(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5657252号
(P5657252)

(45)発行日　平成27年1月21日(2015.1.21)　(24)登録日　平成26年12月5日(2014.12.5)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	45/00	
A61K 31/4409	(2006.01)	A61K	31/4409	
A61K 31/496	(2006.01)	A61K	31/496	
A61P 43/00	(2006.01)	A61P	43/00	105
A61P 27/02	(2006.01)	A61P	27/02	

請求項の数 17　(全 27 頁)

(21)出願番号　特願2009-530186 (P2009-530186)
(86)(22)出願日　平成20年8月28日 (2008.8.28)
(86)国際出願番号　PCT/JP2008/065459
(87)国際公開番号　WO2009/028631
(87)国際公開日　平成21年3月5日 (2009.3.5)
審査請求日　平成23年6月23日 (2011.6.23)
(31)優先権主張番号　特願2007-223141 (P2007-223141)
(32)優先日　平成19年8月29日 (2007.8.29)
(33)優先権主張国　日本国(JP)
(31)優先権主張番号　特願2008-16088 (P2008-16088)
(32)優先日　平成20年1月28日 (2008.1.28)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

前置審査

(73)特許権者　000199175
千寿製薬株式会社
大阪府大阪市中央区平野町２丁目５番８号
(73)特許権者　503076858
木下　茂
大阪府大阪市阿倍野区北畠１－３－１１
(74)代理人　100078282
弁理士　山本　秀策
(74)代理人　100113413
弁理士　森下　夏樹
(74)代理人　100118371
弁理士　▲駒▼谷　剛志
(72)発明者　小泉　範子
京都府京都市左京区高野蓼原町１－３　ルネ下鴨東５１４号

最終頁に続く

(54)【発明の名称】角膜内皮細胞接着促進剤

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有してなる角膜内皮細胞の接着促進剤。
【請求項２】
前記Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が、（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン、１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジンおよびそれらの薬理学的に許容される塩からなる群より選ばれる少なくとも一つである請求項１記載の促進剤。
【請求項３】
前記角膜内皮細胞がヒト由来である請求項１記載の促進剤。
【請求項４】
角膜内皮障害の予防または治療用製剤である請求項１～３いずれか一項に記載の促進剤。
【請求項５】
前房内注射液または眼灌流液の形態である請求項４記載の促進剤。
【請求項６】
Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有してなる角膜保存液。
【請求項７】
前記Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が、（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン、１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモ

ピペラジンおよびそれらの薬理学的に許容される塩からなる群より選ばれる少なくとも一つである請求項６記載の保存液。
【請求項８】
前記角膜がヒト由来である請求項６記載の保存液。
【請求項９】
Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有してなる角膜保護液中に角膜片または角膜内皮細胞を保持する工程を含む、角膜を保護する方法。
【請求項１０】
前記Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が、（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン、１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジンおよびそれらの薬理学的に許容される塩からなる群より選ばれる少なくとも一つである請求項９記載の保護方法。
【請求項１１】
前記角膜がヒト由来である請求項９記載の保護方法。
【請求項１２】
Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有してなる培養液を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を含む、角膜内皮製剤の製造方法。
【請求項１３】
前記Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が、（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン、１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジンおよびそれらの薬理学的に許容される塩からなる群より選ばれる少なくとも一つである請求項１２記載の製造方法。
【請求項１４】
前記角膜内皮細胞がヒト由来である請求項１２記載の製造方法。
【請求項１５】
水疱性角膜症、角膜浮腫または角膜白斑を治療するための角膜内皮製剤であって、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有してなる培養液、および該培養液を用いて培養された角膜内皮細胞を含有する、角膜内皮製剤。
【請求項１６】
前記Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が、（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン、１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジンおよびそれらの薬理学的に許容される塩からなる群より選ばれる少なくとも一つである請求項１５記載の角膜内皮製剤。
【請求項１７】
前記角膜内皮細胞がヒト由来である請求項１５記載の角膜内皮製剤。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、角膜内皮細胞接着促進剤に関し、角膜内皮細胞の接着、維持または保存のために用いられるものである。
【背景技術】
【０００２】
視覚情報は、眼球の最前面の透明な組織である角膜から取り入れられた光が、網膜に達して網膜の神経細胞を興奮させ、発生した電気信号が視神経を経由して大脳の視覚野に伝達することで認識される。良好な視力を得るためには、角膜が透明であることが必要である。角膜の透明性は、角膜内皮細胞のポンプ機能とバリア機能により、含水率が一定に保たれることにより保持される。
【０００３】
ヒトの角膜内皮細胞は、出生時には１平方ミリメートル当たり約３０００個の密度で存在しているが、一度障害を受けると再生する能力を持たない。角膜内皮変性症や種々の原

因による角膜内皮の機能不全によって生じる水疱性角膜症では、角膜が浮腫と混濁を生じ、著しい視力低下をきたす。現在、水疱性角膜症に対しては、角膜の上皮、実質および内皮の３層構造のすべてを移植する全層角膜移植術が行われている。しかし、日本での角膜提供は不足しており、角膜移植の待機患者約５５００人に対し、年間に国内で行われている角膜移植件数は２７００件程度である。

【０００４】

近年、拒絶反応や術後合併症のリスクを軽減し、よりよい視機能を得る目的から、障害を受けた組織のみを移植する「パーツ移植」の考えが注目されている。角膜移植の中でも、角膜上皮のみを移植する上皮移植術、口腔粘膜を角膜上皮の代わりに移植する培養口腔粘膜上皮移植術、実質組織の移植である深層表層角膜移植術などが行われるようになっている。角膜内皮のみを移植する方法も検討されている。角膜内皮の移植用として、コラーゲン層上に培養された角膜内皮層からなる角膜内皮様シートが知られている（特許文献１および２を参照）。しかし、角膜内皮細胞、特にヒト由来の角膜内皮細胞は、角膜の提供者が限られているとともに、試験管内での培養が難しく、移植に必要な数の培養細胞を得るには時間と費用を要するものであった。

【０００５】

ヒト胚性幹（ＥＳ）細胞は、高い自己複製能と多分化能を併せもち、医学応用の観点から注目されているが、培養過程で細胞を分散する操作によって容易に細胞死を起こすため、細胞数が著しく損なわれてしまうという実用面での問題点を抱えていた。近年、ヒトＥＳ細胞を培養した際に起こる細胞死はＲｈｏキナーゼ（ＲＯＣＫ）の活性化により引き起こされていること、およびＲＯＣＫの阻害により細胞死が大きく抑制されることが見出され、ＲＯＣＫ阻害剤であるＹ－２７６３２等を用いたヒトＥＳ細胞の大量培養や大脳細胞の産生が可能となることが報告された（非特許文献１）。

【０００６】

Ｒｈｏキナーゼ（ＲＯＣＫ）阻害剤は、様々な作用を有することが知られている。例えば、特許文献３には、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が角膜神経突起形成を促進すること、およびＲｈｏキナーゼ阻害剤が角膜知覚回復剤として用いられることが開示されている。また、特許文献４には、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が網膜神経節細胞の軸索伸展促進作用を有すること、および視覚機能障害の治療に用いられることが開示されている。

【特許文献１】特開２００４－２４８５２号公報
【特許文献２】特開２００５－２２９８６９号公報
【特許文献３】ＷＯ２００５／１１８５８２号パンフレット
【特許文献４】ＷＯ２００２／０８３１７５号パンフレット
【非特許文献１】Nat Biotechnol. 2007, 25, 681

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００７】

本発明の目的は、角膜内皮細胞を効率的に接着可能な手段および角膜内皮製剤の安定的供給手段の提供である。

【課題を解決するための手段】

【０００８】

本発明者らは、上記問題点に鑑み、鋭意検討した結果、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤の存在下に角膜内皮細胞を培養することにより、当該細胞の培養基材への接着が飛躍的に促進されることを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本願発明は、以下に示す通りである。

【０００９】

〔１〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有してなる角膜内皮細胞の接着促進剤。

〔２〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン、１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジンおよびそれらの薬理学的に許容される塩からなる群より選ばれる少なくとも１種

である前記〔１〕記載の促進剤。
〔３〕角膜内皮細胞がヒト由来である前記〔１〕記載の促進剤。
〔４〕角膜内皮障害の予防または治療用製剤である前記〔１〕～〔３〕いずれか記載の促進剤。
〔５〕前房内注射液または眼灌流液の形態である前記〔４〕記載の促進剤。
〔６〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有してなる角膜内皮細胞の培養液。
〔７〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン、１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジンおよびそれらの薬理学的に許容される塩からなる群より選ばれる少なくとも１種である前記〔６〕記載の培養液。
〔８〕角膜内皮細胞がヒト由来である前記〔６〕記載の培養液。
〔９〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有してなる角膜保存液。
〔１０〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン、１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジンおよびそれらの薬理学的に許容される塩からなる群より選ばれる少なくとも１種である前記〔９〕記載の保存液。
〔１１〕角膜がヒト由来である前記〔９〕記載の保存液。
〔１２〕前記〔６〕～〔８〕いずれかに記載の培養液を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を含む、角膜内皮製剤の製造方法。
〔１３〕角膜内皮細胞がヒト由来である前記〔１２〕記載の製造方法。
〔１４〕角膜内皮細胞の接着促進剤を製造するための、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤の使用。
〔１５〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン、１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジンおよびそれらの薬理学的に許容される塩からなる群より選ばれる少なくとも１種である前記〔１４〕記載の使用。
〔１６〕角膜内皮細胞がヒト由来である前記〔１４〕記載の使用。
〔１７〕角膜内皮細胞の接着促進剤が角膜内皮障害の予防または治療用製剤である前記〔１４〕～〔１６〕いずれかに記載の使用。
〔１８〕角膜内皮細胞の接着促進剤が前房内注射液または眼灌流液の形態である前記〔１７〕記載の使用。
〔１９〕角膜内皮細胞の培養液を製造するための、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤の使用。
〔２０〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン、１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジンおよびそれらの薬理学的に許容される塩からなる群より選ばれる少なくとも１種である前記〔１９〕記載の使用。
〔２１〕角膜内皮細胞がヒト由来である前記〔１９〕記載の使用。
〔２２〕角膜保存液を製造するための、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤の使用。
〔２３〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン、１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジンおよびそれらの薬理学的に許容される塩からなる群より選ばれる少なくとも１種である前記〔２２〕記載の使用。
〔２４〕角膜がヒト由来である前記〔２２〕記載の使用。
〔２５〕角膜内皮細胞の接着の促進を必要とする対象または角膜内皮細胞に、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤の有効量を接触させることを含む、角膜内皮細胞の接着を促進させる方法。
〔２６〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン、１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジンおよびそれらの薬理学的に許容される塩からなる群より選ばれる少なくとも１種である前記〔２５〕記載の促進方法。
〔２７〕角膜内皮細胞がヒト由来である前記〔２５〕記載の促進方法。
〔２８〕角膜内皮障害の予防または治療を目的とする前記〔２５〕記載の促進方法。

〔２９〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤の有効量を前房内注射液または眼灌流液の形態で投与する前記〔２５〕記載の促進方法。
〔３０〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有してなる培養液を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を含む、角膜内皮細胞の培養方法。
〔３１〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン、１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジンおよびそれらの薬理学的に許容される塩からなる群より選ばれる少なくとも１種である前記〔３０〕記載の培養方法。
〔３２〕角膜内皮細胞がヒト由来である前記〔３０〕記載の培養方法。
〔３３〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有してなる角膜保護液中に角膜片または角膜内皮細胞を保持する工程を含む、角膜を保護する方法。
〔３４〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン、１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジンおよびそれらの薬理学的に許容される塩からなる群より選ばれる少なくとも１種である前記〔３３〕記載の保護方法。
〔３５〕角膜がヒト由来である前記〔３３〕記載の保護方法。
〔３６〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有してなる培養液を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を含む、角膜内皮製剤の製造方法。
〔３７〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン、１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジンおよびそれらの薬理学的に許容される塩からなる群より選ばれる少なくとも１種である前記〔３６〕記載の製造方法。
〔３８〕角膜内皮細胞がヒト由来である前記〔３６〕記載の製造方法。
〔３９〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有してなる培養液を用いて角膜内皮細胞を培養する工程、および
前記培養工程により得られた角膜内皮製剤を、角膜内皮の移植を必要とする対象に移植する工程
を含む、水疱性角膜症、角膜浮腫または角膜白斑の治療方法。
〔４０〕Ｒｈｏキナーゼ阻害剤が（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン、１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジンおよびそれらの薬理学的に許容される塩からなる群より選ばれる少なくとも１種である前記〔３９〕記載の治療方法。
〔４１〕角膜内皮細胞がヒト由来である前記〔３９〕記載の治療方法。
【発明の効果】
【００１０】
本発明の角膜内皮細胞の接着促進剤は、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を有効成分として含有するものである。本発明の角膜内皮細胞の接着促進剤は、角膜内皮細胞の接着を促進し、良好な細胞形態および高い細胞密度を持った角膜内皮細胞層の形成を可能とする。これにより、角膜内皮障害を伴う疾患、例えば、水疱性角膜症、角膜内皮炎の治療剤または予防剤として有用である。本発明の角膜内皮細胞の接着促進剤は、角膜内皮障害を伴う疾患の治療または予防における角膜内皮保護剤として有用である。さらに、本発明の角膜内皮細胞の接着促進剤によると、白内障手術や硝子体手術などの内眼手術に伴う角膜内皮障害、眼圧の上昇（特に緑内障発作）によって引き起こされる角膜内皮障害、またはコンタクトレンズ装用による酸素不足によって引き起こされる角膜内皮障害の治療または予防における角膜内皮保護剤として利用可能である。本発明の培養液または角膜保存液によると、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有するものであることから、角膜内皮細胞を良好に培養、維持または保存することができ、角膜内皮製剤の安定的な供給、維持または保存が可能となる。
【図面の簡単な説明】
【００１１】
【図１】図１は、初代培養ウサギ角膜内皮細胞の位相差顕微鏡写真（培養開始２４時間後

、倍率は、１００倍である）である。
【図２】図２は、ＭＴＳアッセイによる初代培養ウサギ角膜内皮細胞の増殖を調べたグラフである。縦軸は、Day1のRock inhibitor (-)群の吸光度に対する相対値を表す。
【図３】図３は、培養開始２４時間後の初代培養ウサギ角膜内皮細胞の接着を調べたグラフである。縦軸は、培養開始２４時間後のRock inhibitor (-)群の吸光度に対する相対値を表す。
【図４】図４は、培養開始後３日目の初代培養サル角膜内皮細胞の位相差顕微鏡写真である。倍率は、１００倍である。
【図５】図５は、初代培養ヒト角膜内皮細胞の位相差顕微鏡写真（７日目、倍率は、１００倍である）である。
【図６】図６は、初代培養サル角膜内皮細胞の写真（Ａ：ROCK inhibitor（－）、Ｂ：ROCK inhibitor（＋）、倍率は、２０倍である）および培養細胞の総面積を示すグラフ（Ｃ）である。
【図７】図７は、初代培養サル角膜内皮細胞の生細胞数を示すグラフである。
【図８】図８は、サル角膜内皮細胞の継代培養に及ぼすＹ－２７６３２の影響を調べたグラフである。
【図９】図９は、サル角膜内皮細胞の継代培養時の細胞形態に及ぼすＹ－２７６３２の影響を調べた位相差顕微鏡写真（倍率は、１００倍である）である。
【図１０】図１０は、サル角膜内皮細胞の継代培養時の細胞形態に及ぼすＹ－２７６３２の影響を調べた顕微鏡写真（ファロイジン蛍光染色、倍率は、２００倍である）である。
【図１１】図１１は、サル角膜内皮細胞の細胞周期に及ぼすＹ－２７６３２の影響を調べた顕微鏡写真（抗Ｋｉ６７抗体染色、倍率は、２００倍である）である。
【図１２】図１２は、サル角膜内皮細胞の細胞周期に及ぼすＹ－２７６３２の影響を調べたフローサイトメトリーの結果である。図１２ＡはROCK inhibitor（－）群の継代培養１日目を、ＢはROCK inhibitor（－）群の継代培養２日目を、ＣはROCK inhibitor（＋）群の継代培養１日目を、ＤはROCK inhibitor（＋）群の継代培養２日目を示す。
【図１３】図１３は、図１２のフローサイトメトリーの結果を抗Ｋｉ６７抗体陽性細胞率により示したグラフである。
【図１４】図１４は、サル角膜内皮細胞のアポトーシスに及ぼすＹ－２７６３２の影響を示すグラフである。
【図１５】図１５は、サル角膜内皮細胞のアポトーシスに及ぼすＹ－２７６３２の影響を死細胞数により示したグラフである。
【図１６】図１６は、培養サル角膜内皮細胞の密度に及ぼすＹ－２７６３２の影響を示すグラフである。
【図１７】図１７は、継代培養から２４時間後の培養サル角膜内皮細胞の接着を調べたグラフである。縦軸は、継代培養開始２４時間後のコントロール群の発光度に対するファスジル群の相対値を表す。
【発明を実施するための最良の形態】
【００１２】
本発明の角膜内皮細胞の接着促進剤（以下、「本発明の接着促進剤」と省略する場合がある）は、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を有効成分として含有するものである。
【００１３】
本発明において、Ｒｈｏキナーゼとは、Ｒｈｏの活性化に伴い活性化されるセリン／スレオニンキナーゼを意味する。例えば、ＲＯＫα（ＲＯＣＫII：Leung, T. ら, J. Biol. Chem., 270, 29051-29054, 1995）、ｐ１６０ＲＯＣＫ（ＲＯＫβ、ＲＯＣＫ－Ｉ ：Ishizaki, T.ら, The EMBO J., 15(8), 1885-1893, 1996）およびその他のセリン／スレオニンキナーゼ活性を有するタンパク質が挙げられる。
【００１４】
本発明においては、１種類のＲｈｏキナーゼ阻害剤を単独で含めることも、また必要に応じて数種類を併用して含めることもできる。

【００１５】
Ｒｈｏキナーゼ阻害剤としては、下記文献：
ＵＳ４６７８７８３、特許３４２１２１７、ＷＯ９９／２０６２０、ＷＯ９９／６１４０３、ＷＯ０２／０７６９７６、ＷＯ０２／０７６９７７、ＷＯ０２／１００８３３、ＷＯ０３／０５９９１３、ＷＯ０３／０６２２２７、ＷＯ２００４／００９５５５、ＷＯ２００４／０２２５４１、ＷＯ２００４／１０８７２４、ＷＯ２００５／００３１０１、ＷＯ２００５／０３９５６４、ＷＯ２００５／０３４８６６、ＷＯ２００５／０３７１９７、ＷＯ２００５／０３７１９８、ＷＯ２００５／０３５５０１、ＷＯ２００５／０３５５０３、ＷＯ２００５／０３５５０６、ＷＯ２００５／０８０３９４、ＷＯ２００５／１０３０５０、ＷＯ２００６／０５７２７０、ＷＯ２００７／０２６６６４などに開示された化合物があげられる。かかる化合物は、それぞれ開示された文献に記載の方法により製造することができる。一具体例として、１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジン（ファスジル）、（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン（Ｙ－２７６３２）などがあげられ、これらの化合物は、市販品を好適に用いることもできる。

【００１６】
中でも、（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン、１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジンおよびそれらの薬理学的に許容される塩は、角膜内皮細胞の接着促進に特に優れているため、好ましく用いられる。該化合物の塩としては、製薬上許容される酸付加塩が好ましく、それらの酸とは塩酸、臭化水素酸、硫酸等の無機酸、メタンスルホン酸、フマル酸、マレイン酸、マンデル酸、クエン酸、酒石酸、サリチル酸等の有機酸があげられる。（＋）－トランス－４－（１－アミノエチル）－１－（４－ピリジルカルバモイル）シクロヘキサン・２塩酸塩、および１－（５－イソキノリンスルホニル）ホモピペラジン塩酸塩がより好ましい。

【００１７】
本発明において、「角膜内皮細胞の接着促進」としては、例えば、角膜内皮の細胞同士の接着促進、および角膜内皮細胞と培養基材との接着促進の両方があげられる。

【００１８】
本発明の接着促進剤は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サルなど）由来の角膜組織から分離された角膜内皮細胞または分離され継代した角膜内皮細胞に対して接着促進作用を奏する。本発明の接着促進剤は、特に培養および継代が困難とされるヒト由来の角膜内皮細胞の接着促進作用に優れていることから、ヒト由来の角膜内皮細胞を対象にすることが好ましい。

【００１９】
角膜内皮細胞は角膜の透明度を維持する役割を担っている。この内皮細胞の密度がある限度を超えて少なくなると角膜にむくみが発生し、角膜の透明性が維持できなくなり、角膜内皮障害が引き起こされる。本発明の接着促進剤は、角膜内皮細胞の接着を促進し、良好な細胞形態および高い細胞密度を持った角膜内皮細胞層の形成を可能とし、さらには角膜内皮細胞に対してアポトーシス抑制作用を有するため、角膜内皮障害を伴う疾患、例えば、水疱性角膜症、角膜内皮炎の治療剤または予防剤として有用である。また、本発明の接着促進剤は、白内障手術や硝子体手術などの内眼手術に伴う角膜内皮障害、眼圧の上昇（特に緑内障発作）によって引き起こされる角膜内皮障害、またはコンタクトレンズ装用による酸素不足によって引き起こされる角膜内皮障害の治療剤または予防剤として有用である。

【００２０】
本発明の接着促進剤は、眼局所投与に適した剤型であれば特に限定されないが、前房内注射液または眼灌流液の形態に製剤化されることが好ましい。これらは当該分野で汎用されている通常の技術を用い、調製することができる。前房内注射液または眼灌流液の形態で眼局所投与した場合、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤と角膜内皮細胞とが生体内で接触し、角膜

内皮細胞の接着が促進される。

【００２１】

例えば、本発明の接着促進剤を前房内注射液または眼灌流液として用いる場合、安定剤（例えば、亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、アスコルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエンなど）、溶解補助剤（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、マクロゴール、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油など）、懸濁化剤（例えば、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウムなど）、乳化剤（例えば、ポリビニルピロリドン、大豆レシチン、卵黄レシチン、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリソルベート８０など）、緩衝剤（例えば、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、グルタミン酸、イプシロンアミノカプロン酸など）、粘稠剤（例えば、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースなどの水溶性セルロース誘導体、コンドロイチン硫酸ナトリウム、ヒアルロン酸ナトリウム、カルボキシビニルポリマー、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、マクロゴールなど）、保存剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、グルコン酸クロルヘキシジン、クロロブタノール、ベンジルアルコール、デヒドロ酢酸ナトリウム、パラオキシ安息香酸エステル類、エデト酸ナトリウム、ホウ酸など）、等張化剤（例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、ホウ酸、ブドウ糖、プロピレングリコールなど）、ｐＨ調整剤（例えば、塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸、酢酸など）、清涼化剤（例えば、ｌ－メントール、ｄ－カンフル、ｄ－ボルネオール、ハッカ油など）などを添加剤として加えることができる。これら添加剤の添加量は、添加剤の種類、用途などによって異なるが、添加剤の目的を達成し得る濃度を添加すればよい。

【００２２】

本発明の接着促進剤における有効成分の量は、通常０．００００１～１ｗ／ｖ％、好ましくは０．００００１～０．１ｗ／ｖ％、より好ましくは０．０００１～０．０１ｗ／ｖ％である。投与量、投与回数は、症状、年齢、体重、投与形態により異なるが、通常成人に対し、例えば前房内注射液として使用する場合には、有効成分を０．０００１～０．１ｗ／ｖ％、好ましくは０．０００１～０．０１ｗ／ｖ％含有する製剤を、１日あたり数回、好ましくは１～２回、より好ましくは１回、１回当たり０．０１～０．１ｍＬ投与することができる。

【００２３】

本発明の接着促進剤は、角膜内皮細胞を試験管内で培養する場合に、培養液に添加することもできる。Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を当該培養液に添加して培養を続けることにより、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤と角膜内皮細胞とが生体外で接触し、角膜内皮細胞の接着が促進される。

【００２４】

本発明は、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有する角膜内皮細胞の培養液を提供する。本発明の培養液に含まれるＲｈｏキナーゼ阻害剤は、前記した通りである。

【００２５】

本発明の培養液には、内皮細胞の培養に通常用いられる培地（例、ＤＭＥＭ（GIBCO BRL社）、血清（例、ウシ胎仔血清（ＦＢＳ））、成長因子（例、ｂ-ＦＧＦ）、抗生物質（例、ペニシリン、ストレプトマイシン）などを含むことができる。

【００２６】

本発明の培養液中のＲｈｏキナーゼ阻害剤の濃度は、通常１～１００μＭ、好ましくは５～２０μＭ、より好ましくは１０μＭである。

【００２７】

本発明の培養液は、角膜内皮細胞の接着を亢進することによって細胞の脱落を防止し、良好な細胞形態および高い細胞密度を持った角膜内皮細胞層の形成を可能とするため、後

述する本発明の角膜内皮製剤の製造方法に好適に用いられる。また、本発明の培養液は、角膜内皮細胞を維持するためにも用いられる。

【００２８】

本発明は、Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有する角膜保存液を提供する。本発明の角膜保存液に含まれるＲｈｏキナーゼ阻害剤は、前記した通りである。角膜保存液とは、ドナーから摘出した角膜片を、レシピエントに移植するまでの期間において保存するための液剤である。

【００２９】

本発明の角膜保存液としては、角膜移植時に通常用いられる保存液（強角膜片保存液（Ｏｐｔｉｓｏｌ　ＧＳ：登録商標）、角膜移植用眼球保存液（ＥＰII：登録商標））、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）などにＲｈｏキナーゼ阻害剤を含有させたものがあげられる。

【００３０】

本発明の角膜保存液中のＲｈｏキナーゼ阻害剤の濃度は、通常１～１００μＭ、好ましくは５～２０μＭ、より好ましくは１０μＭである。

【００３１】

本発明の角膜保存液は、角膜内皮細胞の接着を亢進することによって細胞の脱落を防止し、良好な細胞形態および高い細胞密度を持った角膜内皮細胞層の形成を可能とするため、臓器移植などに用いられる角膜の保存液として用いられる。また、本発明の保存液は、角膜内皮細胞を凍結保存するための保存液としても用いられる。凍結保存のためには、本発明の保存液にグリセロール、ジメチルスルホキシド、プロピレングリコール、アセトアミド等をさらに添加してもよい。

【００３２】

本発明は、本発明の培養液を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を含む、角膜内皮製剤の製造方法を提供する。

【００３３】

角膜内皮製剤は、基材と、当該基材上の試験管内で培養した角膜内皮細胞層とを含有することを特徴とするものである。

【００３４】

本発明において、基材とは、培養角膜内皮細胞層を担持し、移植後少なくとも３日間は生体内でもその形状を維持しうるものであれば特に限定されるものではない。また、当該基材は、角膜内皮細胞を試験管内で培養する場合のスキャフォールドとしての役割を有するものであってもよく、培養後の角膜内皮細胞層を担持させる役割のみを有するものであってもよい。好ましくは、当該基材は、角膜内皮細胞の培養に用いられ、培養完了後にそのまま移植に供することが可能なスキャフォールドとしての役割を有するものである。

【００３５】

前記基材としては、例えば、コラーゲン、ゼラチン、セルロース等の天然物由来の高分子材料、ポリスチレン、ポリエステル、ポリカーボネート、ポリ（Ｎ－イソプロピルアクリルアミド）等の合成高分子材料、ポリ乳酸、ポリグリコール酸等の生分解性高分子材料、ハイドロキシアパタイト、羊膜などがあげられる。

【００３６】

前記基材の形状は、角膜内皮細胞層を担持し、移植に適する形状であれば特に限定されるものではないが、シート状であることが好ましい。本発明の製剤がシート状の場合、移植時に適用部位に合わせた大きさに切断して用いることができる。また、シートを小さく丸めた後、創口から挿入することも可能である。好ましい具体例として、障害した角膜内皮の面積の約８割を覆う円形の形状が例示される。また、適用部位に密着可能なように、前記円形の周辺部に切り込みを入れることも好ましい。

【００３７】

好ましい態様において、前記基材はコラーゲンである。コラーゲンとしては、特開２００４－２４８５２号公報に記載のコラーゲンシートが好適に使用できる。かかるコラーゲ

ンシートは、前記特開２００４－２４８５２号公報に記載の方法に従って、例えば羊膜から調製することができる。

【００３８】

前記角膜内皮細胞層は、以下の特徴を少なくとも１つ備えるものであることが好ましい。より好ましくは、以下の特徴を２つ以上、さらにより好ましくは全て備えるものである。

（１）細胞層が単層構造である。これは生体の角膜内皮細胞層が備える特徴の一つである。

（２）細胞層における細胞密度は約１，０００～約４，０００細胞／mm^2である。特に、成人をレシピエント（移植者）とする場合には約２，０００～約３，０００細胞／mm^2であることが好ましい。

（３）細胞層を構成する細胞の平面視形状が略六角形である。これは生体における角膜内皮細胞層を構成する細胞が備える特徴の一つである。本発明の製剤は生体の角膜内皮細胞層に類似し、生来の角膜内皮細胞層と同様の機能を発揮するとともに、生体内で増殖能も発揮することができる。

（４）細胞層において細胞が規則正しく整列している。生体の角膜内皮細胞層においてはそれを構成する細胞は規則正しく整列しており、これによって角膜内皮細胞の正常な機能と高い透明性が維持され、また角膜の水分調整機能が適切に発揮されると考えられている。したがって、このような形態的な特徴を備えることにより、本発明の製剤は、生体における角膜内皮細胞層と同様の機能を発揮することが期待される。

【００３９】

本発明の製造方法は、本発明の培養液を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を含み、例えば以下の方法により実施され得る。

＜１＞角膜内皮細胞の採取および試験管内での培養

角膜内皮細胞はレシピエント自身または適当なドナーの角膜から常法で採取される。本発明における移植条件を考慮すれば、同種由来の角膜内皮細胞を準備すればよい。例えば、角膜組織のデスメ膜と内皮細胞層を角膜実質から剥離した後、培養皿に移し、ディスパーゼなどで処理する。これによって角膜内皮細胞はデスメ膜より脱落する。デスメ膜に残存している角膜内皮細胞はピペッティングなどによって脱落させることができる。デスメ膜を除去した後、本発明の培養液中で角膜内皮細胞を培養する。培養液としては例えば市販のＤＭＥＭ（Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ’ｓ Ｍｅｄｉｕｍ）にＦＢＳ（ウシ胎仔血清）、ｂ－ＦＧＦ（ｂａｓｉｃ－ｆｉｂｌｏｂｌａｓｔ ｇｒｏｗｔｈ ｆａｃｔｏｒ）、およびペニシリン、ストレプトマイシンなどの抗生物質を適宜添加し、さらにＹ－２７６３２またはファスジルを添加したものを使用することができる。培養容器（培養皿）にはその表面にＩ型コラーゲン、ＩＶ型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンまたはウシ角膜内皮細胞の細胞外マトリックスなどをコーティングしてあるものを使用することが好ましい。あるいは、通常の培養容器をＦＮＣ ｃｏａｔｉｎｇ ｍｉｘ（登録商標）等の市販のコーティング剤で処理したものを用いてもよい。かかるコーティングと本発明の培養液とを併用することにより、角膜内皮細胞の培養容器表面への接着が促され、良好な増殖が行われるからである。

【００４０】

角膜内皮細胞を培養する際の温度条件は、角膜内皮細胞が生育する限りにおいて特に限定されないが、例えば約２５～約４５℃、増殖効率を考慮すれば好ましくは約３０～約４０℃、さらに好ましくは約３７℃である。培養方法は、通常の細胞培養用インキュベーター内で、加湿下、約５～１０％のCO_2濃度の環境下で行われる。

【００４１】

＜２＞継代培養

培養に供された角膜内皮細胞が増殖した後に継代培養を行うことができる。好ましくはサブコンフルエントないしコンフルエントになった時点で継代培養を行う。継代培養は次のように行うことができる。まずｔｒｙｐｓｉｎ－ＥＤＴＡ等で処理することによって細

胞を培養容器表面から剥がし、次いで細胞を回収する。回収した細胞に本発明の培養液を加えて細胞浮遊液とする。細胞を回収する際、あるいは回収後に遠心処理を行うことが好ましい。かかる遠心処理によって細胞密度の高い細胞浮遊液を調製することができる。好ましい細胞密度は、約１～２×１０^{6}個／ｍＬである。尚、ここでの遠心処理の条件としては、例えば、５００ｒｐｍ（３０ｇ）～１０００ｒｐｍ（７０ｇ）、１～１０分を挙げることができる。

【００４２】

細胞浮遊液は上記の初期培養と同様に培養容器に播種され、培養に供される。継代時の希釈倍率は細胞の状態によっても異なるが、約１：２～１：４、好ましくは約１：３である。継代培養は上記の初期培養と同様の培養条件で行うことができる。培養時間は使用する細胞の状態などによっても異なるが、例えば７～３０日間である。以上の継代培養は必要に応じて複数回行うことができる。本発明の培養液を用いれば、培養初期の細胞接着を亢進させることにより、培養期間の短縮が可能となる。

【００４３】

＜３＞角膜内皮細胞層の調製

細胞浮遊液は、コラーゲンシート等の基材上に播種され、培養に供される。この際、最終的に製造される角膜内皮製剤において所望の細胞密度の細胞層が形成されるように播種する細胞数が調整される。具体的には細胞密度が約１，０００～約４，０００細胞／ｍｍ^{2}の細胞層が形成されるように細胞を播種する。培養は上記の初期培養などと同様の条件で行うことができる。培養時間は使用する細胞の状態などによっても異なるが、例えば３～３０日間である。

【００４４】

以上のようにして培養を行うことにより、基材上に試験管内で培養した角膜内皮細胞層が形成された角膜内皮製剤が得られる。

【００４５】

本発明において、角膜内皮製剤は、角膜内皮細胞を維持するために、本発明の培養液を含んでもよい。また、角膜内皮製剤は、移植に供されるまでに本発明の角膜保存液を含んでもよい。本発明は、角膜内皮製剤と本発明の培養液または保存液との組合せも提供する。

【００４６】

本発明の製造方法により得られた角膜内皮製剤は、角膜内皮の移植が必要な疾患、例えば水疱性角膜症、角膜浮腫、角膜白斑、特に、角膜ジストロフィー、外傷または内眼手術に起因する角膜内皮障害によって生じる水疱性角膜症の治療における移植片として用いることができる。

【００４７】

本発明の接着促進剤および角膜内皮製剤の投与対象は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル等）があげられる。

【実施例】

【００４８】

以下に、実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されない。実験動物の使用にあたっては、動物を用いる生物医学研究に関する原則（International Guiding Principles for Biomedical Research involving Animals）ならびに、動物の愛護及び管理に関する法律、実験動物の飼養及び保管等に関する基準に従った。また、本実験はGuidelines of the Association for Research in Vision and Ophthalmology on the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Researchに従って行った。

【００４９】

実施例１

ＲＯＣＫ阻害剤がウサギ角膜内皮細胞培養に与える影響の検討

安楽死後ただちに摘出したウサギ角膜組織から、角膜内皮細胞が付着したデスメ膜を分離した。デスメ膜を１．２Ｕ／ｍｌのディスパーゼII（Roche Applied Science）とも

に３７℃、５％CO_2の条件下で４５分間インキュベートした後、ピペッティング操作により機械的に角膜内皮細胞を分離した。分離した角膜内皮細胞は遠心分離の後、ROCK inhibitor（＋）群は１０μＭのＹ－２７６３２を添加した角膜内皮用培地を用い、ROCK inhibitor（－）群はＹ－２７６３２を添加しない角膜内皮用培地を用いて同じ濃度になるように攪拌し、１ウェルあたり約２０００個の密度で９６ウェルプレートに播種した。角膜内皮用培地として、１％ウシ胎児血清および２ｍｇ／ｍｌ ｂＦＧＦ (Gibco Invitrogen)を添加した培養液（ＤＭＥＭ、Gibco Invitrogen）を用いた。プレートにはあらかじめ、ＦＮＣ ｃｏａｔｉｎｇ ｍｉｘ（Athena ES）で１０分間の前処理を施した。培養開始後７２時間目に培養液の交換を行い、７２時間以降は、ROCK inhibitor（＋）群、ROCK inhibitor（－）群ともにＹ－２７６３２を添加しない通常の角膜内皮用培地を用いて５日目まで培養した。培養開始２４時間後の初代培養ウサギ角膜内皮細胞の位相差顕微鏡写真を図１に示す。培養開始後１日目から３日目まで、２４時間毎に、CellTiter 96（登録商標）AQueous One Solution Cell Proliferation（Promega）を用いたＭＴＳ（[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]アッセイにより細胞数を測定した（図２）。

【００５０】

ROCK inhibitor（＋）群（図１Ｂ）では、ROCK inhibitor（－）群（図１Ａ）に比べて細胞播種後２４時間(day １)での細胞接着は約２．８倍と有意に亢進していた（図２、３）。コンフルエントに到達した３日目時点では両群間で有意差を認めず（図２）、このことからＹ－２７６３２は初代培養のウサギ角膜内皮細胞において、継代後早期の細胞接着を亢進させる作用があることが明らかとなった。また継代培養したウサギ角膜内皮細胞を用いた検討でも同様の結果が得られており、初代培養および継代培養において、Ｙ－２７６３２は継代後早期の細胞接着に作用すると考えられた。

【００５１】

実施例２

Ｙ－２７６３２がサル角膜内皮細胞培養に与える影響の検討

別の目的で安楽死させたカニクイザルから摘出した角膜組織から、角膜内皮細胞が付着したデスメ膜を分離した。ROCK inhibitor（＋）群では、デスメ膜を１０μＭのＹ－２７６３２を添加した角膜内皮用培地に入れて３７℃、５％CO_2の条件下で１０分間インキュベートした。ROCK inhibitor（－）群では、Ｙ－２７６３２を添加しない角膜内皮用培地に入れて同じ条件で１０分間インキュベートした。角膜内皮用培地として、実施例１と同じ細胞培養液を用いた。インキュベート後のデスメ膜を１．２Ｕ／ｍｌのディスパーゼII（Roche Applied Science）とともに３７℃、５％CO_2の条件下で４５分間インキュベートした後、ピペッティング操作により機械的に角膜内皮細胞を分離した。分離した角膜内皮細胞は遠心分離の後、Ｙ－２７６３２（＋）およびＹ－２７６３２（－）の角膜内皮用培地に同じ濃度になるように攪拌し、１ウェルあたり約２００００個の密度で１２ウェルプレートに播種した。プレートにはあらかじめ、ＦＮＣ ｃｏａｔｉｎｇ ｍｉｘ（Athena ES）で１０分間の前処理を施した。 培養開始後７２時間目に培養液の交換を行い、７２時間以降は、ROCK inhibitor（＋）群、ROCK inhibitor（－）群ともにＹ－２７６３２を添加しない通常の角膜内皮用培地を用いて培養した。

【００５２】

図４より、培養開始後２４時間のカニクイザル初代培養角膜内皮細胞において、ROCK inhibitor（＋）（図４Ｂ）ではROCK inhibitor（－）（図４Ａ）に比べて明らかに多くの細胞がプレート上に接着していた。コンフルエントに達するまでの日数は、ROCK inhibitor（＋）では３日であったのに対し、ROCK inhibitor（－）では７日であった。このことから、ウサギに比べて生体外での細胞培養が困難であると考えられるサル角膜内皮細胞においても、Ｙ－２７６３２は培養開始後早期の細胞接着を亢進し、細胞培養を可能にする有用な薬剤であることが示された。

【００５３】

実施例３

Ｙ－２７６３２がヒト角膜内皮細胞培養に与える影響の検討
米国アイバンクから入手したヒト角膜組織のうち、中心部の直径７ｍｍ部分を角膜移植に用いた残りの周辺部角膜組織を用いた。角膜内皮細胞が接着したデスメ膜を分離し、ROCK inhibitor（＋）群では、デスメ膜を１０μＭのＹ－２７６３２を添加した角膜内皮用培地に入れて１０分間３７℃、５％CO_2の条件下でインキュベートした。ROCK inhibitor（－）群では、Ｙ－２７６３２を添加しない角膜内皮用培地に入れて同じ条件で１０分間インキュベートした。角膜内皮用培地としては、実施例１と同じ培養液を用いた。インキュベート後のデスメ膜を１．２Ｕ／ｍｌのディスパーゼII（Roche Applied Science）とともに３７℃、５％CO_2の条件下で４５分間インキュベートした後、ピペッティング操作により機械的に角膜内皮細胞を分離した。分離した角膜内皮細胞は遠心分離の後、Ｙ－２７６３２（＋）およびＹ－２７６３２（－）の角膜内皮用培地に同じ濃度になるように攪拌し、あらかじめＦＮＣ ｃｏａｔｉｎｇ ｍｉｘ（Athena ES）で前処理を施した４８ウェルプレートに１ウェルあたり約１００００個の密度で播種した。周辺部角膜組織から得られるヒト角膜内皮細胞は、きわめて細胞数が少ないために、１眼のドナー角膜から１ウェルの細胞培養を行った。本検討で使用したドナー角膜は、ROCK inhibitor（＋）群が年齢６９歳、ドナー死亡後培養開始まで６日間、ROCK inhibitor （－）群が年齢５１歳、ドナー死亡後培養開始まで７日間のものを使用した。年齢およびドナー死亡後細胞培養までに経過した時間が、細胞培養に与える影響はほぼ等しいと考えられる。
培養開始後７２時間に培養液の交換を行い、７２時間以降は、ROCK inhibitor（＋）群、ROCK inhibitor（－）群ともにＹ－２７６３２を添加しない通常の角膜内皮用培地を用いて培養した。培養開始後の早期の細胞接着および細胞形態に与える影響を検討するために、培養開始後に位相差顕微鏡による細胞観察およびデジタルカメラによる写真撮影を行った（図５）。

【００５４】
図５より、培養開始後７日目には、ROCK inhibitor（＋）群では均一な多角形細胞からなる、正常な角膜内皮細胞に類似した細胞からなるコンフルエントな高密度の単層細胞層が形成されていた（図５Ｂ）のに対し、ROCK inhibitor（－）群では細胞密度の低い線維芽細胞様に伸展した形態の内皮細胞が島状に生着していたのみであった（図５Ａ）。本結果から、培養が非常に困難なことが知られているヒト角膜内皮初代培養において、培養開始後早期の細胞接着を亢進する作用のあるＹ－２７６３２を培養液に添加することにより、良好な細胞形態、高い細胞密度を持った角膜内皮細胞層を形成することが可能であると考えられた。

【００５５】
製剤例１
Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有する前房内注射液
常法により下に示す前房内注射液を調製する。

Ｙ－２７６３２	１０ｍｇ
リン酸二水素ナトリウム	０．１ｇ
塩化ナトリウム	０．９ｇ
水酸化ナトリウム	適量
滅菌精製水	適量
	全量 １００ｍＬ（ｐＨ７）

Ｙ－２７６３２は和光純薬工業製を用いる。

【００５６】
製剤例２
Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有する眼灌流液
常法により下に示す眼灌流液を調製する。

Ｙ－２７６３２	１．０ｍｇ
オペガードＭＡ	適量

全量　１００ｍＬ

オペガードＭＡは千寿製薬製、Ｙ－２７６３２は和光純薬工業製を用いる。

【００５７】

製剤例３

Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有する角膜内皮シート調製用培養液

常法により下に示す培養液を調製する。

Ｙ－２７６３２	０．５ｍｇ
ＦＢＳ	１０ｍＬ
ペニシリン－ストレプトマイシン溶液	１ｍＬ
ＦＧＦ　ｂａｓｉｃ	２００ｎｇ
ＤＭＥＭ	適量
	全量　１００ｍＬ

ＦＢＳはインビトロジェン製、ペニシリン－ストレプトマイシン溶液はナカライテスク製（ペニシリン　5000u/mL，ストレプトマイシン　5000μg/mL含有）、ＦＧＦ　ｂａｓｉｃはインビトロジェン製、Ｙ－２７６３２は和光純薬工業製、ＤＭＥＭはインビトロジェン製を用いる。

【００５８】

製剤例４

Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有する角膜保存液

常法により下に示す保存液を調製する。

Ｙ－２７６３２	０．２ｍｇ
Ｏｐｔｉｓｏｌ－ＧＳ	適量
	全量　１００ｍＬ

Ｏｐｔｉｓｏｌ－ＧＳはボシュ・ロム製、Ｙ－２７６３２は和光純薬工業製を用いる。

【００５９】

実施例４

Ｙ－２７６３２がサル角膜内皮細胞の初代培養に与える影響の検討

安楽死させたカニクイザルから摘出した角膜組織から、角膜内皮細胞が付着したデスメ膜を分離した。実施例２と同様に、ROCK inhibitor（＋）群では、デスメ膜を１０μＭのＹ－２７６３２を添加した角膜内皮用培地に入れて３７℃、５％CO_2の条件下で１０分間インキュベートした。ROCK inhibitor（－）群では、Ｙ－２７６３２を添加しない角膜内皮用培地に入れて同じ条件で１０分間インキュベートした。角膜内皮用培地として、実施例１と同じ細胞培養液を用いた。インキュベート後のデスメ膜を１．２Ｕ／ｍｌのディスパーゼII（Roche Applied Science）とともに３７℃、５％CO_2の条件下で４５分間インキュベートした後、ピペッティング操作により機械的に角膜内皮細胞を分離した。分離した角膜内皮細胞は遠心分離の後、Ｙ－２７６３２（＋）およびＹ－２７６３２（－）の角膜内皮用培地に同じ濃度になるように攪拌し、１ウェルあたり約２０００個の密度で９６ウェルプレートに播種した。培養開始後７２時間目に培養液の交換を行い、７２時間以降は、ROCK inhibitor（＋）群、ROCK inhibitor（－）群ともにＹ－２７６３２を添加しない通常の角膜内皮用培地を用いて培養した。培養１０日目に、細胞を４％パラホルムアルデヒドを用いて１０分間室温で固定後、トルイジンブルーを用いて染色した（図６Ａ、Ｂ）。細胞の総面積をImage Ｊ（アメリカ国立衛生研究所）を用いて測定して解析を行った（図６Ｃ）。

培養開始後１０日目のカニクイザル初代培養角膜内皮細胞において、ROCK inhibitor（－）（図６Ａ）に比べてROCK inhibitor（＋）（図６Ｂ）は、培養初期における接着を促進することによって、培養細胞の総面積を約１．６倍に有意に増加させた（図６Ｃ）。このことから、生体外での細胞培養が困難であると考えられるサル角膜内皮細胞において、Ｙ－２７６３２は初代培養に有用な薬剤であることが示された。

【００６０】

実施例５

Ｙ－２７６３２のサル角膜内皮細胞に対する至適濃度の検討

実施例２と同様に回収したサル角膜内皮細胞（初代培養）を、それぞれ１、１０、３３、１００μＭのＹ－２７６３２を添加した角膜内皮用培地と、Ｙ－２７６３２を含まない角膜内皮用培地に入れて同じ濃度になるように攪拌し、１ウェルあたり約２０００個の密度で９６ウェルプレートに播種した。培養開始後２４時間目にCellTiter-Glo（登録商標）（Promega）を用いて生細胞数を測定した（図７）。

培養開始後２４時間の角膜内皮細胞において、１０μＭのＹ－２７６３２を含む培地で細胞培養を行った場合は、Ｙ－２７６３２を含まない角膜内皮用培地やその他の濃度のＹ－２７６３２を含む角膜内皮用培地で細胞培養を行った場合と比べて、プレート上に接着した細胞数が有意に多かった（図７）。このことから、サル角膜内皮細胞において、１０μＭの濃度のＹ－２７６３２が最も有効であることが示された。

【００６１】

実施例６

Ｙ－２７６３２がサル角膜内皮細胞の継代培養に与える影響の検討

安楽死させたカニクイザルから摘出した角膜組織から、角膜内皮細胞が付着したデスメ膜を分離した。デスメ膜を１．２Ｕ／ｍｌのディスパーゼII（Roche Applied Science）とともに３７℃、５％CO_2の条件下で４５分間インキュベートした後、ピペッティング操作により機械的に角膜内皮細胞を分離した。分離した角膜内皮細胞は遠心分離の後、角膜内皮用培地に播種した。コンフルエントに達した角膜内皮細胞を、０．０５％トリプシンにて３７℃、５％CO_2の条件下で１０分間インキュベートし、継代培養を行った。４－６回の継代を行った後に、角膜内皮細胞を１／２、１／６、１／８の希釈になるように９６ウェルプレートに入れ、ROCK inhibitor（＋）群では１０μＭのＹ－２７６３２を添加した角膜内皮用培地を、ROCK inhibitor（－）群ではＹ－２７６３２を添加しない角膜内皮用培地を用いて継代培養を続けた。継代後２４時間目に、実施例５と同様にCellTiter-Glo（登録商標）（Promega）を用いて細胞数を測定した（図８）。

継代後２４時間のカニクイザル培養角膜内皮細胞において、Ｙ－２７６３２を含む培地で継代培養を行った場合は、Ｙ－２７６３２を含まない角膜内皮用培地と比べて、プレート上に接着した細胞数が有意に多かった（図８）。このことから、初代培養に加えてサル角膜内皮細胞の継代培養においても、Ｙ－２７６３２が有効であることが示された。

【００６２】

実施例７

Ｙ－２７６３２がサル角膜内皮細胞の継代培養時に細胞形態に与える影響の検討

実施例６と同様に継代培養を行ったカニクイザル角膜内皮細胞を、１／４の希釈になるようにスライドガラス上に継代した。継代培養２４時間目に、位相差顕微鏡にて細胞形態を観察した（図９Ａ、Ｂ）。さらにスライドガラス上の角膜内皮細胞を４％パラホルムアルデヒドにて室温１０分間の固定後、ファロイジン蛍光染色にてアクチンファイバーの染色を行った（図１０Ａ、Ｂ）。

継代後２４時間のカニクイザル培養角膜内皮細胞において、Ｙ－２７６３２を含まない角膜内皮用培地と比べて（図９Ａ）、Ｙ－２７６３２を含む培地で継代培養を行った際には（図９Ｂ）、細胞のスライドガラスへの接着が亢進しており、角膜内皮細胞様への扁平化が促進されており、細胞同士の集まりも亢進していた。また、ファロイジン蛍光染色では、Ｙ－２７６３２を含まない角膜内皮用培地と比べて（図１０Ａ）、Ｙ－２７６３２を含む培地で継代培養を行った際には（図１０Ｂ）、アクチンストレスファイバーが明瞭に認められ、Ｙ－２７６３２が細胞骨格形成を促進することがわかった。

【００６３】

実施例８

Ｙ－２７６３２がサル角膜内皮細胞の細胞周期に与える影響の検討

実施例６と同様に継代培養を行ったカニクイザル角膜内皮細胞を１／４の希釈になるようにスライドガラス上に継代した。ROCK inhibitor（＋）群では１０μＭのＹ－２７６３２を添加した角膜内皮用培地を、ROCK inhibitor（－）群では、Ｙ－２７６３２を添加し

ない角膜内皮用培地を用いた。継代培養１、２、１４日目に、スライドガラス上の角膜内皮細胞を４％パラホルムアルデヒドにて室温１０分間の固定後、抗Ｋｉ６７抗体を用いて免疫染色を行った（図１１）。また、同様にカニクイザル角膜内皮細胞を１／４の希釈になるようにROCK inhibitor（＋）とROCK inhibitor（－）群それぞれで継代培養し、継代培養１、２日目に０．０５％トリプシンを用いて回収後、抗Ｋｉ６７抗体を用いてフローサイトメトリーを行い細胞周期の検討を行った（図１２、１３）。

ROCK inhibitor（－）群に比べてROCK inhibitor（＋）群では継代培養１日目、２日目ともにＫｉ６７陽性細胞が多かった一方、１４日目にほぼコンフルエントに達すると、ROCK inhibitor（＋）群の陽性細胞はROCK inhibitor（－）群に比べて少なかった（図１１）。フローサイトメトリーにおいても、ROCK inhibitor（－）群に比べてROCK inhibitor（＋）群では継代培養１日目、２日目ともにＫｉ６７陽性細胞が多く認められた（図１２、１３）。

Ｋｉ６７抗原は細胞増殖周期のＧ１、さらにＳからM期までの細胞の核内に見出されることから、Ｙ－２７６３２は、カニクイザル角膜内皮細胞の継代培養後早期に、細胞周期を促進させる働きがあり、細胞培養を効率的に行うために有用な薬剤であることが示された。

【００６４】

実施例９

Ｙ－２７６３２がサル角膜内皮細胞のアポトーシスに与える影響の検討

実施例６と同様に継代培養を行ったカニクイザル角膜内皮細胞を１／４の希釈になるように継代した。ROCK inhibitor（＋）群では１０μMのＹ－２７６３２を添加した角膜内皮用培地を、ROCK inhibitor（－）群ではＹ－２７６３２を添加しない角膜内皮用培地を用いた。継代培養１日目に０．０５％トリプシンを用いて培地中の細胞を含めて全ての細胞を回収後、Annexin VとPI（Propidium Iodide）を用いてフローサイトメトリーを行い、アポトーシスの検討を行った（図１４、１５）。

ROCK inhibitor（－）群に比べてROCK inhibitor（＋）群では、継代培養１日目の全細胞におけるアポトーシス細胞率の有意な減少を認めた（図１４）。さらに、1×10^4細胞あたりのアポトーシス細胞数を比較するとROCK inhibitor（－）群に比べてROCK inhibitor（＋）群では有意な減少を認めた（図１５）。

このことから、Ｙ－２７６３２はカニクイザル角膜内皮細胞の継代培養時に、アポトーシスを抑制する働きがあることが示された。

【００６５】

実施例１０

Ｙ－２７６３２が培養サル角膜内皮細胞の密度に与える影響の検討

安楽死させたカニクイザルから摘出した角膜組織から、角膜内皮細胞が付着したデスメ膜を分離した。デスメ膜を１．２Ｕ／ｍｌのディスパーゼII（Roche Applied Science）とともに３７℃、５％CO_2の条件下で４５分間インキュベートした後、ピペッティング操作により機械的に角膜内皮細胞を分離した。分離した角膜内皮細胞は遠心分離の後、角膜内皮用培地に播種した。コンフルエントに達した角膜内皮細胞を、０．０５％トリプシンにて３７℃、５％CO_2の条件下で１０分間インキュベートし、継代培養を行った。ROCK inhibitor（＋）群では１０μMのＹ－２７６３２を添加した角膜内皮用培地を、ROCK inhibitor（－）群では、Ｙ－２７６３２を添加しない角膜内皮用培地を用いた。培養開始後７２時間目に培養液の交換を行い、７２時間以降は、ROCK inhibitor（＋）群、ROCK inhibitor（－）群ともにＹ－２７６３２を添加しない通常の角膜内皮用培地を用いて培養した。毎回継代時には位相差顕微鏡を用いて細胞の写真を撮影し、細胞密度を測定してＹ－２７６３２が培養サル角膜内皮細胞の密度に与える影響を検討した。

継代を７回繰り返したところ、継代培養を行った全期間においてROCK inhibitor（－）群に比べてROCK inhibitor（＋）群では高い細胞密度が認められた（図１６）。このことから、Ｙ－２７６３２を用いることで高い密度の角膜内皮細胞の培養が可能となり、将来的に培養角膜内皮シート移植といった再生医療を行う上でも有用であると考えられた。

【００６６】
実施例１１
ファスジルがサル角膜内皮細胞培養に与える影響の検討
安楽死させたカニクイザルから摘出した角膜組織から、角膜内皮細胞が付着したデスメ膜を分離した。デスメ膜を１．２Ｕ／ｍｌのディスパーゼII（Roche Applied Science）とともに３７℃、５％CO_2の条件下で４５分間インキュベートした後、ピペッティング操作により機械的に角膜内皮細胞を分離した。分離した角膜内皮細胞は遠心分離の後、角膜内皮用培地で継代培養した。角膜内皮用培地として、実施例1と同じ細胞培養液を用いた。継代培養時に０．０５％トリプシン処理により回収した培養サル角膜内皮細胞を分離し遠心分離の後、ファスジル群は１０μＭのファスジル（SIGMA-ALDRICH）を添加した角膜内皮用培地を用い、コントロール群はファスジルを添加しない角膜内皮用培地を用いて同じ濃度になるように攪拌し、１ウェルあたり約２０００個の密度で９６ウェルプレートに播種した。培養開始２４時間後にCellTiter-Glo（登録商標） Luminescent Cell Viability Assay (Promega)を用いて接着細胞数を測定した（図１７）。ROCK inhibitorであるファスジルにおいても角膜内皮細胞の細胞接着を促進する効果が認められた。

【００６７】
製剤例５
Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有する前房内注射液
常法により下に示す前房内注射液を調製する。

ファスジル	１０ｍｇ
リン酸二水素ナトリウム	０．１ｇ
塩化ナトリウム	０．９ｇ
水酸化ナトリウム	適量
滅菌精製水	適量
	全量　１００ｍＬ （ｐＨ７）

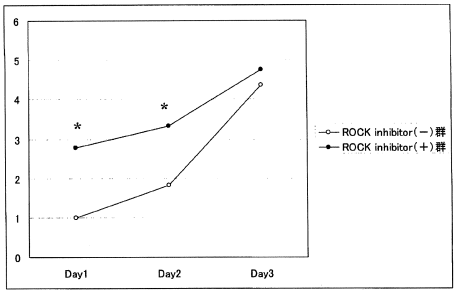
【００６８】
製剤例６
Ｒｈｏキナーゼ阻害剤を含有する角膜内皮シート調製用培養液
常法により下に示す培養液を調製する。

ファスジル	０．５ｍｇ
ＦＢＳ	１０ｍＬ
ペニシリン－ストレプトマイシン溶液	１ｍＬ
ＦＧＦ　ｂａｓｉｃ	２００ｎｇ
ＤＭＥＭ	適量
	全量　１００ｍＬ

ＦＢＳはインビトロジェン製、ペニシリン－ストレプトマイシン溶液はナカライテスク製（ペニシリン　5000u/mL，ストレプトマイシン　5000μg/mL含有）、ＦＧＦ　ｂａｓｉｃはインビトロジェン製、ＤＭＥＭはインビトロジェン製を用いる。

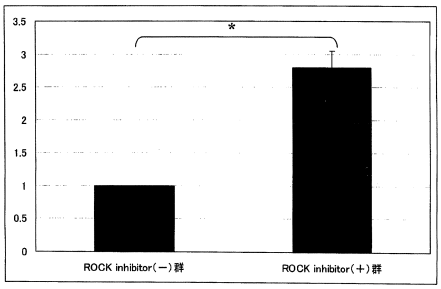
【００６９】
本出願は、日本で出願された特願２００７－２２３１４１（出願日：２００７年８月２９日）および特願２００８－０１６０８８（出願日：２００８年１月２８日）を基礎としており、それらの内容は本明細書に全て包含されるものである。

【図２】



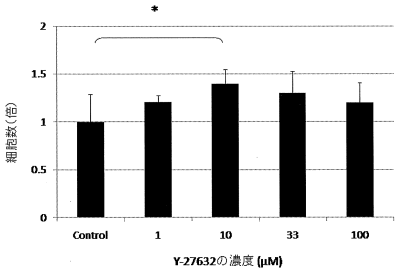
*: p<0.001, Student's t-test

【図３】



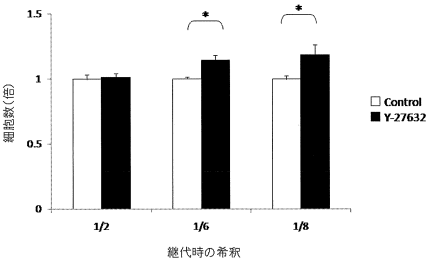
*: p<0.001, Student's t-test

【図７】



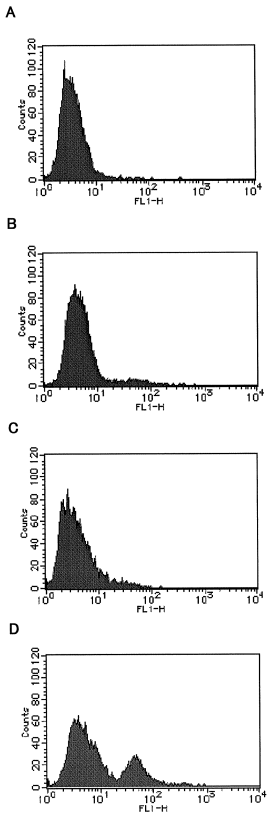
*P<0.05, Dunnett's multiple comparisons test, n=5

【図８】

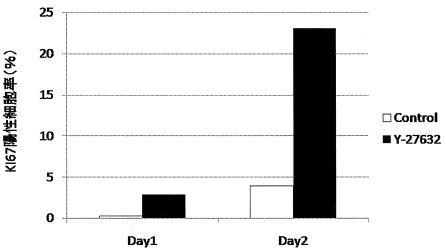


*P<0.01, Student's t-test, n=5

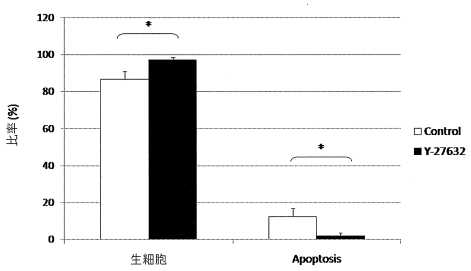
【図１２】



【図１３】

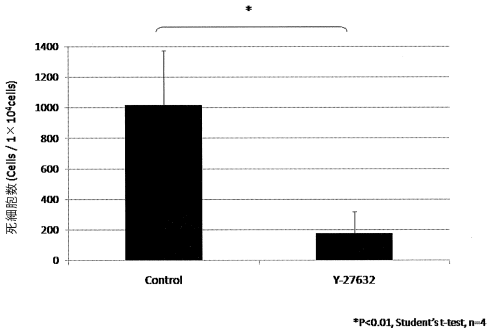


【図１４】

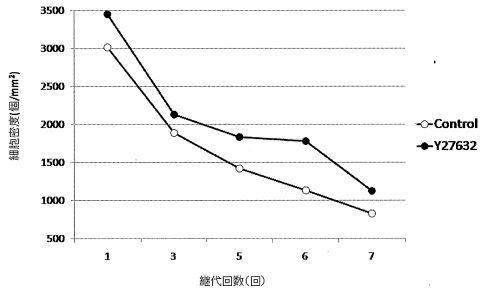


*P<0.01, Student's t-test, n=4

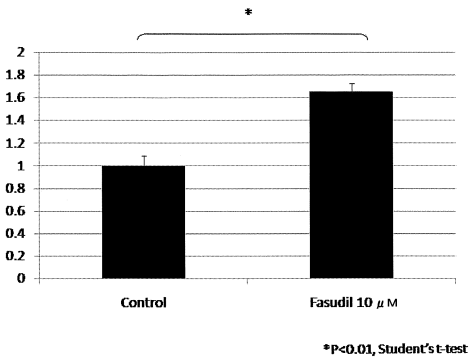
【図１５】


*
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
死細胞数(Cells / 1×10⁴cells)
Control
Y-27632
*P<0.01, Student's t-test, n=4

【図１６】

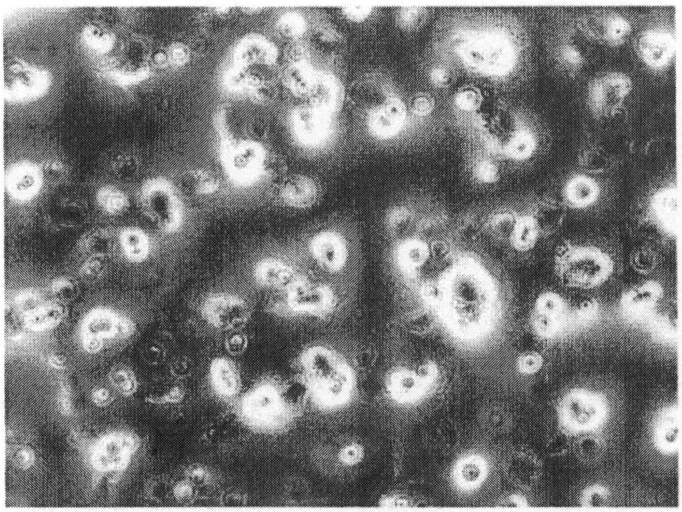

3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
細胞密度(個/mm²)
1
3
5
6
7
継代回数(回)
Control
Y27632

【図１７】

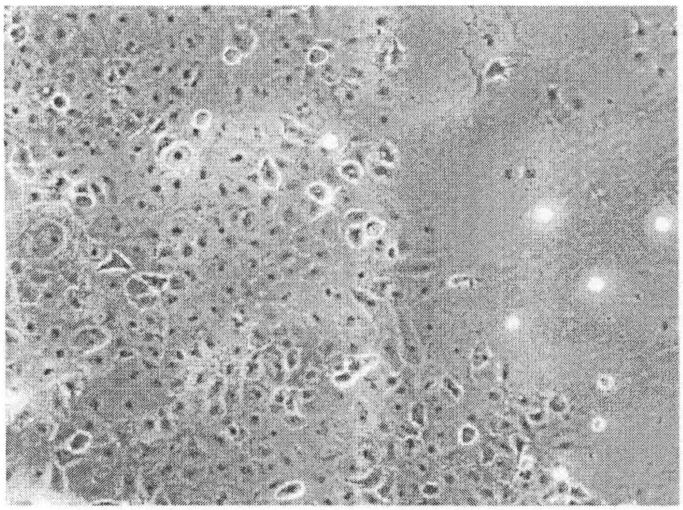

*
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Control
Fasudil 10 μM
*P<0.01, Student's t-test

【図１】

A

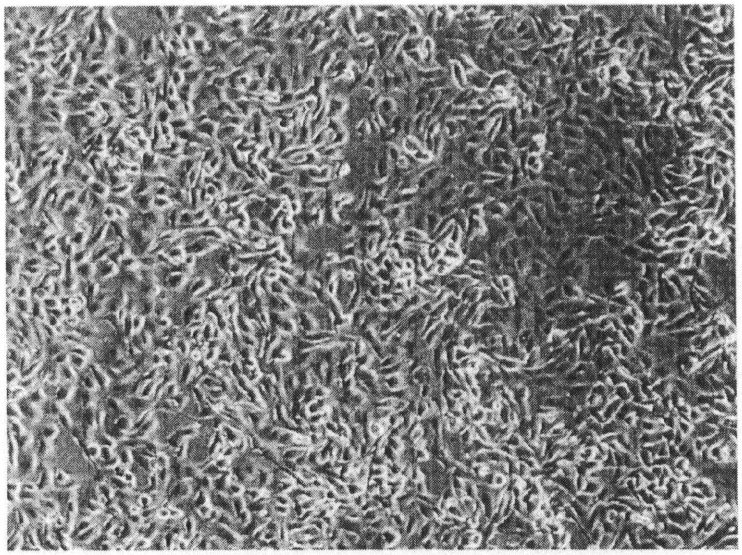


B

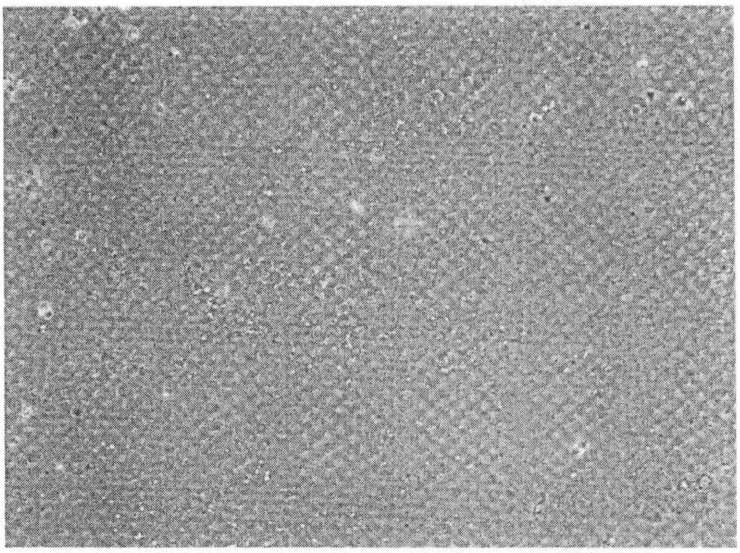


【図４】

A

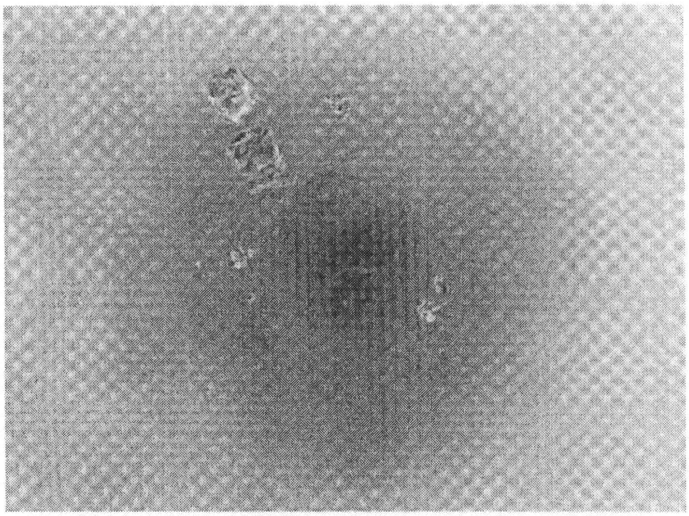


B

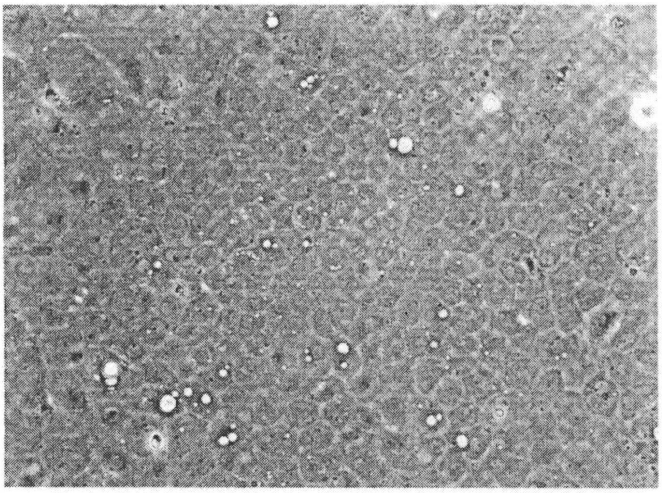


【図５】

A

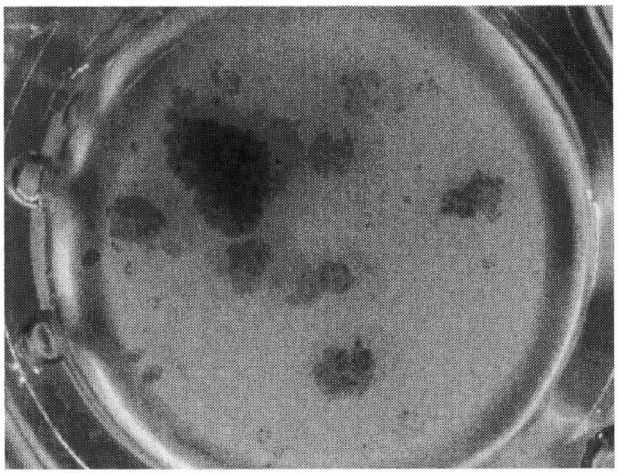


B

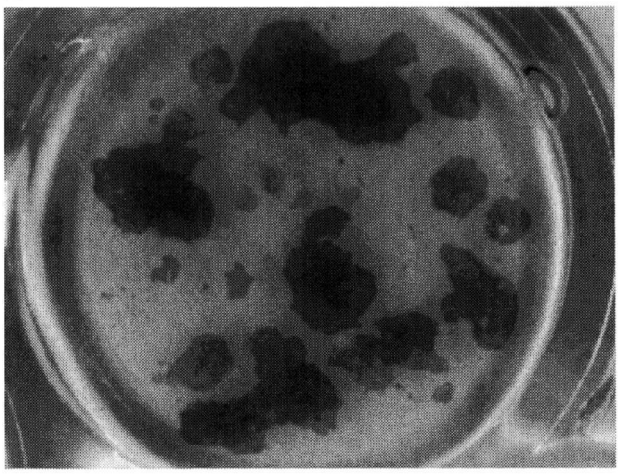


【図６】

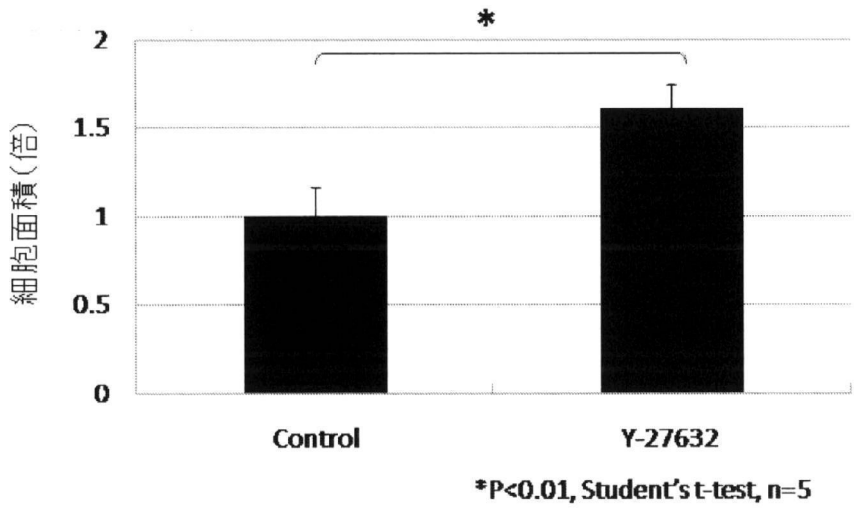
A



B

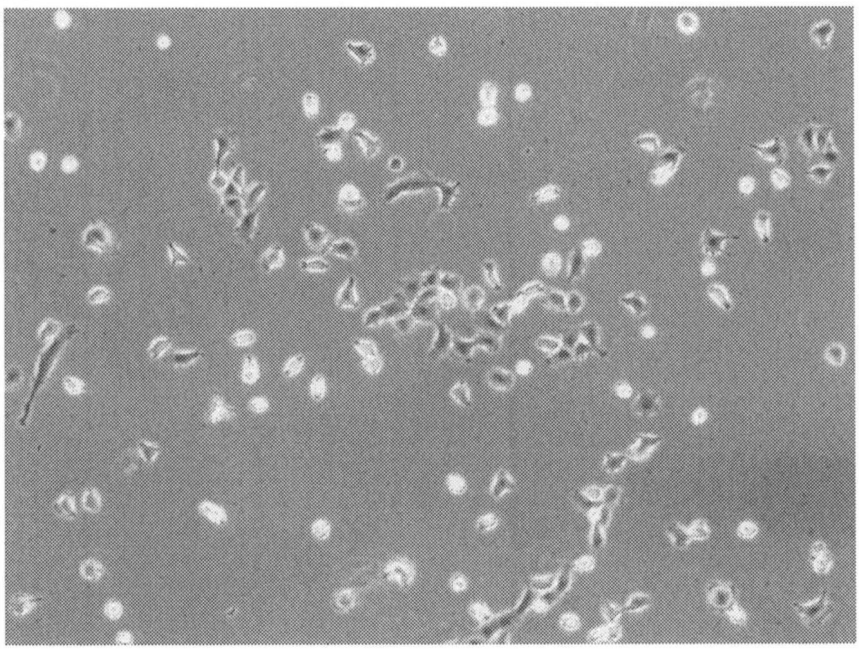


C

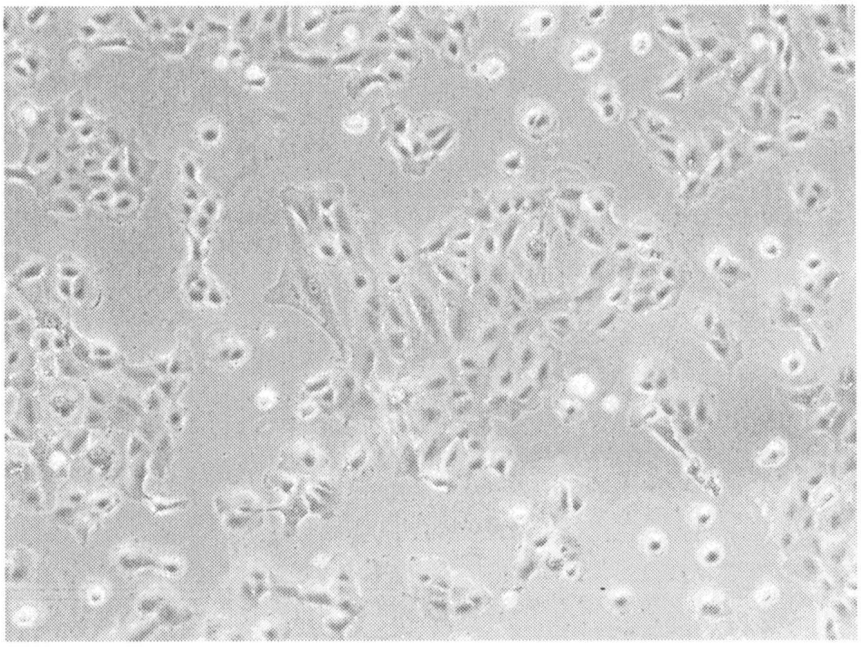


【図９】

A

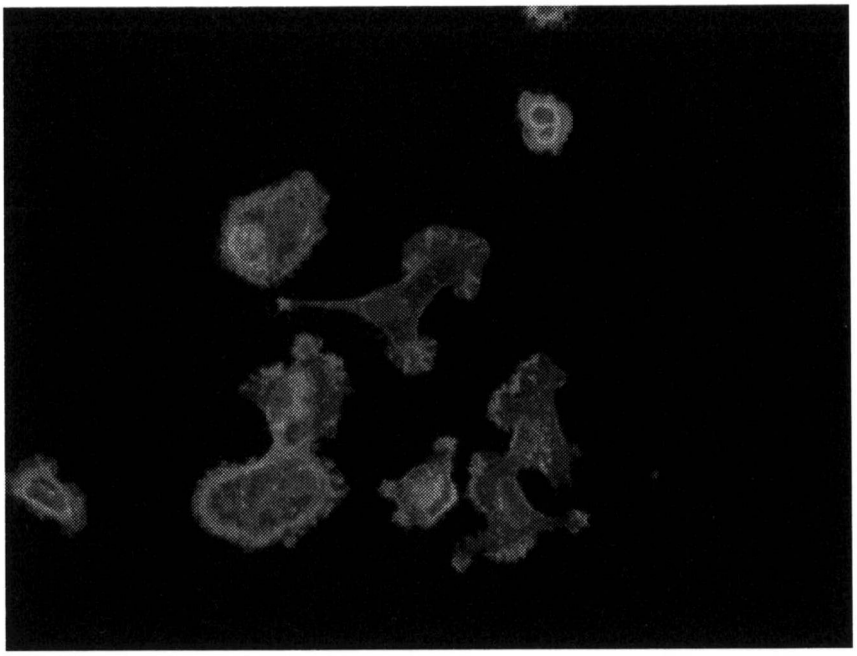


B

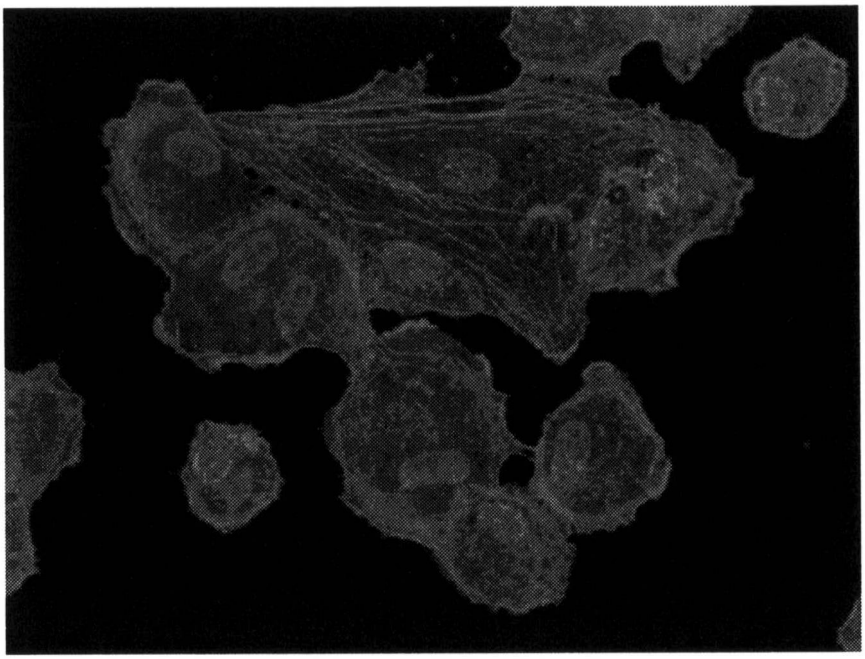


【図１０】

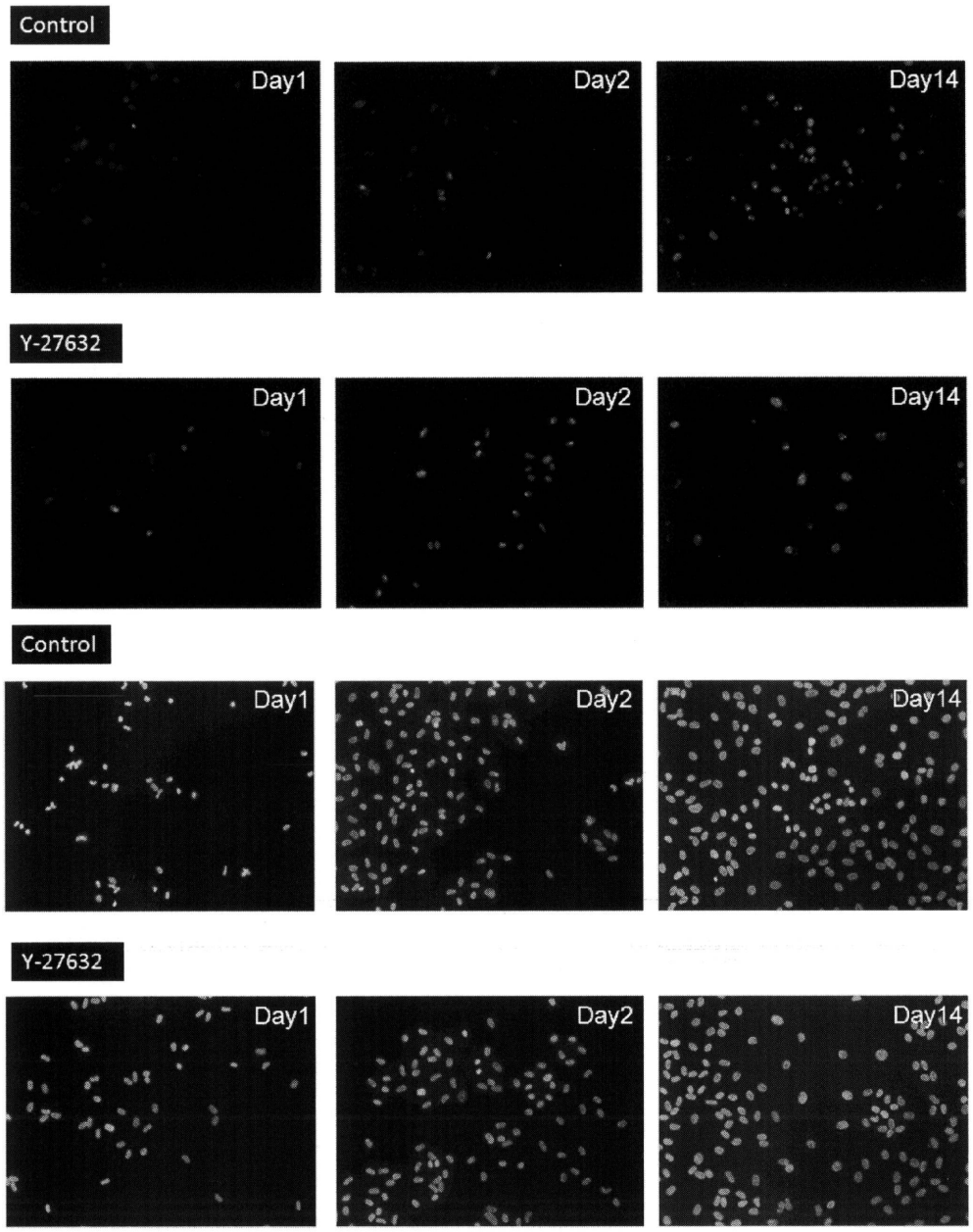
A



B



【図１１】


Control
Day1
Day2
Day14
Y-27632
Day1
Day2
Day14
Control
Day1
Day2
Day14
Y-27632
Day1
Day2
Day14

フロントページの続き

(72)発明者　木下　茂
大阪府大阪市阿倍野区北畠１－３－１１
(72)発明者　上野　盛夫
京都府京都市左京区岡崎北御所町４８

審査官　中尾　忍

(56)参考文献　国際公開第０３／０９２７６２（WO，Ａ１）
小泉範子，前眼部の再生工学（６）“サルを用いた培養角膜内皮シート移植術の開発”，臨床眼科，２００５年，Vol．59，No．11，P.197-201
Lee,H.T. et al., FGF-2 induced reorganization and disruption of actin cytoskeleton through PI 3-kinase, Rho, and Cdc42 in corneal endothelial cells, Mol. Vis., ２００３年１２月　８日, Vol.9, P.624-634
Lee,J.G. et al., FGF-2-Induced Wound Healing in Corneal Endothelial Cells Requires Cdc42 Activation and Rho Inactivation through the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway, Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., ２００６年　４月, Vol.47, No.4, P.1376-1386
Satpathy,M. et al., Thrombin-induced phosphorylation of the regulatory light chain of myosin II in cultured bovine corneal endothelial cells, Exp. Eye Res., ２００４年１０月, Vol.79, No.4, P.477-486

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ａ６１Ｋ　４５／００
Ａ６１Ｋ　３１／４４０９
Ａ６１Ｋ　３１／４９６

ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩ）