

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002 年 1 月 3 日 (03.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/00850 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 5/06, 阪市都島区中野町5丁目13番 3-2005号 Osaka (JP). 廣田久雄 (HIROTA, Hisao) [JP/JP]; 〒665-0845 兵庫県宝塚市栄町2丁目1番 1-W-601 Hyogo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/05520
- (22) 国際出願日: 2001 年 6 月 27 日 (27.06.2001)
- (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: 特願2000-194805 2000 年 6 月 28 日 (28.06.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 木村温英 (KIMURA, Hideharu) [JP/JP]; 〒300-2655 茨城県つくば市大字島名1029番地1 Ibaraki (JP). 小山信行 (KOYAMA, Nobuyuki) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つくば市春日1丁目7番地9 武田春日ハイツ202号 Ibaraki (JP). 谷田清一 (TANIDA, Seiichi) [JP/JP]; 〒617-0847 京都府長岡京市高台西6番地の14 Kyoto (JP). 岸本忠三 (KISHIMOTO, Tadamitsu) [JP/JP]; 〒584-0021 大阪府富田林市中野町3丁目5番31号 Osaka (JP). 瀧原圭子 (TAKIHARA, Keiko) [JP/JP]; 〒531-0027 大阪府大
- (74) 代理人: 弁理士 高橋秀一, 外(TAKAHASHI, Shuichi et al.); 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF PREPARING HEART MUSCLE CELLS AND METHOD OF SEARCHING FOR REMEDY FOR HEART DISEASES

(54) 発明の名称: 心筋細胞の調製法および心疾患治療薬の探索法

(57) Abstract: A method of preparing primary heart muscle cells characterized by comprising washing a fine fragmented heart tissue with a phosphate-buffered physiological saline to thereby eliminate non-heart muscle cells and then hemolyzing the heart tissue digested with a protease to thereby eliminate erythrocytes. According to this method, highly pure primary heart muscle cells can be conveniently obtained in a large amount from the heart of an animal embryo or a newborn. By using the heart muscle cells thus prepared, apoptosis of heart muscle cells can be efficiently and highly sensitively detected. Thus, it is possible to efficiently screen candidate compounds for heart muscle cell apoptosis inhibitors, gp130-mediated receptor agonists, heart muscle cell-protective signal enhancers, preventives and remedies for heart diseases, etc. A method of detecting apoptosis which comprises inducing apoptosis of heart muscle cells by incubating the cells in a serum-free medium, adding serum to the liquid culture medium thereof, then incubating the cells and counting viable heart muscle cells.

[続葉有]



(57) 要約:

本発明は、細片化した心臓組織をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄することにより非心筋細胞を除去し、蛋白質分解酵素で消化した心臓組織を溶血処理に付すことにより赤血球を除去することを特徴とする初代心筋細胞の調製法に係るものである。本発明の方法によれば、動物の胎仔又は新生仔の心臓より高純度の初代心筋細胞を簡便かつ大量に調製することができ、調製した心筋細胞を用いて心筋細胞のアポトーシスを効率的かつ高感度に検出することにより、心筋細胞アポトーシス抑制薬、gp130介在受容体作動薬、心筋細胞保護シグナル増強薬、心疾患予防・治療薬などの候補化合物を効率よくスクリーニングすることができる。アポトーシスの検出法としては、無血清培地で培養することによりアポトーシスの誘導された心筋細胞の培養液に血清を添加した後、培養し、生存心筋細胞数を測定する方法を示す。

明 細 書

心筋細胞の調製法および心疾患治療薬の探索法

5 技術分野

本発明は、心筋細胞アポトーシス抑制作用あるいは心筋細胞保護シグナル増強作用を有する心疾患治療薬の探索に有用な、高純度初代心筋細胞の簡便な大量調製法および効率的かつ高感度な多検体対応型探索法等に関するものである。

- さらに詳しくは、心疾患に対する予防・治療薬となりうる心筋細胞アポトーシス抑制作用あるいは心筋細胞保護シグナル増強作用を有する心疾患治療薬を初代培養心筋細胞を用いて探索するために、動物の胎仔又は新生仔の心臓より高純度の初代心筋細胞を簡便かつ大量に調製し、この心筋細胞を使用して心筋細胞のアポトーシスを効率的かつ高感度に検出することを特徴とする心疾患治療薬の探索法等に関するものである。

15

背景技術

- アポトーシスは発生過程での形態、組織の形成や、ホメオスタシスの維持、生体の防御に深く関わり、個体の生命維持に重要な役割を持つ細胞の死である。遺伝子によって制御されたこの死の過程が、先天的、あるいは後天的に障害されると、アポトーシスが過剰に誘発されたりあるいは抑制されたりして、様々な臓器の機能障害を引き起こして病気に至る（米原 伸、最新医学 第54巻、825頁、1999年）。従って、アポトーシスの観点からの疾患の把握と、その分子機構にもとづいた、診断法や、治療薬の開発が求められている。

- アポトーシスは細胞増殖とは対局を成す。従って、これまで、増殖しない最終分化細胞である心筋細胞と、アポトーシスとの関わりは少ないと考えられてきた。しかし、近年、種々の心疾患の発症あるいは進展にアポトーシスが深く関わっていることが明らかとなってきた（R. Sanders Williams, The New England Journal of Medicine 第341巻、759頁、1999年）。心筋細胞は増殖しないため、心筋細胞がアポトーシスを起こして脱落すると、生き残った細胞のみで収

25

縮機能を維持しなければならないことになる。従って、心臓の収縮機能維持に必要な閾値を超えて心筋細胞の脱落が起こると、心機能に異常をきたし疾患へと進行するものと考えられる。実際、動物を用いた種々の心不全モデルやヒト心不全患者では心筋細胞のアポトーシスが観察されており、アポトーシスによる心筋細胞の消失・脱落が心不全の発症や進展に関わっている可能性が指摘されている (Narula, J. et al., The New England Journal of Medicine 第 335 巻、1182 頁、1996 年)。また、ヒト心不全患者の心筋細胞では、アポトーシス抑制因子 Bcl-2 の過剰発現が認められ、これが心不全の代償機構である可能性が示されていること (Olivetti, G. et al., The New England Journal of Medicine 第 336 巻、1131 頁、1997 年) や、アポトーシスを誘導することが知られている Fas 受容体の膜貫通部分が欠損したドメインのみがスプライシングによって分泌される可溶性 Fas (sFas ; アポトーシス抑制活性を有する) の血漿中の濃度が、基礎疾患に無関係に NYHA (New York Heart Association Functional Class) 分類の重傷度に比例して有意に上昇することから、血漿 sFas 濃度の上昇が心不全時のアポトーシスの亢進を抑制する代償性機序と考えられること (Nishigaki, K. et al., Journal of the American College of Cardiology 第 29 巻、1214 頁、1997 年)、拡張型心筋症を起こした心臓では、正常人に比べて、アポトーシスの指標の一つと考えられる Deoxyribonuclease I (DNase I) を 7 倍以上含有すること (Yao, M. et al., Journal of Molecular & Cell Cardiology 第 28 巻、95 頁、1996 年) などが知られている。

一方、心筋細胞の保護に関連した最近の重要な知見として、gp130 の心室特異的欠損マウスに関する研究成果が上げられる。このマウスの解析から、gp130 介在性受容体からのシグナル (gp130 シグナル) が心機能の保護に重要な役割を果たすことが明らかにされ、心疾患の治療に結びつく心筋細胞保護シグナルの新しい展開として注目を集めている (Hirota, et. al., Cell 第 97 巻、189 頁、1999 年、および Senior, K. Molecular Medicine Today 第 5 巻、283 頁、1999 年)。

従って心筋細胞アポトーシス抑制作用あるいは心筋細胞保護シグナル増強作用を有する化合物は新しい心疾患治療薬となる可能性が極めて高い。

心疾患に対する予防・治療薬として有用な心筋細胞アポトーシス抑制作用を有する化合物、gp130 介在性受容体作動活性を有する化合物、あるいは心筋細胞保護シグナル増強作用を有する化合物を探索する為には、心筋細胞のアポトーシスを指標としてこれを抑制する化合物を多数の検体の中から迅速かつ効率よく選別する必要がある。そのためには、動物そのものや心臓組織を用いて探索を行うのではなく、初代培養心筋細胞を簡便かつ大量に調製して探索を行うことが最善の方法と考えられる。

現在、心筋細胞の調製は、主に動物の心臓をトリプシンやコラゲナーゼ等の蛋白質分解酵素で消化して、細胞を単離する方法で行われている。この際、トリプシンやコラゲナーゼ等の蛋白質分解酵素での消化が容易だという理由で、一般的には胎仔や新生仔の心臓を細片化してから、蛋白質分解酵素で消化する方法が採られている（五島喜興太、金子洋之、心臓・血管研究方法の開発（江橋節郎編）、3 頁、学会出版センター（1983））。しかし、この方法では、血液の除去が十分行えないために、血液由来の細胞の混入により、得られる心筋細胞の純度が低くなることが問題であった。この問題を解決するためにフィコール等を使用して高純度心筋細胞を回収する方法（Jojo, K., et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 第 225 巻、340 頁（1996））や、DNA 合成阻害剤(Bromodeoxyuridine)（Chacko, B. et al., Journal of Cell Biology 第 55 巻、36A 頁（1972））やカルシウムイオノホア(A23187)（Kaneko, H. et al., Experimental Cell Research 第 142 巻、407 頁（1982））等の薬剤を加えて非心筋細胞の増殖を選択的に抑制する方法などが考えられてきた。しかしこれらの方法も、フィコール等を使用した方法は回収に時間がかかり、BrDU や A23187 を用いた方法はそれら自身が細胞毒性を有するため、細胞の回収量や薬剤の心筋細胞への影響などの問題がある。かかる問題のため、このような調製法により調製した心筋細胞を用いて心筋細胞のアポトーシスを抑制する化合物を迅速かつ効率よく選別することは困難であり、心筋細胞のアポトーシスを抑制する化合物を多数の検体の中から迅速かつ効率よく選別する多検体対応型の探索のための心筋細胞の調製方法として好ましいものではなかった。

その他の心筋細胞の調製方法としては、成熟した動物の心筋細胞を摘出して

ランゲンドルフ式灌流装置にセットし、血液を洗浄除去した後、トリプシンやコラゲナーゼなどの蛋白質分解酵素液を還流する方法(杉 晴夫、平本幸男編、実験生物学講座 第10巻、27頁(1984))が知られている。しかしこの方法も、特殊な装置が必要であったり、成熟動物の心筋細胞の生存率が極めて低く、
5 手法の難易度が高いことや回収される心筋細胞の数や性質などに問題があり、上記調製法と同様、多検体対応型の探索には適していない。

このように、心筋細胞のアポトーシスを抑制する化合物を多数の検体の中から迅速かつ効率よく選別するためには初代培養心筋細胞を簡便かつ大量に調製する新たな方法を開発することが必要であった。

10 一方、心筋細胞のアポトーシス抑制作用を有する化合物、gp130 介在性受容体作動活性を有する化合物、あるいは心筋細胞保護シグナル増強作用を有する化合物を探索するためには、高純度の初代培養心筋細胞の簡便な大量調製法だけではなく、心筋細胞のアポトーシスを探索に適した簡便な方法で検出する必要がある。

15 例えば、培養液から血清を除去することによって初代培養心筋細胞にアポトーシスを誘導する為には、密度が濃いと細胞同士の接触による保護シグナルの惹起、保護因子の産生などが考えられることから細胞密度をある程度低くする必要があるうえに、血清を除去したままの状態では生存している心筋細胞の細胞内脱水素酵素活性も低いため、MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-
20 diphenyltetrazolium bromide) 還元法(多田ら、ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソーズ(Journal of Immunological Methods) 第93巻、157頁(1986))などで心筋細胞のアポトーシスを定量的に検出することは困難であった。また、従来、心筋細胞のアポトーシスの検出には、トリパンブルー等で死細胞を染色したり、MTT を添加して生細胞にホルマザンの結晶を作らせた後、生細胞数を
25 計数する方法がとられてきた(Sheng, Z. et al., The Journal of Biological Chemistry 第272巻、No.9、5783頁(1997))。しかしこのような方法では多検体に対応させることは困難であり、心筋細胞のアポトーシス抑制作用を有する化合物、gp130 介在性受容体作動活性を有する化合物、あるいは心筋細胞保護シグナル増強作用を有する化合物を探索するためには、心筋細胞のアポト

ーシスのより効率的で高感度な検出方法を考案する必要があった。

発明の開示

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、哺乳動物の胎仔又は新生仔の心臓組織を細片化したものを、トリプシンやコラゲナーゼなどの蛋白質分解酵素で処理する前にリン酸緩衝生理食塩水等で洗浄すること、および残留する赤血球を低張溶血操作で除去することによって、高純度初代心筋細胞を簡便かつ大量に調製できることを見出した。以下、該調製法を本発明の心筋細胞調製法と称することがある。

10 また、心筋細胞培養液より血清を除去することによって誘導したアポトーシスを、効率よく高感度に検出する方法として、培養液へ血清を添加して約17時間の回復培養を行った後に、WST-8 (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) を発色基質とする細胞数計測キット (Cell counting kit-8; 同人化学研究所社
15 製) などを用いて生細胞数を測定する方法を見出した。以下、該検出法を本発明のアポトーシス検出方法と称することがある。

本発明者らは、これらの方法を組み合わせてさらに検討を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、①心筋細胞アポトーシス抑制作用を有する化合物、gp130
20 介在性受容体作動活性を有する化合物、あるいは心筋細胞保護シグナル増強作用を有する化合物の探索に有用な、高純度初代心筋細胞の簡便な大量調製法、
②これらの化合物を効率的よく高感度に検出する検出方法、③該調製法および該検出方法を組み合わせた多検体対応型の探索方法 (スクリーニング法)、
さらに、④該探索方法によって得られる化合物またはその塩を含有する心筋細胞
25 胞アポトーシス抑制薬、gp130介在受容体作動薬、心筋細胞保護シグナル増強薬または心疾患予防・治療薬等に関する。

さらに詳しくは、本発明は、

(1) 細片化した心臓組織から非心筋細胞を除去した後、該心臓組織を蛋白質分解酵素で消化することを特徴とする初代心筋細胞の調製法、

- (2) 細片化した心臓組織をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄することにより非心筋細胞を除去することを特徴とする前記(1)記載の調製法、
- (3) 細片化した心臓組織を蛋白質分解酵素で消化した後に、赤血球を除去することを特徴とする初代心筋細胞の調製法、
- 5 (4) 溶血処理を行うことにより赤血球を除去することを特徴とする前記(3)記載の調製法、
- (5) 心臓組織より単離した心筋細胞を溶血処理することを特徴とする初代心筋細胞の調製法、
- (6) 細片化した心臓組織から非心筋細胞を除去した後、該心臓組織を蛋白質分解酵素で消化し、赤血球を除去することを特徴とする初代心筋細胞の調製法、
- 10 (7) 細片化した心臓組織をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄することにより非心筋細胞を除去し、蛋白質分解酵素で消化した心臓組織を溶血処理に付すことにより赤血球を除去することを特徴とする前記(6)記載の調製法、
- (8) 無血清培地で培養することによりアポトーシスの誘導された心筋細胞の培養液に血清を添加した後、培養し、生存心筋細胞数を測定することを特徴とする心筋細胞アポトーシスの検出方法、
- 15 (9) 生存心筋細胞数が細胞内脱水素酵素活性を測定することにより測定される前記(8)記載の検出方法、
- (10) 血清添加後の培養時間が約6～30時間である前記(8)記載の検出
- 20 方法、
- (11) 細胞内脱水素酵素活性をMTTまたはWST-8を用いて測定することを特徴とする前記(9)記載の検出方法、
- (12) 前記(1)～(7)のいずれかに記載の調製法により得られた初代心筋細胞を無血清培地で培養することを特徴とする前記(8)記載の検出方法、
- 25 (13) (i) 試験化合物存在下でアポトーシスを誘導させた場合と、(ii) 試験化合物非存在下でアポトーシスを誘導させた場合との生細胞数を前記(12)記載の検出方法により比較することを特徴とする、アポトーシスを阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- (14) 前記(13)記載のスクリーニング方法を用いて得られる化合物また

はその塩を含有する心筋細胞アポトーシス抑制薬、

(15) 前記(13)記載のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を含有するg p 1 3 0介在受容体作動薬、

(16) 前記(13)記載のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を含有する心筋細胞保護シグナル増強薬、

(17) 心疾患予防・治療薬である、前記(14)記載の心筋細胞アポトーシス抑制薬、前記(15)記載のg p 1 3 0介在受容体作動薬または前記(16)記載の心筋細胞保護シグナル増強薬、

(18) 哺乳動物に対して、前記(14)記載の心筋細胞アポトーシス抑制薬、前記(15)記載のg p 1 3 0介在受容体作動薬または前記(16)記載の心筋細胞保護シグナル増強薬の有効量を投与することを特徴とする心疾患の予防・治療方法、

(19) 心疾患予防・治療剤を製造するための前記(14)記載の心筋細胞アポトーシス抑制薬、前記(15)記載のg p 1 3 0介在受容体作動薬または前記(16)記載の心筋細胞保護シグナル増強薬の使用などに関する。

図面の簡単な説明

図1は、実施例1で行った、本発明の心筋細胞調製方法で得られた心筋細胞と、従来法で得られた心筋細胞の純度の比較結果を示す。図中、「従来法」は従来法で得られた心筋細胞の、「本方法」は本発明の心筋細胞調製方法で得られた心筋細胞のフローサイトメトリー解析結果を示す。

図2は、実施例2で行った、本発明のアポトーシス検出方法と従来法によるhLIFの心筋細胞アポトーシス抑制活性検出感度の比較結果を示す。図中、「MTT還元法(従来法)」はMTTを発色基質として用いた従来法で測定した結果を、「MTT還元法(本方法)」はMTTを発色基質として用いた本発明のアポトーシス検出方法で測定した結果を、「WST-8還元法(本方法)」はWST-8を発色基質として用いた本発明のアポトーシス検出方法で測定した結果を示す。

図3は、実施例4で行った、本方法によるhIGF-1の心筋細胞アポトーシス抑制

活性の検出結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について詳しく説明する。

5 (1) 本発明の心筋細胞調製方法

本発明の方法はラットやマウスの胎仔または新生仔のように、ランゲンドルフ灌流装置等では血液を洗い流すことが困難な心臓より心筋細胞を大量に調製するのに適しているが、それらのみに限定されるものではない。

例えばラットの新生仔などの場合は、心臓を摘出し、摘出した心臓をリン酸緩衝生理食塩水などで洗浄した後、細片化する。この細片化した心臓組織をリン酸緩衝生理食塩水等で4～5回程度洗浄することで、血液由来の非心筋細胞を効率よく除去することができる。

次にこの心臓組織片をトリプシンやコラゲナーゼなどの蛋白質分解酵素で消化して細胞を分離する。酵素の種類、反応温度、反応時間などの条件は動物の種類によって適宜選択することができる。酵素反応は血清を含む培地等を加えることで停止させることができる。反応停止後の細胞含有液を遠心分離して細胞を集め、適当な培地に懸濁する。細胞塊を除去した後、細胞を含んだ培地をシャーレにまいて1時間培養する。

この条件であれば多くの心筋細胞はまだ浮遊状態にあるが、繊維芽細胞様細胞などの大部分の非心筋細胞はシャーレに接着するため、浮遊細胞を回収することにより、シャーレに接着した非心筋細胞を除去することができる。本発明の心筋細胞調製方法では、この段階で、すでに血液由来の細胞や大部分の赤血球が除去されているため、繊維芽細胞様細胞などの非心筋細胞のシャーレへの接着効率が高まる結果、効率よく非心筋細胞を除去することができる。シャーレから浮遊している細胞を回収し、低張液などを用いて溶血処理することにより残存する赤血球を除去する。低張液などで溶血処理した細胞を適当な培地に懸濁後、シャーレにまいて24時間程度培養すれば心筋細胞はシャーレに接着する。

この時点でシャーレに接着していない細胞は、殆どが傷害を受けた心筋細胞

であり、これはシャーレを軽く震盪し、シャーレ内の培養液を攪拌後、培地を交換するだけで簡単に除去することができる。

従来の方法で得られる純度の低い心筋細胞では、混入する血液由来の非心筋細胞や傷害をうけた心筋細胞が凝集してプレートに接着するため、シャーレの震盪による攪拌と培地交換では十分に除去できない。このため純度の高い心筋細胞を得るためには、心筋細胞を接着させたプレートをさらに洗浄する必要がある。しかし心筋細胞に影響を与えずに、これらの好ましくない細胞を洗浄除去することは困難であり、従来の方法で多検体対応型の探索に必要な大量の心筋細胞を得ることは不可能であった。

10 さらに具体的に本発明の心筋細胞調製法について記述する。

例えば、ラットの新生仔などの心筋細胞を調製する場合は、まずラット新生仔をエーテルなどで麻酔し、腹部を消毒して心臓を摘出する。摘出した心臓はリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) などで洗浄した後、ハサミ等を用いて細片化する。細片の大きさは 1 mm^3 以下が好ましい。この細片化した心臓組織をリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4) 等で4～5回程度洗浄し、血液由来の非心筋細胞をよく除去する。

次にこの心臓組織片をトリプシンやコラゲナーゼなどの蛋白質分解酵素で消化して細胞を分離する。最適な酵素の種類、反応温度、反応時間などの条件は用いる動物の種類によって異なるが、例えば、ラットの新生仔の心筋細胞を用いる場合、新生仔 10 匹分の組織片に対して 5 ml の酵素液 (1ml の PBS に 1.25 mg のトリプシン (ディフコ社製) と 0.25 mg のコラゲナーゼ (シグマ社製) を溶解したもの) を加えて 15 分間処理した後、15 分ごとに 2.5 ml の酵素液を二回追加し、37℃に保ちながらスターラーで攪拌して行うことができる。酵素反応は終濃度 10% FCS などの血清を含む Medium 199 等の培地を加え、停止させる。反応停止後の細胞含有液を遠心分離して細胞を集め、Medium 199 等の適当な培地に懸濁する。これを、例えばセルストレイナー (ファルコン社製) などのフィルターを用いて濾過して細胞塊を除去した後、細胞を含んだ培地をシャーレにまいて 5 % CO_2 、37℃に設定した CO_2 インキュベーター中で1時間培養する。細胞濃度は、新生仔 10 匹分の細胞あたり培地 50 ml 程度が好ましい。

次に、シャーレから浮遊している細胞を回収し、低張液で溶血処理して残存する赤血球を除去する。具体的には、新生仔 10 匹分の心筋細胞を 2 ml の低張液 (8.29 g NH_4Cl , 1.0g KHCO_3 , 37 mg $\text{EDTA}/2\text{Na}$ を 1 L の水に溶かしたもの) に懸濁し、3 分間放置することにより赤血球を破碎することができる。低張液で
5 溶血処理した細胞を Medium 199 等の適当な培地に、 $3 \times 10^4/\text{well}$ (96 穴プレート) 程度になるように懸濁後、シャーレにまいて 5% CO_2 、37℃ に設定した CO_2 インキュベーター中で 24 時間程度培養する。培養後、シャーレを軽く震盪し、シャーレ内の培養液を攪拌後、培地を交換し、純度の高い心筋細胞を得る。

10 (2) 本発明のアポトーシス検出方法

本方法によって得られた心筋細胞を、適切な細胞密度になるように調整して血清を含まない培地で培養するとアポトーシスを誘導することができ、4 日間の培養後に心筋細胞の生存率を 50% 以下に下げることができる。

血清を除いたままの状態では生存している細胞の脱水素酵素活性などの生細胞の指標となる酵素の活性も低いため、MTT 還元法などで生細胞数を知ること
15 は困難である。それに対し、本発明によれば、血清を除くことによりアポトーシスを誘導した心筋細胞培養液に再び血清を添加し、さらに約 6 ~ 30 時間 (好ましくは、約 17 時間) 培養して、生細胞内の脱水素酵素活性を高めることで、心筋細胞のアポトーシスを WST-8 を発色基質とする市販の細胞数計測キットな
20 どで、簡便かつ高感度に検出することができる。血清を除くことによりアポトーシスを誘導した心筋細胞培養液に血清を添加することにより生細胞内の脱水素酵素活性を高める方法を利用すれば、心筋細胞のアポトーシスの検出は、MTT 還元法などでも行うこともできるが、感度面で発色基質に WST-8 を使用すること
25 で、さらに感度を高めることができる。

さらに具体的に本発明のアポトーシス検出方法について記述する。

本方法によって得られた心筋細胞を、細胞密度が $3 \times 10^4/\text{well}$ (96 穴プレート) 程度になるように調製して血清を含まない培地 Medium 199 培地などで、5% CO_2 、37℃ に設定した CO_2 インキュベーター中で 4 日培養し、アポトーシスを誘導させ、心筋細胞の生存率を 50% 以下に下げる。

培養液に、例えば、終濃度 10 % になるように FCS などの血清を添加し、さらに約 17 時間培養し、MTT または WST-8 を発色基質として脱水素酵素の活性(還元活性)を測定することにより生細胞数を測定する。

本発明によれば、大量の高純度初代心筋細胞を従来の方法によるものと比べて簡便に得ることができる。また、培養液より血清を除去することによって誘導した心筋細胞のアポトーシスを効率的かつ高感度に検出することができる。本発明の方法はラットのみならず、マウス、モルモット、ウサギ、イヌ等の哺乳動物由来の心筋細胞にも応用することができる。

(3) 心疾患予防・治療薬候補化合物のスクリーニング

10 本発明の心筋細胞調製方法により得られた心筋細胞を用いて、本発明のアポトーシス検出方法を実施することにより、アポトーシスを阻害する化合物またはその塩のスクリーニングを行うことができる。

具体的には、本発明の心筋細胞調製方法により得られた心筋細胞を用いて(i)試験化合物存在下でアポトーシスを誘導させた場合と、(ii)試験化合物非存在下でアポトーシスを誘導させた場合との生細胞数を比較することにより、アポトーシスを阻害する化合物またはその塩のスクリーニングを行うことができる。以下、かかるスクリーニング方法を本発明のスクリーニング方法と称することがある。

20 具体的には後述の実施例に記載した方法またはそれに準じた方法によりスクリーニングを行うことができる。

かかるスクリーニング方法により得られた化合物またはその塩は心筋細胞アポトーシス抑制作用、g p 1 3 0 介在受容体作動活性または(および)心筋細胞保護シグナル増強作用を有するため、心疾患(例、うっ血性心筋症、肥大型閉塞性心筋症、肥大型非閉塞性心筋症、特発性心筋症、心筋梗塞、慢性心不全など)などの予防・治療薬として用いることができる。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などがあげられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

例えば、上記 (i) の場合における生細胞数が上記 (ii) の場合に比べて、約 20% 以上、好ましくは 30% 以上、より好ましくは約 50% 以上阻害する試験化合物を心筋細胞のアポトーシスを阻害する化合物として選択することができる。

- 5 本発明のスクリーニング方法で得られた化合物としては、2-(2-ピリジル)-4H-1,3-ベンゾチアジン-4-オン（化合物 1）などが挙げられる。

本発明のスクリーニング方法により得られる化合物またはその塩は、上記した試験化合物、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、
10 発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血漿などから選ばれた化合物であり、心筋細胞のアポトーシスを阻害する活性を有する化合物である。

該化合物の塩としては、酸（無機酸、有機酸）または塩基（無機塩基、有機塩基）との薬理学的に許容される塩などが挙げられる。

- 15 本発明のスクリーニング方法により得られる化合物またはその塩は、例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、得られる化合物またはその塩を生理学的に認められる担体、香味剤、
20 賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な用量が得られるようにするものである。

- 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えば、ゼ
25 ラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記タ

イブの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。

- 5 注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例えば、エタノールなど）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート 8
10 0TM、HCO-50 など）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などがあげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレング
15 リコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調製された注射液は、通常、適当なアンプルに充填される。

- このようにして得られる製剤は、安全で低毒性であるので、例えば、温血動物（例えば、ヒト、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、トリ、ヒツジ、ブ
20 タ、ウシ、ウマ、ネコ、イヌ、サル、など）に対して投与することができる。

- 得られる化合物またはその塩の投与量は、対象疾患、投与対象などにより差異はあるが、例えば、心筋梗塞の予防・治療剤として該化合物またはその塩を投与する場合、一般的に成人（60 kg として）においては、一日につき該化合物またはその塩を約 0.1 mg ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、
25 より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg 投与する。

以下に実施例によって本発明をさらに具体的に説明する。実施例は本発明の一例にすぎず、本発明はこれに限定されるものではない。

実施例1 本発明の方法により得られた心筋細胞と従来法により得られた心筋細胞の細胞数と純度の比較

実験は全てチャールスリバー社製のウイスターラットの新生仔（生後1日以内のもの）を使用して行った。ラット新生仔をエーテル麻酔し、70 %エタノールで消毒後、ピンセットで心臓を摘出した。摘出した心臓はリン酸緩衝生理食塩水（タカラ社製 T900）で洗浄後、手術用のハサミで細片化した。

従来法（五島喜興太、金子洋之、心臓・血管研究方法の開発（江橋節郎編）、3 頁、学会出版センター刊行（1983））ではこの組織片を直接トリプシンやコラゲナーゼなどの蛋白質分解酵素で消化した。一方、本発明の方法ではこれをリン酸緩衝生理食塩水で4～5回洗浄して大部分の血液由来の非心筋細胞を除去してから酵素消化を行った。血液由来の非心筋細胞の洗浄除去は、セルストレイナー（ファルコン社製）に心臓組織片を入れてリン酸緩衝生理食塩水で洗浄することで行った。酵素消化は、新生仔10匹分の組織片に対して5 mlの酵素液（1mlのPBS（-）に1.25 mgのトリプシン（ディフコ社製）と0.25 mgのコラゲナーゼ（シグマ社製）を溶解したもの）を加えて15分間処理した後、15分ごとに2.5 mlの酵素液を二回追加し、37℃に保ちながらスターラーで攪拌して行った。この過程で個々の細胞は組織片から分離された。反応終了後10 %牛胎仔血清（バイオウィカー社製）を含むMedium 199（ギブコ社製）を酵素液の1/2量添加して酵素反応を停止させ、これをセルストレイナーで濾過後、400 x gで5分間遠心分離して細胞を集めた。次に新生仔10匹分の細胞を50 mlの10 %牛胎仔血清を含むMedium 199に懸濁し、100 mmシャーレ（イワキ社製）に10 mlずつまいて5 % CO₂、37℃に設定したCO₂インキュベーター中で1時間培養した。浮遊状態の細胞を回収してセルストレイナーで濾過後、400 x gで5分間遠心分離して心筋細胞を集めた。

次に新生仔10匹分の心筋細胞を2 mlの低張液（8.29 g NH₄Cl, 1.0g KHCO₃, 37 mg EDTA/2Naを1リットルの水に溶かしたもの）に懸濁し、3分間放置して赤血球を破碎した。これに10 mlの10 %牛胎仔血清を含むMedium 199を加えてから、400 x gで5分間遠心分離して心筋細胞を集めた。これを10 %牛胎仔血清を含むMedium 199に懸濁してセルストレイナーで濾過した。従来法ではこの低

張溶血操作を行わなかった。

得られた細胞懸濁液の一部を取ってこれに 0.3 % のトリパンブルーを添加した後、軽く混合して心筋細胞数を血球計算板を用いて計数した。従来法ではラット新生仔 10 匹分の心臓から 7.8×10^6 個の心筋細胞が得られたが、心筋細胞の約 7 倍数の赤血球が混入していた。これに対して、本発明の方法では、ラット新生仔 10 匹分の心臓から赤血球をほとんど含まない心筋細胞が 1.4×10^7 個得られた。

従来法および本発明の方法で調製した細胞をそれぞれ 4×10^5 個/ml の濃度で 10 % 牛胎仔血清を含む Medium 199 に懸濁して 5 % CO_2 、37 °C に設定した CO_2 インキュベーター中で 24 時間培養後、接着している細胞を回収して心筋細胞の純度をフローサイトメトリー (FACScan、ベクトン・ディッキンソン社製) を用いて確かめた。 2×10^6 個の細胞をリン酸緩衝生理食塩水で 2 回洗浄後、70 % エタノールで固定した。この固定化細胞を Wash Buffer (0.2 % 牛胎仔血清、0.1 % NaN_3 を含むリン酸緩衝生理食塩水) で 2 回洗浄後、200 μl の Wash Buffer に懸濁し、マウス抗 α -アクチニン抗体 (シグマ社製) を添加して、4 °C で 30 分暗所で保温した。これを Wash Buffer で 2 回洗浄後、200 μl の Wash Buffer に懸濁し、FITC ラベル化抗マウス抗体 (ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリー社製) を添加して、4 °C で 30 分暗所で保温した。さらに、Wash Buffer で 2 回洗浄後、500 μl の Wash Buffer に懸濁し、これをフローサイトメトリーで分析した。その結果を図 1 に示す。心筋細胞の純度は従来法によるものが約 70 %、本方法によるものが約 90 % であった。

実施例 2 Leukemia Inhibitory Factor によるアポトーシス抑制作用の検出感度の比較

実施例 1 記載の本発明の心筋細胞調製方法により得られたラット新生仔心筋細胞を使用して、培養液より血清を除去して誘導したアポトーシスの、組換え体ヒト Leukemia Inhibitory Factor (hLIF; ペプロテック社製) による抑制を、MTT を発色基質として用いた従来法と、WST-8 又は MTT を発色基質として用いた本発明のアポトーシス検出方法とで検出し、その感度を比較した。

まず本発明の心筋細胞調製方法により得られた心筋細胞を 3×10^5 個/ml と

なるように 10 %牛胎仔血清を含む Medium 199 に懸濁し、96 穴プレートに 0.1 ml/well ずつまいて 5 % CO₂、37 °C に設定した CO₂ インキュベーター中で 1 日培養した。これをマイクロミキサー（大洋化学工業社製）で攪拌後、血清を含まない Medium 199 と 3 回交換して血清を除去し、0~1000 U/ml の hLIF を添加した。培養液をさらに 4 日間培養してアポトーシスを誘導した。従来法では、この培養液中の生細胞数を直接 MTT を発色基質として測定した。これに対して本発明の検出方法では牛胎仔血清を 10 % となるように添加し、5 % CO₂、37 °C に設定した CO₂ インキュベーター中でさらに約 17 時間培養した後、WST-8 又は MTT を発色基質として生細胞数を測定した。

- 図 2 に種々の濃度の hLIF の心筋細胞アポトーシス抑制活性を MTT を発色基質として用いた従来法と、WST-8 又は MTT を発色基質として用いた本発明のアポトーシス検出方法とで測定した結果を示す。従来法では hLIF による心筋細胞アポトーシス抑制傾向は見えるものの、1000 U/ml の hLIF を添加しても hLIF を添加していない対照群と比較して吸光度平均値の上昇が 0.03 以下と非常に小さかった。これは測定機器の検出限界以下であり、従来法を多検体対応型の探索に用いることはできない。これに対して、本発明のアポトーシス検出方法において MTT を発色基質として用いた場合は、hLIF を添加していない対照群の吸光度の平均値が 0.1 以上あり、これに 1000 U/ml の hLIF を添加することによって吸光度がさらに 0.1 近く上昇するため、従来法より遥かに高感度である。
- この方法を用いれば、検体自身の吸光度や濁度が問題にならない場合や、1000 U/ml の hLIF と同等以上の非常に強いアポトーシス抑制活性を示す検体の選択を目的とした探索は可能と考えられる。しかし実際の探索では、測定機器の検出感度、検体自身の吸光度や濁度に起因するノイズなどが問題となることが多いため、的確に活性を示す検体を選択するためには、0.1 以上の吸光度の上昇を選択基準としうることが望まれる。本発明のアポトーシス検出方法において、WST-8 を発色基質として使用した場合はさらに感度が高く、hLIF を添加していない対照群の吸光度の平均値は 0.2 以上あり、これに 1000 U/ml の hLIF を添加することによって吸光度の平均値は 0.3 以上上昇し、しかもノイズにも強いことがわかった。

以上のことから、本発明のアポトーシス検出方法を用いれば、1000 U/ml の hLIF と同等の心筋細胞アポトーシス抑制活性、gp130 介在性受容体作動活性あるいは心筋細胞保護シグナル増強活性を示す検体はもちろんのこと、適切な選択基準を設定することで、多検体の混合物であっても活性を検出することが可能であることがわかった。

実施例 3 多検体対応型測定の実施

96 穴プレートを用いて本発明の心筋細胞調製方法により得られた心筋細胞を培養し、培養液より血清を除去して誘導したアポトーシスを 1000 U/ml の hLIF を用いて抑制し、これを WST-8 を発色基質として検出する方法で、多検体
10 対応型の探索が可能か否かを検討した。

まず実施例 1 記述の方法で得られた心筋細胞を 3×10^5 個/ml となるように 10 % 牛胎仔血清を含む Medium 199 に懸濁し、3 枚の 96 穴プレートの 2~11 列に 0.1 ml/well ずつまいた。この際、1 列目と 12 列目は細胞を含まないブランクとした。これを 5 % CO_2 、37 °C に設定した CO_2 インキュベーター中で 1 日培養した後、マイクロミキサー（大洋化学工業社製）で攪拌し、血清を含まない
15 Medium 199 と 3 回交換して血清を除去した。次に各プレートの 2~6 列に 1000 U/ml の hLIF を添加した。これを 4 日間培養してアポトーシスを誘導した後、牛胎仔血清を 10 % となるように添加し、5 % CO_2 、37 °C に設定した CO_2 インキュベーター中でさらに 17 時間培養した後、WST-8 を発色基質として生細胞数を
20 測定した。

表 1 にその結果を示す。

プレート 1、2、3、の hLIF を含まない対照群の吸光度の平均値はそれぞれ 0.22 ± 0.039 、 0.15 ± 0.028 、 0.13 ± 0.020 で 1000 U/ml の hLIF を添加することによってそれぞれ 0.54 ± 0.055 、 0.45 ± 0.035 、 0.43 ± 0.059 まで上昇した。実際の
25 探索では、検体自身の吸光度や濁度に起因するノイズが問題となるため、的確に検体を選択するためには、0.1 以上の吸光度の上昇を選択基準とすることが望ましい。従って、この方法を用いれば、仮に吸光度を対照群よりも 0.15 以上上昇させる活性を選択基準として設定すれば、240 検体の中から 1000 U/ml の hLIF と同等の心筋細胞アポトーシス抑制活性、gp130 介在性受容体作動活性

あるいは心筋細胞保護シグナル増強活性を示す 120 検体を選別することが可能であることがわかった。

〔表 1〕

Plate. 1	hLIF 1000U/ml												hLIF OU/ml											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0.495	0.453	0.613	0.491	0.607	0.197	0.164	0.172	0.164	0.164	0.311												
B		0.563	0.437	0.556	0.503	0.538	0.210	0.171	0.180	0.171	0.180	0.192												
C		0.577	0.423	0.528	0.535	0.525	0.218	0.230	0.162	0.230	0.162	0.206												
D		0.547	0.440	0.532	0.529	0.514	0.193	0.184	0.163	0.184	0.163	0.182												
E		0.498	0.458	0.536	0.438	0.493	0.200	0.230	0.163	0.230	0.163	0.219												
F		0.472	0.436	0.628	0.500	0.564	0.180	0.224	0.187	0.224	0.187	0.173												
G		0.597	0.555	0.561	0.548	0.629	0.272	0.299	0.228	0.299	0.228	0.262												
H		0.684	0.633	0.684	0.612	0.644	0.367	0.267	0.261	0.267	0.261	0.239												

Plate. 2	1	hLIF 1000U/ml										hLIF OU/ml											
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0.424	0.447	0.548	0.531	0.490	0.166	0.115	0.131	0.124	0.124	0.197	0.480	0.469	0.475	0.467	0.405	0.137	0.125	0.114	0.088	0.124	0.124
B		0.482	0.491	0.373	0.500	0.432	0.194	0.120	0.129	0.149	0.149	0.114	0.459	0.457	0.436	0.415	0.367	0.152	0.108	0.110	0.151	0.118	0.118
C		0.406	0.476	0.436	0.457	0.458	0.182	0.140	0.149	0.156	0.156	0.195	0.446	0.461	0.455	0.391	0.461	0.151	0.157	0.122	0.113	0.180	0.180
D		0.416	0.406	0.422	0.403	0.486	0.202	0.155	0.145	0.145	0.141	0.215	0.460	0.420	0.390	0.401	0.560	0.235	0.220	0.185	0.161	0.190	0.190

Plate. 3	1	hLIF 1000U/ml										hLIF OU/ml											
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		0.353	0.345	0.403	0.369	0.405	0.124	0.126	0.131	0.167	0.127	0.453	0.299	0.362	0.321	0.363	0.116	0.102	0.105	0.100	0.109	0.109	0.109
B		0.453	0.299	0.362	0.321	0.363	0.116	0.102	0.105	0.100	0.109	0.395	0.364	0.382	0.387	0.341	0.102	0.120	0.102	0.147	0.104	0.104	0.104
C		0.395	0.364	0.382	0.387	0.341	0.102	0.120	0.102	0.147	0.104	0.419	0.356	0.421	0.377	0.374	0.118	0.124	0.114	0.107	0.117	0.117	0.117
D		0.419	0.356	0.421	0.377	0.374	0.118	0.124	0.114	0.107	0.117	0.488	0.419	0.386	0.369	0.494	0.162	0.124	0.129	0.162	0.116	0.116	0.116
E		0.488	0.419	0.386	0.369	0.494	0.162	0.124	0.129	0.162	0.116	0.451	0.435	0.485	0.580	0.584	0.137	0.139	0.161	0.161	0.133	0.133	0.133
F		0.451	0.435	0.485	0.580	0.584	0.137	0.139	0.161	0.161	0.133	0.459	0.433	0.484	0.594	0.552	0.146	0.189	0.129	0.161	0.165	0.165	0.165
G		0.459	0.433	0.484	0.594	0.552	0.146	0.189	0.129	0.161	0.165	0.489	0.428	0.565	0.577	0.606	0.149	0.165	0.141	0.165	0.175	0.175	0.175
H		0.489	0.428	0.565	0.577	0.606	0.149	0.165	0.141	0.165	0.175												

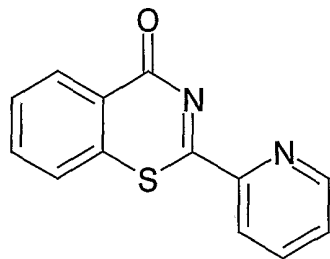
実施例4 Insulin Like Growth Factor-1 のアポトーシス抑制作用の検出

Insulin Like Growth Factor-1 (hIGF-1) は Akt を活性化することによって心筋細胞のアポトーシスを抑制することが知られている (Fujio Y. et al., Circulation 第101巻、660頁、2000年)。そこで、組換え体ヒト IGF-1 (hIGF-1; 5 ペプロテック社製) を用いて、培養液より血清を除去して誘導した心筋細胞のアポトーシスに対する抑制作用を、WST-8 を発色基質とする本発明のアポトーシス検出方法で測定した。

まず本発明の心筋細胞調製方法で得られた心筋細胞を 3×10^5 個/ml となるように 10 % 牛胎仔血清を含む Medium 199 に懸濁し、96 穴プレートに 0.1 ml/well 10 ずつまいて、5 % CO_2 、37 °C に設定した CO_2 インキュベーター中で 1 日培養した。これをマイクロミキサー (大洋化学工業社製) で攪拌後、血清を含まない Medium 199 と 3 回交換して血清を除去し、終濃度 0 ~ 100 nM になるように hIGF-1 を添加した。培養液をさらに 4 日間培養してアポトーシスを誘導した。これに牛胎仔血清を 10 % となるように添加し、5 % CO_2 、37 °C に設定した CO_2 インキュベーター中でさらに約 17 時間培養した後、WST-8 を発色基質として生細胞数を 15 測定した。

図3に種々の濃度の hIGF-1 の心筋細胞アポトーシス抑制活性を測定した結果を示す。このように、本方法を用いれば、gp130 シグナルと異なるメカニズムで心筋保護作用を示す化合物の探索も可能であることがわかった。

20 参考例1 2 - (2 - ピリジル) - 4 H - 1, 3 - ベンゾチアジン - 4 - オン (化合物1)



チオサリチル酸メチル (1.6 g, 9.51 mM) と 2 - シアノピリジン (1.0 g, 9.60 mM) とをトルエン (2 ml) に溶解し、これにトリエチルアミン (2 ml, 14.4 mM) を加え、8 時間加熱還流後、トルエンを留去した。25 残留物にエタノールを加え、析出物を濾取して粗結晶 (1.7 g) を得た。

これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：クロロホルム＝5：1→クロロホルム）で精製し、表題化合物を結晶として得た（1.0 g, 43.4%）。

元素分析値 $C_{13}H_8N_2OS$ として

5 計算値 (%) C : 64.98, H : 3.36, N : 11.66

実測値 (%) C : 64.93, H : 3.31, N : 11.59

1H -NMR ($CDCl_3$) δ : 7.50–7.75 (m, 4H), 7.85–8.00 (m, 1H), 8.50–8.60 (m, 2H), 8.70–8.80 (m, 1H).

10 IR (KBr) : 1660 cm^{-1}

融点 : 173.5–174.3°C

実施例 5

化合物 1 (100 mg)、ラクトース (165 mg)、コーンスターチ (25 mg)、ポリビニールアルコール (4 mg) およびステアリン酸マグネシウム (1 mg) を用いて、常法により錠剤を製造する。

産業上の利用可能性

本発明の心筋細胞調製方法により高純度、簡便かつ大量に心筋細胞を簡便かつ大量に調製することができる。また、本発明のアポトーシス検出方法により、

20 心筋細胞のアポトーシスを、効率よく高感度に検出することができる。

さらに、本発明のスクリーニング方法により、心筋細胞のアポトーシスを阻害する化合物またはその塩を効率よく高感度にスクリーニングすることができ、多数の検体の中から迅速かつ効率よく選別する多検体に対応することができ、心筋細胞アポトーシス抑制作用を有する化合物、gp130 介在性受容体作動活性

25 を有する化合物、あるいは心筋細胞保護シグナル増強作用を有する化合物を得ることができる。かかる化合物は心疾患の予防・治療薬として有用である。

請求の範囲

1. 細片化した心臓組織から非心筋細胞を除去した後、該心臓組織を蛋白質分解酵素で消化することを特徴とする初代心筋細胞の調製法。
- 5 2. 細片化した心臓組織をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄することにより非心筋細胞を除去することを特徴とする請求項1記載の調製法。
3. 細片化した心臓組織を蛋白質分解酵素で消化した後に、赤血球を除去することを特徴とする初代心筋細胞の調製法。
4. 溶血処理を行うことにより赤血球を除去することを特徴とする請求項3記載の調製法。
- 10 5. 心臓組織より単離した心筋細胞を溶血処理することを特徴とする初代心筋細胞の調製法。
6. 細片化した心臓組織から非心筋細胞を除去した後、該心臓組織を蛋白質分解酵素で消化し、赤血球を除去することを特徴とする初代心筋細胞の調製法。
- 15 7. 細片化した心臓組織をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄することにより非心筋細胞を除去し、蛋白質分解酵素で消化した心臓組織を溶血処理に付すことにより赤血球を除去することを特徴とする請求項6記載の調製法。
8. 無血清培地で培養することによりアポトーシスの誘導された心筋細胞の培養液に血清を添加した後、培養し、生存心筋細胞数を測定することを特徴とする心筋細胞アポトーシスの検出方法。
- 20 9. 生存心筋細胞数が細胞内脱水素酵素活性を測定することにより測定される請求項8記載の検出方法。
10. 血清添加後の培養時間が約6～30時間である請求項8記載の検出方法。
11. 細胞内脱水素酵素活性をMTTまたはWST-8を用いて測定することを特徴とする請求項9記載の検出方法。
- 25 12. 請求項1～7のいずれかに記載の調製法により得られた初代心筋細胞を無血清培地で培養することを特徴とする請求項8記載の検出方法。
13. (i) 試験化合物存在下でアポトーシスを誘導させた場合と、(ii) 試験化合物非存在下でアポトーシスを誘導させた場合との生細胞数を請求項12記

載の検出方法により比較することを特徴とする、アポトーシスを阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法。

14. 請求項13記載のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を含有する心筋細胞アポトーシス抑制薬。

5 15. 請求項13記載のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を含有するg p 1 3 0介在受容体作動薬。

16. 請求項13記載のスクリーニング方法を用いて得られる化合物またはその塩を含有する心筋細胞保護シグナル増強薬。

10 17. 心疾患予防・治療薬である、請求項14記載の心筋細胞アポトーシス抑制薬、請求項15記載のg p 1 3 0介在受容体作動薬または請求項16記載の心筋細胞保護シグナル増強薬。

15 18. 哺乳動物に対して、請求項14記載の心筋細胞アポトーシス抑制薬、請求項15記載のg p 1 3 0介在受容体作動薬または請求項16記載の心筋細胞保護シグナル増強薬の有効量を投与することを特徴とする心疾患の予防・治療方法。

19. 心疾患予防・治療剤を製造するための請求項14記載の心筋細胞アポトーシス抑制薬、請求項15記載のg p 1 3 0介在受容体作動薬または請求項16記載の心筋細胞保護シグナル増強薬の使用。

図 1

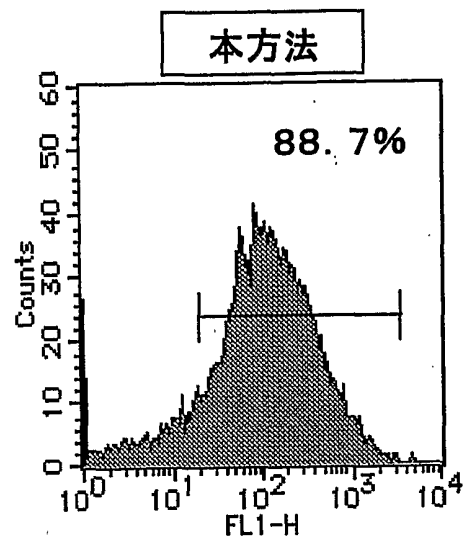
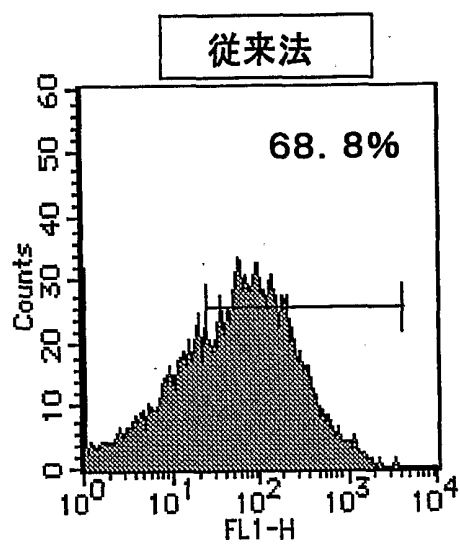
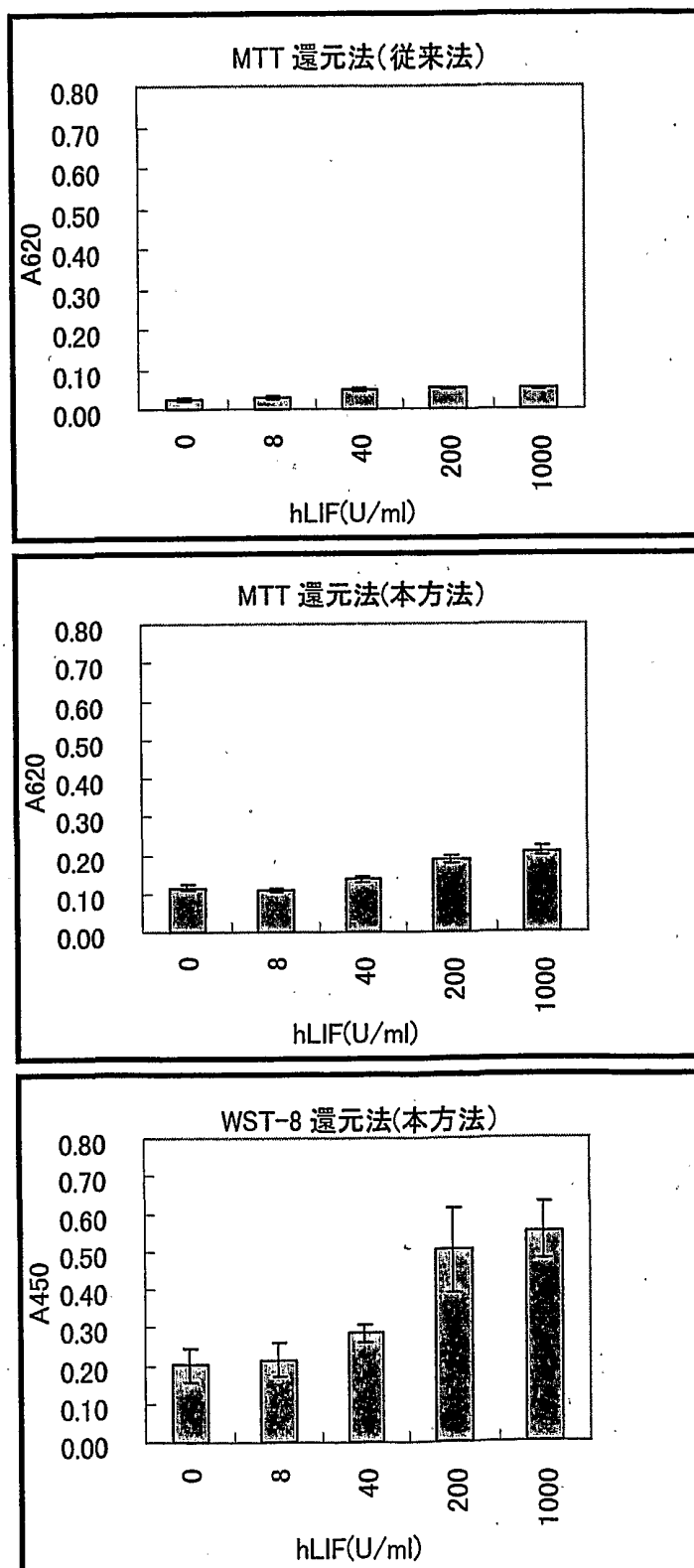
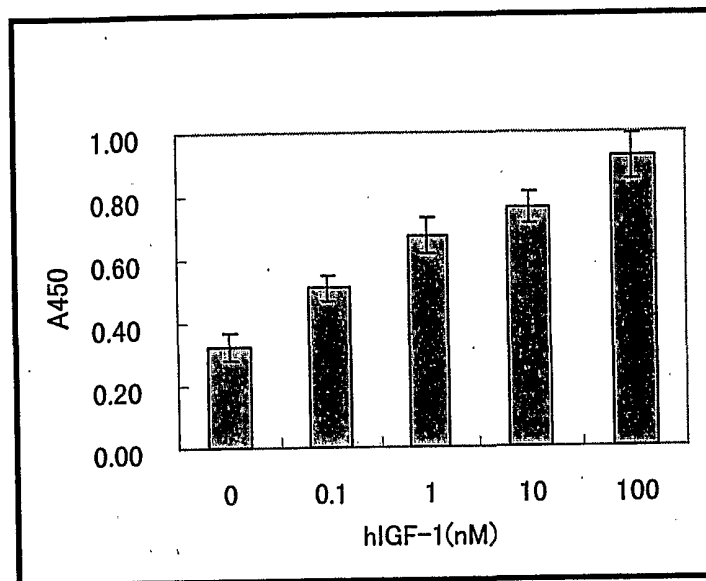


図 2



3/3

図 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05520

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N5/06, C12Q1/02, A61K31/5415, A61P9/00

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)

Int.Cl⁷ C12N5/06, C12Q1/02, A61K31/5415, A61P9/00

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)

WPIDS/BIOSIS/MEDLINE/CA (STN)

REGISTRY/CAOLD (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	Goshima K. et al., "Arrhythmic movement of myocardial cells in culture and their improvement with antiarrhythmic drugs", Journal of Molecular and Cellular Cardiology, (1976), Vol.8, No.3, pages 217 to 238	1, 2 3-7 8-17, 19
Y A	Fukushima Y. et al., "A rapid method for starting a culture for the establishment of Epstein-Barr virus-transformed human lymphoblastoid cell lines", Japanese Journal of Human Genetics, (1992), Vol.37, No.2, pages 149 to 150	3-7 1, 2, 8-17, 19
Y A	Taniguchi J. et al., "Spontaneously active cells isolated from the Sino-atrial and Atrio-ventricular Nodes of the rabbit heart", Japanese Journal of Physiology, (1981), Vol.31, No.4, pages 547 to 558	3-7 1, 2, 8-17, 19
A	Zhao Y. et al., "Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes", The Journal of Biological Chemistry, (1998), Vol.273, No.17, pages 10261 to 10269	1-17, 19

☐ 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 document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
27 September, 2001 (27.09.01)Date of mailing of the international search report
09 October, 2001 (09.10.01)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05520

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 18
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

It pertains to methods for treatment of the human body by surgery or therapy as well as diagnostic methods.
2. ☒ Claims Nos.: 14-17,19
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Concerning the "heart muscle cell apoptosis inhibitors, gp130-mediated receptor agonists, heart muscle cell-protective signal enhancers", the description discloses no compound but 2-(2-pyridyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-one. Therefore, it is unknown what compounds are involved in the scope thereof except 2-(2-pyridyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-one. Thus, the inventions as set forth in the above claims other than those containing 2-(2-pyridyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-one are not clear to such an extent as allowing any meaningful international search. Therefore, the international search has been practiced on those containing 2-(2-pyridyl)-4H-1,3-benzothiazin-4-one.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))		
Int. Cl ⁷ C12N5/06, C12Q1/02, A61K31/5415, A61P9/00		
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 ⁷ C12N5/06, C12Q1/02, A61K31/5415, 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		
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)		
WPIDS/BIOSIS/MEDLINE/CA (STN) REGISTRY/CAOLD (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> <u>Y</u> A	Goshima K. et al., Arrhythmic movement of myocardial cells in culture and their improvement with antiarrhythmic drugs, Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 1976, Vol.8, No. 3, p. 217-238	<u>1, 2</u> <u>3-7</u> 8-17, 19
<u>Y</u> A	Fukushima Y. et al., A rapid method for starting a culture for the establishment of Epstein-Barr virus-transformed human lymphoblastoid cell lines, Japanese Journal of Human Genetics, 1992, Vol. 37, No. 2, p. 149-150	<u>3-7</u> 1, 2, 8-17, 19
☒ C欄の続きにも文献が列举されている。 ☐ 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	27. 09. 01	国際調査報告の発送日
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) 深草 亜子
		4 B 9 5 4 8 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 請求の範囲の番号
<u>Y</u> A	Taniguchi J. et al., Spontaneously active cells isolated from the Sino-atrial and Atrio-ventricular Nodes of the rabbit heart, Japanese Journal of Physiology, 1981, Vol.31, No.4, p.547-558	<u>3-7</u> 1, 2, 8-17, 19
A	Zhao Y. et al., Neuregulins promote survival and growth of cardiac myocytes, the Journal of Biological Chemistry, 1998, Vol.273, No.17, p.10261-10269	1-17, 19

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 18 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

人の身体の手術又は治療による処置及び診断方法に係るものである。

2. ☒ 請求の範囲 14-17, 19 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
心筋細胞のアポトーシス抑制薬、gp130介在受容体作動薬、心筋細胞保護シグナル増強薬については、明細書中に記載されている2-(2-ピリジル)-4H-1,3-ベンゾチアジン-4-オン以外に、どのような化合物が包含されるかに関する記載がない。したがって、2-(2-ピリジル)-4H-1,3-ベンゾチアジン-4-オン以外に (特別ページに続く)

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第 I 欄 2. の続き

どのような化合物が包含されるかは全く不明であり、上記請求の範囲に記載された発明は、2-(2-ピリジル)-4H-1,3-ベンゾチアジン-4-オンを含有するもの以外は、有意義な国際調査をすることができる程度に明確でない。2-(2-ピリジル)-4H-1,3-ベンゾチアジン-4-オンを含有するものについてのみ、国際調査を行った。