

明 細 書

発明の名称：多能性幹細胞由来結膜細胞の誘導方法

技術分野

[0001] 本発明は、多能性幹細胞由来結膜細胞の誘導方法に関する。より詳しくは、多能性幹細胞から結膜細胞を誘導する方法及びその利用に関するものである。

背景技術

[0002] 眼表面は結膜上皮及び角膜上皮で被覆されており、結膜上皮は涙液中へのムチン分泌、眼表面のバリア機能など、角膜上皮は光の透過・屈折、眼球保護などといった役割がある。即ち、眼表面の恒常性維持にはどちらも欠かすことができない重要な役割を担っている。

[0003] ヒト角膜上皮についての研究は比較的進んでおり、例えば、本願の発明者らは、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、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などを確認したことを報告している（特許文献1、非特許文献1、2参照）。

[0004] しかしながら、ヒト結膜上皮については不明な点が多い。この理由として、ヒト結膜上皮の入手が困難であること、及び、結膜上皮のin vitroでの培養が困難な点が挙げられる。

[0005] 一方で、生体中の結膜上皮は、結膜上皮細胞及び結膜杯細胞で構成されており、これらの細胞は基底部に存在する結膜上皮幹・前駆細胞から分化すると報告されている（非特許文献3）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：WO 2016／114285号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Hayashi et al., Nature Protocols, 2017, 12(4), 683-696,

doi: 10.1038/nprot.2017.007

非特許文献2: Hayashi et al., Nature. 2016 Mar 17, 531, 376-80, doi: 10.1038/nature17000

非特許文献3: Gipson, I.K., Progress in Retinal and Eye Research, 2016, 54, 49-63

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] しかしながら、結膜上皮幹・前駆細胞から2種の細胞（結膜上皮細胞及び結膜杯細胞）への詳細な分化機構は不明であり、またこれら2種の細胞（特に結膜杯細胞）を維持可能な培養法も確立されていない。
- [0009] 結膜上皮に関する研究は、ヒト由来の細胞を用いた研究が困難であることから、動物実験に頼らざるを得ないのが現状である。しかしながら、マウスやウサギの結膜上皮はヒトのものとは性状が大きく異なることから、動物から得られた結果をそのままヒトへと外挿することは難しい。また実際の医療現場でも、結膜杯細胞の減少によるムチン欠乏型ドライアイは近年問題となっているが、有効な治療薬は限られている。このように結膜上皮に関する研究は、基礎研究ならびに臨床研究の双方から注目されている。
- [0010] 本発明は、再生医療などに適用可能な多能性幹細胞由来結膜細胞の誘導方法及びその利用に関する。

課題を解決するための手段

- [0011] 上記課題を解決するため鋭意検討した結果、本発明者らは非特許文献1に記載の方法に従って得られる同心円状の帯状構造（a self-formed ectodermal autonomous multi-zone: SEAM）を形成する際に、特定の条件下で培養することで、結膜上皮細胞、結膜杯細胞ならびに結膜上皮幹・前駆細胞が優位な状態で分化誘導できることに初めて成功し、本発明を完成するに至った。
- [0012] また、分化誘導後の細胞集団をSSEA-4、CD200、ITG β 4の3種の抗体で染色後、FACSにより得られた各画分を詳細に解析することで、これらの細胞が出現する画分を特定し、単離・濃縮することに成功した。さらに、単離した細

胞を培養することで、in vitroで結膜杯細胞を維持しつつ結膜上皮細胞を培養することに初めて成功した。

[0013] すなわち、本発明は、以下の〔１〕～〔１１〕に関する。

〔１〕 多能性幹細胞のコロニーをEGF (Epidermal Growth Factor) シグナル伝達活性化因子を含む培地にて培養して分化誘導させることを特徴とする、結膜上皮細胞、結膜杯細胞ならびに結膜上皮幹・前駆細胞の誘導方法。

〔２〕 多能性幹細胞のコロニーをEGFシグナル伝達活性化因子を含む培地にて培養し、SEAM細胞集団 (self-formed ectodermal autonomous multi-zone細胞集団) を形成させる、前記〔１〕記載の誘導方法。

〔３〕 多能性幹細胞のコロニーをEGF (Epidermal Growth Factor) シグナル伝達活性化因子を含む培地にて培養してSEAM細胞集団 (self-formed ectodermal autonomous multi-zone細胞集団) を形成させ、前記SEAM細胞集団から、ITG β 4、SSEA-4及びCD200の抗体の発現程度を指標にして細胞を単離することを特徴とする、結膜上皮細胞、結膜杯細胞ならびに結膜上皮幹・前駆細胞の製造方法。

〔４〕 単離した細胞がCD200陰性である、前記〔３〕記載の製造方法。

〔５〕 単離した細胞がSSEA-4弱陽性／ITG β 4陽性細胞である、前記〔３〕又は〔４〕記載の製造方法。

〔６〕 単離された細胞が結膜上皮幹・前駆細胞である、前記〔５〕記載の製造方法。

〔７〕 単離した細胞がSSEA-4弱陽性／ITG β 4陰性細胞及びSSEA-4陽性／ITG β 4陰性細胞から選ばれる、前記〔３〕又は〔４〕記載の製造方法。

〔８〕 単離された細胞が結膜上皮細胞及び／又は結膜杯細胞である、前記〔７〕記載の製造方法。

〔９〕 前記〔１〕～〔６〕いずれか記載の方法により得られた結膜上皮幹・前駆細胞をKGF (Keratinocyte Growth Factor) を含む培地にて培養する工程を含む、結膜上皮細胞シートの製造方法。

〔１０〕 前記〔１〕～〔６〕いずれか記載の方法により得られた結膜上皮

幹・前駆細胞をFGFR2b (Fibroblast Growth Factor Receptor 2b) 活性化因子を含む培地にて培養する工程を含む、結膜上皮細胞シートの製造方法。

〔11〕 前記〔1〕～〔8〕いずれか記載の方法により得られた結膜上皮細胞、結膜杯細胞及び／又は結膜上皮幹・前駆細胞を培養する工程を含む、結膜に関連する疾患の薬剤スクリーニング方法。

発明の効果

[0014] 本発明によれば、多能性幹細胞から結膜上皮細胞や結膜杯細胞ならびに結膜上皮幹・前駆細胞を大量に作製することが可能となって、結膜上皮の基礎研究や臨床研究に大きく貢献できる。また、機能的な結膜上皮組織を再構成することが可能となって、ひいては、シート移植などを用いて、ドライアイなどの結膜細胞自体の異常に起因する疾患の根本的な再生治療方法や次世代の治療方法を提供することができる。

[0015] また、これまでに結膜細胞の入手が困難であるがために実施されてこなかった、結膜細胞をターゲットとした薬剤スクリーニング等にも応用可能である。

図面の簡単な説明

[0016] [図1]図1は、iPS細胞から結膜細胞への誘導過程の模式的な一例を示す図である。

[図2]図2は、SEAM細胞集団をソーティングした結果の一例を示す図である。

[図3]図3は、iPS細胞から分化誘導した各画分に含まれる細胞における遺伝子発現解析の結果を示す図である。

[図4]図4は、iPS細胞由来結膜杯細胞及び結膜上皮細胞の免疫蛍光染色とPAS染色の結果を示す図である。

[図5]図5は、iPS細胞由来結膜上皮幹・前駆細胞によるシート化を検討した結果を示す図である。

[図6]図6は、iPS細胞由来結膜上皮細胞シートとヒト正常細胞における遺伝子発現解析の結果を示す図である。

[図7]図7は、iPS細胞由来結膜上皮細胞シートの免疫蛍光染色（平面標本）

の結果を示す図である。

[図8]図8は、iPS細胞由来結膜上皮細胞シートの免疫蛍光染色（切片標本）の結果を示す図である。

[図9]図9は、iPS細胞由来結膜上皮細胞シートの免疫蛍光染色（平面標本）の結果を示す図である（EGF以外のEGFシグナル活性化因子で誘導したiPS細胞由来結膜上皮幹・前駆細胞を用いた結膜上皮細胞シート）。

[図10]図10は、iPS細胞由来結膜上皮細胞シートの遺伝子発現解析の結果を示す図である（KGF以外のFGFR2b活性化因子であるFGF10を含む培地で成熟させた結膜上皮細胞シート）。

発明を実施するための形態

[0017] 本発明者らは、これまで、iPS細胞から眼全体の発生を再現させた細胞集団（a self-formed ectodermal autonomous multi-zone : SEAM）を取得し、得られた細胞集団から特定の前駆細胞を単離後、当該細胞に分化誘導、必要により成熟培養を行うことにより高純度な細胞集団、例えば、角膜上皮細胞などを調製していた。ここで、角膜上皮細胞へ分化誘導する際には、iPS細胞のコロニーを形成させた後、KGF（Keratinocyte Growth Factor）等の成長因子を含む分化培地にて培養してSEAM細胞集団を形成し、そこから所望の画分を単離・培養して分化誘導していたが、得られる細胞集団における角膜上皮細胞の割合が高かったことからその他の上皮細胞については未だ不明な点が多かった。そこで、本発明者らは、結膜上皮細胞が優位となる分化誘導方法について鋭意検討した結果、前記方法においてSEAM細胞集団を形成させる際に、iPS細胞のコロニーをEGF（Epidermal Growth Factor）シグナル伝達活性化因子（以降、単に、EGFと記載することもある）の存在下で培養することにより、その中に、分化した結膜上皮細胞と結膜杯細胞に加えて、未分化状態の結膜上皮幹・前駆細胞が、主体として分化誘導できることを見出した。このように、同類の眼表面上皮細胞が誘導されるiPS細胞のコロニーに対してKGFを添加した系とEGFを添加した系で別途分化培養することにより、誘導される上皮細胞の種類が異なるのは本願発明者らが初めて見出したことである。

- [0018] 本発明は、結膜細胞の分化誘導方法を提供するものであって、多能性幹細胞からSEAM細胞集団 (self-formed ectodermal autonomous multi-zone細胞集団) を形成させる際に、得られた多能性幹細胞のコロニーを特定の培地で培養することに特徴を有する。具体的には、多能性幹細胞を自律的に分化させてコロニーを形成させた後、EGFシグナル伝達活性化因子を含む培地にて培養して分化誘導し、SEAM細胞集団を形成させる。これにより、得られたSEAM細胞集団においては、ITG β 4、SSEA-4及びCD200の抗体の発現程度を指標として、結膜上皮細胞、結膜杯細胞ならびに結膜上皮幹・前駆細胞を単離することができる。
- [0019] 本発明においては、先ず、多能性幹細胞からSEAM細胞集団用のコロニーを調製する。
- [0020] 本発明における多能性幹細胞とは、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のことである。具体的には、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細胞及び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細胞種に応じた細胞集団を取得することができる。
- [0021] SEAM細胞集団用のコロニーとは、多能性幹細胞を無血清培地でフィーダー細胞を用いることなく二次元培養することにより得られる、異なる外胚葉系細胞種で構成される同心円状の層からなるコロニーのことである。
- [0022] 具体的には、例えば、ヒトiPS細胞を、動物細胞の培養に用いることができる公知の培地 (例えば、DMEM培地、BME培地など) であって、無調整又は未精製の血清を含まない培地を使用して、二次元培養することにより得られる。そ

の際に、培養容器としては、二次元の細胞培養に使用されるものであれば特に限定されないが、容器の内表面はコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン又はラミニンフラグメント等でコーティングされていることが好ましい。なお、培養条件は特に限定されず、技術常識に従って適宜設定することができる。

[0023] このように培養して得られたSEAM細胞集団用のコロニーは、分化誘導剤や分化誘導促進剤等の外部からの刺激を受けることなく、細胞自らが自律的に分化して形成されたものであり、外胚葉系細胞種で構成される層状のコロニーを形成する。コロニーは、中心部から周辺部に向けて、各々異なる外胚葉系細胞種で構成される同心円状の層からなり、第1層（神経外胚葉系列細胞）、第2層（神経堤系列細胞／眼胚系列細胞）、第3層（眼表面外胚葉系列細胞）及び第4層（表面外胚葉系列細胞）を含む。なお、前記した調製方法としては、例えば、非特許文献1、2及び特許文献1に記載の方法を参照することができる。

[0024] 得られたコロニーは、各層に含まれる細胞種は異なる系列であるため、これを利用して、特定の層に含まれる細胞を分離して用いてもよく、コロニー全体をそのまま用いてもよい。

[0025] このように、本願明細書におけるSEAM細胞集団用のコロニーとしては、例えば、多能性幹細胞を、ラミニン511E8にてコーティングしたプレートに、100～700cells/cm²の密度で播種し、8～10日間、StemFit(登録商標)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)及び55μM 2-mercaptoethanol(Life Technologies)を含有させたGMEM培地(Life Technologies)〕にて4週間培養して自律的に分化誘導させて得られる細胞集団を挙げることができる。

[0026] 次に、得られたSEAM細胞集団用のコロニーを特定の分化培地にて培養する

。なお、ここで用いる培地のことを、結膜用分化培地と記載することもある。

[0027] 結膜用分化培地は、EGFシグナル伝達活性化因子を含む。EGFシグナル伝達活性化因子としては、EGFレセプターを介して作用する因子であれば特に限定されない。例えば、epidermal growth factor (EGF)、transforming growth factor α (TGF α)、amphi-regulin (AR)、cripto、vaccinia virus growth factor (VVGF)、heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF)、neuro differentiation factor/hereregulin (NDF/HRG) などが挙げられる。培地中の濃度は、通常、0.01~1000ng/mL、好ましくは0.1~100ng/mLである。

[0028] 結膜用分化培地は、EGFシグナル伝達活性化因子のほか、Rock阻害剤などを含む。基本培地は、自律的分化で使用した培地など、上皮細胞の培養に用いることのできる培地（無血清培地）であればいずれも用いることができる。なお、「Rock阻害剤」とは、Rhoキナーゼ（ROCK: Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase）を阻害する物質を意味し、例えば、N-(4-ピリジル)-4 β -[(R)-1-アミノエチル]シクロヘキサン-1 α -カルボキサミド（Y-27632）、Fasudil（HA1077）、(2S)-2-メチル-1-[(4-メチル-5-イソキノリニル)スルホニル]ヘキサヒドロ-1H-1,4-ジアゼピン（H-1152）、4 β -[(1R)-1-アミノエチル]-N-(4-ピリジル)ベンゼン-1 α -カルボキサミド（Wf-536）、N-(1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-4-イル)-4 β -[(R)-1-アミノエチル]シクロヘキサン-1 α -カルボキサミド（Y-30141）、N-(3-{[2-(4-アミノ-1,2,5-オキサジアゾール-3-イル)-1-エチル-1H-イミダゾ[4,5-c]ピリジン-6-イル]オキシ}フェニル)-4-{[2-(4-モルホリニル)エチル]-オキシ}ベンズアミド（GSK269962A）、N-(6-フルオロ-1H-インダゾール-5-イル)-6-メチル-2-オキソ-4-[4-(トリフルオロメチル)フェニル]-3,4-ジヒドロ-1H-ピリジン-5-カルボキサミド（GSK429286A）を利用できる。

[0029] 前記培地での培養は、36~38℃、好ましくは36.5~37.5℃で、1~25% O₂、1~15% CO₂の条件下で行われる。また、培養期間は少なくとも1~8週間、好ましくは2~6週間、より好ましくは3~5週間である。なお、培養容器などは

、自律的分化で使用したものと同様のものを使用することができる。

[0030] この培養により、眼表面上皮幹細胞が出現することになる。この眼表面上皮幹細胞を、ピペetting等により分離し、さらに結膜上皮用維持培地で培養する。

[0031] 結膜上皮用維持培地は、結膜上皮前駆細胞への分化誘導を促すために、結膜用分化培地に血清代替物を更に含むことができる。「血清代替物」としては、例えば、アルブミン（例えば、脂質リッチアルブミン）、トランスフェリン、脂肪酸、コラーゲン前駆体、微量元素（例えば亜鉛、セレン）、B27（登録商標）サプリメント、N2サプリメント等が挙げられる。培地中の濃度は、B27サプリメントの場合、0.01～10重量%、好ましくは0.5～4重量%である。

[0032] 前記培地での培養は、結膜用分化培地での培養と同様に行うことができ、36～38℃、好ましくは36.5～37.5℃で、1～25% O₂、1～15% CO₂の条件下で行われる。また、培養期間は少なくとも3日間～12週間、好ましくは1～8週間、より好ましくは2～6週間である。なお、培養容器などは、自律的分化で使用したものと同様のものを使用することができる。

[0033] また、結膜用分化培地や結膜上皮用維持培地には、前記以外に、細胞の維持増殖に必要な各種栄養源や分化誘導に必要な各成分が適宜含まれていてもよい。例えば、栄養源としては、グリセロール、グルコース、果糖、ショ糖、乳糖、ハチミツ、デンプン、デキストリン等の炭素源、また、脂肪酸、油脂、レシチン、アルコール類等の炭化水素類、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、塩化アンモニウム、尿素、硝酸ナトリウム等の窒素源、食塩、カリウム塩、リン酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等の無機塩類（例えば、リン酸一カリウム、リン酸二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、モリブデン酸ナトリウム、タングステン酸ナトリウム、硫酸マンガン）、各種ビタミン類、アミノ酸類等を含むことができる。これらの成分含有量は、技術常識に従って調整することができる。

- [0034] かくして、多能性幹細胞から、結膜細胞、即ち、結膜上皮細胞、結膜杯細胞ならびに結膜上皮幹・前駆細胞が優位なSEAM細胞集団を形成させることができる。
- [0035] 前記誘導方法において形成されたSEAM細胞集団からは、ITG β 4、SSEA-4及びCD200の抗体の発現程度を指標として、結膜上皮細胞、結膜杯細胞ならびに結膜上皮幹・前駆細胞を単離することができる。よって、本発明はまた、結膜上皮細胞、結膜杯細胞ならびに結膜上皮幹・前駆細胞の製造方法を提供する。
- [0036] 本発明の結膜上皮細胞、結膜杯細胞ならびに結膜上皮幹・前駆細胞の製造方法においては、本発明の誘導方法により、結膜上皮細胞、結膜杯細胞ならびに結膜上皮幹・前駆細胞が優位なSEAM細胞集団を形成させて、当該SEAM細胞集団から所望の細胞を単離する。
- [0037] 単離方法としては、前記マーカーの発現を指標としてSEAMから細胞を単離できれば特に限定されず、常法に従って各マーカーに特異的な抗体を用いて容易に実施できる。具体的には、例えば、抗体で標識された磁気ビーズ、抗体を固相化したカラム、蛍光標識された抗体を用いたセルソーター（FACS）による分離を用いて単離すればよい。抗体は、市販のものを利用してもよいし、常法にしたがい作製したものを利用してもよい。本発明においては、かかる単離方法において、前記マーカーの発現程度に応じて細胞を選択するので、以下に、当該選択方法の一例として、FACSによって選択する場合を例に挙げて説明する。
- [0038] 先ず、得られたSEAM細胞集団から、CD200による陰性選択を行う（図2の左）。次に、CD200陰性細胞について、ITG β 4、SSEA-4の発現を調べる（図2の右、横軸がSSEA-4、縦軸がITG β 4）。ここで、各マーカーについて発現の有無を判定するが、その発現程度に応じて、SSEA-4陰性／ITG β 4陽性細胞（P1画分）、SSEA-4弱陽性／ITG β 4陽性細胞（P2画分）、SSEA-4陽性／ITG β 4陽性細胞（P3画分）、SSEA-4陰性／ITG β 4陰性細胞（P4画分）、SSEA-4弱陽性／ITG β 4陰性細胞（P5画分）、SSEA-4陽性／ITG β 4陰性細胞（P6画分）に分

画する。本発明では、この中から、SSEA-4弱陽性／ITG β 4陰性細胞（P5画分）、SSEA-4陽性／ITG β 4陰性細胞（P6画分）の画分〔これらに含まれる細胞をまとめて、SSEA-4陽性～弱陽性／ITG β 4陰性細胞（P5・P6画分）と記載する〕とSSEA-4弱陽性／ITG β 4陽性細胞（P2画分）に含まれる細胞を選択して単離する。なお、弱陽性とは、正常細胞と比べて発現量がやや低いもののことを意味し、本発明においては、陽性と陰性の中間程度の発現量を示すものを含む。

- [0039] 選択したSSEA-4陽性～弱陽性／ITG β 4陰性細胞は、MUC5AC（結膜杯細胞マーカー）、K13（結膜上皮細胞マーカー）及びPAX6（眼細胞マーカー）を高発現しており、P5・6画分には結膜上皮細胞や結膜杯細胞が誘導されていると言える。
- [0040] また、SSEA-4弱陽性／ITG β 4陽性細胞は、p63（上皮系幹細胞マーカー）を高発現し、かつ、K13（結膜上皮細胞マーカー）及びPAX6（眼細胞マーカー）を中等度発現していることから、P2画分には結膜上皮幹・前駆細胞が誘導されていると言える。
- [0041] かくして単離された細胞は、そのまま公知の培養培地にて培養して用いることができ、例えば、前記した結膜用培地や結膜上皮用維持培地にて培養しても、その他の成長因子を含む培養培地にて培養してもよい。
- [0042] 得られた細胞は、種々の用途に用いることができる。具体的には、例えば、P5・6画分の細胞は既に分化した状態であるため、結膜上皮細胞及び結膜杯細胞の詳細な解析や至適培養条件の検討、薬剤スクリーニング試験など、基礎研究分野での適用が考えられる。また、P2画分の細胞は培養することにより結膜上皮細胞や結膜杯細胞に分化誘導することが可能となるため、移植用結膜上皮細胞シートの作製や結膜上皮組織の至適培養条件の検討に用いることができる。よって、本発明はまた、本発明の誘導方法により得られた結膜上皮幹・前駆細胞を培養する工程を含む結膜上皮細胞シートの製造方法を提供する。具体的な態様として、例えば、本発明の誘導方法により得られた結膜上皮幹・前駆細胞を培養する工程を含む移植用結膜上皮細胞シートの製造

方法を挙げることができる。得られた結膜上皮細胞シートは、結膜上皮の機能不全に関連する眼疾患（例えば、ムチン減少型ドライアイ）への適用が期待できる。なお、前記結膜上皮幹・前駆細胞を培養するための培地に添加される成長因子としては、特に制限されないが、少なくともKGFを含むことが好ましい。また、FGFR2b (Fibroblast Growth Factor Receptor 2b) 活性化因子（例えば、FGF10など）を添加してもよい。前記成長因子の培地中の濃度は、通常、0.1~1000ng/mL、好ましくは1~100ng/mLである。

[0043] また、本発明は、本発明の誘導方法により得られた結膜上皮細胞及び結膜杯細胞、あるいは本発明の誘導方法により得られた結膜上皮幹・前駆細胞を分化誘導して得られた結膜上皮細胞及び結膜杯細胞により構成される結膜上皮組織を用いて、スクリーニングする方法を提供する。具体的には、例えば、前記結膜上皮組織において、機能タンパクをコードする遺伝子の発現又は機能タンパクの活性を指標とし、発現の促進又は活性の促進をする物質を、結膜に関連する疾患を治療するための候補化合物として選択する態様が挙げられる。具体的には、例えば、被験物質を接触させた結膜上皮組織において、機能タンパクをコードする遺伝子の発現量又は機能タンパクの活性値を測定し、被験物質を接触させない対照細胞における発現量又は活性値より向上している場合に、被験物質が結膜に関連する疾患を治療するための候補化合物と選択することができる。

実施例

[0044] 以下、実施例によって本発明を詳述するが、これらの実施例は本発明の一例であり、本発明はこれらに限定されるものではない。なお、以降において、室温とは25℃を示す。

[0045] 実施例1 眼表面幹細胞の誘導

iPS細胞からの分化誘導には、self-formed ectodermal autonomous multi-zone (SEAM) 法を用いた (Hayashi et al. Nature. 2016 Mar 17;531(7594): 376-80., Hayashi et al., Nature Protocols, 2017, 12(4), 683-696, doi: 10.1038/nprot.2017.007)。

[0046] 具体的には、ラミニン511E8にてコーティングしたプレートに、ヒトiPS細胞株(201B7)を300~700cells/cm²の密度で播種し、8~10日間、StemFit(登録商標)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)及び55 μ M 2-mercaptoethanol(Life Technologies)を含有させたGMEM培地(Life Technologies)]にて4週間培養した。次いで、結膜用分化培地[CjDM; 10ng/mL EGF(R&D Systems)、10 μ M Y-27632(Wako)及び1% penicillin-streptomycin solutionを含有させたDM培地とCnt-20又はCnt-PR培地(EGF及びFGF2不含有、CellnTEC Advanced Cell Systems)の1:1(v/v)混合培地]にて4週間培養した後、結膜上皮用維持培地[CjEM; 2% B27 Supplement(Life Technologies)、1% penicillin-streptomycin solution、10ng/mL EGF、10 μ M Y-27632を含有させたDMEM/F-12(2:1(v/v))培地(Life Technologies)]に交換後さらに2~4週程度培養して分化誘導した。タイムスケジュールを図1に示す。

[0047] 実施例2 FACSによる目的細胞の抽出

実施例1で得られたSEAM細胞集団から、セルソーターSH800(SONY)にてソーティングしてCD200陰性細胞を抽出後、SSEA-4、ITG β 4にて展開し、図2に示す6つの画分に分画した。各画分の定義は、SSEA4-陰性/ITG β 4陽性細胞(P1画分)、SSEA-4弱陽性/ITG β 4陽性細胞(P2画分)、SSEA-4陽性/ITG β 4陽性細胞(P3画分)、SSEA-4陰性/ITG β 4陰性細胞(P4画分)、SSEA-4弱陽性/ITG β 4陰性細胞(P5画分)、SSEA-4陽性/ITG β 4陰性細胞(P6画分)の通りである。

[0048] 実施例3 遺伝子発現解析

実施例2で得られた6つの画分それぞれを、QIAzol Lysis Reagent(QIAGEN)を用いて回収し、RT-qPCRに供し、各種マーカー発現を評価した。結果を図3に示す。なお、図中、P4画分由来細胞(n=3)、その他の画分由来細胞(n=

5) の結果であり、エラーバーは標準誤差を示した。

[0049] 図3より、P2画分において、p63（上皮系幹細胞マーカー）が高発現、K13（結膜上皮細胞マーカー）及びPAX6（眼細胞マーカー）が中等度発現、K12（角膜上皮細胞マーカー）が低発現であり、結膜上皮幹・前駆細胞の表現系が確認された。また、P5・6画分において、MUC5AC（結膜杯細胞マーカー）、K13及びPAX6が高発現、p63が低発現であり、結膜杯細胞及び結膜上皮細胞の表現系が確認された。

[0050] 実施例4 免疫蛍光染色

実施例2で抽出されたP5・6画分由来細胞を、BD Cytofix/Cytoperm（登録商標）Kit（554714、BD Biosciences）にて固定、膜透過処理後、DMEM/F12培地に50,000cells/mLとなるよう懸濁し、200 μ L/カラムとして、サイトスピン（A78300003、Thermo Fisher Scientific）にてスライドに細胞標本を作製した。続いて、5%NST（5% Normal Donkey Serum, 0.3% Tritonを含むTBS；T903、TaKaRa Bio）でブロッキング（室温、1時間）後に、抗MUC5AC抗体（1：200；sc-21701、Santa Cruz Biotechnology）、抗K13抗体（1：200；ab16112、abcam）、抗K12抗体（1：200；sc-17098、Santa Cruz Biotechnology）、抗PAX6抗体（1：300；PRB-278P、COVANCE）を用いて1次抗体反応（4℃、overnight）を行った。TBSにて5分間、2回洗浄後、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 568またはAlexa Fluor 647で標識した2次抗体（1：200；Life Technologies）及びHoechst33342（1：100；H3570、Molecular Probes）で処理（室温、1時間）後、蛍光顕微鏡で観察した。結果を図4に示す。

[0051] また、P5・6画分由来細胞を、BD Cytofix/Cytoperm（登録商標）Kitにて固定、膜透過処理後、PAS染色キット（101646、Merck KGaA）を用いて染色し、倒立顕微鏡で観察した。結果を図4に示す。

[0052] 図4より、P5・6画分において、K13+、K12-かつPAX6+である結膜上皮細胞（図4b）、MUC5AC+かつPAX6+である結膜杯細胞（図4c）が確認された。また、PAS+細胞（図4d）も確認された。

[0053] 実施例5 ヒトiPS細胞由来結膜上皮幹・前駆細胞の培養

実施例2と同様にして得られたP2画分由来細胞を、ラミニン511E8フラグメント($0.5\mu\text{g}/\text{cm}^2$)でコーティングした細胞培養用インサート上で2~3週間培養した。培養には、KGF培地〔10ng/mL KGF(Wako)、 $10\mu\text{M}$ Y-27632及び2% B27 Supplement、及び1% penicillin-streptomycin solutionを含有させたDMEM/F-12〕またはEGF培地〔10ng/mL EGF、 $10\mu\text{M}$ Y-27632及び2% B27 Supplement、及び1% penicillin-streptomycin solutionを含有させたDMEM/F-12〕を使用した。

[0054] FACSにより抽出したP2画分(図5a)について、培養後の位相差顕微鏡写真ではどちらの培養条件でも細胞のシート化を確認できた(図5b)。

[0055] また、培養前後のP2画分由来細胞及び正常ヒト細胞における遺伝子発現解析を実施例3を参照にして行った結果、P2画分由来細胞をKGF培地で培養した場合においてのみ、培養前と比較してMUC5AC発現上昇が認められた。さらに、P2画分由来細胞は、K13高発現、PAX6中等度発現、K12低発現であり、正常ヒト結膜細胞と同等の表現系を示すことが確認された(図6)。なお、図中、P2画分由来培養前細胞(n=5)、P2画分由来培養後細胞(n=4)、正常ヒト細胞(n=1)の結果であり、エラーバーは標準誤差を示した。

[0056] 次に、細胞培養用インサート上で培養したP2画分由来細胞シートを回収後、平面標本用にメタノール(131-01826、Wako)にて固定(室温、20分)後、染色を行った。また、切片標本用にO.C.T.コンパウンド(4583、Tissue-Tek)中に包埋し、 -80°C にて保存後、クリオスタットにて $5\mu\text{m}$ の切片を作製し、室温で30分以上乾燥させた後、メタノールにて固定(室温、20分)後、染色を行った。染色は、5%NSTでブロッキング(室温、1時間)後に、抗MUC5AC抗体(1:200)、抗K13抗体(1:200)、抗K12抗体(1:200)、抗PAX6抗体(1:300)を用いて1次抗体反応(4°C 、overnight)を行った。TBSにて5分間、2回洗浄後、Alexa Fluor 488又はAlexa Fluor 568で標識した2次抗体(1:200)及びHoechst33342(1:100)で処理(室温、1時間)後、蛍光顕微鏡で観察した。

[0057] 平面標本の免疫蛍光染色では、KGF培地で培養した場合のみMUC5AC+細胞が確認された(図7)。また、切片標本の免疫蛍光染色では、KGF培地で培養し

た場合のみ、MUC5AC+、K13+、PAX6+かつK12-という結膜上皮細胞の表現系が確認された（図8）。

[0058] 実施例6 EGFシグナル伝達活性化因子の検討

実施例1において、結膜用分化培地におけるEGFを、transforming growth factor α (TGF α) 又はamphi-regulin (AR) に変更する以外は、実施例1と同様にして分化誘導を行なった。その後、実施例2と同様にしてP2画分由来細胞を抽出後、実施例5と同様にしてKGF培地で培養し、得られた細胞シートの染色を行なってMUC5ACの発現を確認した。

[0059] 結果、EGF以外のEGFシグナル伝達活性化因子を用いても、MUC5AC陽性細胞を含む結膜上皮細胞シートを作製できることが確認できた（図9）。

[0060] 実施例7 結膜上皮幹・前駆細胞の成長因子の検討

実施例5において、結膜上皮幹・前駆細胞の培養培地におけるKGFを、FGFR2b活性化因子（FGF10）に変更する以外は、実施例5と同様にして培養し、得られた細胞シートを実施例3と同様にしてRT-qPCRに供して、MUC5ACの発現量を評価した。

[0061] 結果、FGF10を用いても、MUC5ACを発現している結膜上皮細胞シートを作製できることが示された（図10）。

産業上の利用可能性

[0062] 本発明により、iPS細胞を含む多能性幹細胞から結膜上皮細胞、結膜杯細胞、結膜上皮幹・前駆細胞を誘導することができることから、結膜上皮細胞、結膜杯細胞の基礎研究、難治性眼表面疾患に対する再生治療や前記疾患に関連する研究などに極めて有用である。