(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
2024年8月22日(22.08.2024)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2024/172043 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 35/30 (2015.01) *A61K 38/08* (2019.01)
A61K 31/436 (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01)
A61K 31/573 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2024/004888

(22) 国際出願日： 2024年2月13日(13.02.2024)

(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 2023-020820 2023年2月14日(14.02.2023) JP

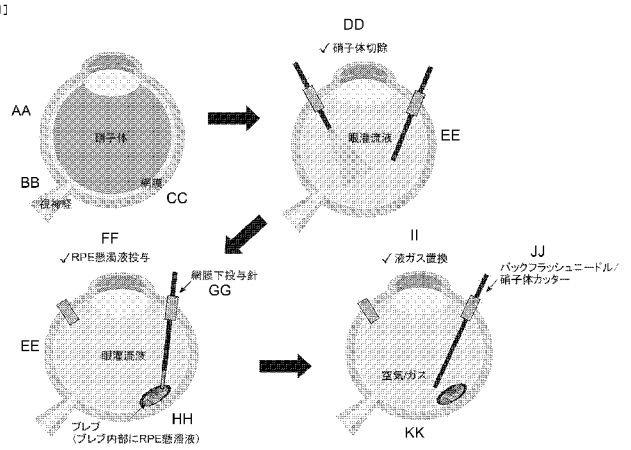
(71) 出願人: 住友ファーマ株式会社(**SUMITOMO PHARMA CO., LTD.**) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町二丁目６番８号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 坂東 清子(**BANDO Kiyoko**); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町１丁目５－２神戸キメックセンタービル５階 住友ファーマ株式会社内 Hyogo (JP). 真鍋 耕一郎(**MANABE Koichiro**); 〒1036012 東京都中央区日本橋２丁目７番１号 東京日本橋タワー 住友ファーマ株式会社内 Tokyo (JP). 亀井 達也(**KAMEI Tatsuya**); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町１丁目５－２神戸キメックセンタービル５階 住友ファーマ株式会社内 Hyogo (JP). 高村 直樹(**TAKAMURA Naoki**); 〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町１丁目５－２神戸キメックセンタービル５階 住友ファーマ株式会社内 Hyogo (JP). 渡邉 仁(**WATANABE Hitoshi**);

(54) **Title:** THERAPEUTIC DRUG FOR RETINAL PIGMENT EPITHELIUM TEARS

(54) 発明の名称： 網膜色素上皮裂孔の治療薬

[図1]



AA Vitreous body
BB Optic nerve
CC Retina
DD Excision of vitreous body
EE Ocular perfusion liquid
FF Administration of RPE suspension
GG Subretinal administration needle
HH Bleb (RPE suspension inside bleb)
II Liquid-gas replacement
JJ Back-flash needle / Vitreous body cutter
KK Air/gas

(57) **Abstract:** The purpose of the present invention is to provide a therapeutic drug for retinal pigment epithelium tears in a human subject. A therapeutic drug for retinal pigment epithelium tears in a human subject according to the present invention comprises a suspension in which human retinal pigment epithelium cells are dispersed.

(57) 要約：本発明は、ヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療薬を提供することを目的とする。本発明のヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療薬は、ヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液からなる。

WO 2024/172043 A1

[続葉有]

〒6500047 兵庫県神戸市中央区港島南町１丁目５－２神戸キメックセンタービル５階 住友ファーマ株式会社内 Hyogo (JP).

(74) 代理人：長谷川 芳樹，外(**HASEGAWA Yoshiki** et al.)；〒1000005 東京都千代田区丸の内二丁目１番１号丸の内 ＭＹ ＰＬＡＺＡ（明治安田生命ビル） ９階 創英国際特許法律事務所 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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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：

一 国際調査報告（条約第21条(3)）

明　細　書

発明の名称 ： 網膜色素上皮裂孔の治療薬

技術分野

[0001] 本発明は、網膜色素上皮裂孔の治療薬に関する。

背景技術

[0002] 網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞は網膜の最外層に存在する色素上皮細胞であり、視細胞外節の貪食、視物質のリサイクルなど視細胞の維持等に重要な役割を担っている。ＲＰＥ細胞に関連する病態として、網膜色素上皮裂孔（ＲＰＥ　ｔｅａｒ）が知られている。網膜色素上皮裂孔は、網膜色素上皮細胞層が断裂し、断裂した部分において網膜色素上皮細胞層が収縮すること等によって引き起こされると考えられており、長期的には視力低下等に至る可能性がある。

[0003] しかしながら、網膜色素上皮裂孔にはこれまで治療薬が存在しない。また、外科的な治療については、過去に、黄斑移動術、自己ＲＰＥ移植等の外科的手術が行われたことがあるが、いずれの方法も手術手技の難度、侵襲性ともに高く、合併症のリスクが高い。現状では網膜色素上皮裂孔の治療の選択肢がなく、経過観察のみ行われている。

[0004] 一方、加齢黄斑変性症等に対しては、網膜色素上皮細胞シート（ＲＰＥシート）移植が検討されてきたが、ＲＰＥシートにおいては、黄斑近傍に大き目の網膜切開を行う必要があり、同部位の視野欠損が生じるなどの問題点が指摘される。また、ＲＰＥ細胞の懸濁液を最小限の侵襲で網膜下に投与する移植においても、不十分な生着や黄斑前膜などの合併症がこれまでに報告されている。したがって、網膜色素上皮細胞の剤形や移植技術は未だ試行錯誤の途上にあり、完成には至っていない。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Sugita S et al. “HLA-Matched Allogeneic iPS Cells-Deriv

ed RPE Transplantation for Macular Degeneration." J Clin Med. 2020;9(7):2217.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、ヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療薬を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記従来技術の課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、網膜色素上皮細胞を媒体に分散させた懸濁液がヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療に有用であることを見出し、本発明の完成に至った。

[0008] すなわち、本発明は以下のとおりのものを提供する。

［１］

ヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液からなる、ヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療薬。

［２］

上記ヒト網膜色素上皮細胞の分散に用いる媒体の粘度が、２５℃におけるせん断速度２（１／ｓ）のとき、４ｍＰａ・ｓ以下である、［１］に記載の治療薬。

［２－１］

上記媒体が製薬学上許容される水性液体を含む、［２］に記載の治療薬。

［２－２］

上記媒体がヒアルロン酸を含む、［２－１］に記載の治療薬。

［２－３］

上記製薬学上許容される水性液体が、平衡塩類溶液である、［２－１］又は［２－２］に記載の治療薬。

［２－４］

上記媒体がコンドロイチン硫酸を含まない、［２－１］～［２－３］のいずれかに記載の治療薬。

［３］

上記懸濁液中の上記ヒト網膜色素上皮細胞の濃度が、０．１×１０^{7}～１×１０^{7}細胞／ｍＬである、［１］又は［２］に記載の治療薬。

［４］

上記治療薬の投与容量が、２０～５０μＬである、［１］～［３］のいずれかに記載の治療薬。

［５］

上記治療薬が、上記ヒト対象の強膜上の約０．４ｍｍ～約０．６５ｍｍの孔から、上記網膜色素上皮裂孔の周囲領域に対し、ブレブを形成させながら投与される、［１］～［４］のいずれかに記載の治療薬。

［６］

上記ブレブが、上記網膜色素上皮裂孔の長径を覆うように形成させる、［５］に記載の治療薬。

［７］

上記治療薬の投与後に、上記ヒト対象の硝子体腔を空気置換することを含む治療に用いられる、［５］又は［６］に記載の治療薬。

［８］

上記治療薬の上記ヒト対象への投与後、網膜前膜の形成が認められない又は網膜前膜の形成の程度が減じられる、［２］～［７］のいずれかに記載の治療薬。

［９］

上記網膜色素上皮裂孔が、上記ヒト対象の網膜色素上皮細胞層が一部断裂し、かつ上記ヒト対象の網膜色素上皮細胞で被覆されずに露出されたブルッフ膜が基底膜として残存している状態である、［１］～［８］のいずれかに記載の治療薬。

［１０］

上記治療薬の上記ヒト対象への投与後、上記ヒト網膜色素上皮細胞が極性を示し、上記露出されたブルッフ膜を覆う、［９］に記載の治療薬。

［１１］

上記ヒト網膜色素上皮細胞が、ヒト多能性幹細胞のｉｎ　ｖｉｔｒｏ分化に由来する、［１］～［１０］のいずれかに記載の治療薬。

［１２］

上記ヒト対象が、上記ヒト網膜色素上皮細胞と、ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）型が適合している、［１］～［１１］のいずれかに記載の治療薬。

［１３］

少なくとも１つの免疫抑制剤と組み合わせて投与される、［１］～［１２］のいずれかに記載の治療薬。

［１４］

上記少なくとも１つの免疫抑制剤が、トリアムシノロンアセトニド、シクロスポリン、タクロリムス、プレドニゾロン及びデキサメタゾンからなる群より選択される少なくとも１つである、［１３］に記載の治療薬。

［１５］

有効量のヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液を、これを必要とするヒト対象に投与することを備える、上記ヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療方法。

［１６］

上記懸濁液が、上記ヒト対象の強膜上の約０．４ｍｍ～約０．６ｍｍの孔から、上記網膜色素上皮裂孔の周囲領域に対し、ブレブを形成させるように投与される、［１５］に記載の治療方法。

［１７］

上記ブレブを、上記網膜色素上皮裂孔の長径を覆うように形成させる、［１６］に記載の治療方法。

［１８］

上記懸濁液の投与後に、上記ヒト対象の硝子体腔を空気置換することをさらに備える、［１５］～［１７］のいずれかに記載の治療方法。

［１９］

上記懸濁液が、［１］～［１４］のいずれかに規定の懸濁液である、［１５］～［１８］のいずれかに記載の治療方法。

［２０］

［１］～［１４］のいずれかに記載の治療薬として用いるための、網膜色素上皮細胞を含む凍結製剤。

［２１］

融解され、２５℃におけるせん断速度２（１／ｓ）のとき、４ｍＰａ・ｓ以下の粘度を示す媒体に置換され、上記ヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液として、上記ヒト対象に投与するための、[２０]に記載の凍結製剤。

［２２］

ヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液の、ヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療における使用。

［２３］

ヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療における使用のための、ヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液。

［２４］

ヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療薬の製造における、ヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液の使用。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、ヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療薬を提供することができる。該治療薬が、網膜色素上皮裂孔を有するヒト対象の眼球の網膜下へ投与される（又は移植される）ことで、ヒト対象の負担及び副作用を軽減したうえで、ヒト対象の投与部位に生着し、それによって、網膜色素上皮裂孔の少なくとも一部を埋めることができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]経硝子体腔法によるＲＰＥ細胞の網膜下への投与手順を示す模式図である。

[図2]実施例１における、摘出豚眼の網膜下へ投与したＲＰＥ細胞を蛍光観察

した画像を示す。

[図3]実施例２の蛍光免疫染色における、代表的な投与部位を含む網膜の低倍率蛍光免疫染色像を示す。

[図4]実施例２の蛍光免疫染色における、代表的な投与部位を含む網膜の低倍率蛍光免疫染色像を示す。

[図5]実施例２の蛍光免疫染色における、代表的な投与部位を含む網膜の高倍率蛍光免疫染色像を示す。

[図6A]実施例３の蛍光免疫染色における、ＨＢＳＳ（＋）媒体を用いてヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞懸濁液を投与した際の代表的な投与部位を含む網膜の蛍光免疫染色像を示す。

[図6B]実施例３の蛍光免疫染色における、ＨＢＳＳ（＋）媒体を用いてヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞懸濁液を投与した際の代表的な投与部位を含む網膜の蛍光免疫染色像を示す。

[図6C]実施例３の蛍光免疫染色における、ＨＢＳＳ（＋）媒体を用いてヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞懸濁液を投与した際の代表的な投与部位を含む網膜の蛍光免疫染色像を示す。

[図6D]実施例３の蛍光免疫染色における、ＨＢＳＳ（＋）媒体を用いてヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞懸濁液を投与した際の代表的な投与部位を含む網膜の蛍光免疫染色像を示す。

[図7A]実施例３の蛍光免疫染色における、プロビスク１００倍希釈媒体を用いてヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞懸濁液を投与した際の代表的な投与部位を含む網膜の蛍光免疫染色像を示す。

[図7B]実施例３の蛍光免疫染色における、プロビスク１００倍希釈媒体を用いてヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞懸濁液を投与した際の代表的な投与部位を含む網膜の蛍光免疫染色像を示す。

[図7C]実施例３の蛍光免疫染色における、プロビスク１００倍希釈媒体を用いてヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞懸濁液を投与した際の代表的な投与部位を含む網膜の蛍光免疫染色像を示す。

[図7D]実施例３の蛍光免疫染色における、プロビスク１００倍希釈媒体を用いてヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞懸濁液を投与した際の代表的な投与部位を含む網膜の蛍光免疫染色像を示す。

[図8]実施例６における、ＲＣＳラットを用いて網膜電図（ＥＲＧ）試験を実施した結果を示す。

[図9]実施例６における、ＲＣＳラットを用いて視覚誘発電位（ＶＥＰ）試験を実施した結果を示す。

[図10]実施例６における、ＲＣＳラットを用いて視運動反射（ＯＫＴ）試験を実施した結果を示す。

[図11A]実施例６における、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞を移植したＲＣＳラット網膜の代表的な蛍光免疫染色像を示す。

[図11B]実施例６における、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞を移植したＲＣＳラット網膜の代表的な蛍光免疫染色像を示す。

[図11C]実施例６における、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞を移植したＲＣＳラット網膜の代表的な蛍光免疫染色像を示す。

[図12]実施例６における、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞を移植したＲＣＳラット網膜の代表的な蛍光免疫染色像を示す。

[図13]実施例６における、ＲＣＳラット網膜への移植後のヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞及びラット視細胞外節の代表的な蛍光免疫染色像を示す。

[図14]実施例６における、ＲＣＳラット網膜への移植後のヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞及び密着結合構成タンパク質の代表的な蛍光免疫染色像を示す。

[図15]実施例６における、外網状層に存在する視細胞と双極細胞間のシナプスの代表的な蛍光免疫染色画像を示す。

[図16]実施例７における、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞のラミニンコート基材上への細胞接着を評価した結果を示す。

[図17]実施例８における、プレート上にＲＰＥシートの一部を剥離させて疑似網膜色素上皮裂孔部位を形成した画像を示す。

[図18]実施例８における、懸濁液として添加したヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の疑似網膜色素上皮裂孔部位に対する細胞接着を評価した結果を示す。

[図19]実施例８における、懸濁液として添加したヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の疑似網膜色素上皮裂孔部位に対する細胞接着を評価した結果を示す。

[図20]実施例８における、無処置の疑似網膜色素上皮裂孔部位を観察した結果を示す。

[図21]実施例８における、懸濁液として添加したヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の疑似網膜色素上皮裂孔部位に対する細胞接着を評価した結果を示す。

[図22]実施例８における、懸濁液として添加したヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の疑似網膜色素上皮裂孔部位に対する細胞接着を評価した結果を示す。

[図23]実施例１０における、Ｆ３４４／ＮＪｃｌヌードラットの腹腔内に媒体のみを投与した際の、ラット網膜の代表的な蛍光免疫染色像を示す。

[図24]実施例１０における、Ｆ３４４／ＮＪｃｌヌードラットの腹腔内にヨウ素酸ナトリウムを投与した際の、ラット網膜の代表的な蛍光免疫染色像を示す。

[図25]実施例１０における、Ｆ３４４／ＮＪｃｌヌードラットを用いてＥＲＧ試験を実施した結果を示す。

[図26]実施例１０における、眼底カメラにより撮像したＦ３４４／ＮＪｃｌヌードラットの眼底像を示す。

[図27]実施例１０における、Ｆ３４４／ＮＪｃｌヌードラットを用いて作成したモデル動物に媒体のみを投与した場合の網膜の代表的な蛍光免疫染色を示す。

[図28]実施例１０における、Ｆ３４４／ＮＪｃｌヌードラットを用いて作成したモデル動物にヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞を移植した場合の網膜の代表的な蛍光免疫染色を示す。

[図29]実施例１０における、Ｆ３４４／ＮＪｃｌヌードラットを用いて作成したモデル動物にヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞を移植した場合の網膜の代表的な蛍光免疫染色を示す。

[図30]実施例１０における、Ｆ３４４／ＮＪｃｌヌードラットを用いて作成したモデル動物に媒体のみを投与した場合の網膜の代表的な蛍光免疫染色を示す。

[図31]実施例１０における、Ｆ３４４／ＮＪｃｌヌードラットを用いて作成したモデル動物にヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞を移植した場合の網膜の代表的な蛍光免疫染色を示す。

発明を実施するための形態

[0011] １．定義

本明細書において「網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞」とは、生体網膜において神経網膜の外側に存在する上皮細胞を意味する。細胞が網膜色素上皮細胞であるか否かは、当業者であれば、例えば細胞マーカー（ＲＰＥ６５、ＭＩＴＦ、ＣＲＡＬＢＰ、ＭＥＲＴＫ、ＢＥＳＴ１、ＴＴＲ、ＰＭＥＬ１７等）の発現や、メラニン顆粒の存在（黒褐色）、細胞間のタイトジャンクション、多角形・敷石状の特徴的な細胞形態等により容易に確認できる。細胞が網膜色素上皮細胞の機能を有するか否かは、ＶＥＧＦ及びＰＥＤＦ等のサイトカインの分泌能等により容易に確認できる。一態様において、網膜色素上皮細胞はＲＰＥ６５陽性細胞、ＭＩＴＦ陽性細胞、又は、ＲＰＥ６５陽性かつＭＩＴＦ陽性細胞である。

[0012] 本明細書において移植対象であるＲＰＥ細胞は特に限定されず、げっ歯類、食肉類又は霊長類由来のＲＰＥ細胞であることが好ましく、特にヒト由来のＲＰＥ細胞であることが好ましい。また、多能性幹細胞（特にｉＰＳ細胞）由来のＲＰＥ細胞であることが好ましく、ヒト多能性幹細胞（特にｉＰＳ細胞）のｉｎ　ｖｉｔｒｏ分化に由来することが特に好ましい。

[0013] 本明細書において「多能性幹細胞」とは、自己複製能と多能性を有する細胞であり、インビトロにおいて培養することが可能で、かつ、三胚葉（外胚葉、中胚葉、内胚葉）に属する細胞系列すべてに分化しうる能力（多能性（ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｃｙ））を有する幹細胞をいう。

[0014] 多能性幹細胞としては、例えば、胚性幹細胞（ＥＳ細胞：Ｅｍｂｒｙｏｎ

ｉｃ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ）、人工多能性幹細胞（ｉＰＳ細胞：ｉｎｄｕｃｅｄ　ｐｌｕｒｉｐｏｔｅｎｔ　ｓｔｅｍ　ｃｅｌｌ）等を挙げることが出来る。本発明に用いる多能性幹細胞は、哺乳動物の多能性幹細胞であり、好ましくはげっ歯類、食肉類又は霊長類の多能性幹細胞であり、より好ましくはヒト多能性幹細胞である。ここで、哺乳動物としては、ヒト、サル等の霊長類、マウス、ラット、ハムスター、モルモット等のげっ歯類、イヌ、ネコ等の食肉類、その他ブタ、ウシ、ヤギ、ウマ、ヒツジ、ウサギ等が挙げられる。

[0015] 胚性幹細胞は、例えば、着床以前の胚盤胞期胚中に存在する内部細胞塊を、フィーダー細胞上又はＬＩＦを含む培地中で培養することにより製造することが出来る。胚性幹細胞の具体的な製造方法は、例えば、ＷＯ９６／２２３６２、ＷＯ０２／１０１０５７、ＵＳ５，８４３，７８０、ＵＳ６，２００，８０６、ＵＳ６，２８０，７１８等に記載されている。胚性幹細胞は、所定の機関より入手でき、また、市販品を購入することもできる。例えば、ヒト胚性幹細胞であるＫｈＥＳ－１、ＫｈＥＳ－２及びＫｈＥＳ－３は、京都大学再生医科学研究所より入手可能である。いずれもマウス胚性幹細胞である、ＥＢ５細胞は国立研究開発法人理化学研究所より、Ｄ３株はＡＴＣＣより、入手可能である。

[0016] なお、ヒト胚性幹細胞は、受精１４日以内のヒト胚から樹立されたものである。

[0017] ＥＳ細胞の一つである核移植ＥＳ細胞（ｎｔＥＳ細胞）は、細胞核を取り除いた卵子に体細胞の細胞核を移植して作ったクローン胚から樹立することができる。

[0018] 「人工多能性幹細胞」は、体細胞を、公知の方法等により初期化（ｒｅｐｒｏｇｒａｍｍｉｎｇ）することにより、多能性を誘導した細胞である。具体的には、例えば線維芽細胞、皮膚細胞、末梢血単核球等の体細胞にＯｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、Ｍｙｃ（ｃ－Ｍｙｃ、Ｎ－Ｍｙｃ、Ｌ－Ｍｙｃ）、Ｇｌｉｓ１、Ｎａｎｏｇ、Ｓａｌｌ４、ｌｉｎ２８、Ｅｓｒｒｂ等の

遺伝子群から選ばれる複数の初期化因子の組合せのいずれかを導入することにより初期化され多分化能が誘導された細胞が挙げられる。好ましい初期化因子の組み合わせとしては、（１）Ｏｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、及びＭｙｃ（ｃ－Ｍｙｃ又はＬ－Ｍｙｃ）、（２）Ｏｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、Ｌｉｎ２８及びＬ－Ｍｙｃ（Stem Cells, 2013;31:458-466）を挙げることが出来る。

[0019] 人工多能性幹細胞は、２００６年、山中らによりマウス細胞で初めて樹立され（Cell,2006, 126(4) pp.663-676）、２００７年にはヒト線維芽細胞でも樹立された（Cell,2007, 131(5) pp.861-872;Science, 2007, 318(5858)pp.1917-1920;Nat. Biotechnol.,2008, 26(1) pp.101-106）。人工多能性幹細胞の誘導方法についてはその後も様々な改良が行われており、具体的な製造方法は、例えば、マウス人工多能性幹細胞については、Cell. 2006 Aug 25;126(4):663-76、ヒト人工多能性幹細胞については、Cell. 2007 Nov 30;131(5):861-72等に記載されている。

[0020] 人工多能性幹細胞として、遺伝子発現による直接初期化で製造する方法以外に、化合物の添加などにより体細胞より人工多能性幹細胞を誘導することもできる（Science, 2013, 341 pp. 651-654）。

[0021] また、株化された人工多能性幹細胞を入手する事も可能であり、例えば、京都大学で樹立された２０１Ｂ７細胞、２０１Ｂ７－Ｆｆ細胞、２５３Ｇ１細胞、２５３Ｇ４細胞、１２０１Ｃ１細胞、１２０５Ｄ１細胞、１２１０Ｂ２細胞又は１２３１Ａ３細胞等のヒト人工多能性細胞株が、京都大学又はｉＰＳアカデミアジャパン株式会社より入手可能である。また、株化された人工多能性幹細胞として、例えば、京都大学で樹立されたＦｆ－ＩＰＳ１０１細胞、Ｆｆ－Ｉ１４細胞及びＱＨＪＩＰＳ１０１細胞が、京都大学より入手可能である。

[0022] 人工多能性幹細胞を製造する際に用いられる体細胞には、特に限定は無く、具体的には、線維芽細胞、血球系細胞（例えば、末梢血単核球又はＴ細胞、臍帯血由来細胞）等が挙げられる。線維芽細胞としては、真皮由来のもの等が挙げられる。

[0023] 人工多能性幹細胞を製造する際に、数種類の初期化因子の発現により初期化する場合、遺伝子発現のための手段には特に限定は無く、当業者に周知の遺伝子導入方法、又はタンパク質の直接注入法を用いることができる。前記遺伝子導入法として具体的には、ウイルスベクター（例えば、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、センダイウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター）を用いた感染法、プラスミドベクター（例えば、プラスミドベクター、エピソーマルベクター）、もしくはＲＮＡベクターを用いたリン酸カルシウム法、リポフェクション法、レトロネクチン法又はエレクトロポレーション法等が挙げられる。

[0024] 人工多能性幹細胞を製造する際には、フィーダー細胞存在下又はフィーダー細胞非存在下（フィーダーフリー）で製造できる。フィーダー細胞存在下で人工多能性幹細胞を製造する際には、公知の方法で、未分化維持因子存在下で人工多能性幹細胞を製造できる。フィーダー細胞非存在下で人工多能性幹細胞を製造する際に用いられる培地としては、特に限定は無いが、公知の胚性幹細胞及び／又は人工多能性幹細胞の維持培地や、フィーダーフリーで人工多能性幹細胞を樹立するための培地を用いることができる。フィーダーフリーで人工多能性幹細胞を樹立するための培地としては、例えばＥｓｓｅｎｔｉａｌ　８培地（Ｅ８培地）や、Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　６培地、ＴｅＳＲ培地、ｍＴｅＳＲ培地、ｍＴｅＳＲ－Ｅ８培地、Ｓｔａｂｉｌｉｚｅｄ　Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ　８培地、ＳｔｅｍＦｉｔ（登録商標）等のフィーダーフリー培地を挙げることができる。人工多能性幹細胞を製造する際、例えば、フィーダー細胞非存在下で体細胞に、センダイウイルスベクターを用いて、Ｏｃｔ３／４、Ｓｏｘ２、Ｋｌｆ４、及びＭｙｃの４因子を遺伝子導入することで、人工多能性幹細胞を作製することができる。

[0025] 本発明に用いられる多能性幹細胞は、好ましくは、げっ歯類、食肉類又は霊長類の人工多能性幹細胞であり、より好ましくは、ヒト人工多能性幹細胞である。

[0026] 多能性幹細胞は、当業者であれば周知の方法により維持培養・拡大培養す

る事ができるが、移植細胞製造の安全性等の観点から、多能性幹細胞は、無血清条件下及びフィーダー細胞非存在下で維持培養・拡大培養する事が好ましい。

[0027] 遺伝子改変された多能性幹細胞は、例えば、相同組換え技術を用いることにより作製できる。改変される染色体上の遺伝子としては、例えば、細胞マーカー遺伝子、組織適合性抗原の遺伝子、網膜色素上皮細胞の障害に基づく疾患関連遺伝子などがあげられる。染色体上の標的遺伝子の改変は、Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press(1994); Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993) ；バイオマニュアルシリーズ８、ジーンターゲッティング、ＥＳ細胞を用いた変異マウスの作製, 羊土社（１９９５）；等に記載の方法を用いて行うことができる。

[0028] 具体的には、例えば、改変する標的遺伝子（例えば、細胞マーカー遺伝子、組織適合性抗原の遺伝子や疾患関連遺伝子など）を含むゲノムＤＮＡを単離し、単離されたゲノムＤＮＡを用いて標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターを作製する。作製されたターゲットベクターを幹細胞に導入し、標的遺伝子とターゲットベクターの間で相同組換えを起こした細胞を選択することにより、染色体上の遺伝子が改変された幹細胞を作製することができる。

[0029] 標的遺伝子を含むゲノムＤＮＡを単離する方法としては、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)やCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)等に記載された公知の方法があげられる。ゲノムＤＮＡライブラリースクリーニングシステム（Ｇｅｎｏｍｅ　Ｓｙｓｔｅｍｓ製）やＵｎｉｖｅｒｓａｌ　ＧｅｎｏｍｅＷａｌｋｅｒ　Ｋｉｔｓ　（ＣＬＯＮＴＥＣＨ製）などを用いることにより、標的遺伝子を含むゲノムＤＮＡを単離することもできる。ゲノムＤＮＡの代わりに、標的蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いることもできる。当該ポリヌクレオチドは、ＰＣＲ法で

該当するポリヌクレオチドを増幅することにより取得する事ができる。

[0030] 標的遺伝子を相同組換えするためのターゲットベクターの作製、及び相同組換え体の効率的な選別は、Gene Targeting, A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press (1993)；バイオマニュアルシリーズ８，ジーンターゲッティング、ＥＳ細胞を用いた変異マウスの作製、羊土社（１９９５）；等に記載の方法にしたがって行うことができる。ターゲットベクターは、リプレースメント型又はインサーション型のいずれでも用いることができる。選別方法としては、ポジティブ選択、プロモーター選択、ネガティブ選択、又はポリＡ選択などの方法を用いることができる。

[0031] 選別した細胞株の中から目的とする相同組換え体を選択する方法としては、ゲノムＤＮＡに対するサザンハイブリダイゼーション法やＰＣＲ法等があげられる。

[0032] 多能性幹細胞から網膜色素上皮細胞を製造する方法としては公知の方法であれば特に限定されず、例えば、ＷＯ２００５／０７００１１号、ＷＯ２００６／０８０９５２号、ＷＯ２００９／０５１６７１号、ＷＯ２０１１／０６３００５号、ＷＯ２０１２／１７３２０７号、ＷＯ２０１５／０５３３７５号、ＷＯ２０１４／０８７２４４号、ＷＯ２０１４／１２１０７７、ＷＯ２０１５／０５３３７６号、ＷＯ２０１５／０６８５０５号、ＷＯ２０１７／０４３６０５、Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ Ｒｅｐｏｒｔｓ，２（２），２０５－２１８ （２０１４）及びＣｅｌｌ Ｓｔｅｍ Ｃｅｌｌ，１０（６），７７１－７８５ （２０１２）に記載の方法であってよい。例えば、ＷＯ２０１７／０４３６０５に開示される下記工程（１）～（２）を含む、網膜色素上皮細胞の製造方法であってよい。

（１）多能性幹細胞を、ＦＧＦ受容体阻害物質及び／又はＭＥＫ阻害物質を含む培地で、３０日を超えない期間（好ましくは２日間～１３日間又は２日間～６日間、更に好ましくは４日～６日間）培養する第一工程、及び

（２）第一工程で得られた細胞を、Ｎｏｄａｌシグナル伝達経路阻害物質及び／又はＷｎｔシグナル伝達経路阻害物質の存在下において培養し、網膜色

素上皮細胞を形成させる第二工程。

[0033] 網膜色素上皮細胞の製造方法は、また下記工程（１）～（２）を含んでもよい。

（１）眼形成転写因子の少なくとも１つの遺伝子発現を誘導するのに十分でありかつ３０日を超えない期間で、多能性幹細胞を、ＦＧＦ受容体阻害物質及び／又はＭＥＫ阻害物質を含む培地で培養する第一工程、及び

（２）第一工程で得られた細胞を、Ｎｏｄａｌシグナル伝達経路阻害物質及び／又はＷｎｔシグナル伝達経路阻害物質の存在下において培養し、網膜色素上皮細胞を形成させる第二工程。

[0034] 網膜色素上皮細胞の製造方法は、さらに下記工程（１）～（２）を含んでもよい。

（１）ＰＡＸ６、ＬＨＸ２及びＳＩＸ３の少なくとも１つの遺伝子発現を誘導するのに十分でありかつ３０日を超えない期間で、多能性幹細胞を、ＦＧＦ受容体阻害物質及び／又はＭＥＫ阻害物質を含む培地で培養する第一工程、及び

（２）第一工程で得られた細胞を、Ｎｏｄａｌシグナル伝達経路阻害物質及び／又はＷｎｔシグナル伝達経路阻害物質の存在下において培養し、網膜色素上皮細胞を形成させる第二工程。

[0035] ＦＧＦ受容体阻害物質とは、ＦＧＦにより媒介されるシグナル伝達を抑制し得る物質であれば特に限定はなく、蛋白質、核酸、低分子化合物のいずれであってもよい。ここで、ＦＧＦは少なくとも２２種類からなるファミリーを形成している。また、代表的なＦＧＦ受容体としてはＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３及びＦＧＦＲ４等が挙げられ、ＦＧＦ受容体阻害物質はこれらの１つ、複数又は全部を阻害する物質である。当該物質として例えば、ＦＧＦ又はＦＧＦ受容体に直接作用する物質（例えば抗体、アプタマー等）、ＦＧＦ又はＦＧＦ受容体をコードする遺伝子の発現を抑制する物質（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ等）、ＦＧＦ受容体とＦＧＦの結合を阻害する物質（例えば可溶型のＦＧＦ受容体、ＦＧＦアンタゴ

ニスト等）、ＦＧＦ受容体によるシグナル伝達に起因する生理活性を阻害する物質［例えば、ＡＴＰ競合によりＦＧＦ受容体のチロシンキナーゼ活性を阻害するPD173074（N-[2-[[4-(Diethylamino)butyl]amino]-6-(3,5-dimethoxyphenyl)pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-yl]-N'-(1,1-dimethylethyl)urea）又はSU5402（2-[(1,2-Dihydro-2-oxo-3H-indol-3-ylidene)methyl]-4-methyl-1H-pyrrole-3-propanoic acid）等の低分子化合物等]が挙げられるが、これらに限定されない。これらの物質は１種のみで用いてもよいし、２種以上を組み合わせて用いてもよい。ここで、ＰＤ１７３０７４及びＳＵ５４０２は公知のＦＧＦ受容体阻害物質であり、市販品等を適宜入手可能である。ＦＧＦ受容体阻害物質として好ましくはＰＤ１７３０７４又はＳＵ５４０２が挙げられる。

[0036] ＭＥＫ阻害物質とは、ＭＥＫファミリーの発現又は活性を阻害する物質であれば特に限定はなく、蛋白質、核酸、低分子化合物のいずれであってもよい。ここで、代表的なＭＥＫファミリーとしてＭＥＫ１、ＭＥＫ２、ＭＥＫ３等が挙げられ、ＭＥＫ阻害物質はこれらＭＥＫファミリーの１つ、複数又は全部の発現又は活性を阻害する物質である。当該物質として例えば、各種ＭＥＫをコードする遺伝子の発現を抑制する物質（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ等）、各種ＭＥＫの酵素活性を阻害する物質[PD0325901(N-[(2R)-2,3-Dihydroxypropoxy]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-iodophenyl)amino]-benzamide)、PD184352((2-[(2-Chloro-4-iodophenyl)amino]-N-cyclopropylmethoxy)-3,4-difluorobenzamide）、PD98059（2'-Amino-3'-Methoxyflavone）、U0126（1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadiene）、MEK162(5-[(4-Bromo-2-fluorophenyl)amino]-4-fluoro-N-(2-hydroxyethoxy)-1-methyl-1H-benzimidazole-6-carboxamide)、SL327（α-[Amino[(4-aminophenyl)thio]methylene]-2-(trifluoromethyl)benzeneacetonitrile）、TAK-733 ((R)-3-(2,3-dihydroxypropyl)-6-fluoro-5-(2-fluoro-4-iodophenylamino)-8-methylpyrido[2,3-d] pyrimidine-4, 7 (3H, 8H)-dione）又はAZD-8330（2-(2-fluoro-4-iodophenylamino)-N-(2-hydroxyeth

oxy)-1,5-dimethyl-6-oxo-1,6-dihydropyridine-3-carboxamide）等の低分子化合物等］等が挙げられるが、これらに限定されない。これらの物質は１種で用いてもよいし、２種以上を組み合わせて用いてもよい。ここで、ＰＤ０３２５９０１、ＰＤ１８４３５２、ＰＤ９８０５９、Ｕ０１２６、ＭＥＫ１６２、ＳＬ３２７、ＴＡＫ－７３３及びＡＺＤ－８３３０は公知のＭＥＫ阻害物質であり、市販品等を適宜入手可能である。ＭＥＫ阻害物質として好ましくはＰＤ０３２５９０１、ＰＤ１８４３５２、Ｕ０１２６、ＴＡＫ－７３３又はＡＺＤ－８３３０が挙げられる。

[0037] Ｎｏｄａｌシグナル伝達経路阻害物質は、Ｎｏｄａｌにより媒介されるシグナル伝達を抑制し得るものである限り特に限定されず、蛋白質、核酸、低分子化合物のいずれであってもよい。Ｎｏｄａｌにより媒介されるシグナルは、Ｎｏｄａｌ受容体を介して伝達される。Ｎｏｄａｌ受容体は、Ｉ型受容体（ＡＬＫ（ａｃｔｉｖｉｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ－ｌｉｋｅ ｋｉｎａｓｅ）－４、ＡＬＫ－５、ＡＬＫ－７）及びＩＩ型受容体（ＡｃｔＲＩＩ）のヘテロ二量体として存在する。Ｎｏｄａｌシグナル伝達経路阻害物質としては、例えば、Ｎｏｄａｌ又はＮｏｄａｌ受容体に直接作用する物質（抗Ｎｏｄａｌ抗体、抗Ｎｏｄａｌ受容体抗体等）、Ｎｏｄａｌ又はＮｏｄａｌ受容体をコードする遺伝子の発現を抑制する物質（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ等）、Ｎｏｄａｌ受容体とＮｏｄａｌの結合を阻害する物質（Ｌｅｆｔｙ－Ａ、Ｌｅｆｔｙ－Ｂ、Ｌｅｆｔｙ－１、Ｌｅｆｔｙ－２、可溶型Ｎｏｄａｌ受容体等）、Ｎｏｄａｌ受容体によるシグナル伝達に起因する生理活性を阻害する物質［ＡＴＰ競合によりＩ型受容体のキナーゼ活性を阻害するＳＢ－４３１５４２（ＳＢ４３１５４２）(4-[4-(1,3-Benzodioxol-5-yl)-5-(pyridin-2-yl)-1H-imidazol-2-yl]benzamide)等の低分子化合物等]等が挙げられるが、これらに限定されない。ＳＢ－４３１５４２は公知のＮｏｄａｌシグナル阻害物質であり、市販品等を適宜入手可能である。Ｎｏｄａｌシグナル阻害物質として好ましくはＳＢ－４３１５４２が挙げられる。

[0038] Ｗｎｔシグナル伝達経路阻害物質は、Ｗｎｔにより媒介されるシグナル伝達を抑制し得るものである限り特に限定されず、蛋白質、核酸、低分子化合物等のいずれであってもよい。Ｗｎｔにより媒介されるシグナルは、Ｆｒｉｚｚｌｅｄ（Ｆｚ）及びＬＲＰ５／６（low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6）のヘテロ二量体として存在するＷｎｔ受容体を介して伝達される。Ｗｎｔシグナル伝達経路阻害物質としては、例えば、Ｗｎｔ又はＷｎｔ受容体に直接作用する物質（抗Ｗｎｔ抗体、抗Ｗｎｔ受容体抗体等）、Ｗｎｔ又はＷｎｔ受容体をコードする遺伝子の発現を抑制する物質（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチド、ｓｉＲＮＡ等）、Ｗｎｔ受容体とＷｎｔの結合を阻害する物質（可溶型Ｗｎｔ受容体、ドミナントネガティブＷｎｔ受容体等、Ｗｎｔアンタゴニスト、Ｄｋｋ１、Ｃｅｒｂｅｒｕｓ蛋白等）、Ｗｎｔ受容体によるシグナル伝達に起因する生理活性を阻害する物質［カゼインキナーゼＩ阻害物質であるＣＫＩ－７(N-(2-Aminoethyl)-5-chloroisoquinoline-8-sulfonamide)及びＤ４４７６（4-[4-(2,3-Dihydro-1,4-benzodioxin-6-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]benzamide）、Ａｘｉｎの代謝回転を阻害する事でβ－カテニン分解複合体を安定化させるＩＷＲ－１－ｅｎｄｏ（ＩＷＲ１ｅ）(4-[(3aR,4S,7R,7aS)-1,3,3a,4,7,7a-hexahydro-1,3-dioxo-4,7-methano-2H-isoindol-2-yl]-N-8-quinolinyl-benzamide)、並びに、膜結合型Ｏ－アシルトランスフェラーゼ（ＭＢＯＡＴ）であるＰｏｒｃｕｐｉｎｅ（Ｐｏｒｃｎ）を不活化しＷｎｔタンパク質のパルミチル化を抑制するＩＷＰ－２（N-(6-Methyl-2-benzothiazolyl)-2-[(3,4,6,7-tetrahydro-4-oxo-3-phenylthieno[3,2-d]pyrimidin-2-yl)thio]acetamide）等の低分子化合物等］等が挙げられるが、これらに限定されない。ＣＫＩ－７、Ｄ４４７６、ＩＷＲ－１－ｅｎｄｏ（ＩＷＲ１ｅ）、ＩＷＰ－２等は公知のＷｎｔシグナル阻害物質であり、市販品等を適宜入手可能である。Ｗｎｔシグナル阻害物質として好ましくはＣＫＩ－７が挙げられる。

[0039] 本明細書における「眼形成転写因子（Eye Field Transcription Factors）」とは、発生初期において眼形成領域に発現する遺伝子であり、ＥＴ（Ｔｂ

ｘ３）、Ｒｘ１（Ｒａｘ）、Ｐａｘ６、Ｓｉｘ３、Ｌｈｘ２、ＴＩｘ（Ｎｒ２ｅ１）、Ｏｐｔｘ２（Ｓｉｘ６）などが同定されている。これら眼形成転写因子は、眼形成初期のマーカーとして用いる事ができる。

[0040] 第一工程の日数は、多能性幹細胞に上記ＦＧＦ受容体阻害物質及び／又はＭＥＫ阻害物質等を暴露することで生じる細胞が網膜色素上皮細胞への分化能を保持している期間内であれば特に制限はないが、第一工程における多能性幹細胞は、３０日を超えない期間培養される。該期間は、用いる多能性幹細胞の株等に応じて変動し得るが、通常２日以上、好ましくは３日以上、より好ましくは４日以上である。第一工程における多能性幹細胞は、より好ましくは２日間～１３日間又は２日間～６日間、更に好ましくは４日～６日間培養される。

[0041] 第二工程の培養期間は、目的とする網膜色素上皮細胞を誘導できる期間であれば特に限定されないが、かかる培養期間の例としては、第二工程開始時から起算して、通常１４～４０日目に網膜色素上皮細胞を生じさせることができる。また、当業者であれば、細胞マーカー（ＲＰＥ６５（網膜色素上皮細胞）、Ｍｉｔｆ（網膜色素上皮細胞）、ＢＥＳＴ１（網膜色素上皮細胞）、ＣＲＡＬＢＰ（網膜色素上皮細胞）など）の発現や、メラニン顆粒の存在（黒褐色）、細胞間のタイトジャンクション、多角形・敷石状の特徴的な細胞形態などにより、網膜色素上皮細胞の生成を確認する事が可能であり、これらを確認する事で培養期間を設定する事も可能である。

[0042] 第二工程終了後、培地を網膜色素上皮細胞の維持培地（以下、ＲＰＥ維持培地と記載する事もある。）に交換し、更に培養することが好ましい。例えば３日に１回以上の頻度で全量培地交換を行いながら５～２０日間程度培養を行う。網膜色素上皮細胞の維持培地は、例えばIOVS, March 2004, Vol. 45, No. 3, Masatoshi Haruta, et. al.、IOVS, November 2011, Vol. 52, No. 12, Okamoto and Takahashi、J.Cell Science 122 (17), Fumitaka Osakada, et. al.、IOVS, February 2008, Vol. 49, No. 2, Gamm, et. al.に記載のものを使用することができ、基礎培地、血清及び／又は血清代替物、及びそ

の他の成分で構成される。

[0043] 第一工程を省略し、第二工程のみ実施することでも網膜色素上皮細胞の製造が可能である。

[0044] 網膜色素上皮細胞を接着培養により製造した場合、網膜色素上皮細胞は互いに接着しシート状構造を形成しうる。従って、網膜色素上皮細胞のシートを製造する事が可能である。当該網膜色素上皮細胞のシートは、トリプシン等の酵素を用いる等当業者に周知の方法で分散させることにより、網膜色素上皮細胞を独立した単独の細胞（単一細胞）として回収し、これらを分散用媒体に懸濁させることにより、患者に移植可能な懸濁液として調製する事も可能である。

[0045] 「接着培養」とは、細胞又は細胞の凝集体を培養器材等に接着させる条件で行われる培養をいう。この場合、細胞が接着するとは、細胞又は細胞の凝集体と培養器材の間に、強固な細胞－基質間結合ができることをいう。すなわち、接着培養とは、細胞又は細胞の凝集体と培養器材等との間に強固な細胞－基質間結合を作らせる条件での培養をいう。当業者であれば、適宜培養器材等の培養条件を設定し、接着培養を行うことができる。

[0046] 網膜色素上皮細胞は、浮遊培養により製造することもできる。すなわち、多能性幹細胞から胚様体（Embryonic body；EBともいう）を製造し、これを網膜色素上皮細胞へと分化誘導し、網膜色素上皮細胞を含む細胞凝集体を製造することができる。当該細胞凝集体は、トリプシン等の酵素を用いる等当業者に周知の方法で分散させることにより、網膜色素上皮細胞を独立した単独の細胞（単一細胞）として回収し、これらを分散用媒体に懸濁させることにより、患者に移植可能な懸濁液として調製する事も可能である。

[0047] 上述の方法で製造した網膜色素上皮細胞の細胞凝集体・シートを、分散させた後、網膜色素上皮細胞を凍結用媒体に懸濁させ、凍結することにより長期保存が可能な、網膜色素上皮細胞を含む凍結製剤を調製することができる。

[0048] ここで用いられる凍結用媒体としては、網膜色素上皮細胞の機能や生存に

悪影響を与えない限り特に限定されず、凍結保護剤を含む媒体であればよい。凍結保護剤として、細胞や細胞小器官を保護するために効果的な（例えば、細胞の凍結時に、氷の結晶が細胞内にできることを防止可能な）物質であればよく、例えば、ジメチルスルホキシド（DMSO）、グリセロール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリン、ソルビトール、デキストラン、トレハロースなどが挙げられる。凍結保護剤を含む凍結用媒体として、市販の細胞凍結保存液（例：StemCellBanker（Zenoaq社））を使用してもよい。

[0049] 網膜色素上皮細胞を含む凍結製剤を融解し、分散用媒体に置換・懸濁させることにより、患者に移植可能な懸濁液を調製することができる。

[0050] 本明細書において「網膜色素上皮裂孔」とは、生体網膜上の網膜色素上皮細胞層に裂孔が生じている状態であり、網膜色素上皮細胞層の部分的な欠損・欠失を有する病態を意味する。網膜色素上皮裂孔は、網膜色素上皮細胞層が断裂し、断裂部から収縮、ロールし、部分的に網膜色素上皮を欠損する病態である。また、網膜色素上皮細胞層下にあるブルッフ膜及び脈絡膜を露出する。網膜色素上皮裂孔の最も古典的な形状は三日月形の裂孔であるが、裂孔の中心に巻き上げられた網膜色素上皮の島が存在する同心円状の裂孔などの様々な形状も存在する。

[0051] 従って、本明細書において、「網膜色素上皮裂孔」の原因には特に限定はなく、網膜・脈絡膜その他の眼関連疾患に起因する網膜色素上皮裂孔及び外傷などの網膜関連の疾患に起因しない網膜色素上皮裂孔がともに包含される。

[0052] 網膜色素上皮裂孔が生じると、網膜色素上皮と視細胞の層構造が破壊され、短期的には視覚サイクル（visual cycle）の破綻、網膜色素上皮の暗幕作用の消失、長期的には視細胞の障害又は変性をもたらす。裂孔の大きさが視機能低下に相関し、裂孔が中心窩にかかった場合には、しばしば重篤な視機能低下をもたらす。また、中心窩近傍に生じた場合にも傍中心暗点を引き起こし、重篤な視機能障害を引き起こす。

[0053] 網膜色素上皮裂孔は、加齢黄斑変性（AMD）に合併することが多い。また、網膜色素上皮裂孔は、網膜色素上皮剥離（a pigment epithelial detachment：PED）を呈する患者において併発している場合もある。なお、網膜色素上皮剥離（PED）は、網膜色素上皮がブルッフ膜からはがれてドーム状に隆起した状態であり、漿液、血液、線維血管膜、ドルセノイド物質、又はそれらの組み合わせが貯留する空間が存在する。

[0054] 特に脈絡膜新生血管（CNV）などに起因して生ずる網膜色素上皮剥離（a pigment epithelial detachment: PED）の辺縁部で、自然経過、光線力学療法後、又は抗血管内皮増殖因子（VEGF）薬の硝子体注射後に裂孔が生じることで発生する。そして、網膜色素上皮剥離を伴う滲出型加齢黄斑変性患者における網膜色素上皮裂孔の発症率は１０～１２％との報告もある。

[0055] 網膜色素上皮裂孔の診断は、さまざまなイメージングモダリティによって行われる。例えば、光干渉断層撮影（optical coherence tomography；OCT）は、網膜色素上皮の欠損部位、ロール部位が明確に把握できるため、網膜色素上皮裂孔を確認するための最良の方法の１つである。網膜色素上皮裂孔の眼底所見では、裂けた部分の網膜色素上皮が裂孔辺縁にロールして褐色の隆起病巣となる。網膜色素上皮の欠損部位はわずかに陥没し、脈絡膜血管が正常部よりも明瞭に透見される。フルオレセイン蛍光造影検査では、ロール状になった網膜色素上皮が重積した部位は脈絡膜からの蛍光がブロックされるため、低蛍光となる。網膜色素上皮の欠損部位では、脈絡膜毛細血管板組織の強い過蛍光がみられる。眼底自発蛍光では網膜色素上皮の欠損部位は低蛍光、ロールした部位は発症初期には過蛍光となる。

[0056] ２．治療薬

本発明の治療薬は、ヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療薬であり、ヒト網膜色素上皮細胞が分散用媒体に分散された懸濁液からなる。本発明の治療薬は、ヒト網膜色素上皮細胞を眼球の網膜下へ投与する（又は移植する）ことにより、ヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療に用いることができる。

[0057] 網膜色素上皮細胞の懸濁液を網膜色素上皮裂孔の病変部に投与することにより、かつて行われていた外科手術等と比較して合併症のリスク等を低減させ、正常な機能を有する網膜色素上皮と視細胞層が接する構造を再建し、視機能（視力、網膜感度等）の回復若しくは維持、又は視機能低下の遅延若しくは抑制が期待できる。本発明の治療薬を用いることによる更なる効果について、以下において詳述する。

[0058] 本発明の治療薬におけるヒト網膜色素上皮細胞としては、１．定義で記載されたヒト網膜色素上皮細胞であってよく、ヒト多能性幹細胞（特にヒトｉＰＳ細胞）のｉｎ　ｖｉｔｒｏ分化に由来するものであることがより好ましい。網膜色素上皮細胞は、分散した網膜色素上皮細胞であってよく、例えば、網膜色素上皮細胞のシートを回収して単細胞及び／又は２～５個の細胞集合に分散して得られた分散細胞であってよい。

[0059] 治療薬において、ヒト網膜色素上皮細胞が、０．１×１０^{7}細胞／ｍＬ～１×１０^{7}細胞／ｍＬの濃度で含まれることが好ましく、０．５×１０^{7}細胞／ｍＬ～１×１０^{7}細胞／ｍＬの濃度であることがより好ましい。治療薬の投与容量は、２０μＬ～８０μＬであればよく、２０μＬ～５０μＬであることが好ましく、３０μＬ～５０μＬであることがより好ましい。すなわち、例えば、０．２×１０^{5}細胞～５×１０^{5}細胞、１×１０^{5}細胞～５×１０^{5}細胞の投与量であってよい。

[0060] １×１０^{7}細胞／ｍＬを超えるヒト網膜色素上皮細胞濃度では、網膜下への注入に際して刺入口付近の視認性が局所的に悪化し、投与時に網膜に損傷を与えるリスクがあるため、当該濃度を上限と設定してもよい。また、網膜色素上皮裂孔の治療において、本発明の治療薬の有効性を最大限発揮するためには、病変部の視細胞層と投与網膜色素上皮細胞が接する構造を可能な限り広範囲に再建することが求められる。黄斑を有し、眼球の大きさ及び解剖学的特徴がヒトに近いカニクイザルへの移植結果から、５０μＬの投与容量によってカニクイザル網膜下に形成されるブレブの径は、平均的な網膜色素上皮裂孔病変部（例：１～１５ｍｍ^{2}、３～１０ｍｍ^{2}）あるいはヒトの中心窩

及び傍中心窩（直径約２～４ｍｍ（例：３ｍｍ）、面積約６～８ｍｍ^2（例：７．０７ｍｍ^2））をカバーするのに十分な容量であることを見出した。また、１ブレブあたり７０～８０μＬまでは、カニクイザルの網膜下へ再現よく投与できることから、上述の投与容量を設定可能である。

[0061] カニクイザルに対し上述のヒト網膜色素上皮細胞濃度及び投与容量にて本発明の治療薬を投与した場合、例えば幅約３～５ｍｍに渡って生着することができる。従って、シート状の網膜色素上皮細胞を移植する場合に比べて、懸濁液にて網膜色素上皮細胞を移植する場合の方が、簡便に広範な病態部位を覆うことができ、手術の負担を減らすこともできる。また、ヒト網膜色素上皮細胞を懸濁液として投与した場合、投与対象の網膜において、網膜色素上皮裂孔が存在する移植を必要とされる部位に生着できる。したがって、どの様な裂孔の形にも対応することが可能である。

[0062] ところで、網膜色素上皮細胞のシートを移植する場合、その挿入のために最低でもシートの幅、あるいはシートを挿入するためのデバイスの幅の網膜切開を必要とする。網膜切開は医原性の網膜裂孔であり、人為的に網膜に裂孔を生じさせると言える。さらに、切開創が大きい場合、術後の網膜剥離などのリスクが上昇する。術後網膜剥離のリスクを下げるためには切開創周囲を光凝固する必要が生じる場合があり、その場合、正常網膜、正常網膜色素上皮細胞層に不可逆的なダメージを与え、視機能への影響が生じうる。網膜色素上皮裂孔では、一般的に病変周囲は正常な視機能を有するため、投与部周囲に光凝固を行うことは、治療での回復以上に正常部位の視機能を低下させるかもしれず、不適切であると考えられる。

[0063] 一方、本発明のヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液による投与では、後述する投与方法等を採用することが可能であり、例えば外径３８ゲージの網膜下投与針の先端の大きさ程度の注入口が網膜に生じるのみで投与が可能である。本発明において、ヒト網膜色素上皮細胞の懸濁液によるこれらのメリットが初めて確認され、様々な形状を有しうる網膜色素上皮裂孔に対し投与可能であることを見出した。なお、これらは、後述する媒体や投与方法

と組み合わせることにより最適化できる。

[0064] 本発明の治療薬におけるヒト網膜色素上皮細胞の分散に用いる媒体（以下、「分散用媒体」ともいう。）は、特に限定されないが、２５℃におけるせん断速度２（１／ｓ）のときの粘度の上限値が４ｍＰａ・ｓ以下、３．５ｍＰａ・ｓ以下、又は３ｍＰａ・ｓ以下であってよい。２５℃におけるせん断速度２（１／ｓ）のときの粘度の下限値は特に限定されないが、例えば、０．５ｍＰａ・ｓ以上、０．６ｍＰａ・ｓ以上、０．７ｍＰａ・ｓ以上、０．８ｍＰａ・ｓ以上であってよい。

[0065] 上記所定の粘度範囲の分散用媒体を用いることで、網膜色素上皮細胞を網膜下へ投与する際に、特に網膜剥離の遷延を抑制できるため、網膜前膜の形成や網膜剥離等の副作用を低減でき、かつ、網膜色素上皮細胞の投与部位への生着を向上させることができる。網膜色素上皮裂孔の病態において、網膜剥離状態が継続することは、網膜色素上皮層の視細胞への直接作用が生じない時間が長引くこととなりより病態を悪化させる可能性があるため、特に網膜剥離の遷延を防止する粘度として、上記を設定可能である。

[0066] 分散用媒体の一態様として、２５℃におけるせん断速度２（１／ｓ）のときの粘度が１．３～３．８ｍＰａ・ｓ、１．５～３．５ｍＰａ・ｓ、２～３ｍＰａ・ｓであってもよい。

[0067] 分散用媒体は、製薬学上許容される水性液体を含んでもよく、製薬学上許容される水性液体であってもよい。「製薬学上許容される水性液体」とは、生体に投与可能であって、移植に適した物性を有する水溶液であれば特に限定は無く、例えば緩衝液、輸液、生理食塩水、注射用水、灌流液等を含む水溶液であってよい。好ましくは、緩衝液が挙げられる。分散用媒体は、製薬学上許容される水性液体のほかに、粘度に影響を与える物質（粘度をつける目的でくわえられる物質、例えば増粘剤）を含んでいてもよい。上述の通り、粘度に影響を与える物質としてヒアルロン酸及びコンドロイチン硫酸が挙げられ、好ましくは、それら以外の粘度に影響を与える物質（例えば増粘剤）を含まない。

[0068] 一態様として、分散用媒体は、ヒアルロン酸を含んでもよい。分散用媒体は、コンドロイチン硫酸を含んでもよいが、好ましくはコンドロイチン硫酸を含まない。ヒアルロン酸及びコンドロイチン硫酸は、いずれも生体に存在するムコ多糖であり、分散用媒体の増粘成分としての機能を有する。

[0069] 本明細書において、ヒアルロン酸は、Ｄ－グルクロン酸とＤ－Ｎ－アセチルグルコサミンがβ－１，４とβ－１，３のグリコシド結合により交互に連結する構造を有する、分子量数万～数百万の直鎖状の高分子多糖である。ヒアルロン酸は高い水分保持能力と粘性を有し、医薬品、化粧品等に幅広く用いられている物質である。本明細書において、「ヒアルロン酸」はフリー体のヒアルロン酸及びその塩をともに含む概念を意味する。ヒアルロン酸の塩としてはヒアルロン酸のアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩等が挙げられ、具体的には、市販されている、ヒアルロン酸ナトリウム、ヒアルロン酸カリウム等を利用することができる。

[0070] コンドロイチン硫酸は、Ｄ－グルクロン酸（ＧｌｃＡ）とＮ－アセチル－Ｄ－ガラクトサミン（ＧａｌＮＡｃ）の２糖が反復する糖鎖に、硫酸が結合した構造を持つムコ多糖である。本明細書において、「コンドロイチン硫酸」はフリー体のコンドロイチン硫酸及びその塩をともに含む概念を意味する。コンドロイチン硫酸の塩としてはコンドロイチン硫酸のアルカリ金属塩、アルカリ土類金属塩等が挙げられ、具体的には、市販されている、コンドロイチン硫酸ナトリウム、コンドロイチン硫酸カリウム等を利用することができる。

[0071] ヒアルロン酸又はその塩として、市販されているヒアルロン酸又はその塩の水溶液を使用することができる。具体的には、ヒアルロン酸ナトリウム３％、コンドロイチン硫酸エステルナトリウム４％、リン酸二水素ナトリウム一水和物、無水リン酸一水素ナトリウム及び等張化剤を成分として含むビスコート（登録商標）０．５眼粘弾剤、ヒアルロン酸ナトリウム１％、無水リン酸一水素ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム一水和物、ｐＨ調整剤（２成分）及び等張化剤を成分として含むプロビスク（登録商標）０．８５眼粘

弾剤１％、ヒアルロン酸ナトリウム０．６％、塩化ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム及びリン酸水素ナトリウムを成分として含むオペガン（登録商標）０．６眼粘弾剤、ヒアルロン酸ナトリウム１．１％、塩化ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム及びリン酸水素ナトリウムを成分として含むオペガン（登録商標）１．１眼粘弾剤、又は、ヒアルロン酸ナトリウム０．３％、イプシロン－アミノカプロン酸、エデト酸ナトリウム水和物、塩化カリウム、塩化ナトリウム及びｐＨ調節剤を成分として含むヒアレインミニ（登録商標）点眼液０．３％を例示することができる。市販されているヒアルロン酸又はその塩の水溶液としては、好ましくはヒアルロン酸及びコンドロイチン硫酸以外の、粘度に影響を与える物質（例えば増粘剤）を含まず、より好ましくは、ヒアルロン酸以外の、粘度に影響を与える物質（例えば増粘剤）を含まない。

[0072] 「製薬学上許容される水性液体」として、平衡塩類を含む水溶液（すなわち、平衡塩類溶液）が挙げられる。平衡塩類を含む水溶液には、緩衝剤、等張化剤、ｐＨ調整剤、抗酸化剤、キレート剤などを適宜選択して、移植される網膜組織の生存率に影響を与えない範囲で含有させることができる。

[0073] 緩衝剤としては、例えば、リン酸緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、酒石酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、アミノ酸、イプシロン－アミノカプロン酸などが挙げられる。

[0074] 等張化剤としては、ソルビトール、グルコース、マンニトールなどの糖類、グリセリン、プロピレングリコールなどの多価アルコール類、塩化ナトリウムなどの塩類、ホウ酸などが挙げられる。

[0075] キレート剤としては、エデト酸ナトリウム、クエン酸などが挙げられる。

[0076] ｐＨ調整剤としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、ホウ酸又はその塩（ホウ砂）、塩酸、クエン酸又はその塩（クエン酸ナトリウム、クエン酸二水素ナトリウム等）、リン酸又はその塩（リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素カリウム等）、酢酸またはその塩（酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム等）、酒石酸又はそ

の塩（酒石酸ナトリウム等）等が挙げられる。

[0077] 抗酸化剤としては、例えば、アスコルビン酸、グルタチオン、亜硫酸水素ナトリウム、乾燥亜硫酸ナトリウム、ピロ亜硫酸ナトリウム、トコフェロール等が挙げられる。

[0078] 「製薬学上許容される水性液体」としては、具体的には、ブドウ糖等の糖類、塩化カルシウム、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、及び硫酸マグネシウム等の無機塩、炭酸水素ナトリウム、酢酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素ナトリウム、無水リン酸一水素ナトリウム、及び塩酸等の無機物、並びに、エデト酸塩（例えば、エデト酸ナトリウム）等のキレート剤等から選択される、１又は複数の成分を含む水溶液が挙げられる。

[0079] 製薬学上許容される水性液体を調製するに当たって、眼内灌流・洗浄液として市販されている液体を使用することができる。眼内灌流・洗浄液として、具体的には、オペガード（登録商標）ＭＡ眼灌流液（千寿製薬株式会社）として市販されている、１ｍＬ中ブドウ糖　１．５ｍｇ、塩化ナトリウム　６．６ｍｇ、塩化カリウム０．３６ｍｇ、塩化カルシウム水和物　０．１８ｍｇ、硫酸マグネシウム水和物　０．３ｍｇ、炭酸水素ナトリウム　２．１ｍｇ、並びに添加物としてクエン酸ナトリウム水和物、酢酸ナトリウム水和物及び塩酸を含む水溶液、又はオキシグルタチオン眼灌流液等を使用することができる。また、製薬学上許容される水性液体を調製するに当たって、ハンクス平衡塩類溶液（ＨＢＳＳ）、イーグル平衡塩類溶液（ＥＢＳＳ）、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（ＤＰＢＳ）等を使用することもできる。

[0080] 分散用媒体の一態様として、増粘成分としてヒアルロン酸及び／又はコンドロイチン硫酸を含み、かつ、上述の緩衝剤、等張化剤、ｐＨ調整剤、抗酸化剤及びキレート剤などから選択される１以上の成分を適宜網膜組織の生存率に影響を与えない範囲で含有する平衡塩類溶液を含む媒体が挙げられる。

[0081] 分散用媒体の一態様として、増粘成分としてヒアルロン酸のみを含む媒体

が挙げられ、具体的には、例えば、ヒアルロン酸ナトリウムを１０ｍｇ／ｍＬ含み、コンドロイチン硫酸を含まない、眼粘弾剤プロビスク（登録商標）０．８５眼粘弾剤１％（日本アルコン株式会社）をＨＢＳＳ等の平衡塩類溶液にて２０～２００倍希釈（好ましくは、５０～１５０倍希釈、約１００倍希釈）して調製することができる。

[0082] 分散用媒体の一態様として、ヒアルロン酸ナトリウムを３０ｍｇ／ｍＬ、コンドロイチン硫酸エステルナトリウムを４０ｍｇ／ｍＬを含有するビスコート（登録商標）０．５眼粘弾剤（日本アルコン株式会社）をＨＢＳＳ等の平衡塩類溶液にて２０～２００倍希釈（好ましくは、５０～１５０倍希釈、約１００倍希釈）して調製することができる。

[0083] 分散用媒体の一態様として、オペガン（登録商標）０．６眼粘弾剤をオペガード等の水性液体にて２０～２００倍希釈して調製することができる。別の態様として、例えば、ヒアレインミニ（登録商標）点眼液０．３％をオペガード等の水性液体にて６～６０倍希釈して調製することができる。

[0084] 分散用媒体の一態様として、増粘成分としてヒアルロン酸を含む媒体が挙げられる。さらに、コンドロイチン硫酸を含んでもよい。ここでヒアルロン酸及びコンドロイチン硫酸の濃度としては、特に限定はなく、分散用媒体の、２５℃におけるせん断速度２（１／ｓ）のときの粘度を０．５～４ｍＰａ・ｓ、好ましくは２～３ｍＰａ・ｓに保つことができることが好ましい。分散用媒体の一態様として、平均分子量５０万～３９０万(好ましくは１５０万～３９０万)のヒアルロン酸を０．００５ｗ／ｖ％～０．１５ｗ／ｖ％（例：０．００７ｗ／ｖ％～０．０４ｗ／ｖ％、０．００８ｗ／ｖ％～０．０３５ｗ／ｖ％、０．００９ｗ／ｖ％～０．０３ｗ／ｖ％、約０．０１ｗ／ｖ％）含む分散用媒体が挙げられる。さらに、分子量２．０万～２．４万のコンドロイチン硫酸又はその塩を、０ｗ／ｖ％超（例：０．００１ｗ／ｖ％）～０．２０ｗ／ｖ％（又は、０．１ｗ／ｖ％、０．０５ｗ／ｖ％）含む、分散用媒体が挙げられる。上述の通り、分散用媒体は、より好ましくはコンドロイチン硫酸を含まない。

[0085] 分散用媒体は、好ましくは、ヒアルロン酸及びコンドロイチン硫酸以外の増粘剤（増粘成分）、又はヒアルロン酸以外の増粘剤（増粘成分）を含まない。増粘剤とは、例えば、アラビアゴム、カラヤガム、キサンタンガム、カゼイン、寒天、アルギン酸、α－シクロデキストリン、デキストリン、デキストラン、カラギーナン、ゼラチン、コラーゲン、ペクチン、デンプン、キチン及びその誘導体、キトサン及びその誘導体、エラスチン、ヘパリン、ヘパリノイド、ヘパリン硫酸、ヘパラン硫酸、ヒアルロン酸、メチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース等の多糖類又はその誘導体、セラミド、マクロゴール、グリセリン、ポビドン、ポリビュルメタアタリレート、ポリビュルアルコール、ポリアクリル酸、カルボキシビュルポリマー、ポリエチレンイミン等が挙げられる。

[0086] 分散用媒体は、好ましくは、抗菌剤及び防腐剤を含まない。

[0087] 分散用媒体は、投与（移植）を受ける患者への負担軽減の観点からは、網膜色素上皮細胞の機能や安定性が確保される限り添加剤が少ない方が好ましい。また、増粘成分を含まない媒体を用いた場合、投与時のブレブが可能な限り早期に復位することで、視細胞の保護や視機能の維持・改善が期待される。従って、分散用媒体の一態様として、増粘成分を含まず、上述の緩衝剤、等張化剤、ｐＨ調整剤、抗酸化剤及びキレート剤などから選択される１以上の成分を、適宜網膜組織の生存率に影響を与えない、投与に適した物性を示す範囲で含有する平衡塩類溶液を含む媒体が挙げられる。

[0088] ここで投与に適した物性としては、ｐＨ、浸透圧などが挙げられる。分散用媒体のｐＨとしては、中性領域であれば特に限定はなく、分散用媒体は、ｐＨ６．５～８．０、好ましくは、ｐＨ７．０～７．５程度に調整されていればよい。分散用媒体の浸透圧としては、低張・等張・高張が挙げられるが、等張に近いことが好ましい。浸透圧比としては、０．７～１．３、好ましくは、０．９～１．１に調整されていればよい。

[0089] また、分散用媒体は、好ましくは、使用する前にメンブレンフィルター等を用いた濾過滅菌などの滅菌処理を行うことができる。

[0090] すなわち、本発明の治療薬は、ヒト網膜色素上皮細胞の分散に用いる媒体の粘度が、上記所定の範囲内である場合、特に後述する投与方法（硝子体腔の空気置換等）と組み合わせた場合、ヒト対象への投与後、網膜前膜の形成が認められない、又は網膜前膜の形成の程度が減じられるものであるともいうことができる。本明細書において、網膜前膜の形成の程度とは、４ｍＰａ・ｓ超（２５℃におけるせん断速度２（１／ｓ））の粘度の分散用媒体を用いた治療薬により網膜色素上皮の障害に基づく疾患又は病態の治療を行った場合（硝子体腔の術後空気置換を実施しなくてもよい）、又は、同一の分散用媒体を用いて硝子体腔の術後空気置換を実施することなく経硝子体的に網膜下投与する術式により網膜色素上皮の障害に基づく疾患又は病態の治療を行った場合と比較した際の網膜前膜の形成の程度を意味する。網膜前膜の形成の程度が減じられるとは、例えば、４ｍＰａ・ｓ超（２５℃におけるせん断速度２（１／ｓ））の粘度の分散用媒体を用いた治療薬により網膜色素上皮の障害に基づく疾患又は病態の治療を行った場合（硝子体腔の術後空気置換を実施しなくてもよい）、又は、同一の分散用媒体を用いて硝子体腔の術後空気置換を実施することなく経硝子体的に網膜下投与する術式により網膜色素上皮の障害に基づく疾患又は病態の治療を行った場合の網膜前膜の形成の程度と比較して、５０％以上、６０％以上、７０％以上、８０％以上、９０％以上減じられることであってもよい。

[0091] 網膜前膜の形成の程度が減じられたことは、例えば、眼底診察や光干渉断層撮影（ＯＣＴ）所見の結果等によって確認することができる。

[0092] すなわち、本発明の治療薬は、ヒト網膜色素上皮細胞の分散に用いる媒体の粘度が、上記所定の範囲内である場合、ヒト対象への投与後、網膜剥離の遷延が認められない、又は網膜剥離の遷延の程度が減じられるものであるともいうことができる。本明細書において、網膜剥離の遷延の程度とは、４ｍＰａ・ｓ超（２５℃におけるせん断速度２（１／ｓ））の粘度の分散用媒体を用いた治療薬により網膜色素上皮の障害に基づく疾患又は病態の治療を行った場合と比較した際の網膜剥離の遷延の程度を意味する。網膜剥離の遷延

の程度が減じられるとは、例えば、４ｍＰａ・ｓ超（２５℃におけるせん断速度２（１／ｓ））の粘度の分散用媒体を用いた治療薬により網膜色素上皮の障害に基づく疾患又は病態の治療を行った場合と比較した際の網膜剥離の遷延の程度が、７０％以上、８０％以上、９０％以上、９５％以上減じられることであってもよい。

[0093] 網膜剥離の遷延が認められないことは、例えば、眼底の診察、眼底写真、蛍光眼底造影検又は光干渉断層撮影（ＯＣＴ）所見の結果等によって確認することができる。

[0094] 本発明の治療薬を投与するヒト対象は、網膜色素上皮裂孔を有するヒト対象であれば特に限定されないが、例えば、網膜色素上皮裂孔の程度及びその大きさ、視機能の程度等、又はこれらを総合して適宜判断してもよい。

[0095] 網膜色素上皮裂孔の程度及びその大きさによる投与対象の判断は、例えば、Ｓａｒｒａｆらのグレード分類（Retina 30(7)1039 45,2010）等により行ってもよい。当該分類を以下の表１に示す。

[表1]

グレード１	<200μm
グレード２	≧200μm,≦1乳頭径
グレード３	>1乳頭径
グレード４	>1乳頭径及び網膜色素上皮裂孔が中心窩にかかっている

[0096] 本発明の治療薬を投与するヒト対象は、上記グレード１～４のいずれに分類されるヒト対象であってもよいが、グレード３～４に分類されるヒト対象であることが好ましい。

[0097] 本発明の治療薬を投与するヒト対象は、網膜色素上皮裂孔による影響はあるが、視機能が一定以上維持されている、又は視機能の維持、回復の可能性があるヒト対象であることが好ましい。視機能が一定以上維持されているとは、ヒト対象において視細胞が一定以上生存していることであってもよく、眼組織の状態が一定以上維持されているヒト対象であってもよい。視機能は、発症又は診断からの日数、眼科検査による所見等により評価することがで

きる。

[0098] 一般的に網膜色素上皮裂孔は突然裂孔を生じ、黄斑部に裂孔が生じれば患者自身が急激な見え方の変化（視力低下や暗点等）として自覚できる。黄斑部以外に生じた場合に自覚することは難しいが、患者が網膜・脈絡膜その他の眼関連疾患で定期的に医療機関を受診していれば、眼底検査・ＯＣＴなどで容易に発見される。本発明の治療薬を投与するヒト対象は、発症時点がある程度特定されることが好ましく、発症から長期間経過していないヒト対象であってよい。例えば、発症又は診断から１年以内、１０か月以内、８か月以内、６か月以内、４か月以内、２か月以内、１か月以内、２週間以内、１週間以内のヒト対象が、視機能が一定以上維持されている、又は維持、回復の可能性がある対象として好ましい。

[0099] 網膜・脈絡膜その他の眼関連疾患において併発又は続発する網膜色素上皮裂孔であってもよく、外傷等が原因の網膜色素上皮裂孔や、あるいは原因が明確ではない特発性の網膜色素上皮裂孔であってもよい。

[0100] 網膜脈絡膜その他の眼関連疾患として、例えば、黄斑変性症（例、萎縮型及び滲出型加齢黄斑変性症など）、遺伝性網膜疾患、中心性漿液性網膜脈絡症（central serous chorioretinopathy）、脈絡膜腫瘍、網膜色素上皮の変性（網膜色素変性症、クリスタリン網膜症を含む）、黄斑ジストロフィー（Ｓｔａｒｇａｒｄｔ病を含む）、錐体ジストロフィー、桿体ジストロフィー、錐体桿体ジストロフィー、高度近視、後部ブドウ腫（staphyloma）、原田病（Vogt-Koyanagi-Harada disease）、汎ブドウ膜炎、強膜手術、並びに、網膜剥離手術及び緑内障手術等の合併症が挙げられる。従って、本明細書における網膜色素上皮裂孔の治療剤には、上記疾患のいずれか（例えば、黄斑変性症）であると診断された患者に移植される網膜色素上皮裂孔の治療剤が含まれる。

[0101] 眼科検査としては、例えば、視力検査（ランドルト環、ＥＴＤＲＳ視力チャート、絵視標、縞視標等を用いた検査、視行動など）、色覚検査、コントラスト検査、ＯＣＴ検査、動的視野検査、静的視野検査、眼底撮影、蛍光眼

底撮影、眼底自発蛍光撮影、網膜電位（ＥＲＧ）検査、ＦＳＴ（Full-field stimulus testing）、視覚誘発電位（ＶＥＰ）検査等が挙げられる。

[0102] 視機能が一定以上維持されているヒト対象としては、例えば、ＥＴＤＲＳ視力チャートを用いた最高矯正視力（ＢＣＶＡ）が、文字スコアで０文字以上８５文字以下（少数視力０．０２～１．０に相当）、２４文字以上７８文字以下、である対象であってもよい。文字スコア１００文字以下（少数視力２．０に相当）であっても、視野欠損等が存在する場合には、ヒト対象として含まれ得る。

[0103] 視機能が一定以上維持されているヒト対象としては、例えば、ゴールドマン型視野計　Ⅰ／２視標で中心視野角度２８度以上であるヒト対象であってもよい。

[0104] 眼組織の状態が一定以上維持されている、又はその可能性があるヒト対象としては、例えば、網膜色素上皮細胞層以外に損傷がないヒト対象であってもよく、少なくとも外境界膜（ＥＬＭ）及び内節外節結合部（ＩＳ／ＯＳ－ｌｉｎｅ）が維持されているヒト対象、網膜色素上皮裂孔部位の外顆粒（ＯＮＬ）層が周辺正常部位と比較し、菲薄化していないヒト対象等であってもよい。

[0105] ＨＬＡは主にＡ、Ｂ、Ｃ、ＤＲ、ＤＱ、ＤＰの６座抗原があり、さらにそれぞれが数十種類の異なるタイプ（アレル）の複雑な組み合わせで構成されており、その組み合わせは数万通り存在する。通常の臓器移植、特に骨髄移植においては、原則的にＨＬＡの主要抗原であるＡ、Ｂ、Ｃ、ＤＲ、ＤＱ、ＤＰの６座抗原をすべて一致させる必要があると考えられている。

[0106] 本発明の治療薬を投与するヒト対象は、ヒト網膜色素上皮細胞とヒト白血球抗原（ＨＬＡ）型が適合しても、適合しなくてもよいが、適合することが好ましい。ヒト対象が本発明における網膜色素上皮細胞とＨＬＡ型が適合する場合、ヒト対象及び網膜色素上皮細胞のＨＬＡ－Ａ、－Ｂ、－Ｃ、－ＤＲ、－ＤＱ及び－ＤＰの全てのＨＬＡ抗原が同じである。ヒト対象が本発明における網膜色素上皮細胞とＨＬＡ型が適合しない場合、ヒト対象のＨＬＡ型

と網膜色素上皮細胞のＨＬＡ型の間で、ＨＬＡ－Ａ、－Ｂ、－Ｃ、－ＤＲ、－ＤＱ及び－ＤＰのうち少なくとも１つのＨＬＡ抗原が異なっていればよく、全て異なっていてもよい。本明細書において、網膜色素上皮細胞のＨＬＡ－Ａ遺伝子座、ＨＬＡ－Ｂ遺伝子座及びＨＬＡ－ＤＲ遺伝子座における遺伝子型がそれぞれホモ接合型である場合には、当該網膜色素上皮細胞の当該遺伝子座に対応する遺伝子座における少なくとも片方のアレルの遺伝子型が当該網膜色素上皮細胞の当該遺伝子座におけるアレルの遺伝子型とそれぞれ一致するヒト対象であるとき、ヒト対象が本発明における網膜色素上皮細胞とＨＬＡ型が適合する場合に含めてもよい。

[0107] ヒト対象において網膜色素上皮裂孔は、ヒト対象の網膜色素上皮細胞層が一部断裂し、かつヒト対象の網膜色素上皮細胞で被覆されずに露出されたブルッフ膜が網膜下に基底膜として残存している状態であることが好ましい。ブルッフ膜とは、網膜色素上皮細胞層と脈絡膜の間に存在する薄い膜であり、ＩＶ型コラーゲン、ラミニンなどから構成される。ブルッフ膜が網膜下に基底膜として残存しているとは、眼組織の網膜下においてブルッフ膜の欠失・欠損が生じておらず、投与した網膜色素上皮細胞が接着する足場が存在することを意味する。残存しているブルッフ膜は、損傷していない方が好ましいが、欠失・欠損が生じていなければ、損傷していてもよい。なお、ブルッフ膜は、網膜側から順に、網膜色素上皮細胞の基底板、内側膠原線維層、弾性線維層、外側膠原線維層、脈絡膜毛細血管内皮細胞の基底板の５層から構成される。一態様において、ブルッフ膜の欠失・欠損とは、特に網膜側の表層（網膜色素上皮細胞の基底板）が欠失・欠損している場合を意味する。

[0108] 実施例で示されたように、ブルッフ膜を構成する成分と同様の性質を有する基材をコーティングして、ヒト網膜色素上皮細胞を播種すると良好に接着するが、コーティング基材がないあるいは剥離すると細胞接着が低下する。したがって、ブルッフ膜が網膜下に基底膜として残存している状態では、本発明の治療薬による治療効果が高いと思われる。本発明の治療薬がヒト対象に投与された後、ヒト網膜色素上皮細胞が極性を示し、露出されたブルッフ

膜を覆うように上皮層を形成しバリア機能を発揮する。極性を示すとは、細胞内で特徴的なタンパク質の局在パターンを示し、頂端膜側と基底膜側で機能に偏りが生じることを意味する。また、バリア機能を発揮するとは、網膜色素上皮細胞同士がタイトジャンクションにより強固に接着することで、物質の移動を厳密に調節し、神経活動に必要な眼内環境を維持することを意味する。

[0109] 網膜色素上皮裂孔が、ヒト対象の網膜色素上皮細胞層が一部断裂し、かつヒト対象の網膜色素上皮細胞で被覆されずに露出されたブルッフ膜が網膜下に基底膜として残存している状態であるとは、例えば、ヒト対象の網膜色素上皮裂孔のグレードが３～４である、ヒト対象の網膜色素上皮裂孔が発症又は診断からの日数が上記範囲内である、ヒト対象の神経網膜（視細胞）が網膜色素上皮細胞層に接していない、ＯＣＴなどの画像的検査によって、ブルッフ膜の断裂、消失が明確に確認されていないこと等であってもよい。

[0110] 本発明の治療薬の網膜下への投与（移植）方法としては、既知の方法であれば特に限定されず、例えば適当な大きさのシリンジ、又は、針若しくは樹脂部分を含む移植用デバイスを用いて注入する方法が挙げられる。より具体的には、経硝子体腔法と経脈絡膜腔法が挙げられる。経硝子体腔法の概要は図１に示されているように、白内障・硝子体手術装置を用いて、後部硝子体膜除去を含む硝子体切除を行ったのち、本発明の治療薬を網膜下腔（感覚網膜と網膜色素上皮細胞の間）に適量注入によって投与し、ブレブ（Ｂｌｅｂ：Ｈｙｄｒａｕｌｉｃａｌｌｙ ｄｅｂｒｉｄｅｄ ｒｅｔｉｎａｌ ｄｅｔａｃｈｍｅｎｔｓ）を形成させることによって行われてもよい。必要に応じて投与後に硝子体腔を空気置換してもよい。また、ブレブを形成させる方法としては、本発明の治療薬そのものを注入して形成させる方法のほかに、先に眼灌流液（ＨＢＳＳ等）などを注入し、ブレブを形成させ、必要に応じてブレブ内の液体を吸引した後、本発明の治療薬を注入する方法もある。

[0111] 本発明の治療薬の投与方法としては、経硝子体腔法であることが好ましく、また、経硝子体腔法網膜下への移植後、硝子体を空気置換することが好ま

しい。

[0112] 経硝子体腔法では、手術機器を挿入するために強膜上に数か所孔を開ける。本発明の治療薬は、針やシリンジ等を用いて投与（注入）可能であるため、経硝子体腔法の中でも低侵襲で実施することができる。本発明の治療薬を経硝子体腔法で投与する場合、本発明の治療薬は、強膜上の約０．４ｍｍ～約０．６５ｍｍの孔から、網膜色素上皮裂孔の周囲領域に対し、ブレブを形成させながら投与されてもよい。網膜色素上皮裂孔の周囲領域に対し投与することにより、脈絡膜に傷をつけ、出血させることを避けることもできる。強膜上の孔は、針の大きさに合わせて、約０．４ｍｍ（２７ゲージ）～約０．６３ｍｍ（２３ゲージ）（例：約０．５ｍｍ（２５ゲージ））の孔であってもよい。ブレブは、網膜色素上皮裂孔の長径を覆うように形成させることが好ましい。網膜色素上皮裂孔の周囲領域は、網膜色素上皮裂孔の縁からの距離が短いほど好ましく、例えば、網膜色素上皮裂孔の縁の周囲１乳頭径（約１．５ｍｍ）以内の領域であってもよい。

[0113] 本発明の治療薬は、強膜上の約０．４ｍｍ～約０．６５ｍｍの孔から、網膜色素上皮裂孔の周囲領域に対し、ブレブを形成させながら投与される場合、投与後に硝子体を空気置換することを含む治療に用いられることが好ましい。

[0114] 経脈絡膜腔法は、眼球の外側からアプローチする方法であり、強膜の一部を切開・剥離し、そこからカテーテルを脈絡膜腔へ挿入し、網膜下に本発明の治療薬を適量に注入することによって投与することができる。

[0115] 投与針は特に限定されないが、金属製のベベル針、ポリチップ針等が挙げられる。特にポリチップ針が好ましい。一態様として、投与針の外径が３８ゲージ、３９ゲージ又は４０ゲージであってよい。

[0116] 経硝子体腔法において、ブレブから移植用組成物又は移植用網膜色素上皮細胞が硝子体へ漏れ出す可能性があり、漏れ出た網膜色素上皮細胞が網膜前膜を形成してしまう可能性がある。一方、経脈絡膜腔法では、網膜側に穴を開けなければ、硝子体腔に移植用組成物が漏れることは殆どない。しかしな

がら、針で狭い領域に液体を投与する際には、網膜側に穴を開けてしまう可能性があるため、経脈絡膜腔法においても、ブレブから漏れ出た網膜色素上皮細胞によって網膜前膜を形成する可能性がある。また、経硝子体腔法も経脈絡膜腔法も網膜剥離を引き起こす。網膜下投与の副作用として、網膜前膜の形成及び網膜剥離の遷延が考えられる。上述のとおり、本発明の治療薬における分散用媒体が、特定の粘度を有することによって、本発明の治療薬の硝子体への細胞漏出及び網膜剥離の遷延を抑制できる。

[0117] 本発明の治療薬は、免疫抑制剤と組み合わせて投与されてもよい。組み合わせて投与する免疫抑制剤は、１種類であっても複数種類であってもよい。免疫抑制剤としては例えば、ステロイド系抗炎症薬、カルシニューリン阻害薬、代謝拮抗薬及びｍＴＯＲ阻害薬などが挙げられる。ステロイド系抗炎症薬として、デキサメタゾン及びプレドニゾロン等、カルシニューリン阻害薬としてシクロスポリン及びタクロリムス等、代謝拮抗薬としてミコフェノール酸等、ｍＴＯＲ阻害薬としてシロリムス（ラパマイシン）等が挙げられる。さらに、ベタメタゾンリン酸エステルナトリウム及び／又はフルオロメトロンを組み合わせてもよい。免疫抑制剤は、本発明の治療薬（網膜色素上皮細胞）に対する拒絶反応の目的で使用される。ステロイド系抗炎症薬であるデキサメサゾン、ベタメタゾンリン酸エステルナトリウム及び／又はフルオロメトロンは、術後の炎症抑制の目的で使用してもよい。

[0118] 一態様として、トリアムシノロンアセトニドは局所投与（例：テノン嚢下投与、硝子体内投与）を行うことができ、シクロスポリン、タクロリムス、デキサメタゾン及びプレドニゾロンは全身投与（例：経口投与、静脈内投与など）を行ってもよい。デキサメタゾンは結膜下に投与してもよく、ベタメタゾンリン酸エステルナトリウム及びフルオロメトロンは点眼してもよい。

[0119] 一態様として、手術前に、プレドニゾロン及び、シクロスポリン又はタクロリムスを投与する。最大手術の７日前（６日前、５日前、４日前、３日前、２日前又は前日）から投与を開始してもよい。トリアムシノロンアセトニド、デキサメサゾン、プレドニゾロン及び、シクロスポリン又はタクロリム

スは、手術後に投与されてもよい。ベタメタゾンリン酸エステルナトリウム及びフルオロメトロンは、手術後に投与されてもよい。

[0120] 本発明の治療薬は、医療機関において上述の分散用媒体等を用いて懸濁液に調製してもよい。その場合、網膜色素上皮細胞は凍結され、網膜色素上皮細胞を含む凍結製剤として医療機関に搬入されてもよい。網膜色素上皮細胞は分散された状態で凍結されることが好ましい。網膜色素上皮細胞を凍結保存する方法は、一般に細胞を凍結保存する方法として公知の方法であれば特に限定されない。例えば、市販の細胞凍結保存液StemCellBanker（Zenoaq社）を用い、－８０℃にて凍結させた後、液体窒素等により凍結保存することができる。医療機関において、使用時に当該凍結製剤を融解させ、分散用媒体等に懸濁させて移植医療に用いても良い。当該凍結製剤の融解後、分散用媒体等に懸濁させる前に、分散用媒体等の緩衝液を用いて洗浄を行ってもよい。

[0121] 従って、本発明の一態様として、融解後、上述の分散用媒体等を用いて懸濁液に調製することにより、本発明の治療薬として用いるための、網膜色素上皮細胞を含む凍結製剤をも提供する。すなわち、融解後、ヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液として、ヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療に用いるための、網膜色素上皮細胞を含む凍結製剤を提供する。

[0122] ３．治療方法

本発明のヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療方法は、有効量のヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液を、これを必要とするヒト対象に投与することを備える。ヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液としては、上記２．治療薬に記載の治療薬を用いてもよい。

[0123] 上述のとおり、ヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液を投与する方法は、既知の方法であれば特に限定されず、例えば、経硝子体腔法と経脈絡膜腔法が挙げられる。本発明の治療方法において、ヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液を投与することは、経硝子体腔法で投与することを含むことが好ましい。

[0124] ヒト対象に局所麻酔（テノン嚢下麻酔/球後麻酔）又は全身麻酔を行う。上記懸濁液を経硝子体腔法で投与する場合、適切な硝子体手術装置（例：コンステレーションビジョンシステム）等を用い、硝子体切除を行う。その際、必要に応じ、硝子体可視化を目的として、トリアムシノロンアセトニド（０．５～４ｍｇ）を硝子体内に注入してもよい。ヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液は、強膜上の約０．４ｍｍ～約０．６５ｍｍの孔から、網膜色素上皮裂孔の周囲領域に対し、ブレブを形成させるように投与されてもよい。これにより、低侵襲でヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療が可能となる。強膜上の孔は、針の大きさに合わせて、約０．４ｍｍ（２７ゲージ）～約０．６３ｍｍ（２３ゲージ）（例：約０．５ｍｍ（２５ゲージ））の孔であってもよい。ブレブは、網膜色素上皮裂孔の長径を覆うように形成させることが好ましい。

[0125] 本発明の治療方法は、ヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液を投与することは、強膜上の約０．４ｍｍ～約０．６５ｍｍの孔から、網膜色素上皮裂孔の周囲領域に対し、ブレブを形成させることを含んでいる場合、上記懸濁液の投与後、硝子体腔を洗浄し、ヒト対象の硝子体腔を空気置換することをさらに備えていてもよい。

[0126] 本発明の治療方法において、上述した免疫抑制剤を組み合わせて投与してもよい。

[0127] 本発明の治療方法の実施後、少なくとも１２時間は仰臥位安静とすることが好ましい。

[0128] 本発明の治療方法は、上述の本発明の治療薬の態様を同様に適用できる。

[0129] 本発明の治療薬の投与（移植）又は治療方法の実施の効果として、網膜色素上皮細胞がヒト対象の投与部位に生着し、視細胞層との接着構造が再建される。その結果、移植した網膜色素上皮細胞が機能することにより、治療薬の投与前又は治療方法の実施前と比べて、視機能が回復する、あるいは、さらなる悪化を防ぎ視機能が維持される。

[0130] 上記の治療効果は、上述の眼科検査により確認することができる。また、

健康関連クオリティ・オブ・ライフ（ＱＯＬ）を測定する尺度で評価することもできる。これらの尺度は身体的・精神的・社会的な側面から健康状態を包括的に評価するもので、視機能に特化した指標もある。例えば、Visual Function Questionnaire (VFQ-25)、Euro-QOL 5 Dimension-5 Level (EQ-5D-5L)、Health Utilities Index Mark3 (HUI3) などがあげられる。

[0131] ４．使用

本発明は、ヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液の、ヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療における使用を提供する。本発明はまた、ヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療における使用のための、ヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液を提供する。本発明は更に、ヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療薬の製造における、ヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液の使用を提供する。

実施例

[0132] ＜実施例１：摘出豚眼を用いた細胞漏出に与える影響の検討＞

眼球サイズがヒトに近い豚眼を用い、分散用媒体の粘度及び硝子体腔内の術後空気置換が細胞漏出に与える影響をｅｘ－ｖｉｖｏで検討した。黒田らの方法（Ｓｔｅｍ　Ｃｅｌｌ　Ｒｅｓ．　２０１９；３９：１０１５１４．）と同様の方法で製造したヒトｉＰＳ細胞（ＱＨＪｉ０１ｓ０４株）由来網膜色素上皮（ＲＰＥ）細胞を全ての実施例において使用した。食肉用豚から摘出された豚眼を当日中に入手し、水晶体の混濁が原因で眼底が観察しにくい場合、必要に応じて水晶体を除去した。後述の方法でヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の懸濁液を、網膜下投与（移植）した。

[0133] ＲＰＥ細胞懸濁液の網膜下投与は、図１の模式図に示したように、一般的な硝子体手術の手順に従って実施した（経硝子体腔法）。白内障・硝子体手術装置（日本アルコン製　コンステレーションビジョンシステム　ＬＴＸ）を用い、トリアムシノロンアセトニド（富士フィルム和光純薬製、２０９－１０９６１）０．５～４ｍｇを硝子体内に注入して硝子体を可視化し、黄斑部から後部硝子体の膜剥離を作成し、周辺部硝子体切除を行った。眼科手術

用注射筒・針用アダプタを適切なチューブを用い、硝子体手術装置に接続のうえ、ＲＰＥ細胞懸濁液を充填した。硝子体手術装置の吐出機能を用い、先端のａｉｒ（空気）を除去した後、網膜下投与針（メドワン・カニューレ：テーパードカニューレ　ポリチップ２５Ｇ／３８Ｇ、３２１９、Ｍｅｄｏｎｅ　Ｓｕｒｇｉｃａｌ、Ｉｎｃ．／有限会社日本サージ）を接続した。網膜下投与針をポートから挿入し、ＲＰＥ細胞懸濁液を網膜下に適量注入によって投与した。ＲＰＥ細胞懸濁液の網膜下投与により、ブレブが形成された。投与後、硝子体腔をしっかりと洗浄し、必要に応じて硝子体腔を空気置換した。

[0134] 投与したＲＰＥ細胞懸濁液は、２種類の移植媒体に、蛍光ラベル試薬ＰＫＨ２６赤色蛍光細胞リンカーＭｉｎｉキット（シグマアルドリッチ製、ＭＩＮＩ２６）でラベルしたＲＰＥ細胞を５．７×１０^{7}個／ｍＬ（空気置換条件）あるいは６．０×１０^{6}個／ｍＬ（空気置換なし）の濃度で懸濁して得られたものであった。

・粘性媒体：ビスコート０．５眼粘弾剤（日本アルコン製）とハンクス平衡塩溶液ＨＢＳＳ（＋）（サーモフィッシャーサイエンティフィック製、１４０２５０９２）を１：６の割合で混合した媒体（７倍希釈）

・バッファーのみの媒体：ＨＢＳＳ（＋）単独の媒体

[0135] 投与後数時間静置し、角膜側半球を除去して実体蛍光顕微鏡（ライカマイクロシステムズ製、Ｌｅｉｃａ　Ｍ１６５ＦＣ）下で眼底の蛍光観察を行い、結果を図２に示す。図２から、媒体にヒアルロン酸を添加することにより、細胞漏出が減少したことが分かった。また、硝子体の空気置換を組み合わせたことにより、細胞漏出が認められなかった。

[0136] さらに、媒体におけるビスコートの希釈倍率を７～２１倍の範囲で変化させて、網膜下投与を実施した。ビスコートの濃度が高い（希釈倍率が低い）と吐出時の抵抗が強くなり、ブレブの形成が困難であったことが分かった。また、投与容量としては、約１００μＬまで投与できたことも確認できたが、投与容量が増えると注入口からの逆流が認められた。ＲＰＥ細胞濃度は、

５．７×１０^{7}個／ｍＬの懸濁液まで問題なく投与できたことが確認された。

[0137] ＜実施例２：カニクイザルへの移植実験１＞

細胞漏出の抑制及び網膜下における細胞生着の改善を目的として、黄斑部を有し眼球の解剖学的特徴がヒトと極めて近いカニクイザルを用いて投与法を検討した。ＨＢＳＳ（＋）（同上）のみ、或いは、眼粘弾剤プロビスク（登録商標）０．８５眼粘弾剤１％（日本アルコン株式会社）（以下、プロビスク）又はビスコート（登録商標）０．５眼粘弾剤（日本アルコン株式会社）（以下、ビスコート）をＨＢＳＳ（＋）で２０、１００又は２００倍希釈した分散用媒体に懸濁したヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞をカニクイザルの網膜下に投与し、適切な分散用媒体組成を検討した。さらに、術後の硝子体腔の空気置換の有無による影響も検討した。ここで、ビスコートはヒアルロン酸ナトリウムを３０ｍｇ／ｍＬ、コンドロイチン硫酸エステルナトリウムを４０ｍｇ／ｍＬを含有し、プロビスクはヒアルロン酸ナトリウムを１０ｍｇ／ｍＬ含み、コンドロイチン硫酸を含まない。

[0138] カンボジア原産のカニクイザル（馴化開始時２．０～５．０ｋｇ）を試験に供した。トロピカミド・フェニレフリン塩酸塩点眼液（ミドリンＰ点眼液、参天製薬株式会社）及びフェニレフリン塩酸塩点眼液（ネオシネジンコーワ５％点眼液、興和株式会社）をそれぞれ右眼に１～２滴点眼して散瞳させた。ケタミン塩酸塩（ケタラール筋注用５００ｍｇ、第一三共プロファーマ株式会社）１０ｍｇ／ｋｇ及び塩酸メデトミジン（ドミトール、Ｏｒｉｏｎ Ｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ）０．０８ｍｇ／ｋｇの筋肉内投与による併用麻酔を実施後、気管内挿管して酸素とイソフルラン（イソフルラン吸入麻酔液「ファイザー」、マイラン製薬株式会社）０．５～２．０％の混合ガスを用いた調節呼吸を行った。動物を仰臥位で手術台に固定し、実施例１と同様の方法で網膜下にＲＰＥ細胞懸濁液（２．５×１０^{6}～１．５×１０^{7}細胞／ｍＬ）を適量（５０～１００μＬ）投与した。投与後、漏れ出た懸濁液があった場合は漏出液を吸引した。また、必要に応じて実施例１と同様に硝子体腔を空気置換した。細胞の沈降及び生着を促進することを目的に最大３時間吸

入麻酔下で仰臥位を維持した。拒絶反応の抑制のために、シクロスポリン（サンディミュン点滴静注用２５０ｍｇ、ノバルティスファーマ株式会社）の一日一回筋肉内注射とトリアムシノロンアセトニド（マキュエイド眼注用４０ｍｇ、わかもと製薬株式会社）の手術時テノン嚢下投与を併用して免疫抑制を行った。投与後は眼底カメラ（Ｋｏｗａ　Ｏｐｔｉｍｅｄ、ＶＸ－１０α）及びＯＣＴ装置（ハイデルベルグ　エンジニアリング、スペクトラリスＯＣＴ２）を用いて投与眼を経時的に観察した。

[0139] カニクイザルの網膜下への投与結果を示す。細胞濃度１．５×１０^{7}細胞／ｍＬの懸濁液を使用した場合、いずれの媒体でも投与時に投与針先端の視認性低下がみられた一方、１．０×１０^{7}細胞／ｍＬ以下の細胞濃度では問題なく投与が可能であった。また、投与容量に関しては、片眼網膜下に５０～１００μＬの範囲で投与できること、７０～８０μＬの投与容量までは再現よく安定した投与が可能であることが確認された。

[0140] ４週間後までのＯＣＴ所見の結果を表２及び表３に示す。表２及び表３から、硝子体腔を空気置換しなかった個体では８例中７例で、空気置換した個体では２３例中８例で網膜前膜の形成が観察され、空気置換によって細胞懸濁液の漏出が抑制され網膜前膜の形成を低減できる可能性が示された。

[0141] また、プロビスク又はビスコートを２０倍希釈した分散用媒体の投与群では、投与部位周辺の網膜剥離が遷延している状態が１０例中８例に観察されたが、その他の投与群では、投与後約４週間までにプロビスク２００倍希釈の１例を除き投与部位の網膜復位が確認できた。プロビスク又はビスコートを２０倍希釈した媒体では、網膜前膜の形成を抑える効果は認められなかった。高い粘度によって懸濁液の漏出量が減る一方、網膜剥離の遷延によって網膜下液が長期間残存するため、硝子体側に漏出する細胞の総和には影響しなかった可能性が考えられる。また、プロビスク又はビスコートを２００倍希釈した分散用媒体ではより高頻度に網膜前膜が認められた。理由は不明だが、ある閾値以下の粘度では漏出が起こるが、漏れ出たヒアルロン酸が硝子体腔に存在することで、ヒアルロン酸を足場にして細胞が前膜を形成しやす

くなる可能性が考えられる。一方で、プロビスク又はビスコートを１００倍希釈した分散用媒体を用いた場合は、網膜前膜の形成が認められなかった。したがって、細胞漏出抑制にはプロビスク又はビスコートを１００倍希釈して媒体に添加するのが好ましいことが分かった。

[表2]

表２．網膜剥離の遷延/網膜前膜の形成

プロビスク/ビスコート	網膜剥離の遷延	空気置換なし網膜前膜	空気置換あり網膜前膜
20 倍希釈	8/10	4/5	2/5
100 倍希釈	0/3	—	0/3
200 倍希釈	1/4	—	3/4
無添加	0/14	3/3	3/11

[表3]

表３．網膜剥離の遷延/網膜前膜の形成

希釈倍率	眼粘弾剤	網膜剥離の遷延	空気置換なし網膜前膜	空気置換あり網膜前膜
20 倍希釈	プロビスク	3/4	1/2	1/2
	ビスコート	5/6	3/3	1/3
100 倍希釈	プロビスク	0/2	—	0/2
	ビスコート	0/1	—	0/1
200 倍希釈	プロビスク	0/2	—	1/2
	ビスコート	1/2	—	2/2
—	HBSS(+)のみ	0/14	3/3	3/11

[0142] 観察期間終了後（術後４、１３、２６週間）に、眼球を摘出・固定し、パラフィン包埋を行った。ブレブをカバーするように０．５６ｍｍ間隔で１０箇所の切片（３～４μｍ厚）を作製し、生着を評価するため、ＲＰＥ細胞マーカーの１つである抗ヒトＰＭＥＬ１７抗体（Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、ＮＢＰ２－４７７８０ＡＦ６４７、マウス又はＡｂｃａｍ、ａｂ１３７０６２、ウサギ）及びヒト細胞として抗ヒトＣＤ１４７抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、ＡＦ９７２、ヤギ）を用いて常法に従い蛍光免疫染色を実施した。染色標本は蛍光顕微鏡（ＫＥＹＥＮＣＥ、ＢＺ－Ｘ８１０）又は

スライドスキャナー（Ｚｅｉｓｓ、Ａｘｉｏ　Ｓｃａｎ．Ｚ１）にて観察し、陽性部位を含む領域を撮像した。

[0143] 使用した抗ＣＤ１４７抗体については、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞が生着していると考えられた領域の一部で強陽性シグナルを示したが、カニクイザルの網膜色素上皮層全体が染色されたことから、サル抗原にも交差することが示唆された。したがって、抗ＰＭＥＬ１７抗体陽性シグナルをヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の生着・分布の主要な指標とし、抗ＣＤ１４７抗体は観察時にサル網膜色素上皮層を識別し易くする目的で多重染色にて使用した。

[0144] また、定量的に生着性能を解析するため、連続的に抗ＰＭＥＬ１７抗体陽性を示した生着部位（網膜下の陽性細胞が１００μｍ以上に渡って連続的に認められる部位）の総数に応じた各切片について、下記の４段階グレード評価（グレード０～３）で評価した１０枚分の結果を合計し、各個体におけるトータルスコア（０～３０）を算出した。

４段階グレード評価

グレード０：陽性細胞なし

グレード１：最小限（連続的な生着はみられなかったが、陽性細胞が認められた）

グレード２：中等度（連続生着部位が１つ又は２つ認められた）

グレード３：顕著（連続生着部位が３つ以上認められた）

[0145] ほとんどの個体でＰＭＥＬ１７陽性部位が認められた。またその陽性部位の多くはサル網膜色素上皮細胞層内で単層に認められ、投与したヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞はサル網膜色素上皮層にインテグレートされて生着していることが確認された。プロビスク１００倍希釈群（個体番号１、術後４週）の代表的な低倍率蛍光免疫染色像を図３及び図４に示す。図３の（Ａ）は各染色を重ねた画像であり、（Ｂ）はＤＡＰＩ染色のみ、図４の（Ａ）はＣＤ１４７染色のみ、（Ｂ）はＰＭＥＬ１７染色のみの画像を示す。図３の（Ａ）における矢印が指している部位は、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞が連

続的に生着している部位を示し、この個体（個体番号１）における連続的生着部位が５か所確認され、グレード３であった。図５は個体番号１（術後４週）の高倍率蛍光免疫染色像（図３及び４の一部領域）を示し、（Ａ）は各染色を重ねた画像であり、（Ｂ）～（Ｄ）はそれぞれＤＡＰＩ、ＣＤ１４７及びＰＭＥＬ１７単独の染色の画像を示す。

[0146] 良好な細胞漏出抑制効果を示したヒアルロン酸添加媒体（１００倍希釈）群について、生着をスコア化した。さらに、個体毎に投与容量（総投与細胞数）が異なるため、単位細胞数あたりのスコアを算出した。その結果を表３に示す。表４から、プロビスクを用いた条件では広範囲に投与細胞が生着したのに対して、ビスコートを用いた条件では僅かな部位のみに生着が認められた。

[表4]

個体番号	移植用媒体	懸濁濃度（細胞/mL）	投与容量（μL）	観察期間（週）	グレード≧1の切片数	トータルスコア	スコア /10^5 細胞
1	プロビスク 100 倍希釈	5×10^6	60	4	8	20	6.67
2		5×10^6	80	4	10	21	5.25
3	ビスコート 100 倍希釈	5×10^6	50	4	2	3	1.20
4		5×10^6	100	4	2	3	0.60

[0147] 以上のことから、投与細胞の硝子体腔への漏出を抑制し、広範囲な生着を果たすためには、平均分子量１５０～３９０万のヒアルロン酸Ｎａを特定の濃度で含有する分散用媒体が最適であることが分かった。

[0148] ＜実施例３：カニクイザルへの移植実験２＞

ヒトーサル異種移植の系において免疫拒絶による影響を可能な限り排除するため、カニクイザルへの免疫抑制を増強して移植用媒体がＲＰＥ細胞の生着に与える影響を評価した。実施例２のプロトコールにミコフェノール酸モフェチル（セルセプト懸濁用散３１．８％、中外製薬株式会社）の１日１回経口投与を併用し、更にシクロスポリンを倍量投与することにより免疫抑制を行ったカニクイザル右眼の網膜下に、実施例２と同様の方法でヒトｉＰＳ

細胞由来ＲＰＥ細胞懸濁液を投与した。網膜下投与針はマイクロチップ・ベベルド・カニューレ（２５ｇ／４０ｇ）（メドワン社製＃３２６１）を使用した。試験条件を揃えて移植用媒体の比較をするため、同一眼の上下にそれぞれＨＢＳＳ（＋）又はＨＢＳＳ（＋）で１００倍に希釈したプロビスクを用いて調製した細胞懸濁液（１．０×10^7細胞／ｍＬ）を５０μＬ注入した。全例、術後に硝子体腔を空気置換し、経時的に眼科的検査を実施した後、蛍光免疫染色により移植眼を組織学的に解析した。組織学的な解析は、４週間の観察期間終了後に、眼球を摘出・固定し、パラフィン包埋を行った。ブレブ全域をカバーするように約０．２８ｍｍ間隔で連続切片（３～４μｍ厚）を作製し、抗ヒトＰＭＥＬ１７抗体（Ｎｏｖｕｓ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ、ＮＢＰ２－４７７８０ＡＦ６４７、マウス）及び抗ヒトＣＤ１４７抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、ＡＦ９７２、ヤギ）を用いて常法に従い蛍光免疫染色を実施した。スライドスキャナー（Ｚｅｉｓｓ、Ａｘｉｏ　Ｓｃａｎ．Ｚ１）を用いて染色標本のヒトＰＭＥＬ１７陽性部位を含む領域を撮像し、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の生着評価を行った。

[0149] 眼底画像を用いてブレブ痕の平均径を測定した結果、ＨＢＳＳ（＋）媒体（ｎ＝４）ではＡｘｉａｌが５．９０ｍｍ、Ｓａｇｉｔｔａｌが５．９３ｍｍとなり、底面積平均値は２７．４８ｍｍ^{2}と算出された。一方、プロビスク１００倍希釈媒体（ｎ＝３）ではＡｘｉａｌが４．７４ｍｍ、Ｓａｇｉｔｔａｌが４．３０ｍｍとなり、底面積平均値は１６．０１ｍｍ^{2}であった。代表的な蛍光免疫染色画像を図６Ａ～Ｄ及び図７Ａ～Ｄに示したとおり、蛍光免疫染色では、すべての個体のいずれの媒体条件においてもＰＭＥＬ１７陽性部位がサル網膜色素上皮細胞層内で認められ、陽性部位の多くはサル網膜色素上皮細胞層内で単層に認められた。したがって、投与したヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞がサル網膜色素上皮細胞層にインテグレートされて生着していることが示唆された。さらに、実施例２と同様に生着グレードを評価した結果、プロビスク１００倍希釈媒体条件のトータルスコアは１４～５４であり個体間で生着にばらつきが認められたが、ＨＢＳＳ（＋）媒体条件では３

２～４２と４例全てで高く、良好な生着が確認された。したがって、どちらの媒体条件も高い生着スコアを示したが、プロビスク１００倍希釈と比較してＨＢＳＳ（＋）を媒体として用いた方が、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の生着性に優れることが示された。また、ＨＢＳＳ（＋）媒体条件ではスコアが１以上の切片数が１４～１９枚あり、水平方向における生着範囲は約３．６４～５．０４ｍｍと広範囲に渡っていた。一方、プロビスク１００倍希釈媒体条件では、２．８～５．６ｍｍ（陽性切片数：１１～２１枚）であった。

[0150] ＜実施例４：カニクイザルへの移植実験３＞

実施例３と同様の方法で投与及び評価を行った。網膜下投与針は実施例１に記載のメドワン社製のポリチップテーパードカニューレを使用した。ＨＢＳＳ（＋）を媒体に用いてヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞懸濁液（１．０×10^7細胞／ｍＬ、５０μＬ／ブレブ／眼）をカニクイザルに網膜下投与し、経時的に眼科的検査（４週及び１３週観察、それぞれ３例）を実施して網膜剥離の遷延及び黄斑上の網膜前膜の有無を評価した。また、観察期間終了後に蛍光免疫染色によって生着性を評価した。

[0151] ＯＣＴ検査の結果、本投与法に関連した網膜剥離は投与後１週時点において既に認められなかったことから、ブレブは１週間未満で復位したことが示唆された。さらに、観察期間を通して黄斑上の網膜前膜はいずれの個体にもみられず、ＨＥ染色による病理組織学的評価でも網膜表面の膜様組織は全く観察されなかった。したがって、投与媒体及び投与法が適切であることが示唆された。蛍光免疫染色については再現性が確認され、投与したヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞（ヒトＰＭＥＬ１７陽性細胞）がサルの網膜色素上皮層にインテグレートされ、４週及び１３週観察群のほとんどの動物で幅広く生着したことから、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の生着が投与後１３週間維持することが確認された。

[0152] ＜実施例５：分散用媒体の粘度測定＞

分散用媒体として、以下の媒体を調製した。（２）～（７）の媒体は、上

記実施例１及び２の結果から、好適な分散用媒体であり、そのうち、（３）及び（６）、特に（６）が好ましい。

[0153] （１）ハンクス平行塩溶液ＨＢＳＳ（＋）

（２）ビスコート２０倍希釈（ＨＢＳＳ（＋）：ビスコート＝２０：１）

（３）ビスコート１００倍希釈（ＨＢＳＳ（＋）：ビスコート＝１００：１）

（４）ビスコート２００倍希釈（ＨＢＳＳ（＋）：ビスコート＝２００：１）

（５）プロビスク２０倍希釈（ＨＢＳＳ（＋）：プロビスク＝２０：１）

（６）プロビスク１００倍希釈（ＨＢＳＳ（＋）：プロビスク＝１００：１）

（７）プロビスク２００倍希釈（ＨＢＳＳ（＋）：プロビスク＝２００：１）

[0154] 上記（１）～（７）の媒体について、粘度測定装置を用いて、粘度を、「２５℃、ずり速度１／ｓ＝２」の条件で測定した。結果を表５に示す。

[表5]

媒体	粘度 (mPa・s)	ヒアルロン酸Na濃度（w/v）	コンドロイチン硫酸エステルNa濃度(w/v)
(1) HBSS(+)	0.829	N.A	N.A
(2) HBSS(+)／ビスコート(20:1)	4.38	0.15%	0.20%
(3)HBSS(+)／ビスコート(100:1)	2.23	0.03%	0.04%
(4)HBSS(+)／ビスコート(200:1)	1.17	0.015%	0.02%
(5) HBSS(+)／プロビスク(20:1)	5.78	0.05%	N.A
(6)HBSS(+)／プロビスク(100:1)	2.13	0.01%	N.A
(7)HBSS(+)／プロビスク(200:1)	1.25	0.005%	N.A

N.A. ：実質的に含有せず

[0155] また、上記（１）～（７）の媒体について、粘度測定装置を用いて、２５℃の条件下、ずり速度（せん断速度）と粘度の相関関係を測定した。結果を表６に示す。その結果、（１）～（７）の媒体のうち、媒体（３）及び（６）の粘度の変化量が、他の媒体に比べて大きいことが判明した。

[表6]

媒体	各せん断速度（1/s）における粘度（mPa・s）					粘度差＊（mPa・s）
	1	2	10	100	1000	
(1) HBSS(+)	0.981	0.829	0.865	0.890	0.909	0.12
(2) HBSS(+)／ビスコート（20:1）	4.45	4.38	4.37	4.36	3.97	0.08
(3)HBSS(+)／ビスコート(100:1)	2.68	2.23	1.96	1.71	1.31	0.72
(4)HBSS(+)／ビスコート(200:1)	1.35	1.17	1.09	1.08	1.07	0.26
(5) HBSS(+)／プロビスク（20:1）	5.87	5.78	5.63	4.66	3.07	0.24
(6)HBSS(+)／プロビスク(100:1)	3.13	2.13	1.89	1.66	1.25	1.24
(7)HBSS(+)／プロビスク(200:1)	1.30	1.25	1.16	1.14	1.07	0.14

＊せん断速度1(1/s)のときの粘度とせん断速度10(1/s)のときの粘度との粘度差（mPa・s）の絶対値

[0156] ＜実施例６：ＲＰＥ機能不全モデルラットを用いた有効性評価＞

ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の非臨床有効性については、有色ＲＣＳラットの網膜下に投与する方法で検討した。ＲＣＳラットは、ＭＥＲＴＫ遺伝子の変異によりＲＰＥ細胞が本来有する視細胞外節の貪食能を欠失しており、外節の異常蓄積により二次的に視細胞が変性するため、ＲＰＥの機能不全モデルとしてＲＰＥ細胞補充療法の薬効薬理作用評価に広く使用されている（Hum Mol Genet. 2000; 9(4): 645-51.、Stem Cells Int. 2017; 2017: 9428176.）。

[0157] シクロスポリン飲水投与により免疫抑制を施した有色ＲＣＳラット（４週齢）左眼に、１×１０^{5}ｃｅｌｌｓのヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞を網膜下投与した。投与後経時的に網膜電図（ＥＲＧ）検査、視覚誘発電位（ＶＥＰ）検査、視運動反射（ＯＫＴ）試験により投与眼の視機能評価を実施した。投与後２ヵ月の摘出眼の蛍光免疫染色によりヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の生着と機能の評価を行った。

[0158] ＥＲＧのｂ波振幅（ｂ－ｗａｖｅ　ａｍｐｌｉｔｕｄｅ）を比較すると、媒体対照群では投与後２週以降応答が消失していたが、投与群においては投与７週後まで有意な回復が認められた。その結果を図８に示す。ＶＥＰは、投与後１か月の時点で、媒体対照群に比して投与群の応答が大きい傾向が認

められた。その結果を図９に示す。

[0159] ＯＫＴ試験では、縞模様の回転方向と同じ向きに首振り行動が見られた場合にＣｏｒｒｅｃｔ、逆向きに首振り行動が見られた場合をＩｎｃｏｒｒｅｃｔとし、Ｉｎｃｏｒｒｅｃｔに対するＣｏｒｒｅｃｔの相対値としてＰｅｒｆｏｒｍａｎｃｅ値を算出した。その結果を図１０に示す。

[0160] 媒体対照群及び無処置群（右眼）では、経時的に有意な視機能の低下が見られた（図１０（Ａ）及び（Ｂ））。一方、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞投与群（左眼）においては、投与後２ヵ月までに有意な視機能の低下は認められなかった（図１０（Ｂ））。投与後２ヵ月の時点において、媒体対照群と比較してヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞投与群では有意な視機能の保持が認められた（図１０（Ｂ））。

[0161] 投与後２ヵ月におけるヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の生着を蛍光免疫染色で評価した。その結果を図１１Ａ～Ｃ及び１２に示す。ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞投与群（図１１Ａ～Ｃ中、「ｉＰＳＣ－ＲＰＥ」）では、ヒト型のＰＭＥＬ１７を特異的に認識する抗体で染色されるＲＰＥ細胞がＲＣＳラットのＲＰＥ層（ＲＰＥ６５陽性部分）と一体化又は重なって生着していた（図１１Ａ～Ｃ）。ＲＰＥの成熟に伴い頂端部に発現するＥｚｒｉｎ、ＣＤ１４７及び基底外側部に発現するＢＥＳＴ１について蛍光免疫染色を実施した結果、それぞれ細胞局所に発現が認められ、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞は移植後に成熟し生理的な細胞極性をもって生着することが示された（図１２）。

[0162] ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の移植後の貪食能及びバリア機能についても蛍光免疫染色で評価した。抗ヒトＰＭＥＬ１７抗体で染色されるヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の中に、抗Ｒｈｏｄｏｐｓｉｎ抗体で染色されるラット視細胞外節を含む小胞が認められ（図１３（Ｃ）、矢印で示す）、移植したヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞が貪食能を有することが確認された。網膜ホールマウント染色により、抗ＣＤ１４７抗体で染色されるヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞に重なって、タイトジャンクションの構成因子であるＺｏ－

１が発現していることから、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞は生着しバリア機能を発揮していると考えられた（図１４）。

[0163] 視細胞保護能については、視細胞の細胞体で構成される外顆粒層（ＯＮＬ）の残存を指標に評価した。未移植群及び媒体対照群では、ＯＮＬ（図１１Ａ中、点線で示す。）は完全に脱落しているか部分的に１～２細胞よりなる層状に残存しているのみであったが、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞投与群では生着部位に接して媒体対照群より明らかに多いＯＮＬの残存が認められた（図１１Ａ）。外網状層（Ｏｕｔｅｒ　Ｐｌｅｘｉｆｏｒｍ　ｌａｙｅｒ、ＯＰＬ）に存在する視細胞と双極細胞間のシナプスを、シナプス前終末に発現するＣｔＢＰ２及びシナプス後受容体であるｍＧｌｕＲ６の蛍光免疫染色で検出したところ、媒体対照群ではシナプスのほとんどが脱落していたのに対し、ＲＰＥ投与群では一定数の残存シナプスが認められた（図１５）。これらの結果より、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞は網膜下に生着し、投与後２ヵ月で成熟して機能を発揮すること、ＲＣＳラットの視細胞脱落に対して抑制効果を発揮し、視細胞を含む網膜保護効果を有すること、視機能を保持する効果を有することが示された。

[0164] ＜実施例７：ラミニンコーティングの有無によるＲＰＥ細胞接着性の評価＞

ブルッフ膜を構成する成分と同様の性質を有する基材としてラミニン５１１のＥ８断片であるｉＭａｔｒｉｘ５１１をコーティングしたウェル（０．５μｇ／ｃｍ^2）とコーティングしないウェルに対するＲＰＥ細胞の接着性を評価した。２４ウェルプレートにヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞を２．５×１０^{7}細胞／ウェルで播種し、ＲＰＥ維持培地（ＤＭＥＭ　３５５ｍＬ、Ｆ－１２　ＨＡＭ　１５０ｍＬ、Ｌ－Ｇｌｎ　５ｍＬ及びＢ－２７　１０ｍＬの混合培地）で培養した。播種翌日に観察した結果、ｉＭａｔｒｉｘ５１１をコーティングしたウェルにはＲＰＥ細胞の接着が認められたものの（図１６（Ｂ））、コーティングしていないウェルではＲＰＥ細胞の接着が認められなかった（図１６（Ａ））。ＲＰＥ細胞のラミニンコーティング基材上における良好な接着が示された。

[0165] ＜実施例８：Ｉｎ　ｖｉｔｒｏ網膜色素上皮裂孔モデルによるＲＰＥ細胞懸濁液の有用性検討＞

ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞を、ｉＭａｔｒｉｘ５１１をコーティングした２４ウェルプレート（０．５μｇ／ｃｍ^2）に播種し、培養後、ＲＰＥシートを形成した。ＲＰＥシートの細胞増殖を抑制するため、Ｍｉｔｏｍｙｃｉｎ　Ｃを６μｇ／ｍＬで処理した。１日培養後、ＲＰＥシートの一部（約５ｍｍ×１０ｍｍ）をセルクレーパーで剥離し、疑似網膜色素上皮裂孔を形成した（図１７）。剥離箇所において保存状態の良いブルッフ膜をミミックするため、ｉＭａｔｒｉｘ５１１の再コーティングを実施後、疑似移植用ＲＰＥ細胞懸濁液として、ＥＧＦＰを発現するヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞懸濁液を１×１０^{6}細胞／ウェルで播種した。播種細胞数はウェル全体を移植時のブレブと見立て、面積あたりの細胞数から設定した。疑似移植用ＲＰＥ細胞懸濁液の播種翌日、ＥＧＦＰ発現ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞は疑似網膜色素上皮裂孔全体に接着した（図１８）。播種６日後には懸濁液由来ＥＧＦＰ発現ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞がホスト側ＲＰＥ細胞との境界を完全に埋め、単一のＲＰＥシートとなっていることが確認された（図１９）。一方、無処置の疑似網膜色素上皮裂孔は剥離部分が形成時のままであった（図２０）。

[0166] 網膜色素上皮裂孔の古典的な形状は三日月形の裂孔であるが、様々な形状も存在するため、次に、複雑な形状の疑似網膜色素上皮裂孔に対するＲＰＥ細胞懸濁液の有用性を、同様に疑似網膜色素上皮裂孔を用いた方法で検討した。その結果、複雑な形状の疑似網膜色素上皮裂孔に対しても、懸濁液由来ＲＰＥ細胞が剥離箇所に隙間なく生着し、単一のＲＰＥシートを回復することが確認された（図２１及び図２２）。剥離部分の被覆漏れあるいは正常ＲＰＥ細胞への重積が予想される定型のＲＰＥシート製剤に対し、ＲＰＥ細胞懸濁液は様々な形状の網膜色素上皮裂孔に対し、被覆漏れなく速やかにホストのＲＰＥシートを回復する可能性が示された。

[0167] ＜実施例９：ｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞製品の網膜色素上皮裂孔を有する患

者を対象とした第Ｉ／ＩＩ相試験＞

試験の目的：網膜色素上皮裂孔（ＲＰＥ　ｔｅａｒ）を有する患者にｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞製品の懸濁液を網膜下投与した時の安全性及び有効性を評価することであり、ランダム化、非遮蔽、多施設共同試験である。ｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の懸濁液の有効性として、視力、網膜感度等を評価する。

[0168] デザイン

Ｐａｒｔ１、Ｐａｒｔ２の２つのパートで構成され、Ｐａｒｔ１から実施する。

Ｐａｒｔ１：ＨＬＡミスマッチ被験者にｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞製品の懸濁液を投与する。

Ｐａｒｔ２：被験者を投与群と観察群にランダムに割付、投与群にｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞製品の懸濁液を投与する。観察群は４８週間の観察終了後、ｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞製品の懸濁液を投与する。

観察期間：共に治療期（４８週間）及び継続治療期（４８週間）の２期から構成される。

投与量：１．０×１０^{7}ｃｅｌｌｓ／ｍＬの細胞懸濁液を治療対象眼に対して５０μＬ網膜下に単回投与する。ただし、細胞懸濁液注入時、術者はＲＰＥ　ｔｅａｒの長径をカバーする用量を投与することを基準とし、その大きさのブレブが作成できた時点で投与を完了とする。したがって、細胞懸濁液の投与量は、最大５０μＬ（５×１０^{5}ｃｅｌｌｓ）とするが、適宜減量することを可とする。

併用薬：細胞移植に伴う免疫拒絶反応抑制又は術後炎症抑制の目的でトリアムシノロンアセトニド、シクロスポリン及びプレドニゾロンなどの免疫抑制剤を投与する。

目標症例数：合計２１名

Ｐａｒｔ１：ＨＬＡミスマッチ被験者１名

Ｐａｒｔ２：ランダム化された被験者として１群当たり１０名（計２０名）

対象患者：

主な選択基準：

１）治療対象眼に、加齢黄斑変性（ＡＭＤ）又はその他網膜疾患に続発する、あるいは特発性のＲＰＥ　ｔｅａｒ（長径が１乳頭径より大きい）が眼底写真（自発蛍光含む）及びＯＣＴにより黄斑部に確認された患者

２）同意取得時に、ＲＰＥ　ｔｅａｒが確認されてから６ヵ月以内の患者

３）スクリーニング時及びベースライン時に、治療対象眼のＥＴＤＲＳチャートによるＢＣＶＡが２４文字以上かつ７８文字以下の患者

４）（Ｐａｒｔ１のみ）ＨＬＡミスマッチ患者

主な除外基準：

１）評価の妨げになるような網膜疾患を有する患者

２）コントロール不良の全身性疾患を合併している患者

主要評価項目：有害事象

副次的評価項目：視力（ＥＴＤＲＳチャート）、網膜感度（マイクロペリメトリー検査、ハンフリー視野検査）、ＯＣＴ検査、Ｖｉｓｕａｌ　Ｆｕｎｃｔｉｏｎ　Ｑｕｅｓｔｉｏｎｎａｉｒｅ（ＶＦＱ－２５）、Ｅｕｒｏ－ＱＯＬ５　Ｄｉｍｅｎｓｉｏｎ－５　Ｌｅｖｅｌ（ＥＱ－５Ｄ－５Ｌ）、Ｈｅａｌｔｈ　Ｕｔｉｌｉｔｉｅｓ　ＩｎｄｅｘＭａｒｋ３（ＨＵＩ３）

[0169] ＜実施例１０：網膜色素上皮変性モデルラットを用いた有効性評価＞

ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の非臨床有効性について、網膜色素上皮変性モデル（ヨウ素酸ナトリウム誘因モデル）ラットの網膜下にヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞を投与する方法で検討した。ヨウ素酸ナトリウムをげっ歯類に全身投与するとＲＰＥ細胞特異的に障害が生じることが知られており、網膜色素上皮変性モデルとして広く利用されている（Ｊ　Ｐｈｏｔｏｃｈｅｍ　Ｐｈｏｔｏｂｉｏｌ　Ｂ．　２０１９　Ｊｕｌ：１９６：１１１５１４．）。

[0170] 免疫不全モデルのＦ３４４／ＮＪｃｌヌードラット（７週齢）の腹腔内にヨウ素酸ナトリウムを０（投与用媒体のみ）又は７０ｍｇ／ｋｇ（投与容量

として０．５ｍＬ／ｋｇ）投与し、その７日後の摘出眼を用いて蛍光免疫染色によりラットＲＰＥ及び基底膜の評価を行った。その結果を図２３（Ａ）～（Ｃ）及び図２４（Ａ）～（Ｃ）に示す。ヨウ素酸ナトリウム７０ｍｇ／ｋｇ投与群においてＲＰＥ細胞マーカーであるＲＰＥ６５が陰性であることから、ラットＲＰＥ細胞特異的な障害が生じていることが確認された（図２４（Ａ））。また、ラット基底膜の構成成分であるＬａｍｉｎｉｎを染色した結果、媒体投与群及びヨウ素酸ナトリウム７０ｍｇ／ｋｇ投与群の両群においてＬａｍｉｎｉｎは発現しており基底膜が維持されていることが明らかとなった（図２３（Ｂ）、図２４（Ｂ））。すなわち、ヨウ素酸ナトリウム投与後７日のヨウ素酸ナトリウム誘因モデルラットではＲＰＥ変性が進行している一方で基底膜は維持されており、網膜色素上皮裂孔の網膜に近い病態であることが示唆された。

[0171] 免疫不全モデルのＦ３４４／ＮＪｃｌヌードラット（７又は９週齢）の腹腔内にヨウ素酸ナトリウムを０又は７０ｍｇ／ｋｇ（投与容量として０．５ｍＬ／ｋｇ）投与した。その７日後に左眼又は右眼に、１×１０^{5}ｃｅｌｌｓのヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞を網膜下投与した。投与後約１ヵ月の網膜電図（ＥＲＧ）試験により電気生理学的機能評価を、投与後約２ヵ月の眼底カメラ撮像により眼底像を確認し、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の生着領域の評価を行った。その後、投与後約２ヵ月の摘出眼の蛍光免疫染色によりヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の生着とホスト網膜の評価を行った。

[0172] 投与後約１ヵ月における電気生理学的機能をＥＲＧ試験で評価した。ラットを３時間以上暗順応させた後、１０ｃｄ×ｓ／ｍ^{2}の光刺激条件下で測定した。その結果を図２５に示す。コントロールであるヨウ素酸ナトリウム０ｍｇ／ｋｇ投与後の媒体投与群（図２５左、シャム）においては、ｂ波振幅は約３５０μＶであった。ヨウ素酸ナトリウム７０ｍｇ／ｋｇ投与後の媒体投与群（図２５中、シャム）においては、ラットＲＰＥ細胞の障害に起因すると考えられる電気生理学的機能低下が生じ、ｂ波振幅の顕著な低下が認められた。一方、ヨウ素酸ナトリウム７０ｍｇ／ｋｇ投与後のＲＰＥ細胞投与群

（図２５右、ＲＰＥ）では、ヨウ素酸ナトリウム７０ｍｇ／ｋｇ投与後の媒体投与群と比較し、ｂ波振幅の有意な上昇が認められた。さらに投与後約２ヵ月においても同様にＥＲＧ試験を行った結果、ｂ波振幅の有意な上昇が認められた。これらの結果より、投与したヒトＲＰＥ細胞がラット網膜下に生着し、電気生理学的機能の低下抑制作用を有することが示された。

[0173] 投与後約２ヵ月の眼底カメラ撮像により眼底像を撮像し、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の生着領域の評価を行った。その結果を図２６（Ａ）～（Ｃ）に示す。生着したヒトＲＰＥ細胞はメラニン沈着により眼底で黒色領域として認識された。なお、ヌードラットはアルビノ眼のため、ＲＰＥ細胞のメラニン沈着はない。そのため、観察される黒色領域は、移植したヒトＲＰＥ細胞のメラニン沈着であると判断された。ヨウ素酸ナトリウム投与群におけるヒトＲＰＥ細胞の生着領域（図２６（Ｃ））は、媒体投与の対照群のヒトＲＰＥ細胞の生着領域（図２６（Ａ））と比較し広範囲に及んでいた。一方、ヨウ素酸ナトリウム７０ｍｇ／ｋｇ投与後媒体投与群においては、黒色領域は観察されなかった（図２６（Ｂ））。

[0174] 投与後約２ヵ月の摘出眼の蛍光免疫染色によりヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞の生着とラット網膜の評価を行った。その結果を図２７～３１に示す。ヨウ素酸ナトリウム投与後に媒体を網膜下投与した群（シャム群）においては、ラット／ヒト型のＲＰＥ６５を特異的に認識する抗体で染色されるラットＲＰＥ細胞の消失が観察された（図２７（Ｂ））。一方、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞投与群（ＲＰＥ投与群）においては、ヒト型のＰＭＥＬ１７を特異的に認識する抗体で染色されるヒトＲＰＥ細胞がラットのＲＰＥ層に概ね一層で生着していた（図２８（Ｃ））。同投与群においては、ＲＰＥの成熟に伴い頂端部に発現するＥｚｒｉｎ、ＣＤ１４７及び基底外側部に発現するＢＥＳＴ１について蛍光免疫染色を実施した結果、それぞれ細胞局所に発現が認められ、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞は移植後に成熟し生理的な極性をもって生着することが示された（図２９（Ａ）～（Ｄ））。ラット網膜の評価については、ＯＮＬの形状及びラット錐体細胞の局在を指標に評価

した。ヨウ素酸ナトリウム投与後に媒体を網膜下投与した群（シャム群）においては、ＲＰＥ細胞の障害の影響によりＯＮＬの形状（図３０（Ｃ））が乱れており、またラット錐体細胞特異的に染色されるＲｘＲγで示すラット錐体細胞の局在も乱れていることが示唆された（図３０（Ｂ））。一方、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞投与群（ＲＰＥ投与群）においては、ＣＤ１４７で染色されたヒトＲＰＥ細胞生着領域近傍において、ＯＮＬの形状（図３１（Ｃ））が正常に近い状態で保たれており、さらにＲｘＲγで示すラット錐体細胞も整列して存在する様子が観察された（図３１（Ｂ））。これらの結果より、網膜色素上皮変性モデル（ヨウ素酸ナトリウム誘因モデル）ラットの網膜下にヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞を投与すると、ヒトｉＰＳ細胞由来ＲＰＥ細胞はラットＲＰＥ層に広く生着し、投与後約２ヵ月時点まで電気生理学的機能の低下抑制作用を有すること、さらに投与後約２ヵ月で成熟し生理的な極性を有すること、ラット網膜の形状を維持する効果を有することが示された。

請求の範囲

[請求項1] ヒト網膜色素上皮細胞が分散された懸濁液からなる、ヒト対象における網膜色素上皮裂孔の治療薬。

[請求項2] 前記ヒト網膜色素上皮細胞の分散に用いる媒体の粘度が、２５℃におけるせん断速度２（１／ｓ）のとき、４ｍＰａ・ｓ以下である、請求項１に記載の治療薬。

[請求項3] 前記懸濁液中の前記ヒト網膜色素上皮細胞の濃度が、０．１×１０^{7}～１×１０^{7}細胞／ｍＬである、請求項１又は２に記載の治療薬。

[請求項4] 前記治療薬の投与容量が、２０～５０μＬである、請求項１～３のいずれか一項に記載の治療薬。

[請求項5] 前記治療薬が、前記ヒト対象の強膜上の約０．４ｍｍ～約０．６５ｍｍの孔から、前記網膜色素上皮裂孔の周囲領域に対し、ブレブを形成させながら投与される、請求項１～４のいずれか一項に記載の治療薬。

[請求項6] 前記ブレブが、前記網膜色素上皮裂孔の長径を覆うように形成させる、請求項５に記載の治療薬。

[請求項7] 前記治療薬の投与後に、前記ヒト対象の硝子体腔を空気置換することを含む治療に用いられる、請求項５又は６に記載の治療薬。

[請求項8] 前記治療薬の前記ヒト対象への投与後、網膜前膜の形成が認められない又は網膜前膜の形成の程度が減じられる、請求項２～７のいずれか一項に記載の治療薬。

[請求項9] 前記網膜色素上皮裂孔が、前記ヒト対象の網膜色素上皮細胞層が一部断裂し、かつ前記ヒト対象の網膜色素上皮細胞で被覆されずに露出されたブルッフ膜が基底膜として残存している状態である、請求項１～８のいずれか一項に記載の治療薬。

[請求項10] 前記治療薬の前記ヒト対象への投与後、前記ヒト網膜色素上皮細胞が極性を示し、前記露出されたブルッフ膜を覆う、請求項９に記載の治療薬。

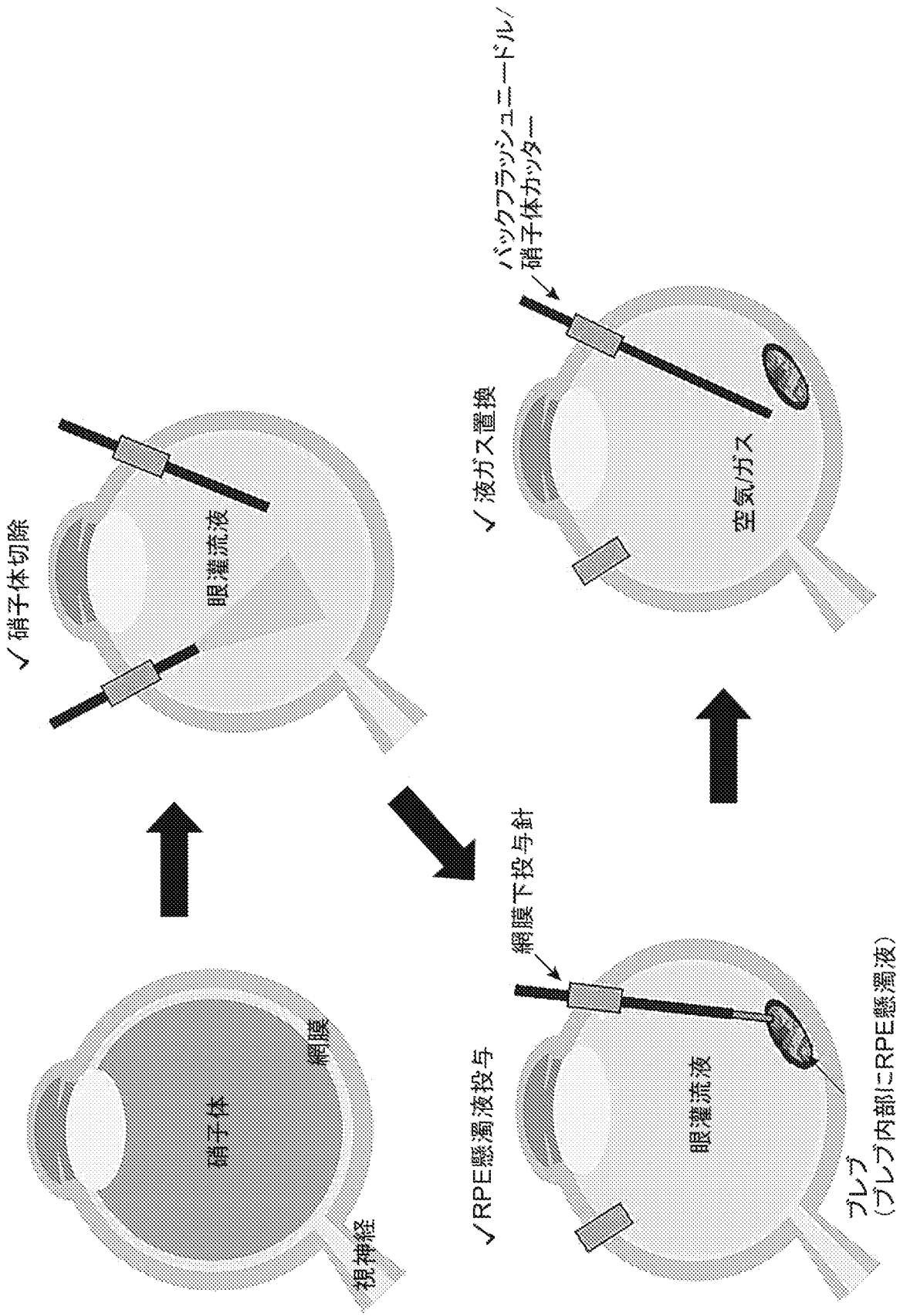
[請求項11] 前記ヒト網膜色素上皮細胞が、ヒト多能性幹細胞のｉｎ　ｖｉｔｒｏ分化に由来する、請求項１～１０のいずれか一項に記載の治療薬。

[請求項12] 前記ヒト対象が、前記ヒト網膜色素上皮細胞と、ヒト白血球抗原（ＨＬＡ）型が適合している、請求項１～１１のいずれか一項に記載の治療薬。

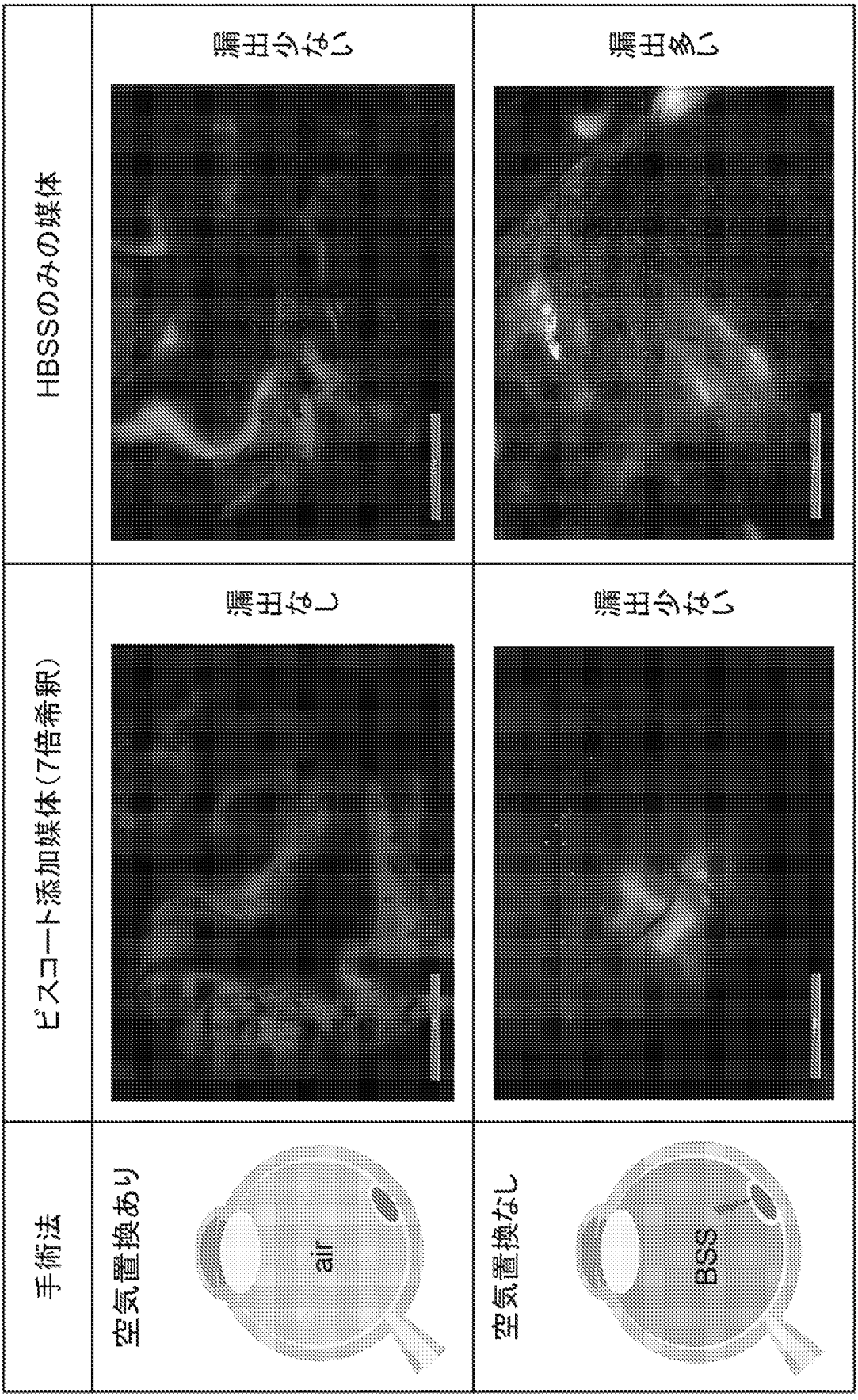
[請求項13] 少なくとも１つの免疫抑制剤と組み合わせて投与される、請求項１～１２のいずれか一項に記載の治療薬。

[請求項14] 前記少なくとも１つの免疫抑制剤が、トリアムシノロンアセトニド、シクロスポリン、タクロリムス、プレドニゾロン及びデキサメタゾンからなる群より選択される少なくとも１つである、請求項１３に記載の治療薬。

[図1]

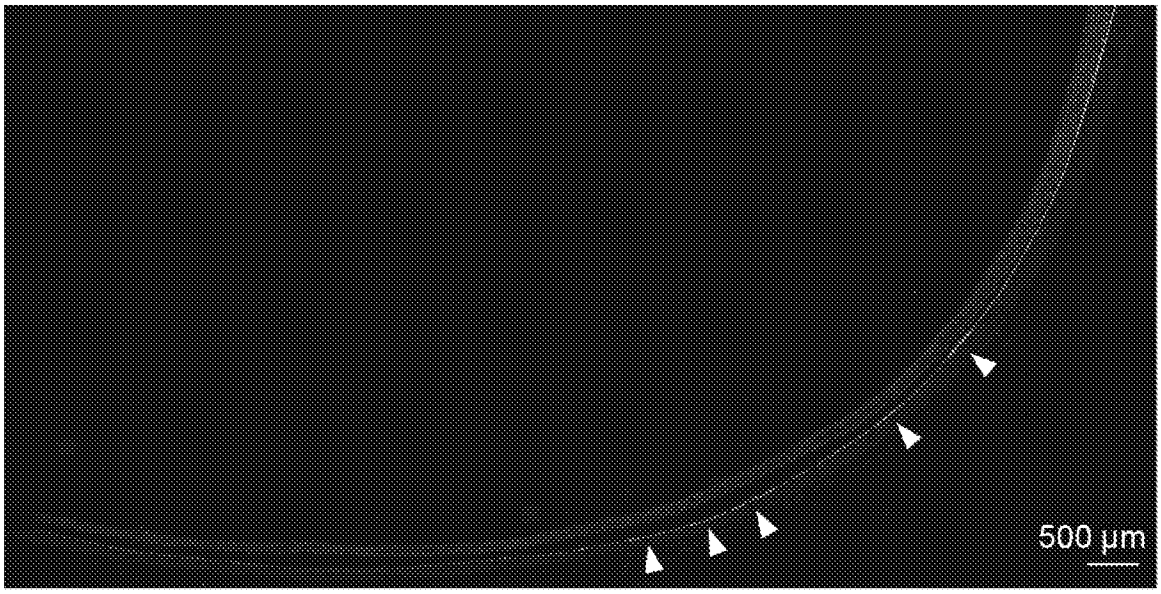

硝子体
網膜
視神経
✓硝子体切除
眼灌流液
✓液ガス置換
バックフラッシュニードル/
硝子体カッター
空気/ガス
✓RPE懸濁液投与
網膜下投与針
眼灌流液
ブレブ
(ブレブ内部にRPE懸濁液)

[図2]

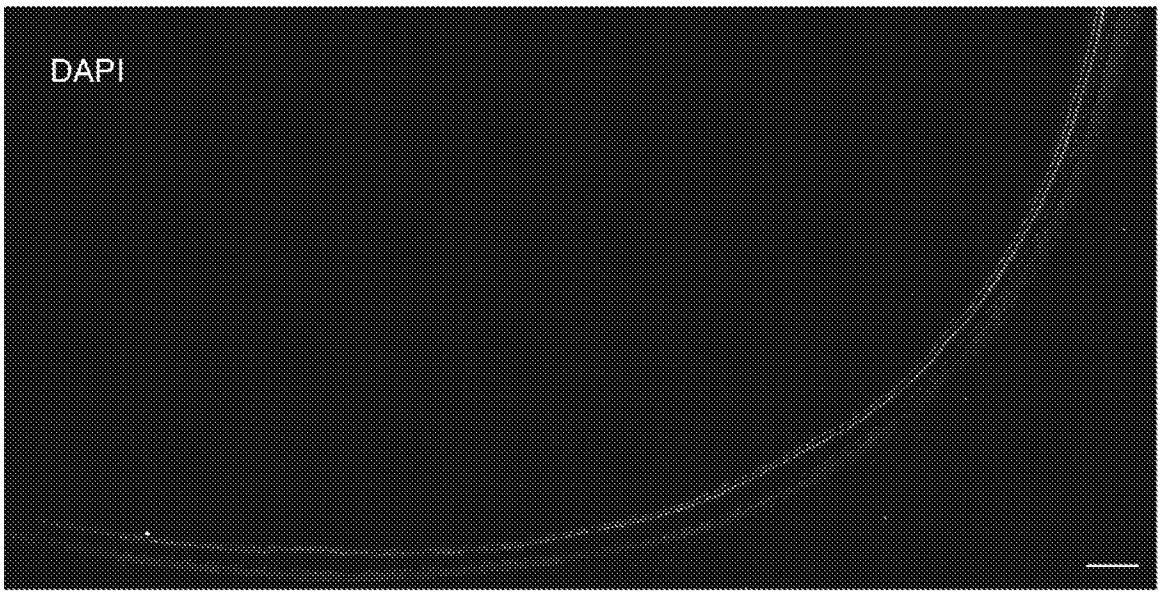

手術法
ビスコート添加媒体（7倍希釈）
HBSSのみの媒体
空気置換あり
air
漏出なし
漏出少なし
空気置換なし
BSS
漏出少なし
漏出多し

[図3]

(A)

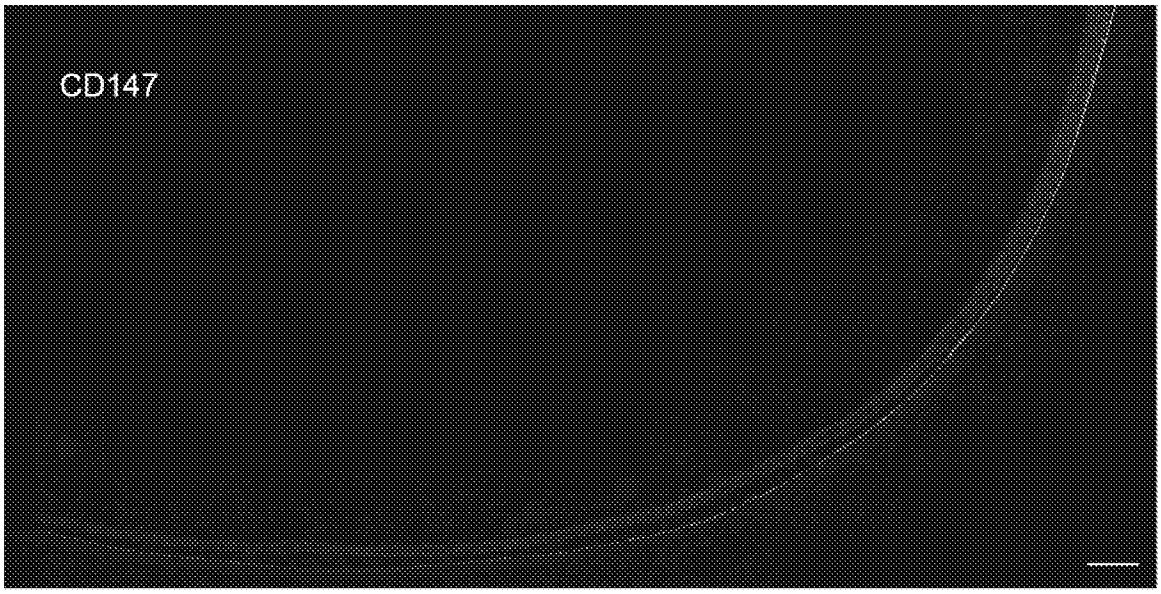


(B)

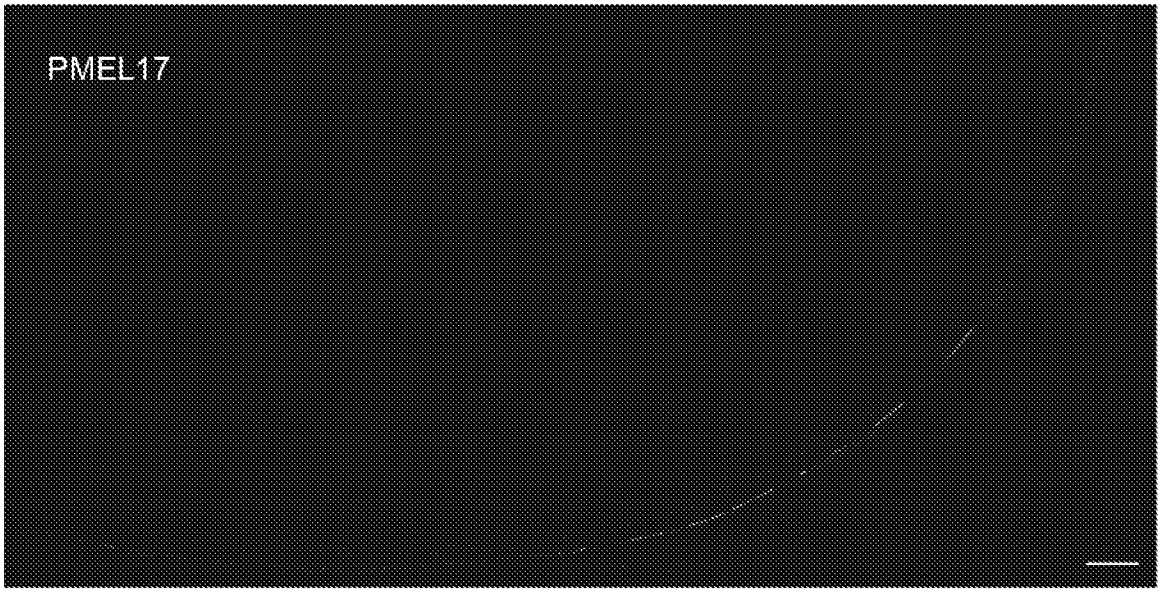


[図4]

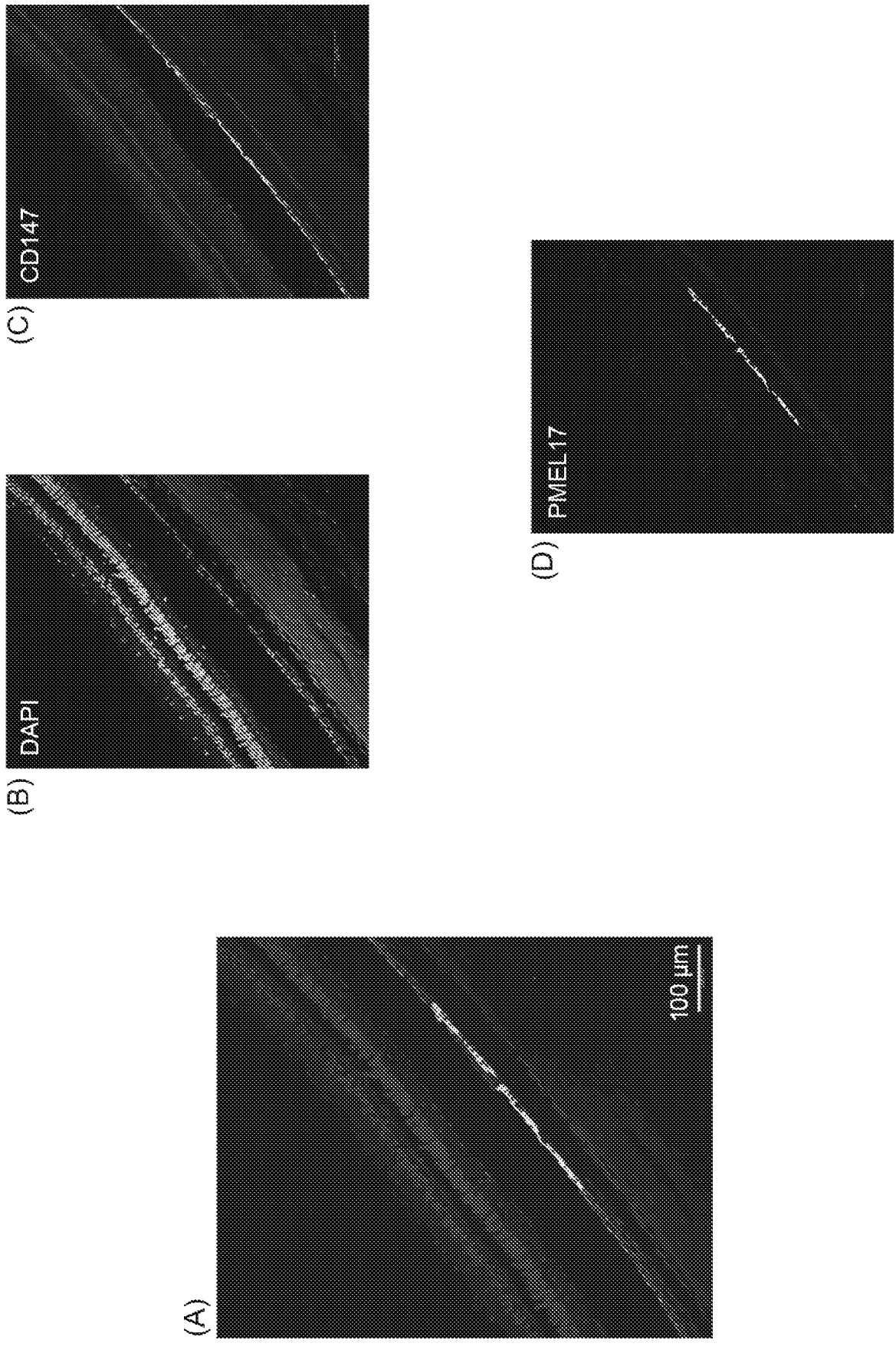
(A)



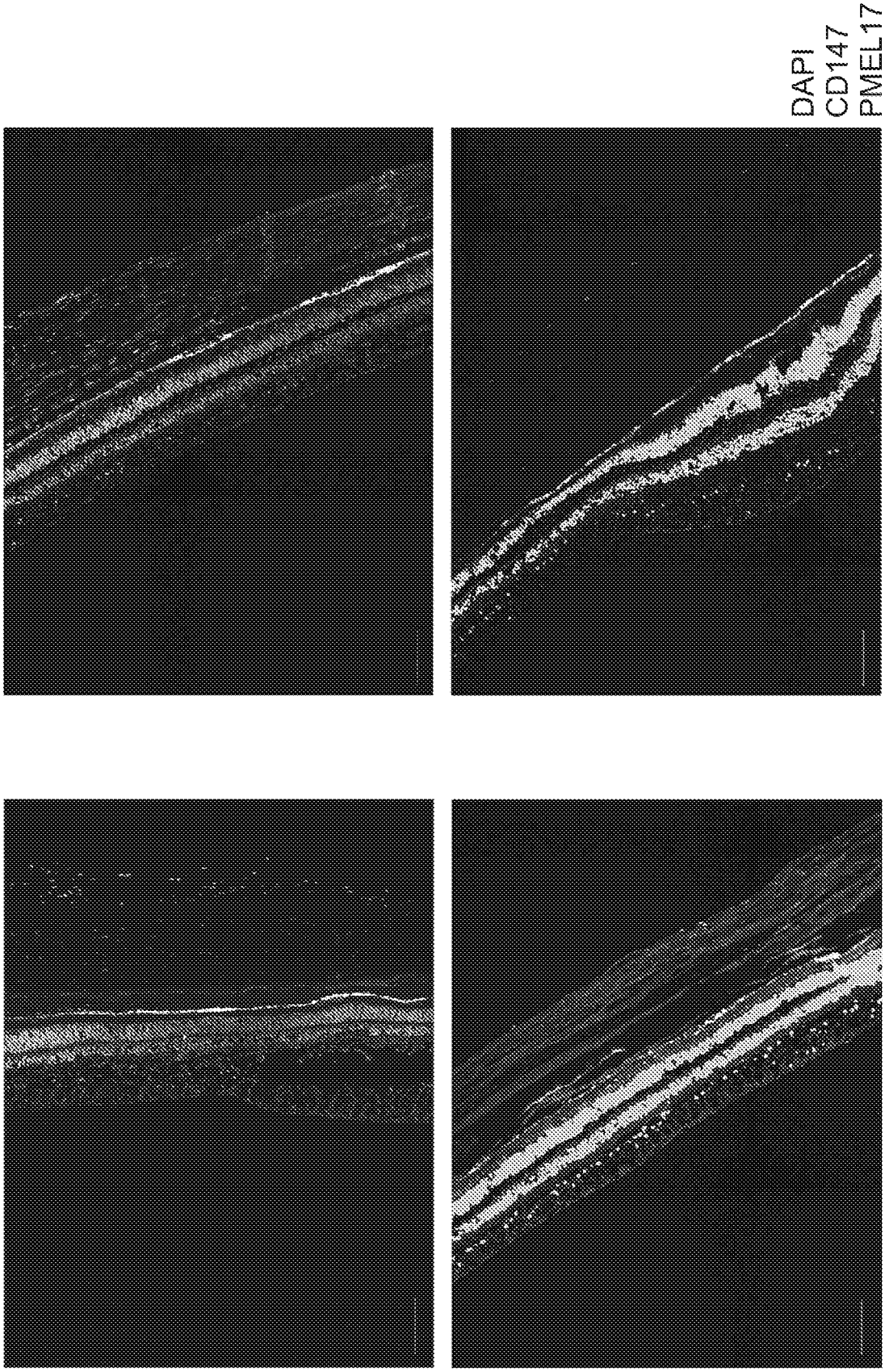
(B)



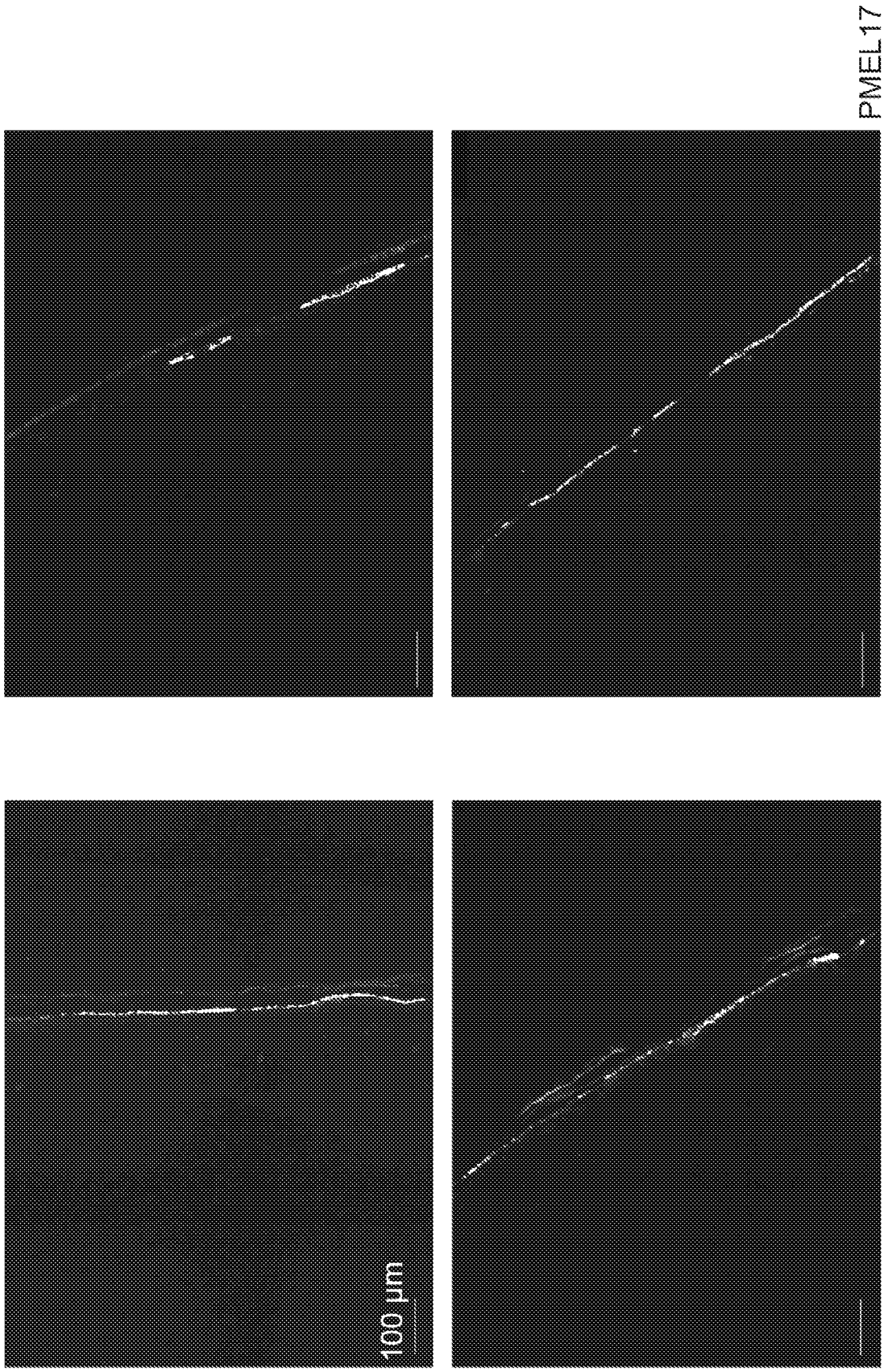
[図5]



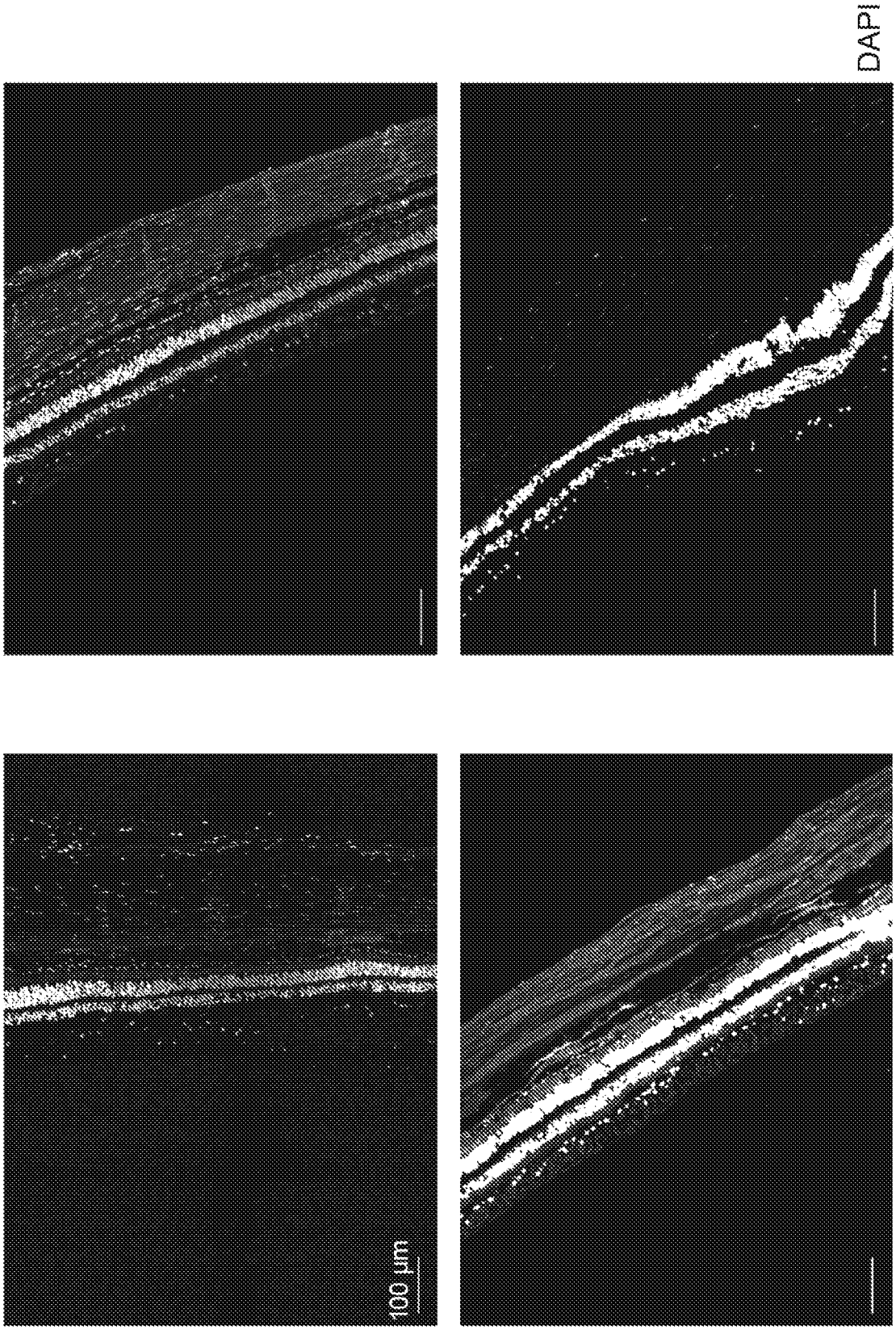
[図6A]



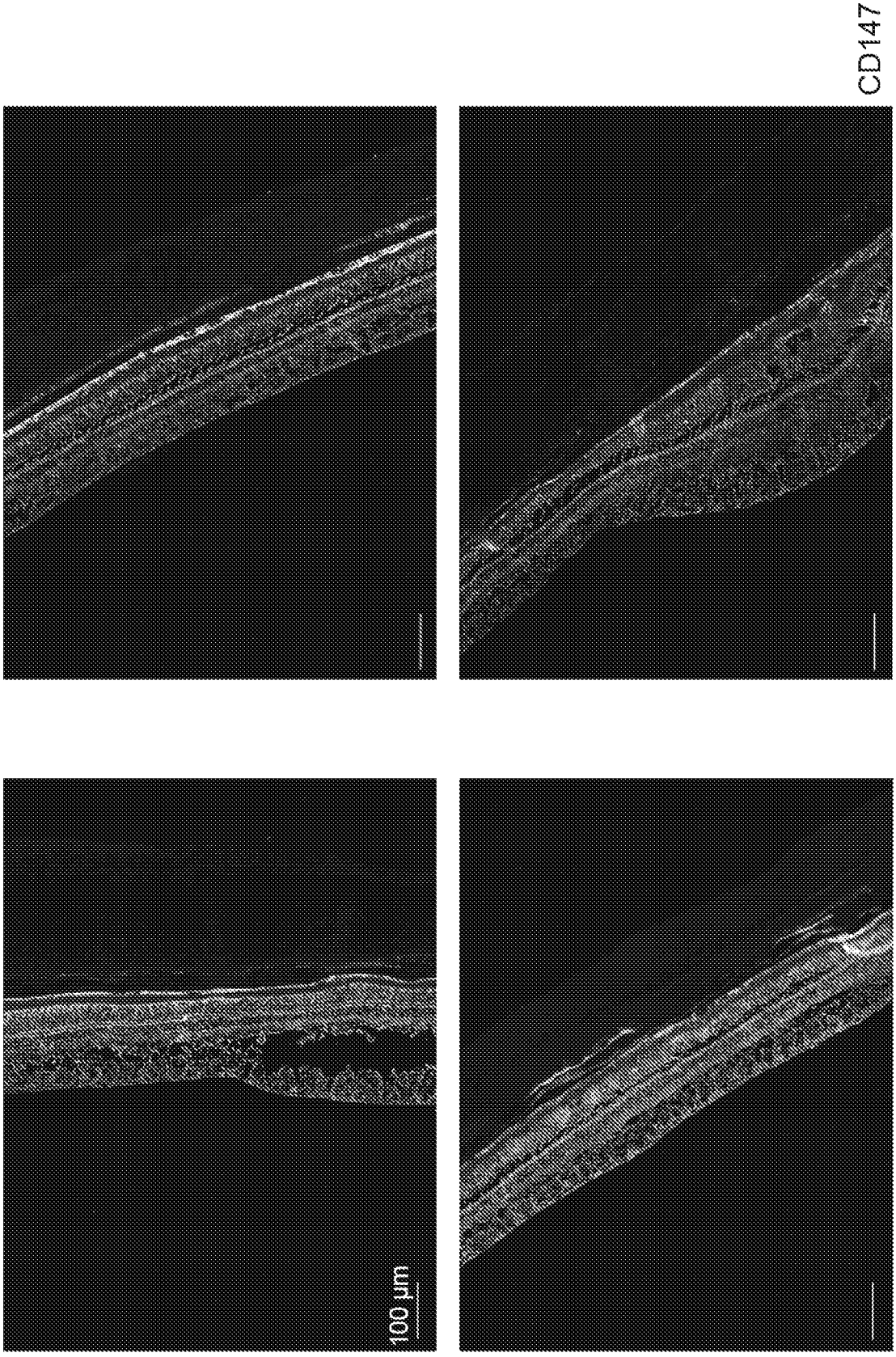
[図6B]



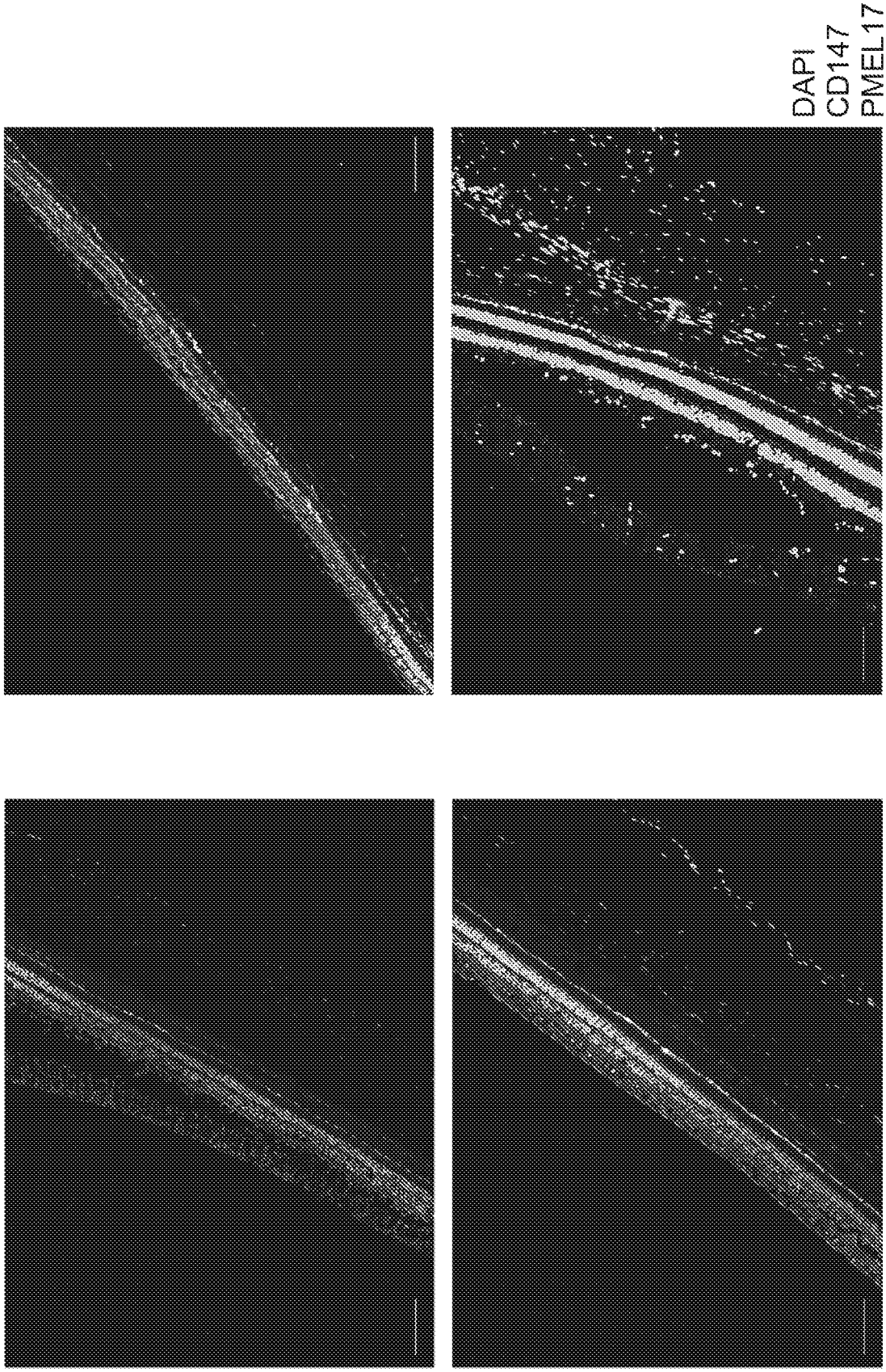
[図6C]



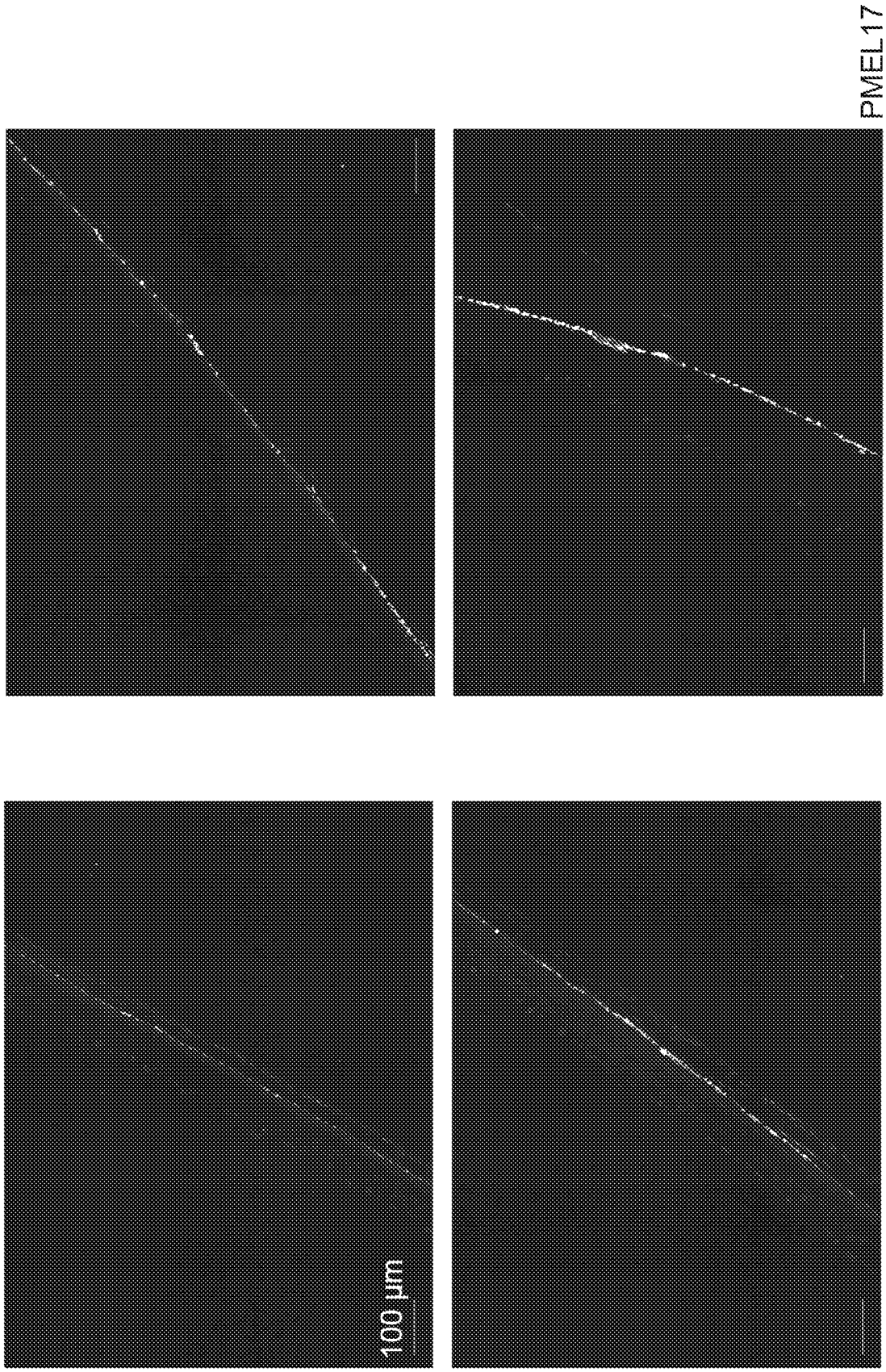
[図6D]



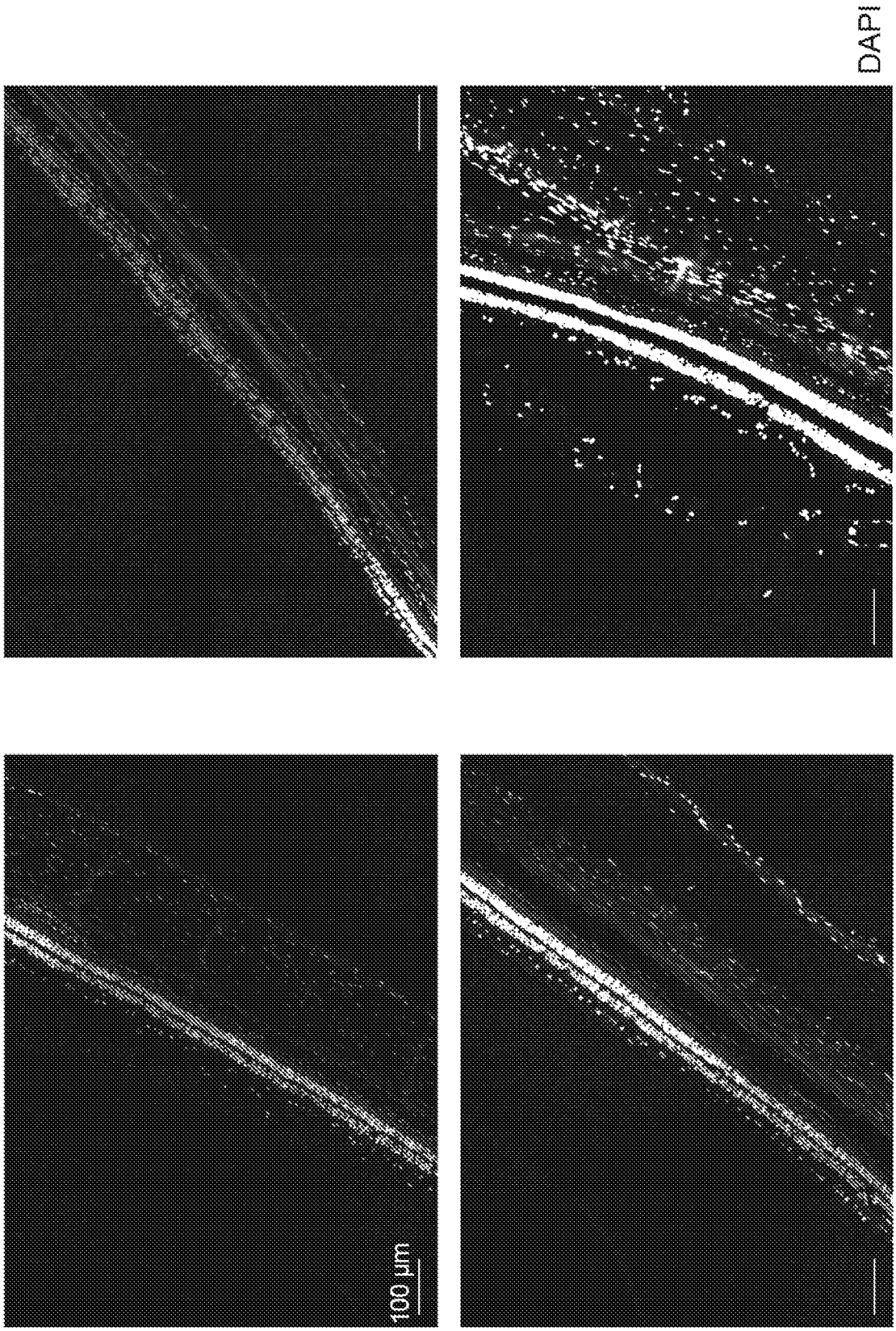
[図7A]



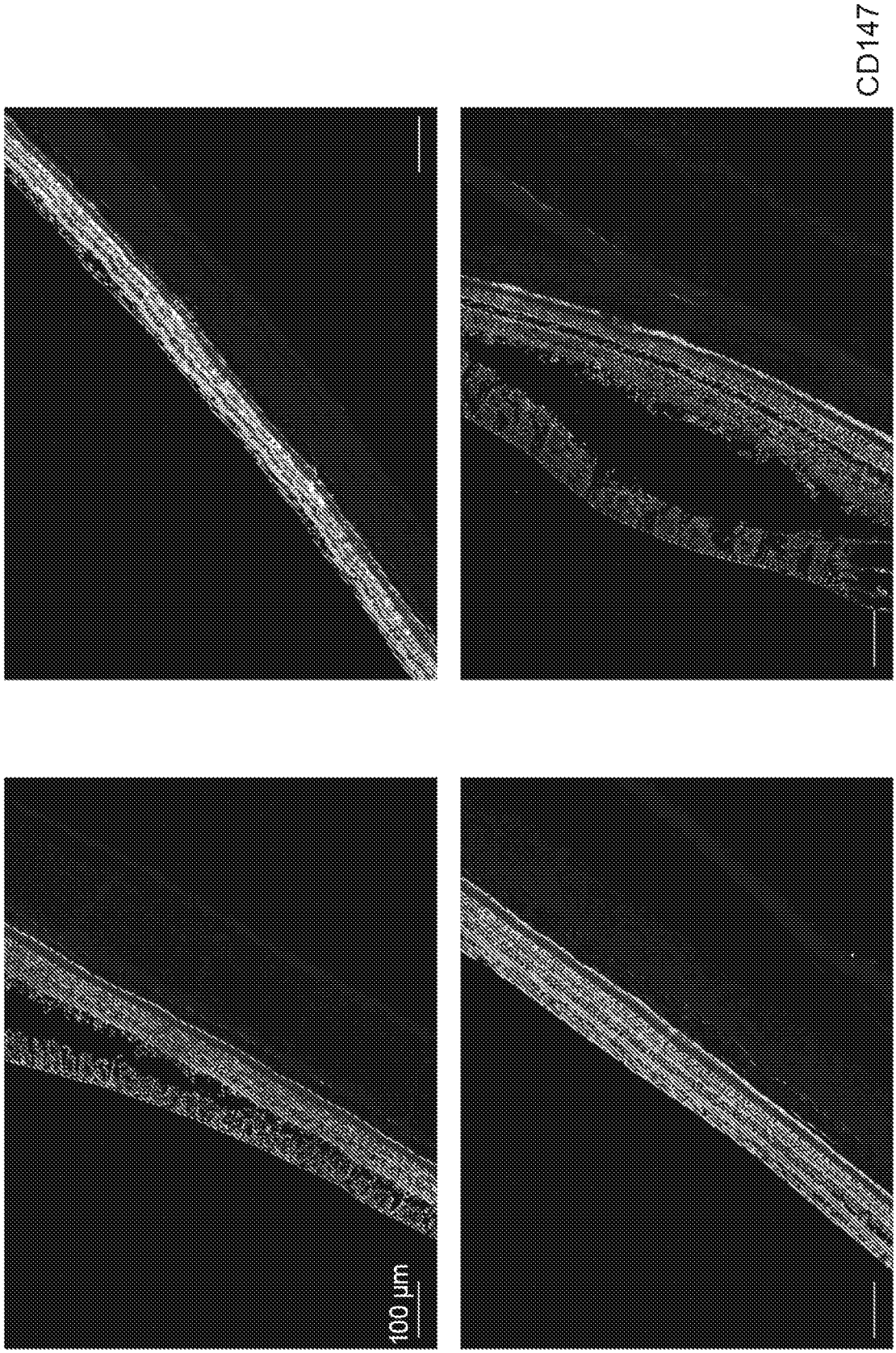
[図7B]



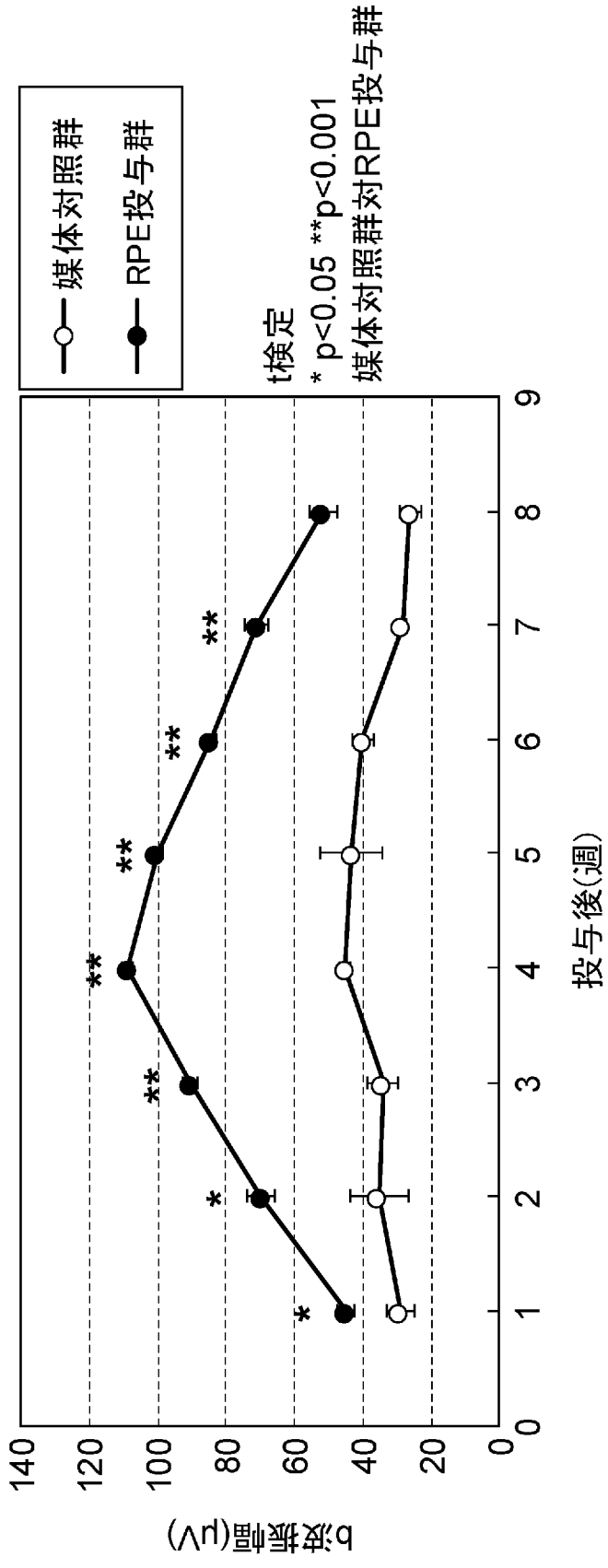
[図7C]



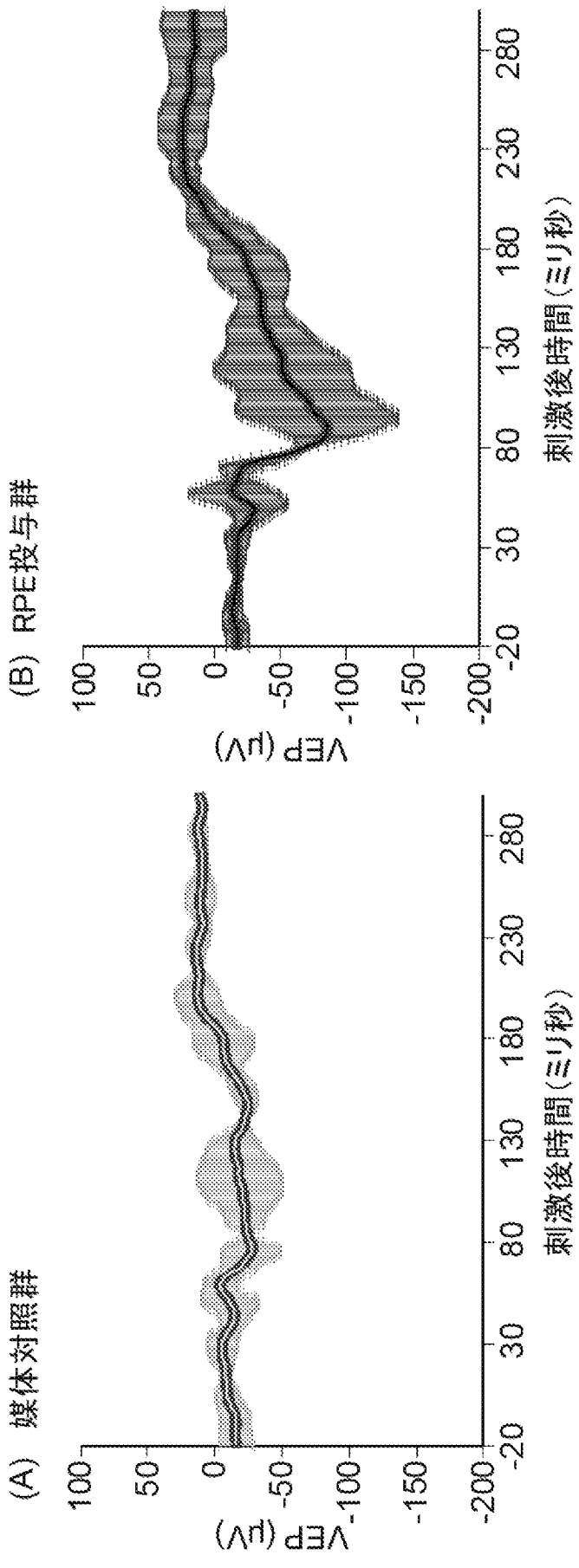
[図7D]



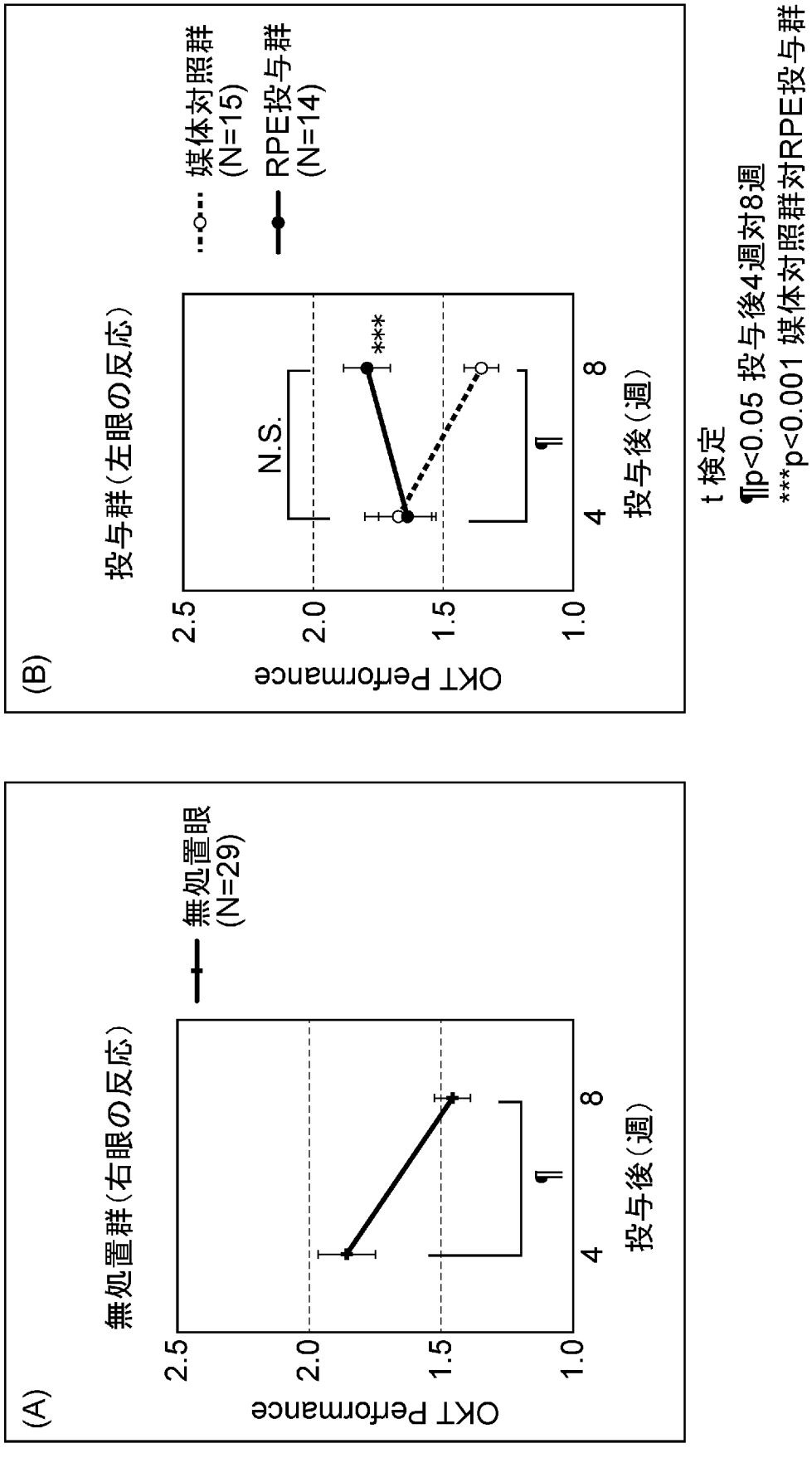
[図8]


媒体対照群
RPE投与群
t検定
* p<0.05 **p<0.001
媒体対照群対RPE投与群
b波振幅(μV)
投与後(週)
0
20
40
60
80
100
120
140
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
*
**

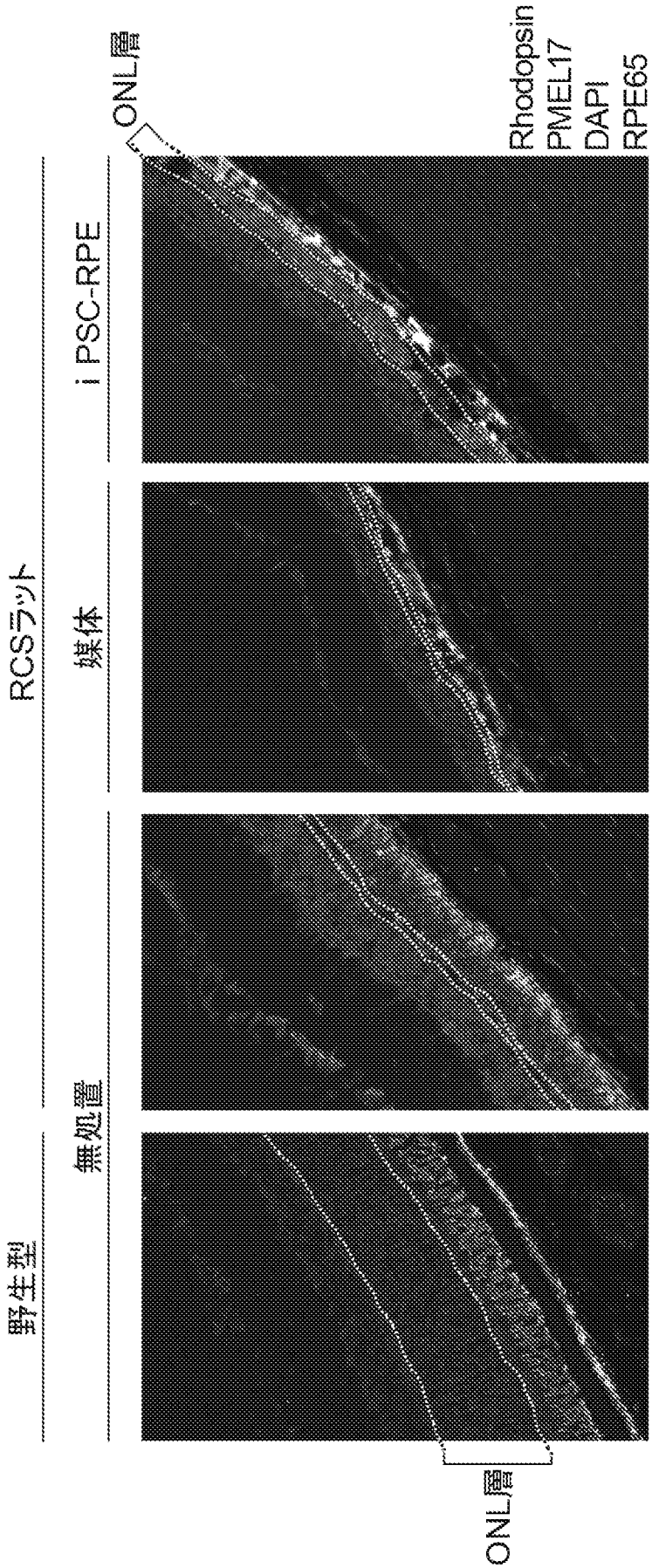
[図9]


(A) 媒体対照群
(B) RPE投与群
VEP (μV)
100
50
0
-50
-100
-150
-200
-20
30
80
130
180
230
280
刺激後時間（ミリ秒）

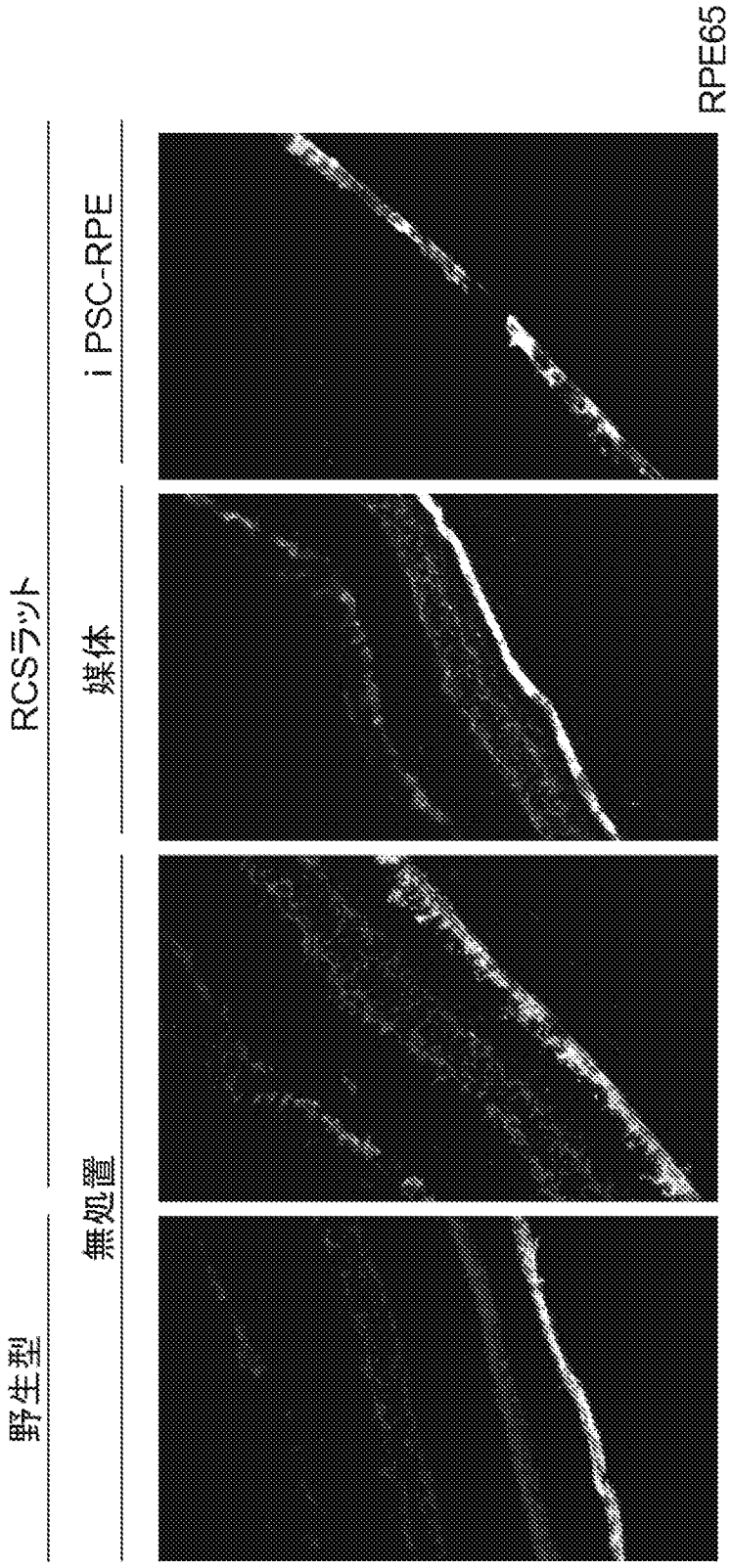
[図10]


(A)
無処置群(右眼の反応)
無処置眼
(N=29)
OKT Performance
2.5
2.0
1.5
1.0
4
8
投与後(週)
¶
(B)
投与群(左眼の反応)
媒体対照群
(N=15)
RPE投与群
(N=14)
N.S.
***
¶
t 検定
¶p<0.05 投与後4週対8週
***p<0.001 媒体対照群対RPE投与群

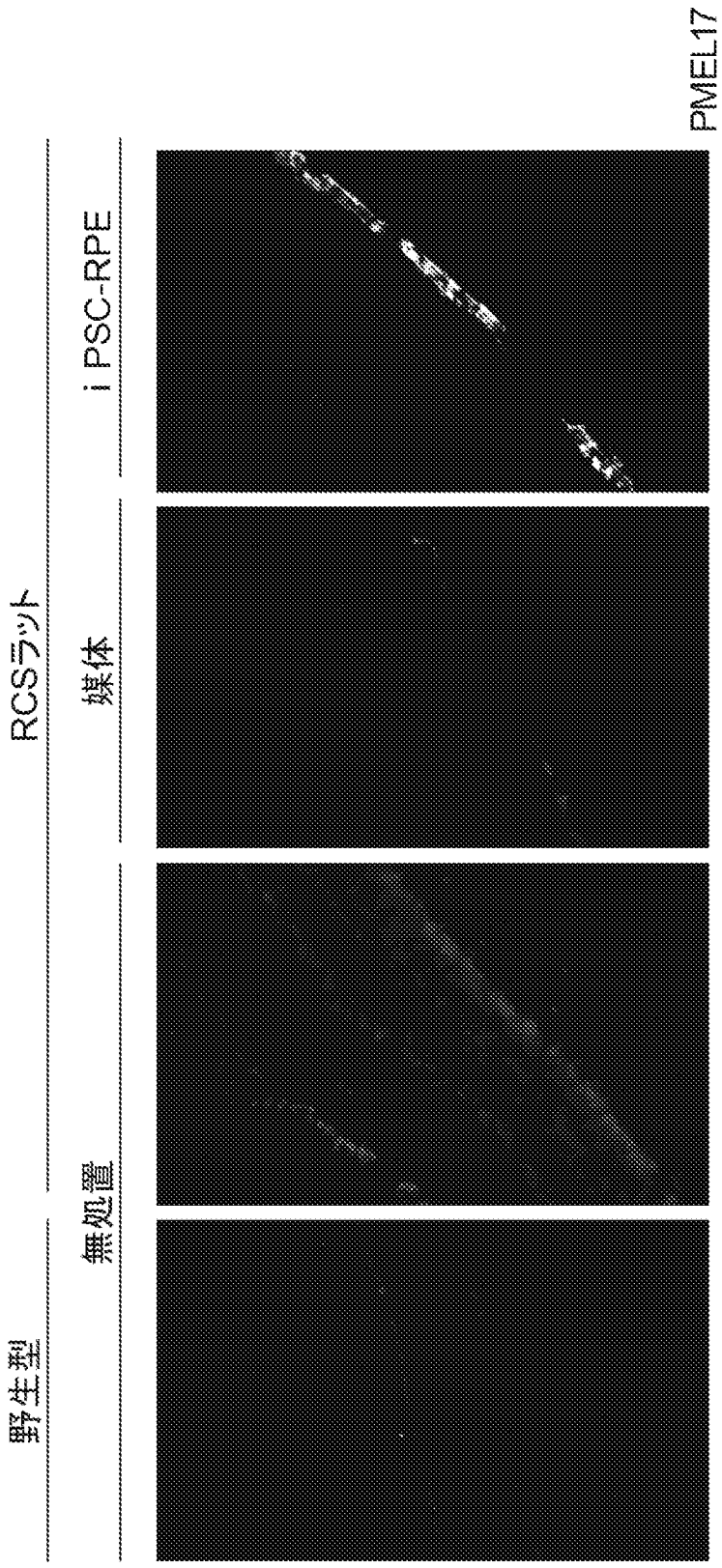
[図11A]


ONL層
Rhodopsin
PMEL17
DAPI
RPE65
RCSラット
iPSC-RPE
媒体
無処置
野生型
ONL層

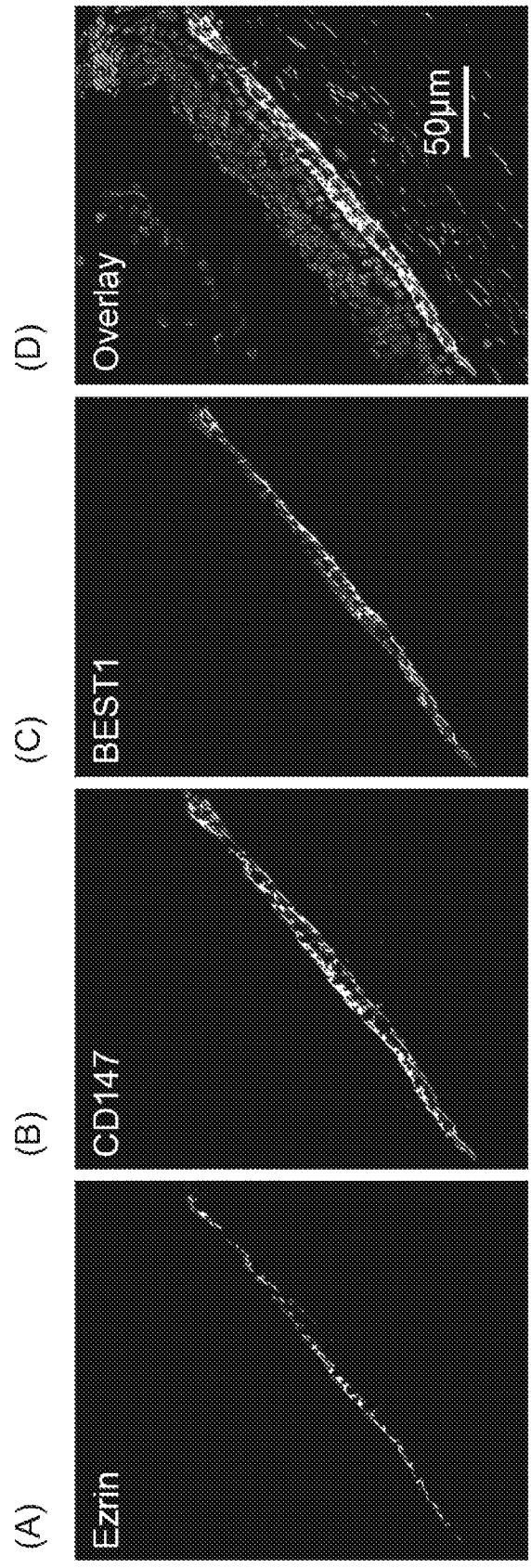
[図11B]



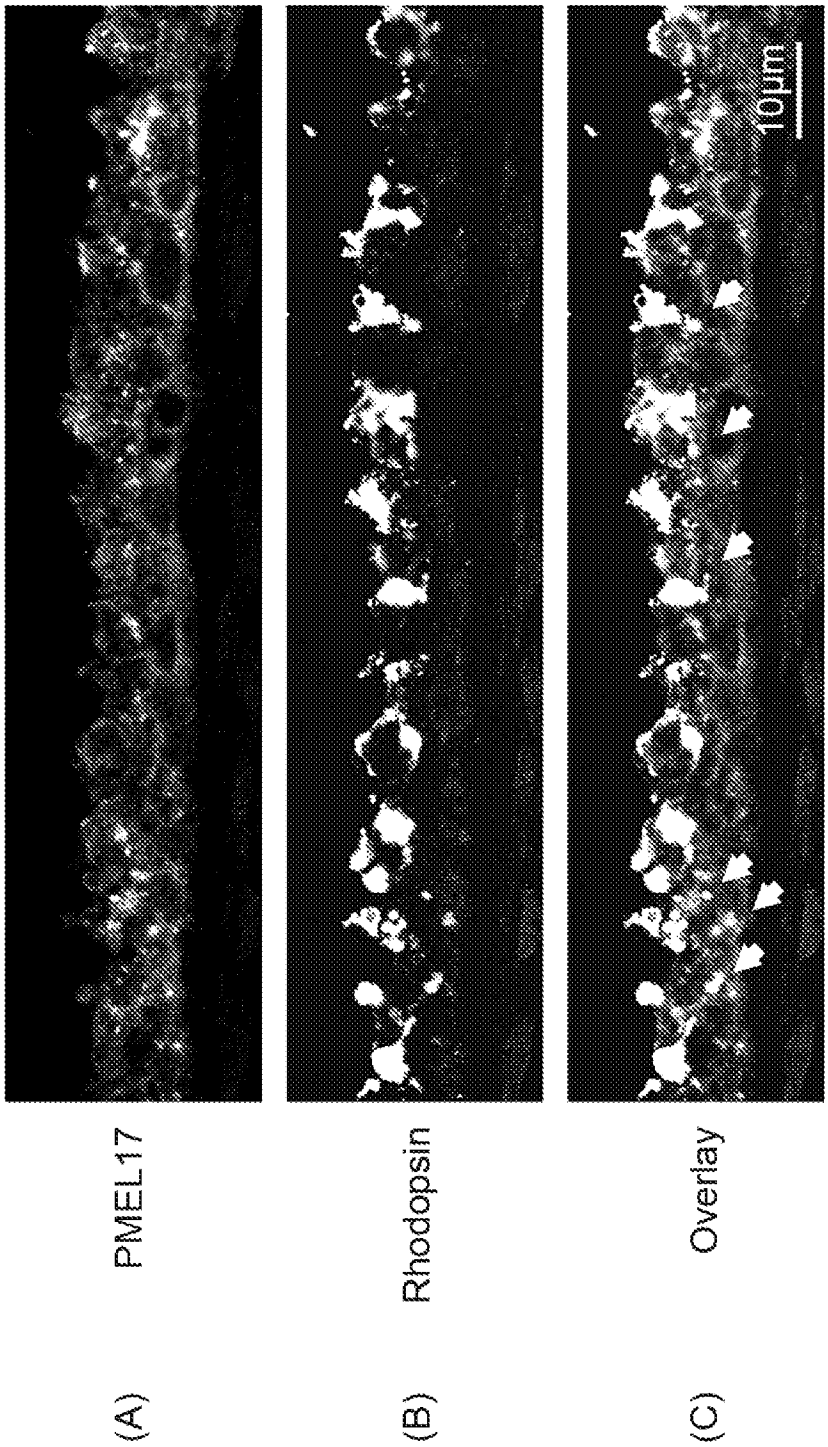
[図11C]



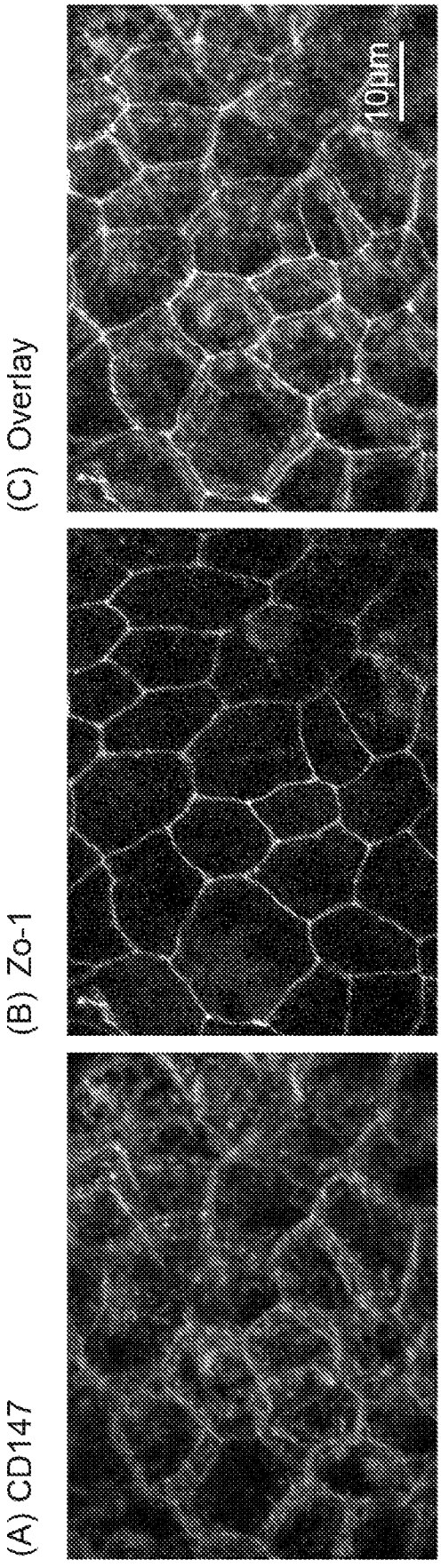
[図12]



[図13]

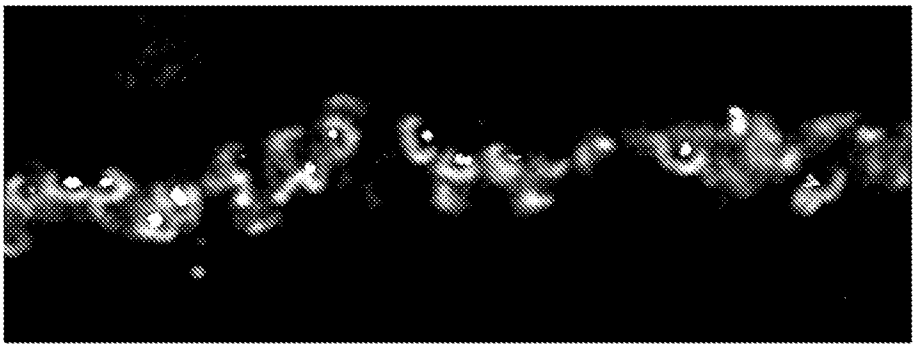


[図14]

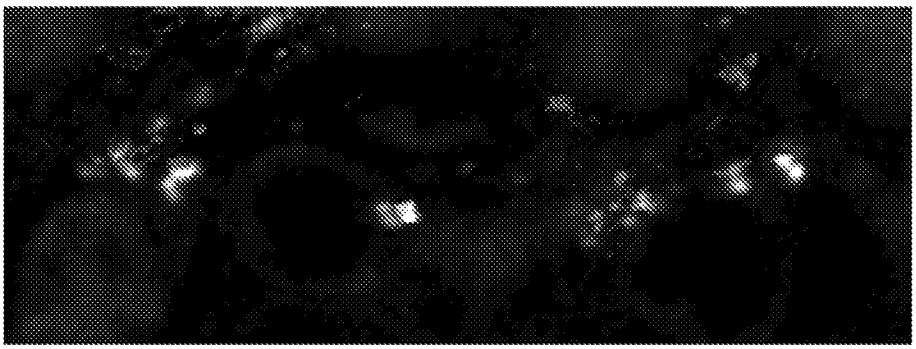


[図15]

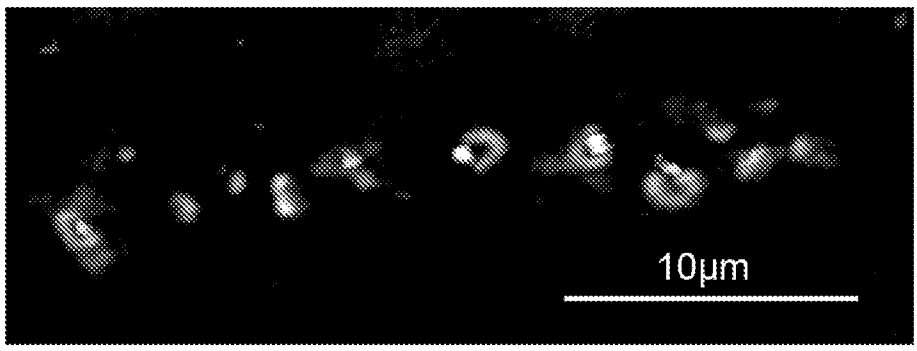
(A) 野生型



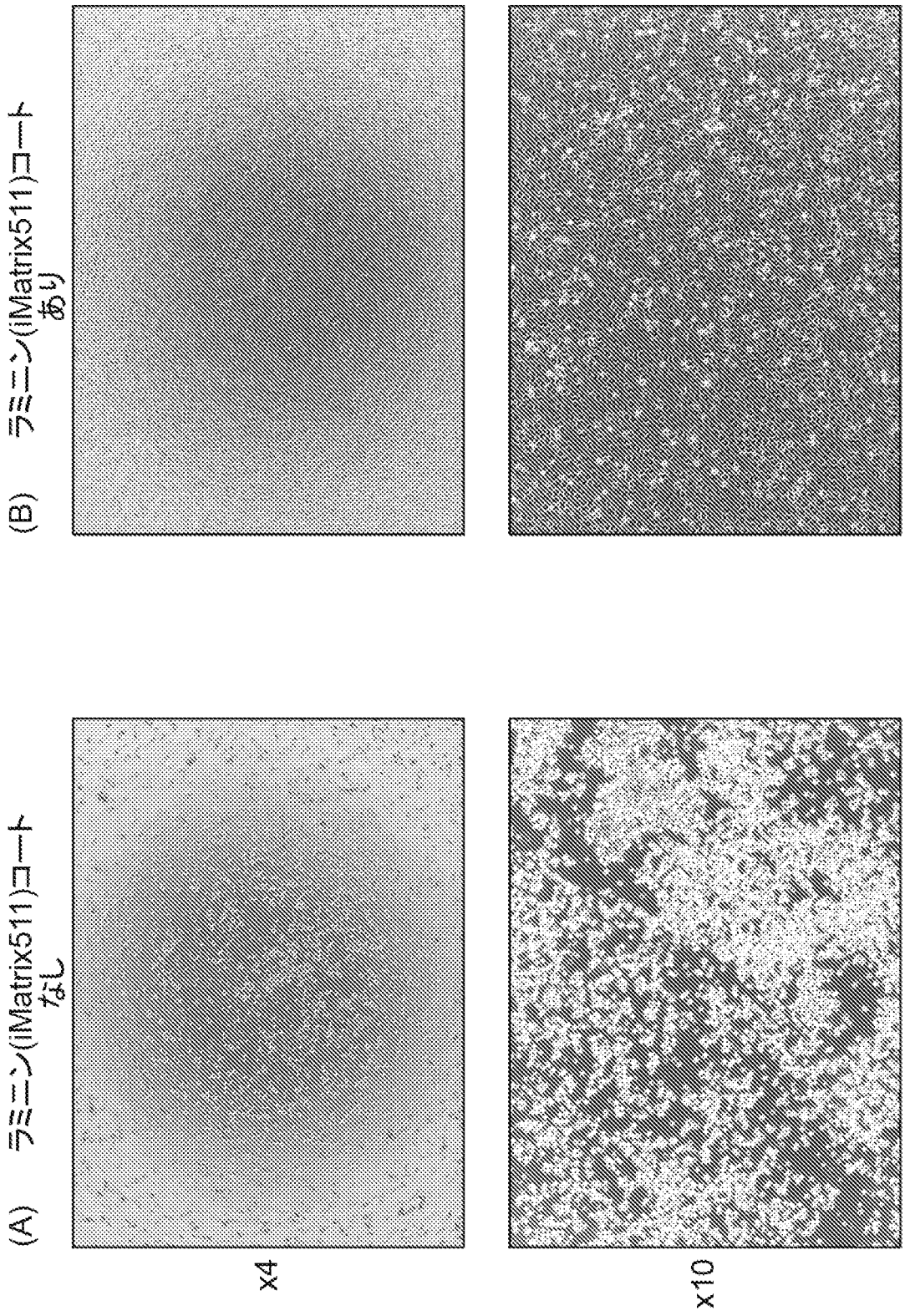
(B) 媒体対照群



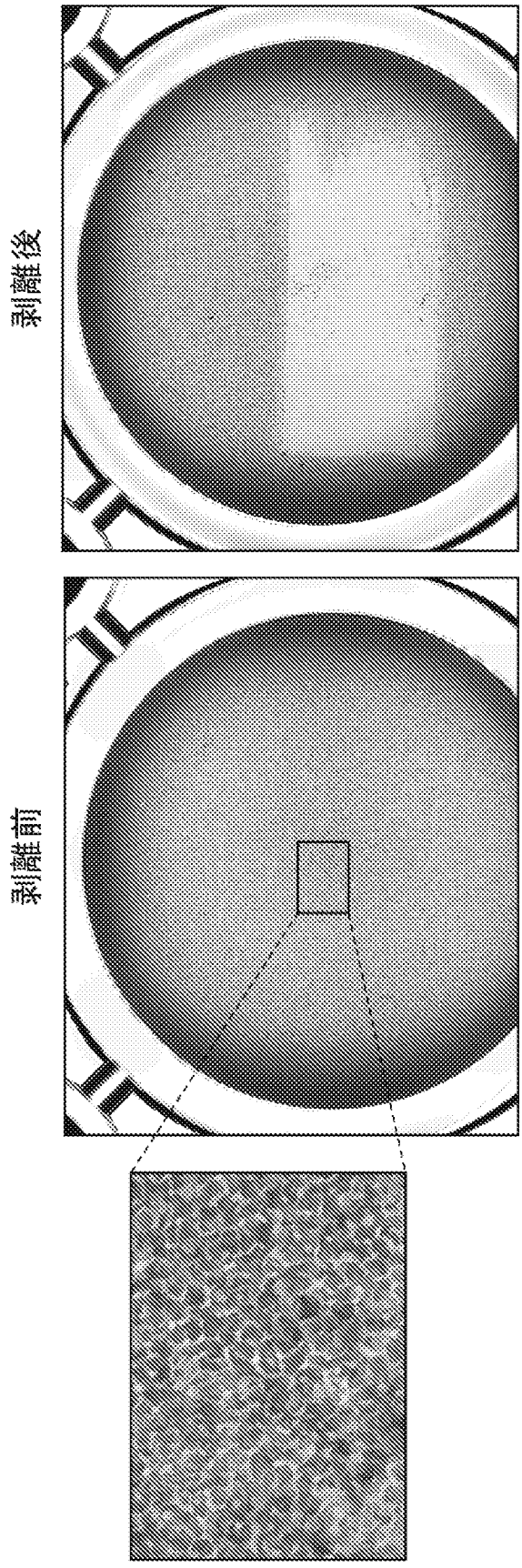
(C) RPE投与群



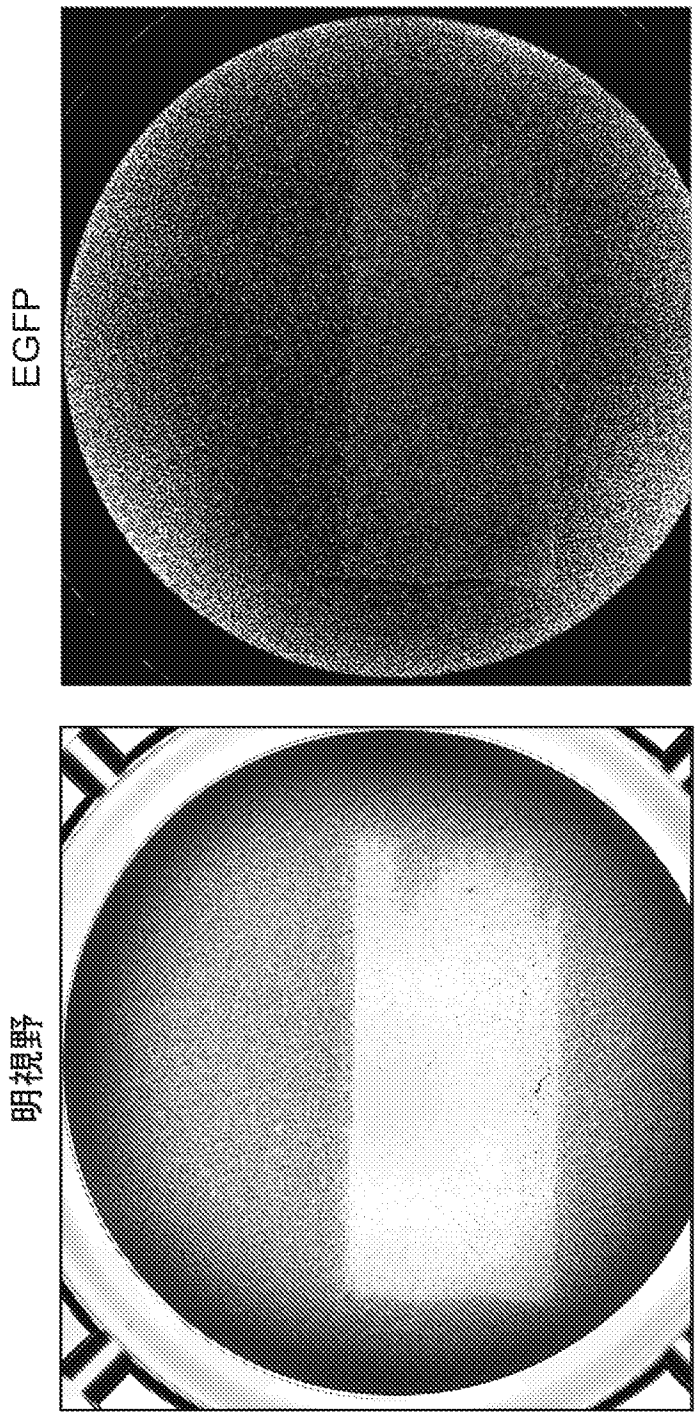
[図16]



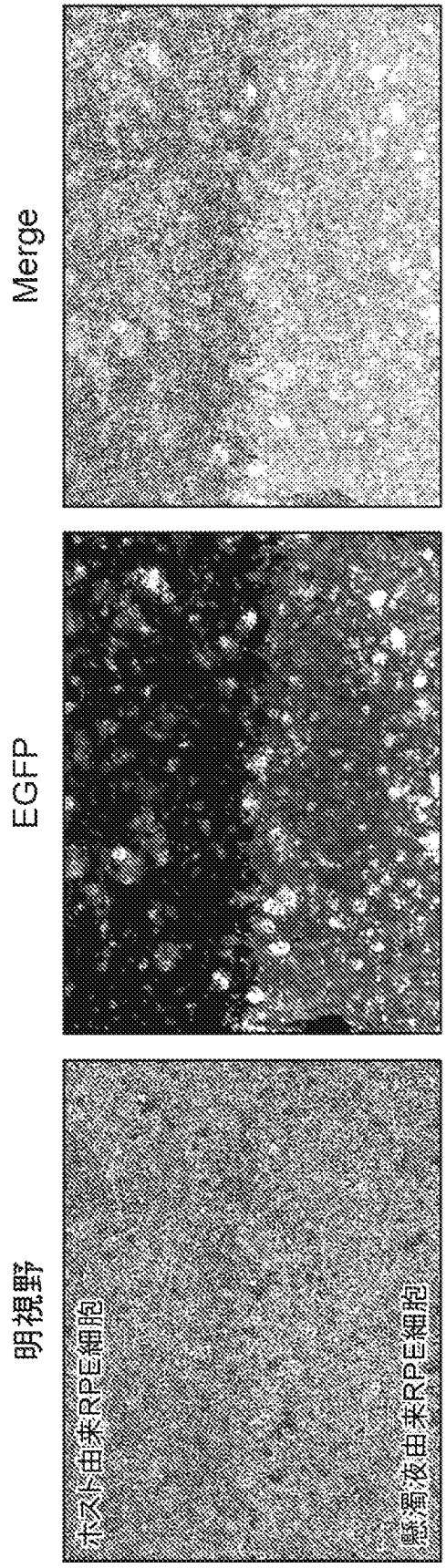
[図17]



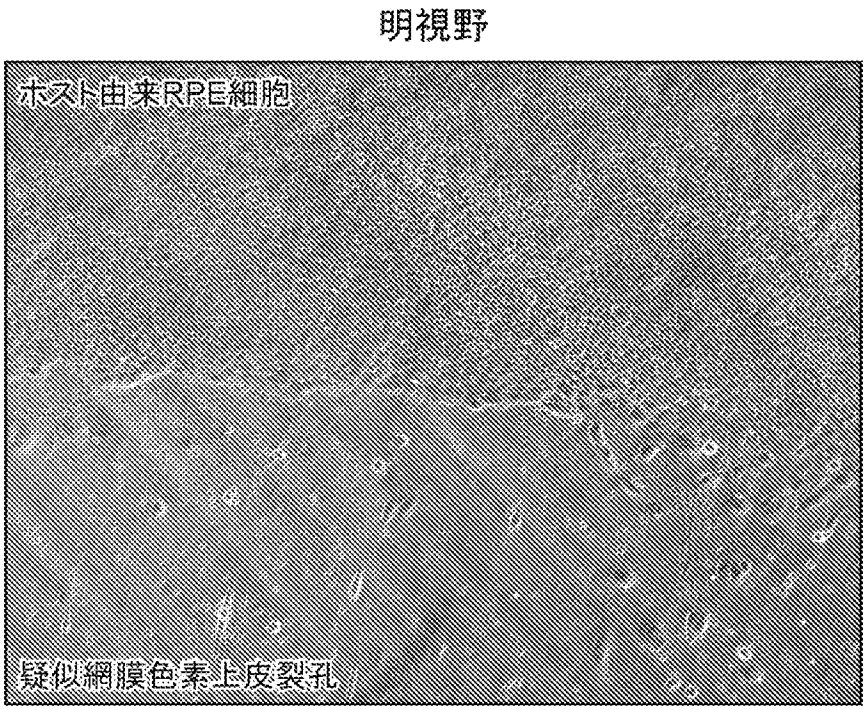
[図18]



[図19]

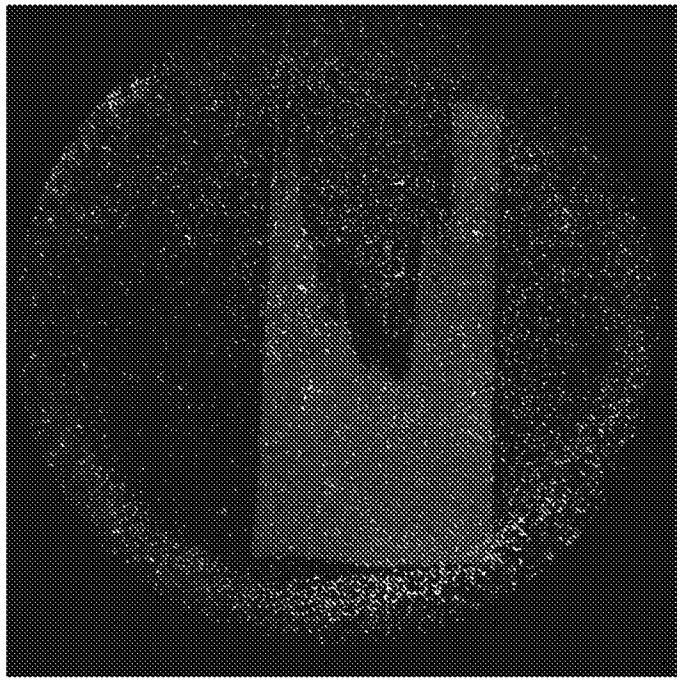


[図20]

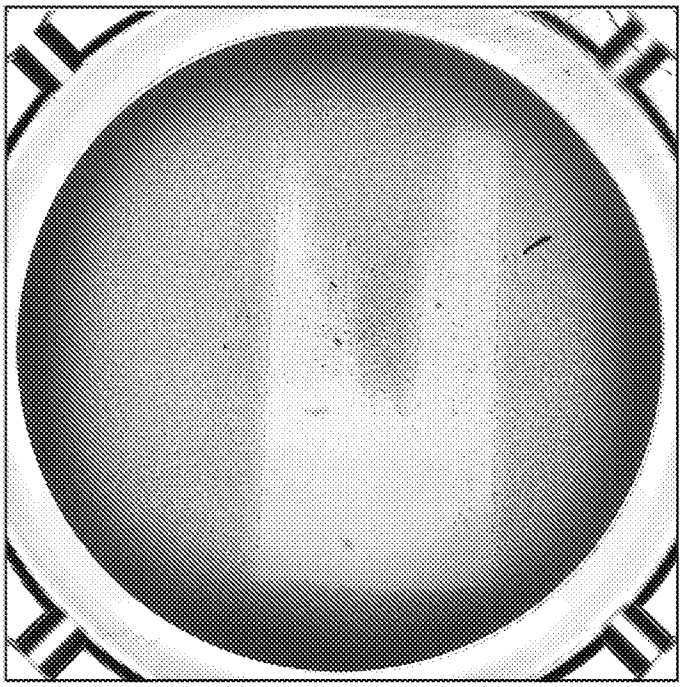


[図21]

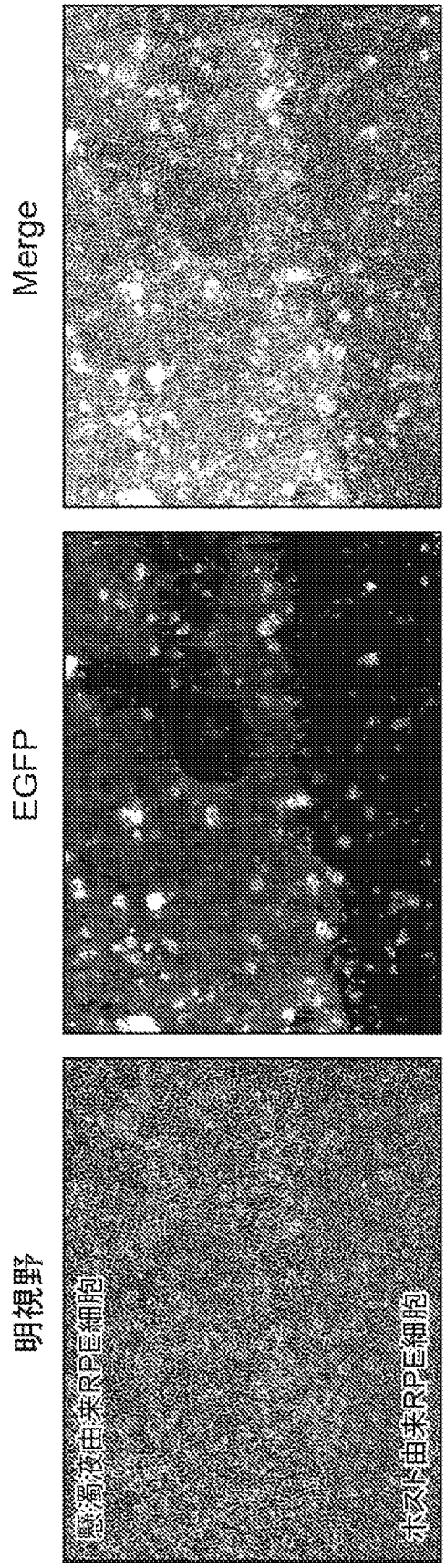
播種6日後
EGFP



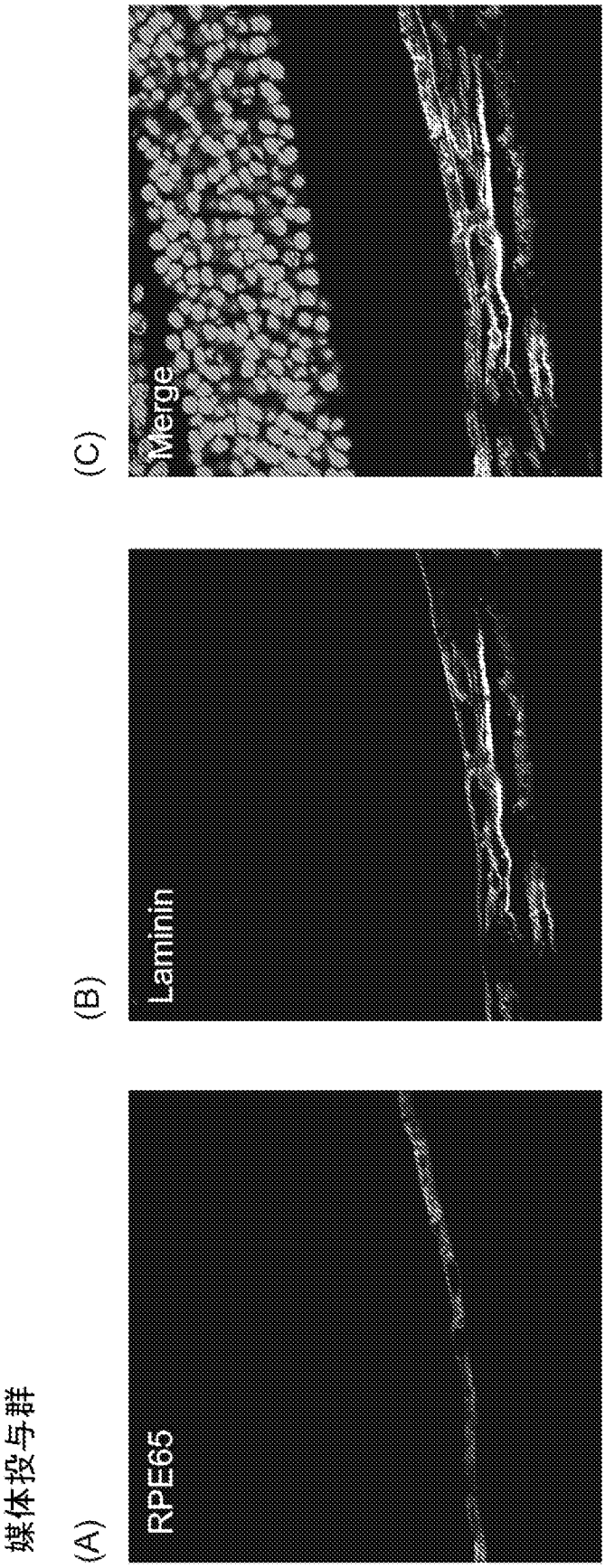
剥離直後
明視野



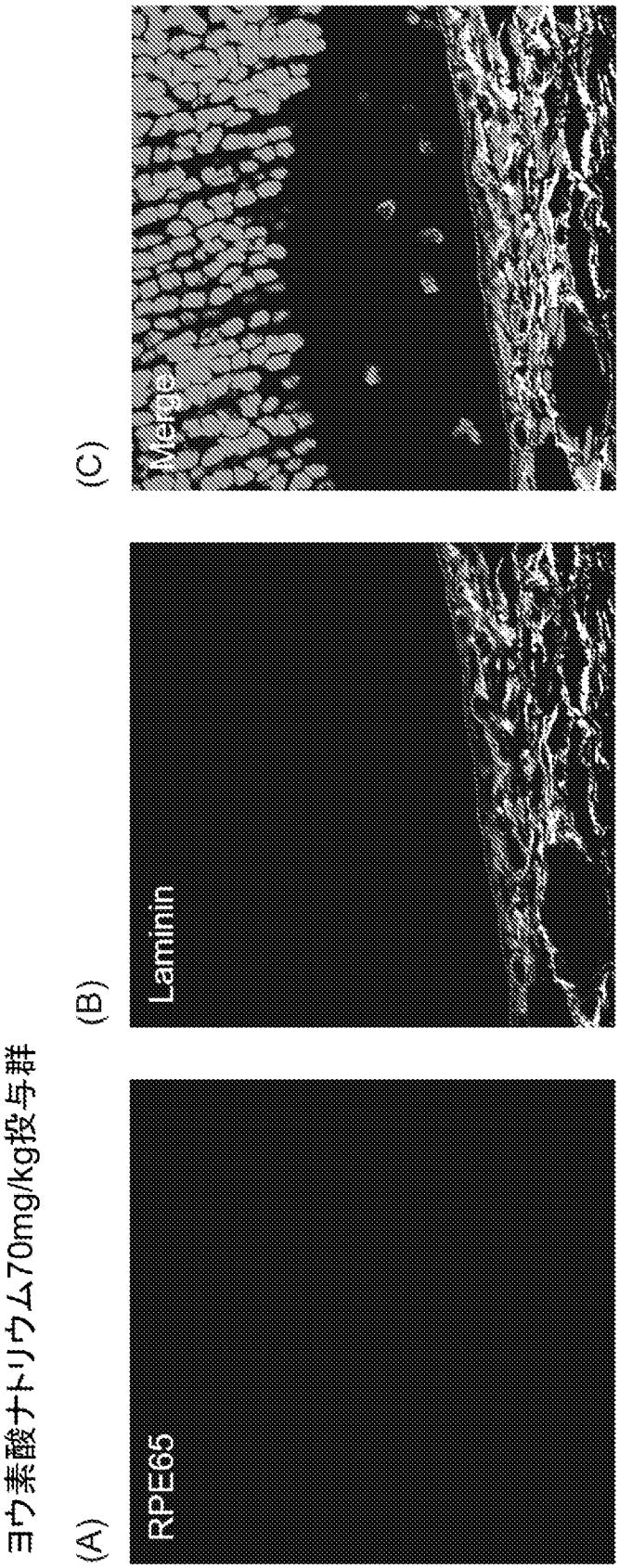
[図22]



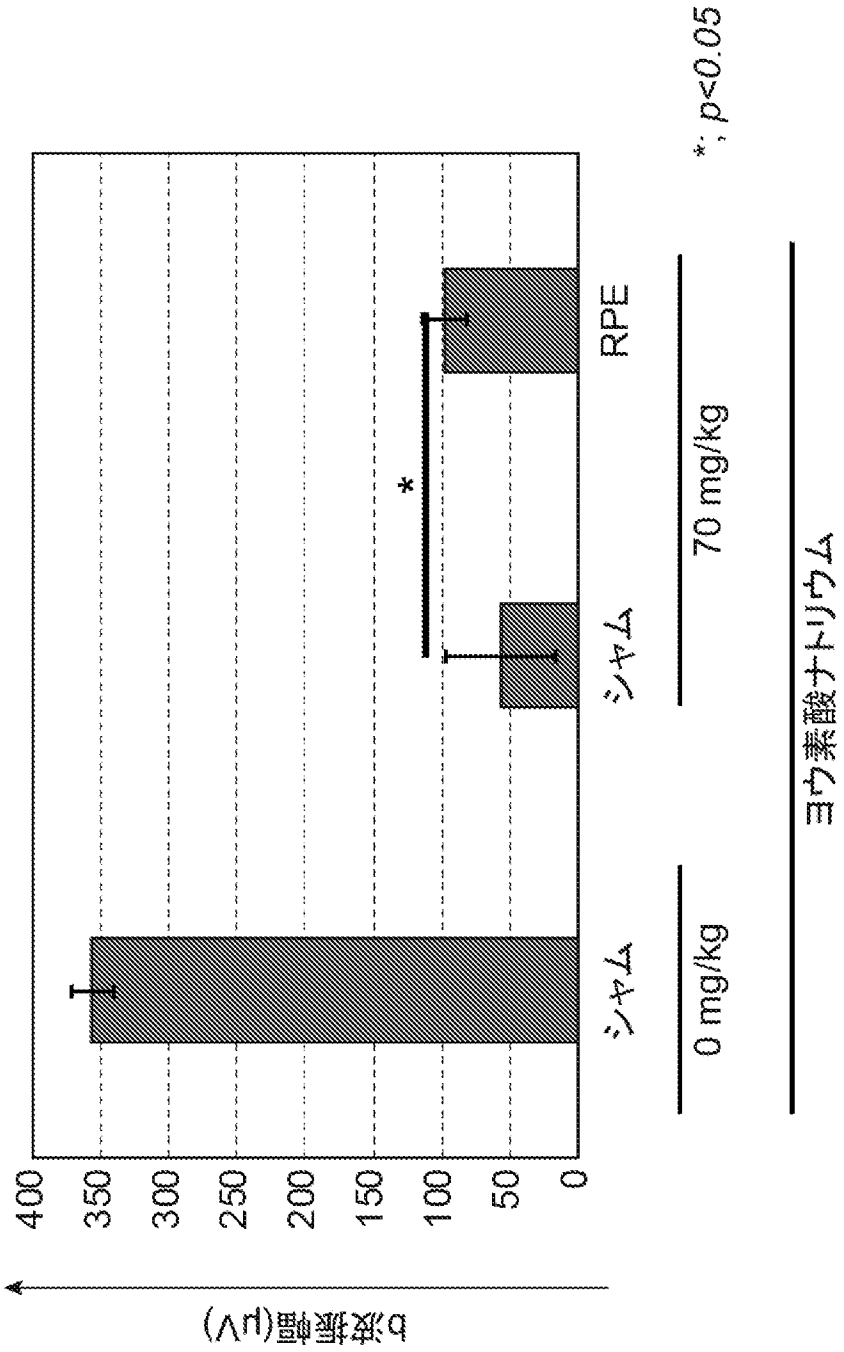
[図23]



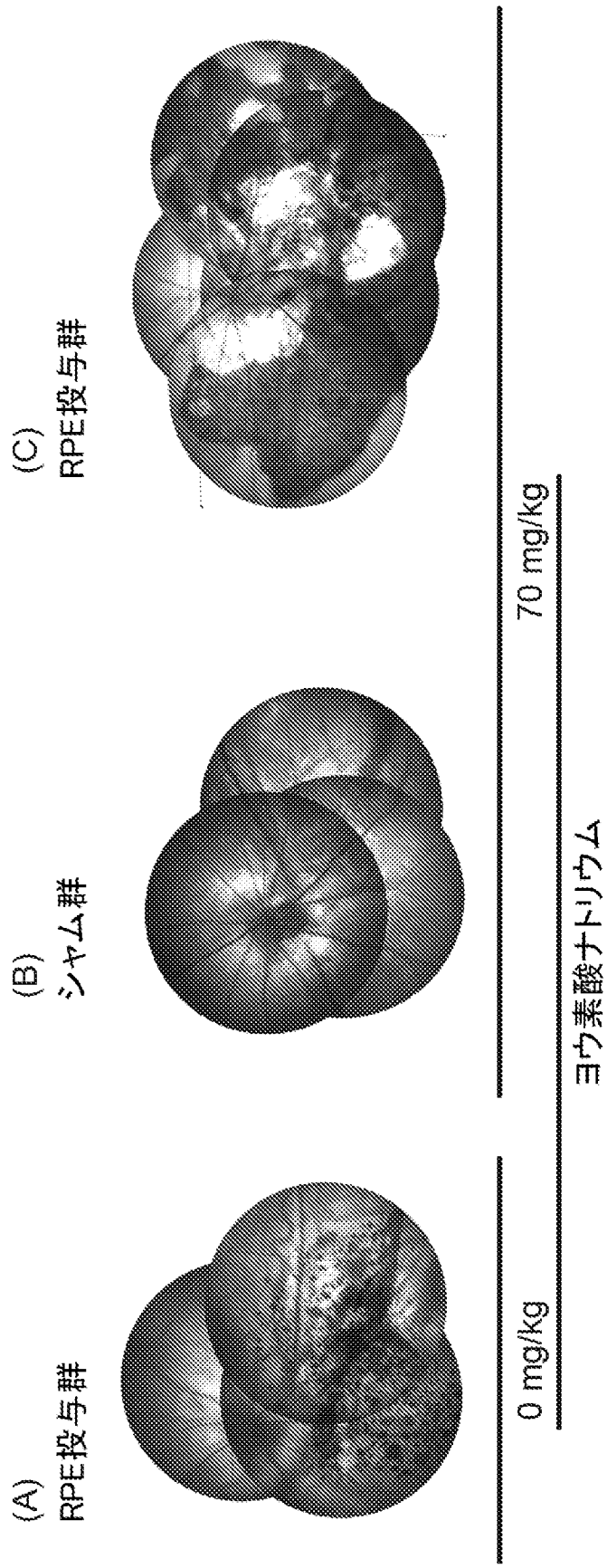
[図24]



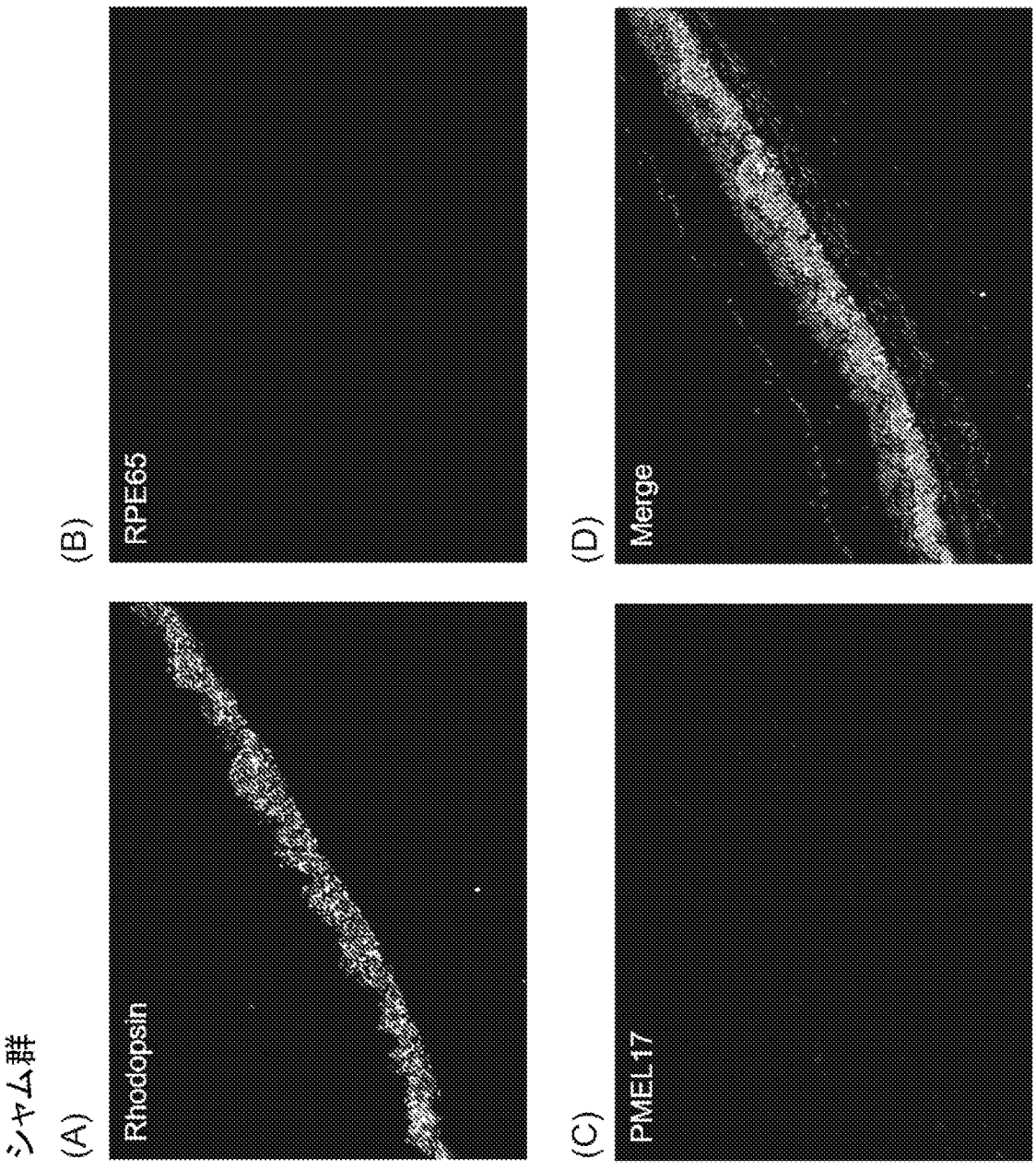
[図25]


b波振幅(μV)
400
350
300
250
200
150
100
50
0
*
シャム
シャム
RPE
0 mg/kg
70 mg/kg
ヨウ素酸ナトリウム
*; p<0.05

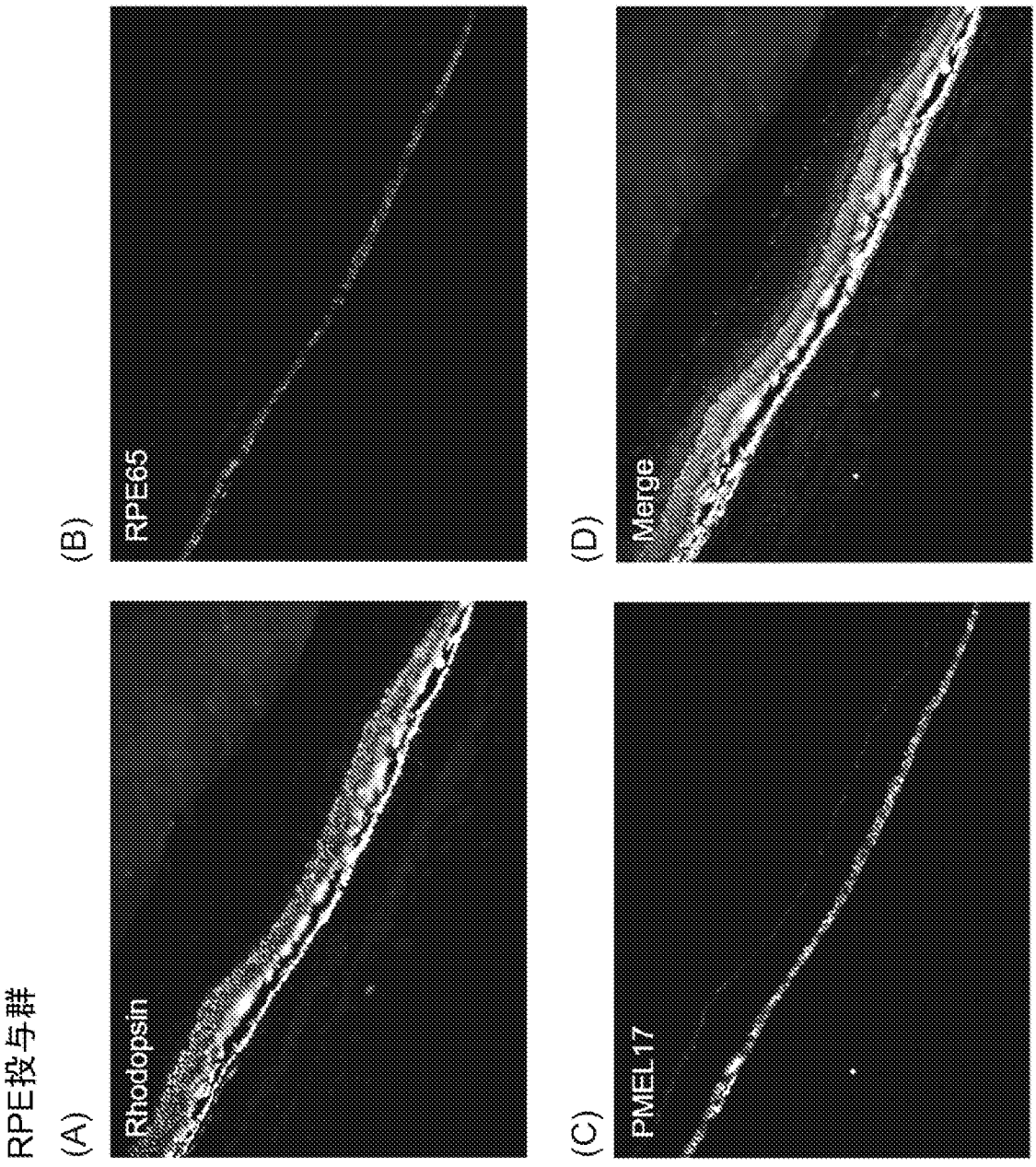
[図26]



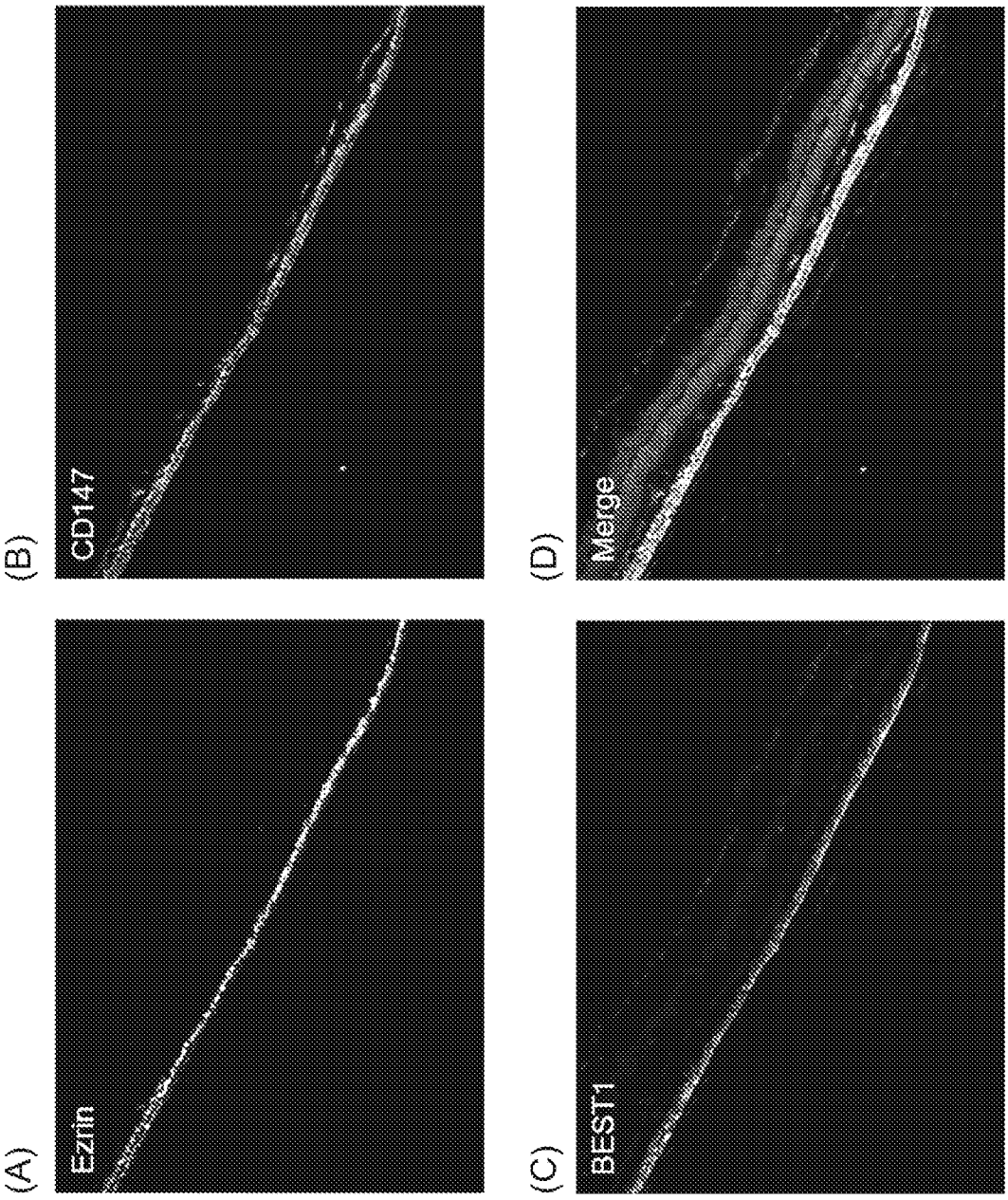
[図27]



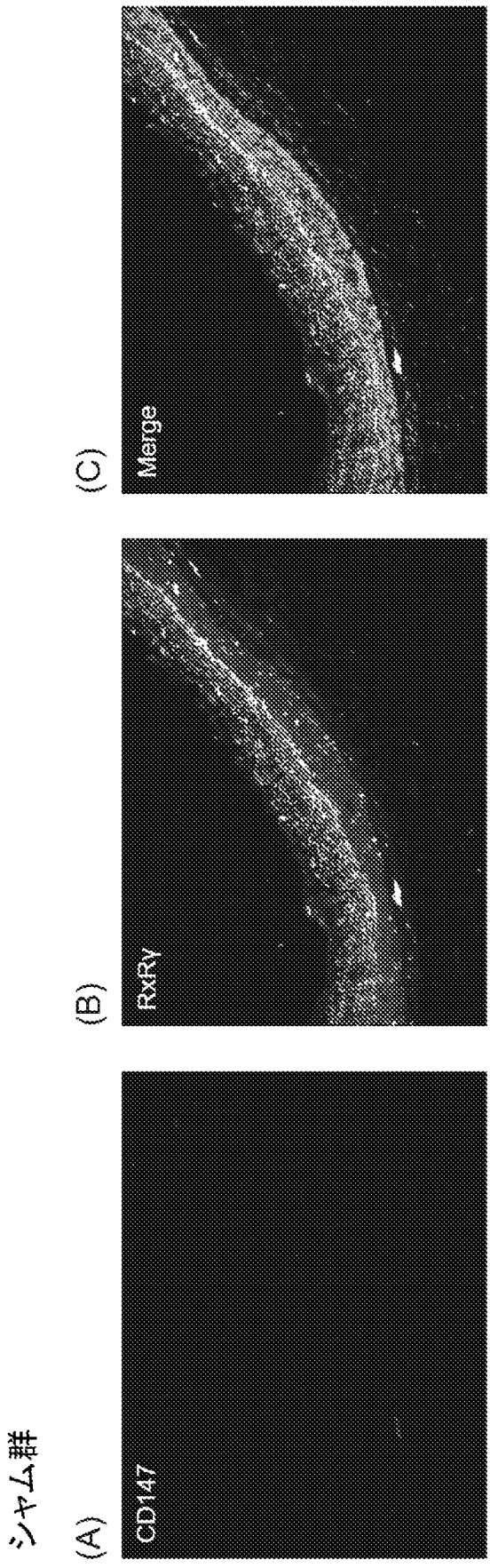
[図28]



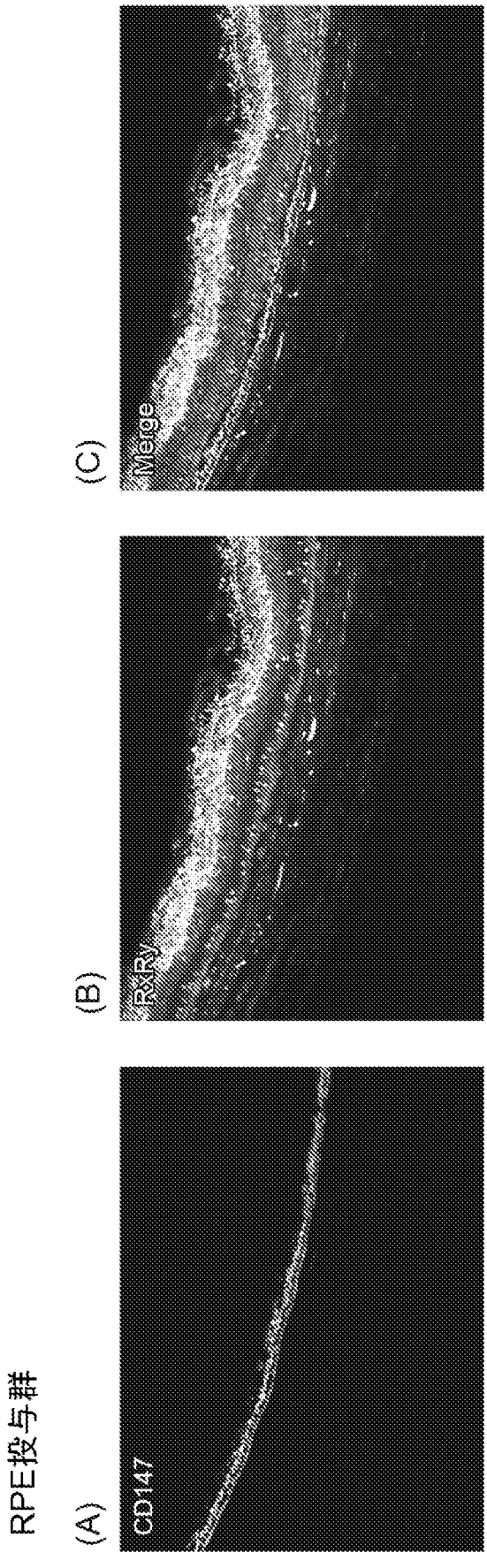
[図29]



[図30]



[図31]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2024/004888

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 35/30(2015.01)i; ***A61K 31/436***(2006.01)i; ***A61K 31/573***(2006.01)i; ***A61K 38/08***(2019.01)i; ***A61P 27/02***(2006.01)i
FI: A61K35/30; A61K31/436; A61K31/573; A61K38/08; A61P27/02

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)

A61K35/30; A61K31/436; A61K31/573; A61K38/08; A61P27/02

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

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ALGVERE, P. V. et al. Long-term outcome of RPE allografts in non-immunosuppressed patiets with AMD. European Joural of Ophthalmology. 1999, vol. 9, issue 3, pp. 217-230 in particular, abstract, p. 218, right column, fourth paragraph, p. 224, left column, fifth paragraph, table 1	1, 3-6, 8-14
Y		2, 7
X	SUGITA, Sunao et al. HLA-matched allogenic iPS cells-derived RPE transplantation for macular degeneration. J. Clin. Med. 2020, vol. 9, 2217, pp. 1-18 in particular, abstract, p. 4, last paragraph	1, 3-6, 8-14
Y		2, 7
A	CASALINO, Giuseppe et al. Spontaneous retinal pigment epithelial tear in type 2 choroidal neovascularization: repair mechanisms following anti-VEGF therapy. Int J Retin Vitr. 2019, vol. 5, no. 4, pp. 1-4 abstract	1-14

☑ 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
"D" document cited by the applicant in the international application
"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	Date of mailing of the international search report
08 April 2024	**23 April 2024**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2022-040140 A (ASTELLAS INST FOR REGENERATIVE MEDICINE) 10 March 2022 (2022-03-10) claims 1, 13, 23-25, 28-29, examples 1, 7, 12, paragraphs [0018], [0076]-[0079]	2
Y	硝子体手術よくある質問＃１５, 医療法人社団ベタニア会　宮の前眼科ホームページ [online], 2018, [retrieved on 05 April 2024], Internet: <URL:https://www.eye-itami.jp/index/blog-detail?id=377>, non-official translation (FAQ of Vitreous surgery #15. Medical Corporation Bethany Association: Miyanomae Ophthalmology Clinic Website.) in particular, section "FAQ of Vitreous surgery #15: Purpose of fluid-air exchange"	7
P, A	WO 2023/176906 A1 (SUMITOMO PHARMA CO., LTD.) 21 September 2023 (2023-09-21) in particular, claims, examples	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/004888

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2022-040140 A	10 March 2022	US 2019/0030168 A1 claims 1, 23-24, 29, examples 1, 7, 12, paragraphs [0016], [0020], [0079]-[0082] WO 2017/031312 A1 EP 3334415 A1	
WO 2023/176906 A1	21 September 2023	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2024/004888

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K 35/30(2015.01)i; A61K 31/436(2006.01)i; A61K 31/573(2006.01)i; A61K 38/08(2019.01)i; A61P 27/02(2006.01)i
FI: A61K35/30; A61K31/436; A61K31/573; A61K38/08; A61P27/02

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

A61K35/30; A61K31/436; A61K31/573; A61K38/08; A61P27/02

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	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２４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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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	ALGVERE, P. V. et al ., Long-term outcome of RPE allografts in non-immunosuppressed patiets with AMD, European Joural of Ophthalmology, 1999, Vol. 9, Issue 3, pp. 217-230 特に、Abstract、第２１８頁右欄第４段落、第２２４頁左欄第５段落、Table 1	１，３－６，８－１４
Y		２，７
X	SUGITA, Sunao et al., HLA-matched allogenic iPS cells-derived RPE transplantation for macular degeneration, J. Clin. Med., 2020, Vol. 9, 2217, pp. 1-18 特に、Abstract、第４頁最終段落	１，３－６，８－１４
Y		２，７
A	CASALINO, Giuseppe et al., Spontaneous retinal pigment epithelial tear in type 2 choroidal neovascularization : repair mechanisms following anti-VEGF therapy, Int J Retin Vitr, 2019, Vol. 5, No. 4, pp. 1-4 Abstract	１－１４

☑ 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
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
08.04.2024	23.04.2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）

菊池　美香 4U 3954

電話番号 03-3581-1101 内線 3439

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
Y	JP 2022-040140 A (アステラス インスティテュート フォー リジェネレイティブ メディシン) 10.03.2022 (2022-03-10) 請求項１、１３、２３－２５、２８－２９、例１、７、１２、段落００１８、００７６－００７９	2
Y	硝子体手術よくある質問＃１５，医療法人社団ベタニア会　宮の前眼科ホームページ [オンライン]，2018，[検索日2024.4.5] インターネット: <URL:https://www.eye-itami.jp/index/blog-detail?id=377> 特に、「硝子体手術よくある質問＃１５　液空気置換の目的」の項	7
P, A	WO 2023/176906 A1 (住友ファーマ株式会社) 21.09.2023 (2023-09-21) 特に、特許請求の範囲、実施例	１－１４

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/004888

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2022-040140 A	10.03.2022	US 2019/0030168 A1 Claims 1, 23-24, 29, Examples 1, 7, 12, [0016],[0020], [0079]-[0082] WO 2017/031312 A1 EP 3334415 A1	
WO 2023/176906 A1	21.09.2023	（ファミリーなし）	