

(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  
2013年9月19日(19.09.2013)



(10) 国際公開番号  
WO 2013/137491 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 5/071 (2010.01) A61L 27/00 (2006.01)  
A61K 35/12 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/058460
- (22) 国際出願日: 2013年3月15日(15.03.2013)
- (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:  
61/611,340 2012年3月15日(15.03.2012) 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番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 山下 潤(YAMASHITA, Jun); 〒6068507 京都府京都市左京区聖護院川原町53 国立大学法人京都大学 i P S細胞研究所内 Kyoto (JP). 升本 英利(MASUMOTO, Hidetoshi); 〒6068507 京都府京都市左京区聖護院川原町53 国立大学法人京都大学 i P S細胞研究所内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕

グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).

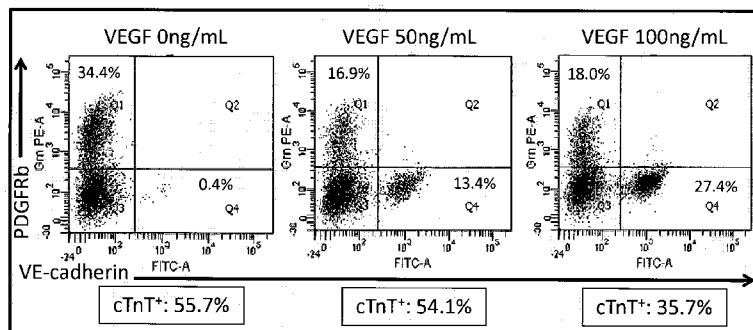
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, 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, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING CARDIAC AND VASCULAR CELL MIXTURE FROM ARTIFICIAL PLURIPOTENT STEM CELLS

(54) 発明の名称: 人工多能性幹細胞から心筋および血管系混合細胞群を製造する方法

図 1



(57) Abstract: The present invention provides: a method for producing a cell mixture comprising cardiac cells, endothelial cells and parietal cells from artificial pluripotent stem cells, said method comprising (a) a step of producing cardiac cells from artificial pluripotent stem cells and (b) a step of culturing the cardiac cells in the presence of VEGF; and a therapeutic agent for heart diseases, comprising a cell mixture produced by the method.

(57) 要約: 本発明は、(a) 人工多能性幹細胞から心筋細胞を製造する工程、および (b) 前記心筋細胞を VEGF の存在下で培養する工程を含む、人工多能性幹細胞から心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を含む混合細胞を製造する方法、ならびに、その方法によって得られた混合細胞を含む心疾患治療剤を提供する。

WO 2013/137491 A1

## 明 細 書

## 発明の名称

人工多能性幹細胞から心筋および血管系混合細胞群を製造する方法

## 技術分野

本発明は、人工多能性幹細胞を用いて心筋および血管系混合細胞群を製造する方法に関する。本発明はまた、上記の方法によって得られた心筋および血管系混合細胞群を含む心疾患治療剤に関する。

## 背景技術

成人の心筋細胞は、ほとんど増殖しないため、虚血性心疾患等で欠損した心筋細胞は不可逆的な損傷となる。現在、臨床的に使用されるどの薬剤も処置も、機能性収縮組織で心筋瘢痕を置換することにおいて、効力を示していない。そこで、正常な心筋細胞を再生するための新規な治療が所望されており、別途製造された心筋細胞を投与する補充療法が提案されている。このような補充療法において、心筋細胞はレシピエントの心臓へ生着させるためシート状にして投与することが検討されている（非特許文献 1、特許文献 1）。さらに、シートにおける細胞量が不十分であるため期待された治療効果が得られないことから、シートを積層化して投与する必要があると考えられている（非特許文献 2）。

一方、シート作製のための心筋細胞の供給元として、胎児心筋細胞、筋芽細胞、脂肪組織由来幹細胞由来の心筋芽細胞、胚性幹細胞由来の心筋細胞を用いた方法が例示されている（特許文献 2、非特許文献 3 および特許文献 3（特願 2011-076235））。

しかし、人工多能性幹細胞（iPS 細胞）由来の分化細胞で形成された心筋シートの投与による効果によって心機能が改善されたとの報告はない。

## 先行技術文献

## 特許文献

特許文献 1 国際公開第 W02002/008387 号パンフレット

特許文献 2 特表 2007-528755 号公報

特許文献 3 特開 2012-210156 号公報

#### 非特許文献

非特許文献 1 Shimizu, T, et al, Biomaterials 24, 2309-2316, 2003

非特許文献 2 Shimizu T, et al. FASEB J. 20: 708-10, 2006

非特許文献 3 Bel A, et al. Circulation. 122:S118-23, 2010

#### 発明の概要

本発明の目的は、人工多能性幹細胞由来の心筋細胞のみならず内皮細胞および壁細胞を含む強固な心筋シートを製造する方法およびそれによって得られた心筋シートを含む心疾患治療剤に関する。したがって、本発明の課題は、人工多能性幹細胞から心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を同時に分化誘導させて、得られた混合細胞から作製した心筋シートを提供することである。

本発明者らは、上記の課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、人工多能性幹細胞を、特定の因子を含む培養条件下で培養することにより、心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を一定の割合で含む心筋シートが得られることを見出した。さらに、このシートを移植することで、心機能を改善できることを確認した。本発明はそのような知見に基づいて完成されたものである。

すなわち、本発明は：

[1] 人工多能性幹細胞から心筋細胞、内皮細胞および壁細胞から構成される混合細胞を製造する方法であって、下記の工程：

(a) 人工多能性幹細胞から心筋細胞を製造する工程、および

(b) 前記心筋細胞を VEGF (vascular endothelial growth factor) の存在下で培養する工程、

を含む、方法、

[2] 前記 VEGF の濃度が、50ng/mL 以上、100ng/mL 以下の範囲である、[1]に記載の方法、

[3] 前記混合細胞において、内皮細胞の含有率が 3% 以上である、[1]または[2]に記載の方法、

- [4] 前記工程 (a) が 2~15 日間および前記工程 (b) が 5~15 日間である、[1]~[3]のいずれかに記載の方法、
- [5] 前記工程 (a) が 5 日間および前記工程 (b) が 10 日間である、[4]に記載の方法、
- [6] 前記工程 (a) が、下記の工程：  
(i) 人工多能性幹細胞を、Activin A を含む培地で培養する工程、および  
(ii) 工程(i)の後、さらに、BMP4(bone morphogenetic protein 4)と bFGF(basic fibroblast growth factor)とを含む培地で培養する工程、  
を含む、[1]~[3]のいずれかに記載の方法、
- [7] 前記工程 (i) が 1~5 日間および前記工程 (ii) が 1~10 日間である、[6]に記載の方法、
- [8] 前記工程 (i) が 1 日間であり、前記工程 (ii) が 4 日間である、[7]に記載の方法、
- [9] 前記工程 (b) で得られた細胞から、TRA-1-60 陰性細胞を選択する工程をさらに含む、[1]~[8]のいずれかに記載の方法、
- [10] [1]~[9]のいずれかに記載の方法で得られた混合細胞を含む、心疾患治療剤、
- [11] [1]~[9]のいずれかに記載の方法で製造された混合細胞を温度応答性ポリマーを被覆した培養器材を用いて培養する工程を含む、心筋シートを製造する方法、
- [12] 前記シートを積層化する工程をさらに含む、[11]に記載の方法、
- [13] 前記積層化が 3 層である、[12]に記載の方法、
- [14] 前記工程が、混合細胞を血清を含有する培地で培養する工程である、[11]に記載の方法、
- [15] 前記混合細胞がヒト細胞である、[1]~[9]および[11]~[14]のいずれかに記載の方法、
- [16] 前記混合細胞がヒト細胞である、[10]に記載の心疾患治療剤、および
- [17] [11]~[15]のいずれかに記載の方法で得られた心筋シートを含む、心疾患治療剤、

を提供するものである。

本発明の方法により、人工多能性幹細胞から、心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を一定の割合で含む心筋シートを製造することが可能となる。また、得られた心筋シートを用いて、心不全、虚血性心疾患、心筋梗塞、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症、拡張型心筋症などの心疾患の治療が可能となる。さらに、本発明の方法により得られた心筋シートは、心臓の細胞・組織モデルとして、薬剤の安全性試験や創薬スクリーニングのために使用することができる。

本明細書は、本願の優先権の基礎である米国特許仮出願 61/611, 340 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 は、ヒト iPS 細胞からの分化誘導段階の後期において VEGF の存在下で培養することにより同時に分化誘導された心筋細胞、内皮細胞および壁細胞の細胞構成比を示す。図中、cTnT+、VE-cadherin および PDGFRb は、それぞれ心筋細胞、内皮細胞および壁細胞のマーカーを示す。

図 2 は、シート化前 (Pre-sheet) およびシート化後 (Post-sheet) における心筋細胞 (CM)、内皮細胞 (EC)、壁細胞 (MC) および未分化細胞 (Undifferentiated) の細胞構成比を示す。図中、N はサンプル数を示す。

図 3 A は、MED64 プローブ上に接着されたシート像を示す。図 3 B は、各電極での細胞外電位を示す。図 3 C は、図 3 B で測定した電位の分布を模式的に示す。peak negative potential の最も高い電極 (図の下部) をゼロ点として、そこから各電極の peak negative potential への時間差 (秒) にて色分けを行った。下部より上部に向かう伝導を認める。

図 4 は、Indicator として Fluo8 (ナカライテスク) を用いた、緑色の蛍光検出によるカルシウム濃度変化の結果を示す (A および B)。蛍光検出は、BZ-9000 (キーエンス) により行われた。

図 5 は、細胞シート積層化の方法の模式図を示す。

図 6 A は、積層化後シートの肉眼的所見を示す。図 6 B は、積層化後シートの光

学顕微鏡像を示す。

図7は、移植後4週までの心臓超音波検査の結果を示す。Aは、左室内径短縮率 (FS)、Bは、収縮期壁厚増加率の経時的変化をそれぞれ示す (いずれも収縮能の指標)。Cは、非収縮範囲 (AL) の経時的変化を示す (梗塞部位範囲の指標)。Dは、左室拡張期の直径 (LVD d) の変化を示す (心拡大の指標)。図中、PreMI; 心筋梗塞前, PreTx; 治療前, Tx2w; 治療後2週目, Tx4w; 治療後4週目。\* $p < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs Sham / † $P < 0.001$  vs PreMI。

図8は、移植後3カ月までの心臓超音波検査の結果を示す。Aは、左室断面変化率 (FAC)、Bは、収縮期壁厚増加率の経時的変化をそれぞれ示す (いずれも左室収縮能の指標)。Cは、非収縮範囲 (AL) の経時的変化を示す (梗塞部位範囲の指標)。Dは、左室拡張期の直径の変化を示す (左室拡大の指標)。図中、PreMI; 心筋梗塞前, PreTx; 治療前, Tx1m; 治療後1カ月, Tx2m; 治療後2カ月, Tx3m; 治療後3カ月。\* $p < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs Sham。

図9は、大型化させた心筋シートの肉眼的所見を示す。左上が12wellで作製したラット移植用の心筋シート、右が大型化させた心筋シート、左下が500円硬貨を示す。大型化させた心筋シートは、直径約34mmであった。

図10は、TRA1-60陽性細胞を除いた細胞をラットへ移植した後の心臓超音波検査の結果を示す。Aは、左室内径短縮率 (FS)、Bは、収縮期壁厚増加率 (いずれも収縮能の指標)、Cは、非収縮範囲 (AL) (梗塞部位範囲の指標)、Dは、左室拡張期の直径 (LVD d) (心拡大の指標) を示す。図中、Tx(1st): 第1世代シート (TRA-1-60陽性細胞の除去工程を含まない方法で作製されたシート) を用いた治療、Tx(2nd): 第2世代シート (TRA-1-60陽性細胞の除去工程を含む方法で作製されたシート) を用いた治療。

#### 発明を実施するための形態

本発明を以下において詳細に説明する。

本発明は、上記のとおり、(a) 人工多能性幹細胞から心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を製造する工程、および (b) 当該心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を用いてシートを形成させる工程を含む、人工多能性幹細胞から心筋シートを製造

する方法およびこの方法によって得られた心筋シートを含む心疾患の治療剤に関する。

#### <人工多能性幹細胞の製造方法>

本発明において、人工多能性幹 (iPS) 細胞は、ある特定の核初期化物質を、DNA またはタンパク質の形態で体細胞に導入することまたは薬剤によって当該核初期化物質の内在性の mRNA およびタンパク質の発現を上昇させることによって作製することができる、ES 細胞とほぼ同等の特性、例えば分化多能性と自己複製による増殖能を有する体細胞由来の人工の幹細胞である (K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) Cell, 126: 663-676、K. Takahashi et al. (2007) Cell, 131: 861-872、J. Yu et al. (2007) Science, 318: 1917-1920、M. Nakagawa et al. (2008) Nat. Biotechnol., 26: 101-106、国際公開 WO 2007/069666 および国際公開 WO 2010/068955)。核初期化物質は、ES 細胞に特異的に発現している遺伝子または ES 細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子もしくはその遺伝子産物であればよく、特に限定されないが、例えば、Oct3/4, Klf4, Klf1, Klf2, Klf5, Sox2, Sox1, Sox3, Sox15, Sox17, Sox18, c-Myc, L-Myc, N-Myc, TERT, SV40 Large T antigen, HPV16 E6, HPV16 E7, Bmi1, Lin28, Lin28b, Nanog, Esrrb, Esrrg または Glis1 が例示される。これらの初期化物質は、iPS 細胞樹立の際には、組み合わせられて使用されてもよい。例えば、上記初期化物質を、少なくとも1つ、2つもしくは3つ含む組み合わせであり、好ましくは4つを含む組み合わせである。

上記の各核初期化物質のマウスおよびヒト cDNA のヌクレオチド配列並びに当該 cDNA にコードされるタンパク質のアミノ酸配列情報は、WO 2007/069666 に記載の NCBI accession numbers を参照すること、また L-Myc、Lin28、Lin28b、Esrrb、Esrrg および Glis1 のマウスおよびヒトの cDNA 配列およびアミノ酸配列情報については、それぞれ下記 NCBI accession numbers を参照することにより取得できる。当業者は、当該 cDNA 配列またはアミノ酸配列情報に基づいて、常法により所望の核初期化物質を調製することができる。

遺伝子名	マウス	ヒト
L-Myc	NM_008506	NM_001033081
Lin28	NM_145833	NM_024674
Lin28b	NM_001031772	NM_001004317
Esrrb	NM_011934	NM_004452
Esrrg	NM_011935	NM_001438
Glis1	NM_147221	NM_147193

これらの核初期化物質は、タンパク質の形態で、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチドとの結合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよいし、あるいは、DNA の形態で、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター (以上、Cell, 126, pp.663-676, 2006; Cell, 131, pp.861-872, 2007; Science, 318, pp.1917-1920, 2007)、アデノウイルスベクター (Science, 322, 945-949, 2008)、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター (Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 85, 348-62, 2009) などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体 (HAC)、酵母人工染色体 (YAC)、細菌人工染色体 (BAC、PAC) などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用しうる (Science, 322:949-953, 2008)。ベクターには、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアデニル化サイトなどの制御配列を含むことができる。使用されるプロモーターとしては、例えば EF1 $\alpha$  プロモーター、CAG プロモーター、SR $\alpha$  プロモーター、SV40 プロモーター、LTR プロモーター、CMV (サイトメガロウイルス) プロモーター、RSV (ラウス肉腫ウイルス) プロモーター、MoMuLV (モロニーマウス白血病ウイルス) LTR、HSV-TK (単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ) プロモーターなどが用いられる。なかでも、EF1 $\alpha$  プロモーター、CAG プロモーター、MoMuLV LTR、CMV プロモーター、SR $\alpha$  プロモーターなどが挙げられる。さらに、必要に応



じて、薬剤耐性遺伝子(例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子など)、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質(GFP)、 $\beta$  グルクロニダーゼ(GUS)、FLAG などのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。また、上記ベクターには、体細胞への導入後、核初期化物質をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合する核初期化物質をコードする遺伝子を共に切除するために、それらの前後に LoxP 配列を有してもよい。別の好ましい一実施態様においては、トランスポゾンを用いて染色体に導入遺伝子を組み込んだ後に、プラスミドベクターもしくはアデノウイルスベクターを用いて細胞に転移酵素を作用させ、導入遺伝子を完全に染色体から除去する方法が用いられ得る。好ましいトランスポゾンとしては、例えば、鱗翅目昆虫由来のトランスポゾンである piggyBac 等が挙げられる (Kaji, K. et al., (2009), Nature, 458: 771-775、Woltjen et al., (2009), Nature, 458: 766-770、WO 2010/012077)。さらに、ベクターには、染色体への組み込みがなくとも複製されて、エピソームに存在するように、リンパ指向性ヘルペスウイルス (lymphotrophic herpes virus)、BK ウイルスおよび牛乳頭腫 (Bovine papillomavirus) の起点とその複製に係る配列を含んでいてもよい。例えば、EBNA-1 および oriP もしくは Large T および SV40ori 配列を含むことが挙げられる (WO 2009/115295、WO 2009/157201 および WO 2009/149233)。また、複数の核初期化物質を同時に導入するために、ポリシストロニックに発現させる発現ベクターを用いてもよい。ポリシストロニックに発現させるためには、遺伝子をコードする配列の間は、IRES または口蹄病ウイルス (FMDV) 2A コード領域により結合されていてもよい (Science, 322:949-953, 2008 および WO 2009/092042、WO 2009/152529)。

核初期化に際して、iPS 細胞の誘導効率を高めるために、上記の因子の他に、例えば、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤[例えば、バルプロ酸 (VPA) (Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、トリコスタチン A、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344 等の低分子阻害剤、HDAC に対する siRNA および shRNA (例、HDAC1 siRNA Smartpool(登録商標) (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene) 等) 等の核酸性発現阻害剤など]、DNA メチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば 5' -azacytidine) (Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、G9a

ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 [例えば、BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2: 525-528 (2008))等の低分子阻害剤、G9a に対する siRNA および shRNA (例、G9a siRNA(human) (Santa Cruz Biotechnology)等)等の核酸性発現阻害剤など]、L-channel calcium agonist (例えば Bayk8644) (Cell Stem Cell, 3, 568-574 (2008))、p53 阻害剤 (例えば p53 に対する siRNA および shRNA) (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、Wnt Signaling activator (例えば soluble Wnt3a) (Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008))、LIF または bFGF などの増殖因子、ALK5 阻害剤 (例えば、SB431542) (Nat. Methods, 6: 805-8 (2009))、mitogen-activated protein kinase signalling 阻害剤、glycogen synthase kinase-3 阻害剤 (PloS Biology, 6(10), 2237-2247 (2008))、miR-291-3p、miR-294、miR-295 などの miRNA (R. L. Judson et al., Nat. Biotech., 27:459-461 (2009))、等を使用することができる。

薬剤によって核初期化物質の内在性のタンパク質の発現を上昇させる方法における薬剤としては、6-bromoindirubin-3'-oxime、indirubin-5-nitro-3'-oxime、valproic acid、2-(3-(6-methylpyridin-2-yl)-1H-pyrazol-4-yl)-1,5-naphthyridine、1-(4-methylphenyl)-2-(4,5,6,7-tetrahydro-2-imino-3(2H)-benzothiazolyl)ethanone HBr(pifithrin-alpha)、prostaglandin J2 および prostaglandin E2 等が例示される (WO 2010/068955)。

iPS 細胞誘導のための培養培地としては、例えば(1) 10~15%FBS を含有する DMEM、DMEM/F12 または DME 培地 (これらの培地にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、puromycin、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、β-メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。)、(2) bFGF または SCF を含有する ES 細胞培養用培地、例えばマウス ES 細胞培養用培地 (例えば TX-WES 培地、トロンボ X 社) または霊長類 ES 細胞培養用培地 (例えば霊長類 (ヒト&サル) ES 細胞用培地 (リプロセル、京都、日本)、mTeSR-1)、などが含まれる。

培養法の例としては、たとえば、37°C、5%CO<sub>2</sub> 存在下にて、10%FBS 含有 DMEM または DMEM/F12 培地中で体細胞と核初期化物質 (DNA またはタンパク質) を接触させ約 4~7 日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞 (たとえば、マイトマイ

シン C 処理 STO 細胞、SNL 細胞等) 上にまきなおし、体細胞と核初期化物質の接触から約 10 日後から bFGF 含有霊長類 ES 細胞培養用培地で培養し、該接触から約 30~約 45 日またはそれ以上ののちに ES 細胞様コロニーを生じさせることができる。また、iPS 細胞の誘導効率を高めるために、5-10%と低い酸素濃度の条件下で培養してもよい。

あるいは、その代替培養法として、フィーダー細胞 (たとえば、マイトマイシン C 処理 STO 細胞、SNL 細胞等) 上で 10%FBS 含有 DMEM 培地 (これにはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、プューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 $\beta$ -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。) で培養し、約 25~約 30 日またはそれ以上ののちに ES 様コロニーを生じさせることができる。

上記培養の間には、培養開始 2 日目以降から毎日 1 回新鮮な培地と培地交換を行う。また、核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが、培養ディッシュ 100cm<sup>2</sup>あたり約  $5 \times 10^3$ ~約  $5 \times 10^6$  細胞の範囲である。

マーカー遺伝子として薬剤耐性遺伝子を含む遺伝子を用いた場合は、対応する薬剤を含む培地 (選択培地) で培養を行うことによりマーカー遺伝子発現細胞を選択することができる。またマーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合は蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、また発色酵素遺伝子の場合は発色基質を加えることによって、マーカー遺伝子発現細胞を検出することができる。

本明細書中で使用する「体細胞」は、哺乳動物 (例えば、ヒト、マウス、サル、ブタ、ラット等) 由来の生殖細胞以外のいかなる細胞であってもよく、例えば、角質化する上皮細胞 (例、角質化表皮細胞)、粘膜上皮細胞 (例、舌表層の上皮細胞)、外分泌腺上皮細胞 (例、乳腺細胞)、ホルモン分泌細胞 (例、副腎髄質細胞)、代謝・貯蔵用の細胞 (例、肝細胞)、境界面を構成する内腔上皮細胞 (例、I 型肺細胞細胞)、内鎖管の内腔上皮細胞 (例、血管内皮細胞)、運搬能をもつ繊毛のある細胞 (例、気道上皮細胞)、細胞外マトリックス分泌用細胞 (例、線維芽細胞)、収縮性細胞 (例、平滑筋細胞)、血液と免疫系の細胞 (例、T リンパ球)、感覚に関する細胞 (例、桿細胞)、自律神経系ニューロン (例、コリン作動性ニューロン)、

感覚器と末梢ニューロンの支持細胞（例、随伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、およびそれらの前駆細胞（組織前駆細胞）等が挙げられる。細胞の分化の程度や細胞を採取する動物の年齢などに特に制限はなく、未分化な前駆細胞（体性幹細胞も含む）であっても、最終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における体細胞の起源として使用することができる。ここで未分化な前駆細胞としては、たとえば神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）が挙げられる。

本発明において、体細胞を採取する由来となる動物個体は特に制限されないが、好ましくはヒトである。また、iPS 細胞を移植用細胞の材料として用いる場合、拒絶反応が起こらないという観点から、移植先の個体の HLA 遺伝子型が同一もしくは実質的に同一である体細胞を用いることが望ましい。ここで、「実質的に同一」とは、移植した細胞に対して免疫抑制剤により免疫反応が抑制できる程度に HLA 遺伝子型が一致していることであり、例えば、HLA-A、HLA-B および HLA-DR の 3 遺伝子座あるいは HLA-C を加えた 4 遺伝子座が一致する HLA 型を有する体細胞である。

<人工多能性幹細胞から心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を同時に製造する方法  
>

本発明において心筋細胞とは、少なくとも心筋トロポニン(cTnT)または $\alpha$ MHCを発現している細胞を意味する。cTnT は、ヒトの場合 NCBI の accession 番号 NM\_000364 が例示され、マウスの場合、NM\_001130174 が例示される。 $\alpha$ MHC は、ヒトの場合 NCBI の accession 番号 NM\_002471 が例示され、マウスの場合、NM\_001164171 が例示される。

本発明において内皮細胞とは、PE-CAM、VE-cadherin およびフォン-ウィルブラント因子(vWF)のいずれか一つを発現している細胞を意味する。また、壁細胞とは、Smooth muscle actin(SMA)を発現している細胞を意味する。ここで、PE-CAM は、ヒトの場合 NCBI の accession 番号 NM\_000442 が例示され、マウスの場合、NM\_001032378 が例示される。VE-cadherin は、ヒトの場合 NCBI の accession 番号 NM\_001795 が例示され、マウスの場合、NM\_009868 が例示される。vWF は、ヒトの

場合 NCBI の accession 番号 NM\_000552 が例示され、マウスの場合、NM\_011708 が例示される。SMA は、ヒトの場合 NCBI の accession 番号 NM\_001141945 が例示され、マウスの場合、NM\_007392 が例示される。

本発明は、次の工程により、人工多能性幹細胞から心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を同時に製造することができる；

- (a) 人工多能性幹細胞から心筋細胞を製造する工程、および
- (b) 前記心筋細胞を VEGF の存在下で培養する工程。

ここで、人工多能性幹細胞から心筋細胞を製造する方法として、例えば Laflamme MA らにより報告された多能性幹細胞を心筋細胞を製造することができる (Laflamme MA & Murry CE, Nature 2011, Review)。この他にも特に特定されないが、例えば、人工多能性幹細胞を浮遊培養により細胞塊 (胚様体) を形成させて心筋細胞を製造する方法、BMP シグナル伝達を抑制する物質の存在下で心筋細胞を製造する方法 (W02005/033298)、Activin A と BMP を順に添加させて心筋細胞を製造する方法 (W02007/002136)、カノニカル Wnt シグナル経路の活性化を促す物質の存在下で心筋細胞を製造する方法 (W02007/126077) および人工多能性幹細胞から Flk/KDR 陽性細胞を単離し、シクロスポリン A の存在下で心筋細胞を製造する方法 (W02009/118928) が例示される。

本発明はさらに、上記の工程により作製された心筋細胞、内皮細胞および壁細胞の混合細胞から未分化な細胞を除去する工程を含むことができる。

[人工多能性幹細胞から心筋細胞を製造する方法]

本発明では、好ましくは、次の工程による心筋細胞を製造する方法が例示される；

- (i) 人工多能性幹細胞を、Activin A を含む培地で培養する工程、および
  - (ii) 工程(i)の後、さらに、BMP4 と bFGF とを含む培地で培養する工程。
- (i) Activin A を含む培地で培養する工程

本工程では、前述のように得られた人工多能性幹細胞を任意の方法で分離し、浮遊培養により培養してもよく、コーティング処理された培養皿を用いて接着培養してもよい。好ましくは、接着培養である。ここで、分離の方法としては、力学的、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液 (例えば、

Accutase(TM)および Accumax(TM)が挙げられる) またはコラゲナーゼ活性のみを有する分離液を用いてもよい。好ましくは、コラゲナーゼ活性のみを有する分離液を用いて解離し、力学的に細かく分離する方法である。ここで、用いる人工多能性幹細胞は、使用したディッシュに対して80%コンフルエントになるまで培養されたコロニーを用いることが好ましい。

ここで浮遊培養とは、細胞を培養皿へ非接着の状態に培養することであり、特に限定はされないが、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理(例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理)されていないもの、もしくは、人工的に接着を抑制する処理(例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸(poly-HEMA)によるコーティング処理)したものを使用して行うことができる。

また、接着培養においては、コーティング処理された培養皿にて、任意の培地中で培養する。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル(BD)、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられる。好ましくは、マトリゲルである。より好ましくは、マトリゲルでコーティング処理された培養皿へ人工多能性幹細胞を接着させ、さらにマトリゲルを添加することで、人工多能性幹細胞全体をマトリゲルでコーティングするマトリゲルサンドイッチ法による接着培養である。

本工程における培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えばIMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、 $\alpha$ MEM培地、Doulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地などが包含される。好ましくは、RPMI 1640培地である。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清でもよい。必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時のFBSの血清代替物)、N2サプリメント (Invitrogen)、B27サプリメント (Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax (Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、抗生物質、抗酸

化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有しうる。本発明において好ましい増殖因子とは、Wnt1、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt7a、TGF- $\beta$ 、Activin A、Nodal、BMP2、BMP4、BMP6、BMP7、GDF、bFGF および VEGF が挙げられる。少なくとも、本工程では Activin A (例えば、(組換え) ヒト Activin A) を増殖因子として用いることが望ましい。

本発明において好ましい培地として、L-グルタミン、B27 サプリメントおよび Activin A を含有する RPMI 培地が例示される。

培地に添加される Activin A の濃度は、例えば、10ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、60ng/mL、70ng/mL、80ng/mL、90ng/mL、100ng/mL、110ng/mL、120ng/mL、130ng/mL、140ng/mL、150ng/mL、175ng/mL または、200ng/mL であるがこれらに限定されない。好ましくは、培地に添加される Activin A の濃度は、100ng/mL である。

培養温度は、以下に限定されないが、約 30~40°C、好ましくは約 37°C であり、CO<sub>2</sub> 含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO<sub>2</sub> 濃度は、好ましくは約 2~5% である。培養時間は、例えば 1 日から 5 日間の培養であり、好ましくは 1 日である。

#### (ii) BMP および bFGF を含む培地で培養する工程

本工程では、前工程が浮遊培養で行われた場合、得られた細胞集団をそのままコーティング処理された培養皿にて、任意の培地中で培養してもよい。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル (BD)、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられる。好ましくは、マトリゲルである。または、前工程が接着培養で行われた場合、培地の交換により培養を続けてもよい。

本工程で用いる培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えば IMDM 培地、Medium 199 培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、 $\alpha$  MEM 培地、Doulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12 培地、RPMI 1640 培地、Fischer's 培地、およびこれらの混合培地などが包含される。好ましくは、RPMI 1640 培地である。培地には、血清が含まれていないことが望ましい。必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、ITS-X (Invitrogen) (インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム含有)、

Knockout Serum Replacement (KSR) (ES 細胞培養時の FBS の血清代替物)、N2 サプリメント (Invitrogen)、B27 サプリメント (Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有しうる。本発明において好ましい増殖因子とは、Wnt1、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt7a、TGF- $\beta$ 、Activin A、Nodal、BMP2、BMP4、BMP6、BMP7、GDF、bFGF および VEGF が挙げられる。少なくとも、本工程では BMP4 (例えば、(組換え) ヒト BMP4) および bFGF (例えば、(組換え) ヒト bFGF) を増殖因子として用いることが望ましい。

本発明において好ましい培地として、L-グルタミン、B27 サプリメント、BMP4 および bFGF を含有する RPMI 培地が例示される。

培地に添加される BMP4 の濃度は、例えば、0.1ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、2.5ng/mL、5ng/mL、6ng/mL、7ng/mL、8ng/mL、9ng/mL、10ng/mL、11ng/mL、12ng/mL、13ng/mL、14ng/mL、15ng/mL、17.5ng/mL、20ng/mL、30ng/mL、40ng/mL または 50ng/mL であるがこれらに限定されない。好ましくは、培地に添加される BMP4 の濃度は、10ng/mL である。

培地に添加される bFGF の濃度は、例えば、0.1ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、2.5ng/mL、5ng/mL、6ng/mL、7ng/mL、8ng/mL、9ng/mL、10ng/mL、11ng/mL、12ng/mL、13ng/mL、14ng/mL、15ng/mL、17.5ng/mL、20ng/mL、30ng/mL、40ng/mL または 50ng/mL であるがこれらに限定されない。好ましくは、培地に添加される bFGF の濃度は、10ng/mL である。

培養温度は、以下に限定されないが、約 30~40°C、好ましくは約 37°C であり、CO<sub>2</sub> 含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO<sub>2</sub> 濃度は、好ましくは約 2~5% である。培養時間は、例えば 1 日から 10 日間の培養であり、好ましくは 4 日である。

#### [VEGF の存在下で心筋細胞を培養する方法]

本工程では、前述した方法で得られた心筋細胞をさらに VEGF の存在下で培養することにより、心筋細胞、内皮細胞および壁細胞が所望の構成比率から成る混合細胞を製造することができる。



例えば、得られた心筋細胞は、前工程が、浮遊培養後の細胞集団の場合、コーティング処理された培養皿にて、任意の培地中で培養してもよい。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル (BD)、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられる。好ましくは、マトリゲルである。または、本工程では前述の工程で接着培養により得られた細胞を、培地の交換により培養を続けてもよい。

本工程で用いる培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えば IMDM 培地、Medium 199 培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、 $\alpha$  MEM 培地、Doulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12 培地、RPMI 1640 培地、Fischer's 培地、およびこれらの混合培地などが包含される。好ましくは、RPMI 1640 培地である。培地には、血清が含まれていないことが望ましい。必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、ITS-X (Invitrogen) (インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム含有)、Knockout Serum Replacement (KSR) (ES 細胞培養時の FBS の血清代替物)、N2 サプリメント (Invitrogen)、B27 サプリメント (Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有する。本発明において好ましい増殖因子とは、Wnt1、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt7a、TGF- $\beta$ 、Activin A、Nodal、BMP2、BMP4、BMP6、BMP7、GDF、bFGF および VEGF が挙げられる。少なくとも、本工程では VEGF を増殖因子として用いることが望ましい。

本発明において好ましい培地として、L-グルタミン、B27 サプリメントおよび VEGF を含有する RPMI 1640 培地が例示される。

培地に添加される VEGF の濃度は、例えば、10ng/mL~500ng/mL、25ng/mL~300ng/mL、40ng/mL~200ng/mL、50ng/mL~100ng/mL、60ng/mL~90ng/mL または 65ng/mL~85ng/mL の範囲内であり得る。好ましくは、培地に添加される VEGF の

濃度は、50ng/mL～100ng/mL である。また、培地に添加される VEGF の濃度は、10ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、55ng/mL、60ng/mL、65ng/mL、70ng/mL、75ng/mL、80ng/mL、85ng/mL、90ng/mL、95ng/mL、100ng/mL、110ng/mL、120ng/mL、130ng/mL、140ng/mL、150ng/mL または 200ng/mL であってもよいがこれらに限定されない。好ましくは、培地に添加される VEGF の濃度は、75ng/mL である。

培養温度は、以下に限定されないが、約 30～40℃、好ましくは約 37℃であり、CO<sub>2</sub>含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO<sub>2</sub>濃度は、好ましくは約 2～5% である。培養時間は、例えば 4 日から 20 日間(例えば、5～15 日間)の培養であり、好ましくは 10 日である。

本方法により作製された心筋細胞、内皮細胞および壁細胞の細胞構成比は、以下のものに限定されないが、心筋細胞 40～80%、内皮細胞 1～20%、壁細胞 1～40%、未分化細胞 0.1～10% である。少なくとも、内皮細胞は、3%程度含有していることが好ましい。心筋細胞、内皮細胞および壁細胞の構成比は、心筋細胞 62.7%、内皮細胞 7.9%、壁細胞 18.3%、未分化細胞 2.7%の構成比の混合細胞が例示される。本発明による心筋細胞、内皮細胞および壁細胞の細胞構成比は、VEGF の濃度およびその他の種々の培養条件により、任意に変化させることが可能であり、細胞をシート化した際に適度な強度を保つことができる範囲内で任意に変化し得る。

〔未分化な細胞 (TRA-1-60 陽性細胞) を除去する工程〕

本発明はさらに、上記の工程により作製された心筋細胞、内皮細胞および壁細胞の混合細胞から未分化な細胞を除去する工程を含むことができる。

本工程は、混合細胞中の心筋細胞、内皮細胞および壁細胞と未分化な細胞を分離し得る任意の方法を採用することができる。心筋細胞、内皮細胞および壁細胞と未分化な細胞の分離は、未分化な細胞の指標をもとに混合細胞から未分化な細胞のみを取り出す方法であってもよく、または心筋細胞、内皮細胞および壁細胞の指標をもとに混合細胞から心筋細胞、内皮細胞および壁細胞を取り出す方法であってもよい。好ましくは、本工程において前者の方法が用いられる。

未分化な細胞の指標は、例えば、未分化な細胞に特異的に発現している遺伝子またはタンパク質であり得る。これらの遺伝子またはタンパク質は、当分野にお

いて十分に知られており (Cell., 2005 Sep 23;122(6):947-56, Stem Cells., 2004;22(1):51-64, Mol Biol Cell., 2002 Apr;13(4):1274-81)、例えば、Oct3/4、Nanog(以上、転写因子)、SSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81(以上、細胞表面抗原)などが挙げられるがこれらに限定されない。本工程における指標は、好ましくは、細胞表面抗原が用いられ、特に好ましくは、TRA-1-60が指標として用いられる。

心筋細胞、内皮細胞および壁細胞それぞれの指標としては、例えば、cardiac troponin-T (cTnT) (心筋細胞)、VE-cadherin (内皮細胞)、PDGFRb (壁細胞)などが用いられるがこれらに限定されない。

本工程における未分化な細胞の除去は、上記の指標をもとに、例えば、フローサイトメトリー (FACS)、磁気細胞分離法 (MACS)などの方法を用いて行われる。好ましくは、MACSが用いられる。

本発明の好ましい態様において、混合細胞から未分化な細胞を除去する工程は、TRA-1-60抗体により未分化な細胞を捕捉し、捕捉した未分化な細胞 (TRA-1-60陽性細胞)を免疫磁性的な方法 (MACS)で除去することにより行われる。

未分化な細胞を除去する工程を行った後の混合細胞は、心筋細胞、内皮細胞および壁細胞のみで構成されていてもよく、または心筋細胞、内皮細胞および壁細胞に加えて任意の細胞が含まれていてもよい。任意の細胞の中には、未分化な細胞が含まれていることもあり得る。

#### <心筋シートを製造する方法>

本発明において、心筋シートとは、心臓または血管を形成する各種細胞から成り、細胞間結合により細胞同士が連結されたシート状の細胞集合体を意味する。ここで、心臓または血管を形成する各種細胞とは上述の心筋細胞、内皮細胞および壁細胞が例示される。

本発明において好ましい心筋シートは、自己拍動しており、細胞間の電氣的結合および配向性を有しており、拍動に应答して一様なカルシウムイオン濃度勾配の変化を有する。

心筋シートは、少なくとも、上述の方法で同時に作製された心筋細胞、内皮細胞および壁細胞の混合細胞をさらに培養することによって製造される。

上記培養には、(メタ)アクリルアミド化合物、N- (若しくは N,N-ジ)アルキル置換(メタ)アクリルアミド誘導体(特開 2010-255001)、又はビニルエーテル誘導体を重合させた温度応答性ポリマーを被覆した培養器材を用いてもよく、好ましくは、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを固定した培養器材である。尚、本培養器材は、UpCell として WAKO 社より購入することもできる。

上記培養に用いられる培養器材は、さらに任意のコーティング剤によりコーティング処理されていてもよい。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル(BD)、コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせが挙げられる。好ましくは、ゼラチンである。

本工程で用いる培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えば IMDM 培地、Medium 199 培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) 培地、 $\alpha$  MEM 培地、Doulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) 培地、Ham's F12 培地、RPMI 1640 培地、Fischer's 培地、およびこれらの混合培地などが包含される。好ましくは、 $\alpha$  MEM 培地または RPMI 1640 培地である。培地には、血清が含まれていることが望ましいが、必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム、ITS-X (Invitrogen) (インスリン、トランスフェリン、亜セレン酸ナトリウム含有)、Knockout Serum Replacement (KSR) (ES 細胞培養時の FBS の血清代替物)、N2 サプリメント (Invitrogen)、B27 サプリメント (Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素などに代替されてもよい。本培地には、さらに、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロール、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、低分子化合物、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの 1 つ以上の物質も含有する。本発明において好ましい増殖因子とは、Wnt1、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt7a、TGF- $\beta$ 、Activin A、Nodal、BMP2、BMP4、BMP6、BMP7、GDF、bFGF および VEGF が挙げられる。少なくとも、本工程では VEGF を増殖因子として用いることが望ましい。さらに、低分子化合物として、Rho キナーゼ (ROCK) 阻害剤が例示される。

ROCK 阻害剤は、Rho キナーゼ (ROCK) の機能を抑制できるものである限り特に限

定されず、例えば、Y-27632(例えば、Ishizaki et al., Mol. Pharmacol. 57, 976-983 (2000) ; Narumiya et al., Methods Enzymol. 325, 273-284 (2000) 参照)、Fasudil/HA1077 (例えば、Uenata et al., Nature 389: 990-994 (1997)参照)、H-1152 (例えば、Sasaki et al., Pharmacol. Ther. 93: 225-232 (2002)参照)、Wf-536 (例えば、Nakajima et al., Cancer Chemother Pharmacol. 52(4): 319-324 (2003)参照) およびそれらの誘導体、ならびに ROCK に対するアンチセンス核酸、RNA 干渉誘導性核酸 (例えば、siRNA)、ドミナントネガティブ変異体、及びそれらの発現ベクターが挙げられる。また、ROCK 阻害剤としては他の低分子化合物も知られているので、本発明においてはこのような化合物またはそれらの誘導体も使用できる (例えば、米国特許出願公開第 20050209261 号、同第 20050192304 号、同第 20040014755 号、同第 20040002508 号、同第 20040002507 号、同第 20030125344 号、同第 20030087919 号、及び国際公開第 2003/062227 号、同第 2003/059913 号、同第 2003/062225 号、同第 2002/076976 号、同第 2004/039796 号参照)。本発明では、1 種または 2 種以上の ROCK 阻害剤が使用され得る。

本発明において好ましい培地として、血清、Y-27632 および VEGF を含有する  $\alpha$  MEM 培地または血清および VEGF を含有する RPMI 1640 培地が例示される。

本工程において、培養に供する各細胞の細胞数は、所望のシートの大きさによって適宜変更できるが、例えば  $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^8$  であるが、心筋シートの大きさは培養器材に依拠して変化させることができる。また、培養日数は、1 日から 10 日でよく、好ましくは 4 日である。

上述の方法で同時に作製された心筋シートに含有される心筋細胞、内皮細胞および壁細胞の細胞構成比はシートの形成前後で変化していても良く、前記構成比は、以下のものに限定されないが、心筋細胞 30~70%、内皮細胞 0.1~20%、壁細胞 1~40%、未分化細胞 0.1~10% である。例えば、心筋細胞、内皮細胞および壁細胞の構成比は、心筋細胞 47.0%、内皮細胞 4.1%、壁細胞 22.5%、未分化細胞 2.2% である。

心筋シート製造のための培養において、心筋シート移植後の腫瘍の形成を防ぐ目的で多能性を保持している未分化細胞を除外して培養することが望まれる。多能性を保持している未分化細胞は、例えば、Nanog または Oct3/4 により認識する

ことが可能である。

作製した心筋シートは、積層化して用いても良く、好ましくは、3層重ねた心筋シートである。積層化は、心筋シートを培養液中で重ねた（好ましくは、各心筋シートをずらして重ねた）後、培養液を除去する事によって接合させることができる。複数枚重ねる場合は、一度に同作業を行っても良く、好ましくは、1層ごとに同作業を行う。

#### <心疾患の治療>

上記方法でえられた心筋細胞、内皮細胞および壁細胞から構成される混合細胞および心筋シートは、動物（好ましくはヒト）の心疾患の治療剤として用いることができる。心疾患の治療方法は、混合細胞である場合、直接心臓の心筋層へ投与してもよい。この時、細胞単体で投与してもよく、好ましくは、生着を促すような足場材と共に投与され得る。ここで足場材とは、コラーゲンなどの生体由来の成分やこれに代替するポリ乳酸などの合成ポリマーが例示されるが、これらに限定されない。心筋シートを投与する場合、所望の部分を覆うように配置することによって達成される。ここで、所望の部分を覆うように配置することは、当該分野において周知技術を用いて行うことができる。配置に際し、所望の部分が大きい場合は、組織を取り巻くように配置してもよい。また、投与は、所望の効果をj得るため、同部分へ数回の配置を行うこともできる。数回の配置を行う場合、所望の細胞が組織へ生着し、血管新生を行うために十分な時間をおいて行うことが望ましい。このような心疾患の治療の機序は、心筋シートの生着により生じる効果であってもよく、あるいは細胞の生着によらない間接的な作用（例えば、誘引物質を分泌することによるレシピエント由来細胞の損傷部位への動員による効果）であってもよい。

本発明における心筋シートは、心筋細胞、内皮細胞および壁細胞に加えて、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン等の細胞足場材料（スキャホールド）を含んでいてもよい。あるいは、本発明における心筋シートは、心筋細胞、内皮細胞および壁細胞以外の任意の細胞（複数も可）を含んでいてもよい。

心疾患の治療において用いられる前記混合細胞または心筋シートは、疾患の対象となる動物種、疾患の治療部位の大きさ、疾患の治療方法などに応じて任意の

細胞数もしくは任意の大きさまたは数のシートを用いることができる。一般には、動物種や個体の大きさの巨大化に伴い、治療のために必要とされる細胞数の増加もしくは心筋シートのサイズの大型化またはシート数の増加がなされる。

本発明において治療される心疾患は、心不全、虚血性心疾患、心筋梗塞、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症、拡張型心筋症などの疾患または障害による欠損等が挙げられるがこれらに限定されない。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はそれらの実施例によって制限されないものとする。

[実施例 1 : ヒト iPS 細胞から心筋細胞、内皮細胞および壁細胞への分化誘導]

ヒト iPS 細胞 (201B6) は、京都大学の山中教授より受領し、以前に報告された方法 (Uosaki H. et al. PLoS One 2011;6:e23657) と同様の方法を用いて維持培養を行った。詳細には、次のとおりである。未分化 hiPS 細胞を、マトリゲル (growth factor reduced, 1:60 希釈、Invitrogen) でコーティングされた FALCON 培養皿 (10cm) に播種し、マウス胎児性線維芽細胞 (MEF) からの conditioned medium (培養上清) (MEF-CM) に 4ng/mL のヒト bFGF (hbFGF, WAKO) を添加した培地を用いて培養維持を行った。この際、10cm dish に対して 10ml の培地を使用した。Conditioned medium の基礎培地は、Knockout DMEM (GIBCO) 471mL, Knockout serum replacement (KSR) 120mL, NEAA 6mL, 200mM L-Glutamine 3mL, 55mM 2-ME (メルカプトエタノール (GIBCO), 4 ng/ml hbFGF) を混合することにより作製された。MEF は、Mitomycin-C (MMC) (WAKO) により 2.5 時間処理されたものを用いた。

4-6 日毎に、CTK solution (0.1% Collagenase IV, 0.25% Trypsin, 20% KSR, および 1 mM  $\text{CaCl}_2$  in Phosphate buffered saline (PBS)) を用いて細胞コロニーを剥離し、セルストレーナーで small clump の状態にして継代培養した。

続いて、Versene (Invitrogen) を用いて 37°C で 3-5 分間インキュベートすることにより、hiPS 細胞を培養皿から剥離した。Versene を吸引した後、MEF-CM にてピペッティングし、single cell にて回収した後、遠心分離して細胞数をカウントした。100,000 細胞/cm<sup>2</sup> をマトリゲルでコーティングした 6well plate (Growth Factor Reduced Matrigel, BD Biosciences) に播種した。培地としては、4ng/mL hbFGF 添加した MEF-CM (6well plate に対し 5ml) を用いた。培地の交換なしに

2-3 日間培養し、コンフルエントになった段階で、マトリゲル (1:60 希釈) および 4ng/mL hbFGF を含んだ MEF-CM で培地交換を行った(マトリゲルサンドイッチ)。

24 時間後に、心筋細胞を分化誘導するために、100 ng/mL の Activin A (ActA; R&D Systems) を添加した RPMI+B27 培地 (RPMI1640 (GIBCO), 2 mM L-glutamine, x1 B27 supplement without insulin (GIBCO)) に交換した (この日を分化誘導 0 日目とする)。24 時間の培養後、10 ng/mL human Bone morphogenetic protein 4 (BMP4; R&D) と 10 ng/mL の hbFGF を添加した RPMI+B27 培地に交換した (1 日目)。4 日間の培養後、内皮細胞および壁細胞をさらに誘導するため 3 種の濃度 (0、50 または 100 ng/ml) の VEGF (rhVEGF, WAKO) を添加した RPMI+B27 培地に交換した (5 日目)。2 日おきに同様の培地にて培地交換を行い、10 日間の培養後、AccuMax (Innovative Cell Technologies) を用いて細胞を回収し、一部を FACS 解析に用いた (15 日目)。

FACS による解析には、下記の抗体を用いた。

- A) 心筋細胞に対しては、monoclonal antibodies for cardiac troponin-T (cTnT) (Neomarkers) (Zenon Mouse IgG Labeling Kits (Molecular Probes) を用いて Alexa Fluor 488 にて標識したものを使用) ;
- B) 内皮細胞に対しては、anti-human VE-cadherin-FITC (BD) ; および
- C) 壁細胞に対しては、anti-human PDGFRb-FITC (BD)。

その結果、細胞構成比は、(1) 0 ng/ml VEGF の場合 : 0 ng/ml VEGF の場合心筋細胞 (CM) : 55.7%, 内皮細胞 (EC) : 0.4%, 壁細胞 (MC) : 34.4%、(2) 50 ng/ml VEGF の場合 : CM: 54.1%, EC: 13.4%, MC: 16.9%、および (3) 100 ng/ml VEGF の場合 ; CM: 35.7%, EC: 27.4%, MC: 18.0% であることが示された (図 1)。

#### [実施例 2 : 心筋シートの作製]

実施例 1 の方法により作製された心筋細胞、内皮細胞および壁細胞の混合細胞 (1,000,000 細胞/well) を、50nM VEGF (rhVEGF, WAKO) と 10  $\mu$ M Y-27632 (Rock inhibitor, WAKO) を添加した 1ml の  $\alpha$ MEM+FBS 培地 (alpha minimum essential medium ( $\alpha$  MEM) (GIBCO, Grand Island, NY), 10% fetal bovine serum (FBS) および 5.5 mM 2-ME) 中、ゼラチン (Sigma-Aldrich) コートした温度感受性培養皿 (UpCell, WAKO) 12-multiwell plate 上に播種し、37°C にて培養した。培養 2 日



後、培地を 50nM VEGF (rhVEGF, WAKO) を添加した RPMI +FBS 培地 (RPMI 1640, L-glutamine および 10% FBS) に交換した。さらに 2 日間の培養後、UpCell を 37°C から室温にもどすことにより、細胞をシート状に剥離させ、心筋シートを得た。

[実施例 3 : 心筋シートの細胞構成]

実施例 2 の方法により作製された心筋シートを用いて FACS 解析を行った。解析には、下記の抗体を用いた。

- A) 心筋細胞に対しては、monoclonal antibodies for cardiac troponin-T (cTnT) (Neomarkers) (Zenon Mouse IgG Labeling Kits (Molecular Probes) を用いて Alexa Fluor 488 にて標識したものを使用) ;
- B) 内皮細胞に対しては、anti-human VE-cadherin-FITC (BD) ;
- C) 壁細胞に対しては、anti-human PDGFRb-FITC (BD) ; および
- D) 未分化細胞に対しては、anti-human TRA1-60-FITC (BD)。

シート化前の細胞 (UpCell に播種する直前の細胞 : Pre-sheet) およびシート化後の細胞 (4 日間の心筋シート作製工程を経て作製された心筋シートの回収直後の細胞 : Post-sheet) を用いて各々 FACS 解析を行った。その結果、シート化前の細胞構成比は、CM:  $62.7 \pm 11.7\%$ , EC:  $7.9 \pm 4.9\%$ , MC:  $18.3 \pm 11.0\%$  および未分化細胞 (Undifferentiated) :  $2.7 \pm 1.3$  であったが、シート化後では、CM:  $47.0 \pm 15.9\%$ , EC:  $4.1 \pm 3.7\%$ , MC:  $22.5 \pm 15.7\%$  および Undifferentiated :  $2.2 \pm 1.1$  であることが示された (図 2)。

[実施例 4 : 心筋シートの電気生理学的評価]

電気生理学的評価を行うため、0.1%ゼラチンにてコーティングした電極付き培養皿 (MED64 system, アルファメッド・サイエンス) の電極上に、上記方法により作製した心筋シートを静置した。続いて、培地を吸引することで電極とシートを固定した後、ゆっくり培地を加え、培養継続した。2 日後、それぞれの電極の電位を測定することにより、シート上での電位の伝導を記録した。その結果を図 3 に示す。細胞外電位測定により、拍動が電氣的に連続して一方向性に伝導することを確認した。また、不整脈の誘因となりうる不規則で周囲との同期を認めないような異常電位発生部位は観察されなかった。

[実施例 5 : 心筋シートのカルシウム濃度変化による評価]

カルシウム濃度変化による評価を行うために、実施例 4 と同様の方法で心筋シートを FALCON 培養皿上に固定させ、培養を継続した。培養の 2 日後に、最終 5  $\mu$  M の濃度になるように Fluo8(ナカライテスク)を溶解させた培地へ交換した。37°C で 1 時間のインキュベーションの後、PBS にて 2 回洗浄し、Fluo8 を含まない培地を入れた。BZ-9000(キーエンス)にて、蛍光を検出することでカルシウム濃度変化を測定したところ、自己拍動に沿って一様な濃度勾配の変化が観察された(図 4)。

〔実施例 6 : 心筋シートの積層化〕

ゼラチンにてコーティングしたディッシュ上に、実施例 1 および 2 の方法で作製した心筋シートを広げて静置し、培地を吸引し培養皿とシートを固定後、培地を加えて 37°C にて 30 分インキュベートした。別の心筋シートを広げてディッシュに固定したシートの上へ静置し、培地を吸引して積層させた。同様の工程を 3 層分繰り返す、2, 3 層目は元のシートから少しずつ位置をずらして積層化させた。その後、ピペットマンを用いて培養皿底面を沿わせるように培地を流し、積層化された細胞シートを培養皿からはがした(図 5 および 6)。

〔実施例 7 : 疾患モデルラットに対する心筋シート移植および心機能評価〕

10-13 週齢、250~330g の無胸腺免疫不全ラット(F344/N Jcl-rnu/rnu) (日本クレア) より次の方法で亜急性期心筋梗塞(MI)モデルを作成した。当該ラットをラット用人工呼吸器にて呼吸管理し、イソフルラン吸引により麻酔した。続いて、少量の酸素による人工呼吸下で左肋間開胸による心膜切開より心臓を露出後、前下行枝を第一中隔枝末梢で 6-0 ポリプロピレン糸にて結紮した。末梢灌流領域の収縮低下および色調変化を確認(それらを認めない場合再度結紮を施行)した後、4-0 ポリプロピレン糸にて閉創した。6 日後に心臓超音波検査(Vivid7, GE 横河メディカル)にて MI の有無を確認した。左室内径短縮率(FS)が 40%を超えるものは不適モデルとして除外した。このように MI 導入後 7 日目に、上記の方法において作製した 3 枚の心筋シートを積層化して用いた。移植は、MI モデルラットに対しジエチルエーテルにて麻酔導入後、ラット用人工呼吸器にて呼吸管理し、イソフルランにて麻酔を維持した。左肋間開胸にて開胸、肺・胸壁との癒着を慎重に剥離し心筋梗塞部を露出させ、積層化心筋シートを梗塞部に移植した。15 分静置ののち 4-0 ポリプロピレン糸にて閉創した。Sham 手術群に対しては心筋梗塞部

露出を同様に行い、15分後に同様に閉創した。

移植後4週および3カ月に心臓超音波検査により心機能を測定した。治療群と Sham 群についてそれぞれ評価し比較した(移植後4週: n = 20(治療群) / 18(Sham 群)、移植後3カ月: n = 11(治療群) / 8(Sham 群))。

心臓超音波検査は次の方法で行った。ジエチルエーテルにて麻酔導入後、ラット用人工呼吸器にて呼吸管理し、イソフルランにて RR 間隔 120~200msec になるような深度で麻酔を維持した。続いて、10S プローブ (4.0~11.0MHz) を用いて測定した。M モードにて拡張期および収縮期の中隔径、左室内腔径、後壁径を測定し、左室内径短縮率 (fractional shortening; FS) および収縮期壁厚増加率 (systolic thickening) を計算した。B モードにて拡張期および収縮期の左室内腔面積および左室周囲長を測定し、左室断面積変化率 (fractional area change; FAC) および非収縮範囲 (akinetik lesion; AL) を計算した。測定時には、人工呼吸を停止し、呼吸によるバイアスを除いた。その結果、左室収縮能を示す FS, FAC および systolic thickening は、治療群において、治療後4週および3カ月で治療前に比べ改善を認め、Sham 群に比べ有意に高値であることが示された。また AL で示される梗塞範囲についても治療前に比べ4週および3カ月で縮小し、Sham 群と比較して有意に限定されていた。左室拡張期の直径については、4週の段階で Sham 群は治療群に対して有意に左室拡大を認めた (図7および8)。

#### [実施例8: 大型シートの作製]

実施例1の方法により作製された心筋細胞、内皮細胞および壁細胞の混合細胞 (8,000,000-10,000,000細胞/well) を、50nM VEGF (rhVEGF, WAKO) と 10  $\mu$ M Y-27632 (Rock inhibitor, WAKO) を添加した 17mL の aMEM+FBS 培地 (alpha minimum essential medium ( $\alpha$  MEM) (GIBCO, Grand Island, NY), 10% fetal bovine serum (FBS) および 5.5 mM 2-ME) 中、ゼラチン (Sigma-Aldrich) コートした温度感受性培養皿 (10cm UpCell dish, WAKO) 上に播種し、37°Cにて培養した。培養の2日後、培地を 50nM VEGF (rhVEGF, WAKO) を添加した RPMI 1640+L-glutamine+10% FBS 培地に交換した。さらに2日間の培養後、UpCell を 37°Cから室温にもどすことにより、細胞をシート状に剥離させ、大型心筋シートを得た。

#### [実施例9: 混合細胞からの TRA-1-60 陽性細胞の除去]

実施例 1 の方法により得られた 15 日目の心筋細胞、内皮細胞および壁細胞の混合細胞を、AccuMax (Innovative Cell Technologies) を用いて回収した。回収した細胞に Anti-Human TRA-1-60-FITC 抗体 (BD) を加えて、室温にて 20 分間インキュベートした。続いて、Anti-FITC MACS beads (Miltenyi) を加えて、4°C にて 20 分間インキュベートした。洗浄後、autoMACS (Miltenyi) を用いて、depl025 モードにて TRA-1-60 陽性細胞を免疫磁性的に除去した。TRA-1-60 陰性細胞の回収率を表 1 に示す。

表 1

	全細胞数 ( $\times 10^4$ )	陰性細胞数 ( $\times 10^4$ )
1	1000	199 (19.9%)
2	2140	350 (16.4%)
3	2000	526 (26.3%)
4	2000	584 (29.2%)
5	1840	518 (28.2%)
6	3500	1096 (31.3%)

#### [実施例 10 : 心筋シートの作製]

実施例 9 の方法により作製された TRA-1-60 陽性細胞除去後の混合細胞 (1,000,000 細胞/well) を用いて、実施例 2 と同様の方法により、心筋シートを作製した。

#### [実施例 11 : 疾患モデルラットに対する心筋シート移植および心機能評価]

実施例 7 と同様の方法により、実施例 10 の方法により作製された心筋シートの疾患モデルラットへの移植後の心機能を評価した。心機能は、左室内径短縮率 (FS)、収縮期壁厚増加率、非収縮範囲 (AL)、左室拡張期の直径 (LVDd) についてそれぞれ評価した。結果を図 10 に示す。

この結果、実施例 10 の方法により作製された心筋シートは、疾患モデルラットへの移植後 2 週間で心機能の回復を認め、以後 4 週間においてもその効果を認めた。また、この 4 週間までの観察において、腫瘍の形成は見られなかった。

### 産業上の利用可能性

本発明の心筋シートは、それを患者の心疾患患部に移植することによって、正常な心筋細胞が増殖するとともに、血流を伴った血管新生をも促進することができる。このことから、心不全、虚血性心疾患、心筋梗塞、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症、拡張型心筋症などの心疾患の治療のための再生医療に本発明の心筋シートを使用することができる。また、本発明の心筋シートは、心臓の細胞・組織モデルとして、薬剤の安全性試験や創薬スクリーニングのために使用することもできる。

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. 人工多能性幹細胞から心筋細胞、内皮細胞および壁細胞から構成される混合細胞を製造する方法であって、下記の工程：

(a) 人工多能性幹細胞から心筋細胞を製造する工程、および

(b) 前記心筋細胞を VEGF (vascular endothelial growth factor) の存在下で培養する工程、

を含む、方法。

2. 前記 VEGF の濃度が、50ng/mL 以上、100ng/mL 以下の範囲である、請求項 1 に記載の方法。

3. 前記混合細胞において、内皮細胞の含有率が 3% 以上である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

4. 前記工程 (a) が 2~15 日間および前記工程 (b) が 5~15 日間である、請求項 1~3 のいずれか 1 項に記載の方法。

5. 前記工程 (a) が 5 日間および前記工程 (b) が 10 日間である、請求項 4 に記載の方法。

6. 前記工程 (a) が、下記の工程：

(i) 人工多能性幹細胞を、Activin A を含む培地で培養する工程、および

(ii) 工程 (i) の後、さらに、BMP4 (bone morphogenetic protein 4) と bFGF (basic fibroblast growth factor) とを含む培地で培養する工程、

を含む、請求項 1~3 のいずれか 1 項に記載の方法。

7. 前記工程 (i) が 1~5 日間および前記工程 (ii) が 1~10 日間である、請求項 6 に記載の方法。

8. 前記工程 (i) が 1 日間であり、前記工程 (ii) が 4 日間である、請求項 7 に記載の方法。

9. 前記工程 (b) で得られた細胞から、TRA-1-60 陰性細胞を選択する工程をさらに含む、請求項 1~8 のいずれか 1 項に記載の方法。

10. 請求項 1~9 のいずれか 1 項に記載の方法で得られた混合細胞を含む、心疾患治療剤。

- 1 1. 請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載の方法で製造された混合細胞を温度応答性ポリマーを被覆した培養器材を用いて培養する工程を含む、心筋シートを製造する方法。
- 1 2. 前記シートを積層化する工程をさらに含む、請求項 1 1 に記載の方法。
- 1 3. 前記積層化が 3 層である、請求項 1 2 に記載の方法。
- 1 4. 前記工程が、混合細胞を血清を含有する培地で培養する工程である、請求項 1 1 に記載の方法。
- 1 5. 前記混合細胞がヒト細胞である、請求項 1 ～ 9 および 1 1 ～ 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 1 6. 前記混合細胞がヒト細胞である、請求項 1 0 に記載の心疾患治療剤。
- 1 7. 請求項 1 1 ～ 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法で得られた心筋シートを含む、心疾患治療剤。

図 1

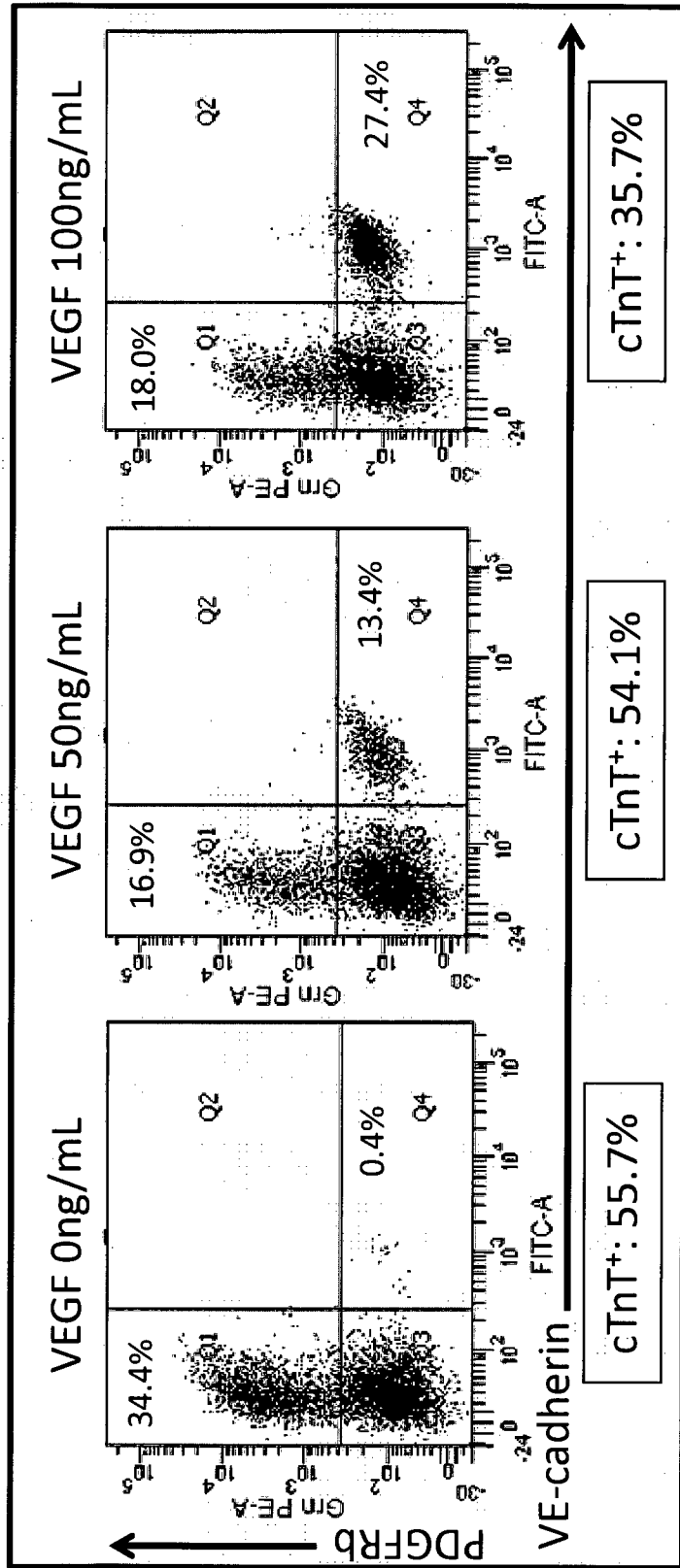
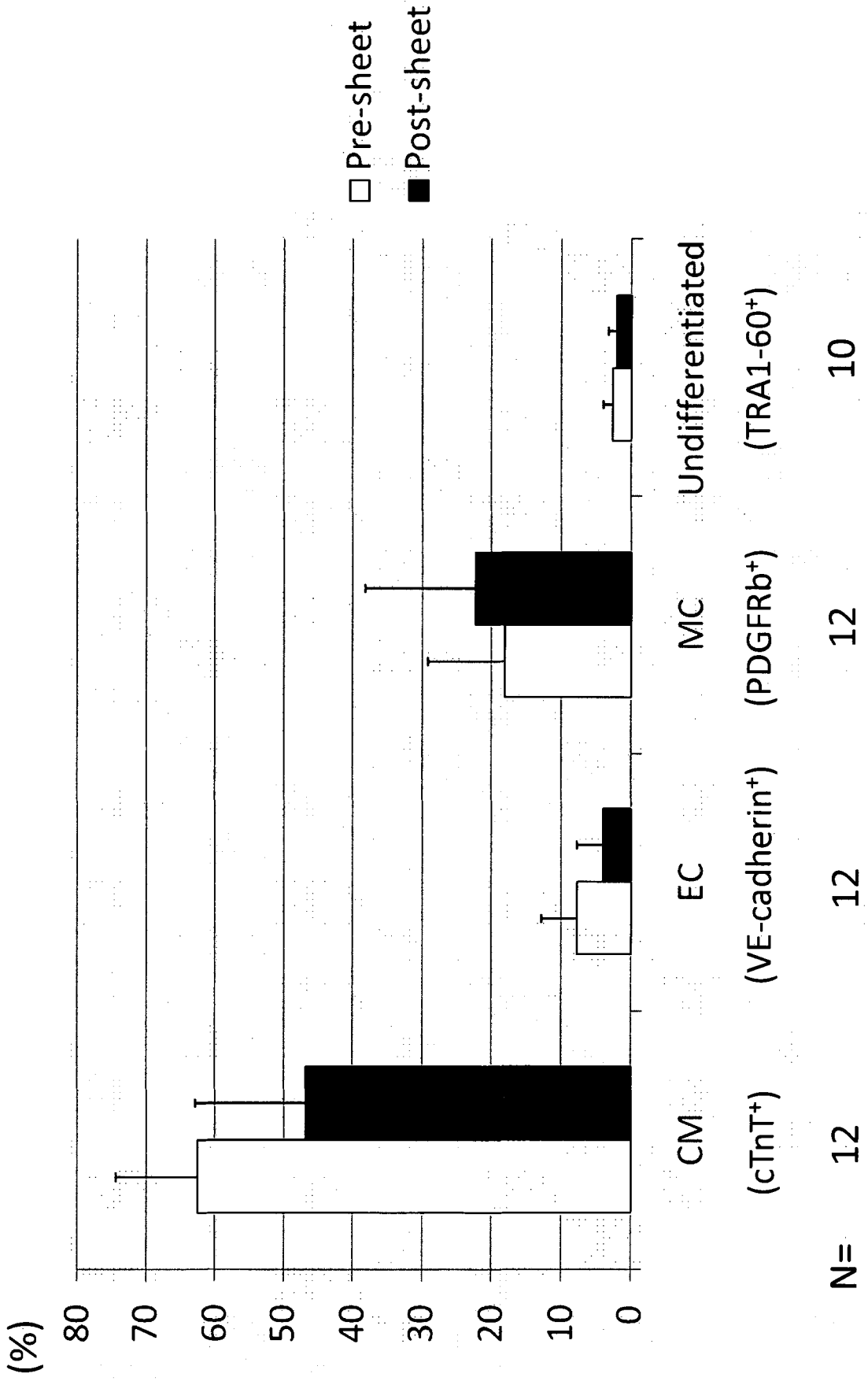




図 2

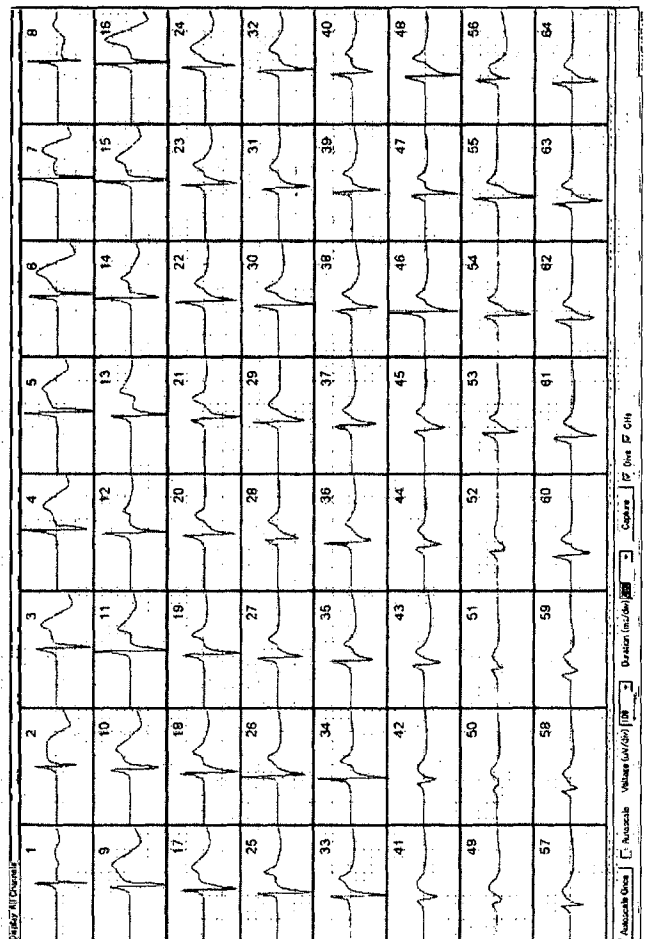


3

A



B



C

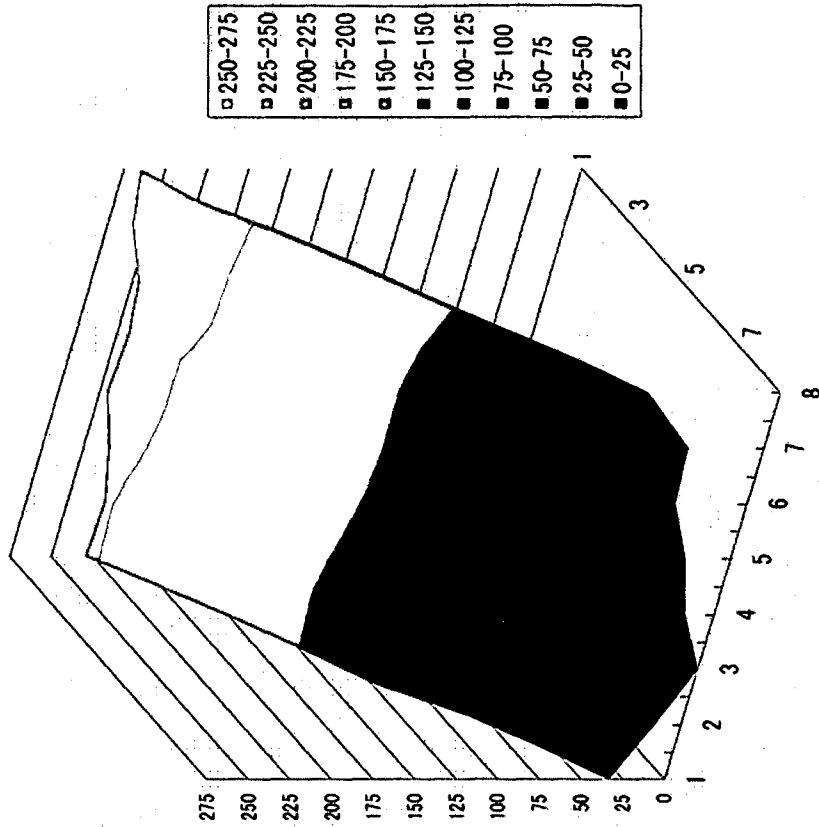
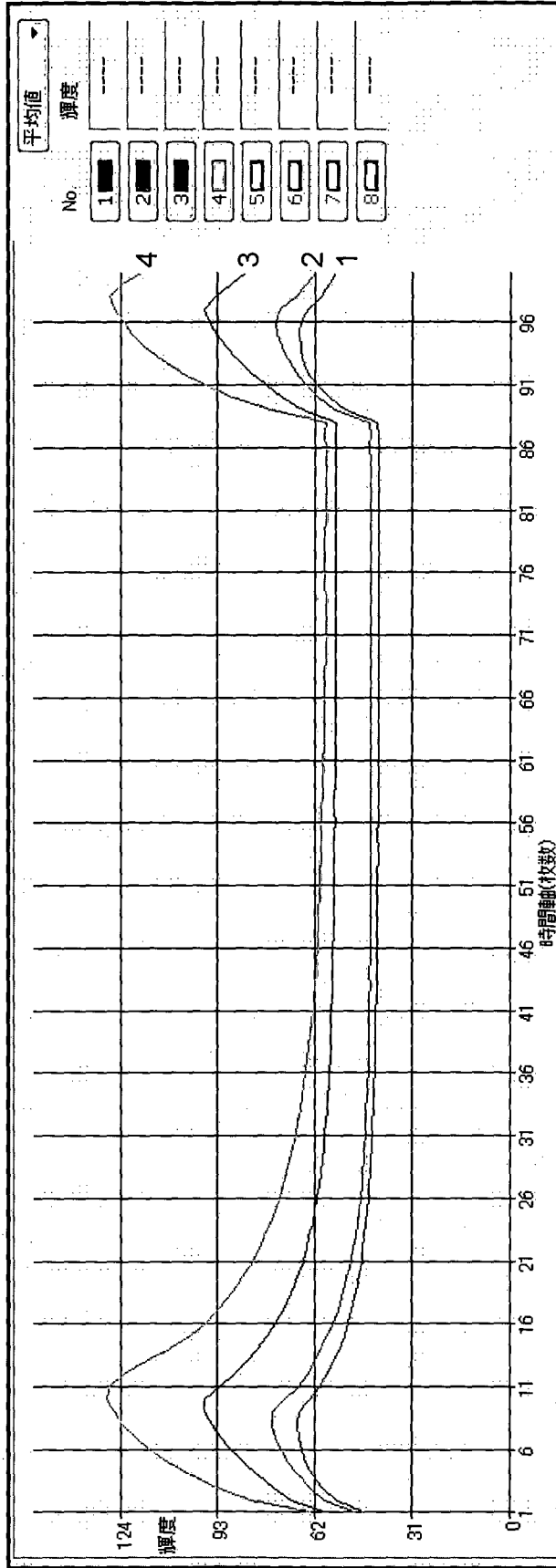


図4

A



B

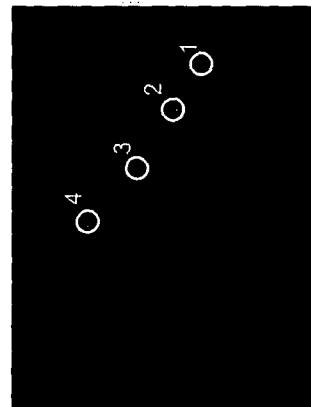


図5

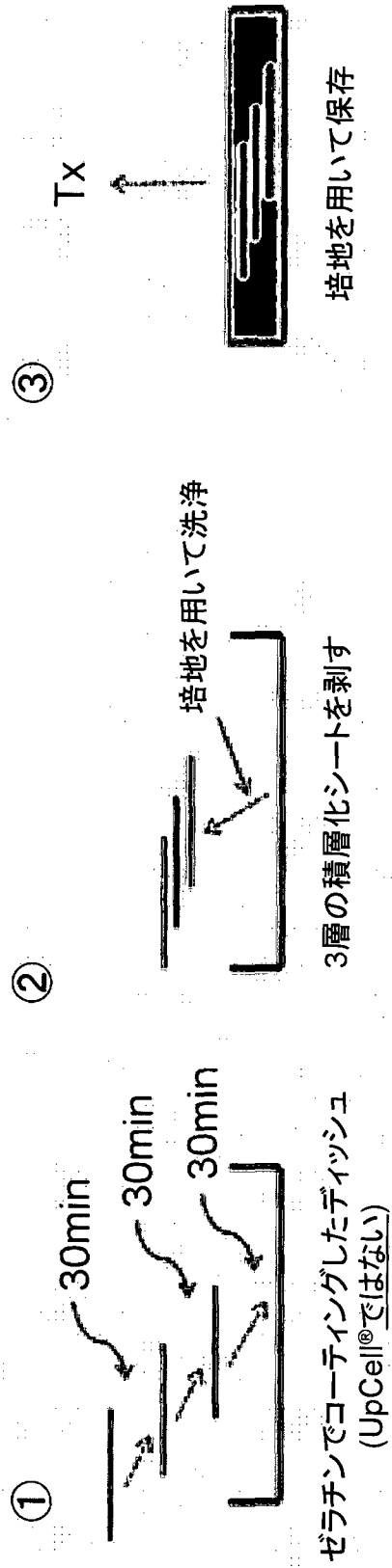
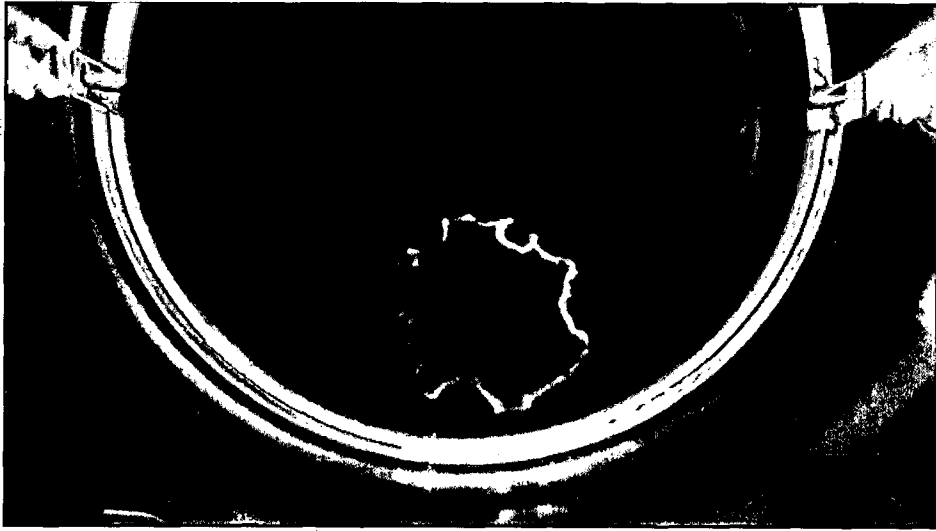


図 6

A

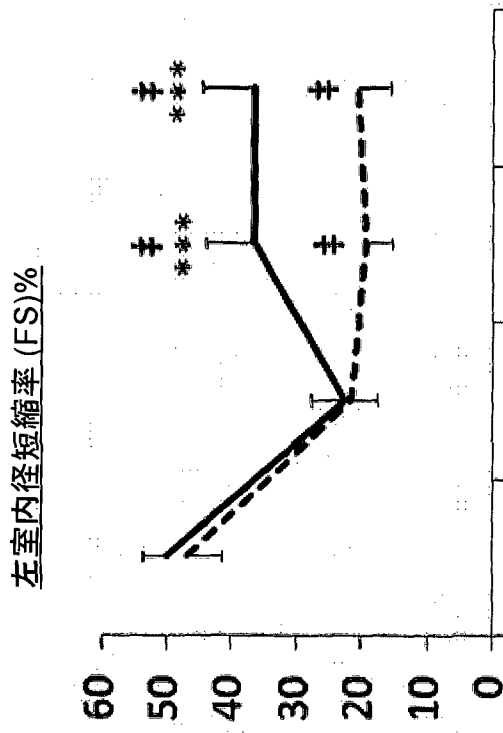


B

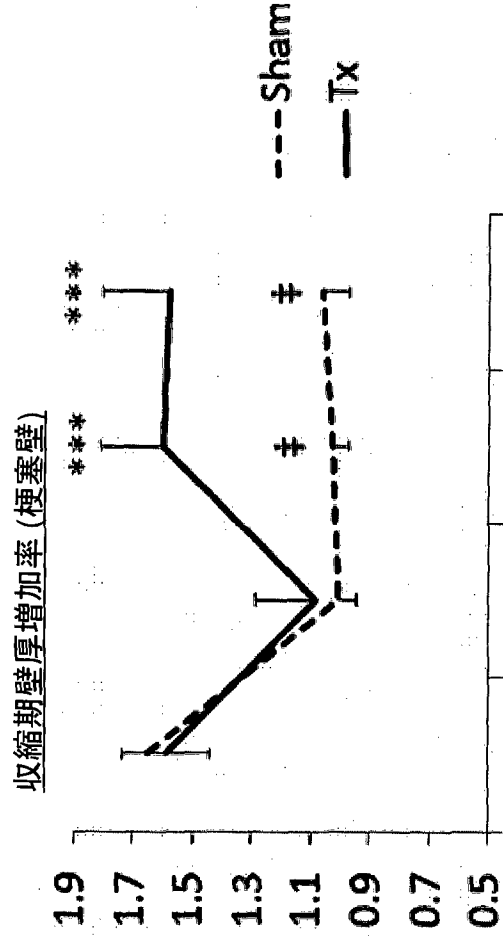


图7

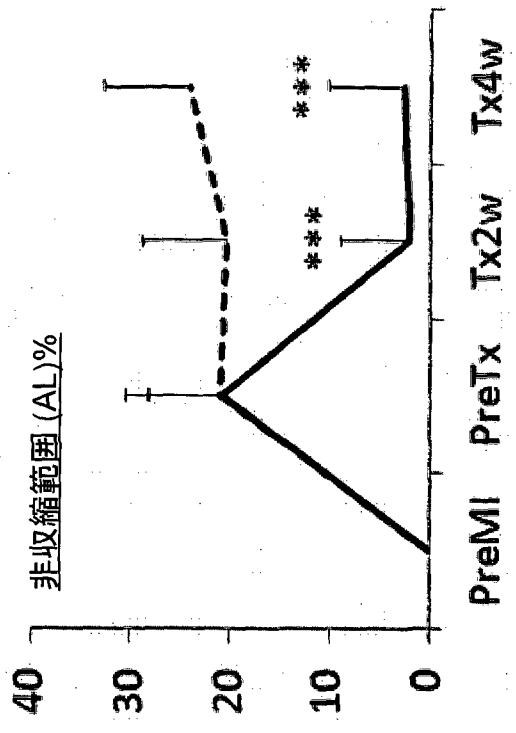
A



B



C



D

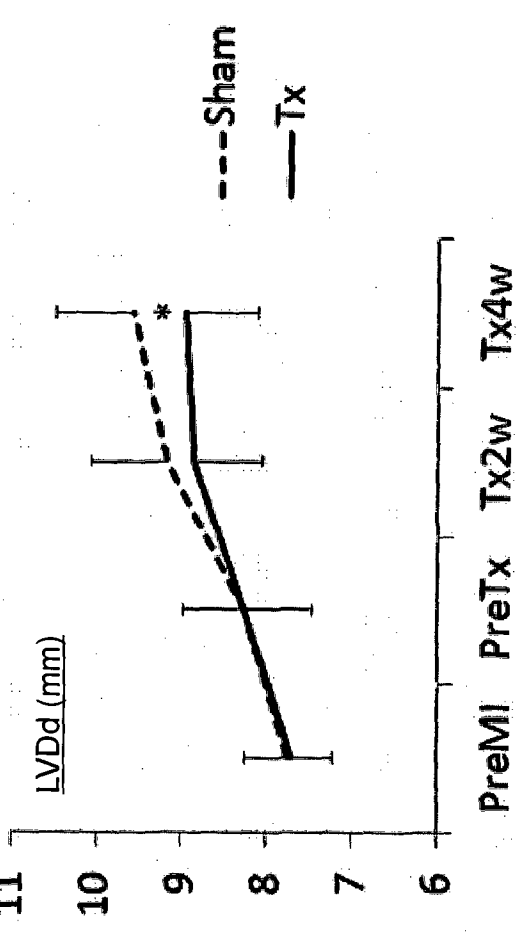
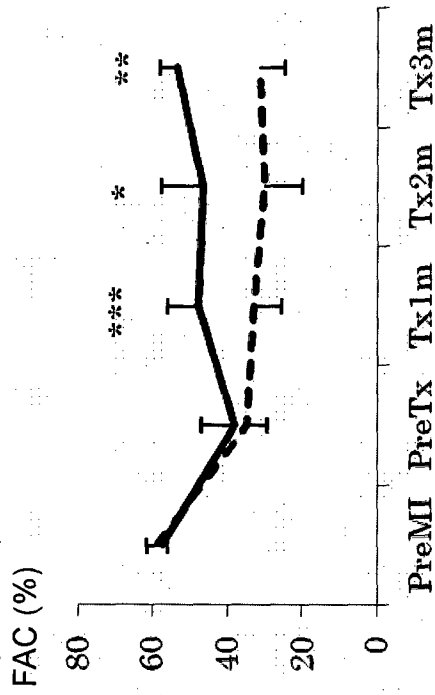
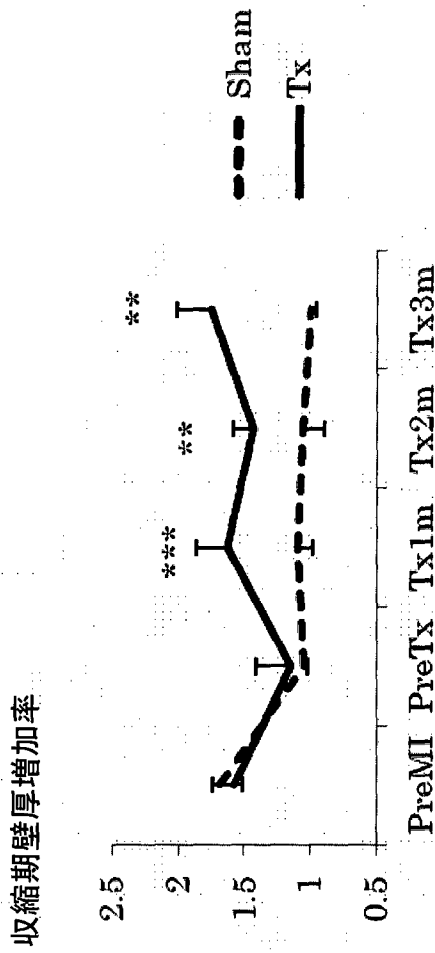


図 8

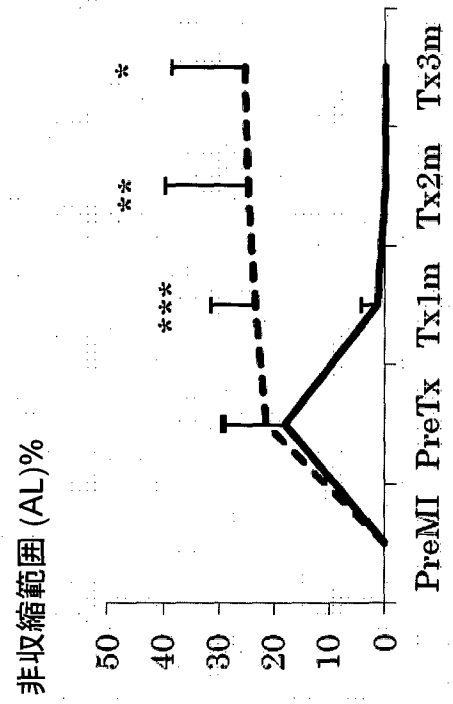
A



B



C



D

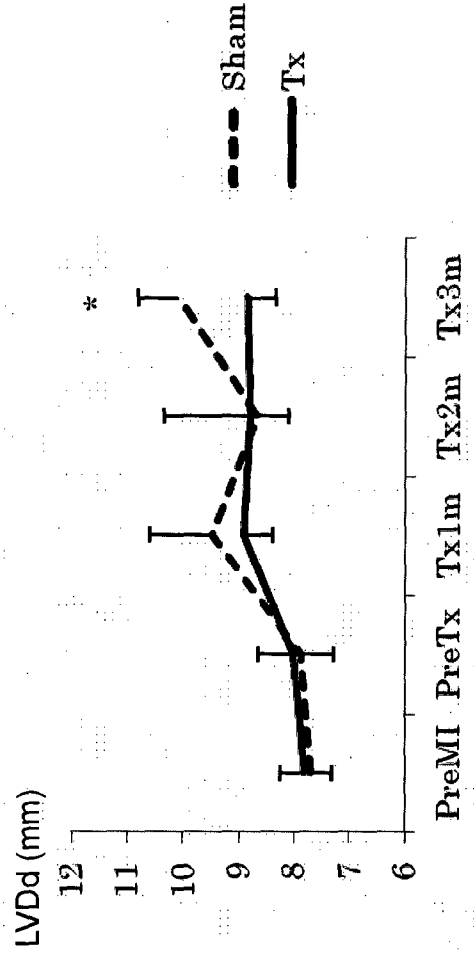


図 9

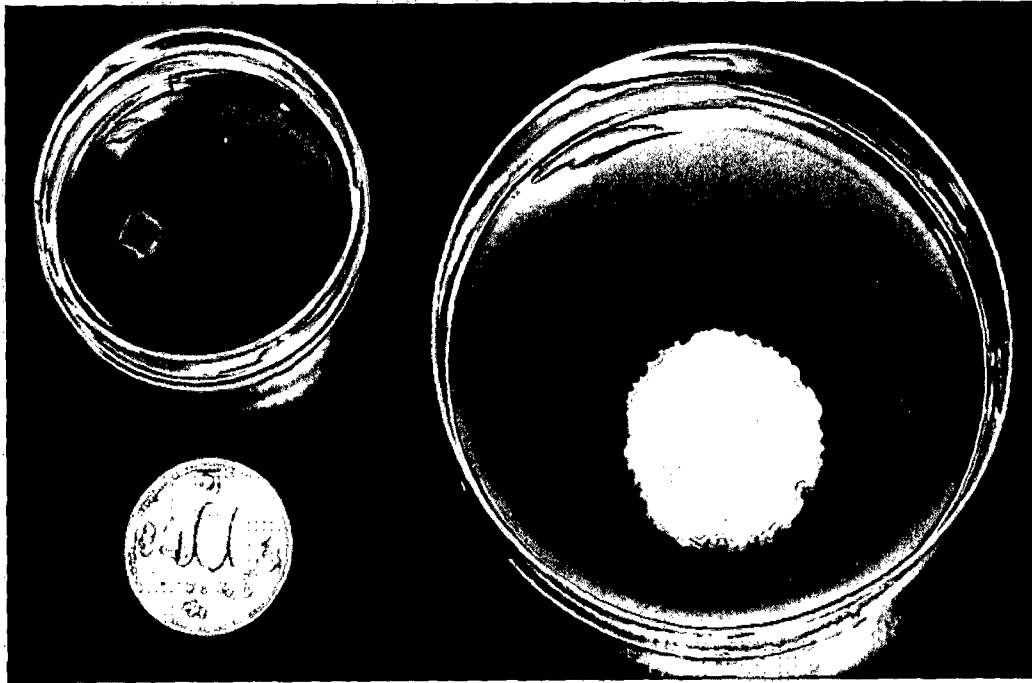
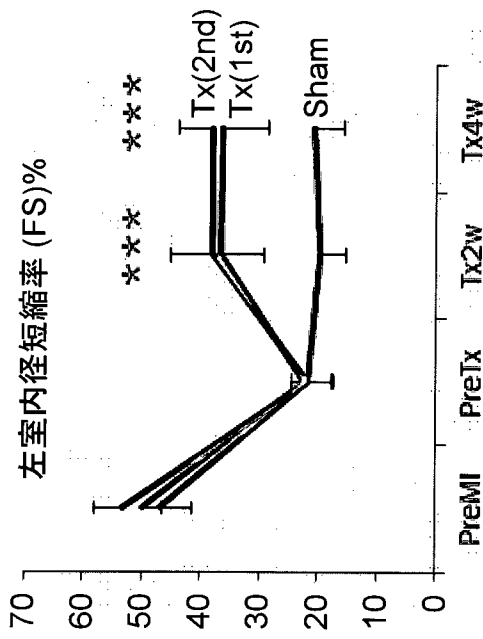


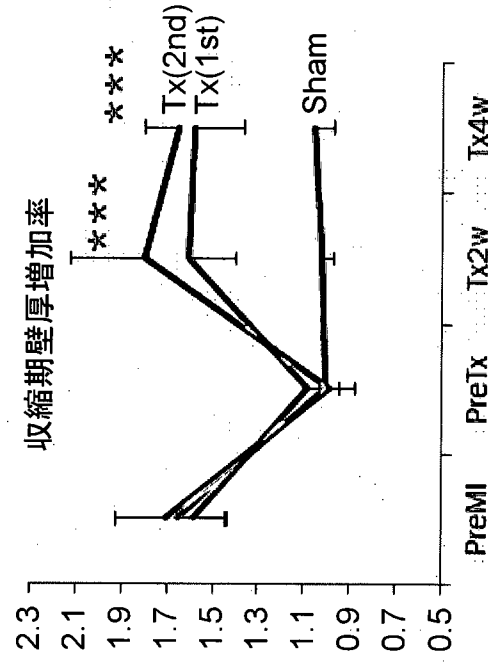


図10

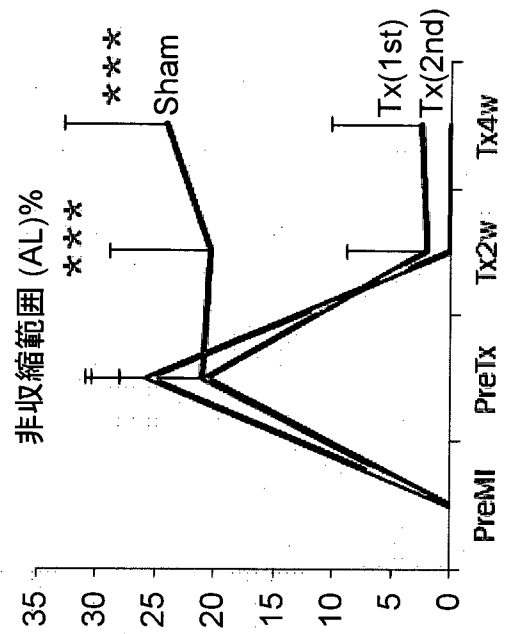
A



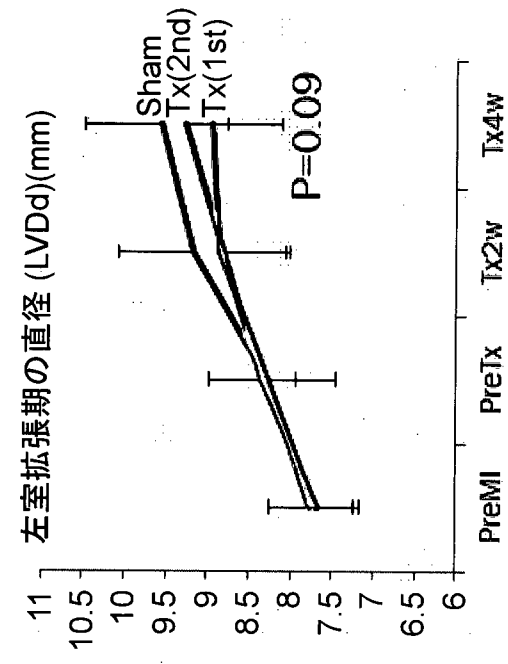
B



C



D



N=18 (Sham)/20(Tx 1st)/8(Tx 2nd). \*\*\*P<0.001, One-way/ANOVA

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/058460

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/071(2010.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/071, A61K35/12, A61L27/00, A61P9/00

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)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN), JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580 (JDreamII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	UOSAKI, Hideki, et al., Efficient and Scalable Purification of Cardiomyocytes from Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells by VCAM1 Surface Expression [online], PLoS One, 2011, 6(8), e23657 [retrieved on 2013-04-09]. Retrieved from the Internet: <URL: http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0023657>, abstract, fig. 1, paragraph of Methods, part of hESC/hiPSC culture and differentiation	1-17
Y	YANG, L., et al., Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR <sup>+</sup> embryonic-stem-cell-derived population, Nature, 453, 2008, pp.524-528, abstract, fig. 1, paragraph of METHODS, part of Differentiation of human	1-17

 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

"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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
10 April, 2013 (10.04.13)Date of mailing of the international search report  
23 April, 2013 (23.04.13)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/058460

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LAFLAMME, M.A., et al., Heart regeneration, Nature, 473, 2011, pp.326-335, paragraph of Stem cells and cell therapy, particularly, paragraph of Pluripotent stem cells, fig. 2	1-17
Y	NARAZAKI, G., et al., Directed and Systematic Differentiation of Cardiovascular Cells From Mouse Induced Pluripotent Stem Cells, Circulation, 118, 2008, pp.498-506, abstract, paragraph of Methods, part of Cell Culture	1-17
Y	Jun YAMASHITA, "iPS Saibo o Mochiita Shinkin Saisei", Shinzo, 43(1), 2011, pages 4 to 9, page 4, left column, 10th to 3rd lines from the bottom	1-17
Y	Jun YAMASHITA, "Hito Yudo Tanosei Kan (iPS) Saibo Yurai Shinzo Saibo no Bunka Yudo to Ishoku Iryo Oyo ni Kansuru Kenkyu", 'Hito Yudo Tanosei Kan (iPS) Saibo Yurai Shinzo Saibo no Bunka Yudo to Ishoku Iryo Oyo ni Kansuru Kenkyu' Heisei 22 Nendo Sokatsu · Buntan Kenkyu Hokokusho, 2011, pages 1 to 6, page 3, left column	11-17
Y	Hidekazu SEKINE et al., "Kyoketsusei Shinfuzen ni Taisuru Naihi - Shinkin Kyobaiyo Saibo Sheet no Ishoku", Dai 19 Kai Japanese Association of Cardiovascular Pharmacology Koen Yoshishu, 2009, page 34, entire text	11-17
Y	Hidekazu SEKINE et al., "Naihi - Shinkin Kyobaiyo Saibo Sheet Ishoku ni yoru Saisei Shinkin Soshikinai Kekkanmo Shinsei no Sokushin to Shinkino Kaizen Koka", Japan Research Promotion Society for Cardiovascular Disease Heisei 18 Nendo Kenkyu Gyosekishu, 2006, (21), pages 5 to 8, entire text	11-17
P,Y	MASUMOTO, H., et al., Transplantation of Cell Sheets with Human iPS Cell-derived Cardiomyocytes and Vascular Cells for Infarcted Hearts: A Basic Study [online], Circulation, 126(21 suppl.), 2012.11.20, abstract no.A11848 [retrieved on 2013-04-09]. Retrieved from the Internet: <URL: <a href="http://circ.ahajournals.org/cgi/content/meeting_abstract/126/21_Meeting_Abstacts/A11848">http://circ.ahajournals.org/cgi/content/meeting_abstract/126/21_Meeting_Abstacts/A11848</a> >, entire text	1-17
P,A	WO 2012/133945 A1 (Tokyo Women's Medical University), 04 October 2012 (04.10.2012), & JP 2012-210156 A	1-17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/071(2010.01)i, A61K35/12(2006.01)i, A61L27/00(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/071, A61K35/12, A61L27/00, A61P9/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2013年
日本国実用新案登録公報	1996-2013年
日本国登録実用新案公報	1994-2013年

国際調査で使用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), JSTplus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

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
Y	UOSAKI, Hideki, et al., Efficient and Scalable Purification of Cardiomyocytes from Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells by VCAM1 Surface Expression [online], PLoS One, 2011, 6(8), e23657 [retrieved on 2013-04-09]. Retrieved from the Internet: <URL: <a href="http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0023657">http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0023657</a> >, 要旨, 図1, Methods の項のうち hESC/hiPSC culture and differentiation の部分	1-17

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

10.04.2013

国際調査報告の発送日

23.04.2013

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)

荒木 英 則

4 B

9 7 3 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	YANG, L., et al., Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR <sup>+</sup> embryonic-stem-cell-derived population, Nature, 453, 2008, pp.524-528, 要旨, 図1, METHODS の項のうち Differentiation of human の部分	1-17
Y	LAFLAMME, M.A., et al., Heart regeneration, Nature, 473, 2011, pp.326-335, Stem cells and cell therapy の項, 特に、Pluripotent stem cells の項, 図2	1-17
Y	NARAZAKI, G., et al., Directed and Systematic Differentiation of Cardiovascular Cells From Mouse Induced Pluripotent Stem Cells, Circulation, 118, 2008, pp.498-506, 要旨, Methods の項のうち Cell Culture の部分	1-17
Y	山下 潤, iPS細胞を用いた心筋再生, 心臓, 43(1), 2011, pp.4-9, 4頁左欄下から10行-下から3行	1-17
Y	山下 潤, ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の分化誘導と移植医療応用に関する研究, 「ヒト誘導多能性幹 (iPS) 細胞由来心臓細胞の分化誘導と移植医療応用に関する研究」平成22年度総括・分担研究報告書, 2011, pp.1-6, 3頁左欄	11-17
Y	関根 秀一ら, 虚血性心不全に対する内皮-心筋共培養細胞シートの移植, 第19回日本循環薬理学会口演要旨集, 2009, p.34, 全文	11-17
Y	関根 秀一ら, 内皮-心筋共培養細胞シート移植による再生心筋組織内血管網新生の促進と心機能改善効果, (財)日本心臓血圧研究振興会平成十八年度研究業績集, 2006, (21), pp.5-8, 全文	11-17
P Y	MASUMOTO, H., et al., Transplantation of Cell Sheets with Human iPS Cell-derived Cardiomyocytes and Vascular Cells for Infarcted Hearts: A Basic Study [online], Circulation, 126(21 suppl.), 2012.11.20, abstract no.A11848 [retrieved on 2013-04-09]. Retrieved from the Internet: <URL: <a href="http://circ.ahajournals.org/cgi/content/meeting_abstract/126/21_MeetingAbstracts/A11848">http://circ.ahajournals.org/cgi/content/meeting_abstract/126/21_MeetingAbstracts/A11848</a> >, 全文	1-17
P A	WO 2012/133945 A1 (学校法人東京女子医科大学) 2012.10.04, & JP 2012-210156 A	1-17