

明 細 書

発明の名称： 心筋細胞の精製方法

技術分野

[0001] 本発明は、心筋細胞の製造方法および精製方法に関し、より詳細には、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤を用いた心筋細胞の製造方法および精製方法に関する。

[0002] (発明の背景)

近年、心筋梗塞の発生率は減少してきてはいるものの、心筋梗塞を含む心疾患は世界中で依然として主な死亡原因である。重症心不全患者においては、心臓移植が現在唯一の治療法であるが、心臓移植はドナー不足という問題を抱えている。そこで、心筋細胞を用いた細胞治療が、心疾患を改善させる治療法として注目されてきている。また、心筋細胞を用いた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にも着目されている。そのため、細胞治療やインビトロでの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] 均一な心筋細胞を安定的に提供する方法の1つとして、幹細胞または心筋前駆細胞から、心筋細胞を分化誘導する方法が挙げられ、効率的な心筋細胞への分化誘導法を確立するために、様々な努力がなされている。かかる分化誘導法として、EGFR阻害剤を含む培地中で多能性幹細胞を培養させることで、多能性幹細胞から心筋細胞への分化誘導を促進する方法（特許文献1）、人工多能性幹細胞を心筋細胞へ分化誘導した後、該心筋細胞とNeuregulin-1のアンタゴニストまたはErbBのアンタゴニストとを接触させることで、心筋細胞を成熟させる方法（特許文献2）、筋芽細胞などの未分化前駆細胞と脱アセチル化酵素阻害剤とを接触させることで、該未分化前駆細胞の分化誘導を促進する方法（特許文献3）、心筋前駆細胞などの成体の前駆細胞と、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤とを接触させることで、該前駆細胞の分化誘導を促進する方法（特許文献4）などが報告されている。また、幹細胞からの分化誘導過程を経ない方法についても

報告されており、例えば、特許文献5には、線維芽細胞などの体細胞から、ダイレクトリプログラミングにより、心筋前駆細胞または心筋細胞を製造する方法が開示されている。

先行技術文献

特許文献

- [0004] 特許文献1：国際公開第2014／136519号
特許文献2：米国公開第2010／0183565号
特許文献3：国際公開第2003／033678号
特許文献4：国際公開第2009／073618号
特許文献5：国際公開第2015／038704号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0005] 本発明は、上記従来の方法とは異なる手段により、純度が高い心筋細胞を含む細胞集団を製造する方法を提供することを課題とする。また、心筋細胞を含む細胞集団から、高純度で心筋細胞を精製する方法を提供することも課題とする。

課題を解決するための手段

- [0006] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、未分化細胞から心筋細胞への分化誘導を促進するのではなく、既に心筋細胞が含まれている細胞集団内の、心筋細胞以外の細胞で高発現しているタンパク質を標的とした阻害剤により、該心筋細胞以外の細胞の増殖を抑制する、あるいは心筋細胞以外の細胞の数を減らすことで、該細胞集団中の心筋細胞の割合を増加させること、即ち心筋細胞を精製できるのではないかとこの着想を得た。そこで、まず、iPS細胞から分化誘導させた心筋細胞を含む細胞集団を用いて、シングルセルRNA sequence解析を行い、該細胞集団中の細胞をクラスタリングした。クラスタリングの結果、心筋細胞と、それ以外の細胞において、受容体型チロシンキナーゼの発現に差異が認められることを

見出した。そこで、受容体型チロシンキナーゼに対する阻害剤を用いて、細胞集団に占める心筋細胞の割合の変化を検証したところ、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤により、首尾よく心筋細胞を純化できることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づいてさらに研究を重ねた結果、本発明を完成させるに至った。

[0007] すなわち、本発明は以下を提供する。

[1] 心筋細胞を含む細胞集団を製造する方法であって、

(1) 多能性幹細胞を心筋細胞分化用培地中で培養して得られた、心筋細胞または心筋前駆細胞とその他の細胞とを含む細胞集団に、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤（但し、EGF受容体阻害剤を除く。）を接触させる工程、および

(2) 該細胞集団を培養する工程、を含む、方法。

[2] 前記工程(1)の細胞集団と受容体型チロシンキナーゼ阻害剤との接触が、多能性幹細胞の分化誘導開始から4日目以降に行われる、[1]に記載の方法。

[3] 前記工程(1)の細胞集団と受容体型チロシンキナーゼ阻害剤との接触が1日以上行われる、[1]または[2]に記載の方法。

[4] 前記阻害剤が、VEGF受容体、PDGF受容体、HGF受容体およびFGF受容体からなる群から選択される少なくとも1つの受容体型チロシンキナーゼに対する阻害剤である、[1]～[3]のいずれかに記載の方法。

[5] 前記阻害剤が、N-[5-(2-[(シクロプロパンカルボニル)アミノ]イミダゾ[1,2-b]ピリダジン-6-イル)オキシ)-2-メチルフェニル]-1,3-ジメチル-1H-ピラゾール-5-カルボキサミド、N-{4-[(6,7-ジメトキシキノリン-4-イル)オキシ]-3-フルオロフェニル}-N'-(4-フルオロフェニル)シクロプロパン-1,1-ジカルボキサミド、AMG337、ASP5878、BGJ398

、Foretinib、ZM323881、CP-673451、CrenolanibおよびCrizotinibからなる群から選択される少なくとも1種である、[1]～[4]のいずれかに記載の方法。

[6] 前記多能性幹細胞が人工多能性幹細胞である、[1]～[5]のいずれかに記載の方法。

[7] [1]～[6]のいずれかに記載の方法により得られた、心筋細胞を含む細胞集団。

[8] [7]に記載の細胞集団を含有してなる、細胞移植療法剤。

[9] 心筋細胞を精製する方法であって、

(1) 多能性幹細胞を心筋細胞分化用培地中で培養して得られた、心筋細胞または心筋前駆細胞とその他の細胞とを含む細胞集団に、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤を接触させる工程、および

(2) 該細胞集団を培養する工程、を含む、方法。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、心筋細胞を高純度で含む細胞集団が提供される。かかる細胞集団は、心疾患に対する細胞移植療法に好適に用いることができる。また、心筋細胞および心筋前駆細胞を含む細胞集団から、高純度で心筋細胞を精製する方法も提供される。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1は、iPS細胞から分化誘導した心筋細胞のシングルセルRNAシーケンシングデータによるクラスタリングのt-SNEプロットと各クラスタのsarcomeric- α -actininとcTnT (Cardiac Troponin T) の発現量を示す。上のパネルの丸で囲った部分は非心筋細胞集団を示す。中央と下のパネルの縦軸は遺伝子発現量を横軸のidentityのラベルは図1のクラスタの番号を示す。一つ一つのドットは個々の細胞を示し、枠で囲った部分は非心筋細胞クラスタを示す。

[図2-1]図2-1は、シングルRNAシーケンシングデータによるiPS細

胞由来心筋細胞のクラスタリング結果の t-SNE プロットと各細胞の VEGFR1、VEGFR2 遺伝子の発現を示す。遺伝子発現を示すパネルの濃い灰色のドットは高い発現量を薄い灰色は低い発現量を示す細胞を表す。発現の高い細胞集団は丸で囲み、集団名を図中に示す (CM: 心筋細胞 (以下 CM)、SMC: 平滑筋様細胞 (以下 SMC)、END: 内胚葉系譜細胞 (以下 END)、EC: 内皮様細胞)。

[図2-2] 図2-2は、シングルRNAシーケンシングデータによる iPS 細胞由来心筋細胞のクラスタリング結果の t-SNE プロットと各細胞の VEGFR3、PDGFRA、PDGFRB 遺伝子の発現を示す。遺伝子発現を示すパネルの濃い灰色のドットは高い発現量を薄い灰色は低い発現量を示す細胞を表す。発現の高い細胞集団は丸で囲み、集団名を図中に示す (SMC: 平滑筋様細胞 (以下 SMC)、EC: 内皮様細胞)。

[図2-3] 図2-3は、シングルRNAシーケンシングデータによる iPS 細胞由来心筋細胞のクラスタリング結果の t-SNE プロットと各細胞の FGFR4、HGFR (c-Met)、EGFR1 遺伝子の発現を示す。遺伝子発現を示すパネルの濃い灰色のドットは高い発現量を薄い灰色は低い発現量を示す細胞を表す。発現の高い細胞集団は丸で囲み、集団名を図中に示す (END: 内胚葉系譜細胞 (以下 END))。

[図2-4] 図2-4は、シングルRNAシーケンシングデータによる iPS 細胞由来心筋細胞のクラスタリング結果の t-SNE プロットと各細胞の EGFR3 遺伝子の発現を示す。遺伝子発現を示すパネルの濃い灰色のドットは高い発現量を薄い灰色は低い発現量を示す細胞を表す。発現の高い細胞集団は丸で囲み、集団名を図中に示す (END: 内胚葉系譜細胞 (以下 END))。

[図3] 図3は、iPS 細胞由来心筋細胞の CD326、CD31、CD49a 発現による細胞集団の分離結果を示す。フローサイトメトリーにより、心筋細胞率 (TNNI1 陽性率) 89.6% (左端のパネル) の TNNI1 レポーター iPS 細胞由来心筋細胞を、CD326 陽性細胞細胞 (END、中央

左のパネルの枠で囲んだ細胞)、CD326陰性CD31陽性細胞(EC、中央右のパネルの枠で囲んだ細胞)、CD326陰性CD31陰性CD49a陽性細胞(SMC、中央右のパネルの枠で囲んだ細胞)、CD326陰性CD31陰性CD49a陰性細胞細胞(Triple Negative: TN、中央右のパネルの左下に位置する細胞)に分離した。TNの99%以上が心筋マーカーTNNI1陽性の細胞(心筋細胞)であった(右端のパネル)。ECとSMCのパーセント表示についてはパネル内の細胞ではなく、CD326陰性細胞も含めた数値を示す。

[図4]図4は、化合物処理後の心筋細胞率を示す。*:細胞数が少なかったため測定不実施。縦軸は実験番号を示し、横軸がActinin陽性細胞率(心筋細胞率)を示す。

[図5]図5は、化合物処理後の非心筋細胞率を示す(END:内胚葉系譜細胞、SMC:平滑筋様細胞、EC:内皮様細胞)。縦軸は実験番号を示し、横軸が非心筋細胞率を示す。

[図6]図6は、化合物処理後の心筋細胞率の平均値(標準偏差)(n=4)を示す。縦軸は実験番号を示し、横軸が心筋細胞率を示す。

[図7]図7は、化合物処理後の非心筋細胞率を示す(END:内胚葉系譜細胞、SMC:平滑筋様細胞、EC:内皮様細胞)。縦軸は実験番号を示し、横軸が非心筋細胞率を示す。

[図8]図8は、化合物処理後の心筋細胞率の平均値(標準偏差)(n=3)を示す。縦軸は実験番号を示し、横軸が心筋細胞率を示す。

[図9]図9は、化合物未処理の場合の回収細胞数を1とした場合の、化合物処理後の回収細胞数の相対比の平均値(標準偏差)(n=3)を示す。縦軸は実験番号を示し、横軸が回収細胞数の相対比を示す。

[図10]図10は、化合物処理後の心筋細胞率の平均値(標準偏差)(n=4)を示す。縦軸は実験番号を示し、横軸が心筋細胞率を示す。

[図11]図11は、化合物未処理の場合の回収細胞数を1とした場合の、化合物処理後の回収細胞数の相対比の平均値(標準偏差)(n=4)を示す。縦

軸は実験番号を示し、横軸が回収細胞数の相対比を示す。

[図12]図12は、化合物処理後の心筋細胞率の平均値（標準偏差）（ $n = 4$ ）を示す。縦軸は実験番号を示し、横軸が心筋細胞率を示す。

[図13]図13は、化合物処理後の非心筋細胞率の平均値（標準偏差）（ $n = 4$ ）を示す（END：内胚葉系譜細胞、SMC：平滑筋様細胞、EC：内皮様細胞）。縦軸は実験番号を示し、横軸が非心筋細胞率を示す。

[図14]図14は、化合物未処理の場合の回収細胞数を1とした場合の、化合物処理後の回収細胞数の相対比の平均値（標準偏差）（ $n = 4$ ）を示す。縦軸は実験番号を示し、横軸が回収細胞数の相対比を示す。

[図15]図15は、化合物処理後の心筋細胞率（実験番号1は $n = 2$ の平均値、他は $n = 1$ ）を示す。縦軸は実験番号を示し、横軸が心筋細胞率を示す。

[図16]図16は、化合物処理後の非心筋細胞率（END：内胚葉系譜細胞、SMC：平滑筋様細胞、EC：内皮様細胞）を示す。縦軸は実験番号を示し、横軸が非心筋細胞率を示す。＊：細胞数が少なかったため測定不実施。

[図17]図17は、化合物処理後の心筋細胞率（実験番号1は $n = 4$ 、実験番号2、3は $n = 3$ の平均値（標準偏差）、実験番号4、5は $n = 1$ ）を示す。縦軸は実験番号を示し、横軸が心筋細胞率を示す。

[図18]図18は、化合物処理後の非心筋細胞率（実験番号1は $n = 4$ 、実験番号2は $n = 3$ の平均値（標準偏差）、実験番号3は $n = 2$ の平均値、実験番号4、5は $n = 1$ ）を示す（END：内胚葉系譜細胞、SMC：平滑筋様細胞、EC：内皮様細胞）。縦軸は実験番号を示し、横軸が非心筋細胞率を示す。

[図19]図19は、化合物処理後の心筋細胞率の平均値（標準偏差）（ $n = 4$ 、実験番号2は $n = 3$ ）を示す。縦軸は実験番号を示し、横軸が心筋細胞率を示す。

[図20]図20は、化合物処理後の非心筋細胞率の平均値（標準偏差）（ $n = 4$ ）を示す（END：内胚葉系譜細胞、SMC：平滑筋様細胞、EC：内皮様細胞）。縦軸は実験番号を示し、横軸が非心筋細胞率を示す。

[図21]図21は、化合物未処理の場合の回収細胞数を1とした場合の、化合物処理後の回収細胞数の相対比の平均値（標準偏差）（ $n=4$ ）を示す。縦軸は実験番号を示し、横軸が回収細胞数の相対比を示す。

[0010]（発明の詳細な説明）

1. 心筋細胞を含む細胞集団の製造方法

本発明は、心筋細胞を含む細胞集団を製造する方法（以下、「本発明の製法」ともいう）を提供する。本発明の製法は、（1）心筋細胞または心筋前駆細胞とその他の細胞とを含む細胞集団に、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤を接触させる工程、および（2）該細胞集団を培養する工程、を含む。本発明の製法において、上記（1）における「受容体型チロシンキナーゼ阻害剤」からは、EGF受容体阻害剤は除かれる。

[0011] 本明細書において、「心筋細胞」とは、サルコメア α -アクチニン（Sarcomeric α -actinin）、心筋トロポニンT（cTnT）、トロポニンIタイプ1（TNNI1）の内の少なくとも1つが陽性の細胞を意味し、好ましくは、サルコメア α -アクチニン陽性細胞である。また、典型的には、自己拍動能を有する心筋の細胞である。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、Nkx2.5、GATA4、MEF2CおよびMESP1の内の少なくとも1つが陽性の細胞を意味する。上記「その他の細胞」とは、心筋細胞および心筋前駆細胞のどちらにも該当しない細胞（以下、「非心筋細胞」ともいう。）を意味し、具体的な細胞としては、例えば、平滑筋細胞、内皮細胞、幹細胞（例：多能性幹細胞）などが挙げられる。

[0012] 本明細書において、「陽性」とは、タンパク質または遺伝子が当該分野で公知の少なくともいずれかの手法による検出可能量で発現していることを意味する。タンパク質の検出は、抗体を用いた免疫学的アッセイ、例えば、ELISA、免疫染色、フローサイトメトリーを利用して行うことができる。また、細胞内に発現し、細胞表面には現れないタンパク質（例えば転写因子またはそのサブユニットなど）の場合は、当該タンパク質とともにレポータ

ータンパク質を発現させ、当該レポータータンパク質を検出することによって対象とするタンパク質を検出できる。遺伝子の検出は、例えば、R T - P C R、バイオチップ（例：マイクロアレイ）、R N A s e q等の核酸増幅方法および／または核酸検出方法を利用して行うことができる。タンパク質又は遺伝子の発現は、一般的な手法で判断することができ、例えばフローサイトメトリーを利用する場合には、タンパク質の発現が陰性の対照群での発現量と比較して、相対的に発現量が高い場合に、タンパク質が検出可能で発現していると判断できる。

[0013] 本明細書において、「陰性」とは、タンパク質または遺伝子の発現量が、上記のような公知手法の全てあるいはいずれかによる検出下限値未満であることを意味する。タンパク質または遺伝子の発現の検出下限値は、各手法により異なり得るが、一般的な手法で判断できる。

[0014] 本明細書において、「細胞集団」とは、同じ種類または異なる種類の2以上の細胞からなる集団を意味する。「細胞集団」は、同じ種類または異なる種類の細胞の一塊（mass）をも意味する。前記工程（1）で用いる心筋細胞または心筋前駆細胞と非心筋細胞とを含む細胞集団は、多能性幹細胞を心筋細胞分化用培地中で培養することにより製造することができる。従って、本発明の製法は、前記工程（1）の前に、工程（0）多能性幹細胞から心筋細胞または心筋前駆細胞を分化誘導する工程、を含んでいてもよい。

[0015] 本発明に用いる多能性幹細胞としては、例えば、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell：iPS細胞）、胚性幹細胞（embryonic stem cell：ES細胞）、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹細胞（nuclear transfer Embryonic stem cell：ntES細胞）、多能性生殖幹細胞（multipotent germline stem cell：mGS細胞）、胚性生殖幹細胞（EG細胞）、Muse細胞（multi-lineage differentiating stress enduring cell）が挙げられるが、好ましくはiPS細胞

胞（より好ましくはヒトiPS細胞）である。上記多能性幹細胞がES細胞またはヒト胚に由来する任意の細胞である場合、その細胞は胚を破壊して作製された細胞であっても、胚を破壊することなく作製された細胞であってもよいが、好ましくは、胚を破壊することなく作製された細胞である。上記多能性幹細胞は哺乳動物（例：マウス、ラット、ハムスター、モルモット、イヌ、サル、オランウータン、チンパンジー、ヒト）由来であることが好ましく、ヒト由来であることがより好ましい。従って、本発明で用いる多能性幹細胞として最も好ましくは、ヒトiPS細胞である。

[0016] 「人工多能性幹細胞（iPS細胞）」とは、哺乳動物体細胞または未分化幹細胞に、特定の因子（核初期化因子）を導入して再プログラミングすることにより得られる細胞を指す。現在、「人工多能性幹細胞（iPS細胞）」にはさまざまなものがあり、山中らにより、マウス線維芽細胞にOct3/4・Sox2・Klf4・c-Mycの4因子を導入することにより、樹立されたiPS細胞（Takahashi K, Yamanaka S., Cell, (2006) 126: 663-676）のほか、同様の4因子をヒト線維芽細胞に導入して樹立されたヒト細胞由来のiPS細胞（Takahashi K, Yamanaka S., et al. Cell, (2007) 131: 861-872.）、上記4因子導入後、Nanogの発現を指標として選別し、樹立したNanog-iPS細胞（Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Nature 448, 313-317.）、c-Mycを含まない方法で作製されたiPS細胞（Nakagawa M, Yamanaka S., et al. Nature Biotechnology, (2008) 26, 101-106）、ウイルスフリー法で6因子を導入して樹立されたiPS細胞（Okita K et al. Nat. Methods 2011 May; 8 (5): 409-12, Okita K et al. Stem Cells. 31 (3): 458-66.）も用いることができる。また、Thomsonらにより作製されたOCT3/4・SOX2・NAN

OG・LIN28の4因子を導入して樹立された人工多能性幹細胞 (Yu J., Thomson J.A. et al., Science (2007) 318:1917-1920.)、Daleyらにより作製された人工多能性幹細胞 (Park I.H., Daley G.Q. et al., Nature (2007) 451:141-146)、桜田らにより作製された人工多能性幹細胞 (特開2008-307007号) 等も用いることができる。

このほか、公開されているすべての論文 (例えば、Shi Y., Ding S., et al., Cell Stem Cell, (2008) Vol 3, Issue 5, 568-574; Kim J.B., Scholer H.R., et al., Nature, (2008) 454, 646-650; Huangfu D., Melton, D.A., et al., Nature Biotechnology, (2008) 26, No 7, 795-797)、あるいは特許 (例えば、特開2008-307007号、特開2008-283972号、US2008-2336610、US2009-047263、WO2007-069666、WO2008-118220、WO2008-124133、WO2008-151058、WO2009-006930、WO2009-006997、WO2009-007852) に記載されている当該分野で公知の人工多能性幹細胞のいずれも用いることができる。人工多能性幹細胞株としては、NIH、理研、京都大学等が樹立した各種iPS細胞株が利用可能である。例えば、ヒトiPS細胞株であれば、理研のHiPS-RIKEN-1A株、HiPS-RIKEN-2A株、HiPS-RIKEN-12A株、Nips-B2株、京都大学の253G1株、201B7株、409B2株、454E2株、606A1株、610B1株、648A1株、再生医療用iPS細胞ストック等が挙げられる。

[0017] 本明細書において、「体細胞」とは、卵子、卵母細胞、ES細胞などの生殖系列細胞または分化全能性細胞を除くあらゆる動物細胞 (好ましくは、ヒトを含む哺乳動物細胞) を意味する。体細胞としては、特に限定されないが

、胎児（仔）の体細胞、新生児（仔）の体細胞、および成熟した健全な若しくは疾患性の体細胞のいずれも包含されるし、また、初代培養細胞、継代細胞、および株化細胞のいずれも包含される。具体的には、体細胞は、例えば（１）神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞、歯髄幹細胞等の組織幹細胞（体性幹細胞）、（２）組織前駆細胞、（３）リンパ球、上皮細胞、内皮細胞、筋肉細胞、線維芽細胞（皮膚細胞等）、毛細胞、肝細胞、胃粘膜細胞、腸細胞、脾細胞、膵細胞（膵外分泌細胞等）、脳細胞、肺細胞、腎細胞および脂肪細胞等の分化した細胞などが例示される。

[0018] 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。ES細胞は、マウスで1981年に発見され（M. J. Evans and M. H. Kaufman (1981), *Nature* 292:154-156）、その後、ヒト、サルなどの霊長類でもES細胞株が樹立された（J. A. Thomson et al. (1998), *Science* 282:1145-1147; J. A. Thomson et al. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7844-7848; J. A. Thomson et al. (1996), *Biol. Reprod.*, 55:254-259; J. A. Thomson and V. S. Marshall (1998), *Curr. Top. Dev. Biol.*, 38:133-165）。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。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、USP 5,843,780; Thomson JA, et al. (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:7844-7848; Thomson JA, et al. (1998), *Science*, 282:1145-1147; Suemori H. et al. (2006), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 345:926-932;

Ueno M. et al. (2006), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:9554-9559; Suemori H. et al. (2001), Dev. Dyn., 222:273-279; Kawasaki H. et al. (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:1580-1585; Klimanskaya I. et al. (2006), Nature, 444:481-485などに記載されている。或いは、ES細胞は、胚盤胞期以前の卵割期の胚の単一割球のみを用いて樹立することもできるし (Chung Y. et al. (2008), Cell Stem Cell 2:113-117)、発生停止した胚を用いて樹立することもできる (Zhang X. et al. (2006), Stem Cells 24:2669-2676.)。「ES細胞」としては、マウスES細胞であれば、inGenious targeting laboratory社、理研（理化学研究所）等が樹立した各種マウスES細胞株が利用可能であり、ヒトES細胞であれば、ウィスコンシン大学、NIH、理研、京都大学、国立成育医療研究センターおよびCellartis社などが樹立した各種ヒトES細胞株が利用可能である。たとえば、ヒトES細胞株としては、ESI Bio社が分譲するCHB-1～CHB-12株、RUES1株、RUES2株、HUES1～HUES28株等、WiCell Researchが分譲するH1株、H9株等、理研が分譲するKhES-1株、KhES-2株、KhES-3株、KhES-4株、KhES-5株、SSES1株、SSES2株、SSES3株等を利用することができる。

[0019] nt ES細胞 (nuclear transfer 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 (Wakayama T. et al. (2001), Science, 292:740-743; S. Wakayama et al. (2005), Biol. Reprod., 72:932-936; Byrne J. et al. (2007), Natu

re, 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 (Cibelli J. B. et al. (1998), Nature Biotechnol., 16:642-646) とES細胞作製技術 (上記) との組み合わせが利用される (若山清香ら (2008), 実験医学, 26巻, 5号 (増刊), 47~52頁)。核移植においては、哺乳動物の除核した未受精卵に、体細胞の核を注入し、数時間培養することで初期化することができる。

[0020] mGS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 (Kanatsu-Shinohara M. et al. (2003) Biol. Reprod., 69:612-616; Shinohara K. et al. (2004), Cell, 119:1001-1012)。神経膠細胞系由来神経栄養因子 (glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)) を含む培養液で自己複製可能であるし、またES細胞と同様の培養条件下で継代を繰り返すことによって、生殖幹細胞を得ることができる (竹林正則ら (2008), 実験医学, 26巻, 5号 (増刊), 41~46頁, 羊土社 (東京、日本))。

[0021] EG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る。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得る (Matsui Y. et al. (1992), Cell, 70:841-847; J. L. Resnick et al. (1992), Nature, 359:550-551)。

[0022] Muse細胞は、生体に内在する非腫瘍性の多能性幹細胞であり、例えば

、WO 2011/007900に記載された方法にて製造することができる。詳細には、線維芽細胞または骨髄間質細胞を長時間トリプシン処理、好ましくは8時間または16時間トリプシン処理した後、浮遊培養することで得られる多能性を有した細胞がMuse細胞であり、SSEA-3およびCD105が陽性である。

[0023] 前記工程(0)は、多能性幹細胞を心筋細胞または心筋前駆細胞へと分化誘導できる限り特に制限されないが、例えば、多能性幹細胞を、心筋細胞分化用培地中で培養することで、心筋細胞または心筋前駆細胞へと分化誘導することができる。本発明の一態様において、前記工程(0)は、(0-1)多能性幹細胞を中胚葉系細胞へと分化誘導する工程、および(0-2)該中胚葉系細胞を心筋細胞または心筋前駆細胞へと分化誘導する工程を含み得る。本明細書において、「心筋細胞分化用培地」とは、サイトカインなどの心筋細胞への分化誘導を促進する因子(以下、「心筋細胞分化誘導因子」と称することがある。)および基礎培地を含む培地を意味する。上記心筋細胞分化誘導促進因子には、多能性幹細胞から心筋細胞または心筋前駆細胞への分化誘導過程における中間細胞(例えば、中胚葉系細胞など)への分化誘導に必要な因子も包含されるものとする。

[0024] 本発明で用いる基礎培地としては、例えば、StemFit(例: StemFit AK03N、StemFit AK02N)(味の素社)、StemPro-34(Thermo Fisher Scientific社)、PECM(Primate ES Cell Medium)、GMEM(グラスゴー最小必須培地: Glasgow Minimum Essential Medium)、IMDM(イスコフ改変ダルベッコ培地: Iscove's Modified Dulbecco's Medium)、199培地、イーグル最小必須培地(Eagle's Minimum Essential Medium)(EMEM)、 α MEM、ダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle's Medium)(DMEM)、Ham's F12培地、RPMI

1640培地、フィッシャー培地 (Fischer's medium)、およびこれらの混合培地などが包含される。

[0025] 基礎培地には、ROCK阻害剤 (例: Y-27632、Fasudil/HA1077、SR3677、GSK269962、H-1152、Wf-536等)、血清 (例: ウシ胎仔血清 (FBS)、ヒト血清、ウマ血清等) 若しくは血清代替物、インスリン、各種ビタミン (例: ビタミンC類 (例: アスコルビン酸))、L-グルタミン、非必須アミノ酸等の各種アミノ酸、2-メルカプトエタノール、チオグリセロール (例: α -モノチオグリセロール (MTG))、各種サイトカイン、幹細胞因子 (SCF (Stem cell factor))、アクチビンなど)、各種ホルモン、各種増殖因子 (白血病抑制因子 (LIF)、塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF)、TGF- β 等)、各種細胞外マトリックス、各種細胞接着分子、ペニシリン/ストレプトマイシン、ピューロマイシン等の抗生物質、フェノールレッド等のpH指示薬などを適宜添加することができる。血清代替物として、アルブミン、トランスフェリン、脂肪酸、インスリン、コラーゲン前駆体、微量元素、Knockout Serum Replacement (KSR)、ITS-サプリメントおよびこれらの混合物などが包含される。

[0026] 本発明においてビタミンC類とは、L-アスコルビン酸およびその誘導体を意味し、L-アスコルビン酸誘導体とは、生体内で酵素反応によりビタミンCとなるものを意味する。本発明に用いるアスコルビン酸の誘導体として、リン酸ビタミンC (例: アスコルビン酸-2リン酸)、アスコルビン酸グルコシド、アスコルビルエチル、ビタミンCエステル、テトラヘキシルデカン酸アスコビル、ステアリン酸アスコビルおよびアスコルビン酸-2リン酸-6パルミチン酸が例示される。好ましくは、リン酸ビタミンC (例: Ascorbic acid 2-phosphate) であり、例えば、リン酸-L-アスコルビン酸Naまたはリン酸-L-アスコルビン酸Mgなどのリン酸-L-アスコルビン酸塩が挙げられる。

[0027] 人工多能性幹細胞または胚様体の培養は、接着培養または浮遊培養であっ

てもよい。接着培養の場合、細胞外基質成分でコーティングした培養容器を用いて行ってもよく、またフィーダー細胞と共培養してもよい。フィーダー細胞としては、特に限定されないが、例えば、線維芽細胞（マウス胎仔線維芽細胞（MEF）、マウス線維芽細胞（STO）など）が挙げられる。フィーダー細胞は自体公知の方法、例えば放射線（ガンマ線など）照射や抗がん剤（マイトマイシンCなど）処理などで不活化されていることが好ましい。細胞外基質成分としては、マトリゲル（Niwa A, et al. PLoS One. 6 (7) : e22261, 2011）、ゼラチン、コラーゲン、エラスチンなどの繊維性タンパク質、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸などのグルコサミノグリカンやプロテオグリカン、フィブロネクチン、ビトロネクチン、ラミニンなどの細胞接着性タンパク質などが挙げられる。

[0028] 培養温度の条件は、特に制限されないが、例えば、37℃～42℃程度、37℃～39℃程度が好ましい。また、低酸素条件で培養してもよく、本発明において低酸素条件とは、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%またはそれら以下の酸素濃度が例示される。

[0029] 浮遊培養とは、細胞を培養容器へ非接着の状態で培養することであり、特に限定はされないが、細胞との接着性を向上させる目的で人工的に処理（例えば、細胞外マトリックス等によるコーティング処理）されていない培養容器、若しくは、人工的に接着を抑制する処理（例えば、ポリヒドロキシエチルメタクリル酸（poly-HEMA）または非イオン性の界面活性ポリオール（Pluronic F-127等）によるコーティング処理）した培養容器を使用して行うことができる。また、例えば、シングルユースバイオリアクター（株式会社バイオット）、シングルユースバイオリアクター（サーモフィッシャー）、シングルユースバイオリアクター（ザルトリウス・ステディウム）、シングルユースバイオリアクター（GEヘルスケアライフサイエンス）などの攪拌翼を備える培養器を用いて、浮遊培養を行ってもよい。用いる培養器の種類および攪拌速度は、培養される細胞の種類に応じて、当業者であれば適宜選択することができる。攪拌速度の例として、例えば、

0～100rpm、20～80rpm、または45～65rpmが挙げられるが、これらに限定されない。

[0030] また、浮遊培養の際には、胚様体（EB）を形成させて培養することが好ましい。従って、前記工程（0）には、多能性幹細胞から胚様体を形成させる工程を含んでいてもよい。かかる工程においては、コロニーを形成した多能性幹細胞を解離して単細胞にしたのちに胚様体を形成させることが好ましい。多能性幹細胞を解離させる工程においては、互いに接着して集団を形成している細胞を個々の細胞に解離（分離）させる。多能性幹細胞を解離させる方法としては、例えば、力学的に解離する方法、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する解離溶液（例えば、AccutaseTMおよびAccumaxTMなど）またはコラゲナーゼ活性のみを有する解離溶液を用いた解離方法が挙げられる。好ましくは、プロテアーゼ活性とコラゲナーゼ活性を有する解離溶液（特に好ましくは、AccumaxTM）を用いて多能性幹細胞を解離する方法が用いられる。上記工程で用いる培地は、チオグリセロール、L-グルタミンおよび／またはアスコルビン酸を含むことが好ましい。

[0031] 上記工程（0-1）で用いる心筋細胞分化誘導因子としては、Wntシグナル活性化物質、アクチビンA、BMP4、bFGFが挙げられ、これらは単独で用いてもよく、複数を組み合わせて用いてもよい。本発明の一態様において、アクチビンA、BMP4およびbFGFの組み合わせが用いられる。また、上記工程（0-1）で用いる培地は、チオグリセロール、L-グルタミンおよび／またはアスコルビン酸を含むことが好ましい。

[0032] 本明細書において、「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、Wntタンパク質、GSK3β阻害剤（例：BIO、CHIR99021等）などが例挙げられる。これらは単独で用いてもよく、複数を組み合わせて用いてもよい。Wntシグナル活性化剤を用いる場合に、培地中でのそ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、培地中での最終濃度100nM～100

μM 、好ましくは $1\ \mu\text{M}$ ～ $10\ \mu\text{M}$ で使用することが好ましい。

[0033] アクチビンAを用いる場合に、培地中でのその濃度としては、 $1\ \text{ng/ml}$ ～ $100\ \text{ng/ml}$ が好ましく、 $1\ \text{ng/ml}$ 、 $2\ \text{ng/ml}$ 、 $3\ \text{ng/ml}$ 、 $4\ \text{ng/ml}$ 、 $5\ \text{ng/ml}$ 、 $6\ \text{ng/ml}$ 、 $7\ \text{ng/ml}$ 、 $8\ \text{ng/ml}$ 、 $9\ \text{ng/ml}$ 、 $10\ \text{ng/ml}$ 、 $11\ \text{ng/ml}$ 、 $12\ \text{ng/ml}$ 、 $13\ \text{ng/ml}$ 、 $14\ \text{ng/ml}$ 、 $15\ \text{ng/ml}$ 、 $16\ \text{ng/ml}$ 、 $17\ \text{ng/ml}$ 、 $18\ \text{ng/ml}$ 、 $19\ \text{ng/ml}$ 、 $20\ \text{ng/ml}$ 、 $30\ \text{ng/ml}$ 、 $40\ \text{ng/ml}$ 、 $50\ \text{ng/ml}$ 、 $60\ \text{ng/ml}$ 、 $70\ \text{ng/ml}$ 、 $80\ \text{ng/ml}$ 、 $90\ \text{ng/ml}$ および $100\ \text{ng/ml}$ が例示される。

[0034] BMP4を用いる場合に、培地中でのその濃度としては、 $1\ \text{ng/ml}$ ～ $1\ \mu\text{g/ml}$ が好ましく、 $1\ \text{ng/ml}$ 、 $2\ \text{ng/ml}$ 、 $3\ \text{ng/ml}$ 、 $4\ \text{ng/ml}$ 、 $5\ \text{ng/ml}$ 、 $6\ \text{ng/ml}$ 、 $7\ \text{ng/ml}$ 、 $8\ \text{ng/ml}$ 、 $9\ \text{ng/ml}$ 、 $10\ \text{ng/ml}$ 、 $11\ \text{ng/ml}$ 、 $12\ \text{ng/ml}$ 、 $13\ \text{ng/ml}$ 、 $14\ \text{ng/ml}$ 、 $15\ \text{ng/ml}$ 、 $16\ \text{ng/ml}$ 、 $17\ \text{ng/ml}$ 、 $18\ \text{ng/ml}$ 、 $19\ \text{ng/ml}$ 、 $20\ \text{ng/ml}$ 、 $30\ \text{ng/ml}$ 、 $40\ \text{ng/ml}$ 、 $50\ \text{ng/ml}$ 、 $60\ \text{ng/ml}$ 、 $70\ \text{ng/ml}$ 、 $80\ \text{ng/ml}$ 、 $90\ \text{ng/ml}$ 、 $100\ \text{ng/ml}$ 、 $200\ \text{ng/ml}$ 、 $300\ \text{ng/ml}$ 、 $400\ \text{ng/ml}$ 、 $500\ \text{ng/ml}$ 、 $600\ \text{ng/ml}$ 、 $700\ \text{ng/ml}$ 、 $800\ \text{ng/ml}$ 、 $900\ \text{ng/ml}$ および $1\ \mu\text{g/ml}$ が例示される。

[0035] bFGFを用いる場合に、培地中でのその濃度としては、 $1\ \text{ng/ml}$ ～ $100\ \text{ng/ml}$ が好ましく、 $1\ \text{ng/ml}$ 、 $2\ \text{ng/ml}$ 、 $3\ \text{ng/ml}$ 、 $4\ \text{ng/ml}$ 、 $5\ \text{ng/ml}$ 、 $6\ \text{ng/ml}$ 、 $7\ \text{ng/ml}$ 、 $8\ \text{ng/ml}$ 、 $9\ \text{ng/ml}$ 、 $10\ \text{ng/ml}$ 、 $11\ \text{ng/ml}$ 、 $12\ \text{ng/ml}$ 、 $13\ \text{ng/ml}$ 、 $14\ \text{ng/ml}$ 、 $15\ \text{ng/ml}$ 、 $16\ \text{ng/ml}$ 、 $17\ \text{ng/ml}$ 、 $18\ \text{ng/ml}$ 、 $19\ \text{ng/ml}$ 、 $20\ \text{ng/ml}$ 、 $30\ \text{ng/ml}$ 、 $40\ \text{ng/ml}$ 、 $50\ \text{ng/ml}$ 、 $60\ \text{ng/ml}$ 、 $70\ \text{ng/ml}$

、80 ng/ml、90 ng/mlおよび100 ng/mlが例示される。

[0036] 上記工程（0-1）の期間としては、中胚葉系細胞が得られる限り特に限定されないが、12時間以上（例：1日間、2日間またはそれ以上）が好ましく、6日間以下（例：5日間、4日間、3日間またはそれ以下）が挙げられる。また、中胚葉系細胞が得られたか否かをモニタリングしてもよく、この場合には、中胚葉マーカー遺伝子の発現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、例えば、T、MIXL1、NODALなどが挙げられる。

[0037] 上記工程（0-2）で用いる心筋細胞分化誘導因子としては、例えば、Wnt阻害剤、VEGFが挙げられ、これらは単独で用いてもよく、複数を組み合わせて用いてもよい。また、上記工程（0-2）で用いる培地は、チオグリセロール、L-グルタミンおよび／またはアスコルビン酸を含むことが好ましい。

[0038] 本明細書において、「Wnt阻害剤」とは、Wntの受容体への結合からβカテニンの蓄積へと続くシグナル伝達を阻害する物質を意味し、受容体であるFrizzledファミリーへの結合を阻害する物質であっても、βカテニンの分解を促進する物質であってもよい。Wnt阻害剤としては、例えば、DKK1タンパク質（例えば、ヒトの場合、NCBIのアクセッション番号：NM_012242）、スクレロスチン（例えば、ヒトの場合、NCBIのアクセッション番号：NM_025237）、IWR-1（Merck Millipore）、IWP-2（Sigma-Aldrich）、IWP-3（Sigma-Aldrich）、IWP-4（Sigma-Aldrich）、PNU-74654（Sigma-Aldrich）、XAV939（Sigma-Aldrich）およびこれらの誘導体などが挙げられる。中でも、IWP-3またはIWP-4が好ましい。Wnt阻害剤は、1種類のみを用いてもよく、複数種類を組み合わせて用いてもよい。

[0039] Wnt阻害剤を用いる場合に、培地中でのその濃度としては、1 nM～50 μMが好ましく、例えば、1 nM、10 nM、50 nM、100 nM、5

00 nM、750 nM、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M、9 μ M、10 μ M、15 μ M、20 μ M、25 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ Mであるがこれらに限定されない。より好ましくは、1 μ Mである。

[0040] VEGFを用いる場合に、培地中でのその濃度としては、1~100 ng/mlが好ましく、1 ng/ml、2 ng/ml、3 ng/ml、4 ng/ml、5 ng/ml、6 ng/ml、7 ng/ml、8 ng/ml、9 ng/ml、10 ng/ml、11 ng/ml、12 ng/ml、13 ng/ml、14 ng/ml、15 ng/ml、16 ng/ml、17 ng/ml、18 ng/ml、19 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/mlおよび100 ng/mlが例示される。

[0041] 上記工程(0-2)では、さらに、心筋細胞分化誘導因子として、BMP阻害剤および/またはTGF β 阻害剤を基本培地に添加しても良い。本明細書において、「BMP阻害剤」としては、Chordin、Noggin、Follistatinなどのタンパク質性阻害剤、Dorsomorphin(6-[4-(2-piperidin-1-yl-ethoxy)phenyl]-3-pyridin-4-yl-pyrazolo[1,5-a]pyrimidine)およびその誘導体(P. B. Yu et al. (2007), Circulation, 116:11_60; P. B. Yu et al. (2008), Nat. Chem. Biol., 4:33-41; J. Hao et al. (2008), PLoS ONE, 3(8):e2904)、LDN-193189(4-(6-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl)quinoline)などが挙げられる。中でも、Dorsomorphinが好ましい。BMP阻害剤およびTGF β 阻害剤は、1種類のみを用いてもよく、複数種類を組み合わせ用いてもよい。

[0042] BMP阻害剤を用いる場合に、培地中でのその濃度としては、1 nM～50 μ Mが好ましく、例えば、1 nM、10 nM、50 nM、100 nM、500 nM、600 nM、700 nM、800 nM、900 nM、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M、9 μ M、10 μ M、15 μ M、20 μ M、25 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ Mであるがこれらに限定されない。

[0043] 本明細書において、TGF β 阻害剤とは、TGF β の受容体への結合からSMADへと続くシグナル伝達を阻害する物質を意味し、受容体であるALKファミリーへの結合を阻害する物質であっても、ALKファミリーによるSMADのリン酸化を阻害する物質であってもよい。TGF β 阻害剤としては、例えば、Lefty-1 (NCBI Accession No. として、マウス: NM_010094、ヒト: NM_020997が例示される)、SB431542、SB202190 (以上、R. K. Lindemann et al., Mol. Cancer, 2003, 2:20)、SB505124 (GlaxoSmithKline)、NPC30345、SD093、SD908、SD208 (Scios)、LY2109761、LY364947、LY580276 (Lilly Research Laboratories)、A-83-01 (WO 2009146408) およびこれらの誘導体などが挙げられる。中でも、SB431542が好ましい。

[0044] TGF β 阻害剤を用いる場合に、培地中でのその濃度としては、1 nM～50 μ Mが好ましく、例えば、1 nM、10 nM、50 nM、100 nM、500 nM、750 nM、1 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、5.2 μ M、5.4 μ M、5.6 μ M、5.8 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M、9 μ M、10 μ M、15 μ M、20 μ M、25 μ M、30 μ M、40 μ M、50 μ Mであるがこれらに限定されない。

[0045] 上記工程(0-2)の期間としては、心筋細胞または心筋前駆細胞が得られる限り特に限定されないが、1日間以上(例: 1日間、2日間、3日間、

4日間、5日間、6日間、7日間またはそれ以上）が挙げられる。また、長期間培養することにより心筋細胞または心筋前駆細胞の樹立に影響がでないことから、上限は特に設けられないが、典型的には、40日間以下である。また、心筋細胞または心筋前駆細胞が得られたか否かをモニタリングしてもよく、この場合には、拍動心筋細胞の数、心筋細胞または心筋前駆細胞のマーカーの発現、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。

[0046] また、前記工程（0）は、さらに、工程（0-3）VEGFおよび／またはbFGFの存在下、または非存在下で、工程（0-2）で得られた心筋細胞または心筋前駆細胞を培養する工程を含んでもよい。本工程で用いる培地は、チオグリセロール、L-グルタミンおよび／またはアスコルビン酸を含むことが好ましい。また、本工程で用いる培地は、心筋成熟化化合物（例：N-（1，1-ジオキソ-2，3-ジヒドロ-1H-1-ベンゾチオフェン-5-イル）-2-（4-（5-[1-オキソ-5-（ピペリジン-1-イル）-1，3-ジヒドロ-2H-イソインドール-2-イル]-1H-ベンゾイミダゾール-2-イル）フェノキシ）アセトアミド）および／またはマルチキナーゼ阻害剤（例：2-（4-（3-[3-（2-アミノ-2-フェニルエトキシ）-4-シアノフェニル]ピラゾロ[1，5-a]ピリミジン-6-イル]-1H-ピラゾール-1-イル）-N-（2-メトキシエチル）アセトアミド）を含んでもよい。

[0047] 工程（0-3）でVEGFを用いる場合、培地中でのその濃度としては、1~100ng/mlが好ましく、1ng/ml、2ng/ml、3ng/ml、4ng/ml、5ng/ml、6ng/ml、7ng/ml、8ng/ml、9ng/ml、10ng/ml、11ng/ml、12ng/ml、13ng/ml、14ng/ml、15ng/ml、16ng/ml、17ng/ml、18ng/ml、19ng/ml、20ng/ml、30ng/ml、40ng/ml、50ng/ml、60ng/ml、70ng/ml、80ng/ml、90ng/mlおよび100ng/mlが例示され

る。

[0048] 工程(0-3)でbFGFを用いる場合、培地中でのその濃度としては、
1~100 ng/mlが好ましく、1 ng/ml、2 ng/ml、3 ng/ml、4 ng/ml、5 ng/ml、6 ng/ml、7 ng/ml、8 ng/ml、9 ng/ml、10 ng/ml、11 ng/ml、12 ng/ml、13 ng/ml、14 ng/ml、15 ng/ml、16 ng/ml、17 ng/ml、18 ng/ml、19 ng/ml、20 ng/ml、30 ng/ml、40 ng/ml、50 ng/ml、60 ng/ml、70 ng/ml、80 ng/ml、90 ng/mlおよび100 ng/mlが例示される。より好ましくは、5 ng/mlである。

[0049] 上記工程(0-3)の期間としては、特に制限されないが、1日間以上(例: 1日間、2日間、3日間、4日間、5日間、6日間、7日間、8日間、9日間、10日間、11日間、12日間、13日間、14日間、15日間、16日間、17日間、18日間、19日間、20日間、21日間、22日間、23日間、24日間、25日間、26日間、27日間、28日間、またはそれ以上)が挙げられる。また、長期間培養することにより心筋細胞または心筋前駆細胞の樹立に影響がでないことから、上限は特に設けられないが、典型的には60日以下である。上記工程(0-3)を行うことで、心筋細胞または心筋前駆細胞への分化効率が向上し得る。

[0050] また、上記工程(0-2)または工程(0-3)を行う前に、上述と同様の方法により、胚様体を解離させてもよい。

[0051] 上記で具体的に説明した方法はあくまで例示であり、上記方法に限定されるものではない。例えば、マウス由来の支持細胞であるEND2細胞と多能性幹細胞を共培養する方法(Mummery, C., et al., Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. Circulation. 107 (21), 273

3-40 (2003))、胚様体を、BMP4、FGF2、インスリンと血清とを用いて培養することで、心筋細胞を誘導する方法 (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).) などが挙げられる。また、接着培養でサイトカインを使わずに心筋細胞を分化誘導する方法 (Lian X, et al., Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling., Proc Natl Acad Sci USA., 2012 July 3; 109 (27): E1848-57)、接着培養と、浮遊培養とを併用し、サイトカインを使わずに心筋細胞を分化誘導する方法 (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) などを用いてもよい。

[0052] 上記のようにして得られた心筋細胞または心筋前駆細胞を含む細胞集団に、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤を接触させ、次いで該細胞集団を培養することで、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤を接触させる前の細胞集団と比較して、心筋細胞の純度が高い細胞集団を製造することができる。即ち、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤を用いて、心筋細胞を精製することができる。従って、本発明の別の態様において、(1') 多能性幹細胞を心筋細胞分

化用培地中で培養して得られた、心筋細胞または心筋前駆細胞と非心筋細胞とを含む細胞集団に、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤を接触させる工程、および（２'）該細胞集団を培養する工程を含む、心筋細胞を精製する方法（以下、「本発明の精製方法」ともいう。）が提供される。

[0053] 本明細書において、心筋細胞を精製するとは、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤により、非心筋細胞の細胞数（「細胞数」は、生細胞数を意味する。以下同様。）の減少割合が心筋細胞の減少割合を上回ること、あるいは非心筋細胞の増殖が阻害されることで心筋細胞の増殖割合が上回ること、細胞集団中の心筋細胞の割合（細胞集団中の心筋細胞数／細胞集団中の全細胞数）が増加することを意味する。従って、心筋前駆細胞から心筋細胞への分化誘導促進または心筋前駆細胞から心筋細胞以外の細胞への分化誘導阻害による、心筋細胞の割合の増加とは区別される。いかなる理論にも拘束されることを望むものではないが、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤による細胞数の減少は、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤により細胞のアポトーシスが誘導された結果であると推測される。

[0054] 前記工程（１）および（１'）において、心筋細胞または心筋前駆細胞を含む細胞集団と、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤とを接触させる期間は特に限定されないが、例えば、１時間以上（例：２時間、３時間、５時間、１２時間、１日間、２日間、３日間またはそれ以上）であることが好ましい。また、長期間培養することにより心筋細胞または心筋前駆細胞の樹立に影響がでないことから、上限は特に設けられないが、典型的には、６０日間以下（例：５０日間、４０日間、３０日間、２０日間、１４日間、１３日間、１２日間、１１日間またはそれ以下）であることが好ましい。心筋細胞または心筋前駆細胞を含む細胞集団と、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤との接触は、該細胞集団を含む培地中に受容体型チロシンキナーゼ阻害剤を添加することにより行ってもよく、また、あらかじめ受容体型チロシンキナーゼ阻害剤を添加した培地に、該細胞集団を播種することにより行ってもよい。受容体型チロシンキナーゼ阻害剤を接触させるタイミングも、細胞集団に心筋細

胞または心筋前駆細胞が含まれタイミングであれば特に限定されないが、例えば、上記工程（0-2）または（0-3）で接触させることが好ましく、多能性幹細胞の分化誘導開始日を基準にすれば、分化誘導開始から4日目以降（例：5日目、6日目、7日目またはそれ以降）に行うことが好ましい。

[0055] 本発明に用いる受容体型チロシンキナーゼ阻害剤により阻害される受容体型チロシンキナーゼとしては、EGF受容体（ErbBまたはHERともいう）（例：ErbB1（EGFR）、ErbB2（HER2）、ErbB3（HER3）、ErbB4（HER4））、インスリン受容体（例：IR-A、IR-B）、インスリン様成長因子1受容体、VEGF受容体（例：VEGFR-1（Flt-1）、VEGFR-2（KDR/Flk-1）、VEGFR-3（Flt-4））、PDGF受容体（例：PDGFR α 、PDGFR β ）、HGF受容体（c-Metともいう）、FGF受容体（例：FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4）、CCK、NGF受容体（Trk受容体ともいう）（例：TrkA、TrkB、TrkC）、Eph（Ephrin）受容体（例：EPHA1、EPHA2、EPHA3、EPHA4、EPHA5、EPHA6、EPHA7、EPHA8、EPHA9、EPHA10、EPHB1、EPHB2、EPHB3、EPHB4、EPHB5、EPHB6）、AXL（TAM受容体ともいう）、TIE（例：TIE-1、TIE-2）、RYK、DDR（例：DDR1）、RET、ROS、LTK、ROR（例：ROR1、ROR2）、MuSK、LMRが挙げられる。中でも、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤の標的として、VEGF受容体、PDGF受容体、HGF受容体およびFGF受容体が好ましい。また、前記工程（1）で用いる受容体型チロシンキナーゼ阻害剤からは、EGF受容体阻害剤は除かれるが、前記工程（1'）で用いる受容体型チロシンキナーゼ阻害剤として、EGF受容体阻害剤を用いることができる。

[0056] 本明細書において、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤は、少なくとも上記のいずれかの受容体型チロシンキナーゼに対する阻害活性を有していれば、他の活性、例えば、他の受容体型チロシンキナーゼに対する阻害活性など、

を有していてもよく、また1種類の受容体型チロシンキナーゼに特異的な阻害活性を有していてもよい。また、EGF受容体阻害剤を除く受容体型チロシンキナーゼ阻害剤は、EGF受容体以外の受容体型チロシンキナーゼに対する阻害活性を有し、かつEGF受容体に対する阻害活性を有しているものを排除するものではなく、本明細書において、「EGF受容体阻害剤」とは、EGF受容体阻害活性が他の活性と比べて優位な物質であり、具体的には、EGF受容体を少なくとも90%以上阻害する物質またはEGF受容体の50%阻害濃度が10 μ M以下である物質を指す。

[0057] 本発明に用いるEGF受容体に対する阻害剤としては、例えば、Cetuximab、Erlotinib HCl (OSI-744)、Gefitinib (ZD1839)、Lapatinib (GW-572016) Ditosylate、Afatinib (BIBW2992)、Canertinib (CI-1033)、TAS6417、PD153035、MTX-211、HS-10296、Theliatinib (HMPL-309)、Lapatinib、AG-490 (Tyrphostin B42)、CP-724714、Dacomitinib (PF-00299804)、WZ4002、Sapitinib (AZD8931)、CUDC-101、AG-1478 (Tyrphostin AG-1478)、PD153035 HCl、Pelitinib (EKB-569)、AC480 (BMS-599626)、AEE788 (NVP-AEE788)、AP26113-analog (ALK-IN-1)、OSI-420、WZ3146、HER2-Inhibitor-1、WZ8040、AST-1306、Rociletinib (CO-1686)、Genistein、Varlitinib、Icotinib、TAK-285、WHI-P154、Daphnetin、PD168393、Tyrphostin 9、CNX-2006、AG-18、AZ5104、Lazertinib、AZD9291、CL-387785 (EKL-785)、Olmotinib (BI 1482694)、(-)-Epigallocatech

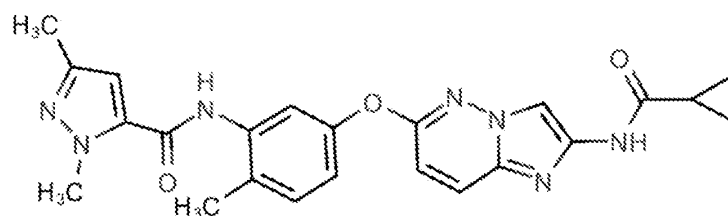
in Gallate, Erlotinib, Gefitinib hydrochloride, Afatinib (BIBW2992) Dimaleate, AZD3759, Pozotinib (HM781-36B)、Brigatinib (AP26113)、Osimertinib mesylate, Naquotinib (ASP8273)、Chrysophanic Acid、Nazartinib (EGF816)、Norcantharidin、Lifirafenib (BGB-283)、Lidocaine hydrochloride、Butein、EA1045、Cyasterone、Avitinib (AC0010) などが挙げられる。

[0058] インスリン受容体またはインスリン様成長因子1受容体に対する阻害剤としては、例えば、HNMPA、GSK1904529A、Dovitinib (TKI-258) Dilactic Acid、Dovitinib (TKI258) Lactate、NVP-AEW541、Dovitinib (TKI-258)、NVP-ADW742、Linsitinib (OSI-906)、GSK1904529A、BMS-754807、TAE226 (NVP-TAE226)、Ceritinib (LDK378) などが挙げられる。

[0059] PDGFR α に対する阻害剤としては、N-[5-({2-[(シクロプロパンカルボニル) アミノ] イミダゾ [1, 2-b] ピリダジーン-6-イル } オキシ) -2-メチルフェニル] -1, 3-ジメチル-1H-ピラゾール-5-カルボキサミド (式 (I) の化合物)

[0060]

[化1]



(I)

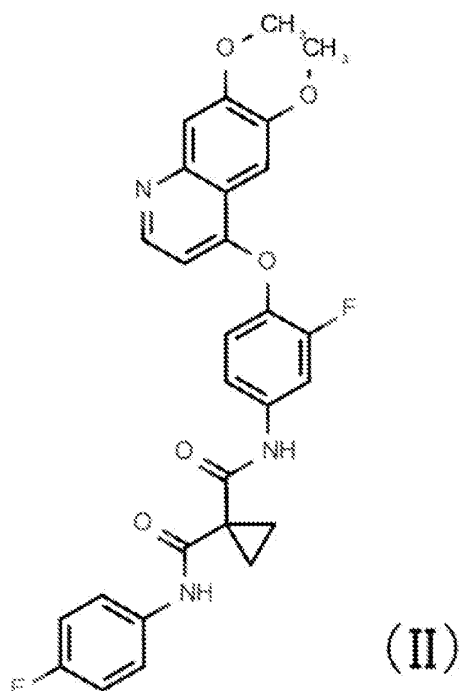
[0061]、Ponatinib (AP24534)、Telatinib、Amuvatinib (MP-470)、Ki8751、KRN 633、Crenolanib (CP-868596)、Axitinib、CP-673451、Tivozanib (AV-951)、Nintedanib (BIBF 1120)、Dovitinib (TKI-258, CHIR-258)、Dovitinib (TKI-258) Lactate、Dovitinib (TKI-258) Dilactic Acid、Masitinib (AB1010) などが挙げられる。PDGFR β に対する阻害剤としては、N-[5-(2-((シクロプロパンカルボニル)アミノ)イミダゾ[1,2-b]ピリダジーン-6-イル)オキシ)-2-メチルフェニル]-1,3-ジメチル-1H-ピラゾール-5-カルボキサミド、CP-673451、Sunitinib Malate、Sunitinib、TSU-68 (SU6668, Orantinib)、MK-2461、Sorafenib Tosylate、Linifanib (ABT-869)、Axitinib、Crenolanib (CP-868596)、Dovitinib (TKI-258) Dilactic Acid、Dovitinib (TKI-258, CHIR-258)、Dovitinib (TKI-258) Lactate、Tivozanib (AV-951)、Nintedanib (BIBF 1120)、Masitinib (AB10

10)、KRN 633などが挙げられる。

[0062] VEGFR-1に対する阻害剤としては、N-[5-({2-[(シクロプロパンカルボニル) アミノ] イミダゾ [1, 2-b] ピリダジンを6-イル} オキシ) -2-メチルフェニル] -1, 3-ジメチル-1H-ピラゾール-5-カルボキサミド、ZM 306416、Axitinib、Motesanib Diphosphate (AMG-706)、Linifanib (ABT-869)、MGCD-265、Cediranib (AZD2171)、Foretinib (GSK1363089)、OSI-930、Dovitinib (TKI-258, CHIR-258)、Pazopanib HCl (GW786034 HCl)、Pazopanib、Dovitinib (TKI-258) Dilactic Acid、Dovitinib (TKI258) Lactate、Cabozantinib (XL184, BMS-907351)、Cabozantinib malate (XL184)、Regorafenib (BAY 73-4506)、Lenvatinib (E7080)、Tivozanib (AV-951)、Nintedanib (BIBF 1120)、AEE788 (NVP-AEE788)、Vatalanib (PTK787) 2HCl、KRN 633、Brivanib (BMS-540215)、Brivanib Alaninate (BMS-582664) などが挙げられる。VEGFR-2に対する阻害剤としては、N-[5-({2-[(シクロプロパンカルボニル) アミノ] イミダゾ [1, 2-b] ピリダジンを6-イル} オキシ) -2-メチルフェニル] -1, 3-ジメチル-1H-ピラゾール-5-カルボキサミド、N-{4-[(6, 7-ジメトキシキノリン-4-イル) オキシ] -3-フルオロフェニル} -N'-(4-フルオロフェニル) シクロプロパン-1, 1-ジカルボキサミド (式 (11) の化合物)

[0063]

[化2]



[0064]、Cabozantinib (XL184, BMS-907351)、Cabozantinib malate (XL184)、Ki8751、Apatinib、Ponatinib (AP24534)、ZM323881、LY2874455、Sorafenib Tosylate、BMS-794833、Golvatinib (E7050)、RAF265 (CHIR-265)、SKLB1002、Vandetanib (ZD6474)、CYC116、Sunitinib Malate、Sunitinib、PD173074、Semaxanib (SU5416)、TSU-68 (SU6668, Orantinib)、Axitinib、Cediranib (AZD2171)、Foretinib (GSK1363089)、MGCD-265、Motesanib Diphosphate (AMG-706)、Linifanib (ABT-869)、Lenvatinib (E7080)、Regorafenib (BAY 73-4506

)、Telatinib、Tivozanib (AV-951)、OSI-930、Dovitinib (TKI-258) Dilactic Acid、Nintedanib (BIBF 1120)、Dovitinib (TKI258) Lactate、Dovitinib (TKI-258, CHIR-258)、Brivanib Alaninate (BMS-582664)、Brivanib (BMS-540215)、Pazopanib、Pazopanib HCl (GW786034 HCl)、Vatalanib (PTK787) 2HCl、ENMD-2076 L-(+)-Tartaric acid、ENMD-2076 L-(+)-Tartaric acid、AEE788 (NVP-AEE788)、KRN 633などが挙げられる。VEGFR-3に対する阻害剤としては、N-[5-({2-[(シクロプロパンカルボニル) アミノ] イミダゾ [1, 2-b] ピリダジン-6-イル} オキシ) -2-メチルフェニル] -1, 3-ジメチル-1H-ピラゾール-5-カルボキサミド、SAR131675、Axitinib、Foretinib (GSK1363089)、Cediranib (AZD2171)、Telatinib、MGCD-265、Lenvatinib (E7080)、Cabozantinib (XL184, BMS-907351)、Cabozantinib malate (XL184)、Motesanib Diphosphate (AMG-706)、Dovitinib (TKI-258, CHIR-258)、Dovitinib (TKI-258) Dilactic Acid、Dovitinib (TKI258) Lactate、Nintedanib (BIBF 1120)、Tivozanib (AV-951)、ENMD-2076 L-(+)-Tartaric acid、ENMD-2076、Regorafenib (BAY 73-4506)、Pazopanib HCl (GW786034 HCl)、Pazopanib、KRN 633、Linifanib (ABT-869)、AEE788 (NVP-AEE788)、Vatalanib (PTK787) 2HClなどが挙げ

られる。

[0065] HGF受容体に対する阻害剤としては、例えば、N- {4- [(6, 7-ジメトキシキノリン-4-イル) オキシ] -3-フルオロフェニル} -N'-(4-フルオロフェニル) シクロプロパン-1, 1-ジカルボキサミド、Crizotinib (PF-02341066)、Cabozantinib (BMS-907351)、Foretinib (GSK1363089)、PHA-665752、SU11274、JNJ-38877618 (OMO-1)、Glumetinib (SCC244)、Altiratinib、SAR125844、SGX-523、BMS-777607、Tivantinib (ARQ 197)、JNJ-38877605、PF-04217903、MGCD-265 analog、Capmatinib (INCB28060)、BMS-754807、BMS-794833、AMG-208、MK-2461、Golivantinib (E7050)、AMG-458、NVP-BVU972、AMG 337、Meresstinib (LY2801653)、S49076、Pulsatilla saponin D、Norcantharidin、NPS-1034、Savolitinib (AZD6094) などが挙げられる。

[0066] FGFR1に対する阻害剤としては、例えば、ASP5878、Ponatinib (AP24534)、PD173074、Danusertib (PHA-739358)、Brivanib Alaninate (BMS-582664)、Brivanib (BMS-540215)、TSU-68 (SU6668, Orantinib)、SSR128129E、AZD4547、BGJ398 (NVP-BGJ398)、LY2874455、Dovitinib (TKI-258, CHIR-258)、Dovitinib (TKI258) Lactate、Dovitinib (TKI-258) Dilactic Acid、CH5183284 (Debio-1347)、MK-2461、Nintedanib (BIBF 1120) などが挙げられる。FGFR2に対する阻害剤としては、例えば、A

SP5878、BGJ398 (NVP-BGJ398)、AZD4547、LY2874455、CH5183284 (Debio-1347)、Nintedanib (BIBF 1120)、MK-2461などが挙げられる。FGFR3に対する阻害剤としては、例えば、ASP5878、BGJ398 (NVP-BGJ398)、AZD4547、LY2874455、Dovitinib (TKI-258) Dilactic Acid、Dovitinib (TKI258) Lactate、Dovitinib (TKI-258, CHIR-258)、CH5183284 (Debio-1347)、MK-2461、Nintedanib (BIBF 1120)などが挙げられる。FGFR4に対する阻害剤としては、例えば、ASP5878、LY2874455、AZD4547、CH5183284 (Debio-1347)、Nintedanib (BIBF 1120)などが挙げられる。

[0067] NGF受容体に対する阻害剤としては、例えば、BMS-754807、GW441756、DS-6051b、GNF-5837、CH7057288、Altiratinib、Selitrectinib (LOXO-195)、BMS-935177、Entrectinib (RXDX-101)、Sitravatinib (MGCD516)、PF-06273340、Belizatinib (TSR-011)、Larotrectinib (LOXO-101) sulfateなどが挙げられる。

[0068] Eph受容体に対する阻害剤としては、例えば、NVP-BHG712、Sitravatinib (MGCD516)などが挙げられる。

[0069] AXLに対する阻害剤としては、例えば、BMS-777607、Bemcentinib (R428)、Cabozantinib malate (XL184)、UNC2250、Dabergmatinib (TP-0903)、UNC-2025、LDC1267、UNC2881、RXDX-106 (CEP-40783)、S49076、Sitravatinib (MGCD516)、2-D08、Gilteritinib (ASP22

15)、NPS-1034などが挙げられる。

[0070] TIEに対する阻害剤としては、例えば、MGCD-265 analog、Tie2 kinase inhibitor、Altiratinib、Pexmetinib (ARRY-614) などが挙げられる。

[0071] また、その他の受容体型チロシンキナーゼ阻害剤についても、適宜選択することができる。受容体型チロシンキナーゼ阻害剤としては、N-[5-(2-[(シクロプロパンカルボニル) アミノ] イミダゾ[1, 2-b] ピリダジン-6-イル) オキシ)-2-メチルフェニル]-1, 3-ジメチル-1H-ピラゾール-5-カルボキサミド、N-{4-[(6, 7-ジメトキシキノリン-4-イル) オキシ]-3-フルオロフェニル}-N'-(4-フルオロフェニル) シクロプロパン-1, 1-ジカルボキサミド、AMG 337、ASP5878、BGJ398、Foretinib、ZM323881、CP-673451、CrenolanibまたはCrizotinibが好ましい。受容体型チロシンキナーゼ阻害剤は、1種類のみを用いてもよく、複数種類を組み合わせ用いてもよい。また、より高い純度の心筋細胞を得るために、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤と同時または前後の工程に他薬剤（ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤等）を用いてもよい。

[0072] 上記阻害剤は、上記化合物またはその塩を1種含有しても、2種以上を含有してもよい。

上記化合物またはその塩は、自体公知の方法に従って、それぞれ製造することができる。

[0073] 上記化合物が塩である場合、薬理的に許容される塩が好ましく、このような塩としては、例えば、無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩等が挙げられる。

無機塩基との塩の好適な例としては、ナトリウム塩、カリウム塩等のアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩；アンモニウム塩等が挙げられる。

有機塩基との塩の好適な例としては、トリメチルアミン、トリエチルアミ

ン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、トロメタミン〔トリス（ヒドロキシメチル）メチルアミン〕、*tert*-ブチルアミン、シクロヘキシルアミン、ベンジルアミン、ジシクロヘキシルアミン、*N*，*N*-ジベンジルエチレンジアミン等との塩が挙げられる。

無機酸との塩の好適な例としては、塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸等との塩が挙げられる。

有機酸との塩の好適な例としては、ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フタル酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、*p*-トルエンスルホン酸等との塩が挙げられる。

塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、アルギニン、リジン、オルニチン等との塩が挙げられる。

酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、アスパラギン酸、グルタミン酸等との塩が挙げられる。

[0074] 上記化合物は、水和物、非水和物、溶媒和物、無溶媒和物のいずれであってもよい。

また、上記化合物は、同位元素（例、 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{35}S 、 ^{125}I など）などで標識または置換された化合物であってもよい。

^1H を ^2H （*D*）に変換した重水素変換体も、上記化合物に包含される。

互変異性体も、上記化合物に包含される。

上記化合物は、薬学的に許容され得る共結晶または共結晶塩であってもよい。ここで、共結晶または共結晶塩とは、各々が異なる物理的特性（例えば、構造、融点、融解熱、吸湿性、溶解性および安定性等）を持つ、室温で二種またはそれ以上の独特な固体から構成される結晶性物質を意味する。共結晶または共結晶塩は、自体公知の共結晶化法に従い製造することができる。

[0075] 受容体型チロシンキナーゼ阻害剤の培地中での濃度としては、当業者であれば適宜選択できるが、例えば、 1 nM ～ $10\text{ }\mu\text{M}$ が好ましく、特に 10 n

M～3 μ Mがより好ましく、具体的には、1 nM、2 nM、3 nM、5 nM、10 nM、20 nM、30 nM、40 nM、50 nM、0.1 μ M、0.2 μ M、0.3 μ M、0.4 μ M、0.5 μ M、1.0 μ M、1.5 μ M、2 μ M、3 μ M、4 μ M、5 μ M、6 μ M、7 μ M、8 μ M、9 μ M、10 μ Mが挙げられる。また、化合物の種類によっても適宜濃度を変更することもでき、例えば、N-[5-(2-((シクロプロパンカルボニル)アミノ)イミダゾ[1,2-b]ピリダジン-6-イル)オキシ)-2-メチルフェニル]-1,3-ジメチル-1H-ピラゾール-5-カルボキサミドを用いる場合には、20 nM～10 μ Mが好ましく、N-{4-[(6,7-ジメトキシキノリン-4-イル)オキシ]-3-フルオロフェニル}-N'-(4-フルオロフェニル)シクロプロパン-1,1-ジカルボキサミドを用いる場合には、0.2 μ M～10 μ Mが好ましく、AMG337を用いる場合には、0.2 μ M～10 μ Mが好ましく、ASP5878を用いる場合には、1 nM～1 μ Mが好ましく、BGJ398を用いる場合には、5 nM～5 μ Mが好ましく、Foretinibを用いる場合には、5 nM～5 μ Mが好ましく、ZM323881を用いる場合には、0.1 μ M～10 μ Mが好ましく、CP-673451を用いる場合には、0.1 μ M～10 μ Mが好ましく、Crenolanibを用いる場合には、0.1 μ M～10 μ Mが好ましく、Crizotinibを用いる場合には、0.1 μ M～10 μ Mが好ましいが、これらの濃度に限定されない。

[0076] 前記工程(2)および(2')における細胞集団の培養方法は、上記(0-2)または(0-3)と同様である。培養期間も同様であり、少なくとも細胞集団と受容体型チロシンキナーゼ阻害剤とを接触をしている間培養を続けられたい。

[0077] 2. 心筋細胞を含む細胞集団

本発明はまた、本発明の製法または精製方法により得られた、心筋細胞を含む細胞集団(以下、「本発明の細胞集団」ともいう)を提供する。上述の通り、本発明の細胞集団は、高い純度で心筋細胞を含む。高い純度とは、細

胞集団中の心筋細胞の割合（細胞集団中の心筋細胞数／細胞集団中の全細胞数）が、具体的には、８０％以上（例：８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上）の高純度で含むことを意味する。当然のことながら、上記心筋細胞の割合は、上記細胞集団と、間葉系幹細胞などの他の細胞または細胞集団とを混合して用いる場合には、他の細胞または細胞集団を混合する前の割合を指す。好ましい態様において、本発明の細胞集団は、多能性幹細胞から心筋細胞を誘導する従来の方法で得られる細胞集団よりも、高い割合で心筋細胞を含む。かかる細胞集団は、セルソーティングなどによりさらに精製してもよく、このように精製された細胞集団もまた、「本発明の細胞集団」に包含されるものとする。

[0078] ３．細胞移植療法剤

本発明はまた、本発明の細胞集団を含有してなる、細胞移植療法剤（以下、「本発明の細胞移植療法剤」ともいう）を提供する。本発明の細胞移植療法剤は、自家移植に用いてもよく、他家移植に用いてもよい。また、他の薬剤、例えば免疫抑制剤、と併用してもよい。上述の通り、本発明の細胞集団は、高純度で心筋細胞を含むため、本発明の細胞集団は、細胞移植療法剤の原料として用いることに適しており、本発明の細胞集団または本発明の細胞移植療法剤は、心疾患の治療または予防に有用である。従って、本発明の細胞集団または細胞移植療法剤の有効量を治療または予防の対象とする哺乳動物（例：ヒト、マウス、ラット、サル、ウシ、ウマ、ブタ、イヌ等）に投与または移植する、心疾患の治療または予防方法も本発明に包含される。治療または予防の対象とする心疾患としては、心不全、虚血性心疾患、心筋梗塞、心筋症、心筋炎、肥大型心筋症、拡張相肥大型心筋症、拡張型心筋症などの疾患または障害による欠損などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0079] 本発明の細胞集団を、細胞移植療法剤に用いる場合、拒絶反応が起こらないという観点から、移植先の個体のHLA遺伝子型が同一若しくは実質的に同一である体細胞から樹立したiPS細胞に由来する細胞を含む細胞集団を

用いることが望ましい。ここで、「実質的に同一」とは、移植した細胞に対して免疫抑制剤により免疫反応が抑制できる程度にHLA遺伝子型が一致していることであり、例えば、HLA-A、HLA-BおよびHLA-DRの3遺伝子座或いはHLA-Cを加えた4遺伝子座が一致するHLA型を有する体細胞である。また、ポリエチレングリコールやシリコンのようなカプセル、多孔性の容器などに包埋して拒絶反応を回避した状態で移植することも可能である。

[0080] 本発明の細胞集団は、常套手段にしたがって医薬上許容される担体と混合するなどして、注射剤、懸濁剤、点滴剤等の非経口製剤として製造される。当該非経口製剤に含まれ得る医薬上許容される担体としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などの注射用の水性液を挙げることができる。本発明の細胞移植療法剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤、酸化防止剤などと配合してもよい。本発明の移植療法剤を水性懸濁液剤として製剤化する場合、上記水性液に約 1×10^6 ～約 1×10^8 細胞/mLとなるように、心筋細胞を含む細胞集団を懸濁させればよい。また、生着を促すような足場材と共に投与され得る。ここで足場材とは、コラーゲンなどの生体由来の成分やこれに代替するポリ乳酸などの合成ポリマーが例示されるが、これらに限定されない。

[0081] あるいは、心疾患の治療は、得られた心筋細胞をシート化して、患者の心臓に貼付することによって行われてもよい。心筋シートを投与する場合、所望の部分を覆うように配置することによって達成される。ここで、所望の部分を覆うように配置することは、当該分野において周知技術を用いて行うことができる。配置に際し、所望の部分が大きい場合は、組織を取り巻くように配置してもよい。また、投与は、所望の効果をを得るため、同部分へ数回の配置を行うこともできる。数回の配置を行う場合、所望の細胞が組織へ生着

し、血管新生を行うために十分な時間をおいて行うことが望ましい。このような心疾患の治療の機序は、心筋シートの生着により生じる効果であってもよく、あるいは細胞の生着によらない間接的な作用（例えば、誘引物質を分泌することによるレシピエント由来細胞の損傷部位への動員による効果）であってもよい。心疾患の治療において、心筋シートを用いる場合には、心筋細胞に加えて、コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン等の細胞足場材料（スキャホールド）を含んでいてもよい。あるいは、心筋細胞の他に、任意の細胞種（複数も可）を含んでいることも可能である。心疾患の治療に用いられる心筋細胞の細胞数は、投与される心筋シートが心疾患の治療において効果を発揮するような量であれば特に限定されるものではなく、患部の大きさや体躯の大きさに合わせて適宜増減して調製することができる。

[0082] さらに別の実施形態では、本発明の細胞集団は、心疾患の治療のための薬剤スクリーニングや薬剤の心毒性評価に利用することもできる。例えば、本発明の細胞集団に試験薬剤を投与し、心筋細胞の応答を調べることにより、試験薬剤の効果や毒性の評価を行うことができる。

[0083] 本発明を以下の実施例でさらに具体的に説明するが、本発明の範囲はそれら実施例に限定されない。

実施例

[0084] 実施例 1. i P S 細胞から心筋細胞に分化誘導した細胞のシングルセル RNA シークエンシング解析

国立大学法人京都大学 i P S 細胞研究所 (C i R A) で作製された臨床用 i P S 細胞株の評価用株を使用した。i P S 細胞株の維持培養は従来法に準じて行った (O k i t a K, et al. Stem Cells. 2012 Nov 29. doi:10.1002/stem.1293)。心筋細胞への分化誘導は、論文 (M i k i et al, Cell Stem Cell. 2015 Jun 4;16. doi:10.1016/j.stem.2015.04.005.) に記載の方法に準じて行った。分化誘導開始後 22 日目の心筋細胞について 10X Genomics 社の Chro

m i u mを用いてシングルセルRNA sequence解析を行った。ソフトウェア (Cell ranger、Seurat、Loupe Cell Browser) により細胞のクラスタリングと各クラスターの解析を行った。i P S細胞から心筋細胞に分化誘導した細胞集団中には、sarcomeric- α -actininとcardiac Troponin Tを発現する心筋細胞集団の他に、sarcomeric- α -actininとcardiac Troponin Tを発現しない3つの非心筋細胞集団 (遺伝子発現から平滑筋様の細胞 (SMC)、内皮様の細胞 (EC)、内胚葉系譜の細胞 (END) と考えられる) が、存在していることを見出した (図1)。

[0085] 実施例2. i P S細胞から心筋に分化誘導した細胞集団に存在する非心筋細胞の解析

シングルセルRNAシーケンシングデータのLoupe Cell Browserによる解析で受容体型チロシンキナーゼの遺伝子発現の解析を行った。その結果、PDGFRA、PDGFRB、VEGFR1、VEGFR2、c-Met (HGFR)、FGFR4等の受容体型チロシンキナーゼの遺伝子発現が非心筋細胞集団において高く、心筋細胞集団では高いことを見出した (図2)。

[0086] 実施例3. 細胞表面マーカーによる非心筋細胞の染色

TNNI1の遺伝子座にEmGFP (配列番号1)、TNNI3の遺伝子座にmCherry (配列番号2) のレポータータンパク質の配列を挿入したダブルノックインのヒトi P S細胞株を作製した。ヒトi P S細胞株の作製はCTL社より購入したPBMC (LP_167, Sample ID: 20130318) を用いてエピソーマルベクター (搭載遺伝子; OCT3/4, KLF4, SOX2, L-MYC, LIN28, mouse p53 DD) により行った (参考文献; Okita K, et al. Stem Cells. 2012 Nov 29. doi:10.1002/stem.1293)。

[0087] iPS細胞株の維持培養は従来法に準じて行った (Okita K, et al. Stem Cells. 2012 Nov 29. doi:10.1002/stem.1293)。

心筋細胞への分化誘導は論文 (Miki et al, Cell Stem Cell. 2015 Jun 4;16. doi:10.1016/j.stem.2015.04.005.) に記載の方法に準じて6 well plateで行った。簡潔に説明すれば、心筋細胞への分化誘導は、レポーターiPS細胞株を0.5mM EDTA/PBSで1/2に希釈した TrypLE select (ライフテクノロジーズ) で4~5分処理後、セルスクレーパー (IWAKI) で細胞を剥離し、ピペティングによりシングルセルへと解離した。1,000rpm, 5minの遠心分離により培地を除去し、得られた細胞を、6ウェルプレート1ウェルあたり 2×10^6 cells播種して、StemPro34培地に1%L-グルタミン、トランスフェリン $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、アスコルビン酸 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ (sigma)、モノチオグリセロール $4 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ Y-27632、 $2 \text{ ng}/\text{mL}$ BMP4 (R&D) および0.5%Growth Factor Reduced Matrigelを添加した培地 $1.5 \text{ mL}/\text{well}$ で、 37°C 、5%酸素条件下にて培養して、胚様体を形成させた (0日目)。

翌日 (1日目)、StemPro34培地に1%L-グルタミン、トランスフェリン $150 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、アスコルビン酸 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ (sigma)、モノチオグリセロール $4 \times 10^{-4}\text{M}$ 、 $2 \text{ ng}/\text{mL}$ BMP4 (R&D) アクチビンA $12 \text{ ng}/\text{mL}$ 、bFGF $5 \text{ ng}/\text{mL}$ 、BMP4 $18 \text{ ng}/\text{mL}$ を加えた培地を各ウェルに 1.5 mL 添加し、 37°C 、5%酸素条件にてさらに2日間培養した。

続いて (3日目)、6ウェルプレートを傾けて静置して胚様体を沈降させ、培地の80~90%除去した後、各ウェルにIMDMを 1.5 mL 添加した。再びウェルプレートを傾けて静置して胚様体を沈降させ、培地の80~

90%除去した後、StemPro34培地に1%L-グルタミン、トランスフェリン $150\mu\text{g}/\text{mL}$ 、アスコルビン酸 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ (sigma)、モノチオグリセロール $4\times 10^{-4}\text{M}$ 、 $10\text{ng}/\text{mL}$ VEGF、 $1\mu\text{M}$ IWP-3、 $0.6\mu\text{M}$ Dorsomorphinおよび $5.4\mu\text{M}$ SB431542を添加した培地中で、 37°C 、5%酸素条件下で、3日間培養した。

続いて(6日目)、6ウェルプレートを傾けて静置して胚様体を沈降させ、培地の80~90%除去した後、1%L-グルタミン、トランスフェリン $150\mu\text{g}/\text{mL}$ 、アスコルビン酸 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ (sigma)、モノチオグリセロール $4\times 10^{-4}\text{M}$ および $5\text{ng}/\text{mL}$ VEGFを添加したStemPro34培地を添加した。8日間、 37°C 、5%酸素条件下で培養した。この間、2~3日に1度同じ条件の培地に交換した。

[0088] 分化誘導15日目に胚様体を含む細胞培養液を 200g で1分間遠心後、上清をアスピレーターで取り除いた。PBSを加え、 $200\times\text{g}$ で1分間遠心後、上清をアスピレーターで取り除いた。IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Media) にDNase $10\mu\text{g}/\text{mL}$ 、Liberase $100\mu\text{g}/\text{mL}$ を加えた溶液 3mL を各チューブに添加し、 37°C 、通常酸素条件下で1時間静置した。1時間後、チューブを 400g で5分間遠心し、胚様体を吸わないように上清を除去した。Accutase (Thermo) にDNase $10\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加した溶液 2mL を各チューブに添加し、 37°C 、通常酸素条件下で10分間静置した。静置後、ピペティングにより単一の細胞 (single cell) とし、IMDMにDNase $10\mu\text{g}/\text{mL}$ を添加した培地 2mL を各チューブに加えて転倒混和することで、シングルセル懸濁液を調製した。

上記のシングルセル懸濁液を、 $200\times\text{g}$ で5分間遠心後、上清を除去し、 -80°C で凍結保存した。

凍結保存した細胞を、 37°C の温浴につけて融解し、 $400\times\text{g}$ で5分間

遠心後、上清を除去した。

細胞ペレットをタッピング後、1%BSAを含むPBSを1mL加え、300×gで3分間遠心し、上清を除去した。1%BSAを含むPBSでAPCFire750標識抗CD326抗体、PE標識抗CD49a抗体、BV605標識抗CD31抗体、DAPIを用いて染色した。DAPI陽性の死細胞を除去した上で、核細胞の各蛍光色素のシグナル量を測定することで、細胞集団の分離と各細胞集団の割合を測定した。

上記レポーターiPS細胞から心筋に分化誘導した心筋細胞は、これらの3つの表面マーカーの発現の違いにより、CD326陽性細胞、CD326陰性CD31陽性細胞、CD326陰性CD31陰性CD49a陽性細胞、CD326陰性CD31陰性CD49a陰性細胞の主に4つの細胞集団に分離された。4つの細胞集団は、これら3つの表面マーカーのいずれかまたは複数を発現する、3つの非心筋細胞を主とする集団（心筋レポーター遺伝子を発現しない細胞を多く含む集団）と、3つのマーカー全てが陰性の心筋細胞集団（心筋レポーター遺伝子を発現する細胞集団）であった。3つのマーカー全てが陰性の細胞集団については、その99%以上が、心筋細胞（心筋レポーター遺伝子を発現する細胞）であった（図3）。

[0089] 次に、実施例2により見出した受容体型チロシンキナーゼに着目し、受容体型チロシンキナーゼ阻害剤により、受容体型チロシンキナーゼの発現が相対的に低い心筋細胞を純化できるか否かを、様々な条件で検証した（試験例1～9）。

以下の試験例1～9において、化合物AとはN-[5-({2-[(シクロプロパンカルボニル)アミノ]イミダゾ[1,2-b]ピリダジン-6-イル}オキシ)-2-メチルフェニル]-1,3-ジメチル-1H-ピラゾール-5-カルボキサミドであり、化合物BとはN-{4-[(6,7-ジメトキシキノリン-4-イル)オキシ]-3-フルオロフェニル}-N'-(4-フルオロフェニル)シクロプロパン-1,1-ジカルボキサミドを表す。

[0090] 試験例 1. 受容体型チロシンキナーゼ阻害剤による心筋細胞の純化作用の検証

<心筋細胞への分化誘導>

ヒト iPS 細胞株は、CTL 社より購入した PBMC (LP__167, Sample ID: 20130318) を用いてエピソードベクター (搭載遺伝子; OCT3/4, KLF4, SOX2, L-MYC, LIN28, mouse p53DD) により作製された (参考文献; Okita K, et al. Stem Cells. 2012 Nov 29. doi:10.1002/stem.1293) 細胞株 (細胞表面マーカーによる非心筋細胞の染色で使用したレポーター細胞の親株) を使用した。

iPS 細胞株の維持培養は従来法に準じて行った (Okita K, et al. Stem Cells. 2012 Nov 29. doi:10.1002/stem.1293)。心筋細胞への分化誘導は論文 (Miki et al, Cell Stem Cell. 2015 Jun 4; 16. doi:10.1016/j.stem.2015.04.005.) に記載の方法に準じて 6 well plate で行った。VEGF については Day 8 以降は添加せずに実施した。

分化誘導 8 日目に、胚様体を 1 つの遠心チューブに集め室温で数分間静置して胚様体を沈降させ、上清をアスピレーターで取り除き、培地を添加することで、培地交換を実施した。胚様体懸濁液を 6 well plate に移し、最終濃度の 100 倍濃度の評価化合物 (以下の表 1 に示す実験番号 2 から 8 の化合物と濃度) を各ウェルに 100 分の 1 量添加後、プレートを攪拌し、細胞培養を行った。

[0091]

[表1]

実験番号	化合物	終濃度(μ M)
1	未処理	-
2	化合物 A	0.5
3	AMG337	2
4	ASP5878	0.02
5	ASP5878	0.05
6	ASP5878	0.12
7	BGJ398	0.2
8	BGJ398	1

[0092] 分化誘導10日目に、6well plateを傾けて数分間静置することで胚様体を沈降させ、上清をアスピレーターで取り除き、培地を添加することで各ウェルの培地交換を実施し、8日目と同様に最終濃度の100倍濃度の評価化合物を100分の1量添加することで、化合物の添加を実施した。分化誘導13日目に、6well plateを傾けて胚様体を沈降させ、広径の1mLピペット用チップを付けたピペットで胚様体を1.5mLチューブに移した。細胞のシングルセル化は細胞表面マーカーによる非心筋細胞の染色に準じて実施し、シングルセル懸濁液を、心筋細胞マーカー陽性細胞率測定、および非心筋細胞マーカー陽性細胞率測定に用いた。

[0093] <心筋マーカー陽性細胞率（心筋細胞率）測定>

上記のシングルセル懸濁液を1.5mLチューブに分注後、400gで3分間遠心し、上清を除去した。細胞ペレットをCyt o f i x / C y t o p e r m F i x a t i o n / P e r m e a b i l i z a t i o n S o l u t i o n (BD) に再懸濁して室温で15分静置し、固定した。各チューブに1xPerm/Wash Buffer 1mLを添加し、1500gで3分間遠心後、上清を除去することで細胞を洗浄した。細胞ペレットをタッピング後に、1xPerm/Wash Buffer 1mLを添加し、同様の操作を行うことで細胞を洗浄した。細胞ペレットはタッピング後、1% BSA を含む1xPerm/Wash Bufferで抗Sarcome

ric α -actinin抗体を用いて、蛍光色素Alexa647で染色後、さらにDAPI (4', 6-Diamidino-2-phenyl indole Dihydrochloride) でDNA染色を行った。フローサイトメーターによる測定で、死細胞 (DNA量がSub-G1の細胞) を除いた細胞集団のAlexa647の蛍光シグナル量を測定することで、Sarcomeric α -actinin陽性の細胞率の解析を行った。その結果、化合物A (N-[5-({2-[(シクロプロパンカルボニル) アミノ] イミダゾ [1, 2-b] ピリダジンを6-イル} オキシ) -2-メチルフェニル] -1, 3-ジメチル-1H-ピラゾール-5-カルボキサミド)、AMG337、ASP5878、BGJ398処理により、化合物未処理に比べ心筋細胞率 (Actinin陽性細胞率) が増加した (図4)。

[0094] <非心筋細胞マーカー陽性細胞率 (非心筋細胞率) 測定>

未凍結のシングルセル懸濁液を用いて、細胞表面マーカーによる非心筋細胞の染色に準じて、染色、測定、解析を実施した。その結果、化合物A、AMG337、ASP5878、BGJ398処理により、化合物未処理に比べ、非心筋細胞率 (CD326、CD31、CD49aいずれかが陽性の細胞率) が減少した (図5)。

[0095] 試験例2. 受容体型チロシンキナーゼ阻害剤による心筋細胞の純化作用の検証

<心筋細胞への分化誘導>

ヒトiPS細胞は試験例1と同じ細胞株を用い、心筋細胞への分化誘導についても同様の方法で行った。培地交換は分化誘導8日目、10日目、13日目に実施し、分化誘導8日目、10日目は試験例1と同様の方法で、分化誘導13日目は試験例1の10日目と同様の方法で行った。分化誘導8日目、10日目、13日目は評価化合物 (以下の表2に示す実験番号2、3の化合物と濃度) の添加を試験例1と同様の方法で実施した。ただし、実験番号3のASP5878の添加は分化誘導8日目と10日目のみで実施した。各

実験について4ウェルずつで実施した。

[0096] [表2]

実験番号	化合物	終濃度(μM)
1	未処理	-
2	Foretinib	2
3	ASP5878	0.02

[0097] 分化誘導16日目に、細胞のシングルセル化、固定、心筋細胞率（S a r c o m e r i c α - a c t i n i n陽性細胞率）測定を試験例1と同様の方法で行った。その結果、F o r e t i n i b、A S P 5 8 7 8処理により、化合物未処理に比べ心筋細胞率が増加した（図6）。

[0098] 試験例3. 受容体型チロシンキナーゼ阻害剤による心筋細胞の純化作用の検証

<心筋細胞への分化誘導>

ヒトiPS細胞株は、CTL社より購入したPBMC（LP__140, S a m p l e I D : 2 0 1 2 0 8 0 8）を用いてエピソーマルベクター（搭載遺伝子；OCT3/4, KLF4, SOX2, L-MYC, LIN28, mouse p53DD）により作製された（参考文献；Okita K, et al. Stem Cells. 2012 Nov 29. doi:10.1002/stem.1293）細胞株を使用した。

iPS細胞株の維持培養は従来法に準じて行った（Okita K, et al. Stem Cells. 2012 Nov 29. doi:10.1002/stem.1293）。心筋細胞への分化誘導は実施例1と同様の方法で行った。VEGFについてはDay10以降は添加せずに実施した。

培地交換は分化誘導8日目、10日目、13日目に実施し、分化誘導8日目、10日目は試験例1と同様の方法で、分化誘導13日目は試験例1の10日目と同様の方法で行った。分化誘導8日目、10日目、13日目は評価

化合物（以下の表 3 に示す実験番号 2 から 6 の化合物と濃度）の添加を試験例 1 と同様の方法で実施した。

[0099] [表3]

実験番号	化合物	終濃度(μM)
1	未処理	-
2	化合物 A	0.5
3	Foretinib	2
4	ZM323881	2
5	Crenolanib	1
6	Crizotinib	2

[0100] 分化誘導 17 日目に、細胞のシングルセル化、非心筋細胞率（CD 3 2 6、CD 3 1、CD 4 9 a いずれかが陽性の細胞率）測定を試験例 1 と同様の方法で行った。その結果、化合物 A、Foretinib、ZM323881、Crenolanib、Crizotinib 処理により、化合物未処理に比べ非心筋細胞率が減少した（図 7）。

[0101] 試験例 4. 受容体型チロシンキナーゼ阻害剤による心筋細胞の純化作用の検証

<心筋細胞への分化誘導>

ヒト i P S 細胞は試験例 3 と同じ細胞株を用い、心筋細胞への分化誘導についても同様の方法で行った。

培地交換は分化誘導 8 日目、10 日目、13 日目に実施し、分化誘導 8 日目、10 日目は試験例 1 と同様の方法で、分化誘導 13 日目は試験例 1 の 10 日目と同様の方法で行った。分化誘導 8 日目、10 日目、13 日目は評価化合物（以下の表 4 に示す実験番号 2、3 の化合物と濃度）の添加を試験例 1 と同様の方法で実施した。各実験について 4 ウェルずつで実施した。

[0102]

[表4]

実験番号	化合物	終濃度(μ M)
1	未処理	~
2	化合物 A	0.5
3	Foretinib	0.5

[0103] 分化誘導17日目に、細胞のシングルセル化を行い、細胞数測定と心筋細胞率測定を行った。固定、心筋細胞率 (Sarcomeric α -actinin陽性細胞率) 測定を試験例1と同様の方法で行った。その結果、化合物A、Foretinib処理により、未処理に比べ心筋細胞率が増加した (図8)。

[0104] 上記のシングルセル懸濁液を、1.5 mLチューブに5倍希釈になるように用意しておいたIMDM培地に加えて転倒混和し、細胞計数装置NC-200 (Chemometec) で細胞数を測定した。その結果、Foretinib処理では未処理に比べて70%程度、化合物A処理ではほぼ同じ数の細胞数が回収された (図9)。

[0105] 試験例5. 受容体型チロシンキナーゼ阻害剤による心筋細胞の純化作用の検証

<心筋細胞への分化誘導>

ヒトiPS細胞は試験例3と同じ細胞株を用い、心筋細胞への分化誘導についても同様の方法で行った。

培地交換は分化誘導8日目、10日目、13日目に実施し、分化誘導8日目、10日目は試験例1と同様の方法で、分化誘導13日目は試験例1の10日目と同様の方法で行った。分化誘導8日目、10日目、13日目は評価化合物 (以下の表5に示す実験番号2から4の化合物と濃度) の添加を試験例1と同様の方法で実施した。ただし、実験番号4のASP5878の添加は分化誘導8日目と10日目のみで実施した。各実験について4ウェルずつで実施した。

[0106]

[表5]

実験番号	化合物	終濃度(μM)
1	未処理	-
2	Crenolanib	1
3	化合物B	2
4	ASP5878	0.02

[0107] 分化誘導16日目に、細胞のシングルセル化、固定、心筋細胞率（Sarcomeric α -actinin陽性細胞率）を試験例1と同様の方法で行った。その結果、化合物未処理に比べ、Crenolanib、化合物B（N- {4- [(6, 7-ジメトキシキノリン-4-イル) オキシ] -3-フルオロフェニル} -N' - (4-フルオロフェニル) シクロプロパン-1, 1-ジカルボキサミド）、ASP5878処理により、心筋細胞率（Sarcomeric α -actinin陽性細胞率）が増加した（図10）。

[0108] 上記のシングルセル懸濁液を用いて、細胞数測定方法を試験例4に記載の方法で実施した。その結果、化合物処理の有無で回収できた細胞数には大きな変化は認められなかった（図11）。

[0109] 試験例6. 受容体型チロシンキナーゼ阻害剤による心筋細胞の純化作用の検証

<心筋細胞への分化誘導>

CiRAで作製された臨床用iPS細胞株を使用した。iPS細胞株の維持培養は従来法に準じて行った（Okita K, et al. Stem Cells. 2012 Nov 29. doi:10.1002/stem.1293）。心筋細胞への分化誘導は、論文（Miki et al, Cell Stem Cell. 2015 Jun 4;16. doi:10.1016/j.stem.2015.04.005.）に記載の方法に準じて行った。

培地交換は分化誘導8、10、14、17、21日目に実施し、分化誘導8日目、10日目は試験例1と同様の方法で、分化誘導14日目以降は試験

例 1 の 10 日目と同様の方法で行った。

分化誘導 14 日目、17 日目、21 日目は評価化合物の 1 つである化合物 A の添加を試験例 1 と同様の方法で実施した。各実験について 4 ウェルずつで実施した。

[0110] [表6]

実験番号	化合物	終濃度(μM)
1	未処理	~
2	化合物 A	0.2

[0111] 細胞のシングルセル化、固定、心筋細胞率測定、非心筋細胞率測定は試験例 1 と同様の方法で、細胞数測定は試験例 4 と同様の方法で行った。その結果、化合物未処理に比べ、化合物 A 処理により心筋細胞率が増加し（図 12）、非心筋細胞率が減少した（図 13）。化合物処理の有無で回収できた細胞数には大きな変化が認められなかった（図 14）。

[0112] 試験例 7. 受容体型チロシンキナーゼ阻害剤による心筋細胞の純化作用の検証

<心筋細胞への分化誘導>

ヒト iPS 細胞は、CiRA で作製された臨床用 iPS 細胞株を使用した。試験例 6 と同じ細胞株を用い、心筋細胞への分化誘導についても同様の方法で行った。

培地交換は分化誘導 8 日目、10 日目、13 日目に実施し、分化誘導 8 日目、10 日目は試験例 1 と同様の方法で、分化誘導 13 日目は試験例 1 の 10 日目と同様の方法で行った。分化誘導 8 日目、10 日目、13 日目は評価化合物（以下の表 7 に示す実験番号 2 から 9 の化合物と濃度、の添加を試験例 1 と同様の方法で実施した（実験番号 1 については 2 ウェル、他は 1 ウェルで実施した）。

[0113]

[表7]

実験番号	化合物	終濃度(μM)
1	未処理	-
2	化合物 A	0.5
3	Foretinib	2
4	Foretinib	0.5
5	ZM323881	2
6	CP-673451	1
7	CP-673451	0.3
8	Crizotinib	2
9	Crizotinib	0.5

[0114] 分化誘導17日目に、細胞のシングルセル化、固定、心筋細胞率（S a r c o m e r i c α - a c t i n i n陽性細胞率）測定、非心筋細胞率測定を試験例1と同様の方法で行った。化合物未処理に比べ、化合物A、F o r e t i n i b、Z M 3 2 3 8 8 1、C P - 6 7 3 5 1、C r i z o t i n i b処理により心筋細胞率が増加し（図15）、非心筋細胞率が減少した（図16）。

[0115] 試験例8. 受容体型チロシンキナーゼ阻害剤による心筋細胞の純化作用の検証

<心筋細胞への分化誘導>

ヒトiPS細胞は試験例6と同じ細胞株を用い、心筋細胞への分化誘導についても同様の方法で行った。

培地交換は分化誘導8、10、13、17、20日目に実施し、分化誘導8日目は試験例1の8日目と同様の方法で、分化誘導10日目以降は試験例1の10日目と同様の方法で行った。分化誘導8、10、13、17、20日目は評価化合物C r e n o l a n i bの添加を表8に記載の条件に従い試験例1と同様の方法で実施した。実験番号4は分化誘導8日目以降、実験番号2、3は分化誘導10日目以降から、実験番号5は分化誘導13日目以降から化合物の添加を行った。実験番号1は4ウェル、実験番号2、3は3ウェル、実験番号4、5については1ウェルで実施した。

[0116] [表8]

実験番号	化合物	終濃度(μM)	添加開始日
1	未処理	-	-
2	Crenolanib	0.2	10日目
3	Crenolanib	1	10日目
4	Crenolanib	1	8日目
5	Crenolanib	1	13日目

[0117] 分化誘導23日目に、細胞のシングルセル化、固定、心筋細胞率（Sarcmeric α -actinin陽性細胞率）測定、非心筋細胞率測定を試験例1と同様の方法で行った。Crenolanib処理により心筋細胞率が増加し（図17）、非心筋細胞率が減少した（図18）。

[0118] 試験例9. 受容体型チロシンキナーゼ阻害剤による心筋細胞の純化作用の検証

<心筋細胞への分化誘導>

ヒトiPS細胞は試験例6と同じ細胞株を用い、心筋細胞への分化誘導についても同様の方法で行った。

培地交換は、分化誘導8日目は試験例1の8日目と同様の方法で、分化誘導10日目、13日目は試験例1の10日目と同様の方法で行った。分化誘導8、10、13日目は評価化合物（以下の表9に示す実験番号2、3の化合物と濃度）の添加を試験例1と同様の方法で実施した。各実験番号4ウェルで実施した。

[0119] [表9]

実験番号	化合物	終濃度(μM)
1	未処理	-
2	Foretinib	0.5
3	Crizotinib	2

[0120] 分化誘導17日目に、細胞のシングルセル化、固定、心筋細胞率（Sarcmeric α -actinin陽性細胞率）測定、非心筋細胞率測定を試験例1と同様の方法で、細胞数測定を試験例4と同様の方法で実施した。

。化合物未処理に比べ、Foretinib、Crizotinib処理により、心筋細胞率が増加し（図19）、非心筋細胞率が減少した（図20）。化合物未処理に比べCrizotinibで8割、Foretinib処理ではほぼ同数の細胞数が回収された（図21）。

[0121] 以上より、様々な種類の受容体型チロシンキナーゼ阻害剤を培地に添加するだけの簡便な処理によって、様々な細胞株において胚様体中の心筋細胞を純化できることが示された。

[0122] なお、上記試験例1～9で用いた各化合物の標的となる受容体型チロシンキナーゼを、表10として示す。

[0123] [表10]

化合物	化合物 A	AMG337	ASP5878	BGJ398	Foretinib
標的	VEGFR1,2,3/PDGFR α, β	c-Met(HGFR)	FGFR1-4	FGFR1-3	VEGFR1,2,3/c-Met (HGFR)
化合物	ZM323881	CP-673451	Crenolanib	Crizotinib	化合物 B
標的	VEGFR2	PDGFR α, β	PDGFR α, β	c-Met	c-Met(HGFR)

産業上の利用可能性

[0124] 本発明により、心筋細胞を高純度で含む細胞集団が提供される。かかる細胞集団は、心疾患に対する細胞移植療法や心疾患の治療剤のスクリーニングに好適に用いることができるため、有用である。

[0125] 本出願は日本で出願された特願2020-050268（出願日：2020年3月19日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。