

(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9月12日(12.09.2014)



(10) 国際公開番号
WO 2014/136519 A1

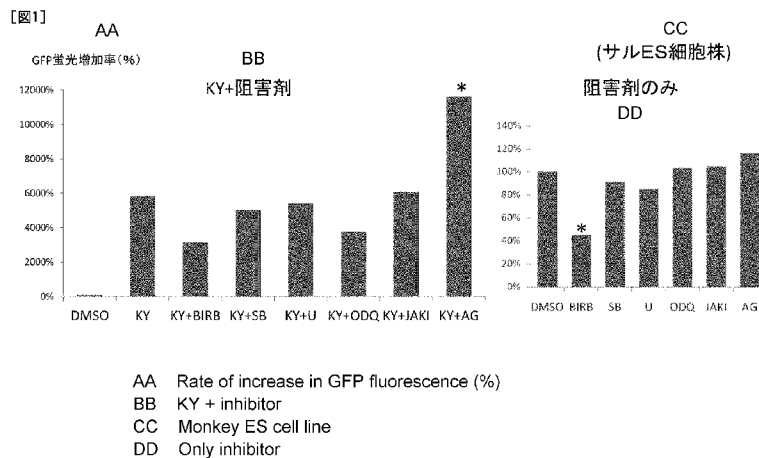
- (51) 国際特許分類:
C12N 5/07 (2010.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12N 5/0735 (2010.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/052673
- (22) 国際出願日: 2014年2月5日(05.02.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2013-046591 2013年3月8日(08.03.2013) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人京都大学(KYOTO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 Kyoto (JP).
- (72) 発明者: 中辻 憲夫(NAKATSUJI, Norio); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP). 南一成(MINAMI, Itsunari); 〒6068501 京都府京都市左京区吉田本町3番地1 国立大学法人京都大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 鮫島 睦, 外(SAMEJIMA, Mutsumi et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号梅田阪急ビルオフィスタワー青山特許事務所 Osaka (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, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, 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.
- (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, 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).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: PROMOTER OF DIFFERENTIATION OF PLURIPOTENT STEM CELL INTO MYOCARDIUM, WHICH COMPRISES EGF RECEPTOR INHIBITOR

(54) 発明の名称: EGF 受容体阻害剤を含む多能性幹細胞の心筋分化促進剤



(57) Abstract: The present invention provides a promoter of the differentiation of a pluripotent stem cell into a myocardium, which comprises an EGF receptor inhibitor. The present invention also provides: a kit for promoting the differentiation into a myocardium, which comprises an EGF receptor inhibitor; and a method for inducing the differentiation of a pluripotent stem cell into a myocardium, which comprises culturing the pluripotent stem cell in a culture medium containing an EGF receptor inhibitor.

(57) 要約: 本発明は、EGF 受容体阻害剤を含む多能性幹細胞の心筋分化促進剤を提供する。また、本発明は、EGF 受容体阻害剤を含む、心筋分化促進用キット、および EGF 受容体阻害剤を含む培地中で多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞の心筋分化誘導方法を提供する。

WO 2014/136519 A1

明 細 書

発明の名称：

E G F 受容体阻害剤を含む多能性幹細胞の心筋分化促進剤

技術分野

[0001] 本発明は、E G F 受容体阻害剤を含む多能性幹細胞の心筋分化促進剤に関する。また、本発明は、E G F 受容体阻害剤を含む、心筋分化促進用キット、およびE G F 受容体阻害剤を含む培地中で多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞の心筋分化誘導方法に関する。

背景技術

[0002] 多能性幹細胞の分化誘導方法は、再生医療の実現やインビトロでの薬効評価試験、あるいは薬剤安全性試験の確立の鍵を握るものである。特に、心疾患は現在日本人の死亡原因の第二位であり、再生医療や心疾患薬効評価については重要である。また心臓に対して心不全や不整脈など重篤な副作用を引き起こす薬物が多いことから、心毒性試験に用いることのできる均一な心筋細胞の安定的な供給が求められている。

[0003] ヒトE S / i P S 細胞を心筋へ分化させる手法として、マウス由来の支持細胞であるE N D 2 細胞とヒトE S 細胞を共培養する方法が報告されている（非特許文献1、参照により本明細書に含まれる）。しかしながら、その分化効率は低く、そのマウス由来のE N D 2 細胞がヒト心筋細胞に混入するため、純粋なヒト心筋細胞が得られないという問題がある。

[0004] ヒトE S / i P S 細胞を心筋へ分化させる他の手法として、E S 細胞から胚葉体を形成し、そこにいくつかのサイトカイン（維芽細胞成長因子（F G F）、骨形態形成タンパク4（B M P 4）、血管内皮細胞増殖因子、D K K 1、アクチビンA）を添加して心筋細胞を誘導する方法が報告されている（非特許文献2および3、参照により本明細書に含まれる）。また、B M P 4、F G F 2、インスリンと血清とを用いて心筋細胞を誘導する方法が報告されている（非特許文献4、参照により本明細書に含まれる）。しかしながら

、これらの方法は大量のサイトカインが必要なためコストが上昇し実用化には適さない。他に、タンキラーゼ阻害剤XAV939を用いてマウスES細胞から心筋細胞を誘導する方法も報告されているが（非特許文献5、参照により本明細書に含まれる）、血清を必要とする問題点に加え、誘導効率も10～60%と低いため、再生医療への適用が難しい。

[0005] 本発明者らは、これまでに、多能性幹細胞からの心筋分化を促進する低分子化合物を報告している（特許文献1および2、並びに非特許文献7、参照により本明細書に含まれる）。

[0006] 上皮成長因子（EGF）受容体は、EGFをリガンドとするチロシンキナーゼ型受容体であり、細胞増殖、分化、維持などの調節に重要である。EGFシグナリングは心臓発生においても重要な役割を持つことが報告されている（非特許文献6、参照により本明細書に含まれる）。また、EGF受容体は癌細胞の増殖や転移などにも深く関わっており、ゲフィチニブなどのEGF受容体阻害剤が抗癌剤として使用されている。しかしながら、ゲフィチニブやAG1478などのEGF受容体阻害剤をヒト多能性幹細胞の心筋分化に応用した報告はこれまでにない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第2011/071118号パンフレット

特許文献2：国際公開第2012/026491号パンフレット

非特許文献

[0008] 非特許文献1：Mummery, C., et al., Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation*. 107(21), 2733-40 (2003).

非特許文献2：Yang, L., et al., Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature*. 453(7194), 524-8 (2008).

非特許文献3：Leschik, J., et al., Cardiac commitment of primate embryo

onic stem cells. Nat Protoc. 3(9), 1381-7 (2008).

非特許文献4: Paul, W B., et al., A Universal System for Highly Efficient Cardiac Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells That Eliminates Interline Variability. PLoSone. 6(4), e18293 (2011).

非特許文献5: Wang, H., et al., Cardiac induction of embryonic stem cells by a small molecule inhibitor of Wnt/ β -catenin signaling. ACS Chem Biol. 6(2), 192-7 (2011).

非特許文献6: Iwamoto, R., et al., Heparin-binding EGF-like growth factor and ErbB signaling is essential for heart function. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(6), 3221-6 (2003).

非特許文献7: Minami, I., et al., A Small Molecule that Promotes Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells under Defined, Cytokine- and Xeno-free Conditions. Cell Rep. 2012 Nov 29;2(5):1448-60. doi: 10.1016/j.celrep.2012.09.015. Epub 2012 Oct 25.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 本発明は、高効率かつ低コストな多能性幹細胞の心筋分化を可能とする心筋分化促進剤および方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明は、EGF受容体阻害剤を含む、多能性幹細胞の心筋分化促進剤を提供する。

[0011] 本発明はまた、EGF受容体阻害剤を含む、心筋分化促進用キットを提供する。

[0012] 本発明はまた、EGF受容体阻害剤を含む培地中で多能性幹細胞を培養することを含む、多能性幹細胞の心筋分化誘導方法を提供する。

発明の効果

[0013] 本発明により、高効率かつ低コストに多能性幹細胞の心筋分化を誘導し、

心筋細胞を製造することが可能となる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]各種阻害剤の心筋分化促進効果。KY: KY02111、SB: SB203580、BIRB: BIRB796、U: U0126、JAKI: チロホスチンAG490、AG: AG1478。

[図2]EGF受容体阻害剤(AG1478)の心筋分化促進効果。

[図3]EGF受容体阻害剤(ゲフィチニブ)の心筋分化促進効果。

[図4]EGF受容体阻害剤(AG1478またはゲフィチニブ)の心筋分化促進効果およびEGF受容体阻害剤(AG1478またはゲフィチニブ)とWntシグナル阻害剤(KY02111および/またはXAV939)との相乗効果。

[図5]実施例で用いた心筋培養系。

[図6]ヒトES細胞(KhES-3)でのサイトカインおよび異種成分不含条件下における心筋分化に対するEGF受容体阻害剤(ゲフィチニブ)の分化促進効果。

[図7]ヒトES細胞(KhES-3)およびiPS細胞(IMR90-1)でのサイトカインおよび異種成分不含条件下における心筋分化に対するEGF受容体阻害剤(AG1478またはゲフィチニブ)の心筋分化促進効果。

[図8]EGF受容体阻害剤(AG1478またはゲフィチニブ)とWntシグナル阻害剤(XAV939)との相乗効果。

[図9]ヒトiPS細胞(253G1)のスフェア培養系からの直接心筋分化。

[図10]EGF受容体阻害剤(PP3)とWntシグナル阻害剤(KY02111)との相乗効果。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明の多能性幹細胞の心筋分化促進剤は、上皮成長因子(EGF)受容体阻害剤を含む。本発明における「EGF受容体阻害剤」とは、EGF受容体からのシグナル伝達を阻害するあらゆる物質を意味し、低分子化合物、核酸、ペプチド、抗体などが含まれるがこれらに限定されない。EGF受容体

阻害剤としては、AG1478、ゲフィチニブ (Gefitinib)、アファチニブ (Afatinib)、ARRY334543、AST1306、AZD8931、BIBU1361、BIBX1382、BPDQ、BPIQ-1、BPIQ-11、カネルチニブ (Canertinib)、CL-387,785、CUDC101、ダコミチニブ (Dacomitinib)、バンデタニブ (Vandetanib)、EGFR Inhibitor III (N-(4-(3,4-ジクロロ-6-フルオロフェニル)アミノ)-キナゾリン-6-イル)-2-クロロアセトアミド、CAS 733009-42-2)、EGFR/ErbB-2 Inhibitor (4-(4-ベンジルオキシアニリノ)-6,7-ジメトキシキナゾリン、CAS 179248-61-4)、エルロチニブ (Erlotinib)、GW583340、GW2974、HDS029、ラパチニブ (Lapatinib)、WHI-P154、OSI-420、PD153035、PD168393、PD174265、ペリチニブ (Pelitinib)、Compound 56、XL657、PP3、AG-490、AG555、チロホスチン (Typhostin) B42、チロホスチンB44、AG556、AG494、AG825、RG-13022、DAPH、EGFR Inhibitor (シクロプロパンカルボン酸-(3-(6-(3-トリフルオロメチルフェニル)アミノ)-ピリミジン-4-イルアミノ)-フェニル)-アミド、CAS 879127-07-8)、エルブスタチンアナログ (Erbstatin Analog) (メチル 2,5-ジヒドロキシシナマート、CAS 63177-57-1)、JNJ28871063、チロホスチン47、ラベンダスチン (Lavendustin) A、ラベンダスチンC、ラベンダスチンCメチルエステル、LFM-A12、TAK165、TAK285、チロホスチン51、チロホスチンAG183、チロホスチンAG528、チロホスチンAG99、チロホスチンRG14620、WZ3146、WZ4002、WZ8040、ブテイン、チロホスチンAG112などが例示される。ある態様において、EGF受容体阻害剤は、キナゾリン系骨格を有するEGF受容体阻害剤、例えばAG1478、ゲフィチニブ、アファチニブ、ARRY334543、AST1306、AZD8931、BIBU1361、BIBX1382、BPDQ、BPIQ-1、BPIQ-11、カネルチニブ、

CL-387, 785、CUDC101、ダコミチニブ、バンデタニブ、EGFR Inhibitor III (CAS 733009-42-2)、EGFR/ErbB-2 Inhibitor (CAS 179248-61-4)、エルロチニブ、GW583340、GW2974、HDS029、ラパチニブ、WHI-P154、OSI-420、PD153035、PD168393、PD174265、ペリチニブ、Compound 56、もしくはXL657であるか、または、PP3である。本発明に好適なEGF受容体阻害剤は、AG1478、ゲフィチニブ、およびPP3である。EGF受容体阻害剤は、Santa Cruz Biotechなどから入手可能である。

[0016] 本発明において「多能性幹細胞」とは、成体を構成する全ての細胞に分化することができる多分化能 (pluripotency) と、細胞分裂を経てもその多分化能を維持することができる自己複製能を有する細胞を意味する。「多能性幹細胞」には、胚性幹細胞 (ES細胞)、胚性生殖細胞 (EG細胞)、人工多能性幹細胞 (iPS細胞) が含まれる。「多能性幹細胞」の生物種は特に限定はされないが、好ましくは哺乳類であり、より好ましくは齧歯類または霊長類である。本発明は、サルまたはヒト多能性幹細胞に特に好適である。

[0017] ES細胞は、初期胚に由来する多能性幹細胞であり、胚盤胞の内部細胞塊または着床後の初期胚のエピブラストから樹立することができる。ES細胞としては、ヒト (Thomson J. A. et al., Science 282: 1145-1147 (1998)、Biochem Biophys Res Commun. 345(3), 926-32 (2006); アカゲザルおよびマーモセット等の霊長類 (Thomson J. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7844-7848 (1995); Thomson J. A. et al., Biol. Reprod. 55: 254-259 (1996)); ウサギ (特表2000-508919号); ハムスター (Doetshman T. et al., Dev. Biol. 127: 224-227 (1988))、ブタ (Evans M. J. et al., Theriogenology 33: 125128 (1990); Piedrahita J.A. et al., Theriogenology 34: 879-891 (1990); Notarianni E. et al., J. Reprod. Fert. 40: 51-56 (1990); Talbot N. C. et al., Cell. Dev. Biol. 29A: 546-554 (1993))、ヒツジ (Notarianni E. et al., J. Reprod. Fert. Supp

l. 43: 255-260 (1991))、ウシ (Evans M. J. et al., Theriogenology 33: 125-128 (1990); Saito S. et al., Roux. Arch. Dev. Biol. 201: 134-141 (1992))、ミンク (Sukoyan M. A. et al., Mol. Reorod. Dev. 33: 418-431 (1993)) (いずれも参照により本明細書に含まれる) などのES細胞が挙げられる。

[0018] EG細胞は、始原生殖細胞に由来する多能性幹細胞であり、例えば、ヒトEG細胞 (Shamblott, et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 95: 13726-13731 (1998)) (参照により本明細書に含まれる) が挙げられる。

[0019] 本発明において「iPS細胞」とは、体細胞や組織幹細胞などの多能性幹細胞以外の細胞から誘導された多能性幹細胞を意味する。iPS細胞の作製方法は、例えば、WO2007/069666、WO2009/006930、WO2009/006997、WO2009/007852、WO2008/118820、Cell Stem Cell 3(5): 568-574 (2008)、Cell Stem Cell 4(5): 381-384 (2009)、Nature 454: 646-650 (2008)、Cell 136(3): 411-419 (2009)、Nature Biotechnology 26: 1269-1275 (2008)、Cell Stem Cell 3: 475-479 (2008)、Nature Cell Biology 11: 197-203 (2009)、Cell 133(2): 250-264 (2008)、Cell 131(5): 861-72 (2007)、Science 318 (5858): 1917-20 (2007) (いずれも参照により本明細書に含まれる) に記載される。しかしながら、人工的に誘導された多能性幹細胞であれば、いかなる方法で作製された細胞も本発明の「iPS細胞」に含まれる。

[0020] 本発明の心筋分化促進剤は、Wntシグナル阻害剤、Wntシグナル活性化剤、ニトロピン、サイトカイン (bFGF、BMP4、VEGF、DKK1 およびアクチビンAの組み合わせ) などの別の心筋分化促進因子と併用してもよい。本発明における「心筋分化促進因子」には、心筋分化促進効果を有するあらゆる物質が含まれる。好ましい態様において、本発明の心筋分化促進剤は、Wntシグナル阻害剤および/またはWntシグナル活性化剤と併用される。

[0021] 本発明における「Wntシグナル活性化剤」とは、Wntシグナル経路を

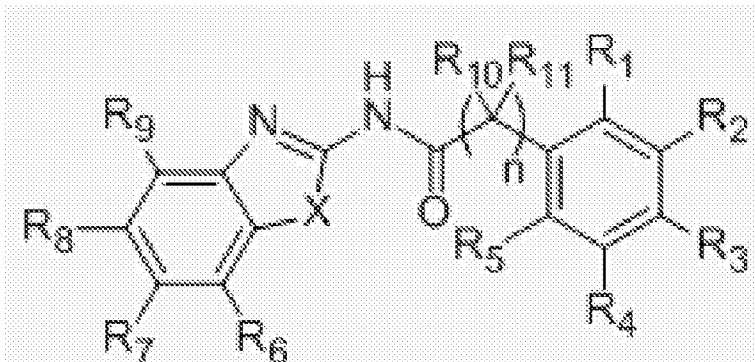
活性化する物質を意味する。Wntシグナル活性化剤としては、例えばB I OおよびC H I R 9 9 0 2 1などのGSK3β阻害剤が例示される。本発明においては、2以上、例えば2、3、または4種類のWntシグナル活性化剤を併用してもよい。

[0022] 本発明における「Wntシグナル阻害剤」とは、Wntシグナル経路を阻害する物質を意味する。Wntシグナル阻害剤には、例えば、以下の式(1)の化合物またはその塩、IWP2、XAV939、およびIWR1などの化合物、並びにIGFBP4、およびDkk1などのタンパク質が含まれる。好ましくは、本発明におけるWntシグナル阻害剤は化合物であり、例えば、式(1)の化合物またはその塩、IWP2、XAV939、およびIWR1である。本発明においては、2以上、例えば2、3、または4種類のWntシグナル阻害剤を併用してもよい。

[0023] ある態様において、Wntシグナル阻害剤は、以下の式(1)の化合物またはその塩である：

式(1)：

[化1]



[式中、

$R_1 - R_5$ は、各々独立して、水素原子；ハロゲン原子；水酸基；炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基；非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基；又は基- $NR_{12}R_{13}$ (R_{12} 及び R_{13} は、各々独立して、水素原子、酸素原子、又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖または分岐アルキル基である)である、ここで

$R_1 - R_5$ のうち隣接する2つが一緒になって $-O-CH_2-O-$ または $-O-(CH_2)_2-O-$ を形成していてもよい、

$R_6 - R_9$ は、各々独立して、水素原子；ハロゲン原子；水酸基；炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基；基 $-C(O)A$ で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基（Aは、非置換又は炭素数1～5の直鎖または分岐アルキル基で置換された飽和または不飽和5または6員環であり、該環は窒素原子、酸素原子、及び硫黄原子から独立に選択される1または2個の原子を含んでいてもよい）；非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基；又は基 $-NR_{12}R_{13}$ （ R_{12} 及び R_{13} は、各々独立して、水素原子、酸素原子、又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖または分岐アルキル基である）である、ここで $R_6 - R_9$ のうち隣接する2つが一緒になって $-O-CH_2-O-$ または $-O-(CH_2)_2-O-$ を形成していてもよい、

$R_{10} - R_{11}$ は、各々独立して、水素原子；又は炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基である、

Xは、 $-CR_{14}$ （ R_{14} は、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基、非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基である）；酸素原子；硫黄原子；セレン原子；又は基 $-NR_{15}$ （ R_{15} は、水素原子、炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基、又は炭素数1～5の直鎖又は分岐アシル基である）である、および

nは、0から6の整数である]。

[0024] 炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、イソプロポキシ基、ブトキシ基、イソブトキシ基、sec-ブトキシ基、tert-ブトキシ基、ペンチルオキシ基が挙げられる。

[0025] 炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、イソプロピル基、ブチル基、イソブチル基、sec-

ブチル基、tert-ブチル基、ペンチル基が挙げられる。

- [0026] 炭素数1～5の直鎖又は分岐アシル基としては、例えば、ホルミル基、アセチル基、プロピオニル基、ブチリル基、イソブチリル基、バレリル基、イソバレリル基が挙げられる。
- [0027] ハロゲン原子としては、Cl、Br、IまたはFが挙げられる。
- [0028] 好ましい態様において、 R_1-R_5 は、各々独立して、水素原子；ハロゲン原子；水酸基；炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基；又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基であり、ここで R_1-R_5 のうち隣接する2つが一緒になって $-O-CH_2-O-$ または $-O-(CH_2)_2-O-$ を形成していてもよい。
- [0029] R_2 及び R_3 は、好ましくは、炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基であるか、又は、一緒になって $-O-CH_2-O-$ または $-O-(CH_2)_2-O-$ を形成している。さらに好ましくは、 R_2 及び R_3 は、メトキシ基、エトキシ基、又はプロポキシ基である。さらにより好ましくは、 R_2 はメトキシ基であり、 R_3 はメトキシ基、エトキシ基、又はプロポキシ基である。
- [0030] R_1 、 R_4 及び R_5 は、好ましくは、水素原子である。
- [0031] ある態様において、 R_6-R_9 は、各々独立して、水素原子；ハロゲン原子；水酸基；炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基；非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基；又は基 $-NR_{12}R_{13}$ (R_{12} 及び R_{13} は、各々独立して、水素原子、酸素原子、又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖または分岐のアルキル基である)であり、ここで R_6-R_9 のうち隣接する2つが一緒になって $-O-CH_2-O-$ または $-O-(CH_2)_2-O-$ を形成していてもよい。
- [0032] R_6 及び R_9 は、好ましくは、各々独立して、水素原子；ハロゲン原子；水酸基；炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基；又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基であり、より好ましくは、水素原子である。
- [0033] 好ましい態様において、 R_7 は、水素原子；ハロゲン原子；水酸基；炭素数

1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基；基-C(O)Aで置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基（Aは、非置換又は炭素数1～5の直鎖または分岐アルキル基で置換された飽和または不飽和5または6員環であり、該環は窒素原子、酸素原子、及び硫黄原子から独立に選択される1または2個の原子を含んでいてもよい）；非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基；又は基-NR₁₂R₁₃（R₁₂及びR₁₃は、各々独立して、水素原子、酸素原子、又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基である）であって、R₈は、水素原子；ハロゲン原子；水酸基；炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基；又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基であるか、又は、R₇及びR₈は、一緒になって-O-CH₂-O-または-O-(CH₂)₂-O-を形成している。

[0034] ある態様において、R₇は、ハロゲン原子である。

[0035] ある態様において、R₇は、基-C(O)Aで置換された炭素数1～5の直鎖アルコキシ基であり、基-C(O)Aは前記アルコキシ基の末端の炭素原子に結合している。

[0036] 好ましい態様において、Aは窒素原子を少なくとも1つ含み、そのようなAとしては、非置換又は炭素数1～5の直鎖または分岐アルキル基で置換された、ピロリジニル、イミダゾリジニル、ピラゾリジニル、ピロリル、イミダゾリル、ピラゾリル、チアゾリル、イソチアゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、ピペリジニル、ピペラジニル、モルホリニル、ピリジル、ピリミジニル、ピラジニル、及びピリダジニル基が例示される。より好ましい態様において、Aは、非置換又は炭素数1～5の直鎖または分岐アルキル基で置換された、ピペリジニル基、ピペラジニル基、又はモルホリニル基である。さらに好ましい態様において、Aは、非置換又は炭素数1～5の直鎖または分岐アルキル基で置換された、ピペリジン-1-イル基、ピペラジン-1-イル基、又はモルホリン-4-イル基である。

[0037] R₁₀及びR₁₁は、好ましくは、水素原子である。

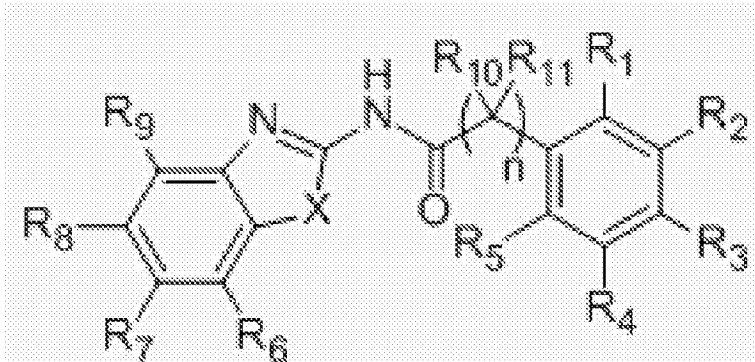
[0038] 好ましい態様において、Xは、酸素原子；硫黄原子；基-NR₁₅（R₁₅は、水素原子、炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基、炭素数1～5の直鎖又は分岐アシル基である）である。Xは、好ましくは、硫黄原子である。

[0039] 好ましい態様において、nは、0から4の整数である。さらに好ましい態様において、nは、1から3の整数であり、さらにより好ましくは2又は3である。

[0040] 本発明における式（1）の化合物またはその塩としては、以下の化合物またはその塩が例示される：

（1）式（1）：

[化2]



[式中、

R₁ - R₅は、各々独立して、水素原子；ハロゲン原子；水酸基；炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基；非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基；又は基-NR₁₂R₁₃（R₁₂及びR₁₃は、各々独立して、水素原子、酸素原子、又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖または分岐アルキル基である）である、ここでR₁ - R₅のうち隣接する2つが一緒になって-O-CH₂-O-または-O-(CH₂)₂-O-を形成していてもよい、

R₆ - R₉は、各々独立して、水素原子；ハロゲン原子；水酸基；炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基；基-C(O)Aで置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基（Aは、非置換又は炭素数1～5の直鎖または分岐アルキル基で置換された飽和または不飽和5または6員環であり、該

環は窒素原子、酸素原子、及び硫黄原子から独立に選択される1または2個の原子を含んでもよい) ; 非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1~5の直鎖又は分岐アルキル基 ; 又は基 $-NR_{12}R_{13}$ (R_{12} 及び R_{13} は、各々独立して、水素原子、酸素原子、又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1~5の直鎖または分岐アルキル基である) である、ここで R_6-R_9 のうち隣接する2つが一緒になって $-O-CH_2-O-$ または $-O-(CH_2)_2-O-$ を形成していてもよい、

$R_{10}-R_{11}$ は、各々独立して、水素原子 ; 又は炭素数1~5の直鎖又は分岐アルキル基である、

Xは、 $-CR_{14}$ (R_{14} は、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、炭素数1~5の直鎖又は分岐アルコキシ基、非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1~5の直鎖又は分岐アルキル基である) ; 酸素原子 ; 硫黄原子 ; セレン原子 ; 又は基 $-NR_{15}$ (R_{15} は、水素原子、炭素数1~5の直鎖又は分岐アルキル基、又は炭素数1~5の直鎖又は分岐アシル基である) である、および

nは、0から6の整数である] の化合物またはその塩。

(2) R_6-R_9 が、各々独立して、水素原子 ; ハロゲン原子 ; 水酸基 ; 炭素数1~5の直鎖又は分岐アルコキシ基 ; 非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1~5の直鎖又は分岐アルキル基 ; 又は基 $-NR_{12}R_{13}$ (R_{12} 及び R_{13} は、各々独立して、水素原子、酸素原子、又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1~5の直鎖または分岐アルキル基である) である、ここで R_6-R_9 のうち隣接する2つが一緒になって $-O-CH_2-O-$ または $-O-(CH_2)_2-O-$ を形成していてもよい、(1)に記載の化合物またはその塩。

(3) R_1-R_5 が、各々独立して、水素原子 ; ハロゲン原子 ; 水酸基 ; 炭素数1~5の直鎖又は分岐アルコキシ基 ; 又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1~5の直鎖又は分岐アルキル基である、ここで R_1-R_5 のうち隣接する2つが一緒になって $-O-CH_2-O-$ または $-O-(CH_2)_2-O-$

O-を形成していてもよい、および

Xが、酸素原子；硫黄原子；基-NR₁₅（R₁₅は、水素原子、炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基、又は炭素数1～5の直鎖又は分岐アシル基である）である、（2）に記載の化合物またはその塩。

（4）R₂及びR₃が、炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基である、又はR₂及びR₃が、一緒になって-O-CH₂-O-または-O-(CH₂)₂-O-を形成している、

R₆及びR₉が、各々独立して、水素原子；ハロゲン原子；水酸基；炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基；又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基である、および

R₇が、水素原子；ハロゲン原子；水酸基；炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基；非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基；又は基-NR₁₂R₁₃（R₁₂及びR₁₃は、各々独立して、水素原子、酸素原子、又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基である）である、

R₈が、水素原子；ハロゲン原子；水酸基；炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基；又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基である、

又は、R₇及びR₈が、一緒になって-O-CH₂-O-または-O-(CH₂)₂-O-を形成している、（3）に記載の化合物またはその塩。

（5）R₁、R₄、R₅、R₆、R₉、R₁₀及びR₁₁が、水素原子である、

R₂及びR₃が、メトキシ基、エトキシ基、又はプロポキシ基である、

Xが、硫黄原子である、および

nが、0から4の整数である、（4）に記載の化合物またはその塩。

（6）R₇が、ハロゲン原子であり、R₈が、水素原子である、（5）に記載の化合物またはその塩。

（7）R₂が、メトキシ基である、および

R₃が、メトキシ基、エトキシ基、又はプロポキシ基である、（5）または

(6) に記載の化合物またはその塩。

(8) n が、1 から 3 の整数である、(5) ~ (7) のいずれかに記載の化合物またはその塩。

(9) R_1 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_8 、及び R_9 が、各々独立して、水素原子；ハロゲン原子；水酸基；炭素数 1 ~ 5 の直鎖又は分岐アルコキシ基；又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数 1 ~ 5 の直鎖又は分岐アルキル基である、

R_2 及び R_3 が、炭素数 1 ~ 5 の直鎖又は分岐アルコキシ基である、又は R_2 及び R_3 が、一緒になって $-O-CH_2-O-$ または $-O-(CH_2)_2-O-$ を形成している、

R_7 が、基 $-C(O)A$ で置換された炭素数 1 ~ 5 の直鎖又は分岐アルコキシ基 (A は、非置換又は炭素数 1 ~ 5 の直鎖または分岐アルキル基で置換された飽和または不飽和 5 または 6 員環であり、該環は窒素原子、酸素原子、及び硫黄原子から独立に選択される 1 または 2 個の原子を含んでいてもよい) である、および

X が、酸素原子；硫黄原子；基 $-NR_{15}$ (R_{15} は、水素原子、炭素数 1 ~ 5 の直鎖又は分岐アルキル基、又は炭素数 1 ~ 5 の直鎖又は分岐アシル基である) である、(1) に記載の化合物またはその塩。

(10) R_1 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_8 、及び R_9 が、水素原子である、

R_2 及び R_3 が、メトキシ基、エトキシ基、又はプロポキシ基である、

R_{10} 及び R_{11} が、水素原子である、

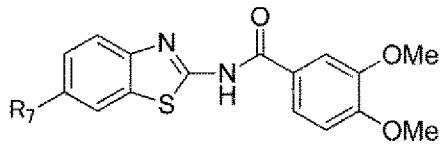
X が、硫黄原子である、

A が、非置換又は炭素数 1 ~ 5 の直鎖または分岐アルキル基で置換された、ピペリジニル基、ピペラジニル基、又はモルホリニル基である、および

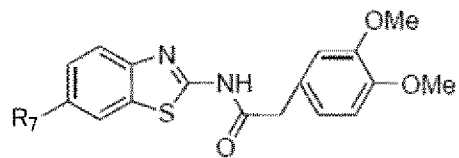
n が、0 から 4 の整数である、(11) に記載の化合物またはその塩。

[0041] ある態様において、式 (1) の化合物またはその塩は、以下の化合物またはその塩である：

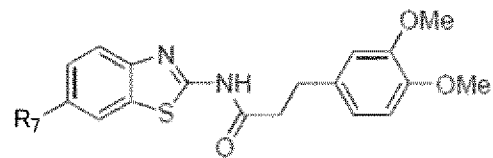
[化3]



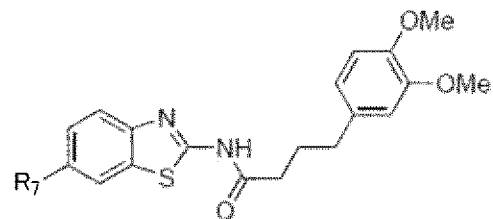
[化4]



[化5]

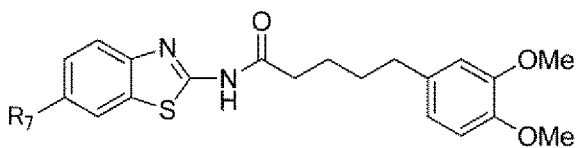


[化6]



および、

[化7]

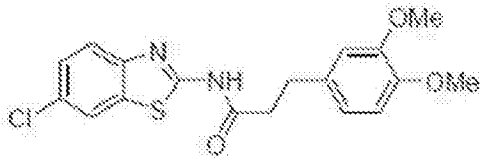
[式中、R₇は、ハロゲン原子である。]

[0042] 本発明における好適なW n t シグナル阻害剤は、以下から選択される化合

物またはその塩である：

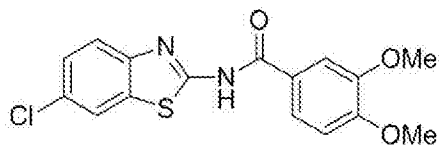
K Y O 2 1 1 1

[化8]



K Y O 1 0 4 1

[化9]



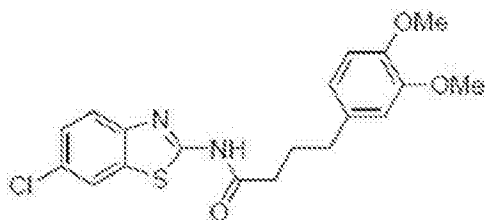
T 6 1 1 6 4

[化10]



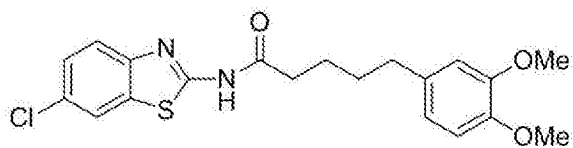
K Y O 2 1 1 4

[化11]



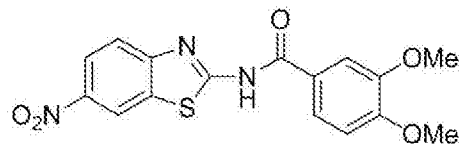
K Y O 1 0 4 5

[化12]



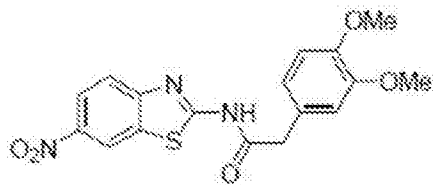
K Y O 1 0 4 0

[化13]



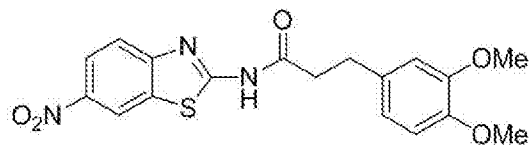
KY02109

[化14]



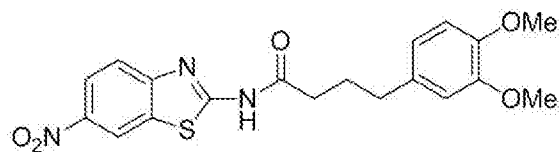
KY01042

[化15]



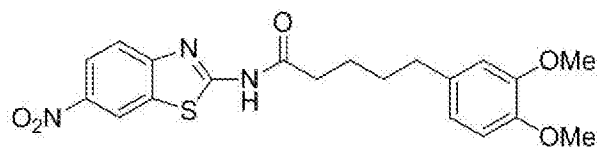
KY01043

[化16]



KY01046

[化17]



PB2852

[化18]



N 1 1 4 7 4

[化19]



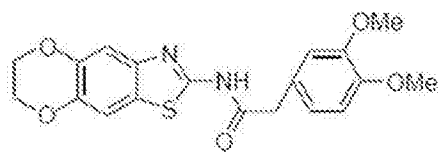
P B 2 5 7 2

[化20]



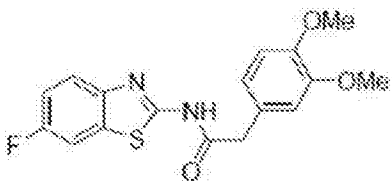
P B 2 5 7 0

[化21]



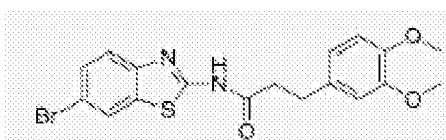
K Y 0 2 1 0 4

[化22]



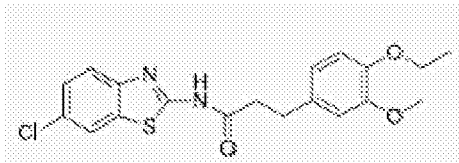
S O 0 8 7

[化23]



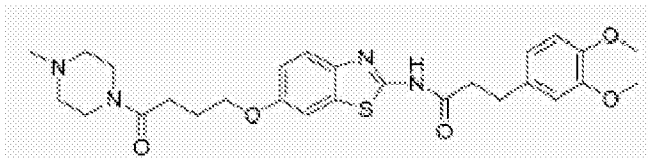
S O 1 0 2

[化24]



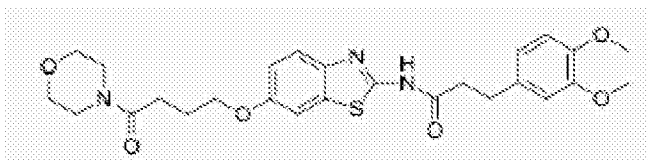
SO096

[化25]



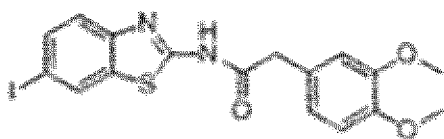
SO094

[化26]



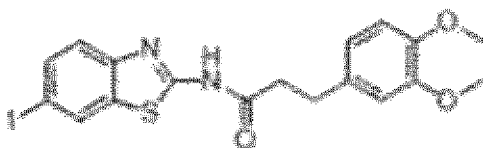
SO3031 (KY01-1)

[化27]



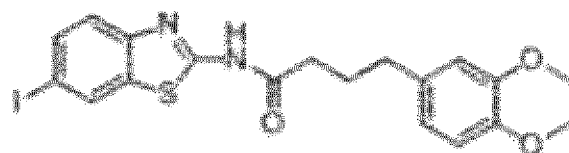
SO2031 (KY02-1)

[化28]



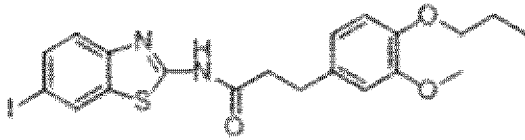
SO3042 (KY03-1)

[化29]



S O 2 0 7 7

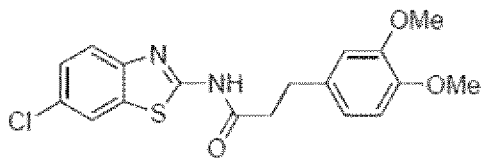
[化30]



[0043] 本発明における特に好適な式(1)の化合物またはその塩は、以下から選
択される化合物またはその塩である：

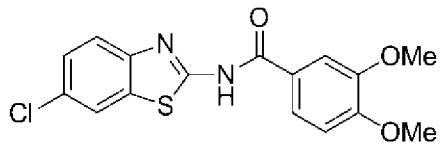
K Y O 2 1 1 1

[化31]



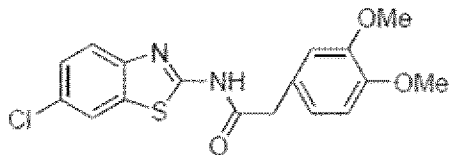
K Y O 1 0 4 1

[化32]



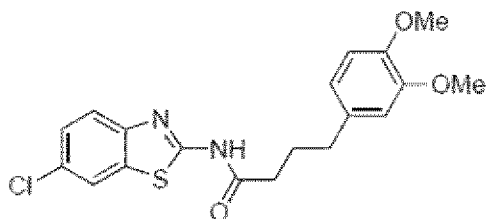
T 6 1 1 6 4

[化33]



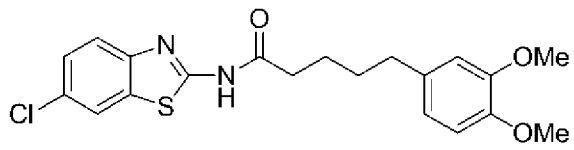
K Y O 2 1 1 4

[化34]



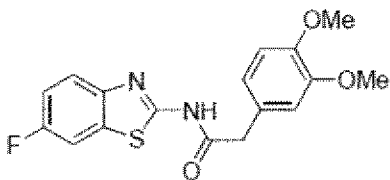
KY01045

[化35]



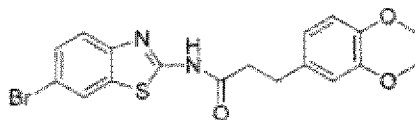
KY02104

[化36]



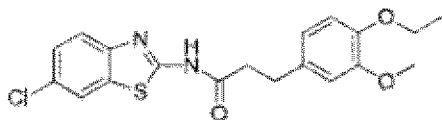
SO087

[化37]



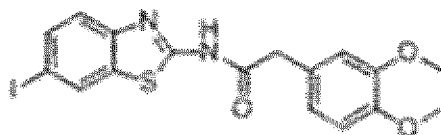
SO102

[化38]



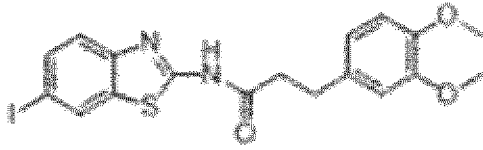
SO3031 (KY01-1)

[化39]



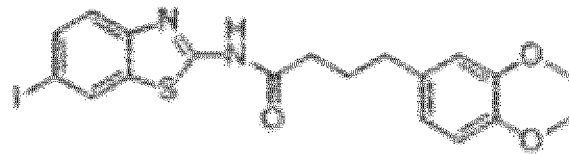
SO2031 (KY02-1)

[化40]



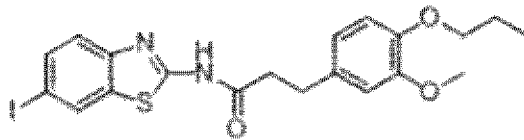
SO3042 (KY03-1)

[化41]



SO2077

[化42]



[0044] 式(1)の化合物は、公知の方法(J. Med. Chem., 1965, 8(5), pp 734-735) (参照により本明細書に含まれる)により、あるいは国際公開第2012/026491号パンフレットに記載の方法に準じて、合成することができる。

[0045] 上記化合物は、例えば、J. Med. Chem., 1965, 8(5), pp 734-735 (参照により本明細書に含まれる)に記載されている(N11474、T61164)。また、UkrOrgSynthesis社(PB2852、PB2572、PB2570)やENAMINE社(T61164)などから入手可能である。

[0046] 本発明の心筋分化促進剤は、後述する本発明の多能性幹細胞の心筋細胞誘導方法にしたがい使用することができる。

[0047] 本発明の心筋分化促進用キットは、EGF受容体阻害剤を含む。本発明の心筋分化促進用キットはさらに、Wntシグナル阻害剤、Wntシグナル活性化剤その他の心筋分化促進因子を含んでいてもよい。

[0048] 本発明の多能性幹細胞の心筋細胞誘導方法は、EGF受容体阻害剤を含む

培地中で多能性幹細胞を培養することを含む。本発明は、インビトロで実施される。本発明の方法に用いる培地は、一般的に多能性幹細胞の心筋分化に使用される培地（以下、心筋分化培地ともいう）であればよく、その組成は特に限定はされない。本発明の方法に用いる培地としては、IMDM培地を基本とした心筋分化培地（例えば、実施例で使用している培地）、DMEMを基本とした心筋分化培地（例えば、DMEM/F12培地（Sigma）200ml、ウシ胎児血清（GIBCO）50ml、MEM non-essential amino acid solution（Sigma）2.5ml、ペニシリン-ストレプトマイシン（GIBCO）2.5ml、200mM L-グルタミン 2.5ml、2-メルカプトエタノール）、またはStemPro-34SFM（GIBCO）+BMP4（10ng/ml）のような培地が例示される。

[0049] ある態様において本発明は、血清を含まない培地（以下、血清不含培地ともいう）を用いる多能性幹細胞の心筋細胞誘導方法を提供する。血清不含培地を用いる場合、培地はアルブミンを含むことが好ましい。アルブミンとしては、ウシ血清アルブミン、ヒト血清アルブミンが挙げられる。アルブミンを含む血清不含培地を用いた場合、血清、サイトカイン、支持細胞（フィーダー細胞）等、アルブミン以外のタンパク質や、使用する多能性幹細胞とは異なる生物種に由来する成分（すなわち、異種成分）の非存在下で多能性幹細胞の心筋分化を誘導することができる。

[0050] 本発明の方法においては、一般的に多能性幹細胞の心筋分化に適した培養方法を用いることができる。培養方法としては、例えば、接着培養法、浮遊培養法、懸濁培養法等が挙げられる。ある態様において、本発明の方法は、END2細胞のような支持細胞（フィーダー細胞）を使用しない。

[0051] 本発明の方法において、心筋分化培地における培養（以下、心筋分化培養ともいう）の開始からEGF受容体阻害剤を含む培地中での培養開始までの期間、およびEGF受容体阻害剤を含む培地中での培養期間は、適宜変更されうる。好適には、サルまたはヒトES細胞またはiPS細胞の場合、心筋分化培養の2、3、または4日目から14日目までのうち2日間以上（具体

的には、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12日間）、好ましくは3～10日間、より好ましくは4～10日間、さらに好ましくは4～8日間、培養すればよい。例えば、心筋分化培養の2、3、または4日目から10日目までのうち4～8日間、例えば心筋分化培養の2～10日目（8日間）、2～9日目（7日間）、2～8日目（6日間）、3～10日目（7日間）、3～9日目（6日間）、3～8日目（5日間）、4～10日目（6日間）、4～9日目（5日間）、4～8日目（4日間）に実施することが好ましい。

[0052] 本発明の方法は、Wntシグナル活性化剤を含む培地中で多能性幹細胞を培養すること、および／またはWntシグナル阻害剤を含む培地中で多能性幹細胞を培養することをさらに含んでもよい。

[0053] ある態様において、本発明の方法は、EGF受容体阻害剤とWntシグナル阻害剤とを含む培地中で多能性幹細胞を培養する工程を含む。本方法は、EGF受容体阻害剤とWntシグナル阻害剤とを含む培地中で多能性幹細胞を培養する工程に加えて、EGF受容体阻害剤またはWntシグナル阻害剤のいずれか一方を含む培地中で細胞を培養する工程を含んでもよい。例えば、EGF受容体阻害剤を含みWntシグナル阻害剤を含まない培地、またはWntシグナル阻害剤を含みEGF受容体阻害剤を含まない培地中で細胞を1～2日間培養した後、培地をEGF受容体阻害剤とWntシグナル阻害剤の両方を含む培地に交換し、培養を継続してもよい。あるいは、培養期間全体においてEGF受容体阻害剤とWntシグナル阻害剤との両方を含む培地を使用してもよい。また、EGF受容体阻害剤とWntシグナル阻害剤との両方を含む培地中での培養後、いずれか一方のみを含む培地中で細胞を培養する期間があってもよい。

[0054] ある態様において、本発明の方法は、以下の工程を含む：

(1) 多能性幹細胞をWntシグナル活性化剤を含む培地中で培養する工程、および；

(2) 工程(1)の後、前記細胞をEGF受容体阻害剤を含む培地中で培養

する工程。

前記方法において、心筋分化培養の開始から工程（１）の開始までの期間、工程（１）の終了から工程（２）の開始までの期間、および工程（１）および（２）の培養期間は適宜変更されうる。工程（２）は、工程（１）の終了直後から開始してもよいし、工程（１）の終了から一定期間後に開始してもよい。Wntシグナル活性化剤は、多能性幹細胞の心筋分化の初期段階に添加すればよい。ここで、多能性幹細胞の心筋分化の初期段階とは、中胚葉マーカー遺伝子の発現上昇が起こる、多能性幹細胞から中胚葉への分化誘導期を意味する。中胚葉への分化は、中胚葉マーカー遺伝子の発現を調べることにより決定することができる。中胚葉マーカー遺伝子としては、T、MIXL1、NODAL等が挙げられる。

[0055] 例えば、サルまたはヒトES細胞またはiPS細胞の場合、心筋分化培養の0～2日目または0～3日目に、すなわち心筋分化培養開始から2または3日間、工程（１）を実施し、次いで、心筋分化培養の2、3、または4日目から14日目までのうち2日間以上（具体的には、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12日間）、好ましくは3～10日間、より好ましくは4～10日間、さらに好ましくは4～8日間、工程（２）を実施すればよい。工程（２）は、例えば、心筋分化培養の2、3、または4日目から10日目までのうち4～8日間、例えば心筋分化培養の2～10日目（8日間）、2～9日目（7日間）、2～8日目（6日間）、3～10日目（7日間）、3～9日目（6日間）、3～8日目（5日間）、4～10日目（6日間）、4～9日目（5日間）、または4～8日目（4日間）に実施することが好ましい。

[0056] 前記方法において、好ましくは、工程（２）の培養期間の全体または一部において、EGF受容体阻害剤に加えてWntシグナル阻害剤をさらに含む培地中で細胞を培養する。Wntシグナル阻害剤は、多能性幹細胞の心筋分化の中期段階に添加すればよい。ここで、多能性幹細胞の心筋分化の中期段階とは、中胚葉から心筋細胞への分化誘導期を意味する。心筋細胞への分化

は、拍動心筋細胞の数、心筋マーカーの発現、イオンチャネルの発現、電気生理学的刺激に対する反応等により確認することができる。心筋マーカーとしては、 α MHC、 β MHC、cTnT、 α アクチニン、およびNKX2.5が挙げられる。また、イオンチャネルとしては、HCN4、Nav1.5、Cav1.2、Cav3.2、HERG1b、およびKCNQ1が挙げられる。

[0057] 例えば、EGF受容体阻害剤を含みWntシグナル阻害剤を含まない培地中で細胞を1～2日間、好ましくは1日間培養した後、培地をEGF受容体阻害剤とWntシグナル阻害剤とを含む培地に交換し、培養を継続する。あるいは、工程(2)の培養期間全体においてEGF受容体阻害剤とWntシグナル阻害剤の両方を含む培地を使用してもよい。また、Wntシグナル阻害剤を含みEGF受容体阻害剤を含まない培地中で細胞を1～2日間培養した後、培地をEGF受容体阻害剤とWntシグナル阻害剤とを含む培地に交換し、培養を継続してもよい。さらに、EGF受容体阻害剤とWntシグナル阻害剤との両方を含む培地中での培養後、いずれか一方のみを含む培地中で細胞を培養する期間があってもよい。本方法によれば、浮遊培養法によっても効率的に多能性幹細胞の心筋分化を誘導することができる。

[0058] 本発明におけるEGF受容体阻害剤の濃度は、特に限定はされない。EGF受容体阻害剤としてゲフィチニブまたはAG1478を使用する場合、最終濃度100nM～100 μ M、好ましくは1 μ M～20 μ Mで使用すればよい。EGF受容体阻害剤としてPP3を使用する場合、最終濃度1 μ M～1mM、好ましくは10 μ M～100 μ Mで使用すればよい。

[0059] 本発明におけるWntシグナル活性化剤およびWntシグナル阻害剤の濃度は、特に限定はされない。Wntシグナル活性化剤としてBIOまたはCHIR99021を使用する場合、最終濃度100nM～100 μ M、好ましくは1 μ M～10 μ Mで使用すればよい。Wntシグナル阻害剤としてIWP2、XAV939、またはIWR1を用いる場合、例えば最終濃度0.5～20 μ M、好ましくは1～10 μ Mで使用すればよい。Wntシグナル阻

害剤として式（１）の化合物またはその塩を用いる場合、使用する化合物またはその塩に応じて、例えば最終濃度 $0.1 \sim 20 \mu\text{M}$ 、好ましくは $0.1 \sim 10 \mu\text{M}$ 、より好ましくは $1 \sim 10 \mu\text{M}$ で使用すればよい。

[0060] 本発明の方法は、心筋細胞の製造に用いることができる。心筋細胞が得られたことは、拍動心筋細胞の数、心筋マーカーの発現、イオンチャネルの発現、電気生理学的刺激に対する反応等により確認することができる。本発明の方法により得られた心筋細胞は、インビトロにおける薬剤安全性試験に、あるいは心臓疾患などに対する移植用心筋細胞として、使用することができる。

[0061] さらに態様において、本発明は、前記式（１）の化合物またはその塩を含む多能性幹細胞の心筋分化促進剤であって、EGF受容体阻害剤と併用される心筋分化促進剤を提供する。本態様における式（１）の化合物またはその塩およびEGF受容体阻害剤は、「EGF受容体阻害剤を含む、多能性幹細胞の心筋分化促進剤」について説明のとおりである。

[0062] さらに態様において、本発明は、多能性幹細胞の心筋分化促進のためのEGF受容体阻害剤の使用、および多能性幹細胞の心筋分化促進剤の製造のためのEGF受容体阻害剤の使用を提供する。かかる態様は、本発明の心筋分化促進剤および心筋分化誘導方法に関する記載に準じて実施することができる。

[0063] 以下、実施例によりさらに本発明を説明するが、本発明は如何なる意味においても本実施例により限定されない。

実施例

[0064] 1. サルES細胞の接着培養系におけるEGF受容体阻害剤の心筋分化促進効果（１）

心筋分化マーカーである α -MHC遺伝子のプロモータを持つGFP遺伝子を導入したサルES細胞を6ウェルプレート（旭硝子/5816-006 : Ezviewカルチャープレート）上に播種（ 2.0×10^5 細胞/ウェル）し、IMDM培地を基本とした20%FBS（GIBCO 10099-141）含有心筋分化培地（IMDM

(Sigma) (20% FBS (Gibco)、1% MEM 非必須アミノ酸溶液 (Sigma)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Gibco)、2 mM L-グルタミン (Sigma)、0.001% 2-メルカプトエタノール (Gibco)、および0.005N NaOH含有)) で培養した。培養4~8日目に、KY02111 (10 μ M) と、EGF受容体阻害剤であるAG1478または下記のキナーゼ阻害剤のいずれかを投与した。

SB203580 (20 μ M) : p38MAPK阻害剤

BIRB796 (10 μ M) : p38MAPK阻害剤 (SBよりもp38阻害活性が強い。)

U0126 (10 μ M) : ERK/MAPKK (MEKK) 阻害剤

ODQ (20 μ M) : NO感受性グアニル酸シクラーゼ阻害剤 (NOによるcGMP産生を阻害する。)

チロホスチンAG490 (5 μ M) : JAK2/3阻害剤

AG1478 (20 μ M) : EGF受容体チロシンキナーゼおよびErbB2受容体阻害剤

培養10日目にGFP蛍光量が増加している化合物を、HCS (high contents screening) システム (オリンパスIX81倒立顕微鏡およびモレキュラーデバイス/MetaMorph イメージングシステム) を用いてGFP蛍光量を測定することで検出した。

[0065] その結果、EGF受容体阻害剤であるAG1478が心筋分化促進効果を有することが見出された (図1、2)。また、他のEGF受容体阻害剤であるゲフィチニブも、心筋分化促進効果を有することが分かった (図3)。さらに、AG1478やゲフィチニブは、Wntシグナル阻害剤であるKY02111やXAV939 (WAKO) の同時添加により、相乗的に心筋分化を促進することが分かった (図4)。

[0066] 2. ヒトES細胞およびiPS細胞の浮遊培養系におけるEGF受容体阻害剤の心筋分化促進効果

マウスフィーダー細胞で継代維持したヒトES細胞またはiPS細胞を回収し、そのヒトES細胞またはiPS細胞コロニー (3-10 \times 10⁶細胞/

ウェル) を、Ultra-lowカルチャーディッシュの6ウェルプレート (CORNING 3261) に播種し、IMDMを基本とした既知組成培地 (IMDM (Sigma) (1% MEM 非必須アミノ酸溶液 (Sigma)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Gibco)、2 mM L-グルタミン (Sigma)、0.5 mM L-カルニチン (Sigma)、0.001% 2-メルカプトエタノール (Gibco)、および0.4% ヒト血清アルブミン (Sigma)含有)) を用いて浮遊培養で30日間培養した (図5)。培養0~2日目に (2日間) CHIR99021 (Axon) (4 μ M) とBIO (Calbiochem) (1 μ M) を添加し、培養3~9日目に (6日間) KY02111 (10 μ M) とXAV939 (1 μ M) を添加した。また、KY02111とXAV939に加えて、EGF受容体阻害剤であるAG1478あるいはゲフィチニブを、5~20 μ Mの濃度で、培養0~2日目 (2日間)、2~5日目 (3日間)、3~7日目 (4日間)、あるいは2~9日目 (7日間) 添加した。心筋分化効果は、培養30日目に、心筋特異的マーカーである心筋トロポニンT (cTnT) に対する抗体を用いたフローサイトメトリーにより心筋細胞の割合を解析して評価した。

[0067] その結果、ヒトES細胞 (KHES-3) において、ゲフィチニブ (10 μ M) の0~2日目の添加では心筋分化促進効果は見られなかったが、2~5日目および3~7日目の添加では顕著な分化効率の増加が見られた (図6)。さらに、ヒトES細胞 (KHES-3) とヒトiPS細胞 (IMR90-1) について、AG1478またはゲフィチニブを培養2~9日目に5~20 μ M添加したところ、ヒトES細胞とiPS細胞の両方について心筋分化効率の増加が見られ、特にAG1478の20 μ M添加では心筋細胞の割合が92~95%まで顕著に上昇した (図7)。また、AG1478とゲフィチニブは、それぞれ単独 (KY02111およびXAV939の添加なし) でも心筋分化促進効果を示し、XAV939のみとの組み合わせ (XAV+AG1478またはゲフィチニブ) においても分化促進効果が確認された (図8)。これらの結果は、EGF受容体阻害剤とWntシグナル活性化剤および/またはWntシグナル阻害剤とを組み合わせることで相乗的な強い

心筋分化促進効果が得られることを示す。

[0068] 3. フィーダーフリーのヒト i P S 細胞スフェア培養系における E G F 受容体阻害剤の心筋分化促進効果

ヒト i P S 細胞株 (2 5 3 G 1) に対して支持細胞なし (フィーダーフリー) のスフェア培養を行った。具体的には、マウスフィーダー細胞で継代維持した 2 5 3 G 1 細胞を回収し、その細胞塊を 5 0 μ m のメッシュ (CellTrics, PARTEC04004-2327) に通して均一な細胞塊 (8 0 - 1 2 0 μ m) を得た後、Ultra-lowカルチャーディッシュの 6 ウェルプレート (CORNING 3261) に播種し、3%メチルセルロース (R & D, HSC001) を含んだ m T e S R 1 培地 (Stem Cell Technology 05850) で i P S 細胞コロニーの大きさが約 2 0 0 - 3 0 0 μ m になるまで浮遊培養した。このフィーダーフリーのスフェア培養法を用いて上記の手順を繰り返すことで 2 0 継代以上培養維持した細胞に対し、I M D M を基本とした既知組成培地 (I M D M (Sigma) (1% MEM 非必須アミノ酸溶液 (Sigma)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン (Gibco)、2 mM L-グルタミン (Sigma)、0.5 mM L-カルニチン (Sigma)、0.001% 2-メルカプトエタノール (Gibco)、および 0.4% ヒト血清アルブミン (Sigma) 含有) を培地交換によりそのまま添加し、浮遊培養で 3 0 日間培養した (図 5)。培養 0 ~ 2 日目に (2 日間) C H I R 9 9 0 2 1 (4 μ M) と B I O (1 μ M) を添加し、培養 3 ~ 9 日目に (6 日間) K Y O 2 1 1 1 (1 0 μ M) と X A V 9 3 9 (1 μ M) を添加した。また、K Y O 2 1 1 1 と X A V 9 3 9 に加えて、E G F 受容体阻害剤である A G 1 4 7 8 あるいはゲフィチニブを、1 0 μ M の濃度で、3 ~ 9 日目 (6 日間) 添加した。心筋分化効果は、培養 3 0 日目に、心筋特異的マーカーである心筋トロポニン T (c T n T) に対する抗体を用いたフローサイトメトリーにより心筋細胞の割合を解析して評価した。

[0069] その結果、A G 1 4 7 8 あるいはゲフィチニブの添加により、分化誘導された心筋細胞の割合が 3 4 % から 5 0 % 近くにまで増加した (図 9)。すなわち、マウスフィーダー細胞上のヒト i P S 細胞だけではなく、フィーダー

フリーのスフェア培養系における i P S 細胞に対しても、E G F 受容体阻害剤が心筋分化効率を高める効果が持つことが分かった。

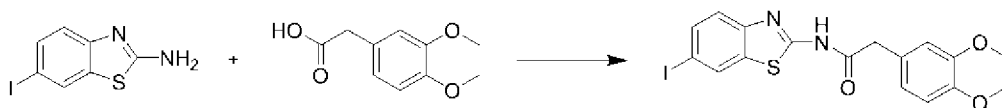
[0070] 4. サル E S 細胞の接着培養系における E G F 受容体阻害剤の心筋分化促進効果 (2)

上記 1 と同様にして、サル E S 細胞において E G F 受容体阻害剤である P P 3 の心筋分化促進効果を検討した。培養 4 ~ 8 日目に、K Y O 2 1 1 1 (10 μM) と、P P 3 (3 μM、10 μM、30 μM、または 100 μM) を投与した。その結果、P P 3 は K Y O 2 1 1 1 の心筋分化促進効果を増強することが分かった (図 10)。P P 3 は、A G 1 4 7 8 や ゲ フィ チ ニ ブ と 骨 格 構 造 が 異 なる こと、ま た E G F R を リ ン 酸 化 す る S r c キ ナ ー ゼ に 対 す る 阻 害 作 用 を 有 さ ない E G F R 阻 害 剤 で あ る こと から、こ の 結 果 は E G F 受 容 体 か ら の シ グ ナ ル 伝 達 を 阻 害 す る 物 質 が 心 筋 分 化 促 進 効 果 を 有 す る こと を 示 す。

[0071] 製造例

S O 3 0 3 1 (K Y O 1 - 1)

[化 43]



2-アミノ-6-ヨードベンゾチアゾール (200 mg, 0.723 mmol)、3,4-ジメトキシフェニル酢酸 (157 mg, 0.795 mmol) の N, N-ジメチルホルムアミド (3 ml) 溶液に、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (139 μl, 0.803 mmol)、O-(6-クロロベンゾトリアゾール-1-イル)-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (360 mg, 0.870 mmol) を加えて終夜、室温にて攪拌した。反応終了後、酢酸エチルにて希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和塩化ナトリウム水溶液にて洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をエタノールにて再結晶し、2-(2-(3,4-ジメトキシフェニル)アセトアミド)-

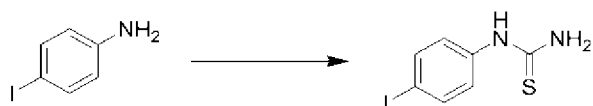
6-ヨードベンゾチアゾールを167mg、収率50%で得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 12.61 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.73–7.69 (m, 1H), 7.54 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 6.97–6.84 (m, 3H), 3.75–3.72 (m, 8H).

MS (ESI) Found; 455 $[\text{M}+\text{H}]^+$

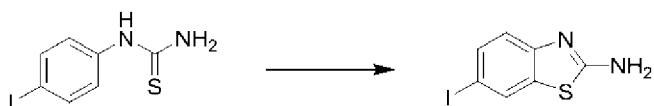
[0072] SO2031 (KY02-1)

[化44]



4-ヨードアニリン (1.00g, 4.57mmol) のジクロロメタン (3ml) 溶液に、チオカルボニルジイミダゾール (976mg, 5.47mmol) を加えて1.5時間、室温にて攪拌した。25%アンモニア水 (3ml) を加えて終夜、室温にて攪拌した。反応終了後、溶媒を減圧下で留去し、析出物を濾過して1-(4-ヨードフェニル)チオウレアを889mg、収率59%で得た。

[化45]



1-(4-ヨードフェニル)チオウレア (889mg, 3.19mmol) のクロロホルム (7ml) 懸濁液に、臭素 (328 μ l, 6.40mmol) を加えて加熱還流し、6時間攪拌した。反応終了後、溶媒を留去し、ジクロロメタンを加えて、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和塩化ナトリウム水溶液にて洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去後、析出物を濾過して2-アミノ-6-ヨードベンゾチアゾールを650mg、収率73%で得た。

[化46]



2-アミノ-6-ヨードベンゾチアゾール (100mg, 0.362mmol)

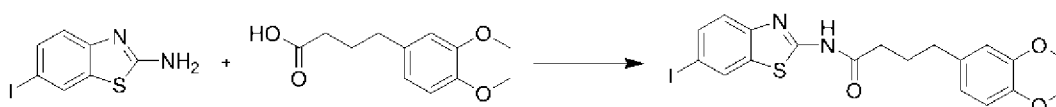
o l)、3-(3,4-ジメトキシフェニル)プロピオン酸(91.4 mg, 0.435 mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(2 ml)溶液に、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(69.4 μ l, 0.398 mmol)、O-(6-クロロベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート(180 mg, 0.435 mmol)を加えて終夜、室温にて攪拌した。反応終了後、酢酸エチルにて希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和塩化ナトリウム水溶液にて洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をエタノールにて再結晶し、2-(3-(3,4-ジメトキシフェニル)プロパンアミド)-6-ヨードベンゾチアゾールを83 mg、収率48%で得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 12.42 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.72-7.69 (m, 1H), 7.52 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.85-6.83 (m, 2H), 6.75-6.72 (m, 1H), 3.71 (s, 3H), 3.69 (s, 3H), 2.90-2.76 (m, 4H).

MS (ESI) Found; 469 [M+H] $^+$

[0073] SO3042 (KY03-1)

[化47]



2-アミノ-6-ヨードベンゾチアゾール(250 mg, 0.905 mmol)、4-(3,4-ジメトキシフェニル)ブタン酸(224 mg, 0.995 mmol)のN,N-ジメチルホルムアミド(3 ml)溶液に、N,N-ジイソプロピルエチルアミン(174 μ l, 0.995 mmol)、O-(6-クロロベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート(450 mg, 1.09 mmol)を加えて終夜、室温にて攪拌した。反応終了後、酢酸エチルにて希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和塩化ナトリウム水溶液にて洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をエ

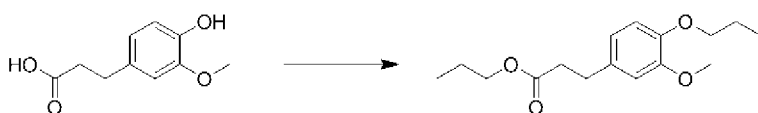
タノールにて再結晶し、2-(4-(3,4-ジメトキシフェニル)ブタンアミド)-6-ヨードベンゾチアゾールを131mg、収率30%で得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO-d_6): δ 12.37 (s, 1H), 8.37 (s, 1H), 7.72-7.69 (m, 1H), 7.52 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H), 6.86-6.79 (m, 2H), 6.70 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.70 (s, 3H), 2.58-2.48 (m, 4H), 1.96-1.86 (m, 2H).

MS (ESI) Found; 483 $[\text{M}+\text{H}]^+$

[0074] S O 2 0 7 7

[化48]



4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニルプロピオン酸 (500mg, 2.54mmol) のN,N-ジメチルホルムアミド (5ml) 溶液に、炭酸カリウム (881mg, 6.37mmol)、1-ブロモプロパン (692 μ l, 7.65mmol) を加えて、室温にて終夜攪拌した。反応終了後、酢酸エチルにて希釈し、水、飽和塩化ナトリウム水溶液にて洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n-ヘキサン/酢酸エチル=4/1) にて精製し、プロピル 3-(3-メトキシ-4-プロポキシフェニル) プロパノエートを590mg、収率82%で得た。

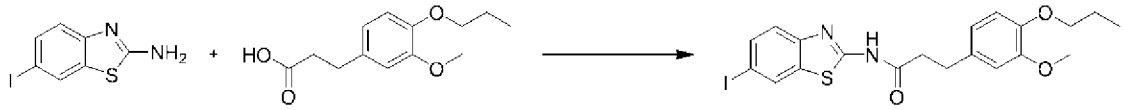
[化49]



プロピル 3-(3-メトキシ-4-プロポキシフェニル) プロパノエート (590mg, 2.10mmol) を1,4-ジオキサンに溶かし、5mol/l水酸化ナトリウム水溶液 (1.68ml) を加えて室温にて終夜攪拌した。反応終了後、6mol/l塩酸を加えて、酢酸エチルにて抽出した。有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。減圧下で溶媒を留去し、3-(3-メトキシ-4-プロポキシフェニル)

ル) プロピオン酸を 438 mg、収率 87% で得た。

[化50]



2-アミノ-6-ヨードベンゾチアゾール (200 mg, 0.723 mmol)、3-(3-メトキシ-4-プロポキシフェニル)プロピオン酸 (200 mg, 0.839 mmol) の N, N-ジメチルホルムアミド (3 ml) 溶液に、N, N-ジイソプロピルエチルアミン (140 μ l, 0.803 mmol)、O-(6-クロロベンゾトリアゾール-1-イル)-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスファート (360 mg, 0.870 mmol) を加えて終夜、室温にて攪拌した。反応終了後、酢酸エチルにて希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、飽和塩化ナトリウム水溶液にて洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をエタノールにて再結晶し、2-(3-(3-メトキシ-4-プロポキシフェニル)プロパンアミド)-6-ヨードベンゾチアゾールを 217 mg、収率 60% で得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6): δ 12.42 (s, 1H), 8.38-8.37 (m, 1H), 7.72-7.69 (m, 1H), 7.54-7.51 (m, 1H), 6.85-6.82 (m, 2H), 6.72 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 3.86-3.82 (m, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.87-2.78 (m, 4H), 1.72-1.65 (m, 2H), 0.94 (t, J = 7.3 Hz, 3H).

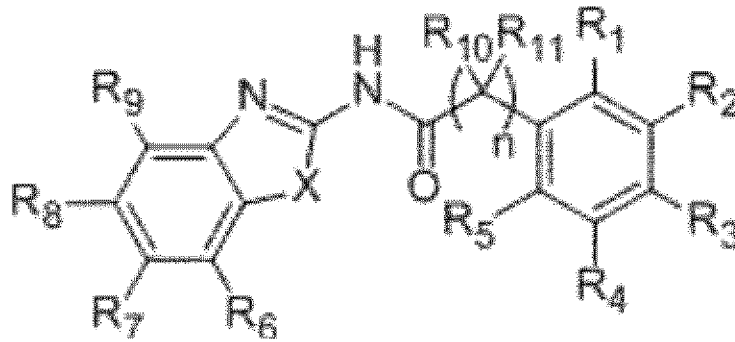
MS (ESI) Found; 497 [M+H]⁺

[0075] SO3031 (KY01-1)、SO2031 (KY02-1)、SO3042 (KY03-1)、およびSO2077が心筋分化促進効果を有することを、国際公開第2012/026491号に記載の実施例と同様の方法により確認した。

請求の範囲

- [請求項1] EGF受容体阻害剤を含む、多能性幹細胞の心筋分化促進剤。
- [請求項2] EGF受容体阻害剤が、AG1478、ゲフィチニブ、アファチニブ、ARRY334543、AST1306、AZD8931、BIBU1361、BIBX1382、BPDQ、BPIQ-1、BPIQ-11、カネルチニブ、CL-387,785、CUDC101、ダコミチニブ、バンデタニブ、EGFR Inhibitor III (CAS 733009-42-2)、EGFR/ErbB-2 Inhibitor (CAS 179248-61-4)、エルロチニブ、GW583340、GW2974、HDS029、ラパチニブ、WHI-P154、OSI-420、PD153035、PD168393、PD174265、ペリチニブ、Compound 56、XL657、PP3、AG-490、AG555、チロホスチンB42、チロホスチンB44、AG556、AG494、AG825、RG-13022、DAPH、EGFR Inhibitor (CAS 879127-07-8)、エルブスタチンアナログ (CAS 63177-57-1)、JNJ28871063、チロホスチン47、ラベンダスチンA、ラベンダスチンC、ラベンダスチンCメチルエステル、LFM-A12、TAK165、TAK285、チロホスチン51、チロホスチンAG183、チロホスチンAG528、チロホスチンAG99、チロホスチンRG14620、WZ3146、WZ4002、WZ8040、ブテイン、およびチロホスチンAG112から選択される、請求項1記載の心筋分化促進剤。
- [請求項3] EGF受容体阻害剤が、AG1478、ゲフィチニブ、およびPP3から選択される、請求項2記載の心筋分化促進剤。
- [請求項4] 1以上のWntシグナル阻害剤と併用される、請求項1～3のいずれかに記載の心筋分化促進剤。
- [請求項5] Wntシグナル阻害剤が以下の式(1)の化合物またはその塩である、請求項4記載の心筋分化促進剤：
式(1)：

[化1]



[式中、

$R_1 - R_5$ は、各々独立して、水素原子；ハロゲン原子；水酸基；炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基；非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基；又は基- $N R_{12} R_{13}$ (R_{12} 及び R_{13} は、各々独立して、水素原子、酸素原子、又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖または分岐アルキル基である)である、ここで $R_1 - R_5$ のうち隣接する2つが一緒になって $-O-CH_2-O-$ または $-O-(CH_2)_2-O-$ を形成していてもよい、

$R_6 - R_9$ は、各々独立して、水素原子；ハロゲン原子；水酸基；炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基；基- $C(O)A$ で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基 (A は、非置換又は炭素数1～5の直鎖または分岐アルキル基で置換された飽和または不飽和5または6員環であり、該環は窒素原子、酸素原子、及び硫黄原子から独立に選択される1または2個の原子を含んでいてもよい)；非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基；又は基- $N R_{12} R_{13}$ (R_{12} 及び R_{13} は、各々独立して、水素原子、酸素原子、又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖または分岐アルキル基である)である、ここで $R_6 - R_9$ のうち隣接する2つが一緒になって $-O-CH_2-O-$ または $-O-(CH_2)_2-O-$ を形成していてもよい、

$R_{10}-R_{11}$ は、各々独立して、水素原子；又は炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基である、

Xは、 $-CR_{14}$ (R_{14} は、水素原子、ハロゲン原子、水酸基、炭素数1～5の直鎖又は分岐アルコキシ基、又は非置換又はハロゲン原子で置換された炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基である)；酸素原子；硫黄原子；セレン原子；又は基 $-NR_{15}$ (R_{15} は、水素原子、炭素数1～5の直鎖又は分岐アルキル基、又は炭素数1～5の直鎖又は分岐アシル基である)である、および

nは、0から6の整数である]。

[請求項6]

式(1)の化合物またはその塩において、

R_1 、 R_4 、 R_5 、 R_6 、 R_8 、 R_9 、 R_{10} 及び R_{11} が水素原子である、

、

R_2 及び R_3 が、メトキシ基、エトキシ基、又はプロポキシ基である、

R_7 が、ハロゲン原子である

Xが、硫黄原子である、および

nが、0から4の整数である、請求項5記載の心筋分化促進剤。

[請求項7]

式(1)の化合物またはその塩において、

R_2 が、メトキシ基である、および

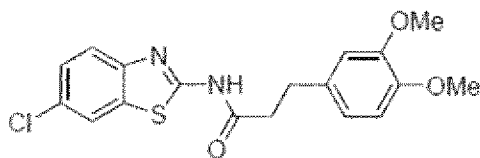
R_3 が、メトキシ基、エトキシ基、又はプロポキシ基である、請求項6記載の心筋分化促進剤。

[請求項8]

W n t シグナル阻害剤が以下からなる群から選択される化合物またはその塩である、請求項4記載の心筋分化促進剤：

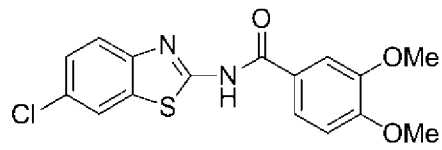
K Y O 2 1 1 1

[化2]



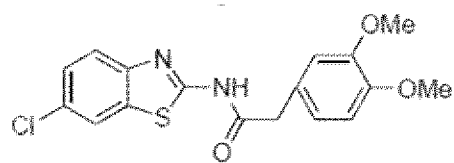
KY01041

[化3]



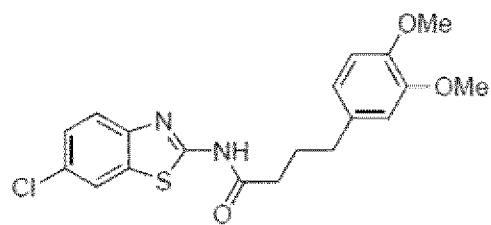
T61164

[化4]



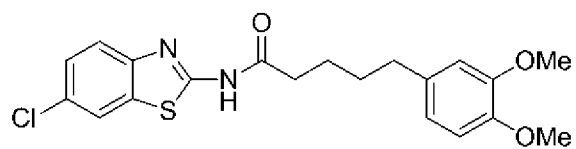
KY02114

[化5]



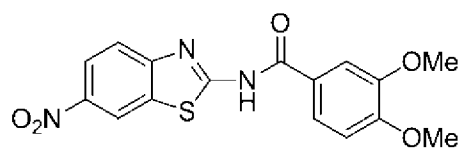
KY01045

[化6]



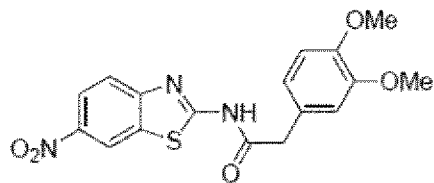
KY01040

[化7]



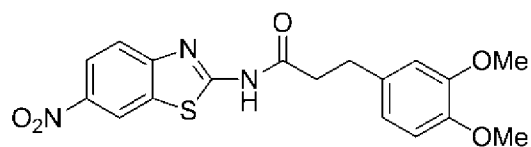
KY02109

[化8]



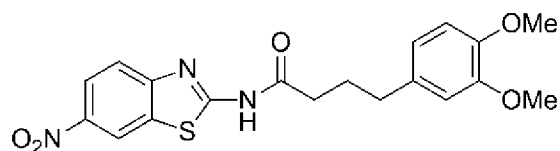
KY01042

[化9]



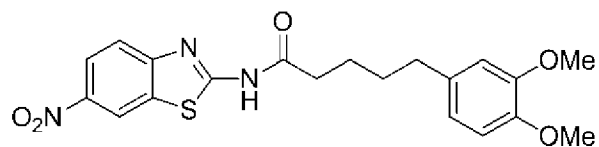
KY01043

[化10]



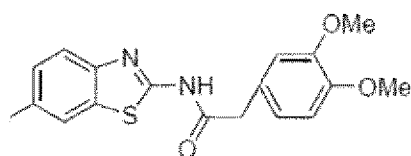
KY01046

[化11]



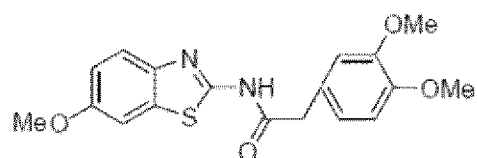
PB2852

[化12]



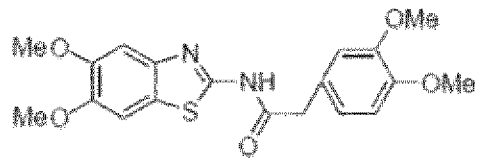
N11474

[化13]



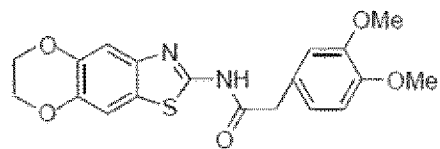
PB2572

[化14]



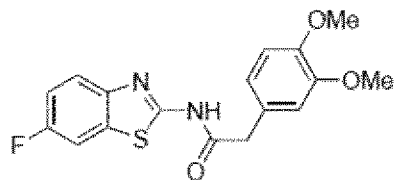
PB2570

[化15]



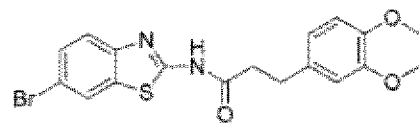
KY02104

[化16]



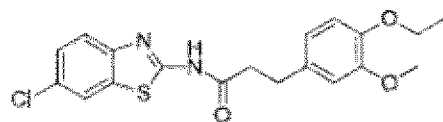
SO087

[化17]



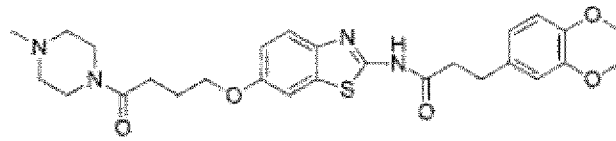
SO102

[化18]



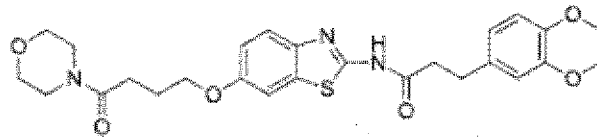
SO096

[化19]



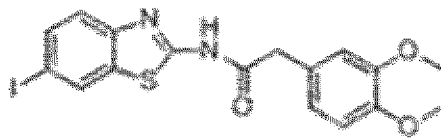
SO094

[化20]



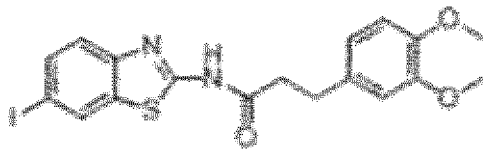
SO3031 (KY01-1)

[化21]



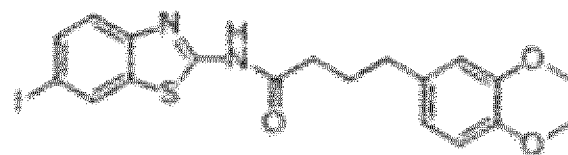
SO2031 (KY02-1)

[化22]



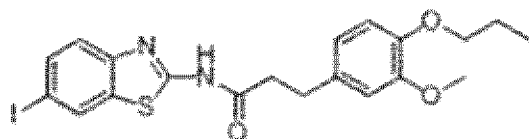
SO3042 (KY03-1)

[化23]



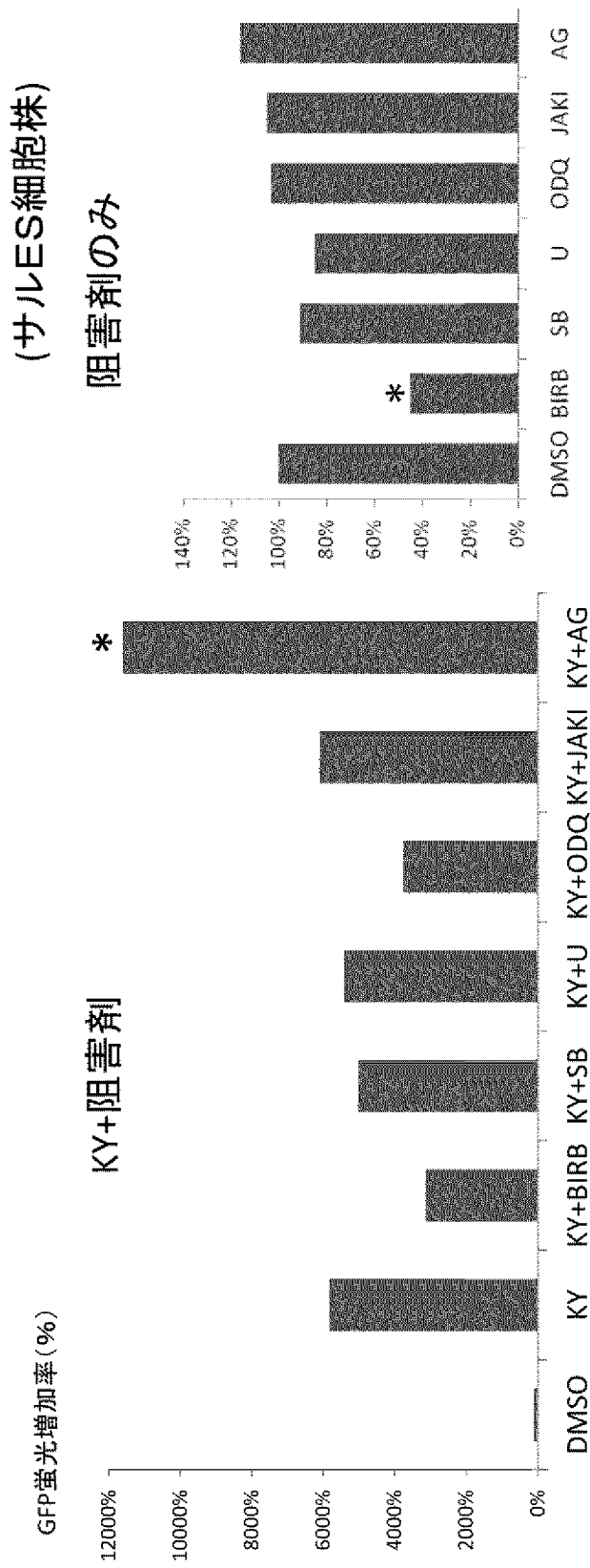
SO2077

[化24]

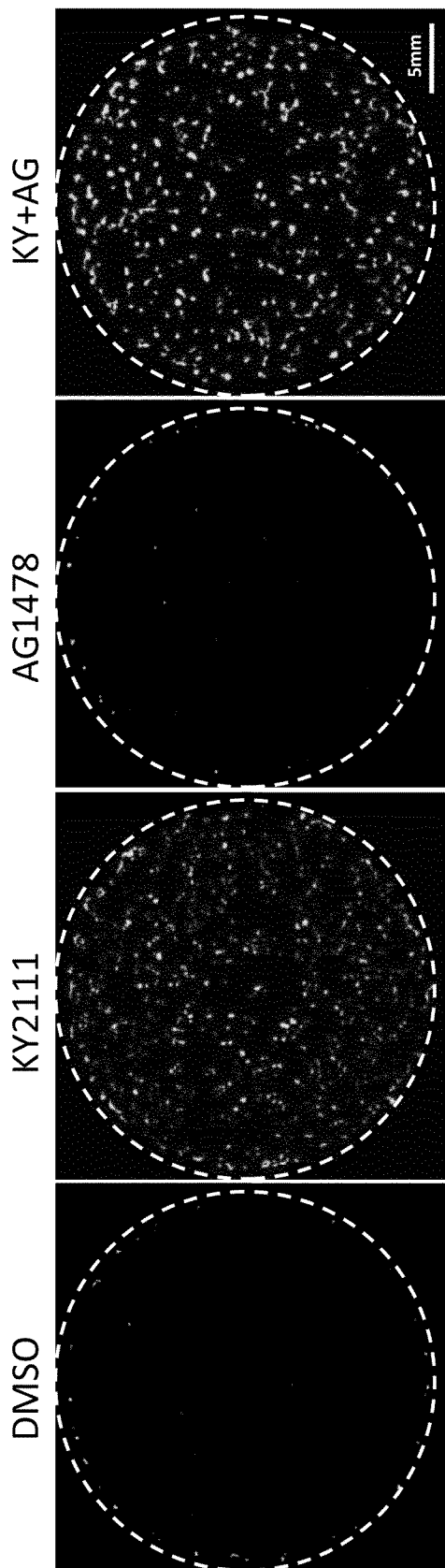


- 。
- [請求項9] W n t シグナル阻害剤が I W P 2、X A V 9 3 9、および I W R 1 からなる群から選択される、請求項 4 に記載の心筋分化促進剤。
- [請求項10] 1 以上の W n t シグナル活性化剤と併用される、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の心筋分化促進剤。
- [請求項11] W n t シグナル活性化剤が B I O および C H I R 9 9 0 2 1 からなる群から選択される、請求項 1 0 記載の心筋分化促進剤。
- [請求項12] E G F 受容体阻害剤を含む、心筋分化促進用キット。
- [請求項13] E G F 受容体阻害剤を含む培地中で多能性幹細胞を培養することを含む、インビトロにおける多能性幹細胞の心筋分化誘導方法。
- [請求項14] W n t シグナル活性化剤を含む培地中で多能性幹細胞を培養すること、および／または W n t シグナル阻害剤を含む培地中で多能性幹細胞を培養することをさらに含む、請求項 1 3 記載の方法。
- [請求項15] 以下の工程を含む、請求項 1 3 記載の方法：
(1) 多能性幹細胞を W n t シグナル活性化剤を含む培地中で培養する工程、および；
(2) 工程 (1) の後、前記細胞を E G F 受容体阻害剤を含む培地中で培養する工程。
- [請求項16] 工程 (2) の培養期間の全体または一部において、E G F 受容体阻害剤および W n t シグナル阻害剤を含む培地中で細胞を培養する、請求項 1 5 記載の方法。
- [請求項17] 培地がアルブミン以外のタンパク質を含まない、請求項 1 3 ~ 1 6 のいずれかに記載の方法。
- [請求項18] 浮遊培養により行われる、請求項 1 3 ~ 1 7 のいずれかに記載の方法。
- [請求項19] 心筋細胞の製造方法である、請求項 1 3 ~ 1 8 のいずれかに記載の方法。

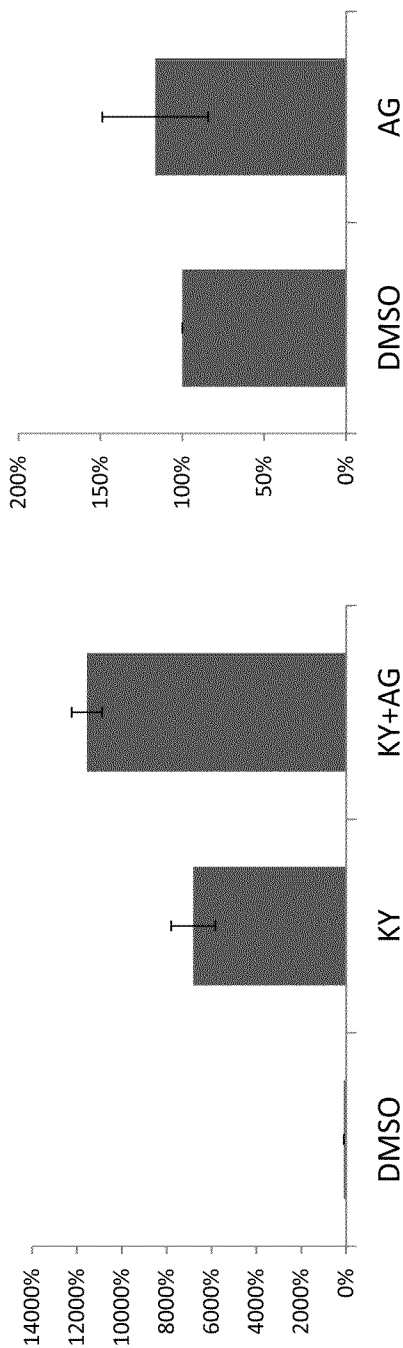
[図1]



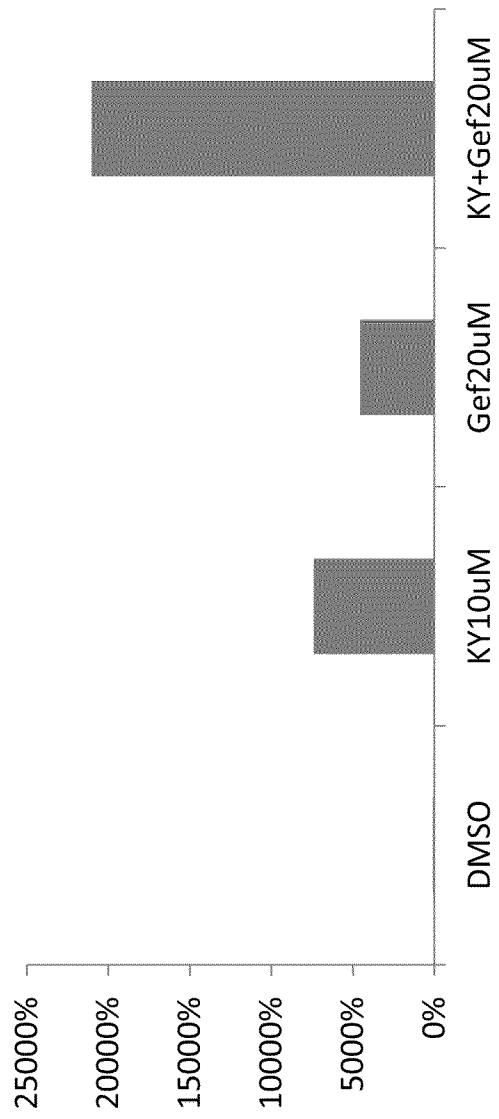
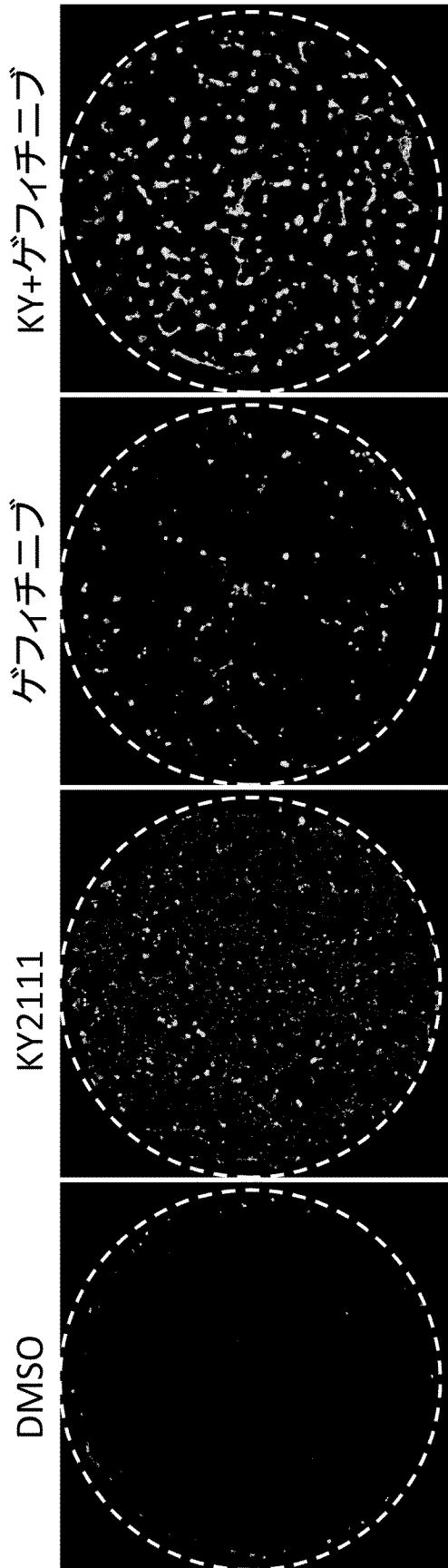
[図2]



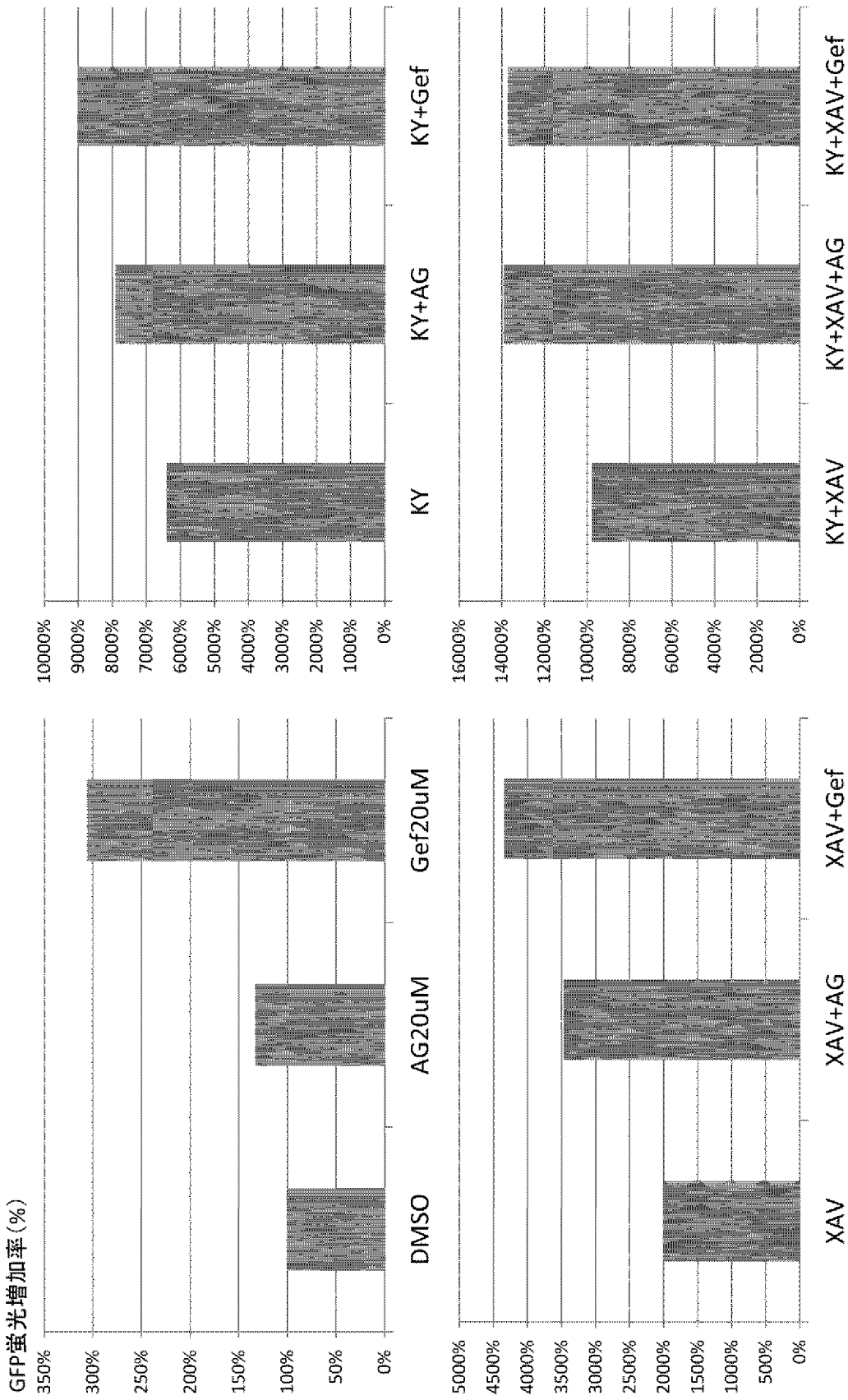
(サルES細胞)



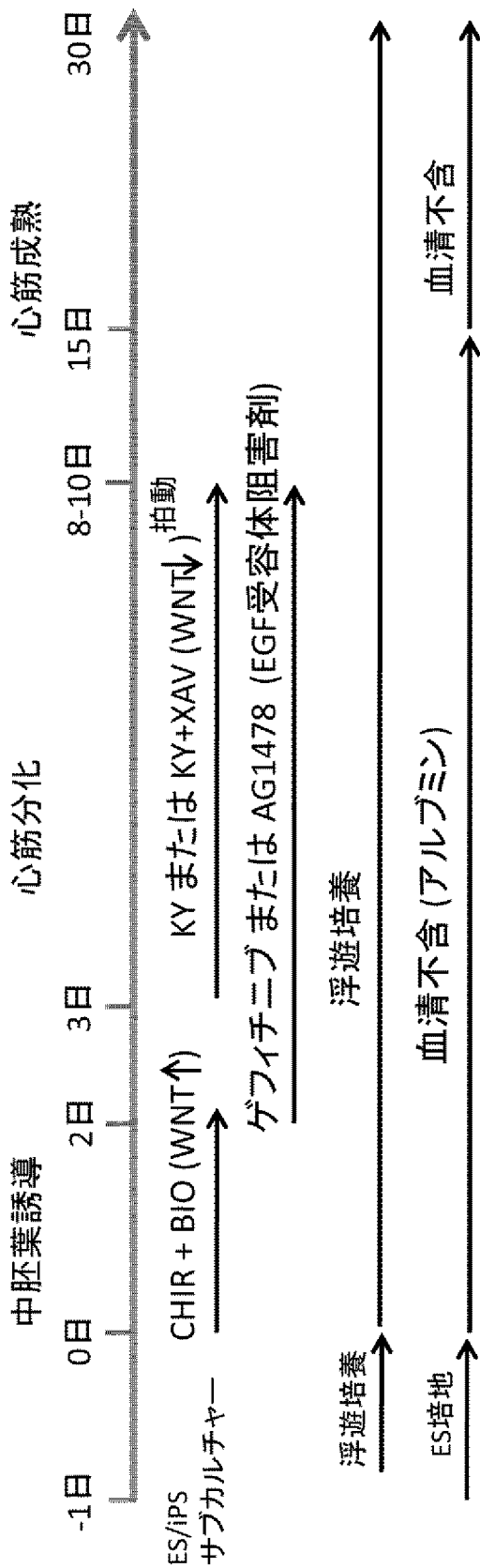
[図3]



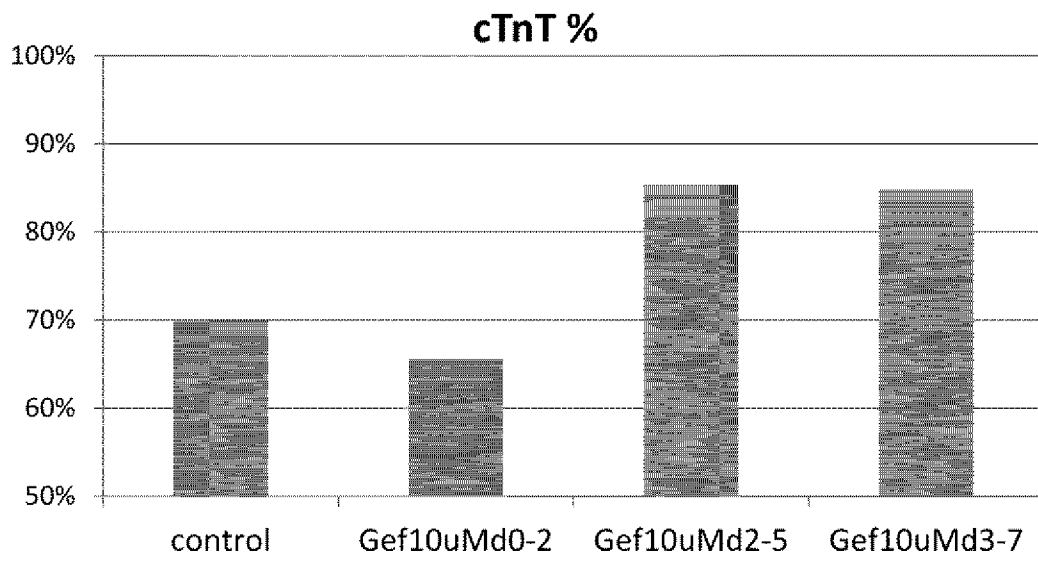
[圖4]



[図5]



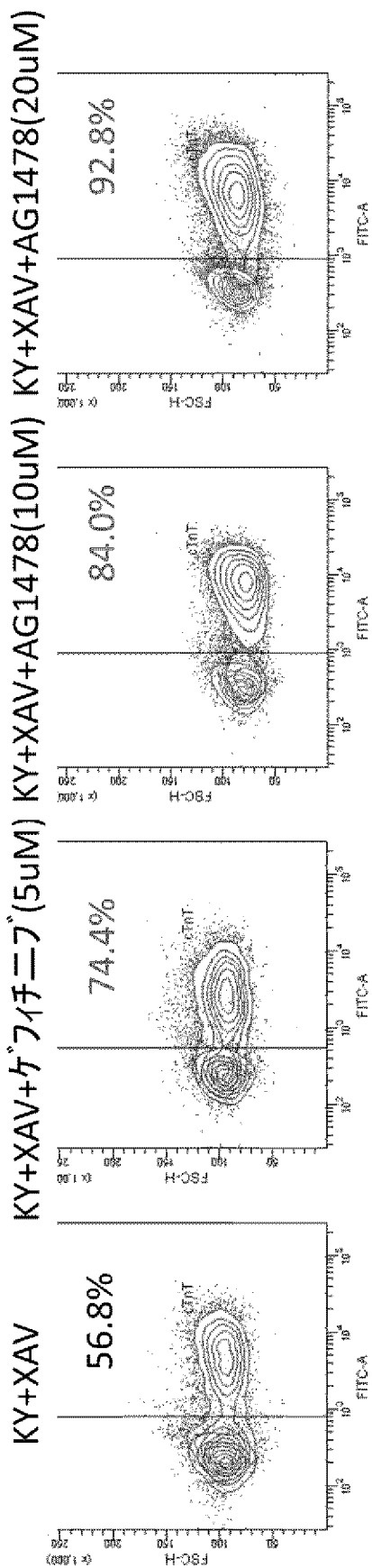
[図6]



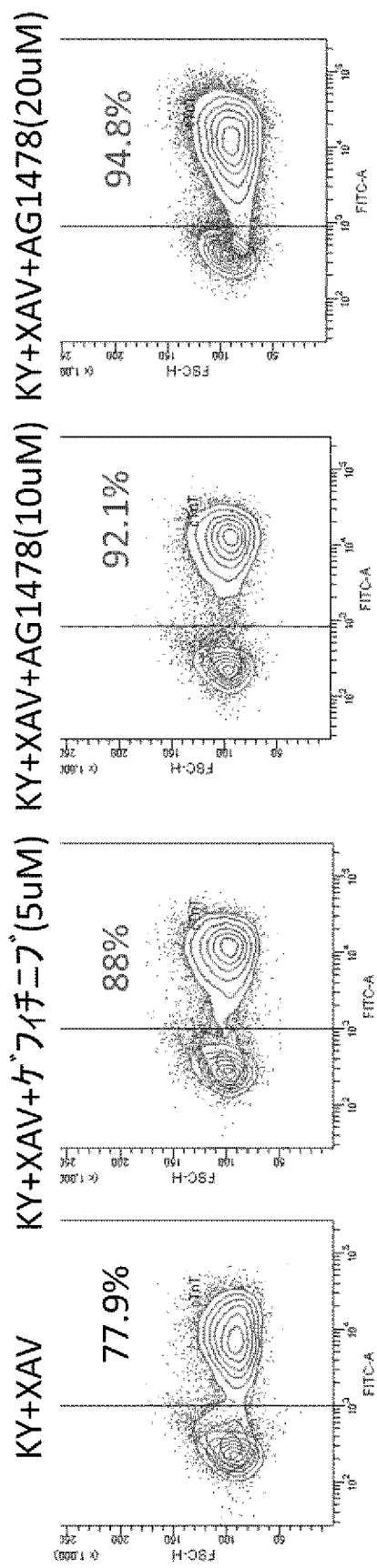
コントロール=KY+XAV(浮遊培養)

[図7]

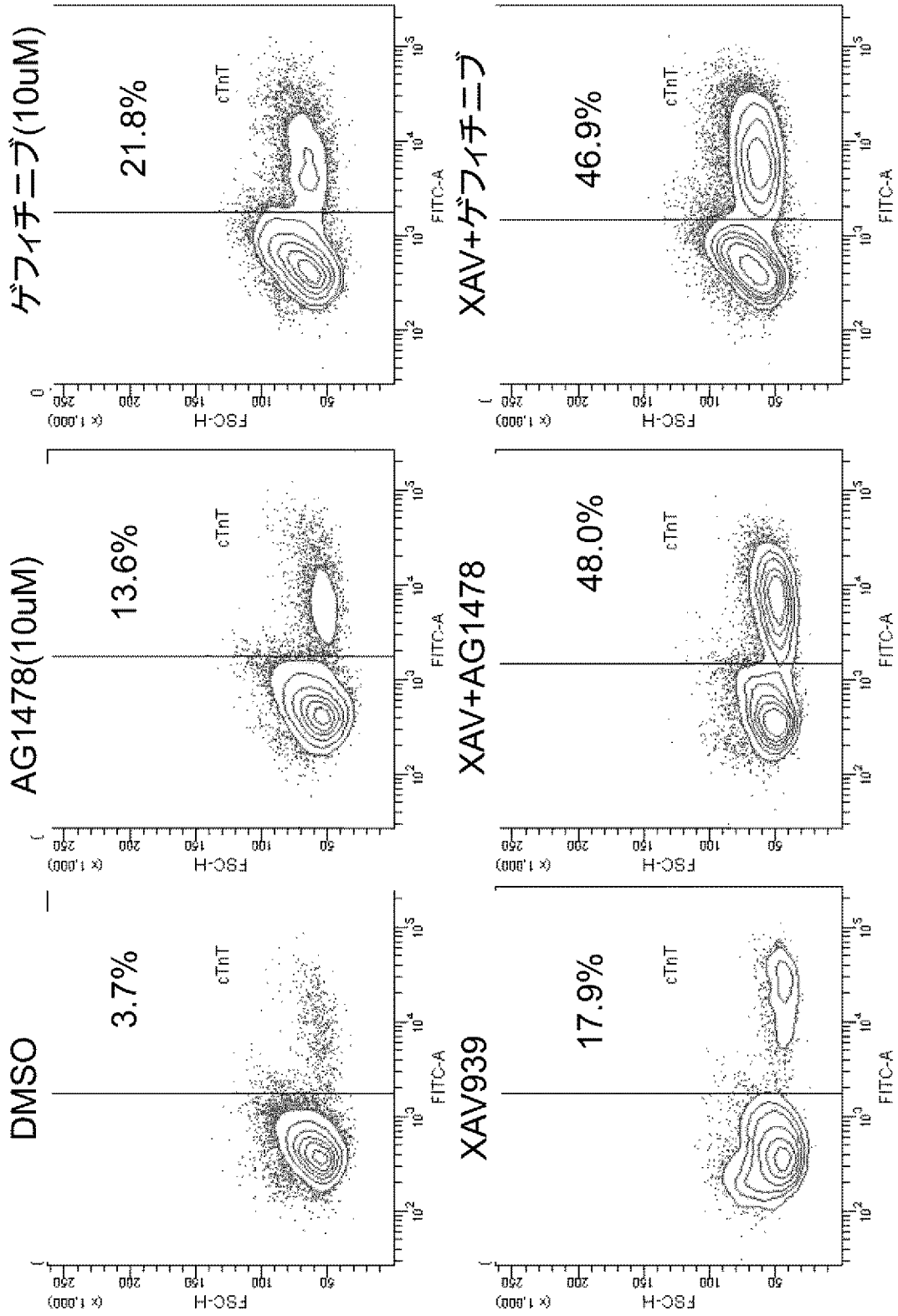
ヒトiPS細胞IMR90-1



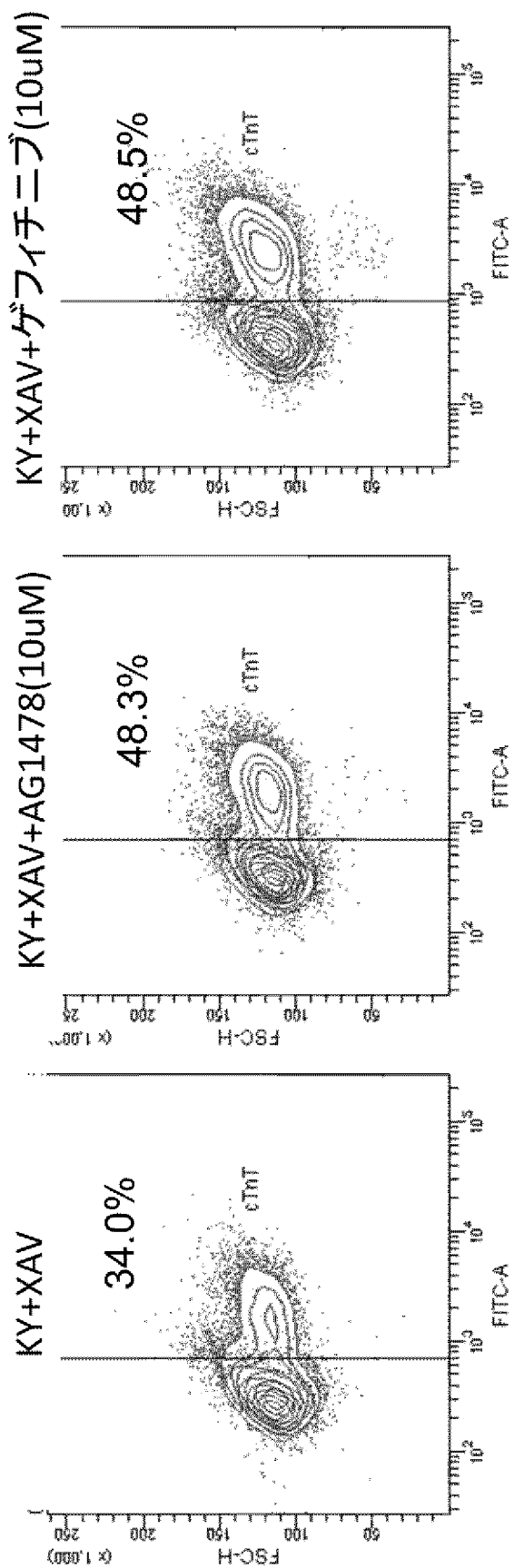
ヒトES細胞KhES-3



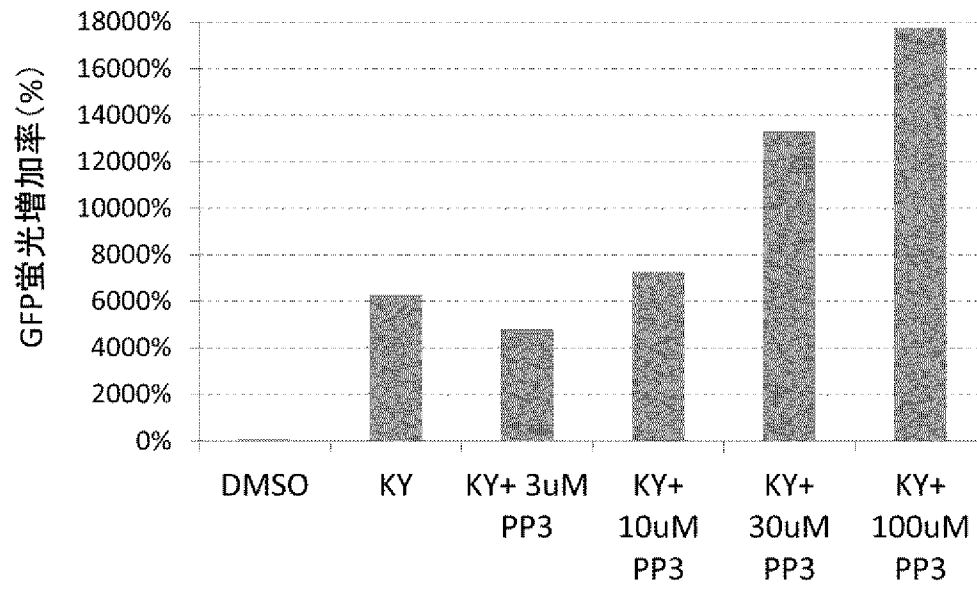
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2014/052673

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N5/07(2010.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C12N5/07, C12N5/0735, C12N5/10

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (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	SHEN, G., et al., A 2,6-Disubstituted 4-Anilinoquinazoline Derivative Facilitates Cardiomyogenesis of Embryonic Stem Cells, ChemMedChem, 2012, 7, pp.733-740, entire text, particularly, summary, page 734, right column, line 11 to page 736, right column, the last line, fig. 2, 3, tables 1, 2 (It is described that Iressa (gefitinib), which is a compound having an inhibitory activity on EGF receptors, showed poorer results than those of a negative control with respect to the capability of accelerating the differentiation of a pluripotent stem cell into a cardiac muscle.)	1, 12, 13
Y		2-11, 14-19
L		1-19

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 16 April, 2014 (16.04.14)	Date of mailing of the international search report 28 April, 2014 (28.04.14)
----------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/052673

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y L	Takayuki MORISAKI, "Shinkin Bunka ni Okeru Bunshi Kaibogakuteki Seigyo Kiko no Kaimei ni Kansuru Kenkyu", Annual report of the research on cardiovascular diseases (Heisei 15 Nendo), National Cardiovascular Center, 2005.01, page 177, entire text (It is described that the decrease in occurrence rate of an embryoid body that can spontaneously beat was observed when AG1478, which is mentioned as an EGF receptor inhibitor in the application, was added to a system for differentiating an ES cell into a cardiac muscle.)	2-11 1-19
Y L	WANG, Z., et al., Neuregulin-1 enhances differentiation of cardiomyocytes from embryonic stem cells, Med. Biol. Eng. Comput., 2009, 47, pp.41-48, entire text, particularly, summary, page 42, left column, line 1 to right column, line 2, page 43, left column, line 21 to right column, line 23, fig. 2, 4 (It is described that the induction of the differentiation of an ES cell into a cardiac muscle was accelerated with neuregulin-1 which is a member belonging to the EGF family, and that the increase in a transcriptional factor Nkx2.5 which is inherent in a cardiac muscle in a differentiated ES cell induced with neuregulin-1 was inhibited when AG1478, which is mentioned as an EGF receptor inhibitor in the application, was added.)	2-11 1-19
Y	MINAMI, I., et al., A Small Molecule that Promotes Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells under Defined, Cytokine- and Xeno-free Conditions, Cell Reports, 2012, 2, pp.1448-1460, entire text, particularly, summary, fig. 5	4-11,14-19
Y	Itsunari MINAMI et al., "Shinki Teibunshi Kagobutsu o Mochiita Hito ES/iPS Saibo no Rinsho Grade Shinkin Bunka Yudoho no Kaihatsu", Regenerative Medicine, 28 February 2013 (28.02.2013), 12(suppl.), page 151, entire text	4-11,14-19
Y	WO 2012/026491 A1 (Kyoto University), 01 March 2012 (01.03.2012), entire text; particularly, claims; examples & US 2013/0183753 A1 & EP 2610249 A1 & CN 103209968 A	4-8,14-19
Y	WANG Hanmin, et al., Cardiac Induction of Embryonic Stem Cells by a Small Molecule Inhibitor of Wnt/ β -Catenin Signaling, ACS Chem. Biol., 2011, 6, pp.192-197, summary	9,14-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/052673

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010/0183565 A1 (LAFLAMME M.A.), 22 July 2010 (22.07.2010), (Family: none)	1-19
P, Y	WO 2013/111875 A1 (Kyoto University), 01 August 2013 (01.08.2013), entire text; particularly, claims; examples (Family: none)	4-11, 14-19

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N5/07(2010.01)i, C12N5/0735(2010.01)i, C12N5/10(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） Int.Cl. C12N5/07, C12N5/0735, C12N5/10		
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 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (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	SHEN, G., et al., A 2,6-Disubstituted 4-Anilinoquinazoline Derivative Facilitates Cardiomyogenesis of Embryonic Stem	1, 12, 13
Y	Cells, ChemMedChem, 2012, 7, pp.733-740, 全文, 特に要旨, 734 頁右欄 11 行-736 頁右欄最下行, 図 2, 図 3, 表 1, 表 2	2-11, 14-19
L	（EGF 受容体阻害活性を示す化合物であるイレッサ（ゲフィニチブ）が、多能性幹細胞の心筋分化促進能力に関し、ネガティブコントロールよりも低い結果を示したことが記載されている。）	1-19
<input checked="" type="checkbox"/> C 欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「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 <p style="text-align:center;">16.04.2014</p>		国際調査報告の発送日 <p style="text-align:center;">28.04.2014</p>
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） <p style="text-align:center;">荒木 英 則</p> 電話番号 03-3581-1101 内線 3448
		4 B 9 7 3 6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	森崎隆幸, 心筋分化における分子解剖学的制御機構の解明に関する研究, 厚生労働省循環器病研究委託費による研究報告集 (平成15年度), 国立循環器病センター, 2005.01, p.177, 全文	2-11
L	(ES細胞の心筋分化系において、本願でEGF受容体阻害剤として挙げられているAG1478を添加すると、自動拍動する胚葉体の出現頻度低下が観察されたと記載されている。)	1-19
Y	WANG, Z., et al., Neuregulin-1 enhances differentiation of cardiomyocytes from embryonic stem cells, Med. Biol. Eng. Comput., 2009, 47, pp.41-48, 全文、特に要旨,	2-11
L	42頁左欄1行-右欄2行, 43頁左欄21行-右欄23行, 図2, 図4 (EGFファミリーの一種であるニューレグリン-1によりES細胞の心筋分化誘導が促進されたこと、及び、本願でEGF受容体阻害剤として挙げられているAG1478を添加すると、ニューレグリン-1により誘導された分化ES細胞中にある心筋特有の転写因子Nkx2.5の増大が阻害されたことが記載されている。)	1-19
Y	MINAMI, I., et al., A Small Molecule that Promotes Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells under Defined, Cytokine- and Xeno-free Conditions, Cell Reports, 2012, 2, pp.1448-1460, 全文, 特に要旨, 図5	4-11, 14-19
Y	南一成ら, 新規低分子化合物を用いたヒトES/iPS細胞の臨床グレード心筋分化誘導法の開発, 再生医療, 2013.02.28, 12(suppl.), p.151, 全文	4-11, 14-19
Y	WO 2012/026491 A1 (国立大学法人京都大学) 2012.03.01, 全文, 特に請求の範囲, 実施例 & US 2013/0183753 A1 & EP 2610249 A1 & CN 103209968 A	4-8, 14-19
Y	WANG Hanmin, et al., Cardiac Induction of Embryonic Stem Cells by a Small Molecule Inhibitor of Wnt/ β -Catenin Signaling, ACS Chem. Biol., 2011, 6, pp.192-197, 要旨	9, 14-19
A	US 2010/0183565 A1 (LAFLAMME M. A.) 2010.07.22 (ファミリーなし)	1-19
P Y	WO 2013/111875 A1 (国立大学法人京都大学) 2013.08.01, 全文, 特に請求の範囲, 実施例 (ファミリーなし)	4-11, 14-19