

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5474559号
(P5474559)

(45) 発行日 平成26年4月16日 (2014. 4. 16)

(24) 登録日 平成26年2月14日 (2014. 2. 14)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 5/077 (2010. 01)

C 1 2 N 5/00 2 O 2 G

C 1 2 N 5/07 (2010. 01)

C 1 2 N 5/00 2 O 2 Z

A 6 1 K 35/39 (2006. 01)

A 6 1 K 35/39

A 6 1 K 35/28 (2006. 01)

A 6 1 K 35/28

A 6 1 P 3/10 (2006. 01)

A 6 1 P 3/10

請求項の数 15 (全 26 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-538403 (P2009-538403)
 (86) (22) 出願日 平成19年11月20日 (2007. 11. 20)
 (65) 公表番号 特表2010-509936 (P2010-509936A)
 (43) 公表日 平成22年4月2日 (2010. 4. 2)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/024258
 (87) 国際公開番号 W02008/063640
 (87) 国際公開日 平成20年5月29日 (2008. 5. 29)
 審査請求日 平成22年11月22日 (2010. 11. 22)
 (31) 優先権主張番号 60/860, 637
 (32) 優先日 平成18年11月21日 (2006. 11. 21)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

前置審査

(73) 特許権者 504332366
 ロジャー・ウィリアムズ・ホスピタル
 アメリカ合衆国、ロード・アイランド州
 O 2 9 0 8、プロビデンス、チョークスト
 ーン・アベニュー 8 2 5
 (74) 代理人 100102668
 弁理士 佐伯 憲生
 (74) 代理人 100147289
 弁理士 佐伯 裕子
 (74) 代理人 100158872
 弁理士 牛山 直子
 (72) 発明者 ルオ, ルガン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O
 2 7 7 1 シーコンク カウンティ・スト
 リート 3 4 9

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 臍島細胞の長期培養のための骨髄細胞の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

臍島 細胞をインビトロで骨髄細胞と少なくとも 3 0 日の持続期間で培養することを含有してなる、臍島 細胞を培養する方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法により臍島 細胞を培養することを含有してなる、インビトロで臍島 細胞を増殖する方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法により臍島 細胞を培養することを含有してなる、臍島 細胞の生存能力を増大し、臍島 細胞の機能を改善し、及び / 又は臍島 細胞の形態を改善する

10

【請求項 4】

持続期間が少なくとも 6 0 日、少なくとも 9 0 日又は少なくとも 1 2 0 日である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

臍島 細胞を骨髄細胞と培養することが、骨髄細胞の非存在下で培養された臍島 細胞と比較すると、臍島 細胞の生存能力を増大し、臍島 細胞の機能を改善し、及び / 又は臍島 細胞の形態を改善する、請求項 1 ~ 4 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 6】

臍島 細胞の機能を基礎インスリン分泌試験又はグルコース誘導インスリン分泌試験で

20

測定する、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

膵島 細胞の生存能力の増大、機能の改善、及び / 又は形態の改善が持続期間の間に達成される、請求項 5 又は 6 に記載の方法。

【請求項 8】

膵島 細胞を骨髄細胞と培養することが、骨髄細胞の非存在下で培養された膵島 細胞と比較すると、膵島 細胞のアポトーシスを減少させる、請求項 1 ~ 7 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 9】

膵島 細胞を骨髄細胞と培養することが、骨髄細胞の非存在下で培養された膵島 細胞と比較すると、膵島 細胞からのサイトカインの放出を減少させる、請求項 1 ~ 7 の何れか一項に記載の方法。

10

【請求項 10】

サイトカインが IL - 1 である、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

膵島 細胞を骨髄細胞と培養することが、少なくとも 1 つの内分泌細胞に特異的な遺伝子の発現を増大する、請求項 1 ~ 7 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 12】

内分泌細胞に特異的な遺伝子が、GCG (グルカゴン、細胞遺伝子)、INS (インスリン、細胞遺伝子)、SST (ソマトスタチン、細胞遺伝子)、細胞膵臓及び十二指腸ホメオボックス 1 (PDX 1 又は IPF 1)、ニューロジェニン 3 (NGN 3)、ペアドボックス遺伝子 6 (PAX 6)、膵島 - 1 (ISL - 1)、v - maf 筋腱肉腫癌遺伝子ホモログ A (MAF a)、及び Mist 1 に対する転写因子よりなる群から選ばれる、請求項 11 に記載の方法。

20

【請求項 13】

骨髄細胞とインビトロで少なくとも 30 日の持続期間で培養された膵島 細胞を含有してなる、医薬組成物。

【請求項 14】

骨髄細胞とインビトロで少なくとも 30 日の持続期間で培養された膵島 細胞及び骨髄細胞を含有してなる、医薬組成物。

30

【請求項 15】

糖尿病を治療するための、請求項 13 又は 14 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本出願は、2006 年 11 月 21 日出願の、米国仮特許出願第 60 / 860 , 637 号の優先権を主張し、この全てを参照として本明細書に組み入れる。

【0002】

(連邦政府支援研究に関する陳述)

40

本発明は、国立衛生研究所 (NIH) 認可番号第 P20RP018757 号を受けて米国政府の支援によってなされた。従って、米国政府は本発明に対して幾らかの権利を有している。

【0003】

(技術分野)

本発明は概して膵島細胞培養の分野に關している。より詳細には、本発明は移植前の膵島細胞の長期培養及び可能性のある増殖のための骨髄細胞の使用に關する。本発明は、対象におけるインビボのヒト膵島機能と置き換えるための、骨髄細胞の存在下で生育している膵島細胞の使用も包含している。

【背景技術】

50

【 0 0 0 4 】

糖尿病は、主要で高まりつつある世界的な健康問題である[非特許文献 1]。血糖値を管理しながらの、標準的なインスリンによる治療方法は、治癒をもたらさず、そして患者は未だこの疾患の多くの長期的な合併症にさらされている[非特許文献 2, 3]。膵臓移植はこの疾患を治癒できるが、組織適合性及び免疫抑制療法に対する反応性によって制限されている[非特許文献 4]。膵島細胞の生存能力を保持するために、比較的速いドナーからの膵臓の採取が必要である。標準的な移植免疫抑制療法は膵臓移植に必ずしも有効とは限らない。更に、免疫抑制療法は、膵臓移植が必要な患者において、腎臓に、しばしば機能低下を呈する更なる損傷をもたらす。これに代わって、膵島細胞の移植は効果が得られ、そして必要としている免疫抑制療法はそれ程極端でないが、膵島細胞は膵臓よりも入手しにくい[非特許文献 5]。功を奏する膵島細胞移植はしばしば、二人又は三人のドナーから採取した細胞を必要とし、更にこの方法で治療できる患者の数を限定する。移植するための膵島細胞の単離も簡単ではない。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【 0 0 0 5 】

【非特許文献 1】Yamada, S. and I. Kojima, Regenerative medicine of the Pancreatic beta cells. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2005. 12(3): p. 218-26.

【非特許文献 2】Das, S.R., et al., Increased cardiovascular risk associated with diabetes in Dallas County. Am Heart J, 2006. 151(5): p. 1087-93.

20

【非特許文献 3】Borrero Pachon, M.P., [Diabetic foot]. Rev Enferm, 2006, 29(3): p. 8-14.

【非特許文献 4】Balamurugan, A.N., et al., Prospective and Challenges of islet transplantation for the therapy of autoimmune diabetes. Pancreas, 2006. 32(3): p. 231-43.

【非特許文献 5】Shapiro, A.M., et al., International Trial of the Edmonton Protocol for Islet Transplantation. N Engl J Med, 2006. 355(13): p. 1318-1330.

【非特許文献 6】Lakey, J.R., M. Mirbolooki, and A.M. Shapiro, Current status of clinical islet cell transplantation. Methods Mol Biol, 2006. 333: p. 47-104.

【非特許文献 7】Kayed, H., et al., Hedgehog signaling in the normal and diseased pancreas. Pancreas, 2006, 32(2): p. 119-29.

30

【非特許文献 8】Lingohr, M.K., et al., Specific regulation of IRS-2 expression by glucose in rat primary pancreatic islet beta-cells. J Biol Chem, 2006. 281(23): p. 15884-92.

【非特許文献 9】McCabe, C., A. Samali, and T. O'Brien, Cytoprotection of beta cells: rational gene transfer strategies. Diabetes Metab Res Rev, 2006. 22(3): p. 241-52.

【非特許文献 10】Truong, W., et al., Coinhibitory T-cell signaling in islet allograft rejection and tolerance. Cell Transplant, 2006. 15(2): p. 105-19.

【非特許文献 11】Matsuda, T., et al., Inhibition of p38 pathway suppresses human islet production of pro-inflammatory cytokines and improves islet graft function. Am J Transplant, 2005. 5(3): p. 484-93.

40

【非特許文献 12】Chae, H.Y., et al., Effective glycemic control achieved by transplanting non-viral cationic liposome-mediated VEGF-transfected islets in streptozotocin-induced diabetic mice. Exp Mol Med, 2005. 37(6): p. 513-23.

【非特許文献 13】Mattsson, G., et al., Endothelial cells in endogenous and transplanted pancreatic islets: differences in the expression of angiogenic peptides and receptors. Pancreatology, 2006. 6(1-2): p.86-95.

【非特許文献 14】Olsson, R., A. Maxhuni, and P.O. Carlsson, Revascularization of transplanted pancreatic islets following culture with stimulators of angiogenesis

50

sis. Transplantation, 2006. 82(3): p. 340-7.

【非特許文献 1 5】Oh, S.H., et al., Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type 1 diabetes. Lab Invest, 2004, 84(5): p. 607-17.

【非特許文献 1 6】Hess, D., et al., Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. Nat Biotechnol, 2003. 21(7): p. 763-70.

【非特許文献 1 7】Lechner, A., et al., No evidence for significant transdifferentiation of bone marrow into pancreatic beta-cells in vivo. Diabetes, 2004. 53(3): p. 616-23.

【非特許文献 1 8】Mathews, V., et al., Recruitment of bone marrow-derived endothelial cells to sites of pancreatic beta-cell injury. Diabetes, 2004. 53(1): p. 91-8.

【非特許文献 1 9】Dawn, B. and R. Bolli, Adult bone marrow-derived cells: Regenerative potential, plasticity, and tissue commitment. Basic Res Cardiol, 2005. 100(6): p. 494-503.

【非特許文献 2 0】Luo, L., N. Yano, and J.Z. Luo, The molecular mechanism of EGF receptor activation in pancreatic beta-cells by thyrotropin-releasing hormone. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2006. 290(5): p. E889-99.

【非特許文献 2 1】Luo, L.G., et al., Effect of prepro TRH antisense on thyrotropin-releasing hormone synthesis and viability of cultured rat diencephalic neurons. Endocrine, 2001. 15(1): p. 79-85.

【非特許文献 2 2】Luo, L.Z. and L. Luo, American Ginseng Stimulates Insulin Production and Prevents Apoptosis through Regulation of Uncoupling Protein-2 in Cultured beta Cells. Evid Based Complement Alternat Med, 2006. 3(3): p. 365-72.

【非特許文献 2 3】Cabrera, O., et al., The unique cytoarchitecture of human pancreatic islets has implications for islet cell function. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(7): p. 2334-9.

【非特許文献 2 4】Brissova, M., et al., Assessment of human pancreatic islet architecture and composition by laser scanning confocal microscopy. J Histochem Cytochem, 2005. 53(9): p. 1087-97.

【非特許文献 2 5】Welsh, N., et al., Is there a role for locally produced interleukin-1 in the deleterious effects of high glucose or the type 2 diabetes milieu to human pancreatic islets? Diabetes, 2005, 54(11): p. 3238-44.

【非特許文献 2 6】Storling, J., et al., Nitric oxide contributes to cytokine-induced apoptosis in pancreatic beta cells via potentiation of JNK activity and inhibition of Akt. Diabetologia, 2005. 48(10): p. 2039-50.

【非特許文献 2 7】Paraskevas, S., et al., Cell loss in isolated human islets occurs by apoptosis. Pancreas, 2000, 20(3): p. 270-6.

【非特許文献 2 8】Amrani, A., et al., IL-1alpha, IL-1beta, and IFN-gamma mark beta cells for Fas-dependent destruction by diabetogenic CD4(+)T lymphocytes. J Clin Invest, 2000. 105(4): p. 459-68.

【非特許文献 2 9】Eizirik, D.L. and M.I. Draville, beta-cell apoptosis and defense mechanisms: lessons from type 1 diabetes. Diabetes, 2001. 50 suppl 1: p. S64-9.

【非特許文献 3 0】Gurol, A.O., et al., Peritransplant and long-term secretion of interleukin-1beta in cyclosporine treated syngeneic rats allografted with islets of langerhans. Transplant Proc, 2005. 37(5): p. 2375-8.

【非特許文献 3 1】Raida, M., et al., Role of bone morphogenetic protein 2 in the crosstalk between endothelial progenitor cell and mesenchymal stem cells. Int J Mol Med, 2006. 18(4): p. 735-9.

10

20

30

40

50

【非特許文献 3 2】Ruscetti, F.W., S. Akel, and S.H. Bartelmez, Autocrine transforming growth factor-beta regulation of hematopoiesis: many outcomes that depend on the context. *Oncogene*, 2005. 24(37): p.5751-63。

【非特許文献 3 3】Ozturk, M.A., G.S. Guven, and I.C. Haznedaroglu, How hematopoietic stem cells know and act in cardiac microenvironment for stem cell plasticity? Impact of local renin-angiotensin systems. *Med Hypotheses*, 2004. 63(5): p. 866-74。

【非特許文献 3 4】Zhang, N., et al., Blood-borne stem cells differentiate into vascular and cardiac lineages during normal development. *Stem Cells Dev*, 2006. 15(1): p. 17-28。

10

【非特許文献 3 5】Thatava, T., et al., Chromatin-remodeling factors allow differentiation of bone marrow cells into insulin-producing cells. *Stem Cells*, 2006。

【非特許文献 3 6】Taneera, J., et al., Failure of transplanted bone marrow cells to adopt a pancreatic beta-cell fate. *Diabetes*, 2006. 55(2): p. 290-6。

【非特許文献 3 7】Kang, E.M., et al., Hematopoietic stem cell transplantation prevents diabetes in NOD mice but does not contribute to significant islet cell regeneration once disease is established. *Exp Hematol*, 2005. 33(6): p. 699-705。

【非特許文献 3 8】Moriscot, C., et al., Human bone marrow mesenchymal stem cells can express insulin and key transcription factors of endocrine pancreas developmental pathway upon genetic and/or microenvironmental manipulation in vitro. *Stem Cells*, 2005. 23(4): p. 594-603。

20

【非特許文献 3 9】Steele, A. and P. Steele, Stem cells for repair of the heart. *Curr Opin Pediatr*, 2006. 18(5): p. 518-523。

【非特許文献 4 0】Le Blanc, K. and O. Ringden, Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol*, 2006. 18(5): p. 586-91。

【非特許文献 4 1】Fazel, S., et al., Cardioprotective c-kit+ cells are from the bone marrow and regulate the myocardial balance of angiogenic cytokines. *J Clin Invest*, 2006. 116(7): p. 1865-77。

【非特許文献 4 2】Dell'Agnola, C., et al., Hematopoietic stem cell transplantation does not restore dystrophin expression in Duchenne muscular dystrophy dogs. *Blood*, 2004. 104(13): p. 4311-8。

30

【非特許文献 4 3】Chien, K.R., Lost and found: cardiac stem cell therapy revisited. *J Clin Invest*, 2006. 116(7): p. 1838-40。

【非特許文献 4 4】Wollert, K.C. and H. Drexler, Cell-based therapy for heart failure. *Curr Opin Cardiol*, 2006. 21(3): p. 234-9。

【非特許文献 4 5】Tang, Y.L., et al., Autologous mesenchymal stem cell transplantation induce VEGF and neovascularization in ischemic myocardium. *Regul Pept*, 2004. 117(1): p. 3-10。

【非特許文献 4 6】Carvalho, K.A., et al., Proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells, skeletal muscle cells and co-culture of both for cell myocardium therapy in Wistar rats. *Transplant Proc*, 2006. 38(6): p. 1955-6。

40

【非特許文献 4 7】Bin, F., et al., Construction of tissue-engineered homograft bioprosthetic heart valves in vitro. *Asaio J*, 2006. 52(3): p. 303-9。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

膵島の単離、保存及び移植の間に受ける事象は、膵島機能の損失及び糖尿病患者への膵島移植の治療可能性の限定をもたらす細胞死に関するものである。膵島細胞移植方法についての重大な問題は、インビトロ又はインビボにおいて生存している膵島を保持するこ

50

との困難さ、及びインビトロ培養における膵臓組織の増殖不良に關している。ドナーからの膵臓の採取後できるだけ早く実施するように、膵臓から採取する間に細胞を培養しないと、移植が最も成功するということを研究が立証している。当然のことながら、移植は最も多くの移植を行うセンターにおいても最も成功する。このロバストな培養条件が欠如しているという理由で、膵臓細胞移植のドナーは、組織の採取時に主要な移植センターの近くにいなけねばならず、そして移植者は、しばしばある持続期間にわたり、一人以上のドナーを待ちながら、主要な移植センターの近くに住んでいなければならない。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、持続期間培養下で、膵臓細胞の生存能力、構造及び/又は機能を維持する方法を含んでいる。この方法は、骨髓細胞と膵臓細胞を培養することを含んでいる。骨髓細胞が、炎症性サイトカインの放出及びアポトーシスを減少させながら、膵臓細胞の生育及び生存能力を促進し、そして膵臓細胞の機能及び形態を強化することを見出した。膵臓細胞が、基礎的な及び誘導的なインスリン放出によって示されたように、膵臓細胞の機能を保持することを示した。膵臓血細胞及び単離した末梢CD34+血液細胞は膵臓細胞の生育を保持し又は生存能力を増大することができなかった。

【0008】

本発明は、膵臓細胞を複数の骨髓細胞と共に培養することによって、共培養におけるアポトーシスを減少させる方法を包含している、培養下の膵臓細胞を増殖する方法を含んでいる。骨髓細胞が、部分的であってもアポトーシスを減少させることによって、しかしながら膵臓細胞の数を増加することによっても、膵臓細胞の生育を促進することを見出した。膵臓細胞を増殖する能力は、単独の移植者に対して複数のドナーの必要性を減少させるのに必須であり、膵臓細胞移植の広範な利用を潜在的に可能にする。

【0009】

本発明は、膵臓細胞を複数の骨髓細胞と培養することによって、培養下で膵臓凝集を促進する方法を含んでいる。骨髓細胞は膵臓凝集の過程を刺激する。

【0010】

本発明は更に、培養下の膵臓細胞からのサイトカイン及び他の炎症性調節因子の放出を減少する方法を含んでいる。この方法は、膵臓細胞を骨髓細胞と共に培養することを含んでいる。膵臓細胞の骨髓細胞との共培養は、骨髓細胞なしでの膵臓細胞の生育と比べると、インターロイキン(IL)-1のような炎症性サイトカインの放出を減少させた。このことは膵臓細胞移植に応答する患者における炎症応答の減少をもたらすことができる。

【0011】

本発明は、膵臓細胞を複数の骨髓細胞と培養することによって、膵臓に特異的な転写因子を含む内分泌細胞に特異的な遺伝子の発現を増大する方法を含んでいる。この因子は、GCC(グルカゴン、細胞遺伝子)、INS(インスリン、細胞遺伝子)、及びSST(ソマトスタチン、細胞遺伝子)の内分泌細胞に特異的な遺伝子;及び細胞膵臓及び十二指腸ホメオボックス1(PDX1又はIPF1)、ニューロジェニン3(NGN3)、ペアドボックス遺伝子6(PAX6)、膵臓-1(ISL1)、v-maf筋腫肉腫遺伝子ホモログA(MAFa)、及びMist1に対する転写因子を含んでいる。この方法は、膵臓細胞を骨髓細胞と培養することを含む。この方法は更に、細胞の再生を増加させるためにNGN3の発現を増大することを含んでいる。この方法は更に、PDX1、IPF1、NGN3、PAX6、ISL1、及びMAFaのうちの少なくとも1つの発現を増大することによって、細胞の長期生存を促進することを含んでいる。この方法は、Mist1の発現を増大することによる新しい膵臓組織の構築を促進することも含んでいる。

【0012】

本発明は、膵臓細胞を得ること、膵臓細胞を骨髓細胞の存在下で培養すること、及び結合した膵臓細胞と骨髓細胞を治療が必要な対象に移植することを含む、膵臓

10

20

30

40

50

細胞の移植を必要とする個人を治療する方法を含んでいる。この方法は、治療を必要とする対象の減少した又は失われた膵臓細胞の機能を改善するために、骨髄、好ましくは自家の骨髄の存在下で培養している膵島細胞の直接移植によってインビボの膵臓細胞の機能を改善及び／又は置き換えるための骨髄の移植を含んでいる。膵島細胞の移植を必要とする対象は、Ⅰ型又はⅡ型の糖尿病を患っている個人でよい。糖尿病は、病気による、又は膵臓癌におけるような膵臓の少なくとも一部の除去による、膵臓損傷によるものであってよい。本発明は更に、膵島細胞移植、改善された又は置き換わった膵島細胞の機能が必要な対象を選択又は同定することを含むことができる。本発明は、改善された膵臓活性について対象を監視することも含むことができる。

【 0 0 1 3 】

本発明は更に、本発明の方法を実施するためのキットを含んでいる。このキットは、例えば骨髄細胞又は骨髄を如何に採取するかについての説明書を、本発明の方法によって如何に膵臓細胞を培養するかについての説明書と共に含むことができる。キットは更に、骨髄細胞の存在下で膵島細胞を培養するための試薬、又は骨髄細胞と共に培養して生育する膵島細胞の生存能力、機能、及び／又は特性を測定するための試薬を包含している。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 1 4 】

【 図 1 】 図 1 は、骨髄細胞を加えて又は加えないで 6 日間又は 1 5 6 日間培養した膵島細胞の位相差顕微鏡画像である。（画像の倍率は 2 0 倍）。図 1 a は、6 日間単独で培養した膵島細胞を示す。図 1 b は、6 日間骨髄細胞と培養した膵島細胞を示す。図 1 c は、1 5 6 日間単独で培養した膵島細胞を示す。図 1 d は、1 5 6 日間骨髄細胞と培養した膵島細胞を示す。

【 図 2 a - b 】 図 2 は、細胞型特異的マーカーを用いる、膵島細胞及び骨髄細胞の免疫蛍光及び免疫組織化学分析である。図 2 a は、プロインスリンの抗体で染色した（矢印で示してある）、C D 4 5（骨髄細胞、細い矢印で示してある）（下図）で染色した、及び D A P I で核染色した、免疫組織化学染色を示す。図 2 b は、プロインスリン（太い矢印で示してある）及び C D 4 5（細い矢印で示してある）のための免疫組織化学染色を示す。（画像の倍率は 2 0 倍）。図 2 c は、2 8 日における骨髄 - 膵島の共培養と比較した膵島単独培養におけるプロインスリン陽性細胞の数を示す棒グラフである。（ $^* = p < 0 . 0 1$ 、 $n = 6$ ）

【 図 2 c 】 図 2 は、細胞型特異的マーカーを用いる、膵島細胞及び骨髄細胞の免疫蛍光及び免疫組織化学分析である。図 2 a は、プロインスリンの抗体で染色した（矢印で示してある）、C D 4 5（骨髄細胞、細い矢印で示してある）（下図）で染色した、及び D A P I で核染色した、免疫組織化学染色を示す。図 2 b は、プロインスリン（太い矢印で示してある）及び C D 4 5（細い矢印で示してある）のための免疫組織化学染色を示す。（画像の倍率は 2 0 倍）。図 2 c は、2 8 日における骨髄 - 膵島の共培養と比較した膵島単独培養におけるプロインスリン陽性細胞の数を示す棒グラフである。（ $^* = p < 0 . 0 1$ 、 $n = 6$ ）

【 図 3 】 図 3 は、1 5 3 日間培養した、膵島及び細胞の細胞型特異的マーカーを用いる免疫蛍光分析である。画像は位相差顕微鏡図（左図）、及び膵島表面（中央図）及び中間部（右図）の共焦点顕微鏡図である。アルファ細胞はグルカゴンに対する抗体で染色し（明るい矢印で示してある）、そして細胞はプロインスリンに対する抗体で染色した（暗い矢印で示してある）。

【 図 4 】 図 4 は、骨髄細胞を加えて又は加えないで生育した膵島細胞の機能分析である。図 4 a は、一連の時点の間の基礎インスリン分泌のグラフである。図 4 b は、2 0 4 日目までの一連の時点の間の高グルコースに应答するインスリン放出のグラフである。（ $^* = p < 0 . 0 1$ 、 $n = 6$ ）

【 図 5 a - c 】 図 5 は、培養中の膵島の生育である。図 5 a は試験の概略図である。図 5 b は、骨髄細胞の非存在下（上図）又は存在下（下図）でのグリッド上の膵島の生育を示す。図 5 c は、培養中の膵島の生育を定量した棒グラフである（ $^* = p < 0 . 0 5$ 、 $n =$

10

20

30

40

50

6)。図5 dは、新生期間中(左図)及び再添加後(右図、13ヶ月以上)(倍率は5倍)におけるグリッド上で骨髄細胞と生育した膵島を示す。図5 eは、図5 dの右図に示されている膵島からの322日目~406日目のインスリン放出のグラフである。図5 fは、360、369、及び399日目の高グルコース投与に応答するインスリン分泌のグラフである。膵島単独培養は同じ時点で検出可能なインスリン分泌を有していない。

【図5 d - f】図5は、培養中の膵島の生育である。図5 aは試験の概略図である。図5 bは、骨髄細胞の非存在下(上図)又は存在下(下図)でのグリッド上の膵島の生育を示す。図5 cは、培養中の膵島の生育を定量した棒グラフである($^* = p < 0.05$ 、 $n = 6$)。図5 dは、新生期間中(左図)及び再添加後(右図、13ヶ月以上)(倍率は5倍)におけるグリッド上で骨髄細胞と生育した膵島を示す。図5 eは、図5 dの右図に示されている膵島からの322日目~406日目のインスリン放出のグラフである。図5 fは、360、369、及び399日目の高グルコース投与に応答するインスリン分泌のグラフである。膵島単独培養は同じ時点で検出可能なインスリン分泌を有していない。

【図6】図6は、153日目に細胞型特異的マーカーを使用して行った、骨髄細胞を加えて又は加えないで培養した膵島細胞の形態学的及び免疫蛍光分析である。左の画像は、骨髄細胞を加えて(上図)又は加えないで(下図)生育した膵島細胞の位相差顕微鏡図である。右の画像は、Ki67及びプロインスリン(矢印で示してある)に対する抗体を用いる蛍光免疫組織化学図である。(画像の倍率は20倍)

【図7 a - c】図7は、190日目に細胞型特異的マーカーを使用して行った、骨髄細胞と培養した膵島細胞の形態学的、免疫蛍光、及び機能分析である。図7 aは、骨髄細胞と190日間培養した膵島から生成した組織の画像であって、棒線は1cmを示す。組織は長さが約1.8cmで、明確な3次元構造を有している。図7 b及びcは、図7 aで示されているものに相当する凍結組織からの5 μ mの切断面である。図7 bは、組織構造を明らかにするためのヘマトキシリン及びエオシンによる組織化学的染色を示す。矢印は、多孔性足場状組織で囲まれている部分に現れている膵島状構造を示している。図7 cは、抗-ヒトプロインスリン抗体による免疫蛍光染色(矢印bで示してある)、抗-ヒトグルカゴン抗体で染色した細胞(矢印aで示してある)、及び核染色DAPIである。図7 dは、骨髄細胞を加えないで(I)又は加えて(B+I)培養した190日目の膵島細胞からの基礎インスリン放出を示す棒グラフである。図7 eは、骨髄細胞を加えないで(I)又は加えて(B+I)培養した190日目の膵島細胞からのグルコース投与に応答するインスリン放出を示す棒グラフである。($p < 0.05$ 対膵島単独培養。画像の倍率は20倍)

【図7 d - e】図7は、190日目に細胞型特異的マーカーを使用して行った、骨髄細胞と培養した膵島細胞の形態学的、免疫蛍光、及び機能分析である。図7 aは、骨髄細胞と190日間培養した膵島から生成した組織の画像であって、棒線は1cmを示す。組織は長さが約1.8cmで、明確な3次元構造を有している。図7 b及びcは、図7 aで示されているものに相当する凍結組織からの5 μ mの切断面である。図7 bは、組織構造を明らかにするためのヘマトキシリン及びエオシンによる組織化学的染色を示す。矢印は、多孔性足場状組織で囲まれている部分に現れている膵島状構造を示している。図7 cは、抗-ヒトプロインスリン抗体による免疫蛍光染色(矢印bで示してある)、抗-ヒトグルカゴン抗体で染色した細胞(矢印aで示してある)、及び核染色DAPIである。図7 dは、骨髄細胞を加えないで(I)又は加えて(B+I)培養した190日目の膵島細胞からの基礎インスリン放出を示す棒グラフである。図7 eは、骨髄細胞を加えないで(I)又は加えて(B+I)培養した190日目の膵島細胞からのグルコース投与に応答するインスリン放出を示す棒グラフである。($p < 0.05$ 対膵島単独培養。画像の倍率は20倍)

【図8】図8は、生細胞膜染色色素を用いて行った、共培養して最初の48時間の膵島細胞及び骨髄細胞の免疫蛍光分析である。PKI-26GLで標識したヒト骨髄細胞を、PK-2GLで染色した膵島と共培養して、培養中の骨髄細胞と膵島細胞との相互作用を検討するために、特異的抗-プロインスリン抗体及び核染色用のDAPIで免疫組織化

10

20

30

40

50

学染色を実施した。図 8 a は 7 時間後の細胞を示す。図 8 b は 24 時間後の細胞を示す。図 8 c は 48 時間後の細胞を示す。図 8 d は 96 時間後の細胞を示す。(画像の倍率は 20 倍、矢印は骨髄及び 細胞と共局在化している骨髄を示している)

【図 9】図 9 は、骨髄細胞及び膵島 細胞を共培養液に導入後 20 分間隔で記録した経時的顕微鏡検査の画像である。骨髄細胞及び膵島細胞をそれぞれ P K H 2 6 及び P K H 2 で個別に標識し、次いで共に培養した。画像 a ~ j は 96 時間培養の 1 回分の画像である。太い矢印は骨髄を示し、細い矢印は、膵島中に放出された骨髄物質を示している。(画像の倍率は 20 倍)

【図 10】図 10 は、互いに向かって移動して(図 10 a ~ d)、最終的に融合する(図 10 e)グリッド上の 3 つの膵島細胞を記録した経時的顕微鏡検査の画像である。図 10 f は、骨髄細胞の結合した膵島内への移動を示す、骨髄細胞が標識されている別の実験からの画像である。

【図 11】図 11 は、各時点で細胞型特異的マーカーを用いて測定した、膵島 細胞の骨髄細胞との培養液中の、I L - 1 の濃度である。図 11 a は、培養液中への I L - 1 の放出を示すグラフである。図 11 b は、高グルコース(20 mM)刺激後の培養液中への I L - 1 の放出を示すグラフである。(n = 6、* = p < 0.001)

【図 12】図 12 は、特定時点で細胞型特異的マーカーを用いて行った、骨髄細胞と培養する膵島 細胞のアポトーシスの免疫蛍光分析である。図 12 a は、T U N E L アッセイで評価した、骨髄細胞を加えないで(I)又は加えて(B + I)培養した膵島 細胞中のアポトーシスの免疫蛍光分析を示す。膵島 細胞が、培養期間の 7 時間時点(7 H)、48 時間時点(48 H)及び 3 週間時点(3 W)にプロインスリン抗体で蛍光免疫組織化学染色されて示されている。図 12 b は、示された時点における総 細胞に対するアポトーシス細胞の量を百分率で示すグラフである。(n = 24、* = p < 0.01)

【図 13】図 13 は、培養下の膵島 細胞の機能を保護する非骨髄細胞型の分析である。図 13 は、31 日間にわたって単独培養、又は臍帯血、末梢血、又は末梢血 C D 3 4 + 細胞と共培養した膵島 細胞からのインスリン放出のグラフである。

【図 14】図 14 は、糖尿病のマウスモデルにおける膵島 細胞と骨髄細胞との共培養のインビボ評価である。図 14 は、単独で培養した膵島 細胞又は骨髄細胞と共培養した膵島 細胞を移植したマウスにおける血糖値のグラフである。

【図 15】図 15 は、膵島 細胞の移動を骨髄細胞が促進することのインビトロでの証明である。膵島凝集の形成の経時的顕微鏡検査の画像である。図 15 a ~ e は、倍率が 5 倍である。図 15 f の膵島表面の濃い色は、膵島への骨髄細胞の移動を示している。(倍率は 20 倍)

【図 16】図 16 a は、骨髄細胞の有り無しで生育した膵島 細胞における G C G 及び I N S の発現レベルについての倍数変化のグラフである。図 16 b は、骨髄細胞の有り無しで生育した膵島 細胞における S S T 及び N G N 3 の発現レベルについての倍数変化のグラフである。図 16 c は、骨髄細胞の有り無しで生育した膵島 細胞における I P F 1、I S L 1、P A X 6、M I S T 1、及び M A F A の発現レベルについての倍数変化のグラフである。

【0015】

(定義)

「持続期間」は、細胞のインスリンを放出する機能が、好ましくは膵島組織の生育を伴って、維持されるように膵島 細胞を維持するのに十分な期間であると解釈される。ある態様では、この期間は少なくとも約 30 日、好ましくは少なくとも約 60 日、より好ましくは少なくとも約 90 日、更により好ましくは少なくとも約 120 日である。

【0016】

「膵島 細胞の機能」は、これに限定されないが、形態学的、免疫組織化学的及び機能試験を含む多くの試験の何れかによって定義することができる。好ましい態様では、膵島 細胞の機能は、静止細胞又はグルコースに対する応答の何れかにおける、インスリン放出試験の活性によって定義される。より好ましい態様では、膵島 細胞は、約 20 ~ 10

10

20

30

40

50

0 膵島 (I E Q) において、(2 0 μ M のグルコース処理に応答して) 3 0 分間にわたって少なくとも約 1 5 0 ユニットのインスリンを放出する機能を有していると定義される。膵島細胞機能を測定する正確な方法は本発明の限りではない。

【 0 0 1 7 】

「増大した膵島 細胞の生存能力」は、好ましくは膵島 細胞を骨髓細胞なしで生育させる対照培養と比較して、単時点で又は時間をかけて観察される細胞死のより低い比率として解釈される。生細胞の数は、生存細胞を確認するためのトリパンブルー色素排除、及び特定領域又は容量中の生細胞の数を測定するための血球計数機を用いる細胞計数のような、当業者に公知の方法で測定される。細胞の生存能力は、多くの市販アポトーシスアッセイの何れかをを用いて、又は当業者に公知の方法によって測定することもできる。対照試料と比較して試料中アポトーシスのより低い割合は膵島 細胞の生存能力の増大を示唆している。アポトーシスのアッセイを、膵島 細胞であることを確認するための免疫組織化学染色と組み合わせることができる。膵島 細胞を測定する特定の方法は本発明の限定ではない。

10

【 0 0 1 8 】

本明細書で解釈されているような「膵島」は、インスリン及びその他のホルモンを分泌して器官の内分泌部分を形成する、膵臓に存在する細胞の集団であり、ランゲルハンス島としても知られている。膵島は膵臓の質量のおよそ 1 ~ 2 % を構成している。健康成人の膵臓に約 1 0 0 万の膵島があり、これは臓器中に散らばっていて、これらの総重量は 1 ~ 1 . 5 g である。各膵島はおおよそ 1 0 0 0 個の細胞を含有していて、直径が 5 0 ~ 5 0 0 μ m である。インスリン - 産生 細胞が膵島細胞の約 6 5 ~ 8 0 % を構成していて、グルカゴン - 放出アルファ細胞が膵島細胞の約 1 5 ~ 2 0 % を構成している。膵島細胞はソマトスタチン - 産生デルタ細胞 (約 3 ~ 1 0 %) 及び膵臓ポリペプチド - 含有 P P 細胞 (1 %) も含有している。

20

【 0 0 1 9 】

「細胞を得ること」は、作成すること、購入すること、又はそれ以外で細胞を入手することであると、本明細書では解釈される。

【 0 0 2 0 】

「膵島 細胞の増殖」にあるような用語「増殖」及び「増殖する」は、時間をかけて、培養中の膵島 細胞の生存細胞数及び機能が増大することであると解釈されている。増殖は、存在している膵島 細胞の細胞分裂又は骨髓細胞の膵島細胞への変換又はその両方を促進することによって起こり得る。

30

【 0 0 2 1 】

用語「培養中」は、例えば、温度、C O ₂、及び栄養の適切な条件下でのペトリ皿における、細胞の生育を包含すると解釈することができる。細胞は、例えば、動物、植物、又は海藻由来の天然又は人工のタンパク質基質のような、基質の存在下で培養できる。適切な状況下では、培養中は、例えば細胞の非天然の条件下での生育と解釈することができる。例えば、細胞を、動物の特定臓器中を含む、マウスのような動物に移植した培地中で、又は動物に移植する前にエキスピボの臓器培地中で培養することができる。

【 0 0 2 2 】

40

「膵島 細胞機能を維持する又は維持すること」にあるような「維持する」及び「維持すること」は、骨髓細胞の非存在下で培養されている膵島 細胞と比較して、膵島 細胞の生存能力の増大、及び / 又は膵島 細胞の機能の改善、及び / 又は膵島 細胞の形態の改善を含んでいると解釈される。

【 0 0 2 3 】

用語「対象」は生体を示す。ある態様では、生体は動物である。ある好ましい態様では、対象は哺乳動物である。ある態様では、対象は家畜である。ある態様では、対象はヒトである。対象は、ヒト、サル、イヌ、ネコ、マウス、ラット、ウシ、ウマ、ヤギ、及びヒツジを包含する。対象は糖尿病であると診断されていてもよい。別の態様では、対象はある別の膵臓疾患であると診断されている。

50

【0024】

用語「対象の選択」又は「対象の同定」は、これに限定されないが、身体症状、診断方法で確認された臨床的特徴を包含する特有な特徴に基づいて、混合個人集団から1人又はそれ以上を選択することであると解釈される。

【0025】

用語「対象の観察」は、膵島細胞の移植後に、好ましくは膵島細胞の移植前後の両方において、変化した膵島細胞の機能、好ましくは改善された膵島細胞の機能について、対象を観察することであると解釈することができる。

【0026】

本明細書中で述べられている範囲は、範囲内の全ての値についての略号であると解釈できる。例えば、1～50秒の時間は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、又は50秒を含んでいると解釈される。

10

【0027】

特定の記述がないか又は文脈から明瞭である限り、本明細書で用いられている用語「又は」は、包括的であると解釈することができる。

【0028】

特定の記述がないか又は文脈から明瞭である限り、本明細書で用いられている用語「a」、「an」、及び「the」は単数又は複数であると解釈することができる。

20

【0029】

(詳細な説明及び好ましい態様)

本検討において、インビトロにおけるドナーヒト膵島の内分泌機能を保持する、同種骨髄の能力を検討した。ヒト膵島細胞の同種骨髄との共培養は、膵島の生存及び機能の増大を示し、最終的に膵島構造及び細胞の機能を保持する微小環境を維持可能な新規な膵臓内分泌組織を形成した。

【0030】

骨髄細胞は、膵臓内分泌組織の生育を刺激する一方で、膵島細胞から、IL-1のような炎症性サイトカインの放出を減少できることを示した。骨髄細胞との共培養は膵島細胞のアポトーシスも減少させた。骨髄細胞は最終的に、長期間にわたる培養において(13ヶ月以上)ヒト膵島細胞を機能的な膵臓内分泌膵島組織に回復させることを示した。このような効果は骨髄細胞に特異的であることが見出された。臍帯血細胞及び/又は単離した末梢血CD34⁺細胞は、インビトロにおいて膵島の機能又は生存を保持するのに有用ではなかった。このことは骨髄が、インスリン非依存性確立の成功を有意に改善することができる、ヒト内分泌膵臓組織の保持において独特な利点を提供することを立証している。

30

【0031】

本発明は膵島細胞の骨髄細胞との共培養を含んでいる。しかしながら、好ましい態様では、約1～5×10⁶個の骨髄細胞に対して約25～100個の膵島の比率である。骨髄細胞に対する膵島のその他の比率も可能であること、そして培養が、骨髄幹細胞、葉様細胞、及び膵臓アルファ細胞のような追加の細胞型を含んでもよいことを理解されたい。

40

【0032】

作用メカニズムに結びつけようとは思わないが、このデータは、骨髄細胞が膵島細胞からIL-1を含むサイトカインの放出を減少することによって、膵島細胞の形態、生存能力、及び/又は機能を増大することを示唆している。このことは、炎症性因子放出の減少、及びアポトーシス又は細胞死の減少をもたらすことが提示される。共培養は、膵臓特異的遺伝子及び再生に係わる成長因子の発現を増大することも明らかにした。本明細書に開示されているデータは、幾つかの骨髄細胞が細胞の表現型を呈してはいるが、恐らく

50

明らかにされた生存及び生育効果の些細な要素に過ぎないことを示唆する。明らかにされた本発明の共培養方法の抗 - アポトーシス効果は、恐らく傍分泌効果（その一つが炎症性サイトカイン、インターロイキン - 1 の抑制であろう）に基づくものだろう [非特許文献 25、28 ~ 30]。骨髓傍分泌生育因子によって刺激された膵島細胞の増殖及び生育が、膵島組織の再構築に寄与する主要な因子であると思われる [非特許文献 20、31 ~ 33]。

【 0 0 3 3 】

本発明は、膵島細胞と完全な骨髓との共培養に限定されない。勾配による細胞選別方法、細胞表面マーカー、及びその他の方法は当業者に周知である。骨髓細胞の 1 つ又はそれ以上の亜集団が、ある持続期間にわたり培養中の膵島細胞の生存能力、形態、及び機能

10

を促進するのに有効であることが期待される。本発明は細胞の起源によっても限定されない。同種の膵島細胞と骨髓細胞を共培養する方法の使用は、何れかの哺乳動物の膵島細胞と骨髓細胞の培養のために利用できることを理解されたい。用語「哺乳動物」は、齧歯動物、ウサギ、又は霊長類及び特にヒト患者のような、温血動物を示すように本明細書で用いる。意図する特定の齧歯動物及び霊長類は、ブタ、チンパンジー、ヒツジ、ヤギ、ウマ、マウス、ラット、ウサギ、及びサルを含む、認証されているヒト疾患のモデルを示すような動物を包含する。意図する特定のヒト患者は、膵臓細胞機能の低下若しくは喪失があるか、それが疑われるか、又はその危険性があるヒトを包含する。更に、免疫系が欠如しているヌードマウス又はその他の動物の骨髓中で、ヒト膵島細胞を培養すること

20

【 0 0 3 4 】

本明細書中に開示されているデータは、同種のヒト骨髓と膵島細胞との共培養が、インビトロにおいて 13 週間以上を含む、長期間にわたる膵島組織の生育を伴う膵島数及びインスリン放出機能の維持を可能にすることを示唆している。先行の検討では、培養したヒト膵島は一般に機能及び生存能力を 3 ~ 4 週間後に失った [非特許文献 27]。これらの検討における、膵島中の細胞は基礎のインスリン産生及びグルコース投与への応答を維持している 及び 細胞を含有している。これらの観察は同種の骨髓細胞との共培養を用いる膵島細胞の移植に対して即時の対応を示唆している。しかしながら、本発明の方法は培養で生育させた後の膵島細胞の使用に限定されない。

【 0 0 3 5 】

本発明を以下の実施例を用いて更に説明する。これらの実施例は、発明の理解を助けるために提供されていて、それらを限定するように意図されていない。本願全体にわたって引用されている引例、特許及び公開特許出願は、更に図面も、その全てが参照として本明細書に組み込まれる。

30

【 実施例 】

【 0 0 3 6 】

（ 実施例 1 ）

細胞染色方法。

蛍光及び化学染色色素を用いる細胞の染色及び免疫蛍光測定の方法は当業者に周知である。多数の実施例がこのような染色方法を含んでいる。細胞染色の典型的な方法を提供する。チャンバースライド上で生育している細胞を 3 % のパラホルムアルデヒドで固定し、次いで 10 % の正常ヤギ血清へ暴露した。スライドを洗浄せずにプロットして、一次抗体の混合物を適用し、次いでスライドを湿性チャンバー中、4 で 1 晩培養した。スライドを 3 回洗浄した後、二次抗体に室温で 45 分間暴露した。洗浄後、希釈した二次抗体を適用して、スライドを 15 分間培養した。引き続きスライドを PBS で十分に洗浄して、必要により、二次蛍光色素（例えば、DAPI）及び / 又は三次抗原 - 検出抗体を用いて、上記の工程を繰り返した。工程が終了したときに、スライドを蛍光封入剤及びカバーライドで覆った。次いで、試料を観察して、共焦点蛍光顕微鏡を用いて撮影した [非特許文献 22]。

40

【 0 0 3 7 】

50

(実施例2)

ヒト骨髓とヒト膵島 細胞の共培養。

正常ドナー由来の、ヒト膵島組織を、Islet Resource Centers(ICRs) in the ICR Basic Islet Distribution Program、Human Islet Laboratory、University of Pennsylvania (Philadelphia, PA)、Joslin Diabetes Center (Boston, MA) 及び City of Hope National Medical Center (Duarte, CA) から入手した。これらの細胞の使用は、IRB at Roger William Hospital 及び ICRs Committes から認証を受けた。

【0038】

正常ドナー由来のヒト骨髓は、Roger Williams Hospital Institutional Review Committee (IRB) によって認証された適切な同意書に署名した後に入手した。骨髓単核細胞を、Ficoll-Paque (登録商標) Plus (Amersham Biosciences; Amersham, UK)を用いて製造会社の説明書に従って単離した。次いで細胞を5%のFCS/PBSで2回洗浄して、培養培地(下記を参照されたい)に再懸濁した。細胞の生存能力を評価するために、トリパンブルー染色を用いた。

【0039】

ヒト膵島を、ボランティアドナーの死後48時間以内に Islet Cell Resource Centers (ICRs) から受領した(純度>90%、生存率>95%)。1ml当たり50膵島当量(IEQs)を 1×10^6 個/mlの同種全骨髓細胞と、10%の加熱不活性化ウシ胎仔血清(HIFBS)、5.5mMのグルコース、10mMのHEPES、及び1%のP/Sで補完した、RPMI 1640(製造会社)中で、加湿した37℃のインキュベータ中、5%のCO₂下で、培養した。

【0040】

図1a~dは、骨髓細胞の非存在下(a及びc)及び存在下(b及びd)で6日(a及びb)又は156日(c及びd)の何れかの間生育させた膵島 細胞を示している。形態の相違がたった6日後に明瞭である。骨髓細胞の非存在下で生育した細胞は単層の形成を開始した(図1a)のに対して、骨髓細胞の存在下で生育した細胞は同様な形態上の損失を示さなかった。骨髓細胞は膵島細胞を包囲して、膵島細胞膜を保護し、そして細胞が拡散するのを阻害する(図1b)。形態における相違は156日目でもなおさら目立った。骨髓細胞の非存在下で生育した細胞は単層を形成した(図1c)のに対して、骨髓細胞の存在下で生育したものは、円形の膵島を形成した(図1d)。

【0041】

図2a~bは、骨髓細胞の非存在下(左図)又は存在下(右図)で生育した28日目の膵島 細胞を示す。膵島を0.05%のトリプシン(Promega, Madison, WI)で5分間消化した。PBSで1回洗浄した後、細胞のサイトスピンスライドを作成した。図2aの上図の細胞は核を可視化するためにDAPIで染色した。下図の細胞は、プロインスリン及び骨髓細胞のマーカーであるCD45を標的とする抗体で染色して、画像化すると異なった色で見える二次抗体を用いて可視化した。

【0042】

膵島細胞単独培養(左図)における細胞数は、骨髓共培養(右図)と比較して、実質的に少なかった。更に、膵島細胞単独培養において、多くの細胞がプロインスリンを発現していないように見えた(すなわち、これらはDAPIで染色されるが、抗-CD45抗体では染色されない)。

【0043】

右側の図において、太い下の矢印で示されている比較的大きな細胞の集団が、集団中に幾つかの骨髓細胞が存在していることを示唆する、いくらかの斑点CD45染色を伴い、プロインスリン染色されていた。細い上の矢印は、CD45抗体で染色されている細胞を示している。共培養中のプロインスリン染色されていない大部分の細胞は、CD45に染まり、これらが骨髓細胞であることを示唆した。

【0044】

免疫蛍光分析による観察を確認するために、免疫組織化学法を用いて細胞を染色した。

プロインスリン発現細胞及びC D 4 5 発現細胞を異なった発色団で染色した。また、膵島細胞単独培養中の多くの膵島細胞がプロインスリン発現していなかったのに対して、共培養中の殆ど全ての非骨髄細胞がインスリンを発現していた。プロインスリン染色は左図において矢印で示されていて、矢印は右図でも更に右に示されている。C D 4 5 染色は左図において更に図の左に矢印で示されている。また、より生存能力がある細胞及びより多くのプロインスリン染色が共培養中で観察された。

【 0 0 4 5 】

プロインスリン陽性膵島の百分率の定量分析が図 2 c に示されている。膵島細胞単独培養と比較して、共培養において有意に多数の (2 . 7 倍多い) 膵島細胞がプロインスリンを発現することが見出された ($p < 0 . 0 1$ 、 $n = 6$)。

10

【 0 0 4 6 】

図 3 は、1 5 3 日目の培地に形成された膵島を示す。左図は膵島の位相差画像である。中央図及び右図は、それぞれ膵島の先端部及び中心部の共焦点画像である。細胞をグルカゴンに対する抗体で染色して、細胞塊の中心に向かう矢印で示し、そして細胞をプロインスリンを標的とする抗体で染色して細胞集団の外に向かう矢印で示した。細胞は低血糖に应答してグルカゴンを放出する。共焦点画像から明らかにのように、細胞が細胞を取り囲んだ。この分析は、細胞が細胞集団の大多数を占め、そして細胞が膵島の中心部に局在することを明らかにして、これらの培養中で再構成が起こっていることを示唆している [非特許文献 2 3、2 4]。

【 0 0 4 7 】

20

これらの結果は、骨髄細胞が、インビトロで長期にわたって、膵島の形態を保持し、そして膵島細胞に特異的なマーカーの発現を保持するのに役立つことを明確に示唆している。

【 0 0 4 8 】

(実施例 3)

インスリン放出試験における膵島機能の評価

グルコースを投与するか又は投与しないときのインスリンの放出を測定して膵島細胞の機能の評価した。培養培地を 1 週間に 2 回採取して、E L I S A による基礎インスリン放出を試験するまで、- 8 0 で保管した。

【 0 0 4 9 】

30

高グルコース投与試験を以下のようにして 1 週間に 1 回実施した。培養液を採取して、培養細胞を R P M I 培養液で 1 回洗浄した。次いで培養液を高グルコース (2 0 m M) R P M I 1 6 4 0 に 1 5 分間及び 3 0 分間置き換えた。培養液を最終的に採取して、E L I S A によるインスリン試験まで - 8 0 で保管した。

【 0 0 5 0 】

標本 (細胞培養培養液又は組織抽出物) 中のインスリン濃度を、Human Insulin ELISA Kit (Linco Research, St. Charles, MO) を用い、製造会社の使用説明書に従って測定した。すなわち、インスリン標準品及び適切に希釈した (1 : 5 0 ~ 1 : 5 0 0) サンプルをインスリン抗体で被覆した 9 6 ウェルのマイクロプレートに加えて 4 で 2 時間培養した。洗浄後、抗 - ヒトインスリン酵素複合体をそれぞれのウェルに加えて室温で 3 0 分間培養した。洗浄後、酵素基質溶液を加えてから、暗所で室温にて、4 5 分間培養した。1 N の硫酸を加えて反応を停止した。4 5 0 n m における吸光を、 μ Quant (登録商標) マイクロプレートリーダー (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT) で読み取って、K C Junior (登録商標) マイクロプレートリーダーソフトウェア (Bio-Tek Instruments, Inc.) で濃度を計算した [非特許文献 2 0]。

40

【 0 0 5 1 】

細胞の機能的統合性を、基礎インスリン放出試験及び高グルコース投与に应答するインスリン分泌試験を用いて測定した。これらの試験は、骨髄細胞と共培養された膵島が培養 2 0 4 日にわたって安定した形でインスリンを放出することを明らかにした (図 4 a)。インスリン放出レベルは、開始時の約 8 0 0 0 μ U / m l から培養 1 9 5 日目の約 1 0 ,

50

000 $\mu\text{U}/\text{ml}$ でほぼ安定していた。経時的なヒトインスリン放出の増大は、経時的な膵島細胞の再生及び/又は増殖を示唆している。

【0052】

単独で培養した膵島は不安定なインスリン放出を示した(図4a)。すなわち、平均約9,500 $\mu\text{U}/\text{ml}$ で始まって、培養の28日目の約17,500の高さから約4,900 $\mu\text{U}/\text{ml}$ へ急激に下落する著しい変化を伴い、5週間目までに機能を失った。形態学的研究と関連付けると、これら15日目と28日目における急な山形の所見は、膵島単独培養中の死にかけている細胞からのインスリンの漏出の結果が原因である可能性が高かった。同様に、共培養の最初の21日間における比較的低い基礎インスリン放出は、機能安定化を達成する前の死にかけた細胞の不足に起因していたのであろう。

10

【0053】

グルコース投与(20mM)に応答するインスリン分泌の評価は、膵島細胞の単独培養が、高グルコース投与に対する応答能力を殆ど42日目までに、完全に70日目までに失うのに対して、骨髓細胞と培養した膵島細胞が培養中の204日にわたってグルコースに応答可能であることを明らかにした(図4b)。インスリン放出及びグルコース投与に応答するインスリン分泌に関する、膵島単独培養とBMとの膵島培養との間の差は、統計的に有意であった($p < 0.01$, $n = 6$)。

【0054】

(実施例4)

膵島細胞の骨髓細胞との共培養は細胞の生育及び膵島細胞塊の形成を促進する。

20

細胞の生育及び膵島細胞の形成を、グリッド(格子)上で膵島細胞を骨髓細胞有り又は無しで生育させて観察した。グリッドの上にある膵島細胞の概略図を図5aに示してある。グリッドを用いて、1つの膵島を生育について経時的に観察することができる。膵島細胞を追跡して、形態学的変化を顕微鏡写真として記録した。NIHの画像分析ソフトウェアを用いて膵島の表面積(ピクセル値)を定量した。3つの膵島の表面積値の平均を1つのサンプルとみなして、1群当たり6つのサンプルを集めた。

【0055】

培養の始めの3週間においては、機能的に有意な差があるにも係わらず、骨髓細胞有り及び無しで培養した膵島の間には形態学的な相違が殆ど観察されなかった(図示せず)。しかしながら、3週間後に骨髓細胞の存在下で培養した膵島が増殖し続けたのに対して、骨髓細胞の非存在下で培養した膵島は、減少して最終的に消失した(図5c)。膵島及び細胞の大きさの変化を、画像分析ソフトウェアを用いて定量した。その結果は、骨髓の膵島との共培養では、17日間(54日目~71日目)でその表面積を1.8倍増大したことを明らかにした。これは、大きさの増大及び膵島の形成を実質的に示さない膵島単独培養と比較すると優位な差であった(図5c、 $p < 0.05$, $n = 6$)。

30

【0056】

図5dは、13ヶ月にわたる共培養(右図)における新生初期(左図)のグリッドスライド上の膵島細胞の生育を示す。長時間にわたる共培養における大きさの実質的な増大がグリッドスライド上で容易に観察される。増大した膵島の大きさは、骨髓細胞が膵島の増殖を刺激した結果であると思われ、このことはそのKi67の有意な発現によって確認できる(図6)。

40

【0057】

図5e及びfは、膵島細胞が培養13ヶ月後に機能を保持していたことを明らかにしている。機能試験を上記のように実施した。インスリンの放出を、観察期間406日間の終わりまで観察した(図5e)。高グルコースに応答するインスリン分泌を、図5fに示すように、360日目、369日目、及び399日目に観察した。これらのデータは、少なくとも13ヶ月にわたって骨髓の存在下で生育した膵島細胞の持続した機能を明らかにしている。

【0058】

50

(実施例 5)

膵島 細胞の骨髄細胞との共培養は増殖を促進する。

図 6 は、培養液中で骨髄細胞有りで（上図）又は無しで（下図）生育した 153 日後の膵島 細胞培養物を示す。左側の図は位相差画像である。右側の図では、細胞がプロインスリン及び細胞増殖のマーカーである Ki 67 で染色されている。核は DAPI で可視化してある。上図は、細胞がプロインスリンで染色された細胞の大きな集団によって膵島形態を進展して、実質的なプロインスリン染色によって明らかにされたように増殖していることを示す。矢印で示されている細胞を含む、Ki 67 染色の多数のスポットも観察される。下図は殆どプロインスリン又は Ki 67 染色されていない比較的均質な単層を示す。膵島培養物では、細胞は基本的に DAPI 染色だけで可視化されている。これらの画像は、骨髄細胞の存在下で培養された膵島 細胞が、ある持続期間にわたって培養液中に、プロインスリンを発現し、膵島を形成し、そして増殖することを明らかにしている。反対に、膵島 細胞単独培養においては、特異的な膵島の形態が観察されなかった。同様に、膵島 細胞単独培養においては、プロインスリン又は Ki 67 染色が殆ど観察されなかった。

10

【0059】

(実施例 6)

膵島 細胞の骨髄細胞との共培養は肉眼的な膵島の形成を促進する。

20

膵島 細胞の骨髄細胞との長期培養後に、肉眼的な組織が形成された。図 7 a は、骨髄細胞と 190 日間培養した膵島細胞から生成された組織を表示している。バーは 1 cm を示している。組織は明確な 3 次元構造で長さが約 1.8 cm である。5 ミクロンの凍結切片を同程度の組織サンプルから調整し、ヘマトキシリン及びエオシンで染色して組織の形態を明らかにした（図 7 b）。組織学的染色は、切片に現れている、有孔骨格状組織で囲まれている膵島様構造（矢印で示してある）を組織が有していることを示した。組織のインスリン含量は、タンパク質 1 mg 当たり 56307 μ U であることが見出された（ELISA アッセイ）。この膵島様組織は、蛍光免疫組織化学で示されるように、主に 細胞及びほんの少しの 細胞を含有していた（図 7 c）。膵島 細胞をプロインスリンに対する抗体で（矢印 a で示してある）、 細胞をグルカゴンに対する抗体（矢印 b で示してある）で染色して、核を DAPI で染色した。

30

【0060】

この組織を、上記の方法を用いて、基礎インスリン放出及び高グルコースに応答する誘導インスリン分泌について分析した。予想通り、膵島 細胞 - 骨髄共培養で形成された組織は基礎インスリン放出（図 7 d）及び高グルコースに応答する誘導インスリン分泌（図 7 e）の両方を示した。同世代の膵島 細胞単独培養中の細胞からは実質的にインスリン分泌が観察されなかった。このデータは膵島 細胞の骨髄細胞との共培養が、膵島様構造及び機能を有する、高次の三次元構造の形成を可能にすることを明らかにしている。

【0061】

(実施例 7)

骨髄細胞の膵島細胞共培養との相互作用。

40

培養中の膵島 細胞を保護する骨髄細胞の能力を、組織化学及び免疫蛍光分析を用いて、更に明らかにした。細胞型間の相互作用を観察するために、PKH 細胞標識キット（Sigma, St. Louis, MO）を骨髄及び膵島 細胞の標識用に使用した。PKH 染色色素を、細胞の形態及び機能に影響を及ぼさずに生体を標識するために用いることができる。この染色色素は膜に組み込む長い脂溶性末端と結合する蛍光標識で、蛍光部位を細胞の表面付近に露出したままにする。この染色色素は集団中の 2 つの型の生細胞の追跡を可能にする。製造会社の説明書に従い、4 μ M の PKH 26（PKH 26 GL）及び PKH 2（PKH 2 GL）を、 1×10^6 個の骨髄細胞及び 50 個の膵島と共にそれぞれ 3 分間培養した。

50

細胞を別々にPBS中で洗浄した。冷却したBSAの1%PBS溶液を1mL加えて染色を停止した。細胞を5回ゆっくりペレット化してPBS中に再懸濁して結合していない何れの染色色素も除去した。標識化が完了した後、骨髓細胞と脾島を上記の条件下で共培養した。

【0062】

培養の7、24、48及び96時間後に細胞を採取した。細胞をプロインスリンを標的とする抗体で染色した。7時間目に骨髓細胞(太い矢印)が脾島に密接に接近して(図8a)、24時間目までに脾島中に盛んに移動した(図8b)ことが観察された。48時間後に、骨髓細胞は脾島の細胞に接着したように見えた(図8c、挿入図は高倍率)。高倍率画像は脾島細胞と接触している骨髓細胞を示した。更に、左上隅の高倍率画像(図8d、挿入図は高倍率)で示されているように、培養96時間目に、骨髓細胞は細胞と凝集して完全な脾島の形成を助長したとように見えた。骨髓細胞が脾島細胞と両側で結合していることに気付かれない。

10

【0063】

骨髓細胞の脾島細胞との相互作用も、リアルタイムの経時的顕微鏡検査法及び生体染色色素を用いて64時間培養した培養中の骨髓細胞及びヒト脾島を観察し、20分毎に記録した画像(図9)で分析した。骨髓細胞(太い矢印)は、図9a、b、及びcに見られるように、徐々に脾島に接近した。次いで、d、e、及びfに見られるように、脾島集団中への骨髓細胞の浸入があった。g、h、i、及びjに見られるように、骨髓細胞は次第に脾島の外に移動した(細い矢印)。この画像は、BM細胞は脾島細胞に接触して、脾島細胞の近傍に物質を放出することを明らかに示唆している。

20

【0064】

骨髓が脾島の再生にどのように関与しているかの知見をもたらすために、脾島細胞と培養している骨髓細胞の移動も長期にわたって観察した。図10では、生体染色色素PKH-26で標識したヒト骨髓細胞(矢印で示してある)が、3時間の共培養でヒト脾島(大きな集団)から分離し(図10a)、30日間の培養後に脾島内へ移動して(図10b)、60日間の培養で脾島の周囲にカプセル状の組織を形成した(図10c)。脾島の単独培養は、3時間で何ら赤色を示さず(図10d)、そして脾島は30日目に培養中で単層となって(図10e)、60日目にそれを維持した(10f)。(倍率は20倍)。

【0065】

30

(実施例9)

脾島細胞の骨髓細胞との共培養はサイトカインの放出を阻害する。

ヒト脾島で産生されて放出される、IL-1は脾島の生存及び機能に重要な役割を果たしていることが知られている[非特許文献25、26]。脾島培養物の生存におけるIL-1の役割を評価するために、骨髓細胞の存在下及び非存在下における脾島細胞培養液中のIL-1レベルを測定した。ヒトIL-1に特異的なELISAキットを用いて、脾島を単独で培養したときの脾島からのIL-1放出の穏やかな増大を明らかにした。サイトカイン産生のレベルは、培養物の蒔種時における検出不能なレベルから培養63日後の25倍増まで増大した。これは、IL-1濃度が非常に低い、骨髓細胞と培養した脾島(図11a)と対照的である。高グルコースの存在下でのIL-1放出の更なる評価は、脾島単独培養ににおいてIL-1放出のレベルが1500倍に増大したのに対して、脾島を骨髓と培養するとIL-1のレベルが非常に低く保持される(図11b)ことを示した。

40

【0066】

(実施例10)

脾島細胞の骨髓細胞との共培養は細胞の生存を促進する。

脾島細胞のアポトーシスが、インビボ及びインビトロにおける細胞死の主因であることが認識されている。ヒト脾島の生存及び機能の骨髓による調節が培養脾島のアポトー

50

シス過程に關与しているか否かについて分析した。ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ (TDT) が介在する dUTP ジゴキシゲニンニックエンド標識 (TUNEL) 方法 (Clone ApoAlert (登録商標) DNA Fragmentation assay kit BD Clontech) をアポトーシス核を検出するために、製造会社の説明書に従って用いた。すなわち、ヒト膵島調製物を 3% のパラホルムアルデヒド中に固定して、 H_2O_2 の 0.3% メタノール液中で 5 分間培養して、内因性のペルオキシダーゼを阻害した。スライドを TdT 培養緩衝液と 37 で 2 時間培養して、2 倍の SSC で反応を終結した。細胞も抗 - ヒトプロインスリン抗体で染色した。アポトーシス細胞を、処理手順の予備知識なしで、アポトーシス細胞の総数をインスリン陽性細胞の総数で割って計算して分析した。結果は、それぞれのスライドから無作為に抽出した 10 個以上の膵島の測定値から計算し、それぞれの試料から合計 4 つのスライドを測定した [非特許文献 21]。

10

【 0067 】

培養開始からの時間を関数としたアポトーシスの試験は、早ければ 7 時間で、骨髓細胞が膵島をアポトーシスから保護すること、及びこの効果が骨髓の非存在下で生育した膵島と比較したときに有意であったことを明らかにした (図 12a 及び b)。図 12a は、膵島単独 (I) 培養における 7 時間目に始まった実質的な TUNEL 染色を示す (上列)。骨髓細胞による膵島細胞アポトーシスの保護は培養時間の増大に伴って、例えば 48 時間目と 3 週間目の細胞を比較すると、より明瞭となる。膵島単独培養画像において、8 時間目に幾らかの非アポトーシス細胞が観察されるが、3 週間目には殆ど確認できない。このことは、全ての観察時点において細胞が実質的に非アポトーシスであることが明らかな膵島 + 骨髓 (I + B) 培養 (下列) とは明確に異なっていた。この実験の結果を定量して、培養液中のアポトーシス細胞の百分率を図 12b に示す。これは骨髓細胞の膵島に対するほぼ即時の保護効果を明らかにしている画像に示されることを反映している。

20

【 0068 】

(実施例 11)

臍帯血細胞又は CD34 + 末梢血細胞の存在下での膵島細胞の共培養。

BM 以外の細胞の膵島機能に対する効果を評価するために、全臍帯血細胞、動員末梢血細胞、及び動員末梢 CD34 + 細胞を上記の BM 培養と同じ条件下で膵島と培養して、これらが膵島細胞の生育をサポートして膵島の形成を促進するか否かについて確認した。指定の日数の培養後に、インスリン放出を分析した (図 13)。膵島のインスリン放出測定から得た値は、これらの細胞と、膵島単独培養との間で、有意な差を示さず、このことは BM 細胞が膵島細胞の生存に独特な利点を提供することを示唆している。

30

【 0069 】

(実施例 12)

骨髓細胞と共培養した膵島細胞を用いる糖尿病のマウスモデルにおける膵臓機能の再構築。

骨髓細胞と共培養した膵島細胞が、糖尿病のマウスモデルの膵島細胞移植方法において機能するかを評価するために、単独又は骨髓と共培養の何れか一方で 3 週間培養して保持した膵島細胞を膵島細胞の移植に用いた。マウス (8 週齢、雄、Balb/c SCID マウス) に体重 1 kg 当たり 200 mg の STZ を注射 (i.p.) して、3 日間連続して 400 mg / dL を越える血糖値を有すると定義されている、糖尿病を誘発した。骨髓なしで培養したヒト膵島細胞 (I3W = 1500 膵島 (IEQ)) 又は骨髓と培養した細胞 (I3W = 1500 膵島 (IEQ)) 及び 1×10^6 個の骨髓細胞を左、腎臓下の莢膜に移植した。血糖値を観察した (図 14)。

40

【 0070 】

4 ヶ月後に、骨髓と共培養した膵島細胞を移植した動物は正常な血糖値を有していて、血液は検出可能なヒトインスリン値 (157 uU / mL) を有していた。単独培養で生育した膵島細胞を移植した動物は高血糖を維持していた。これらのデータは膵臓のインスリ

50

ン応答が骨髄共培養で生育した移植された膵島によって置き換わったが、膵島単独培養で生育した膵島によっては置き換わらなかったことを強く示唆している。

【0071】

血糖コントロールが移植細胞によって誘発されたことを確実にするために、移植細胞を含有している腎臓を除去した。これに応答して、動物は高血糖になった。これらのデータは骨髄細胞と共培養した膵島細胞の、膵島細胞移植における使用に対する及び糖尿病の治療及び/又は改善に対する有用性を明らかにしている。

【0072】

(実施例13)

膵島細胞の骨髄細胞との共培養は膵島の凝集を促進する。

10

骨髄は膵島の凝集を促進する。先のデータは培養中の実質的な膵臓組織の形成を示しており、これは膵島の凝集を骨髄が刺激した結果であり得る。一連の経時的顕微鏡画像(図15)からのデータは、骨髄が膵島細胞の凝集及びまとまった膵臓組織の形成の過程を刺激することを示唆している。培養下でのグリッドの使用は、週に1回撮ったライブ顕微鏡画像中の個々の膵島移動の確認及び観察を可能にした。

【0073】

図15aでは、グリッドの幾つかの領域に3つの膵島が目に見える。図15b、c、及びdでは、3つの大きな膵島のうちの2つが互いの方向に移動して、図15eでは、最終的に結合してより大きな膵島を形成する(倍率=5倍)。生体染色色素PKH-26で骨髄を標識した後(別の実験で)、骨髄が結合した膵島の中に移動して、被包性の再構築された膵島を形成したことが見出された(図15f)。(倍率=20倍)

20

【0074】

(実施例14)

骨髄の非存在下及び存在下で培養している膵島細胞における遺伝子発現の分析。

膵島単独(islet)又は膵島と骨髄の共培養(islet+B)で生育したヒト膵島細胞における遺伝子発現を分析した。内分泌細胞に特異的な遺伝子及び再生転写因子遺伝子の発現レベルを、遺伝子特異的プライマーによるRT-PCRを用いて分析した。細胞を209日間培養し、総RNAを単離して逆転写し、そして得られたcDNAを通常の方法を用いてPCRで増幅した。

30

【0075】

内分泌特異的遺伝子GCG、INS、及びSSTの発現が、再生関連遺伝子NGN3の発現と同じように、共培養下の細胞において有意に増大したが、膵島単独培養下では増大しなかった(図16a及びb)。これらの結果は、インビトロで骨髄細胞がヒト膵島細胞の再生を刺激することを示唆している。同様に、膵臓に特異的な転写因子PDX1又はIPF1、PAX6、ISL1及びMAFAの発現における増大も共培養において見られたが、膵島単独培養では見られなかった(図16c)。これらの転写因子は、共培養下で観察される長期生存及び機能の増強をもたらすことができる、培養下の移動、分化、及び増殖を調節する。

40

【0076】

Mist1は、外分泌細胞で特異的に発現されて、膵臓腺房細胞の構成及び機能に必要である、ベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス型転写因子である。検討により、Mist-1の発現が膵島の進展及び機能を保持する微小環境をもたらすことが示唆されている。Mist1の発現は、膵島細胞を高次構造に構成することを可能にするだろう。

【0077】

(統計学的評価)

全てのデータを平均+/-SEMで表して、特に指示しない限り、スチューデントt-検定の後に分散分析(ANOVA)によって分析した。図表を作るためにSigma Plot (SPSS Inc. Chicago, IL)を用いた。全てのデータは3回の結果を示している。

50

【 0 0 7 8 】

(参照としての取り込み)

本明細書で挙げられているか又は引用されている、全ての文献、特許、特許出願、ペプチド及び核酸の受入番号は参照して本明細書中に組み込まれている。

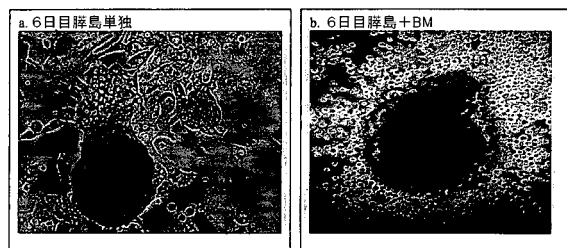
【 0 0 7 9 】

(均等物)

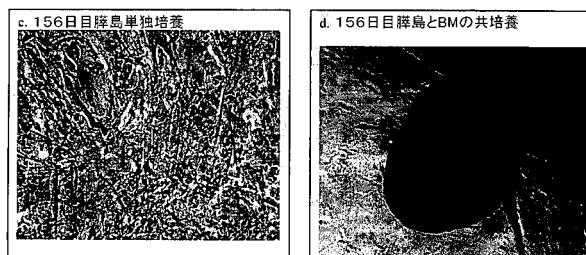
当業者は、本明細書に記載されている発明の特定な態様に対する多種均等物を、通常の実験のみを用いて、確認できるか、又は解明できるであろう。このような均等物は以下の特許請求の範囲に包含されるように意図されている。

【 図 1 】

図 1

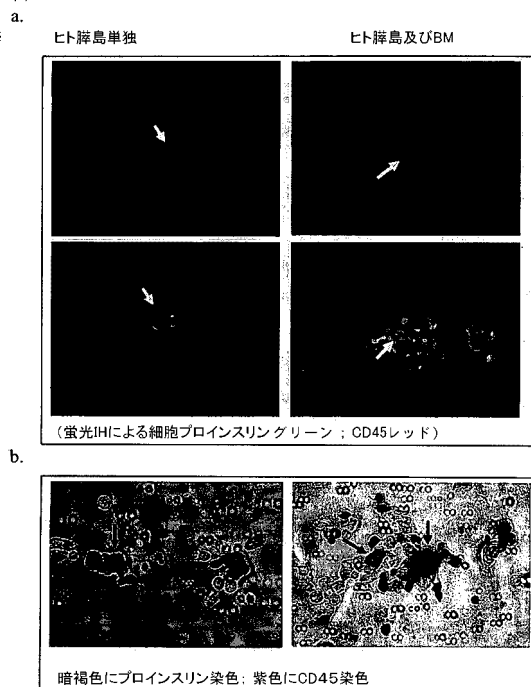


培養156日後の形態的变化



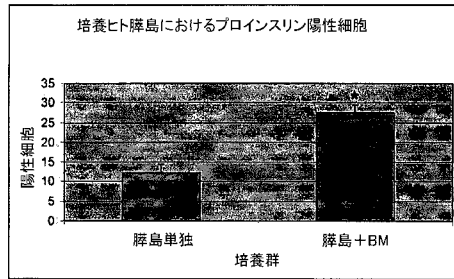
【 図 2 a - b 】

図 2

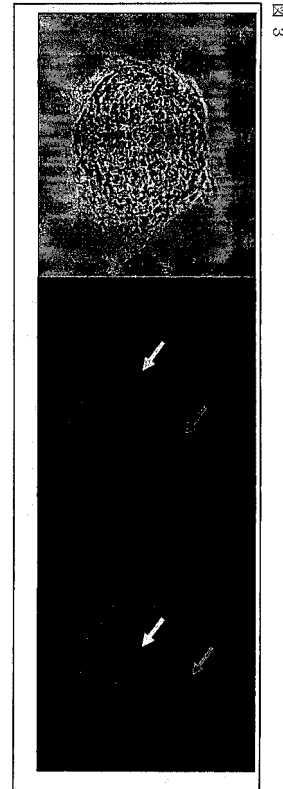


【図 2 c】

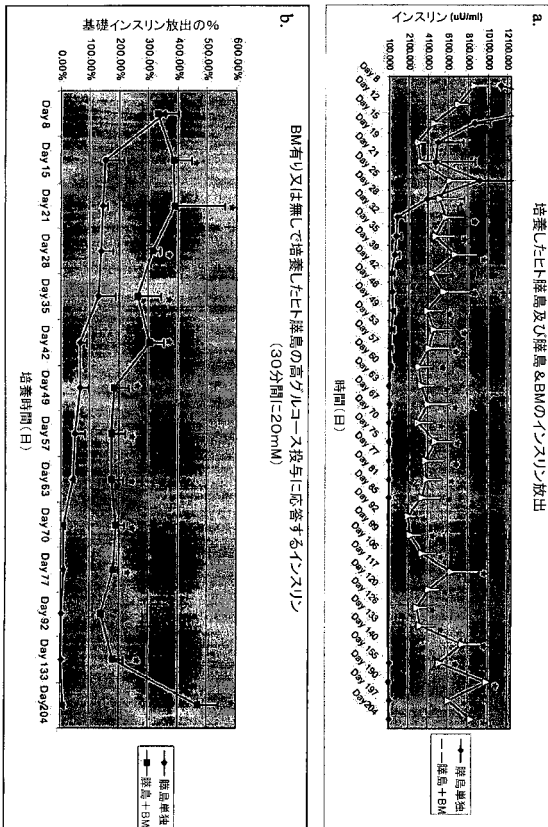
図 2c.



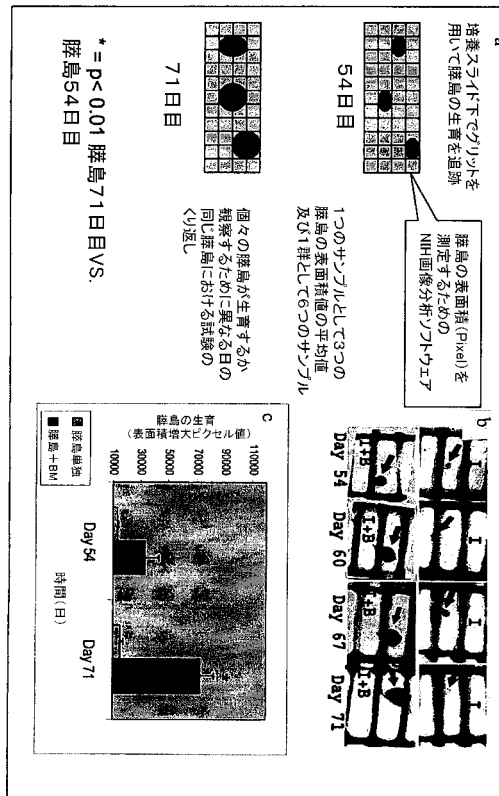
【図 3】



【図 4】



【図 5 a - c】



【図 5 d - f】



図 5e

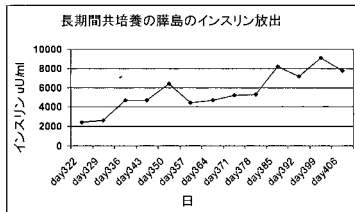
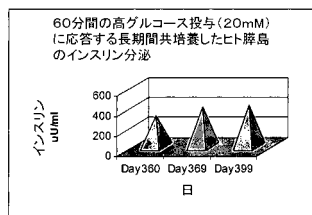


図 5f



【図 6】

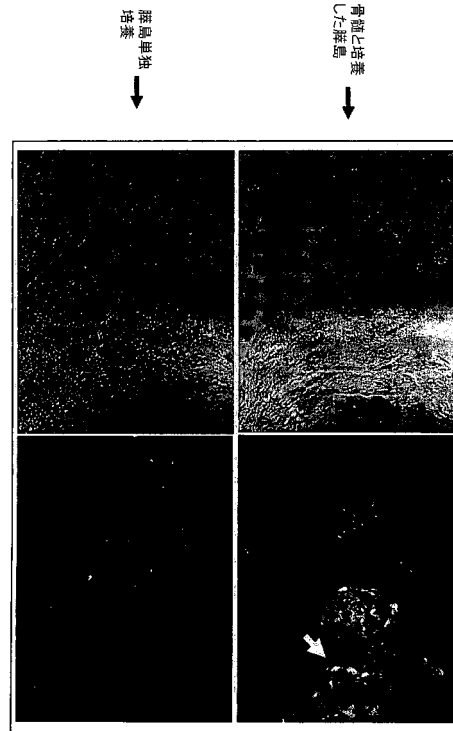
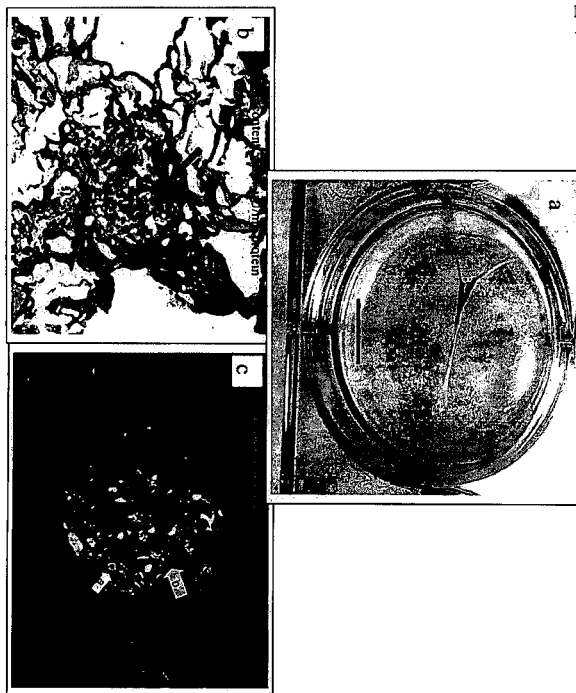


図 6

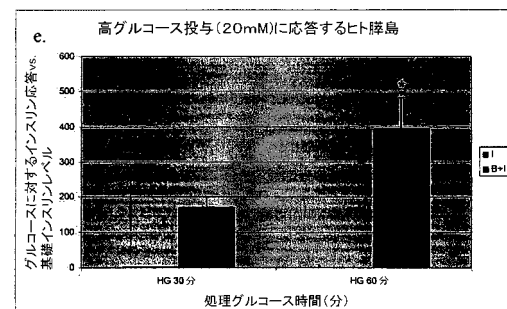
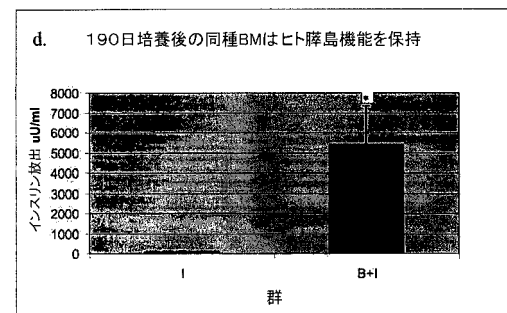
【図 7 a - c】



【図 7 d - e】

図 7

図 7



【図 8】

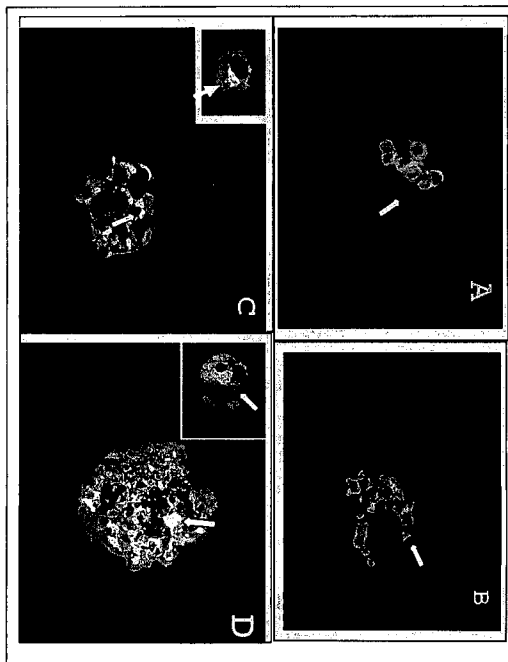


図 8

【図 9】

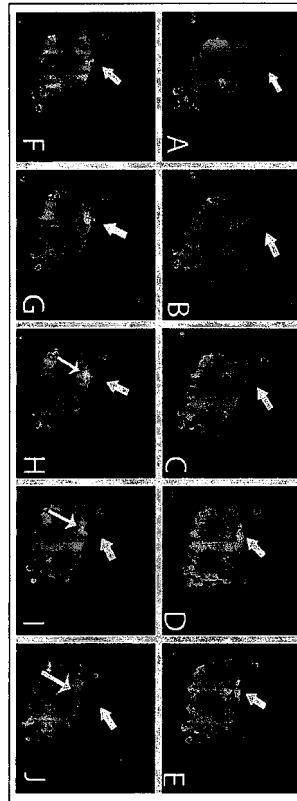


図 9

【図 10】

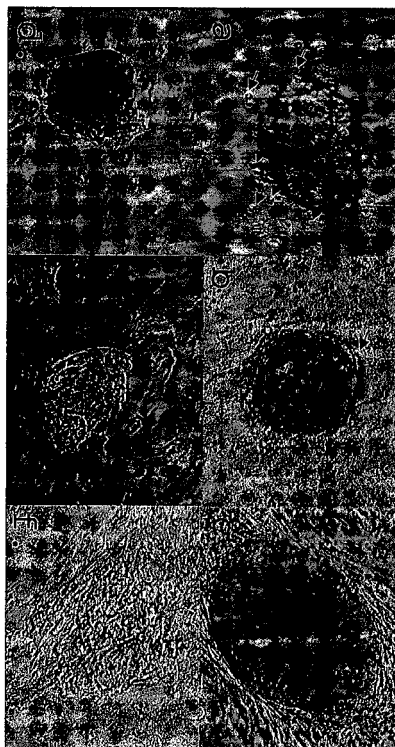
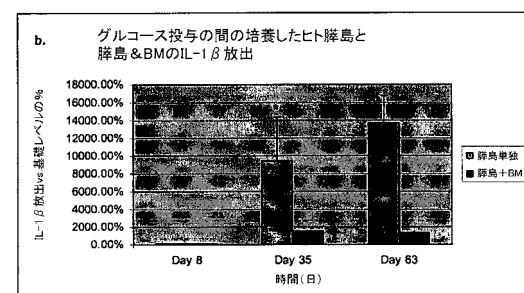
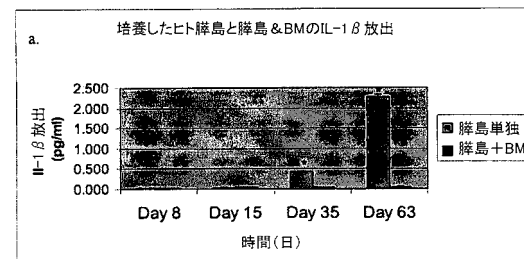


図 10

【図 11】

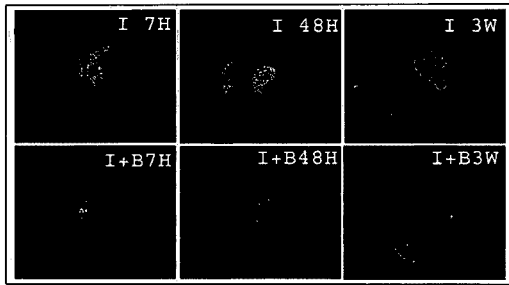
図 11



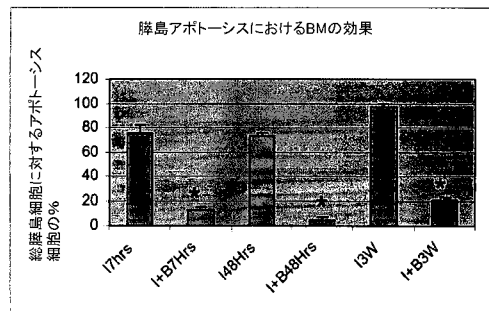
【図 12】

図 12

A.

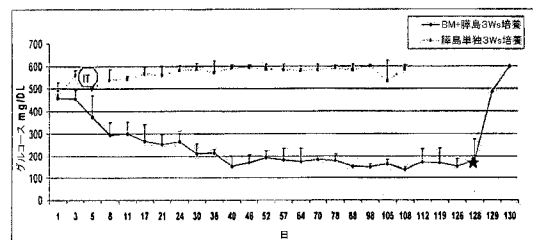


B.



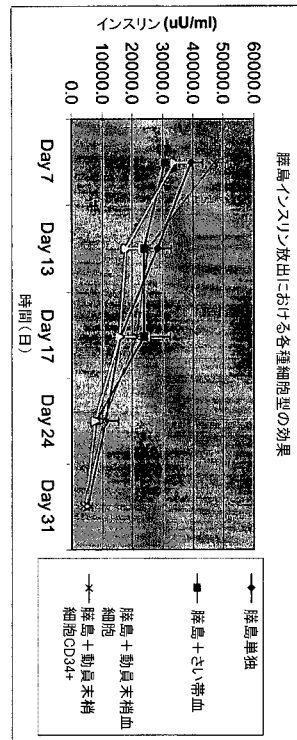
【図 14】

図 14



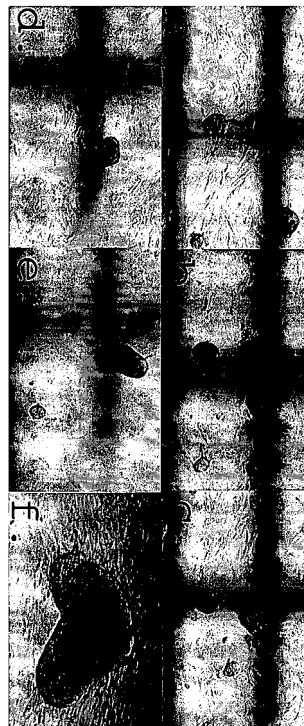
【図 13】

図 13



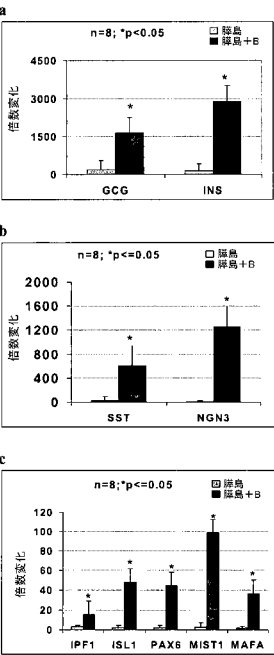
【図 15】

図 15



【図 16】

図 16



 フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 43/00 (2006.01) A 6 1 P 43/00 1 0 5

審査官 水落 登希子

(56)参考文献 Blood, 2 0 0 3 年, Vol.102, No.11, p.338a, Abst.1220
 糖尿病, 2 0 0 6 年 4 月 2 5 日, Vol.49, Suppl.1, p.S-42, S13-6
 Diabetes, 2 0 0 4 年, Vol.53, p.99-104
 人工臓器, 2 0 0 3 年, 第 3 2 巻 第 1 号, p.37-45

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 7 / 0 8
 A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 3 5 / 7 6
 A 6 1 P 3 / 1 0
 A 6 1 P 4 3 / 0 0
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 B I O S I S / M E D L I N E / W P I D S / W P I X (S T N)