

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-517085

(P2009-517085A)

(43) 公表日 平成21年4月30日(2009.4.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 Q 1/42</b> (2006.01)	C 1 2 Q 1/42 Z N A	4 B 0 6 3
<b>A 6 1 K 45/00</b> (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
<b>A 6 1 P 43/00</b> (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 7	4 C 0 8 6
<b>G 0 1 N 33/53</b> (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
<b>A 6 1 K 31/704</b> (2006.01)	A 6 1 K 31/704	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2008-543385 (P2008-543385)  
 (86) (22) 出願日 平成18年11月27日 (2006.11.27)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年7月28日 (2008.7.28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/045515  
 (87) 国際公開番号 W02007/062243  
 (87) 国際公開日 平成19年5月31日 (2007.5.31)  
 (31) 優先権主張番号 60/740,173  
 (32) 優先日 平成17年11月28日 (2005.11.28)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

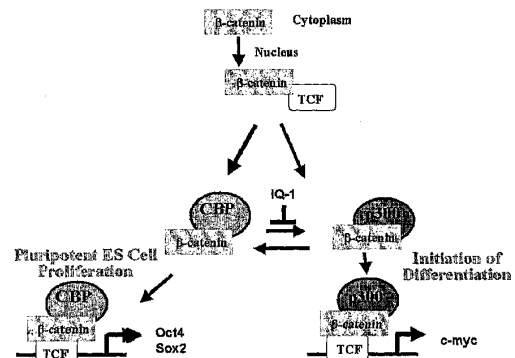
(71) 出願人 508139206  
 チョンウェ ファーマ コーポレイション  
 大韓民国 156-757 ソウル トン  
 ジャクク シンデバンドン 698  
 (74) 代理人 100147485  
 弁理士 杉村 憲司  
 (74) 代理人 100119530  
 弁理士 富田 和幸  
 (74) 代理人 100135172  
 弁理士 野田 裕子  
 (72) 発明者 ミシェル カーン  
 アメリカ合衆国 98034 ワシントン  
 州 カークランド 第80 プレイス  
 エヌイー 10916  
 Fターム(参考) 4B063 QA01 QQ33 QS33

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 培養における細胞の無血清増殖

(57) 【要約】

CBPまたはp300とβ-カテニンまたはE-cadherinとの相互作用を調節するための方法と薬物が開示される。β-カテニンへのCBPの結合を増加させる薬物は、胚幹細胞だけでなく、造血幹細胞、神経幹細胞、皮膚幹細胞、および膵島幹細胞を含む成体幹細胞のβ-カテニン関連増殖を強化させることに関連している。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

哺乳類幹細胞の増殖を維持できる薬物を同定する方法であって、セリン/スレオニンタンパク質ホスファターゼ P P 2 A のサブユニット P R 7 2 / 1 3 0 の少なくとも1つと薬物を接触させるステップと前記少なくとも1つのサブユニットへの前記薬物の結合を検出するステップとを含む方法。

## 【請求項 2】

前記結合を免疫プロッティングによって検出する請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記薬物が式 1 ~ 5 , 7 ~ 1 2 、 1 5 および 1 7 ~ 2 8 の化合物からなる群から選択される請求項 1 に記載の方法。 10

## 【請求項 4】

哺乳類幹細胞に C B P または p 3 0 0 と - カテニンの相互作用を選択的に調節する薬物を投与することを含む、哺乳類幹細胞の増殖を増進させる方法。

## 【請求項 5】

前記薬物が C B P への - カテニンの結合を増加させる請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記薬物が p 3 0 0 への - カテニンの結合を減少させる請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記幹細胞への前記投与が生体外 ( e x v i v o ) で行われる請求項 4 に記載の方法 20

## 【請求項 8】

前記幹細胞が造血幹細胞である請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記幹細胞が有毛細胞である請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記幹細胞が神経幹細胞である請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記幹細胞が膵島細胞である、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 12】

前記幹細胞が皮膚幹細胞である請求項 4 に記載の方法。 30

## 【請求項 13】

前記幹細胞が筋肉幹細胞である請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 14】

前記方法によって、前記化合物がセリン/スレオニンタンパク質ホスファターゼ P P 2 A の異なってスプライスされた調節サブユニット ( d i f f e r e n t i a l l y s p l i c e d r e g u l a t o r y s u b u n i t s ) である P R 7 2 / 1 3 0 の1つと相互作用し、 - カテニン / p 3 0 0 相互作用を犠牲にして - カテニン / C B P の相互作用を増加させる請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 15】

前記方法によって、カノニカルな W n t 刺激と共同して前記化合物が O c t 4 および S o x 2 の発現を増加させ、 c - m y c の発現を減少させる請求項 4 に記載の方法。 40

## 【請求項 16】

精製した W n t 3 a と共同して前記化合物が O c t 4 および S o x 2 の発現を増加させ、 c - m y c の発現を減少させる請求項 1 5 に記載の方法。

## 【請求項 17】

G S K - 3 活性の抑制と共同して前記化合物が O c t 4 および S o x 2 の発現を増加させ、 c - m y c の発現を減少させる請求項 1 5 に記載の方法。

## 【請求項 18】

前記方法によって、カノニカルな W n t 刺激と共同して、前記化合物が幹細胞を分化さ 50

せることなく増殖を引き起こす請求項 14 に記載の方法。

【請求項 19】

前記幹細胞が胚幹細胞である請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記幹細胞が成体幹細胞である請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

I Q - 1 の生物学的活性を有する化合物を哺乳類幹細胞に投与することを含む、哺乳類幹細胞の増殖を増進させるための組成物。

【請求項 22】

前記生物学的活性が p 3 0 0 のリン酸化を防止すること、胚幹細胞培養において N a n g o の発現を維持すること、E S C 培養において O c t 3 / 4 の発現を維持すること、および E S C 培養において R e x - 1 の発現を維持することからなる群から選択される請求項 21 に記載の組成物。

10

【請求項 23】

前記化合物が I Q - 1 である、請求項 21 に記載の組成物。

【請求項 24】

前記方法によって、W n t 3 a または G S K 3 抑制因子のいずれかを用いて、カノニカル W n t 経路の刺激と共同して、前記化合物が M A R K キナーゼ経路 ( M E K または E R K ) および P K C を抑制する請求項 4 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0001】

本発明は、 - カテニンまたは - カテニンとコアクチベータタンパク質 C B P との間、あるいは - カテニンまたは - カテニンとコアクチベータタンパク質 p 3 0 0 との間の相互作用を調節し、幹 / 前駆細胞の増殖 / 脱分化または分化を増進させる化合物と方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

ここ数年間、幹細胞は、適切な細胞の微環境 ( m i c r o e n v i r o n m e n t ) 下において、多様な細胞および組織のタイプに分化し、かつ発達する潜在力によって相当な関心が集められている。成体幹細胞の十分なプール ( p o o l s ) を発生させることを可能にすることによって、細胞置換療法、遺伝子療法、および組織工学を含めたいくつかの重要な生物医学的な応用が可能となる。米国国立衛生研究所 ( N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h ) によれば、幹細胞の治療上の用途は 20 年以内に医学の礎になると見込まれている：

30

“ 最も破壊的な疾病を克服するための新しい治療法の開発につながる幹細胞の巨大な可能性を考慮すると、直ちに利用できる幹細胞のソース ( s o u r c e ) を同定すれば、この研究が医療業務を変革し、暮らしの質と寿命を向上させるという話があり非現実的なものではなくなる ( N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h . S t e m C e l l s : S c i e n t i f i c P r o g r e s s a n d F u t u r e R e s e a r c h D i r e c t i o n s . J u n e 1 7 , 2 0 0 1 ) 。 ”

40

【0003】

しかし、成体幹細胞に対するこのような応用の開発は、培養で機能的な成体幹細胞を増殖させ増やすことができないために著しく妨げられてきた。今日に至るまで、これは幹細胞において非常に難題であることが判明している ( S h e r l e y , J . ( 2 0 0 2 ) S t e m C e l l s , 2 0 : 5 6 1 - 5 7 2 ) 。ここ 10 年間、科学者らは移植のための細胞の数を増加させるために培養で幹細胞を成長させる試みを行ってきた。こういう作業が直面した問題は幹細胞の分化しやすい性質である。この問題は、生後の身体組織において幹細胞固有の非対称的な細胞動態 ( a s y m m e t r i c c e l l k i n e t i c s ) と関連し得るものである ( S h e r l e y , J . ( 2 0 0 2 ) S t e m C e l l s

50

、20:561-572)。幹細胞の数を増加させるために用いられる既存の科学的方法は、2Dのストローマ層上において細胞を培養すること、および様々なサイトカインの混合物の存在下でそれらを成長させることがある(Rebel, V.I., et al. (1994) Blood, 83(1):128-136)。しかし、既存の生体外(ex vivo)の方法のいずれも、増殖を増進させつつ幹細胞の分化を防止することができなかった(Rebel, V.I. et al. (1996) J Hematother, 5(1):25-37)。よって、本技術分野において、培養で成体幹細胞を増殖させ増やすのに用いる化合物および方法が求められている。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0004】

本発明は、 $\beta$ -カテニン(または $\gamma$ -カテニン)とコアクチベータタンパク質CBPおよびp300との間の相互作用を調節し、幹/前駆細胞の増殖/脱分化または分化を増進させる化合物と方法に関するものである。

【課題を解決するための手段】

【0005】

この方法の一実施態様において、薬物は $\beta$ -カテニンのCBPに対する結合を増加させる。前記方法の他の一実施態様において、薬物は $\beta$ -カテニンに対するp300の結合を減少させる。

20

【0006】

前記方法の実施態様において、薬物は $\beta$ -カテニンへのp300の結合を増加させるか、または薬物は $\beta$ -カテニンにへのCBPの結合を減少させる。

【0007】

細胞は本発明の薬物で生体外(ex vivo)で処理することができ、細胞は幹/前駆細胞であってもよい。

【0008】

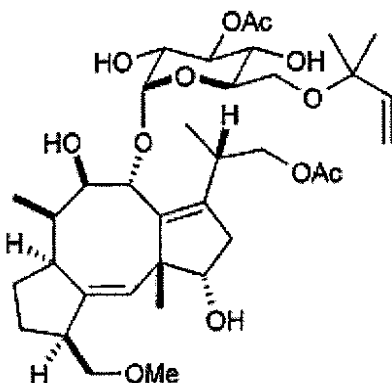
特定の実施態様において、薬物は前記細胞を含む哺乳動物に局所的に投与することができる。

【0009】

他の特定の実施態様において、薬物は14-3-3タンパク質とSer 89がリン酸化されたp300(Ser 89 phosphorylated p300)の相互作用を調節し、薬物はフシコキシンの類似体であってもよく、ここでフシコキシンの類似体は下記の一般式:

30

【化1】



FC-A (FC)

40

を有する。

【0010】

また、本発明は、細胞においてCBPまたはp300と $\beta$ -カテニンの相互作用を調節する方法に関するものであり、該方法において、薬物は $\beta$ -カテニン、CBPまたはp3

50

00とプロリルイソメラーゼ(Pin1)の相互作用を調節し；特定の実施態様において、薬物はCBPとPin1の結合を増加させる。

【0011】

これらすべての実施態様において、薬物は幹細胞の成長を支持できる生体材料に組み込むことができ；幹細胞は造血幹細胞であってもよい。

【0012】

また、本発明は、CBPまたはp300とβ-カテニンの相互作用の調節を含む哺乳類の幹細胞の増殖を増進させる方法に関するものであり；薬物はCBPに対するβ-カテニンの結合を増加させることができ；また、薬物はp300に対するβ-カテニンの結合を減少させることができる。

10

【0013】

幹細胞への投与は生体外(ex vivo)で行うことができ、幹細胞は造血幹細胞、有毛細胞、神経幹細胞、膵島細胞、または胚幹細胞であってもよい。

【0014】

また、本発明は、セリン/スレオニンタンパク質ホスファターゼPP2AのPR72/130の異なってスプライスされた調節サブユニット(adifferentially spliced regulatory subunit)と選択的に相互作用する、IQ-1などの薬物を胚幹細胞に投与することを含む、未分化状態で胚幹細胞を維持する方法に関するものであり、该方法において、β-カテニン/CBPの相互作用を増加させる。

20

【0015】

また、本発明は、セリン/スレオニンタンパク質ホスファターゼPP2AのPR72/130の異なってスプライスされた調節サブユニットと選択的に相互作用する薬物を胚幹細胞に投与することを含む、未分化状態で胚幹細胞を維持する方法に関するものであり、该方法において、β-カテニン/p300の相互作用を減少させる。

【0016】

前記方法の特定の実施態様において、化合物は、Wnt3aまたはGSK3抑制因子を用いるカノニカル(canonical)Wnt経路の刺激と共同して、MAPKキナーゼ経路(MEKまたはERK)およびPCKを抑制する。

【0017】

また、本発明は、幹細胞の自己再生を維持し、かつ/又は増進させるのに適した化合物を同定するためのアッセイに関するものである。そのようなアッセイの1つは、セリン/スレオニンタンパク質ホスファターゼPP2AのPR72/130サブユニットのうちの1つ以上への化合物または薬物の選択的な結合を測定するものである。特定の実施態様において、薬物はIQ-1に類似する活性を有する。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

幹細胞は自己再生(すなわち、新しい幹細胞を作ること)および分化(すなわち、最終的に分化した細胞を発生させること)のプロセスのバランスをとることによって組織の再生および維持を担うものである。このようなバランスは、幹細胞に内在する調節シグナルと微環境からの外部シグナルの統合によって生じる。自己再生と分化間のバランスが攪乱すると、幹細胞枯渇の結果(例えば、再生不良貧血)や自己再生の増加の結果(例えば、癌)として疾病が生じ得る。神経発生において、転写因子Sox1、Sox2およびSox3は未分化状態で神経細胞を維持する役割をする。

40

【0019】

哺乳動物において、幹細胞調節の分子レベルのメカニズムについての大半の知識は造血系の研究から得られたものである。末端の系統(terminal lineages)への分化を調節する分子レベルのメカニズムが広範囲にわたって理解され、その理解が広がっている。しかし、造血幹細胞(HSC)の運命決定を調節するメカニズムの機械的な理解はよく知られていない。除去される時に、HSC自己再生の攪乱(例えば、TNF

50

- P 5 5 - レセプター、p 2 1、R a e 2 8、および B m i - 1 ) または分化の改変 ( 例  
 えば、T E L、P U . 1、F l t - 3、および p 2 7 ) をもたらすいくつかの遺伝子が同  
 定されている。一方、H S C s において、H o x B 4、 $\beta$ -カテニン、およびノッチ ( N  
 o t c h ) シグナルが H S C において過剰発現した場合、これらのシグナルは H S C の自  
 己再生を刺激する。

#### 【 0 0 2 0 】

最近の研究では H S C の自己再生および分化において C B P および p 3 0 0 が重要な役  
 割をすることが明らかになっている。C B P および p 3 0 0 は様々な転写シグナルの分子  
 統合因子として機能する。転写因子によって C B P および p 3 0 0 がプロモーターへ補充  
 された際に、それらは、クロマチンのリモデリング、関連タンパク質のアシル化、および  
 基本転写装置の補充を含めた複数のメカニズムによって転写のコアクチベータとして作用  
 する。C B P および p 3 0 0 は、構造的なレベルにおいて、高度な相同性を有し、あるタ  
 ンパク質 - 結合ドメイン内では 9 3 % までの同一性を有する ( 配列番号 1 および 2 ) 。多  
 くの機能について、前記 2 つのタンパク質は機能上重複しているように見える。しかし、  
 マウスの遺伝子の機能喪失研究によって、H S C において p 3 0 0 と C B P の機能間の違  
 いが明らかとなり、すなわち、C B P の喪失によって不完全な H S C の自己再生がもたら  
 される一方で、p 3 0 0 の喪失によって造血幹細胞の不完全な分化がもたらされた。

10

#### 【 0 0 2 1 】

C B P および p 3 0 0 は H S C 調節に重要であることが示されている既知の転写因子 ( 例  
 えば、H o x B 4、 $\beta$ -カテニン、ノッチ ( N o t c h )、A M L - 1、M L L ) の多  
 くと相互作用することが既に示されている。過去の結果は、H S C 内に、自己再生のため  
 に不可欠な C B P によって特異的に共活性化される転写因子、および分化に非常に必要な  
 p 3 0 0 によって選択的に共活性化されるその他のものなどがあり得ることを示唆する。  
 C B P および p 3 0 0 を区別して用いると見られるシグナル伝達経路 ( シグナル経路 ) の  
 一例は W n t シグナル伝達経路である。W n t シグナル伝達経路は、血液、腸、および皮  
 膚を含む様々な組織の発達および維持に関連した役割を果たすことが明らかになっている  
 。その効果は、幹細胞および前駆細胞のレベルで達成され、自己再生および分化の両方に  
 影響を与える。さらに、胚幹 ( E S ) 細胞の未分化の特徴の維持における W n t シグナル  
 の重要性はよく明らかにされている。重要なことは、W n t シグナルが攪乱される際に、  
 これらの同様の組織において癌の発達が引き起こされ得ることである。

20

30

#### 【 0 0 2 2 】

$\beta$ -カテニン ( 配列番号 3 ) はショウジョウバエ遺伝子のアルマジロの脊椎動物ホモロ  
 グであり、細胞接着、および本明細書において論じられている W n t シグナル経路の両方  
 において機能する。 $\beta$ -カテニン ( 配列番号 4 ) もまた、アルマジロの脊椎動物ホモログ  
 である。 $\beta$ -カテニンおよび  $\beta$ -カテニンは類似する構造および機能を有し、A P C 腫瘍  
 抑制因子によって調節される能力を有する。

#### 【 0 0 2 3 】

W n t シグナル経路の活性化は、T C F ( T 細胞因子 ) /  $\beta$ -カテニン複合体の核での  
 安定化および C B P および p 3 0 0 などの転写コアクチベータの補充を必要とする。 $\beta$ -  
 カテニンは構成的に細胞内で生産され、生体内において、異常な転写活性をもたらす、  
 癌などの病的状態をもたらすレベル以下に  $\beta$ -カテニンのレベルを維持する抑制メカニズ  
 ムが存在する。異常な調節の一例において、最近、E m a m i と同僚らは ( P N A S , 1  
 0 1 , 1 2 6 8 2 - 7 , 2 0 0 4 )、癌細胞において  $\beta$ -カテニンが C B P と優先して結  
 合することを証明した。しかし、 $\beta$ -カテニンが  $\beta$ -カテニン / C B P - 特異的抑制因子  
 を用いることによって C B P と結合しないようにした際には、 $\beta$ -カテニンは p 3 0 0 と  
 結合することができた。 $\beta$ -カテニンの p 3 0 0 への“代替的な”結合は、分化の遺伝子  
 プログラムの実行によって達成された ( T e o e t a l . P N A S s u b m i t t e d ) 。よって、  
 $\beta$ -カテニンは C B P に結合し、それを活性化することによって分化す  
 ることなく増殖を促進させ、p 3 0 0 に結合し、それを活性化することによって分化を開  
 始し、増殖を制限すると考えられる。従って、C B P 及び / 又は p 3 0 0 と  $\beta$ -カテニン

40

50

の相互作用の攪乱は分化または増殖に影響を及ぼすと予想される。

【0024】

幹細胞治療は、様々な細胞のタイプに分化するヒト胎児または成体多能性幹細胞の能力に基づいている。幹細胞は、癌、パーキンソン病、脊髄損傷、火傷、糖尿病、心臓病、リウマチ関節炎、および骨関節炎を含む多くの種々の疾病に対する治療として損傷した細胞を置換するのに、および遺伝子療法に用いることができる (Lazic, S. E. et al. *J Hematother Stem Cell Res*, 12 (6): 635 - 642, Gafhi, Y. et al. *Gene Ther*, 11 (4): 417 - 426)。長い間、幹細胞治療は我々を興奮させる可能性のある医学的な突破口であった。不具合のある患者組織を置換し得る器官 - 特異的な細胞を生じさせることができる、正常幹細胞を患者に注入できることは大きな可能性をもたらすものである。

10

【0025】

胚幹細胞 (ES細胞) は重要な研究ツール及び再生医薬のための潜在資源である。一般的に、ES細胞はマウス胚繊維芽細胞 (MEFs) の支持フィーダー細胞層と共に培養される。前記MEFフィーダー細胞層はES細胞の自己再生能力を維持し自発的な分化を阻害する因子を供給する。これらの煩わしい条件に加えて、MEFs上で成長したヒトES細胞の生体異物汚染の危険によって、ES細胞の増殖のために安全に用いることが可能な化学的に規定された培地の開発が優先される。ハイスループットの細胞ベースのスクリーニングを用いて、MEFフィーダー層または白血病抑制因子 (LIF) 無しでマウスES細胞の増殖を可能にし、かつ自発的な分化を阻害する化合物として低分子IQ-1が同定された。また、IQ-1が、 $\beta$ -カテニンがCBPからp300へコアクチベータの使用を切り替えられないようにすることが確認された。 $\beta$ -カテニン/p300によって媒介される転写を犠牲にして $\beta$ -カテニン/CBPによって媒介される転写を増加させることは幹細胞の多能性維持のために重要である。

20

【0026】

胚の内細胞塊に由来するES細胞は胚繊維芽細胞層上で共培養することができる。最近、Xuら (Xu et al. *Nat. Biotech.* 2001, 19, 971) は、ヒトES細胞をMEF馴化培地を用いるフィーダーがない条件下で成長させることができることを証明した。しかし、MEFsおよびMEF馴化培地における変化、馴化培地においてどのような因子が重要であるかについての知識の欠如および人畜共通の汚染への懸念によって、ES細胞を増殖させる化学的に規定された条件の必要性が強調される。

30

【0027】

インビトロで成人皮膚幹細胞を維持できることによって、火傷患者に培養した皮膚の移植 (engraftment) が可能となっている (Green, H. (1991) *Sci Am*, 265: 96 - 102)。さらに、現在、造血の再構成に用いられる3つの成体幹細胞に関連した移植手段、すなわち骨髄移植 (BMT)、末梢血幹細胞移植 (PBSC T) および臍帯血幹細胞移植 (UCBSC T) がある。最初の2つの造血再構成技術、BMTおよびPBSC Tは、同種ドナーとの一致の問題にかなり悩まされている。移植の成功に必要な一致の程度は、UCBSC TよりはBMTまたはPBSC Tにおいてより厳格であると見られる。しかし、得られる幹細胞が比較的少量であることおよび移植手段当たり1つのみ採られた臍帯血単位が利用できることにより、UCBSC Tを幅広く利用することができない (McCaffrey, P. *Lancet Oncol*, 6 (1): 5, 2005)。この問題に対する1つの解決方法は、臍帯血幹細胞の生体外で増殖させることである。しかし、このような直接的な解決方法を提供するためには克服しなければならない大きなハードルがある。

40

【0028】

幹細胞および癌“幹細胞”

全ての癌の共通する特徴はそれらの無制限な自己再生能力であり、これは正常幹細胞の明らかな特徴でもある。数十年前に、すべての癌細胞の増殖能力は同等ではなく、ごく一部の腫瘍細胞だけが頻繁に増殖できるということが発見された (Hamburger, A

50

W . e t a l . ( 1 9 7 7 ) S c i e n c e , 1 9 7 ( 4 3 0 2 ) : 4 6 1 - 4 6 3 ) 。これは、悪性腫瘍が相当な増殖の潜在力を有する癌幹細胞と制限された増殖能力を有するより分化した癌細胞の別のプールで構成されるという概念を提示した。癌幹細胞の仮設の重要な意味は、正常幹細胞の自己再生と癌幹細胞の増殖との間に機械的な類似性があるということである ( P a r d a l , R . e t a l . ( 2 0 0 3 ) N a t R e v C a n c e r , 3 ( 1 2 ) : 8 9 5 - 9 0 2 ) 。最近の研究では、特定の遺伝子産物は癌細胞の増殖だけでなく、正常な体細胞の幹細胞の自己再生も調節するということが証明された ( P a r k , I K . e t a l . ( 2 0 0 3 ) N a t u r e 4 2 3 : 3 0 2 - 3 0 5 ; L e s s a r d , J . e t a l . ( 2 0 0 3 ) N a t u r e , 4 2 3 ( 6 9 3 7 ) : 2 5 5 - 2 6 0 ) 。これは、増殖性で、かつ未分化な状態を維持するために幹細胞および癌細胞の両方において類似するメカニズムが用いられるということの意味する。

10

【 0 0 2 9 】

#### 幹細胞および癌におけるWntシグナル

Wnt /  $\beta$ -カテニン経路は正常発達および癌の初期および進展の両方において重要なシグナル伝達系を開始させるものである ( G i l e s , R H e t a l . ( 2 0 0 3 ) B i o c h i m B i o p h y s A c t a , 1 6 5 3 ( 1 ) : 1 - 2 4 ; W o d a r z , A . e t a l . ( 1 9 9 8 ) A m u R e v C e l l D e v B i o l , 1 4 : 5 9 - 8 8 ) 。Wntシグナル、特に  $\beta$ -カテニンの核機能は幹細胞の分化だけでなく、維持、増殖においても重要であると証明された ( S o n g , X . e t a l . ( 2 0 0 3 ) D e v e l o p m e n t , 1 3 0 ( 1 4 ) : 3 2 5 9 - 3 2 6 8 ) 。本発明に関連するこのようなシグナル経路の顕著な特徴中のいくつかは図1に要約されている。Wnt /  $\beta$ -カテニン経路は、増殖と分化の両方を促進させることに関与する遺伝子範囲の発現を調節する。Wnt経路の活性化によって、 $\beta$ -カテニンが核に蓄積され、転写因子のTCFファミリーのメンバーに結合し、かつ転写コアクチベータCBPまたはそれと密接に関連したホモログ、p300を補充することによって、転写的に活性を有する複合体が形成されるようになる。しかし、結腸癌の85%以上において、この経路内の突然変異によって、ターゲット遺伝子、例えば、c-myc、サイクリンD1およびスルビピン ( s u r v i v i n ) の構成的な活性化および発現が誘導され、その総ての遺伝子は迅速な細胞増殖のために重要なものである ( K o l l i g s , F T . e t a l . ( 1 9 9 9 ) M o l C e l l B i o l , 1 9 ( 8 ) : 5 6 9 6 - 5 7 0 6 ; T e t s u , O . e t a l . ( 1 9 9 9 ) N a t u r e , 3 9 8 ( 6 7 2 6 ) : 4 2 2 - 4 2 6 ; K i m , P J . e t a l . ( 2 0 0 3 ) L a n c e t , 3 6 2 : 2 0 5 - 2 0 9 ) 。よって、腸上皮における腫瘍形成は、腸陰窩幹細胞のWnt /  $\beta$ -カテニンによって誘導された過剰増殖およびその後継ぐ悪性腫瘍と癌進行をもたらす更なる突然変異の蓄積によって引き起こされたものであると思われる。また、Wntシグナルは、培養において、マウスおよびヒトの胚幹細胞の両方において多能性の維持のために重要であると証明されている ( S a t o , N , e t a l . ( 2 0 0 4 ) N a t M e d , 1 0 ( 1 ) : 5 5 - 6 3 ) 。Wnt経路の多数の成分の発現は、胚幹細胞だけでなく、P19ヒト胚性癌腫細胞株においても明らかである ( W a l s h , J . e t a l . ( 2 0 0 3 ) A P M I S , 1 1 1 ( 1 ) : 1 9 7 - 2 1 1 ) 。

20

30

40

【 0 0 3 0 】

#### Wntおよび造血幹細胞 ( H S C )

造血幹細胞 ( H S C ) の自己再生もWntシグナルによって増進される。マウス由来の培養された骨髓HSCにおける安定した  $\beta$ -カテニンの過剰発現によって、長期間の培養において、放射線照射後のマウスの造血系を再構成する能力によって測定したこれらの細胞数が増加した。さらに、精製したWnt3aは培養において自己再生は増進させたが、HSCの分化は一部のみ抑制した ( R e y a , T . e t a l . ( 2 0 0 3 ) N a t u r e , 4 2 3 ( 6 9 3 8 ) : 4 0 9 - 4 1 4 ) 。

【 0 0 3 1 】

#### Wnt / $\beta$ -カテニンシグナルにおける区別したコアクチベータの使用

50

前述したように、CBPおよびp300の機能はいくつかの研究で十分に説明されており (reviewed in Goodman, R.H. et al. (2000) *Genes Dev*, 14(13): 1553-1577)、マウスの発生中、それらの発現パターンはほぼ同一である (Partanen, A. et al. (1999) *M J Dev Biol*, 43(6): 487-494)。しかし、これらの高度に相同であるコアクチベータは生理的条件下で重複しておらず、別個の転写プログラムを担うことが次第に明らかになっている。Revelら (Rebel, V.I. et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(23): 14789-14794) は、ノックアウトマウスから得た細胞を用いて、p300ではなくCBPの総量がHSC自己再生にとって重要であり、逆に、CBPではなくp300が適切な造血分化のために必須であることを証明した。同じく、Ecknerおよび同僚らは (Roth, J.F. et al. (2003) *Embo J*, 22(19): 5186-5196)、CBPのHAT活性ではなく、p300のヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性 (HAT) が果たす重要な役割を証明した。これらおよび他の研究では、発達中、CBPおよびp300が重複しない、別個の役割を果たすということを明らかに証明するものである。

【0032】

- カテニン/CBP相互作用の低分子の抑制因子および付加的な遺伝子発現プロファイリングを用いる本発明者らの先のケモゲノミクス研究から、Wntシグナルにおいて区別してコアクチベータを使用することが増殖対分化をどのように調節するかを表すモデルが開発された。このモデルの重要な特徴は、例えば、癌や幹細胞において経路のCBPアーム (arm、図10、左側) が分化することなく増殖するために必須であり、その反面、p300アーム (arm、図10、右側) は分化させ、増殖を制限するために重要であるということである。ICG-001は特異的に - カテニン/CBP依存転写 (すなわち、経路の左アーム) を抑制し、よって、癌細胞においてプログラムされた細胞死を選択的に誘導し (Emami, K.H. et al. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 12682-7, 2004)、また、非腫瘍形成前駆細胞、例えば、C2C12筋芽細胞 (図11および12) および3T3-L1前脂肪細胞の分化を誘導する。

【0033】

本発明は、特定のメカニズムにとらわれずに、 - カテニン/p300相互作用 (すなわち、図10の右側経路) を選択的に抑制するか、又は下方調節することによって、多能性幹細胞が分化することなく増殖するようになるという前提に基づくものである。また、本発明は、実施例1にてより詳細に開示するように、あるメカニズムが、セリン/スレオニンタンパク質ホスファターゼPP2AのPR72/130サブユニットの少なくとも1つへの化合物または薬物の選択的な結合を伴うという発見に基づいている。一実施態様において、薬物はIQ-1と類似する活性を有する。

【0034】

セリン/スレオニンホスファターゼPP2Aは、細胞内のシグナル伝達、遺伝子発現、および細胞周期の進行の調節に参与する。PP2Aの主な機能は、セリン/スレオニンキナーゼの活性を妨害することにより、シグナル伝達系を調節することである (20)。PP2Aはマルチサブユニット複合体からなる。この三量体の複合体の核の成分は36kDaの触媒のサブユニット、65kDaの調節サブユニット (PR65) および3番目の可変 (variable) サブユニットであり、これらのうちの1つがPR72/130である。PR72/130は同一遺伝子の組織選択的な異なってスプライスされた形態を示す (21)。PP2AはWntシグナル伝達系を色々なレベルで調節する (22, 23)。最近、PR72/130はWntシグナル経路の負の制御成分であるNkd (Naked cuticle) タンパク質と相互作用し (24)、それによってWntシグナル伝達を調節するということが証明されている (25)。Creightonらは、ゼノプスの胚において、モルフォリノを用いて、NkdのようにPR72が“カノニカルな” Wnt/-カテニンシグナルの“負の”制御因子であり、“カノニカルな” Wntシグナル

伝達から“非カノニカルな”収斂伸長への切り替えに關与することを証明した(25)。

【0035】

造血幹細胞の増殖維持のために、本発明の好ましい薬物はCBP、p300、またはβ-カテニンのうちのいずれか1つの翻訳後修飾に影響を及ぼし、CBPとβ-カテニンの相互作用の選択的な増加またはp300とβ-カテニンの相互作用の選択的な減少を誘導することによって幹細胞の増殖を“調節する”。前記で薬物はCBPまたはp300に直接結合しない。“相互作用する”および“相互作用”は2つまたは3つ以上の分子の間、この場合にはβ-カテニンとCBPまたはp300の間の正常な生物学的関係を意味する。一実施態様において、前記薬物はCBPに対するβ-カテニンの結合を増加させる。別の実施態様において、前記薬物はp300に対するβ-カテニンの結合を減少させる。これらの実施態様のうちのいずれかによって、全体の結果はβ-カテニン経路をターゲット細胞の“増殖/非分化プログラム”の方に偏らせ、本発明における該ターゲット細胞は造血幹細胞、神経幹細胞、または皮膚幹細胞などの成体幹細胞である。薬物の非存在下で幹細胞の増殖がより多くなり、かつ/又は肝細胞の分化がより少なくなる場合、その薬物は幹細胞の増殖を“調節”するものだろう。例えば、図5Cを参照すれば、CBPへβ-カテニンが優先的に結合し、p300への結合が少ないことは、未分化状態で連続して増殖する造血幹細胞の維持と関連しており、造血システム再生治療が必要なヒトなどの哺乳動物の造血システムを再生するのに有用な未分化細胞の数を増殖させる結果をもたらす。このような調節は、例えば、実施例に記述されたアッセイを用いて測定することができる。

10

【0036】

本発明における使用に適した薬物は、Emami et al., PNAS, 101, 12682-7, 2004に記載された共免疫沈降方法を用いてスクリーニングすることができる。簡単に言えば、ターゲット細胞を、HSCの場合において、全長のβ-カテニンまたは全長のp300によってトランスフェクトする。核溶解物を放射標識した検査薬単独または非放射性的検査薬で処理する。結合していない放射標識した検査薬を除去し、放射標識した検査薬の結合を測定する。結果は検査薬が特異的にp300と相互作用するかどうかを示す。

20

【0037】

別の一連の実験では、p300とβ-カテニンの相互作用の抑制を証明することができる。CBP(アミノ酸1-111)、p300(アミノ酸1-111)、およびβ-カテニンのC末端領域(配列番号3)(アミノ酸647-781)の最小結合ドメインを、適切な薬物で処理した哺乳類細胞において発現させて、相互作用を改変し、精製する。β-カテニンを、β-カテニン特異的抗体で被覆したプロテインA-アガロースビーズ(beads)に結合させ、CBP又はp300とインキュベートする。非結合タンパク質を洗浄によって除去し、次いでCBPまたはSer89がリン酸化されたp300に直接結合する化合物をテストするために、β-カテニンとp300との間、およびβ-カテニンとCBPとの間の特異的相互作用を検査薬を使ってテストする。CBPへのβ-カテニンの結合を増加させるか、又はp300へのβ-カテニンの結合を減少させる薬物を、造血幹細胞増殖/分化の適切なモデルを用いて、インビトロでさらにテストする。このようなモデルの1つはRebel, V.I. et al., PNAS 99:14789-14794, 2002に記載されている。

30

40

【0038】

本発明に係る薬物はいくつかのメカニズムのうちの1つを通じて望ましい生物学的作用を達成することができる。いずれの場合において、“増加”または“減少”への言及は、薬物の非存在下での値と関連したアッセイの結果または生物学的作用を指す。例えば、薬物はCBPのアミノ末端の110個のアミノ酸へのβ-カテニンの結合を増加させることができるか、または薬物はp300のアミノ末端の110個のアミノ酸へのβ-カテニンの結合を減少させることができる。p300へのβ-カテニンの結合の減少はp300のSer89のリン酸化を抑制することによって達成することができ、ここで、前記リン酸化はタンパク質キナーゼC-イプシロン(PKC)、カルシウム/カルモジュリン-依存

50

性タンパク質キナーゼ (CaMK)、プロテアーゼ活性化受容体 - 4 (PAR - 4)、プロテアーゼ - 活性化受容体 - 1 (PAR - 1)、または他のセリン/スレオニンタンパク質キナーゼによって、キナーゼカスケードを通じて直接または間接的に触媒される。

【0039】

p300のSer89のリン酸化の減少は、例えば、マイトジェン - 活性化タンパク質キナーゼ4 (MAPK)、サイクリン依存性キナーゼ (CDK)、または他のセリン/スレオニンタンパク質キナーゼを用いて、Ser90のリン酸化を増加させることによって、達成することができる。

【0040】

本発明の好ましい薬物は14 - 3 - 3タンパク質とSer89がリン酸化されたp300の相互作用を調節することができる。このような薬物はフシコキシンの類似体であってもよい。フシコキシンはH<sup>+</sup> - ATPアーゼの活性化を研究するために用いられる真菌毒素である。メカニズムはH<sup>+</sup> - ATPアーゼのC - 末端部分と14 - 3 - 3タンパク質との間の不可逆的な結合を誘導することを伴うものである (Svennilid, F. et al., Plant Cell 11: 2379 - 2392, 1999)。その結果として、C末端の自己阻害ドメインが置換される。同様に、フシコキシンの類似体は14 - 3 - 3タンパク質とSer89がリン酸化されたp300の相互作用を調節ことができ、 $\beta$  - カテニンとp300の相互作用の減少をもたらす。

10

【0041】

他の実施態様において、薬物は $\beta$  - カテニンとまたはCBPもしくはp300とのPin1の相互作用を調節する。本発明の一実施態様において、薬物は $\beta$  - カテニン/CBPとPin1との結合を増加させる。Pin1 (プロリルイソメラーゼ) は腫瘍抑制因子APCと $\beta$  - カテニンの相互作用を抑制することによって癌のメカニズムに関わっている。Pin1の過剰発現はヒト乳癌で起こると報告されている (Ryo, A. et al., Nat. Cell Biol. 3: 793 - 801 (2001))。また、Pin1は正常な精子形成にも関わっている。Atchison, F. W. ら (Biol. Reprod. 69: 1989 - 1997, 2003) は、成体のPin1欠乏マウスが幹細胞の潜在力の加速した枯渇の証拠を示し、Pin1の非存在下において分化の経路に偏る可能性を報告した。

20

【0042】

リン酸化はタンパク質の立体構造に影響を及ぼし、リン酸化された残基を認識することができる特定の適切なドメインヘシグナルトランスデューサーを結合させるための条件を構築する。Pin1は、リン酸化されたS/T - P結合 (Ser/Thr - プロモチーフ) を特異的に認識する。例えば、Pin1はリン酸化されたSer - プロモチーフ (Ser 246 - Pro) を $\beta$  - カテニン内においてAPC - 結合部位の次に直接結合させ、大腸腺腫症タンパク質 (adenomatous polyposis coli protein, (APC)) と $\beta$  - カテニンの相互作用を抑制し、それにより、細胞核へのその移行 (translocation) を増加させる (Ryo, A. et al., Nature Cell Biol. 3: 793 - 801, 2001)。

30

【0043】

また、Pin1は、転写因子とのコアクチベータの相互作用に影響を及ぼし得る。p73は腫瘍抑制因子p53に関連する転写因子である。Pin1により改変されたp73は改変されていないp73よりp300に対してより高い親和性を示した (Montovani, F. et al., Mol. Cell 14: 625 - 636, 2004)。同様に、リン酸化された $\beta$  - カテニンへのPin1の結合は $\beta$  - カテニン/CBP相互作用を増加させることができ、それによって $\beta$  - カテニン/CBP依存性の遺伝子転写は分化を犠牲にして増殖を増進させる。

40

【0044】

本発明の薬物は、造血幹細胞が成長する生体適合材料に入れることができる。その例はHorakら、Biomaterials 25, 5249 - 60, 2004およびHa

50

r risonら、Biomaterials 25, 4977-86, 2004に開示されている。

【0045】

造血幹細胞が本発明の方法のターゲットの実施態様として本明細書に記載されているが、該方法は組織再生に用いることができるいずれの成体哺乳類幹細胞（またはES細胞）にも適用することができる。成体幹細胞は出生後一生の間に増殖する能力、および病んだり、死んだり、喪失したりした細胞を代替するために特定細胞に分化する能力を有する未分化の細胞集団を構成する（Agrawal, S. et al; Trends in Biotechnology 23: 78-83, 2005）。HSCに加え、本発明に従う用途に適した幹細胞としては、神経幹細胞、皮膚幹細胞、筋肉幹細胞、および膵島細胞が挙げられる。

10

【0046】

糖尿病治療の目的はインスリン生産細胞の正常な数および機能を回復することである。Trucco, M. (J. Clin. Invest. 115: 5-12, 2005)は、細胞を生産することができ、膵島由来多能性前駆体と称される成体膵島前駆細胞の存在について論じている。他の幹細胞を細胞へ分化を方向付けるように誘導することができる。細胞のこれらの供給源のいずれかとして、本発明の方法および薬物は、治療的用途のため適切な数の細胞を得るために、増殖を誘導しおよび分化を制限するのに適している。

【0047】

成体神経幹細胞は、成体神経システムの3つの主要系統であるニューロン、星状細胞、およびオリゴデンドロサイトに分化することができる。本発明のこのような適用のためには、生体内原位置において成体神経幹細胞を操作することが生体内において神経発生を達成するために適切であり得る。活性幹細胞は海馬の歯状回の領域内、前脳の脳室下帯（subventricular zone）の成熟した脳に存在し、これらの幹細胞はニューロン、星状細胞、およびオリゴデンドロサイトに分化することができる。また、無活動の幹細胞のプールは脊髄、黒質、視覚神経、および視床下部に存在する（Agrawal, S. et al., 2005）。よって、神経幹細胞の限定されたプールは本発明における調節のために用いることができる。

20

【0048】

皮膚幹細胞は毛髪の成長を増進させるか又は回復するために生体内で増殖するように誘導することができる。最近の証拠は、Wnt経路が多能性幹細胞の特性を得るか、かつ/又は維持する皮膚表皮細胞の能力に関与することを示唆している（Alonso, L. et al.; PNAS 100: 11830-11835, 2003）。皮膚における多能性幹細胞は、それらが毛嚢を形成する前にWntシグナルを受ける。β-カテニンが構成的に安定化した遺伝子導入マウスの皮膚において、成体毛嚢間の表皮（interfollicular epidermis）は胚皮膚の特徴を有し、毛嚢に発達する能力を有し得る（Gat, V., Cell 95: 605-614, 1998）。よって、本発明の薬物および方法は、皮膚において多能性幹細胞の増殖を増進させて、局所的に使用することによって、生体内適用を含めた失われた毛髪の成長を増加させるか、又は置換するために毛嚢を形成することが可能な細胞のリザーバを提供するのに適している。米国特許第6,419,913号には、毛髪喪失を治療するための薬物を含む治療剤の局所送達に適した組成物が開示されている。また、米国特許第6,680,344号には毛髪喪失を治療するために薬物を局所送達することが開示されている。

30

40

【0049】

本発明の薬物および方法によって誘導された増殖後、幹細胞を用いることに加え、用いる前に前記幹細胞を遺伝子治療法によって変化させることもまた可能である。したがって、本発明は、治療用途のための細胞の投与前に、外因性遺伝子を発現する哺乳類幹細胞の増殖を増進させる方法を提供する。また、遺伝子治療を生体内で行って、例えば、神経幹細胞の分化潜在力を変化させることができる（Gomes, W. A. et al., De

50

v. Biol. 255:164-177, 2003; Partridge, W. M., Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 6:683-691, 2003)。

#### 【0050】

哺乳類幹細胞が未分化状態で維持されるかどうかを決定するのに適したアッセイは、OCT4プロモーターの調節下でのレポーター遺伝子の使用を伴う。OCT4は未分化の幹/前駆細胞状態の既知のマーカーであり、そのプロモーター領域は、Gerrard, L. et al., Stem Cells 23:124-133 (2005)に記載されているような、EGFP(高感度緑色蛍光タンパク質(enhanced green fluorescent protein))またはルシフェラーゼのようなレポーター遺伝子に機能的に連結することができる。いずれかのレポーター遺伝子を用いて、細胞を、Gerrardら(2005)に記載された方法を用いてOCT4-レポーター遺伝子コンストラクトでトランスフェクトし、細胞の未分化状態対分化状態に対する本発明に係る薬物の効果を試験する。

10

#### 【0051】

インビトロで幹細胞に対する低分子の効果をテストするための方法としては、Chen, J. K. et al., P. N. A. S. 99:14701-14076 (2002)およびFrank-Kamenetsky, M. et al., J. Biol. 1:10 (2002)によって記載されたものなどが挙げられる。

#### 【0052】

胚幹細胞は研究のための重要なツールであり、基本的には再生医学のための潜在的なリソースである(Hori Y et al Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 2002, 99, 16105, Kim JH et al. Nature, 2002, 418, 50, Lanza RP et al, Nat Med, 1999, 5, 975)。多能性の内細胞塊に由来するマウスES(mES)細胞は血清とLIFで補充された培地においてフィーダー細胞の非存在下で成長することができる。mES細胞の多能性を維持するためのLIFの能力にはSTAT3シグナル経路の活性が必要である。しかし、LIFが前記STAT3シグナル経路を活性化させるという事実にもかかわらず、LIFはhES細胞の未分化状態を維持しない(Humphrey RおよびBeattie G Stem Cells 2004, Daheron LおよびOpitz S Stem Cells 2004)。

20

#### 【0053】

実施例で詳細に示すように、IQ-1は投与量依存的にES細胞増殖および多能性を維持した。培地にWnt3aを補充した場合、IQ-1は血清の非存在下でES細胞増殖を維持できた。重要なことは、Wnt3aプラスIQ-1は、培養において長期間(少なくとも48日間)ES細胞の増殖および多能性を維持するのに十分なものであったことである。Wnt3aおよびIQ-1の組み合わせはP19胚性癌腫細胞においてOct4およびSox2の発現を増加させ、c-mycの発現を減少させた。最近、Boyerら(Cell 122, 947, 2005)は、Oct4およびSox2がヒトES細胞の維持のために必要な遺伝子の実質的な部分のプロモーター/エンハンサーを共に占有するということを証明した。さらに、c-mycが幹細胞の自己再生および分化間のバランスにおいて重要な役割を有し、分化の際に増加すると見られている(Wilson A et al Genes Dev 18, 2747, 2004)。

30

40

#### 【0054】

カノニカルなまたはWnt/-カテニンシグナル伝達はヒトおよびマウスの幹細胞集団の両方の増殖の調節において重要な役割を果たす(Kleber MおよびSommer L Current Op Cell Bio 2004, Willert KおよびBrown J Nature 2003, およびSato NおよびMeijer L Nat. Med 2004)。しかし、数多くの研究では、Wntが多能性を維持する成長因子としての機能を果たすことができるか、またはその代わりに分化を誘導するこ

50

とができ、細胞系統の決定に影響を及ぼし得るということを証明した (Kleber および Sommer 2004, IHe F および Sommer L Cell Mo I L i f e S c i 2005, Murashov A, Pak E Faseb J 2004, Feng Z および Srivastava A BBRC 2004)。

【0055】

最近、本発明者らはこれらの多岐にわたる Wnt / - カテニンシグナル伝達の活性を説明するためのモデルを開発した (図5)。このモデルは、Wnt / - カテニンシグナル経路におけるコアクチベータ CBP および p300 の別々の役割を明確にするものである (Emami et al 2004, Ma et al 2005, Teo et al 2005, McMillan および Kahn 2005)。前記モデルの重要な特徴は、TCF / - カテニン / CBP によって媒介される転写が幹 / 前駆細胞増殖のために重要である一方、TCF / - カテニン / p300 によって媒介される転写への切り替えが、ICG-001 を用いてケモゲノミクスにより (chemogenomically) 誘導されても、内生的に誘導されても、増殖能力をより制限することにより分化のプログラムを開始するために重要であることである。このモデルに基づき、実験を行って、IQ-1 が Wnt / - カテニンシグナル経路において選択的な CBP コアクチベータの使用に影響を及ぼすかどうかを決定した。

【0056】

IQ-1 は対応する p300 / - カテニンの相互作用を犠牲にして、選択的に - カテニン / CBP 相互作用を増進させた。親和性クロマトグラフィーのアプローチを使用して、IQ-1 の分子ターゲットがタンパク質ホスファターゼ PP2A の PR72 / 130 の異なってスプライスされた調節サブユニットであることが本明細書において示された (Bernards R 2004 および in press)。Bernards は、以前に、PR72 が Wnt / - カテニンシグナル伝達の Wnt - 誘導性拮抗剤であるタンパク質 Nkd と相互作用し、PR72 または Nkd の損失が Wnt / - カテニンシグナル伝達の活性化をもたらすことを証明した。IQ-1 はゼブラフィッシュの胚発生および収斂伸長に対し劇的な効果を有していた。IQ-1 の分子ターゲットとして PR72 / 130 を同定することによって、本発明は幹細胞増殖の促進及び / 又は維持に有用な他の薬物を同定するためのアッセイを提供する。

【0057】

所定の成長条件下において、“幹 / 前駆” 集団を増殖する能力は再生医学の領域において派生的な効果を有する (Hori Y et al Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2002, 99, 16105, Kim JH et al. Nature, 2002, 418, 50, Lanza RP et al, Nat Med, 1999, 5, 975)。Wnt シグナル経路は、“幹 / 前駆” 集団の増殖において明らかに重要な役割を果たす (Reya T et al. Nature, 2005, ; 434, 843)。しかし、Wnt シグナル伝達は、また、細胞、組織および器官の分化プロセスおよび発生において重要な役割を果たす。Wnt シグナル伝達のこれら多岐にわたる行動はコアクチベータタンパク質である CBP または p300 の選択的な使用によって明らかに調節されている (Ma et al., Teo et al. および McMillan および Kahn 2005)。コアクチベータ使用の内生的な選択は、複雑な一連の区別された翻訳後修飾によって調節されるように思われる。

【0058】

薬理的に、本発明者らは、以前に ICG-001 で CBP / - カテニン相互作用を遮断し、それによって多岐にわたるプロモーター特異的な効果を有する p300 / - カテニン相互作用への切り替えを促進させることによって直接的にコアクチベータを選択することを示した (Ma et al)。本結果は、翻訳後修飾の調節および Wnt / - カテニン抑制フィードバックの成分との相互作用により、IQ-1 は、また、Wnt / - カテニンのコアクチベータの選択を操作できることを示す。IQ-1 によって Wnt / - カテニン / CBP シグナルを増進させ、かつ Wnt / - カテニン / p300

10

20

30

40

50

の使用への切り替えを妨害することは、MEFsまたは血清のない所定の培地において多能性を維持しつつ、ES細胞の長期間の増殖を可能にするものである。再生医学のために必要な原料を生産するために“幹/前駆”細胞を調節して増殖させることは本発明の重要な成果である。

【0059】

本明細書に記載され、特許請求の範囲に記載された方法を実施するために有用な更なる化合物は、2004年12月27日に出願された特願2006-180763号公報に開示され、教示されている化合物があり、参照によって本明細書に組み込むものとする。前記特許公報の化合物としては特願2006-180763にに記載されているような構造を有する化合物として示されたものなどがあり、その例を下記に示す。

10

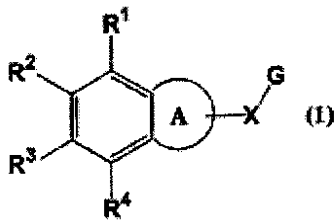
【0060】

化合物としては化学式(化合物)番号として下記に示す次のようなものがある。

【0061】

式1

【化2】



20

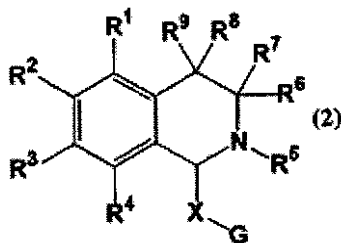
(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、及びR<sup>4</sup>は、それぞれ同一または異なっていてもよく；電子吸引基、電子供与基または水素原子を表す。A環は、少なくとも1つのヘテロ原子を環内に含む5～8員環を表す。Xは、主鎖の原子数が0～10のアルキレン基を表す。原子数0のアルキレン基とは単結合を表す。該アルキレン基を構成する1つ以上のエチレンが、-C=C-基及び/又は-N=N-基及び/又は-CONH-基で置き換わっていてもよい。また、環Aと結合するポンドが二重結合となる基であってもよい。さらに、該アルキレン基は、置換基として、電子吸引基、電子供与基または水素原子を1つ以上有してもよい。Gは、電子吸引基、電子供与基または水素原子を有してもよい芳香族基である。該A環は、-XG基以外の置換基として電子吸引基及び/又は電子供与基を1つ以上有してもよい。

30

【0062】

式2

【化3】



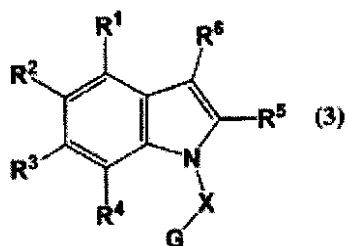
40

(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、X及びGは、前記化学式(1)中の定義と同義である。R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、及びR<sup>9</sup>は、それぞれ同一または異なっていてもよく、電子吸引基、電子供与基または水素原子を表す。)

【0063】

式3

【化 4】



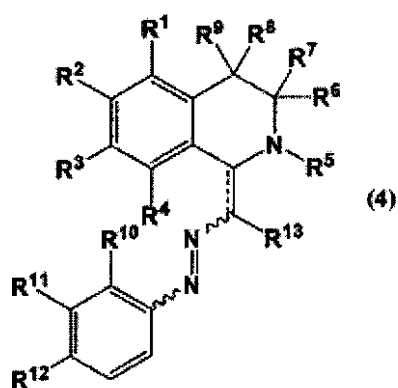
(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、X及びGは、前記化学式(1)中の定義と同義である。R<sup>5</sup>及びR<sup>6</sup>は、それぞれ同一または異なっていてもよく、電子吸引基、電子供与基または水素原子を表す。)

10

【0064】

式 4

【化 5】



20

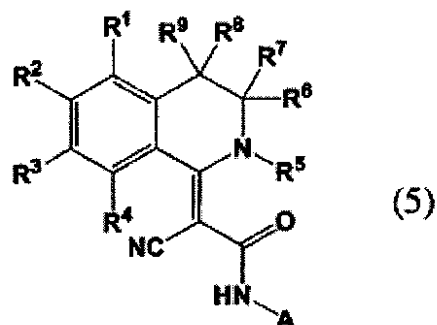
(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、及びR<sup>9</sup>は、前記と同義である。R<sup>10</sup>、R<sup>11</sup>、R<sup>12</sup>、及びR<sup>13</sup>は、それぞれ同一または異なっていてもよく、電子吸引基、電子供与基または水素原子を表す。二重片側破線は単結合または二重結合を表す。二重片側破線が二重結合を表す場合、波線部に関して幾何異性体が存在する。これらの幾何異性体の配置は特に限定されず、それぞれ独立に、E体又はZ体のいずれであってもよい。)

30

【0065】

式 5

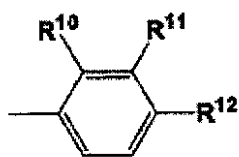
【化 6】



40

(ただし、Aは水素原子もしくは式6：

【化 7】



を表す。

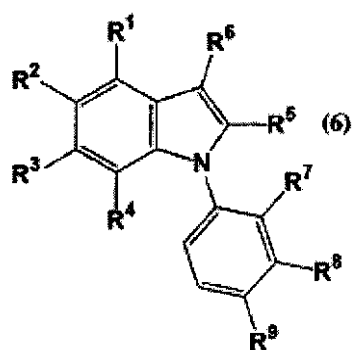
式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、及びR<sup>9</sup>は、前記と同義である。R<sup>10</sup>、R<sup>11</sup>、R<sup>12</sup>は、それぞれ同一または異なってもよく、電子吸引基、電子供与基または水素原子を表す。）

10

【0066】

式 7

【化 8】



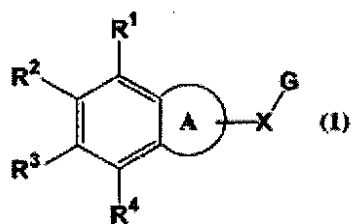
20

(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、及びR<sup>6</sup>は前記と同義である。R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>、及びR<sup>9</sup>は、それぞれ同一または異なってもよく、電子吸引基、電子供与基または水素原子を表す。)

【0067】

式 8

【化 9】



30

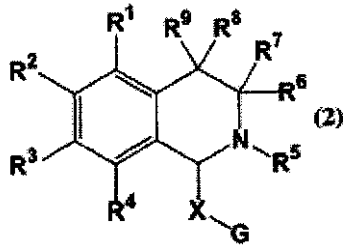
(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、及びR<sup>4</sup>は、それぞれ同一または異なってもよく、電子吸引基、電子供与基または水素原子を表す。電子供与基とは、ベンゼン環へ電子を供与し得る置換基をいい、電子吸引基とはベンゼン環上の電子を吸引する性質を有する置換基をいう。また、Hammettの置換基定数を用いて < 0を電子供与基、> 0を電子吸引基と定義することもできる(基礎有機反応論、橋本静信ら著、三共出版、1997年)。)

40

【0068】

式 9

【化 1 0】

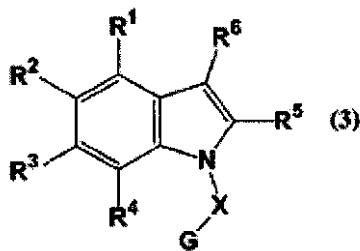


(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $X$ 及び $G$ は、前記と同義である。 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 、及び $R^9$ は、それぞれ同一または異なってもよく、電子吸引基、電子供与基または水素原子を表す。)

【0069】

式 1 0

【化 1 1】

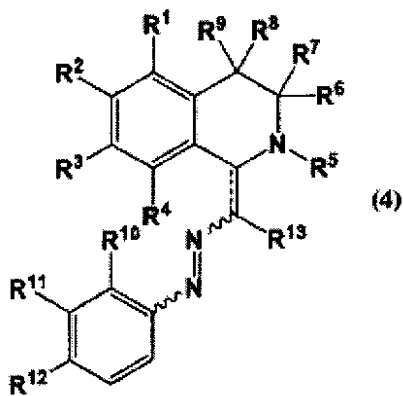


(式中、 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $X$ 及び $G$ は、前記と同義である。 $R^5$ 及び $R^6$ は、それぞれ同一または異なってもよく、電子吸引基、電子供与基または水素原子を表す。)

【0070】

式 1 1

【化 1 2】



式 1 2

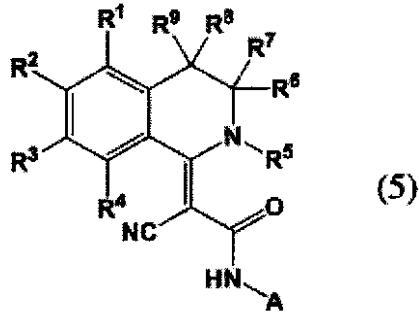
10

20

30

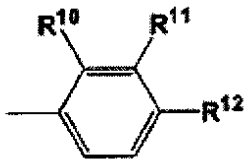
40

【化 1 3】



(ただし、A は水素原子もしくは

【化 1 4】



を表す。)

【0071】

式 (11) 及び (12) 中、 $R^1 \sim R^{13}$  は、それぞれ同一または異なっていてもよく、電子吸引基、電子供与基または水素原子を表す。

【0072】

具体的な例としては次のようなものが挙げられる。

2 - (4 - アセチル - フェニルアゾ) - 2 - (3, 3 - ジメチル - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン) - アセトアミド

2 - (3 - アセチル - フェニルアゾ) - 2 - (3, 3 - ジメチル - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン) - アセトアミド

2 - (4 - プロモ - フェニルアゾ) - 2 - (3, 3 - ジメチル - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン) - アセトアミド

2 - (3 - プロモ - フェニルアゾ) - 2 - (3, 3 - ジメチル - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン) - アセトアミド

2 - (4 - クロロ - フェニルアゾ) - 2 - (3, 3 - ジメチル - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン) - アセトアミド

2 - (3 - クロロ - フェニルアゾ) - 2 - (3, 3 - ジメチル - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン) - アセトアミド

2 - (3, 3 - ジメチル - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン) - 2 - m - トリルアゾ - アセトアミド

2 - (3, 3 - ジメチル - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン) - 2 - p - トリルアゾ - アセトアミド

2 - (3, 3 - ジメチル - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン) - 2 - (4 - メトキシ - フェニルアゾ) - アセトアミド

2 - (3, 3 - ジメチル - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン) - 2 - (3 - メトキシ - フェニルアゾ) - アセトアミド

2 - (3, 3 - ジメチル - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン) - 2 - (4 - ニトロ - フェニルアゾ) - アセトアミド

2 - (3, 3 - ジメチル - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン) - 2 - (3 - ニトロ - フェニルアゾ) - アセトアミド

2 - (3, 3 - ジメチル - 3, 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン) - 2 - (4 - スルファモイル - フェニルアゾ) - アセトアミド

10

20

30

40

50

- 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) -  
 2 - ( 3 - スルファモイル - フェニルアゾ ) - アセトアミド
- 2 - ( 4 - アセチルアミノ - フェニルアゾ ) - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒ  
 ドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - アセトアミド
- 2 - ( 3 - アセチルアミノ - フェニルアゾ ) - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒ  
 ドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - アセトアミド
- 2 - ( 2 - アセチル - フェニルアゾ ) - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ -  
 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - アセトアミド
- 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) -  
 2 - フェニルアゾ - アセトアミド
- ( 4 - アセチル - フェニルアゾ ) - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソ  
 キノリン - 1 - イリデン ) - 酢酸エチルエステル
- 2 - ( 4 - アセチル - フェニルアゾ ) - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 1 , 2 , 3 , 4 - テ  
 ラヒドロ - イソキノリン - 1 - イル ) - アセトアミド
- 2 - ( 4 - アセチル - フェニルアゾ ) - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ -  
 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - N - メチル - アセトアミド
- 2 - ( 4 - アセチル - フェニルアゾ ) - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ -  
 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - N - フェニル - アセトアミド
- 2 - ( 4 - アセチル - フェニルアゾ ) - 2 - ( 2 , 3 , 3 - トリメチル - 3 , 4 - ジヒ  
 ドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - アセトアミド
- ( 4 - アセチル - フェニルアゾ ) - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イ  
 ソキノリン - 1 - イリデン ) - アセトニトリル
- 2 - ( 4 - アセチル - フェニルアゾ ) - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ -  
 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - N , N - ジメチル - アセトアミド
- ( 4 - アセチル - フェニルアゾ ) - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イ  
 ソキノリン - 1 - イリデン ) - 酢酸
- 2 - ( 2 - アセチル - 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1  
 - イリデン ) - 2 - ( 4 - アセチル - フェニルアゾ ) - アセトアミド
- 2 - シアノ - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 -  
 イリデン ) - N - p - トリル - アセトアミド
- 2 - シアノ - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 -  
 イリデン ) - N - m - トリル - アセトアミド
- 2 - シアノ - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 -  
 イリデン ) - N - o - トリル - アセトアミド
- 2 - シアノ - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 -  
 イリデン ) - N - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - アセトアミド
- 2 - シアノ - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 -  
 イリデン ) - N - ( 3 - メトキシ - フェニル ) - アセトアミド
- 2 - シアノ - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 -  
 イリデン ) - N - ( 4 - ニトロ - フェニル ) - アセトアミド
- 2 - シアノ - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 -  
 イリデン ) - N - ( 3 - ニトロ - フェニル ) - アセトアミド
- 4 - [ 2 - シアノ - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン  
 - 1 - イリデン ) - アセチルアミノ ] - 安息香酸エチルエステル
- 3 - [ 2 - シアノ - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン  
 - 1 - イリデン ) - アセチルアミノ ] - 安息香酸エチルエステル
- 2 - シアノ - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 -  
 イリデン ) - N - フェニル - アセトアミド
- 2 - シアノ - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 -  
 イリデン ) - N - ( 2 , 4 - ジメチル - フェニル ) - アセトアミド

10

20

30

40

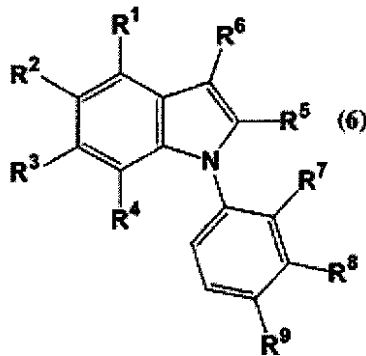
50

2 - シアノ - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 -  
イリデン ) - アセトアミド

【 0 0 7 3 】

式 1 5

【 化 1 5 】



10

( 式中、 $R^1 \sim R^9$  は同一または異なってもよい電子吸引基、電子供与基または水素原子を表す。このうち、好ましくは、 $R^1 \sim R^9$  はアルキル基、アルコキシ基、ヒドロキシル基、ニトロ基、ニトリル基、アセトキシ基、アセトキシアルキル基、酸素原子を含んでもよい環状アルキルアミノアルキル基、ジアルキルアミノアルキル基、ジアルキルアミノビニル基、ヒドロキシアルキルアミノアルキル基、アリールアミノビニル基、アルコキシカルボニル基、ハロゲン原子及び水素原子よりなる群から選ばれる基または原子があげられる。さらには、 $R^1$  および  $R^2$  が水素原子であり； $R^3$  がヒドロキシル基またはアセトキシ基であり； $R^4$  がアセトキシアルキル基、酸素原子を含んでもよい環状アルキルアミノアルキル基、ジ低級アルキルアミノ低級アルキル基、ヒドロキシ低級アルキルアミノ低級アルキル基、又は水素原子であり； $R^5$  が低級アルキル基、ジ低級アルキルアミノビニル基またはアリールアミノビニル基であり； $R^6$  がニトロ基であり； $R^7$ 、 $R^8$ 、及び  $R^9$  が同一であっても異なってもよい低級アルキル基、低級アルコキシ基、または水素原子であることが望ましい。 )

20

【 0 0 7 4 】

化合物の具体的な例としては次のようなもの挙げられる。

30

2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 6 - オール

1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 - オール

2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 - p - トリル - 1 H - インドール - 6 - オール

2 - [ 2 - ( 4 - メトキシ - フェニルアミノ ) - ビニル ] - 3 - ニトロ - 1 - p - トリル - 1 H - インドール - 6 - オール

1 - ( 2 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 - オール

7 - ジメチルアミノメチル - 2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 3 - ニトロ - 1 - p - トリル - 1 H - インドール - 6 - オール

40

1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 7 - ピペリジン - 1 - イルメチル - 1 H - インドール - 6 - オール塩酸塩

2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 7 - モルフォリン 4 - イルメチル - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 - オール

7 - [ ( 3 - ヒドロキシ - プロピルアミノ ) - メチル ] - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 - オール塩酸塩

7 - ジメチルアミノメチル - 2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 - オール

7 - ジエチルアミノメチル - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 - オール

50

7 - ジメチルアミノメチル - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 - p - トリル - 1 H - インドール - 6 - オール

1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 7 - ピペリジン - 1 - イルメチル - 1 H - インドール - 6 - オール酢酸

7 - アセトキシメチル - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 - p - トリル - 1 H - インドール - 6 - イルエステル

2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 3 - ニトロ - 7 - ピペリジン - 1 - イルメチル - 1 H - インドール - 6 - オール

7 - ジメチルアミノメチル - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 6 - オール

7 - ジメチルアミノメチル - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 - オール酢酸

6 - アセトキシ - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 7 - イルメチルエステル

2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 3 - ニトロ - 1 - p - トリル - 1 H - インドール - 6 - オール

2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 3 - ニトロ - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 6 - オール

酢酸 6 - アセトキシ - 2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 7 - イルメチルエステル

1 - ( 4 - クロロ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 - オール

酢酸 2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 6 - ヒドロキシ - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 7 - イルメチルエステル

5 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 4 , 6 - ジニトロ - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 3 - カルボン酸エチルエステル

7 - [ [ ビス - ( 2 - ヒドロキシ - エチル ) - アミノ ] - メチル ] - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 - オール

7 - [ [ ビス - ( 2 - ヒドロキシ - エチル ) - アミノ ] - メチル ] - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 - p - トリル - 1 H - インドール - 6 - オール

7 - ジメチルアミノメチル - 2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 3 - ニトロ - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 6 - オール

2 - ( 6 - ヒドロキシ - 3 - ニトロ - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 2 - イルメチル ) - イソチオウレア

酢酸 2 - ( N , N ' - ジフェニル - カーバムイミドイルスルファニルメチル ) - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 - イルエステル

酢酸 6 - アセトキシ - 1 - ( 4 - アセトキシ - フェニル ) - 2 - ( ジメチルアミノ - ビニル ) - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 7 - イルメチルエステル

2 - ( 2 - ジメチルアミノ - 5 - ヒドロキシ - ベンゾフラン - 3 - イル ) - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 - オール

2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 - オール

5 - プロモ - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 - オール

酢酸 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 - オール

7 - ジメチルアミノメチル - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 3 - カルボニトリル

7 - ジエチルアミノメチル - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 3 - カルボニトリル

10

20

30

40

50

- 2 - ( 2 - ジメチルアミノ - 5 - ヒドロキシ - ベンゾフラン - 3 - イル ) - 6 - メトキシ - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 3 - カルボニトリル
- 6 - メトキシ - 2 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 3 - カルボニトリル
- 2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 6 - メトキシ - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 3 - カルボニトリル
- 5 - ブロモ - 6 - ヒドロキシ - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - カルボニトリル
- 5 , 7 - ジブロモ - 6 - ヒドロキシ - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - カルボニトリル
- 6 - ヒドロキシ - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - カルボニトリル 10
- 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 - p - トリル - 1 H - インドール - 3 - カルボニトリル
- 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 3 - カルボニトリル
- 1 H - フロ [ 2 , 3 - g ] インドール - 3 - 酢酸 , 5 - ヒドロキシ - 1 - ( 4 - メトキシフェニル ) - 2 , 8 - ジメチル , エチルエステル
- 5 - ブロモ - 7 - ジメチルアミノメチル - 6 - ヒドロキシ - 1 - フェニル - 2 - フェニルスルファニルメチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
- 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸
- 5 - ブロモ - 6 - ヒドロキシ - 1 - フェニル - 2 - フェニルスルファニルメチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル 20
- 6 - アセトキシ - 5 - ブロモ - 2 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
- 5 - ブロモ - 7 - ジメチルアミノメチル - 6 - ヒドロキシ - 1 - フェニル - 2 - フェニルスルファニルメチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
- 6 - アセトキシ - 5 - ブロモ - 2 - ブロモメチル - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
- 6 - アセトキシ - 2 - ブロモメチル - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
- 6 - アセトキシ - 2 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル 30
- ピロロ [ 2 , 3 - f ] [ 1 , 3 ] ベンゾキサジン - 3 - 酢酸 , 8 - エチル - 1 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - 2 - メチル - 1 - ( 4 - ニトロフェニル ) - , エチルエステル
- 6 - アセトキシ - 2 - メチル - 1 - ( 2 - トリフルオロメチル - フェニル ) - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
- 1 - ( 2 , 4 - ジメトキシ - フェニル ) - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
- 6 - ヒドロキシ - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
- 1 - ( 4 - エトキシカルボニル - フェニル ) - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル 40
- 1 - ( 4 - シアノ - フェニル ) - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
- 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 - ( 2 - トリフルオロメチル - フェニル ) - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
- 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 - ( 4 - トリフルオロメチル - フェニル ) - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
- 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 - ( 4 - ニトロ - フェニル ) - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
- 1 - ( 4 - ブロモ - フェニル ) - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 50

- 酢酸エチルエステル
  - 1 - ( 4 - フルオロ - フェニル ) - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 - ( 4 - ニトロ - フェニル ) - 5 , 7 - ビス - ピペリジン - 1 - イルメチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 5 , 7 - ビス - ジメチルアミノメチル - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 - ( 4 - ニトロ - フェニル ) - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 - ( 4 - ニトロ - フェニル ) - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 6 - アセトキシ - 1 - ( 4 - クロロ - フェニル ) - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 7 - ジメチルアミノメチル - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 - ( 4 - ニトロ - フェニル ) - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 7 - ジメチルアミノメチル - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 - p - トリル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 1 - ( 4 - クロロ - フェニル ) - 7 - ジメチルアミノメチル - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 1 - ( 4 - ジメチルアミノ - フェニル ) - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 1 - ( 2 - クロロ - フェニル ) - 6 - メトキシ - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 1 - ( 2 - クロロ - フェニル ) - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 6 - アセトキシ - 1 - ( 4 - クロロ - フェニル ) - 2 - メチル - 5 , 7 - ジニトロ - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 1 - ( 4 - クロロ - フェニル ) - 6 - ヒドロキシ - 2 - メトキシ - 2 - メチル - 5 , 7 - ジニトロ - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 6 - アセトキシ - 5 , 7 - ジブromo - 1 - ( 4 - クロロ - フェニル ) - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 5 , 7 - ジブromo - 1 - ( 4 - クロロ - フェニル ) - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 6 - アセトキシ - 5 - ブromo - 1 - ( 4 - クロロ - フェニル ) - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 5 - ブromo - 1 - ( 4 - クロロ - フェニル ) - 6 - メトキシ - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 1 - ( 4 - クロロ - フェニル ) - 6 - メトキシ - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 1 - ( 4 - クロロ - フェニル ) - 6 - メトキシ - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
  - 1 - ( 4 - クロロ - フェニル ) - 6 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 1 H - インドール - 3 - 酢酸エチルエステル
- 【 0 0 7 5 】
- Rで表される低級アルキル基としては、例えば、メチル、エチル、n - プロピル、イソプロピル、n - ブチル、イソブチル、sec - ブチル、tert - ブチル、n - ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、1 - メチルプロピル、n - ヘキシル、イソヘキシル、1 , 1 - ジメチルブチル、2 , 2 - ジメチルブチル、3 , 3 - ジメチルブチル、3 , 3 - ジ

メチルプロピル、2-エチルプロピルなどが挙げられる。好ましくはメチルである。Rで表される低級アルコキシ基としては、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、sec-ブトキシ、tert-ブトキシ、ペントキシ、ヘキシロキシ、ヘプチロキシ、オクチロキシなどが挙げられる。好ましくはメトキシである。

【0076】

Rで表されるハロゲン原子としては、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素などが挙げられるが、好ましくは塩素または臭素である。Rで表される低級アシル基として、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリルなどが挙げられるが、好ましくはアセチルである。Rで表される環状構造を形成してもよい低級アルキル基としてシクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチルなどが挙げられるが、好ましくはシクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチルである。

10

【0077】

Rで表される低級アルコキシカルボニルとして、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニルなどが挙げられるが、好ましくはメトキシカルボニルもしくはエトキシカルボニルである。Rで表されるアミノカルボニルとしては、例えば、 $-CONR_2$  (Rは同一でも異なってもよい水素原子、先に例示した低級アルキル基、及び置換基を有してもよいフェニル基を表す)などが挙げられる。

【0078】

Rで表される二級アミノカルボニル基としては、例えば、 $-CONHR$  (先に例示した低級アルキル基、及び置換基を有してもよいフェニル基を表す)などが挙げられる。また、三級アミノカルボニル基としては、例えば、 $-CONR_2$  (Rは同一でも異なってもよい先に例示した低級アルキル基、及び置換基を有してもよいフェニル基を表す)などが挙げられる。Rで表されるアミノアルキル基としては、例えば、 $-(CH_2)_n-NR_2$  (nは1~8の整数を示すが、好ましくは1である。またRは同一でも異なってもよい水素原子、低級アルキル基、又は環状構造を形成してもよい低級アルキル基(環状構造中には窒素や酸素などのヘテロ原子を1~3個含んでもよい)、及び置換基を有してもよいフェニル基を表す)などが挙げられる。

20

【0079】

Rで表されるアセトキシアルキルとしては、 $-(CH_2)_n-OAc$  (nは1~8の整数を表す)が挙げられる、好ましくはnは1である。

30

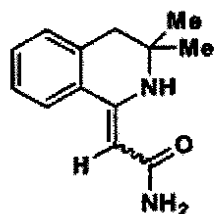
【0080】

他の具体例としては下記の式17~28の化合物が挙げられる。

【0081】

3,3-ジメチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリニデン-1-アセトアミド(式17)

【化16】

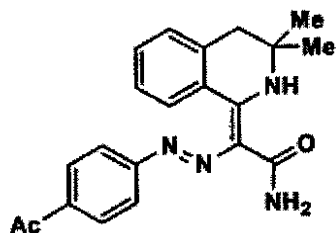


40

【0082】

2-(4-アセチル-フェニルアゾ)-2-(3,3-ジメチル-3,4-ジヒドロ-2H-イソキノリン-1-イリデン)-アセトアミド(式18)

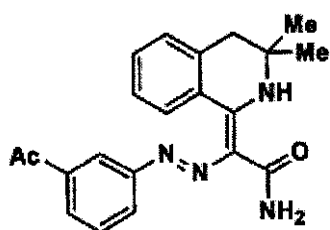
【化 17】



【0083】

2-(3-アセチル-フェニルアゾ)-2-(3,3-ジメチル-3,4-ジヒドロ-2H-イソキノリン-1-イリデン)-アセトアミド(式19) 10

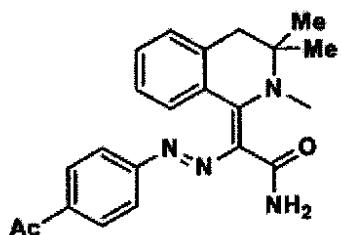
【化 18】



【0084】

2-(4-アセチル-フェニルアゾ)-2-(2,3,3-トリメチル-3,4-ジヒドロ-2H-イソキノリン-1-イリデン)-アセトアミド(式20) 20

【化 19】

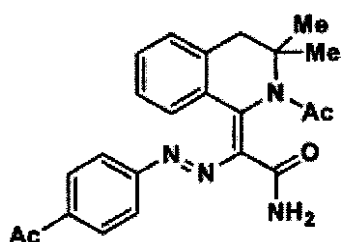


30

【0085】

2-(2-アセチル-3,3-ジメチル-3,4-ジヒドロ-2H-イソキノリン-1-イリデン)-2-(4-アセチル-フェニルアゾ)-アセトアミド(式21)

【化 20】

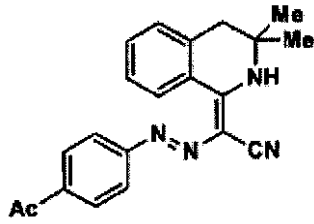


40

【0086】

(4-アセチル-フェニルアゾ)-(3,3-ジメチル-3,4-ジヒドロ-2H-イソキノリン-1-イリデン)-アセトニトリル(式22)

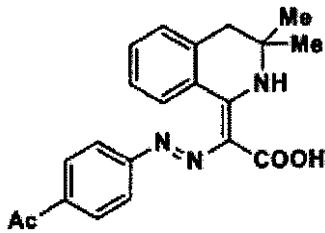
【化 2 1】



【 0 0 8 7】

( 4 - アセチル - フェニルアゾ ) - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - 酢酸 ( 式 2 3 ) 10

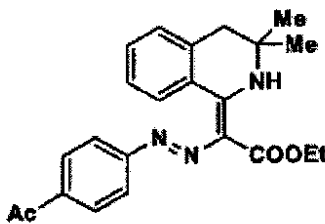
【化 2 2】



【 0 0 8 8】

( 4 - アセチル - フェニルアゾ ) - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - 酢酸エチルエステル ( 式 2 4 ) 20

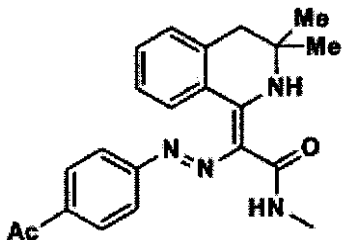
【化 2 3】



【 0 0 8 9】

2 - ( 4 - アセチル - フェニルアゾ ) - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - N - メチル - アセトアミド ( 式 2 5 )

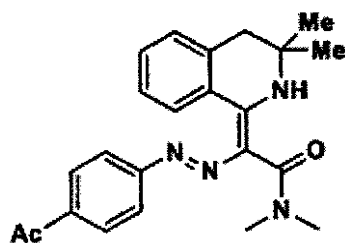
【化 2 4】



【 0 0 9 0】

2 - ( 4 - アセチル - フェニルアゾ ) - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - N , N - ジメチル - アセトアミド ( 式 2 6 ) 40

【化 2 5】

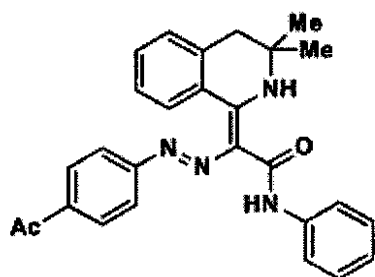


【0091】

10

2 - ( 4 - アセチル - フェニルアゾ ) - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - N - フェニル - アセトアミド ( 式 2 7 )

【化 2 6】

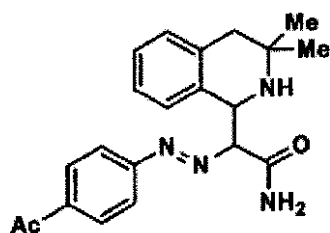


20

【0092】

2 - ( 4 - アセチル - フェニルアゾ ) - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロ - イソキノリン - 1 - イル ) - アセトアミド ( 式 2 8 )

【化 2 7】



30

【0093】

化合物の他の例としては次のものなどが挙げられる：

2 - シアノ - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - N - p - トリル - アセトアミド

2 - ( 4 - アセチル - フェニルアゾ ) - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - アセトアミド

40

2 - ( 3 - クロロ - フェニルアゾ ) - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - アセトアミド

2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - 2 - ( 3 - メトキシ - フェニルアゾ ) - アセトアミド

2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - 2 - ( 3 - ニトロ - フェニルアゾ ) - アセトアミド

2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - 2 - ( 4 - トリルアゾ - フェニルアゾ ) - アセトアミド

2 - ( 3 - アセチル - フェニルアゾ ) - 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) - アセトアミド

50

- 2 - ( 3 , 3 - ジメチル - 3 , 4 - ジヒドロ - 2 H - イソキノリン - 1 - イリデン ) -  
 2 - m - トリルアゾ - アセトアミド
- 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 - フェニル - 1 H - インドール - 6 - オール
- 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 -  
 オール
- 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 - p - トリル - 1 H - インドール - 6 - オール
- 2 - [ 2 - ( 4 - メトキシ - フェニルアミノ ) - ビニル ] - 3 - ニトロ - 1 - p - トリ  
 ル - 1 H - インドール - 6 - オール
- 1 - ( 2 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 -  
 オール
- 7 - ジメチルアミノメチル - 2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 3 - ニトロ - 1 -  
 p - トリル - 1 H - インドール - 6 - オール
- 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 7 - ピペリジン - 1 - イ  
 ルメチル - 1 H - インドール - 6 - オール
- 2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 7 - モルフ  
 オリン - 4 - イルメチル - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 - オール
- 7 - [ ( 3 - ヒドロキシ - プロピルアミノ ) - メチル ] - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニ  
 ル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 - オール
- 7 - ジメチルアミノメチル - 2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 1 - ( 4 - メトキ  
 シ - フェニル ) - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 - オール
- 7 - ジメチルアミノメチル - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニト  
 ロ - 1 H - インドール - 6 - オール
- 7 - ジメチルアミノメチル - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 - p - トリル - 1 H - インド  
 ール - 6 - オール
- 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 7 - ピペリジン - 1 - イ  
 ルメチル - 1 H - インドール - 6 - オール
- 酢酸 7 - アセトキシメチル - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 - p - トリル - 1 H - インド  
 ール - 6 - イルエステル
- 2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 3 - ニトロ  
 - 7 - ピペリジン - 1 - イルメチル - 1 H - インドール - 6 - オール
- 7 - ジメチルアミノメチル - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 - フェニル - 1 H - インド  
 ール - 6 - オール
- 7 - ジメチルアミノメチル - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニト  
 ロ - 1 H - インドール - 6 - オール
- 酢酸 6 - アセトキシ - 1 - ( 4 - メトキシ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1  
 H - インドール - 7 - イルメチルエステル
- 2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 3 - ニトロ - 1 - p - トリル - 1 H - インド  
 ール - 6 - オール
- 2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 3 - ニトロ - 1 - フェニル - 1 H - インド  
 ール - 6 - オール
- 酢酸 6 - アセトキシ 2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 1 - ( 4 - メトキシ - フェ  
 ニル ) - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 7 - イルメチルエステル
- 1 - ( 4 - クロロ - フェニル ) - 2 - メチル - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 6 - オ  
 ール
- 酢酸 2 - ( 2 - ジメチルアミノ - ビニル ) - 6 - ヒドロキシ - 1 - ( 4 - メトキシ - フ  
 ェニル ) - 3 - ニトロ - 1 H - インドール - 7 - イルメチルエステル
- 5 - ヒドロキシ - 2 - メチル - 4 , 6 - ジニトロ - 1 - フェニル - 1 H - インドール -  
 3 - カルボン酸エチルエステル
- 【 0 0 9 4 】

10

20

30

40

50

このような化合物は、特許請求の範囲に記載され、本明細書に開示された方法を実行す

るのにそれらが適切であるかについて実施例に記載されたようにテストすることができる。

【0095】

本明細書に記載された実施例と実施態様は単に説明するためのものであり、これらの観点から様々な変形および変更を当業者であれば想到することができ、そのような変形および変更は本願の精神および範囲内に含まれると理解しなければならない。

【実施例】

【0096】

実施例1～7に用いられた実験手順

10

細胞培養：ESC s、D3ES (ATCC CRL - 1934) を15% FBS (Invitrogen)、0.1mM MEM非必須アミノ酸 (Invitrogen)、0.1mM 2-メルカプトエタノール (Sigma)、2mM L-グルタミン (Invitrogen)、および1,000U/ml LIF (CHEMICON) が補充されたDMEM (Invitrogen) を含有するマウスESC培地中で、マイトマイシンC (で処理したMEFs上で維持した。MEFsを除去するためにトリプシン処理によって細胞を収集し、ゼラチンコーティングを施した培養皿上に20分間プレーティングした。主にESC sからなる非接着性細胞 (non-adherent cells) をゼラチンコーティング培養皿上に再びプレーティングした。非接着性細胞は追加実験のために用いられた。P19細胞をATCCによって推奨された条件に従って培養した。細胞を5% CO<sub>2</sub> インキュベーターにおいて37 °C でインキュベートした。精製されたWnt3aは購入した (R&D Systems)。

20

【0097】

化合物の選別：低分子の選別のために、ESC sのアルカリホスファターゼ活性を測定した。ESC sをLIFのないESC培地においてウェル当たり316 - 1,000個の細胞の密度で96ウェル組織培養プレート (Falcon) にプレーティングした。化合物を4 μg/mlの最終濃度で添加した。細胞を化合物で7日間処理し、試験細胞集団をPBSで洗浄し、p-ニトロフェニルリン酸溶液 (MOSS Inc.) 100 μlを添加した。405nmでの吸光度を吸光度計 (Spectramax, Molecular Devices) で測定した。

30

【0098】

フローサイトメトリー：ESC sのSSEA-1発現の分析をZandstraら (35) に従ってフローサイトメトリーで行った。試験細胞集団を2% FCS (HF) を含有する氷冷したHBSS (Hank's Balanced Salt solution, Invitrogen) で洗浄し、非特異的結合を遮断するために抗マウスCD16/CD32単一クローン抗体を1 μg/100 μl (Pharmingen) 含有するHFで10分間再懸濁した。次に、遮断された細胞を抗SSEA-1 (Kyowa Medex) と共に氷上で40分間、1 x 10<sup>7</sup> 細胞/mlでインキュベートし、続いてFITC-Goat抗マウスIgM抗体 (ZYMED) とともにインキュベートした。次に、SSEA-1発現について分析した細胞を、HFで2回洗浄し、最終洗浄液には2 μg/mlのヨウ化プロピジウム (Dojindo) を添加した。その後、細胞をFACS Calibur (Becton Dickinson) での分析のためにHFに再懸濁した。

40

【0099】

NIH-3T3細胞 (wt)、NIH-3T3 CBP (+/-) 細胞およびNIH-3T3 p300 (+/-) 細胞を (26) に記載された通りにトランスフェクトした。簡単に述べると、Fugene6 (Roche Molecular Biochemicals) を用いて、細胞にTOPFLASHまたはFOPFLASHをトランスフェクトした。トランスフェクション効率はpRL-nullルシフェラーゼプラスミドを用いて規準化した。DUAL-ルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (Promega) を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。

50

## 【0100】

リアルタイムRT-PCR：全RNAを分離し、SuperScript III (Invitrogen)を用いて逆転写した。遺伝子特異的なプライマーを用いてリアルタイムRT-PCR (Sybr Green; Biorad)を行った。

Nanog - F aggggtctgctactgagatgctctg (配列番号5)

Nanog - R caaccactggttttctgccaccg (配列番号6)

GAPDH - F ggtgaaggctcgggtgtgaacgga (配列番号7)

GAPDH - R tgttagtggggtctcgcctcctg (配列番号8)

## 【0101】

一部の実験において、製造者のプロトコルに従って、SuperScript III RT-PCRシステム (Invitrogen)を用いて、抽出した全RNA 2  $\mu$ gを逆転写した。1  $\mu$ lのcDNAを直線範囲において増幅された反応物を得るために、最適化したPCRサイクルを用いて、配列番号5 - 18の遺伝子特異的なプライマーの1つ又は複数を用いたPCRによって増幅させた。

10

## 【0102】

Oct - 3 / 4 - F ggcgttctctttggaaagggtgttc (配列番号9)

Oct - 3 / 4 - R ctcgaaaccacatccttctct (配列番号10)

Rex - 1 - F gtccttatac gatgctggagtg (配列番号11)

Rex - 1 - R aaagctcttctcgcagccat (配列番号12)

Sox - 2 - F gcatgtcctactcgcagcag (配列番号13)

Sox - 2 - R gctgatcatgtcccggagggt (配列番号14)

C - Myc - F accaacagcaactatgacctc (配列番号15)

C - Myc - R aaggacgtagcgcaccgcaac (配列番号16)

MDR - 1 - F tgcttatggatcccagagtgga (配列番号17)

MDR - 1 - R ttgggtgaggatctctccgcgt (配列番号18)

20

## 【0103】

トランスフェクションおよびルシフェラーゼアッセイ：ESCsを0.1%水性ゼラチン溶液でコーティングされた96ウェル細胞培養皿で培養し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いて、0.2  $\mu$ g / ウェルのpSTAT3 - TA - Luc (CLONTECH)をトランスフェクトした。6時間後、細胞を洗浄し、指示された投与量のIQ - 1またはLIFに24時間さらした。トランスフェクション効率をpRL - nullルシフェラーゼプラスミドを用いて基準化した。DUAL - ルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (Promega)を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。

30

## 【0104】

一部の実験において、NIH - 3T3細胞 (wt)、NIH - 3T3 CBP (+ / -)細胞およびNIH - 3T3 p300 (+ / -)細胞を(26)に記載された通りにトランスフェクトした。簡単に述べると、Fugene 6 (Roche Molecular Biochemicals)を用いて、細胞にTOPFLASHまたはFOPFLASHをトランスフェクトした。トランスフェクション効率はpRL - nullルシフェラーゼプラスミドを用いて基準化した。DUAL - ルシフェラーゼレポーターアッセイシステム (Promega)を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。

40

## 【0105】

P19細胞におけるCBP、p300、およびホスホ - セリン89 - p300の検出：P19細胞をWnt3aまたはビヒクル対照群にさらし、その後、10  $\mu$ Mの最終濃度となるようにIQ - 1を添加した。対照群のDMSOは0.025%であった。細胞を24時間インキュベートした。このインキュベーション期間が終わってから細胞を洗浄、溶解し、SDS - PAGEした。ウサギポリクローナル抗体 (A - 22) (1 : 5000) ; および (C - 20) (1 : 5000) (Santa Cruz)を用いて、CBPおよびp3

50

00をそれぞれ検出した。1:100の割合で薄めたカスタムの抗血清を用いてホスホセリン89-p300を検出した。

【0106】

P19細胞におけるCBPまたはp300とβ-カテニンの共免疫沈降:(27)に記載された通りに共免疫沈降を行った。簡単に述べると、P19細胞を10μMのICG-001または10μMのIQ-1(対照群のDMSOは0.025%であった)で24時間処理し、その後、それらを洗浄して溶解した。核の画分を分離し、CBP(A-22)またはp300(N-15)に対する抗体で予め清浄した(preclear)。1:5000の割合で薄めたマウス単クローン抗体(Becton Dickinson)を用いてβ-カテニンを検出した。

10

【0107】

インビトロでリン酸化されたp300のβ-カテニンに対する親和性:キナーゼバッファー(20mM Hepes、pH7.4、10mM酢酸マグネシウム、1mMジチオトレイトール、100μM ATP)中でPKCとともにHA-tagと融合させた組み換え型p300(1-110aa)をインキュベートした。HA-tag抗体を用いてインビトロでリン酸化したp300と混合したP19溶解物において共免疫沈降を行った。ウサギポリクローナル抗体(C20)、1:5000を用いてp300を検出した。1:5000の割合で薄めたマウス単クローン抗体(Becton Dickinson)を用いてβ-カテニンを検出した。

20

【0108】

ターゲットタンパク質の親和性精製:P19細胞を90-100%のコンフルエンスになるように培養した。タンパク質-結合バッファー[PBB、20mM Hepes、pH7.9/100mM NaCl/0.5mM EDTA/0.5% Nonidet P-40/6mM MgCl2/5mM 2-メルカプトエタノール/Complete protease inhibitor mixture(Roche Molecular Biochemicals)のタブレット1個]に細胞を溶解した。室温で一晩、50%DMSOおよび50%PBBを含有するバッファー中で、ビオチン化IQ-1をストレプトアビジン-アガロースビーズ(Amersham Pharmacia)の50%スラリーに結合させた。ビーズを洗浄して結合していないIQ-1を除去し、次いで全細胞溶解物と共にインキュベートした。SDS中で煮沸することによって溶出したタンパク質をクマシーで染色してターゲットタンパク質を検出するか、又は免疫ブロッキングした。

30

【0109】

ゼブラフィッシュ実験:細胞周期の1ステージにおける野生型(AB)ゼブラフィッシュ系統を胚培地において24時間最終濃度1μMのIQ-1で処理した。対照群のゼブラフィッシュ胚を同一濃度のDMSOにおいてインキュベートした。この24時間の処理が終わった後、手作業で胚の絨毛膜を除去してイメージ化した。ゼブラフィッシュ胚を28で維持した。2つの独立した実験から、各グループの少なくとも10個の胚から得た代表的な結果を示す。

40

【0110】

免疫細胞化学および抗体:細胞をPBS中の4%のパラホルムアルデヒドで20分間固定した。標準プロトコルを用いて免疫染色を行った。次の希釈剤において1次抗体を用いた:anti-fetoprotein mouse monoclonal(R&D systems、10ug/ml)、anti-Actin、Smooth muscle Ab-I mouse monoclonal(LAB VISION、1:1)、anti-GATA4 mouse monoclonal(SANTA CRUZ、1:100)、anti-MAP(microtubule associated protein)2 mouse monoclonal(Chemicon、1:200)、III-tubulin mouse monoclonal(Chemicon、1:200)、anti-Oligodendrocyte mouse mono

50

clonal (Chemicon、1:1,000)。2次抗体はAlexa Fluor 488または594 goat anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen、1:200)であった。細胞をx40~200の倍率でOlympus IX 70顕微鏡を用いてイメージ化した。

#### 【0111】

##### 実施例1

##### PR72/130およびES細胞増殖

低分子IQ-1 (Asahi Kasei Pharma、図1)は、 $\beta$ -カテニンがp300の使用を犠牲にしてコアクチベータとしてCBPを使用することを選択的に増加させ、それによって未分化状態に胚(ES)細胞を維持した。Wnt3aとIQ-1の組み合わせによって、Oct4、NanogおよびRex1の発現によって判断される増殖及び多能性の維持が可能となったが、IQ-1単独では、ES細胞の増殖および多能性の維持をもたらすのに充分ではなかった。

10

#### 【0112】

本実施例は、IQ-1の分子ターゲットの同定に関するものである。IQ-1の分子ターゲットを同定するために、P19胚性癌腫細胞由来の全細胞溶解物をビオチン化IQ-1で処理した。対照群のビオチン化合物(図3A、レーン2)と比較して、ビオチン化IQ-1は3つのタンパク質に選択的に結合した(図3A、レーン3)。セリン/スレオニンタンパク質ホスファターゼPP2Aの異なってスプライスされた調節サブユニットPR72/130として72および130 kDaの2つのバンドがマスペクトルによる配列決定(mass spectral sequencing)によって確認された。その後、このことを、免疫プロットングによって確認した(図3B)。

20

#### 【0113】

PR72/130がWntシグナル経路の成分であるネイキッドキューティクル(Naked cuticle, Nkd)タンパク質と相互作用し、それによってWntシグナル伝達を調節することが既に示されていることから(Creyghton, M. P. et al., GenesおよびDev 19:376-386 2005)、IQ-1がこれらのタンパク質に選択的に結合するという事実は、Wntシグナル伝達の調節で見られる効果とよく相関している。ゼノプスの胚においてモルフォリノ(morpholino)を用いて、PR72が、ネイキッドキューティクル(Nkd)のように、Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達の負の調節因子であり、また、非カノニカルな(non-canonical)収斂伸長への切り替えに参与する(Creyghton et al.)ことも証明された。

30

#### 【0114】

##### 実施例2

##### IQ-1のESCsの未分化状態の維持

未分化のESCsのマーカであるアルカリホスファターゼ(AP)の生産を増進させる化合物を同定するために、マウスESCs(D3 ES)を化学的ライブラリー(Asahi Kasei)を用いてスクリーニングした(12)。このスクリーニングから、IQ-1(MW=362.42、図1A)を同定し、該IQ-1は、外因性の白血病抑制因子(LIF)を追加することなく、15%FCSを含有する培地において投与量依存的にAP活性を増加させた(図1B)。IQ-1を用いた処理は未分化ESCマーカである、段階特異的胚性抗原1(Stage Specific Embryonic Antigen 1, SSEA-1)の発現を投与量依存的に増大させた(図1C)。

40

#### 【0115】

IQ-1は培養において、MEFsおよび外因性LIFを添加することなくESCsの長期間増殖を可能にした。マウスD3 ESCsを、15%FCSおよび4 $\mu$ g/ml IQ-1を含有する培地で65日間培養した。ESCsは10日ごとに対数で約2増加するという安定した速度で増殖し続けた(図1D)。

#### 【0116】

50

## 実施例 3

L I Fと関係ないI Q - 1のマウスE S C自己再生の維持

S t a t 3シグナル伝達経路を活性化させることにより、サイトカインL I FはマウスE S Cの対称的な自己再生を維持し、分化を遮断する(13、14、15)。L I FはヒトE S Cの自己再生を維持しなかった(16、17)。N a n o gはE S C sに対する多岐にわたるホメオタンパク質の多能性を維持する因子である(18、19)。N a n o gはE S Cの自己再生を誘導するためのS t a t 3のL I F - 誘発刺激と並行して作用することが示されている。さらに、N a n o gの発現の向上は、S t a t 3活性の非存在下において、E S C sのクローン性増殖および主要幹細胞転写因子O c t 4の発現の維持のために十分なものである(19)。

10

## 【0117】

I Q - 1の作用メカニズムをさらに調べるために、N a n o g発現に対するI Q - 1の効果を測定した。フィーダー細胞なしで、L I Fのみで処理したE S C sはN a n o gレベルをわずかに増加させた反面、I Q - 1は、リアルタイムR T - P C Rによって判断した培養におおけるN a n o g発現を著しく増加させ、維持した(図2A)。培養物からI Q - 1を除去すると、N a n o gレベルの急激な低下がもたらされた(図2B)。N a n o g発現の損失は既にE S Cの分化にと関連していることが示されている(18、19)。I Q - 1の作用がS t a t 3シグナル伝達によって媒介されないということを確認するために、S t a t 3 / ルシフェラーゼレポーター遺伝子コンストラクトを用いた。I Q - 1がN a n o g発現を著しく向上させる反面、L I Fとは異なり、S t a t 3 / ルシフェラーゼの発現に影響を及ぼさず、予想したとおり、有意な反応を導き出した(図2C)。この実施例から、マウスE S Cの多能性の維持に対するI Q - 1の影響はL I F / S t a t 3経路と無関係であると結論付けることができる。

20

## 【0118】

## 実施例 4

P R 7 2 / 1 3 0との相互作用を通じてのI Q - 1のW n tシグナル伝達の調節

本実施例は、ゼブラフィッシュ(*d a n i o r e r i o*)の発生中、収斂伸長を観察することによって“非カノニカル”W n tシグナル伝達に対するI Q - 1の効果を評価するために行った。1  $\mu$  M I Q - 1で処理したゼブラフィッシュ胚は著しい発生上の欠陥を示した(図3C)。特に、収斂伸長の抑制と一致し、P R 7 2のモルフォリノの効果と類似する短い尾が観察された(25)。本実施例と実施例1から、I Q - 1の分子ターゲットはP R 7 2 / 1 3 0であると結論付けることができる。P R 7 2 / 1 3 0とI Q - 1の相互作用はP R 7 2 / 1 3 0 / N k d複合体の分裂をもたらし、カノニカルW n t / - カテニンシグナル伝達および同時に起こる“非カノニカル”収斂伸長への切り替えの“負”の調節を抑制する。

30

## 【0119】

## 実施例 5

I Q - 1によるE S C sの維持のW n t / B - カテニン / C B P依存性。

W n t / - カテニンシグナル伝達は、神経分化を抑制し、幹細胞において多能性を維持すること(1 - 3)が証明されており、前駆細胞の増殖のために重要である(4)。しかし、W n t / - カテニンシグナルは、また、E S C sおよび神経幹細胞の神経分化のためにも必要である(5 - 6)。最近特徴付けられた - カテニン / C B P相互作用の特異的な拮抗剤であるI C G - 0 0 1を用いて、W n t / - カテニンシグナルの多岐にわたる活性を説明するためのモデルを開発した(7、8、26、27)。このモデルの核心となる特徴は、 - カテニン / C B Pによって媒介される転写が“幹 / 前駆”細胞増殖のために重要である反面、 - カテニン / p 3 0 0によって媒介される転写への切り替えは、増殖能力がより制限されることによって分化プログラムを開始するために重要であるということである。

40

## 【0120】

野生型N I H - 3 T 3細胞(w t)、N I H - 3 T 3 C B P (+ / - )細胞、および

50

NIH-3T3 p300 (+/-) 細胞において、Wnt/ $\beta$ -カテニンレポーターコンストラクトTOPFLASHおよびFOPFLASHを用いて、IQ-1が、PP2AのPR72/130サブユニットをターゲティングすることにより、 $\beta$ -カテニンがp300の使用を犠牲にして、コアクチベータとしてCBPを用いることを選択的に増加させ、それにより、未分化状態にESCsを維持するかどうかを決定した(図4A)。 $\beta$ -カテニンを構成的に転位置させた点突然変異体(pt-mut- $\beta$ -cat)を用いて、レポーター活性を刺激した(28)。IQ-1は、wtまたはCBP(+/-) 細胞においてはTOPFLASHおよびFOPFLASHの活性に影響を及ぼさなかったが、p300(+/-) 細胞においてはTOPFLASH活性の2-3倍の増加が観察された(図6)。これは、IQ-1の効果のコアクチベータに特異的であり、p300の発現レベルに依存することを示唆する。

10

## 【0121】

$\beta$ -カテニンコアクチベータの使用に対するIQ-1の効果を実験するために、CBPまたはp300に対する抗体を用いる共免疫沈降を行い、IQ-1の存在下または非存在下において、Wnt3aで処理したP19胚性癌腫細胞を用いるコアクチベータ結合 $\beta$ -カテニンに対する免疫プロットを行った。IQ-1は、Wnt3a、およびDMSO又はCBP/ $\beta$ -カテニン拮抗剤ICG-001のいずれかで処理した細胞に比べ、CBPと結合された $\beta$ -カテニンの相対的な量の劇的な増加をもたらした。細胞分化を誘導する(7)ICG-001は、CBP/ $\beta$ -カテニン相互作用を犠牲にして、p300/ $\beta$ -カテニン相互作用を著しく増大させた(図4B)。

20

## 【0122】

## 実施例6

IQ-1によるp300 Ser89のリン酸化およびそれによる $\beta$ -カテニン/p300相互作用の間接的な減少

“非カノニカル”Wnt経路を通じたシグナル伝達がPKC活性(29)を増加させることができ、p300のSer89をPKC依存的にリン酸化することができること(30)がよく知られている。本実施例は、p300のSer89のPKCによるリン酸化が $\beta$ -カテニンに対するp300の結合に及ぼす効果を評価するために行った。組み換え型p300(1-110aa)を精製されたPKCでリン酸化した。次に、インビトロでリン酸化されたp300をP19細胞からの細胞溶解物に添加し、 $\beta$ -カテニン/p300複合体を共免疫沈降させた。PKCによって予めリン酸化すると、p300/ $\beta$ -カテニン相互作用が増大した(図4C、レーン2をレーン1と比較)。増大した相互作用がPKCによるp300のSer89のリン酸化に依存するものであるかどうかを決定するために、組み換え型p300断片において、セリン残基をアラニンに突然変異させた。Ser89のAla89への突然変異誘発によって、 $\beta$ -カテニンに対する結合のPKCに依存した増加を阻害した(図4C、レーン1および2とのレーン3および4の差異比較)。これは、p300のSer89のリン酸化によって $\beta$ -カテニン/p300相互作用の親和性が増大することを示す。

30

## 【0123】

細胞において $\beta$ -カテニン/p300相互作用を増加させるためのこのようなリン酸化依存メカニズムの生理学的な関連性を決定するために、P19細胞を精製したWnt3aにさらし、IQ-1またはDMSO対照群のいずれかで処理した。免疫プロットによって判定したように、Wnt3aで刺激されたP19細胞をIQ-1で処理すると、p300のSer89のリン酸化レベルの劇的な減少を示し(図4Dの一番上、レーン2および3の比較)、その反面、p300の総量はIQ-1によって影響を受けなかった(図4Dの中間、レーン2および3の比較)。これらのような結果に基づき、IQ-1は、p300のSer89のリン酸化を負に調節することによって $\beta$ -カテニン/p300相互作用の親和性を減少させ、 $\beta$ -カテニン/CBPの使用を増加させると結論付けることができる。

40

## 【0124】

50

## 実施例 7

I Q - 1 および W n t 3 a を含有する無血清培地における E S C s の長期間維持

W n t 3 a および I Q - 1 で処理した P 1 9 細胞のリアルタイム R T - P C R は、O c t 4、S o x 2 ( 3 1 ) および M D R - 1 ( 3 2 ) を含めた “ 幹 / 前駆 ” マーカーの発現の増加を示し、W n t 3 a と共に D M S O で処理した細胞 ( 表 1 ) に比べて c - m y c ( 3 3 ) 発現の減少を示した。4  $\mu$  g / m l の I Q - 1 と併せての 1 5 % K S R ( 血清代替培地 ) への精製した W n t 3 a ( 1 0 0 n g / m l ) の添加は、アルカリホスファターゼのレベルの増加および長期間 ( 4 8 d a y s ) の E S C の多能性維持のために充分であり、I Q - 1 および 1 5 % F C S で得られた結果と類似するものであった ( 図 7 )。W n t 3 a 単独または I Q - 1 単独は、いずれも K S R 培地において E S C s の未分化状態を維持するのに充分ではなかった ( 図 8 )。W n t 3 a 単独は増殖を誘導したものの、幹細胞マーカー O c t 4、N a n o g または R e x 1 の発現を維持するのに充分ではなかった。しかし、W n t 3 a および I Q - 1 の組み合わせは、O c t 4、N a n o g および R e x 1 の発現によって判断される増殖および多能性の維持を可能にした ( 図 9 A、B、および C )。I Q - 1 および W n t 3 a による E S C s の処理は、4 8 日後に胚様体を形成する能力 ( 図 5 A、左側パネル ) と、3 個すべての胚葉由来組織に分化 ( 図 5 B ) させる能力によって判断される E S C s の多能性を維持した。I Q - 1 の除去によって、急速な ( 3 日以内 ) 多能性喪失および胚様体を形成する能力喪失がもたらされた ( 図 5 A、右側パネル )。このような実施例に基づき、I Q - 1 は、W n t /  $\beta$ -カテニン / C B P 依存シグナル伝達を増加させ、W n t /  $\beta$ -カテニン / p 3 0 0 によって媒介される転写への切り替えを阻害することにより、長期間マウス E S C の多能性を維持するのに充分であったと結論付けることができる。

【 0 1 2 5 】

【 表 1 】

	$\Delta\Delta$ CT IQ-1
Sox-2	4.31
MDR-1	1.69
Oct4	0.39
c-myc	-2.01

上記表 1 に、R T - P C R によって測定した、幹細胞維持に関連する遺伝子に対する I Q - 1 処理の効果を示す。前記値は対照群遺伝子の  $\beta$ -アクトチンからの C T で示す。

【 0 1 2 6 】

これらの実施例は、精製した W n t 3 a と共同して I Q - 1 が、血清の非存在下で長期の培養期間中 ( 少なくとも 4 8 日 )、マウス E S C の増殖および多能性を維持するのに充分であることを示す。I Q - 1 と W n t 3 a の処理は、E S C の維持に重要な転写因子 O c t 4 および S o x 2 の発現を上方制御した。最近、B o y e r らは、O c t 4 および S o x 2 がヒト E S C s の維持に必要な遺伝子の実質的な部分のプロモーター / エンハンサーを共に占有することを証明した ( 3 1 )。前記実施例で証明したように、I Q - 1 は c - m y c の発現を下方制御する。c - m y c は幹細胞の自己再生および分化の間のバランスに重要な役割を果たすと見られ、分化時に増加する ( 3 3 )。

【 0 1 2 7 】

親和性クロマトグラフィーによるアプローチを用いて、I Q - 1 の分子ターゲットがセリン / スレオニンタンパク質ホスファターゼ P P 2 A の異なってスプライスされた調節サ

ブユニット PR72 / 130 であることが決定された。これは、PR72 が “カノニカル” Wnt /  $\beta$ -カテニンシグナル伝達の Wnt 誘導性拮抗剤 (24) であるタンパク質 Nkd (25) と相互作用するという点で非常に興味深いものである。PR72 モルフォリノを用いて観察された結果 (25) と同様に、IQ-1 はゼブラフィッシュ胚の発生中、“非カノニカル”収斂伸長に対して劇的な効果を示した。“カノニカル”から “非カノニカル” Wntシグナルへの切り替えにおいて、2つのスプライスバリエント PR72 および PR130 の役割に対する議論は非常に複雑なものになると見られる。最近、Bernardsらは、PR72 とは異なり、PR130 が様々なアッセイにおいて Nkd の効果のうちいくつかを拮抗することができることを証明した。しかし、PR130 モルフォリノはゼノプス胚における体節 (発生および尾形成に影響を及ぼす (34))。よって、ゼブラフィッシュ胚の発生に対する IQ-1 の効果は、スプライスバリエントのすべてを潜在的に抑制することと一致する。特定のメカニズムにとらわれずに、前記結果は PR72 / 130 と IQ-1 の相互作用が PR72 / 130 と Nkd の複合体の分裂をもたらし、それによって Wntシグナル伝達を調節するモデルと一致する。前記ゼブラフィッシュ発生に対する形態学上の効果は、IQ-1 がカノニカル Wnt /  $\beta$ -カテニンシグナル伝達および “非カノニカル”収斂伸長への同時切り替えの “負の”調節を抑制するモデルと一致する (図5C)。

10

## 【0128】

PKCによる組み換え型 p300 のインビトロでのリン酸化において、“非カノニカル” Wntシグナル伝達によって活性化した酵素は p300 に対する  $\beta$ -カテニンの親和性を増加させた。さらに、細胞において、IQ-1 は p300 の全体の細胞レベルに影響を及ぼすことなく、p300 の Ser89 において Wnt によって刺激されたリン酸化を著しく減少させた。IQ-1 が p300 の Ser89 におけるリン酸化状態を減少させることができるメカニズムは不明であって、現行の研究課題である。

20

## 【0129】

IQ-1 は、対応する  $\beta$ -カテニン / p300 相互作用を犠牲にして、 $\beta$ -カテニン / CBP 相互作用を選択的に増進させた。IQ-1 は、Wnt /  $\beta$ -カテニン / CBP によって媒介される転写を増大させ、Wnt /  $\beta$ -カテニン / p300 によって媒介される転写への切り替えを防止することにより、MEFs または血清なしで多能性を維持すると同時にマウス ESCs の長期間の増殖を可能にする。

30

## 【0130】

Wnt /  $\beta$ -カテニンシグナル伝達において、区別されたコアクチベータの使用は、“幹 / 前駆”状態の維持、増殖能力がより制限されることによる分化の開始および “カノニカル” から “非カノニカル” な Wntシグナル伝達への切り替えにおいて重要な調節因子であると見られる。Wnt によって媒介される多能性に対する IQ-1 の効果は、Nkd / PR72 / PP2A 複合体によるカノニカル Wnt /  $\beta$ -カテニンシグナル伝達の “負の”調節の抑制に関連し、それにより、 $\beta$ -カテニン / p300 によって誘導される転写を犠牲にして  $\beta$ -カテニン / CBP によって誘導される転写を増加させる。

## 【0131】

所定の成長条件下において、“幹 / 前駆”集団を増殖する能力は再生医学の分野で重要な結果であり、実施例はそのような用途を裏付けるものである。

40

## 【0132】

- 1 Willert, K., Brown, J. D., Danenberg, E., Duncan, A. W., Weissman, I. L., Reya, T., Yates, JR 3<sup>rd</sup> & Nusse, R. (2003) *Nature* **423**, 448-452.
- 2 Haegeler, L., Ingold, B., Naumann, H., Tabatabai, G., Ledermann, B. & Brandner, S. (2003) *Mol. Cell Neurosci.* **24**, 696-708.
- 3 Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. & Brivanlou, A. (2004) *Nat. Med.* **10**, 55-63.
- 4 Chenn, A. & Walsh, C. A. (2002) *Science* **297**, 365-369. 10
- 5 Otero, J. J., Fu, W., Kan, L., Cuadra, A. E. & Kessler, J. A. (2004) *Development* **131**, 3545-3557(2004).
- 6 Muroyama, Y., Kondoh, H. & Takada, S. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 915-921.
- 7 Teo, J. L., Ma, H., Nguyen, C., Lam, C. & Kahn, M. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12171-12176.
- 8 McMillan, M. & Kahn, M. (2005) *Drug Discov. Today* **10**, 1467-1474.
- 9 Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D., & Carpenter, M. (2001) *Nat. Biotech.* **19**, 971-974. 20
- 10 Lu, J., Hou, R., Booth, C. J., Shih-Hung Yang, S and Snyder, M. (2006) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **103**, 5688-5693.
- 11 Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G. M., Hayek, A. & Ding, S. (2006) *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **103**, 6907-6912.
- 12 Pease, S., Braghetta, P., Gearing, D., Grail, D. & Williams, RL. (1990) *Dev. Biol.* **141**, 344-352.
- 13 Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M. & Rogers D. (1988) *Nature* **336**, 688-690. 30
- 14 Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A. & Gough, N. M. (1988) *Nature* **336**, 684-687.
- 15 Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., & Smith, A. (1998) *Genes Dev.* **12**, 2048-2060.
- 16 Humphrey, R. K., Beattie, G. M., Lopez, A. D., Bucay, N., King, C. C., Firpo, M. T., Rose-John, S. & Hayek, A. (2004) *Stem Cells* **22**, 522-530.
- 17 Daheron, L., Opitz, S. L., Zaehres, H., Lensch, W. M., Andrews, P. W., Itskovitz-Eldor, J. & Daley, G. Q. (2004) *Stem Cells* **22**, 770-778. 40
- 18 Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama,

- 19 Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. & Smith, A. (2003) *Cell* 113, 643-655.
- 20 Mumby, M. C. & Waler, G. (1993) *Physiol. Rev.* 73, 673-699.
- 21 Hendrix, P., Mayer-Jackel, R. E., Cron, P., Goris, J., Hofsteenge, J., Merlevede, W., Hemmings, B. A. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 15267-15276.
- 22 Seeling, J. M., Miller, J. R., Gil, R., Moon, R. T., White, R. & Virshup, D. M. (1999) *Science* 283, 2089-2091.
- 23 Ratcliffe, M. J., Itoh, K. & Sokol, S. Y. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 35680-35683. 10
- 24 Zeng, W., Wharton, K. A. Jr, Mack, J. A., Wang, K., Gadbow, M., Suyama, K., Klein, P. S., Scott, M. P. (2000) *Nature* 403, 789-795.
- 25 Creighton, M. P., Roel, G., Eichhorn, P. J. A., Hijmans, E. M., Maurer, I., Destrée, O. & Bernards, R. (2005) *Genes. Dev.* 19, 376-386.
- 26 Emami, K. H., Nguyen, C., Ma, H., Kim, D. H., Jeong, K. W., Eguchi, M., Moon, R. T., Teo, J. L., Kim, H. Y., Moon, S. H., et al. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12682-12687.
- 27 Ma, H., Nguyen, C., Lee, K. S. & Kahn, M. (2005) *Oncogene* 24, 3619-3631. 20
- 28 Korinek, V., Barker, N., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. & Clevers, H. (1997) *Science* 275, 1784-1787.
- 29 Kohn, A. D. & Moon, R. T. (2005) *Cell Calcium* 38, 439-446.
- 30 Yuan, L. W. & Gambee, J. E. (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 40946-40951.
- 31 Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G. et al. (2005) *Cell* 122, 947-956.
- 32 Feuring-Buske, M. & Hogge, D. E. (2001) *Blood* 97, 3882-3889.
- 33 Wilson, A., Murphy, M. J., Oskarsson, T., Kaloulis, K., Bettess, M. D., Oser, G. M., Pasche, A. C., Knabenhans, C., Macdonald, H. R. & Trumpp, A. (2004) *Genes Dev* 18, 2747-2763. 30
- 34 Creighton, M. P., Roel, G., Eichhorn, P. J. A., Vredeveld, L. C., Destrée, O. & Bernards, R. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 5397-5402.
- 35 Zandstra, P. W., Le, H. V., Daley, G. Q., Griffith, L. G. & Lauffenburger, D. A. (2000) *Biotechnol Bioeng.* 69, 607-617.

## 【 0 1 3 3 】 40

特定の実施態様および実施例を含む前述の詳細な説明は本発明を説明するためのものであって、本発明を限定するものではない。数多くの他の変形および変更は本発明の真の精神を逸脱することなく達成することができ、本明細書で言及または引用した刊行物はすべての図面および表を含めたそれらの内容全体を、それらが本明細書の明白な教示と不一致ではない範囲で参照によって組み込むものとする。

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 1 3 4 】

【 図 1 A 】 図 1 A は、I Q - 1 が E S C s の未分化状態を維持することを示し、I Q - 1 の構造を示す。すべてのエラーバーは平均 ± S D を示す。

【 図 1 B 】 図 1 B は、I Q - 1 が E S C s の未分化状態を維持することを示す。I Q - 1 50

は投与量依存的にアルカリホスファターゼ活性を維持する。すべてのエラーバーは平均 ± S Dを示す。

【図 1 C】図 1 C は、I Q - 1 が E S C s の未分化状態を維持することを示す。I Q - 1 は投与量依存的に S S E A - 1 発現を維持する。S S E A - 1 発現は I Q - 1 を添加してから 7 日目に分析した。すべてのエラーバーは平均 ± S Dを示す。

【図 1 D】図 1 D は、I Q - 1 が E S C s の未分化状態を維持することを示す。I Q - 1 は E S C s が M E F フィーダー細胞または L I F がなくても少なくとも 65 日間未分化状態で増殖することを可能にした。4 μ g / m l I Q - 1 で補充された培地において、E S C s を 6 c m の皿当たり 1 X 1 0 <sup>5</sup> ~ 1 X 1 0 <sup>6</sup> 細胞の比率で毎週 2 ~ 3 回継代し、カウントした。すべてのエラーバーは平均 ± S Dを示す。

【図 2 A】図 2 A は、I Q - 1 が L I F に関係なく E S C s の自己再生を維持することを示す。I Q - 1 は L I F に比べて N a n o g 遺伝子発現を著しく増加させる。フィーダー細胞がないシステム下において、I Q - 1 ( 4 μ g / m l ) または L I F ( 1 0 0 0 U / m l ) の存在下で 2 1 時間培養した E S C s から m R N A を分離した。N a n o g に対するリアルタイム R T - P C R を行った。0 日の N a n o g の対照群の発現レベルを 1 とした。すべてのエラーバーは平均 ± S Dを示す。

【図 2 B】図 2 B は、I Q - 1 が L I F に関係なく E S C s の自己再生を維持することを示す。I Q - 1 の除去によって E S C s における N a n o g 遺伝子の発現が減少した。フィーダー細胞がないシステム下において、I Q - 1 ( 4 μ g / m l ) の存在下で 3 日間培養された E S C s から I Q - 1 を除去した。この期間の終了時に、N a n o g 遺伝子発現を分析するために m R N A を分離し、リアルタイム R T - P C R を行った。すべてのエラーバーは平均 ± S Dを示す。

【図 2 C】図 2 C は、I Q - 1 が L I F に関係なく E S C s の自己再生を維持することを示す。I Q - 1 の効果はルシフェラーゼレポーターアッセイによって判断したものであり、S t a t 3 シグナル経路を通じて媒介されなかった。p S T A T 3 - T A - L u c レポーターでトランスフェクトした、フィーダー細胞のない E S C s を所定投与量の I Q - 1 または L I F にさらした。すべてのエラーバーは平均 ± S Dを示す。

【図 3 A】図 3 A は、I Q - 1 が P R 7 2 / 1 3 0 との相互作用によって W n t シグナルを調節することを示す。I Q - 1 の分子ターゲットの親和性クロマトグラフィー分離は実験手順に記載された通りに行った。7 2 k D a および 1 3 0 k D a ( 標識された ) において 2 つのバンドは、マスペクトルによる配列決定によってセリン / スレオニンタンパク質ホスファターゼ P P 2 A の異なってスプライスされた調節サブユニット P R 7 2 / 1 3 0 として同定した。

【図 3 B】図 3 B は、I Q - 1 が P R 7 2 / 1 3 0 との相互作用によって W n t シグナルを調節することを示す。前記 2 つのバンドを同定するために、P R 7 2 / 1 3 0 抗血清を用いて免疫プロットングを行った。

【図 3 C】図 3 C は、I Q - 1 が P R 7 2 / 1 3 0 との相互作用によって W n t シグナルを調節することを示す。図 3 C : I Q - 1 はゼブラフィッシュにおいて発生上の欠陥を起こす。1 - 細胞ステージのゼブラフィッシュ胚は 1 μ M I Q - 1 ( 下側 ) または D M S O 対照群 ( 上側 ) で 2 4 時間処理された。その結果は 3 つの独立した実験から少なくとも 1 0 個の胚の代表的なものである。

【図 4 A】図 4 A は、I Q - 1 の E S C s の維持が W n t / - カテニン / C B P に依存することを示し、W n t / - カテニンコアクチベータの切り替えのモデルを示す。

【図 4 B】図 4 B は、I Q - 1 の E S C s の維持が W n t / - カテニン / C B P に依存することを示す。I Q - 1 は p 3 0 0 / - カテニン複合体を犠牲にして C B P / - カテニン複合体を増加させた。P 1 9 細胞を I Q - 1 、C B P / - カテニン I C G - 0 0 1 または D M S O 対照群で補充された W n t 3 a で処理した。核溶解物は抗 - C B P または抗 - p 3 0 0 抗体によって共免疫沈降し、- カテニンに対して免疫プロットングを行った。

【図 4 C】図 4 C は、I Q - 1 の E S C s の維持が W n t / - カテニン / C B P に依存

10

20

30

40

50

することを示す。PKC 依存的に p300 Ser 89 のリン酸化は p300 / - カテニン相互作用を増加させた。PKC を用いたインビトロでのリン酸化後、野生型 p300 (1-110 aa) および変異 p300 (p300 S89A) を P19 溶解物と混合し、HA-tag を用いて共免疫沈降した。p300 (上側) または - カテニンローディング対照群 (下側) についてのウエスタンブロット分析を行った。レーン 1: p300 / - カテニン結合、レーン 2: PKC リン酸化 p300 / - カテニン結合、レーン 3: S89A p300 / - カテニン結合、レーン 4: PKC リン酸化 S89A p300 / - カテニン結合。

【図 4 D】図 4 D は、IQ-1 の ESCs の維持が Wnt / - カテニン / CBP に依存することを示す。IQ-1 は p300 のリン酸化を減少させた。P19 細胞を IQ-1 または DMSO (対照群) で処理し、精製した Wnt3a にさらした。p300 または Ser 89 の位置にてリン酸化された p300 に特異的な抗体を用いて細胞溶解物を免疫ブロッキングした。レーン 1: 負の対照群、レーン 2: Wnt3a プラス DMSO 対照群、一番上のパネル: ホスホ Ser 89 p300 免疫ブロット、中央のパネル: p300 免疫ブロット、レーン 3: Wnt3a プラス IQ-1、一番上のパネル: ホスホ Ser 89 p300 免疫ブロット、中央のパネル: p300 免疫ブロット。

【図 5 A】図 5 A は、長期間培養した ESCs の多能性を示す。長期間培養した ESCs は、3 日間の懸濁培養において胚様体を形成するように誘導された。Wnt3A および IQ-1 (4  $\mu$ g/ml) が存在する培地で 48 日間培養した ESCs は胚様体を形成することができた (左側)。ESCs は IQ-1 非存在下で 3 日間培養した後、胚様体を形成する能力を失う (右側)。

【図 5 B】図 5 B は、長期間培養した ESCs の多能性を示す。IQ-1 処理した ESCs 由来の胚様体を 7 ~ 14 日間培養して (付着培養)、更なる分化を誘導した。 - フェトプロテイン、平滑筋アクチン、GATA4、MAP2、 - III チューブリンおよび乏突起膠細胞に対する免疫蛍光染色は、IQ-1 の存在下において長期間培養した ESCs が多能性を維持することを証明した。

【図 5 C】図 5 C は、長期間培養した ESCs の多能性を示し、IQ-1 作用の提案されたメカニズムを示すモデルを示す。

【図 6】図 6 は、TCF / - カテニンレポーター遺伝子分析を示す。TCF / - カテニンレポーターコンストラクト TopFlash を、IQ-1 の存在下または非存在下において構成的に活性を有する - カテニンとともに、NIH-3T3 細胞 - wt、CBP (+ / -) および p300 (+ / -) にコトランスフェクトした。Fopflash レポーターに対する IQ-1 の効果はなかった。

【図 7】図 7 は、IQ-1 および精製した Wnt3a で補充された無血清培地を用いるフィーダー細胞のないシステムにおける ESCs の長期間培養を示す。ESCs は 15% KSR、4  $\mu$ g/ml IQ-1 および 100 ng/ml Wnt3a で培養された。ESCs を 6 cm の皿当たり  $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  細胞の比率で毎週 2 ~ 3 回継代させ、細胞をカウントした。

【図 8】図 8 は、IQ-1 による ESC 増殖および多能性の維持が 15% KSR 培地において Wnt シグナルに依存することを示す。15% FCS または 15% KSR で補充された、IQ-1 を含有する培地において 7 日間培養した ESCs の AP 活性。Wnt3a の添加は、15% FCS を含有する培地と同じレベルに 15% KSR を含有する培地において 7 日間培養した ESCs の AP 活性を増加させた (エラーバーは  $\pm$  S.D. を示す)。

【図 9 A】図 9 A は、MEF フィーダー細胞なしで 42 日間 IQ-1 および Wnt3a で補充された 15% KSR で培養した ESCs に対して行われたリアルタイム RT-PCR 示す。42 日の培養期間にわたって、IQ-1 および Wnt3a が存在する培地で培養した ESCs は多能性マーカー、Nanog の発現を維持する。0 日における発現レベルを 1 とした。

【図 9 B】図 9 B は、MEF フィーダー細胞なしで 42 日間 IQ-1 および Wnt3a で補充された 15% KSR で培養した ESCs に対して行われたリアルタイム RT-PCR

10

20

30

40

50

示す。42日の培養期間にわたって、IQ-1およびWnt3aが存在する培地で培養したESCsは多能性マーカー、Oct3/4の発現を維持する。0日における発現レベルを1とした。

【図9C】図9Cは、MEFフィーダー細胞なしで42日間IQ-1およびWnt3aで補充された15%KSRで培養したESCsに対して行われたリアルタイムRT-PCRを示す。42日の培養期間にわたって、IQ-1およびWnt3aが存在する培地で培養したESCsは多能性マーカー、Rex-1の発現を維持する。0日における発現レベルを1とした。

【図10】図10は、核においてCBPまたはp300との選択的な相互作用から生じる - カテニン作用の2つの考えられるメカニズムの概略図である。

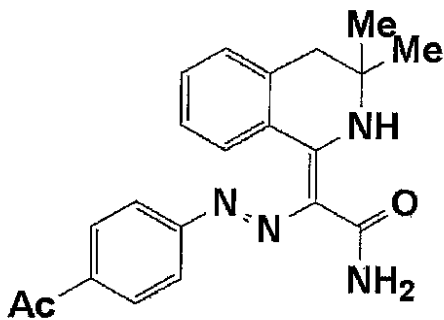
【図11】図11は、成長培地単独と比較して、10 $\mu$ M濃度のICG-001が、成長培地において、分化培地と同様に、C2C12筋芽細胞の分化を誘導したことを図示する。

【図12】図12は、分化培地と同様に、C2C12筋芽細胞の分化が成長培地において10 $\mu$ M ICG-001によって誘導されたことを図示する。

10

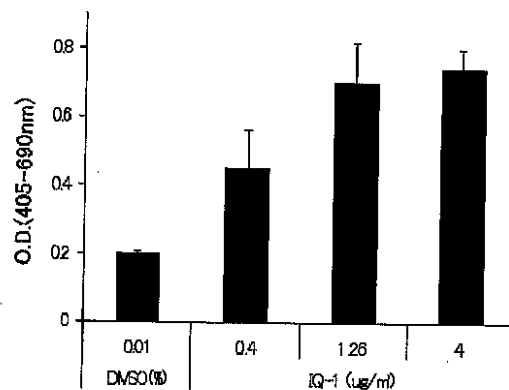
【図1A】

Figure 1A

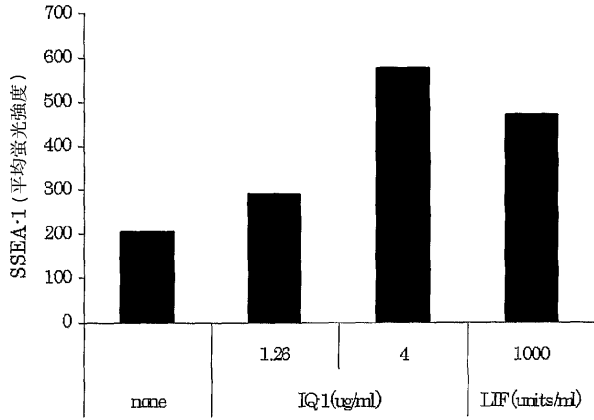


【図1B】

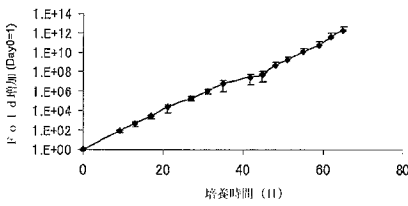
Figure 1B



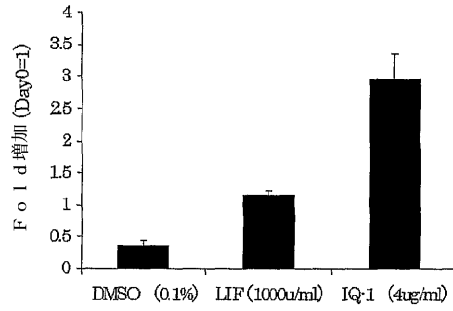
【 図 1 C 】



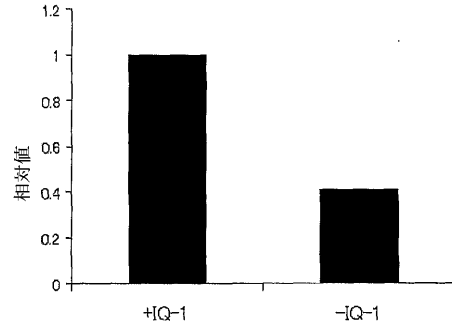
【 図 1 D 】



【 図 2 A 】

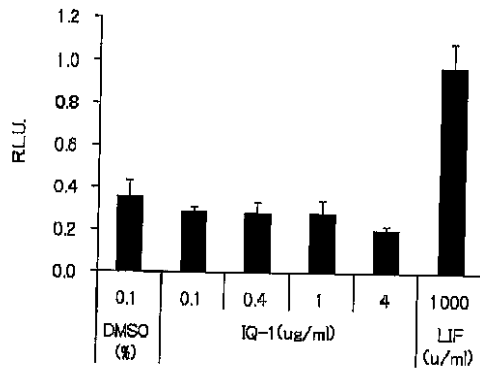


【 図 2 B 】



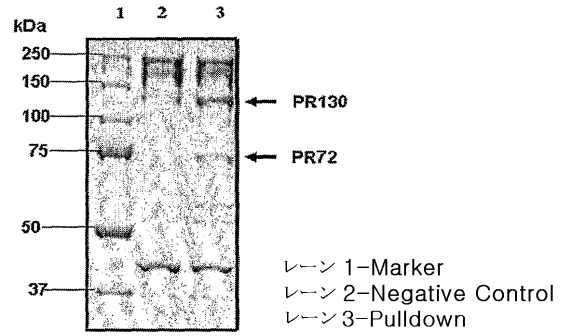
【 図 2 C 】

Figure 2C

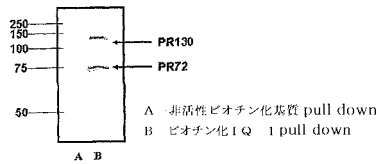


【 図 3 A 】

親和性に対するクマシー染色

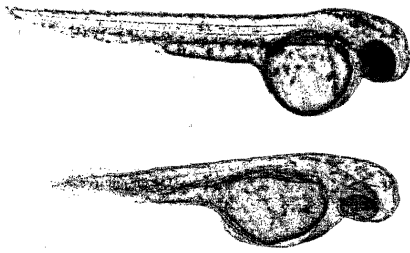


【 図 3 B 】

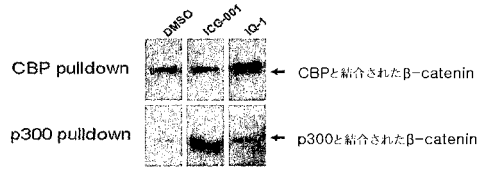


【 図 3 C 】

Figure 3C

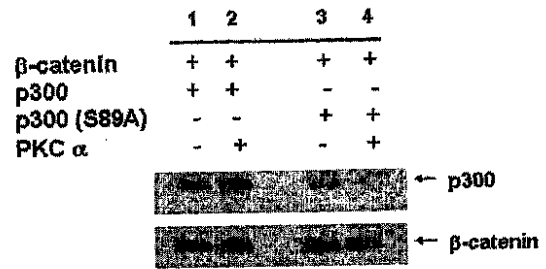


【 図 4 B 】

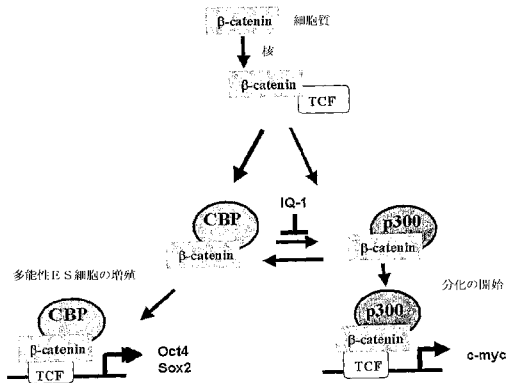


【 図 4 C 】

Figure 4C

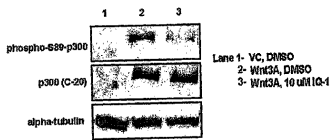


【 図 4 A 】

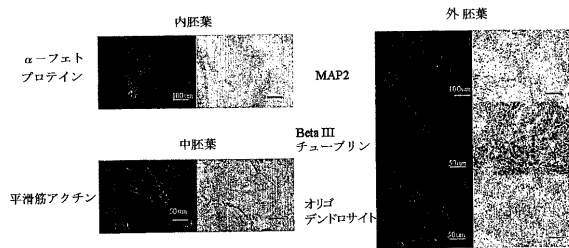


【 図 4 D 】

Figure 4D

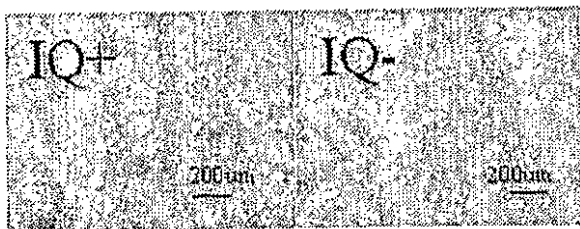


【 図 5 B 】



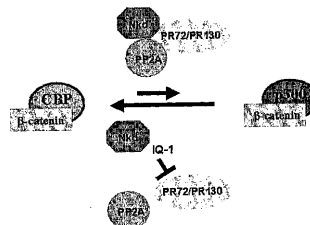
【 図 5 A 】

胚様体 (Embryoid body)

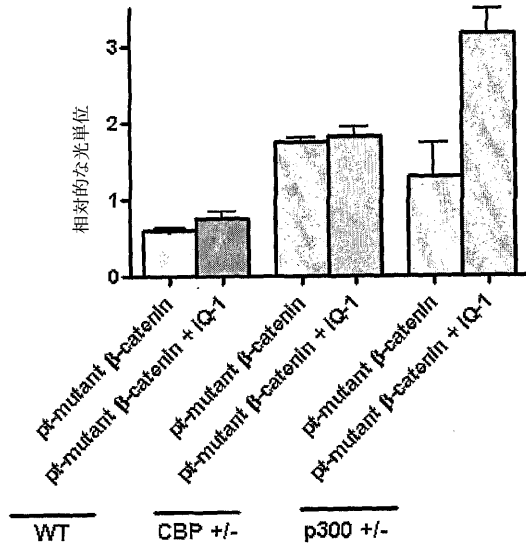


【 図 5 C 】

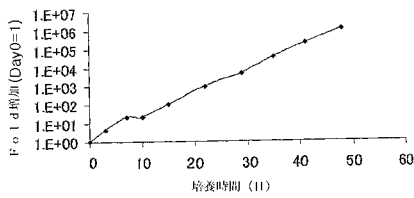
Figure 5C



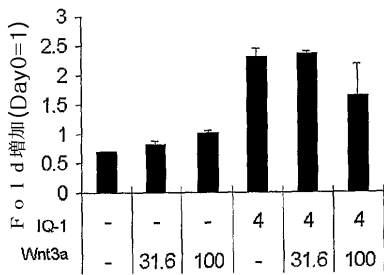
【 図 6 】



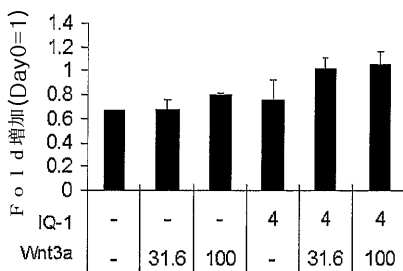
【 図 7 】



【 図 9 A 】

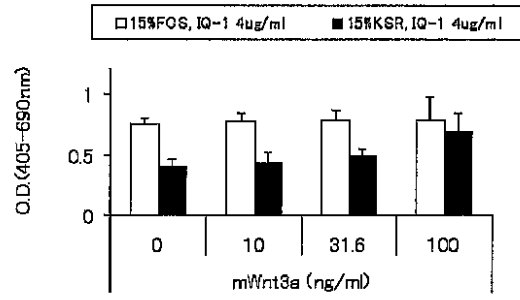


【 図 9 B 】

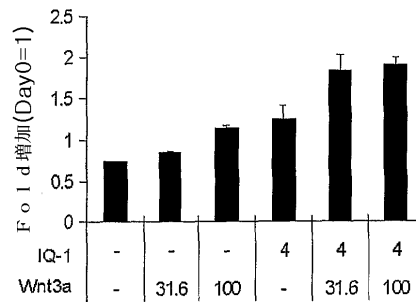


【 図 8 】

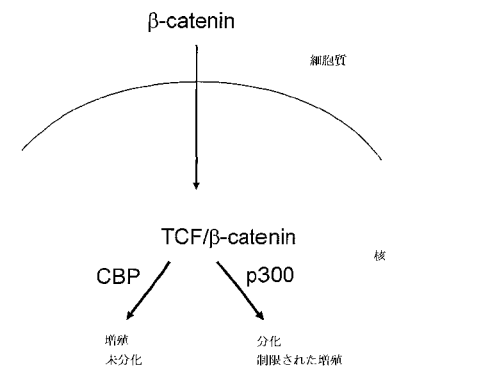
Figure 8



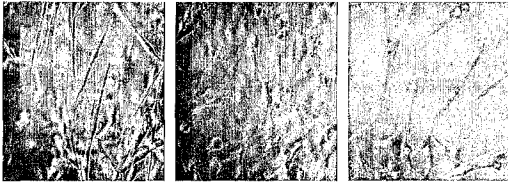
【 図 9 C 】



【 図 10 】



【 図 1 1 】

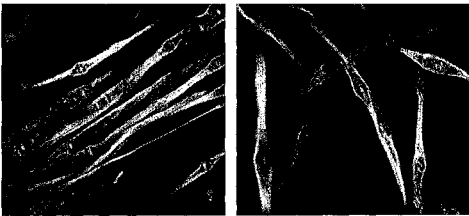


分化培地

成長培地

成長培地 +  
10 $\mu$ M ICG-001

【 図 1 2 】



分化培地

成長培地 +  
10 $\mu$ M ICG-001

【 配 列 表 】

2009517085000001.app

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2006/045515
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. G01N33/50 G01N33/52 G01N33/68 C12N5/00 G01N33/573		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N C12N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, Sequence Search		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2005/153941 A1 (MIYABAYASHI TOMOYUKI [JP] ET AL) 14 July 2005 (2005-07-14) the whole document claims 1-49 paragraph [0253]	1-3
A	WO 03/104442 A (ES CELL INTERNAT PTE LTD [AU]; PEBAY ALICE MARIE [AU]; PERA MARTIN FRE) 18 December 2003 (2003-12-18) the whole document claims 1-108	-/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 March 2007		25/06/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Jenkins, Gareth

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2006/045515

(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>RUEDIGER RALF ET AL: "Alterations in protein phosphatase 2A subunit interaction in human carcinomas of the lung and colon with mutations in the Abeta subunit gene" ONCOGENE, vol. 20, no. 15, 5 April 2001 (2001-04-05), pages 1892-1899, XP002426557 ISSN: 0950-9232 the whole document</p>	1-3
A	<p>CREYGHTON MENNO P ET AL: "PR72, a novel regulator of Wnt signaling required for naked cuticle function" GENES &amp; DEVELOPMENT, vol. 19, no. 3, 1 February 2005 (2005-02-01), pages 376-386, XP002426558 ISSN: 0890-9369 the whole document</p>	1-3
A	<p>MCMILLAN ET AL: "Investigating Wnt signaling: a chemogenomic safari" DDT - DRUG DISCOVERY TODAY, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, vol. 10, no. 21, 1 November 2005 (2005-11-01), pages 1467-1474, XP005124585 ISSN: 1359-6446 the whole document</p>	1-3
A	<p>DATABASE Geneseq [Online] 2 June 2003 (2003-06-02), "Human DITHP intracellular signalling protein." XP002426565 retrieved from EBI accession no. GSP:ABR41330 Database accession no. ABR41330 the whole document</p>	1-3

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2006/045515**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

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

see additional sheet

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

1-3 (full)

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2006 /045515

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: claims 1-3 [full]

Screening method of claim 1.  
---

Inventions 2-29: claims 4-24 [partial]

Compounds corresponding to formulae 1-28, respectively.  
---

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2006/045515

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 2005153941	A1	14-07-2005	AU 2004257966 A1	27-01-2005
			EP 1640449 A1	29-03-2006
			WO 2005007838 A1	27-01-2005
			KR 20060056901 A	25-05-2006
WO 03104442	A	18-12-2003	CA 2488425 A1	18-12-2003
			EP 1511838 A1	09-03-2005
			GB 2405642 A	09-03-2005
			JP 2006505248 T	16-02-2006
			US 2005266553 A1	01-12-2005
			US 2004214319 A1	28-10-2004

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 31/472 (2006.01)	A 6 1 K 31/472	
A 6 1 K 31/404 (2006.01)	A 6 1 K 31/404	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4C084 AA17 MA63 NA10 NA14 ZB222  
 4C086 AA01 AA02 BC13 BC30 EA10 MA01 MA04 NA10 NA14 ZB22

专利名称(译)	培养中细胞无血清生长		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009517085A</a>	公开(公告)日	2009-04-30
申请号	JP2008543385	申请日	2006-11-27
[标]申请(专利权)人(译)	钟网页制药株式会社		
申请(专利权)人(译)	Chon'we制药公司		
[标]发明人	ミシエルカーン		
发明人	ミシエル カーン		
IPC分类号	C12Q1/42 A61K45/00 A61P43/00 G01N33/53 A61K31/704 A61K31/472 A61K31/404		
CPC分类号	G01N33/6872 C12N5/0606 C12N2500/90 C12N2501/415 C12N2501/999 C12Q1/42 G01N33/5005 G01N33/5058 G01N33/5061 G01N33/507 G01N33/5073 G01N33/52 G01N33/573 G01N2333/916 G01N2500/04		
FI分类号	C12Q1/42.ZNA A61K45/00 A61P43/00.107 G01N33/53.D A61K31/704 A61K31/472 A61K31/404		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QQ33 4B063/QS33 4C084/AA17 4C084/MA63 4C084/NA10 4C084/NA14 4C084/ZB222 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/BC13 4C086/BC30 4C086/EA10 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/NA10 4C086/NA14 4C086/ZB22		
代理人(译)	杉村健二 野田优子		
优先权	60/740173 2005-11-28 US		
其他公开文献	JP2009517085A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了用于调节CBP或p300与β-连环蛋白或γ-连环蛋白的相互作用的方法和药物。药物，增加了CBP对β-连环蛋白，不仅胚胎干细胞，造血干细胞，神经干细胞，在关系结合来加强皮肤干细胞，和成体干细胞，包括胰岛干细胞β-连环蛋白相关的增长那里。

