

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02010/131641

発行日 平成24年11月1日(2012.11.1)

(43) 国際公開日 平成22年11月18日(2010.11.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/02 (2006.01)	C12Q 1/02	2G043
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	2G054
GO1N 33/53 (2006.01)	GO1N 33/53 S	4B063
GO1N 21/64 (2006.01)	GO1N 33/53 Y	
GO1N 21/78 (2006.01)	GO1N 33/53 V	

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 32 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2011-513340 (P2011-513340)	(71) 出願人	510136312 独立行政法人国立成育医療研究センター 東京都世田谷区大蔵2-10-1
(21) 国際出願番号	PCT/JP2010/057938		
(22) 国際出願日	平成22年5月11日(2010.5.11)	(71) 出願人	301021533 独立行政法人産業技術総合研究所 東京都千代田区霞が関1-3-1
(31) 優先権主張番号	特願2009-114877 (P2009-114877)	(71) 出願人	509131742 株式会社GPバイオサイエンス 北海道札幌市中央区南九条西三丁目2番5-406号
(32) 優先日	平成21年5月11日(2009.5.11)	(74) 代理人	100108947 弁理士 涌井 謙一
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100117086 弁理士 山本 典弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞の状態を判別する方法

(57) 【要約】

細胞の状態を迅速、簡便かつ正確に特定する技術を提供する。

判別対象になっている細胞の表面に存在している糖鎖又は当該糖鎖を含有している糖鎖含有サンプルを、液相中で複数種類のレクチンに結合させたまま測定することによって得た、前記複数種類のレクチンにそれぞれ結合した前記判別対象になっている細胞の量又は糖鎖含有サンプルの量を用いて細胞の状態を判別する方法。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

判別対象になっている細胞の持つ糖鎖又は当該糖鎖を含有している糖鎖含有サンプルを、液相中で複数種類のレクチンに結合させたまま測定することによって得た、前記複数種類のレクチンにそれぞれ結合した前記判別対象になっている細胞の量又は糖鎖含有サンプルの量を用いて細胞の状態を判別する方法。

【請求項 2】

前記細胞が幹細胞または前駆細胞であることを特徴とする請求項 1 記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 3】

前記幹細胞が体性幹細胞、胚性幹細胞、核移植幹細胞、または、人工多能性幹細胞のいずれかであることを特徴とする請求項 2 記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 4】

前記体性幹細胞が造血幹細胞、又は、間葉系幹細胞であることを特徴とする請求項 3 記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 5】

前記細胞が哺乳動物由来、又は、ヒト由来であることを特徴とする請求項 2 乃至 4 いずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 6】

判別する細胞の状態が、細胞の未分化の状態及び、細胞の分化の状態を含むことを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 7】

判別する細胞の状態が、細胞の分化傾向、又は、細胞の分化に対する抵抗性であることを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 8】

判別する細胞の状態が、細胞のがん化、又は細胞のがん化の傾向であることを特徴とする請求項 1 乃至 5 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 9】

前記糖含有分子が糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、プロテオグリカンの中のいずれか一種又は複数種であることを特徴とする請求項 1 乃至 8 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 10】

前記複数種類のレクチンがレクチンアレイ、ELISAプレート、磁気ビーズ、ラテックスビーズの中のいずれか一種に固定されていることを特徴とする請求項 1 乃至 9 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 11】

前記細胞または糖鎖含有サンプルの量が蛍光測定または発光測定によって測定されることを特徴とする請求項 1 乃至 10 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 12】

前記蛍光測定がエバネッセント励起法または共焦点蛍光測定法であることを特徴とする請求項 11 記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 13】

前記蛍光測定がフローサイトメトリーであることを特徴とする請求項 11 記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 14】

細胞状態の判別方法が遺伝子発現解析、または対象となる状態の細胞の特異的マーカー抗体との結合測定の片方又は両方と組み合わせて行われることを特徴とする請求項 1 乃至 13 いずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 15】

細胞状態の判別方法が線形判別分析又は、非線形判別分析によって行われることを特徴

10

20

30

40

50

とする請求項 1 乃至 13 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 16】

前記非線形判別分析が、マハラノビス距離による判別分析であることを特徴とする請求項 15 記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 17】

細胞状態の判別方法が教師あり機械学習手法または半教師あり機械学習手法によるものであることを特徴とする請求項 1 乃至 13 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 18】

前記機械学習手法が k 近傍法、ナイーブベイズ分類器、決定木、ニューラルネットワーク、サポートベクターマシン、バギング法、ブースティング法、ランダムフォレスト法から選ばれるいずれかの手法によって行われることを特徴とする請求項 17 記載の細胞の状態を判別する方法。

10

【請求項 19】

細胞状態の判別方法が、主成分分析、クラスター分析、自己組織化マップから選ばれるいずれかの手法によって行われることを特徴とする請求項 1 乃至 13 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 20】

判別する細胞の状態がヒト胚性幹細胞またはヒト人工多能性幹細胞の未分化および分化であり、その判別に使用するレクチンがイヌエンジュレクチン I、インゲンマメレクチン(L)、インゲンマメレクチン(E)、スピンドルツリーレクチンの中のいずれか一種、またはこれらの中のいずれかのレクチンにそれぞれ類似の糖結合特異性を持つ分子からなる群から 1 つまたは複数選択されたものであることを特徴とする請求項 1 乃至 19 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

20

【請求項 21】

判別する細胞の状態がヒト間葉系幹細胞の未分化および骨分化であり、その判別に使用するレクチンがイヌエンジュレクチン I、ニワトコレクチン、ニホンニワトコレクチン、キカラスウリレクチン - I、デイゴマメレクチンの中のいずれか一種、またはこれらの中のいずれかのレクチンにそれぞれ類似の糖結合特異性を持つ分子からなる群から 1 つまたは複数選択されたものであることを特徴とする請求項 1 乃至 19 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は細胞の状態の判別に関する。

【背景技術】

【0002】

病気や障害による臓器や組織の欠損や不全を、培養した細胞やそれにより得られた組織を移植することによって回復・治療する医療を再生医療と呼び、実際に皮膚、骨・軟骨、血管、角膜等の分野では臨床応用が行われている。

40

【0003】

幹細胞研究は、個体の発生と分化という生命の理解に深く関わっていると同時に、幹細胞から分化した細胞を用いた再生医療への応用につながる。このことにより従来は不可能だった分野においても再生医療を行えるようになることが期待されている。

【0004】

幹細胞の評価方法としては細胞形態による評価、遺伝子発現解析による評価、表面抗原を用いた評価などが行われている。

【0005】

特許文献 1 には幹細胞の形態観察により細胞分化を診断する方法が述べられている。

【0006】

50

特許文献2には細胞から採取したDNA中のシトシンのメチル化パターンから細胞の分化をモニターする方法が述べられている。

【0007】

未分化なヒト胚性幹(hES)細胞は、(1)形態的特徴の観察に加えて、(2)アルカリフォスターゼ活性陽性、(3)糖脂質であるstage-specific embryonic antigen(SSEA)-3及びSSEA-4並びにケラタン硫酸プロテオグリカンを認識するTRA-1-60、TRA-1-81の細胞表面マーカー陽性、(4)未分化マーカーの遺伝子OCT3/4, SOX2, NANOGの発現検出、さらには(5)免疫不全マウスへの移植によるテラトーマ(奇形腫)の形成確認、を行うことによって評価が行われている。

【0008】

細胞の表面には様々なタンパク質、脂質が存在し、様々な抗原が発現していることが知られている。さらにそれらは糖鎖修飾されているものも多く、細胞の表面は多種多様な糖鎖に覆われていることが知られている。細胞の種類によってその表面の糖鎖も異なることから、糖鎖は細胞の顔とも言われている。例えばK. A. Wearneらは蛍光標識レクチンを用いて、ヒトES細胞の分化前後で様々な糖鎖構造の変化が起っていることを示している(非特許文献1)。

【0009】

特許文献3では、少なくともその糖結合部位が改変されたレクチンを少なくとも1つ以上含むレクチン群により構成されているか、或いは所定の糖鎖を有する細胞若しくは擬細胞体に対してパニングすることにより選別したレクチンを少なくとも1つ以上含むレクチン群により構成されるレクチンライブラリを使用した糖鎖解析方法が提案されている。

【0010】

特許文献4では、複数の種類のレクチンから所定の解析能を有するレクチンを選別する方法及びその方法で選別されたレクチンが提案されている。

【0011】

特許文献5では、基板を洗浄せずに励起光を作用させて糖鎖に相互作用を示すタンパク質と糖鎖との相互作用を分析する方法が提案されている。

【0012】

特許文献6では、糖鎖結合性タンパク質を複数種配置固定した導光性材料からなる基板と、該基板の側部端面に光を導入し、該基板表面にエバネッセント波を発生させて蛍光標識を励起する手段と、該手段により生じた蛍光の強度を上記糖鎖結合性タンパク質の配置位置毎に測定する蛍光強度測定手段とを有する、糖鎖あるいは複合糖質の解析装置が提案されている。

【0013】

特許文献7では、細胞表層に存在するタンパク質、糖鎖、脂質などの分子の構造情報を、細胞を破壊せずに観察するためのアレイ基板と、これを用いて細胞表層のプロファイルを達成する手法が提案されている。

【0014】

幹細胞を再生医療へ応用するにあたっては、その品質管理技術は非常に重要である。品質管理を行うには、未分化及び分化、分化の方向を含めた、幹細胞の状態を判別する技術が必要となるため、細胞の評価技術、細胞の標準化方法の確立が待たれている。

【0015】

例えば、ヒトES細胞においては樹立された細胞株によってその分化傾向に違いがあることが報告されている(非特許文献2)。

【0016】

iPS細胞等のES様細胞においても現時点ではその評価基準はES細胞に拠る他はなく、同様の課題がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0017】

10

20

30

40

50

【特許文献1】WO2006/057444

【特許文献2】特開2004-194655

【特許文献3】特許3658394

【特許文献4】WO2004/018513

【特許文献5】WO2005/064333

【特許文献6】特開2007-3357

【特許文献7】特開2008-187932

【非特許文献】

【0018】

【非特許文献1】K. A. Wearne et al., Glycobiology 2006, 16, 981-990

10

【非特許文献2】K. Osafune et al., Nature Biotechnology 2008, 26, 313-315

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

細胞の状態を維持しつつ増殖させることや、細胞を適切に分化させるためには、細胞の状態及び変化に関する情報を迅速、簡便かつ正確に評価することが必要である。

【0020】

そこで、本発明が解決しようとするのは、細胞の状態を迅速、簡便かつ正確に判別する技術の提供である。

【課題を解決するための手段】

20

【0021】

本願の発明者は上記の課題を解決する手段として、レクチンによる細胞の判別方法についての検討を重ねた結果、細胞の持つ糖鎖の、複数のレクチンに対する結合測定データを用いて細胞の状態を判別する方法を発明するに至った。

【0022】

請求項1記載の発明は、

判別対象になっている細胞の持つ糖鎖又は当該糖鎖を含有している糖鎖含有サンプルを、液相中で複数種類のレクチンに結合させたまま測定することによって得た、前記複数種類のレクチンにそれぞれ結合した前記判別対象になっている細胞の量又は糖鎖含有サンプルの量を用いて細胞の状態を判別する方法

30

である。

【0023】

請求項2記載の発明は、

前記細胞が幹細胞または前駆細胞であることを特徴とする請求項1記載の細胞の状態を判別する方法

である。

【0024】

請求項3記載の発明は、

前記幹細胞が体性幹細胞、胚性幹細胞、核移植幹細胞、または、人工多能性幹細胞のいずれかであることを特徴とする請求項2記載の細胞の状態を判別する方法

40

である。

【0025】

請求項4記載の発明は、

前記体性幹細胞が造血幹細胞、又は、間葉系幹細胞であることを特徴とする請求項3記載の細胞の状態を判別する方法

である。

【0026】

請求項5記載の発明は、

前記細胞が哺乳動物由来、又は、ヒト由来であることを特徴とする請求項2乃至4いずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法

50

である。

【0027】

請求項6記載の発明は、
判別する細胞の状態が、細胞の未分化の状態及び、細胞の分化の状態を含むことを特徴とする請求項1乃至5のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法
である。

【0028】

請求項7記載の発明は、
判別する細胞の状態が、細胞の分化傾向、又は、細胞の分化に対する抵抗性であることを特徴とする請求項1乃至5のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法
である。

10

【0029】

請求項8記載の発明は、
判別する細胞の状態が、細胞のがん化、又は細胞のがん化の傾向であることを特徴とする請求項1乃至5のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法
である。

【0030】

請求項9記載の発明は、
前記糖含有分子が糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、プロテオグリカンの中のいずれか一種又は複数種であることを特徴とする請求項1乃至8のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法
である。

20

【0031】

請求項10記載の発明は、
前記複数種類のレクチンがレクチンアレイ、ELISAプレート、磁気ビーズ、ラテックスビーズの中のいずれか一種に固定されていることを特徴とする請求項1乃至9のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法
である。

【0032】

請求項11記載の発明は、
前記細胞または糖鎖含有サンプルの量が蛍光測定または発光測定によって測定されることを特徴とする請求項1乃至10のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法
である。

30

【0033】

請求項12記載の発明は、
前記蛍光測定がエパネッセント励起法または共焦点蛍光測定法であることを特徴とする請求項11記載の細胞の状態を判別する方法
である。

【0034】

請求項13記載の発明は、
前記蛍光測定がフローサイトメトリーであることを特徴とする請求項11記載の細胞の状態を判別する方法
である。

40

【0035】

請求項14記載の発明は、
細胞状態の判別方法が遺伝子発現解析、または対象となる状態の細胞の特異的マーカー抗体との結合測定の片方又は両方と組み合わせて行われることを特徴とする請求項1乃至13いずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法
である。

【0036】

50

請求項 15 記載の発明は、

細胞状態の判別方法が線形判別分析又は、非線形判別分析によって行われることを特徴とする請求項 1 乃至 13 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法である。

【0037】

請求項 16 記載の発明は、

前記非線形判別分析が、マハラノビス距離による判別分析であることを特徴とする請求項 15 記載の細胞の状態を判別する方法である。

【0038】

請求項 17 記載の発明は、

細胞状態の判別方法が教師あり機械学習手法または半教師あり機械学習手法によるものであることを特徴とする請求項 1 乃至 13 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法である。

【0039】

請求項 18 記載の発明は、

前記機械学習手法が k 近傍法、ナイーブベイズ分類器、決定木、ニューラルネットワーク、サポートベクターマシン、バギング法、ブースティング法、ランダムフォレスト法から選ばれるいずれかの手法によって行われることを特徴とする請求項 17 記載の細胞の状態を判別する方法

である。

【0040】

請求項 19 記載の発明は、

細胞状態の判別方法が、主成分分析、クラスター分析、自己組織化マップから選ばれるいずれかの手法によって行われることを特徴とする請求項 1 乃至 13 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法

である。

【0041】

請求項 20 記載の発明は、

判別する細胞の状態がヒト胚性幹細胞またはヒト人工多能性幹細胞の未分化および分化であり、その判別に使用するレクチンがイヌエンジュレクチン I、インゲンマメレクチン(L)、インゲンマメレクチン(E)、スピンドルツリーレクチンの中のいずれか一種、またはこれらの中のいずれかのレクチンにそれぞれ類似の糖結合特異性を持つ分子からなる群から 1 つまたは複数選択されたものであることを特徴とする請求項 1 乃至 19 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法

である。

【0042】

請求項 21 記載の発明は、

判別する細胞の状態がヒト間葉系幹細胞の未分化および骨分化であり、その判別に使用するレクチンがイヌエンジュレクチン I、ニワトコレクチン、ニホンニワトコレクチン、キカラスウリレクチン - I、デイゴマメレクチンの中のいずれか一種、またはこれらの中のいずれかのレクチンにそれぞれ類似の糖結合特異性を持つ分子からなる群から 1 つまたは複数選択されたものであることを特徴とする請求項 1 乃至 19 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法

である。

【発明の効果】

【0043】

本発明を用いることによって、細胞の状態を迅速、簡便かつ正確に判別することができる。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】本発明の方法に用いるレクチンマイクロアレイに固定されている複数種のレクチンの一例を表す図。

【図2】本発明の方法におけるクラスター分析結果の一例を表す図。

【図3】本発明の方法における主成分分析結果の一例を表す図。

【図4】本発明の方法により未分化細胞群と分化細胞群との判別結果が表された図。

【図5】本発明の方法により未分化細胞群と分化細胞群との判別結果が表された他の例の図。

【図6】本発明で使用したヒトES細胞とEBの未分化遺伝子マーカーの測定結果を表す図。

10

【図7】本発明の他の方法における主成分分析結果の一例を表す図。

【図8】本発明の他の方法により未分化間葉系幹細胞群と骨分化細胞群との判別結果が表された図。

【図9】本発明の更に他の方法におけるクラスター分析結果の一例を表す図。

【図10】本発明の更に他の方法における主成分分析結果の一例を表す図。

【図11】本発明の方法により未分化細胞群と分化細胞群との判別結果が表された更に他の例の図。

【図12】本発明の方法により分化傾向の異なる細胞群の判別結果が表された例の図。

【図13】本発明の方法により分化傾向の異なる細胞群の判別結果が表された他の例の図

20

【図14】本発明の方法により細胞の種類を判別を行ったクラスター分析結果の一例を表す図。

【図15】本発明で使用した細胞を遺伝子発現解析データにより判別を行った結果の一例を表す図。

【図16】本発明の方法により細胞の由来組織の判別を行ったクラスター分析結果の一例を表す図。

【図17】サンプルが細胞抽出物である場合の本発明の方法による判別結果（抗体マイクロアレイから得られたシグナル）を表す図。

【図18】サンプルが細胞抽出物である場合の本発明の方法による判別（クラスター分析）結果を表わす図。

30

【図19】サンプルが細胞抽出物である場合の本発明の方法による判別（主成分分析）結果を表わす図。

【図20】サンプルが細胞抽出物である場合の本発明による判別式の精度の検討結果を表す図。

【図21】サンプルがヒトES細胞の未分化および分化後の状態である場合の本発明の方法によるクラスター分析結果の一例を表す図。

【図22】サンプルがヒト間葉系幹細胞および胎児性癌細胞である場合の本発明の方法によるクラスター分析結果の一例を表す図。

【図23】サンプルがヒト間葉系幹細胞および胎児性癌細胞である場合で、本発明の方法により目的を特定して判別したときのクラスター分析結果の一例を表す図。

40

【図24】サンプルがヒト間葉系幹細胞および胎児性癌細胞である場合で、本発明の方法により目的を特定して判別したときのクラスター分析結果の他の一例を表す図。

【発明を実施するための形態】

【0045】

本発明による細胞の状態を判別する方法は、判別対象になっている細胞の持つ糖鎖又は当該糖鎖を含有している糖鎖含有サンプル（例えば、判別対象になっている細胞の持つ糖鎖を含有している糖鎖含有サンプルである細胞抽出物）を、液相中で複数種類のレクチンに結合させたまま測定することによって得た、前記複数種類のレクチンにそれぞれ結合した前記判別対象になっている細胞の量又は糖鎖含有サンプルの量を用いて細胞の状態を判別するものである。

50

【0046】

細胞は多種多様な糖鎖を持っていることから、糖鎖結合分子であるレクチンを一種類ではなく複数種類、同時に用いることにより、当該複数種類のレクチンのそれぞれに結合した判別対象になっている細胞の量を用いて、あるいは、当該複数種類のレクチンのそれぞれに結合した判別対象になっている細胞の持つ糖鎖を含有している糖鎖含有サンプル（例えば、判別対象になっている細胞からの細胞抽出物）の量を用いて細胞の状態を判別するものである。

【0047】

糖鎖や、糖鎖含有分子とレクチンの結合は抗原抗体反応等の生体分子間相互作用と比較して弱いことが知られており、そのため従来のELISAプレートを用いた蛍光測定などの手法では測定時に行われる洗浄工程及び/又は乾燥工程において糖鎖あるいは糖鎖含有分子とレクチンとの結合が解離してしまい、検出感度が低下すると共に再現性が低下し、測定精度が低下する。また、乾燥工程における非特異吸着等によるノイズシグナルの発生によっても測定精度は低下する。

10

【0048】

そこで、判別対象になっている細胞の持つ糖鎖又は当該糖鎖を含有している糖鎖含有サンプル（例えば、判別対象になっている細胞からの細胞抽出物）とレクチンとの結合測定には、糖鎖又は糖鎖含有サンプルとレクチンが反応した後、なるべく洗浄を行わず液相のまま測定を行うことが可能な手法が望ましい。

【0049】

洗浄を行わずに液相で測定可能な手法としては、例えば、共焦点蛍光測定法またはエバネッセント励起による蛍光測定法が挙げられる。

20

【0050】

従来の手法では結合した/しないといった定性的な情報しか得られなかったが、上記のような液相で測定可能な手法を用いることによって、統計解析に耐えうる定量的なデータを再現性よく得ることができるようになる。

【0051】

異なる状態の細胞が持つ糖鎖構造の違いは1種類であることは殆どなく複数であると考えることが妥当である。そのため、細胞の状態を判別するレクチンは1種類ではなく複数種類を同時に使用することによってその判別の精度が上がると考えられる。

30

【0052】

糖鎖の検出に用いるレクチンは、対象の細胞において違いの小さい、または対象の細胞に存在しない糖鎖を認識するレクチンは必要がないどころか、そのレクチンから得られるシグナルが細胞の判別を行う際にノイズとなることもあるため、測定または判別に用いるレクチンは必要に応じて選別されることが望ましい。

【0053】

細胞の判別に使用するレクチンの選別は、判別を行いたい細胞の持つ糖鎖と複数種類のレクチンとの結合測定を行い、その結果から違いの見られたレクチンを抽出するスクリーニングを行うことが望ましい。その測定方法は複数種類のレクチンを搭載したレクチンアレイを使用することが望ましく、それが判別対象になっている細胞の持つ糖鎖又は当該糖鎖を含有している糖鎖含有サンプルとレクチンとの結合測定であることから、液相のまま測定が可能な測定方法によることが望ましい。例えば、共焦点蛍光測定法や、エバネッセント励起法を用いた蛍光測定法を用いることができる。

40

【0054】

レクチンとは糖結合タンパク質として定義されるが、免疫反応の産物である抗糖鎖抗体はレクチンには含まれない。

【0055】

レクチンは植物、真菌類、動物、微生物など様々な生体から得られる。それぞれのレクチンは糖及び糖鎖に対する特異性を持っている。マンノース、ガラクトース、N-アセチルガラクトサミン、フコース、シアル酸などの単糖に対する親和性を持つレクチン、上記の

50

単糖を含むオリゴ糖に対して親和性を持つレクチンなどがある。いずれのレクチンも本発明において使用可能である。

【0056】

判別対象になっている細胞の持つ糖鎖を含有している糖鎖含有サンプル（例えば、細胞抽出物）をサンプルとする場合、細胞から抽出した糖鎖含有分子である糖鎖含有サンプルと複数レクチンとの結合測定には、ELISAプレート、磁気ビーズ、ラテックスビーズ等を用いたレクチンバイndingアッセイ、表面プラズモン共鳴法、レクチンアレイなどを使用できるが、好ましくは、レクチンアレイである。さらには、レクチンアレイは液相状態で測定が可能な測定方法によることが望ましい。例えば、共焦点蛍光測定法や、エバネッセント場励起法を用いて測定することができる。

10

【0057】

細胞をサンプルとする場合、細胞表面の糖鎖とレクチンとの結合測定にはフローサイトメトリー、液相状態で測定が可能なELISAプレート、磁気ビーズ、ラテックスビーズ等を用いたレクチンバイndingアッセイ、表面プラズモン共鳴法、液相状態で測定が可能なレクチンアレイを用いることができる。

【0058】

レクチンアレイとは、担体上に複数のレクチンを固定化し、反応させる糖鎖や、糖鎖含有サンプルとの結合測定を行うものである。担体はガラス、プラスチック、金属等が用いられる。例えば、判別対象になっている細胞や、細胞の持つ糖鎖を含む糖鎖含有サンプルは蛍光標識され、担体に固定されたレクチンと反応させることができる。このときレクチンに結合した蛍光標識された細胞の蛍光強度や、蛍光標識された糖鎖含有サンプルの蛍光強度が測定でき、その蛍光強度は蛍光標識された細胞の量や、蛍光標識された糖鎖含有サンプルの量に対応して増減する。

20

【0059】

測定された蛍光強度は数値化して扱うことができる。この数値は目的に応じて処理されることが望ましい。例えば、細胞の状態の判別を行うには、糖鎖含有サンプル（例えば、細胞抽出物）又は細胞とレクチンとの結合測定から得られた値は正規化されることが望ましい。さらにはその値に対してカットオフが行われることが望ましい。さらには統計解析処理時にノイズとなりうるシグナルの無いまたは非常に小さいレクチンを解析前に削除することも含まれる。さらにはその値はそれぞれのレクチンの特異性に対応した糖鎖を持つ糖タンパク質などの標準物質により測定された値により補正されることが望ましい。

30

【0060】

細胞の状態を判別する際に用いるレクチンは、その細胞の持つ糖鎖と複数のレクチンとの結合測定を行った結果を用いて、判別に必要なレクチンを抽出することもできる。例えば、判別を行いたい複数の状態の細胞をサンプルとして、細胞抽出物または細胞と複数種類のレクチンとの結合測定を行った結果から、それらの状態の細胞において特徴的な違いを示すレクチンを抽出することができる。レクチンを抽出する手法はt検定などの有意差検定、主成分分析などの統計的手法を用いることができる。

【0061】

細胞の状態の判別においては、レクチンとの結合測定だけでなく他の手法を組み合わせることも可能である。例えば、遺伝子発現解析（DNAアレイまたはPCR）、エピジェネティクス解析（DNAメチル化解析、ヒストン化学修飾解析）、判別対象となる状態の細胞の特異的マーカー抗体との結合測定（免疫染色、フローサイトメトリー、ELISA、抗体アレイ）の結果と組み合わせ、細胞の状態を判別することが可能である。

40

【0062】

前述した本発明の方法によって判別される細胞の状態は、細胞の未分化の状態及び、細胞の分化後の状態を含むものである。ここで、細胞の未分化の状態には幹細胞及び前駆細胞を含む。幹細胞は未分化で自己複製能及び多分化能を持つ細胞のことを指し、造血幹細胞・間葉系幹細胞といった体性幹細胞や、胚性幹細胞(ES細胞)、核移植ES細胞(ntES細胞)、人工多能性幹細胞(iPS細胞)などを含む。

50

【0063】

前記において、分化とは幹細胞及び前駆細胞等の未分化の細胞が分化能または多分化能を喪失し、細胞型に特異的な特性を獲得することである。分化においては細胞の状態が変化している。

【0064】

さらに細胞の状態とは、細胞が未分化であること、多能性を持っていること、分化したこと、未分化の細胞が持つ分化の傾向、分化に対する抵抗性、細胞ががん化したこと、細胞のがん化の傾向、細胞の由来種、細胞の由来組織、細胞のウィルス感染、遺伝子操作による細胞の変化を含む。

【0065】

細胞の持つ糖鎖を測定するには、細胞から糖鎖含有分子を抽出することも可能である。その場合、細胞から糖鎖含有分子を抽出する工程を含み、その糖鎖含有分子には糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、プロテオグリカンが含まれる。または細胞そのものを測定することも可能である。細胞から抽出される糖鎖含有分子は細胞表面に存在する糖鎖含有分子、すなわち細胞膜から抽出される糖鎖含有分子であることが好ましく、特に細胞膜から抽出される糖タンパク質であることが好ましい。

【0066】

本発明における判別方法を得る手段は統計解析手法または機械学習によるものが好ましい。特に教師データを用いた判別分析によるものが好ましい。例えば2群の細胞の状態の判別を行う場合、線形判別分析で十分である場合も多い。しかし線形判別分析は各グループの母分散が等しいとの仮定に基づくことからその適用に制約があることなどから、より複雑なデータを用いて判別を行う場合または多群のクラス分類を精度良く行う必要がある場合は、用いるデータに適した手法が必要になる。その手法として、非線形判別分析や機械学習による判別分析を用いることができる。非線形判別分析としてはマハラノビス距離による判別分析が挙げられる。機械学習による判別分析としてはk近傍法、ナイーブベイズ分類器、決定木、ニューラルネットワーク、サポートベクターマシン、さらにバギング法、ブースティング法、ランダムフォレスト法といった集団学習が挙げられる。このような手法はパターン認識の分野において発展しており、その知見を本発明においても応用することができる。

【0067】

また教師データを用いない解析手法である、主成分分析、階層クラスタリング、非階層クラスタリング、自己組織化マップといった手法を用いても、既知の状態の細胞データと共に解析を行うことによって判別方法とすることもできる。

【0068】

細胞の判別を行うにあたって必要なレクチンはそれぞれの細胞の状態によって異なる。それゆえある特定の細胞の状態であるか否かを判別するためのレクチンセット及び判別方法を提供することができる。さらには判別キットを提供することができる。

【0069】

複数の細胞の状態を判別するのに必要なレクチンを含むレクチンセットを作成することもできる。これにより複数の細胞の状態または状態の変化を判別するためのレクチンセット及び判別方法を提供することができる。さらには判別キットを提供することができる。

【0070】

上記レクチンセットの抽出には、判別したい状態の細胞または細胞抽出物を複数のレクチンにより測定した結果から、有意差検定、主成分分析、等の統計的手法によりその状態間で差の見られるレクチンを抽出する手段を用いることができる

本発明によれば上記の判別方法により判別された細胞を提供することができる。

【0071】

また、その判別された細胞を用いることによって未分化性を維持する方法及びそれに使用する化合物、分化誘導を行う方法およびそれに使用する化合物のスクリーニング法を提供することができる。

10

20

30

40

50

【実施例 1】

【0072】

(サンプルがヒトES細胞の未分化及び分化後の状態である場合の判別方法)

サンプルが細胞抽出物である場合の本発明のヒト未分化細胞判別方法の一例を説明する。

【0073】

タンパク質の抽出

$1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 個のヒト胚性幹(hES)細胞およびhES細胞から分化させた胚葉体(EB)を凍結保存した細胞ペレットから、CellLytic MEM protein extraction kit (Sigma社製)を用いて、膜タンパク質を含む疎水性画分を分離抽出した。抽出液を20-60倍希釈してMicro BCA protein assay kit (PIERCE社製)を用いてタンパク質濃度を測定した。

10

【0074】

膜タンパク質のラベル化

疎水性画分に含まれるタンパク質0.2 μg について、Cy3-NHS (GEヘルスケア社製)を反応させ、蛍光標識を行った。反応後、Sephadex G-25カラムを用いて反応液から未反応の蛍光標識試薬を除いた。

【0075】

蛍光ラベル化タンパク質とレクチンマイクロアレイとの反応

蛍光ラベル化タンパク質を最終濃度0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ または0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう、1%Triton X-100, 0.5M Glycine, 1mM CaCl_2 , 1mM MnCl_2 を含む TBS で調製し、レクチンマイクロアレイ上に載せ、4 時間で一晩反応させた。これによりサンプル中の蛍光標識糖タンパク質は、それぞれの持つ糖とレクチンの特異性に依りて結合する。

20

【0076】

用いたレクチンマイクロアレイ (LecChip, GPバイオサイエンス社製)には45種類のレクチンがそれぞれ3スポットずつ固定化されている。使用した45種類のレクチンは図1に示されている。

【0077】

レクチンマイクロアレイの測定

反応液を取り除き、1%Triton X-100 含有TBSによる洗浄を行った後、エバネッセント場励起型スキャナー (GlycoStation Reader, GPバイオサイエンス社製) でレクチンマイクロアレイの蛍光測定を行った。測定時の露光時間を199msecとして、カメラゲインは70, 80, 90, 100, 110の各段階で測定した。

30

【0078】

データ前処理

各レクチンに対する蛍光強度を数値化し、得られた各レクチンの3スポットの数値データを平均したものをレクチンの示した蛍光強度とした。

【0079】

タンパク質が多く結合しているレクチンは蛍光強度が強くなることからこれを利用して糖含有分子と、複数種類のレクチンとの結合を測定し、それぞれのレクチンに結合した糖含有分子の量を把握するようにしたものである。

40

【0080】

この実施例では、蛍光強度を次の手法で補正し、補正したデータを用いた。すなわち、久野、板倉ら (J. Proteomics Bioinform. Vol.1 68-72 (2008)) の手法に従い、蛍光強度は適切な2つのゲインで測定したデータを統合し、高い方のゲインで測定したときに飽和しているシグナルを補正したデータを用いた。

【0081】

サンプル毎の各レクチンのシグナル値は、バックグラウンドの値を引いた後、全レクチンのうちで最大シグナル強度を示したUDAのシグナルを基準値(100)と定めた相対値を求め、以下の統計処理を行った。

【0082】

50

細胞の未分化性を判別する判別式の作成

1) 説明変数の抽出

上記相対値を常用対数に変換した値を用いて、クラスター分析法及び主成分分析法によりレクチンのシグナルパターンを解析し、未分化細胞群(hES)と分化細胞群(EB)に分かれることを確認した(図2、図3)。

【0083】

次に、t検定を用いて2群間でシグナルに有意差(p<0.01)のみられるレクチンを抽出した結果、MAL, PHA(E), EELの3レクチンを得た。

【0084】

2) 判別式の作成

線形判別分析法を用いて、1)で抽出したレクチンを説明変数とする以下の判別式(1)を求めた。MAL, PHA(E), EELはそれぞれのレクチンの上記相対値を示す。

【0085】

スコアが正の場合は分化細胞、負の場合は未分化細胞と判定される。

【0086】

$$F = 2.64 \times \text{MAL} - 0.018 \times \text{PHA(E)} - 1.26 \times \text{EEL} - 1.17 \dots \dots \dots (1)$$

【0087】

3) 判別式の検証1

上記2)で作成した判別式を、hES細胞、EB、ヒト肺組織由来線維芽細胞(MRC5)及びMRC5由来のiPS細胞をサンプルとして上記と同様に得たレクチンマイクロアレイデータに適用し、細胞の未分化及び分化の判別を行った(図4)。

【0088】

この結果より、hES細胞及びiPS細胞のスコアはマイナスの値を示し、EB及びMRC5のスコアはプラスの値を示したことから、この式が未分化の多能性幹細胞の判別に有効であることが確認された。

【0089】

4) 判別式の検証2

上記2)で作成した判別式を、3)とは別に測定したヒト羊膜由来間葉系細胞、及び羊膜由来間葉系細胞由来のiPS細胞をサンプルとして上記と同様に得たレクチンマイクロアレイデータに適用し、未分化及び分化の判別を行った(図5)。

【0090】

この結果より、iPS細胞のスコアはマイナスの値を示し、羊膜由来間葉系細胞のスコアはプラスの値を示したことから、この式が未分化の多能性幹細胞の判別に有効であることが確認された。

【0091】

k近傍法による判別

上記で抽出した3レクチンのデータを用いて、上記hES細胞及びEBを学習データ、上記MRC5及びMRC5由来iPS細胞をテストデータとして、k近傍法(k=3)により判別を行った。その結果、iPS細胞の21データは全てhES細胞のクラスに、MRC5の3データは全てEBのクラスに分類された。以上より、この手法が未分化の多能性幹細胞の判別に有効であることが確認された。

【0092】

細胞の遺伝子発現解析

上記ES細胞及びEB(各3株)から抽出したRNAよりcDNAを合成し、hES細胞の未分化マーカー遺伝子の発現を定量real-time PCR (qRT-PCR)にて測定した。得られた結果についてhES細胞の発現量を1とした相対量として示した(図6)。この結果により、本実施例に用いたEBにおいてはhES細胞が示した未分化性マーカーが大幅に低下していることが確認された。

【実施例2】

【0093】

10

20

30

40

50

(サンプルがヒト間葉系幹細胞の骨芽細胞分化である場合の判別方法)

サンプルが細胞抽出物である場合の本発明のヒト未分化細胞判別方法の一例を説明する。

【0094】

タンパク質の抽出

$1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 個のヒト間葉系幹細胞と、同細胞を2週間骨芽細胞分化誘導(LONZA, 骨芽細胞分化培地で3日ごと培地交換)した細胞の細胞ペレットから、CellLytic MEM protein extraction kitを用いて、膜タンパク質を含む疎水性画分を分離抽出した。抽出液を20-60倍希釈してMicro BCA protein assay kitを用いてタンパク質濃度を測定した。

【0095】

膜タンパク質のラベル化

疎水性画分に含まれるタンパク質0.2 μg について、Cy3-NHSを反応させ、蛍光標識を行った。反応後、Sephadex G-25カラムを用いて反応液から未反応の蛍光標識試薬を除いた。

【0096】

蛍光ラベル化タンパク質とレクチンマイクロアレイとの反応

蛍光ラベル化タンパク質を最終濃度0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう、1%Triton X-100, 0.5M Glycine, 1mM CaCl_2 , 1mM MnCl_2 を含むTBSで調製し、実施例1で使用したのと同じレクチンマイクロアレイ(LecChip)上に載せ、4℃で一晩反応させた。これによりサンプル中の蛍光標識糖タンパク質は、それぞれの持つ糖とレクチンの特異性に応じて結合する。

【0097】

レクチンマイクロアレイの測定

反応液を取り除き、1%Triton X-100含有TBSによる洗浄を行った後、エバネッセント場励起型スキャナー(GlycoStation Reader)でレクチンマイクロアレイの蛍光測定を行った。測定時の露光時間を199msecとして、カメラゲインは70, 80, 90, 100, 110の各段階で測定した。

【0098】

データ前処理

各レクチンに対する蛍光強度を数値化し、得られた各レクチンの3スポットの数値データを平均したものをレクチンの示した蛍光強度とした。

【0099】

蛍光強度は実施例1と同様の手法により補正したデータを用いた。

【0100】

サンプル毎の各レクチンのシグナル値は、バックグラウンドの値を引いた後、全レクチンのうちで最大シグナル強度を示したUDAのシグナルを基準値(100)と定めた相対値を求め、以下の統計処理を行った。

【0101】

細胞の未分化性を判別する判別式の作成

1) 説明変数の抽出

上記相対値を常用対数に変換した値を用いて、主成分分析法によりレクチンのシグナルパターンを解析し、未分化間葉系幹細胞群と骨分化細胞群に分かれることを確認した(図7)。

【0102】

次に、t検定を用いて2群間でシグナルに有意差($p < 0.01$)のみられるレクチンを抽出した結果、MAL, SNA, SSA, TJA-I, ECAの5レクチンを得た。

【0103】

2) 判別式の作成

線形判別分析法を用いて、1)で抽出したレクチンを説明変数とする以下の判別式(2)を求めた。MAL, SNA, SSA, TJA-I, ECAはそれぞれのレクチンの上記相対値を示す。

【0104】

10

20

30

40

50

スコアが正の場合は分化細胞、負の場合は未分化細胞と判定される。

【 0 1 0 5 】

$$F = -10.81 \times \text{MAL} + 5.87 \times \text{SNA} - 3.19 \times \text{SSA} - 1.49 \times \text{TJA-I} + 16.20 \times \text{ECA} + 5.97 \dots \dots \dots (2)$$

【 0 1 0 6 】

3) 判別式の検証

上記2)で作成した判別式を、上記測定方法と同様に得た間葉系幹細胞及び骨分化細胞のレクチンマイクロアレイデータに適用し、細胞の未分化性及び分化性の判別を行った(図8)。

【 0 1 0 7 】

この結果より、間葉系幹細胞群はプラスの値を示したことから、この判別式が未分化細胞と分化細胞の判別に有効であることが確認された。

【実施例3】

【 0 1 0 8 】

(サンプルがヒトES細胞である場合の未分化性判別方法)

サンプルが細胞抽出物である場合の本発明のヒト未分化細胞判別方法の一例を説明する。

【 0 1 0 9 】

タンパク質の抽出

hES細胞及びEBを凍結保存した細胞ペレット(1×10⁶~5×10⁶個)から、CellLytic MEM protein extraction kitを用いて、膜タンパク質を含む疎水性画分を分離抽出した。抽出液を20-60倍希釈してMicro BCA protein assay kitを用いてタンパク質濃度を測定した。

【 0 1 1 0 】

膜タンパク質のラベル化

疎水性画分に含まれるタンパク質0.2 μgに対してCy3-NHSを反応させ、蛍光標識を行った。反応後、Sephadex G-25カラムを用いて反応液から未反応の蛍光標識試薬を除いた。

【 0 1 1 1 】

蛍光ラベル化タンパク質とレクチンマイクロアレイとの反応

蛍光ラベル化タンパク質を最終濃度0.5 μg/mlになるよう、1%Triton X-100, 0.5M Glycine, 1mM CaCl₂, 1mM MnCl₂を含むTBSで調製し、実施例1で使用したのと同じレクチンマイクロアレイ(LecChip)上に載せ、20℃で一晩反応させた。これによりサンプル中の蛍光標識糖タンパク質は、それぞれの持つ糖とレクチンの特異性に依りて結合する。

【 0 1 1 2 】

レクチンマイクロアレイの測定

反応液を取り除き、1%Triton X-100含有TBSによる洗浄を行った後、エバネッセント場励起型スキャナー(GlycoStation Reader)でレクチンマイクロアレイの蛍光測定を行った。測定時の露光時間を199msecとして、カメラゲインは80, 90, 100, 110の各段階で測定した。

【 0 1 1 3 】

データ前処理

各レクチンに対する蛍光強度を数値化し、得られた各レクチンの3スポットの数値データを平均したものをレクチンの示した蛍光強度とした。蛍光強度は実施例1と同様の手法により補正したデータを用いた。

【 0 1 1 4 】

サンプル毎の各レクチンのシグナル値は、バックグラウンドの値を引いた後、全レクチンのうちで最大シグナル強度を示したレクチンのシグナルを基準値(100)と定めた相対値を以下の統計学的処理のために用いた。全てのサンプルにおいて5未満の上記相対値を示したレクチンは以下の解析には使用しないこととした。

【 0 1 1 5 】

非線形判別分析による細胞の判別

10

20

30

40

50

上記相対値を常用対数に変換した値を用いて、クラスター分析法及び主成分分析法によりレクチンのシグナルパターンを解析し、それぞれの細胞群に分かれることを確認した(図9、図10)。

【0116】

上記データから判別に用いるレクチンの例としてUEA-I, MAL, PHA(E), BPL, WFAの5レクチンを抽出し、上記hES細胞とEBのデータを学習データとして、上記とは別途、同様の方法による測定を行い得られたhES細胞とEBのレクチンアレイデータを用い、マハラノビス距離法による未分化細胞の判別分析を行った(図11)。ここでD1はサンプル細胞とhES細胞群の中心との距離、D2はサンプル細胞とEB群の中心との距離を表わし、それぞれの細胞はこの距離が小さい方の細胞として判別される。

10

【0117】

この結果、hES細胞5データは全てhES細胞として、EBは全てEBとして判別され、この手法が未分化細胞の判別に有効であることが示された。

【実施例4】

【0118】

(サンプルがヒトES細胞である場合の分化傾向判別方法)

サンプルが細胞抽出物である場合の本発明のヒトES細胞分化傾向の判別方法の一例を説明する。

【0119】

タンパク質の抽出

20

分化傾向が調べられたヒトES細胞株3株(HUES 3, HUES 8, HUES 9)を凍結保存した細胞ペレット($1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 個)から、CellLytic MEM protein extraction kitを用いて、膜タンパク質を含む疎水性画分を分離抽出した。抽出液を20-60倍希釈してMicro BCA protein assay kitを用いてタンパク質濃度を測定した。

【0120】

細胞株の分化傾向

それぞれの細胞株の分化傾向は以下の通りである(K. Osafune et al., Nature Biotechnology 2008, 26, 313-315)。HUES 3: 外胚葉、心臓への分化傾向を持つ。HUES 8: 中胚葉、内胚葉、皮膚、脂肪、血液、内皮、膵臓、肝臓、腸への分化傾向を持つ。HUES 9: 外胚葉、神経への分化傾向を持つ。

30

【0121】

膜タンパク質のラベル化、蛍光ラベル化タンパク質とレクチンマイクロアレイとの反応、レクチンマイクロアレイの測定、データ前処理については実施例3と同様の操作により行った。

【0122】

細胞の判別

上記により得られた相対値を常用対数に変換した値を用いて、クラスター分析及び主成分分析法によりレクチンのシグナルパターンを解析したところ、それぞれの細胞株に分かれることが確認された(図12、図13)。

【実施例5】

40

【0123】

(サンプルがヒト間葉系幹細胞およびヒト胎児性癌細胞である場合の判別方法)

サンプルが細胞である場合の本発明のヒト間葉系幹細胞およびヒト胎児性癌細胞の判別方法の一例を説明する。

【0124】

細胞の回収

ヒト骨髄由来間葉系幹細胞2株(UEET12、UET13)およびヒト胎児性癌細胞1株(NCR G3)の培養細胞を5mM EDTA/ 2mM EGTAを含むPBSにより剥離させ回収した。細胞を4%ホルムアルデヒドを含むPBSを用いて30分間室温で固定化し、PBSにより2回洗浄を行った。

【0125】

50

レクチンによる細胞染色

固定化した細胞を1 µg/mLのビオチン化レクチンと60分間反応させた。細胞はPBSにより2回洗浄し、Alexa488標識ストレプトアビジンと60分間反応させた。さらに細胞をPBSにより2回洗浄し、セルストレーナーにより凝集した細胞を除いた。レクチンはWGA、SSA、SNA、MAH、PNA、BPL、ABA、ACA、PWM、MAL、AAL、LEL、DSA、ConA、PHA(E)、Jacalin、HPA、DBA、SBA、PHA(L)、PSAの21種類を使用した。

【0126】

フローサイトメトリー測定

Beckman FC500フローサイトメーターによりフローサイトメトリー測定を行った。レクチン染色を行った細胞で検出された蛍光シグナルの平均値から、染色していない細胞で検出されたシグナルを引いた値を測定値とした。21種類のレクチンのシグナルのうち、最も高い値を示したレクチンのシグナルを1.0として、そのほかのレクチンのシグナルをそれに対する相対値として規格化を行った。

10

【0127】

細胞の判別

上記により得られた測定値を常用対数に変換した値を用いて、21種類のレクチンのうち、MAL、PHA(L)の2種類の値を用いてクラスター分析により解析したところ、胎児性癌細胞株と間葉系幹細胞株2種が分かれるという結果が得られた(図14)。

【0128】

以上より、この手法が細胞の種類の判別に有効であることが確認された。

20

【実施例6】

【0129】

(サンプルが由来組織の異なるヒト間葉系細胞である場合の判別方法)

サンプルが細胞抽出物である場合の本発明の由来組織の異なるヒト間葉系幹細胞の判別方法の一例を示す。

【0130】

細胞の種類

それぞれ由来組織が臍帯血由来(UCB302)、骨髄由来(UET13、UBET7、3F0664)および子宮内膜由来(EPC100)であるヒト間葉系幹細胞株5株をサンプルとした。

【0131】

遺伝子発現解析による細胞の判別

各細胞株の遺伝子発現解析データは、NCBIのGEOデータベース(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>)に登録されているデータを使用した。各細胞株のIDは3F0664:GSM201145、UET13:GSM210397、UBET7:GSM210386、UCB302:GSM210404、EPC100:GSM210413である。

30

【0132】

上記遺伝子発現データを用いてクラスター分析により解析したところ、細胞の由来組織とは異なるグループ分けがなされるという結果となった(図15)。

【0133】

タンパク質の抽出

上記各細胞を凍結保存した細胞ペレットから、CellLytic MEM protein extraction kitを用いて、膜タンパク質を含む疎水性画分を分離抽出した。抽出液を20-60倍希釈してMicro BCA protein assay kitを用いてタンパク質濃度を測定した。

40

【0134】

膜タンパク質のラベル化

疎水性画分に含まれるタンパク質0.2 µgについて、Cy3-NHSを反応させ、蛍光標識を行った。反応後、Sephadex G-25カラムを用いて反応液から未反応の蛍光標識試薬を除いた。

【0135】

蛍光ラベル化タンパク質とレクチンマイクロアレイとの反応

蛍光ラベル化タンパク質を最終濃度0.25 µg/mlになるよう、1%Triton X-100, 0.5M Gly

50

cine, 1mM CaCl₂, 1mM MnCl₂ を含む TBS で調製し、実施例 1 で使用したものと同一レクチンマイクロアレイ (LecChip) 上に載せ、4 で一晚反応させた。これによりサンプル中の蛍光標識糖タンパク質は、それぞれの持つ糖とレクチンの特異性に依りて結合する。

【0136】

レクチンマイクロアレイの測定

反応液を取り除き、1%Triton X-100 含有TBSによる洗浄を行った後、エバネッセント場励起型スキャナー (GlycoStation Reader) でレクチンマイクロアレイの蛍光測定を行った。測定時の露光時間を199msecとして、カメラゲインは70, 80, 90, 100, 110の各段階で測定した。

【0137】

データ前処理

各レクチンに対する蛍光強度を数値化し、得られた各レクチンの3スポットの数値データを平均したものをレクチンの示した蛍光強度とした。

【0138】

蛍光強度は実施例 1 と同様の手法により補正したデータを用いた。

【0139】

サンプル毎の各レクチンのシグナル値は、バックグラウンドの値を引いた後、全レクチンのうちで最大シグナル強度を示したUDAのシグナルを基準値(100)と定めた相対値を求めた。

【0140】

細胞の判別

上記により得られた相対値を常用対数に変換した値を用いて、クラスター分析によりシグナルを解析したところ、細胞の由来組織を反映したグループ分けがなされることが確認された(図16)。

【0141】

遺伝子解析結果によるクラスター解析では必ずしも同一組織由来の細胞株が同じグループに判別されなかったが、レクチンマイクロアレイによるクラスター解析では同一組織由来の細胞株が1つのグループに判別された。以上より、レクチンマイクロアレイが細胞の状態の判別に有効であることが確認された。ただしこれは対象となる細胞によって異なるであろうから、2つの手法を同時に実施することがより望ましい。

【実施例7】

【0142】

(サンプルがヒトiPS細胞の未分化および分化後の状態である場合の判別方法)

サンプルが細胞抽出物であり、判別する状態がヒト未分化細胞の未分化性及び細胞の分化度である場合の本発明の判別方法の一例を説明する。

【0143】

タンパク質の抽出

ヒトiPS細胞およびiPS細胞から分化させた胚様体(EB)2種(分化誘導後4日後および16日後)を凍結保存した細胞ペレットから、CellLytic MEM protein extraction kit を用いて、親水性画分を分離抽出した。抽出液を20-60倍希釈してMicro BCA protein assay kit を用いてタンパク質濃度を測定した。

【0144】

タンパク質のラベル化

親水性画分に含まれるタンパク質1μgに対して、Cy3-NHS (GEヘルスケア社製)を反応させ、蛍光標識を行った。反応後、Sephadex G-25カラムを用いて反応液から未反応の蛍光標識試薬を除いた。

【0145】

蛍光ラベル化タンパク質とレクチン・抗体マイクロアレイとの反応

蛍光ラベル化タンパク質を最終濃度0.5μg/mlまたは0.25μg/mlになるよう、1%Triton X-100, 0.5M Glycine, 1mM CaCl₂, 1mM MnCl₂ を含む TBS で調製し、レクチン・抗体

10

20

30

40

50

マイクロアレイ上に載せ、4 で一晩反応させた。これによりサンプル中の蛍光標識糖タンパク質は、それぞれの持つ糖とレクチンの特異性に応じて結合し、サンプル中のマーカー物質はそれぞれの抗体の特異性に応じて結合する。

【0146】

ここで用いたレクチン・抗体マイクロアレイは、図1に示された45種類のレクチンおよびヒトES細胞およびヒトiPS細胞の未分化マーカーであるTRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-3, SSEA-4, Sox2 Oct3/4, Nanogの抗体がそれぞれ2スポットずつ固定化されたものを使用した。

【0147】

レクチンマイクロアレイ・抗体マイクロアレイの測定

反応液を取り除き、1%Triton X-100 含有TBSによる洗浄を行った後、エバネッセント場励起型スキャナー（GlycoStation Reader, GPバイオサイエンス社製）でレクチンマイクロアレイの蛍光測定を行った。測定時の露光時間を199msecとして、カメラゲインは70, 80, 90, 100, 110の各段階で測定した。

【0148】

レクチン・抗体マイクロアレイのデータ前処理

各レクチン及び抗体に対する蛍光強度を数値化し、得られた各レクチンの2スポットの数値データを平均したものをレクチン及び抗体の示した蛍光強度とした。蛍光強度は実施例1と同様の手法により補正したデータを用いた。

【0149】

レクチンマイクロアレイから得られたシグナルの前処理

サンプルごとの各レクチンのシグナル値は、バックグラウンドの値を引いた後、全レクチンのうちで最大シグナル強度を示したレクチンのシグナルを基準値（100）と定めた相対値を以下の統計学的処理のために用いた。すべてのサンプルにおいて、1未満の上記相対値を示したレクチンのシグナルを全て1とした。

【0150】

抗体マイクロアレイから得られたシグナル

各サンプルに対して得られたシグナルは、iPS細胞のシグナルを1とした相対値として示した（図17）。この結果、本実施例に用いたEBにおいて、未分化マーカーが低下していることが確認され、細胞が未分化性を失っていることが確認できた。また分化誘導後4日後の細胞と16日後の細胞とではほとんど違いは見られなかった。

【0151】

レクチンによる細胞の判別

上記により得られた相対値を常用対数に変換した値を用いて、クラスター分析及び主成分分析法によりレクチンのシグナルパターンを解析したところ、iPS細胞とEBに判別されることが確認された（図18、図19）。また図19において、iPS細胞とEBの判別を行うことができる主成分1(PC1)によって、分化誘導後4日後のEBと16日後のEBも判別できることが示された。すなわちレクチンマイクロアレイ解析では、分化誘導後の状態をも判別できることが確認された。

【0152】

以上より、レクチン・抗体マイクロアレイにより得られるデータが細胞の状態の判別に有効であり、未分化性の判別についてはレクチンマイクロアレイと抗体マイクロアレイの結果を組み合わせることにより明確に判別が可能であること、さらにはレクチンマイクロアレイによる解析がより詳細な状態の判別に有効であることが確認された。

【実施例8】

【0153】

（サンプルがヒトES細胞の未分化および分化後の状態である場合の判別方法）

サンプルが細胞抽出物である場合の本発明のヒト未分化細胞判別方法の他の一例を説明する。

【0154】

10

20

30

40

50

実施例 1で行ったものと同様にしてタンパク質の抽出、膜タンパク質のラベル化、蛍光ラベル化タンパク質とレクチンマイクロアレイとの反応、レクチンマイクロアレイの測定を行った。また、実施例 1と同様にしてデータ前処理を行い、サンプル毎の各レクチンのシグナル値について相対値を求めた。

【0155】

そして、実施例 1と同様にして、前記相対値を常用対数に変換した値を用いて、クラスター分析法及び主成分分析法によりレクチンのシグナルパターンを解析し、未分化細胞群(hES)と分化細胞群(EB)に分かれることを確認した後、t検定を用いて2群間でシグナルに有意差($p < 0.01$)のみられるレクチンを抽出した結果、4つのレクチンMAL、PHA(L)、EEL、PHA(E)を抽出した。

10

【0156】

次いで、この抽出したレクチンの組み合わせと判別精度を検討した。前記に記載した判別式を用いて、別途にヒト肺組織由来線維芽細胞(MRC5)由来のiPS細胞をレクチンマイクロアレイにより測定したデータの、判別式による判別の正否を数値化した。その結果は図20の通りであった。

【0157】

このようにして最適な組み合わせとして、PHA(L)、EELを選択した。選択したPHA(L)、EELでのクラスタリング結果は図21の通りであった。

【0158】

以上より、判別対象となる状態を特定してレクチンを選別することにより、判別精度が向上することが確認された。

20

【実施例9】

【0159】

(サンプルがヒト間葉系幹細胞およびヒト胎児性癌細胞である場合の判別方法)

サンプルが細胞抽出物であり、判別する状態が細胞の種類および細胞の由来組織である判別方法の一例を説明する。

【0160】

タンパク質の抽出

$1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 個のヒト間葉系幹細胞(余剰指由来細胞(Yub)、余剰指骨髄由来細胞(Yub_BMC)、臍帯血由来細胞(UCB)、胎盤由来細胞(PL)、羊膜由来細胞(AM)、骨髄由来細胞(2F、3F、UET、UEET、UBET)、子宮内膜由来細胞(UtE、EPC)、月経血由来細胞(Edom))と、ヒト胎児性癌細胞(NCRG3)の細胞ペレットから、CellLytic MEM protein extraction kitを用いて、膜タンパク質を含む疎水性画分を分離抽出した。抽出液を20-60倍希釈してMicro BCA protein assay kitを用いてタンパク質濃度を測定した。

30

【0161】

膜タンパク質のラベル化

疎水性画分に含まれるタンパク質0.2 μg について、Cy3-NHSを反応させ、蛍光標識を行った。反応後、Sephadex G-25カラムを用いて反応液から未反応の蛍光標識試薬を除いた。

【0162】

蛍光ラベル化タンパク質とレクチンマイクロアレイとの反応

蛍光ラベル化タンパク質を最終濃度0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう、1%Triton X-100, 0.5M Glycine, 1mM CaCl_2 , 1mM MnCl_2 を含むTBSで調製し、実施例1で使用したのと同じレクチンマイクロアレイ(LecChip)上に載せ、4℃で一晩反応させた。これによりサンプル中の蛍光標識糖タンパク質は、それぞれの持つ糖とレクチンの特異性に応じて結合する。

40

【0163】

レクチンマイクロアレイの測定

反応液を取り除き、1%Triton X-100含有TBSによる洗浄を行った後、エバネッセント場励起型スキャナー(GlycoStation Reader)でレクチンマイクロアレイの蛍光測定を行った。測定時の露光時間を199msecとして、カメラゲインは70, 80, 90, 100, 110の各段

50

階で測定した。

【0164】

データ前処理

各レクチンに対する蛍光強度を数値化し、得られた各レクチンの3スポットの数値データを平均したものをレクチンの示した蛍光強度とした。

【0165】

蛍光強度は実施例1と同様の手法により補正したデータを用いた。

【0166】

サンプル毎の各レクチンのシグナル値は、バックグラウンドの値を引いた後、全レクチンのうちで最大シグナル強度を示したUDAのシグナルを基準値(100)と定めた相対値を求め、以下の統計処理を行った。

10

【0167】

前記相対値を常用対数に変換した値を用いて、クラスター分析法によりレクチンのシグナルパターンを解析したところ、図21のように、間葉系幹細胞と胎児性癌細胞の判別、および細胞の由来を判別することができた。すなわち、クラスター分析法により図1に示されている45種類のレクチンのシグナルパターンを解析したところ、図22のように、間葉系幹細胞と胎児性癌細胞を判別することができた。

【0168】

目的に応じたレクチンの選別

Yub判別用に4レクチン(GSL I B4, PTL-I, GSL I A4, PNA)を選別した。

20

【0169】

階層クラスタリング分析により判別を行った結果、Yub由来間葉系幹細胞とその他の細胞が明確に判別されることが確認された(図23)。

【0170】

次に、胎児性癌細胞の判別用に2レクチン(MAL, PHA(L))を選別した。

【0171】

階層クラスタリング分析により判別を行った結果、胎児性癌細胞と間葉系幹細胞が明確に判別されることが確認された(図24)。

【0172】

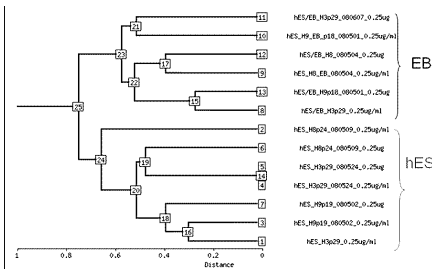
以上、本発明の実施形態、好ましい実施例を説明したが、本発明はこれらに限定されるものではなく、特許請求の範囲の記載から把握される技術的範囲において種々の形態に変更可能である。

30

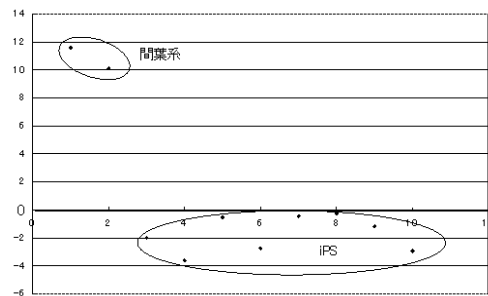
【 図 1 】

レクチン名	略称	レクチン名	略称
ロータスレクチン	LTL	キカラスウリレクチン-II	TJA-II
エンドウマレクチン	PSA	スピンドルツリーレクチン	EEL
レンズマレクチン	LCA	マッシュルームレクチン	ABA
ハリエンダレクチン-I	UEA-I	トマトレクチン	LEL
コウジカビレクチン	AOL	ジャガイモレクチン	STL
ヒロチャワンタケレクチン	AAL	セイヨウイラクサレクチン	UDA
イヌエンジュレクチン I	MAL	アメリカヤマゴボウレクチン	PWM
ニフトコレクチン	SNA	ジャックフルーツレクチン	Jacalin
ニホンニフトコレクチン	SSA	ピーナッツレクチン	PNA
キカラスウリレクチン-I	TJA-I	フジレクチン	WFA
インゲンマレクチン(L)	PHA(L)	ゼンニンコレクチン	ACA
ダイゴマレクチン	ECA	アメリカハリガワレクチン	MPL
ヒママレクチン	RCA120	エスカルゴレクチン	HPA
インゲンマレクチン(E)	PHA(E)	カラス/エンドウレクチン	VVA
チョウセンササガオレクチン	DSA	ドリコスマレクチン	DBA
バンデリアマレクチン II	GSL-II	ダイズレクチン	SBA
ラッパイズンレクチン	NPA	ヒロハセルガオレクチン	Calsea
ナタマレクチン	ConA	シカクマレクチン I	PTL-I
ユキノハナレクチン	GNA	イヌエンジュレクチン II	MAH
アマリスレクチン	HHL	コムギレクチン	WGA
ヤナギマツタケレクチン	ACG	バンデリアマレクチン I A4	GSL-1A4
チューリップレクチン	TaLCl	バンデリアマレクチン I B4	GSL-1B4
ムラサキモクワヅレクチン	BPL		

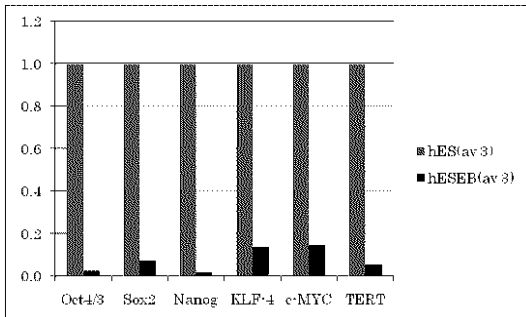
【 図 2 】



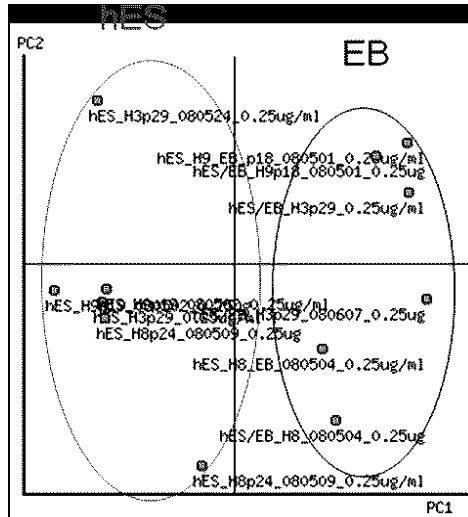
【 図 5 】



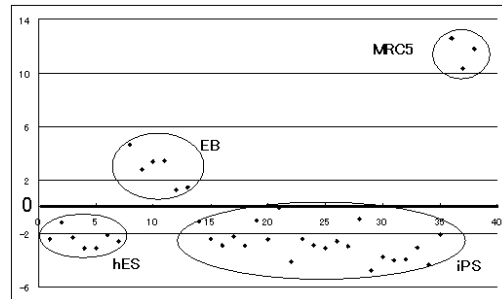
【 図 6 】



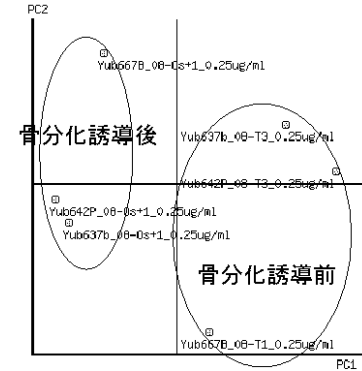
【 図 3 】



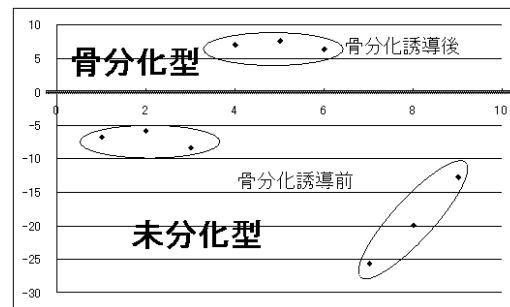
【 図 4 】



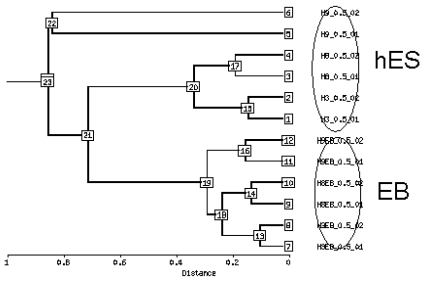
【 図 7 】



【 図 8 】



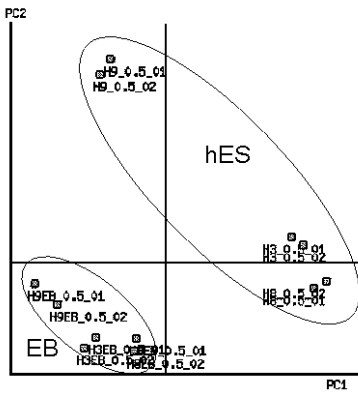
【 図 9 】



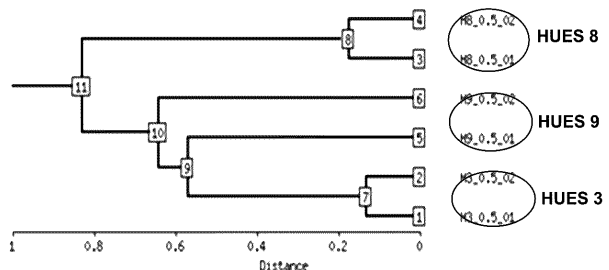
【 図 1 1 】

No.	D1	D2	判別結果	細胞	正否
1	61.4	1460.7	ES	ES	○
2	4.3	710.2	ES	ES	○
3	160.6	1332.4	ES	ES	○
4	718.3	3043.4	ES	ES	○
5	224.3	432.3	ES	ES	○
6	1171.9	9.4	EB	EB	○
7	3816.9	180.2	EB	EB	○
8	1198.1	63.4	EB	EB	○
9	305.9	95.4	EB	EB	○
10	618.3	569.3	EB	EB	○

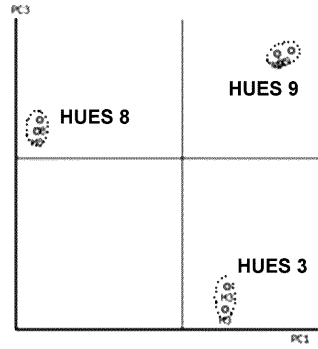
【 図 1 0 】



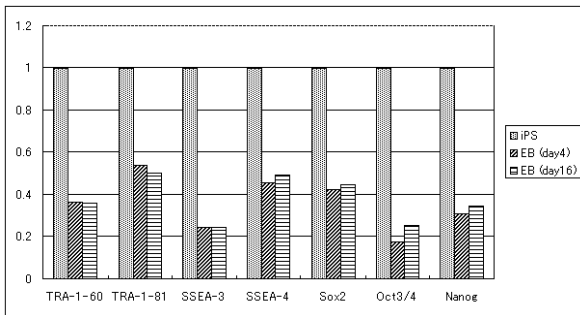
【 図 1 2 】



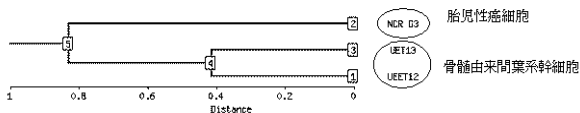
【 図 1 3 】



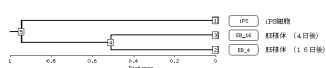
【 図 1 7 】



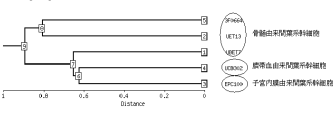
【 図 1 4 】



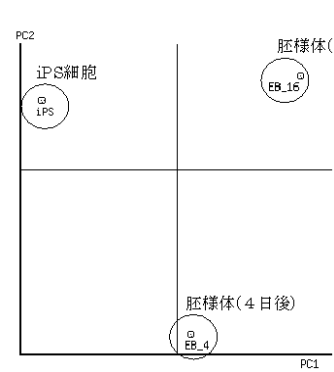
【 図 1 8 】



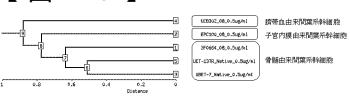
【 図 1 5 】



【 図 1 9 】



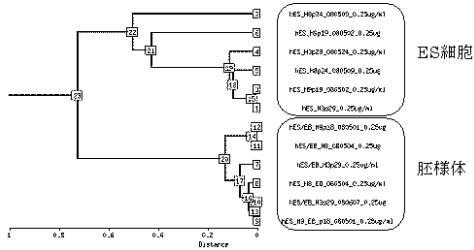
【 図 1 6 】



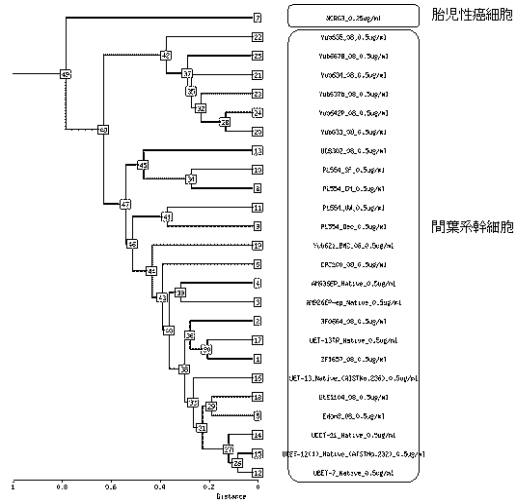
【 図 2 0 】

判別に使用するレクチン	判別式	判別精度(%)
PHA(L), EEL	$S = -1.85 \times \text{PHA(L)} + 1.37 \times \text{EEL} + 1.94$	100.0
MAL, EEL	$S = -2.44 \times \text{MAL} + 1.36 \times \text{EEL} + 1.40$	97.0
PHA(L)	$S = 2.46 \times \text{PHA(L)} - 3.57$	94.0
MAL, PHA(L), EEL	$S = -3.06 \times \text{MAL} + 0.80 \times \text{PHA(L)} + 1.55 \times \text{EEL} + 0.68$	86.6
MAL, PHA(L)	$S = -2.86 \times \text{MAL} + 0.06 \times \text{PHA(L)} + 2.41$	55.2
MAL	$S = 2.80 \times \text{MAL} - 2.46$	55.2
EEL	$S = 2.77 \times \text{EEL} - 1.50$	89.6

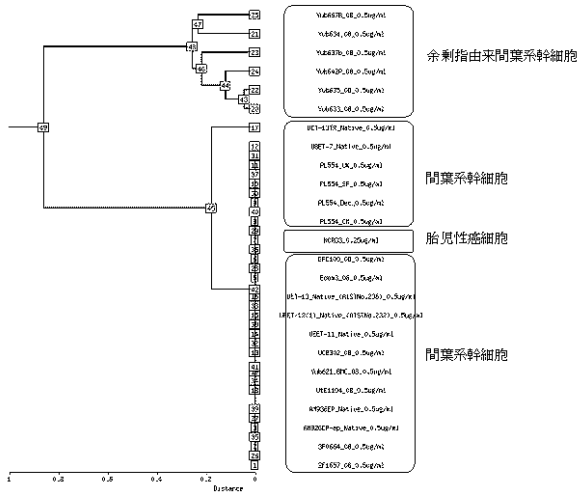
【 図 2 1 】



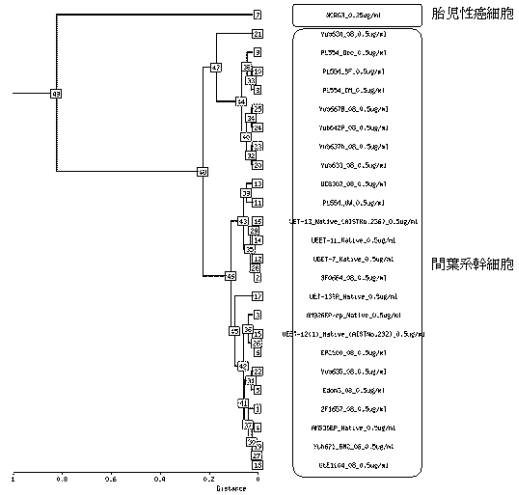
【 図 2 2 】



【 図 2 3 】



【 図 2 4 】



【手続補正書】

【提出日】平成23年3月10日(2011.3.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

判別対象になっている細胞の持つ糖鎖又は当該糖鎖を含有している糖鎖含有サンプルを、液相中で複数種類のレクチンに結合させたまま蛍光測定することによって得た、前記複数種類のレクチンのそれぞれに対する蛍光強度を数値化し、当該数値化された蛍光強度から統計的手法により前記細胞の判別すべき各状態において特徴的な違いが示される複数種の判別用レクチンを前記複数種類のレクチンの中から抽出し、当該判別用レクチンの前記数値化された蛍光強度を利用して前記判別対象になっている細胞の状態を判別する方法。

【請求項2】

前記複数種の判別用レクチンが、イヌエンジュレクチンI(MAL)、インゲンマメレクチン(E)(PHA(E))、スピンドルツリーレクチン(EEL)の中の中から選ばれる一種以上を含むものであり、判別する細胞の状態が、ヒトES細胞またはヒトiPS細胞の未分化及び分化後の状態であることを特徴とする請求項1記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項3】

前記複数種の判別用レクチンが、イヌエンジュレクチンI(MAL)、ニワトコレクチン(SNA)、ニホンニワトコレクチン(SSA)、キカラスウリレクチン-I(TJA-I)、デイゴマメレクチン(ECA)の中の中から選ばれる一種以上を含むものであり、判別する細胞の状態が、ヒト間葉系幹細胞の未分化及び分化後の状態であることを特徴とする請求項1記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項4】

前記複数種の判別用レクチンが、ハリエニシダレクチン-I(UEA-I)、イヌエンジュレクチンI(MAL)、インゲンマメレクチン(E)(PHA(E))、ムラサキモクワンジュレクチン(BPL)、フジレクチン(WFA)の中の中から選ばれる一種以上を含むものであり、判別する細胞の状態が、ヒトES細胞またはヒトiPS細胞の未分化及び分化後の状態であることを特徴とする請求項1記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項5】

前記複数種の判別用レクチンが、ハリエニシダレクチン-I(UEA-I)、イヌエンジュレクチンI(MAL)、インゲンマメレクチン(E)(PHA(E))、ムラサキモクワンジュレクチン(BPL)、フジレクチン(WFA)の中の中から選ばれる一種以上を含むものであり、判別する細胞の状態が、ヒトES細胞またはヒトiPS細胞の分化傾向であることを特徴とする請求項1記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項6】

前記複数種の判別用レクチンが、イヌエンジュレクチンI(MAL)、インゲンマメレクチン(L)(PHA(L))の中の中から選ばれる一種以上を含むものであり、判別する細胞の状態が、細胞の種類を判別であって、ヒト間葉系幹細胞と、ヒト胎児性がん細胞との判別であることを特徴とする請求項1記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項7】

前記複数種の判別用レクチンが、インゲンマメレクチン(L)(PHA(L))、スピンドルツリーレクチン(EEL)の中の中から選ばれる一種以上を含むものであり、判別する細胞の状態が、ヒトES細胞またはヒトiPS細胞の未分化及び分化後の状態であることを特徴とする請求項1記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項8】

前記複数種の判別用レクチンが、バンデリアマメレクチン I B 4 (G S L - I B 4)、シカクマメレクチン I (P T L - I)、バンデリアマメレクチン I A 4 (G S L - I、A 4)、ピーナツレクチン (P N A) の中から選ばれる一種以上を含むものであり、判別する細胞の状態が、細胞の種類の判別であって、ヒト間葉系幹細胞の由来組織の判別であることを特徴とする請求項 1 記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 9】

前記糖含有分子が糖タンパク質、糖ペプチド、糖脂質、プロテオグリカンの中のいずれか一種又は複数種であることを特徴とする請求項 1 乃至 8 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 10】

前記複数種類のレクチンがレクチンアレイ、E L I S A プレート、磁気ビーズ、ラテックスビーズの中のいずれか一種に固定されていることを特徴とする請求項 1 乃至 9 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 11】

(削除)

【請求項 12】

前記蛍光測定がエバネッセント励起法または共焦点蛍光測定法であることを特徴とする請求項 1 乃至 10 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 13】

前記蛍光測定がフローサイトメトリーであることを特徴とする請求項 1 乃至 10 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 14】

細胞状態の判別方法が遺伝子発現解析、または対象となる状態の細胞の特異的マーカー抗体との結合測定の片方又は両方と組み合わせて行われることを特徴とする請求項 1 乃至 12 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 15】

細胞状態の判別方法が線形判別分析又は、非線形判別分析によって行われることを特徴とする請求項 1 乃至 13 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 16】

前記非線形判別分析が、マハラノビス距離による判別分析であることを特徴とする請求項 14 記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 17】

細胞状態の判別方法が教師あり機械学習手法または半教師あり機械学習手法によるものであることを特徴とする請求項 1 乃至 13 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 18】

前記機械学習手法が k 近傍法、ナイーブベイズ分類器、決定木、ニューラルネットワーク、サポートベクターマシン、バギング法、ブースティング法、ランダムフォレスト法から選ばれるいずれかの手法によって行われることを特徴とする請求項 16 記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 19】

細胞状態の判別方法が、主成分分析、クラスター分析、自己組織化マップから選ばれるいずれかの手法によって行われることを特徴とする請求項 1 乃至 13 のいずれか一項記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 20】

判別する細胞の状態がヒト胚性幹細胞またはヒト人工多能性幹細胞の未分化および分化であり、その判別に使用するレクチンがイヌエンジュレクチン I (M A L)、インゲンマメレクチン (L) (P H A (L))、インゲンマメレクチン (E) (P H A (E))、スピンドルツリーレクチン (E E L) の中のいずれか一種、またはこれらの中のいずれかのレクチンにそれぞれ類似の糖結合特異性を持つ分子からなる群から 1 つまたは複数選択さ

れたものであることを特徴とする請求項 1 記載の細胞の状態を判別する方法。

【請求項 2 1】

判別する細胞の状態がヒト間葉系幹細胞の未分化および骨分化であり、その判別に使用するレクチンがイヌエンジュレクチン I (MAL)、ニワトコレクチン (SNA)、ニホンニワトコレクチン (SSA)、キカラスウリレクチン - I (TJA - I)、デイゴマメレクチン (ECA) の中のいずれか一種、またはこれらの中のいずれかのレクチンにそれぞれ類似の糖結合特異性を持つ分子からなる群から 1 つまたは複数選択されたものであることを特徴とする請求項 1 項記載の細胞の状態を判別する方法。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2010/057938
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12Q1/06(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G01N33/53(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) C12Q1/06, G01N21/64, G01N33/53 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE/CAPLUS/BIOSIS/WPIDS (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.
X/Y	Atsushi KUNO et al., "Rinsho Tosa Biomarker no Kaihatsu- Tosa Kino no Kaimei to Sono Oyo Dai 1 Sho Gijutsuhen Tosa Kozo Kaiseki Gijutsu no Kaihatsu to Iryo Oyo 1) Lectine Microarray ni yoru Tosa Profiling System no Tosa Biomarker Tansaku eno Katsuyo", Ideshi Igaku MOOK 11, 2008, pages 34 to 39, 4	1,8-12/1-21
X/Y	EBE, Y., et al., Application of lectin microarray to crudesamples: differential glycan profiling of lec mutants.J. Biochem., 2006, Vol.139, No.3, pp.323-327	1,9-13/1-21
X/Y	TATENO, H., et al., A novel strategy for mammalian cell surface glycome profiling using lectin microarray. Glycobiology, 2007, Vol.17, No.10, pp.1138-1146	1,7,8/1-21
<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 27 May, 2010 (27.05.10)		Date of mailing of the international search report 08 June, 2010 (08.06.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/057938

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yoko ITAKURA et al., "Lectine Microarray o Mochiita Mouse Yurai Kansaibo no Bunka Hanbetsu Gijutsu Kaihatsu", Dai 80 Kai The Japanese Biochemical Society Taikai, Dai 30 Kai The Molecular Biology Society of Japan Godo Taikai Koen Yoshishu, 2007, page 727, 4P-0111	1-21
Y	TAO, SC., et al., Lectin microarrays identify cell-specific and functionally significant cell surface glycan markers. Glycobiology, 2008, Vol.18, No.10, pp.761-769	1-21
Y	WEARNE, KA., et al., Use of lectins for probing differentiated human embryonic stem cells for carbohydrates. Glycobiology, 2006, Vol.16, No.10, pp.981-990	1-21
Y	WO 2008/093828 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 07 August 2008 (07.08.2008), & JP 2008-187932 A	1-21
Y	DAIBA, A., et al., A low-density cDNA microarray with a uniuqereference RNA: pattern recognition analysis for IFN efficacy prediction to HCV as a model. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, Vol.315, pp.1088-1096	1-21
Y	TAKAHASHI, H., et al., Classification of intramural metastases and lymph node metastases of esophageal cancer from gene expression based on boosting and projective adaptive resonance theory. J. Biosci. Bioeng., 2006, Vol.102, No.1, pp.46-52	1-21
Y	Hiroyuki HONDA et al., "Idenshi Hatsugen Profile Karano Gan'yogo Kanren Inshi Jido Chushutsu Tool Kaihatsu", Dai 62 Kai The Japanese Cancer Association Sokai, 2003, page 331, 1541-PA	1-21
Y	ZHANG, H., et al., Cell and tumor classification using gene expression data: construction of forests. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, Vol.100, No.7, pp.4168-4172	1-21
P,Y	Masahi TOYODA et al., "Tosa Kino Katsuyo Gijutsu Kaihatsu Tosa Profiling ni Motozuku Kansaibo Senbetsu Gijutsu no Kaihatsu", Baio Tekunoroji Shinpojiumu Yokoshu, 05 November 2009 (05.11.2009), vol.27, pages 115 to 116	1-21

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 0 / 0 5 7 9 3 8	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12Q1/06(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G01N33/53(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. C12Q1/06, G01N21/64, G01N33/53			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE/Caplus/BIOSIS/WPIDS (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	
X/ Y	久野敦 他, 臨床糖鎖バイオマーカーの開発ー糖鎖機能の解明とその応用 第1章 技術編 糖鎖構造解析技術の開発と医療応用 1) レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイリングシステムの糖鎖バイオマーカー探索への活用, 遺伝子医学MOOK 11, 2008, pp. 34-39, 4	1, 8-12/ 1-21	
X/ Y	EBE, Y., et al., Application of lectin microarray to crude samples: differential glycan profiling of lec mutants. J. Biochem., 2006, Vol.139, No. 3, pp. 323-327	1, 9-13/ 1-21	
<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 27.05.2010		国際調査報告の発送日 08.06.2010	
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) 佐々木 大輔	4 N 3 9 6 2
		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 1 0 / 0 5 7 9 3 8
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y	TATENO, H., et al., A novel strategy for mammalian cell surface glycome profiling using lectin microarray. Glycobiology, 2007, Vol.17, No.10, pp.1138-1146	1,7,8/ 1-21
Y	板倉陽子 他, レクチンマイクロアレイを用いたマウス由来幹細胞の分化判別技術開発, 第80回日本生化学会大会 第30回日本分子生物学会合同大会講演要旨集, 2007, p.727, 4P-0111	1-21
Y	TAO, SC., et al., Lectin microarrays identify cell-specific and functionally significant cell surface glycan markers. Glycobiology, 2008, Vol.18, No.10, pp.761-769	1-21
Y	WEARNE, KA., et al., Use of lectins for probing differentiated human embryonic stem cells for carbohydrates. Glycobiology, 2006, Vol.16, No.10, pp.981-990	1-21
Y	WO 2008/093828 A1 (独立行政法人産業技術総合研究所) 2008.08.07, & JP 2008-187932 A	1-21
Y	DAIBA, A., et al., A low-density cDNA microarray with a unique reference RNA: pattern recognition analysis for IFN efficacy prediction to HCV as a model. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, Vol.315, pp.1088-1096	1-21
Y	TAKAHASHI, H., et al., Classification of intramural metastases and lymph node metastases of esophageal cancer from gene expression based on boosting and projective adaptive resonance theory. J. Biosci. Bioeng., 2006, Vol.102, No.1, pp.46-52	1-21
Y	本多裕之 他, 遺伝子発現プロファイルからの癌予後関連因子自動抽出ツールの開発, 第62回日本癌学会総会, 2003, p.331, 1541-PA	1-21
Y	ZHANG, H., et al., Cell and tumor classification using gene expression data: construction of forests. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, Vol.100, No.7, pp.4168-4172	1-21
P, Y	豊田雅士 他, 糖鎖機能活用技術開発 糖鎖プロファイリングに基づく幹細胞選別技術の開発, バイオテクノロジーシンポジウム予稿集, 2009.11.05, Vol.27 th , pp.115-116	1-21

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 G 0 1 N 21/64 F
 G 0 1 N 21/78 C

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, S E, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, I L, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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

(出願人による申告)平成20年度独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構委託研究「基礎研究から臨床研究への橋渡し促進技術開発/橋渡し促進技術開発/糖鎖プロファイリングによる幹細胞群の品質管理、安全評価システムの研究開発」産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(74)代理人 100124383

弁理士 鈴木 一永

(74)代理人 100059281

弁理士 鈴木 正次

(72)発明者 梅澤 明弘

東京都世田谷区大蔵2-10-1 独立行政法人国立成育医療研究センター内

(72)発明者 豊田 雅士

東京都世田谷区大蔵2-10-1 独立行政法人国立成育医療研究センター内

(72)発明者 平林 淳

茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

(72)発明者 久野 敦

茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

(72)発明者 板倉 陽子

茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

(72)発明者 山田 雅雄

神奈川県横浜市青葉区あざみ野南1-3-3 株式会社G Pバイオサイエンス内

(72)発明者 小川 智央

神奈川県横浜市青葉区あざみ野南1-3-3 株式会社G Pバイオサイエンス内

(72)発明者 横田 京子

神奈川県横浜市青葉区あざみ野南1-3-3 株式会社G Pバイオサイエンス内

Fターム(参考) 2G043 BA16 EA01

2G054 AA06 CE02 EA03

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ53 QQ67 QQ79 QR32 QR48 QR56

QS33 QS34 QX02

(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。

专利名称(译)	一种用于确定细胞状态的方法		
公开(公告)号	JPWO2010131641A1	公开(公告)日	2012-11-01
申请号	JP2011513340	申请日	2010-05-11
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人国立成育医疗研究中心 GP生物科学		
申请(专利权)人(译)	国立儿童健康研究中心 先进工业科学和技术研究院 GP公司生物科学		
[标]发明人	梅澤明弘 豊田雅士 平林淳 久野敦 板倉陽子 山田雅雄 小川智央 横田京子		
发明人	梅澤 明弘 豊田 雅士 平林 淳 久野 敦 板倉 陽子 山田 雅雄 小川 智央 横田 京子		
IPC分类号	C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 G01N21/64 G01N21/78		
CPC分类号	G01N33/574 G01N33/5073 G01N33/5091 G01N2333/4724 G01N2400/00		
FI分类号	C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.S G01N33/53.Y G01N33/53.V G01N21/64.F G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G043/BA16 2G043/EA01 2G054/AA06 2G054/CE02 2G054/EA03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QQ67 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02		
代理人(译)	德宏山本 铃木 一永 铃木正嗣		
优先权	2009114877 2009-05-11 JP		
其他公开文献	JPWO2010131641A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(EN) 提供了一种用于快速，简单且准确地识别细胞状态的技术。通过测量在液相中与多种类型的凝集素结合时存在于待区分细胞表面上的糖链或包含该糖链的含糖链样品而获得。一种使用待鉴别细胞的数量或结合到多种类型凝集素中的每一个的含糖链样品的数量来鉴别细胞状态的方法。 [选择图]无

レクテン名	略称	レクテン名	略称
ロータスレクテン	LTL	キカラスウリレクテンⅡ	TJA-II
エンドウマメレクテン	PSA	スピンドルツリーレクテン	EEL
レンズマメレクテン	LGA	マッシュルームレクテン	ABA
ハリエニシダレクテン-I	UEA-I	トマトレクテン	LEL
コウジカビレクテン	ACL	ジャガイモレクテン	STL
ヒイロチャワンタケレクテン	AAL	セイヨウイラクサレクテン	UDA
イヌエンジュレクテン I	MAL	アメリカヤマゴボウレクテン	PWM
ニフトコレクテン	SNA	ジャックフルーツレクテン	Jacelin
ニホンニフトコレクテン	SSA	ピーナッツレクテン	PNA
キカラスウリレクテン-I	TJA-I	フジレクテン	WFA
インゲンマメレクテン(L)	PHA(L)	センニンコクレクテン	ACA
ダイゴマレクテン	ECA	アメリカハリゴワレクテン	MPL
ヒママレクテン	RCA120	エスカルゴレクテン	HPA
インゲンマメレクテン(E)	PHA(E)	カラスノエンドウレクテン	VVA
チョウセンアサガオレクテン	DSA	ドリコスマメレクテン	DBA
バンデリアマメレクテン II	GSL-II	ダイズレクテン	SBA
ラッパズイセンレクテン	NPA	ヒロハヒルガオレクテン	Calsepa
ナタマレクテン	GonA	シカクマメレクテン I	PTL-I
ユキノハナレクテン	GNA	イヌエンジュレクテン II	MAH
アマリスレクテン	HHL	コムギレクテン	WGA
ヤナギマツタケレクテン	ACG	バンデリアマメレクテン I A4	GSL-I A4
チューリップレクテン	TxlC I	バンデリアマメレクテン I B4	GSL-I B4
ムラサキモクワシジュレクテン	BPL		