

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6518878号
(P6518878)

(45) 発行日 令和1年5月29日 (2019.5.29)

(24) 登録日 令和1年5月10日 (2019.5.10)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 5/071 (2010.01)

C 1 2 N 5/071

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10 Z N A

C 1 2 N 5/0735 (2010.01)

C 1 2 N 5/0735

請求項の数 3 (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2015-541641 (P2015-541641)
 (86) (22) 出願日 平成26年10月9日 (2014.10.9)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2014/077111
 (87) 国際公開番号 W02015/053375
 (87) 国際公開日 平成27年4月16日 (2015.4.16)
 審査請求日 平成29年9月20日 (2017.9.20)
 (31) 優先権主張番号 特願2013-212345 (P2013-212345)
 (32) 優先日 平成25年10月9日 (2013.10.9)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(73) 特許権者 513229509
 株式会社ヘリオス
 東京都港区浜松町2丁目4番1号
 (73) 特許権者 503359821
 国立研究開発法人理化学研究所
 埼玉県和光市広沢2番1号
 (73) 特許権者 504176911
 国立大学法人大阪大学
 大阪府吹田市山田丘1番1号
 (74) 代理人 100080791
 弁理士 高島 一
 (74) 代理人 100125070
 弁理士 土井 京子
 (74) 代理人 100136629
 弁理士 鎌田 光宜

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 網膜色素上皮細胞の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ラミニン 5 1 1 E 8 フラグメントがコーティングされた培養基材上でヒト多能性幹細胞を接着培養する工程を含む、網膜色素上皮細胞の製造方法であって、接着培養する工程が、分化誘導因子の存在下で行われる、方法。

【請求項 2】

ヒト多能性幹細胞が、ヒト i P S 細胞である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

ラミニン 5 1 1 E 8 フラグメントがコーティングされた培養基材上で網膜色素上皮細胞を接着培養する工程を含む、網膜色素上皮細胞の増幅方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト多能性幹細胞から網膜色素上皮 (R P E) 細胞を効率よく製造する方法及び網膜色素上皮細胞を安定に培養する方法等に関する。

【背景技術】

【0002】

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、SFEB法と称される無血清培地でES細胞を浮遊凝集体として培養する方法 (特許文献1等)、および分化誘導因子の存在下、弱細胞接着性のコーティング剤でコーティングされた培養基材上で多能性幹細胞を

分化誘導する方法等が知られている（非特許文献 1 など）。しかしこれらの方法では、分化誘導効率が低いため、網膜色素上皮細胞の高濃度細胞集団を得るために、接着培養と浮遊培養を組み合わせる複数の工程が必要であることや、さらに色素細胞のコロニーを光学顕微鏡下で選択的にピックアップするといった、作業負担も時間もかかる純化工程を要するという問題があった。加えてこれらの方法では、継代培養途中に細胞損失が生じやすいという問題があった。このため、高純度の網膜色素上皮細胞を簡易な方法で安定して取得できる方法が求められていた。

【 0 0 0 3 】

ヒト多能性幹細胞の維持培養に際し、フィーダー細胞に代えて細胞外マトリクスを用いる方法が広く用いられている。なかでもラミニンが好適に用いられつつあり、例えば非特許文献 2 には、ラミニン 5 1 1 上でヒト E S 細胞を長期間維持培養できたという報告がなされている。さらに細胞接着活性を向上させたラミニン改変体として知られている E 8 フラグメントについて、例えば、特許文献 2 や非特許文献 3 には、ヒトラミニン $\alpha 5 \beta 1 \gamma 1$ の E 8 フラグメント（ラミニン 5 1 1 E 8、以下同様に表記）及びヒトラミニン 3 2 2 E 8 を使用したヒト多能性幹細胞の培養方法が開示されている。非特許文献 4 には、ラミニン 5 1 1 E 8 が全長ラミニン 5 1 1 と同程度の $\alpha 6 \beta 1$ インテグリンに対する結合活性を保持していることが記載されており、また特許文献 2 には、このラミニン 5 1 1 E 8 を用いることで多能性幹細胞を培養皿上に安定に固定し、その結果該細胞の分化多能性を保持した状態で維持培養することができることが記載されている。しかし、このようなラミニンの E 8 フラグメントを、多能性幹細胞の培養以外、たとえば多能性幹細胞の分化誘導等に利用することの報告はない。

【 0 0 0 4 】

一方、ヒト多能性幹細胞をフィーダー細胞の非存在下で網膜色素上皮細胞に分化誘導する方法として、ラミニンを用いた方法が知られている。例えば非特許文献 5 には、ラミニン 1 1 1 およびマトリゲル上で多能性幹細胞を接着培養することで、網膜色素上皮細胞への分化誘導効率が著しく上昇したことが記載されている。しかしながら、未だラミニンの E 8 フラグメントを多能性幹細胞の網膜色素上皮細胞への分化誘導のために用いたという報告はない。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 5 】

【 特許文献 1 】 国際公開第 2 0 0 5 / 1 2 3 9 0 2 号

【 特許文献 2 】 国際公開第 2 0 1 1 / 0 4 3 4 0 5 号

【 非特許文献 】

【 0 0 0 6 】

【 非特許文献 1 】 PLoS One. 2012; 7(5): e37342.

【 非特許文献 2 】 Nature Biotech. June 2010; 28(6): 611-5

【 非特許文献 3 】 Nat. Commun. 3:1236 doi: 10.1038/ncomms2231

【 非特許文献 4 】 J Biol Chem. 284:7820-7831, 2009

【 非特許文献 5 】 J. Tissue Eng Regen Med 2013; 7: 642-653

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 7 】

本発明の目的は、多能性幹細胞からの網膜色素上皮細胞への分化誘導効率が改善され、簡易な操作で高い純度の網膜色素上皮細胞を短期間で得ることができる網膜色素上皮細胞の製造方法、細胞を安定に増殖培養できる網膜色素上皮細胞の培養法、及び移植治療に有用な網膜色素上皮細胞を用いた毒性・薬効評価法並びに網膜疾患治療薬を提供することにある。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 8 】

本発明者らは上記目的を達成するために鋭意検討した結果、ヒト多能性幹細胞をラミニン E 8 でコーティングした培養基材上で培養すると、播種した多能性幹細胞が培養基材へ速やかに接着し、早い段階から多量の色素細胞の生成が認められ、網膜色素上皮細胞の収量を著しく向上でき、しかも、培地交換時に細胞を失いにくく、純化工程を簡略化でき且つ短期間で高い純度の細胞集団が得られることを見出した。これにより、多能性幹細胞を網膜色素上皮細胞へ分化誘導する上での課題であった操作性及び経済性が著しく改善され、目的の網膜色素上皮細胞を安定に効率よく製造できることを見出し、本発明を完成させた。

【 0 0 0 9 】

即ち、本発明は以下に関する。

[1] ラミニン E 8 フラグメントがコーティングされた培養基材上でヒト多能性幹細胞を接着培養する工程を含む、網膜色素上皮細胞の製造方法。

[2] ラミニン E 8 フラグメントが、ラミニン 5 1 1 E 8 フラグメントである、[1] の方法。

[3] 接着培養する工程が、分化誘導因子の存在下で行われる、[1] または [2] の方法。

[4] ヒト多能性幹細胞が、ヒト i P S 細胞である、[1] ~ [3] のいずれかの方法。

[5] ラミニン E 8 フラグメントがコーティングされた培養基材上でヒト多能性幹細胞を接着培養することによって製造される、網膜色素上皮細胞。

[6] ラミニン E 8 フラグメントがコーティングされた培養基材上でヒト多能性幹細胞を接着培養することによって製造される、網膜色素上皮細胞シート。

[7] ラミニン E 8 フラグメントがコーティングされた培養基材上で網膜色素上皮細胞を接着培養する工程を含む、網膜色素上皮細胞の増幅方法。

[8] ラミニン E 8 フラグメントがコーティングされた培養基材上で網膜色素上皮細胞を接着培養する工程を含む、網膜色素上皮細胞の純化方法。

[9] [1] ~ [4] のいずれかの方法により製造される網膜色素上皮細胞、又は [7] の方法により培養される網膜色素上皮細胞を含む、網膜疾患治療薬。

【 発明の効果 】

【 0 0 1 0 】

本発明によれば、多能性幹細胞から網膜色素上皮細胞を高い収率で製造できる。また、分化誘導効率が改善され、網膜色素上皮細胞を高濃度で含む細胞集団を得ることができ、簡易な純化操作で高純度の網膜色素上皮細胞を製造できる。さらに、本発明によれば、網膜色素上皮細胞を安定に接着できるため、培地交換途中に細胞が損失しにくく、安定に継代培養することができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 1 】

【 図 1 】 ラミニン E 8 の構造の模式図を示す。

【 図 2 】 ヒト iPS 細胞 (201B7) から誘導した RPE 細胞における RPE 関連遺伝子の発現を示す。

【 図 3 】 比較例 3 における、ラミニン 5 1 1 - E 8、マトリゲルまたはラミニン 5 1 1 全長でコーティングした基材に iPS 細胞を播種し、分化誘導を開始してから 1 日目、2 日目および 3 日目の細胞接着の様子を示す。

【 図 4 】 比較例 3 における、ラミニン 5 1 1 - E 8、マトリゲルまたはラミニン 5 1 1 全長でコーティングした基材に iPS 細胞を播種し、分化誘導を開始してから 1 5 日目および 4 0 日目頃の細胞集団の様子を示す。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 2 】

1. 網膜色素上皮細胞の製造方法

本発明は、ラミニン E 8 フラグメントがコーティングされた培養基材を用いてヒト多能性幹細胞を接着培養する工程を含む網膜色素上皮細胞の製造方法である (以下、「本発明

10

20

30

40

50

の製造方法」という)。

【0013】

本発明における「多能性幹細胞」とは、自己複製能と分化多能性を有する幹細胞を意味し、特に限定されることはなく、例えば、胚性幹細胞(ES細胞)、人工多能性幹細胞(iPS細胞)等が広く利用される。好ましくはヒトES細胞またはヒトiPS細胞が利用され、より好ましくはヒトiPS細胞が利用される。

【0014】

本発明における「iPS細胞」とは、体細胞(例えば線維芽細胞、皮膚細胞、リンパ球等)へ核初期化因子を接触させることにより、人為的に自己複製能及び分化多能性を獲得した細胞をいう。本発明におけるiPS細胞の製造法は、特に限定されるものではない。

10

【0015】

本発明における「網膜色素上皮細胞」とは、網膜色素上皮を構成する上皮細胞、及びその前駆細胞をいう。網膜色素上皮細胞であるかは、例えば、細胞マーカー(RPE65、CRALBP、MERTK、BEST1等)の発現や、細胞の形態(細胞内のメラニン色素沈着、多角形で扁平状の細胞形態、多角形のアクチン束の形成等)等により確認できる。また、網膜色素上皮細胞の前駆細胞とは、網膜細胞への分化誘導が方向づけられた細胞を意味し、当該前駆細胞であるかは、細胞マーカー(Mitf、Pax6、Rx、Crx等)の発現等により確認できる。また網膜色素上皮細胞の機能評価は、例えばサイトカイン(VEGFやPEDF等)の分泌能や貪食能等を指標にして確認できる。これらの機能評価および確認操作は、当業者であれば適宜条件を設定して実施することが可能である。

20

【0016】

本発明における「ラミニン」とは、 α 、 β 、 γ 鎖からなるヘテロ三量体分子であり、サブユニット鎖の組成が異なるアイソフォームが存在する細胞外マトリックスタンパク質である。具体的には、ラミニンは、5種の α 鎖、4種の β 鎖および3種の γ 鎖のヘテロ三量体の組合せで約15種類のアイソフォームを有する。 α 鎖($\alpha 1 \sim \alpha 5$)、 β 鎖($\beta 1 \sim \beta 4$)および γ 鎖($\gamma 1 \sim \gamma 3$)のそれぞれの数字を組み合わせ、ラミニンの名称が定められている。例えば $\alpha 1$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖の組合せによるラミニンをラミニン111といい、 $\alpha 5$ 鎖、 $\beta 1$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖の組合せによるラミニンをラミニン511といい、 $\alpha 5$ 鎖、 $\beta 2$ 鎖、 $\gamma 1$ 鎖の組合せによるラミニンをラミニン521という。ラミニンとしては、例えば哺乳動物に由来するラミニンを使用できる。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル、ヒトが挙げられる。ヒトへの移植を目的として網膜色素上皮細胞を製造する場合等には、ヒトラミニンが好ましく用いられる。現段階でヒトラミニンには15種類のアイソフォームが知られている。

30

【0017】

ラミニンE8フラグメントは、そもそもマウスラミニン111をエラスターゼで消化して得られたフラグメントの中で、強い細胞接着活性をもつフラグメントとして同定されたものである(EMBO J., 3:1463-1468, 1984.; J. Cell Biol., 105:589-598, 1987.)。マウスラミニン111以外のラミニンについてもエラスターゼで消化した際にマウスラミニン111のE8フラグメントに相当するフラグメントの存在が推定されるが、マウスラミニン111以外のラミニンをエラスターゼで消化してE8フラグメントを分離・同定したことはこれまで報告されていない。したがって、本発明に用いられるラミニンE8フラグメントは、各ラミニンのエラスターゼ消化産物であることを要するものではなく、対応する各ラミニンと同様の細胞接着活性を有し、エラスターゼで消化したE8フラグメントと対応する構造を有するラミニンのフラグメントであれば組換え体であってもよい。すなわち本発明における「ラミニンE8フラグメント(以下、「ラミニンE8」と記載する場合もある)」とは、 α 鎖、 β 鎖、 γ 鎖の各C末端領域でヘテロ三量体を構成し、インテグリンに対する結合活性を保持すると共に、細胞接着活性を保持している分子をいう。ラミニンE8は、ラミニンアイソフォームごとに異なるインテグリン結合特異性を示し、対応するインテグリンを発現する細胞へ強い接着活性を発揮することができる。

40

50

【 0 0 1 8 】

本発明におけるラミニン E 8 とは、具体的に説明すると、

(1) 機能上、全長ラミニンと少なくとも同等の細胞接着活性を有し、かつ少なくとも同等のインテグリン結合活性を有し、かつ

(2) 構造上、マウスラミニン E 8 に対応する構造を有する、具体的にはラミニン三量体のコイルドコイル C 末端領域から G ドメインの 1 ~ 3 番目に対応する構造を有するラミニンフラグメントをいう。以下、(1) 機能面および(2) 構造面からさらに詳細に説明する。

【 0 0 1 9 】

(1) ラミニン E 8 の機能について

10

本発明におけるラミニン E 8 としては、例えば、ヒト多能性幹細胞及び/又はヒト網膜色素上皮細胞の表面に発現するインテグリンの少なくとも一つに対する結合特異性を示す分子、好ましくはヒト多能性幹細胞及びヒト網膜色素上皮細胞の両細胞の表面に発現するインテグリンと、ヒト網膜色素上皮細胞の表面に発現するインテグリンに結合特異性を示す分子が好ましく用いられる。ヒト多能性幹細胞の表面に発現するインテグリンとしては、 $\alpha 6 \beta 1$ インテグリン等が挙げられ、ヒト網膜色素上皮細胞の表面に発現するインテグリンとしては、例えば $\alpha 6 \beta 1$ インテグリン、 $\alpha 3 \beta 1$ インテグリン、 $\alpha 7 \beta 1$ インテグリン等が挙げられる。

【 0 0 2 0 】

本発明におけるラミニン E 8 は、各ラミニンと少なくとも同等のインテグリンに対する結合特異性を示す。また、特にインテグリンに対する親和性が強いものが好ましく用いられる。「インテグリンに対する親和性が強いラミニン E 8」とは、公知の方法で測定された解離定数が有意に低いものであって、例えば、The Journal of Biological Chemistry (2009) 284, pp.7820-7831のTable1に示される方法で測定された解離定数が、例えば10 nM以下である。

20

【 0 0 2 1 】

本発明におけるラミニン E 8 としては、また、細胞接着活性が強いものが好ましく用いられる。「細胞接着活性が強いラミニン E 8」とは、公知の方法で測定された細胞接着性試験において有意に強い接着活性を示すものであって、例えば、The Journal of Biological Chemistry (2007) 282, pp.11144-11154に記載の細胞接着アッセイを行った場合に、ラミニン E 8 のコーティング濃度が10 nM以下で400個/mm²以上の接着細胞数が得られるものである。

30

【 0 0 2 2 】

本発明においては、ラミニン E 8 としては、 $\alpha 6 \beta 1$ インテグリンに対する結合特異性を示し、分化誘導初期の多能性幹細胞を安定に接着させ、分化誘導後期の網膜色素上皮細胞またはその前駆細胞を安定に接着できるものが好ましく用いられる。この観点から、ラミニン E 8 のなかでも、特にラミニン 5 1 1 E 8 は $\alpha 6 \beta 1$ インテグリンに加え、 $\alpha 3 \beta 1$ インテグリン及び $\alpha 7 \beta 1$ インテグリンに対する結合特異性を有するため、網膜色素上皮細胞に対する接着活性を向上させることにより、多能性幹細胞を網膜色素上皮細胞へと分化誘導する効率を向上させることに寄与する点で、あるいは網膜色素上皮細胞の維持培養の安定化に寄与し得る点で、非常に好ましい。

40

【 0 0 2 3 】

(2) ラミニン E 8 の構造について

本発明におけるラミニン E 8 は、前述のとおり、あるいは図 1 に示されるとおり、マウスラミニン 1 1 1 のエラスターゼ消化物における細胞接着活性を有するフラグメント (E 8 フラグメント) に構造上対応するラミニンフラグメントである。すなわち全長ラミニンにおけるドメイン I I (三本鎖コイルドコイルドメイン) の一部を保持 (図 1 の E8 fragment を表す絵ではそのようには記載されていないが、実際はコイルドコイル構造を保持している) し、E 8 の N 末端側では β 鎖の対応するフラグメントおよび γ 鎖の対応するフラグメントとで短いコイルドコイル構造を形成する。また E 8 の C 末端側では、 α 鎖の G 1

50

～ G 3 ドメイン構造が保持されている。また β 鎖と γ 鎖とは、それぞれの C 末端側にあるシステイン残基を介して、ジスルフィド結合を形成することにより、互いに結合している。

【 0 0 2 4 】

本発明におけるラミニン E 8 は、前述の通り、天然ラミニンをエラストーゼ処理して得られる酵素処理体であってもよく、あるいは遺伝子組換えにより産生される組換え体であってもよい。また本発明のラミニン E 8 が組換え体である場合、対応する全長（天然）ラミニンにおけるインテグリンとの結合活性を保持し、その細胞接着性を損なわない範囲で、精製すること等を目的として N 末端にタグが結合していてもよい。そのようなタグとしては特に限定されず、例えば H i s タグ、F l a g タグ、H A タグなどが挙げられる。またタグとラミニン E 8 とのリンカー部分の配列についても、対応する全長（天然）ラミニンにおけるインテグリンとの結合活性を保持し、細胞接着性を損なわない限りにおいて特に限定されない。

10

【 0 0 2 5 】

本発明におけるラミニン E 8 は、対応するラミニンにおけるインテグリンとの結合活性を保持し、その細胞接着性を損なわない範囲で、アミノ酸配列の一部が欠失、付加、又は置換されたものであってもよい。E 8 フラグメントは、一般的には α 鎖 C 末端側の G ドメインを二つ（G 4 および G 5）欠失しているが、本発明におけるラミニン E 8 においては、対応する全長（天然）ラミニンにおけるインテグリンとの結合活性を保持し、その細胞接着性を損なわない範囲で、この G 4、G 5 ドメインの一部または全部が含まれていてもよい。例えばラミニン 5 1 1 E 8 においては、ラミニン 5 1 1 と同等のインテグリン $\alpha 6 \beta 1$ への結合活性を保持し、細胞接着活性が損なわれていなければ G 4、G 5 ドメインの一部または全部が含まれていてもよい。

20

一方で、ラミニン E 8 は全長ラミニンと同様に β 鎖と γ 鎖とがコイルドコイル部分の C 末端側でシステインを介して結合しているが、このシステインはインテグリン結合活性に影響するため、置換、欠失されないことが望ましい。さらに γ 鎖における当該システイン以降の C 末端側アミノ酸もインテグリン結合活性に影響するため、少なくとも欠失されないことが望ましい（J Biol Chem. 2007 Apr 13;282(15):11144-54.）。

【 0 0 2 6 】

このようなラミニン E 8 の具体的な例としては、W O 2 0 1 1 / 0 4 3 4 0 5 の実施例（3）で作製された r h L M 5 1 1 E 8 が挙げられる。当該ラミニン 5 1 1 E 8 は、本発明のラミニン E 8 として好ましく利用することができる。

30

【 0 0 2 7 】

本発明に用いる「培養基材」は、本発明のラミニン E 8 を培養器表面にコーティングすることにより製造できる。ここで培養器表面への「コーティング」とは、ラミニン E 8 と培養器表面との何らかの相互作用を介してラミニン E 8 を培養器表面に吸着させることをいい、本発明の効果を奏するにあたって特にラミニン E 8 の配向性は問題にならない。培養器としては、細胞培養に使用できるものであれば特に限定されず、例えば、ディッシュ（培養皿とも称する）、シャーレやプレート（6 穴、2 4 穴、4 8 穴、9 6 穴、3 8 4 穴、9 6 0 0 穴などのマイクロタイタープレート、マイクロプレート、ディープウェルプレート等）、フラスコ、チャンバースライド、チューブ、セルファクトリー、ローラーボトル、スピナーフラスコ、フォロファイバー、マイクロキャリア、ビーズ等が挙げられる。本発明における培養基材は、ラミニン E 8 による細胞接着特性を損なわない限り、適宜表面処理が施されていてもよい。

40

【 0 0 2 8 】

本発明における「接着培養」とは、目的の細胞がラミニン E 8 を介して培養器の底面に接着し、培養中に培養器を軽く揺らしても細胞が培養液中に浮かんでこない状態における培養を意味する。本発明に用いるラミニン E 8 は、極めて優れた細胞接着性を示すため、細胞播種後、速やかに培養器を振動させるなどの方法で均一に分散させることが好ましい。なお本発明の目的の範囲内であれば、接着培養の前後で、目的の細胞をラミニン E 8 が

50

存在する培養器中で浮遊培養してもよい。

【0029】

培地は、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。基礎培地としては、哺乳動物細胞の培養に一般的に用いられる合成培地を一種又は複数種を組み合わせて利用でき、例えば、DMEM、GMEM等の市販品が入手可能である。

【0030】

血清は、ウシ、ヒトなどの哺乳動物に由来する血清を使用できる。血清代替物とは、細胞培養に用いられるFBS等の血清の代わりとなる低タンパク質代替品であって、市販品として、例えば、Knockout Serum Replacement (KSR)、Chemically-defined Lipid concentrated (Gibco社製)、Glutamax (Gibco社製)などのほか、神経細胞培養用血清代替物であるN2、B27などが入手可能である。本発明においては、目的の細胞の品質管理上の観点から血清代替物が好ましく、特にKSRが好適である。

10

【0031】

血清又は血清代替物の濃度は、例えば0.5～30% (v/v)の範囲から適宜設定でき、濃度は一定でもよく、段階的に変化させて用いても良く、例えば濃度を1～3日程度(好ましくは2日)の間隔で、段階的に低下させて用いてもよい。例えば、血清又は血清代替物の濃度を20%、15%、10%の3段階に分けて添加することができる。

【0032】

培地を構成するその他の成分として、培養液中に分散されたヒト多能性幹細胞の細胞死を抑制する目的で、Y-27632などのRhoキナーゼ阻害剤を用いることができる。Rhoキナーゼ阻害剤の添加期間は、分化誘導工程の一部または全期間いずれであってもよい。例えば、分化誘導工程の後期は、Rhoキナーゼ阻害剤を添加しない培地を用いることで、目的の細胞へ分化しなかった不要な細胞を細胞死により除去することができる。

20

【0033】

培地は、上述以外に、哺乳動物細胞の培養に一般的に使用されるその他の成分を含むことができる。

【0034】

本発明の製造法に用いられるヒト多能性幹細胞の濃度は、多能性幹細胞を均一に播種でき、接着培養可能な濃度であれば特に限定されないが、例えば、10cmディッシュを用いる場合、1ディッシュ当たり $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 細胞、好ましくは $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 細胞、より好ましくは $5 \times 10^5 \sim 9 \times 10^6$ 細胞である。

30

【0035】

本発明の製造方法における接着培養は、分化誘導因子の存在下で行うこともできる。分化誘導因子としては、目的の細胞への分化誘導を促進する因子として公知のものを利用することができる。本発明の製造方法では、網膜色素上皮細胞への分化誘導を行うため、網膜色素上皮細胞への分化誘導因子を用いることが望ましい。網膜色素上皮細胞の分化誘導因子としては、例えば、Nodalシグナル阻害剤、Wntシグナル阻害剤、ソニック・ヘッジホッグシグナル阻害剤、及びActivinシグナル促進剤などが挙げられる。

【0036】

Nodalシグナル阻害剤は、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、低分子化合物等を用いることができる。Nodalシグナル阻害剤としては、例えば、Lefty-A、可溶型Nodal受容体、抗Nodal抗体、Nodal受容体阻害剤等のタンパク質、ペプチド、又は核酸；SB-431542等の低分子化合物等が挙げられ、特に、入手が容易でロット間の差も少ない、SB-431542等の低分子化合物が好適である。

40

【0037】

Wntシグナル阻害剤は、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、低分子化合物等を用いることができる。Wntシグナル阻害剤としては、例えば、Dkk1、Cerberus蛋白、Wnt受容体阻害剤、可溶型Wnt受容体、Wnt抗体、カゼインキナーゼ阻害剤、ドミナントネガティブWnt

50

t 蛋白等のタンパク質、ペプチド、又は核酸；C K I - 7 (N - (2 - アミノエチル) - 5 - クロロ - イソキノリン - 8 - スルホンアミド)、D 4 4 7 6 (4 - { 4 - (2 , 3 - ジヒドロベンゾ [1 , 4] ジオキシン - 6 - イル) - 5 - ピリジン - 2 - イル - 1 H - イミダゾール - 2 - イル } ベンズアミド)、I W R - 1 - e n d o (I W R 1 e)、I W P - 2 等の低分子化合物が挙げられ、特に、入手が容易でロット間の差も少ない低分子化合物が好適である。なかでも、カゼインキナーゼ I を選択的に阻害する活性を有する低分子化合物が好ましく、例えば C K I - 7、D 4 4 7 6 などを利用できる。

【 0 0 3 8 】

A c t i v i n シグナル促進剤としては、例えば、A c t i v i n ファミリーに属する蛋白、A c t i v i n 受容体、A c t i v i n 受容体アゴニストなどが挙げられる。

10

【 0 0 3 9 】

これらの分化誘導因子の濃度は、分化誘導因子の種類に応じて適宜選択できるが、具体的には、N o d a l シグナル阻害剤として S B - 4 3 1 5 4 2 を用いる場合、例えば、0.01 ~ 50 μ M、好ましくは 0.1 ~ 10 μ M、より好ましくは 5 μ M の濃度であり、W n t シグナル阻害剤として C K I - 7 を用いる場合、0.01 ~ 30 μ M、好ましくは 0.1 ~ 30 μ M、より好ましくは 3 μ M の濃度で添加する。

【 0 0 4 0 】

本発明の製造方法においては、好ましくは、分化誘導因子として、N o d a l シグナル阻害剤 (例、S B - 4 3 1 5 4 2) と W n t シグナル阻害剤 (例、C K I - 7) とが組み合わせて用いられる。

20

【 0 0 4 1 】

上述の方法に従った培養により、多能性幹細胞から網膜色素上皮細胞への分化を誘導し、それにより、多能性幹細胞の播種から通常 2 5 ~ 4 5 日目に網膜色素上皮細胞を生じさせることができる。網膜色素上皮細胞が生成したことの確認は、上述した方法に従って行うことができる。網膜色素上皮細胞の生成が確認されたら、培地を網膜色素上皮細胞の維持培地に交換し、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 ~ 1 0 日間更に培養することが好ましい。それにより、さらにははっきりとメラニン色素沈着細胞群や基底膜に接着する多角扁平状の形態を有する細胞群を観察することができる。

【 0 0 4 2 】

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。基礎培地としては、哺乳動物細胞の培養に一般的に用いられる合成培地を一種又は複数種を組み合わせ利用でき、例えば、DMEM、GMEM 等の市販品が入手可能である。

30

血清は、ウシ、ヒト、ブタなどの哺乳動物に由来する血清を使用できる。血清代替物とは、細胞培養に用いられる FBS 等の血清の代わりとなる低タンパク質代替品であって、市販品として、例えば、Knockout Serum Replacement (KSR)、Chemically-defined Lipid concentrated (Gibco 社製)、Glutamax (Gibco 社製) などのほか、神経細胞培養用血清代替物である N 2、B 2 7 などが入手可能である。本発明においては、目的の細胞の品質管理上の観点から血清代替物が好ましく、特に B 2 7 が好適である。

40

その他の成分としては、例えば、L-glutamine、ペニシリンナトリウム、硫酸ストレプトマイシン等が挙げられる。

【 0 0 4 3 】

本発明の製造方法は、さらに、濃縮操作により網膜色素上皮細胞を純化する工程を含んでいてもよい。本発明の製造方法によれば、分化誘導効率が著しく改善されるため、簡易な操作で、高純度の網膜色素上皮細胞を短い製造期間で得ることができる。網膜色素上皮細胞を濃縮する方法としては、一般に細胞を濃縮する方法として公知の方法であれば特に限定されないが、例えば濾過、遠心分離、灌流分離、フローサイトメトリー分離、抗体修

50

篩担体によるトラップ分離などの方法を用いることができ、好ましくはナイロンメッシュを用いた濾過等の方法を利用できる。

【 0 0 4 4 】

本発明の製造方法によれば、細胞接着性に優れたラミニン E 8 を介してヒト多能性幹細胞が培養器に速やかに接着、固定された状態で培養を行うことにより、分化誘導効率が著しく向上し、しかも培地交換中の細胞損失を抑制することができる。したがって、高濃度の網膜色素上皮細胞の細胞集団を大量に得ることができる。さらに、簡易な操作で細胞純化を行うことができ、純化工程にかかる時間を短縮でき、網膜色素上皮細胞を極めて効率よく製造することができる。また本発明の製造方法によれば、網膜色素上皮細胞は互いに接着しシート状構造を採り得る。したがって本発明の製造方法により網膜色素上皮細胞のシートを製造することが可能である。この網膜色素上皮細胞のシートは、3. で後述されるように、網膜疾患を治療する細胞移植治療薬として用いる細胞集団として有用である。

10

【 0 0 4 5 】

2. 網膜色素上皮細胞の増幅方法

本発明はまた、ラミニン E 8 がコーティングされた培養基材を用いて網膜色素上皮細胞を接着培養する工程を含む網膜色素上皮細胞の増幅方法に関する（以下、「本発明の増幅方法」という）。本発明の増幅方法によれば、網膜色素上皮細胞を簡便な方法で容易に増殖させることができる。

【 0 0 4 6 】

本発明の増幅方法における網膜色素上皮細胞としては、例えば哺乳動物に由来する網膜色素上皮細胞を使用できる。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル、ヒトが挙げられる。ヒトへの移植等を目的として網膜色素上皮細胞を製造する場合等には、ヒト網膜色素上皮細胞が好ましく用いられる。

20

【 0 0 4 7 】

本発明の増幅方法における網膜色素上皮細胞は、網膜色素上皮を構成する上皮細胞、及びその前駆細胞をいい、例えば、生体由来の網膜色素上皮細胞；未分化細胞（多能性幹細胞、網膜色素上皮細胞の前駆体等）から分化誘導された網膜色素上皮細胞；分化細胞や網膜色素上皮細胞以外の細胞の前駆体から分化転換された網膜色素上皮細胞等、好ましくは未分化細胞から分化誘導された網膜色素上皮細胞、より好ましくは上記本発明の製造方法で得た、多能性幹細胞から分化誘導された網膜色素上皮細胞である。

30

【 0 0 4 8 】

本発明の増幅方法に用いられる網膜色素上皮細胞の濃度は、網膜色素上皮細胞を均一に接着培養可能な濃度であれば特に限定されないが、例えば、10 cm ディッシュを用いる場合、1 ディッシュ当たり $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^8$ 細胞、好ましくは $2 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ 細胞、より好ましくは $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 細胞である。

【 0 0 4 9 】

本発明の増幅方法におけるラミニン E 8 フラグメントは上記と同様であり、培養基材へのコーティング方法も同様である。したがって、上記本発明の製造方法により得られた網膜色素上皮細胞を同じラミニン E 8 フラグメントがコーティングされた培養器上で培養することにより、得られた網膜色素上皮細胞をそのまま増幅させ、大量に得ることができるのである。さらに本発明の増幅方法によれば、分化誘導した網膜色素上皮細胞のなかに含まれる分化誘導しきれなかった細胞を相対的に減らすことができるため、本発明の増幅方法は、網膜色素上皮細胞の純化方法としても用いることが可能である。

40

【 0 0 5 0 】

本発明の増幅方法において用いるラミニン E 8 としては、特にラミニン 5 1 1 E 8 が $\alpha 6 \beta 1$ インテグリンに加え、 $\alpha 3 \beta 1$ インテグリン及び $\alpha 7 \beta 1$ インテグリンに対する結合特異性を有するため、網膜色素上皮細胞に対する接着活性の向上により、網膜色素上皮細胞の維持培養の安定化、ならびに細胞増殖に寄与しうる点で好ましい。

【 0 0 5 1 】

50

本発明の増幅方法によれば、細胞接着性に優れたラミニン E 8 を介して網膜色素上皮細胞が培養器に速やかに固定され、培地交換時の細胞損失を抑制でき、さらに継代による細胞形態の変形を抑制できるため、安定して網膜色素上皮細胞の維持培養、そして培養増殖を行うことができる。また、本発明の増幅方法によれば、膜状の網膜色素上皮細胞群をそのまま、又は培養基材より分離回収することにより、下記に示す網膜疾患治療薬として利用することもできる。

【 0 0 5 2 】

3 . 網膜色素上皮細胞

本発明の製造方法、あるいは増幅方法によって得られた網膜色素上皮細胞は、ラミニン E 8、特にラミニン 5 1 1 E 8 上で培養することから、細胞単独でも、そしてシートとして培養基材から分離回収することが容易であり、優れた特性を有している。

【 0 0 5 3 】

4 . 網膜疾患治療薬

本発明の製造方法により製造された網膜色素上皮細胞、及び本発明の増幅方法により増幅された網膜色素上皮細胞は、懸濁液やシート形状により生体へ移植して網膜疾患を治療する細胞移植治療薬として用いることができる。網膜疾患とは、網膜に関わる眼科疾患であって、糖尿病など他の疾患による合併症も含まれる。

【 0 0 5 4 】

5 . 毒性・薬効評価薬

本発明の製造方法により製造された網膜色素上皮細胞は、健常および疾患のモデル細胞として網膜系疾患治療薬および・薬効評価糖尿病など他の合併症の疾患治療薬、またその予防薬のスクリーニング、化学物質等の安全性試験、ストレス試験、毒性試験、副作用試験、感染・混入試験に活用が可能である。一方、網膜細胞特有の光毒性、網膜興奮毒性等の毒性研究、毒性試験等に活用することも可能である。その評価方法としては、アポトーシス評価などの刺激・毒性試験のほか、前駆細胞から網膜色素上皮細胞および視細胞への正常分化に及ぼす影響を評価する試験（各種遺伝子マーカーの RT-PCR、サイトカインの ELISA などによる発現タンパク質解析、貪食能試験）、光毒性などの毒性試験、視機能に対する網膜電位や経上皮電気抵抗、自己免疫反応に起因する細胞傷害試験などがある。また、これらの試験の為に細胞材料としては、網膜色素上皮細胞のみならず、その前駆細胞も用いることが可能で、例えば、細胞を播種接着したプレート、細胞懸濁液、そのシートまたは成形体を提供することができる。これは、ヒトおよび動物試験の外挿試験として用いることができる。

【 0 0 5 5 】

本明細書中で挙げられた特許及び特許出願明細書を含む全ての刊行物に記載された内容は、本明細書での引用により、その全てが明示されたと同程度に本明細書に組み込まれるものである。

【 0 0 5 6 】

以下、実施例を示して本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下に示す実施例によって何ら限定されるものではない。

【 実施例 】

【 0 0 5 7 】

実施例 1 iPS 細胞由来 RPE 細胞の製造
試薬

・分化誘導基本培地（GMEM 培地 (Invitrogen)、KSR (Invitrogen)、0.1mM MEM 非必須アミノ酸溶液 (Invitrogen)、1mM ビルビン酸ナトリウム (SIGMA)、0.1M 2-メルカプトエタノール (和光純薬)、100U/ml ペニシリン-100 µg/ml ストレプトマイシン (Invitrogen))

・第1分化誘導培地（KSR を 20% 含む分化誘導基本培地、10 µM Y-27632 (和光純薬)、5 µM SB431542 (SIGMA)、3 µM CKI-7 (SIGMA))

・第2分化誘導培地（KSR を 15% 含む分化誘導基本培地、10 µM Y-27632 (和光純薬)、5 µM SB431542 (SIGMA)、3 µM CKI-7 (SIGMA))

- ・第3分化誘導培地 (KSRを10%含む分化誘導基本培地、10 μ M Y-27632(和光純薬)、5 μ M SB431542(SIGMA)、3 μ M CKI-7(SIGMA))
- ・第4分化誘導培地 (KSRを10%含む分化誘導基本培地)
- ・RPE維持培地 (67% DMEM low glucose (SIGMA), 29% F12 (SIGMA), 1.9mM L-glutamine (Invitrogen), 1.9% B-27 supplement (Invitrogen), 96 U/mL ペニシリンナトリウム, 96 μ g/mL 硫酸ストレプトマイシン)

【0058】

網膜色素上皮細胞の製造 (分化誘導)

ヒト末梢血 (単核球) 由来iPS細胞 (1120C7、京都大学提供) をラミニンコーティング培養皿 (住化ベークライト社製) へ、 9×10^6 cells/9cm dishになるように播種した。ラミニンコーティング培養皿は、9cm培養皿 (BD FALCON) をラミニン511E8フラグメント (W02011043405の実施例 (3) に開示のタンパク質。 (ニッピ社製 (iMatrix-511、NIP-8920-02)) の0.5 μ g/cm²水溶液を用い、37℃で1時間以上コーティングして作成した。iPS細胞は、培養皿上に速やかに接着し、浮遊凝集体の形成は確認されなかった。

上記分化誘導は以下のタイムラインで行い、本明細書中の実施例、比較例における分化誘導は全てこれに従った。培養初日をDay0とし、培養開始後 (Day1) から色素細胞が確認されるDay40ごろまで毎日、全量培地交換を行った。培地は、次に示す通り段階的に組成を変更した。すなわちDay1-4は第1次分化誘導培地 (20% KSR)、Day5-8は第2次分化誘導培地 (15% KSR)、Day9-12は第3次分化誘導培地 (10% KSR)、Day13から色素細胞が確認されるDay40ごろまでは第4次分化誘導培地 (10% KSR) を用いた。

Day40ごろに色素細胞が確認された後は、Day47まで、RPE維持培地を用いて、3日に1回以上、全量培地交換を行った。培養が進むにつれ、細胞の色素が濃くなり、Day47には、多数の濃い色素を有する細胞群が認められた。Day 47に色素細胞を含む細胞集団を回収した。

コーティング剤としてラミニン511E8フラグメントを用いたことにより、播種されたiPS細胞は、培養皿に高密度で速やかに接着し、分化誘導培地による培養期間中も接着状態を安定に維持していた。そのため、全量培地交換を繰り返した際にも細胞の損失を低く抑えることができた。さらに、コラーゲンをコーティングした培養器にiPS細胞を播種したときと比較して、色素細胞が生成される割合が大幅に向上し、分化誘導効率が著しく改善された。

【0059】

実施例2 RPE細胞の製造 (他のiPS細胞)

ヒト末梢血 (単核球) 由来iPS細胞 (1120C7、京都大学提供) に代えて、ヒト皮膚 (繊維芽細胞) 由来iPS細胞 (201B7、京都大学提供) を用いた点以外は実施例1と同様の方法で色素細胞を得た。

その結果、実施例1と同様に、播種したiPS細胞に対して色素細胞が生成される割合が大幅に向上し、分化誘導効率が著しく改善された。

【0060】

実施例3 iPS細胞由来RPE細胞の増幅

実施例1及び実施例2におけるDay47の色素細胞を含む細胞集団が接着培養された培養皿に、0.01% Trypsin-0.53mM EDTAを加えて処理し培養皿から細胞塊を剥離した。次いで穏やかなピペティングにより、細胞間の接着を乖離した。さらに遠心分離により細胞混合物中のタンパク質分解酵素液とその残渣不純物を上清と共に除き、次いで、セルストレーナー (DB Falcon Cell Strainer 40 μ m Nylon) を通して過分離により不要な細胞を分離して、RPE細胞を含む細胞集団を回収した (Day48)。

得られた細胞を、 9×10^6 cells/9cm dishになるように、実施例1に記載のRPE維持培地を用いて、実施例1で用いたのと同じラミニン511E8コーティング培養皿5枚へ播種し、RPE細胞コロニーの接着が確認されるDay50ごろまで静置培養した。

Day51からDay71まで、3日に1回以上3週間、RPE維持培地を用いた全量培地交換を行い、次いで、2度目のフィルター濾過分離に供したのと同じラミニン511E8コーティング培

10

20

30

40

50

養皿各5枚へ播種し、同様に2週間培養したところ、実施例1及び実施例2のいずれの細胞集団からも、網膜色素上皮細胞を10cmディッシュで25枚分の収量にまで増幅した。得られた細胞集団の純度(n=4)は、それぞれ96.4%、100%、98.6%、99.6%であった。

一例として、98.6%純度であったディッシュの純度算出データを示す。

【0061】

【表1】

98.6%純度のRPE細胞の純度算出データ

視野	陽性細胞				陰性細胞	陽性細胞 合計	全細胞数	純度 (%)
	色素 陽性	色素陰性						
		Bestrophin 陽性	Pax6 陽性	Bestrophin、Pax6 両陽性	Bestrophin、Pax6 両陰性			
1	11	0	0	6	0	17	17	98.6
2	176	5	33	30	4	244	248	
3	88	0	0	14	1	102	103	

10

【0062】

純度は、Pax6、Bestrophinの免疫染色を行い、いずれかが染色された場合にはRPE細胞と判定し、また蛍光が見られない細胞については細胞内のメラニン色素の有無を調べ、色素を確認することでRPE細胞と判定した(色素により蛍光観察が阻害されることがあるため、蛍光が見られなくとも色素が存在すればRPE細胞と判定)。そしてそれぞれを陽性細胞に加算する方法により求めた。

20

なお本実施例を異なるライン(201B7)のiPS細胞で行っても、同様の結果が得られた。

【0063】

比較例1

実施例1の分化誘導工程において、ラミニン511E8でコーティングした培養皿(BD FALCON)による接着培養に代えて、MPC(2-Methacryloxyethyl Phosphoryl Choline)処理された非接着性培養皿(Nunc)を用いて浮遊培養を行った点以外は、実施例1と同様の方法で分化誘導工程を行った。

その結果、分化誘導工程における培地交換中にほぼすべての色素細胞が失われ、Day 47には色素細胞を回収できなかった。

【0064】

30

比較例2

実施例1の分化誘導工程において、ラミニン511E8でコーティングされた培養皿に代えて、ポリDリジン及びゼラチンでコーティングした培養皿を用いて接着培養を行った点以外は、実施例1と同様の方法で分化誘導を行った。

ラミニン511E8コーティング培養皿に比べて、ポリDリジン/ゼラチンコート培養皿に対する細胞の接着性は弱く、培地交換中に細胞が失われやすかった。そのため、培養開始後Day47の色素細胞の割合は、培養皿中の全細胞に対する色素細胞数を目視観察したところ、実施例1の1/20以下であり、分化誘導効率も著しく低かった。

【0065】

(評価1) RPE細胞マーカーの発現

40

実施例1～3で得られた色素細胞について、Journal of Cell Science 2009 Sep 1 122 3169-79に記載された方法に従って、以下に示す配列のプライマーを用いてRT-PCR解析を行ったところ、市販のヒトRPE細胞株と同様、RPE細胞特異的遺伝子(RPE65, CRALBP, MERTK, BEST1)の発現がみられ、RPE細胞であることが確認された。

RPE65-F TCC CCA ATA CAA CTG CCA CT (配列番号1)

RPE65-R CCT TGG CAT TCA GAA TCA GG (配列番号2)

CRALBP-F GAG GGT GCA AGA GAA GGA CA (配列番号3)

CRALBP-R TGC AGA AGC CAT TGA TTT GA (配列番号4)

MERTK-F TCC TTG GCC ATC AGA AAA AG (配列番号5)

MERTK-R CAT TTG GGT GGC TGA AGT CT (配列番号6)

50

BEST1-F TAG AAC CAT CAG CGC CGT C (配列番号 7)

BEST1-R TGA GTG TAG TGT GTA TGT TGG (配列番号 8)

【0066】

なお本実施例を異なるライン(201B7)のiPS細胞で行っても、同様の結果が得られた。代表的な例として、RPE65で行った結果を図2に示す。

【0067】

(評価2) サイトカイン分泌能

実施例1～3で得られた色素細胞について、IOVS.2006 47 612-3624に記載の方法に準じて、ELISAでPEDFの産生量を検出した。その結果、成人網膜のRPE細胞と同様にサイトカイン分泌能があることが確認された(表2)。

【0068】

【表2】

PEDF 分泌量

継代後 日数	濃度(ng/mL)				
	実施例 1	実施例 2	実施例 3	平均値	標準誤差
7	945.2	998.8	993.3	979.1	17.0
10	1266.1	1263.1	1288.0	1272.4	7.9
12	1574.3	1567.0	1616.3	1585.8	15.4
14	1542.0	1622.4	1524.3	1562.9	30.2
17	1621.2	1533.5	1482.9	1545.8	40.4
19	1727.7	1752.7	1842.8	1774.4	35.0
21	1504.8	1581.0	1570.6	1552.1	23.8

【0069】

なお本実施例を異なるライン(201B7)のiPS細胞で行っても、同様の結果が得られた。

【0070】

(評価3) 貪食能

実施例1～3で得られた色素細胞について、J Cell Sci. 1993 104 37-49に記載の方法に準じて、FluoSpheres(登録商標)蛍光マイクロスフェア(Invitrogen, F13081)を用いて貪食能を解析したところ、市販のヒトRPE細胞株と同程度の貪食能があることが確認された。なお本実施例を異なるライン(201B7)のiPS細胞で行っても同様の結果が得られた。また異なるライン(201B7)のiPS細胞を用い、The Lancet 2012 379 713-720に記載された方法に準じてpHrod Green E. coli BioParticles(登録商標) Conjugate for Phagocytosis (Molecular Probes, P35366)を用いて貪食能を解析しても、同様の結果が得られた。

【0071】

比較例3

実施例2と同様にヒト皮膚(繊維芽細胞)由来iPS細胞(201B7、京都大学提供)を用い、以下1)～3)のいずれかでコーティングされた培養皿を用いて、実施例1と同様の方法で分化誘導を行った。3つの基材を同時に分化誘導に供する試験を2回行い、基材ごとに別々に追試を一度行った。

1) ラミニン511E8(分子量150,000)(iMatrix511:ニッピ社製NIP-8920-02)を $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ となるようコーティングに供する。

2) ヒト組み換えラミニン511全長(分子量776,000)(販売:ペリタス(製造:BioLamina)/BLA-LN511)を $2.59\mu\text{g}/\text{cm}^2$ となるようコーティングに供する。

3) マトリゲル(BD社製 354230(総タンパク濃度:9-12 mg/ml))(基底膜マトリックス、マウス Engelbreth-Holm-Swarm(EHS)肉腫由来の可溶性基底膜調製品。基底膜の主要な分子、IV型コラーゲン、ニドゲン、パールカン、ラミニン-111を含む)を使用し、4で一晩溶解し、冷やした状態のまま、 $10\text{mL}/57\text{cm}^2$ ($0.175\text{mL}/\text{cm}^2$)となるように培養容器

のコーティングに供する。

分化誘導開始後 1 日目、2 日目、3 日目の細胞接着の様子を図 3 に示す。ラミニン 5 1 1 E 8 コーティングの基材の場合、播種翌日から、ディッシュ全面に万遍なく細胞が接着・増殖し、速やかに分化誘導過程に入った。マトリゲル（ラミニン - 1 1 1）コーティングの基材の場合、細胞の接着にムラがあり、一部はゲル内に浸食し、最後まで全面層にならなかった。ラミニン全長コーティングの基材の場合、接着が弱く播種翌日には細胞が一部コロニー状になっていた。増殖してディッシュ全面に広がるには 4 ～ 5 日を要した。そのため分化誘導過程が不揃いになり結果として分化誘導が進まない部分が認められた。

また、分化誘導開始後 1 5 日目および細胞のろ過分離工程を行う前（4 0 日頃）の細胞集団の様子を図 4 に示す。ラミニン 5 1 1 E 8 コーティングの基材の場合、1 5 日頃、全面に細胞が敷き詰められた上に、厚く重層細胞が積り、メラニン呈色を認めた。4 0 日頃には、細胞が厚く均一に重層しており、基底部の破れや剥がれはなかった。重層の上部にははっきりとしたメラニン含有細胞塊を認めた。マトリゲルコーティングの基材の場合、1 5 日頃、接着細胞の均一層は認められず、細胞はゲル内に巻き込まれていた。4 0 日頃には、明確に基底側に一層の細胞膜が形成されず、メラニン呈色もなかった。ラミニン全長コーティングの基材の場合、1 5 日頃、全面に接着細胞が認められたが、分化誘導が進んでいない部分が多く認められ、他のロットでは接着面層に破れや剥がれが見られたケースもあった。また上部の重層細胞が貧弱であり、メラニン呈色は極めて弱かった。重層していた細胞は 2 0 日頃から徐々に脱落し、4 0 日頃には、基底側の細胞膜の破れが顕著化した。

以上のことから、マトリゲルコーティングの基材の場合、いずれも生育不全および分化誘導不全が認められ、ラミニン全長コーティングの基材の場合、いずれも接着細胞数の減少、重層細胞数の脆弱が顕著化し、メラニン呈色によって示される R P E 細胞の出現効率、その分化誘導速度ともに著しく低く、最終的に得られる R P E 細胞の収率は低かった。よって、本発明のラミニン E 8 フラグメントでコーティングされた培養基材により、網膜色素上皮細胞が極めて効率よく製造できることが明らかになった。

【産業上の利用可能性】

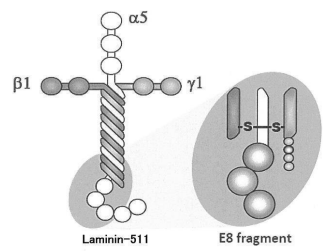
【0 0 7 2】

本発明の製造法によれば、ラミニン E 8 フラグメントでコーティングされた培養基材により、網膜色素上皮細胞を簡易な方法で効率よく製造できる。本発明の製造法は、分化誘導効率に優れ、簡易な操作で網膜色素上皮細胞を純化でき、しかも工程中の細胞損失を抑えて高い収量で網膜色素上皮細胞を産生することができる。本発明の方法で製造された網膜色素上皮細胞は網膜疾患の治療のみならず、健常および疾患モデル細胞としても有用である。

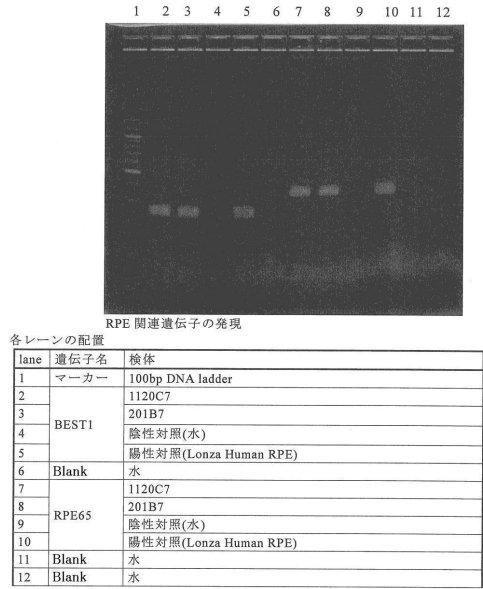
【0 0 7 3】

本出願は日本で出願された特願 2 0 1 3 - 2 1 2 3 4 5（出願日：2 0 1 3 年 1 0 月 9 日）を基礎としており、その内容は本明細書に全て包含されるものである。

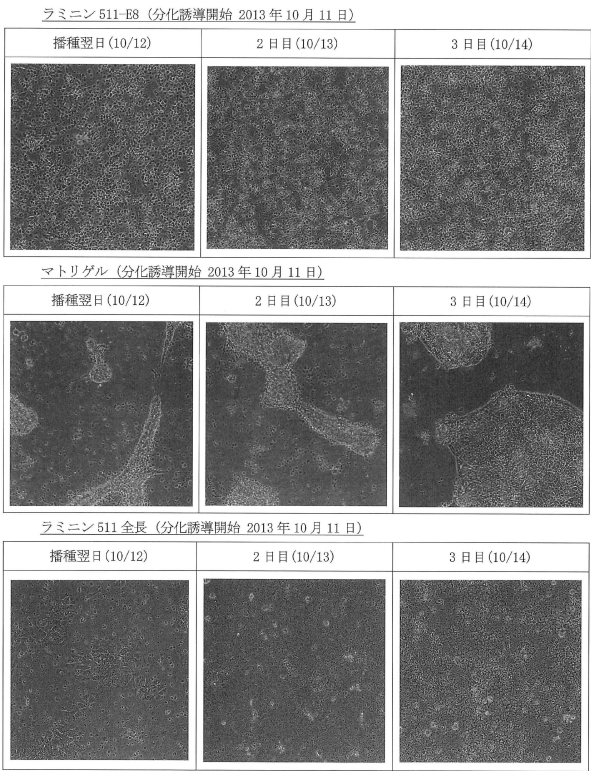
【図 1】



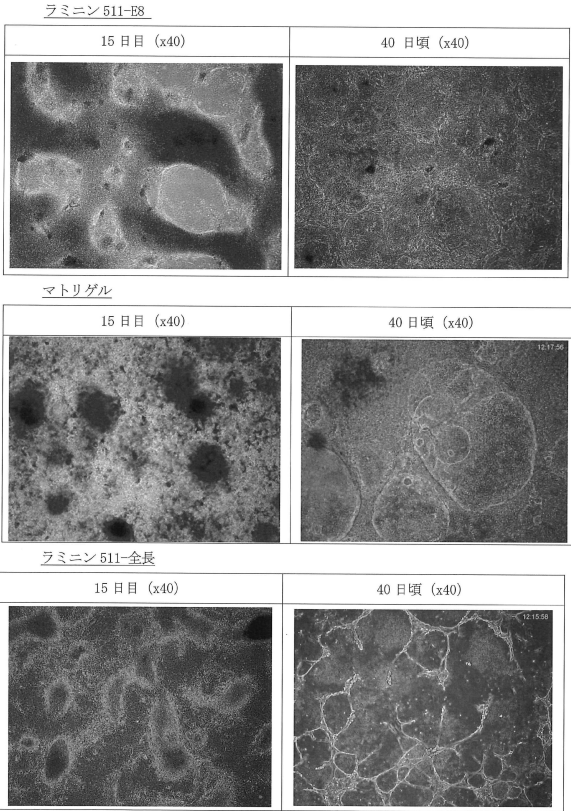
【図 2】



【図 3】



【図 4】



【配列表】

0006518878000001.app

フロントページの続き

- (74)代理人 100121212
弁理士 田村 弥栄子
- (74)代理人 100117743
弁理士 村田 美由紀
- (74)代理人 100163658
弁理士 小池 順造
- (74)代理人 100174296
弁理士 當麻 博文
- (72)発明者 澤田 昌典
東京都港区浜松町 2 丁目 4 番 1 号 株式会社ヘリオス内
- (72)発明者 高橋 政代
埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内
- (72)発明者 関口 清俊
大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内

審査官 鳥居 敬司

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 8 / 1 2 9 5 5 4 (WO , A 1)
国際公開第 2 0 1 2 / 1 1 5 2 4 4 (WO , A 1)
米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 1 9 6 3 6 9 (US , A 1)
国際公開第 2 0 1 1 / 0 4 3 4 0 5 (WO , A 1)
PENG Shaomin, et al., "Tight Junctions of RPE Derived from Human Embryonic Stem Cells"
, Visionary genomics, 2011, poster 2237/A403
Plos One, 2013.01, Vol.8, No.1, e54552
Plos One, 2012, Vol.7, No.5, e37342
臨床評価, 2013.07, Vol.41, No.1, pp.124-127
Nature Communications, 2012, 3:1236

- (58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)
C 1 2 N 5 / 0 0 - 5 / 2 8
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
W P I D S / W P I X (S T N)