

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2017-522016

(P2017-522016A)

(43) 公表日 平成29年8月10日 (2017. 8. 10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 5/10 (2006. 01)	C 1 2 N 5/10 Z N A	2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
A 6 1 K 35/30 (2015. 01)	A 6 1 K 35/30	4 B 0 6 5
A 6 1 K 35/36 (2015. 01)	A 6 1 K 35/36	4 C 0 8 4
A 6 1 P 27/02 (2006. 01)	A 6 1 P 27/02	4 C 0 8 7
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 90 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2016-575401 (P2016-575401)
 (86) (22) 出願日 平成27年6月29日 (2015. 6. 29)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年2月15日 (2017. 2. 15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/038384
 (87) 国際公開番号 W02015/200920
 (87) 国際公開日 平成27年12月30日 (2015. 12. 30)
 (31) 優先権主張番号 62/018, 396
 (32) 優先日 平成26年6月27日 (2014. 6. 27)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506115514
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
 ティ オブ カリフォルニア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94
 607 オークランド フランクリン ス
 トリート 1111 トウエルフス フロ
 ア
 (74) 代理人 100091096
 弁理士 平木 祐輔
 (74) 代理人 100118773
 弁理士 藤田 節
 (74) 代理人 100122389
 弁理士 新井 栄一
 (74) 代理人 100111741
 弁理士 田中 夏夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 培養哺乳動物輪部幹細胞、その産生方法及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、染色体に組み込まれた、あるいは組み込まれていない染色体外遺伝物質のままのPAX6をコードする、化学合成、組換え、又は単離核酸を含む、単離された輪部幹若しくは前駆細胞(LSC)集団又はLSC様集団であって、単離されたLSC集団は非LSC細胞を実質的に含まず、又はLSC様集団は非LSC様細胞を実質的に含まず、又は単離されたLSC又はLSC様集団は、非LSC細胞及び非LSC様細胞を実質的に含まない、LSC集団又はLSC様集団、及びそれらの使用を提供する。

【選択図】 図9 e

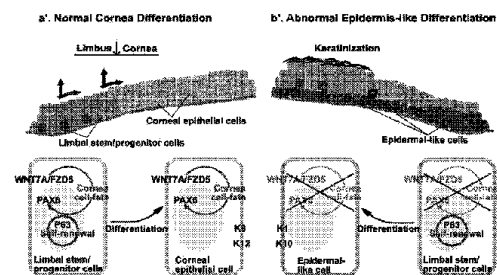


Figure 9c

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

染色体に組み込まれた、あるいは組み込まれていない染色体外遺伝物質のままのPAX6をコードする、化学合成、組換え、又は単離核酸を含む、単離された輪部幹若しくは前駆細胞(LSC)集団又はLSC様集団であって、単離されたLSC集団は非LSC細胞を実質的に含まず、又はLSC様集団は非LSC様細胞を実質的に含まず、又は単離されたLSC又はLSC様集団は非LSC細胞及び非LSC様細胞を実質的に含まない、単離されたLSC集団又はLSC様集団。

【請求項 2】

化学合成、組換え、又は単離核酸が、PAX6又はその断片を発現することができ、PAX6又はその断片が、LSC又はLSC様状態を維持することができ、又は幹細胞又は前駆細胞をLSC又はLSC様状態へと方向づけることができ、LSC又はLSC様状態が、結果として角膜上皮細胞(CEC)に至る分化経路に細胞集団を制限する、請求項1に記載の単離されたLSC集団又はLSC様集団。

10

【請求項 3】

化学合成、組換え、又は単離核酸が、PAX6又はその断片を発現し、PAX6又はその断片が、LSC又はLSC様状態を維持し、又は幹細胞又は前駆細胞をLSC又はLSC様状態へと方向づけ、LSC又はLSC様状態が、結果として角膜上皮細胞に至る分化経路に細胞集団を制限する、請求項2に記載の単離されたLSC集団又はLSC様集団。

【請求項 4】

染色体に組み込まれた、あるいは組み込まれていない染色体外遺伝物質のままのPAX6をコードする、化学合成、組換え、又は単離核酸を含む、単離された皮膚上皮幹細胞(SESC)集団又はSESC様集団であって、単離されたSESC集団は非SESC細胞を実質的に含まず、又はSESC様集団は非SESC様細胞を実質的に含まず、又は単離されたSESC又はSESC様集団は非SESC細胞及び非SESC様細胞を実質的に含まず、又は単離されたSESC又はSESC様集団は非SESC、非SESC様、非LSC及び非LSC様細胞を実質的に含まない、単離されたSESC集団又はSESC様集団。

20

【請求項 5】

化学合成、組換え、又は単離核酸が、PAX6又はその断片を発現することができ、PAX6又はその断片が、LSC又はLSC様状態を維持することができ、又は幹細胞又は前駆細胞をLSC又はLSC様状態へと方向づけることができ、LSC又はLSC様状態が、結果として角膜上皮細胞に至る分化経路に細胞集団を制限する、請求項4に記載の単離されたSESC集団又はSESC様集団。

30

【請求項 6】

化学合成、組換え、又は単離核酸が、PAX6又はその断片を発現し、PAX6又はその断片が、SESC又はSESC様細胞をLSC又はLSC様状態へと方向づけ、LSC又はLSC様状態が、結果として角膜上皮細胞に至る分化経路に細胞集団を制限する、請求項5に記載の単離されたSESC集団又はSESC様集団。

【請求項 7】

請求項1に記載のLSC集団又はLSC様集団及び適する担体を含む、医薬組成物。

【請求項 8】

請求項4に記載のSESC集団又はSESC様集団及び適する担体を含む、医薬組成物。

40

【請求項 9】

CECに分化することなく少なくとも17継代にわたって培養することができる、請求項1に記載のLSC集団又はLSC様集団。

【請求項 10】

第3継代でのPAX6及びp63を発現する細胞の割合が、第17継代での割合と同じである、請求項1に記載のLSC集団又はLSC様集団。

【請求項 11】

第3継代でKi19及びKi67を発現する細胞の割合が、第17継代以降での割合よりわずかに大きい、請求項1に記載のLSC集団又はLSC様集団。

50

【請求項 1 2】

CECに分化することなく40～60世代にわたって安定的に繁殖できる細胞を含む、請求項1に記載のLSC集団又はLSC様集団。

【請求項 1 3】

角膜上皮細胞集団に分化する、請求項1に記載のLSC集団又はLSC様集団。

【請求項 1 4】

皮膚表皮細胞又は角膜上皮細胞に分化することなく少なくとも17継代にわたって培養することができる、請求項4に記載のSESC集団又はSESC様集団。

【請求項 1 5】

皮膚表皮細胞又は角膜上皮細胞に分化することなく40～60世代にわたって安定的に繁殖できる細胞を含む、請求項4に記載のSESC集団又はSESC様集団。 10

【請求項 1 6】

細胞運命がLSC又はLSC様細胞運命に切り替えられたSESC又はSESC様細胞を含む、請求項4に記載のSESC集団又はSESC様集団。

【請求項 1 7】

LSC又はLSC様細胞運命を採用したSESC集団又はSESC様集団であって、SESC又はSESC様細胞運命が存在しない、請求項16に記載のSESC集団又はSESC様集団。

【請求項 1 8】

角膜上皮細胞に分化する、請求項4、16又は17に記載のSESC集団又はSESC様集団。

【請求項 1 9】

実質的に皮膚表皮細胞を含まない、角膜上皮細胞に分化する、請求項18に記載のSESC集団又はSESC様集団。 20

【請求項 2 0】

LSC集団又はLSC様集団の90～95%が、p63、PAX6、K19及びKi67を発現する、請求項1に記載のLSC集団又はLSC様集団。

【請求項 2 1】

LSC集団の5%未満が、K5及びK14を発現する、請求項1に記載のLSC集団又はLSC様集団。

【請求項 2 2】

LSC集団の95%より多くが、WNT7A及びFZD5を発現する、請求項1に記載のLSC集団。

【請求項 2 3】

LSC様集団の5%未満が、WNT7Aを発現する、請求項1に記載のLSC様集団。 30

【請求項 2 4】

細胞集団の90～95%が、SESC又はSESC様細胞運命のままで、p63、K5及びKi67を発現する、請求項4に記載のSESC集団又はSESC様集団。

【請求項 2 5】

K3又はK12発現が、SESC又はSESC様細胞運命のままである細胞では検出されない、請求項4に記載のSESC集団又はSESC様集団。

【請求項 2 6】

WNT7Aが、SESC又はSESC様細胞運命のままである細胞において、LSC細胞におけるレベルより約4倍～5倍低いレベルで発現される、請求項4に記載のSESC集団。 40

【請求項 2 7】

PAX6が、SESC又はSESC様細胞運命のままである細胞において発現されないか、又はLSC細胞におけるレベルの約8分の1未満のレベルで発現される、請求項4に記載のSESC集団又はSESC様集団。

【請求項 2 8】

WNT7Aが、SESC様運命のままである細胞の70%より多くで発現される、請求項4に記載のSESC様集団。

【請求項 2 9】

LSC又はLSC様細胞運命に切り替えられた集団内の細胞の90～95%が、p63、PAX6、K19及びKi67を発現する、請求項16に記載のSESC集団又はSESC様集団。 50

【請求項 3 0】

角膜上皮細胞がPAX6並びに角膜上皮マーカー、K3及びK12を発現する、請求項2又は18に記載のLSC集団又はLSC様集団。

【請求項 3 1】

皮膚表皮細胞が、皮膚表皮分化マーカー、K1及びK10を発現する、請求項19に記載のSESC集団又はSESC様集団。

【請求項 3 2】

ヒトである、請求項1に記載のLSC集団又はLSC様集団。

【請求項 3 3】

ヒトである、請求項4に記載のSESC集団又はSESC様集団。

10

【請求項 3 4】

遺伝子改変されている、請求項1に記載のLSC集団又はLSC様集団。

【請求項 3 5】

遺伝子改変されている、請求項4に記載のSESC集団又はSESC様集団。

【請求項 3 6】

LSC又はLSC様細胞運命のままであるか、又はLSC又はLSC様細胞運命を維持する、請求項1に記載のLSC集団又はLSC様集団。

【請求項 3 7】

SESC又はSESC様細胞運命からLSC又はLSC様細胞運命に切り替えられる、請求項4に記載のSESC集団又はSESC様集団。

20

【請求項 3 8】

複数の請求項1又は4に記載の細胞を含む被定義細胞集団。

【請求項 3 9】

均一である、請求項38に記載の被定義細胞集団。

【請求項 4 0】

不均一である、請求項38に記載の被定義細胞集団。

【請求項 4 1】

クローン性であるか、又は単一細胞に由来する、請求項38に記載の被定義細胞集団。

【請求項 4 2】

角膜上皮細胞に発達するように決定された、請求項38に記載の幹細胞の子孫細胞。

30

【請求項 4 3】

請求項38に記載の細胞を含む組織。

【請求項 4 4】

対象において組織を形成する方法であって、対象中又は対象上に、請求項42に記載の子孫細胞を、前記対象の角膜上皮細胞の形成に十分な量で導入することを含む方法。

【請求項 4 5】

対象において組織を再生又は修復する方法であって、対象中又は対象上に、請求項1又は4に記載の細胞を、組織の再生又は修復に十分な量で導入することを含む方法。

【請求項 4 6】

再生又は修復される組織が、輪部幹又は前駆細胞(LSC)と角膜上皮細胞とを含む角膜上皮細胞系統の組織を含む、請求項45に記載の方法。

40

【請求項 4 7】

対象の皮膚上皮幹細胞(SESC)から輪部幹細胞又は前駆細胞(LSC)様細胞を得る方法であって、SESCをLSC様細胞に転換するのに十分なレベルにSESC中のPAX6タンパク質を増加させることによって対象のSESCからLSC様細胞を得るための、SESCへのPAX6遺伝子の導入又はSESCにおけるPAX6遺伝子発現のアップレギュレーションを含む方法。

【請求項 4 8】

対象の皮膚上皮幹細胞(SESC)から輪部幹又は前駆細胞(LSC)様細胞を得るためのSESCへのPAX6遺伝子の導入又はSESCにおけるPAX6遺伝子発現のアップレギュレーションが、

(a)SESCを対象から得るステップ、

50

(b)SESCをインビトロ又はエキスピボでのフィーダーフリー細胞培養で培養するステップ、

(c)SESCに少なくとも1つのPAX6遺伝子を導入して又はSESCにおけるPAX6遺伝子発現をアップレギュレートさせて、SESCを輪部幹細胞又は前駆細胞(LSC)様細胞に転換するのに十分なレベルにSESC中のPAX6タンパク質を増加させ、それによって対象からの皮膚上皮幹細胞(SESC)から哺乳動物輪部幹細胞又は前駆細胞(LSC)様細胞を得るステップを含む、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

インビトロの方法であるか、エキスピボ方法であるか、又は生体内原位置 (in situ) で若しくは直接対象に適用される、請求項47に記載の方法。

【請求項50】

PAX6タンパク質をコードする核酸を導入するか、PAX6遺伝子発現をアップレギュレートするか、又はPAX6活性を増加させる薬剤で、対象が処置される、請求項47に記載の方法。

【請求項51】

薬剤が、遺伝子治療ベクター、ウイルス粒子、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、組換え核酸、組換えタンパク質、PAX6タンパク質、PAX6発現の小分子レギュレーター、PAX6発現の負のレギュレーターの阻害剤、PAX活性の負のレギュレーターの小分子阻害剤、PAX6活性の小分子エンハンサー、又はこれらの組合せを含む、請求項47に記載の方法。

【請求項52】

PAX6遺伝子が、PAX6a遺伝子、PAX6b遺伝子、操作されたPAX6a遺伝子、操作されたPAXb遺伝子、PAX6遺伝子ファミリーの任意のメンバー、PAX6aタンパク質のすべて又は一部をコードする核酸、PAX6bタンパク質のすべて又は一部をコードする核酸、及びPAX6又はPAX6様活性を有するタンパク質をコードする任意の核酸のセットから選択される、請求項47又は48に記載の方法。

【請求項53】

PAX6タンパク質が、PAX6aタンパク質、PAX6bタンパク質、タンパク質のPAX6ファミリーの任意のメンバー、及びPAX6又はPAX6様活性を有する任意のタンパク質のセットから選択される、請求項47又は48に記載の方法。

【請求項54】

PAX6又はPAX6様活性を有するタンパク質が、内因性K19の発現増加を生じさせることができる任意のタンパク質であり、K19がアップレギュレートされたSECSが、K3及びK12遺伝子発現増加並びにK1及びK10遺伝子発現減少を有する角膜上皮細胞(CEC)又はCEC様細胞に分化しうる、請求項52又は53に記載の方法。

【請求項55】

請求項48に記載のLSC様細胞から角膜上皮細胞(CEC)様細胞を得る方法であって、フィーダーフリーLSC分化培地で(c)の細胞を分化させてLSC様細胞をCEC様細胞に転換するステップをさらに含む方法。

【請求項56】

フィーダーフリーLSC分化培地が既知組成である、請求項55に記載の方法。

【請求項57】

培地がゼノフリーであるか、又は培地に培養細胞と同じ種に由来する成分以外の成分を含まない、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

培地が無血清である、請求項56に記載の方法。

【請求項59】

培地が、一切の動物又はヒト産物を有さない、請求項56に記載の方法。

【請求項60】

皮膚上皮幹細胞(SESC)から輪部幹又は前駆細胞(LSC)様細胞を得る方法であって、

(a)SESCを対象から得るステップ、

10

20

30

40

50

(b) SESCをインビトロでのフィーダーフリー細胞培養で培養するステップ、

(c) SESCにおけるPAX6遺伝子発現をアップレギュレートさせる薬剤とSESCを接触させて、SESCを輪部幹細胞又は前駆細胞(LSC)様細胞に転換するの十分なレベルにSESC中のPAX6タンパク質を増加させ、それによって対象からの皮膚上皮幹細胞(SESC)から哺乳動物輪部幹細胞又は前駆細胞(LSC)様細胞を得るステップを含む、方法。

【請求項 6 1】

薬剤が、PAX6遺伝子を含む核酸、遺伝子治療ベクター、ウイルス粒子、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、組換えタンパク質、PAX6タンパク質、PAX6発現の小分子レギュレーター、PAX6発現の負のレギュレーターの阻害剤、PAX活性の負のレギュレーターの小分子阻害剤、PAX6活性の小分子エンハンサー、及びこれらの組合せからなる群から選択される、請求項60に記載の方法。

10

【請求項 6 2】

PAX6遺伝子が、PAX6a遺伝子、PAX6b遺伝子、操作されたPAX6a遺伝子、操作されたPAXb遺伝子、PAX6遺伝子ファミリーの任意のメンバー、PAX6aタンパク質のすべて又は一部をコードする核酸、PAX6bタンパク質のすべて又は一部をコードする核酸、及びPAX6又はPAX6様活性を有するタンパク質をコードする任意の核酸のセットから選択される、請求項61に記載の方法。

【請求項 6 3】

PAX6タンパク質が、PAX6aタンパク質、PAX6bタンパク質、タンパク質のPAX6ファミリーの任意のメンバー、並びにPAX6又はPAX6様活性を有する任意のタンパク質及びその断片のセットから選択される、請求項61に記載の方法。

20

【請求項 6 4】

対象から哺乳動物LSCを得るためのインビトロの方法であって、

(a) 対象の眼の輪部領域から組織のサンプルを採取するステップ、

(b) 組織を解離させて単一細胞を得るステップ、及び

(c) LSCの増殖を可能にするようにフィーダーフリー細胞培養培地で(b)の単一細胞を培養するステップであって、ここで増殖したLSCは角膜上皮細胞(CEC)に分化する潜在力を有し、それによって対象からインビトロで哺乳動物LSCを得る、ステップを含む、方法。

30

【請求項 6 5】

輪部領域が眼の角膜輪部を含む、請求項64に記載の方法。

【請求項 6 6】

(b)における組織の解離が、解離剤での処置を含み、解離剤が、組織をより小さい塊及び単一細胞に機械的に解離させるための機器若しくはツール、酵素、プロテアーゼ、化学薬品、金属キレート剤、レーザー又はこれらの組合せである、請求項64に記載の方法。

【請求項 6 7】

フィーダーフリー細胞培養培地が、rho関連プロテインキナーゼ(ROCK)阻害剤若しくは白血病抑制因子(LIF)又は両方をさらに含む、請求項60又は64に記載の方法。

【請求項 6 8】

ROCK阻害剤が、Y-27632(4-[(1R)-1-アミノエチル]-N-4-ピリジニル-トランス-シクロヘキサンカルボキサミド二塩酸塩)である、請求項67に記載の方法。

40

【請求項 6 9】

LSC又はLSC様細胞を、マトリックス又は細胞外マトリックス上で培養することによって、CEC様細胞に転換するステップをさらに含む、請求項60又は64に記載の方法。

【請求項 7 0】

対象から哺乳動物輪部幹又は前駆細胞(LSC)を得てフィーダーフリーLSC培養培地においてインビトロで拡大させる方法であって、

(a) 対象の眼の輪部領域から組織のサンプルを採取するステップ、

(b) 組織を解離させて単一細胞を得るステップ、及び

50

(c)LSCの増殖を可能にするようにフィーダーフリー細胞培養培地で(b)の単一細胞を培養するステップであって、ここで増殖したLSCは角膜上皮細胞(CEC)に分化する潜在力を有し、それによって対象から哺乳動物輪部幹細胞を得てインビトロで拡大させる、ステップを含む、方法。

【請求項 7 1】

(c)において、単一細胞がマトリックス又は細胞外マトリックス上で培養される、請求項48又は70に記載の方法。

【請求項 7 2】

マトリックス又は細胞外マトリックスが、Matrigel(登録商標)又はその等価物、増殖因子低減Matrigel(登録商標)又はその等価物、コラーゲン、コラーゲンIV、コラーゲンIVシート、哺乳動物羊膜、ヒト羊膜、フィブリノーゲン、トロニン、パールカン、ラミニン、フィブロネクチン、組換えフィブロネクチン、プロテオグリカン、プロコラーゲン、ヒアルロン酸、エンタクチン、ヘパラン硫酸、テネイシン、ポリ-L-リシン、ゼラチン、ポリ-L-オルニチン、細胞外マトリックスタンパク質、トロニンシート、フィブリノーゲンとトロニンシート、及びこれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項71に記載の方法。

【請求項 7 3】

増殖したLSC又はLSC様細胞を継代前に70~90%の集密度及び継代後に15~20%の集密度で継代するステップ(d)をさらに含む、請求項70に記載の方法。

【請求項 7 4】

増殖したLSC又はLSC様細胞をLSC又はLSC様細胞として安定的に継代することができる回数が、17継代以上である、請求項73に記載の方法。

【請求項 7 5】

LSCが、約16~20時間の世代時間で増殖する、請求項73に記載の方法。

【請求項 7 6】

LSC又はLSC様細胞が、CECに分化することなく40~60世代にわたって安定的に繁殖する、請求項73に記載の方法。

【請求項 7 7】

フィーダーフリーLSC培養培地が1日おきに交換される、請求項70に記載の方法。

【請求項 7 8】

輪部領域が、眼の角膜輪部、角膜と結膜の間の周縁部、角膜と強膜の境界、角強膜輪部、柵間乳頭間突起を含む領域、又はVogt柵を含む領域を含む、請求項70に記載の方法。

【請求項 7 9】

(b)における組織の解離が、解離剤での処置を含み、解離剤が、組織をより小さい塊及び単一細胞に機械的に解離させるための機器若しくはツール、酵素、プロテアーゼ、化学薬品、金属キレート剤、レーザー又はこれらの組合せである、請求項70に記載の方法。

【請求項 8 0】

プロテアーゼが、トリプシン、コラゲナーゼIV、又はこれらの組合せを含む、請求項79に記載の方法。

【請求項 8 1】

金属キレート剤が、EDTA、EGTA、又はこれらの組合せを含む、請求項79に記載の方法。

【請求項 8 2】

フィーダーフリー細胞培養培地が、最小必須培地、増殖因子、ホルモン及び可溶性因子を含む、請求項70に記載の方法。

【請求項 8 3】

フィーダーフリー細胞培養培地が、好ましくは、LSCを得て拡大させる種からの血清、又は代用血清をさらに含む、請求項82に記載の方法。

【請求項 8 4】

フィーダーフリー細胞培養培地が、rho関連プロテインキナーゼ(ROCK)阻害剤をさらに含む、請求項82に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 85】

ROCK阻害剤が、(R)-(+)-トランス-4-(1-アミノエチル)-N-(4-ピリジル)シクロヘキサンカルボキサミド二塩酸塩一水和物(Y-27632)、5-(1,4-ジアゼパン-1-イルスルホニル)イソキノリン(ファスジル又はHA1077)、H-1152、H-1152P、(S)-(+)-2-メチル-1-[(4-メチル-5-イソキノリニル)スルホニル]ホモピペラジン二塩酸塩、ジメチルファスジル(diMF、H-1152P)、N-(4-ピリジル)-N'-(2,4,6-トリクロロフェニル)尿素、Y-39983、Wf-536、SNJ-1656、及び(S)-(+)-2-メチル-1-[(4-メチル-5-イソキノリニル)スルホニル]-ヘキサヒドロ-1H-1,4-ジアゼピン二塩酸塩(H-1152)、イミダゾール含有ベンゾジアゼピン、イミダゾピリジン誘導体、インダゾールコア、2-アミノピリジン/ピリミジンコア、9-デアザグアニン誘導体、ベンズアミド又はアミノフラザンを含む化合物、並びにこれらの誘導体及び類似体、並びにそれらの組合せからなる群から選択される、請求項84に記載の方法。

【請求項 86】

対象からのLSCの単離後、LSCの第4継代後にフィーダーフリー細胞培養培地にROCK阻害剤が添加される、請求項84に記載の方法。

【請求項 87】

フィーダーフリー細胞培養培地が、白血病抑制因子(LIF)をさらに含む、請求項82に記載の方法。

【請求項 88】

対象からのLSCの単離後、LSCの第4継代後にフィーダーフリー細胞培養培地にLIFが添加される、請求項87に記載の方法。

【請求項 89】

フィーダーフリー細胞培養培地が、DMEM/F12培地、DMEM、ペニシリン-ストレプトマイシン、血清、EGF、インスリン、ヒドロコルチゾン、コレラ毒素、3,3',5-トリヨード-L-チロニン、又はこれらの組合せを含み、血清が、ウシ胎仔血清、しかし好ましくは培養されるLSCと同じ種からの血清、又は代用血清でありうる、請求項70に記載の方法。

【請求項 90】

フィーダーフリー細胞培養培地が、DMEM/F12培地、DMEM、ペニシリン-ストレプトマイシン、血清、EGF、インスリン、ヒドロコルチゾン、コレラ毒素、及び3,3',5-トリヨード-L-チロニンを含み、血清が、ウシ胎仔血清、しかし好ましくは培養されるLSCと同じ種からの血清、又は代用血清でありうる、請求項70に記載の方法。

【請求項 91】

フィーダーフリー細胞培養培地が、ROCK阻害剤、Y-27632をさらに含む、請求項89又は90に記載の方法。

【請求項 92】

ROCK阻害剤、Y-27632が、細胞第4継代後にフィーダーフリー細胞培養培地に添加される、請求項91に記載の方法。

【請求項 93】

フィーダーフリー細胞培養培地が、白血病抑制因子(LIF)をさらに含む、請求項89又は90に記載の方法。

【請求項 94】

対象からのLSCの単離後、LSCの第4継代後にフィーダーフリー細胞培養培地にLIFが添加される、請求項93に記載の方法。

【請求項 95】

LSCが、WNT7A、FZD5、PAX6、p63、ケラチン5(K5)、ケラチン14(K14)、ケラチン19(K19)及びKi67を含むマーカーのセットを発現する、請求項70に記載の方法。

【請求項 96】

LSCの90~95%が、p63、PAX6、K19及びKi67を発現する、請求項70に記載の方法。

【請求項 97】

LSCの5%未満が、K5及びK14を発現する、請求項70に記載の方法。

【請求項 98】

10

20

30

40

50

LSCの95%より多くが、WNT7A及びFZD5を発現する、請求項70に記載の方法。

【請求項 9 9】

CECが、WNT7A、FZD5、PAX6、ケラチン3(K3)及びケラチン12(K12)を含むマーカーのセットを発現し、ここでK3及びK12発現はLSCと比較して統計的に有意に高く、K19発現はLSCと比較して統計的に有意に低い、請求項70に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

CECが、p63を発現しないか、又はLSCより有意に低いレベルのp63を発現し、ケラチン1(K1)及びケラチン10(K10)を発現しないか、又は皮膚又は表皮細胞より有意に低いレベルのケラチン1(K1)及びケラチン10(K10)を発現する、請求項70に記載の方法。

【請求項 1 0 1】

単離されたLSCをインビトロで角膜上皮細胞(CEC)に分化させる方法であって、

(a)元々対象に由来した、好ましくは単一細胞状態に解離されている、事前に培養されたLSCを得るステップ、

(b)単離されたLSCを、分化に適している3次元細胞培養物を形成する又は形成を可能にするように、マトリックス又は細胞外マトリックス中及び/又は上に配置するステップ、及び

(c)単離されたLSCのCECへのインビトロでの分化を可能にするようにLSC分化培地でLSCを培養することによって、単離されたLSCをインビトロで角膜上皮細胞に分化させるステップ

を含む方法。

【請求項 1 0 2】

マトリックス又は細胞外マトリックスが、Matrigel(登録商標)又はその等価物、増殖因子低減Matrigel(登録商標)又はその等価物、コラーゲン、コラーゲンIV、コラーゲンIVシート、哺乳動物羊膜、ヒト羊膜、フィブリノーゲン、トロニン、パールカン、ラミニン、フィブロネクチン、組換えフィブロネクチン、プロテオグリカン、プロコラーゲン、ヒアルロン酸、エンタクチン、ヘパラン硫酸、テネイシン、ポリ-L-リシン、ゼラチン、ポリ-L-オルニチン、細胞外マトリックスタンパク質(Fischer又はLife Tech)、トロニンシート(Fibrin Sealant、Reliseal(商標)、Reliance Life Sciences)、フィブリノーゲンとトロニンのシート(Reliance Life)、及びこれらの任意の組合せからなる群から選択される、請求項101に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

マトリックス又は細胞外マトリックスが、増殖因子低減Matrigel(登録商標)若しくはその等価物、又はコラーゲンを含む、請求項101に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

輪部幹細胞分化培地が、フィーダーフリー及び既知組成培地である、請求項101に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

フィーダーフリー及び既知組成培地が、CnT-30培地(Cellntec Advanced Cell Systems AG、Bern、Switzerland)、CnT-02(Cellntec)、CnT-02-3DP5(Cellntec)又は機能的等価物を含み、前記培地がLSCのCECへの分化を促進する、請求項104に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

CECが、WNT7A、FZD5、PAX6、ケラチン3(K3)及びケラチン12(K12)を含むマーカーのセットを発現し、ここでK3及びK12発現はLSCと比較して統計的に有意に高く、K19発現はLSCと比較して統計的に有意に低い、請求項101に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

CECが、p63を発現しないか、又はLSCより有意に低いレベルのp63を発現し、ケラチン1(K1)及びケラチン10(K10)を発現しないか、又は皮膚又は表皮細胞より有意に低いレベルのケラチン1(K1)及びケラチン10(K10)を発現する、請求項106に記載の方法。

【請求項 1 0 8】

LSC分化培地が1日おきに交換される、請求項101に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 0 9】

請求項60又は64に記載の方法由来の単離された輪部幹細胞(LSC)又はLSC様細胞の集団。

【請求項 1 1 0】

LSCが、WNT7A、FZD5、PAX6、p63、ケラチン5(K5)、ケラチン14(K14)、ケラチン19(K19)、及びKi67を含むマーカーのセットを発現する、請求項109に記載の細胞。

【請求項 1 1 1】

請求項101に記載の方法由来の単離された角膜上皮細胞(CEC)の集団。

【請求項 1 1 2】

CECが、(i)WNT7A、FZD5、PAX6、ケラチン3(K3)及びケラチン12(K12)を含むマーカーのセットを発現し、ここでK3及びK12発現はLSCと比較して統計的に有意に高く、K19発現はLSCと比較して統計的に有意に低く、(ii)p63を発現しないか、又はLSCより有意に低いレベルのp63を発現し、ケラチン1(K1)及びケラチン10(K10)を発現しないか、又は皮膚又は表皮細胞より有意に低いレベルのケラチン1(K1)及びケラチン10(K10)を発現する、請求項111に記載の細胞。

【請求項 1 1 3】

請求項60、64又は101に記載の方法によって生産されたLSC、LSC様細胞若しくはCEC、又はこれらの細胞の組合せ、包装材料及び使用説明書を含む、角膜組織修復用キット。

【請求項 1 1 4】

医薬的に許容される担体をさらに含む、請求項113に記載のキット。

【請求項 1 1 5】

医薬的に許容される担体が、ヒト又は動物の眼の湾曲部のような湾曲部での細胞付着又は増殖を支持するために使用されるコンタクトレンズ又はその等価物である、請求項114に記載のキット。

【請求項 1 1 6】

ヒト羊膜又は動物羊膜をさらに含む、請求項115に記載のキット。

【請求項 1 1 7】

輪部幹細胞又は角膜上皮細胞の機能不全に関連した疾患を有する対象を処置する方法であって、

a. 請求項1、6、7又は8に記載のLSC、LSC様、CEC又はCEC様細胞を対象の罹患した眼に移植するステップを含み、移植された細胞が対象の罹患した眼の角膜又は輪部に定着し、正常な角膜透明性及び透明度を回復させ、
それによって、輪部幹若しくは前駆細胞又は角膜上皮細胞の機能不全に関連した疾患を有する対象を処置する方法。

【請求項 1 1 8】

輪部幹細胞又は角膜上皮細胞の機能不全に関連した疾患を有する対象を処置する方法であって、

(a) 請求項47、48、55、60、64、70又は101に記載の方法によって生産されたLSC、LSC様、CEC又はCEC様細胞を対象の罹患した眼に移植するステップを含み、移植された細胞が対象の罹患した眼の角膜又は輪部に定着し、正常な角膜透明性及び透明度を回復させ、

それによって、輪部幹若しくは前駆細胞又は角膜上皮細胞の機能不全に関連した疾患を有する対象を処置する方法。

【請求項 1 1 9】

疾患又は状態が、輪部幹若しくは前駆細胞の欠損、角膜上皮細胞の欠損、角膜輪部の損傷、眼の角膜の損傷、輪部幹細胞の損傷、角膜上皮細胞の損傷、角膜の発生若しくは機能に影響を与える先天性欠損、角膜の発生若しくは機能に影響を与える後天性欠損、角膜が皮膚系統に切り替えられる細胞運命決定に影響を与える先天性欠損、角膜が皮膚系統に切り替えられる細胞運命決定に影響を与える後天性欠損、異常表皮分化、スティーブンス・ジョンソン症候群、無虹彩、再発性翼状片、角膜疾患、角膜上皮扁平上皮化生、炎症性角膜症、外傷、化学熱傷、アルカリ熱傷、半盲目又は全盲を含む、請求項117又は118に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2 0】

疾患又は状態が、半盲目、全盲、角膜表面疾患、角膜疾患、角膜上皮扁平上皮化生、炎症性角膜症、外傷又はアルカリ熱傷である、請求項117又は118に記載の方法。

【請求項 1 2 1】

半盲目、全盲、角膜表面疾患、角膜疾患、角膜上皮扁平上皮化生、炎症性角膜症、外傷又はアルカリ熱傷を有する対象の正常な角膜透明性及び透明度を回復させる方法であって、

(a) 請求項1、6、7又は8に記載のLSC、LSC様、CEC又はCEC様細胞を対象の罹患した眼に移植するステップを含み、移植された細胞が対象の罹患した眼の角膜又は輪部に定着し、正常な角膜透明性及び透明度を回復させ、

それによって、半盲目、全盲、角膜表面疾患、角膜疾患、角膜上皮扁平上皮化生、炎症性角膜症、外傷又はアルカリ熱傷を有する対象の正常な角膜透明性及び透明度を回復させる方法。

【請求項 1 2 2】

半盲目、全盲、角膜表面疾患、角膜疾患、角膜上皮扁平上皮化生、炎症性角膜症、外傷又はアルカリ熱傷を有する対象の正常な角膜透明性及び透明度を回復させる方法であって、

(a) 請求項47、48、55、60、64、70又は101に記載の方法によって生産されたLSC、LSC様、CEC又はCEC様細胞を対象の罹患した眼に移植するステップを含み、移植された細胞が対象の罹患した眼の角膜又は輪部に定着し、正常な角膜透明性及び透明度を回復させ、

それによって、半盲目、全盲、角膜表面疾患、角膜疾患、角膜上皮扁平上皮化生、炎症性角膜症、外傷又はアルカリ熱傷を有する対象の正常な角膜透明性及び透明度を回復させる方法。

【請求項 1 2 3】

対象の角膜組織を再生又は修復する方法であって、請求項1、6、7又は8に記載の単離されたLSC、LSC様、CEC又はCEC様細胞集団を角膜組織の再生又は修復に十分な量で対象に導入することを含む方法。

【請求項 1 2 4】

対象の角膜組織を再生又は修復する方法であって、請求項47、48、55、60、64、70又は101に記載の方法によって生産された単離されたLSC、LSC様、CEC又はCEC様細胞集団を角膜組織の再生又は修復に十分な量で対象に導入することを含む方法。

【請求項 1 2 5】

細胞が、対象以外の個体からのものである、請求項121、122、123又は124に記載の方法。

【請求項 1 2 6】

請求項121、122、123又は124に記載の方法であって、細胞が、前記方法によって生産された細胞で処置される対象からのものである、方法。

【請求項 1 2 7】

対象が哺乳動物である、請求項121、122、123又は124に記載の方法。

【請求項 1 2 8】

哺乳動物が、ヒト、ラット、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ウサギ、ウシ、サル又はマウスである、請求項127に記載の方法。

【請求項 1 2 9】

眼化生を有する患者がPAX6遺伝子又は遺伝子産物での処置の利益を受け得るかどうかを判定する方法であって、化生領域におけるWNT7A、PAX6、K3及び/又はK12の遺伝子発現又はタンパク質レベルを評価することを含み、化生領域におけるWNT7A、PAX6、K3及び/又はK12の非存在が、眼化生を有する患者が、PAX6遺伝子若しくは遺伝子産物又は請求項1若しくは4に記載の細胞での処置の利益を受け得ることを示す方法。

【請求項 1 3 0】

眼化生を有する対象がWNT7A遺伝子又は遺伝子産物での処置の利益を受ける可能性があ

10

20

30

40

50

るかどうかを判定する方法であって、化生領域におけるWNT7A、PAX6、K3及び/又はK12の遺伝子発現又はタンパク質レベルを評価することを含み、化生領域におけるWNT7A、PAX6、K3及び/又はK12の非存在が、眼化生を有する患者が、WNT7A遺伝子又は遺伝子産物での処置の利益を受け得ることを示す方法。

【請求項131】

眼化生を有する対象がWNT7A及びPAX6両方の遺伝子又は遺伝子産物での処置の利益を受け得るかどうかを判定する方法であって、化生領域におけるWNT7A、PAX6、K3及び/又はK12の遺伝子発現又はタンパク質レベルを評価することを含み、化生領域におけるWNT7A、PAX6、K3及び/又はK12の非存在が、眼化生を有する患者が、WNT7A及びPAX6両方の遺伝子又は遺伝子産物での処置の利益を受け得ることを示す方法。

10

【請求項132】

眼化生を有する対象がPAX6遺伝子若しくは遺伝子産物又は請求項47、48、55、60、64、70若しくは101に記載の方法によって生産された細胞での処置の利益を受け得るかどうかを判定する方法であって、化生領域におけるWNT7A、PAX6、K3及び/又はK12の遺伝子発現又はタンパク質レベルを評価することを含み、化生領域におけるWNT7A、PAX6、K3及び/又はK12の非存在が、眼化生を有する患者が、PAX6遺伝子若しくは遺伝子産物又は請求項47、48、55、60、64、70若しくは101に記載の方法によって生産された細胞での処置の利益を受け得ることを示す方法。

【請求項133】

対象の角膜組織を再生又は修復する方法であって、請求項1、64又は70に記載の単離されたLSC集団を角膜組織の再生又は修復に十分な量で対象に導入することを含む方法。

20

【請求項134】

対象が哺乳動物である、請求項133に記載の方法。

【請求項135】

哺乳動物が、ヒト、ラット、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ウサギ、ウシ、サル又はマウスである、請求項134に記載の方法。

【請求項136】

請求項47、48、55、60、64、70若しくは101に記載の方法によって生産されたLSC、LSC様、CEC若しくはCEC様細胞又はこれらの細胞の組合せの有効量及び適する医薬担体を含む、医薬組成物。

30

【請求項137】

眼疾患を処置する方法であって、請求項1に記載の単離されたLSC若しくはLSC様集団又は請求項4に記載のSESC若しくはSESC様集団を、請求項1又は4に記載の単離されたLSC又はLSC様集団が、CEC又はCEC様細胞への分化を可能にするLSC又はLSC様状態を生じさせる又は維持するのに十分な量のPAX6を生産又は過剰発現するのに十分な量で、対象に投与することによって、眼疾患を処置することを含む方法。

【請求項138】

眼疾患が、ヒト角膜疾患、角膜上皮扁平上皮化生、炎症性角膜症、外傷及びアルカリ熱傷である、請求項137に記載の方法。

【請求項139】

眼疾患が、ヒト眼疾患である、請求項137に記載の方法。

40

【請求項140】

対象の角膜組織を再生又は修復する方法であって、対象の角膜組織、角膜組織の推定位置又は眼の前面を角膜組織の再生又は修復に十分な量のPAX6と接触させることを含む方法。

【請求項141】

対象の角膜組織を再生又は修復する方法であって、請求項47、48、55、60、64、70若しくは101に記載の方法によって生産されたLSC、LSC様、CEC若しくはCEC様細胞又はこれらの細胞の組合せを角膜組織の再生又は修復に十分な量で角膜又は眼の前面に投与することを含む方法。

50

【請求項 1 4 2】

対象の角膜組織を再生又は修復する方法であって、角膜組織、角膜組織の推定位置又は眼の前面に角膜組織の再生又は修復に十分な量のPAX6タンパク質を投与することを含む方法。

【請求項 1 4 3】

請求項1又は6に記載のLSC又はLSC様集団を増殖及び維持するためのキットであって、LSC集団を維持するための細胞培養培地を含み、前記培地が本質的にフィーダーフリーである、キット。

【請求項 1 4 4】

請求項4に記載のSESC又はSESC様集団のLSC又はLSC様集団を増殖及び維持するためのキットであって、LSC集団を維持するための細胞培養培地を含み、前記培地が本質的にフィーダーフリーである、キット。

【請求項 1 4 5】

培地が、本質的にゼノフリーである、請求項143又は144に記載のキット。

【請求項 1 4 6】

LSC又はLSC様集団をCEC又はCEC様集団に分化させるためのLSC分化培地をさらに含む、請求項143又は144に記載のキット。

【請求項 1 4 7】

培地が、本質的に無血清である、請求項143又は144に記載のキット。

【請求項 1 4 8】

培地に本質的に動物産物を含まない、請求項143又は144に記載のキット。

【請求項 1 4 9】

培地に本質的にヒト産物を含まない、請求項143又は144に記載のキット。

【請求項 1 5 0】

培地が、既知組成である、請求項143又は144に記載のキット。

【請求項 1 5 1】

請求項47、48、55、60、64、70若しくは101に記載の方法によって生産されたLSC、LSC様、CEC若しくはCEC様細胞又はこれらの細胞の組合せ、包装材料及び使用説明書を含む、角膜組織修復用のキット。

【請求項 1 5 2】

医薬的に許容される担体をさらに含む、請求項151に記載のキット。

【請求項 1 5 3】

医薬的に許容される担体が、ヒト又は動物の眼の湾曲部のような湾曲部での細胞付着又は増殖を支持するために使用されるコンタクトレンズ又はその等価物である、請求項152に記載のキット。

【請求項 1 5 4】

ヒト羊膜又は動物羊膜をさらに含む、請求項153に記載のキット。

【請求項 1 5 5】

対象の角膜又は角膜機能に影響を与える眼疾患を発症するリスクを評価する方法であって、(a)LSC又は角膜上皮細胞におけるWNTZ7A、FZD5及びPAX6又はこれらの組合せの活性を評価するステップを含み、WNTZ7A、FZD5及びPAX6又はこれらの組合せの活性がより低い又は低いことが、対象の角膜又は角膜機能に影響を与える眼疾患を発症するリスクがより高いことを示し、それによって対象の角膜又は角膜機能に影響を与える眼疾患を発症するリスクを評価する方法。

【請求項 1 5 6】

請求項47、48、55、60、64、70若しくは101に記載の方法によって生産されたLSC、LSC様、CEC若しくはCEC様細胞又はこれらの細胞の組合せでの細胞移植、あるいはPAX6タンパク質又はPAX6をコードする核酸での処置に適している患者集団であって、角膜の異常な皮膚表皮様細胞及び随伴角質化、並びにWNTZ7A、FZD5及びPAX6遺伝子又は遺伝子の組合せの発現喪失又は減少を有する患者集団を同定する方法。

【請求項 1 5 7】

輪部幹細胞が欠損している対象の輪部にLSC又はLSC様細胞を再定着させる方法であって、請求項47、48、64又は70に記載の方法によって生産されたLSC又はLSC様細胞を対象の眼の前面に投与するステップ、及び前記細胞のLSCニッチへの遊走を可能にするステップであって、それによって対象の輪部にLSC又はLSC様細胞を再定着させる、ステップを含む、方法。

【請求項 1 5 8】

LSC又はLSC様細胞を投与するステップが、LSC又はLSC様細胞のシートを対象の眼表面にグラフトするステップ、あるいは、LSC又はLSC様細胞を含む細胞若しくは組織浮遊液を投与するステップを含む、請求項157に記載の方法。

10

【請求項 1 5 9】

対象の眼へのLSC又はLSC様細胞の投与後、LSC又はLSC様細胞が羊膜、好ましくはヒト羊膜で覆われる、請求項158に記載の方法。

【請求項 1 6 0】

輪部幹細胞が欠損している対象の輪部にLSC又はLSC様細胞を再定着させる方法であって、結膜、推定角膜位置、眼又は眼瞼の皮膚上皮幹細胞(SESC)をLSC又はLSC様細胞に転換するために、対象の結膜、推定角膜位置、眼又は眼瞼の領域にPAX6活性又は発現を増加させる薬剤を投与することを含み、輪部への移動時に、対象の輪部にLSC又はLSC様細胞を再定着させ、それによって対象の輪部にLSC又はLSC様細胞を再定着させる方法。

【請求項 1 6 1】

最小必須培地、増殖因子、ホルモン、可溶性因子及び血清又は代用血清を含む、LSC、LSC様、SESC又はSESC様の短期インビトロ培養のためのフィーダーフリー細胞培養培地。

20

【請求項 1 6 2】

短期インビトロ培養が、LSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞の第0～約第4継代である、請求項161に記載のフィーダーフリー細胞培養培地。

【請求項 1 6 3】

DMEM/F12培地、DMEM、ペニシリン-ストレプトマイシン、ウシ胎仔血清、EGF、インスリン、ヒドロコルチゾン、コレラ毒素及び3,3',5-トリヨード-L-チロニンを含み、前記ウシ胎仔血清はヒト血清又は代用血清に代替されてもよく、EGF及びインスリンが、それぞれ、組換えEGF及び/又は組換えインスリン、好ましくは組換えヒトEGF及び組換えヒトインスリンであってもよく、ここでLSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞が増殖してCEC又は皮膚表皮細胞に分化しない限り、成分の各々が機能的に等価の成分に置換されてもよい、請求項161に記載のフィーダーフリー細胞培養培地。

30

【請求項 1 6 4】

DMEM/F12及びDMEM(1:1)とともに10～20%の範囲のウシ胎仔血清又は10～20%の範囲の血清の代用血清、10～20ng/mlの範囲のEGF、5～10 µg/mlの範囲のインスリン、0.2～0.8 µg/mlの範囲のヒドロコルチゾン、 5×10^{-11} ～ 5×10^{-10} Mの範囲のコレラ毒素及び 10^{-9} M～ 4×10^{-9} Mの範囲の3,3',5-トリヨード-L-チロニンを含み、EGF及びインスリンが、それぞれ、組換えEGF及び/又は組換えインスリン、好ましくは組換えヒトEGF及び組換えヒトインスリンであってもよく、ここでLSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞が増殖してCEC又は皮膚表皮細胞に分化しない限り、成分の各々が機能的に等価の成分に置換されてもよい、請求項161に記載のフィーダーフリー細胞培養培地。

40

【請求項 1 6 5】

DMEM/F12及びDMEM(1:1)とともに100U/mlペニシリン、100 µg/mlストレプトマイシン、10%ウシ胎仔血清、10ng/ml EGF、5 µg/mlインスリン、0.4 µg/mlヒドロコルチゾン、 10^{-10} Mコレラ毒素及び 2×10^{-9} M 3,3',5-トリヨード-L-チロニンを含み、ウシ胎仔血清はヒト血清又は代用血清に代替されてもよく、EGF及びインスリンが、それぞれ、組換えEGF及び/又は組換えインスリン、好ましくは組換えヒトEGF及び組換えヒトインスリンであってもよく、ここでLSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞が増殖してCEC又は皮膚表皮細胞に分化しない限り、成分の各々が機能的に等価の成分に置換されてもよい、請求項161に記載のフ

50

ィーダーフリー細胞培養培地。

【請求項 166】

最小必須培地、増殖因子、ホルモン、可溶性因子、血清又は代用血清、及びrho関連プロテインキナーゼ(ROCK)阻害剤を含む、LSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞の長期インビトロ培養のためのィーダーフリー細胞培養培地。

【請求項 167】

長期インビトロ培養が、LSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞の17継代以上の継代である、請求項166に記載のィーダーフリー細胞培養培地。

【請求項 168】

DMEM/F12培地、DMEM、ペニシリン-ストレプトマイシン、ウシ胎仔血清、EGF、インスリン、ヒドロコルチゾン、コレラ毒素及び3,3',5-トリヨード-L-チロニン、及びY-27632を含み、ウシ胎仔血清はヒト血清又は代用血清に代替されてもよく、EGF及びインスリンが、それぞれ、組換えEGF及び/又は組換えインスリン、好ましくは組換えヒトEGF及び組換えヒトインスリンであってもよく、Y-27632は別のROCK阻害剤に置換されてもよく、LSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞が増殖してCEC又は皮膚表皮細胞に分化しない限り、成分の各々の代わりに機能的に等価の成分を代用してもよい、請求項166に記載のィーダーフリー細胞培養培地。

【請求項 169】

DMEM/F12及びDMEM(1:1)とともに10~20%の範囲のウシ胎仔血清又は10~20%の範囲の血清の代用血清、10~20ng/mlの範囲のEGF、5~10 µg/mlの範囲のインスリン、0.2~0.8 µg/mlの範囲のヒドロコルチゾン、 5×10^{-11} ~ 5×10^{-10} Mの範囲のコレラ毒素、 10^{-9} M~ 4×10^{-9} Mの範囲の3,3',5-トリヨード-L-チロニン及び1~10 µMの範囲のY-27632を含み、EGF及びインスリンが、それぞれ、組換えEGF及び/又は組換えインスリン、好ましくは組換えヒトEGF及び組換えヒトインスリンであってもよく、Y-27632は別のROCK阻害剤に置換されてもよく、ここでLSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞が増殖してCEC又は皮膚表皮細胞に分化しない限り、成分の各々が機能的等価物に置換されてもよい、請求項166に記載のィーダーフリー細胞培養培地。

【請求項 170】

DMEM/F12及びDMEM(1:1)とともに100U/mlペニシリン、100 µg/mlストレプトマイシン、10%ウシ胎仔血清、10ng/ml EGF、5 µg/mlインスリン、0.4 µg/mlヒドロコルチゾン、 10^{-10} Mコレラ毒素、 2×10^{-9} M 3,3',5-トリヨード-L-チロニン及び1 µM Y-27632を含み、ウシ胎仔血清はヒト血清又は代用血清に代替されてもよく、EGF及びインスリンが、それぞれ、組換えEGF及び/又は組換えインスリン、好ましくは組換えヒトEGF及び組換えヒトインスリンであってもよく、Y-27632は別のROCK阻害剤に置換されてもよく、ここでLSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞が増殖してCEC又は皮膚表皮細胞に分化しない限り、成分の各々が機能的等価物に置換されてもよい、請求項166に記載のィーダーフリー細胞培養培地。

【請求項 171】

最小必須培地、増殖因子、ホルモン、可溶性因子、血清又は代用血清、rho関連プロテインキナーゼ(ROCK)阻害剤及び白血病抑制因子(LIF)を含む、LSC又はLSC様細胞の長期インビトロ培養のためのィーダーフリー細胞培養培地。

【請求項 172】

長期インビトロ培養が、LSC又はLSC様細胞の17継代以上の継代である、請求項171に記載のィーダーフリー細胞培養培地。

【請求項 173】

DMEM/F12培地、DMEM、ペニシリン-ストレプトマイシン、ウシ胎仔血清、EGF、インスリン、ヒドロコルチゾン、コレラ毒素及び3,3',5-トリヨード-L-チロニン、Y-27632及びLIFを含み、ウシ胎仔血清はヒト血清又は代用血清に代替されてもよく、EGF、インスリン及びLIFが、それぞれ、組換えEGF、組換えインスリン及び/又は組換えLIF、好ましくは組換えヒトEGF、組換えヒトインスリン及び組換えヒトLIFであってもよく、Y-27は別のROCK阻害剤に置換されてもよく、ここでLSC又はLSC様細胞が増殖してCECに分化しない限り、成

分の各々の代わりに機能的に等価の成分を代用してもよい、請求項171に記載のフィーダーフリー細胞培養培地。

【請求項174】

DMEM/F12及びDMEM(1:1)とともに10~20%の範囲のウシ胎仔血清又は10~20%の範囲の血清の代用血清、10~20ng/mlの範囲のEGF、5~10 µg/mlの範囲のインスリン、0.2~0.8 µg/mlの範囲のヒドロコルチゾン、 5×10^{-11} ~ 5×10^{-10} Mの範囲のコレラ毒素、 10^{-9} M~ 4×10^{-9} Mの範囲の3,3',5-トリヨード-L-チロニン、1~10 µMの範囲のY-27632及び5~20ng/ml LIFを含み、EGF、インスリン及びLIFが、それぞれ、組換えEGF、組換えインスリン及び/又は組換えLIF、好ましくは組換えヒトEGF、組換えヒトインスリン及び組換えヒトLIFであってもよく、Y-27632は別のROCK阻害剤に置換されてもよく、ここでLSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞が増殖してCECに分化しない限り、成分の各々が機能的等価物に置換されてもよい、請求項161に記載のフィーダーフリー細胞培養培地。

【請求項175】

培地が、DMEM/F12及びDMEM(1:1)とともに100U/mlペニシリン、100 µg/mlストレプトマイシン、10%ウシ胎仔血清、10ng/ml EGF、5 µg/mlインスリン、0.4 µg/mlヒドロコルチゾン、 10^{-10} Mコレラ毒素、 2×10^{-9} M 3,3',5-トリヨード-L-チロニン、1 µM Y-27632及び10ng/ml LIFを含み、ウシ胎仔血清の代わりにヒト血清又は代用血清を使用してもよく、EGF、インスリン及びLIFが、それぞれ、組換えEGF、組換えインスリン及び/又は組換えLIF、好ましくは組換えヒトEGF、組換えヒトインスリン及び組換えヒトLIFであってもよく、Y-27632は別のROCK阻害剤に置換されてもよく、ここでLSC又はLSC様細胞が増殖してCECに分化しない限り、成分の各々が機能的等価物に置換されてもよい、請求項161に記載のフィーダーフリー細胞培養培地。

【請求項176】

ROCK阻害剤が、(R)-(+) -トランス-4-(1-アミノエチル)-N-(4-ピリジル)シクロヘキサノカルボキサミド二塩酸塩一水和物(Y-27632、Sigma-Aldrich)、5-(1,4-ジアゼパン-1-イルスルホニル)イソキノリン(ファスジル又はHA1077、Cayman Chemical)、H-1152、H-1152P、(S)-(+) -2-メチル-1-[(4-メチル-5-イソキノリニル)スルホニル]ホモピペラジン二塩酸塩、ジメチルファスジル(diMF、H-1152P)、N-(4-ピリジル)-N'-(2,4,6-トリクロロフェニル)尿素、Y-39983、Wf-536、SNJ-1656、及び(S)-(+) -2-メチル-1-[(4-メチル-5-イソキノリニル)スルホニル]-ヘキサヒドロ-1H-1,4-ジアゼピン二塩酸塩、イミダゾール含有ベンゾジアゼピン、イミダゾピリジン誘導体、インダゾールコア、2-アミノピリジン/ピリミジンコア、9-デアザグアニン誘導体、ベンズアミド又はアミノフラザンを含む化合物、並びにこれらの誘導体及び類似体、並びにそれらの組合せからなる群から選択される、請求項166又は171に記載のフィーダーフリー細胞培養培地。

【請求項177】

ウシ胎仔血清がヒト血清又は代用血清に代替される、請求項163、164、165、168、169、170、173、174又は175に記載のフィーダーフリー細胞培養培地。

【請求項178】

EGF、インスリン又はLIFが、それぞれ、組換えEGF、組換えインスリン又は組換えLIFである、請求項163、164、165、168、169、170、173、174又は175に記載のフィーダーフリー細胞培養培地。

【請求項179】

EGFが、組換えヒトEGFである、請求項178に記載のフィーダーフリー細胞培養培地。

【請求項180】

インスリンが、組換えヒトインスリンである、請求項178に記載のフィーダーフリー細胞培養培地。

【請求項181】

LIFが、組換えヒトLIFである、請求項178に記載のフィーダーフリー細胞培養培地。

【請求項182】

SESCを得てインビトロでフィーダーフリー細胞培養培地において拡大させる方法であっ

て、単離されたSESC皮膚を請求項161又は166に記載のフィーダーフリー細胞培養培地で培養することを含む方法。

【請求項183】

SESCが、毛包間表皮から単離される、請求項102に記載の方法。

【請求項184】

SESCが、ヒト又は動物のSESCを有する任意のSESCニッチから単離される、請求項102に記載の方法。

【請求項185】

輪部幹細胞(LSC)から上皮幹細胞(SESC)又はSESC様細胞を得る方法であって、(a)細胞運命をLSCからSESC運命に変えるために十分にWNT7A又はPAX6遺伝子又はタンパク質の発現又は活性をノックダウンするステップを含み、それによってLSC細胞からSESC又はSESC様細胞を得る方法。

【請求項186】

LSCを、WNT7A若しくはPAX6に指向されたshRNAと接触させて、あるいは、LSCが、WNT7A若しくはPAX6遺伝子に指向されたshRNA、RNAi若しくはアンチセンスRNAを生産する導入遺伝子を発現して、LSCをSESC又はSESC様細胞に転換するために十分にWNT7A又はPAX6の発現を低減させる、請求項185に記載の方法。

【請求項187】

対象から皮膚上皮幹細胞(SESC)を得て、フィーダーフリー細胞培養培地においてインビトロで拡大させる方法であって、

(a)対象の毛包間表皮から又は対象のSESCを有する任意のSESC幹細胞ニッチから組織サンプルを採取するステップ、

(b)組織を解離させて単一細胞を得るステップ、及び

(c)SESCの増殖を可能にするようにフィーダーフリー細胞培養培地で(b)の単一細胞を培養するステップであって、ここで増殖したSESCは皮膚表皮細胞に分化する潜在力を有し、それによって対象から皮膚上皮幹細胞を得てインビトロで拡大させる、ステップを含む、方法。

【請求項188】

SESCが、請求項161、163、164、165、166、168、169又は170に記載のフィーダーフリー細胞培養培地においてインビトロで培養される、請求項185に記載の方法。

【請求項189】

インビトロでSESC又はSESC様細胞から皮膚表皮細胞又は皮膚表皮様細胞を得る方法であって、SESC又はSESC様細胞の皮膚表皮細胞又は皮膚表皮様細胞への分化を支持する既知組成分化培地で単離されたSESC又はSESC様細胞を培養することによって、インビトロでSESC又はSESC様細胞から皮膚表皮細胞又は皮膚表皮様細胞を得ることを含む方法。

【請求項190】

既知組成分化培地が、CnT-02(CellnTec)又は等価の培地である、請求項189に記載の方法。

【請求項191】

新たな皮膚を必要とする対象を処置する方法であって、請求項185に記載の方法によって得た又は請求項182、187若しくは189に記載の方法によって得て拡大させたSESC細胞、SESC様細胞、皮膚表皮細胞又は表皮上皮様細胞を対象に投与して、例えば、対象のSESC細胞集団又は皮膚表皮細胞集団を再定着させ、対象に新たな皮膚をもたらすことによって、新たな皮膚を必要とする対象を処置することを含む方法。

【請求項192】

皮膚を必要とする対象が、皮膚ジストロフィー、皮膚疾患、皮膚感染症、熱傷傷害、皮膚潰瘍、擦過創、黒色腫、癌腫、創傷、加齢、皮膚の遺伝障害、皮膚生検、手術、美容上の欠陥、若しくは皮膚に影響を与える再建術を患う、又は皮膚を必要とする対象が、皮膚置換術を必要とする対象、又は皮膚に影響を与える美容整形若しくは再建術を受ける対象である、請求項191に記載の方法。

【請求項 193】

輪部幹若しくは前駆細胞(LSC)及び/又はその子孫をSESC又はSESC様細胞に変化させる方法であって、LSC及び/又はその子孫をSESC又はSESC様細胞に変化させるために十分にLSCにおけるWNT7A又はPAX6遺伝子の発現をダウンレギュレートさせることによって、LSC及び/又はその子孫をSESC又はSESC様細胞に変化させることを含む方法。

【請求項 194】

LSC様細胞及び/又はその子孫をSESC又はSESC様細胞に変化させる方法であって、LSC様細胞及び/又はその子孫をSESC又はSESC様細胞に変化させるために十分にLSC様細胞におけるWNT7A又はPAX6遺伝子の発現をダウンレギュレートさせることによって、LSC様細胞及び/又はその子孫をSESC又はSESC様細胞に変化させることを含む方法。

10

【請求項 195】

皮膚上皮幹細胞(SESC)及び/又はその子孫をLSC又はLSC様細胞に変化させる方法であって、SESC細胞及び/又はその子孫をLSC又はLSC様細胞に変化させるために十分にSESCにおいてPAX6又はWNT7A遺伝子をアップレギュレート又は過剰発現させることによって、SESC及び/又はその子孫をLSC又はLSC様細胞に変化させることを含む方法。

【請求項 196】

SESC様細胞及び/又はその子孫をLSC又はLSC様細胞に変化させる方法であって、SESC様細胞及び/又はその子孫をLSC又はLSC様細胞に変化させるために十分にSESC様細胞においてPAX6又はWNT7A遺伝子をアップレギュレート又は過剰発現させることによって、SESC様細胞及び/又はその子孫をLSC又はLSC様細胞に変化させることを含む方法。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、その全体が参照によって本明細書に組み入れられる2014年6月27日に出願した米国仮出願第62/018,396号の利益を主張する。

【0002】

本出願を通して様々な出版物が参照される。本出願が関係する技術分野の現状をより十分に説明するために、これらの出版物の開示は、参照によってそれら全体が本明細書により本出願に組み入れられる。

【0003】

技術分野

30

本発明の分野は、眼科的障害、疾患及び傷害を処置するための方法及び組成物に関する。詳細には、本発明の分野は、角膜及び眼表面の障害、疾患、欠損及び傷害を処置するための方法、キット及び組成物に関する。本開示は、角膜輪部組織に由来する、培養哺乳動物輪部幹細胞の調製に関する。好ましい実施形態では、輪部幹細胞株は、自己再生性であり、角膜上皮組織に分化する能力がある。輪部幹細胞株を培養する方法、並びにそれらの使用の方法及び組成物も開示する。

【背景技術】

【0004】

成熟幹細胞が眼の角強膜輪部に存在することは公知である。これらの細胞は、角膜表面の動的平衡に関与し、眼をまばたきしている間に流され、剥がれ落ちる表在性上皮細胞を置換する。化学熱傷若しくは温度熱傷、コンタクトレンズ、重症微生物感染症、複数回の外科手術、凍結療法、又は疾患、例えばスティーブンス・ジョンソン症候群若しくは眼瘢痕性類天疱瘡からの輪部幹細胞の重度損傷は、異常な角膜表面、羞明及び視力低下につながる可能性がある、輪部幹細胞破壊及び輪部幹細胞欠損をもたらすことがある(Andersonら、(2001)Br. J. Ophthalmol. 85:567-575)。輪部幹細胞源の再導入なしにこの損傷を修復することはできない(Tsengら、(1998)Arch.Ophthalmol.116:431-41、Tsaiら、(2000)N. Engl. J. Med.343:86-93、Hendersonら、(2001)Br. J. Ophthalmol.85:604-609)。それゆえ、増殖能力が高い輪部幹細胞は、角膜表面の平衡の維持に必要な角膜上皮細胞を途絶えることなく供給するので、生存眼表面の維持に明らかに重要である(Tseng、(1996)Mol.Biol

40

50

.Rep.23:47-58)。

【0005】

いくつかのアプローチを使用して角膜表面障害後に正常視力の回復が試みられてきたが、これらのアプローチは、一般に、輪部幹細胞の喪失に関連する又は起因する損傷を修復するのに十分なものではない。1つの従来のアプローチは、対象の眼の表面に羊膜を直接移植することによる損傷角膜表面の修復である。(Andersonら、(2001)Br J. Ophthalmol.85:567-575)。羊膜移植は、上皮化を助長すること、正常上皮表現型を維持すること、炎症を低減させること、瘢痕化を低減させること、組織接着を低減させること、及び眼の血管新生を低減させることが判明している。しかし、羊膜移植には一様に成功しないという欠点があり、患者の出発点と大して差のない最終結果となることが多い(Prabhasawatら(1997)Arch.Ophthalmol 115:1360-67)。ヒト羊膜上皮細胞を単離し、それらを角膜表面上皮に分化させる方法もHuら(W000/73421)によって開示されている。

10

【0006】

角膜損傷を処置するもう1つのアプローチは角膜移植である。(Lindstrom、(1986)N. Engl. J. Med.315:57-59)。輪部幹細胞欠損を処置するさらに別のアプローチは、ドナーの眼からレシピエントの眼へ輪部グラフトの移植である。

【0007】

生きているドナーから大きな輪部生検材料を除去することの不利益を考慮して、健常な眼から輪部上皮のほんの小さな生検材料の採取に依存する、輪部幹細胞欠損を処置するための他の方法が開発された(Pellegriniら、(1997)Lancet 349:990-993)、(Koizumiら、(2000)Invest.Ophthalmol.Vis. Sci.41:2506-2513、Koizumiら、(2000)Cornea 19:65-71、Duaら、(2000)Surv.Ophthalmol.44:415-425、Jun Shimazakiら、(2002)Ophthalmol.109:1285-1290)。羊膜を利用する別のアプローチが米国特許出願公開第2003/0208266号に開示されており、この特許文献には、特別に処置された羊膜を用いてエキスビボで培養される上皮幹細胞の移植が記載されている。

20

【0008】

グラフトを作成するための別のアプローチが欧州特許第0572364号に記述されており、この特許文献には、眼の輪部及び/若しくは輪部周辺領域又は眼の円蓋及び/若しくは結膜領域由来の生検材料を用いて、ヒト眼表面上皮生検材料をインビトロで増殖させる方法が開示されている。別の特許出願、W003/030959には、輪部幹細胞を培養するために表面が修飾されたコンタクトレンズを使用する、角膜病変を処置するための角膜修復デバイスが開示されている。

30

【0009】

同様に、米国特許出願公開第2002/0039788号には、損傷又は罹病した角膜上皮表面の処置用の生物学によって作られた複合グラフトであって、分化した上皮細胞の多層上皮を含む複合グラフトが開示されている。米国特許第6,610,538号には、眼を損傷した患者にグラフトとして使用するためのヒト角膜上皮薄膜を輪部幹細胞の培養物からインビトロで再構築する方法が開示されている。W003/093457には、膜タンパク質マーカーCD34又はCD133(これらは両方とも表面抗原分類(CD)に属する)を発現する幹細胞を選択することによって角膜組織から幹細胞を同定及び単離する方法も開示されている。

40

【0010】

あらゆる輪部細胞移植の安定性及び成功は、眼表面に再定着させるための生存輪部幹細胞を継続的に再生するその能力に依存する。輪部幹細胞欠損の処置に現在使用されている移植片又はグラフトは、限られた量でしか存在しないことがある輪部幹細胞ではなく、高い割合の分化角膜上皮細胞を一般に含有する。そのような移植片又はグラフト中のドナー上皮は、限られた輪部幹細胞供給量のため、一般にほんの短期間しか生存しないであろう。あるいは、移植片は澄んだ角膜上皮を生じさせることもあるが、十分な輪部幹細胞を欠くことに起因して異常な上皮表面及び治癒不良となり、その結果、眼表面を修復することができず、視力を向上することができない。したがって、輪部幹細胞が欠損している眼に輪部幹細胞を供給することを意図したこれらのアプローチには、移植片又はグラフト中に

50

存在する自己再生能を有する未分化輪部幹細胞の限られた供給に起因しうる重大な制限がある。それゆえ、輪部幹細胞を再生して眼に継続的に供給することができる十分な輪部幹細胞集団を提供することによって眼表面障害の修復及び再構築がより成功することになる移植片又はグラフトを提供することが望ましい。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0011】

【特許文献1】国際公開第W000/73421号

【特許文献2】米国特許出願公開第2003/0208266号

【特許文献3】欧州特許第0572364号

10

【特許文献4】国際公開第W003/030959号

【特許文献5】米国特許出願公開第2002/0039788号

【特許文献6】米国特許第6,610,538号

【特許文献7】国際公開第W003/093457号

【非特許文献】

【0012】

【非特許文献1】Andersonら、(2001)Br. J. Ophthalmol. 85:567-575

【非特許文献2】Tsengら、(1998)Arch.Ophthalmol.116:431-41

【非特許文献3】Tsaiら、(2000)N. Engl. J. Med.343:86-93

【非特許文献4】Hendersonら、(2001)Br. J. Ophthalmol.85:604-609

20

【非特許文献5】Tseng、(1996)Mol.Biol.Rep.23:47-58

【非特許文献6】Prabhasawatら(1997)Arch.Ophthalmol 115:1360-67

【非特許文献7】Lindstrom、(1986)N. Engl. J. Med.315:57-59

【非特許文献8】Pellegriniら、(1997)Lancet 349:990-993)

【非特許文献9】Koizumiら、(2000)Invest.Ophthalmol.Vis. Sci.41:2506-2513

【非特許文献10】Koizumiら、(2000)Cornea 19:65-71

【非特許文献11】Duaら、(2000)Surv.Ophthalmol.44:415-425

【非特許文献12】Jun Shimazakiら、(2002)Ophthalmol.109:1285-1290

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0013】

今までのところ、角膜上皮損傷を完全に回復させることができる又は損傷若しくは死滅した細胞を置換するために新たな角膜上皮細胞若しくは輪部幹細胞の増殖及び発生を誘導することができる処置選択肢は存在せず、これらの処置選択肢のいずれか又はすべてが患者を正常な又はほぼ正常な視覚機能に戻すことに役立つことができるだろう。したがって、本発明の目的は、眼科的障害、疾患及び傷害、特に角膜障害、疾患及び傷害に罹患している患者にそのような処置選択肢を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本開示は、非胚性組織、好ましくは角膜輪部組織、に由来する哺乳動物輪部幹細胞(LSC)の培養を記載するものである。詳細には、本開示は、(i)角強膜輪部から単離される、(ii)インビトロ培養で拡大される、及び(iii)分化系統が決定されている角膜上皮細胞に分化する潜在力をインビトロ培養で又は治療的にそれを必要とする対象の眼において維持する、培養哺乳動物LSC、及び培養哺乳動物LSCの産生方法を提供する。

40

【0015】

特定の実施形態において、LSCは、少なくとも最小必須培地に加えて任意選択の薬剤、例えば増殖因子、血清及び1つ以上の可溶性因子を含む細胞培地がさらに補充された、細胞外マトリックス上のフィーダーフリー培養培地で培養される培養細胞である。

【0016】

本発明の輪部幹細胞は、任意の適する哺乳動物から単離することができる。一部の実施

50

形態では、本発明の輪部幹細胞をレシピエントでないドナーから単離することができる。そのようなドナーは、対象と生体適合性である死体又は臓器ドナーであることができる。一部の実施形態では、本発明の輪部幹細胞は、レシピエントでもあるドナーから単離することができ、したがって、レシピエント及びドナーは同じ個体又は対象であることができる。

【0017】

輪部幹細胞の単離は、培養及び拡大前、中又は後に行うことができる。好ましい実施形態では、解離させた組織を利用して本発明のLSCを単離することができ、その後、そのLSCを拡大させる。

【0018】

本発明の輪部幹細胞は、輪部幹細胞の増殖及び拡大を支持する培養培地で培養することができる。単離されたLSCは、何継代にもわたってインビトロ培養で実質的に未分化のままである。

【0019】

特定の実施形態において、本発明の輪部幹細胞は、細胞外マトリックス又はバイオコートされた表面、例えば細胞外マトリックス担体又はバイオコートされたレンズ、などの適切な支持材料上で培養される。表面材料は、本明細書に記載の1つ以上の付着因子でバイオコートされたいずれの支持体であってもよい。

【0020】

本発明の輪部幹細胞を様々な治療様式で用いることができ、例えば、それを必要とする患者の眼科的障害、疾患又は傷害を処置する方法であって、単離されたLSC細胞を含む治療有効量の1つ以上の組成物を前記患者に投与することを含む方法で用いることができる。例えば、本発明は、それを必要とする患者又は輪部幹細胞が欠損している患者において角膜上皮細胞の増殖又は再生を刺激する方法を企図している。

【0021】

本発明の一実施形態では、細胞外マトリックス又はバイオコートされた表面などの適切な支持材料上の本発明のLSC細胞が対象に提供される。支持材料は、新規のものであってもよく、又は本発明のLSCの培養に用いられる支持材料であってもよい。例えば、本発明の例となるものは、バイオコートされたレンズキットで培養されたLSCを含む。代替実施形態では、本発明のLSCは、培養培地から単離され、それを必要とする対象に細胞外マトリックス、培地及び他の材料とともに提供される。同様に、培地及び他の因子は培養培地に由来し得る。一例では、本発明のLSCは、他の薬剤又は処置法と併用で投与されることもある。より特異的な実施形態では、他の薬剤は活性薬剤である。そして最も特異的な実施形態では、活性薬剤は、増殖因子、サイトカイン、阻害剤、免疫抑制剤、ステロイド、ケモカイン、抗体、抗生物質、抗真菌薬、抗ウイルス薬、マイトマイシンC、又は他の細胞タイプを含む。別の特異的な実施形態は、他の処置法がコンタクトレンズ、滴剤、及びLSCを送達するための他の眼科的手段を含むものである。

【0022】

本発明は、角膜を修復するための材料を調製するためのLSC及び材料であって、前記調製が、(1)輪部幹細胞浮遊液から輪部幹細胞を単離するステップ、(2)前記浮遊液から輪部幹細胞を得るステップ及び輪部幹細胞の角膜上皮細胞への分化を促進するための誘導培養培地中に配置された足場に前記輪部幹細胞を播種するステップを含む上記ステップ(1)を含む、上記LSC及び材料を提供する。

【0023】

上記ステップ(1)において、一実施形態では、輪部幹細胞を次の方法によって得てもよい：新鮮な輪部組織を清浄化し、小片に切断し、37℃で、2～4時間、0.2%コラゲナーゼIVで処置して細胞塊を消化してもよい。輪部組織を単一細胞浮遊液で10～20分間、37℃で1～3% Matrigel被覆培養皿において0.25%トリプシン及び1mM EDTAによってさらに消化してもよい。

【0024】

好ましくは、別の実施形態では、コラゲナーゼIV消化時間は3時間であり、0.25%トリプシン及び1mM EDTA消化時間は15分間であり、Matrigel濃度は2%であった。

【0025】

さらに、さらに別の態様では、輪部幹細胞浮遊液中の細胞濃度は、約 $2 \times 10^2 \sim 8 \times 10^2$ /u1であってもよい。

【0026】

加えて、本発明のある実施形態では、ステップ(2)での足場は、生物由来の材料であってもよく、又は無細胞レンズであってもよい。

【0027】

またさらなる実施形態では、ステップ(2)での生物材料は、細胞由来コラーゲンであってもよく、又はMatrigel羊膜であってもよい。

【0028】

加えて、一実施形態では、ステップ(2)で誘導に使用される培地は、上皮細胞培養培地CnT-30である。

【0029】

さらなる実施形態では、ステップ(2)での誘導培養のための培養時間は、約3～18日であってもよい。好ましくは、ステップ(2)での培養時間は、約14～18日である。

【0030】

本発明は、角膜傷害用の薬物を調製するための角膜修復材料の上記処置も提供する。

【0031】

本発明の他の特徴及び利点は、付随する説明、実施例及び特許請求の範囲から明らかになる。本出願を通して引用するすべての参考文献、係属特許出願及び発行特許の内容は、参照によって本明細書により明確に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】角膜上皮の正常及び病的変化並びに皮膚とのその比較を示す図である。a、正常な角膜-輪部接合部。K19及びp63によって識別される輪部(図2eも参照されたい)並びにK12によって識別される角膜。b、基底層におけるp63及びK5/K14(図2a、bを参照されたい)とK3/K12の非存在とによって識別される正常皮膚表皮。c、K3/K12とp63及びK1/K10の非存在とによって標識される正常中心角膜(図2c、d、fも参照されたい)。d、K3/K12の非存在(a')並びに皮膚上皮マーカーp63(b')及びK5/K1/K10(c'～e')の存在を示す、異常表皮分化を有する角膜。H&E染色、左パネル。スケールバー:100 μ m。

【図2】ケラチン発現プロファイル並びにLSC及びSESCの細胞培養/3D分化を示す図である。a～f、ヒト輪部、角膜及び皮膚表皮におけるケラチン発現プロファイル。a、b、輪部及び皮膚の基底細胞層において陽性K5(a)及びK14(b)発現を示す周辺角膜-輪部接合部及び皮膚組織、並びに中心角膜上皮におけるそれらの非存在。c～d、陽性K1(c)及びK10(d)発現を示す皮膚表皮、並びに角膜及び輪部におけるそれらの非存在。e～f、輪部では陽性K19で中心角膜上皮及び皮膚では陰性(e)、並びに角膜でのみ陽性K3/K12で輪部及び皮膚では陰性(f)を示す周辺角膜-輪部接合部。g～j、第12継代で幹/前駆細胞及びSESCの特徴を有する培養LSC、並びに3D分化システムの検証。g、p63(a')及びKi67(b')の陽性幹細胞シグナル並びに陰性分化CECシグナル、K3/12(c')を示すLSCの免疫蛍光染色、位相差写真(d'); (h)LSCと比較した3D分化アッセイからのCECのK3/K12アップレギュレーション及びK19ダウンレギュレーションを示すqPCR解析;i、SESCと比較した3D分化アッセイからのSECのK1/K10アップレギュレーション(c)、すべて、n=3、p<0.01。j、陽性p63(a')、輪部幹細胞マーカーK19の陰性シグナル(b')及び成熟皮膚上皮マーカーK1/K10の陰性シグナル(c'、d')を示す、培養SESCの免疫蛍光染色。スケールバー、100 μ m。

【図3】輪部及び角膜でのWNT7A及びPAX6の排他的発現を示す図である。a～d、培養LSC及びSEC並びに3D分化CEC及びSECの免疫蛍光染色。左パネル、位相差写真;LSCにおけるp63、K19及びKi67(a)、SESCにおけるp63、K5及びKi67(c)、3D培養スフェアでのCECにおけるK3/12、K1、K5、K10及びK14(b)並びに3D培養スフェアでのSECにおけるK3/12、K1、K5、K10及

10

20

30

40

50

びK14(d)の染色。e、LSCとCECとSESCとを比較する示差遺伝子発現を描写するヒートマップ。^{*}はWNT7A及びPAX6を示す。f、輪部、角膜及び皮膚でのWNT7A及びPAX6の免疫蛍光染色(a'~d')。培養LSCにおけるWNT7A及びPAX6の発現(e'、g')並びに3D CECスフェアにおけるWNT7A及びPAX6の発現(f'、h')。略語:LSC:輪部幹/前駆細胞、SESC:皮膚上皮幹細胞、CEC:角膜上皮細胞、SEC:皮膚上皮細胞。スケールバー、100 μ m。

【図4】遺伝子発現解析を示す図である。a~c、LSC、CEC及びSESCのゲノムワイド遺伝子発現マイクロアレイ。a、LSC/CECとSESCの比較からの上位100有意遺伝子。b、強い相関関係を示す、qPCR解析でのマイクロアレイデータの検証。c、SESCと比較したLSC及びCECにおけるWNT7A及びPAX6発現のqPCR解析、すべてn=3、p<0.05。d、1歳ヒト乳児の角膜及び輪部におけるWNT7A及びPAX6の発現。H&E染色(a')、四角で囲った領域を連続切片(b'~d')で示した。WNT7Aの免疫蛍光染色(b')、PAX6の免疫蛍光染色(c')及びK3/12の免疫蛍光染色(d')。スケールバー、100 μ m。

【図5】WNT7A及びPAX6が角膜細胞運命の維持に必須であることを示す図である。a、ヒト角膜上皮扁平上皮化生。赤色囲み枠(対の左側の囲み枠、又はa'の単一の大きい囲み枠)は化生領域を示し、青色囲み枠(対の右側の囲み枠)は比較的正常な角膜の領域を示す;最上部パネル:典型的な皮膚表皮形態を示すH&E染色(最上部パネル)であって、基底層が陽性p63(a'、矢尻はp63染色を示す)であり、WNT7Aの喪失(b')及びPAX6の喪失(c')に角膜K3/K12の非存在(d')が付随した。最上部パネルの赤色及び青色囲み枠で印を付けた領域の連続切片を下方パネルに示す。b、WNT7A又はPAX6がノックダウンされた3D分化細胞の免疫蛍光;K1及びK5、左パネル;PAX6及びK10、中央パネル;K3/12、右パネル。c、WNT7A又はPAX6がノックダウンされた3D分化細胞における角膜又は皮膚上皮マーカーの遺伝子発現変化についての定量的PCR解析(すべてn=3、p<0.05)。データを平均 $\pm$ s.d.として示す。スケールバー、100 μ m。

【図6】ヒト角膜疾患における皮膚表皮マーカーの出現と角膜マーカーの喪失を示す図である。スティーブンス・ジョンソン症候群(a、b)、眼類天疱瘡(c)、外傷傷害(d)及びアルカリ熱傷(e)を有する患者の角膜における皮膚表皮マーカーp63、K5及びK10の出現と角膜マーカーK3/12、PAX6及びWNT7Aの喪失。すべての画像について、角膜上皮扁平上皮化生の病変(a')に関してH&E染色を行った(a')。b'~f'、基底上層でのp63(b'、d')及びK5(c'、d')及びK10(e')増加を示す連続切片における同じ病変領域。この領域ではWNT7Aを検出できず(e')、K3/12及びPAX6も検出できなかった(f')。スケールバー、100 μ m。

【図7】LSCにおけるPAX6発現に対するWNT7A/FZD5の効果を示す図である。a~c、LSCにおけるPAX6発現に対するWNT7Aノックダウンの効果。a、LSC及びそれらの3D分化スフェアにおけるWNT7A及びPAX6ノックダウン(shWABT7A及びshPAX6)の効果を示す位相差写真。b、LSCにおけるWNT7A及びPAX6の遺伝子発現変化のqPCR解析。WNT7AノックダウンはPAX6発現を減少させた(n=3、p<0.01)、PAX6ノックダウンではWNT7A発現の有意な変化なし。c、ウェスタンブロット分析によるLSCにおけるWNT7A及びPAX6のノックダウン効率の検証。d~f、WNT7A及びFZD5は、PAX6発現の上流レギュレーターとして作用した。d、LSC及び3D分化スフェアにおけるFZD5ノックダウン(shFZD5)の細胞形態を示す位相差写真。e、LSCにおけるWNT7A及びFZD5の共免疫沈降。f、FZD5がノックダウンされたLSCの3D分化細胞(3D shFZD5 LSC)における角膜及び皮膚上皮マーカーの遺伝子発現変化のqPCR解析。FZD5ノックダウンはWNT7A発現に影響を及ぼさなかった;その他すべて、n=3、p<0.05。スケールバー、100 μ m。

【図8】SESCにおけるPAX6形質導入の効果を示す図である。a、PAX6が形質導入された(PAX6⁺)SESC及び3D分化スフェアの位相差写真。b、ウェスタンブロット分析による3D分化スフェアにおけるK12及びPAX6遺伝子発現の検証。c、PAX6が形質導入されたSESCの3D分化(3D PAX6⁺ SESC)における皮膚特異的ケラチン、K1/K10の喪失。スケールバー、100 μ m。

【図9 a】PAX6形質導入による角膜上皮様細胞へのSESCの転換を示す図である。a、トランスフェクトされたSESCにおけるPAX6及びp63の二重免疫蛍光染色、K19はPAX6形質導入(PAX6⁺)SESCにおいて陽性であった。b、3D分化条件でのK3/12及びPAX6⁺ SESCの免疫蛍光染色。c、PAX6⁺SESCにおけるケラチンの遺伝子発現のqPCR解析(すべてn=3、p<0.05)。デー

タを平均±s.d.として示す。d、CECと、PAX6がノックダウンされた分化LSC(3D shPAX6 LSC)と、SECと、PAX6が形質導入された分化SESC(3D PAX6⁺ SESC)との間の階層的クラスター解析。e、CECへの正常なLSC分化(a')、及び角膜表面上皮細胞疾患の際にLSC中のWNT7A/PAX6の喪失が異常な皮膚表皮様分化をもたらす提案機序(b')を示す概要図。スケールバー、100 μm。

【図9b】図9aのつづきである。

【図9c】図9bのつづきである。

【図9d】図9cのつづきである。

【図9e】図9dのつづきである。

【図10】RNA-seqデータの定量的情報を示す図である。a、RNA-seqサンプルの統計解析：各サンプルの生リード、マッピングリード及びマッピング率を含む。b、重複生体サンプルの対比較。c、SECと3D PAX6⁺ SESCとの、CECと3D shPAX6 LSCとの差、すべてFDR<0.001。a、PAX6が形質導入されたウサギSESC(Rb PAX6⁺ SESC)又はPAX6がノックダウンされたLSC(Rb shPAX6 LSC)におけるPAX6発現のqPCR解析(すべてn=3、p<0.05)。多少の実験変動の結果として生じることがある、又は本発明者らがこの研究で実証するようにPAX6発現は遺伝子発現レベルと機能レベルの両方でSESCからCECへの細胞運命の切り替えに大いに貢献するが、このシグナル転写因子はCECと完全に同一である細胞を作り出すには十分でない可能性に起因する、ヒートマップのいくつかの小さな差に本発明者らは注目した。

【図11】PAX6の操作された発現及びウサギLSC欠損モデルを示す図である。a~e、ウサギSESC及びPAX6ノックダウンLSCにおける、PAX6の操作された発現の定量、及び培養。a、PAX6が形質導入されたウサギSESC(Rb PAX6⁺ SESC)又はPAX6がノックダウンされたLSC(Rb shPAX6 LSC)におけるPAX6発現のqPCR解析(すべてn=3、p<0.05)。b、p63が陽性染色され、PAX6が陰性染色されたウサギSESC。左パネル、位相差写真。c、上方横列、PAX6が形質導入されたウサギSESCにおけるPAX6及びp63の二重免疫染色。上方左パネル、位相差写真。下の横列、ウサギPAX6⁺ SESCを移植のためにGFPでさらに標識した。d、p63及びPAX6が陽性染色されたウサギLSC。上方左パネル、位相差写真。e、PAX6がノックダウンされたGFP標識ウサギLSCの培養。f、a'、結膜角膜周囲切開を行い、2mm前側輪部結膜の周囲ストリップを除去した。b'~d'、前側角膜実質面に沿ってLSC及び角膜上皮を完全に除去するための表層強膜及び角膜切開。切除されたキャップを(d'、矢印)に示す。e'~f'、露出した角膜実質層をヒト羊膜によって覆い(e')、縫合した(f')。(n=3)。スケールバー、100 μm。

【図12】ウサギLSC欠損モデルのGFP標識PAX6⁺ SESC移植による角膜上皮再生及び修復を示す図である。a、角膜上皮欠損修復の時間経過。移植15日後：角膜表面のフルオレセイン染色によって証明される全角膜上皮欠損に伴う角膜透明性減少；移植30日後、角膜透明性向上及び角膜上皮欠損のフルオレセイン染色減少；移植45及び90日後：角膜透明性の回復及び維持。b~c、角膜上皮欠損の完全修復及び再上皮化を示す、GFP標識PAX6⁺ SESCの移植90日後のウサギ角膜上皮表面の再生及び修復についての他の2つの例。a~c、左から、角膜上皮の光学顕微鏡写真、細隙灯顕微鏡写真及びフルオレセイン染色のパネル(注記：角膜表面の輝点はカメラの光の反射に起因するものであり、上皮欠損ではなかった)。(n=5)。d、インタクト角膜上皮組織像を示す、GFP標識PAX6⁺ SESCの移植90日後の3匹の別々のウサギにおける角膜上皮表面の再生及び修復のH&E染色。

【図13】ウサギLSC欠損モデルにおける移植による角膜上皮再生を示す図である。a、GFP標識PAX6⁺ SESCの移植後のウサギLSC欠損モデルに関する角膜上皮再生及び修復の時間経過。上方パネル、移植3日後。左、角膜混濁を示す光学顕微鏡写真；右、輪部領域のGFP+ドナー細胞(矢印)。下方パネル、移植20日後。左、部分的に透明性のある角膜を示す光学顕微鏡写真；右、透明領域に共に位置するGFP⁺ドナー(矢印)。スケールバー、1mm。本発明者らは、輪部領域からの移植細胞のみが生存でき、増殖でき、角膜表面上皮を再生できることを観察した。これは、輪部が幹細胞生存及び増殖に好適な幹細胞ニッチを含有することを示唆している。b、GFP標識PAX6⁺ SESCの移植90日後のウサギレシピエントの眼の輪部領域からの再プログラムされたドナーGFP標識PAX6⁺ SESC上皮細胞の培養及び再単離。上方パネル、PAX6及びGFPの二重免疫蛍光染色；下のパネル、PAX6が形質導入されたウサギSESC

におけるp63及びGFPの二重免疫蛍光染色。スケールバー、100 μm 。c、GFP標識PAX6⁺SESCを移植した角膜に対する反復角膜上皮傷害の修復及び回復。上方パネル、本発明者らはPAX6⁺SESCの最初の移植の3ヶ月後、ドナー由来角膜上皮細胞を医原的にこすって除去して大きい角膜表面上皮欠損を生じさせた(矢印)。下のパネル、上皮欠損が治癒して完全修復及び回復が72時間以内に観察された(n=3)。左パネル、光学顕微鏡写真;中央パネル、細隙灯顕微鏡写真;右パネル、フルオレセイン染色。

【図14】ウサギ輪部幹細胞欠損モデルの細胞移植及び角膜上皮修復を示す図である。a、移植2ヶ月後のウサギ角膜の免疫蛍光染色。上方パネル、角膜表面での陽性GFPシグナル並びに角膜上皮マーカーK3及びK12の発現を示す、GFP標識PAX6⁺SESCを移植した角膜。下のパネル、陽性GFPシグナル及び皮膚表皮上皮マーカーK10の発現を示す、GFP標識shPAX6-LSCを移植した角膜。スケールバー、100 μm 。b~f、細胞移植2ヶ月後のウサギ角膜(左パネル、H&E染色;中央の2つのパネル、白色光顕微鏡写真及び細隙灯顕微鏡写真;右パネル、角膜上皮表面のフルオレセイン染料染色)。スケールバー、100 μm 。b、典型的な角膜上皮組織像と上皮欠損のないインタクト角膜表面とを有する正常角膜。c、上皮化生及び血管新生を伴う角膜混濁の組織像を示す、ヒト羊膜で覆っただけの露出した角膜(n=4)。d~e、角膜上皮組織像、上皮欠損のない治癒したインタクト角膜表面を示す、GFP標識LSC(d、n=3)及びGFP標識PAX6⁺SESC(e、n=5)を移植した角膜。f、上皮化生、上皮欠損がある混濁した、血管新生を起こした角膜表面の組織像を示す、GFP標識、shPAX6処置LSCを移植した角膜(n=4)。g、GFP標識PAX6⁺SESC移植3ヶ月後のウサギ角膜:平滑で透明な角膜(一番上のパネル)であって、陽性GFPシグナルがある(第2のパネル、スケールバー、1mm)。第2のパネルの枠で囲まれた領域を拡大して、GFP(中央パネル)、PAX6(第4のパネル)及びGFP-PAX6両方(一番下のパネル)の発現を示す。スケールバー、100 μm 。

【図15】異なる胚期でのマウス角膜のPax6及びp63発現パターンを示す図である。A、マウス角膜におけるE12.5での陽性PAX6。p63は検出不能である。より高倍率の拡大図(左パネル)は、ヘマトキシリン及びエオシン(H&E)で染色した角膜-輪部-結膜接合部(赤色囲み枠)を示す。B、眼領域(結膜、輪部及び角膜組織、白色矢印)内でのPAX6発現に印を付けるが、p63は、E14.5で眼瞼皮膚、輪部及び角膜において陽性であった。左パネルはH&E染色を示す。C及びD、E16.5(C)及びE18.5(D)でのマウス角膜におけるPAX6及びp63発現。右上方パネル、すべての眼組織におけるPAX6発現及び角膜組織におけるp63発現を示す、H&E染色での赤色囲み枠(左パネル)内に描かれている領域のPAX6及びp63染色;右下方パネル、黄色囲み枠によって囲まれた領域のより高倍率の拡大図。E、P1及びP60でのROSA^{mT/mG};PAX6-GFPcreマウスの角膜上皮におけるPAX6の系統追跡。ROSA^{mT/mG}は対照として役立つ。スケールバー=100 μm 。

【図16】ヒト角膜及び皮膚上皮の特徴づけを示す図である。A、PAX6及びK3/12とp63、K5、K1及びK10非存在とによって識別される角膜。B、p63、K5、K1及びK10とPAX6及びK3/12の非存在とによって識別される皮膚表皮。左上方パネル、H&E染色。スケールバー=100 μm 。

【図17】ヒト輪部領域並びに培養ヒトLSC及びSESCの免疫蛍光染色を示す図である。A、PAX及びp63によって識別されるヒト輪部領域。左上方パネル、角膜-輪部接合部(矢印)のH&E染色。B、PAX6及びp63が染色された培養LSC。左パネル、位相差。C、p63及びK5が染色された培養SESC。左パネル、位相差。スケールバー=100 μm 。

【図18】PAX6が角膜細胞運命の維持に不可欠であることを示す図である。A、ヒトLSC及びそれらの分化細胞におけるPAX6ノックダウンの細胞形態及びKi67染色を示す位相差。B、分化LSCと比較した、分化PAX6 shRNA LSC(shPAX6-LSC)における角膜又は皮膚上皮マーカーの遺伝子発現変化の定量的PCR解析(n=3、p<0.05)。データを平均±S.D.として示す。スケールバー=100 μm 。

【図19】角膜-輪部デルモイドを有する患者における皮膚表皮マーカーの出現と角膜マーカーの喪失を示す図である。A、典型的な角膜輪部デルモイドを有する患者(パネルa)及びH&E染色(パネルb)。B、基底上層におけるp63増加(パネルa)、K5増加(パネルb)及びK10増加(パネルc)を示す連続切片。K3/12及びPAX6を検出することはできなかった(パネルd)

。スケールバー=100 μm 。

【図 20】LSC及びSESCに関わるシグナル経路同定を示す図である。A、LSCとSESCの比較でのWnt、Notch及びTGF- β 経路における遺伝子発現データのヒートマップ。ヒートマップ中の各遺伝子について、赤色及び青色は、すべてのサンプルの平均発現レベルと比較して高い及び低い発現をそれぞれ示す。B、Wnt及びNotch経路に属する遺伝子間の遺伝子相互作用のグラフィック表示。2つの独立したLSC及びSESC標品における平均発現値間の倍数差を使用して、各遺伝子を個々に色分けした(赤色、LSCでのほうが高い発現;青色、SESCでのほうが高い)。Notch及びWnt経路に関連する遺伝子のサブセットを選択した。

【発明を実施するための形態】

【0033】

定義

用語「培養培地」、「細胞培養培地」又は「細胞培地」は、細胞、例えば幹細胞、前駆細胞又は分化細胞を増殖させる細胞増殖培地を記述するために使用される。培養培地は当技術分野において公知であり、少なくとも最小必須培地に加えて任意選択の薬剤、例えば、増殖因子(例えば、線維芽細胞増殖因子、好ましくは塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、及び上皮増殖因子(EGF)を含む)、サイトカイン(例えば、白血病抑制因子(LIF))、ホルモン(例えば、グルココルチコイド(例えばヒドロコルチゾン)及び甲状腺ホルモン(例えば、3,3',5-トリヨード-L-チロニン)を含む)、グルコース、非必須アミノ酸、グルタミン、インスリン、トランスフェリン、ベータメルカプトエタノール、ROCK阻害剤、コレラ毒素、及び当技術分野において周知の他の薬剤を含む。そのような培地は、L-グルタミン、ノックアウト血清代替物(KSR)、ウシ胎仔血清(FBS)、非必須アミノ酸、白血病抑制因子(LIF)、上皮増殖因子(EGF)、ベータ-メルカプトエタノール、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、ヒドロコルチゾン、3,3',5-トリヨード-L-チロニン、ROCK阻害剤、抗生物質、B27培地サプリメント及び/又は他の培地サプリメントのいずれか1つ以上が補足されていてもよい、DMEM/F12(1:1)などの市販の培地を含む。本発明に有用な細胞培地は市販されており、非常に多数の商業的供給源の中でもInvitrogen Corp.(GIBCO)及びBiological Industries、Beth HaEmek、Israelから入手できる市販の成分をそのような細胞培地に補足することができる。

【0034】

「LSC培養培地」又は「LSC維持培地」は、輪部幹若しくは前駆細胞(LSC)又はLSC様細胞のインビトロでの安定した増殖用に処方される培養培地である。

【0035】

「分化培地」は、特定の細胞系統の細胞への幹又は前駆細胞のインビトロ分化用に処方される培養培地又は細胞培養培地である。例えば、「LSC分化培地」は、角膜上皮細胞(CEC)又はCEC様細胞への輪部幹若しくは前駆細胞又はLSC様細胞のインビトロ分化用に処方される培養培地でありうる。

【0036】

「フィーダーフリー培養培地」は、目的の細胞、すなわちLSC又はSECSを培養するために使用される培養培地が、細胞の安定した増殖を可能にするためにフィーダー細胞を必要としないことを指す。例えば、フィーダー細胞層が培養物中に存在しない「フィーダーフリー培養培地」で培養されたLSC細胞は分裂することができ、そのような細胞をLSCとして維持することができる。

【0037】

「無血清」は、動物又はヒトから得られる精製血液産物である血清を有さないことを指す。

【0038】

「無血清」培養培地は、血清を有さない培養培地である。これは、例えば、代用血清又は血清代替物を含むこともある。

【0039】

「既知組成」培地又は「既知組成」培養培地は、その成分が化学的に規定される培養培

10

20

30

40

50

地である。したがって、これは既知組成でない成分である血清を有さない。血清を必要とする細胞又は組織培養のための「既知組成」培地は、通常、血清の代わりに代用血清又は血清代替物を含有する。「既知組成」培地は、動物由来産物を含有しない又は異質な動物由来産物を含有しない場合、「ゼノフリー」である。これは、ヒト由来産物不含であることもある。動物由来又はヒト由来産物のを、以前に動物との接触又は動物への曝露がない、組換え生産材料、化学合成材料又は酵素的に合成された材料に置換することが一般には望ましい。

【0040】

「幹細胞」は、自己再生を示し、前駆細胞を生じさせる細胞であり、前記細胞は、増殖することができ、有糸分裂後である最終分化細胞に分化することができる。例えば、輪部幹細胞は、分裂して輪部幹細胞はもちろん前駆細胞も生じさせることができる。前駆細胞を(例えば適切な条件下でのインビトロ培養によって)、例えば角膜上皮細胞(CED)に分化するように方向づけることができる。

【0041】

「輪部幹若しくは前駆細胞」又は「LSC」は、例えば、眼の角膜と結膜の間の領域である輪部から得られる幹細胞を含む。LSCは、増殖し、分化して、角膜上皮細胞(CEC)を生じさせることができる。特に、LSCは、輪部内のLSCニッチに存在すると考えられる。LSCは、眼の角膜輪部を含む輪部領域、角膜と結膜の間の周縁部、角膜と強膜の境界、角強膜輪部、輪部上皮の基底層の陰窩領域、柵間(interpalisade)乳頭間突起を含む領域、又はVogt柵(Palisades)を含む領域から単離されうる。

【0042】

本明細書にて定義の「単離された」は、その元々の環境から取り出された材料を指し、それゆえ、その自然の状態から「人間の手によって」改変されている。

【0043】

「単離された輪部幹又は前駆細胞」は、個体から単離され、エキスビボ又はインビトロ培養下に置かれたLSCを含む。通常、組織検体材料中の単離されたLSCを解離させて単一細胞を得ることができる。

【0044】

本明細書で使用する場合、「濃縮された」は、混合物からの望ましくない材料の除去又は望ましい材料の選択及び分離によって1つ以上の材料の濃度又は量を選択的に増す(すなわち、特異的細胞マーカーを有する細胞を、集団内のすべての細胞が前記マーカーを発現するとは限らない異種細胞集団から分離する)ことを意味する。

【0045】

本明細書で使用する場合、用語「全能性細胞」は、次の意味を有するものとする。哺乳動物において、全能性細胞は、成体内のあらゆる細胞タイプになる潜在力があり、胚体外膜(例えば胎盤)のあらゆる細胞タイプになる潜在力がある。全能性細胞は、受精卵、及びその分裂によって生ずる最初のおおよそ4個の細胞を含む。

【0046】

本明細書で使用する場合、用語「多能性幹細胞」は、次の意味を有するものとする。多能性幹細胞は、体内のあらゆる分化細胞を作る潜在力がある真の幹細胞であるが、栄養芽層に由来する胚体外膜の成分を作ることに寄与することはできない。羊膜は、栄養芽層ではなく、胚盤葉上層から発生する。これまでに、3タイプの多能性幹細胞:胚性幹(ES)細胞(霊長類では全能性であることもある)、胚性生殖(EG)細胞、及び胚性腫瘍(EC)細胞が確認されている。これらのEC細胞は、胎児の生殖腺において起こることもある腫瘍である奇形腫から単離することができる。それらは、他の2種とは異なり、通常は異数性である。

【0047】

本明細書で使用する場合、用語「複能性幹細胞」は、真の幹細胞であるが、限られた数のタイプにしか分化することができない。例えば、骨髄は、血液のすべての細胞を生じさせるが他の細胞タイプに分化できないことがある複能性幹細胞を含有する。

【0048】

本明細書に記載する特定の組成物、増殖条件、培養培地などに言及するときの用語「動物質を含まない」とは、ウシ血清、タンパク質、脂質、炭水化物、核酸、ビタミンなどの非ヒト動物由来でない材料を特定の組成物の調製、増殖、培養、拡大、保存若しくは製剤化又はプロセスに使用することを意味する。「非ヒト動物由来でない材料」とは、該材料が、非ヒト動物体若しくは物質内に存在したこと又は非ヒト動物体若しくは物質と接触していたことが決してなく、それゆえ、異物で汚染されていないことを意味する。

【0049】

本明細書で使用する場合、用語「フィーダー細胞」は、補助物質としての役割を果たすさらなる細胞であって、例えば、増殖又は分化される標的多能性幹細胞のための培養条件を調整するために使用される細胞を意味することを意図したものである。例えば、フィーダー細胞、特に、動物フィーダー細胞、例えばマウス由来一次培養線維芽細胞は、細胞接着のための足場の提供及び幹細胞に必要とされる増殖因子の供給に関与する。したがって、「フィーダーフリー」又はフィーダー細胞が「ない」とは、フィーダー細胞が、特定の組成物の調製、増殖、培養、拡大、保存若しくは製剤化又はプロセスに使用されないことを意味する。

10

【0050】

細胞組成物に関しての用語「拡大された」とは、細胞集団が、先の方法を使用して得られるものより有意に高い細胞濃度となることを意味する。例えば、「拡大された」集団は、組織のグラム当たりの細胞数が先の方法と比較して少なくとも2倍かつ最大10倍向上している。用語「拡大された」は、人が介在して細胞数を上昇させた状況のみを対象にすることを意図したものである。

20

【0051】

本明細書で使用する場合、用語「継代」は、組織培養容器内で集密に達した又は集密に近い培養で増殖中の細胞をその容器から除去し、新鮮培養培地で希釈し(例えば、1:5希釈し)、新たな組織培養容器に入れてそれらの連続的増殖及び生存能を可能ならしめる細胞培養技術を意味する。例えば、輪部から単離されたLSCを初代細胞と言う。そのような細胞を、本明細書に記載の増殖培地で増殖させることによって培養で拡大させる。そのような初代細胞を継代培養するときの各継代培養ラウンドを継代と言う。本明細書で使用する場合、「初代培養物」は、対象から新たに単離された細胞集団を意味する。

【0052】

本明細書で使用する場合、用語「分化」は、細胞が進行性により特殊化されるプロセスを意味する。多能性幹細胞を記述するために本明細書で使用する場合、用語「分化」は、多能性幹細胞に、それらの分化多能性(すなわちすべての組織に分化する潜在能力)を失わせ、特定の組織を構成する細胞としての特徴を持たせる変化を意味することを意図したものである。

30

【0053】

本明細書で使用する場合の用語「生理的レベル」は、生物系において物質が見出されるレベルであって、生化学的及び/又は生物学的プロセスが正しく機能するのに適切であるレベルを意味する。

【0054】

本明細書で使用する場合、用語「プールされた」は、プールされない組成物と比較してより一定した又は一貫した特徴を有する新たな組成物を作り出すために組み合わせられた複数の組成物を意味する。

40

【0055】

用語「治療有効量」は、所望の生理作用を達成する(例えば、修復する、又は角膜治癒を促進する)ために必要な治療薬の量を意味する。

【0056】

本明細書で使用する場合の用語「溶解物」は、細胞、例えばLSCを溶解し、場合によりその細胞片(例えば細胞膜)を除去したときに得られる組成物を指す。これを機械的手段によって、凍結及び融解によって、超音波処理によって、EDTAなどの界面活性剤の使用によ

50

って、又は例えばトリプシン、キモトリプシン、コラゲナーゼ、エラスターゼ、ヒアルロニダーゼ、ディスパーゼ及びヌクレアーゼ、並びにStem Pro Accutaseなどの商品を使用する酵素的消化によって果たすことができる。場合によっては、細胞を溶解し、細胞膜部分を保持し、溶解細胞の残部を廃棄することが望ましいこともある。

【0057】

本明細書で使用する場合、用語「医薬的に許容される」は、治療薬に加えて、製剤を構成する成分が、本発明に従って処置される患者への投与に適していることを意味する。

【0058】

本明細書で使用する場合、用語「組織」は、一体となって特定の機能を遂行する、同様に特殊化された細胞の凝集体を指す。

10

【0059】

本明細書で使用する場合の用語「移植」は、未分化形態、部分的に分化された形態又は完全に分化された形態のいずれかである細胞(細胞浮遊液、又はマトリックス若しくは組織に組み込まれた細胞を含む)を含む組成物のヒト又は他の動物への投与を指す。

【0060】

本明細書で使用する場合、用語「付属の」は、連帯して、と一緒に、に加えて、とともになどを意味する。

【0061】

本明細書で使用する場合、用語「併用投与」は、2つ以上の薬剤の同時又は逐次投与を含むことができる。

20

【0062】

用語「対象」及び「個体」は、交換可能に使用される。本明細書で使用する場合、両方の用語は、任意の動物、例えば、ヒト及び/又は非ヒトを含む哺乳動物を意味する。用語患者、対象及び個体は、交換可能に使用される。いずれの用語も、医療専門家(例えば、医者、看護師、医師助手、用務員、ホスピス職員)の監督を必要とすると解釈されないものとする。

【0063】

本明細書で使用する場合、用語「処置する」、「処置すること」又は「処置」は、予防的に若しくは治療的に、疾患及び/若しくは状態の症状を軽減、寛解及び/若しくは改善すること、さらなる症状を予防すること、症状の基礎をなす代謝原因を改善及び/若しくは予防すること、疾患及び/若しくは状態を抑制すること、例えば、疾患及び/若しくは状態の発症を抑止すること、疾患及び/若しくは状態を緩和すること、疾患及び/若しくは状態を退行させること、疾患及び/若しくは状態に起因する状態を緩和すること並びに/又は疾患及び/若しくは状態の症状を停止させることを含む。

30

【0064】

本明細書で使用する場合の製剤、組成物又は成分に関しての用語「眼科的に許容される」は、処置される眼若しくはその機能に又は処置される対象の全身の健康状態に対して実質的に有害である持続的作用を有さないことを意味する。一時的な作用、例えば、小さな刺激又は「刺すような」感覚は、薬の眼科的局所投与にはよくあることであり、そのような一時的作用の存在は、本明細書にて定義の「眼科的に許容される」問題の製剤、組成物又は成分に矛盾しないと考えられるであろう。しかし、好ましい製剤、組成物及び成分は、たとえ一時的性質のものであっても実質的な有害作用の原因とならないものである。

40

【0065】

本明細書で使用する場合、用語「マトリックス」は、輪部幹細胞及び/又はそれらの前駆細胞が接着できる、したがって、フィーダー細胞の細胞付着機能の代わりに務めることができる任意の物質、又はそれらの接着を支持する任意の物質、例えば付着因子を指す。基底膜に由来する細胞外マトリックス成分、又は接着分子受容体-リガンド結合の一部を形成する細胞外マトリックス成分は、本発明での使用に特に適している。本発明のこの態様の方法によって使用することができる、適するマトリックスの非限定的な例としては、哺乳動物羊膜(例えば、ヒト羊膜)、コラーゲン(例えば、コラーゲンIV)、フィブリノーゲ

50

ン、パールカン、ラミニン、フィブロネクチン、プロテオグリカン、プロコラーゲン、ヒアルロン酸、エンタクチン、ヘパラン硫酸、テネイシン、ポリ-L-リシン、ゼラチン、ポリ-L-オルニチンなど、又はこれらの任意の組合せが挙げられる。あるいは、細胞外マトリックスは市販されている。市販細胞外マトリックスの例は、細胞外マトリックスタンパク質(Fischer又はLife Tech)、フィブリノーゲンとトロンビンシート(Reliance Life)、及びMatrigel(商標)(BD Biosciences)、並びにそれらの等価物である。完全に動物質を含まない培養条件が所望される場合、マトリックスは、ヒト源に由来する、又は組換え技術を使用して合成される。そのようなマトリックスは、例えば、ヒト羊膜、ヒト由来フィブロネクチン、Sigma、St. Louis、MO、USAから入手することができる又は公知の組換えDNA技術(例えば、米国特許第6,152,142号、及びTsengら、(1997)Am. J. Ophthalmol.124:765-774を参照されたく、これらの参考文献の各々が参照によって本明細書に組み入れられる)を使用して生産することができる組換えフィブロネクチンマトリックスを含む。

【0066】

本発明に従って、当技術分野の技能の範囲内の従来の分子生物学、微生物学及び組換えDNA技術を用いてもよい。そのような技術は、文献で十分に説明されている。例えば、Sambrookら、2001、「Molecular Cloning: A Laboratory Manual」; Ausubel編、1994、「Current Protocols in Molecular Biology」、I~III巻; Celis編、1994、「Cell Biology: A Laboratory Handbook」、I~III巻; Coligan編、1994、「Current Protocols in Immunology」、I~III巻; Gait編、1984、「Oligonucleotide Synthesis」; Hames及びHiggins編、1985、「Nucleic Acid Hybridization」; Hames及びHiggins編、1984、「Transcription And Translation」; Freshney編、1986、「Animal Cell Culture」; IRL Press、1986、「Immobilized Cells And Enzymes」; Perbal、1984、「A Practical Guide To Molecular Cloning」を参照されたい。

【0067】

値の範囲が与えられている場合、その範囲の上限と下限の間の、文脈による明確な指示がない限り下限の単位の10分の1までの、介在する各値、及びその述べられている範囲内の任意の他の述べられている又は介在する値は、本発明に包含されると解される。より小さい範囲に独立して含まれることがある、これらのより小さい範囲の上限及び下限も、述べられている範囲内の任意の特に除外される限界を前提に、本発明の範囲に包含される。述べられている範囲が一方又は両方の限界を含む場合、それら両方の含まれる限界のいずれかを除外する範囲も本発明に含まれる。

【0068】

本明細書で使用する場合、範囲を含む数字表示、例えば、温度、時間、量、濃度及びその他の前に使用する用語「約」は、(+)又は(-)10%、5%又は1%変動することがある近似値を示す。

【0069】

本明細書で使用する場合、用語「実質的にない」は、所与の物質若しくは細胞タイプがないこと、又はその物質若しくは細胞タイプがほぼないこと、例えば、所与の物質若しくは細胞タイプの約1%未満を有することを含む。

【0070】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用する場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(and)」及び「その(the)」は、文脈による別段の明白な指図がない限り、複数の言及対象を含む。

【0071】

本明細書で使用する場合、用語「含むこと」又は「含む」は、組成物及び方法が述べられている要素を含むが、他のものを除外しないことを意味することを意図したものである。組成物及び方法を定義するために使用する場合の「から本質的になる」は、述べられている目的のためにその組合せにとってあらゆる本質的に有意なもの以外の要素を除外することを意味するものとする。したがって、本明細書にて定義の要素から本質的になる組成物は、本開示の基礎的及び新規特徴に実質的に影響を及ぼさない他の材料又はステップを

除外しないことになる。「からなる」は、他の成分の微量要素及び実質的な方法ステップ以外のものを除外することを意味するものとする。これらの移行語の各々によって定義される実施形態は、本開示の範囲内である。

【0072】

別段の定義がない限り、本明細書において用いるすべての専門及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されているのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと同様又は等価の任意の方法及び材料も本発明の実施又は試験に使用することができるが、好ましい方法及び材料を次に説明する。

【0073】

本発明の組成物

本発明は、染色体に組み込まれた、あるいは組み込まれていない染色体外遺伝物質のままのPAX6をコードする、化学合成、組換え、又は単離核酸を含む、単離された輪部幹若しくは前駆細胞(LSC)集団又はLSC様集団であって、前記単離されたLSC集団は非LSC細胞を実質的に含まず、又は前記LSC様集団は非LSC様細胞を実質的に含まず、又は前記単離されたLSC又はLSC様集団は、非LSC細胞及び非LSC様細胞を実質的に含まない、上記単離されたLSC集団又はLSC様集団を提供する。LSC集団又はLSC様集団は、ヒトなどの哺乳動物からのものであってもよい。LSC集団又はLSC様集団は、遺伝子改変されていてもよい。さらに、LSC集団又はLSC様集団は、LSC又はLSC様細胞運命のままであることもあり、又はLSC又はLSC様細胞運命を維持することもある。

【0074】

本発明の一実施形態では、化学合成、組換え、又は単離核酸は、PAX6又はその断片を発現することができる。PAX6又はその断片は、LSC又はLSC様状態を維持することがあり、又は幹細胞又は前駆細胞をLSC又はLSC様状態へと方向づけることができる。さらに、LSC又はLSC様状態は、結果として角膜上皮細胞(CEC)に至る分化経路に細胞集団を制限することもある。別の態様では、PAX6又はその断片は、LSC又はLSC様状態を維持し、又は幹細胞又は前駆細胞をLSC又はLSC様状態へと方向づけ、さらに、そのLSC又はLSC様状態が、結果として角膜上皮細胞に至る分化経路に細胞集団を制限する。

【0075】

本発明のさらなる実施形態では、LSC集団又はLSC様集団の90~95%は、p63、PAX6、K19及びKi67を発現する。別の実施形態では、LSC集団の5%未満がK5及びK14を発現する。さらに別の実施形態では、LSC集団の95%より多くがWNT7A及びFZD5を発現する。さらに別の実施形態では、LSC様集団の5%未満がWNT7Aを発現する。

【0076】

本発明の別の実施形態では、角膜上皮細胞は、PAX6並びに角膜上皮マーカー、K3及びK12を発現する。

【0077】

一実施形態では、単離されたLSCは、WNT7A、FZD5、PAX6、p63、ケラチン5(K5)、ケラチン14(K14)、ケラチン19(K19)、及びKi67を含むマーカーのセットを発現する。別の実施形態では、LSCの90~95%は、p63、PAX6、K19及びKi67を発現する。さらに別の実施形態では、LSCの95%より多くがWNT7A及びFZD5を発現する。別の実施形態では、LSCの5%未満がK5及びK14を発現する。さらに別の実施形態では、LSCの90~95%はp63、PAX6、K19及びKi67を発現し、LSCの95%より多くがWNT7A及びFZD5を発現し、LSCの5%未満がK5及びK14を発現する。

【0078】

例えば、輪部幹若しくは前駆細胞様細胞又はLSC様細胞は、PAX6の十分な量での過剰発現時に「LSC様」状態に切り替わる又は採用する非LSC幹細胞、例えば皮膚上皮幹細胞(SESC)である。一実施形態では、「LSC様」状態に切り替えられた幹細胞は、核内でp63とPAX6両方の発現と同時に起きる誘導性K19発現を有する。別の実施形態では、「LSC様」細胞をLSC分化培地の存在下で3次元培養下に置く(増殖因子低減Matrigelに包埋する)と、「LSC様」細胞は、角膜K3及びK12発現増加と同時に皮膚K1及びK10発現減少を有する「CEC様」

細胞に分化する。例えば、角膜K3発現は、(分化決定済みのSESCのままでいるのではなくLSC系統に転換される)PAX6過剰発現SESCの3D分化によって生産されたCEC様細胞でのほうが、PAX6を過剰発現しないが同様に処置されたSESCでより約9.4倍高いこともある。

【0079】

本発明は、LSC集団又はLSC様集団の複数の細胞を含む被定義細胞集団をさらに提供する。この被定義細胞集団は、均一であることもあり、又は不均一であることもある。被定義細胞集団は、クローン性であることもあり、又は単一細胞に由来することもある。本発明は、角膜上皮細胞に発達するように決定された、LSC集団又はLSC様集団の子孫細胞をさらに提供する。加えて、本発明は、LSC集団又はLSC様集団の細胞を含む組織も提供する。

【0080】

本発明は、LSC集団又はLSC様集団及び適する担体を含む、医薬組成物をさらに提供する。本発明の一実施形態では、LSC集団又はLSC様集団は、CECに分化することなく、少なくとも17継代にわたって培養することができる。加えて、本発明の別の実施形態では、第3継代でPAX6及びp63を発現する細胞の割合は、第17継代での割合と同じである。本発明のさらなる実施形態では、第3継代でK19及びKi67を発現する細胞の割合は、第17継代以降での割合よりわずかに大きい。本発明のさらにさらなる実施形態では、本発明のLSC集団又はLSC様集団は、CECに分化することなく40～60世代にわたって安定的に繁殖できる細胞を含む。さらに、本発明の一実施形態では、LSC集団又はLSC様集団は、角膜上皮細胞集団に分化することもある。

【0081】

加えて、本発明は、本発明のLSC集団又はLSC様集団の細胞を含む組織も提供する。さらに、本発明は、対象において組織を形成する方法であって、対象中又は対象上に、本発明のLSC集団又はLSC様集団の子孫細胞を、前記対象の角膜上皮細胞の形成に十分な量で導入することを含む方法をさらに提供する。

【0082】

本発明は、染色体に組み込まれた、あるいは組み込まれていない染色体外遺伝物質のままのPAX6をコードする、化学合成、組換え、又は単離核酸を含む、単離された皮膚上皮幹細胞(SESC)集団又はSESC様集団であって、前記単離されたSESC集団は非SESC細胞を実質的に含まない、上記SESC集団又はSESC様集団をさらに提供する。さらに、SESC様集団は非SESC様細胞を実質的に含んでいなくてもよく、又は単離されたSESC又はSESC様集団は非SESC及び非SESC様細胞を実質的に含んでいなくてもよく、又はさらになお、単離されたSESC又はSESC様集団は、非SESC、非SESC様、非LSC及び非LSC様細胞を実質的に含んでいなくてもよい。加えて、本発明の一実施形態では、化学合成、組換え、又は単離核酸は、PAX6又はその断片を発現することができ、前記PAX6又はその断片は、LSC又はLSC様状態を維持することができ、又は幹細胞又は前駆細胞をLSC又はLSC様状態へと方向づけることができ、そしてまたそのLSC又はLSC様状態は、結果として角膜上皮細胞に至る分化経路に前記細胞集団を制限しうる。本発明の別の実施形態では、化学合成、組換え、又は単離核酸は、PAX6又はその断片を発現することができ、前記PAX6又はその断片は、SESC又はSESC様細胞をLSC又はLSC様状態へと方向づけ、そしてまた、結果として角膜上皮細胞に至る分化経路に前記細胞集団を制限しうる。SESC集団又はSESC様集団は、ヒトなどの哺乳動物からのものであってもよい。SESC集団又はSESC様集団は、遺伝子改変されていてもよい。さらに、SESC集団又はSESC様集団は、SESC又はSESC様細胞運命からLSC又はLSC様細胞運命に切り替えられることもある。

【0083】

一実施形態では、細胞集団の約90～95%は、SESC又はSESC様細胞運命のままで、p63、K5及びKi67を発現する。別の実施形態では、SESC又はSESC様細胞運命のままである細胞ではK3及びK12発現について検出されない。さらにさらなる実施形態では、WNT7Aは、SESC又はSESC様細胞運命のままである細胞において、LSC細胞におけるレベルより約4倍～5倍低いレベルで発現される。さらに別の実施形態では、PAX6は、SESC又はSESC様細胞運命のままである細胞において発現されないか、又はLSC細胞におけるレベルの約8分の1未満のレベ

10

20

30

40

50

ルで発現される。さらなる実施形態では、WNT7Aは、SESC様運命のままである細胞の70%より多くで発現される。さらにさらなる実施形態において、LSC又はLSC様細胞運命に切り替えられた集団の細胞の90～95%は、p63、PAX6、K19及びKi67を発現する。加えて、本発明のある実施形態では、皮膚表皮細胞は、皮膚表皮分化マーカー、K1及びK10を発現する。

【0084】

加えて、本発明は、SESC集団又はSESC様集団及び適する担体を含む、医薬組成物をさらに提供する。本発明の一実施形態では、SESC集団又はSESC様集団は、皮膚表皮細胞又は角膜上皮細胞に分化することなく、少なくとも17世代にわたって培養することができる。一実施形態では、SESC集団又はSESC様集団は、皮膚表皮細胞又は角膜上皮細胞に分化することなく40～60世代にわたって安定的に繁殖できる細胞を含むことがある。さらなる実施形態では、SESC集団又はSESC様集団は、細胞運命がLSC又はLSC様細胞運命に切り替えられたSESC又はSESC様細胞を含むこともある。さらに、一実施形態では、SESC集団又はSESC様集団は、LSC又はLSC様細胞運命を採用し、SESC又はSESC様細胞運命は存在しない。SESC集団又はSESC様集団は、角膜上皮細胞に分化することもある。一実施形態では、SESC集団又はSESC様集団は、皮膚表皮細胞を実質的に含まない角膜上皮細胞に分化することもある。

【0085】

本発明は、SESC集団又はSESC様集団の複数の細胞を含む被定義細胞集団をさらに提供する。被定義細胞集団は、均一であることもあり、又は不均一であることもある。被定義細胞集団は、クローン性であることもあり、又は単一細胞に由来することもある。本発明は、角膜上皮細胞に発達するように決定された、SESC集団又はSESC様集団の子孫細胞をさらに提供する。

【0086】

加えて、本発明は、本発明のSESC集団又はSESC様集団の細胞を含む組織も提供する。さらに、本発明は、対象において組織を形成する方法であって、対象中又は対象上に、本発明のSESC集団又はSESC様集団の子孫細胞を、前記対象の角膜上皮細胞の形成に十分な量で導入することを含む方法をさらに提供する。

【0087】

本発明の方法

本発明の一実施形態では、本開示は、哺乳動物輪部幹細胞(LSC)の培養に関する。輪部幹細胞は、ヒトドナーからの角強膜又は角膜輪部組織に由来する。詳細には、本開示は、自己再生輪部幹細胞を有する系であり、LSC、例えば、少なくとも約70%、少なくとも約80%、又は少なくとも約90%輪部幹細胞の大集団を含むことができる。角膜輪部組織を単離するための典型的な手技は、ドナーの眼の角膜表面の上又は耳側四分円(temporal quadrant)からの、0.8～3mm²の輪部組織からなる小さい検体材料の、外科的除去である。角膜輪部からそのような検体材料を例えば表層角膜切除術によって得るための手技は、当業者には公知である。輪部幹細胞を産生するために使用される輪部組織検体材料のドナーは、組織系移植片、インプラント又はグラフトのレシピエントであることもある(すなわち自家組織系)。あるいは、輪部組織検体材料のドナーがレシピエントでない場合、ドナーは、一例として、生体適合性ドナー、例えば移植片若しくはグラフトのレシピエントの近親者であり、又は生体適合性(例えば組織適合性)の死体であることもある(すなわち同種組織系)。移植される細胞又は組織は、組織拒絶反応に関する問題を回避するためにその移植片のレシピエントと遺伝学的に適合性又は同一であることが一般には望ましい。

【0088】

本開示のLSCは、角膜上皮細胞に分化する潜在力がある、未分化又は実質的に未分化の細胞である。未分化細胞の形態的特徴は、当業者に周知である。本発明の実施形態において有用な細胞、例えば、角膜上皮の輪部幹細胞を、多数の相補的要因、例えば、それらが得られるインビボ部位及び/又はそれらの形態若しくはサイズ(例えば平均直径)並びに、バイオマーカー、例えば、ATP結合カセットサブファミリーGメンバー2(ABCG2)、転写因子p63、Bmi-1、Notch-1、ステージ特異的胎児抗原-4(SSEA4)、ステージ特異的胎児抗原-3(SSEA3)、N-カドヘリン、CD73、CD105、CD54、CD117、Oct-4、Ki67、Nanog、Rex 1、Sox2、

Tra-1-60、Tra-1-81、幹細胞因子、並びにサイトカイン(K)、例えばK1、K3、K5、K10、K12、K14又はK15、K19、及びデスモグレイン-3の存在、非存在及び/又は発現レベルによっても特徴づけることができることは、この技術分野の当業者には理解される(例えば、Nakatsuら、Investigative Ophthalmology & Visual Science 2011;52:4734-4741; Truongら、Invest Ophthalmol Vis Sci.2011;52:6315-6320; Duaら、Surv Ophthalmol.2000 Mar-Apr;44(5):415-25; Watsonら、Curr Eye Res.2013年4月10日; Meyer-Blazejewskaら、Invest Ophthalmol Vis Sci.2010 Feb;51(2):765-74;及びRamaら、N Engl J Med 2010;363: 147-55; Thomsonら、(Science 282:1145-1147, 1998)、Reubinoffら(Nature Biotech.18:399-403, 2000)を参照されたい)。本発明の実例的な実施形態では、ヒト輪部幹細胞は、ATP結合カセットサブファミリーGメンバー2(ABCG2)、-転写因子p63 α 、ステージ特異的胎児抗原-4(SSEA4)、N-カドヘリン、及びサイトカイン(K)、例えばK1、K3、K5、K10、K12、K14又はK15の1つ以上の発現を試験することによって特徴づけられる発現プロファイルを示す。本発明の実施形態では、ヒト輪部幹細胞又はフィーダー細胞の他の特徴、例えば、細胞のサイズ又は形態も同定又は特徴づけられる。

【0089】

例えば、検体材料をドナーから除去したら、輪部幹細胞の単離を可能にするために輪部組織生検材料の十分な部分が生存可能なままであるような仕方でそれを取り扱わなければならない。一実施形態では、輪部組織生検材料は、その生検材料の生存能を支援する培地内で輸送又は保存される。生検材料を保存又は輸送するための培地の例としては、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)及びハムF-12(比率1:1)、DMSO(0.1~0.5%)、組換えヒト上皮増殖因子(rhEGF、0.5~2ng/ml)、インスリン(0.5~5 μ g/ml)、トランスフェリン(0.5~5 μ g/ml)、亜セレン酸ナトリウム(0.5~5 μ g/ml)、ヒドロコルチゾン(0.1~0.5 μ g/ml)、コレラ毒素A(0.01~0.1 μ mol/l)、ゲンタマイシン(10~50 μ g/ml)、及びアンホテリシンB(0.5~1.25 μ g/ml)を挙げることができる。あるいは、前記培地の代わりに機能的に等価の成分又は異なる抗生物質を使用してもよい。培地にヒト臍帯血血清(3~5%)をさらに補足することができる。輪部細胞生検材料をドナーからの外科的除去から48時間以内に培養下に置くことができる。

【0090】

輪部幹細胞を輸送前又は後に組織検体材料から直接精製してもよい。輪部組織生検材料をインタクト外植片として培養してもよいし、又は培養前に解離させて単個(又は希釈された)細胞浮遊液にしてもよい。例えば、生物活性が増加した特定の集団について組織を精製してもよい。当技術分野において公知の手段を使用して精製を行ってもよく、又は本明細書に記載のLSCマーカーについての陽性選択によって精製を果たしてもよい。本発明の一実施形態では、輪部幹細胞を無菌様式で機械的に分解し、酵素で処置して、回収組織から細胞を解離させる。そのような酵素としては、トリプシン、キモトリプシン、コラゲナーゼ、エラスターゼ、ヒアルロニダーゼ及び/又は商品、例えばStem Pro Accutase(Fischer)が挙げられるが、これらに限定されない。その後、輪部幹細胞の浮遊液を洗浄し、生存能について評価し、本発明の実施に直接使用してもよいし、又は拡大のために培養してもよい。一部の状況では、条件培地による産生に使用する前に細胞を拡大させることが望ましいであろう。拡大は、本明細書に記載の特定の因子とともにエキスピボで培養することによって行うことができる。

【0091】

ドナーからの輪部組織の生検を行った後、それを培養培地での、及び一実施形態では適切な支持マトリックス、例えば細胞外マトリックス又はバイオコートされた表面、例えば細胞外マトリックス担体又はバイオコートされたペトリ皿での、培養下に置く。一実施形態では、支持マトリックスの存在は、生検材料中の輪部幹細胞の組織培養プレート又は容器への接着を助長し、その結果、輪部幹細胞の増殖を助長する。培養下に置く前に外植片を小片に切断することができる。

【0092】

ヒト羊膜を用意して、凍結融解、酵素的消化及び機械的擦過によって内在性羊膜上皮細

10

20

30

40

50

胞を除去し、その後、増殖因子、細胞外マトリックス化合物及び/又は接着増進分子でその表面を処置することによって、輪部幹細胞の増殖を増進させてもよい。一実施形態では、基底膜又は角膜実質を上にして羊膜をLSC培養用培養プレートに平らに取り付ける。

【0093】

LSCをインビトロで支持することができる任意の培地を使用してLSCを培養してもよい。LSCの増殖を支持することができる培地処方としては、最小必須培地イーグル、ADC-1、LPM(ウシ血清アルブミン不含)、F10(HAM)、F12(HAM)、DCCM1、DCCM2、RPMI 1640、BGJ培地(フィットン-ジャクソン改変を伴う及び伴わない)、基本培地イーグル(BME-アール塩ベースを有する)、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM-血清なし)、山根、IMEM-20、グラスゴー改変イーグル培地(GMEM)、リーボヴィッツL-15培地、マッコイ5A培地、培地M199(M199E-アール塩ベースを有する)、培地M199(M199H-ハンクス塩ベースを有する)、最小必須培地イーグル(MEM-E-アール塩ベースを有する)、最小必須培地イーグル(MEM-H-ハンクス塩ベースを有する)及び最小必須培地イーグル(MEM-NAA、非必須アミノ酸を有する)、アルファ改変最小必須培地(α MEM)、及びロズウェルパーク記念研究所培地1640(RPMI培地1640)、上皮細胞用EPILIFE(登録商標)培養培地(Cascade Biologicals)、OPTI-PRO(商標)無血清培養培地、VP-SFM無血清培地、IMDM高濃縮基本培地、KNOCKOUT(商標)DMEM低浸透圧培地、293 SFM II限定無血清培地(すべてGibco; Invitrogen製)、HPGM造血前駆細胞増殖培地、Pro 293S-CDM無血清培地、Pro 293A-CDM無血清培地、UltraMDCK(商標)無血清培地(すべてCambrex製)、STEMLINE(登録商標)T細胞拡大培地及びSTEMLINE(登録商標)II造血幹細胞拡大培地(両方ともSigma-Aldrich製)、DMEM培養培地、DMEM/F-12栄養混合物増殖培地(両方ともGibco製)、ハムF-12栄養混合物増殖培地、M199基本培養培地(両方ともSigma-Aldrich製)、並びに他の同等の基本培地など(数ある他の多くのものの中でも、培地199、CMRL 1415、CMRL 1969、CMRL 1066、NCTC 135、MB 75261、MAB 8713.DM 145、ウィリアムズG、Neuman & Tytell、樋口、MCDB 301、MCDB 202、MCDB 501、MCDB 401、MCDB 411、MDBC 153を含む)が挙げられるがこれらに限定されない。本発明における使用に好ましい培地はDMEMである。これらの及び他の有用な培地は、数ある中でもGIBCO、Grand Island、N.Y.、USA及びBiological Industries、Bet HaEmek、Israelから入手可能である。多数のこれらの培地は、Academic Press, Inc.によって発行されたWilliam B. Jakoby及びIra H. Pastanによって編集されたMethods in Enzymology、LVIII巻、「Cell Culture」、62~72頁に要約されている。

【0094】

本発明の方法において有用な培地のさらなる非限定的な例は、ウシ胎仔血清、ウシ血清又は他の種の血清を少なくとも1%~約30%、少なくとも約5%~15%、例えば約10%の濃度で含有することができる。特定の実施形態では、ヒト血清を使用することが好ましいことがある。

【0095】

好ましい実施形態では、本発明において使用される培地は、フィーダーフリー、無血清及びゼノフリー培地である。例えば、輪部組織検体材料を輸送するために使用される培地、生検材料を培養するために使用される培地、輪部幹細胞を培養するために使用される培地、及び組織系を輸送するために使用される培地を含む、組織系を調製するために使用される培地は、動物由来のいずれの血清又は他の因子も含有しない。これは、異種成分での組織系の一切の汚染リスクを最小にすることによってその組織系をヒトへの投与に安全なものにするのに役立つことになる。最も好ましい実施形態では、フィーダーフリー、無血清及びゼノフリー培地は、培地中の全成分が既知組成であり、被定義の動物由来又はヒト由来産物を含む、既知組成培地である。

【0096】

LSCの培養に利用することができる、細胞培養及び幹細胞の培養に関する一般技術について、実施者は、標準的な教科書及び総説、例えば、E. J. Robertson、「Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical approach」、編集、IRL Press Ltd. 1987; Hu and Aunins(1997)、Curr.Opin.Biotechnol.8:148-153; Kitano(1991)、Biotechnolog

y 17:73-106; Spier(1991)、Curr.Opin.Biotechnol.2:375-79; Birch and Arathoon(1990)、Bioprocess Technol.10:251-70; Xuら(2001)、Nat. Biotechnol.19(10):971-4;及びLebkowskiら(2001)Cancer J. 7 Suppl. 2:S83-93を参照することができ、これらの各々が参照によって本明細書に組み入れられる。

【0097】

本発明による方法のさらなる実施形態は、ROCK(Rho関連プロテインキナーゼ)阻害剤を含む培養培地を含む。ROCK阻害剤の添加は、特に幹細胞を培養する際、アノイキスを防止するために見出された。ROCK阻害剤は当技術分野において周知であり、一例では、(R)-(+)-トランス-4-(1-アミノエチル)-N-(4-ピリジル)シクロヘキサカルボキサミド二塩酸塩一水和物(Y-27632、Sigma-Aldrich)、5-(1,4-ジアゼパン-1-イルスルホニル)イソキノリン(ファスジル又はHA1077、Cayman Chemical)、H-1152、H-1152P、(S)-(+)-2-メチル-1-[(4-メチル-5-イソキノリニル)スルホニル]ホモピペラジン、2HCl、ROCK阻害剤、ジメチルファスジル(diMF、H-1152P)、N-(4-ピリジル)-N'-(2,4,6-トリクロロフェニル)尿素、Y-39983、Wf-536、SNJ-1656、及び(S)-(+)-2-メチル-1-[(4-メチル-5-イソキノリニル)スルホニル]-ヘキサヒドロ-1H-1,4-ジアゼピン二塩酸塩(H-1152、Tocris Bioscience)、並びにその誘導体及び類似体から選択される。Rhoキナーゼ阻害剤を現在開発している会社としては、千寿製薬株式会社(大阪、日本)、Novartis(Basel、Switzerland)、興和創薬株式会社(名古屋、日本)、宇部興産株式会社とともに研究している参天製薬株式会社(東京、日本)、及びInspire Pharmaceuticals(Durham、N.C.)が挙げられる。オンラインジャーナルに関連したオンラインニュースレター、http://www.revophth.com/content/d/glaucoma_management/d/1222/p/23008/c/22947/#sthash.H16F1ABU.dpufのReview of Ophthalmology Onlineで2009年3月20日に発表されたLama Al-AswadによるRhoキナーゼに関する総説においてより多くのものを参照されたい。さらなるROCK阻害剤としては、イミダゾール含有ベンゾジアゼピン及び類似体が挙げられる(例えばW097/30992を参照されたい)。他のものとしては、例えば、国際出願公開番号W001/56988、W002/100833、W003/059913、W002/076976、W004/029045、W003/064397、W004/039796、W005/003101、W002/085909、W003/082808、W003/080610、W004/112719、W003/062225、及びW003/062227に記載のものが挙げられる。これらの事例の一部では、阻害剤中のモチーフは、インダゾールコア、2-アミノピリジン/ピリミジンコア、9-デアザグアニン誘導体、ベンズアミドを含むもの、アミノフラザンを含むもの、及び/又はそれらの組合せを含む。

【0098】

Rock阻害剤は、ROCK活性を減弱することができるROCK活性の負のレギュレーター、例えば、小GTP結合タンパク質(例えば、Gem、RhoE及びRad)も含む。本開示の特異的实施形態では、ROCK2ではなくROCK1を標的にし、例えば、W003/080610は、ROCK阻害剤などのキナーゼ阻害剤としてのイミダゾピリジン誘導体、並びにROCK1及び/又はROCK2の作用を阻害する方法に関する。上で引用した出願の開示は、参照によって本明細書に組み入れられる。Rho阻害剤は、Rhoの阻害につながるROCK(Rho活性化キナーゼ)との相互作用によって下流で作用することもできる。そのような阻害剤は、米国特許第6,642,263号に記載されている(この特許文献の開示はその全体が参照によって本明細書に組み入れられる)。使用してもよい他のRho阻害剤は、米国特許第6,642,263号及び同第6,451,825号に記載されている。そのような阻害剤は、従来の細胞スクリーニングアッセイ、例えば、米国特許第6,620,591号に記載されているものを使用して同定することができる(これらの特許文献のすべては、それら全体が参照によって本明細書に組み入れられる)。

【0099】

培養培地は、培地中で適切な濃度でLSCを培養するために必要な増殖因子、サイトカイン及びホルモンも含むことができる。本発明の方法に有用な培地は、LSCの培養に有用な抗生物質、抗炎症、抗ウイルス、細胞分裂促進又は分化化合物を含むがこれらに限定されない、興味のある1つ以上の化合物も含有することがある。細胞を、非限定的な一実施形態では約27℃~40℃の間の温度で増殖させてもよく、別の非限定的実施形態では約31℃~37℃で増殖させてもよく、別の非限定的実施形態では加湿インキュベーターの中で増殖さ

せてもよい。二酸化炭素含有量を約2%~10%の間で維持してもよく、酸素含有量を約1%~2%の間で維持してもよい、しかし、本発明がLSCを単離及び培養するためのいずれか1つの方法に限定されると決して解釈すべきではない。むしろ、LSCを単離及び培養するいずれの方法も本発明に含まれると解釈すべきである。

【0100】

培地に増殖因子を補足してもよい。本明細書で使用する場合、用語「増殖因子」は、細胞表面の受容体と結合し、主として細胞の増殖及び/又は分化を活性化する結果となるタンパク質を指す。輪部組織を培養するために使用される増殖因子は、例えば、上皮増殖因子(EGF)、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)、白血病抑制因子(LIF)、神経増殖因子(NGF)、インスリン増殖因子(IGF)、TGF-ベータ、肝細胞増殖因子、ケラチノサイト増殖因子、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、ヒトトランスフェリン、又はヒト白血病抑制因子(hLIF)、ウシ下垂体抽出物など、及びこれらの組合せである。しかし、当業者に公知のいずれの適する培養培地を使用してもよい。特定の実施形態では、LSCを培養下で好ましく増殖させるサイトカイン又は他の増殖因子で輪部細胞を処置する。輪部細胞を培養するために使用される他の因子は、DMSO及びヒドロコルチゾン、グルコース、L-グルタミン、葉酸、重炭酸ナトリウム、アデニン、CaCl₂、プロゲステロン、エタノールアミン、トリヨードチロニン、ホスホリルエタノールアミンなどから選択することができる。

【0101】

特定の実施形態において、抗生物質は、マクロライド(例えば、トブラマイシ(TOBI(登録商標)))、セファロスポリン(例えば、セファレキシ(KEFLEX(登録商標)))、セフラジン(VELOSEF(登録商標)))、セフロキシム(CEFTIN(登録商標))、セフprozil(CEFZIL(登録商標))、セファクロル(CECLOR(登録商標))、セフィキシム(SUPRAX(登録商標))又はセファドロキシル(DURICEF(登録商標))、クラリスロマイシン(例えば、クラリスロマイシン(Biaxin))、エリスロマイシン(例えば、エリスロマイシン(EMYCIN(登録商標)))、ペニシリン(例えば、ペニシリンV(V-CILLINK(登録商標))若しくはPEN VEEK(登録商標)))又はキノロン(例えば、オフロキサシン(FLOXIN(登録商標))、シプロフロキサシン(CIPRO(登録商標))若しくはノルフロキサシン(NOROXIN(登録商標)))、アミノグリコシド系抗生物質(例えば、アブラマイシン、アルベカシン、バンベルマイシン、ブチロシン、ジベカシン、ネオマイシン、ネオマイシン、ウンデシレン酸塩、ネチルマイシン、パロモマイシン、リボスタマイシン、シソマイシン及びスペクチノマイシン)、アンフェニコール系抗生物質(例えば、アジダムフェニコール、クロラムフェニコール、フロルフエニコール、及びチアンフェニコール)、アンサマイシン系抗生物質(例えば、リファミド及びリファンピン)、カルバセフェム(例えば、ロラカルベフ)、カルバペネム(例えば、ピアペネム及びイミペネム)、セファロスポリン(例えば、セファクロル、セファドロキシル、セファマンドール、セファトリジン、セファゼドン、セフォゾプラン、セフピミゾール、セフピラミド及びセフピロム)、セファマイシン(例えば、セフペラゾン、セフメタゾール及びセフミノクス)、モノバクタム(例えば、アズトレオナム、カルモナム及びチゲモナム)、オキサセフェム(例えば、フロモキセフ及びモキサラクタム)、ペニシリン(例えば、アムジノシリン、アムジノシリンピボキシル、アモキシシリン、バカンピシリン、ベンジルペニシリン酸、ベンジルペニシリンナトリウム、エピシリン、フェンペニシリン、フロキサシリン、ペナメシリン、ペネタメート塩酸塩、ペニシリンo-ペネタミン、ペニシリン0、ペニシリンV、ペニシリンVベンザチン、ペニシリンVヒドラバミン、ペニメピサイクリン及びフェネチシリンカリウム)、リンコサミド(例えば、クリンダマイシン及びリンコマイシン)、マクロライド(例えば、アジスロマイシン、カルボマイシン、クラリスロマイシン、ジリスロマイシン、エリスロマイシン及びエリスロマイシンアシストラート)、アンホマイシン、バシトラシン、カプレオマイシン、コリスチン、エンデュラシジン、エンビオマイシン、テトラサイクリン(例えば、アピサイクリン、クロルテトラサイクリン、クロモサイクリン及びデメクロサイクリン)、2,4-ジアミノピリミジン(例えば、プロジモプリム)、ニトロフラン(例えば、フラルタドン及び塩化フラゾリウム)、キノロン及びその類似体(例えば、シノキサシン、シプロフロキサシン、クリナフロキサシン、フルメキン及びグレパフロキサシン)、ス

ルホンアミド(例えば、アセチルスルファメトキシピラジン、ベンジルスルファミド、ノプリルスルファミド、フタリルスルファセタミド、スルファクリソイジン及びスルファシチン)、スルホン(例えば、ジアチモスルホン、グルコスルホンナトリウム及びソラスルホン)、サイクロセリン、ムピロシン及びツベリンである。

【0102】

有用な抗炎症剤としては、非ステロイド性抗炎症薬(例えば、サリチル酸、アセチルサリチル酸、サリチル酸メチル、ジフルニサル、サルサラート、オルサラジン、スルファサラジン、アセトアミノフェン、インドメタシン、スリンダク、エトドラク、メフェナム酸、メクロフェナム酸ナトリウム、トルメチン、ケトロラク、ジクロフェナク、イブプロフェン、ナプロキセン、ナプロキセンナトリウム、フェノプロフェン、ケトプロフェン、フルルピプロフェン、オキサプロジン、ピロキシカム、メロキシカム、アンピロキシカム、ドロキシカム、ピボキシカム、テノキシカム、ナブメトン、フェニルブタゾン、オキシフェンブタゾン、アンチピリン、アミノピリン、アパゾン及びニメスリド)、ロイコトリエンアンタゴニスト(ジレウトン、オーロチオグルコース、金チオリンゴ酸ナトリウム及びオーラノフィンを含むがこれらに限定されない)、及び他の抗炎症剤(メトトレキサート、コルヒチン、アロプリノール、プロベネシド、スルフィンピラゾン及びベンズブロマロンを含むがこれらに限定されない)が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0103】

有用な抗ウイルス剤としては、ヌクレオシド類似体、例えばジドブジン、アシクロビル、ガンシクロビル、ビダラビン、イドクスウリジン、トリフルリジン及びリバビリン、並びにホスカルネット、アマンタジン、リマンタジン、サキナビル、インジナビル、リトナビル、及びアルファ-インターフェロンが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0104】

一実施形態では、単離されたLSC集団は、実質的に分化することなく細胞を拡大させることが可能な培地で、例えば、不活性化ヒト胚性繊維芽細胞から得られる条件培地、ヒト白血病抑制因子で強化された培養培地、又はジメチルスルホキシド、組換えヒト上皮増殖因子、インスリン、亜セレン酸ナトリウム、トランスフェリン、プロゲステロン、プトレシン、亜セレン酸塩、ヒドロコルチゾン及び塩基性線維芽細胞増殖因子からなる群から選択される1つ以上の可溶性因子が補足された培養培地で培養される。あるいは、LSCは、例えば、特定の増殖因子又は培地、例えば角膜上皮培養培地CnT-30(CELLnTEC、Zen-Bio)又は既知組成ゼノフリー培養培地、RegES(Regea 06/015、Regea 07/046、及びRegea 08/013; Rajalaら、2010、PLOS One 5(4):e10246)を使用して、細胞を例えば角膜上皮細胞に分化させることになる培地で培養される。

30

【0105】

輪部組織検体材料を培養する例示的方法は、外植片を細胞外マトリックス又はバイオコートされた組織培養プレート上に配置する前又は配置した後、外植片を数分間、ドライインキュベーションに付す方法である。次いで、外植片が細胞外マトリックス又はバイオコートされた組織培養プレートに固着するように少量の培養培地をその外植片に添加する。数時間〜1日後、追加の培地を穏やかに添加し、1日おきに培地を交換しながら数日間、37℃で、CO₂インキュベーターで外植片をインキュベートする。好ましくは、そのような例では、幹細胞を培養下で増殖し始めた後に元の輪部組織生検材料数片を培養物から除去する。

40

【0106】

他の実施形態では、拡大前に、輪部組織生検材料を使用して単一細胞浮遊液を生成し、その後、それを培養して、本明細書に開示の組織系を産生する。例えば、輪部組織生検材料を洗浄し、次いで、例えばトリプシン-EDTA(例えば、約0.25%、20〜30分間)又はディスペラーゼ(例えば、4℃で一晩)で酵素的に処置して、LSCを含む単一細胞浮遊液を生成する。酵素的処置は上皮の分離を可能にするため、単一細胞浮遊液中の角膜実質又は間葉系細胞が低減されうる、又は非存在になりうる。

【0107】

50

輪部組織を数日間、例えば細胞が集密になるまで、培養した後、LSCを培養物から単離することができる。好ましくは、この例では、輪部組織培養物を、それが少なくとも約50%、60%、70%、80%、90%又は95%集密になるまで増殖させる。一実施形態では、輪部細胞を、細胞外マトリックス又はバイオコートされた組織培養プレートから、例えば酵素的消化、例えば、トリプシン-EDTA又はディスパーゼ溶液を使用する酵素的消化によって先ず解離させる。当業者に公知の様々な方法、例えば、免疫標識及び蛍光選別、例えば固相吸着、蛍光活性化細胞選別(FACS)、磁気親和性細胞選別(MACS)などを使用して、培養物中の他の細胞からLSCを単離することもできる。特定の実施形態では、LSCは、選別、例えば、特定の細胞表面マーカーの免疫蛍光選別によって単離される。当業者に周知の2つの好ましい選別方法がMACS及びFACSである。

10

【0108】

選別技術は、培養下でLSCを他の細胞から分離するために適切な幹細胞マーカーの使用を含むことがある。1つ以上の特異的表面マーカーによって、そのマーカーと特異的に相互作用する1つ以上の標識抗体又は因子を使用してLSCを同定し、FACSの場合は蛍光標識又はMACSの場合は常磁性材料などの標識の存在に基づいて選別してもよい。培養輪部細胞からLSCを単離するために使用することができる適切な幹細胞特異的表面マーカーとしては、ABCG2、転写因子p63、SSEA4、SSEA3、N-カドヘリン、CD73、CD105、CD54、CD117、Oct-4、Nanog、TDGF、UTX-1、FGF-4、Rex1、Sox2、Tra-1-60、Tra-1-81、幹細胞因子、及びK1、K3、K10、K12、K14又はK15、K19が挙げられるが、これらに限定されない。このようにして、輪部組織生検材料から培養された細胞の混合集団から、LSCに陽性の細胞表面マーカーの濃縮集団が得られる。あるいは、LSC上で見出されない細胞表面マーカーについて選択することによって細胞を選別して望ましくない細胞を除去することができる。輪部組織から単離されたLSCの場合、LSCは、次の細胞表面マーカーについて陰性である：CD34、CD45、CD14、CD133、CD106、CD11c、CD123及びHLA-DR。

20

【0109】

選別によって得られる濃縮輪部細胞培養物は、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%又は99% LSCを有する。代替実施形態では、輪部細胞を含有する混合細胞培養物は、特定の遺伝子マーカーの発現についてのスクリーニングによってLSCの存在についてスクリーニングされる。混合輪部細胞培養の場合、遺伝子マーカー、例えば、ABCG2、転写因子p63、SSEA4、SSEA3、N-cadherin、CD73、CD105、CD54、CD117、Oct-4、Nanog、TDGF、UTX-1、FGF-4、Rex1、Sox2、Tra-1-60、Tra-1-81、幹細胞因子、及びK1、K3、K10、K12、K14若しくはK15、K19、並びに未分化細胞の他の遺伝子マーカー、又はそれらの組合せの発現によって、LSC集団を同定することができる。

30

【0110】

上記方法の1つを使用してLSCが濃縮された輪部細胞の集団を単離した後、それらの単離された細胞を損傷又は罹病した眼に移植、内植又はグラフトするためにLSCの増殖及び組織系の発生を支持する条件下、支持する培地で培養することが好ましい。好ましくは、これらの条件下で培養される組織系は、少なくとも約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は95% LSCを含むことになる。ある実施形態では、単離されたLSCを、LSCを有する組織を発生させるために強化培地の存在下、組織ベースにおいて培養する。異なる因子を様々な増殖又は拡大段階で添加することができる。例えば、ROCK阻害剤を数継代の拡大後に添加することができる。組織ベースは、自然な眼の表面に近い特徴、例えば、澄んでいること、薄いこと、弾力性があること、生体適合性であること、非血管性であること及び非抗原性であることなどの特徴を有することができ、並びにまたLSC増殖はもちろん、移植、インプラント又はグラフト後の正常な分化も支持することができる。

40

【0111】

LSCを含む輪部細胞は、LSCが実質的に未分化状態のままであることを可能にする適切な培地で培養又は継代される。集団内のLSCのコロニーは、分化される隣接細胞に隣接していることもあるが、その集団が適切な条件下で培養又は継代され、個々のLSCがその細胞集団の実質的な割合を構成する場合、LSCの培養物は、それにもかかわらず、実質的に未

50

分化のままであるであろう。実質的に未分化である未分化幹細胞培養物は、少なくとも約20%未分化LSCを含有し、少なくとも約40%、60%、80%又は90% LSCを含有することもある。例えば、培養下のLSCを、分化を防止するために培養培地を頻繁に交換しながら約 $10^4/\text{cm}^2$ の適切な細胞密度で保持して継代培養しなければならない。長期培養の場合、細胞を約70～90%の集密度で継代すると、それらは分散されて小さなクラスター又は単一細胞浮遊液になりうる。典型的には、細胞の単一細胞浮遊液が得られ、その後、それを別の組織培養グレードプラスチック皿に播種して、継代後、約15～20%の集密度に達する。

【0112】

培養物をLSCの実質的分化なしに少なくとも10、20、40、60、80、100継代以上にわたって連続的に継代することができる。LSCを含む輪部細胞培養物を、分化潜在力の喪失なくさらなる使用のために様々な時点で凍結保存することができ、好ましくは、そのような場合、ヒト臍帯血から採集した約10～90%熱不活性化血清と約5～10% DMSOとを有する培養培地を含む凍結培地で凍結保存することができる。あるいは、凍結培地は、無血清、ゼノフリー及びフィーダーフリーである既知組成のものでありうると予想される。輪部細胞培養物は、毎継代後、例えば凍結保存によって保存されたLSCを含むことができ、したがって、さらなる又は複数の組織系を単一の輪部組織生検材料から産生することができる。これらの凍結保存培養物は、任意の所定の時点での将来の使用のための未分化、自己再生及び生存輪部幹細胞のプールとしても役立つことになる。例えば、免疫抑制、以前の手術からの合併症、感染症などに起因してレシピエントの組織系が不全の場合には、これらの凍結保存培養物を使用して、自家使用のためのさらなる組織系を産生してもよい。また、これらの凍結保存培養物を使用して、生体適合性患者のためのさらなる組織系を産生してもよい。これらの保存培養物の有用性は、組織系が不全の場合にドナーからさらなる輪部組織を除去する必要をなくすることにもなり、その結果、将来、自家幹細胞源を使い果たす危険を防止することにもなる。

【0113】

本明細書に開示の組織系を産生した後、移植片、インプラント又はグラフトのレシピエントの所在地にそれを輸送してもよい。組織系を輸送するために使用される手段は、輸送後に移植片、インプラント又はグラフトとしてなお有用である組織系の生存能を十分に維持することができる。組織系は、輸送培地が入っている容器で輸送され、前記輸送培地は、LSCを含む組織系を培養するために使用される強化培地、又は増殖因子を有さない輸送中に組織系を緩衝するのに十分な代替培地でありうる。あるいは、本明細書に開示の組織系を保持する施設にレシピエントを連れて行き、輸送培地の必要をなくしてもよい。

【0114】

本明細書に開示のLSCを含む組織系は、治療応用に、例えば、片眼又は両眼の輪部幹細胞が欠損している対象の移植片、インプラント又はグラフトとして利用することができる。本開示の組織系を使用して、ヒト、霊長類、及び飼育動物、家畜、ペット、又は競技用動物、例えばイヌ、ウマ、ネコ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ラット、マウスなどを含むがこれらに限定されない、処置を必要とする任意の対象を処置することができる。本明細書で使用する場合、用語「治療の」、「治療的に」、「処置すること」、「処置」又は「治療」は、治療的処置と予防的(prophylactic)又は予防(preventative)対策の両方を指す。治療的処置は、特定の疾患、状態、傷害若しくは障害の症状を低減させる若しくは除去すること、又は既存の疾患若しくは障害の進行を遅速若しくは減弱すること、又は既存の疾患若しくは障害を治癒させることを含むが、これらに限定されない。そのような治療を必要とする対象は、機能を回復又は再生するために組織系の治療有効量によって処置されることになる。本明細書で使用する場合、組織系の「治療有効量」は、輪部幹細胞の喪失、損傷、機能不全又は変性に起因する対象の生理作用を抑止又は改善するのに十分な量である。使用される細胞又は組織の治療有効量は、対象の必要、対象の年齢、生理状態及び健康状態、所望の治療効果、治療の標的となる組織領域のサイズ、内植部位、病状の程度、選択される送達経路、及び処置戦略に依存することになる。意図される部位への組織系のグラフトを可能にし、機能欠損領域の再構成又は再生を可能にする方法で、組織系を患者に投

与することが好ましい。

【0115】

好ましい実施形態では、本開示の組織系を使用して、眼の損傷又は疾患、特に眼表面障害を有する対象を治療的に処置する。あるいは、開示する組織系を使用して、輪部組織に由来する未分化幹細胞源から治療的利益を受けると予想される他の疾患又は損傷を処置、例えば、熱傷を負った皮膚領域を修復してもよい。開示する組織系は、遺伝性の状態に起因しうる原発性輪部幹細胞欠損、例えば、無虹彩、多発性内分泌欠損関連角膜炎、輪部炎、及び後天性の状態から起こりうる特発性又は二次的輪部幹細胞喪失、例えば、ステイブンス・ジョンソン症候群、感染症(例えば、重症細菌性角膜炎)、眼表面腫瘍、化学的若しくは熱的傷害又は紫外線放射、複数回の手術若しくは凍結療法への曝露に起因する外傷性輪部幹細胞破壊、角膜上皮内新生物、縁辺潰瘍性又は炎症性角膜炎、虚血性角膜炎、角膜症、コンタクトレンズ又はレンズ洗浄液によって誘導される毒性作用、免疫学的状態、眼瘢痕性類天疱瘡、翼状片、偽翼状片などを有する対象の処置に特によく適している。特定の実施形態では、組織系は対象に移植、内植又はグラフトされ、対象の眼損傷又は疾患を、例えば、対象の損傷又は罹病した眼に安定した輪部幹細胞集団を提供することによって修復することができる。特定の実施形態では、組織系の移植、内植又はグラフトは、眼における上皮化を助長し、正常な上皮表現型を維持し、炎症を低減させ、瘢痕化を低減させ、組織の接着を低減させ、血管新生を低減させ、及び視力を向上させる。

10

【0116】

例えば、組織系を移植、内植又はグラフトして、損傷した角膜を修復することができる。多くのそのような方法は当業者に周知であるが、1つのそのような方法は、輪部での角膜周囲切開、続いて強膜を露出させるための輪部周囲結膜下瘢痕及び炎症組織の除去を含む。角膜の線維性血管性組織を表層角膜切除術によって除去してもよい。レシピエントの眼のサイズに従って組織系を拡大縮小し、対応するレシピエント輪部領域に移植又はグラフトすることができる。あるいは、組織系を全層状角膜組織として使用し、表層角膜移植術として移植又はグラフトして全領域を覆ってもよい。その後、その移植、内植又はグラフトされた組織系を、例えば縫合又は当業者に公知の任意の他の手段で、損傷部位に固定する。

20

【0117】

本発明は、対象において組織を再生又は修復する方法であって、対象中又は対象上に、本発明のLSC集団又はLSC様集団又はSESC集団又はSESC様集団の細胞を、組織の再生又は修復に十分な量で導入することを含む方法をさらに提供する。

30

【0118】

一実施形態では、再生又は修復される組織は、輪部幹又は前駆細胞(LSC)と角膜上皮細胞とを含む角膜上皮細胞系統の組織を含む。

【0119】

本発明は、対象の皮膚上皮幹細胞(SESC)から輪部幹細胞又は前駆細胞(LSC)様細胞を得る方法をさらに提供する。本発明のある実施形態では、この方法は、SESCをLSC様細胞に転換するのに十分なレベルにSESC中のPAX6タンパク質を増加させることによって対象のSESCからLSC様細胞を得るための、SESCへのPAX6遺伝子の導入又はSESCにおけるPAX6遺伝子発現のアップレギュレーションを含む。一実施形態では、対象の皮膚上皮幹細胞(SESC)から輪部幹又は前駆細胞(LSC)様細胞を得るためのSESCへのPAX6遺伝子の導入又はSESCにおけるPAX6遺伝子発現のアップレギュレーションは、(a)SESCを対象から得るステップ、(b)前記SESCをインビトロ又はエキスビボでのフィーダーフリー細胞培養で培養するステップ、(c)前記SESCに少なくとも1つのPAX6遺伝子を導入して又は前記SESCにおけるPAX6遺伝子発現をアップレギュレートさせて、SESCを輪部幹細胞又は前駆細胞(LSC)様細胞に転換するのに十分なレベルにSESC中のPAX6タンパク質を増加させ、それによって対象からの皮膚上皮幹細胞(SESC)から哺乳動物輪部幹細胞又は前駆細胞(LSC)様細胞を得るステップを含む。

40

【0120】

50

本発明の実施に従って、前記方法は、インビトロの方法であってもよく、エキスビボ方法であってもよく、又は生体内原位置(in situ)で若しくは直接対象に適用してもよい。

【0121】

一実施形態では、PAX6タンパク質をコードする核酸を導入するか、PAX6遺伝子発現をアップレギュレートするか、又はPAX6活性を増加させる薬剤で、対照は処置される。前記薬剤の適する例としては、遺伝子治療ベクター、ウイルス粒子、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、組換え核酸、組換えタンパク質、PAX6タンパク質、PAX6発現の小分子レギュレーター、PAX6発現の負のレギュレーターの阻害剤、PAX活性の負のレギュレーターの小分子阻害剤、PAX6活性の小分子エンハンサー、又はこれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0122】

PAX6遺伝子の例としては、PAX6a遺伝子、PAX6b遺伝子、操作されたPAX6a遺伝子、操作されたPAX6b遺伝子、PAX6遺伝子ファミリーの任意のメンバー、PAX6aタンパク質のすべて又は一部をコードする核酸、PAX6bタンパク質のすべて又は一部をコードする核酸、及びPAX6又はPAX6様活性を有するタンパク質をコードする任意の核酸が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の一実施形態では、PAX6タンパク質は、PAX6aタンパク質、PAX6bタンパク質、タンパク質のPAX6ファミリーの任意のメンバー、及びPAX6又はPAX6様活性を有する任意のタンパク質のいずれかである。本発明の一実施形態では、PAX6又はPAX6様活性には内因性K19の発現増加を生じさせることができる任意のタンパク質が関係することがあり、K19がアップレギュレートされたSECSは、K3及びK12遺伝子発現増加並びにK1及びK10遺伝子発現減少を有する角膜上皮細胞(CEC)又はCEC様細胞に分化しうる。

20

【0123】

一実施形態では、本発明は、上記の本発明のLSC様細胞から角膜上皮細胞(CEC)様細胞を得る方法であって、フィーダーフリーLSC分化培地で(c)の細胞を分化させてLSC様細胞をCEC様細胞に転換するステップをさらに含む方法を提供する。

【0124】

本発明のある実施形態では、フィーダーフリーLSC分化培地は、既知組成であることがある。本発明の別の実施形態では、前記培地はゼノフリーであるか、培養細胞と同じ種に由来する成分以外の成分を含まない。さらに別の実施形態では、培地は無血清であることがある。さらなる実施形態では、培地は、一切の動物又はヒト産物を有さないことがある。

30

【0125】

例えば、ゼノフリー培地又はゼノフリー培養培地は、培地が異質な動物由来産物又は材料を含有しないものである。詳細には、培養培地中のいずれの産物及び材料も、異質な動物細胞において生産されず、又は異質な動物細胞と接触していない。ウシ胎仔血清を含む培養培地は、ヒト細胞を培養するのに使用される場合又はウシ細胞以外の任意の動物細胞の培養に使用される場合、血清がウシに由来するのでゼノフリーと考えられないであろうが、一切の動物由来産物又は材料の非存在下でヒト血清を含む培養培地は、ヒト細胞を培養する場合、ゼノフリーと考えられるであろう。例えば、ゼノフリー培地は、細菌又は酵母などの微生物から生産された又は得られた産物又は材料を含有することがある。ゼノフリー培地は、「動物質を含まない」培地と考えられることもある。この例では、ゼノフリーは、異質な動物由来産物又は材料の非存在を指す。

40

【0126】

本発明は、皮膚上皮幹細胞(SESC)から輪部幹又は前駆細胞(LSC)様細胞を得る方法をさらに提供する。この方法は、(a)SESCを対象から得るステップ、(b)前記SESCをインビトロでのフィーダーフリー細胞培養で培養するステップ、(c)前記SESCにおけるPAX6遺伝子発現をアップレギュレートさせる薬剤と前記SESCを接触させて、SESCを輪部幹細胞又は前駆細胞(LSC)様細胞を転換するのに十分なレベルにSESC中のPAX6タンパク質を増加させ、それによって対象からの皮膚上皮幹細胞(SESC)から哺乳動物輪部幹細胞又は前駆細胞(LSC)様細胞を得るステップを含む。

50

【0127】

適する薬剤の例としては、PAX6遺伝子を含む核酸、遺伝子治療ベクター、ウイルス粒子、レンチウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、組換えタンパク質、PAX6タンパク質、PAX6発現の小分子レギュレーター、PAX6発現の負のレギュレーターの阻害剤、PAX6活性の負のレギュレーターの小分子阻害剤、PAX6活性の小分子エンハンサー、及びこれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

【0128】

適するPAX6遺伝子の例としては、PAX6a遺伝子、PAX6b遺伝子、操作されたPAX6a遺伝子、操作されたPAX6b遺伝子、PAX6遺伝子ファミリーの任意のメンバー、PAX6aタンパク質のすべて又は一部をコードする核酸、PAX6bタンパク質のすべて又は一部をコードする核酸、及びPAX6又はPAX6様活性を有するタンパク質をコードする任意の核酸が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0129】

本発明の実施に従って、PAX6タンパク質は、PAX6aタンパク質、PAX6bタンパク質、タンパク質のPAX6ファミリーの任意のメンバー、又はPAX6若しくはPAX6様活性を有する任意のタンパク質及びその断片のいずれであってもよい。

【0130】

本発明は、対象から哺乳動物LSCを得るインビトロの方法をさらに提供する。一実施形態では、この方法は、(a)対象の眼の輪部領域から組織のサンプルを採取するステップ、(b)前記組織を解離させて単一細胞を得るステップ、及び(c)LSCの増殖を可能にするようにフィーダーフリー細胞培養培地で(b)の単一細胞を培養するステップであって、ここで増殖されたLSCは角膜上皮細胞(CEC)に分化する潜在力を有し、それによって対象からインビトロで哺乳動物LSCを得る、ステップを含む。一実施形態では、輪部領域は、眼の角膜輪部を含む。本発明のある実施形態では、(b)での組織の解離は、組織を小塊及び/又は単一細胞に機械的に解離させるための機器又はツール(例えばレーザー)による機械的又は物理的解離を含む。別の実施形態では、解離は、酵素、プロテアーゼ、化学薬品、金属キレート剤又はこれらの組合せなどの薬剤(単数又は複数)の使用を含む。当技術分野において公知のように、組織を解離させる他の方法を使用して単個LSCを得てもよい。

20

【0131】

本発明のある実施形態では、フィーダーフリー細胞培養培地は、rho関連プロテインキナーゼ(ROCK)阻害剤若しくは白血病抑制因子(LIF)又は両方をさらに含む。ROCK阻害剤の一例は、Y-27632(4-[(1R)-1-アミノエチル]-N-4-ピリジニル-トランス-シクロヘキサノールボキサミド二塩酸塩)である。

30

【0132】

本発明の別の実施形態では、前記方法は、LSC又はLSC様細胞を、マトリックス又は細胞外マトリックス上で培養することによって、CEC様細胞に転換するステップをさらに含む。

【0133】

本発明は、フィーダーフリーLSC培養培地において対象から哺乳動物輪部幹又は前駆細胞(LSC)を得る及び/又はインビトロで拡大させる方法をさらに提供する。一実施形態では、この方法は、(a)対象の眼の輪部領域から組織のサンプルを採取するステップ、(b)前記組織を解離させて単一細胞を得るステップ、及び(c)LSCの増殖を可能にするようにフィーダーフリー細胞培養培地で(b)の単一細胞を培養するステップであって、ここで増殖されたLSCは角膜上皮細胞(CEC)に分化する潜在力を有し、それによって対象から哺乳動物輪部幹細胞を得てインビトロで拡大させる、ステップを含む。本発明のある実施形態では、前記方法のステップ(c)において単一細胞をマトリックス又は細胞外マトリックス上で培養する。

40

【0134】

本発明の実施に従って、マトリックス又は細胞外マトリックスは、Matrigel(登録商標)又はその等価物、増殖因子低減Matrigel(登録商標)又はその等価物、コラーゲン、コラー

50

ゲンIV、コラーゲンIVシート、哺乳動物羊膜、ヒト羊膜、フィブリノーゲン、トロンビン、パールカン、ラミニン、フィブロネクチン、組換えフィブロネクチン、プロテオグリカン、プロコラーゲン、ヒアルロン酸、エンタクチン、ヘパラン硫酸、テネイシン、ポリ-L-リシン、ゼラチン、ポリ-L-オルニチン、細胞外マトリックスタンパク質(Fischer又はLife Tech)、トロンビンシート(Fibrin Sealant, Reliseal(商標, Reliance Life Sciences)、フィブリノーゲンとトロンビンのシート(Reliance Life)及びこれらの任意の組合せのいずれであってもよい。

【0135】

別の実施形態では、増殖したLSC又はLSC様細胞を継代前に約70~90%の集密度及び継代後に約15~20%の集密度で継代するステップ(d)をさらに含む。さらにさらなる実施形態では、増殖したLSC又はLSC様細胞をLSC又はLSC様細胞として安定的に継代することができる回数は、約17継代以上である。別の実施形態では、LSCは、約16~20時間の世代時間で増殖しうる。さらに、LSC又はLSC様細胞は、CECに分化することなく約40~60世代にわたって安定的に繁殖できる。本発明のある実施形態では、フィーダーフリーLSC培養培地を1日おきに交換することもある。

【0136】

本発明の実施に従って、輪部領域は、眼の角膜輪部、角膜と結膜の間の周縁部、角膜と強膜の境界、角強膜輪部、柵間乳頭間突起(interpalisade rete ridge)を含む領域、又はVogt柵(Palisades of Vogt)を含む領域を含むうる。

【0137】

ステップbにおいて、前記方法は、一実施形態では、組織を解離剤(単数若しくは複数)で処置することによって又は解離剤(単数若しくは複数)と接触させることによって組織を解離させるステップをさらに提供し、前記解離剤(単数又は複数)は、酵素、プロテアーゼ、化学薬品、金属キレート剤又はこれらの組合せである。別の実施形態では、組織をより小さい塊及び単一細胞に機械的に解離させるための機器又はツールによる機械的又は物理的破壊によって解離が達成される。

【0138】

一実施形態では、プロテアーゼは、トリプシン、コラゲナーゼIV、又はこれらの組合せを含むことがある。さらに、金属キレート剤は、EDTA、EGTA又はこれらの組合せを含むことがある。

【0139】

本発明のある実施形態では、フィーダーフリー細胞培養培地は、最小必須培地、増殖因子、ホルモン及び可溶性因子を含むことがある。さらなる実施形態では、フィーダーフリー細胞培養培地は、好ましくは、LSCを得て拡大させる種からの血清、又は代用血清をさらに含むことがある。さらなる実施形態では、フィーダーフリー細胞培養培地は、その上さらにrho関連プロテインキナーゼ(ROCK)阻害剤を含むことがある。さらなる実施形態では、フィーダーフリー細胞培養培地は、白血病抑制因子(LIF)をさらに含む。

【0140】

ROCK阻害剤の適する例としては、(R)-(+)-トランス-4-(1-アミノエチル)-N-(4-ピリジル)シクロヘキサンカルボキサミド二塩酸塩一水和物(Y-27632)、5-(1,4-ジアゼパン-1-イルスルホニル)イソキノリン(ファスジル又はHA1077)、H-1152、H-1152P、(S)-(+)-2-メチル-1-[(4-メチル-5-イソキノリニル)スルホニル]ホモピペラジン二塩酸塩、ジメチルファスジル(diMF、H-1152P)、N-(4-ピリジル)-N'-(2,4,6-トリクロロフェニル)尿素、Y-39983、Wf-536、SNJ-1656、及び(S)-(+)-2-メチル-1-[(4-メチル-5-イソキノリニル)スルホニル]-ヘキサヒドロ-1H-1,4-ジアゼピン二塩酸塩(H-1152)、イミダゾール含有ベンゾジアゼピン、イミダゾピリジン誘導体、インダゾールコア、2-アミノピリジン/ピリミジンコア、9-デアザグアニン誘導体、ベンズアミド又はアミノフラザンを含む化合物、並びにこれらの誘導体及び類似体、並びにそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

【0141】

本発明のある実施形態では、対象からのLSCの単離後、LSCの約第4継代後にフィーダー

10

20

30

40

50

フリー細胞培養培地にROCK阻害剤を添加する。

【0142】

一実施形態では、対象からのLSCの単離後、LSCの約第4継代後にフィーダーフリー細胞培養培地にLIFを添加する。

【0143】

本発明の特定の実施形態では、フィーダーフリー細胞培養培地は、DMEM/F12培地、DMEM、ペニシリン-ストレプトマイシン、血清、EGF、インスリン、ヒドロコルチゾン、コレラ毒素、3,3',5-トリヨード-L-チロニン、又はこれらの組合せを含む。血清は、ウシ胎仔血清、しかし好ましくは培養しようとするLSCと同じ種の血清、又は代用血清でありうる。フィーダーフリー細胞培養培地は、ROCK阻害剤、Y-27632をさらに含むことがある。ROCK阻害剤、Y-27632を細胞約第4継代後にフィーダーフリー細胞培養培地に添加してもよい。フィーダーフリー細胞培養培地は、白血病抑制因子(LIF)をさらに含む。対象からのLSCの単離後、LSCの約第4継代後にフィーダーフリー細胞培養培地にLIFを添加してもよい。

【0144】

本発明の一実施形態では、そのようにして得られた及び/又は拡大されたLSCは、WNT7A、FZD5、PAX6、p63、ケラチン5(K5)、ケラチン14(K14)、ケラチン19(K19)及びKi67を含むマーカーのセットを発現しうる。別の実施形態では、そのようにして得られた及び/又は拡大されたLSCの約90~95%は、p63、PAX6、K19及びKi67を発現する。さらに別の実施形態では、LSCの約5%未満がK5及びK14を発現する。さらなる実施形態では、LSCの約95%より多くがWNT7A及びFZD5を発現する。さらなる実施形態では、CECは、WNT7A、FZD5、PAX6、ケラチン3(K3)及びケラチン12(K12)を含むマーカーのセットを発現し、ここでK3及びK12発現はLSCと比較して統計的に有意に高く、K19発現はLSCと比較して統計的に有意に低い。別の実施形態では、CECは、p63を発現しないか、又はLSCより有意に低いレベルのp63を発現し、ケラチン1(K1)及びケラチン10(K10)を発現しないか、又は皮膚又は表皮細胞より有意に低いレベルのケラチン1(K1)及びケラチン10(K10)を発現する。

【0145】

本発明は、単離されたLSCをインビトロで角膜上皮細胞(CEC)に分化させる方法も提供する。この方法は、(a)元々対象に由来した、好ましくは単一細胞状態に解離されている、事前に培養されたLSCを得るステップ、(b)単離されたLSCを、分化に適している3次元細胞培養物を形成する又は形成を可能にするように、マトリックス又は細胞外マトリックス中及び/又は上に配置するステップ、及び(c)単離されたLSCのCECへのインビトロでの分化を可能にするようにLSC分化培地でLSCを培養することによって、単離されたLSCをインビトロで角膜上皮細胞に分化させるステップを含む。

【0146】

本発明の実施に従って、マトリックス又は細胞外マトリックスは、Matrigel(登録商標)又はその等価物、増殖因子低減Matrigel(登録商標)又はその等価物、コラーゲン、コラーゲンIV、コラーゲンIVシート、哺乳動物羊膜、ヒト羊膜、フィブリノーゲン、トロロンビン、パールカン、ラミニン、フィブロネクチン、組換えフィブロネクチン、プロテオグリカン、プロコラーゲン、ヒアルロン酸、エンタクチン、ヘパラン硫酸、テネイシン、ポリ-L-リシン、ゼラチン、ポリ-L-オルニチン、細胞外マトリックスタンパク質(Fischer又はLife Tech)、トロロンビンシート(Fibrin Sealant, Reliseal(商標, Reliance Life Sciences))、フィブリノーゲンとトロロンビンのシート(Reliance Life)及びこれらの任意の組合せのいずれであってもよい。

【0147】

一実施形態では、マトリックス又は細胞外マトリックスは、増殖因子低減Matrigel(登録商標)若しくはその等価物、又はコラーゲンを含む。別の実施形態では、輪部幹細胞分化培地は、フィーダーフリーの既知組成培地である。例えば、一実施形態では、フィーダーフリーの既知組成培地は、CnT-30培地(Cellntec Advanced Cell Systems AG, Bern, Switzerland)、CnT-02(Cellntec)、CnT-02-3DP5(Cellntec)又は機能的等価物を含むことがあり、前記培地はLSCのCECへの分化を促進する。

【0148】

さらなる実施形態では、CECは、WNT7A、FZD5、PAX6、ケラチン3(K3)及びケラチン12(K12)を含むマーカーのセットを発現し、ここでK3及びK12発現はLSCと比較して統計的に有意に高く、K19発現はLSCと比較して統計的に有意に低い。

【0149】

さらにさらなる実施形態では、そのように生産された、得られた又は拡大されたCECは、p63を発現しないか、又はLSCより有意に低いレベルのp63を発現し、ケラチン1(K1)及びケラチン10(K10)を発現しないか、又は皮膚又は表皮細胞より有意に低いレベルのケラチン1(K1)及びケラチン10(K10)を発現する。

【0150】

本発明の方法の一実施形態では、LSC分化培地を1日おきに交換する。

【0151】

本発明は、単離されたSESCの皮膚を本発明の請求項に記載のフィーダーフリー細胞培養培地で培養することを含む、SESCを得てインビトロでフィーダーフリー細胞培養培地において拡大させる方法も提供する。一実施形態では、SESCを毛包間表皮から単離することがある。別の実施形態では、ヒト又は動物のSESCを有するSESCニッチからSESCを単離する。

【0152】

本発明は、輪部幹細胞(LSC)から上皮幹細胞(SESC)又はSESC様細胞を得る方法であって、(a)細胞運命をLSCからSESC運命に変えるために十分にWNT7A又はPAX6遺伝子又はタンパク質の発現又は活性をノックダウンするステップを含み、それによってLSC細胞からSESC又はSESC様細胞を得る方法をさらに提供する。一実施形態では、LSCを、WNT7A若しくはPAX6に対するshRNAとLSCを接触させて、あるいは、LSCが、WNT7A若しくはPAX6遺伝子に対するshRNA、RNAi若しくはアンチセンスRNAを生産する導入遺伝子を発現して、LSCをSESC又はSESC様細胞に転換するために十分にWNT7A又はPAX6の発現を低減させてもよい。

【0153】

本発明は、対象から皮膚上皮幹細胞(SESC)を得て、フィーダーフリー細胞培養培地においてインビトロで拡大させる方法も提供する。一実施形態では、この方法は、(a)対象の毛包間表皮から又は対象のSESCを有する任意のSESC幹細胞ニッチから組織サンプルを採取するステップ、(b)前記組織を解離させて単一細胞を得るステップ、及び(c)SESCの増殖を可能にするようにフィーダーフリー細胞培養培地で(b)の単一細胞を培養するステップであって、ここで増殖したSESCは皮膚表皮細胞に分化する潜在力を有し、それによって対象から皮膚上皮幹細胞を得てインビトロで拡大させる、ステップを含む。別の実施形態では、SESCを本発明のフィーダーフリー細胞培養培地においてインビトロで培養することがある。

【0154】

本発明は、インビトロでSESC又はSESC様細胞から皮膚表皮細胞又は皮膚表皮様細胞を得る方法であって、SESC又はSESC様細胞の皮膚表皮細胞又は皮膚表皮様細胞への分化を支持する既知組成分化培地で、単離されたSESC又はSESC様細胞を培養することによって、インビトロでSESC又はSESC様細胞から皮膚表皮細胞又は皮膚表皮様細胞を得ることを含む方法をさらに提供する。一実施形態では、既知組成分化培地は、CnT-02(CellnTec)又は等価の培地でありうる。

【0155】

本発明は、新たな皮膚を必要とする対象を処置する方法であって、本発明の方法によって得た又は本発明の方法のいずれかによって得て拡大させたSESC細胞、SESC様細胞、皮膚表皮細胞又は皮膚表皮様細胞を対象に投与して、例えば、対象のSESC細胞集団又は皮膚表皮細胞集団を再定着させ、対象に新たな皮膚をもたらすことによって、新たな皮膚を必要とする対象を処置することを含む方法を提供する。

【0156】

一実施形態では、皮膚を必要とする対象は、皮膚ジストロフィー、皮膚疾患、皮膚感染症、熱傷傷害、皮膚潰瘍、擦過創、黒色腫、癌腫、創傷、加齢、皮膚の遺伝障害、皮膚生

10

20

30

40

50

検、手術、美容上の欠陥、又は皮膚に影響を与える再建術を患っていることがある。あるいは、皮膚を必要とする対象は、皮膚置換術を必要とする対象、又は皮膚に影響を与える美容整形若しくは再建術を受ける対象であることもある。

【0157】

本発明は、輪部幹若しくは前駆細胞(LSC)及び/又はその子孫をSESC又はSESC様細胞に変化させる方法をさらに提供する。この方法は、LSC及び/又はその子孫をSESC又はSESC様細胞に変化させるために十分にLSCにおけるWNT7A又はPAX6遺伝子の発現をダウンレギュレートさせることによって、LSC及び/又はその子孫をSESC又はSESC様細胞に変化させることを含む。

【0158】

本発明は、LSC様細胞及び/又はその子孫をSESC又はSESC様細胞に変化させる方法も提供する。この方法は、LSC様細胞及び/又はその子孫をSESC又はSESC様細胞に変化させるために十分にLSC様細胞におけるWNT7A又はPAX6遺伝子の発現をダウンレギュレートさせることによって、LSC様細胞及び/又はその子孫をSESC又はSESC様細胞に変化させることを含む。

【0159】

本発明は、皮膚上皮幹細胞(SESC)及び/又はその子孫をLSC又はLSC様細胞に変化させる方法を提供する。この方法は、SESC細胞及び/又はその子孫をLSC又はLSC様細胞に変化させるために十分にSESCにおいてPAX6又はWNT7Aをアップレギュレート又は過剰発現させることによって、SESC様及び/又はその子孫をLSC又はLSC様細胞に変化させることを含む。

【0160】

加えて、本発明は、SESC様細胞及び/又はその子孫をLSC又はLSC様細胞に変化させる方法を提供する。この方法は、SESC様細胞及び/又はその子孫をLSC又はLSC様細胞に変化させるために十分にSESC様細胞においてPAX6又はWNT7Aをアップレギュレート又は過剰発現させることによって、SESC様及び/又はその子孫をLSC又はLSC様細胞に変化させることを含む。

【0161】

本発明は、本発明の方法のいずれかによって得られる又は生産される単離された輪部幹細胞(LSC)又はLSC様細胞の集団を提供する。一実施形態では、LSCは、WNT7A、FZD5、PAX6、p63、ケラチン5(K5)、ケラチン14(K14)、ケラチン19(K19)、及びKi67を含むマーカーのセットを発現する。

【0162】

本発明は、本発明の方法のいずれかによって得られる単離された角膜上皮細胞(CEC)の集団を提供する。一実施形態では、CECは、(i)WNT7A、FZD5、PAX6、ケラチン3(K3)及びケラチン12(K12)を含むマーカーのセットを発現し、ここでK3及びK12発現はLSCと比較して統計的に有意に高く、K19発現はLSCと比較して統計的に有意に低く、(ii)p63を発現しないか、又はLSCより有意に低いレベルのp63を発現し、ケラチン1(K1)及びケラチン10(K10)を発現しないか、又は皮膚又は表皮細胞より有意に低いレベルのケラチン1(K1)及びケラチン10(K10)を発現する。

【0163】

本発明は、本発明の方法のいずれかによって生産されたLSC、LSC様細胞若しくはCEC、又は前記細胞の組合せ、包装材料及び使用説明書を含む、角膜組織修復用のキットをさらに提供する。一実施形態では、前記キットは、医薬的に許容される担体をさらに含む。医薬的に許容される担体は、ヒト又は動物の眼の湾曲部のような湾曲部での細胞付着又は増殖を支持するために使用されるコンタクトレンズ又はその等価物であってもよい。別の実施形態では、前記キットは、ヒト羊膜又は動物羊膜をさらに含む。

【0164】

本発明は、本発明の方法のいずれかによって生産されたLSC、LSC様、CEC若しくはCEC様細胞又は前記細胞の組合せの有効量及び適する医薬担体を含む、医薬組成物をさらに提供する。

【0165】

10

20

30

40

50

本発明は、本発明のLSC若しくはLSC様集団又は本発明のSESC若しくはSESC様集団を増殖及び維持するためのキットであって、LSC集団を維持するための細胞培養培地を含み、前記培地が本質的にフィーダーフリーである、キットも提供する。一実施形態では、前記キットの成分は、本質的にゼノフリーである。さらに別の実施形態では、前記キットは、LSC又はLSC様集団をCEC又はCEC様集団に分化させるためのLSC分化培地をさらに含む。さらなる実施形態では、前記キットの成分は、本質的に無血清である。さらにさらなる実施形態では、前記成分は動物の産物を本質的に含まず、例えば、ヒトの産物を本質的に含まない。さらなる実施形態では、前記キットの成分は、既知組成である。

【0166】

本発明の方法のいずれかによって生産されたLSC、LSC様、CEC若しくはCEC様細胞、又は前記細胞の組合せ、包装材料及び使用説明書を含む、角膜組織修復用のキットも提供する。前記キットは、医薬的に許容される担体をさらに含む。医薬的に許容される担体は、ヒト又は動物の眼の湾曲部のような湾曲部での細胞付着又は増殖を支持するために使用されるコンタクトレンズ又はその等価物である。加えて、前記キットは、ヒト羊膜又は動物羊膜をさらに含むことがある。

【0167】

治療用途

本発明は、輪部幹細胞又は角膜上皮細胞の機能不全に関連した疾患を有する対象を処置する方法を提供する。一実施形態では、この方法は、(a)本発明の、又は本発明の方法によって生産された、LSC、LSC様、CEC又はCEC様細胞を対象の罹患した眼に移植するステップを含み、移植された細胞が前記対象の罹患した眼の角膜又は輪部に定着し、正常な角膜透明性及び透明度を回復させ、それによって、輪部幹若しくは前駆細胞又は角膜上皮細胞の機能不全に関連した疾患を有する対象を処置する。

【0168】

前記疾患又は状態の例としては、輪部幹若しくは前駆細胞の欠損、角膜上皮細胞の欠損、角膜輪部の損傷、眼の角膜の損傷、輪部幹細胞の損傷、角膜上皮細胞の損傷、角膜の発生若しくは機能に影響を与える先天性欠損、角膜の発生若しくは機能に影響を与える後天性欠損、角膜が皮膚系統に切り替えられる細胞運命決定に影響を与える先天性欠損、角膜が皮膚系統に切り替えられる細胞運命決定に影響を与える後天性欠損、異常表皮分化、ステーブンス・ジョンソン症候群、無虹彩、再発性翼状片、角膜疾患、角膜上皮扁平上皮化生、炎症性角膜症、外傷、化学熱傷、アルカリ熱傷、半盲目、又は全盲が挙げられるが、これらに限定されない。

【0169】

一実施形態では、前記疾患又は状態は、半盲目、全盲、角膜表面疾患、角膜疾患、角膜上皮扁平上皮化生、炎症性角膜症、外傷又はアルカリ熱傷である。

【0170】

本発明は、半盲目、全盲、角膜表面疾患、角膜疾患、角膜上皮扁平上皮化生、炎症性角膜症、外傷又はアルカリ熱傷を有する対象の正常な角膜透明性及び透明度を回復させる方法をさらに提供する。一実施形態では、この方法は、(a)本発明の、又は本発明の方法によって生産された、LSC、LSC様、CEC又はCEC様細胞を対象の罹患した眼に移植するステップを含み、移植された細胞が前記対象の罹患した眼の角膜又は輪部に定着し、正常な角膜透明性及び透明度を回復させ、それによって、半盲目、全盲、角膜表面疾患、角膜疾患、角膜上皮扁平上皮化生、炎症性角膜症、外傷又はアルカリ熱傷を有する対象の正常な角膜透明性及び透明度を回復させる。

【0171】

本発明は、対象の角膜組織を再生又は修復する方法であって、本発明の、又は本発明の方法のいずれかによって生産された、単離されたLSC、LSC様、CEC又はCEC様細胞集団を、角膜組織の再生又は修復に十分な量で前記対象に導入することを含む方法も提供する。

【0172】

一実施形態では、細胞は、対象以外の個体からのものである。別の実施形態では、細胞

は、前記方法によって生産された細胞で処置される対象からのものである。

【0173】

一実施形態では、対象は哺乳動物である。哺乳動物の例としては、ヒト、ラット、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ウサギ、ウシ、サル又はマウスが挙げられるが、これらに限定されない。

【0174】

本発明は、眼化生を有する患者がPAX6遺伝子又は遺伝子産物での処置の利益を受け得るかどうかを判定する方法をさらに提供する。一実施形態では、この方法は、化生領域におけるWNT7A、PAX6、K3及び/又はK12の遺伝子発現又はタンパク質レベルを評価することを含み、化生領域におけるWNT7A、PAX6、K3及び/又はK12の非存在は、眼化生を有する患者がPAX6遺伝子若しくは遺伝子産物又は本発明の細胞での処置の利益を受け得ることを示す。

10

【0175】

加えて、本発明は、眼化生を有する患者がWNT7A遺伝子又は遺伝子産物での処置の利益を受け得るかどうかを判定する方法をさらに提供する。本発明のある実施形態では、この方法は、化生領域におけるWNT7A、PAX6、K3及び/又はK12の遺伝子発現又はタンパク質レベルを評価することを含み、化生領域におけるWNT7A、PAX6、K3及び/又はK12の非存在は、眼化生を有する患者がWNT7A遺伝子又は遺伝子産物での処置の利益を受け得ることを示す。

【0176】

また、本発明は、眼化生を有する患者がWNT7AとPAX6両方の遺伝子又は遺伝子産物での処置の利益を受け得るかどうかを判定する方法をさらに提供する。一実施形態では、この方法は、化生領域におけるWNT7A、PAX6、K3及び/又はK12の遺伝子発現又はタンパク質レベルを評価することを含み、化生領域におけるWNT7A、PAX6、K3及び/又はK12の非存在は、眼化生を有する患者がWNT7AとPAX6両方の遺伝子又は遺伝子産物での処置の利益を受け得ることを示す。

20

【0177】

さらに、本発明は、眼化生を有する患者がPAX6遺伝子若しくは遺伝子産物又は本発明の方法のいずれかによって生産された細胞での処置の利益を受け得るかどうかを判定する方法を提供し、この方法は、化生領域におけるWNT7A、PAX6、K3及び/又はK12の遺伝子発現又はタンパク質レベルを評価することを含み、化生領域におけるWNT7A、PAX6、K3及び/又はK12の非存在は、眼化生を有する患者が、PAX6遺伝子若しくは遺伝子産物又は本発明の方法のいずれかによって生産された細胞での処置の利益を受け得ることを示す。

30

【0178】

本発明は、対象の角膜組織を再生又は修復する方法であって、本発明の単離されたLSC集団を、角膜組織の再生又は修復に十分な量で前記対象に導入することを含む方法も提供する。対象は、哺乳動物対象でありうる。例としてはヒト、ラット、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ウサギ、ウシ、サル又はマウスが挙げられるがこれらに限定されない。

【0179】

さらに、本発明は、眼疾患を処置する方法であって、本発明の単離されたLSC若しくはLSC様集団又は本発明のSESC若しくはSESC様集団を、本発明の単離されたLSC又はLSC様集団が、CEC又はCEC様細胞への分化を可能にするLSC又はLSC様状態を生じさせる又は維持するのに十分な量のPAX6を生産又は過剰発現するのに十分な量で、対象に投与することによって、前記眼疾患を処置することを含む方法をさらに提供する。一実施形態では、眼疾患は、ヒト角膜疾患、角膜上皮扁平上皮化生、炎症性角膜症、外傷及びアルカリ熱傷である。本発明の実施に従って、眼疾患は、ヒト眼疾患でありうる。

40

【0180】

対象の角膜組織を再生又は修復する方法であって、対象の角膜組織、角膜組織の推定位置又は眼の前面を角膜組織の再生又は修復に十分な量のPAX6と接触させることを含む方法を、さらに提供する。

50

【0181】

対象の角膜組織を再生又は修復する方法であって、本発明の方法のいずれかによって生産されたLSC、LSC様、CEC若しくはCEC様細胞又はこれらの前記細胞の組合せを角膜組織の再生又は修復に十分な量で角膜又は眼の前面に投与することを含む方法を、さらに提供する。

【0182】

対象の角膜組織を再生又は修復する方法であって、角膜組織、角膜組織の推定位置又は眼の前面に角膜組織の再生又は修復に十分な量のPAX6タンパク質を投与することを含む方法を、さらに提供する。

【0183】

対象の角膜又は角膜機能に影響を与える眼疾患を発症するリスクを評価する方法も提供する。一実施形態では、前記方法は、(a)LSC又は角膜上皮細胞におけるWNTZ7A、FZD5及びPAX6又はこれらの組合せの活性を評価するステップを含み、WNTZ7A、FZD5及びPAX6又はこれらの組合せの活性がより低い又はないことは、対象の角膜又は角膜機能に影響を与える眼疾患を発症するリスクがより高いことを示し、それによって対象の角膜又は角膜機能に影響を与える眼疾患を発症するリスクを評価する。

【0184】

本発明は、本発明の方法のいずれかによって生産されたLSC、LSC様、CEC若しくはCEC様細胞又はこれらの前記細胞の組合せでの細胞移植、あるいはPAX6タンパク質又はPAX6をコードする核酸での処置に適している患者集団であって、角膜の異常な皮膚表皮様細胞及び随伴角質化、並びにWNTZ7A、FZD5及びPAX6遺伝子又は遺伝子の組合せの発現喪失又は減少を有する患者集団を同定する方法をさらに提供する。

【0185】

本発明は、輪部幹細胞が欠損している対象の輪部にLSC又はLSC様細胞を再定着させる方法も提供する。一実施形態では、この方法は、本発明の方法のいずれかによって生産されたLSC又はLSC様細胞を対象の眼の前面に投与するステップ、及び細胞のLSCニッチへの遊走を可能にするステップであって、それによって前記対象の輪部にLSC又はLSC様細胞を再定着させる、ステップを含む。別の実施形態では、LSC又はLSC様細胞を投与するステップを含む前記方法は、LSC又はLSC様細胞のシート(単数又は複数)を対象の眼表面にグラフトするステップ、あるいは、LSC又はLSC様細胞を含む細胞若しくは組織浮遊液を投与するステップを含む。さらなる実施形態では、対象の眼へのLSC又はLSC様細胞の投与後、LSC又はLSC様細胞を羊膜、好ましくはヒト羊膜で覆うこともある。

【0186】

本発明は、輪部幹細胞が欠損している対象の輪部にLSC又はLSC様細胞を再定着させる方法であって、結膜、推定角膜位置、眼又は眼瞼の皮膚上皮幹細胞(SESC)をLSC又はLSC様細胞に転換するために、対象の結膜、推定角膜位置、眼又は眼瞼の領域にPAX6活性又は発現を増加させる薬剤を投与することを含み、輪部に移動すると、前記対象の輪部にLSC又はLSC様細胞を再定着させ、それによって対象の輪部にLSC又はLSC様細胞を再定着させる方法をさらに提供する。

【0187】

したがって、一態様では、本発明は、処置のために、例えば視覚系及び他の器官の傷害又は疾患を処置するために、本発明の輪部幹細胞を供給することに関する。本発明の治療用組成物を使用して処置することができる例示的視覚系傷害又は疾患は、次の通りである：輪部幹細胞が欠損している患者の眼の表面の再建のために(Tsengら、1998)、一般に視覚系加齢性疾患の処置のために、角膜の持続性上皮欠損を有する患者の眼表面の再建のために(Tsengら、1998)、レーザー屈折矯正角膜切除術後の角膜上皮治癒のため並びに角膜実質リモデリング及び混濁形成を回避するために(Wooら、2001)、スティーブンス・ジョンソン症候群及びOCPに関連した眼表面損傷後の治癒プロセスを促進及び支援することができる物質として(Tsubotaら、1996)、ドライアイ、シェーグレン症候群、温度熱傷及び化学熱傷並びに急性及び慢性炎症を含む他の眼前面疾患に関する治癒サポート及び治療ア

ブローチのために、並びに完全及び部分上皮幹細胞欠損の原因を処置することができる多目的化合物として。例示的完全上皮幹細胞欠損としては、化学的及び熱的傷害、スティーブンス・ジョンソン症候群、輪部領域の複数回の手術の影響、コンタクトレンズ長期装用及び重症微生物感染症が挙げられるが、これらに限定されない。例示的部分上皮幹細胞欠損としては、神経栄養性角膜炎、虚血性角膜炎、縁辺潰瘍性及び炎症性角膜炎、輪部炎、無虹彩、翼状片、偽翼状片並びに多発性内分泌欠損(Tsengら、1998; Uchidaら、2000)が挙げられるが、これらに限定されない。

【0188】

本発明による組成物の他の例示的使用は、皮膚ジストロフィー、熱傷傷害及び皮膚潰瘍の処置剤としての使用(Trelfordら、1979)、化学療法性口内炎の治療薬としての使用、自己免疫疾患における免疫調節薬としての使用、自家、同種及び異種移植片の処置の際の寛容性を増加させるための使用、骨再生誘導法の骨誘導性物質(Gomesら、2001)としての使用、インビトロ又はインビボでの細菌及び他の単純生物培養に現在使用されている実際の機器に組み込むことができる物質としての使用、細胞培養専用の現在使用されているデバイス、例えば細胞培養皿、3次元マトリックス又はゲル(Uchidaら、2000)に組み込むことができる物質としての使用、ヒト細胞用の保存又は培養培地としての使用、羊膜のすべての有益作用の遠隔放出のための、到達可能な部位から必要としている部位に有効化合物を輸送することになる統合送達システムの一部としての使用、骨及び組織抗炎症薬としての使用、神経変性疾患又は炎症性疾患に使用するための因子及び受容体源としての使用、並びにグルコース輸送を媒介する受容体源としての使用である。

【0189】

前記方法の別の実施形態では、前記眼の外科手術は、角膜の形状を変化させるか、屈折矯正手術である。特定の実施形態において、前記眼の外科手術は、レーザー屈折矯正角膜切除術(PRK)、レーザー角膜上皮切除術(LASEK)又はレーザー角膜切削形成術(LASIK)である。別の特定の実施形態では、前記眼の外科手術は、自動表層角膜移植術(ALK)、レーザー熱角膜形成術(LTK)、又は伝導式角膜形成術(CK)である。

【0190】

D. 標的疾患及び状態

本発明は、眼疾患又は状態を有する対象を処置する方法であって、本明細書に記載の輪部幹細胞の治療量を含む組成物を前記対象への送達に適している治療製剤で前記対象に投与することを含む方法を企図している。角膜損傷は、病態生理に関与することに関係づけられているいずれの傷害、状態又は疾患であってもよい。非限定的な例を下で述べる。

【0191】

1. 眼の傷害

角膜創傷は、眼表面の傷害であり、熱的創傷(すなわち熱傷)、化学的(すなわち酸)創傷、物理的創傷(すなわち擦過創)若しくは手術(すなわち角膜移植)創傷又はこれらの組合せであることができる。本発明の組成物及び方法は、角膜創傷の処置に有効でありうる。

【0192】

a. 異物

眼の傷害全体の約25%は、角膜表面の異物に関わる。傷害が角膜上皮しか侵さない場合は瘢痕化は起こらないであろうが、ボーマンゾーンも侵す場合には瘢痕化が起こりうる。異物の除去後、眼をスルホンアミド又は抗生物質で処置し、毛様体うっ血及び羞明がある場合又は異物の除去が難しい場合には眼を約5%ホマトロピンなどの毛様体調節薬で処置する。場合によっては、本発明の治療用組成物は、異物に起因する傷害の治療を促進するように、感染を予防するように、及び臨床成績を向上させるように設計される。

【0193】

b. 化学熱傷

化学熱傷は、眼に液体を流すことによって化学薬品を先ず希釈し、その後、局所抗生物質の使用によって感染を予防することにより処置される。

【0194】

チモロール、エピネフリン、アセタゾラミド又は他の同様の薬剤を適用することによって眼圧を低下させることもある。1週間後に角膜の上皮化が不完全であれば、感染リスクに加えて角膜実質壊死の危険もある。したがって、これらのリスクを低下させるために治癒を促進することが重要である。

【0195】

重度瘢痕化は、化学熱傷のもう1つのよく見られる結果である。本発明の治療用組成物は、化学熱傷に起因する角膜びらの治癒を促進するように、角膜実質壊死及び眼の感染を予防するように、並びに角膜瘢痕化を低減させ、それによって角膜の透明度を回復させる/保つように設計される。

【0196】

意外にも、本発明の組成物は、瘢痕形成を防止又は低減させることができる上、同時に、眼の治癒、創傷修復、及び角膜透明度の維持を増進する。いかなる特定の作用機序によっても拘束されることを望まないが、本組成物の抗炎症作用に起因してこれらの有益作用を得ることができると思われる。場合によっては、本発明の組成物の抗炎症作用と抗アポトーシス作用の組合せに起因して有益作用を得ることができる。

【0197】

c. 裂傷

角膜の裂傷後、損傷部を閉鎖する虹彩脱出が生ずる。すべての眼傷害の場合と同様、感染症のリスクがある。裂傷は強膜に及ぶこともあり、これは、よりいっそう重篤な傷害である。そのような場合、脱出したぶどう膜組織を傷害領域から除去するために手術が必要であり、強膜を縫合で閉じる。本発明の治療用組成物は、裂傷の治癒を促進するように及び感染症を予防するように設計される。

【0198】

炎症状態

角膜炎は、角膜の炎症を指す。原因としては、アメーバ、細菌、真菌若しくはウイルス感染、光線角膜炎、被曝(眼瞼機能障害)、化学的傷害、外傷、手術(LASIK、PRK、白内障、角膜移植、翼状片手術)、又は先天的原因、例えば円錐角膜、フックスジストロフィー、若しくは乾性角結膜炎が挙げられるが、これらに限定されない。眼の他の炎症媒介状態としては、ぶどう膜炎、黄斑浮腫、加齢性黄斑変性、網膜剥離、眼腫瘍、多巣性脈絡膜炎、糖尿病性ぶどう膜炎、増殖性硝子体網膜症(PVR)、交感神経性眼炎、フォークト・小柳・原田(VKH)症候群、ヒストプラスマ症、及びぶどう膜滲出が挙げられるが、これらに限定されない。

【0199】

角膜潰瘍は、角膜の表面が何らかの方法で損傷されたとき又は損なわれたとき形成する。潰瘍は、無菌性又は感染性であることがあり、処置コースを左右する。細菌感染性潰瘍は、極度の疼痛を伴う傾向があり、角膜の最外層である上皮の破壊に概して関連している。シュードモナスなどの特定のタイプの細菌は、極度に侵襲性であり、未処置で放置すると24~48時間以内に重度の損傷及びさらには失明を引き起こしうる。無菌性潰瘍は、疼痛をあったとしてもわずかにしか生じさせない。それらは、多くの場合、角膜縁辺部付近に見られ、必ずしも角膜上皮層の破壊を伴うとは限らない。角膜潰瘍には多くの原因がある。コンタクトレンズ装用者は、彼らのレンズ及びケースをこまめにクリーニングし、取り扱い、消毒しないと角膜潰瘍のリスクが高まる。細菌感染性潰瘍は、生物が角膜を感染させる絶好の機会を作る、角膜表面を損なう疾患にも関連している。まばたきが困難である又は自分自身の面倒を見ることができない、重度のドライアイを有する患者にもリスクがある。潰瘍の他の原因は、単純ヘルペスウイルス感染症、炎症性疾患、角膜擦過創又は傷害、及び他の全身性疾患を含む。本発明の組成物及び方法は、角膜潰瘍の処置に有効でありうる。

【0200】

本発明の組成物及び方法は、角膜炎の処置に有効でありうる。眼の抗炎症治療として、特に、眼の付属器、眼瞼又は眼球結膜、角膜及び眼球前部の炎症状態の処置に、マイク

ロスフェアの懸濁液が使用されることがある。マイクロスフェアの抗炎症性懸濁液の一般的治療応用としては、ウイルス、アレルギー生結膜炎、酒さ性ざ瘡、虹彩炎及び虹彩毛様体炎が挙げられる。マイクロスフェアは、化学熱傷若しくは温度熱傷、又は異物の侵入に起因する角膜傷害に関連した炎症を改善するために使用されることもある。そのような状態は、眼の手術、傷害、アレルギー又は感染の結果として生ずることがあり、重度の不快感の原因となりうる。

【0201】

特に、マイクロスフェアには、NSAI剤及びコルチコステロイドの一般的な眼への局所使用と比較して炎症反応を低減させる点で相当な治療的利点がある。局所ステロイドの使用は、後囊下白内障形成、眼圧上昇、二次的眼感染症、角膜創傷治癒遅延、ぶどう膜炎、散瞳、一次的な眼の不快感及び眼瞼下垂をはじめとする多数の合併症と関連づけられている。非常に多くの全身性合併症もコルチコステロイドの眼への局所適用から生じうる。これらの合併症としては、副腎不全、クッシング症候群、消化性潰瘍、骨粗鬆症、高血圧、筋力低下又は筋萎縮症、成長障害、糖尿病、感染の活性化、気分変動及び創傷治癒遅延が挙げられる。

【0202】

3. 眼の手術応用

本発明によるマイクロスフェアの組成物は、眼の手術に関連した炎症を改善するためにも使用されることがあり、これに関連して、予防的様式ではもちろん、上で詳述したような治癒の促進及び瘢痕化の低減にも特に有用である。

【0203】

本発明の組成物の使用は、レーザー屈折矯正角膜切除術(PRK)、レーザー角膜上皮切除術(LASEK)、レーザー角膜切削形成術(LASIK)、自動表層角膜移植術(ALK)、レーザー熱角膜形成術(LTK)、伝導式角膜形成術(CK)、線維柱帯切除術(濾過手術)後、翼状片手術後、付属器外傷及び手術後、眼内手術後、特に、水晶体切除術後、硝子体切除術後、網膜剥離手術後、並びに網膜上膜及び網膜下膜ピーリング後に、特に適している。

【0204】

治療的光線角膜切除(別名、光線療法角膜切除(PTK))で処置することができる他の角膜病理としては、レイス・バックラースジストロフィー、グレノーの再発(Groenouw's palindromia)、角膜白斑、治療後角膜炎、翼状片、角膜異物、重症角膜炎、角膜移植術後小結節、角膜びらん、アルカリ熱傷、放射状角膜形成術及びPRK後に起因する合併症、並びに角膜瘢痕、混濁、又は上皮層を超えて広がるジストロフィー(例えば、実質前部ジストロフィーからの持続性上皮欠損)に関係する視力障害又は刺激性症状、再発性角膜びらん、表在性角膜ジストロフィー、上皮膜ジストロフィー、角膜融解、角膜潰瘍、及びザルツマン結節変性又は円錐角膜結節に起因するでこぼこした角膜表面の処置における合併症が挙げられる。

【0205】

これらが、本発明の組成物及び方法が有用である一般的な外科手術の非限定的な例として役立つことを意図したものであることは、当業者には理解されるであろう。

【0206】

4. 他の前眼状態

前眼状態は、前眼(すなわち眼の前方)領域又は部位、例えば、眼周囲の筋肉、眼瞼若しくは眼球組織、又は水晶体囊の前壁から後壁に位置する流体、又は毛様体筋を侵す又はそれらに関わる疾患、病気又は状態である。したがって、前眼状態は、結膜、角膜、前眼房、虹彩、後眼房(虹彩の後ろ、しかし水晶体囊の後壁の前)、水晶体又は水晶体囊、並びに前眼領域又は部位に血管形成する又は神経支配する血管及び神経を侵す、又はそれらに関わる。

【0207】

したがって、前眼状態は、例えば、無水晶体、偽水晶体、乱視、眼瞼痙攣、白内障、結膜疾患、結膜炎(アトピー性角結膜炎を含むがこれに限定されない)、角膜傷害(角膜実質

10

20

30

40

50

領域の傷害を含むがこれに限定されない)、角膜疾患、角膜潰瘍、ドライアイ症候群、眼瞼疾患、涙器疾患、涙道閉塞、近視、老視、瞳孔障害、屈折障害及び斜視などの、疾患、病気又は状態を含むことができる。緑内障処置の臨床上的目標は前眼房の房水の圧上昇を低下させることでありうるので、緑内障を前眼状態と考えることもできる。

【0208】

本発明に従って処置することができる眼の他の疾患又は障害としては、眼瘢痕性類天疱瘡(OCP)、スティーブンス・ジョンソン症候群及び白内障が挙げられるが、これらに限定されない。

【0209】

ドライアイ症候群は、眼科医によって処置される最も頻度の高い問題の1つである。これは、眼を潤滑する涙膜の量に関する問題に通常は起因する。涙は三層を含む。筋肉層は、角膜を被覆して、涙膜が眼に接着することができるための基礎を形成し、中間水性層は、角膜に潤いを与え、酸素及び他の重要な栄養素を供給し、そして外側脂質層は油膜であり、これは眼上の涙膜を密封し、蒸発を防止するのに役立つ。涙は、眼の周囲の数本の腺によって作られる。水層は、上眼瞼の下に位置する涙腺で生産され、眼瞼の数本の小腺が油及び筋肉層を作る。まばたきするたびに、眼瞼が眼に涙を塗り広げる。過剰な涙は、鼻経由で眼の端の2つの小さい排液管に流れ込む。これらの管は、鼻道につながっている小さい導管に通じる。ドライアイ症候群には多くの原因がある。乾燥の最も一般的な理由の1つは、正常な老化プロセスである。熱い、乾燥した又は風の強い気候、高地、空調及びタバコの煙などの他の多くの要因もドライアイの原因となる。多くの人はまた、コンピュータでの読み取り又は作業時に眼が刺激されると感じる。コンタクトレンズ装用者も乾燥に苦しむことがある。コンタクトが涙膜を吸収し、それに起因して水晶体の表面でタンパク質を形成するからである。特定の薬物、甲状腺の状態、ビタミンA欠損、閉経、並びにパーキンソン病及びシェーグレン症候群などの疾患も乾燥の原因となりうる。本発明の組成物及び方法は、ドライアイ症候群の処置に有効でありうる。

【0210】

製剤、投薬量及び投与

輪部幹細胞を含む組成物を対象に投与して、様々な細胞又は組織機能をもたらし、例えば、外傷、手術、遺伝的特徴、疾患などに起因する眼科障害を処置することができる。本明細書で使用する場合、「対象」は、ヒトを意味することもあり、非ヒト動物を意味することもある。

【0211】

そのような組成物は、1つ以上の生理的に許容される担体を使用して、賦形剤及び助剤を場合により含めて、任意の従来の方法で製剤化されうる。適切な製剤化は、選択される投与経路に依存する。前記組成物は、眼科障害の処置に又は治療的に重要な代謝機能の回復にそれらを使用するための書面での指示とともに包装されることもある。1つ以上の生理的に許容される担体中の前記組成物がレシピエントに投与されることもある。

【0212】

処置キット—本発明は、包装材料と該包装材料内に収容された本発明の医薬組成物とを含む製品であって、前記医薬組成物がLSCを単独で又は担体との組合せで含むものである製品も提供する。包装材料は、LSCを眼科障害、例えば角膜障害/疾患/傷害の処置に使用することができることを示すラベル又は添付文書を含む。

【0213】

一実施形態では、本発明は、本発明のLSCが搭載された使い捨てソフトコンタクトレンズを含む、コンタクトレンズなどの担体を提供する。一実施形態では、コンタクトレンズは、生体適合性格子であることができる。本明細書で使用する場合、用語「生体適合性格子」は、組織発生のために伝導性の3次元構造になることを助長することができる基材を指すことを意図したものである。したがって、例えば、細胞外マトリックス材料を含むもの、又はLSC増殖又は接着を支持するようにバイオコートされたものなどの、そのような生体適合性格子上に細胞を培養又は播種することができる。前記格子を組織タイプの発生

の助長に望ましい形状に成形することができる。また、細胞培養中の少なくとも初期段階に、培地及び/又は基材に、適切な組織タイプ及び構造の発生を助長する因子(例えば、増殖因子、サイトカイン、細胞外マトリックスなど)を補足する。レシピエントへの輸送前に、LSCをレンズ上で拡大させる又はレンズ上に配置することができる。

【0214】

本発明の方法を使用するソフトコンタクトレンズの形成に適する材料としては、限定ではないが、シリコーンエラストマー、シリコーン含有マクロマー(限定ではないが、米国特許第5,371,147号、同第5,314,960号及び同第5,057,578号に開示されているもの(前記特許文献はそれら全体が参照によって本明細書に組み入れられる))、ヒドロゲル、シリコーン含有ヒドロゲルなど、及びこれらの組合せが挙げられる。より好ましくは、シロキサン官能基を含有する材料(限定ではないが、ポリジメチルシロキサンマクロマー、メタクリルオキシプロピルポリアルキルシロキサン及びこれらの混合物を含む)、シリコーンヒドロゲル、又はヒドロキシ基、カルボキシ基若しくは両方を含有するモノマーから製造されたヒドロゲル、及びこれらの組合せからレンズを製造する。ソフトコンタクトレンズを製造するための材料は周知であり、市販されている。例えば、レンズ材料は、アクアフィルコン、エタフィルコン、ゲンフィルコン、レネフィルコン、バラフィルコン、ロトラフィルコン又はガリフィルコンである。パッキング溶液中の添加剤を使用することによってレンズをさらに強化してもよい。そのような添加剤の一例は、ポリビニルピロリドンである。適するレンズ材料は、ポリメチルメタクリレートである。しかし、ガス透過性材料(シリコーン、ポリメチルメタクリレートとシリコーンの組合せ、及び酢酸酪酸セルロースを含む)を使用してもよい。

【0215】

本開示のコンタクトレンズは、透明である(すなわち、少なくとも約20%の可視光透過率を有する)こともあり、不透明であることもあり、又は両方の組合せであることもある。例えば、特定の実施形態では、本開示のコンタクトレンズは透明であることがあり、この場合、前記コンタクトレンズは、片眼又は両眼の視力を矯正することもあり、しないこともある。

【0216】

本開示のコンタクトレンズは、軟質の可撓性材料を含むことがあり、又は硬質のガス透過性材料を含むこともある。軟質可撓性材料の例は、1つ以上のポリマー、例えば、シリコーンなどのポリマー、シリコーンヒドロゲル又は他のヒドロゲル材料(例えば、ホモポリマーを含有する材料、又は2つ以上のヒドロゲルモノマー、例えば2-ヒドロキシエチルメタクリレート、1-ビニル-2-ピロリドン、メタクリル酸など、のコポリマーを含有する材料)の組合せを使用して形成されることもある。硬質剤料の例としては、シリコーンアクリレート(S/A)コポリマー、フルオロシリコーンアクリレート(F-S/A)コポリマー、及びポリ(メチルメタクリレート)(PMMA)が挙げられる。

【0217】

角膜の自然な湾曲とマッチし、標準的はまり具合をもたらすように、レンズが湾曲部を有していてもよい。ソフトコンタクトレンズの場合、これは、1サイズであることがある。例えば、コンタクトレンズは、患者にとって快適で安全なはまり具合をもたらす範囲の標準的角膜湾曲(例えば、数ある値の中でも、8mm~10mmの範囲のベースカーブ)で提供されることもあり、患者にとって快適で安全なはまり具合をもたらす範囲の直径(例えば、数ある値の中でも、8mm~18mmの範囲の直径)を有することもある。ソフトコンタクトレンズの理想的なサイズは、数ある値の中でも、8.8mmのベースカーブ及び14mmの直径でありうる。

【0218】

本開示のさらにさらなる態様は、患者の処置に有用であるキットに関する。このキットは、本開示による患者の処置に有用なすべての成分を含むこともあり、又は前記すべての成分のサブセットを含むこともある。前記キットは、例えば、(a)本開示による1つ以上のコンタクトレンズ、(b)本発明の培養LSCの治療有効量、(c)コンタクトレンズにバイオコ

ートされることもあり、されないこともある、本発明のLSCの増殖を支持するための製剤中の細胞外マトリックス、(d)任意選択的に、本発明のLSCの増殖を維持するための、又は輸送中のLSCを緩衝するための培地、(e)本発明の組成物を患者の眼に投与するための及び/又はコンタクトレンズをはめるための説示、並びに(f)細胞治療製品、医薬品及び/又は医療デバイスを規制する政府の規制当局による要求事項としての包装及び情報を含みうる。加えて、本発明のキットは、本発明のレンズから過剰な培地を洗い流すのに適している液体担体(例えば、注射用滅菌水、生理食塩水、リン酸緩衝液、リン酸緩衝食塩水など)の1つ以上の容器を含むことができる。

【0219】

特定の実施形態では、キットの成分は、医療専門家による適便な使用のために滅菌単個包装で提供される。

【0220】

好ましい実施形態では、マトリックスは、哺乳動物羊膜、Matrigel(商標)及びその等価物、ラミニン、テネイシン、エンタクチン、ヒアルロン、フィブリノーゲン、トロニン、コラーゲン-IV、コラーゲン-IVシート、ポリ-L-リシン、ゼラチン、ポリ-L-オルニチン、フィブロネクチン、トロニンシート(Fibrin Sealant、Reliseal(商標)、Reliance Life Sciences)など、又はこれらの組合せから選択される。

【0221】

本開示の組織系の産生に使用するための組織ベースの一例は、当業者に周知の方法を使用して調製されうるヒト羊膜である。ヒト羊膜をインタクトで上皮表面とともに使用してもよく、又は上皮細胞から剥ぎ取ってもよい。ヒト羊膜の好ましい調製方法は、以下の実施例で開示する。他の実施形態では、組織ベースは、さらなる支持材料、例えば、組織ベース上へのLSCの結合を助長する材料で、バイオコートされる。用いることができるさらなる支持材料は、フィブリノーゲン、ラミニン、コラーゲンIV、テネイシン、フィブロネクチン、コラーゲン、ウシ下垂体抽出物、EGF、肝細胞増殖因子、ケラチノサイト増殖因子、ヒドロコルチゾン、又はこれらの組合せから選択することができる。

【0222】

あるいは、非限定的な実施例では、本発明の組成物は、例えば点眼剤形態などで眼に局所投与されることもある。さらなる非限定的実施形態では、点眼剤は、角膜の疾患又は障害を処置するために角膜に投与することができる、本発明のLSCを含む。

【0223】

様々な実施形態では、本発明の組成物は、溶液中の、浮遊液中の、又は両方の、本発明のiLSCを含む液体を含むことができる。本明細書で使用する場合、液体組成物はゲルを含む。

【0224】

他の実施形態では、組織ベースは、コラーゲングル又はフィブリンゲルであり、前記ゲルは、組織系の産生に望ましい他の細胞タイプをさらに含むことがあり、前記細胞タイプは、線維芽細胞、例えば角膜実質線維芽細胞、間葉組織の派生物、及び上皮細胞、例えば角膜上皮細胞を含むが、これらに限定されない。さらに他の実施形態では、組織ベースは、ヒドロゲル、例えば、合成ヒドロゲル、ヒドロゲルソフトコンタクトレンズ、又はポリHEMAマトリックスである。特定の実施形態では、組織ベースは、組織系の移植、内植又はグラフト後、インビボで徐々に再吸収されることになる。加えて、組織ベースは、例示的には非抗原性であり、有意な線維血管増殖なしに上皮化を助長する。

【0225】

本明細書での用語「浮遊液」は、本発明のLSCが細胞外マトリックス及び培地との組合せで溶液中に存在する液体組成物を含む。本発明は、本発明の様々な成分を分離することもでき、その場合、培地を有する浮遊液中のLSCを用意し、別途、細胞外マトリックスを有する第二の溶液を用意し、別々に導入又は組合せで(例えば送達前に予混して)導入される浮遊液と溶液の両方を処置の時点で併せる。

【0226】

好ましい実施形態では、マトリックスは、哺乳動物羊膜、Matrigel(商標)及びその等価物、ラミニン、テネイシン、エンタクチン、ヒアルロン、フィブリノーゲン、トロニン、コラーゲン-IV、コラーゲン-IVシート、ポリ-L-リシン、ゼラチン、ポリ-L-オルニチン、フィブロネクチン、血小板由来増殖因子(PDGF)、トロニンシート(Fibrin Sealant、Reliseal(商標)、Reliance Life Sciences)など、又はこれらの組合せから選択される。

【0227】

本開示の組織系の産生に使用するための組織ベースの一例は、当業者に周知の方法を使用して調製されるヒト羊膜である。ヒト羊膜をインタクトで上皮表面とともに使用してもよく、又は上皮細胞から剥ぎ取ってもよい。ヒト羊膜の例示的調製方法は、以下の実施例で開示する。他の実施形態では、組織ベースは、さらなる支持材料、例えば、組織ベース上へのLSCの結合を助長する材料で、バイオコートする。用いることができるさらなる支持材料は、好ましくは、フィブリノーゲン、ラミニン、コラーゲンIV、テネイシン、フィブロネクチン、コラーゲン、ウシ下垂体抽出物、EGF、肝細胞増殖因子、ケラチノサイト増殖因子、ヒドロコルチゾン、又はこれらの組合せから選択される。

【0228】

好ましくは、液体組成物は水性である。あるいは、組成物は、軟膏の形態をとることができる。好ましい実施形態では、組成物は、例えば生体内原位(in situ)置ゲル化可能水溶液のような、生体内原位置(in situ)ゲル化可能水性組成物である。そのような組成物は、眼との又は眼の外面の涙液との接触時にゲル化を促進するのに有効な濃度でゲル化剤を含むことができる。

【0229】

本発明の水性組成物は、眼科的に適合性のpH及び浸透圧を有する。これらの組成物は、例えば、無菌条件下での調製及び包装によって、並びに/又は眼科的に許容される保存薬の抗微生物有効量を含めることによって、微生物の増殖を阻害するための手段を取り入れることができる。適する保存薬は、非限定的に、水銀含有物質、例えば、フェニル水銀塩(例えば酢酸、ホウ酸及び硝酸フェニル水銀)及びチメロサル;安定化二酸化塩素;第四級アンモニウム化合物、例えば、塩化ベンザルコニウム、臭化セチルトリメチルアンモニウム及び塩化セチルピリジニウム;イミダゾリジニル尿素;パラベン、例えば、メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン及びブチルパラベン、並びにこれらの塩;フェノキシエタノール;クロロフェノキシエタノール;フェノキシプロパノール;クロロブタノール;クロロクレゾール;フェニルエチルアルコール;EDTA二ナトリウム;並びにソルビン酸及びその塩を含む。

【0230】

適するゲル化剤は、非限定的に、熱硬化性ポリマー、例えば、エチレンオキシドとプロピレンオキシドの四置換エチレンジアミンプロックコポリマー(例えば、ポロキサミン1307);ポリカルボフィル;並びに多糖類、例えば、ゼラチン、カラゲナン(例えば、カップ-カラゲナン及びイオタ-カラゲナン)、キトサン及びアルジネートゴムを含む。語句「生体内原位置(in situ)ゲル化可能」は、眼との又は眼の外側の涙液との接触時にゲルを形成することができる低粘度の液体のみならず、眼への又は眼周囲領域への投与時に粘度又はゲル剛性の実質的増加を示す半流体及びチキソトロピーゲルなどのより粘性の液体も含む。

【0231】

当業者は、特定の目的のための本発明のLSCの適切な濃度及び用量を容易に決めることができるだろう。好ましい用量が、それを必要とする患者の角膜創傷治療などの治療効果を生じさせるものであることは、当業者には理解されるであろう。もちろん、LSCの適正な用量は、処置される疾患、傷害、障害又は状態の重症度及びタイプ、患者の年齢、体重、性別、健康状態、患者に投与されている他の薬物及び処置などを含むがこれらに限定されないいくつかの変要素に基づいて、使用時に経験的に決定する必要がある。適正な処置を確実なものにするために有意な量のLSCを与える。投与すべき用量数(投薬レジメン)も、例えば処置される疾患、傷害、障害又は状態の重症度又はタイプに基づいて経験

的に決定する必要があることも、当業者には理解されるであろう。一実施形態では、1用量で十分である。他の実施形態には、2、3、4用量以上が企図される。他の実施形態では、本発明の組成物をコンタクトレンズの内面に塗布することがあり、その後、それを眼に配置することによって、眼表面へのLSCの直接送達を可能にする。コンタクトレンズに塗布するために使用されるLSCは、液体、ゲル又は他の適する眼科的に適合性のビヒクルで製剤化されうる。

【0232】

本発明の培地

本発明は、最小必須培地、増殖因子、ホルモン、可溶性因子及び血清又は代用血清を含む、LSC、LSC様、SESC又はSESC様の短期インビトロ培養のためのフィーダーフリー細胞培養培地も提供する。一実施形態では、短期インビトロ培養を使用して、約0～約第4継代のLSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞を継代する。

10

【0233】

本発明のある実施形態では、培地は、DMEM/F12培地、DMEM、ペニシリン-ストレプトマイシン、ウシ胎仔血清、EGF、インスリン、ヒドロコルチゾン、コレラ毒素及び3,3',5-トリヨード-L-チロニンを含み、前記ウシ胎仔血清はヒト血清又は代用血清に代替されてもよく、EGF及びインスリンは、それぞれ、組換えEGF及び/又は組換えインスリン、好ましくは組換えヒトEGF及び組換えヒトインスリンであってもよく、ここでLSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞が増殖してCEC又は皮膚表皮細胞に分化しない限り、前記成分の各々は機能的に等価の成分に置換されてもよい。

20

【0234】

別の実施形態では、培地は、DMEM/F12及びDMEM(1:1)とともに、約10～20%の範囲のウシ胎仔血清又は約10～20%の範囲の前記血清の代用血清、10～20ng/mlの範囲のEGF、5～10 µg/mlの範囲のインスリン、0.2～0.8 µg/mlの範囲のヒドロコルチゾン、 5×10^{-11} ～ 5×10^{-10} Mの範囲のコレラ毒素及び 10^{-9} M～ 4×10^{-9} Mの範囲の3,3',5-トリヨード-L-チロニンを含み、EGF及びインスリンは、それぞれ、組換えEGF及び/又は組換えインスリン、好ましくは組換えヒトEGF及び組換えヒトインスリンであってもよく、ここでLSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞が増殖してCEC又は皮膚表皮細胞に分化しない限り、前記成分の各々は機能的に等価の成分に置換されてもよい。

【0235】

さらにさらなる実施形態では、培地は、DMEM/F12及びDMEM(1:1)とともに、100U/mlペニシリン、100 µg/mlストレプトマイシン、10%ウシ胎仔血清、10ng/ml EGF、5 µg/mlインスリン、0.4 µg/mlヒドロコルチゾン、 10^{-10} Mコレラ毒素及び 2×10^{-9} M 3,3',5-トリヨード-L-チロニンを含み、前記ウシ胎仔血清はヒト血清又は代用血清に代替されてもよく、EGF及びインスリンは、それぞれ、組換えEGF及び/又は組換えインスリン、好ましくは組換えヒトEGF及び組換えヒトインスリンであってもよく、ここでLSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞が増殖してCEC又は皮膚表皮細胞に分化しない限り、前記成分の各々は機能的に等価の成分に置換されてもよい。

30

【0236】

本発明は、最小必須培地、増殖因子、ホルモン、可溶性因子、血清又は代用血清、及びrho関連プロテインキナーゼ(ROCK)阻害剤を含む、LSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞の長期インビトロ培養のためのフィーダーフリー細胞培養培地も提供する。ある実施形態では、長期インビトロ培養を使用して、約17継代以上のLSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞を継代する。

40

【0237】

一実施形態では、培地は、DMEM/F12培地、DMEM、ペニシリン-ストレプトマイシン、ウシ胎仔血清、EGF、インスリン、ヒドロコルチゾン、コレラ毒素及び3,3',5-トリヨード-L-チロニン、及びY-27632を含み、前記ウシ胎仔血清はヒト血清又は代用血清に代替されてもよく、EGF及びインスリンは、それぞれ、組換えEGF及び/又は組換えインスリン、好ましくは組換えヒトEGF及び組換えヒトインスリンであってもよく、Y-27632は別のROCK阻害

50

剤に置換されてもよく、ここでLSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞が増殖してCEC又は皮膚表皮細胞に分化しない限り、前記成分の各々は機能的に等価の成分に置換されてもよい。

【0238】

別の実施形態では、培地は、DMEM/F12及びDMEM(1:1)とともに、約10~20%の範囲のウシ胎仔血清又は約10~20%の範囲の血清の代用血清、約10~20ng/mlの範囲のEGF、約5~10 µg/mlの範囲のインスリン、約0.2~0.8 µg/mlの範囲のヒドロコルチゾン、約 5×10^{-11} ~ 5×10^{-10} Mの範囲のコレラ毒素、約 10^{-9} M~ 4×10^{-9} Mの範囲の3,3',5-トリヨード-L-チロニン及び約1~10 µMの範囲のY-27632を含み、EGF及びインスリンは、それぞれ、組換えEGF及び/又は組換えインスリン、好ましくは組換えヒトEGF及び組換えヒトインスリンであってもよく、Y-27632は別のROCK阻害剤に置換されてもよく、ここでLSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞が増殖してCEC又は皮膚表皮細胞に分化しない限り、前記成分の各々が機能的等価物に置換されてもよい。

10

【0239】

さらに別の実施形態では、培地は、DMEM/F12及びDMEM(1:1)とともに、約100U/mlペニシリン、約100 µg/mlストレプトマイシン、約10%ウシ胎仔血清、約10ng/ml EGF、約5 µg/mlインスリン、約0.4 µg/mlヒドロコルチゾン、約 10^{-10} Mコレラ毒素、約 2×10^{-9} M 3,3',5-トリヨード-L-チロニン及び約1 µM Y-27632を含み、前記ウシ胎仔血清はヒト血清又は代用血清に代替されてもよく、EGF及びインスリンは、それぞれ、組換えEGF及び/又は組換えインスリン、好ましくは組換えヒトEGF及び組換えヒトインスリンであってもよい。Y-27632は別のROCK阻害剤に置換されてもよい。さらに、LSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞が増殖してCEC又は皮膚表皮細胞に分化しない限り、前記成分の各々が機能的等価物に置換されてもよい。

20

【0240】

本発明は、最小必須培地、増殖因子、ホルモン、可溶性因子、血清又は代用血清、rho関連プロテインキナーゼ(ROCK)阻害剤及び白血病抑制因子(LIF)を含む、LSC又はLSC様細胞の長期インビトロ培養のためのフィーダーフリー細胞培養培地をさらに提供する。前記長期インビトロ培養を使用して、約17継代以上のLSC又はLSC様細胞を継代することができる。

【0241】

一実施形態では、培地は、DMEM/F12培地、DMEM、ペニシリン-ストレプトマイシン、ウシ胎仔血清、EGF、インスリン、ヒドロコルチゾン、コレラ毒素及び3,3',5-トリヨード-L-チロニン、Y-27632及びLIFを含み、前記ウシ胎仔血清はヒト血清又は代用血清に代替されてもよく、EGF、インスリン及びLIFは、それぞれ、組換えEGF、組換えインスリン及び/又は組換えLIF、好ましくは組換えヒトEGF、組換えヒトインスリン及び組換えヒトLIFであってもよく、Y-27632は別のROCK阻害剤に置換されてもよく、ここでLSC又はLSC様細胞が増殖してCECに分化しない限り、前記成分の各々は機能的に等価の成分に置換されてもよい。

30

【0242】

別の実施形態では、培地は、DMEM/F12及びDMEM(1:1)とともに、約10~20%の範囲のウシ胎仔血清又は約10~20%の範囲の血清の代用血清、約10~20ng/mlの範囲のEGF、約5~10 µg/mlの範囲のインスリン、約0.2~0.8 µg/mlの範囲のヒドロコルチゾン、約 5×10^{-11} ~ 5×10^{-10} Mの範囲のコレラ毒素、約 10^{-9} M~ 4×10^{-9} Mの範囲の3,3',5-トリヨード-L-チロニン、約1~10 µMの範囲のY-27632及び約5~20ng/ml LIFを含む。さらに、EGF、インスリン及びLIFは、それぞれ、組換えEGF、組換えインスリン及び/又は組換えLIFであってもよい。好ましくは、組換えヒトEGF、組換えヒトインスリン及び組換えヒトLIFを使用する。さらに、Y-27632は別のROCK阻害剤に置換されてもよい。さらになお、LSC、LSC様、SESC又はSESC様細胞が増殖してCECに分化しない限り、前記成分の各々が機能的等価物に置換されてもよい。

40

【0243】

さらに別の実施形態では、培地は、DMEM/F12及びDMEM(1:1)とともに、約100U/mlペニシ

50

リン、100 µg/ml ストレプトマイシン、10% ウシ胎仔血清、10ng/ml EGF、5 µg/ml インスリン、0.4 µg/ml ヒドロコルチゾン、 10^{-10} M コレラ毒素、 2×10^{-9} M 3,3',5-トリヨード-L-チロニン、1 µM Y-27632 及び 10ng/ml LIF を含む。ウシ胎仔血清はヒト血清又は代用血清に代替されてもよく、EGF、インスリン及びLIFは、それぞれ、組換えEGF、組換えインスリン及び/又は組換えLIF、好ましくは組換えヒトEGF、組換えヒトインスリン及び組換えヒトLIFであってもよい。Y-27632の代わりに別のROCK阻害剤を代用してもよい。加えて、他の実施形態では、LSC又はLSC様細胞が増殖してCECに分化しない限り、前記成分の各々が機能的等価物に置換されてもよい。

【0244】

適するROCK阻害剤の例としては、(R)-(+)-トランス-4-(1-アミノエチル)-N-(4-ピリジル)シクロヘキサノカルボキサミド二塩酸塩一水和物(Y-27632、Sigma-Aldrich)、5-(1,4-ジアゼパン-1-イルスルホニル)イソキノリン(ファスジル又はHA1077、Cayman Chemical)、H-1152、H-1152P、(S)-(+)-2-メチル-1-[(4-メチル-5-イソキノリニル)スルホニル]ホモピペラジン二塩酸塩、ジメチルファスジル(diMF、H-1152P)、N-(4-ピリジル)-N'-(2,4,6-トリクロロフェニル)尿素、Y-39983、Wf-536、SNJ-1656、及び(S)-(+)-2-メチル-1-[(4-メチル-5-イソキノリニル)スルホニル]-ヘキサヒドロ-1H-1,4-ジアゼピン二塩酸塩(H-1152、Tocris Bioscience)、イミダゾール含有ベンゾジアゼピン、イミダゾピリジン誘導体、インダゾールコア、2-アミノピリジン/ピリミジンコア、9-デアザグアニン誘導体、ベンズアミド又はアミノフラザンを含む化合物、並びにこれらの誘導体及び類似体、並びにそれらの組合せが挙げられるが、これらに限定されない。

【0245】

本発明の実施に従って、ウシ胎仔血清は、(そのようにして得られる及び/又は拡大される幹細胞の哺乳動物起源に依存して)ヒト血清又は別の代用血清を代替されてもよい。例えば、幹細胞は、ヒト、ラット、イヌ、ネコ、ブタ、ウマ、ウサギ、ウシ、サル又はマウスなどの哺乳動物からのものでありうる。

【0246】

一実施形態では、EGF、インスリン又はLIFは、それぞれ、組換えEGF、組換えインスリン又は組換えLIFである。例えば、EGFは、組換えヒトEGFであってもよい。単に例として、インスリンは、組換えヒトインスリンであってもよい。別の例では、LIFは、組換えヒトLIFであってもよい。

【0247】

ある実施形態では、本発明は、上記の実施形態のいずれかの成分を有するが、グリコーゲンシンターゼキナーゼ3(GSK3)の阻害剤及び/又はトランスフォーミング増殖因子β(TGF-β)を含有しない、本発明の培養培地を提供する。

【0248】

別の実施形態では、本発明は、上記実施形態のいずれかの成分から本質的になる本発明の培養培地を提供する。

【0249】

さらに別の実施形態では、本発明で使用する場合のホルモンは、グルココルチコイド、ヒドロコルチゾン、グルココルチコイド受容体アゴニスト、甲状腺ホルモン、3,3',5-トリヨード-L-チロニン又はT3、甲状腺受容体アゴニスト、及びインスリンを含む。ホルモンは、自然界に見られるホルモンの構造を反映して合成してもよく、又はグルココルチコイド受容体、甲状腺受容体若しくはインスリン受容体などの特定のホルモン受容体の活性を修飾することができるが自然界に見られない合成/人工ホルモンであってもよい。

【0250】

以下の実施例は、本開示の好ましい実施形態を実証するために含めるものである。以下の実施例で開示する技術が、本発明の実施に当たりよく機能することを本発明者らが見出した技術の代表であること、したがって、その実施の好ましい様式を構成すると考えることができることは、当業者には理解されるものとする。しかし、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、開示する特定の実施形態に多くの変更を加え、なお同様の又は類似

の結果を得ることができることは、本開示にかんがみて当業者には理解されるものとする。

【0251】

[実施例]

以下の実施例は、本発明の方法及び組成物の製造及び使用方法の完全な開示及び説明を当業者に与えるために提示するものであり、本発明者らが自らの発明と考える範囲を限定することを意図したものではない。使用する数値(例えば、量、温度など)に関して正確を期すように努めたが、多少の実験的誤差及び偏差を考慮すべきである。別段の指示がない限り、部は重量部であり、分子量は平均分子量であり、温度は摂氏度であり、圧力は大気圧又はほぼ大気圧である。

【0252】

[実施例1]

材料及び方法

ヒト病理サンプル

角膜上皮扁平上皮化生及び他のすべての組織は、非特定化された手術標本として入手し、免疫蛍光研究のために5%ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋し、薄片にし、染色した。

【0253】

輪部幹細胞及び皮膚表皮幹細胞の単離及び培養

死後ヒト眼球をアイバンクから入手し、輪部領域を採取し、100IUペニシリン及び100 µg/mlストレプトマイシンを含有する冷PBSで洗浄し、小片に切断した。37°Cで2時間の0.2%コラゲナーゼIV消化によって細胞クラスターを得、37°Cで15分間の0.25%トリプシン-EDTAでのさらなる消化によって単一細胞を得た。2%増殖因子低減Matrigel(354230、BD Biosciences, Inc.)で被覆されたプラスチックプレートに初代細胞を播種した。GFP標識ラット及びウサギからの輪部幹細胞を単離し、ヒトLSCについての方法と同じ方法を使用して培養した。

【0254】

眼瞼のドナー皮膚検体材料からヒト表皮を採取し、顕微鏡下で毛包を除去した。ヒト輪部幹細胞について説明したのと同じ方法を使用して、初代ヒト及びウサギ表皮幹細胞を毛包間表皮から単離した。培養培地は次の通り:1/100Pen-Strep、10%ウシ胎仔血清、10ng/ml EGF、5 µg/mlインスリン、0.4 µg/mlヒドロコルチゾン、 10^{-10} Mコレラ毒素及び 2×10^{-9} M 3,3',5'-トリヨード-L-チロニンを含有する、DMEM/F12及びDMEM(1:1)。

【0255】

この実施例1で使用したすべての細胞は、本発明者らの研究室で作った初代培養細胞からのものである。マイコプラズマ汚染試験をルーチンで行い、陰性であった。

【0256】

インビトロ3次元(3D)分化プロトコル

3D分化を24ウェルプレート又は8ウェルチャンバーで行った。簡単に言うと、解離させた単個幹細胞をMatrigel(登録商標)に 2×10^4 細胞/50 µlゲルで包埋した。分化培地CnT-30(輪部幹細胞分化)又はCnT-02(皮膚表皮幹細胞分化)(CellnTec, Inc.)で14~18日培養後、3D構造が形成された。

【0257】

免疫蛍光及びレーザー共焦点顕微鏡観察

培養細胞中のタンパク質の局在を検出するために、細胞を4%パラホルムアルデヒドで20分間固定し、次いで0.3%Trion X-100-PBSで5分間、2回、透過処理し、5%ウシ血清アルブミン及び0.3%Triton X-100を含有するPBSでブロックし、その後、一次抗体中、4°Cで一晩インキュベートした。PBSでの3回の洗浄後、細胞を二次抗体とともにインキュベートした。細胞核をDAPIで対比染色した。パラフィン包埋組織切片の免疫蛍光のために、脱パラフィンを行い、その後、上で説明したのと同じ免疫蛍光プロトコルを行った。

【0258】

10

20

30

40

50

次の抗体を使用した:マウス抗P63モノクローナル抗体、ウサギ抗K5モノクローナル抗体、マウス抗K10モノクローナル抗体、ビオチン標識されたマウス抗K14モノクローナル抗体、マウス抗K19モノクローナル抗体、(MA1-21871、RM2106S0、MS611P0、MS115B0、MS1902P0、Thermo Fisher Scientific, Inc.)、ウサギ抗PAX6ポリクローナル抗体(PRB-278P、Covance, Inc.)、マウス抗K1モノクローナル抗体(sc-376224、Santa Cruz, Inc.)、ウサギ抗WNT7Aポリクローナル抗体、マウス抗K3/12モノクローナル抗体、ウサギ抗K12モノクローナル抗体(ab100792、ab68260、ab124975、Abcam, Inc.)、マウス抗Ki67モノクローナル抗体(550609、BD Sciences, Inc)、抗GFPウサギモノクローナル抗体及び抗GFPマウスモノクローナル抗体(G10362、A11120、Invitrogen, Inc)。二次抗体、Alexa Fluor 488又は568結合抗マウス又はウサギ免疫グロブリンG(IgG)(Invitrogen, Inc.)を1:500希釈で使用した。Olympus FV1000共焦点顕微鏡を使用して画像を得た。

10

【0259】

リアルタイムPCR(Q-PCR)

RNeasyキット(Qiagen, Inc.)を使用してRNAを単離し、オンカラムDNアーゼ消化に付した。Superscript III逆転写酵素キットをその製造業者(Invitrogen, Inc.)の説示に従って使用してcDNA合成を行った。7500リアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems, Inc.)で遺伝子特異的プライマー(表1)及びPower SYBR Green PCR Master Mixを使用して40サイクル増幅によって定量的PCRを行った。測定を3回ずつ行い、内因性GAPDHレベルに正規化した。 $\Delta\Delta CT$ 法(CT 値 <30)を使用して発現の相対倍数変化を計算した。データを3回反復に基づいて平均 $\pm$ SDとして示す。

20

【0260】

【表 1】

表 1.プライマー配列

遺伝子(ヒト)	フォワードプライマー	リバースプライマー
<i>CASZ1</i>	GTTCTACGGACAGAAGACCACG	TCTTGAAGCCGTCCTTGGCGTA
<i>FGFR3</i>	AGTGGAGCCTGGTCATGGAA	GGATGCTGCCAAACTTGTCTC
<i>FZD5</i>	TGGAACGCTTCCGCTATCCTGA	GGTCTCGTAGTGGATGTGGTTG
<i>GAPDH</i>	GAGTCAACGGATTGGTCTGT	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG
<i>ID2</i>	TTGTCAGCCTGCATCACCAGAG	AGCCACACAGTGTCTTGTCTGTC
<i>K1</i>	CAGCATATTGCTGAGGTCAAGG	CATGTCTGCCAGCAGTGATCTG
<i>K3</i>	ACGTGACTACCAGGAGCTGATG	ATGCTGACAGCACTCGGACACT
<i>K5</i>	GCTGCCTACATGAACAAGGTGG	ATGGAGAGGACCAGTGGGTGT
<i>K10</i>	CCTGCTTCAGATCGACAATGCC	ATCTCCAGGTGAGCCTTGGTCA
<i>K12</i>	AGCAGAATCGGAAGGACGCTGA	ACCTCGCTCTTGTCTGGACTGAA
<i>K14</i>	TGCCGAGGAATGGTTCTTACC	GCAGCTCAATCTCCAGGTTCTG
<i>K15</i>	AGGACTGACCTGGAGATGCAGA	TGCGTCCATCTCCACATTGACC
<i>K19</i>	AGCTAGAGGTGAAGATCCGCGA	GCAGGACAATCCTGGAGTTCTC
<i>MEIS1</i>	AAGCAGTTGGCACAAGACACGG	CTGCTCGGTTGGACTGGTCTAT
<i>MMP9</i>	GCCACTACTGTGCCTTTGAGTC	CCCTCAGAGAATCGCCAGTACT
<i>MMP10</i>	TCCAGGCTGTATGAAGGAGAGG	GGTAGGCATGAGCCAAACTGTG
<i>NR2F2</i>	TGCACGTTGACTCAGCCGAGTA	AAGCACACTGAGACTTTTCTGTC
<i>NOTCH1</i>	GGTGAACCTGCTCTGAGGAGATC	GGATTGCAGTCGTCCACGTTGA
<i>NOTCH3</i>	TACTGGTAGCCACTGTGAGCAG	CAGTTATCACCATTGTAGCCAGG
<i>ODZ3</i>	GGACAAGGCTATCACAGTGGAC	TTCTGAGGGAGCCGTCATAACC
<i>PAX6</i>	TGTCCAACGGATGTGTGAGT	TTTCCCAAGCAAAGATGGAC
<i>PDGFA</i>	CAGCGACTCCTGGAGATAGACT	CGATGCTTCTCTTCTCCGAATG
<i>PPARG</i>	AGCCTGCGAAAGCCTTTTGGTG	GGCTTCACATTACAGCAAACCTGG
<i>PRDM8</i>	CTGTGTCCTGAGCCATATTCC	CCTTCTGAGGAACCATTTGCTGC
<i>TGFB1</i>	AGGACTGACGGAGACCCTCAAC	TCCGCTAACCAGGATTTCATCAC
<i>WNT7A</i>	TGCCCCGACTCTCATGAAC	GTGTGGTCCAGCACGTCITG
遺伝子(ウサギ)	フォワードプライマー	リバースプライマー
<i>GAPDH</i>	GCGAGATCCCGCCAAACATCAAGT	AGGATGCGTTGCTGACAATC
<i>PAX6</i>	GTATTCTTGCTTCAGGTAGAT	GAGGCTCAAATGCGACTTCAGCT
PAX6 形質導入に使用したプライマー		
<i>PAX6 InF</i>	TTCCCGAATTCTGCAGACCCATGCAGATGCAAAAGTCCAAGTGTGGACAATCAAAA CGTGTCACACGGATGTG	
<i>PAX6 InR</i>	CACATCCGTTGGACACGTTTGTATTGTCCAGCACTTGGACTTTTGCATCTGCATGGG TCTGCAGAATTCCGGAA	

【0261】

ゲノムワイド遺伝子発現マイクロアレイ及びデータ解析

3D分化アッセイから、全RNAをLSC、SESC及び分化CECから単離した。Illuminaヒトゲノムマイクロアレイシステムを使用して、サンプルごとに生物学的反復実験で(群あたりn=2、Human HT-12 v4 Expression BeadChip、Illumina、San Diego、CA)、遺伝子発現マイクロアレイ解析を行った。生データを寄託番号GSE32145でGEOデータベースに寄託した。Illumina BeadStudioバージョン3.4.0によって発現レベルデータを生成し、四分位数正規化を使用して正規化した。少なくとも1つのサンプルで発現レベルが64の閾値を超えるプローブが検出されると考えた。閾値は、log2発現レベルの分布プロットから調査によって見つけた。検出されたプローブを、プローブが有意とみなされる最小偽陽性率(FDR)であるそれらのp値に従って選別した。マイクロアレイの有意性分析及び公式統計パッケージsam¹⁹でのその実装を用いてFDRを評価した。偽小分散に起因する偽陽性コールを回避するために、正規化t統計量において交換可能性因子s0に使用する標準偏差値の百分位数を50に設定した。本発明者らは、LESC及びCECサンプルを組み合わせて4サンプルの1群にし、この群とSESCサンプル間で差次的に発現される遺伝子を探した。この比較における上位100有意遺伝子を図4に提示する。この図中のすべての遺伝子は、0.01以下のFDRレベルで有意である。研究所内階層的クラスタリングソフトウェアを使用してヒートマップを生成した

。色は倍数変化に定性的に対応する。

【0262】

RNA-seq及び階層的クラスター解析

全RNAをPicopure RNA単離キット(Life Technology)によって精製した。RNA-seqは、以前に記載された²⁰ように行った。簡単に言うと、600ngの全RNAを、superscript IIIファーストストランド合成キットとプライマー-Biotin-B-Tによって、先ずcDNAに変換した。そのcDNAをNucleoSpin Gel and PCR Clean-Up Kitカラム(Clontech)によって精製して、遊離プライマー及び酵素を除去した。次いで、末端トランスフェラーゼ(NEB)を利用してcDNA 3'末端の端部をブロックした。ストレプトアビジン被覆磁気ビーズ(Life Technology)をさらに利用してcDNAを単離した。水酸化ナトリウムによるRNA消化後、第二鎖cDNAをプライマー-A-N8でのランダムプライミングによって合成した。その第二鎖cDNAを熱変性によってビーズから溶離した。次いで、そのcDNAをテンプレートとして使用して、バーコードプライマー及びプライマー-PBでの増幅によりライブラリーを構築した。シーケンシングは、HiSeq2000システムで行った。

10

【0263】

階層的クラスター解析は、クラスター及びJava TreeView²¹で行った。Clusterプログラムによって提供されたデフォルトパラメータを使用して生データを先ずフィルタリングし、フィルタリングされたデータをlog変換によって調整し、中央値を用いて遺伝子及びアレイと中心に揃え、その後、遺伝子とアレイの両方をユークリッド及び平均連結で階層的にクラスタリングした。階層樹及び遺伝子マトリックスをJava Treeviewによって可視化及び生成した。

20

【0264】

レンチウイルスRNAi及びPAX6形質導入

PAX6、WNT7A及びFZD5遺伝子を標的にするレンチウイルスshRNAをAge IとEcoR I間のpLK0.1プラスミドにクローニングした、又はSigmaから直接購入した。遺伝子特異的ノックダウンのためのshRNA標的化配列は次の通りであった:PAX6、CGTCCATCTTTGCTTGGGAAA及びAGTTTGAGAGAACCCATTATC;WNT7A、CGTGCTCAAGGACAAGTACAA及びGCGTTCACCTACGCCATCATT;FZD5、CGCAGCCCTTCGTGCCCATT及びTCCTAAGGTTGGCGTTGTAAT。本発明者らは、いずれの種からのいずれの既知遺伝子も標的にしないshRNAをコードするレンチウイルスpLK0.1-puro Non-Target shRNA対照プラスミド(Sigma, Inc.)を、すべての遺伝子ノックダウン実験において陰性対照として使用した。

30

【0265】

レンチウイルスshRNA粒子を以前に記載されたプロトコル²²に従って調製した。簡単に言うと、複製能力のないレンチウイルス粒子を、shRNA構築物とパッケージングミックス(比率9:1でpCMV-dR8.2及びpCMV-VSVG)の共トランスフェクションによって、293T細胞にパッケージングした。ウイルスを2回、トランスフェクションの48時間及び72時間後に回収した。

【0266】

形質導入のために、PAX6a ORFをThermo Scientificから購入したcDNA(MHS6278-202756612)からPCR増幅させ、pLenti CMV-GFP PuroベクターのBamH1とBsrG1の間に挿入した。PAX6bは、プライマーPAX6 InF及びPAX6 InR(表1)でのPCR媒介点突然変異戦略によって産生させた。GFP標識には、Addgeneから購入したpLenti CMV-GFP Hygro(656-4)を使用した。レンチウイルス粒子をパッケージングプラスミドpsPax2及びpMD2.Gと共トランスフェクションによってパッケージングした。

40

【0267】

レンチウイルス感染については、個々のウイルス及びポリブレンを8 µg/mlの最終濃度で含有する新鮮培地で細胞を16~20時間感染させた。感染細胞を2 µg/mlピューロマイシンによって48時間、又は200 µg/mlハイグロマイシンによって72時間、さらに選択した。

【0268】

ウェスタンブロット及び共免疫沈降(Co-IP)

50

ウェスタンブロッティングのために、細胞をPBSで1回洗浄し、その後、細胞溶解緩衝液(50mM Tris-HCl、pH6.8;2%SDS;10%グリセロール;100mM DTT)に回収した。タンパク質濃度をNanodropによって定量し、ブロモフェノールブルーを0.1%の最終濃度まで添加し、次いで25 µgの全溶解物を4-12%NUPAGEゲル(Life Technology, Inc)で分画した。タンパク質を100Vで1時間、ニトロセルロース膜に転写した。その膜を5%ミルクでブロックし、関連抗体及びマウス抗β-アクチンモノクローナル抗体(A5316、Sigma, Inc.)でプローブした。

【0269】

FZD5とWNT7Aの相互作用を検出するために、90%の集密度の輪部幹細胞の10cm皿を回収し、細胞ペレットを700 µlのCo-IP緩衝液(10mM Tris-HCl、pH7.4、100mM NaCl、2.5mM MgCl₂、0.5%NP-40、1Xプロテイナーゼ阻害剤)に再浮遊させ、氷上で20分間インキュベートし、その後、4℃で20分間、13,000rpmで遠心分離した。600 µlの上清を2本の予冷したエッペンドルフチューブに分取し、5 µgのウサギ抗FZD5モノクローナル抗体(#5266、Cell signaling, Inc.)又はWNT7A抗体を各チューブに添加し、4℃で一晩インキュベートした。50 µlのプロテインA/G磁気ビーズ(Thermo Fisher, Inc.)を各チューブに添加し、4℃で2時間インキュベートし、Co-IP緩衝液で洗浄し、70℃の1X SDSサンプル緩衝液緩衝液(Life Technology, Inc.)で溶離した。投入物及び溶離物を4-12%NUPAGEゲルで分画し、FZD5及びWNT7A抗体でプロットした。

【0270】

細胞移植

すべての動物研究は、眼科及び視覚研究における動物使用についてのARVO声明(ARVO statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research)を完全に順守して行い、施設内実験動物管理委員会の承認を得た。

【0271】

ニュージーランド白ウサギ(2.0kg~2.5kg、雄)を研究に使用した。ウサギをキシラジン塩酸塩(2.5mg/mL)及びケタミン塩酸塩(37.5mg/mL)の筋肉内注射で麻酔した。輪部幹細胞欠損モデル(図11f)を作るために、角膜及び輪部上皮を360度結膜角膜周囲切開及び表層切開によって除去して、角膜の中心に向かって輪部から2mm後の前強膜及び角膜実質組織を除去した。この切開によって、LSC及び全角膜内皮を確実に除去した。5×10⁵ウサギGFP標識LSC、PAX6+ SESC又はshPAX6 LSC細胞をフィブリン(25mg/ml)及びトロンビン(25U/ml)と混合し、レシピエント角膜及び輪部領域の露出した実質層に播種し、その後、ヒト羊膜(Bio-tissue, Inc. USA)によってその表面を覆った。そのヒト羊膜をVICRYL縫合糸(ETHICON, USA)で固定する(表2)。

【0272】

【表2】

表2.ウサギ移植結果の要約

GFP 標識ドナー細胞	再生及び再上皮化	ウサギ数	
		混濁した血管新生を 起こした角膜表面	全身性感染症又は無関係の合併症による死亡
LSC	3	0	0
PAX6+ SESC	5	0	2
shPAX6 LSC	0	4	1

【0273】

陰性対照として、羊膜のみを露出した角膜に適用した。抗生物質(レボフロキサシン)及びステロイド(ベタメタゾン)を細胞移植手技直後に両眼に適用し、2週間、1日3回投与した。動物を各実験群に無作為に割り当てた。細胞移植を行った研究者には使用した細胞の素性を知らせなかった。ウサギの角膜上皮修復効果の評価には別の研究者を用い、移植に使用した細胞の素性をその研究者に知らせなかった。分析については、本発明者らは、感染症などの術後合併症から死亡した動物のみを除外した。これらの動物は、細胞移植効果

の評価のエンドポイントに達しなかったからであった。この基準は、先定されたものである。

【0274】

結果及び考察

角膜及び皮膚上皮は、重層上皮の典型的な形態、並びに輪部及び表皮の基底細胞層のケラチン5/ケラチン14+(K5/K14)におけるp63によるそれらの幹細胞の維持を含む、多くの類似点を共有する^{4~8}(図1a、1b、2a及び2b)。しかし、それらには顕著な違いがある。皮膚上皮幹細胞(SESC)は、分化中に深部から基底上層へと上方に垂直に移動し^{9、10}、そこでK5及びK14は皮膚特異的K1/K10によって置き換えられる(参考文献11、図2c及び2d)。対照的に、LSC(輪部でK19によって規定される¹²、図1a及び2eを参照されたい)は、分化を受けている間に中心角膜の方に求心的に数ミリメートル遊走し、K5/K14は角膜特異的K3及びK12によって置き換えられる(参考文献13及び4、図1c及び2f)。

10

【0275】

CECによって維持される澄んだ透明な角膜は、視力に不可欠である。ケラチン発現の形態変化及び切り替え(例えば、角膜特異的K3/K12の皮膚特異的K1/K10とともに基底層のK5陽性細胞による置換、図1dを参照されたい)によって示されるような、CECの皮膚様上皮細胞への病的転換は、角膜の透明度の喪失をもたらし、世界中の何百万人もの人々を半盲目又は全盲で苦しめる原因となる³が、根底にある機序は、大部分が依然として不明である。

【0276】

20

可能性のある疾患機序を解明するために、本発明者らは、ヒトドナーからのLSCを拡大させるフィーダーフリー細胞培養プロトコルの開発に成功し、その結果、本発明者らは、均一な細胞集団を産生させて、LSC細胞運命決定及びCEC分化の制御に関与する重要な因子を正確に説明することができるようになった。LSCの増殖は、陽性p63及びK19と高い割合の有糸分裂マーカーKi67を特徴とした(図2a及び3a)。次に、本発明者らは、3次元(3D)LSC分化プロトコルを確立して、CEC特異的マーカーK3/K12の強い発現(図3b)によって証明されるように単個LSCから14~18日以内に3D CECスフェア構造を確立した。この3D分化スフェアは、LSCとCEC間の遺伝子発現の重要な差を特徴とし、後者(CEC)は、K3の発現増加(↑31.2倍)及びK12の発現増加(↑24.7倍)と同時にK19の発現減少(↓6.2倍、すべて $p<0.01$ 、図2hを参照されたい)を示した。本発明者らは、同様の戦略を使ってSESCを拡大させ、典型的なSESCマーカーP63及びK5の強い発現を培養SESCにおいて観察した(図3c)。予想通り、本発明者らは、3D分化皮膚上皮細胞(SEC)においてSESCと比較して表皮分化マーカーK1の発現増加(↑16.6倍)及びK10の発現増加(↑225.8倍)を検出した(図2i、2j及び3d)。

30

【0277】

LSC、CEC及びSESCにおいて独特に発現されるさらなる遺伝子を同定するために、本発明者らはゲノムワイド遺伝子発現解析を行った(図3e、4a及び4b)。差次的に発現された遺伝子の中で、本発明者らはシグナル伝達分子及び転写因子に焦点を当てた。細胞運命決定及び分化におけるそれらの中心的役割のためである。本発明者らは、SESCと比較してLSC及びCECにおいて高度に発現されるWNT7A及びPAX6を確認した(PAX6、LSCでは↑8.8倍及びCECでは↑12.3倍、 $p<0.001$; WNT7A、LSCでは↑4.5倍、CECでは↑6.0倍、 $p<0.001$)(図3e及び4c)。本発明者らは、WNT7A発現が、インビトロLSC及びCEC培養物において並びに乳児~成人の角膜及び輪部のインビボ上皮層においてPAX6の発現パターンを正確に反映することを観察したが、これら両方の遺伝子は皮膚表皮では検出できなかった(図3f及び4d)。

40

【0278】

LSC及びCECにおけるWNT7A及びPAX6発現の臨床的関連性を判定するために、本発明者らは、いくつかのタイプのヒト角膜疾患、角膜上皮扁平上皮化生、炎症性角膜症、外傷及びアルカリ熱傷を調査した。本発明者らは、基底層でのp63及びK5の局在発現(図5a及び6)、並びに基底上層におけるK10の発現(図1d及び6)を観察した。WNT7A/PAX6及びK3/12発現は、化生領域内での非存在が目立つが、周囲角膜上皮では陽性であることにも本発明者らは気づいた(図5a及び6)。これらの結果は、角膜上皮細胞がこれらの疾患状態を有する患者

50

組織において皮膚様上皮細胞に切り替えられたことを示唆している。

【0279】

Wnt分子は、細胞運命決定及び組織特異性の制御に重要な役割を果たす分泌型シグナル伝達タンパク質である¹⁵。PAX6もまた眼発生及び疾患の周知制御遺伝子である¹⁶。しかし、PAX6の喪失が眼表面疾患時の異常な皮膚表皮分化の原因又は結果であるかどうかは、依然として不明である。

【0280】

WNT7A及びPAX6がLSC及びCEC細胞運命決定及び分化に必要であることを実証するために、本発明者らは、レンチウイルスshRNAを使用してLSC中のそれらを特異的にノックダウンした。WNT7A又はPAX6のいずれかがノックダウンされたLSCは増殖及び形態学的特徴を変化させなかった(図7a)が、これらの処置は、3D分化条件下で角膜K3/K12の発現を有意に減少させ(WNT7Aノックダウン:K3では↓24.7倍、K12では↓22.6倍;PAX6ノックダウン:K3では↓20.8倍、K12では↓21.4倍、すべて $P<0.05$)、そして同時に皮膚特異的K1/K10の発現がより顕著になった(WNT7Aノックダウン:K1では↑3.9倍及びK10では↑5.7倍;PAX6ノックダウン:K1では↑3.1倍及びK10では↑6.1倍、すべて $P<0.05$)。これは、皮膚様分化のほうが多いことを示している(図5b及び5c)。さらに、WNT7Aのノックダウンは、LSCにおけるPAX6発現を低減させた(↓1.8倍、 $p<0.001$)。この抑制効果は、分化したCECでのほうがよりいっそう強かった(↓8.0倍、 $p<0.01$)。対照的に、LSCにおいても、CECにおいても、PAX6をノックダウンしたときにWNT7A発現に有意な差はなかった(図5c、7b及び7c)。これらの結果は、WNT7AがCEC分化中にPAX6の上流で作用することを示唆している。

【0281】

角膜運命決定及び分化におけるWntシグナル伝達経路の役割をさらに研究するために、本発明者らは、相互作用し、WNT7Aシグナルを伝達することが共免疫沈降に基づいて証明されている¹⁷、Frizzled受容体(FZD)の機能的要件を調査した。本発明者らは、WNT7AがLSC細胞においてFZD5と強く相互作用し(図7d及び7e)、予測通り、LSCにおけるFZD5のノックダウンがPAX6発現低減をもたらすこと(LSCでは↓1.7倍及び分化したCECでは↓3.0倍($p<0.001$))を見出した(図7f)。総合して、これらのデータは、WNT7A又はPAX6の喪失が角膜上皮細胞の皮膚様表皮細胞への切り替えをもたらすこと、及びWNT7A/FZD5が角膜分化におけるPAX6発現の上流レギュレーターとして作用することを実証した。

【0282】

眼発生におけるPAX6の中心的役割¹⁶を考慮して、本発明者らは、次に、PAX6の操作された発現がSESCをLSC様細胞に転換できる可能性を試験した(図8a)。実際、本発明者らは、核内でのP63とPAX6両方の発現と同時に起こる表面での誘導K19発現によって証明されるように、SESCをLSC様細胞に転換するのにSESCにおけるPAX6a又はPAX6bいずれかの発現で十分であることを見出した(図9a)。3D培養下に置いたとき、PAX6形質導入SESCは、角膜K3/K12発現の劇的増加(↑9.4倍及び↑72.7倍、すべて $p<0.05$)と同時に皮膚K1/K10発現の減少(↓20.8倍及び↓20.0倍、すべて $p<0.01$)を示した(図8b、8c、9b及び9c)。細胞運命転換成功の包括的証拠を得るために、本発明者らは、PAX6ノックダウン後のCEC、SEC及びLSCを用いて、並びに3D分化時にPAX6が形質導入されたSESCを用いて、RAN-seqによる遺伝子発現プロファイリング¹⁸を行った。本発明者らは、各生体サンプルから3~7百万リードを生成し、それらを独自にRefseqデータベースにマッピングした(図10a)。ペアワイズ比較は、同じサンプル群内ではデータに非常に再現性がある(図10b)が、対照的に、異なる運命を有する細胞間で比較すると、 $FDR<0.001$ の統計的カットオフに基づいてデータが顕著な差を示すことを実証した(図10c)。本発明者らは、誘導遺伝子(赤色)と抑制遺伝子(緑色)の両方が、CECとPAX6+ SESC間、並びにshPAX6処置LSCとshPAX6処置SEC間で明確に共分離されたことを示す、様々な細胞タイプの>10,000遺伝子の発現を記録した全データセットを表示した(図9d)。したがって、これらのデータによって、SESCからCECへの細胞運命転換におけるWNT7A/PAX6軸の役割の包括的証拠を得た。総合して、これらのデータは、WNT7A/PAX6軸の欠損が、ヒトの角膜疾患の際の角膜細胞の皮膚表皮様細胞への化生転換(図9eに図示)の原因となる可能性が高いことを示唆しているが、角膜上皮分化におけるWNT7及びP

AX6軸の有意性を決定するためにさらなる研究を行う必要がある。

【0283】

最後に、本発明者らは、ヒトによく見られる角膜疾患状態を模倣するウサギLSC欠損モデル(図11f)を用いて、PAX6発現を操作したSESC(図11a、11b及び11c)を角膜上皮欠損の処置及び修復に使用できる可能性を試験した。本発明者らは、PAX6を形質導入したウサギSESCが、上皮細胞の連続シートを形成して角膜特異的K3/12が陽性染色され(図14a)、全角膜表面の上皮欠損をうまく修復して、正常な角膜透明性及び透明度を回復させ、3カ月にわたって維持する(図14b～14g及び12)ことを証明した。GFP標識PAX6+ SESCを使用することによって角膜上皮表面修復の時間経過を追跡することにより、本発明者らは、これらのPAX6再プログラムSESCが、最初は輪部領域のみに局在し、その後、次第に中心角膜の方へ移動し、対応する領域の角膜透明性が回復されることを観察した(図13a)。重要なこととして、これらのグラフトされた細胞は、輪部領域からのPAX6+ SESCの培養及び再単離によって証明されるように、実際に輪部に再定着することができた(図13b)。顕著なこととして、これらの再プログラムSESCは、反復角膜上皮擦過後に大きい角膜上皮欠損を修復することができた(13c)。際だって対照的に、露出した角膜表面へのPAX6がノックダウンされたウサギLSC(図11a、11d及び11e)の移植は、混濁した血管新生を起こしたK10陽性皮膚様上皮をもたらした(図14f)。総合して、これらのデータは、PAX6発現を有するSESCが、角膜様上皮に分化転換でき、角膜上皮欠損を修復できることを実証する。

【0284】

要約すると、この研究は、フィーダーフリー条件下でのLSC拡大の実行可能性及びその治療的可能性を確証し、角膜系統特定におけるWNT7A及びPAX6の重要な役割を実証する。重要なこととして、PAX6発現によって角膜運命に転換されたSESC又は他の細胞は、特に完全LSC欠損を有する患者において、潜在的な角膜表面修復及び再生源として役立ちうる。これは、患者自身のLSCを移植に使用する上での主な実行可能性問題を打開し、したがって、ヒトによく見られる多くの角膜疾患を処置するための可能性のある治療戦略を提示することになる。

参考文献

10

20

- 1 Davanger, M. & Evensen, A. Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* **229**, 560-561 (1971).
- 2 Cotsarelis, G., Cheng, S. Z., Dong, G., Sun, T. T. & Lavker, R. M. Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell* **57**, 201-209 (1989).
- 3 Li, W. *et al.* Down-regulation of Pax6 is associated with abnormal differentiation of corneal epithelial cells in severe ocular surface diseases. *The Journal of pathology* **214**, 114-122, doi:10.1002/path.2256 (2008). 10
- 4 Pellegrini, G. *et al.* p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 3156-3161, doi:10.1073/pnas.061032098 (2001).
- 5 Mills, A. A. *et al.* p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* **398**, 708-713, doi:10.1038/19531 (1999).
- 6 Yang, A. *et al.* p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* **398**, 714-718, doi:10.1038/19539 (1999).
- 7 Koster, M. I., Kim, S., Mills, A. A., DeMayo, F. J. & Roop, D. R. p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes & development* **18**, 126-131, doi:10.1101/gad.1165104 (2004). 20
- 8 Rama, P. *et al.* Limbal stem-cell therapy and long-term corneal regeneration. *The New England journal of medicine* **363**, 147-155, doi:10.1056/NEJMoa0905955 (2010).
- 9 Blanpain, C. & Fuchs, E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nature reviews. Molecular cell biology* **10**, 207-217, doi:10.1038/nrm2636 (2009).
- 10 Arwert, E. N., Hoste, E. & Watt, F. M. Epithelial stem cells, wound healing and cancer. *Nature reviews. Cancer* **12**, 170-180, doi:10.1038/nrc3217 (2012).
- 11 Kopan, R. & Fuchs, E. A new look into an old problem: keratins as tools to investigate determination, morphogenesis, and differentiation in skin. *Genes & development* **3**, 1-15 (1989). 30
- 12 Lauweryns, B., van den Oord, J. J. & Missotten, L. The transitional zone between limbus and peripheral cornea. An immunohistochemical study. *Investigative ophthalmology & visual science* **34**, 1991-1999 (1993).
- 13 Eichner, R., Bonitz, P. & Sun, T. T. Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point, and mode of expression. *The Journal of cell biology* **98**, 1388-1396 (1984).
- 14 Schlotzer-Schrehardt, U. & Kruse, F. E. Identification and characterization of limbal stem cells. *Experimental eye research* **81**, 247-264, doi:10.1016/j.exer.2005.02.016 (2005). 40
- 15 Dorsky, R. I., Moon, R. T. & Raible, D. W. Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway. *Nature* **396**, 370-373, doi:10.1038/24620 (1998).

- 16 Eiraku, M. et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 472, 51-56, doi:10.1038/nature09941 (2011).
- 17 von Maltzahn, J., Bentzinger, C. F. & Rudnicki, M. A. Wnt7a-Fzd7 signalling directly activates the Akt/mTOR anabolic growth pathway in skeletal muscle. *Nature cell biology* 14, 186-191, doi:10.1038/ncb2404 (2012).
- 18 Yu, F-X, Zhao, B., Panupinthu, N., Jewell, J.L., Lian, I., Wang, L.H., Zhao, J., Yuan, H., Tumaneng, K., Li, H., Fu, X-D, Mills, G.B., Guan, K-L (2012). Regulation of the Hippo-YAP pathway by G-protein-coupled receptor signaling. *Cell*, 150:780--791. 10
- 19 Tusher, V. G., Tibshirani, R. & Chu, G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5116-5121, doi:10.1073/pnas.091062498 (2001).
- 20 Fox-Walsh, K., Davis-Turak, J., Zhou, Y., Li, H. & Fu, X. D. A multiplex RNA-seq strategy to profile poly(A+) RNA: application to analysis of transcription response and 3' end formation. *Genomics* 98, 266-271, doi:S0888-7543(11)00083-8 [pii]10.1016/j.ygeno.2011.04.003.
- 21 Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O. & Botstein, D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863-14868 (1998). 20
- 22 Xue, Y. et al. Direct conversion of fibroblasts to neurons by reprogramming PTB-regulated microRNA circuits. *Cell* 152, 82-96, doi:S0092-8674(12)01433-X [pii] 10.1016/j.cell.2012.11.045.

【 0 2 8 5 】

[実施例2]

材料及び方法

動物

ROSA^{mT/mG} マウスは以前に記載されており (PMID:17868096;28)、それをホモ接合体マウスとして飼育した。Pax6 P0エンハンサーの制御下でEGFP-Creリコンビナーゼ融合タンパク質を発現するP0-3.9-GFPCreマウスをFVBバックグラウンドで飼育し、記載されている(29)のようにPCR遺伝子型判定を行った。

【 0 2 8 6 】

系統追跡

ホモ接合体GFPレポーターマウス (ROSA^{mT/mG}) と、Cre発現がマウスPax6外胚葉エンハンサーの制御下にある水晶体特異的Creトランスジェニックマウス (P0-3.9-GFPCre) とを交配させることによって、系統追跡実験を行った。生後第1日 (P1) 及びP60に眼を開き、4%ホルムアルデヒドで一晩固定した。その後、組織を10%スクロース中でインキュベートし、凍結切片作成のために最適切断温度培地に包埋した。凍結切片をPBSで洗浄し、Zeiss Axio Imager 蛍光顕微鏡で撮像した。 40

【 0 2 8 7 】

ヒトLSC及び皮膚表皮幹細胞 (SESC) の単離及び培養

死後ヒト眼球は、アイバンクから入手し、ヒト表皮は、眼瞼のドナー皮膚生検から得た。輪部領域を切除し、100IU/mlペニシリン及び100 µg/mlストレプトマイシンを含有する冷PBSで洗浄した。輪部領域を小片に切断した後、37℃で2時間の0.2%コラゲナーゼIV消化によって細胞クラスターを得た。この後、37℃で15分間、0.25%トリプシン/EDTAでさらに消化して単一細胞を得た。2%増殖因子低減Matrigel (登録商標) (354230, BD Biosciences, Inc.) で被覆されたプラスチックプレートに初代細胞を播種した。同じ処置を使用して毛 50

包間表皮から初代ヒトSESCを単離した。

【0288】

輪部幹細胞(LSC)と皮膚表皮幹細胞(SESC)両方のための培養培地は、DMEM/栄養素混合物F-12及びDMEM(1:1)とともに100IU/mlペニシリン、100 µg/mlストレプトマイシン、10%ウシ胎仔血清、10ng/ml上皮増殖因子(EGF)、5 µg/mlインスリン、0.4 µg/mlヒドロコルチゾン、 10^{-10} Mコレラ毒素及び 2×10^{-9} M 3,3',5'-トリヨード-L-チロニンを含む。LSCを分化させるために、細胞をCnT-30(Cellntec, Inc.)で8~12日間培養した。

【0289】

リアルタイム定量的PCR(qPCR)

RNeasyキット(Qiagen, Inc.)を使用してRNAを単離した。オンカラムDNアーゼ消化を行った。Superscript III逆転写酵素キット(Invitrogen, Inc.)をその製造業者の説示に従ってcDNA合成に使用した。リアルタイムPCRシステム(Applied Biosystems, Inc.)を使用して定量的PCRを行った。遺伝子特異的プライマー(表3)及びPower SYBR Green PCR Master Mixを使用して40サイクルの増幅を行った。測定を3回ずつ行い、内因性GAPDHレベルに正規化した。 $\Delta \Delta C_T$ 法(C_T 値<30)を使用して発現の相対倍数変化を計算した。データを3回反復に基づいて平均±S.D.として示す。

【0290】

【表3】

表3.リアルタイムPCRに使用したプライマー

遺伝子	フォワードプライマー	リバースプライマー
GAPDH	GAGTCAACGGATTGCTCGT	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG
K1	CAGCATCATGCTGAGGTCAGG	CATGTCTGCCAGCAGTGATCTG
K3	ACGTGACTACCAGGAGCTGATG	ATGCTGACAGCACTCGGACACT
K10	CCTGCTTCAGATCGACAATGCC	ATCTCCAGGTCAGCCTTGGTCA
K12	AGCAGAATCGGAAGGACGCTGA	ACCTCGCTCTTGCTGGACTGAA
PAX6	TGTCCAACGGATGTGTGAGT	TTTCCCAAGCAAAGATGGAC

【0291】

レンチウイルスRNAi

pLKO.1プラスミドのAge IとEcoR Iの間にクローニングしたレンチウイルスshRNAを使用してPAX6遺伝子を標的化した。遺伝子特異的ノックダウンのためのshRNA標的化配列は、5'-CGTCCATCTTTGCTTGGGAAA-3'及び5'-AGTTTGAGAGAACCCATTATC-3'であった。すべての遺伝子ノックダウン実験において、本発明者らは、いずれの種からのいずれの既知遺伝子も標的にしないshRNAをコードするレンチウイルスpLKO.1-puro non-target shRNA対照プラスミド(Sigma, Inc.)を陰性対照として使用した。レンチウイルスshRNA粒子を調製するために、複製能力のないレンチウイルス粒子を、shRNA構築物とパッケージング混合物(比率9:1でpCMV-dR8.2及びpCMV-VSVG)の共トランスフェクションによって、293T細胞にパッケージングした。ウイルスを2回、トランスフェクションの48時間及び72時間後に回収した。個々のウイルス及びポリブレンを8 µg/mlの最終濃度で含有する新鮮培地を用いて、16~20時間、細胞をレンチウイルスに感染させた。感染細胞をさらに2 µg/mlピューロマイシンによって48時間選択した。

【0292】

免疫蛍光及び共焦点顕微鏡観察

細胞を4%パラホルムアルデヒドで15分間、室温で固定し、0.3%Triton X-100を含むリン酸緩衝食塩水(PBS)で10分間透過処理し、5%ウシ血清アルブミンと0.3%Triton X-100とを含むPBSでブロックした。それらの細胞を一次抗体とともに18時間、4°Cでインキュベートし、PBSで3回洗浄し、二次抗体とともに1時間インキュベートした。細胞核をDAP

Iで対比染色した。パラフィン包埋組織切片の免疫蛍光を、標準的な脱パラフィン、続いての上で説明したのと同じ免疫蛍光プロトコルによって遂行した。

【0293】

次の抗体を使用した:マウス抗p63モノクローナル抗体、ウサギ抗K5モノクローナル抗体、及びマウス抗K10モノクローナル抗体(MA1-21871、RM2106S0、及びMS611P0、Thermo Fisher Scientific, Inc.)、ウサギ抗PAX6ポリクローナル抗体(PRB-278P、Covance, Inc.)、マウス抗K1モノクローナル抗体(sc-376224、Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、並びにマウス抗K3/12モノクローナル抗体及びウサギ抗K12モノクローナル抗体(ab68260及びab124975、Abcam, Inc.)。二次抗体、Alexa Fluor 488又は568結合抗マウス又はウサギ免疫グロブリンG(IgG)(Invitrogen, Inc.)を1:500希釈で使用した。Olympus FV1000共焦点顕微鏡を使用して画像を得た。

【0294】

マイクロアレイデータ解析

本発明者らの以前の研究(15)の場合と同様に全RNAをLSC及びSESCから単離した。生データを寄託番号GSE32145でGene Expression Omnibus(GEO)データベースに寄託した。この研究で生成したマイクロアレイベースの遺伝子発現データを全サンプルにわたって正規化し、Cluster3.0/Tree Viewソフトウェアパッケージを使用する平均連結階層的クラスタリング(16)に付した。Wnt及びNotch経路に属する遺伝子の選択を以前の研究に基づいて行った。Reactomeネットワーク用のGeneSet解析ツール(17)を使用し、Cytoscape3用のReactome Functional Interaction(FI)プラグイン(18)を使用して生成したネットワークに発現値をオーバーレイした。

【0295】

結果

マウスにおける眼発生中のPAX6及びp63発現

角膜発生中のPAX6及びp63の機能を解明するために、本発明者らは、胎生12.5日(E12.5)～E18.5のマウス胚におけるそれらの発現プロファイルを先ず研究した。E12.5で、強いPAX6発現が眼領域、特に初期角膜上皮において検出されたが、p63発現は陰性であった(図15A)。対照的に、p63陽性細胞は、眼瞼の発生及び融合後、E14.5で、眼表面に出現し、後に輪部及び角膜に拡大した(図15B)。PAX6発現は、眼発生中は眼領域に限定された(図15A～D)。加えて、本発明者らは、GFPレポーターを駆動するPax6プロモーターを使用して系統追跡実験を行った。本発明者らは、ROSA^{mT/mG}の角膜上皮において、P1及びP60のPAX6-GFPCreマウスにおいて強いGFP発現を観察した(図15E)。これらの結果は、初期発生期から成人期の輪部幹細胞及び角膜上皮におけるPAX6の中心的役割を示唆している。

【0296】

ヒト角膜及び皮膚上皮におけるPAX6及びP63発現

本発明者らは、扁平上皮細胞発生の主要レギュレーターが、輪部と皮膚表皮両方の基底層において主として発現されることを観察した。これは、これら2つの上皮細胞タイプの類似性を示唆している。しかし、PAX6は角膜の上皮層において高度に発現されたが、成人の皮膚表皮では検出不能であった(図16)。皮膚表皮上皮及び角膜上皮のさらなる特徴づけのために、本発明者らは、組織特異的ケラチンの免疫染色を行った。LSCは、K3及びK12を角膜特異的マーカーとして、分化すると中心角膜に遊走する(図16A)が、皮膚表皮特異的ケラチン、K1及びK10、は、表皮基底上層で発現され(図16B)、PAX6及びp63は、角膜輪部に共局在した(図17A)。本発明者らは、さらに、LSC及び皮膚表皮幹細胞(SESC)を単離し、インビトロで培養した。LSCを拡大させ、PAX6及びp63発現によって同定することができ(図17B)、SESCをp63及びK5発現によって同定することができた(図17C)。

【0297】

PAX6は、角膜細胞運命決定に不可欠である

角膜細胞運命を決定する上でのPAX6の役割を調査するために、本発明者らは、ヒトLSCにおけるレンチウイルス媒介PAX6ノックダウンを使用した。本発明者らは、ピューロマイシン選択によってPAX6 shRNA LSCを精製した。RNAを幹細胞と分化細胞両方から抽出し、

関連遺伝子の発現レベルを定量的PCRによって比較した。PAX6に2つの異なるshRNAを使用し、それらは同様の結果を示した。LSCでのPAX6の4.5倍ノックダウンは、活性Ki67発現に伴って増殖異常を生じさせなかった(図18A)が、角膜特異的マーカーK3及びK12は、分化時に、対照と比較してそれぞれ17.7倍及び14.5倍($p<0.05$)、有意にダウンレギュレートされた。対照的に、皮膚特異的K1及びK10発現は、それぞれ4.1倍及び4.4倍($p<0.05$)アップレギュレートされた(図18B)。これらの結果は、LSCにおけるPAX6の喪失が皮膚様分化につながることを示す。

【0298】

ヒト先天性輪部デルモイド組織におけるPAX6の喪失

LSC及び角膜上皮細胞(CEC)におけるPAX6発現の臨床的関連性を判定するために、本発明者らは、角膜実質に血管新生及び無秩序な細胞を有する皮膚表皮病態(図19A)を示す、ヒト角膜輪部デルモイドを研究した。本発明者らは、PAX6発現が角膜デルモイド領域に完全に存在しないことを見出した(図19B)。さらに、本発明者らは、基底層におけるp63及びK5の局在発現(図19B)、並びに基底上層における皮膚特異的ケラチンK1及びK10の局在発現(図19B)を観察した。これらの結果は、発生中の患者組織における角膜上皮細胞の皮膚様上皮細胞への転換を示唆しており、角膜上皮細胞運命決定におけるPAX6の本質的役割を強く裏づける。

【0299】

LSC運命決定におけるシグナル伝達経路

角膜細胞運命決定を制御する機能的特徴をさらに決定するために、本発明者らは、LSC及びSESCにおいて差次的に活性化されうるシグナル伝達経路を同定しようとした。本発明者らは、マイクロアレイを使用してLSC及びSESCでのRNA発現解析を行い、続いて、DAVIDを使用する遺伝子オントロジー及び経路解析(19、20)を行った。本発明者らは、LSCとSESC間で少なくとも2倍の発現差を示す遺伝子のサブセットを同定し、その結果、合計1185の遺伝子を得た。この解析によって、非常に多くのG0期と、多くの細胞及び代謝プロセスに影響を与えるシグナル経路とを同定した。しかし、特に、Notch、Wnt及びTGF-ベータ経路がこの解析から重要な経路として浮上した。これは、上皮を含む様々な組織からの幹細胞の自己再生及び分化系統決定におけるそれらの重要な役割(21~23)と一致する。これらの経路の注目すべきメンバーについての発現変化のグラフィック表示を図20に提供する。

【0300】

考察

澄んだ透明な角膜は、LSCの自己再生及びCECへのそれらの分化によって維持される(24、25)。これらの2つのプロセスは、角膜上皮の完全性及び恒常性を維持するために高度に組織化されている。LSCの病的変化は、角膜の透明度の喪失をもたらすこともあり、半盲目又は全盲の原因となることもある(2、15)。この研究において、本発明者らは、PAX6が、LSCの特徴の維持及びCEC系統へのそれらのさらなる分化系統決定に不可欠であることを見出した。注目すべきこととして、p63は、一般的扁平上皮、例えば、角膜、表皮及び前立腺の扁平上皮の自己再生及び分化の主要遺伝子として文書で十分に裏づけられている(4~6)が、本発明者らは、p63がPAX6後に発現することを観察した。これは、角膜細胞運命制御における中心事象としてのPAX6発現を示唆する。

【0301】

培養下のPAX6欠損LSCは、分化時のケラチン発現の際の転換、特に、皮膚特異的K1/K10による角膜特異的K3/K12の置換によって示されるように、皮膚様上皮細胞運命を示す。さらに、PAX6は、角膜が皮膚系統に切り替えられる先天性奇形腫である角膜デルモイド組織には存在しない。これは、スティーブンス・ジョンソン症候群、化学熱傷、無虹彩及び再発性翼状片の際に見られるものなどの、異常表皮分化の際のPAX6ダウンレギュレーションについての最近の所見(2)と一致する。

【0302】

Wnt及びNotchシグナル伝達が胚形成時の上皮細胞及び様々な組織からの幹細胞の自己再生及び分化系統決定にとって重要であることは証明されている(21~23)。両方のシグナル

伝達経路が複雑であり、様々な受容体、リガンド、共活性化因子及び抑制タンパク質を伴う。例えば、Notch1は、傷害したマウス角膜の修復中、角膜上皮細胞運命を維持する(26)。眼表面発生に対するWntシグナル伝達の影響も広範に報告されている。Wnt4は、ヒト胎児角膜において及び成人基底LSCにおいて発現される(27)。正規Wntシグナル伝達のアンタゴニストであるDkk2は、Wnt/ β -カテニン活性の調節によるマウスの眼表面上皮の正確な発達に必要である(14)。加えて、本発明者らの以前の研究は、PAX6の過剰発現によってSESCをLSC様細胞に転換することができる、角膜上皮細胞運命決定におけるWnt7A-PAX6軸の中心的役割を提案した(15)。現在の研究において、本発明者らは、LSCとSESC間の遺伝子発現プロファイルの比較によってWnt及びNotchシグナル伝達経路の重要性のさらなる証拠を提供している。角膜上皮特定におけるこれらの遺伝子の機能を定義するためのさらなる調査は、角膜疾患をよりよく理解し、操作することを可能にしよう。

10

【0303】

まとめると、本発明者らのデータは、LSC及び角膜上皮運命決定におけるPAX6の重要な役割を示す。さらに、本発明者らは、角膜上皮表現型の決定におけるPAX6の肝要な役割を同定した。PAX6が角膜細胞運命をいかにして制御するのかを理解することは、角膜の恒常性及び疾患についての重要な洞察をもたらし、一般的な角膜疾患の処置の新たな治療戦略の開発に役立つであろう。

参考文献

1. Masse, K., Bhamra, S., Eason, R., Dale, N., and Jones, E. A. (2007). Purine-mediated signalling triggers eye development. *Nature* **449**, 1058-1062.
2. Li, W., Chen, Y. T., Hayashida, Y., Blanco, G., Kheirkah, A., He, H., Chen, S. Y., Liu, C. Y., and Tseng, S. C. (2008). Down-regulation of *Pax6* is associated with abnormal differentiation of corneal epithelial cells in severe ocular surface diseases. *J. Pathol.* **214**, 114-122.
3. Zhao, B., Allinson, S. L., Ma, A., Bentley, A. J., Martin, F. L., and Fullwood, N. J. (2008). Targeted cornea limbal stem/progenitor cell transfection in an organ culture model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **49**, 3395-3401.
4. Koster, M. I., Kim, S., Mills, A. A., DeMayo, F. J., and Roop, D. R. (2004). *p63* is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program. *Genes Dev.* **18**, 126-131.
5. Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., Ponzin, D., McKeon, F., and De Luca, M. (2001). *p63* identifies keratinocyte stem cells. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 3156-3161.
6. Mills, A. A., Zheng, B., Wang, X. J., Vogel, H., Roop, D. R., and Bradley, A. (1999). *p63* is a *p53* homologue required for limb and epidermal morphogenesis. *Nature* **398**, 708-713.
7. Yang, A., Schweitzer, R., Sun, D., Kaghad, M., Walker, N., Bronson, R. T., Tabin, C., Sharpe, A., Caput, D., Crum, C., and McKeon, F. (1999). *p63* is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. *Nature* **398**, 714-718.
8. Arwert, E. N., Hoste, E., and Watt, F. M. (2012). Epithelial stem cells, wound healing and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 170-180.
9. Blanpain, C., and Fuchs, E. (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 207-217.
10. Kopan, R., and Fuchs, E. (1989). A new look into an old problem: keratins as tools to investigate determination, morphogenesis, and differentiation in skin. *Genes Dev.* **3**, 1-15.
11. Schlotzer-Schrehardt, U., and Kruse, F. E. (2005). Identification and characterization of limbal stem cells. *Exp. Eye Res.* **81**, 247-264.
12. Eichner, R., Bonitz, P., and Sun, T. T. (1984). Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point, and mode of expression. *J. Cell Biol.* **98**, 1388-1396.
13. Ramaesh, T., Collinson, J. M., Ramaesh, K., Kaufman, M. H., West, J. D., and Dhillon, B. (2003). Corneal abnormalities in *Pax6*^{+/-} small eye mice mimic human aniridia-related keratopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 1871-1878.
14. Mukhopadhyay, M., Gorivodsky, M., Shtrom, S., Grinberg, A., Niehrs, C., Morasso, M. I., and Westphal, H. (2006). *Dkk2* plays an essential role in the corneal fate of the ocular surface epithelium. *Development* **133**, 2149-2154.

10

20

30

40

15. Ouyang, H., Xue, Y., Lin, Y., Zhang, X., Xi, L., Patel, S., Cai, H., Luo, J., Zhang, M., Zhang, M., Yang, Y., Li, G., Li, H., Jiang, W., Yeh, E., Lin, J., Pei, M., Zhu, J., Cao, G., Zhang, L., Yu, B., Chen, S., Fu, X. D., Liu, Y., and Zhang, K. (2014). WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis. *Nature* **511**, 358-361.
16. de Hoon, M. J., Imoto, S., Nolan, J., and Miyano, S. (2004). Open source clustering software. *Bioinformatics* **20**, 1453-1454.
17. Wu, G., Feng, X., and Stein, L. (2010). A human functional protein interaction network and its application to cancer data analysis. *Genome Biol.* **11**, R53.
18. Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J. T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**, 2498-2504.
19. Huang da, W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44-57.
20. Huang da, W., Sherman, B. T., and Lempicki, R. A. (2009). Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1-13.
21. Lien, W. H., and Fuchs, E. (2014). Wnt some lose some: transcriptional governance of stem cells by Wnt/ β -catenin signaling. *Genes Dev.* **28**, 1517-1532.
22. Collu, G. M., Hidalgo-Sastre, A., and Brennan, K. (2014). Wnt-Notch signalling crosstalk in development and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 3553-3567.
23. Kopan, R., and Ilagan, M. X. (2009). The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell* **137**, 216-233.
24. Cotsarelis, G., Cheng, S. Z., Dong, G., Sun, T. T., and Lavker, R. M. (1989). Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell* **57**, 201-209.
25. Davanger, M., and Evensen, A. (1971). Role of the pericorneal papillary structure in renewal of corneal epithelium. *Nature* **229**, 560-561.
26. Figueira, E. C., Di Girolamo, N., Coroneo, M. T., and Wakefield, D. (2007). The phenotype of limbal epithelial stem cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **48**, 144-156.
27. Vaclair, S., Majo, F., Durham, A. D., Ghyselinck, N. B., Barrandon, Y., and Radtke, F. (2007). Corneal epithelial cell fate is maintained during repair by Notch1 signaling via the regulation of vitamin A metabolism. *Dev. Cell* **13**, 242-253.
28. Muzumdar, M. D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., and Luo, L. (2007) A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* **45**, 593-605.
29. Rowan, S., Conley, K.W., Le, T. T., Donner, A. L., Maas, R. L., and Brown, N. L. (2008). Notch signaling regulates growth and differentiation in the mammalian lens. *Dev. Biol.* **321**, 111-122.

【 0 3 0 4 】

[実施例3]

ドナー角膜修復材料の調製方法

1. 材料

輪部幹細胞培養培地又は輪部幹細胞維持培地: 次のものを補足したDMEM/栄養素混合物F-

10

20

30

40

50

12(比率3:1での体積:体積のDMEM:F-12)基礎培地:10%ウシ胎仔血清、0.4 µg/mlヒドロコルチゾン、 10^{-10} Mコレラ毒素、5 µg/mlトランスフェリン、 2×10^{-9} M3,3',5-トリヨード-L-チロニン、5 µg/mlインスリン、10ng/ml上皮増殖因子(EGF)、100U/mlペニシリン及び100 µg/mlストレプトマイシン。細胞第4継代後、ROCK阻害剤を輪部幹細胞培養培地に添加して、例えば、1 µM Y-27632の添加によって、LSCを増殖状態で維持する。上記成分、DMEM、F12培地及びウシ胎仔血清は、GIBCO(登録商標)(Life Technologies)から購入し、残りの成分は、Sigma, USAから購入する。

【0305】

輪部幹細胞分化培地:CnT-30又は等価物(CellnTec Advanced Cell Systems AG、Bern、Switzerland)。CnT-30の代わりに使用することができるだろう他の輪部幹細胞分化培地は、CnT-02、CnT-02-3DP5、RegES(Regea06/015、Regea07/046及びRegea 08/013、Rajalaら、2010、PLOS One 5(4):e10246)である。 10

眼球:ドナーから。

【0306】

2. 方法

輪部幹細胞単離及び拡大:輪部の標本を眼球から単離し、PBS中の100IU/mlペニシリン及び100 µg/mlストレプトマイシンで洗浄し、小片(組織サイズ約 $2 \times 2\text{mm}^2$)に刻み、37°Cで1時間、0.2%コラゲナーゼIVで消化した。次いで、37°Cで15分間の0.25%トリプシン及び1mMエチレンジアミン四酢酸(EDTA)でのさらなる処置によって単一細胞を得る。2%増殖因子低減(GFR)Matrigel(登録商標)マトリックス(BD Biosciencesカタログ番号354230)で被覆されたプラスチック皿に初代細胞を播種した。フィーダー細胞を含有しない(フィーダーフリー)輪部幹細胞培養培地で細胞を培養し、70~90%の集密度から継代後に15~20%の集密度で継代する。 20

【0307】

移植用の角膜修復材料:第3継代(P3)世代の培養輪部幹細胞(ヒト角膜幹細胞とも呼ぶ)の細胞 2×10^4 個での浮遊液を最終体積50 µlでMatrigel(登録商標)と混合して3次元細胞培養物を形成し、Matrigel(登録商標)に包埋された角膜幹細胞を分化誘導培地CnT-30(CellnTec Advanced Cell Systems AG、Bern、Switzerland)で14日間培養して、移植用のドナー細胞としての角膜上皮細胞に分化させる。

【0308】

[実施例4]

ドナー角膜修復材料の調製方法

1. 材料

実施例3の場合と同じ。

【0309】

2. 方法

輪部幹細胞単離及び拡大:輪部の標本を眼球から単離し、PBS中の100IU/mlのペニシリン及び100 µg/mlストレプトマイシンで洗浄し、小片(組織サイズ約 $2 \times 2\text{mm}^2$)に刻み、37°Cで2時間、0.2%コラゲナーゼIVで消化した。次いで、37°Cで15分間の0.25%トリプシン及び1mM EDTAでのさらなる処置によって単一細胞を得る。2%増殖因子低減Matrigel(登録商標)マトリックス(BD Biosciencesカタログ番号354230)で被覆されたプラスチック皿に初代細胞を播種した。フィーダー細胞を含有しない(フィーダーフリー)輪部幹細胞培養培地で細胞を培養し、70~90%の集密度から継代後に15~20%の集密度で継代する。 40

【0310】

移植用の細胞源の調製:第3継代(P3)世代培養ヒトLSCの細胞 4×10^4 個での浮遊液を最終体積50 µlでMatrigel(登録商標)と混合し、その包埋されたLSCを角膜上皮分化誘導培地CnT-30(CellnTec Advanced Cell Systems AG、Bern、Switzerland)で3日間培養して、移植ドナー細胞を得る。

【0311】

[実施例5]

ドナー角膜修復材料の調製方法

1. 材料

実施例3の場合と同じ。

【0312】

2. 方法

輪部幹細胞単離及び拡大: 輪部組織を眼球から切除し、PBS中の100IU/mlのペニシリン及び100 µg/mlストレプトマイシンで洗浄する。輪部組織を2mm×2mm片に切断し、0.2%コラゲナーゼIVとともに37℃で2.5時間インキュベートして消化し、その後、37℃で20分間、0.25%トリプシン及び1mM EDTAで処置して単一細胞浮遊液を得る。その後、これらの消化された初代細胞をMatrigel(登録商標)被覆皿(増殖因子低減Matrigel(登録商標)、BD Biosciencesカタログ番号354230)に播種する。フィーダー細胞を含有しない(フィーダーフリー)輪部幹細胞培養培地で細胞を培養してLSCを拡大させ、70~90%の集密度から継代後に15~20%の集密度で継代する。

【0313】

移植用の細胞源の調製: 1×10^4 個での第3継代培養ヒト角膜幹細胞の浮遊液を最終体積50 µlでCnT-30培地(CellnTec Advanced Cell Systems AG、Bern、Switzerland)中のコラーゲンと混合し、そのコラーゲンに包埋された角膜幹細胞を分化誘導培地CnT-30(CellnTec Advanced Cell Systems AG、Bern、Switzerland)中で18日間インキュベートしてドナー角膜修復材料を得る。

【0314】

[実施例6]

ドナー角膜修復材料の調製方法

1. 材料

実施例3の場合と同じ。

【0315】

2. 方法

輪部幹細胞単離及び拡大: 輪部の標本を眼球から単離し、PBS中の100IU/mlのペニシリン及び100 µg/mlストレプトマイシンで洗浄し、小片(約2mm×2mm)に刻み、37℃で3.5時間、0.2%コラゲナーゼIVで消化した。次いで、細胞及び細胞塊を37℃で10分間、0.25%トリプシン及び1mM EDTAでさらに処置して単一細胞懸濁液を得る。その後、その初代単一細胞を、2%増殖因子低減Matrigel(登録商標)、BD Biosciencesカタログ番号354230)で被覆された皿で培養する。フィーダー細胞を含有しない(フィーダーフリー)輪部幹細胞培養培地で細胞を培養してLSCを拡大させ、70~90%の集密度から継代後に15~20%の集密度で継代する。典型的に、ROCK阻害剤、Y-27632をP4後にLSC培養培地に添加して、LSC増殖を維持する。

【0316】

移植用の細胞源の調製: 3×10^4 個での第3継代培養ヒト角膜幹細胞の浮遊液を最終体積50 µlでCnT-30培地(CellnTec Advanced Cell Systems AG、Bern、Switzerland)中の羊膜と混合する。その羊膜処置ヒト角膜幹細胞混合物を14日間、分化誘導培地CnT-30培地中での培養下に置いて、ドナー角膜修復材料を得る。

【0317】

実施例3~6では第3継代(P3)LSCを使用するが、他のLSC継代を使用してもよい。第4継代後に得たLSCについては、これらのLSCを、1 µM Y-27632の濃度で使用したY-27632などのROCK阻害剤を補足したLSC培養培地又は維持培地で維持したことになる。

【0318】

培養LSCの3D分化

LSC細胞の播種前に、プラスチックプレートを30分間、37℃で2%増殖因子低減Matrigel(登録商標)(354230、BD Biosciences, Inc.)で被覆することによって処理する。LSC培養培地又は維持培地は、1/100 Pen-Strep、10%ウシ胎仔血清、10ng/ml EGF、5 µg/ml インスリン、0.4 µg/ml ヒドロコルチゾン、 10^{-10} M コレラ毒素及び 2×10^{-9} M 3,3',5-トリヨード-L-

チロニンを含む、DMEM/F12及びDMEM(1:1)であり、LSC細胞がゆっくり増殖している場合にのみそれに1 μ M Y-27632を添加する。細胞を70～90%の集密度で継代し、増殖因子低減Matrigel(登録商標)被覆皿での連続培養についての継代直後の細胞は約15～20%の集密度である。インビトロでLSCを分化させるために、LSCを解離させて単一細胞浮遊液を得、個々のLSCをMatrigel(登録商標)に 2×10^4 細胞/50 μ lゲルで包埋する。分化培地CnT-30(CellnTec Advanced Cell Systems AG、Bern、Switzerland)又はLSCのCECへの分化を支持する等価の培地で14～18日培養後、3D構造が形成された。

【0319】

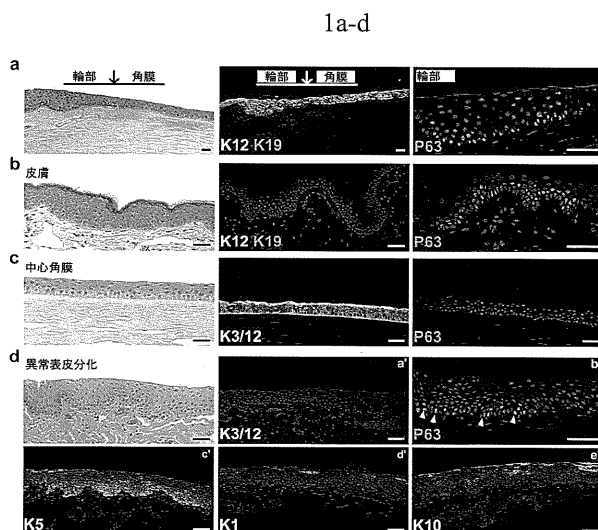
本発明の趣旨又は本質的特質を逸脱することなく他の特定の形態で本発明を実施してもよい。いずれの等価実施形態も本発明の範囲内であることを意図している。実際、本明細書中に示し、記載するものに加えて、本発明の様々な変更形態が、上述の説明から当業者に明らかになるだろう。そのような変更実施形態も添付の請求項の範囲に入ることを意図している。

【0320】

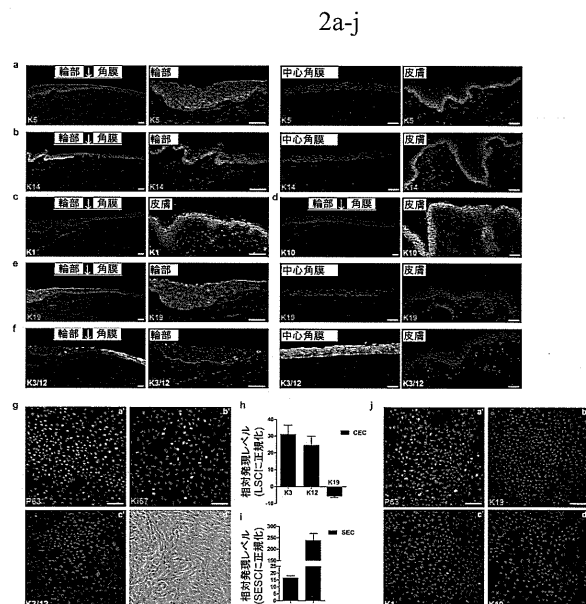
本明細書を通して様々な出版物が参照されている。各出版物は、参照によってその全体が本明細書に組み入れられることを意図している。

10

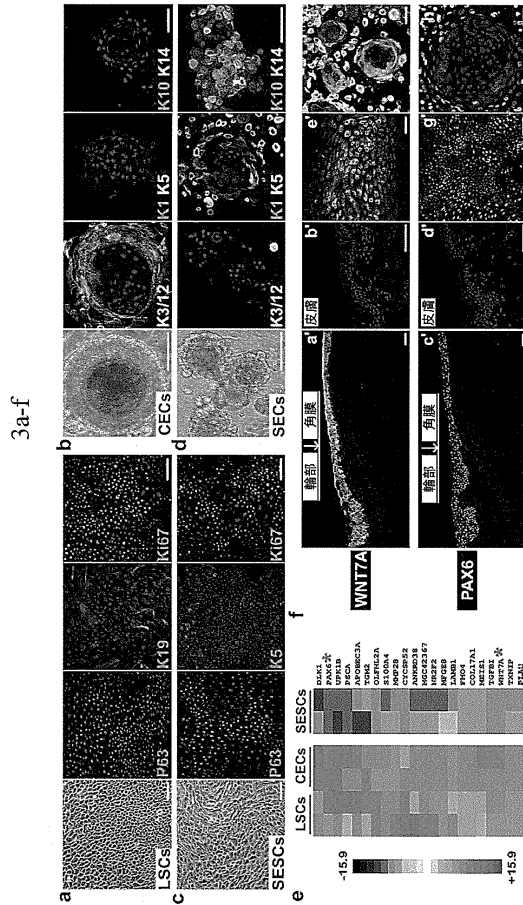
【図1】



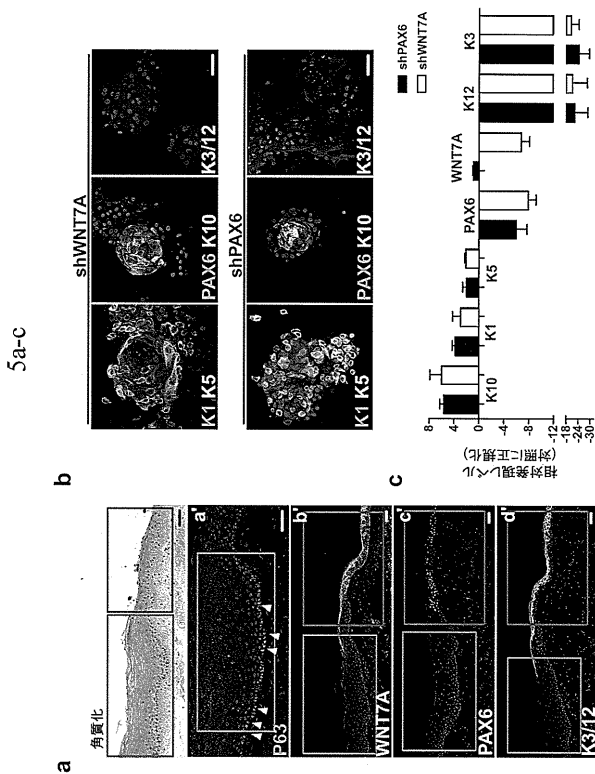
【図2】



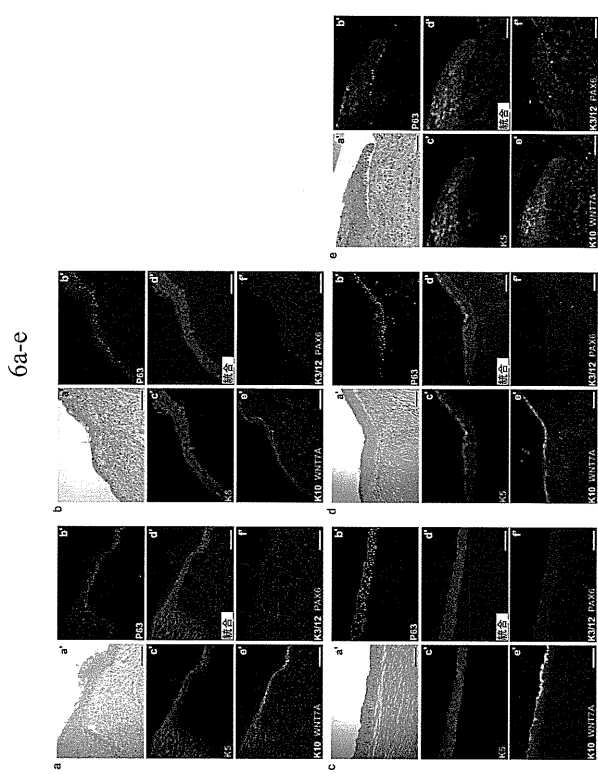
【図 4】



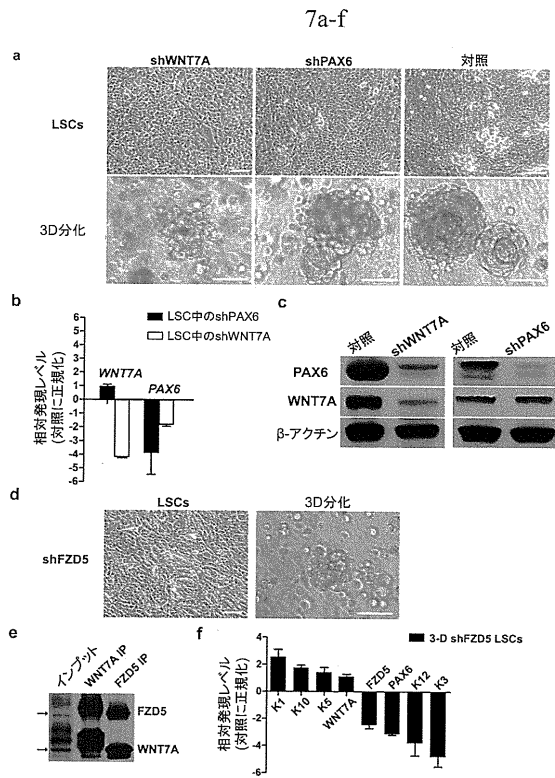
【図 5】



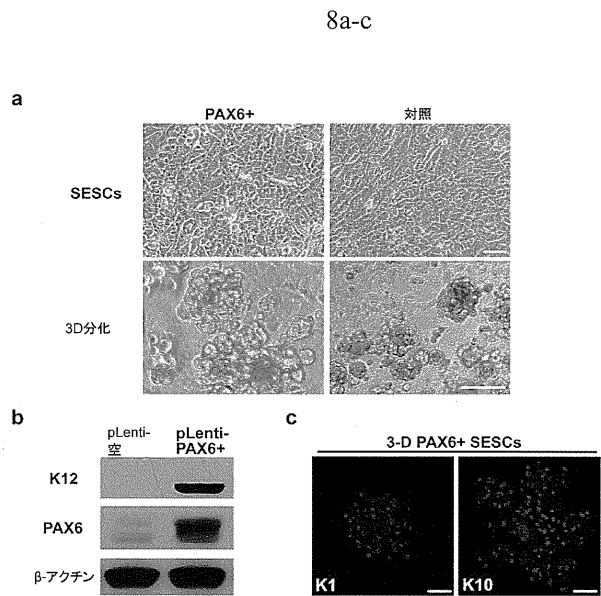
【图 6】



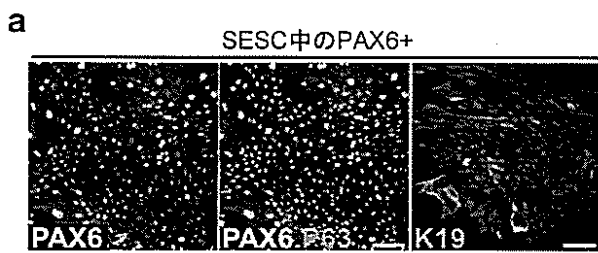
【図 7】



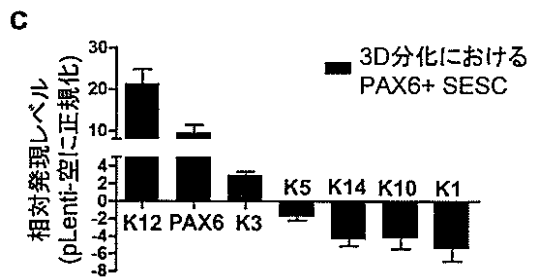
【図 8】



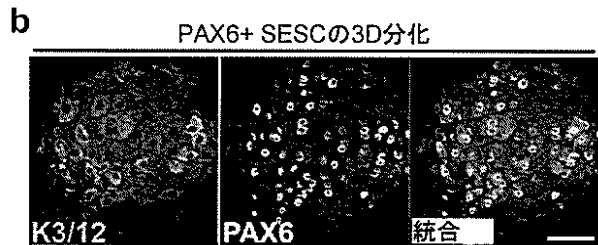
【図 9 a】



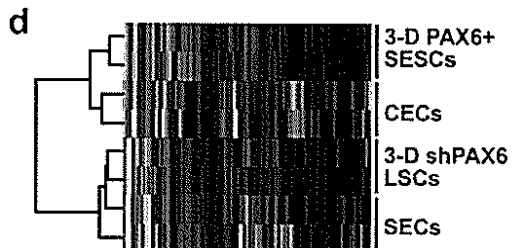
【図 9 c】



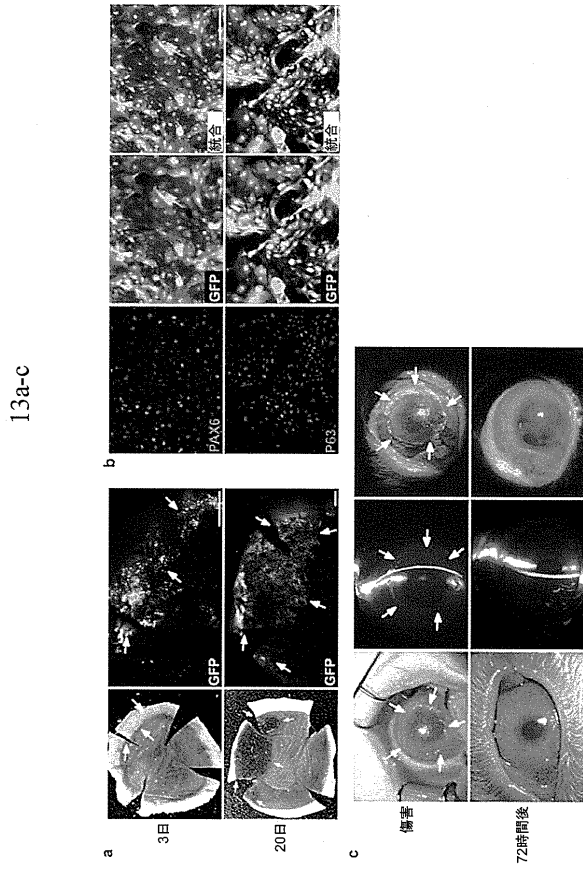
【図 9 b】



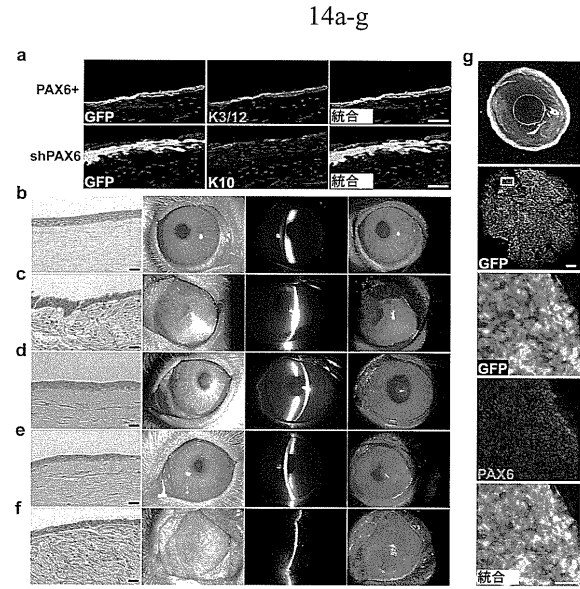
【図 9 d】



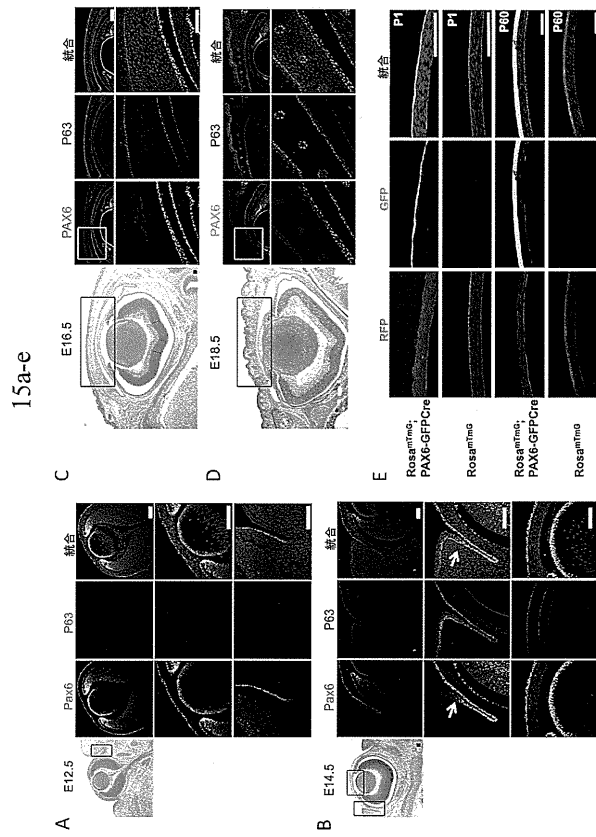
【図 1 3】



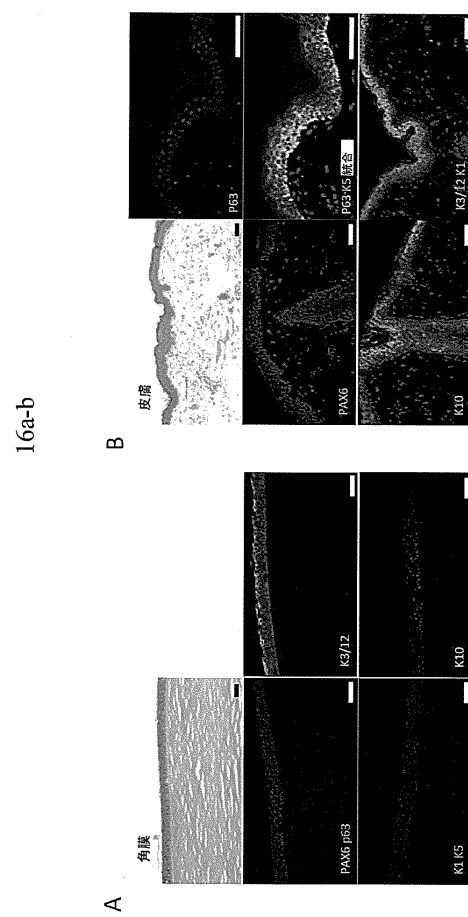
【図 1 4】



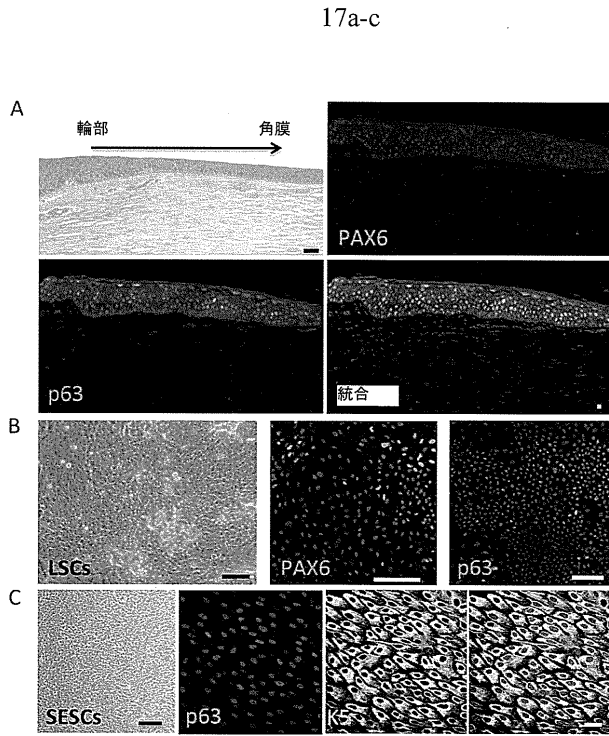
【図 1 5】



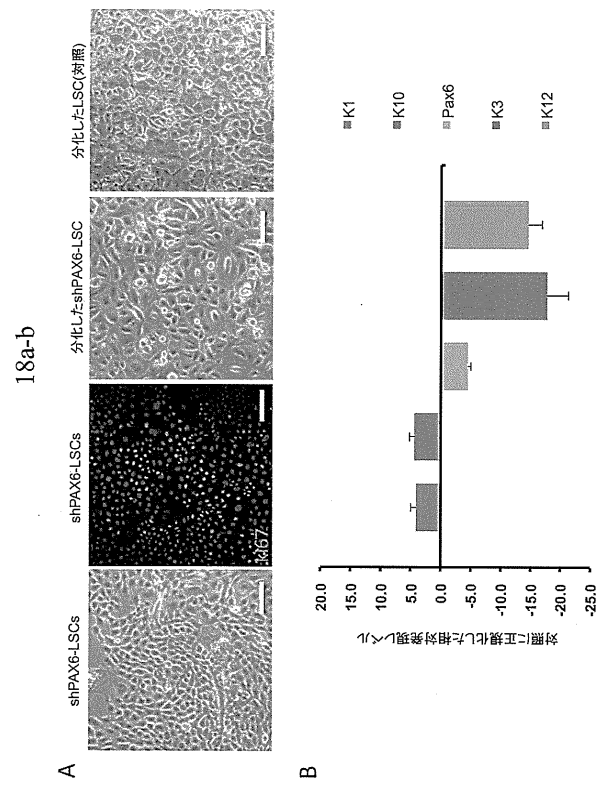
【図 1 6】



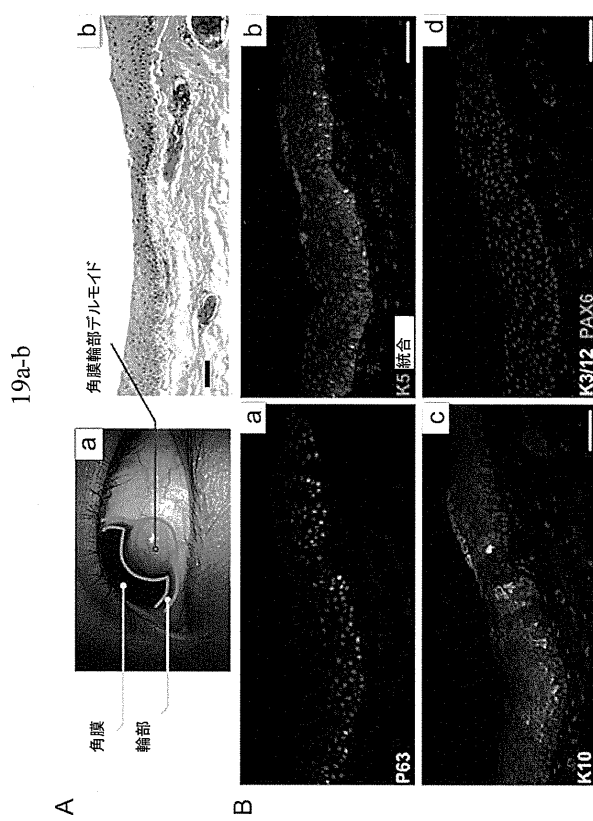
【図 17】



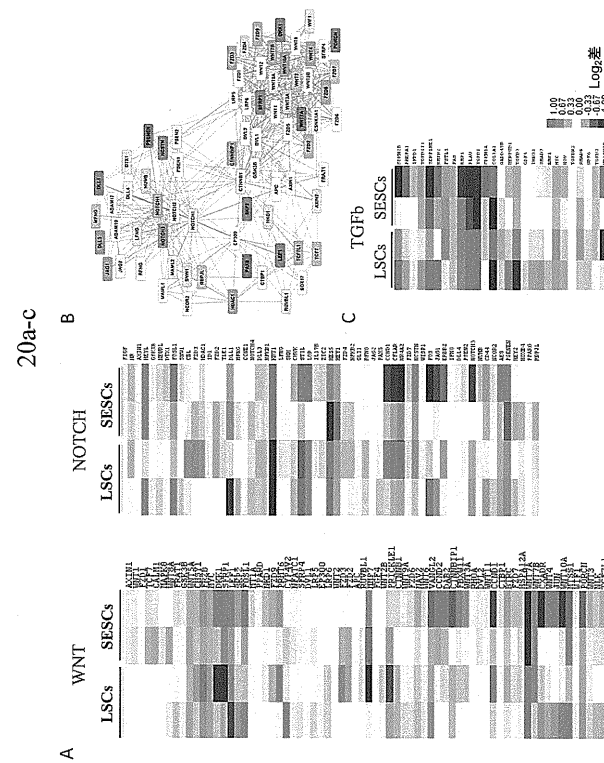
【図 18】



【図 19】



【図 20】



【配列表】

2017522016000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/038384

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12N 5/071 (2015.01)

CPC - C12N 5/0621 (2015.10)

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)

IPC(8) - A61K 35/12; C12N5/02, 5/071 (2015.01)

USPC - 424/93.21; 435/325, 366

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

CPC - A61F 2/142; A61K 35/12; A61L 27/3834, 27/3895, 2430/16; C12N 5/00, 5/0062, 5/0068, 5/0602, 5/0606, 5/0607, 5/0621, 5/0623, 5/0629, 2500/98, 2501/235, 2502/085, 2506/00, 2506/09, 2506/45, 2509/00, 2533/90 (2015.10) (keyword delimited)

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

PatBase, Orbit, Google Patents, Google Scholar, Google, ProQuest, PubMed

Search terms used: limbus limbal stem cell LSC LSC-like progenitor cell corneal epithelial cell feeder-free culture in vitro differentiation PAX6

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Li et al. "Transcription Factor PAX6 (Paired Box 6) Controls Limbal Stem Cell Lineage in Development and Disease," J Biol Chem. 04 June 2015 (04.06.2015), Vol. 290, Pgs. 20448-20454, entire document	64, 70, 161
P, X	QIYANG et al. "WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis," Nature. 02 July 2014 (02.07.2014), Vol. 511, Pgs. 358-361, entire document	4, 47, 64, 70, 101, 161, 185, 195, 196
A	MIYASHITA et al. "Long-term maintenance of limbal epithelial progenitor cells using rho kinase inhibitor and keratinocyte growth factor," Stem Cells Transl Med. 27 August 2013 (27.08.2013), Vol. 2, Pgs. 758-765, entire document	1-29, 31-53, 55-112, 117, 118, 121-124, 129-131, 133-140, 142-144, 151-187, 189, 190, 193-196
A	SHAHADADFAR et al. "Ex vivo expanded autologous limbal epithelial cells on amniotic membrane using a culture medium with human serum as single supplement," Exp Eye Res. 07 February 2012 (07.02.2012), Vol. 97, Pgs. 1-9, entire document	1-29, 31-53, 55-112, 117, 118, 121-124, 129-131, 133-140, 142-144, 151-187, 189, 190, 193-196
A	DAVIS et al. "Overexpression of Pax6 in mouse cornea directly alters corneal epithelial cells: changes in immune function, vascularization, and differentiation," Invest Ophthalmol Vis Sci. 13 June 2011 (13.06.2011), Vol. 52, Pgs. 4158-4168, entire document	1-29, 31-53, 55-112, 117, 118, 121-124, 129-131, 133-140, 142-144, 151-187, 189, 190, 193-196
A	LEKHANONT et al. "A serum- and feeder-free technique of culturing human corneal epithelial stem cells on amniotic membrane," Mol Vis. 30 June 2009 (30.06.2009), Vol. 15, Pgs. 1294-1302, entire document	1-29, 31-53, 55-112, 117, 118, 121-124, 129-131, 133-140, 142-144, 151-187, 189, 190, 193-196

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

06 October 2015

Date of mailing of the international search report

02 NOV 2015

Name and mailing address of the ISA/

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-8300

Authorized officer

Blaine Copenhaaver

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/038384

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. ☐ forming part of the international application as filed:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

ISA/225 mailed on 07 July 2015. No approved electronic sequence listing was submitted in response to the ISA/225.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/038384

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 30, 54, 113-116, 119, 120, 125-128, 132, 141, 145-150, 188, 191, 192
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2015/038384

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NOTARA et al. "A xenobiotic-free culture system for human limbal epithelial stem cells," Regen Med. November 2007, Vol. 2, Pgs. 919-927. entire document	1-29, 31-53, 55-112, 117, 118, 121-124, 129-131, 133-140, 142-144, 151-187, 189, 190, 193-196
A	COLLINSON et al. "Corneal development, limbal stem cell function, and corneal epithelial cell migration in the Pex6(+/-) mouse," Invest Ophthalmol Vis Sci. April 2004, Vol. 45, Pgs. 1101-1108. entire document	1-29, 31-53, 55-112, 117, 118, 121-124, 129-131, 133-140, 142-144, 151-187, 189, 190, 193-196

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I		テーマコード (参考)	
A 6 1 P 27/10 (2006.01)	A 6 1 P	27/10		
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 7 1	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/00		
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P	17/02		
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16		
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N	33/48	M	
G 0 1 N 33/68 (2006.01)	G 0 1 N	33/68		
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N	15/00	A	

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

(74)代理人 100169971

弁理士 菊田 尚子

(74)代理人 100196966

弁理士 植田 渉

(72)発明者 ツァン, カン

アメリカ合衆国 9 2 0 9 3 カリフォルニア州, ラ ホヤ, ギルマン ドライブ 9 5 0 0

(72)発明者 オウヤン, ホン

アメリカ合衆国 9 2 0 9 3 カリフォルニア州, ラ ホヤ, ギルマン ドライブ 9 5 0 0

(72)発明者 ホウ, ルイ

中華人民共和国 1 1 0 0 0 0, シェンヤン, フンナン ディストリクト, プジアンユアン, ナンバー 1 7

(72)発明者 カイ, ファイミン

中華人民共和国 1 1 0 0 0 0, シェンヤン, フンナン ディストリクト, プジアンユアン, ナンバー 1 7

F ターム (参考) 2G045 AA24 AA25 AA40 BA13 BA14 BB20 BB22 BB24 CB01 CB09
CB17 DA13 DA14 DA36 FA12 FA16 FA19 FB01 FB02 FB03
FB12 FB13 FB15 GB01 JA01 JA06
4B063 QA01 QA18 QA19 QQ43 QR77 QR80 QS38
4B065 AA90X AA90Y AA91X AA93X AB01 AC20 BA02 BB25 BB28 BB34
BC37 BC46 BD44 CA44
4C084 AA02 BA44 MA58 MA63 NA14 ZA331 ZA891 ZB261 ZB321 ZC521
ZC611
4C087 AA01 AA02 BB48 BB56 BB63 MA58 MA63 NA14 ZA33 ZA89
ZB26 ZB32 ZC52 ZC61