

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年8月18日(18.08.2016)



(10) 国際公開番号

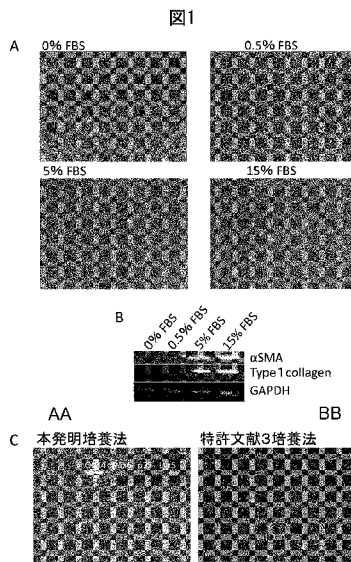
WO 2016/129654 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 11/02* (2006.01)
A61L 27/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/054028
- (22) 国際出願日: 2016年2月10日(10.02.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-025869 2015年2月12日(12.02.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人 東京大学(THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 島 伸行(SHIMA, Nobuyuki); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 山上 聡(YAMAGAMI, Satoru); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 天野 史郎(AMANO, Shiro); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 青木 篤, 外(AOKI, Atsushi et al.); 〒1058423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR PREPARING CORNEAL ENDOTHELIAL PRECURSOR CELLS

(54) 発明の名称: 角膜内皮前駆細胞の調製方法



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide: a method for preparing corneal endothelial cells having a pump function and precursor cells thereof; corneal endothelial cells and precursor cells thereof prepared using said method; and a method for producing a corneal endothelial cell sheet for transplant, using said corneal endothelial cells and the precursor cells thereof. By culturing corneal endothelial cells under low serum conditions, it becomes possible to grow corneal endothelial precursor cells while maintaining productivity and undifferentiated properties, and the aforementioned problem was resolved by using the corneal endothelial cells in an unchanged state or by inducing differentiation in same.

(57) 要約: ポンプ機能有する角膜内皮細胞及びその前駆細胞を調製する方法、当該方法により調製された角膜内皮細胞及びその前駆細胞、並びに当該角膜内皮細胞及びその前駆細胞を用いて移植用角膜内皮細胞シートの製造方法の提供を目的とする。角膜内皮細胞を低血清下で培養することにより、増殖性と未分化性を維持した角膜内皮前駆細胞を増殖させることが可能となり、角膜内皮前駆細胞をそのまま、又は分化誘導して用いることにより、上記課題を解決した。

AA Culture method of the present invention
BB Culture method of Patent Document 3

WO 2016/129654 A1



MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユー
ラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

明 細 書

発明の名称：角膜内皮前駆細胞の調製方法

技術分野

[0001] 本発明は、角膜内皮前駆細胞の調製方法に関する。より具体的には、低血清の培養培地中で角膜内皮細胞を培養することを含む、角膜内皮前駆細胞の調製方法に関する。また、本発明は、上記の調製方法により調製された角膜内皮前駆細胞、並びに角膜内皮前駆細胞がキャリア上に担持された角膜内皮細胞材料の製造方法にも関する。

背景技術

[0002] 角膜は、目を構成する層状の組織であり、角膜上皮を最外層とし、角膜内皮を最内層とする5つの層から構成される。角膜上皮細胞は、高い増殖能力を有し、再生力が高い一方で、角膜内皮細胞は再生力が乏しいことが知られている。角膜内皮は、角膜実質から前房部に水分を能動的に輸送するポンプ機能を有しており、それにより角膜に水分が染みこむことにより生ずる白濁（角膜混濁）を防いでいる。様々な要因で角膜内皮が損傷を受けて角膜内皮細胞の数が減少すると、角膜内皮細胞は、減少した箇所を細胞増殖により補填することができず、伸展移動と拡大により細胞表面積を大きくし、それにより損傷箇所を埋め合わせようとする。その結果、角膜内皮細胞の単位面積あたりの密度が減少し、一定の密度を下回ると、十分なポンプ機能を維持することができず、角膜混濁や水疱性角膜症が引き起こされる。

[0003] 水疱性角膜症は、失明にも至る重篤な疾患であり、治療には角膜移植が必要となるが、ドナー不足は慢性的な問題であり、また手術後には拒絶反応を引き起こすことも多い。そして、移植治療において、透明治癒率は高くなく、術後の矯正視力が十分ではないなどの問題もあり、角膜移植による治療は万全の治療法とは言い難い。

[0004] 一方で、再生医療の進歩により、培養角膜内皮細胞シートを製造して移植に供する研究も行われてきている。特許文献1（特開2005-22986

9号)は、単離培養した角膜内皮細胞を培養して移植する角膜の再構築方法に関する。また、特許文献2(WO2011/096593)は、角膜内皮細胞の培養において、アスコルビン酸誘導体が増殖率を改善することを見出している。非特許文献1(STEM CELLS AND DEVELOPMENT)には、p75ニューロトロフィン受容体(p75NTR又はP75ともいう)の発現を基にヒト角膜内皮前駆細胞を単離しており、こうして単離されたヒト角膜内皮前駆細胞が十分な増殖性を有し、透明な角膜内皮細胞シートの製造に用いることができる旨を開示している。また特許文献3(WO2013/012087)には、特定の無血清培養液を用いることで、増殖能の高い、未分化な状態のp75陽性の角膜内皮前駆細胞を取得できると記載している。特許文献4(WO2014/007402)及び非特許文献3(STEM CELLS 2013; 31: 1396-1407)には、LGR5の発現が、内皮細胞の表現系を維持し、Wntシグナルを介した内皮間葉移行を抑制すること、さらにはLGR5のリガンドであるR-spondin類が、角膜内皮細胞の分化抑制及び/又は増殖促進に寄与することが開示されている。このように角膜内皮細胞を増殖させる方法が検討されてきているが、角膜内皮細胞は増殖性が極めて限定的であり、また培養条件によっては内皮間葉移行(EndMT)と言われている異なる細胞への形質転換が生じてしまい、ポンプ機能が失われてしまうことから、培養が非常に難しいことが知られている。非特許文献1及び3、並びに特許文献2～4の手法を用いたとしても、その増殖性は十分ではなく、敷石状の角膜内皮細胞又はその前駆細胞を増殖させることはできなかった。したがって、ポンプ機能を有する角膜内皮細胞を十分に増殖させて調製する方法が依然として望まれている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開2005-229869号公報

特許文献2：国際公開第2011/096593号

特許文献3：国際公開第2013/012087号

特許文献4：国際公開第2014／007402号

非特許文献

- [0006] 非特許文献1：STEM CELLS AND DEVELOPMENT 2014; 23: 2190-2201,
非特許文献2：The Journal of Biological Chemistry, (2004) vol.279, No. 31, pp. 32325-32332
非特許文献3：STEM CELLS 2013; 31: 1396-1407

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 上記事情に鑑み、本発明が解決しようとする課題は、ポンプ機能を有する角膜内皮細胞及び/又はポンプ機能を有する角膜内皮細胞に分化可能なその前駆細胞を十分な増殖性で調製する方法、当該方法により調製された角膜内皮細胞及び/又はその前駆細胞、並びに当該角膜内皮細胞及び/又はその前駆細胞を用いた移植用角膜内皮細胞シートの製造方法を提供することである。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは、角膜内皮細胞の培養において血清濃度を調節することにより、驚くべきことに角膜内皮前駆細胞をin vitroで増殖させることができることを見出し本発明に至った。より具体的には、血清濃度を0.5%～2.0%の濃度で培養することにより、増殖率及び培養後のポンプ機能の点で優れた角膜内皮前駆細胞を調製することができる。
- [0009] したがって、本発明は以下の発明に関する：
- [1] 0.5～2.0%の血清を含む培養培地中で角膜内皮細胞又はその前駆細胞を培養することを含む、角膜内皮前駆細胞の調製方法。
 - [2] 前記培養培地が、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を含む、項目1に記載の調製方法。
 - [3] 前記培養培地のカルシウム濃度が、50 μ M～200 μ Mである、項目1又は2に記載の調製方法。
 - [4] 前記角膜内皮前駆細胞を、細胞外マトリクス分子でコーティングさ

れた培養容器で培養する、項目 1～3 のいずれか一項に記載の調製方法。

[5] 前記細胞外マトリクス分子が、ラミニン又はその機能断片である、項目 4 に記載の調製方法。

[6] 前記培養培地が、さらにアスコルビン酸 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、テトラヘキシルデカン酸アスコルビル、ステアリン酸アスコルビル、及びアスコルビン酸-2リン酸-6パルミチン酸からなる群から選択される誘導体、或いはそれらの組合せを含む、項目 1～5 のいずれか一項に記載の調製方法。

[7] 項目 1～6 のいずれか一項の調製方法により製造された、内皮間葉移行が生じていない敷石状を呈する角膜内皮前駆細胞。

[8] 前記角膜内皮前駆細胞において内皮間葉移行が生じていないことが、 α -平滑筋アクチン、コラーゲン 1 からなる群から選ばれる少なくとも 1 のタンパク質の低レベルの発現により決定される、項目 6 に記載の角膜内皮前駆細胞。

[9] OCT4、Nanog 及び Lgr5 が陽性である、項目 7 又は 8 に記載の角膜内皮前駆細胞。

[10] 項目 7～9 のいずれか一項に記載の角膜内皮前駆細胞から分化誘導された角膜内皮細胞。

[11] キャリアに担持された角膜内皮細胞材料の製造方法であって、
0.5～2.0%の血清を含む培養培地中で角膜内皮前駆細胞を培養する工程；

培養された角膜内皮前駆細胞を、キャリア上に播種する工程
を含む、角膜内皮細胞材料の製造方法。

[12] 培養後に分化誘導工程を含む、項目 11 に記載の製造方法。

[13] 前記培養工程において、角膜内皮前駆細胞を、ラミニン分子又はその機能断片でコーティングされた培養容器で培養する、項目 11 又は 12 に記載の製造方法。

[14] 前記培養工程において、前記培養培地のカルシウム濃度が、50

$\mu\text{M} \sim 200 \mu\text{M}$ である、項目11～13のいずれか一項に記載の製造方法。

[15] 前記培養工程において、前記培養培地が、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)を含む、項目11～14のいずれか一項に記載の製造方法。

[16] 前記角膜内皮細胞材料が、角膜内皮細胞シートである、項目11～15のいずれか一項に記載の製造方法。

発明の効果

[0010] 本発明の方法により、敷石状の角膜内皮前駆細胞を選択的に高い増殖率で増殖させることができる。こうして増殖された角膜内皮前駆細胞は、ポンプ機能を有する角膜内皮細胞へと分化することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図1Aは、血清濃度に応じた細胞の増殖及び形状を示す写真である。0%では、細胞の増殖がほとんど認めなかった一方で、0.5%以上では細胞の増殖が認められた。また、0.5%血清存在下で培養することで、敷石状の形状の細胞が増殖する一方で、5%、15%と血清濃度が高まるにつれて、線維芽細胞の特徴である紡錘状の細胞が増殖する。図1Bは、EndMTの指標となる αSMA 及び1型コラーゲンの発現レベルを示す写真である。0%及び0.5%では発現が極めて低かった一方で、5%、15%と血清濃度が増えるに従い、 αSMA 及び1型コラーゲンの発現は高まった。図1Cは、本発明である1%血清存在下と特許文献3の培養法を比較する写真である。

[図2]図2は、0.5%血清存在下で種々の増殖因子を添加して増殖促進効果を調べた結果である。単独添加ではbFGFが最も増殖促進効果が高く、各種増殖因子を組み合わせで添加しても顕著な相乗効果は認めなかった。

[図3]図3Aは、使用した細胞外マトリクスの比較を示すグラフである。ラミニン511活性断片であるE8を用いることにより、アテロコラーゲンよりも増殖率が高かった。図3Bは、1%血清存在下で、E8とアテロコラーゲ

ンを用いて培養後の比較写真である。

[図4]図4 Aは、血清存在下でのC a濃度の増殖率に及ぼす影響を示すグラフである。図4 Bは、血清存在下でのC a濃度のE n d M Tマーカーである α S M A、及び未分化マーカーであるO C T 4に及ぼす影響を示すグラフである。

[図5]図5 Aは、低血清存在下においてC a濃度が継代後に増殖率に及ぼす影響を示すグラフである。図5 Bは、低血清存在下においてC a濃度が継代後にE n d M Tマーカーである α S M Aに及ぼす影響を示すグラフである。図5 Cは、低血清存在下においてC a濃度が継代後に未分化マーカーであるO C T 4に及ぼす影響を示すグラフである。

[図6]図6は、異なる血清濃度及びカルシウム濃度で培養された角膜内皮前駆細胞のポンプ機能を示すグラフである。写真は細胞シートを抗N a⁺K⁺A T Pアーゼ抗体で免疫染色した結果を示す。

[図7]図7 Aは、低血清低カルシウム培養においてアスコルビン酸2-リン酸が細胞増殖率に及ぼす影響を示すグラフである。図7 Bは、低血清低カルシウム培養においてアスコルビン酸2-リン酸がE n d M Tマーカーである α S M A発現に及ぼす影響を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] 本発明は、角膜内皮前駆細胞を低血清培養培地中で培養することを含む、角膜内皮前駆細胞の調製方法に関する。

[0013] 本発明において、角膜内皮細胞は、眼球の角膜の最内層に位置する敷石状の細胞であり、分離し培養した細胞であってもよい。角膜内皮細胞は、生体角膜内皮より採取してもよいし、株化された角膜内皮細胞であってもよい。角膜内皮細胞の由来元の動物は、任意の動物であってもよく、例えばヒト、サル、チンパンジー、イヌ、ネコ、ウサギ、ブタ、ウシ、ウマなど由来であってもよいが、移植に用いることから、実験動物としては、サル、チンパンジーなどが好ましく、ヒトが最も好ましい。

[0014] 角膜内皮細胞は、生体内では増殖性を有しておらず、生体角膜内皮から採

取された細胞のうち一部が増殖性を有する。この増殖性を有する細胞を本発明において角膜内皮前駆細胞と呼ぶこととする。角膜内皮前駆細胞は、増殖性と角膜内皮細胞へと分化する分化性を有する細胞である。ある態様では、角膜内皮前駆細胞は、未分化マーカーの発現により特徴付けることができ、例えばOct 4、Nanog、TERT及びLGR5からなる群から選ばれる1以上の未分化マーカーの発現が亢進している。発現の亢進は、通常の血清濃度、すなわち10～15%血清で培養した場合の角膜内皮細胞又はその前駆細胞における発現と比較することで決定することができる。その一方で、非特許文献1や特許文献3において角膜内皮前駆細胞のマーカーとして用いられたp75については、本発明により調製された角膜内皮前駆細胞では発現が低下する傾向が見られ、場合によっては陰性であり、本発明により調製された角膜内皮前駆細胞と、非特許文献1においてFACSによりP75陽性細胞として収集され、増幅された角膜内皮前駆細胞とは異なる細胞である。また、非特許文献1にp75陽性細胞はneural crest様の、双極性紡錘形状を呈していることが記載されており、形態的にも本発明により調製された敷石状を呈する角膜内皮前駆細胞とは容易に識別できる。敷石状とは、図1Aの0.5%血清で培養した際の写真のように、略円形の細胞を敷き詰めたように見える状態をいう。一方で、線維芽細胞や内皮間葉転換(EndMT)が生じた細胞は、図1Aの15%血清で培養した際の写真のように極性を有する紡錘状の形状となる。

[0015] 角膜内皮細胞及びその前駆細胞は、培養の過程で、培養条件に応じて内皮間葉転換(EndMT)を生じる。EndMTを起こした細胞は、ポンプ機能を失ってしまうことから角膜内皮細胞として移植に適さない。したがって、 α 平滑筋アクチン(α SMA)、1型コラーゲン(Col1)、及びフィブロネクチン(FN)からなる群から選ばれる1又は複数、より好ましくは全てのEndMTマーカーの発現が低いことが好ましい。その一方で、培養細胞の一部がEndMTを生じていても、その残りがEndMTを起こしていない細胞であればよいため、EndMTマーカーがすべて完全に発現して

いないことを要求するものではない。E n d M T マーカーの発現の測定は、当業者に知られる既知の方法により行われてもよく、例えば発現されたタンパク質を免疫測定手法、例えばウエスタンブロットにより測定してもよいし、m R N A 量を P C R により増幅することにより行われてもよい。別の好ましい態様では、リアルタイム P C R により発現量を数値化することもできる。E n d M T マーカーの発現は、通常の血清濃度、すなわち 1 0 ~ 1 5 質量%の血清濃度で培養された角膜内皮細胞又はその前駆細胞における高い発現レベルと比較することで、その発現の高低を決定することができる。一方、これらの E n d M T マーカーの発現は、正常の組織内皮細胞においても低レベルで認められることより、正常組織内皮細胞と同等の発現レベルを低レベルとすることができる。したがって、E n d M T マーカーの発現が、正常組織内皮細胞と同等の発現レベルであれば E n d M T に形質転換していないと判断できる。

[0016] 本発明において、低血清とは、0. 5 ~ 2. 0 質量%の血清のことをいう。血清の濃度範囲の下限としては、角膜内皮細胞又はその前駆細胞の増殖性を高めることができれば任意の濃度であってよく、例えば 0. 7 5 質量%以上、より好ましくは 1. 0 質量%以上である。一方で血清の濃度範囲の上限は、E n d M T を抑制する観点から、2. 0 質量%以下、より好ましくは 1. 5 質量%以下、さらに好ましくは 1. 0 質量%以下の濃度である。一般に角膜内皮細胞又はその前駆細胞の培養は、1 0 ~ 1 5 質量%の血清で行われることが多い。しかしながら、本発明者らの研究により、1 5 質量%の血清下では、角膜内皮細胞又はその前駆細胞が高い増殖率で増加するものの、一部又は全部の細胞において E n d M T が生じることが示された（図 1 A）。E n d M T により内皮系の細胞である角膜内皮細胞又はその前駆細胞が、間葉系の細胞に転換してしまい、移植用の角膜内皮細胞として適していなかった。その一方で、無血清培地では、角膜内皮細胞又はその前駆細胞の増殖率は著しく低く、ほとんど増加しなかった（図 1 A）。したがって、上記の低血清の濃度範囲では、角膜内皮前駆細胞の増殖性を保ちつつ、E n d M T が

抑制されることから、角膜内皮前駆細胞の増殖には特に好ましい。

[0017] 本発明に用いられる血清は、任意の血清であってもよく、通常市販の血清を使用することができる。血清の由来元は、任意の動物種であってもよく、ヒト、サル、チンパンジー、イヌ、ネコ、ウサギ、ブタ、ウシ、ウマなどの動物由来の血清であってもよく、それらの胎児血清を用いることもできる。血清として、例えばウシ胎児血清（FBS）を用いることができるが、移植に用いる細胞又は細胞シートを作製する観点から、ヒト由来血清を用いることもできる。

[0018] 本発明では、角膜内皮細胞又はその前駆細胞の増殖性を高めるために、さらに増殖因子や成長因子を添加してもよい。添加されうる増殖因子又は成長因子として、酸性線維芽細胞増殖因子（aFGF）、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF又はFGF2と呼ばれることもある）、上皮成長因子（EGF）、肝細胞増殖因子（HGF）、Wnt3A等が挙げられ、これらの成長因子は、単独で使用されてもよいし、組み合わせて使用してもよい。bFGF（FGF-2）は、角膜内皮細胞において内皮間葉移行（EndMT）を誘導する直接的なメディエーターであることが知られている（非特許文献2：The Journal of Biological Chemistry, (2004) vol.279, No.31, pp.32325-32332）。その一方で、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を低血清培地に添加して用いた場合に、驚くべきことにEndMTを抑制しつつ、角膜内皮細胞又はその前駆細胞の増殖性を高めることが可能になったため（図1A～B、図2）、特に好ましい。また、増殖率の向上の観点から、bFGFとWnt3Aの組み合わせを使用することはさらに好ましい（図2B）。細胞培養培地中のこれらの因子の濃度は、増殖因子又は成長因子の種類に応じて当業者であれば適宜選択して選択することができ、0.5～100 ng/ml、好ましくは1～50 ng/ml、さらに好ましくは2～25 ng/mlで用いることができる。

[0019] 本発明において使用される培養培地は、細胞培養に用いられる培地であれば任意の培地であってもよい。培養培地の例として、ダルベッコ改変イーグ

ル培地（DME）、最小必須培地（MEM）、F12、DME／F12、EpiLife（登録商標）Mediumなどを用いることができる。本発明で用いられる培地には、血清、増殖因子や成長因子などのさらなる成分を含んでもよい。培養培地中に含まれるさらなる成分としては、アミノ酸類、細胞増殖促進剤などを適宜加えることができる。その一方で、通常培地に含まれるカルシウムの濃度を制限することで、EndMTマーカーである α SMAの発現を抑えつつ、未分化マーカー（OCT4）の発現が高まることが見出されたことから（図4及び図5）、カルシウムの濃度を通常の培養に用いられる $1800\mu\text{M}$ より低い値に維持することが好ましいが、 $1800\mu\text{M}$ を超えた場合であっても、増殖率の観点では使用することが可能である。カルシウムの濃度範囲の上限としては、EndMTマーカーの発現を抑えつつ、未分化マーカーの発現を高める観点からは、 $1800\mu\text{M}$ 以下、好ましくは $600\mu\text{M}$ 以下、さらに好ましくは $200\mu\text{M}$ 以下、さらにより好ましくは $150\mu\text{M}$ 以下である。カルシウムの濃度範囲の下限としては、細胞の増殖を可能にする観点から、 $20\mu\text{M}$ 以上が好ましく、 $40\mu\text{M}$ 以上がより好ましく、 $50\mu\text{M}$ 以上がさらに好ましく、さらにより好ましくは $60\mu\text{M}$ 以上である。

[0020] 本発明において使用される培養培地には、さらにアスコルビン酸誘導体が含まれてもよい。アスコルビン酸誘導体は、角膜内皮細胞及び/又はその前駆細胞の増殖を促進しつつ、EndMTを抑制することができる。アスコルビン酸の誘導体としては、以下のものに限定されることを意図するものではないが、例えばアスコルビン酸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、テトラヘキシルデカン酸アスコルビル、ステアリン酸アスコルビル、アスコルビン酸-2リン酸-6パルミチン酸が挙げられる。アスコルビン酸誘導体は、単独で用いられてもよいし、組み合わせて用いられてもよい。アスコルビン酸は、L体、D体、又はラセミ体であってもよいが、生理活性を有する観点からは、L体が好ましい。アスコルビン酸誘導体の濃度は、細胞の増殖促進及び/又はEndMTを抑制する観点から $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上

が好ましく、 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上がより好ましく、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上がさらに好ましい。pH変化を抑制する観点から $1000\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下が好ましく、 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下が好ましく、 $200\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下がさらに好ましい。

[0021] 本発明の低血清培養培地には、角膜内皮細胞及び/又はその前駆細胞の増殖を促進しつつ、EndMTを抑制する観点から、増殖因子や成長因子、低濃度のCa、及びアスコルビン酸又はその誘導体のうちの1つ又は2以上が添加される。血清以外のこれらの追加の成分は、全て組み合わせられることが好ましい。

[0022] 角膜内皮細胞又はその前駆細胞は、任意の培養容器に接着させて培養することができる。使用する培養容器は、生体適合性の高分子によりコーティングされていてもよい。使用される生体適合性の高分子としては、ラミニン、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、フィブリノーゲン、トロンプスポンジ、ゼラチン、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸などの細胞外マトリックス分子から選択される1種又は複数の分子又はその機能断片であってもよい。細胞増殖性を確保する観点から、ラミニンやコラーゲン、又はその機能断片が特に好ましく、最も好ましくはラミニン又はその機能断片が用いられる。機能断片とは、タンパク質の機能を司るそのタンパク質の断片をいい、その改変体も含むものとする。

[0023] ラミニンは、 α 鎖、 β 鎖、及び γ 鎖のヘテロ3量体により構成される。ファミリーとして5種の α 鎖、4種の β 鎖、及び3種の γ 鎖が存在しているが、任意の組合せであってもよい。特に角膜内皮前駆細胞の増殖性を担保する観点から、ラミニン511、521、332又はその機能断片が好ましく、ラミニン511又はその機能断片が最も好ましい。

[0024] 本発明の角膜内皮前駆細胞の調製方法の培養条件は、動物細胞の培養に用いられる任意の条件を用いることができる。一例として、哺乳動物の細胞の場合、 $35\sim 39^{\circ}\text{C}$ 、より好ましくは $36\sim 38^{\circ}\text{C}$ 、さらに好ましくは 37°C にて、 $2\sim 15\%$ 、好ましくは $5\%\text{CO}_2$ の雰囲気下で培養することができる。

るが、通常上記条件に設定されたインキュベーター内で培養することができる。

[0025] 本発明により調製された角膜内皮前駆細胞は、さらに分化誘導を行うことで角膜内皮細胞へと分化することができる。分化誘導の手法としては、任意の手段が行われてよいが、例えば細胞をコンフレントの状態ですべて2週間程度維持することにより分化誘導が可能である。ある態様では、10～15%のFBSを含むDME培地で細胞密度を1000個/mm²以上の高密度で播種して2～3週間培養することにより、分化を誘導することができる。一方、上述のように高濃度のFBSを用いるとEndMTを誘導する可能性が考えられる。そこで1～2%の低濃度FBSを用いて細胞密度を1000個/mm²以上の高密度で播種して2～3週間培養した結果、低濃度のFBS濃度でも十分に分化誘導できることを確認している。分化誘導の確認法としては、角膜内皮細胞のポンプ機能に重要な役割を担うNa⁺K⁺ATPアーゼ発現が細胞周辺部に局在していることを免疫染色法により観察することにより確認できる。また、実施例で詳述する方法により細胞のポンプ機能の有無を実際に測定することにより確認できる。

[0026] 本発明により調製された角膜内皮前駆細胞及び／又は当該前駆細胞を分化誘導することにより得られた角膜内皮細胞は、角膜内皮細胞の損傷により生じる疾患の治療に用いることができる。より具体的に、本発明により調製された角膜内皮前駆細胞及び／又は当該前駆細胞を分化誘導することにより得られた角膜内皮細胞を前房内に注入し、直接角膜内皮に定着させることもできるし、キャリア上に担持させた角膜内皮細胞材料として、角膜内皮に定着させてもよい。したがって、本発明は、角膜内皮細胞の損傷により生じる疾患の治療方法又は治療用組成物にも関する。

[0027] 本発明において、角膜内皮細胞材料とは、角膜内皮細胞又はその前駆細胞をキャリア上に担持させた移植用の材料のことをいう。キャリアとしては、細胞キャリアとして用いられるものであれば任意のものを使用することができる。例えば、シート状のキャリアを用いることにより、角膜内皮細胞材料

は、角膜内皮細胞シートとして用いることができる。より好ましくは、細胞キャリアは、移植後に生体に吸収されて消失する材料であることが好ましく、例えばコラーゲンやゼラチンやビトリゲルなどの細胞外マトリクスをシート状に成型したものを用いることができる。

[0028] 角膜内皮細胞材料は、角膜内皮前駆細胞を培養する工程、及び培養された角膜内皮前駆細胞をキャリア上に播種する工程を含む製造方法により製造することができる。角膜内皮前駆細胞を培養する工程は、本発明にかかる角膜内皮細胞の培養方法のことをいう。この製造方法には、さらに角膜内皮前駆細胞を分化誘導させる工程を含んでもよい。分化誘導は、キャリア上への播種前に行われてもよいし、播種後に行われてもよい。

実施例

[0029] ヒト角膜内皮細胞調製物の取得法

ヒト強角膜片を $100\mu\text{g}/\text{ml}$ のアスコルビン酸-2リン酸（和光純薬）、 $2\text{ng}/\text{ml}$ bFGF（和研薬）、 $1\times\text{GlutaMax}$ （ギブコ）を含む Advanced DME/F12 培地（ギブコ）（以下基礎培地と記載）で洗浄後、微細なセッシを用いて、角膜内皮をデスメ膜ごと剥ぎ取り、 35mm ペトリディッシュに移した。ペトリディッシュ上で角膜内皮細胞が付着したデスメ膜片をさらに 5mm 角程の小片に細切後、遠心チューブに回収した。上清を取り除き、 1mL の 0.2% のコラゲナーゼ（ロシュ）を含む基礎培地を加え、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ で $1\sim 3$ 時間インキュベートした。上清を取り除き、PBS を 10mL 加え、 500g 、5 分間遠心して洗浄した。細胞塊に 1mL の 0.5% トリプシン/ 0.2% EDTA を加え、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ で 5 分間インキュベート後ピペティングにより細胞を分散させた。 10mL の基礎培地を加え、 500g で 5 分遠心後、上清を取り除き、得られた細胞ペレットを 1mL の基礎培地に懸濁した（以下ヒト角膜内皮細胞調製物と記載）。

[0030] ウシ胎児血清（FBS）濃度の検討

10mM 酢酸で希釈した $50\mu\text{g}/\text{mL}$ のアテロコラーゲン溶液（高研）

を6ウェルディッシュに1 ml 加え、37℃で1時間放置後、5 ml のPBSで2回洗浄してアテロコラーゲンコートディッシュを作製した。ヒト角膜内皮細胞調製物を、0%、0.5%、5%、15%のFBS（ニチレイ）を含む基礎培地に均等に懸濁した。それぞれの細胞懸濁液をアテロコラーゲンコートディッシュ上に播種し、37℃、5%CO₂下で2～3週間、2～3日毎に培地を交換しながら培養した。図1Aに2週間培養後の細胞像を示す。0%FBS群では細胞の増殖はほとんど認めなかったが0.5%FBS群では角膜内皮の形態に近似した敷石状細胞の増殖を認めた。一方、5%及び15%のFBSを用いた群では、細胞の増殖を認めたものの細胞形態が線維芽細胞様に変化していた。

[0031] RT-PCR

細胞がサブコンフルエントになったところで、上記トリプシン／EDTAで細胞を剥離・集積し、RNA抽出のためのサンプルとした。RNA抽出にはRNeasy mini kit（キアゲン）を使用し、Nanodropで濃度測定とクオリティチェックを行った。500 ng 相当のRNAをテンプレートとしAdvantage（登録商標）cDNA PCR Kit（クロンテック）を用いてcDNA合成した。合成したcDNAを1／5に希釈し、PCR用サンプルとした。プライマーは下記の表1に記載のものを使用した。titanium taqDNA polymerase（クロンテック）を添付の反応条件に従い使用し、94℃、63℃、72℃の30－35サイクルで増幅した。2%アガロースゲルにて電気泳動し発現量を比較した（図1B）。その結果、5%及び15%のFBSを用いた群では、形質転換マーカーとされる α SMA及びType1 collagenの発現亢進が確認された。

[表1]

遺伝子名		配列	配列番号
GAPDH	Forward	CCATGGGGAAGGTGAAGGTC	配列番号 1
	Reverse	ACATGTAAACCATGTAGTTGAGGC	配列番号 2
1 型コラーゲン (Type1 collagen)	Forward	AGTGGTTTGGATGGTGCCAA	配列番号 3
	Reverse	GCACCATCATTTCCACGAGC	配列番号 4
α SMA	Forward	GAAGGAGATCACGGCCCTA	配列番号 5
	Reverse	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	配列番号 6

[0032] 公知培養法との比較

特許文献 3 に開示された以下の方法によりヒト角膜内皮細胞調製物を得た。PBS で希釈した $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ のラミニン 511 (ベリタス) 3 ml を 10 cm ディッシュに加え、 37°C で 3 時間放置後、 5 ml の PBS で 2 回洗浄してラミニン 511 コートディッシュを作製した。角膜内皮細胞が付着したデスメ膜片を $10 \mu\text{M}$ の Y-27632 (和光純薬) を含む DME (ギブコ) の入った遠沈管に移し、 37°C で 30 分放置した。上清を取り除き、 1 mL の Stem Pro Accutase (Invitrogen) を加え、 37°C で 30 分処理した。 4 mL の DME を加え、 1500 rpm 、5 分遠心後上清を除去し細胞ペレットをヒト角膜内皮細胞調製物とした。本発明培地である 0.5% の FBS を含む基礎培地、及び特許文献 3 に開示された培地、即ち、20% KnockOUT Serum Replacement (Invitrogen)、 2 mM L-グルタミン、1% 非必須アミノ酸、 $100 \mu\text{M}$ 2-メルカプトエタノール、 $4 \text{ ng}/\text{ml}$ bFGF を含む DMEM/F-12 培地 (Invitrogen) を調製した。これらの培地に上記ヒト角膜内皮細胞調製物を均等に懸濁し、 $500 \text{ cells}/\text{cm}^2$ の密度でラミニン 511 コートディッシュに播種した。各培地で 2~3 日毎に培地交換し 3 週間培養した。その結果、本発明の培養液を用いた時は、敷石状の細胞が活発に増殖し 3 週間でコンフレントに達した。一方、特許文献 3 の培養液では非特許文献 1 に示された細胞と同様の neural crest 様の、双極性紡錘形状細胞の増殖を確認したがコンフレントにまで至らずに

増殖停止した（図1C）。未分化マーカー発現解析の結果、写真上段に示すように、本発明培養ではOCT4、Lgr5の発現を認めたが、Pax6、p75の発現は認めなかった。尚、特許文献3の培養法は細胞増殖が不十分であったため発現解析はできなかった。

[0033] 添加する増殖因子の検討

bFGFを含まない基礎培地に0.5%のFBS（ニチレイ）を加え、さらに各種増殖因子を加えて以下の培地を作成した。（1）増殖因子無添加コントロール、（2）2ng/ml bFGF、（3）50ng/ml RSP O1（R&D）、（4）50ng/ml Wnt3A（R&D）、（5）2ng/ml bFGF+50ng/ml RSP O1、（6）2ng/ml bFGF+50ng/ml Wnt3A、（7）50ng/ml RSP O1+50ng/ml Wnt3A、（8）2ng/ml bFGF+50ng/ml RSP O1+50ng/ml Wnt3A。bFGFを含まない基礎培地で懸濁したヒト角膜内皮細胞調製物をこれらの培地に均等に懸濁し、それぞれの細胞懸濁液をアテロコラーゲンコートディッシュ上に播種し、37℃、5%CO₂下で2～3日毎に培地を交換しながら培養した。12日後にトリプシン/EDTAで細胞を剥離し細胞数をカウントした。その結果、増殖因子単独添加ではbFGFが最も増殖促進効果が高く、bFGFとWnt3Aとの組み合わせは相加的な増殖促進効果が見られたが、各種増殖因子を組み合わせで添加しても顕著な相乗効果は認めなかった（図2）。

[0034] ラミニン511の効果

PBSで希釈した10μg/mlのE8（iMatrix-511、ラミニン511の活性部位のみを発現させた製品、ニッピ）1mlを6ウェルディッシュに加え、37℃で3時間放置後、5mlのPBSで2回洗浄してE8コートディッシュを作製した。比較として、10mM酢酸で希釈した50μg/mLのアテロコラーゲン溶液（高研）を6ウェルディッシュに1ml加え、37℃で1時間放置後、5mlのPBSで2回洗浄することで作製したアテロコラーゲンコートディッシュを用いた。ヒト角膜内皮細胞調製物を0.5%、1

％、2％、5％のFBS（ニチレイ）を含む基礎培地に均等に懸濁し、上記E8又はアテロコラーゲンをコートした6ウェルディッシュに播種した。各培地で2～3日毎に培地交換し、11日後にトリプシン／EDTAで細胞を剥離し細胞数をカウントした（図3A）。その結果、E8コート群では血清濃度1％の時が最も増殖率が高く、形態も角膜内皮細胞に特徴的な敷石状を示した。一方、アテロコラーゲンコートした群は血清濃度依存性の細胞増殖を認めたが、細胞増殖はE8と比較して低く、特に0.5％～2％の低濃度FBS群ではほとんど増殖が認められなかった。図3BにE8およびアテロコラーゲン上での1％FBS群での細胞像を示す。

[0035] 低濃度Ca培地の効果

PBSで10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈したLN511（ベリタス）1 mLを6ウェルディッシュに加え、37℃で3時間放置後、5 mLのPBSで2回洗浄してLN511コートディッシュを作製した。2 ng/mLのbFGFを含むEpilife（登録商標）Medium（CaCl₂・2H₂Oを60 μM 含有）（ギブコ）（以下低Ca培地と記載）及び低Ca培地にカルシウム濃度が通常用いられる濃度である1800 μM になるようにCaCl₂・2H₂Oを添加した培地（以下通常Ca培地と記載）のそれぞれで、1％、2％、5％、10％のFBSを含む培地を作製した。先に記載のヒト角膜内皮細胞調製物の取得法で得たヒト角膜内皮細胞調製物をそれぞれの培地に均等に懸濁し、LN511をコートした6ウェルディッシュに播種した。各培地で2～3日毎に培地交換し、10日後にトリプシン／EDTAで細胞を剥離し細胞数をカウントした。図4Aに細胞増殖の結果を示す。通常Ca培地では1％FBS群が最も細胞増殖速度が早かった。一方、低Ca培地では2％FBS群が最も増殖速度が早く1％FBSではやや増殖速度が低下した。いずれの群においてもラミニン511の効果で示した結果と同様に、低血清培養の方が通常用いられる10％血清濃度での培養よりも高い増殖性を示した。

[0036] リアルタイムPCR

トリプシナイズした細胞をRNA抽出のためのサンプルとした。RNA抽

出は、TRIzol（登録商標）（Ambion）を用い、イソプロパノール沈殿を行い、精製することにより行った。抽出されたRNAについて、Nanodropで濃度測定とクオリティチェックを行った。RNA 500ng相当をAdvantage（登録商標）cDNA PCR Kit（クロンテック）を用いてcDNA合成した。合成cDNAを1／5に希釈し、RT-PCR用のサンプルとした。RT-PCRはThermal Cycler Dice（登録商標）Real Time System II（TaKaRa）を用いて行った。反応試薬はSYBR（登録商標）Premix Ex Taq（商標）IIを添付の反応条件に従い使用した。プライマーは、下記の表2に記載のものをを用いた。その結果、形質転換マーカーの α SMA発現はFBS濃度に依存して発現亢進を認めたが、総じて低Ca培養の方が通常Ca培養よりも低値を示し、低Ca培地1％FBS群が最も低かった（図4B）。一方、未分化細胞マーカーのOCT4の発現は低Ca培地群の方が通常Ca培地群よりも高値を示し、特に低濃度FBS群で発現亢進を認め、低Ca培地1％FBS群が最も高かった（図4C）。これらの結果より、低Ca培養は形質転換を抑制し、未分化を維持する効果があることが示唆された。又、細胞増殖の観点からは1％FBSよりも2％FBSの方が優れているものの形質転換抑制及び未分化維持という点では1％FBSがより有用であると考えられた。

[表2]

遺伝子名		配列	配列番号
GAPDH	Forward	CCATGGGGAAGGTGAAGGTC	配列番号1
	Reverse	ACATGTAAACCATGTAGTTGAGGC	配列番号2
α SMA	Forward	GAAGGAGATCACGGCCCTA	配列番号5
	Reverse	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	配列番号6
OCT4	Forward	CTCACCCCTGGGGGTTCTATT	配列番号7
	Reverse	CTCCAGGTTGCCTCTCACTC	配列番号8

[0037] 継代後における細胞安定性の評価

PBSで10 μ g／mLに希釈したLN511（ベリタス）3mLを10

cmディッシュに加え、37℃で3時間放置後、5 mlのPBSで2回洗浄してLN511コートディッシュを作製した。低Ca培地及び通常Ca培地のそれぞれに2% FCSを添加した培地を作製した。先に記載のヒト角膜内皮細胞調製物の取得法で得たヒト角膜内皮細胞調製物を、上記培地のそれぞれに均等に懸濁し、LN511コートした10 cmディッシュに播種した。それぞれの培地にて2～3日毎に培地を交換しながら約2週間培養した。

[0038] 細胞がサブコンフルエントになった時点でトリプシンEDTAにより細胞を剥離し、遠心洗浄後、それぞれの培地に1000個/cm²濃度で懸濁し、LN511コートディッシュに播種した。細胞がサブコンフルエントになった時点で同様に継代操作を繰り返し、細胞安定性を評価した（図5A）。その結果、細胞増殖速度に関しては、継代毎に増殖速度が高まる傾向を認め、低Ca培養の方が通常Ca培養よりもやや増殖が速かった。形質転換マーカーの α SMA発現は低Ca培養の方が通常Ca培養よりも低値を示し、通常Ca培地群では継代毎に α SMA発現が亢進したが低Ca培地群では継代後も低い α SMA発現レベルを維持した（図5B）。一方、未分化細胞マーカーのOCT4の発現は、低Ca培地群の方が通常Ca培地群よりも高値を示し、低Ca培地群では継代後も高発現レベルを維持した（図5C）。これらの結果より、2% FBS培養においても低Ca培養は形質転換を抑制し、未分化を維持する効果があることが示唆された。

[0039] 細胞シートの作製

先に記載のヒト角膜内皮細胞調製物の取得法で得たヒト角膜内皮細胞調製物を、2% FBSを含む低Ca培地及び通常Ca培地、並びに15% FBSを含む通常Ca培地のそれぞれに均等に懸濁し、LN511コートした10 cmディッシュに播種した。それぞれの培地にて2～3日毎に培地を交換しながら細胞がサブコンフルエントになるまで約2～3週間週間培養した。トリプシンEDTAにより細胞を剥離し、遠心洗浄後、15% FBS、2 ng/ml FGFを含むDME培地（分化培地）に懸濁して、PBSで膨潤させたアテロセル（高研）に、3000個/mm²濃度で、それぞれの細胞を播

種した。3-4日毎に分化培地を交換し14日間培養することにより細胞シートを製造した。

[0040] 細胞シートの免疫染色

細胞シートを6mmトレパンで切り出し、24ウェルプレートに置き、コールドメタノールを2mL添加し、冷凍庫にて10分間固定した。アスピレーターでメタノールを除去後、風乾し、0.15% triton (シグマ)を含むPBS (以下洗浄バッファー) 1mLで洗浄した。細胞シートを250 μ Lの3%BSA (シグマ)、0.3% tritonを含むPBSで、室温にて30分間ブロッキングした。アスピレーターでブロッキングバッファーを除去し、洗浄バッファーで200倍に希釈したNa⁺K⁺ATPアーゼ抗体 (メルクミリポア) を250 μ L加え、室温で2時間反応させた。アスピレーターで抗体溶液を除去し、1mLの洗浄バッファーで3回洗浄した。洗浄バッファーで200倍に希釈したアレクサフルオロ標識抗マウス抗体 (ライフテクノロジー) を250 μ L加え、室温で遮光下1時間反応させた。アスピレーターで抗体溶液を除去し、1mL洗浄バッファーで3回洗浄した。細胞シートに封入剤を乗せ、カバーガラスをして、蛍光顕微鏡にて観察した。図6に各々の方法で製造した細胞シートを抗Na⁺K⁺ATPアーゼ抗体で免疫染色した結果を示す。いずれの細胞シートもNa⁺K⁺ATPアーゼが細胞周辺部分に局在していることより角膜内皮細胞に分化していることが確認できた。

[0041] ポンプ機能の測定

ウッシングチャンバーシステム (WPI社) を用いて、以下の方法により細胞のポンプ機能を測定した。2% アガロース3M KClで電圧電極を作製しチャンバーにセットした。5% FBS、2ng/mL FGFを含むDMEM培地を左右のチャンバー内に均等に満たし、95%エア、5%CO₂の混合ガスをバブリングすることで培地を平衡化した。スライダー上に設置した細胞シートをチャンバー内に充填して電圧測定を開始した。10分程度、電圧が安定するのを確認後、ウバインを最終濃度が0.5mMになる

よう添加し、添加前後の電位差を測定した（図6）。その結果、15% FBS 通常Ca培地で増幅培養した細胞では電位差を確認できなかった。一方、2% FBS 通常Ca培地で増幅培養した細胞では3 μ V程度の電位差がみられた。さらに2% FBS 低Ca培地で増幅培養した細胞では10 μ V程度の電位差がみられた。これより、低血清培地、及び低血清低Ca培地で細胞を増幅することにより、高いポンプ機能を有する細胞が取得できることがわかった。

[0042] 低血清低濃度Ca培地でのアスコルビン酸2-リン酸の効果

PBSで10 μ g/mlに希釈したLN511（ベリタス）1 mLを6ウェルディッシュに加え、37℃で3時間放置後、5 mLのPBSで2回洗浄してLN511コートディッシュを作製した。2 ng/mlのbFGF及び1% FBSを含むEpilife（登録商標）Medium（CaCl₂・2H₂Oを60 μ M含有）（ギブコ）（以下低Ca培地とする）で、終濃度が100 μ g/mlのアスコルビン酸-2リン酸を含む培地とアスコルビン酸-2リン酸非含有培地を調製した。上述のヒト角膜内皮細胞調製物の取得法に従い取得されたヒト角膜内皮細胞調製物を各培地に均等に懸濁し、LN511をコートした6ウェルディッシュに、10000 cells/ウェルで播種した。各培地で2～3日毎に培地交換し、10日後にトリプシン/EDTAで細胞を剥離し細胞数をカウントした。図7Aにカウントされた細胞数の結果を示す。アスコルビン酸-2リン酸を含む低血清低濃度Ca培地で培養した細胞はアスコルビン酸-2リン酸を含まない培地と比較して細胞増殖速度が早かった。

[0043] トリプシナイズした細胞をRNA抽出のためのサンプルとし、上述の方法に従って、リアルタイム-PCRを実施し、 α SMAと内部標準としてGAPDHの発現量を測定した。その結果、図8Bに示すように形質転換マーカーの α SMA発現はアスコルビン酸-2リン酸を含む培地の方が含まない培地よりも低値を示した。

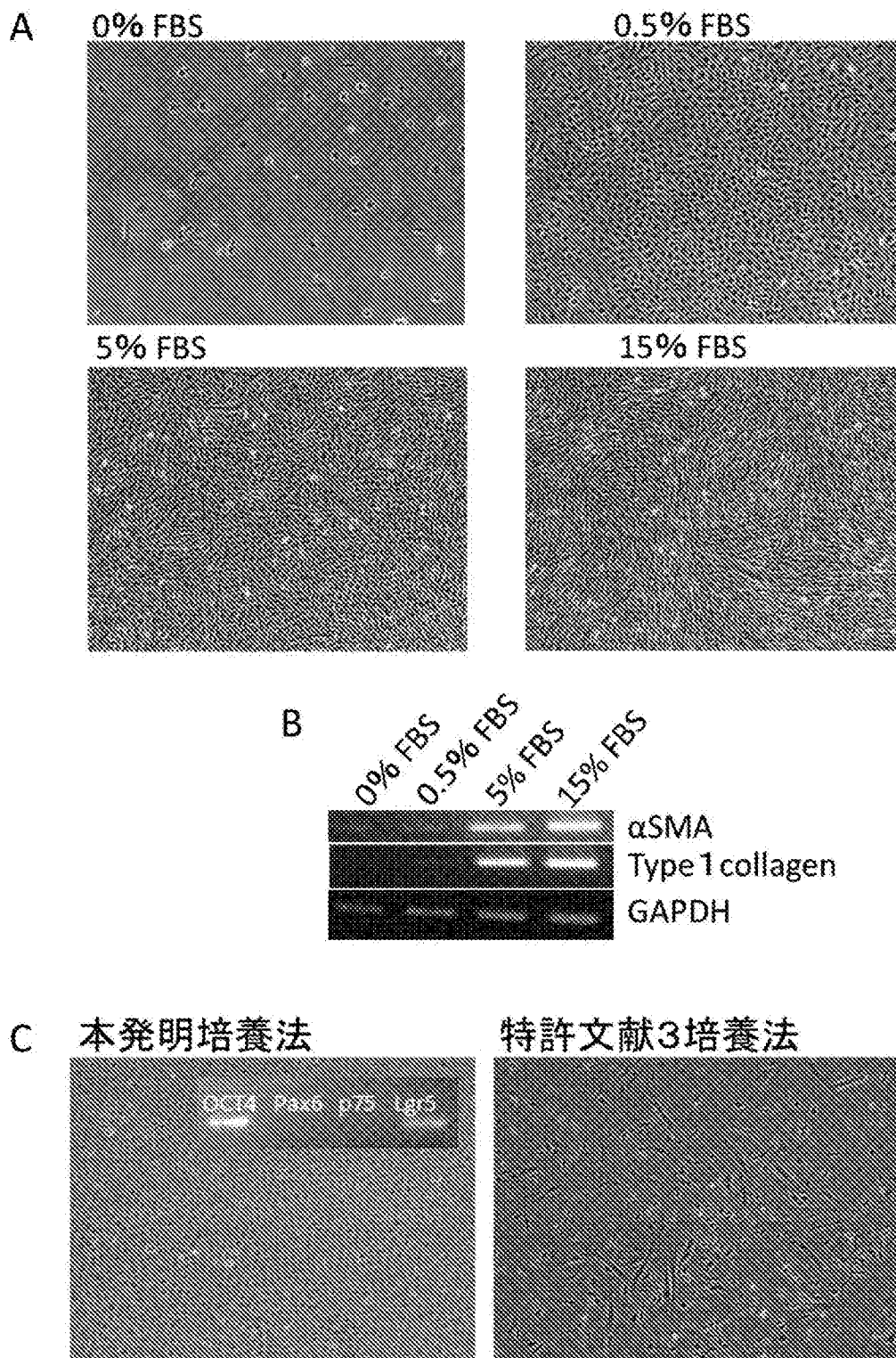
請求の範囲

- [請求項1] 0.5～2.0%の血清を含む培養培地中で角膜内皮細胞又はその前駆細胞を培養することを含む、角膜内皮前駆細胞の調製方法。
- [請求項2] 前記培養培地が、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を含む、請求項1に記載の調製方法。
- [請求項3] 前記培養培地のカルシウム濃度が、 $50\mu\text{M}$ ～ $200\mu\text{M}$ である、請求項1又は2に記載の調製方法。
- [請求項4] 前記角膜内皮前駆細胞を、細胞外マトリクス分子でコーティングされた培養容器で培養する、請求項1～3のいずれか一項に記載の調製方法。
- [請求項5] 前記細胞外マトリクス分子が、ラミニン又はその機能断片である、請求項4に記載の調製方法。
- [請求項6] 前記培養培地が、さらにアスコルビン酸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、テトラヘキシルデカン酸アスコルビル、ステアリン酸アスコルビル、及びアスコルビン酸-2リン酸-6パルミチン酸からなる群から選択されるアスコルビン酸誘導体、或いはそれらの組合せを含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の調製方法。
- [請求項7] 請求項1～6のいずれか一項の調製方法により製造された、内皮間葉移行が生じていない敷石状を呈する角膜内皮前駆細胞。
- [請求項8] 前記角膜内皮前駆細胞において内皮間葉移行が生じていないことが、 α -平滑筋アクチン、コラーゲン1からなる群から選ばれる少なくとも1のタンパク質の低レベルの発現により決定される、請求項7に記載の角膜内皮前駆細胞。
- [請求項9] OCT4、Nanog及びLgr5が陽性である、請求項7又は8に記載の角膜内皮前駆細胞。
- [請求項10] 請求項7～9のいずれか一項に記載の角膜内皮前駆細胞から分化誘導された角膜内皮細胞。

- [請求項11] キャリアに担持された角膜内皮細胞材料の製造方法であって、
 0.5～2.0%の血清を含む培養培地中で角膜内皮前駆細胞を培養する工程；
 培養された角膜内皮前駆細胞を、キャリア上に播種する工程
 を含む、角膜内皮細胞材料の製造方法。
- [請求項12] 培養後に分化誘導工程を含む、請求項11に記載の製造方法。
- [請求項13] 前記培養工程において、角膜内皮前駆細胞を、ラミニン分子又はその機能断片でコーティングされた培養容器で培養する、請求項11又は12に記載の製造方法。
- [請求項14] 前記培養工程において、前記培養培地のカルシウム濃度が、 $50\mu\text{M}$
 $\sim 200\mu\text{M}$ である、請求項11～13のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項15] 前記培養工程において、前記培養培地が、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を含む、請求項11～14のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項16] 前記角膜内皮細胞材料が、角膜内皮細胞シートである、請求項11～15のいずれか一項に記載の製造方法。

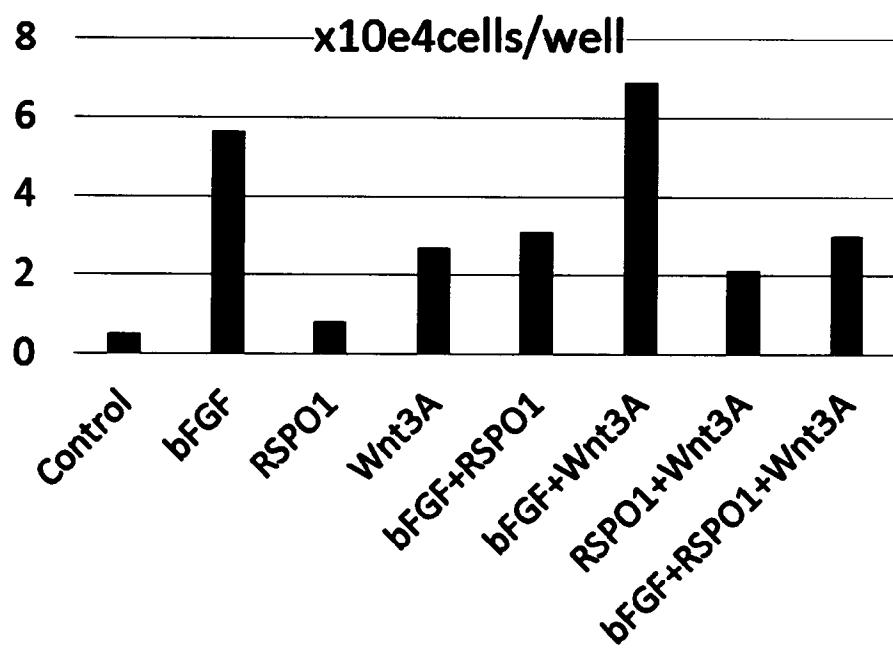
[図1]

図1



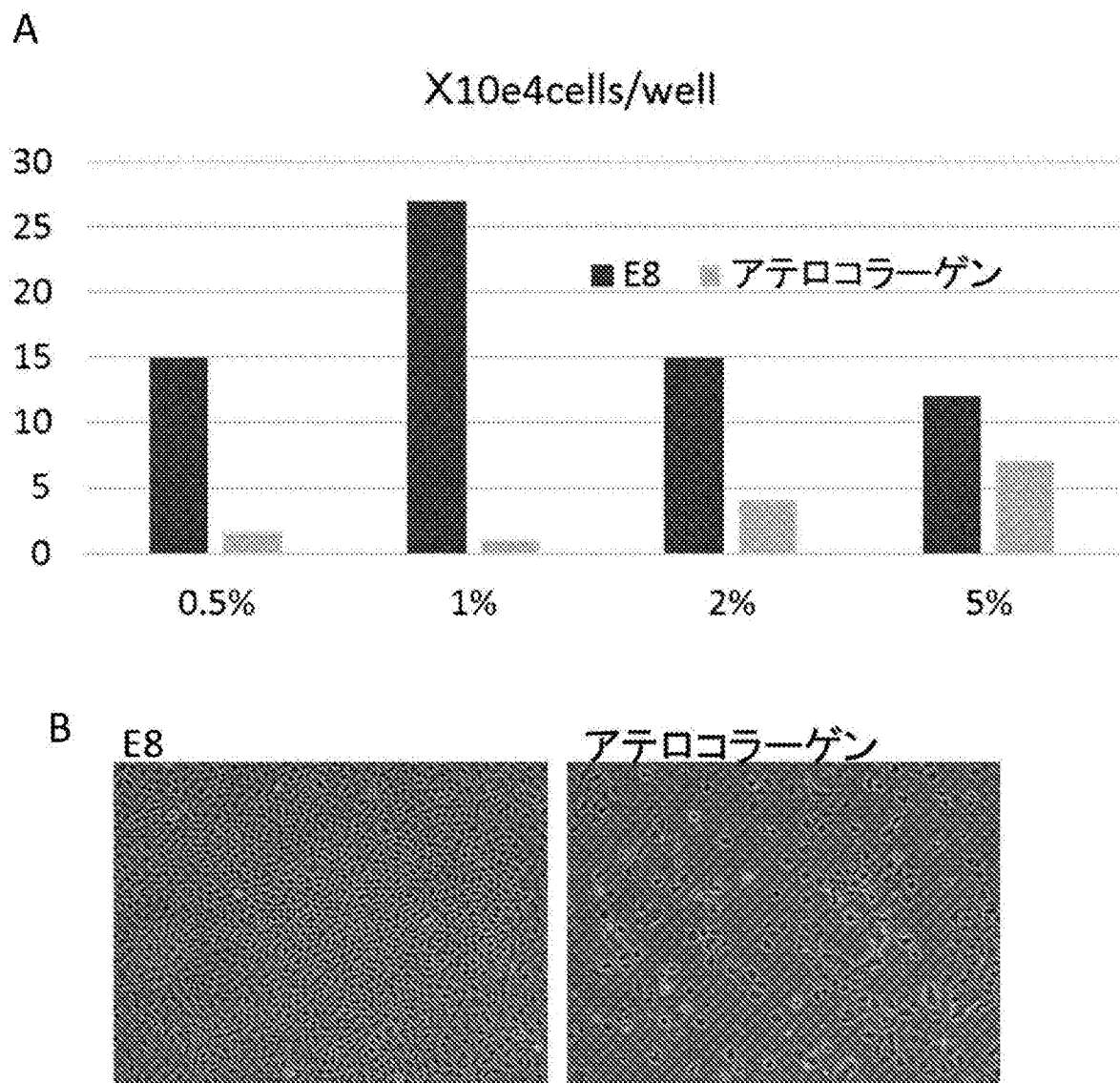
[図2]

図2



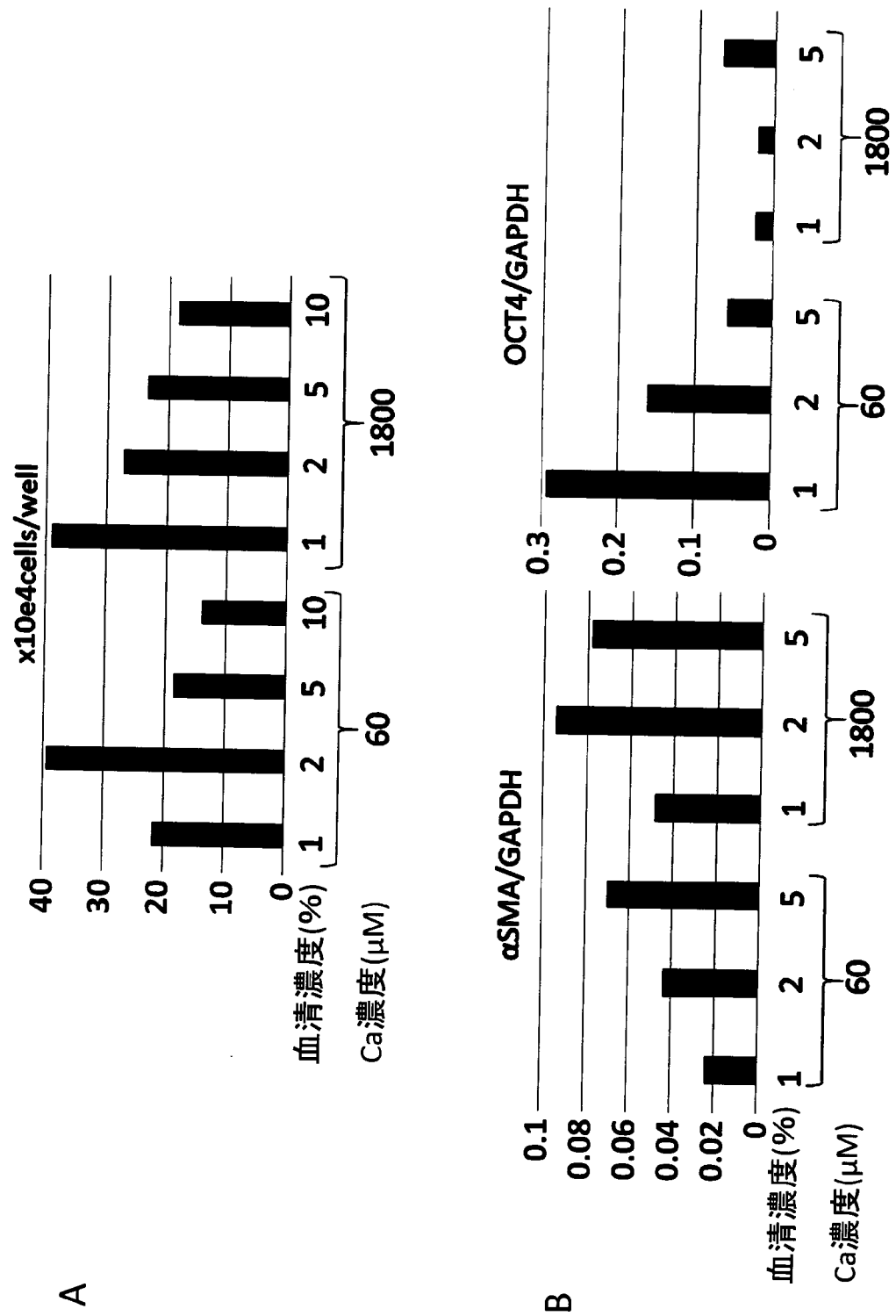
[図3]

図3



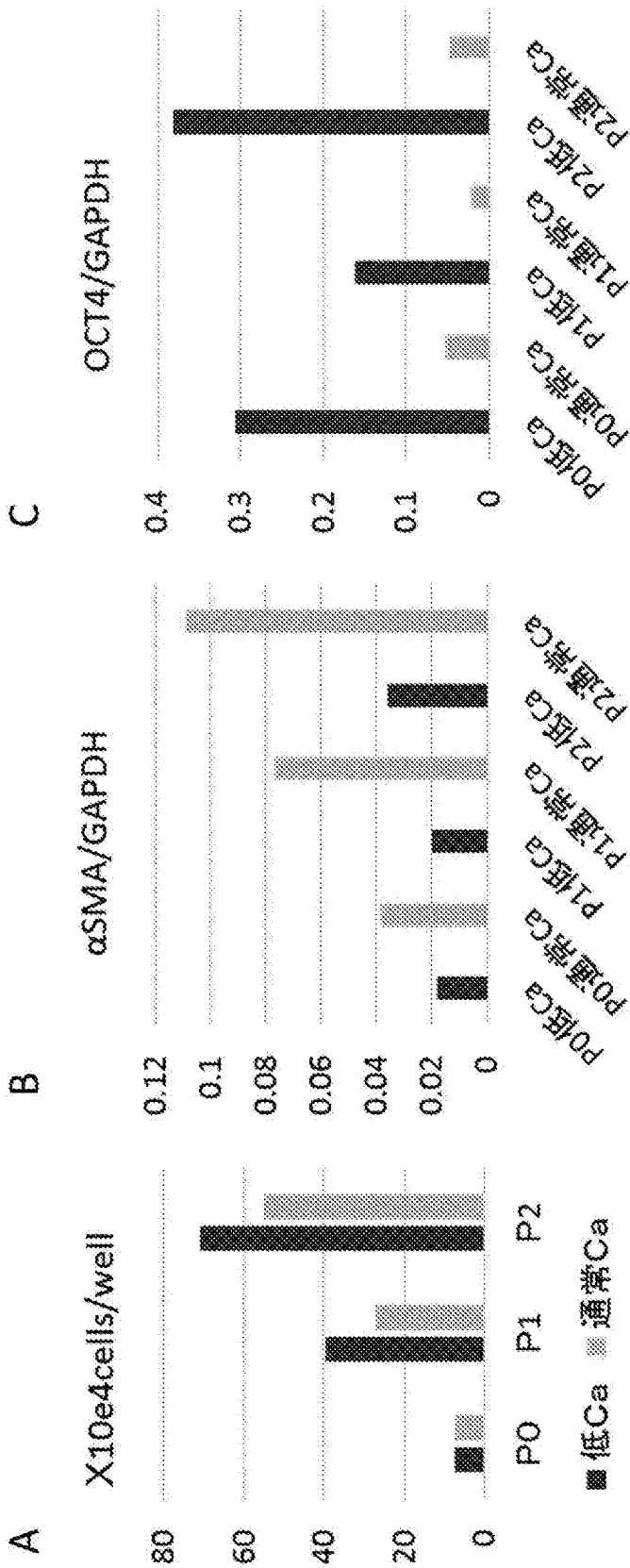
[図4]

図4



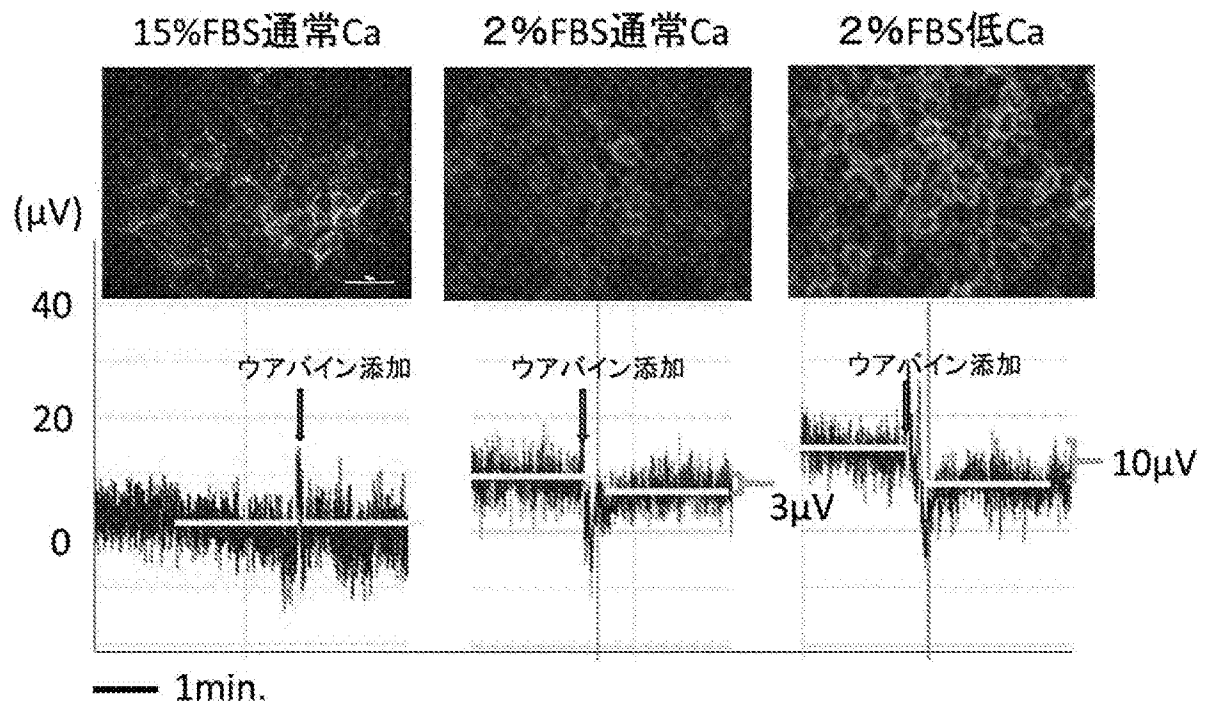
[図5]

図5

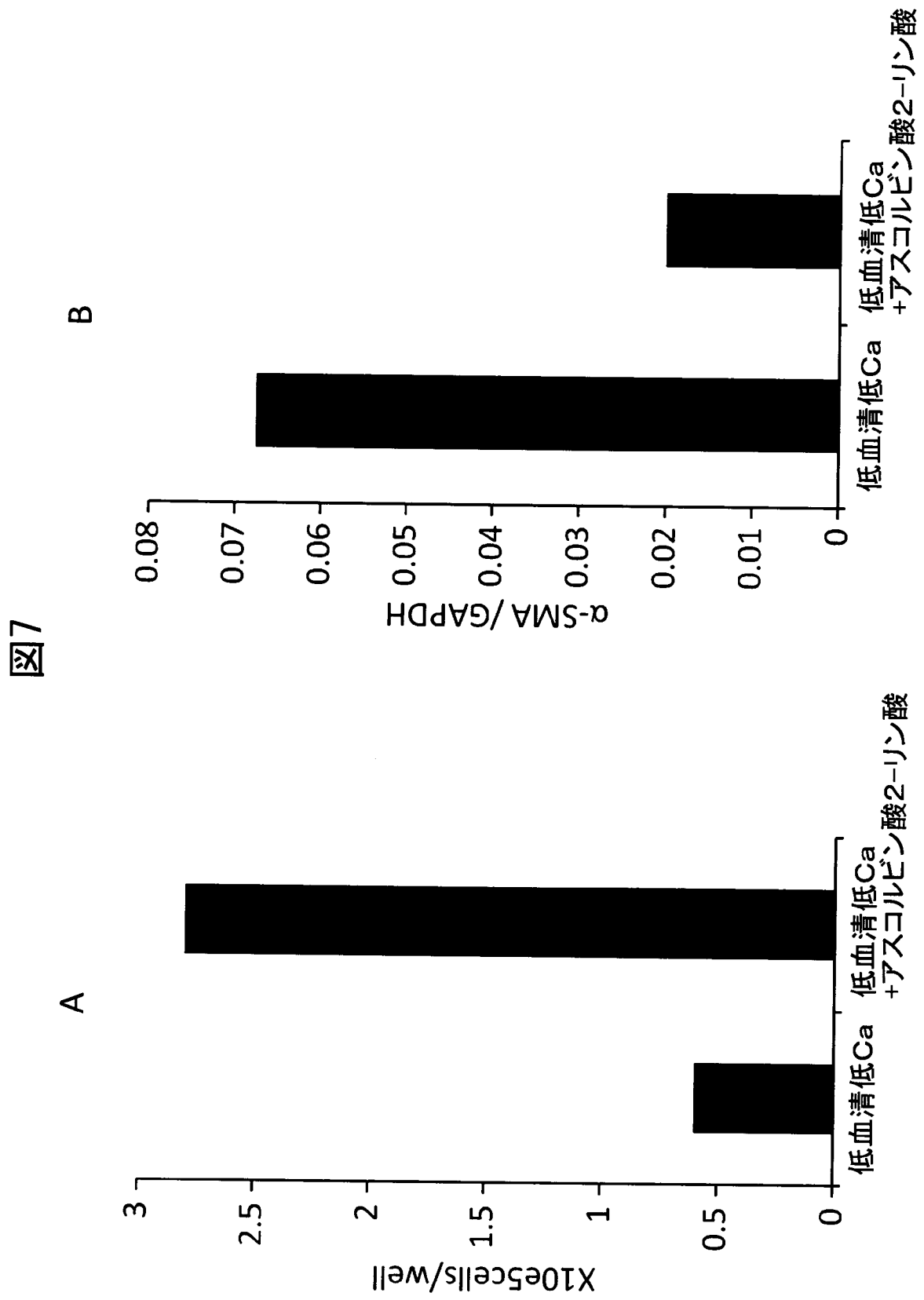


[図6]

図6



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/054028

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/071(2010.01)i, A61L27/00(2006.01)i, C12N11/02(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/071, A61L27/00, C12N11/02

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

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

CAPplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS/WPIX (STN),

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 2006-187281 A (Shiro AMANO), 20 July 2006 (20.07.2006), claims; paragraphs [0012] to [0039]; examples & US 2009/0232772 A1 claims; paragraphs [0012] to [0055]; examples & EP 1835023 A1 & WO 2006/092894 A1	1, 2, 4, 7-12, 15, 16/4-6, 8, 9, 13
X/Y	JP 2000-198701 A (Bausch & Lomb Surgical, Inc.), 18 July 2000 (18.07.2000), paragraph [0014]; examples 1, 2 & US 6153582 A 4th paragraph, line 53; examples 1, 2 & EP 1000541 A1	1, 2, 7-10/ 4-6, 8, 9, 13



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 April 2016 (28.04.16)

Date of mailing of the international search report

17 May 2016 (17.05.16)

Name and mailing address of the ISA/

Japan Patent Office

3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,

Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/054028

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	WO 2014/007402 A1 (Kyoto Prefectural Public University Corp.), 09 January 2014 (09.01.2014), claims; examples 5, 8; paragraphs [0501], [0507] & US 2015/0202256 A1 claims; examples 5, 8; paragraphs [0683], [0689] & EP 2876160 A1	7-10/8,9
X/Y	HIRATA-TOMINAGA, K. et al., Corneal endothelial cell fate is maintained by LGR5 through the regulation of hedgehog and Wnt pathway, Stem Cells (2013) Vol.31, No.7, pp.1396-1407, ISSN: 1066-5099, abstract, fig. 3, 6, page 1401, left column, line 11 to right column, line 7	7-10/8,9
X	WO 2013/012087 A1 (Osaka University), 24 January 2013 (24.01.2013), claims; examples; paragraphs [0089], [0092] & US 2014/0170751 A1 claims; examples; paragraphs [0139] to [0141], [0148] to [0149] & EP 2733201 A1	10
X/Y	WO 2011/096593 A1 (Foundation for Biomedical Research and Innovation), 11 August 2011 (11.08.2011), claims; paragraphs [0017] to [0023]; examples & US 2013/0023050 A1 claims; paragraphs [0063] to [0071]; examples & EP 2532738 A1	10/4-6,13
Y	MIMURA, T. et al., Corneal endothelial regeneration and tissue engineering, Progress in Retinal and Eye Research, (2013) Vol.35, pp.1-17, ISSN: 1350-9462, page 1, abstract, page 4, table 1, pages 4 to 5, paragraph of '3.2'	4-6,13
Y	Yasushi SHINTANI, "Collagen I-induced epithelial mesenchymal transition", Journal of Japanese Biochemical Society (2009) vol.81, no.2, pages 113 to 117, ISSN: 0037-1017, page 113, paragraph of '2.'	8,9

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N5/071(2010.01)i, A61L27/00(2006.01)i, C12N11/02(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. C12N5/071, A61L27/00, C12N11/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

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

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

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y	JP 2006-187281 A (天野 史郎), 2006.07.20, 特許請求の範囲, 【0012】 - 【0039】, 実施例 & US 2009/0232772 A1, 特許請求の範囲, [0012] - [0055], 実施例 & EP 1835023 A1 & WO 2006/092894 A1	1, 2, 4, 7-12, 15, 16/ 4-6, 8, 9, 13

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

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 8 . 0 4 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

1 7 . 0 5 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

坂崎 恵美子

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

4 B

5 8 0 2

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y	JP 2000-198701 A (ボシュ ロム サージカル インコーポレイテ ッド), 2000.07.18, 【0014】, 実施例1, 2 & US 6153582 A, 第4段第53行, 実施例1, 2 & EP 1000541 A1	1, 2, 7-10/ 4-6, 8, 9, 13
X/ Y	WO 2014/007402 A1 (京都府公立大学法人), 2014.01.09, 特許請求の範囲, 実施例5, 8, 【0501】、【0507】 & US 2015/0202256 A1, 特許請求の範囲, 実施例5, 8, [0683], [0689] & EP 2876160 A1	7-10/ 8, 9
X/ Y	HIRATA-TOMINAGA, K. et al., Corneal endothelial cell fate is maintained by LGR5 through the regulation of hedgehog and Wnt pathway, Stem Cells (2013) Vol. 31, No. 7, pp.1396-1407, ISSN: 1066-5099 要約, 図3, 6, 第1401頁左欄第11行-右欄第7行	7-10/ 8, 9
X	WO 2013/012087 A1 (国立大学法人大阪大学), 2013.01.24, 特許請求の範囲, 実施例, 【0089】、【0092】 & US 2014/0170751 A1, 特許請求の範囲, 実施例, [0139]-[0141], [0148]-[0149] & EP 2733201 A1	10
X/ Y	WO 2011/096593 A1 (財団法人先端医療振興財団), 2011.8.11, 特許請求の範囲, 【0017】-【0023】, 実施例 & US 2013/0023050 A1, 特許請求の範囲, [0063]-[0071], 実施例 & EP 2532738 A1	10/ 4-6, 13
Y	MIMURA, T. et al., Corneal endothelial regeneration and tissue engineering, Progress in Retinal and Eye Research, (2013) Vol. 35, pp.1-17, ISSN: 1350-9462 第1頁 要約, 第4頁 表1, 第4頁-5頁「3.2」項	4-6, 13
Y	新谷康, I型コラーゲンによる上皮間葉転換の誘導, 生化学 (2009) Vol. 81, No. 2, pp.113-117, ISSN: 0037-1017 第113頁「2.」項	8, 9