

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3621106号

(P3621106)

(45) 発行日 平成17年2月16日(2005.2.16)

(24) 登録日 平成16年11月26日(2004.11.26)

(51) Int. Cl.⁷

C 1 2 N 5/06

A O 1 K 67/027

A 6 1 K 35/39

F I

C 1 2 N 5/00

A O 1 K 67/027

A 6 1 K 35/39

E

請求項の数 19 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願平7-528420	(73) 特許権者	ユニバーシティ オブ フロリダ リサーチ ファウンデーション, インコーポレイ テッド
(86) (22) 出願日	平成7年4月28日(1995.4.28)		アメリカ合衆国 3 2 6 1 1 フロリダ州, ゲインズビル, グリントー ホール 2 2 3
(65) 公表番号	特表平9-512440	(74) 代理人	弁理士 浅村 皓
(43) 公表日	平成9年12月16日(1997.12.16)		
(86) 国際出願番号	PCT/US1995/005303	(74) 代理人	弁理士 浅村 肇
(87) 国際公開番号	W01995/029988		
(87) 国際公開日	平成7年11月9日(1995.11.9)	(74) 代理人	弁理士 長沼 暉夫
審査請求日	平成14年4月15日(2002.4.15)		
(31) 優先権主張番号	08/234, 071	(74) 代理人	弁理士 池田 幸弘
(32) 優先日	平成6年4月28日(1994.4.28)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 機能的なランゲルハンス島のインビトロ培養およびそのインビボ使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

機能的島細胞及び／又は島様構造物へと分化する膵臓幹細胞のインビトロ培養法において

、
哺乳動物種からの前記幹細胞を含む膵臓細胞を、正常血清で補充した栄養培地で培養し、
前記膵臓細胞を再補給なしで少なくとも約3週間発育させて、間質様細胞及び膵臓幹細胞
を含む培養物を生成し、

前記培養物に、正常血清を補充した栄養培地を再補給することにより、前記幹細胞の、機
能的島細胞又は島様構造物への細胞分化を開始させることを含む、上記方法。

【請求項 2】

前記膵臓細胞はヒト細胞であり、前記血清は正常ヒト血清である、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

前記膵臓細胞はマウス細胞であり、前記血清は正常マウス血清である、請求項1記載の方法。

【請求項 4】

栄養培地は高アミノ酸栄養培地からなる、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

細胞培養を栄養再補給するために用いる培地は更にグルコースを含有する、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

10

20

前記培養での発育の約4週から5週の時点で、前記間質様細胞及び膵臓幹細胞を含む前記細胞培養物に同族正常血清を補充した栄養培地を再補給することにより、培養された幹細胞の分化を開始させる、請求項1記載の方法。

【請求項7】

前記培養物に前記培地を再補給することにより、前記幹細胞の分化を開始させた後、前記培地を1週間間隔で栄養を再補給する、請求項1記載の方法。

【請求項8】

前記膵臓細胞を得たのと同じ哺乳動物種から正常血清を得る、請求項1記載の方法。

【請求項9】

内分泌ホルモンの製造法において、哺乳動物種からの幹細胞を含む膵臓細胞を正常血清で補充した栄養培地で培養し、前記膵臓細胞を再供給なしで少なくとも約3週間発育させて、間質様細胞及び膵臓幹細胞を含む培養物を生成し、前記培養物に、正常血清を補充した栄養培地を再補給することにより、前記幹細胞の、機能的島細胞又は島様構造物への細胞分化を開始させ、前記機能的島細胞又は島様構造物から分泌される前記内分泌ホルモンを採取することを含む、上記方法。

【請求項10】

前記ホルモンはヒトのホルモンである、請求項9記載の方法。

【請求項11】

前記ホルモンはマウスのホルモンである、請求項9記載の方法。

【請求項12】

前記培養での発育の約4週から5週の時点で、前記培養物に、前記正常血清を補充した栄養培地を再補給することにより、前記幹細胞の分化を開始させる、請求項9記載の方法。

【請求項13】

前記内分泌ホルモンはインスリン、グルカゴンおよびソマトスタチンからなる群から選ばれる、請求項9記載の方法。

【請求項14】

人間を除く哺乳動物に膵臓様の器官をつくる方法において、請求項1記載の方法により得られる機能的島細胞、島様構造物、または膵臓幹細胞を哺乳動物の組織中に移植することからなる上記方法。

【請求項15】

請求項14記載の方法に従い人間を除く哺乳動物の生体内に膵臓様の器官をつくることを含む、人間を除く哺乳動物における膵臓疾患の治療法。

【請求項16】

前記機能的島細胞は、α細胞、β細胞およびδ細胞からなる群から選ばれた細胞からなる、請求項1記載の方法。

【請求項17】

哺乳動物中に移植された前記機能的島細胞、島様構造物、または膵臓幹細胞は、移植片を受け取る哺乳動物に対し同原（autologous）である、請求項14記載の方法。

【請求項18】

請求項14記載の方法に従いつくられた膵臓様器官をもつ人間を除く哺乳動物。

【請求項19】

前記哺乳動物はマウスである、請求項18記載の哺乳動物。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

糖尿病は公衆衛生の大きな問題である。National Diabetes Advisory Boardにより委任されたThe Natinal Long-Range Plan to Combat Diabetesの1987年に提出された報告書が示す通り、合衆国においては600万人が糖尿病に罹っていて、更に500万人が未だ糖尿病であると診断されることがないこの病気をもっていることが分かる。毎年新しく500,000人より多くの糖尿病患者が確認されている。1984年におけるアメリカ人35,000人の直接の死

10

20

30

40

50

因が糖尿病であり、更に95,000人の死亡の一因となっている。

合衆国における20才から74才までの人達の法律上失明した新しい患者の主な原因は糖尿病の目の合併症である。糖尿病をもつ個人の下肢切断の危険は糖尿病をもたない人より15倍大きい。腎臓病は頻度の高い、かつ重篤な糖尿病合併症である。終末期の腎臓病の治療を受けている合衆国のすべての新患者のおよそ30パーセントは糖尿病をもっている。糖尿病をもつ各個人はまた歯周病の危険が増している。歯周感染症は迅速に進行し、歯を失うだけでなく、代謝機能不全の危険にさらされるようになる。糖尿病に罹っている婦人は重篤な妊娠合併症の危険がある。現在の統計によれば、糖尿病をもつ母親の幼児の死亡率は約7パーセントであることが示唆されている。

明らかに糖尿病の経済的負担は莫大である。糖尿病あるいはその合併症をもつ患者は毎年 10
2400万患者日を病院で費やしている。糖尿病に起因する総年間コストの内輪の見積りは少なくとも240億ドルである（American Diabetes Association見積り、1988）。しかし、この病気による最大限の経済的影響は尚一層大である。それは糖尿病そのものでなく、糖尿病の特定の合併症に起因してしばしば医療の費用が付加されるからである。

糖尿病は、身体が炭水化物、脂肪およびタンパク質を正しく維持し使用することを不可能ならしめる複雑な慢性代謝疾患である。この病気は種々な遺伝性のそして環境上の因子の相互作用から起こり、インスリン産生不全あるいはその利用障害に原因する高い血糖濃度を特徴とする。糖尿病の殆どの患者は二つの臨床型、即ちI型、あるいは若年型とII型、あるいは成人型、に入る。I型の糖尿病はしばしばインスリン依存性糖尿病、あるいはID 20
Dと呼ばれる。各型は異なる予後、治療法および原因をもつ。

糖尿病患者のおよそ5から10パーセントはIDDに罹っている。IDDは、普通は膵臓ランゲルハンス島のインスリンをつくるβ細胞の破壊により、不完全にあるいは完全にインスリン産生能力を欠くという特徴をもつ。IDDに罹った患者はその病気を抑えるために毎日インスリン注射をしなければ死亡するであろう。

I型IDDの病因発生機序が自己免疫であることを示唆するまで証拠が蓄積し始めた1970年代中頃までは、糖尿病の発生機序を解明する上で進歩は殆どなされなかった。現在では、遺伝学的に素因をつくる個人個人において、膵臓ランゲルハンス島のインスリン産生β細胞を選択的に破壊する進行性自己免疫応答からIDDが生ずることが一般に受け入れられている。IDDにおけるβ細胞に対する自己免疫は体液型免疫機構（Baekkes Kov等、1982; Baekkes Kov等、1990; Reddy等、1988; Pontesilli等、1987）および細胞媒介型免疫機構（Red 30
dy等、1988; Pontesilli等、1987; Waug等、1987）の両方を含む。体液型免疫の特徴はβ細胞膜に対する自己抗体（抗-69kD及び島細胞表面の自己抗体）、β細胞成分（抗-カルボキシペプチダーゼA₁、抗-64kDおよび（または）抗-GAD自己抗体）、および（または）β細胞分泌生成物（抗-インスリン）の出現にある。血清はIDDを伝達しないが、抗-β細胞自己抗体は非常に早い年令で生じ、多分抗原性擬態を含む環境的誘因の問題を提起している。IDDの自然の進行に細胞で媒介された免疫学的反応性が存在することは、インスリチス（insulitis）と呼ばれる膵島内の炎症性病変により証明される。炎症/免疫細胞の湿潤物が組織学的技術によりはっきり見えるインスリチスは、TおよびBリンパ球、単球および自然のキラー細胞を含めて多数の細胞型からなることが示された（Signore等、1 40
989; Jarp等、1991）。ヒトIDDのモデルとしてNOD（非肥満性糖尿病）マウスを使用した養子移入実験は、IDDの発生機序における自己攻撃性Tリンパ球の主要な役割を明確に証明した（Bendelac等、1987; Miller等、1988; Hanafusa等、1988; Bendelac等、1988）。不都合にも膵臓β細胞の破壊の基礎をなす機作は不明のままである。

膵臓β細胞に対する免疫学的攻撃を緩和するための可能な手段として、多数の方策（例えば、骨髓交換、免疫抑制薬物および自己抗原免疫化）が研究された。しかし、これらの方策を有効とするためには、究極的に臨床的疾患を発現するであろう個人個人を識別しなければならない。この免疫学的攻撃は大多数のβ細胞が既に破壊されてしまう点まで進行するので、効果的な介入療法を行なうには患者の識別が遅すぎることがしばしばである。β細胞は終末段階の分化した細胞であると考えられるので、身体が新しいβ細胞を再生する能力を殆どもたないと考えられ、従って常に終生の療法を必要とする。最近、この問題を 50

克服する一つの解決法は島細胞移植である。島細胞移植は島が同種間のものであり、従ってこれが同種免疫反応を引き起こすという欠点を有する。従って、IDD患者から直接機能的β細胞を含むランゲルハンス島を発育させることに大きい利点があるであろう。

発明の簡単な要約

本発明は、インスリン産生β細胞ならびに他の島細胞型を含む機能的な島を一つの多分化能性幹細胞から長期培養で発育させることができるという発見に関する。

新規本発明方法は多分化能性幹細胞が成人一人一人の膵臓にも存在するという発見を利用するものである。これら細胞は正常血清で補った高アミノ酸栄養培地で培養でき、そして前記血清は島細胞の起源として役立つ同じ哺乳動物種に由来することが好ましい（同族血清）。次にこの培養を数週間静置して間質細胞を定着させる。いったんこの間質細胞層が成熟したならば、同族正常血清＋グルコースで補った高アミノ酸培地で細胞培養を栄養再補給することにより細胞分化を開始させることができる。追加培養期間の後、次にインスリン、グルカゴン、ソマトスタチンおよび他の内分泌ホルモンを産生する細胞を含む機能的な島を標準技術を用いて採取できる。

膵臓細胞を使用してβ細胞を含む新しい島細胞を培養で発育させることは以前に知られていなかった、あるいは想像外であった。島様組織をインビトロで発育させる培養技術のこの思いがけない発見は、以前に糖尿病の研究に対する実質的な積年の障害であった要因を取り除いた。本明細書中に記載された新規方法および材料から、糖尿病の機作を一層よく理解できるであろう。更にまた、島細胞を培養で発育させる能力は、今や糖尿病の幾つかの治療法を先ず可能にするであろう。例えば、本発明方法によれば、インスリン療法に対する患者の要求を抑える、あるいは取り除く方法として、糖尿病の人から得た新しい培養島を患者に移植することができる。それは培養された島および（または）島細胞が生体内でインスリンを産生しうるからである。従って、本発明はまた生体内で発育させた本発明に係る島を、IDDの生体内治療のため哺乳動物種に移植する方法に関する。

本発明はまた後の免疫学的破壊に抵抗する島細胞の遺伝子工学を著しく助長するものである。例えば、培養された島細胞を、破壊的な免疫過程を抑制または防止するタンパク質あるいはペプチドを発現するように転換することができる。他の有用なタンパク質あるいはペプチドも発現させることができる。

従って、個人の膵臓細胞から機能性の島をインビドロで培養できる能力は、一つの大きい技術的前進であり、IDDの治療のために新しい方策を用いる方法を促進させる。多分化能性幹細胞が成人の膵臓に存在するという発見によって、細胞源として胎児組織を使用する必要性を回避できる。

本発明は、本明細書に記載の方法に従ってインビトロでつくられた島細胞にも関する。これら細胞はインビドロで培養された哺乳動物の膵臓細胞浮遊系からつくることができ、機能的な島細胞および島様組織構造物をつくり出すことができる。

本発明は更に膵臓幹細胞、即ち正常な膵臓をつくり上げている種々な型の細胞および組織のすべてを形成しうる始原細胞あるいは細胞群、のインビトロ培養、増殖および分化に関する更にまた、本発明はインビトロ培養した膵臓幹細胞を生体内で使用して正常な膵臓で観察される特徴と類似した機能的、形態学的そして組織学的な特徴を示す「外部膵臓」器官をつくる方法に関する。従って、インビトロで培養した膵臓細胞から機能的な「外部膵臓」を生体内でつくくり出す能力を用いることにより膵臓の損傷あるいは破壊を起こすことが分かっている多種多様な膵臓疾患を治療、好転あるいは治癒させることができる。

図の簡単な要約

図1Aから1Dは本発明の手順に従って培養した細胞を示す。

図2は本発明方法に従って発育させた島を示す。

発明の詳細な説明

本発明方法によれば、先ず第一に、機能的なランゲルハンス島をインビドロ培養で培養することができる。本発明に係る技術はインスリン、グルカゴン、ソマトスタチンあるいは他の内分泌ホルモンを産生しうる細胞培養をもたらす。他の有用なタンパク質も、例えば対象とするタンパク質をコード化したDNAで島細胞を転換することによりつくることがで

10

20

30

40

50

きる。これら機能的な細胞培養を育てる能力は、当業者が以前には不可能だった手順を実施できるようにした。

本発明方法は哺乳動物の膵臓から得られる幹細胞の浮遊液をつくるものである。なるべくこの幹細胞は前糖尿病の哺乳動物の膵臓から得るのがよいであろう。しかし、既に糖尿病の臨床的徴候を示している哺乳動物から得た細胞も本発明で利用することが企図されている。細胞浮遊液は標準の技術を用いてつくる。次に細胞の発育を促進する栄養培地で細胞浮遊系を培養する。特に適当な一具体例においては、この栄養培地は高濃度のアミノ酸を含むものである。一つのこのような培地はクリック (Click) EHAA培地として知られ、当業者に周知であり、入手容易である。他の同等の栄養培地も当業者によって調製でき、利用できる。島細胞を浮遊させるために用いられる培地を、その島細胞が由来する同種の哺乳動物から得られる正常な血清で補うのが有利である。従って、マウスの島の場合には、培地を正常なマウス血清で補うのに対し、ヒトの島細胞の場合には、培地を正常なヒト血清で補う。正常な血清の調製は当業者のよく知るところである。本発明に係る細胞培養法に用いる正常血清の濃度は約0.5%から約10%にわたるが、マウスに対しては約1%がよい。ヒトの血清に対してはもっと高濃度、例えば約5%がよい。

正常血清で補った栄養培地中で調製された細胞浮遊系を、次に細胞増殖を促進する条件下で、なるべくは約35-40℃で、またなるべくは約5%のCO₂雰囲気中で、インキュベーションする。従って、このインキュベーション時間は当業者にとって公知の標準手順を用いることにより行なわれる。次にこの細胞培養を栄養補給なしに数週間静置するのがよい。なるべくは培養を少なくとも約3週間は乱さない方がよい。この期間中に間質脂肪が増殖して単層をつくり上げ、これが究極的には島細胞となる。細胞分化の開始は上記のように正常血清で補ったクリックEHAA培地で培養を栄養再補給することによりもたらされる。迅速な栄養再補給は広汎な島細胞増殖巣の形成を誘発し、多量の細胞分化を起こすことが分かった。島様構造物中の細胞を組織学的に検査すると、少なくとも三通りの別個の細胞型が確認でき、対象マウスの島から調製された島細胞と同様に見えた。これら細胞増殖巣内で細胞分化を起こさせるのに要する時間は栄養再補給の頻度を増すと減少した。

本発明者等は、島から誘導された間質細胞+島細胞増殖巣を新しい培養フラスコへ連続的に移し替えることによって、島生成培養を増殖させ、拡張することができた。これにより、例えばIDDの代謝問題を好転させるために本明細書記載の方法で用いるのに要求される十分な数の島の発生が助長される。

本発明方法に従ってインビトロでつくられた島様構造物および（または）島細胞が、IDDを逆転させることができるかどうかを決定するために、島様構造物をNODマウスに移植した。島移植片を受けたマウスはインスリン依存性糖尿病の逆転を示したが、未処置NODマウスは臨床的徴候を示した。更にまた、移植片の持続期間中は自己免疫の病因は観察されなかった。従って、本発明島移植片はヒトを含めて哺乳動物の糖尿病の治療に生体内で使用する事ができる。

本発明の特に適当な一具体例においては、免疫学的攻撃に関与する特別な因子に抵抗するように設計された、自己由来の島を再移植することによって、糖尿病の進行を遅らせるか、または停止させることができる。例えば、島が細胞毒性T-細胞誘導インターフェロン- γ 耐性となるように島を設計できる。 β 細胞の細胞認識、島湿潤の様式、および β 細胞破壊の免疫機構を含めてIDDの発生機序を追求する研究に、完全な島の長期にわたる培養の入手性を利用することもできる。更にまた、この技術は島の移植、自己由来の島の置換、および人工の島の発現をも促進するであろう。本発明方法の手順によるこれら細胞の培養は、細胞の分化と機能に関する重要な諸点を学生に教える上で大きい利用性をもつ。

本発明の更にもう一つの具体例においては、多分化能性膵臓幹細胞を、哺乳動物から分散された膵臓細胞からインビトロで発育させた。これらインビトロ培養細胞を本発明方法と共に用いた驚くべき発見は、機能的、形態学的をして組織学的な内分泌および外分泌組織を発揮する器官をインビボで発育させ、つくり出す能力であった。本発明方法に従いインビボでつくられた外部膵臓（体腔内の正常でない部位に位置する膵臓様の器官）は大きい科学的発見に相当し、膵臓に関連した幾つかの病理状態を学習し、治療し、好転させ、あ

10

20

30

40

50

るいは治癒させる新規手段を提供する。

本明細書中で用いた「培養あるいは発育」という用語は細胞に生きている状態に維持することを指し、細胞の増殖および（または）分化を包含するがこれに限定されない。「増殖」という用語は細胞分裂の結果として培養中に存在する細胞の数の増加を指す。

下記の例は本発明方法を実施するための最良の様式を含めて手順を例示するものである。これらの例を制限と見做すべきではない。特に断らない限りすべての百分率は重量で表わし、またすべての溶媒混合物の割合は体積で表わしてある。

例 1

機能的ランゲルハンス島の培養

他の文献（Shieh等、1993）に詳述されたように、19～20週令の前糖尿病雄NOD/UFマウスの膵臓から分離された完全な島から島細胞の単一細胞浮遊系を調製した。典型的な場合、NODコロニーで雄マウスの約25%がこの週令で明白なIDDをもち、すべてが重篤なインスリチスをもつであろう。正常マウス血清（NMS）で1%まで補ったクリックEHAA培地中に島細胞を再浮遊させ（Peck and Bach、1973; Peck and Click、1973）、25cm²組織培養フラスコ中に塗布し、5%CO₂雰囲気中37℃でインキュベーションした。この段階で二つの成果が可能である：第一に、島浸潤細胞が優勢となり、従って免疫細胞系の確立ができる。また第二には、間質様細胞が優勢となり、従って「ナース細胞（nurse cell）」の単層の発育を可能にする。間質様細胞の単層の発育は、島浸潤細胞を同時に、しかし限られた数で塗布したとき起こるようである。浸潤細胞の数を減らして島細胞を豊富にすることは、勾配分離方（Jarpe等、1991）により達成できる。間質細胞培養は、4－5週間乱さずに（即ち、栄養再補給せずに）静置したとき、培養容器の底面全体を覆うまで増殖した。この細胞単層から小さい丸味を帯びた細胞がまるで間質細胞層から出芽するように現れた。グルコースまたはショ糖または他の糖同等物を含有する糖溶液およびNMSで補ったクリックEHAA培地で、培養を栄養再補給することにより培養の分化を開始させた。典型的には、糖はグルコースである。グルコースの濃度は約10mMから25mMであるが、15から17mMが普通である。なるべく培地中のグルコースの濃度は約16mMがよい。インビトロ細胞培養を栄養再補給する技術はこの分野でよく知られていて、典型的には古い栄養培地の約50%から約90%を取り除き、そして新しい培地を培養フラスコに加えるものである。迅速な栄養再補給は細胞分化を示す島の成長中心（本明細書で細胞増殖巣と呼ぶ）の形成数の増加を誘発させる。栄養再補給の割合は、例えば約1週間間隔でよい。この栄養再補給の割合は約5から6日間隔がよい。

形成ピーク時で、1個の25cm²組織培養フラスコ中に同時に150～200個といった多くの細胞増殖巣が生ずる。細胞の増殖および分化が進行するにつれて島の組織化が起こり、島がそれ自体被膜状の物質で取り囲まれているように見えることさえある。島は一般に一定の大きさに発育し（幾つかの島は一般的寸法の約2倍まで育つけれども）、次に間質層から離れて培地中に浮ぶ。これら自由に浮遊する島は、同様な条件下で培養された分離膵島と似て48－72時間以内にこわれる傾向がある。

間質層から自然に離れるか、あるいはパスツールピペットを用いて間質層から取り出した後に集めた島様構造物を培地中でおだやかに洗浄し、次に逆流ピペット操作（reflux pipetting）により単細胞浮遊系にこわす。単細胞浮遊系は細胞遠心により調製され、次いで一般的形態学およびインスリン産生のために染色される。この細胞増殖巣は内分泌ホルモンであるグルカゴン（α細胞）、インスリン（β細胞）および（または）ソマトスタチン（δ細胞）を産生する細胞を含有した。更にまた、抗インスリン抗体で陽性に染色された細胞の主要集団は、培養された島に含まれた主要細胞型を示し、インスリン産生性β細胞である。図1Aから図1Dは培養過程で発現する種々な細胞型を示す。図2は、本発明方法に従い細胞のインビトロ培養を行なった後に得られる十分よく発達した島を示す。

例 2

ヒト島細胞の培養

ヒト島細胞を培養するには、例1記載の方法と同様の手順を用いる。本発明に係る手順は特に有利であるが、それは細胞培養を開始するために胎児細胞を利用する必要がないから

である。特に適当な一具体例においては、ヒトの細胞を正常なヒト血清で補ったクリックEHAA培地（あるいはそれと同等のもの）中に浮遊させることができる。培地に用いる正常なヒト血清の濃度は約5%がよい。培養をなるべくは数週間の間栄養再補給せずに静置すべきである。約4～5週培養後、例1記載のようにグルコースおよび正常なヒト血清で補ったクリックEHAA培地で培養を再補給することにより、細胞分化を開始させることができる。その後、例1記載のように島様構造物を集め、更に増殖させるため単細胞浮遊系を調製することができる。

例 3

インビトロで発育させた島細胞の移植

インビトロで発生させたこれら島様構造物がIDD合併症を逆転させる効力を試験するため、本発明方法に従ってNODマウスの膵臓組織からインビトロで発育させたおよそ150～200個の細胞増殖巣＋若干の間質細胞を、組織培養フラスコから逆流ピペット操作により取り出した。次にこれら細胞を、毎日のインスリン注射により維持した同系の糖尿病NODマウスの腎臓莢膜下部に移植した。移植は腎臓莢膜に皮下針で穴をあけ、薄い皮質領域を糸でつなぐことにより行なった。毛細管を注意深く引き出し、穴をあけた部位を焼灼した。移植した各マウスの外科的切り口を皮膚が治癒の徴候を示すまで締めた。移植されたマウスは4日間完全な1日投与量でインスリン注射を維持し、次に2日間半分の1日投与量を維持し、その後マウスをそれ以上のインスリン治療から完全に離した。対照動物は移植片を受けなかった糖尿病NODマウスからなる。

対照NODマウスは、毎日のインスリン注射をやめたとき、迅速に明白な病気の始り、例えば嗜眠、呼吸困難、体重減少、血糖濃度上昇、消耗症候群、傷の治癒不全を示し、3週間以内に死亡した。約180mg/dlの血糖濃度（これはマウスの正常は範囲よりやや高い）を維持した移植NODマウスは、活動性が増し、外科手術部位および血液を抜いた部位の治癒が早く、呼吸困難を起こさず、組織学的研究のために殺すまでは健康を保った。脾臓内移植片を用いた場合も同様な観察事項が見られた。

例 4

外部膵臓のインビボ産生

例3に記載のように島細胞を移植されたマウスの移植部位を組織学的に検査したところ、インビトロでつくり出された島形成幹細胞の更に一つの特徴が示された。腎臓の移植部位から「漏れた」移植細胞が更に増殖と分化を受け、高度に構成された外部膵臓を形成した。第一に、外部膵臓組織は完全に増殖しつつある外分泌細胞からなり、そしてこのものは神経を分布する血管で完成された外分泌膵臓に組織化した。その外分泌膵臓は島様の内分泌構造物を形づくるように進行した。従って、本発明方法によりつくられたインビトロ細胞培養は、完全に新しい膵臓を再生することのできる多分化能性膵臓幹細胞を含んでいる。外分泌および内分泌両方の組織を含む膵臓の成長は、膵臓炎および膵臓癌を含めて膵臓疾患の新しい治療法を提供するものである。

本明細書中に記載された実施例および具体例は例示を目的とするだけであり、それに照して種々な修正あるいは変更が当業者に示唆を与えるであろうし、そしてそれらは本出願の主旨と範囲の中にかつ請求の範囲の範囲内に包含される筈であることは理解されるに違いない。

10

20

30

40

引用文献

- Eisenbarth, G. S., (1986) N. Engl. J. Med 314:1360.
- Cahil, G. F., and H. O. McDevitt (1981) N. Engl J. Med. 304:1454.
- Todd JA, J. A., 等、 (1989) Nature 338:587.
- Prochazka, M, D. V. Serreze, S. M. Worthen, and E. H. Leiter (1989) Diabetes 38:1446.
- Baekkeskov, S., 等、 (1982) Nature 298:167. 10
- Baekkeskov, S., 等、 (1990) Nature 347:151.
- Reddy, S., N. J. Bidy, and R. B. Elliot (1988) Diabetologia 31:322.
- Pontesilli, O., P. Carotenuto, L. S. Gazda, P. F. Pratt, and S. J. Prowse (1987) Clin. Exp. Immunol. 70:84.
- Wang, Y., L. Hao, R. G. Gill, and K. I. Lafferty (1987) Diabetes 36:535.
- Karjalainen 等、 (1992) N. Engl. J. Med. 327:302. 20
- Serreze, D. V., E. H. Leiter, E. L. Kuff, P. Jardieu, and K. Ishizaka (1988) Diabetes 37:351
- Signore, A., P. Pozzilli, E. A. M. Gale, D. Andreani, and P. C. L. Beverly (1989) Diabetologia 32:282.
- Jarpe, A. J., M. Hickman, J. T. Anderson, W. E. Winter, and A. B. Peck (1991) Regional Immunol. 3:305
- Bendelac, A., C. Carnaud, C. Boitard, and J. F. Bach (1987) J. Exp. Med 166:8 30
- 23.
- Miller, B. J., M. C. Appel, J. J. O'Neil, and L. S. Wicker (1988) J. Immunol. 140:52.
- Hanafusa T. 等、 (1988) Diabetes 37:204.
- Bandelac A. 等、 (1988) J. Immunol. 141:2625.
- Rossini, A. A., J. P. Mordes, and E. S. Handler (1988) Diabetes 37:257.
- Nerup, J., 等、 (1989) Diabetes Care 11:16. 40
- Kanazawa, Y., 等、 (1984) Diabetologia 27:113.
- Anderson, J. T., J. G. Cornelius, A. J. Jarpe, W. E. Winter and A. B. Peck (1993)

Autoimmunity 15:113.

Shieh, D. C., J. G. Cornelius, W. E. Winter, and A. B. Peck (1993) Autoimmunity 15:123.

Peck, A. B. and F. H. Bach (1973) J. Immunol. Methods 3:147.

Peck, A. B. and R. E. Click (1973) European J. Immunology 3:382.

【図 1 A】

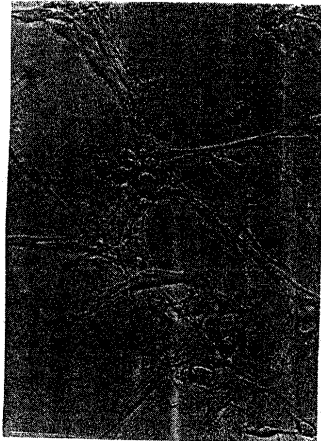


Figure 1A

【図 1 B】

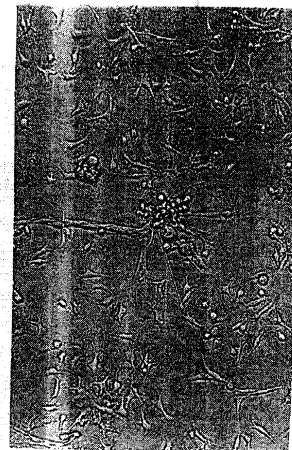


Figure 1B

【図 1 C】

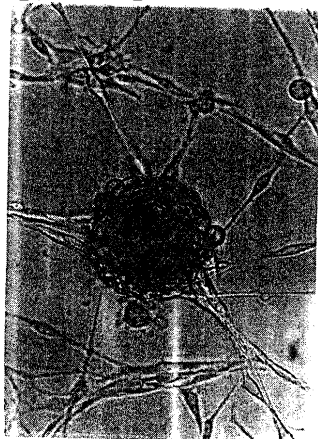


Figure 1C

【図 2】

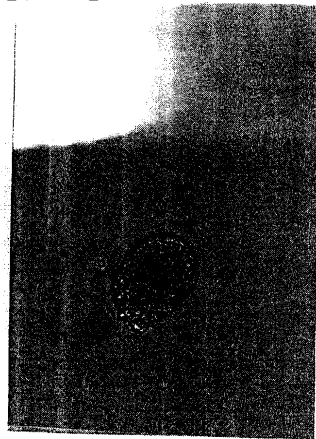


Figure 2

【図 1 D】



Figure 1D

フロントページの続き

(72)発明者 ペック, アモン ビー.

アメリカ合衆国 32608 フロリダ州ゲインズビル, エス. ダブリュ. フォーティーサード
レーン 9311

(72)発明者 コーネリウス, ジャネット ジー.

アメリカ合衆国 32606 フロリダ州ゲインズビル, エヌ. ダブリュ. フィフティーセカンド
テラス 6024

審査官 ▲高▼ 美葉子

(56)参考文献 国際公開第93/000441 (WO, A1)

特表平08-506735 (JP, A)

特表平01-500957 (JP, A)

国際公開第94/04169 (WO, A1)

Proc.Natl.Acad.Sci.(1980),Vol.77,No.6,p.3519-3523

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

C12N 5/00

A01K 67/027

A61K 35/00

BIOSIS/WPI(DIALOG)

PubMed