(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3996950号
(P3996950)
(45)発行日　平成19年10月24日(2007.10.24)　(24)登録日　平成19年8月10日(2007.8.10)

(51)Int.Cl.　　F I
C12N 5/06 (2006.01)　　C12N 5/00 E
A61K 35/39 (2006.01)　　A61K 35/39 ADP

請求項の数 32　(全 22 頁)

(21)出願番号　特願平7-528510
(86)(22)出願日　平成7年4月28日(1995.4.28)
(65)公表番号　特表平10-503923
(43)公表日　平成10年4月14日(1998.4.14)
(86)国際出願番号　PCT/US1995/005521
(87)国際公開番号　WO1995/029989
(87)国際公開日　平成7年11月9日(1995.11.9)
審査請求日　平成14年2月25日(2002.2.25)
(31)優先権主張番号　08/235,394
(32)優先日　平成6年4月29日(1994.4.29)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
ザ　ユナイテッド　ステイツ　オブ　アメリカ　リプレゼンティド　バイ　ザ　シークレタリー　デパートメント　オブ　ヘルス　アンド　ヒューマン　サービシーズ　ナショナル　インスティチュート　オブ　ヘルス
アメリカ合衆国　メリーランド州　ロックビル　エグゼクティヴ　ブラヴァード　６０１１　スート　３２５、ナショナル　インスティテュート　オブ　ヘルス

最終頁に続く

(54)【発明の名称】エクスビボのヒト胎児膵臓細胞及びヒト成人膵臓細胞の増殖及び分化を刺激する組成物及び方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
(a)ヒト胎児より得られた膵臓細胞の初代培養をインビトロにおいて調製する段階、及び
(b)該初代培養細胞を有効濃度のHGF/SFと有効な時間接触させる段階、を含む、ヒト胎児膵臓β膵島細胞のエクスビボの増殖及び分化を刺激する方法。
【請求項２】
初代培養細胞を有効濃度の抗-TGF-β抗体と有効な時間接触させることをさらに含む、請求項１記載の方法。
【請求項３】
細胞増殖及び細胞分化が、他の細胞型に対するβ上皮細胞数の増加、β上皮細胞を含有する膵島様細胞クラスターの形成の増加、または平均細胞インスリン産生の増加を含む、請求項１または２記載の方法。
【請求項４】
HGF/SFの有効濃度が５から50ng/mlまでの範囲である、請求項１から３のいずれか一項記載の方法。
【請求項５】
培養された細胞をHGF/SFの存在下で細胞外マトリックス上で単層で培養することをさらに含む、請求項１から４のいずれか一項記載の方法。
【請求項６】
細胞外マトリックスが804G細胞外マトリックスまたはBCEM細胞外マトリックスである、請

求項５記載の方法。
【請求項７】
マトリックスから単層細胞を非酵素的手段により解離することをさらに含む、請求項５または６記載の方法。
【請求項８】
単層培養細胞を再集合させることをさらに含む、請求項５から７のいずれか一項記載の方法。
【請求項９】
細胞をインスリン遺伝子を促進制御する試薬と接触させることをさらに含む、請求項１から８のいずれか一項記載の方法。
【請求項１０】
試薬が、ニコチンアミド又はベンズアミドのようなポリ（ADP-リボース）合成酵素阻害剤である、請求項９記載の方法。
【請求項１１】
(a)ヒト胎児より得られた膵臓細胞の初代培養をインビトロにおいて調製する段階、
(b)該細胞を、膵島細胞クラスターが形成する条件下で有効濃度のHGF/SFと共に培養する段階、
(c)該クラスターを、有効濃度のHGF/SFの存在下で細胞外マトリックス上の単層として培養する段階、
(d)該細胞を、非酵素的手段により該単層から解離する段階、及び
(e)該解離された細胞を、ポリ（ADP-リボース）合成酵素の阻害剤の存在下で再集合させる段階、
を含む、ヒト胎児膵臓β細胞のエクスビボの増殖及び分化を刺激する方法。
【請求項１２】
(a)バイオリアクターにヒト胎児膵臓細胞培養物を接種する段階、及び
(b)該バイオリアクターを、場合により有効濃度の抗-TGF-β抗体と共に、有効濃度のHGF/SFを添加した完全増殖培地で灌流する段階、
を含む、臨床的に有用な量の増殖し分化するヒト胎児膵島細胞を製造する、請求項１から11のいずれか一項記載の方法。
【請求項１３】
(c)マトリックスから非酵素的手段により細胞を解離する段階、
(d)該解離した細胞を再集合させる段階、及び
(e)該再集合した細胞を、インスリン遺伝子促進制御剤と接触させる段階、
をさらに含む、バイオリアクターが細胞外マトリックスで被覆されている培養表面を有する、請求項12記載の方法。
【請求項１４】
上記のように処理した膵臓細胞を回収する段階をさらに含む、請求項１から13のいずれか一項記載の方法。
【請求項１５】
HGF/SFの存在下で予め増加させられた容器中の低温保存されたヒト成人膵臓細胞クラスターを含み、該ヒト膵臓細胞クラスターはヒト膵臓細胞の初代培養に比べてβ細胞を高い割合で含有する、市販用のキット。
【請求項１６】
(a)ヒト成人より得られた膵臓細胞の初代培養をインビトロにおいて調製する段階、及び
(b)該初代培養細胞を有効濃度のHGF/SFと有効な時間接触させる段階、を含む、ヒト成人膵臓β膵島細胞のエクスビボの増殖を刺激する方法。
【請求項１７】
初代培養細胞を有効濃度の抗-TGF-β抗体と有効な時間接触させることをさらに含む、請求項16記載の方法。
【請求項１８】

細胞増殖が、他の細胞型に対するβ上皮細胞数の増加を含む、請求項16記載の方法。
【請求項１９】
HGF/SFの有効濃度が５から50ng/mlまでの範囲である、請求項16から18のいずれか一項記載の方法。
【請求項２０】
培養された細胞をHGF/SFの存在下で細胞外マトリックス上で単層で培養することをさらに含む、請求項16から19のいずれか一項記載の方法。
【請求項２１】
細胞外マトリックスが804G細胞外マトリックスまたはBCEM細胞外マトリックスである、請求項20記載の方法。
【請求項２２】
マトリックスから単層細胞を非酵素的手段により解離することをさらに含む、請求項20または21記載の方法。
【請求項２３】
単層培養細胞を再集合させることをさらに含む、請求項20から22のいずれか一項記載の方法。
【請求項２４】
細胞をインスリン遺伝子を促進制御する試薬と接触させることをさらに含む、請求項16から23のいずれか一項記載の方法。
【請求項２５】
試薬が、ニコチンアミド又はベンズアミドのようなポリ（ADP-リボース）合成酵素阻害剤である、請求項24記載の方法。
【請求項２６】
上記のように処理した膵臓細胞を回収する段階をさらに含む、請求項16から25のいずれか一項記載の方法。
【請求項２７】
請求項16から26のいずれか一項記載の方法により培養されたヒト膵臓細胞クラスターを含む、薬学的に許容しうる担体中の移植組成物で、該ヒト膵臓細胞クラスターはヒト膵臓細胞の初代培養に比べてβ細胞を高い割合で含有する組成物。
【請求項２８】
１型糖尿病の患者の治療に使用するための、請求項26記載の方法によって製造された、ヒト膵臓細胞の初代培養に比べてβ細胞を高い割合で含有する回収されたヒト膵臓細胞クラスター。
【請求項２９】
門脈内経路、脾臓内経路、腎被膜下経路、又は静脈内経路による投与のための、請求項28記載の回収された細胞クラスター。
【請求項３０】
さらにHGF/SFを含む、請求項15記載のキット。
【請求項３１】
さらに細胞外マトリックスを含有する容器を含む、請求項15または30記載のキット。
【請求項３２】
さらにポリ（ADP-リボース）合成酵素阻害剤を含有する容器を含む、請求項15、30、または31記載のキット。
【発明の詳細な説明】
発明の背景
本発明は、１型糖尿病を治療するためのヒト胎児又は成熟膵臓細胞の移植に関する。更に詳しくは、本発明は、糖尿病患者への移植に先だって膵臓細胞のエクスビボの増殖及び分化を誘導するための、ヒトのサイトカインである肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor）／分散因子（scatter factor）（「ＨＧＦ／ＳＦ」）の使用に関する。
１型（インスリン依存性）糖尿病は、特にインスリンを産生するベータ（「β」）細胞の

減少、及び自己免疫攻撃による代謝の補償作用喪失（decompensation）を特徴とする（Fisenharth, N. Eng. J. Med. 314: 1360（1986）；Sweane, Diabetologia 35: 193（1992））。このような患者の治療には、主にウシもしくはブタインスリン又は組換えヒトインスリンの非経口投与が含まれる。しかし、この治療は、この疾患の後遺症を遅らせるが、回避させることはなく、更にこの治療には、１日に複数回のインスリンの注射及び／又は留置カテーテルとインスリンポンプの使用が必要である。

１型糖尿病が自己免疫の疾患であるという理論に基づいて、患者の免疫抑制治療、例えばサイクロスポリンＡ又はＦＫ５０６が行われているが、限定された成功しか収めていない。免疫抑制剤は、免疫系の抑制の結果としての感染の可能性を含む有毒な副作用を有する。

最近、インスリン注射からの解放を実現するために、成人ヒト膵島が患者に移植された（Scharp et al., Transplant. 51: 76（1991）；Warnock et al., Diabetologia 34: 55（1991））。これらの進歩にもかかわらず、臓器提供者の数が限定されていること、ほとんどの成熟膵臓から得ることのできる膵島の量が不充分であること、及び移植片拒絶反応の問題が相重なって、この取り組みの一般的な有用性は限定されている（Ricordi et al., Transplant. 53: 407（1992））。

移植のための膵島の代替供給源は、胎児膵臓である。この組織は、少なくとも理論上は、移植後に成長及び成熟することができる未分化のβ細胞に富む（Tuch et al., Diabetes 35: 464（1986））。胎児の未成熟の免疫系は受容者（recipient）による胎児膵島拒絶反応の確率を低下させるが、適切な胎児膵臓の利用可能性が限定されていること、及びこのような組織のインスリン産生細胞の未成熟性に関する問題が依然としてこの取り組みの成功を妨げている。総説については、「Andersson, Transplantation Revs. 6: 20（1992）」を参照のこと。

最初齧歯類及びヒト血漿及び齧歯類血小板で同定された、８７kDaの二本鎖糖蛋白サイトカインであるＨＧＦは、強力な肝細胞分裂促進剤である（Rubin et al., Biochem. Biophys. Acta 1155: 357（1993））。ＨＧＦは、上皮細胞を解離させてその運動性を上昇させることが知られている、分散因子（「ＳＦ」）と呼ばれる繊維芽細胞分泌蛋白と同一であると考えられている（Gherardi et al., Nature 346: 228（1990）；Weidner et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci.（USA）88: 7001（1991）；Furlong et al., J. Cell Sci. 100: 173（1991）；Naldini et al., EMBO J. 10: 2867（1991）；Bhargava et al., Cell Growth Differ. 3: 11（1992））。この理由から、本明細書ではこのサイトカインの名称の略語として「ＨＧＦ／ＳＦ」を使用している。ＨＧＦ／ＳＦの生物学の総説については、「Strain, J. Endocrinol. 137: 1（1993）」、「Furlong, BioEssays 14: 613（1992）」及び「Rubin et al.,（1993）, 上記文献」を参照のこと。

ＨＧＦは、均質になるまで精製され、配列決定され、その遺伝子がクローン化されている。「Miyazawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 163: 967（1989）」、「Rubin et al., Proc. Nat'l. Acad. USA 88: 415（1991）」、「Weidner et al., Sci.（USA）88: 7001（1991）」、「Nakamura et al., FEBS Lett. 224: 311（1987）」、「Nakamura et al., Nature 342: 440（1989）」、「Gohda et al., J. Clin. Invest. 81: 414（1988）」を参照のこと。

ウォルフ（Wolf）ら（Hepatology 14: 488（1991）は、免疫組織化学により成人ヒト膵臓組織中でＨＧＦ／ＳＦを同定した。しかし、その同定のシグナルは、外分泌組織でのみ強く、内分泌組織では非常に弱く、種々の細胞型間で明白な差はなかった。これとは全く対照的に、ツダ（Tsuda）ら（Jpn. J. Cancer Res. 83: 1262（1992））は、成人（ヒト及びラット）膵臓のグルカゴン産生Ａ細胞ではＨＧＦ／ＳＦを同定したが、外分泌膵臓では同定しなかったという免疫組織化学研究を報告した。この著者らは、このサイトカインが、主にＡ細胞で産生又は貯蔵されると結論し、ＨＧＦ／ＳＦが成長因子として傍分泌様及び内分泌様に作用するという仮説がたてられた。更に、デフランセス（DeFrances）ら（Development. 116: 387（1992））は、発生途上のラット胎児膵臓において、腺房細胞で強く染色されるＨＧＦ／ＳＦの存在を免疫組織化学的に証明した。

したがって、臨床的に有用な数の、胎児及び成熟ヒト膵臓細胞の高度に増殖及び分化する膵島様のクラスターを提供する方法が依然として必要とされている。

発明の概要

本発明の目的は、胎児又は成人膵臓組織の初代培養をＨＧＦ／ＳＦで処理することによりヒト膵臓β細胞の増殖を刺激する方法を提供することである。

本発明の別の目的は、培養物をＨＧＦ／ＳＦで処理することにより、ヒト胎児及び成熟膵臓細胞の初代培養からβ上皮細胞を含有する膵島様細胞クラスターを産生する方法を提供することである。

本発明のもう１つ別の目的は、ヒト膵臓細胞をＨＧＦ／ＳＦで処理することにより、このような細胞の初代培養におけるインスリン産生を増加させる方法を提供することである。

本発明の更に別の目的は、糖尿病患者への移植に充分な量の、ＨＧＦ／ＳＦで処理した機能性ヒト胎児及び成熟膵臓β膵島細胞を調製する方法を提供することである。

ヒト膵臓β膵島細胞のエクスビボの増殖及び分化を刺激する方法は、

（ａ）ヒト膵臓細胞の初代培養を調製する段階、及び

（ｂ）該初代培養細胞を有効濃度のＨＧＦ／ＳＦ及び場合により有効濃度の抗ＴＧＦ－β抗体と有効な時間接触させる段階、を含む。

ＨＧＦ／ＳＦの存在下で特異的な細胞外マトリックス上での培養によりヒト膵臓細胞の数をエクスビボで増大させる方法を提供することも本発明の目的である。その後、単層培養から細胞を再集合させ、ポリ（ＡＤＰ－リボース）合成酵素阻害剤で処理することにより、膵島特異的遺伝子（例えばインスリン）の発現が増加する。

本発明のこれらの面及びその他の面は、以下の本発明の詳細な説明と添付した請求の範囲により明らかになろう。

【図面の簡単な説明】

図１は、膵島様細胞クラスター（図１Ａ）、全ＤＮＡ（図１Ｂ）、全インスリン含量（図１Ｃ）、及びＤＮＡ含量の単位当りのインスリン含量（図１Ｄ）のヒト胎児膵臓細胞培養からの収量に対する、ＨＧＦ／ＳＦ、ＴＧＦ－β及びＦＧＦ－２の効果の差を示すヒストグラムを示す。

図２は、両方の抗原に陽性の細胞を検出するＢｒｄＵ（黒い矢印）及びインスリン（白い矢印）についての二重免疫染色による、ＨＧＦ／ＳＦで処理したＩＣＣのβ膵島細胞複製の証拠を示す。

図３は、細胞数に反映される胎児ヒト膵臓細胞におけるＨＧＦ／ＳＦの分裂促進作用に対する、細胞外マトリックス８０４Ｇ及びＢＣＥの効果を示す。

図４は、ＨＧＦ／ＳＦの分裂促進作用が用量依存性であることを示す。

図５は、ＨＧＦ／ＳＦの存在下での細胞倍加時間を示す。

図６は、増殖増加と細胞伸展の組合せに由来するＨＧＦ／ＳＦによる単層の増大を示す（下、対照；上、ＨＧＦ／ＳＦ）。

図７は、ＩＣＣと、ニコチンアミドの存在下及び非存在下で再集合したＩＣＣにおける、インスリン及びＥＰ４（膵臓上皮細胞のマーカーである上皮抗原）について免疫染色した細胞の表面積の定量を示す。

図８は、細胞集団を細胞外マトリックス上の単層で数を増大させた時のＤＮＡ含量とインスリン含量との反比例関係を示す。

図９は、グルカゴン、インスリン及びシクロフィリンの転写レベルのリボヌクレアーゼ保護アッセイを示す。

図１０は、ニコチンアミドの存在下での細胞中のインスリンｍＲＮＡのレベルを示す。

図１１は、種々のヒト胎児膵臓細胞調製物を無胸腺ヌードマウスに移植し成熟させた後のヌードマウスにおけるヒトインスリンＣ－ペプチドのグルコース誘導性放出を示す。ＩＣＣ＝新鮮ＩＣＣを移植した陽性対照。単層＝８０４Ｇ上で培養した単層からの移植細胞。再集合＋ＮＩＣ＝ニコチンアミドで処理し、次いで移植した、再集合した単層からの細胞。

好適な態様の詳細な説明

適切な培養条件下で有効な時間、有効濃度のサイトカインのＨＧＦ／ＳＦと共にエクスビボで初代培養細胞を培養することにより、意外なことに、ヒト膵臓細胞の初代培養が増殖及び分化するのを、即ち、インスリン産生の増加したβ上皮細胞を高い割合で含有する膵島様細胞クラスター（「ＩＣＣ」）を形成する膵臓細胞が数多く産生するのを誘導できることが発見された。この方法で調製した増殖中の分化したＩＣＣは、糖尿病患者、特にインスリン産生が低下している１型糖尿病のヒトの患者への、症状を緩和するための移植にも、ヒトの治療様式（modalities）の開発のための糖尿病の動物モデルへの移植にも使用することができる。

本データは、本発明の方法が、ヒト胎児膵臓細胞のみでなく、成熟（例えば、成人）ヒト膵臓細胞にも適用できることを明白に証明している。それにもかかわらず、前者が以下の理由から非常に好適である：（ａ）胎児の免疫系は未成熟であるため、胎児の膵島の拒絶反応の確率が低下する；（ｂ）ＨＧＦ／ＳＦ及び他の因子に対する胎児膵臓細胞の増殖及び分化応答は、成人細胞で観察される応答よりも大きい。

このように処理した膵臓培養物を増殖させることにより、糖尿病患者に移植するための機能性β細胞膵島の供給が臨床上有用な数に増加する。

「初代培養」とは、ＩＣＣ内の上皮細胞と間充織細胞との相互作用を許容するヒト膵臓細胞の混合細胞集団を意味する。

「エクスビボ」とは、細胞が生体から摘出され、一時的にインビトロで培養されて、生体内に戻されることを意味する。

「増殖」とは、細胞数の増加を示す。

本明細書における「分化」とは、インスリンの産生量が増加したβ上皮細胞の含有割合が増加した膵島様細胞クラスターの数の増加を意味する。

「ＨＧＦ／ＳＦ」とは、肝細胞増殖因子／分散因子の略語である。ＨＧＦ／ＳＦの「有効濃度」とは、ヒト胎児膵臓細胞の初代培養が増殖し、ＩＣＣを形成し、β上皮細胞の数を増加させ、及びインスリン産生を増加させるのを誘導する濃度である。好適な濃度は、５～５０ng/mlであり、最も好適には、１５～３５ng/ml増殖培地である。「有効な時間」とは、上述のような増強を認めるのに必要な時間の長さを意味する。

「ＦＧＦ－２」とは、塩基性繊維芽細胞増殖因子のことをいう。「ＦＧＦ－７」は、ケラチン生成細胞増殖因子を意味する。「ＩＧＦ－Ｉ」及び［ＩＧＦ－II」は、インスリン様増殖因子のことをいう。「ＴＧＦ－β」は、トランスフォーミング増殖因子βを意味する。「ＮＧＦ」は、神経成長因子の略語である。「ＥＧＦ」は、上皮増殖因子を意味する。「Ａｂ－１」は、抗ＩＧＦ－Ｉ受容体モノクローナル抗体を意味する。「ＡＢ－１０１－ＮＡ」は、ニワトリ抗ヒトＴＧＦ－βを意味する。

「細胞外マトリックス」とは、細胞により分泌され、このような細胞の間及び周囲に存在し、そして架橋により不溶化された高分子の複合混合物を意味する。一般に、このようなマトリックスは、種々の接着性蛋白、グリコサミノグリカン、ヘパリン硫酸及びプロテオグリカンが結合しているコラーゲン骨格よりなる。

膵臓組織供給源

ヒト胎児膵臓は、種々の妊娠期間（１８～２４週が好適である）で、ＩＲＢ（治験審査委員会）の審議及び承認の後、アドバンスト・バイオサイエンス・リソース（Advanced Bio science Resource）（オークランド、カリフォルニア州）、医学の発展のための国際研究所（The International Institute for Advancement of Medicine）（エクストン、ペンシルバニア州）及びアナトミック・ギフト財団（Anatomic Gift Foundation）（ローレル、メリーランド州）のような非営利的な調達元から得ることができる。膵臓は、標準的な培地［例えば、１０％正常ヒト血清と抗生物質（ペニシリン１００U/ml、ストレプトマイシン０．１mg/ml、及びアンホテリシンＢ１mg/ml）を添加した、ＲＰＭＩ－１６４０（アーヴィン・サイエンティフィック（Irvine Scientific）、アーヴィン、カリフォルニア州）］中で冷蔵輸送し、摘出後１８～２４時間以内に受け取る必要がある。

組織培養

膵臓の消化及び培養は、「Otonkoski et al., Acta Endocrinol. 118: 68（1988）」によ

り記載されたような従来法により行われる。簡単に述べると、組織の断片をコラゲナーゼ、例えばコラゲナーゼＰ（ベーリンガー（インディアナポリス、インディアナ州）の製品）で消化する。平衡塩類緩衝液中で洗浄後、ディスポ（diSPo）（バクスター（マグローパーク、イリノイ州）の製品）のような、１０％ヒト血清を含有するＲＰＭＩ－１６４０培地中で細胞の付着を防止する型の培養培養皿に消化した組織を蒔いて、ヒト血清と抗生物質を添加した完全増殖培地（例えば、ＲＰＭＩ－１６４０）中で培養する。
多変数を試験する場合、何セットかの皿を使用し、１つのセットは対照とし、残りは種々の成長因子を試験するために用いるのが便利である。
患者に移植するための又は他の用途の臨床的に有用な、即ちバルク量の膵島細胞を産生するために、大規模なバイオリアクター中で膵臓細胞を培養することにより細胞収量を増大させることは本発明の範囲に含まれる。「バルク量」とは、症状を軽減又は改善するための多数の患者への移植に適した多数の細胞を意味する。
一般に、このような大規模培養方法において、オプティカル（OPTICAL）（商標）培養系、モデル５３００Ｅ（チャールズ・リバー研究所（Charles River Labs.）；ウィルミントン；マサチューセッツ州）、又はセルマックス（CELLMAX）（商標）クアッド（QUAD）細胞培養系（セルコ社（Cellco, Inc.）；ジャーマンタウン、メリーランド州）のような商業規模のバイオリアクターに、ヒト膵臓細胞の初代培養を接種する。このバイオリアクターは、適切な有効濃度のＨＧＦ／ＳＦ（例えば、１０ng/ml）を添加した適切な完全増殖培地で灌流する。そしてβ上皮細胞を含有する膵島様クラスターが回収される。細胞は、例えば、「Beattie et al., Transplantation 56: 1340（1993）」に記載されるように、使用前に低温保存しておくことができる。

細胞外マトリックス上の単層培養

培地中で浮遊している３次元ＩＣＣとして増殖したヒト膵臓β細胞においてＨＧＦ／ＳＦは強力な分裂促進作用及び分化作用を誘導しうるが、意外なことに、ある種の細胞外マトリックス上での単層としてのこのような細胞の増殖と、ＨＧＦ／ＳＦによるこのような培養物の処理との組合せが、相互依存的に分裂促進作用を増大させる（マトリックス又は成長因子の非存在下で増殖させたＩＣＣで観察されるより１０倍高い作用）ことを本発明者らは見い出した。細胞をマトリックス上で培養する時、マトリックスがない場合に比べて３倍もの分裂促進作用の上昇が観察される。成長因子と組合せて細胞外マトリックス上で増殖させた細胞から生成したＩＣＣはまた、大きく増加した上皮細胞及びβ細胞含量を示す。細胞外マトリックス上での単層培養としての胎児又は成熟膵臓細胞の増殖は、本発明による極めて好適な方法である。
また、ＨＧＦ／ＳＦと細胞外マトリックスの組合せの相互依存的効果は、胎児ヒト膵臓細胞に限定されず、成熟ヒト膵臓細胞でも観察することができ（以下の実施例を参照のこと）、従って組織の代替供給源を提供するということも重要である。
好適な細胞外マトリックスはラット膀胱癌細胞株８０４Ｇ（Langhofer et al., J. Cell Science 105: 753（1993）参照）、及びＢＣＥＭウシ角膜内皮細胞（Gospdarowiczら, 細胞培養：分子及び細胞生物学の方法（Cell Culture: Methods For Molecular And Cell Biology）、Barnesら編、Alan R. Liss、ニューヨーク、1984、275-295ページを参照のこと）からの周知の細胞外マトリックスである。しかし、８０４Ｇ及びＢＣＥＭの機能的性質を示す他の細胞外マトリックスは本発明の範囲に含まれる。マトリックスは、例えば「Hayek et al., In vitro 25: 146（1989）」により以前に記載されたようにして調製することができる。
細胞外マトリックスの使用の具体的な例は、以下の実施例で示されるが、一般には、上記及び実施例中に記載されるように、最初に浮遊ＩＣＣを膵臓からペトリ皿で調製する。大きさが均一で（一般に、直径５０～７０μm）均質な半透明な外観の選択されたＩＣＣを用手的に採取し、細胞外マトリックスで被覆された培養培養皿上の１０％ヒト血清を含有するＲＰＭＩ－１６４０中に蒔く。こうして選び取ったＩＣＣは、非常に上皮細胞に富んでいる。所定の時点（典型的には増殖５日後）で、非酵素的解離用培地（シグマ社（Sigma Corp.）、セントルイス、ミズーリ州）を使用して単層細胞をマトリックスから取り出

し、単一細胞懸濁液として分散させて洗浄し、次いで再集合させる。
胎児膵臓細胞は、初代培養として、細胞外マトリックス上の単層として、又は再集合した単層細胞として、インスリン遺伝子を促進制御する生物化学剤と接触させることにより、インスリン遺伝子を促進制御し、それによりインスリン産生を大きく増加させることができる。ニコチンアミド又はベンズアミドのようなポリ（ＡＤＰ－リボース）合成酵素阻害剤は、典型的には約１０mMの濃度で、本発明の非常に好適なインスリン遺伝子促進制御剤である。これに関して、単独、又はインスリンと一緒のニコチンアミドが、ヒト及び動物モデルにおけるＩ型糖尿病の治療として検討されていることは興味深いが、結果は不明瞭である。例えば「ニコチンアミド：糖尿病予防における生物学的作用と治療的可能性、国際糖尿病免疫療法グループのワークショップ（Nicotinamide: biological actions and therapeutic potential in diabetes prevention, A workshop of the International Diabetes Immunotherapy Group）」の「糖尿病におけるニコチンアミドに関するセッション（Session on Nicotinamide In Diabetes）、コペンハーゲン、1992年12月4-5日、要約集」を参照のこと。ポリ（ＡＤＰ－リボース）合成酵素の他の特異的阻害剤は、「Banasikらの、ポリ（ＡＤＰ－リボース）合成酵素の特異的阻害剤（Specific Inhibitors of Poly（ADP-ribose）Synthetase）」、「Poirierら編の、ＡＤＰ－リボシル化反応（ADP-ribosylation reactions）、表1-5、pp344以下、シュプリンガー・フェアラーク（Springer Verlag）、ニューヨーク、1992」に列挙されている。
次に、再集合した単層細胞は、こうして数を増大させた膵島細胞集団の、試験動物モデル又は患者への移植のための調製物にして、ペトリ皿に移される。
膵島細胞の移植
新たに摘出したか又は低温保存した、処理した膵臓細胞、特に膵島様細胞クラスターを形成するよう誘導した細胞は、糖尿病の患者又は実験モデルに注入するのに適した薬剤担体中に入れることができる。例えば、細胞は、薬剤担体に懸濁する前に、１～１０％ヒト血清アルブミンを添加したＲＰＭＩ－１６４０培地又は２～３％ヒト血清アルブミンを添加したＣＭＲＬ－１０６６培地で洗浄する。（適切な懸濁液についてレミントンの製剤学（REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES）を参照のこと）。次に細胞をヒト患者に注入するため６０mlシリンジなどのシリンジに充填する。例えば、全て上で引用したScharpら（1991）；Warnockら（1991）；及びRicordiら（1992）を参照のこと。患者への細胞の注入のための適切な経路は、門脈内、脾臓内、腎被膜下腔（renal subcapsular space）及び静脈内経路を含む。腎臓は比較的免疫が免除されている（immunoprivileged）部位であり、この部位の移植は内分泌学的破壊を受けにくいため、腎臓の経路が好適である（Anderssonet al., Transplantation Revs. 6: 20（1992））。
インビトロインキュベーション条件
ＩＧＦ－Ｉ、ＩＧＦ－II又はＰＤＧＦ以外の全ての成長因子で１０％ヒト血清を使用することが好ましく、ＩＦＧ－Ｉ、ＩＧＦ－II又はＰＤＧＦでは、１％ヒト血清、トランスフェリン及びウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）を添加することが好ましい。増殖培地は、適切な間隔、好適には約３日のインキュベーションで交換される。
接種後適切な時点で細胞増殖の程度を測定することが必要な場合は、［メチル－^{3}Ｈ］－チミジン（アマシャム（Amersham）；アーリントン、イリノイ州）を各培養容器に添加して、細胞の放射活性の上昇を追跡することができる。
丸い細胞集合体（ＩＣＣ）を採取して実体顕微鏡下で計測することができる。更なる分析用に細胞を回収するために、これらのＩＣＣを皿中の残りの細胞（以下の実施例に記載されるように短時間の低速の遠心分離により単離される）と合わせることができる。合わせた細胞を平衡塩類緩衝液（例えばＨＢＳＳ）で洗浄後、細胞を超音波分解し、ＤＮＡ含量を測定（例えば、「Hinegarden, Anal. Biochem. 39: 192（1971）」により記載される蛍光測定法により）し、細胞超音波分解物のエタノール抽出物で、例えばＲＩＡ（DPC；ロサンゼルス、カリフォルニア州）により、従来法でインスリン含量を測定する。放射活性チミジンの取り込みは、液体シンチレーション計測により測定することができる。
生物活性ペプチド及び抗体

組換えヒトＩＧＦ－Ｉ及びＩＧＦ－II（１００ng/ml）は、カリフォルニア大学サンディエゴ校（University of California at San Diego）（ラホイア（La Jolla）、カリフォルニア州92037）のウィッティアープログラム（The Whittier Program）により得られる。コラボラティブ・リサーチ（Collaborative Research）（ベッドフォード、マサチューセッツ州）は、組換えヒトＰＤＧＦ（１０ng/ml）、７ｓ ＮＧＦ（１００ng/ml）、及びマウスＥＧＦ（２５ng/ml）の供給元である。組換えヒトＴＧＦ－α（２５ng/ml）はシグマ社（Sigma）（セントルイス、ミズーリ州）の製品である。

組換えヒトＨＧＦ／ＳＦ（２５ng/ml）は、以下の通りバキュロウイルス発現系により産生される：

昆虫細胞系スポドプテラ・フルギペルダ（Spodoptera frugiperda）（Ｓｆ９）は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（American Type Culture Collection）から入手して、エクセル４００（EXCELL 400）（ＪＲサイエンティフィック）無血清増殖培地中で２７℃で培養した。アウトグラフィカ・カリフォルニカ（Autographica californica）ウイルス（ＡｃＮＰＶ）は、サマーズ博士（Dr. M. Summers）（テキサスＡ＆Ｍ大学（Texas A&M University）から入手することができる。Ｓｆ９細胞は、蛋白発現研究用に≧１０プラーク形成単位／細胞の感染粒子の多重度で感染させ、保存用ウイルス作成用には０．１～１０pfu/細胞で感染させる。バキュロトランスファーベクターｐＶＬ９４１は、「Luckow et al., Virology 170: 31（1989）」により作成することができる。ヒトＨＧＦ／ＳＦ ｃＤＮＡをｐＶＬ９４１に挿入するため、ＢａｍＨ１制限酵素標識したオリゴヌクレオチドプライマーを使用してポリメラーゼ・チェーン反応（ＰＣＲ）によりＨＧＦ／ＳＦの完全長コード領域を作成する。ＰＣＲ増幅した生成物をＢａｍＨ１で切断してバキュロウイルスベクターｐＶＬ９４１のＢａｍＨ１部位にサブクローン化する。リン酸カルシウムトランスフェクションによりＡｃＮＰＶ ＤＮＡ（１mg）とｐＶＬ－ＨＧＦ（２mg）でＳｆ９昆虫細胞を同時トランスフェクションすることにより組換えバキュロウイルスを作成した。生じた培養上清液は、４日後に回収し、肉眼検査、及び^{32}Ｐ標識しニックトランスレーションを行ったＨＧＦ ｃＤＮＡプローブを用いたドットブロットハイブリダイゼーションにより、相同組換えについてスクリーニングする。精製された組換えバキュロウイルスは、３回のプラーク精製後得ることができる。組換えＨＧＦ／ＳＦの発現のため、Ｓｆ９細胞に、エクセル４００のような培地中で３日間増殖させた組換えバキュロウイルスを感染させた。生じた調整培地を回収し、１０００×ｇで１０分間の遠心分離により清澄化し、－２０℃で凍結保存する。続いて、この培地を解凍し、限外濾過（ＹＭフィルター、カットオフ１０kDa、アミコン（Amicon）により濃縮する。濃縮物中の組換えＨＧＦ／ＳＦは、本質的に既に記載されているように、ヘパリン親和性クロマトグラフィーにより精製することができる（Rubin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 415（1991））。

組換えヒトＦＧＦ－２（５０ng/ml）は、「Isaachi et al.,上記引用文献88: 2628（1991）」により作成される。組換えヒトＫＧＦ／ＦＧＦ－７（５０ng/ml）は、「Ron et al., Ｊ. Biol. Chem. 268: 2984（1993）」により産生される。

モノクローナル抗－ＩＧＦ－１受容体（２μg/ml）は、オンコジーン・サイエンス（Oncogene Science）（ユニオンデール、ニューヨーク州）から入手され、ニワトリ抗ヒトＴＧＦ－β（５μg/ml）はＲ＆Ｄシステムズ（ミネアポリス、ミネソタ州）から入手される。

免疫組織化学及び形態計測

ＩＣＣは、ブロモデオキシウリジン（「ＢｒｄＵ」）と共にインキュベートし、ホルムアルデヒド中で固定し、パラフィンに包埋して切片にすることができる。切片は、例えば、「Erber et al., Am. J. Clin. Path. 88: 43（1987）」に記載されている免疫アルカリホスファターゼ法を使用して、一次抗体としてポリクローナルモルモット抗ブタインスリン（ケミコン（Chemicon）；エルセクンド、カリフォルニア州）を使用してインスリンを染色することができる。

ＤＮＡ合成の間にＢｒｄＵを取り込んだ細胞核は、マウスモノクローナル抗ＢｒｄＵ（ダコ（Dako）；カーピンタリア、カリフォルニア州）を使用して同定し、「Sternberger et

al., J. Histochem., Cytochem. 18: 315（1970）」の免疫過酸化物法で検出し、続いてヘマトキシリンでカウンター染色することができる。
上皮細胞は、一次抗体としてマウスモノクローナル抗上皮抗原抗体（Ｂｅｒ－ＥＰ４、ダコ、上記）を使用して別の切片で同定することができる。
全ＩＣＣ面積に対するパーセント数として計算されるインスリン陽性及び上皮細胞の表面積は、コンピュータによる画像解析機（アメリカン・イノヴィジョン（American Innovision）；サンディエゴ、カリフォルニア州）で定量することができる。ＢｒｄＵ標識指数の測定にも同じ方法を使用することができる。またインスリン及びＢｒｄＵの両方に陽性の細胞は、同じ標本の別の切片で、２つの抗原の二重染色により記録することができる。
平均細胞サイズは、核の数に対する全ＩＣＣ面積の比により計算することができる。
平均β細胞サイズは、個々のインスリン陽性細胞の表面積を測定することにより概算することができる。
標本の生物学的及び実験的変動を修正するため、各標本について充分な数のＩＣＣ切片（少なくとも１５個）及び核（少なくとも１０００）を分析すべきである。
ＩＣＣ自体に、又は増殖培地中に使用される市販のヒト血清中に存在しうる、サイトカインＴＧＦ－βは、胎児膵臓細胞の増殖及び分化に対して有害な作用を有することが観察されている。この有害な作用は、以下の実施例４に記載されるように、中和濃度の抗－ＴＧＦ－β抗体を培地に添加することにより回避することができる。
キット
別の区画に、低温保存した、ＨＧＦ／ＳＦで処理して数を増大させたヒト膵臓細胞培養物、これに加えて１つ以上の追加成分（例えば、ＨＧＦ／ＳＦ、細胞外マトリックス、ポリ（ＡＤＰ－リボース）合成酵素阻害剤（例えば、ニコチンアミド）のようなインスリン遺伝子促進制御剤、及び被験者における処理及び使用のため細胞を懸濁するための薬剤学的に許容しうる担体）を含有する、市販用のキットが本発明の範囲に含まれる。
本発明は以下の説明のための実施例により更に記載されるが、これらは本発明の範囲を限定するものと解釈してはならず、本発明の範囲は本明細書及び添付した請求の範囲により定義される。
実施例１
ＩＣＣの作成
膵臓を周囲の組織から切開して取り出し、４等分に切断した。次に組織を水きりし、秤量し、小片（１mm^3）に切断した。振盪水浴（３７℃、２００振動／分）中で、５．５mg/mlコラゲナーゼＰを含有するハンクス平衡塩類液（「ＨＢＳＳ」中で断片を１５分間消化した。消化した組織を冷ＨＢＳＳ中で２回洗浄して、１０％ＨＳＡ及び抗生物質を含むＲＰＭＩ１６４０中で、細胞の付着を促進する型の６０mmペトリ皿に蒔いた（１/４膵臓／皿）。皿の一つを対照とし、成長因子類をその他の皿に添加した。上述のように、ＩＧＦ－Ｉ、ＩＧＦ－II又はＰＤＧＦの場合には、培地のヒト血清アルブミン含量を１％に低下させ、培地に１０μg/mlトランスフェリン及び０．１％ＢＳＡを添加した。培地（添加したもの）は、３日後に交換した。
５日目に、０．５μCi/mlの標識チミジン（５．０Ci/mmol）を各皿に添加した。１６時間のインキュベーション後、全ての充分に形成した丸い細胞集合体（ＩＣＣ）を採取して上述のように計測した。
１０％ＨＳＡ中の対照培養物から回収したＩＣＣの平均数は、出発組織１mgにつき１３．４個であった（表１）。組織の収量は、妊娠齢に影響されなかった。３８３個の膵臓の分析に基づき、膵臓の平均重量は、１８週齢で１０２mgであり２４週齢で２４７mgであった。このことは、この週齢範囲ではＩＣＣの平均収量が膵臓当り１４００～３３００個であったことを示唆する。収量は、１％ＨＳＡで僅かながらも有意に低い（９．２対１３．４ＩＣＣ／mg、表１）。
実施例２
ＩＣＣの収量に対する成長因子の効果
ＩＣＣ収量に対して刺激作用を有する成長因子には、表１に示される濃度のＨＧＦ／ＳＦ

、ＩＧＦ－II、ＦＧＦ－２及びＦＧＦ－７が含まれた。ＴＧＦ－α、ＥＧＦ、ＮＧＦ、ＩＧＦ－Ｉ及びＰＤＧＦの効果は有意でなかった。ＴＧＦ－βは、試験した他の因子とは異なり、強力な阻害効果を有していた（表１）。この潜在的な問題は、培地に抗－ＴＧＦ－β抗体を添加することにより回避することができる。

最も強力な刺激性成長因子は、ＨＧＦ／ＳＦであった（ＩＣＣ数が約３倍増加）。ＨＧＦ／ＳＦの存在下で形成されたＩＣＣは、一般に対照に比べてより透明で丸かった。

ＦＧＦ－２はＨＧＦ／ＳＦとほぼ同じ程度に強力なＩＣＣ形成の刺激物質であった（約２．６倍増加）が、これは、ＩＣＣの２つの異なる型［小さい半透明のＩＣＣ（免疫染色により大部分が上皮であることが判った）、及び主に非上皮細胞を含有する大きな密度の高いクラスター］の形成を誘導するようであった。ＦＧＦ－７は最も作用が低かった。

全細胞を回収するために、ＩＣＣを、皿から８００×ｇで３分間の遠心分離により単離した小さい細胞ペレットと合わせた。ＨＢＳＳ中で２回洗浄後、細胞を超音波分解によりホモジナイズした。ＤＮＡを蛍光測定法により分析した（上記参照）。

平均ＤＮＡ含量／ＩＣＣに有意な差はなかった（対照の平均３４ng／ＩＣＣ）。全細胞数の概算としてのＤＮＡの総量は、ＩＣＣから計算した結果をよく反映していた（表１）。

培養期間の終わりに^{3}Ｈ－チミジン取り込みにより測定した全ＤＮＡ合成は、ＩＣＣ数及びＤＮＡ含量から得られた結果と近似していた。

表１：ICCの収量、DNA含量及びインスリン含量に対する成長因子の効果

培養条件	N	ICCの数 (組織1mg当たり)	DNA含量 (組織1mg当たり)	インスリン含量 (組織1mg当たり)	インスリン含量 (DNA 1mg当たり)
10% HS	41	13.4(11.3-15.4)	409 ng(335-483)	0.8pmol(0.6-1.1)	2.9 pmol(1.6-4.2)
		(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
FGF-2 50 ng/ml	11	265(160-371)**	302(200-404)**	187(120-254)*	70(44-97)*
FGF-7 50 ng/ml	9	131(113-150)**	166(107-224)*	95(68-122)	54(34-74)**
HGF/SF 25 ng/ml	9	308(113-503)*	233(120-346)*	280(178-381)**	165(100-230)*
TGF-α 25 ng/ml	6	192(94-289)	150(92-209)	144(68-220)	95(71-120)
EGF 25 ng/ml	6	136(82-190)	137(46-228)	188(51-383)	120(73-167)
TGF-β 10 ng/ml	6	43(26-61)***	44(16-72)**	147(25-268)	360(150-571)*
NGF 100 ng/ml	8	121(88-155)	107(62-204)	186(40-353)	145(72-217)
1% HS	12	9.2(6.9-11.2)	323 ng(216-407)	0.5 pmol(0.3-0.8)	2.0 pmol(0.7-3.2)
		(100%)	(100%)	(100%)	(100%)
IGF-I 100 ng/ml[1]	7	148(90-207)	147(87-209)	174(100-250)*	127(86-167)
IGF-II 100 ng/ml[1]	7	155(103-206)*	135(84-187)	145(91-197)	115(60-171)
PDGF 10 ng/ml[1]	9	149(78-219)	147(62-232)	133(44-223)	115(50-180)

膵臓を４分割して対照培地又は実験培地で６日間培養した。組織重量は培養前の元の重量を意味し、DNA含量は培養後の最終含量を意味する。対照に関しては絶対値が示され；成長因子の効果は個々の各対照に対するパーセント数として示される（平均値及び95%信頼区間）。

1%ヒト血清中で培養（他の成長因子は全て10%血清中で使用）

(1標本両側t検定で仮定される集団平均値（=100）と比較)

実施例３

インスリン含量に対する成長因子の効果

インスリンは、＋４℃で１６時間の酸性エタノール抽出後、市販の固相ＲＩＡキットにより測定した。測定変動係数は、１３６及び２８μU/mlインスリンを含有する対照試料について各々８．３及び１２．２％であった。

試験した大部分の成長因子は、細胞の全インスリン含量に対して効果がなかった。この点に関してインスリンの全含量を増加させた因子は、ＨＧＦ／ＳＦ、ＦＧＦ－２及びＩＧＦ

－Ｉのみであった。ＨＧＦ／ＳＦは、明らかに最も強力であり、１８０％増加させた。ＨＧＦ／ＳＦとＦＧＦ－２の間には根本的な違いが観察された；ＦＧＦ－２では実際には単位ＤＮＡ当りの平均インスリン含量を３０％減少させたのに対して、ＨＧＦ／ＳＦでは同じパラメーターを６５％増加させた（表１、図１）。ＦＧＦ－７は、ＦＧＦ－２に比較して更に強力にＤＮＡ当りのインスリン含量を減少させた。

全インスリン含量は、ＴＧＦ－βには影響されなかったが、この因子により引き起こされる全ＤＮＡの劇的な減少の結果として、ＤＮＡ当りのインスリン含量は３．６倍増加した（表２、図１）。

実施例４

抗体の効果

予想されるように、中和ＴＧＦ－β抗体は、抗原自体の効果と反対の効果を有しており、これは、ＩＣＣ又は血清含有培地がＴＧＦ－βの供給源であり得ることを示唆している。ＴＧＦ－β抗体により、ＩＣＣ収量は増加し、ＤＮＡ合成は刺激された。また全インスリン含量は６１％増加した（表２）。

表２：培養５日後のICCの発生、DNA合成及びインスリン含量に対するポリクローナルTGF-β抗体とモノクローナルIGF-1受容体抗体の効果

	抗-IGF-R（n=3）	抗-TGF-β（n=5）
組織1mg当たりのICC収量	64(32-86)*	183(145-221)**
組織1mg当たりのDNA収量	82(6-169)	196(62-330)
3H-チミジン取り込み		
組織1mg当たり	70(0-161)	173(101-251)*
DNA当たり	84(25-141)	96(66-124)
インスリン含量		
組織1mg当たり	89(0-239)	161(99-224)*
DNA当たり	107(0-217)	106(17-194)

データは同一の膵臓に由来する、10％HSを含有する培地で抗体を添加することなく培養した、対照ICCに対するパーセント数として示される（平均値及び95％信頼区間）。

*，**，p<0.05，0.01，1群t検定（母集団平均値=100）

外因性のＩＧＦの比較的弱い効果が、内因性のＩＧＦの存在によるものであるかどうかを試験するために、ＩＧＦ－Ｉ受容体を中和抗体でブロックした。ＴＧＦ－β抗体の効果とは対照的に、ＩＣＣ数の有意な（３６％）減少があったが、ＤＮＡ合成やインスリンレベルには影響がなかった（表２）。

実施例５

形態計測

ＩＣＣに含まれる細胞集団に対する効果について、３つの最も強力な成長因子（ＨＧＦ／

ＳＦ、ＦＧＦ－２及びＴＧＦ－β）を試験した。培養７日後の上皮細胞含量に基づき、ＨＧＦ／ＳＦのみが上皮細胞の増殖を明らかに刺激した。対照的には、ＦＧＦ－２又はＴＧＦ－βと一緒の培養後は、上皮細胞の割合は５０％低かった（表３）。上述のデータと考え合わせると、ＦＧＦ－２は主に非上皮細胞の増殖を刺激し、ＴＧＦ－βの増殖阻害作用は主に上皮細胞を標的としていたことが示唆される。ＦＧＦ－２で処理した培養物において、非上皮細胞は主に、比較的小さな細胞よりなる大きな（＞１００μｍ）丸い細胞クラスターに見い出され、一方ＴＧＦ－βで処理した培養物では、非上皮細胞がしばしば中央部に不定形な細胞クラスターで見られ、周辺部には上皮及びインスリン陽性細胞が見られた。

対照培養物において、インスリン染色は、通常ＩＣＣ内に散在する陽性細胞の単一細胞又は小さい群で見い出されたが、場合によっては、染色はＩＣＣから伸び出しているような細胞群で見い出された。ＨＧＦ／ＳＦで処理したＩＣＣでは、これらのインスリン陽性の伸び出たものに、より普通に遭遇した。インスリン陽性細胞は、対照ＩＣＣの切片において全細胞表面積の４％を占めた。ＦＧＦ－２及びＴＧＦ－βで処理したＩＣＣは、対照と差がなかったが、一方ＨＧＦ／ＳＦで処理したＩＣＣのインスリン陽性面積は２．３倍高かった（９．４％対４．０％、ｐ＜０．０１；表３）。平均細胞サイズはＨＧＦ／ＳＦ処理及び対照ＩＣＣにおいて差はなかった（各々６２．１対６９．３μm^2）。これらの細胞のわずか１０％未満のみがβ細胞であったため、個々のインスリン陽性細胞のサイズも測定した。インスリン陽性細胞の平均サイズは、平均細胞サイズより１．６倍大きかった。また、ＨＧＦ／ＳＦ処理細胞及び対照細胞の間に差はなかった（各々１１０対１０８μm^2）。

ＦＧＦ－２で処理したＩＣＣのＢｒｄＵ標識は、対照よりほぼ２倍高かった（６．９対３．７％、ｐ＜０．０５、表３）。ＨＧＦ／ＳＦで処理したＩＣＣの標識は、ＦＧＦ－２処理に近い高さであった（６．３％）。ＴＧＦ－βで処理したＩＣＣの標識指数は、有意に低く（１．９％、ｐ＜０．０５）、^{3}Ｈ－チミジン取り込みにより得られた結果を確認した。インスリンとＢｒｄＵの両方に陽性の細胞は極くわずかで、対照培養物では全てのＢｒｄＵ標識細胞のわずか２．５％を占めたのみであった。ＨＧＦ／ＳＦでは、インスリン陽性細胞中のＢｒｄＵ標識を著しく増加させた（全ての標識細胞の７．４％、ｐ＜０．０１、表３、図２）。

表３：成長因子と共に６日間培養した後のICC中の細胞集団の形態計測的解析

	対照	HGF/SF	FGF-2	TGF-β
上皮細胞（表面積の%）	55.7±2.0	64.5±2.8	28.3±2.1*	38.6±8.1*
インスリン細胞（表面積の%）	4.04±0.73	9.38±1.14*	3.39±0.78	6.05±1.04
BrdU 標識指数（%）	3.68±0.53	6.34±1.31	6.85±0.96*	1.88±0.29
全 BrdU 細胞中の	10 of 408	27 of 363#	11 of 597	1 of 114
インスリン＋ BrdU 二重陽性細胞	(2.45%)	(7.44%)	(1.84%)	(0.88%)

数値は４回の別々の実験の平均値±標準誤差である。ただし、インスリン／ BrdU は４つの切片で検出された核の総数として示される。

群間の有意差は以下の通り示される。
*, $p<0.05$, 対照と比較（一元配置分散分析後のフィッシャーの PLSD 検定）
#, $p<0.01$, 対照と比較（χ二乗検定）

実施例６

移植可能なヒト胎児膵島組織を増加させるためのＨＧＦ／ＳＦの使用

前記実施例で産生した、ＨＧＦ／ＳＦ又はＦＧＦ－２で誘導したＩＣＣ（５００）及び５００個の対照ＩＣＣを無胸腺ヌードマウスの腎被膜下に移植した。処理したクラスターは、グルコース試験へのヒトＣ－ペプチド応答（両者とも対照に対してＨＧＦ／ＳＦ、５．０倍増加；ＦＧＦ－２、１．９倍増加）により判定されるように、機能性膵島組織に発達した。しかし、血清Ｃ－ペプチドの絶対レベル及び応答は、ＦＧＦ－２処理移植片で有意（ｐ＜０．０１）に低く、一方ＨＧＦ／ＳＦ処理移植片は、機能的にも形態学的にも正常対照と同一であった。

即ち、移植を目的としたヒト胎児膵臓細胞のＨＧＦ／ＳＦ前処理により、移植可能な細胞

量の有意な増加がもたらされる。
従って、混合ヒト胎児膵臓細胞よりなる培養物における分裂促進作用、形態形成作用及び向インスリン作用についてスクリーニングしたペプチド成長因子の中で、ＨＧＦ／ＳＦが、胎児膵臓細胞からのＩＣＣ形成のための最も強力な刺激物質であり、そして最も重要なことに、ＨＧＦ／ＳＦが、上皮、β細胞及び細胞のインスリン含量を増加させる唯一の因子であることが見い出された。ＢｒｄＵ実験により、β細胞又はその前駆体に及ぼすＨＧＦ／ＳＦの分裂促進作用が確認された。対照的に、ＴＧＦ－βは膵臓上皮細胞に対する内因性の抗増殖作用を有する。
これらのデータにより、ＨＧＦ／ＳＦが、膵島細胞移植による１型糖尿病の患者の治療に使用するための膵島細胞又はその前駆体の、より豊富でより分化した供給源を作成するために有用であるということが確立された。典型的な方法では、ヒト胎児膵臓細胞の初代培養を、抗－ＴＧＦ－βヒト抗体若しくはヒト化抗体の非存在下又は存在下で、このような培養中のβ細胞が増殖及び分化して、β上皮細胞を高い割合（例えば、５０％）で含有するインスリン産生膵島細胞クラスターになるような条件下で、ＨＧＦ／ＳＦと接触させて、次にこの培養物を非経口的に（例えば、門脈内、脾臓内、腎被膜下又は静脈内経路により）患者に投与する。

実施例７

ＨＧＦ／ＳＦの存在下での８０４Ｇ細胞外マトリックス上での培養によるヒト胎児膵臓細胞のエクスビボの細胞数増大

ヒト胎児膵臓（ＨＦＰ）を、アナトミック・ギフト財団（Anatomic Gift Foundation）（ローレル、メリーランド州）及びアドバンスト・バイオサイエンス・リソーシーズ（Advanced Bioscience Resources）（オークランド、カリフォルニア州）（両方とも非営利機関である）から提供を受けた。組織供与のインフォームド・コンセントをこれらの調達センターから得て、本発明者らのＩＲＢは、これらの研究のための胎児組織の使用を審議して承認した。

ＩＣＣの単離　妊娠１８～２４週の間の頚管拡張術及び遂娩手術による妊娠の終了後、膵臓を得た。妊娠齢は、大横径、大腿骨長及び胎児足の測定を含む幾つかの基準により測定した。温虚血時間は約５分であり、冷虚血時間は約２４時間であった。組織を前述｛９０６｝のように消化して、断片を付着しないペトリ皿中で、１０％のヒトプール血清及び抗生物質（１００U/mlペニシリン、０．１mg/mlストレプトマイシン、及び１μg/mlアンホテリシンｂ）を含有するＲＰＭＩ－１６４０培地中でインキュベートした。肝細胞増殖因子／分散因子（ＨＧＦ／ＳＦ）を１０ng/ml濃度で培養物に添加した。

単層中のＩＣＣからの細胞の細胞数増大　ペトリ皿で２日間培養後、齧歯類（Hayekら，1989，上記文献）及びヒト膵臓細胞（Beattie et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 78 : 1232（1994））について以前に本発明者らが刊行したプロトコールによりＩＣＣから単層を得た。使用したマトリックスは、ＢＣＥＭ又は８０４Ｇであり、「Hayek et al., 1989, 上記文献」により調製した。サイズが均一で（直径５０～７０μｍ）均質な半透明な外観の選択されたＩＣＣを、用手的に採取して、組織培養ペトリ皿単独、又は８０４Ｇ若しくはＢＣＥＭマトリックスのいずれかで被覆したペトリ皿で、１０％ヒト血清を含有するＲＰＭＩ－１６４０中に蒔いた。こうして選択したＩＣＣは、非常に上皮細胞に富んでいる。対照のＩＣＣはペトリ皿に浮遊させたまま残した。幾つかのペトリ皿にはＨＧＦ／ＳＦを種々の濃度で添加した。

細胞数の定量　３０サイクル／分で振盪しながら３７℃の水浴中で解離用培地中でインキュベートすることにより、ＩＣＣの単一細胞懸濁液を作成した。１５分の間をおいて、パスツールピペットで数回粉砕することにより細胞を分散させた。単一細胞を吸引により取り出して、凝集塊が管内に落ち着くのを待って、氷上に維持した。凝集塊の残りがなくなるまで、この方法を繰り返した。血球計で計測する前に、解離用培地を使用してマトリックスからも細胞を取り出した。３つの異なる実験で皿４枚ずつからの細胞を計測した。出発物質の細胞数／ＩＣＣを概算するため、１０回の独立の単離操作による１００個のＩＣＣの単一細胞懸濁液を定量した。

免疫組織化学　単層又は再集合したＩＣＣを４％パラホルムアルデヒド中で固定して、５μの連続切片をヘマトキシリン及びエオシンを使用して染色して、一次抗体としてモルモット抗ブタインスリン（ケミコン（Chemicon）、エルセグンド、カリフォルニア州）又はヒト上皮抗原Ｂｅｒ－ＥＰ４に対するマウスｍＡｂ（ダコ（DAKO）、カーピンテリア、カリフォルニア州）を使用する、免疫アルカリホスファターゼ法を利用した。対照の血清として正常ウサギ又はマウス血清を使用した。免疫染色の定量は、コンピュータによる画像解析系（オンコア（Oncor）、サンディエゴ、カリフォルニア州）を使用して行った。５個の異なる標本の各々で少なくとも１２００個の細胞を試験して、データは、表面積のパーセント±標準誤差として表した。形態学的分析を行う者には、標本が何であるかを知らせなかった。酸性β－ガラクトシダーゼ（β－ｇａｌ）活性は、酸性ｐＨで基質としてＸ－ｇａｌを使用する４時間のインキュベーションにより局在した；この酵素は膵島細胞のマーカーと考えられる。

ホルモンアッセイ　固相ＲＩＡアッセイキット（ダイアグノスティック・プロダクツ（Diagnostic Products）、ロサンゼルス、カリフォルニア州）を使用してインスリンを測定した。標準法により酸性エタノールを使用してインスリンを組織から抽出した。データは、各試料のＤＮＡの蛍光測定により定量化した。

ＲＮＡｓｅ保護アッセイ　以前に報告（Beattieら，1994，上記文献）されたようにＲＮＡ保護アッセイを行った。

統計解析　必要な場合には、データをマッキントッシュ用ソフトウェア（スタットビュー（Statview）IV；アバカス・コンセプツ（Abacus Concepts）、バークレー、カリフォルニア州、米国）で解析した。観察された差の統計的有意性は、有意性の限界として９５％レベルを使用して、分散分析（ANOVA）及びフィッシャーの保護最小有意差検定（Fisher's protected least significance difference test）を使用して検定した。

移植の検討　異なる組織培養処理後、上述のように細胞を無胸腺ヌードマウスの腎被膜下に移植した。５００個のＩＣＣ又は２５０，０００個の単層細胞（５００個のＩＣＣと等価）、又は５００個の再集合したＩＣＣを移植した。３ケ月後、マウスに３g/Kgのグルコースを投与して、ＲＩＡにより血清ヒトＣ－ペプチドを測定した。

ＨＧＦ／ＳＦの存在下でヒト胎児膵臓消化物をペトリ皿中で浮遊培養した時、ＨＧＦ／ＳＦの非存在下での培養と比較して、生成したＩＣＣの数が２～３倍増加した。更には、これらのＩＣＣは、上皮及びβ細胞含量が増加していた。半透明で、均質な外観の均一なＩＣＣ（直径５０～７０μｍ、約４００細胞／ＩＣＣ）を採取したものは更に上皮細胞含量が増加していた。８０４Ｇ又はＢＣＥＭマトリックスのいずれかで被覆した皿に蒔いた後、ＩＣＣは一晩で付着して、単層形成は一般に２４時間で開始した。被覆していない組織培養皿では、付着及び単層形成はほとんどなかった。１週間後、ＨＧＦ／ＳＦ及び８０４Ｇマトリックスの存在下では細胞数が、マトリックス又は成長因子の非存在下で培養したＩＣＣに比較して１０倍に増加した。８０４ｇ単独に蒔いたＩＣＣではマトリックスがない場合に比較して３倍の増加が；ＢＣＥＭ単独の場合と比較して２倍の増加が観察された。マトリックスの非存在下ではＨＧＦ／ＳＦの分裂促進作用は観察されなかった（図３）。ＨＧＦ／ＳＦの分裂促進作用は用量依存的であり（図４）、細胞倍加時間は１０mg/mlの濃度で４６時間であった（図５）。細胞数に比較して単層のサイズが２．５倍増加したことで証明されるように、成長因子の影響下で細胞伸展が観察された（図６）。

インスリン及びグルカゴン遺伝子の転写は、マトリックス上で単層培養している活発に増殖している細胞において抑制制御を受ける。ＨＧＦ／ＳＦの存在下での８０４Ｇマトリックス上での培養後の単層の免疫染色により、数の増大した細胞集団は、インスリンが染色される極く僅かな細胞と共に、酸性β－ｇａｌ（内分泌腺前駆細胞のマーカー）に陽性の事実上全ての上皮細胞から成ることが証明された。これは図７に定量化されている。対照の関与していない上皮抗原であるＥＰ４の産生が、試験した全ての実験条件で同程度であった（図７、下）条件下で、インスリンの量は、未処理の単層（「単層」）で非常に低いが、このような単層細胞が再集合してニコチンアミドで処理されると何倍も大きくなった（「再集合＋ＮＩＣ」）。

細胞集団を１０日間にわたって単層中で数を増大させると、ＤＮＡとインスリン含量の間に反比例関係があった（図８）。ＲＮＡｓｅ保護アッセイによる転写分析では、シクロフィリンシグナルに対して標準化した後、単層中のグルカゴン及びインスリンｍＲＮＡの発現は、浮遊して残っていたＩＣＣの場合に比較して、１０日間で有意に減少したことが示された。ホルモン遺伝子のこの抑制制御は、細胞集団の再集合により一部反転し、以下に記載されるようにニコチンアミドの存在により更に増加しうる。

実施例８

単層細胞の再集合

単層培養の５日後、非酵素的解離用培地（シグマ社（Sigma Corp.）、セントルイス、ミズーリ州）を使用して細胞をマトリックスから取り出した。培地中に分散させて洗浄後、単一細胞懸濁液を以前に記載されているように再集合させた（Roulle r et al., Exp. Cel l Res. 191: 305（1990））。簡単に述べると、細胞をクリオバイアル（ナルゲ社（Nalge Co.）、ロチェスター、ニューヨーク州）中の培地に入れて、４５°の角度で３７℃の水浴に入れて７０サイクル／分で１時間振盪した。次に、細胞集合体をペトリ皿に移した。ニコチンアミド（ＮＩＣ；シグマ社（Sigma Corp.）、セントルイス、ミズーリ州）を１０mMで幾つかの皿に添加した。対照の皿は、実験の全過程でペトリ皿中で浮遊させておいたＩＣＣ、及び再集合していないＩＣＣの単層を含んでいた。

膵島特異的な遺伝子転写は、数の増大した単層の細胞再集合により促進制御を受けた。数の増大した単層からの細胞を再集合させてＩＣＣを形成し、ペトリ皿で５日間浮遊させてインキュベートした時、インスリン及びグルカゴンのｍＲＮＡの発現のレベルは、単層中の細胞よりも有意に増加した。この効果は、この浮遊集合体に１０mMニコチンアミドを添加することにより増強された（図７、９、及び１０）。ニコチンアミドの存在下で５日間培養した再集合したＩＣＣの免疫組織化学的分析により、ニコチンアミドの非存在下で培養した再集合体よりもインスリン含有細胞の表面積が有意に大きい、良好に形成されたＩＣＣが示された。

移植のデータは、図１１に説明される。血中ヒトインスリンＣ－ペプチドの増加により証明されるように、再集合した細胞の移植を受けた無胸腺ヌードマウスの移植片のみが、グルコース投与に応答することができた。

実施例９

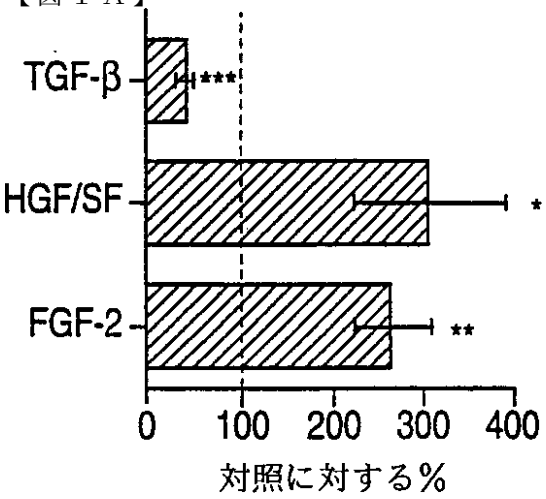
成人ヒト膵臓細胞の増殖に対するＨＧＦ／ＳＦ及びマトリックス８０４Ｇの効果

成人ヒト膵島（ＤＴＺによる純度９０％、２０膵島／ウェル、約１５，０００細胞／ウェル）をＨＧＦ／ＳＦ（１０ng/ml）の非存在下及び存在下で、８０４Ｇマトリックス上で、５．５mMグルコースを含むＲＰＭＩ－１６４０培地中で培養した。１週間後、細胞数を測定した。

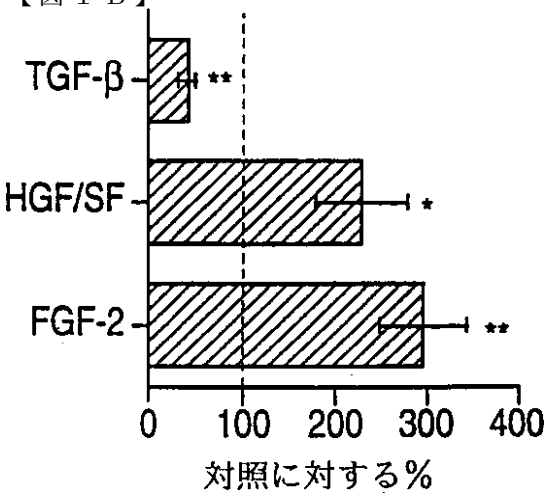
対照	＋ＨＧＦ／ＳＦ
14,000	21,000
14,000	23,000
19,000	23,000

これらの実験から、成人ヒト膵臓上皮細胞は、サイトカインとの接触後マトリックス上の単層で増殖することが明白である。しかし、この作用は胎児膵臓細胞ほど充分なものではない。

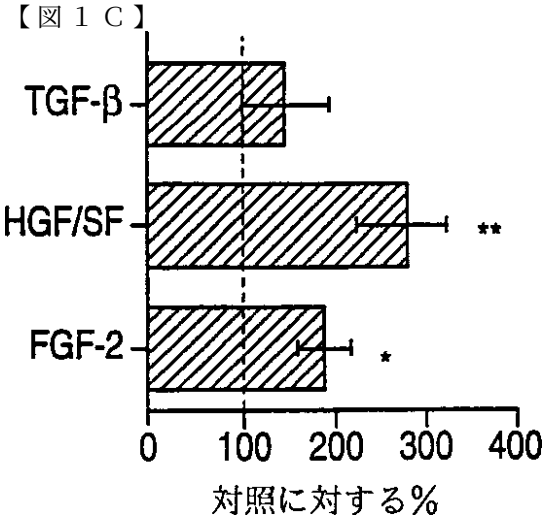
【図１Ａ】



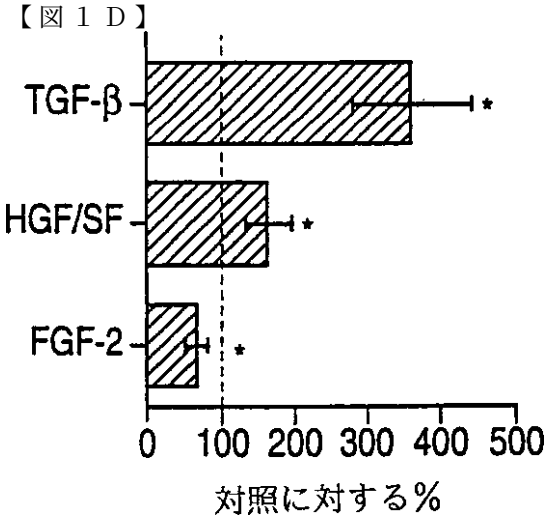
【図１Ｂ】



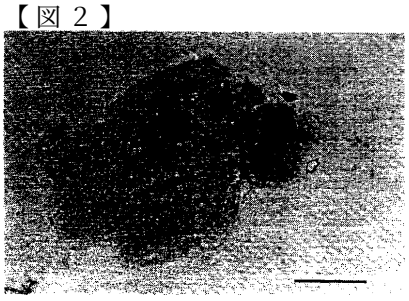
【図１Ｃ】



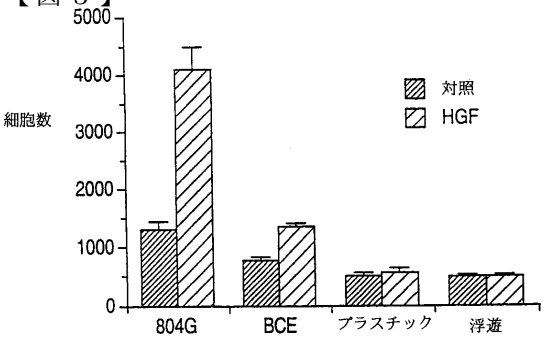
【図１Ｄ】



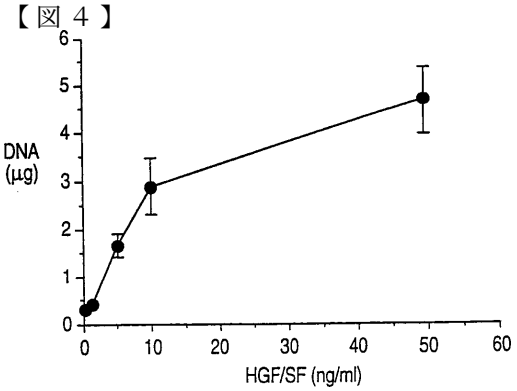
【図２】



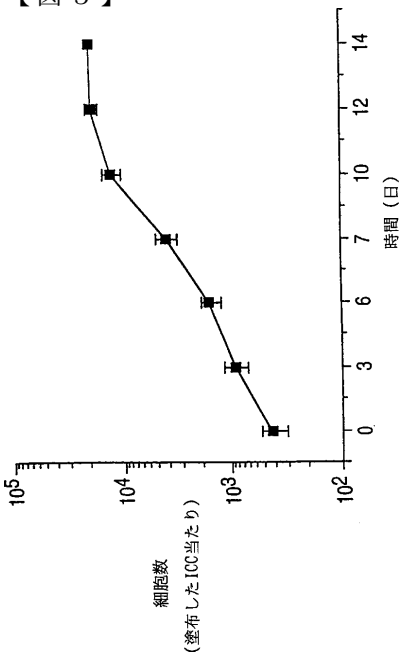
【図３】



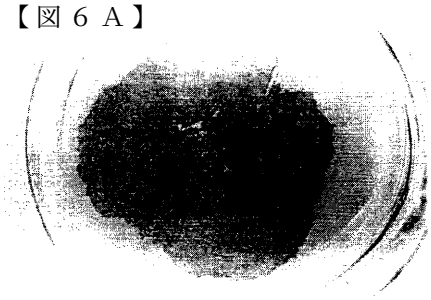
【図４】



【図５】



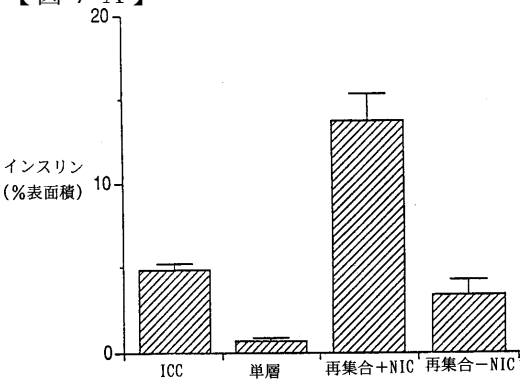
【図６Ａ】



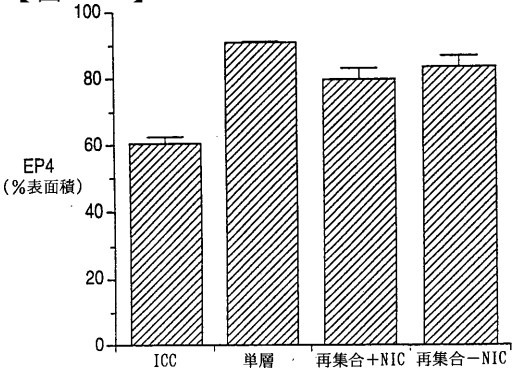
【図６Ｂ】



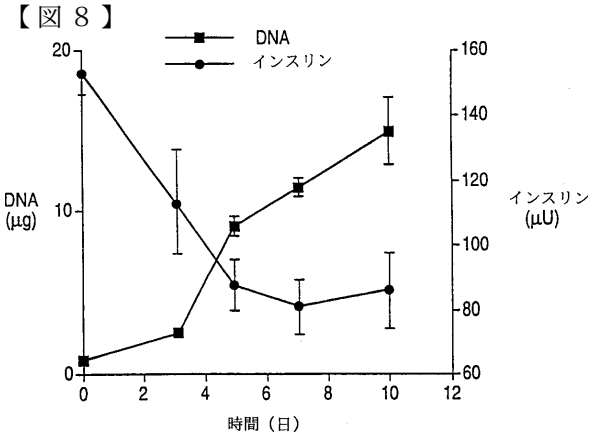
【図７Ａ】



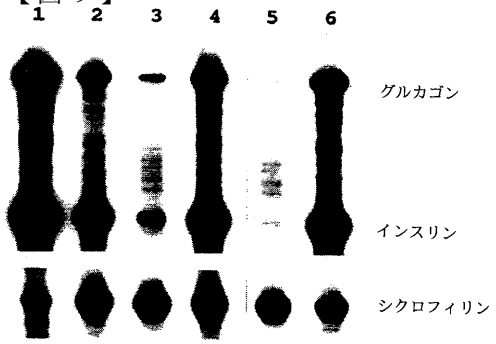
【図７Ｂ】



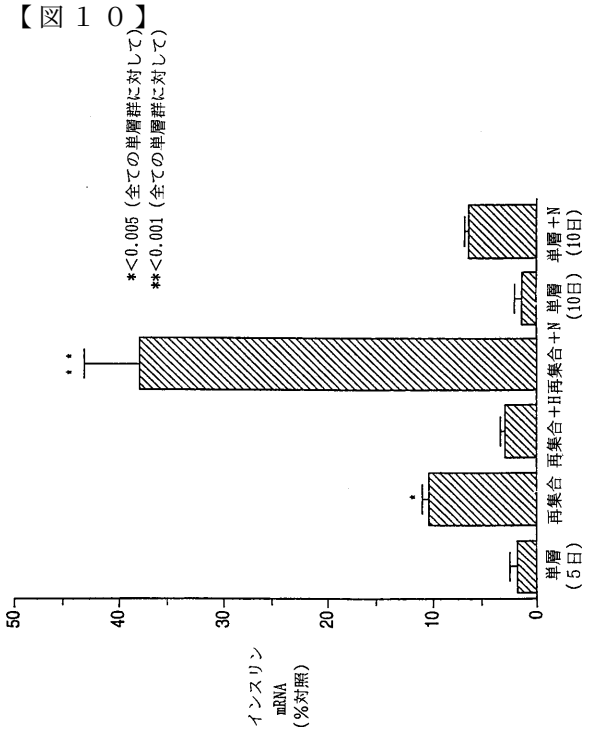
【図８】


DNA
インスリン
DNA (μg)
インスリン (μU)
時間（日）

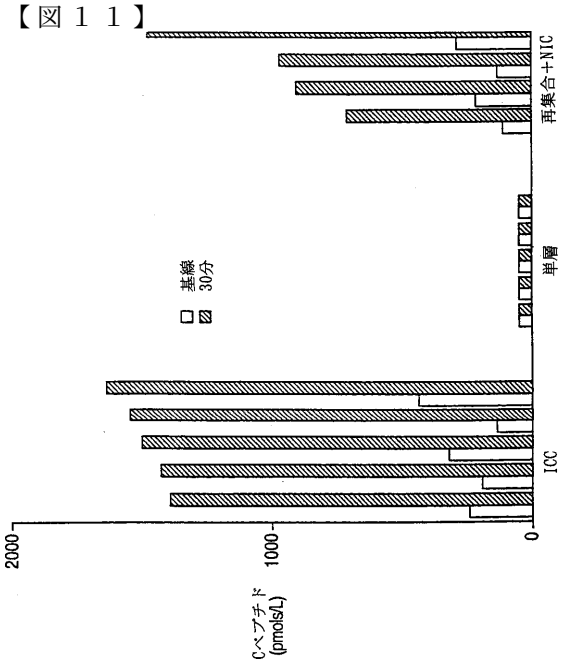
【図９】


1
2
3
4
5
6
グルカゴン
インスリン
シクロフィリン

【図１０】


*<0.005（全ての単層群に対して）
**<0.001（全ての単層群に対して）
インスリン mRNA (%対照)
単層（5日）
再集合
再集合+H
再集合+N
単層（10日）
単層+N（10日）

【図１１】


基礎
30分
ICC
単層
再集合+NIC
Cペプチド (pmols/L)

フロントページの続き

(73)特許権者
ザ ホゥイッティアー インスティテュート フォア ダイアベイツ アンド エンドクリノロジー
アメリカ合衆国 カルフォルニア州 ラ ジョラ ジェネシー アヴェニュー ９８９４
(74)代理人
弁理士 清水 初志
(72)発明者 ルビン ジェフリー
アメリカ合衆国 メリーランド州 ロックビル ブリアーウッド テラス １４４０５
(72)発明者 オトンコスキー ティモ ピリ ジュアニ
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ラ ジョラ フレスコ カミニト ８９５６
(72)発明者 ビアッティ ジィリアン エム.
アメリカ合衆国 カルフォルニア州 ポーウェイ セージウッド ドライヴ １３６１５
(72)発明者 ハイェイク アルベルト
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ラ ジョラ ノッティンハム プレース ８８２１
(72)発明者 クァランタ ヴィト
アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ラ ジョラ ノッティンハム プレース ８８６１

審査官 長井 啓子

(56)参考文献 国際公開第９４／００４１６９（WO, Ａ１）
特表平０１－５００９５７（ＪＰ, Ａ）
J.Clin.Invest.,Vol.92,No.3(1993)p.1459-1466
Transplantation,Vol.56,No.6(1993)p.1340-1343
Diabetes,Vol.34,No.11(1985)p.1113-1119
TSUDA,H. et al., Jpn.J.Cancer Res., vol.83, pp.1262-1266 (1992)

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
C12N 5/06
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)