

請求の範囲

- [請求項1] ヒトの眼前房内への注入時にヒト角膜機能を惹起し得るヒト機能性角膜内皮細胞を製造する方法であって、
- (b) 角膜内皮前駆細胞を、増殖ストレスなど培養ストレスを極小化し得る培養条件下で増殖および／または分化・成熟させる工程を含む、方法。
- [請求項2] 前記ヒト角膜機能は、角膜内皮細胞機能特性を含む、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] (a) ヒト角膜内皮組織由来細胞を脱分化させて前記角膜内皮前駆細胞を得る工程をさらに包含する、請求項1または2に記載の方法。
- [請求項4] ヒトの眼前房内への注入時にヒト角膜機能、就中、角膜内皮細胞機能特性を惹起し得る機能性ヒト角膜内皮細胞を製造する方法であって、ヒト角膜内皮前駆細胞を形質転換が生じる量未満の細胞成長因子の存在下で増殖および／または分化・成熟させる請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項5] 前記細胞成長因子は上皮成長因子（EGF）を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項6] 前記形質転換は内皮間葉転換を含む、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項7] 前記増殖および／または分化・成熟させる工程はROCK阻害剤の存在下で行われる、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項8] (b) で得られた細胞が、ミトコンドリアにおいてミトコンドリア依存性酸化的リン酸化が増加し、細胞質・核内のアセチルC○Aの発現が増加しないこと、並びにアセチルC○Aによるヒストンアセチル化を介するエピジェネティックな多遺伝子発現が惹起されていない細胞であることを確認する工程を含む、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項9] (b) で得られた細胞が、ミトコンドリアにおいて、クエン酸シン

ターゼ (CS)、アコニターゼ2 (ACO2)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ2 (IDH2)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ2 (MDH2)、リンゴ酸酵素3 (ME3)、ACSS1、アセチルCoAアセチルトランスフェラーゼ1 (ACAT1)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH)、BCAT2、及び分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ2 (BCKDH2) からなる群から選択される1または複数の代謝関連酵素が発現している細胞であることを確認する工程を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

[請求項10] (b) で得られた細胞が、ATPクエン酸リアーゼ (ACLY)、アコニターゼ1 (ACO1)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ1 (IDH1)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ1 (MDH1)、リンゴ酸酵素1 (ME1)、ACSS2、アセチルCoAアセチルトランスフェラーゼ2 (ACAT2)、及び／または乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) が発現しない、もしくはほとんど発現しないことを確認する工程を含む、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

[請求項11] (b) で得られた細胞が、角膜混濁や水和浮腫の改善、その結果、持続的に長期に亘り角膜内皮組織細胞密度を保持させ、視力改善に繋がるような角膜内皮(細胞)機能特性に繋がるイオンチャネルおよび／または単カルボン酸輸送体の発現の認められることを確認する工程を含む、請求項1～10のいずれか一項に記載の方法。

[請求項12] (b) で得られた細胞が、ナトリウム／水素交換体1 (NHE1) 並びに／または、アクアポリン1 (AQP-1) の発現が亢進していることを確認する工程を含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

[請求項13] (b) で得られた細胞が、重炭酸脱水酵素5B (CA5B) の発現が亢進していることを確認する工程を含む、請求項9～10のいずれか一項に記載の方法。

[請求項14] (b) で得られた細胞が、TCA回路などに係る代謝酵素やAce

t y l C o A などの代謝産物が夾雑相転移細胞の生成に繋がらないように細胞質や核には存在せずに、ミトコンドリアにオルガネラ選択的に局在する特性を有することを確認する工程を含む、請求項 1 ～ 1 2 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項15] 前記ヒト機能性角膜内皮細胞が、角膜内皮組織由来細胞、多能性幹細胞、間葉系幹細胞、角膜内皮から採取した角膜内皮前駆細胞、角膜内皮から採取した細胞、並びにダイレクトプログラミング法で作成される角膜内皮前駆細胞および角膜内皮様細胞からなる群から選択される細胞を起源として作製されたものである、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項16] ヒト機能性角膜内皮細胞であって、角膜混濁や水和浮腫の改善、その結果、持続的に長期に亘り角膜内皮組織細胞密度を保持させ、視力改善に繋がるような角膜内皮（細胞）機能特性に繋がる機能性蛋白の発現が認められるか、または当該角膜内皮（細胞）機能特性を阻害する蛋白が惹起されないまたは低下している、細胞。

[請求項17] 前記細胞は、ヒト眼前房内への注入時にヒト角膜内皮機能特性を惹起し得るヒト機能性角膜内皮細胞であり、ミトコンドリアにおいて、クエン酸シンターゼ（C S）、アコニターゼ 2（A C O 2）、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ 2（I D H 2）、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ 2（M D H 2）、リンゴ酸酵素 3（M E 3）、A C S S 1、アセチル C o A アセチルトランスフェラーゼ 1（A C A T 1）、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ（P D H）、B C A T 2、及び分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ 2（B C K D H 2）からなる群から選択される 1 または複数の代謝関連酵素が発現している、請求項 1 6 に記載の細胞。

[請求項18] 前記細胞は、ヒト眼前房内への注入時にヒト角膜内皮機能特性を惹起し得るヒト機能性角膜内皮細胞であり、ミトコンドリアにおいてミトコンドリア依存性酸化リン酸化が増加し、または細胞質・核内のアセチル C o A の発現が増加しないこと、並びにアセチル C o A によ

るヒストンアセチル化を介するエピジェネティックな多遺伝子発現が惹起されていない群から選択される少なくとも1つを含む、請求項16または17に記載の細胞。

[請求項19] 前記細胞はヒト角膜内皮細胞であり、ATPクエン酸リアーゼ (ACLY)、アコニターゼ1 (ACO1)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ1 (IDH1)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ1 (MDH1)、リンゴ酸酵素1 (ME1)、ACSS2、アセチルCoAアセチルトランスフェラーゼ2 (ACAT2)、及び／または乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) が発現しない、または実質的に発現しない、請求項16～18のいずれか一項に記載の細胞。

[請求項20] 前記ヒト機能性角膜内皮細胞において、ナトリウム／水素交換体1 (NHE1) 並びに／または、アクアポリン1 (AQP-1) の発現が亢進している、請求項16～19のいずれか一項に記載の細胞。

[請求項21] 前記ヒト機能性角膜内皮細胞において、重炭酸脱水酵素5B (CA5B) の発現が亢進している、請求項16～20のいずれか一項に記載の細胞。

[請求項22] 前記ヒト機能性角膜内皮細胞が、(i) TCA回路などに係る代謝酵素やAcetyl CoAなどの代謝産物が夾雑相転移細胞の生成に繋がらないように細胞質や核には存在せずに、ミトコンドリアにオルガネラ選択的に局在する特性、(ii) ミトコンドリアにおけるミトコンドリア依存性酸化的リン酸化の増加、(iii) アセチルCoAによるヒストンアセチル化を介するエピジェネティックな多遺伝子発現の低下 (惹起無を含む)、(iv) ナトリウム／水素交換体1 (NHE1) および／またはアクアポリン1 (AQP-1) の発現の亢進、並びに(v) 重炭酸脱水酵素5B (CA5B) の発現の亢進からなる群から選択されるすべてを含む、請求項16～21のいずれか一項に記載の細胞。

[請求項23] 内皮間葉系移行が起きていない、または実質的に起きていない、請

求項 16～22 のいずれか一項に記載の細胞。

[請求項24] ヒト眼前房内への注入時にヒト角膜内皮機能特性を惹起し得るヒト機能性角膜内皮細胞であって、内皮間葉系移行が起きていない、または実質的に起きていない、細胞。

[請求項25] 前記ヒト機能性角膜内皮細胞は、角膜内皮組織由来細胞、多能性幹細胞、間葉系幹細胞、角膜内皮から採取した角膜内皮前駆細胞、角膜内皮から採取した細胞、並びにダイレクトプログラミング法で作成される角膜内皮前駆細胞および角膜内皮様細胞からなる群から選択される細胞を起源として作成されたものである、請求項 16～24 のいずれか一項に記載の細胞。

[請求項26] 請求項 1～15 のいずれか一項に記載の方法によって製造された細胞および／または請求項 16～25 のいずれか一項に記載の細胞を含む細胞集団。

[請求項27] ヒトの眼前房内への注入時にヒト角膜内皮機能特性を惹起し得るヒト機能性角膜内皮細胞の品質管理または工程管理の方法であって、前記細胞のミトコンドリアにおいて、クエン酸シンターゼ (CS)、アコニターゼ2 (ACO2)、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ2 (IDH2)、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ2 (MDH2)、リンゴ酸酵素3 (ME3)、ACSS1、アセチルCoAアセチルトランスフェラーゼ1 (ACAT1)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH)、BCAT2、及び分岐鎖ケト酸デヒドロゲナーゼ2 (BCKDH2) からなる群から選択される1または複数の代謝関連酵素が発現していることを確認する工程を含む、方法。

[請求項28] 前記細胞において細胞質・核内のアセチルCoAの発現、およびアセチルCoAによるヒストンアセチル化を介するエピジェネティックな多遺伝子発現が惹起されていないことを確認する工程をさらに含む、請求項 27 に記載の方法。

[請求項29] 前記細胞において、ナトリウム／水素交換体1 (NHE1) および

／またはアクアポリン 1 (AQP-1) の発現が亢進していることを確認する工程をさらに含む、請求項 27 または 28 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項30] 前記細胞において、重炭酸脱水酵素 5 B (CA5B) の発現が亢進していることを確認する工程をさらに含む、請求項 27 ～ 29 のいずれか一項に記載の方法。

[請求項31] ヒトの眼前房内への注入時にヒト角膜内皮機能特性を惹起し得るヒト機能性角膜内皮細胞の品質管理もしくは工程管理の方法、またはヒト機能性角膜内皮細胞に混在する角膜内皮非機能性細胞を検出する方法であって、以下：

(1) 移植日の位相差画像による外観検査で、線維芽細胞、異物、変色、または他の異常なし

(2) 移植日 2 週間前および／または移植日の細胞数が 1.5×10^6 細胞 / $450 \mu\text{L}$ (3) 細胞生存率がトリパンブルー染色で 85 % 以上

(4) 細胞上清の ELISA による純度試験で、

PDGF-BB : 100 pg/mL 以上

(5) 移植日 2 週間前および／または移植日に採取された細胞上清の FACS による純度試験で、

CD166⁺ > 99 %

CD24⁺ < 5 %

CD26⁺ < 5 %

CD200⁺ < 5 %

CD44^{high} < 5 %

CD44^{low} > 90 %

CD105^{~weak} > 90 %

CD90⁺ < 5 %

(6) エフェクター細胞 (E-ratio) > 90 %

(7) 移植日2日前のポンプ機能 ($\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$) : 陽性

(8) 移植日2日前のバリア機能 ($\text{ZO}-1$) : 陽性

(9) BSA陰性試験で $125\text{ ng}/\mu\text{L}$ 未満

(10) 移植日のECDが $1500\text{ 細胞}/\text{mm}^2$ 以上

(11) miR184の発現

(12) 乳酸産生

(13) 細胞サイズが $250\mu\text{m}$ 未満

の1または複数の項目を確認する工程を含む、方法。

[請求項32] ヒトの眼前房内への注入時にヒト角膜内皮機能特性を惹起し得るヒト機能性角膜内皮細胞の細胞集団であって、以下:

(1) 移植日の位相差画像による外観検査で、線維芽細胞、異物、変色、または他の異常なし

(2) 移植日2週間前および/または移植日の細胞数が $1.5 \times 10^6\text{ 細胞}/450\mu\text{L}$

(3) 細胞生存率がトリパンブルー染色で85%以上

(4) 細胞上清のELISAによる純度試験で、

PDGF-BB: $100\text{ pg}/\text{mL}$ 以上

(5) 移植日2週間前および/または移植日に採取された細胞上清のFACSによる純度試験で、

$\text{CD}166^+ > 99\%$

$\text{CD}24^+ < 5\%$

$\text{CD}26^+ < 5\%$

$\text{CD}200^+ < 5\%$

$\text{CD}44^{\text{high}} < 5\%$

$\text{CD}44^{\text{low}} > 90\%$

$\text{CD}105^{\sim\text{weak}} > 90\%$

$\text{CD}90^+ < 5\%$

- (6) エフェクター細胞 (E-ratio) > 90%
 - (7) 移植日2日前のポンプ機能 (Na⁺/K⁺ATPase) : 陽性
 - (8) 移植日2日前のバリア機能 (ZO-1) : 陽性
 - (9) BSA陰性試験で125 ng/μL未満
 - (10) 移植日のECDが1500細胞/mm²以上
 - (11) miR184の発現
 - (12) 乳酸産生
 - (13) 細胞サイズが250 μm未満
- の1または複数の項目を充足する、細胞集団。