

明 細 書

発明の名称： ヒト機能性角膜内皮細胞およびその応用

技術分野

[0001] 本開示は、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、その細胞を含む医薬、その製造法等に関する。

背景技術

[0002] 水疱性角膜症を代表とする角膜内皮障害に対する現在の治療法はドナー角膜を用いた角膜移植術のみであるが、この手術の長期的な臨床結果は不十分である。また、角膜移植後の視力は、角膜不正乱視が誘導されることに起因して患者の満足度の点でも十分ではない。角膜移植患者の約60%以上は、水疱性角膜症や早期フックス角膜ジストロフィを含む角膜内皮機能不全である。水疱性角膜症の主な原因は白内障手術、緑内障手術、硝子体網膜手術、またはレーザー虹彩切開術等の眼科手術に起因する角膜内皮障害、角膜外傷、偽落屑症候群、およびフックス角膜内皮ジストロフィである。欧米におけるフックス角膜内皮ジストロフィの遺伝的な素因を有する潜在的有病率は約5%以上と報告されている。角膜移植術では、病的な1眼を治療するために1眼のドナー角膜が必要であり、継続的なドナー不足を解決する手段とはならない。全世界的に潜在患者が多数存在することに鑑み、角膜移植技術に比較し、広汎な医療機関で適用できる汎用性と簡便性を持つ革新的医療の提供が、喫緊の課題として全世界で強く望まれている。加えて、細胞注入療法は、角膜移植に随伴する歪みを生じず角膜の正常な形状をもたらし、その結果、長期に亘り良好な視覚機能の回復をもたらす。

発明の概要

課題を解決するための手段

[0003] 本発明者らは、培養ヒト角膜内皮細胞が培養中の細胞の相転移（線維化、上皮間葉系移行、内皮間葉系移行、老化、脱分化等）により、健康な角膜内皮組織が保持する角膜内皮細胞とは形質を異にする細胞亜集団が夾雑するこ

とを世界において初めて見出し、培養中の亜集団を選択的に増殖する技術を考案することで、特定の亜集団、すなわち成熟分化ヒト角膜内皮細胞の機能を十分に有する機能性細胞（e f f e c t o r（エフェクター）細胞とも称する。）が、細胞注入療法に最適な小型で六角形の敷石様形状を形成し、健康な角膜内皮組織が保持する角膜内皮細胞と類似の形質を有することを確認している。

[0004] 本開示においては、臨床治験において、早期臨床効果発現、および長期安定的臨床効果が確認された培養ヒト角膜内皮細胞を特定する細胞形質の検定技術を鋭意検討し、世界で初めて同技術の発明を達成した。新たに発明創出した技術に基づき、ミトコンドリア機能を種々の代謝関連酵素で規定することで早期臨床効果発現、および長期安定的臨床効果が担保される培養ヒト角膜内皮細胞を特定、提供する発明を完成させた。

本開示は、世界で初めて、何時も同じ医療を提供するための絶対要件である安定的生産が可能で、全世界での広汎な適用を可能とするコスト的に格段に安価な製法により均質で小型で移植後高細胞密度角膜内皮組織を長期に亘り再構築する患者にやさしい画期的な医療を提供する。ミトコンドリア依存性の酸化的呼吸が亢進した培養ヒト角膜内皮細胞である。角膜移植においては拒絶応答の起こる患者にも有効であることが判明している。

また本開示に係る製造法では、細胞質や核において働くT C A代謝経路に係る酵素による代謝産物、就中、アセチルコエンザイムA（A c C o A）によるヒストンのアセチル化などのエピジェネティックな多遺伝子の活性化が回避されることで、培養細胞の相転移が起きず、代謝リプログラミングがミトコンドリア機能の保持に傾斜するという革新的な発明により、上述の夾雑亜集団細胞の生成が極小化され、汎く角膜内皮機能不全患者の角膜混濁や水和浮腫の改善に極めて長期的に有用な高機能内皮細胞が提供されるものである。

[0005] したがって、本開示は以下を提供する。

（項目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。

(項目2) 前記ヒト角膜機能は、角膜内皮細胞機能特性を含む、(項目1)に記載の方法。

(項目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、(項目1)または(項目2)に記載の方法。

(項目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(項目1)～(項目3)のいずれか一項に記載の方法。

(項目5) 前記細胞成長因子は上皮成長因子(EGF)を含む、(項目1)～(項目4)のいずれか一項に記載の方法。

(項目6) 前記形質転換は内皮間葉転換を含む、(項目1)～(項目5)のいずれか一項に記載の方法。

(項目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、(項目1)～(項目6)のいずれか一項に記載の方法。

(項目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CoAの発現が増加しないこと、並びにアセチル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細胞であることを確認する工程を含む、(項目1)～(項目6)のいずれか一項に記載の方法。

(項目9) (b) で得られた細胞が、ミトコンドリアにおいて、クエン酸シントナーゼ(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、(項目1)～(項目8)のいずれか一項に記載の方法。

(項目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、(項目1)～(項目9)のいずれか一項に記載の方法。

(項目10A)(b)で得られた細胞におけるIDH1および／またはACSS2の発現が、非ヒト機能性角膜内皮細胞と比較して減弱している、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目10B)(b)で得られた細胞において、ATPクエン酸リアーゼ (ACLY)が発現しない、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目10C)(b)で得られた細胞におけるIDH2の発現が、非ヒト機能性角膜内皮細胞と比較して増強している、上記項目のいずれか一項に記載の方法。

(項目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ンネルおよび／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、(項目1)～(項目10)のいずれか一項に記載の方法。

(項目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、（項目１）～（項目１１）のいずれか一項に記載の方法。

（項目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、（項目９）～（項目１０）のいずれか一項に記載の方法。

（項目１４）（ｂ）で得られた細胞が、ＴＣＡ回路などに係る代謝酵素やＡｃｅｔｙｌＣｏＡ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、（項目１）～（項目１２）のいずれか一項に記載の方法。

（項目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、（項目１）～（項目１４）のいずれか一項に記載の方法。

[0006] また以下の発明も提供する。

（項目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。

（項目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（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、（項目16）に記載の細胞。

（項目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的リン酸化が増加し、または細胞質・核内のアセチルCoAの発現が増加しないこと、並びにアセチル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群から選択される少なくとも1つを含む、（項目16）または（項目17）に記載の細胞。

（項目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、（項目16）～（項目18）のいずれか一項に記載の細胞。

（項目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、（項目16）～（項目19）のいずれか一項に記載の細胞。

（項目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、（項目16）～（項目20）のいずれか一項に記載の細胞。

（項目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AcetylCoA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、（項目16）～（項目21）のいずれか一項に記載の細胞。

（項目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、（項目16）～（項目22）のいずれか一項に記載の細胞。

（項目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。

（項目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、（項目16）～（項目24）のいずれか一項に記載の細胞。

（項目26）（項目1）～（項目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。

（項目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。

（項目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、（項目27）に記載の方法。

（項目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、（項目27）または（項目28）のいずれか一項に記載の方法。

（項目30）

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

（項目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 (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確認する工程を含む、方法。

(項目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 × 10⁶細胞/450 μL (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 (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。

[0007] また以下の発明も提供する。

(医薬)

(項目A1) ヒト機能性角膜内皮細胞を含む医薬であって、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、医薬。

(項目A12) 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(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、（項目A1）に記載の医薬。

（項目A3）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CoAの発現が増加しないこと、並びにアセチル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群から選択される少なくとも1つを含む、（項目A1）または（項目A2）に記載の医薬。

（項目A4）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、（項目A1）～（項目A3）のいずれか一項に記載の医薬。

（項目A5）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、（項目A1）～（項目A4）のいずれか一項に記載の細胞。

（項目A6）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、（項目A1）～（項目A5）のいずれか一項に記載の医薬。

（項目A7）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AcetylCoA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）、（i V）ナトリウム／水素交換体 1（N H E 1）および／またはアクアポリン 1（A Q P - 1）の発現の亢進、並びに（v）重炭酸脱水酵素 5 B（C A 5 B）の発現の亢進からなる群から選択されるすべてを含む、（項目 A 1）～（項目 A 6）のいずれか一項に記載の医薬。

（項目 A 8）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前記細胞を有する、（項目 A 1）～（項目 A 7）のいずれか一項に記載の医薬。

（項目 A 9）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を有する医薬であって、前記細胞が、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、医薬。

（項目 A 1 0）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、（項目 A 1）～（項目 A 9）のいずれか一項に記載の医薬。

（項目 A 1 1）（項目 1）～（項目 1 5）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（項目 1 6）～（項目 2 5）のいずれか一項に記載の細胞を含む細胞集団を含む医薬。

（項目 A 1 2）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を含む医薬であって、前記細胞集団は、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 E L I S A 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 (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、医薬。

[0008] 本開示において、上述した1または複数の特徴は、明示された組み合わせに加え、さらに組み合わせて提供され得ることが意図される。本開示のなおさらなる実施形態および利点は、必要に応じて以下の詳細な説明を読んで理解することにより、当業者に認識される。

図面の簡単な説明

[0009] [図1] 図1は、CD44を介するミトコンドリアのエネルギー代謝制御作用を表す概念図である。

[図2] 図2は、本開示の一実施形態に係る機能性ヒト角膜内皮細胞（規格細胞

）における各種臨床効果の作用機序を示す概念図である。

[図3]図3は、本開示の一実施形態に係る機能性ヒト角膜内皮細胞の製造方法を変更した場合に及ぼされる影響を調べた結果を示すグラフである。

[図4]図4は、体性（幹）細胞からの脱分化経路による本開示の一実施形態に係る分化成熟・機能性ヒト角膜内皮細胞の誘導を示す概念図である。

[図5]図5は、分化とEMTを含む相転移を並行して起こさせた場合に生じる拮抗作用を示す概念図である。

[図6]図6は、本開示の一実施形態において、本開示の機能性ヒト角膜内皮細胞を製造する際に添加するEGF濃度を非添加（－）、0.5 ng/mL、1 ng/mL、または5 ng/mLとした場合におけるP2での細胞写真である。

[図7]図7は、本開示の一実施形態において、本開示の機能性ヒト角膜内皮細胞を製造する際に添加するEGF濃度を非添加（－）または0.5 ng/mLとした場合におけるP3でのFACS結果である。

[図8]図8は、本開示の一実施形態において、本開示の機能性ヒト角膜内皮細胞を製造する際に添加するEGF濃度を1 ng/mLまたは5 ng/mLとした場合におけるP3でのFACS結果である。

[図9]図9は、本開示の一実施形態において、本開示の機能性ヒト角膜内皮細胞を製造する際に添加するEGF濃度を非添加（－）または0.5 ng/mLとした場合におけるP4でのFACS結果である。

[図10]図10は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞を製造する際に添加するEGF濃度を1 ng/mLまたは5 ng/mLとした場合におけるP4でのFACS結果である。

[図11]図11は、本開示の一実施形態において、本開示の機能性ヒト角膜内皮細胞を製造する際に初代培養時からEGFを添加した場合の効果を調べるために、P0で非添加（－）または0.5 ng/mLとした場合のFACS結果である。

[図12]図12は、本開示の一実施形態において、本開示の機能性ヒト角膜内

皮細胞を製造する際に初代培養時からEGFを添加した場合の効果を調べるために、P0で非添加（－）、かつP1で非添加（－）または0.5 ng/mLとした場合のFACS結果である。

[図13]図13は、本開示の一実施形態において、本開示の機能性ヒト角膜内皮細胞を製造する際に初代培養時からEGFを添加した場合の効果を調べるために、P0で0.5 ng/mL、かつP1で非添加（－）または0.5 ng/mLとした場合のFACS結果である。

[図14]図14は、本開示の一実施形態において、本開示の機能性ヒト角膜内皮細胞を製造する際に初代培養時からEGFを添加した場合の効果を調べるために、P0で非添加（－）、かつP2で非添加（－）または0.5 ng/mLとした場合のFACS結果である。

[図15]図15は、miR378、miR146、miR34、miR184の細胞内での遺伝子変動を測定するための場合分けを示す模式図である。

[図16]図16は、EGFありなし、及びY27632ありなしのそれぞれの場合でのFACS測定および写真評価結果を示す表である。

[図17]図17は、EGFありなし、及びYありなしの場合のmiR184遺伝子発現変動の結果を示すグラフである。

[図18]図18は、EGFありなし、及びYありなしの場合のmiR34a-5p遺伝子発現変動の結果を示すグラフである。

[図19]図19は、代謝産物の階層性の例を示す模式図である。

[図20]図20は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞（目的細胞）と、そうではない細胞（非目的細胞）との代謝産物特性を確認した結果を示すグラフである。

[図21]図21は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞（目的細胞）と、そうではない細胞（非目的細胞）との代謝産物特性を確認した結果を示すグラフである。

[図22]図22は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞（目的細胞）と、そうではない細胞（非目的細胞）との代謝産物特性

を確認した結果を示すグラフである。

[図23]図23は、本開示の一実施形態において、各種添加物の効果を試験するための各培養条件を示す表である。

[図24]図24は、図23の条件1および2でのCTO9 P5の細胞写真である。

[図25]図25は、図23の条件3および4でのCTO9 P5の細胞写真である。

[図26]図26は、図23の条件5でのCTO9 P5の細胞写真である。

[図27]図27は、図23の条件1および2でのFACS結果である。

[図28]図28は、図23の条件3および4でのFACS結果である。

[図29]図29は、図23の条件5でのFACS結果である。

[図30]図30は、ELISA PDGF- β およびIL-8のCTO9 P4およびP5の培養上清・サンプルリストである。

[図31]図31は、本開示の一実施形態において、PDGF- β を添加物で分類した結果を示すグラフである。

[図32]図32は、本開示の一実施形態において、PDGF- β を週で分類した結果を示すグラフである。

[図33]図33は、本開示の一実施形態において、IL-8を添加物で分類した結果を示すグラフである。

[図34]図34は、本開示の一実施形態において、IL-8を週で分類した結果を示すグラフである。

[図35]図35は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞におけるミトコンドリア呼吸能を調べた結果である。

[図36]図36は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞におけるミトコンドリア呼吸能を調べた結果である。

[図37]図37は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞におけるミトコンドリア呼吸能を調べた結果である。

[図38]図38は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内

皮細胞に対する R O C K 阻害剤の添加の影響を調べるためのドナー情報を示す表である。

[図39]図 3 9 は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞に対する R O C K 阻害剤の添加の影響を調べるための培養条件を示す表である。

[図40]図 4 0 は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞に対する R O C K 阻害剤の添加の影響を調べるための添加物と上清回収の時期を示す表である。

[図41]図 4 1 は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞に対する R O C K 阻害剤の添加の影響を調べた F A C S 結果をまとめた表である。

[図42]図 4 2 は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞に対する R O C K 阻害剤の添加の影響を調べた細胞写真である。

[図43]図 4 3 は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞に対する R O C K 阻害剤の添加の影響を調べた F A C S 結果である。

[図44]図 4 4 は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞に対する R O C K 阻害剤の添加の影響を調べた F A C S 結果である。

[図45]図 4 5 は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞に対する R O C K 阻害剤の添加の影響を調べた F A C S 結果である。

[図46]図 4 6 は、本開示の一実施形態における # 1 9 0 7 1 9 の培養上清中の E L I S A P D G F - b b 測定結果（項目ごと）を示すグラフである。

[図47]図 4 7 は、本開示の一実施形態における # 1 9 0 3 1 8 の培養上清中の E L I S A P D G F - b b 測定結果（項目ごと）を示すグラフである。

[図48]図 4 8 は、本開示の一実施形態における # 1 9 0 7 1 9 の培養上清中の E L I S A P D G F - b b 測定結果（週ごと）を示すグラフである。

[図49]図 4 9 は、本開示の一実施形態における # 1 9 0 3 1 8 の培養上清中の E L I S A P D G F - b b 測定結果（週ごと）を示すグラフである。

[図50]図 5 0 は、本開示の一実施形態における # 1 9 0 7 1 9 の培養上清中

のELISA IL-8測定結果（週ごと）を示すグラフである。

[図51]図51は、本開示の一実施形態における#190318の培養上清中のELISA IL-8測定結果（週ごと）を示すグラフである。

[図52]図52は、本開示の一実施形態における#190802の培養上清中のELISA PDGF-bbおよびIL-8測定結果（項目ごと）を示すグラフである。

[図53]図53は、#190318の培養上清中のサイトカイン測定（Bio Plex）の結果（項目ごと）を示すグラフである。

[図54]図54は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞に対するROCK阻害剤の添加の影響を調べるための添加物の条件を示す表である。

[図55]図55は、本開示の一実施形態における#190719のROCK阻害剤のありなしでのP4での細胞写真である。

[図56]図56は、本開示の一実施形態における#190719のROCK阻害剤のありなしでのP4でのFACS結果である。

[図57]図57は、本開示の一実施形態における#190719のROCK阻害剤のありなしでのP4でのFACS結果である。

[図58]図58は、本開示の一実施形態におけるELISAでのPDGF-bbおよびIL-8の項目ごとの結果を示すグラフである。

[図59]図59は、本開示の一実施形態におけるELISAでのPDGF-bbおよびIL-8の週ごとの結果を示すグラフである。

[図60]図60は、本開示の一実施形態において、ROCK阻害剤による接着増強が本開示の細胞製造に関係するかどうかを調べた結果の細胞写真である。

[図61]図61は、本開示の一実施形態において、ROCK阻害剤による接着増強が本開示の細胞製造に関係するかどうかを調べた結果の細胞写真である。

[図62]図62は、本開示の一実施形態において、ROCK阻害剤による接着

増強が本開示の細胞製造に関係するかどうかを調べた結果の細胞写真である。

[図63]図 6 3 は、本開示の一実施形態において、R O C K 阻害剤による接着増強が本開示の細胞製造に関係するかどうかを調べた結果の細胞写真である。

[図64]図 6 4 は、代謝産物によるEpigenetics制御と細胞老化や細胞分化の破綻について表した模式図である。

[図65]図 6 5 は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞（分化成熟細胞）において発現する酵素リストである。

[図66]図 6 6 は、本開示の一実施形態におけるD A V I D解析のためのH C E Cの培養条件を示す模式図である。

[図67]図 6 7 は、本開示の一実施形態におけるD A V I D解析のためのH C E CのP 1でのF A C S結果である。

[図68]図 6 8 は、本開示の一実施形態におけるD A V I D解析のためのH C E CのP 4でのF A C S結果である。

[図69]図 6 9 は、本開示の一実施形態におけるD A V I D解析のためのH C E CのP 4での細胞写真である。

[図70]図 7 0 は、本開示の一実施形態におけるプロテオミクスのD A V I D解析のための手順である。

[図71]図 7 1 は、本開示の一実施形態における3群解析の結果である。

[図72]図 7 2 は、本開示の一実施形態におけるG O T E R M解析の結果である。

[図73]図 7 3 は、本開示の一実施形態におけるD A V I D解析後のミトコンドリアに関する比較結果を示す表である。

[図74]図 7 4 は、本開示の一実施形態におけるD A V I D解析後のミトコンドリアに関する比較のクラスタリング結果を示す表である。

[図75]図 7 5 は、本開示の一実施形態におけるD A V I D解析後のミトコンドリアに関する比較のクラスタリング結果を示す表である。

[図76]図76は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞（規格細胞）と非規格細胞との代謝経路に係る酵素や基質のタンパク発現強度を比較した模式図である。

[図77]図77は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞（規格細胞）と非規格細胞との代謝経路に係る酵素や基質のタンパク発現強度を比較した模式図である。

[図78]図78は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞（規格細胞）と非規格細胞との代謝経路に係る酵素や基質のタンパク発現強度を比較した模式図である。

[図79]図79は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞（規格細胞）と非規格細胞との代謝経路に係る酵素や基質のタンパク発現強度を比較した模式図である。

[図80]図80は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞（規格細胞）と非規格細胞との代謝経路に係る酵素や基質のタンパク発現強度を比較した模式図である。

[図81]図81は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞（規格細胞）と非規格細胞との代謝経路に係る酵素や基質のタンパク発現強度を比較した模式図である。

[図82]図82は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞（規格細胞）と非規格細胞との代謝経路に係る酵素や基質のタンパク発現強度を比較した模式図である。

[図83]図83は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞（規格細胞）と非規格細胞との代謝経路に係る酵素や基質のタンパク発現強度を比較した模式図である。

[図84]図84は、本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞（規格細胞）と非規格細胞との代謝経路に係る酵素や基質のタンパク発現強度を比較するために用いた抗原リストである。

[図85]図85は、本開示の一実施形態において、イオンチャンネル 単カル

ボン酸輸送体系を調べるための細胞染色結果を示す写真である。

[図86]図86は、本開示の一実施形態において、イオンチャンネル 単カルボン酸輸送体系を調べるための細胞染色結果を示す写真である。

[図87]図87は、本開示の一実施形態において、イオンチャンネル 単カルボン酸輸送体系を調べるための細胞染色結果を示す写真である。

[図88]図88は、本開示の一実施形態において、イオンチャンネル 単カルボン酸輸送体系を調べるための細胞染色結果を示す写真である。

[図89]図89は、本開示の一実施形態における#190719（規格細胞）のP2でのFACS結果と細胞内pHを示すグラフである。

[図90]図90は、本開示の一実施形態における#190719（規格細胞）のP2での細胞写真である。

[図91]図91は、本開示の一実施形態における#190802（非規格細胞）のP3でのFACS結果と細胞内pHを示すグラフである。

[図92]図92は、本開示の一実施形態における#190802（非規格細胞）のP3での細胞写真である。

[図93]図93は、本開示の一実施形態において、#190719（規格細胞）と#190802（非規格細胞）との細胞内pHを比較した結果を示すグラフである。

[図94]図94は、本開示の一実施形態において、添加物の効果を調べた結果を示すFACSと細胞写真である。

[図95]図95は、本開示の一実施形態において、添加物の効果を調べるための培養条件を示す模式図である。

[図96]図96は、本開示の一実施形態において、各培養条件での細胞でのFACS結果である。

[図97]図97は、本開示の一実施形態において、各培養条件での細胞でのFACS結果である。

[図98]図98は、本開示の一実施形態において、各培養条件での細胞でのFACS結果である。

[図99]図 9 9 は、本開示の一実施形態において、各培養条件での細胞におけるサイトカイン測定結果を示すグラフである。

[図100]図 1 0 0 は、各培養条件での細胞におけるサイトカイン測定結果を示すグラフである。

[図101]図 1 0 1 は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化呼吸の亢進を説明する模式図である。

[図102]図 1 0 2 は、本開示の一実施形態におけるミトコンドリアの酸化的リン酸化呼吸の亢進を示すグラフである。

[図103]図 1 0 3 は、ミトコンドリアの酸化的リン酸化呼吸の亢進と臨床の薬理効果との関連性を示す模式図である。

[図104]図 1 0 4 は、体性（幹）細胞からの脱分化経路による分化成熟・機能性ヒト角膜内皮細胞の誘導を示す模式図である。

[図105]図 1 0 5 は、細胞内 pH によりミトコンドリア機能が左右され、細胞の分化・脱分化状態が規定されることを説明する概念図である。

[図106]図 1 0 6 は、本開示の一実施形態における # C R 0 4 （規格細胞）の P 3 での F A C S 結果とその写真である。

[図107]図 1 0 7 は、本開示の一実施形態において、イオンチャネルの選択的発現を細胞の免疫染色によって確認した結果である。

[図108]図 1 0 8 は、本開示の一実施形態において、非規格細胞におけるヒストンのアセチル化亢進を示す結果である。

[図109]図 1 0 9 は、本開示の一実施形態において、規格細胞と非規格細胞とにおける免疫プロットティングの結果である。

[図110]図 1 1 0 は、本開示の一実施形態における # 1 9 1 2 2 4 S （規格細胞）の P 4 での F A C S 結果とその写真である。

[図111]図 1 1 1 は、本開示の一実施形態における # 2 0 0 3 1 3 （非規格細胞）の P 1 での F A C S 結果とその写真である。

[図112]図 1 1 2 は、本開示の一実施形態における # 1 9 1 2 2 4 S （規格細胞）の P 4 での F A C S 結果とその写真である。

[図113]図113は、本開示の一実施形態における#191224S（規格細胞）のP4でのFACS結果とその写真である。

[図114]図114は、本開示の一実施形態におけるHAT／HDAC活性の測定結果を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0010] 以下、本開示の実施の形態について詳細に説明する。なお、同様な内容については繰り返しの煩雑を避けるために、適宜説明を省略する。また、本明細書の全体にわたり、単数形の表現は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。従って、単数形の冠詞（例えば、英語の場合は「a」、「an」、「the」など）は、特に言及しない限り、その複数形の概念をも含むことが理解されるべきである。また、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で用いられることが理解されるべきである。従って、他に定義されない限り、本明細書中で使用されるすべての専門用語および科学技術用語は、本開示の属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。矛盾する場合、本明細書（定義を含めて）が優先する。

[0011] 最初に本開示において使用される用語および一般的な技術を説明する。

[0012] 本明細書において、「約」とは、後に続く数値の±10%を意味する。

[0013] 本明細書において「角膜内皮」および「ヒト角膜内皮」は、当該分野で用いられる通常の意味で用いられる。角膜とは、眼を構成する層状の組織の一つであり透明であり、最も外界に近い部分に位置する。角膜は、ヒトでは外側（体表面）から順に5層でできているとされ、外側から角膜上皮、ボーマン膜（外境界線）、固有層、デスメ膜（内境界線）、および角膜内皮で構成される。特に、特定しない限り、上皮および内皮以外の部分は「角膜実質」とまとめて称することがあり、本明細書でもそのように称する。

[0014] 本明細書では、角膜内皮組織に由来する細胞を「角膜内皮組織由来細胞」という。また、分化することで、角膜内皮細胞になる細胞を総括して「角膜内皮前駆細胞」という。

- [0015] 本明細書において「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」とは、ヒトの眼前房内に注入した際に、ヒト角膜機能（ヒトについていう場合は「ヒトヒト角膜機能」といい、特に制限するものではないが、本明細書において単に「ヒト角膜機能」という）を惹起する能力を有する、角膜の機能を惹起する能力を有する細胞である。「ヒト角膜機能を惹起し得る」とは、角膜内皮機能特性を惹起し得る（例えば、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効能を有する等）を包含し得る。
- [0016] 本明細書において「ヒトの眼前房内への注入時に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」とは、ヒトの眼前房内に注入した際に、角膜内皮機能特性（ヒトについていう場合は「ヒト角膜内皮機能特性」といい、特に制限するものではないが、本明細書において単に「角膜内皮機能特性」という）を発現する能力を有する、角膜内皮の機能性を有する細胞である。代表的な機能としては、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効能を有するものを示す。特に省略していう場合は「本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞」ともいう。ヒト細胞についていうときは、「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」という。本開示はおもにヒトの角膜細胞に関連するものであることから、特に断らない限りヒト細胞をいうことが理解される。本明細書において、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞は、そのままの状態で角膜内皮機能特性を有する「機能性成熟分化角膜内皮細胞」および機能を一部欠くものの同様に使用されまたは注入後に機能性成熟分化角膜内皮細胞と同等の機能を発揮する「中程度分化角膜内皮細胞」を包含する。
- [0017] 本明細書において「角膜内皮（細胞）機能特性」とは、角膜内皮組織に存在する角膜内皮細胞が正常な状態で有する視機能保持に有用な（細胞）機能特性をいう。なお、本明細書において、角膜内皮細胞機能特性と、角膜内皮機能特性とは、同じ意義を有し、invitroの議論においては多くの場合におい

て前者を示す。

[0018] 本明細書において「機能性成熟分化角膜内皮細胞」とは、健常なヒト角膜内皮組織に存在する成熟分化角膜内皮細胞およびその機能（代表的には、上記角膜内皮（細胞）機能特性）を有する任意の細胞を指し、ヒトの細胞の場合、機能性成熟分化ヒト角膜内皮細胞という。特に、角膜内（細胞）皮機能特性は、小型で六角形の敷石様形状を形成しミトコンドリア機能によるエネルギー代謝系を利用すること、並びに、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形質を保持することで確認され、注入したとき（例えば、ヒトの眼前房内）に、治療効果を有し得るかどうかで判定をすることができるが、それに限定されず、角膜内皮機能特性は、サロゲートマーカーを指標に判定することもできる。そのようなサロゲートマーカーとしては、（１）内皮ポンプ・バリア機能の保持、（C l a u d i n発現を含む）（２）特定のラミニンに対する接着・結合性、（３）分泌サイトカインプロファイル、（４）産生するマイクロRNA（m i R N A）プロファイル、（５）産生する代謝産物プロファイル、（６）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上述の角膜内皮（細胞）機能特性に繋がるイオンチャンネル、単カルボン酸輸送体の発現、（７）相転移細胞の生成に繋がるT C A回路などに係る代謝酵素が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、（８）インビトロ培養時の飽和細胞密度、（９）培養時に得られる細胞の空間的大きさやその分布、（１０）マウス角膜に対する液体窒素低温凍結損傷後に細胞注入した場合の細胞維持の１０種類のいずれかもしくはその組み合わせで判定することもできる。

[0019] （１）内皮ポンプ・バリア機能の保持の判定は、例えば、角膜内皮に通常使用されるポンプ機能測定法、バリア機能測定法を用いて判定することができる。このような判定は、シート形態の場合に利用されるUssing chamberを用いて Wigham C, Hodson S. : Current Eye Research, 1, 37-

41,1981、Hodson S, Wigham C. : J Physiol., 342:409-419,1983、H
atou S., Yamada M., Akune Y., Mochizuki H., Shiraishi A.,
Joko T., Nishida T., Tsubota K. :Investigative Ophthalmology
& Visual Science, 51, 3935-3942, 2010に記載の方法を応用した技
術が挙げられる。Claudin発現は、当該分野で公知の手法、例えば、免疫学的
手法を用いて確認することができるClaudin発現は当該分野で公知の任意の免
疫学的手法を用いて確認することができる。ただし、本開示の細胞は、懸濁
液中で注入されることが想定されることから、その場合、好ましくは、Claud
in発現または(2)～(10)のいずれかまたはその組み合わせを応用して
角膜内皮機能を評価することができる。

[0020] (2) 特定のラミニンに対する接着・結合性に関する判定には、ラミニン
511 (α 5鎖、 β 1鎖、 γ 鎖1の複合体)、ラミニン521 (α 5鎖、 β
2鎖、 γ 鎖1の複合体) またはその機能性フラグメント (例えば、ラミニン
511-E8フラグメント) に対する接着性および/またはこれに対するイン
テグリン (例えば、 α 3 β 1、 α 6 β 1等) の発現の上昇を指標に判定する
ことができる。そのような手法は細胞接着アッセイによって実施することが
できる。

[0021] ここで、ラミニン α 鎖について、「 α 5鎖」(LAMA5)とは、細胞外
マトリックスにある細胞接着分子のタンパク質・ラミニンのサブユニットの
1つであり、LAMA5; KIAA1907などと称する。ヒトLAMA5
は、それぞれ遺伝子およびタンパク質の配列がNCBI登録番号のNM_005560およ
びNP_005551に登録されている。OMIMは601033とのアクセッション番号で同定
される。ラミニン β 鎖について、「 β 1鎖」(LAMB1)とは、細胞外マ
トリックスにある細胞接着分子のタンパク質・ラミニンのサブユニットの1
つであり、LAMB1; CLM; LIS5などと称する。ヒトLAMB1は
、それぞれ遺伝子およびタンパク質の配列がNCBI登録番号のNM_002291および
NP_002282に登録されている。OMIMは150240とのアクセッション番号で同
定される。また、「 β 2鎖」(LAMB2) (laminin S)とは、細胞外マト

リックスにある細胞接着分子のタンパク質（ラミニン）のサブユニットの1つであり、LAMB2；LAMS；NPHS5などと称する。ヒトLAMB2は、それぞれ遺伝子およびタンパク質の配列がNCBI登録番号のNM_002292およびNP_002283に登録されている。OMIMは150325とのアクセッション番号で同定される。ラミニン γ 鎖について、「 γ 1鎖」（LAMC1）とは、細胞外マトリックスにある細胞接着分子のタンパク質（ラミニン）のサブユニットの1つであり、LAMC1；LAMB2などと称する。ヒトLAMC1は、それぞれ遺伝子およびタンパク質の配列がNCBI登録番号のNM_002293およびNP_002284に登録されている。OMIMは150290とのアクセッション番号で同定される。

[0022] （3）分泌サイトカインプロファイルの判定は、本明細書において別の箇所において説明される「血清」または「前房水」のサイトカインプロファイルの産生レベルを測定することで実施することができる。このようなサイトカインにはRANTES、PDGF-BB、IP-10、MIP-1b、VEGF、EOTAXIN、IL-1ra、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12（p70）、IL-13、IL-17、FGFbasic、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、MCP-1、MIP-1a、TNF- α 等が含まれるがそれらに限定されない。具体的には、サイトカインの統合解析のためのBio-Plex等のサイトカイン測定キットおよび解析システムを用いて解析することができる。

[0023] （4）産生するマイクロRNA(miRNA)プロファイルの判定は、本明細書において別の箇所において説明される「miRNAプロファイル」の解析手法を用いて測定することができる。例えば、マイクロRNA発現プロファイルの分析方法を用いて実現することができ、例えば、Torayの「3D-Genes」ヒトmiRNAオリゴチップ（miRBase version 17）を用いて実施することができる。組織および細胞の両方の試料から取得した全RNAを、例えば、miRCURY LNA（登録商標）microRNA Power Labeling Kits（Exiqon, V

edbaek, Denmark)などのキットを使用してHy5等の標識で標識したものと、上清から取得した全miRNAを標識したものとを調製する。標識したマイクロRNAを、別々にマイクロRNAチップの表面にハイブリダイズさせ、適切な条件（例えば、16時間32°Cで）インキュベートする。このマイクロRNAチップを、オゾンを含まない環境において洗浄および乾燥した後、3D-Gene scanner 3000 (Tora Industries Inc., Tokyo, JAPAN)のようなスキャナを使用してスキャンを行い、3D-Gene Extraction software (Tora)を使用して解析することができる。

[0024] (5) 産生する代謝産物プロファイルは、例えば、細胞内代謝物の代謝抽出物を、Internal Standard Solution (Human Metabolome Technologies; HMT, Inc., Tsuruoka, Japan)などの内部標準試薬を含有するメタノールを有するcHCEC培養容器から調製する。培地を置換し、細胞抽出物を処理し、CE-MS分析を行い代謝物を解析する。メタボローム解析は、Soga, et al. (Soga, D. et al., T. Soga, et al., Anal.Chem. 2002; 74: 2233-2239 Anal.Chem. 2000; 72: 1236-1241; T. Soga, et al., J. Proteome Res. 2003; 2: 488-494)によって開発された方法に従って、測定することができ、適宜自動統合ソフトウェア（それぞれMasterHands, Keio University, Tsuruoka, Japan (M. Sugimoto, et al., Metabolomics, 2009; 6: 78-95) および MassHunter Quantitative Analysis B.04.00, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)を用いて解析する。CEにおけるMTおよびTOFMSによって測定されたm/z 値に基づいて、HMT代謝物データベースから、仮定的な代謝物によってピークをアノテーションし、標準化して計算する。階層クラスター分析(HCA)および主成分分析(PCA)を行い、メタボローム測定を行うことができる。

[0025] (6) 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上述の角膜内皮(細胞)機

能特性に繋がるイオンチャネル、単カルボン酸輸送体の発現は、本明細書に記載されるかまたは公知の任意の手法を用いて測定することができる。例えば、実施例に記載されるように、角膜組織から得られた細胞を、固定し、特異的抗体を用いて免染することで、蛍光顕微鏡等で観察することで、測定することができる。このほか、イオンチャネルや単カルボン酸輸送体の機能を測定することで、これらの発現を測定することもできる。

- [0026] (7) 相転移細胞の生成に繋がるTCA回路などに係る代謝酵素が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もまた、本明細書に記載されるかまたは公知の任意の手法を用いて測定することができる。例えば、DAVID解析などを応用して、ミトコンドリアにオルガネラ選択的に代謝酵素が局在することを観察することができるが、これに限定されない。
- [0027] (8) インビトロ培養時の飽和細胞密度は、本明細書に記載される適宜の培養条件を用いて、細胞密度を測定することで判定することができ、細胞の大きさと並行して測定されることもあり、倒立顕微鏡システム(例えば、CKX41, Olympus, Tokyo, Japan)によって、BZX-700顕微鏡システム(Keyence, Osaka, Japan)等の画像取得システムを含む機器を用いて撮影位相差顕微鏡画像を取得し、細胞計数ソフトウェア(例えば、BZ-H3C Hybrid細胞計数ソフトウェア(Keyence))等を用いて定量することができる。本開示において好ましい飽和細胞密度は本明細書の他の箇所に記載されている。
- [0028] (9) 培養時に得られる細胞の空間的大きさやその分布は、本明細書に記載される適宜の培養条件を用いて、細胞の写真を撮影し任意のソフトウェア等で測定したりして、細胞の空間的大きさやその分布を測定することで判定することができ、BZ-H3C Hybrid細胞計数ソフトウェア(Keyence)等の粗画像処理ソフトウェアによって実現することができる。本開示において好ましい細胞の空間的大きさやその分布は本明細書の他の箇所に記載されている。
- [0029] (10) マウス角膜に対する液体窒素低温凍結損傷後に細胞注入した場合の細胞維持の判定は、マウスモデルを作製することにより実施することがで

きる。具体的には、適切なマウス（例えば、BALB/c）の角膜の中央領域（例えば、2 mm）を低温損傷により前処理し内皮細胞を取り除いてモデルを作製する。そしてそのモデルの眼前房に、判定すべき細胞を注入し、角膜透明性の特徴を臨床的に観察し、角膜の厚さをパキメータにより評価し、HCECの接着をヒト核染色により病理組織学的に検査してその細胞が機能を有するかどうかを確認する。

[0030] 角膜内皮組織に由来（角膜内皮組織の脱分化で得られる細胞も含む）したものではない細胞（例えば、幹細胞（例えば、誘導性多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）等から角膜内皮前駆細胞、角膜内皮細胞への成熟分化をさせて生産した細胞）は、本開示に記述する角膜内皮機能特性を有する限りにおいて本開示のヒトの眼前房内への注入時に角膜内皮機能特性を惹起し得る機能性角膜内皮細胞または機能性成熟分化角膜内皮細胞の範囲に入る。本明細書において示される説明や実験においては、本開示のヒト機能性成熟分化角膜内皮細胞は、「ヒト機能性成熟分化角膜内皮細胞」、「機能性成熟分化ヒト角膜内皮細胞」、「機能性細胞」、「目的細胞」、「規格細胞」等とも称されることがあるが、いずれも同義で使用される。

[0031] 本明細書において、「角膜内皮非機能性細胞」とは、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞（すなわち、「機能性成熟分化角膜内皮細胞」以外の細胞であり、「非目的細胞」、「不合格細胞」、「目的外細胞」、「非機能性細胞」、「非規格細胞」などと称することがある。

[0032] 本明細書において、「細胞指標」とは、ある細胞が、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞、（例えば機能性成熟分化角膜内皮細胞）であることを示す任意の指標をいい、成熟分化ヒト角膜内皮およびその機能を有する任意の細胞の有する特性であるため、「機能性細胞指標」ともいう。その具体的な特性は「細胞機能特性」ともいう。

[0033] 本明細書において「培養ストレスを極小化し得る培養条件」とは、増殖ストレスなどの細胞に係る培養時のストレスが、最小化（極小化）し得る任意の培養条件をいう。「培養ストレス」は、位相差顕微鏡による観察で相転移

を生じた大型で異形の細胞の混在が5～20%以上認められるか、ならびに、もしくは、培養30日目以降40日目までの細胞密度が1000個・mm²水準を下回るか否かを指標に測定することができ、あるドナーについて予備的実験でその指標で培養ストレスが極小化され得ることが判明したならば、その条件を実際の細胞の調製及び投与の際に適用することができる。このような培養条件は、例えば、細胞成長因子、例えば、上皮成長因子の量を形質転換が生じる量未満にして培養することで達成することができるが、これに限定されない。この量はドナーの年齢によっても、また細胞播種時の細胞密度によっても成長因子の添加濃度などによって変動し得るが、当業者は、入手し得る種々の情報や、ドナーの情報等を考慮し、このような条件（例えば、量等）を確定することができる。

[0034] 本明細書において「形質転換」とは、細胞の形質が正常ではない状態に変化することをいい、正常細胞が無制限に分裂を行うようになる、つまりがん化の意味、または化生の中で特にダイナミックなもの（幹細胞まで脱分化したり組織の基本形の壁を越えて変化したりするもの）の意味を含む。形質転換の例としては、EMT、線維化、上皮間葉系移行、老化、脱分化、内皮間葉系移行等のような細胞状態相転移(CST)を挙げることができる。角膜内皮細胞は、しばしば上皮間葉相転移のような形質転換を起こし、機能性成熟分化角膜内皮細胞でなくなることが多い。あるいは、形質転換は、内皮間葉系移行を含む。本開示の製造方法には、このような上皮間葉系移行または内皮間葉系移行の生じた細胞でも、脱分化後、成熟分化させることで、機能性成熟分化角膜内皮細胞に変換させることができる製造法を含む。

[0035] 本明細書において「形質転換が生じる量未満」とは、細胞成長因子などについて言及するとき、対象となる角膜内皮細胞の形質転換（例えば、内皮間葉系移行）が生じる量より少ないまたは全くない量をいう。形質転換が生じる量未満の細胞成長因子を使用する場合、増殖ストレスによる内皮間葉系移行を含む形質転換を惹起しないことが特徴である。例えば、細胞成長因子としてEGFを用いる場合には、形質転換が生じる量未満の量としては、約1

ng/mL未満、好ましくは約0.5 ng/mL未満、さらに好ましくは0 ng/mLである。

[0036] 本明細書において「内皮間葉系移行」(EndMT)とは、内皮細胞が間葉系細胞へと形質転換することをいう。

[0037] 本明細書では、「上皮間葉相転移」(EMT; 上皮間葉転換ともいう)とは、上皮細胞がその細胞極性や周囲細胞との細胞接着機能を失い、遊走、浸潤能を得ることで間葉系様の細胞へと変化するプロセスをいう。

[0038] 本明細書において「細胞成長因子」とは、動物の体内において、特定の細胞の成長、増殖を促すタンパク質の総称であり、「増殖因子」、「細胞増殖因子」と時に同義である。上皮細胞成長因子(EGF)、線維芽細胞成長因子(FGF)、インスリン様成長因子(IGF)、トランスフォーミング成長因子(TGFなど)が挙げられる。本開示では、培養中に細胞に増殖ストレスと呼称される細胞ストレスを与える成長因子を加えないことが特徴のひとつであり得る。添加濃度、添加時間、添加時期によりストレスの強度は変動する。

[0039] ここで、本明細書において使用され得る各種試料や製造方法における出発細胞としては、機能性成熟分化角膜内皮細胞または目的とする細胞またはそれに由来する物質であって遺伝子発現を可能にするものを含むと考えられる試料であればよく、例えば、角膜内皮から直接単離した細胞(角膜内皮組織由来細胞ともいう)あるいは分化することで角膜内皮様の機能を有するようになった細胞を用いることができる。角膜内皮組織由来細胞は公知の方法により取得することができる(Koizumi N, Okumura N, Kinoshita S., Experimental Eye Research, 2012;95:60-7.)。好ましくは、角膜内皮のドナーから得ら

れた細胞等を細胞試料として用いることができる。また、インビトロで分化誘導された、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞または機能性成熟分化角膜内皮細胞を含む培養細胞を試料として用いることができる。インビトロにおける本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞または機能性成熟分化角膜内皮

細胞への分化誘導は、公知のES細胞、iPS細胞、骨髄間質細胞等の細胞を出発材料として、公知の方法、例えば、AMED法等による分化させる<Ueno M, Matsumura M, Watanabe K, Nakamura T, Osakada F, Takahashi M, Kawasaki H, Kinoshita S, Sasai Y.;, Proc Natl Acad Sci USA. 103(25): 9554-9559, 2006. >処理を行うことにより実施することができる。

- [0040] 本明細書で用いられる場合、代表的には、CD44陰性～弱陽性CD24陰性CD26陰性である、miRNAの「高発現」、「中発現」および「低発現」等の表現は、細胞の発現強度を相対的に表現する際に用いられる。なお、「中発現」はない場合もあり、その場合、「高発現」および「低発現」でそれぞれの細胞を識別することができる。
- [0041] 本明細書において「細胞の大きさ」は、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞の一つの細胞指標であり、当該分野で慣用される技術によって測定される。細胞の大きさは、例えば、細胞面積によって表現される。本明細書において「細胞面積」は、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞の一つの細胞指標であり、細胞の写真を撮影し任意のソフトウェア等で測定することができる。このような測定手法としては、例えば、BZ-H3C Hybrid細胞計数ソフトウェア(Keyence)等の画像処理ソフトウェアを利用する方法が挙げられる。その平均値は「平均細胞面積」という。通常は算術平均が用いられる。
- [0042] 本明細書において「細胞の密度」、「(平均)細胞密度」は、一定面積に存在する細胞の数で表示される細胞の指標であり、当該分野で慣用される任意の技術によって測定される。細胞集団の平均密度は、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞または機能性成熟分化角膜内皮細胞の一つの細胞指標である。平均としては通常は算術平均が用いられる。細胞の大きさと並行して測定されることもあり、倒立顕微鏡システム(例えば、CKX41, Olympus, Tokyo, Japan)によって、BZ-X700顕微鏡システム(Keyence, Osaka, Japan)等の画像取得システムを含む機器を用いて撮影位相差顕微鏡画像を取得し、細胞計数ソフトウェア(例えば、BZ-H3C Hybrid細胞計数ソフトウェア(Keye

nce))等を用いて定量することができる。細胞密度は、飽和細胞培養（（培養）コンフルエントともいい、本明細書では飽和細胞培養と（培養）コンフルエントとは同じ意味で使用される。）時におけるものを指標とすることのほか、播種する際の密度も本開示の製造方法において目安として使用される。また、細胞密度は、注入後の治療成績の指標としても使用され得る。

[0043] 本明細書において「細胞代謝産物」とは、細胞が生成する任意の代謝産物をいい、「細胞代謝産物（該産物）の関連生体物質」とは、細胞代謝産物に関連する任意の生体物質（例えば、その代謝産物を合成する酵素、代謝する酵素、シグナル伝達経路に関連するタンパク質等）をいい、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞または機能性成熟分化角膜内皮細胞の一つの細胞指標である。代謝産物としては、例えば、ミトコンドリア系におけるエネルギー代謝系の産物、グルタチオン代謝系産物、メチオニン代謝回路産物、脂質代謝産物、ペントースリン酸経路産物、トリカルボキシル酸（TCA）回路代謝産物、解糖系代謝産物等に関連する任意の産物が含まれ、特に、TCA回路代謝産物、解糖系代謝産物が重要である。細胞代謝産物および該産物の関連生体物質としては、例えば、コハク酸、Pro、Gly、グリセロール3-ホスフェート、Glu、乳酸、アルギノコハク酸、キサンチン、N-カルバモイルアスパラギン酸、イソクエン酸、cis-アコニット酸、クエン酸Ala、3-ホスホグリセリン酸、ヒドロキシプロリン、リンゴ酸、尿酸、ベタイン、葉酸、Gln、2-オキシイソ吉草酸、ピルビン酸、Ser、ヒポキサンチン、Asn、Trp、Lys、コリン、Tyr、尿素、Phe、Met、カルノシン、Asp、オルニチン、Arg、クレアチン、2-ヒドロキシグルタミン酸、β-Ala、シトルリン、Thr、Ile、Leu、Val、クレアチニン、His、N、N-ジメチルグリシンを挙げることができる。

[0044] 本開示の細胞の検出、同定、品質管理等は、マーカーとなる物質に結合する物質や相互作用分子を用いることによって実現することができる。本開示の関連において、マーカーとなる物質に「結合する物質」または「相互作用

分子」は、少なくとも一時的にマーカーとなる物質（例えば、CD44）等の分子に結合し、そして好ましくは、結合したことを表示しうる（例えば標識されるか標識可能な状態である）、分子または物質である。CD44等の分子に結合する物質はCD44等の分子のリガンドであってもよく、その例としては、抗体、アンチセンス・オリゴヌクレオチド、siRNA、低分子量分子（LMW）、結合性ペプチド、アプタマー、リボザイムおよびペプチド模倣体（peptidomimetic）等を挙げることができ、例えばCD44等の分子に対して向けられる、結合性タンパク質または結合性ペプチド、並びにCD44等の分子の遺伝子に対して向けられる核酸も含まれる。本明細書において、CD44等の分子について「結合性タンパク質」または「結合性ペプチド」とは、CD44等の分子に結合する種類のタンパク質またはペプチドを指し、そしてCD44等の分子に対して指向されるポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体、抗体フラグメントおよびタンパク質骨格を含むがこれらに限定されない。

[0045] 本明細書において、活性、発現産物（例えば、タンパク質、転写物（RNAなど））の「低下」、「減少」または「抑制」あるいはその類義語は、特定の活性、転写物またはタンパク質の量、質または効果における低下、減少、または減少させる活性をいう。減少のうち活性、発現産物等が検出限界未満になる場合、特に区別して「消失」ということがある。本明細書では、「消失」は「低下」、「減少」または「抑制」に包含される。また、「低下」とは、何らかの遺伝子などがすでに発現している状態からその量または効果などが減少することだけではなく、発現を何ら惹起させないことも含む。

[0046] 本明細書において、活性、発現産物（例えば、タンパク質、転写物（RNAなど））の「増加」または「活性化」あるいはその類義語は、特定の活性、転写物またはタンパク質の量、質または効果における増加または増加させる活性をいう。「増加」には、比較前の状態で特定の活性、転写物またはタンパク質の量、質または効果が存在している場合（既に存在する量が相対的に増加すること）の他、特定の活性、転写物またはタンパク質の量、質または効

果が存在していない場合に、惹起されること（無から有）も包含される。

[0047] 本明細書において「ミトコンドリア依存性酸化的リン酸化」とは、「ミトコンドリアOXPHOS」とも呼ばれ、の呼吸活性に依存した酸化的リン酸化の反応をいう。「ミトコンドリアOXPHOS」に関連する反応は、細胞内代謝の状態を解析する細胞外フラックスアナライザーは、OXPHOS活性の指標である酸素消費速度（OCR）および解糖活性の指標である細胞外酸化速度（ECAR）を計測することができる

[0048] 本明細書において「細胞質・核内のアセチルC○Aの発現」とは、細胞質・核内でアセチルC○Aが発現することをいう。本明細書では、公知の蛋白発現を解析する任意の手法や抗体を用いる細胞免疫染色によりアセチルC○Aの発現を測定することができる。

[0049] 本明細書において「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」とは、アセチルC○Aによってヒストンがアセチル化することで、多種の遺伝子の発現が調節されることをいう。これらの多遺伝子の発現で細胞の相転移CSTが引き起こされる。本明細書では、例えば、CellMetab. 2015 Mar 3;21(3):349-50.、Trends in Cell Biology, June 2017, Vol.27, No.6、およびSheikhet al. Nature Rev. Genetics, 2019に開示されるような手法でエピジェネティックな多遺伝子発現を測定することができ、また代謝産物によるEpigenetics制御と細胞老化や細胞分化の破綻については

図64の模式図のように考えることができる。

[0050] 本明細書において「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」とは、「角膜内皮（細胞）機能特性関連機能性蛋白」または「（本開示の）機能性蛋白」ともいい、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、視力改善に繋がる機能を有する任意の蛋白をいい、AQP1、Na-KATPase、NHE1等の本明細書において記載される任意の蛋白の

他、他の蛋白も包含することが理解される。機能性蛋白には、例えば、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）や、重炭酸脱水酵素5B（CA5B）（発現が亢進）の他、ミトコンドリアにおける、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）等、も包含されることが理解される。

[0051] また、「機能性蛋白」の「発現」には、「機能性蛋白」が発現することに加え、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、もしくは、細胞質・核内のアセチルCoAの発現、並びにAcCoA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も包含される。

[0052] 加えて、「機能性蛋白」の「発現」には、「機能性蛋白」が発現することに加え、「機能性蛋白」とは逆の機能を有する蛋白の発現の低下または惹起されないことも包含され、そのようなものには、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などが包含される。

[0053] ここで、実質的にまたはほとんど「発現しない」とは、本開示の発明において使用されるとき、ヒト角膜内皮機能特性を惹起し得るかどうかで判定することができる。

[0054] 以上から、「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」は、「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」と表現されることもあり得る。

[0055] 本開示において、「R h oキナーゼ」または「R O C K」（Rho-associate d coiled-coil forming kinase：Rho結合キナーゼ）とは、R h oの活性化に伴い活性化されるセリン／スレオニンキナーゼを意味する。例えば、R O K α （R O C K-11：Leung, T. et al., J.Biol.Chem., 270, 29051-29054, 1995）、p 1 6 0 R O C K（R O K β 、R O C K-1：Ishizaki, T. et al., The EMBO J., 15(8), 1885-1893, 1996）およびその他のセリン／スレオニンキナーゼ活性を有するタンパク質が挙げられる。

[0056] R O C K阻害剤（R h oキナーゼ阻害剤ともいう）としては、下記文献：米国特許4 6 7 8 7 8 3号、特許第3 4 2 1 2 1 7号、国際公開第9 5 / 2 8 3 8 7、国際公開9 9 / 2 0 6 2 0、国際公開9 9 / 6 1 4 0 3、国際公開0 2 / 0 7 6 9 7 6、国際公開0 2 / 0 7 6 9 7 7、国際公開第2 0 0 2 / 0 8 3 1 7 5、国際公開0 2 / 1 0 0 8 3 3、国際公開0 3 / 0 5 9 9 1 3、国際公開0 3 / 0 6 2 2 2 7、国際公開2 0 0 4 / 0 0 9 5 5 5、国際公開2 0 0 4 / 0 2 2 5 4 1、国際公開2 0 0 4 / 1 0 8 7 2 4、国際公開2 0 0 5 / 0 0 3 1 0 1、国際公開2 0 0 5 / 0 3 9 5 6 4、国際公開2 0 0 5 / 0 3 4 8 6 6、国際公開2 0 0 5 / 0 3 7 1 9 7、国際公開2 0 0 5 / 0 3 7 1 9 8、国際公開2 0 0 5 / 0 3 5 5 0 1、国際公開2 0 0 5 / 0 3 5 5 0 3、国際公開2 0 0 5 / 0 3 5 5 0 6、国際公開2 0 0 5 / 0 8 0 3 9 4、国際公開2 0 0 5 / 1 0 3 0 5 0、国際公開2 0 0 6 / 0 5 7 2 7 0、国際公開2 0 0 7 / 0 2 6 6 6 4などに開示された化合物があげられる。かかる化合物は、それぞれ開示された文献に記載の方法により製造することができる。具体例として、1-（5-イソキノリンスルホニル）ホモペラジンまたはその塩（たとえば、ファスジル（1-（5-イソキノリンスルホニル）ホモペラジン））、（+）-トランス-4-（1-アミノエチル

) - 1 - (4 - ピリジルカルバモイル) シクロヘキサン ((R) - (+) - トランス - (4 - ピリジル) - 4 - (1 - アミノエチル) - シクロヘキサンカルボキサミド) またはその塩 (たとえば、Y - 27632 ((R) - (+) - トランス - (4 - ピリジル) - 4 - (1 - アミノエチル) - シクロヘキサンカルボキサミド 2 塩酸塩 1 水和物) など) などがあげられ、これらの化合物は、市販品 (和光純薬株式会社、旭化成ファーマ等) を好適に用いることもできる。本明細書において ROCK 阻害剤は、培養ヒト角膜内皮細胞を増殖および／または分化・成熟させる工程において特に用いられる。一つの実施形態では、脱分化させて角膜内皮前駆細胞を得る工程においては ROCK 阻害剤が使用されないこともある。また、理論に束縛されることを望まないが、ROCK 阻害剤は、脱分化または分化・成熟させる対象となる角膜内皮細胞または角膜内皮前駆細胞などの継代数、またはその由来となるドナー年齢などの細胞固有の性質に応じて、脱分化させて角膜内皮前駆細胞を得る工程において使用してもよく、使用しなくてもよい。例えば、一例を述べると、継代数が少ない場合 (例えば、継代数が 1、2 または 3 程度の場合) および／または若いドナー由来の細胞の場合は、増殖および／または分化・成熟させる工程のみに使用してもよく、継代数が多い場合 (例えば、継代数が 4、5、6 等) は、ROCK 阻害剤を、細胞播種時において使用することとすることもできる。このように、一定の実施形態では、増殖および／または分化・成熟させる工程のみに ROCK 阻害剤を用いるだけで、全期間 ROCK 阻害剤を付与した場合に匹敵するレベルの細胞を得ることができることを見出したことは、本開示における一つの成果でありうる。

[0057] (好ましい実施形態)

以下に本開示の好ましい実施形態を説明する。以下に提供される実施形態は、本開示のよりよい理解のために提供されるものであり、本開示の範囲は以下の記載に限定されるべきでないことが理解される。従って、当業者は、本明細書中の記載を参酌して、本開示の範囲内で適宜改変を行うことができることは明らかである。また、本開示の以下の実施形態は単独でも使用され

あるいはそれらを組み合わせて使用することができることが理解される。

[0058] なお、本明細書では、下記の種々の局面においては、国際公開2017/141926を適宜参酌して援用する。従って、適切な場合、WO2017/141926の内容は、本明細書において参考として援用されることが理解される。

[0059] (ヒトの眼前房内への移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)

本開示の一局面において、本開示は、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、ヒト機能性角膜内皮細胞を提供する。このような機能性蛋白の発現または蛋白の惹起がされないまたは低下されることは、本明細書の開示に従って、本実施例の例示に鑑み、当業者が適宜実施することができる。本開示では、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、ヒト機能性角膜内皮細胞は、「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、ヒト機能性角膜内皮細胞」と表現されることもあるが、これらは特に注釈を入れない限り同義である。

[0060] 一実施形態では、本開示は、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って、(i)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の増加、(ii)細胞質・核内のアセチルCoAの発現が増加しないこと、および(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

の低下からなる群から選択される少なくとも1つを含む、細胞が提供される。この場合、アセチルC o Aの発現の増加は、非機能性角膜内皮細胞において発現していなかったものが発現することも含み、またエピジェネティックな多遺伝子発現の低下とは、なんら惹起しないことも含む。また本開示の一実施形態において、このような細胞は、(i) 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の増加、(ii) ミトコンドリア内においてアセチルC o Aの発現がオルガネラ選択的に起こり、細胞質・核内のアセチルC o Aの発現の生じないこと、(iii) 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上述の角膜内皮(細胞)機能特性に繋がるイオンチャネル、単カルボン酸輸送体の発現および(iv) 相転移細胞の生成に繋がるTCA回路などに係る代謝酵素が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、就中、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の低下もしくは起きないこと、からなる群から選択されるすべてを含むこともできる。

[0061] 本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞は、内皮間葉転換が起きておらず、または実質的に起きていない。

[0062] また本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞は、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C o A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おり、他の実施形態においてはこの細胞では、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C o Aアセチルトランスフ

エラーゼ2（ACAT2）、及び乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）からなる群から選択される少なくとも1つの酵素が発現しておらず、または実質的に発現していない。

[0063] また本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞は、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）の発現が亢進しており、他の実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞は、重炭酸脱水酵素5B（CA5B）の発現が亢進している。

[0064] また本開示の一実施形態において、本開示の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ることもできる。

[0065] さらに、本開示の一実施形態において、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 (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確認する工程を含む、方法を提供する。

[0066] また他の実施形態においては、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 × 10⁶細胞/450 μL (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 (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、細胞集団を提供し、この場合、(1) ~ (13) のすべての項目を充足する細胞集団とすることもできる。

[0067] なお、実際の運用においては、すべての項目を採用する必要は必ずしもなく、品質規格としては、(1) ~ (13) のいくつかを採用するだけでもよい。

[0068] 例えば、(3)、(5)のうち CD44^{high} < 5 %、CD44^{low} > 90 %、CD105^{-~weak} > 90 %、CD90+ < 5 % ; (6)、(11)、(12)、(13) を品質規格として採用することができる。

[0069] また、(1) ~ (13) をすべて採用する実施形態は、例えば、何らかの事故が起こり細胞の同一性を担保できなくなった時の生物学的同等性の試験を行う際に採用されることができる。

[0070] 加えて、(1) ~ (13) に加えて、または代替的に、本明細書において開示された1または複数の他の評価項目を試験に加えることができる。

このように、本開示は、臨床で極めて優れた効果を示す培養ヒト角膜内皮細胞を作出した上で、その細胞を同定できる技術も明確にしたという点で、

極めて有用性の高い技術を提供するものといえる。

[0071] 他の局面において、本開示は、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（本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞ともいう。）を提供する。本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞は、成熟分化角膜内皮の角膜内皮機能特性を有するものであり、細胞注入治療（例えば、ヒトの眼前房内への注入時に角膜内皮機能特性を惹起し得る）においても効果を奏するものであることから、代表的には、ヒトの眼前房内への注入時に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ということができる。本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞は機能性成熟分化角膜内皮細胞のほか、中程度分化角膜内皮細胞を含みうる。本開示の機能性成熟分化角膜内皮細胞は、角膜内皮機能を発揮する成熟分化した細胞であり、注入に最適な亜集団であるエフェクター細胞が小型で六角形の敷石様形状を形成しミトコンドリア機能によるエネルギー代謝系を利用する。

[0072] 従来「培養角膜内皮細胞」または「培養ヒト角膜内皮細胞」との名称の細胞が報告されているが、これらが複数の亜集団から構成されていることは知られておらず、これを明らかにし、その中で特に細胞注入療法に最適な亜集団が存在することも知られていなかったことから、本開示の意義は大きい。特に、本開示の開示前は、再生医療に随伴する細胞の不均質性に係る課題自体がヒト角膜内皮細胞においては明確には認識されておらず、このような課題を見出し解決したことの意義は大きい。ヒト角膜内皮細胞（HCEC）は、インビボでは細胞分裂することができず細胞周期のG1期で停止しているものの、増殖能は依然保持しているとされているが、近年の研究から、HCECを長期間培養することは大変困難であると理解されていたからである。

[0073] 本開示の応用例として、特に、高品質で核型異常を示さず免疫拒絶応答を惹起しない「アロ」機能性成熟分化ヒト角膜内皮細胞を懸濁液として用いて前房内注入による角膜内皮機能の再生を可能とするという点で注目される。本開示の細胞を用いた医療技術では、特に、若年者ドナー由来の角膜内皮細胞を、生体外で拡大培養、増幅後、細胞懸濁液を水疱性角膜症患者の前房内

に注入する治療を可能とするものであり、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に基づく臨床研究において、ヒト適用においての安全性、臨床POCが本開示により実証・確立されたものである。

[0074] 本開示の細胞を提供することができた経緯の一つとして、注入治療に用いる細胞は不均質細胞亜集団の混合物であること、および治療に使用され得る「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」はその一部に限定されることを見出したことがある。

[0075] 本開示において、角膜内皮細胞では、核型異常は亜集団選択的に生じ、亜集団選択的に反応する自己抗体が存在することも判明した。本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞は、特に、機能性成熟分化角膜内皮細胞ではかかる異常はなく、他亜集団に比較し、免疫拒絶反応に係るHLAクラスI抗原は他亜集団より相対的に低発現で、従来、細胞マーカーではないかとこれまで想定されていたCD200抗原の発現が陰性であることも判明した。非目的細胞では細胞老化に係るサイトカイン（SASP関連タンパク質）産生が高いことも判明した。

[0076] 本開示の開示前は、再現性の良い培養手段が限られていたため、線維化や細胞老化、上皮間葉系移行（EMT）、内皮間葉系移行などのような細胞状態相転移（CST）がなく核型異数性のない培養ヒト角膜内皮細胞をインビトロで増殖しようとする試みは、その細胞特性に関する知見ならびに細胞集団が複数の亜集団から構成されるのか、培養条件により産生される細胞集団が安定的公正を示すかなどに関する知見・報告が全くなく、そうした視点での解析すら行われていなかったため、著しく困難であった。

[0077] 培養HCECは、CSTを起こして老化表現型、EMTおよび線維芽細胞形態に向かう傾向がある。本発明者らは、移入細胞として不適切なこれら培養夾雑細胞を識別する明確な細胞表面マーカーを同定し、非機能性ヒト角膜内皮組織の再構築に適用可能であるHCEC集団を規定することを可能にした。

なお、本開示では、必要に応じて、適宜WO2017/141926に記載されている

細胞マーカーを用いることができる。

[0078] 一つの実施形態では、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞は、本明細書において規定される細胞指標の角膜発現特性を有する。

[0079] 本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞が有し得る細胞指標には、細胞表面マーカー（CDマーカー等）、細胞産物特性、細胞形態指標、細胞の遺伝子特性などが含まれ、具体的には、細胞表面マーカー（CDマーカー等）；タンパク質性産物および該産物の関連生体物質の特性；SASP関連タンパク質の発現特性；miRNA（例えば、細胞内miRNA、分泌型miRNA等）の発現；エクソゾームの特性；細胞代謝産物および該産物の関連生体物質の発現特性；細胞の大きさ；細胞の密度および自己抗体反応性細胞の存在を含みうる。本開示の機能性成熟分化角膜内皮細胞は、その細胞指標が、特定の範囲またはレベルの細胞機能特性またはその組み合わせを示す。したがって、特定の細胞指標の特定の範囲またはレベルの細胞機能特性またはその組み合わせを定めることにより、本開示の機能性成熟分化角膜内皮細胞かどうかを判定することができる。本開示の機能性成熟分化角膜内皮細胞に特有の特定の範囲またはレベルの細胞機能特性またはその組み合わせについては、本開示で初めて同定されたものであり、これにより種々の細胞の亜集団を特定することができ、品質管理や品質検定をすることができるようになり、ひいては、効果の高い治療を達成することが可能となった。以下に、これらの細胞指標およびその特定の範囲またはレベルの細胞機能特性またはその組み合わせについて、具体的に詳細に説明する。

[0080] 特定の実施形態では、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞は、CD166陽性およびCD133陰性を含む細胞機能特性を有する。さらなる細胞機能特性として重要なものにCD44の発現特性があり、その発現強度は好ましくは、CD44陰性～中陽性、より好ましくは、CD44陰性～弱陽性、さらに好ましくは、CD44陰性を挙げることができるが、それに限定されない。本開示では、角膜内皮細胞または角膜内皮様に分化させた細胞において機能性かどうかを確認するために、CD166陽性およびCD133陰性

であることを確認することによって、機能性かどうかを確認することができ
ることを見出した。これに加えて、CD44についてもその発現が低い（CD
44 陰性～中陽性、好ましくは、CD44 陰性～弱陽性）ことを確認する
ことで、機能性かどうかをより高い精度で見出すことができた。

[0081] したがって、好ましい実施形態では、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞は、CD166陽性、CD133陰性およびCD44陰性～弱陽性を含む細胞機能特性を有する。理論に束縛されることを望まないが、これらの3つの細胞マーカーを有することによって、角膜内皮細胞または角膜内皮様に分化させた細胞において、高い品質の機能性を有する機能性成熟分化角膜内皮細胞であることが確認された。このような機能性は、臨床研究の結果において、短期間（例えば、1か月程度）で、角膜内皮細胞検査（スペキュラ）の値で見ると約1000（個/mm²）を超えるレベル、約2000（個/mm²）を超えるレベル、好ましくは約2300（個/mm²）を超えるレベル、さらに好ましくは約2500（個/mm²）を超えるレベル、場合によっては約3000（個/mm²）を超えるレベルという高いレベルの治療効果が達成されることが示されている。

[0082] さらに好ましくは、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞は、CD166陽性、CD133陰性およびCD44陰性を含む細胞機能特性を有する。理論に束縛されることを望まないが、CD44陰性細胞にさらに限定することによって、増殖能等が高度に担保された品質の高い細胞（本明細書では「高品質」の機能性成熟分化角膜内皮細胞ということがある。）をより適切に提供することができる。「高品質」の機能性成熟分化角膜内皮細胞は、より安定し、改善された角膜内皮機能特性を有する。

[0083] 別の実施形態では、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞は、CD166陽性、CD133陰性およびCD200陰性を含む細胞機能特性を有する。従来CD200については、CD200陽性が角膜内皮細胞の特性であるといわれてきたが、本開示において亜集団ごとに詳細に検討することにより、CD200陽性細胞は移入には適さないCSTを有する大型細胞であること

が判明するとともに、CD200陰性がヒトの眼前房内への移入時にヒト角膜内皮機能特性を惹起し得る機能性角膜内皮細胞の特性であることを見出した。このような特性については、従来の知見では予想できなかったことであり、本開示において亜集団を丹念に分析した結果であるともいえる。

[0084] 別の実施形態では、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞は、CD166陽性、CD133陰性、CD44陰性～CD44弱陽性およびCD90陰性～弱陽性を含む細胞機能特性を有する。これによりさらに細胞の同質性を担保することができる。あるいは、細胞表面抗原は、CD166陽性、CD133陰性、およびCD44陰性～中陽性、CD90陰性表現型を含む。別の実施形態において、細胞表面抗原は、CD166陽性、CD133陰性、およびCD44陰性～CD44弱陽性表現型を含み、あるいは、細胞は、CD44陰性～CD44弱陽性表現型を含む細胞表面抗原を発現する。

[0085] 本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞は、さらに追加の細胞機能特性を有し得る。このような細胞機能特性としては、CD90陰性（CD90陰性～弱陽性）、CD105陰性～弱陽性、CD24陰性、CD26陰性、LGR5陰性、SSEA3陰性、MHC1弱陽性（特に、相転移細胞に比較して弱陽性である。）、MHC2陰性、PD-L1陽性、ZO-1陽性、Na⁺/K⁺-ATPase陽性、Claudin10陽性などの発現特性のうち、一つまたはそれより多くの発現特性を含みうるが、これらに限定されない。あるいは、群は、CD105陰性～弱陽性、CD24陰性、CD26陰性、LGR5陰性、SSEA3陰性、MHC1弱陽性、MHC2陰性、ZO-1陽性、Na⁺/K⁺-ATPase陽性からなる群であってもよい。

[0086] 本明細書において、CDマーカー等の細胞指標のマーカーの発現の強度は、発現が実質的にないものを陰性（-と表示することがある。また、-と±とを分ける場合はいずれも含む）と表示する。ここで、陰陽性（dull Positive）は本明細書では陰性に包含する。陰性ではないもの、すなわち発現が有意に観察されるものを陽性（すなわち、+と-との2分類で表示する場合は+と表示することがある。）で表す。特に発現レベルを区別する場合、その

強度を3段階に分類し、弱陽性、中陽性、強陽性で識別する。FACS測定の結果グラフの表示等の関係から、これらは、+の個数で表示することもあり、弱陽性、中陽性、強陽性はそれぞれ、+、++、+++で表示されることもあるが、これらは同義である。この場合、「弱陽性」「中陽性」「強陽性」として区別することができる。区別しない場合は、単に陽性といってもよい。弱陽性には満たない場合通常は陰性という。これらのレベルの強度は、当該分野で慣用される通りに用いられる。これらのレベルは、相対的なものであり、以下のように定義する。例えば、「-」は発現が実質的にみられないものを指す。発現が認められるものは、弱陽性、中陽性、強陽性の3段階に分類する。FACS分離の際に、シグナルは陰性、弱陽性、中陽性、強陽性に等級づけることができる。

[0087] 具体的なレベルは、FACSにおけるシグナル強度の表示に関して、陰性、陰陽性、弱陽性、中陽性、強陽性の表示について、平均蛍光シグナル強度(MFI)を用いて識別することができる。細胞の分布をヒストグラムで表示して、相対的に判断して陰性、陰陽性、弱陽性、中陽性、強陽性を表示することができるが、さらに具体的な測定値についての判断基準を説明すると、具体的には以下のようなレベルが例示される。

[0088] 本明細書では、CDマーカー等の細胞指標のマーカーの発現の強度は代表的に、標識の蛍光の種類、機器設定により蛍光強度が異なるため、以下の条件：PE-Cy 7 標識抗ヒトCD44抗体 (BD Biosciences) を使用して、FACS Canto II の Blue laser の Area Scaling Factor を0.75、PE-Cy 7 のvoltage を 495 に設定した場合の弱の蛍光強度範囲はおおよそ3800未満、中の蛍光強度範囲はおおよそ3800以上～27500未満、強の蛍光強度範囲はおおよそ27500以上である。尚、本明細書の実施例において、この設定での陰性対照(アイソタイプコントロール)の平均蛍光強度はおおよそ50であった。(55±25の範囲、細胞ロットにより同じ設定でも多少ずれることがあるが、当業者はこれらのずれを理解して実施することができる。)。したがって、「弱の蛍光強度範囲はおおよそ3800未満、中の蛍光強度範囲はおおよそ3800以上～275

00未満、強の蛍光強度範囲はおよそ27500以上である。」からすると、陰性対照（アイソタイプコントロール）の平均蛍光強度PE-Cy 7: 約50 [33~80程度]であるため、弱: <76倍、中: 76~550倍、強>550倍となる。陰性対照（アイソタイプコントロール）について同じ染色強度パターンであれば陰性であり、少しでもシフトすれば陽性と判断する。

[0089] 本明細書において使用される場合、他の設定値としては以下を挙げることができる:

- ・ Area Scaling Factor: FSC=0.5、Blue laser= 0.75、Red laser=0.8
- ・ voltage: FSC=270、SSC=400、FITC=290、PE=290、PerCP-Cy 5.5=410、PE-Cy 7=495、APC=430

・ 陰性対照（アイソタイプコントロール）の平均蛍光強度としては、以下を挙げることができる。

FITC: 約130 [65~225程度]

PE: 約120 [73~204程度]

PerCP-Cy5.5: 約120 [74~191程度]

PE-Cy 7: 約50 [33~80程度]

APC: 約110 [67~196程度]。

[0090] なお、このような細胞のマーカーの強度は、蛍光活性化細胞分類及び免疫組織化学など（これらに限定されるものではない）の技術によって容易に評価できる。上記のマーカー及びそれらの発現レベルに関して、「陰性」はマーカーの発現が欠如している又はそのレベルが著しく低いことを意味し、「陽性」は発現が顕著であることを意味する。細胞マーカーの「陰性」から「陽性」への移行は、欠如している発現又は低レベルの発現から高レベル又は著しいレベルの発現への変化を示す。「弱陽性」という用語は弱い発現すなわち低レベルの発現を意味し「低発現」と表示されることもあり、「中陽性」とは容易に検出できる中レベルの発現を意味するため「中発現」と表現されることもあり、「強陽性」は発現が顕著でありきわめて容易に検出できる強い発現すなわち高レベルの発現を意味し、「高発現」と表示されることも

ある。この場合、「弱陽性」から「中陽性」）、「中陽性」から「強陽性」又は「強陽性」から「中陽性」、「中陽性」から「弱陽性」への発現の移行は、容易に確認できる。例えば、非目的細胞はCD44強陽性を示し、前駆細胞はCD44中陽性を示し、本開示の機能性成熟分化角膜内皮細胞はCD44陰性またはCD44弱陽性を示す。例えば実施例で示されているように、2つ以上の細胞表面マーカー等を用いて細胞を亜集団等に分類することができる。

- [0091] 本開示で使用される更なる細胞指標には、MHC-1、MHC-2の発現強度が含まれるが、いずれも免疫拒絶がないことに関連するものである。本開示は臨床的に、細胞注入治療に使用されることから、免疫拒絶反応がないか、低いことが好ましい。
- [0092] 本開示で使用される更なる細胞指標には、ZO-1、Na⁺K⁺/ATPaseが含まれる。これらはヒト角膜内皮細胞の機能性を示すために密接に関連する特性であることから、これらはいずれも正常に明確に発現していること（+）が好ましい。
- [0093] 本開示が提供する本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞は、革新的な治療法の臨床応用を可能とするものであるところ、品質管理することが必要であり、そのための信頼度の高い方法が必要とされる。細胞相転移（CST）および核型異常（異数性）を起こさない機能性成熟分化角膜内皮細胞の識別および品質管理が、本開示で提供され得る。
- [0094] 一つの実施形態では、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞は、特定のサイトカインやその関連物質について機能性に特異的な特性を有し得る。そのような特性としては、例えば、PDGF-BB高産生、IL-8低産生、MCP-1低産生、TNF- α 高産生、IFN γ 高産生、およびIL-1Rアンタゴニスト高産生、VEGF低産生等を挙げることができるがこれらに限定されない。好ましい指標としては、炎症性の細胞等他を攻撃する状態を反映する場合のサイトカインレベルは好ましくなく、正常状態である場合の状態を反映するサイトカインレベルが好ましい。

[0095] 本開示の細胞は、使用前に品質検定を行ったとき、以下のような基準を満たしていることが好ましい。

[0096] ここで外観試験は、六角形の敷石様形状であることや線維化していないことを確認することなどを含む。

[0097] 本開示では、品質規格としては、以下の表のような基準を満たすことが一例として挙げられる。

[表1]

Parameter	Sample	Method	Specification
Visual inspection	T-25 flask on the day of transplantation	Phase Contrast Image	No fibroblastic cells, foreign body, discoloration or other abnormality
Recoverd cell number /Cell viability	Harvested cell suspension (2 wks before / The day of Transplantation)	hemacytometer-based trypan blue dye exclusion	1.5×10^6 cells/450 μ L Viability: >95%
PDGFbb	Culture Supernatant	ELISA	>100 pg/ml
Cell surface markers	Harvested cell suspension (2 wks before / The day of Transplantation)	FACS	CD166 ⁺ >98%, CD24 ⁺ <5%, CD26 ⁺ <5%, CD300 ⁺ <5%, CD44 ^{low} <5%, CD44 ^{high} >50%, CD133 ^{low} >50%, CD30 ⁺ <5%, E-ratio >90%
Na ⁺ /K ⁺ ATPase, ZO-1 expression	24 well plate (2 days before)	ICC	Positive
Negative test for BSA from the medium	Washed solution of the final product	ELISA	<125 ng/mL
ECD	T-25 flask on the day of transplantation	hemacytometer Software K22-0002 (Konan)	>1500 cells/mm ²
miRNA*	Culture Supernatant	Realtime PCR	mi>154
Metabolic Products*	Culture Supernatant		lactic acid
Cell Size*	PBS(-) treated cells	Hybrid Cell Count Software	< 200 μ m

[0098] 本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞は、その細胞面積が少ないこと、すなわち小さな細胞であることが好ましい。本開示において、細胞面積は、通常PBS処理した細胞を画像化した条件での細胞面積で評価される。すなわち、本明細書では、ハイブリッドセルカウントの測定値は、PBS処理した細胞で画像を取得しているため、細胞間に間隙ができている状態の面積で測定される。すなわち、培養液中飽和細胞培養（コンフルエント）時のタイトジャンクションが形成された成熟分化の状態よりは細胞面積が低い値で測定

されることになる。機能性細胞は1細胞あたりの面積が小さく、培養における細胞密度が最も高くなることで、品質が高いことが本開示で判明している。これは、正常角膜内皮組織の内皮細胞と同じ水準の細胞面積、細胞密度のレベルあるいはこれを超えるレベルであるといえる。PBS処理した細胞の好ましい飽和細胞培養（コンフルエント）時の細胞面積としては、その細胞集団の平均または個々の細胞が約 $250\mu\text{m}^2$ 以下を挙げることができ、より好ましくは、約 $245\mu\text{m}^2$ 以下、約 $240\mu\text{m}^2$ 以下、約 $235\mu\text{m}^2$ 以下、約 $230\mu\text{m}^2$ 以下、約 $225\mu\text{m}^2$ 以下、約 $220\mu\text{m}^2$ 以下、約 $215\mu\text{m}^2$ 以下、約 $210\mu\text{m}^2$ 以下、約 $205\mu\text{m}^2$ 以下、約 $200\mu\text{m}^2$ 以下等を挙げることができる。他方、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞の好ましい細胞面積として実現した値としては、例えば、約 $150\mu\text{m}^2$ 以上、約 $155\mu\text{m}^2$ 以上、約 $160\mu\text{m}^2$ 以上、約 $165\mu\text{m}^2$ 以上、約 $170\mu\text{m}^2$ 以上、約 $175\mu\text{m}^2$ 以上、約 $180\mu\text{m}^2$ 以上等を挙げることができるがこれらに限定されない。細胞面積は当該分野で公知の任意の手法で測定することができるが、代表的な例として、位相差顕微鏡画像を用いた測定法があり、ここでは、倒立顕微鏡システム(CKX41, Olympus, Tokyo, Japan)等の市販のシステムを用いて

撮影することができる。また、面積分布測定のためには、例えば、対象となる細胞をPBS (-)で3回洗浄する等して測定しやすい前処理を行った後、位相差顕微鏡画像を例えば、BZ-X700顕微鏡システム(Keyence, Osaka, Japan)等の市販のシステムを用いて取得することができる。また、面積分布はBZ-H3C Hybrid細胞計数ソフトウェア(Keyence)等の市販のソフトウェアを用いて定量することができる。

[0099] したがって、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞は、細胞の大きさ；細胞の密度および自己抗体反応性細胞の存在からなる群より選択される少なくとも1つの細胞指標において、上記好ましい数値を有していることが有利である。

[0100] 本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞は、本明細書において説明される、

細胞表面マーカー；タンパク質性産物および該産物の関連生体物質；SASP関連タンパク質；細胞内または分泌型miRNA；エキソゾーム；アミノ酸を含む細胞代謝産物および該産物の関連生体物質；細胞の大きさ；細胞の密度および自己抗体反応性細胞の存在からなる群より選択される少なくとも一つの細胞指標において、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞（すなわち、機能性成熟分化角膜内皮細胞および中程度分化角膜内皮細胞を含む）に相同する細胞機能特性、好ましくは、機能性成熟分化角膜内皮細胞に相当する細胞機能特性を有することが好ましい。本開示において好ましい細胞指標としては、例えば、本明細書の各指標に関する説明において記載される具体的な数値や範囲、レベルが任意に採用され、それらの組合せも採用され得る。ある候補細胞がこれらの細胞指標について、本明細書に規定された本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞、好ましくは機能性成熟分化角膜内皮細胞が有すべき値を有する場合、その候補細胞は、ヒトの眼前房内への注入時にヒト角膜内皮機能特性を発現する中程度分化角膜内皮細胞であるまたは機能性成熟分化角膜内皮細胞と判定される。また、上記に列挙したような細胞指標での判定に加えて、または並行して、以下のような指標も参照できる。特に、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞の機能は、小型で六角形の敷石様形状を形成しミトコンドリア機能によるエネルギー代謝系を利用することで確認され、注入したとき（例えば、眼前房内に）に、治療効果を有し得るかどうかで判定をすることができる。更に、限定されず、サロゲートマーカー的な指標も有効である。そのような指標としては、（１）内皮ポンプ・バリア機能の保持、（Claudin発現を含む）の陽性（２）ラミニン511、あるいはそのフラグメントE8に対する高接着・結合性、（３）分泌サイトカインプロファイル、PDGFbb、TNF α 、IFN γ 、IL-1受容体アンタゴニストの産生量が基準値以上であること（４）産生するマイクロRNA(miRNA)プロファイルによる規定（５）産生する代謝産物プロファイルによる規定、（６）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上述の角膜内皮（細胞）機能特性に繋がるイオン

チャンネル、単カルボン酸輸送体の発現、(7) 相転移細胞の生成に繋がるTCA回路などに係る代謝酵素が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、(8) インビトロ培養時の飽和細胞密度、(9) 培養時に得られる細胞の空間的大きさやその分布、(10) マウス角膜に対する液体窒素低温凍結損傷後に細胞注入した場合の角膜内皮面への接着性の10種類のいずれかもしくはその組み合わせを指標とすることもできる。特に、理論に束縛されることを望まないが、タンパク質性産物または該産物の関連生体物質によって、およそそのCST細胞かどうかを判別することができ、miRNAにより、目的外細胞を一部または全部除去することができ、細胞代謝産物または該産物の関連生体物質によって、中程度分化角膜内皮細胞と機能性成熟分化角膜内皮細胞とを区別することができ、より品質の高い機能性角膜内皮細胞を培養物中において選択的に増殖することができるからである。

[0101] 好ましい実施形態では、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞、特に、成熟分化角膜内皮細胞は核型異常を有しない。cHCECを細胞注入再生医薬に適用する上での最も大きな障害は、Miyaiらによって示されたように、cHCECは、多くの場合、数代の継代で培養中に異数性を示すことである(Miyai T, et al., Mol Vis. 2008; 14:942-50)。cHCECにおいて観察される異数性は、細胞分裂に起因して培養中に誘導される。ここで、本発明者らは、cHCECにおける異数性の有無が、cHCEC中で優勢な特定の細胞亜集団に密接に関連するという新たな知見を提供する。本発明者らは、核型異常のない特定の細胞亜集団は、角膜組織中に存在する機能性成熟分化角膜内皮細胞と表面発現型の特定のパターンに並行して現れることを見出した。核型異常のない機能性成熟分化角膜内皮細胞からほとんどの細胞亜集団を選択的に増殖させる洗練した培養条件の確立に成功し、これによって水疱性角膜症等の角膜内皮障害の処置のために機能性成熟分化角膜内皮細胞を細胞懸濁液の形態で前房に注入することによる安全で安定した再生医薬を提供することができるようになった。このように、本開示では、これまで明らかではなかった、核型異常は

亜集団選択的に生じることを見出した。そして、本開示の技術を用いることによって、核型異常を実質的に起こさない亜集団を選択することができるようになった。

[0102] 別の局面において、本開示は、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞、特に機能性成熟分化角膜内皮細胞を含む、細胞集団を提供する。

[0103] 本開示の細胞集団は、その平均細胞密度が、飽和細胞培養（コンフルエント）時に少なくとも約1500個/mm²以上、少なくとも約1600個/mm²以上、少なくとも約1700個/mm²以上、少なくとも約1800個/mm²以上、少なくとも約1900個/mm²以上、あるいは少なくとも約2000個/mm²以上であることが好ましい。本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞を含む細胞集団は、細胞の大きさが小さいため、その密度が相当程度高く提供されることが理解される。細胞密度は高品質な角膜内皮機能特性に伴って見出される特徴であり、逆にこのような細胞密度を測定することで品質の高い機能性成熟分化角膜内皮細胞を選択する一つの指標として用いることができる。細胞密度は、細胞面積と直接関連する数値であるから、細胞面積を当該分野で公知の任意の手法で測定することで、同様に算定することができる。上述したように、代表的な例として、位相差顕微鏡画像を用いた測定法があり、ここでは、倒立顕微鏡システム(CKX41, Olympus, Tokyo, Japan)等の市販のシステムを用いて撮影することができる。また、面積分布測定のためには、例えば、対象となる細胞をPBS(-)で3回洗浄する等して測定しやすい前処理を行った後、位相差顕微鏡画像を例えば、BZ X-700顕微鏡システム(Keyence, Osaka, Japan)等の市販のシステムを用いて取得することができる。また、面積分布はBZ-H3C Hybrid細胞計数ソフトウェア(Keyence)等の市販のソフトウェアを用いて定量することができる。

[0104] 好ましい実施形態では、本開示の細胞集団の平均細胞密度は、少なくとも約2100個/mm²以上、少なくとも約2200個/mm²以上、少なくとも約2300個/mm²以上、少なくとも約2400個/mm²以上、少なくとも約2500個/mm²以上であるがこれらに限定されない。上限としては

、任意の実現可能な数値を挙げることができるが、例えば、約3000個/ mm^2 以上、約3100個/ mm^2 、約3200個/ mm^2 、約3300個/ mm^2 、約3400個/ mm^2 、約3500個/ mm^2 、約3600個/ mm^2 、約3700個/ mm^2 、約3800個/ mm^2 、約3900個/ mm^2 、約4000個/ mm^2 等でも上限として実現可能である。これらの上限下限の任意の組合せが、本開示の細胞集団の好ましい細胞密度範囲として使用されることが理解される。

[0105] このような細胞密度または細胞面積の特徴は、ハイブリッドセルカウント法による培養細胞の位相差像定量化技術による培養最終細胞産物の治験適用適合性評価に応用することができる。本開示の機能性成熟分化角膜内皮細胞は1細胞あたりの面積が小さく、培養における細胞密度が最も高くなることが判明している。本開示の製造法で作製した培養ヒト角膜内皮細胞でも実施例において例示されるように細胞面積は $216\mu\text{m}^2$ 、細胞密度は2582個/ mm^2 と正常角膜内皮組織の内皮細胞と同じ水準の細胞面積、細胞密度を示している。

[0106] 一つの実施形態において、本開示の細胞集団は、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞が、天然に存在する比率よりも高められた比率で存在することが特徴である。角膜内皮機能特性を惹起し得る細胞の比率が、天然に存在する比率よりも高い細胞集団を提供することによって、天然に入手可能な角膜内皮細胞の集団を用いるよりも効果の高い治療を提供することができるからである。このような角膜内皮機能特性を惹起し得る細胞の比率を高めることができるのは、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞（例えば、機能性成熟分化角膜内皮細胞または中程度分化角膜内皮細胞）を数多くの亜集団を特定し選抜することができる技術が提供されたからである。

[0107] 好ましい実施形態では、本開示の細胞集団における少なくとも5%以上の、約10%以上の、約15%以上の、約20%以上の、約25%以上の、約30%以上の、約35%以上の、約40%以上の、約45%以上の、約50%以上の、約55%以上の、約60%以上の、約65%以上の、約70%以上の、約75%以上の、約80%以上の、約85%以上の、約90%以上の

、約 95%以上の、約 98%以上の、約 99%以上の細胞が本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞であることが有利である。ここで、これらの細胞集団に含まれる細胞は、本明細書に記載の角膜内皮細胞機能特性を有し得る。例えば、これらの細胞集団に含まれる細胞としては、CD166陽性およびCD133陰性を含む細胞機能特性を含み、必要に応じてCD44陰性～中陽性を有するものが選抜される。本開示の細胞集団が効果を奏する理由としては、理論に拘束されることを望まないが、一定程度の本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞が含まれることにより、その細胞集団を被験体に注入した際に、良好な治療効果または予防効果が示されるからである。好ましい実施形態では、本開示の細胞集団は、約 70%以上の細胞が本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞であることが有利である。このレベルの本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞の存在により、角膜細胞注入治療の成功の目安とされる細胞密度（例えば、約 2300細胞/mm²）を達成することができるからである。さらに好ましい実施形態では、本開示の細胞集団は、約 90%以上の細胞が本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞であることが有利である。このレベルの本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞の存在比を達成しようとした場合は、偶然の手法ではできず、細胞亜集団をきっちりと確実に識別し分離することができる技術および情報を確立することが必要であるからであり、従来の技術ではこのようなことは大凡不可能であったといえるからである。なお、角膜細胞注入治療の成功の目安とされる細胞密度は、細胞集団を注入した後にヒトの角膜内皮面に生着した細胞の平均細胞密度を測定することによって、算定することができる。そのような細胞密度は、少なくとも約 1000個/mm²以上であり、好ましくは少なくとも約 1100個/mm²以上、好ましくは少なくとも約 1200個/mm²以上、好ましくは少なくとも約 1300個/mm²以上、好ましくは少なくとも約 1400個/mm²以上、好ましくは少なくとも約 1500個/mm²以上、好ましくは少なくとも約 1600個/mm²以上、好ましくは少なくとも約 1700個/mm²以上、好ましくは少なくとも約 1800個/mm²以上、好ましくは少なくとも約 1900

0個/mm²以上、好ましくは少なくとも約2000個/mm²以上、好ましくは少なくとも約2200個/mm²以上、好ましくは少なくとも約2300個/mm²以上、好ましくは少なくとも約2400個/mm²以上、好ましくは少なくとも約2500個/mm²以上、好ましくは少なくとも約2600個/mm²以上、好ましくは少なくとも約2700個/mm²以上、好ましくは少なくとも約2800個/mm²以上、好ましくは少なくとも約2900個/mm²以上、好ましくは少なくとも約3000個/mm²以上でありうる。

[0108] さらに好ましい実施形態では、本開示の細胞集団は、機能性成熟分化角膜内皮細胞の比率が、天然に存在する比率よりも高められた比率で存在することが特徴である。機能性成熟分化角膜内皮細胞は、そのまま眼前房内への注入時にヒト角膜内皮機能特性を発現するというものであり、高品質の細胞の比率が、天然に存在する比率よりも高い細胞集団を提供することによって、天然に入手可能な角膜内皮細胞の集団を用いるよりもさらに効果の高い治療を提供することができるからである。このような高品質な機能性が付与された細胞の比率を高めることができるのは、本開示の機能性成熟分化角膜内皮細胞を数多くの亜集団において特定し選抜することができる技術が提供されたからである。

[0109] 好ましい実施形態では、本開示の細胞集団における少なくとも5%以上の、約10%以上の、約15%以上の、約20%以上の、約25%以上の、約30%以上の、約35%以上の、約40%以上の、約45%以上の、約50%以上の、約55%以上の、約60%以上の、約65%以上の、約70%以上の、約75%以上の、約80%以上の、約85%以上の、約90%以上の、約95%以上の、約98%以上の、約99%以上の細胞が機能性成熟分化角膜内皮細胞であることが有利である。このような機能性成熟分化角膜内皮細胞の比率は、本明細書において「E-ratio」（「E比」ともいう）と表示することがある。E-ratioの算出方法は本明細書の他の箇所に記載されている。ここで、これらの細胞集団に含まれる細胞は、本明細書に

記載の角膜内皮細胞機能特性を有し得る。例えば、これらの細胞集団に含まれる細胞としては、CD166陽性、CD133陰性およびCD44陰性～弱陽性（好ましくは、CD44陰性）を有するものが選抜される。あるいは、CD166陽性、CD133陰性およびCD200陰性の細胞が選抜され得る。さらに品質を高めた本開示の細胞集団が効果を奏する理由としては、理論に拘束されることを望まないが、一定程度の機能性成熟分化角膜内皮細胞が含まれることにより、なお一層、その細胞集団を被験体に注入した際に、良好な治療効果または予防効果が示されるからである。好ましい実施形態では、本開示の細胞集団は、約40%以上の細胞が機能性成熟分化角膜内皮細胞であることが有利である。このレベルの機能性細胞の存在により、角膜細胞注入治療の成功の目安とされる高い品質の細胞密度（例えば、角膜内皮面に生着した細胞で約1000細胞/mm²以上、好ましくは約2000細胞/mm²、通常約2300細胞/mm²）をより確実に達成することができるからである。さらに好ましい実施形態では、本開示の細胞集団は、少なくとも約70%以上の、より好ましくは少なくとも80%以上の、さらにより一層好ましくは少なくとも約90%以上の細胞が機能性成熟分化角膜内皮細胞であることが有利である。このレベルの機能性細胞の存在比を達成しようとした場合は、偶然の手法ではできず、細胞亜集団をきっちりと確実に識別し分離することができる技術および情報を確立することが必要であるからであり、従来の技術ではこのようなことは大凡不可能であったといえるからである。なお、発明の技術を用いることにより、機能性成熟分化角膜内皮細胞の比率は、さらに高めることができ、例えば、少なくとも約95%以上の、少なくとも約96%以上の、少なくとも約97%以上の、少なくとも約98%以上の、少なくとも約99%以上の細胞が機能性成熟分化角膜内皮細胞である細胞集団も提供することができる。そして、このような機能性成熟分化角膜内皮細胞を含む細胞集団が提供されることにより約2300細胞/mm²を超える（例えば、約3000細胞/mm²）ような治療成績を注入後1か月もたたないうちに達成することも実証されており、従来にない迅

速かつ高品質な治療技術が提供されているといえる。

[0110] 一つの実施形態において、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞（機能性成熟分化角膜内皮細胞を含む）または細胞集団は、他重集団に比較し、免疫拒絶反応に係るHLAクラスⅠ抗原や細胞変性関連抗原の発現が低いことも特徴である。また、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞、特に機能性成熟分化角膜内皮細胞は他重集団でみられる自己抗体が存在しないことから、免疫学的にも安定な細胞であるといえる。

[0111] 別の局面では、本開示は、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞または細胞集団を含む製品を提供する。このような製品は、どのような形態でもよく、例えば、ヒトに投与するために調製される細胞加工製品等を指すがこれらに限定されない。このような細胞製品は、好ましくは、目的外の形質転換を起こしていないことや、細胞・組織が産生する生理活性物質による影響もないかまたは少ないこと、正常な細胞又は組織への影響もないかまたは少ないこと、異所性組織を形成する可能性がないかまたは少ないこと、望ましくない免疫反応が生じる可能性がないかまたは少ないこと、腫瘍形成及びがん化の可能性がないかまたは少ないこと、遺伝子導入が行われている場合には、遺伝子治療用製品指針に定める安全性評価がなされていること、および一般毒性試験等をクリアしていることが望ましい。

[0112] 別の局面では、本開示は、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞、機能性成熟分化角膜内皮細胞または細胞集団を培地交換により継代することを包含する該細胞または細胞集団の保存方法を提供する。ここで、この培地交換により、細胞機能特性が維持保存されることが本開示で解明された。ここで使用される培地は、任意の培地を用いることができるが、好ましくは、本明細書において説明される細胞の製法に用いられる成分や培地を用いることが有利である。

[0113] 別の実施形態では、本開示は、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞、機能性成熟分化角膜内皮細胞または細胞集団の保存方法を実施する工程を含む、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞、機能性成熟分化角膜内皮細胞また

は細胞集団の送達方法を提供する。

- [0114] なお、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞、機能性成熟分化角膜内皮細胞を分取する手順としてソーティングが代表的に挙げられるが、それ以外の方法として、例えば、目的細胞と非目的細胞の細胞特性の差を活用しての非目的細胞に選択的なアポトーシス誘導（miRNAスイッチ法）や壊死誘導（グルコース飢餓など）による方法を用いることができる。しかしながら、本開示では、通常、本開示の製法により本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞または機能性成熟分化角膜内皮細胞の純度を高めることがなされる。
- [0115] 一つの実施形態では、本開示は、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞または細胞集団を含む細胞バンクを提供する。細胞バンクは、研究等を通じて生み出されたあるいは収集された「細胞」（通常培養細胞）を預かり、それを他の研究者や事業者に提供するための機関またはシステムをいう。
- [0116] 別の局面では、本開示は、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞または細胞集団を含む製品を提供する。このような製品は、どのような形態でもよく、例えば、ヒトに投与するために調製される細胞加工製品等を指すがこれらに限定されない。このような細胞製品は、好ましくは、目的外の形質転換を起こしていないことや、細胞・組織が産生する生理活性物質による影響もないかまたは少ないこと、正常な細胞又は組織への影響もないかまたは少ないこと、異所性組織を形成する可能性がないかまたは少ないこと、望ましくない免疫反応が生じる可能性がないかまたは少ないこと、腫瘍形成及びがん化の可能性がないかまたは少ないこと、遺伝子導入が行われている場合には、遺伝子治療用製品指針に定める安全性評価がなされていること、および一般毒性試験等をクリアしていることが望ましい。
- [0117] 別の局面において、本開示は、ヒトの眼前房内への注入時にヒト角膜組織機能（特に、ヒト角膜内皮機能特性）を惹起し得る機能性角膜内皮細胞（本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞）または機能性成熟分化角膜内皮細胞を含む医薬を提供する。本開示の医薬において使用される細胞は、本明細書の他の箇所にも記載されている任意の細胞を含むことができる。本開示は、他

の治療評価項目、例えば、角膜厚、視力等でも顕著に改善するものであり、例えば、角膜厚の評価を見ても、従来法に比べ早期に治療効果が達成され、E-ratioを上昇し、十分に角膜厚が減少しており、顕著な改善が見られている。本開示の医薬は、他の項目、例えば、視力、実質浮腫およびこれらの合計スコアでも、顕著に改善するものであり、また、重篤な有害事象は観察されず、非重篤な有害事象もほとんど観察されず、良好な治療結果を提供するものであると理解される。本開示の医薬は、水疱性角膜症等の角膜に障害を有する患者を対象とした培養角膜内皮細胞注入を行うことができる。

[0118] 1つの具体的な実施形態では、本開示の医薬は、角膜内皮機能障害、角膜内皮障害または角膜内皮疾患の処置のためのものである。このような角膜内皮機能障害、角膜内皮障害または角膜内皮疾患としては、角膜内皮障害Grade 3と角膜内皮障害Grade4(代表的に、水疱性角膜症) (例えば、フックス角膜内皮ジストロフィ、PEX-BK (pseudoexfoliation bullous keratopathy ; 偽落屑症候群に伴う水疱性角膜症)、レーザー虹彩切開術後水疱性角膜症、白内障手術術後水疱性角膜症(偽水晶体眼または無水晶体水疱性角膜症)、緑内障術後水疱性角膜症、外傷後の水疱性角膜症、原因不明の多重手術後の水疱性角膜症、角膜移植後の移植片不全、先天遺伝性角膜内皮ジストロフィ、先天性前房隅角形成不全症候群等) とからなる群より選択される少なくとも一つを含むがこれらに限定されない。本明細書において使用されるグレードシステムは、Japanese Journal of Ophthalmology 118: 81-83, 2014に基づいた角膜内皮疾患の重症度分類に基づく。例えば、水疱性角膜症の一例としてレーザー虹彩切開術後水疱性角膜症があるが、緑内障治療薬のみでは眼圧コントロールが難しい患者の虹彩にレーザーで穴を開け、房水の流れを良くする手術であるが、その流水が角膜内皮に当たって、内皮が損傷すると考えられており、本開示の医薬は著効を示すと考えられる。フックス角膜ジストロフィについては、先天性の遺伝子疾患で、欧米では40~50歳以上の4~5%が罹患していると言われており、角膜中央の内皮が脱落して混濁を呈し、欧米での角膜移植の原因のトップを占めている。本開示の医薬はフ

ックス角膜ジストロフィにも著効を示すと考えられる。また、M u l t i p l e O P - B K と呼ばれる原因不明の多重手術後の水疱性角膜症にも有効である。このような多重手術としては、代表的に網膜硝子体手術と白内障＋眼内レンズ挿入を同時に行う手術で、通常「トリプル手術」と言われている術後などを挙げることができる。

本開示の医薬は、任意の形態で被験体に投与することができるが、好ましい実施形態では、本開示の医薬に含まれる細胞は前房内投与されることが望ましい。培養角膜内皮細胞を前房内に注入する技術が確立されており、理論に拘束されることを望まないが、前房内注入により角膜内皮を再生させるという概念は、（１）低侵襲性で、（２）人工材料を用いず、（３）若年者由来の老化の少ない高機能性の角膜内皮細胞をマスター細胞として用いることが可能であるからである。また、前房内注入することによって、角膜内皮機能再生が最も効率よく行われるからであり、また、生体外で培養拡大後、細胞懸濁液を（水疱性角膜症等の）患者の前房内に注入することは、ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針に基づく研究（偵察・探索臨床研究）により、ヒト適用においての安全性、臨床POCは確立していることが本開示の過程において明らかになっているからである。

[0119] 本開示の医薬は、細胞の他に、さらなる薬剤とともに投与されてもよい。このようなさらなる薬剤としては、眼科治療において通常使用される薬剤（例えば、ステロイド剤、抗生物質、抗菌物質、NSAID）が使用され得る。このようなさらなる薬剤は、医薬として本開示の細胞医薬に含まれていてもよく、あるいは、別途投与される形態で提供されてもよい。別途提供または投与される形態の場合、キットや組合せ薬剤として提供される。キットや組合せ薬剤として使用される場合は、その使用方法を記した添付書類等が組み合わされてもよい。

[0120] 尚、「さらなる薬剤」に関していえば、本細胞注入に代わり、此処に詳述した細胞の産生物を単独もしくは当該細胞と共に注入することも可能であり、本開示には当該投与に適した細胞やその産生物も含まれる。

- [0121] 本開示の医薬、医薬組成物または剤（治療剤もしくは予防剤等）はキットとして提供することができる。特定の実施形態では、本開示は、本開示の細胞または医薬の1以上の成分が充填された、1以上の容器を含む、薬剤パックまたはキットを提供する。場合によって、このような容器に付随して、医薬または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって規定された形で、政府機関による、ヒト投与のための製造、使用または販売の認可を示す情報を示すことも可能である。
- [0122] 本開示の医薬は、さらに、細胞注入ビヒクルを含んでいてもよい。このような細胞注入ビヒクルは、本開示の細胞と混合されて提供されてもよく、あるいは、別々に提供されてもよい。別途提供または投与される形態の場合、キットや組合せ薬剤として提供される。キットや組合せ薬剤として使用される場合は、その使用方法を記した添付書類等が組合せされてもよい。
- [0123] 本明細書において「キット」とは、通常2つ以上の区画に分けて、提供されるべき部分（例えば、検査薬、診断薬、治療薬、抗体、標識、説明書など）が提供されるユニットをいう。安定性等のため、混合されて提供されるべきでなく、使用直前に混合して使用することが好ましいような組成物の提供を目的とするときに、このキットの形態は好ましい。そのようなキットは、好ましくは、提供される部分（例えば、検査薬、診断薬、治療薬をどのように使用するか、あるいは、試薬をどのように処理すべきかを記載する指示書または説明書を備えていることが有利である。本明細書においてキットが試薬キットとして使用される場合、キットには、通常、検査薬、診断薬、治療薬、抗体等の使い方などを記載した指示書などが含まれる。
- [0124] 本明細書において「指示書」は、本開示を使用する方法を医師または他の使用者に対する説明を記載したものである。この指示書は、本開示の検出方法、診断薬の使い方、または医薬などを投与することを指示する文言が記載されている。また、指示書には、投与部位として、眼球または前房への投与（例えば、注射などによる）することを指示する文言が記載されていてもよい。この指示書は、本開示が実施される国の監督官庁（例えば、日本であれ

ば厚生労働省、米国であれば食品医薬品局（FDA）などが規定した様式に従って作成され、その監督官庁により承認を受けた旨が明記される。指示書は、いわゆる添付文書（label）であり、通常は紙媒体で提供されるが、それに限定されず、例えば、電子媒体（例えば、インターネットで提供されるホームページ、電子メール）のような形態でも提供され得る。

- [0125] 本明細書において使用される「細胞注入ビヒクル」は、細胞を維持することができる限りどのような液でも用いることができ、眼灌流液等として用いられるものが含まれる。細胞注入ビヒクルとして使用されるものとしては、Opti-MEM、その添加物追加形態、OPeguard-MA、OPeguard+F等を挙げることができる。発明で用いられる細胞注入ビヒクルはさらに、アルブミン、アスコルビン酸および乳酸の少なくとも一つを含んでいてもよい。

本明細書において得られた知見をもとにして、代謝産物等を指標として、患者を層別化し、層別化された患者の病態に応じて本開示の細胞を適宜調製し、適切な治療を行うことができる。

- [0126] （ヒトの眼前房内への注入時にヒト角膜内皮細胞機能特性を発現し得るヒト機能性角膜内皮細胞の製造方法）

一つの局面において、本開示は、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機能性ヒト角膜内皮細胞を製造する方法であって、（b）前記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・成熟させる工程とを含む、方法を提供する。

- [0127] 別の局面において、ヒトの眼前房内への注入時にヒト角膜機能特性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、（a）ヒト角膜内皮組織由来細胞を脱分化させて角膜内皮前駆細胞を得る工程と、（b）前記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・成熟させる工程とを含む、方法を提供する。

- [0128] さらに別の局面において、ヒトの眼前房内への注入時にヒト角膜機能特性

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、（a）ヒト角膜内皮組織由来細胞を脱分化させて角膜内皮前駆細胞を得る工程と、（b）前記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・成熟させる工程とを含む、方法を提供する。

[0129] さらに他の局面においては、ヒトの眼前房内への注入時にヒト角膜機能特性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、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・成熟させる工程を含む、方法を提供する。

[0130] 好ましい実施形態では、ヒト角膜機能は、角膜内皮細胞機能特性を含み、さらに好ましくは、ヒト角膜機能は、角膜内皮細胞機能特性である。

[0131] 本開示の一実施形態において、CD44抗原の発現強度が本開示のヒト機能性角膜内皮細胞の機能を左右する。CD44を介するミトコンドリアのエネルギー代謝制御作用については、図1のように考えることができる。

[0132] 例えば、下記代謝関連酵素のミトコドリア局在で規定した早期臨床効果発現、長期安定的臨床効果の確認された培養ヒト角膜内皮細胞が本開示の細胞の一例である：

[表2]

脱分化 前駆細胞	vs	分化 成熟細胞	
ACLY		CS	ACLY, ATP-citrate lyase, CS, citrate synthase
ACO1		ACO2	Aconitase 1/2
IDH1		IDH2	Isocitrate dehydrogenase 1/2
MDH1		MDH2	Malate dehydrogenase
ME1		ME3	Malic acid enzyme 1/3
ACSS2		ACSS1	
ACAT2		ACAT1	Acetyl-CoA acetyltransferase 1/2
LDH		PDH	Lactate dehydrogenase, Pyruvate dehydrogenase
		BCAT2	
		BCKDH2	Branched-chain ketoacid dehydrogenase 2
細胞質・核		ミトコンドリア	

[0133] 本開示の一実施形態において、臨床効果に繋がる培養ヒト角膜内皮細胞の

機能特性については、図2に示すとおり、規格細胞においては臨床効果につながる細胞機能として、ミトコンドリアOXPHOSが活性され、カチオン・アニオン平衡や細胞内pHが維持されることにより、水排出機能が高まり、角膜混濁改善、水和浮腫改善、角膜内皮細胞小型化、内皮組織の細胞高密度化につながる。

[0134] 本開示の一つの好ましい実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞を作成する際には、ROCK阻害剤（例えば、Y-27632）を培養液中に連続して添加する培養方法とすることができ、あるいは、脱分化時または培養早期にはROCK阻害剤は添加せず、増殖および／または分化・成熟させる工程にのみROCK阻害剤を存在させることで品質の高い規格細胞または品質の高い規格細胞の純度が高い細胞集団を生産することができる。また他の実施形態において、TGF- β 阻害剤（例えば、SB-431542）を、培養液中に添加しない培養方法とすることもできる。一つの実施形態では、亜集団レベルでの解析結果より、TGF- β 作用を抑制しない方が細胞形質が良いことがわかっている。また他の実施形態において、p38MAPキナーゼ阻害剤（例えば、SB203580）を、培養液中に添加しなかったり、培養の最終成熟工程にのみ添加する培養方法とすることもできる。一つの実施形態では、亜集団レベルでの解析結果より、細胞ストレスのかからない条件下ではp38MAPキナーゼを抑制しない方が細胞形質が良いことがわかっている。

本開示で有用な点の一つとしては、ROCK阻害剤、TGF- β 阻害剤、p38MAPキナーゼ阻害剤、および／あるいは、EGFなどの試薬をミニマムに使用することで、経済的に低価格において、使用した場合に匹敵する品質の細胞を提供しうることを見出した点が挙げられる。

また、インビトロの製法で、生体組織で得られるレベルの細胞を入手することができるようになったことで、生体組織の細胞における品質を推測できるようになった点も有用な点でありうる。

非限定的な好ましい実施形態では、理論に束縛されることを望まないが、

TGF- β 阻害剤（例えば、SB-431542）についていえば、培養期間を通じて非添加であることが好ましい。

非限定的な好ましい実施形態では、理論に束縛されることを望まないが、p38MAPキナーゼ阻害剤（例えば、SB203580）についていえば、培養期間を通じて非添加でもよく、培養最終の28-35日の段階でのみ添加する形態でもよい。

[0135] また本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞を作成する際には、ヒト間葉系幹細胞馴化培地を用いないとすることもできる。これは、万人規模の医療展開の場合にヒトMSCのドナー差／ロット差が障壁となり、含有SASPが品質を不安定化させ、miRがパラクリンの相転移を抑制するがロット差が大きいためである。非限定的な好ましい実施形態では、理論に束縛されることを望まないが、ヒト間葉系幹細胞馴化培地（MSC-CM）を培養期間全体にわたって非添加で十分であることが理解され得る。

[0136] また本開示の一実施形態において、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞を作成する際には、細胞成長因子の一種であるEGFを非添加とすることもでき、これにより安定的な目的細胞の生産をすることができる。また、P5など長期継代時にも目的細胞を高収率で得ることができる。一つの実施形態では、本開示の培養方法（製造方法）では、培養期間を通じてEGFを使用しないことが好ましい。別の実施形態では、培養初期（例えば、7日以内等）のみに添加する培養方法を用いてもよい。一つの代替的な実施形態では、EGFの濃度を培養ストレスが生じない程度の濃度で使用してもよいことが理解される。

[0137] 本開示の一実施形態において、以上のように製造方法を変更したとしても、遺伝子発現変化の網羅的検索やフラックスアナライザーを用いるミトコンドリア呼吸機能の検定などの結果、培養ヒト角膜内皮細胞機能に影響を及ぼす変化は認めることはなかった（図3）。

[0138] 本開示の一実施形態において、体性（幹）細胞からの脱分化経路による分

化成熟・機能性ヒト角膜内皮細胞の誘導は図4のようにして行うことができる。この方法によれば、増殖性・継代可能数が、若年者ドナーでP6：83，000倍水準であり、1眼から約10，000眼分を得ることができ、ドナー年齢幅が拡大し、壮年者ドナーでもP4で1眼から約600眼分を得ることができる。また、良好な細胞形態・形状の維持、高密度の維持、細胞面積約200mm²，分布小を達成することができる。

[0139] 本開示の一実施形態において、理論に束縛されることを望まないが、図5に示すような製法は、分化とEMTを含む相転移を並行して起こさせるものであるため拮抗作用による不都合が生じ得るところ、本開示のように、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・成熟させる工程および／または増殖および／または分化・成熟させる工程は調節された微量の細胞成長因子の存在下で行うことによって、形質転換による分化作用に対する拮抗作用による副作用を解決することができる。

[0140] 本開示の一実施形態においては、形質転換は内皮間葉系移行を含み、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こともできる。

[0141] また本開示の一実施形態において、増殖および／または分化・成熟させる工程後に得られた候補細胞において、(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を有する(ii) 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)の発現が亢進することからなる群から選択される少なくとも1つの特徴を確認し、該特徴を少なくとも1つ含む場合、該候補細胞が該ヒト機能性角

膜内皮細胞であると同定する工程をさらに含むこともできる。

[0142] 本開示では、細胞内 pH の制御に係る細胞の発現するイオンチャネル Carbonic Anhydrase (CA)、NHE-1 や単カルボン酸〔ピルビン酸、乳酸などの代謝産物〕の細胞内輸送体発現や角膜混濁、水和浮腫の軽減など臨床効果に直結する水の排出に係る AQP1 発現亢進などの形質で規定した細胞が提供されることが一つの特徴であり得る。これらの特徴を有することの結果として、細胞内 pH、結果として、細胞の大きさの規定、ミトコンドリア機能の制御に係る機能が精緻に規定された細胞が本開示において提供される。

[0143] したがって、本開示の一実施形態において、増殖および／または分化・成熟させる工程後に得られた候補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かどうかを確認し、該発現が確認された場合、該候補細胞をヒト機能性角膜内皮細胞であると同定する工程をさらに含むこともできる。

[0144] また本開示の他の一実施形態において、増殖および／または分化・成熟させる工程後に得られた候補細胞において、ATP クエン酸リアーゼ (ACL Y)、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)、及び乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) からなる群から選択される少なくとも 1 つの酵素が発現しているかどうかを確認し、該酵素が発現しない、または実質的に発現していない場合、該候補細胞をヒト機能性角膜内皮細胞と同定する工程をさらに含むこともできる。

[0145] さらに、他の実施形態において、増殖および／または分化・成熟させる工

程後に得られた候補細胞において、ナトリウム／水素交換体 1（NHE1）および／または水チャネルであるアキアポリン 1（AQP-1）の発現が亢進しているかどうかを確認し、該亢進が確認される場合、該候補細胞をヒト機能性角膜内皮細胞と同定する工程をさらに含むこともでき、別の実施形態においては、増殖および／または分化・成熟させる工程後に得られた候補細胞において、重炭酸脱水酵素 5 B（CA5B）の発現が亢進しているかどうかを確認し、該亢進が確認される場合、該候補細胞をヒト機能性角膜内皮細胞と同定する工程をさらに含むこともできる。

[0146] また本開示の一実施形態において、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かどうかを確認する工程をさらに有することもでき、他の実施形態においては、角膜内皮前駆細胞を、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する工程を包含することもできる。

[0147] 本明細書において「角膜内皮組織由来細胞または角膜内皮前駆細胞」とは、本明細書において別の箇所では定義されるように、それぞれ、角膜内皮組織に由来する細胞および脱分化工程を経て分化することで、本開示の角膜内皮特性具備機能性細胞または機能性成熟分化角膜内皮細胞になる細胞を指すが、これらには、ドナーの角膜内皮から入手した細胞の他、iPS細胞、ES細胞等から角膜内皮細胞様に分化させた細胞、角膜内皮細胞に分化する前の前駆細胞等任意の細胞を含み、本明細書で定義される中程度分化角膜内皮細胞も含まれる。

[0148] 本開示の製造方法において、使用され得る出発材料としての角膜内皮組織由来細胞は、生体から採取したものであり、あるいは、使用され得る出発材

料は、角膜内皮前駆細胞、例えば、幹細胞もしくは前駆細胞から分化させたものであってもよい。このような分化させた細胞は、例えば、種々の幹細胞（例として、誘導性多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）、受精卵、体性幹細胞）から分化させた細胞を含みうるがこれらに限定されない。したがって、具体的な実施形態では、本開示において使用される（出発材料としての）角膜内皮組織由来細胞または角膜内皮前駆細胞は、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角膜内皮細胞、なら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等を挙げることができるがこれらに限定されない。ここで、多能性幹細胞としては、誘導性多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）等を挙げることができるがそれらに限定されない。したがって、本開示において使用される（出発材料としての）角膜内皮細胞またはその前駆細胞は、誘導性多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）等から、角膜内皮様に分化させることによって調製される細胞を含むことが理解される。誘導性多能性幹細胞（iPS細胞）、胚性幹細胞（ES細胞）等から、角膜内皮様に分化させる技術は当該分野において公知であり、例えば、AMED法（Uenoら上述）、WO2013/051722（慶應義塾）等を挙げることができるがそれらに限定されない。

[0149] 角膜内皮様に分化させていない細胞を用いる場合は、角膜内皮様に分化または成熟分化させる工程を包含することが好ましい。

[0150] （品質管理）

本開示の一実施形態において、ヒトの眼前房内への細胞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こともできる。この場合、ヒト機能性角膜内皮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こともできる。

[0151] また、他の一実施形態において、品質管理を行う際に、ヒト機能性角膜内皮細胞において、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)が発現していない、または実質的に発現していないことを確認する工程をさらに含むこともでき、他の実施形態においては、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)および／またはアクアポリン1(AQP-1)、または重炭酸脱水酵素5B(CA5B)の発現が亢進していることを確認する工程をさらに含むこともできる。また、他の実施形態においては、品質管理を行う際に、ヒト機能性角膜内皮細胞において、細胞内pHを測定する工程を含むこともできる。

[0152] (他の実施の形態)

本開示の1つまたは複数の態様に係る判定方法および解析方法について、実施の形態に基づいて説明したが、本開示は、この実施の形態に限定されるものではない。本開示の趣旨を逸脱しない限り、当業者が思いつく各種変形を本実施の形態に施したものや、異なる実施の形態における構成要素を組み合わせて構築される形態も、本開示の1つまたは複数の態様の範囲内に含まれてもよい。

[0153] 本明細書において「または」は、文章中に列挙されている事項の「少なく

とも1つ以上」を採用できるときに使用される。「もしくは」も同様である。本明細書において「2つの値の範囲内」と明記した場合、その範囲には2つの値自体も含む。

- [0154] 以上、本開示を、理解の容易のために好ましい実施形態を示して説明してきた。以下に、実施例に基づいて本開示を説明するが、上述の説明および以下の実施例は、例示の目的のみに提供され、本開示を限定する目的で提供したのではない。従って、本開示の範囲は、本明細書に具体的に記載された実施形態にも実施例にも限定されず、特許請求の範囲によってのみ限定される。

実施例

- [0155] 以下に、実施例を用いて、本開示をより詳細に説明するが、本開示はこれらの実施例に限定されるものではない。
- [0156] 以下に、本開示において用いる実験手法および材料について説明する。なお、本実施形態において、以下の実験手法を用いているが、これら以外の実験手法を用いても、同様の結果を得ることができる。
- [0157] 以下の実施例では、ヘルシンキ宣言などの医療的な倫理規定、GCHなどの規則、ならびに、京都府立医科大学その他で規定される規定を遵守し、発明者が所属する組織に関係する倫理委員会の承認のもとで行った。必要なインフォームドコンセントを取得した上で以下の実験を行った。

- [0158] (実施例1：I. 添加EGF濃度の検討実験)

本実施例では、機能性ヒト角膜内皮細胞の製造において、使用する上皮成長因子(EGF)の濃度についての検討を行った。以下に詳細を示す。

- [0159] (方法および材料)

ドナー情報は#202、ABG-4040SCN/ODCN(右目左目)、年齢64、内皮細胞密度(ECD)=3104/3070、死因(COD):Metastatic Neuroendocrine Carcinoma of the Uterus、D-P(角膜ドナーの死亡後、角膜を保存液に入れるまでの時間)=12:15、D-C(角膜ドナーの死亡後、細胞培養に入るまでの時間)=8Dである。

添加 E G F の濃度は、以下の培養条件において、検討した。詳細は以下のとおりである。

0+Y, SB2, EGF, Asc (アスコルビン酸) で培養

↓

P1 +Y, SB2, EGF, Asc で培養

↓

P2 EGF(-), 0.5ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mLの4通りで培養(+Y, SB2, Asc)

↓ P2それぞれの条件から継代

P3 EGF(-), 0.5ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mLの4通りで培養(+Y, SB2, Asc)

↓ P3それぞれの条件から継代

P4 EGF(-), 0.5ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mLの4通りで培養(+Y, SB2, Asc)

*剥離時のトリプシン (TrypLE、ThermoFisher) 濃度x10、播種細胞数ECD800

(以上、Pは継代数を示す。)

[0160] 培養条件は以下のとおりである。

SB2, EGF, Ascは、それぞれ、SB203580、上皮細胞成長因子、アスコルビン酸を意味する。表皮成長因子は和光純薬工業株式会社（大阪、日本）から購入し、SB203580 (SB2) はケイマンケミカル（アンダーバー、ミシガン州）から入手した。ダルベッコの改良イーグル中高グルコース (DMEMHG) およびウシ胎児血清はギブコ・インダストリーズ社（ラングリー、OK）から入手し、プラスチック培養プレートはコーニングから入手した。異なる指示がない限り、他のすべての化学物質は、Sigma-Aldrich, Inc.（ミズーリ州セントルイス）から購入した。

EGF(-), 0.5ng/mL, 1 ng/mL, 5 ng/mLは、上記SB2, EGF, Ascにそれぞれの濃度のEGFを加えたもの、または加えないものである。

[0161] (結果)

P2のD41での4つの写真を図6に示した。またP3～P4でのFACSの結果を図7～図10に示した。

これらの結果から、理論に束縛されることを望まないが、顕微鏡観察での細胞形状、および細胞表面CD抗原形質の両面から判断して、P2-P4のどの継代時でもEGF非添加が望ましいことがわかった。また、成長因子EGF非添加での増殖ストレス解除の意義として、本開示のヒト機能性角膜内皮細胞を作成する際にEGF非添加とすると、EMTを含む細胞相転移CSTが解除され細胞老化回路が回避され成熟分化細胞が効率よく製造されることが考えられる。

[0162] (実施例2: I I. 初代培養時からのEGF添加効果)

次に、初代培養時におけるEGFの添加の与える影響について調べた。以下に詳細を示す。

[0163] (方法および材料)

次に、P0初代培養時からEGFを添加した場合の効果を調べた。

ドナー情報は、#214、ABS-3550SCN/ODCN、NancyY(+)、年齢18、内皮細胞密度(ECD) = 3571 / 3401、死因: Multitrauma 2' MVA、D-P= 12:32、D-C = 7Dである。

また培養条件等は以下のとおりである。

P0 2眼まとめてEGF(-), 0.5ng/mLの2通りで培養(+Y, SB2, Asc)

↓ P0それぞれの条件から継代

P1 EGF(-), 0.5ng/mLの2通りで培養(+Y, SB2, Asc)

↓ P1それぞれの条件から継代

P2 EGF(-), 0.5ng/mLの2通りで培養(+Y, SB2, Asc)

* 剥離時のTrypLE濃度x10、播種時ECD800

[0164] Y, SB2, Ascは、それぞれ、Y 27632、SB203580、アスコルビン酸を意味する。Rho関連プロテインキナーゼ(ROCK)阻害剤Y-27632(Y)および表皮成長因子は和光純薬工業株式会社(大阪、日本)から購入し、SB203580(SB2)はケイマンケミカル(アンアーバー、ミシガン州)から入手した。ダルベッコの改良イーグル中高グルコース(DMEMHG)およびウシ胎児血清はギブコ・インダストリーズ社(ラン

グリー、OK) から入手し、プラスチック培養プレートはコーニングから入手した。異なる指示がない限り、他のすべての化学物質は、Sigma-Aldrich, Inc. (ミズーリ州セントルイス) から購入した。

EGF(-), 0.5ng/mLは、上記Y, SB2, Ascにそれぞれの濃度のEGFを加えたもの、また

は加えないものである。具体的に記載したもの以外は実施例1に準ずる。

[0165] (結果)

またP0～P2でのFACSの結果を図11～図14に示した。理論に束縛されることを望まないが、本開示の角膜内皮細胞は、EGF非添加の場合にその比率が上昇することから、EGFの非添加の場合（または濃度が低い場合）には、培養ストレスが減少し、より好ましい細胞が製造されることが理解され、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の製造には、好ましいことが理解される。

[0166] したがって、これらからも、本開示において、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・成熟させることが規格細胞割合の高い培養のためには重要であることが理解される。

[0167] (実施例3：III. EGF非添加のmIR発現での検定、ROCK阻害剤の添加効果)

本実施例では、EGF非添加の細胞規格をmIR発現で検定し得るかどうかを試験し、また、ROCK阻害剤の添加効果についても検証した。

[0168] (材料および方法)

図15のように場合分けし、miR378、miR146、miR34、miR184の細胞内での遺伝子変動を測定した。

ROCK阻害剤としてはY27632を使用した。

培養条件は、実施例1および2に準ずる。

[0169] (結果)

FACS測定および写真評価結果を図16に示した。その結果、年齢差の影響

がY+/-に重層していることがわかった。

- [0170] qRT-PCRによるEGFありなし、及びYありなしの場合のmiR184、miR34、miR378、miR146遺伝子発現変動の結果を図17および図18に示した。
- [0171] この結果、理論に束縛されることを望まないが、miR184は、（１）細胞内CD44遺伝子発現量と逆比例関係である、（２）壮年より若年で発現量増加、（３）ROCK阻害剤非添加よりROCK阻害剤添加で発現量増加、（４）EGF添加よりEGF非添加で発現量増加、ということがわかった。
- [0172] また、理論に束縛されることを望まないが、miR34a-5pは、（１）同一ドナー内では細胞内CD44遺伝子発現量と逆比例関係であるが、ドナーを超えた比較ではCD44との対比は逆転する可能性を示唆、（２）壮年より若年で発現量変化なし、（３）ROCK阻害剤非添加よりROCK阻害剤添加で発現量増加、（４）EGF添加よりEGF非添加で発現量増加、ということがわかった。
- [0173] この結果から、理論に束縛されることを望まないが、EGF非添加が望ましいことは細胞特性指標のmiR184、34a発現強度からも確認できた。またROCK阻害剤を添加することによりmiR184および34aの発現量が増加することが確認できた。
- [0174] これらからも、本開示において、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・成熟させることが重要であることが理解される。
- [0175] （実施例4：IV. EGF非添加時の細胞機能特性代謝産物による検定、ROCK阻害剤の添加効果）
続いて、EGF非添加の本開示の細胞の細胞機能特性代謝産物の検定を行った。また、ROCK阻害剤の添加効果も判定した。
- [0176] （材料および方法）
本実施例では、ヒト機能性角膜内皮細胞の代謝産物特性と非目的細胞の代謝産物特性と差異を確認した。

(代謝産物検定)

培地中の代謝産物の測定

培養上清 (CS) の代謝物の測定用に、20 μ L の CS および内部標準溶液1 (H3304-1002; HumanMetabolome Technologies, Inc., Yamagata, Japan) を含む80 μ L Milli-Q (Merck KGaA, ドイツ, ダルムシュタット) を完全に混合した。陽イオン化合物は、CE飛行時間型質量分析 (CE-TOFMS) のポジティブモードで測定し、陰イオン化合物は、CEタンデムMS (CE-MS/MS) のポジティブモードとネガティブモードで測定した。階層的クラスター分析 (HCA) は、独自のソフトウェアである「PeakStat」を使用して実行した。値の違いは、スチューデントのt検定または一元配置分散分析 (ANOVA) とボンフェローニの事後検定 (GraphPad Prism 6.0, GraphPadソフトウェア) を使用して統計的に分析した。 <0.05 の p 値を統計的に有意とみなした。

ROCK 阻害剤の添加効果については、実施例3に準じて行った。

[0177] (結果)

代謝産物の階層性の例を図19に示した。

また、本開示が目的とする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 (目的細胞) と、そうではない細胞 (非目的細胞) との代謝産物特性を確認した結果を図20～図22に示した。

[0178] その結果、目的細胞はLactic Acid やL/P (乳酸/ピルビン酸) 比の増加が乏しいことがわかり、これは嫌氣的解糖活性が低いことを示す。また目的細胞はGlnが増加する一方で、Gluはあまり増加しないことがわかり、これはGlutaminolysisよりGln合成経路を亢進させることを示す。

[0179] また目的細胞はBCAAが顕著に低値を示すことがわかり、これはBCAA依存性が高い代謝であることがわかる。

[0180] さらにEGFの添加量が少なくなると目的細胞の特徴の一つである分岐鎖アミノ酸 (Ile, Leu) の産生量が低下することがわかり、これにより目的細胞含量が増えることがわかった。

[0181] 理論に束縛されることを望まないが、以上の結果から、EGF添加により

培養内皮細胞の代謝産物は非目的細胞プロファイルを示すことがわかった。

[0182] また、EGFの添加量が少ない方が、Lactic AcidやL/P比の増加が乏しいことから、嫌氣的解糖活性が低い目的細胞の含量が増え、すなわち、EGF添加によって培養内皮細胞は嫌氣的解糖活性が高い非目的細胞プロファイルを示すことがわかった。

[0183] これらからも、本開示において、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・成熟させることが重要であることが理解される。

[0184] (実施例5：V. 各種添加物の効果)

本実施例では、各種添加物の効果を試験した。以下に詳述する。

V-1. p38 MAPK阻害剤(SB203580)非存在の新培養法での製品の評価

本実施例では、p38 MAPK阻害剤であるSB203580を加えない手法(SB2-ともいう。)について試験した。

[0185] (材料および方法)

SB2-の新培養法で製品を評価するため、ロットCT09 P5を用いて添加物の効果を検定した。まずCT09 P4(FBSロット検定用細胞余り)を用いて、継代前日に培養上清を回収し(Day42)、その後CT09 P5にECD400で継代(181219)し、Nancy培地(FBS#1652794、アスコルビン酸含)で図23に示す1～5の条件で培養した(各6ウェルプレート2ウェル)。1週目から5週目までは培養上清を回収し、Day34(190122)で1ウェルをFACS測定し、培養上清はIL-8, PDGF-bbをELISAで測定した。

[0186] また実験条件については、図30に、ELISA PDGF-bbおよびIL-8のCT09 P4、P5の培養上清・サンプルリストを示した。

[0187] (結果)

各条件でのCT09 P5の写真を図24～図26に、またDay34でのFACSの結果を図27～図29にそれぞれ示した。

またELISA PDGF- β およびIL-8のCT09 P4、P5の培養上清・サンプルリストを図30に示した。PDGF- β を添加物で分類した結果を図31に、週で分類した結果を図32に、それぞれ示した。またIL-8を添加物で分類した結果を図33に、週で分類した結果を図34に、それぞれ示した。

以上の結果から、理論に束縛されることを望まないが、添加物の効果について、総合的に見てSB4、EGFなし、Y 10日目から、SB2非添加または培養最終期のみの添加が望ましいことがわかった。

[0188] V-2. ミトコンドリア呼吸能

本実施例では、ミトコンドリア呼吸能を調べた。

[0189] (材料および方法)

角膜内皮細胞(HCEC)をSightLife (Seattle, WA, USA) が提供したドナー角膜から入手し、そのHCECを公開されているプロトコル(Toda M, Ueno M, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2017;58:2011) にいくつかの修正を加えた方法で培養した。2～5代のHCECをすべての実験に使用した。CSTを含むSPは、低細胞密度で継代培養した。cHCECのSPは、位相差顕微鏡画像とフローサイトメトリー法を用いて、細胞表面マーカー(CD24、44、105、166)によって特定した。

[0190] (結果)

その結果を図35～図37に示した。

以上の結果から、規格細胞ではミトコンドリア呼吸能が高いことがわかった。またEGF添加は規格細胞比率を低下させるが、これに対応してミトコンドリア呼吸能が低下し、酸化的リン酸化(OXPHOS)が低下することもわかった。

[0191] (実施例6: VI. ROCK阻害剤の添加)

本実施例では、ROCK阻害剤(例えば、Y27632)の添加について、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(目的細胞)産生に与える効果を調べた。

[0192] (材料および方法)

ドナー情報を図38に示す。培養の条件については、#190719ではP1, P2でY添加時期の検討を行い、#190802ではP1でY添加時期の検討を行うため、図39に示した条件で各1w~5wの培養上清を回収した。また#190318ではP1, P2で図40に示した条件で培養上清を回収した。

[0193] (結果)

FACS結果を図41および図43~図45に、培養細胞写真を図42に示した。この結果から、3つの実験のいずれにおいてもROCK阻害剤を培養開始後10日目に添加したほうが規格細胞の割合は高くなっていた。理論に束縛されることを望まないが、この結果から、増殖および／または分化・成熟させる工程において、ROCK阻害剤の存在下で培養することが好ましいことが理解される。これらからも、本開示において、角膜内皮前駆細胞を得るために不可欠な効率よい分化が誘導されることが判明した。

[0194] また#190719の培養上清中のELISAPDGF-bb測定結果(項目ごと)を図46に示した。この結果、P1およびP2の2つの実験のいずれにおいても、ROCK阻害剤を培養開始後10日目に添加しても成熟規格細胞の規格の一つのPDGFは分化から成熟期に至り高くなっており、本培養条件下では高価なYを接着目的で、培養初日から添加することは無意味なことが示された。分化の時期に添加する方が脱分化を阻害しないためと考えられる。またP1では、4wでピークとなり、5wでやや低下することもわかった。

[0195] また#190318の培養上清中のELISAPDGF-bb測定結果(項目ごと)を図47に示した。この結果、p38MAPK阻害剤SB2を添加しない方法では、3wでPDGF高値となり、分化の早期誘導を示すことがわかった。

[0196] また#190719の培養上清中のELISA PDGF-bb測定結果(週ごと)を図48に、#190318の培養上清中のELISA PDGF-bb測定結果(週ごと)を図49に、それぞれ示した。この結果、理論に束縛されることを望まないが、#190719のP1, P2ではY27632添加でPDGF高値に、またP1増殖期はやや低値になることがわかった。

た。理論に束縛されることを望まないが、またPDGFはSB203580の有無とはほぼ関係なく、独立因子であることもわかった。

[0197] また#190719の培養上清中のELISA IL-8測定結果（項目ごと）を図50に示した。この結果、P1およびP2の2つの実験のいずれにおいても、ROCK阻害剤を培養開始後10日目に添加しても、成熟規格細胞の規格の一つのIL8は分化から成熟期に至り最も低くなっていた。またP1では増殖期は高値であり、分化が進むと低値となり、P2でも分化が進むと低値となることもわかった。

[0198] また#190318の培養上清中のELISA IL-8測定結果（週ごと）を図51に示した。この結果、IL-8はSB2の有無にほぼ依存的に変動することがわかった。

[0199] また#190802の培養上清中のELISA PDGF-bbおよびIL-8測定結果（項目ごと）を図52に示した。この結果、PDGFはROCK阻害剤（Y27632）による分化誘導に依存的に増加すること、またIL-8はp38 MAPK阻害剤（SB203580）に依存的に減少することがわかった。

[0200] また#190318の培養上清中のサイトカイン測定（Bio Plex）の結果（項目ごと）を図53に示した。その結果、IL-6、IL-8、MIP-1bの3つともp38 MAPK阻害剤（SB203580）に依存的であることがわかった。

[0201] これらからも、本開示において、角膜内皮前駆細胞を得るために不可欠な効率よい分化が誘導されることが判明した。

[0202] （実施例7：VIL, ROCK阻害剤の添加）

本実施例でも、実施例6に続き、ROCK阻害剤に関する条件をさらに調べた。以下に詳述する。

[0203] （材料および方法）

#190719のP4を用いて1～5wで培養上清を回収してROCK阻害剤の有無による違いを調べた。添加物の条件を図54に示した。ドナー情

報は、#190719S/D、AEB-301、OSCN/ODCN、Age= 40 / Gender = M、ECD = 344
8 / 3289、COD:BleomycinLung Toxicity 2/2 ChemoTreatments、D-P = 11:28
、D-C = 8Dである。

[0204] (結果)

D A Y 3 5 の写真を図 5 5 に、F A C S 結果を図 5 6 及び図 5 7 に、それぞれ示した。また E L I S A での P D G F - b b および I L - 8 の項目ごとの結果を図 5 8 に、週ごとの結果を図 5 9 に、それぞれ示した。

[0205] 以上の結果、3 群比較の実験においても、R O C K 阻害剤を培養開始時に 3 日間添加しても、成熟規格細胞は F A C S でまったく検出されなかった。また規格の一つである P D G F は低値であり、規格基準値を満足しないことがわかった。I L - 8 についても規格より高値となり、これは分化の時期に添加する必要性を示す。

[0206] 以上から、一つの実施形態では、増殖および／または分化・成熟させる工程において、R O C K 阻害剤の存在下で培養することが好ましいことが理解される。

[0207] (実施例 8 : V I I I . R O C K 阻害剤による接着増強)

次に、R O C K 阻害剤の接着増強に関する試験を行った。R O C K 阻害剤による接着増強が規格細胞製造に関係するかどうかを調べるため、以下の条件で培養された細胞を P O において Y 添加または Y 非添加で比較検証した。

[0208] (材料および方法)

AEM-510(62Y, Male)、ECD ODCN : 3058、OSCN : 3058を用いて、1/30に4℃で保存し、1/31 10:00に角膜処理を行い、10:45にODコラゲナーゼ処理を開始し、11:05にOSコラゲナーゼ処理を開始した。その後、14:45から播種を開始し、ODではY-, A (アスコルビン酸) +で、OSではY+, A+で培養した。2/4 10:00に培地交換し、両眼 : Y+, A+、写真撮影(位相差x4, x10)を行った。

[0209] (結果)

その結果を図 6 0 ~ 図 6 3 に示した。この実施例で示した実施形態では、R O C K 阻害剤 Y 2 7 6 3 2 は細胞播種後、確かに培養器への接着を亢進す

るものの、4日目以降に初めてY27632を添加しても培養14日目に差異はまったく認められないことから、増殖および／または分化・成熟させる工程において、ROCK阻害剤の存在下で培養することでも、規格細胞が提供され得ることが理解される。

[0210] (実施例9: IX. ミトコンドリアから核への情報伝達によるエピゲノム制御)

本実施例では、ミトコンドリアから核への情報伝達によるエピゲノム制御を調べた。

ミトコンドリアから核への情報伝達によるエピゲノム制御については、Cell Metab. 2015 Mar 3;21(3):349-50.、Trends inCell Biology, June2017, Vol.27, No.6、およびSheikh et al. Nature Rev. Genetics, 2019などに詳しく、代謝産物によるEpigenetics制御と細胞老化や細胞分化の破綻については図64の模式図のように考えることができる。またオルガネラ局在の酵素としては図65のものが考えられ、上述の脱分化前駆細胞で発現するアイソザイムは細胞質、核に存在することで核内移行AcCoAを介してヒストンのアセチル化を行う。

[0211] 本実施例においては、代謝酵素などのタンパク発現が規格細胞と相転移を起こした非規格細胞との間で顕著に異なることを検証し、アイソザイムのオルガネラ選択的局在の明確な差を示すことができた。

[0212] (材料および方法)

いわゆるDAVID解析を行った。以下に手順を示す。

(HCEC)

まずHCECは、公開されているプロトコルにいくつかの修正を加えた手法に従って培養した。CECを含むデスメ膜をドナー角膜から剥がし、1mg/mLコラゲナーゼA (RocheApplied Science, Penzberg, Germany) で37℃で2時間消化した。単一のドナー角膜から得られたHCECを、I型コラーゲンコーティング6ウェルプレート (Corning, Inc., Corning, NY) の1ウェルに播種した。培地は公開されたプロトコルに従って調製した。HCEC

がコンフルエンスに達したときに、37℃で12分間、10×TrypL Select (ThermoFisherScientific, Inc., Waltham, MA) 処理で収穫した後に継代した。2～3代のHCECをすべての実験に使用したドナー情報は、#184、ABF-9560SCN/ODCN、Age= 11、Gender = Female、ECD = 3207/3588と、#225、ABZ-612 OSCN/ODCN、Age= 27、Gender =Male、ECD = 3195 / 3425である。また培養条件は図66に示したとおりである。P1とP4でのFACS結果を図67及び図68に、また各細胞写真を図69に、それぞれ示した。

[0213] (培養ヒト角膜内皮細胞 (cHCECs) 継代・細胞懸濁液の調製)

顕微鏡写真以外の作業はすべて安全キャビネット内で行い、培養室に入る際は手をきれいに洗い、マスク・手袋を着用した。

予めPBS (-)、培地 (Nancy medium) を37℃で温め、添加試薬 (グレーのボックス) を常温に戻しておいた。培養中の細胞を取り出し、ロット番号を確認し、位相差顕微鏡下にて細胞を観察した。位相差顕微鏡用カメラにて40倍 (24-well : 1箇所, 12-well : 1箇所, 6-well : 2箇所, T-25 : 3箇所) と100倍 (24-well : 2箇所, 12-well : 2箇所, 6-well : 3箇所, T-25 : 3箇所) の写真を撮影した。細胞を安全キャビネット内に入れ、ピペットマンまたはディスポピペットを用いて培養上清をチューブ (1.5-mLまたは15-mL) に回収した。PBS (-) (24-well : 500mL, 12-well : 1mL, 6-well : 2.5mL, T-25 : 7mL) を注入し (1回目)、培養容器を軽く揺らしウェル内を洗浄した。ウェル内のPBS (-) をディスポピペットで取り除き、PBS (-) (24-well : 500mL, 12-well : 1mL, 6-well : 2.5mL, T-25 : 7mL) を注入し (2回目)、培養容器を軽く揺らしウェル内を洗浄した。ウェル内のPBS (-) をディスポピペットで取り除き、PBS (-) (24-well : 500mL, 12-well : 1mL, 6-well : 2.5mL, T-25 : 7mL) を注入した (3回目)。タイマー1

0分をスタートさせ、位相差顕微鏡用カメラにて40倍（24-well：1箇所，12-well：1箇所，6-well：2箇所，T-25：3箇所）と100倍（24-well：2箇所，12-well：2箇所，6-well：3箇所，T-25：3箇所）の写真撮影した。CO₂インキュベーターにて10分間（タイマーが鳴るまで）静置した。恒温槽中でTrypLE Select（10×）を37℃で温め、タイマー10分が経過する前に安全キャビネット内においた。PBS（-）でTrypLE Select（10×）を（5×）に希釈し（1：1希釈）、ディスポピペットでPBS（-）を取り除き、P-1000で完全に除去した。TrypLE Select（5×）を注入し（24-well：200mL，12-well：400mL，6-well：1mL，T-25：2.5mL）、CO₂インキュベーターにて15分間静置した。位相差顕微鏡にて全体の半分以上の細胞が丸くなってきているか確認し、タッピングして細胞を底面から剥離した。丸い細胞が全体の半分に満たない場合は再度CO₂インキュベーターにて2～5分間静置した（TrypLEによる酵素処理時間の最大を計20分とし、丸い細胞が全体の半分以上を満たない場合であっても計20分を経過時点で次の工程に用いた）。

続いて、安全キャビネット内に入れ、P-1000チップにて吸引と底面への吐出を繰り返して細胞を剥離し、1.5-mLプロテオセーブチューブあるいは15-mLチューブに回収した。ここでは安全キャビネットのライトを点けてもよい。P-1000を用いて、1ウェルあたり回収した培養上清（24-well：200mL，12-well：400mL，6-well：1mL，T-25：2.5mL）を添加してウェルを洗いこみ、21のチューブに回収した。遠心機にて遠心し（300×g；eppendorf #5452000034卓上遠心機では2,100rpm 3分、TOMY #LC-220チューブ遠心機では1,200rpm 5分）、P-1000チップ（ロング）に付け替えて、上清を除去した。新しいチップに交換し、回収した培地を1ウェル当たり（24-well：100mL，1

2-w e l l : 2 0 0 m L , 6 - w e l l : 5 0 0 m L , T - 2 5 : 1 m L) 添加し、細胞を懸濁した。遠心機にて遠心し (3 0 0 × g ; e p p e n d o r f # 5 4 5 2 0 0 0 0 3 4 卓上遠心機では 2 , 1 0 0 r p m 3 分、T O M Y # L C - 2 2 0 チューブ遠心機では 1 , 2 0 0 r p m 3 分) 、 P - 1 0 0 0 チップ (ロング) に付け替えて、上清を除去した。新しいチップに交換し、回収した培地を 1 ウェル当たり (2 4 - w e l l : 2 0 0 m L , 1 2 - w e l l : 4 0 0 m L , 6 - w e l l : 1 m L , T - 2 5 : 2 . 5 m L) 添加し、細胞を懸濁した。P - 2 0 にチップをつけ、細胞懸濁液から 1 0 m L を速やかに抜き取り、計測用 9 6 - w e l l p l a t e (F A L C O N : 3 5 5 9 1 , 9 6 - w e l l アッセイプレート U 底蓋なし非滅菌ポリスチレン) に入れた。細胞懸濁液から 1 0 m L にトリパンブルー 1 0 m L を加え、ピペティングにより混合し、1 0 m L 取って血球計算盤にて生細胞数をカウントした。

細胞数計算

生細胞数 (カウント値) ÷ _____ (区画数) × 2 × 1 0 ⁴ = 生細胞数 (c e l l s / m L)

生細胞数 (c e l l s / m L) × 懸濁液量 (m L) = 総生細胞数 (c e l l s)

F A C S 解析を行う場合は、1 6 × 1 0 ⁴ c e l l s (抗体 1 種類 + N e g a t i v e c o n t r o l) をプロテオセーブチューブに分注して、残りを継代した。F A C S は抗体 1 種類につき 8 × 1 0 ⁴ c e l l s 必要とした。継代は Endothelial Cell Density (E C D : c e l l s / m m ²) 4 0 0 (1 9 1 0 0 1 時点) で播種した (2 4 - w e l l : 7 . 6 × 1 0 ⁴ c e l l s , 1 2 - w e l l : 1 5 . 2 × 1 0 ⁴ c e l l s , 6 - w e l l : 3 8 × 1 0 ⁴ c e l l s , T - 2 5 : 1 0 0 × 1 0 ⁴ c e l l s) 。

(培地の調整)

使用する量の培地 + α (2 4 - w e l l : 5 0 0 m L , 1 2 - w e l l :

1 mL, 6-well : 2.5 mL, T-25 : 7 mL) を適したチューブに取り、添加試薬（培地液量に対して各 1 / 1000 量）を加えた。添加試薬は光に弱いため、調整時・培地交換時は安全キャビネットのライトは消した。プレートを縦横に揺らして細胞を均一に播き、CO₂インキュベーターにて培養した。

[0214] (FACS測定)

〈必要な試薬類〉

□ cHCEC suspension (FACS抗体1種類 + Negative Control (NC) で 16×10^4 cells 必要)

□ FACS Buffer (+NaN₃)

BSA (グロブリンフリー) 0.5% / NaN₃ 0.05% / 1×PBS 100 mL

FACS Buffer (-NaN₃)

BSA (グロブリンフリー) 0.5% / 1×PBS 100 mL

FACS用抗体 (ex. CD90-FITC / CD166-PE / CD24-PerCP-Cy5.5 / CD44-PE-Cy7 / CD105-APC)

セルストレーナー

氷箱

[0215] 〈FACSの測定〉

FACSを立ち上げ、抗体溶液（以下遮光、on ice）を以下のよう
に調整した。抗原 蛍光色素 容量 (μL) ×サン

プル種類 + α (μL)

CD90 FITC 4

CD166 PE 4

CD24 PerCP-Cy5.5 1

CD44 PE-Cy7 0.25

CD105 APC 1

FACS Buffer (+NaN₃) 9.75 (total vol. 20 μ L)

サンプルが複数ある場合は、+ α の溶液を調整した。

細胞懸濁液を250 $\times$ g (1, 800 rpm)、2分、4℃で遠心を行い、P-200を用いて上清を除き、4 $\times$ 10⁶ cells/mLに濃度を合わせてFACS Buffer (+NaN₃)で懸濁した。懸濁液が30 μ Lに満たない場合は30 μ Lで懸濁して20 μ Lを反応に、10 μ LをNCとして使用した。

抗体溶液20 μ Lと懸濁液20 μ Lをピペッティングでよく混ぜ、チューブにアルミを巻いて遮光、4℃、ローテーターで2時間(max 4時間まで)回転させた。250 $\times$ g (1, 800 rpm)、2分、4℃で遠心を行い、上清を捨て、FACS Buffer (+NaN₃) 100 μ Lで洗浄した。250 $\times$ g (1, 800 rpm)、2分、4℃で遠心を行い、上清を捨て、FACS Buffer (-NaN₃) 350 μ Lで懸濁して、セルストレーナーを通して5-mLチューブへ移した。NCは、最初の懸濁液の残りすべてを計350 μ LになるようにFACS Buffer (-NaN₃)で懸濁して、セルストレーナーを通して5-mLチューブへ移した。FACS測定の間も、サンプルは遮光、on iceにしておき、FACSのレーザーの値、ターゲットセルの範囲を決め、ファイルを作成した(Bookを開く⇒Syringe開く⇒緑⇒Cytometer tab: Laser⇒Area scaling for HCEC labelに従う: FSC 0.5/Blue 0.75/Red 0.80)。NCをSITにセットして少し流し(Flow rate: mediumにセット、Acquire data 5秒⇒サンプルをSITから外してon ice)、蛍光のパラメーターグラフとターゲットセルの範囲をチェックした。パラメーター: 102~103の間にピークが来るか確認し、ずれている場合は流れている間にパラメーターの数値を上下させてRestartで確認して調整を行った。サンプルを流したときにピークがグラフ外へ出ると、グラフ

外のピークが最大値105にすべて換算されてしまうので、それを超えないように調整が必要。ターゲットセル：死細胞や細胞の塊を測定範囲に入れないように調整した。NC、サンプルの順に流した(Acquire data⇒Record data⇒10,000 events or 5 min⇒(after 5 min) Stop Recording⇒Stop acquire)。サンプルを流し終えたらFACSシャットダウンの手順を行った。

液体クロマトグラフィー／質量分析(LC/MS)による複合プロテオミクス

継代4のcHCECの細胞ライセートを、プロテオーム分析に使用した。93.9%の比率(エフェクター比=E比、n=3)でCD44-/+成熟分化cHCEC SPを含む高品質(HQ)cHCEC、および73.8%の比率(n=3)でCD44+/+/+未成熟cHCEC SPを含む低品質(LQ)cHCECを、分析した。HQ cHCECまたはLQ cHCECそれぞれの3アリコートからの細胞ライセートを乾燥させ、20 mmol/L HEPES-NaOH (pH 5.8.0)、12 mmol/L デオキシコール酸ナトリウムおよび12 mmol/L N-ラウロイルサルコシンナトリウム中で再構成させた。10分間100℃での20 mmol/L

ジチオスレイトールでの還元、および45分間周囲温度での50 mmol/L ヨードアセトアミドでのアルキル化の後、6時間にわたり37℃で shaking at 1000 rpmで振盪しながら、タンパク質を固定化トリプシン(Thermo Fisher Scientific)で消化した。デオキシコール酸ナトリウムの除去後、得られたペプチドを、Oasis HLB m-溶出プレート(Waters)によって脱塩し、質量分析に供した。ペプチドを、Ulti-Mate 3000 RSLCナノフローHPLCシステム(Thermo Fisher Scientific)と組み合わせたLTQ-Orbitrap-Velos質量分析計(Thermo Fisher Scientific)によって分析した

。タンパク質の同定および定量分析を、MaxQuantソフトウェアで行った。MS/MSスペクトルを、ペプチド同定フィルターおよびタンパク質同定フィルターの両方について偽発見率1%に設定してSwiss-Prot内のホモサピエンスタンパク質データベースに対して検索した。「Razor unique peptides」のみを、相対的タンパク質濃度の計算に使用した。タンパク質の複合分析について、検出された全てのピークを、1.0~104にメジアン値を補正することによって標準化した。

(LC/MSデータセット分析)

LC/MSデータセットは、総計4641種のタンパク質からなり、これは、Proteome Discoverer 2.2ソフトウェアを使用することによって得られた。存在量比が計算できないデータを除去した後、本発明者らは、ウェブベースのプログラムであるDAVID v6.8 (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery; <https://david.ncifcrf.gov>) によって残りのデータを分析した。最終的に、4315種の遺伝子になり、その後の分析のために、各々、固有のDAVID遺伝子IDを与えた。遺伝子発現分析に関しては、本発明者らは、2群間の統計的P値および変化倍率を計算し、ボルケーノプロットを描画し、HQ cHCECおよびLQ cHCECで異なって発現された遺伝子を抽出した。着目した遺伝子ならびにcHCEC代謝に関連することが示唆される関連遺伝子/経路のさらなる調査は、DAVIDおよびそのオプション「BIOCARTA」および「KEGG_PATHWAY」を使用することによって実行した。BioCarta (https://cgap.nci.nih.gov/Pathways/BioCarta_Pathways) またはKEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; <https://www.genome.jp/kegg/>) の元のデータベースを参照して、図中の参照遺伝子/経路はわずかに変更した。遺伝子オントロジー (GO) 分析については、存在比率 (LQ/HQ) の範囲に基づいてデータを3つのグループに分割し、各グループに「GOTERM_DIRECT」オブ

ションを使用してDAVIDで分析した。GOの結果をP値でソートし、各グループの上位10位のGO用語を表示した。LC/MSデータ解析では、HQとLQ cHCECの違いの有意性は、F検定による確認後、スチューデントまたはウェルチのt検定によって評価した。

[0216] (プロテオミクスのDAVID解析)

続いて、プロテオミクスのDAVID解析を以下の順に行った(図70)

。

(1) 3群解析

(2) ratio 27 越えのものの解析

(3) GOTERMのみの解析

(4) DAVID解析後のミトコンドリアに関する比較

[0217] (1) 3群解析

Proteins数4641個について、Abundance Ratio: (225) 相転移非規格細胞LQ / (184) 規格細胞HQのない323個は除外した(323個)。残りの4318個のProteinsをAbundance Ratio: LQ / HQを基に群に分けた(一つでもデータがあれば、解析対象)。

3群わけは以下の表のとおりとなった。

[表3]

3群	Abundance Ratio: (225) / (184)	Proteins数	DAVID IDに変換できた数	DAVID ID 数
1	有意に225が高い群 ≥ 2	1006	1004	976 DAVID IDs
2	差があまりない群 $2 \sim 0.5$	2805	2804	2789 DAVID IDs
3	有意に184が高い群 ≥ 0.5	507	507	504 DAVID IDs

[0218] (2) ratio 27 越えのものの解析

次に、ratio 27 越えのものを解析した。図71においてAbundance Ratio: LQ / HQが27を超えている2つについてDAVID解析をしたところ、結果はcluster 0であった。KEGG PATHWAYで調べると、Nitrogen metabolismがあった。KEGG PATHWAYのNitrogen metaboli

smに含まれている遺伝子（17個）と今回解析にかけたタンパク（4641個）とで共通するものを探し、7つ（CA12, CA2, CA3, CA5B, GLUD1, GLUD2, GLUL）をピックアップした。これらを更にDAVIDにかけ、KEGG PATHWAY（Nitrogen metabolism）を探し、確認した。

[0219] （3）GOTERMのみの解析

次にGOTERMのみの解析を行った。DAVID解析では、50ほどのデータベースを使い解析ができ、DAVID推奨（Defaults）の解析では、そのうちの10ほど（例えば、UP_KEYWORD、KEGG_PATHWAY、INTERPROなど）を使うこととなっており（GOTERMも含まれている）、今回はその中の3つ（GOTERM_BP_DIRECT, GOTERM_CC_DIRECT, GOTERM_MF_DIRECT）のGOTERMのみを使った解析をした。Biological Process（BP）：細胞内での機能。Cellular Component（CC）：細胞の構成要素。Molecular Function（MF）：分子の機能。その結果を図72に示した。

[0220] （4）DAVID解析後のミトコンドリアに関する比較

続いて、DAVID解析後のミトコンドリアに関する比較を行った。

AbundanceRatio:LQ/ HQ0.5-0.2のグループ(398個)のAnnotation Cluster1(EnrichmentScore:72.73354929082193)では、ミトコンドリアに関するものが多かった(図73)。そこでPATHWAYをもう少し確認するため、398個を再びDAVIDで解析し、GOTERM, PASTHWAY, PROTEINDOMAINSの項目のうち、DAVIDのDefaultsで選ばれている項目でクラスタリングした(図74)。クラスタリングした結果から調べるpathwayを選択した(図75)。pathwayを調べGenesのグラフを書き入れた。更に、代謝経路上関心のある経路をKEGGPathwayで検索図示し〔太字〕、相転移非規格細胞と規格細胞の代謝経路に係る酵素や基質のタンパク発現強度を比較した(図76～図83)。

[0221] （実施例10：X. イオンチャンネル 単カルボン酸輸送体系細胞感染）

本実施例では、イオンチャネル 単カルボン酸輸送体系について調べた。

[0222] (材料および方法)

以下のドナーの角膜組織から得られた細胞を免疫染色した。また使用抗体データは図84に示した。

#190802S/D、ACW-1340SCN/ODCN、年齢28/ 性別：女性、ECD = 3003 / 3021、死因：ESRDD-P = 08:57、D-C=5D

免疫染色結果は以下の表のとおりであった。

[表4]

培養条件	Day 0 ~ 4	Day 5 ~ 41, 42 or 43
①	Nancy + 10 μ M Y-27632	
②	Nancy + 10 μ M Y-27632 + 10 μ M SB203580 + 5 ng/mL EGF	Nancy + 10 μ M SB203580 + 5 ng/mL EGF

1は規格細胞、2は相転移非規格細胞、かつEGF添加培養である。いずれもDay 0-41, 42 または 43まで培養後、実験に使用した。いずれの細胞もそれぞれ200倍で画像取得し、2箇所ずつ染色した。

Immunofluorescent Staining of chCECs (24-well plate)を行うに際して、以下のものを準備した。

☐ 固定液 (-30℃氷冷特級メタノール(nacalai #21915-35) or RTに戻した4% PFA/リン酸緩衝液 (wako #163-20145))

☐ PBS (-)

☐ PBS(-)/0.2% Triton X-100 (0.5 mL $\times$ wells $\times$ 1.1 = mL)

☐ 1% BSA/PBS(-) (BSA: EIA/RIA grade, nacalai #01281084) (BSA g / PBS(-) mL)

☐ 一次抗体 (Isotype control含む)

☐ 蛍光標識二次抗体

☐ DAPI (同人化学, wako #340-07971)

[0223] また手順は以下のとおりである。すべての容量は24-well plate 1-well当

たりで行った。

まず、細胞の培養上清を除き、PBS(-) 0.5 mLで洗浄した(1回)。固定液を0.5 mL加え、15分室温で静置した(MeOHの場合は-30℃)。PBS(-)/0.2%Triton X-100を0.5mL加え、15分室温でインキュベートした。溶液を除き、1%BSA/PBS(-)を0.5 mL加え、60分室温でブロッキングした。溶液を除き、一次抗体を1%BSA/PBS(-)で希釈し、0.3 mL加えて4℃でインキュベート0/Nした。PBS(-)0.5 mLで5分間洗浄した(3回)。溶液を除き、蛍光標識二次抗体を1%BSA/PBS(-)で希釈し、0.3mL加えて室温で60分以上インキュベートした。PBS(-)0.5 mLで5分間洗浄した(1回)。溶液を除き、DAPIをPBS(-)で200倍希釈し、0.3 mL加えて室温で5～15分インキュベートした。PBS(-)0.5mLで5分間洗浄した(2回)。PBS(-) 0.5 mLを加え、蛍光顕微鏡で観察した。

[0224] (結果)

その結果を図85～図88に示した。その結果、ATP1A1(Na+K ATPase)およびAQP1は、規格細胞で細胞膜に高発現しているが、非規格細胞では発現していないことが分かった。SLC4A11、NHE1、SLC25A42についても同様であった。以上から、理論に束縛されることを望まないが、単カルボン酸輸送体のオルガネラ選択的局在が明らかになった。以上から、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、規格細胞では認められることが理解される。

[0225] (実施例11: XI. 輸送体SLCファミリータンパク)

次に、本実施例では、どのような輸送体SLCファミリータンパクの発現が規格細胞でみられるか観察した。以下に詳述する。

[0226] (材料および方法)

本実施例では、輸送体SLCファミリータンパクについて、発現について実験を行った。

CD44-/+ (成熟) 主構成cHCECまたはCD44++/+++細

胞状態転移（CST）主構成cHCECのいずれかについて、各々3つの検体を対象に液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析（LC-MS/MS）による細胞溶解物についての統合プロテオミクス解析を行った。細胞培養の条件などは、上記実施例に記載したものに準じる。

カチオン／アニオン輸送体（イオン輸送体）、単カルボン酸輸送体および溶質キャリア（SLC）ファミリータンパク質の発現パターンならびに炭酸脱水素酵素（CA）を検定した。

MS/MSスペクトルをヒトタンパク質配列データベース（SwissProt）に対して、MascotまたはSEQUEST検索エンジンを用いて、Proteome Discoverer 2.2ソフトウェア（Thermo Fisher Scientific）を用いて解析した。

[0227] （結果）

規格細胞と非規格細胞との間の輸送体SLCファミリータンパクの存在比率

[表5]

SLC	CD44+/+ Mature	CD44+/+/+ Immature	Abundance Ratio: LQ/HQ	SLC	CD44+/+ Mature	CD44+/+/+ Immature	Abundance Ratio: LQ/HQ	SLC	CD44+/+ Mature	CD44+/+/+ Immature	Abundance Ratio: LQ/HQ
SLC38A9	279.672	1.038.721	3.72	SLC25A17	238.222	208.620	0.88	SLC25A11	71.153.370	38.197.055	0.54
SLC28A1	1.352.053	7.388.578	5.46	SLC38A2	333.522	1.548.507	0.88	SLC25A18	339.043	185.825	0.55
SLC38A2	105.590.458	239.542.708	2.26	SLC37A4	1.085.958	1.400.143	0.88	SLC25A1	31.583.103	28.690.688	0.90
SLC44A8	3.798.133	7.858.415	2.07	SLC25A2	383.188	354.688	0.92	SLC25A20	15.857.043	6.838.686	0.58
SLC38A3	3.798.133	7.858.415	2.07	SLC38A2	1.872.288	1.728.347	0.92	SLC25A11	135.189.883	64.494.219	0.50
SLC44A8	2.312.220	4.794.281	1.59	SLC4A7	294.720	250.213	0.85	SLC25A5	125.692.113	58.082.704	0.47
SLC38A1	50.549.128	89.093.620	1.78	SLC38A10	171.704	141.781	0.82	SLC25A8	837.330.458	268.085.421	0.32
SLC22A5	322.411	714.180	1.74	SLC13A3	11.431.855	8.565.381	0.80	SLC25A11	492.059	173.852	0.35
SLC12A5	1.858.121	2.838.113	1.52	SLC38A8	1.744.423	1.187.762	0.80	SLC22A1	915.154	236.109	0.43
SLC38E1	1.626.432	2.253.181	1.42	SLC31A1	669.141	503.064	0.75	SLC25A14	595.141	252.302	0.42
SLC12A4	10.378.434	14.696.249	1.42	SLC56A2	722.315	487.458	0.78	SLC12A8	3.861.037	1.889.000	0.42
SLC12A9	2.218.803	3.085.058	1.43	SLC11A2	392.014	200.026	0.75	SLC25A3	345.073.331	140.545.608	0.41
SLC68A2	183.889	231.080	1.33	SLC38A2	3.042.135	2.304.221	0.75	SLC28A2	538.330	202.048	0.38
SLC38A9	407.081	533.951	1.38	SLC2A10	126.043	89.617	0.73	SLC3A2	6.627.101	1.940.675	0.37
SLC2A1	239.606.501	393.430.609	1.63	SLC38A1	1.242.970	902.063	0.72	SLC27A5	8.130.425	2.565.155	0.32
SLC38A2	4.177.277	6.838.517	1.63	SLC25A3	25.441.755	17.282.960	0.68	SLC25A13	183.959.205	67.548.687	0.37
SLC18A1	3.507.462	4.835.505	1.38	SLC12A2	51.883.638	36.752.474	0.69	SLC25A10	23.594.456	6.529.975	0.32
SLC38A5	558.454	1.195.748	1.15	SLC25A4	2.218.093	1.578.240	0.69	SLC27A14	2.551.813	244.587	0.23
SLC38A10	638.475	2.653.238	1.14	SLC27A4	1.689.554	755.727	0.57	SLC3A1	550.043	<1.000	0.01
SLC5A3	385.731	399.788	1.13	SLC15A4	1.555.755	802.876	0.57	SLC44A1	252.738	<1.000	0.01
SLC38A14	758.331	795.508	1.08	SLC25A12	31.439.385	17.852.087	0.55	SLC2A15	358.625	<1.000	0.01
SLC25A21	452.908	482.822	1.05	SLC27A3	304.044	158.072	0.54	SLC21A1	3.380.743	<1.000	0.01
SLC9A7	1.472.075	1.452.862	1.03	SLC38A4	1.678.313	882.511	0.54	SLC25A13	122.509	<1.000	0.01
SLC38A7	3.079.332	3.791.028	0.97	SLC25A24	31.179.877	16.051.185	0.53	SLC25A18	78.877	<1.000	0.01
SLC25A25	2.380.937	2.100.732	0.97	SLC41A3	789.008	383.168	0.52	SLC3A1A3	4.246.987	<1.000	0.01
SLC40A1	1.275.838	1.142.408	0.93	SLC25A3	5.882.952	3.268.977	0.52	SLC18A2	202.342	<1.000	0.01
SLC15A3	1.442.144	1.289.811	0.93								

[0228] 上述の結果から、CST cHCECでは、ニコチン酸およびニコチンアミド代謝物に関連する酵素が最も上方制御されており、他方で、エクトヌクレオチドピロホスファターゼのみが、成熟cHCECで上方制御されていた

。興味深いことに、グルタミン酸－アンモニアリガーゼ（GLUL）の発現が、CST cHCECで上昇していたのに対して、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ1, 2（GLUD1, 2）およびグルタミナーゼ2（GLS2）は発現が減少していた。統合プロテオミクスによって、カチオン／アニオン輸送体（イオン輸送体）、単カルボン酸輸送体（MCT）および溶質キャリア（SLC）ファミリータンパク質の発現パターンならびに炭酸脱水素酵素（CA）が、成熟cHCEC（目的細胞）とCST cHCEC（非目的細胞）とでオルガネラ選択的な局在発現を示していることが観察された。

[0229] （実施例12：X11．細胞内pH測定）

本実施例では、細胞内pHとの関係を目的細胞について調べた。以下に詳述する。

[0230] （材料および方法）

続いて、細胞内pHを測定した。ドナー情報は以下のとおりである。Lot#190802P3: #190802S/D、ACW-1340SCN/ODCN、年齢28 /性別女性、内皮細胞密度 $CD = 3003 / 3021$ 、死因: ESRD、D-P =08:57、D-C = 5D

[0231] （細胞内pH測定）

細胞の形態を示す位相差顕微鏡写真と細胞表面CD抗原発現プロファイルでの亜集団解析並びにpH測定を行った。

[0232] 培養ヒト角膜内皮細胞の細胞内pHは細胞の大きさやミトコンドリア機能を規定すると考えられる。以下、培養条件で規格細胞と相転移非規格細胞を作成しpHを検定し、CD44⁺の規格細胞の細胞内pHがCD44⁺/+++の相転移非規格細胞よりも低いことを検証した。

[表6]

培養条件 (24-well plate)	Day 0 ~ 4	Day 5 ~ 42
①: 9 wells	Nancy + 10 μ M Y-27632	
②: 12 wells	Nancy + 10 μ M Y-27632 + 10 μ M SB203580 + 5 ng/mL EGF	Nancy + 10 μ M SB203580 + 5 ng/mL EGF

[0233] (cHCECs細胞内pH測定方法)

(調整試薬)

HEPES buffer (153mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM glucose, 20 mM HEPES, pH7.4)

Calibration buffer(130 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgSO₄, 10 mM Na-MOPS)
…pH6.6/7.0/7.2/7.4/7.8/8.2

2 mg/mL Nigercin/EtOHストック溶液…分注して-30℃保存

1 mM BCECF-AM/DMSO溶液 (同人化学B221: 50 mg/tubeに72.612 mL DMSOを
添加・混合し、分注して-30℃保存)

[0234] (準備物)

黒色平底96-wellプレート(Thermo Fisher: 237105 蓋つき個包装、未処理)

回収できる細胞数を検討しておく (1×10⁵ cells/sample; calibrationに6
samples使

用するので最低7~8×10⁵cells用意した)

pHi測定試薬(HEPES, 1 mM BCECF-AM/DMSO, 2 mg/mL Nigercin/EtOH)

cHCECs剥離関連試薬(PBS, TrypLE/PBS)

[0235] (方法)

(細胞浮遊液(測定したい細胞)の調製)

位相差顕微鏡用カメラで細胞を撮影し、ヒト培養角膜内皮細胞をPBS(-) (位相差顕微鏡用カメラで細胞を撮影)、5×TrypLE/PBS(-) にて剥離した。

[0236] 細胞数をカウントし(実数値: cells/mL, total cells/ mL)、1.5-mLプロ
テオセーブチューブ1本中に2-10×10⁵cells/1mLHEPESになるようにHEPES Buff
er に懸濁した。1 mM BCECF-AM/DMSOを1 mLあたり5 mL 添加し(final conc. 5
mM) (実数値: cells/mL× 本)、培養室の37℃ 5%CO₂インキュベータにて30
分間反応させた。実験台に移り、300×g(1,867 rpm:eppendorf centrifuge54
18) 3 min遠心し、上清を取り除き、HEPES buffer 200 mLにて細胞ペレット
を懸濁した(wash1回目)。300×g (1,867rpm) 3 min遠心し、上清を取り除き
、2×10⁵ cells/mL HEPESになるようにHEPESBufferに懸濁し、15-mLチューブ

にすべてを合わせた(ex. 8×10^5 cells/4 mL HEPESにする)。この細胞浮遊液から細胞を500mL/1.5-mLプロテオセーブチューブへ分取した(ex. 全量 8×10^5 cells/4 mLHEPESの場合2本)。分取前には細胞浮遊液が均一になるように混ぜた(分取した後に、キャリブレーション用細胞浮遊液準備へ進んだ)。300×g(1,867rpm) 3 min遠心し(wash 2回目)、上清を捨て、細胞PelletをHEPES buffer 500 mLに懸濁した。

[0237] (キャリブレーション用細胞浮遊液調製)

キャリブレーション用緩衝液を準備し、細胞浮遊液から細胞を500 mL/1.5-mLプロテオセーブチューブへ6本分取した。300×g (1,867 rpm) 3 min遠心し(wash 2回目)、上清を捨て、細胞Pelletを各pH液500mLで懸濁した。2mg/mL Nigercin/EtOH を500 mLあたり2.5mL 添加し(final conc. 10 mg/mL)、10分室温にてインキュベートした。このキャリブレーション用細胞浮遊液と細胞浮遊液とを150mL/well(96-wellplate)、3-wellずつ加えた。

[0238] (測定)

蛍光プレートリーダー (GloMax Explorer, Promega) を使用し、励起500 nm・蛍光波長530 nmにて測定した(GloMaxでは励起Blue(475nm)、蛍光フィルタ500-550nmに設定)。

[0239] (結果)

結果を図89～図93に示す。

[0240] (実施例13：XIII. 添加物の効果)

本実施例では、添加物の効果をさらに調べた。以下に詳述する。

(材料および方法)

P3 T-251枚を24wpに継代して使用 (=P4)した。C37、ABH-096 OSCN/ODCN、Age = 26Y /ECD = 3255 / 3137、COD:Trauma、D-P= 17:57 / D-C = 8D

[表7]

	橋樑/継代日	培養日数	橋樑 ECD	継代時 ECD	ソフト解析 ECD	Effector	準合格
P0	8月4日	45	(264)	2284	2887	ND	ND
P1	9月18日	42	859	2040	2388	95.8%	0.7%
P2	10月30日	49	808	1848	1746	95.9%	1.0%
P3	12月18日	39	891	1789	1747	75.0%	20.2%
P4	1月28日		800				

*ND: Not Determined

[0241] (結果)

結果を図94～図100に示した。測定項目のうち、IL-1b、IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-9、IL-10、IL-13、IL-15、IL-17、basic FGF、IFN-g、MIP-1a、MIP-1b、TNF-a、VEGFについては検出限界以下となった。

[0242] 以上の実施例1～13によれば、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・成熟させることが重要であることが理解される。また、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、規格細胞では認められることが理解される。加えて、好ましい実施形態では、増殖および／または分化・成熟させる工程において、ROCK阻害剤の存在下で培養することが好ましいことが理解される。

[0243] (実施例14：酸化的リン酸化呼吸の増加)

図1で説明したとおり、非規格細胞でMir34a発現が低下し、結果、ミトコンドリアの解糖系が亢進する。そこで、強制的にmiR43aのmimicsを細胞内導入し、miR43aの発現を高めたところ、酸化的リン酸化呼吸が高まることを確認した（図101、図102）。

[0244] ミトコンドリアの酸化的リン酸化呼吸OXPHOSが高まると、角膜実質の水分が排出されることで臨床の薬理効果につながる（図103）。また増殖性の未分化細胞を増やし、その後分化させることで薬理効果に優れる規格

細胞、高品質細胞を生産することができる（図104）。

- [0245] 本開示の細胞が成熟分化細胞となるか、または脱分化状態となるかは、細胞内pHによりミトコンドリア機能が左右されることに起因すると考えられる（図105）。

本開示の角膜内皮細胞は余分な水を角膜実質より前房側に排泄し角膜実質を透明に保つために機能する。そのため、臨床効果として評価される角膜混濁軽減・透明化、角膜肥厚の非薄化などを挙げることができる。また、細胞注入医療適格細胞ではミトコンドリアのOXPHOSが亢進し、内皮細胞内に実質側から前房側への乳酸の濃度勾配が形成され、結果、浸透圧によりAQP1チャンネルを介する水排出を促進する。したがって、細胞機能特性評価としては、ミトコンドリア酸化的リン酸化機能、AQP1チャンネル発現などを挙げることができる。そして、上記のとおり、細胞内pHが脱分化抑制性miR34aの低下を抑制し、CD44の発現を抑制し、ミトコンドリアのOXPHOSを維持するため、細胞機能特性評価として、細胞内mir34a、CD44の発現低下などを挙げることができる。細胞内カチオン・アニオン平衡が細胞内pHを7.0～7.2の中性域に維持することでミトコンドリアのOXPHOSを高水準に維持する。細胞機能特性評価としては、Na⁺K⁺ATPase（AT1P1）、NBCe1（重炭酸イオンチャンネル）、NHE1（Na⁺, H⁺交換イオンチャンネル）、MCT4（乳酸輸送体：前房水側に放出）、SLC4A11などを挙げることができる。また最終製品適格細胞への非適格細胞の混在の機能的評価法として、細胞内カチオン・アニオン平衡が細胞内pHをアルカリ域に偏奇させることを確認する手法が考えられ、細胞機能特性評価として、ヒストンのアセチル化の有無、ミトコンドリア機能異常などを確認できる。

- [0246] （実施例15：細胞の免疫染色）

実施例10では、プロテオミクスの結果をもとにイオンチャンネルおよび／または単カルボン酸輸送体系について確認しているが、本実施例では、イオンチャンネルの選択的発現を細胞の免疫染色によって確認した。

[0247] FACS+イオンチャンネル系分子免疫染色結果

(Lot #CR04_P3:ドナー情報)

#CR04

ORL2002-314 LCN/RCN

- ・年齢=12/性別=男性
- ・ECD=3546/3460
- ・死因: Blunt head trauma
- ・D-P=6:42
- ・D-C=--D

[0248] FACS測定結果

(Lot #CR04_Day41)

CPCによってECD800~900で播種後、Day2にて御車へその後Day41まで培養し、5xTrypLE selectで剥離し、FACSに使用した。培養条件は以下の表のとおりである。

培養条件 {24-wp}	Day 0 ~ 41
規格細胞	Nancy + 10 μM Y-27632 + 20 μg/ml ascorbic acid

また41日目の写真を図106に示した。

[0249] さらに、免疫染色については、上記のようにDay41まで培養した後に実験に使用し、200倍で画像取得した。使用抗体は以下の表のとおりである。

抗体名	抗体種	抗体情報	ロット
human ATPase	mouse	Anti-Rat/Man ATPase-1 Antibody, clone D64.5 G5-269	5
human AQP4	abcam	Anti-Aquaporin 4 抗体 [EP1218066] (ab180895)	1, 2
human AE2	bovine	SLC42 Polyclonal Antibody (Catalog # F45-6175)	5, 6
human NHE1	bovine	Anti-SLC44 (S-1) 抗体 (sc-518548)	6, 7
human NHE1	abcam	Anti-Sodium/Hydrogen Exchanger 1/ATPase-1 抗体 (ab67534)	2
human ZO-1	bovine	ZO-1 Monoclonal Antibody (2D2-1432) (R83-9506)	3
human ZO-1	bovine	ZO-1 Polyclonal Antibody (R83-7900)	3
Acetyl-Histone H3	mouse	Anti-acetyl-Histone H3 (F05-929)	1
DAPI	bovine	DAPI CellStain® DAPI solution (works code: S40-0787)	1
2nd Ab: anti-rat IgG dye-conjugated	bovine	Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488 (#A32780)	1
2nd Ab: anti-rat IgG dye-conjugated	bovine	Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 647 (#A32785)	1
2nd Ab: anti-mouse IgG dye-conjugated	bovine	Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 488 (#A32780)	1
2nd Ab: anti-mouse IgG dye-conjugated	bovine	Donkey anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 647 (#A32785)	1

その結果、ATP1A1は細胞膜局在し、NHE1は細胞内局在し、一部

で細胞膜にも局在し、A Q P 1 は細胞膜局在し、N B C e 1 は細胞膜局在し、A E 2 は細胞内・細胞膜局在し、A c e t y l - H i s t o n e H 3 は低発現となった。この結果をまとめたものを図 1 0 7 に示した。

[0250] (実施例 1 6 : 非規格細胞におけるヒストンのアセチル化亢進)

本実施例では、非規格細胞がなぜ生成するかについて確認した。図 1 0 8 に示したとおり、細胞内 p H がミトコンドリアの G l y c o l y s i s を亢進し、ミトコンドリアから核へ移送される C i t r a t e が核内に局在する A C L Y、A C S S 2 によってヒストンをアセチル化し、ミトコンドリア M a t r i x 構成タンパク組成を変えることが示唆された。

[0251] (実施例 1 7 : 規格細胞と非規格細胞の比較)

本実施例では、規格細胞と非規格細胞 (C S T 細胞) における特定のタンパク質の発現を比較した。規格細胞として # 1 9 1 2 2 4 S P 4 D a y 4 6 (+ Y) を、非規格細胞として # 2 0 0 3 1 3 P 1 D a y 7 4 (+ S B 4、E G F) を用いた。結果を図 1 0 9 ~ 図 1 1 1 に示した。

[0252] また非規格細胞でヒストンアセチル化が亢進する理由の 1 つとして、規格細胞ではヒストン脱アセチル化酵素活性が低下していることを確認するため、規格細胞および非規格細胞で H A T / H D A C 活性を測定した。H A T / H D A C 活性の測定は以下のとおりに行った。

[0253] ドナーとして以下の L o t # 1 9 1 2 2 4 S _ P 4 を用いた。

1 9 1 2 2 4 S

A E N - 0 2 4 O S C N

年齢 = 2 9 / 性別 = 男性

E C D = 2 9 4 1

死因 : A c u t e R e s p i r a t o r y D i s t r e s s S y n d r o m e

D - P = 0 7 : 3 2

D - C = 7 D

[0254] 培養条件は以下の表のとおりとした。

培養条件 (6-wp)	Day 0 ~ 42
D42: 2 well	① Nancy + 10 μ M Y-27632
each	② Nancy + 1 μ M SB431542 + 5 ng/mL EGF

1についてはECD400、2についてはECD800（非規格細胞からの継代）で播種後、Day 42まで培養した。

それぞれ1wellをFACS: 5xTrypLE selectで剥離し、実験に使用した（miRNA発現測定用と同サンプル）。また1wellを核タンパク抽出し、細胞を直接NuclearExtractionKitで回収した。結果を図112～図114に示した。

[0255] ミトコンドリア呼吸系の基質要求性は規格細胞に比較して、CST細胞ではanaplerosisが亢進すること、規格細胞ではミトコンドリア内の分岐鎖アミノ酸代謝に係るBCAT2やBCKDHの亢進が確認された。興味あることに、TCA経路に係るミトコンドリア偏在代謝酵素CS, ACO2, IDH2, MDH2, ME3やAcetylCoA産生に係るACSS1, ACAT1は全て規格細胞で亢進し、細胞質に遍在するisozymesであるACLY, ACO1, IDH1, MDH1, ME1や細胞質や核内のAcetylCoA産生に係るACSS2, ACAT2は非適格細胞であるCST細胞で発現が亢進していた。このことは、培養ストレスという環境因子の影響下で細胞質や核内のAcetylCoAがEpigeneticにヒストンのアセチル化に係りCST細胞の形質発現を制御している可能性を示唆する。脱分化細胞の分化破綻に核局在AcetylCoAの偏在が重要な役割をしていると考えられる。

[0256] （注記）

以上のように、本開示の好ましい実施形態を用いて本開示を例示してきたが、本開示は、特許請求の範囲によってのみその範囲が解釈されるべきであることが理解される。本明細書において引用した特許、特許出願及び他の文献は、その内容自体が具体的に本明細書に記載されているのと同様にその内

容が本明細書に対する参考として援用されるべきであることが理解される。
本願は、日本国特許庁に2020年2月27日に出願された特願2020-32139に対して優先権主張をするものであり、その内容はその全体が少なくとも本願の内容を構成するのと同様に参考として援用される。

産業上の利用可能性

[0257] 本開示は、角膜内皮再生医療に関する医療産業およびその周辺産業において利用可能性が見出される。