

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2014 年 3 月 20 日(20.03.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/042290 A1

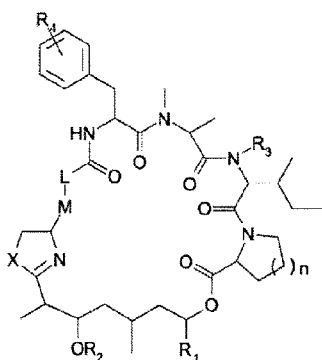
- (51) 国際特許分類:
A61K 38/00 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
A61P 9/04 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/077279
- (22) 国際出願日: 2013 年 10 月 7 日(07.10.2013)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2012-193433 2012 年 9 月 3 日(03.09.2012) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 中尾 洋一(NAKAO, Yoichi); 〒1698050 東京都新宿区戸塚町 1 丁目 1 0 4 番地 学校法人早稲田大学内 Tokyo (JP). 前島 寛(MAEJIMA, Hiroshi); 〒1698050 東京都新宿区戸塚町 1 丁目 1 0 4 番地 学校法人早稲田大学内 Tokyo (JP). 土

- 井 隆行(DOI, Takayuki); 〒9808577 宮城県仙台市青葉区片平二丁目 1 番 1 号 国立大学法人東北大学内 Miyagi (JP). 山下 潤(YAMASHITA, Jun); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 魚崎英毅(UOSAKI, Hideki); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 福島 弘之(FUKUSHIMA, Hiroyuki); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋 3 丁目 4 番 1 0 号 アクロポリス 2 1 ビル 6 階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,

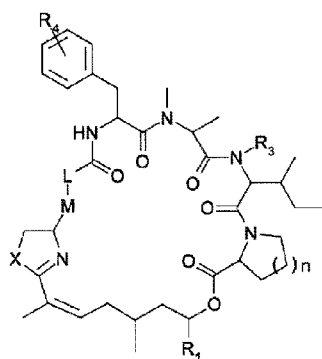
[続葉有]

(54) Title: NOVEL USE METHOD FOR CYCLIC DEPSIPEPTIDE

(54) 発明の名称: 環状デプシペプチドの新規使用方法



(I)



(II)

(57) Abstract: A pharmaceutical composition containing at least one compound selected from the group consisting of a cyclic depsipeptide represented by formula (I) or (II), medically acceptable salts of same, solvates of same and prodrugs of same, and a manufacturing method for cardiomyocytes, said method including a step for bringing the above-mentioned compound into contact with cardiac progenitor cells. (In the formulas: R₁ and R₃ are each independently H or a C1-C6 alkyl group; R₂ is a substituent group selected from the group consisting of H, a C1-C6 alkyl group, a trimethylsilyl group and a triethylsilyl group; R₄ is a substituent group selected from the group consisting of H, OH, a C1-C6 alkoxy group, F, Cl, Br and I; L-M has a structure selected from the group consisting of CH=C(Me), CH=CH, CH₂-CH₂ and CH₂-CH(Me); X is O or S; and n is 1 or 2.)

(57) 要約: 式 (I) または (II) で表される環状デプシペプチド並びにそれらの薬学上許容される塩、溶媒和物及びプロドラッグからなる群より選択される 1 以上の化合物を含有する医薬組成物、および当該化合物を心筋前駆細胞へ接触させる工程を含む心筋細胞の製造方法。(式中、R₁ および R₃ はそれぞれ H または C1-C6 アルキル基であり、R₂ は H、C1-C6 アルキル基、トリメチルシリル基およびトリエチルシリル基からなる群から選択される置換基であり、R₄ は H、OH、C1-C6 アルコキシ基、F、Cl、Br および I からなる群から選択される置換基であり、L-M は CH=C(Me)、CH=CH、CH₂-CH₂ および CH₂-CH(Me) からなる群から選択される構造を有し、X は、O または S であり、n は、1 または 2 である)



LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, 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.

FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 国際出願日が優先期間の満了の日から二箇月以内 (規則 26 の 2.3)

明 細 書

発明の名称：環状デプシペプチドの新規使用方法

技術分野

[0001] 本発明は、環状デプシペプチドを含有する医薬組成物ならびに環状デプシペプチドを用いて心筋細胞および/または心筋前駆細胞を効率よく分化増殖させるための方法に関する。

背景技術

[0002] 成体の心筋細胞は分裂能を失っていることから、心筋梗塞、心筋炎または老化等により心筋が損傷された場合、修復をすることが困難と考えられていた。しかし、Beltramiらにより、心筋細胞の中にも梗塞後に再生能を獲得する細胞があることが確認された（非特許文献1）。さらに、Laugwitzらが、出生後の個体の心臓に心筋前駆細胞の存在を明らかとした（非特許文献2）。しかしながら、心筋梗塞後の心機能の低下を鑑みると、成体内に存在する心筋前駆細胞の通常の分化再生能のみでは、心機能を回復するには十分でないと考えられる。そこで、心筋細胞を増殖させる化合物なども報告されている（特許文献1）。

[0003] 近年、胚性幹細胞（ES細胞）や人工多能性幹細胞（iPS細胞）などの多能性幹細胞から心筋細胞の発生段階を模倣して製造した心筋前駆細胞（特許文献2）を分化増殖させる試薬が報告されている（特許文献3）。

[0004] アプラトキシンA は、2001年にLueschらによって、シアノバクテリアより単離され、構造決定された25員環デプシペプチドであり（非特許文献3）、抗腫瘍活性を有することが知られているが、心筋分化増殖制御に関する機能については知られていない。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：W02007/048352

特許文献2：W02009/118928

特許文献3 : W02012/067266

非特許文献

[0006] 非特許文献1 : Beltrami AP, et al. N Engl J Med. 344:1750, 2001

非特許文献2 : Laugwitz KL, et al. Nature. 433:647, 2005

非特許文献3 : Luesch H, et al. J. Am. Chem. Soc. 123, 5418, 2001

発明の概要

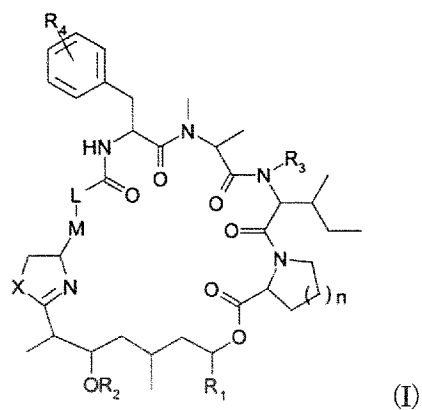
[0007] 本発明は心筋細胞および/または心筋前駆細胞を効率よく分化増殖させるための化合物を提供することである。

[0008] 本発明者らはマウスES細胞から分化誘導した心筋細胞および/または心筋前駆細胞の分化増殖を促進させる薬剤をスクリーニングしたところ、複数の環状デプシペプチドにより該細胞の分化増殖が促進されることが明らかとなった。本発明はこのような知見に基づき完成するに至ったものである。

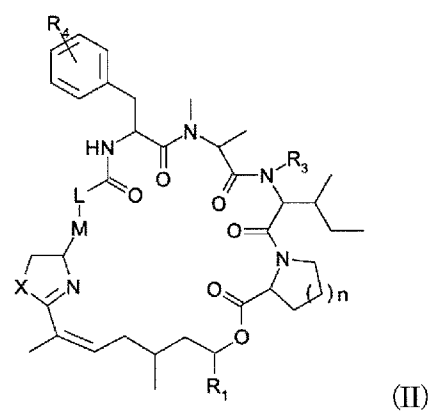
[0009] すなわち、本発明は以下の特徴を有する。

[1] 以下の式 (I) または式 (II) (式中、 R_1 および R_3 はそれぞれHまたはC1-C6アルキル基であり、 R_2 はH、C1-C6アルキル基、トリメチルシリル基およびトリエチルシリル基からなる群から選択される置換基であり、 R_4 はH、OH、C1-C6アルコキシ基、F、Cl、BrおよびIからなる群から選択される置換基であり、L-MはCH=C(Me)、CH=CH、CH₂-CH₂およびCH₂-CH(Me)からなる群から選択される構造を有し、Xは、OまたはSであり、nは、1または2である) で表される環状デプシペプチドまたはその薬学上許容される塩、溶媒和物もしくはプロドラッグを有効成分として含有する医薬組成物。

[化1]



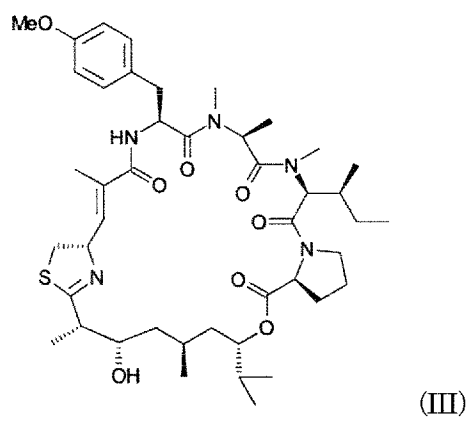
[化2]



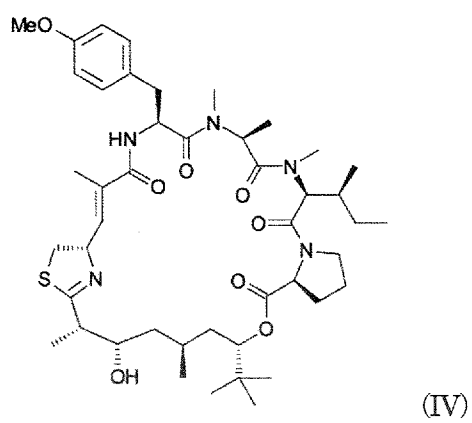
[2] R_1 がイソプロピル基またはt-ブチル基であり、 R_2 がHであり、 R_3 がメチル基であり、 R_4 がメトキシ基であり、L-MがCH=C(Me)であり、XがOまたはSであり、nが1である、[1]に記載の医薬組成物。

[3] 環状デプシペプチドが、次の式 (III) から式 (VIII) で表される化合物から成る群より選択される、[1]に記載の医薬組成物；

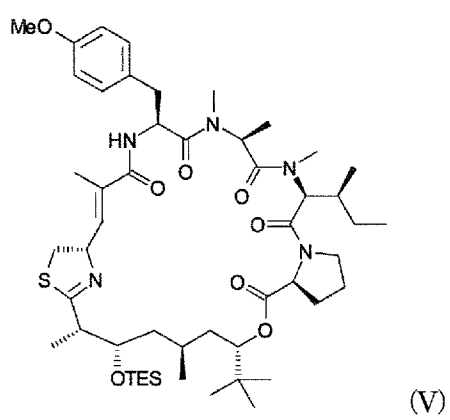
[化3]



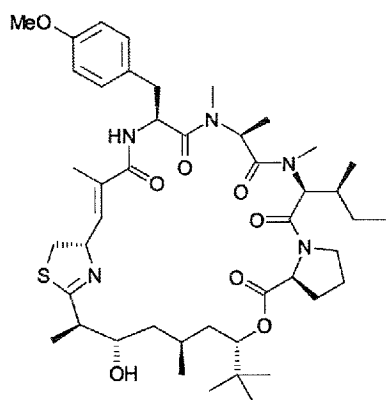
[化4]



[化5]

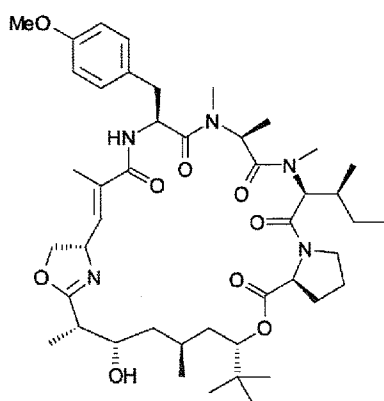


[化6]



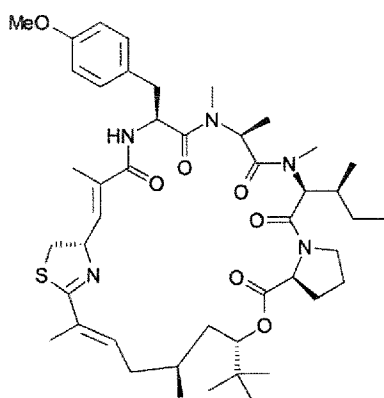
(VI)

[化7]



(VII)

[化8]



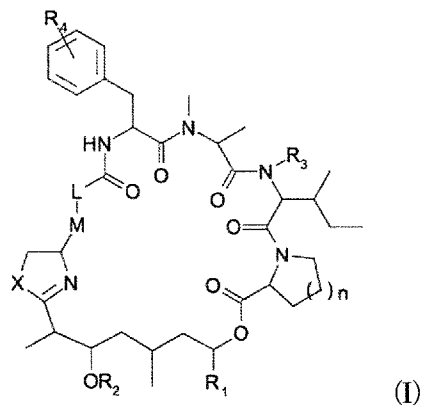
(VIII)

[4] 心不全、虚血性心疾患または心筋症から選択される心疾患の治療に用いられる[1]～[3]のいずれかに記載の医薬組成物。

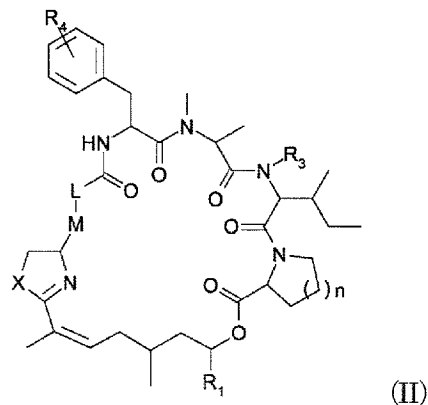
[5] 以下の式 (I) または式 (II) (式中、R₁およびR₃はそれぞれHまたはC1-

C6アルキル基であり、 R_2 はH、C1-C6アルキル基、トリメチルシリル基およびトリエチルシリル基からなる群から選択される置換基であり、 R_4 はH、OH、C1-C6アルコキシ基、F、Cl、BrおよびIからなる群から選択される置換基であり、L-Mは $\text{CH}=\text{C}(\text{Me})$ 、 $\text{CH}=\text{CH}$ 、 CH_2-CH_2 および $\text{CH}_2-\text{CH}(\text{Me})$ からなる群から選択される構造を有し、Xは、OまたはSであり、nは、1または2である) で表される環状デプシペプチドを心筋前駆細胞へ添加する工程を含む、心筋細胞の製造方法。

[化9]



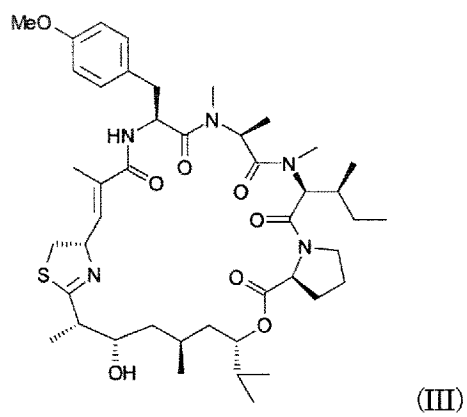
[化10]



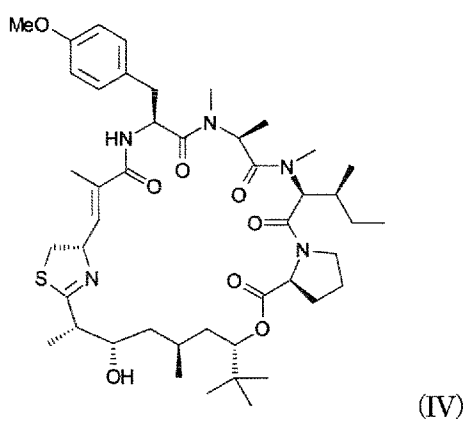
[6] R_1 がイソプロピル基またはt-ブチル基であり、 R_2 がHであり、 R_3 がメチル基であり、 R_4 がメトキシ基であり、L-Mが $\text{CH}=\text{C}(\text{Me})$ であり、XがOまたはSであり、nが1である、[5]に記載の方法。

[7] 環状デプシペプチドが、次の式(III)から式(VIII)で表される化合物から成る群より選択される、[5]に記載の方法。

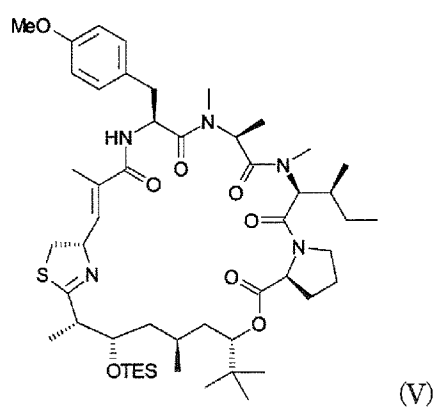
[化11]



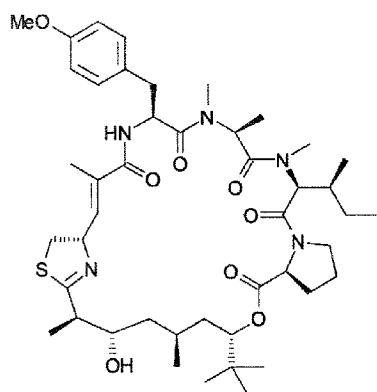
[化12]



[化13]

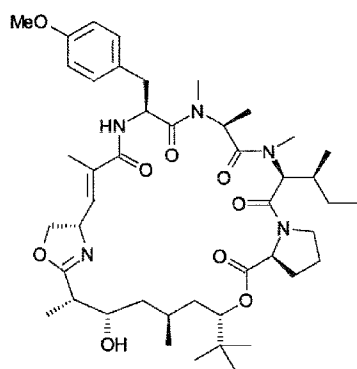


[化14]



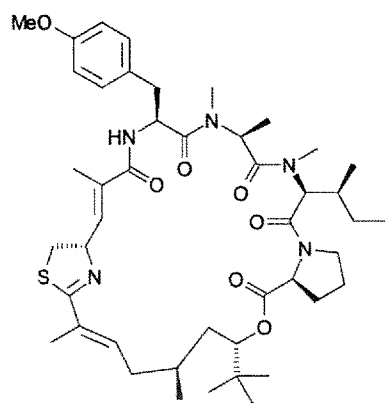
(VI)

[化15]



(VII)

[化16]



(VIII)

[8] 前記心筋前駆細胞が、side population細胞（SP細胞）を含む生体内の心筋前駆細胞、または多能性幹細胞から誘導された心筋前駆細胞である、[5]～[7]のいずれかに記載の方法。

[9] 前記多能性幹細胞から誘導された心筋前駆細胞が、Flk1（KDR）陽性の細

胞である、[8]に記載の方法。

[0010] 心筋前駆細胞に、上記式 (I) または式 (II) で表される化合物を接触させると、心筋細胞の誘導効率を顕著に向上させることができるので、これらの化合物は、心筋前駆細胞または心筋細胞の分化増殖のために特に有用であり、心筋梗塞等の心疾患の治療に用いられる医薬組成物へ含有される。または、心筋前駆細胞を当該化合物と接触させることで、心筋細胞を効率良く得るために特に有用である。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]各濃度の21-2およびAPT-1による心筋前駆細胞 (Flk1陽性細胞) から心筋細胞 (α MHC陽性細胞) への分化誘導率を示す。図中、コントロールは無添加群の陰性対照であり、シクロスポリンAは陽性対照である。

[図2]各濃度のAPT-7、APT-8、APT-9およびAPT-10による心筋前駆細胞 (Flk1陽性細胞) から心筋細胞 (α MHC陽性細胞) への分化誘導率を示す。図中、コントロールは無添加群の陰性対照であり、シクロスポリンAは陽性対照である。

[図3]Aに、Side Population (SP) 細胞から心筋細胞への誘導プロトコールを示す。Bに、21-2を添加したDay21の心筋細胞のDAPIおよび抗心筋トロポニン抗体を用いた免疫染色像 (写真) を示す。

発明を実施するための形態

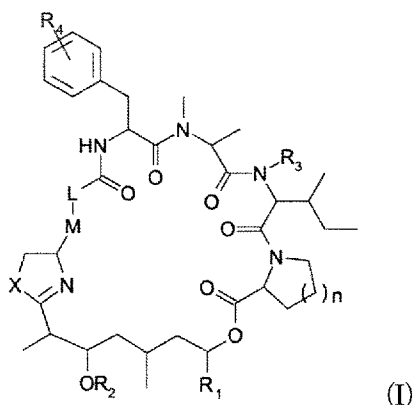
[0012] 本発明は、上記の式 (I) 式または式 (II) で表される環状デプシペプチドまたはその塩を有効成分として含有する医薬組成物を提供する。さらに、当該環状デプシペプチドは、心筋前駆細胞と接触させることにより、心筋細胞を効率良く入手できることから、当該化合物と心筋前駆細胞を接触させる工程を含む心筋細胞の製造方法を提供する。

[0013] 本発明において、デプシペプチドとは、一つ以上のエステル結合を有するペプチドであり、環状デプシペプチドとは、少なくとも1つの環構造を有するデプシペプチドである。

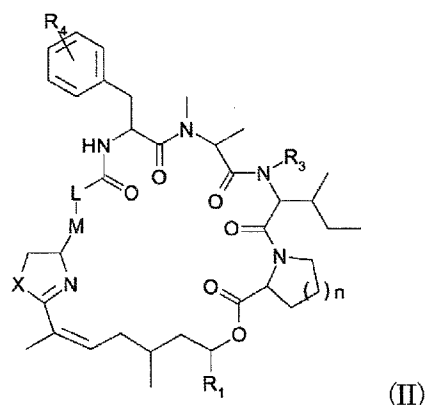
[0014] 本発明において好ましい環状デプシペプチドは、式 (I) または式 (II) で

表される化合物、またはその薬学上許容される塩、溶媒和物若しくはプロドラッグである。

[化17]



[化18]



(式中、 R_1 および R_3 がそれぞれH（水素原子）またはC1-C6アルキル基であり、 R_2 はH、C1-C6アルキル基、トリメチルシリル（TMS）基およびトリエチルシリル（TES）基からなる群から選択される置換基であり、 R_4 はH、OH、C1-C6アルコキシ基、F、Cl、BrおよびIからなる群から選択される置換基であり、L-MはC(Me)=CH、CH=CH、CH₂-CH₂およびCH(Me)-CH₂からなる群から選択される構造を有し、Xは、O（酸素原子）またはS（硫黄原子）であり、nは、1または2である。）

[0015] 本発明において、「C1-C6アルキル基」は、直鎖状、分枝状もしくは環状のアルキル基を意味し、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、シクロプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、

tert-ブチル基、シクロブチル基、n-ペンチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基、tert-ペンチル基、シクロペンチル基、n-ヘキシル基、2,2-ジメチルブチル基、3,3-ジメチルブチル基、2-エチルブチル基、およびシクロヘキシル基が挙げられる。

本発明において、「C1-C6アルコキシ基」は、直鎖状、分枝状もしくは環状のアルコキシ基を意味し、例えば、メトキシ基、エトキシ基、n-プロポキシ基、イソプロポキシ基、シクロプロピルオキシ基、1-エチルプロポキシ基、2,2-ジメチルプロポキシ基、n-ブトキシ基、イソブチルオキシ基、tert-ブトキシ基、n-ペンチルオキシ基、シクロペンチルオキシ基、n-ヘキシルオキシ基、およびシクロヘキシルオキシ基等が挙げられる。

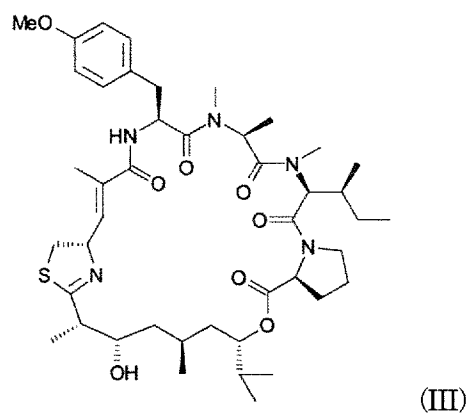
[0016] 好ましくは、環状デプシペプチドは、表1に記載された置換基を有する式(III)から式(VIII)に記載された化合物である。

[0017] [表1]

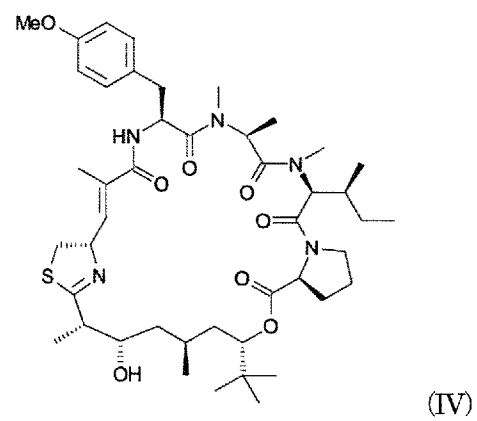
表1

化合物名	構造式	基本骨格	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	L-M	X	n
21-2	III	(I)	イソプロピル基	H	メチル基	メトキシ基	C(Me)=CH	S	1
APT-1	IV	(I)	tert-ブチル基	H	メチル基	メトキシ基	C(Me)=CH	S	1
APT-7	V	(I)	tert-ブチル基	トリエチルシリル基	メチル基	メトキシ基	C(Me)=CH	S	1
APT-8	VI	(I)	tert-ブチル基	H	メチル基	メトキシ基	C(Me)=CH	S	1
APT-9	VII	(I)	tert-ブチル基	H	メチル基	メトキシ基	C(Me)=CH	O	1
APT-10	VIII	(II)	tert-ブチル基	・	メチル基	メトキシ基	C(Me)=CH	S	1

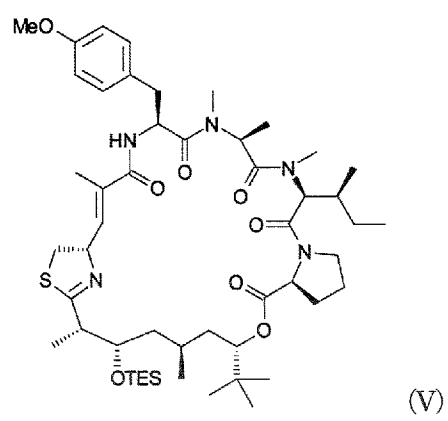
[化19]



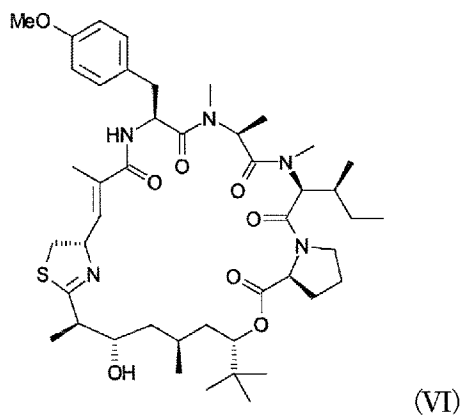
[化20]



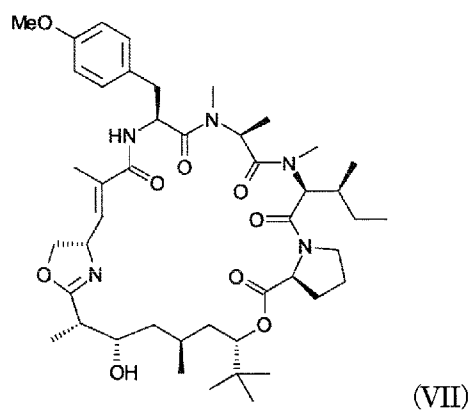
[化21]



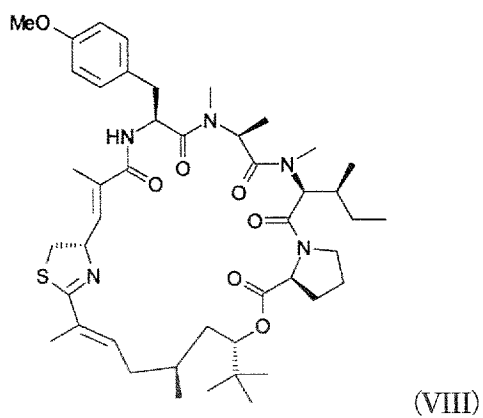
[化22]



[化23]



[化24]



[0018] 本発明において、前記環状デプシペプチドは光学異性体、又はラセミ体を含む。本発明において、環状デプシペプチドの薬学上許容される塩としては、例えば、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩、硝酸塩等の無機酸塩

、ギ酸塩、酢酸塩、プロピオン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、コハク酸塩、乳酸塩、リンゴ酸塩、酒石酸塩、クエン酸塩、アスコルビン酸塩、マロン酸塩、シュウ酸塩、グリコール酸塩、フタル酸塩、ベンゼンスルホン酸塩等の有機酸との塩、または、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩、バリウム塩等のアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩；アンモニウム塩；トリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、2,6-ルチジン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、N,N-ジエチルアミン、シクロヘキシルアミン、N,N'-ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン、N,N-ジメチルアミノピリジン（DMAP）、1,4-ジアザビスクロ〔2.2.2〕オクタン（DABCO）、1,5-ジアザビスクロ〔4.3.0〕ノネン-5（DBN）、1,8-ジアザビスクロ〔5.4.0〕ウンデ-7-セン（DBU）等の有機塩基との塩；アルギニン、リジン、オルニチン等の塩基性アミノ酸との塩、または、アスパラギン酸、グルタミン酸等の酸性アミノ酸との塩等が挙げられる。また、これらの塩を組合せて用いることもできる。

[0019] 環状デプシペプチドのプロドラッグとは、生体内で加水分解されて環状デプシペプチドに変換される化合物をいい、例えば、アミノ基をアルカノイル基（アシル基）に置換した誘導体（すなわちアミド化した誘導体）、ヘミアミナルエーテル誘導体、アルコキシカルボニルオキシメチル基に置換した誘導体、N-オキシド誘導体等が挙げられる。

[0020] 本発明において、環状デプシペプチドは、Doi T, et al. Chem. Asian J. 6, 180, 2011、Doi T, et al. Org. Lett., 8, 531, 2006、Numajiri Y, et al. Chem Asian J, 4, 111, 2009、Zou B, et al. Org Lett, 5, 3503, 2003 およびQi-Yin Chen, et al. ACS Med. Chem. Lett., 2, 861-865, 2011に記載の方法及びそれに準じた方法によって合成することができる。または、Henrik L, et al. J. Am. Chem. Soc. 123, 5418, 2001に記載されたようにシアノバクテリアを凍結乾燥し、有機溶媒への溶解層より抽出することができる。

- [0021] 本発明はまた、環状デプシペプチドを含有する医薬組成物を提供する。本発明において対象となる疾患は、心疾患であり、例えば、心不全、虚血性心疾患または心筋症等が上げられる。
- [0022] 本発明の環状デプシペプチドはそのまま単独で、または薬理学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤等と混合し、適当な剤型の医薬組成物として経口的又は非経口的に投与することができる。
- [0023] 経口投与のための組成物としては、固体または液体の剤形、具体的には錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、丸剤、顆粒剤、散剤、カプセル剤（ソフトカプセル剤を含む）、シロップ剤、乳剤、懸濁剤等が挙げられる。一方、非経口投与のための組成物としては、例えば、注射剤、坐剤等が用いられ、注射剤は静脈注射剤、皮下注射剤、皮内注射剤、筋肉注射剤、点滴注射剤等の剤形を包含しても良い。これらの製剤は、賦形剤（例えば、乳糖、白糖、葡萄糖、マンニトール、ソルビトールのような糖誘導体；トウモロコシデンプン、バレイショデンプン、 α 澱粉、デキストリンのような澱粉誘導体；結晶セルロースのようなセルロース誘導体；アラビアゴム；デキストラン；プルランのような有機系賦形剤；及び、軽質無水珪酸、合成珪酸アルミニウム、珪酸カルシウム、メタ珪酸アルミン酸マグネシウムのような珪酸塩誘導体；燐酸水素カルシウムのような燐酸塩；炭酸カルシウムのような炭酸塩；硫酸カルシウムのような硫酸塩等の無機系賦形剤である）、滑沢剤（例えば、ステアリン酸、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウムのようなステアリン酸金属塩；タルク；コロイドシリカ；ビーズワックス、ゲイ蠟のようなワックス類；硼酸；アジピン酸；硫酸ナトリウムのような硫酸塩；グリコール；フマル酸；安息香酸ナトリウム；DLロイシン；ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸マグネシウムのようなラウリル硫酸塩；無水珪酸、珪酸水和物のような珪酸類；及び、上記澱粉誘導体である）、結合剤（例えば、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、及び、前記賦形剤と同様の化合物である）、崩壊剤（例えば、低置換度ヒドロキシプロピルセ

ルコース、カルボキシメチルセルコース、カルボキシメチルセルコースカルシウム、内部架橋カルボキシメチルセルコースナトリウムのようなセルコース誘導体；カルボキシメチルスターチ、カルボキシメチルスターチナトリウム、架橋ポリビニルピロリドンのような化学修飾されたデンプン・セルコース類である）、乳化剤（例えば、ベントナイト、ビーガムのようなコロイド性粘土；水酸化マグネシウム、水酸化アルミニウムのような金属水酸化物；ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸カルシウムのような陰イオン界面活性剤；塩化ベンザルコニウムのような陽イオン界面活性剤；及び、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステルのような非イオン界面活性剤である）、安定剤（メチルパラベン、プロピルパラベンのようなパラオキシ安息香酸エステル類；クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェニルエチルアルコールのようなアルコール類；塩化ベンザルコニウム；フェノール、クレゾールのようなフェノール類；チメロサル；デヒドロ酢酸；及び、ソルビン酸である）、矯味矯臭剤（例えば、通常使用される、甘味料、酸味料、香料等である）、希釈剤等の添加剤を用いて周知の方法で製造される。

[0024] 本発明における環状デブシペプチドの投与量は、患者の症状、年齢、体重等の種々の条件により変化し得る。

[0025] その投与量は症状、年齢等により異なるが、経口投与の場合には、1回当たり下限0.1mg（好適には0.5mg）、上限1000mg（好適には500mg）を、非経口的投与の場合には、1回当たり下限0.01mg（好適には0.05mg）、上限100mg（好適には50mg）を、成人に対して1日当たり1乃至6回投与することができる。症状に応じて増量もしくは減量してもよい。

[0026] 本発明は、また、環状デブシペプチドを心筋前駆細胞へ添加する工程を含む、心筋細胞の製造方法を提供する。当該工程は、*in vitro*であっても*in vivo*であっても良いが、好ましくは環状デブシペプチドを単離された心筋前駆細胞へ添加する、*in vitro*の方法である。

ここで、心筋細胞とは、自己拍動の特性を有する心筋の細胞を意味する。

また、心筋前駆細胞とは、前記心筋細胞の前駆細胞であって、培養または成熟によって心筋細胞を生じる能力を有する細胞であり、例えば、生体の心臓に含まれる心筋幹細胞および心筋前駆細胞、多能性幹細胞から分化誘導された細胞、骨髓細胞、骨格筋芽細胞または脂肪由来間葉系細胞に含まれる細胞またはこれらの細胞から分化誘導された細胞（特開2006-115771、特開2003-325169および特開2008-307205）が挙げられる。また、心筋幹細胞および心筋前駆細胞は、別段の記載がなければ特に区別されない。ここで、生体の心臓に含まれる心筋前駆細胞として、心臓に含まれる細胞のうちside populationに存在する細胞（SP細胞）が例示される（Oyama T, et al. J Cell Biol. 176, 329-341, 2007）。SP細胞とは、Hoechst33342 というDNA蛍光色素に対して高い排出能を有する細胞を意味する。心筋細胞および心筋前駆細胞は互いに混在していても良く、また、単離されていても良い。

[0027] 本発明において、心筋細胞はまた、心筋マーカである心筋トロポニン（cTNTまたはtroponin T type 2）および/または α MHC（ α myosin heavy chain）が陽性であることによって特徴づけられる。

また、心筋前駆細胞は、特に限定されないが、Flk1/KDR、islet1、Wt1および/またはN-Cadherinが陽性であること、および/またはFACS解析においてside population（SP細胞分画）に存在することによって特徴づけられる。

[0028] 本発明において、心筋前駆細胞は、in vitroで多能性幹細胞を分化させることによって用意されても良い。ここで、多能性幹細胞とは、生体に存在するすべての細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ幹細胞であり、それには、特に限定されないが、例えば胚性幹(ES)細胞、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹(ntES)細胞、精子幹細胞（「GS細胞」）、胚性生殖細胞（「EG細胞」）、人工多能性幹(iPS)細胞、培養線維芽細胞や骨髓幹細胞由来の多能性細胞（Muse細胞）などが含まれる。

[0029] (A) 胚性幹細胞

ES細胞は、ヒトやマウスなどの哺乳動物の初期胚（例えば胚盤胞）の内部細胞塊から樹立された、多能性と自己複製による増殖能を有する幹細胞であ

る。

[0030] ES細胞は、受精卵の8細胞期、桑実胚後の胚である胚盤胞の内部細胞塊に由来する胚由来の幹細胞であり、成体を構成するあらゆる細胞に分化する能力、いわゆる分化多能性と、自己複製による増殖能とを有している。ES細胞は、マウスで1981年に発見され(M. J. Evans and M. H. Kaufman (1981), *Nature* 292:154-156)、その後、ヒト、サルなどの霊長類でもES細胞株が樹立された(J. A. Thomson et al. (1998), *Science* 282:1145-1147; J. A. Thomson et al. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7844-7848; J. A. Thomson et al. (1996), *Biol. Reprod.*, 55:254-259; J. A. Thomson and V. S. Marshall (1998), *Curr. Top. Dev. Biol.*, 38:133-165)。

[0031] ES細胞は、対象動物の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取出し、内部細胞塊を線維芽細胞のフィーダー上で培養することによって樹立することができる。また、継代培養による細胞の維持は、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor (LIF))、塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor (bFGF))などの物質を添加した培養液を用いて行うことができる。ヒトおよびサルのES細胞の樹立と維持の方法については、例えばUSP5,843,780; Thomson JA, et al. (1995), *Proc Natl. Acad. Sci. U S A*. 92:7844-7848; Thomson JA, et al. (1998), *Science*. 282:1145-1147; H. Suemori et al. (2006), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345:926-932; M. Ueno et al. (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:9554-9559; H. Suemori et al. (2001), *Dev. Dyn.*, 222:273-279; H. Kawasaki et al. (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:1580-1585; Klimanskaya I, et al. (2006), *Nature*. 444:481-485などに記載されている。

[0032] ES細胞作製のための培養液として、例えば0.1mM 2-メルカプトエタノール、0.1mM 非必須アミノ酸、2mM L-グルタミン酸、20% KSRおよび4ng/ml bFGFを補充したDMEM/F-12培養液を使用し、37℃、2% CO₂/98% 空気の湿潤雰囲気下でヒトES細胞を維持することができる(O. Fumitaka et al. (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26:215-224)。また、ES細胞は、3~4日おきに継代する必要がある。

り、このとき、継代は、例えば1mM CaCl_2 および20% KSRを含有するPBS中の0.25% トリプシンおよび0.1mg/mlコラゲナーゼIVを用いて行うことができる。

[0033] ES細胞の選択は、一般に、アルカリホスファターゼ、Oct-3/4、Nanogなどの遺伝子マーカーの発現を指標にしてReal-Time PCR法で行うことができる。特に、ヒトES細胞の選択では、OCT-3/4、NANOG、ECADなどの遺伝子マーカーの発現を指標とすることができる(E. Kroon et al. (2008), Nat. Biotechnol., 26:443-452)。

[0034] ヒトES細胞株は、例えばWA01(H1)およびWA09(H9)は、WiCell Research Instituteから、KhES-1、KhES-2およびKhES-3は、京都大学再生医科学研究所(京都、日本)から入手可能である。

[0035] (B) 精子幹細胞

精子幹細胞は、精巣由来の多能性幹細胞であり、精子形成のための起源となる細胞である。この細胞は、ES細胞と同様に、種々の系列の細胞に分化誘導可能であり、例えばマウス胚盤胞に移植するとキメラマウスを作出できるなどの性質をもつ(M. Kanatsu-Shinohara et al. (2003) Biol. Reprod., 69:612-616; K. Shinohara et al. (2004), Cell, 119:1001-1012)。神経膠細胞系由来神経栄養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF))を含む培養液で自己複製可能であるし、またES細胞と同様の培養条件下で継代を繰り返すことによって、精子幹細胞を得ることができる(竹林正則ら(2008), 実験医学, 26巻, 5号(増刊), 41~46頁, 羊土社(東京、日本))。

[0036] (C) 胚性生殖細胞

胚性生殖細胞は、胎生期の始原生殖細胞から樹立される、ES細胞と同様な多能性をもつ細胞であり、LIF、bFGF、幹細胞因子(stem cell factor)などの物質の存在下で始原生殖細胞を培養することによって樹立しうる(Y. Matsui et al. (1992), Cell, 70:841-847; J.L. Resnick et al. (1992), Nature, 359:550-551)。

[0037] (D) 人工多能性幹細胞

人工多能性幹(iPS)細胞は、特定の初期化因子を、DNA又はタンパク質の形

態で体細胞に導入することによって作製することができる、ES細胞とほぼ同等の特性、例えば分化多能性と自己複製による増殖能、を有する体細胞由来の人工の幹細胞である (K. Takahashi and S. Yamanaka (2006) *Cell*, 126:663-676; K. Takahashi et al. (2007), *Cell*, 131:861-872; J. Yu et al. (2007), *Science*, 318:1917-1920; Nakagawa, M. ら, *Nat. Biotechnol.* 26:101-106 (2008) ; 国際公開WO 2007/069666) 。初期化因子は、ES細胞に特異的に発現している遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNAまたはES細胞の未分化維持に重要な役割を果たす遺伝子、その遺伝子産物もしくはnon-coding RNA、あるいは低分子化合物によって構成されてもよい。初期化因子に含まれる遺伝子として、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3またはGls1等が例示され、これらの初期化因子は、単独で用いても良く、組み合わせて用いても良い。初期化因子の組み合わせとしては、WO2007/069666、WO2008/118820、WO2009/007852、WO2009/032194、WO2009/058413、WO2009/057831、WO2009/075119、WO2009/079007、WO2009/091659、WO2009/101084、WO2009/101407、WO2009/102983、WO2009/114949、WO2009/117439、WO2009/126250、WO2009/126251、WO2009/126655、WO2009/157593、WO2010/009015、WO2010/033906、WO2010/033920、WO2010/042800、WO2010/050626、WO 2010/056831、WO2010/068955、WO2010/098419、WO2010/102267、WO 2010/111409、WO 2010/111422、WO2010/115050、WO2010/124290、WO2010/147395、WO2010/147612、Huangfu D, et al. (2008), *Nat. Biotechnol.*, 26: 795-797、Shi Y, et al. (2008), *Cell Stem Cell*, 2: 525-528、Eminli S, et al. (2008), *Stem Cells*, 26:2467-2474、Huangfu D, et al. (2008), *Nat Biotechnol.* 26:1269-1275、Shi Y, et al. (2008), *Cell Stem Cell*, 3, 568-574、Zhao Y, et al. (2008), *Cell Stem Cell*, 3:475-479、Marson A, (2008), *Cell Stem Cell*, 3, 132-135、Feng B, et al. (2009), *Nat Cell Biol.* 11:197-203、R.L. Judson et al., (2009), *Nat. Biotech.*, 27:459-461、Lyssiotis CA, et al. (2

009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:8912-8917、Kim JB, et al. (2009), Nature. 461:649-643、Ichida JK, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:491-503、Heng JC, et al. (2010), Cell Stem Cell. 6:167-74、Han J, et al. (2010), Nature. 463:1096-100、Mali P, et al. (2010), Stem Cells. 28:713-720、Maekawa M, et al. (2011), Nature. 474:225-9.に記載の組み合わせが例示される。

[0038] 上記初期化因子には、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 [例えば、バルプロ酸 (VPA)、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA (例、HDAC1 siRNA Smartpool (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等)等の核酸性発現阻害剤など]、MEK阻害剤 (例えば、PD184352、PD98059、U0126、SL327およびPD0325901)、Glycogen synthase kinase-3阻害剤 (例えば、BioおよびCHIR99021)、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、5-azacytidine)、ヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば、BIX-01294等の低分子阻害剤、Suv39hl、Suv39h2、SetDB1およびG9aに対するsiRNAおよびshRNA等の核酸性発現阻害剤など)、L-channel calcium agonist (例えばBayk8644)、酪酸、TGF β 阻害剤またはALK5阻害剤 (例えば、LY364947、SB431542、616453およびA-83-01)、p53阻害剤 (例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA)、ARID3A阻害剤 (例えば、ARID3Aに対するsiRNAおよびshRNA)、miR-291-3p、miR-294、miR-295およびmir-302などのmiRNA、Wnt Signaling (例えばsoluble Wnt3a)、神経ペプチドY、プロスタグランジン類 (例えば、プロスタグランジンE2およびプロスタグランジンJ2)、hTERT、SV40LT、UTF1、IRX6、GLIS1、PITX2、DMRTB1等の樹立効率を高めることを目的として用いられる因子も含まれており、本明細書においては、これらの樹立効率の改善目的にて用いられた因子についても初期化因子と別段の区別をしないものとする。

[0039] 初期化因子は、タンパク質の形態の場合、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチド (例えば、HIV由来のTATおよびポリアルギニン) との融合

、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよい。

[0040] 一方、DNAの形態の場合、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター（以上、Cell, 126, pp.663-676, 2006; Cell, 131, pp.861-872, 2007; Science, 318, pp.1917-1920, 2007）、アデノウイルスベクター（Science, 322, 945-949, 2008）、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター（WO 2010/008054）などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体（HAC）、酵母人工染色体（YAC）、細菌人工染色体（BAC、PAC）などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用する（Science, 322:949-953, 2008）。ベクターには、核初期化物質が発現可能なように、プロモーター、エンハンサー、リボゾーム結合配列、ターミネーター、ポリアダニル化サイトなどの制御配列を含むことができるし、さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子（例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子など）、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質（GFP）、 β グルクロニダーゼ（GUS）、FLAGなどのレポーター遺伝子配列などを含むことができる。また、上記ベクターには、体細胞への導入後、初期化因子をコードする遺伝子もしくはプロモーターとそれに結合する初期化因子をコードする遺伝子を共に切除するために、それらの前後にLoxP配列を有してもよい。

[0041] また、RNAの形態の場合、例えばリポフェクション、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入しても良く、分解を抑制するため、5-メチルシチジンおよびpseudouridine（TriLink Biotechnologies）を取り込ませたRNAを用いても良い（Warren L, (2010) Cell Stem Cell, 7:618-630）。

[0042] iPS細胞誘導のための培養液としては、例えば、10～15%FBSを含有するDME

M、DMEM/F12又はDME培養液（これらの培養液にはさらに、LIF、penicillin/streptomycin、puromycin、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）または市販の培養液[例えば、マウスES細胞培養用培養液(TX-WES培養液、トロンボX社)、霊長類ES細胞培養用培養液（霊長類ES/iPS細胞用培養液、リプロセル社）、無血清培地（mTeSR、Stemcell Technology社）]などが含まれる。

[0043] 培養法の例としては、たとえば、37℃、5%CO₂存在下にて、10%FBS含有DME M又はDMEM/F12培養液上で体細胞と初期化因子とを接触させ約4～7日間培養し、その後、細胞をフィーダー細胞(たとえば、マイトマイシンC処理ST0細胞、SNL細胞等)上にまきなおし、体細胞と初期化因子の接触から約10日後からbFGF含有霊長類ES細胞培養用培養液で培養し、該接触から約30～約45日又はそれ以上ののちにiPS様コロニーを生じさせることができる。

[0044] あるいは、37℃、5% CO₂存在下にて、フィーダー細胞(たとえば、マイトマイシンC処理ST0細胞、SNL細胞等)上で10%FBS含有DMEM培養液（これにはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン、L-グルタミン、非必須アミノ酸類、 β -メルカプトエタノールなどを適宜含むことができる。）で培養し、約25～約30日又はそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。望ましくは、フィーダー細胞の代わりに、初期化される体細胞そのものを用いる（Takahashi K, et al. (2009), PLoS One. 4:e8067 またはW02010/137746）、もしくは細胞外基質（例えば、Laminin-5 (W02009/123349) およびマトリゲル（BD社））を用いる方法が例示される。

[0045] この他にも、血清を含有しない培地を用いて培養する方法も例示される（Sun N, et al. (2009), Proc Natl Acad Sci U S A. 106:15720-15725）。さらに、樹立効率を上げるため、低酸素条件（0.1%以上、15%以下の酸素濃度）によりiPS細胞を樹立しても良い（Yoshida Y, et al. (2009), Cell Stem Cell. 5:237-241またはW02010/013845）。

[0046] 上記培養の間には、培養開始2日目以降から毎日1回新鮮な培養液と培養液交換を行う。また、核初期化に使用する体細胞の細胞数は、限定されないが

、培養ディッシュ100cm²あたり約 5×10^3 ～約 5×10^6 細胞の範囲である。

[0047] iPS細胞は、形成したコロニーの形状により選択することが可能である。一方、体細胞が初期化された場合に発現する遺伝子（例えば、Oct3/4、Nanog）と連動して発現する薬剤耐性遺伝子をマーカー遺伝子として導入した場合は、対応する薬剤を含む培養液（選択培養液）で培養を行うことにより樹立したiPS細胞を選択することができる。また、マーカー遺伝子が蛍光タンパク質遺伝子の場合は蛍光顕微鏡で観察することによって、発光酵素遺伝子の場合は発光基質を加えることによって、また発色酵素遺伝子の場合は発色基質を加えることによって、iPS細胞を選択することができる。

[0048] 本明細書中で使用する「体細胞」なる用語は、卵子、卵母細胞、ES細胞などの生殖系列細胞または分化全能性細胞を除くあらゆる動物細胞（好ましくは、ヒトを含む哺乳動物細胞）をいう。体細胞には、非限定的に、胎児(仔)の体細胞、新生児(仔)の体細胞、および成熟した健全なもしくは疾患性の体細胞のいずれも包含されるし、また、初代培養細胞、継代細胞、および株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば（1）神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）、（2）組織前駆細胞、（3）リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞（皮膚細胞等）、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞（膵外分泌細胞等）、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分化した細胞などが例示される。

[0049] また、iPS細胞を移植用細胞の材料として用いる場合、拒絶反応が起こらないという観点から、移植先の個体のHLA遺伝子型が同一もしくは実質的に同一である体細胞を用いることが望ましい。ここで、「実質的に同一」とは、移植した細胞に対して免疫抑制剤により免疫反応が抑制できる程度にHLA遺伝子型が一致していることであり、例えば、HLA-A、HLA-BおよびHLA-DRの3遺伝子座あるいはHLA-Cを加えた4遺伝子座が一致するHLA型を有する体細胞である。

[0050] (E) 核移植により得られたクローン胚由来のES細胞

nt ES細胞は、核移植技術によって作製されたクローン胚由来のES細胞であ

り、受精卵由来のES細胞とほぼ同じ特性を有している (T. Wakayama et al. (2001), Science, 292:740-743; S. Wakayama et al. (2005), Biol. Reprod., 72:932-936; J. Byrne et al. (2007), Nature, 450:497-502)。すなわち、未受精卵の核を体細胞の核と置換することによって得られたクローン胚由来の胚盤胞の内部細胞塊から樹立されたES細胞がnt ES(nuclear transfer ES)細胞である。nt ES細胞の作製のためには、核移植技術 (J.B. Cibelli et al. (1998), Nature Biotechnol., 16:642-646) とES細胞作製技術(上記)との組み合わせが利用される(若山清香ら(2008), 実験医学, 26巻, 5号(増刊), 47~52頁)。核移植においては、哺乳動物の除核した未受精卵に、体細胞の核を注入し、数時間培養することで初期化することができる。

[0051] (F) Multilineage-differentiating Stress Enduring cells (Muse細胞)

Muse細胞は、W02011/007900に記載された方法にて製造された多能性幹細胞であり、詳細には、線維芽細胞または骨髄間質細胞を長時間トリプシン処理、好ましくは8時間または16時間トリプシン処理した後、浮遊培養することで得られる多能性を有した細胞であり、SSEA-3およびCD105が陽性である。

[0052] 本発明では、多能性幹細胞から心筋前駆細胞への分化誘導方法は特に限定されないが、例えば、以下の方法を用いることができる。

[0053] 多能性幹細胞を任意の方法で分離し、浮遊培養もしくはコーティング処理された培養皿を用いて接着培養または/およびフィーダー細胞との共培養を行ってもよい。また、浮遊培養および接着培養を組み合わせても良い。ここで、分離の方法としては、力学的、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する分離溶液(例えば、Accutase(TM)およびAccumax(TM)が挙げられる)またはコラゲナーゼ活性のみを有する分離液を用いても良い。ここで、浮遊培養においては、培養皿の表面が、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理(例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理)されていないもの、もしくは、人工的に接着を抑制する処理(例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸(poly-HEMA)によるコーティング処理)したものを使用できる。接着培養においては、例えば、マトリゲル(BD)、I型コラー

ゲン、IV型コラーゲン、ゼラチン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、またはエンタクチン、およびこれらの組み合わせを用いてコーティング処理された培養皿を使用できる。また、共培養に用いられる細胞は、OP9細胞 (Nishikawa, S.I. et al, Development 125, 1747-1757 (1998)) またはEND-2細胞 (Mummery C, et al, Circulation. 107:2733-40 (2003)) が例示される。

[0054] 本工程における培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えばIMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、 α MEM培地、Doulbec co's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地などが包含される。好ましくは、 α MEMまたはDMEMである。培地には、血清が含有されていてもよいし、あるいは無血清でもよい。必要に応じて、例えば、アルブミン、トランスフェリン、Knockout Serum Replacement (KSR) (ES細胞培養時のFBSの血清代替物)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロール、ITS-サプリメントなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、B27-サプリメント、N2-サプリメント、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax (Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、サイトカイン、Wntシグナル阻害剤、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類などの1つ以上の物質も含有しうる。サイトカインとして、アクチビンAおよびBMP 4 が例示される。Wntシグナル阻害剤として、XAV939 (Shih-Min A. Huang, et al, Nature 461, 614-620, 2009)、ビタミンA (レチノイン酸)、リチウム、フラボノイド、Dickkopf1 (Dkk1)、インスリン様増殖因子結合タンパク質 (IGFBP) (W02009/131166)、 β カテニンに対するsiRNA等が例示される。

[0055] 培養温度は、以下に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO₂含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO₂濃度は、好ましくは約2~5%である。培養時間は、Flk1/KDRが発現するために必要な日数であり、例えば4

日以上である。

[0056] 本発明において、心筋細胞を製造するための環状デプシペプチドを心筋前駆細胞へ添加する工程では、上記多能性幹細胞から心筋前駆細胞への分化誘導方法と同様の条件下において実施され得る。環状デプシペプチドを添加する期間は、cTNTまたは α MHCが発現するために必要な日数であり、例えば6日以上である。環状デプシペプチドを添加する濃度は用いる前駆細胞と環状デプシペプチドの種類に応じて適宜選択されるが、好ましくは0.25nM～25nMである。

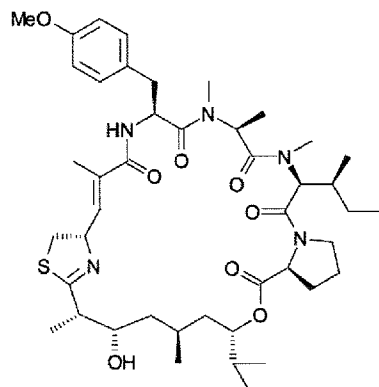
[0057] [実施例]

以下に実施例を挙げて本発明をより具体的に説明するが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

実施例 1

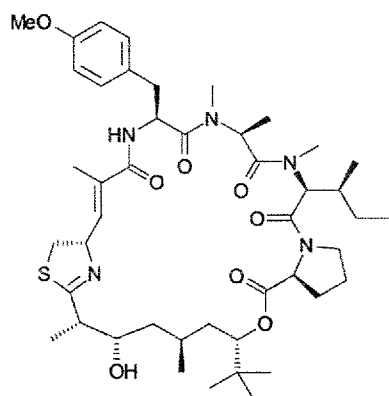
[0058] マウス α -ミオシン重鎖 (MHC) プロモーターにより駆動されるEGFP遺伝子を有するEMG7マウスES細胞から分化誘導し、純化されたFlk1陽性細胞を心筋前駆細胞とし、環状デプシペプチドを添加して培養することにより、心筋細胞へ分化誘導した (Yamashita, J.K. et al, FASEB J. 19, 1534-1536 (2005))。このFlk1陽性細胞をOP9間質細胞上へ播種すると同時に、シクロスポリンA、21-2 (式 (III)) (Luesch, Bioorg Med Chem, 2002) およびAPT-1 (式 (IV)) (Luesch, J Am Chem Soc, 2001) を添加した。同様に、対照として、薬剤の無添加による培養を行った。OP9細胞上へ播種した後、6日後に細胞を回収して、FACSによりEGFP陽性細胞数をカウントした。ここで、回収した全細胞数に対するEGFP陽性細胞数を算出し、対照である無添加群に対するこの値の比率 (Fold increase) を用いて各薬剤について評価した。その結果を図1および表2に示す。21-2は、2 nMから4nMの濃度範囲において顕著な活性が確認できた。また、APT-1は、3 nMから4.5nMの濃度範囲において顕著な活性が確認できた。これらの活性は、シクロスポリンAより高かった。

[化25]



(III): 21-2

[化26]



(IV): APT-1

[0059] [表2]

表 2

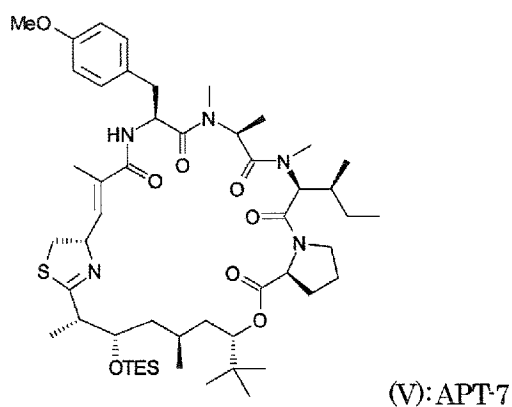
化合物	濃度	心筋増加効率 (fold increase)
コントロール	-	1
シクロスポリン A	-	10.5
21-2	3.5nM	18.4
APT-1	3.5nM	15.7

実施例 2

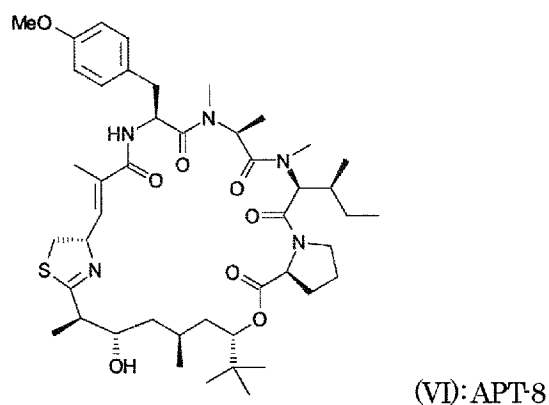
[0060] 実施例 1 と同様の方法を用いて、APT-7 (式 (V))、APT-8 (式 (VI)) (Numajiri Y, et al, Chem. Asian J. 2009, 4, 111 – 125)、APT-9 (式 (VII)) (Numajiri Y, et al, Chem. Asian J. 2009, 4, 111 – 125) およ

びAPT-10 (式 (VIII)) (Doi T, et al, Chem. Asian J. 2011, 6, 180 – 188) についても評価を行った。その結果を図2および表3に示す。APT-7、APT-8、APT-9およびAPT-10は、それぞれ、10nM、7.5 nM、7.5nM から20nMおよび1 nM から1.5nMの濃度範囲において顕著な活性が確認できた。これらの活性は、シクロスポリンAより高かった。

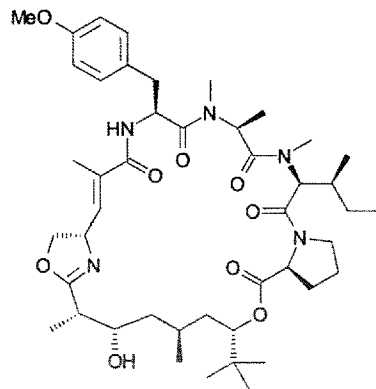
[化27]



[化28]

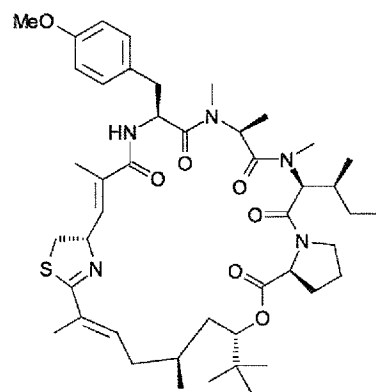


[化29]



(VII): APT-9

[化30]



(VIII): APT-10

[0061] [表3]

表 3

化合物	濃度	心筋増加効率 (fold increase)
コントロール	-	1
シクロスポリン A	-	6.1
21-2	2.5nM	19.3
APT-1	10nM	8.1
APT-7	7.5nM	12.5
APT-8	15nM	21.8
APT-9	1.5nM	15.5

実施例 3

[0062] 心筋細胞中のside population細胞 (SP細胞) は、Oyamaらの方法を用いて単離した (Oyama T, et al. J Cell Biol. 176, 329-341, 2007)。詳細には

、新生児ラットより抽出した心筋細胞を 1.0×10^6 cells/mlで3%FBS含有PBS中に懸濁させ、 $1 \mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342を添加し、 37°C で60分間暗所にてインキュベート後、フローサイトメーターを用いてSP細胞として単離した。SP細胞は、 350nm のUVレーザーでHoechst 33342を励起させ、 450nm (Hoechst blue) と 675nm (Hoechst red) において特異的位置に検出される細胞として分離した(Goodell MA, et al. J Exp Med. 183:1797-1806, 1996)。この時、Propidium iodideで染色される細胞を死細胞として除去した。得られたSP細胞は、10%FBSを含有するIMDM中で培養し、24時間後に21-2を添加して72時間培養を続けた。さらに、21-2の非添加の条件で培養を継続し、SP細胞単離から3週間後にcTNT抗体染色により細胞を観察した(図3A)。その結果を図3Bに示す。サルコメア構造を持った心筋細胞が誘導され、一部拍動することが確認された。以上より、21-2は、これまで報告されてきた心筋SP細胞から心筋細胞への分化誘導が可能であったオキシトシンやトリコスタチンAと少なくとも同等の機能を有していると推定される。

[0063] 以上の結果から、ここで示した環状デプシペプチドには心筋前駆細胞からの心筋細胞の分化誘導能を有することが確認された。

[0064] 本発明を好ましい態様を強調して説明してきたが、好ましい態様が変更され得ることは当業者にとって自明であろう。本発明は、本発明が本明細書に詳細に記載された以外の方法で実施され得ることを意図する。したがって、本発明は添付の「請求の範囲」の精神及び範囲に包含されるすべての変更を含むものである。

ここで述べられた特許及び特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、ここに引用されたことによって、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

産業上の利用可能性

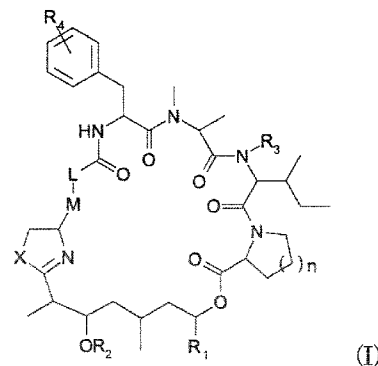
[0065] 本発明によれば、心筋前駆細胞からの心筋細胞誘導効率を顕著に向上させることができるので、心疾患の治療または多能性幹細胞を用いた細胞移植治療への応用に特に有用である。

請求の範囲

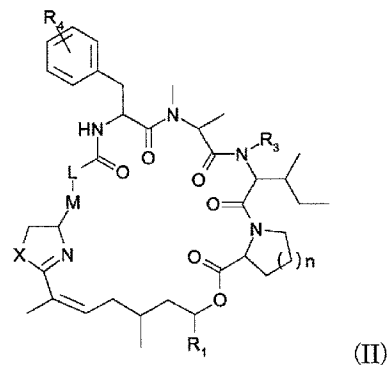
[請求項1]

以下の式 (I) または式 (II) (式中、 R_1 および R_3 はそれぞれHまたはC1-C6アルキル基であり、 R_2 はH、C1-C6アルキル基、トリメチルシリル基およびトリエチルシリル基からなる群から選択される置換基であり、 R_4 はH、OH、C1-C6アルコキシ基、F、Cl、BrおよびIからなる群から選択される置換基であり、L-MはC(Me)=CH、CH=CH、CH₂-CH₂およびCH(Me)-CH₂からなる群から選択される構造を有し、Xは、OまたはSであり、nは、1または2である) で表される環状デブシペプチドまたはその薬学上許容される塩、溶媒和物もしくはプロドラッグを有効成分として含有する医薬組成物。

[化1]



[化2]

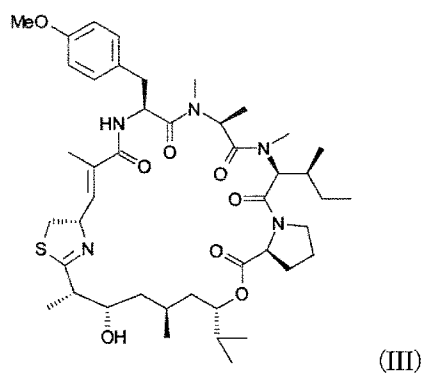


[請求項2]

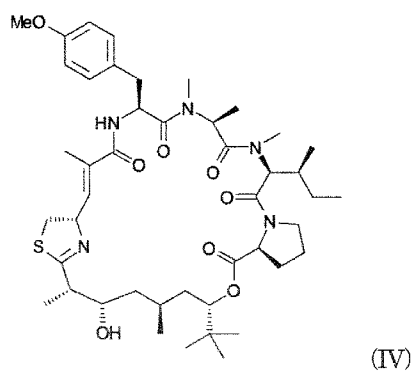
R_1 がイソプロピル基またはt-ブチル基であり、 R_2 がHであり、 R_3 がメチル基であり、 R_4 がメトキシ基であり、L-MがC(Me)=CHであり、XがOまたはSであり、nが1である、請求項1に記載の医薬組成物。

[請求項3] 環状デプシペプチドが、次の式 (III) から式 (VIII) で表される化合物から成る群より選択される、請求項 1 に記載の医薬組成物；

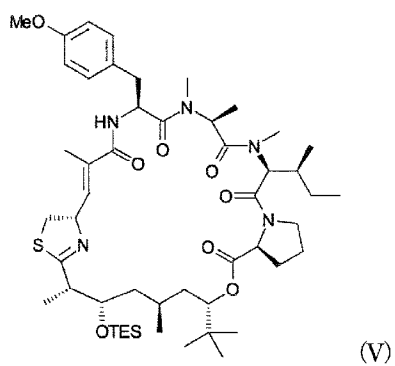
[化3]



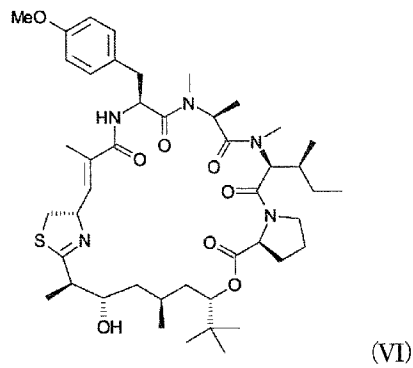
[化4]



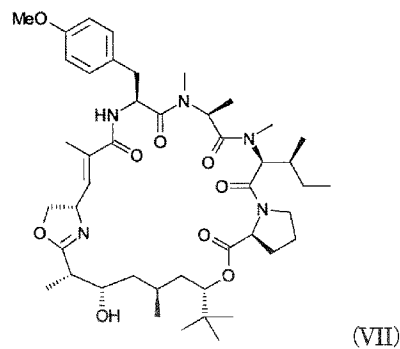
[化5]



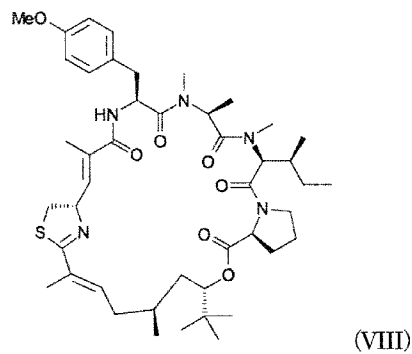
[化6]



[化7]



[化8]

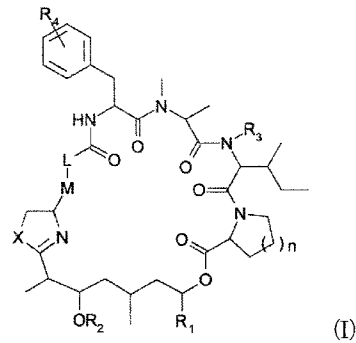


[請求項4] 心不全、虚血性心疾患または心筋症から選択される心疾患の治療に用いられる請求項1～3のいずれか一項に記載の医薬組成物。

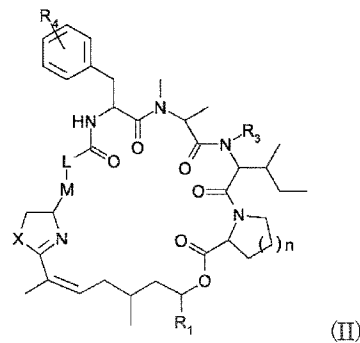
[請求項5] 以下の式 (I) または式 (II) (式中、 R_1 および R_3 はそれぞれHまたはC1-C6アルキル基であり、 R_2 はH、C1-C6アルキル基、トリメチルシリル基およびトリエチルシリル基からなる群から選択される置換基であり、 R_4 はH、OH、C1-C6アルコキシ基、F、Cl、BrおよびIからなる群

から選択される置換基であり、L-MはC(Me)=CH、CH=CH、CH₂-CH₂およびCH(Me)-CH₂からなる群から選択される構造を有し、Xは、OまたはSであり、nは、1または2である）で表される環状デプシペプチドを心筋前駆細胞へ添加する工程を含む、心筋細胞の製造方法。

[化9]



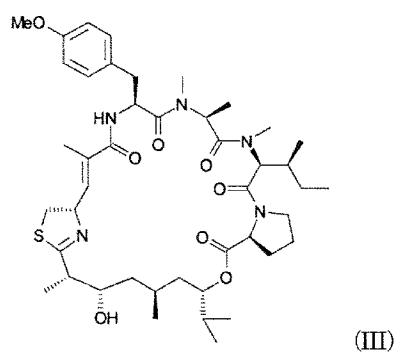
[化10]



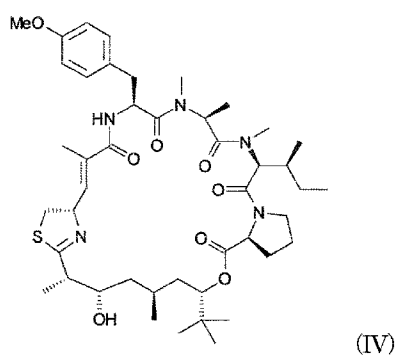
[請求項6] R₁がイソプロピル基またはt-ブチル基であり、R₂がHであり、R₃がメチル基であり、R₄がメトキシ基であり、L-MがC(Me)=CHであり、XがOまたはSであり、nが1である、請求項5に記載の方法。

[請求項7] 環状デプシペプチドが、次の式 (III) から式 (VIII) で表される化合物から成る群より選択される、請求項5に記載の方法。

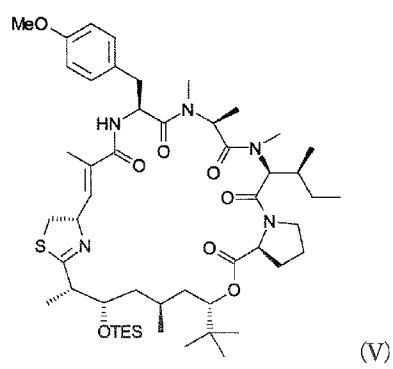
[化11]



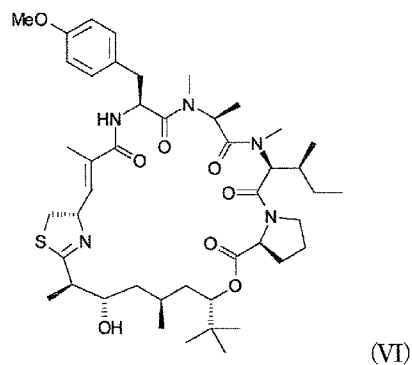
[化12]



[化13]

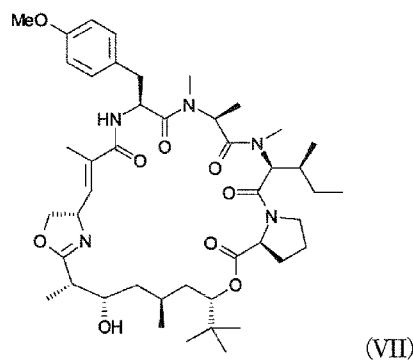


[化14]



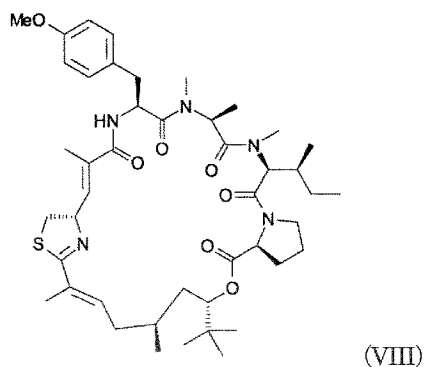
(VI)

[化15]



(VII)

[化16]

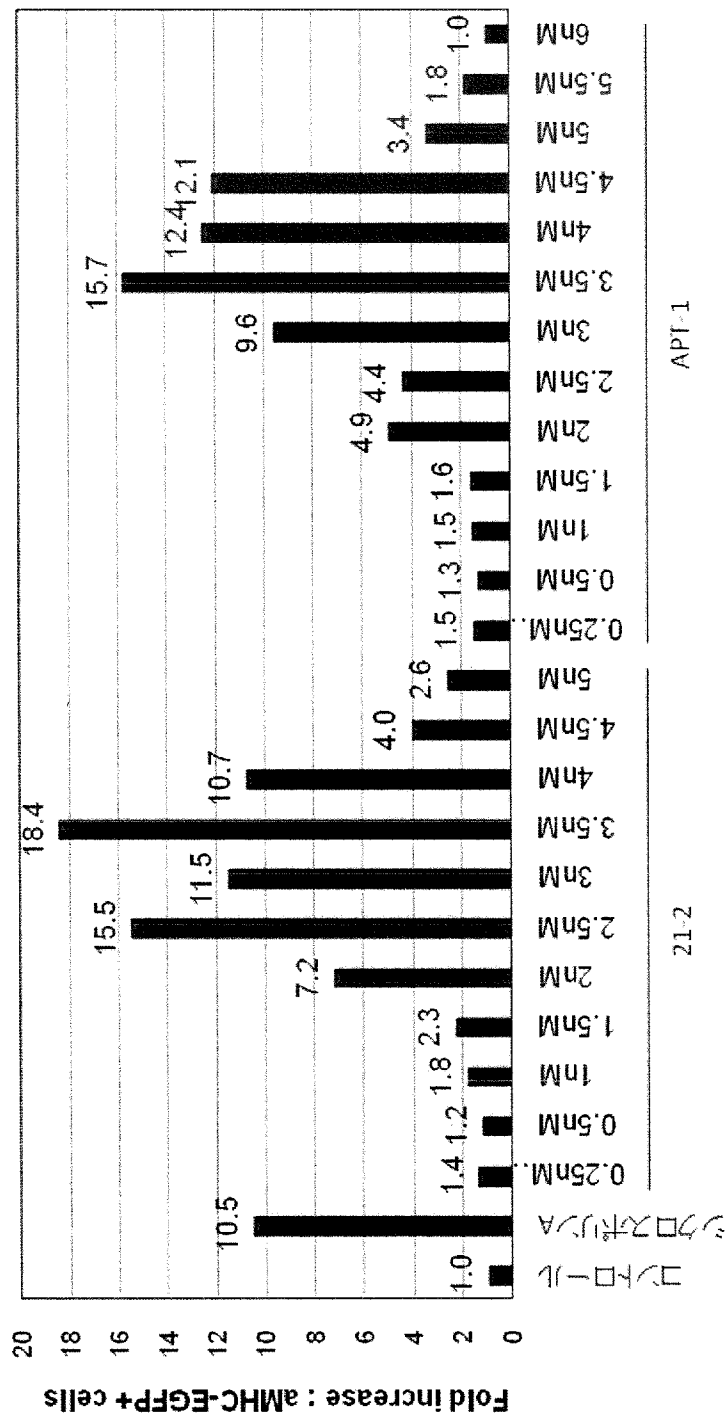


(VIII)

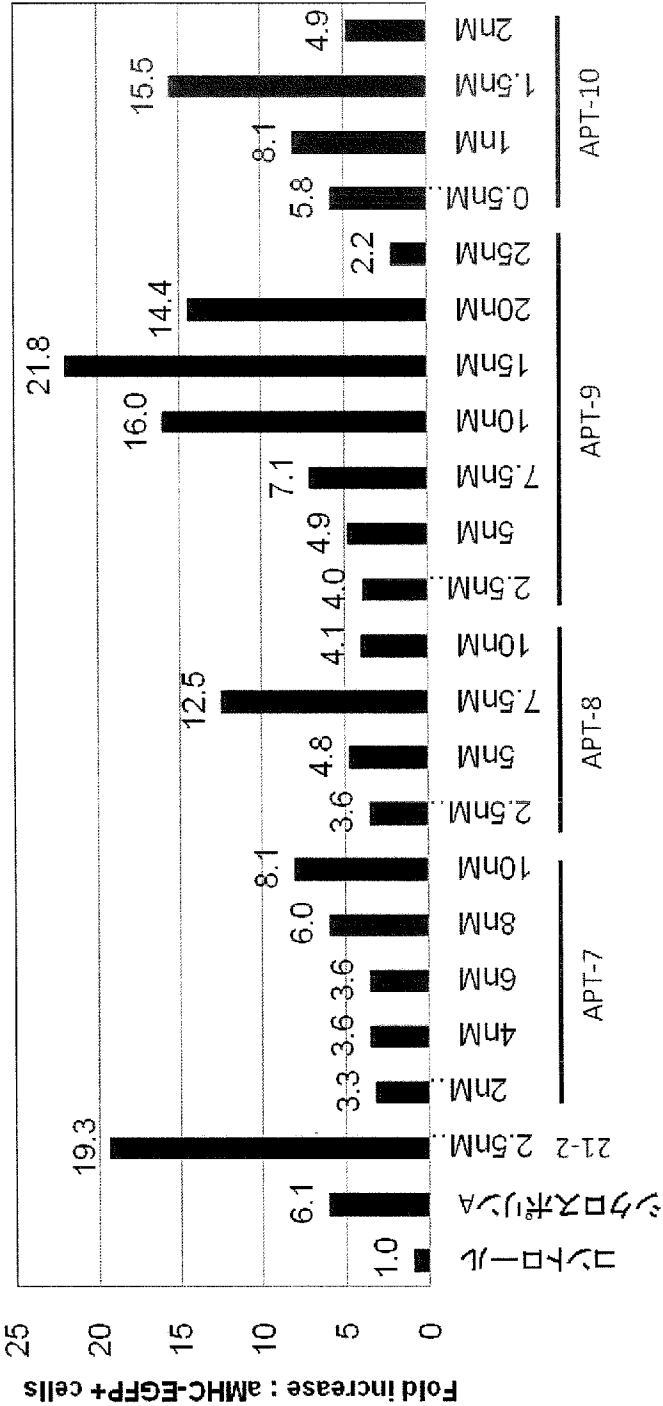
[請求項8] 前記心筋前駆細胞が、side population細胞（SP細胞）を含む生体内の心筋前駆細胞、または多能性幹細胞から誘導された心筋前駆細胞である、請求項5～7のいずれか一項に記載の方法。

[請求項9] 前記多能性幹細胞から誘導された心筋前駆細胞が、Flk1（KDR）陽性の細胞である、請求項8に記載の方法。

[図1]

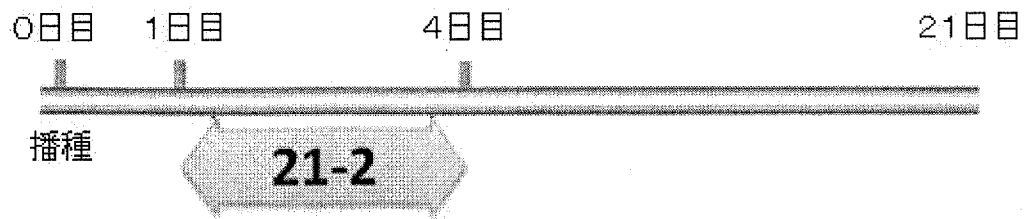


[図2]

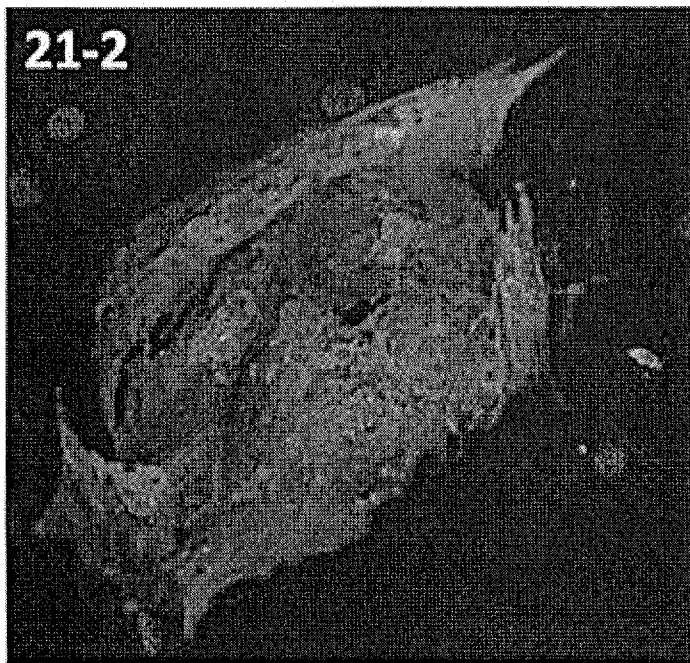


[図3]

A



B



(緑:心筋トロポニンT)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/077279

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K38/00(2006.01)i, A61P9/04(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)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)

A61K38/00, A61P9/04, A61P9/10, C12N5/071

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2010/065563 A1 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC.), 10 June 2010 (10.06.2010), claims; page 1, line 25 to page 10, line 4; page 19, line 12 to page 20, line 10; page 21, lines 20 to 29 & US 2011/0294720 A1	1-3 4-9
X A	WO 2009/032338 A1 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION), 12 March 2009 (12.03.2009), claims; page 1, line 24 to page 6, line 16; page 15, lines 1 to 33; page 17, lines 10 to 15 (Family: none)	1-3 4-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
29 November, 2013 (29.11.13)

Date of mailing of the international search report
10 December, 2013 (10.12.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/077279

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	Dawei Ma et al., Total Synthesis of the Cyclodepsipeptide Apratoxin A and Its Analogues and Assessment of Their Biological Activities, Chemistry - A European Journal, 2006, Vol.12, No.29, p.7615-7626	1-3 4-9
A	JP 11-171897 A (Meiji Milk Products Co., Ltd.), 29 June 1999 (29.06.1999), & WO 1998/054211 A2	1-9
A	JP 6-135992 A (Merck & Co., Inc.), 17 May 1994 (17.05.1994), & EP 496452 A1 & CA 2059380 A	1-9
A	JP 2009-520683 A (Lead Billion Ltd.), 28 May 2009 (28.05.2009), & JP 2009-520684 A & US 2008/0124388 A1 & US 2009/0028959 A1 & US 2012/0252744 A1 & EP 1848440 A & EP 1848445 A & WO 2007/048353 A1 & CA 2593161 A & CA 2593171 A & CN 101137387 A & CN 101141965 A & AU 2006308337 A & AU 2006308338 A	1-9

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. A61K38/00(2006.01)i, A61P9/04(2006.01)i, A61P9/10(2006.01)i, C12N5/071(2010.01)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（I P C））

Int.Cl. A61K38/00, A61P9/04, A61P9/10, C12N5/071

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 3 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 3 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 3 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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 A	WO 2010/065563 A1 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 2010.06.10, 特許請求の範囲、1 頁 2 5 行～1 0 頁 4 行、1 9 頁 1 2 行～2 0 頁 1 0 行、2 1 頁 2 0 ～2 9 行 & US 2011/0294720 A1	1 - 3 4 - 9
X A	WO 2009/032338 A1 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION) 2009.03.12, 特許請求の範囲、1 頁 2 4 行～6 頁 1 6 行、1 5 頁 1 行～3 3 行、1 7 頁 1 0 行～1 5 行（ファミリーなし）	1 - 3 4 - 9

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 9 . 1 1 . 2 0 1 3

国際調査報告の発送日

1 0 . 1 2 . 2 0 1 3

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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）

4 U

9 4 5 4

上條 のぶよ

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 3 9

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 A	Dawei Ma et al., Total Synthesis of the Cyclodepsipeptide Apratoxin A and Its Analogues and Assessment of Their Biological Activities, Chemistry – A European Journal, 2006, Vol. 12, No. 29, p. 7615-7626	1 – 3 4 – 9
A	JP 11-171897 A (明治乳業株式会社) 1999. 06. 29, & WO 1998/054211 A2	1 – 9
A	JP 6-135992 A (メルク エンド カムパニー インコーポレーテッド) 1994. 05. 17, & EP 496452 A1 & CA 2059380 A	1 – 9
A	JP 2009-520683 A (リード ビリオン リミテッド) 2009. 05. 28, & JP 2009-520684 A & US 2008/0124388 A1 & US 2009/0028959 A1 & US 2012/0252744 A1 & EP 1848440 A & EP 1848445 A & WO 2007/048353 A1 & CA 2593161 A & CA 2593171 A & CN 101137387 A & CN 101141965 A & AU 2006308337 A & AU 2006308338 A	1 – 9