

[1] 心筋細胞集団から、CD105を高発現する心筋細胞を回収する工程と、回収した前記心筋細胞を拡大培養する工程と、を含む、心筋細胞の製造方法。

[2] 心筋細胞集団から、CD105を高発現する心筋細胞を回収する工程と、回収した前記心筋細胞を培養して心臓組織を作製する工程と、を含む、心臓組織の製造方法。

[3] 前記心筋細胞集団が多能性幹細胞由来である、[1]又は[2]に記載の製造方法。

[4] 前記多能性幹細胞がヒトiPS細胞である、[3]に記載の製造方法。

[5] 心筋細胞集団から増殖能が高い心筋細胞を選別する方法であって、前記心筋細胞集団から、CD105を高発現する心筋細胞を選別する工程を含む方法。

[6] 心筋細胞集団から細胞周期が活性化している心筋細胞を選別する方法であって、前記心筋細胞集団から、CD105を高発現する心筋細胞を選別する工程を含む方法。

[7] 前記心筋細胞集団が多能性幹細胞由来である、[5]又は[6]に記載の方法。

[8] 前記多能性幹細胞がヒトiPS細胞である、[7]に記載の方法。

[0008] 本発明は以下の態様を含むものであるということもできる。

[P 1] 多能性幹細胞由来の心筋細胞集団から増殖能が高い心筋細胞を選別する方法であって、前記心筋細胞集団から、CD 105を高発現する心筋細胞を選別する工程を含み、選別した前記心筋細胞が増殖能が高い心筋細胞である、方法。

[P 2] 多能性幹細胞由来の心筋細胞集団から細胞周期が活性化している心筋細胞を選別する方法であって、前記心筋細胞集団から、CD 105を高発現する心筋細胞を選別する工程を含み、選別した前記心筋細胞が、細胞周期が活性化している心筋細胞である、方法。

[P 3] 多能性幹細胞由来の心筋細胞の成熟度を判定する方法であって、前記心筋細胞のCD 105の発現量を測定する工程を含み、前記発現量が対照と比較して高いことが、前記心筋細胞の細胞周期が活性化していて心筋細胞としての成熟度が低いことを示し、前記発現量が対照と比較して低いことが、前記心筋細胞の細胞周期の活性化が認められず心筋細胞としての成熟度が高いことを示す、方法。

[P 4] 心疾患の治療方法であって、多能性幹細胞由来の心筋細胞集団から、CD 105を高発現する心筋細胞又はCD 105を低発現する心筋細胞を回収する工程と、回収した前記心筋細胞を患者の心臓に移植する工程であって、増殖能が高い心筋細胞又は細胞周期が活性化していて心筋細胞としての成熟度が低い心筋細胞を移植することが必要な患者には、CD 105を高発現する前記心筋細胞を移植し、細胞周期の活性化が認められず心筋細胞としての成熟度が高い心筋細胞を移植することが必要な患者には、CD 105を低発現する前記心筋細胞を移植する工程と、を含む、治療方法。

[P 5] 多能性幹細胞由来の心筋細胞集団から、CD 105を高発現する心筋細胞を回収する工程と、回収した前記心筋細胞をインビトロで拡大培養する工程と、を含む、心筋細胞を大量に製造する方法。

[P 6] 多能性幹細胞由来の心筋細胞集団から、細胞周期が活性化した心筋細胞を回収する工程と、回収した前記心筋細胞を培養して心臓組織を作製す

る工程と、を含み、前記細胞周期が活性化した心筋細胞は、CD105を高発現する心筋細胞である、心臓組織を高効率に製造する方法。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、遺伝子導入を行うことなく、増殖能が高い心筋細胞を得る技術を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、実験例1における、HAND1-mCherryレポーターhiPSCの作製の概要を説明する模式図である。

[図2]図2は、実験例1における、HAND2-EGFPレポーターhiPSCの作製の概要を説明する模式図である。

[図3]図3は、実験例2で使用した、MYH6-iRFP670トランスポゾンベクターの構造を示す模式図である。

[図4]図4は、実験例4の結果を示すヒートマップである。

[図5]図5は、実験例5におけるフローサイトメーター解析（FACS解析）の結果を示すグラフである。横軸はEGFPの蛍光強度を示し、縦軸はAPCの蛍光強度を示す。図中、「High」はMYH6-EGFP陽性細胞かつCD105-APC高発現心筋細胞を指定し、「Low」はMYH6-EGFP陽性細胞かつCD105-APC低発現心筋細胞を指定する。

[図6]図6は、実験例5におけるEdUアッセイの結果を示すグラフである。図中、「High」はCD105高発現心筋細胞の結果であることを示し、「Low」はCD105低発現心筋細胞の結果であることを示す。縦軸はEdU陽性細胞の割合を示す。

[図7]図7は、実験例6におけるEdUアッセイの結果を示すグラフである。図中、「High」はCD105高発現心筋細胞の結果であることを示し、「Low」はCD105低発現心筋細胞の結果であることを示す。縦軸はEdU陽性細胞の割合を示す。

[図8]図8は、実験例6におけるEdUアッセイの結果を示すグラフである。図中、「High」はCD105高発現心筋細胞の結果であることを示し、

「Low」はCD105低発現心筋細胞の結果であることを示す。縦軸はEdU陽性細胞の割合を示す。

[図9]図9は、実験例7における定量的リアルタイムPCRの結果を示すグラフである。図中、「High」はCD105高発現心筋細胞の結果であることを示し、「Low」はCD105低発現心筋細胞の結果であることを示す。図中、縦軸は、GAPDH遺伝子の発現量を内部コントロールとしてddCt法によりCD105低発現心筋細胞のHAND1遺伝子の発現量を1とした相対値を示す。

[図10]図10は、実験例8における定量的リアルタイムPCRの結果を示すグラフである。図中、「High」はCD105高発現心筋細胞の結果であることを示し、「Low」はCD105低発現心筋細胞の結果であることを示す。図中、縦軸は、GAPDH遺伝子の発現量を内部コントロールとしてddCt法によりCD105低発現心筋細胞のHAND1遺伝子の発現量を1とした相対値を示す。

[図11]図11は、実験例8における定量的リアルタイムPCRの結果を示すグラフである。図中、「High」はCD105高発現心筋細胞の結果であることを示し、「Low」はCD105低発現心筋細胞の結果であることを示す。図中、縦軸は、GAPDH遺伝子の発現量を内部コントロールとしてddCt法によりCD105低発現心筋細胞のHAND1遺伝子の発現量を1とした相対値を示す。

発明を実施するための形態

[0011] 本明細書において、陽性であることを「+」、陰性であることを「-」と表記する場合がある。また、陽性であるとは、細胞における対象遺伝子又は対象タンパク質の発現量が高いこと、あるいは、所定の条件下で細胞が染色される程度が高いことを意味する。また、陰性であるとは、細胞における対象遺伝子又は対象タンパク質の発現量が低いこと、あるいは、所定の条件下で細胞が染色される程度が低いことを意味する。

[0012] [増殖能が高い心筋細胞を選別する方法]

1 実施形態において、本発明は、心筋細胞集団から増殖能が高い心筋細胞を選別する方法であって、前記心筋細胞集団から、CD105を高発現する心筋細胞を選別する工程を含む方法を提供する。選別した前記心筋細胞が、増殖能が高い心筋細胞である。

[0013] 本実施形態の方法によれば、心筋細胞に遺伝子導入を行うことなく、増殖能が高い心筋細胞を選別することができる。遺伝子導入を行わないため、ヒトに移植することが可能な安全な心筋細胞を容易に得ることができる。本実施形態の方法により選別し、回収した心筋細胞は、生物学的メカニズムの解明や再生医療分野における細胞移植治療等に利用することができる。

[0014] 本実施形態の方法は、心筋細胞集団から増殖能を有する心筋細胞を選別する方法、心筋細胞集団から細胞周期が活性化している心筋細胞を選別する方法等といいかえることができる。

[0015] 本実施形態の方法において、心筋細胞集団は、生体由来の心筋細胞集団であってもよいし、多能性幹細胞から分化誘導して得られたものであってもよい。心筋細胞集団には、増殖能が高い心筋細胞、増殖能が低い心筋細胞、増殖能を失った心筋細胞等が含まれる。多能性幹細胞を心筋細胞に分化誘導する方法は特に限定されず、当技術分野において通常行われる方法であってよい。多能性幹細胞としては、ヒト由来の細胞であることが好ましく、胚性幹細胞（ESC）、人工多能性幹細胞（iPSC）等が挙げられる。多能性幹細胞から分化誘導した細胞集団の場合、例えば分化誘導開始から、8日目、9日目、10日目、11日目、12日目、13日目、14日目、15日目、16日目、17日目、18日目、19日目、20日目、21日目、22日目、23日目、24日目、25日目、26日目、27日目、28日目、29日目、30日目、40日目、50日目のものが用いられる。

[0016] 心筋細胞の増殖能が高い、心筋細胞が増殖能を有する、あるいは、心筋細胞の細胞周期が活性化しているとは、例えば、心筋細胞の新生DNA合成量が、対照細胞と比較して1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4

倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3.0倍、4.0倍、5.0倍、6.0倍、7.0倍、8.0倍、9.0倍、10.0倍高いことであってもよいし、心筋細胞の細胞増殖量が対照細胞と比較して1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3.0倍、4.0倍、5.0倍、6.0倍、7.0倍、8.0倍、9.0倍、10.0倍高いことであってもよい。ここで、対照細胞としては、細胞増殖能が低いことが予め明らかとなっている細胞を用いることができ、例えば、成体の心臓組織由来の心筋細胞、CD105の発現量が低い心筋細胞等が挙げられる。

[0017] 新生DNA合成量は、例えば、ヌクレオシドアナログであるEdU（5-エチニル-2'-デオキシウリジン）のDNAへの取り込みを測定する、EdUアッセイ等により測定することができる。

[0018] CD105は、ENG遺伝子にコードされる細胞膜表面タンパク質の1種である。以下、ENG遺伝子のことをCD105遺伝子という場合がある。ヒトCD105タンパク質のNCBIアクセッション番号は、NP_000110.1、NP_001108225.1、NP_001265067.1等である。また、ヒトCD105遺伝子のmRNAのNCBIアクセッション番号は、NM_000118.3、NM_001114753.3、NM_001278138.2等である。

[0019] CD105の発現量が低い、あるいは、CD105を低発現するとは、例えば、抗CD105抗体で染色していない心筋細胞と比較して、抗CD105抗体による染色の程度が同程度であることであってもよい。

[0020] また、CD105の発現量が高い、あるいは、CD105を高発現するとは、対照細胞と比較して、mRNAレベル又はタンパク質レベルにおけるCD105の発現量が有意に高いことであってもよいし、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8

倍、2.9倍、3.0倍、4.0倍、5.0倍、6.0倍、7.0倍、8.0倍、9.0倍、10.0倍高いことであってもよい。ここで対照細胞としては、細胞増殖能が低いことが予め明らかとなっている細胞を用いることができ、上述したものと同様である。

[0021] CD105の遺伝子レベルでの発現量は、例えば定量的リアルタイムPCR等により測定することができる。また、CD105のタンパク質レベルでの発現量は、例えば、蛍光標識した抗CD105抗体による細胞染色及びフローサイトメーター解析（FACS解析）等により測定することができる。

[0022] 本実施形態の方法において、CD105を高発現する心筋細胞を選別する工程は、例えば、抗CD105抗体で心筋細胞集団を染色し、フローサイトメーター等で解析することにより行うことができる。また、フローサイトメーターのソーティング機能を用いて、増殖能が高い心筋細胞を回収してもよい。

[0023] 実施例において後述するように、発明者らは、HAND1、HAND2及びMYH6の3つのレポーター遺伝子を発現するヒト人工多能性幹細胞（hiPSC）を樹立し、心筋細胞の分化におけるこれらの遺伝子の発現を解析した。RNAシーケンス（RNA-seq）及びEdU解析の結果、HAND1の発現は細胞増殖と相関することが明らかとなった。更に、発明者らは、HAND1陽性細胞特異的に発現する細胞表面タンパク質に着目し、CD105を同定した。したがって、CD105は、増殖性心筋細胞の新規マーカーであるということができる。

[0024] 現在までにhiPSC由来心筋細胞の中から増殖能を示す心筋細胞を分離する技術は知られていない。本実施形態の方法により、遺伝子導入を行うことなく、増殖能が高い心筋細胞を簡便に得ることができる。

[0025] [心筋細胞の製造方法]

1 実施形態において、本発明は、心筋細胞集団から、CD105を高発現する心筋細胞を回収する工程と、回収した前記心筋細胞をインビトロで拡大培養する工程とを含む、心筋細胞の製造方法を提供する。

[0026] 本実施形態の方法において、心筋細胞集団については、上述したものと同様である。また、心筋細胞集団から、CD105を高発現する心筋細胞を回収する工程は、上述した方法と同様にして行うことができる。より具体的には、抗CD105抗体で心筋細胞集団を染色し、例えば、フローサイトメーターのソーティング機能を用いて、増殖能が高い心筋細胞を回収することができる。あるいは、抗CD105抗体を結合させた磁気ビーズを心筋細胞集団に接触させた後、磁気ビーズに結合した細胞をマグネティックスタンドで回収することにより、CD105を高発現する心筋細胞を回収してもよい。

[0027] 続いて、回収した心筋細胞をインビトロで拡大培養する。実施例において後述するように、CD105を高発現する心筋細胞は増殖能を有する。このため、培養することにより増殖させ、細胞数を増加させることができる。この結果、心筋細胞を大量に調製することができる。ここで、大量に調製するとは、培養開始時の心筋細胞の細胞数を、例えば1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、3.0倍、4.0倍、5.0倍、6.0倍、7.0倍、8.0倍、9.0倍、10.0倍に増殖させることであってよい。

[0028] 本実施形態の方法は、心筋細胞を増殖させる方法、心筋細胞を大量に培養する方法等といいかえることができる。

[0029] [心臓組織の製造方法]

1 実施形態において、本発明は、心筋細胞集団から、CD105を高発現する心筋細胞を回収する工程と、回収した前記心筋細胞を培養して心臓組織を作製する工程と、を含む、心臓組織の製造方法を提供する。

[0030] 本実施形態の方法において、心筋細胞集団については、上述したものと同様である。また、心筋細胞集団から、CD105を高発現する心筋細胞を回収する工程についても上述したものと同様である。

[0031] 続いて、回収した心筋細胞を培養して心臓組織を作製する。心臓組織の作製は、例えば、培養皿上に心筋細胞を密に播種し単層培養し、続いて、単層

培養した培養物を積層し、多層の心筋シートとする方法、3Dプリンターを用いて心筋細胞を配置する方法等により行うことができる。

[0032] [その他の実施形態]

1実施形態において、本発明は、心疾患の治療方法であって、CD105を高発現する心筋細胞の有効量を、それを必要とする対象の心臓に移植する工程とを含む、治療方法を提供する。CD105を高発現する心筋細胞は、遺伝子導入することなく、ヒト多能性幹細胞由来の心筋細胞集団から、選別及び回収された細胞であることが好ましい。

[0033] 1実施形態において、本発明は、心疾患の治療における使用のためのCD105を高発現する心筋細胞を提供する。本実施形態の心筋細胞は、細胞医薬として製剤化されていることが好ましい。また、遺伝子導入することなく、ヒト多能性幹細胞由来の心筋細胞集団から、選別及び回収された細胞であることが好ましい。

[0034] 1実施形態において、本発明は、心疾患治療用細胞医薬の製造におけるCD105を高発現する心筋細胞の使用を提供する。CD105を高発現する心筋細胞は、遺伝子導入することなく、ヒト多能性幹細胞由来の心筋細胞集団から、選別及び回収された細胞であることが好ましい。

実施例

[0035] 次に実施例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0036] [材料及び方法]

(hiPSCの培養及び心筋細胞への分化誘導)

hiPSCは、4ng/mL bFGF（カタログ番号「#060-04543」、富士フイルム和光純薬）を添加した霊長類ES細胞培地（カタログ番号「#RCHEMD001」、リプロセル）中、SNLフィーダー細胞上で培養した。

[0037] 全ての分化培地はStemPro34培地（カタログ番号「#10640-019」、サーモフィッシャーサイエンティフィック）及びサプリメント

(カタログ番号「# 1 0 6 4 1 - 0 2 5」、サーモフィッシャーサイエンティフィック) をベースとし、 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ アスコルビン酸 (カタログ番号「# A 4 5 4 4 - 2 5 G」、シグマ)、 2 mM L-グルタミン (カタログ番号「# 2 5 0 3 0 1 6 4」、サーモフィッシャーサイエンティフィック)、 $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ トランスフェリン (カタログ番号「# 1 0 6 5 2 2 0 2 0 0 1」、シグマ)、 $4 \times 10^{-4} \text{ M}$ モノチオグリセロール (カタログ番号「# M 6 1 4 5 - 2 5 M L」、シグマ) 及び 0.5% ペニシリン/ストレプトマイシン (カタログ番号「# 1 5 1 4 0 - 1 2 2」、サーモフィッシャーサイエンティフィック) を含むものであった。

[0038] 分化誘導の0日目に、Accumax (カタログ番号「# AM-105」、Innovative Cell Technologies) で 37°C 、5分間処理してhiPSCを単一細胞に解離した。

[0039] 続いて、細胞をピペティングし、 6 mL のIMDM ($1\times$) (カタログ番号「# 1 2 4 4 0 - 0 5 3」、サーモフィッシャーサイエンティフィック) と共に 15 mL チューブに集めた。続いて、チューブを 800 rpm で5分間遠心し、ペレットを、 $10 \mu\text{M}$ Y-27632 (カタログ番号「# 0 3 6 - 2 4 0 2 3」、富士フイルム和光純薬)、 $2 \text{ ng}/\text{mL}$ BMP4 (カタログ番号「# 3 1 4 - B P」、R&D Systems) 及びマトリゲルを含む培地 (0日目培地) で懸濁し、Hema (カタログ番号「# P 3 9 3 2 - 2 5 G」、シグマ) コートした96ウェルラウンドボトムプレートに 2×10^4 個/ウェルの細胞密度で播種し、凝集させた。

[0040] 分化誘導の1日目に、0日目培地に、 $12 \text{ ng}/\text{mL}$ ヒト組換えアクチビンA (カタログ番号「# 3 3 8 - A C - 5 0 0」、R&D Systems)、 $18 \text{ ng}/\text{mL}$ BMP4、 $10 \text{ ng}/\text{mL}$ bFGF (カタログ番号「# 2 3 3 - F B」、R&D Systems) を添加した。

[0041] 分化誘導の3日目に、胚葉体を 15 mL チューブに集め、Accumaxで解離し、 6 mL のIMDMで洗浄して遠心した。続いて、 $10 \text{ ng}/\text{mL}$ VEGF (カタログ番号「# 2 9 3 - V E」、R&D Systems)

及び1 μ M IWP-3（カタログ番号「#04-0035」、Stemgent）を含む分化培地中で4日間培養し、再び胚葉体を形成した。

[0042] 分化誘導の7日目に、胚葉体を、5 ng/mLのVEGFを含む分化培地中、Hemaでコートした6ウェルプレートに集めた。続いて、20日目まで、培地を2～3日ごとに交換した。分化誘導中、0～12日目は、細胞は低酸素条件下（5%O₂）で培養した。続いて、12日目に、プレートを通常酸素条件下に移した。

[0043] （RNA抽出及び定量的リアルタイムPCR）

QIAzol試薬及びmiRNeasy Micro Kit（カタログ番号「#217084」、キアゲン）を用いてRNAを精製した。続いて、ReverTra Ace（R）（カタログ番号「#TRT-101」、東洋紡）及びポリTプライマー、又は、ReverTra Ace（R）qPCR RT Master Mix with gDNA Remover（カタログ番号「#FSQ-301」、東洋紡）を用いてcDNAを合成した。

[0044] HAND1遺伝子は、TaqManプローブ（カタログ番号「#4331182」、Hs02330376_m1、サーモフィッシャーサイエンティフィック）及びTaqMan™ Universal Master Mix II, with UNG（カタログ番号「#4440044」、サーモフィッシャーサイエンティフィック）を用いて増幅し、StepOne（カタログ番号「#4376374」、サーモフィッシャーサイエンティフィック）を用いてリアルタイム定量的PCR解析を行った。

[0045] 遺伝子発現レベルはGAPDH遺伝子（カタログ番号「#4331182」、Hs99999905_m1、サーモフィッシャーサイエンティフィック）又はACTB遺伝子（カタログ番号「#4331182」、Hs0035733_g1、サーモフィッシャーサイエンティフィック）を内部コントロールに用いてddCt法により推定した。qPCRの結果の統計的解析は、Prism7（GraphPad）を用いてウェルチ検定により行った。

[0046] (RNA抽出、RNAシーケンス及び解析)

分化誘導開始から20日目の細胞から、心筋細胞をFACSにより分取し、miRNeasy Micro Kit with RNase-Free DNase Set (カタログ番号「#79254」、キアゲン)を用いて全RNAを抽出及び精製した。

[0047] 続いて、200 μ gのRNAを使用して、TruSeq Stranded total RNA with Ribo-Zero Gold LT Sample Prep Kit (カタログ番号「#20020598」、イルミナ)及びTruSeq RNA Single Indexes Set A and B (カタログ番号「#20020492」及び「#20020493」、イルミナ)を用いてライブラリを作製した。

[0048] シーケンスはNextSeq 500/550 High Output Kit v2 (75 Cycles) (カタログ番号「#20024906」、イルミナ)を用いて行った。

[0049] 続いて、cutadapt-1.15を用いて、リードからアダプター配列を除去し、20bp未満のリードは廃棄した。続いて、bowtie2 (ver. 2.2.2.5)を用いて、アダプター配列を除去したリードをヒトリボソーマルRNA及びトランスファーRNAにマップした。続いて、samtools及びbam2fastqを用いて、マップされなかったbamファイルを抽出し、fastqファイルに翻訳した。

[0050] 続いて、STAR (ver. 2.5.4a)を用いて、UCSC Genome BrowserからダウンロードしたGRCh38ヒトリファレンスゲノムにfastqファイルをアラインした。

[0051] リードのカウント及び正規化は、HTSeq (ver. 0.9.1)、DESeq2 (Rパッケージ)及びR-3.6.1のiGenomeのgtfファイルを使用して行った。また、Pheatmap (Rパッケージ)により、「原形質膜の外側」(GO:0009897)にリストされ、尤度比検定、調整P値<0.05によって4つのサブポピュレーションで差次的に発

現されることが示された遺伝子の発現レベルのヒートマップを作成した。

[0052] (抗CD105抗体を用いた増殖性／非増殖性心筋細胞のソーティング)

心筋細胞のレポーター（例えば、MYH6-EGFP）を有するhiPSCから得られた胚葉体を、まず、コラゲナーゼタイプI（カタログ番号「#C-0130」、シグマ）で6～12時間処理し、15mLチューブに集めた。

[0053] 続いて、コラゲナーゼを除去し、1～2mLのAccumaxを添加した。37℃で15分間インキュベートした後、胚葉体を穏やかにピペティングして解離した。続いて、15mLチューブに6mLのIMDMを添加し、800rpmで5分間遠心した。上清を除去した後、細胞をFACSバッファー（5%FBS-PBS）で1：50に希釈した抗CD105抗体（カタログ番号「#130-099-125」、ミルテニーバイオテック）に懸濁し、室温で30分間インキュベートして染色した。

[0054] 続いて、FACSバッファーで2回洗浄した後、細胞を、DNase（カタログ番号「#260913」、カルビオケム）及びDAPI（カタログ番号「#D1306」、サーモフィッシャーサイエンティフィック）を含むFACSバッファーに懸濁した。

[0055] 続いて、懸濁した細胞をフィルターに通し、5mL FACSチューブに入れ、FACS AriaII（ベクトン・ディッキンソン）を用いて細胞をソーティングした。まず、DAPI陽性細胞を除去し、続いて、EGFP陽性のCD105^{high}又はCD105^{low}心筋細胞を、それぞれ、増殖性心筋細胞及び非増殖性心筋細胞として単離した。

[0056] (EdUアッセイ)

Click-iT (R) EdU Flow Cytometry Assay Kits（カタログ番号「#C10418」、サーモフィッシャーサイエンティフィック）を使用してEdUアッセイを行った。

[0057] ソートした心筋細胞をフィブロネクチン（カタログ番号「#F4759-5MG」、シグマ）コートした6ウェルプレート又は12ウェルプレートに

、それぞれ 6×10^5 個／ウェル又は 2×10^5 個／ウェルで播種した。続いて、2日後に $1 \mu\text{M}$ のEdUを添加して18時間インキュベートし、説明書にしたがってアッセイを行った。

[0058] [実験例1]

(HAND1-mCherry/HAND2-EGFPダブルレポーターhiPSCの樹立)

CRISPR/Cas9システムを使用してダブルレポーターhiPSCを樹立した。まず、HAND1遺伝子及びHAND2遺伝子の終止コドンの近傍に、それぞれガイドRNA (gRNA) を設計した。続いて、各gRNAをpHL-H1-ccdB-mEF1a-RiHベクター (カタログ番号「#60601」、Addgene) にそれぞれクローニングした。

[0059] また、flagタグ、2Aペプチド、及び、mCherry遺伝子を、HAND1遺伝子の終止コドンにノックインするように設計し、ターゲティングベクターを作製した。また、HAタグ、2Aペプチド、及び、EGFP遺伝子を、HAND2遺伝子の終止コドンにノックインするように設計し、ターゲティングベクターを作製した。これらのターゲティングベクターは、LoxP配列の間に、PGKプロモーター及びピューロマイシン耐性遺伝子又はネオマイシン耐性遺伝子を有する抗生物質選択カセットを有していた。これらの配列は、相同組換えのために、HAND1遺伝子及びHAND2遺伝子の終止コドンから1,000塩基上流及び1,000塩基下流領域の相同アームの間に配置した。

[0060] 図1は、HAND1-mCherryレポーターhiPSCの作製の概要を説明する模式図である。また、図2は、HAND2-EGFPレポーターhiPSCの作製の概要を説明する模式図である。図1及び2中、「5arm」は5' 相同アームを示し、「3arm」は3' 相同アームを示し、「2A」は2Aペプチドを示し、「flag」はflagタグを示し、「HA」はHAペプチドを示し、「PGK」はホスホグリセリン酸キナーゼ1のプロモーター配列を示し、「PuroR」はピューロマイシン耐性遺伝子を示し

、「NeoR」はネオマイシン耐性遺伝子を示し、「H」はサザンブロッティングに使用したHindIII切断部位を示し、「Probe」はサザンブロッティングに使用したプローブを示す。なお、ヒトHAND1遺伝子のmRNAのNCBIアクセッション番号は、NM_004821.3等である。また、ヒトHAND2遺伝子のmRNAのNCBIアクセッション番号は、NM_021973.3等である。

[0061] エピソーマル法により樹立された409B2 hiPSCを使用した。409B2 hiPSCは、ピューロマイシン耐性及びネオマイシン耐性のSTO細胞上で培養した。エレクトロポレーション（製品名「NEPA21」、NEPAGENE）により、 50×10^4 個の細胞に、 $2.5 \mu\text{g}$ のCas9発現ベクター（pHL-EF1a-SphcCas9-iP-A、カタログ番号「#60599」、Addgene）、それぞれ $3 \mu\text{g}$ のターゲティングベクター、それぞれ $2.5 \mu\text{g}$ のHAND1 gRNAベクター及びHAND2 gRNAベクターを同時に導入した。

[0062] 48時間後、 $0.5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ピューロマイシンを添加し5日間処理した。続いて、 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ネオマイシン（製品名「Geneticin™ Selective Antibiotic (G418 Sulfate) (50mg/mL)」、カタログ番号「#10131027」、サーモフィッシャーサイエンティフィック）を添加した。

[0063] 続いて、生存した細胞をクローニングし、PCRでノックインした配列を同定し、相同アームの内側及び外側の塩基配列をシーケンスした。また、HindIII（NEB）及びノックインした配列の内部領域及び外部領域に対応する4つのプローブを用いてサザンブロッティングを行った。

[0064] 続いて、選択カセットを除去した。具体的には、まず、マトリゲル（カタログ番号「#354230」、コーニング）を $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ になるようDMEM/F-12（カタログ番号「#11320033」、サーモフィッシャーサイエンティフィック）で希釈してディッシュに入れ、1時間インキュベートしてコートした。続いて、hiPSCに、FuGENE HD Tr

ansfection Reagent (カタログ番号「#E2311」、プロメガ)を用いて、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ のCre発現ベクター(pCAG-Cre-Blast、沖田圭介博士より提供された)を遺伝子導入し、上述したディッシュに播種した。

[0065] 続いて、hiPSCsをMEFコンディションドメディウム中で培養し、 $10\mu\text{g}/\text{mL}$ ブラストサイジン(カタログ番号「#KK-400」、フナコシ)を添加して2日間インキュベートした。続いて、hiPSCsを再度クローニングし、PCR及びサザンブロットングにより同定した。

[0066] [実験例2]

(MYH6-iRFP670/HAND1-mCherry/HAND2-EGFPトリプルレポーターhiPSCの樹立)

MYH6レポーター遺伝子をHAND1-mCherry/HAND2-EGFPダブルレポーターhiPSCのゲノムに導入した。

[0067] 具体的には、ヒトMYH6プロモーター(-4391~+1051)、iRFP670-IRES-ピューロマイシン耐性遺伝子カセット、LoxP配列に挟まれPGKプロモーターに制御されたネオマイシン耐性カセットを有する、PiggyBacトランスポゾンベクター(PB-hMYH6-iRFP670-IPPNL)を作製した。図3は、トランスポゾンベクターの構造を示す模式図である。

[0068] 続いて、FuGENE HD Transfection Reagent (カタログ番号「#E2311」、プロメガ)を用いて、トランスポゾンベクター(PB-hMYH6-iRFP670-IPPNL)及びPiggyBacトランスポザゼ発現ベクターを導入した。続いて、トランスポゾンベクターが導入された細胞をネオマイシン($50\mu\text{g}/\text{mL}$)で選択し、MYH6-iRFP670/HAND1-mCherry/HAND2-EGFPトリプルレポーターhiPSCを得た。なお、ヒトMYH6遺伝子のmRNAのNCBIアクセッション番号は、NM__002471.4等である。

[0069] [実験例3]

(MYH6-EGFPレポーターhiPSCの樹立)

図3に構造を示すトランスポゾンベクターにおいて、iRFP670遺伝子の代わりにEGFP遺伝子を有するトランスポゾンベクターを作製した。

[0070] 続いて、FuGENE HD Transfection Reagent (カタログ番号「#E2311」、プロメガ)を用いて、201B7 hiPSCにトランスポゾンベクター及びPiggyBacトランスポザゼ発現ベクターを導入した。続いて、トランスポゾンベクターが導入された細胞をネオマイシン ($50 \mu\text{g}/\text{mL}$) で選択し、MYH6-EGFPレポーターhiPSCを得た。MYH6-EGFPレポーターhiPSCは、心筋細胞 (MYH6陽性細胞) に分化するとEGFPを発現する。

[0071] [実験例4]

(RNAシーケンス解析)

実験例2で作製した、MYH6-iRFP670/HAND1-mCherry/HAND2-EGFPトリプルレポーターhiPSCを心筋細胞に分化誘導した。続いて、分化誘導開始から20日目の細胞から、mCherry-EGFP⁻、mCherry⁺EGFP⁻、mCherry⁺EGFP⁺、mCherry-EGFP⁺である、iRFP670陽性細胞 (心筋細胞) を、FACSにより分取し、それぞれRNAシーケンスを行った。実験は3回ずつ行った。

[0072] RNAシーケンスの結果に基づいて、遺伝子オントロジー (gene ontology, GO) 解析を行った。その結果、HAND1陽性細胞 (mCherry⁺細胞) で細胞周期に関連するtermが濃縮された。更に、EdUアッセイを行ったところ、HAND1陽性細胞において、細胞周期が活性化していることを示すEdU陽性細胞の割合が、HAND1陰性細胞と比較して高いことが確認された。

[0073] 続いて、RNAシーケンスのデータを用いて、細胞表面に露出する遺伝子をAmiGOデータベースから抽出し (GO:0009897)、これらの

遺伝子についてヒートマップを作成した。図4は、作成したヒートマップである。ヒートマップの色の濃淡は、遺伝子発現量のZスコアに対応する。図4中、「ex1」、「ex2」、「ex3」は、それぞれ1回目、2回目及び3回目の実験結果であることを示す。

[0074] 図4に示すヒートマップに基づいて、HAND1が発現していてHAND2が発現していない心筋細胞、すなわちmCherry+EGFP-細胞における遺伝子発現が、他の細胞と比較して高い遺伝子として、CD105に着目した。

[0075] [実験例5]

(CD105高発現心筋細胞のEdUアッセイ1)

実験例3で作製した、201B7 hiPSC由来のMYH6-EGFPレポーターhiPSCを、心筋細胞に分化誘導した。MYH6-EGFPレポーターhiPSCはSNLフィーダー細胞上で培養した。

[0076] 分化誘導開始から20日目の細胞から、抗CD105抗体(CD105-APC)を用いたFACSソーティングにより、CD105高発現心筋細胞(上位30%)と低発現心筋細胞(下位30%)をそれぞれ分取した。図5は、FACS解析の結果を示すグラフである。図5中、横軸はEGFPの蛍光強度を示し、縦軸はAPCの蛍光強度を示す。また、「High」と示す四角で囲んだ領域は、回収したCD105高発現心筋細胞の領域を示し、「Low」と示す四角で囲んだ領域は、回収したCD105低発現心筋細胞の領域を示す。また、「Negative control」は、抗CD105抗体で染色していない細胞の結果を示す。

[0077] 続いて、分取した各細胞についてEdUアッセイを行った。図6は分化誘導開始から23日目のEdU陽性細胞の割合を示すグラフである(n=3)。図6中、「High」はCD105高発現心筋細胞の結果であることを示し、「Low」はCD105低発現心筋細胞の結果であることを示す。また、「***」は、対応のないサンプルのt検定の結果、 $p < 0.001$ で有意差が存在することを示す。

[0078] その結果、CD105高発現細胞中に、有意に高い割合でEdU陽性細胞が存在していることが明らかになった。この結果は、CD105を高発現している心筋細胞は、細胞周期が活性化していることを示す。

[0079] [実験例6]

(CD105高発現心筋細胞のEdUアッセイ2)

実験例5とは異なるhiPSC株を心筋細胞に分化誘導し、CD105高発現心筋細胞のEdUアッセイを行った。hiPSC株としては、692D2株及び1390D4株を使用した。692D2株はSNLフィーダー細胞上で培養した。1390D4株はフィーダーフリーで培養した。

[0080] 分化誘導開始から20日目の各細胞から、抗CD105抗体(CD105-APC)、Lineageマーカーに対する抗体、心筋細胞マーカーであるSIRPA(CD172a)に対する抗体(抗CD172a/b抗体、CD172a/b-PE/Cyanine7、カタログ番号「323808」、BioLegend)を用いたFACSソーティングにより、Lineage陰性SIRPA陽性のCD105高発現心筋細胞(上位30%)と低発現心筋細胞(下位30%)をそれぞれ分取した。Lineageマーカーに対する抗体としては、抗CD140b抗体(CD104b-PE、カタログ番号「558821」、BD Biosciences)、抗CD49a抗体(CD49a-PE、カタログ番号「559596」、BD Biosciences)、抗CD31抗体(CD31-PE、カタログ番号「555446」、BD Biosciences)、抗CD90抗体(CD90-PE、カタログ番号「555596」、BD Biosciences)を混合して使用した。

[0081] 続いて、分取した各細胞についてEdUアッセイを行った。図7及び図8は分化誘導開始から23日目のEdU陽性細胞の割合を示すグラフである(n=3)。図7は692D2 hiPSCの結果であり、図8は1390D4 hiPSCの結果である。図7及び図8中、「High」はCD105高発現心筋細胞の結果であることを示し、「Low」はCD105低発現心

筋細胞の結果であることを示す。また、「*」、「**」は、対応のないサンプルの t 検定の結果、 $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ でそれぞれ有意差が存在することを示す。

[0082] その結果、201B7 以外の hiPSC 株においても、CD105 高発現細胞中に、有意に高い割合で EdU 陽性細胞が存在していることが明らかになった。この結果は、CD105 を高発現している心筋細胞は、細胞周期が活性化していることを更に支持するものである。

[0083] [実験例 7]

(CD105 高発現心筋細胞における HAND1 遺伝子の発現の検討 1)

実験例 3 で作製した、201B7 hiPSC 由来の MYH6-EGFP レポーター hiPSC を、心筋細胞に分化誘導した。

[0084] 分化誘導開始から 20 日目の細胞から、抗 CD105 抗体 (CD105-APC) を用いた FACS ソーティングにより、EGFP 陽性の CD105 高発現心筋細胞 (上位 30%) と低発現心筋細胞 (下位 30%) をそれぞれ分取した。

[0085] 続いて、分取した各細胞について定量的リアルタイム PCR により HAND1 遺伝子の発現量を測定した。図 9 は、定量的リアルタイム PCR の結果を示すグラフである。図 9 中、縦軸は、GAPDH 遺伝子の発現量を内部コントロールとして ddCt 法により CD105 低発現心筋細胞の HAND1 遺伝子の発現量を 1 とした相対値を示す。また、「**」は、対応のないサンプルの t 検定の結果、 $p < 0.01$ で有意差が存在することを示す。

[0086] その結果、CD105 高発現の細胞において、有意に HAND1 が高発現であることが明らかとなった。実験例 4 の図 4 の結果及び図 9 の結果から、HAND1 高発現の心筋細胞では CD105 も高発現であり、CD105 高発現の心筋細胞では HAND1 も高発現であることが示された。

[0087] [実験例 8]

(CD105 高発現心筋細胞における HAND1 遺伝子の発現の検討 2)

実験例 7 とは異なる hiPSC 株を心筋細胞に分化誘導し、CD105 高

発現心筋細胞におけるHAND1遺伝子の発現量を検討した。hiPSC株としては、692D2株及び1390D4株を使用した。692D2株はSNLフィーダー細胞上で培養した。1390D4株はフィーダーフリーで培養した。

[0088] 分化誘導開始から20日目の各細胞から、抗CD105抗体（CD105-APC）、Lineageマーカーに対する抗体、心筋細胞マーカーであるSIRPA（CD172a）に対する抗体（抗CD172a/b抗体、CD172a/b-PE/Cyanine7、カタログ番号「323808」、BioLegend）を用いたFACSソーティングにより、Lineage陰性SIRPA陽性のCD105高発現心筋細胞（上位30%）と低発現心筋細胞（下位30%）をそれぞれ分取した。Lineageマーカーに対する抗体としては、抗CD140b抗体（CD104b-PE、カタログ番号「558821」、BD Biosciences）、抗CD49a抗体（CD49a-PE、カタログ番号「559596」、BD Biosciences）、抗CD31抗体（CD31-PE、カタログ番号「555446」、BD Biosciences）、抗CD90抗体（CD90-PE、カタログ番号「555596」、BD Biosciences）を混合して使用した。

[0089] 続いて、分取した各細胞について、定量的リアルタイムPCRによりHAND1遺伝子の発現量を測定した。図10及び図11は、定量的リアルタイムPCRの結果を示すグラフである。図10及び図11中、縦軸は、GAPDH遺伝子の発現量を内部コントロールとしてddCt法によりCD105低発現心筋細胞のHAND1遺伝子の発現量を1とした相対値を示す。また、「**」は、対応のないサンプルのt検定の結果、 $p < 0.01$ で有意差が存在することを示し、「ns」は有意差が存在しないことを示す。

[0090] その結果、201B7以外のhiPSC株においても、CD105高発現の細胞において、HAND1が高発現であることが明らかとなった。この結果は、CD105高発現の心筋細胞ではHAND1も高発現することを更に

支持するものである。

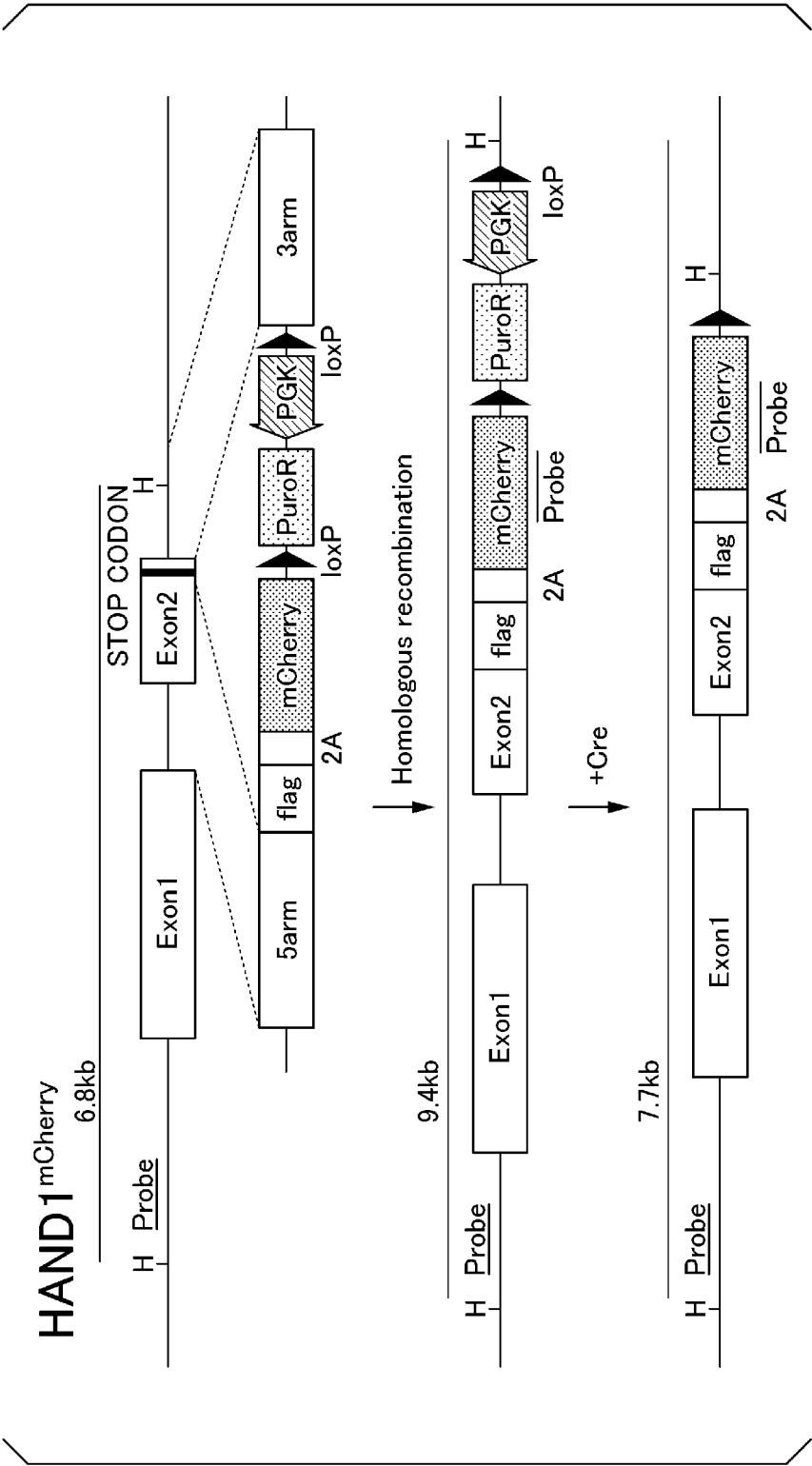
産業上の利用可能性

[0091] 本発明によれば、遺伝子導入を行うことなく、増殖能が高い心筋細胞を得る技術を提供することができる。

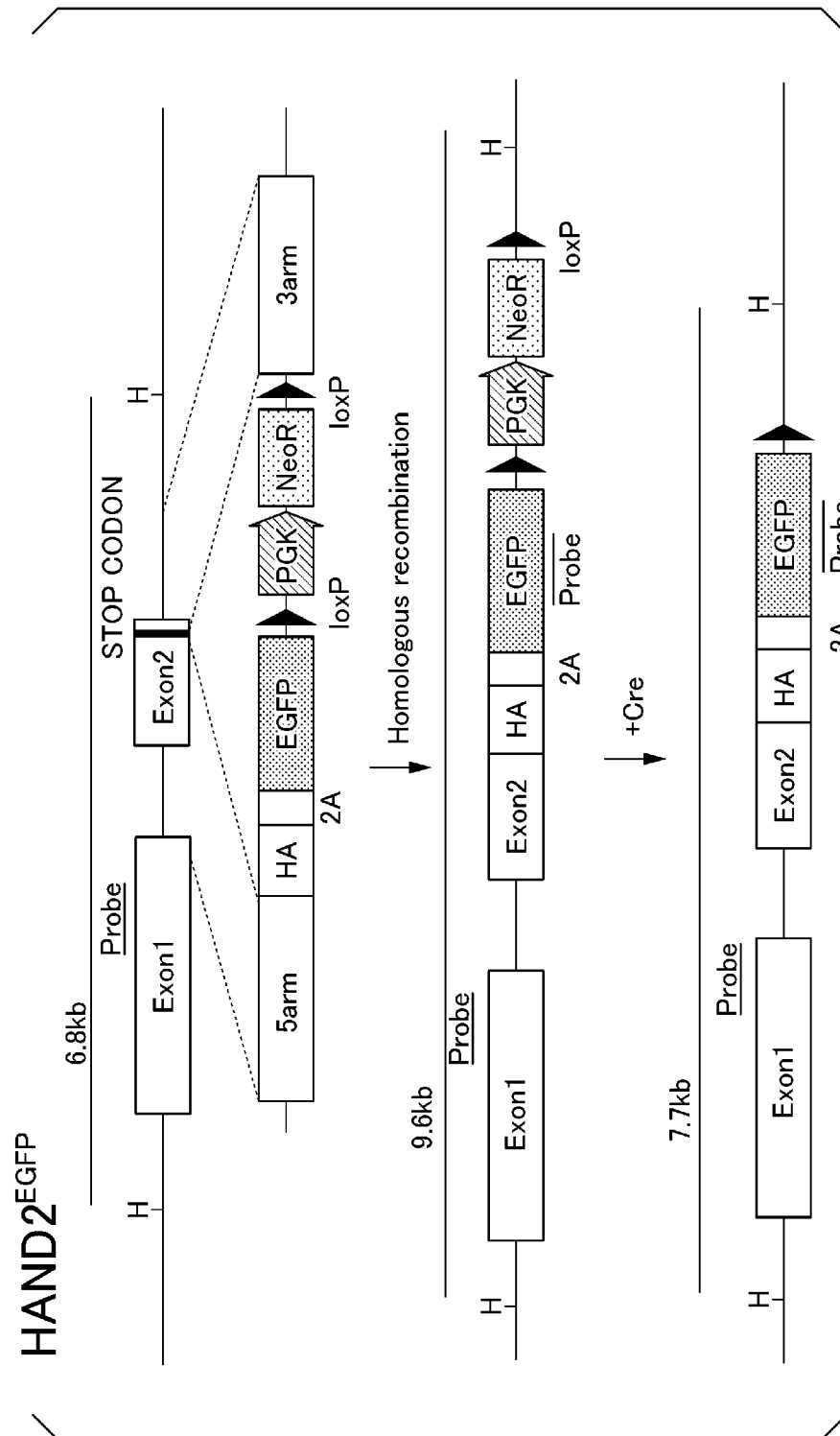
請求の範囲

- [請求項1] 心筋細胞集団から、C D 1 0 5 を高発現する心筋細胞を回収する工程と、
回収した前記心筋細胞を拡大培養する工程と、
を含む、心筋細胞の製造方法。
- [請求項2] 心筋細胞集団から、C D 1 0 5 を高発現する心筋細胞を回収する工程と、
回収した前記心筋細胞を培養して心臓組織を作製する工程と、
を含む、心臓組織の製造方法。
- [請求項3] 前記心筋細胞集団が多能性幹細胞由来である、請求項 1 又は 2 に記載の製造方法。
- [請求項4] 前記多能性幹細胞がヒト i P S 細胞である、請求項 3 に記載の製造方法。
- [請求項5] 心筋細胞集団から増殖能が高い心筋細胞を選別する方法であって、
前記心筋細胞集団から、C D 1 0 5 を高発現する心筋細胞を選別する工程を含む方法。
- [請求項6] 心筋細胞集団から細胞周期が活性化している心筋細胞を選別する方法であって、
前記心筋細胞集団から、C D 1 0 5 を高発現する心筋細胞を選別する工程を含む方法。
- [請求項7] 前記心筋細胞集団が多能性幹細胞由来である、請求項 5 又は 6 に記載の方法。
- [請求項8] 前記多能性幹細胞がヒト i P S 細胞である、請求項 7 に記載の方法。

[図1]

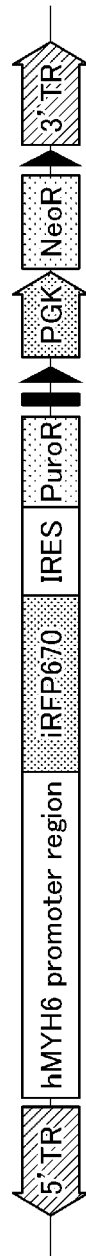


[図2]

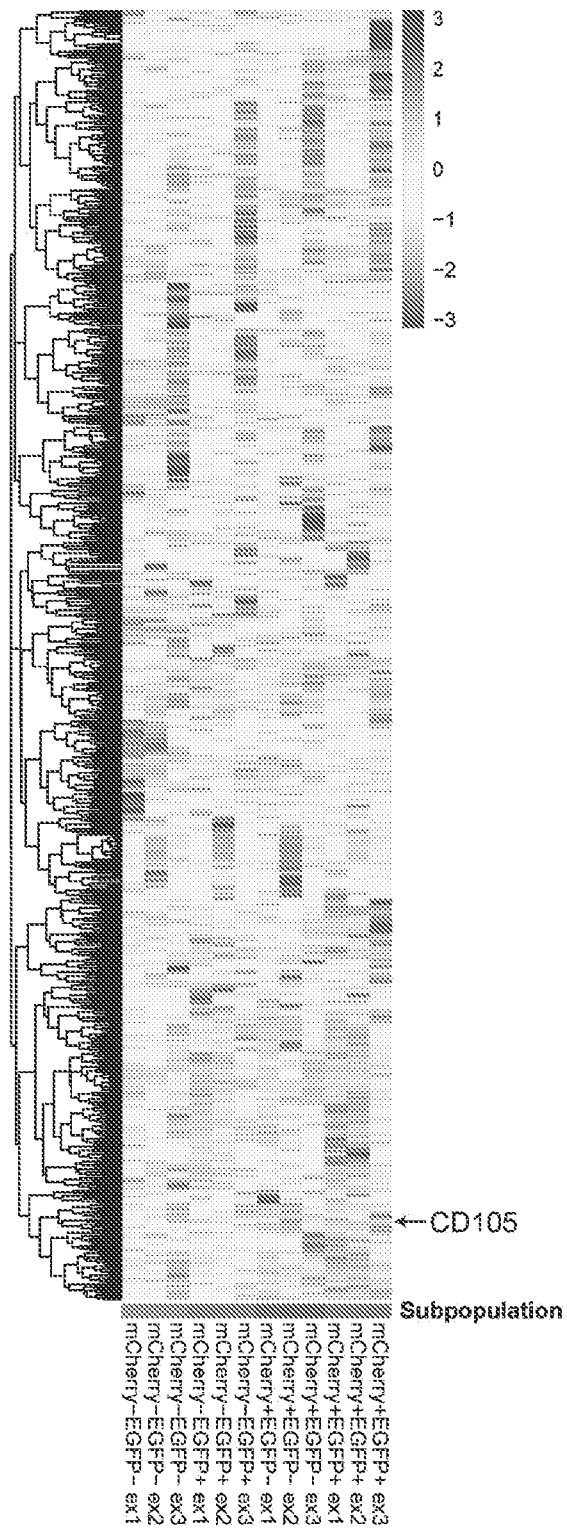


[図3]

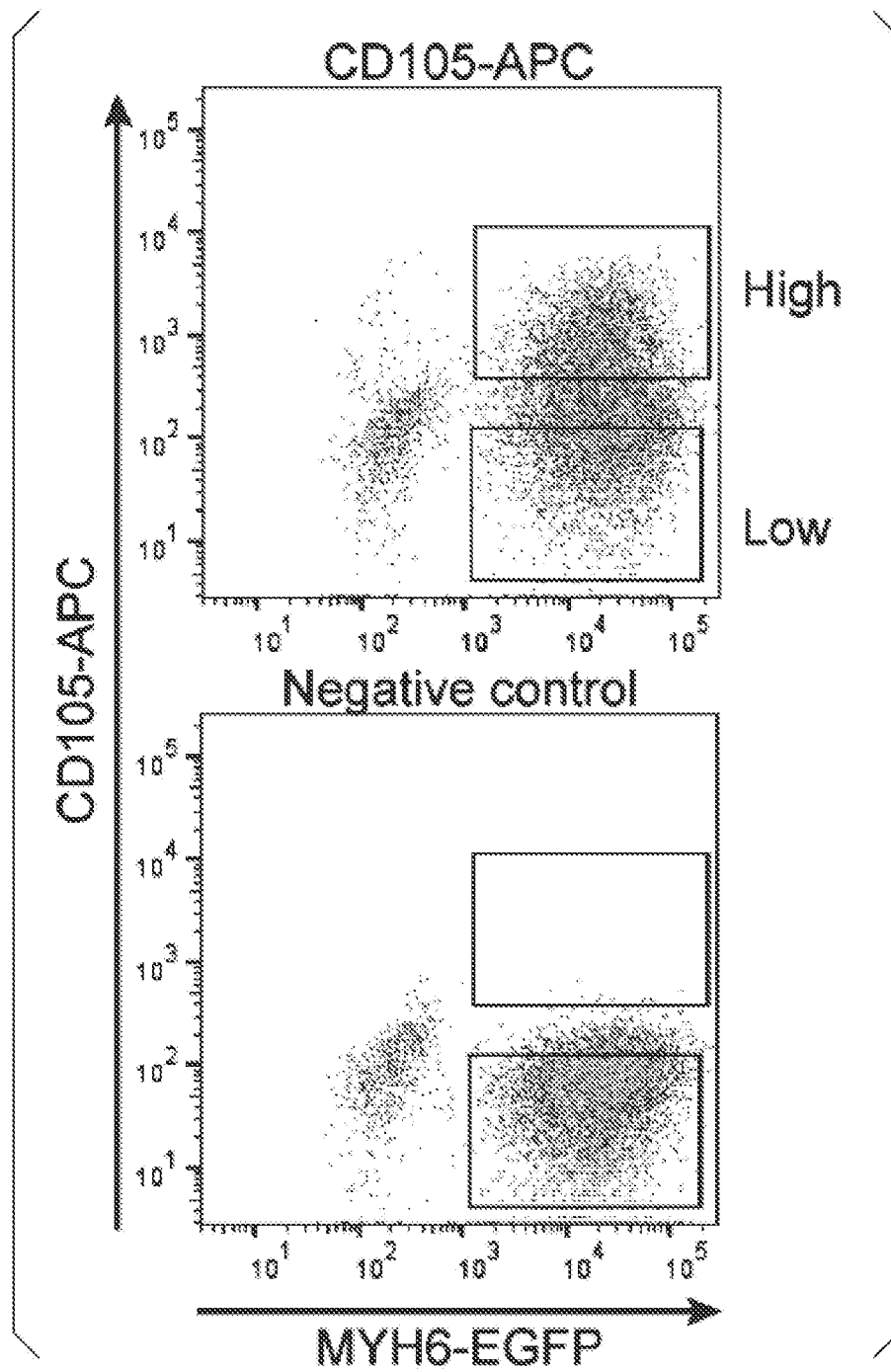
MYH6-iRFP670



[図4]

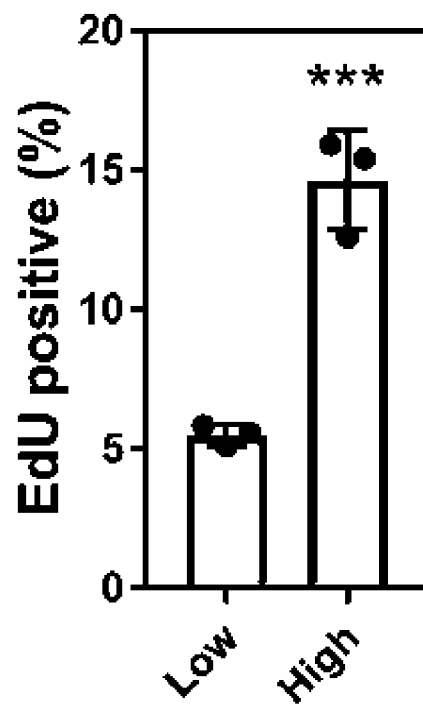


[図5]



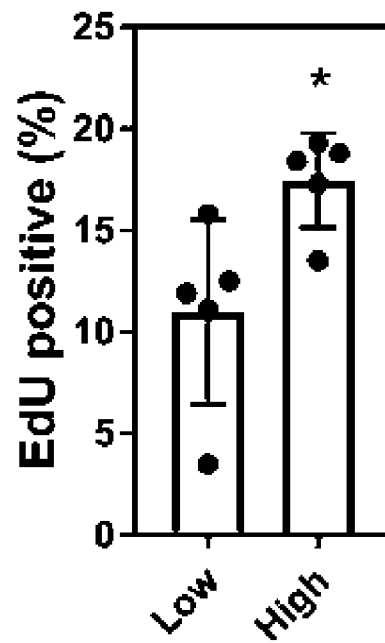
[図6]

iPSC: 201B7 (on feeder)
MYH6-EGFP陽性心筋細胞



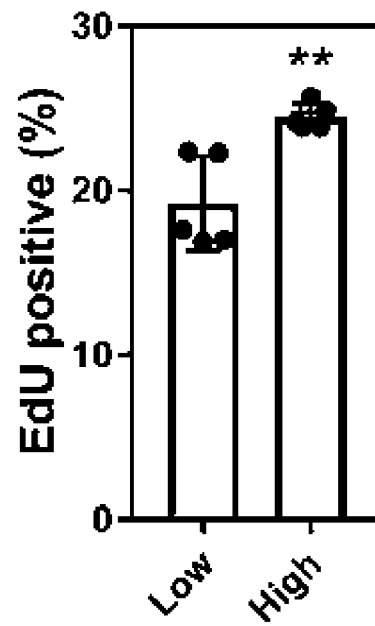
[図7]

iPSC: 692D2 (on feeder)
Lineage陰性SIRPA陽性心筋細胞



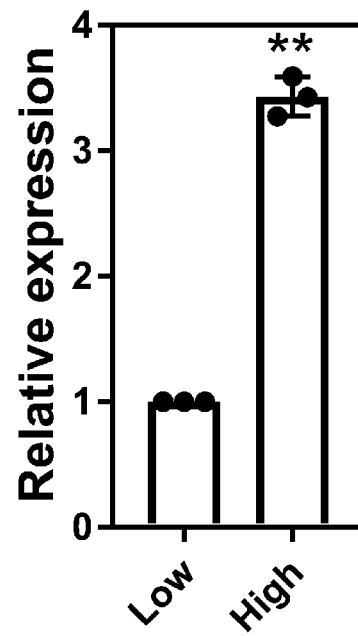
[図8]

iPSC: 1390D4 (feeder free)
Lineage陰性SIRPA陽性心筋細胞



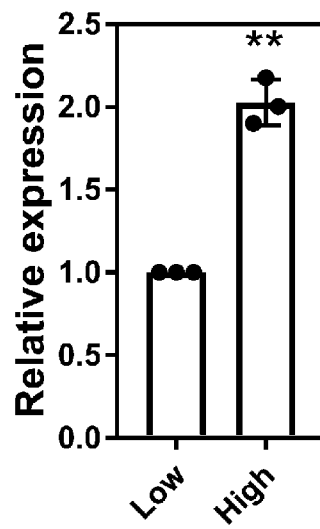
[図9]

iPSC: 201B7 (on feeder)
MYH6-EGFP陽性心筋細胞



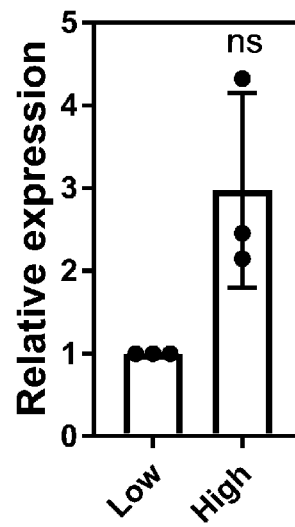
[図10]

iPSC: 692D2 (on feeder)
Lineage陰性SIRPA陽性心筋細胞



[図11]

iPSC: 1390D4 (feeder free)
Lineage陰性SIRPA陽性心筋細胞



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/019678

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/071 (2010.01) i

FI: C12N5/071

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/071

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

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	松下 訓, 再生医療を用いた心筋傷害に対する治療, 順天堂医学, 2011, vol. 57, pp. 324-328, page 325, fig. 1, page 325, left column, lines 10-18, page 325, right column, line 17, page 326, left column, lines 8-16, (MATSUSHITA, Satoshi, "Regeneration therapy for heart disease", Juntendo Medical Journal)	1-8
X	JP 2008-518730 A (THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY) 05 June 2008 (2008-06-05) claims, paragraphs [0004], [0044], [0047], [0049], [0057], fig. 1, 2	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"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

"I" 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

08 June 2021 (08.06.2021)

Date of mailing of the international search report

15 June 2021 (15.06.2021)

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/JP2021/019678

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEITOLIS, A. et al., "Human heart explant-derived extracellular vesicles: characterization and effects on the in vitro recellularization of decellularized heart valves", International Journal of Molecular Sciences, 14 March 2019, vol. 20, 1279, see https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6471048/ , page 2, column 2.1, same table 1, page 11, column 4.2	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/019678

Patent Documents
referred in the
ReportPublication
Date

Patent Family

Publication
Date

JP 2008-518730 A

05 Jun. 2008

US 2008/0267921 A1
claims, paragraphs
[0004], [0016],
[0049], [0051],
[0054], fig. 1, 2
WO 2006/052925 A2
EP 2546333 A2
CN 101437938 A

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 5/071(2010.01)i FI: C12N5/071		
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）） C12N5/071		
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 1971-2021年 日本国実用新案登録公報 1996-2021年 日本国登録実用新案公報 1994-2021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） CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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	松下 訓, 再生医療を用いた心筋傷害に対する治療, 順天堂医学, 2011, 57巻, p324-328 325頁図1、325頁左欄10-18行、325頁右欄17行、326頁左欄 8-16行	1-8
X	JP 2008-518730 A (ザ ジョンズ ホプキンス ユニバーシティー) 05.06.2008 (2008-06-05) 特許請求の範囲、[0004]、[0044]、[0047]、[0049]、 [0057]、図1、2	1-8
X	LEITOLISI, A. et al., Human heart explant-derived extracellular vesicles: characterization and effects on the in vitro recellularization of decellularized heart valves, International Journal of Molecular Sciences, 2019.03.14, Vol.20, 1279, https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/ PMC6471048/参照 2頁2. 1欄、同表1、11頁4. 2欄	1-8
☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に 公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を 付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の 後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵 触するものではなく、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 08.06.2021		国際調査報告の発送日 15.06.2021
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 大久保 智之 4N 3446 電話番号 03-3581-1101 内線 3488

国際出願番号
PCT/JP2021/019678

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2008-518730	A	05.06.2008	US 2008/0267921 A1 Claims, [0004], [0016], [0049], [0051], [0054], Figures1,2 WO 2006/052925 A2 EP 2546333 A2 CN 101437938 A	