

明 細 書

発明の名称：角膜内皮細胞マーカー

技術分野

[0001] 本発明は、角膜内皮細胞に特異的に発現している分子マーカー、並びに、それを利用した角膜内皮細胞の製造方法、及び角膜内皮細胞の評価方法等に関する。

背景技術

[0002] 角膜は、眼球の表面に位置する透明組織であり、表面から順に、角膜上皮層、ボーマン膜、角膜実質層、デスメ膜、及び角膜内皮層が存在する。角膜上皮層は、角膜の一番外側にある層で、外部からのホコリや細菌等から、角膜を保護するバリアとして機能する。ボーマン膜は、角膜上皮層のベースとして機能すると考えられている。角膜実質層は、3層の中で最も厚く、角膜の強度を維持する役割を担う。デスメ膜は、角膜実質層の下にある薄膜で、角膜実質層と角膜内皮層を繋ぐ働きをする。角膜内皮層は、六角形の形状を持つ角膜内皮細胞が敷石状に規則的に配列された単層の細胞層であり、バリア機能及びポンプ機能により、前房の水分が角膜実質に浸透するのを防ぐとともに角膜の水分を前房側へと排出することで含水率を一定に保持し、角膜の透明性を維持する重要な役割を担う。

[0003] 遺伝的要因や外的要因等により角膜内皮細胞が傷害され、角膜内皮細胞数が著明に低下すると上記の機能が損なわれ、角膜浮腫を来す。重度の角膜内皮障害により角膜の透明性を維持できなくなり、水疱性角膜症を発症すると著明な視力低下を招く。

[0004] 角膜内皮細胞はヒトの生体内では増殖能が極めて乏しい。従って、重度の角膜内皮障害に対する根本的治療としては、現時点では角膜移植が最も有効な手段である。実際、水疱性角膜症は角膜移植の適応疾患の第一位となっている。従来、角膜内皮障害に関しては、全層角膜移植術が行われてきたが、慢性的なドナー不足と移植後の拒絶反応が問題となっている。拒絶反応を軽

減するために、角膜内皮を含む一部組織のみを疾患眼に移植する方法(Desemet's Stripping Automated Endothelial Keratoplasty; DSAEK)が開発されたが、DSAEKもドナー不足の問題を克服することはできない。また、角膜内皮細胞をin vitroで増殖させ、これを治療に利用する方法も試みられているが（非特許文献1，特許文献1～3）、継代を繰り返すと形質転換を起こし、機能を消失してしまう（非特許文献2）。

[0005] 上記の問題を解決するため、臍帯血由来間葉系幹細胞（非特許文献3）、骨髓由来細胞（非特許文献4）、虹彩由来幹細胞（非特許文献5）、角膜実質由来幹細胞（非特許文献6）、胚性幹細胞（非特許文献7）、及び誘導多能性幹細胞（特許文献4）等から移植用の角膜内皮細胞を誘導する多くの研究がなされている。しかし、どのような起源の細胞を用いたとしても、培養して得られる細胞には、角膜内皮細胞以外にも異なる種類の細胞が含まれる。従って、目的産物である角膜内皮細胞の単離並びに評価を目的とした、角膜内皮細胞特異的マーカーがこれらの研究においては必要不可欠である。

[0006] 現在、ZO-1（非特許文献8）、 Na^+/K^+ ATPase（非特許文献9）、及びN-カドヘリン（非特許文献10）等のタンパク質が角膜内皮細胞マーカーとして使用されているが、これらのタンパク質は他の多くの細胞で非特異的に発現している（非特許文献11～13）。よって、これらのタンパク質を利用した角膜内皮細胞の単離は、特に、角膜内皮細胞への分化誘導に使用される幹細胞が種々の細胞への多分化能を有することを考慮すると、充足した結果が期待できない。

先行技術文献

特許文献

- [0007] 特許文献1：WO 2006/092894 A1
特許文献2：WO 2011/096593 A1
特許文献3：WO 2013/012087 A1
特許文献4：WO 2013/051722 A1

非特許文献

- [0008] 非特許文献1: Ide T, Nishida K, Yamato M, Sumide T, Utsumi M, et al. (2006) Structural characterization of bioengineered human corneal endothelial cell sheets fabricated on temperature-responsive culture dishes. *Biomaterials* 27:607-614.
- 非特許文献2: Joyce NC (2003) Proliferative capacity of the corneal endothelium. *Prog Retin Eye Res* 22: 359-389. I
- 非特許文献3: Joyce NC, Harris DL, Markov V, Zhang Z, Saitta B (2012) Potential of human umbilical cord blood mesenchymal stem cells to heal damaged corneal endothelium. *Mol Vis* 18: 547-564.
- 非特許文献4: Shao C, Fu Y, Lu W, Fan X (2011) Bone marrow-derived endothelial progenitor cells: a promising therapeutic alternative for corneal endothelial dysfunction. *Cells Tissues Organs* 193: 253-263.
- 非特許文献5: Kikuchi M, Hayashi R, Kanakubo S, Ogasawara A, Yamato M, et al. (2011) Neural crest-derived multipotent cells in the adult mouse iris stroma. *Genes Cells* 16: 273-281.
- 非特許文献6: Hatou S, Yoshida S, Higa K, Miyashita H, Inagaki E, et al. (2013) Functional corneal endothelium derived from corneal stroma stem cells of neural crest origin by retinoic acid and Wnt/beta-catenin signaling. *Stem Cells Dev* 22: 828-839.
- 非特許文献7: Zhang, K, Pang, K, Wu, X. (2014) Isolation and transplantation of corneal endothelial cell-like cells derived from in-vitro-differentiated human embryonic stem cells. *Stem cells and development* 23: 1340-1354.
- 非特許文献8: Barry PA, Petroll WM, Andrews PM, Cavanagh HD, Jester JV. (1995) The spatial organization of corneal endothelial cytoskeletal proteins and their relationship to the apical junctional complex. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:1115-1124.
- 非特許文献9: Zam ZS, Cerda J, Polack FM. (1980) Isolation of the plas

ma membrane from corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 19: 648-652.

非特許文献10: Vassilev VS, Mandai M, Yonemura S, Takeichi M (2012) Loss of N-cadherin from the endothelium causes stromal edema and epithelial dysgenesis in the mouse cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 53: 7183-7193.

非特許文献11: Howarth AG, Hughes MR, Stevenson BR (1992) Detection of the tight junction-associated protein ZO-1 in astrocytes and other non-epithelial cell types. Am J Physiol 262: C461-469.

非特許文献12: Mobasher A, Avila J, Cozar-Castellano I, Brownleader M D, Trevan M, et al. (2000) Na⁺, K⁺-ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. Biosci Rep 20: 51-91.

非特許文献13: Tsuchiya B, Sato Y, Kameya T, Okayasu I, Mukai K (2006) Differential expression of N-cadherin and E-cadherin in normal human tissues. Arch Histol Cytol. 69: 135-145.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0009] 上記のような現状の下、本発明は、角膜内皮細胞に特異的に発現する分子マーカー、並びに、それを利用した角膜内皮細胞の製造方法、角膜内皮細胞の評価方法、等の応用技術を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ね、角膜内皮細胞で発現している遺伝子を網羅的にカバーするデータベースから、角膜内皮細胞での発現レベルが高く、細胞膜タンパク質をコードしており、且つ、他の組織での発現レベルが低いものを選抜した。そして、本発明者らは、それらの遺伝子の角膜内皮細胞及び他の組織での発現を確認し、角膜内皮細胞において特異的に発現している遺伝子を見出した。更に、本発明者らは、それらの遺

伝子がコードするタンパク質を標的としてヒト角膜切片を免疫染色し、角膜内皮に特異的に発現していることを確認した。これらの知見に基づき、下記に代表される発明が提供される。

[0011] 項 1.

角膜内皮細胞を含む細胞集団から、ZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R、HTR1D、及びCLRN1から成る群より選択される一種以上を発現している細胞を分取する工程を含む、角膜内皮細胞の製造方法。

項 2.

角膜内皮細胞を含む細胞集団が幹細胞を分化誘導して得られる、項 1 に記載の方法。

項 3.

角膜内皮細胞を含む細胞集団が角膜内皮細胞を培養して得られる、項 1 に記載の方法。項 4.

分取する工程が、ZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R、HTR1D、及びCLRN1から成る群より選択される 1 種以上を特異的に認識する抗体を該角膜内皮細胞を含む細胞集団に結合させることを含む、項 1 ～ 3 のいずれかに記載の方法。

項 5.

ZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R、HTR1D、及びCLRN1から成る群より選択される一種以上の発現を指標にして角膜内皮細胞を評価する方法。

項 6.

ZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R、HTR1D、及びCLRN1から成る群より選択される一種以上からなる角膜内皮細胞検出用マーカー。

項 7.

ZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R、HTR1D、及びCLRN1から成る群より選択される 1 種以上を特異的に認識する物質を含む、角膜内皮細胞検出用キット。

発明の効果

[0012] 角膜内皮細胞に特異的に発現する分子マーカーが提供されるため、角膜内皮細胞を特異的に検出することができる。また、該分子マーカーの発現産物

は細胞表面タンパク質であるため、細胞が生きた状態でその識別及び／又は分取ができる。よって、角膜内皮細胞を生きた状態で効率的に提供することができる。このようにして得られる角膜内皮細胞は移植に適するため、角膜内皮細胞の移植を必要とする疾患の治療が可能であるだけでなく、角膜移植におけるドナー不足の解消に資する。また、該分子マーカーを利用することにより、培養した角膜内皮細胞が移植に適した状態であるか適切に評価することができる。よって、本発明は、角膜内皮細胞の機能障害に起因する種々の疾患の治療に有用である。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]13の候補分子をコードする遺伝子の角膜内皮細胞及び他の22の組織における発現レベルを測定した結果を示す。各図において、CECsは角膜内皮細胞、A-brainは成人脳、F-brainは胎児脳、SCは脊髄、SGは唾液腺、BMは骨髄、SMは骨格筋、A-liverは成人肝臓、F-liverは胎児肝臓、SIは小腸を意味する。縦軸は、コントロールと比較した相対発現量を示す。

[図2]候補分子をコードする遺伝子の眼組織における発現レベルを定量PCRで測定した結果を示す。各図において、CECsは角膜内皮細胞、CCは培養角膜内皮細胞、C. stromaは角膜実質、C. epi.は角膜上皮、Limbusは角膜輪部、Iris pig. epiは虹彩色素上皮細胞、TMは線維柱帯、CBは毛様体、RPE/choroidは網膜色素上皮/脈絡膜、ONは視神経を意味する。縦軸は、コントロールと比較した相対発現量を示す。

[図3]6つのタンパク質（GRIP1、CLRN1、MRGPRX3、ZP4、GLP1R、及びHTR1D）について、ヒト角膜切片を免疫染色した結果を示す。

[図4]ヒトiPS細胞を角膜内皮細胞に誘導した前後のZP4遺伝子の発現レベルを示す。

発明を実施するための形態

[0014] 1. 角膜内皮細胞の製造方法

1-1. 角膜内皮細胞を含む細胞集団

角膜内皮細胞を製造する出発材料となる「角膜内皮細胞を含む細胞集団」

とは、角膜内皮細胞を含む細胞の集合体であり、角膜内皮細胞を含む限り、その由来及び構成は制限されない。例えば、角膜内皮細胞を含む細胞集団には、幹細胞を人為的に分化させて得られた細胞集団、及び、角膜から単離された角膜内皮細胞を培養して得られた細胞集団が含まれる。角膜内皮細胞を含む細胞集団は、多くの場合、角膜内皮細胞以外の細胞を含むが、角膜内皮細胞のみで構成されていても良い。角膜内皮細胞を含む細胞集団の由来は、特に制限されないが、好ましくはヒトである。

[0015] 例えば、角膜内皮細胞を含む細胞集団に含まれる角膜内皮細胞の数は、全体の1%以上、5%以上、10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、又は80%以上である。

[0016] 角膜内皮細胞を含む細胞集団を調製するために使用される幹細胞は、インビトロにおいて培養することが可能であり、かつ、角膜内皮細胞に分化可能な細胞であれば特に制限されず、公知の幹細胞及び今後開発される幹細胞から適宜選択して使用することができる。このような幹細胞としては、例えば、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cells；iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）、胎児の始原生殖細胞由来の多能性幹細胞（EG細胞）、精巣由来の多能性幹細胞（GS細胞）、及び角膜内皮細胞に分化可能なヒト体性幹細胞（組織幹細胞）等を挙げることができる。

[0017] iPS細胞は、任意の手法で得ることができ、例えば、特定の初期化因子をDNA又はタンパク質の形態で体細胞に導入することによって作製できる。初期化因子としては、例えば、Oct3/4、Sox2、Sox1、Sox3、Sox15、Sox17、Klf4、Klf2、c-Myc、N-Myc、L-Myc、Nanog、Lin28、Fbx15、ERas、ECAT15-2、Tcl1、beta-catenin、Lin28b、Sall1、Sall4、Esrrb、Nr5a2、Tbx3、及びGlis1等を挙げることができる。初期化因子は、単独で用いても良く、任意に組み合わせて用いることができる。初期化因子の組み合わせは、例えば、W02007/069666、W02008/118820、W02009/007852、W02009/032194、W02009/058413、及びW02009/057831等に例示されている。体細胞の種類は、特に制限されず、これまでにiPS細胞の製造が確認されている任意の細胞及び今後報告される任意の

細胞を含む。一実施形態において好ましい体細胞としては、例えば、線維芽細胞、及び白血球等を挙げることができる。好ましい体細胞の由来はヒトである。

[0018] ES細胞は、任意の手法によって取得でき、例えば、哺乳類（好ましくは、ヒト）の受精卵の胚盤胞から内部細胞塊を取出し、内部細胞塊を線維芽細胞のフィーダー上で培養することによって樹立することができる。哺乳動物は特に制限されないが、好ましくはヒトである。継代培養によるES細胞の維持は、白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor (LIF))、及び／又は塩基性線維芽細胞成長因子(basic fibroblast growth factor (bFGF))等の物質を添加した培養液を用いて行うことができる。ES細胞の選択は、例えば、OCT-3/4、NANOG、ECAD等の遺伝子マーカーの発現を指標として行うことができる。

[0019] EG細胞は、胎生期の始原生殖細胞から樹立される、ES細胞と同様な多能性をもつ細胞であり、LIF、bFGF、及び幹細胞因子(stem cell factor)等の物質の存在下で始原生殖細胞を培養することによって樹立できる(Y. Matsui et al. (1992), Cell, 70:841-847; J.L. Resnick et al. (1992), Nature, 359:550-551)。

[0020] GS細胞は、精巣由来の多能性幹細胞であり、精子形成のための起源となる細胞である。この細胞は、ES細胞と同様に、種々の系列の細胞に分化誘導可能である。神経膠細胞系由来神経栄養因子(glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF))を含む培養液で自己複製可能であり、ES細胞と同様の培養条件下で継代を繰り返すことにより、精子幹細胞を得ることができる (M. Kanatsu-Shinohara et al. (2003) Biol. Reprod., 69:612-616)。

[0021] 角膜内皮細胞へと分化し得る体性幹細胞としては、例えば、角膜実質に由来する神経堤幹細胞(COPs)、間葉系幹細胞(mesenchymal stem cells)、及び皮膚由来多能性前駆細胞(skin-derived precursors:SKPs)等が挙げられる。好ましくはCOPs及びSKPsである。COPsは、例えば、角膜から上皮及び内皮を取り除いた後、角膜実質をコラゲナーゼで処置し、EGF、FGF2、B27サプリメント、及びLIFを添加したDMEM/F12培地で分離した細胞を培養することにより

調製できる。SKPsは、例えばNat Cell Biol., 2001 vol. 3, 778-784に記載された方法に準じて調製することができる。

[0022] 一実施形態において好ましい幹細胞は、iPS細胞である。他の実施形態において好ましい幹細胞は、神経堤幹細胞であり、より好ましくはiPS細胞由来の神経堤幹細胞及び角膜実質由来の神経堤幹細胞である。神経堤幹細胞とは、自己複製能と多分化能を持つ多能性の幹細胞であり、脊椎動物の発生過程では、神経管の背側から体中に移動し、様々な組織の形成に寄与することが知られている。iPS細胞からの神経堤幹細胞の誘導は当分野で知られている手法に従って、あるいはそれに準じた方法で実施することができる。例えばNature Protocols, 2010 vol. 5, No.4, 688-701に記載された方法に準じて実施することができる。神経堤幹細胞を用いることで効率よく角膜内皮細胞への分化誘導が可能である。

[0023] 上述する幹細胞を角膜内皮細胞に分化誘導させる方法は、特に制限されず、公知の手法及び今後開発される手法を用いて行うことができる。例えば、特許文献4に開示される方法に従って分化誘導させることができる。具体的には、幹細胞を幹細胞の培養に適した培地（例えば、MEM培地）にGSK3阻害剤、レチノイン酸、TGF β 2、インスリン及びROCK阻害剤から成る群より選択される1種以上の分化誘導因子を添加した培地にて、30～40℃、1～10%CO₂の条件下、数日から1ヶ月半程度培養することによって角膜内皮細胞に分化させることができる。分化誘導因子は、好ましくはGSK3阻害剤及びレチノイン酸を含み、より好ましくはGSK3阻害剤、レチノイン酸、及びROCK阻害剤を含み、更に好ましくは、GSK3阻害剤、レチノイン酸、ROCK阻害剤、及びインスリンを含む。

[0024] このようにして幹細胞から角膜内皮細胞を含む細胞集団を得ることができる。得られた角膜内皮細胞を含む細胞集団は、直ぐに角膜内皮細胞の分取に供しても良く、一定期間継代培養を繰り返した後に角膜内皮細胞の分取に供しても良い。

[0025] 角膜から単離された角膜内皮細胞を培養して角膜内皮細胞を含む細胞集団

を得る手段は、特に制限されず、公知の方法及び今後開発される方法を適宜選択して行うことが出来る。例えば、W02014/104366に開示される方法に従って行うことができる。具体的には、ヒト強角膜片よりヒト角膜内皮細胞が付着した状態でデスメ膜を採取した後、細切し、コラゲナーゼを約0.2%含む培地中で5% CO₂、37℃の条件で1～3時間培養する。培地には15%牛胎児血清（FCS）及び2ng/mLの塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を含むDME培地を用いることができる。その後、遠心洗浄により線維芽細胞等を除去し、トリプシン消化を行うことによりペレット状の角膜内皮細胞を含む細胞集団（初代培養細胞）を得ることができる。

[0026] 上記のようにして得られる角膜内皮細胞を含む細胞集団は、更に動物細胞の培養に一般的に使用されるD-MEM、MEM等の基礎培地中で培養することができる。培地に含有させるグルコース濃度は、好ましくは2.0 g/L 以下であり、より好ましくは0.1～1.0 g/Lである。培地には、成長因子として、肝細胞増殖因子（HGF）、上皮成長因子（EGF）、組換えEGF（rEGF）、及び／又は線維芽細胞増殖因子（FGF）等を添加することが好ましい。これらの因子は1種のみを単独で用いても良く、複数を適宜組み合わせる培地に添加しても良い。培地中の成長因子の濃度は、通常1～100ng/mL、好ましくは2～5 ng/mLである。効率的に角膜内皮細胞を培養する観点から、培地には、アスコルビン酸2-リン酸等のアスコルビン酸誘導体を5～1,000 μg/mL配合することが好ましい。

[0027] 角膜内皮細胞の培養は、マトリゲル、コラーゲン等のマトリクスでコーティングした培養容器（例えば、ディッシュ、ペトリディッシュ、組織培養用ディッシュ、マルチディッシュ、マイクロプレート、マイクロウエルプレート、マルチプレート、マルチウエルプレート、チャンバースライド、シャーレ、チューブ、トレイ、培養バック等）を用いて付着培養により行うことができる。培養温度は、通常35～38℃であり、好ましくは37℃である。湿潤条件は、通常90～100%湿潤、好ましくは100%湿潤である。CO₂濃度は、通常5～15%、好ましくは10%である。よって、このような条件を維持可能なインキュベ

ータ内で培養することが好ましい。培養期間は、特に制限されないが、例えば、細胞が集密（コンフルエント）になる段階（定常状態）まで（例えば、1～5日）行うことができる。

[0028] 細胞がコンフルエントに達した時点で必要に応じて更に継代培養することができる。例えば、コンフルエント状態の細胞をPBSで洗浄後、トリプシン/EDTAにて分散させ、遠心し、上記と同様の培地を含む培養容器に、500～60,000細胞/cm²の細胞密度となるように播種し、上記の培養条件で培養することができる。更に細胞がコンフルエントに達した時点で同様の継代操作を繰り返すことができる。このようにして継代培養細胞である角膜内皮細胞を含む細胞集団を得ることが出来る。

[0029] 1－2. 分子マーカーを指標にした角膜内皮細胞の分取

角膜内皮細胞には、ZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R、HTR1D、CLRN1、SCNN1D、PKD1、CNTN6、NSF、CNTN3、PPIP5K1及びPCDHB7が特異的に発現している。よって、これらの分子から選択される少なくとも一種の発現を指標にして角膜内皮細胞を含む細胞集団から角膜内皮細胞を分取し、角膜内皮細胞を製造することが出来る。尚、本書では、ZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R、HTR1D、CLRN1、SCNN1D、PKD1、CNTN6、NSF、CNTN3、PPIP5K1及びPCDHB7を分子マーカーとも称する。

[0030] ZP4は、卵母細胞を取り囲む細胞外マトリックスである透明帯を構成する糖タンパク質の一つをコードする遺伝子である（Hartmann JF, et al., (1972), Proc Natl Acad Sci USA, 69: 2767-2769）。その大部分は細胞外に存在するが、カルボキシル末端は細胞膜貫通ドメインである（Gupta SK, et al. (2012), Cell Tissue Res, 349: 665-678）。

[0031] MRGPRX3は、Mas関連Gタンパク質共役受容体の一つをコードする遺伝子であり、感覚神経において痛覚の制御に関与することが示唆されている（Lembo P M, et al. (2002), Nat Neurosci 5: 201-209）。

[0032] GRIP1は、AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate) 型グルタミン酸受容体の細胞内ドメインカルボキシル末端に結合するタンパ

ク質をコードする遺伝子であり、シナプスや脳に発現していることが報告されている (Dong H, et al., (1999), J Neurosci, 19: 6930-6941)。

[0033] GLP1Rは、膵臓の β 細胞からのインスリン分泌を促進するインクレチンの一つである、グルカゴン様ペプチド-1(Glucagon-like peptide-1)の受容体をコードする遺伝子である (Orskov C, (1992), Diabetologia, 35: 701-711)。従って、GLP1Rは膵臓に発現していることが報告されている (Tornehave D, et al., (2008), J Histochem Cytochem, 56: 841-851)。

[0034] HTR1Dは、セロトニン受容体の一つをコードする遺伝子であり、頭蓋顔面組織の神経線維に発現しており、偏頭痛の発症に関与することが示唆されている (Harriott AM, et al., (2008), Cephalalgia, 28: 933-944)。

[0035] CLRN1は、内耳障害及び網膜色素変性症を来すUsher症候群typeIIIaの原因遺伝子の一つとして報告されている (Kremer H, et al., (2006), Hum Mol Genet 15 Spec No 2: p. 262-270)。CLRN1は内耳の有毛細胞ならびに網膜の神経膠細胞に発現しており、内耳有毛細胞の発生・分化に重要な役割を担うと考えられているが (Geller SF, et al., (2009), PLoS Genet 5: e1000607)、その詳細な機能は明らかにされていない。

[0036] SCNN1Dは、上皮型Naチャネル(ENaC)の δ サブユニットをコードする遺伝子である。脳や心臓、呼吸器、腎臓等で発現することが報告されている (Ji HL et al., (2012), Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 303: 1013-1026)。

[0037] PKD1は、ポリシスチン-1をコードする遺伝子であり、常染色体優性多発性嚢胞腎の原因遺伝子の一つとして報告されている (Gabow PA, (1993) N Engl J Med, 329: 332-342)。従って腎臓で高発現している。ポリシスチン-1は尿細管上皮細胞の分化に関与することが示唆されている (Boletta A et al., (2003) Trends Cell Biol, 13: 484-492)。

[0038] CNTN6は、コンタクチン6をコードする遺伝子である。コンタクチン6は免疫グロブリンスーパーファミリーの一つで細胞接着に関与しており、神経系の発生段階においてシナプス結合の形成に関与することが示唆されている (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/27255>)。

- [0039] NSFは、N-エチルマレイミド感受性因子をコードする遺伝子であり、このタンパク質はSNAP(soluble NSF attachment protein)およびSNARE(SNAP receptor)と複合体を形成して、シナプス小胞と細胞膜の融合を促進する(Sollner T et al., (1993) Nature. 362: 318-324)。
- [0040] CNTN3は、コンタクチン3をコードする遺伝子であるが、その構造からコンタクチン6同様、細胞接着に関与することが示唆される。前頭葉、後頭葉、小脳等での発現が報告されている (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9P232>)。
- [0041] PPIP5K1は、イノシトールキナーゼをコードする遺伝子であり、細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たすことが示唆されている(Gokhale NA et al., (2013) Biochem J. 453: 413-426)。
- [0042] PCDHB7は、プロトカドヘリン β 7をコードする遺伝子である。特異的な機能は不明だが、神経系において細胞間接着に重要な役割を果たすことが示唆されている (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/56129>)。
- [0043] 角膜内皮細胞の指標として利用する分子マーカーは、ZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R、HTR1D、CLRN1、SCNN1D、PKD1、CNTN6、NSF、CNTN3、PPIP5K1及びPCDHB7から成る群より選択される1種だけでもよいが、2種以上を任意に組み合わせて用いても良い。一実施形態において好ましい分子マーカーは、発現産物が角膜内皮細胞の表面タンパク質であり、且つ、角膜内皮細胞での発現の特異性が高いという観点から、ZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R、HTR1D、及びCLRN1であり、より好ましくはZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R及びHTR1Dであり、更に好ましくはZP4、MRGPRX3、GRIP1、及びGLP1Rであり、より更に好ましくはZP4、MRGPRX3、及びGRIP1であり、一層好ましくはZP4及びMRGPRX3であり、特に好ましくはZP4である。
- [0044] SCNN1D、PKD1、CNTN6、NSF、CNTN3、PPIP5K1及びPCDHB7は、図1に示される通り、脳、脊髄、骨格筋、又は肝臓等の他の組織でも発現していると考えられるが、角膜内皮細胞を含む細胞群が由来する幹細胞の種類、及び／又は、角膜内皮細胞に分化させる条件等を制御すること、或いは、角膜内皮細胞

を含む細胞群として角膜内皮細胞を培養して得られる細胞群を採用すること等により、それらの組織での発現は無視することができる。よって、これらの分子マーカーも角膜内皮細胞を分取又は検出するために有用である。これらの分子マーカーの中でも好ましくはSCNN1D、PKD1、CNTN6、NSF、CNTN3、及びPPIP5K1であり、より好ましくはSCNN1D、PKD1、CNTN6、NSF、及びCNTN3であり、更に好ましくはSCNN1D、PKD1、CNTN6、及びNSFであり、より更に好ましくはSCNN1D、PKD1、及びCNTN6であり、一層好ましくはSCNN1D、及びPKD1であり、特に好ましくはSCNN1Dである。

[0045] ZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R、HTR1D、CLRN1、SCNN1D、PKD1、CNTN6、NSF、CNTN3、PPIP5K1及びPCDHB7から成る群より選択される1種以上の分子マーカーの発現を指標にした、角膜内皮細胞を含む細胞集団からの角膜内皮細胞の分取は、例えば、細胞集団中に角膜内皮細胞以外に当該少なくとも一種の分子マーカーを発現する細胞が含まれていない場合、当該少なくとも一種の分子マーカーを発現している細胞を分取することで実施できる。また、細胞集団中に角膜内皮細胞以外にも当該少なくとも一種の分子マーカーを発現する他の細胞が存在する場合、当該他の細胞と比較して有意に高い発現を示す細胞を分取することにより、角膜内皮細胞を得ることができる。指標とする分子マーカーは、2種以上、3種以上、4以上、又は5種以上を適宜組み合わせ使用することができる。

[0046] 分子マーカーの発現の検出は、任意の手段を用いて行うことができる。代表的な検出方法としては、例えば、上記一種以上の分子マーカーをコードする遺伝子の発現をR T - P C Rを用いて測定する方法、及び、上記一種以上の分子マーカーの存在をそれに特異的に結合する物質を用いて検出する方法等を挙げることができる。上記分子マーカーはいずれも角膜内皮細胞の表面タンパク質である。よって、細胞が生きたまま分子マーカーの検出が可能であるという観点から、分子マーカーに特異的に結合する物質を用いて検出する方法が好ましい。

[0047] 分子マーカーに特異的に結合する物質の種類は特に制限されず、例えば、

抗体、及びアプタマー等を挙げることができる。好ましい当該物質は、抗体もしくはその断片である。抗体は、ポリクローナル及びモノクローナル抗体のいずれでもよい。抗体の断片としては、例えば、Fab断片、F(ab)₂断片、ScFv断片等を挙げることができる。2種以上の分子マーカーの発現を利用して角膜内皮細胞を検出する場合は、各々に特異的に結合する物質を組み合わせ使用することができる。一実施形態において分子マーカーに特異的に結合する物質は、角膜内皮細胞を含む細胞群を個々の細胞にばらばらにするための処理（例えば、プロテアーゼによる処理）によって、分解されない性質を有することが好ましい。

[0048] 分子マーカーを特異的に認識する抗体は、市販されているものを使用してもよく、周知の技術を用いて作製しても良い。抗体の作製は周知であり、例えば、ポリクローナル抗体の場合、精製した各分子マーカー又はその部分ペプチドで非ヒト動物を免疫し、その動物の血清から常法に従って得ることができる。モノクローナル抗体の場合は、免疫された動物から得た脾臓細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合させて調製したハイブリドーマから得ることができる。

[0049] 分子マーカーに特異的に結合する物質が結合した細胞の検出を容易にするため、当該物質は、任意の標識物質によって標識されていることが好ましい。標識物質としては、特に制限されないが、例えば、蛍光標識、放射性標識、化学発光標識、酵素、ビオチンまたはストレプトアビジン等を挙げることができる。分子マーカーに特異的に結合する物質は間接的に標識されていてもよい。例えば、当該物質（例えば、抗体）に特異的に結合する予め標識した抗体（二次抗体）を用いることができる。

[0050] 分子マーカーに特異的に結合する物質が結合した細胞を識別し、分取する方法は特に制限されず、公知の方法及び今後開発される方法から適宜選択することができる。例えば、細胞の識別／分取方法は、使用する標識物質の種類に応じて選択することができる。代表的な細胞の識別／分取方法には、蛍光標識細胞分取法（Fluorescence-Activated Cell Sorting: FACS）、磁気細

胞分取法 (Magnetic-Activated Cell Sorting: MACS)、及びアフィニティークロマトグラフィー法等が含まれる。同時に複数の分子マーカの検出が可能であるという観点から、好ましくは蛍光標識細胞分離法及び磁気細胞分離法であり、より好ましくはセルソーター付きフローサイトメーターを用いたFACSである。FACSの様式は特に制限されず、例えば、様式は液滴荷電方式及びセルキャプチャー方式のいずれであっても良い。このようにして角膜内皮細胞を純化させることができる。

[0051] 上記の通り、分子マーカーを指標にして、角膜内皮細胞を含む細胞集団から角膜内皮細胞を分取することにより、角膜内皮細胞を得ることができる。尚、角膜内皮細胞には、角膜内皮前駆細胞も含まれる。上記方法に従えば、角膜内皮細胞が濃縮された細胞集団を得ることも可能である。角膜内皮細胞が濃縮された細胞集団に含まれる角膜内皮細胞の割合は、細胞数換算で、例えば、50%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、又は99%以上である。

[0052] 1-3. 角膜内皮細胞の利用

上記分子マーカーを指標にして得られる角膜内皮細胞は、角膜内皮層の機能障害に起因する疾患の治療に用いることができる。よって、当該角膜内皮細胞を含む、角膜内皮疾患の治療用医薬組成物を提供することができる。このような医薬組成物には、角膜内皮細胞の維持、増殖、患部への投与を補助するための各種成分、足場材料、及び担体等を更に含めてもよい。

[0053] 細胞の維持及び／又は増殖を補助する成分としては、例えば、炭素源、窒素源、ビタミン、ミネラル、塩類、及び各種サイトカイン等の培地成分を挙げることができる。患部への投与を補助する足場材料としては、例えば、コラーゲン、ポリ乳酸、ヒアルロン酸、セルロース、及びこれらの誘導体を挙げることができる。これらの成分及び足場材料は、2種以上を組み合わせることもできる。医薬組成物は、注射用水溶液（例えば、生理食塩水、PBSなどの生理緩衝液、ブドウ糖やその他の補助剤を含む等張液）中に角膜内皮細胞を含む形態であっても良い。

- [0054] 上記分子マーカーを指標にして得られる角膜内皮細胞を、適当な担体（例えば、高分子膜）上で培養することにより角膜内皮細胞シートを提供することができる。そのような担体は、特に制限されないが、例えば、コラーゲン、アテロコラーゲン、アルカリ処理コラーゲン、ゼラチン、ケラチン、ヒアルロン酸、グリコサミノグリカン（コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパラン硫酸、ヘパリン、ケラタン硫酸）、プロテオグリカン、アルギン酸、キトサン、ポリアミノ酸（ポリ乳酸）、セルロース等のバイオポリマー、（メタ）アクリルアミド化合物、N-（若しくはN，N-ジ）アルキル置換（メタ）アクリルアミド誘導体、ビニルエーテル誘導体、又はこれらの共重合体等の温度応答性ポリマー等を挙げることができる。シート状の他、角膜内皮細胞は、フィルター濾過等によって濃縮したペレット（細胞塊）の状態で用いることもできる。
- [0055] 角膜内皮細胞は、必要に応じて、保護剤等を添加し、凍結保存することができる。保護剤としては、例えば、グリセロール、DMSO（ジメチルスルホキシド）、プロピレングリコール、アセトアミド等を上げることができる。また、移植片としての安全性を維持するために、角膜内皮細胞を加熱処理及び／または放射線処理等に供することもできる。
- [0056] 角膜内皮細胞、それを含む医薬組成物、及び角膜内皮細胞シートを用いた治療の対象となりうる疾患としては、特に制限されないが、例えば、水疱性角膜症を含む角膜内皮機能不全、角膜ジストロフィー、発達緑内障、Rieger奇形、先天性遺伝性角膜内皮ジストロフィー、輪部デルモイド、強膜化角膜、円錐角膜やペルーシド角膜変性等の角膜形状異常、角膜瘢痕、角膜浸潤、角膜沈着、角膜浮腫、角膜潰瘍、化学物質や熱による眼外傷、角膜炎、角膜変性、角膜感染症などの眼疾患や神経芽細胞腫、Hirschsprung病、Waardenburg症候群、限局性白皮症Recklinghausen病が挙げられる。
- [0057] 角膜内皮細胞の移植を必要とする患者（例えば、上記疾患を患う患者）に、角膜内皮細胞又は角膜内皮細胞シートを移植することにより、上記疾患を治療することができる。よって、上述の方法によって得られた角膜内皮細胞

を、角膜内皮細胞の移植を必要とする患者に投与することを含む、上記疾患の治療方法が提供される。

[0058] 2. 角膜内皮細胞の評価方法

上述するZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R、HTR1D、CLRN1、SCNN1D、PKD1、CNTN6、NSF、CNTN3、PPIP5K1及びPCDHB7から成る群より選択される1種以上は、角膜内皮細胞に特異的に発現している。よって、当該分子マーカーの発現を指標にした角膜内皮細胞の評価方法が提供される。例えば、角膜内皮細胞であると考えられる（又は推測される）被検細胞について、当該分子マーカーの発現を測定し、特異的な発現が確認された場合（又は、有意な発現が確認された場合）に、被検細胞を角膜内皮細胞であると評価することができる。このような評価方法での使用に好ましい分子マーカーは、上記1-2で記載した分子マーカーと同じである。

[0059] 被検細胞としては、特に制限されないが、例えば、上記1-1.に記載する細胞を角膜内皮細胞への分化誘導に適した培地及び条件で培養して得られた細胞、及び、角膜から採取した角膜内皮細胞を培養して得られた細胞を挙げることができる。分子マーカーの発現を測定する方法は、特に制限されず、例えば、上記1-2.に記載するRT-PCRを用いた測定方法、及び、分子マーカーに特異的に結合する物質を用いて測定する方法等を挙げることができる。このようにして被検細胞を評価することにより、それを角膜内皮細胞として安全に利用することができる。

[0060] 3. 角膜内皮細胞検出用キット

ZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R、HTR1D、CLRN1、SCNN1D、PKD1、CNTN6、NSF、CNTN3、PPIP5K1及びPCDHB7から成る群より選択される1種以上の分子マーカーを特異的に認識する物質を含む角膜内皮細胞検出用キットが提供される。分子マーカーを特異的に認識する物質とは、特に制限されず、例えば、上記1-2.に記載する抗体、及びアプタマー等を挙げることができる。キットには、分子マーカーを特異的に認識する物質以外に、角膜内皮細胞の検出に利用される任意の物質、容器、及び説明書などを含めることができる。例えば

、キットには、上述する分子マーカーを特異的に認識する物質を標識する標識物質を含めることができる。

実施例

[0061] 以下、実施例により本発明についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに制限されるものではない。

1. 候補分子の同定

ヒト生体内の角膜内皮細胞に発現している遺伝子の情報として、Chen et al. によって報告されたRNA-seqデータ(GSE41616, Chen, et al., (2013), Hum Mol Genet 22: 1271-1279)を遺伝子発現情報データベース (Gene Expression Omnibus: GEO) から入手した。このデータには、3個体の成人ドナー (31歳、56歳、64歳) 由来の角膜内皮細胞、並びに、2個体の胎児ドナー (16~18週) 由来の角膜内皮細胞で発現しているRNAのデータが含まれている。データの信頼性を確認するため、角膜上皮細胞特異的マーカーであるKRT3及びKRT12について当該データを調べたところ、56歳の成人ドナー由来のデータでこれらの発現レベルが高いことが確認された。よって、この個体由来のsampleには、角膜上皮細胞が混在していたものと考えられたため、残りの4個体に由来するデータのみを用いて以下の解析を行った。

[0062] RNA-seqリードを、TopHat (バージョン1.4.1) を用いてヒトリファレンスゲノム (hg19) へとアライメントし、その結果を用いて、Cufflinksパッケージ (バージョン2.1.1) によって転写産物モデルを構築した (Trapnell, et al., (2012), Nat. Protoc. 7: 562-578)。Cufflinksを用いて、遺伝子発現量をFPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments: FPKM) として定量化し、角膜内皮細胞で10FPKM以上発現している遺伝子を選択した。その結果、10,627の遺伝子を選択された。次に、これらの遺伝子を、下記の表1に示すG0タームを用いて、細胞膜タンパク質をコードする遺伝子だけに絞り込んだ。その結果、表1に示す通り、1494の遺伝子にまで絞り込むことができた。このうち、1075の遺伝子は成人及び胎児の両方の角膜内皮細胞で発現しており、225の遺伝子は成人の角膜内皮細胞のみで発現して

おり、194の遺伝子は胎児の角膜内皮細胞のみで発現している。

[0063] [表1]

GO ターム	GO ID	両方	成人	胎児
plasma membrane	GO:0005886	762	155	124
integral to plasma membrane	GO:0005887	215	49	57
cell surface	GO:0009986	111	20	28
apical plasma membrane	GO:0016324	59	18	9
basolateral plasma membrane	GO:0016323	50	12	8
external side of plasma membrane	GO:0009897	31	9	9
lateral plasma membrane	GO:0016328	10	0	4
basal plasma membrane	GO:0009925	8	2	2
extrinsic to plasma membrane	GO:0019897	8	2	0
apicolateral plasma membrane	GO:0016327	5	0	1
anchored to external side of plasma membrane	GO:0031362	4	0	0
anchored to plasma membrane	GO:0046658	2	2	0
extrinsic to external side of plasma membrane	GO:0031232	2	0	0
intrinsic to external side of plasma membrane	GO:0031233	1	1	0
intrinsic to plasma membrane	GO:0031226	1	1	0
cell outer membrane	GO:0009279	1	0	0
external side of cell outer membrane	GO:0031240	0	0	0
integral to cell outer membrane	GO:0045203	0	0	0
合計		1,075	225	194

[0064] 最後に、FANTOM5 (Functional Annotation of the Mammalian Genome 5) のデータベースを用いて、5以上の組織又は細胞種で10 TPM (tags per million) 以上発現している遺伝子を排除した。この結果、候補分子をコードする遺伝子は、下記の表2に示す13の遺伝子にまで絞り込まれた。

[0065]

[表2]

遺伝子名	RNA-seq FPKM 値		FANTOM5 CAGE	
	成人角膜内皮細胞	胎児角膜内皮細胞	発現量の最も高い組織又は細胞 (tpm)	10tpm以上発現している組織又は細胞数
成人角膜内皮細胞でのみ高発現の遺伝子				
PPIP5K1	17.39	6.17	なし	0
CLRN1	14.15	0.56	水晶体上皮細胞 (22.91)	2
MRGPRX3	11.16	0.26	マラッセ上皮遺残細胞 (26.14)	1
GLP1R	10.85	2.64	胎児心臓 (10.51)	1
胎児角膜内皮細胞でのみ高発現の遺伝子				
CNTN3	5.36	19.86	なし	0
PCDHB7	1.11	11.14	硬膜 (9.37)	0
HTR1D	7.41	10.48	小腸 (12)	2
成人及び胎児の角膜内皮細胞の両方で高発現の遺伝子				
GRIP1	39.33	22.70	胎児側頭葉 (6.46)	0
NSF	31.58	14.09	松果腺 (7.84)	0
PKD1	24.99	38.47	大動脈 (8.45)	0
SCNN1D	21.72	28.05	顆粒球-マクロファージ前駆細胞 (22.21)	4
ZP4	12.22	56.52	なし	0
CNTN6	11.48	22.09	小脳 (24.20)	4

[0066] 2. 候補分子の眼組織及び全身組織におけるRNA発現量

上記1で絞り込んだ13の遺伝子の角膜内皮細胞及び全身組織での発現量を確認するため、成人ヒト角膜内皮細胞及び22の組織における各遺伝子のRNA発現量を定量PCRにより計測した。具体的な手順は後述する。その結果、図1に示すように、全ての遺伝子が、データ解析結果に則し、角膜内皮細胞で発現していることが確認された。中でもZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R、HTR1D、CLRN1、は、角膜内皮細胞における発現量が他の組織における発現量と比較して最も高く、他の限られた組織でしか発現していないことが確認された。

[0067] 次に、これらの6つの遺伝子について、眼組織間における発現量を定量PCRにより計測した。眼組織には、2個体の成人ドナーから得られた4つの眼球を用いた。その結果、図2に示す通り、全ての遺伝子について角膜内皮細胞での

高発現が確認された。角膜実質は角膜内皮層に隣接しており、角膜内皮細胞と同様に頭部神経堤に由来するため、角膜実質で発現していないこと又は発現量が低いことは、角膜内皮細胞のマーカーとして重要な特徴の一つと考えられる。CLRN1は、角膜実質においてわずかな発現がみられたが、他の5つの遺伝子の発現は認められなかった。従って、これらの全ての分子は、角膜内皮細胞に特異的なマーカーとして有用である。

[0068] 角膜内皮細胞からのRNA抽出は次の手順で行った。尚、ヒトサンプルは全て、ヘルシンキ宣言を遵守して取り扱った。ヒトドナー由来の研究用強角膜片及び全眼球は、Sight Life（ワシントン州シアトル）から入手した。強角膜片はOptisol-GS（Bausch & Lomb、ニューヨーク州ロチェスター）に浸漬され4℃で保存し、死後4日以内に使用した。ドナーの年齢は58歳であった。強角膜片をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で3回洗浄した後、鑷子を用いて角膜内皮及びデスメ膜をシュワルベ線に沿って剥離した。剥離した角膜内皮からQia gen miRNeasy Mini Kit（QIAGEN Inc.）を用いてRNAを抽出した。

[0069] 培養角膜内皮細胞からのRNA抽出は次の手順で行った。4個体のドナー由来の4眼から強角膜片を取得した。ドナーの年齢は14歳～25歳であった。角膜内皮及びデスメ膜は上述のように単離した。単離組織を、1.2U/mL dispase I I（合同酒精株式会社）及び1% Antibiotic-Antimycotic(Anti-Anti;Invitrogen/Gibco)を添加したダルベッコ変法イーグル培地（DMEM ; Invitrogen）中で37℃にて1時間インキュベートし、角膜内皮細胞をデスメ膜から単離した。単離した角膜内皮細胞を穏やかに遠心分離して回収し、50U/mL ペニシリン、50μg/mL ストレプトマイシン、10%ウシ胎児血清（ICN Biomedicals, Inc., オハイオ州オーロラ）及び2ng/mL 塩基性線維芽細胞成長因子（bFGF ; invitrogen）を添加したDMEM培地中で懸濁させた後、細胞付着試薬（FNCコーティングミックス ; Athena ES、メリーランド州バルチモア）でコーティングした培養皿上に播種し、5% CO₂の加湿雰囲気下、37℃で培養した。その後、Isogen RNA抽出キットを用いてRNAを抽出した。尚、RNA抽出に使用された細胞は全て第1代継代のものではあった。

[0070] ヒト眼組織からのRNA抽出は次の手順で行った。2個体のドナー由来の4眼球は湿潤容器内で4℃保存され、死後5日以内に使用した。ドナーの年齢は75歳及び79歳であった。まず、強角膜片を作成し、毛様体、虹彩及び水晶体を前眼部から単離し、虹彩実質と虹彩色素上皮細胞を単離した。角膜内皮及びデスメ膜は上述の方法で剥離し、線維柱帯を単離した。更に、強角膜片から結膜を切除し、8.0mm径のトレパンを用いて分離した角膜中央部及び輪部をDispase I（合同酒精株式会社、東京）で4℃にて一晩処理し、角膜上皮及び輪部上皮を実質から単離した。また、後眼部から鑷子を用いて神経網膜を剥離した後、網膜色素上皮細胞（RPE）と脈絡膜とを一塊に摘出し、最後に視神経を単離した。これらの単離した組織は全て、ISOGEN RNA抽出キットを用いてRNAを抽出した。

[0071] 眼組織以外のヒト全身組織由来のRNAサンプルはヒトtotal RNA master panel II（#636643；Clontech、カリフォルニア州マウンテンビュー）を入手した。これには、腎臓RNA及び膵臓RNAは含まれていなかったため、別途、Human Kidney Total RNA（#AM7976；Ambion、テキサス州オースティン）及びHuman Pancreas Total RNA（#AM7954；Ambion）を購入した。

[0072] 逆転写定量ポリメラーゼ連鎖反応（RT-qPCR）は次の手順で行った。SuperScript III First-Strand Synthesis System（Invitrogen、カリフォルニア州カールスバッド）を用いて各RNAからcDNAを逆転写し、定量的リアルタイムPCR（95℃30秒の後、95℃5秒、60℃30秒、72℃30秒を45サイクル）によりcDNAを定量した。SYBR Pre-mix Dimer Eraser（タカラバイオ株式会社、日本、滋賀）を使用し、内部コントロールには β -アクチン（ACTB）を用いた。使用したプライマーのリストを下記の表3に示す。

[0073]

[表3]

遺伝子名	Forward/ Reverse	プライマーの塩基配列	配列番号	Accession Number
ACTB	Forward	5'-ACAGAGCCTCGCCTTTGC-3'	配列番号 1	NM_001101
	Reverse	5'-GCGGCGATATCATCATCC-3'	配列番号 2	
GRIP1	Forward	5'-ATGTGGACAAGAAGCAGCAC-3'	配列番号 3	NM_021150
	Reverse	5'-GGAGTTTTGGCAACTTCGAC-3'	配列番号 4	
NSF	Forward	5'-CCTATTGGCCCTCGATTTTC-3'	配列番号 5	NM_006178
	Reverse	5'-GGCTAGTGGTCCCAATGATAAG-3'	配列番号 6	
PKD1	Forward	5'-AAGACACCCACATGGAACG-3'	配列番号 7	NM_001009 944
	Reverse	5'-CCAGCGTCTCTGTCTTCTCC-3'	配列番号 8	
SCNN1D	Forward	5'-TGGAGCTGCTACACAACACC-3'	配列番号 9	NM_001130 413
	Reverse	5'-GAGCAGGTCTCCACCATCAG-3'	配列番号 10	
ZP4	Forward	5'-AAACAGGCCCTCAGGGGA-3'	配列番号 11	NM_021186
	Reverse	5'-GACAGGTCACCACACAGGAT-3'	配列番号 12	
CNTN6	Forward	5'-TTCTGAGTCGGAAGGCAAAG-3'	配列番号 13	NM_014461
	Reverse	5'-CGGACAGATACTGTGCTTCTTG-3'	配列番号 14	
PPIP5K1	Forward	5'-CTTCCCTACGTCAAGTGAGTG-3'	配列番号 15	NM_014659
	Reverse	5'-GCTGCTGTGCATGGAATC-3'	配列番号 16	
CLRN1	Forward	5'-AATGCAGTACGGGCTTTTCC-3'	配列番号 17	NM_174878
	Reverse	5'-GCTCACTGGGATTGCTTTG-3'	配列番号 18	
MRGPR X3	Forward	5'-GGAGGTCTTCACCACTGGAC-3'	配列番号 19	NM_054031
	Reverse	5'-ACCCAAGACTGGGATGGTTG-3'	配列番号 20	
GLP1R	Forward	5'-GCAGAAATGGCGAGAATACC-3'	配列番号 21	NM_002062
	Reverse	5'-TTCATCGAAGGTCCGGTTG-3'	配列番号 22	
CNTN3	Forward	5'-CCATGGAAACAGTTGATCCTG-3'	配列番号 23	NM_020872
	Reverse	5'-GCTGTTGCTGGGTTCTTTG-3'	配列番号 24	
PCDHB7	Forward	5'-ATTTTGTGCGGTCGCTCTAC-3'	配列番号 25	NM_018940
	Reverse	5'-TCCCCATTACTCCGGTATC-3'	配列番号 26	
HTR1D	Forward	5'-CATGCGTTTCTTCCACTGAG-3'	配列番号 27	NM_000864
	Reverse	5'-CATCGGCACTGCAAATACTG-3'	配列番号 28	

[0074] 3. 角膜組織内の角膜内皮細胞の染色

上記6つの遺伝子について、タンパク質レベルでの発現を確認するために、ヒトドナー由来の角膜組織片を下記の表4に示す抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、図3に示す通り、いずれのタンパク質を標的として染色した場合も角膜内皮層が強く染色された。特に、抗ZP4抗体、抗GLP抗体、及び抗HTR1D抗体の3種については、角膜内皮層のみが特異的に染色された。GRIP1、CLR

N1、及びMRGPRX3については、角膜実質も染色されたが、その蛍光強度は、角膜内皮細胞のものと比較して明らかに低いため、この有意な発現レベルの差に基づいて、角膜内皮細胞を角膜実質と区別することは可能である。このように、上記6つの遺伝子及びそれがコードするタンパク質が角膜内皮細胞を特異的に認識するマーカーとして有用であることが示された。

[0075] [表4]

抗体名	供給元	由来及びタイプ	希釈率
GRIP1 glutamate receptor interacting protein 1 Cat No. ab122514	Abcam, Cambridge, MA	Rabbit ポリクローナル抗体	1:100
ZP4 zona pellucida glycoprotein 4 Cat No. LS-C160968	LifeSpan BioSciences, Inc. Seattle, WA	Rabbit ポリクローナル抗体	1:50
CLRN1 clarin 1 Cat No. sc-69073	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA.	Goat ポリクローナル抗体	1:50
MRGPRX3 MAS-related GPR, member X3 Cat No. ab140863	Abcam, Cambridge, MA	Rabbit ポリクローナル抗体	1:25
GLP1R glucagon-like peptide 1 receptor Cat No. GTX44806	Genetex Inc., Irvine, CA	Rabbit ポリクローナル抗体	1:100
HTR1D 5-hydroxytryptamine receptor 1D Cat No. ab140486	Abcam, Cambridge, MA	Rabbit ポリクローナル抗体	1:150

[0076] 上記の免疫染色は、次の手順で行った。強角膜片は死後11日以内に使用した。ドナーの年齢は27歳であった。強角膜片をOCTコンパウンドに包埋し、凍結切片をミクロトームクライオスタット（HM560、Thermo Fisher Scientific Inc.、ドイツ、ヴァルドルフ）を用いて10 μ mに切断した。室温にて30分間乾燥させた後、組織切片をTris緩衝生理食塩水（TBS；タカラバイオ株式会社）で3回洗浄し、5%ロバ血清及び0.3% Triton X-100の入ったTBSとともに1時間インキュベートして、非特異的反応を阻害した。次いで各切片を表4に挙げた一次抗体とともに4℃で一晩インキュベートした。続いて切片をTBSで更に3回洗浄して、各Alexa Fluor 488結合二次抗体（Life Technologies）の200倍希釈液及びHoechst 33342（#B2261、Sigma-Aldrich）の100倍希釈液とともに室温にて2時間インキュベートした。切片は蛍光顕微鏡（Axio Observer D1;Carl Zeiss Jena GmbH、ドイツ、イエーナ）を用いて観察した。

[0077] 4. ヒトiPS細胞からの誘導角膜内皮細胞におけるZP4の発現

多能性幹細胞であるヒトiPS細胞（京都大学iPS細胞研究所から提供）から角膜内皮細胞を誘導したところ、図4に示す通り、誘導によってZP4の発現が上昇することが確認された。ZP4遺伝子の発現は、RT-PCRで測定した。角膜内皮細胞及び前駆細胞に特異的にZP4が発現していることから、この結果は、ZP4が角膜内皮細胞の製造及び角膜内皮細胞の評価に有用なマーカーであることを裏付けている。

請求の範囲

- [請求項1] 角膜内皮細胞を含む細胞集団から、ZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R、HTR1D、及びCLRN1から成る群より選択される一種以上を発現している細胞を分取する工程を含む、角膜内皮細胞の製造方法。
- [請求項2] 角膜内皮細胞を含む細胞集団が幹細胞を分化誘導して得られる、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 角膜内皮細胞を含む細胞集団が角膜内皮細胞を培養して得られる、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 分取する工程が、ZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R、HTR1D、及びCLRN1から成る群より選択される1種以上を特異的に認識する抗体を該角膜内皮細胞を含む細胞集団に結合させることを含む、請求項1～3のいずれかに記載の方法。
- [請求項5] ZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R、HTR1D、及びCLRN1から成る群より選択される一種以上の発現を指標にして角膜内皮細胞を評価する方法。
- [請求項6] ZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R、HTR1D、及びCLRN1から成る群より選択される一種以上からなる角膜内皮細胞検出用マーカー。
- [請求項7] ZP4、MRGPRX3、GRIP1、GLP1R、HTR1D、及びCLRN1から成る群より選択される1種以上を特異的に認識する物質を含む、角膜内皮細胞検出用キット。