

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02009/122747

発行日 平成23年7月28日 (2011. 7. 28)

(43) 国際公開日 平成21年10月8日 (2009. 10. 8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 5/078 (2010.01)</b>	C 1 2 N 5/00 2 O 2 J	4 B O 6 5
<b>A 6 1 K 35/14 (2006.01)</b>	A 6 1 K 35/14 Z	4 C O 8 7
<b>A 6 1 P 35/00 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00	
<b>A 6 1 P 35/02 (2006.01)</b>	A 6 1 P 35/02	
<b>A 6 1 P 7/04 (2006.01)</b>	A 6 1 P 7/04	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 27 頁)

出願番号 特願2010-505402 (P2010-505402)	(71) 出願人 504137912 国立大学法人 東京大学 東京都文京区本郷七丁目3番1号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2009/001542	(74) 代理人 100137512 弁理士 奥原 康司
(22) 国際出願日 平成21年4月1日 (2009. 4. 1)	(72) 発明者 中内 啓光 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
(31) 優先権主張番号 特願2008-94584 (P2008-94584)	(72) 発明者 江藤 浩之 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内
(32) 優先日 平成20年4月1日 (2008. 4. 1)	(72) 発明者 錦井 秀和 茨城県つくば市天王台一丁目1番1 国立大学法人筑波大学内
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	

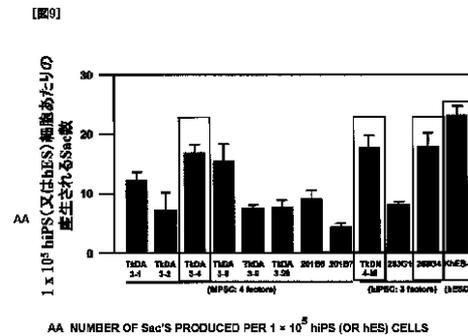
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 i P S細胞からの血小板の調製方法

(57) 【要約】

本発明は、i P S細胞からインビトロの培養系により、成熟巨核細胞、血小板などの血球細胞を効率的に調製する方法の提供を目的とする。

本発明は、i P S細胞をフィーダー細胞上に播き、造血前駆細胞の分化誘導に適した条件で培養して得られる、造血前駆細胞を内包するネット様構造物を提供する。また、該ネット様構造物に内包される造血前駆細胞を、血球細胞の分化誘導に適した条件でさらに培養し、各種血球細胞を産生する方法を提供する。さらに、ネット様構造物を介さずに各種血球細胞、特に、巨核球及び血小板を産生する方法を提供する。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒト由来の i P S 細胞をフィーダー細胞上に播き、造血前駆細胞の分化誘導に適した条件で培養して得られる、造血前駆細胞を内包するネット様構造物。

## 【請求項 2】

前記造血前駆細胞の分化誘導に適した条件が、V E G F 存在下、14 ~ 17 日間培養することである請求項 1 に記載のネット様構造物。

## 【請求項 3】

前記フィーダー細胞が C 3 H 1 0 T 1 / 2 細胞、又は O P 9 細胞であることを特徴とする請求項 1 又は 2 に記載のネット様構造物。

10

## 【請求項 4】

請求項 1 乃至 3 のいずれかに記載のネット様構造物の産生能力の高い i P S 細胞クローンを選択し、該 i P S 細胞クローンが産生するネット様構造物の隔壁を形成する細胞と造血前駆細胞を分離し、得られた造血前駆細胞をフィーダー細胞上に播き、血球細胞の分化誘導に適した条件で培養し、血球細胞を産生する方法。

## 【請求項 5】

前記血球細胞が巨核球及び血小板であることを特徴とする請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記血球細胞の分化誘導に適した条件が、T P O 存在下、7 ~ 9 日間培養することである請求項 5 に記載の方法。

20

## 【請求項 7】

前記血球細胞の分化誘導に適した条件が、T P O、S C F 及び H e p a r i n 存在下、7 ~ 9 日間培養することである請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 8】

請求項 5 乃至 7 のいずれかに記載の方法により産生された巨核球及び / 又は血小板。

## 【請求項 9】

請求項 5 乃至 7 のいずれかに記載の方法により産生された血小板を有効成分とする血液製剤。

## 【請求項 10】

マウス由来の i P S 細胞を液体培養することで、胚様体の内部に造血前駆細胞を形成させ、該胚様体をさらに培養して、血球細胞を産生する方法。

30

## 【請求項 11】

前記血球細胞が巨核球及び血小板であることを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記胚様体をさらに培養する期間が、5 ~ 7 日間である請求項 10 又は 11 に記載の方法。

## 【請求項 13】

前記胚様体をさらに培養する条件が、T P O 及び S C F の存在下、3 ~ 5 日間培養することである請求項 10 乃至 12 のいずれかに記載の方法。

## 【請求項 14】

請求項 10 乃至 13 のいずれかに記載の方法により産生された巨核球及び / 又は血小板。

40

## 【請求項 15】

請求項 10 乃至 13 のいずれかに記載の方法により産生された血小板を有効成分とする血液製剤。

## 【請求項 16】

請求項 4 乃至 7 および請求項 10 乃至 13 のいずれかに記載の方法により血小板を調製するためのキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

50

## 【0001】

本発明は、iPS細胞(induced pluripotent stem cells)から血小板を調製する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

白血病に代表される血液関連疾患の治療に対し、治療に必要な量の血球細胞を安定に増幅し、供給することは極めて重要なことである。このため、これまで多くの研究者によって、造血幹細胞又は造血前駆細胞の効率的な増幅が試みられてきた。血球細胞の中でも、巨核球は、血小板前駆細胞(prop platelet)、さらには、血小板を産生する細胞であり、治療上、重要な位置を占めている。

10

血球細胞のなかでも血小板は血液凝固(止血)に必須の細胞であるため、白血病、骨髄移植、抗癌治療などにおいて、血小板の需要は極めて高い。これまでに、血小板は、ドナーからの献血により採取する方法により供給されてきた。しかし、ドナーからの献血により採取する方法では、慢性的なドナー不足や、採取した血小板を凍結することができないことなどから、安定に血小板を供給することが困難である。また、ドナーからの献血により採取する方法以外に、TPOを患者に投与する方法、臍帯血又は骨髄細胞から巨核球を分化させる方法などが試みられたが、TPOを患者に投与する方法は、TPOの投与後TPOに対する無力化抗体が産生されてしまうため、この方法は、実用化には至っていない。さらに、臍帯血又は骨髄細胞からの巨核球分化による方法も、巨核球のソースとなる造血幹細胞を極めて少数しか得ることができないため、安定した血小板の提供に適した方法ではない。

20

## 【0003】

近年、血小板を生体外で調製する方法として、ES細胞から誘導した造血幹細胞又は造血前駆細胞を効率的に巨核球及び血小板へ分化させる方法などが報告されている。Etoらは、マウスES細胞をOP9ストローマ細胞と共培養することで巨核球へ分化誘導することを明らかにした(非特許文献1)。Fujimotoらは、Etoらと同様の方法を用いて血小板の誘導を確認したとの報告を行っている(非特許文献2)。また、サルES細胞から巨核球の分化誘導に成功したとの報告(非特許文献3)、ヒトES細胞から巨核球の分化誘導に成功したとの報告(非特許文献4)もある。しかし、いずれも、血小板の放出を確認していない。また、ES細胞からの血小板の取得方法が、臨床的に利用し得る程度に確立した場合であっても、ES細胞から誘導した血小板を輸血により患者に適用する場合(特に初回輸血では問題視されないが、同一患者が、頻回に輸血を受けるような場合には)、ヒト白血球型抗原(HLA)の適合性の問題は依然として残ることになる。

30

## 【0004】

iPS細胞(induced pluripotent stem cells)は、人工多能性幹細胞若しくは誘導多能性幹細胞とも称され、線維芽細胞などの体細胞へ数種類の転写因子遺伝子を導入することにより、ES細胞と同等の分化多能性を獲得した細胞である。

マウスのiPS細胞は、Yamanakaらによって、分化万能性の維持に重要なNanog遺伝子の発現を指標にし、マウス線維芽細胞へOct3/4、Sox2、Klf4、c-Mycの4つの遺伝子を導入することにより、初めて樹立された(非特許文献5)。その後も同様の方法によるマウスiPS細胞の樹立が報告されている(非特許文献6、非特許文献7)。さらに、iPS細胞の癌化の問題を克服するために、c-Myc遺伝子以外の3つの遺伝子(Oct3/4、Sox2、Klf4)のみでも、iPS細胞の樹立が可能であることが報告された(非特許文献8)。

40

一方、ヒトのiPS細胞に関しては、Thomsonらが、ヒトの線維芽細胞にOCT3/4、SOX2、NANOG、LIN28を導入してヒトiPS細胞を樹立した(非特許文献9)。また、Yamanakaらは、OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYCをヒトの線維芽細胞に導入して、同じくiPS細胞を樹立した(非特許文献10)。

50

## 【 0 0 0 5 】

【非特許文献1】Eto $\bar{r}$ , Proc. Acad. Sci. USA 2002, 99: 12819 - 12824.

【非特許文献2】Fujimoto $\bar{r}$ , Blood 2003, 102: 4044 - 4051.

【非特許文献3】Hiroyama $\bar{r}$ , Exp. Hematol. 2006, 34: 760 - 769.

【非特許文献4】Gaur $\bar{r}$ , J. Thromb. Haemost. 2005, 4: 436 - 442.

【非特許文献5】Okita $\bar{r}$ , Nature 2007, 448: 313 - 317. 10

【非特許文献6】Wernig $\bar{r}$ , Nature 2007, 448: 318 - 324.

【非特許文献7】Maherali $\bar{r}$ , Cell Stem Cell 2007, 1: 55 - 70.

【非特許文献8】Nakagawa $\bar{r}$ , Nat. Biotechnol. 2008, 26: 101 - 106.

【非特許文献9】Yu $\bar{r}$ , Science 2007, 318: 1917 - 1920.

【非特許文献10】Takahashi $\bar{r}$ , Cell 2007, 131: 861 - 872.

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】 20

## 【 0 0 0 6 】

本発明者らは、すでにES細胞から効率的に巨核球及び血小板を取得する方法を確立しているが、ES細胞を使用した場合には、使用するES細胞毎に巨核球及び血小板の誘導効率が異なっている。巨核球及び血小板の誘導効率の優れたES細胞の選定を早期に行うことができれば、巨核球及び血小板の取得効率の安定化、効率の一層の向上を図ることが可能になるが、現状では最終的に巨核球、血小板を得るまで優れたES細胞を見極めるのが難しかった。

そこで、本発明者らは、上記事情に鑑み、第一にiPS細胞から巨核球及び血小板を取得する方法を確立することを課題とし、さらには、巨核球及び血小板の取得効率を安定化し得る方法を確立することを課題とする。 30

## 【課題を解決するための手段】

## 【 0 0 0 7 】

今回、発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ね、iPS細胞から巨核球及び血小板の誘導を試み、その誘導方法を確立した。その試みの中でiPS細胞では、同じロット由来の細胞がヘテロな特徴を有していることを見出し、このヘテロな細胞集団から、早期に効率のよい巨核球及び血小板の誘導し得る細胞を選択することをも試みた。その結果、一定の特徴を示す細胞クローン、例えば、ネット様構造をより多く形成するクローンが巨核球、血小板の誘導効率に優れていることを見出し、当該細胞を選別し、分化誘導を行うことにより、安定的に効率よく巨核球又は血小板の誘導し得ることが可能になった。 40

すなわち、本発明は、iPS細胞から巨核球及び血小板を調製する方法に関し、具体的には、以下の(1)～(16)に関する。

(1)本発明の第1の態様は、「ヒト由来のiPS細胞をフィーダー細胞上に播き、造血前駆細胞の分化誘導に適した条件で培養して得られる、造血前駆細胞を内包するネット様構造物」である。

(2)本発明の第2の態様は、「前記造血前駆細胞の分化誘導に適した条件が、VEGF存在下、14～17日間培養することである上記(1)に記載のネット様構造物」である。

。

(3)本発明の第3の態様は、「前記フィーダー細胞がC3H10T1/2細胞、又はOP9細胞であることを特徴とする上記(1)又は(2)に記載のネット様構造物」である 50

。

(4) 本発明の第4の態様は、「上記(1)乃至(3)のいずれかに記載のネット様構造物の産生能力の高いiPS細胞クローンを選択し、該iPS細胞クローンが産生するネット様構造物の隔壁を形成する細胞と造血前駆細胞を分離し、得られた造血前駆細胞をフィーダー細胞上に播き、血球細胞の分化誘導に適した条件で培養し、血球細胞を産生する方法」である。

(5) 本発明の第5の態様は、「前記血球細胞が巨核球及び血小板であることを特徴とする上記(4)に記載の方法」である。

(6) 本発明の第6の態様は、「前記血球細胞の分化誘導に適した条件が、TPO存在下、7~9日間培養することである上記(5)に記載の方法」である。

(7) 本発明の第7の態様は、「前記血球細胞の分化誘導に適した条件が、TPO、SCF及びHeparin存在下、7~9日間培養することである上記(5)に記載の方法」である。

(8) 本発明の第8の態様は、「上記(5)乃至(7)のいずれかに記載の方法により産生された巨核球及び/又は血小板」である。

(9) 本発明の第9の態様は、「上記(5)乃至(7)のいずれかに記載の方法により産生された血小板を有効成分とする血液製剤」である。

(10) 本発明の第10の態様は、「マウス由来のiPS細胞を液体培養することで、胚様体の内部に造血前駆細胞を形成させ、該胚様体をさらに培養して、血球細胞を産生する方法」である。

(11) 本発明の第11の態様は、「前記血球細胞が巨核球及び血小板であることを特徴とする上記(10)に記載の方法」である。

(12) 本発明の第12の態様は、「前記胚様体をさらに培養する期間が、5~7日間である上記(10)又は(11)に記載の方法」である。

(13) 本発明の第13の態様は、「前記胚様体をさらに培養する条件が、TPO及びSCFの存在下、3~5日間培養することである上記(10)乃至(12)のいずれかに記載の方法」である。

(14) 本発明の第14の態様は、「上記(10)乃至(13)のいずれかに記載の方法により産生された巨核球及び/又は血小板」である。

(15) 本発明の第15の態様は、「上記(10)乃至(13)のいずれかに記載の方法により産生された血小板を有効成分とする血液製剤」である。

(16) 本発明の第16の態様は、「上記(4)乃至(7)及び上記(10)乃至(13)のいずれかに記載の方法により血小板を調製するためのキット」である。

#### 【発明の効果】

##### 【0008】

本発明のiPS細胞(特に、ヒトiPS細胞)からの巨核球及び血小板の誘導方法を使用することで、ES細胞を使用した場合よりも、安定的に効率よく巨核球及び血小板を誘導することが可能となる。

##### 【0009】

本発明の方法によれば、輸血等を必要とする患者の遺伝的特徴を保持した、患者専用の血球細胞を調製することができるため、ヒト白血球型抗原(HLA)の適合性の問題を克服することが可能となる。また、臨床現場で問題となっている自己以外のHLA型血液の混入による抗血小板抗体の産生を回避することができる。

##### 【0010】

また、発明の方法を用いると、生体外において所望の血球を効率的に取得することができる。特に、ヒトに関し、特定個人専用の血小板の産生を、比較的大量かつ効率的に行うことができる。

##### 【0011】

さらに、本発明の方法を用いると、血小板を有効成分とする血液製剤の安定的な供給を実現することができる。

10

20

30

40

50

## 【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】マウス*iPS*細胞から血小板を誘導する過程を模式的に示した図である。

【図2】マウス*iPS*細胞由来の培養10日目の血小板前駆細胞である巨核球細胞をサイトスピン後、ギムザ染色(A)、及びAlexa 488 - ファロイジン、DAPI、抗CD41抗体及び抗GPIIb抗体による免疫染色(Alexa 647による2次染色法)(B)を行った結果を示す。(B)のCD41はCD41陽性細胞の、GPIIbはGPIIb陽性細胞の染色像であることを示す。

【図3】マウス*iPS*細胞由来の培養14日目の血小板前駆体の位相差顕微鏡像(A)及びAlexa 488 - ファロイジン、抗CD41抗体及び抗GPIIbによる免疫染色(B)をAlexa 647により2次染色した結果を示す。(B)のCD41/F-actinは抗CD41抗体(Alexa 647, 赤)/Alexa 488(緑) - ファロイジンによる二重染色の結果を、GPIIb/F-actinは抗GPIIb抗体(Alexa 647, 赤)/Alexa 488(緑) - ファロイジンによる二重染色の結果を示す。

【図4】マウス*iPS*細胞から培養14日目に誘導された血小板の電子顕微鏡像を示す。

【図5】マウス*iPS*細胞由来の培養10日目(上図)及び培養14日目(下図)の細胞を、フローサイトメーターにより解析した結果を示す。

【図6】トロンビンに対するマウス*iPS*細胞由来血小板の形態変化を観察した。培養14日目の上清を回収し、フィブリノーゲンでコートしディッシュに添加した後、血小板活性刺激薬(トロンビン)を加えて刺激を行った(上図)。トロンビンにより、*iPS*細胞から作製した血小板はきれいに伸展して安定血栓に寄与できうる形態を示した(下図)。結果は、抗IIb抗体(Alexa 647による2次染色)及びAlexa 488 - ファロイジンによる染色像を示した(下図)。

【図7】ヒト*iPS*細胞(201B6株)からSac構造物を形成させ、さらに、巨核球及び血小板を誘導する過程を示す。上図は、培養の経過を模式的に示し、下の各写真は、培養過程で誘導される、*iPS*-Sac、巨核球を示す。下の写真は、左から、培養0日目の未分化状態の*iPS*細胞(位相差顕微鏡による観察像)、*iPS*細胞から誘導した*iPS*-Sac(培養後17日目の観察像)、巨核球(培養23~24日目、ギムザ染色後の観察像)を各々示す。

【図8】*iPS*-Sacの免疫染色像を示す。*iPS*-Sacは、ES-Sac同様CD31陽性、VEGF-R2陽性の内皮細胞により構成されていた。

【図9】ヒト*iPS*細胞クローン間での*iPS*-Sacの誘導効率を比較した結果を示す。培養15日目の血球前駆細胞を含むSacの数(グラフ縦軸)を計測した。同じロット皮膚由来のヒト*iPS*細胞株(TkDA3-1、2、4、5、9、20)でも分化能力に差を認めた。TkDA3-1、2、4、5、9、20(東京大学で樹立)は同じ皮膚細胞由来の4因子(Oct3/4、Sox2、Klf4、c-My c)から作成されたヒト*iPS*細胞、TkDN4-M(東京大学で樹立)は皮膚細胞由来の3因子(c-My c以外)から作成されたヒト*iPS*細胞、201B6、201B7(京都大学で樹立)は皮膚細胞由来の4因子から作成されたヒト*iPS*細胞、253G1、253G4(京都大学で樹立)は皮膚細胞由来の3因子から作成されたヒト*iPS*細胞である。また、KhES-3はコントロールとして用いた血球分化能力の高いヒトES細胞株である。

【図10】図9に示される*iPS*細胞の中からSac形成能の異なるクローンを用いて、血小板誘導能を解析した結果を示す。

【図11】ヒトES細胞及びヒト*iPS*細胞由来造血前駆細胞の表面抗原解析結果。ヒトES細胞(上段)由来血液前駆細胞と分化能力の高いTkDN4-M(3因子;中段)、TkDA3-4(4因子;下段)由来の血液前駆細胞を比較した。未分化な血液/血管内皮の共通マーカーとされるCD31陽性/CD34陽性細胞の頻度や巨核球前駆細胞のマーカーとされるCD34陽性/CD41a陽性細胞はES細胞同様に発現していた。

【図12】ヒト*iPS*細胞由来血球コロニーの解析。TkDN4-M(3因子)、Tk

10

20

30

40

50

D A 3 - 4 ( 4 因子 ) 由来の血液前駆細胞の血球分化能をメチルセルロース半固形培地に播いて比較した。左図は代表的な各血球系のギムザ染色像である。右図はコロニー形成細胞の頻度を示す ( 縦軸は、 $1 \times 10^4$  血球前駆細胞由来のコロニー数 )。T k D A 3 - 4 のみ芽球様 ( 左図の右下パネル ) コロニーを形成したが、他の血球への分化能は同様であった。

【図 1 3】培養後 17 ~ 18 日目の培養液中の浮遊細胞成分を、フローサイトメーターで解析した結果を示す。X 軸は C D 4 1 a、Y 軸はそれぞれ C D 4 2 b、C D 4 2 a、C D 9。左から K h E S - 3 ( ヒト E S 細胞 )、2 5 3 G 4 ( 3 因子ヒト i P S 細胞 )、T k D N 4 - M ( 3 因子ヒト i P S 細胞 )、T k D A 3 - 4 ( 4 因子ヒト i P S 細胞 ) を示す。成熟巨核球のマーカーとされる C D 4 2 a、C D 4 2 b はヒト E S 細胞由来巨核球と同様に発現していた。

10

【図 1 4】ヒト i P S 細胞由来血小板の表面抗原解析結果を示す。培養 24 日目に培養上清中に放出される血小板を、フローサイトメーターを用いて解析した。X 軸は C D 4 1 a、Y 軸はそれぞれ C D 4 2 b、C D 4 2 a、C D 9。左からヒト末梢血血小板、K h E S - 3 ( ヒト E S 細胞 ) 由来血小板、2 5 3 G 4 ( 3 因子ヒト i P S 細胞 ) 由来血小板、T k D N 4 - M ( 3 因子ヒト i P S 細胞 ) 由来血小板、T k D A 3 - 4 ( 4 因子ヒト i P S 細胞 ) 由来血小板を示す。血小板の重要な機能分子である C D 4 1 a や C D 4 2 a、C D 9 は末梢血由来血小板同様に発現していた。一方、C D 4 2 b に関してはヒト E S 細胞及びヒト i P S 細胞由来血小板は一部で発現が低下していた ( 上段パネル )。

【図 1 5】巨核球からの血小板放出形態の観察像を示す。培養後 17 ~ 18 日目の浮遊細胞を、A l e x a 4 8 8 結合抗 C D 4 1 a 抗体で染色し蛍光顕微鏡により観察した ( 右図 )。左図は、微分干渉法を使用した明視野による観察像である。

20

【図 1 6】ヒト末梢血、ヒト E S 細胞及びヒト i P S 細胞由来の血小板とヒト i P S 細胞由来の巨核球の電子顕微鏡像を示す。ヒト E S 細胞及びヒト i P S 細胞由来の血小板では、様々な血小板の生理活性化物質を含む顆粒や血小板の微小管構造は末梢血と同様に保持していた。

【図 1 7】ヒト i P S 細胞由来の血小板の機能解析 ( インサイドアウトシグナル ) 結果を示す。上パネル ; 代表的な F A C S 像。ヒト i P S 細胞由来血小板 ( 下段 ) はヒト E S 細胞由来血小板 ( 上段 ) 同様、生体内の重要な血小板活性化物質 A D P によりインテグリンの活性化 ( P A C 1 抗体陽性血小板の増加 ) を認めた。下パネル ; ヒト E S 細胞由来血小板 ( 白い棒グラフ ) 同様、ヒト i P S 細胞由来血小板 ( 黒い棒グラフ ) は低濃度の A D P (  $5 \mu M$  ) から反応し、用量依存的に反応が増加した。他の活性化物質であるトロンピンへの反応も確認できた。n o a g o n i s t ; A D P なしの結果。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本発明の実施形態の 1 つは、i P S 細胞をフィーダー細胞上に播き、造血系細胞の分化誘導に適した条件で培養して得られる、造血前駆細胞を内包するネット様構造物 ( s a c ) である。該ネット様構造物には、造血前駆細胞が濃縮されて存在しているため、各種血球細胞を生体外において効率的に分化誘導することができる。ここで「ネット様構造物」とは、E S 又は i P S 細胞由来の立体的な囊状 ( 内部に空間を伴うもの ) 構造物で、内皮細胞集団などで形成され、内部に血液前駆細胞を含むものである。ネット様構造物の詳細については、例えば、T A K A Y A M A ら、B L O O D 2 0 0 8, 1 1 1 : 5 2 9 8 - 5 3 0 6、を参照のこと。ここで「i P S 細胞」とは、人工多能性幹細胞若しくは誘導多能性幹細胞とも称され、線維芽細胞などの体細胞へ数種類の転写因子遺伝子を導入することにより、E S 細胞と同等の分化多能性を獲得した細胞である。ここで、分化多能性の獲得に必要な転写因子遺伝子としては、例えば、N a n o g、O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、c - M y c、L i n 2 8 などが知られている。これらの遺伝子のうち、例えば、O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4、c - M y c の組合せ、O c t 3 / 4、S o x 2、N a n o g、L i n 2 8 の組合せ、O c t 3 / 4、S o x 2、K l f 4 の組合せで、選択した遺伝子を線維芽細胞などの体細胞に導入することにより、i P S 細胞の樹立が可

40

50

能となる。本発明で使用するiPS細胞は、その樹立の手法は問わず、上記の遺伝子を導入する手法で樹立された細胞以外にも、上記と異なる遺伝子の導入による樹立方法、タンパク質や低分子化合物などを用いた樹立方法によるiPS細胞であってもよい。

また、「フィーダー細胞」として、ES細胞やiPS細胞の分化誘導に寄与する細胞であればいずれも使用可能であり、例えば、マウス胚線維芽細胞、好ましくは、C3H10T1/2細胞株、OP9細胞などを用いることができる。「フィーダー細胞」を用いるときには、例えば、放射線を照射するなどして、細胞の増殖を抑制しておくのがよい。

#### 【0014】

iPS細胞の培養条件としては、ネット様構造物(以下、iPS-Sacとも記載する。)を調製するために適した条件を選択することができる。この培養条件は、用いるiPS細胞の生物種によって異なる。一例を挙げるならば、ヒト由来のiPS細胞の場合、培地としては、最終濃度15%のFBSを添加したIMDMを用い、その他無血清の場合においても適宜増殖因子およびサプリメント等を加えたものを使用することができる。さらに、ヒト由来のiPS細胞からネット様構造物を効率的に形成させるためには、例えば、VEGFを、0~100ng/ml程度、より好ましくは、20ng/ml程度加えるのがよい。また、培養の環境としては、用いるiPS細胞によって異なるが、例えば、5%CO<sub>2</sub>、36~38℃、好ましくは37℃の条件を用いることができる。ネット様構造物が形成されるまでの培養期間は、用いるヒトiPS細胞によって異なるが、例えば、フィーダー細胞上に播いてから、14~17日後くらいにその存在を確認することができる。

10

20

#### 【0015】

形成されたネット様構造物は、濾胞状構造になっており、中胚葉細胞のマーカーの一つであるFlk1(fetal liver kinase 1)、CD31、CD34、又はUEA-Iレクチン(Ulex europaeus agglutinin-1)陽性細胞によって隔壁が構成されている。このネット様構造物の内部には、造血前駆細胞が濃縮された状態で存在している。ネット様構造物の内部に存在する造血前駆細胞から各種血球細胞を分化誘導する場合には、隔壁を構成している細胞などから造血前駆細胞を分離する必要がある。この分離は、物理的な手段により行うのが望ましい。例えば、滅菌済みの篩状器具(例えば、セルストレイナーなど)に通すことにより、隔壁細胞と造血前駆細胞を分離することができる。

30

#### 【0016】

本発明のさらなる実施形態は、ネット様構造物から分離した造血前駆細胞から各種血球細胞を産生する方法である。得られた造血前駆細胞をフィーダー細胞上に播き、所望の血球細胞の分化誘導に適した条件で培養を行う。ここで「血球細胞の分化誘導に適した条件」とは、目的の血球細胞の種類に応じて、例えば、TPO、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-11、EPO、GM-CSF、SCF、G-CSF、Flt3リガンド、Heparinなどのいずれか又はこれらのうちの2つ以上を組合せて添加した条件を挙げることができる。巨核球及び血小板を分化誘導する場合には、例えば、TPO(10~200ng/ml、好ましくは100ng/ml程度)の存在下で、あるいは、TPO(10~200ng/ml、好ましくは100ng/ml程度)、SCF(10~200ng/ml、好ましくは50ng/ml程度)及びHeparin(10~100U/ml、好ましくは25U/ml程度)の存在下で、7~15日間程度培養することができる。培養環境としては、生体外で血球細胞の分化誘導を行うにあたり適した環境であればよいが、例えば、5%CO<sub>2</sub>、36~38℃、好ましくは37℃の条件下で培養を実施する。

40

また、iPS細胞、特にヒト由来のiPS細胞から巨核球、血小板を産生させる場合、上記ネット様構造物の産生効率がiPS細胞クローンによって異なるため、ネット様構造物の産生効率の高いiPS細胞クローンを予め選択し、該iPS細胞クローンの産生するネット様構造物から、巨核球や血小板などの各種血球細胞を産生することで、より効率的に多くの血球細胞を調製することができる(図9を参照のこと)。ここで、ネット様構造

50

物の産生効率の「高い」iPS細胞クローンとして、ネット様構造物の形成数が、例えば、 $1 \times 10^5$ 細胞あたり10以上、好ましくは15以上のクローンを選択することができる。

#### 【0017】

本発明の他の実施形態は、マウス由来のiPS細胞から胚様体（分化誘導した中胚葉系未分化細胞を含む細胞集団）を形成させ、さらに巨核球及び血小板を誘導する方法である。マウスES細胞の場合、OP9細胞などのフィーダー細胞との共培養を行わなくても胚様体を形成し、中胚葉系未分化細胞へ分化誘導させることが可能である。マウスiPS細胞の場合にも、マウスES細胞の場合と同様の条件で中胚葉系未分化細胞を誘導することが可能である。この場合の培養条件としては、例えば、培地としては、用いるiPS細胞によって異なるが、例えば、FBS、ヒトトランスフェリンなどを添加したIMDMを用い、その他適宜サプリメント等を加えたものを使用することができる。また、培養の環境としては、用いるiPS細胞によって異なるが、例えば、5% CO<sub>2</sub>、36~38℃、好ましくは37℃の条件を用いることができる。胚様体が形成されるまでの培養期間は、用いるiPS細胞によって異なるが、例えば、6~9日後くらいにその存在を確認することができる。

10

#### 【0018】

次に、胚様体を血球細胞の分化誘導に適した条件で培養し、巨核球及び血小板を誘導することができる。ここで「血球細胞の分化誘導に適した条件」とは、例えば、TPO、IL-1、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-9、IL-11、EPO、GM-CSF、SCF、G-CSF、Flt3リガンド、Heparinなどのいずれか又はこれらのうちの2つ以上を組合せて添加した条件を挙げることができる。巨核球及び血小板を分化誘導する場合には、例えば、TPO（10~200 ng/mL）、SCF（1~200 ng/mL）、IL-6（1~100 ng/mL程度）、IL-11（1~100 ng/mL程度）などを、単独又は適宜組合せて、適切な時期に培地に添加する。胚様体からの培養後、3~5日後くらいに巨核球が誘導され、7~9日後くらいに血小板が誘導される。培養環境としては、生体外で血球細胞の分化誘導を行うために適した環境であればよいが、例えば、5% CO<sub>2</sub>、36~38℃、好ましくは37℃の条件下で培養を実施する。

20

#### 【0019】

さらに、本発明の実施形態には、血小板を調製するためのキットが含まれる。当該キットには、細胞培養のための培地、血清、増殖因子などのサプリメント（例えば、TPO、SCF、Heparin、IL-6、IL-11など）、抗生物質などが含まれる。その他、例えば、ヒト由来の血小板の調製用に、ネット様構造物に存在するマーカーを確認するための抗体（例えば、Flk1、CD31、CD34、UEA-Iレクチンなどに対する抗体）なども含まれる。キット中に含まれる試薬、抗体等は、構成成分が活性を長期間有効に持続し、容器の材質によって吸着されず、変質を受けないような何れかの種類の容器中に供給される。例えば、封着されたガラスアンプルは、窒素ガスのような中性で不反応性ガスの下において包装されたバッファーを含む。アンプルは、ガラス、ポリカーボネート、ポリスチレンなどの有機ポリマー、セラミック、金属、又は試薬を保持するために通常用いられる他の何れかの適切な材料などから構成される。

30

40

#### 【0020】

血小板は、白血病、骨髄移植、抗ガン剤治療の際の血小板減少の予防又は改善に有効であるため、本発明により得られたヒト血小板を製剤の形態で安定的に供給することも可能である。本発明の方法によって産生される血小板は、巨核球から放出されて血小板が豊富に存在する培養液の画分（例えば、ヒト由来の血小板の場合、iPS細胞の培養後22~28日目程度）を回収し、白血球除去フィルター（例えば、テルモ社、旭化成メディカル社などから購入可能）などを使用して巨核球、その他の血液細胞の除外を行うことにより、血小板以外の成分を除去して、調製することができる。血液製剤を調製するにあたっては、血小板が保存に対して不安定であることなどを考慮して、血小板の安定化に資する他

50

の成分を含有せしめることもできる。血小板を安定化させる条件は、当該技術分野の専門家において周知の方法を選択することが可能である。より具体的には、取得した血小板（ヒトES細胞由来洗浄血小板）は、例えば、以下の方法により製剤化することができる。

ACD-A液：FFP（fresh frozen plasma；献血で得られた全血液から調整したもの、アルブミン、凝固因子など血液成分以外のものをすべて含む）を1：10の比率で調整し、15 - 50 Gyの放射線照射後に20 - 24 にて振とうしながら保存する。ACD-A液；クエン酸ナトリウム22 g / クエン酸8 g / ブドウ糖22 gを注射用水で全体を1 Lとするように調整する。

以上の方法を使用する場合、血小板の濃度としては、例えば、 $1 \times 10^9$  血小板 / mL程度が望ましい。

また、GM6001（a broad-range hydroxamic acid-based metalloprotease inhibitor）（Calbiochem社、La Jolla, CA, USA）を添加しておく、冷凍保存および室温保存中に起きる血小板機能分子 GPIb-V-IXやGPVIの切断に伴う不活化を予防できる。本発明者らは、この方法により、マウスES細胞由来血小板に関し不活性化の予防が可能であることを確認している。なお、ヒト血小板を使用したこの血小板不活性化に関する機序の参考論文として、Bergmeier, W et al., *Circ Res* 95:677-683, 2004及び Gardiner, EE et al., *J Thrombosis and Haemostasis*, 5:1530-1537, 2007を参照のこと。

なお、血小板を含む製剤を収納する容器は、ガラスのように血小板を活性化する材質のものを避けるのが好ましい。

#### 【実施例】

##### 【0021】

以下に実施例を示してさらに詳細に説明するが、本発明は実施例により何ら限定されるものではない。

##### 【0022】

1. マウスiPS細胞からの巨核球及び血小板の誘導

1-1. マウスストロマ細胞株OP9細胞の培養

OP9細胞は15% FBS、2 mM L-グルタミン、100 U ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシンを添加した、Minimum Essential Medium（MEM；Invitrogen/GIBCO）で継代培養した。培地は一日ごとに交換し、細胞の形質を変化させない為に、初代培養から継代培養数30回以内の細胞を実験に用いた。

##### 【0023】

1-2. マウスNanog-iPS細胞の培養

Nanog-iPS細胞（Nature, 448, 313-317（2007））（京都大学、山中伸弥博士より供与を受けた）を、15% FBS、300  $\mu$ g/mL ヒトトランスフェリン（Sigma）、4.5 mM モノチオグリセロール（Sigma）、50  $\mu$ g/mL アスコルビン酸（Sigma）、0.1 mM 2-メルカプトエタノール（Invitrogen/GIBCO）、2 mM L-グルタミン、100 U ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシンを添加したIscove's Modified Dulbecco's Medium（IMDM；Invitrogen/GIBCO）を用いてペトリ皿（Sterilin、米国）で培養した。10 cmペトリ皿に10 mLの培養液に対して $2 \times 10^5$ 個の細胞数で培養を開始し、胚様体形成を試みた。

##### 【0024】

1-3. 巨核球、血小板の誘導

培養6～7日目に産生された胚様体は0.25% トリプシンで処理した後、コンフルエントなOP9細胞上に、 $1 \times 10^5$ 個/ウェルとなるように播き直し、20 ng/mL マウス TPO（peprotec）、10 ng/mL SCFを添加したMEM中

10

20

30

40

50

で培養を行った(図1)。

培養10日後には、CD41<sup>+</sup>GPIb<sup>+</sup>の成熟巨核球が誘導され(図2及び図5上図)、さらに、培養を継続した培養14日後には、CD41<sup>+</sup>GPIb<sup>+</sup>の血小板が誘導された(図3及び図5下図)。このようにして誘導された血小板は、末梢血由来の血小板と同様の形態的特徴を有していた(図4)。

#### 【0025】

ここで得られた血小板の機能について検討を行った。フィブリノーゲンでコートしたディッシュに血小板が放出された培養上清を添加し、トロンピンで刺激を行ったところ(図6上図)、血小板に特徴的な細胞伸展を示した(図6下図)。この結果から、本発明方法により、マウスiPS細胞から、生体内の血小板と同じ特徴を備えた血小板を誘導できることが明らかとなった。

#### 【0026】

### 2. ヒトiPS細胞からの巨核球及び血小板の誘導

#### 2-1. ネット様構造物(iPS-Sacs)の調製

本実施例で使用した細胞株、201B6(皮膚細胞にOct3/4, Klf4, Sox2及びc-Mycを導入したもの、Cell, 131, 861-872(2007))及び253G1(皮膚細胞にOct3/4, Klf4及びSox2を導入したもの、Nature Biotech., 26, 101-106(2008))は、京都大学、山中伸弥博士より供与を受けた。さらに、TkDA3-1、TkDA3-2、TkDA3-4、TkDA3-5、TkDA3-9、TkDA3-20(東京大学で新しく樹立した株で(皮膚細胞にOct3/4, Klf4, Sox2及びc-Mycを導入したもの)及びTkDN4-M(皮膚細胞にOct3/4, Klf4及びSox2を導入したもの;東京大学樹立)を使用した。また、フィーダー細胞は、マウス胎児由来細胞、C3H10T1/2細胞株をつくば理研BioResource centerより供与を受けて使用し、又はOP9細胞株を大阪大学医学部、仲野徹教授から供与を受けて使用した。分化実験を行う前日に、0.1%ゼラチンコート化ディッシュにC3H10T1/2細胞を $6 \times 10^5 / 10 \text{ cm}^2$ ディッシュの密度となるように播き、分化実験の当日に、C3H10T1/2細胞の増殖を止めるため50Gyの放射線照射を行い、フィーダー細胞として用いた。また、OP9細胞株をフィーダー細胞として使用する場合には、分化実験の前日に50Gyの放射線照射を行い、播き直しを行った後に使用した。

#### 【0027】

ヒトiPS細胞は、15%FBS(JRH BIOSCIENCES、米国)、2mM L-グルタミン(Invitrogen)、ITSサプリメント( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  インスリン、 $5.5 \text{ mg}/\text{ml}$  トランスフェリン、 $5 \text{ ng}/\text{ml}$  亜セレン酸ナトリウム)(Sigma)、 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$  アスコルビン酸(Sigma)、 $0.45 \text{ mM}$  MTG(Sigma)、 $20 \text{ ng}/\text{ml}$  VEGF(R&D systems)を添加したIMDM(IMDM; Invitrogen/GIBCO)中、OP9細胞又はC3H10T1/2細胞上に播いて培養した。

培養後、15~17日前後に内部に血球様細胞を含んだネット様構造物が多数確認された(図7、iPS-Sac)。

iPS細胞株クローンは、例えば、4因子を使用して樹立しているにもかかわらず、ヘテロ(heterogeneity)な細胞株であることから、同一の皮膚細胞から作成しても分化能力は様々であった。従って、ヒトiPS細胞の場合、事前のスクリーニング(例えば、より多くのネット様構造物を形成するクローンを選択するなど)により分化に適したクローンを選択することが可能で、より効率的に血球系細胞を分化誘導するクローンを容易に選択することが可能となる(図9参照)。実際に、図9に示されるiPS細胞の中からSac形成能の異なるクローンを選択して血小板誘導能を比較した。具体的には、iPS細胞(TkDA3-4、TkDN4-M及び253G1)及びES細胞(Khes3)を $1 \times 10^5$ 細胞用い、最終的に得られる血小板の数を計測した(図10)。図10より、Sac形成能の高いiPS細胞(TkDA3-4、TkDN4-M)は、血液前

10

20

30

40

50

駆細胞を多く含むSacを形成しやすく、最終的な血小板数も増えることが示唆された。

【0028】

#### 2-2. コロニーアッセイ

ネット様構造物中の造血前駆細胞の細胞表面分子について調べたところ、未分化な血液/血管内皮の共通マーカーとされるCD31陽性/CD34陽性細胞の頻度がES細胞と同様であり、巨核球前駆細胞のマーカーとされるCD34陽性/CD41a細胞についても、ES細胞の場合と同様に発現していることが分かった(図11)。また、コロニー形成能については、ヒトES細胞と同様であり(図12)、4因子によるヒトiPS細胞株TkDA3-4では芽球様コロニー(blast-like、図12)が観察され、ガン化(白血病化)の危険が示唆された。

10

【0029】

#### 2-3. 巨核球/血小板の誘導

次に、P-1000ピペットを用いて、位相差顕微鏡下でネット様構造物をピックアップし、70 $\mu$ mセルストレイナーを用いて、血球細胞とネット様構造物を分離した。新たに、6ウェルプレートに用意した放射線照射済みのC3H10T1/2細胞(6 $\times$ 10<sup>5</sup>/6ウェルプレート1枚)上に血球細胞を2~3 $\times$ 10<sup>4</sup>/ウェルで播き、15%FBS(JRH BIOSCIENCES、米国)、2mM L-グルタミン(Invitrogen)、ITSサプリメント(10 $\mu$ g/ml インスリン、5.5mg/ml トランスフェリン、5ng/ml 亜セレン酸ナトリウム)(Sigma)、50 $\mu$ g/ml アスコルビン酸(Sigma)、0.45mM MTG(Sigma)、100ng/ml ヒトTPO(Peprotec)、50ng/ml SCF及び25U/ml Heparinを添加したIMDM(IMDM; Invitrogen/GIBCO)中でさらに培養し、巨核球/血小板を誘導した(図7、図8及び図15)。

20

【0030】

253G1(京都大学株)、201B6(京都大学株)、TkDA3-4(東京大学株)、TkDN4-M(東京大学株)細胞株の培養後23~24日目の浮遊細胞成分をフローサイトメーターで解析し、細胞表面抗原の特徴を調べたところ、巨核球、血小板特異的な表面分子抗原であるヒトCD41a(integrin IIb)及びヒトCD42b(GPIIb)、CD42a(GPIX)、CD9陽性細胞が観察された(図13; 巨核球、図14; 血小板)。また、巨核球から血小板が放出される際に示される形態的な特徴も確認された(図15及び図16)。

30

次に、血小板活性化物質によるインテグリンの活性化について検討したところ、ヒトiPS細胞由来血小板(図17上パネル、下段)は、ヒトES細胞由来血小板(図17下パネル、上段)同様、生体内の重要な血小板活性化物質ADPによりインテグリンの活性化(PAC1抗体陽性血小板の増加)を認めた。また、ヒトES細胞由来血小板(図17下パネル、白い棒グラフ)同様、ヒトiPS細胞由来血小板(図17下パネル、黒い棒グラフ)は低濃度のADP(5 $\mu$ M)から反応し、用量依存的に反応が増加した。さらに、他の活性化物質であるトロンピンへの反応も確認できた(図17下パネル、6)。これらの結果から、iPS細胞から作製された血小板は、ヒトES細胞由来血小板と同様に機能性を発揮することが明らかとなった。

40

以上の結果から、本発明の方法により、ヒトiPS細胞から巨核球及び血小板を効率的に誘導できることが明らかとなった。

【産業上の利用可能性】

【0031】

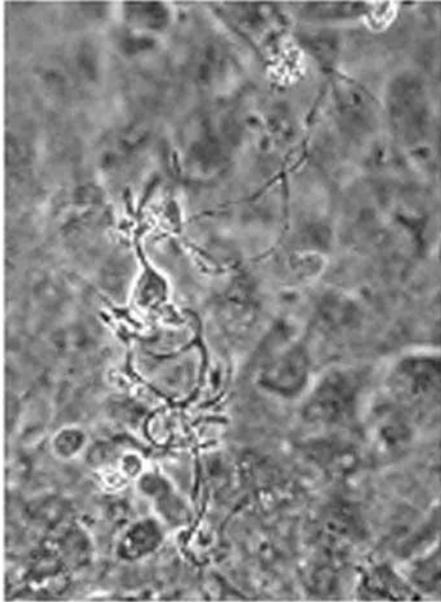
本発明によれば、HLA適合性の問題を克服可能な血小板を提供することができる。従って、輸血が必要な患者専用の血小板の供給が可能となることから、抗血小板抗体の産生による血小板の破壊などの問題も解決することができる。



【 図 3 】

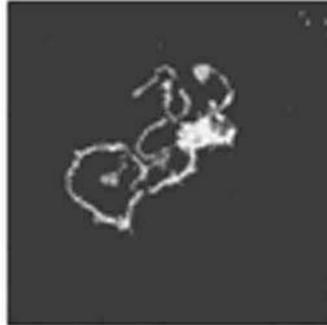
**A**

**Proplatelet**

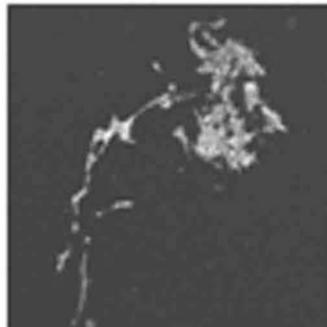


**B**

**CD41/F-actin**

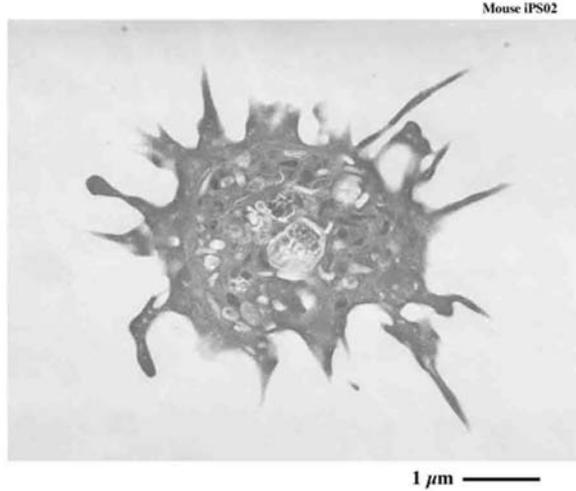
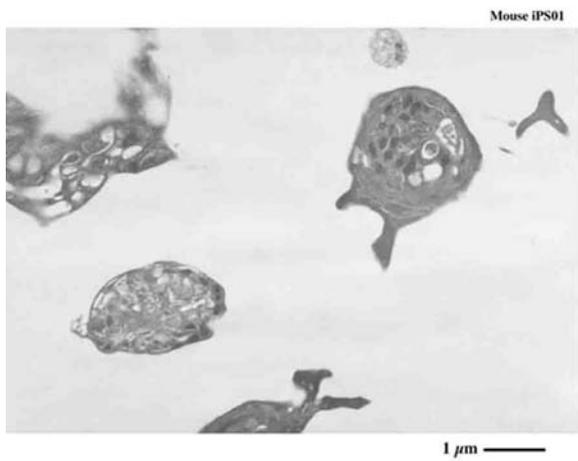


**GPIb $\alpha$ /F-actin**

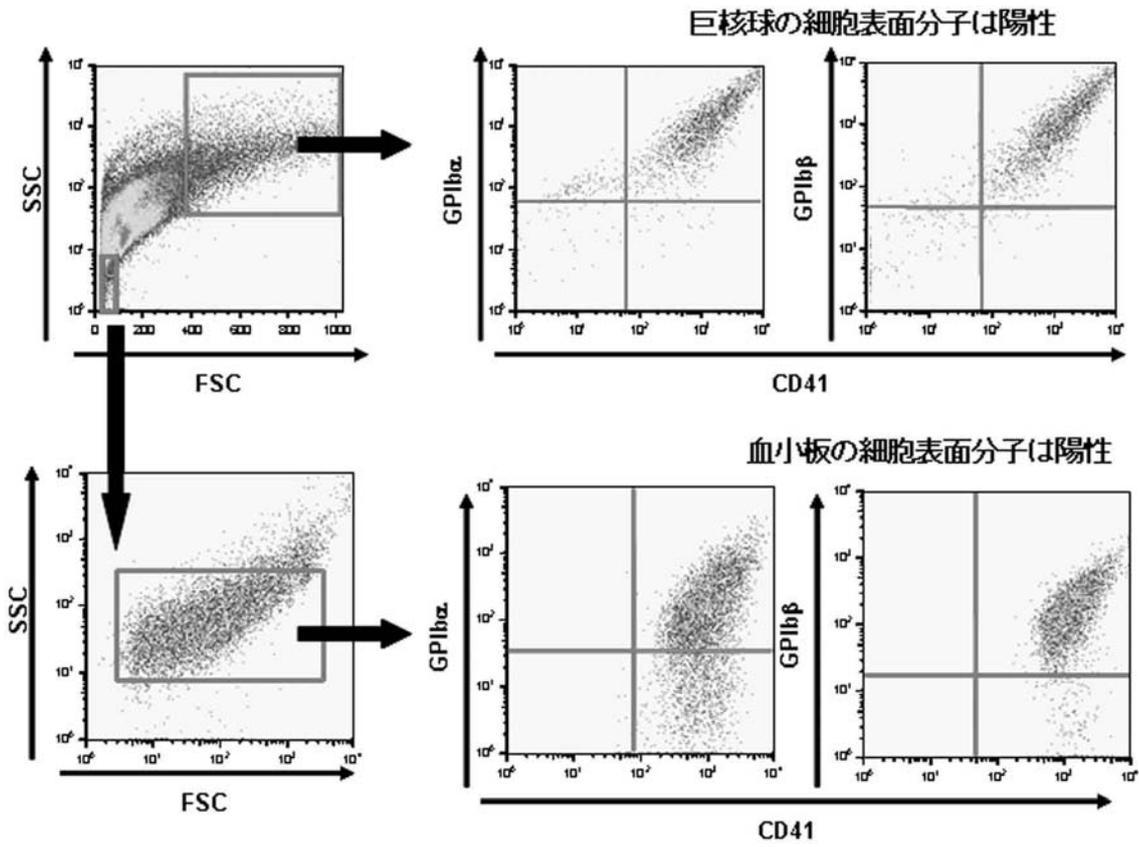


【 図 4 】

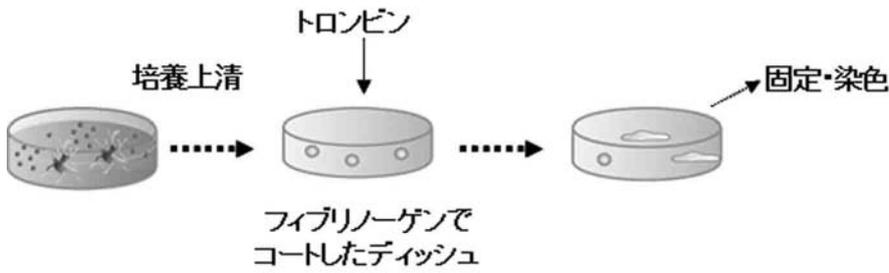
マウスiPS由来血小板



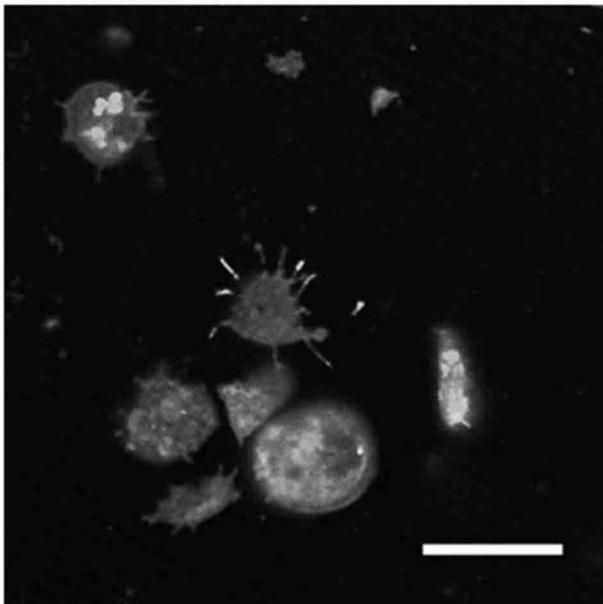
【 図 5 】



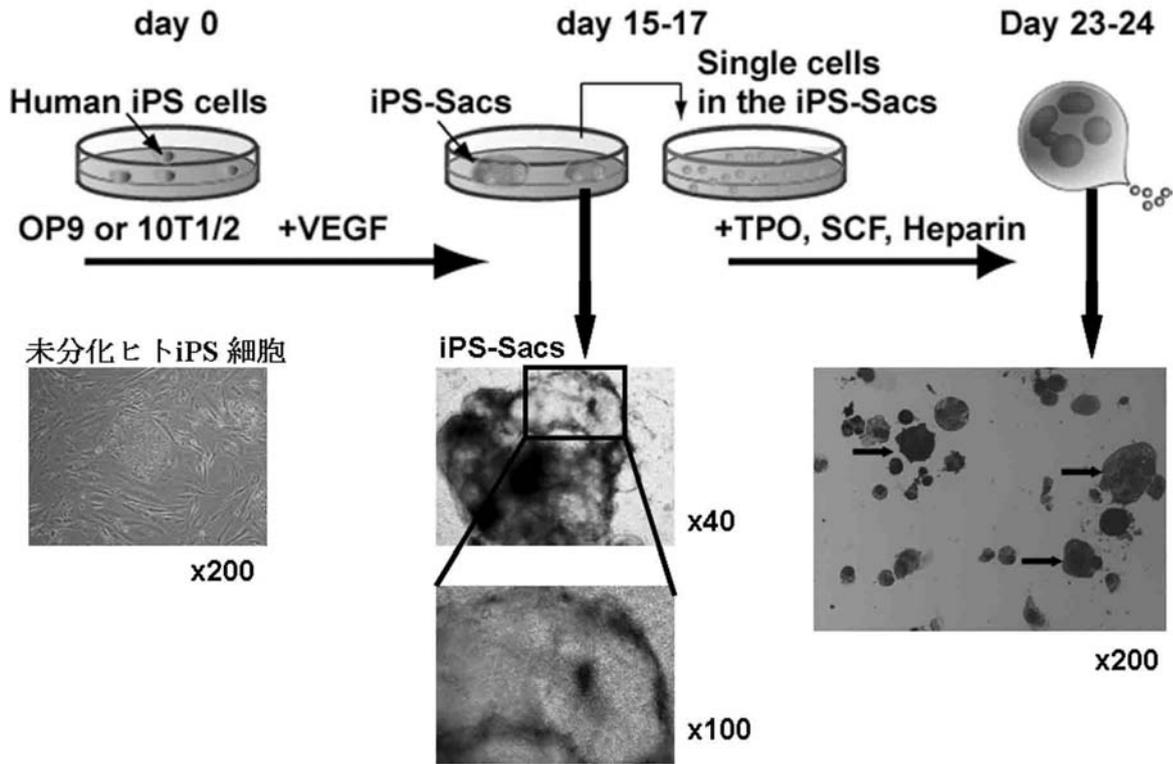
【 図 6 】



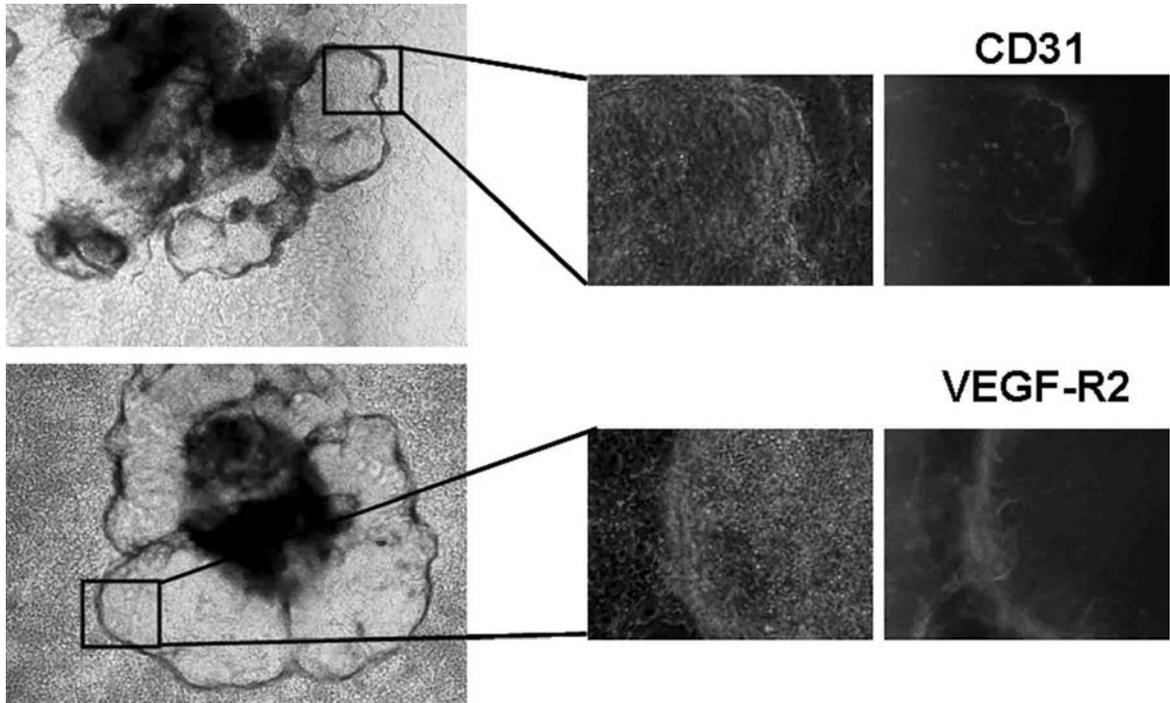
iPS 由来血小板



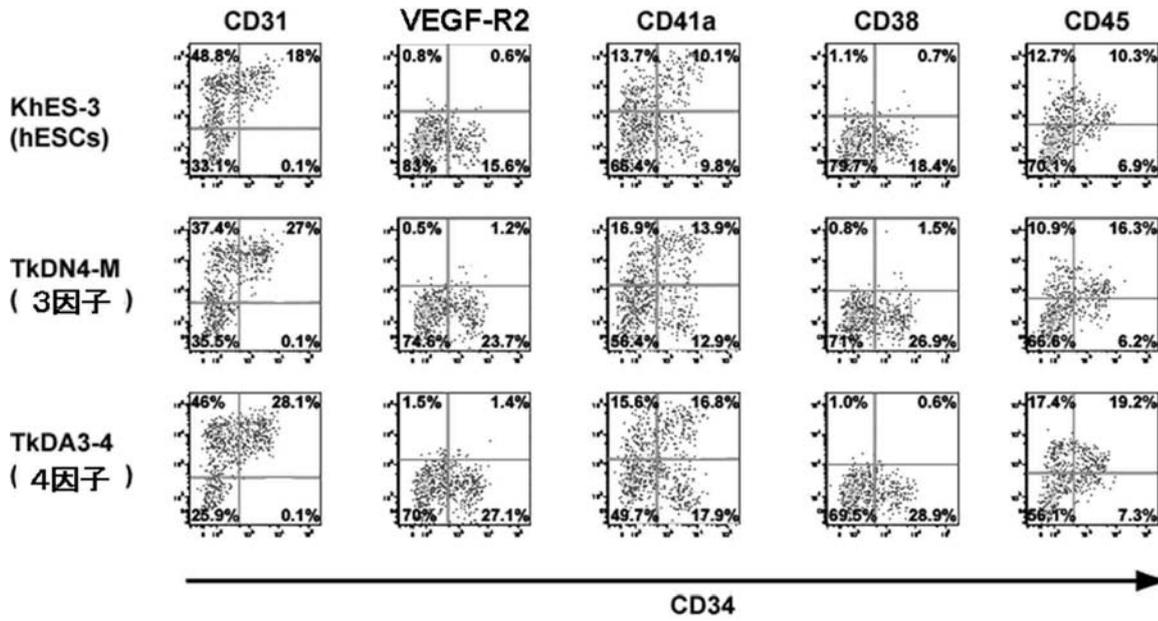
【 図 7 】



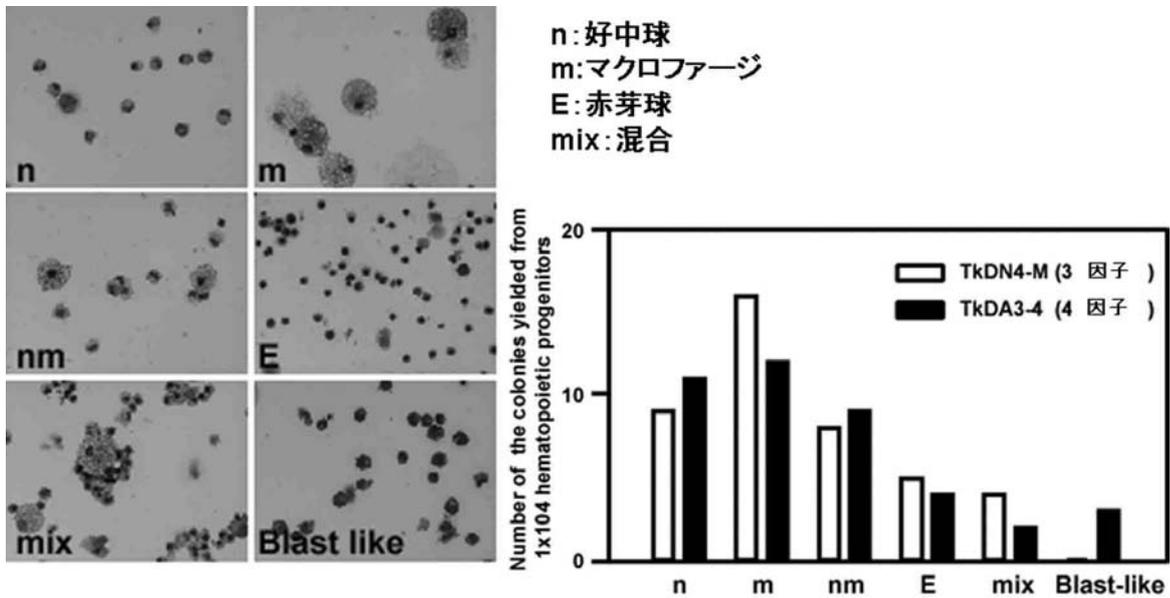
【 図 8 】



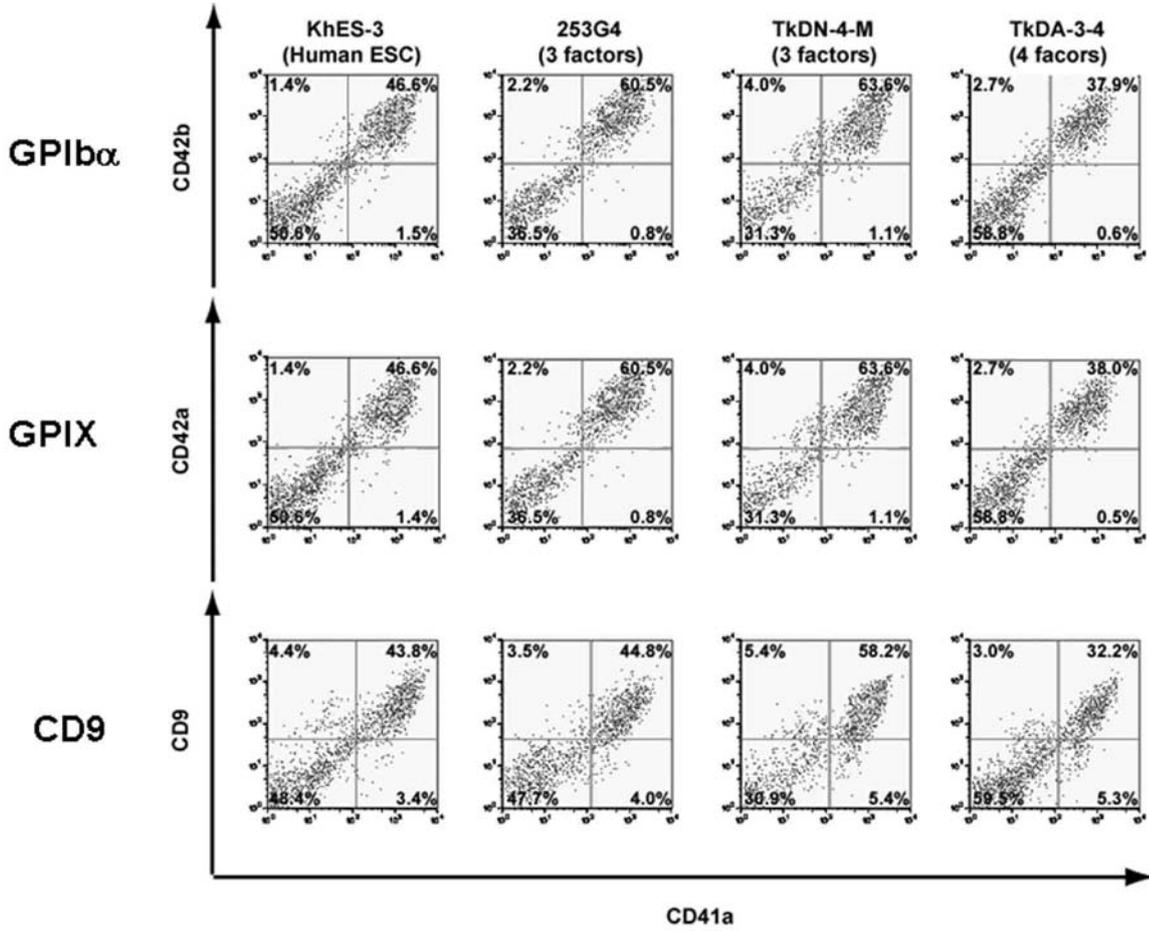
【 図 1 1 】



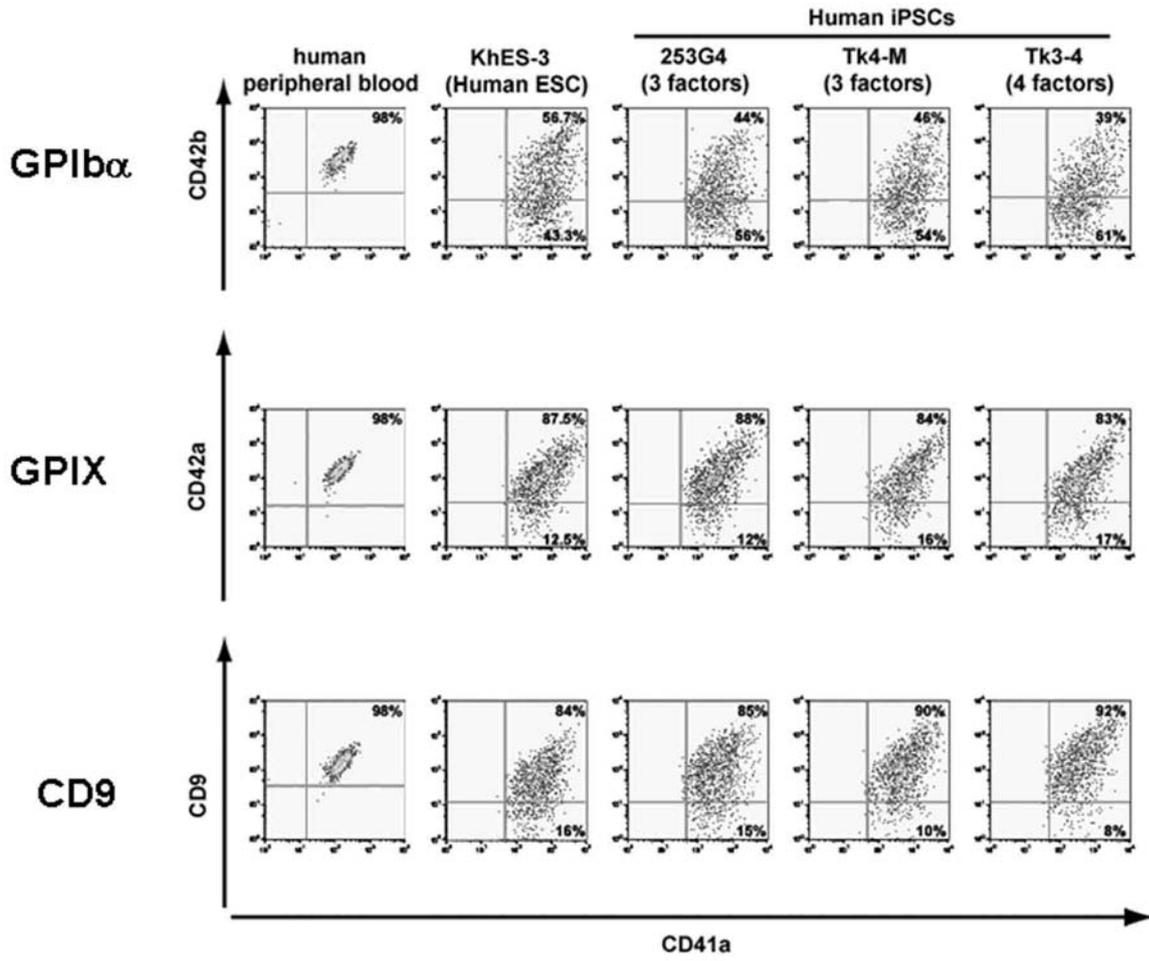
【 図 1 2 】



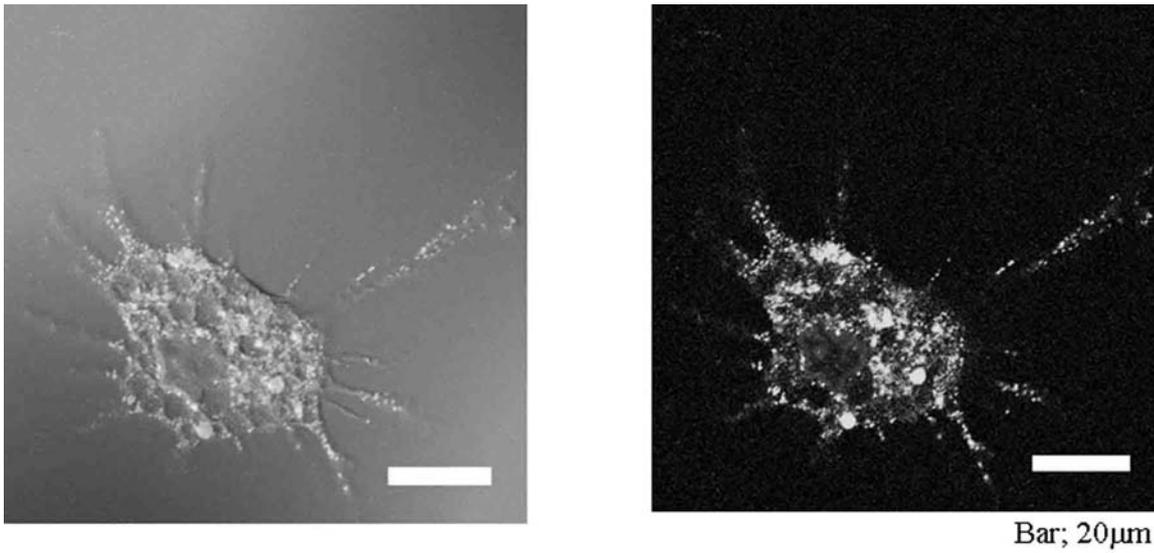
【 図 1 3 】



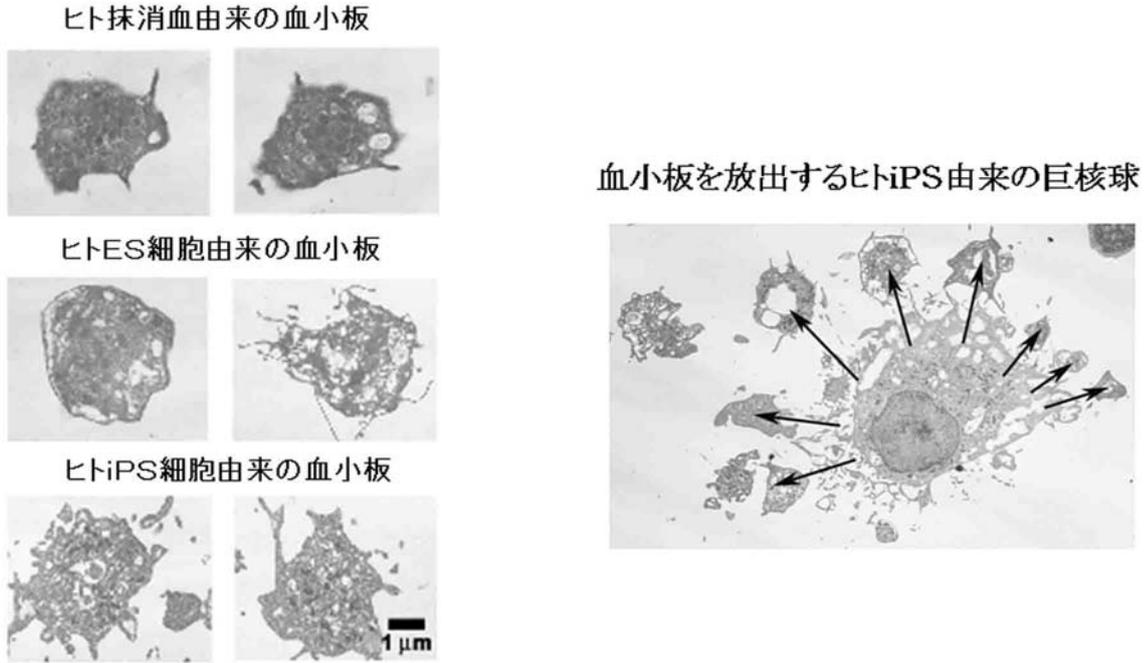
【 図 1 4 】



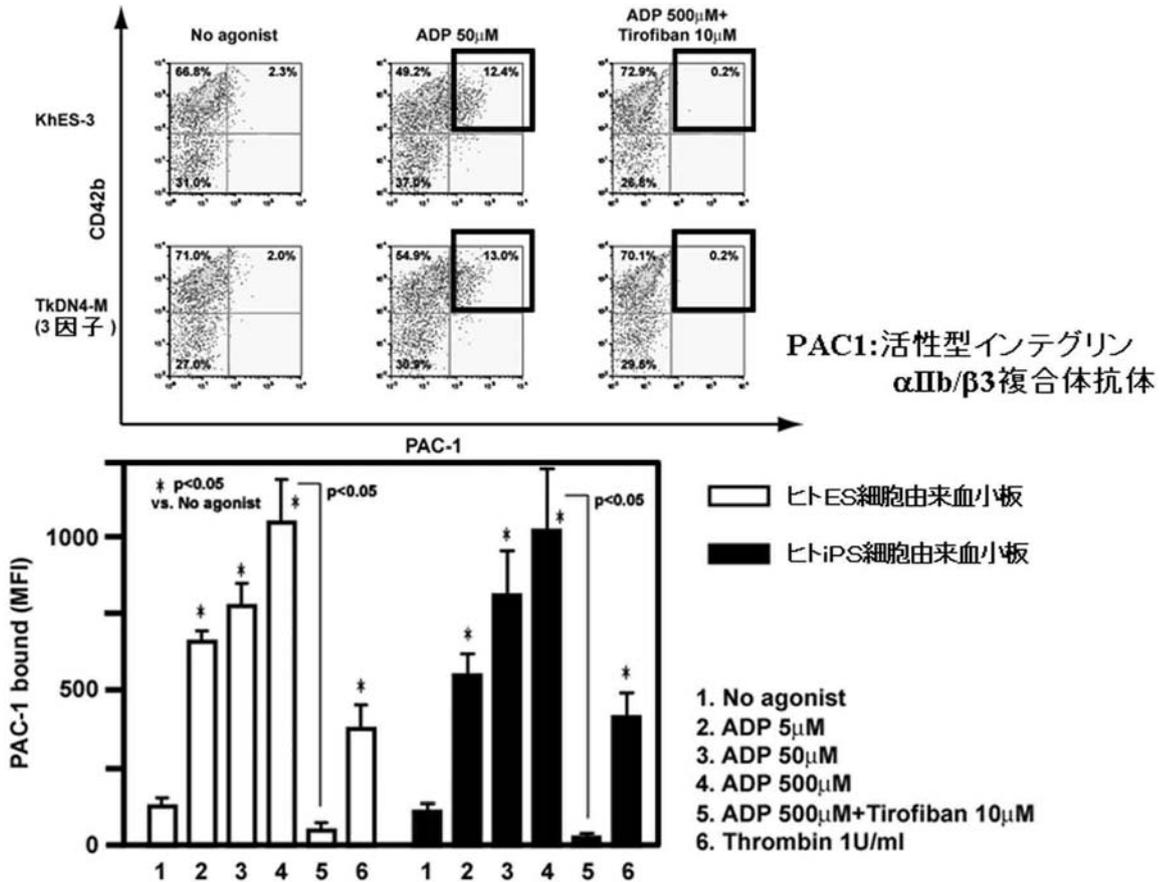
【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2009/001542
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> C12N5/10(2006.01)i, A61K35/14(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/10, A61K35/14, C12N15/09  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 1996-2009 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2009 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2009  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), JST7580 (JDreamII)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HIROYAMA T, et al., Long-lasting in vitro hematopoiesis derived from primate embryonic stem cells., Experimental Hematology(2006), Vol.34, p.760-769	1-16
Y	US 2006/0099198 A1 (CHEN-I), 11 May, 2006 (11.05.06), Full text & JP 2008-518603 A & EP 1807507 A & WO 2006/050330 A2	1-16
Y	JIANG J, et al., High dose chemotherapy and transplantation of hematopoietic progenitors from murine D3 embryonic stem cells., Journal of Chemotherapy(2005), Vol.17, No.3, p.302-308	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 April, 2009 (28.04.09)		Date of mailing of the international search report 19 May, 2009 (19.05.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/001542

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	JP 2005-511084 A (Geron Corp.), 28 April, 2005 (28.04.05), Par. Nos. [0056], [0063] & US 2004/0224403 A1 & US 2005/0282272 A1 & US 2003/0153082 A1 & EP 1463803 A & WO 2003/050251 A2	<u>8, 9</u> 1-7, 10-16
Y	WO 2005/019441 A1 (Tanabe Seiyaku Co., Ltd.), 03 March, 2005 (03.03.05), & US 2007/0124826 A1 & EP 1661984 A1	1-16
Y	Yuka NAGATA, "Thrombopoietin ni yoru Tabaitaika o Tomonau Kyokakukyu Tokuiteki na Bunka Seijuku Katei no Kaiseki", Research Reports of Uehara Memorial Foundation (1999), Vol.13, pages 89 to 91	1-16
Y	JP 2005-287479 A (Kazuhisa MAEDA), 20 October, 2005 (20.10.05), (Family: none)	1-16
<u>X</u> Y	JP 2007-089432 A (ReproCELL Inc.), 12 April, 2007 (12.04.07), Claims 13, 14; Par. No. [0035] (Family: none)	<u>8, 9, 14-16</u> 1-7, 10-13
<u>X</u> Y	Naoya TAKAYAMA et al., "Hito ES Saibo Yurai Zoketsu Shiji Kozotai: Nojo Kozobutsu (ES-Sac) Karano Ketsueki Saibo no Bunka Yudo", Rinsho Ketsueki (2007), Vol.48, No.9, page 936	<u>1-3, 8, 9</u> 4-7, 10-16
<u>X</u> Y	Naoya TAKAYAMA, et al., Human Embryonic Stem Cell-Derived "NET-Like" Structure Serves as a Hematopoietic Progenitor Niche and Favors Generation of Mature Megakaryocytes and Functional Platelets., Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)(2006), Vol.108, No.11, p.474a, Abstract 1665, Poster Board#session: 793-I	<u>1-3</u> 4-16
Y	WO 2007/069666 A1 (Kyoto University), 21 June, 2007 (21.06.07), & JP 2008-283972 A & US 2009/0047263 A & EP 1970446 A1	1-16
Y	Yunying Yu, et al., Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells., Science(2007), Vol.318, No.5858, p.1917-1920	1-16

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2009/001542

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Takayama N, et al., Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors., Blood(2008 Jun), Vol.111, No.11, p.5298-5306 (Epub 2008 Apr 3)	1-16
P, X	WO 2008/041370 A1 (The University of Tokyo), 10 April, 2008 (10.04.08), Claims (Family: none)	1-16

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 0 1 5 4 2									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, A61K35/14(2006.01)i, C12N15/09(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. C12N5/10, A61K35/14, C12N15/09											
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>1971-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2009年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2009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	1971-2009年	日本国実用新案登録公報	1996-2009年	日本国登録実用新案公報	1994-2009年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2009年										
日本国実用新案登録公報	1996-2009年										
日本国登録実用新案公報	1994-2009年										
国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus (JDreamII), JMEDPlus (JDreamII), 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	HIROYAMA T, et al., Long-lasting in vitro hematopoiesis derived from primate embryonic stem cells., Experimental Hematology(2006), Vol. 34, p. 760-769	1-16									
Y	US 2006/0099198 A1 (CHEN-I) 2006.05.11, 全文 & JP 2008-518603 A & EP 1807507 A & WO 2006/050330 A2	1-16									
<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 28.04.2009		国際調査報告の発送日 19.05.2009									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 高 美葉子	4 N 9839								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3488								

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 0 1 5 4 2
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	JIANG J, et al., High dose chemotherapy and transplantation of hematopoietic progenitors from murine D3 embryonic stem cells., Journal of Chemotherapy (2005), Vol. 17, No. 3, p. 302-308	1-16
<u>X</u> Y	JP 2005-511084 A (ジェロンコーポレイション) 2005. 04. 28, 【0056】、【0063】 & US 2004/0224403 A1 & US 2005/0282272 A1 & US 2003/0153082 A1 & EP 1463803 A & WO 2003/050251 A2	<u>8, 9</u> 1-7, 10-16
Y	WO 2005/019441 A1 (田辺製薬株式会社) 2005. 03. 03, & US 2007/0124826 A1 & EP 1661984 A1	1-16
Y	永田由香, トロンボポエチンによる多倍体化を伴う巨核球特異的な分化成熟過程の解析, 上原記念生命科学財団研究報告集(1999), Vol. 13, p. 89-91	1-16
Y	JP 2005-287479 A (前田和久) 2005. 10. 20, (ファミリーなし)	1-16
<u>X</u> Y	JP 2007-089432 A (株式会社リプロセル) 2007. 04. 12, 請求項1 3、 請求項1 4、【0035】 (ファミリーなし)	<u>8, 9, 14-16</u> 1-7, 10-13
<u>X</u> Y	高山直也, et al., ヒトES細胞由来造血支持構造体:囊状構造物(ES-Sac)からの血液細胞の分化誘導, 臨床血液 (2007), Vol. 48, No. 9, p. 936	<u>1-3, 8, 9</u> 4-7, 10-16
<u>X</u> Y	Naoya TAKAYAMA, et al., Human Embryonic Stem Cell-Derived "NET-Like" Structure Serves as a Hematopoietic Progenitor Niche and Favors Generation of Mature Megakaryocytes and Functional Platelets., Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) (2006), Vol. 108, No. 11, p. 474a Abstract 1665, Poster Board#session:793-I	<u>1-3</u> 4-16
Y	WO 2007/069666 A1 (国立大学法人京都大学) 2007. 06. 21, & JP 2008-283972 A & US 2009/0047263 A & EP 1970446 A1	1-16
Y	Yunying Yu, et al., Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells., Science (2007), Vol. 318, No. 5858, p. 1917-1920	1-16
P X	Takayama N, et al., Generation of functional platelets from human embryonic stem cells in vitro via ES-sacs, VEGF-promoted structures that concentrate hematopoietic progenitors., Blood (2008 Jun), Vol. 111, No. 11, p. 5298-5306 (Epub 2008 Apr 3)	1-16

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 0 1 5 4 2
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
P X	WO 2008/041370 A1 (国立大学法人東京大学) 2008.04.10, 請求項 (ファミリーなし)	1-16

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 高山 直也

東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内

(72)発明者 山中 伸弥

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内 物質-

細胞統合システム拠点 i P S細胞研究センター内

(72)発明者 高橋 和利

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内 物質-

細胞統合システム拠点 i P S細胞研究センター内

Fターム(参考) 4B065 AA93X BA24 BA30 BB19 BB40 BC50 CA44

4C087 AA01 AA02 AA03 BB64 CA04 DA21 MA17 MA66 NA20 ZA53

ZB26 ZB27

(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。