

## 明 細 書

発明の名称：角膜上皮細胞集団の製造方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、角膜上皮細胞集団の製造方法に関するものであり、移植用角膜上皮細胞シートの作製に使用するための高純度角膜上皮細胞集団の製造方法に関するものである。

### 背景技術

[0002] 角膜上皮細胞は、眼の最表面に位置しており、外界からのバリア機能など重要な機能を果たしている。難治性の眼疾患の一群として、Stevens-Johnson症候群、眼類天疱瘡、アルカリ腐食などの疾患が、角膜上皮幹細胞疲弊症として知られている。角膜上皮幹細胞疲弊症においては、外傷や自己免疫などによる慢性的な炎症反応により眼の角膜輪部に存在する角膜上皮幹細胞が不可逆的な機能不全に陥る、あるいは消失してしまい、角膜が混濁するとの症状を呈する。その結果として、眼の結膜上皮が、角膜中央部に侵入することにより角膜が本来有する透明性が失われて、著しい視力低下がもたらされる。角膜上皮幹細胞疲弊症などの重篤な角膜疾患患者の視力を回復するための処置として、従来から角膜移植術が行われてきた。特に、両眼で疾病が発症する両眼性の患者に対しては、患者本人由来の正常な角膜が存在しないため、他家の角膜移植術しか行えないのが現状である。しかしながら、他家の角膜移植術を行なうにあたって必要な角膜を供給できるドナーが不足しているとの問題や、ドナー由来の角膜に対して生じうる拒絶反応の問題があるため、自家細胞源を用いた治療法の開発が望まれている。

[0003] 角膜上皮幹細胞疲弊症などの重篤な角膜疾患に対する新規治療法として、本願の発明者らはiPS細胞から角膜上皮細胞シートを作製する技術を開発し、動物モデルを用いてその有効性を確認した（非特許文献1）。非特許文献1に記載の分化誘導法によりiPS細胞から生成される細胞は、眼周囲の様々な細胞を含む細胞集団であるため、角膜上皮細胞シートの作製に用いるためには

、角膜上皮細胞を純化する必要がある。そのため、非特許文献1では、角膜上皮細胞特異的な細胞表面マーカーに対する抗体を用い、FACSソーティングにて純化を行っている。

- [0004] FACSソーティングは、抗体染色した細胞を液流で流し、レーザーの照射により細胞表面抗原の発現を確認し、特定の細胞を分取する技術であるが、細胞が通過する全流路の無菌性を担保することが難しく、細胞の汚染が懸念されるという問題がある。また、FACSソーティングは、回収した細胞のダメージが大きいという問題がある。さらに、FACSソーティングは、用いる機器のメンテナンスに専門的な知識や技術を要する。それゆえ、FACSソーティングは、移植用角膜上皮細胞シートの作製に用いるための細胞を大量に調製する場面では、必ずしも理想的な方法ではなく、非特許文献1の技術を実用化および産業化するうえで課題が残っている。

### 先行技術文献

#### 非特許文献

- [0005] 非特許文献1: Hayashi et al., Nature, 2016 Mar 17;531(7594):376-80. doi: 10.1038/nature17000. Epub 2016 Mar 9.

### 発明の概要

#### 発明が解決しようとする課題

- [0006] 本発明は、角膜上皮細胞を含む細胞集団から、FACSソーティングを用いずに、移植用角膜上皮細胞シートの作製に使用可能な高純度かつ安全でダメージが少ない角膜上皮細胞集団を、短時間かつ簡便な操作で、大量に製造する方法を提供することを課題とする。

#### 課題を解決するための手段

- [0007] 本発明は上記の課題を解決するために、以下の発明を包含する。
- [1] 移植用角膜上皮細胞シートを作製するための角膜上皮細胞集団を製造する方法であって、以下の工程(1)～(3)を含むことを特徴とする製造方法：

(1) 角膜上皮細胞を含む細胞集団を調製する工程、  
(2) 工程(1)で調製した細胞集団を磁気細胞分離に供し、CD200陰性/SSEA-4陽性細胞を取得する工程、および  
(3) 工程(2)で取得した細胞を、 $\alpha 3$ 鎖を有するラミニン、 $\alpha 4$ 鎖を有するラミニンおよび $\alpha 5$ 鎖を有するラミニンからなる群より選択されるラミニンまたはそのE8フラグメントに接触させて、接着した細胞を取得する工程。

[2] 前記工程(3)が、(3-1)工程(2)で取得した細胞を、 $\alpha 2$ 鎖を有するラミニンまたはそのE8フラグメントと接触させて非接着細胞を取得する工程、および(3-2)得られた非接着細胞を、 $\alpha 3$ 鎖を有するラミニン、 $\alpha 4$ 鎖を有するラミニンおよび $\alpha 5$ 鎖を有するラミニンからなる群より選択されるラミニンまたはそのE8フラグメントと接触させて、接着した細胞を取得する工程である前記[1]に記載の製造方法。

[3] 前記角膜上皮細胞を含む細胞集団が、多能性幹細胞を眼周囲細胞へ分化誘導して得られた細胞集団である前記[1]または[2]に記載の製造方法。

[4] 前記移植用角膜上皮細胞シートを作製するための角膜上皮細胞集団におけるPAX6陽性/p63陽性細胞の割合が50%以上である前記[1]～[3]のいずれかに記載の製造方法。

[5]  $\alpha 3$ 鎖を有するラミニン、 $\alpha 4$ 鎖を有するラミニンおよび $\alpha 5$ 鎖を有するラミニンからなる群より選択されるラミニンまたはそのE8フラグメントが、ラミニン $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ のE8フラグメント、ラミニン $\alpha 4\beta 1\gamma 1$ のE8フラグメント、またはラミニン $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ のE8フラグメントである前記[1]～[4]のいずれかに記載の製造方法。

[6]  $\alpha 2$ 鎖を有するラミニンまたはそのE8フラグメントが、ラミニン $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ のE8フラグメントである前記[2]に記載の製造方法。

[7] 前記[1]～[6]のいずれかに記載の製造方法により製造された角膜上皮細胞集団を培養する工程を含むことを特徴とする移植用角膜上皮細胞シートの製造方法。

## 発明の効果

[0008] 本発明によれば、角膜上皮細胞を含む細胞集団から、FACSソーティングを用いずに、移植用角膜上皮細胞シートの作製に使用可能な高純度かつ安全でダメージが少ない角膜上皮細胞集団を、短時間かつ簡便な操作で、大量に製造することができる。

## 図面の簡単な説明

[0009] [図1] iPS細胞から分化誘導した眼周囲細胞中のCD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞をFACSソーティングにより分離した結果を示す図であり、(A)はCD200陰性細胞のエリアを示し、(B)はCD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞のエリアを示す図である。

[図2] FACSソーティングにより分離したCD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞を3週間培養した結果を示す図であり、(A)は位相差顕微鏡で細胞を観察した結果、(B)は得られた細胞シートの発現タンパク質を解析した結果を示す図である。

[図3] iPS細胞から分化誘導した眼周囲細胞、当該眼周囲細胞から磁気細胞分離によりCD200陽性細胞を除去した細胞、さらに磁気細胞分離によりSSEA-4陽性細胞を分取した細胞について、それぞれCD200、SSEA-4およびITGB4の発現をFACSで解析した結果を示す図である。

[図4] 図3のFACS解析結果をグラフ化した図である。

[図5] iPS細胞から分化誘導した眼周囲細胞を、各種ラミニンE8フラグメントをコーティングしたプレートに播種し、それぞれ非接着細胞を回収して、CD200、SSEA-4およびITGB4の発現をFACSで解析した結果を示す図である。

[図6] iPS細胞から分化誘導した眼周囲細胞を、ラミニン211E8フラグメントをコーティングしたプレートに播種し、非接着細胞の角膜上皮細胞率を解析した結果を示す図である。

[図7] iPS細胞から分化誘導した眼周囲細胞を、ラミニン211E8フラグメントをコーティングしたプレートに播種し、接着細胞の角膜上皮マーカー遺伝子および非角膜上皮マーカー遺伝子の発現を解析した結果を示す図である。

[図8] iPS細胞から分化誘導した眼周囲細胞を用いて、本発明の製造方法により角膜上皮細胞集団を製造する過程において、各段階の細胞集団の角膜上皮マーカー遺伝子および非角膜上皮マーカー遺伝子の発現を解析した結果を示す図である。

[図9] 本発明の製造方法で製造した角膜上皮細胞集団をラミニン511E8フラグメント上で3週間培養し、コンフルエントな状態になった細胞を位相差顕微鏡で観察した結果を示す図である。

[図10] 本発明の製造方法で製造した角膜上皮細胞集団をラミニン511E8フラグメント上で3週間培養し、得られた細胞シートの発現タンパク質を解析した結果を示す図である。

[図11] 本発明の製造方法で製造した角膜上皮細胞集団およびFACSソーティングにより分離したCD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞を、それぞれラミニン511E8フラグメント上で3週間培養した後、細胞を剥離・分散してK14陽性細胞およびK12陽性細胞をFACSで解析した結果を示す図である。

[図12] 本発明の製造方法で製造した角膜上皮細胞集団（MLS(322)、MLS(511)）から作製した細胞シートの形態を、他の細胞集団から作製した細胞シートの形態と比較した結果を示す図である。

[図13] 上皮幹細胞マーカーであるp63のEGFP共発現ノックインiPS細胞から分化誘導した眼周囲細胞から各種ラミニンE8を用いて角膜上皮細胞の純化を行い、得られた細胞の位相差顕微鏡画像および蛍光顕微鏡画像を示す図である。

[図14] 上皮幹細胞マーカーであるp63のEGFP共発現ノックインiPS細胞から分化誘導した眼周囲細胞から各種ラミニンE8を用いて角膜上皮細胞の純化を行い、得られた細胞におけるp63陽性細胞率を算出した結果を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0010] 非特許文献1において、発明者らは、iPS細胞から分化誘導された眼周囲細胞集団から角膜上皮細胞を純化するために、未分化のiPS細胞に発現するTRA-1-60を発現しない細胞（TRA-1-60陰性細胞）をFACSで回収し、さらに角膜上

皮細胞に発現するSSEA-4およびインテグリン $\beta$ 4（以下「ITGB4」とも記す）の共陽性細胞をFACSで回収した細胞集団を角膜上皮細胞集団として使用した。しかしながら、TRA-1-60陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞集団を培養すると、角膜上皮細胞と異なる不純細胞から生じたコロニーが観察される場合があり、必ずしも十分に純化されているとはいえないことがわかった。そこで、発明者らはTRA-1-60陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞集団の培養で生じた角膜上皮細胞コロニーと不純細胞コロニーの発現遺伝子を網羅的に解析し、不純細胞コロニーで発現が高い遺伝子としてCD200を同定した。CD200が多能性幹細胞に発現していることや、角膜上皮細胞に発現していないことは報告されておらず、CD200は、既知のTRA-1-60より幅広く不純細胞を除去し得る、非常に優れた選択マーカーであることが明らかになった。したがって、本願発明の「角膜上皮細胞」は、「CD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞」と同義である。

[0011] 本発明は、移植用角膜上皮細胞シートを作製するための角膜上皮細胞集団の製造方法（以下、「本発明の製造方法」と記す）を提供する。本発明の製造方法は、以下の工程（１）、工程（２）および工程（３）を含むものであればよい。

（１）角膜上皮細胞を含む細胞集団を調製する工程

（２）工程（１）で調製した細胞集団を磁気細胞分離に供し、CD200陰性/SSEA-4陽性細胞を取得する工程

（３）工程（２）で取得した細胞を、 $\alpha$ 3鎖を有するラミニン、 $\alpha$ 4鎖を有するラミニンおよび $\alpha$ 5鎖を有するラミニンからなる群より選択されるラミニンまたはそのE8フラグメントに接触させて、接着した細胞を取得する工程

[0012] 工程（１）では、角膜上皮細胞を含む細胞集団を調製する。角膜上皮細胞を含む細胞集団は、多能性幹細胞から分化誘導することにより調製することができる。また、ドナー角膜などの角膜を含む組織から調製することができる。多能性幹細胞としては、生体に存在するすべての細胞に分化可能である多能性を有し、かつ、増殖能をも併せもつ幹細胞であればよい。例えば、胚

性幹細胞（ES細胞）、核移植により得られるクローン胚由来の胚性幹細胞（ntES細胞）、精子幹細胞（GS細胞）、胚性生殖細胞（EG細胞）、人工多能性幹細胞（iPS細胞）、培養線維芽細胞や骨髓幹細胞由来の多能性細胞（Muse細胞）などが挙げられる。好ましくは、ES細胞、ntES細胞およびiPS細胞であり、より好ましくはiPS細胞である。多能性幹細胞は、哺乳動物の多能性幹細胞であることが好ましい。哺乳動物は特に限定されず、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ等が挙げられる。なかでもヒトが好ましい。ヒト多能性幹細胞を用いることにより、ヒトの再生医療に利用可能な安全な角膜上皮細胞集団を取得することができる。

[0013] 多能性幹細胞から分化誘導により角膜上皮細胞を含む細胞集団を調製する方法は特に限定されず、公知の方法から適宜選択して用いることができる。例えば、本発明者らが開発した多能性幹細胞を眼周囲細胞へ分化誘導する方法（非特許文献1）を好適に用いることができる。この分化誘導方法は、維持培養されたヒトiPS細胞を、ヒトケラチノサイト成長因子（Keratinocyte Growth Factor: KGF）およびヒト繊維芽細胞成長因子-2（Fibroblast Growth Factor-2: FGF-2）を含む培地で培養する方法である。なお、非特許文献1に記載の分化誘導方法において、角膜上皮細胞の誘導にはFGF-2は必須ではなく、非特許文献1に記載の培地にFGF-2が含まれていなくても、ヒトiPS細胞から角膜上皮細胞を含む細胞集団を分化誘導することができる（参考例1参照）。これら以外に、例えば以下の文献(a)～(e)に記載の分化誘導方法等を用いても、多能性幹細胞から角膜上皮細胞を含む細胞集団を調製することができる。

(a) Shalom-Feuerstein, R., Serror, L., De La Forest Divonne, S., Petit, I., Aberdam, E., Camargo, L., Damour, O., Vigouroux, C., Solomon, A., Gaggioli, C., et al. (2012). Pluripotent stem cell model reveals essential roles for miR-450b-5p and miR-184 in embryonic corneal lineage specification. *Stem Cells* 30, 898-909.

(b) Hewitt, K.J., Shamis, Y., Carlson, M.W., Aberdam, E., Aberdam, D.

, and Garlick, J.A. (2009). Three-dimensional epithelial tissues generated from human embryonic stem cells. *Tissue Eng. Part A* 15, 3417-3426.

(c) Hayashi, R., Ishikawa, Y., Ito, M., Kageyama, T., Takashiba, K., Fujioka, T., Tsujikawa, M., Miyoshi, H., Yamato, M., Nakamura, Y., and Nishida, K. (2012). Generation of corneal epithelial cells from induced pluripotent stem cells derived from human dermal fibroblast and corneal limbal epithelium. *PLoS ONE* 7, e45435.

(d) Hanson, C., Hardarson, T., Ellerstrom, C., Nordberg, M., Caisander, G., Rao, M., Hyllner, J., and Stenevi, U. (2013). Transplantation of human embryonic stem cells onto a partially wounded human cornea in vitro. *Acta Ophthalmol. (Copenh.)* 91, 127-130.

(e) Ahmad, S., Stewart, R., Yung, S., Kolli, S., Armstrong, L., Stojkovic, M., Figueiredo, F., and Lako, M. (2007). Differentiation of human embryonic stem cells into corneal epithelial-like cells by in vitro replication of the corneal epithelial stem cell niche. *Stem Cells* 25, 1145-1155.

[0014] ドナー角膜などの角膜を含む組織から調製する方法は特に限定されず、公知の方法から適宜選択して用いることができる。例えば、ドナー角膜の強角膜組織からピンセット等を用いて実体顕微鏡下で角膜上皮細胞を掻き出し、培養に供する方法 (Hayashi R, et al., *Tissue Eng Part C Methods*. 16(4):553-560, 2010.) 等が挙げられる。

[0015] 本発明の製造方法に使用する角膜上皮細胞を含む細胞集団としては、非特許文献1に記載の方法で調製された細胞集団、すなわちヒトiPS細胞を眼周囲細胞へ分化誘導して得られた細胞集団が好ましい。

[0016] 工程(2)では、工程(1)で調製した細胞集団を磁気細胞分離 (Magnetic-activated cell sorting、以下「MACS」とも記す) に供し、CD200陰性/SSEA-4陽性細胞を取得する。工程(2)は市販の磁気細胞分離装置を用いて行う

ことができる。通常、CD200陽性細胞を除去した後にSSEA-4陽性細胞を回収する方法が採用されるが、これに限定されない。MACSによりCD200陽性細胞を除去する方法としては、工程（１）で調製した細胞集団を抗CD200抗体で染色し、当該抗CD200抗体に結合できる磁性マイクロビーズ（例えば、抗免疫グロブリン抗体が結合した磁性マイクロビーズ）と接触させた後に磁気細胞分離装置の磁気カラムに通して、カラムを通過した細胞を、CD200陽性細胞が除去された細胞集団（CD200陰性細胞集団）として回収する方法が挙げられる。抗CD200抗体は標識されていてもよく、標識抗CD200抗体を用いる場合は標識物質と結合する磁性マイクロビーズを用いることができる。また、抗CD200抗体が結合した磁性マイクロビーズが使用できる場合は、抗CD200抗体で細胞を染色する操作を省略することができる。

[0017] 次に、回収したCD200陰性細胞集団を抗SSEA4抗体で染色し、当該抗SSEA4抗体に結合できる磁性マイクロビーズ（例えば、抗免疫グロブリン抗体が結合した磁性マイクロビーズ）と接触させた後に磁気細胞分離装置の磁気カラムに通して、カラム内に保持された細胞を、CD200陰性/SSEA-4陽性細胞として回収する方法が挙げられる。カラム内に保持された細胞は、カラムを磁場から離して適当なバッファーで溶出させることにより回収することができる。抗SSEA4抗体は標識されていてもよく、標識抗SSEA4抗体を用いる場合は標識物質と結合する磁性マイクロビーズを用いることができる。また、抗SSEA4抗体が結合した磁性マイクロビーズが使用できる場合は、抗SSEA4抗体で細胞を染色する操作を省略することができる。

[0018] 工程（３）では、工程（２）で取得した細胞を、 $\alpha$ 3鎖を有するラミニン、 $\alpha$ 4鎖を有するラミニンおよび $\alpha$ 5鎖を有するラミニンからなる群より選択されるラミニンまたはそのE8フラグメントに接触させて、接着した細胞を取得する。また、工程（２）で取得した細胞を、 $\alpha$ 2鎖を有するラミニンまたはそのE8と接触させて非接着細胞を取得し、得られた非接着細胞を、 $\alpha$ 3鎖を有するラミニン、 $\alpha$ 4鎖を有するラミニンおよび $\alpha$ 5鎖を有するラミニンからなる群より選択されるラミニンまたはそのE8フラグメントに接触させて、接着し

た細胞を取得してもよい。さらに、 $\alpha$ 3鎖を有するラミニン、 $\alpha$ 4鎖を有するラミニンおよび $\alpha$ 5鎖を有するラミニンからなる群より選択されるラミニンまたはそのE8フラグメントに接着した細胞を直ちに剥離・回収せず、非接着細胞を除去してそのままラミニンまたはそのE8フラグメント上で培養を続け、その後に増殖した細胞を回収してもよい。工程（3）で取得した細胞により、移植用角膜上皮細胞シートの作製に使用可能な高純度の角膜上皮細胞集団が構成される。

[0019] ラミニンは、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖および $\gamma$ 鎖の3本のサブユニット鎖からなるヘテロ三量体分子である。 $\alpha$ 鎖は $\alpha$ 1～ $\alpha$ 5の5種類、 $\beta$ 鎖は $\beta$ 1～ $\beta$ 3の3種類、 $\gamma$ 鎖は $\gamma$ 1～ $\gamma$ 3の3種類が知られており、それらの組み合わせで少なくとも12種類以上のアイソフォームが存在する（表1参照）。本明細書において、ラミニンの各アイソフォームを、例えばラミニン111のように表記する。また、本明細書において単に「ラミニン」と表記した場合は、「全長ラミニン」を意味する。

[0020] [表1]

| $\alpha$ 鎖 | 三量体組成                                        |
|------------|----------------------------------------------|
| $\alpha$ 1 | $\alpha$ 1 $\beta$ 1 $\gamma$ 1 (laminin-1)  |
|            | $\alpha$ 1 $\beta$ 2 $\gamma$ 1 (laminin-3)  |
| $\alpha$ 2 | $\alpha$ 2 $\beta$ 1 $\gamma$ 1 (laminin-2)  |
|            | $\alpha$ 2 $\beta$ 2 $\gamma$ 1 (laminin-4)  |
|            | $\alpha$ 2 $\beta$ 1 $\gamma$ 3 (laminin-12) |
| $\alpha$ 3 | $\alpha$ 3 $\beta$ 3 $\gamma$ 2 (laminin-5)  |
|            | $\alpha$ 3 $\beta$ 1 $\gamma$ 1 (laminin-6)  |
|            | $\alpha$ 3 $\beta$ 2 $\gamma$ 1 (laminin-7)  |
| $\alpha$ 4 | $\alpha$ 4 $\beta$ 1 $\gamma$ 1 (laminin-8)  |
|            | $\alpha$ 4 $\beta$ 2 $\gamma$ 1 (laminin-9)  |
| $\alpha$ 5 | $\alpha$ 5 $\beta$ 1 $\gamma$ 1 (laminin-10) |
|            | $\alpha$ 5 $\beta$ 2 $\gamma$ 1 (laminin-11) |

[0021] ラミニンE8フラグメント（以下、「ラミニンE8」または「E8」と記す）は、マウスラミニン111をエラスターゼで消化して得られたヘテロ三量体を形成しているフラグメントであり、強い細胞接着活性をもつフラグメントとして同定されたものである（Edgar D et al., J. Cell Biol., 105:589-598, 198

7) 。マウスラミニン111以外のラミニンについてもエラスターゼで消化した際にマウスラミニン111E8に相当するフラグメントの存在が推定されるが、マウスラミニン111以外のラミニンをエラスターゼで消化してE8を分離、同定した報告はない。したがって、本発明の製造方法に用いるラミニンE8は、ラミニンのエラスターゼ消化産物であることを要するものではなく、マウスラミニン111E8と同様の細胞接着活性を有し、類似の構造を有するラミニンフラグメントであればよい。

[0022] ラミニンE8は、 $\alpha$ 鎖のC末端フラグメントから球状ドメイン4および5が除かれたフラグメント ( $\alpha$ 鎖E8)、 $\beta$ 鎖のC末端フラグメント ( $\beta$ 鎖E8) および $\gamma$ 鎖のC末端フラグメント ( $\gamma$ 鎖E8) が三量体を形成したフラグメントである。三量体の分子量は特に限定されないが、通常約150～約170kDaである。 $\gamma$ 鎖E8のC末端部から3番目のグルタミン酸残基はラミニンE8のインテグリン結合活性に必須である (Hiroyuki Ido et al., The Journal of Biological Chemistry, 282, 11144-11154, 2007) 。

[0023] ラミニンはどのような生物のラミニンでもよいが、哺乳動物のラミニンが好ましい。ラミニンE8も同様である。哺乳動物としては、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウシ、ブタ等が挙げられるが、限定されない。なかでもヒトが好ましい。ヒトに対して安全な移植用角膜上皮細胞シートを作製するための角膜上皮細胞集団を製造するためには、製造工程において異種生物由来の成分の使用を排除することが求められるからである。

[0024] ラミニンは天然型であってもよく、その生物学的活性を維持したまま、1個またはそれ以上のアミノ酸残基が修飾された修飾型であってもよい。ラミニンE8も同様である。ラミニンの製造方法は特に限定されず、例えば、ラミニン高発現細胞から精製する方法や、組換えタンパク質として製造する方法などが挙げられる。ラミニンE8の製造方法も特に限定されず、例えば、全長ラミニンをエラスターゼ等のタンパク質分解酵素で消化し、目的のフラグメントを分取、精製する方法や、組換えタンパク質として製造する方法などが挙げられる。製造量、品質の均一性、製造コスト等の観点から、ラミニンお

よびラミニンE8の両者とも、組換えタンパク質として製造することが好ましい。

- [0025] 組換えラミニン、組換えラミニンE8は、公知の遺伝子組換え技術を適宜用いることにより製造することができる。組換えラミニン、組換えラミニンE8の製造方法としては、例えば、 $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖および $\gamma$ 鎖の各全長タンパク質をコードするDNA、または各鎖のE8フラグメントをコードするDNAをそれぞれ取得し、これをそれぞれ発現ベクターに挿入し、得られた3種類の発現ベクターを適切な宿主細胞に共導入して発現させ、3量体を形成しているタンパク質を公知の方法で精製することにより製造することができる。組換えラミニン（全長）の製造方法としては、例えば井戸ら（Hiroyuki Ido et al., The Journal of Biological Chemistry, 279, 10946-10954, 2004）の方法などが挙げられるが、これに限定されない。組換えラミニンE8の製造方法としては、例えば井戸ら（Hiroyuki Ido et al., The Journal of Biological Chemistry, 282, 11144-11154, 2007）の方法が挙げられるが、これに限定されない。
- [0026] 主要な哺乳動物のラミニンを構成する $\alpha$ 鎖、 $\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖をコードする遺伝子の塩基配列情報および各鎖のアミノ酸配列情報は、公知のデータベース（GenBank等）から取得することができる。表2に、ヒトのラミニンを構成する各鎖のアクセッション番号を示す。これら以外の各種生物のラミニン構成鎖の塩基配列情報およびアミノ酸配列情報も同様に公知のデータベース（GenBank等）から取得することができる。

[0027]

[表2]

|                    | アミノ酸配列    | 塩基配列      |
|--------------------|-----------|-----------|
| ヒトラミニン $\alpha$ 1鎖 | NP_005550 | NM_005559 |
| ヒトラミニン $\alpha$ 2鎖 | NP_000417 | NM_000426 |
| ヒトラミニン $\alpha$ 3鎖 | NP_000218 | NM_000227 |
| ヒトラミニン $\alpha$ 4鎖 | NP_002281 | NM_002290 |
| ヒトラミニン $\alpha$ 5鎖 | NP_005551 | NM_005560 |
| ヒトラミニン $\beta$ 1鎖  | NP_002282 | NM_002291 |
| ヒトラミニン $\beta$ 2鎖  | NP_002283 | NM_002292 |
| ヒトラミニン $\beta$ 3鎖  | NP_000219 | NM_000228 |
| ヒトラミニン $\gamma$ 1鎖 | NP_002284 | NM_002293 |
| ヒトラミニン $\gamma$ 2鎖 | NP_005553 | NM_005562 |
| ヒトラミニン $\gamma$ 3鎖 | NP_006050 | NM_006059 |

[0028]  $\alpha$ 2鎖を有するラミニンにはラミニン211およびラミニン221が含まれる。 $\alpha$ 3鎖を有するラミニンにはラミニン332、ラミニン311およびラミニン321が含まれる。 $\alpha$ 4鎖を有するラミニンにはラミニン411およびラミニン421が含まれる。 $\alpha$ 5鎖を有するラミニンにはラミニン511およびラミニン521が含まれる。非接着細胞を取得するために使用するラミニンまたはラミニンE8としては、ラミニン211E8が好ましい。接着細胞を取得するために使用するラミニンまたはラミニンE8としては、ラミニン332E8、ラミニン411E8またはラミニン511E8が好ましく、ラミニン332E8またはラミニン511E8がより好ましい。

[0029] 工程（3）において、細胞をラミニンまたはラミニンE8と接触させる方法は特に限定されない。例えば、培養用シャーレ等の培養器の培養面にラミニンまたはラミニンE8をコーティングし、そこに細胞懸濁液を添加して、一定時間静置する方法が挙げられる。また、例えばビーズ等の担体にラミニンまたはラミニンE8をコーティングし、この担体を工程（1）で調製された角膜上皮細胞を含む細胞集団の細胞懸濁液に投入して接触させる方法が挙げられる。

[0030] ラミニンまたはラミニンE8のコーティング濃度は特に限定されず、目的が達成できるコーティング濃度を適宜選択して使用すればよい。例えば、約0.1～約2.0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の範囲から選択することができる。ラミニンE8をコーティングする場合は、約0.25～約1.0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であってもよく、約0.5～約1.0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ で

あってもよい。ラミニンまたはラミニンE8と細胞を接触させる時間は特に限定されず、用いたコーティング濃度に応じて目的が達成できる時間を適宜選択すればよい。本発明の製造方法にラミニンE8を用いる場合、通常約1分～約30分の範囲で選択される。好ましくは約3分～約20分である。

[0031] ラミニンまたはラミニンE8に接着していない細胞（非接着細胞）を回収する方法は特に限定されない。ラミニンまたはラミニンE8をコーティングした培養器を用いた場合には、例えば、回収した培地およびコーティング表面をPBS等で数回洗浄した洗浄液に含まれる細胞を遠心分離等により回収することができる。ラミニンまたはラミニンE8をコーティングした担体を細胞懸濁液に投入した場合には、担体を回収した細胞懸濁液に残っている細胞を遠心分離等により回収することができる。

[0032] ラミニンまたはラミニンE8に接着した細胞（接着細胞）を回収する方法は特に限定されず、接着細胞を剥離する公知の方法を適宜選択して用いることができる。ラミニンまたはラミニンE8をコーティングした培養器を用いた場合には、例えば、非接着細胞を除去した後、ラミニンまたはラミニンE8のコーティング面にEDTA液、トリプシン液等の公知の細胞剥離用溶液を添加してピペッティング等することにより細胞を剥離させ、回収することができる。ラミニンまたはラミニンE8をコーティングした担体を用いた場合には、細胞剥離用溶液に担体を投入してピペッティング等することにより細胞を剥離させ、回収することができる。ラミニンまたはラミニンE8をコーティングした培養器を用いて、接着細胞をそのまま培養する場合は、非接着細胞を除去するだけでよい。

[0033] 本発明の製造方法により製造した細胞集団は、そのまま培養すれば移植用角膜上皮細胞シートを作製することができる高純度の角膜上皮細胞集団である。ここで、「移植用角膜上皮細胞シートを作製するための角膜上皮細胞集団」とは、少なくとも一眼（片眼）用の角膜上皮細胞シートの作製に必要な $1 \times 10^5$ 個以上の細胞で構成される細胞集団であることを要する。ただし、本願発明の産業上利用を考慮すれば、「移植用角膜上皮細胞シートを作製するた

めの角膜上皮細胞集団」は複数眼用の角膜上皮細胞シートの作製に必要な細胞数を有することが望ましい。したがって、「移植用角膜上皮細胞シートを作製するための角膜上皮細胞集団」を構成する細胞数は、 $2 \times 10^5$ 個以上、 $4 \times 10^5$ 個以上、 $6 \times 10^5$ 個以上、 $8 \times 10^5$ 個以上、 $1 \times 10^6$ 個以上であることが好ましい。また、「移植用角膜上皮細胞シートを作製するための角膜上皮細胞集団」は、不純細胞の含有率が50%未満であることが好ましく、45%未満、40%未満、35%未満、30%未満であることが好ましい。

[0034] 移植用角膜上皮細胞シートは、本発明の製造方法により製造した細胞集団を、6ウェルプレートを用いる場合は $1.5 \times 10^5 \sim 6.0 \times 10^5$  cells/wellで播種し、12ウェルプレートを用いる場合は $0.5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5$  cells/wellで播種して、コンフルエントになるまで5～12日間培養することにより作製することができる。

[0035] 本発明の製造方法により製造した細胞集団における角膜上皮細胞の純度は、細胞集団の全細胞数に対するCD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞数を測定することで求めることができる。しかし、本発明の製造方法の工程（3）でラミニンまたはラミニンE8に接着した細胞をシャーレから剥離してFACSソーティングに供した場合、剥離に用いる酵素等により細胞表面のマーカータンパク質がダメージを受けた結果、特異的抗体がマーカータンパク質を認識できなくなった場合には、CD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞の細胞数を正確に測定できなくなる。そのため、本発明では、工程（3）でラミニンまたはラミニンE8に接着した細胞におけるPAX6陽性/p63陽性細胞の割合により、角膜上皮細胞の純度を求めてもよい。PAX6は眼関連転写因子であり、p63は上皮幹細胞マーカーとして知られている。本発明者らは、CD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞から作製した細胞シートは、PAX6およびp63がどちらも陽性であることを確認している（参考例1の図2、実施例1の図10参照）。

[0036] ラミニンまたはラミニンE8に接着した細胞におけるPAX6陽性/p63陽性細胞の割合を求める方法は特に限定されないが、例えば、接着した状態の細胞を、パラホルムアルデヒド等で固定し、抗PAX6抗体および抗p63抗体で染色し、

さらに核をHoechst33342やDAPIなどで染色した後、核が染色された全細胞数と、PAX6およびp63がともに陽性の共陽性細胞数をカウントして算出することができる。ラミニンまたはラミニンE8に接着した細胞におけるPAX6陽性/p63陽性細胞の割合は、50%以上であればよく、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上であってもよい。

[0037] 本発明の製造方法を用いれば、FACSソーティングでCD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞を分離して調製した角膜上皮細胞集団に匹敵する純度の角膜上皮細胞集団をより短時間で大量に製造することができる。例えば、角膜上皮細胞率が5%程度の細胞集団をSONY製セルソーターSH800に供し、FACSソーティングで移植用角膜上皮細胞シートを作製するための角膜上皮細胞集団を製造する場合、一眼（片眼）用の角膜上皮細胞シートの作製に必要な $1 \times 10^5$ 個のCD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞を取得するためには、最初の細胞集団は $2 \times 10^6$ 個以上の細胞数が必要であり、ソーティングに30分～1時間程度を要すると考えられる。一方、本発明の製造方法、すなわちMACS法とラミニンまたはラミニンE8接着法の組み合わせの場合、市販の磁気細胞分離装置は、上記FACSソーティングに供する細胞数（ $2 \times 10^6$ 個）より1～2オーダー高い細胞数の細胞集団をより短時間で処理できる。ラミニンまたはラミニンE8接着法も、プレート数を増やすことで短時間に大量の細胞を処理することが可能である。したがって、本発明の製造方法は、FACSソーティングより実用化および産業化に適している非常に有用な製造方法である。

[0038] また、本発明の製造方法を用いれば、FACSソーティングで純化して得られる角膜上皮細胞集団より安全でダメージが少ない角膜上皮細胞集団を製造することができる。FACSソーティングにより回収した細胞のダメージが大きいことは公知であり、FACSソーティングと異なる手段で同等の純度の細胞集団を取得することが従来求められている。本発明の製造方法は、MACS法とラミニンまたはラミニンE8接着法を組み合わせることにより、FACSソーティングに匹敵する純度の角膜上皮細胞集団を製造することができる。そして、本発明の製造方法は、特定のラミニンまたはラミニンE8と接着した細胞を取得す

る工程を有するので、細胞は賦活化されバイアビリティーの向上が期待できる。ラミニンまたはラミニンE8と細胞は、細胞表面のインテグリンを介して接着する。このようなラミニンへのインテグリン依存的な細胞接着は、細胞のアポトーシスを抑制して細胞の生存を維持するとともに、細胞増殖を促す細胞内シグナル伝達経路を活性化することが知られている (Gu J et al. The Journal of Biological Chemistry 277:19922-19928, 2002)。したがって、本発明の製造方法は、FACSソーティングと比較して、高いバイアビリティーを維持した状態の角膜上皮細胞集団を製造できるという大きな利点を有する。

[0039] 本発明の製造方法により製造された角膜上皮細胞集団は、そのまま移植用角膜上皮細胞シートの製造原料として使用することができる。したがって、本願発明には、本発明の製造方法により製造された角膜上皮細胞集団を培養する工程を含む移植用角膜上皮細胞シートの製造方法が含まれる。本発明の製造方法により製造された角膜上皮細胞集団から移植用角膜上皮細胞シートを製造するための培養方法は特に限定されない。例えば、本発明の製造方法により製造した細胞集団を、6ウェルプレートを用いる場合は $1.5 \times 10^5 \sim 6.0 \times 10^5$  cells/wellで播種し、12ウェルプレートを用いる場合は $0.5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^5$  cells/wellで播種して、コンフルエントになるまで5～12日間培養することにより作製することができる。培地交換は2日に1回の割合で行うことが好ましい。プレートには通常の細胞培養用プレートを用いることができる。また、細胞シート回収用温度応答性細胞培養（セルシード社製「Up Cell（商品名）」）を用いてもよい。

## 実施例

[0040] 以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0041] [参考例1：FACSソーティングによるCD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞の分離と角膜上皮細胞マーカーの分析]

(1) iPS細胞からの眼周囲細胞の分化誘導

iPS細胞からの眼周囲細胞の分化誘導には、self-formed ectodermal autonomous multi-zone (SEAM) 法を用いた (Hayashi et al. Nature. 2016 Mar 17;531(7594):376-80.)。ヒトiPS細胞株 (201B7) を、ラミニン511E8 (i-Matrix; Nippi) を $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度でコーティングした6または12ウェルプレートに $300\text{--}440\text{ cells}/\text{cm}^2$ の密度で播種し、8-10日間、StemFit培地 (味の素) で維持後、分化培地 (DM; 10% knockout serum replacement (KSR, Life technologies), 1mM sodium pyruvate (Life Technologies), 0.1mM non-essential amino acids (Life Technologies), 2mM L-glutamine (Life Technologies), 1% penicillin-streptomycin solution (Life Technologies) and  $55\mu\text{M}$  2-mercaptoethanol (Life Technologies) 含有GMEM (Life Technologies)) にて4週間培養した。続いて、角膜分化培地 (CDM; 20ng/mL のKGF (Wako)、 $10\mu\text{M}$  Y-27632 (Wako)、1% penicillin-streptomycin solution含有DMと、Cnt-20またはCnt-PR (EGFおよびFGF2不含有) (CellnTEC Advanced Cell Systems) の1:1混合培地) にて4週間培養した後、角膜上皮維持培地 (CEM; 2% B27 supplement (Life Technologies), 1% penicillin-streptomycin, 20ng/mL KGF,  $10\mu\text{M}$  Y-27632含有 DMEM/F12 (2:1) (Life Technologies)) でさらに2-5週培養した。

[0042] (2) 分化誘導された眼周囲細胞懸濁液の調製

分化誘導後の細胞をAccutase (Life Technologies) 処理し、KCM培地 (5% FBS (Japan Bio Serum, Hiroshima, Japan),  $0.4\mu\text{g}/\text{ml}$  hydrocortisone succinate (Wako), 2nM 3,3',5-Triiodo-L-thyronine sodium salt (MP biomedical, Santa Ana, CA), 1nM cholera toxin (List Biological Laboratory, Campbell, CA),  $2.25\mu\text{g}/\text{ml}$  bovine transferrin Holo form (Life Technologies), 2mM L-glutamine, 0.5% insulin transferrin selenium solution (Life Technologies), 1% penicillin-streptomycin含有DMEM/F-12, no glutamine (Thermo Fisher Scientific)) に再懸濁した。セルストレイナー ( $40\mu\text{m}$ , BD Biosciences, San Diego, CA) を通過させ、PBSで調製した眼周囲細胞懸濁液を以後の工程に供した。

[0043] (3) FACSソーティングによるCD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞の分離  
上記(2)で調製した眼周囲細胞懸濁液をPE-Cy7標識抗CD200抗体(BD Pharmingen)、FITC標識抗SSEA-4抗体(Biolegend)およびAlexa Fluor647標識抗CD104抗体(抗ITGB4抗体)(Biolegend または BD Pharmingen)で染色した後、FACS Verse (BD Biosciences)に供し、図1に示したとおり、CD200陰性細胞を回収し(図1(A)の破線で囲った部分)、さらにSSEA-4およびITGB4共陽性細胞を回収した(図1(B)の破線で囲ったP3部分)。

[0044] (4) CD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞の形態および角膜上皮マーカー発現

回収したCD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞を、ラミニン511E8(i-Matrix; Nippi)を $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度でコーティングした12ウェルプレートに $1\times 10^5$  cells/wellで播種し、角膜上皮維持培地で3週間培養した。細胞の形態を位相差顕微鏡で観察した後、培地を除去し、PBSで洗浄し、 $2.4\text{U}/\text{ml}$ のDispase含有DMEM(Life Technologies)を添加して $37^\circ\text{C}$ で10分間インキュベートした。培地を除去し、PVDFメンブレンリングを用いてシートを回収し、OCT compoundに包埋し、凍結切片を作製した。スライドガラス上で一次抗体(抗K12抗体(N-16, Santa Cruz)、抗PAX6抗体(PRB-278P, Covance)、抗p63抗体(4A4, Santa Cruz))にて $4^\circ\text{C}$ で一晩インキュベートした。TBSで洗浄後、二次抗体(それぞれAlexa Fluor 488, 568, 647標識抗体)にて室温で1時間インキュベートし、TBSで洗浄後、蛍光顕微鏡(Axio Observer D1)で観察した。

[0045] (5) 結果

結果を図2に示した。(A)は培養3週間後の細胞を位相差顕微鏡で観察した結果であり、(B)は角膜上皮細胞シートにおけるマーカー遺伝子の発現を解析した結果である。(A)に示したように、培養3週間後の細胞を位相差顕微鏡で観察すると、均一な細胞が重層化してシートを形成しており、不純細胞から生じたコロニーは観察されなかった。また、(B)に示したように、得られた細胞シートは上皮幹細胞マーカーであるp63、眼関連転写因子であるPAX6、および角膜上皮に特異的に発現するK12(ケラチン12)を発現し

ており、角膜上皮細胞シートが形成されていることが確認できた。

[0046] [参考例 2 : 磁気細胞分離による角膜上皮細胞の純化]

(1) 抗体染色

参考例 1 の (1) および (2) で調製した眼周囲細胞懸濁液を、PE-Cy7 標識抗 CD200 抗体 (BD Pharmingen)、FITC 標識抗 SSEA-4 抗体 (Biolegend) および PE 標識抗 CD104 抗体 (抗 ITGB4 抗体) (Biolegend または BD Pharmingen) で染色した後、細胞を MACS buffer (0.5 % BSA および 2 mM EDTA 含有 PBS) に再懸濁し、磁気細胞分離装置 (Miltenyi Biotec) に供した。前段の CD200 陽性細胞の除去では、抗 Cy7 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) で 4℃ 15 分間標識後、MACS buffer で洗浄し、磁場に設置した MS カラムまたは LS カラム (Miltenyi Biotec) を通して標識細胞を除去し、非標識細胞を回収した。後段の SSEA-4 陽性細胞の分取では、抗 FITC マイクロビーズ (Miltenyi Biotec) で 4℃ 15 分間標識後、MACS buffer で洗浄し、磁場に設置した MS カラムまたは LS カラムを通し、カラムを MACS buffer で洗浄後、カラムにトラップした細胞を磁場から離し、MACS buffer を用いて回収した。

[0047] (2) FACS 解析

抗体染色後 MACS 分離前の細胞集団、MACS で CD200 陽性細胞を除去した細胞集団および CD200 陽性細胞除去後の細胞から MACS で SSEA-4 陽性細胞回収した細胞集団を、セルソーター SH800 (SONY) または FACS Verse (BD Biosciences) に供して、各マーカーの陽性率を解析した。

[0048] (3) 結果

結果を図 3 および図 4 に示した。図 3 および図 4 は、いずれも FACS 解析した結果を示す図であり、図中 Bulk は抗体染色後 MACS 分離前の細胞集団、CD200 Depletion は MACS で CD200 陽性細胞を除去した細胞集団、After MACS (図 3) および CD200 Dep/SSEA4 selection (図 4) は CD200 陽性細胞除去後の細胞から MACS で SSEA-4 陽性細胞回収した細胞集団の結果である。図 4 において、SSEA4+ は図 3 上段の各ヒストグラムの縦線より右側の細胞の比率であり、ITGB4+ は図 3 上段の各ヒストグラムの横線より上側の細胞の比率であり、SSEA4+/IT

GB4+は図3上段の各ヒストグラムの右上の細胞の比率であり、CD200+は図3下段の各ヒストグラムの横曲線より上側の細胞の比率である。図3および図4から明らかなように、CD200陽性細胞除去後の細胞からMACSでSSEA-4陽性細胞回収した細胞集団には、SSEA-4およびITGB4共陽性細胞が高率で存在しているが、CD200陽性細胞も残存していることが示された。

[0049] [参考例3：ラミニンE8による角膜上皮細胞の純化]

(1) ラミニンE8

ラミニン111E8（以下「LN111E8」と記す。他のラミニンE8も同様に記す。）、LN211E8、LN332E8、LN411E8およびLN511E8の5種類のラミニンE8を使用した。LN511E8（i-Matrix; Nippi）は市販品を使用し、LN511E8以外は、大阪大学・関口清俊教授から分与を受けた。

(2) プレートのコーティング

12-well plate（BD Falcon）にPBSを1mL/well添加し、コーティング濃度が $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ になるように各アイソフォームのラミニンE8を添加し、37°Cで1-3時間静置してコーティングを行った。

[0050] (3) 非接着細胞のFACS解析

参考例2の(1)と同様に、参考例1の(1)および(2)で調製した眼周囲細胞懸濁液を、PE-Cy7標識抗CD200抗体（BD Pharmingen）、FITC標識抗SSEA-4抗体（Biolegend）およびPE標識抗CD104抗体（抗ITGB4抗体）（Biolegend または BD Pharmingen）で染色した後、角膜上皮維持培地に懸濁し、上記コーティングプレートに $5 \times 10^5$  cells/wellで播種した。コントロールとして、何もコーティングしていないプレートを用いた。5-30分間37°Cでインキュベート後、非接着細胞を回収した。回収した細胞をPBSで再懸濁し、セルソーターSH800（SONY）にてFACS解析を行った。なお、本実験に用いた抗ITGB4抗体は、予め抗体を細胞に結合させても細胞とラミニンE8との接着に影響を及ぼさないことが、発明者らにより確認されている。

[0051] (4) 結果

非接着細胞のFACS解析結果を図5に示した。図中、Bulkは抗体染色後プレ

ートに播種していない細胞集団、Noはコーティングしていないプレートに播種した細胞集団である。結果は、各処理群におけるSSEA4+、ITGB4+、SSEA4+/ITGB4+およびCD200+画分の割合を、Bulkにおけるそれらの割合に対する比率で示した。図5から明らかなように、LN332E8（図中LN332）、LN411E8（図中LN411）およびLN511E8（図中LN511）に対する非接着細胞では、CD200陽性細胞の割合が増加し、SSEA4陽性細胞、ITGB4陽性細胞およびSSEA4/ITGB4共陽性細胞の割合が減少した。これに対してLN211E8（図中LN211）に対する非接着細胞では、CD200陽性細胞の割合はBulkと同等であったが、ITGB4陽性細胞、SSEA4およびITGB4共陽性細胞の割合が増加する傾向が示された。No、LN111E8（図中LN111）に対する非接着細胞は概ねBulkと同等であった。この結果から、LN332E8、LN411E8およびLN511E8に対する非接着細胞を除去することにより、SSEA4/ITGB4共陽性の純度を向上できる可能性が示唆された。

[0052] [参考例4：LN211E8による角膜上皮細胞の純化]

(1) プレートのコーティング

12-well plate (BD Falcon) にPBSを1mL/well添加し、コーティング濃度が0.5-5.0  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  になるようにLN211E8を添加し、37°Cで1-3時間静置してコーティングを行った。

[0053] (2) 非接着細胞の角膜上皮細胞率

参考例2の(1)と同様に、参考例1の(1)および(2)で調製した眼周囲細胞懸濁液を、PE-Cy7標識抗CD200抗体 (BD Pharmingen)、FITC標識抗SSEA-4抗体 (Biolegend) およびPE標識抗CD104抗体 (抗ITGB4抗体) (Biolegend または BD Pharmingen) で染色した後、角膜上皮維持培地に懸濁し、上記コーティングプレートに $5 \times 10^5$  cells/wellで播種した。コントロールとして、何もコーティングしていないプレートを用いた。10分間37°Cでインキュベート後、非接着細胞を回収した。回収した細胞をPBSで再懸濁し、セルソーターSH800 (SONY) にてFACS解析を行い、CD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞率 (角膜上皮マーカー陽性率) を算出した。

[0054] (3) 結果

結果を図6に示した。図中Bulkは抗体染色後プレートに播種していない細胞集団である。LN211E8非接着細胞の角膜上皮マーカー陽性率は、元の細胞集団および何もコーティングしていないプレートの角膜上皮マーカー陽性率より高くなったことから、LN211E8に接着しない細胞を回収することにより、SSEA4/ITGB4共陽性細胞の純度を向上できる可能性が示唆された。

[0055] (4) 接着細胞の遺伝子発現解析

非接着細胞を回収したプレートに残った接着細胞からQIAzol Lysis Reagent (QIAGEN) を用いてRNAを抽出し、総量20  $\mu$ Lの反応系にてSuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen) により作製したcDNAをTaqman assay (Life Technologies) にてqRT-PCRを行った。角膜上皮マーカー遺伝子としてK12およびTP63を解析した。非角膜上皮マーカー遺伝子として、ITGA7およびVimentinを解析した。

[0056] (5) 結果

結果を図7に示した。(A)がK12、(B)がTP63、(C)がITGA7、(D)がVimentinの結果である。LN211E8(図中211)に接着した細胞では、角膜上皮マーカー遺伝子であるK12およびTP63の発現量は低く、非角膜上皮マーカー遺伝子であるITGA7およびVimentinの発現量が高かった。この結果から、LN211E8コーティングプレートを用いて接着細胞を除去し、非接着細胞を回収することにより、SSEA4/ITGB4共陽性細胞の純度を向上できることが示された。

[0057] [実施例1：磁気細胞分離とラミニンE8接着法の組み合わせによる角膜上皮細胞の純化]

1-1 角膜上皮細胞の純化

(1) 磁気細胞分離による純化

参考例1の(1)および(2)で調製した眼周囲細胞懸濁液を、PE-Cy7標識抗CD200抗体(BD Pharmingen)で染色した後、MACS bufferに再懸濁し、磁気細胞分離装置(Miltenyi Biotec)に供した。最初にCD200陽性細胞を除去し、続いてSSEA-4陽性細胞を分取した。CD200陽性細胞の除去では、抗Cy7マイクロビーズ(Miltenyi Biotec)で4℃15分間標識後、MACS bufferで洗浄し

、磁場に設置したMSカラムまたはLSカラム (Miltenyi Biotec) を通して標識細胞を除去し、非標識細胞を回収した。SSEA-4陽性細胞を分取では、抗SSEA4マイクロビーズ4℃15分間標識後、MACS bufferで洗浄し、磁場に設置したMSカラムまたはLSカラムを通し、カラムをMACS bufferで洗浄後、カラムにトラップした細胞を磁場から離し、MACS bufferを用いて回収した。

[0058] (2) ラミニンE8接着法による純化

磁気細胞分離による純化後の細胞を、LN511E8コーティングプレート (コーティング濃度:  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) に約  $5 \times 10^5 \text{ cells/well}$  で播種し、37℃5分間インキュベート後、非接着細胞を除去した。

[0059] 1-2 遺伝子発現解析

(1) 実験方法

各段階の細胞集団における角膜上皮マーカー遺伝子および非角膜上皮マーカー遺伝子の発現を解析した。具体的には、参考例1の(1)および(2)で調製した眼周囲細胞集団 (Bulk)、磁気細胞分離によりCD200陽性細胞を除去した細胞集団 (CD200 Dep.)、さらに磁気細胞分離によりSSEA-4陽性細胞を分取した細胞集団 (After MACS1)、磁気細胞分離後LN511E8コーティングプレートに接着した細胞集団 (MLS(511)) について、遺伝子解析を行った。コントロールとして、FACSで純化したCD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞集団を用いた。各細胞集団からQIAzol Lysis Reagent (QIAGEN) を用いてRNAを抽出し、総量20  $\mu\text{L}$  の反応系にてSuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix for qRT-PCR (Invitrogen) により作製したcDNAをTaqman assay (Life Technologies) にてqRT-PCRを行った。角膜上皮マーカー遺伝子としてK12、PAX6、TP63およびITGB4を解析した。非角膜上皮マーカー遺伝子として、CRYAA、RPE65、CD200およびK10を解析した。

[0060] (2) 結果

結果を図8に示した。上段 (K12、PAX6、TP63、ITGB4) が角膜上皮マーカー遺伝子であり、下段 (CRYAA、RPE65、CD200、K10) が非角膜上皮マーカー遺伝子である。磁気細胞分離とラミニンE8接着法を組み合わせることで純化した細胞

胞集団（図中MLS(511)）では、角膜上皮マーカー遺伝子（上段）の発現量は、コントロールとほぼ同等のレベルであり、非角膜上皮マーカー遺伝子（下段）の発現量は、K10がわずかに発現している以外は、検出限界以下であった。

[0061] 1-3 角膜上皮細胞シートの作製

（1）実験方法

上記（2）でLN511E8コーティングプレートに接着した細胞をそのまま3週間培養した結果、均一な細胞がコンフルエントな状態に増殖した。細胞の形態を位相差顕微鏡で観察した結果を図9に示した。

培地を除去し、PBSで洗浄し、2.4U/mlのDispase含有DMEM（Life Technologies）を添加して37℃で10時間インキュベートした。培地を除去し、PVDFメンブレンリングを用いてシートを回収し、OCT compoundに包埋し、凍結切片を作製した。スライドスライドガラス上で一次抗体（抗K12抗体(N-16, Santa Cruz)、抗PAX6抗体(PRB-278P, Covance)、抗MUC16抗体(0V185:1, abcam)、抗p63抗体(4A4, Santa Cruz))にて4℃で一晩インキュベートした。TBSで洗浄後、二次抗体（それぞれAlexa Fluor 488, 568, 647標識抗体）にて室温で1時間インキュベートした。Hoechst 33342（Molecular Probes）にて10分間室温で対比染色を行い、TBSで洗浄後、蛍光顕微鏡（Axio Observer D1）で観察した。

[0062] （2）結果

結果を図10に示した。得られた細胞シートはK12、PAX6、MUC16およびp63が全て陽性であり、角膜上皮細胞シートが形成されていることが確認できた。

[0063] 1-4 角膜上皮細胞シートを構成する細胞のFACS解析

（1）実験方法

上記1-3においてLN511E8コーティングプレート上で3週間培養した細胞をAccutaseにて37℃で1時間インキュベートして細胞を剥離し、単一に分散させた。PBSで洗浄後、BD Cytotfix/Cytoperm solution（BD Biosciences）を加

え、4℃で20分間インキュベートして固定した。続いて、BD Perm/wash buffer (BD Biosciences) にて洗浄・再懸濁後、一次抗体（抗K12抗体(N-16, Santa Cruz)、抗K14抗体(RCK107, abcam)）および蛍光標識二次抗体で染色し、PBSで洗浄・再懸濁後、FACS Verse (BD Biosciences) にて解析を行った。抗K12抗体の場合は、4℃で3時間反応させた後、二次抗体を4℃で1時間反応させた。抗K14抗体の場合は、二次抗体を同時に添加して室温で2時間反応させた。

対照として、FACSソーティングにより分離したCD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞をLN511E8コーティングプレート上で3週間培養した細胞を用い（参考例1参照）、同様に剥離・分散・固定後、抗体染色してFACS Verse (BD Biosciences) にて解析を行った。

[0064] (2) 結果

結果を図11に示した。上段(Sorting)がFACSソーティングにより分離したCD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞の結果であり、下段(MLS)が本発明の方法により取得した細胞集団の結果である。各ヒストグラムの左側のピークは、アイソタイプコントロールのピークである。本発明の方法で取得した細胞集団を用いて作製した細胞シートの重層上皮マーカーK14および角膜上皮特異的ケラチンであるK12の陽性率は、FACSソーティングで取得した細胞集団を用いて作製した細胞シートと同等またはそれ以上であった。

[0065] 1-5 位相差顕微鏡による角膜上皮細胞シートの観察

(1) 実験方法

以下の6種類の細胞を3週間培養して細胞シートを作製し、位相差顕微鏡で観察した。

(A) MACSのみ

上記1-1(1)と同じ方法で回収した細胞を、LN511E8(i-Matrix; Nippi)を $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度でコーティングした12ウェルプレートに $1\times 10^5\text{cells/well}$ で播種し、角膜上皮維持培地で3週間培養した。

(B) LN332のみ

参考例 1 の (1) および (2) で調製した眼周囲細胞懸濁液を、LN332E8 を  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  の濃度でコーティングした 12 ウェルプレートに約  $5 \times 10^5 \text{cells}/\text{well}$  で播種し、 $37^\circ\text{C}$  15 分間インキュベート後、非接着細胞を除去した後、そのまま角膜上皮維持培地で 3 週間培養した。

(C) LN511 のみ

参考例 1 の (1) および (2) で調製した眼周囲細胞懸濁液を、LN511E8 を  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  の濃度でコーティングした 12 ウェルプレートに約  $5 \times 10^5 \text{cells}/\text{well}$  で播種し、 $37^\circ\text{C}$  15 分間インキュベート後、非接着細胞を除去した後、そのまま角膜上皮維持培地で 3 週間培養した。

(D) Sorting

FACSソーティングで分離した CD200 陰性/SSEA-4 陽性/ITGB4 陽性細胞を、LN511E8 を  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  の濃度でコーティングした 12 ウェルプレートに  $1 \times 10^5 \text{cells}/\text{well}$  で播種し、角膜上皮維持培地で 3 週間培養した (参考例 1 参照)。

(E) MLS(322) : 本発明の製造方法で取得した角膜上皮細胞集団

上記 1-1 (1) と同じ方法で回収した細胞を、LN332E8 を  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  の濃度でコーティングした 12 ウェルプレートに約  $5 \times 10^5 \text{cells}/\text{well}$  で播種し、 $37^\circ\text{C}$  5 分間インキュベート後、非接着細胞を除去した後、そのまま角膜上皮維持培地で 3 週間培養した。

(F) MLS(511) : 本発明の製造方法で取得した角膜上皮細胞集団

上記 1-1 (1) と同じ方法で回収した細胞を、LN511E8 を  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  の濃度でコーティングした 12 ウェルプレートに約  $5 \times 10^5 \text{cells}/\text{well}$  で播種し、 $37^\circ\text{C}$  15 分間インキュベート後、非接着細胞を除去した後、そのまま角膜上皮維持培地で 3 週間培養した。

[0066] (2) 結果

結果を図 12 に示した。上段の (A) MACS のみ、(B) LN332 のみ、(C) LN511 のみには、視野中に不純細胞コロニーが観察されたが、(D) Sorting、(E) MLS(322)、(F) MLS(511) では、シートを形成している細胞中に不純細胞コロニーは観察されなかった。

## [0067] 1-6 純化効率の評価

## (1) 純化効率算出方法

参考例2におけるMACS前後の細胞集団について、FACSを用いてCD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞（角膜上皮細胞）以外の細胞（不純細胞）の割合（％）を求めた。それぞれの細胞集団における不純細胞の割合から、以下の計算式にて純化効率（不純細胞残存率）を算出した。

純化効率＝MACS後の不純細胞率（％）／MACS前の不純細胞率（％）×100

[0068] 参考例3におけるラミニンE8による純化（ラミニンE8接着法）前後の細胞集団について、FACSを用いてCD200陰性/SSEA-4陽性/ITGB4陽性細胞（角膜上皮細胞）以外の細胞（不純細胞）の割合（％）を求めた。具体的には、純化前の細胞集団を、LN332E8、LN411E8またはLN511E8を $0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の濃度でコーティングした12-well plate (BD Falcon) に、 $5\times 10^5\text{cells}/\text{well}$ で播種し、37℃5分間インキュベート後、非接着細胞を除去した。そのまま3週間培養した後、細胞を剥がして単一細胞になるまで分散し、抗体染色してFACSに供した。それぞれの細胞集団における不純細胞の割合から、以下の計算式にて純化効率（不純細胞残存率）を算出した。

純化効率＝ラミニンE8接着法による純化後3週間培養した細胞集団の不純細胞率（％）／純化前の不純細胞率（％）×100

[0069] MACS後の細胞集団をラミニンE8接着法に供し、その後3週間培養した細胞集団の純化効率の理論値は、それぞれの純化効率を掛け算して求めた。一方、実測値は、3週間培養後の細胞シートに存在する不純細胞コロニー数を目視で観察することにより求めた。

## [0070] (2) 結果

結果を表3に示した。MACSにおいては不純細胞を分離前の26.75%に減少させることができた。一方、ラミニンE8接着法では、最も効果の高いLN332E8を用いた場合に不純細胞を分離前の74.14%に減少させることができたが、LN411E8またはLN511E8を用いた場合は、不純細胞を減少させなかった。これらの実測値に基づいて算出した理論値は、MACSとLN332E8の組み合わせの場合は、純

化効率が19.83%、MACSとLN511E8の組み合わせの場合は、純化効率が27.37%であったが、これらの細胞を3週間培養して得られた細胞シートには、どちらも不純細胞コロニーは存在しなかった（不純細胞残存率：0%）。

[0071] この結果は、ラミニンE8接着法による純化は、角膜上皮細胞以外の細胞（不純細胞）が多数存在する分化誘導後の眼周囲細胞懸濁液（参考例1参照）に適用した場合には純化効率が低いが、予めMACSで20%程度まで不純細胞率を低下させた細胞集団に適用すれば、不純細胞をほぼ完全に除去できることを実証するものである。

[0072] [表3]

| 純化方法                            |         | 不純細胞の割合(%)    |       | 純化効率(%)<br>(不純細胞残存率) |
|---------------------------------|---------|---------------|-------|----------------------|
|                                 |         | Bulk          | 純化後   |                      |
| MACSによる純化                       |         | 83.39         | 22.31 | 26.75                |
| ラミニンE8接着法による純化<br>+3週間培養後       | LN332E8 | 80.95         | 60.02 | 74.14                |
|                                 | LN411E8 | 80.95         | 82.24 | 101.59               |
|                                 | LN511E8 | 80.95         | 82.81 | 102.30               |
| MACS+LN332E8接着法<br>+3週間培養後(理論値) |         | 26.75 x 74.14 |       | 19.83                |
| MACS+LN332E8接着法<br>+3週間培養後(実測値) |         |               |       | 0<br>(不純コロニーなし)      |
| MACS+LN511E8接着法<br>+3週間培養後(理論値) |         |               |       | 27.37                |
| MACS+LN511E8接着法<br>+3週間培養後(実測値) |         |               |       | 0<br>(不純コロニーなし)      |

[0073] [実施例2：磁気細胞分離とラミニンE8接着法の組み合わせにより純化した角膜上皮細胞集団におけるp63陽性細胞の定量]

#### (1) 実験方法

上皮幹細胞マーカーであるp63のEGFP共発現ノックインiPS細胞(Stem Cell Res. 2017 Oct 31;25:256-265. doi: 10.1016/j.scr.2017.10.015.)を用いて、参考例(1)と同じ方法で、当該iPS細胞から眼周囲細胞を分化誘導し、参考例(2)と同じ方法で眼周囲細胞懸濁液を調製した。

LN211E8を1 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>の濃度でコーティングした12-well plate (BD Falcon) に、眼周囲細胞を1 $\times$ 10<sup>5</sup>cells/wellで播種し、15分間37℃でインキュベートした。非接着細胞を回収し、LN332E8またはLN511E8を1 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>の濃度でコーティングした12-well plate (BD Falcon) に播種した。LN211E8コーティングプレ

ートの1ウェルから回収した非接着細胞の全部を、LN332E8またはLN511E8コーティングプレートの1ウェルに播種した。15分間37℃でインキュベートした後、一部のウェルでは非接着細胞を除去して接着細胞のみ培養を続け、残りのウェルは非接着細胞を除去せずに培養を続けた。LN211E8コーティングプレートに接着した細胞は、培地を添加してそのまま培養を続けた。

1日後に、各ウェルの位相差顕微鏡画像と蛍光顕微鏡画像を撮影した。さらに、蛍光顕微鏡の100倍観察で取得した5視野中における全細胞数とGFP発現細胞（p63陽性細胞）数をカウントし、p63陽性細胞率を算出した。

[0074] （2）実験結果

顕微鏡観察画像を図13に示した。図中上段（Phase）は位相差顕微鏡画像、中段（p63(EGFP)）は蛍光顕微鏡画像、下段（Merged）は上段と中段を重ねた画像である。図中211AdはLN211E8に接着した細胞をそのまま培養したウェル、332はLN211E8非接着細胞をLN332E8で培養したウェル、332AdはLN211E8非接着細胞をLN332E8で培養して非接着細胞を除去したウェル、511はLN211E8非接着細胞をLN511E8で培養したウェル、511AdはLN211E8非接着細胞をLN332E8で培養して非接着細胞を除去したウェルである。図中矢印はp63陰性細胞を示し、スケールバーは100 $\mu$ mである。図13は、332Adと511Adにはp63陰性細胞がほとんど観察されないことを示しており、p63陽性細胞はLN332E8またはLN511E8に短時間で接着すると考えられた。

[0075] p63陽性細胞率を図14に示した。各群の表示は図13と同じである。図14から明らかなように、332Adと511Adのp63陽性細胞率が他の群より高いことが示された。すなわち、LN332E8またはLN511E8の非接着細胞を除去する工程は、角膜上皮細胞の純度を上げるうえで重要な工程であることが明らかになった。

[0076] なお本発明は上述した各実施形態および実施例に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された学術文献およ

び特許文献の全てが、本明細書中において参考として援用される。

### 請求の範囲

- [請求項1] 移植用角膜上皮細胞シートを作製するための角膜上皮細胞集団を製造する方法であって、以下の工程（１）～（３）を含むことを特徴とする製造方法：
- （１）角膜上皮細胞を含む細胞集団を調製する工程、
  - （２）工程（１）で調製した細胞集団を磁気細胞分離に供し、CD200陰性/SSEA-4陽性細胞を取得する工程、および
  - （３）工程（２）で取得した細胞を、 $\alpha 3$ 鎖を有するラミニン、 $\alpha 4$ 鎖を有するラミニンおよび $\alpha 5$ 鎖を有するラミニンからなる群より選択されるラミニンまたはそのE8フラグメントに接触させて、接着した細胞を取得する工程。
- [請求項2] 前記工程（３）が、（３－１）工程（２）で取得した細胞を、 $\alpha 2$ 鎖を有するラミニンまたはそのE8フラグメントと接触させて非接着細胞を取得する工程、および（３－２）得られた非接着細胞を、 $\alpha 3$ 鎖を有するラミニン、 $\alpha 4$ 鎖を有するラミニンおよび $\alpha 5$ 鎖を有するラミニンからなる群より選択されるラミニンまたはそのE8フラグメントと接触させて、接着した細胞を取得する工程である請求項１に記載の製造方法。
- [請求項3] 前記角膜上皮細胞を含む細胞集団が、多能性幹細胞を眼周囲細胞へ分化誘導して得られた細胞集団である請求項１または２に記載の製造方法。
- [請求項4] 前記移植用角膜上皮細胞シートを作製するための角膜上皮細胞集団におけるPAX6陽性/p63陽性細胞の割合が50%以上である請求項１～３のいずれかに記載の製造方法。
- [請求項5]  $\alpha 3$ 鎖を有するラミニン、 $\alpha 4$ 鎖を有するラミニンおよび $\alpha 5$ 鎖を有するラミニンからなる群より選択されるラミニンまたはそのE8フラグメントが、ラミニン $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ のE8フラグメント、ラミニン $\alpha 4\beta 1\gamma 1$ のE8フラグメント、またはラミニン $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ のE8フラグメントであ

る請求項 1 ～ 4 のいずれかに記載の製造方法。

[請求項6]            $\alpha 2$ 鎖を有するラミニンまたはそのE8フラグメントが、ラミニン $\alpha 2$   
 $\beta 1 \gamma 1$ のE8フラグメントである請求項 2 に記載の製造方法。

[請求項7]           請求項 1 ～ 6 のいずれかに記載の製造方法により製造された角膜上  
皮細胞集団を培養する工程を含むことを特徴とする移植用角膜上皮細  
胞シートの製造方法。