



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102858380 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 23

(21) 申请号 201080044395. 5

(22) 申请日 2010. 08. 02

(30) 优先权数据

2009-193648 2009. 08. 02 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 04. 01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2010/063033 2010. 08. 02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/016423 JA 2011. 02. 10

(73) 专利权人 学校法人东京女子医科大学

地址 日本东京都

(72) 发明人 清水裕史 大桥一夫 鹤头理惠

伊势一哉 大和雅之 冈野光夫

后藤满一

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51) Int. Cl.

A61L 27/00(2006. 01)

C12N 5/077(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2008/124169 A2, 2008. 10. 16,

EP 0470681 A2, 1992. 02. 12,

WO 2008/124169 A2, 2008. 10. 16,

WO 00/14542 A2, 2000. 03. 16,

CN 1753696 A, 2006. 03. 29,

CN 1643133 A, 2005. 07. 20,

CN 101147704 A, 2008. 03. 26,

李禎翼等. 利用温度敏感培养皿制造免疫隔离生物人工胰腺细胞片的工程. 《Tiss. Cult. Res. Commun》. 2007, 第 26 卷第 115-123 页.

审查员 潘艺茗

权利要求书2页 说明书10页 附图7页

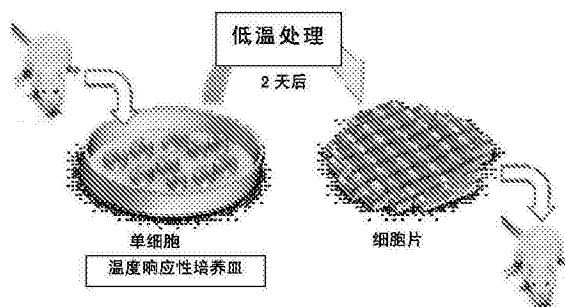
(54) 发明名称

胰岛细胞片、制造方法及其利用方法

(57) 摘要

在于表面包覆有水合力在 0 ~ 80℃ 的温度范围变化的聚合物的细胞培养支撑体上, 在聚合物的水合力弱的温度区域培养胰岛细胞, 之后, 使培养液的温度变化为聚合物的水合力强的状态, 由此能够得到片状的胰岛细胞。如此得到的片状的胰岛细胞即使在非血流条件下也具有胰岛素产生功能。

胰岛细胞片



1. 一种由分散的构成胰岛的单个细胞再构成为片状的胰岛细胞片,其能够移植到血管内以外的部位并具有胰岛素产生功能,其特征在于,所述胰岛细胞片通过以下方法制造:

酶处理胰岛,从而使其分散为单个细胞,在于表面包覆有水合力在  $0 \sim 80^{\circ}\text{C}$  的温度范围变化的聚合物的细胞培养支撑体上,在聚合物的水合力弱的温度区域培养作为分散的单个细胞的胰岛细胞,之后,使培养液的温度变化为聚合物的水合力强的状态,由此将所培养的胰岛细胞以片状剥离。

2. 根据权利要求 1 所述的胰岛细胞片,其中,  $\beta$  细胞含量为 40% 以上。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的胰岛细胞片,其具有胰高血糖素产生功能和葡萄糖浓度感知功能。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的胰岛细胞片,其中混合了塞托利细胞、胰管细胞、血管内皮细胞、血管内皮祖细胞、肝实质细胞、骨髓来源细胞、脂肪来源细胞中的任一种或两种以上的细胞。

5. 根据权利要求 1 或 2 所述的胰岛细胞片,其层积了 2 个以上的胰岛细胞片。

6. 根据权利要求 1 或 2 所述的胰岛细胞片,其在胰岛细胞片上层积了塞托利细胞、软骨细胞、胰管细胞、血管内皮细胞、血管内皮祖细胞、肝实质细胞、骨髓来源细胞、脂肪来源细胞中的任一种细胞的细胞片或两种以上细胞混合而成的细胞片。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的胰岛细胞片,其被合成聚合物和 / 或天然聚合物所包覆。

8. 根据权利要求 1 或 2 所述的胰岛细胞片,其被微胶囊化。

9. 一种胰岛细胞片的制造方法,其特征在于,酶处理胰岛,从而使其分散为单个细胞,在于表面包覆有水合力在  $0 \sim 80^{\circ}\text{C}$  的温度范围变化的聚合物的细胞培养支撑体上,在聚合物的水合力弱的温度区域培养作为分散的单个细胞的胰岛细胞,之后,使培养液的温度变化为聚合物的水合力强的状态,由此将所培养的胰岛细胞以片状剥离。

10. 根据权利要求 9 所述的胰岛细胞片的制造方法,其中,在细胞培养支撑体表面包覆了层粘连蛋白 5。

11. 根据权利要求 9 或 10 所述的胰岛细胞片的制造方法,其中,将所剥离的胰岛细胞片再层积到另一个胰岛细胞片上,或者重复该操作,由此使胰岛细胞片层积化。

12. 根据权利要求 9 或 10 所述的胰岛细胞片的制造方法,其中,剥离方法为不实施基于蛋白质分解酶的处理而从细胞培养支撑体剥离。

13. 根据权利要求 9 或 10 所述的胰岛细胞片的制造方法,其中,剥离方法为在培养结束时使载体贴紧到培养细胞上,培养细胞与载体一起剥离。

14. 根据权利要求 9 或 10 所述的胰岛细胞片的制造方法,其中,胰岛由生物体组织采集。

15. 根据权利要求 9 或 10 所述的胰岛细胞片的制造方法,其中,培养时接种的细胞数为  $0.4 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$  个 /  $\text{cm}^2$ 。

16. 根据权利要求 9 或 10 所述的胰岛细胞片的制造方法,其中,水合力在  $0 \sim 80^{\circ}\text{C}$  的温度范围变化的聚合物为聚 (N- 异丙基丙烯酰胺)。

17. 权利要求 1-8 中任一项所述的胰岛细胞片在用于制造人工胰脏中的用途。

18. 一种人工胰脏,其利用了权利要求 1 ~ 8 中任一项所述的胰岛细胞片。

19. 根据权利要求 18 所述的人工胰脏,其中,所剥离的胰岛细胞为片状,且利用该片的

大小和 / 或形状能够控制功能的表现量。

20. 根据权利要求 18 或 19 所述的人工胰脏, 其特征在于, 其以 1 型糖尿病、2 型糖尿病、慢性胰腺炎、胰脏全摘除后的治疗、或胰腺功能辅助为目的。

21. 根据权利要求 18 或 19 所述的人工胰脏, 其中, 通过基因导入技术而强化了胰岛细胞功能。

22. 一种胰腺功能评价方法, 其特征在于, 对于胰岛细胞移植动物给药待测物质, 判断该待测物质对胰功能的影响, 其中所述方法为非疾病诊断或治疗方法, 所述胰岛细胞移植动物为移植有权利要求 18-21 中任一项所述的人工胰脏的动物。

23. 根据权利要求 22 所述的胰腺功能评价方法, 其特征在于, 动物为大鼠、小鼠、豚鼠、狨猴、兔、狗、猪、黑猩猩或它们的免疫缺陷动物。

## 胰岛细胞片、制造方法及其利用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及在医学、生物、药物开发、药学等领域有用的胰岛细胞片、制造方法及其利用方法。

### 背景技术

[0002] 胰脏是生物体内的重要脏器之一，其由将淀粉酶等消化酶分泌到十二指肠内的外分泌腺和胰岛构成。胰脏的 90% 以上被外分泌腺所占据，作为内分泌细胞的细胞团的胰岛如岛般漂浮存在于其中。胰岛由 4 种内分泌细胞构成，即在动物的脏器之一的胰脏中分泌胰高血糖素的  $\alpha$  细胞（A 细胞）、分泌使血糖量降低的激素胰岛素的  $\beta$  细胞（B 细胞）、分泌生长抑素的  $\delta$  细胞和分泌胰多肽的 PP 细胞。其中， $\beta$  细胞是指分散存在于许多脊椎动物的胰脏内的球形内分泌腺组织，主要分泌胰岛素并进行血糖的调节。据说，胰岛的直径为  $100 \sim 300 \mu\text{m}$ ，人的情况下，每 1mg 胰脏有  $10 \sim 20$  个胰岛，整个胰脏中存在 100 万个以上的胰岛。啮齿类中， $\beta$  细胞位于胰岛的中心部， $\alpha$ 、 $\delta$ 、PP 细胞位于周边部，但是在人中该分布没有啮齿类那样明确。

[0003] 若该胰岛的功能发生障碍，则会引起严重的疾病。例如，若  $\beta$  细胞的胰岛素分泌断绝，会导致重症糖尿病。在该重症糖尿病病例中，血糖控制多为非常困难，除了糖尿病相关的并发症之外，还多产生胰岛素给药后的低血糖发作，生活质量（QOL）极其不良。

[0004] 迄今为止，对于这样的重症糖尿病患者进行了各种各样的治疗。其中，胰岛移植是以稳定的胰岛素供给为目的的疗法，与移植胰脏这一脏器本身相比侵袭较低，因而最近开始受到注目。目前，加入了组织工学技术，例如，专利文献 1 中开发了在生物体外的蜂窝状多孔质体上制造该胰岛的方法；专利文献 2 中开发了在三维培养装置中制造胰岛的方法等。众多开发者对胰岛移植相关技术进行了研究，但现状是：这里所利用的细胞为胰岛或者胰岛样细胞团，若对它们进行移植，则为了将营养成分和氧供给至该细胞团内部的细胞，不得不在门静脉等血管中或肝脏组织等血流丰富的部位进行移植。近年来，已经确立了与移植方法相关的草案，并且治疗成绩逐渐提高，但是即便如此，据说糖尿病患者 1 年后的胰岛素给药脱离率也不过 45% 左右（参照非专利文献 1）。作为该方法的问题点，可列举出血液介导的即刻炎性反应（IBMIR）和伴随胰岛导致的栓塞门静脉区域的缺血引起的炎性反应。其结果，丧失了所移植的胰岛的半数以上（参照非专利文献 2、3、4）。为了解决这些问题，希望对胰岛进一步实施组织工学加工。

[0005] 在这样的背景的基础下，专利文献 3 中记载了下述新型的细胞培养法：在于基材表面包覆了在水中的上限或下限临界溶解温度为  $0 \sim 80^\circ\text{C}$  的聚合物的细胞培养支撑体上，在上限临界溶解温度以下或下限临界溶解温度以上的温度培养细胞，然后设为上限临界溶解温度以上或下限临界溶解温度以下，从而无需进行酶处理而将培养细胞剥离。另外，专利文献 4 中记载了下述内容：利用该温度响应性细胞培养基材，在上限临界溶解温度以下或下限临界溶解温度以上的温度培养皮肤细胞，然后设为上限临界溶解温度以上或下限临界溶解温度以下，从而以低损伤将培养皮肤细胞剥离。通过利用温度响应性细胞培养基材，变

得能对于现有的培养技术实现各种各样的新型的发展。专利文献 5 中,将该技术进一步发展,发现通过将肝组织内存在的实质细胞制成细胞片,从而可以长期维持肝组织细胞功能,这在现有技术中是很困难的。但是,对于具有特殊形态的胰岛,迄今尚未进行任何研究。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献 1 :日本特开 2008-278769 号公报

[0009] 专利文献 2 :日本特开 2006-304791 号公报

[0010] 专利文献 3 :日本特开平 02-211865 号公报

[0011] 专利文献 4 :日本特开平 05-192138 号公报

[0012] 专利文献 5 :日本再表 2007-080990 号公报

[0013] 非专利文献

[0014] 非专利文献 1 :The New England Journal of Medicine, 355, 1318-1330 (2006)

[0015] 非专利文献 2 :Xenotransplantation, 14(4), 288-297 (2007)

[0016] 非专利文献 3 :Journal of Leukocyte Biology, 77(5), 587-597 (2005)

[0017] 非专利文献 4 :Pharmacological Reviews, 58, 194-243 (2006)

## 发明内容

[0018] 发明要解决的问题

[0019] 本发明是为了解决上述那样的与胰岛移植技术相关的问题而进行的。即,本发明提供基于与现有技术完全不同的构思的新型的胰岛细胞片、制造方法及其利用方法。

[0020] 用于解决问题的方案

[0021] 为了解决上述课题,本发明人从各种角度加以讨论并进行了研究开发。结果发现,通过破坏胰岛的形态并将其再构筑成片状,从而无需移植到血管内,在血流缺乏的组织中也可以植活。本发明是基于该见解而完成的。

[0022] 即,本发明提供一种胰岛细胞片,其能够移植到血管内以外的部位并具有胰岛素产生功能。另外,本发明提供在包覆有温度响应性聚合物的基材表面制作该胰岛细胞片的方法。进而,本发明提供利用所得到的胰岛细胞片的方法。本发明是使用基于细胞片这一世界上无类似物的新想法的细胞结构物首次实现的、极其重要的发明。

[0023] 发明的效果

[0024] 若利用本发明所示的胰岛细胞片,则无需将胰岛细胞移植到血管内之类的血流中,即使移植到例如皮下组织之类的血流缺乏的组织中,也可以充分表现出胰岛细胞自身所具有的功能。

## 附图说明

[0025] 图 1 是示出实施例 1 的概要的图。

[0026] 图 2 是示出实施例 1 的细胞片的剥离的概要的图。

[0027] 图 3 是示出实施例 1 的在温度响应性培养皿上培养的胰岛细胞的图。倍率为 100 倍。

[0028] 图 4 是对实施例 1 的在温度响应性培养皿上培养的胰岛细胞内存在的胰岛素进行

染色的图。倍率为 400 倍。

[0029] 图 5 是示出对实施例 1 的与培养基中的糖浓度对应的胰岛素分泌能力进行讨论的结果的图。

[0030] 图 6 是示出将实施例 1 的在温度响应性培养皿上培养的胰岛细胞片剥离时的情况的图。

[0031] 图 7 是示出对实施例 1 中得到的胰岛细胞片进行 HE 染色的结果的图。倍率为 400 倍。

[0032] 图 8 是示出对实施例 1 中得到的胰岛细胞片内的胰岛素进行染色的结果的图。倍率为 400 倍。

[0033] 图 9 是示出将实施例 1 中得到的胰岛细胞片移植到大鼠的背部的皮下时的情况的图。

[0034] 图 10 是示出对实施例 1 中从移植部位摘除的胰岛细胞片内的胰岛素进行染色的结果的图。

[0035] 图 11 是示出实施例 4 中向糖尿病化 SCID 小鼠移植胰岛细胞片后的血中葡萄糖量（浓度）的变化的结果的图（标题：链脲菌素诱发糖尿病化 SCID 小鼠中的大鼠胰岛细胞片移植后的血中葡萄糖量的变化）。

[0036] 另外，图 11 中记载的线图表示基于以下条件的数据。

[0037] Non fasting blood glucose levels of the streptozotocin-induced diabetic SCID mice after transplantation. At day 0, 2 islet cell sheets (triangle: n=5) or single islet cells (circular: n=3) were transplanted into the subcutaneous space on the dorsal site of diabetic SCID mice. Sham-operation (square: n=4). Data are showed as a mean  $\pm$  SEM. \*P<0.05 (Student's t test)

[0038] 即，图 11 表示出链脲菌素诱发糖尿病化 SCID 小鼠中的大鼠胰岛细胞片移植后的非绝食状态下的血中葡萄糖量的变化。0 天和 2 天后，胰岛细胞片（三角：n=5）或个别的胰岛细胞（黑圆：n=3）被移植到糖尿病化 SCID 小鼠的背面的皮下。将进行了假手术的小鼠（方形：n=4）作为对照。数据以平均值  $\pm$  SEM 表示。P<0.05（学生 t 检验）。

[0039] 图 12 是示出实施例 5 中向糖尿病化 SCID 小鼠移植胰岛细胞片后进行葡萄糖负荷试验时的血中葡萄糖量（浓度）的变化的结果的图（标题：葡萄糖负荷试验）。

[0040] 另外，图 12 中记载的线图表示基于以下条件的数据。

[0041] Intraperitoneal glucose tolerant test (IPGTT, 2g of glucose/kg body wt) of the streptozotocin-induced diabetic or non-diabetic SCID mice that received 2 islet cell sheets. IPGTT was performed 60 days after islet cell sheet transplantation. IPGTT results showing glucose concentrations before (time 0) and 15, 30, 60, 90, 120, 150 min after glucose administration. Diabetic SCID mice with 2 islet cell sheets (n=7, triangle), diabetic SCID mice with sham-operation (n=5, square), non-diabetic SCID mice without islet cell sheet transplantation (n=11, circle). Data were represented as a mean  $\pm$  SEM.

[0042] 即，图 12 示出接受了 2 片胰岛细胞片移植的、链脲菌素诱发糖尿病化或非糖尿病化 SCID 小鼠的腹腔内葡萄糖负荷试验（IPGTT，每 1kg 体重为 2g 葡萄糖）的结果。IPGTT

在胰岛细胞片移植后第 60 天实施。IPGTT 的结果表示葡萄糖给药前 (0 分钟) 和葡萄糖给药后 15 分钟、30 分钟、60 分钟、90 分钟、120 分钟、150 分钟的葡萄糖浓度。该试验中使用的小鼠为具有 2 片胰岛细胞片的糖尿病化 SCID 小鼠 ( $n = 7$ , 三角)、进行了假手术的糖尿病化 SCID 小鼠 ( $n = 5$ , 方形)、和接受了胰岛细胞片移植的非糖尿病化 SCID 小鼠 ( $n = 11$ , 黑圆)。数据以平均值  $\pm$  SEM 表示。

[0043] 图 13 是示出实施例 6 中向糖尿病化 SCID 小鼠移植胰岛细胞片后的胰岛细胞片的情况的图 (标题: 胰岛细胞片移植后的组织学分析 (胰岛素免疫染色))。

## 具体实施方式

[0044] 本发明的胰岛细胞片中使用的胰岛细胞是由胰脏回收的细胞。本发明中, 只要其中含有表现胰岛素产生功能的  $\beta$  细胞即可, 该  $\beta$  细胞的含有比例没有任何限制, 不过考虑到本发明的胰岛细胞片的原本的目的是产生胰岛素, 则  $\beta$  细胞的含有比率优选为 40% 以上, 进一步优选为 50% 以上, 更优选为 60% 以上。关于  $\beta$  细胞以外的细胞的种类、比率, 也没有任何限制, 可以含有胰岛中所含的  $\alpha$  细胞、 $\delta$  细胞、PP 细胞。若本发明的胰岛细胞片内含有  $\alpha$  细胞, 则形成还产生胰高血糖素的胰岛细胞片, 若含有 PP 细胞, 则形成分泌胰多肽的胰岛细胞片, 在进一步表现胰岛样的功能的意义上是优选的。若利用本发明的胰岛细胞片, 则能感知胰岛细胞片周围的糖浓度, 并根据该浓度产生胰岛素、和 / 或胰岛所产生的其他生理活性物质。本发明中, 还可以含有胰岛原本所含细胞以外的细胞, 其种类没有任何限制, 例如可列举出塞托利细胞 (Sertoli cell)、胰管细胞、血管内皮细胞、血管内皮祖细胞、肝实质细胞、骨髓来源细胞、脂肪来源细胞中的任一种细胞或混合了两种以上细胞的细胞。另外, 这些细胞各自的含有比例也没有特别限定。

[0045] 本发明中使用的细胞可列举出从生物体组织直接采集的细胞; 人工多能干细胞 (iPS 细胞)、胚胎干细胞 (胚性干细胞) 等从生物体组织直接采集、之后在培养体系等中分化的细胞; 或者细胞株, 其种类没有任何限制。这些细胞的来源没有特别限制, 例如, 可列举出人、或者大鼠、小鼠、豚鼠、狨猴、兔、狗、猫、绵羊、猪、黑猩猩或它们的免疫缺陷动物等, 在将本发明的胰岛细胞用于人的治疗时, 希望使用人、猪、黑猩猩来源的细胞。本发明中的用于细胞培养的培养基只要使用 RPMI 1640 等对于培养细胞常用的培养基即可, 没有特别限制。

[0046] 本发明中, 需要对胰岛内的细胞进行酶处理, 从而使其成为单个细胞的状态。胰岛为稳定的细胞团, 将其移植到生物体时, 由于所移植的是细胞团, 因而不得不移植到血流丰富的血管内。本发明中将该稳定的胰岛进一步分散为单个细胞, 虽然通过该分散操作使得  $\beta$  细胞等有用细胞受到若干损伤, 但是所得到的胰岛细胞片不会像细胞团那么厚, 因此不需要像细胞团那样移植到血流丰富的血管内。此时的处理方法依照常规方法即可, 没有任何限制。另外, 培养时接种的细胞数因使用细胞的动物种类而异, 通常适宜为  $0.4 \times 10^6 \sim 2.5 \times 10^6$  个 /  $\text{cm}^2$ , 优选为  $0.5 \times 10^6 \sim 2.1 \times 10^6$  个 /  $\text{cm}^2$ , 进一步优选为  $0.6 \times 10^6 \sim 1.7 \times 10^6$  个 /  $\text{cm}^2$ 。接种浓度低于  $0.4 \times 10^6$  个 /  $\text{cm}^2$  时, 胰岛细胞的增殖差, 所得到的胰岛细胞片的功能表现程度变差, 在实施本发明的方面来看是不优选的。另外, 在接种浓度高于  $2.5 \times 10^6$  个 /  $\text{cm}^2$  时, 胰岛细胞的增殖也差, 所得到的胰岛细胞片的功能表现程度也变差, 在实施本发明的方面来看是不优选的。

[0047] 本发明中,在于表面包覆了水合力在  $0 \sim 80^{\circ}\text{C}$  的温度范围变化的聚合物的细胞培养支撑体上,在聚合物的水合力弱的温度区域培养上述细胞。该温度通常优选为培养细胞的温度、即  $37^{\circ}\text{C}$ 。本发明中使用的温度响应性高分子可以是均聚物、共聚物中的任意一种。作为这样的高分子,可列举出例如日本特开平 2-211865 号公报中记载的聚合物。具体而言,例如通过以下的单体的均聚或共聚获得。作为能够使用的单体,可列举出例如(甲基)丙烯酰胺化合物、N-(或 N, N-二)烷基取代(甲基)丙烯酰胺衍生物或乙烯基醚衍生物,在共聚物的情况下,这些之中可以使用任意的 2 种以上。此外,还可以使用与上述单体以外的单体类的共聚、聚合物彼此之间的接枝或共聚、或者聚合物、共聚物的混合物。另外,在不损害聚合物本来的性质的范围内,还可以进行交联。此时,由于所培养、剥离的物质是细胞,因而分离在  $5^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$  的范围进行,因此作为温度响应性聚合物,可列举出聚-N-正丙基丙烯酰胺(均聚物的下限临界溶解温度  $21^{\circ}\text{C}$ )、聚-N-正丙基甲基丙烯酰胺(均聚物的下限临界溶解温度  $27^{\circ}\text{C}$ )、聚-N-异丙基丙烯酰胺(均聚物的下限临界溶解温度  $32^{\circ}\text{C}$ )、聚-N-异丙基甲基丙烯酰胺(均聚物的下限临界溶解温度  $43^{\circ}\text{C}$ )、聚-N-环丙基丙烯酰胺(均聚物的下限临界溶解温度  $45^{\circ}\text{C}$ )、聚-N-乙氧基乙基丙烯酰胺(均聚物的下限临界溶解温度约  $35^{\circ}\text{C}$ )、聚-N-乙氧基乙基甲基丙烯酰胺(均聚物的下限临界溶解温度约  $45^{\circ}\text{C}$ )、聚-N-四氢糠基丙烯酰胺(均聚物的下限临界溶解温度约  $28^{\circ}\text{C}$ )、聚-N-四氢糠基甲基丙烯酰胺(均聚物的下限临界溶解温度约  $35^{\circ}\text{C}$ )、聚-N, N-乙基甲基丙烯酰胺(均聚物的下限临界溶解温度  $56^{\circ}\text{C}$ )、聚-N, N-二乙基丙烯酰胺(均聚物的下限临界溶解温度  $32^{\circ}\text{C}$ )等。作为本发明中使用的用于共聚的单体,可列举出聚丙烯酰胺、聚-N, N-二乙基丙烯酰胺、聚-N, N-二甲基丙烯酰胺、聚环氧乙烷、聚丙烯酸及其盐、聚甲基丙烯酸羟乙酯、聚丙烯酸羟乙酯、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯烷酮、纤维素、羧甲基纤维素等含水聚合物等,没有特别限制。

[0048] 本发明中使用的在基材表面包覆上述各聚合物的方法没有特别限制,例如,对于基材和上述单体或聚合物,可以通过电子射线照射(EB)、 $\gamma$ 射线照射、紫外线照射、等离子体处理、电晕处理、有机聚合反应中的任意一种,或者通过涂布、混炼等物理吸附等来进行包覆。培养基材表面的温度响应性聚合物的包覆量适宜为  $1.1 \sim 2.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  的范围,优选为  $1.4 \sim 1.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ,进一步优选为  $1.5 \sim 1.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 。包覆量少于  $1.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  时,即使进行刺激,该聚合物上的细胞也难以剥离,作业效率显著变差,故不优选。相反若为  $2.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以上,则细胞难以附着于该区域,难以使细胞充分地附着。该情况下,若在温度响应性聚合物包覆层上进一步包覆细胞粘接性蛋白质,则基材表面的温度响应性聚合物包覆量可以为  $2.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以上,此时的温度响应性聚合物的包覆量适宜为  $9.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以下,优选为  $8.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以下,适合为  $7.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以下。若温度响应性聚合物的包覆量为  $9.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  以上,则即使在温度响应性聚合物包覆层上进一步包覆细胞粘接性蛋白质,细胞也难以附着,故不优选。这样的细胞粘接性蛋白质的种类没有任何限定,可列举出例如胶原、层粘连蛋白、层粘连蛋白 5、纤连蛋白、基质胶等中的单独 1 种或者 2 种以上的混合物。另外,这些细胞粘接性蛋白质的包覆方法依照常规方法即可,通常,采用下述方法:在基材表面涂布细胞粘接性蛋白质的水溶液,然后将该水溶液除去并冲洗。本发明是利用了温度响应性培养基皿的、尽可能利用细胞片自身的技术。因此,温度响应性聚合物层上的细胞粘接性蛋白质的包覆量极多是不优选的。温度响应性聚合物的包覆量、以及细胞粘接性蛋白质的包覆量的测定依照常规方法即可,可列举出例如使用 FT-IR-ATR 直接测定细胞附着部的方法;利用



同样的方法将预先标签化的聚合物固定,并根据固定于细胞附着部的标签化聚合物量来推测的方法等,可以使用任意一种方法。

[0049] 本发明的方法中,为了将所培养的细胞片从温度响应性基材剥离回收,能够通过将所培养的细胞所附着的培养基材的温度设为培养基材上的包覆聚合物的上限临界溶解温度以上或下限临界溶解温度以下而使其剥离。此时,可以在培养液中进行,也可以在其他等渗液中进行,可以根据目的选择。为了更快、更高效地将细胞剥离、回收,可以单独或合用下述方法:轻轻敲打或晃动基材的方法、进而使用移液管搅拌培养基的方法等。温度以外的培养条件依照常规方法即可,没有特别限制。例如,关于使用的培养基,可以是添加了公知的胎牛血清(FCS)等血清的培养基,另外,也可以是未添加这样的血清的无血清培养基。

[0050] 以聚(N-异丙基丙烯酰胺)作为温度响应性聚合物的例子,对上述内容进行说明。已知聚(N-异丙基丙烯酰胺)是在31℃具有下限临界溶解温度的聚合物,若为游离状态,其在水中于31℃以上的温度引起脱水合,聚合物链凝聚、发生白浊。相反在31℃以下的温度下,聚合物链水合,成为溶解于水中的状态。本发明中,该聚合物包覆、固定在培养皿等基材表面。因此,若为31℃以上的温度,则基材表面的聚合物也同样地脱水合,但由于聚合物链包覆、固定在基材表面,因此基材表面显示出疏水性。相反,若为31℃以下的温度,则基材表面的聚合物水合,但由于聚合物链包覆、固定在基材表面,因此基材表面显示出亲水性。此时的疏水性的表面是细胞能够附着、增殖的适度的表面,并且,亲水性的表面成为细胞无法附着的表面,培养中的细胞、或者细胞片也可以仅通过冷却而剥离。

[0051] 作为实施包覆的基材,以通常在细胞培养中所用的玻璃、改性玻璃、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯等化合物为首,可以使用通常能够赋予形态的物质、例如上述以外的聚合物化合物、陶瓷类等全部。

[0052] 本发明中的培养基材的形状没有特别限制,可列举出例如碟、多孔板、烧瓶、细胞插件那样的形态的基材、或者平膜状的基材等。

[0053] 本发明中的胰岛细胞片是在温度响应性基材上制作的,其培养时不会受到以分散酶(disperse)、胰蛋白酶等为代表的蛋白质分解酶所带来的损伤。因此,从基材剥离的胰岛细胞片具有粘接性蛋白质,在将胰岛细胞以片状剥离时以某种程度保持了细胞与细胞间的桥粒结构。由此,在移植时能够与患部组织良好地粘接,能够实施效率良好的移植。通常关于作为蛋白质分解酶的分散酶,就细胞与细胞间的桥粒结构而言,已知能够以保持10~40%的状态进行剥离,但由于基本上破坏了细胞与基材间的基底膜样蛋白质等,因此所得到的细胞片的强度弱。与之相对,本发明的胰岛细胞片为桥粒结构、基底膜样蛋白质均残存60%以上的状态,能够得到上述那样的各种效果。

[0054] 如此,得到本发明中的胰岛细胞片。本发明中,该细胞片可以是多片层积而成的。其层积片数没有特别限定,层积次数适宜为10次以下,优选为8次以下,进一步优选为4次以下。若层积胰岛细胞片,则单位面积细胞片的细胞密度提高,作为胰岛细胞片的功能也提高,故优选。

[0055] 本发明中使用的细胞片层积体也可以是与下述片组合的状态层积而成的:用于向细胞片内导入血管的血管内皮细胞或血管内皮祖细胞等的细胞片、或者用于胰岛细胞片的免疫隔离的软骨细胞片等由其他细胞所形成的片。此时,若利用2种以上不同的细胞,则在不同的细胞间相互作用,得到具有更高活性的细胞片,故优选。此时所利用的细胞没有特

别限定,例如,为塞托利细胞、软骨细胞、胰管细胞、血管内皮细胞、血管内皮祖细胞、肝实质细胞、骨髓来源细胞、脂肪来源细胞中的任一种细胞的细胞片或两种以上这些细胞混合而成的细胞片。另外,其层积的位置、顺序、层积次数没有特别限制,根据包覆或填补的组织,使用粘接性强的滑膜来源细胞片等适宜进行改变。另外,层积次数适宜为 10 次以下,优选为 8 次以下,进一步优选为 4 次以下。此时,在选择了血管内皮细胞时,可以利用在细胞片层积体内构筑血管网的方法来预防。该构筑血管网的方法没有特别限定,可列举出例如在层积体内预先混杂血管内皮细胞的方法、在制造层积体时层积血管内皮细胞片的方法、或者将细胞片层积体埋入在生物体内而构筑血管网的方法等。

[0056] 关于制作本发明中的细胞片层积体的方法,也没有特别限定,例如可以通过下述方式获得:以片状剥离培养细胞,根据需要使用培养细胞移动夹具使培养细胞片彼此层积。此时,关于培养基的温度,在包覆于培养基材表面的上述聚合物具有上限临界溶解温度时,为该温度以下即可;另外在上述聚合物具有下限临界溶解温度时,为该温度以上即可,没有特别限制。但是,当然在培养细胞不增殖的低温区域、或者培养细胞死亡的高温区域下的培养是不合适的。温度以外的培养条件依照常规方法即可,没有特别限制。例如,关于所使用的培养基,可以是公知的添加了胎牛血清(FCS)等血清的培养基,另外,也可以是未添加这样的血清的无血清培养基。并且,所使用的培养细胞移动夹具只要能够捕捉剥离后的细胞片则没有特别限定,可列举出例如多孔膜、纸、橡胶等的膜类、板类、海绵类等,为了易于进行层积操作,可以利用在带柄的夹具上安装有多孔膜、纸、橡胶等的膜类、板类、海绵类等的工具。

[0057] 本发明中,在使胰岛细胞片的功能稳定的意义上,还可以对胰岛细胞片包覆合成聚合物或天然聚合物,或者根据常规方法进行微胶囊化。此时的聚合物的包覆法、微胶囊化方法、以及所使用的材料没有任何限定,通常,可以将聚乙烯醇、氨基甲酸酯、纤维素及其衍生物、几丁质、壳聚糖、胶原、聚偏二氟乙烯(PVDF)、硅等材料制成膜状、多孔膜状、无纺布状、织布状并使其与胰岛细胞片接触而使用。

[0058] 由此,本发明中的细胞片层积体是指,从包覆有温度响应性聚合物的细胞培养基材上剥离,根据需要使用培养细胞移动夹具,从而得到培养细胞片,该培养细胞片在培养时没有受到以分散酶、胰蛋白酶等为代表的蛋白质分解酶所带来的损伤,培养时所形成的细胞与基材间的基底膜样蛋白质也没有受到酶的破坏,而且细胞与细胞间的桥粒结构得到保持,结构的缺陷少,强度高。

[0059] 在使胰岛细胞片贴紧时使用的载体是用于保持本发明的细胞的结构物,可以使用例如高分子膜或由高分子膜成型的结构物、金属性夹具等。例如,在使用高分子作为载体的材质时,作为其具体的材质,可列举出聚偏二氟乙烯(PVDF)、聚丙烯、聚乙烯、纤维素及其衍生物、纸类、几丁质、壳聚糖、胶原、氨基甲酸酯、明胶等。载体的形状没有特别限定。

[0060] 能够将本发明中得到的胰岛细胞片移植到生物体内的规定部位。该移植部位可以是生物体内的任意场所,没有特别限定,可列举出例如皮下组织、大网膜、腹腔内组织、腹膜下组织、肝脏、肌肉、筋膜下组织等。其中,特别是从存在丰富的血管且移植行为容易的方面出发,优选大网膜。其移植部位可以预先实施血管诱导,也可以不实施,没有特别限定。这里,实施血管诱导的方法也没有特别限定,例如,可列举出下述方法:将作为血管增殖因子的 FGF 包埋在微球中,一边改变该微球的组成、大小、注入范围,一边作用于生物体 8 ~ 10

天;将聚对苯二甲酸乙二醇酯网切割成任意的大小,制作袋状物,向该袋的内侧加入溶解于高浓度琼脂糖溶液的 FGF,8~10 天后除去该袋,从而制作进行了血管诱导的空间;等等。无论何种方法,本发明中得到的胰岛细胞片均无需像以往的胰岛移植那样移植到血管内那样的血流下。在以往的胰岛的情况下,若将它们进行移植,为了使营养成分和氧供给至该细胞团内部的细胞,不得不在门静脉等血管中或肝脏组织等血流丰富的部位进行移植,与此相对,本发明的胰岛细胞片仅排列了一层所构成的胰岛细胞,因此能够容易地将营养成分和氧供给至构成细胞片的细胞,因而,本发明的胰岛细胞片无需移植到血管内这样的血流丰富的部位,能够移植到血管内以外的通常的组织中。本发明的胰岛细胞片仅通过简便的移植即可表现出对于生命的维持而言不可欠缺的胰腺功能。

[0061] 本发明中所移植的胰岛细胞片保持了基底膜样蛋白质,植活性极其良好。移植时根据目的改变细胞数即可,所移植的细胞为片状时,通过改变其大小或形状,能够改变胰岛功能的总活性度。

[0062] 若将本发明所示的胰岛细胞片用于人,则所移植的胰岛细胞片在人的生物体内长期表现胰岛功能,以该状态成为人工胰脏。可以通过所剥离的胰岛细胞片的大小或形状、或者这两者来控制功能的表现量。例如以 1 型糖尿病、2 型糖尿病、慢性胰腺炎等各疾病的本质性治疗、或胰脏全摘除后的治疗、或者胰腺功能辅助为目的而使用这样的人工胰脏,没有特别限定。

[0063] 若将本发明所示的胰岛细胞片移植至动物,则成为胰岛细胞移植动物。可以通过所剥离的胰岛细胞片的大小或形状来控制功能的表现量。这里所使用的动物可列举出大鼠、小鼠、豚鼠、狨猴、兔、狗、猪、黑猩猩或者它们的免疫缺陷动物等,没有特别限定。例如,以胰腺功能评价系统等为目的而使用这样的胰岛移植动物,没有特别限定,所述胰腺功能评价系统为对该胰岛移植动物给药待测物质,并判定该待测物质对胰腺功能的影响。

[0064] 实施例

[0065] 以下,基于实施例对本发明进行更详细的说明,但这些实施例并不对本发明造成任何限定。

[0066] 实施例 1

[0067] 在温度响应性培养皿上培养由各脏器得到的细胞,成为铺满(confluent)的状态后,实施低温处理,从而能够以片状回收细胞。该技术已经应用于心肌、角膜上皮、食道粘膜上皮、肝细胞等,但尚无使用胰岛的研究(图 1)。

[0068] 胰岛细胞的分离

[0069] 对于出生后 8 周的大鼠(Lewis rat、雄性、体重约 250g),在异氟烷(isoflurane)麻醉下剖腹,进行胰岛的摘除。使所摘除的胰岛在胶原酶溶液中反应 32 分钟,之后通过使用 Ficol1 液的浓度梯度法将胰岛分离。然后,对于所得到的胰岛,在 0.125%胰蛋白酶-EDTA 中反应 5 分钟,从而使胰岛成为单个细胞。此时,细胞保管于含有 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养基(Sigma-Aldrich 公司制)中。所得到的胰岛细胞的活性(viability)为 90%以上。

[0070] 胰岛细胞的培养

[0071] 作为细胞培养基材,使用对聚苯乙烯制的 35mm 细胞培养皿(Corning 公司制)包覆了作为温度响应性聚合物的聚-N-异丙基丙烯酰胺而成的基材。温度响应性聚合物的包覆依照日本特开平 02-211865 号公报所示的方法进行,最终得到温度响应性聚合物的包

覆量为  $4.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  的温度响应性细胞培养基材。本实验中,在该温度响应性细胞培养基材表面进一步涂覆  $0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  的层粘连蛋白 5 (CHEMICON 公司),在其表面接种  $5.7 \times 10^5$  个/ $\text{cm}^2$  的上述胰岛细胞,以该状态培养 2 天。此时,作为培养基,利用含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基 (Sigma-Aldrich 公司制)。包覆了聚-N-异丙基丙烯酰胺的基材表面在  $32^\circ\text{C}$  以上时为疏水性,在低于  $32^\circ\text{C}$  时为亲水性。由此,在  $32^\circ\text{C}$  的培养条件下能够粘接培养,为低于  $32^\circ\text{C}$  时,无需进行胰蛋白酶处理而以片状剥离 (图 2)。

#### [0072] 胰岛细胞片评价

[0073] 培养第 2 天,培养皿上胰岛细胞的密度几乎接近 100% (图 3)。利用胰岛素染色对该培养皿上铺满的胰岛细胞进行了观察,结果 7 ~ 8 成的细胞确认为胰岛素阳性 (图 4)。接着,对于另外准备的温度响应性培养基材上的胰岛细胞,使用以葡萄糖浓度为 3mM、20mM、3mM 的方式制作的培养基,分别每隔 1 小时更换一次培养基,测定培养基中的胰岛素浓度。其结果,证明了与 糖浓度相应的胰岛素分泌能力 (图 5)。进而,使用 PKH26 (SIGMA) 对胰岛细胞片进行了荧光染色。结果可知,所得到的细胞为胰岛细胞。

[0074] 接着,将所得到的胰岛细胞片在  $20^\circ\text{C}$  的培养室中静置 30 分钟,接着使用支撑膜 (CellShifter™、CellSeed 公司制) 由温度响应性培养基材表面剥离胰岛细胞片。采集后,在培养皿上没有确认到细胞残留 (图 6)。进而,将胰岛细胞片以附着于支撑膜上的状态封入到包埋剂中,制成冷冻切片。对切片进行 HE 染色、胰岛素染色,并利用荧光显微镜、进而利用电子显微镜对细胞内的结构进行观察。其结果,观察到胰岛细胞片为一层的片状 (图 7)。另外,还确认到该胰岛细胞片由胰岛素阳性细胞和阴性细胞形成 (图 8)。进而,由电子显微镜观察可知,所得到的胰岛细胞片中桥粒结构、基底膜样蛋白质均以无损伤的状态存在。

#### [0075] 胰岛细胞片的移植、移植评价

[0076] 最后,将所得到的胰岛细胞片移植到与供体相同种类的大鼠 (Lewis rat、出生后 8 周、雄性、体重约 250g) 中。在背部以 L 字状切开皮肤,剥离皮下,露出该部位的筋膜。在该处静置使用上述支撑膜采集的胰岛细胞片,细胞片和筋膜面附着后,向支撑膜添加生理盐水,缓慢地除去支撑膜。通过向支撑膜添加水分,从而使支撑膜与胰岛细胞片间的吸附力降低,由此胰岛细胞片停留在筋膜上,能够不弄乱片而进行移植 (图 9)。移植 4 天后,使其失血死,然后采集背部的移植组织。将所采集的组织制成冷冻切片,利用胰岛素染色进行评价,并在荧光显微镜下进行评价。其结果,通过预先对胰岛细胞实施荧光染色,从而由移植 4 天后摘除的组织中确认到以胰岛细胞片的状态存在。另外,通过胰岛素染色,在形成片的细胞中确认到胰岛素阳性细胞的存在 (图 10)。

#### [0077] 实施例 2

[0078] 除了将实施例 1 中得到的胰岛细胞片移植到与供体相同种类的大鼠 (Lewis rat、出生后 8 周、雄性、体重约 250g) 的大网膜中以外,均与实施例 1 同样地进行实验。移植 14 天后,使其失血死,然后采集大网膜的移植组织。将所采集的组织制成冷冻切片,利用胰岛素染色进行评价,并在荧光显微镜下进行评价。其结果,通过预先对胰岛细胞实施荧光染色,从而由移植 14 天后摘除的组织中确认到以胰岛细胞片的状态存在。另外,通过胰岛素染色,在形成片的细胞中确认到胰岛素阳性细胞的存在。

#### [0079] 实施例 3

[0080] 对于实施例 1 中得到的胰岛细胞片,层积在与实施例 1 相同的温度响应性培养基材上另外制作的血管内皮细胞片,制作依次层叠了胰岛细胞片、血管内皮细胞片、胰岛细胞片的层积化细胞片。除了将该层积化细胞片移植到与供体相同种类的大鼠 (Lewis rat、出生后 8 周、雄性、体重约 240g) 的皮下以外,均与实施例 1 同样地进行实验。移植 14 天后,使其失血死,然后采集皮下的移植组织。将所采集的组织制成冷冻切片,利用胰岛素染色进行评价,并在荧光显微镜下进行评价。其结果,通过预先对胰岛细胞实施荧光染色,从而由移植 14 天后摘除的组织中确认到以胰岛细胞片的状态存在。另外,通过胰岛素染色,在形成胰岛细胞片的细胞中确认到胰岛素阳性细胞的存在。进而,可知血管侵入了层积化胰岛细胞片中,已经植活了具有厚度的胰岛细胞片。

#### [0081] 实施例 4

[0082] 根据常规方法制作糖尿病化 SCID 小鼠。具体而言,测定 SCID 小鼠的体重后,以 220mg/kg 体重的给药量腹腔内给药链脲菌素(streptozotocin)(Sigma 公司制),从而制作糖尿病化 SCID 小鼠。另外,链脲菌素给药后,由尾静脉采集全血,使用小型血糖值测定器 Glucocard(Hoechst Marion Roussel Japan 制)测定血糖值,将血糖值为 350mg/dL 以上的小鼠视为糖尿病发病。利用与实施例 1 同样的操作,向该糖尿病化 SCID 小鼠的背部皮下移植实施例 1 的胰岛细胞片。移植后的血中葡萄糖量的变化示于图 11。确认到:在糖尿病化 SCID 小鼠中血中葡萄糖量没有降低,但移植了胰岛细胞片的小鼠从移植后开始血中葡萄糖量迅速下降,其效果至少持续了 60 天,进而 60 天后血中葡萄糖量也没有再次上升的倾向。另一方面,不将胰岛细胞制成片而以单个的状态进行了同样的实验,但该方法中不能使血中葡萄糖量降低,而且无法使其效果持续。由此,认为本发明的胰岛细胞片对于糖尿病治疗有效。

#### [0083] 实施例 5

[0084] 使用结束了实施例 4 后的糖尿病化 SCID 小鼠、胰岛细胞片移植糖尿病化 SCID 小鼠、以及健康的 SCID 小鼠,对各小鼠分别再进行葡萄糖负荷试验。此时的葡萄糖负荷量为 2g/kg 体重。所得到的结果示于图 12。结果确认到:在糖尿病化 SCID 小鼠中血中葡萄糖量没有降低,但移植了胰岛细胞片的小鼠与健康的小鼠同样地从葡萄糖负荷 30 分钟后血中葡萄糖量迅速降低,其效果持续,进而 150 分钟后血中葡萄糖量也没有再次上升的倾向。由此,认为本发明的胰岛细胞片对于糖尿病治疗有效。

#### [0085] 实施例 6

[0086] 实施例 4 中在胰岛细胞片移植 18 天后以及 89 天后使其失血死,采集背部的移植胰岛细胞片部分。对所采集的组织进行福尔马林固定、并制成石蜡处理切片,利用胰岛素染色进行评价。其结果,在移植了胰岛细胞片的皮下组织内胰岛细胞以片状组织化,确认到胰岛素阳性细胞的存在(图 13)。由移植 89 天后的组织还可以确认到以下情况:胰岛素阳性细胞在移植部被再配置,胰岛素阳性细胞彼此聚集。这暗示了本发明中移植的胰岛细胞片有可能在移植部位再构成为更优选的状态。

#### [0087] 产业上的可利用性

[0088] 在温度响应性培养基材上制作的胰岛细胞片不需要将胰岛细胞移植到血管内,即使移植到例如皮下组织那样的血流缺乏的组织中,也能够充分地表现出胰岛细胞自身所具有的功能。

## 胰岛细胞片

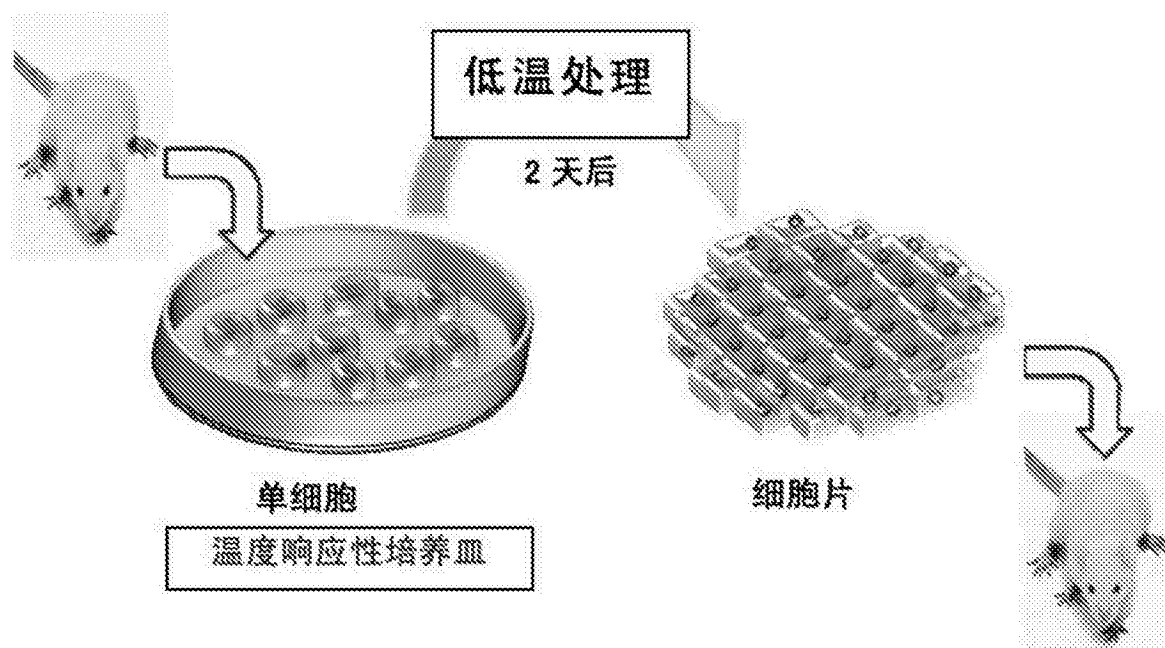


图 1

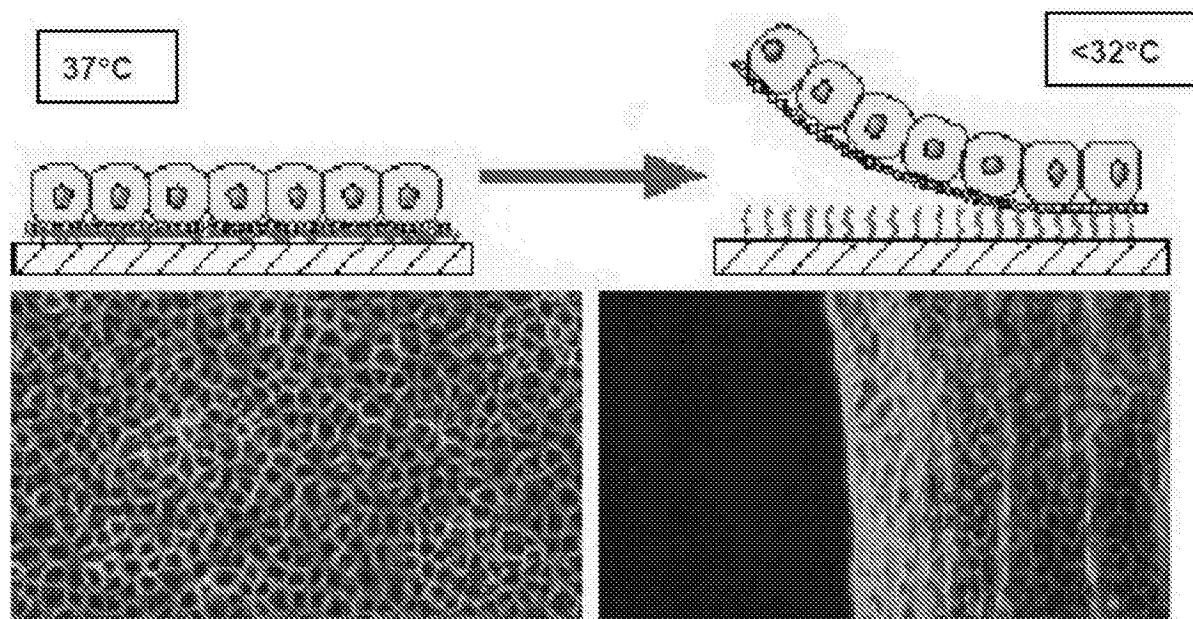


图 2

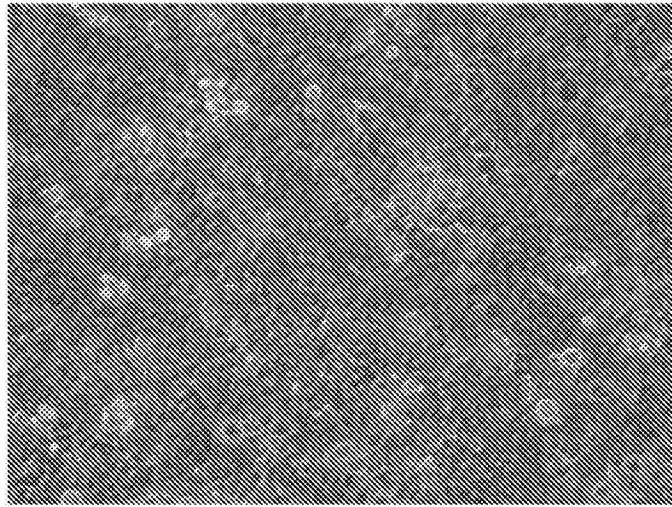


图 3

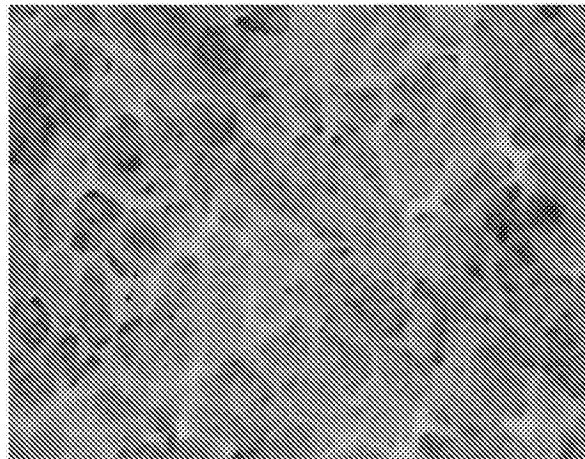


图 4

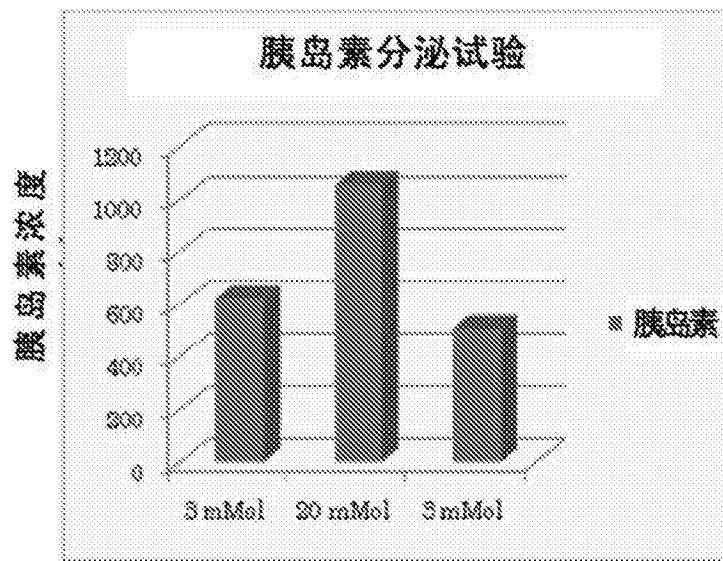


图 5

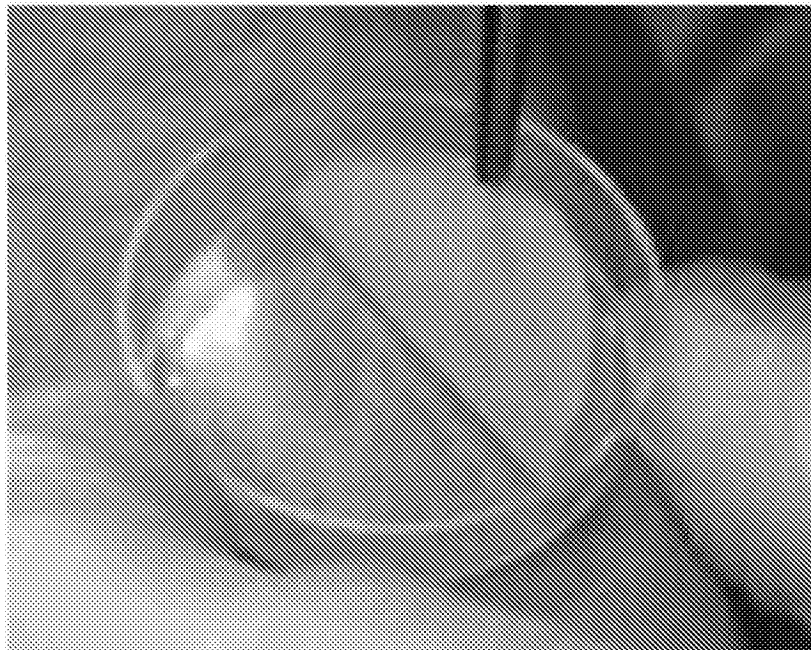


图 6



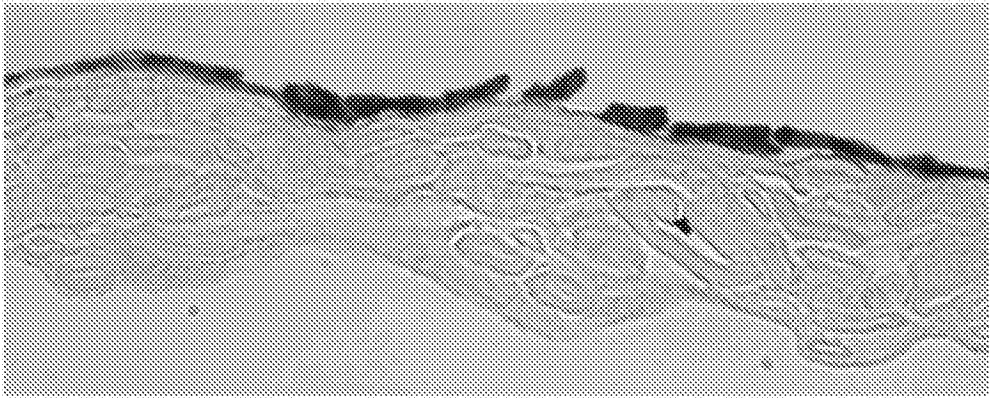


图 7

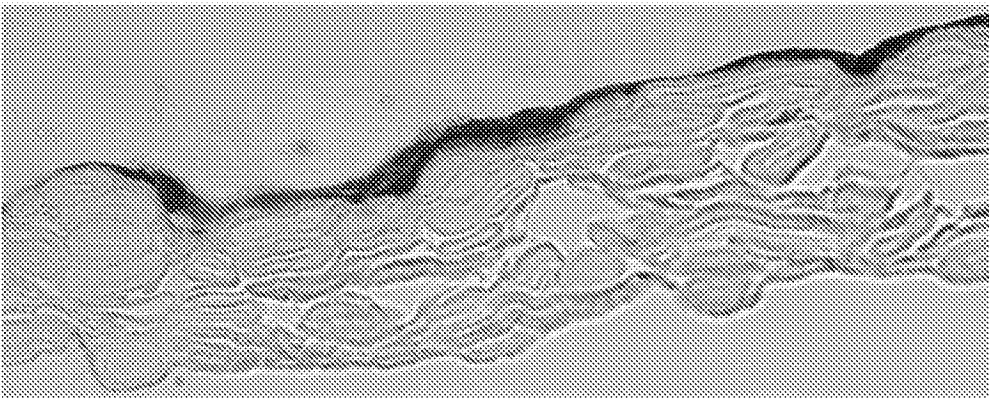


图 8

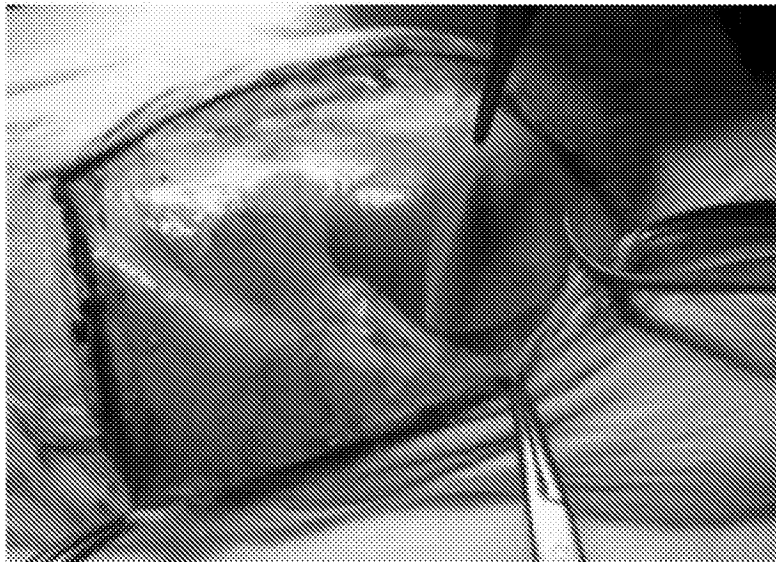


图 9

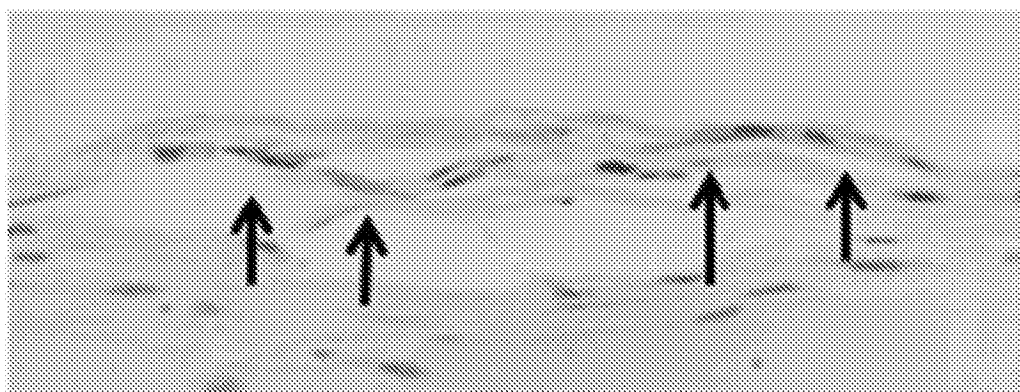


图 10

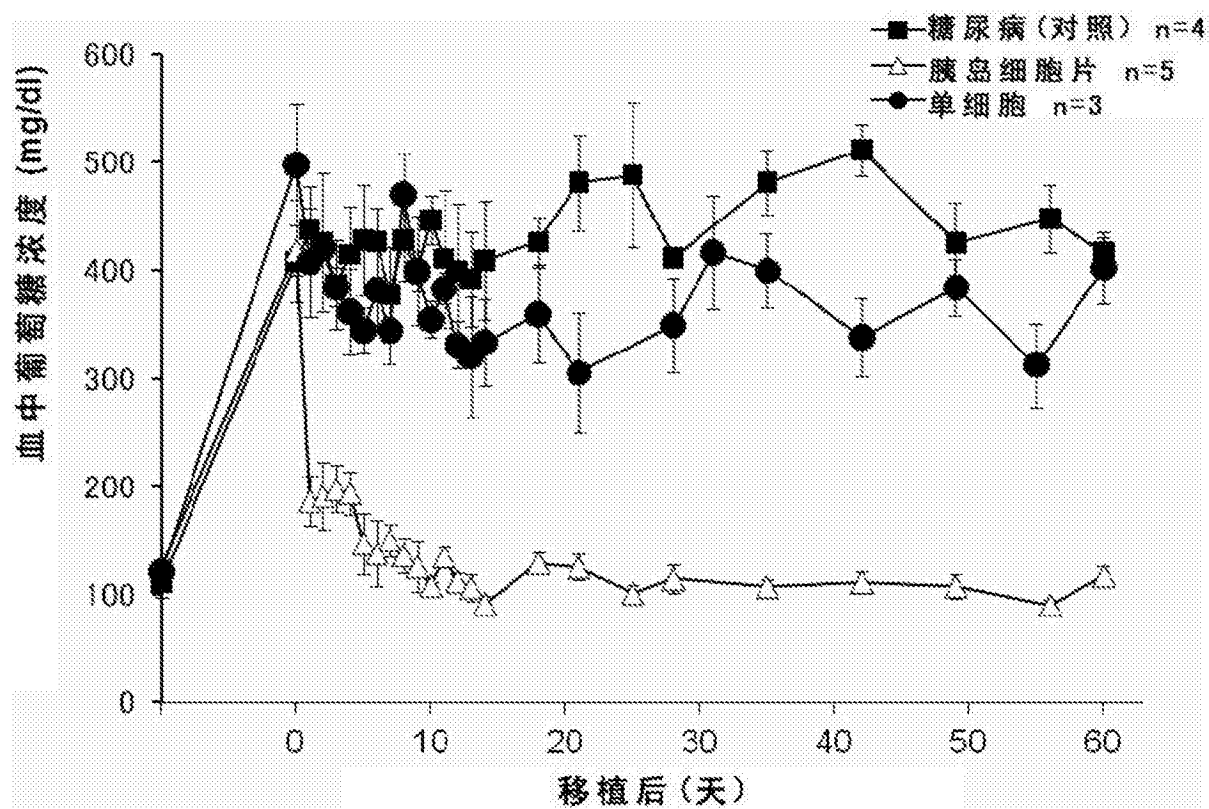


图 11

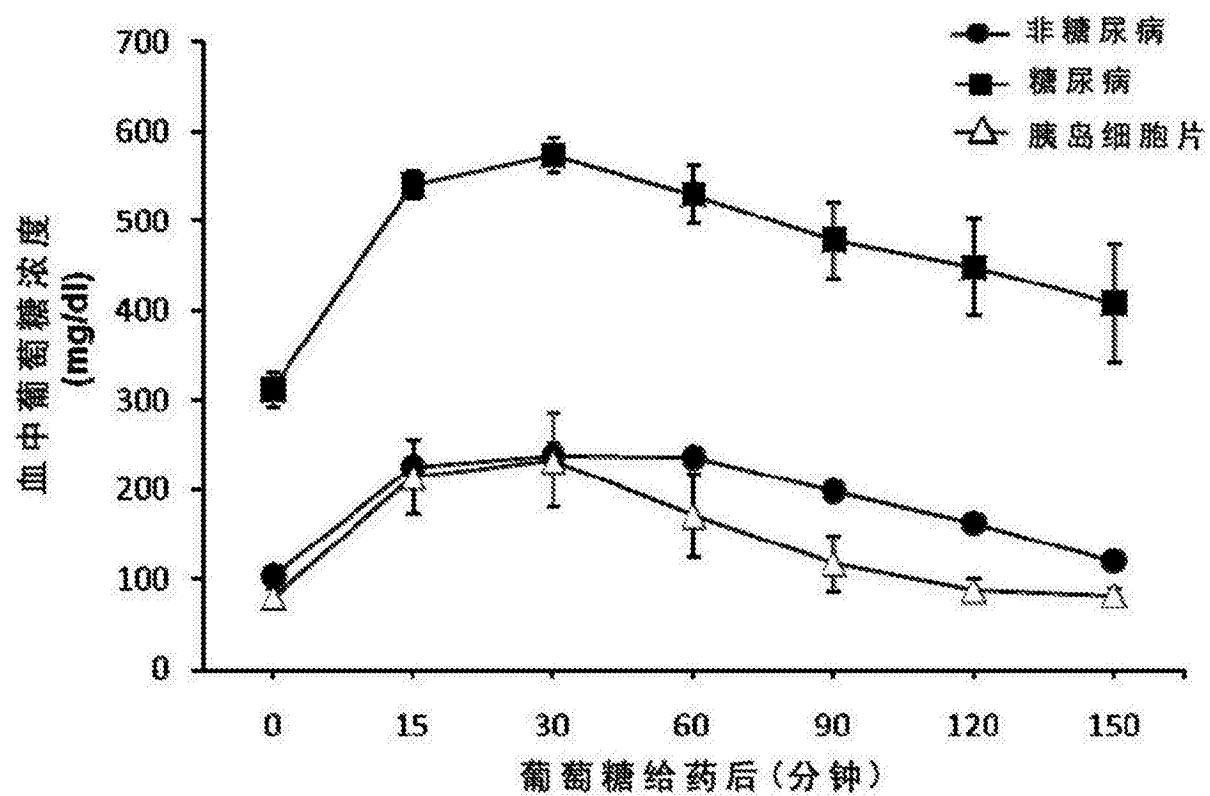


图 12

## 胰岛细胞片移植后的组织学分析 (胰岛素免疫染色)

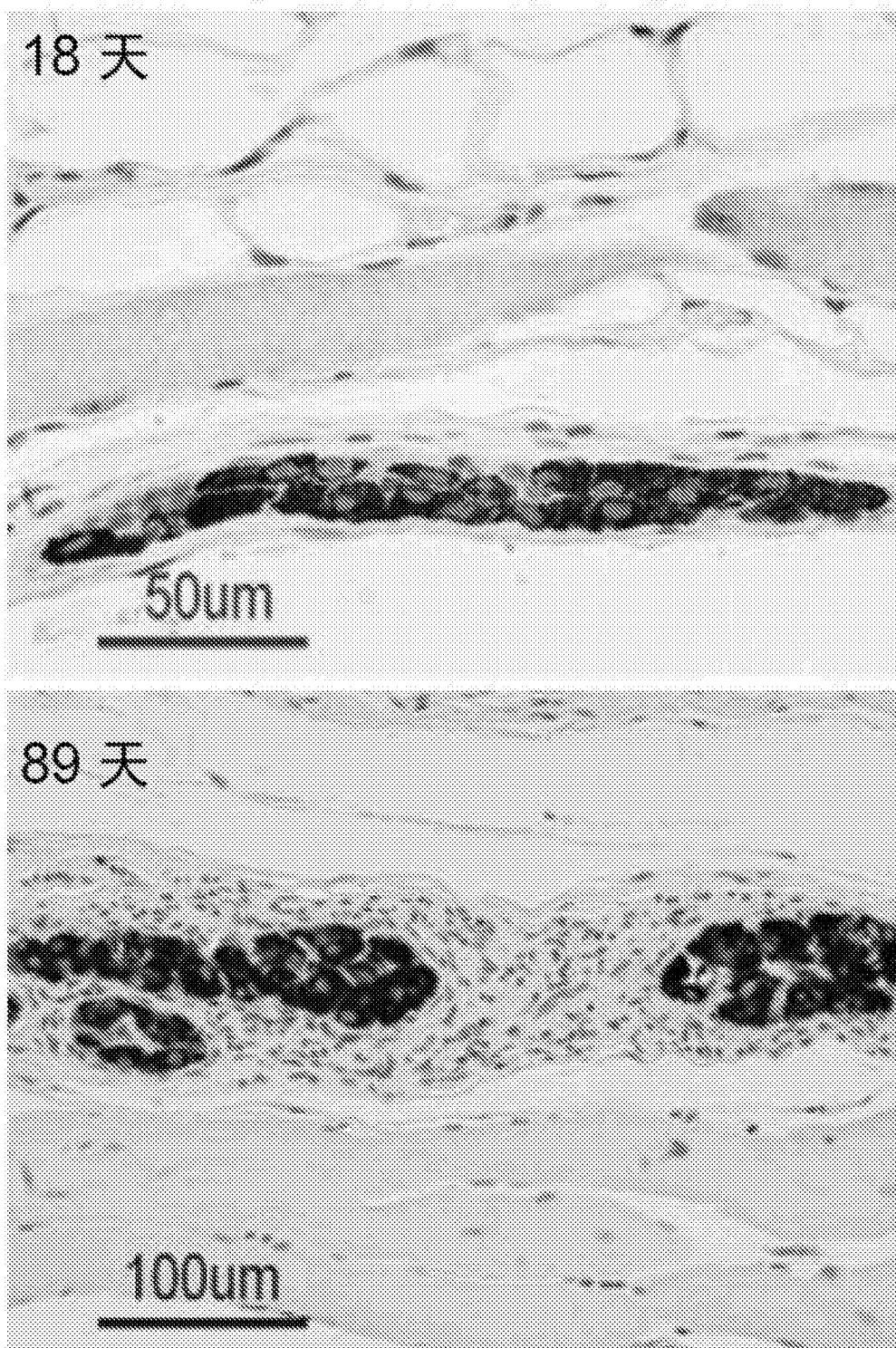


图 13