

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2013年7月4日 (04.07.2013)

W I P O | P C T

(10) 国際公開番号
W O 2013/100208 A 1

- (51) 国際特許分類 :
C12N 5/071 (2010.01) A61L 27/00 (2006.01)
A61K 9/70 (2006.01) A 61P 27/02 (2006.01)
A61K 31/4418 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号 : PCT/JP20 12/084320
- (22) 国際出願日 : 2012年12月27日 (27.12.2012)
- (25) 国際出願の言語 : 日本語
- (26) 国際公開の言語 : 日本語
- (30) 優先権データ :
特願 2011-289666 2011年12月28日 (28.12.2011) JP
特願 2012-030969 2012年2月15日 (15.02.2012) JP
特願 2012-15 1340 2012年7月5日 (05.07.2012) JP
- (71) 出願人 : 京都府公立大学法人 Kyoto Prefectural Public University corporation [JP/JP]; 〒6028566 京都府京都市上京区河原町通広小路 上る 梶井町 4 6 5 Kyoto (JP). 学校法人同志社 (The Doshisha) [JP/JP]; 〒6028580 京都府京都市上京区今出川通 烏丸東入玄武町 6 0 1 番地 Kyoto (JP). 千寿製 株式会社 (Senju Pharmaceutical Co., Ltd.) [JP/JP]; 〒5410046 大阪府大阪市中央区平野町 2 - 5 - 8 Osaka (JP).
- (72) 発明者 : 木下 茂 iKINOSHITA, Shigeru ; 〒6028566 京都府京都市上京区河原町通広小路 上る 梶井町 4 6 5 京都府公立大学法人内 Kyoto (JP). 小泉 範子 (KOIZUMI, Noriko); 〒6100394 京都府 田辺市多々羅都谷 1 - 3 同志社大学内 Kyoto (JP). 奥村 直毅 (OKUMURA, NaokD; 〒6100394 京都府
- 田辺市多々羅都谷 1 - 3 同志社大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人 : 山本 秀策, 外 (YAMAMOTO, Shusaku et al); 〒5406015 大阪府大阪市中央区城見一丁目 2 番 2 7 号 クリスタルタワー 1 5 階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類 :
- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



W 2 13/1 0208 A1

(54) Title: NORMALIZATION OF CULTURE OF CORNEAL ENDOTHELIAL CELLS

(54) 発明の名称 : 角膜内皮細胞の培養正常化

(57) Abstract: The present invention provides a method for the normalized culture of corneal endothelial cells. More specifically, the present invention provides a culture-normalizing agent for corneal endothelial cells, which comprises a fibrosis inhibitor. Specifically, the present invention provides a culture-normalizing agent which comprises a transforming growth factor (TGF) β signaling inhibitor. The present invention also provides a culture medium for culturing corneal endothelial cells normally, which comprises the culture-normalizing agent according to the present invention and corneal endothelium culture components. The present invention also provides a method for culturing corneal endothelial cells normally, which comprises a step of culturing the corneal endothelial cells using the culture-normalizing agent according to the present invention or the culture medium according to the present invention.

(57) 要約 : 本発明は、角膜内皮細胞の正常化培養方法を提供する。より詳細には、本発明は、線維化抑制剤を含む角膜内皮細胞の培養正常化剤を提供する。詳細には、本発明はトランスフォーミング増殖因子 (TGF) β シグナル阻害剤を含む培養正常化剤を提供する。本発明はまた、本発明の培養正常化剤と角膜内皮の培養成分とを含む、角膜内皮細胞を正常に培養するための培地も提供する。本発明はさらに、本発明の培養正常化剤、または本発明の培地を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を包含する、角膜内皮細胞を正常に培養する方法も提供する。

明細書

【発明の名称】角膜内皮細胞の培養正常化

【技術分野】

【0001】

- 5 本発明は、角膜内皮細胞を正常な状態で培養するための技術、方法、ならびにそのための薬剤および培地に関する。

【背景技術】

【0002】

- 10 視覚情報は、眼球の最前面の透明な組織である角膜から取り入れられた光が、網膜に達して網膜の神経細胞を興奮させ、発生した電気信号が視神経を經由して大脳の視覚野に伝達することで認識される。良好な視力を得るためには、角膜が透明であることが必要である。角膜の透明性は、角膜内皮細胞のポンプ機能とバリア機能により、含水率が一定に保たれることにより保持される。

【0003】

- 15 ヒトの角膜内皮細胞は、出生時には1平方ミリメートル当たり約3000個の密度で存在しているが、一度障害を受けると再生する能力を持たない。角膜内皮変性症や種々の原因による角膜内皮の機能不全によって生じる水疱性角膜症では、角膜が浮腫と混濁を生じ、著しい視力低下をきたす。現在、水疱性角膜症に対しては、角膜の上皮、実質および内皮の3層構造のすべてを移植する
20 全層角膜移植術が行われている。しかし、日本での角膜提供は不足しており、角膜移植の待機患者約2600人に対し、年間に国内で行われている角膜移植件数は1700件程度である。

【0004】

- 25 近年、拒絶反応や術後合併症のリスクを軽減し、よりよい視機能を得る目的から、障害を受けた組織のみを移植する「パーツ移植」の考えが注目されている。角膜移植の中でも、実質組織の移植である深層表層角膜移植術、角膜内皮組織の移植であるデスメ膜角膜内皮移植術 (Descemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty) などが行われるようになってきている。
30 また、生体外で培養した角膜上皮や口腔粘膜を角膜上皮の代わりに移植する培養粘膜上皮移植術は既に臨床応用されており、同様に生体外で培養した角膜内皮を移植する方法も検討されている。角膜内皮の移植用として、コラーゲン層上に培養された角膜内皮層からなる角膜内皮様シートが知られている (特許文献1を参照)。しかし、角膜内皮細胞、特にヒト由来の角膜内皮細胞は、角膜の提供者が限られているとともに、試験管内での培養が難しく、移植に必要な
35 数の培養細胞を得るには時間と費用を要するものである。

【0005】

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

あるY—27632等を用いたヒトES細胞の大量培養や大脳細胞の産生が可能となることが報告された(非特許文献1)。そこで、本発明者らは、Y—27632等を用いた角膜内皮細胞の大量培養の方法を開示した(特許文献2)。

【0006】

5 このほか、特許文献3は、角膜内皮前駆細胞を用いたニューロスフェア法を開示する。

【0007】

特許文献4は、上皮細胞の培養のために、TGF— β キナーゼ阻害剤およびP38 MAPK阻害剤を用いることを開示する。

10 【0008】

また、非特許文献2および4は、特異な重症角膜内皮疾患におけるTGF— β 、P38 MAPK、Smadの関与を記載する。非特許文献3は、ROCK阻害剤を用いたヒト角膜内皮細胞の増殖に対する展望を記載する。非特許文献5は、角膜の重度な障害時の線維化がIL—1 α により、途中p38 MAPKの活性化によるということを示す。非特許文献6は、ウサギでの過剰な冷凍外傷時にみられる線維化がp38 MAPKの活性化により、阻害剤で線維化が抑制できることをウサギを用いて示す。非特許文献7は、従来の角膜内皮細胞培養培地では、継代すると正常な状態を維持しつつ増殖させることができないことが記載されている。非特許文献8は、角膜内皮細胞用の培地を開示する。この培地は、FBS、EGFおよびNGFを含むものであるが、この培地では、培養すべき細胞は若年の生物由来のものでないと良好に培養できないことが記載されている。非特許文献9は、塩基性FGFを用いた角膜内皮細胞用培地を開示する。非特許文献10は、コラゲナーゼを用いた角膜内皮細胞溶培地を開示する。非特許文献11は、馴化培地を用いた角膜内皮細胞溶培地を開示する。非特許文献8—11のように種々培地は開発されているが、非特許文献7に示されるように、従来の角膜内皮細胞培養培地では、継代すると正常な状態を維持しつつ増殖させることができないことが知られている。非特許文献12—14もまた、培養角膜内皮シートの製造を記載する。非特許文献9—12および15は、ヒト眼組織由来幹細胞および自家角膜内皮移植術を開示する。非特許文献16および17もまた、培養角膜内皮シートの製造を記載する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】特開2005—229869号公報

35 【特許文献2】国際公開2009/28631号

【特許文献3】特開2006—187281号公報

【特許文献4】米国特許出願公開第2006/0234911号明細書

【非特許文献】

【0010】

40 【非特許文献1】Watanabe K., et al., Nat Biotechnol . 2007 , 25 ,

【非特許文献 2】雑賀、第 324 回関西眼疾患研究会特別講演「上皮-間葉系移行と眼疾患」2010 年 06 月 23 日 <http://ohpth.kpu-m.ac.jp/wp-content/uploads/2010/07/title20100623.doc>

【非特許文献 3】小泉、最先端・次世代研究開発支援プログラム http://www.jsps.go.jp/j-jisedai/data/ife/LS117_outline.pdf

【非特許文献 4】Sumioka T., et al., Molecular Vision 2008 ; 14 : 2272-2281

【非特許文献 5】Lee JG., et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2009 ; 50 : 2067-2076

【非特許文献 6】Song SK., et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2010 ; 51 : 822-829

【非特許文献 7】Peh GS., et al., ARVO 2011, 561 Corenal Endothelium : Health and Diseases 6595 (May 1-5, 2011)

【非特許文献 8】Nancy C. Joyce, et al., Cornea 2004 ; 23 (Suppl 1) S8- S19

【非特許文献 9】Miyata K., et al., Cornea 20 (1) : 59-63, 2001

【非特許文献 10】Wei Li, et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2007 ; 48 : 614-620

【非特許文献 11】Xiaoyan Lu, et al., Molecular Vision 2010 ; 16 : 611-622

【非特許文献 12】Mimura T., et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004 Sep ; 45 (9) : 2992- 2997

【非特許文献 13】Mimura T., et al., Exp Eye Res. 2003 Jun ; 76 (6) : 745-751

【非特許文献 14】Yokoo S., et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005 May ; 46 (5) : 1626- 1631

【非特許文献 15】Amano S et al., Curr Eye Res. 2003 Jun ; 26 (6) : 313-318

【非特許文献 16】Ide T et al., Biomaterials. 2006 Feb ; 27 (4) : 607- 614. Epub 2005 Aug 15.

【非特許文献 17】Sumide T et al., FASEB J. 2006 Feb ; 20 (2) : 392- 404. Epub 2005 Dec 9.

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、腫瘍壊死因子 β (TGF- β) 経路を阻害することにより、正常な機能を保ったまま角膜内皮細胞を増殖させることができる技術を見出した。これにより、正常な機能を有する角膜内皮細胞を比較的少量に増殖させることができるようになった。すなわち、本発明は、以下を提供する。

(1) 線維化抑制剤を含む角膜内皮細胞の培養正常化剤。

(2) 前記線維化抑制剤はトランスフォーミング増殖因子 (TGF) β シグナル阻害剤を含む、項目 1 に記載の培養正常化剤。

(3) 前記培養正常化は、Z O - 1 および $N a^{+} / K^{+} - A T P a s e$ からなる群より選択される細胞機能が正常であることを含む、項目1または2に記載の培養正常化剤。

5 (4) 前記培養正常化は角膜移植に適応する移植用細胞を製造するためのものである、項目1〜3のいずれか1項に記載の培養正常化剤。

(5) 前記移植用細胞は霊長類の細胞である、項目4に記載の培養正常化剤。

(6) 前記移植用細胞はヒトの細胞である、項目4または5に記載の培養正常化剤。

10 (7) 前記 $T G F - \beta$ シグナル阻害剤は、 $T G F - \beta$ のアンタゴニスト、 $T G F - \beta$ のレセプターのアンタゴニスト、または $S m a d 3$ の阻害剤である、項目2〜6のいずれか1項に記載の培養正常化剤。

15 (8) 前記 $T G F - \beta$ シグナル阻害剤は、 $S B 4 3 1 5 4 2$ (4 - [4 - (1, 3 - ベンゾジオキソール - 5 - イル) 2 - ピリジニル]) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル] ベンズアミド)、 $B M P - 7$ 、抗 $T G F - \beta$ 抗体、抗 $T G F - \beta$ レセプター抗体、 $T G F - \beta$ の $s i R N A$ 、 $T G F - \beta$ レセプターの $s i R N A$ 、 $T G F - \beta$ のアンチセンスオリゴヌクレオチド、6, 7 - ジメトキシ - 2 - ((2 E) - 3 - (1 - メチル - 2 - フェニル - 1 H - ピロロ [2, 3 - b] ピリジン - 3 - イル) - プロパ - 2 - エノイル)) - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロイソキノロン、 $A 8 3 - 0 1$ (3 - (6 - メチル - 2 - ピリジニル) - N - フェニル - 4 - (4 - キノリニル) - 1 H - ピラゾール - 1 - カルボチオアミド)、ステモレキユールTM $T L K$ インヒビター (2 - (3 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル) - 1, 5 - ナフチリジン)、ステモレキユール^M $B M P$ インヒビター $L D N - 1 9 3 1 8 9$ (6 - (4 - (ピペリジン - 1 - イル) エトキシ) フェニル) - 3 - (ピリジン - 4 - イル) ピラゾロ [1, 5 - a] ピリミジン)、 $S D - 2 0 8$ (2 - (5 - クロロ - 2 - フルオロフェニル) - 4 - [(4 - ピリジニル) アミノ] プテリジン)、 $L Y 3 6 4 9 4 7$ (4 - [3 - (2 - ピリジニル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル] - キノリン)、それらの薬学的に許容可能な塩もしくは溶媒和物、またはその薬学的に受容可能な塩の溶媒和物を少なくとも1種含む、項目2〜7のいずれか1項に記載の培養正常化剤。

20

25

30

35 (8A) 前記 $T G F - \beta$ シグナル阻害剤は、 $S B 4 3 1 5 4 2$ (4 - [4 - (1, 3 - ベンゾジオキソール - 5 - イル) 2 - ピリジニル]) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル] ベンズアミド)、 $B M P - 7$ 、抗 $T G F - \beta$ 抗体、抗 $T G F - \beta$ レセプター抗体、 $T G F - \beta$ の $s i R N A$ 、 $T G F - \beta$ レセプターの $s i R N A$ 、 $T G F - \beta$ のアンチセンスオリゴヌクレオチド、 $A 8 3 - 0 1$ (3 - (6 - メチル - 2 - ピリジニル) - N - フェニル - 4 - (4 - キノリニル) - 1 H - ピラゾール - 1 - カルボチオアミド)、ステモレキユールTM $T L K$ インヒビター (2 - (3 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル) - 1, 5 - ナフチリジン)、ステモレキユール^M $B M P$ インヒビター $L D N - 1 9 3 1 8 9$ (6 - (4 - (ピペリジン - 1 - イル) エトキシ) フェニル) - 3 - (ピリジン - 4 - イル) ピラゾロ [1, 5 - a] ピリミジン)、 $S D - 2 0 8$ (2 - (5 - クロロ - 2 - フルオロフェニル) - 4 - [(4 - ピリジニル) アミノ] プテリジン)、 $L Y 3 6 4 9 4 7$ (4 - [3 - (2 - ピリジニル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル] - キノリン)、それらの薬学的に許容可能な塩もしくは溶媒和物、またはその薬学的に受容可能な塩の溶媒和物を少なくとも1種含む、項目2〜7のいずれか1項に記載の培養正常化剤。

40

- ル) - 4 - [(4 - ピリジニル) アミノ] プテリジン)、 L Y 3 6 4 9 4 7 (4 - [3 - (2 - ピリジニル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル] - キノリン)、それらの薬学的に許容可能な塩もしくは溶媒和物、またはその薬学的に受容可能な塩の溶媒和物を少なくとも1種含む、項目2~8のいずれか1項に記載の培養正常化剤。
- 5 (9) 前記 T G F - β シグナル阻害剤は、 S B 4 3 1 5 4 2 (4 - [4 - (1 , 3 - ベンゾジオキソール - 5 - イル) 2 - ピリジニル) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル] ベンズアミド) またはその薬学的に許容可能な塩を含む、項目2~8または8Aのいずれか1項に記載の培養正常化剤。
- 10 (9 A) 前記 S B 4 3 1 5 4 2 は、使用時に約 0 . 1 μ M ~ 約 1 0 μ M の濃度で存在するように含まれる、項目8、8Aまたは9に記載の培養正常化剤。
- (9 B) 前記 T G F - β シグナル阻害剤は、 B M P - 7 を含む、項目2~8または8Aのいずれか1項に記載の培養正常化剤。
- (9 C) 前記 B M P - 7 は、使用時に約 1 0 n g / m l ~ 約 1 0 0 0 n g / m l の濃度で存在するように含まれる、項目8、8Aまたは9Bに記載の培養正常化剤。
- 15 (9 D) 前記 B M P - 7 は、使用時に約 1 0 0 n g / m l ~ 約 1 0 0 0 n g / m l の濃度で存在するように含まれる、項目8、8Aまたは9Bに記載の培養正常化剤。
- 20 (9 E) 前記 B M P - 7 は、使用時に約 1 0 0 0 n g / m l の濃度で存在するように含まれる、項目8、8Aまたは9Bに記載の培養正常化剤。
- (1 0) 前記線維化抑制剤はさらに M A P キナーゼ阻害剤を含む、項目1~8、8A、9、9A、9B、9C、9Dまたは9Eのいずれか1項に記載の培養正常化剤。
- 25 (1 1) 前記 M A P キナーゼ阻害剤は S B 2 0 3 5 8 0 (4 - [4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - メチルスルフィエニル) - 1 H - イミダゾール - 5 - イル] ピリジン) またはその薬学的に許容可能な塩を含む、項目10に記載の培養正常化剤。
- (1 2) 老化抑制剤をさらに含む、項目1~8、8A、9、9A、9B、9C、9D、9E、10または11のいずれか1項に記載の培養正常化剤。
- 30 (1 3) 前記老化抑制剤は、 p 3 8 M A P キナーゼ阻害剤を含む、項目12に記載の培養正常化剤。
- (1 4) 前記老化抑制剤は S B 2 0 3 5 8 0 (4 - [4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - メチルスルフィニルフェニル) - 1 H - イミダゾール - 5 - イル] ピリジン) を含む、項目13に記載の培養正常化剤。
- 35 (1 5) S B 4 3 1 5 4 2 (4 - [4 - (1 , 3 - ベンゾジオキソール - 5 - イル) 2 - ピリジニル) - 1 H - イミダゾール - 2 - イル] ベンズアミド) と、 S B 2 0 3 5 8 0 (4 - [4 - (4 - フルオロフェニル) - 2 - (4 - メチルスルフィニルフェニル) - 1 H - イミダゾール - 5 - イル] ピリジン) またはその薬学的に許容可能な塩とを含む、項目1~8、8A、9、9A、9B、9C、9D、9E、10または11~14のいずれか1項に記載の培養正常化剤。
- 40

(16) 細胞接着促進剤をさらに含む、項目1〜8、8A、9、9A、9B、9C、9D、9E、10または11〜15のいずれか1項に記載の培養正常化剤。

5 (17) 前記細胞接着促進剤は (R) - (+) - トランス - (4 - ピリジル) - 4 - (1 - アミノエチル) - シクロヘキサンカルボキサミドまたはその薬学的に許容可能な塩 (たとえば、Y - 27632 (R) - (+) - トランス - (4 - ピリジル) - 4 - (1 - アミノエチル) - シクロヘキサンカルボキサミド2塩酸1水和物) を含む、項目16に記載の培養正常化剤。

10 (18) 前記線維化抑制剤は、前記角膜内皮細胞の培養の間常に存在させ、他方、前記接着促進剤は、一定期間存在させた後、いったん該接着促進剤を欠損させ、再度該細胞接着促進剤は、一定期間存在させることを特徴とする、項目16または17に記載の培養正常化剤。

15 (19) 前記線維化抑制剤および前記細胞接着促進剤の両方を、前記角膜内皮細胞の培養の間常に存在させることを特徴とする、項目16または17に記載の培養正常化剤。

(20) 前記移植用細胞は、角膜内皮障害の予防または治療のためのものである、項目4〜8、8A、9、9A、9B、9C、9D、9E、10または11〜19のいずれか1項に記載の培養正常化剤。

20 (21) 項目1〜8、8A、9、9A、9B、9C、9D、9E、10または11〜20のいずれかに記載の培養正常化剤と角膜内皮の培養成分とを含む、角膜内皮細胞を正常に培養するための培地。

25 (22) 項目1〜8、8A、9、9A、9B、9C、9D、9E、10または11〜20のいずれかに記載の培養正常化剤、または項目21に記載の培地を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を包含する、角膜内皮細胞を正常に培養する方法。

(23) 項目22に記載の方法で培養される角膜内皮細胞。

(24) 項目1〜8、8A、9、9A、9B、9C、9D、9E、10または11〜20のいずれかに記載の培養正常化剤を含む、角膜内皮細胞の保存液。

30 (25) 項目1〜8、8A、9、9A、9B、9C、9D、9E、10または11〜20のいずれかに記載の培養正常化剤、または項目21に記載の培地を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を包含する、角膜内皮細胞を正常に培養する方法によって生産された角膜内皮細胞を含む、角膜内皮疾患、障害または状態の処置または予防のための医薬。

35 (26) 前記処置または予防は、霊長類の角膜内皮のためのものである、項目25に記載の医薬。

(27) 前記処置または予防は、ヒトの角膜内皮のためのものである、項目25または26に記載の医薬。

(28) 前記角膜内皮細胞は霊長類由来である、項目25〜27のいずれか1項に記載の医薬。

40 (29) 前記角膜内皮細胞はヒト由来である、項目25〜28のいずれか1項に記載の医薬。

(30) 前記角膜内皮疾患、障害または状態が水疱性角膜症または角膜内皮炎である、項目25～29のいずれか1項に記載の医薬。

(31) 前記医薬は、シート状または懸濁物である、項目25～30のいずれか1項に記載の医薬。

5 (32) 細胞接着促進剤をさらに含む、項目24～31のいずれか1項に記載の医薬。

(32A) 前記細胞接着促進剤はRhoキナーゼ阻害剤を含む、項目32に記載の医薬。

10 (33) 前記細胞接着促進剤は (R) - (+) - トランス - (4 - ピリジル) - 4 - (1 - アミノエチル) - シクロヘキサンカルボキサミドまたはその薬学的に許容可能な塩 (たとえば、Y - 27632 (R) - (+) - トランス - (4 - ピリジル) - 4 - (1 - アミノエチル) - シクロヘキサンカルボキサミド2塩酸1水和物)) である、項目32または32Aに記載の医薬。

15 (34) 項目1～8、8A、9、9A、9B、9C、9D、9E、10または11～20のいずれかに記載の培養正常化剤、または項目21に記載の培地を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を包含する、角膜内皮細胞を正常に培養する方法によって生産された角膜内皮細胞を用いる工程を包含する、角膜内皮疾患、障害または状態の処置または予防のための方法。

20 (34A) さらに、項目26～32、32Aおよび33のいずれか1項に記載の特徴を少なくとも1つ有する、項目34に記載の方法。

(35) 細胞接着促進剤を含む、ヒトの角膜内皮疾患、障害または状態の処置または予防のための医薬。

(35A) 前記細胞接着促進剤はRhoキナーゼ阻害剤を含む、項目35に記載の医薬。

25 (36) 前記細胞接着促進剤は (R) - (+) - トランス - (4 - ピリジル) - 4 - (1 - アミノエチル) - シクロヘキサンカルボキサミドまたはその薬学的に許容可能な塩 (たとえば、Y - 27632 (R) - (+) - トランス - (4 - ピリジル) - 4 - (1 - アミノエチル) - シクロヘキサンカルボキサミド2塩酸1水和物)) である、項目35または35Aに記載の医薬。

30 (37) 前記医薬は、項目1～8、8A、9、9A、9B、9C、9D、9E、10または11～20のいずれかに記載の培養正常化剤、または項目21に記載の培地を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を包含する、角膜内皮細胞を正常に培養する方法によって生産された角膜内皮細胞と共に用いられる、項目35、35Aまたは36に記載の医薬。

35 (38) 前記角膜内皮疾患、障害または状態が水疱性角膜症または角膜内皮炎である、項目35、35A、および36～37のいずれか1項に記載の医薬。

(39) 細胞接着促進剤を処置または予防が必要な被験体に投与する工程を包含する、ヒトの角膜内皮疾患、障害または状態の処置または予防のための方法。

40 (39A) 項目35A、および36～38のいずれか1項に記載の特徴を少なくとも1つ有する、項目39に記載の方法。

【 0 0 1 2 】

本発明において、上記 1 または複数の特徴は、明示された組み合わせに加え、さらに組み合わせて提供されることが意図される。本発明のなおさらなる実施形態および利点は、必要に応じて以下の詳細な説明を読んで理解すれば、当業者に認識される。

5 5 発明の効果】

【0013】

本発明は、従来では達成が困難であった正常な機能を保ったまま角膜内皮細胞を増殖させることができる技術を提供する。正常な機能には、ZO-1 および Na⁺/K⁺-ATPase 等の角膜内皮細胞の生化学的機能、霊長類への移植能などが含まれ、角膜移植を実現するための機能を包含する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

図 1】図 1 は、従来法でのカニクイザルおよびヒトの細胞を培養した場合の、形態変化を示す。上側はカニクイザルのものを示し、下側はヒトのものを示す。カニクイザルは DMEM + 10% FBS + 2 ng/ml 塩基性 FGF、ヒトは Opti-MEM 1 Reduced-Serum Medium、Liquid + 8% FBS + 200 mg/ml CaCl₂ · 2H₂O + 0.08% コンドロイチン硫酸 + 20 μg/ml アスコルビン酸 + 50 μg/ml ゲンタマイシン + 5 ng/ml EGF という条件での培養結果である。左は正常角膜内皮の形態を示しているが、長期培養または継代培養により、右の様に容易に形態変化を生じる。

図 2】図 2 は、従来技術で培養した場合に、正常機能を消失することを示す。左パネルは、免疫染色の結果を示す。左側は、正常の形態に培養できたサル角膜内皮細胞 (MC EC) を示し、右側は長期培養により線維芽細胞様に形態変化した MC EC を示す。左パネルの上側には ZO-1 での染色を示し、下側には、Na⁺/K⁺-ATPase での染色を示す。右上パネルは、ウェスタンブロットの結果を示す。右下パネルはリアルタイム PCR の分析結果を示す。右上パネルおよび右下パネルとも、左側は正常の形態に培養できた MC EC を示し、右側は従来の長期培養により線維芽細胞様に形態変化した MC EC を示す。上から Na⁺/K⁺-ATPase、ZO-1 および GAPDH に対する抗体またはプローブでの染色を示す。

図 2A】図 2A は、線維芽霊長類角膜内皮細胞 (CEC) は、異常な細胞外マトリックスを生成することを示し、すなわち、従来技術で培養した場合に、正常機能を消失することを示す。(A) フィブロネクチンおよびコラーゲン 1 型の線維芽細胞表現型および正常な細胞の表現型における発現を示す。上段はフィブロネクチン、下段はコラーゲン 1 型を示す。左側は正常な細胞の表現型を示し、右側は、線維芽細胞表現型を示す。線維芽細胞表現型は、フィブロネクチンおよびコラーゲン 1 型などの過剰の細胞外マトリックスを示した。他方、正常な細胞の表現型は、染色能を完全に喪失した。(B) フィブロネクチンの線維芽細胞表現型および正常な細胞の表現型におけるタンパク質の発現のウェスタンブロットを示す。GAPDH はコントロールである。フィブロネクチンのタンパク質発現レベルは、正常の表現型よりも線維芽細胞の表現型にお

いて強くアップレギュレートされていた。(C) コラーゲン 1 型、4 型、8 型
 フィブロネクチン、インテグリン $\alpha 5$ 、およびインテグリン $\beta 1$ (上から順
 に列挙した。) の線維芽細胞表現型 (右) および正常な細胞の表現型 (左) に
 5 おける半定量PCRの結果を示す。GAPDHはコントロールである。半定量
 PCR分析によって、1型コラーゲン転写物 ($\alpha 1(I)$ mRNA) は線維芽
 細胞表現型において豊富に発現されていたが、他方、正常な表現型においては、
 $\alpha 1(I)$ mRNA の発現は減少していた。基底膜コラーゲン表現型である、
 $\alpha 1(IV)$ mRNA および $\alpha 1(VIII)$ mRNA は、正常表現型および
 10 線維芽細胞表現型の表現型の両方で発現されていたが、正常表現型では発現の
 程度は線維芽細胞表現型よりも少なかった。フィブロネクチンおよびインテグ
 リン $\alpha 5$ の mRNA は線維芽細胞表現型で観察されたが、正常表現型ではこれ
 らの2種のmRNAは発現されなかった。 $\beta 1$ インテグリンのmRNAは、両
 方の表現型で同様のレベルで発現がみられた。

【図3】 図3は、従来法での線維化を示す。3T3フィーダー細胞用の馴
 15 化培地 (Conditioned medium) は線維芽細胞変化 (形質転
 換) を抑制する (中央) が、しかし継代培養をするとやはり形質転換にいたる
 こと (右) を示す。左はヒト角膜内皮細胞を Opti-MEM 1 Reduced-Serum
 Medium, Liquid + 8% FBS + 200 mg
 20 /ml $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ + 0.08% コンドロイチン硫酸 + 20 μg /
 ml アスコルビン酸 + 50 μg /ml ゲンタマイシン + 5 ng/ml 上
 皮増殖因子 (EGF) という条件で培養したところ線維芽細胞様に形質転換し
 たことを示し、中央は同様の培地をマウス由来線維芽細胞である3T3を用い
 た馴化培地としたものでの結果を示す。右は、ヒト角膜内皮細胞を3T3を用
 いた馴化培地にて培養して継代培養を行った7日後の位相差顕微鏡写真である。
 25 細胞は線維芽細胞様に形質転換して重層化した細胞を拡大したものである。こ
 のように従来の培地で継代培養をすると、線維化が生じることが分かる。

【図4】 図4は、サル角膜内皮細胞の線維化した細胞では、Smad経路、
 p38 MAPK経路およびJNK経路が活性化されていることを示す図であ
 30 る。各パネルにおいて左は、正常形態のサル角膜内皮細胞 (MCEC) を示し、
 右は、線維芽細胞様に形態変化したMCECを示す。左側に上からpSmad
 2、Smad2、pERK1/2、ERK1/2に対する抗体でのウエスタン
 ブロットの結果を示し、右側に上からp38、p38、pJNK、JNKに
 35 対する抗体でのウエスタンブロットの結果を示す。なお、ERKのリン酸化は細胞
 の線維化による変化のみではなく、細胞増殖による影響があるために、細胞
 の増殖の状態によっては異なる結果となることがありうることを確認している。

【図5】 図5は、TGF- β シグナルをレセプターのリン酸化阻害剤によ
 り阻害することでサル角膜内皮の形質転換を抑制することができたことを示す
 40 図である。左はカニクイザルの角膜内皮をDMEM + 10% FBS + 2 ng/
 ml 塩基性FGF (本明細書において通常培地ともいう) で培養したところ
 線維芽細胞様に形態変化したことを示し、右には同じ個体からの角膜内を培地
 にTGF- β シグナルをレセプターのリン酸化阻害剤であるSB431542

を加えてで培養した結果を示す。大小不動が少なく、一層の多角形細胞が認められ、線維芽細胞様に形態変化が抑制されていることが理解される。

5 **【図6】** 図6は、TGF- γ シグナル阻害によりサル角膜内皮細胞の線維化による機能関連タンパク質の喪失が抑制されることを示す。左側は、カニクイザルの角膜内皮をDMEM+10%FBS+2ng/ml塩基性FGF(通常培地)で培養したところ線維芽細胞様に形態変化したMCEC、右側はSB431542で処理して正常な形態に培養できたMCECの機能関連マーカーであるZO-1(上側)およびNa⁺/K⁺-ATPase(下側)による免疫染色像を示す。右上パネルは、ウェスタンブロットの結果を示す。右下パネルはリアルタイムPCRの分析結果を示す。右上パネルおよび右下パネルとも、左側はSB431542で処理して正常な形態に培養できたMCECを示し、右側は線維芽細胞様に形態変化したMCECを示す。上からNa⁺/K⁺-ATPase、ZO-1およびGAPDHに対する抗体またはプローブでの染色を示す。

15 **【図7】** 図7は、TGF- β シグナルがサル角膜内皮の形質転換に関与することを確認するために、TGF- α を添加して形質転換を誘導し機能関連タンパクが喪失することを示した図である。上側はコントロールのMCECを示し、下側はTGF- β で処理した細胞での結果を示す。左には位相差顕微鏡写真による細胞形態を示し、中央には、Na⁺/K⁺-ATPaseに対する抗体での染色結果を示し、右にはZO-1に対する抗体での染色結果を示す。

20 **【図8】** 図8は、TGF- β によりサル角膜内皮細胞が線維化し形態変化して機能関連タンパク質を喪失することを示す図である。TGF- β の投与量による変化を示す(左側のパネルでは左から0ng/ml、1ng/ml、3ng/ml、10ng/ml、30ng/mlを示す。右側のパネルでは、左から0ng/ml、1ng/ml、10ng/mlを示す。)。左側上からNa⁺/K⁺-ATPase、ZO-1、およびGAPDHに対する抗体でのウェスタンブロットの結果を示し、右側には上からpSmad2、Smad2に対する抗体での染色結果を示す。

30 **【図9】** 図9は、ヒト角膜内皮においても、TGF- β シグナルをレセプターのリン酸化阻害剤により阻害することで形質転換を抑制し、正常な内皮を培養することが可能であることを示す図である。左はコントロール(通常培地)であり、右はSB431542での染色結果を示す。

35 **【図9A】** 図9Aは、SB431542が、ヒト角膜内皮細胞(HCEC)の機能を維持し、ヒト角膜内皮細胞の線維芽細胞様の変化を抑制することを示す(A、B)。(A)では左は通常の培地にて培養したヒト角膜内皮細胞を示し、右は通常培地にSB431542を1 μ Mの濃度で添加した培地で培養したものを示す。角膜内皮細胞の機能関連マーカーとしてNa⁺/K⁺-ATPase(ポンプ機能)、ZO-1(バリア機能)をマーカーとして免疫染色したところ、通常の培地では一部の細胞でのみこれらのマーカーの発現が認められた一方で、SB431542を加えた培地ではすべての細胞で発現が認められた。(B)では、SB431542を3種類の濃度(右から10 μ M、1 μ Mおよび0.1 μ M)で行ったウェスタンブロットの実験結果を示す。コン

トロールは何も添加していない培地を示す。上から $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 、 $\text{ZO}-1$ および GAPDH (コントロール) の発現を示す。SB431542による TGF レセプターシグナル伝達をブロックすることによって、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ および $\text{ZO}-1$ が細胞膜での細胞内局在が可能になり、それらのタンパク質発現の維持が可能になった。スケールバーは $100\mu\text{m}$ を示す。(C) ELISA アッセイを示す。SB431542を加えたときと加えないときのコラーゲン1型の分泌量を細胞上清における濃度を示す。 ELISA アッセイによって、SB431542が、コラーゲン1型の細胞上清への分泌を顕著にダウンレギュレートしたことを示された。* * $P < 0.05$ 。
 (D, E) 定量PCRを示す。コントロールとして、SB431542 ($1\mu\text{M}$) を加えたときの、コラーゲン1型の発現量の変化 (D) およびフィブロネクチンの発現量の変化 (E) を、 GAPDH の発現のSB431542による発現量の変化を用いて正規化 (すなわち、 GAPDH を 100% にする) したグラフである。SB431542がコラーゲン1型およびフィブロネクチンの発現を mRNA レベルで有意に減少させることを示す。* $P < 0.01$ 、* * $P < 0.05$ 。

【図10】 図10は、SB431542以外の方法でも TGF シグナルを拮抗させヒト角膜内皮の形質転換を抑制することができたことを示す図である。上側の結果は位相差顕微鏡での結果を示す。下側はファロイジン染色の結果を示す (緑色の染色 (細胞の周囲状に網目状となっているものがファロイジンであり、赤色の染色 (粒子状) はPIである。)。左側はOpti-MEM Reduced-Serum Medium, Liquid+8% FBS+200mg/ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ +0.08% コンドロイチン硫酸+20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アスコルビン酸+50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ゲンタマイシン+5ng/ml EGF を培地 (図中では通常培地と表示する) として培養したヒト角膜内皮細胞であり、右側は培地に $100\text{ng}/\text{mL}$ の $\text{BMP}-7$ を添加して培養した結果を示す。

【図10A】 図10Aは、図10で一部強拡大で示したものを $\text{BMP}-7$ の濃度別に効果を検討したものを示す。ここでは、 $\text{BMP}7$ がヒト角膜内皮細胞の線維芽細胞様への変化を抑制し、その機能を維持することを示す。(A) 位相差顕微鏡の写真である。左上は $\text{BMP}-7$ 無添加のコントロール (Controlと表示する。) である。左上が $10\text{ng}/\text{mL}$ 、右下が $100\text{ng}/\text{mL}$ 、左下 $1000\text{ng}/\text{mL}$ の $\text{BMP}-7$ を示す。線維芽細胞の表現型の細長い細胞形は、濃度依存性の様式で $\text{BMP}-7$ の存在下で応答して多角形細胞形態に変換された。スケールバーは $100\mu\text{m}$ である。(B) ファロイジン染色の写真である。左上は $\text{BMP}-7$ 無添加のコントロールである。左上が $10\text{ng}/\text{mL}$ 、右下が $100\text{ng}/\text{mL}$ 、左下 $1000\text{ng}/\text{mL}$ の $\text{BMP}-7$ を示す。 $\text{BMP}-7$ は、通常の六角形の細胞形態を可能にし、アクチンの細胞表層における細胞骨格分布を可能にした。スケールバーは $100\mu\text{m}$ である。(C) (D) それぞれ $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 、 $\text{ZO}-1$ 染色の写真である。左上は $\text{BMP}-7$ 無添加のコントロールである。左上が $10\text{ng}/\text{mL}$ 、右下が $100\text{ng}/\text{mL}$ 、左下 $1000\text{ng}/\text{mL}$ の $\text{BMP}-7$ を示す。 $\text{BMP}-$

7 は、細胞膜における $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ および $\text{ZO}-1$ の細胞内局在を維持した。スケールバーは $100 \mu\text{m}$ である。(E) (F) コントロールおよび $\text{BMP}-7$ の濃度を3種類使用して培養したときの $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 陽性細胞 (E) および $\text{ZO}-1$ 陽性細胞 (F) の割合を示すグラフである。5
 コントロールは無添加である。 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ 陽性細胞および $\text{ZO}-1$ 陽性細胞の両方とも、 $\text{BMP}-7$ で処理した場合に、コントロールに比べて割合が有意に増加していた。 $* P < 0.01$ 、 $** P < 0.05$ 。

【図 11】 図 11 は、p38 MAPK の阻害剤を SB431542 に加えて用いたところ p38 MAPK 阻害 + TGF- β シグナル阻害によりヒト角膜炎細胞が、継代を繰り返しても高密度で形態保持して培養が可能になることを示す図である。左上は、コントロール (図中では通常培地と表示する) であり、右上は SB431542 のみでの結果である。左下は SB203580 のみでの結果であり、右下は SB431542 および SB203580 の両方での結果を示す図である。10

【図 12】 図 12 は、本発明で確立されたヒト角膜炎細胞の標準的な培養法の一例である。上パネルには継代培養の模式図を示し、実施例 8 において実施した培養法 1~3 の模式図を示す。いずれに方法でも、SB203580 および SB431432 を存在させている。培養法 1 は、Y-27632 は 48 時間存在させた後、いったん欠失させ、その後再度加える方法である。培養法 2 では、Y-27632 を常に共存させている。培養法 3 では、Y-27632 は存在させない。15

【図 13】 最終的に確立されたヒト角膜炎細胞培養での結果を示す。左側の写真で示すように、線維化が抑えられ、増殖も順調であることが理解される。右の写真にあるように上側に示す $\text{ZO}-1$ および下側に示す $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ での染色から明らかのように、正常機能が保持されていたことが理解される。20

【図 14】 実施例 9 において、正常な形態に機能を維持して培養したヒト角膜炎細胞をコラーゲンシート上に培養してカニクイザル水疱性角膜炎モデルに移植することで角膜の透明治癒が得られることを示す。左側は、本発明の培養法で培養した細胞のみを移植した結果であり、右側は本発明の培養法で培養した細胞の移植時に ROCK 阻害剤である Y-27632 を注入した場合の結果を示す。25

【図 15】 実施例 9 において、2.5 カ月後に安楽死させ、角膜を摘出して組織を固定した後に、実施例 2 と同様にファロイジンおよび $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ および $\text{ZO}-1$ に対して免疫染色を行い、蛍光顕微鏡にて撮影した結果を示す。上段は、細胞 + ROCK 阻害剤の結果を示し、下段は細胞のみの結果を示す。左側は、ファロイジン (原色は緑色、グレイスケールでは上側では網目状となっており下側では拡散して見える) および DAPI (原色は青色。グレイスケールでは上側では細胞内部が粒子状に染色され、下側でも粒子状であるが、その数は上側と比べて減少しておりファロイジン染色と重複して見える) の染色を示し、中央は $\text{ZO}-1$ (原色は緑色。グレイスケールでは上側では網目状となっており下側では左上と右下に一部残存して見える。) および D 30
 35
 40

A P I (原色は青色。グレイスケールでは上側では細胞内部が粒子状に染色され、下側では粒子状の染色は消え薄く全体に染色されている。)の染色を示し、右側はN a⁺/ K⁺-A T P a s e (原色は緑色。グレイスケールでは上側では網目状となっており下側では中央に一部残存して見える。)およびD A P I (原色は青色。グレイスケールでは上側では細胞内部が粒子状に染色され、下側でも粒子状であるが、その数は上側と比べて減少しておりファロイジン染色と重複して見える)の染色を示す。

【図16】図16は実施例10で行った抗TGF-β中和抗体を用いた場合での培養正常化を示す。左は通常培地での結果を示し、右は抗TGF-β中和抗体での結果を示す。

【図17】図17は実施例11で行ったS m a d 3阻害剤であるC a 1 b i o c h e m社から販売される6,7-ジメトキシ-2-(2E)-3-(1-メチル-2-フェニル-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル-プロプ-2-エノイル)-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノロン(カタログ番号:566405)を用いた場合での培養正常化を示す。左は通常培地での結果を示し、右は抗TGF-β中和抗体での結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0015】

以下、本発明を説明する。本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞(例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など)は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、本明細書において使用される用語は、特に言及しない限り、当該分野で通常用いられる意味で用いられることが理解されるべきである。したがって、他に定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語および科学技術用語は、本発明の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書(定義を含めて)が優先する。

【0016】

(定義)

本明細書において「線維化抑制剤」とは、線維化を抑制する任意の薬剤を言う。本発明で使用される線維化抑制剤は、トランスフォーミング増殖因子(TGF)-βシグナル阻害剤、分裂促進因子(マイトージエン)活性化タンパク質キナーゼ(MAPK)38抑制剤、インターロイキン(IL)-12、IL-10、インターフェロン(IFN)-γ、またはBMP-7(OP-1)などの、抗線維化作用を有することが知られているサイトカイン等を挙げることができる。このようなサイトカイン類等の情報は、公的データベース、例えばGenBank、雑誌刊行物などから入手することができる。理論に束縛されることを望まないが、本発明では、線維化を抑制することによって、従来は、正常な機能を有する細胞の増殖が困難であった角膜内皮細胞の顕著な増加を達成することができた。したがって、本発明に用いられる線維化抑制剤は、正常

な機能を有する細胞の増殖をもたらすものである限り、どのような薬剤でも用いられることが理解される。

【 0 0 1 7 】

例えば、様々な哺乳動物 I F N - γ ポリペプチドがヒト疾患の治療に使用されうるが、一般に、ヒトの角膜内皮細胞のためには、ヒトタンパク質が使用される。ヒト I F N - γ コード配列は、G e n B a n k アクセッション番号 P 0 1 5 7 9 および C A A 0 0 3 7 5 において見出されうる。対応するゲノム配列は、G e n B a n k アクセッション番号 J 0 0 2 1 9、M 3 7 2 6 5、および V 0 0 5 3 6 において見出されうる。例えば Gray et al. (1982) Nature 295: 501 (GenBank X13274) ; および Rinderknecht et al. (1984) J. Biol. Chem. 259 6790 を参照。

【 0 0 1 8 】

あるいは、線維化抑制剤として、ベラパミルなどのカルシウムチャネル遮断薬を用いることができる。そのような線維化抑制剤は、コラーゲン I 型の合成を減らす能力のみならず、コラーゲン I 型線維の分解の刺激による抗線維化作用を有し得る。線維芽細胞についての *in vitro* 試験は、コラーゲンの細胞外輸送が、カルシウムの存在に依存することを示す。カルシウムチャネル遮断薬であるベラパミルは、細胞内カルシウム濃度を低下させて、コラーゲナーゼ活性を増加させる。それはまた、線維芽細胞の増殖を阻害する。

【 0 0 1 9 】

本明細書において「トランスフォーミング増殖因子 - β (トランスフォーミング成長因子 - β ; 略称 T G F - β とともに表示される)」とは、当該分野で用いられるものと同様の意味で用いられ、様々な硬化性疾患や、関節リウマチ、増殖性硝子体網膜症の病態形成を担い、脱毛に深く関与し、免疫担当細胞の働きを抑制する一方、プロテアーゼの過剰産生を抑制することによって肺組織が分解され肺気腫に陥るのを防ぎ、癌細胞の増殖を抑制するなど、多彩な生物活性を示す分子量 25 k D のホモダイマー多機能性サイトカインである。ヒトでは、T G F - β 1 ~ 3 までの 3 つのアイソフォームが存在する。T G F - β はレセプターに結合できない分子量約 300 k D の不活性な潜在型として産生され、標的細胞表面やその周囲において活性化されてレセプターに結合できる活性型となり、その作用を発揮する。

【 0 0 2 0 】

理論に束縛されることを望まないが、標的細胞における T G F - β の作用は S m a d という情報伝達を担う一連のタンパク質のリン酸化経路によって伝達されるとされている。まず、活性型 T G F - β が標的細胞表面に存在する I I 型 T G F - β レセプターに結合すると、I I 型レセプター 2 分子と I 型 T G F - β レセプター 2 分子からなるレセプター複合体が形成され、I I 型レセプターが I 型レセプターをリン酸化する。次に、リン酸化 I 型レセプターは、S m a d 2 または S m a d 3 をリン酸化すると、リン酸化された S m a d 2 および S m a d 3 は S m a d 4 と複合体を形成して核に移行し、標的遺伝子プロモーター領域に存在する C A G A b o x と呼ばれる標的配列に結合し、コアクチベーターとともに標的遺伝子の転写発現を誘導するとされている。

【 0 0 2 1 】

形質転換増殖因子- β (TGF- β) シグナル伝達経路は、その標的遺伝子の調節によって、細胞増殖および分化、増殖停止、アポトーシス、ならびに上皮間充織分化転換 (EMT) といったような、多くの細胞活性を調節することができる。TGF- β 自体 (例えば、TGF- β 1、TGF- β 2 および TGF- β 3)、アクチビンおよび骨形成タンパク質 (BMP) が含まれる、TGF- β ファミリーのメンバーは、細胞増殖、分化、移動およびアポトーシス等の強力な調節剤である。

【 0 0 2 2 】

TGF- α は、Bリンパ球、Tリンパ球および活性化マクロファージを含め、多くの細胞により、および多くの他の細胞型により産生される、約 24 Kd のタンパク質である。免疫系に対する TGF- α の効果の中には、IL-2 レセプター誘導、IL-1 誘発性胸腺細胞増殖の阻害、および IFN- γ 誘発性マクロファージ活性化の遮断がある。TGF- β は、様々な病的状態に関与すると考えられており (Border et al. (1992) J. Clin. Invest. 90:1)、そして腫瘍抑制物質または腫瘍プロモーターのいずれかとして機能することが十分裏付けられている。

【 0 0 2 3 】

TGF- β は、2つのセリン/スレオニンキナーゼ細胞表面レセプターである TGF- β RI I および ALK 5 によって、そのシグナル伝達を媒介する。TGF- β シグナル伝達は、TGF- β RI I が ALK 5 レセプターをリン酸化するのを可能とする、リガンド誘発性レセプター二量体化で開始される。そのリン酸化は、ALK 5 キナーゼ活性を活性化して、活性化 ALK 5 は次に、下流エフェクター Smad タンパク質 (MAD の脊椎動物相同体、または Mothers against DPP (デカペンタプレジック) タンパク質)、Smad 2 または 3 をリン酸化する。Smad 4 との p-Smad 2/3 複合体は、核に入って、標的遺伝子の転写を活性化する。

【 0 0 2 4 】

Smad 3 は、Smad の R-Smad (レセプター 活性化 Smad) サブグループのメンバーであって、TGF- β レセプターによる転写活性化の直接メディエーターである。TGF- β 刺激は、Smad 2 および Smad 3 のリン酸化および活性化をもたらし、これらは、Smad 4 (脊椎動物における 共通 (common) Smad) または 「co-Smad」) と複合体を形成し、これが核と共に蓄積して、標的遺伝子の転写を調節する。R-Smad は、細胞質に局在し、そして TGF- β レセプターによるリガンド誘発性リン酸化で、co-Smad と複合体を形成して、核へと移動し、ここで、それらは、クロマチンおよび協同転写因子と関連のある遺伝子発現を調節する。Smad 6 および Smad 7 は阻害性 Smad (「I-Smad」) であり、すなわち、TGF- β により転写的に誘発されて、TGF- β シグナル伝達の阻害剤として機能する (Feng et al. (2005) Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 21: 659)。Smad 6/7 は、R-Smad のレセプター媒介活性化を妨げることにより、それらの阻害効果を発揮する ; それらは、R-Smad の動員

およびリン酸化を競合的に妨げる、I型レセプターと関連する。Smad6およびSmad7は、Smad6/7相互作用タンパク質のユビキチン化および分解をもたらす、E3ユビキチンリガーゼを補充することが知られている。

[0025]

- 5 TGF- β シグナル伝達経路は、このほか、BMP-7などによって伝達される経路も存在し、これは、ALK-1Z2/3/6を経由し、Smad1Z5/8を介して機能が発現されるとされている。TGF- β シグナル伝達経路について、J. Massagué, Annu. Rev. Biochem. 1998. 67: 753-91; Vilar JMG, Jansen R, Sander C (2006) PLoS Comput Biol 2(1) e3; Leask, A., Abraham, D. J. FASEB J. 18 816-827 (2004); Coert Margadant & Arnoud Sonnenberg EMBO reports (2010) 11, 97-105; Joel Rosenbloom et al., Ann Intern Med. 2010; 152: 159-166等を参照のこと。

[0026]

- 15 本明細書において「トランスフォーミング増殖因子(TGF)- β シグナル阻害剤」とは、TGFシグナル伝達を阻害する任意の因子をいう。TGF- β について拮抗する場合はアンタゴニストという場合もあるが、本発明についていう場合TGF- β アンタゴニストはTGF- β シグナル阻害剤に包含される。

- 20 **[0027]**

したがって、代表的には、本発明において用いられるTGF- β シグナル阻害剤としては、TGF- β のアンタゴニスト、TGF- β のレセプターのアンタゴニスト、またはSmad3の阻害剤が挙げられるがそれらに限定されない。

- 25 **[0028]**

- 本発明で用いられる例示的なTGF- β シグナル阻害剤としては、SB431542(4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)2-ピリジニル]-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミド)、BMP-7、抗TGF- β 抗体、抗TGF- β レセプター抗体、TGF- β のsiRNA、TGF- β レセプターのsiRNA、TGF- β のアンチセンスオリゴヌクレオチド、6,7-ジメトキシ-2-((2E)-3-(1-メチル-2-フェニル-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル)プロペ-2-エニル)-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノロン、A83-01(3-(6-メチル-2-ピリジニル)-N-フェニル-4-(4-キノリニル)-1H-ピラゾール-1-カルボチオアミド)、ステモレキュールTMTLKインヒビター(2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5-ナフチリジン)、ステモレキュールTMBMPインヒビターLDN-193189(6-(4-(ピペリジン-1-イル)エトキシ)フェニル)-3-(ピリジン-4-イル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン)、SD-208(2-(5-クロロ-2-フルオロフェニル)-4-[4-(4-ピリジニル)アミノ]プテリジン)、LY364947(4-[3-(2-ピリジニル)-1H-ピラゾール-4-イル]-キノリン)、それらの
- 30
- 35
- 40

薬学的に許容可能な塩もしくは溶媒和物、またはその薬学的に受容可能な塩の溶媒和物等を挙げることができるがこれらに限定されない。

【0029】

このほかのTGF- β シグナル阻害剤としては、TGF- β の1つまたは
 5 複数のアイソフォームに対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体
 (米国特許第5,571,714号;国際公開第97/13844号および国
 際公開第00ズ66631号もまた参照)、TGF- β レセプター、そのよう
 なレセプターの可溶性形態(例えば、可溶性TGF- β III型レセプター)、
 10 またはTGF- β レセプターに対して向けられる抗体(米国特許第5,693,
 607号、米国特許第6,001,969号、米国特許第6,010,872
 号、米国特許第6,086,867号、米国特許第6,201,108号;国
 際公開第98/48024号;国際公開第95/10610号;国際公開第9
 3/09228号;国際公開第92/00330号)、潜在性関連ペプチド
 (国際公開第91/08291号)、大きな潜在型TGF- β (国際公開第9
 15 4/09812号)、フエチユイン(米国特許第5,821,227号)、デ
 コリンならびにバイグリカン、フィブロモジュリン、ルミカン、およびエンド
 ダリンなどの他のプロテオダリカン(国際公開第91Z10727号;米国特
 許第5,654,270号、米国特許第5,705,609号、米国特許第5,
 20 726,149号;米国特許第5,824,655号;国際公開第91/04
 748号;米国特許第5,830,847号、米国特許第6,015,693
 号;国際公開第91/10727号;国際公開第93/09800号;および
 国際公開第94/10187号)、ソマトスタチン(国際公開第98/085
 29号)、マンノース-6-リン酸またはマンノース-1-リン酸(米国特許
 25 第5,520,926号)、プロラタチン(国際公開第97/40848号)、
 インスリン様成長因子II(国際公開第98/17304号)、IP-10
 (国際公開第97/00691号)、Arg-Gly-Asp含有ペプチド
 (Pfeffer、米国特許第5,958,411号;国際公開第93/10
 808号)、植物、菌類、および細菌の抽出物(EP-A-813875;特
 30 許第5,693,610号)、アンチセンスオリゴヌクレオチド(米国特許第
 5,683,988号;米国特許第5,772,995号;米国特許第5,8
 21,234号、米国特許第5,869,462号;および国際公開第94/
 25588号)、SmadおよびMADを含む、TGF- β シグナル伝達に関
 与するタンパク質(EP-A-874046;国際公開第97/31020
 35 号;国際公開第97Z38729号;国際公開第98/03663号;国際公
 開第98Z07735号;国際公開第98/07849号;国際公開第98/
 45467号;国際公開第98/53068号;国際公開第98/55512
 号;国際公開第98/56913号;国際公開第98Z53830号;国際公
 40 開第99Z50296号;米国特許第5,834,248号;米国特許第5,
 807,708号;および米国特許第5,948,639号)、Skiおよび
 Sno(Vogel、1999、Science、286:665;およびS
 troschein et al.、1999、Science、286:7

71〜774)、その同起源のレセプターへのTGF- β の結合を阻害するまたはそれに干渉するのに適している、1つまたは複数の一本鎖オリゴヌクレオチドアプタマーまたはそれをコードする発現プラスミド、ならびにTGF- β の活性を阻害する能力を保持する、上記に同定される分子の任意の変異体、断片、または誘導体を含むが、これらに限定されない。TGF- β 阻害剤は、TGF- β アンタゴニストであり得、そのレセプターへのTGF- β 結合を遮断するヒトモノクローナル抗体またはヒト化モノクローナル抗体(またはF(ab)₂断片、Fv断片、単鎖抗体、およびTGF- β に結合する能力を保持する抗体の他の形態もしくは断片などのその断片)であり得る。TGF- β レセプターおよびTGF- β レセプターのTGF- β 結合断片、とりわけ、可溶性断片は、本発明の方法における有用なTGF- β アンタゴニストである。ある実施形態において、TGF- β 機能の好ましい阻害剤は、可溶性TGF- β レセプター、とりわけ、例えば、TGFBIIRまたはTGFBIIRの細胞外ドメイン、好ましくは組換え可溶性TGF- β レセプター(rsTGFBIIRまたはrsTGFBIIR)を含む、TGF- β II型レセプター(TGFBIIR)またはTGF- β III型レセプター(TGFBIIRもしくはベータダリカン)である。TGF- β レセプターおよびTGF- β レセプターのTGF- β 結合断片、とりわけ、可溶性断片は、本発明の方法における有用なTGF- β アンタゴニストである。TGF- β レセプターおよびそれらをコードする核酸は、当技術分野において十分に知られている。TGF- β 1型レセプターをコードする核酸配列は、GenBankアクセッション番号L15436および米国特許第5,538,892号(Donahoe et al.)において開示される。TGF- β 2型レセプターの核酸配列は、GenBankアクセッション番号AW236001、A135790、A1279872、A1074706、およびAA808255の下で公的に入手可能である。TGF- β 3型レセプターの核酸配列もまた、GenBankアクセッション番号NM003243、A1887852、A1817295、およびA1681599の下で公的に入手可能である。

【0030】

またさらなる他のTGF- β シグナル阻害剤またはアンタゴニストおよびそれらの製造方法は、現在開発中のより多くのものと共に、当該分野で十分知られている。有効なTGF- β アンタゴニストはいずれも、本発明の方法において有用であり得ることから、使用する特異的TGF- β シグナル阻害剤またはアンタゴニストは、限定的な特徴のものではない。そのようなアンタゴニストの例には、1つまたはそれより多いアイソタイプのTGF- β に対するモノクローナルおよびポリクローナル抗体(米国特許第5,571,714号および国際公開97/13844)、TGF- β レセプター、そのフラグメント、その誘導体、およびTGF- β レセプターに対する抗体(米国特許第5,693,607号、同第6,008,011号、同第6,001,969号および同第6,010,872号、ならびに国際公開92Z00330、国際公開93Z09228、国際公開95/10610および国際公開98/48024)；潜伏関連ペプチド(latency associated peptide

e ; 国際公開 9 1 / 0 8 2 9 1) 、 l a r g e l a c e n t T G F - β (国際公開 9 4 / 0 9 8 1 2) 、 フエチユイン (米国特許第 5 , 8 2 1 , 2 2 7 号) 、 デコリン、ならびにバイグリカン、フィプロモジユリン、ルミカンおよびエンドダリンといったような他のプロテオダリカン (米国特許第 5 , 5 8 3 , 1 0 3 号、同第 5 , 6 5 4 , 2 7 0 号、同第 5 , 7 0 5 , 6 0 9 号、同第 5 , 7 2 6 , 1 4 9 号、同第 5 , 8 2 4 , 6 5 5 号、同第 5 , 8 3 0 , 8 4 7 号、同第 6 , 0 1 5 , 6 9 3 号、ならびに国際公開 9 1 / 0 4 7 4 8 、 国際公開 9 1 / 1 0 7 2 7 、 国際公開 9 3 / 0 9 8 0 0 および国際公開 9 4 / 1 0 1 8 7) が含まれる。

10 **【 0 3 1 】**

そのようなアンタゴニストのさらなる例には、ソマトスタチン (国際公開 8 / 0 8 5 2 9) 、 マンノース-6-リン酸またはマンノース-1-リン酸 (米国特許第 5 , 5 2 0 , 9 2 6 号) 、 プロラタチン (国際公開 9 7 / 4 0 8 4 8) 、 インスリン様増殖因子 I I (国際公開 9 8 / 1 7 3 0 4) 、 I P - 1 0 (国際公開 9 7 / 0 0 6 9 1) 、 アルギニン (a r g) - ダリシン (g 1 y) - アスパラギン酸 (a s p) 含有ペプチド (米国特許第 5 , 9 5 8 , 4 1 1 号および国際公開 9 3 / 1 0 8 0 8) 、 植物、真菌類および細菌類の抽出物 (欧州特許出願第 8 1 3 8 7 5 号、特開平 8 - 1 1 9 9 8 4 号および米国特許第 5 , 6 9 3 , 6 1 0 号) 、 アンチセンスオレゴヌクレオチド (米国特許第 5 , 6 8 3 , 9 8 8 号、同第 5 , 7 7 2 , 9 9 5 号、同第 5 , 8 2 1 , 2 3 4 号および同第 5 , 8 6 9 , 4 6 2 号、ならびに国際公開 9 4 / 2 5 5 8 8) 、 ならびに S m a d および M A D (欧州特許出願 E P 8 7 4 0 4 6 、 国際公開 9 7 / 3 1 0 2 0 、 国際公開 9 7 / 3 8 7 2 9 、 国際公開 9 8 / 0 3 6 6 3 、 国際公開 9 8 / 0 7 7 3 5 、 国際公開 9 8 / 0 7 8 4 9 、 国際公開 9 8 / 4 5 4 6 7 、 国際公開 9 8 Z 5 3 0 6 8 、 国際公開 9 8 / 5 5 5 1 2 、 国際公開 9 8 Z 5 6 9 1 3 、 国際公開 9 8 / 5 3 8 3 0 および国際公開 9 9 / 5 0 2 9 6 、 ならびに米国特許第 5 , 8 3 4 , 2 4 8 号、同第 5 , 8 0 7 , 7 0 8 号および同第 5 , 9 4 8 , 6 3 9 号) 、 ならびに S k i および S n o (G . V o g e l , S c i e n c e , 2 8 6 : 6 6 5 (1 9 9 9) および S t r o s c h e i n e t a l . , S c i e n c e , 2 8 6 : 7 7 1 - 7 4 (1 9 9 9)) 、 ならびに T G F - γ の活性を阻害する能力を保持する上記分子のいずれかのフラグメントおよび誘導体を含め、TGF- γ シグナル伝達に関与する他のタンパク質の宿主が含まれる。

30 **【 0 3 2 】**

35 本発明における使用のための適した T G F - β アンタゴニストはまた、TGF- β の量または活性を阻害するそれらの能力が保持される限り、前述の T G F - β アンタゴニストの機能的変異体、変異体、誘導体、および類似体をも含む。本明細書において使用される「変異体」、「誘導体」、「および類似体」は、親化合物に対して同様の形または構造を有し、TGF- β アンタゴニストとして作用する能力を保持する分子を指す。例えば、本明細書において開示される T G F - β アンタゴニストのいずれも、結晶化されてもよく、有用な類似体は、(1つまたは複数の)活性部位の形のための担う座標に基づいて合理的

40

に設計され得る。その代わりに、当業者は、不必要な実験を伴うことなく、知られているアンタゴニストの官能基を改変し得、あるいは活性、半減期、生物学的利用能、または他の望ましい特徴の増加についてそのような改変分子をスクリーニングし得る。TGF- β アンタゴニストがポリペプチドである場合、

5 ポリペプチドの断片および改変体は、送達の容易さ、活性、半減期などを増加させるために産生され得る（例えば、上記に議論されるようなヒト化抗体または機能的抗体断片）。合成および組換えポリペプチドの産生の当技術分野における技術のレベルを考慮すれば、そのような改変体は、不必要な実験を伴うことなく、達成される可能性がある。当業者らはまた、本明細書において記載されるTGF- β 阻害剤の結晶構造およびノまたは活性部位についての知識に基づいて新規な阻害剤を設計してもよい。可溶性TGF- β レセプターなどのポリペプチド阻害剤はまた、遺伝子移入を介して有効に導入され得る。したがって、本発明の方法のある実施形態は、TGF- β レセプターまたは結合パートナー、好ましくは可溶性レセプターまたは可溶性結合パートナーの発現のための適したベクターの使用を含む。ある好ましい実施形態において、可溶性TGF- β アンタゴニストの投与は、可溶性アンタゴニストをコードするcDNA、

10 あるいは、TGF- β II型レセプター (rsTGFBIIR) またはTGF- β I型レセプター (rsTGFBIIR) の細胞外ドメインをコードするcDNAを含むベクターを使用する遺伝子移入によって達成することができ、このベクターは、ベクターを用いて形質移入される細胞中で可溶性TGF- β アンタゴニストの *in situ* 発現を引き起こし、TGF- β の活性を阻害し、TGF- β 媒介性の線維形成を抑制する。任意の適したベクターを使用することができる。好ましいベクターは、遺伝子移入の目的で開発されたアデノウイルスベクター、レンチウイルスベクター、エプスタインバーウイルス (EBV) ベクター、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター、およびレトロウイルスベクターを含む。遺伝子移入の他の非ベクター方法、例えば脂質/DNA複合体、タンパク質/DNA抱合体、裸のDNAの移入方法などもまた使用することができる。アデノウイルス遺伝子移入を介しての送達のために開発されたさらなる適したTGF- β アンタゴニストは、IgFcドメインに融合された、TGF- β II型レセプターの細胞外ドメインをコードするキメラcDNA (Isaka et al., 1999, *Kidney Int.*, 55 :p p. 465~475)、TGF- β I型レセプターのドミナントネガティブ変異体のアデノウイルス遺伝子移入ベクター (Zhao et al., 1998, *Mech. Dev.*, 72 :p p. 89~100)、および

20 TGF- β 結合プロテオダリカンであるデコリンのアデノウイルス遺伝子移入ベクター (Zhao et al., 1999, *Am. J. Physiol.*, 277 :p p. L412~L422) を含むが、これらに限定されない。アデノウイルス媒介性の遺伝子移入は、他の遺伝子送達様式と比較して、効率が非常に高い。

【033】

TGF- β レセプターおよびTGF- β レセプターのTGF- β 結合フラグメント、可溶性フラグメント等は、本発明において有用なTGF- β アンタ

ゴニストである。TGF- β レセプターおよびそれらをコードする核酸は、当該分野で十分知られている。TGF- β 1型レセプターをコードする核酸配列は、GenBankのアクセッション番号L15436およびDonahoeらの米国特許第5,538,892号に開示されている。TGF- β 2型レセプターの核酸配列は、GenBankのアクセッション番号AW236001; A135790; A1279872; A1074706; およびAA808255の下、公的に入手可能である。TGF- β 3型レセプターの核酸配列もまた、GenBankのアクセッション番号NM003243; A1887852; A1817295; およびA1681599の下、公的に入手可能である。1つの例示的な実施形態において、TGF- β アンタゴニストは、そのレセプター、またはF(ab)₂フラグメント、Fvフラグメント、単鎖抗体、およびTGF- β に結合する能力を保持する他の「抗体」型といったようなそのフラグメントへのTGF- β 結合を遮断する抗体である。その抗体は、キメラ化またはヒト化され得る。本明細書中、キメラ化抗体は、ヒト抗体の定常領域、およびマウス抗体といったような非ヒト抗体の可変領域を含む。ヒト化抗体は、ヒト抗体の定常領域およびフレームワーク可変領域（すなわち、超可変領域以外の可変領域）、ならびにマウス抗体といったような非ヒト抗体の超可変領域を含む。勿論、その抗体は、ファージ提示システムから選択されるもしくは選抜されるか、またはゼノマウスから産生されるヒト抗体といったような、いずれかの他の種類の抗体誘導體であり得る。

[0034]

Smad関連の知見も増大している。TGF- β シグナル伝達経路は、この分子がタイプI (TbRI) およびタイプII (TbRII) のセリン/スレオニンキナーゼ受容体からなるヘテロ二量体細胞表面複合体に結合し、そしてこのヘテロ二量体細胞表面複合体を誘起するときに開始される。ついでこのヘテロ二量体受容体は、前記のシグナルを下流の標的Smadプロテインのリン酸化を通じて前記のシグナルを伝播する。上述のように、Smadタンパク質には三つの機能クラスがあり、それらは、例えばSmad2及びSmad3のような、レセプターにより制御されるSmad (R-Smad)、Smad4とも呼ばれるコメディエーター (Co-Smad) および阻害Smad (I-Smad) である。このヘテロ二量体受容体複合体によるリン酸化に続いて、このR-SmadがこのCo-Smadと複合体を形成し、そして前記の核に移り、他の各タンパク質と連携して、それらは標的遺伝子の転写を調節する (Derynck, R., et al. (1998) Cell 95: 737-740); Massague, J. and Wotton, D. (2000) EMBO J. 19:1745)。ヒトSmad3のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi: 42476202に開示されている。ネズミSmad3のヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、例えばGenBank Accession No. gi: 31543221に開示されている。上述のように、TGF- β 刺激は、Smad2およびSmad3のリン酸化および活性化をもたらす、これらは、Smad4 (「common Smad」または「Co-Smad」とも称する) と複合体を形成し、これが核と共に蓄積して、標的遺伝子

の転写を調節する。したがって、TGF- α シグナル阻害は、Smad2、3
 またはco-Smad (Smad4) の阻害によっても達成されうる。R-S
 madは、細胞質に局在し、そしてTGF- β レセプターによるリガンド誘発
 性リン酸化で、co-Smadと複合体を形成して、核へと移動し、ここで、
 5 それらは、クロマチンおよび協同転写因子と関連のある遺伝子発現を調節する。
 したがって、R-Smadを直接または間接に阻害することによってもTGF-
 - β シグナル阻害が達成されうる。Smad6およびSmad7は阻害性Sm
 ad (I-Smad) であり、すなわち、TGF- β により転写的に誘発され
 て、TGF- α シグナル伝達の阻害剤として機能する (Feng ら (2005)
 10 Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 21: 659)。Smad6/7は、R-Smadの
 受容体媒介活性化を妨げることにより、それらの阻害効果を発揮する。それら
 は、R-Smadの動員およびリン酸化を競合的に妨げる、I型受容体と関連
 する。Smad6およびSmad7は、Smad6/7相互作用タンパク質の
 ユビキチン化および分解をもたらす、E3ユビキチンリガーゼを補充すること
 15 が知られている。したがって、Smad6および7は、本発明においてTGF-
 - β シグナル阻害剤として機能しうる。

【0035】

本発明において使用されうるSmad3の阻害剤としては、アンチセンスヌ
 クレオチド、siRNA、抗体等のほか、低分子化合物として、Ca1bio
 20 chemから販売される6,7-ジメトキシ-2-((2E)-3-(1-メ
 チル-2-フェニル-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル)プロ
 プ-2-エノイル)-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノロンなどを挙
 げることができるがそれらに限定されない。

【0036】

本明細書において角膜内皮細胞の「培養正常化」とは、角膜内皮細胞が本来
 有している機能 (本明細書では「正常(な)機能」ともいう。)等の特徴を少
 なくとも1つは維持しながら培養をすることをいう。そのような機能としては、
 ZO-1およびNa⁺/K⁺-ATPase、角膜移植への適応能 (Matsubara
 M, Tanishima T: Wound-healing of the cornea endothelium in
 30 the monkey: a morphometric study, Jpn J Ophthalmol 1982, 26:264-
 273; MatsubaraM, Tanishima T: Wound-healing of corneal
 endothelium in monkey: an autoradiographic study, Jpn J
 Ophthalmol 1983, 27:444-450; Van Horn DL, Hyndiuk RA:
 Endothelial wound repair in primate cornea, Exp Eye Res 1975,
 35 21:113-124 および VanHorn DL, Sendele DD, Seideman S, Bucu PJ:
 Regenerative capacity of the corneal endothelium in rabbit and
 cat, Invest Ophthalmol Vis Sci 1977, 16:597-613) 等が挙げられる
 がそれらに限定されない。すなわち、「正常な機能」は、角膜移植を実現する
 のに必要な機能または十分であることを示す指標でありうるということが理解される。

【0037】

角膜移植への適応能は、通常ウサギ等の実験動物においても水疱性角膜症モ
 デルとして角膜内皮を機械的に搔爬して、培養細胞の移植試験を行うことがで

きる。しかしながら、ウサギの角膜内皮細胞は生体内で増殖するため、ホストの角膜内皮細胞の増殖による自然治癒の可能性を否定できない (Matsubara M, et al., Jpn J Ophthalmol 1982, 26:264-273 ;Matsubara M, et al., Jpn J Ophthalmol 1983, 27:444- 450 ; Van Horn DL, et al., Exp Eye Res1975 , 21:113-124 および Van Horn DL, et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 1977, 16: 597-613) 。したがって、より正確な移植適応能を評価するためには、霊長類への生着を評価することが好ましい。ヒトへの移植適応能を評価する場合は、霊長類であるカニクイザルなどにおいて、例えば、少なくとも1ヶ月、好ましくは少なくとも2ヶ月、より好ましくは少なくとも3ヶ月、さらに好ましくは少なくとも6ヶ月、さらにより好ましくは少なくとも12ヶ月経過させた後の適応性を評価する。サル等の霊長類での移植適応能を確認することは特にヒトへの適用において重要である。

【0038】

本明細書において「培養正常化剤」とは、培養中に生じうる、角膜内皮細胞等の正常な機能等の特徴の喪失を防止するための薬剤をいう。培養正常化剤がその機能を発揮したというためには、本明細書に記載されるような角膜内皮細胞の正常な機能が維持されているか、あるいは低下幅が減少していることを1つでも試験することによって確認することができる。例えば、正常化の判断方法としては、Z O - 1 および $Na^+ / K^+ - ATPase$ のような角膜内皮細胞における機能タンパク質を指標としてその発現の変化を見たり、あるいはサル等への移植によって生着し、機能するかどうかを調べることによって実行することができる。移植による判断方法は以下のとおりに行なうことができる。すなわち、I型コラーゲン上に角膜内皮培養して培養角膜内皮シートを作製する。全身麻酔下でカニクイザルの角膜輪部を1.5mm切開してシリコン製の手術器具を前房内に挿入して角膜内皮細胞を機械的に搔爬して水疱性角膜症モデルを作製する。続いて角膜輪部を5—6mm切開して培養角膜内皮シートを前房内に挿入し、前房を空気で置換することでシートを角膜内皮面に接着させる。培養角膜内皮シートの移植による水疱性角膜症の治療効果は細隙灯顕微鏡による角膜透明性の評価にて行う。

【0039】

本明細書において「細胞分裂因子 (マイトージェン) 活性化タンパク質 (MAP) キナーゼ阻害剤」とは、MAPキナーゼのシグナル伝達経路を直接または間接に阻害する任意の阻害剤をいう。したがって、MAPキナーゼ阻害剤は、マイトージェン活性化タンパク質を標的とし、低下させる、または阻害する化合物に関する。MAPキナーゼは、様々な細胞外刺激に应答して活性化され、細胞表面から核へのシグナル伝達を仲介するタンパク質セリンダスレオニンキナーゼ群である。それらは、炎症、アポトーシスによる細胞死、発癌性形質転換、腫瘍細胞侵襲、および転移を含む、いくつかの生理的および病理学的細胞現象を制御する。

【0040】

本発明による有用なMAPキナーゼ阻害剤は、いずれのMAPキナーゼ因子、例えば、限定されるものでないが、MAPK、ERK、MEK、MEKK、E

RK1、ERK2、Raf、MOS、p21ras、GRB2、SOS、JNK、c-jun、SAPK、JNKK、PAK、RAC、およびp38を阻害するものであり得る。MAPキナーゼ阻害剤の例は、限定されるものでないが、PD184352、VX-745、SB202190、アニソマイシン、PD98059、SB203580、U0126、AG126、アピゲニン、HSP25キナーゼ阻害剤、5-ヨードツベルシジン、MAPキナーゼアンチセンスオリゴヌクレオチド、コントロールMAPキナーゼオリゴヌクレオチド、MAPキナーゼカスケード阻害剤、MAPキナーゼ阻害剤セット1、MAPキナーゼ阻害剤セット2、MEK阻害剤セット、オロモウシン (O1omoucine)、イソオロモウシン、N⁹イソプロピルオロモウシン、p38 MAPキナーゼ阻害剤、PD169316、SB202474、SB202190塩酸塩、SB202474二塩酸塩、SB203580スルホン、lotó-SB203580、SB220025、SC68376、SKF-86002、チルホスチン (Tyrophostin) AG126、U0124、U0125、およびZM336372を含む。Ca1BioChemカタログのページixxviii; <http://www.tocris.com/>; および <http://www.vpharm.com/frame09.html> を参照。

【0041】

MAPキナーゼはセリソ/トレオンキナーゼのファミリーを記載するために使われる一般名である。MAPキナーゼはまた、細胞外シグナル調節性プロテインキナーゼ (extracellular signal-regulated protein kinases) またはERKとも呼ばれ、3キナーゼカスケードの末端酵素である。関係するが区切られたシグナル伝達経路に対する3キナーゼカスケードの反復が、一経路内で逐次的に作用するモジュール多機能シグナル伝達要素としてのMAPK経路の概念を生み、この経路ではそれぞれの酵素がリン酸化してそれによりシーケンスの次のメンバーを活性化することが特徴である。このようにして、標準的MAPKモジュールは3つのプロテインキナーゼからなる。すなわち、あるMAPKキナーゼ (またはMEK) があるMAPKキナーゼ (またはMEK) を活性化し、これが、順に、あるMAPKZERK酵素を活性化する。MAPKZERK、JNK (c-junアミノ末端プロテインキナーゼ (またはSAPK))、およびp38カスケードは、それぞれMEKK、MEKおよびERK。またはMAPKスーパーファミリーメンバーを含む3つの酵素モジュールからなる。様々な細胞外シグナルはそれらのそれぞれの細胞表面レセプターと連合すると初期事象をトリガーし、次いでこのシグナルが細胞内部に伝達され、そこで適切なカスケードを活性化する。

【0042】

MAPKはマイトーゲン活性化プロテインキナーゼ (またはERK) スーパーファミリーであって、TXYコンセンサス配列を触媒コアに有する。ERK1/2、p38HOG、およびJNKZSAPKは、平行経路における関係するが別個の末端酵素である。

【 0 4 3 】

例えば、MAPキナーゼの構成的活性化は多数の癌細胞系統（膵臓、大腸、肺、卵巣、および腎臓）および様々なヒト器官（腎臓、大腸、および肺）由来の原発腫瘍と関連している（Hoshino et al., *Oncogene*, 18 (3):813-22 (Jan. 1999)）。さらに、p 38 MAPキナーゼは、炎症の発症および進行と関連する2つのサイトカイン、TNF α およびIL-1の産生を調節する。p 38 MAPキナーゼ阻害剤はまた、関節リュウマチなどの炎症性疾患に加えて、心不全、脳卒中、神経性疾患、およびその他の疾患の治療において将来にある役割を果たしうる。このように、MAPキナーゼ阻害剤は、癌から炎症まで、多様な病状を治療するのに有用である。

【 0 4 4 】

さらに、ERKはMEK1に関する限り唯一の基質であるので、この緊密な選択性は、MAPキナーゼ経路の中心的役割および腫瘍細胞におけるその本質的成分の発現の増強と合体して、この経路の阻害が腫瘍細胞の放射線および化学感作の両方に対する重要なルートでありかつ増殖性疾患における薬理的介入の可能性のある標的であることを示す。

【 0 4 5 】

Sebolt-Leopold et al., *Nat. Med.*, 5(7) 810-6 (Jul, 1999) は、MAPキナーゼ (MAPK) 経路の小分子阻害剤を同定するための *in vitro* カスケードアッセイシステムを記載している。グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) -MEK1およびGST-MAPK融合タンパク質を細菌細胞から調製して、これらをこのアッセイシステムにおいてMEK1のMAPKへ、MBP (myelin basic protein (ミエリン塩基性タンパク質)) への逐次リン酸化に使用した。MEK1を直接阻害するPD184352 [2-(2-クロロ-4-ヨードフェニル)アミノ]-N-シクロプロピルメトキシ-3,4-ジフルオロベンズアミド] も見出されている。

【 0 4 6 】

MAPキナーゼ阻害剤の例は、MAPキナーゼ阻害剤 :AG126、アピゲニン (Apigenin)、HSP25キナーゼ阻害剤、5-ヨードツベルシジン、MAPキナーゼアンチセンスオリゴヌクレオチド、コントロー/LEMAPキナーゼオリゴヌクレオチド、MAPキナーゼカスケード阻害剤、MAPキナーゼ阻害剤セット1、MAPキナーゼ阻害剤セット2、MEK阻害剤セット、オロモウシン (Olmoucin), イソオロモウシン、N⁹イソプロピルオロモウシン、p 38 MAPキナーゼ阻害剤、PD98059 (2, -アミノ-3'-メトキシフラボン)、PD98059溶液、PD169316 (Calbiochem)、SB202474、SB202190 (4-[4-(4-フルオロフェニル)-5-(4-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル]フェノール; BIOMO Research Labs., Inc.)、SB202190溶液、SB202190塩酸塩、SB202474二塩酸塩、SB203580 (4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルホニルフェニル)-5-(4-ピリジニル)イミダゾール<4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1

H-イミダゾール-5-イル]ピリジン) ; Journal of Biological
 ical Chemistry 272 (18) 12116-12121, 19
 97)、SB203580 溶液、SB203580 塩酸塩、SB203580
 スルホン、Ioto-SB203580、SB220025、SP60012
 5 (1,9-ピラゾロアントロン、アントラピラゾロン)、SB239063
 (トランス-4-[4-(4-フルオロフェニル)-5-(2-メトキシ-4
 -ピリミジニル)-1H-イミダゾール-1-イル]シクロヘキサノール)、
 SC68376、FR167653 (Nikken Chemical C
 o., Ltd.)、BIRB796BS (あるいはBIRB-796; 1-
 10 (5-tert-ブチル-2-p-トリル-2H-ピラゾール-3-イル)-
 3-(4-(2-モルホリン-4-イル-エトキシ)ナフタリン-1-イル)
 尿素、Bloodiol, 4446-4448, 2003)、SKF-860
 02、チルホスチン (Tyrophostin) AG126、U0124、U0
 125、U0126 (1,4-ジアミノ-2,3-ジシアノー-1,4-ビス
 15 [2-アミノフェ-ルチオ]ブタジエン)、4-アザインドール、3-(4-
 フルオロフェニル)-2-(ピリジン-4-イル)-1H-ピロロ[3,2-
 b]ピリジン、ZM336372、CalBio506126 (2-(4-ク
 ロロフェニル)-4-(4-フルオロフェニル)-5-ピリジン-4-イル-
 1,2-ジヒドロピラゾール-3-オン)、RO3201195、R1487
 20 等を含む。CalBioChemカタログのページixxviiiも参照しう
 る。このほかの、本発明で用いることができるMAPキナーゼ阻害剤としては、
 例えば、MAPキナーゼに対する中和抗体、MAPキナーゼの活性を阻害する
 化合物、MAPキナーゼをコードする遺伝子の転写を阻害する化合物 (例えば、
 アンチセンス核酸、RNAi、リボザイム)、ペプチド、および植物成分 (例
 25 えば、ポリフェノール、フラボノイド、配糖体)等の化合物が挙げられる。使用
 される濃度として、SB203580、SB202190、PD16931
 6、FR167653、BIRB796BS等であれば約50nmol/l、
 100μmol/l、1が例示され、通常、約0.001~100μmol/l、
 好ましくは、約0.01~75μmol/l、約0.05~50μmol/l、
 30 約1~10μmol/l、約0.01~10μmol/l、約0.05~10
 μmol/l、約0.075~10μmol/l、約0.1~10μmol/l、
 約0.5~10μmol/l、約0.75~10μmol/l、約1.0
 ~10μmol/l、約1.25~10μmol/l、約1.5~10μmo
 1/l、約1.75~10μmol/l、約2.0~10μmol/l、約2.
 35 5~10μmol/l、約3.0~10μmol/l、約4.0~10μmo
 1/l、約5.0~10μmol/l、約6.0~10μmol/l、約7.
 0~10μmol/l、約8.0~10μmol/l、約9.0~10μmo
 1/l、約0.01~50μmol/l、約0.05~5.0μmol/l、
 約0.075~5.0μmol/l、約0.1~5.0μmol/l、約0.
 40 5~5.0μmol/l、約0.75~5.0μmol/l、約1.0~5.
 0μmol/l、約1.25~5.0μmol/l、約1.5~5.0μmo
 1/l、約1.75~5.0μmol/l、約2.0~5.0μmol/l、

約 2.5 ~ 5.0 μmol/l、約 3.0 ~ 5.0 μmol/l、約 4.0 ~ 5.0 μmol/l、約 0.01 ~ 3.0 μmol/l、約 0.05 ~ 3.0 μmol/l、約 0.075 ~ 3.0 μmol/l、約 0.1 ~ 3.0 μmol/l、約 0.5 ~ 3.0 μmol/l、約 0.75 ~ 3.0 μmol/l、約 1.0 ~ 3.0 μmol/l、約 1.25 ~ 3.0 μmol/l、約 1.5 ~ 3.0 μmol/l、約 1.75 ~ 3.0 μmol/l、約 2.0 ~ 3.0 μmol/l、約 0.01 ~ 1.0 μmol/l、約 0.05 ~ 1.0 μmol/l、約 0.075 ~ 1.0 μmol/l、約 0.1 ~ 1.0 μmol/l、約 0.5 ~ 1.0 μmol/l、約 0.75 ~ 1.0 μmol/l、約 0.9 ~ 3.5 μmol/l であり、より好ましくは、約 0.05 ~ 1.0 μmol/l、約 0.075 ~ 1.0 μmol/l、約 0.1 ~ 1.0 μmol/l、約 0.5 ~ 1.0 μmol/l であるがこれらに限定されない。

【0047】

15 本明細書において、「角膜内皮細胞の 老化抑制剤」または「老化防止剤」とは、細胞老化を抑制することができる任意の薬剤をいう。ヒト正常細胞は、一定回数以上の分裂を繰り返すことで分裂能力を失い、老化する (replicative senescence)。老化細胞は特定の形態学上および生理学的な変化を経て、特定の遺伝子を誘導する。また、正常細胞は様々な処理によって上と同様な現象を示す (premature senescence)。

20 このように本明細書では細胞の「老化を抑制する」とは、細胞の密度を上昇させる効果を有することをいう。したがって、より詳細に説明すると、「老化抑制剤」または「老化防止剤」は、細胞の密度を上昇させる任意の薬剤をいう。細胞の老化の程度は、細胞の形態観察 (細胞は老化すると扁平化、肥大化が起きる) および老化マーカーとして知られる β-ガラクトシダーゼの染色像 (老化が進むと β-ガラクトシダーゼの染色像が大きくなる) を観察することにより調べることができる。したがって、本発明において用いられる老化抑制剤としては、上記老化抑制作用を有する限りどのような薬剤であっても使用することができる。老化を抑制する作用としては、老化に伴って引き起こされる正常細胞の機能低下を抑える作用であり、例えば、細胞周期の停止を抑える作用、正常細胞の分裂寿命の短縮を抑える作用、正常細胞の生存率の低下を抑える作用、老化に伴う正常細胞の形態学的変化を抑える作用等が挙げられる。理論に束縛されることを望まないが、Funayama R and Ishikawa F (Chromosoma (2007) 116:431-440) によれば、角膜内皮細胞ではないものの、線維芽細胞などにおいて種々の細胞ストレスによる老化が p38 MAPK の活性化によることを示している。さらには p38 MAPK 阻害剤である SB203580 により細胞ストレスによる細胞老化を阻害できることを報告している。本発明者らの実施例において例示した実験結果においては、SB203580 により線維化抑制効果のみならず、細胞密度の低下を抑制して高密度の角膜内皮細胞の培養が可能になることを示した。したがって、本発明において用いられる場合、老化抑制剤であれば、ど

のようなものでも細胞密度の低下を抑制して高密度の角膜内皮細胞の培養を改善することができることが理解される。

【0048】

5 本明細書において「老化抑制」の判断は、角膜内皮細胞密度の低下を抑制し高密度を維持できていることによる。生体内においても老化に従って角膜内皮密度が低下することが知られており（大原國俊、水流忠彦、伊野田 繁：角膜内皮細胞形態のパラメーター、日眼会誌91：1073-1078，1987）臨床的観点からも老化判断の良い指標である。また、一般的な細胞老化の指標として核/細胞質比の低下があるが角膜内皮においても同様に用いることができると考えられる。また、他の老化抑制剤の例としては、他のp38 MAPキナーゼ阻害剤を挙げるができるがこれらに限定されない。

【0049】

15 本明細書において「p38 MAPキナーゼ阻害剤」とは、p38に関連するMAPキナーゼのシグナル伝達を阻害する任意の薬剤をいう。したがって、p38 MAPキナーゼ阻害剤は、MAPKファミリーメンバーであるp38-MAPKを標的とし、低下させる、または阻害する化合物に関する。

【0050】

20 p38は哺乳類動物MAPKスーパーファミリーメンバーであって、ストレス、紫外光、および炎症性サイトカインにより活性化される。触媒コアにTGYコンセンサス配列を有する。

【0051】

25 異常調節されたキナーゼは多くの疾患、特に増殖性および炎症性障害における主な病因であるということが次第に認識されている。癌領域において最初に同定される発癌遺伝子の1つは、上皮増殖因子レセプターキナーゼ（EGFR）に対するものであったが、その過剰発現は肺、乳、脳、前立腺、GIおよび卵巣癌と関連している。例えば、MAPキナーゼの構成的活性化は多数の癌細胞系統（脾臓、大腸、肺、卵巣、および腎臓）および様々なヒト器官（腎臓、大腸、および肺）由来の原発腫瘍と関連している（Hoshinoら、Oncogene, 18(3):813-22 (Jan. 1999)）。さらに、p38 MAPキナーゼは、炎症の発症および進行と関連する2つのサイトカイン、TNF α およびIL-1の産生を調節する。p38 MAPキナーゼ阻害剤はまた、関節リウマチなどの炎症性疾患に加えて、心不全、脳卒中、神経性疾患、およびその他の疾患の治療において将来にある役割を果たしうる。このように、MAPキナーゼ阻害剤は、癌から炎症まで、多様な病状を治療するの

35

【0052】

40 本発明において使用されうるp38 MAPキナーゼ阻害剤は、VX-745（Vertex Pharmaceuticals Inc.）の他、p38 MAPキナーゼ阻害活性を有する化合物であれば特に制限されず、例えば特開2002-97189号公報、特表2000-503304号公報、特表2001-522357号公報、特表2003-535023号、特表2001-506266号公報、特表平9-508123号公報、国際公開第01/

5 6 5 5 3号公報、国際公開第93/14081号公報、国際公開第01/3
 5 9 5 9号公報、国際公開第03/68229号公報、国際公開第03/85
 8 5 9号公報、特表2002-534468号公報、特表2001-5262
 2 2号公報、特表2001-526223号公報、米国特許第6344476
 5 号明細書、国際公開第03/99811号公報、国際公開第03/99796
 号公報、特表2004-506042号公報、国際公開第04/60286号
 公報、特表2002-363179号公報、特表2004-107358号公
 報、米国特許第5670527号明細書、米国特許第6096753号明細書、
 10 国際公開第01/42189号公報、国際公開第00/31063号公報など
 の特許公報に記載された化合物が挙げられ、好ましくは4-(4-フルオロフ
 エニル)-2-(4-ヒドロキシフェニル)-5-(4-ピリジル)-1H-イ
 ミダゾール (SB-202190)、trans-4-[4-(4-フルオ
 15 オロフェニル)-5-(2-メトキシ-4-ピリミジニル)-1H-イミダゾ
 ル-1-イル]シクロヘキサノール (SB-239063)、4-(4-フル
 オロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-5-(4-ピリ
 ジル)-1H-イミダゾール (SB-203580)、4-(4-フルオロフ
 20 エニル)-5-(2-メトキシピリミジン-4-イル)-1-(ピペリジン-
 4-イル)イミダゾール (SB-242235)、4-(4-フルオロフェ
 ニル)-2-(4-ヒドロキシ-1-ブチル)-1-(3-フェニルプロピ
 25 ル)-5-(4-ピリジル)イミダゾール (RWJ-67657)、4-(4-
 フルオロフェニル)-1-(ピペリジン-4-イル)-5-(4-ピリジ
 ル)イミダゾール (HEP-689)、(S)-2-(2-アミノ-3-フェ
 ニルプロピルアミノ)-1-メチル-5-(2-ナフチル)-4-(4-ピリ
 30 ジル)ピリミジン-6-オン (AMG-548)、2-クロロ-4-(4-フ
 ルオロ-2-メチルアニリノ)-2'-メチルベンゾフェノン (EO-160
 6)、3-(4-クロロフェニル)-5-(1-ヒドロキシアセチルピペリジ
 ン-4-イル)-4-(ピリミジン-4-イル)ピラゾール (SD-06)、
 5-(2,6-ジクロロフェニル)-2-(2,4-ジフルオロフェニルチ
 35 オ)ピリミド[3,4-b]ピリダジン-6-オン (VX-745)、4-ア
 セチルアミノ-N-tert-ブチルベンズアミド (CPI-1189)、N-
 [3-tert-ブチル-1-(4-メチルフェニル)ピラゾール-5-イル
 40 ル]-N'-[4-(2-モルホリノエトキシ)-1-ナフチル]ウレア (ド
 ラマピモド (Dramapimod))、2-ベンズアミド-4-[2-エチ
 ル-4-(3-メチルフェニル)チアゾール-5-イル]ピリジン (TAK-
 715)、SCIO-469、VX-702、GSK-681323、PS-
 540446、SC-80036、AVE-9940、RO-320-119
 5、SB-281832、SCIO-323、KC-706、:N, N'-ビス
 [3,5-ビス[1-(2-アミノヒドラゾノ)エチル]フェニル]デカ
 ンジアミド、N, N'-ビス[3,5-ビス[1-[2-(アミノイミノメチ
 40 ル)ヒドラゾノ]エチル]フェニル]デカンジアミド (セマピモド (Sema
 pimod))である。

D 0 5 3]

さらに、Tocris Cookson社 (St Louis, USA) は <http://www.tocris.com/> に例示される様々なMAPキナーゼ阻害剤を提供する。例えば、SB202190 (4-[4-(4-フルオロフェニル)-5-(4-ピリジニル)-1H-イミダゾール-2-イル]フェノール) は、高度に選択的、強力、かつ細胞浸透性のp38 MAPキナーゼ阻害剤である (SmithKline Beecham, pic) (Jiangら, J. Biol. Chem., 271:17920 (1996); Frantzら, Biochemistry, 37:138-46 (1998); Nemotoら, J. Biol. Chem., 273:16415 (1998); およびDaviesら, Biochem. J., 351:95 (2000))。また、アニソマイシン (2R, 3S, 4S)-2-[(4-メトキシフェニル)メチル]-3,4-ピロリジンジオール-3-アセテート) は、タンパク質合成インヒビター (翻訳をブロックする) である。これは、ストレス活性化プロテインキナーゼ (JNK/SAPK) およびp38 MAPキナーゼの強力なアクチベーターであり、前初期遺伝子 (c-fos, fosB, c-jun, junB, およびjunD) 誘導の相対的脱感作を選択的に誘発する強力なシグナル伝達アゴニストとして作用する。PD98059 (2-(2-アミノ-3-メトキシフェニル)-4H-1-ベンゾピラン-4-オン) は、マイトジェン活性化プロテインキナーゼキナーゼ (MAPKK) の特異的阻害剤である (Pfizer=Warner-Lambert Company) 。SB203580 (4-[5-(4-フルオロフェニル)-2-[4-(メチルスルホニル)フェニル]-1H-イミダゾール-4-イル]ピリジン) は、p38マイトジェン活性化プロテインキナーゼの高度に選択的な阻害剤 (SmithKlineBeecham, pic) である。インターロイキン-2誘導によるT細胞増殖、シクロオキシゲナーゼ-1および-2、ならびにトロンボキサンシンターゼを阻害することが示されている。SB203580塩酸塩 (4-[5-(4-フルオロフェニル)-2-[4-(メチルスルホニル)フェニル]-1H-イミダゾール-4-イル]ピリジン) 化合物は、高度に選択的なp38マイトジェン活性化プロテインキナーゼの阻害剤の水溶性塩である。インターロイキン-2誘導によるT細胞増殖、シクロオキシゲナーゼ-1および-2、ならびにトロンボキサンシンターゼを阻害することが示されている。U0126 (1,4-ジアミノ-2,3-ジシアノ-1,4-ビス[2-アミノフェニルチオ]プタジエン) は、MAPキナーゼキナーゼの強力かつ選択的な非競合性の阻害剤である。

【0054】

好ましいp38 MAPK阻害剤としては、SB203580 (4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジン) が例示されるがそれに限定されない。

【0055】

本明細書において使用される、「角膜内皮細胞の細胞接着促進剤」または「接着促進剤」は、細胞の接着性を付与または改善する薬剤をいい、そのような機能を有するものであれば、どのような薬剤を用いてもよい。例示的な角膜

内皮細胞の接着促進剤としては、R h o キナーゼ阻害剤が挙げられるがこれらに限定されない。

【 0 5 6 】

本発明において、「R h o キナーゼ」とは、R h o の活性化に伴い活性化されるセリン/ スレオニンキナーゼを意味する。例えば、R O K α (R O C K - 1) (Leung, T. et al., J. Biol. Chem., 270, 29051-29054, 1995), p 160 R O C K (R O K β , R O C K - 2) (Ishizaki, T. et al., The EMBO J., 15(8), 1885-1893, 1996) およびその他のセリン/スレオニンキナーゼ活性を有するタンパク質が挙げられる。

【 0 5 7 】

R h o キナーゼ阻害剤としては、下記文献 (米国特許 4 6 7 8 7 8 3 号、特許第 3 4 2 1 2 1 7 号、国際公開第 9 5 / 2 8 3 8 7、国際公開 9 9 / 2 0 6 2 0、国際公開 9 9 / 6 1 4 0 3、国際公開 0 2 / 0 7 6 9 7 6、国際公開 0 2 / 0 7 6 9 7 7、国際公開第 2 0 0 2 / 0 8 3 1 7 5、国際公開 0 2 / 1 0 0 8 3 3、国際公開 0 3 Z 0 5 9 9 1 3、国際公開 0 3 / 0 6 2 2 2 7、国際公開 2 0 0 4 / 0 0 9 5 5 5、国際公開 2 0 0 4 / 0 2 2 5 4 1、国際公開 2 0 0 4 / 1 0 8 7 2 4、国際公開 2 0 0 5 / 0 0 3 1 0 1、国際公開 2 0 0 5 / 0 3 9 5 6 4、国際公開 2 0 0 5 / 0 3 4 8 6 6、国際公開 2 0 0 5 / 0 3 7 1 9 7、国際公開 2 0 0 5 / 0 3 7 1 9 8、国際公開 2 0 0 5 / 0 3 5 5 0 1、国際公開 2 0 0 5 / 0 3 5 5 0 3、国際公開 2 0 0 5 / 0 3 5 5 0 6、国際公開 2 0 0 5 / 0 8 0 3 9 4、国際公開 2 0 0 5 / 1 0 3 0 5 0、国際公開 2 0 0 6 / 0 5 7 2 7 0、国際公開 2 0 0 7 / 0 2 6 6 6 4 など) に開示された化合物があげられる。かかる化合物は、それぞれ開示された文献に記載の方法により製造することができる。具体例として、1 - (5 - イソキノリンスルホニル) ホモピペラジンまたはその塩 (たとえば、ファスジル (1 - (5 - イソキノリンスルホニル) ホモピペラジン))、(+)-トランス-4 - (1 - アミノエチル) - 1 - (4 - ピリジルカルバモイル) シクロヘキサンの (+)-トランス-4 - (1 - アミノエチル) - シクロヘキサンのカルボキサミド) またはその塩 (たとえば、Y - 2 7 6 3 2 ((R) - (+)-トランス-4 - (1 - アミノエチル) - シクロヘキサンのカルボキサミド 2 塩酸塩 1 水和物) など) などがあげられ、これらの化合物は、市販品 (和光純薬株式会社、旭化成ファーマ等) を好適に用いることもできる。

【 0 5 8 】

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

(+) —トランス— (4 - ピリジル) - 4 - (1 - アミノエチル) - シクロヘキサンカルボキサミド) · 2 塩酸塩 (一水和物であつてもよい)、および 1 - (5 - イソキノリンスルホニル) ホモピペラジン塩酸塩がより好ましい。

【0059】

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

【0060】

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

15 【0061】

角膜内皮細胞は角膜の透明度を維持する役割を担っている。この内皮細胞の密度がある限度を超えて少なくなると角膜にむくみが発生し、角膜の透明性が維持できなくなり、角膜内皮障害が引き起こされる。本発明において使用されうる接着促進剤は、角膜内皮細胞の接着を促進し、良好な細胞形態および高い細胞密度を持った角膜内皮細胞層の形成の改善を可能とする。

【0062】

25 本明細書において、「TGF- β 等の) 発現を抑制する物質 (例えば、核酸)」とは、標的遺伝子の mRNA の転写を抑制する物質、転写された mRNA を分解する物質 (例えば、核酸)、または mRNA からの蛋白質の翻訳を抑制する物質 (例えば、核酸) であれば特に限定されるものでない。かかる物質として、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイムまたはこれらの発現ベクター等の核酸などが例示される。その中でも、siRNA およびその発現ベクターが好ましく、特に siRNA が好ましい。遺伝子の発現を抑制する物質」としては、上記のほか、タンパク質やペプチド、あるいは他の小分子も含まれる。なお、本発明において標的遺伝子は、TGF- β シグナル伝達経路に關与する任意の遺伝子である。

【0063】

35 本発明において標的とされる TGF- β 等の特定の内在性遺伝子の発現を阻害する方法としては、アンチセンス技術を利用する方法が当業者によく知られている。アンチセンス核酸が標的遺伝子の発現を阻害する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。即ち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNA ポリメラーゼによって局所的に開状ループ構造が作られた部位とのハイブリッド形成による転写阻害、合成の進みつつある RNA とのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエクソンとの接合点におけるハイブリッド形成によるスプライシング阻害、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング阻害、mRNA とのハイブリッド形成による核から細胞質への移行阻害、キャッピング部位やポリ (A) 付加部位とのハイブリッド形成

によるスプライシング阻害、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始阻害、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳阻害、mRNAの翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻害、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現阻害などである。このようにアンチセンス核酸は、転写、スプライシングまたは翻訳など様々な過程を阻害することで、標的遺伝子の発現を阻害する(平島および井上, 新生化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現, 日本生化学会編, 東京化学同人, 1993, 319-347.)。

【0064】

本発明で用いられるアンチセンス核酸は、上記のいずれの作用により、上述のTGF- β のシグナル伝達経路のメンバー等をコードする遺伝子(核酸)の発現および/または機能を阻害してもよい。一つの実施形態としては、上述のTGF- β 等をコードする遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的と考えられる。また、コード領域もしくは3'の非翻訳領域に相補的な配列も使用することができる。このように、上述のTGF- β 等をコードする遺伝子の翻訳領域だけでなく、非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含む核酸も、本発明で利用されるアンチセンス核酸に含まれる。使用されるアンチセンス核酸は、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製された核酸は、公知の方法を用いることで所望の動物(細胞)に形質転換することができる。アンチセンス核酸の配列は、形質転換される動物(細胞)が有するTGF- β 等をコードする遺伝子またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に抑制できる限りにおいて、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは標的遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。アンチセンス核酸を用いて標的遺伝子の発現を効果的に阻害するには、アンチセンス核酸の長さは少なくとも12塩基以上25塩基未満であることが好ましいが、本発明のアンチセンス核酸は必ずしもこの長さ限定されず、例えば、11塩基以下、100塩基以上、または500塩基以上であってもよい。アンチセンス核酸は、DNAのみから構成されていてもよいが、DNA以外の核酸、例えば、ロックド核酸(LNA)を含んでいてもよい。一つの実施形態としては、本発明で用いられるアンチセンス核酸は、5'末端にLNA、3'末端にLNAを含むLNA含有アンチセンス核酸であってもよい。また、本発明において、アンチセンス核酸を用いる実施形態では、例えば平島および井上, 新生化学実験講座2 核酸IV 遺伝子の複製と発現, 日本生化学会編, 東京化学同人, 1993, 319-347.に記載される方法を用いて、TGF- β 等の核酸配列に基づき、アンチセンス配列を設計することができる。

【0065】

TGF- β 等の発現の阻害は、リボザイム、またはリボザイムをコードするDNAを利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するR

RNA分子を指す。リボザイムには種々の活性を有するものが存在するが、中でもRNAを切断する酵素としてのリボザイムに焦点を当てた研究により、RNAを部位特異的に切断するリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループIイントロン型やRNase Pに含まれるMI RNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある（小泉誠および大塚栄子，タンパク質核酸酵素，1990，35，2191.）。

【066】

例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15という配列のC15の3'側を切断するが、その活性にはU14とA9との塩基対形成が重要とされ、C15の代わりにA15またはU15でも切断され得ることが示されている（Koizumi, M. et al., FEBS Lett, 1988, 228, 228.）。基質結合部位が標的部近傍のRNA配列と相補的なリボザイムを設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムを作出することができる（Koizumi, M. et al., FEBS Lett, 1988, 239, 285.、小泉誠および大塚栄子，タンパク質核酸酵素，1990，35，2191.、Koizumi, M. et al., Nucl. Acids Res., 1989, 17, 7059.）。

【067】

また、ヘアピン型リボザイムも本発明の目的に有用である。このリボザイムは、例えば、タバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される（Buzayan, JM., Nature, 1986, 323, 349.）。ヘアピン型リボザイムからも、標的特異的なRNA切断リボザイムを作出することが示されている（Kikuchi, Y. & Sasaki, N., Nucl. Acids Res, 1991, 19, 6751.、菊池洋，化学と生物，1992，30，112.）。このように、リボザイムを用いてTGF- β 等をコードする遺伝子の転写産物を特異的に切断することで、該遺伝子の発現を阻害することができる。

【068】

TGF- β 等の内在性遺伝子の発現の抑制は、さらに、標的遺伝子配列と同一もしくは類似した配列を有する二本鎖RNAを用いたRNA干渉（RNA interference、以下「RNAi」と略称する）によっても行うことができる。RNAiは、二本鎖RNA（dsRNA）が直接細胞内に取り込まれると、このdsRNAと相同な配列を持つ遺伝子の発現が抑えられ現在注目を浴びている手法である。哺乳類細胞においては、短鎖dsRNA（siRNA）を用いることにより、RNAiを誘導する事が可能で、RNAiは、ノックアウトマウスと比較して、効果が安定、実験が容易、費用が安価であるなど、多くの利点を有している。siRNAについては、本明細書において他の箇所において詳述される。

【069】

本明細書において、「siRNA」とは、15〜40塩基からなる二本鎖RNA部分を有するRNA分子であり、前記siRNAのアンチセンス鎖と相補的な配列をもつ標的遺伝子のmRNAを切断し、標的遺伝子の発現を抑制する

機能 を有する。詳細には、本発明における *siRNA* は、*TGF-β* 等の *mRNA* 中の連続した *RNA* 配列と相同な配列からなるセンス *RNA* 鎖と、該センス *RNA* 配列に相補的な配列からなるアンチセンス *RNA* 鎖とからなる二本鎖 *RNA* 部分を含む *RNA* である。かかる *siRNA* および後述の変異体 *siRNA* の設計および製造は当業者の技量の範囲内である。*TGF-β* 等の配列の転写産物である *mRNA* の任意の連続する *RNA* 領域を選択し、この領域に対応する二本鎖 *RNA* を作製することは、当業者においては、通常の試行の範囲内において適宜行い得ることである。また、該配列の転写産物である *mRNA* 配列から、より強い *RNAi* 効果を有する *siRNA* 配列を選択することも、当業者においては、公知の方法によって適宜実施することが可能である。また、一方の鎖が判明していれば、当業者においては容易に他方の鎖（相補鎖）の塩基配列を知ることができる。*siRNA* は、当業者においては市販の核酸合成機を用いて適宜作製することが可能である。また、所望の *RNA* の合成については、一般の合成受託サービスを利用することができる。

【0070】

二本鎖 *RNA* 部分の長さは、塩基として、15〜40 塩基、好ましくは 15〜30 塩基、より好ましくは 15〜25 塩基、更に好ましくは 18〜23 塩基、最も好ましくは 19〜21 塩基である。これらの上限および下限は、これら特定のものに限定されず、これら列挙されているものの任意の組み合わせであってもよいことが理解される。*siRNA* のセンス鎖またはアンチセンス鎖の末端構造としては、特に制限はなく、目的に応じて適宜選択することができ、例えば、平滑末端を有するものであってもよいし、突出末端（オーバーハング）を有するものであってもよく、3' 端が突き出したタイプが好ましい。センス *RNA* 鎖およびアンチセンス *RNA* 鎖の 3' 末端に数個の塩基、好ましくは 1〜3 個の塩基、さらに好ましくは 2 個の塩基からなるオーバーハングを有する *siRNA* は、標的遺伝子の発現を抑制する効果が大きい場合が多く、好ましいものである。オーバーハングの塩基の種類は特に制限はなく、*RNA* を構成する塩基あるいは *DNA* を構成する塩基のいずれであってもよい。好ましいオーバーハング配列としては、3' 末端に dTdT（デオキシTを2bp）等を挙げることができる。例えば、好ましい *siRNA* としては、全ての *siRNA* のセンス・アンチセンス鎖の、3' 末端に dTdT（デオキシTを2bp）をつけているものが挙げられるがそれに限定されない。

【0071】

さらに、上記 *siRNA* のセンス鎖またはアンチセンス鎖の一方または両方において1〜数个までのヌクレオチドが欠失、置換、挿入および/または付加されている *siRNA* も用いることができる。ここで、1〜数塩基とは、特に限定されるものではないが、好ましくは 1〜4 塩基、さらに好ましくは 1〜3 塩基、最も好ましくは 1〜2 塩基である。かかる変異の具体例としては、3' オーバーハング部分の塩基数を 0〜3 個としたもの、3' −オーバーハング部分の塩基配列を他の塩基配列に変更したもの、あるいは塩基の挿入、付加または欠失により上記センス *RNA* 鎖とアンチセンス *RNA* 鎖の長さが 1〜3 塩基異なるもの、センス鎖および/またはアンチセンス鎖において塩基が別の塩基

にて置換されているもの等が挙げられるが、これらに限定されない。ただし、これらの変異体 siRNA においてセンス鎖とアンチセンス鎖とがハイブリダイゼーションしうること、ならびにこれらの変異体 siRNA が変異を有しない siRNA と同等の遺伝子発現抑制能を有することが必要である。

5 【0072】

さらに、siRNA は、一方の端が閉じた構造の分子、例えば、ヘアピン構造を有する siRNA (Short Hairpin RNA ; shRNA) であってもよい。shRNA は、標的遺伝子の特定配列のセンス鎖 RNA、該センス鎖配列に相補的な配列からなるアンチセンス鎖 RNA、およびその両鎖を繋ぐリンカ配列を含む RNA であり、センス鎖部分とアンチセンス鎖部分
10 がハイブリダイズし、二本鎖 RNA 部分を形成する。

 【0073】

siRNA は、臨床使用の際には、いわゆる off-target 効果を示さないことが望ましい。off-target 効果とは、標的遺伝子以外に、
15 使用した siRNA に部分的にホモロジーのある別の遺伝子の発現を抑制する作用をいう。off-target 効果を避けるために、候補 siRNA について、予め DNA マイクロアレイなどを利用して交差反応がないことを確認することが可能である。また、NCBI (National Center for Biotechnology Information) などが提供する公知のデータベースを用いて、標的となる遺伝子以外に候補 siRNA の配列と相同性が高い部分を含む遺伝子が存在しないかを確認する事によって、off-target 効果
20 を避けることが可能である。

 【0074】

本発明の siRNA を作製するには、化学合成による方法および遺伝子組換え技術を用いる方法等、公知の方法を適宜用いることができる。合成による方法では、配列情報に基づき、常法により二本鎖 RNA を合成することができる。また、遺伝子組換え技術を用いる方法では、センス鎖配列やアンチセンス鎖配列をコードする発現ベクターを構築し、該ベクターを宿主細胞に導入後、転写により生成されたセンス鎖 RNA やアンチセンス鎖 RNA をそれぞれ取得することによって作製することもできる。また、標的遺伝子の特定配列のセンス鎖、
30 該センス鎖配列に相補的な配列からなるアンチセンス鎖、およびその両鎖を繋ぐリンカ配列を含み、ヘアピン構造を形成する shRNA を発現させることにより、所望の二本鎖 RNA を作製することもできる。

 【0075】

35 siRNA は、標的遺伝子の発現抑制活性を有する限りにおいては、siRNA を構成する核酸の全体またはその一部は、天然の核酸であってもよいし、修飾された核酸であってもよい。

 【0076】

本発明における siRNA は、必ずしも標的配列に対する一組の二本鎖 RNA である必要はなく、標的配列を含んだ領域に対する複数組 (この「複数」とは特に制限されないが、好ましくは 2 ~ 5 個程度の少数を指す。) の二本鎖 RNA の混合物であってもよい。ここで標的配列に対応した核酸混合物としての
40

s i R N A は、当業者においては市販の核酸合成機および D I C E R 酵素を用いて適宜作成することが可能であり、また、所望の R N A の合成については、一般の合成受託サービスを利用することができる。なお、本発明の s i R N A には、所謂「カクテル s i R N A」が含まれる。また、本発明における s i R N A は、必ずしも全てのヌクレオチドがリボヌクレオチド (R N A) でなくともよい。即ち、本発明において、s i R N A を構成する 1 もしくは複数のリボヌクレオチドは、対応するデオキシリボヌクレオチドであってもよい。この「対応する」とは、糖部分の構造は異なるものの、同一の塩基種 (アデニン、グアニン、シトシン、チミン (ウラシル)) であることを指す。例えば、アデニンを有するリボヌクレオチドに対応するデオキシリボヌクレオチドとは、アデニンを有するデオキシリボヌクレオチドのことをいう。

【 0 0 7 7 】

さらに、本発明の上記 R N A を発現し得る D N A (ベクター) もまた、T G F - β 等の発現を抑制し得る核酸の好ましい実施形態に含まれる。例えば、本発明の上記二本鎖 R N A を発現し得る D N A (ベクター) は、該二本鎖 R N A の一方の鎖をコードする D N A、および該二本鎖 R N A の他方の鎖をコードする D N A が、それぞれ発現し得るようにプロモーターと連結した構造を有する D N A である。本発明の上記 D N A は、当業者においては、一般的な遺伝子工学技術により、適宜作製することができる。より具体的には、本発明の R N A をコードする D N A を公知の種々の発現ベクターへ適宜挿入することによって、本発明の発現ベクターを作製することが可能である。

【 0 0 7 8 】

本発明において標的遺伝子の発現を抑制する核酸には、修飾された核酸を用いてもよい。修飾された核酸とは、ヌクレオシド (塩基部位、糖部位) および / またはヌクレオシド間結合部位に修飾が施されていて、天然の核酸と異なった構造を有するものを意味する。修飾された核酸を構成する「修飾されたヌクレオシド」としては、例えば、無塩基 (a b a s i c) ヌクレオシド ; アラビノヌクレオシド、2' -デオキシウリジン、 α -デオキシリボヌクレオシド、 β -L -デオキシリボヌクレオシド、その他の糖修飾を有するヌクレオシド ; ペプチド核酸 (P N A)、ホスフェート基が結合したペプチド核酸 (P H O N A)、ロックド核酸 (L N A)、モルホリノ核酸等が挙げられる。上記糖修飾を有するヌクレオシドには、2' -O -メチルリボース、2' -デオキシ-2' -フルオロリボース、3' -O -メチルリボース等の置換五単糖 ; 1 , , 2' -デオキシリボース ; アラビノース ; 置換アラビノース糖 ; 六単糖およびアルファアノマーの糖修飾を有するヌクレオシドが含まれる。これらのヌクレオシドは塩基部位が修飾された修飾塩基であってもよい。このような修飾塩基には、例えば、5 -ヒドロキシシトシン、5 -フルオロウラシル、4 -チオウラシル等のピリミジン ; 6 -メチルアデニン、6 -チオグアノシン等のプリン ; および他の複素環塩基等が挙げられる。

【 0 0 7 9 】

修飾された核酸を構成する「修飾されたヌクレオシド間結合」としては、例えば、アルキルリンカー、グリセリルリンカー、アミノリンカー、ポリ (エチ

レンダリコール) 結合、メチルホスホネートヌクレオシド間結合 ;メチルホスホノチオエート、ホスホトリエステ/レ、ホスホチオトリエステ/レ、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、トリエステ/レプロドラッグ、スルホン、スルホンアミド、サルファメート、ホグムアセタール、N-メチルヒドロキシルアミン、カルボネート、カルバメート、モルホリノ、ポラノホスホネート、ホスホルアミデートなどの非天然ヌクレオシド間結合が挙げられる。

【 0 8 0 】

本発明の二本鎖 siRNA に含まれる核酸配列としては、TGF- β または他の TGF- β シグナルのメンバーに対する siRNA などを挙げる事ができる。

【 0 8 1 】

また、本発明の核酸または薬剤をリボソームなどのリン脂質小胞体に導入し、その小胞体を投与することも可能である。siRNA または shRNA を保持させた小胞体をリポフエクション法により所定の細胞に導入することができる。そして、得られる細胞を例えば、静脈内、動脈内等に全身投与する。眼の必要な部位等に局所的に投与することもできる。siRNA は in Vitro においては非常に優れた特異的転写後抑制効果を示すが、in vivo においては血清中のヌクレアーゼ活性により速やかに分解されてしまうため持続時間が限られるためより最適で効果的なデリバリーシステム開発が求められてきた。一つの例としては、Ochiya, Tらの Nature Med., 5: 707-710, 1999、Curr. Gene Ther., 1: 31-52, 2001 より生体親和性材料であるアテロコラーゲンが核酸と混合し複合体を形成させると、生体中の分解酵素から核酸を保護する作用があり siRNA のキャリアーとして非常に適しているキャリアーであると報告されており、このような形態を利用することができるが、本発明の核酸または医薬の導入の方法はこれには限られない。このようにして、生体内においては血清中の核酸分解酵素の働きにより、速やかに分解されてしまうため長時間の効果の継続を達成することができる。例えば、Takeshi ta F. PNAS. (2003) 102 (34) 12177-82、Minakuchi Y Nucleic Acids Reserch (2004) 32 (13) e109 では、牛皮膚由来のアテロコラーゲンが核酸と複合体を形成し、生体内の分解酵素から核酸を保護する作用があり、siRNA のキャリアーとして非常に適していると報告されており、このような技術を用いることができる。

【 0 8 2 】

本明細書において「培地」とは、角膜内皮細胞を維持または増殖することができる任意の培地を指し、必要に応じ適切な場合、液体培地 (培養液)、懸濁培地、固体培地等の任意の形態をとることができる。このような角膜内皮細胞に使用される培地の成分としては、例えば、DMEM (GIBCO BRL 社)、OptiMEM (Life Technologies)、血清 (例えば、ウシ胎仔血清 (FBS))、増殖因子/成長因子 (例えば、b-FGF)、抗生物質 (例えば、ペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン) 等を挙げる事ができる。

【 0 8 3 】

(一般技術)

- 本明細書において用いられる分子生物学的手法、生化学的手法、微生物学的手法は、当該分野において周知であり慣用されるものであり、例えば、
- 5 Sambrook J. et al. (1989) . Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor およびその 3rd Ed. (2001) Ausubel, F. M. (1987) . Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley—Interscience; Ausubel, F. M. (1989) . Short Protocols in Molecular Biology :A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene
- 10 Pub. Associates and Wiley- Interscience ; Innis M. A. (1990) . PCR Protocols :A Guide to Methods and Applications, Academic Press Ausubel, F. M. (1992) . Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Ausubel, F. M. (1995) . Short Protocols in
- 15 Molecular Biology A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates; Innis, M. A. et al. (1995) . PCR Strategies, Academic Press Ausubel, F. M. (1999) . Short Protocols in Molecular Biology :A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, and annual
- 20 updates ;Sninsky, J. J. et al. (1999) . PCR Applications :Protocols for Functional Genomics, Academic Press 、 Gait, M. J. (1985) . Oligonucleotide Synthesis :A Practical Approach, IRL Press ;Gait, M. J. (1990) . Oligonucleotide Synthesis :A Practical Approach, IRL Press ;Eckstein, F. (1991) . Oligonucleotides and
- 25 Analogues :A Practical Approach, IRL Press Adams, R. L. et al. (1992) . The Biochemistry of the Nucleic Acids, Chapman&Hall ;Shabarova Z. et al. (1994) . Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids, WeinheimBlackburn, G. M. et al. (1996) . Nucleic Acids in Chemistry and Biology, Oxford University
- 30 Press Hermanson, G. T. (1996) . Bioconjugate Techniques, Academic Press ;別冊実験医学「遺伝子導入&発現解析実験法」羊土社、1997などに記載されている。角膜内皮細胞については、Nancy Joyceらの報告 {Joyce, 2004 #161} {Joyce, 2003 #7} がよく知られているが、前述のごとく長期培養、継代培養により線維芽細胞様の形質転換を生じ、効率的な培養法の研究が現在も行われている。これらは本明細書において関連する部分
- 35 (全部であり得る) が参考として援用される。

【 0 8 4 】

(好ましい実施形態の説明)

- 以下に好ましい実施形態の説明を記載するが、この実施形態は本発明の例示
- 40 であり、本発明の範囲はそのような好ましい実施形態に限定されないことが理解されるべきである。当業者はまた、以下のような好ましい実施例を参考にし

て、本発明の範囲内にある改変、変更などを容易に行うことができることが理解されるべきである。

【0085】

(培養正常化剤)

5 1つの局面において、本発明は、線維化抑制剤を含む角膜内皮細胞の培養正常化剤を提供する。本発明が提供される前、角膜内皮細胞は、移植に適した形態を維持しつつ増殖させることは困難であった。特に、継代を重ねると移植が困難になるものであった。移植が困難になる指標としては、機能タンパク質の消失がある。従来、通常の培養法では形態変化が生じることが知られていたが、
 10 本発明ではこれが形態的に線維芽細胞様であることから線維性変化であると考え、それがTGF- β シグナルの活性化を伴うものであることを発見した。ここで、TGF- β シグナルの活性化は、限定を意図しないが、実施例で例示されるように、フィブロネクチンおよびコラーゲン1型、4型、8型フィブロネクチン、インテグリン $\alpha 5$ 、およびインテグリン $\beta 1$ などの細胞外マトリクスまたはインテグリン等の量、レベル等を調べることによって、判定することができる。限定を意図するものではないが、フィブロネクチンのタンパク質発現レベルは、正常の表現型よりも線維芽細胞の表現型において強くアップレギュレートされる。従来、生体において先天性梅毒などの極めて稀な疾患において角膜内皮細胞の線維化が伴うことは見いだされていたが、線維化を抑制する
 20 治療法の開発はない。したがってこのような疾患や培養条件下において線維化を薬物により抑制することで正常な機能を維持することができるかどうか予想できなかつた。本発明者らは、他の細胞でTGF- β シグナル阻害剤を代表例として線維化を抑えることが知られている薬剤を使用したところ、形態変化を抑制した培養が可能になり予想外に正常機能を維持しつつ継代を行なうことができ(すなわち、培養正常化が可能)、角膜内皮細胞の大幅な増殖を可能にすることを発見した。正常な機能を維持しながら角膜内皮細胞を大量培養することは従来不可能であった。したがって、本発明によって達成された効果は、まさに顕著であるというべきである。

【0086】

30 本発明においては、線維化抑制剤を単独で含めることも、また必要に応じて数種類を併用して含めることもできる。

【0087】

本発明で使用される線維化抑制剤の濃度は、通常約0.1~100 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ 、好ましくは約0.1~30 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ 、より好ましくは約1 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ であり、数種類を使用する場合は適宜変更することができ、他の濃度範囲としては、例えば、通常、約0.001~100 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ 、好ましくは、約0.01~75 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ 、約0.05~50 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ 、約1~10 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ 、約0.01~10 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ 、約0.05~10 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ 、約0.075~10 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ 、約0.1~10 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ 、約0.5~10 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ 、約0.75~10 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ 、約1.0~10 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ 、約1.25~10 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ 、約1.5~10 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ 、約1.75~10 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ 、約2.0~10 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ 、約2.5~10 $\mu\text{m o l} / \text{l}$ 、

5 5.0 μmol/l、約0.75~5.0 μmol/l、約1.0~5.0 μmol/l、約1.25~5.0 μmol/l、約1.5~5.0 μmol/l、約1.75~5.0 μmol/l、約2.0~5.0 μmol/l、約2.5~5.0 μmol/l、約3.0~5.0 μmol/l、約4.0~5.0 μmol/l、約0.01~3.0 μmol/l、約0.05~3.0 μmol/l、約0.075~3.0 μmol/l、約0.1~3.0 μmol/l、約0.5~3.0 μmol/l、約0.75~3.0 μmol/l、約1.0~3.0 μmol/l、約1.25~3.0 μmol/l、約1.5~3.0 μmol/l、約1.75~3.0 μmol/l、約2.0~3.0 μmol/l、約0.01~1.0 μmol/l、約0.05~1.0 μmol/l、約0.075~1.0 μmol/l、約0.1~1.0 μmol/l、約0.5~1.0 μmol/l、約0.75~1.0 μmol/l、約0.09~3.5 μmol/l、約0.09~3.2 μmol/lであり、より好ましくは、約0.05~1.0 μmol/l、約0.075~1.0 μmol/l、約0.1~1.0 μmol/l、約0.5~1.0 μmol/l、約0.75~1.0 μmol/lを挙げることができるがこれらに限定されない。

【090】

TGF- β おシグナル伝達経路は、ALK4, 5 または 7 を經由する Smad 2/3 系と、ALK1, 2, 3 または 6 を經由する Smad 1/5/8 系とに大きく分類され、いずれも線維化に関連していることがよく知られている (J. Massagué, Annu. Rev. Biochem. 1998. 67:753-91; Villar JM, Jansen R, Sander C (2006) PLoS Comput Biol 2(1):e3; Leask, A., Abraham, D. J. FASEB J. 18, 816-827 (2004); Coert Margadant & Arnoud Sonnenberg EMBO reports (2010) 11, 97-105; Joel Rosenbloom et al., Ann Intern Med. 2010; 152:159-166.)。BMP-7 は TGF- β シグナルを抑制し線維化を抑制することができることも知られている (上記文献の他、Ral f Weiskirchen, et al., Frontiers in Bioscience 14, 4992-5012, June 1, 2009; Elisabeth M Zeisberg et al., Nature Medicine 13, 952-961 (2007); Michael Zeisberg et al., Nature Medicine 9, 964-968 (2003))。しかしながら、非特許文献 2, 4 では、非常に特殊な疾患である梅毒製角膜実質炎または人工的に作成した重度の障害により実際にコラーゲンなどの細胞外基質からなる膜状組織を伴うような状態について TGF- β との関与が記載されているが、これから正常化の維持を達成しうることは困難である。また、非特許文献 5 では角膜の重度な障害時の線維化が IL-1 および、途中 p38 MAPK の活性化によるということを示し、非特許文献 6 ではウサギでの過剰な冷凍外傷により生体において重度の炎症が生じた時にみられる線維化が p38 MAPK の活性化を伴い、阻害剤で一部線維化が抑制できることをウサギを用いて示している。これらの文献は極めて強い炎症が生体に生じ細胞外基質からなる膜状組織を伴うような状況において p38 MAPK の活性化を伴うことを示したものであり、通常の培養状態で線維化が生じることには言及しておらず、TGF- β シグナル阻害剤および p38 MAPK 阻害剤が正常化維持に有効であるということを示したのではなく、正常状態

M

の維持についてなんら示唆を与えるものではない。このように、角膜内皮細胞については、従前は正常機能を保ちつつ培養することは困難であると考えられており、非特許文献7-11等で報告された培地は、結局のところ正常化能を維持できなかつたことが非特許文献7および本明細書における比較例等で実証されている。ましてや、線維化抑制またはTGF-βシグナル伝達経路を抑制することにより、角膜内皮細胞の培養正常化をすることができるとは考えられていなかった。 約

【0091】 0

1つの実施形態では、本発明において用いられる線維化抑制剤はトランスフォーミング増殖因子(TGF)βシグナル阻害剤を含む。したがって、本発明には、TGF-βシグナル阻害剤を含む角膜内皮細胞の培養正常化剤を提供するという側面もある。本発明で用いられるTGF-βシグナル阻害剤は、TGF-βのシグナル経路を阻害することができる限り、どのような薬剤(agent)を用いてもよい。また、阻害されるべきTGF-βシグナル伝達経路は、周知のように、TGF-βおよびTGF-βレセプターが直接関連するもののほか、BMP-7のように最終的にTGF-βのシグナル伝達経路と同様(阻害剤・アンタゴニスト等であれば正反対)の効果を発揮するものであれば、どのようなシグナルに関連する因子であってもよい。

【0092】

本発明においては、TGF-βシグナル阻害剤を単独で含めることも、また必要に応じて数種類を併用して含めることもできる。

【0093】 0

本発明で使用されるTGF-βシグナル阻害剤の濃度は、通常約 $1 \sim 100 \mu\text{mol/l}$ 、好ましくは約 $0.1 \sim 30 \mu\text{mol/l}$ 、より好ましくは約 $1 \mu\text{mol/l}$ であり、数種類を使用する場合は適宜変更することができる。他の濃度範囲としては、例えば、通常、約 $0.001 \sim 100 \mu\text{mol/l}$ 、好ましくは、約 $0.01 \sim 7.8 \mu\text{mol/l}$ 、約 $0.05 \sim 50 \mu\text{mol/l}$ 、約 $1 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $0.01 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $0.05 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $0.075 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $0.1 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $0.5 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $0.75 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $1 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $1.25 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $1.5 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $1.75 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $2.0 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $2.5 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $3.0 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $4.0 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $5.0 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $6.0 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $7.0 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $8.0 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $9.0 \sim 10 \mu\text{mol/l}$ 、約 $0.01 \sim 50 \mu\text{mol/l}$ 、約 $0.05 \sim 5.0 \mu\text{mol/l}$ 、約 $0.075 \sim 5.0 \mu\text{mol/l}$ 、約 $0.1 \sim 5.0 \mu\text{mol/l}$ 、約 $0.5 \sim 5.0 \mu\text{mol/l}$ 、約 $0.75 \sim 5.0 \mu\text{mol/l}$ 、約 $1.0 \sim 5.0 \mu\text{mol/l}$ 、約 $1.25 \sim 5.0 \mu\text{mol/l}$ 、約 $1.5 \sim 5.0 \mu\text{mol/l}$ 、約 $1.75 \sim 5.0 \mu\text{mol/l}$ 、約 $2.0 \sim 5.0 \mu\text{mol/l}$ 、約 $2.5 \sim 5.0 \mu\text{mol/l}$ 、約 $3.0 \sim 5.0 \mu\text{mol/l}$ 、約 $4.0 \sim 5.0 \mu\text{mol/l}$ 、約 $5.0 \mu\text{mol/l}$ 、約 $0.01 \sim 3.0 \mu\text{mol/l}$ 、約

5 $\mu\text{m o l} / 1$ 、約 $0.075 \sim 3.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $0.1 \sim 3.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $0.5 \sim 3.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $0.75 \sim 3.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $1.0 \sim 3.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $1.25 \sim 3.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $1.5 \sim 3.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $1.75 \sim 3.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $2.0 \sim 3.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $0.01 \sim 1.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $0.05 \sim 1.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $0.075 \sim 1.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $0.1 \sim 1.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $0.5 \sim 1.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $0.75 \sim 1.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $0.09 \sim 3.5 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $0.09 \sim 3.2 \mu\text{m o l} / 1$ であり、より好ましくは、約 $0.05 \sim 1.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $0.075 \sim 1.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $0.1 \sim 1.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $0.5 \sim 1.0 \mu\text{m o l} / 1$ 、約 $0.75 \sim 1.0 \mu\text{m o l} / 1$ を挙げるができるがこれらに限定されない。

【0094】

1つの実施形態において、培養正常化は、Z O - 1 および $\text{N a}^+ / \text{K}^+ - \text{A T P a s e}$ を発現しており、形態的に多角形であり重層化していないものからなる群より選択される細胞機能が正常であることを含む。

【0095】

20 1つの実施形態において、培養正常化は角膜移植に適応する移植用細胞を製造するためのものである。好ましい実施形態では、上記移植用細胞は霊長類の細胞である。1つの好ましい実施形態では、上記移植用細胞はヒトの細胞である。

【0096】

25 1つの実施形態では、T G F - β シグナル阻害剤は、T G F - β のアンタゴニスト、T G F - β のレセプターのアンタゴニスト、または S m a d 3 の阻害剤、本明細書において他に例示される成分、それらの薬学的に許容可能な塩もしくは溶媒和物、またはその薬学的に受容可能な塩の溶媒和物を少なくとも1種含む。T G F - β のアンタゴニスト、T G F - β のレセプターのアンタゴニスト、および S m a d 3 の阻害剤は本明細書において他の箇所で説明された任意のものを利用することができる。

【0097】

30 1つの実施形態では、本発明において用いられうる T G F - β シグナル阻害剤は、S B 4 3 1 5 4 2 (4 - [4 - (1, 3 - ベンゾジオキソール - 5 - イル) 2 - ピリジニル] - 1 H - イミダゾール - 2 - イル) ベンズアミド)、B M P - 7、抗 T G F - β 抗体、抗 T G F - β レセプター抗体、T G F - β の s i R N A、T G F - β レセプターの s i R N A、T G F - β のアンチセンスオリゴヌクレオチド、6, 7 - ジメトキシ - 2 - ((2 E) - 3 - (1 - メチル - 2 - フェニル - 1 H - ピロロ [2, 3 - b] ピリジン - 3 - イル) - プロ - 2 - エノイル)) - 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロイソキノロン、A 8 3 - 0 1 (3 - (6 - メチル - 2 - ピリジニル) - N - フェニル - 4 - (4 - キノリニル) - 1 H - ピラゾール - 1 - カルボチオアミド)、ステモレキユール
 35 TM T L K インヒビター (2 - (3 - (6 - メチルピリジン - 2 - イル) - 1 H - ピラゾール - 4 - イル) - 1, 5 - ナフチリジン)、ステモレキユール
 40 TM B M P インヒビター L D N - 1.9 3 1 8 9 (6 - (4 - (ピペリジン - 1

5 -イル)エトキシ)フエニル) - 3 - (ピリジン - 4 - イル)ピラゾロ [1, 5 - a] ピリミジン)、SD - 208 (2 - (5 - クロロ - 2 - フルオロフェニル) - 4 - [(4 - ピリジニル)アミノ] プテリジン)、LY 364947 (4 - [3 - (2 - ピリジニル) - 1H - ピラゾール - 4 - イル] - キノリン)、本明細書において他に例示される成分、それらの薬学的に許容可能な塩もしくは溶媒和物、またはその薬学的に受容可能な塩の溶媒和物を少なくとも1種含む。理論に束縛されることを望まないが、Smad2/3 (ALK4、5および7に関連する)を介して効果を奏するSB431542、Smad1/5/8 (ALK1、2、3および6に関連する)を介して効果を奏するBMP-7の両方で正常化が観察されていることから、これらのいずれの経路のTGF- β シグナル阻害剤であっても、本発明の効果を達成することができるとう理解される。

【0098】

15 好ましい実施形態では、本発明において用いられるTGF- β シグナル阻害剤は、SB431542 (4 - [4 - (1, 3 - ベンゾジオキソール - 5 - イル) 2 - ピリジニル) - 1H - イミダゾール - 2 - イル] ベンズアミド)を含む。線維化が抑制された上に、正常機能を担うタンパク質が保持されていることが示され、また霊長類への移植にも耐えたからである。好ましい実施形態では、SB431542は、使用時に約0.1 μ M - 約10 μ Mの濃度で存在する
 20 ように含まれ、好ましくは、使用時に約1 μ M - 約10 μ Mの濃度で存在するように含まれ、さらに好ましくは使用時に約1 μ Mの濃度で存在するように含まれる。

【0099】

25 別の好ましい実施形態では、本発明において用いられるTGF- β シグナル阻害剤は、BMP-7を含む。線維化が抑制された上に、正常機能を担うタンパク質が保持されていることが示され、また霊長類への移植にも耐え得るからである。好ましい実施形態では、BMP-7は、使用時に約10 ng/m¹ - 約1000 ng/m¹の濃度で存在するように含まれ、より好ましくは、使用時に約100 ng/m¹ - 約1000 ng/m¹の濃度で存在するように含まれる。BMP-7は、使用時に約100 ng/m¹の濃度で存在するように含まれていても、約1000 ng/m¹の濃度で存在するように含まれていてもよい。

【0100】

35 好ましい実施形態では、本発明において用いられる線維化抑制剤はさらにMAPキナーゼ阻害剤を含む。本発明で標的とされるMAPキナーゼ阻害剤は、MAPキナーゼのシグナル経路を阻害することができる限り、どのような薬剤 (agent) を用いてもよい。また、阻害されるべきMAPキナーゼシグナルは、MAPキナーゼをリン酸化することに参与し、その上流または下流へとシグナルが伝達されあるいは、傍流として他の経路から合流する経路があるが、
 40 どのようなシグナルであってもよい。

【0101】

本発明においては、1種類のMAPキナーゼ阻害剤を単独で含めることも、また必要に応じて数種類を併用して含めることもできる。

【0102】

本発明で使用されるMAPキナーゼ剤の濃度は、通常約0.1~100 $\mu\text{mol/l}$ 、
 5 0.1/l、好ましくは約0.1~30 $\mu\text{mol/l}$ 、より好ましくは約1 $\mu\text{mol/l}$ であり、数種類使用する場合は適宜変更することができ、他の濃度範囲としては、例えば、通常、約0.001~100 $\mu\text{mol/l}$ 、好ましくは、
 10 約0.01~75 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.05~50 $\mu\text{mol/l}$ 、約1~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.01~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.05~10 $\mu\text{mol/l}$ 、
 15 約0.075~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.1~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.5~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.75~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.0~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.25~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.5~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.75~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約2.0~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約2.5~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約3.0~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約4.0~10 $\mu\text{mol/l}$ 、
 20 約5.0~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約6.0~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約7.0~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約8.0~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約9.0~10 $\mu\text{mol/l}$ 、
 25 約0.01~50 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.05~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.075~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.1~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.5~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.75~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.0~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、
 30 約1.25~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.5~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.75~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約2.0~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約2.5~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約3.0~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約4.0~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、
 35 約0.01~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.05~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.1~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.5~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.75~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.0~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.25~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.5~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.75~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約2.0~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、
 40 約0.01~1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.05~1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.075~1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.1~1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.5~1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.75~1.0 $\mu\text{mol/l}$ を挙げることができるがこれらに限定されない。

【0103】

好ましいの実施形態では、本発明において用いられるMAPキナーゼ阻害剤はSB203580 (4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジン)のほか、本明細書において他に例示される成分を含む。

【0104】

別の実施形態では、本発明の培養正常化剤は老化抑制剤をさらに含む。ここで、使用されうる老化抑制剤としては、細胞の老化を抑制することが知られてゐる薬剤であればどのようなものでも使用されうるということが理解される。

【105】

5 本発明においては、1種類の老化抑制剤を単独で含めることも、また必要に応じて数種類を併用して含めることもできる。

【106】

本発明で使用される老化抑制剤の濃度は、通常約0.1~100 μmol/l、好ましくは約0.1~30 μmol/l、より好ましくは約1 nmol/l、10であり、数種類を使用する場合は適宜変更することができ、他の濃度範囲としては、例えば、通常、約0.001~100 μmol/l、好ましくは、約0.01~75 μmol/l、約0.05~50 μmol/l、約1~10 μmol/l、約0.01~10 μmol/l、約0.05~10 μmol/l、約0.075~10 μmol/l、約0.1~10 μmol/l、約0.5~10 μmol/l、約0.75~10 μmol/l、約1~10 μmol/l、約1.25~10 μmol/l、約1.5~10 μmol/l、約1.75~10 μmol/l、約2.0~10 μmol/l、約2.5~10 μmol/l、約3.0~10 μmol/l、約4.0~10 μmol/l、約5.0~10 μmol/l、約6.0~10 μmol/l、約7.0~10 μmol/l、約8.0~10 μmol/l、約9.0~10 μmol/l、約0.01~50 μmol/l、約0.05~50 μmol/l、約0.075~50 μmol/l、約0.1~50 μmol/l、約0.5~50 μmol/l、約1.0~50 μmol/l、約1.25~50 μmol/l、約1.5~50 μmol/l、約1.75~50 μmol/l、約2.0~50 μmol/l、約2.5~50 μmol/l、約3.0~50 μmol/l、約4.0~50 μmol/l、約5.0~50 μmol/l、約6.0~50 μmol/l、約7.0~50 μmol/l、約8.0~50 μmol/l、約9.0~50 μmol/l、約0.01~30 μmol/l、約0.05~30 μmol/l、約0.1~30 μmol/l、約0.5~30 μmol/l、約1.0~30 μmol/l、約1.25~30 μmol/l、約1.5~30 μmol/l、約1.75~30 μmol/l、約2.0~30 μmol/l、約2.5~30 μmol/l、約3.0~30 μmol/l、約4.0~30 μmol/l、約5.0~30 μmol/l、約6.0~30 μmol/l、約7.0~30 μmol/l、約8.0~30 μmol/l、約9.0~30 μmol/l、約0.01~10 μmol/l、約0.05~10 μmol/l、約0.1~10 μmol/l、約0.5~10 μmol/l、約1.0~10 μmol/l、約1.25~10 μmol/l、約1.5~10 μmol/l、約1.75~10 μmol/l、約2.0~10 μmol/l、約2.5~10 μmol/l、約3.0~10 μmol/l、約4.0~10 μmol/l、約5.0~10 μmol/l、約6.0~10 μmol/l、約7.0~10 μmol/l、約8.0~10 μmol/l、約9.0~10 μmol/l、約0.01~1.0 μmol/l、約0.05~1.0 μmol/l、約0.1~1.0 μmol/l、約0.5~1.0 μmol/l、約0.75~1.0 μmol/l、約0.9~35 μmol/l、約0.09~3.2 μmol/lであり、より好ましくは、約0.05~1.0 μmol/l、約0.075~1.0 μmol/l、約0.1~1.0 μmol/l、約0.5~1.0 μmol/l、約0.75~1.0 μmol/l、約0.9~3.2 μmol/lを挙げることができるがこれらに限定されない。

【107】

40 1つの実施形態では、本発明で用いられる老化抑制剤は、p38 MAPキナーゼ阻害剤を含む。

【108】

本発明においては、1種類のp38 MAPキナーゼ阻害剤を単独で含めることも、また必要に応じて数種類を併用して含めることもできる。

【0109】

本発明で使用されるP38 MAPキナーゼ剤の濃度は、通常約0.1~1000 $\mu\text{mol/l}$ 、好ましくは約0.1~30 $\mu\text{mol/l}$ 、より好ましくは約1 $\mu\text{mol/l}$ であり、数種類使用する場合は適宜変更することができ、他の濃度範囲としては、例えば、通常、約0.001~100 $\mu\text{mol/l}$ 、好ましくは、約0.01~75 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.05~50 $\mu\text{mol/l}$ 、約1~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.01~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.05~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.075~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.1~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.5~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.75~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.0~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.25~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.5~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.75~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約2.0~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約2.5~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約3.0~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約4.0~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約5.0~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約6.0~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約7.0~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約8.0~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約9.0~10 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.01~8.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.05~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.075~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.1~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.5~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.75~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.0~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.25~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.5~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.75~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約2.0~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約2.5~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約3.0~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約4.0~5.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.01~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.05~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.075~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.1~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.5~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.75~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.0~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.25~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.5~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約1.75~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約2.0~3.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.01~1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.05~1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.075~1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.1~1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.5~1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.75~1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.09~3.2 $\mu\text{mol/l}$ であり、より好ましくは、約0.05~1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.075~1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.1~1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.5~1.0 $\mu\text{mol/l}$ 、約0.75~1.0 $\mu\text{mol/l}$ を挙げることができるがこれらに限定されなし。

【0110】

1つの好ましい実施形態では、本発明で用いられる老化抑制剤はSB203580 (4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニル)フェニル]-1H-イミダゾール-5-イル)ピリジン)を含む。

【0111】

さらに好ましい実施形態では、本発明は、SB431542 (4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)2-ピリジニル]-1H-イミダゾール-2-イル)ベンズアミド)と、SB203580 (4-[4-(4-

フルオロフェニル) - 2 - (4 - メチルスルフィニルフェニル) - 1H - イミダゾール - 5 - イル] ピリジン) とを含む培養正常化剤を提供する。この2つの薬剤の組合せにより、正常化を維持しつつ、増殖速度を上げ、細胞密度も十分な培養がより改善されている。

5 **【 1 1 2 】**

別の実施形態では、本発明の培養正常化剤は細胞接着促進剤をさらに含む。本発明において用いられる細胞接着促進剤は、細胞接着を促進することができる薬剤であれば、どのような薬剤を用いてもよい。

【 1 1 3 】

10 1つの好ましい実施形態では、本発明で用いられる細胞接着促進剤としては1 - (5 - イソキノリンスルホニル) ホモピペラジンまたはその塩 (たとえば、ファスジル (1 - (5 - イソキノリンスルホニル) ホモピペラジン))、
 (+) - トランス - 4 - (1 - アミノエチル) - 1 - (4 - ピリジルカルバモ
15 2 ((R) - (+) - トランス - (4 - ピリジル) - 4 - (1 - アミノエチル) - シクロヘキサンカルボキサミド2 塩酸塩 1水和物) など) などのR h o
 キナーゼ阻害剤が挙げられる。

【 1 1 4 】

20 本発明において使用される接着促進剤は、角膜内皮細胞を試験管内で培養する場合に、培養正常化剤または培養液等の培地に添加することもできる。R h o
 キナーゼ阻害剤を当培養正常化剤または培地に添加して培養を続けることにより、R h o
 キナーゼ阻害剤と角膜内皮細胞とが生体外で接触し、角膜内皮細胞の接着が促進される。

【 1 1 5 】

25 本発明において使用される培地には、内皮細胞の培養に通常用いられる培地 (例えば、DMEM (G I B C O B R L 社)、血清 (例えば、ウシ胎仔血清 (F B S))、成長因子 (例えば、塩基性 (b -) F G F))、抗生物質 (例えば、ペニシリン、ストレプトマイシン) などを含むことができる。

【 1 1 6 】

30 本発明の培養成分にR h o キナーゼ阻害剤を含めることにより、角膜内皮細胞の接着を亢進することによって細胞の脱落を防止し、良好な細胞形態および高い細胞密度を持った角膜内皮細胞層の形成を可能とするため、本明細書に記載される本発明の角膜内皮製剤の製造方法に好適に用いられる。また、本発明の培養液は、角膜内皮細胞を維持するためにも用いられる。

【 1 1 7 】

35 本発明の培養正常化剤は、R h o キナーゼ阻害剤をさらに含有していてもよい。本発明に含まれるR h o キナーゼ阻害剤は、前記した通りである。本明細書において「角膜保存液」とは、ドナーから摘出した角膜片を、レシピエントに移植するまでの期間において保存するため、あるいは増殖前または増殖した
40 角膜内皮細胞を保存するための液剤である。

【 1 1 8 】

5 本発明の培養正常化剤は、角膜保存液として使用されてもよい。本発明の培養正常化剤が加えられるそのような角膜保存液としては、角膜移植時に通常用いられる保存液（強角膜片保存液（Optiso 1 GS：登録商標）、角膜移植用眼球保存液（EPI 1：登録商標））、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）などがあげられる。

【0119】

本発明においては、1種類のRhヒキナーゼ阻害剤を単独で含めることも、また必要に応じて数種類を併用して含めることもできる。

【0120】

10 本発明中のRhヒキナーゼ阻害剤の濃度は、通常1~100 μmol/l、好ましくは0.1~20 μmol/l、より好ましくは10 μmol/lであり、数種類使用する場合は適宜変更することができ、他の濃度範囲としては、例えば、通常、約0.001~100 μmol/l、好ましくは、約0.01~75 μmol/l、約0.05~50 μmol/l、約1~10 μmol/l、
 15 約0.01~10 μmol/l、約0.05~10 μmol/l、約0.075~10 μmol/l、約0.1~10 μmol/l、約0.5~10 μmol/l、約0.75~10 μmol/l、約1.0~10 μmol/l、約1.25~10 μmol/l、約1.5~10 μmol/l、約1.75~10 μmol/l、約2.0~10 μmol/l、約2.5~10 μmol/l、約3.0~10 μmol/l、約4.0~10 μmol/l、約5.0~10 μmol/l、約6.0~10 μmol/l、約7.0~10 μmol/l、約8.0~10 μmol/l、約9.0~10 μmol/l、約0.01~50 μmol/l、約0.05~50 μmol/l、約0.075~50 μmol/l、約0.1~50 μmol/l、約0.5~50 μmol/l、約0.75~50 μmol/l、約1.0~50 μmol/l、約1.25~50 μmol/l、約1.5~50 μmol/l、約1.75~50 μmol/l、約2.0~50 μmol/l、約2.5~50 μmol/l、約3.0~50 μmol/l、約4.0~50 μmol/l、約5.0~50 μmol/l、約6.0~50 μmol/l、約7.0~50 μmol/l、約8.0~50 μmol/l、約9.0~50 μmol/l、約0.01~3.0 μmol/l、約0.05~3.0 μmol/l、約0.075~3.0 μmol/l、約0.1~3.0 μmol/l、約0.5~3.0 μmol/l、約0.75~3.0 μmol/l、約1.0~3.0 μmol/l、約1.25~3.0 μmol/l、約1.5~3.0 μmol/l、約1.75~3.0 μmol/l、約2.0~3.0 μmol/l、約0.01~1.0 μmol/l、約0.05~1.0 μmol/l、約0.075~1.0 μmol/l、約0.1~1.0 μmol/l、約0.5~1.0 μmol/l、約0.75~1.0 μmol/l、約0.9~3.5 μmol/l、約0.09~3.2 μmol/lであり、より好ましくは、約0.05~1.0 μmol/l、約0.075~1.0 μmol/l、約0.1~1.0 μmol/l、約0.5~1.0 μmol/l、約0.75~1.0 μmol/lを挙げることができ、これらに限定されない。

20
 25
 30
 35
 40

【0121】

本発明は、角膜の形質転換を防止し、正常化された培養を可能とし、あるいは角膜内皮細胞の接着を亢進することによって細胞の脱落を防止し、良好な細胞形態および高い細胞密度を持った角膜内皮細胞層の形成を可能とするため、臓器移植などに用いられる角膜の保存液として用いられる。また、本発明の培養正常化剤は、角膜内皮細胞を凍結保存するための保存液またはその成分としても用いられる。凍結保存のためには、本発明の保存液にグリセロール、ジメチルスルホキシド、プロピレングリコール、アセトアミド等をさらに添加してよい。

【0 1 2 2】

1つの実施形態では、本発明の培養正常化剤を使用する際、培養正常化剤は、複数の薬剤が別々に使用されうる。そのような実施形態では、例えば、線維化抑制剤は、前記角膜内皮細胞の培養の間常に存在させ、他方、接着促進剤は、一定期間存在させた後、いったん該接着促進剤を欠損させ、再度該細胞接着促進剤は、一定期間存在させることができる。

【0 1 2 3】

別の実施形態では、本発明の培養正常化剤を使用する際、線維化抑制剤および前記細胞接着促進剤の両方を、前記角膜内皮細胞の培養の間常に存在させることができる。

【0 1 2 4】

1つの実施形態では、本発明の培養正常化剤で培養される角膜内皮細胞は霊長類由来である。好ましい実施形態では、本発明の培養正常化剤で培養される角膜内皮細胞はヒト由来である。

【0 1 2 5】

好ましい実施形態では、本発明が目的とする培養は、角膜内皮障害の予防または治療のための細胞培養である。

【0 1 2 6】

(角膜内皮細胞を正常に培養するための培地)

別の局面において、本発明は、本発明の培養正常化剤と角膜内皮の培養成分とを含む、角膜内皮細胞を正常に培養するための培地を提供する。本発明の培地において用いられる培養正常化剤は、本明細書において説明される任意の形態を用いることができることが理解される。また、本発明において使用される培養成分は、角膜内皮の培養に用いられうる成分であればどのようなものでも用いることができ、従来販売され使用されている培地成分であってもよく、あるいは、別途角膜内皮用に開発された成分であってもよい。そのような培地成分の例としては、OptiMEM、DMEM、M199、MEM等（これらは、INVITROGEN等から入手可能）を挙げることができるがこれらに限定されない。

【0 1 2 7】

(角膜内皮細胞を正常に培養する方法)

別の局面において、本発明は、本発明の培養正常化剤、または本発明の培地を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を包含する、角膜内皮細胞を正常に培養する方法を提供する。本発明の方法において用いられる培養正常化剤は、本明

細書において説明される任意の形態を用いることができることが理解される。また、本発明の方法において使用される培養成分は、角膜内皮の培養に用いられる成分であればどのようなものでも用いることができ、(角膜内皮細胞を正常に培養するための培地)において説明されたものを例示することができる。

5

【 1 2 8 】

1つの例示的な培養法は、図12に示している。例えば、1つの例示的な培養法において。本発明の培養正常化剤は、複数の薬剤が別々に使用され得、例えば、線維化抑制剤は、前記角膜内皮細胞の培養の間常に存在させ、他方、接着促進剤は、一定期間(例えば、24時間〜72時間、あるいは48時間等)存在させた後、いったん該接着促進剤を欠損させ、再度該細胞接着促進剤は、一定期間(例えば、24時間〜72時間、あるいは48時間等、この期間は毎回変動してもよく同じであってもよし)存在させることができる。あるいは、これらの培養法において、接着促進剤を使用しないパターンもあり得る。すなわち、この例示的な培養法は、図12下に示している。例えば、この例示的な培養法において。本発明の培養正常化剤はとして線維化抑制剤は、前記角膜内皮細胞の培養の間常に存在させることができる。

10

15

【 1 2 9 】

別の実施形態では、本発明の方法において、使用される培養正常化剤は線維化抑制剤および前記細胞接着促進剤の両方を含み、これらを前記角膜内皮細胞の培養の間常に存在させることができる。

20

【 1 3 0 】

1つの実施形態では、本発明の培養正常化剤で培養される角膜内皮細胞は霊長類由来である。好ましい実施形態では、本発明の培養正常化剤で培養される角膜内皮細胞はヒト由来である。

25

【 1 3 1 】

好ましい実施形態では、本発明の方法が目的とする培養は、角膜内皮障害の予防または治療のための細胞培養であり、特に移植用の細胞または組織等を生産するために用いることができる。

30

【 1 3 2 】

(角膜内皮細胞および角膜内皮製剤)

本発明は、本発明の方法で培養される角膜内皮細胞を提供する。本発明は、通常の培養を行い継代しても、線維化せず、正常機能を喪失しないという細胞である点従来の細胞に無い性質を有するということができる。そして、最も重要な性質は、機能としては正常な角膜内皮の性質を有しているという点である。したがって、本発明が提供する角膜内皮細胞は、製剤として提供されうることから、本発明は、角膜内皮製剤を提供するということになる。

35

【 1 3 3 】

したがって、本発明は、本発明の培養正常化剤を含む培養液を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を含む、角膜内皮製剤の製造方法を提供する。

40

【 1 3 4 】

1つの局面において、本発明の角膜内皮製剤は、基材と、その基材上の試験管内で培養した角膜内皮細胞層とを含有する。

【0135】

5 本発明において使用される基材とは、培養角膜内皮細胞層を担持し、移植後一定期間好ましくは少なくとも3日間は生体内でもその形状を維持しうるものであれば特に限定されるものではない。また、本発明において使用される基材は、角膜内皮細胞を試験管内で培養する場合のスキヤフォールドとしての役割を有するものであってもよく、培養後の角膜内皮細胞層を担持させる役割のみを有するものであってもよい。好ましくは、本発明において使用される基材は、
10 角膜内皮細胞の培養に用いられ、培養完了後にそのまま移植に供することが可能なスキヤフォールドとしての役割を有するものである。

【0136】

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

【0137】

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

【0138】

好ましい実施形態において、本発明において使用される基材の例はコラーゲンである。コラーゲンとしては、特開2004-24852号公報に記載のコラーゲンシートが好適に使用できる。かかるコラーゲンシートは、特開2004-24852号公報に記載の方法に従って、例えば、羊膜から調製することができる。
30

【0139】

以下に角膜内皮製剤の一例として角膜内皮細胞層の調製を記載する。

【0140】

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

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

40 (2) 細胞層における細胞密度は約1,000~約4,000細胞/mm²である。特に、成人をレシピエント(移植者)とする場合には約2,000~約3,000細胞/mm²であることが好ましい。

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

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

10 **【0141】**

本発明の製造方法は、本発明の培養正常化剤または培地を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を含み、例えば以下の方法により実施され得る。

【0142】

- 15 < 1 > 角膜内皮細胞の採取および試験管内での培養

角膜内皮細胞はレシipient自身または適切なドナーの角膜から常法で採取される。本発明における移植条件を考慮すれば、同種由来の角膜内皮細胞を準備すればよい。例えば、角膜組織のデスメ膜と内皮細胞層を角膜実質から剥離した後、培養皿に移し、デイスパーゼなどで処理する。これによつて角膜内皮細胞はデスメ膜より脱落する。デスメ膜に残存している角膜内皮細胞はピペッティングなどによつて脱落させることができる。デスメ膜を除去した後、本発明の培養液中で角膜内皮細胞を培養する。培地または培養液としては例えば市販のDMEM (D u i b e c c o ' s M o d i f i e d E a g l e ' s M e d i u m) (例えば、INVITROGEN、カタログ番号：12320等)にFBS (ウシ胎仔血清) (例えば、BIOWEST、カタログ番号：S1820-500)、b-FGF (塩基性線維芽細胞増殖因子) (例えば、INVITROGEN、カタログ番号：13256-029)、およびペニシリン、ストレプトマイシンなどの抗生物質を適宜添加し、さらに本発明の培養正常化剤の成分を添加したものを使用することができる。培養容器 (培養皿) にはその表面にI型コラーゲン、IV型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンまたはウシ角膜内皮細胞の細胞外マトリックスなどをコーティングしてあるものを使用することが好ましい。あるいは、通常の培養容器をFNC coating mix (登録商標) (50ml (AES-0407)、ATHENA、カタログ番号：0407)等の市販のコーティング剤で処理したものを
20
25
30
35
用いてもよい。かかるコーティングと本発明の培養液とを併用することにより、角膜内皮細胞の培養容器表面への接着が促され、良好な増殖が行われるからである。

【0143】

角膜内皮細胞を培養する際の温度条件は、角膜内皮細胞が生育する限りにおいて特に限定されないが、例えば約25℃～約45℃、増殖効率を考慮すれば、好ましくは約30℃～約40℃、さらに好ましくは約37℃である。培養方法
40

は、通常の細胞培養用インキュベーター内で、加湿下、約5～10%のCO₂濃度の環境下で行われる。

【0144】

<2> 継代培養

- 5 培養に供された角膜内皮細胞が増殖した後に継代培養を行うことができる。好ましくはサブコンフルエントないしコンフルエントになった時点で継代培養を行う。継代培養は次のように行うことができる。まずトリプシン-EDTA等で処理することによって細胞を培養容器表面から剥がし、次いで細胞を回収する。回収した細胞に本発明の培養正常化剤または培地を加えて細胞浮遊液とする。細胞を回収する際、あるいは回収後に遠心処理を行うことが好ましい。10 かかる遠心分離処理によって細胞密度の高い細胞浮遊液を調製することができる。好ましい細胞密度は、約 $1 \sim 2 \times 10^6$ 個/mLである。尚、ここでの遠心処理の条件としては、例えば、500rpm(30g)～1000rpm(70g)、1～10分を挙げることができる。

15 【0145】

- 細胞浮遊液は上記の初期培養と同様に培養容器に播種され、培養に供される。継代時の希釈倍率は細胞の状態によっても異なるが、約1:2～1:4、好ましくは約1:3である。継代培養は上記の初期培養と同様の培養条件で行うことができる。培養時間は使用する細胞の状態などによっても異なるが、例えば20 7～30日間である。以上の継代培養は必要に応じて複数回行うことができる。本発明の培養正常化剤または培地において、細胞接着促進剤を用いれば、培養初期の細胞接着を亢進させることにより、培養期間の短縮が可能となる。

【0146】

<3> 角膜内皮細胞層の調製

- 25 細胞浮遊液は、コラーゲンシート等の基材上に播種され、培養に供される。この際、最終的に製造される角膜内皮製剤において所望の細胞密度の細胞層が形成されるように播種する細胞数が調整される。具体的には細胞密度が約1,000～約4,000細胞/mm²の細胞層が形成されるように細胞を播種する。培養は上記の初期培養などと同様の条件で行うことができる。培養時間は30 使用する細胞の状態などによっても異なるが、例えば3～30日間である。

【0147】

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

【0148】

- 35 本発明において、角膜内皮製剤は、角膜内皮細胞を維持するために、本発明の培養正常化剤またはそれを含む培地を含んでもよい。また、角膜内皮製剤は、移植に供されるまでに本発明の培養正常化剤またはそれを含む培地を含んでもよい。本発明は、角膜内皮製剤と本発明の培養正常化剤またはそれを含む培地との組合せも提供する。

40 【0149】

本発明の製造方法により得られた角膜内皮製剤は、角膜内皮の移植が必要な疾患、例えば水疱性角膜症、角膜浮腫、角膜白斑、特に、角膜ジストロフィ、

外傷または内眼手術に起因する角膜内皮障害によって生じる水疱性角膜症の治療における移植片として用いることができる。このような水疱性角膜症、角膜内皮障害などの原因としては、手術のほかフックス角膜内皮ジストロフィ、偽落屑症候群、角膜内皮炎等を挙げることができる。

5 【0150】

本発明の角膜内皮製剤の投与対象は、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル等）があげられ、好ましくは霊長類（例えば、ヒト）である。

 【0151】

10 （角膜内皮疾患、障害または状態の処置または予防）

本発明は、本発明の培養正常化剤、または本発明の培地を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を包含する、角膜内皮細胞を正常に培養する方法によって生産された角膜内皮細胞を含む、角膜内皮疾患、障害または状態の処置または予防のための医薬を提供する。本発明の培地または培養正常化剤は本明細書において説明される任意の形態を用いることができることが理解され、例えば、（培養正常化剤）、（角膜内皮細胞を正常に培養するための培地）、（角膜内皮細胞を正常に培養する方法）に記載された事項を参酌することができる。また、医薬として使用される角膜内皮細胞は、本明細書において使用される任意の形態をとり得ることが理解され、例えば、（角膜内皮細胞および角膜内皮製剤）に記載された事項を参酌することができる。

15 【0152】

1つの実施形態では、本発明の医薬は、霊長類の角膜内皮の処置または予防を目的とする。好ましくは、この処置または予防の対象は、ヒトの角膜内皮である。

20 【0153】

1つの実施形態では、本発明の医薬において使用される角膜内皮細胞は霊長類由来である。好ましくは、本発明の医薬において使用される角膜内皮細胞はヒト由来である。

 【0154】

25 1つの実施形態では、本発明の医薬が対象とする角膜内皮疾患、障害または状態が水疱性角膜症、角膜内皮炎、角膜浮腫、角膜白斑等である。

 【0155】

1つの実施形態では、本発明の医薬は、シート状または懸濁物で提供される。

 【0156】

30 1つの実施形態では、本発明の医薬は、細胞接着促進剤をさらに含む。細胞接着促進剤は、角膜組織から分離された角膜内皮細胞または分離され継代した角膜内皮細胞に対して接着促進作用を奏する。この細胞接着促進剤は、医薬として提供される角膜内皮細胞と一緒にまたは別々に提供されることができる。具体的な実施形態では、本発明の医薬において使用される細胞接着促進剤としては、Rhoキナーゼ阻害剤を挙げることができる。Rhoキナーゼ阻害剤としては、下記文献：米国特許4678783号、特許第3421217号、国際公開第95Z28387、国際公開99/20620、国際公開99/61

403、国際公開02/076976、国際公開02/076977、国際公開第2002/083175、国際公開02/100833、国際公開03/059913、国際公開03/062227、国際公開2004/009555、国際公開2004/022541、国際公開2004/108724、国際公開2005/003101、国際公開2005/039884、国際公開2005/034866、国際公開2005/037197、国際公開2005/037198、国際公開2005/035501、国際公開2005/035503、国際公開2005/035506、国際公開2005/080394、国際公開2005/103050、国際公開2006/057270、国際公開2007/026664などに開示された化合物があげられる。かかる化合物は、それぞれ開示された文献に記載の方法により製造することができ、例えば、1-(5-イソキノリンスルホニル)ホモピペラジンまたはその塩(たとえば、フアスジル(1-(5-イソキノリンスルホニル)ホモピペラジン))、(+)-トランス-4-(1-アミノエチル)-1-(4-ピリジルカルバモイル)シクロヘキサンカルボキサミドまたはその塩(たとえば、Y-27632((R)-(+)-トランス-(4-ピリジル)-4-(1-アミノエチル)-シクロヘキサンカルボキサミド2塩酸塩1水和物)など)などを挙げるができる。

【0157】

20 本発明の医薬または方法の投与(移植)対象は、哺乳動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、ヒツジ、サシ等)があげられるが、霊長類が好ましく、特にヒトが好ましい。霊長類での角膜内皮治療はこれまで十分な成績が達成されておらず、その意味で本発明は画期的な治療法および医薬を提供する。

【0158】

25 別の局面において、本発明は、本発明の培養正常化剤、または本発明の培地を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を包含する、角膜内皮細胞を正常に培養する方法によって生産された角膜内皮細胞を用いる工程を包含する、角膜内皮疾患、障害または状態の処置または予防のための方法を提供する。

【0159】

30 別の局面において、本発明は、細胞接着促進剤を含む、ヒトの角膜内皮疾患、障害または状態の処置または予防のための医薬を提供する。この局面では、細胞接着促進剤のもつ、角膜組織から分離された角膜内皮細胞または分離され継代した角膜内皮細胞に対して有する接着促進作用を利用する。この局面の1つの具体的な実施形態では、本発明の医薬において使用される細胞接着促進剤はRhoキナーゼ阻害剤を挙げるができる。Rhoキナーゼ阻害剤としては、
 35 下記文献:米国特許4678783号、特許第3421217号、国際公開第95/28387、国際公開99/20620、国際公開99/61403、国際公開02/076976、国際公開02/076977、国際公開第2002/083175、国際公開02/100833、国際公開03/059913、国際公開03/062227、国際公開2004/009555、国際公開2004/022541、国際公開2004/108724、国際公開2

005/003101、国際公開2005/039564、国際公開2005/034866、国際公開2005/037197、国際公開2005/037198、国際公開2005/035501、国際公開2005/035503、国際公開2005/035506、国際公開2005/080394、国際公開2005/103050、国際公開2006/057270、国際公開2007/026664などに開示された化合物があげられる。かかる化合物は、それぞれ開示された文献に記載の方法により製造することができ、例えば、1-(5-イソキノリンスルホニル)ホモピペラジンまたはその塩(たとえば、ファスジル(1-(5-イソキノリンスルホニル)ホモピペラジン))、(+)-トランス-4-(1-アミノエチル)-1-(4-ピリジルカルバモイル)シクロヘキサニルボキサミドまたはその塩(たとえば、Y-27632((R)-(+)-トランス-4-(ピリジル)-4-(1-アミノエチル)-シクロヘキサニルボキサミド2塩酸塩1水和物)など)などを挙げる
 5
 10
 15

【0160】

本発明の細胞接着促進剤を含む医薬は、本発明の培養正常化剤、または本発明の培地を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を包含する、角膜内皮細胞を正常に培養する方法によって生産された角膜内皮細胞と共に用いられる。ここで、本発明の細胞接着促進剤を含む医薬は、この角膜内皮細胞と一緒に投与または移植されてもよく、別々に投与または移植されてもよい。
 20

【0161】

1つの具体的な実施形態では、本発明の細胞接着促進剤を含む医薬が標的とする角膜内皮疾患、障害または状態が水疱性角膜症、角膜内皮炎、角膜浮腫、角膜白斑等である。
 25

【0162】

別の局面では、本発明は、細胞接着促進剤を処置または予防が必要な被験体に投与する工程を包含する、ヒトの角膜内皮疾患、障害または状態の処置または予防のための方法を提供する。
 30

【0163】

細胞接着促進剤を含む医薬についても、本発明の医薬または方法の投与(移植)対象は、哺乳動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、ヒツジ、サル等)があげられるが、霊長類が好ましく、特にヒトが好ましい。霊長類での角膜内皮治療はこれまで十分な成績が達成されておらず、その意味で本発明は画期的な治療法および医薬を提供する。
 35

【0164】

本発明の細胞接着促進剤を含む医薬または、本発明の方法を用いて生産された角膜内皮細胞を含む、角膜内皮疾患、障害または状態の処置または予防のための医薬において使用される細胞接着促進剤またはRhoキナーゼ阻害剤が使用される濃度は限定されないが、例えば、通常、約0.00001~1w/v%、好ましくは、約0.00001~0.1w/v%、より好ましくは約0.0001~0.05w/v%、約0.001~0.05w/v%、約0.00

International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals) ならびに、動物の愛護および管理に関する法律、実験動物の飼養および保管等に関する基準に従った。また、本実験は Guidelines of the Association for Research in Vision and Ophthalmology on the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research に従って行った。組織の単離は、それぞれ、日精バイリス株式会社滋賀研究所 (Shiga Laboratory, Nissei Biolis Co., Ltd.) (滋賀県大津市) (Ohtsu, Japan) の動物実験倫理委員会および株式会社イブバイオサイエンス (Eve Bioscience, Co., Ltd.) (和歌山県橋本市) (Hashimoto, Japan) の動物実験委員会による承認を受けた。また、該当する場合生物試料等の取り扱いは、厚生労働省、文部科学省等において規定される基準を遵守し、該当する場合はヘルシンキ宣言またはその宣言に基づき作成された倫理規定に基づいて行った。研究のための眼の寄贈については、全ての故人ドナーの近親者から同意書を得た。本研究は、SightLife™ (Seattle, WA) アイバンクの治験審査委員会による承認を受けた。

【 168 】

(実験手法 : サルの角膜組織および研究グレードのヒト角膜組織)

それぞれ、日精バイリス株式会社滋賀研究所および株式会社イブバイオサイエンスで飼われた4匹のカニクイザル (3~5歳齢 ; ヒト年齢では5~20歳に等しいと推定される) からの8個の角膜を、サル角膜内皮細胞 (MCEC) 培養に使用した。12個のヒトドナー角膜は、SightLife™ アイバンクから入手し、全ての角膜を、初代培養前に14日未満の期間にわたり、保存培地 (Optisol; Chiron Vision Corporation, Irvine, CA) 中、4℃で保存した。

【 169 】

(統計解析)

2 サンプルの比較の平均値における統計的有意差 (P 値) は、スチューデントの t 検定を用いて決定した。複数のサンプルセットの比較における統計的有意差は、ダネットの多重比較検定を用いて解析した。グラフに示す値は平均土 SE を表す。

【 170 】

(比較例 1)

本例では、従来法で培養したカニクイザルおよびヒトの角膜内皮細胞の様子を示す。以下にその詳細を示す。

【 171 】

(材料および方法)

カニクイザル角膜内皮細胞 (MCEC ; 入手先および培養方法) : MCEC は、以前に記載された改良型プロトコールで培養した [Koizumi N, et al. (2007) Invest Ophthalmol Vis Sci 48 : 4519-4526]、[Li W, et

al. (2007) Invest Ophthalmol Vis Sci 48 : 614-620]。簡単に述べると、別の目的で安楽死させたカニクイザルの眼球を購入して、(Nissei Billis Co., Ltd., Ohtsu, Japan および Kears Co., Ltd., Wakayama, Japan) (方法は上述)、

5 角膜内皮細胞を含むデスメ膜を剥離し、角膜内皮細胞を基底膜とともに機械的に剥離して、デイスパーゼあるいはコラゲナーゼ (ROCHE カタログ番号 : 10 103 586 001) を用いて処理後に初代培養を行った。代表的には、1mg/mL コラゲナーゼA (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) を用いて37°Cにて2時間

10 処理した。培地は10% FBS (BIOWEST、カタログ番号 : S1820-500) と2ng/ml 塩基性FGF (INVITROGEN、カタログ番号 : 13256-029) を添加したDMEM (INVITROGEN カタログ番号12320) を用いた。培養には、FNC Coating MIX (登録商標) (Athena Environmental Sciences, Baltimore, MD) でコーティングした6 ウエルプレート等

15 を用いた。次いで、MCECを5% CO₂中37°Cの加湿雰囲気下で培養し、2日おきに培養培地を交換した。MCECが10〜14日でコンフルエントに達すると、これらを、Ca²⁺およびMg²⁺非含有ダルベッコリン酸緩衝化生理食塩水 (PBS) 中でリンスし、37°Cにて5分間0.05% トリプシン-E

20 DTA (Life Technologies) でトリプシン処理し、そして、1 : 2〜4 の比で継代した。トランスフォーミング増殖因子- β (TGF- β) の選択的インヒビターであるSB431542 (Merck Millipore, Billerica, MA) を、抗線維芽細胞様作用について調べた。

25 ・ヒト角膜内皮細胞 (HCEC、入手先および培養方法) : HCECは、MCECについて用いたプロトコールの改良バージョンで培養した。簡単に述べると、シアトルアイバンクから購入した研究用角膜より、角膜内皮細胞を含むデスメ膜を剥離し、角膜内皮細胞を基底膜とともに機械的に剥離して、コラゲナーゼ (ROCHE カタログ番号 : 10 103 586 001) を用いて

30 基底膜よりはがして (代表的には、1mg/mL コラゲナーゼA (Roche Applied Science) を用いて37°Cにて2時間処理した。) 回収後、初代培養を行った。培地はヒトはOpti-MEM 1 Reduced-Serum Medium, Liquid (INVITROGEN カタログ番号 : 31985-070) + 8% ウシ胎仔血清 (FBS) (BIOWEST、カタログ番号 : S1820-500) + 200mg/ml CaCl₂ · 2H₂O (SIGMA カタログ番号 : C7902-500G) + 0.08% コンドロイチン硫酸 (SIGMA カタログ番号 : C9819-5G) + 20 μ g/ml アスコルビン酸 (SIGMA カタログ番号 : A4544-25G) + 50 μ g/ml ゲンタマイシン (INVITROGEN カタ

35 ログ番号 : 15710-064) + 5ng/ml EGF (INVITROGEN カタログ番号 : PHG0311) を3T3フィーダー細胞用に馴化させたものを用いた。具体的には、37°Cでの消化後、個々の角膜から得られたH

40

CECを培養培地中に再懸濁させ、FNC Coating Mix (登録商標)でコーティングした12ウェルプレートの1ウェルにプレーティングした。培養培地は、一部の改変を加えた公開されたプロトコールに従って調製した。

簡単に述べると、OptiMEM-1 (Life Technologies)、8% FBS、5 ng/mL 上皮増殖因子 (EGF) (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO)、20 μ g/mL アスコルビン酸 (Sigma-Aldrich)、200 mg/L 塩化カルシウム (Sigma-Aldrich)、0.08% コントロイチン硫酸 (和光純薬工業株式会社、大阪市) および50 ng/mL のゲンタマイシンを含有する基本培養培地を準備し、次いで、不活性化3T3線維芽細胞の培養後に馴化培地を回収した。3T3線維芽細胞の不活性化は、以前に記載されたとおりに実施した。簡単に述べると、コンフルエントな3T3線維芽細胞を4 \times 10⁶ cells/mL マイトマイシンC (MMC) (協和発酵キリン株式会社、東京都) とともに、5% CO₂ 下で37°Cにて2時間インキュベートし、次いでトリプシン処理し、そして、2 \times 10⁴ cells/cm² の密度でプラスチック皿にプレーティングした。HCECは、5% CO₂ 中37°Cにて加湿雰囲気下で培養し、2日おきに培養培地を交換した。HCECが14~28日でコンフルエントに達すると、これらを、Ca²⁺およびMg²⁺非含有PBS中でリンスし、37°Cにて5分間0.05% トリプシン-EDTAでトリプシン処理し、そして、1:2の比で継代した。SB431542 (Merck Millipore)、TGF- β に対する中和抗体 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN)、Smad3インヒビター (Merck Millipore) および骨形成タンパク質 (BMP) BMP-7 (R&D Systems) を、抗線維芽細胞様作用について調べた。

・染色等の細胞観察方法 (組織学的試験) 細胞観察は位相差顕微鏡にて行った。また、細胞を固定した後に機能関連マーカーとしてZO-1、Na⁺/K⁺-ATPaseを用いて免疫染色を行い蛍光顕微鏡にて観察を行った。組織染色検査のために、培養したMCECまたはHCECをLab-Tek™ Chamber Slides™ (NUNC A/S, Roskilde, Denmark) に入れ、4%ホルムアルデヒドで10分間室温 (RT) で固定し、1% ウシ血清アルブミン (BSA) とともに30分間インキュベートした。具体的には、Lab-Tek™ Chamber Slides™ (NUNC A/S, Roskilde, Denmark) 上の培養MCECまたはHCECを室温で10分間4%ホルムアルデヒド中で固定し、1% ウシ血清アルブミン (BSA) とともに30分間インキュベートした。CECの表現型を調べるために、密着結合関連タンパク質であるZO-1 (Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA)、ポンプ機能に関連するタンパク質であるNa⁺/K⁺-ATPase (Upstate Biotech, Inc., Lake Placid, NY)、フィブロネクチン (BD, Franklin Lakes, NJ) およびアクチンの免疫組織化学分析を行った。CECの機能に関連するマーカーとしてZO-1 およびNa⁺/K⁺-ATPaseを使用し、線維芽細胞様の変化を評価するた

めにフィブロネクチンおよび1型コラーゲンを使用し、そして、細胞の形態を評価するためにアクチンの染色を使用した。ZO-1、Na⁺/K⁺-ATPase、1型コラーゲンおよびフィブロネクチンの染色は、それぞれ、ZO-1ポリクローナル抗体、Na⁺/K⁺-ATPaseモノクローナル抗体、および

5 フィブロネクチンモノクローナル抗体の1:200希釈を用いて実施した。二次抗体には、Alexa Fluor (登録商標) 488標識、または、Alexa Fluor (登録商標) 594標識ヤギ抗マウスIgG (Life Technologies) の1:2000希釈を使用した。アクチンの染色は、Alexa Fluor (登録商標) 488標識ファロイジン (Life Technologies) の1:400希釈を用いて実施した。次いで、細胞の核をDAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) またはPI (Sigma-Aldrich) で染色した。次いで、スライドを蛍光顕微鏡 (TCS SP2 AOB S; Leica Microsystems, Weizlar, Germany) で観察した。

15 **[172]**

(結果)

図1にカニクイザルおよびヒトにおける従来の細胞培養法での培養結果を示す。培養結果から明らかのように、サル、ヒトの角膜内皮において通常の培養法では形質転換し、すなわち、いずれの細胞でも線維化が生じており、多角形の一層の細胞である正常細胞とは異なった形態であり移植には適さない状態となっていることが分かる。

20 **[173]**

(比較例2)

25 本例では、従来技術で培養した場合に、正常機能を消失することを示す実験を行った。本例では、サル角膜内皮が機能関連タンパク質の発現を消失するかどうかを、免疫染色およびウエスタンブロット法ならびにリアルタイムPCR法にて実証した。以下にその詳細を示す。

30 **[174]**

(材料および方法)

以下に使用した材料のうち比較例1と同じものは比較例1と同様に入手し培養等を行った。

- カニクイザル角膜内皮細胞 :比較例1と同じである。
- ヒト角膜内皮細胞 :比較例1と同じである。

35 •Na⁺/K⁺-ATPaseに対する抗体 :MILLIPORE社製 (MILLIPORE カタログ番号 :05-369) のものを用いた。

40 •ZO-1に対する抗体 :マウスINVITROGEN社製 (INVITROGEN カタログ番号 :339100)、ウサギZYMED LABORATORIES社製 (ZYMED LABORATORIES カタログ番号 :61-7300) のものを用いた。'フィブロネクチンに対する抗体 :BD BIOSCIENCES社製 (カタログ番号 :610077)

• コラーゲン1型に対する抗体 : (ABCAM社製) (カタログ番号 : ab292)

• GAPDHに対する抗体 : ABCAM社製 (カタログ番号 : ab36840) のものを用いた。

5 ' 二次抗体 (HPR結合抗ウサギIgG二次抗体) Cell Signaling Technology社製 (カタログ番号 : 7074)

• 二次抗体 (抗ウサギIgG二次抗体) Cell Signaling Technology社製 (カタログ番号 : 7076)

10 • 細胞画分抽出・調製法 : コンフルエントに達した細胞をPBS (Dulbecco's PBS、ニッスイ、カタログ番号 : 5913) で3回洗浄後、RIPAバッファー (1X PBS、1% Nonidet P-40 (ナカライテスト、カタログ番号 : 23640-94)、0.5%デオキシコール酸ナトリウム (ナカライテスト、カタログ番号 : 10712-12)、0.1%SDS (ラウリル硫酸ナトリウム、ナカライテスト、カタログ番号 : 31607-65)) で溶解した。前述のRIPAバッファー中には、ホスファターゼインヒビターカクテル2 (Sigma-Aldrich) およびプロテアーゼインヒビターカクテル (ナカライテスト株式会社、京都市) を添加した。得られた細胞溶解液を遠心分離 (1500 Orpm、10分間) し、その上清を回収し、

20 タンパク質をBCA PROTEIN ASSAY KIT (PIERCE社製 (カタログ番号 : 23227)) により定量した。5mM 2-メルカプトエタノール (ナカライテスト社製 (カタログ番号 : 21418-42)) を含む100 μ lの溶解バッファー (レムリサンプルバッファー) で溶解した。

' 免疫染色 : コンフルエントに達した細胞をPBS (ニッスイ、カタログ番号 : 5913) 洗浄後、氷冷したエタノール (ナカライテスト、カタログ番号 : 14713-95) と酢酸 (WAKO カタログ番号 : 017-00256) (95 : 5) にて10分間固定した。

【b175】

0.1% (vol/vol) ポリエチレンソルビタンモノラウレート (ナカライテスト、カタログ番号 : 28353-85) (TBS-T) と10% ウシ胎仔血清を補ったTris緩衝化食塩水 (10mM Tris-HCl、pH 7.4 ; 100mM NaCl) で1時間インキュベートすることによりブロッキング操作を行った。ウサギ抗ヒトZO-1抗体 (1 : 200)、マウス抗ヒトNa⁺/K⁺-ATPase抗体 (1 : 200) を一次抗体として使用し、室温にて1時間反応させた。フィブロネクチンに対する抗体、コラーゲン1型に対する抗体についても、同様に使用した。希釈率は、1 : 200または1 : 1000を適宜使用した。

35

【b176】

次いでTBS-Tにて1000倍に希釈したALEXA FLUOR 594 (INVITROGEN社 (カタログ番号 : A21203)) とALEXA FLUOR 488 (INVITROGEN社 (カタログ番号 : A21206)) で室温で1時間反応させた。PBSで洗浄後、VECTASHIELD WITH DAPI (VECTOR LABORATORIES社 (カタロ

40

グ番号 : 94010)) とともにスライドに封入し、共焦点顕微鏡 (ライカ社製) で観察した。

ウエスタンブロット法 : R I P A バッファーで抽出し得られたタンパク質を 7.5% ポリアクリルアミドで電気泳動した。分離されたタンパク質は P V D F 膜 (P A L L L I F E S C I E N C E 社製 (カタログ番号 : E H - 2 2 2 2)) に転写した。

5% 無脂肪乾燥乳 (5% N O N F A T D R Y M I L K、C E L L S I G N A L I N G 社 (カタログ番号 : 9999)) を補った 0.1% (v o l / v o l) ポリエチレンソルビタンモノラウレート (ナカライテスタ、カタログ番号 : 28353-85) を含む T r i s 緩衝化食塩水

(10mM T r i s - H C l、p H 7.4 ; 100mM N a C l) (T B S - T) と、ブロットした膜を 1 時間インキュベートすることによりブロッキング操作を行った。この後、Z O - 1 抗体と N a + / K + - A T P a s e 抗体を

5% 無脂肪乾燥乳を補った T B S - T にて 1000 倍に希釈したものをメンブレンに浸し、室温で 1 時間反応させた。T B 3 - T で 3 回洗浄後、マウス - I

g G 抗体 H R P 複合体 (C E L L S I G N A L I N G 社 (カタログ番号 : 7074P2)) とインキュベートし、洗浄後、E C L - A D V A V C E W e s t e r n B l o t t i n g D e t e c t i o n K i t (G E べルスケア・ジャパン社 (カタログ番号 : R P N 2135V)) で発光させたバンドを検出した。

ファイブロネクチンに対する抗体、コラーゲン 1 型に対する抗体についても、同様に使用した。次いで、以下の一次抗体 : N a + / K + - A T P a s e (M e r c k M i l l i p o r e) 、Z O - 1、G A P D H (A b c a m、C a m b r i d g e、U K) 、ファイブロネクチンおよび S m a d 2 (C e 1 1 S i g n a l i n g T e c h n o l o g y) 、リン酸化 S m a d 2 (C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y) 、E R K 1 / 2 (B D) 、リン酸化 E R K 1 / 2 (B D) 、p 3 8 M A P K (B D) 、リン酸化 P 3 8 M A P K (B D) 、J N K (B D) またはリン酸化 J N K (B D) (1 : 1000 希釈) 、および、H R P 標識抗ウサギまたは抗ウサギ I g G 二次抗体 (C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y) (1 : 5000 希釈) とともにインキュベーションを行った。メンブレンを、E C L A d v a n c e W e s t e r n B l o t t i n g D e t e c t i o n K i t (G E H e a l t h c a r e、P i s c a t a W a y、N J) によって感光させ、次いで、L A S 4 0 0 0 S 画像化システム (富士フイルム株式会社、東京都) を用いて調べた。

• リアルタイム PCR (半定量的逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (R T - P C R)) : また、以下の方法にて N a + Z K + - A T P a s e、Z O - 1、G A P D H に対する PCR 法を行った。プライマーは、オリゴヌクレオチド合成会社である I N V I T R O G E N から購入し、脱塩処理したものを用いた。自然に線維様形態に変化した角膜内皮細胞および正常角膜内皮細胞を試料とし、N a + / K + - A T P a s e、Z O - 1 の m R N A 量を半定量的 PCR 法により調べた。細胞からの総 RNA の抽出には R N E a s y (Q I A G E N 社、カタログ番号 : 74106) を用いた。抽出した RNA は R e v e r T r a A c e (T O Y O B O 社 (カタログ番号 : T R T - 101)) により逆転写反応 (4

20

25

30

35

40

45

50

2℃、60分間)を行い、TAKARA Taq Hot Start Version (タカラバイオ社、カタログ番号:RR001A)によりGAPDHを内部標準としてNa⁺/K⁺-ATPase、ZO-1を増幅した。同量のDNAを、PCR機(GeneAmp 9700; Applied Biosystems)と、下記のプライマーペアによって増幅した。PCR反応には下記に示すプライマーを用いた。フィブロネクチンに対する抗体、コラーゲン1型、4型、インテグリン α 5、インテグリン β 1に対するPCR反応についても、同様に下記プライマーを使用した。

5

10

15

20

25

30

35

40

- Na⁺/K⁺-ATPase-F: CTTCTCCGCATTTATGCTCATTCTCACCC (配列番号1)
- Na⁺/K⁺-ATPase-R: GGATGATCATAAACTTAGCCTTGATGAACTC (配列番号2)
- ZO-1-F: GGACGAGGCATCATCCCTAA (配列番号3)
- ZO-1-R: CCAGCTTCTCGAAGAACCAAC (配列番号4)
- GAPDH-F: GAGTCAACGGATTTGGTCGT (配列番号5)
- GAPDH-R: TTGATTTTGGAGGGATCTCG (配列番号6)
- Collagen 1-F: TCGGCGAGAGCATGACCGATGGAT (配列番号7)
- Collagen 1-R: GACGCTGTAGGTGAAGCGGCTGTT (配列番号8)
- Collagen 4-F: AGCAAGGTGTTACAGGATTGGT (配列番号9)
- Collagen 4-R: AGAAGGACACTGTGGGTCATCT (配列番号10)
- Collagen 8-F: ATGTGATGGCTGTGCTGCTGCTGTGCCT (配列番号11)
- Collagen 8-R: CTCTTGGGCCAGGCTCTCCA (配列番号12)
- Fibronectin-F: AGATGAGTGGGAACGAATGCTCT (配列番号13)
- Fibronectin-R: GAGGGTCACACTTGAATTCTCC (配列番号14)
- Integrin α 5-F: TCCTCAGCAAAGAATCTCAACAA (配列番号15)
- Integrin α 5-R: GTTGAGTCCCGTAACTCTGGTCTC (配列番号16)
- Integrin β 1-F: GCTGAAGACTATCCCATTTGACC (配列番号17)
- Integrin β 1-R: ATTTCCAGATATGCGCTGTTTT (配列番号18)

増幅されたDNA断片は1.5%アガロースゲル(ナカライテスト、カタログ番号:01149-76)で電気泳動し、エチジウムブロマイド(ナカライテスト、カタログ番号:14603-51)での染色により検出した。

• 定量PCRは、以下のTaqMan(登録商標)(Invitrogen)プライマーを用いて実施した。コラーゲン1型:Hs00164004-m1;フィブロネクチン:Hs01549976_m1;GAPDH:Hs00266705-gl。PCRは、StepOne™(Applied Biosystems)リアルタイムPCRシステムを用いて行った。GAPDHは内部標準として用いた。

【0177】

(結果)

図2で示されるように、従来技術で培養した場合に、線維芽細胞様に形態変化したサル角膜内皮細胞においては正常機能を消失することが示された。正常の形態に培養できたサル角膜内皮細胞と比較すると、線維芽細胞様(fibroblastic)に形態変化することで、サル角膜内皮が機能関連マーカーの発現を消失することを免疫染色、ウェスタンブロット法およびリアルタイムPCR法にて示された。

【0178】

より詳細に述べると、細胞培養中の霊長類CECの2つの異なる表現型が示された。最も興味深いことに、培養中の霊長類CECは、細胞の形態および特徴的な接触阻害型の表現型によつて決定した場合に、2つの異なる表現型を示した。およそ60%の細胞は、特徴的な多角形の細胞形態と接触阻害型の表現型を維持しており、これらの細胞を正常表現型と称した。他方で、40%の細胞は多層を持つ線維芽細胞様の形状を示し、これらの細胞を、線維芽細胞様表現型と称した(図1)。次に、これらの2つの表現型を、内皮細胞性の特徴について検討した;原形質膜におけるNa⁺/K⁺-ATPaseおよびZO-1の染色パターンは、正常表現型においてよく保存されていたが、線維芽細胞様表現型は、原形質膜におけるNa⁺/K⁺-ATPaseおよびZO-1の特徴的な染色プロフィールを完全に喪失した(図2左)。2つの機能的タンパク質の発現は、タンパク質レベル(図2右上)およびmRNAレベル(図2右下)の両方で、正常表現型において、線維芽細胞様表現型よりもかなり多く見られた。

【0179】

(細胞外マトリックスの挙動)

さらに、線維芽霊長類CECは、細胞外マトリックス等の状況がどうなっているかを調べた。その結果を図2Aに示す。

【0180】

図2Aは、線維芽霊長類CECは、異常な細胞外マトリックスを生成することを示し、すなわち、従来技術で培養した場合に、正常機能を消失することを示す。(A)フィブロネクチンおよびコラーゲン1型の線維芽細胞表現型および正常な細胞の表現型における発現を示す。上段はフィブロネクチン、下段はコラーゲン1型を示す。左側は正常な細胞の表現型を示し、右側は、線維芽細

胞表現型を示す。線維芽細胞表現型は、フィブロネクチンおよびコラーゲン1型などの過剰の細胞外マトリクスを示した。他方、正常な細胞の表現型は、染色能を完全に喪失した。(B) フィブロネクチンの線維芽細胞表現型および正常な細胞の表現型におけるタンパク質の発現のウェスタンブロットを示す。GAPDHはコントロールである。フィブロネクチンのタンパク質発現レベルは、正常の表現型よりも線維芽細胞の表現型において強くアップレギュレートされていた。(C) コラーゲン1型、4型、8型フィブロネクチン、インテグリン $\alpha 5$ 、およびインテグリン $\beta 1$ (上から順に列挙した。)の線維芽細胞表現型(右)および正常な細胞の表現型(左)における半定量PCRの結果を示す。GAPDHはコントロールである。半定量PCR分析によって、1型コラーゲン転写物($\alpha 1(I)_{m}$ mRNA)は線維芽細胞表現型において豊富に発現されていたが、他方、正常な表現型においては、 $\alpha 1(I)$ mRNAの発現は減少していた。基底膜コラーゲン表現型である、 $\alpha 1(IV)$ mRNAおよび $\alpha 1(VIII)$ mRNAは、正常表現型および線維芽細胞表現型の両方で発現されていたが、正常表現型では発現の程度は線維芽細胞表現型よりも少なかった。フィブロネクチンおよびインテグリン $\alpha 5$ のmRNAは線維芽細胞表現型で観察されたが、正常表現型ではこれらの2種のmRNAは発現されなかった。お1インテグリンのmRNAは、両方の表現型で同様のレベルで発現がみられた。

【b 181】

真の線維性細胞外マトリクス(ECM)タンパク質の比較により、線維芽細胞表現型のものは、フィブロネクチンの線維性ECM染色パターンを示したが、他方、正常な表現型は、フィブロネクチンの染色能を完全に失っていた(図2AのA)。フィブロネクチンのタンパク質レベルは、正常表現型よりも線維芽細胞表現型においてより強くアップレギュレートされていた(図2AのB)。線維芽細胞表現型によつて産生されるコラーゲン1型は、二重の部位での発現を示し、ECMおよび細胞質の両方で見られた。興味深いことに、コラーゲン1型の細胞質の部位は、ゴルジ複合体にあるようであり、その細胞内局在は、分泌に必須である。これらの知見は、既知のデータ(Ko MK, Kay EP. Subcellular localization of procollagen I and prolyl 4-hydroxylase in cornea & endothelial cells. Experimental cell research. 2001;264: 363-71)に類似する。他方、正常表現型におけるコラーゲン1型染色は、明確には観察されなかった(図2A)。RT-PCR分析を用いて主要なECMタンパク質の発現を測定した。コラーゲン1型転写物($\alpha 1(I)$ mRNA)は、線維芽細胞表現型において豊富に発現されていることが見出された。他方、 $\alpha 1(I)$ mRNAの発現は、正常な表現型において無視しうるものであった(図2C)。コラーゲン1型の転写物とは異なり、基底膜コラーゲン表現型である $\alpha 1(IV)$ mRNAおよび $\alpha 1(VIII)$ のmRNAは、正常表現型および線維芽細胞表現型の両方において発現していた。その発現の程度は、正常表現型において、線維芽細胞表現型に比べて少なかった。フィブロネクチンおよびインテグリン $\alpha 5$ の発現は、線維芽細胞表現型において観察された。反対に、正常表現型では、これらの2つの転写物は、

発現していなかった (図2AのC)。他方、 β 1インテグリンのmRNAは、正常表現型および線維芽細胞表現型の両方において同様のレベルで発現していた (図2AのC)。

【182】

5 (比較例3 :従来法の別法での正常機能喪失)

本比較例では、従来の培養法では角膜内皮細胞の線維化が生じることを確認した (図3)。3T3フィーダー細胞由来の馴化培地は線維芽変化 (fibroblastic change) を抑制する。しかし3T3フィーダー細胞由来の馴化培地のみでは継代培養を行うとやはり形質転換にいたることを示す (図3右)。

【183】

(材料および方法)

使用した材料のうち比較例1および2と同じものは比較例1および2と同様に入手し培養等を行った。

- 15 ・コントロール :コントロールのヒト角膜内皮細胞の培養に用いた培地はOpti-MEM 1 Reduced-Serum Medium, Liquid (INVITROGEN カタログ番号 :31985-070) + 8% FBS (BIOWEST、カタログ番号 :S1820-500) + 200mg/m¹ CaCl₂ · 2H₂O (SIGMA カタログ番号 :C7902-500G) + 0.08% コンドロイチン硫酸 (SIGMA カタログ番号 :C9819-5G) + 20μg/m¹ アスコルビン酸 (SIGMA カタログ番号 :A4544-25G) + 50μg/m¹ ゲンタマイシン (INVITROGEN カタログ番号 :15710-064) + 5ng/m¹ EGF (INVITROGEN カタログ番号 :PHG0311) である。
- 25 ・3T3フィーダー細胞用の馴化培地 :NIH3T3細胞を0.1%ゼラチンコート (SIGMA社、カタログ番号 :G1890-500G) した150mm デイッシュ (FALCON、カタログ番号 :3025) に10% FBS (BIOWEST、カタログ番号 :S1820-500) /DMEM (INVITROGEN、カタログ番号 :12320) で播種し、サブコンフルエント
- 30 まで培養しておく。続いて終濃度0.04mg/mL マイトマイシンC溶液 (協和発酵キリン、カタログ番号 874231) にて37°C、5%CO₂インキュベーター内で2時間インキュベートする。10% FBS (BIOWEST、カタログ番号 :S1820-500) ZDMEM 培地に置換して一晩培養する。このように作成したNIH3丁3細胞にOpti-MEM 1 Reduce
- 35 d-Serum Medium, Liquid (INVITROGEN、カタログ番号 :31985-070) + 8% FBS (BIOWEST、カタログ番号 :S1820-500) + 200mg/m¹ CaCl₂ · 2H₂O (SIGMA、カタログ番号 :C7902-500G) + 0.08% コンドロイチン硫酸 (SIGMA、カタログ番号 :C9819-5G) + 2Qμg/m¹
- 40 アスコルビン酸 (SIGMA、カタログ番号 :A4544-25G) + 50μg/m¹ ゲンタマイシン (INVITROGEN、カタログ番号 :15710-064) + 5ng/m¹ EGF (INVITROGEN、カタログ番号

号 : P H G O 3 1 1) を加えて 1 晩培養してヒト角膜内皮培養用馴化培地とする。

- 培養方法 : 比較例 1 と同様の方法で、それぞれの培地を用いて培養した。
- 染色等の細胞観察方法 : 位相差顕微鏡にて細胞の形態を観察した。

5 【 0 1 8 4 】

(結果)

図 3 に示すように、従来法の別法として 3 T 3 フィーダー細胞を用いた馴化培地での培養でも、線維化が生じ移植には適しな状態になってしまったことが示された。

10 【 0 1 8 5 】

比較例 1 および 3 での結果は、非特許文献 7 で示されたように、従来の角膜内皮細胞培養培地では、継代すると正常な状態を維持しつつ増殖させることができないことを確認するものである。

【 0 1 8 6 】

15 (実施例 1)

本実施例では、形質転換が線維芽細胞様の形態であることに着目して、一般的な細胞種で知られている線維化誘導の際に活性化される経路の活性化についてウェスタンブロット法にて検討した。

【 0 1 8 7 】

20 (材料および方法)

使用した材料のうち比較例 1 ~ 3 と同じものは比較例 1 ~ 3 と同様に入手し培養等を行った。

- カ- クイザル角膜内皮細胞 : 別の目的で安楽死させたカニクイザルの眼球を購入して、(N i s s e i B i l i s C o . , L t d . , O h t s u , J a p a n および K e a r i C o . , L t d . , W a k a y a m a , J a p a n) 角膜内皮細胞を基底膜とともに機械的に剥離し、デイスパーゼあるいはコラゲナーゼを用いて基底膜よりはがして回収後、初代培養を行った。培地は 1 0 % F B S (B I O W E S T 、カタログ番号 : S 1 8 2 0 - 5 0 0) と 2 n g / m l 塩基性 F G F (I N V I T R O G E N 、カタログ番号 : 1 3 2 5 6 - 0 2 9) を添加した D M E M (I N V I T R O G E N 、カタログ番号 : 1 2 3 2 0) を用いた。この際、サル角膜内皮細胞は図 1 に示したように正常の形態に培養されることもあるが、同様の培養法、長期培養、継代培養により線維芽細胞様に形態変化することが多い。そこで、正常の形態に培養できた細胞と線維芽細胞様に形態変化した細胞を回収してウェスタンブロット法に

- p S m a d 2 に対する抗体 : C E L L S I G N A L I N G 社から入手したもの (カタログ番号 : 3 1 0 8 P) を用いた。
- p S m a d に対する抗体 : C E L L S I G N A L I N G 社から入手したもの (カタログ番号 : 5 3 3 9 P) を用いた。

- p p 3 8 に対する抗体 : B D T R A N S D U C T I O N L L A B O R A T O R I E S 社から入手したもの (p 3 8 a Z S A P K 2 a と同じ。カタログ番号 : 6 1 2 1 6 8) を用いた。

• p38 に対する抗体 :BD TRANSDUCTIONAL LABORATORIES社から入手したもの (カタログ番号 :612280) を用いた。

• pERK1/2 に対する抗体 :BD TRANSDUCTIONAL LABORATORIES社から入手したもの (カタログ番号 :612358) を用いた。

• ERK1/2 に対する抗体 :BD TRANSDUCTIONAL LABORATORIES社から入手したもの (カタログ番号 :610030) を用いた。

• pJNK に対する抗体 :BD TRANSDUCTIONAL LABORATORIES社から入手したもの (カタログ番号 :610627) を用いた。

• JNK に対する抗体 :BD TRANSDUCTIONAL LABORATORIES社から入手したもの (カタログ番号 :612540) を用いた。

【 188 】

(実験方法)

• 細胞画分抽出・調製法 :コンフルェントに達した細胞をPBSで3回洗浄後、RIPAバッファー (1XPBS (ニッスイ、カタログ番号 :5913)、1% Nonidet

P-40 (ナカライテスク、カタログ番号 :23640-94)、0.5% デオキシコール酸ナトリウム (ナカライテスク、カタログ番号 :10712-12)、0.1% SDS (ナカライテスク、カタログ番号 :31607-65)) で溶解した。得られた細胞溶解液を遠心分離 (15000rpm、10分間) し、その上清を回収し、タンパク質をBCA PROTEIN ASSAY KIT (PIERCE社製、カタログ番号 :23227) により定量した。

5mM 2-メルカプトエタノール (ナカライテスク社製、カタログ番号 :21418-42) を含む100 μ lの溶解バッファー (レムリサンプルバッファー) で溶解した。

• ウエスタンブロット法 :RIPAバッファーで抽出し得られたタンパク質を7.5% ポリアクリルアミドで電気泳動した。分離されたタンパク質はPVD F膜 (PALL LIFE SCIENCE社製、カタログ番号 :EH-2222) に転写した。0.1% (v/v) ポリエチレンソルビタンモノラウレート (ナカライテスク、カタログ番号 :28353-85) (TBS-T) と5% 無脂肪乾燥乳 (CELL SIGNALING社、カタログ番号 :9999) を補ったTris緩衝化食塩水 (10mM Tris-HCl, pH 7.4 ;100mM NaCl) と、ブロットした膜を1時間インキュベートすることによりブロッティング操作を行った。この後、Smad2抗体、pSmad2抗体、p38抗体、pp38抗体、ERK抗体、pERK抗体、JNK抗体、およびpJNK抗体を5% NON FAT DRY MILK (CELL SIGNALING社、カタログ番号 :9999) を補ったTBS-Tにて1000倍に希釈したものをメンブレンに浸し、室温で1時間反応させた。

T-TBSで3回洗浄後、マウス-IgG抗体HRP複合体 (CELL SIGNALING社、カタログ番号 :7074P2) とウサギ-IgG抗体HRP複合体 (GE Healthcare、カタログ番号 :NA934) インキ

ユベートし、洗浄後、ECL-ADVANCE (GEヘルスケア'ジャパン社、カタログ番号:RPN2135V)で発光させたバンドを検出した。

【 189 】

(結果)

5 図4に、線維化の形質転換の原因となりうる主たる経路の活性をサル角膜内皮を用いてウエスタンブロットで検討した結果を示す。線維芽細胞においてSmad2のリン酸化(TGF- β 経路の活性化)、p38 MAPKの活性化、JNK経路の活性化が認められた。一方で、ERK1/2のリン酸化は抑制されていた。Smad2、p38、ERK1/2およびJNKは報告によればすべてEMT経路に関与している[Chen KH, et al. (1999) Invest Ophthalmol Vis Sci 40: 2513-2519]、[Kim TY, et al. (2001) Invest Ophthalmol Vis Sci 42: 3142-3149]、[Naumann GO, et al. (2000) Ophthalmology 107: 1111-1124]、[Parsons CJ, et al. (2007) J Gastroenterol Hepatol 22 Suppl 1: S79-84]、[Ma FY, et al. (2009) Front Biosci (Schol Ed) 1: 171-187]ので、本発明者らは、Smad2およびMAPKが、上皮細胞において観察されるEMTと同様の内皮間葉転換に関与するかどうかを検討した。Smad2のリン酸化は、正常表現型のものと比較した場合に、線維芽細胞様表現型において大いに促進されることが分かった(図4)。p38およびERK1/2のリン酸化は、線維芽細胞様表現型において大いに増強されたが、JNKの活性化は無視しうるものであった。ただし、ERKのリン酸化は細胞の線維化による変化のみではなく、細胞増殖による影響があるために、細胞の増殖の状態によっては異なる結果となることがありうることを確認している。これらの知見は、TGF- β シグナル伝達が、CECの線維芽細胞様転換にとって重要な役割を發揮し得ることを示す。

【 190 】

(実施例2:角膜内皮の形質転換の抑制例)

本例では、TGF- β シグナルをレセプターのリン酸化阻害剤により阻害することでサル角膜内皮の形質転換を抑制することができた例を示す。

【 191 】

(材料および方法)

使用した材料のうち比較例1-3および実施例1と同じものは比較例1-3および実施例1と同様に入手し培養等を行った。

35 •カニクイザル角膜内皮細胞:別の目的で安楽死させたカニクイザルの眼球を購入して、(Nissei Bilis Co., Ltd., Ohtsu, JapanおよびKeari Co., Ltd., Wakayama, Japan)角膜内皮細胞を基底膜とともに機械的に剥離し、コラゲナーゼを用いて基底膜よりはがして回収後、初代培養を行った。この際同一角膜を2分して、サル角膜内皮培養用基本培地(10%FBS(BIOWEST、カタログ番号:S1820-500)と2ng/ml塩基性FGF(INVITROGEN、カタログ番号:13256-029)を添加したDMEM(INVITROGEN、カタログ番号:12320))および基本培地に1 μ mol/l

SB431542 (TOCRIS社、カタログ番号 : 1614) を添加したものをを用いた。

【0192】

(結果)

- 5 図5に示すように、位相差像は、SB431542の存在下で培養した霊長類CECが真の多角形細胞形状と接触阻害型の単層を示す一方で、コントロールのCECは、線維芽細胞様の形態を示すことを実証した(図4A)。コントロールの基本培地で培養したものは線維芽細胞様に形質転換して重層化を認める一方で、TGF- β シグナルをレセプターのリン酸化阻害剤により阻害する
- 10 ことで多角形の大小不動の小さい一層の生体同様の形態を示し、サル角膜内皮の形質転換を抑制することができた。

【0193】

(実施例3 : 角膜内皮の正常機能の維持の実証)

- 15 本実施例では、本発明により、培養の正常化の実証として、角膜内皮の機能関連タンパク質が維持されることを実証した。以下に詳細を示す。

【0194】

(材料および方法)

- 20 使用した材料のうち上記比較例および実施例と同じものは上記比較例および実施例と同様に入手し培養等を行った。特に実施例2と同様のものをを用いた。
- SB431542 : TOCRIS社から得た(カタログ番号 : 1614)。
- Na⁺/K⁺-ATPaseに対する抗体 : MILLIPORE社製のもの(カタログ番号 : 05-369)を用いた。
 - ZO-1に対する抗体 : マウスINVTROGEN社製(カタログ番号 : 339100)、ウサギZYME LABORATORIES社製(カタログ番号 : 61-7300)のものを用いた。
 - GAPDHに対する抗体 : ABCAM社のもの(カタログ番号 : ab36840)を用いた。
 - 免疫染色等 : 実施例2と同様に培養した細胞を固定してNa⁺/K⁺-ATPaseおよびZO-1に対して免疫染色を行い、蛍光顕微鏡にて撮影した。
 - ウェスタンブロット法 : 実施例1と同様にNa⁺/K⁺-ATPase、ZO-1、GAPDHに対するウェスタンブロット法を行った。
 - リアルタイムPCR法 : また、以下の方法にてNa⁺/K⁺-ATPase、ZO-1、GAPDHに対するPCR法を行った。プライマーは、オリゴヌクレオチド合成会社であるINVTROGENから購入し、脱塩処理したものをを用いた。自然に線維様形態に変化した角膜内皮細胞および正常角膜内皮細胞を試料とし、Na⁺/K⁺-ATPase、ZO-1のmRNA量を半定量的PCR法により調べた。細胞からの総RNAの抽出にはRNeasy(QIAGEN社、カタログ番号 : 74106)を用いた。抽出したRNAはReverTraAce(TOYOBO社、カタログ番号 : TRT-101)により逆転写反応(42℃、60分間)を行い、TAKARA Taq Hot Start Version(タカラバイオ社、カタログ番号 : RR001A)によ
- 35
- 40

りGAPDHを内部標準としてNa⁺/K⁺-ATPase、ZO-1を増幅した。PCR反応には下記に示すプライマーを用いた。

• Na⁺/K⁺-ATPase-F-CTTCCTCCGCATTTATGCT
CATTCTCAACC (配列番号1)

5 • Na⁺/K⁺-ATPase-R-GGATGATCATAACTTAGC
CTTGATGAACCTC (配列番号2)

- ZO-1-F-GGACGAGGCATCATCCCTAA (配列番号3)

• ZO-1-R-CCAGCTTCTCGAAGAACCAAC (配列番号4)

10 • GAPDH-F-GAGTCAACGGATTTGGTCGT (配列番号
5)

• GAPDH-R-TTGATTTTGGAGGGATCTCG (配列番号
6)

増幅されたDNA断片は1.5%アガロースゲルで電気泳動し、エチジウム
ブロマイド染色により検出した。

15 【0195】

(結果)

図6に示すように、培養により線維芽細胞様に形質転換したサル角膜内皮細胞においては機能関連マーカであるNa⁺/K⁺-ATPase、ZO-1の発現が免疫染色、ウエスタンブロット、PCRにて示された。一方で、TGF-βシグナルをレセプターのリン酸化阻害剤により阻害することでサル角膜内皮の機能関連タンパク質が維持されることが示された。すなわち、SB431542処理したCECがNa⁺/K⁺-ATPaseおよびZO-1の特徴的な原形質膜染色を示した一方で、コントロールのCECはその染色を失っており、SB431542処理した細胞では内皮機能が維持されることが示唆された
20 (図6左)。また、Na⁺/K⁺-ATPaseおよびZO-1の発現は、タンパク質 (図6右上) およびmRNAレベル (図6右下) の両方で、SB431542処理した線維芽細胞様表現型において強力に亢進された。これらのデータは、TGF-βが壺長類CEC培養において観察された内皮間葉転換の直接媒介因子であり得ることをさらに確認した。

30 【0196】

(実施例4 : TGF-βの正常化喪失能)

本実施例では、TGF-βシグナルがサル角膜内皮の形質転換に関与することを確認するために、TGF-βを添加して形質転換を誘導し機能関連タンパクが喪失することを示した (免疫染色)。また、ウエスタンブロットにより、
35 TGF-βを添加して形質転換を誘導し機能関連タンパクが喪失することを示した。以下に詳細を示す。

【0197】

(材料および方法)

使用した材料のうち上記比較例および実施例と同じものは上記比較例および
40 実施例と同様に入手し培養等を行った。

• TGF-β : R & D SYSTEMS社のもの (カタログ番号 : 240-B) を用いた。

• Na^+/K^+ -ATPase に対する抗体 : MILLIPORE 社製のもの (カタログ番号 : 05-369) を用いた。

• ZO-1 に対する抗体 : マウス INVITROGEN 社製 (カタログ番号 : 339100)、ウサギ ZYME LABORATORIES 社製 (カタログ番号 : 61-7300) のものを用いた。

• GAPDH に対する抗体 : ABCAM 社製のもの (カタログ番号 : ab36840) を用いた。

• pSmad2 に対する抗体 : CELL SIGNALING 社製のもの (カタログ番号 : 3108P) を用いた。

• pSmad に対する抗体 : CELL SIGNALING 社製のもの (カタログ番号 : 5339P) を用いた。

• 培養方法 : サル角膜内皮細胞をサブコンフルエントまで培養し、培地中に終濃度 0、1、10 ng/mL となるように TGF- β および TGF- β お1 を添加し、37°C で形態に変化が現れるまで培養した。

• 染色方法 : 上記実施例のとおりである。

• 細胞画分抽出法 : 上記実施例のとおりである。

• ウェスタンブロット法 : 上記実施例のとおりである。

【198】

(結果)

図7に示すように、TGF- β シグナルがサル角膜内皮の形質転換に関与することを確認するために免疫染色を行ったところ、TGF- β を添加して形質転換を誘導し機能関連タンパクが喪失することが示された。すなわち、図7に示すように、正常表現型が、外来性TGF- β に曝露された際に、線維芽細胞様の細胞へと転換することが示された。正常表現型の原形質膜における Na^+/K^+ -ATPase および ZO-1 の染色パターンは、TGF- β に暴露されることにより完全に消失した (図7中列、右列)。

【199】

また、図8に示すように、TGF- β を添加して形質転換を誘導し機能関連タンパクが喪失することがウェスタンブロットにおいても示された。また、Smad2 のリン酸化がTGF- β の添加により誘導されており、TGF- β の添加により下流シグナルの活性化が生じていることが確認できる。この結果から、TGF- β とその下流シグナルの活性化が正常機能の喪失の直接的な原因であり、その経路を阻害することによって正常化を維持することができることが理解される。すなわち、増殖因子もまた、タンパク質レベルにおいて、これら2つのタンパク質の発現を、濃度依存性の様式で著しく低減させたが (図8左欄)、Smad2 のリン酸化は、濃度依存性の様式で大きく増大した (図8右欄)。これらのデータは、霊長類 CEC の正常表現型でさえ、TGF- β および TGF- β の刺激に応答して線維芽細胞様表現型を獲得する傾向にあることを示す。

【200】

(実施例5 : ヒト細胞での実証)

本実施例では、ヒト角膜内皮においても、 $TGF-\beta$ シグナルをレセプターのリン酸化阻害剤により阻害することで形質転換を抑制し、正常な内皮を培養することを確認した。以下に詳細を示す。

【0201】

5 (材料および方法)

使用した材料のうち上記比較例および実施例と同じものは上記比較例および実施例と同様に入手し培養等を行った。

【0202】

10 シアトルアイバンクから購入した研究用角膜より角膜内皮細胞を基底膜とともに機械的に剥離し、コラゲナーゼを用いて基底膜よりはがして回収後、初代培養を行った。培地はOPTI-MEM 1 Reduced-Serum
 15 Medium, Liquid (INVITROGEN、カタログ番号:31985-070) + 8% FBS (BIOWEST、カタログ番号:S1820-500) + 200 mg/ml $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (SIGMA、カタログ
 20 番号:C7902-500G) + 0.08% コンドロイチン硫酸 (SIGMA、カタログ番号:C9819-5G) + 20 $\mu g/ml$ アスכולピン酸 (SIGMA、カタログ番号:A4544-25G) + 50 $\mu g/ml$ ゲンタマイシン (INVITROGEN、カタログ番号:15710-064) + 5 ng/ml
 30 1 EGF (INVITROGEN、カタログ番号:PHG0311) を3T3フィーダ細胞用の馴化させたものを基本培地として用いた。回収したヒト角膜内皮細胞は二分して、一方は基本培地で培養してコントロールとして、他方は基本培地に最終濃度1 $\mu g/ml$ となるようにSB431542 (TOCRIS社、カタログ番号:1614) を添加して培養した。

25 ●酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) : HCECの培養上清中の1型コラゲンを、ELISA kits for Collagen Type I Alpha 2 (COL1a2) (Usen Life Science Inc., Wuhan, China) を製造元の説明書に従って使用して測定した。SB431542と共に、または、SB431542なしで培養したHCEC由来の培養上清を各群 (n = 5) について使用した。

30 (結果)

35 図9に示すように、SB431542を含まない基本培地で培養すると線維芽細胞様に形質転換して、重層化するのに対して、SB431542を培地に添加したものでは多角形の大小不動の少ない一層の細胞が培養される。このことより、サルのみならずヒト角膜内皮においても、 $TGF-\beta$ シグナルをレセプターのリン酸化阻害剤により阻害することで形質転換を抑制し、正常な内皮を培養することが確認された。すなわち、霊長類CECにおいて観察された興味深い知見から、HCECが、内皮間葉転換に至る同様の望ましくない細胞の不可避の変化に供されたかどうかをさらに検討した。最も興味深いことに、培養HCECは、特徴的な接触阻害型の単層構造と、多角形表現型を失い、そして、
 40 霊長類CECのような線維芽細胞様の細胞形態を獲得した (図9)。

【0203】

(SB431542のさらなる解析)

次に、本発明者らは、SB431542が内皮細胞の機能を維持することができるかどうか試験した。ここでは、SB431542が、HCECの機能を維持し、HCECの線維芽細胞様の変化を抑制することを種々の実験を用いて実証した。結果を図9Aに示す。

5 **【0204】**

図9AのAおよびBに示されるように、SB431542によるTGFレセプターシグナル伝達をブロックすることによって、 $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ およびZO-1が細胞膜での細胞内局在が可能になり、それらのタンパク質発現の維持が可能になった。スケールバーは $100\mu\text{m}$ を示す。図9AのCに示されるように、ELISAアッセイによって、SB431542が、コラーゲン1型の細胞上清への分泌を顕著にダウンレギュレートしたことを示された。
10 * * $P < 0.05$ 。図9AのDおよびEに示されるように、SB431542がコラーゲン1型およびフィブロネクチンの発現をmRNAレベルで有意に減少させることが示された。

15 **【0205】**

以上のように、図9AのAおよびBに示す知見により、TGFレセプターシグナル伝達のブロックによって、細胞膜(原形質膜)における $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ およびZO-1の細胞内局在が可能になり、そのタンパク質の発現の維持が可能になったことが実証された。非常に重要なことに、ELISAアッセイによって、SB431542は、コラーゲン1型の培養上清への分泌を顕著にダウンレギュレートしていたことが明らかになった(図9AのC)。また、SB431542は、mRNAレベルでコラーゲン1型およびフィブロネクチンの発現を顕著に減少させた(図9AのDおよびE)。

【0206】

25 (実施例6:別法での角膜内皮の培養正常化例)

本実施例では、上述の実施例で用いたSB431542以外の方法としてBMP-7を用いてもTGF- α シグナルを拮抗させヒト角膜内皮の形質転換を抑制することができることを実証した。以下にその詳細を示す。

【0207】

30 (材料および方法)

使用した材料のうち上記比較例および実施例と同じものは上記比較例および実施例と同様に入手し培養等を行った。

• BMP-7: R&D SYSTEMS社のもの(カタログ番号:354-BP)を用いた。

35 • ファロイジン: A1exa Fluor (登録商標)488 (INVITROGEN、カタログ番号:A12379)を用いた。

• 培養方法: 図3と同様の方法でヒト角膜内皮細胞を馴化培地にて培養した。続いてトリプシンにて継代培養を行ったが、同様の馴化培地にBMP-7($100\text{ng}/\text{ml}$)を添加した培地で培養したものと、コントロールとして同様の馴化培地にて培養したものを比較した。
40

•位相差顕微鏡およびファロイジンによる細胞骨格の染色による形態観察において、コントロールでは線維芽細胞様に形質転換して重層化する一方で、BMP-7添加培地では一層の多角形細胞の形態を維持できた。

【 208 】

5 (結果)

図10に示すように、SB431542以外の方法としてBMP-7を用いてもTGF- β シグナルを拮抗させサル角膜内皮の形質転換を抑制することができた。BMP-7はSB431542とは他の詳細な伝達経路は異なるもののTGF- β シグナルに関連する因子としては共通することが知られている。すなわち、TGF- β シグナル伝達経路は、ALK4、5または7を経由するSmad2/3系と、ALK1、2、3または6を経由するSmad1/5/8系とに大きく分類され、いずれも線維化に関連していることがよく知られている。したがって、実質的にTGF- β シグナル全般を抑制することにより、角膜内皮の形質転換を抑制することができることが理解される。理論に束縛されることを望まないが、Smad2/3(ALK4、5および7に関連する)を介して効果を奏するSB431542、Smad1/5/8(ALK1、2、3および6に関連する)を介して効果を奏するBMP-7の両方で正常化が観察されていることから、これらのいずれの経路のTGF- β シグナル阻害剤であっても、本発明の効果を達成することができるかと理解される。TGF- β シグナル伝達経路は、ALK4/5/7を経由するSmad2/3系と、ALK1/2/3/6を経由するSmad1/5/8系とに大きく分類され、いずれも線維化に関連していることがよく知られている(J. Massagué, Annu. Rev. Biochem. 1998. 67:753-91; Vilar JMG, Jansen R, Sander C (2006) PLoS Comput Biol 2(1):e3; Leask, A., Abraham, D. J. FASEB J. 18, 816-827 (2004); Coert Margadant & Arnoud Sonnenberg EMBO reports (2010) 11, 97-105; Joel Rosenbloom et al., Ann Intern Med. 2010; 152:159-166.)。したがって、2種類の代表的なTGF- β シグナル阻害剤のいずれによっても培養正常化が達成し得たことから、これらの結果から、Smad経路を問わず、どのようなTGF- β シグナル阻害剤であっても、培養正常化剤として機能しうることが理解される。

【 209 】

(BMP-7の濃度依存性の確認)

次に、3種類の濃度を用いて、BMP7がHCEC線維芽細胞様への変化を抑制し、その機能を維持することを示した。BMP-7はMETを促進し、TGF- β 媒介性の上皮間葉転換を特異的に阻害する。したがって、この分子は、EMTプロセスをアンタゴナイズするために使用されている[Zeisberg M, et al. (2003) Nat Med 9: 964-968]、[Simic P, et al. (2007) EMBO Rep 8:327-331]、[Buijs JT, et al. (2007) Am J Pathol 171: 1047-1057]、[Zeisberg M, et al. (2007) J Biol Chem 282: 23337-23347]。それゆえ、本発明者らは、BMP-7がHCECの不可避の変化をアンタゴナイズできたかどうかを検討した。線維芽細胞様HCECを、10~1000 ng/mlの範囲の濃度のBMP-7で処理した。

【 2 1 0 】

結果を図10Aに示す。図10AのAに示されるように、線維芽細胞の表現型の細長い細胞形は、濃度依存性の様式でBMP-7の存在下で応答して多角形細胞形態に変換された。スケールバーは100 μ mである。図10AのBに示されるように、BMP-7は、正常なCECで観察されたもの [Barry PA, et al. (1995) Invest Ophthalmol Vis Sci 36: 1115-1124] と同様に、通常の六角形の細胞形態を可能にし、アクチンの細胞表層における細胞骨格分布を可能にした。スケールバーは100 μ mである。図10AのCおよびDに示されるように、BMP-7は、細胞膜(原形質膜)におけるNa⁺/K⁺-ATPaseおよびZO-1の細胞内局在を維持した。スケールバーは100 μ mである。図10AのEおよびFに示されるように、BMP-7は、1000ng/mlの濃度において、CECを、機能関連マーカーの陽性発現をともなう、多角形の接触阻害型表現型に維持することができた。なお、コントロールは無添加である。Na⁺/K⁺-ATPase陽性細胞およびZO-1陽性細胞の両方とも、BMP-7で処理した場合に、コントロールに比べて割合が有意に増加していた。* P < 0.01、** P < 0.05。

【 2 1 1 】

BMP-7を用いて線維芽細胞様への変化を抑制し、内皮細胞機能を維持することが証明された。

【 2 1 2 】

本発明者らは、骨形態形成タンパク質7 (BMP-7) がHCECの先行変化を阻害することができるかどうかを調べた。線維芽細胞様HCECをBMP-7で10ng/ml~1000ng/mlの濃度範囲で処理した。重要なことに、線維芽細胞様の表現型の細長い細胞形状は、濃度依存的にBMP-7の存在下に応答して、多角形細胞形態へと変換した(図10AのA)。BMP-7によって、六角形の細胞形態が可能となり、アクチンの細胞表層への細胞骨格分布の維持が可能になった(図10AのB)。これは、正常のCECにおいて観察されるのと同様の状態である (Barry PA, Petroll 麗, Andrews PM, Cavanagh HD, Jester JV. The spatial organization of corneal endothelial cytoskeletal proteins and xheir relationship to the apical junctional complex. Investigative ophthalmology & visual science. 1995;36: 1115-24)。Na⁺/K⁺-ATPase陽性細胞(図10AのC)およびZO-1陽性細胞(図10AのD)の細胞膜への細胞内局在も維持されていた。したがって、BMP-7は、1000ng/mlの濃度で、CECを多角形の形態に維持し、機能関連マーカーの陽性発現を伴う接触阻害による表現型の維持を行うことができることが示された(図10AのEおよびF)。この傾向は、10ng/mlでも見られ、100ng/mlでその傾向が増大しており、1000ng/mlでより顕著であった。

【 2 1 3 】

(実施例7 :追加的効果の確認)

本実施例では、TGF- β シグナル伝達において p38 MAPK の阻害剤でもある SB203580 を、SB431542 に加えて用いることによって、培養正常化が強化されることを示す。以下に詳細を示す。

【0214】

5 (材料および方法)

使用した材料のうち上記比較例および実施例と同じものは上記比較例および実施例と同様に入手し培養等を行った。

【0215】

10 シアトルアイバンクから購入した研究用角膜より角膜内皮細胞を基底膜とともに機械的に剥離し、コラゲナーゼを用いて基底膜よりはがして回収後、初代培養を行った。培地はヒトは Opti-MEM 1 Reduced-Serum Medium, Liquid (INVITROGEN カタログ番号 : 31985-070) + 8% FBS (BIOWEST、カタログ番号 : S1820-500) + 200 mg/ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA
15 カタログ番号 : C7902-500G) + 0.08% コンドロイチン硫酸 (SIGMA カタログ番号 : C9819-5G) + 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ アスコルビン酸 (SIGMA カタログ番号 : A4544-25G) + 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 1 ゲンタマイシン (INVITROGEN カタログ番号 : 15710-064) + 5 ng/ml EGF (INVITROGEN カタログ番号 : PHG
20 0311) を 3T3 フィーダ細胞用の馴化させたものを基本培地として用いた。また、基本培地に SB431542 (1 $\mu\text{mol}/\text{l}$ 、TOCRIS、カタログ番号 : 1614) を添加したもの、SB203580 (1 $\mu\text{mol}/\text{l}$ 、CALBIOCHEM、カタログ番号 : 559389) を添加したもの、SB431542 (1 $\mu\text{mol}/\text{l}$) および SB203580 (1 $\mu\text{mol}/\text{l}$) を
25 添加したもので培養した。

【0216】

回収したヒト角膜内皮細胞は二分して、一方は基本培地で培養してコントロールとして、他方は基本培地に最終濃度 1 $\mu\text{mol}/\text{l}$ となるように SB431542 (TOCRIS 社) を添加して培養した。

30 【0217】

(結果)

35 図 11 に示すように、TGF- β シグナル伝達において p38 MAPK の阻害剤でもある SB203580 を、SB431542 に加えて用いることによって、培養正常化が強化されることが実証され、さらに老化により活性化することが知られている p38 MAPK の阻害剤である SB203580 を添加することで、老化することで低下することが知られている角膜内皮密度が上昇した。このことから SB203580 の老化抑制 (未分化維持) の効果も追加的に発揮されることにより、効果が増強されることが理解される。このように、p38 MAPK 阻害に加えて TGF- β シグナル阻害によりヒト角膜内
40 皮細胞が、継代を繰り返しても高密度で形態保持したヒト角膜内皮細胞 (HCEC) の培養が可能になり、培養の正常化がより強化されることが分かった (継代を繰り返しても高密度で形態保持した HCEC ができることを示す)。

【 2 1 8 】

非特許文献7では、従来の角膜内皮細胞培養培地では、継代すると正常な状態を維持しつつ増殖させることができないことが記載されている。また、非特許文献8〜11には、それぞれ、FBS、EGFおよびNGFを含む培地、b-FGFを用いた培地、コラゲナーゼを用いた培地、および馴化培地を用いた培地記載されているが、非特許文献7および比較例で示されたように、いずれの従来培地も、正常な機能を維持しつつ角膜内皮細胞を増殖することはできない。この文献を参考にして、本発明の培地または培養正常化剤の効果を評価すると、従来技術の培地に比べて格段に正常化維持能があることが理解される。

【 2 1 9 】

(実施例8 :好ましい培養法の確立)

以上の実施例等の結果から、ヒト角膜内皮細胞の好ましい培養法の確立を試みた。以下にその詳細を示す。

【 2 2 0 】

(材料および方法)

使用した材料のうち上記比較例および実施例と同じものは上記比較例および実施例と同様に入手し培養等を行った。

【 2 2 1 】

シアトルアイバンクから購入した研究用角膜より角膜内皮細胞を基底膜とともに機械的に剥離し、コラゲナーゼを用いて基底膜よりはがして回収後、初代培養を行った。培地はヒトはOpti-MEM 1 Reduced-Serum Medium, Liquid (INVITROGEN カタログ番号 : 31985-070) + 8% FBS (BIOWEST、カタログ番号 : S1820-500) + 200mg/ml CaCl₂ · 2H₂O (SIGMA カタログ番号 : C7902-500G) + 0.08% コンドロイチン硫酸 (SIGMA カタログ番号 : C9819-5G) + 20μg/ml アスコルビン酸 (SIGMA カタログ番号 : A4544-25G) + 50μg/ml ゲンタマイシン (INVITROGEN カタログ番号 : 15710-064) + 5ng/ml EGF (INVITROGEN カタログ番号 : PHG0311) を3T3フィーダ細胞用の馴化させたものを基本培地としてSB431542 (1μmol/l) およびSB203580 (1μmol/l) を添加したもので培養した。

【 2 2 2 】

プロトコールは図12に例示される。詳細には以下のとおりである。

【 2 2 3 】

(培養法1)

初代培養および継代培養時には接着促進作用をもつRhoキナーゼ阻害剤であるY-27632 (WAKOあるいはTOCRIS) を最終濃度10μmol/lとして48時間添加した。

【 2 2 4 】

(培養法2)

Rh oキナーゼ阻害剤であるY—27632 (WAK O、カタログ番号 :253-00513) を最終濃度 $10 \mu\text{m o l} / 1$ として培養中は常に添加した。
【225】

(培養法3)

5 Y—27632 を添加しないで基本培地としてS_B431542 ($1 \mu\text{m o l} / 1$) およびS_B203580 ($1 \mu\text{m o l} / 1$) を添加したもので培養した。

【226】

(結果)

10 図13に示すのは最終的に確立されたヒト角膜内皮細胞培養の1例であり、この図および図12で示されるように、培養法1～培養法3のいずれにおいても、ヒト角膜内皮細胞をその正常な機能を維持しつつ多角形の一層の正常の形態を示す細胞として高密度で増幅させることが確認され、標準培養法の例を確立することができた。

【227】

(実施例9 培養ヒト角膜内皮移植例)

15 実施例8で確立された培養法のうち培養法3により培養したヒト角膜内皮細胞を、霊長類であるカニクイザルを用いた角膜内皮不全モデル (水疱性角膜症モデル) に移植した結果を示す。接着促進作用を有するROCK阻害剤とともに培養したヒト角膜内皮細胞を移植することにより角膜の透明治癒が得られることを示す。これは本発明において培養したヒト角膜内皮細胞が生体においても正常な機能を発現して、再生医療に応用できることを示す。

【228】

(材料および方法)

25 使用した材料のうち上記比較例および実施例と同じものは上記比較例および実施例と同様に入手し培養等を行った。

- カニクイザル 滋賀医科大学動物生命科学研究センターにおいて倫理審査を得たのちに、可能な限り動物愛護的に以下の検討を行った。

【229】

30 全身麻酔下でカニクイザルの角膜輪部を 1.5mm 切開してシリコン製の手術器具を前房内に挿入して角膜内皮細胞を機械的に搔爬して水疱性角膜症モデルを作製する。続いて生体外で本発明による方法により培養したヒト角膜内皮細胞を 2.0×10^5 個を基礎培地に懸濁して、接着促進効果を有するROCK阻害剤であるY—27632を最終濃度 $100 \mu\text{m o l} / 1$ となるように添加して前房内に注入した。コントロールとしてヒト角膜内皮細胞を 2.0×10^5 個を基礎培地に懸濁したものをROCK阻害剤を併用せずに注入した。注入後、眼球が下向きになるようにつむぎ姿勢で3時間維持して、角膜内皮面八の細胞接着を促した。培養角膜内皮シートの移植による水疱性角膜症の治療効果は細針灯顕微鏡による角膜透明性評価、超音波パキメーターによる角膜厚測定にて行った (図14)。図14に示すように、霊長類モデル角膜内皮不全モデルにおいて、本発明の方法で培養した細胞は、細胞のみでも良好な治療成績を示し、ROCK阻害剤を加えるとさらに治療成績が改善した。

【 0 2 3 0 】

2. 5 カ月後に安楽死させ、角膜を摘出して組織を固定した後に、実施例 2 と同様にフアロイジンおよび $\text{Na}^+ / \text{K}^+ - \text{ATPase}$ および $\text{ZO}-1$ に対して免疫染色を行い、蛍光顕微鏡にて撮影した (図 15)。結果を図 15 に示す。

5 図 15 でも示すように、霊長類モデル角膜内皮不全モデルにおいて、本発明の方法で培養した細胞は、細胞のみでも良好な治療成績を示し、ROCK 阻害剤を加えるとさらに治療成績が改善し、特に、これまで実現できなかった、ヒト被験体において初めて、角膜内皮の正常な機能を維持する治療法が本発明によつて提供された。

【 0 2 3 1 】

(実施例 10 : 抗 TGF- β 中和抗体での例)

本実施例では、抗 TGF- β および中和抗体でも同様に培養正常化が達成されるか確認した。薬剤を交換すること以外は、上記比較例および実施例に準じて実験をした。

【 0 2 3 2 】

(材料および方法)

使用した材料のうち上記比較例および実施例と同じものは上記比較例および実施例と同様に入手し培養等を行った。

- 抗 TGF- β 中和抗体 : R & D SYSTEMS 社のもの (カタログ番号 : M A B 2 4 0) を用いた。

• 培養方法 : 図 3 の結果を示した方法 (比較例 3 等を参照) と同様の方法でヒト角膜内皮細胞を培養した。続いてトリプシンにて継代培養を行ったが、通常培地として Opti-MEM 1 Reduced-Serum Medium, Liquid (INVITROGEN カタログ番号 : 3 1 9 8 5 - 0 7 0) + 8% ウシ胎仔血清 (FBS) (BIOWEST、カタログ番号 : S 1 8 2 0 - 5 0 0) + 200 mg / ml $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (SIGMA カタログ番号 : C 7 9 0 2 - 5 0 0 G) + 0.08% コンドロイチン硫酸 (SIGMA カタログ番号 : C 9 8 1 9 - 5 G) + 200 μg / ml アスコルビン酸 (SIGMA カタログ番号 : A 4 5 4 4 - 2 5 G) + 50 μg / ml ゲンタマイシン (INVITROGEN カタログ番号 : 1 5 7 1 0 - 0 6 4) + 5 ng / ml EGF (INVITROGEN カタログ番号 : P H G 0 3 1 1) で培養したものと、これに TGF- β 中和抗体 (500 ng / ml) を添加した培地で培養したものを比較した。

• 位相差顕微鏡による形態観察において、図 16 に示されるように、通常培地では形質転換して多角形細胞の形態を喪失し、大小不動の細胞が多く認められる一方で、TGF- β 中和抗体添加培地では高密度の一層の多角形細胞の形態を維持できた。霊長類 CEC と一致して、CEC を、TGF- β 受容体に対する特異的インヒビター (S B 4 3 1 5 4 2) とともに培養した場合、このインヒビターは、細胞の形状が線維芽細胞様表現型に変化することをブロックすることができた。線維芽細胞様表現型に対する S B 4 3 1 5 4 2 の阻害作用と同様に、TGF- β に対する中和抗体 (図 16 B) もまた、細胞が線維芽細胞様表現型を獲得するのをブロックした。

【 0 2 3 3 】

このように、抗 T G F - β 中和抗体を用いても、3 B 4 3 1 5 4 2 および B M P - 7 に代えて用いて同様の実験を行い、培養正常化を確認することができた。

5

【 0 2 3 4 】

本実施例においても、T G F - β 自体を中和することによって T G F - β シグナル伝達を阻害しても、線維化が抑制され、Z O - 1 および N a + / K + - A T P a s e の活性を保持することが示され、継代培養しても「正常化」活性を維持しつつ増殖させることができることが証明された。

10

【 0 2 3 5 】

(実施例 1 1 :別法での角膜内皮の培養正常化例)

本実施例では、上述の実施例で用いた S B 4 3 1 5 4 2 以外の方法として S m a d 3 阻害剤を用いて T G F - β シグナルを阻害させヒト角膜内皮の形質転換を抑制することができることを実証した。以下にその詳細を示す。

15

【 0 2 3 6 】

(材料および方法)

使用した材料のうち上記比較例および実施例と同じものは上記比較例および実施例と同様に入手し培養等を行った。

20

S m a d 3 阻害剤 : C a 1 b i o c h e m 社の 6 , 7 - ジメトキシー - 2 - ((2 E) - 3 - (1 - メチル - 2 - フェニル - 1 H - ピロロ [2 , 3 - b] ピリジン - 3 - イル - プロプ - 2 - エノイル)) - 1 , 2 , 3 , 4 - テトラヒドロイソキノロン (カタログ番号 : 5 6 6 4 0 5) を用いた。S m a d 3 阻害剤は、M e r c k M i l l i p o r e から入手可能である。

25

●培養方法 : 図 3 の結果を示した方法 (比較例 3 等を参照) と同様の方法でヒト角膜内皮細胞を培養した。続いてトリプシンにて継代培養を行ったが、通常培地として O p t i - M E M 1 R e d u c e d - S e r u m M e d i u m , L i q u i d (I N V I T R O G E N カタログ番号 : 3 1 9 8 5 - 0 7 0) + 8 % ウシ胎仔血清 (F B S) (B I O W E S T , カタログ番号 : S 1 8 2 0 - 5 0 0) + 2 0 0 m g / m l C a C l ₂ · 2 H ₂ O (S I G M A カタログ番号 : C 7 9 0 2 - 5 0 0 G) + 0 . 0 8 % コンドロイチン硫酸 (S I G M A カタログ番号 : C 9 8 1 9 - 5 G) + 2 0 μ g アスコルビン酸 (S I G M A カタログ番号 : A 4 5 4 4 - 2 5 G) + 5 0 μ g / m l ゲンタマイシン (I N V I T R O G E N カタログ番号 : 1 5 7 1 0 - 0 6 4) + 5 n g / m l E G F (I N V I T R O G E N カタログ番号 : P H G 0 3 1 1) で培養したものと、これに S m a d 3 阻害剤 (0 . 3 m M および 3 m M) を添加した培地で培養したものを比較した。

35

【 0 2 3 7 】

その結果を図 1 7 に示す。位相差顕微鏡による形態観察において、通常培地では形質転換して多角形細胞の形態を喪失し、大小不動の細胞が多く認められる一方で、S m a d 3 阻害剤添加培地では 0 . 3 m M および 3 m M とともに高密度の一層の多角形細胞の形態を維持できた。すなわち、霊長類 C E C と一致して、C E C を、T G F - β 受容体に対する特異的インヒビター (S B 4 3 1 5

40

4 2) とともに培養した場合、このインヒビターは、細胞の形状が線維芽細胞様表現型に変化することをブロックすることができた。線維芽細胞様表現型に対するSB431542の阻害作用と同様に、Smad3インヒビター (図17) もまた、細胞が線維芽細胞様表現型を獲得するのをブロックした。

5 **【 2 3 8 】**

(考察)

視覚障害をともなう角膜内皮機能不全は、角膜移植手術の主要な適応症である [Darlington JK, et al. (2006) *Ophthalmology* 113: 2171-2175]、
10 [Price MO, et al. (2010) *Clin Experiment Ophthalmol* 38: 128-140]。角膜移植は角膜内皮機能不全について広く行われているが、研究者らは現在、健康な角膜内皮を回復させるための代替的な方法を探究している。角膜内皮が、若いドナーから培養され、「マスター細胞」としてストックすることにより、高い機能的能力を持つ細胞の移植が可能となる。加えて、拒絶のリスクを低下させるためのHLA適合移植 [Khairuddin R, et al. (2003)
15 Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 241: 1020-1028]、[Coster DJ, et al. (2005) *Am J Ophthalmol* 140: 1112-1122]が可能となる。組織生体工学は、視力を失った患者のための治療を開発するための新たなアプローチである [Engelmann K, et al. (2004) *Exp Eye Res* 78: 573-578]。今日までに、生体工学的アプローチを利用する2つの方法が存在する：1) 生体工学コンストラクト上に接着させた培養ドナーHCECの使用 [Ishino Y, et al. (2004) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 800-806]、[Mimura T, et al. (2004) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45: 2992-2997]、[Koizumi N, et al. (2007) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48: 4519-4526]、
20 [Koizumi N, et al. (2012) *Exp Eye Res* 95: 60-67]、そして、2) 前眼房内への培養HCECの移植 [Okumura N, et al. (2012) *Am J Pathol* 181: 268-277]、[Mimura T, et al. (2003) *Exp Eye Res* 76: 745-751]、[Mimura T, et al. (2005) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46: 3128-3135]、[Patel SV, et al. (2009) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50: 2123-2131]。臨床の状況に対してこれら2つの方法のいずれを応用するかに関わらず、HCECのための効率的な培養技術の確立は、必須かつ不可避である [Peh GS, et al. (2011) *Transplantation* 91: 811-819]。多くの研究者が、HCECの不変で長期の培養を確立することが非常に難しいことを認めている [Engelmann K, et al. (2004) *Exp Eye Res* 78: 573-578]。HCECの首尾よい培養がいくつかのグループによって報告されているが、単離およびその後の培養プロトコールにともなう手順は、研究室間で非常に多様である [Peh GS, et al. (2011) *Transplantation* 91: 811-819]。最も困難な問題の1つは、HCECが、各継代ごとに甚だしい線維芽細胞様の変化を受けやすいことである [Engelmann K, et al. (2004) *Exp Eye Res* 78: 573-578]。それゆえ、移植の目的での後の使用のために生理学的表現型
35 を維持するためには、CECの自発的な転換を回避する手段を見出すことが必須である。

【 2 3 9 】

内皮細胞から線維芽細胞様の細胞への転換は、内皮間葉転換と呼ばれる。こ
 うした転換は、Smad2/3経路を介してTGF- α によって誘発される
 [Saika S (2006) Lab Invest 86: 106-115]。内皮間葉転換は、接触阻
 害型の単層の喪失、および、原形質膜における頂端結合タンパク質の喪失とい
 った、特徴的な内皮表現型の喪失を引き起こす。さらに、これは、1型コラー
 5 ゲンおよびフィブロネクチンといった繊維性タンパク質の誘導を引き起こす。
 本研究において、本発明者らは、培養CECの線維芽細胞様表現型が、内皮様
 の特徴を大きく失うことを実証した；Na⁺/K⁺-ATPaseおよびZO-
 1の発現は、著しく低減し、その細胞内局在化は、真の細胞膜ではなくサイト
 10 ゴル内となった。さらに、線維芽細胞様表現型は、基底膜表現型（IV型およ
 びVII型コラーゲン）ではなく、繊維性ECMタンパク質（1型コラーゲ
 ン、フィブロネクチンおよびインテグリン α 5）の産生を著しく増強する。こ
 のような望ましくない細胞の存在は、臨床の状況における培養細胞の移植の成
 功を大きく妨げるであろう。それゆえ、何が表現型の変化を引き起こし、培養
 15 CECのこのような内皮間葉転換プロセスにおいてどのように干渉するかを決定
 することが重要である。Smad2/3のリン酸化が線維芽細胞様表現型に
 おいて大いに増強されたという事実から、本発明者らは、線維芽細胞様表現型
 力 霊長類およびヒトの両方のCECにおいて、TGF- β シグナル伝達によ
 つて媒介されると結論付けるに至った。それゆえ、本発明者らは、線維芽細胞
 20 様表現型において観察される内皮間葉転換プロセスをブロックするためにTGF
 F- β 受容体に対する特異的インヒビター（SB431542）[Inman GJ,
 et al. (2002) Mol Pharmacol 62: 65-74]を用いた。SB431542は、
 望ましくない細胞の変化を完全に無効にし、霊長類またはヒトのいずれかのC
 E C培養をSB431542で処理した場合、線維芽細胞様表現型への細胞の
 25 不可避の変化は、完全に無効にされた。同時に、ZO-1およびNa⁺/K⁺-
 ATPaseの特徴的な細胞内位置が原形質膜に戻り、そして、これら2つの
 タンパク質の発現はmRNAおよびタンパク質の両方のレベルにおいて大きく
 増大し、これらの培養におけるバリアおよびポンプの機能がインタクトである
 ことが示唆される。さらに、本発明者らは、繊維性ECMタンパク質の産生が
 30 大きく減少したことも見出した。本発明者らはさらに、周知の抗EMT因子で
 あるBMP-7 [Zeisberg M, et al. (2003) Nat Med 9: 964-968]、
 [Zeisberg M, et al. (2007) J Biol Chem 282: 23337-23347]が、HCEC
 の線維芽細胞様表現型を逆転させる作用について検討した。BMP-7は
 また、線維芽細胞様表現型を、単層の特徴的な内皮接着を持つ正常な角膜内皮
 35 細胞へと逆転させた。まとめると、SB431542およびBMP-7はとも
 に、培養CECの正常な内皮表現型を維持するための強力なツールとなり得、
 したがって、その後の移植の成功につながる。

【240】

結論として、本発明者らの知見は、TGF- β 受容体に対するインヒビター
 40 （SB431542）および/または、抗EMT分子（BMP-7）の使用が、
 HCECを正常な生理学的機能（すなわち、バリアおよびポンプの機能）を維
 持したまま増殖させることを可能にすることを示した。より徹底的な将来の研

5 究が有益であるが、本発明者らは、数回の継代の後でさえ、形態および機能に
 関して、連続的なSB431542またはBMP-7での処置の何らかの明
 5 明し得る。加えて、培養中の線維芽細胞様の変化の阻害のこの新たな戦略は、
 最終的に、臨床医に対して、角膜内皮機能不全の治療のためならず、様々な病
 理学的疾患全般のための再生医療における新たな治療様式を提供することがで
 ける。

【0241】

10 (実施例12 :他の阻害剤での例)

本実施例では、他のTGF- β シグナル阻害剤でも同様に培養正常化が達成
 されるか確認する。薬剤を交換すること以外は、上記実施例に準じて実験をす
 ることができる。

【0242】

15 (材料および方法)

• A83-01 (TOCRIS社またはミルテューバイオテック (Miltenyi
 y i B i o t e c) 社から入手可能) :A83-01はI型TGF- β 受容
 体ALK5、Activin/Noda1受容体ALK4、Noda1受容体
 ALK7の選択的阻害物質である。

20 - Stemolecule™ ALK5インヒビター (ミルテューバイオテック
 (Miltenyi B i o t e c) 社から入手可能) :I型TGF- β 受容
 体であるアクチビン受容体様キナーゼ (activin receptor-
 like kinase) (ALK5) の選択的なATP競合的阻害物質であ
 る。

25 • LDN-193189 (ミルテューバイオテック (Miltenyi B i o
 t e c) 社から入手可能) :BMP Type I 受容体ALK2およびAL
 K3を阻害する。

• SmadのsiRNA (標準的な方法で合成する。)

30 これらを上記実施例で使用されたSB431542またはBMP-7に代え
 て用いて同様の実験を行い、培養正常化を確認する。

【0243】

35 本実施例においても、いずれのTGF- β シグナル阻害剤であっても、線維
 化が抑制され、ZO-1およびNa+ZK+-ATPaseの活性を保持するこ
 とが示され、継代培養しても「正常化」活性を維持しつつ増殖させることがで
 けることが証明される。

【0244】

(実施例12 :製剤例 :角膜内皮シート調製用培養液)

本実施例では、製剤例として、本発明の培養正常化剤を含有する角膜内皮シ
 ーシート調製用培養液を以下のようにして製造する。

40 【0245】

常法により下に示す培養液を調製する。

SB431542 3.8439mg

SB203580 3.7743mg
 FBS 10mL
 ペニシリンーストレプトマイシン溶液 1mL
 FGF basic 200ng
 5 DMEM 適量
 全量 100mL

FBSは例えば、BIOGEST (カタログ番号 :S1820—500) またはインビトロジェン製、ペニシリンーストレプトマイシン溶液はナカライテスク製 (ペニシリン 5000u/mL, ストレプトマイシン 5000 μ g/mL含有)、FGF basicは例えば、インビトロジェン製 (INVITROGEN、カタログ番号 :13256—029)、SB431542はTOCRIS社製、SB203580はCALBIOCHEM社製、DMEMはインビトロジェン製を用いることができる。

【246】

15 (実施例13 製剤例 培養正常化剤を含有する角膜保存液)

本実施例では、製剤例として、本発明の培養正常化剤を含有する角膜保存液を以下のように製造する。

【247】

常法により下に示す保存液を調製する。

20 SB431542 3.8439mg
 SB203580 3.7743mg
 Optisol-GS (Bausch—Lomb) 適量
 全量 100mL

各成分は、実施例12と同様に入手することができる。

25 【248】

(実施例14 移植用培養角膜内皮細胞シートの作製)

本実施例では、実施例8で確立した手法または同等の方法により調製したウサギ角膜内皮細胞を使用する。また、本実施例では、実施例9と同様の方法により調製した細胞接着促進剤としてのRhoキナーゼ阻害剤または対照物質を使用する。

【249】

35 移植用培養角膜内皮細胞シートの作製時にRhoキナーゼ阻害剤、例えば、Y-27632を添加し、上述の実施例と同様の手法を用いて、角膜内皮細胞の機能タンパクであるZO-1およびNa⁺/K⁺ATPaseの蛍光免疫細胞染色を行い、発現を確認する。

【250】

40 角膜内皮シートを、95%エタノール (-30℃) で10分間固定する。PBS洗浄の後、0.5% TritonX-100/PBSで5分間処理する。その後、1%BSAZ/PBSを1時間処理する。その後、抗ZO-1抗体または抗Na⁺/K⁺ATPase抗体を一晩処理する。PBS洗浄後、Alexa-488標識2次抗体を1時間処理する。PBS洗浄後、DAPI含有の封入

剤を滴下し、カバーガラスで封入する。蛍光顕微鏡で写真を撮影し、ZO-1 および、Na⁺/K⁺ ATPaseの発現を確認する。

【D 2 5 1】

(実施例 15 : 注入剤の調製例)

5 点眼剤の調製例

各濃度の被験物質の組成を以下に示す。

【D 2 5 2】

10 Y—27632 (WAK O、カタログ番号 : 253—00513) または他のRhokinase阻害剤 0.003g、0.01g、0.03g、0.05g または0.1g (脱塩酸体としての用量)

塩化ナトリウム	0.85g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	0.1g
ベンザルコニウム塩化物	0.005g
水酸化ナトリウム	適量
15 精製水	適量
	全量100mg (pH 7.0)。

【D 2 5 3】

点眼剤は、基剤で希釈することも出来る。

【D 2 5 4】

20 基材の組成は以下のとおり。

【D 2 5 5】

塩化ナトリウム	0.85g
リン酸二水素ナトリウム二水和物	0.1g
25 ベンザルコニウム塩化物	0.005g
水酸化ナトリウム	適量
精製水	適量
	全量100mg (pH 7.0)。

【D 2 5 6】

30 以上のように、本発明の好ましい実施形態を用いて本発明を例示してきたが、本発明は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願および文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。

【産業上の利用可能性】

35 **【D 2 5 7】**

角膜内皮細胞の正常化培養方法が提供され、角膜移植に関連する技術に関与する産業 (細胞培養産業、製薬等) において利用可能な技術が提供される。

【配列表フリーテキスト】

【D 2 5 8】

40 配列番号 1 : Na⁺/K⁺-ATPaseのフォワードプライマー ; CTTCC
TCCGCATTTATGCTCATTTTCTCACCC

- 配列番号 2 : Na⁺/K⁺-ATPase のリバースプライマー ; GGATGATCATAAACTTAGCCTTGATGAACTC
- 配列番号 3 : ZO-1 のフォワードプライマー ; GGACGAGGCATCATCCCTAA
- 5 配列番号 4 : ZO-1 のリバースプライマー ; CCAGCTTCTCGAAGAACCAAC
- 配列番号 5 : GAPDH のフォワードプライマー ; GAGTCAACGGATTGGGTCGT
- 配列番号 6 : GAPDH のリバースプライマー ; TTGATTTTGGAGGGATCTCG
- 10 配列番号 7 : Collagen 1 のフォワードプライマー ; TCGGCGAGAGCATGACCGATGGAT
- 配列番号 8 : Collagen 1 のリバースプライマー ; GACGCTGTAGGTGAAGCGGCTGTT
- 15 配列番号 9 : Collagen 4 のフォワードプライマー ; AGCAAAGGTGTTACAGGATTGGT
- 配列番号 10 : Collagen 4 のリバースプライマー ; AGAAGGACACTGTGGGTCATCT
- 配列番号 11 : Collagen 8 のフォワードプライマー ; ATGTGATGGCTGTGCTGCTGCTGCCT
- 20 配列番号 12 : Collagen 8 のリバースプライマー ; CTCCTTGGGCCAGGCTCTCCA
- 配列番号 13 : Fibronectin のフォワードプライマー ; AGATGAGTGGGAACGAATGTCT
- 25 配列番号 14 : Fibronectin のリバースプライマー ; GAGGGTCACTTGAATTCTCC
- 配列番号 15 : integrin $\alpha 5$ のフォワードプライマー ; TCCTCAGCAAAGAATCTCAACAA
- 配列番号 16 : integrin $\alpha 5$ のリバースプライマー ; GTTGAGTCCCAGTAACTCTGGTCT
- 30 配列番号 17 : integrin $\beta 1$ のフォワードプライマー ; GCTGAAAGACTATCCCATTTGACC
- 配列番号 18 : integrin $\beta 1$ のリバースプライマー ; ATTTCCAGATATGCGCTGTTTT
- 35

請求の範囲

請求項 1】

線維化抑制剤を含む角膜内皮細胞の培養正常化剤。

請求項 2】

- 5 前記線維化抑制剤はトランスフォーミング増殖因子 (TGF) β シグナル阻害剤を含む、請求項 1 に記載の培養正常化剤。

請求項 3】

前記培養正常化は、Zn²⁺およびNa⁺/K⁺-ATPaseからなる群より選択される細胞機能が正常であることを含む、請求項 1 に記載の培養正常化剤。

- 10 **請求項 4】**

前記培養正常化は角膜移植に適応する移植用細胞を製造するためのものである、請求項 1 に記載の培養正常化剤。

請求項 5】

前記移植用細胞は霊長類の細胞である、請求項 4 に記載の培養正常化剤。

- 15 **請求項 6】**

前記移植用細胞はヒトの細胞である、請求項 4 に記載の培養正常化剤。

請求項 7】

前記TGF- β シグナル阻害剤は、TGF- β のアンタゴニスト、TGF- β のレセプターのアンタゴニスト、またはSmad3の阻害剤である、請求項 2 に記載の培養正常化剤。

- 20

請求項 8】

前記TGF- β シグナル阻害剤は、4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)2-ピリジニル]-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミド、BMP-7、抗TGF- β 抗体、抗TGF- β レセプター抗体、TGF- β のsiRNA、TGF- β レセプターのsiRNA、TGF- β のアンチセンスオリゴヌクレオチド、6,7-ジメトキシ-2-((2E)-3-(1-メチル-2-フェニル-1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-3-イル)プロプ-2-エノイル)-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノロン、3-(6-メチル-2-ピリジニル)-N-フェニル-4-(4-キノリニル)-1H-ピラゾール-1-カルボチオアミド、2-(3-(6-メチルピリジン-2-イル)-1H-ピラゾール-4-イル)-1,5-ナフチリジン、6-(4-(ピペリジン-1-イル)エトキシ)フェニル)-3-(ピリジン-4-イル)ピラゾロ[1,5-a]ピリミジン、2-(5-クロロ-2-フルオロフェニル)-4-[(4-ピリジニル)アミノ]プテリジン、4-[3-(2-ピリジニル)-1H-ピラゾール-4-イル]-キノリン、それらの薬学的に許容可能な塩もしくは溶媒和物、またはその薬学的に受容可能な塩の溶媒和物を少なくとも1種含む、請求項 2 に記載の培養正常化剤。

- 35

請求項 9】

前記TGF- β シグナル阻害剤は、4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)2-ピリジニル]-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミドまたはその薬学的に許容可能な塩を含む、請求項 2 に記載の培養正常化剤。

- 40

請求項 10】

前記線維化抑制剤はさらにMAPキナーゼ阻害剤を含む、請求項1に記載の培養正常化剤。

請求項11】

- 5 前記MAPキナーゼ阻害剤は4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジンまたはその薬学的に許容可能な塩を含む、請求項10に記載の培養正常化剤。

請求項12】

老化抑制剤をさらに含む、請求項1に記載の培養正常化剤。

請求項13】

- 10 前記老化抑制剤は、p38 MAPキナーゼ阻害剤を含む、請求項12に記載の培養正常化剤。

請求項14】

- 15 前記老化抑制剤は4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジンまたはその薬学的に許容可能な塩を含む、請求項13に記載の培養正常化剤。

請求項15】

- 20 4-[4-(1,3-ベンゾジオキソール-5-イル)2-ピリジニル]-1H-イミダゾール-2-イル]ベンズアミドまたはその薬学的に許容可能な塩と、4-[4-(4-フルオロフェニル)-2-(4-メチルスルフィニルフェニル)-1H-イミダゾール-5-イル]ピリジン)またはその薬学的に許容可能な塩を含む、請求項1に記載の培養正常化剤。

請求項16】

細胞接着促進剤をさらに含む、請求項1のいずれか1項に記載の培養正常化剤。

請求項17】

- 25 前記細胞接着促進剤は(R)-(+)-トランス-(4-ピリジル)-4-(1-アミノエチル)-シクロヘキサノールボキサミドまたはその薬学的に許容可能な塩を含む、請求項16に記載の培養正常化剤。

請求項18】

- 30 前記線維化抑制剤は、前記角膜内皮細胞の培養の間常に存在させ、他方、前記接着促進剤は、一定期間存在させた後、いったん該接着促進剤を欠損させ、再度該細胞接着促進剤は、一定期間存在させることを特徴とする、請求項16に記載の培養正常化剤。

請求項19】

- 35 前記線維化抑制剤および前記細胞接着促進剤の両方を、前記角膜内皮細胞の培養の間常に存在させることを特徴とする、請求項16に記載の培養正常化剤。

請求項20】

前記移植用細胞は、角膜内皮障害の予防または治療のためのものである、請求項4に記載の培養正常化剤。

請求項21】

- 40 請求項1に記載の培養正常化剤と角膜内皮の培養成分とを含む、角膜内皮細胞を正常に培養するための培地。

請求項22】

請求項 1 に記載の培養正常化剤を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を包含する、角膜内皮細胞を正常に培養する方法。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 に記載の方法で培養される角膜内皮細胞。

5 【請求項 2 4】

請求項 1 に記載の培養正常化剤を含む、角膜内皮細胞の保存液。

【請求項 2 5】

請求項 1 に記載の培養正常化剤を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を包含する、角膜内皮細胞を正常に培養する方法によって生産された角膜内皮細胞を含む、角膜内皮疾患、障害または状態の処置または予防のための医薬。

10

【請求項 2 6】

前記処置または予防は、霊長類の角膜内皮のためのものである、請求項 2 5 に記載の医薬。

【請求項 2 7】

15 前記処置または予防は、ヒトの角膜内皮のためのものである、請求項 2 5 に記載の医薬。

【請求項 2 8】

前記角膜内皮細胞は霊長類由来である、請求項 2 5 に記載の医薬。

【請求項 2 9】

20 前記角膜内皮細胞はヒト由来である、請求項 2 5 に記載の医薬。

【請求項 3 0】

前記角膜内皮疾患、障害または状態が水疱性角膜症または角膜内皮炎である、請求項 2 5 に記載の医薬。

【請求項 3 1】

25 前記医薬は、シート状または懸濁物である、請求項 2 5 に記載の医薬。

【請求項 3 2】

細胞接着促進剤をさらに含む、請求項 2 5 に記載の医薬。

【請求項 3 3】

前記細胞接着促進剤は (R) - (+) - トランス - (4 - ピリジル) - 4 - (1 - アミノエチル) - シクロヘキサンカルボキサミドまたはその薬学的に許容可能な塩である、請求項 3 2 に記載の医薬。

30

【請求項 3 4】

請求項 1 に記載の培養正常化剤を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を包含する、角膜内皮細胞を正常に培養する方法によって生産された角膜内皮細胞を用いる工程を包含する、角膜内皮疾患、障害または状態の処置または予防のための方法。

35

【請求項 3 5】

細胞接着促進剤を含む、ヒトの角膜内皮疾患、障害または状態の処置または予防のための医薬。

40

【請求項 3 6】

前記細胞接着促進剤は (R) - (+) - トランス - (4 - ピリジル) - 4 - (1 - アミノエチル) - シクロヘキサンカルボキサミド2 塩酸 1 水和物である、請求項 3 5 に記載の医薬。

【請求項 3 7】

- 5 前記医薬は、請求項 1 に記載の培養正常化剤を用いて角膜内皮細胞を培養する工程を包含する、角膜内皮細胞を正常に培養する方法によって生産された角膜内皮細胞と共に用いられる、細胞接着促進剤を含む、ヒトの角膜内皮疾患、障害または状態の処置または予防のための医薬。

【請求項 3 8】

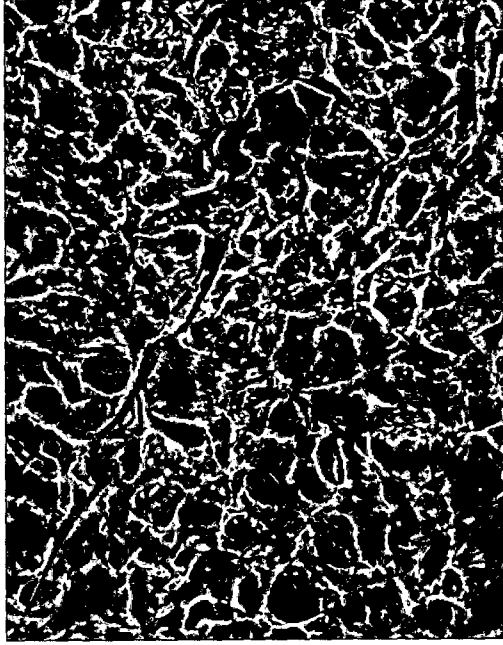
- 10 前記角膜内皮疾患、障害または状態が水疱性角膜症または角膜内皮炎である、請求項 3 5 に記載の医薬。

【請求項 3 9】

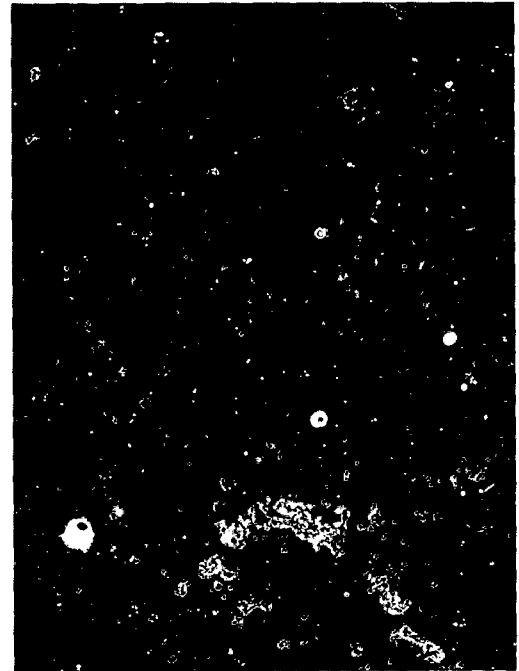
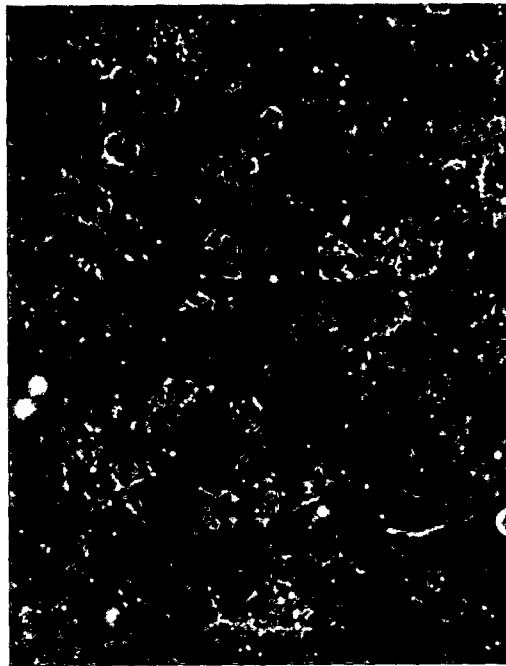
細胞接着促進剤を処置または予防が必要な被験体に投与する工程を包含する、ヒトの角膜内皮疾患、障害または状態の処置または予防のための方法。

15

形態変化を生じた細胞



正常形態の角膜内皮細胞

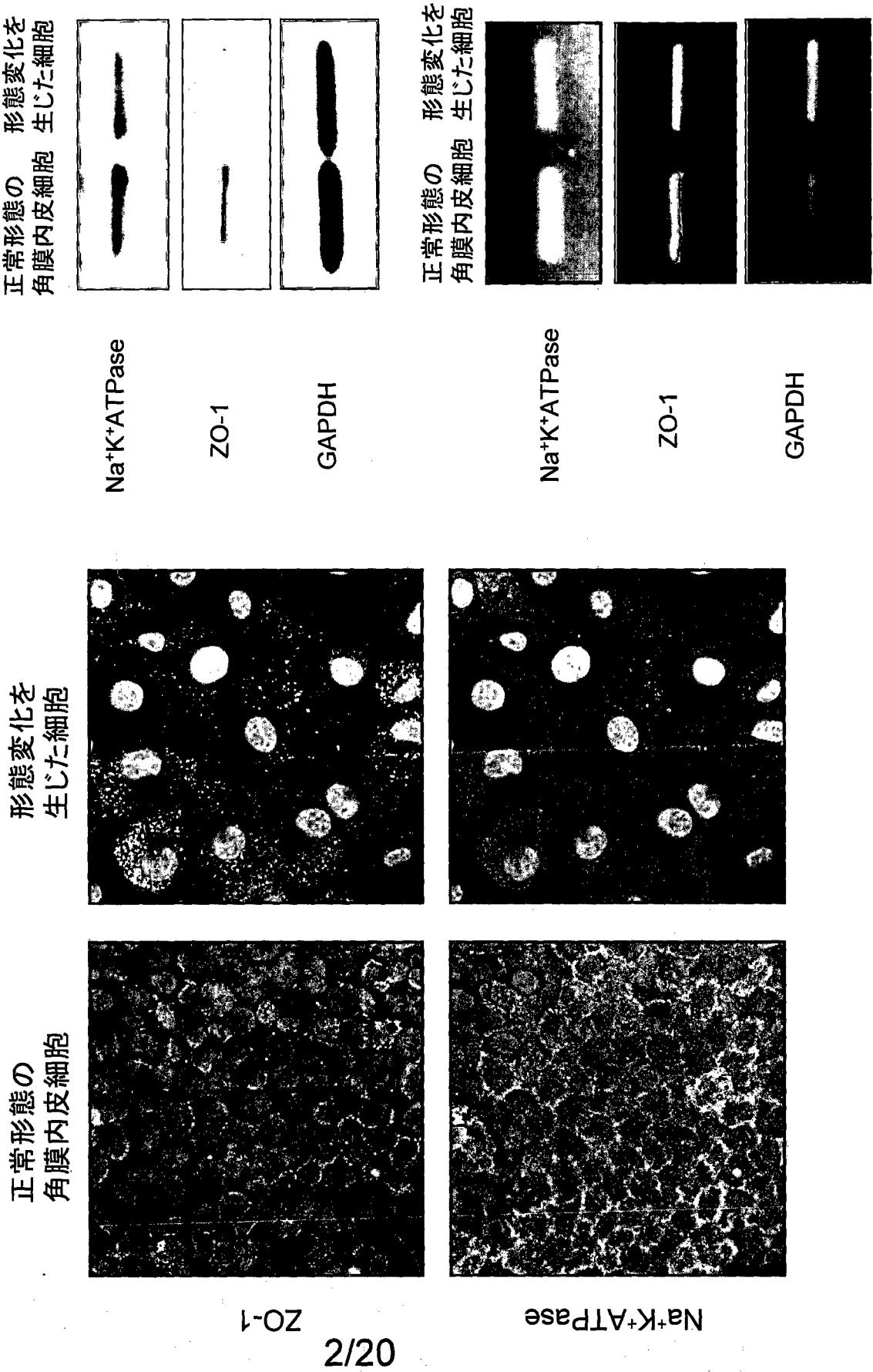


カニクイザル

ヒ

Fig.1

Fig.2



ZO-1

2/20

Na⁺K⁺ATPase

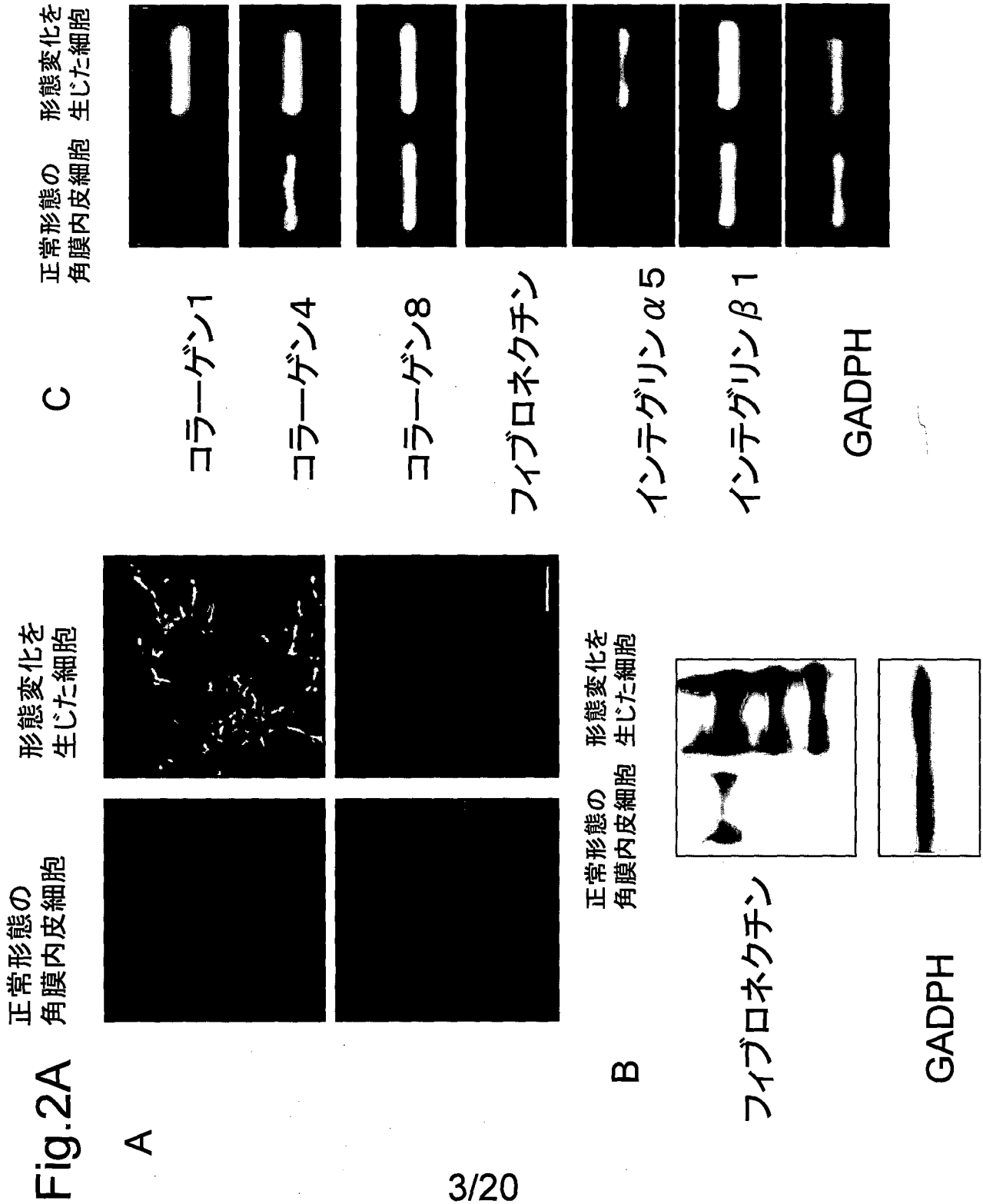
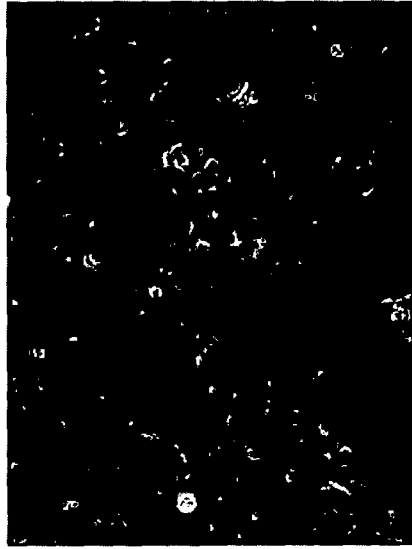


Fig.3

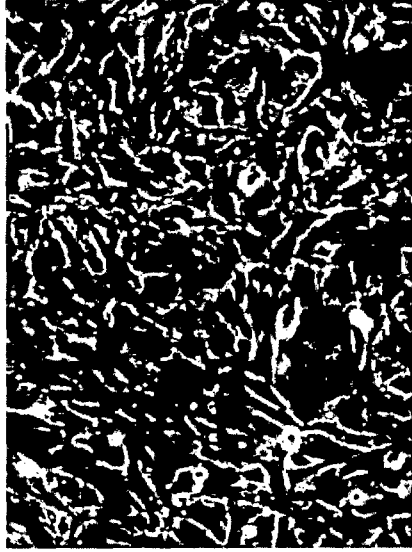
形態変化を生じた細胞



馴化培地にて培養した細胞
(正常形態を示す)



馴化培地での継代培養後
(形態変化を生じる)



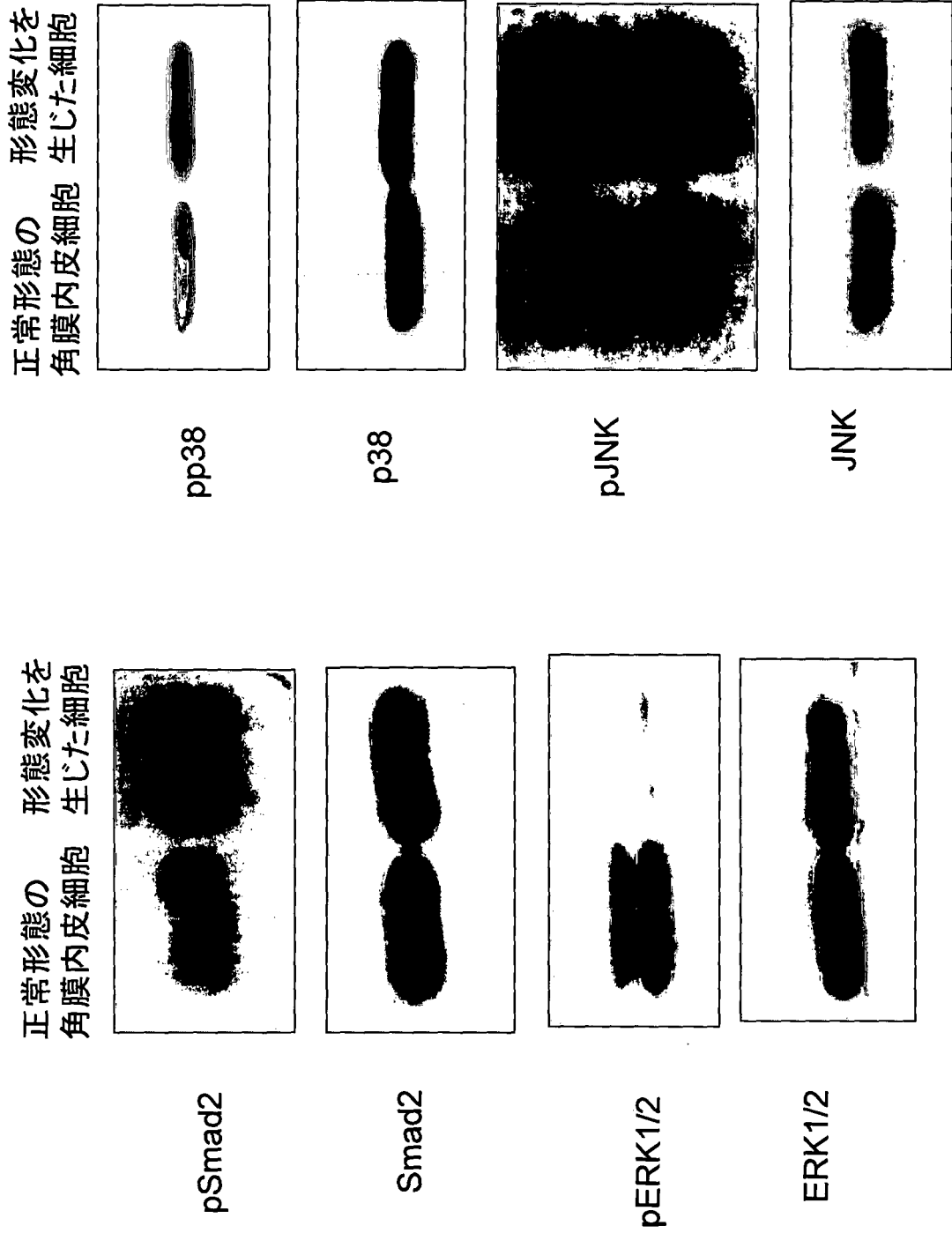
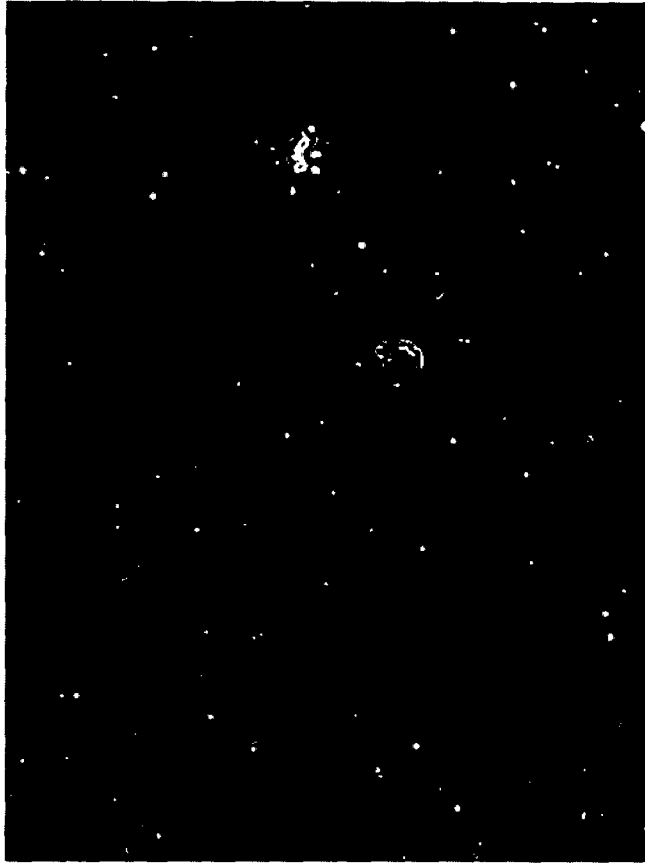


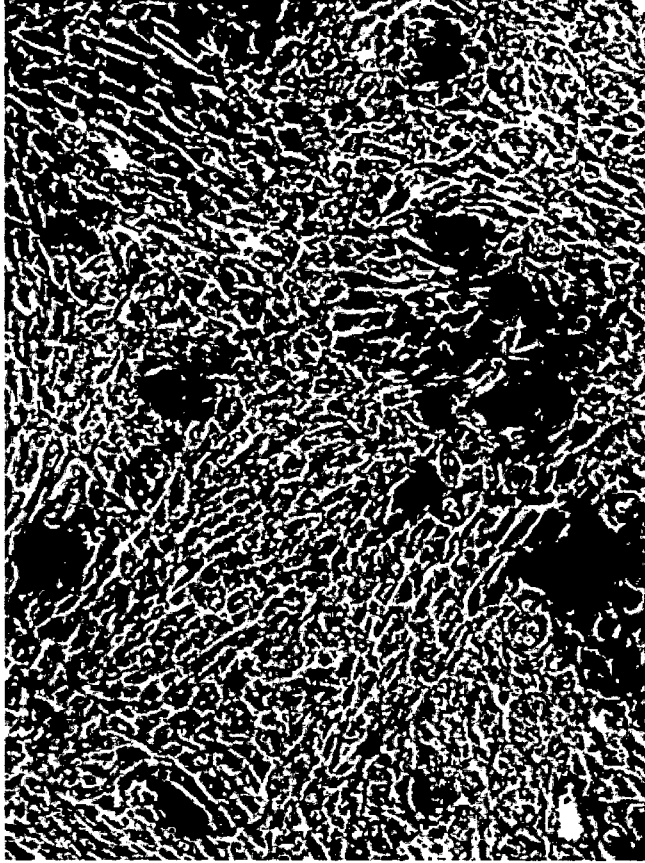
Fig.4

Fig.5

SB431542



通常培地



6/20

Fig.6

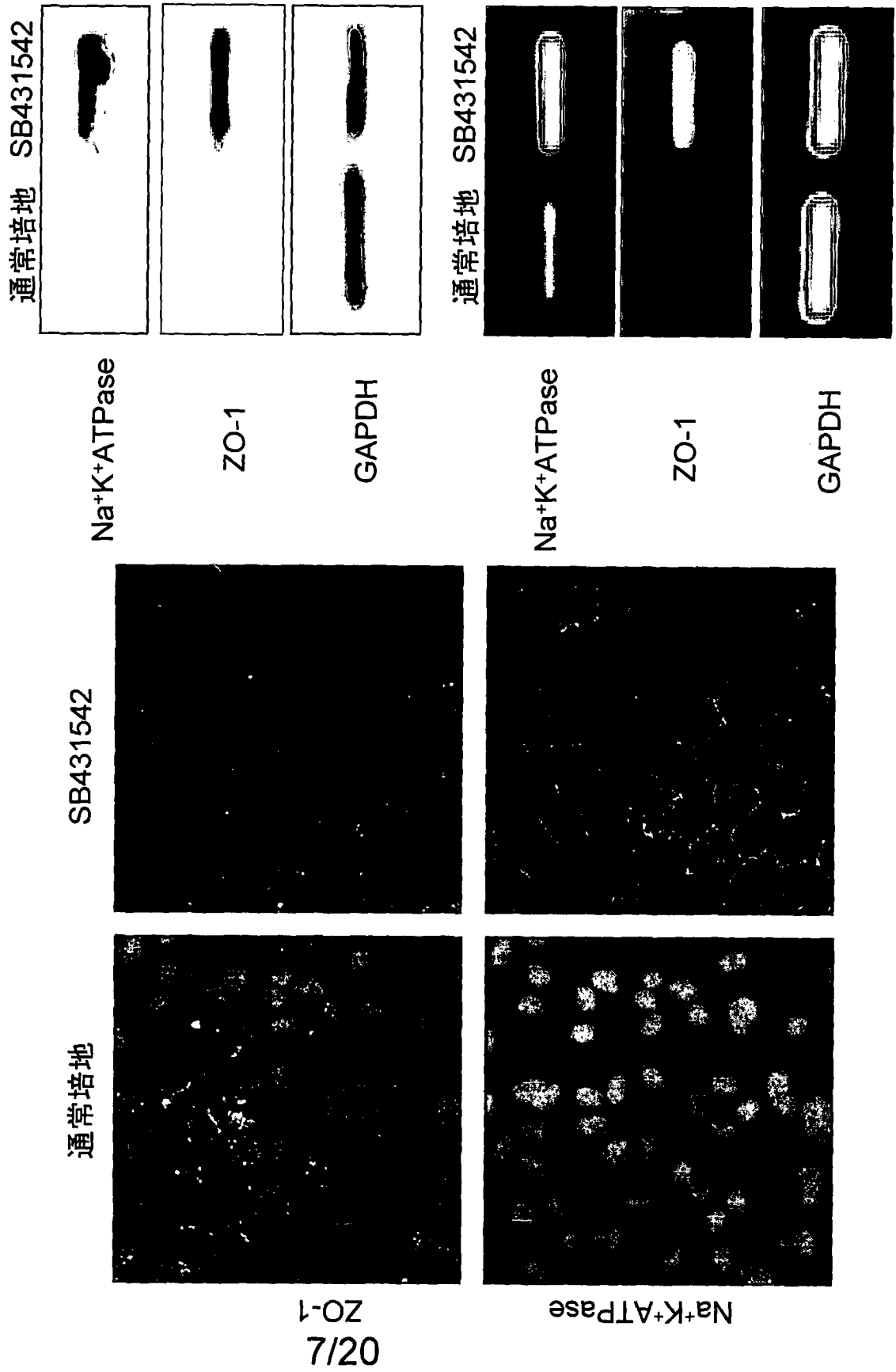


Fig.8

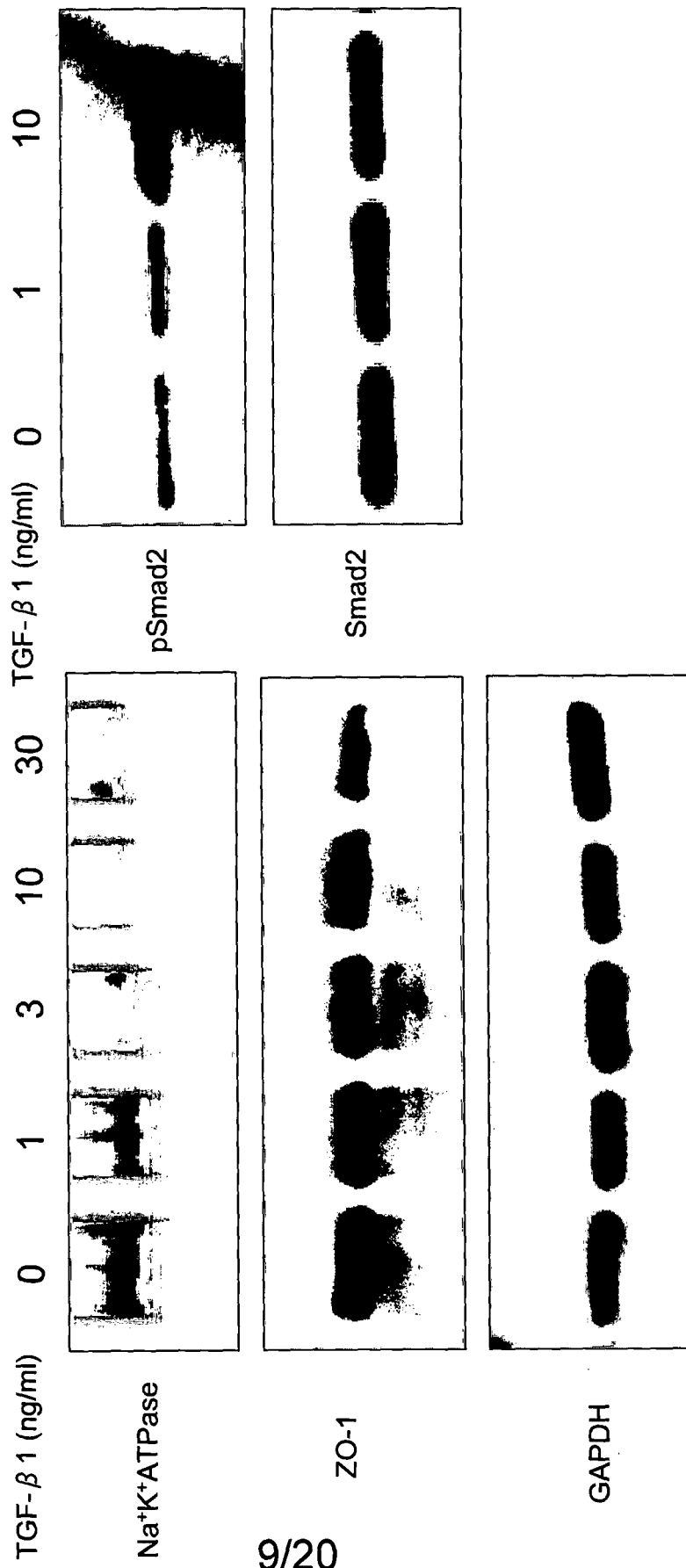
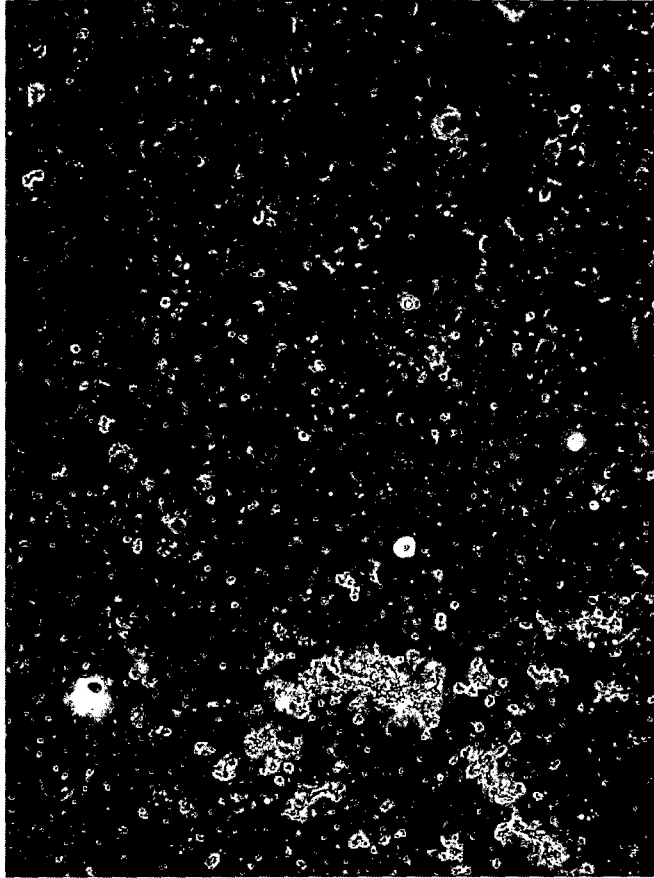
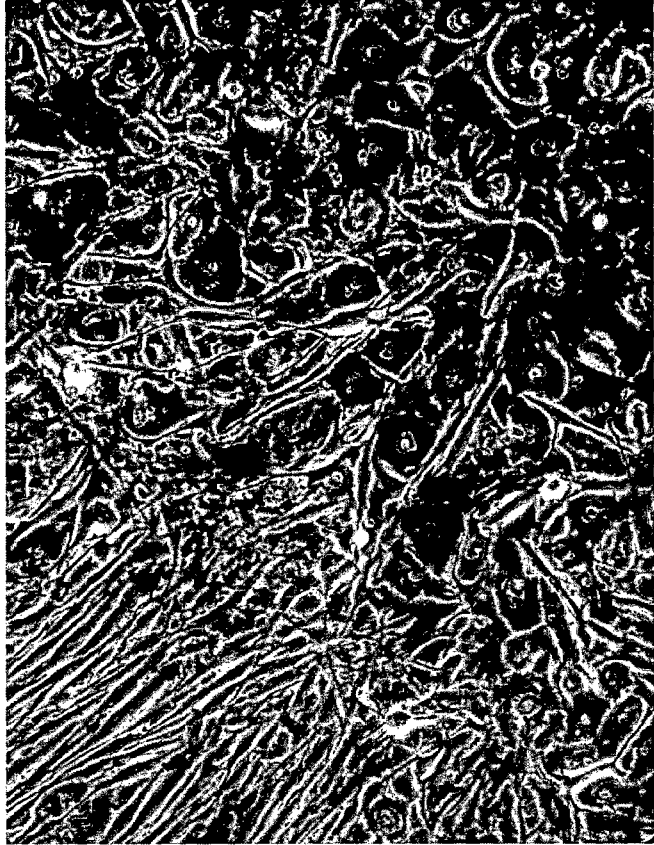


Fig. 9

SB431542

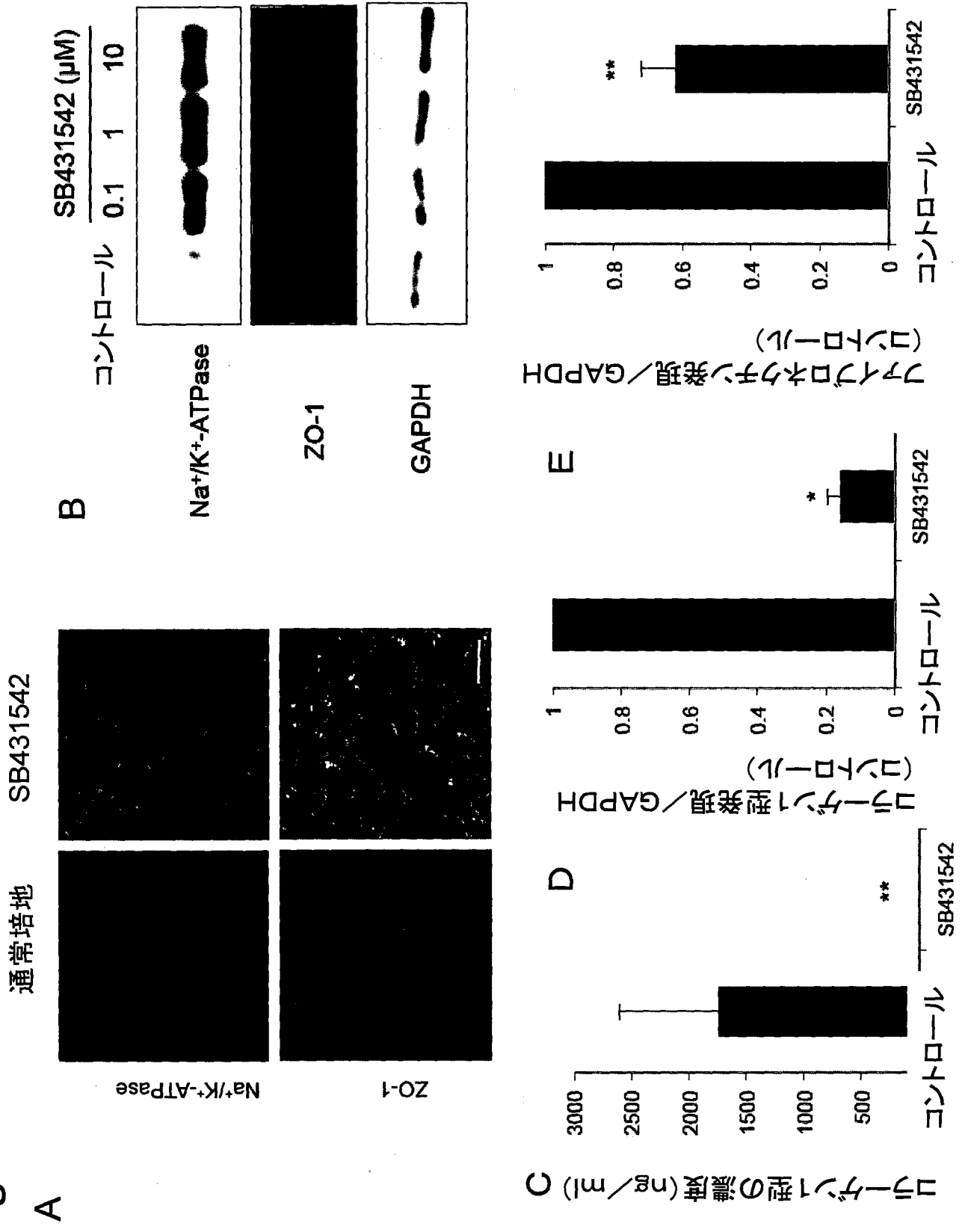


通常培地



10/20

Fig.9A



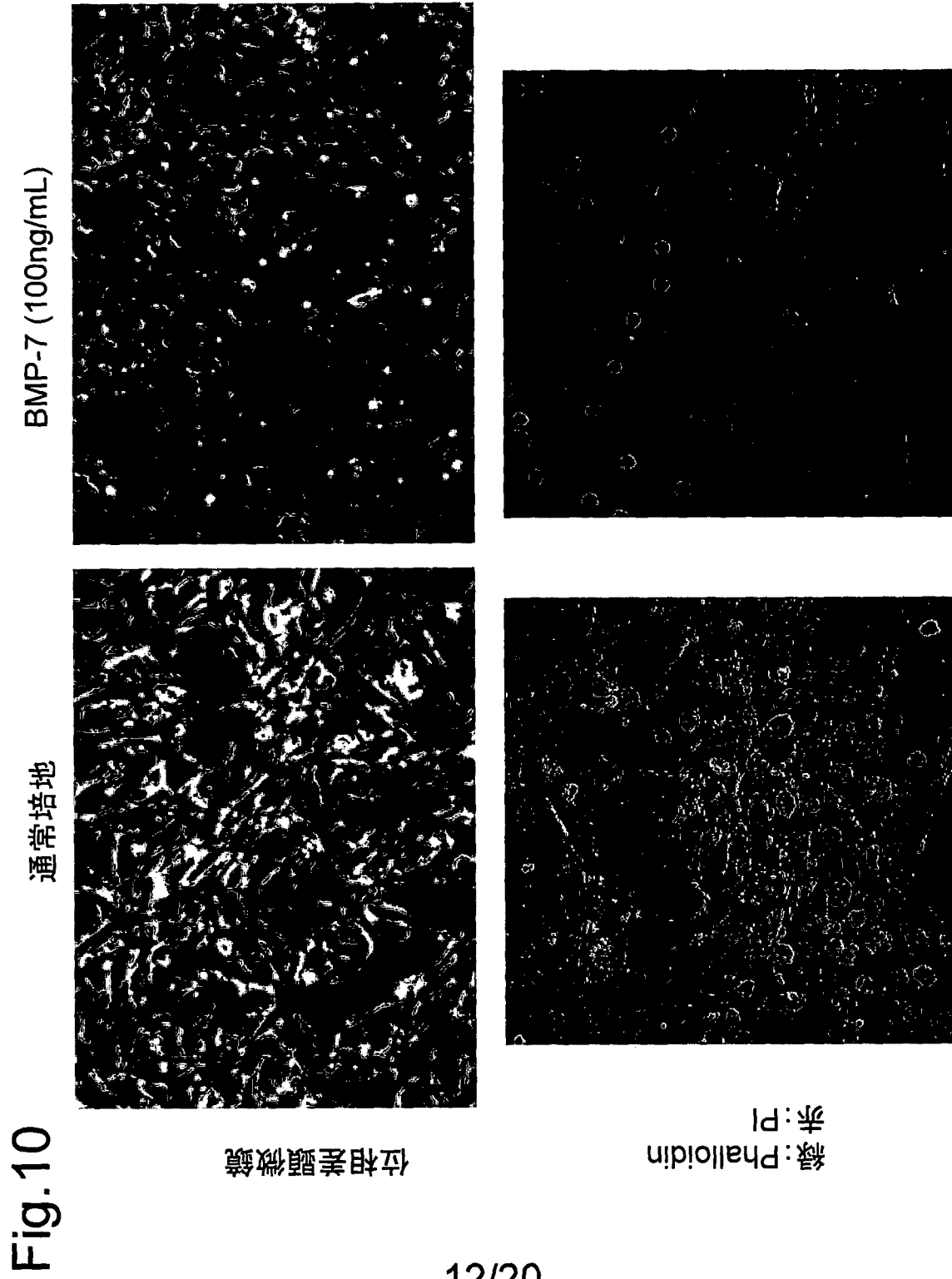


Fig. 10A

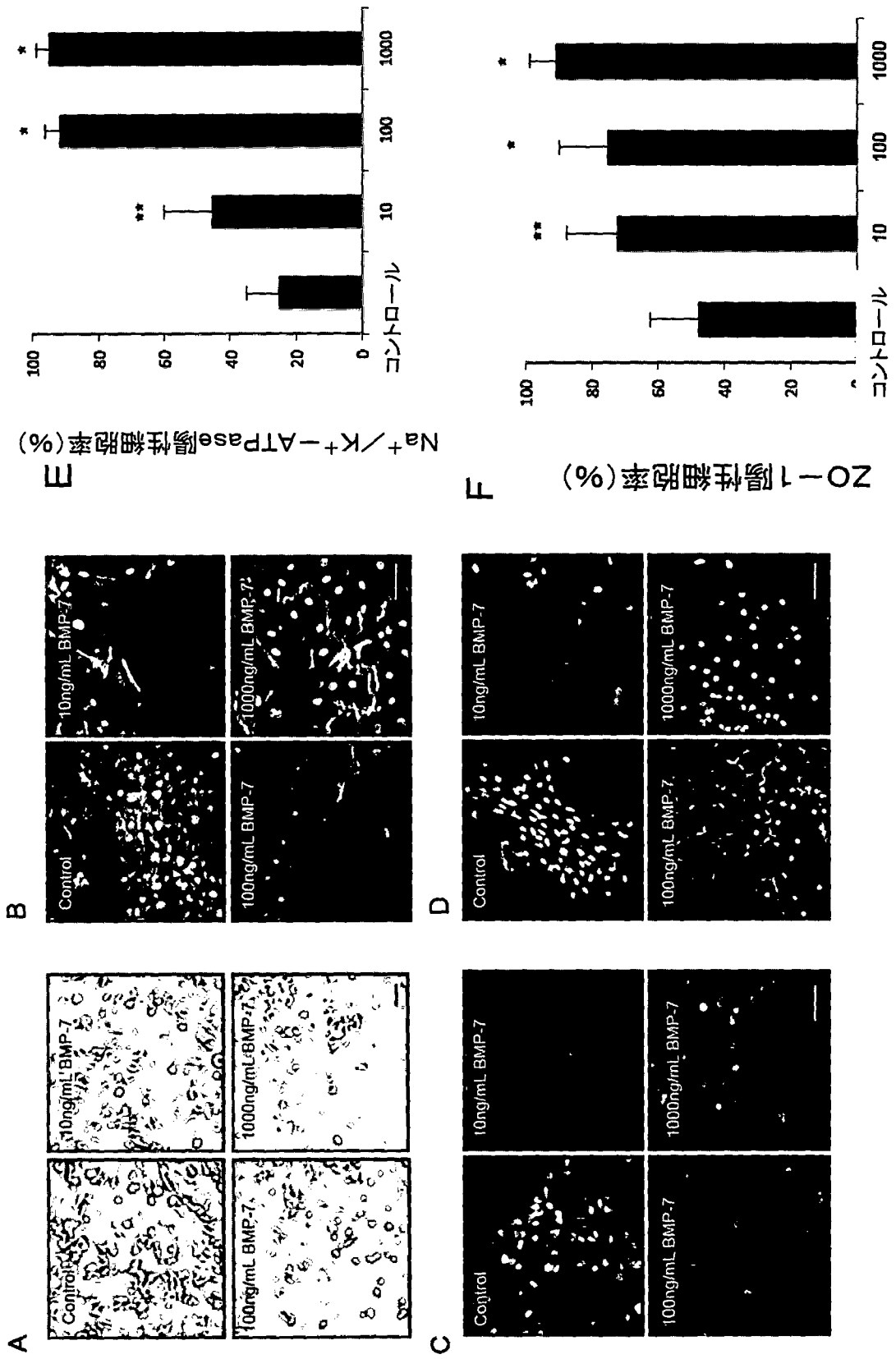
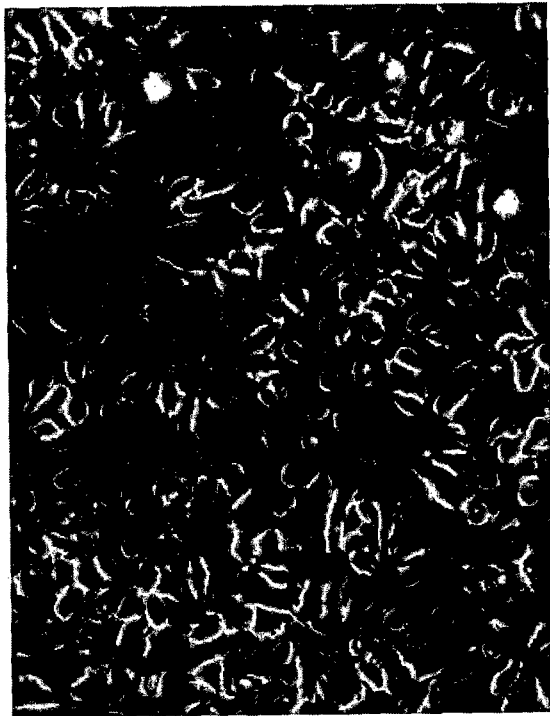
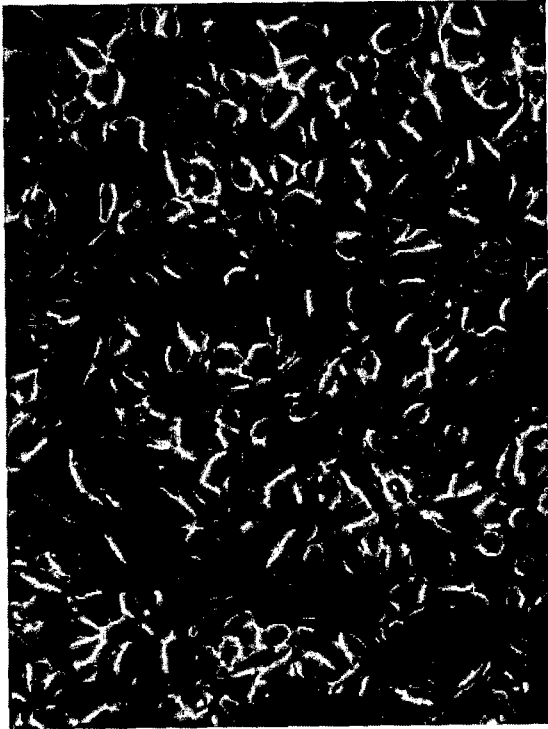


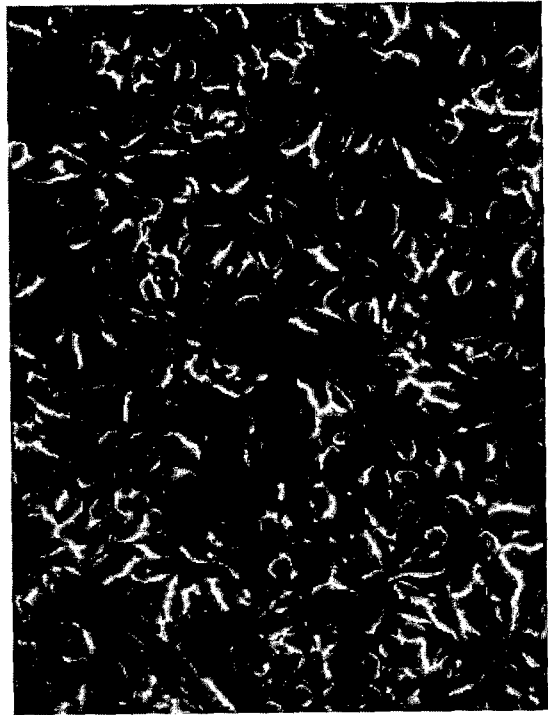
Fig. 11
通常培地



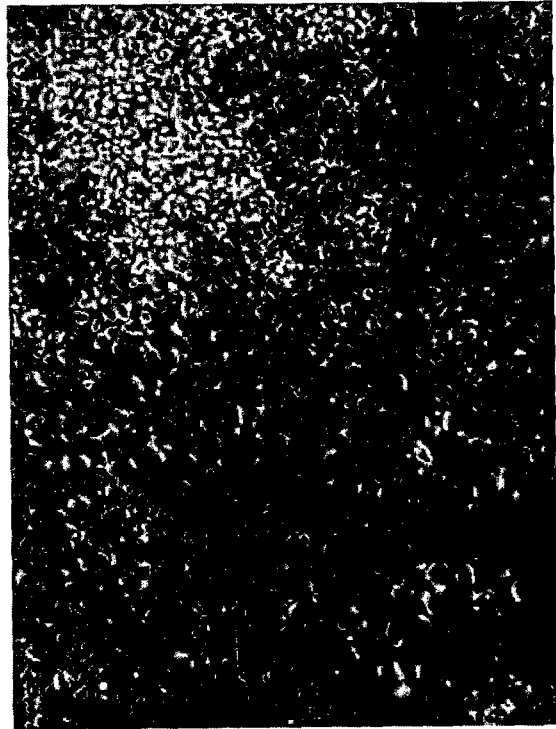
SB431542



SB203580



SB203580+SB431542



4継代目

ヒト角膜上皮細胞の標準培養法

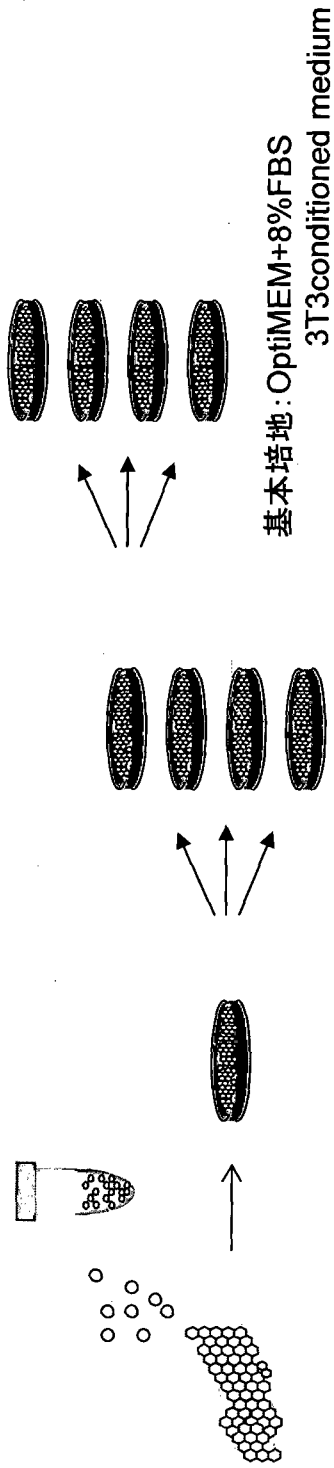
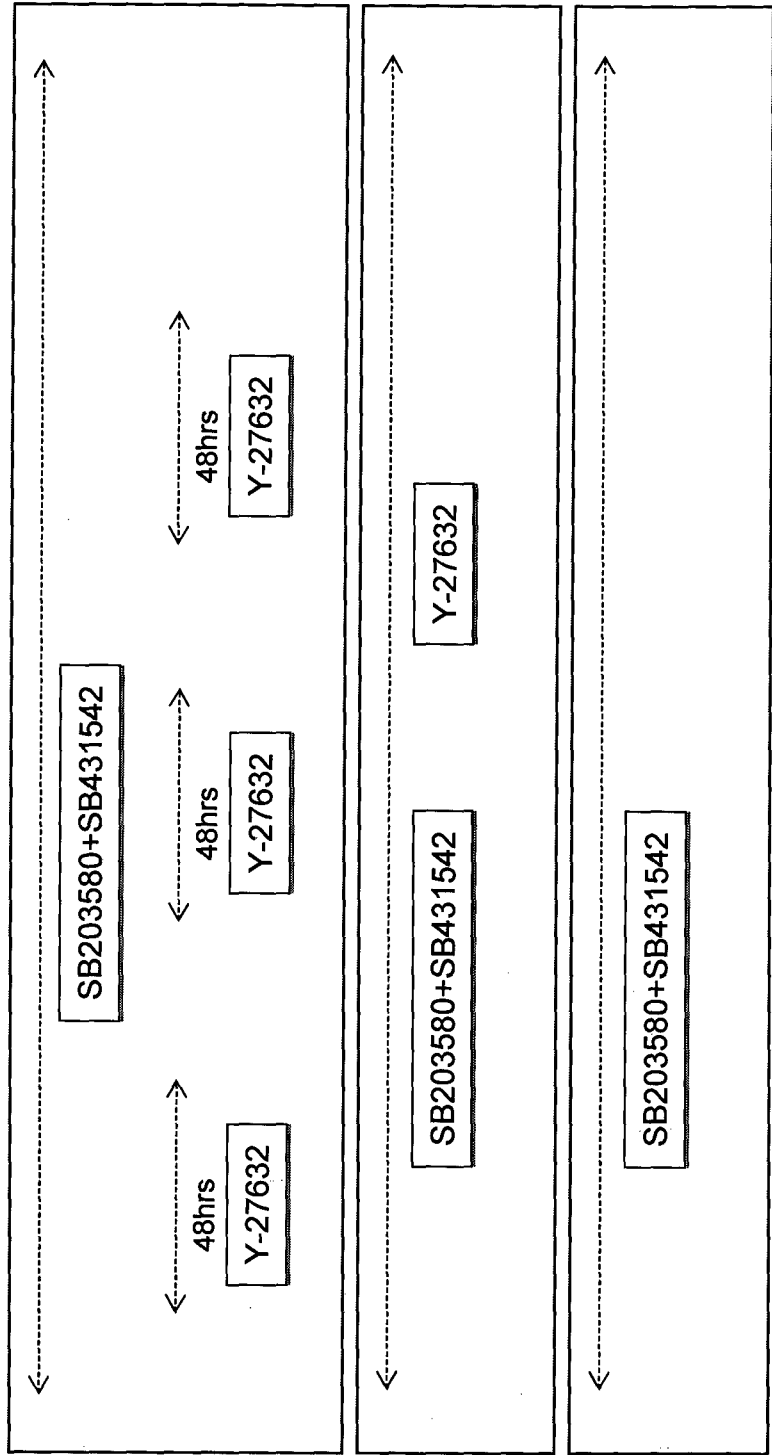
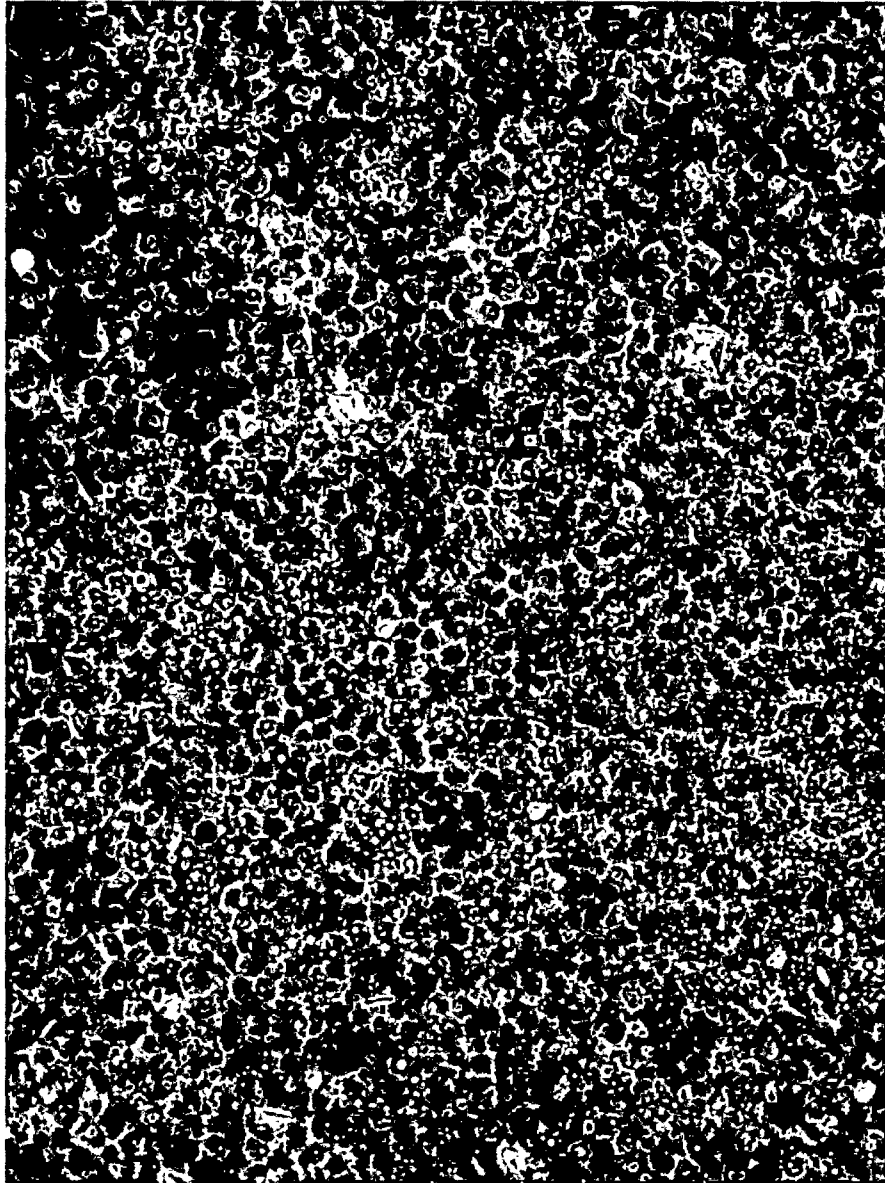
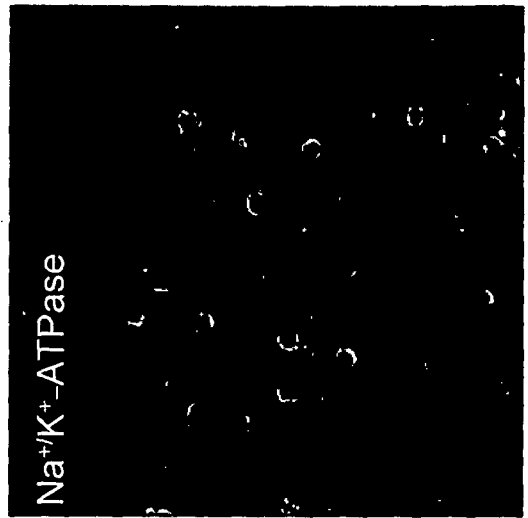
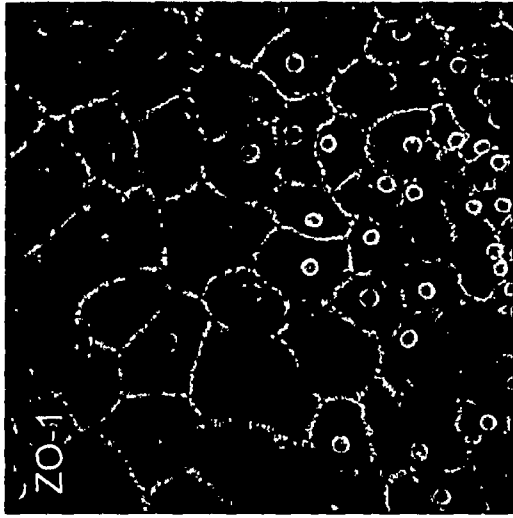


Fig.12





細胞密度:
3096cells/mm²

Fig.13

Fig.14

細胞+ROCK阻害剤



角膜厚:507 μ m

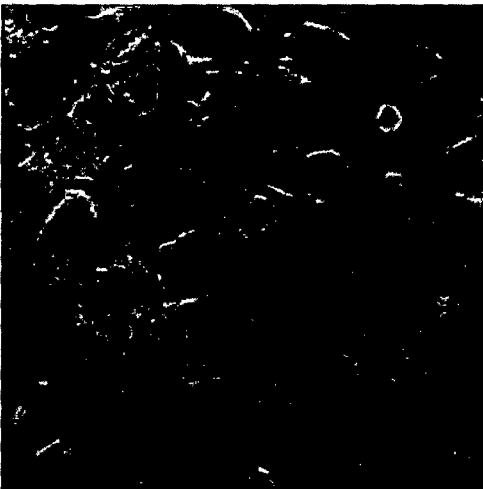
細胞のみ



角膜厚:947 μ m

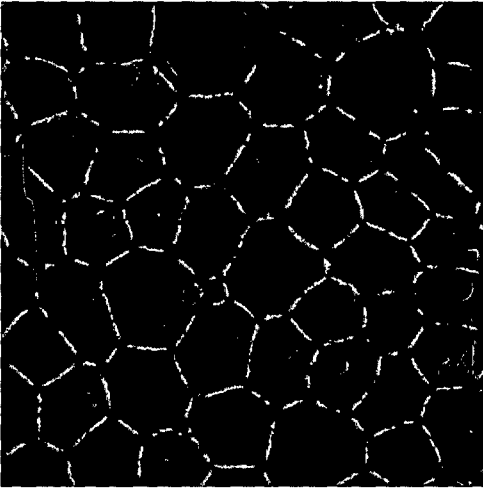
Fig.15

緑 : Phalloidin
青 : DAPI

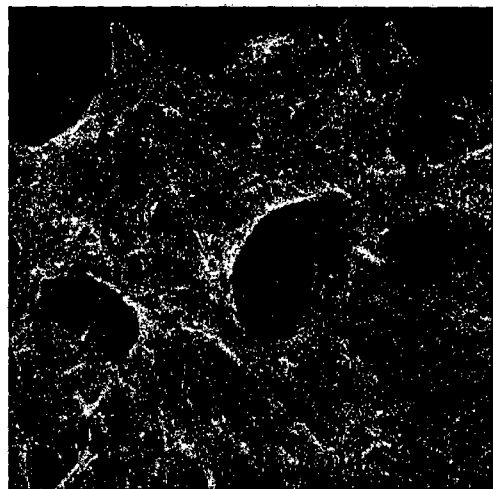


細胞+ROCK阻害剤

緑 : ZO-1
青 : DAPI



緑 : Na⁺K⁺ATPase
青 : DAPI



細胞のみ

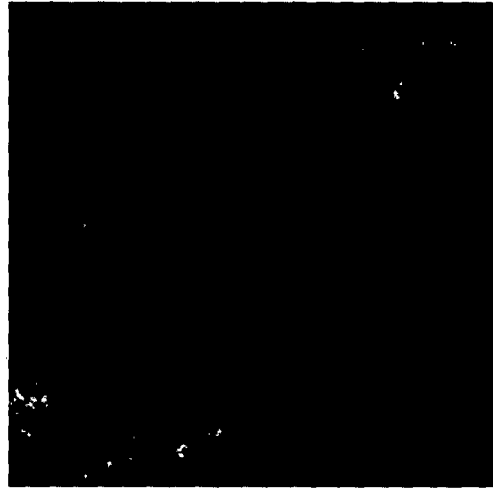


Fig. 16

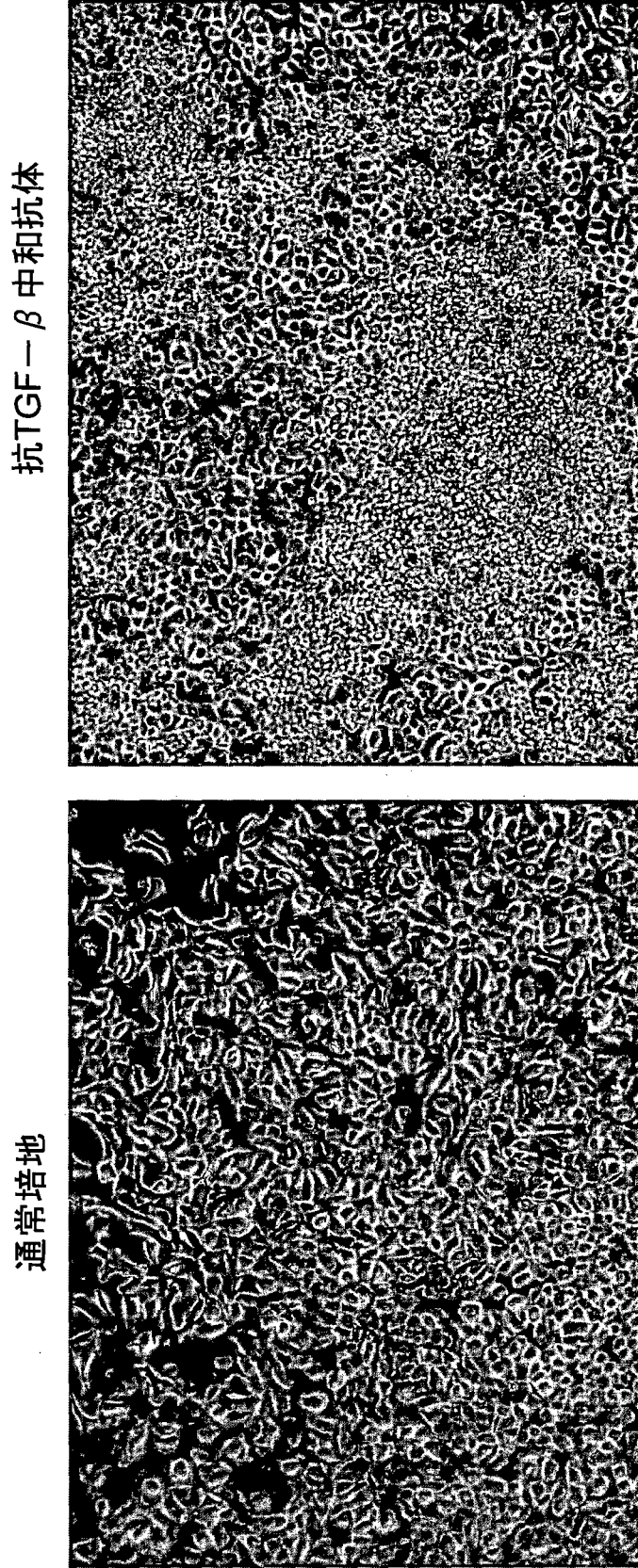
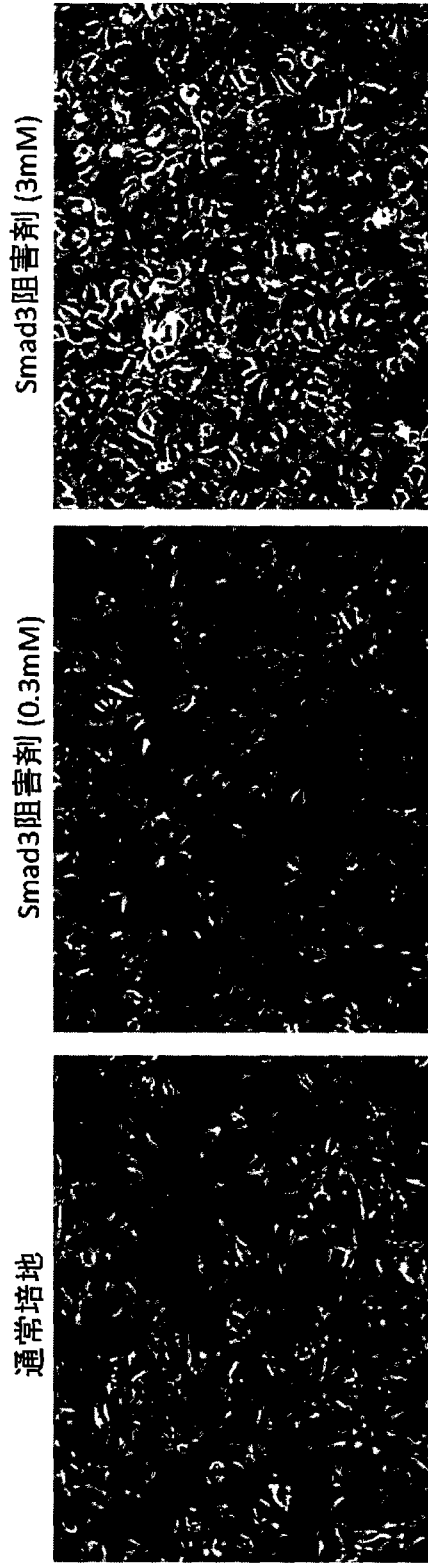


Fig.17



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT / JP2 012 / 084320

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/071 (2010.01)i, A61K9/70 (2006.01)i, A61K31/4418 (2006.01)i, A61K35/12 (2006.01)i, A61L27/00 (2006.01)i, A61P27/02 (2006.01)i, A61P43/00 (2006.01)i, C12N15/09 (2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N5/071, A61K9/70, A61K31/4418, A61K35/12, A61L27/00, A61P27/02, A61P43/00, C12N15/09

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

Jitsuyo	Shinan	Koho	1922-1996	Jitsuyo	Shinan	Toroku	Koho	1996-2013
Kokai	Jitsuyo	Shinan	1971-2013	Toroku	Jitsuyo	Shinan	Koho	1994-2013

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPI/DS(STN), Science Direct, JST Plus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamline)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/A	FUNAKI T. et al., Smad7 suppresses the inhibitory effect of TGF- β 2 on corneal endothelial cell proliferation and accelerates corneal endothelial wound closure in vitro - Cornea, 2003, Vol. 22, No. 2, pp. 153-159	1, 2, 21, 22 / 3-20, 23-39
X/Y / A	KOI ZUMI N. et al., Cultivated Corneal Endothelial Cell Sheet Transplantation in a Primate Model. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2007, Vol. 48, No. 10, pp. 4519-4526	23, 25-32, 34 / 3-20, 24/1, 2, 21, 22, 33, 35-39
X/Y / A	OKUMURA N. et al., Enhancement on Primate Corneal Endothelial Cell Survival in Vitro by a ROCK Inhibitor. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2009, Vol. 50, No. 8, pp. 3680-3687	23, 25-34 / 3-20, 24/1, 2, 21, 22, 35-39



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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
25 February, 2013 (25.02.13)

Date of mailing of the international search report
05 March, 2013 (05.03.13)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT / JP2 012 / 084320

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/ Y/A	Nori ko KOI ZUMI, " Cult ivated Corneal Endothel ial Cel l Sheet Tran splantat ion in a Primate Model ", Journal of Japane se Ophthamo logi cal Society , 2009, vol .113, page s 1050 to 1059	35- 39/ 3- 20, 24/ 1, 2, 21- 23, 25- 34
X/ Y/A	Nao ki OKUMURA, " Shudankai Shoroku 3. Enhancement on Primate Corneal Endothe lial Cel l Survival in Vit ro by a ROCK Inhibi tor", Journal of Kyoto Pre fectural Unive rsity of Medi cine , 2010, vol .119, no.2, page s 125 to 126	35- 39/ 3- 20, 24/ 1, 2, 21- 23, 25- 34
Y/A	PETROLL W.M. et al ., Myofibrobla st trans format ion of cat corneal endothel ium by trans forming growth factor— $\beta 1$, - $\beta 2$, and - $\beta 3$. Inve sti gative Ophthamo logy & Vi sua l Sci ence , 1998, Vol .39, No.11, pp.2018-2032	3- 20, 24/ 1, 2, 21- 23, 25- 39
Y/A	SUMIOKA T. et al ., Inhibitory effect of blo cking TGF- β / Smad signal on injury- indu ced fibro sis of corneal endothel ium. Mol ecul ar Vi sion , 2008, Vol .14, pp.2272-2281	3- 20, 24/ 1, 2, 21- 23, 25- 39
Y/A	SAI KA S. et al ., Inhibi tion of p38MAP ki nase suppre sses fibrot ic reacti on of reti nal pig ment epi thel ial cel ls. Laborato ry Inve sti gati on, 2005, Vol .85, pp.838-850	10- 15/ 1- 9, 16- 39
A	JOYCE N.C., Pro liferative capaci ty of the corneal endothe lium. Progre ss in Ret inal and Eye Research , 2003, Vol .22, pp.359-389	1-39
A	SAI KA S., TGF β pathobio logy in the eye . Laboratory Inve sti gat ion , 2006, Vol .86, pp.106-115	1-39
A	SAI KA S. et al ., Fibrot ic disorder s in the eye : Target s of gene the rapy . Progre ss in Ret inal and Eye Research , 2008, Vol .27, pp.177-196	1-39
A	wo 2005/038015 AI (CELLULAR BIOENGINEERING , INC .), 28 Apr il 2005 (28.04.2005), & EP 1675944 AI & JP 2007-508015 A & US 2007/0275365 AI	1-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT / JP2 0 1 2 / 0 8 4 3 2 0

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.:
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:

The inventions described in claims 1-34 (a first group of inventions) relate to "a culture-normalizing agent for a corneal endothelial cell, which comprises a fibrosis inhibitor".

The inventions described in claims 35-39 (a second group of inventions) relate to "a medicinal agent for treating or preventing a corneal endothelial disease in a human body, which comprises a cell adhesion promoter".

(Continued to extra sheet)

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/JP2 012/084320

Continuation of Box No. III of continuation of first sheet (2)

A common matter between the first group of inventions and the second group of inventions is "a composition containing a medicinal agent capable of acting on a corneal endothelium". However, the composition is known, as disclosed in documents 2-4. Therefore, the matter cannot be regarded as a special technical feature.

Consequently, the first invention group and the second invention group do not comply with unity of invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/07K2010. 01 i, A61K9/70 (2006. 01) i, A61K31/4418 (2006. 01) i, A61K35/12 (2006. 01) i, A61L27/00 (2006. 01) i, A61P27/02 (2006. 01) i, A61P43/00 (2006. 01) i, C12N15/09 (2006. 01) n

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N5/071, A61K9/70, A61K31/4418, A61K35/12, A61L27/00, A61P27/02, A61P43/00, C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-
 日本国公開実用新案公報 1971-2
 日本国実用新案登録公報 1996-
 日本国登録実用新案公報 1994-2

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)、Science Direct、JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 QDream I)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ A	FUNAKI T. et al. , Smad7 suppresses the inhibitory effect of TGF-β2 on corneal endothelial cell proliferation and accelerates corneal endothelial wound closure in vitro. Cornea, 2003, Vol.22, No.2, pp.153-159	1, 2, 21, 22/ 3-20, 23-39

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日 25.02.2013	国際調査報告の発送日 05.03.2013
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA / JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 伊達 利奈 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

c (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー水	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/ Y/ A	KOIZUMI N. et al. , Cultivated Corneal Endothelial Cell Sheet Transplantation in a Primate Model. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2007, Vol.48, No. 10, pp.45 19-4526	23, 25-32, 34/ 3-20, 24/ 1, 2, 21, 22, 33, 35-39
X/ Y/ A	OKUMURA N. et al. , Enhancement on Primate Corneal Endothelial Cell Survival in Vitro by a ROCK Inhibitor. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 2009, Vol.50, No. 8, pp.3680-3687	23, 25-34/ 3-20, 24/ 1, 2, 21, 22, 35-39
X/ Y/ A	小泉 範子、 霊長類を用いた角膜内皮再生医療の開発。 日本眼科学会雑誌 ,2009, Vol. 113, pp. 1050- 1059	35-39/ 3-20, 24/ 1, 2, 21-23, 25-34
X/ Y/ A	奥村 直毅、 集談会抄録 3 . Enhancement on Primate Corneal Endothelial Cell Survival in Vitro by a ROCK Inhibitor. 京都府立医科大学雑誌 ,2010, Vol. 119, No.2, pp. 125-126	35-39/ 3-20, 24/ 1, 2, 21-23, 25-34
Y/ A	PETROLL W.M. et al. , Myofibroblast transformation of cat corneal endothelium by transforming growth factor-61, -62, and -63. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1998, Vol.39, No. 11, pp.20 18-2032	3-20, 24/ 1, 2, 21-23, 25-39
Y/ A	SUMIOKA T. et al. , Inhibitory effect of blocking TGF-6/Smad signal on injury-induced fibrosis of corneal endothelium. Molecular Vision, 2008, Vol. 14, pp.2272-2281	3-20, 24/ 1, 2, 21-23, 25-39
Y/ A	SAIKA S. et al. , Inhibition of p38MAP kinase suppresses fibrotic reaction of retinal pigment epithelial cells. Laboratory Investigation, 2005, Vol.85, pp. 838-850	10-15/ 1-9, 16-39

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JOYCE N.C., Proliferative capacity of the corneal endothelium. Progress in Retinal and Eye Research, 2003, Vol.22, pp. 359-389	1-39
A	SAIKA S., TGF β pathobiology in the eye. Laboratory Investigation, 2006, Vol.86, pp. 106-115	1-39
A	SAIKA S. et al., Fibrotic disorders in the eye: Targets of gene therapy. Progress in Retinal and Eye Research, 2008, Vol.27, pp. 177-196	1-39
A	WO 2005/038015 A1 (CELLULAR BIOENGINEERING, INC.) 2005.04.28 , & EP 1675944 A1 & JP 2007-508015 A & US 2007/0275365 A1	1-39

第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (P C T 17条 (2) (a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

2. 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

請求項 1 - 3 4 に記載されている発明 (第1発明群) は、線維化抑制剤を含む角膜内皮細胞の培養正常化剤」に関するものである。

請求項 3 5 - 3 9 に記載されている発明 (第2発明群) は、細胞接着促進剤を含む、ヒトの角膜内皮疾患の処置又は予防のための医薬」に関するものである。

第1発明群と第2発明群とに共通する事項は、角膜内皮に対して作用する薬剤を含む組成物」であるが、そのような組成物は、例えば、文献2 - 4 に記載されているように公知であるから、当該事項を特別な技術的特徴であるとは認められない。

したがって、第1発明群及び第2発明群は、発明の単一性を満たしていない。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。