

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6090855号  
(P6090855)

(45) 発行日 平成29年3月8日 (2017.3.8)

(24) 登録日 平成29年2月17日 (2017.2.17)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 5/07 (2010.01)

C 1 2 N 5/07

C 1 2 N 1/00 (2006.01)

C 1 2 N 1/00 Z N A G

C 1 2 N 5/077 (2010.01)

C 1 2 N 5/077

C 1 2 Q 1/02 (2006.01)

C 1 2 Q 1/02

C 1 2 N 5/073 (2010.01)

C 1 2 N 5/073

請求項の数 12 (全 20 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-523110 (P2013-523110)  
 (86) (22) 出願日 平成23年11月17日 (2011.11.17)  
 (65) 公表番号 特表2013-544071 (P2013-544071A)  
 (43) 公表日 平成25年12月12日 (2013.12.12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2011/077266  
 (87) 国際公開番号 W02012/067266  
 (87) 国際公開日 平成24年5月24日 (2012.5.24)  
 審査請求日 平成26年11月14日 (2014.11.14)  
 (31) 優先権主張番号 61/414,812  
 (32) 優先日 平成22年11月17日 (2010.11.17)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 504132272  
 国立大学法人京都大学  
 京都府京都市左京区吉田本町 3 6 番地 1  
 (74) 代理人 100100549  
 弁理士 川口 嘉之  
 (74) 代理人 100126505  
 弁理士 佐貫 伸一  
 (74) 代理人 100131392  
 弁理士 丹羽 武司  
 (72) 発明者 山下 潤  
 日本国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  
 (72) 発明者 魚崎 英毅  
 日本国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  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 心筋細胞および／または心筋前駆細胞増殖剤ならびに心筋細胞および／または心筋前駆細胞の増殖方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

CaMK2阻害剤を含有する心筋細胞および／または心筋前駆細胞増殖剤。

【請求項 2】

前記CaMK2阻害剤がKN62またはKN93である、請求項 1 に記載の心筋細胞および／または心筋前駆細胞増殖剤。

【請求項 3】

i) GSK3  $\beta$  阻害剤およびCaMK2阻害剤、もしくは、ii) GSK3  $\beta$  阻害剤およびERK脱リン酸化阻害剤を含む、心筋細胞および／または心筋前駆細胞増殖剤。

【請求項 4】

i) BIOおよびSU1498、もしくは、ii) BIOおよびKN93を含む、請求項 3 に記載の心筋細胞および／または心筋前駆細胞増殖剤。

【請求項 5】

i) GSK3  $\beta$  阻害剤、CaMK2阻害剤およびp38阻害剤、もしくは、ii) GSK3  $\beta$  阻害剤、ERK脱リン酸化阻害剤およびp38阻害剤を含む、心筋細胞および／または心筋前駆細胞増殖剤。

【請求項 6】

i) BIO、SU1498およびSB203580、もしくは、ii) BIO、KN93およびSB203580を含む、請求項 5 に記載の心筋細胞および／または心筋前駆細胞増殖剤。

【請求項 7】

ERK脱リン酸化阻害剤、およびRaf活性化剤からなる群より選ばれる少なくとも一つの化合

10

20

物を含有する心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤であって、前記ERK脱リン酸化阻害剤がSU1498であり、前記Raf活性化剤がZM336372である、心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤。

【請求項 8】

前記心筋細胞および心筋前駆細胞がそれぞれヒト心筋細胞およびヒト心筋前駆細胞である、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤。

【請求項 9】

前記心筋細胞および/または心筋前駆細胞が、多能性幹細胞を分化誘導して得られる心筋細胞および/または心筋前駆細胞である、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤。

10

【請求項 10】

CyclinA2、CyclinD2、CyclinD3、Cdk2およびcdk4の発現を増強させ、Ink4bの発現を減少させるための、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤。

【請求項 11】

心筋細胞および/または心筋前駆細胞を、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤を含有する培地で培養する工程を含む、心筋細胞および/または心筋前駆細胞の増殖方法。

【請求項 12】

以下の工程を含む、心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤のスクリーニング方法。

20

(1) 試験物質を、多能性幹細胞を分化誘導して得られた心筋細胞および/または心筋前駆細胞に接触させる工程、

(2) 工程(1)の後に心筋細胞および/または心筋前駆細胞の数を計測する工程、及び

(3) 心筋細胞および/または心筋前駆細胞の数が、請求項 1～7 のいずれか一項に記載の心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤から選択される陽性コントロール物質と接触させたときの心筋細胞および/または心筋前駆細胞の数と比べて同等または大きい場合に、該試験物質を心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤として選択する工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

30

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増殖させるための薬剤ならびにそれ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増殖させるための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

心筋細胞は出生と同時にその分裂能を喪失し、再生が困難であることから、心筋梗塞、心筋炎または老化等を原因とする傷害心組織に対して、胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)など多能性を有する細胞(特許文献1)を分化誘導して得られる心筋細胞を移植する補充療法が注目されている。これら多能性幹細胞からの心筋細胞への分化誘導法は多数報告されているが(特許文献2、特許文献3および非特許文献1)、誘導した心筋細胞の増殖方法について言及した報告は少ない。例えば、心筋細胞そのものを再生することを目的とした心筋細胞の増殖方法として、核移行型サイクリンD1およびCDK4を発現させることで心筋細胞の増殖を促進させる方法(特許文献4)やp38阻害剤を用いる方法(非特許文献2)が報告されている。

40

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】W02007/069666

【特許文献2】W02007/002136

【特許文献3】W02009/118928

50

【特許文献4】W02005/049822

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Yan P, et al, Biochem Biophys Res Commun. 379:115-20 (2009)

【非特許文献2】Engel FB, et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 103:15546-51 (2006)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

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増殖させるための方法を提供することである。

10

【課題を解決するための手段】

【0006】

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増殖を促進させる薬剤をスクリーニングしたところ、GSK3 $\beta$ 阻害剤、ERK脱リン酸化阻害剤およびCaMK2阻害剤により該細胞の増殖が促進されることが明らかとなった。

【0007】

次に本発明者らはこれらの薬剤と同じ効果を有する他の薬剤を調べたところRaf活性化剤およびp38阻害剤も同様に機能することを確認した。

【0008】

さらに本発明者らは、ヒトiPS細胞から分化誘導した心筋前駆細胞または心筋細胞において該薬剤が同様の効果を示すか否かを検討したところ、該薬剤がマウスES細胞由来の細胞と同様にその細胞増殖を促進されることが確認された。

20

【0009】

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。

【0010】

本発明の一つの態様は、GSK3 $\beta$ 阻害剤、ERK脱リン酸化阻害剤、Raf活性化剤、CaMK2阻害剤およびp38阻害剤からなる群より選ばれる少なくとも一つの化合物を含有する心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤を提供することである。

本発明の他の態様は、前記心筋細胞および心筋前駆細胞がそれぞれヒト心筋細胞およびヒト心筋前駆細胞である、前記心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤を提供することである。

30

本発明の他の態様は、前記心筋細胞が、多能性幹細胞を分化誘導して得られる心筋細胞および/または心筋前駆細胞である、前記心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤を提供することである。

本発明の他の態様は、前記薬剤が、i) GSK3 $\beta$ 阻害剤、CaMK2阻害剤およびp38阻害剤、もしくは、ii) GSK3 $\beta$ 阻害剤、ERK活性化剤およびp38阻害剤から成る、前記心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤を提供することである。

本発明の他の態様は、前記薬剤が、CyclinA2、CyclinD2、CyclinD3、Cdk2およびcdk4の発現を増強させ、Ink4bの発現を減少させる、前記心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤を提供することである。

40

本発明の他の態様は、前記GSK3 $\beta$ 阻害剤がCHIR99021またはBIOであり、前記ERK脱リン酸化阻害剤がSU1498であり、前記Raf活性化剤がZM336372であり、前記CaMK2阻害剤がKN62またはKN93であり、前記p38阻害剤がSB203580である、前記心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤を提供することである。

本発明の他の態様は、前記薬剤が、i) BIO、SU1498およびSB203580、もしくは、ii) BIO、KN93およびSB203580から成る、前記心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤を提供することである。

本発明の他の態様は、心筋細胞および/または心筋前駆細胞を、GSK3 $\beta$ 阻害剤、ERK脱リン酸化阻害剤、Raf活性化剤、CaMK2阻害剤およびp38阻害剤からなる群より選ばれる少なくとも一つの化合物を含有する培地で培養する工程を含む、心筋細胞および/または心筋前

50

駆細胞の増殖方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記心筋細胞および心筋前駆細胞がそれぞれヒト心筋細胞およびヒト心筋前駆細胞である、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記心筋細胞および/または心筋前駆細胞が、多能性幹細胞を分化誘導して得られる心筋細胞および/または心筋前駆細胞である、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記薬剤が、i) GSK3 $\beta$ 阻害剤、CaMK2阻害剤およびp38阻害剤、もしくは、ii) GSK3 $\beta$ 阻害剤、ERK活性化剤およびp38阻害剤から成る、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記薬剤が、CyclinA2、CyclinD2、CyclinD3、Cdk2およびcdk4の発現を増強させ、Ink4bの発現を減少させる、前記方法を提供することである。 10

本発明の他の態様は、前記GSK3 $\beta$ 阻害剤がCHIR99021またはBIOであり、前記Raf活性化剤がZM336372であり、前記ERK活性化剤がSU1498であり、前記CaMK2阻害剤がKN62またはKN93であり、前記p38阻害剤がSB203580である、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、前記薬剤が、i) BIO、SU1498およびSB203580、もしくは、ii) BIO、KN93およびSB203580から成る、前記方法を提供することである。

本発明の他の態様は、以下の工程を含む、心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤のスクリーニング方法を提供することである。

(1) 試験物質を、多能性幹細胞を分化誘導して得られた心筋細胞および/または心筋前駆細胞に接触させる工程、 20

(2) 工程(1)の後に心筋細胞および/または心筋前駆細胞の数を計測する工程、及び

(3) 心筋細胞および/または心筋前駆細胞の数が、試験物質と接触させないときの心筋細胞および/または心筋前駆細胞の数よりも大きい場合に、該試験物質を心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤として選択する工程。

本発明の他の態様は、以下の工程を含む、心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤のスクリーニング方法を提供することである。

(1) 試験物質を、多能性幹細胞を分化誘導して得られた心筋細胞および/または心筋前駆細胞に接触させる工程、

(2) 工程(1)の後に心筋細胞および/または心筋前駆細胞の数を計測する工程、及び

(3) 心筋細胞および/または心筋前駆細胞の数が、心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖能を有する陽性コントロール物質と接触させたときの心筋細胞および/または心筋前駆細胞の数と比べて同等または大きい場合に、該試験物質を心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤として選択する工程。 30

本発明の他の態様は、前記陽性コントロール物質がGSK3 $\beta$ 阻害剤、ERK脱リン酸化阻害剤、Raf活性化剤、CaMK2阻害剤およびp38阻害剤からなる群より選ばれる少なくとも一つの化合物である、前記方法を提供することである。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1aは、マウス改変ES細胞であるEMG-7から分化誘導されたFlkd6へ7つの薬剤を添加し培養したときの1つのウェルあたりのalpha-MHC-GFP陽性細胞数のグラフを示す。ここで、DMSOは基剤のみの添加による対照である。図1bは、EMG-7から分化誘導されたFlkd6へBIO、SU(SU1498)およびKN93をそれぞれ添加し2日間(Flkd6+2)および5日間(Flkd6+5)培養したときの1つのウェルあたりのalpha-MHC-GFP陽性細胞数のグラフを示す。ここで、DMSOは基剤のみの添加による対照である。 40

【図2】図2は、EMG-7から分化誘導されたFlkd6へBIO、SU(SU1498)およびKN93をそれぞれ添加し3日間(Flkd6+3)および5日間(Flkd6+5)培養したときのヒストン3のリン酸化(pH3)をグレー、エチニルウリジン(EdU)を黄緑、troponin T type 2(cTnT)を赤色およびDAPIを青色で表した免疫染色像(a)(写真)ならびに各染色の陽性細胞数(bからe)を示す。ここで、DMSOは基剤のみの添加による対照である。

【図3】図3aおよびbは、EMG-7から分化誘導されたFlkd6へCHIR(CHIR99021)およびKN6 50

2をそれぞれ添加し培養したときの1つのウェルあたりのalpha-MHC-GFP陽性細胞数のグラフを示す。ここで、DMSOは基剤のみの添加による対照である。図3cは、CaMK2の各サブタイプをsiRNAで抑制した時のEMG-7から分化誘導された心筋細胞数のグラフを示す。ここで、siScrは、標的遺伝子のない無意味な配列を有するsiRNAを用いたときの対照心筋細胞数である。図3dは、EMG-7から分化誘導されたFlkd6へSU (SU1498)、PD (PD98059)、SU+PDおよびZM (ZM336372)をそれぞれ添加し培養したときの1つのウェルあたりのalpha-MHC-GFP陽性細胞数のグラフを示す。ここで、DMSOは基剤のみの添加による対照である。

【図4】図4aは、EMG-7から分化誘導されたFlkd6へBIO+ SU (SU1498)、BIO+ KN 93、SU+ KN93、BIO+ SU+ KN93、p38i (SB203580)、BIO+ SU+p38iおよびBIO+KN93+p38iをそれぞれ添加し培養したときの1つのウェルあたりのalpha-MHC-GFP陽性細胞数のグラフを示す。ここで、DMSOは基剤のみの添加による対照である。図4bからiは、EMG-7から分化誘導されたFlkd6へBIO+ p38i、BIO+ SUおよびBIO+ KN93をそれぞれ添加し培養したときの細胞中のCyclinA2 (b)、CyclinB2 (c)、CyclinD1 (d)、CyclinD2 (e)、CyclinD3 (f)、Cdk2 (g)、cdk4 (h) およびInk4b (i) のmRNAの発現量のDMSOを添加した時に対する相対値のグラフを示す。

【図5】図5は、ヒトiPS細胞株253G1由来の心筋細胞へBIO、SU (SU1498)、KN93、p38i (SB203580)、BIO+ SU+p38iおよびBIO+ KN+p38iをそれぞれ添加し培養したときの1つのウェルあたりのtroponin T type 2 (cTnT) 陽性細胞数のグラフ (a)、およびヒストン3のリン酸化 (pH3) をグレー、エチニルウリジン (EdU) を黄緑、troponin T type 2 (cTnT) を赤色およびDAPIを青色で表した免疫染色像 (b) (写真) を示す。ここで、DMSOは基剤のみの添加による対照である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、GSK3β阻害剤、ERK脱リン酸化阻害剤、Raf活性化剤、CaMK2阻害剤および/またはp38阻害剤を用いた心筋細胞および/または心筋前駆細胞の増殖方法を提供する。

【0013】

<GSK-3β阻害剤>

本発明に係る「GSK-3β阻害剤」とは、GSK (グリコーゲンシンターゼキナーゼ) -3β蛋白質のキナーゼ活性 (例えばβカテニンに対するリン酸化能) を阻害する物質として定義され、既に多数のものが知られているが、その具体例としては、インジルビン誘導体であるBIO (別名、GSK-3βインヒビターIX; 6-ブロモインジルビン3'-オキシム)、マレイミド誘導体であるSB216763 (3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン)、フェニルαブロモメチルケトン化合物であるGSK-3βインヒビターVII (4-ジブロモアセトフェノン)、CHIR99021、6- [(2-{[4-(2,4-ジクロロフェニル)-5-(4-メチルイミダゾール-2-イル)ピリジン-2-イル]アミノ}エチル)アミノ]ピリジン-3-カルボニトリル (WO1999/65897)、および、細胞膜透過型のリン酸化ペプチドであるL803-mts (別名、GSK-3βペプチドインヒビター; Myr-N-GKEAPPAPPQSpP-NH<sub>2</sub>)、ならびにこれらの誘導体などが挙げられる。これらの化合物はCalbiochem社、Biomol社やStemgen社等から市販されており、容易に使用することが可能であるが、特にこれらに限定されない。

【0014】

対象細胞へのGSK-3β阻害剤の接触は、該阻害物質を適当な濃度で水性もしくは非水性溶媒に溶解し、適した培地 (例えば、約5~20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地 (MEM)、ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM)、alpha MEM、RPMI1640培地、199培地、F12培地など) 中に、阻害物質濃度がGSK-3βの機能阻害に十分で且つ細胞毒性がみられない範囲となるように該阻害物質溶液を添加して、細胞を一定期間培養することにより実施することができる。阻害物質濃度は用いる阻害物質の種類によって異なるが、例えば、約100nM~約10μMの範囲で適宜選択される。接触期間は対象細胞が増殖するために十分な時間であれば特に制限はないが、例えば、2日から5日の範囲で適宜選択される。

【0015】

10

20

30

40

50

#### <ERK脱リン酸化阻害剤>

本発明に係る「ERK脱リン酸化阻害剤」とは、ERKと脱リン酸化酵素との結合を阻害し、ERKの脱リン酸化を阻害する物質として定義され、SU1498 ((E)-3-(3,5-ジイソプロピル-4-ヒドロキシフェニル)-2-[(3-フェニル-n-プロピル)アミノカルボニル]アクリロニトリル) またはAG1296 (6,7-ジメトキシ-3-フェニルキノキサリン) が例示される。本発明におけるERKは、ERK1/2が例示される。本剤によってリン酸化が維持されるERKのリン酸化部位としては、例えばJ Biol Chem. 279, 5716 (2004)に記載の202番目および204番目のチロシンが例示されるがこれに限定されない。これらの化合物はCalbiochem社から市販されており、容易に使用することが可能であるが、特にこれらに限定されない。

#### 【0016】

対象細胞へのERK脱リン酸化阻害剤の接触は、該阻害物質を適当な濃度で水性もしくは非水性溶媒に溶解し、適した培地（例えば、約5～20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、alpha MEM、RPMI1640培地、199培地、F12培地など）中に、阻害物質濃度がERKの脱リン酸化の阻害に十分で且つ細胞毒性がみられない範囲となるように該阻害物質溶液を添加して、細胞を一定期間培養することにより実施することができる。阻害物質濃度は用いる阻害物質の種類によって異なるが、例えば、約10nM～約10μMの範囲で適宜選択される。接触期間は対象細胞が増殖するために十分な時間であれば特に制限はないが、例えば、2日から5日の範囲で適宜選択される。

#### 【0017】

#### <Raf活性化剤>

本発明に係る「Raf活性化剤」とは、細胞内のRafを活性化する物質として定義され、ZM336372 (3-(ジメチルアミノ)-N-[3-[(4-ヒドロキシベンゾイル)アミノ]-4-メチルフェニル]ベンズアミド) が例示される。本発明におけるRafは、Raf-1が例示される。ZM336372は、Calbiochem社から市販されており、容易に使用することが可能であるが、特にこれに限定されない。

#### 【0018】

対象細胞へのRaf活性化剤の接触は、該活性化物質を適当な濃度で水性もしくは非水性溶媒に溶解し、適した培地（例えば、約5～20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、alpha MEM、RPMI1640培地、199培地、F12培地など）中に、活性化物質濃度がRafの活性化に十分で且つ細胞毒性がみられない範囲となるように該活性化物質溶液を添加して、細胞を一定期間培養することにより実施することができる。活性化物質濃度は用いる活性化物質の種類によって異なるが、例えば、約10nM～約10μMの範囲で適宜選択される。接触期間は対象細胞が増殖するために十分な時間であれば特に制限はないが、例えば、2日から5日の範囲で適宜選択される。

#### 【0019】

#### <CaMK2阻害剤>

本発明に係る「CaMK2阻害剤」とは、CaMK2の機能を阻害する物質もしくはCaMK2遺伝子の発現を阻害する物質として定義され、（1）KN62 (1-[N,0-ビス(5-イソキノリンスルホニル)-N-メチル-L-チロシル]-4-フェニルピペラジン) またはKN93 (2-[N-(2-ヒドロキシエチル)]-N-(4-メトキシベンゼンスルホニル)]アミノ-N-(4-クロロシンナミル)-N-メチルベンジルアミン) に例示される化学的阻害物質、（2）カルモジュリン結合部位と競合的に作用するドミナントネガティブ変異体（例えば、CaMK(281-302Ala286)（アミノ酸配列：MHRQEAVDCLKKFNARRKLKGA：SEQ ID No:13）およびこれをコードする核酸、（3）CaMK2に対するsiRNA及びshRNA等が例示される。本発明において、好ましいCaMK2のアイソフォームは、Camk2dおよびCamk2gである。

#### 【0020】

例示された化学的阻害物質はCalbiochem社またはWako社から市販されており、容易に使用することが可能であるが、化学的阻害物質は特にこれらに限定されない。

#### 【0021】

CaMK2に対するsiRNA及びshRNAは、CaMK2の配列から、例えば、Ambionが提供するsiRNA Ta

10

20

30

40

50

arget Finder ([http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/jp/techlib/misc/siRNA_finder.html)) を利用して容易に設計することができる。好ましいCaMK2に対するsiRNA配列として、配列番号5～12の標的配列が例示される。siRNAは1種を単独で用いても良く、複数種を同時に用いても良い。siRNA及びshRNAを構成するヌクレオチド分子は、天然型のRNAでもよいが、安定性（化学的および／または対酵素）や比活性（mRNAとの親和性）を向上させるために、種々の化学修飾を含むことができる。例えば、ヌクレアーゼなどの加水分解酵素による分解を防ぐために、アンチセンス核酸を構成する各ヌクレオチドのリン酸残基（ホスフェート）を、例えば、ホスホロチオエート（PS）、メチルホスホネート、ホスホロジチオネートなどの化学修飾リン酸残基に置換することができる。また、各ヌクレオチドの糖（リボース）の2'位の水酸基を、-OR（Rは、例えばCH<sub>3</sub>（2'-O-Me）、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OCH<sub>3</sub>（2'-O-MOE）、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NHC(NH)NH<sub>2</sub>、CH<sub>2</sub>CONHCH<sub>3</sub>、CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN等を示す）に置換してもよい。さらに、塩基部分（ピリミジン、プリン）に化学修飾を施してもよく、例えば、ピリミジン塩基の5位へのメチル基やカチオン性官能基の導入、あるいは2位のカルボニル基のチオカルボニルへの置換などが挙げられる。

10

#### 【0022】

対象細胞へのCaMK2の化学的阻害物質の接触は、該阻害物質を適当な濃度で水性もしくは非水性溶媒に溶解し、適した培地（例えば、約5～20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、alpha MEM、RPMI1640培地、199培地、F12培地など）中に、該阻害物質濃度がCaMK2の阻害に十分で且つ細胞毒性がみられない範囲となるように該阻害物質溶液を添加して、細胞を一定期間培養することにより実施することができる。阻害物質濃度は用いる阻害物質の種類によって異なるが、例えば、約10nM～約10μMの範囲で適宜選択される。接触期間は対象細胞が増殖するために十分な時間であれば特に制限はないが、例えば、2日から5日の範囲で適宜選択される。

20

#### 【0023】

対象細胞へのCaMK2のドミナントネガティブ変異体の接触は、当業者に周知のタンパク質導入方法を用いて実施することができる。そのような方法としては、例えば、タンパク質導入試薬を用いる方法、タンパク質導入ドメイン（PTD）融合タンパク質を用いる方法、マイクロインジェクション法などが挙げられる。タンパク質導入試薬としては、カチオン性脂質をベースとしたBioPOTER Protein Delivery Reagent（Gene Therapy Systems）、Pro-Ject<sup>TM</sup> Protein Transfection Reagent（PIERCE）及びProVectin（IMGENEX）、脂質をベースとしたProfect-1（Targeting Systems）、膜透過性ペプチドをベースとしたPenetrain Peptide（Q biogene）及びChariot Kit（Active Motif）等が市販されている。導入はこれらの試薬に添付のプロトコルに従って行うことができる。

30

#### 【0024】

対象細胞へのCaMK2に対するsiRNAもしくはshRNAは、直接接触させても良く、CaMK2に対するsiRNAもしくはshRNAを発現するベクターを接触させる方法で実施することができる。siRNAもしくはshRNAを発現するベクターは、例えば、polIII系プロモーターと該siRNAもしくは該shRNAを連結させた発現カセットをプラスミドベクターもしくはウィルスベクターへ組み込むことで作製される。siRNA、shRNAまたはこれらを発現するプラスミドベクターは、当業者に周知の導入方法を用いて実施することができる。そのような方法としては、リポソーム法、ポリアミン法、エレクトロポレーション法、ビーズ法等が例示される。リポソーム試薬としては、Lipofectamine2000、Oligofectamine（Invitrogen）、GeneErase<sup>rTM</sup> siRNA transfection reagent（Stratagene）等が市販されている。導入はこれらの試薬に添付のプロトコルに従って行うことができる。また、ウィルスベクターとしては、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルスなどが例示され、当業者に周知の方法で細胞へ導入することができる。

40

#### 【0025】

<p38阻害物質>

本明細書に係る「p38阻害物質」とは、p38タンパク質の機能を阻害する物質として定義され、例えば、p38の化学的阻害物質、p38のドミナントネガティブ変異体もしくはそれをコ

50

ードする核酸などが挙げられるが、これらに限定されない。

#### 【0026】

本発明における、p38の化学的阻害物質としては、SB203580(4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルホニルフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イミダゾール)、及びその誘導体、SB202190 (4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-ヒドロキシフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イミダゾール) 及びその誘導体、SB239063 (trans-4-[4-(4-フルオロフェニル)-5-(2-メトキシ-4-ピリミジニル)-1H-イミダゾール-1-イル]シクロヘキサノール) 及びその誘導体、SB220025及びその誘導体、PD169316、RPR200765A、AMG-548、BIRB-796、SC10-469、SC10-323、VX-702、FR167653が例示されるが、これらに限定されない。これらの化合物は市販されており、例えばSB203580、SB202190、SC239063、SB220025およびPD169316についてはCalbiochem社、SC10-469およびSC10-323についてはScios社などから入手可能である。

10

#### 【0027】

また、p38のドミナントネガティブ変異体は、p38のDNA結合領域に位置する180位のスレオニンをアラニンに点変異させたp38T180A、ヒトおよびマウスにおけるp38の182位のチロシンをフェニルアラニンに点変異させたp38Y182Fなどが挙げられる

#### 【0028】

対象細胞へのp38の化学的阻害物質の接触は、該阻害物質を適当な濃度で水性もしくは非水性溶媒に溶解し、適した培地（例えば、約5〜20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、alpha MEM、RPMI1640培地、199培地、F12培地など）中に、該阻害物質濃度がp38の阻害に十分で且つ細胞毒性がみられない範囲となるように該阻害物質溶液を添加して、細胞を一定期間培養することにより実施することができる。阻害物質濃度は用いる阻害物質の種類によって異なるが、例えば、約10nM〜約10μMの範囲で適宜選択される。接触期間は対象細胞が増殖するために十分な時間であれば特に制限はないが、例えば、2日から5日の範囲で適宜選択される。

20

#### 【0029】

対象細胞へのp38のドミナントネガティブ変異体の接触は、上述のCaMK2のドミナントネガティブ変異体と同様の方法を用いて行うことができる。

#### 【0030】

他の態様として、本発明において、上述のGSK3β阻害剤、ERK脱リン酸化阻害剤、Raf活性化剤、CaMK2阻害剤およびp38阻害剤は、CyclinA2、CyclinD2、CyclinD3、Cdk2およびcdk4の発現を増強させ、Ink4bの発現を減少させる薬剤であってもよい。

30

#### 【0031】

本発明における対象細胞は、心筋細胞および/または心筋前駆細胞であり、好ましくは、多能性幹細胞を分化誘導して得られる心筋細胞および/または心筋前駆細胞が例示される。

#### 【0032】

<多能性幹細胞>

本発明で使用可能な多能性幹細胞は、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、以下のものに限定されないが、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)細胞などが含まれる。好ましい多能性幹細胞は、ES細胞、ntES細胞、およびiPS細胞である。

40

#### 【0033】

(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。

#### 【0034】

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. Evan

50



s および 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および J.A. Thomson および V.S. Marshall (1998), Curr. Top. Dev. Biol., 38:133-165)。

#### 【0035】

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地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およびH. Kawasaki et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:1580-1585などに記載されている。

#### 【0036】

ES細胞作製のための培地として、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及び4ng/ml bFGFを補充したDMEM/F-12培地を使用し、37℃、5% CO<sub>2</sub>湿潤雰囲気下でヒトES細胞を維持することができる。また、ES細胞は、3〜4日おきに継代する必要がある、このとき、継代は、例えば1mM CaCl<sub>2</sub>及び20% KSRを含むPBS中の0.25% トリプシン及び0.1mg/ml コラゲナーゼIVを用いて行うことができる。

#### 【0037】

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行うことができる。特に、ヒトES細胞の選択では、OCT-3/4、NANOG、などの遺伝子マーカーの発現をReal-Time PCR法で検出したり、細胞表面抗原であるSSEA-3、SSEA-4、TRA-1-60、TRA-1-81を免疫染色法にて検出することで行うことができる (Klimanskaya I, et al. (2006), Nature. 444:481-485)。

#### 【0038】

ヒトES細胞株である例えばKhES-1、KhES-2及び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。

#### 【0039】

##### (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))を含む培地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(竹橋正則ら(2008), 実験医学, 26巻, 5号(増刊), 41〜46頁, 羊土社(東京、日本))。

#### 【0040】

##### (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)。

#### 【0041】

##### (D) 人工多能性幹細胞

人工多能性幹(iPS)細胞は、ある特定の核初期化物質を、DNAまたはタンパク質の形態で

10

20

30

40

50

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

10

#### 【0042】

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

20

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

#### 【0043】

これらの核初期化物質は、タンパク質の形態で、例えばリポフェクション、細胞膜透過性ペプチドとの結合、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入してもよいし、あるいは、DNAの形態で、例えば、ウイルス、プラスミド、人工染色体などのベクター、リポフェクション、リポソーム、マイクロインジェクションなどの手法によって体細胞内に導入することができる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター（以上、Cell, 126, pp.663-676, 2006; Cell, 131, pp.861-872, 2007; Science, 318, pp.1917-1920, 2007）、アデノウイルスベクター（Science, 322, 945-949, 2008）、アデノ随伴ウイルスベクター、センダイウイルスベクター（Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 85, 348-62, 2009）などが例示される。また、人工染色体ベクターとしては、例えばヒト人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、細菌人工染色体(BAC、PAC)などが含まれる。プラスミドとしては、哺乳動物細胞用プラスミドを使用する（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。使用されるプロモーターとしては、例えばEF1αプロモーター、CAGプロモーター、SRαプロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMV（サイトメガロウイルス）プロモーター、RSV（ラウス肉腫ウイルス）プロモーター、MoMuLV（モロニーマウス白血病ウイルス）LTR、HSV-TK（単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターなどが用いられる。なかでも、EF1αプロモーター、CAGプロモーター、MoMuLV LTR、CMVプロモーター、SRαプロモーターなどが挙げられる。さらに、必要に応じて、薬剤耐性遺伝子（例えばカナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ピューロマイシン耐性遺伝子など）、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子などの選択マーカー配列、緑色蛍光タンパク質(GFP)、βグルクロニダーゼ(GUS)

30

40

50

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

#### 【0044】

核初期化に際して、iPS細胞の誘導効率を高めるために、上記の因子の他に、例えば、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 阻害剤 [例えば、バルプロ酸 (VPA) (Nat. Biotechnol., 26 (7): 795-797 (2008))、トリコスタチンA、酪酸ナトリウム、MC 1293、M344等の低分子阻害剤、HDACに対するsiRNAおよびshRNA (例、HDAC1 siRNA Smartpool(登録商標) (Millipore)、HuSH 29mer shRNA Constructs against HDAC1 (OriGene)等) 等の核酸性発現阻害剤など]、DNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤 (例えば5'-azacytidine) (Nat. Biotechnol., 26(7): 795-797 (2008))、G9aヒストンメチルトランスフェラーゼ阻害剤 [例えば、BIX-01294 (Cell Stem Cell, 2: 525-528 (2008))等の低分子阻害剤、G9aに対するsiRNAおよびshRNA (例、G9a siRNA(human) (Santa Cruz Biotechnology)等) 等の核酸性発現阻害剤など]、L-channel calcium agonist (例えばBayk8644) (Cell Stem Cell, 3, 568-574 (2008))、p53阻害剤 (例えばp53に対するsiRNAおよびshRNA) (Cell Stem Cell, 3, 475-479 (2008))、Wnt Signaling activator (例えばsoluble Wnt3a) (Cell Stem Cell, 3, 132-135 (2008))、LIFまたはbFGFなどの増殖因子、ALK5阻害剤 (例えば、SB431542) (Nat. Methods, 6: 805-8 (2009))、mitogen-activated protein kinase signalling 阻害剤、glycogen synthase kinase-3阻害剤 (PloS Biology, 6(10), 2237-2247 (2008))、miR-291-3p、miR-294、miR-295などのmiRNA (R.L. Judson et al., Nat. Biotech., 27:459-461 (2009))、等を使用することができる。

#### 【0045】

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

#### 【0046】

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

#### 【0047】

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

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

#### 【0048】

あるいは、その代替培養法として、フィーダー細胞（たとえば、マイトマイシンC処理STO細胞、SNL細胞等）上で10%FBS含有DMEM培地（これにはさらに、LIF、ペニシリン/ストレプトマイシン、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日またはそれ以上ののちにES様コロニーを生じさせることができる。

10

#### 【0049】

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

#### 【0050】

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

20

#### 【0051】

本明細書中で使用する「体細胞」は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、サル、ブタ、ラット等）由来の生殖細胞以外のいかなる細胞であってもよく、例えば、角質化する上皮細胞（例、角質化表皮細胞）、粘膜上皮細胞（例、舌表層の上皮細胞）、外分泌腺上皮細胞（例、乳腺細胞）、ホルモン分泌細胞（例、副腎髄質細胞）、代謝・貯蔵用の細胞（例、肝細胞）、境界面を構成する内腔上皮細胞（例、I型肺胞細胞）、内鎖管の内腔上皮細胞（例、血管内皮細胞）、運搬能をもつ繊毛のある細胞（例、気道上皮細胞）、細胞外マトリックス分泌用細胞（例、線維芽細胞）、収縮性細胞（例、平滑筋細胞）、血液と免疫系の細胞（例、Tリンパ球）、感覚に関する細胞（例、桿細胞）、自律神経系ニューロン（例、コリン作動性ニューロン）、感覚器と末梢ニューロンの支持細胞（例、随伴細胞）、中枢神経系の神経細胞とグリア細胞（例、星状グリア細胞）、色素細胞（例、網膜色素上皮細胞）、およびそれらの前駆細胞（組織前駆細胞）等が挙げられる。細胞の分化の程度や細胞を採取する動物の齢などに特に制限はなく、未分化な前駆細胞（体性幹細胞も含む）であっても、最終分化した成熟細胞であっても、同様に本発明における体細胞の起源として使用することができる。ここで未分化な前駆細胞としては、たとえば神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）が挙げられる。

30

#### 【0052】

本発明において、体細胞を採取する由来となる哺乳動物個体は特に制限されないが、好ましくはヒトである。

40

#### 【0053】

(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

50

al. (1998), Nat. 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再プログラム化することができる。

#### 【0054】

##### (F) 融合幹細胞

体細胞と卵子もしくはES細胞とを融合させることにより、融合させたES細胞と同様な多能性を有し、さらに体細胞に特有の遺伝子も有する幹細胞である(Tada M et al. Curr Biol. 11:1553-8, 2001; Cowan CA et al. Science. 2005 Aug 26;309(5739):1369-73)。

#### 【0055】

##### <心筋細胞および心筋前駆細胞の分化誘導法>

本発明において、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、拍動筋肉と電気伝導組織を形成する心筋細胞および血管平滑筋を生じる能力を有する細胞を意味する。ここで、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。

#### 【0056】

心筋細胞および心筋前駆細胞とは、心筋マーカーである心筋トロポニン(cTNTまたはtropomyosin T type 2) 陽性および/または $\alpha$ MHC( $\alpha$  myosin heavy chain) 陽性であることによって特徴づけられる。心筋細胞および心筋前駆細胞の増殖を測定する場合、これらのマーカーのいずれか1つ以上の発現量またはこれらのマーカーのプロモーターに結合されたレポーター遺伝子の発現量を指標とすることができる。

#### 【0057】

ES細胞、iPS細胞などの多能性幹細胞から心筋細胞および心筋前駆細胞への分化誘導に際して、以下の方法を用いることができる。

#### 【0058】

前述のように得られた多能性幹細胞を任意の方法で分離し、コーティング処理された培養皿を用いて接着培養、フィーダー細胞との共培養、および/または浮遊培養を行ってもよい。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またはEDTA溶液(例えば、0.5mM EDTA溶液)を用いても良い。ここで、接着培養においては、コーティング処理された培養皿にて、任意の培地中で培養する。コーティング剤としては、例えば、マトリゲル(BD)、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が挙げられる。好ましくは、ゼラチンまたはIV型コラーゲンである。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。浮遊培養は、細胞接着特性を向上させるための人工的な処理(例えば、細胞外マトリクスなどによるコート処理)がされていない培養皿、または接着を人工的に抑制するための処理(例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)によるコート処理)がされた培養皿を用いて行うことができる。しかしながら、これらの例には限定されない。他の態様では、浮遊培養と付着培養との組み合わせ法がなされる。好ましくは、浮遊培養の後に付着培養がなされる。

#### 【0059】

本工程における培地は、動物細胞の培養に用いられる培地を基礎培地として調製することができる。基礎培地としては、例えばIMDM培地、Medium 199培地、Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)培地、 $\alpha$  MEM培地、Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)培地、Ham's F12培地、RPMI 1640培地、Fischer's培地、およびこれらの混合培地などが包含される。好ましくは、 $\alpha$  MEM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)、B-27 Suppl

10

20

30

40

50

ement (Invitrogen)、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、2-メルカプトエタノール、3'-チオールグリセロールなどの1つ以上の血清代替物を含んでもよいし、脂質、アミノ酸、L-グルタミン、Glutamax (Invitrogen)、非必須アミノ酸、ビタミン、増殖因子、抗生物質、抗酸化剤、ピルビン酸、緩衝剤、無機塩類、Dkk1、シクロスポリンAなどの1つ以上の物質も含有しうる。本発明において好ましい増殖因子として、bFGF、アクチビンAおよびBMP4が例示される。

【0060】

好ましい培地として、10%FBSを含有するαMEM培地、1~3μg/mLのシクロスポリンAおよび10%FBSを含有するαMEM培地、ならびに10%FBSを含有するDMEM培地が例示される。

【0061】

培養温度は、以下に限定されないが、約30~40℃、好ましくは約37℃であり、CO<sub>2</sub>含有空気の雰囲気下で培養が行われ、CO<sub>2</sub>濃度は、好ましくは約2~5%である。培養時間は、心筋トロポニンおよび/またはαMHCが発現するために必要な日数であり、例えば10日から20日間である。

【0062】

好ましい条件として、10%FBSを含有するαMEM培地で4日間培養後、Flk1陽性細胞を単離し、3μg/mLのシクロスポリンAおよび10%FBSを含有するαMEM培地を用いてOP9細胞と6日間共培養する条件、もしくは10%FBSを含有するDMEM培地を用いてEND-2細胞と16日間共培養する条件が挙げられる。

【0063】

<心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤のスクリーニング方法>

本発明は、心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤のスクリーニング方法を提供する。

【0064】

心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤は、多能性幹細胞の分化誘導によって得られた心筋細胞および/または心筋前駆細胞を増殖させるために使用でき、また、心筋細胞の欠損によって生じる疾患の治療薬としても使用できる。心筋細胞の欠損によって生じる疾患としては心筋炎や心筋梗塞が例示されるが、これらには限定されない。

【0065】

心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤のスクリーニング方法の例としては、以下の工程を含む方法が挙げられる。

(1-1) 試験物質を、多能性幹細胞を分化誘導して得られた心筋細胞および/または心筋前駆細胞に接触させる工程、

(1-2) 工程(1-1)の後に心筋細胞および/または心筋前駆細胞の数を計測する工程、及び

(1-3) 心筋細胞および/または心筋前駆細胞の数が、試験物質と接触させないときの心筋細胞および/または心筋前駆細胞の数(参照の数)よりも大きい場合に、該試験物質を心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤として選択する工程。

【0066】

多能性幹細胞の分化誘導によって得られた心筋細胞および/または心筋前駆細胞の好ましい例としては、多能性幹細胞を、10%FBSを含むαMEMで約4日間、次いで、Flk1陽性細胞を単離し、該Flk1陽性細胞を、OP9細胞の存在下、3μg/mLのシクロスポリンAおよび10%FBSを含むαMEMを用いて約6日間培養することによって得られた心筋細胞および/または心筋前駆細胞が挙げられる。

【0067】

心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤のスクリーニング方法の他の例としては、以下の工程を含む方法が挙げられる。

(2-1) 試験物質を、多能性幹細胞を分化誘導して得られた心筋細胞および/または心筋前駆細胞に接触させる工程、

(2-2) 工程(2-1)の後に心筋細胞および/または心筋前駆細胞の数を計測する工

10

20

30

40

50

程、及び

(2-3) 心筋細胞および/または心筋前駆細胞の数が、心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖能を有する陽性コントロール物質と接触させたときの心筋細胞および/または心筋前駆細胞の数(参照の数)と比べて同等または大きい場合に、該試験物質を心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤として選択する工程。

【0068】

数は参照の数と実質的に同等であれば、参照の数と同等とすることができ、例えば、計測された数と参照の数の違いは約5%以内、好ましくは約1%以内である。

【0069】

陽性コントロール薬剤の例としては、GSK3 $\beta$ 阻害剤、ERK脱リン酸化阻害剤、Raf活性化剤、CaMK2阻害剤およびp38阻害剤が挙げられる。

10

【0070】

心筋細胞および/または心筋前駆細胞の数は、例えば、顕微鏡下で一定の領域あたりの心筋細胞および/または心筋前駆細胞の数を計測すること、またはフローサイトメーターを用いて一定細胞数当たりの心筋マーカー陽性細胞を計測することにより計測することができる。心筋マーカーの例としては、心筋トロポニン、 $\alpha$ MHC、CD166(ALCM) (Rust W, et al, Regen Med. 4, 225-37 (2009))、N-カドヘリン (特開2010-158206A およびHonda M, et al, Biochem Biophys Res Commun. 29, 351, 877-82 (2006))、ならびにVCAM1 (CD106) (米国61/470,101)が挙げられる。

【0071】

20

本発明のスクリーニング方法においては、任意の試験物質が使用でき、試験物質の例としては、細胞抽出物、細胞培養上清、微生物発酵物、海洋生物由来抽出物、植物抽出物、精製および粗精製タンパク質、ペプチド、非ペプチド化合物、合成低分子化合物、および天然化合物が含まれる。試験物質は、1) 生物学ライブラリー法、2) デコンボリューションを用いた合成ライブラリー法、3) 1ビーズ1化合物ライブラリー法、4) アフィニティクロマトグラフィー選択を利用した合成ライブラリー法などの公知のコンビナトリアルライブラリー法の多くの手法を用いて得ることができる。アフィニティクロマトグラフィー選択を利用した合成ライブラリー法の利用はペプチドライブラリーには限定されず、他の手法がペプチド、非ペプチドオリゴマーまたは化合物の低分子化合物ライブラリー(Lam (1997) Anticancer Drug Des. 12: 145-67)に適用できる。分子ライブラリーの合成法の例が知られている (DeWitt et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6909-13; Erb et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 11422-6; Zuckermann et al. (1994) J. Med. Chem. 37: 2678-85; Cho et al. (1993) Science 261: 1303-5; Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2059; Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33: 2061; Gallop et al. (1994) J. Med. Chem. 37: 1233-51)。

化合物ライブラリーは、溶液 (Houghten (1992) Bio/Techniques 13: 412-21)、ビーズ (Lam (1991) Nature 354: 82-4)、チップ (Fodor (1993) Nature 364: 555-6)、細菌 (米国特許5,223,409 B)、孢子 (米国特許5,571,698 B, 米国特許 5,403,484 B および米国特許5,223,409 B)、プラスミド (Cull et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1865-9) またはファージ (Scott および Smith (1990) Science 249: 386-90; Devlin (1990) Science 249: 404-6; Cwirla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 6378-82; Felici (1991) J. Mol. Biol. 222: 301-10; US 2002-103360)として調製されてもよい。

30

40

【0072】

薬剤スクリーニングキット

本発明は、心筋細胞および/または心筋前駆細胞増殖剤をスクリーニングするためのキットを提供する。該キットは上記細胞、試薬、及び培地を含んでもよい。該キットはさらに、分化誘導プロトコルを記載した文書または仕様説明書を含んでもよい。

【0073】

以下の実施例は本発明を説明するために示し、本発明の範囲を何ら限定するものではない

50

。

## 【実施例】

## 【0074】

細胞および培養

マウスES細胞は、E14Tg2aの一方のアリルにおいてOct3/4遺伝子領域へIRESBSDpAをKnock inすることで作製されたES細胞株EB3 (Niwa H, et al, Nat Genet.24:372-6 (2000)) へ  $\alpha$ -MHCのプロモーターによりGFPの発現が制御されるベクターを導入したEMG-7(Yamashita J, FASEB J, 2005)を用いた。ヒトiPS細胞 (253G1) は、京都大学の山中教授より受領し、従来の方法で培養した (Nakagawa M, et al. Nat Biotechnol. 26:101-6 (2008))。尚、253G1は、理研BRCより入手可能である。

10

## 【0075】

心筋細胞への分化誘導方法

マウスES細胞株EMG-7を0.1%ゼラチンコートディッシュ上で10%FBS含有  $\alpha$  MEM培地を用いて108から110時間培養した。続いて、Flk1陽性細胞をFACSを用いて単離し、OP9細胞上で3  $\mu$ g/ml のCyclosporine Aを含有する培地 (10%FBS含有  $\alpha$  MEM) を用いて6日間培養して心筋細胞へ分化誘導した。この細胞をFlkd6と称す。

## 【0076】

ヒトiPS細胞株253G1を用いて、Mummery C, et al, Circulation. 107:2733-40 (2003)に記載の方法により心筋細胞へ分化誘導した。簡潔には、253G1細胞を10%FCS含有DMEM培地を用いて16日間END-2細胞と共培養することで行った。

20

## 【0077】

## 実施例 1

心筋細胞増殖促進剤のスクリーニング

EMG-7から分化誘導した上述のFlkd6から  $\alpha$ -MHC-GFPを指標としてFACSで純化した。得られた細胞に282個の候補薬剤を加えて培養し、5日後に、無添加群と比較して  $\alpha$ -MHC-GFP陽性細胞数が1.5倍以上であった薬剤を9種選択した。そのうち作用機序が異なるものを7剤選択した。さらに、これらの7剤のうち添加後の  $\alpha$ -MHC-GFP細胞数を有意に増加させる1  $\mu$ M のBIO (Calbiochem)、5  $\mu$ M のSU1498(Calbiochem)および5  $\mu$ M のKN93 (wako) を再選択した (図1a)。これらの3剤をFlkd6へ添加して2日間培養 (Flkd6+2) または5日間培養 (Flkd6+5) した時の  $\alpha$ -MHC-GFP陽性細胞数をFACSで測定したところ、特にFlkd6+5において陽性細胞数の有意な増加が確認された (図1b)。

30

## 【0078】

## 実施例 2

心筋細胞増殖促進剤の細胞周期へ与える影響

細胞周期へ与える影響を確認するため、ヒストン3のリン酸化 (pH3) (M期) およびエチニルウリジン (EdU) (S期) の陽性細胞数を確認した (図2a~d)。BIOは添加後早期からS期M期を促進することが確認された。

## 【0079】

## 実施例 3

同じ作用を有する他剤の効果

GSK3  $\beta$  阻害剤およびCa<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ2 (CaMK2) 阻害剤について、同様にFlkd6+5においてその効果を確認したところ、CHIR99021 (Stemgen) およびKN62(wako)においても同様の効果を有することを確認した (図3a, b)。さらに、CaMK2の各サブタイプのsiRNA (表1) により遺伝子を抑制したところ、Camk2dおよびCamk2gを抑制した時に有意に心筋細胞増殖促進効果が高かった (図3c)。また、SU1498のメカニズムを確認するため、MEK阻害剤であるPD98059と同時に添加したところその効果がなくなったことから (図3d)、SU1498はERKのリン酸化を保持することにより心筋細胞の増殖を促進させていると示唆された。これより、Raf 活性化剤であるZM336372(Calbiochem)についても検討したところ、SU1498と同様に心筋細胞増殖促進効果を有していることが確認された (図3d)。

40

50



【表 1】

表 1

| Target gene | Pooled siRNA target sequences | SEQ ID NO |
|-------------|-------------------------------|-----------|
| Camk2a      | GGCCUGGACUUUCAUCGAU           | 1         |
|             | GCAAAUGGCAGAUCGUCCA           | 2         |
|             | GUGCGACCCUGGAAUGACA           | 3         |
|             | GCGGAGGAAACAAGAAGAA           | 4         |
| Camk2d      | GAUCAAGGCCGGAGCUUAC           | 5         |
|             | GCUAGAAUCUGCCGUCUCU           | 6         |
|             | CGACGAGUAUCAGCUCUUU           | 7         |
|             | GAAGCGGGAUGCCAAAGAC           | 8         |
| Camk2g      | CGGUAGAGUGCUUACGCAA           | 9         |
|             | GCAAGGGUGCUGCGGUCAA           | 10        |
|             | ACUUGCUGCUGGCGAGUAA           | 11        |
|             | AGUAUGAGAAAGACGCAAA           | 12        |

## 【0080】

## 実施例 4

組み合わせによる効果および細胞周期関連遺伝子の発現について

p38の阻害剤にも心筋細胞の増殖の促進効果が報告されていることから（Engel FB, et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 103:15546-51 (2006)）、p38阻害剤であるSB203580を含めて、以下の組み合わせによる効果を検討した。濃度は、実施例 1 に記載したものと同様である。

- (1) BIO+ SU1498
- (2) BIO+ KN93
- (3) SU1498+ KN93
- (4) BIO+ SU1498+ KN93
- (5) SB203580
- (6) BIO+ SU1498+SB203580
- (7) BIO+ KN93+SB203580

## 【0081】

いずれの組み合わせも対照である基剤のみを加えた時より、EMG-7由来のFlkd6+5において alpha-MHC-GFP陽性細胞数を増加させた。特に、(1)、(2)、(6) および (7) の組み合わせにおいてその効果が高いことが確認された（図 4a）。

## 【0082】

続いて、CyclinA2、CyclinB2、CyclinD1、CyclinD2、CyclinD3、Cdk2、cdk4およびInk4bの細胞周期関連遺伝子の発現に与える影響をPCRで確認したところ、BIO+SUおよびBIO+KN93の組み合わせにおいて、CyclinA2、CyclinD2、CyclinD3、Cdk2およびcdk4において対照と比較して有意にその発現量を上げることが確認された。また逆に、Ink4bの発現を減少

させることも確認された（図 4 bから i）。

【0083】

#### 実施例 5

#### ヒト iPS 細胞由来の心筋細胞に対する効果

253G1 を上述の方法で心筋細胞へ分化し、各薬剤を 4 日間添加したときの troponin T type 2 (cTnT) 陽性細胞数を検出したところ、BIO、SU1498、BIO+ SU1498+SB203580 および BIO+ KN93+SB203580 において対照より比較的多く、特に BIO+ SU1498+SB203580 の場合、有意に当該細胞数が多かった（図 5 a）。この時の pH3 および EdU の免疫染色の陽性率を検討したところ、EdU の陽性率において、対照 ( $11.3 \pm 1.0\%$ ) に比べて、BIO ( $16.0 \pm 0.5\%$ )、SU1498 ( $14.3 \pm 0.4\%$ )、SB203580 ( $14.6 \pm 2.1\%$ )、BIO+ SU1498+SB203580 ( $19.9 \pm 1.4\%$ ) および BIO+KN93+SB203580 ( $16.3 \pm 4.3\%$ ) と陽性率が高かった（図 5 b）。

10

【産業上の利用可能性】

【0084】

本発明の GSK3  $\beta$  阻害剤、ERK 脱リン酸化阻害剤、Raf 活性化剤、CaMK2 阻害剤または p38 阻害剤を含む薬剤は、ES 細胞等の多能性幹細胞から分化誘導された心筋細胞または心筋前駆細胞の増殖促進剤として用いることができる。

【0085】

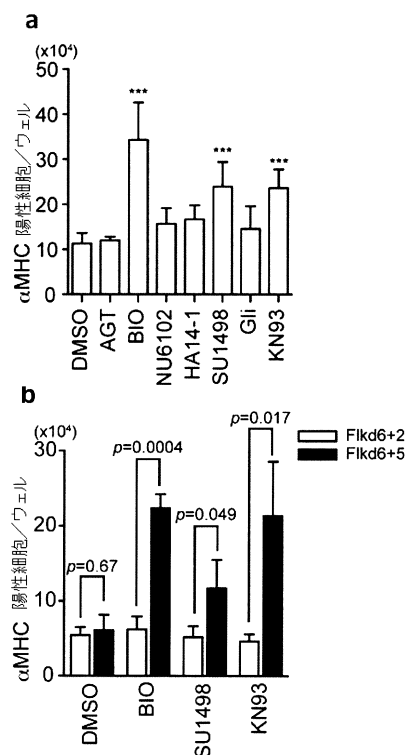
本発明を好ましい態様を強調して説明してきたが、好ましい態様に変更され得ることは当業者にとって自明であろう。本発明は、本発明が本明細書に詳細に記載された以外の方法で実施され得ることを意図する。従って、本発明は添付の「請求の範囲」の精神及び範囲に包含されるすべての変更を含むものである。

20

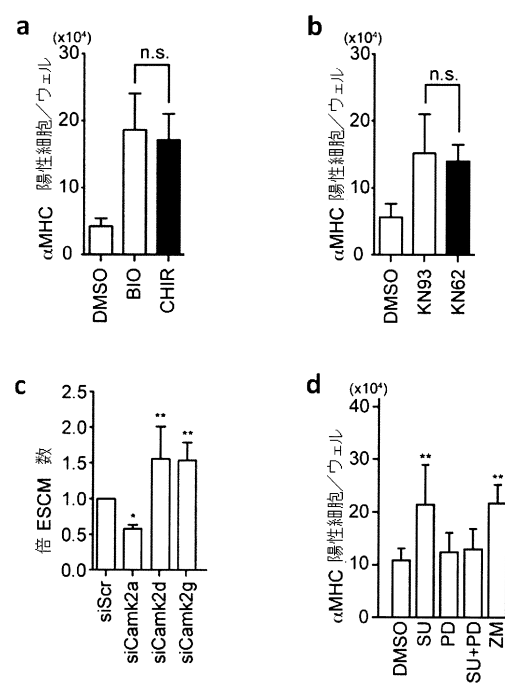
【0086】

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。

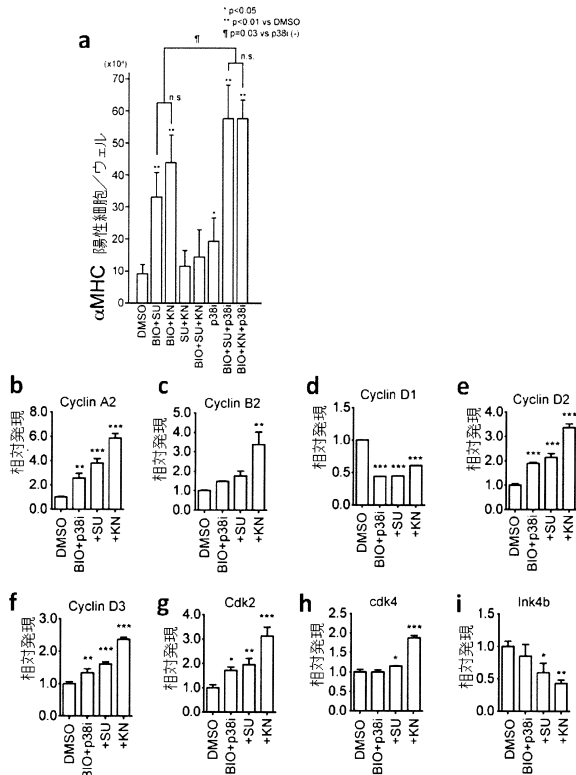
【図 1】



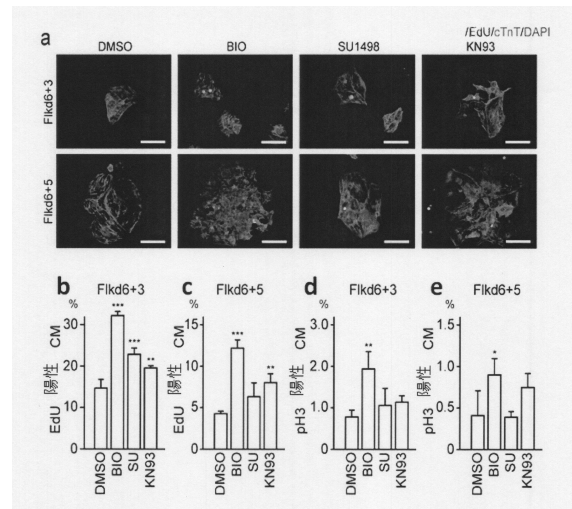
【図 3】



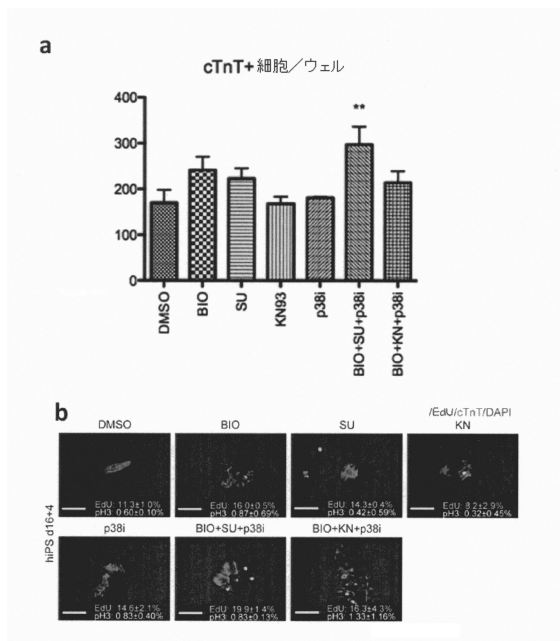
【図 4】



【図 2】



【図 5】



フロントページの続き

|                |             |                  |         |       |   |
|----------------|-------------|------------------|---------|-------|---|
| (51)Int.Cl.    |             |                  | F I     |       |   |
| <b>C 1 2 N</b> | <b>5/10</b> | <b>(2006.01)</b> | C 1 2 N | 5/10  |   |
| C 1 2 N        | 15/09       | (2006.01)        | C 1 2 N | 15/00 | A |

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 国際公開第2006/118914 (WO, A1)  
 特表2009-545302 (JP, A)  
 Chemistry & Biology, (2006), Vol. 13, p. 957-963  
 Proc Natl Acad Sci USA, (2006), Vol. 103, No. 42, p. 15546-15551  
 再生医療 日本再生医療学会雑誌, (2010), Vol. 9 Suppl, p. 158, 0-03-5  
 Trends Cardiovasc Med, (2005), Vol. 15, p. 225-229  
 Mol Cancer Ther, (2005), Vol. 4, No. 6, p. 910-917

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
 C 1 2 N 5/00  
 C 1 2 N 1/00  
 C 1 2 N 15/00  
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)  
 Caplus/MEDLINE/BIOSIS (STN)  
 WPIDS (STN)