

明 細 書

発明の名称：角膜内皮代替細胞を含有する治療用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、角膜内皮代替細胞を含有する治療用組成物、特に、移植用の治療用組成物に関する。

背景技術

[0002] 角膜内皮細胞の減少などの角膜内皮の損傷により、角膜内皮細胞の機能が損なわれ、角膜実質部に浮腫が生じる。これは角膜の透明性の低下を招き、視力を低下させる。このような状態は、水疱性角膜症と呼ばれている。一方で、ヒトの角膜内皮細胞は、一度障害を受けると再生する能力をほとんど持たないことが知られている。従って、なんらかの傷害により角膜内皮細胞が減少した場合、その治療は角膜移植が有効な、唯一の手段となる。実際、角膜移植適応例の約半数は角膜内皮機能不全による水疱性角膜症が占める。

[0003] 現在、角膜内皮損傷患者は、角膜の上皮、実質及び内皮の３層構造の全てを移植する全層角膜移植により処置されている。全層角膜移植は、確立された技術ではあるが、日本での角膜提供は不足しているのが現状であり、また、拒絶反応が問題となる。かかる問題点を解消するために、損傷を受けた組織のみを移植する「パーツ移植」が普及しつつある。角膜内皮を温存して、ドナーの上皮と実質のみを移植する深層層状角膜移植（Deep Lamellar Keratoplasty：DLKP）や内皮を含む一部の角膜だけを移植する角膜内皮移植等が知られている。しかしながら、例えば角膜内皮移植の場合、その移植材料の供給源となるのは依然として角膜内皮そのものであり、角膜の提供者が限られていることを鑑みれば、全層角膜移植同様、ドナー不足の問題点を克服することができない。さらに角膜内皮細胞は培養が難しく、移植に十分な数の培養細胞を調製することには時間的及び費用的な負担が大きい。

[0004] ドナー不足の問題点を解決する為に、角膜内皮細胞乃至角膜内皮細胞と同等の機能を有する角膜内皮細胞の代替となる細胞の創製が試みられている。

例えば、iPS細胞あるいはES細胞から角膜内皮細胞の代替となる細胞を誘導する方法が報告されている。iPS細胞あるいはES細胞から角膜内皮細胞（実際は、角膜内皮細胞に特異的な表面マーカー等が今のところ確立されていないため、角膜内皮細胞に近い性質の細胞、いわゆる角膜内皮様細胞（Corneal endothelial like cell））への誘導法・細胞培養法に関しては、非特許文献1に総説されている。また、本発明者らは、これまでに角膜内皮細胞と同等の機能を有する、角膜内皮細胞の代替となる細胞の製造方法を確立し（特許文献1～3）、当該方法によって得られた角膜内皮様細胞を「角膜内皮代替細胞」と命名している。iPS細胞由来角膜内皮代替細胞の水疱性角膜症に対する臨床研究も始まっている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：WO／2013／051722

特許文献2：WO／2016／093359

特許文献3：WO／2019／142833

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Hatou S, Shimmura S; Inflamm Regen. 2019;39:19.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 培養角膜内皮細胞又は角膜内皮代替細胞を実際の臨床で治療に用いるには、製造した細胞を安定に治療時まで保存する、かつ製造拠点から病院あるいは診療所へ輸送することなどが出来なければならない。しかし、細胞加工物の剤型や、保存・輸送の温度帯によって、細胞の生存率や品質は変動するため、安定な保存・輸送が可能となる剤型と温度帯の設定が重要である。また、治療にあたってできるだけユーザーフレンドリーな剤型が望ましい。

移植用の細胞の安定な保存・輸送を可能にする手段として細胞や細胞塊、あるいはその細胞加工物を凍結保存液に懸濁し凍結保存する方法が挙げられ

る。凍結保存液には、ジメチルスルホキシド（DMSO）等の凍結保護剤が含まれている。一般的に凍結保護剤の存在は細胞やそれを投与する生体に影響を与える。従って、治療のために細胞や細胞塊、あるいは細胞加工物を用いる際には、解凍後、凍結保護剤の洗浄／除去が必要となる。凍結保護剤の洗浄／除去工程の実施は、時間及びコスト的に望ましいものではなく、また、細胞へのダメージが大きい。

従って、本発明は、凍結保存可能で、解凍による細胞へのダメージがなく、さらに、解凍後の細胞に対し洗浄と遠心分離等の追加のプロセスを経ることなくそのまま患者に投与可能な治療用組成物、特に移植治療用組成物を提供することを目的とする。

角膜内皮代替細胞は、多能性幹細胞、特に人工多能性幹細胞を分化・誘導することによって調製される。しかしながら、全ての多能性幹細胞に対して目的とする角膜内皮代替細胞へと誘導することは難しく、一部に由来となる幹細胞や、角膜内皮代替細胞への分化・誘導途上にある未分化細胞が残存することがある。このような未分化細胞は、増殖活性を有し、角膜内皮代替細胞以外の細胞に分化し、また、生体内に移植された場合、奇形腫を形成する恐れがある。従って、本発明で用いる角膜内皮代替細胞を含有する細胞集団は、できるだけ未分化細胞の割合が低減されたものであることが好ましい。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題に鑑み、細胞、特に培養角膜内皮細胞又は角膜内皮代替細胞の安定な保存・輸送が可能となる剤型と温度帯を鋭意検討した結果、細胞を保存液に懸濁し凍結保存することによって安定に保存・輸送が可能なこと、さらに、得られる細胞含有組成物をフェノールフタレイン誘導体存在下で解凍、希釈することで移植に適した治療用組成物とし得ることを見出した。当該治療用組成物は、凍結保存液に含まれていた凍結保護剤を洗浄等で除去する必要がない。さらに凍結保存された細胞が、解凍後も角膜内皮機能を維持していることを確認して本発明を完成するに至った。

さらに、本発明者らは、幹細胞由来の角膜内皮代替細胞を含有する治療用

医薬組成物において、未分化細胞の割合（以下、未分化細胞残存率とも称する）を調べ、医薬上許容し得る未分化細胞残存率を見出した。

[0009] 即ち、本発明は、以下を提供する。

[1] CD24陽性表現型を有する角膜内皮代替細胞、及び所望によりフェノールフタレイン誘導体をさらに含む、治療用組成物。

[2] さらに、凍結保護剤を含む、上記[1]記載の組成物。

[3] 凍結保護剤が、ジメチルスルホキシド（DMSO）である、上記[2]記載の組成物。

[4] 組成物中のDMSO濃度が1～10%である、上記[3]記載の組成物。

[5] フェノールフタレイン誘導体が、フェノールスルホンフタレイン（フェノールレッド）、フェノールフタレイン、プロモフェノールブルー、イソバレルルフェノールフタレイン、アセチルフェノールフタレイン、フェノールフタレインジブチレート、フェノールフタレインジホスフェート、フェノールフタレインジスルフェート、フェノールフタレイングルクロン酸、フェノールフタレインモノ-β-グルコシドウロン酸、フェノールフタレインモノ-β-グルクロン酸、フェノールフタレインモノ-ホスフェート、およびクレゾールレッドからなる群より選択される、上記[1]～[4]のいずれかに記載の組成物。

[6] フェノールフタレイン誘導体が、フェノールレッドである、上記[1]～[4]のいずれかに記載の組成物。

[7] 組成物中のフェノールレッド濃度が1～20mg/Lである、上記[6]記載の組成物。

[8] 組成物中の細胞の濃度が $0.5 \sim 1.0 \times 10^6$ 細胞/mLである、上記[1]～[7]のいずれかに記載の組成物。

[9] 細胞のスフェロイド懸濁液の剤形である、上記[1]～[8]のいずれかに記載の組成物。

[10] 組成物中に含まれる細胞集団が、面積相当径が30μm以上のスフ

ェロイドを含み、当該スフェロイドのうち50%以上が面積相当径30～90 μm である、上記〔9〕記載の組成物。

[0010] 〔11〕角膜内皮代替細胞が幹細胞由来である、上記〔1〕～〔10〕のいずれかに記載の組成物。

〔12〕幹細胞が多能性幹細胞である、上記〔11〕記載の組成物。

〔13〕多能性幹細胞がiPS細胞（遺伝子編集あるいは遺伝子導入により追加機能を付与した細胞を含む）由来である、上記〔12〕記載の組成物。

〔14〕ヒト角膜内皮細胞または培養内皮細胞よりもB2M発現量が低い上記〔13〕記載の組成物。

〔15〕移植用である、上記〔1〕～〔14〕のいずれかに記載の組成物。

〔16〕前房内への移植用である、上記〔15〕記載の組成物。

〔17〕角膜内皮の移植が必要な疾患の治療用である、上記〔16〕記載の組成物。

〔18〕該疾患が、水疱性角膜症、円錐角膜、角膜炎、角膜の化学熱傷、角膜実質ジストロフィー、角膜浮腫及び角膜白斑からなる群より選択される1種である、上記〔17〕記載の組成物。

〔19〕角膜内皮の移植が必要な疾患の治療用組成物を製造する為の、CD24陽性表現型を有する角膜内皮代替細胞の使用。

〔20〕該治療用組成物が、所望によりフェノールフタレイン誘導体を含む、上記〔19〕記載の使用。

[0011] 〔21〕該治療用組成物が、さらに凍結保護剤を含む、上記〔19〕又は〔20〕に記載の使用。

〔22〕該疾患が、水疱性角膜症、円錐角膜、角膜炎、角膜の化学熱傷、角膜実質ジストロフィー、角膜浮腫及び角膜白斑からなる群より選択される1種である、上記〔19〕～〔21〕のいずれかに記載の使用。

〔23〕角膜内皮の移植が必要な疾患の治療に使用する為の、CD24陽性表現型を有する角膜内皮代替細胞を含む治療用組成物。

〔24〕所望によりフェノールフタレイン誘導体を含む、上記〔23〕記載

の組成物。

〔25〕さらに凍結保護剤を含む、上記〔23〕又は〔24〕に記載の組成物。

〔26〕該疾患が、水疱性角膜症、円錐角膜、角膜炎、角膜の化学熱傷、角膜実質ジストロフィー、角膜浮腫及び角膜白斑からなる群より選択される1種である、上記〔23〕～〔25〕のいずれかに記載の組成物。

〔27〕CD24陽性表現型を有する角膜内皮代替細胞を含む治療用組成物の有効量を、それを必要とする患者の前房内へ移植することを含む、角膜内皮の移植が必要な疾患の治療方法。

〔28〕該治療用組成物が、所望によりフェノールフタレイン誘導体を含む、上記〔27〕記載の治療方法。

〔29〕該治療用組成物が、さらに凍結保護剤を含む、上記〔27〕記載の治療方法。

〔30〕該疾患が、水疱性角膜症、円錐角膜、角膜炎、角膜の化学熱傷、角膜実質ジストロフィー、角膜浮腫及び角膜白斑からなる群より選択される1種である、上記〔27〕～〔29〕のいずれかに記載の治療方法。

〔31〕凍結保護剤の存在下、 -20°C 以下で凍結された角膜内皮代替細胞の細胞懸濁液あるいは細胞スフェロイド懸濁液にフェノールフタレイン誘導体を含む移植用基材を添加することを含む、治療用組成物の製造方法。

〔32〕該角膜内皮代替細胞がCD24陽性表現型を有する、上記〔31〕記載の方法。

〔33〕幹細胞由来の角膜内皮代替細胞を含有する治療用組成物であって、未分化細胞残存率が1%未満であることを特徴とする組成物。

〔34〕該角膜内皮代替細胞がCD24陽性表現型を有する、上記〔33〕記載の組成物。

〔35〕未分化細胞残存率が0.1%以下である、上記〔33〕又は〔34〕に記載の組成物。

〔36〕幹細胞が多能性幹細胞である、上記〔33〕～〔35〕のいずれか

に記載の組成物。

〔37〕多能性幹細胞がiPS細胞（遺伝子編集あるいは遺伝子導入により追加機能を付与した細胞を含む）由来である、上記〔36〕記載の組成物。

〔38〕ヒト角膜内皮細胞または培養内皮細胞よりもB2M発現量が低い上記〔33〕～〔37〕のいずれかに記載の組成物。

〔39〕未分化細胞残存率が未分化細胞マーカーの発現プロファイルによって評価される、上記〔33〕～〔38〕のいずれかに記載の組成物。

〔40〕移植用である、上記〔33〕～〔39〕のいずれかに記載の組成物。

〔41〕前房内への移植用である、上記〔40〕記載の組成物。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、凍結保存可能で、解凍による細胞へのダメージがなく、さらに、解凍後の細胞に対し洗浄や遠心分離等の追加のプロセスを経ることなくそのまま患者に投与可能な治療用組成物、特に移植治療用組成物の提供が可能になる。本発明の治療用組成物は、全世界に、角膜移植適応症例の約50%を占めているという水疱性角膜症における角膜内皮代替細胞の移植に有用である。

本発明によれば、治療用組成物、特に移植用組成物においてその未分化細胞残存率を確認することで副作用のない移植が可能になる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]角膜内皮代替細胞を冷蔵保管した場合と冷凍保管した場合の細胞の状態を比較した結果を示す図である。冷凍保管の方が、細胞塊を長期間維持できることがわかった。

[図2]本発明の治療用組成物において、解凍後の角膜内皮代替細胞の境界にタイトジャンクションが形成されることを示した図である。細胞境界にZO-1の発現が見られた。

[図3]未分化細胞残存率について検討した結果を示す図である。

[図4]未分化細胞スパイク率の奇形腫形成に及ぼす影響を調べた図である。奇

形種形成には 1 % 以上のスパイク率を要し、スパイク率 0. 1 %、0. 0 1 % では奇形腫形成は確認されなかった。

[図5]未分化 i P S 細胞スパイク試験による生存曲線 (K a p l a n - M e i e r 曲線) を表すグラフである。

[図6]未分化細胞残存率 0. 1 % 以下の角膜内皮代替細胞をヌードラット前房内に移植し、経過観察した結果を表す図である。最長 2 6 週まで経過観察したが、造腫瘍性は認めなかった。

[図7]スフェロイド化した角膜内皮代替細胞のサイズを検証した結果を示すグラフである。

[図8]凍結保護剤の濃度違いによる C E C S i 細胞の顕微鏡観察像である。

[図9]凍結保護剤の濃度違いによる C E C S i 細胞の抗 Z O - 1 抗体の染色像である。

[図10]ヒト角膜内皮細胞、i P S 細胞 (F f - I O 1 s O 4) 及び C E C S i 細胞における b e t a - 2 m i c r o g l o b u l i n (B 2 M) の発現量を比較した結果を示すグラフである。

[図11]C E C S i 細胞スフェロイド懸濁液の顕微鏡写真を示す図である (左 ; フェノールレッドなし、右 ; フェノールレッド有り)。

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明を説明する。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を有する。

[0015] 1. 治療用組成物

本発明は、培養角膜内皮細胞又は角膜内皮代替細胞、及びフェノールフタレイン誘導体を含有する治療用組成物、特に移植治療用組成物を提供する。好ましくは角膜内皮代替細胞及びフェノールフタレイン誘導体を含有する治療用組成物、好ましくは移植治療用組成物である。本発明は、また、幹細胞由来の角膜内皮代替細胞を含有する治療用組成物であって、未分化細胞残存率が 1 % 未満であることを特徴とする組成物を提供する。本明細書中、これらを総称して本発明の治療用組成物と略記する場合がある。当該治療用組成

物は、角膜内皮代替細胞あるいは培養角膜内皮細胞を眼内に移植、特に前房内に移植するのに好適に用いられる。

[0016] (細胞)

本発明の治療用組成物には、培養角膜内皮細胞又は角膜内皮代替細胞、好ましくは角膜内皮代替細胞、より好ましくは i P S 細胞由来の角膜内皮代替細胞が用いられる。

[0017] 培養角膜内皮細胞としては、初代培養細胞であっても株化細胞であってもよいが、角膜内皮細胞は初代培養が難しいことから、株化細胞を用いることが好ましい。

[0018] 本発明において、角膜内皮代替細胞は、i P S 細胞や E S 細胞、あるいはそれらに遺伝子編集あるいは遺伝子導入により追加機能を付与した細胞、等の幹細胞から誘導される、角膜内皮機能不全を治療可能な、角膜内皮細胞の代替となり得る細胞である。即ち、角膜内皮代替細胞は角膜内皮細胞と同等の生理機能を有する。

幹細胞は、インビトロにおいて培養することが可能で、かつ、生体を構成する複数系列の細胞に分化し得る細胞をいい、具体的には胚性幹細胞 (E S 細胞)、胎児の始原生殖細胞由来の多能性幹細胞 (E G 細胞)、精巢由来の多能性幹細胞 (G S 細胞)、体細胞由来人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells; i P S 細胞)、ヒトの体性幹細胞 (組織幹細胞) が挙げられる。i P S 細胞としては、任意の温血動物、好ましくは哺乳動物に由来する細胞を使用できる。哺乳動物としては、例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ウマ、ヤギ、サル、ヒト等が挙げられる。好ましくはヒトに由来するものが使用できる。

[0019] 具体的には、i P S 細胞としては、例えば、皮膚細胞等の体細胞に複数の遺伝子を導入して得られる、E S 細胞同様の多分化能を獲得した細胞が挙げられ、例えば Oct3/4 遺伝子、Klf4 遺伝子、C-Myc 遺伝子及び Sox2 遺伝子を導入することによって得られる i P S 細胞、Oct3/4 遺伝子、Klf4 遺伝子及び Sox2

遺伝子を導入することによって得られる i P S 細胞 (Nat Biotechnol 2008; 26: 101-106) 等が挙げられる。他にも、導入遺伝子をさらに減らした方法 (Nature, 2008 Jul 31;454(7204):646-50)、低分子化合物を利用した方法 (Cell Stem Cell, 2009 Jan 9;4(1):16-9、Cell Stem Cell, 2009 Nov 6;5(5):491-503)、遺伝子の代わりに転写因子タンパク質を利用した方法 (Cell Stem Cell, 2009 May 8;4(5):381-4) など、i P S 細胞の作成法については技術的な改良が鋭意行なわれているが、作製された i P S 細胞の基本的な性質、すなわち多分化能を有するという点は作出方法によらず同等であり、いずれも本発明で用いる角膜内皮代替細胞の由来となり得る。

[0020] 具体的には、i P S 細胞としては、201B7、201B7-Ff、253G1、253G4、1201C1、1205D1、1210B2、836B3、FF-I14s03、FF-I01s04、MH09s01、Ff-XT18s02、Ff-WIs03、Ff-WJs513、Ff-CLs14、Ff-KVs09、QHJI14s03、QHJI01s04、RWMH09s01、DRXT18s02、RJWIs03、YZWJs513、ILCLs14、GLKVs09、Ff-XT28s05-ABo_To、Ff-I01s04-ABII-K0、Ff-I14s04-ABII-K0 (いずれも i P S アカデミア ジャパン社、又は京都大学 i P S 研究財団)、Tic(JCRB1331株)、Dotcom (JCRB1327株)、Squeaky(JCRB1329株)、及びToe (JCRB1338株)、Lollipop (JCRB1336株) (以上成育医療センター、医薬基盤研究所難病・疾患資源研究部・J C R B 細胞バンク)、UTA-1株及びUTA-1-SF-2-2株 (いずれも東京大学)、21526、21528、21530、21531、31536、31538株 (いずれもフジフイルム・セルラー・ダイナミクス社) 等を用いることができる。

[0021] 本発明の治療用組成物に含められる角膜内皮代替細胞は、例えば本発明者らによって開発された角膜内皮様の細胞 (特許文献 1 ~ 3) であり、特許文献 1 ~ 3 に記載の方法によって製造、調製することができる。好ましくは、角膜内皮細胞様の性状及び機能を有し、且つ、NR3C2 (nuclear receptor sub family 3, group C, member 2) の遺伝子発現量が増強されていることを特徴とする、i P S 細胞 (遺伝子編集あるいは遺伝子導入により追加機能を付与した細胞を含む) 由来の角膜内皮代替細胞 (Corneal Endothelial Cell Substitute from iPS cells; CECSi細胞) である (特許文献 3)。

[0022] 角膜内皮代替細胞が有する角膜内皮細胞様の性状及び機能としては、具体的には以下の特徴 (i) ~ (iv) が挙げられ、角膜内皮代替細胞はこれらの特徴のうち少なくとも1つ、好ましくは2つ、より好ましくは3つ、いっそう好ましくは4つ全ての特徴を有する。

(i)細胞間接着がN-Cadherinで構成されている。

(ii)細胞間にタイトジャンクション (tight junction) が形成されている。

(iii)細胞膜上にNa, K-ATPase $\alpha 1$ subunitを発現する。

(iv)細胞核に転写因子PITX2の発現が観察される。

細胞間接着がN-Cadherinで構成されているか否かは、N-Cadherinに対する免疫染色で確認することができる。

細胞間にtight junctionが形成されているか否かは、tight junctionを構成するタンパク質であるZO-1の存在を、ZO-1に対する免疫染色で観察することにより確認することができる。また、電子顕微鏡により直接構造を観察することによって確認することもできる。

細胞膜上にNa, K-ATPase $\alpha 1$ subunit (ATP1A1) を発現しているか否かは、ZO-1とNa, K-ATPase $\alpha 1$ subunitに対する免疫染色により、両者が共染色されることで確認することができる。

細胞核に転写因子PITX2が発現しているか否かは、PITX2に対する免疫染色で確認することができる。

[0023] 本発明の一実施態様として、本発明の治療用組成物に含められる角膜内皮代替細胞は、CD24陽性表現型を有することを特徴とする。CD24は、高度にグリコシル化された小さなムチン様グリコシルホスファチジルイノシトール (glycosylphosphatidyl-inositol、GPI) 結合細胞表面タンパク質である。CD24は、B細胞、T細胞、好中球、好酸球、樹状細胞、及びマクロファージなどの造血細胞、並びに神経細胞、神経節細胞、上皮細胞、ケラチノサイト、筋肉細胞、腺細胞、及び上皮幹細胞などの非造血細胞において高レベルで発現している。近年、CD24にマクロファージの食作用を回避する機能があることが報告されている。従って、CD24陽性表現型を有

する角膜内皮代替細胞を含む本発明の治療用組成物は、移植の際の拒絶反応の低減が期待できる。一方で、ヒト角膜内皮細胞はCD24陰性であることが報告されている（特表2019-510509号公報、特開2020-073602号公報）。

CD24陽性表現型の有無は、細胞表面上に発現するCD24抗原に対する免疫染色で確認することができる。

[0024] 各免疫染色は当分野で通常実施されており、また、用いる試薬や機器等は商業的に入手可能であるか、既報に従って調製することができる。

[0025] 治療用組成物中の培養角膜内皮細胞又は角膜内皮代替細胞はスフェロイドであることが好ましい。本明細書において「スフェロイド」とは、数十個乃至数百個の細胞が凝集した細胞の塊であって、一般的に球状を呈する。ここで「球状」とは、完全に球形である場合に加え、卵形やラグビーボール状といった略球形の形状であることを含む。

該スフェロイドは、例えば、直径または面積相当径が10～200 μ mの範囲であることが好ましく、より好ましくは30～150 μ mの範囲であり、特に好ましくは30～100 μ mの範囲であり、いっそう好ましくは30～90 μ mの範囲であり、さらにいっそう好ましくは40～80 μ mの範囲である。スフェロイドが大きすぎても生着にムラが生じて一様に生着せず、小さすぎても沈着しにくく生着効率が低減するが、スフェロイドの大きさがこの範囲であれば、移植部において細胞が効率的に生着する。「面積相当径」とは、粒子（本願の場合スフェロイド）の投影面積と等しい円の直径を意味し、ハイウッド径又は円相当径とも称される。すなわち、略球形の形状のスフェロイドの投影面積と等しい面積を有する円の直径である。

[0026] 本発明の治療用組成物は、培養角膜内皮細胞又は角膜内皮代替細胞の細胞懸濁液、好ましくはスフェロイド懸濁液の剤形として提供される。

治療用組成物中の培養角膜内皮細胞又は角膜内皮代替細胞の濃度は、通常、0.5～1.0 $\times 10^6$ 細胞/mL、好ましくは、1.0～5 $\times 10^6$ 細胞/mLである。細胞濃度が高すぎても低すぎても細胞の移植部における生着効

率が低減する。

細胞濃度の決定は、本発明の治療用組成物の剤形が細胞懸濁液の場合は細胞懸濁液の一部をサンプリングし、当該サンプル中の細胞数を計測し；剤形がスフェロイド懸濁液の場合はスフェロイド懸濁液の一部をサンプリングし、当該サンプル中のスフェロイドを酵素処理して細胞を1個ずつばらばらにして細胞数を計測し、その結果を用いて行う。

剤形がスフェロイド懸濁液の場合、本発明の治療用組成物中に含まれる細胞集団は、面積相当径が $30\mu\text{m}$ 以上のスフェロイドを含む。スフェロイド懸濁液において含まれるスフェロイドのうち50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上が、直径または面積相当径の中央値 $\pm 30\mu\text{m}$ の範囲に含まれる。一スフェロイドの直径または面積相当径のバラつきが少ない方が、効率的かつ均一に生着面を覆うことができる。実施態様として、スフェロイドの50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上は直径または面積相当径 $30\sim 90\mu\text{m}$ の大きさである。

[0027] 本発明の角膜内皮代替細胞を含む治療用組成物は、由来となる幹細胞、例えばiPS細胞や、角膜内皮代替細胞への分化・誘導途上にある細胞等（以下、未分化細胞とも称する）を含み得る。未分化細胞の割合が大きい程、生体に移植した際に奇形腫形成等の副作用が生じやすくなる。本発明の角膜内皮代替細胞を含む治療用組成物は、好ましくは未分化細胞残存率が1%未満、より好ましくは0.1%以下、いっそう好ましくは0.01%以下である。未分化細胞残存率を1%未満に抑えることで、生体に移植した際の奇形腫形成や腫瘍形成を抑制することができる。

[0028] ここで、「未分化細胞残存率」は、本発明の治療用組成物に含まれる細胞全体における未分化細胞の割合を意味する。未分化細胞率が0%の場合には、本発明の治療用組成物中の細胞の全部が角膜内皮代替細胞であり、未分化細胞率が100%の場合には、本発明の治療用組成物中の細胞の全部が未分化細胞であることを意味する。未分化細胞残存率が1%未満、0.1%以下

、0.01%以下の場合は、それぞれ本発明の治療用組成物中の全細胞の1%未満、0.1%以下、0.01%以下が未分化細胞であることを意味する。本発明の治療用組成物中の全細胞数が 1×10^4 細胞の場合、未分化細胞残存率が1%未満、0.1%以下、0.01%以下の場合は、それぞれ100個未満、10個以下、1個以下の細胞が未分化細胞であり得ることを意味する。

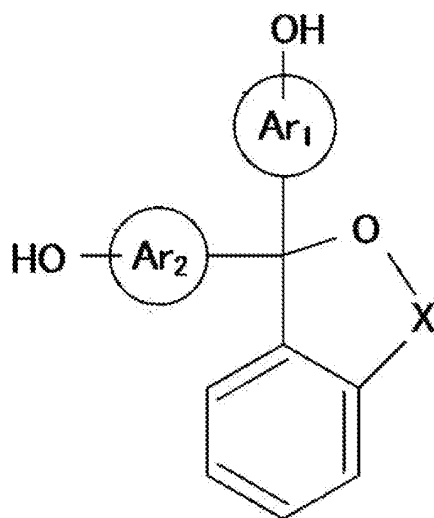
[0029] 未分化細胞残存率の測定は、特に限定されるものではないが、例えば未分化細胞に特異的な細胞マーカー（以下、「未分化細胞マーカー」とも称する）の発現プロファイルを評価することによって行うことができる。本明細書において未分化細胞マーカーとは、由来となった幹細胞に特異的に発現している遺伝子又はタンパク質であり、転写因子のNANOG、OCT4、及びSOX2、表面抗原のSSEA4、TRA-1-60、及びTRA-1-81等が挙げられる。好ましくはOCT4発現を評価することによって実施される（Stem Cell Research 55 (2021) 102497）。OCT4は、多能性を有する細胞のマーカーとして使用される因子で、ES細胞やiPS細胞はこの遺伝子を発現しているが、皮膚の細胞や心臓の細胞など、多能性のない細胞はOCT4を発現していない。具体的には実施例に記載の方法によって評価することができるが、組成物に対しOCT4の定量的PCRを実施し、ヒト角膜内皮細胞の樹立株であるB4G12細胞におけるOCT4発現量の4.0倍以下である場合が「未分化細胞残存率0.1%以下」に相当する。他の未分化細胞マーカーについても同様にあらかじめ発現量と未分化細胞残存率との相関性を確認することによって、本発明の角膜内皮代替細胞を含有する治療用組成物が移植に適したものであるか否かを知ることができる。

[0030] （フェノールフタレイン誘導体）

本発明の治療用組成物は、上記細胞に加え、フェノールフタレイン誘導体を含むことを特徴とする。フェノールフタレイン誘導体は、下記式で表される基本骨格を有すれば所望の効果が得られる限り特に限定されない。

[0031]

[化1]



[0032] 式中、 $-X-$ は $-SO_2-$ 又は $-CO-$ であり、環 Ar_1 及び環 Ar_2 は同一又は異なって、1～3個の置換基（例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル等の炭素数1～3の分岐鎖を有してもよいアルキル基；酸素原子、塩素原子等のハロゲン原子；アセチル、イソバレリル等のアシル基）を有していてもよい炭素数6又は12の芳香環（例、ベンゼン、ナフタレン）である。

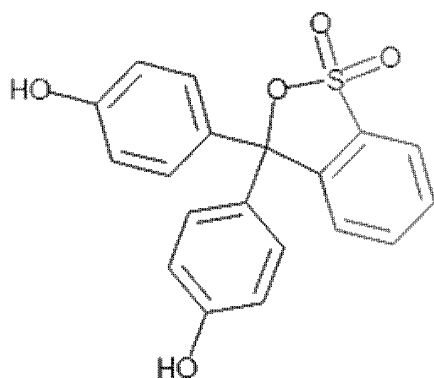
好ましくは $-X-$ は $-SO_2-$ である。環 Ar_1 及び環 Ar_2 は同一又は異なって、1～3個、好ましくは1又は2個の置換基（例、メチル、イソプロピル、酸素原子）を有していてもよいベンゼンである。

当該フェノールフタレイン誘導体は、その塩又はそのエステルであってもよい。あるいは酸付加物であってもよい。

[0033] フェノールフタレイン誘導体としては、例えばフェノールスルホンフタレイン（フェノールレッド）、フェノールフタレイン、ブロモフェノールブルー、イソバレリルフェノールフタレイン、アセチルフェノールフタレイン、フェノールフタレインジブチレート、フェノールフタレインジホスフェート、フェノールフタレインジスルフェート、フェノールフタレイングルクロン酸、フェノールフタレインモノ- β -グルコシドウロン酸、フェノールフタレインモノ- β -グルクロン酸、フェノールフタレインモノ-ホスフェート

、クレゾールレッドが挙げられる。フェノールフタレイン誘導体は自体既知の方法によって製造することができる。フェノールフタレイン誘導体はフタル酸と該当する各種フェノール類で合成が可能であることは公知であり、使用するフェノール類がフェノールであればフェノールフタレインが合成できる。また、各種フェノールフタレイン誘導体は商業的に入手可能である。簡便性及び品質の安定性の観点から商業的に入手したものをを用いることが好ましい。フェノールフタレイン誘導体として好ましくは、下記構造のフェノールレッド（フェノールスルホンフタレインともいう）である。フェノールレッドは通常、pH指示薬として培地に含められるが、細胞培養という観点からは任意の添加成分であり、フェノールレッドフリーの培地も市販されている。本発明の治療用組成物に含まれるフェノールレッドの濃度は、通常1～20mg/L、好ましくは1～15mg/L、より好ましくは5～10mg/Lである。フェノールレッド以外のフェノールフタレイン誘導体の濃度も通常1～20mg/L、好ましくは1～15mg/L、より好ましくは5～10mg/Lである。

[0034] [化2]



[0035] フェノールフタレイン誘導体が有する「所望の効果」とは、移植後の細胞の生着を促進する効果である。

[0036] 本発明の治療用組成物の投与対象としては、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ウマ、ヒツジ、サル、ヒト等の哺乳動物が挙げられるが、好ましくはヒトである。

本発明の治療用組成物の投与量としては、投与対象の体重や年齢、症状などにより一概に規定されるものではないが、例えば体重25～300Kg、年齢16～100歳、症状が水疱性角膜症であるヒトであれば一眼あたり50～200 μ L、が前房内に注射で投与される。本発明の、凍結保護剤、移植用基材および細胞又は細胞スフェロイドを含む治療用組成物の前房内注射において、眼圧の上昇や著しい炎症などの副作用は生じず、安全である。

[0037] 本発明の治療用組成物は角膜内皮の移植が必要な疾患の治療用として好適に用いることができる。該疾患としては、水疱性角膜症、円錐角膜、角膜炎、角膜の化学熱傷、角膜実質ジストロフィー、角膜浮腫、角膜白斑等が挙げられるがこれらに限定されるものではない。

本発明は、また、治療用組成物の有効量を、それを必要とする患者の前房内へ移植することを含む、角膜内皮の移植が必要な疾患の治療方法を提供し得る。ここで、適応疾患、投与量としては、上述のものが挙げられる。

[0038] 2. 治療用組成物の製造方法

本発明の治療用組成物は、例えば、上記した培養角膜内皮細胞又は角膜内皮代替細胞、好ましくは角膜内皮代替細胞、より好ましくはCEC*Si*細胞を、スフェロイド化した後、凍結保存液に懸濁し凍結し、一定期間保存した後、フェノールフタレイン誘導体存在下で解凍、希釈することで調製することができる。

細胞をスフェロイド化する方法としては、ハンギングドロップ法、旋回培養法、低付着性培養容器による培養等が知られている。低付着性培養容器による培養法は、操作が簡便なことから好ましく用いられる方法である。通常の培養容器で増殖した付着性の細胞は、低付着性の容器で培養すると、細胞自身を持つ性質により、細胞同士が付着してスフェロイドを形成する。例えば、EZSphere（登録商標、AGCテクノグラス）、ウェルバッグ（東洋製罐）などの容器内で浮遊培養することにより細胞をスフェロイド化することができる。スフェロイド化には好ましくはスフェロイド形成培地を使用する。スフェロイド形成培地としては、例えば実施例に記載される培地が挙げられるが、

それに限定されない。スフェロイド形成培地にはフェノールフタレイン誘導体を含まないことにより、より多くのスフェロイドが形成しやすい。

本発明において、細胞又はスフェロイド化した細胞を凍結する方法及び保存する方法は特に限定されず、細胞の凍結保存で通常実施される方法で行うことができる。好ましくは -70°C 以下、より好ましくは -80°C 以下で凍結し、保存する。保存期間は特に限定されないが、通常、数週間～半年、好ましくは2週間～6か月、より好ましくは4か月の保存期間が挙げられ、解凍後の生存率を損なうことなく保存することができる。

[0039] 細胞の凍結保存とは、継代培養することなしに細胞を長期間維持する目的で細胞を凍結保存させることをいう。細胞をそのまま凍結させると細胞内に含まれる水分のために氷晶が発生し、成長した氷晶が細胞膜を破壊する、いわゆる凍害が起こることが知られている。そのため、凍結保存の際に用いられる凍結保存液には、凍害防止の目的で凍結保護剤が含まれる。従って、本発明の治療用組成物は、細胞及びフェノールフタレイン誘導体に加え、凍結保護剤を含有し得る。

[0040] 凍結保護剤としては、凍害防止の目的が達成される限り特に限定されないが、例えば、細胞浸透性の凍結保護剤や細胞非浸透性の凍結保護剤などが挙げられる。例えば、ジメチルスルホキシド（DMSO）、エチレングリコール、カルボキシル化ポリリジン、グリセロール、プロピレングリコール、セリシン、プロパンジオール、デキストラン、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ヒドロキシエチルデンプン、コンドロイチン硫酸、ポリエチレングリコール、ホルムアミド、アセトアミド、アドニトール、ペルセイトール、ラフィノース、ラクトース、トレハロース、スクロース、マンニトールなどが挙げられる。凍結保護剤は、単独で用いても、2種または3種以上を組み合わせ用いてもよい。好ましくは汎用されているDMSOである。

[0041] 凍結保存液は、凍結保護剤を溶解および／または希釈し、細胞の生存を維持するための媒体を含んでもよい。媒体としては、上記の機能を有するもの

であれば特に限定されず、生理食塩水、種々の生理緩衝液（例えば、PBS、HBSS等）、種々の細胞培養用の基礎培地をベースにしたものなどを使用してもよい。基礎培地としては、例えば、MEM培地、BME培地、BGJb培地、CMRL 1066培地、Glasgow MEM培地、Improved MEM Zinc Option培地、IMDM培地、Medium 199培地、Eagle MEM培地、 α MEM培地、DMEM培地、ハム培地（例、F10、F12）、RPMI 1640培地、Fischer's培地、及びこれらの混合培地等、動物細胞の培養に用いることができる培地であれば特に限定されない。これらの培地は、商業的に入手可能である。さらにこれらの培地は、血清含有培地、無血清培地であり得る。好ましくは無血清培地である。本発明で用いられる培地が血清含有培地である場合には、ウシ血清（Bovine Serum）、ウシ胎児血清（Fetal Bovine Serum）などの哺乳動物の血清が使用でき、該血清の培地中の濃度は0.1～20%（v/v）、好ましくは1～10%（v/v）である。

[0042] 凍結保存液への凍結保護剤の添加濃度、または、凍結保存液中の凍結保護剤の濃度は、凍結・解凍操作により細胞の品質を過度に劣化させない濃度であれば特に限定されず、典型的には、例えば、凍結保存液全体に対して、約1%～約60%（v/v）、約2%～約50%（v/v）、約5%～約40%（v/v）、約5%～約20%（v/v）、約10%～約20%（v/v）などとすることができる。凍結保護剤がDMSOの場合は、例えば凍結保存液においては10～20%で含められる。

[0043] あらかじめ凍結保護剤が含まれている、凍結保存液として市販されているもの（例、セルバンカー（登録商標）、バンバンカー（登録商標））も好適に用いることができる。

[0044] かくして凍結された、培養角膜内皮細胞又は角膜内皮代替細胞（好ましくは角膜内皮代替細胞、より好ましくはCEC*Si*細胞）及び凍結保護剤を含む凍結保存液を含む、凍結された組成物を、本発明の「細胞含有組成物」と称する。細胞含有組成物をフェノールフタレイン誘導体存在下で解凍、希釈することで本発明の治療用組成物を調製することができる。

[0045] 凍結保存されている細胞含有組成物を、フェノールフタレイン誘導体存在下で解凍、希釈する工程は、具体的には、凍結保存されている細胞含有組成物に移植用基材を添加することによって実施することができる。通常、細胞含有組成物1重量部に対し、1～9重量部（2～10倍希釈）、より好ましくは4重量部（5倍希釈）の移植用基材を添加する。移植用基材を添加後の組成物中の凍結保護剤の濃度は2%以下が好ましく、より好ましくは1%以下である。

フェノールフタレイン誘導体は、移植用基材のみ、あるいは凍結保存液及び移植用基材の両方に含めることができるが、好ましくは、移植用基材のみに含まれる。

[0046] 凍結保存液及び／又は移植用基材へのフェノールフタレイン誘導体の添加濃度、又は、凍結保存液及び／又は移植用基材中のフェノールフタレイン誘導体の濃度は、凍結保護剤による細胞や生体への影響を排除し得る濃度であれば特に限定されず、最終濃度、即ち、治療用組成物中の濃度で1～20 mg/L、好ましくは1～15 mg/L、より好ましくは5～10 mg/Lとなるように調整することができる。例えば、フェノールフタレイン誘導体がフェノールレッドで、移植用基材中の濃度が6～12 mg/Lである場合、該移植用基材で細胞含有組成物を5倍希釈すると、治療用組成物中のフェノールレッドの濃度は5～10 mg/Lとなる。

[0047] 細胞含有組成物を移植用基材で2～10倍希釈、好ましくは5倍希釈して治療用組成物を調製することから、凍結保護剤は凍結保存時の治療用組成物において、0.1～30% (v/v)、0.2～25% (v/v)、0.5～20% (v/v)、0.5～10% (v/v)、1～10% (v/v) などとすること、あるいは0.2～12% (v/v)、0.4～10% (v/v)、1～8% (v/v)、1～4% (v/v)、2～4% (v/v) などとすることができる。凍結保護剤がDMSOの場合は、例えば凍結保存液においては10～20% (v/v) で、移植時の治療用組成物においては5% (v/v) 以下、好ましくは2% (v/v) 以下で含まれる。

[0048] 移植用基材としては、眼内投与、特に前房内投与に適した溶液であれば特に限定されないが、非刺激性の等張化された培養液や生理食塩水、緩衝液等が用いられる。好ましくは培養角膜内皮細胞又は角膜内皮代替細胞を培養していたのと同様の培養液を使用する。移植用基材にはフェノールフタレイン誘導体以外に、必要に応じて各種の成分を含めることができる。該成分は、前房内に投与された（移植された）培養角膜内皮細胞又は角膜内皮代替細胞が脱落することなく角膜内皮細胞層へ分化するのに有用なものであれば特に限定されないが、インスリンあるいはインスリン様成長因子を添加することが好ましい。またレチノイン酸、EGF及びbFGFも添加するのに好ましい成分である。

実施例

[0049] 以下に実施例を用いて本発明を詳述するが、本発明は以下の実施例に何ら限定されるものではない。また、使用する試薬及び材料は特に限定されない限り商業的に入手可能である。本明細書中で用いた略語は特に断りの無い限り、当分野で通常用いられるものと同様である。

[0050] 実施例1：スフェロイド化した角膜内皮代替細胞の保存条件の検証

特許文献3の実施例4と同様の方法でiPS細胞からCECSI細胞を誘導し、14日目にAccutase（ナカライテスク #12679-54）を用いて細胞を回収し、凍結保存液バンバンカー（登録商標）hRM（日本ジェネティクス #CS-07-001；10%DMSO含有）に 1×10^7 細胞/mLの細胞濃度で懸濁し-80℃のディープフリーザーで凍結保存した。7カ月後に凍結保存した細胞を解凍し、スフェロイド形成バック（東洋製罐、ウェルバッグ）を用いて培養することにより、CECSI細胞をスフェロイド化した。

スフェロイド化したCECSI細胞を回収し、凍結保存液バンバンカー（登録商標）hRM（日本ジェネティクス #CS-07-001；10%DMSO含有）に 6×10^6 細胞/mLの細胞濃度で懸濁し-80℃のディープフリーザーで凍結保存した（冷凍保管）。7日後に凍結保存した細胞は、4

倍容量のフェノールレッド含有移植用基材（8. 1 mg / L のフェノールレッド含有）を添加して解凍し、スフェロイドの形状を確認した。移植用基材としては、特許文献3の実施例4で用いたCECS i 細胞誘導用（+T）培地を用いた。また、同様に i P S 細胞から誘導したCECS i 細胞をスフェロイド化後、4℃で冷蔵保存し（冷蔵保管）、保存後1日目及び2日目にスフェロイドの形状を確認した。結果を図1に示す。

冷蔵保管では保存後2日目で既にほとんどのスフェロイドは、分散していたが、凍結保存した細胞は、7日間の冷凍保管後も解凍後殆どのスフェロイドにおいて形状の維持が確認された。

これらの結果より、凍結保存によりスフェロイド化した角膜内皮代替細胞を長期間保存できることが確認された。

さらに、解凍後のスフェロイド化した角膜内皮代替細胞を培養容器へ播種し、角膜内皮代替細胞の角膜内皮様の機能が維持されているか調べた。

角膜内皮代替細胞の重要な機能の一つであるバリア機能をタイトジャンクションの形成能を指標に評価した。

凍結保存前、あるいは7日間の冷凍保管後のスフェロイド化した角膜内皮代替細胞を48ウェルプレートに播種し、細胞をプレートに接着させた。24時間後、ウェル上の細胞を、培地を除去し氷冷した4%パラホルムアルデヒドで固定した。PBSで2回ウェルを洗ったのち、ブロッキング溶液（Normal Donkey Serumを10%含むPBST（10%NDS/PBST））を添加し30分間ブロッキングを行った。その後、下記の抗体量で1次抗体反応を室温で1時間行った。

Rabbit anti human ZO-1;Invitrogen, 40-2200, 1:500, 0.4 μL/well

ブロッキング溶液（10%NDS/PBST）, 0.20mL/well

次に、ウェルをPBSで2回洗ったのち、下記の抗体量で2次抗体反応を室温で1時間行った。

Donkey anti-rabbit Cy-3, Jackson, 711-165-152, 1:200, 1.00 μL/well

DAPI, 1:1000, 0.20 μL/well

ブロッキング溶液（10%NDS/PBST），0.20mL/well

その後、PBSで2回洗浄後、マウント剤を滴下し、蛍光顕微鏡で観察した。

結果を図2に示す。凍結保存後のスフェロイドにおいても凍結前と同様に細胞の境界にZO-1の発現が確認された。以上の結果より、凍結保存後の角膜内皮代替細胞が凍結保存後もそのバリア機能を維持していることが確認された。

[0051] 実施例2：移植用基材での希釈による効果の検証

実施例1でスフェロイド化した角膜内皮代替細胞の凍結保存が可能であり、解凍後も角膜内皮機能を維持していることが確認された。しかしながら、凍結保存には、凍結保存液を使用している。その凍結保存液には、凍結保護剤としてDMSOが含まれているため、前房内投与前に洗浄が必要となる。本実施例では、解凍後に洗浄操作等を必要としない方法を検討した。

洗浄ではなく移植用基材を用いて希釈することにより、凍結保存液の影響を受けず角膜内皮代替細胞の機能を維持するかを検証するため、タイトジャンクションの形成能を指標に実施例1と同様にしてバリア機能を評価した。その結果、移植用基材で5倍以上希釈することにより、角膜内皮機能を維持した状態で角膜内皮代替細胞が得られることがわかった。さらに動物試験を実施し、前房内へ安全に投与可能であることを確認する。

[0052] 試験例1：スパイク試験（未分化細胞がどの程度残っていてもよいかの予備試験）

（方法）

本発明の角膜内皮代替細胞を含有する治療用組成物中に残っていても良い未分化細胞の割合（「未分化細胞残存率」とも称する）の許容範囲を定めるため、iPS細胞スパイク試験を下記の方法で実施した。

方法：ヒト線維芽細胞に未分化iPS細胞株Ff-101s04（継代回数P=20）を下記の個数で混合し、iPS細胞用培地AK03NにY27632（ROCK阻害剤）10μMを含んだ培地と混合し、この懸濁液をマト

リゲルと1 : 1 混合して、ヌードラット眼前房内に 1×10^6 細胞／匹で移植した。なお、栄養細胞としてのヒト線維芽細胞、iPS細胞用培地、及びマトリゲルとともに移植することで、混合された未分化iPS細胞の造腫瘍性を増幅させた。これにより、より厳しく安全性の高い閾値設定を求めた。

未分化Ff-iOS04細胞移植数（スパイク率）

1×10^6 個（100%）

1×10^4 個（1%）

1×10^3 個（0.1%）

1×10^2 個（0.01%）

（判定基準）

観察期間中；

以下の2つの項目を共に満たした場合に「肉眼的造腫瘍性あり」と判定し、その個体について安楽死後、移植眼を摘出、病理組織診断にて確定診断を行った。

i. 明らかな左右差をもって、移植眼が腫大化している。

ii. 移植眼の前房内が固形組織で充満している。

観察期間終了後；

全個体を安楽死後、移植眼を摘出、HE染色を用いた病理組織診断を行った。

（結果）

判定基準i、iiに基づき、病理組織診断で前房内の奇形種形成が確認されたものを「死亡」とみなした。スパイク率による代表的な奇形種の組織写真を図4、Kaplan-Meier曲線を図5に示す。

Ff-iOS04未分化iPS細胞スパイク率100%（即ち、未分化iPS細胞のみ）群は9週までに生存率0%であった。未分化iPS細胞スパイク率1%群は16週までで生存率16.7%であった。

一方、スパイク率0.1%、0.01%群では最終的な病理診断でも奇形種形成は確認されなかったため、生存率は100%であった。

[0053] 実施例3：iPS細胞由来角膜内皮代替細胞のヌードラットにおける単回前房内投与造腫瘍性試験

1. 未分化細胞残存率の評価方法

ヌードラットにおける単回前房内投与造腫瘍性試験に用いるiPS細胞由来角膜内皮代替細胞（CECSI細胞）の未分化細胞残存率を既報（Stem Cell Res. 2021 Aug;55:102497.）に従って評価した。要すれば以下の通り。

未分化iPS細胞株（Ff-101s04及びQHJ101s04）をB4G12細胞にいくつかの濃度で混合（スパイク）し、OCT4の発現レベルを解析した。そのデータを尺度とし、各クローンに残存する未分化iPSC集団を定量化した（図3）。CECSI細胞におけるOCT4の発現量をqPCRにより測定した（day11）。スパイクテストのスケールを用いて、Ff-101s04あるいはQHJ101s04由来のCECSI細胞における残存未分化細胞が0.1%以下であることを確認した（図3）。

2. 造腫瘍性試験

iPS細胞由来角膜内皮代替細胞を含有する治療用組成物（未分化細胞残存率0.1%以下）をヌードラット（F344/NJcl-rnu/rnu；4週齢；日本クレア）に単回前房内（右眼）投与（ 2.5×10^4 細胞/5 μ L/眼）して、造腫瘍性を調べた。

移植用基材：DMEM/F12、ITS supplement（1 $\times$ ）、IGF1（10ng/mL）、Y27632（100 μ M）

試験群構成は下記の通り。

[0054] [表1]

被験物質群1群

群	被験物質	投与量 (cells/eye)	投与容量 (μ L/eye)	濃度 (cells/mL)	剖検 時期	動物数(動物番号)	
						雄	雌
1	CLS001	2.5×10^4	5	5×10^6	26w*	13	13

*：投与後16週間観察終了時に前房内に細胞塊の存在が確認されない場合は剖検する。

[0055] スリットランプを用いて前眼部及び中間透光体を検査し、前眼部（右眼）の写真撮影を行った。

＜造腫瘍性の判断基準＞

1) 明らかな左右差をもって、右眼が腫大化している。

2) 右眼の前房内が固形組織で充満している。

上記治療用組成物（未分化細胞残存率0.1%以下）をヌードラット前房内に移植し、26匹を最長26週まで経過観察した。

移植後12週以降より、前眼部写真で4週間以上前房内に細胞が観察されない場合は細胞の消失と判定し、移植後16週以降で細胞が消失したと判定された場合（図6a）、消失判定の翌日に剖検を実施した。

前房内に細胞が残存している動物は26週まで観察し、観察期間終了の翌日に剖検を実施した。図6b～eに示すように、経過中、前房内の細胞塊の大きさに変化はなく造腫瘍性は認められなかった。

[0056] 実施例4：スフェロイド化した角膜内皮代替細胞のサイズの検証

1. iPS細胞拡大培養（解凍）

iPS細胞用培地AK03N（味の素）にY-27632（wako/039-24591）を10 μ Mの濃度で添加した（以下AK03N+Y培地とする）。

T12.5フラスコ（コーニング/353107）をiMatrix511（マトリクスーム/892005）、6 μ g/mLの濃度でコーティングした。iPS細胞（FF-101s04株）を8.0 $\times$ 10³細胞/cm²の細胞濃度でAK03N+Y培地に懸濁し、得られた細胞懸濁液をこのT12.5フラスコへ播種した。37℃のCO₂インキュベーターで培養を開始し、翌日、Y-27632を含まないAK03N培地に培地交換した。中2日を空けたあと2日連続で培地交換を行い、培養6日目に継代を行った。

T25フラスコ（住友ベークライト/MS-23050）をiMatrix511（マトリクスーム/892005）、6 μ g/mLの濃度でコーティングした。iPS細胞を2.2 $\times$ 10³細胞/cm²の細胞濃度でAK03

N + Y 培地に懸濁し、得られた細胞懸濁液をこの T 2 5 フラスコへ播種した。37℃のCO₂インキュベーターで培養を開始し、翌日、Y-27632 を含まない AK03N 培地に培地交換した。中 2 日を空けたあと 2 日連続で培地交換を行い、培養 6 日目に継代を行った。

[0057] 2. フェノールレッド不含の角膜内皮代替細胞誘導用培地の調製

基礎培地として DMEM / F12 non phenol red (サーモフィッシャー / 11039-021) を用いた。基礎培地 500 mL に、添加物として、ITS-Supplement (Ventría / 7771TS091)、IGF1 (オーファンパシフィック ; ソマゾン注 / 858100075、1 mg / mL)、LIF (富士フイルム和光純薬 / 125-06661)、IL-6 (ミルテニーバイオテク / 170-076-161)、IL-11 (Peprrotech / AF-200-11)、TNF α (ミルテニーバイオテク / 170-076-178)、水溶性ヒドロコトン注射液 (日医工 / 620002208) を添加した。

[0058] [表2]

試薬名	添加量	最終濃度
LIF	200 μ L	10 ng / mL
IL-11	250 μ L	5 ng / mL
IL-6	250 μ L	10 ng / mL
TNF α	100 μ L	10 ng / mL
ITS-Supplement	5 mL	10 mL / L
IGF1	5 μ L	10 ng / mL
ヒドロコトン	20 μ L	200 nM

[0059] 3. サイズの検証

表 2 に記載の角膜内皮代替細胞誘導用培地を用い、特許文献 3 に記載の方法と同様にして iPS 細胞から CEC Si 細胞を誘導した。誘導後 14 日目に Accutase (イノベティブ セル テクノロジーズ #AT104-100ML) を用いて細胞を回収し、細胞保存液バンバンカー (登録商標) hRM (日本ジェネティクス #CS-07-001) に 1×10^7 細胞

／mLの細胞濃度で懸濁し－80℃のディープフリーザーで凍結保存した。凍結保存した角膜内皮代替細胞を解凍し、直後に下記に記載のスフェロイド形成用培地で懸濁した後、大型スフェロイド形成バッグ（東洋製罐、ウェルバック）に 1.2×10^8 個の細胞数で播種し、最終的に約400mLになるようにスフェロイド形成用培地を追加した。これを37℃インキュベーターで一日培養することにより、CECSI細胞のスフェロイド（細胞塊）を形成させた。このCECSI細胞スフェロイドをCTS Rotea Counterflow Centrifugation System（サーモフィッシャー）で洗浄濃縮した。濃縮した一部をサンプリングし、スフェロイドをAccumax（イノベータティブ セル テクノロジーズ #AM105）で酵素処理して細胞数を計測した。この計測結果を用いて細胞数が 7.5×10^6 細胞／mLになるようにスフェロイドを細胞保存液バンバンカー（登録商標）hRMに懸濁し、40μLずつ分注して－70℃以下で凍結保存した。解凍後、移植用基材の基礎培地として使用しているDMEM／F12（サーモフィッシャー／11330-032）で5倍希釈し（最終的な細胞濃度は 1.5×10^6 細胞／mL）、iSpect DIA-10（島津製作所）を用いて面積相当径（粒子の面積と、粒子と同じ面積の円の直径）が30μm以上のスフェロイドの個数を測定した。結果を図7に示す。解析の結果、スフェロイド径（スフェロイドの面積相当径）は約30～150μm、そのうち90%以上は約30～90μmの範囲の細胞集団だった。スフェロイド径がこの範囲内であれば、治療用組成物としての生着効果を維持できる。

[0060] 実施例5：スフェロイド化した角膜内皮代替細胞のDMSO濃度検討

表2に記載の角膜内皮代替細胞誘導用培地を用い、特許文献3に記載の方法と同様にしてiPS細胞からCECSI細胞を誘導した。誘導後14日目にAccutase（イノベータティブ セル テクノロジーズ #AT104-100ML）を用いて細胞を回収し、細胞保存液バンバンカー（登録商標）hRM（日本ジェネティクス #CS-07-001 10%DMSO含有）に 1×10^7 細胞／mLの細胞濃度で懸濁し－80℃のディープフリー

ザーで凍結保存した。凍結保存した角膜内皮代替細胞を解凍し、直後に下記に記載のスフェロイド形成用培地で懸濁し、大型スフェロイド形成バッグ（東洋製罐，ウェルバッグ）上に 1.2×10^8 細胞／バッグの細胞数で播種した。これを 37°C インキュベーターで一日培養することにより、CECSI細胞のスフェロイドを形成させた。スフェロイド形成バッグよりスフェロイド化したCECSI細胞を回収洗浄後、細胞保存液バンバンカー（登録商標）hRM（日本ジェネティクス #CS-07-001 10%DMSO含有）を用いて、 7.5×10^6 細胞／mLの細胞濃度に調製する。調製したスフェロイド懸濁液を一次容器に 3×10^5 細胞／ $40 \mu\text{L}$ の細胞濃度で分注し、 -70°C 以下で凍結保存する。

[0061] <スフェロイド形成培地の調製>

基礎培地としてDMEM／F12（サーモフィッシャー／11330-032）またはDMEM／F12 no phenol red（サーモフィッシャー／21041-025）を用いた。基礎培地40mLに、添加物として、ITS-Supplement（Ventría／777ITS091）、Y-27632（富士フィルム和光純薬／039-24591）、IGF1（オーファンパシフィック；ソマゾン注／858100075、1mg/mL）を添加した。

[0062] [表3]

試薬名	添加量	最終濃度
ITS-Supplement	$400 \mu\text{L}$	10mL/L
Y-27632	$40 \mu\text{L}$	$100 \mu\text{M}$
IGF1	$2 \mu\text{L}$	50ng/mL

[0063] 凍結保存後のCECSI細胞のスフェロイドを各DMSO濃度（100%，50%，25%，10%，5%，2%，1%，0%）の移植用基材を用いて、48ウェルプレート（iMatrix511MGコート済み）に播種し、細胞をプレートに接着させた。24時間後、ウェル上のスフェロイドを、培地を除去し氷冷した4%パラホルムアルデヒドで固定した。DPBSで2回ウェルを洗ったのち、ブロッキング溶液（Normal Donkey

Serumを10%含むPBST (10%NDS/PBST)) を添加し30分間ブロッキングを行った。その後、下記の抗体量で1次抗体反応を室温で1時間行った。

- ・ Rabbit anti human ZO-1; Invitrogen, 40-2200, 1:500, 0.5 μ L/well
- ・ Mouse anti human Na,K-ATPase α 1; Novus, NB300-146, 1:500, 0.5 μ L/well

- ・ ブロッキング溶液 (10%NDS/PBST) , 0.25mL/well

次に、ウェルをDPBSで2回洗ったのち、下記の抗体量で2次抗体反応を室温で1時間行った。

- ・ Donkey anti-rabbit Cy-3, Jackson, 711-165-152, 1:200, 1.25 μ L/well
- ・ Donkey anti-mouse Alexa flour 488, Invitrogen, A21202, 1.67 μ L/well
- ・ DAPI, 1:1000, 0.25 μ L/well
- ・ ブロッキング溶液 (10%NDS/PBST) , 0.25 mL/well

その後、PBSで2回洗浄後、マウント剤を添加し、蛍光顕微鏡で観察した。移植の際のDMSO濃度が5%以下であれば、生着能とタイトジャンクション形成能があることを確認できた。

[0064] 試験例2：FCMを用いたCECSI細胞表面マーカーのスクリーニング

Human Cell Surface Marker Screening Panel (Lyoplate) を用いて、CECSI細胞における細胞表面抗原の発現をフローサイトメーター (BD Biosciences、BD LSRFortessa™ X-20) で解析し、スクリーニングを実施した。データ解析はBD FACSDivaソフトウェアver. 8.0.1 (ベクトンディッキンソン) を使用した。

CECSI細胞は、3ロット用意し (Lot.2020F1, Lot.2020G01, Lot.2020I24) 、それぞれ所定の抗体反応を行い、FCM測定直前に7-AAD (BD Biosciences #559925) を適量添加して細胞を染色した。AF647 (Alexa Fluor 647) が80%以上検出されたものを強陽性 (◎)、10%以上80%未満で検出されたものを陽性 (○)、5%以上10%未満で検出されたものを弱陽性とした。

その結果、CECSI細胞に特徴的な細胞表面マーカーとしてCD24を見出した。

[0065] [表4]

マーカー	Lot. 2020F1	Lot. 2020G01	Lot. 2020I24
Buffer	~	~	~
CD24	⊙	⊙	⊙

[0066] 試験例3：B2M発現量比較

DNAマイクロアレイによる、海外ドナー研究用角膜から採取した本物のヒト角膜内皮細胞、iPS細胞（Ff-I01s04）、CECSI細胞を用い、アジレントテクノロジー社製DNAマイクロアレイ解析（SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ 8x60K Ver. 3.0）を行い、遺伝子プロファイルを網羅的に解析し、その結果の中から、Human Leukocyte Antigen（HLA）を構成する因子の一つであるbeta-2 microglobulin（B2M）の発現量を比較した。iPS細胞およびCECSI細胞のB2M発現量は、ヒト角膜内皮細胞と比較し、相対的に低いことが示された（図3）。よって、他家移植の際、CECSI細胞はヒト角膜内皮細胞よりも拒絶反応を起こしにくい特徴を有する。

[0067] 実施例6：フェノールレッドのスフェロイド形成への影響の検証

スフェロイド形成培地を充填した中型スフェロイド形成バッグ（東洋製罐，ウェルバッグ、容量20mL）上に 2.5×10^6 細胞／バッグの細胞数で播種した。これを37℃インキュベーターで一日培養することにより、CECSI細胞のスフェロイドを形成させた。このCECSI細胞スフェロイドを15mL遠心管（住友ベークライト #MS-90150）に集め、遠心分離（条件：200g，5min，25℃）による回収後に顕微鏡による観察（図9）と全生細胞数（表5）を測定した。その結果、基礎培地としてDMEM/F12 no phenol redを基礎培地としたスフェロイド形成培地により、スフェロイド形成させた方がスフェロイド生成数、全生細胞数ともに多かった。フェノールレッドを含まない培地を使用するか、ま

たはフェノールレッドを取り除く工程を追加することでスフェロイドを形成しやすくすることができる。

[0068] [表5]

	全生細胞数 (DMEM/F12 no phenol red)	全生細胞数 (DMEM/F12)
CECsi (Lot. 1)	2.61×10^5 cells	1.20×10^5 cells
CECsi (Lot. 2)	0.73×10^5 cells	0.43×10^5 cells

産業上の利用可能性

[0069] 本発明によれば、凍結保存可能で、解凍による細胞へのダメージがなく、さらに、解凍後の細胞に対し洗浄や遠心分離等の追加のプロセスを経ることなくそのまま患者に投与可能な治療用組成物、特に移植治療用組成物の提供が可能になる。本発明の治療用組成物は、全世界に、角膜移植適応症例の約50%を占めているという水疱性角膜症における角膜内皮代替細胞の移植に有用である。

[0070] 本出願は、米国で出願された米国仮特許出願第63/219,086（出願日：2021年7月7日）及び米国仮特許出願第63/320,846（出願日：2022年3月17日）を基礎としておりその内容は本明細書に全て包含されるものである。

請求の範囲

- [請求項1] C D 2 4 陽性表現型を有する角膜内皮代替細胞、及び所望によりフェノールフタレイン誘導体をさらに含む、治療用組成物。
- [請求項2] さらに、凍結保護剤を含む、請求項 1 記載の組成物。
- [請求項3] 凍結保護剤が、ジメチルスルホキシド（DMSO）である、請求項 2 記載の組成物。
- [請求項4] 組成物中のDMSO濃度が1～10%である、請求項 3 記載の組成物。
- [請求項5] フェノールフタレイン誘導体が、フェノールスルホンフタレイン（フェノールレッド）、フェノールフタレイン、ブロモフェノールブルー、イソバレリルフェノールフタレイン、アセチルフェノールフタレイン、フェノールフタレインジブチレート、フェノールフタレインジホスフェート、フェノールフタレインジスルフェート、フェノールフタレイングルクロン酸、フェノールフタレインモノ-β-グルコシドウロン酸、フェノールフタレインモノ-β-グルクロン酸、フェノールフタレインモノ-ホスフェート、およびクレゾールレッドからなる群より選択される、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の組成物。
- [請求項6] フェノールフタレイン誘導体が、フェノールレッドである、請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の組成物。
- [請求項7] 組成物中のフェノールレッド濃度が1～20mg/Lである、請求項 6 記載の組成物。
- [請求項8] 組成物中の細胞の濃度が0.5～10×10⁶細胞/mLである、請求項 1～7 のいずれか 1 項に記載の組成物。
- [請求項9] 細胞のスフェロイド懸濁液の剤形である、請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載の組成物。
- [請求項10] 組成物中に含まれる細胞集団が、面積相当径が30μm以上のスフェロイドを含み、当該スフェロイドのうち50%以上が面積相当径30～90μmである、請求項 9 記載の組成物。

- [請求項11] 角膜内皮代替細胞が幹細胞由来である、請求項1～10のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項12] 幹細胞が多能性幹細胞である、請求項11記載の組成物。
- [請求項13] 多能性幹細胞がiPS細胞（遺伝子編集あるいは遺伝子導入により追加機能を付与した細胞を含む）由来である、請求項12記載の組成物。
- [請求項14] ヒト角膜内皮細胞または培養内皮細胞よりもB2M発現量が低い請求項13記載の組成物。
- [請求項15] 移植用である、請求項1～14のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項16] 前房内への移植用である、請求項15記載の組成物。
- [請求項17] 凍結保護剤の存在下、－20℃以下で凍結された角膜内皮代替細胞の細胞懸濁液あるいは細胞スフェロイド懸濁液にフェノールフタレイン誘導体を含む移植用基材を添加することを含む、治療用組成物の製造方法。
- [請求項18] 該角膜内皮代替細胞がCD24陽性表現型を有する、請求項17記載の方法。
- [請求項19] 幹細胞由来の角膜内皮代替細胞を含有する治療用組成物であって、未分化細胞残存率が1%未満であることを特徴とする組成物。
- [請求項20] 該角膜内皮代替細胞がCD24陽性表現型を有する、請求項19記載の組成物。
- [請求項21] 未分化細胞残存率が0.1%以下である、請求項19又は20に記載の組成物。
- [請求項22] 幹細胞が多能性幹細胞である、請求項19～21のいずれか1項に記載の組成物。
- [請求項23] 多能性幹細胞がiPS細胞（遺伝子編集あるいは遺伝子導入により追加機能を付与した細胞を含む）由来である、請求項22記載の組成物。
- [請求項24] ヒト角膜内皮細胞または培養内皮細胞よりもB2M発現量が低い請

求項 1 9 ～ 2 3 のいずれか 1 項に記載の組成物。

- [請求項25] 未分化細胞残存率が未分化細胞マーカーの発現プロファイルによって評価される、請求項 1 9 ～ 2 4 のいずれか 1 項に記載の組成物。
- [請求項26] 移植用である、請求項 1 9 ～ 2 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。
- [請求項27] 前房内への移植用である、請求項 2 6 記載の組成物。