

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-533746
(P2005-533746A)

(43) 公表日 平成17年11月10日(2005.11.10)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テマコード (参考)
A61K 35/39	A 61 K 35/39	4 B 02 4
A61K 31/436	A 61 K 31/436	4 B 06 5
A61K 31/7088	A 61 K 31/7088	4 C 08 4
A61K 38/00	A 61 K 45/00	4 C 08 6
A61K 38/22	A 61 P 3/10	4 C 08 7
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 74 頁) 最終頁に続く
(21) 出願番号	特願2003-530223 (P2003-530223)	(71) 出願人 592017633 ザ ジェネラル ホスピタル コーポレイ ション アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2 1 1 4, ボストン, フルーツ ストリ ート 5 5
(86) (22) 出願日	平成14年9月26日 (2002.9.26)	(74) 代理人 100083806 弁理士 三好 秀和
(85) 翻訳文提出日	平成16年5月25日 (2004.5.25)	(72) 発明者 ハベナー、 ジョエル エフ. アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 O 2 4 5 9 ニュートン グラント アベニ ュー 1 5 6
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/030700	(72) 発明者 ズレウスキー、 ヘンリク イスス国 シーエイチ-4 0 5 7 バセル オフェンバーガーストラッセ 5 5 最終頁に続く
(87) 國際公開番号	W02003/026584	
(87) 國際公開日	平成15年4月3日 (2003.4.3)	
(31) 優先権主張番号	09/963,875	
(32) 優先日	平成13年9月26日 (2001.9.26)	
(33) 優先権主張國	米国 (US)	
(31) 優先権主張番号	10/120,687	
(32) 優先日	平成14年4月11日 (2002.4.11)	
(33) 優先権主張國	米国 (US)	
(31) 優先権主張番号	10/136,891	
(32) 優先日	平成14年5月2日 (2002.5.2)	
(33) 優先権主張國	米国 (US)	

(54) 【発明の名称】 ランゲルハンス島の幹細胞および真性糖尿病の処置におけるその使用

(57) 【要約】

種々の膵島細胞（インスリン産生性 細胞を含む）ならびに肝細胞に分化し得る新規に同定された幹細胞を用いて、I型インスリン依存型真性糖尿病および他の状態を治療するための方法および組成物が記載される。ネスチンおよびABC G 2は、膵臓幹細胞に対する分子マーカーとして同定されているが、一方サイトケラチン-19は、異なるクラスの島の導管細胞に対するマーカーとして役立つ。それによってネスチンおよび／またはABC G 2ポジティブな幹細胞は、膵島から単離および培養されて、さらなる幹細胞または偽島様構造を獲得し得る方法が記載される。膵臓幹細胞のエキソビオ分化についての方法が開示される。それによって膵臓幹細胞は単離され、拡張され、そしてそれを必要とする患者に同種異系、同系または異種のいずれかとして移植されて、失われたかまたは損傷を受けたインスリン分泌性細胞または他の細胞に対する代替を提供し得る方法が記載される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

真性糖尿病を有する患者を治療する方法であって、
(a) ネスチングリーバーな臍臓幹細胞をドナーの臍島から単離するステップと、
(b) 該幹細胞がインスリン産生性細胞に分化するような該幹細胞を該患者に移植する
ステップと、
を含む方法。

【請求項 2】

上記ネスチングリーバーな臍臓幹細胞がまた A B C G 2 ポジティブであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

上記ネスチングリーバーな臍臓幹細胞がまた、 Oct 3 / 4 、 GLP - 1 レセプター、
ラトロフィリン (2型) 、 Hes - 1 、ネスチングリーバー、インテグリンサブユニット 6 および
1 、 C - kit 、 MDR - 1 、 SUR - 1 または Kir 6.2 からなる群より選択される
マーカーのうちの少なくとも 1 つについてポジティブであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

上記ネスチングリーバーな臍臓幹細胞が、 CD34 、 CD45 、 CD133 、 MHC クラス I および MHC クラス II からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも 1 つを発見しないことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 5】

真性糖尿病を有する患者を治療する方法であって、
(a) ABCG2 ポジティブな臍臓幹細胞をドナーの臍島から単離するステップと、
(b) 該幹細胞がインスリン産生性細胞に分化するような該幹細胞を該患者に移植する
ステップと、
を含む方法。

【請求項 6】

上記患者が、上記のステップ a の幹細胞に対する上記ドナーとして役立つことを特徴とする請求項 1 または 5 に記載の方法。 30

【請求項 7】

上記移植ステップの前に、上記幹細胞が、 EGF 、 bFGF - 2 、高グルコース、 KG F 、 HGF / SF 、 GLP - 1 、 exendin - 4 、 IDH - 1 、 IDH - 1 をコードする核酸分子、ベータセルリン、アクチビン A 、 TGF - およびそれらの組み合わせからなる群より選択される因子でエキソビオ処理されることを特徴とする請求項 1 または 5 に記載の方法。

【請求項 8】

上記移植ステップが、内視鏡的逆行性注入を介して行われることを特徴とする請求項 1 または 5 に記載の方法。 40

【請求項 9】

請求項 1 または 5 に記載の方法であって、
(c) 上記患者を免疫抑制剤で治療するステップ、
をさらに含むことを特徴とする方法。

【請求項 10】

上記免疫抑制剤が、 FK - 506 、シクロスボリンおよび GAD65 抗体からなる群より選択されることを特徴とする請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

真性糖尿病を有する患者を治療する方法であって、
(a) ネスチングリーバーな臍臓幹細胞をドナーの臍島から単離するステップと、
(b) 該幹細胞をエキソビオで拡張して前駆細胞を產生するステップと、
(c) インスリン産生性 細胞に分化するような該前駆細胞を該患者に移植するステッ 50

プと、
を含む方法。

【請求項 1 2】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞がまた A B C G 2 ポジティブであることを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞がまた、Oct 3 / 4、GLP-1レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes-1、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C-kit、MDR-1、SUR-1またはKir 6.2 からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも 1 つについてポジティブであることを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。10

【請求項 1 4】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞が、CD34、CD45、CD133、MHC クラス I および MHC クラス II からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも 1 つを発現しないことを特徴とする請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

真性糖尿病を有する患者を治療する方法であって、
(a) A B C G 2 ポジティブな臍臓幹細胞をドナーの臍島から単離するステップと、
(b) 該幹細胞をエキソビオで拡張して前駆細胞を產生するステップと、
(c) インスリン產生性 細胞に分化するような該前駆細胞を該患者に移植するステップと、20
を含む方法。

【請求項 1 6】

上記患者が、上記のステップ a の幹細胞に対する上記ドナーとして役立つことを特徴とする請求項 1 1 または 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

上記拡張ステップが、EGF、bFGF-2、高グルコース、KGF、HGF/SF、GLP-1、exendin-4、IDX-1、IDX-1 をコードする核酸分子、ベータセルリン、アクチビンA、TGF- およびそれらの組み合わせからなる群より選択される因子の存在環境下で行われることを特徴とする請求項 1 1 または 1 5 に記載の方法。30

【請求項 1 8】

上記移植ステップが、内視鏡的逆行性注入を介して行われることを特徴とする請求項 1 1 または 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 1 または 1 5 に記載の方法であって、
(d) 上記患者を免疫抑制剤で治療するステップ、
をさらに含むことを特徴とする方法。

【請求項 2 0】

上記免疫抑制剤が、FK-506、シクロスボリンおよびGAD65 抗体からなる群より選択されることを特徴とする請求項 1 9 に記載の方法。40

【請求項 2 1】

真性糖尿病を有する患者を治療する方法であって、
(a) ネスチンポジティブな臍臓幹細胞をドナーの臍島から単離するステップと、
(b) 該幹細胞を拡張して前駆細胞を產生するステップと、
(c) 培養物中の該前駆細胞を分化させて偽島様集団を形成するステップと、
(d) 該偽島様集団を該患者に移植するステップと、
を含む方法。

【請求項 2 2】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞がまた A B C G 2 ポジティブであることを特徴とする請求項 2 1 に記載の方法。50

【請求項 2 3】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞がまた、Oct 3 / 4、GLP-1レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes-1、ネスチン、インテグリンサブユニット6および1、C-kit、MDR-1、SUR-1またはKir6.2からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つについてポジティブであることを特徴とする請求項21に記載の方法。

【請求項 2 4】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞が、CD34、CD45、CD133、MHCクラスIおよびMHCクラスIIからなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つを発現しないことを特徴とする請求項21に記載の方法。

10

【請求項 2 5】

真性糖尿病を有する患者を治療する方法であって、
(a) ABCG2ポジティブな臍臓幹細胞をドナーの臍島から単離するステップと、
(b) 該幹細胞を拡張して前駆細胞を産生するステップと、
(c) 培養物中の該前駆細胞を分化させて偽島様集団を形成するステップと、
(d) 該偽島様集団を該患者に移植するステップと、

を含む方法。

【請求項 2 6】

上記患者が、上記のステップaの幹細胞に対する上記ドナーとして役立つことを特徴とする請求項21または25に記載の方法。

20

【請求項 2 7】

上記拡張ステップが、EGF、bFGF-2、高グルコース、KGF、HGF/SF、GLP-1、exendin-4、IDX-1、IDX-1をコードする核酸分子、ベータセルリン、アクチビンA、TGF- およびそれらの組み合わせからなる群より選択される因子の存在環境下で行われることを特徴とする請求項21または25に記載の方法。

【請求項 2 8】

上記移植ステップが、内視鏡的逆行性注入を介して行われることを特徴とする請求項21または25に記載の方法。

【請求項 2 9】

請求項21または25に記載の方法であって、
(e) 上記患者を免疫抑制剤で治療するステップ、
をさらに含むことを特徴とする方法。

30

【請求項 3 0】

上記免疫抑制剤が、FK-506、シクロスボリンおよびGAD65抗体からなる群より選択されることを特徴とする請求項29に記載の方法。

【請求項 3 1】

臍島から幹細胞を単離する方法であって、
(a) 臍島をドナーから取り出すステップと、
(b) 該臍島由来の細胞を培養するステップと、
(c) 該培養物からネスチンポジティブなクローンを選択するステップと、

40

を含む方法。

【請求項 3 2】

上記ネスチンポジティブなクローンがまたABCG2ポジティブなクローンであることを特徴とする請求項31に記載の方法。

【請求項 3 3】

上記ネスチンポジティブなクローンがまた、Oct 3 / 4、GLP-1レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes-1、ネスチン、インテグリンサブユニット6および1、C-kit、MDR-1、SUR-1またはKir6.2からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つについてポジティブであることを特徴とする請求項31に記載の方法。

50

【請求項 3 4】

上記ネスチンポジティブなクローンが、CD34、CD45、CD133、MHCクラスIおよびMHCクラスIIからなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つを発現しないことを特徴とする請求項31に記載の方法。

【請求項 3 5】

臍島から幹細胞を単離する方法であって、
 (a) 臍島をドナーから取り出すステップと、
 (b) 該臍島由来の細胞を培養するステップと、
 (c) 該培養物からABC G 2ポジティブなクローンを選択するステップと、
 を含む方法。

10

【請求項 3 6】

前記培養ステップが、第一にコンカナバリンAでコーティングされた容器中で行われ、次いで再びコンカナバリンAでコーティングされない容器中で行われることを特徴とする請求項31または35に記載の方法。

【請求項 3 7】

請求項31または35に記載の方法であって、
 (d) EG F、bFGF - 2、高グルコース、KGF、HGF / SF、GLP - 1、exendin - 4、ID X - 1、ID X - 1をコードする核酸分子、ベータセルリン、アクチビンA、TGF - およびそれらの組み合わせからなる群より選択される1の因子での処理によって、上記ネスチンポジティブなクローンを拡張するさらなるステップ、を含むことを特徴とする方法。

20

【請求項 3 8】

請求項35に記載の方法であって、
 (d) EG F、bFGF - 2、高グルコース、KGF、HGF / SF、GLP - 1、exendin - 4、ID X - 1、ID X - 1をコードする核酸分子、ベータセルリン、アクチビンA、TGF - およびそれらの組み合わせからなる群より選択される1の因子での処理によって、上記ABC G 2ポジティブなクローンを拡張するさらなるステップ、を含むことを特徴とする方法。

30

【請求項 3 9】

臍臓前駆細胞へのネスチンポジティブな臍臓幹細胞の分化を誘導する方法であって、
 ネスチンポジティブな臍臓幹細胞を、EG F、bFGF - 2、高グルコース、KGF、HGF / SF、ID X - 1、ID X - 1をコードする核酸分子、GLP - 1、exendin - 4、ベータセルリン、アクチビンA、TGF - およびそれらの組み合わせからなる群より選択される1の因子で処理することによって、該幹細胞を引き続き臍臓前駆細胞に分化させるステップ、を含む方法。

30

【請求項 4 0】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞がまたABC G 2ポジティブなクローンであることを特徴とする請求項39に記載の方法。

40

【請求項 4 1】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞がまた、Oct3 / 4、GLP - 1レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes - 1、ネスチン、インテグリンサブユニット6および1、C-kit、MDR - 1、SUR - 1またはKir6.2からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つについてポジティブであることを特徴とする請求項39に記載の方法。

40

【請求項 4 2】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞が、CD34、CD45、CD133、MHCクラスIおよびMHCクラスIIからなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つを発現しないことを特徴とする請求項39に記載の方法。

50

【請求項 4 3】

臍臓前駆細胞への A B C G 2 ポジティブな臍臓幹細胞の分化を誘導する方法であって、 A B C G 2 ポジティブな臍臓幹細胞を、 E G F 、 b F G F - 2 、高グルコース、 K G F 、 H G F / S F 、 I D X - 1 、 I D X - 1 をコードする核酸分子、 G L P - 1 、 e x e n d i n - 4 、ベータセルリン、アクチビンA、 T G F - およびそれらの組み合わせからなる群より選択される1の因子で処理することによって、該幹細胞を引き続き臍臓前駆細胞に分化させるステップ、
を含む方法。

【請求項 4 4】

前記臍臓前駆細胞が引き続き偽島様集団を形成することを特徴とする請求項 3 9 または 10
4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

神経幹細胞ではない、単離されたネスチンポジティブなヒト臍臓幹細胞または単離されたネスチンポジティブなヒト肝臓幹細胞。

【請求項 4 6】

上記細胞がまた A B C G 2 ポジティブであることを特徴とする請求項 4 5 に記載の単離された幹細胞。

【請求項 4 7】

上記細胞がまた、 O c t 3 / 4 、 G L P - 1 レセプター、ラトロフィリン(2型)、 H e s - 1 、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1 、 C - k i t 、 M D R - 1 、 S U R - 1 または K i r 6 . 2 からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つについてポジティブであることを特徴とする請求項 4 5 に記載の単離された幹細胞。
20

【請求項 4 8】

上記細胞が、 C D 3 4 、 C D 4 5 、 C D 1 3 3 、 M H C クラスIおよびM H C クラスI I からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つを発現しないことを特徴とする請求項 4 5 に記載の単離された幹細胞。

【請求項 4 9】

神経幹細胞ではない、単離された A B C G 2 ポジティブなヒト臍臓幹細胞または単離された A B C G 2 ポジティブなヒト肝臓幹細胞。

【請求項 5 0】

上記細胞がまた、 O c t 3 / 4 、 G L P - 1 レセプター、ラトロフィリン(2型)、 H e s - 1 、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1 、 C - k i t 、 M D R - 1 、 S U R - 1 または K i r 6 . 2 からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つについてポジティブであることを特徴とする請求項 4 9 に記載の単離された細胞。
30

【請求項 5 1】

上記細胞が、 C D 3 4 、 C D 4 5 、 C D 1 3 3 、 M H C クラスIおよびM H C クラスI I からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つを発現しないことを特徴とする請求項 4 9 に記載の単離された細胞。

【請求項 5 2】

上記細胞が、 C D 3 4 、 C D 4 5 、 C D 1 3 3 、 M H C クラスIおよびM H C クラスI I からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つを発現しないことを特徴とする請求項 4 9 に記載の単離された幹細胞。
40

【請求項 5 3】

分化してインスリン産生性 細胞を形成することを特徴とする請求項 4 5 または 4 9 に記載の単離された幹細胞。

【請求項 5 4】

分化してグルカゴン産生性 細胞を形成することを特徴とする請求項 4 5 または 4 9 に記載の単離された幹細胞。

【請求項 5 5】

分化して偽島様集団を形成することを特徴とする請求項 4 5 または 4 9 に記載の単離さ
50

れた幹細胞。

【請求項 5 6】

分化して肝細胞を形成することを特徴とする請求項 4 5 または 4 9 に記載の単離された幹細胞。

【請求項 5 7】

臍細胞を幹細胞として同定する方法であって、

細胞を標識されたネスチングリーン特異的抗体と接触させることによって、該細胞が該抗体で標識されるようになる場合に該細胞が幹細胞として同定されるステップ、
を含む方法。

【請求項 5 8】

細胞を、A B C G 2、O c t 3 / 4、G L P - 1 レセプター、ラトロフィリン(2型)、H e s - 1、ネスチングリーン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C - k i t、M D R - 1、S U R - 1 または K i r 6 . 2 からなる群より選択されるマーカーに結合する標識された抗体と接触させることによって、該細胞が該抗体で標識されるようになる場合に該細胞が幹細胞として同定されるステップ、

をさらに含むことを特徴とする請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

上記細胞を、標識されたサイトケラチン - 19 特異的抗体と接触させることによって、該細胞が該抗体で標識されるようにならない場合に該細胞が幹細胞として同定されるステップ、

をさらに含むことを特徴とする請求項 3 0 に記載の方法。

【請求項 6 0】

上記細胞を、標識された I V 型コラーゲン特異的抗体と接触させることによって、該細胞が該抗体で標識されるようにならない場合に該細胞が幹細胞として同定されるステップ、

をさらに含むことを特徴とする請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 1】

上記細胞を、C D 3 4、C D 4 5、C D 1 3 3、M H C クラス I および M H C クラス II からなる群より選択されるマーカーに結合する標識された抗体と接触させることによって、該細胞が該抗体で標識されるようにならない場合に該細胞が幹細胞として同定されるステップ、

をさらに含むことを特徴とする請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 2】

肝細胞に分化するようにネスチングリーンポジティブな臍臓幹細胞を誘導する方法であって、

該ネスチングリーンポジティブな臍臓幹細胞を、肝細胞、または肝細胞に分化する前駆細胞に分化するように該幹細胞を誘導する有効量の因子で処理するステップ、
を含む方法。

【請求項 6 3】

上記ネスチングリーンポジティブな臍臓幹細胞がまた A B C G 2 ポジティブであることを特徴とする請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 4】

上記ネスチングリーンポジティブな臍臓幹細胞がまた、O c t 3 / 4、G L P - 1 レセプター、ラトロフィリン(2型)、H e s - 1、ネスチングリーン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C - k i t、M D R - 1、S U R - 1 または K i r 6 . 2 からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも 1 つについてポジティブであることを特徴とする請求項 6 2 に記載の方法。

【請求項 6 5】

上記ネスチングリーンポジティブな臍臓幹細胞が、C D 3 4、C D 4 5、C D 1 3 3、M H C クラス I および M H C クラス II からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも 1 つを発現しないことを特徴とする請求項 6 2 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 6 6】

肝細胞に分化するように A B C G 2 ポジティブな臍臓幹細胞を誘導する方法であって、該 A B C G 2 ポジティブな臍臓幹細胞を、肝細胞、または肝細胞に分化する前駆細胞に分化するように該幹細胞を誘導する有効量の因子で処理するステップ、を含む方法。

【請求項 6 7】

上記因子がサイクロパミンであることを特徴とする請求項 6 2 または 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

肝臓疾患有する患者を治療する方法であって、

(a) ネスチンポジティブな臍臓幹細胞をドナーの臍島から単離するステップと、
(b) 該幹細胞が肝細胞に分化するような該幹細胞を該患者に移植するステップと、
を含む方法。

【請求項 6 9】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞がまた A B C G 2 ポジティブであることを特徴とする請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 0】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞がまた、Oct 3 / 4、GLP-1 レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes-1、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C-kit、MDR-1、SUR-1 または Kir 6.2 からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも 1 つについてポジティブであることを特徴とする請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 1】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞が、CD34、CD45、CD133、MHC クラス I および MHC クラス II からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも 1 つを発現しないことを特徴とする請求項 6 8 に記載の方法。

【請求項 7 2】

肝臓疾患有する患者を治療する方法であって、

(a) A B C G 2 ポジティブな臍臓幹細胞をドナーの臍島から単離するステップと、
(b) 該幹細胞が肝細胞に分化するような該幹細胞を該患者に移植するステップと、
を含む方法。

【請求項 7 3】

上記患者が、上記のステップ a の幹細胞に対する上記ドナーとして役立つことを特徴とする請求項 6 8 または 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

肝臓疾患有する患者を治療する方法であって、

(a) ネスチンポジティブな臍臓幹細胞をドナーの臍島から単離するステップと、
(b) 該幹細胞をエキソビオで拡張して前駆細胞を產生するステップと、
(c) 該前駆細胞が肝細胞に分化するような該前駆細胞を該患者に移植するステップと、
を含む方法。

【請求項 7 5】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞がまた A B C G 2 ポジティブであることを特徴とする請求項 7 4 に記載の方法。

【請求項 7 6】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞がまた、Oct 3 / 4、GLP-1 レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes-1、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C-kit、MDR-1、SUR-1 または Kir 6.2 からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも 1 つについてポジティブであることを特徴とする請求項 7 4 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 7 7】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞が、CD34、CD45、CD133、MHCクラスIおよびMHCクラスIIからなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つを発現しないことを特徴とする請求項74に記載の方法。

【請求項 7 8】

肝臓疾患有する患者を治療する方法であって、

(a) ABCG2ポジティブな臍臓幹細胞をドナーの臍島から単離するステップと、

(b) 該幹細胞をエキソビオで拡張して前駆細胞を產生するステップと、

(c) 該前駆細胞が肝細胞に分化するような該前駆細胞を該患者に移植するステップと

10

、
を含む方法。

【請求項 7 9】

上記患者が、上記のステップaの幹細胞に対する上記ドナーとして役立つことを特徴とする請求項74または78に記載の方法。

【請求項 8 0】

肝臓疾患有する患者を治療する方法であって、

(a) ネスチンポジティブな臍臓幹細胞をドナーの臍島から単離するステップと、

(b) エキソビオで該幹細胞を分化させて肝細胞を產生するステップと、

(c) 該肝細胞を該患者に移植するステップと、

を含む方法。

20

【請求項 8 1】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞がまたABCG2ポジティブであることを特徴とする請求項80に記載の方法。

【請求項 8 2】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞がまた、Oct3/4、GLP-1レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes-1、ネスチン、インテグリンサブユニット6および1、C-kit、MDR-1、SUR-1またはKir6.2からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つについてポジティブであることを特徴とする請求項80に記載の方法。

30

【請求項 8 3】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞が、CD34、CD45、CD133、MHCクラスIおよびMHCクラスIIからなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つを発現しないことを特徴とする請求項80に記載の方法。

【請求項 8 4】

肝臓疾患有する患者を治療する方法であって、

(a) ABCG2ポジティブな臍臓幹細胞をドナーの臍島から単離するステップと、

(b) エキソビオで該幹細胞を分化させて肝細胞を產生するステップと、

(c) 該肝細胞を該患者に移植するステップと、

を含む方法。

40

【請求項 8 5】

上記患者が、上記のステップaの幹細胞に対する上記ドナーとして役立つことを特徴とする請求項80または84に記載の方法。

【請求項 8 6】

生理学的に適合性のキャリアと混合された請求項45に記載の単離された幹細胞を含む薬学的組成物。

【請求項 8 7】

生理学的に適合性のキャリアと混合された請求項46に記載の単離された幹細胞を含む薬学的組成物。

【請求項 8 8】

生理学的に適合性のキャリアと混合された請求項49に記載の単離された幹細胞を含む

50

薬学的組成物。

【請求項 8 9】

哺乳動物における器官移植の前に免疫寛容状態をあらかじめ誘導する方法であって、
(a) ネスチングポジティブな臍臓幹細胞をドナーの臍島から単離するステップと、
(b) 該ネスチングポジティブな臍臓幹細胞を移植レシピエントに移植するステップと、
(c) 該ドナーの幹細胞に対して該レシピエントにおいて免疫寛容状態を誘導するステップと、
(d) 免疫抑制剤の投与を伴わずに、該ドナーから該レシピエントに器官を移植するステップと、
を含む方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

(優先権)

本出願は、2001年9月26日に出願された米国出願番号09/963,875号、
2002年4月11日に出願された米国出願番号10/120,687号、および2002年5月2日に出願された米国出願番号10/136,891号に対する優先権を主張する。

【0 0 0 2】

(発明の技術分野)

本発明は、幹細胞およびその分化に関する。特に、臍臓のランゲルハンス島の細胞およびネスチングポジティブな肝臍幹細胞、および幹細胞または前駆細胞からのそれらの分化、ならびに移植における臍臓の幹細胞、前駆細胞および分化した細胞、またはネスチングポジティブな肝臍の幹細胞または前駆細胞の使用に関する。

20

【0 0 0 3】

(発明の背景)

本発明は、少なくとも部分的に国立衛生研究所によって与えられた米国政府基金、助成金番号DK30457、DK30834、DK55365、DK60125を用いてもたらされ、従って米国政府は、本発明において特定の権利を保持し得る。

30

【0 0 0 4】

胚発生および成熟哺乳動物の両方の間における臍島細胞の起源は、集中的な研究にもかかわらず不明なままである。特定の導管上皮細胞は、分化または分化転換のいずれかを生じ、細胞および成熟した島に見出される他の細胞型を形成し得る(Boouwens、1998)。単離された島由来の導管細胞は、培養物において増殖し得、そして動物に移植される場合に機能的な細胞に分化し得る(Corneliusら、1997)。

【0 0 0 5】

exendin-4(長時間作用型GLP-1アゴニスト)が、ラットに投与される場合に、導管前駆細胞からの細胞の分化(新生)および細胞の増殖の両方を刺激することが実証されている。2型糖尿病の部分臍切除ラットモデルにおいて、臍切除後10日間のexendin-4の毎日の投与は、糖尿病の発達を減じた。exendin-4は、

40

細胞の新生および増殖によって、臍臓の再生および細胞集団の拡張を刺激することがまた実証されている(Xuら、1999、Diabetes、48:2270~2276)。

【0 0 0 6】

Ramiyalaは、成体の前糖尿病性NODマウスの臍管から単離された多能性幹細胞からインビトロで作製された島が分化して、糖尿病性NODマウスに被包を伴うかまたは伴わずに移植された後にインスリン依存型糖尿病を逆転し得るグルコース反応性の島を形成することを実証した(Ramiyala、2000、Nature Med.、6:278~282)。

【0 0 0 7】

50

腸管によって產生されるインスリン指向性ホルモン、グルカゴン様ペプチド（G L P）-1は、膵臓の発生およびインスリン遺伝子の転写調節に重大なホメオドメイン転写因子I D X - 1の膵臓発現を増強する。付隨して、糖尿病性マウスに投与されるG L P - 1は、インスリン分泌を刺激し、そしてその血糖レベルを効果的に低下させる。G L P - 1はまた、細胞の新生および島のサイズを増強する（S t o f f e r sら、2 0 0 0、D i a b e t e s、4 9 : 7 4 1 ~ 7 4 8）。

【0008】

F e r b e r らは、マウス肝臓へのP D X - 1（また、I D X - 1として公知である）導入遺伝子のアデノウイルス媒介性のインビオ移植が、肝細胞部分集団の細胞表現型への超転換（t r a n s c o n v e r s i o n）をもたらすことを実証した。P D X - 1アデノウイルスペクターを用いたマウスの静脈内注入後に、肝細胞の60%までがP D X - 1を合成したことが実証されている。肝細胞の60%がアデノウイルスに感染し、そしてP D X - 1を発現するようになったが、これらの細胞の5~8%の部分集合のみが、インスリン発現性細胞に変化した。免疫反応性のインスリン濃度は、処置マウスの肝臓および血清において増大した。P D X - 1で処置されたマウスは、ストレプトゾトシン誘導性の糖尿病を乗り切り、そして血糖を標準的にさえし得る（F e r b e r ら、2 0 0 0、N a t u r e M e d .、6 : 5 6 8 ~ 5 7 2）。

【0009】

単離された島から得られた導管細胞培養物は、インスリン分泌性細胞を生じさせ得る細胞を含むようであるが、これらの細胞が眞の幹細胞を表すか、または単に分化転換を受ける導管上皮細胞を表すかどうかは不確かなままである。たとえこのような調製物が本物の幹細胞を含んだとしても、どの画分が幹細胞を表し、そしてどの汚染細胞型が存在し得るかは未知である。当該分野において、膵臓組織から特定の細胞型を単離する必要性が存在し、この細胞型は、分子マーカーを用いて幹細胞として特徴付けられ、そして多能性かつ長期間増殖することが実証される。

【0010】

神経組織およびグリア組織に分化し得る多能性の幹細胞は、脳において同定されている。神経幹細胞は、特にネスチン（中間径フィラメントタンパク質）を発現する（L e n d a h l ら、1 9 9 0；D a h l s t r a n d ら、1 9 9 2）。ネスチンは、発生中のラット胚の神経管においてE 1 1日に発現され、大脳皮質においてE 1 6日に最大レベルの発現に到達し、そして成体皮質において減少し、上衣細胞の集団に限定されるようになる（L e n d a h l ら、1 9 9 0）。発生中の神経細胞および膵島細胞は、一般的な細胞性マーカーによって特徴付けられる表現型の類似性を示す。

【0011】

本発明は、神経幹細胞および肝臓幹細胞に類似し、そして島の細胞（グルカゴン）および細胞（インスリン）に分化する膵島幹／前駆細胞（I P C）の集団に関する。本発明はまた、ネスチンポジティブな肝細胞に関する。本発明に従ったI P Cは、免疫学的にサイレント／免疫特権（i m m u n o p r i v i l e g e d）であり、そして自己として移植レシピエントによって認識される。本発明に従ったI P Cは、同種異系障壁および異種障壁を越えた移植について使用され得る。

【0012】

当該分野において、同種異系障壁および異種障壁を越えて幹細胞を移植する方法に対する必要性が存在する。

【0013】

島、ネスチンポジティブな膵臓幹細胞またはネスチンポジティブな肝臓幹細胞が、同種異系障壁または異種障壁を越えてレシピエントに移植され、そして移植片拒絶が生じないI型真性糖尿病を治療する方法に対する必要性が当該分野においてまた存在する。

【0014】

島、ネスチンポジティブな膵臓幹細胞またはネスチンポジティブな肝臓幹細胞が、同種異系障壁または異種障壁を越えてレシピエントに移植され、そして移植片拒絶が生じない

10

20

30

40

50

哺乳動物への移植の方法に対する必要性が当該分野においてまた存在する。

【0015】

(発明の要旨)

真性糖尿病および他の障害の処置における使用について、哺乳動物の臍臓幹細胞または肝臍幹細胞を提供することが本発明の目的である。臍臓幹細胞を同定し、局在化そして単離するための方法を提供することがまた本発明の目的である。臍臓幹細胞を分化させ、インスリンおよび他のホルモンを産生する細胞を獲得するための方法を提供することが本発明のさらなる目的である。哺乳動物の臍臓幹細胞または肝臍幹細胞を利用する哺乳動物への移植のための方法を提供することがまた本発明の目的である。本発明のこれらの目的および他の目的は、以下に記載される1以上の実施態様によって提供される。

10

【0016】

本発明の一実施態様は、真性糖尿病を有する患者を治療する方法を提供する態様である。ネスチンポジティブな臍臓幹細胞が、ドナーの臍島から単離される。別の実施態様において、ABC G 2、Oct 3 / 4、GLP - 1レセプター、ラトロフィリン (latrophilin) (2型)、Hes - 1、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C - kit、MDR - 1、SUR - 1、Kir 6.2 のうちの少なくとも1つに対してポジティブであり、そして/あるいは、CD 34、CD 45、CD 133、MHC クラスIおよびMHC クラスIIのうちの1つもしくはすべてを発現しない臍臓幹細胞が、ドナーの臍島から単離される。別の実施態様において、SST - R 2、SST - R 3 および/またはSST - R 4 に対してポジティブな臍臓幹細胞が、ドナーの臍島から単離される。この幹細胞は患者に移植され、ここでこの幹細胞は、インスリン産生性細胞に分化する。

20

【0017】

別の実施態様は、糖尿病を有する患者を治療する別の方法を提供する態様である。ネスチンポジティブな臍臓幹細胞が、ドナーの臍島から単離され、そしてエキソビボで拡張されて前駆細胞を産生する。別の実施態様において、ABC G 2、Oct 3 / 4、GLP - 1レセプター、ラトロフィリン (2型)、Hes - 1、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C - kit、MDR - 1、SST - R 2、SST - R 3、SST - R 4、SUR - 1、Kir 6.2 のうちの少なくとも1つに対してポジティブであり、そして/あるいは、CD 34、CD 45、CD 133、MHC クラスIおよびMHC クラスIIのうちの1つもしくはすべてを発現しない臍臓幹細胞が、ドナーの臍島から単離され、そしてエキソビボで拡張されて前駆細胞を産生する。この前駆細胞は患者に移植され、ここでこの前駆細胞は、インスリン産生性 細胞に分化する。別の実施態様は、糖尿病患者を治療するなお別の方法を提供する。ネスチンポジティブな臍臓幹細胞が、ドナーの臍島から単離され、そして拡張されて前駆細胞を産生する。別の実施態様において、ABC G 2、Oct 3 / 4、GLP - 1レセプター、ラトロフィリン (2型)、Hes - 1、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C - kit、MDR - 1、SST - R 2、SST - R 3、SST - R 4、SUR - 1、Kir 6.2 のうちの少なくとも1つに対してポジティブであり、そして/あるいは、CD 34、CD 45、CD 133、MHC クラスIおよびMHC クラスIIのうちの1つもしくはすべてを発現しない臍臓幹細胞が、ドナーの臍島から単離され、そして拡張されて前駆細胞を産生する。この前駆細胞は培養物中で分化して、患者に移植される偽島様集合体を形成する。

30

【0018】

別の実施態様は、真性糖尿病を有する患者を治療する別の方法を提供する態様である。ネスチンポジティブな臍臓幹細胞が、ドナーの臍島から単離され、そしてエキソビボで培養されて前駆細胞を産生する。別の実施態様において、ABC G 2、Oct 3 / 4、GLP - 1レセプター、ラトロフィリン (2型)、Hes - 1、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C - kit、MDR - 1、SST - R 2、SST - R 3、SST - R 4、SUR - 1、Kir 6.2 のうちの少なくとも1つに対してポジティブであり、そして/あるいは、CD 34、CD 45、CD 133、MHC クラスIおよびMHC クラスIIのうちの1つもしくはすべてを発現しない臍臓幹細胞が、ドナーの臍島から単離され、そして拡張されて前駆細胞を産生する。この前駆細胞は

40

50

ラスⅡのうちの1つもしくはすべてを発現しない臍臓幹細胞が、ドナーの臍島から単離され、そしてエキソビボで培養されて前駆細胞を产生する。この前駆細胞は患者に移植され、ここでこの前駆細胞は、インスリン產生性細胞に分化する。

【0019】

これらの実施態様において、この患者はまた、自ら臍島組織のドナーとなり得、細胞の同系移植片細胞または分化した組織を提供する。

【0020】

別の好ましい実施態様において、移植ステップの前に、この幹細胞は、EGF、bFGF-2、高グルコース、KGF、HGF/SF、GLP-1、exendin-4、ID-X-1、IDX-1をコードする核酸分子、ベータセルリン(betacellulin)、アクチビンA、TGF- およびそれらの組み合わせからなる群より選択される因子でエキソビボで処理される。
10

【0021】

別の好ましい実施態様は、この移植ステップは、内視鏡的逆行性注入または臍動脈への注入によって行われる態様である。

【0022】

別の好ましい実施態様は、真性糖尿病を有する患者を治療する方法は、免疫抑制剤でこの患者を治療するステップをさらに含む態様である。

【0023】

別の好ましい実施態様は、この免疫抑制剤は、FK-506、シクロスボリンおよびGAD65抗体からなる群より選択される態様である。
20

【0024】

別の実施態様は、幹細胞を臍臓のランゲルハンス島から単離する方法を提供する。臍島がドナーから取り出され、そしてそこから細胞が培養される態様である。ネスチンポジティブな幹細胞クローンが、この培養物から選択される。別の実施態様において、ABC G 2、Oct 3 / 4、GLP - 1レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes - 1、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C - kit、MDR - 1、SST - R 2、SST - R 3、SST - R 4、SUR - 1、Kir 6.2 のうちの少なくとも1つに対してポジティブであり、そして/あるいは、CD34、CD45、CD133、MHC クラスIおよびMHC クラスIIのうちの1つもしくはすべてを発現しない臍臓幹細胞のクローンが、この培養物から選択される。必要に応じて、この島は、非島細胞と結合するコンカナバリンAでコーティングされた容器中の培養によって非島細胞を最初に除去する。
30

【0025】

好ましい実施態様において、幹細胞を単離する方法は、EGF、bFGF-2、高グルコース、KGF、HGF/SF、GLP-1、exendin-4、IDX-1、IDX-1をコードする核酸分子、ベータセルリン、アクチビンA、TGF- およびそれらの組み合わせからなる群より選択される一つの因子での処理によって、このクローンを拡張するさらなるステップをさらに含む。

【0026】

さらなる実施態様は、ネスチンポジティブな臍臓幹細胞の臍臓前駆細胞への分化を誘導する方法を提供する態様である。別の実施態様は、ABC G 2、Oct 3 / 4、GLP - 1レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes - 1、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C - kit、MDR - 1、SST - R 2、SST - R 3、SST - R 4、SUR - 1、Kir 6.2 のうちの少なくとも1つに対してポジティブであり、そして/あるいは、CD34、CD45、CD133、MHC クラスIおよびMHC クラスIIのうちの1つもしくはすべてを発現しない臍臓幹細胞の分化を誘導する方法を提供する。本明細書中で使用される場合、「分化」は、細胞が特定の細胞型(例えば特殊化された細胞型)へと変化するプロセスをいう。この幹細胞は、EGF、bFGF-2、高グルコース、KGF、HGF/SF、IDX-1、IDX-1をコードする核酸分子、GLP
40

- 1、e x e n d i n - 4、ベータセルリン、アクチビンA、T G F - およびそれらの組み合わせからなる群より選択される因子で処理される。この幹細胞は、引き続いて臍臓前駆細胞に分化する。

【0027】

好みの実施態様は、この臍臓前駆体は、引き続いて偽島様集合体を形成する態様である。

【0028】

なお別の実施態様は、単離されたネスチンポジティブなヒト臍臓幹細胞または単離されたネスチンポジティブなヒト肝臓幹細胞を提供する態様である。なお別の実施態様は、A B C G 2、O c t 3 / 4、G L P - 1 レセプター、ラトロフィリン(2型)、H e s - 1 10
、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C - k i t 、M D R - 1 、S S T - R 2 、S S T - R 3 、S S T - R 4 、S U R - 1 、K i r 6 . 2 のうちの少なくとも 1つに対してポジティブであり、そして / あるいは、C D 3 4 、C D 4 5 、C D 1 3 3 、M H C クラスIおよびM H C クラスIIのうちの1つもしくはすべてを発現しない単離された臍臓幹細胞を提供する態様である。この実施態様のバージョンにおいて、この幹細胞は、 細胞、 細胞、偽島様集合体または肝細胞のいずれかに分化する。この実施態様のバージョンにおいて、この幹細胞は免疫特権を持つ。この実施態様のバージョンにおいて、この幹細胞は、クラスI M H C 抗原を発現しない。この実施態様のバージョンにおいて、この幹細胞は、クラスII M H C 抗原を発現しない。この実施態様のバージョンにおいて、この幹細胞は、クラスI M H C 抗原もクラスII M H C 抗原も発現しない。 20

【0029】

なお別の実施態様は、臍臓細胞を幹細胞として同定する方法を提供する態様である。細胞は、標識されたネスチン特異的抗体と接触される。この細胞が抗体で標識されるようになる場合、この細胞が幹細胞として同定される。別の実施態様において、臍臓幹細胞は、A B C G 2、O c t 3 / 4、G L P - 1 レセプター、ラトロフィリン(2型)、H e s - 1 、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C - k i t 、M D R - 1 、S S T - R 2 、S S T - R 3 、S S T - R 4 、S U R - 1 またはK i r 6 . 2 のうちのいずれかに特異的な抗体とこの細胞を接触させることによって幹細胞として同定され、ここで抗体で標識されるようになる細胞が、幹細胞として同定される。さらなる任意のステップは、この細胞をサイトケラチン19に対する抗体およびI V型コラーゲンに対する抗体と接觸させるステップを有する。この細胞は、サイトケラチン19抗体またはI V型コラーゲン抗体のいずれでも標識されない場合に幹細胞として同定される。 30

【0030】

別の実施態様において、臍臓幹細胞は、C D 3 4 、C D 3 5 、C D 1 3 3 、M H C クラスIおよびM H C クラスIIのうちのいずれかに特異的な抗体とこの細胞を接觸させることによって幹細胞として同定され、ここでこの細胞は、これらの抗体のいずれでも標識されない場合に幹細胞として同定される。

【0031】

別の実施態様は、肝細胞に分化するようにネスチンポジティブな臍臓幹細胞を誘導する方法を提供する態様である。このネスチンポジティブな臍臓幹細胞は、肝細胞または肝細胞に分化する前駆細胞に分化するようにこの幹細胞を誘導する有効量の因子で処理される。好みの実施態様において、この因子はサイクロパミン(cyclopamine)である。別の実施態様は、肝細胞または肝細胞に分化する前駆細胞に分化するようにこの幹細胞を誘導する有効量の因子での処理によって、A B C G 2、O c t 3 / 4、G L P - 1 レセプター、ラトロフィリン(2型)、H e s - 1 、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C - k i t 、M D R - 1 、S S T - R 2 、S S T - R 3 、S S T - R 4 、S U R - 1 、K i r 6 . 2 のうちの少なくとも1つに対してポジティブであり、そして / あるいは、C D 3 4 、C D 4 5 、C D 1 3 3 、M H C クラスIおよびM H C クラスIIのうちの1つもしくはすべてを発現しない臍臓幹細胞を肝細胞に分化するように誘導する方法を提供する態様である。 40

【0032】

なお別の実施態様は、肝臓疾患有する患者を治療する方法を提供する態様である。ネスチンポジティブな臍臓幹細胞が、ドナーの臍島から単離され、そして患者に移植され、ここでこの幹細胞は肝細胞に分化する。別の実施態様において、A B C G 2、O c t 3 / 4、G L P - 1 レセプター、ラトロフィリン(2型)、H e s - 1、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C - k i t、M D R - 1、S S T - R 2、S S T - R 3、S S T - R 4、S U R - 1、K i r 6 . 2 のうちの少なくとも 1 つに対してポジティブであり、そして /あるいは、C D 3 4、C D 4 5、C D 1 3 3、M H C クラス I および M H C クラス I I のうちの 1 つもしくはすべてを発現しない臍臓幹細胞が、ドナーの臍島から単離され、そして患者に移植され、ここでこの幹細胞は肝細胞に分化する。

10

【0033】

関連実施態様において、この幹細胞は、エキソビボで前駆細胞に拡張され、この前駆細胞は患者に移植され、そしてさらに肝細胞に分化する。

【0034】

別の関連実施態様において、この幹細胞は、エキソビボで前駆細胞に分化し、この前駆細胞は患者に移植され、そしてさらに肝細胞に分化する。別の関連実施態様において、この幹細胞はエキソビボで肝細胞に分化し、この肝細胞は患者に移植される。

【0035】

これらの実施態様において、この患者はまた、臍島組織のドナーとして役立ち得、細胞の同系移植片または分化した組織を提供する。

20

【0036】

なお別の実施態様は、単離されたネスチンポジティブなヒト肝臓幹細胞を提供する態様である。この実施態様のバージョンにおいて、この幹細胞は免疫特権を持つ。この実施態様のバージョンにおいて、この幹細胞は、クラス I M H C 抗原を発現しない。この実施態様のバージョンにおいて、この幹細胞は、クラス I I M H C 抗原を発現しない。この実施態様のバージョンにおいて、この幹細胞は、クラス I M H C 抗原もクラス I I M H C 抗原も発現しない。

【0037】

なお別の実施態様は、神経幹細胞ではない単離されたネスチンポジティブなヒト幹細胞を提供し、この幹細胞は、移植片対宿主拒絶を引き起こさずに動物に移植され得る態様である。この実施態様のバージョンにおいて、この幹細胞は、主要組織適合複合体クラス I でもクラス I 拘束性でもない。なお別の実施態様は、A B C G 2、O c t 3 / 4、G L P - 1 レセプター、ラトロフィリン(2型)、H e s - 1、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C - k i t、M D R - 1、S S T - R 2、S S T - R 3、S S T - R 4、S U R - 1、K i r 6 . 2 のうちの少なくとも 1 つに対してポジティブであり、そして /あるいは、C D 3 4、C D 4 5、C D 1 3 3、M H C クラス I および M H C クラス I I のうちの 1 つもしくはすべてを発現しない単離されたヒト幹細胞を提供し、この幹細胞は、神経幹細胞ではなく、移植片対宿主拒絶を引き起こさずに動物に移植され得る。

30

【0038】

本明細書中で使用される場合、「幹細胞」は、インビボまたはエキソビボのいずれかで本質的に無制限に増殖し得、そして他の細胞型に分化し得る未分化細胞である。これは、単離された組織に存在する特定の分化した細胞型、運命づけられた細胞型、未熟な細胞型、前駆細胞型もしくは成熟細胞型か、または劇的に分化した細胞型(例えば、共通の前駆細胞に由来する赤血球およびリンパ球のような)か、あるいはこの幹細胞が得られる組織とは完全に異なる組織の任意の段階の細胞型でさえあり得る。例えば、血液幹細胞は脳細胞または肝細胞になり得、神経幹細胞は血液細胞になり得、その結果幹細胞は多能性であり、そしてそれらの環境から適切なシグナルを受けると、これらの幹細胞は体内で任意の組織に分化し得る。

40

【0039】

一実施態様において、本発明に従った「幹細胞」は、免疫学的にブラインドであるかま

50

たは免疫特権である。本明細書中で使用される場合、「免疫学的にブラインド」または「免疫特権」は、免疫応答を誘導しない細胞をいう。本明細書中で使用される場合、「免疫応答」は、外来物質に対して免疫系によって引き起こされる応答をいう。本明細書中で使用される場合、免疫応答は、移植拒絶または移植片拒絶、抗体産生、炎症および抗原に対する抗原特異的リンパ球の応答を含むがこれらに限定されない。免疫応答は、当該分野で周知の方法に従って、そして本明細書中において「移植片拒絶の分析」という表題の節で規定されるように、例えば移植された物質が首尾よく移植されたかまたは拒絶されたかを決定することによって検出される。一実施態様において、本発明に従った「免疫学的にブラインドな幹細胞」または「免疫特権の幹細胞」は、移植拒絶を伴わずに同種移植または異種移植され得、そして移植レシピエントまたは宿主において自己として認識される。

10

【0040】

移植物質または移植片物質は、宿主が移植された物質に免疫寛容である場合を除いて、または免疫抑制剤が拒絶を妨げるよう使用される場合を除いて、移植レシピエントまたは宿主の免疫系によって拒絶され得る。

【0041】

本明細書中で使用される場合、本発明に従った「免疫寛容」である宿主は、本明細書中で規定されるように、免疫応答を開始できない。一実施態様において、「免疫寛容」である宿主は、移植された物質を拒絶または破壊しない。一実施態様において、「免疫寛容」である宿主は、抗原に結合し得る抗体を産生することによって抗原に反応しない。

20

【0042】

本明細書中で使用される場合、「拒絶」とは、宿主の免疫系による移植された物質の拒絶をいう。一実施態様において、「拒絶」とは、宿主の免疫応答に応答して、移植された物質の90%を超える細胞または組織のネクローシスの発生を意味する。別の実施態様において、「拒絶」とは、宿主の免疫応答に応答して、移植された物質の生存能力が、移植前の移植された物質の生存能力と比較して90%を超えて減少するような生存能力の減少を意味する。生存能力の減少は、当該分野で周知の方法（トリパンブルー排除染色を含むがこれに限定されない）によって決定され得る。別の実施態様において、「拒絶」とは、移植された物質が増殖できないことを意味する。増殖は、当該分野で公知の方法（ヘマトキシリソウ/エオシン染色が挙げられるがこれに限定されない）によって測定され得る。移植拒絶の発生および/または拒絶が移植後に生じる速度は、因子（移植された物質（すなわち、細胞型または細胞数）あるいは宿主（すなわち、この宿主が免疫寛容であるか否か、および/または免疫抑制剤で処置されているか否か）が挙げられるがこれらに限定されない）に依存して変化する。本明細書中で使用される場合、「移植片対宿主拒絶」または「移植片対宿主応答」とは、移植された物質のT細胞が宿主の抗原と反応する細胞媒介性反応をいう。

30

【0043】

本明細書中で使用される場合、「宿主対移植片拒絶」または「宿主対移植片応答」とは、宿主の免疫系の細胞が外来の移植片物質または移植物質を攻撃する細胞媒介性反応をいう。

40

【0044】

本発明の別の実施態様において、特定の抗体（例えば、移植された物質に対する抗原に特異的に結合する抗体、すなわち外来物質または外来物質の産物に特異的に結合する抗体）の産生が、当該分野で周知の免疫学的方法（ELISA、免疫染色、免疫沈降法およびウェスタンプロット分析が挙げられるがこれらに限定されない）によって検出される場合に、免疫応答が生じる。

【0045】

幹細胞は、細胞表面上で形態形成ホルモンレセプターまたは成長ホルモンレセプターを発現し、そして例えば傷害関連因子を検知し得、次いで組織傷害の部位に局在化し、そしてこの部位にとどまるか、またはその局所的な微環境を検知し得、そして適切な細胞型に分化する。

50

【0046】

「本質的に無制限な増殖」は、例えば、単離された幹細胞が、細胞培養系において少なくとも50の細胞分裂、好ましくは100の細胞分裂、そして200以上までさえの細胞分裂を通じて増殖する能力によって決定され得る。幹細胞は「全能」であり得、これは、生殖細胞の場合のように、生物のすべての細胞を誘発し得ることを意味する。「全能」はまた、胚および栄養芽層の両方を誘発し得る受精卵を意味する。幹細胞はまた「多能性」であり得、多くの異なる細胞型（生物のすべての細胞ではない）を誘発し得ることを意味する。「多能性」はまた、胚のみを誘発し、栄養芽層を誘発しないことを意味する。幹細胞が分化する場合、これは一般的には、より成熟した細胞型を誘発し、この細胞型は、ある程度分化した細胞（例えば前駆細胞）、分化細胞または最終分化細胞であり得る。幹細胞は極めて運動能力を有し得る。

【0047】

「ネスチン」は、Genbank登録番号X65964（図7）に開示される配列を有する中間径フィラメントタンパク質をいう。

【0048】

「ABC G 2」は、Genbank登録番号XM_032424（図18）に開示される配列を有するATP結合力セット多剤耐性輸送体G 2をいう。当業者は、ABC G 2をコードするDNA配列が変化し得るが、コードされたアミノ酸配列は同じままである等価物が存在することを認識する。

【0049】

「Oct 3 / 4」は、Genbank登録番号NM_013633に開示される配列を有するPOU/ホメオドメイン転写因子をいう。

【0050】

「GLP-1R」は、図21（GenBank登録番号U01156）に示される核酸配列によってコードされ、そしてまた図17（GenBank登録番号U01156）に示されるアミノ酸配列を有するグルカゴン様ペプチド1レセプターをいう。当業者は、GLP-1RをコードするDNA配列が変化し得るが、コードされたアミノ酸配列は同じままである等価物が存在することを認識する。

【0051】

「ラトロフィリン（2型）」は、Genbank登録番号AJ131581に開示される配列を有するGタンパク質共役レセプターをいう。

【0052】

「Hes-1」は、Genbank登録番号NM_005524に開示される配列を有するbHLH転写因子をいう。

【0053】

インテグリンは、鎖および鎖から構成される完全な細胞表面タンパク質である。特定の鎖は、異なるインテグリンをもたらす複数のパートナーと結合し得る。例えば6は、TSP180といわれるインテグリンにおいて4と結合し得るか、またはインテグリンVLA-6において1と結合し得る。

【0054】

インテグリンサブユニット「6」とは、Genbank登録番号NM_000210に開示される配列を有するヒトイントグリン6 cDNAをいう。

【0055】

インテグリンサブユニット「1」とは、Genbank登録番号X07979に開示される配列を有するヒト1 cDNAをいう。

【0056】

「c-Kit」とは、Genbank登録番号X06182に開示される配列を有する細胞表面レセプターチロシンキナーゼをいう。

【0057】

「MDR-1」とは、Genbank登録番号NM_000927に開示される配列を

10

20

30

40

50

有する多剤耐性輸送体1をいう。

【0058】

「SST-R2」「SST-R3」および「SST-R4」とは、Genbank登録番号XM_085745(SSTR-2)；NM_001051(SSTR-3)；XM_009594(SSTR-4)に開示される配列を有するソマトスタチンレセプターをいう。

【0059】

「SUR-1」は、Genbank登録番号XM_042740に開示される配列を有するヒトルホニル尿素レセプターをいう。

【0060】

「Kir6.2」は、Genbank登録番号AF021139に開示される配列を有するヒト内向き整流カリウムチャネルをいう。

【0061】

「CD34」は、Genbank登録番号NM_001773に開示される配列を有する膜貫通糖タンパク質をいう。

【0062】

「CD45」は、Genbank登録番号Y00638に開示される配列を有する白血球共通抗原をいう。

【0063】

「CD133」は、Genbank登録番号NM_006017に開示される配列を有する5回膜貫通造血幹細胞抗原をいう。

【0064】

「臍臓の」幹細胞は、臍臓組織から単離されている幹細胞、および／またはネスチングリオブロブ染色、ネスチングリオブロブ遺伝子発現、サイトケラチン-19ネガティブ染色、培養物における長期間の増殖および培養物において偽島に分化する能力という特性のすべてを有する細胞を意味する。

【0065】

「臍臓の」幹細胞はまた、ABC G2、Oct3/4、GLP-1レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes-1、ネスチングリオブロブ染色、ネスチングリオブロブ遺伝子発現、サイトケラチン-19ネガティブ染色、培養物における長期間の増殖および培養物において偽島に分化する能力という特性のすべてを有する細胞を意味する。

【0066】

一実施態様において、「臍臓の」幹細胞はまた、SST-R2、SST-R3および／またはSST-R4に対してポジティブな幹細胞をいう。

【0067】

「肝臓の」幹細胞は、肝臓組織から単離されている幹細胞、および／またはネスチングリオブロブ染色、ネスチングリオブロブ遺伝子発現および培養物における長期間の増殖という特性のすべてを有する細胞を意味する。

【0068】

「前駆細胞」は、分化によって幹細胞から派生し、そしてより成熟した細胞型にさらに分化し得る細胞である。

【0069】

本明細書中で使用される場合、用語「インスリン産生性細胞」は、ヒト臍臓におけるランゲルハンス島の細胞によって産生および分泌されるインスリンと類似の量でインスリンを産生および分泌し得る任意の細胞をいう。好ましくは、インスリン産生性細胞によるインスリンの分泌はまた、in situでのヒト細胞によるインスリン分泌の調節と類似の様式で調節される。例えば、インスリン分泌は、インスリン産生性細胞周囲の溶液のグルコース濃度の増加によって刺激されるはずである。

【0070】

10

20

30

40

50

「偽島様」集合体は、臍臓のランゲルハンス島と形態および機能が類似するインスリン分泌性細胞の人工的集団である。偽島様集合体は、細胞培養条件下でエキソビオで作製される。これは、直径およそ 50 ~ 150 μm (in situ の島についての平均直径 100 μm と比較して) であり、そして球状である。

【0071】

幹細胞の「単離」は、組織サンプルから幹細胞を取り出し、そして組織の幹細胞ではない他の細胞を分離するプロセスをいう。単離された幹細胞は、一般的に他の細胞型による汚染がなく、そして一般的に、単離された組織の成熟細胞を產生する増殖能および分化能を有する。しかし幹細胞の蓄積物（例えば幹細胞の培養物）を扱う場合、100% 純粋な幹細胞の蓄積物を獲得することは事実上不可能であることが理解される。従って単離された幹細胞は、他の分化した細胞型の分析または產生についてこの幹細胞の利用を妨げない他の細胞型の小画分の存在環境下で存在し得る。単離された幹細胞は、一般的に少なくとも 30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98% または 99% 純粋である。好ましくは、本発明に従った単離された幹細胞は、少なくとも 98% または少なくとも 99% 純粋である。

【0072】

幹細胞は、培養物中で増殖され、そして細胞分裂によって他の幹細胞および / または前駆細胞を誘発する場合に「拡張」される。幹細胞の拡張は、幹細胞が培養物中で増殖する場合に自発的に生じ得るか、あるいは特定の成長条件（例えば最小細胞密度、すなわち培養容器表面上の細胞コンフルエント状態）、または化学的因素（例えば増殖因子、分化因子もしくはシグナリング因子）の付加を必要とし得る。

【0073】

幹細胞、前駆細胞または分化細胞が患者に培養容器から移植される場合に、哺乳動物にそれらの細胞が「移植」または「導入」されることになる。本明細書中で使用される場合、移植は、本発明に従って幹細胞を単離するステップ、およびこの幹細胞を哺乳動物または患者に移植するステップを有し得る。移植は、哺乳動物または患者に細胞懸濁液を注入することによって、哺乳動物または患者の組織または器官への細胞集団の外科的移植によって、あるいは細胞懸濁液での組織または器官の灌流によって、哺乳動物または患者に幹細胞を移植するステップを含み得る。幹細胞の移植経路または移植経路は、細胞が特定の組織または器官に存在する必要性、ならびに細胞が所望の標的組織または器官を見出す能力および所望の標的組織または器官によって保持される能力によって決定される。移植された細胞が特定の場所に存在するべき場合、組織または器官に外科的に配置され得るか、あるいは細胞が所望の標的器官に移動する能力を有する場合には単に血流に注入され得る。

【0074】

本明細書中で使用される場合、移植は、本発明に従って幹細胞を単離するステップ、ならびにこの幹細胞を培養するステップおよび哺乳動物または患者にこの幹細胞を移植するステップを有し得る。本明細書中で使用される場合、移植は、本発明に従って幹細胞を単離するステップ、この幹細胞を分化するステップ、および哺乳動物または患者にこの幹細胞を移植するステップを有し得る。本明細書中で使用される場合、移植は、本発明に従って幹細胞を単離するステップ、この幹細胞を分化および拡張するステップ、ならびに哺乳動物または患者にこの幹細胞を移植するステップを有し得る。

【0075】

免疫抑制剤での処置は、その処置を必要とする患者に、所望の免疫応答（例えば移植された細胞、組織または器官の拒絶）の発生を妨げるか、その応答を遅らせるかあるいはその応答の強度を減少させる任意の因子を投与することによって達成され得る。

【0076】

本明細書中で使用される場合、「免疫抑制」は、本明細書中で規定されるような「免疫応答」が検出不可能であるような免疫応答の阻止（例えば、本明細書中で規定されるような「免疫抑制剤」の投与による）をいう。本明細書中で使用される場合、免疫応答の「阻

10

20

30

40

50

止」は、免疫応答が検出不可能であることを意味する。免疫応答（例えば、移植拒絶または抗体産生）は、当該分野で周知の方法および本明細書中で規定される方法に従って検出される。

【0077】

本発明に従った「免疫抑制」はまた、免疫抑制剤を受けていない移植レシピエント、あるいは本明細書中で規定されるような「免疫学的にブラインド」または「免疫特権」ではない物質を移植されている移植レシピエントのうちのいずれか一方と比較した場合の免疫応答の発生の遅延を意味する。免疫応答の発生の遅延は、短い遅延（例えば1時間～10日間、すなわち1時間、2日間、5日間または10日間）であり得る。免疫応答の発生の遅延はまた、長い遅延（例えば10日間～10年間（すなわち、30日間、60日間、90日間、180日間、1年間、2年間、5年間または10年間））であり得る。10

【0078】

本発明に従った「免疫抑制」はまた、免疫応答の強度の減少を意味する。本発明に従って、免疫応答の強度は、免疫抑制剤を受けていない移植レシピエント、あるいは本明細書中で規定されるような「免疫学的にブラインド」または「免疫特権」ではない物質を移植されている移植レシピエントのうちのいずれか一方の免疫応答の強度よりも5～100%少なく、好ましくは25～100%少なく、そして最も好ましくは75～100%少ないように減少され得る。この免疫応答の強度は、移植された物質が拒絶される時点を決定することによって測定され得る。例えば、移植後1日目の移植された物質の拒絶を含む免疫応答は、移植後30日目の移植された物質の拒絶を含む免疫応答よりも強度が大きい。この免疫応答の強度はまた、移植された物質に結合し得る特定の抗体量を定量することによって測定され得、ここで抗体産生のレベルは、免疫応答の強度に直接相関する。あるいは、この免疫応答の強度は、移植された物質に結合し得る特定の抗体が検出される時点を決定することによって測定され得る。20

【0079】

種々のストラテジーおよび因子が、免疫抑制について利用され得る。例えば、リンパ球の増殖および活性は、例えばFK-506またはシクロスボリンあるいは他の免疫抑制剤のような因子で一般的に阻害され得る。別の可能なストラテジーは、抗GAD65モノクローナル抗体のような抗体、または移植された細胞上の表面抗原をマスクし、従って実質的にこの細胞を宿主の免疫応答に認識されなくする別の化合物を投与することである。30

【0080】

「免疫抑制剤」は、宿主における外来細胞（特に移植された細胞）に対する免疫反応の発生を妨げるか、この発生を遅延するか、またはこの反応の強度を減少させる任意の因子である。非自己として免疫系によって同定される細胞に対する細胞媒介性免疫応答を抑制する免疫抑制剤が好ましい。免疫抑制剤の例は、シクロスボリン、シクロホスファミド、プレドニゾン、デキサメタゾン、メトトレキサート、アザチオプリン、ミコフェノラート、サリドマイド、FK-506、全身性ステロイド、ならびに広範囲の抗体、レセプター・アゴニスト、レセプター・アンタゴニスト、および当業者に公知のような他のこのような因子が挙げられるがこれらに限定されない。40

【0081】

「マイトイジェン」は、因子が加えられる細胞の有糸分裂および細胞増殖を刺激する任意の因子である。

【0082】

「分化因子」は、幹細胞または前駆細胞を別の細胞型に分化させる任意の因子である。分化は、通常幹細胞または前駆細胞の1以上の遺伝子の発現を変更することによって達成され、そしてその構造および機能を変更する細胞をもたらす。

【0083】

本明細書中で使用される場合、「シグナリング因子」は、同じ細胞または異なる細胞に対する効果を有する細胞によって分泌される因子である。例えばシグナリング因子は、その細胞自身、近隣の細胞、または生物中で遠い位置にある細胞の成長、増殖または分化を50

阻害または誘導し得る。シグナリング因子は、例えば組織における位置情報を伝達し得るか、パターン形成を媒介し得るか、または種々の解剖学的構造のサイズ、形状および機能に影響を与える。

【 0 0 8 4 】

本明細書中で使用される場合、哺乳動物は、任意の哺乳動物（ヒト、マウス、ラット、ヒツジ、サル、ヤギ、ウサギ、ハムスター、ウマ、ウシまたはブタを含むがこれらに限定されない）をいう。

【 0 0 8 5 】

本明細書中で使用される場合、「非ヒト哺乳動物」は、ヒトではない任意の哺乳動物をいう。

10

【 0 0 8 6 】

本明細書中で使用される場合、「同種異系」は、同じ種の遺伝学的に異なるメンバーをいう。

【 0 0 8 7 】

本明細書中で使用される場合、「同系」は、同一の遺伝学的組成をいう。

【 0 0 8 8 】

本明細書中で使用される場合、「異種」は、異なる種のメンバーをいう。

【 0 0 8 9 】

本明細書中で使用される場合、「培養」は、細胞生存能力または細胞増殖を支持する環境およびこのような条件下で一定期間インキュベートすることによる細胞、細胞の蓄積物、組織または器官の増殖または育成をいう。培養は、本発明に従った細胞、細胞の蓄積物、組織または器官を拡張および増殖させるステップのうちの1以上を有し得る。

20

【 0 0 9 0 】

本明細書中で使用される場合、「免疫寛容状態のあらかじめの誘導または免疫寛容状態の誘導」は、ドナー由来の器官、組織または細胞の移植の際に、レシピエントの免疫系が、ドナーの組織を自己として認識し、従って「移植片対宿主」応答を開始しないような移植ドナーに由来する幹細胞での潜在的な移植レシピエントの処置をいう。好ましい実施態様において、この幹細胞は、ネスチンポジティブな幹細胞である。

【 0 0 9 1 】

本明細書中で使用される場合、「寛容」は、特定の外来抗原がこの免疫系の細胞によって自己として認識される免疫系状態をいう。

30

【 0 0 9 2 】

本明細書中で使用される場合、「レシピエント」は、ドナーから取り出された器官、組織または細胞を受け取る哺乳動物をいう。

【 0 0 9 3 】

本明細書中で使用される場合、「ドナー」は、器官、組織または細胞がレシピエントへの移植について取り出される哺乳動物をいう。

【 0 0 9 4 】

本発明はまた、生理学的に適合性のキャリアと混合された本発明の単離された幹細胞を含む薬学的組成物を提供する。

40

【 0 0 9 5 】

（発明の詳細な説明）

本発明者らは、幹細胞の機能的特性および分子特性を有する哺乳動物の臍臓のランゲルハンス島から特定のサブクラスの導管細胞を同定し、そして単離した。特に、これらの新規に発見された臍臓幹細胞は、1以上の以下（そして好ましくは以下のうちのすべて）によってとりわけ特徴付けられる：ネスチンポジティブ染色、ネスチン遺伝子発現、G L P - 1 R ポジティブ染色、G L P - 1 R 遺伝子発現、A B C G 2 ポジティブ染色、A B C G 2 遺伝子発現、O c t 3 / 4 ポジティブ染色、O c t 3 / 4 遺伝子発現、ラトロフィリン（2型）ポジティブ染色、ラトロフィリン（2型）遺伝子発現、H e s - 1 ポジティブ染色、H e s - 1 遺伝子発現、インテグリンサブユニット 6 および 1 ポジティブ染色、

50

インテグリンサブユニット 6 および 1 遺伝子発現、C - k i t ポジティブ染色、C - k i t 遺伝子発現、M D R - 1 ポジティブ染色、M D R - 1 遺伝子発現、S S T - R , 2 , 3 , 4 ポジティブ染色、S S T - R , 2 , 3 , 4 遺伝子発現、S U R - 1 ポジティブ染色、S U R - 1 遺伝子発現、K i r 6 . 2 ポジティブ染色、K i r 6 . 2 遺伝子発現、C D 3 4 ネガティブ染色、C D 4 5 ネガティブ染色、C D 1 3 3 ネガティブ染色、M H C クラス I ネガティブ染色、M H C クラス I I ネガティブ染色、サイトケラチン - 1 9 ネガティブ染色、培養物における長期間の増殖ならびに培養物において偽島に分化する能力。本発明者らはまた、ネスチンポジティブ染色を示す肝細胞を同定した。

【 0 0 9 6 】

一実施態様において、本発明は、I型インスリン依存型糖尿病および糖尿病の他の形態に対する細胞置換療法、ならびに種々の糖尿病状態、ホルモン異常、および遺伝子疾患または状態（例えば特定の生理学的状態もしくは病理学的状態との多型の関連）の発症および進行を研究するための研究手段の開発を含むがこれらに限定されない種々の適用について幹細胞を提供する。本発明の幹細胞がまた使用されて、同系移植片移植、同種移植片移植または異種移植片移植において内分泌臓器組織または他の組織の遺伝子治療を行い得る。さらに、本明細書中で記載される幹細胞が使用されて、培養物中で組換え細胞、人工組織および置換器官を產生し得る。これらはまた、インスリンおよび他のホルモンのエキソビオ产生について使用され得る。本発明者らによって発見された臓器幹細胞の分子特性（例えばネスチンポジティブ染色、G L P - 1 R ポジティブ染色、A B C G 2 ポジティブ染色、O c t 3 / 4 ポジティブ染色、ラトロフィリン（2型）ポジティブ染色、H e s - 1 ポジティブ染色、インテグリンサブユニット 6 および 1 ポジティブ染色、C - k i t ポジティブ染色、M D R - 1 ポジティブ染色、S S T - R , 2 , 3 , 4 ポジティブ染色、S U R - 1 ポジティブ染色、K i r 6 . 2 ポジティブ染色ならびにサイトケラチン - 1 9 ネガティブ染色、C D 3 4 ネガティブ染色、C D 4 5 ネガティブ染色、C D 1 3 3 ネガティブ染色、M H C クラス I ネガティブ染色およびM H C クラス I I ネガティブ染色）または肝臓幹細胞の分子特性（例えばネスチンポジティブ染色）が、種々の診断手順、病理学的手順または研究手順において使用されて、患者または実験動物由来の組織において幹細胞を同定、局在化および定量し得る。

【 0 0 9 7 】

（ 脇島における幹細胞の同定 ）

以前の研究者らは、島の内分泌細胞の新生に対する幹細胞の潜在的な供給源として、脇島の導管上皮細胞または外分泌組織に焦点を合わせていた。ネスチンは、R . 4 0 1 と命名されたモノクローナル抗体を用いて、E 1 5 ラット胚からc D N A ライブライアリをスクリーニングすることによってクローニングされた中間径フィラメントタンパク質である（H o c k f i e l d およびM c K a y 、1 9 8 5 ; L e n d a h l ら、1 9 9 0 ）。ネスチンは、神経上皮幹細胞において第一に見出され、そして発生中の中枢神経系において発現される。最大レベルがラット胚においてE 1 6 で到達された後、ネスチン発現は、成体の大脳皮質においてほとんど検出不可能なレベルまで低下し、これは初期のネスチン発現性前駆細胞の最終分化と一致する（L e n d a h l ら、1 9 9 0 ）。ネスチンは、胚の発生中の脳および骨格筋の幹細胞において独占的に当初見出された（L e n d a h l ら、1 9 9 0 ）。後の研究は、成体の哺乳動物前脳の上衣下層においてネスチンポジティブな神経幹細胞を同定した（M o r s h e a d ら、1 9 9 4 ）。ネスチンポジティブな幹細胞は、成体のマウスまたはラットの脳から単離された場合でさえ多能性を示していた。例えば、ネスチンポジティブな幹細胞は、培養物中で神経細胞のあらゆる3つの主要なクラス（ニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイト）を作製し得る（R e y n o l d s およびW e i s s 、1 9 9 6 ）。ネスチンポジティブな神経幹細胞は、アストロサイトに分化する遊走細胞の増殖および変性によって脊髄損傷に反応し、瘢痕形成に関与し（J o h a n s s o n ら、1 9 9 9 ）、そして照射を受けたマウスへの注入後に骨髄の造血細胞を回復させる（B j o r n s o n ら、1 9 9 9 ）。

【 0 0 9 8 】

10

20

30

40

50

(幹細胞のキャラクタリゼーション)

本発明に従った幹細胞は、例えば、F A C S、免疫細胞化学染色、R T - P C R、サザンノーザンプロット分析およびウェスタンプロット分析、ならびに当業者に公知のような細胞同定の他のこののような技術によって、ネスチンおよび/またはG L P - 1 R、A B C G 2、O c t 3 / 4、ラトロフィリン(2型)、H e s - 1、インテグリンサブユニット6および1、C - k i t、M D R - 1、S S T - R , 2 , 3 , 4、S U R - 1ならびにK i r 6 . 2のこれらの発現によって同定され得る。

【0099】

例えば免疫細胞化学染色は、以下の方法に従って行われる。臍臓または肝臓ならびに細胞から調製された凍結切片(6 μ M)を、ホスフェートにおける4%パラホルムアルデヒドで固定する。細胞を、第一に3%正常ロバ血清で30分間室温でブロックし、そして目的のタンパク質に対する一次抗血清とともに4で一晩インキュベートする。この抗血清をP B Sですすぎ、そして適切な蛍光標識された二次抗血清とともに室温で1時間インキュベートする。次いでスライドをP B Sで洗浄し、そして蛍光封入剤(Kirkegaard and Perry Labs, Gaithersburg, MD)で覆う。蛍光像を、I P Lab Spectrum分析ソフトウェア(Signal Analytics Corp, Vienna, VA)をインストールされたPowerMac 7100と接続されたOpttronics TEC-470 CCDカメラ(Optronics Engineering, Goleta, CA)を備えたZeiss Epifluorescence顕微鏡を用いて獲得する。

【0100】

本発明に従って有用な抗血清は以下を有する：ヒトサイトケラチン19に対するマウスマノクローナル抗体(クローンK 4 . 6 2、Sigma, St. Louis, MO)、ラットネスチンに対するウサギポリクローナル抗血清およびラットI D X - 1に対するウサギポリクローナル抗血清(それぞれ精製G S T - ネスチン融合タンパク質でのウサギの免疫、またはラットI D X - 1の最後の12アミノ酸でのウサギの免疫によって調製された)(McManusら、1999、J. Neurosci., 19: 9004 ~ 9015)、G L P - 1 Rに対するウサギポリクローナル抗血清(Hellerら、1997、Diabetes 46: 7851)、A B C G 2に対する抗血清(M A B 4146、Chemicon(Temecula, CA))、インテグリンGに対する抗血清(SC-6597, Santa Cruz)、インテグリン1に対する抗血清(SC-6622, Santa Cruz)、H E S 1に対する抗血清(A B 5702、Chemicon)、C D 4 5に対する抗血清(31252X、BD Pharmingen(San Diego, CA))、C D 3 4に対する抗血清(M S - 363 - PO、NeoMarketers(Freemont, CA))、M H C Iに対する抗血清(M S - 557 - PO、NeoMarketers)、M H C I Iに対する抗血清(M S - 162 - PO、NeoMarketers)、M D R - 1(p170)に対する抗血清(M S - 660 - PO、NeoMarketers)、O c t 3 / 4に対する抗血清(SC-5279, Santa Cruz(SC, CA))、S U R - 1に対する抗血清(SC-5789, Santa Cruz)、K I R 6 . 2に対する抗血清(SC-11227, Santa Cruz)、A B C G 2に対する抗血清(SC-18841, Santa Cruz)、c - k i tに対する抗血清(SC-1493, Santa Cruz)、S S T R 2に対する抗血清(SC-11606, Santa Cruz)、S S T R 3に対する抗血清(SC-11610, Santa Cruz)、S S T R 4に対する抗血清(SC-11619, Santa Cruz)、Linco, St. Charles, MOから得られるモルモット抗インスリン抗血清および抗臍臓ポリペチド抗血清、ならびにそれぞれSigma(St. Louis, MO)およびDAKO(Carpinteria, CA)から購入したマウス抗グルカゴン抗血清およびウサギ抗ソマトスタチン抗血清、マウス抗ヒトガラニン(Peninsula Laboratories, Belmont, CA)、I V型コラーゲン抗血清(Caltag Laboratories, San Francisco, C 50

A)、マウス抗ラットMHCクラスI血清(Serotek)ならびに抗ラットMHCクラスII血清。本発明は、このようなマーカーを示す他の抗血清が入手可能であるか、または開発されることを意図する。このような他の抗血清は、本発明の範囲内にあるとみなされる。

【0101】

RT-PCRおよびサザンプロット分析は、以下の方法に従って行われる。ラット島またはヒト島から調製された全細胞性RNAが逆転写され、そして以前に記載されるように(Danielら、1998、Endocrinology、139:3721~3729)増幅の所望の程度に依存しておよそ35サイクルのPCRによって増幅される。PCRについてのプライマーまたはアンプライマー(amplicimer)として使用されるオリゴヌクレオチド、および引き続くサザンプロットハイブリダイゼーションについてのプローブとして使用されるオリゴヌクレオチドは以下である：

ラットネスチン：フォワード、5' g c g g g g c g g t g c g t g a c t a c 3'；
リバース、5' a g g c a a g g g g g a a g a g a a g g a t g t 3'；
ハイブリダイゼーション、5' a a g c t g a a g c c g a a t t t c
c t t g g g a t a c c a g a g g a 3'。

【0102】

ラットケラチン19：フォワード、5' a c a g c c a g t a c t t c a a g a c c 3'；
リバース、5' c t g t g t c a g c a c g c a c g t t a 3'；
ハイブリダイゼーション、5' t g g a t t c c a c a c c a g g
c a t t g a c c a t g c c a 3'。

【0103】

ラットNCAM：フォワード、5' c a g c g t t g g a g a g t c c a a a t 3'；
リバース、5' t t a a a c t c c t g t g g g g t t g g 3'；
ハイブリダイゼーション、5' a a a c c a g c a g c g g a t c t c
a g t g g t g t g g a a c g a t g a t 3'。

【0104】

ラットIDX-1：フォワード、5' a t c a c t g g a g c a g g g a a g t 3'；
リバース、5' g c t a c t a c g t t t c t a t c t 3'；
ハイブリダイゼーション、5' g c g t g g a a a a g c c a g t g
g g 3'；

ヒトネスチン：フォワード、5' a g a g g g g a a t t c c t g g a g 3'；
リバース、5' c t g a g g a c c a g g a c t c t c t a 3'；
ハイブリダイゼーション、5' t a t g a a c g g g c t g g a g c a g
t c t g a g g a a a g t 3'。

【0105】

ヒトケラチン：フォワード、5' c t t t t c g c g c g c c c a g c a t t 3'；
リバース、5' g a t c t t c c t g t c c c t c g a g c 3'；
ハイブリダイゼーション、5' a a c c a t g a g g a g g a a a t c a
g t a c g c t g a g g 3'。

【0106】

ヒトグルカゴン：フォワード、5' a t c t g g a c t c c a g g c g t g c c 3'；
リバース、5' a g c a a t g a a t t c c t t g g c a g 3'；
ハイブリダイゼーション、5' c a c g a t g a a t t g a g a g a
c a t g c t g a a g g g 3'；

ヒトE-カドヘリン：フォワード、5' a g a a c a g c a c g t a c a c a g c c 3'；
リバース、5' c c t c c g a a g a a a c a g c a a g a 3'；
ハイブリダイゼーション、5' t c t c c c t t c a c a g c a g 50

a a c t a a c a c a c g g g 3 '

ヒトトランスチレチン：フォワード、5' g c a g t c c t g c c a t c a a t g t g 3

リバース、5' g t t g g c t g t g a a t a c c a c c t 3'
ハイブリダイゼーション、5' c t g g a g a g c t g c a t g

g g c t c a c a a c t g a g g 3'

ヒト肺臓アミラーゼ：フォワード、5' g a c t t t c c a g c a g t c c c a t a 3'

リバース、5' g t t t a c t t c c t g c a g g g a a c 3'

ハイブリダイゼーション、5' t t g c a c t g g a g a a g g a
t t a c g t g g c g t t c t a 3'

ヒトプロカルボキシペプチダーゼ：フォワード、5' t g a a g g c g a g a a g g t g
t t c c 3'

リバース、5' t t c g a g a t a c a g g c a g a
t a t 3'

ハイブリダイゼーション、5' a g t t a g a c t t
t t a t g t c c t g c c t g t g c t c a 3'

ヒトシナプトフィジン：フォワード、5' c t t c a g g c t g c a c c a a g t g t 3
,

リバース、5' g t t g a c c a t a g t c a g g c t g g 3'
ハイブリダイゼーション、5' g t c a g a t g t g a a g a

g g c c a c a g a c c c a g a 3'

ヒト肝細胞増殖因子（HGF）：フォワード、5' g c a t c a a a t g t c a g c c c
t g g 3'

リバース、5' c a a c g c t g a c a t g g a a t t c
c 3'

ハイブリダイゼーション、5' t c g a g g t c t c a t
g g a t c a t a c a g a a t c a g g 3'

ヒトc MET（HGF - レセプター）：フォワード、5' c a a t g t g a g a t g t c
t c c a g c 3'

リバース、5' c c t t g t a g a t t g c a g g
c a g a 3'

ハイブリダイゼーション、5' g g a c t c c c a
t c c a g t g t c t c c a g a a g t g a t 3'

ヒトXBP - 1：フォワード、5' g a g t a g c a g c t c a g a c t g c c 3'

リバース、5' g t a g a c c t c t g g g a g c t c c t 3'

ハイブリダイゼーション、5' c g c a g c a c t c a g a c t a c g
t g c a c c t c t g c a 3'

ヒトGlut - 2：フォワード、5' g c a g c t g c t c a a c t a a t c a c 3'

リバース、5' t c a g c a g c a c a a g t c c c a c t 3'

ハイブリダイゼーション、5' a c g g g c a t t c t t a t t a g
t c a g a t t a t t g g t 3'

ヒトイヌリン：フォワード、5' a g g c t t c t t c t a c a c a 3'

リバース、5' c a g g c t g c c t g c a c c a 3'

ハイブリダイゼーション、5' a g g c a g a g a c c t g c a 3'

他のこののような配列が可能であり、そしてこののような配列は、当該分野の範囲内にある
ことが考慮される。本発明は、以下からなる群より選択されるマーカーのうちのいずれか

として、PCRについてのプライマーまたはアンプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチド、およびサザン分析についてのプローブとして使用されるオリゴヌクレオチドを有する：ABC G 2、Oct 3 / 4、GLP - 1 レセプター、ラトロフィリン（2型）、
Hes - 1、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C - kit、MDR

- 1、S S T - R , 2 , 3 , 4、S U R - 1、K i r 6 . 2、C D 3 4、C D 4 5、C D 1 3 3、M H C クラス I および M H C クラス I I 。一般的な指針として、プライマーは 2 つの異なるエキソンから選択され、そして少なくとも 1 つのイントロン配列を包含する。さらに、R T マイナスコントロールが、大半のサンプルについて行われる。P C R 増幅は、9 4 で 1 分間、その後の 9 4 で 10 秒間、5 8 / 5 6 で 10 秒間、7 2 で 1 分間を 3 5 サイクル、および 7 2 で 2 分間で達成される。このアニーリング温度は、ラットネスチンについては 5 8 であり、そして残存プライマー対については 5 6 である。

【 0 1 0 7 】

ラットでもヒトでもない哺乳動物から単離された m R N A の R T - P C R について、分析されている哺乳動物種由来の増幅核酸に特異的なオリゴヌクレオチドが調製される。このようなプライマーの選択および使用は、当業者に公知である。

10

【 0 1 0 8 】

サザンハイブリダイゼーションについて、オリゴヌクレオチドプローブは、従来技術を用いて適切な放射性核種（例えば ^{32}P A T P）で標識される。放射能標識されたプローブは、3 7 で 1 時間ナイロン膜に転移された P C R 産物とハイブリダイズされ、次いで 1 × S S C および 0 . 5 % S D S において 5 5 で 10 ~ 20 分間、または 0 . 5 × S C C および 0 . 5 % S D S において 4 2 でヒト P C R 産物について洗浄される。

【 0 1 0 9 】

（ 腺臓幹細胞のマーカーとしてのネスチン ）

本発明者らは、成体哺乳動物（ヒトを含む）の腺臓がネスチンを発現する細胞を含むことを現在予期せず発見した。重要なことには、腺臓におけるネスチンポジティブな細胞の分布は、ホルモン産生細胞の分布と一致しない。例えば、インスリンまたはグルカゴンと特異的に反応性の蛍光標識された抗体は、それぞれ島の 細胞および 細胞を標識するが、一方本発明者らは、マウス、ラットおよびヒトにおいて、蛍光標識されたネスチン抗体は、小管上皮の特定の細胞のみに局在し、そして腺島における 細胞、 細胞および腺臓ペプチド産生細胞に局在しないことを観察した（図 1）。本発明者らはまた、I V 型コラーゲンに特異的な抗体（脈管内皮細胞に対するマーカー）、ガラニンに特異的な抗体（神経終末のマーカー）およびサイトケラチン 1 9 に特異的な抗体（導管細胞に対するマーカー）が、ネスチン抗体と共に局在しないことを観察した。さらに本発明者らは、ネスチンポジティブな島細胞が、インスリン、グルカゴン、ソマトスタチンまたは腺臓ペプチドに対する抗体と共に標識しないことを見出した（図 1）。これは、これらのネスチン含有細胞が、内分泌細胞、導管細胞、神経細胞または脈管内皮細胞ではないが、以前に記載されていない島内部のまったく独特の細胞型を示し得ることを示唆する。本発明者らは、島において、ならびに腺管の局在化領域において、そして外分泌腺臓の房心領域内にネスチンポジティブな細胞を見出した。

20

30

30

【 0 1 1 0 】

単離された島におけるネスチン m R N A の発現は、単離されたラット島由来の R N A を用いた R T - P C R を使用して検出された（図 2）。ネスチンポジティブな腺臓細胞の機能的性質は、細胞培養技術を用いて、そして島からのネスチンポジティブな細胞の単離によって研究され、これらの両方は以下に記載される。

40

【 0 1 1 1 】

本発明者らはまた、ラットの肝臓がネスチンを発現する細胞を含むことを発見した（図 1 3 ）。

【 0 1 1 2 】

（ 腎臓幹細胞のマーカーとしての A T P 結合力セット（ A B C ）多剤耐性輸送体（ A B C G 2 (B r c p 1) および M D R -)

ヒト島由来 N I P は、A B C G 2 、M D R 1 およびネスチンを共発現する S P 細胞の実質的分集団を含む（ A B C G 2 発現は、染料ヘキスト 3 3 3 4 2 の排除に基づいて、骨髄における多能性幹細胞の S P 表現型を規定する）。M D R - 1 は、S P 細胞に複製能を与える。S P 細胞（ C D 3 4 低 / ネガティブ）は増殖せず、従ってインビトロでは拡張され

50

ることができない。CD34低ネガティブなSP細胞におけるMDR-1の強制発現は、このSP細胞の増殖を引き起こす(Buntingら、2000、Blood 96:902)。NIPはまた、CD34低/ネガティブである。従ってNIPは、そのABCDEFG2発現に基づいてSP細胞としてここで規定され、そして髄由来SP細胞とは異なって、NIPはMDR-1を発現し、従って増殖し得、移植の目的についてエキソビオでNIP SP細胞の拡張を可能にする。

【0113】

(臍臓幹細胞のマーカーとしてのOct3/4)

NIPはOct3/4を発現する。Oct3/4は、Pouホメオドメインタンパク質のファミリーに属する転写因子である(Niwalaら、2002、Mol. Cell. Biol. 22:1526; Niwalaら、2000、Nat. Genet. 24:328; Niwa、2001、Cell Struct Funct 26:137; Shimazakiら、1993、EMBO 12:4489; Wangら、1996、Biochem Cell Biol 74:579; Nicholsら、1998、Cell 95:379)。これは重要な発見である。なぜならOct3/4の発現は、厳密に幹/前駆細胞に限定されるからである(Niwalaら、2002、上記; Niwalaら、2000、上記; Niwa、2001、上記)。NIPは、強力にOct3/4を発現し、それによってそれ自身を幹/前駆細胞であると規定する。これは、Oct3/4発現が完全に幹/前駆細胞に限定され、そしてOct3/4がNIPにおいて発現される場合、NIPは幹/前駆細胞である。

10

20

【0114】

(臍臓幹細胞のマーカーとしてのインテグリンサブユニット6およびB1)

NIPは、インテグリンサブユニット6およびB1を発現する。6/B1インテグリンはラミニンレセプターである(GiancottiおよびRuoslahti、1999、Science 285:1028)。ES細胞は、ラミニンでコーティングされた培養皿において増殖され得、そして支持細胞層上での成長を必要としないことが最近示されている(Xuら、Nature Biotechnology、2001年10月、19:971)。この細胞表面発現性インテグリンは、細胞成長および発達の維持に不可欠である(Giancottiら、上記を参照のこと)。この6/B1レセプターは、ラミニンの認識に特異的であり、ラミニンは、胚盤胞において発現される本質的なタンパク質である。従って6/B1は、ES細胞(幹/前駆細胞)のマーカーである。NIPは、インテグリンサブユニット6およびB1を発現する。従ってNIPは、この点ではES細胞に類似する。

30

【0115】

(臍臓幹細胞のマーカーとしてのHes-1)

側方抑制のノッチシグナリング経路は、胚発生に重大である。ノッチシグナリングの重要性について多く記載されている。ノッチシグナリングはまた、NIPにおいて重要である。ノッチシグナリングは、臍臓の発生に絶対的に必要とされる(Apelquistら、1999、Nature 400:6747; Lammertら、2000、Mech Dev. 94:; Jensenら、2000、Nat. Genet. 24:36; Jansenら、Diabetes 2000、49:163)。Ngn-3は、内分泌臍臓系統の発生に必要とされる重要なbHLH転写因子決定基である。Hes-1は、Ngn-3発現の強力なサブレッサーである。NIPは、強力にHes-1を発現する。従ってNIPは、内分泌細胞への分化を妨げる前駆細胞である。従ってNIPにおいてHes-1発現をブロックする方法は、内分泌細胞(細胞)へのその分化を導く。Hes-1発現をブロックするためのこのような方法は、siRNAオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスHes-1 RNAを発現する発現プラスミドのいずれかを使用することによる、トランスクレベントされたアンチセンスRNAの使用であり得る。

40

【0116】

(臍臓幹細胞のマーカーとしてのGLP-1R)

50

本発明者らは、成体哺乳動物（ヒトを含む）の臍臓が、グルカゴン様ペプチド-1レセプター（GLP-1R）を発現する細胞を含むことをさらに発見した。本発明は、GLP-1Rポジティブな細胞が、ネスチンポジティブな細胞と共に局在し得るという発見にさらに基づく。本発明はまた、ネスチンポジティブな臍臓幹細胞が、GLP-1Rポジティブな細胞と共に局在し得るという逆の発見に基づく。グルカゴン遺伝子は、多機能性プログルカゴンをコードし、これは、臍臓および腸管におけるプロホルモン転換酵素による特異的なプロセスであって、グルカゴンおよびグルカゴン様ペプチド（GLP）を生じる。GLP-1は、臍臓細胞に見出されるGタンパク質共役レセプターに特異的に結合して、cAMP依存性経路を介してインスリン分泌を刺激することが示されている（KieferおよびHabener、1999、Endocrinology 20: 876；Drucker、1998 Diabetes 47: 159）。本発明は、上記のように、臍島および臍管に見出されるネスチンポジティブな幹細胞がまたGLP-1Rポジティブであるという発見に一部基づく。

10

20

30

40

【0117】

ネスチンポジティブな島前駆細胞（NIP）は、ヒト島組織から単離され、そして上記で略述された一般的な免疫細胞化学手順に従って、GLP-1Rに対するウサギポリクローナル抗血清と反応した（Helloerら、上記）。レセプターの免疫反応性は、試験されたNIPの60%を超えて検出された（図22A）。NIPにおけるGLP-1Rの免疫細胞化学同定をさらに確認するために、RT-PCRが、NIP細胞から調製されたmRNAに対して行われた。増幅プライマー、5'gtgtggcgccaaattactac3'（フォワード）；5'cttggcaagtcgtgcatttga3'（リバース）を用いたNIP mRNAの増幅は、予期された346bp産物を產生し（図22B）、GLP-1Rタンパク質の発現に加えて、NIPがGLP-1Rを产生する生合成能を有することを示した。従って、ネスチンに加えてGLP-1Rは、本発明において臍臓幹細胞に対するマーカーとして有用である。

20

【0118】

（導管上皮細胞の異なる集団に対するマーカーとしてのサイトケラチン-19）

サイトケラチン-19（CK-19）は、別の中間径フィラメントタンパク質である。CK-19および関連するサイトケラチンは、臍管細胞において発現されることが以前に見出されていた（Bouwensら、1994）。しかし本発明者らは、CK-19発現は確かに小管に限定される一方で、CK-19に特異的な蛍光性抗体は、ネスチン特異的抗体で標識された細胞とは異なる導管細胞を標識することを発見した。これは、島におけるネスチンポジティブな細胞は、CK-19ポジティブな細胞とは異なる細胞型の導管細胞であり得ることを示唆する。

30

40

【0119】

（NIPはCD34低／ネガティブである）：

NIPのSP画分（図19Bの左下ゲート）は、低レベルからゼロのレベルのCD34を発現する。この発見は重要である。なぜならCD34ポジティブなSP細胞と対照してみると、CD34低ネガティブな髄由来のSP細胞はきわめて多能性であるからである（Goodell、1999、Blood 94: 12545を参照のこと）。髄由来のCD34低／ネガティブなSP細胞は、たとえあったとしても増殖能が限定される（Goodellら、1996、J. Exp. Med. 183: 1797；Goodellら、1997 Nature Medicine 3: 1337）。CD34低／ネガティブなNIPはインビトロで増殖しない。なぜならこのNIPはMdr-1を発現するからである。

50

【0120】

（臍臓幹細胞のさらなるマーカー）

本発明はまた、以下からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つに対してポジティブな臍臓幹細胞を提供する：ラトロフィリン（2型）（Sudhof、2001、Annual Rev. Neurosci. 24: 933）、C-kit（CD117）

50

(Gibsonら、2002、Adv Anat Pathol 9:65)、SSTR-2, 3および4(ソマトスタチンレセプター)(Schulzら、2000、J Physiol Paris 94:259)、SUR-1(スルホニル尿素(sulfonylurea)レセプター)(Winartoら、2001、Arch Histol Cytol 64:59; Landgraf、2000、Drugs Aging、17:411)、ならびにKir6.2(SUR-1を含む内向き整流K⁺チャネルサブユニット)(Winartoら、上記; Landgraf、上記)。

【0121】

本発明はまた、以下のうちの少なくとも1つに対してネガティブな臍臓幹細胞を提供する: CD45(Sasakiら、2001、Int J Biochem Cell Biol 33:1041)、CD133(Kobariら、2001、J Hematother Stem Cell Res 10:273)、MHCクラスIIおよびMHCクラスIII。

【0122】

(臍島由来の単離された幹細胞およびその使用)

幹細胞は、臍臓組織の調製物(例えば糖尿病患者由来の組織の生検サンプルから得られた島)から単離され得る。次いでこの幹細胞はエキソビオで拡張され得、そしてこの得られる細胞は、同系移植片としてドナーに戻して移植され得る。ドナーの内部において、この細胞は分化して、インスリン分泌性細胞(例えば細胞)を提供し、糖尿病を引き起こした自己免疫攻撃に奪われた細胞の代わりとなり得る。このアプローチは、組織(例えばドナーとして役立ち得る別の個体由来の島)の移植から生じる免疫拒絶の問題を克服し得る。本発明の一実施態様において、同系移植された幹細胞の使用により、別の技術が免疫拒絶を防ごうと努力して行われ得る(すなわち、移植された細胞を免疫攻撃(例えば1型糖尿病を有する個体に存在する自己免疫)に対して抵抗性にする移植細胞の遺伝子治療)。島全体にわたる幹細胞の使用のさらなる利点は、移植された幹細胞がインサイチュで分化し得、そして宿主環境により良く適応し得る(例えば適切な微小循環および宿主の生理的要件に応答する異なる島細胞型の補体を提供する)ことである。本発明の別の実施態様は、例えば前駆細胞を形成するためにエキソビオで部分的に分化した幹細胞の使用を意図し、この前駆細胞は引き続いて宿主に移植され、さらなる分化が宿主内で必要に応じて生じる。幹細胞の同系移植片の使用、前駆細胞の同系移植片の使用または偽島の同系移植片の使用が好ましい。別の実施態様は、別の個体または別の種の哺乳動物から得られた幹細胞の同系移植片の使用、前駆細胞の同系移植片の使用または偽島の同系移植片の使用を意図する。

【0123】

本発明のなお別の実施態様において、この幹細胞は、免疫学的にブラインドであるかまたは免疫特権である。本発明のこの局面の一実施態様において、免疫特権の幹細胞は、十分な量のクラスIおよび/またはクラスIIの主要組織適合抗原(別名HLAまたはヒト白血球抗原)を発現せず、宿主からの免疫応答を惹起する。例えば、同種異系供給源または異種供給源から得られるこれらの幹細胞は、免疫応答性の移植レシピエントにおいて宿主対移植片応答を起こさない。

【0124】

本発明のこの局面の別の実施態様において、免疫特権の幹細胞は、クラスI MHC抗原および/またはクラスII MHC抗原を発現しない。同種異系供給源または異種供給源から得られるこれらの幹細胞は、免疫応答性の移植レシピエントにおいて宿主対移植片応答を起こさない。

【0125】

本発明の別の実施態様において、幹細胞を含むヒト組織移植片は、ヒト特異的なクラスI MHC抗原およびクラスII MHC抗原の両方を発現するが、免疫応答性のマウスによって自己として認識され、そして宿主対移植片拒絶を受けない。同種異系供給源または異種供給源から得られるこれらの幹細胞は、免疫応答性の移植レシピエントにおいて宿

10

20

30

40

50

主対移植片応答を起こさない。

【0126】

本発明はまた、異種ドナーから幹細胞を単離する方法、および得られる細胞を異種移植片として別の種の哺乳動物に移植する方法（例えば、マウス幹細胞が、ヒト（例えば糖尿病性ヒト患者）に移植される）を提供する。

【0127】

本発明は、ネスチンポジティブな幹細胞の同系移植、同種異系移植または異種移植を行う方法を提供し、ここでこの幹細胞は、移植前に一定期間（例えば2～4時間、4～5時間、5～10時間または1～3日間）培養される。本発明はまた、A B C G 2、O c t 3 / 4、G L P - 1 レセプター、ラトロフィリン（2型）、H e s - 1、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C - k i t、M D R - 1、S S T - R 2、S S T - R 3、S S T - R 4、S U R - 1、K i r 6 . 2 のうちの少なくとも1つに対してポジティブであり、そして／あるいはC D 3 4、C D 4 5、C D 1 3 3、M H C クラスIおよびM H C クラスIIのうちの1もすべても発現しない幹細胞の同系移植、同種異系移植または異種移植を行う方法を提供し、ここでこの幹細胞は、移植前に一定期間（例えば2～4時間、4～5時間、5～10時間または1～3日間）培養される。
10

【0128】

本発明はまた、ネスチンポジティブな幹細胞の同系移植、同種異系移植または異種移植を行う方法を提供し、ここでこの幹細胞は、移植前に一定期間（例えば2～4時間、4～5時間、5～10時間または1～3日間）拡張されて、細胞分裂によって他の幹細胞または前駆細胞を生じさせる。
20

【0129】

本発明はまた、A B C G 2、O c t 3 / 4、G L P - 1 レセプター、ラトロフィリン（2型）、H e s - 1、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C - k i t、M D R - 1、S S T - R 2、S S T - R 3、S S T - R 4、S U R - 1、K i r 6 . 2 のうちの少なくとも1つに対してポジティブであり、そして／あるいはC D 3 4、C D 4 5、C D 1 3 3、M H C クラスIおよびM H C クラスIIのうちの1もすべても発現しない幹細胞の同系移植、同種異系移植または異種移植を行う方法を提供し、ここでこの幹細胞は、移植前に一定期間（例えば2～4時間、4～5時間、5～10時間または1～3日間）拡張される。
30

【0130】

本発明はまた、幹細胞の同系移植、同種異系移植または異種移植を行う方法を提供し、ここでこのネスチンポジティブな幹細胞は、移植前に一定期間（例えば2～4時間、4～5時間、5～10時間または1～3日間）、E G F、b F G F - 2、高グルコース、K G F、H G F / S F、I D X - 1、I D X - 1をコードする核酸分子、G L P - 1、e x e n d i n - 4、ベータセルリン、アクチビンA、T G F - およびそれらの組み合わせからなる群より選択される因子での処理によって前駆細胞へ分化するように誘導される。

【0131】

臍臓幹細胞の場合において、この幹細胞は、引き続いて臍臓前駆細胞に分化する。

【0132】

本発明はまた、A B C G 2、O c t 3 / 4、G L P - 1 レセプター、ラトロフィリン（2型）、H e s - 1、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C - k i t、M D R - 1、S S T - R 2、S S T - R 3、S S T - R 4、S U R - 1、K i r 6 . 2 のうちの少なくとも1つに対してポジティブであり、そして／あるいはC D 3 4、C D 4 5、C D 1 3 3、M H C クラスIおよびM H C クラスIIのうちの1もすべても発現しない幹細胞の同系移植、同種異系移植または異種移植を行う方法を提供し、ここでこの幹細胞は、移植前に一定期間（例えば2～4時間、4～5時間、5～10時間または1～3日間）、E G F、b F G F - 2、高グルコース、K G F、H G F / S F、I D X - 1、I D X - 1をコードする核酸分子、G L P - 1、e x e n d i n - 4、ベータセルリン、アクチビンA、T G F - およびそれらの組み合わせからなる群より選択される因子での処理
40

によって前駆細胞へ分化するように誘導される。臍臓幹細胞の場合において、この幹細胞は、引き続いて臍臓前駆細胞に分化する。

【0133】

本発明は、同系移植、同種異系移植または異種移植を行う方法を提供し、ここでネスチ¹⁰ンポジティブな幹細胞は、移植前に培養もされないか、拡張もされないか分化もされず、あるいはここでネスチ¹⁰ンポジティブな幹細胞は、移植前に培養されるかそして／または拡張されるかそして／または分化される。

【0134】

本発明はまた、同系移植、同種異系移植または異種移植を行う方法を提供し、ここでABC G 2、Oct 3 / 4、GLP - 1レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes - 1¹⁰、ネスチ¹⁰ン、インテグリンサブユニット 6および 1、C - kit、MDR - 1、SST - R 2、SST - R 3、SST - R 4、SUR - 1、Kir 6.2のうちの少なくとも1つに対してポジティブであり、そして／あるいはCD 34、CD 45、CD 133、MHCクラスIおよびMHCクラスIIのうちの1もすべて発現しない幹細胞は、移植前に培養もされないか、拡張もされないか分化もされず、あるいはここでABC G 2、Oct 3 / 4、GLP - 1レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes - 1、ネスチ¹⁰ン、インテグリンサブユニット 6および 1、C - kit、MDR - 1、SST - R 2、SST - R 3、SST - R 4、SUR - 1、Kir 6.2のうちの少なくとも1つに対してポジティブであり、そして／あるいはCD 34、CD 45、CD 133、MHCクラスIおよびMHCクラスIIのうちの1もすべて発現しない幹細胞は、移植前に培養されるかそして／または拡張されるかそして／または分化される。²⁰

【0135】

ネスチ¹⁰ンポジティブな細胞は、単離された臍島由来の培養物中で増殖され、そして引き続いて単離されて、本質的に無限に増殖し得る幹細胞系統を形成し得る。

【0136】

別の実施態様において、ABC G 2、Oct 3 / 4、GLP - 1レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes - 1、ネスチ¹⁰ン、インテグリンサブユニット 6および 1、C - kit、MDR - 1、SST - R 2、SST - R 3、SST - R 4、SUR - 1、Kir 6.2のうちの少なくとも1つに対してポジティブであり、そして／あるいはCD 34、CD 45、CD 133、MHCクラスIおよびMHCクラスIIのうちの1もすべて発現しない幹細胞は、単離された臍島由来の培養物中で増殖され、そして引き続いて単離されて、本質的に無限に増殖し得る幹細胞系統を形成し得る。³⁰

【0137】

本発明者らは、ネスチ¹⁰ンを発現する細胞が培養された島を離れて成長し、そして培養物中でおよそ4日と同じくらい早期に島の周囲での成長が観察され得ることを発見した。これらの細胞は、ニューロン様形態を有し(図3)、ネスチ¹⁰ンポジティブ染色を示し、そしてネスチ¹⁰ンmRNAを発現する。ネスチ¹⁰ンポジティブな細胞を含む島は、島の懸濁液をコンカナバリンAに暴露することによって、培養された島から増殖する他の細胞(例えば線維芽細胞)から分離され得る。ネスチ¹⁰ンポジティブな幹細胞を含む島は、コンカナバリンAでコーティングされた培養容器に接着せず、例えば島は単にデカントされ得、一方他の細胞型はこの容器に接着したままである。次いでこの島は、コンカナバリンAコーティングを有さないウェル上にプレーティングされ、ここで島は接着する。培養手順および単離手順の詳細は、以下の実施例1においてラット細胞について記載される。類似の結果がヒト細胞を用いて得られている。⁴⁰

【0138】

(培養物中の偽島および導管構造の形成)

本発明の一実施態様は、幹細胞または前駆細胞に、不十分な島細胞集団を有する患者に移植され得る偽島様集団を形成させて、ホルモン療法を伴わずに生理学的制御を維持することによる幹細胞または前駆細胞の移植の代案を提供する。島由来の幹細胞は、上記で示されるように培養された島から調製され得るか、または増殖中の幹細胞系統から得られ得⁵⁰

る。次いでこの幹細胞は、これらを種々の増殖因子に暴露することによって分化するよう誘導され得る。このプロセスは、実施例2および3に例示される。

【0139】

(幹細胞または前駆細胞の島細胞への分化)

臍臓幹細胞の分化を誘導し得る増殖因子としては、EGF-2、塩基性FGF、高グルコース、KGF、HGF/SF、GLP-1、exendin-4、ベータセルリン、アクトビンA、TGF- おびそれらの組み合わせが挙げられるがこれらに限定されない。GLP-1は、グルカゴン様ペプチド-1をいう。高グルコースは、幹細胞の培養に通常使用される濃度よりも高いグルコース濃度をいう。例えば幹細胞は、およそ5.6 mM

グルコースにおいて一般に培養および増殖され得、そして高グルコース濃度は、5.6 mMを超える別の濃度をいう。好ましい実施態様において、16.7 mMの濃度が意図される。実施例2において、塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)および上皮増殖因子(EGF)を使用する1つの可能な増殖因子処理が記載される。

【0140】

培養細胞の培地に添加される増殖因子に加えて、さらなる増殖因子が、幹細胞が動物またはヒトに移植される場合に分化を引き起こすもととなり得る。この局面において、公知または未知のいずれかの多くの増殖因子が、内因性の細胞によって分泌され得、そしてインサイチュで幹細胞に暴露され得る。移植された幹細胞は、所望の結果(すなわち、最終分化した細胞型(単数または複数)および形成された解剖学的構造(例えば組織または器官))に適合した内因性の増殖因子および外因的に投与される増殖因子の任意の組み合わせによって分化するよう誘導され得る。

【0141】

一実施態様は、分化を刺激するアプローチを提供し、これは増殖因子の下流エフェクターを投与することか、あるいはこのようなエフェクターをコードする核酸分子を用いて幹細胞または前駆細胞をトランスフェクトすることである。一例はIDX-1であり、これはGLP-1またはexendin-4によって誘導される転写因子である。IDX-1のようなエフェクターの導入は分化を誘発して、内分泌性島細胞を形成し得る。

【0142】

(移植片拒絶の分析)

本発明は、移植された物質の生存を評価するためのインビオ手順を提供する。実験的な移植拒絶は、免疫抑制された哺乳動物または免疫抑制されない哺乳動物に本発明に従った幹細胞または偽島様集団を移植することによって分析される。

【0143】

例えば免疫抑制されないC57BL/6マウスは、本発明に従ったヒト幹細胞を移植される(例えば腎被膜下)。移植片拒絶は、移植レシピエントを屠殺しそして生存能力について染色するか、または適切な移植後の時点で移植された物質の部位(すなわち移植された物質の部位に存在する器官または組織)で免疫細胞化学染色を行うかによって分析される。移植された物質の部位の染色(例えばヘマトキシリン/エオシン染色または免疫染色)が行われる時点は、例えば平均生存時間または移植された物質の期待される生存時間に従って変化し得る。移植片の部位は、例えば移植後1日~10年(すなわち、1日、5日、10日、30日、100日以上、1年、2年、5年または10年)、好ましくは移植後10日~1年、そして最も好ましくは移植後10~100日の染色によって分析される。例えば、移植された物質がマウスの腎被膜下で導入される場合、移植されたマウスの腎臓が精査される。移植された物質は、この移植された物質がなお検出可能であるか、そして/またはこの移植された物質が組織集団に増殖した場合に首尾良く移植される(すなわち拒絶されない)。

【0144】

移植された物質の検出および移植された物質の増殖は、例えば移植部位(すなわち腎臓)から調製される凍結切片のヘマトキシリン/エオシン染色、および移植レシピエントに由来しない(すなわち宿主の腎臓に由来しない)新しい成長の検出によって決定される。

10

20

30

40

50

異種移植の場合において、移植された物質は、当該分野で公知であり、そして本明細書中に記載される免疫細胞化学染色の方法に従った、移植された物質が由来する種由来の抗原に特異的な抗血清での特異的な免疫染色がポジティブな細胞を同定する場合に首尾良く移植される。あるいは、異種移植が行われる実施態様において、移植された物質は、移植された種（すなわち移植された物質が由来する種）由来の分子（すなわちタンパク質または抗原）が移植レシピエントの血液において検出される場合に首尾良く移植される。

【0145】

本明細書中で使用される場合、「拒絶」は、宿主の免疫系による移植された物質の拒絶をいう。一実施態様において、「拒絶」は、宿主の免疫応答に応答して、移植された物質の90%以上の細胞または組織のネクローシスの発生を意味する。別の実施態様において、「拒絶」は、移植された物質の生存能力が、宿主の免疫応答に応答して、移植前の移植物質の生存能力と比較して90%以上減少するような生存能力の減少を意味する。生存能力の減少は、当該分野で周知の方法（トリパンブルー排除染色が挙げられるがこれに限定されない）によって決定され得る。別の実施態様において、「拒絶」は、移植された物質が増殖できないことを意味する。増殖は、当該分野で公知の方法（ヘマトキシリノエオシン染色が挙げられるがこれに限定されない）によって測定され得る。移植拒絶の発生および/または拒絶が移植後に生じる速度は、移植された物質（すなわち細胞型もしくは細胞数）または宿主（すなわち宿主が免疫寛容であるか否か、そして/もしくは宿主が免疫抑制剤で処置されているか否か）が挙げられるがこれらに限定されない因子に依存して変化する。

【0146】

（移植の方法）

本発明は、哺乳動物への移植の方法を提供する。幹細胞、前駆細胞または分化した細胞は、培養容器から患者へ移植される場合に哺乳動物へ「移植」または「導入」される。

【0147】

本発明に従った移植は、本発明に従って幹細胞を単離するステップ、およびこの幹細胞を哺乳動物または患者に移植するステップを有し得る。本発明に従った移植は、細胞懸濁液の哺乳動物または患者への注入、哺乳動物または患者の組織または器官への細胞集団の外科的移植、あるいは組織または器官の細胞懸濁液での灌流によって、幹細胞を哺乳動物または患者に移植するステップを含み得る。幹細胞の移植経路または移植経路は、細胞が特定の組織または器官に存在する必要性、ならびに細胞が所望の標的組織または器官を見出す能力および所望の標的組織または器官によって保持される能力によって決定される。移植された細胞が特定の場所に存在するべき場合には組織または器官に外科的に配置され得るか、あるいは細胞が所望の標的器官に移動する能力を有する場合には単に血流に注入され得る。本発明に従った移植は、本発明に従って幹細胞を単離するステップ、ならびにこの幹細胞を培養するステップおよび哺乳動物または患者にこの幹細胞を移植するステップを有し得る。別の実施態様において、本明細書中で使用される場合、移植は、本発明に従って幹細胞を単離するステップ、この幹細胞を分化させるステップ、および哺乳動物または患者にこの幹細胞を移植するステップを有し得る。本明細書中で使用される場合、移植は、本発明に従って幹細胞を単離するステップ、この幹細胞を分化および拡張するステップ、ならびに哺乳動物または患者にこの幹細胞を移植するステップを有し得る。

【0148】

（臍臓幹細胞を用いたインスリン依存型糖尿病を治療する方法）

幹細胞は、1型糖尿病患者由来の失われた細胞の置換、または2型糖尿病患者における細胞の総数の増大に有用である。糖尿病患者は、好ましくは幹細胞、前駆細胞または偽島様集団を産生するために使用される臍臓組織のドナーとして役立つ。幹細胞は、成体の臍島ならびに臍管内に存在する。糖尿病患者が臍臓生検を受けた後、島は生検組織から単離され、そしてエキソビオで好ましくは24時間の範囲で培養の準備をされる。幹細胞は、上記の方法によって2~3週間の範囲で増殖および単離され得る。幹細胞は、単離後直接患者に戻して移植され得るか、または増殖因子によって誘導される分化の期間後に移

10

20

30

40

50

植され得る。島は、実施例 2 に記載されるように継代培養によって產生され得る。外科的な脾臓生検および移植のプロセス全体は、およそ 30 日の期間以内に行われ得る。

【 0 1 4 9 】

本発明の一実施態様において、多能性幹細胞が使用される。これらの細胞は、免疫学的にブラインドまたは免疫特権であり、その結果同種異系移植または異種移植において、これらの細胞はレシピエントによって自己として認識され、そしてクラス I 抗原またはクラス II 抗原によって MHC 拘束されない。本発明のこの実施態様の一局面において、これらの細胞は、MHC クラス I 抗原および / または MHC クラス II 抗原を発現しない。

【 0 1 5 0 】

本発明の別の実施態様において、移植のレシピエントは、他の移植された細胞の宿主対移植片拒絶を実証し得、この拒絶は、例えば自己抗原（例えば GAD 65）に対する遮断抗体の投与、本明細書中で記載される 1 以上の免疫抑制剤の投与、あるいは自己免疫拒絶を妨げるかまたは改善するための当該分野で公知の任意の方法によって闘われ得る。

【 0 1 5 1 】

あるいは、本発明に従って非ヒト哺乳動物から単離された幹細胞が、ヒト糖尿病患者に移植される。移植ステップの前に、この幹細胞は培養され得るかそして / または拡張され得るかそして / または分化され得る。

【 0 1 5 2 】

（脾臓幹細胞を用いて肝臓疾患を患う患者を治療する方法）

脾臓幹細胞または脾臓前駆細胞が分化転換して肝細胞を形成する能力は周知である（Bisgaard および Thorgerelsson, 1991）。本発明の脾臓幹細胞が使用されて、肝臓組織の機能的集団が減少している肝臓疾患（例えば肝硬変（cirrosis）、肝炎または肝臓癌）を患う患者に肝細胞を提供し得る。本発明の幹細胞はまた、遺伝子治療によって処置されて遺伝子欠陥を修正し得、そして患者に導入されて肝臓機能を回復させ得る。ネスチンポジティブな幹細胞は、1 以上の増殖因子を加えることによって、または他の処理（例えば核酸分子を用いたトランスフェクション）によって培養物中またはインビオのいずれかで分化され得、これは幹細胞の肝細胞への分化をもたらす。一実施態様において、本発明は、例えばソニックヘッジホッグを抑制するためのサイクロパミンの使用を意図し、これは肝細胞形成をもたらす。本発明の別の実施態様において、この幹細胞は、任意のエキソビオ処理を受けずに移植され得、そして適切な増殖因子が、インサイチュで患者の体内に提供され得る。なお別の実施態様において、この幹細胞は、増殖因子または他の因子でエキソビオ処理され得、そして引き続いて部分的に分化した状態または最終分化した状態で患者に移植され得る。幹細胞または前駆細胞をトランスフェクトする方法、投与の投薬量および経路、薬学的組成物、ドナー - 同系移植片プロトコル、ならびに免疫抑制方法を含む本発明の他の局面は、脾臓組織への分化の場合とまったく同様に肝細胞への分化転換によって行われ得る。

【 0 1 5 3 】

本発明は、同系幹細胞、同種異系幹細胞または異種幹細胞、あるいはそれらの任意の組み合わせの患者への移植を特に意図する。

【 0 1 5 4 】

（幹細胞のトランスフェクションの方法）

種々の方法が、脾臓幹細胞への遺伝子移植に利用可能である。リン酸カルシウム沈殿化 DNA が使用されているが、特に非接着細胞について低い形質転換効率を提供する。加えて、リン酸カルシウム沈殿化 DNA 方法は、しばしば多数の縦列反復配列の挿入をもたらし、内因性 DNA または外因性 DNA のいずれかの遺伝子機能の混乱の可能性を増大する（Boggs, 1990）。陽イオン脂質の使用（例えばリポソームの形態）がまた、真核生物細胞のトランスフェクションについて DNA をパッケージングする有効な方法であり、そして陽イオン脂質のいくつかの市販された調製物が入手可能である。エレクトロポレーションは、リン酸カルシウムプロトコルを超える改善された形質転換効率を提供する。これは、ゲノムの単一の部位で単一のコピーインサートを提供する利点を有する。細胞

10

20

30

40

50

の核へのDNAの直接マイクロインジェクションは、遺伝子移植のなお別の方法である。これは、短期トランスフェクションについてほぼ100%の効率を提供し、そして安定なDNA組込みについては20%の効率を提供することが示されている。マイクロインジェクションは、細胞質への外因性DNAの時折問題の多い細胞輸送を回避する。このプロトコルは、少量の物質を必要とする。これは、細胞当たり公知の量のDNAの導入を可能にする。実質的に純粋な集団の幹細胞を得る能力は、臍臓幹細胞の標的化遺伝子修飾に対するマイクロインジェクションアプローチの実現可能性を改善する。しかしマイクロインジェクションは、長く極めて専門的なプロトコルである。このプロトコルの真の特質は、任意の所定の時に注入され得る細胞数を限定し、大規模産生におけるその使用を限定する。レトロウイルス方法を用いた臍臓幹細胞への遺伝子挿入が、好ましい方法である。レトロウイルスは、極めて高いトランスフェクション効率でランダムな單一コピーの単一部位のインサートを提供する。他のこのようなトランスフェクション方法が当業者に公知であり、そして本発明の範囲内にあるとみなされる。

【0155】

(臍臓幹細胞のレトロウイルス形質転換)

臍臓細胞についての遺伝子移植プロトコルは、「ヘルパーウイルス」(すなわち、目的の外来遺伝子を保有するが、完全なウイルス粒子を形成することができない外殻被包(en capsidation)欠損ウイルスゲノム)としてレトロウイルスペクターを含み得る。他のキャリア(例えばDNA媒介性移植、アデノウイルスペクター、SV40ベクター、アデノ随伴ウイルスペクターおよび単純ヘルペスウイルスペクター)がまた利用され得る。いくつかの因子が、感染について適切なベクターを選択する際に考慮されるべきである。スプライシングされたサブゲノムRNAに頼るよりはむしろ外来遺伝子を発現するためにウイルスの末端反復配列または強力な内部プロモーターを使用することが時折好ましい。

【0156】

幹細胞形質転換の2つの主な方法は、共培養および上清感染である。上清感染は、ウイルス上清への幹細胞の繰り返される暴露を含む。共培養は、幹細胞および感染された「パッケージ細胞株」(以下を参照のこと)の24時間~48時間の混合を含む。共培養は、代表的には、幹細胞形質転換については上清感染よりも効率的である。共培養後、感染された幹細胞は、しばしばさらに培養されて、長期培養(LTC)を確立する。

【0157】

ヘルパーウイルスを含む細胞株は、パッケージ細胞株といわれる。種々のパッケージ細胞株が現在利用可能である。このパッケージ細胞株の重要な特徴は、複製能のあるヘルパーウイルスを產生しないことである。

【0158】

本発明の一実施態様において、幹細胞が収集される動物または患者は、抽出の前に5-FU(5-FU)で処理され得る。5-FU処理された幹細胞は、未処理の細胞よりもレトロウイルス感染を受けやすい。しかし5-FU幹細胞は、クローン原性前駆体の数を劇的に減少する。

【0159】

別の実施態様において、収集された幹細胞は、種々の増殖因子(例えば臍臓幹細胞の増殖または分化を促進するために利用される増殖因子)に暴露され得る。増殖因子は、感染前、感染の間または感染後に培養物中に導入されて、細胞の複製および形質導入を改善し得る。研究は、増殖因子の使用が、形質転換効率を30%から80%に増大することを報告する。

【0160】

(代表的なレトロウイルス形質転換プロトコル)

哺乳動物の臍臓幹細胞のエキソビオ形質導入、ならびに有効な移植およびその子孫細胞を含む種々の組織における遺伝子発現を得るに十分な非切除レシピエントへの引き継ぐ移植が、マウスにおいて示されている。この標的細胞は、レシピエントへ注入される前に、

目的の遺伝子を含む適切なベクターの存在環境下で2~4日間培養される。

【0161】

具体的には、骨髄幹細胞を雄性ドナー(4~8週齢)のBALB/c AnNCrマウス(National Cancer Institute, Division of Cancer Treatment Animal Program, Frederick, MD)から収集した。この細胞を、10cm皿当たり $1 \sim 2 \times 10^7$ 細胞の密度でプレーティングし、そして以下を含むダルベッコ変形イーグル培地(DMEM)において48時間培養した: 10% 热不活性ウシ胎仔血清、グルタミン、Pen/Strep、100U/mlのインターロイキン-6(IL-6)および細胞成長を刺激するための幹細胞因子(SCF; Immunex, Seattle, WA)(Schiffmannら, 1995)。

【0162】

同時に、ウイルスパッケージ細胞株を24時間培養した。Schiffmannによって使用されたパッケージ細胞株は、GP+E86であり、そしてこのウイルスベクターは、LNシリーズのレトロウイルスベクターに基づいたLGレトロウイルスベクターであった。

【0163】

適切なインキュベーション期間後、 $1 \sim 2 \times 10^7$ の幹細胞を、ウイルスパッケージ細胞を含む10cm皿上にプレーティングし、そして8μg/mlのポリブレンの存在環境下、およびドナーの幹細胞と同じ増殖因子刺激条件下で48時間共培養した。次いでこの幹細胞を収集し、増殖培地で洗浄し、そして複数の注入について(合計5回の注入、毎日または毎週のいずれかで)1回の注入当たり 2×10^7 細胞の投薬量でレシピエントマウスに注入した。

【0164】

首尾良い幹細胞の形質導入および幹細胞の移植は、例えばPCR分析、免疫細胞化学染色、サザンノーザンプロットティングまたはウェスタンプロットティング、あるいは当業者に公知の他のこのような技術によって決定され得る。

【0165】

(哺乳動物)

本発明に従って有用な哺乳動物は、任意の哺乳動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、サル、ウマ、ハムスター、ブタまたはウシ)を有する。本発明に従った非ヒト哺乳動物は、ヒトではない任意の哺乳動物であり、マウス、ラット、ヒツジ、ウサギ、ヤギ、サル、ウマ、ハムスター、ブタまたはウシが挙げられるがこれらに限定されない。

【0166】

(投与の投薬量および様式)

例えば本明細書中で記載されるような臍臓幹細胞を必要とする患者は、以下のように処置され得る。本発明の細胞が、好ましくは生物学的に適合性の溶液または薬学的に受容可能な送達ビヒクル中で、経口摂取、注入、吸入または任意の数の他の方法によって患者に投与され得る。好ましい方法は、内視鏡的逆行性注入である。別の好ましい方法は、臍動脈への注入である。別の好ましい方法は、細胞または偽島様集団の腎被膜下空間への注入または配置である。投与される投薬量は、患者毎に変化する。「治療有効用量」は、例えば限定されないが、機能(例えばインスリン産生または血漿グルコースレベル)の増大のレベルによって決定され得る。幹細胞導入のレベルのモニタリング、このような移植によって影響を及ぼされる特定の遺伝子発現のレベルのモニタリング、および/またはコードされる産物の存在もしくはレベルのモニタリングによってまた、当業者は投与される投薬量を選択および調整し得る。一般的には、幹細胞を有する組成物は、体重1kg当たり $10^5 \sim 10^8$ 細胞の範囲、好ましくは体重1kg当たり $10^6 \sim 10^7$ 細胞の範囲で単回用量で投与される。この投薬量は、毎日、毎週、毎月、毎年または治療する医師によって適切であると考慮されるように繰り返され得る。本発明は、細胞集団がまた患者から取り

出され得るか、または別の状況では提供され得、エキソビボで拡張され得、所望であれば治療遺伝子を含むプラスミドを用いて形質導入され得、次いで患者に再導入され得る。

【0167】

(薬学的組成物)

本発明は、生理学的に適合性のキャリアと混合された本発明に従った幹細胞を含む組成物を提供する。本明細書中で使用される場合、「生理学的に適合性のキャリア」は、生理学的に受容可能な希釈剤（例えば水、リン酸緩衝化生理食塩水または生理食塩水）をいい、そしてさらにアジュバントを有し得る。アジュバント（例えば不完全フロイントアジュバント、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウムまたはミョウバン）は、当該分野で周知の物質である。

10

【0168】

本発明はまた、薬学的組成物を提供する。活性成分に加えて、これらの薬学的組成物は、薬学的に使用され得る適切な薬学的に受容可能なキャリア調製物を含み得る。

【0169】

経口投与についての薬学的組成物は、経口投与に適切な投薬量で当該分野で周知の薬学的に受容可能なキャリアを用いて処方され得る。このようなキャリアは、患者による摂取について薬学的組成物が錠剤、丸剤、糖剤、カプセル、液体、ゲル、シロップ、スラリー、懸濁液などとして処方されることを可能にする。

【0170】

経口使用についての薬学的調製物は、活性化合物の固形賦形剤との組み合わせを通じて得られ得、所望であれば適切な補助剤の添加後に、必要に応じて得られる混合物を粉碎し、そして顆粒の混合物を処理して錠剤または糖剤のコアを得る。適切な賦形剤は、炭水化物またはタンパク質のフィラー（例えば、ラクトース、スクロース、マンニトールまたはソルビトールを含む糖；トウモロコシ、コムギ、イネ、ジャガイモまたは他の植物由来のデンプン；メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースまたはカルボキシメチルセルロースナトリウムのようなセルロース；ならびにアラビアゴムおよびトラガカントゴムを含むゴム；ならびにゼラチンおよびコラーゲンのようなタンパク質）である。所望であれば、崩壊剤または溶解剤（例えば架橋ポリビニルピロリドン、塞天、アルギン酸またはその塩（例えばアルギン酸ナトリウム））が添加され得る。

20

【0171】

糖剤のコアは、適切なコーティング（例えば濃縮糖溶液）を用いて提供され、これはまた、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カルボポールゲル、ポリエチレングリコールおよび／または二酸化チタン、ラッカー溶液ならびに適切な有機溶媒または溶媒混合物を含み得る。染料または顔料は、製品識別のため、または活性化合物の量、すなわち投薬量を特徴付けるために錠剤または糖剤のコーティングに添加され得る。

30

【0172】

経口で使用され得る薬学的調製物としては、ゼラチンから作られるプッシュフィットカプセル、ならびにゼラチンから作られるソフトシールカプセル、およびコーティング（例えばグリセロールまたはソルビトール）が挙げられる。プッシュフィットカプセルは、フィラーまたは結合剤（例えばラクトースもしくはデンプン）、潤滑剤（例えばタルクもしくはステアリン酸マグネシウム）および必要に応じて安定剤と混合して活性成分を含み得る。ソフトカプセルにおいて、この活性化合物は、適切な液体（例えば脂肪油、液体パラフィンまたは液体ポリエチレングリコール）に安定剤とともにまたは安定剤を伴わずに溶解または懸濁され得る。

40

【0173】

非経口投与についての薬学的処方物は、活性化合物の水溶液を有する。注入について、本発明の薬学的組成物は、水溶液、好ましくは生理学的に適合性の緩衝液（例えばハンクス溶液、リンガー溶液または生理的塩類溶液）において処方され得る。水性注入懸濁液は、懸濁液の粘性を増大する物質（例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトールまたはデキストラン）を含み得る。さらに、活性溶媒またはビヒクリの懸濁液は、

50

脂肪油（例えばゴマ油）または合成脂肪酸エステル（例えばオレイン酸エチルもしくはトリグリセリド）あるいはリボソームを有する。必要に応じてこの懸濁液はまた、適切な安定剤またはこの化合物の溶解度を増大させる因子を含み、高度に濃縮された溶液の調製を可能にし得る。

【0174】

鼻投与について、透過されるべき特定の障壁に適した浸透剤が、この処方において使用される。このような浸透剤は、一般的に当該分野で公知である。

【0175】

本発明の薬学的組成物は、当該分野で公知の様式において（例えば、従来の混合プロセス、溶解プロセス、粒状化プロセス、糖剤作製プロセス、湿式粉碎プロセス、乳化プロセス、カプセル化プロセス、捕捉プロセスまたは凍結乾燥プロセスの手段によって）製造され得る。

10

【0176】

薬学的組成物は、塩として提供され得、そして多くの酸（塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸などを含むがこれらに限定されない）とともに形成され得る。塩は、対応する遊離塩基形態である水性溶媒または他のプロトン性溶媒においてより可溶性である傾向がある。他の場合において、好ましい調製物は、使用前に緩衝液と化合される 1 mM ~ 50 mM ヒスチジン、0.1% ~ 2% スクロース、2% ~ 7% マンニトールにおける 4.5 ~ 5.5 の pH 範囲での凍結乾燥粉末であり得る。

20

【0177】

受容可能なキャリア中で処方される本発明の化合物を含む薬学的組成物が調製された後、この組成物は、適切な容器に配置され得、そして指示された状態の処置について投与の量、頻度および方法を含む情報とともにラベルを貼られ得る。

【0178】

上記の開示は一般的に本発明を記載する。より完全な理解は、以下の特定の実施例を参照することによって得られ得、この実施例は、本明細書中において例示の目的のみについて提供され、本発明の範囲を限定することは意図されない。

【0179】

(実施例 1)

(ラット臍臓からのネストチンポジティブな幹細胞の単離)

30

ラット島を、Lacy および Kostianovsky によって記載されるコラゲナーゼ消化方法を用いて、2 ~ 3 月齢の Prague-Dawley ラットの臍臓から単離した。ヒト島を、コラゲナーゼ処理を用いて Diabetes Research Institute、Miami、FL によって提供した。この島を、コンカナバリン A でコーティングされている 12 ウエルプレート (Falcon 3043 プレート、Becton Dickinson、Lincoln Park、NJ) において 37 度 96 時間培養した。この培養培地は、10% ウシ胎仔血清、1 mM ピルビン酸ナトリウム、10 mM HEPES 緩衝液、100 µg / ml ストレプトマイシン、100 単位 / ml ペニシリン、0.25 µg / ml アンホテリシン B (GIBCO BRL、Life Science Technology、Gaithersburg、MD) および 71.5 mM メルカプトエタノール (Sigma、St. Louis、MO) を補充した RPMI 1640 であった。

40

【0180】

96 時間後、線維芽細胞および他の非島細胞が、コンカナバリン A でコーティングされた細胞の表面に接着し、そして島は浮遊したままであった（表面に接着しなかった）。この時点で、島を含む培地を取り出し、遠心分離で落とし、そして浄化された島をコンカナバリン A のコーティングを伴わない 12 ウエルプレートに再プレーティングした。次いで島を、20 ng / ml の塩基性線維芽細胞増殖因子 2 および 20 ng / ml の上皮増殖因子を補充された上記の RPMI 1640 培地中で培養した。

【0181】

50

島はこのプレートの表面に接着し、そして細胞は外へ向かい、島を離れて単層で成長した。単層を形成するこれらの細胞は、Massachusetts General Hospital の Dr. Mario Vallejo によって開発されたウサギ抗ラットネスチン抗血清での免疫染色によってネスチンポジティブであった。他のネスチン抗体（例えば、本明細書中上記で記載される R. 401 抗体または MAB 533 抗体）が使用され得る。ラット胚脊髄ネスチンに特異的なモノクローナル抗体（MAB 353、ATCC 番号 1023889）は、Journal of Neuroscience 1996; 16: 1901~100 に記載され、そしてまた、Chemicon International、Single Oak Dr.、Temecula、CA 92590 USA から入手可能である。¹⁰ 培養の 2 週間後、いくつか（3~5 個）のネスチンポジティブな单層細胞を、毛細管で突くことによって取り出し（シリンドークローニング）、そして 12 ウェルプレート（コンカナバリン A でコーティングされない）上に再プレーティングし、そしてさらに bFGF-2 および EGF を補充された RPMI 1640 培地中で培養した。この細胞は速い速度で増殖し、そして培養の 6 日後にコンフルエントな状態に達した。培養の 12 日後、この細胞の单層は波を形成し、これにおいて細胞は、共線様式で積み重なり始めた。培養の 15 日目に、細胞の波は凝縮し始め、小球体に移動し始め、そして 17 日目までにウェルの表面は、これらの小球体（直径約 100 μm）、空所および残存する单層細胞のいくつかの領域を含んだ。これらの单層細胞のいくつかを再び拾い上げ、そして再びクローニングし、そして上記で記載されるプロセスを、正確に同じ時間順序で再び行った。²⁰

【0182】

（実施例 2）

（島を形成するための臍臓幹細胞の分化）

ラット由来の臍島を、コンカナバリン A でコーティングされた 12 ウェルプレートを用いて、10% ウシ胎仔血清を含む RPMI 培地中で第一に培養した。この島を、ウシ胎仔血清によって供給される増殖因子以外に添加された増殖因子の非存在環境下において 3 日間培地中で維持した。この期間後、島が接着しなかった間、この島をコンカナバリン A を含まない新しいプレートに移した。次いで幹細胞を、bFGF-2 (20 ng/ml) および EGF (20 ng/ml) に 24 日間暴露することによって、单層として島から出て増殖するように刺激した。³⁰ 24 日間後、この单層はコンフルエントであった。それらの間で、細胞集団は島を囲んだ。この集団由来の細胞を取り出し、そして新しい 12 ウェルプレートにサブクローニングし、そして再び bFGF および EGF を含む培地中で培養した。このサブクローニングされた細胞は、クローン様式で单層に急速に増殖し、中心から周辺へと拡張した。この細胞は 6 日目でコンフルエントになり、次いで 12 日目に重なり合う細胞の波を形成し始めた。17 日目までに、細胞はほとんど完全に小球体構造、ならびに島様構造に類似する管状構造（偽島様集団）および導管様構造（偽導管）に移動した（図 4）。RT-PCR 分析は、偽島様集団が、NCAM（内分泌細胞に対するマーカー、図 5 を参照のこと）、サイトケラチン 19（導管細胞に対するマーカー、図 5 を参照のこと）および転写因子 brain-4（細胞のマーカー）を発現することを明らかにした。増殖因子での処理は、成熟島細胞への最終分化を達成するために必要とされる。⁴⁰

【0183】

（実施例 3）

（ヒト臍島またはラット臍島の単離および培養）

ヒト臍島を単離および培養した。ヒト島組織を、Cell Transplant Center、Diabetes Research Institute、University of Miami School of Medicine および Juvenile Diabetes Foundation Center for Islet Transplantation、Harvard Medical School、Boston、MA の島分配プログラムから得た。十分に洗浄した島を手でつかみ、10% ウシ胎仔血清、10 mM HEPES 緩衝液、1 mM ピルビン酸ナトリウム、10⁵⁰

0 U / m l ペニシリソ G 溶液、100 µg / m l ストレプトマイシン硫酸塩、0.25 ng / m l アンホテリシン B および 71.5 µM メルカプトエタノールを補充した改変 RPMI 1640 培地 (11.1 mM グルコース) 中で懸濁し、そしてコンカナバリン A (Con A) でコーティングされている Falcon 3043 12 ウェル組織培養プレートに添加した。この島調製物を、95% 空気および 5% CO₂ とともに 37° で 96 時間インキュベートした。これらの条件において、多くの島は懸濁液中に残存した（浮遊した）が、一方線維芽細胞および他の非島細胞は基底に接着した。96 時間のインキュベーション後、懸濁された島を含む培地を慎重に移し、この島を手動で取り出し、そしてここで各々 20 ng / mL 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) および上皮増殖因子 (EGF) をさらに補充された改変 RPMI 1640 培地中に再懸濁した。この島懸濁液（1 ウェル当たり 20 ~ 30 の島を含む）を、Con A でコーティングされない 12 ウェル組織培養プレートに添加した。この島は、プレートの表面に直ちに接着した。数日以内に、外へ向かい、島を離れて成長する細胞の単層を観察した。特定の場合において、ヒト由来の細胞を、2.5 mM グルコースおよびアクチビン - A (2 nM) 、肝細胞増殖因子 (100 pM) またはベータセルリン (500 pM) を含むいくつかの増殖因子の組み合わせを含む改変 RPMI 培地中で培養した。細胞を 10 mM ニコチンアミドでチャレンジした実験において、この培地は血清も増殖因子も含まなかった。

10

20

30

40

50

【0184】

（実施例 4）

（膵臓幹細胞の分化に対するグルコースおよび GLP-1 の効果）

血漿グルコース濃度の上昇は、膵臓島サイズの増大を導いた。従って培養培地におけるグルコース濃度の効果を、単離された島を用いて研究し、この島はネスチングポジティブな幹細胞を含んだ。ラット膵島を、高 (16.7 mM) グルコースを含む培地または正常 (5.6 mM) グルコースでの培地中で培養した。4 日後 RT-PCR を行って、ネスチング RNA のレベルを決定した。この結果は、正常グルコースで培養された島と比較して、高グルコースで培養された島においてネスチング RNA レベルを 3 倍刺激したことを見た（図 6）。

【0185】

同様に、マウスへのグルカゴン様ペプチド - 1 (GLP-1) の注入は、48 時間で島の大きさを 2 倍に増大したことを見出した。GLP-1 レセプターに対する崩壊された遺伝子を有するノックアウトマウスを、膵島におけるネスチング発現について試験した。ネキシン抗体を用いた免疫染色は、GLP-1 レセプターを有する正常マウスと比較して著しく減少することを見出した。

【0186】

（真性糖尿病の動物モデル）

症状の緩和をもたらす真性糖尿病型に対する処置を、糖尿病の症状を示す動物において試験した。動物は、ヒトにおける糖尿病の処置に有用な因子および手順についてのモデルとして役立つことが意図された。従って糖尿病についての潜在的な処置は、潜在的な処置を動物に投与し、そしてその効果を観察し、そして処置された動物を未処置のコントロールと比較することによって、動物モデルにおいて第一に試験され得た。

【0187】

非肥満性糖尿病 (NOD) マウスは、I 型糖尿病またはインスリン依存型真性糖尿病の重要なモデルであり、そしてヒト糖尿病に対して特に適切なモデルであった（本明細書中で参考として援用される Kikutano および Makino、1992、Adv. Immunol. 52 : 285、およびそこに引用される参考文献を参照のこと）。NOD マウスにおける I 型糖尿病の発達は、任意の外部刺激を伴わずに自発的かつ突然に生じた。NOD マウスが糖尿病を発達する間、このマウスは慢性自己免疫疾患によって引き起こされる 細胞の進行性破壊を受けた。NOD マウスにおけるインスリン依存型真性糖尿病の発達は、以下の 2 つの段階に大まかに分類され得た：自己免疫インスリン炎（膵島におけるリンパ球の炎症）の開始、ならびに島の破壊および明白な糖尿病の増進。糖尿病性 NO

Dマウスは、正常血糖または正常な血液グルコースレベルから一生を開始するが、およそ15～16週齢までにこのNODマウスは高血糖となりだし、これは膵細胞の大多数の破壊、および膵臓が十分なインスリンを産生できない対応する能力を示した。インスリン欠損および高血糖に加えて、糖尿病性NODマウスは、急速な体重減少を伴う重篤な糖尿、多渴症(polydypsia)および多尿を受けた。従って、疾患の原因および進行の両方が、インスリン依存型真性糖尿病に冒されたヒト患者に類似した。自発的な寛解は、NODマウスでは滅多に観察されず、そしてこれらの糖尿病性動物は、インスリン療法を受けない限りは糖尿病の発症後1～2ヶ月以内に死んだ。

【0188】

NODマウスが動物モデルとして使用されて、本発明に従った幹細胞調製物を投与することによって、糖尿病の種々の処置方法の有効性を試験した。それ自体では、幹細胞の投与を介した処置を、I型糖尿病に対する効果についてNODマウスにおいて試験した。

【0189】

幹細胞を、以下の投薬量に従って代表的には腹腔内にNODマウスに投与した。NODマウスに、1匹のマウス当たりおよそ $1 \times 10^1 \sim 1 \times 10^4$ 細胞を投与した。細胞の投与を、およそ4週齢のNODマウスにおいて開始し、そして8～10週間、例えば1週間に3回継続した。このマウスを、糖尿病についておよそ13週齢で開始してモニターし、このマウスは以下に記載される方法に従って1週当たり2回試験された。処置の効果を、処置NODマウスおよび未処置NODマウスの比較によって決定した。

【0190】

NODマウスにおける糖尿病に対する本発明の処置方法の有効性を、当業者に公知の手段によってNODマウスにおける糖尿病についてアッセイすることによって、例えば多渴症、多尿、糖尿、高血糖およびインスリン欠損または体重減少についてNODマウスを試験することによってモニターした。例えば、本明細書中で参考として援用されるBurkly、1999、米国特許第5,888,507号によって記載されるように、尿グルコース(糖尿)のレベルを、Testape(Eli Lilly、Indianapolis、IN)を用いてモニターし得、そして血漿グルコースレベルを、Glucometer 3 Blood Glucose Meter(Miles, Inc.、Elkhart、IN)を用いてモニターし得た。これらの方針によって尿グルコースレベルおよび血漿グルコースレベルをモニターすることによって、NODマウスを、2つの連続した尿陽性試験が、+1以上のTestape値または250mg/dLを超える血漿グルコースレベルを与えた後に糖尿病であるとみなした(Burkly、1999、上記)。NODマウスにおける糖尿病をアッセイする別の手段は、NODマウスにおける膵臓インスリンレベルを試験することであった。例えば、膵臓インスリンレベルはイムノアッセイによって試験され得、そして処置マウスおよびコントロールマウスとの間で比較され得た(Yoon、米国特許第5,470,873号、本明細書中で参考として援用される)。この場合において、インスリンをマウス膵臓から抽出し、そしてその濃度を、標準としてマウスインスリンを用いて、その免疫反応性によって(例えば放射線免疫検定法技術によって)決定した。

【0191】

一般に糖尿病についてNODマウスをモニターすることに加えて、処置の創意に富んだ方法の効果をまた、投与される幹細胞を異種遺伝子を用いて形質転換またはトランسفクトする場合、遺伝子特異的効果または遺伝子産物特異的効果についてモニターし、それによって、異種遺伝子の発現と糖尿病に対するその効果との間を相關させ得た。例えば、異種遺伝子産物の存在を、遺伝子産物およびインスリンについてNODマウスの膵細胞の免疫組織化学によって試験し得た。patched遺伝子およびsmoothened遺伝子の発現を、patchedレセプターおよびsmoothenedレセプターに対するRNA転写物の検出によって、NODマウスの島においてさらに試験した。逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)増幅を公知の手段によって行って、マウスのpatched cDNAのフラグメントまたはsmoothened cDNAのフラグメン

10

20

30

40

50

トを増幅し、そして標準的な手段に従ってアガロースゲル電気泳動によって分析した。増幅された cDNA フラグメントの同定を、patched 遺伝子または smoothened 遺伝子について放射能標識された内部オリゴヌクレオチドプローブとの増幅フラグメントのハイブリダイゼーションによって、あるいは当業者に公知のような他のこのような方法によって、patched RNA または smoothened RNA に一致するとして確認した。

【0192】

(実施例 5)

(ネスチンポジティブなヒトおよびラットの臍臓幹細胞の免疫細胞化学同定)

臍島を、ネスチン発現について分析した。島および幹細胞を、上記のように単離した。ネスチン発現を、16日胚(E16)のラット臍臓の発達中の島集団内部の細胞の異なる集団において(図8A)、そして成体臍臓(生後60日)の島において(図8B)、免疫細胞化学染色によって観察した。免疫細胞化学染色を、以下のように行った。

【0193】

16日胚および成体(60日)のラット臍臓ならびに細胞から調製された凍結切片(6μM)を、ホスフェートにおける4%パラホルムアルデヒドで固定した。細胞を、第一に3%正常ロバ血清で30分間室温でブロックし、そして一次抗血清とともに4で一晩インキュベートした。この抗血清を PBS ですすぎ、そしてそれぞれ Cy - 3 および Cy - 2 で標識された二次抗血清とともに室温で1時間インキュベートした。次いでスライドを PBS で洗浄し、そして蛍光封入剤(Kirkegaard and Perry Labs, Gaithersburg, MD)で覆った。組織切片を、一次抗血清とともに4で一晵インキュベートした。次いで一次抗血清を PBS ですすぎ、そしてロバ抗-Cy3(インドカルボシアニン(indocarbocyanine))および抗モルモット(インスリン)、抗マウス(グルカゴン)または抗ヒツジ(ソマトスタチン)血清 D TAF のいずれか(Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA)との室温で30分間のインキュベーション前に、スライドを3%正常ロバ血清とともに室温で10分間ブロックした。次いでスライドを PBS で洗浄し、そして蛍光封入剤(Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)で覆った。蛍光像を、IP Lab Spectrum 分析ソフトウェア(Signal Analytics Corp, Vienna, VA)をインストールされた PowerMac 7100 と接続された Opttronics TEC-470 CCD カメラ(Optronics Engineering, Goleta, CA)を備えた Zeiss Epifluorescence 顕微鏡を用いて獲得した。

【0194】

このネスチンポジティブな細胞は、細胞、細胞、細胞および PP 細胞とは異なった。なぜならこれらの細胞は、インスリンホルモンに対する抗血清(図8AおよびB)、グルカゴンホルモンに対する抗血清、ソマトスタチンホルモンに対する抗血清または臍臓ポリペプチドに対する抗血清と共に染色しないからである。このネスチンポジティブな細胞はまた、IV型コラーゲンに対する抗血清(脈管内皮細胞に対するマーカー)とも(図8C)ガラニンに対する抗血清(神経細胞に対するマーカー)またはサイトケラチン 19 に対するモノクローナル抗体(導管細胞に対する特異的マーカー)とも共染色しなかった(図8)。ネスチンポジティブな染色は、核共染色によって明確に観察される島内部の独特的細胞と関連した(図4D)。

【0195】

(実施例 6)

(RT-PCRによるネスチンポジティブなヒト幹細胞およびラット幹細胞の同定)

臍島におけるネスチン発現の免疫細胞化学同定を確認するために、本発明者らは、新たに単離されたラット島およびヒト島組織から調製された総 RNA を用いて、ネスチン mRNA の RT-PCR を行った。RT-PCR を、以下の方法に従って行った。

10

20

30

40

50

【0196】

ラット島またはヒト島から調製された細胞性RNA全体を逆転写し、そして以前に記載されるように、35サイクルのPCRによって増幅した(Danielら、1998、Endocrinology、139:3721~3729)。PCRについてのプライマーまたはアンプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチド、および引き続くサザンプロットハイブリダイゼーションについてのプローブとして使用されるオリゴヌクレオチドは以下であった：

ラットネスチン：フォワード、5' g c g g g g c g g t g c g t g a c t a c 3'；
リバース、5' a g g c a a g g g g g a a g a g a a g g a t g t 3'
'；

10

ハイブリダイゼーション、5' a a g c t g a a g c c g a a t t t c
c t t g g g a t a c c a g a g g a 3'。

【0197】

ラットケラチン19：フォワード、5' a c a g c c a g t a c t t c a a g a c c 3'

；

リバース、5' c t g t g t c a g c a c g c a c g t t a 3'；
ハイブリダイゼーション、5' t g g a t t c c a c a c c a g g
c a t t g a c c a t g c c a 3'。

【0198】

ラットNCAM：フォワード、5' c a g c g t t g g a g a g t c c a a a t 3'；

20

リバース、5' t t a a a c t c c t g t g g g g t t g g 3'；

ハイブリダイゼーション、5' a a a c c a g c a g c g g a t c t c
a g t g g t g t g g a a c g a t g a t 3'。

【0199】

ラットIDX-1：フォワード、5' a t c a c t g g a g c a g g g a a g t 3'

20

リバース、5' g c t a c t a c g t t t c t t a t c t 3'；

ハイブリダイゼーション、5' g c g t g g a a a a g c c a g t g
g g 3'；

ヒトネスチン：フォワード、5' a g a g g g g a a t t c c t g g a g 3'；

30

リバース、5' c t g a g g a c c a g g a c t c t c t a 3'；

ハイブリダイゼーション、5' t a t g a a c g g g c t g g a g c a g
t c t g a g g a a a g t 3'。

【0200】

ヒトケラチン：フォワード、5' c t t t t c g c g c g c c a g c a t t 3'；

リバース、5' g a t c t t c c t g t c c c t c g a g c 3'；

ハイブリダイゼーション、5' a a c c a t g a g g a g g a a a t c a
g t a c g c t g a g g 3'。

【0201】

ヒトグルカゴン：フォワード、5' a t c t g g a c t c c a g g c g t g c c 3'；

40

リバース、5' a g c a a t g a a t t c c t t g g c a g 3'；

ハイブリダイゼーション、5' c a c g a t g a a t t g a g a g a
c a t g c t g a a g g g 3'；

プライマーを2つの異なるエキソンから選択し、そして少なくとも1つのイントロン配列を包含した。さらに、RTマイナスコントロールを、大半のサンプルについて行った。

PCRサイクルは、94℃で1分間、その後の94℃で10秒間、58/56℃で10秒間、72℃で1分間を35サイクル、および72℃で2分間であった。このアニーリング温度は、ラットネスチンについては58℃であり、そして残存プライマー対については56℃であった。

【0202】

サザンハイブリダイゼーションについて、オリゴヌクレオチドプローブを、T4ポリヌ

50

クレオチドキナーゼおよび³²P ATPで放射能標識した。放射能標識されたプローブを、37℃で1時間ナイロン膜に転移されたPCR産物とハイブリダイズさせ、次いで1×SSCおよび0.5%SDSにおいて55℃で10~20分間、または0.5×SCCおよび0.5%SDSにおいて42℃でヒトPCR産物について洗浄した。

【0203】

このRT-PCRは、正確に予測されたサイズの産物を生成し(図8E、上部のパネル)、そしてサザンプロットティング(図8E、下部のパネル)およびこの産物のDNA配列決定によって確認された。これらのデータは、ネスチンを発現し、そして中枢神経系におけるネスチンポジティブな幹細胞と類似の島多能性幹細胞を表し得る臍島の新規の細胞型の同定を実証した。

【0204】

(実施例7)

(ATP依存性輸送体ABC G 2は、臍島由来のネスチンポジティブな細胞において発現される)

ヒト島由来NIPは、ABC G 2、MDR 1およびネスチンを共発現するSP細胞の実質的な部分集団を含んだ。ネスチンは、神経および筋肉の幹/前駆細胞のマーカーとして第一に示された(Lendahlら、1990、Cell 60:585:Zimmermannら; 1994、Neuron 12:11)。神経幹細胞は、ニューロンおよびグリア細胞の異なる型を生じさせる高程度の可塑性を特に示した。神経幹/前駆細胞はまた、造血細胞に分化し、これは神経幹/前駆細胞をまさに多能性幹細胞にする(Shihら、2001、Blood 98:2412)。これまでの多能性の成熟幹細胞の最良の例は、骨髄由来の幹細胞、いわゆるSP細胞であった(Goodellら、1996、J. Exp. Med. 183:1797)。SP細胞は、蛍光生体染料であるヘキスト33342を有効に排除し、そして骨髄再占有(repopulating)細胞の大多数を含むその特性によって同定されていた。SP細胞は、成体ヒトおよびマウスの骨髄全体の0.05%を表し、そしてあらゆる造血系統を生じさせることは別として、このSP細胞はまた、骨格筋および心筋、ならびに内皮細胞を生じさせ得た(Gussoniら、1999、Nature 401:390; Jacksonら、2001、J. Clin. Invest. 107:1395)。ATP結合力セット輸送体ABC G 2(BCRP 1)は、SP表現型の主要な構成要素であることが実証されており、従って明確にSP細胞を同定する分子手段を提供した(Kimら、2002、Clin. Cancer Res. 8:22; Scharenbergら、Blood 99:507; Zhouら、2001、Nat. Med. 7:1028)。特に、骨髄由来のSP細胞は、たとえあったとしてもインビトロでの増殖能は限定されるが(Buntingら、2000、Blood 96:902; Stormsら、2000、Blood 96:2125)、骨髄細胞におけるP糖タンパク質ポンプ(MDR-1)機能の増強は、インビトロでのSP幹細胞の拡張およびインビボでの細胞の再占有をもたらした(Buntingら、2002、Stem Cells 20:11)。

【0205】

NIP(そのネスチンの発現によって神経幹細胞に関連される)はまた、ヘキスト33342排除アッセイによって同定されるNIPの実質的な部分集団におけるそのABC G 2の発現によって、骨髄SP幹細胞の特性を示した。このNIPのSPはまた、MDR-1を発現し、これはインビトロでのその持続拡張に寄与した。従ってNIPは、糖尿病被験体への移植のための島組織の產生に有用な成体多能性幹/前駆細胞の可能性のある供給源であり得た。

【0206】

ヒト臍島を、Cell Transplant Center、Diabetes Research Institute、University of Miami School of Medicine(Miami、FL)およびJuvenile Diabetes Research Foundation Center for Is-

10

20

30

40

50

Let Transplantation、Harvard Medical School (Boston、MA) の島分配プログラムから得た。NIPを、以前に記載されるように単離した (Zulewskiら、2001、Diabetes 50:521)。手短に言えば、ヒト臍島を手でつかみ、10% ウシ胎仔血清、10ミリモル/1 HEPES 緩衝液、1ミリモル/1 ピルビン酸ナトリウム、71.5マイクロモル/1 メルカプトエタノールおよびantibiotic-antimycotic (Gibco Life Technologies、Gaithersburg、MD) を補充した改变 RPMI 1640 培地において、コンカナバリンA (ConA) でコーティングされた培養皿において、37、5% CO₂ でインキュベートした。96時間後、浮遊している島を、ConAコーティングを伴わない新しいプラスチック培養皿中の20ng/ml 塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) および20ng/ml 上皮増殖因子 (EGF) (両方ともSigma、St. Louis、MOから) をさらに補充された新鮮な培地に移した。この島は、コーティングされないプラスチック表面に接着し、そして数日以内に、外へ向かい、島を離れて成長する細胞の単層を観察した。単層の周辺由来の細胞、つまりネスチンポジティブな島由来の前駆細胞 (NIP) を、新しい培養皿に移し、そして上記と同じ条件下でコンフルエントな状態近くまで成長させた。細胞を、さらに2つの培養皿に分配して、ベラパミル (H33342染料輸送のインヒビター)とともに、およびベラパミルを伴わずにヘキスト33342染料排除アッセイを行った (Goodellら、1996、上記)。

【0207】

RT-PCRは、ABC G2の発現を実証した (図19A)。RT-PCRで生成されたDNA産物を配列決定し、そしてヒトABC G2の配列 (GenBank登録番号XM-032424、図18)と一致する (586bp)ことを示した (データは示さず)。クローニングされたABC G2プローブとのサザンプロットハイブリダイゼーションは、正確なcDNAの増幅を確認した (図19A)。

【0208】

RNAを、Trizol (Gibco) を用いて製造業者のプロトコルに従って、培養されたNIP、ならびにソートされたSP細胞および非SPコントロール (それぞれ5000細胞および10,000細胞) から単離した。一本鎖cDNAを、Superscript First-Strand System (Invitrogen、Carlsbad、CA) を用いて作製した。このcDNAを、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅した。逆転写酵素を含まないコントロール (-RTコントロール) を、すべてのPCR反応について行った。PCR産物を、アガロースゲル電気泳動によって分析し、そして産物の正確な同一性を、配列決定によって確認した。鑄型濃度を、GAPDHについて均一化した (31サイクル)。ABC G2、MDR1およびネスチンを、それぞれ34サイクル、38サイクルおよび36サイクルで増幅した。プライマーは以下であった: GAPDHについては、5' t g a a g g t c g g a g t c a a c g g a t t t g g t 3' および5' c a t g t g g g c c a t g a g g t c c a c c a c 3'、ネスチンについては、5' a g a g g g g a a t t c c t g g a g 3' および5' c t g a g g a c c a g g a c t c t c a 3'、MDR1については、5' t c c t g g a g c g g t t c t a c g a c 3' および5' g g g c t t c t t g g a c a a c c t t t t c a 3'、そしてABC G2については、5' g c t g g g g t t c t c t c t c c t g a c g 3' および5' c t a c c c c a g c c a g t g t c a a c 3'。ABC G2についてのPCR産物を、ナイロン膜 (Hybond N+; Amersham Pharmacia; Little Chalfont; GB) に転移した。プロットを、Rapid Hybrid Buffer (Amersham) を用いて製造業者のプロトコルに従って、放射能標識されてクローニングされたABC G2プローブまたはMDR1プローブとともにハイブリダイズした。ヒトABC G2の完全なオープンリーディングフレームに対するプライマーは、5' t a t t a a g c t g a a a a g a t a a a a a c t c t c c 3' および5' a t g t g a g g a t a a a t c a t a c t g a a t 3' (Genbank配列XM_0

Buffer (Amersham) を用いて製造業者のプロトコルに従って、放射能標識されてクローニングされたABC G2プローブまたはMDR1プローブとともにハイブリダイズした。ヒトABC G2の完全なオープンリーディングフレームに対するプライマーは、5' t a t t a a g c t g a a a a g a t a a a a a c t c t c c 3' および5' a t g t g a g g a t a a a t c a t a c t g a a t 3' (Genbank配列XM_0

32424の塩基対174～202および2184～2207)であった。

【0209】

(実施例8)

(1.5～2%の培養細胞は、ヘキスト33342染料排除アッセイにおいてSP表現型を有する)

NIP(そのネスチンの発現によって神経幹細胞に関連される)はまた、ヘキスト33342排除アッセイによって同定されるNIPの実質的な部分集団におけるそのABC G2の発現によって、骨髄SP幹細胞の特性を示した。このNIPのSPはまた、MDR-1を発現し、これはインビトロでのその持続拡張に寄与した。

【0210】

ABC G2の発現が、培養されたNIPのいくつかにSP表現型を与えるか否かを調べるために、ヘキスト33342染料排除アッセイを、公表されたプロトコル(Goodaleら、1996、上記)をわずかに改変したプロトコルに従って行った。ヘキスト33342染料の排除(これは、造血幹細胞の多能性SPを規定する)は、ATP結合カセット輸送体、ABC G2によって媒介された。ベラパミルを、H33342輸送の特異的インヒビターとして使用した(Goodaleら、1996、上記)。

【0211】

ヘキスト染料排除アッセイを、Goodaleら、1996、上記のプロトコルに従つて行い、細胞を培養皿に接着させたまま染色を行うという改変を施した。プロトコルにおいてこの変化を伴う細胞生存能力は、細胞を懸濁液中のまま染色する本来のプロトコルと比較してかなり高かった。ヘキスト33342(Sigma)を、5 μg/mlの最終濃度で増殖培地に添加し、そして細胞を、37℃で90分間インキュベートした。示された場合、ベラパミル(Sigma)を、50マイクロモル/1の最終濃度でアッセイの開始15分前に添加した。分析について、細胞をトリプシン処理し、40 μmの細胞ストレーナーに注ぎ、そして死細胞の識別について、2 μg/mlの最終濃度でヨウ化プロピジウム(Sigma)を含む氷冷ハンクス液に再懸濁した。フローサイトメトリーを、ヘキスト33342およびヨウ化プロピジウムの励起に対するUVレーザーを用いて、a Vantage and a MoFloセルソーターで行った。450/20BP(青)フィルターおよび630/20(赤)フィルターを、線形モードでの分析について使用した。

【0212】

蛍光活性化セルソーティング(FACS)は、明確に認識できるSPを示し(図19B; 2.1% ゲート細胞)、これはインヒビター、ベラパミルの存在環境下において存在しなかった(図19C; 0.1% ゲート細胞)。独立して由来する2つの他のNIP培養物の分析において、SPポジティブ細胞のパーセンテージは、それぞれ1.5%および2%であった(データは示さず)。本発明者らはまた、NIP由来のABC G2の完全なオープンリーディングフレームを増幅した。発現ベクターにおけるクローニングおよびINS-1インシリノーマ細胞へのトランスフェクションは、トランスフェクトされた細胞において有効なヘキスト33342排除をもたらした(データは示さず)。

【0213】

(実施例9)

(SP表現型は、ABC G2、MDR1およびネスチンの発現に相関する)

SP細胞および非SPコントロール細胞を、FACSによって培養NIPから単離した(図20A; それぞれゲートR1およびR2)。ABC G2の発現は、RT-PCR(図20B)およびクローニングされたABC G2プローブとのサザンプロットハイブリダイゼーションによって示されるようにSP表現型と良好に相関した。RT-PCRおよびサザンプロットハイブリダイゼーションは、培養NIPのSP画分においてMDR-1((P糖タンパク質)、造血幹細胞に存在する別のATP結合カセット輸送体(Chaudharyら、1991、Cell 66:85)の発現を実証した(図20B)。このSP画分はまた、非SPコントロールよりも著しく高いレベルでネスチンを発現した(図20

10

20

30

40

50

B)。

【0214】

ヒト臍島由来のネスチンポジティブな細胞は、1.5~2%のSP細胞を含み、これは、非SPコントロール細胞と比べて高いレベルでABC G 2およびネスチンを発現した。SP表現型とのABC G 2発現の相関は、ABC G 2活性がSP染料流出の主要な要素であるという発見を確認した(Kimら、上記；Scharenberglら、上記；Zhouら、上記)。ネスチンおよびABC G 2の共発現は、幹/前駆細胞の一般的マーカーとしてのネスチンに対する幅広い役割を示した。

【0215】

異なる哺乳動物種(ヒトを含む)における骨髄のSP細胞画分は、多能性造血幹細胞(HSC)の大多数を含んだ(Goodellら、1997、上記)。骨髄由来のSP細胞の分化は、血液系統に限定されなかった。動物モデルにおいて、SP細胞はまた、骨格筋および心筋ならびに内皮細胞に分化した(Gussoniら、Nature 401:390；Jacksonら、2001、J Clin Invest 107:1395)。さらに骨髄由来の幹細胞は、機能的な脳細胞および肝細胞に分化した(Brazeletonら、2000、Science 290:1775；Lagasseら、2000、Nat Med 6:1229)。

【0216】

NIP培養物におけるSP細胞部分(1.5~2%)は、骨髄において見出される部分(0.05%)よりも少なくとも20倍高かった(Goodellら、1996、上記)。しかし比較可能なパーセンテージのSP細胞は、筋肉の衛星細胞の培養物において見出され、この衛星細胞は、筋形成前駆体と考えられた(Jacksonら、1999、Proc Natl Acad Sci 96:14482)。分化した筋繊維の生成に加えて、筋肉のSP細胞は、致命的に放射線を照射されたマウスの骨髄を再構成することが示されており、従って思いもよらない程度の可塑性を示した(Gussoniら、1999、上記)。これらのSP細胞はまた、筋肉に残留する前に骨髄から生じるといいういくつかの証拠が存在した(Kawadaら、2001、Blood 98:2008)。SP集団はまた、マウスの胚幹細胞において実証されている(Zhouら、2001、上記)。ABC G 2神経幹細胞での発現は、より分化した神経細胞での発現よりも著しく高いことが示されている(Geswindら、2001、Neuron 29:325)。

【0217】

MDR1(P糖タンパク質、ABC B 1)は、造血幹細胞において(いくつかの他の細胞型の間で)発現される別のATP結合カセット輸送体であった(Zhouら、2001、上記；Chaudharyら、1991、上記)。骨髄細胞におけるMDR1の過剰発現は、SP集団の拡張、培養物におけるその生存の延長、およびマウスへの移植後の再占有活性の増強を導いた(Buntingら、2000、上記)。移植動物のいくつかにおいて、これは最後に、慢性骨髄性白血病に類似した骨髄増殖性症候群をもたらした(Buntingら、1998、Blood 92:2269)。従ってMDR-1発現は、造血幹細胞の拡張に関係し、そしてABC G 2のみ発現する静止細胞と対照して増殖性の幹細胞の特性として示唆された(Buntingら、2002、上記)。MDR1は、NIP由来の臍島のSP画分において発現された。

【0218】

(実施例10)

(GLP-1Rポジティブなヒト臍臓幹細胞の免疫細胞化学同定)

ネスチンポジティブな臍島幹細胞を、GLP-1R発現について分析した。ヒト島組織を、Juvenile Diabetes Research Center for Islet Transplantation、Harvard Medical Schoolから得た。NIPを以前に記載されるように単離した(Zulewskiら、2001、Diabetes 50:521)。手短に言えば、島を洗浄し、そして血清、11.1 mM グルコース、抗生素質、ピルビン酸ナトリウム、メルカプトエタノール

10

20

30

40

50

および増殖因子を含む RPMI 1640 培地で培養した。数日以内に、ネスチンポジティブな細胞（上記のように免疫細胞化学的に同定された）は、島を離れて成長した。後にこれらの細胞をクローニングし、そして 20 ng / ml の塩基性線維芽細胞増殖因子および上皮増殖因子、または 1000 単位の組換えヒト白血病阻害因子を含む培地中で拡張した。血清の非存在環境下において GLP-1 とのインキュベーションを行い、そして新しいペプチドを、培地を変えずに 48 時間毎に添加した。

【0219】

GLP-1R の免疫細胞化学検出を、以下の通りにウサギポリクローナル抗血清（Hellerら、上記）を用いて行った。Lab-Tek チャンバースライド（Nunc、Naperville、IL）または方眼のついたカバーグラス（Bellco Glass、NJ）上で培養された細胞を、室温で 10 分間 PBS における 4% パラホルムアルデヒドで固定した。PBS での数回のすすぎ後、細胞を正常ロバ血清で 30 分間ブロックし、そして一次抗血清または免疫前血清とともに 4°でインキュベートした。翌日、細胞を PBS ですすぎ、そして Cy-3 または Cy-2 標識された二次抗血清（ロバ抗ウサギ抗血清およびロバ抗モルモット抗血清）とともに室温で 1 時間インキュベートした。数回の洗浄後、細胞を含むカバーグラスを、核を染色する DAPI (Vector Laboratories、Burlingame、CA) を含む封入剤を含むスライド上にマウントした。蛍光像を、PowerMac 7100 と接続された Opttronics TEC-470 CCD カメラ (Opttronics Engineering、Goleta、CA) を備えた Zeiss epifluorescence 顕微鏡を用いて獲得した。IP lab Spectrum ソフトウェア (Signal Analytics、Vienna、VA) を使用して、像を獲得および分析した。

【0220】

GLP-1R 免疫反応性を、試験された NIP のうちの大多数（少なくとも 60%）において検出した（図 22A）。

【0221】

（実施例 11）

（RT-PCR による GLP-R1 ポジティブなヒト幹細胞の同定）

臍島（NIP）における GLP-1R 発現の免疫細胞化学同定を確認するために、RT-PCR を、NIP から調製した総 RNA を用いて行った。RT-PCR を、上記の実施例 6 のように行い、ネスチン mRNA の同定についての差異は、以下の GLP-1R 特異的プライマーを使用したことであった：5' g t g t g g c g g c c a a t t a c a c 3' (フォワード)；5' c t t g g c a a g t c t g c a t t t g a 3' (リバース)。NIP mRNA の増幅は、予測された 346 bp の産物を產生し（図 22B）、GLP-1R タンパク質の発現に加えて、NIP は GLP-1R を产生する生合成能を有することを示した。従ってネスチンに加えて GLP-1R は、本発明において臍臓幹細胞に対するマーカーとして有用であった。

【0222】

（実施例 12）

（ネスチンポジティブな幹細胞のインビトロ増殖）

ネスチンポジティブな幹細胞がインビトロで増殖する能力を決定した。

【0223】

60 日齢ラットまたは正常な成体ヒトから調製した島を、第一にコンカナバリン A でコーティングされた皿上にプレーティングし、そして 10% ウシ胎仔血清を含む変形 RPMI 1640 培地中で 4 日間培養して、Con A でコーティングされたプレートに接着した線維芽細胞および他の非島細胞を島調製物から除去した。これらの培養条件下でプレートに接着しなかった島を収集し、そしてここでさらに bFGF および EGF (それぞれ 20 ng / mL) を補充した同じ変形 RPMI 1640 培地を含む 12 ウェルプレート (Con A コーティングを伴わない) に移した。増殖因子 bFGF および EGF を共に選択した。なぜならこれらの増殖因子は、脳の上衣に由来する神経幹細胞の増殖を刺激する

10

20

30

40

50

ことが公知だからである（ReynoldsおよびWeiss、1996、Dev. Biol. 175: 1~13）。この島はプレートに接着し、そして細胞は、単層として徐々に島を離れて成長した（ヒト細胞において推定細胞倍加時間は40~45時間）。生長中の単層の細胞は、表現型が相同であり（図9A、パネル1）、そしてネスチンを発現した（図9A、パネル2）。ラット細胞を単層から選び（少なくとも20~30細胞群）、12ウェルプレートにサブクローニングし、そしてbFGFおよびEGFを含む変形RPMI 1640培地（11.1 mM グルコース）とともにインキュベートした。このサブクローニングされた細胞は急速に成長し、そして6日でコンフルエントとなり、推定細胞倍加時間は12~15時間であり（図9A、パネル3）、そして12日までに波様構造を形成した。培養の15~17日後、細胞は島様集団（ILC）を形成した（図9A、パネル4）。類似の細胞をヒト島からクローニングした（図9B）。コンフルエントな状態に達した際（図9B、パネル1）、このヒト細胞が移動して、皿中で大きな空胞構造を形成した（図9B、パネル2および3）。次いで大きな空間の輪郭を描く細胞は形態を変え、円形になり、そして互いに集合して3次元のILCを形成した（図9B、パネル4~6）。

10

20

30

40

【0224】

これらのILCを形成したこれらのネスチンポジティブな島前駆細胞（NIP）の分化の指標は、RT-PCRおよびサザンプロットによって特徴付けられ、そしてこれらの細胞が内分泌マーカーであるNCAM（神経細胞接着分子）（Cirulliら、1994、J. Cell Sci. 107: 1429~36）（図9C、右パネル）および導管細胞マーカーであるCK19（サイトケラチン19）（Bouwensら、1998、J. Pathol. 184: 234~9；Bouwensら、1995、J. Histochem. Cytochem. 43: 245~53；Bouwensら、1994、Diabetes 43: 1279~93）（図9C、左パネル）を発見することを見出した。研究のこの段階で、NIPがコンフルエントになり、そして島様細胞集団に集合したときに、NIPは臍臓遺伝子（NCAMおよびCK19）を発現し始めたが、内分泌細胞への分化に不可欠な増殖因子の欠如のために島遺伝子の発現は限定されたことを結論付けた。前駆細胞集団の分化が、第一に増殖期、次いで分化特異的なモルフォゲン増殖因子の存在環境下での増殖の静止を代表的には必要とすることがまた認識された。従って培養条件を、場合によっては11.1 mM グルコース、bFGFおよびEGFを含む培地を置換することによって（これは細胞の増殖を誘導する）、低グルコース（2.5 mM）を含む培地で置換することによって（これは増殖を抑える）、そして因子HGF/Sscatter FactorまたはベータセルリンおよびアクチビンAを含む培地で置換することによって改変した。グルコースは、臍島 細胞に対する公知の増殖因子であり（Swenne、1992、Diabetologia 35: 193~201；Bonner-Weir、1989、Diabetes 38: 49~53）、そしてHGF/Sscatter FactorおよびアクチビンAの両方は、臍臓導管細胞株AR42Jをインスリン、グルカゴンおよび他の臍臓内分泌細胞タンパク質を産生する内分泌表現型に分化させることが示されている（Mashimaら、1996、Endocrinology 137: 3969~76；Mashimaら、1996、J. Clin. Invest. 97: 1647~54）。

30

40

50

【0225】

ILCを含む培養物は、免疫細胞化学（図10A、上部パネル）、RT-PCRおよびサザンプロット（図10B）、ならびにウェスタン免疫プロット（図10C）によって、臍臓特異的なホメオドメインタンパク質、ID-X-1を発現した。ILCはまた、RT-PCR（図10D）によって観察されるようにプログルカゴンをコードするmRNAを発現し、そして免疫反応性のグルカゴン、グルカゴン様ペプチド-1およびインスリンを產生した。いくつかのウェルにおける島様集団の培養の72~96時間後に得られた培地の放射線免疫検定法は、40~80 pg/ml GLP-1、30~70 pg/ml グルカゴン、29~44 pg/ml インスリンの値を与えた。放射線免疫検定法を、以下の

通りに行った。

【0226】

培養培地におけるインスリンおよびグルカゴンの濃度を、それぞれ L i n c o R e s e a r c h I n c . および D P C I n c . から購入した超高感度放射線免疫検定法キットによって決定した。それぞれのキットにおいて供給される抗血清は、モルモット抗ヒトインスリンおよびウサギ抗ヒトグルカゴンであった。G L P - 1 分泌を、スカシ貝(k e y h o l e l i m p e t)へモシアニンに結合体化された合成ペプチド、C F I A W L V K G R アミドとのウサギの免疫によって惹起された抗ヒト G L P - 1 (7 ~ 3 6) アミドウサギポリクローナル抗血清を用いて測定した。この抗血清は、G L P - 1 (7 ~ 3 6) アミドの検出に極めて特異的であり、そしてプログルカゴンを弱くしか検出しなかった。これらのアッセイについての感受性レベルは、それぞれ 6 p g / m L 、 1 3 p g / m L および 1 0 . 2 p g / m L であった。
10

【0227】

R a m i y a ら (R a m i y a ら、 2 0 0 0 、 N a t . M e d . 、 6 : 2 7 8 ~ 2 8 2) によって記載されるように、 1 0 m M ニコチンアミドにおける 7 日間の I L C のインキュベーションは、インスリン分泌を 2 ~ 3 倍増大した。

【0228】

いくつかのさらなる臍臓マーカーは、図 1 5 に示されるように、分化した N I P (例えばグルコース輸送体 2 (W a n g ら、 1 9 9 8) 、シナプトフィジンおよび H G F (M e n k e ら、 1 9 9 9)) において発現した。分化している N I P が臍臓外分泌組織の性質を有し得るか否かを決定するために、本発明者らは R T - P C R を使用し、そしてアミラーゼおよびプロカルボキシペプチダーゼの発現を検出した (図 1 5) 。
20

【0229】

幹細胞を含む N I P のいくつかの培養物はまた、 R T - P C R によって観察されるように、プログルカゴンをコードする m R N A およびインスリンをコードする m R N A を発現した (図 1 6 A および B) 。

【0230】

I D X - 1 の発現は特に重要であった。なぜならこれは、臍臓発生の主要な調節因子であることが認識され、そして特に、インスリンを産生する臍島 細胞の成熟および機能に必要とされることが認識されるからである (S t o f f e r s ら、 1 9 9 7 、 T r e n d s E n d o c r i n o l . M e t a b . 、 8 : 1 4 5 ~ 1 5 1) 。
30

【0231】

新しい島の新生がまた、特に新生児期 (ラットおよびマウス) の間に (しかしある程度成体期を通じて) 臍管における細胞の分化によって生じることが公知であるので (B o n n e r - w e i r ら、 1 9 9 3 、 D i a b e t e s 、 4 2 : 1 7 1 5 ~ 1 7 2 0 ; R o s e n b e r g 、 1 9 9 5 、 C e l l T r a n s p l a n t 、 4 : 3 7 1 ~ 3 8 3 ; B o u w e n s ら、 1 9 9 6 、 V i r c h o w s A r c h 、 4 2 7 : 5 5 3 ~ 5 6 0) 、ネスチングを、成体ラットの臍管において分析した。ネスチングおよびサイトケラチン 1 9 に対する抗血清を用いた二重蛍光免疫細胞化学によって、導管上皮のマーカーであるネスチングは、大きな導管および小さな導管の両方の局所領域において、ならびに外分泌腺房組織内のいくつかの中央小葉導管において強力に発現した (図 1 1 A および 1 1 B) 。珍しいことに、導管におけるネスチング発現の局所領域は、抗 C K 1 9 抗血清での染色をほとんど欠いた。さらに、導管におけるネスチング発現の局所領域は、抗 C K 1 9 抗血清での染色をほとんど欠いた。上皮細胞は、立方体様の丸い細胞の相同集団からなるが、一方ネスチングポジティブな細胞は、有核で蛇行状であり、そして上皮細胞の間または周囲の空間に存在するようであった (図 1 1 C) 。
40

【0232】

従って C K 1 9 は、ネスチングを発現する導管細胞の大多数において発現されず、臍管内に位置するこれらのネスチングを発現する細胞は、導管上皮細胞とは異なる細胞のパッセンジャー集団であり、そして導管表現型または内分泌表現型にまだ分化していない幹細胞で
50

あることを示唆した。成体ラット膵臓の膵管および膵島内のネスチンを発現する細胞の局所集団の発見は、ラット膵管は島細胞の前駆体である細胞を含むが（新生）、これらの前駆体はそれ自体は導管上皮細胞の部分集団ではないという考え方さらに支持した。

【0233】

（実施例13）

（真性糖尿病を有するヒト被験体においてIDX-1を発現するように操作された膵臓幹細胞の移植）

ブタまたはヒトのドナー膵臓、あるいは起こり得るヒト移植レシピエントの膵臓生検から単離された島を、幹細胞の生長を刺激する条件においてエキソビオで培養した。次いで幹細胞を島から単離し（クローニング）、bFGF-2、EGFおよび11.1mMグルコースを含む増殖培地においてインビトロで拡張し、転写因子IDX-1をコードするDNAを含む発現ベクターを用いてトランスフェクト／注入し、そして糖尿病レシピエントに移植した。あるいはIDX-1をトランスフェクトされた幹細胞を、操作された幹細胞の細胞への分化のプロセスを開始するために、移植前にGLP-1あるいは他の分化モルフォゲンまたは増殖因子で1～3日間処理した。一実施態様において、幹細胞を、レシピエントに投与する前に拡張も分化もしないか、あるいはレシピエントに投与する前に拡張または分化のみ行った。一実施態様において、GLP-1を、幹細胞の分化を刺激しそして首尾良い移植を促すために、移植の間および移植後数日間レシピエントに投与した。この方法に従って、異種移植（ブタ島）または同種移植（レシピエントではないヒトドナー由来のヒト島）、ならびに同系移植（レシピエント由来の島）を行った。宿主レシピエントへ移植された場合、幹細胞遺伝的レパートリーが、宿主が幹細胞を自己として認識する（異種移植または同種移植の場合において）ように再プログラムされて、その結果自己免疫（1型糖尿病）による免疫不寛容ならびに移植片拒絶および移植片破壊が生じないと仮定された。

【0234】

（実施例14）

（真性糖尿病を有するヒト被験体におけるIDX-1の発現を刺激するように培養された膵臓幹細胞の移植）

上記のように単離された島を、島内部に存在する幹細胞の拡張（増殖）を第一に刺激し、次いで転写因子IDX-1の発現を刺激する条件において、数日間エキソビオで培養した。幹細胞の増殖を、bFGF-2、EGFおよび11.1mMグルコースを含む培地において島を培養することによって達成した。IDX-1発現の誘導を、GLP-1および2mMグルコースの存在環境下でのインキュベーションによって達成した。記載される処理によってそのようにあらかじめ処理された島を、宿主レシピエントに移植した。さらに宿主レシピエントに、幹細胞をさらに拡張しそしてインスリン産生性細胞に分化させて移植の成功を増強するために、移植の間および移植後数日間GLP-1を投与し得た。

【0235】

この方法に従って、異種移植（ブタ島）、同種移植（レシピエントではないヒトドナー由来のヒト島）、ならびに同系移植（レシピエント由来の島）をもたらした。

【0236】

（実施例15）

（腎臓への膵臓幹細胞の異種移植）

ヒトのネスチンポジティブな島前駆細胞（NIP）を記載されるように単離し、そして免疫抑制されていない8匹のC57BL/6マウスの腎被膜下に移植した。移植されたヒト細胞は、マウスレシピエントによって拒絶されなかった。現在の理解は、異種移植片（例えばヒト組織）は、5～10日以内にマウスによって拒絶されるということであった。現在の理解と反対に、本発明者らは、今まで試験された8匹の非免疫抑制マウスのうちの8匹において、すべての移植片が首尾良く移植され、そしておよそ $10^5 \sim 10^6$ 細胞の移植後1ヶ月（30～38日）までに腎臓の極を巻き込む大集団の組織に増殖した。

【0237】

10

20

30

40

50

1匹のC57B16マウスを屠殺し、そして移植部位に広い領域の新しい成長を有することを決定した。新しい組織を有する腎臓の切片を、2つの断片に分割した。一方の断片を、凍結切片組織学について凍結し、そして他方の断片を、パラフィン切片組織学についてパラホルムアルデヒド中に固定した。凍結切片を調製し、そしてヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)、ならびに種々の島細胞抗原に対する抗血清で染色した。

【0238】

H&E染色された腎臓切片の試験は、肝臓成分、神経成分、導管成分、脂肪(adipocytic)成分および造血成分を含む混合された間葉組織および上皮組織からなる多形態性の形態を示す腎臓の一部ではない新しい成長の存在を実証した。腎臓切片の顕微鏡写真は、新しい成長が、腎実質および糸球体に浸潤しているように見えたことが実証された。ヒト特異的(マウスではない)抗血清での特異的免疫染色は、ヒト特異的ケラチン、ビメンチンおよびヒト造血リンパ球に特異的なCD45白血球抗原について染色する免疫ポジティブな細胞の索を明らかにした。第二のC57B16マウスの腎臓はまた、NIP移植の部位で類似の様相の新しい成長を有した。

【0239】

C57B16マウス(屠殺されるべき第一のマウス)のNIP移植された腎臓のパラフィン切片を試験した。試験された組織塊は、腎臓の先端由来であり、そして外来組織が腎実質への「浸潤」の徴候を伴わずに腎被膜下に良好に含まれたことを示した。特に多形態性様相の移植片組織の間が、腎実質に類似した領域であった。理論に束縛されない1つの仮説は、移植片は分化しようとする幹細胞からなるということと、そしてこの幹細胞は「浸潤」しておらず、しかし単に移動し、増殖し、そしてニッシェを探している(すなわち間葉指令)ということであった。これらは、腎臓から合図を受け取り得、そして腎臓に分化しようとした。この移植片細胞は、悪性ではないようであるが、その機能を果たそうとするただの幹細胞であり得た。

【0240】

(実施例16)

(脾臓幹細胞の脾臓への異種移植)

ヒトのネスチングポジティブな島前駆細胞(NIP)を、記載されるように単離し、そして免疫抑制されないマウスの脾臓、および(a)ストレプトゾトシン(ストレプトゾトシン誘導性糖尿病を产生するため)処理によって傷つけられたマウスの脾臓または(b)炎症を伴う進行中の島が存在するNODマウスの脾臓へ移植した。

【0241】

移植された動物の脾臓を、NIPがその適切なニッシェを見出すか否か、島領域から指令を受け取るか否か、そして島細胞(細胞)に分化するか否かを決定するために試験した。

【0242】

(実施例17)

(脾臓幹細胞の異種移植による糖尿病の処置)

ヒト島を記載されるように単離し、そしてインビトロで数日間培養して、幹細胞集団を拡張した。ヒトNIPを、門脈を介して肝臓に移植した(肝臓への移植について当該分野で周知の従来手順に従って)。

【0243】

あるいはヒトNIPの集団(記載されるように単離された)を、血流に導入した。特定の実施態様において、ヒトNIPを、脾動脈を介して導入して、これらを糖尿病性脾臓へ導いた。

【0244】

コントロール動物(移植を受けない動物)の集団および移植された動物の集団を、糖尿病の症状(例えば血液グルコースレベル、インスリンレベル、脾細胞数)の改善について分析した。

【0245】

10

20

30

40

50

(実施例 18)

(肝臓におけるネスチンポジティブな幹細胞の同定)

ラット肝臓を単離し、そして凍結切片を、当該分野で公知の方法および本明細書中に記載される方法に従って調製した。

【0246】

ラット肝臓の凍結切片(6 μM)を、ウサギポリクローナル抗ネスチン血清で免疫染色した。この免疫蛍光シグナルを、フルオロフォア、Cy3(黄色～橙色)でタグ化された抗ロバ IgG 血清の反応によって見えるようにした。可能な大きい胆管を囲むネスチンポジティブな細胞を、図13Aに示した。いくつかの小さな胆管を囲むネスチンポジティブな細胞の集団を、図13Bに示した。

10

【0247】

(実施例 19)

(NIP の肝臓表現型への分化)

肝臓幹細胞(卵円形細胞(oval cells))、肝臓星状細胞および脾臓の前駆細胞との間の明白な共通の性質の報告、ならびにいくらかの損傷後に再生中の脾臓が肝臓化生を受けるという観察の報告のために(Slack, 1995; Reddyら、1991; Bisgaardら、1991; Raoら、1996)、本発明者らはRT-PCRを行って、幹細胞における肝臓発現性遺伝子を検出した。PCR産物を、XBP-1(肝細胞発生に必要とされる転写因子(Reimoldら、2000))、およびトランスクレチン(肝臓急性期タンパク質)について得た。いくつかの他の肝臓マーカー(例えばフェトプロテイン(Dabevaら、2000)、E-カドヘリン(Stamatoglouら、1992)、c-MET(Ikedaら、1998)、HGF(Skratciら、1999)およびシナプトフィジン(Wangら、1998);図15を参照のこと)がまた発現された。脾臓および肝臓によって共有されるタンパク質(例えばHGFおよびシナプトフィジン)の発現は、胚前腸内胚葉に由来する共通の起源を反映し得、そして脾臓表現型または肝臓表現型のいずれかへの分化を示し得た。

20

【0248】

(実施例 20)

(NIPにおけるGLP-1Rシグナリング)

GLP-1アミドの個々の単離されたNIPへの適用は、細胞内Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)のレベルを上昇させた。細胞を方眼のついたカバーガラス上にプレートイングして、ネスチン発現について試験するために、同じ細胞の引き続く免疫組織化学染色を可能にした。[Ca²⁺]_i記録が行われたすべての細胞は、ネスチンを発現することを示した。成熟細胞とは対照的に、GLP-1は、基礎的な(5.6 mM)グルコースで[Ca²⁺]_iレベルを刺激したが、高い(20 mM)グルコースの存在環境下においては効果がなかった(図23、パネルA)。これらの効果を、フォルスコリンによって再現し(図23、パネルB)、これはGLP-1の効果が、GsおよびcAMP産生の活性化(正常なベータ細胞において使用される同じシグナリング経路)を通じて媒介されることを示唆した。ペプチドExendin(9~39)(GLP-1の特異的アンタゴニスト)での個々の単離されたNIPの前処理は、GLP-1によって媒介される[Ca²⁺]_iの増大を妨げた(図23、パネルCおよびD)。GLP-1RアンタゴニストであるExendin(9~39)の効果は、GLP-1Rの同じアイソフォームが、細胞のようにNIPにおいて発現されることを示唆した。GLP-1によって媒介される[Ca²⁺]_iの増大は、細胞外(extracellular)La³⁺(5 μM)によって阻害され、これはGLP-1が、細胞を脱分極するその公知の役割と一致して[Ca²⁺]_i流入を活性化したことを示唆した(図23、パネルE)。本発明者らはさらに、トルブタミド(100 μM)が、NIPにおける[Ca²⁺]_i上昇を刺激することを実証し、これは細胞がATP感受性K⁺チャネルを発現することを示した(図23、パネルF)。これらのデータは、細胞におけるその作用機構と一致して、GLP-1誘導性の膜脱分極、およびNIPにおける電圧依存性Ca²⁺チャネルの活性化と一致した。

40

50

【0249】

(実施例21)

(G L P - 1 は N I P のインスリン分泌性細胞への分化を誘導する)

以前の研究は、 G L P - 1 のインスリン指向性作用、ならびに部分臍切除ラットにおいて 細胞新生を刺激する能力を実証した (X u ら、 1999、 Diabetes 48 : 2270)。N I P を島培養物から選び、そして b F G F および E G F を含む増殖培地において 3 ~ 10 日間拡張した (継代 0 1) (Z u l e w s k i ら、 2001 Diabetes 50 : 521)。特定の場合において、3 ~ 5 日間拡張された N I P O を固定し、そして図 24 A に示されるようにネスチン (C y - 3) およびインスリン (C y - 2) の免疫細胞化学検出に供した。この段階で、N I P はネスチンポジティブでありそしてインスリンネガティブであることが見出された。N I P 培養物を 7 ~ 10 日間拡張し、次いで G L P - 1 またはその安定なアナログである e x t e n d i n - 4 のいずれかで処理した場合、細胞の部分集合は、インスリンポジティブ (C y - 2 ; 図 24 B 、パネル 3 、 5 および 6) 、および I d x - 1 ポジティブ (C y - 3 ; 図 24 B 、パネル 7) ならびにネスチンネガティブ (C y - 3 ; 図 23 B 、パネル 4) になった。培養物を G L P - 1 で処理した場合、ネスチン発現は総体的に減少した (図 24 B 、パネル 2 対 4)。従って E x t e n d i n - 4 での処理は、インスリン分泌の 2 ~ 3 倍の増大を誘導した (図 25)。しかしいくつかの培養ウェルにおいて、コンフルエントな状態だけで、少量のインスリン分泌を開始するのに十分であった。

10

20

30

【0250】

ホメオドメインタンパク質、I d x - 1 は、臍発生に重大であり、そしてインスリン遺伝子の転写調節において重要な役割を果たした。I d x - 1 発現の単独誘導欠損 (h a p l o i n d u f f i c i e n c y) は、早期発症の 2 型糖尿病の形態をもたらし (M O D Y 4) 、そして I d x - 1 の遺伝性アミノ酸変化は、後期発症の 2 型糖尿病に関連した。I d x - 1 は、分化した N I P 細胞集団において発現された。

40

【0251】

繰り返し継代されたヒト N I P は、G L P - 1 に応答してインスリンを分泌する能力を失った。しかしヒト I d x - 1 c D N A をコードする発現ベクターを用いたこれらの細胞のトランスフェクトによって、G L P - 1 反応性になり、そして N I P の部分集合においてインスリンの合成を誘導した (図 26 、パネル 1)。興味深いことに、G L P - 1 処理を行わない I d x - 1 での N I P (継代 9) のトランスフェクションは、インスリン生合成を誘導しなかったが (図 26 、下部パネル B) 、I d x - 1 発現レベルを刺激した (図 26 、上部パネル B)。総合すれば、これらの結果は、G L P - 1 が、N I P 細胞における I d x - 1 発現のレベルを刺激し、そして I d x - 1 の臨界閾値濃度が、N I P がインスリン産生性細胞に転換されるのに必要とされることを示唆し、従って島細胞分化における G L P - 1 R についての役割を示唆した。

【0252】

(実施例22)

(組織 / 器官移植片の有望な宿主レシピエントにおいて免疫寛容状態をあらかじめ誘導するための N I P の使用のための方法)

N I P を、潜在的な器官ドナーに対して寛容状態をあらかじめ誘導するために使用した。最近公表された報告は、ドナーから移植レシピエントへの幹細胞の移植は、どの免疫抑制剤も必要とせずにドナー由来の移植片に対する寛容を誘導し得ることを示した (例えば F a n d r i c h ら、N a t . M e d . 、F e b 2 0 0 2 、8 : 1 7 1 ; Q u a i n i ら、N . E n g l . J . M e d . 、3 J a n 2 0 0 2 、3 4 6 : 5 ; K o r b l i n g ら、N . E n g l . J . M e d . 、7 M a r 2 0 0 2 、3 4 6 : 7 3 8 を参照のこと)。本明細書中に記載される手順は、これらの報告を確証し、そしてドナーからレシピエントへの器官移植の前に、潜在的な器官ドナーに対して免疫寛容状態をあらかじめ誘導するという N I P の新規の使用を実証した。

50

【0253】

この方法に従って、組織生検を、有望なヒトドナーの脾臓または肝臓から得た。ヒトのネスチンポジティブな細胞（NIP）を、記載されるように単離しそしてインビトロで拡張して、NIPまたはNIPに等価な幹／前駆細胞を作製した。次いでこれらのNIPを、皮下注入または静脈内注入のいずれかを介して免疫学的に応答性のレシピエントに投与した。4～8週間後、組織標本を、針生検またはパンチ生検によって得た。ゲノムPCRおよびドナー特異的プローブを用いたインサイチュハイブリダイゼーションは、移植されたヒトNIPは、レシピエントの複数の器官にコロニー形成し、そして微小な／混成のキメラ現象の状態を生成し、これが免疫寛容状態を誘導したことを示した。レシピエントによるヒト組織移植片の受容は、移植された幹／前駆細胞の樹状抗原提示細胞への分化から生じ、そのためレシピエントの免疫系を誘導して、移植されたヒト組織を自己として認識したと考えられた。ドナー組織に対するレシピエントにおける免疫寛容の誘導の成功は、ドナーから皮膚生検材料を採取することによって、そしてレシピエントの皮膚上にその生検材料を移植することによって確認され、そしてレシピエントはドナーの皮膚移植片を拒絶しないことを示した。ドナーに対する免疫寛容状態の誘導の確認後、NIP移植片を外科的に除去した。次いでドナー由来の器官（腎臓、心臓、肝臓、脾臓）を、移植された器官の拒絶を招くことなくレシピエントに移植した。この器官の予備移植プロトコルは、レシピエントの免疫系を奪い取って、移植された器官を自己として認識し、従って強力であるが毒性の免疫抑制剤についての必要性を不要にした。

【0254】

(参考文献)

- Bisgaard, H. C. および Thorgerisson, S. S. 1991. Evidence for a common cell of origin for primitive epithelial cells isolated from rat liver and pancreas. *J. Cell Physiol.* 147: 333～343.
- Bjornson, C. R. ら、1999. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. *Science* 283: 534～537.
- Boggs, S. S. 1990. Targeted gene modification for gene therapy of stem cells. *Int J. Cell Cloning* 8: 80～96.
- Bouwens, L. ら、1994. Cytokeratins as markers of ductal cell differentiation and islet neogenesis in the neonatal rat pancreas. *Diabetes* 43: 1279～1283.
- Bouwens, L. 1998. Transdifferentiation versus stem cell hypothesis for the regeneration of islet beta cells in the pancreas. *Microsc. Res. Tech.* 43: 332～336.
- Cornelius, J. G. ら、1997. In vitro-generation of islet in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas. *Horm. Metab. Res.* 29: 271～277.
- Dahlstrand, J. ら、1992. Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J. Cell Sci.* 103: 589～597.
- Dabeva, M. D. ら、2000. Proliferation and differentiation of fetal liver epithelial p

10

20

30

40

50

rogenitor cells after transplantation into adult rat liver. Am. J. Pathol. 156: 2017~2031.

Hockfield, S. および McKay, R. D. 1985. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. J. Neurosci. 5: 3310~3328.

Ikedaira, 1998. Activated rat stellate cells express c-met and respond to hepatocyte growth factor to enhance transforming growth factor beta1 expression and DNA synthesis. Biochem Biophys Res Commun 250: 769~775.

Johansson, C. B. ら、1999. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. Cell 96: 25~34.

Karlsson, S. 1991. Treatment of genetic defects in hematopoietic cell function by gene transfer. Blood 78(10): 2481~2492.

Lendahl, U. ら、1990. CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. Cell 60: 585~595.

Miller, A. D. 1990. Retrovirus packaging cells. Hum Gene Therapy 1: 5.

Morshead, C. M. ら、1994. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain: a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. Neuron 13: 1071~1082.

Rao, M. S. ら、1996. Expression of transcription factors and stem cell factor precedes hepatocyte differentiation in rat pancreas. Gene Expr 6: 15~22.

Reddy, J. K. ら、1991. Pancreatic Hepatocytes. An in vivo model for cell lineage in pancreas of adult rat. Dig. Dis. Sci. 36: 502~509.

Reimold, A. M. ら、2000. An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. Genes Dev. 14: 152~7.

Reynolds, B. A. および Weiss, S. 1996. Clonal and population analyses demonstrate that an EGF-responsive mammalian embryonic CNS precursor is a stem cell. Dev. Biol. 175: 1~13.

Schiffmann, 1995. Transfer of the human glucocerebrosidase gene into hematopoietic stem cells of nonablated recipients: successful engraftment and long-term expression of the transgene. Blood 86(3): 1218~1227.

- Skrtic, S. ら、1999. Hepatocyte-stimulated expression of hepatocyte growth formation (HGF) in cultured rat hepatic stellate cells. *J. Hepatol.* 30: 115~124.
- Slack, J. M. W., 1995. Developmental Biology of the pancreas. *Development*, 121: 1569~1580.
- Stamatoglou, S. C. ら、1992. Temporal changes in the expression and distribution of adhesion molecules during liver development and regeneration. *J. Cell. Biol.* 116: 1507~1515.
- Wang, Z. ら、1998. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 47: 50~56.
- Williams, D. A. 1990. Expression of introduced genetic sequences in hematopoietic cells following retroviral-mediated gene transfer. *Hum. Gene Therapy* 1: 229.

10

20

(他の実施態様)

他の実施態様は、添付の特許請求の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

【0255】

【図1】図1Aおよび1Bは、16日胚(図1A)および生後60日目(図1B)のラット臍島の二重蛍光免疫細胞化学染色を示す。ネスチンに対する抗体での免疫染色を白色で示し(オリジナルでは赤色、フルオロフォアとしてCy3を使用)、そしてインスリンに対する抗体での免疫染色を灰色で示す(オリジナルでは緑色、フルオロフォアhとしてCy2を使用)。

30

【図2】図2は、50のラットの島から得られたmRNAを用いて行われたRT-PCRの結果を示す。フォワードプライマーおよびリバースプライマーを示す。834bpの1本のバンドを配列決定し、そして実質的にネスチンに対する配列として同定した。

【図3】図3は、培養されたラットの島から外へ増殖したネスチンポジティブな細胞を示す。

【図4】図4は、培養物中の島様構造の発生を示す。

【図5】図5は、培養物中で作製された島様構造のRT-PCR分析の結果を示す。NCAMの発現およびサイトケラチン-19(CK19)の発現を検出した。

【図6】図6は、高グルコースによるネスチンmRNA発現の刺激を示す。APRTをコントロールとして試験した。

40

【図7A】図7Aは、ネスチンのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列である。

【図7B】図7Bは、ネスチンのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列である。

【図7C】図7Cは、ネスチンのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列である。

【図8】図8は、免疫細胞化学またはRT-PCRによって決定されるように、臍島内部の独特的な細胞集団における神経幹細胞特異的なマーカーであるネスチンの発現を示す。

【図9】図9は、免疫細胞化学およびRT-PCRによって臍臓から単離された幹細胞におけるネスチンのキャラクタリゼーションを示す。

【図10】図10は、ネスチンポジティブな島前駆細胞(NIP)に由来するヒト島様集団におけるホメオドメインタンパク質ID-X-1およびプログルカゴンの発現を示す。

【図11】図11は、ラット臍臓の導管の局在化領域に対するネスチンポジティブな細胞の局在性を実証する。

50

【図12】図12は、島の内分泌細胞の前駆体である臍管細胞の起源についての別のモデルを示す。

【図13】図13AおよびBは、ネスチンポジティブな肝臓幹細胞の免疫蛍光染色を示す。

【図14】図14は、マウス内分泌臍臓の発生の間の転写因子の順次出現を示す。

【図15】図15は、幹細胞を含むヒトNIP培養物中の神経内分泌の発現、外分泌臍臓マーカーの発現および肝臓マーカーの発現を示す。

【図16】図16は、RT-PCRによって決定されるようなプログルカゴンmRNAの発現およびインスリンmRNAの発現、ならびにインスリン分泌を示す。

【図17】図17は、NIPマーカーを示す。

【図18】図18は、ヒトABC G 2の核酸配列(a)およびアミノ酸配列(b)を示す。

【図19】図19aは、RT-PCRおよびサザンプロットハイブリダイゼーションによるATP結合力セット輸送体ABC G 2の発現を示す。図19bは、ネスチンポジティブな島由来の前駆細胞(NIP)が、ヘキスト33342染色によって実証されるようになりの数のSP細胞を有することを実証する。図19cは、SP細胞からの染料流出が、ベラパミルの存在環境下で阻害されることを実証する。SPゲート細胞は、Bにおいて分析された細胞の総数の2.1%であるのに対し、Cにおいては0.1%である。

【図20】図20は、FACSによって単離されたSP細胞が、高レベルのABC G 2、MDR1およびネスチンを共発現することを実証する。図20Aは、SP細胞および非SPコントロール細胞が、ヘキスト33342染色後にFACSによって単離されたことを示す(それぞれR1およびR2)。図20Bは、この細胞が、RT-PCRによってABC G 2 RNA、MDR1 RNA、ネスチンRNAおよびGAPDH RNAの発現について分析されたことを実証する。ABC G 2およびMDR1に対するPCR産物の同一性を、サザンプロットハイブリダイゼーションによって確認した。

【図21】図21は、ヒトGLP-1Rの核酸配列(21A)およびアミノ酸配列(21B)を示す。

【図22】図22は、臍島由来の幹/前駆細胞に対するGLP-1Rの発現を示す。パネルAは、GLP-1Rの免疫細胞化学検出(Cy-3)およびDAPIで染色された核を示す。パネルBは、GLP-1Rに特異的なプライマーを用いてNIPから調製されたRNAのRT-PCRを示す。

【図23】図23は、ネスチンポジティブなNIPにおけるCa²⁺流入のGLP-1(7~36)アミド刺激およびトルブタミド刺激を示す。

【図24】図24は、GLP-1誘導性分化を実証するNIPの免疫組織化学染色を示す。パネルAは、ネスチンおよびインスリンの免疫組織化学同定を示す。パネルBは、細胞をGLP-1でチャレンジした後のネスチンおよびインスリンの免疫組織化学染色を示す。

【図25】図25は、GLP-1でチャレンジされたNIP培養物からのインスリン分泌レベルを示す。

【図26】図26は、ヒトイdx-1でトランスフェクトされたNIP培養物におけるインスリン発現の免疫組織化学分析を示す。

【図 1 A】

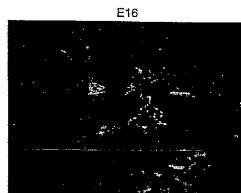


FIG. 1A

【図 1 B】

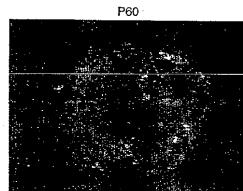
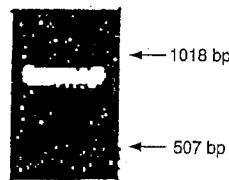


FIG. 1B

【図 2】



フォワードプライマー [GCGGGGCGGTGCCTGACTAC]
リバースプライマー [GGGTGGTGAGGGTTGAGGTTGTG]

FIG. 2

【図 3】

ネスチンポジティブな細胞は、インビトロで島の周囲で増殖する

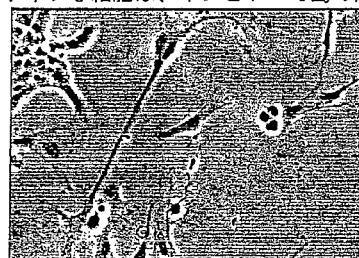


FIG. 3

【図 4 A】

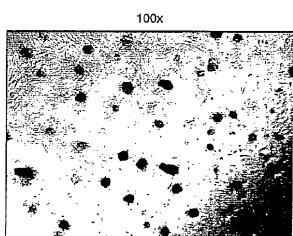


FIG. 4A

【図 6】

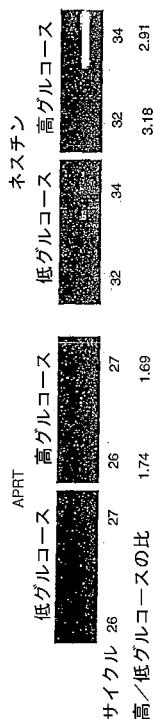


FIG. 6

【図 4 B】

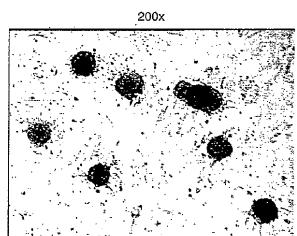


FIG. 4B

【図 5】

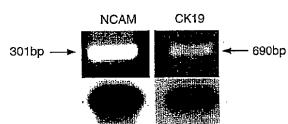


FIG. 5

【 図 7 A 】

ネスチシアミノ酸配列
"MEGCMGEESQFWLNELRRRLAELYLRVKAEEQNELLSSAGLGGLR
ROSADTWSRAHADDLEALRALVDQRWREKHAEEAVARDNLAEELEGVAGRCEQLRL
ARERTTVEEVARNRRAVEAEKCARAWLSSQGAELERELAELRVAHEEBERVGLNAAQAC
APRILPAPRPPPAPEVEELARRLGEAWRGAVRGYQERVAHMETSQDQTERRLARAVQ
GAR
EVRLELQQLQABERGGLLERRAELAQLRGRWQEERLARATEKFQLAVEALEQEOKQGLOSQ
IAQWLEGRQQLAHLSMSLSELEVATYRTILEAENSRLQTGGGSKTSLSFQDPKLLELFQ
PTPRGEGRLSLLPVPLSPTLSPSLATPLTPVAFPLKFNQEFQLQARTPLTASLPTP
PQAPSPAVDAEIRAQDAPLSSLQTOQGRKQAPPEPLRAEARVAIPASVLPGEPEPGQR
QESTAQGSQEDHASLAPLSPDNEESEAKLDGEGSSGRVSFICRGEGEQWGLVEKET
AIEKGWVSSVLSQQLEIWEEDEDNLRNKEIDOSVPELETKLKSLEBEEOSLTKLENQSHET
LERENQECPRSLEEDLETLSLEKENKRAIKCGGSISRSKRGCRQLKPTGKEDTQL
OSLQSOQMLKMSLQNSLENNGLTFLPPTGENQVLSSLSQNLNESLTALEKENQEPRLSPSVEV
DEEALRPLTKENQPLRSLEDENKEAFLRSLEENQKPLTLEEDQSVPRLTENH
KSLRSLSEEDQETLRLKEKETQQRRRLSGEQDQDMITLRPPEKVDLPEPLKSLSDQEIARPL
ENENQECPLSLEEVESVAKSLELSKASQAGENLETLKSPETQPALWTPEEINK
SGNESSSRKGNSTLTVGCGSFRDITQPTGRGESGHEIESTSMSMPEFEIGRSVKDQEKS
RNLEEEENLKGKGEYQEQLRSLEEEQQLPQSAVDQWRWEDTVEVKDQLAQBESPGMAGV
ENKDEAELNRLREQDFKGEYEEVVEQEGLNNEAVEWPFGEHGPENPEKEQRLRVLVEGAS
VKGAEAGLQDPEQPSQSQVGTGPQLQAPQQLCPEALPVEPLWEDDVQGDQDASPEVMLGSEF
AMGESAAGAEPGLCQGVGGLDPDGHLTREEVMEPPLIEESELEAKRVQGLEGRKDLEE
AGGLTFTSELFSFGKRSRDFWPEPREGRESEEEAARPGRGAEAEPAFTLGTISDAPSWP
EADLSEEDPVPLVPSPTPPLAEDAPGLQPKQAEQSGASQEWVGQRAEEAGAKVESEQ
EELGSGEIPFGLQKQEEGEESRESEEDELGETLPDSTPLGFYLRSPTRWTPLESRGH
PTKETGEKGWDPAVLASEGLEPEKKEEYEEGEEEEEGRDSLSEEEFDLTGEAPFLPG
VPGEVAEPFLQGVQPLLQDPAWDRDGESEDGFDAEDEESEGGEEDEQEEBREGPAGHRWGP
GGSVSLQALQSSQQRGFLESDSVSVWPWDSLRAVAGAPKTALETESQDSAEPG
SEEEEDPSVLSLEEDKVPCLPEIPSMDAGPFGADIYGVNGQGPNLGKSQHVNGVMN
GLEQSEESGARNALVSEGDRGSQFPEEEEGSALKRSSAGAPVHLQGQQLFKTQRQEDGR
EWSGSGED"

ネチシヌクレオチド配列
 塩基総数 1238 a、1176 c、1676 g、764 t、
 alggaggcgt gcgatggggg ggacgcgtt cagatgtgg agctcaacg ggcgttcggag 61
 gcactacc ggcggccatc ccggcgatgg ggcggaaatg agtcgttcgg cggccggatc 121
 gggggccatc ggccaaatc cgggacatc tcggcgatgg cgcataatc cgcacggatc 181
 cggccatc ggcgttcgtt tgaaatcggc tgccggatgg aacatgggg cggatggatc 241
 cggccatc ttggatca gttggatgg gtcggatcc gtcgcgcata gtcgcgcgtt 301
 ggcggatgg ggcacatgg ggatggatgg gtcgcgcata gtcgcgcgtt 361
 tcggccggcc ctgtcgatgg lagatcgatgg ggcacggatc agcgacatgtt 421
 ctggatcc acggatggaa ggcgttcgtt tgatcgatgg agcgacatgtt tgccggatc

FIG. 7A

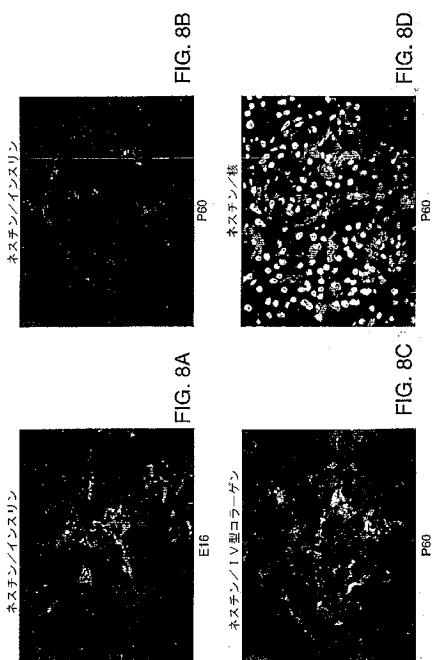
【 図 7 C 】

FIG. 7C

【 図 7 B 】

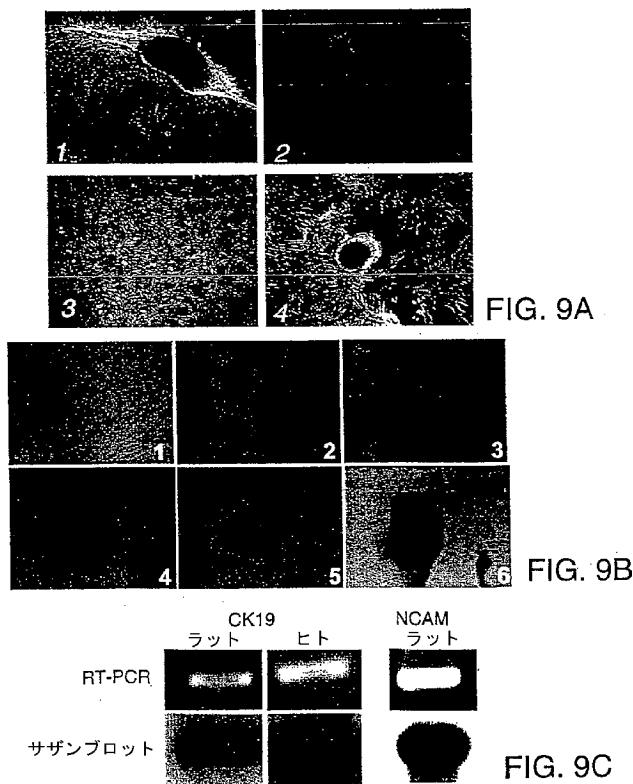
FIG. 7B

【 四 8 】

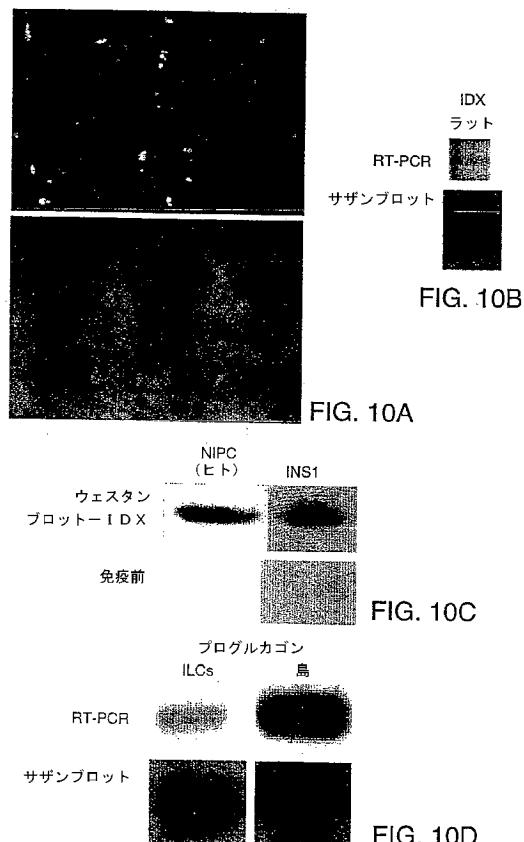


ネスチング・インスリニ

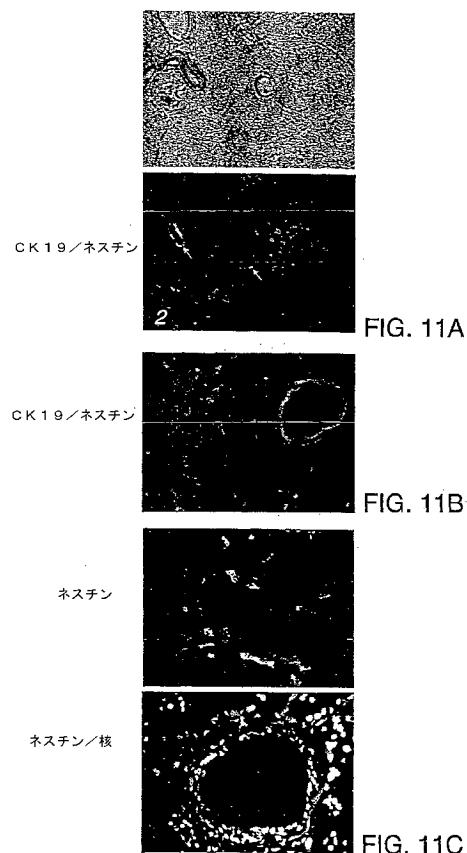
【図9】



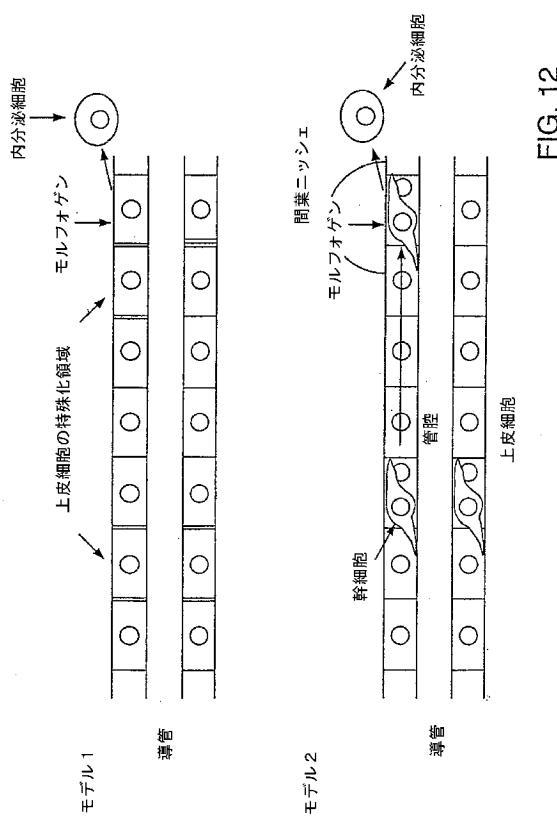
【図10】



【図11】



【図12】



【図 13A】

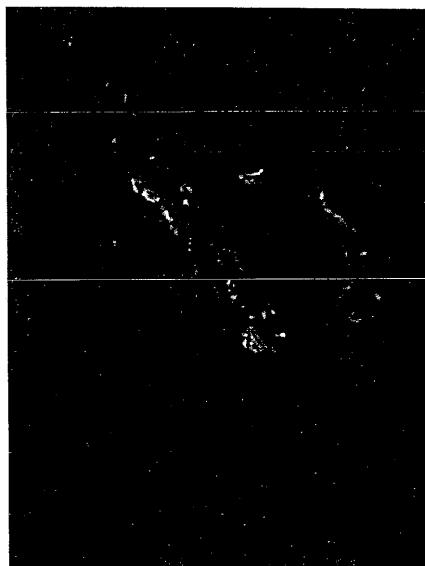


FIG. 13A

【図 13B】

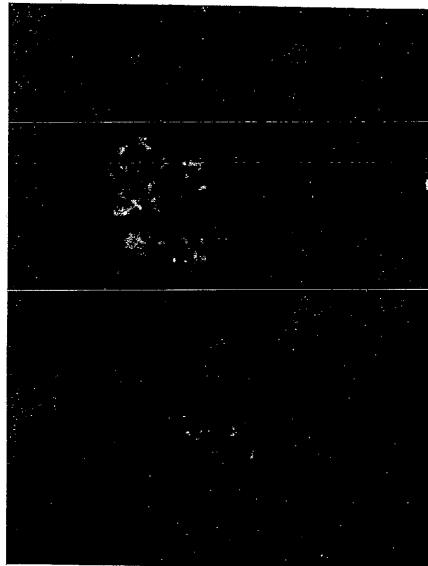


FIG. 13B

【図 14】

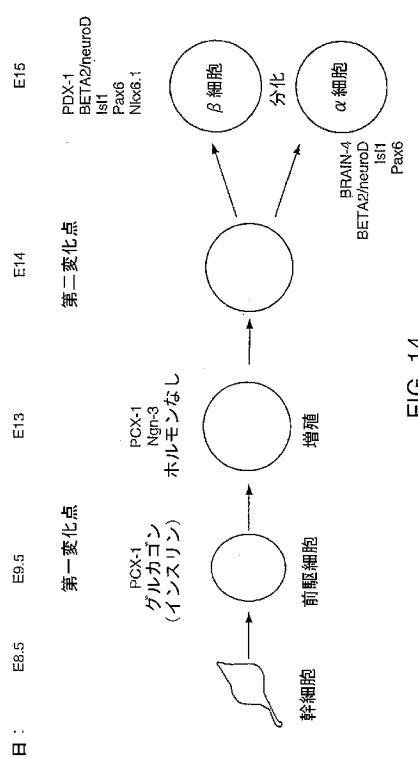


FIG. 14

【図 15】

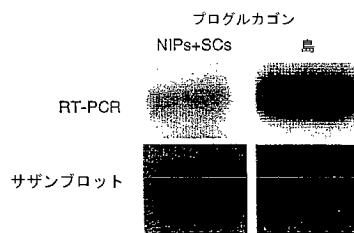


FIG. 15A

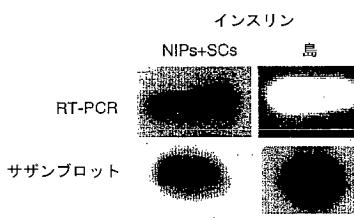


FIG. 15B

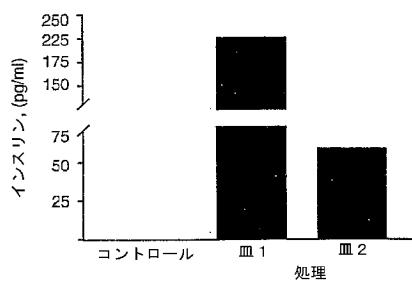


FIG. 15C

【 図 1 6 】

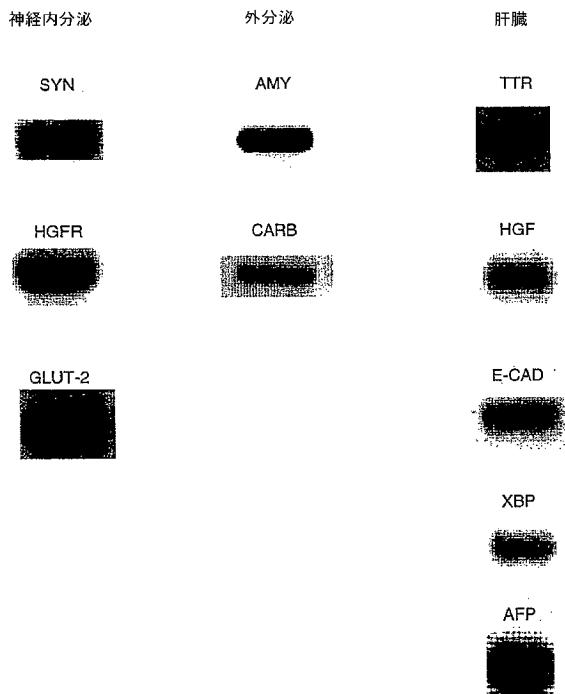


FIG. 16

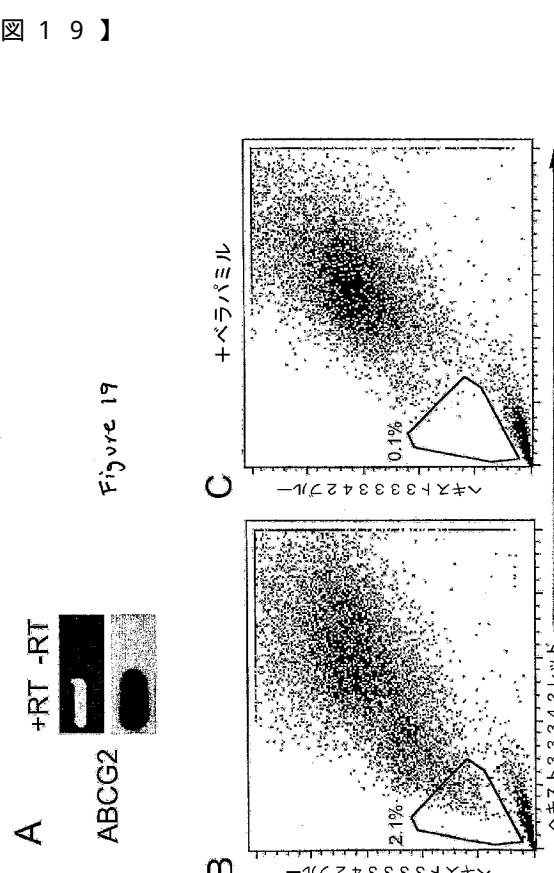
【 図 1 7 】

- ABCG2 (Bor p1) ATP結合カセット : SP細胞マーカー
 - Oct 3/4 : Pou/ホメオドメイン転写因子 (ES細胞マーカー)
 - GLP-1レセプター : 7MS GPCR
 - ラトロフィリン (latrophilin) (2型) : 7MS GPCR
 - Hes-1 : bHLH転写因子
 - ネスチン : 中間径フィラメントタンパク質
 - インテグリンα6 β1 : ラミニン (laminin) レセプター (CD200)
 - C-kit (CD117) : 細胞因子レセプター
 - MDR-1 : 多剤耐性輸送体
 - SST-R, 2, 3, 4 : ソマトスタチンレセプター
 - SUR-1 : スルホニル尿素レセプター
 - FGF-6, 2 : SUR-1を含む内向き整流K⁺チャネルサブユニット
 - CD34, CD45, CD133, MHC I および II に対してネガティブ

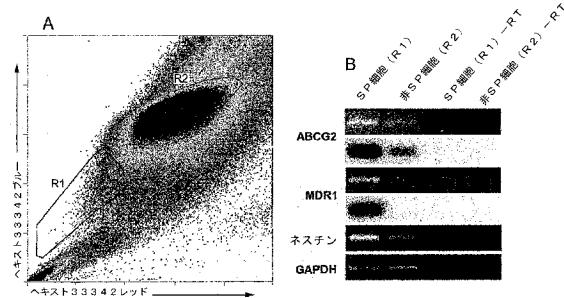
A

B

MSSNNVEVFPIVSQNGNTNGPATASNDLKAFTEGAVLSFHNYC
KJLQHNSKGLFCKRPKVEKEIILSNGIMPKGLNAILTGTTGGKSSLLDVLARKDPSGL
SGDVLINGAPRPNFKCNSSVYQQVDDVMGLTVERLNQFSALARLATTMINHEKNER
INRQVIOELGLDKVADSKVQTFQRVGSSGERKRTSIGMELITDPSFLFEDPTGLDS
STANAVALLLKRMSKQGRTHSFIHSQRFYJSFLKDLSLTLISASGRMLFGHPAQEALGY
FESAGYHCSEA YNNPDAFFLDIINDGDTAVALNRREDFKA TEIHEPSKQDKPLIEKLA
EYVNSSFYKEEKAELHOLSGEKKKUUTPKEVYITSCHQLRWW SKRSKKNLLGNP
QASIAQIVTVGLVIGAYIQTGFLNDKSTGQNRAYGLFELTNNQCSVSVALEFWV
EKELFLHIEYGSYVSSFLGKDLSDLPMLRQGMLPSIHFCTIVYFLGMGLKPADEFVV
MMFTLMMVVAASMSMALIAAQSOGVSATVSLTMLMTCVFFMFMSGLVNLNTIASWLS
WLQYOSIPRYQFLQHNEFNGONCPGLNATGNPCNPNYC ATCTGEEYLVKQGIDLSPW
GJWKHNWHLACMIVIFKJYI KJL FKI JKYS



【 図 2 0 】

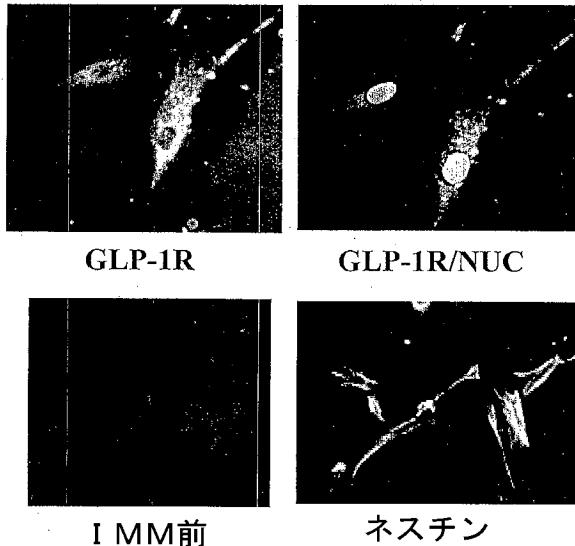


A

1

MAGAGPGLRLAIIJLNGMVGRAGPRPGATVSLWLTQVKWRERVRRCRQLSTDTPPPA
TDLFCNTRIDEXAYACWPDEGFSVNPSCWPVLYPLWASSVPGOHYVTRCTAEALWLQKD
NSSLWPRLDSECEKSRRGERSSPEEFLLYIITVYTGALFSALSVAIASLLGFRHLHCTR
NYIHLNHLASFLRASLVEKDFAAKLWYMSTAQQAHQWHDGLLSYDOSLDSCLRLVFLMQL
YCVAAANYYWLLVEGVYIYTLLAFSVEFQSWIYRFLVPSWIGWFLPVFPWGVKIVBL
DECWTGRTRSNMNYWLIILRPLLFGIVNLFVLRPVCIVSCKLNLMKTCIDCRKLAKST
LTLIPLLGTHIEVFVAFMDEBARTHGLTRFLKLTFRPSSQFLMVLAYCIVCFVNNEQVLF
KSWRERLHEHJLHRDSSMPLCKPTTSLSGGATQSMSMTATQCASC

【図22】



B



NIPs

島

346bp

【 図 2 3 】

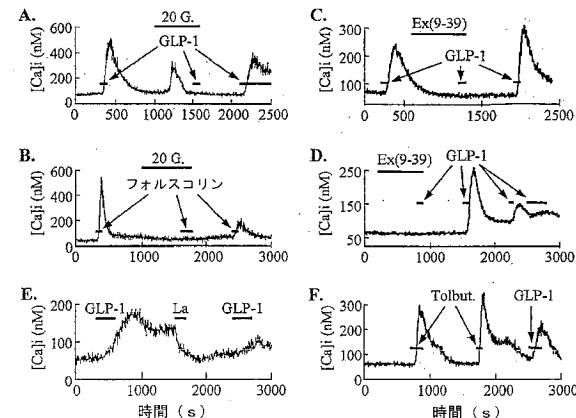


図 GLP-1(7~36)アミドおよびトルブタミドは、幹細胞において $[Ca^{2+}]_i$ 流入を刺激する。

(A) 5.6mM グルコース浴中の Fura2 ロード細胞は、10nM GLP-1 に応答して $[Ca^{2+}]_i$ 増大を示す。

20mMまでの細胞外グルコースの増大(20G)はまた、 $[Ca^{2+}]_i$ の増大を引き起したが、20mMグルコースにおけるGLP-1の適用は、 $[Ca^{2+}]_i$ 応答を产生できなかった。5.6mMグルコースまでの復帰に対する

GLP-1 の第三の適用は、 $[Ca^{2+}]_i$ 応答を產生した。(B) GLP-1 のグルコース依存性効果を、10mM

フルスコリンによって再現し、これは、 $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が cAMP 媒介性であることを示唆した。

(C) $[Ca^{2+}]_i$ の CLP-1 媒介性増大は、10nM exendin (9 ~ 39) によって可逆的に阻害された。この効果は、

(D) exendin (9 ~ 39) の存在環境下における GLP-1 の適用が心臓を產生できなかつたのに対して、exendin の造後後の GLP-1 の引き続く適用が、嚴重なる $[Ca^{2+}]_i$ 上昇を产生したので、ヒセブター

脱感作に起因しない。(E) $[Ca^{2+}]_i$ の GIP-1 様介性増大が、0.5mM 細胞外 La^{3+} によって阻害され、

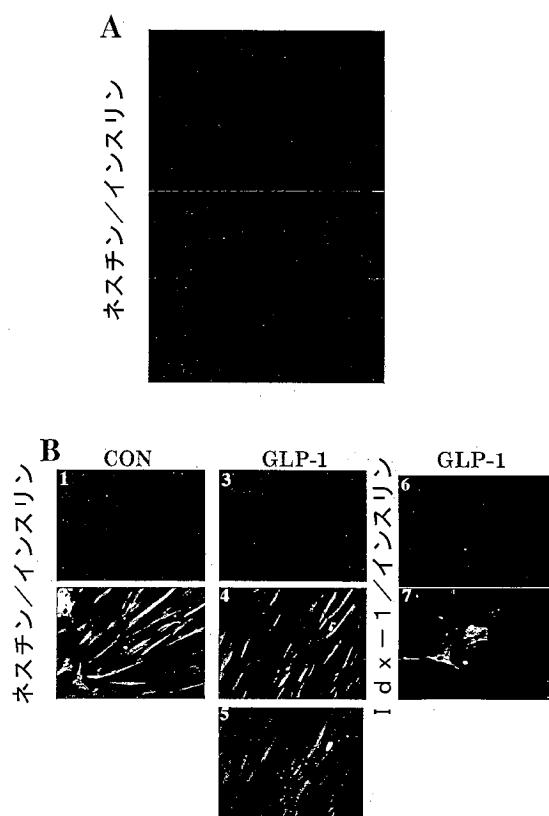
これは GLP-1 が Ca^{2+} 流入を刺激することを示唆する。(F) 5.6 mM グルコース浴中の幹細胞は、 $100 \mu\text{M}$

トルブタミド (Tolbut.) で刺激され、そして $[Ca^{2+}]_i$ の増大とともに度重なる適用に応答した。

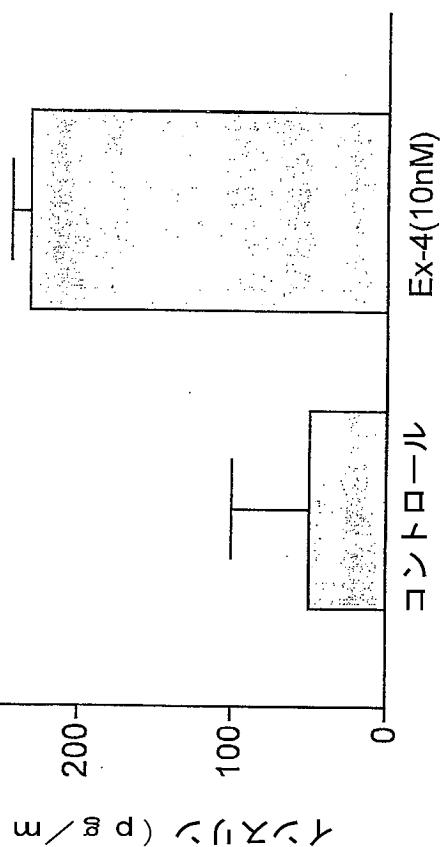
10nM GLP-1の適用はまた、 $[Ca^{2+}]_i$ の増大を刺激し、これはGLP-1が細胞の脱分極によって作用

することを示唆する。

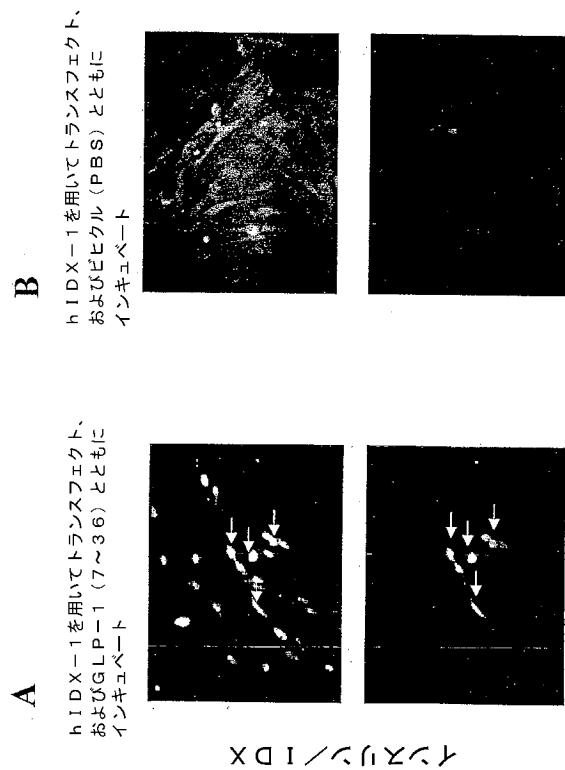
【図24】



【図25】



【図26】



【配列表】2005533746000001.app**【手続補正書】****【提出日】**平成16年12月14日(2004.12.14)**【手続補正1】****【補正対象書類名】**特許請求の範囲**【補正対象項目名】**全文**【補正方法】**変更**【補正の内容】****【特許請求の範囲】****【請求項1】**

臍島から幹細胞を単離する方法であって、

(a) 脐島をドナーから取り出すステップと、

(b) 該臍島由来の細胞を培養するステップと、

(c) 該培養物からネスチンポジティブなクローンを選択するステップと、
を含む方法。

【請求項2】

上記ネスチンポジティブなクローンがまたABC G 2ポジティブなクローンであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

上記ネスチンポジティブなクローンがまた、Oct 3 / 4、GLP - 1レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes - 1、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C - kit、MDR - 1、SUR - 1またはKir 6.2からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つについてポジティブであることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項4】

上記ネスチンポジティブなクローンが、CD 34、CD 45、CD 133、MHCクラスIおよびMHCクラスIIからなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つを発現しないことを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項5】

臍島から幹細胞を単離する方法であって、

(a) 脐島をドナーから取り出すステップと、

(b) 該臍島由来の細胞を培養するステップと、

(c) 該培養物からABC G 2ポジティブなクローンを選択するステップと、
を含む方法。

【請求項6】

前記培養ステップが、第一にコンカナバリンAでコーティングされた容器中で行われ、次いで再びコンカナバリンAでコーティングされない容器中で行われることを特徴とする請求項1または5に記載の方法。

【請求項7】

請求項1または5に記載の方法であって、

(d) EGF、bFGF - 2、高グルコース、KGF、HGF / SF、GLP - 1、endo - 4、IDX - 1、IDX - 1をコードする核酸分子、ベータセルリン、アクチビンA、TGF - およびそれらの組み合わせからなる群より選択される1の因子での処理によって、上記ネスチンポジティブなクローンを拡張するさらなるステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項8】

請求項5に記載の方法であって、

(d) EGF、bFGF - 2、高グルコース、KGF、HGF / SF、GLP - 1、endo - 4、IDX - 1、IDX - 1をコードする核酸分子、ベータセルリン、ア

クチビンA、TGF- α およびそれらの組み合わせからなる群より選択される1の因子での処理によって、上記ABC G 2ポジティブなクローニングを拡張するさらなるステップを含むことを特徴とする方法。

【請求項9】

臍臓前駆細胞へのネスチンポジティブな臍臓幹細胞の分化を誘導する方法であって、ネスチンポジティブな臍臓幹細胞を、EGF、bFGF-2、高グルコース、KGF、HGF/SF、IDX-1、IDX-1をコードする核酸分子、GLP-1、exendin-4、ベータセルリン、アクチビンA、TGF- α およびそれらの組み合わせからなる群より選択される1の因子で処理することによって、該幹細胞を引き続き臍臓前駆細胞に分化させるステップを含む方法。

【請求項10】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞がまたABC G 2ポジティブなクローニングであることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項11】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞がまた、Oct3/4、GLP-1レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes-1、ネスチン、インテグリンサブユニット6および1、C-kit、MDR-1、SUR-1またはKir6.2からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つについてポジティブであることを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項12】

上記ネスチンポジティブな臍臓幹細胞が、CD34、CD45、CD133、MHCクラスIおよびMHCクラスIIからなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つを発現しないことを特徴とする請求項9に記載の方法。

【請求項13】

臍臓前駆細胞へのABC G 2ポジティブな臍臓幹細胞の分化を誘導する方法であって、ABC G 2ポジティブな臍臓幹細胞を、EGF、bFGF-2、高グルコース、KGF、HGF/SF、IDX-1、IDX-1をコードする核酸分子、GLP-1、exendin-4、ベータセルリン、アクチビンA、TGF- α およびそれらの組み合わせからなる群より選択される1の因子で処理することによって、該幹細胞を引き続き臍臓前駆細胞に分化させるステップを含む方法。

【請求項14】

前記臍臓前駆細胞が引き続き偽島様集団を形成することを特徴とする請求項9または13に記載の方法。

【請求項15】

神経幹細胞ではない、単離されたネスチンポジティブな哺乳動物臍臓幹細胞または単離されたネスチンポジティブなヒト肝臓幹細胞。

【請求項16】

上記細胞がまたABC G 2ポジティブであることを特徴とする請求項15に記載の単離された幹細胞。

【請求項17】

上記細胞がまた、Oct3/4、GLP-1レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes-1、ネスチン、インテグリンサブユニット6および1、C-kit、MDR-1、SUR-1またはKir6.2からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つについてポジティブであることを特徴とする請求項15に記載の単離された幹細胞。

【請求項18】

上記細胞が、CD34、CD45、CD133、MHCクラスIおよびMHCクラスIIからなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つを発現しないことを特徴とする請求項15に記載の単離された幹細胞。

【請求項19】

神経幹細胞ではない、単離された A B C G 2 ポジティブな 哺乳動物 脾臓幹細胞または単離された A B C G 2 ポジティブなヒト肝臓幹細胞。

【請求項 2 0】

上記細胞がまた、Oct 3 / 4、GLP - 1 レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes - 1、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C-kit、MDR - 1、SUR - 1 または Kir 6.2 からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも 1つについてポジティブであることを特徴とする請求項 1_9 に記載の単離された細胞。

【請求項 2 1】

上記細胞が、CD34、CD45、CD133、MHCクラスIおよびMHCクラスIからなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも 1つを発現しないことを特徴とする請求項 1_9 に記載の単離された細胞。

【請求項 2 2】

上記細胞が、CD34、CD45、CD133、MHCクラスIおよびMHCクラスIからなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも 1つを発現しないことを特徴とする請求項 1_9 に記載の単離された幹細胞。

【請求項 2 3】

分化してインスリン産生性 細胞を形成することを特徴とする請求項 1_5 または 1_9 に記載の単離された幹細胞。

【請求項 2 4】

分化してグルカゴン産生性 細胞を形成することを特徴とする請求項 1_5 または 1_9 に記載の単離された幹細胞。

【請求項 2 5】

分化して偽島様集団を形成することを特徴とする請求項 1_5 または 1_9 に記載の単離された幹細胞。

【請求項 2 6】

分化して肝細胞を形成することを特徴とする請求項 1_5 または 1_9 に記載の単離された幹細胞。

【請求項 2 7】

脾細胞を幹細胞として同定する方法であって、

細胞を標識されたネスチン特異的抗体と接触させることによって、該細胞が該抗体で標識されるようになる場合に該細胞が幹細胞として同定されるステップを含む方法。

【請求項 2 8】

細胞を、ABC G 2、Oct 3 / 4、GLP - 1 レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes - 1、ネスチン、インテグリンサブユニット 6 および 1、C-kit、MDR - 1、SUR - 1 または Kir 6.2 からなる群より選択されるマーカーに結合する標識された抗体と接触させることによって、該細胞が該抗体で標識されるようになる場合に該細胞が幹細胞として同定されるステップをさらに含むことを特徴とする請求項 2_7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

上記細胞を、標識されたサイトケラチン - 19 特異的抗体と接触させることによって、該細胞が該抗体で標識されるようにならない場合に該細胞が幹細胞として同定されるステップをさらに含むことを特徴とする請求項 2_7 に記載の方法。

【請求項 3 0】

上記細胞を、標識されたIV型コラーゲン特異的抗体と接触させることによって、該細胞が該抗体で標識されるようにならない場合に該細胞が幹細胞として同定されるステップ、をさらに含むことを特徴とする請求項 2_7 に記載の方法。

【請求項 3 1】

上記細胞を、CD34、CD45、CD133、MHCクラスIおよびMHCクラスIからなる群より選択されるマーカーに結合する標識された抗体と接触させることによって、該細胞が該抗体で標識されるようにならない場合に該細胞が幹細胞として同定される

ステップをさらに含むことを特徴とする請求項2_7に記載の方法。

【請求項 3_2】

肝細胞に分化するようにネスチングポジティブな臍臓幹細胞を誘導する方法であって、該ネスチングポジティブな臍臓幹細胞を、肝細胞、または肝細胞に分化する前駆細胞に分化するように該幹細胞を誘導する有効量の因子で処理するステップを含む方法。

【請求項 3_3】

上記ネスチングポジティブな臍臓幹細胞がまた A B C G 2 ポジティブであることを特徴とする請求項3_2に記載の方法。

【請求項 3_4】

上記ネスチングポジティブな臍臓幹細胞がまた、Oct 3 / 4、GLP-1レセプター、ラトロフィリン(2型)、Hes-1、ネスチング、インテグリンサブユニット 6 および 1、C-kit、MDR-1、SUR-1またはKir 6.2からなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つについてポジティブであることを特徴とする請求項3_2に記載の方法。

【請求項 3_5】

上記ネスチングポジティブな臍臓幹細胞が、CD34、CD45、CD133、MHCクラスIおよびMHCクラスIIからなる群より選択されるマーカーのうちの少なくとも1つを発現しないことを特徴とする請求項3_2に記載の方法。

【請求項 3_6】

肝細胞に分化するようにA B C G 2 ポジティブな臍臓幹細胞を誘導する方法であって、該A B C G 2 ポジティブな臍臓幹細胞を、肝細胞、または肝細胞に分化する前駆細胞に分化するように該幹細胞を誘導する有効量の因子で処理するステップを含む方法。

【請求項 3_7】

上記因子がサイクロパミンであることを特徴とする請求項3_2または3_6に記載の方法。

。

【請求項 3_8】

生理学的に適合性のキャリアと混合された請求項1_5に記載の単離された幹細胞を含む薬学的組成物。

【請求項 3_9】

生理学的に適合性のキャリアと混合された請求項1_6に記載の単離された幹細胞を含む薬学的組成物。

【請求項 4_0】

生理学的に適合性のキャリアと混合された請求項1_9に記載の単離された幹細胞を含む薬学的組成物。

【請求項 4_1】

哺乳動物における器官移植の前に免疫寛容状態をあらかじめ誘導する方法であって、

(a) ネスチングポジティブな臍臓幹細胞をドナーの臍島から単離するステップと、
(b) 該ネスチングポジティブな臍臓幹細胞を移植レシピエントに移植するステップと、
(c) 該ドナーの幹細胞に対して該レシピエントにおいて免疫寛容状態を誘導するステップと、

(d) 免疫抑制剤の投与を伴わずに、該ドナーから該レシピエントに器官を移植するステップと、
を含む方法。

【請求項 4_2】

(a) ドナーから臍島を取り出すステップと、

(b) 培養した細胞が該島から転位したネスチングポジティブ細胞を含む条件下該臍島から細胞を培養するステップと、

(c) 該培養物から該ネスチングポジティブ細胞を選択するステップと
を含む臍臓のランゲルハンスの島から幹細胞を分離する方法。

【請求項 4_3】

該ステップ(b)からの転位細胞が単層を形成することを特徴とする請求項42に記載の方法。

【請求項44】

(a) 膵臓ランゲルハンス島から幹細胞取り出すステップと、
(b) 幹細胞でない細胞から該幹細胞を分離するステップと、
を含む胰臓のランゲルハンスの島から幹細胞を分離する方法。

【請求項45】

(a) ドナーから胰島を取り出すステップと、
(b) コンカナバリンAでコーティングした第一の容器中胰島からの細胞を培養するステップと、
(c) コンカナバリンAでコーティングしていない第二の容器にステップ(b)からの細胞を移動するステップと、
(d) 細胞培養物を生成するために該第二の容器においてステップ(c)からの細胞を培養するステップと、
(e) 単離した幹細胞を生成するために、ステップ(d)からネスチンポジティブ細胞を選択するステップと、
を含む胰臓のランゲルハンスの島から幹細胞を分離する方法。

【請求項46】

請求項5、42、44および45に記載の方法によって単離した、請求項15と19に記載の幹細胞。

【請求項47】

生理学上適宜な担体と混合した請求項46に記載の単離した幹細胞を含む医薬組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No. PCT/US02/30700												
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12Q 1/00; G01N 33/53; C12N 5/02; A61K 48/00 US CL : 435/4,7.1,325; 424/93.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC														
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/4,7.1,325; 424/93.1														
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched None														
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet														
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Category *</th> <th style="text-align: left;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 01/39784 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 07 June 2001 (07.06.2001), see entire document.</td> <td>1, 3-4, 6-11, 13-14, 16-21, 23-24, 26-31, 33-34, 36-37, 39, 41-42, 44-45, 47-48, 53-62, 67-68, 70-71, 73-74, 76-77, 79-80, 82-83, 85-86, 89</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>ZHOU, S. et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. Nat. Med. 01 September 2001, Vol. 7, No. 9, 1028-1034, see entire document.</td> <td>2, 5, 12, 15, 22, 25, 32, 35, 38, 40, 43, 46, 49-52, 63-66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87-88</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-89</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 01/39784 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 07 June 2001 (07.06.2001), see entire document.	1, 3-4, 6-11, 13-14, 16-21, 23-24, 26-31, 33-34, 36-37, 39, 41-42, 44-45, 47-48, 53-62, 67-68, 70-71, 73-74, 76-77, 79-80, 82-83, 85-86, 89	Y	ZHOU, S. et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. Nat. Med. 01 September 2001, Vol. 7, No. 9, 1028-1034, see entire document.	2, 5, 12, 15, 22, 25, 32, 35, 38, 40, 43, 46, 49-52, 63-66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87-88	Y		1-89
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.												
X	WO 01/39784 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 07 June 2001 (07.06.2001), see entire document.	1, 3-4, 6-11, 13-14, 16-21, 23-24, 26-31, 33-34, 36-37, 39, 41-42, 44-45, 47-48, 53-62, 67-68, 70-71, 73-74, 76-77, 79-80, 82-83, 85-86, 89												
Y	ZHOU, S. et al. The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. Nat. Med. 01 September 2001, Vol. 7, No. 9, 1028-1034, see entire document.	2, 5, 12, 15, 22, 25, 32, 35, 38, 40, 43, 46, 49-52, 63-66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87-88												
Y		1-89												
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input type="checkbox"/> See patent family annex.												
Special categories of cited documents: "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed														
Date of the actual completion of the international search 19 March 2003 (19.03.2003)	Date of mailing of the international search report <i>17 APR 2003</i>													
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer <i>Deborah Reynolds</i> Telephone No. 703-308-1235													

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/30700

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HUNZIKER, E. et al. Nestin-expressing cells in the pancreatic islets of langerhans. Biochem. Biophys. Res. Comm. April 2000, Vol. 271, No. 1, pages 116-119, see entire document.	45, 47-48, 53-56, 86 ----- 1-44, 46, 49-52, 57-85, 87-89

Y	CORNELIUS, J. G. et al. In vitro-generation of islets in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas. Horm. Met. Res. June 1997, Vol. 29, No. 6, pages 271-277, see entire document.	1-89

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/30700

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
DIALOG-Medline, Embase, Cancerlit, Scisearch, Biosis; BRS-EAST-EPO, JPO, Derwint, USPatfull
search terms: nestin, pancreatic stem cells, abcg2, mxr, bcrp, abc half-transporter, diabetes

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 45/00	C 1 2 N 5/00	E
A 6 1 P 3/10	A 6 1 K 37/02	
C 1 2 N 5/06	A 6 1 K 37/24	
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N0,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 トーマス、メリッサ ケイ。

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02114 ボストン ワン ロングフェロー プレイス

(72)発明者 アブラハム、エリザベス ジェイ。

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02169 クインシー ウティカ ストリート 119

(72)発明者 バレジヨ、マリオ

スペイン国 イー-28014 マドリッド 3ディ パセオ インファンタ イサベル 15

(72)発明者 リーチ、コリン エイ。

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02127 サウス ボストン ツドー ストリート 1
28 ディ

(72)発明者 ノラン、アンナ ルイス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02446 ブルックリン ハーバード アベニュー ナンバー4 40

(72)発明者 レチナー、アンドレアス

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 02109 ボストン ナンバー2 フォスター シーティ. 2

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA02 CA11 CA12 DA03 EA04 GA11 HA14
 4B065 AA90X AB01 AC14 BA02 BA21 BB16 BB19 BC41 CA24 CA44
 4C084 AA02 AA16 BA25 BA44 DB22 DB52 DB53 DB58 MA02 MA67
 MA70 NA14 ZB082 ZC351
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA02 MA67 MA70 NA14 ZC35
 4C087 AA01 AA02 BB51 BB63 MA02 MA67 MA70 NA14 ZC35

专利名称(译)	朗格汉斯胰岛干细胞及其在糖尿病治疗中的应用		
公开(公告)号	JP2005533746A	公开(公告)日	2005-11-10
申请号	JP2003530223	申请日	2002-09-26
[标]申请(专利权)人(译)	总医院集团		
申请(专利权)人(译)	总医院集团		
[标]发明人	ハベナージョエルエフ ズレウスキー・ヘンリク トーマス・メリッサ・ケイ アブラハム・エリザベス・ジェイ バレジヨ・マリオ リーチ・コリン・エイ ノラン・アン・ナルイス レチナー・アンドレアス		
发明人	ハベナ、ジョエル エフ. ズレウスキー、ヘンリク トーマス、メリッサ ケイ. アブラハム、エリザベス ジェイ. バレジヨ、マリオ リーチ、コリン エイ. ノラン、アン ルイス レチナー、アンドレアス		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K A61K31/436 A61K31/7088 A61K35/12 A61K35/39 A61K38/00 A61K38/22 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/10 C12N C12N5/02 C12N5/074 C12Q1/00 G01N33/53 C12N5/06		
CPC分类号	A01K67/0271 A61K35/12 A61K2035/122 A61P3/10 C12N5/0678 C12N2500/34 C12N2501/11 C12N2501/115 C12N2501/335 C12N2510/02		
FI分类号	A61K35/39.ZNA A61K31/436 A61K31/7088 A61K45/00 A61P3/10 C12N5/00.E A61K37/02 A61K37/24 C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B065/AA90X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA21 4B065/BB16 4B065/BB19 4B065/BC41 4B065/CA24 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA16 4C084/BA25 4C084/BA44 4C084/DB22 4C084/DB52 4C084/DB53 4C084/DB58 4C084/MA02 4C084/MA67 4C084/MA70 4C084/NA14 4C084/ZB082 4C084/ZC351 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/EA16 4C086/MA02 4C086/MA67 4C086/MA70 4C086/NA14 4C086/ZC35 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BB51 4C087/BB63 4C087/MA02 4C087/MA67 4C087/MA70 4C087/NA14 4C087/ZC35		
代理人(译)	三好秀		
优先权	09/963875 2001-09-26 US 10/120687 2002-04-11 US 10/136891 2002-05-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

使用各种胰岛细胞（包括产生胰岛素的β细胞）治疗I型胰岛素依赖性糖尿病和其他病症的方法和组合物以及新鉴定的可分化成肝细胞的干细胞被描述。巢蛋白和ABCG2已被鉴定为胰腺干细胞的分子标记，而细胞角蛋白19作为不同类胰岛的导管细胞的标记。从而描述如何从胰岛中分离和培养巢蛋白和/或ABCG2阳性干细胞以获得额外的干细胞或假胰岛样结构。公开了用于胰腺干细胞离体

分化的方法。由此将胰腺干细胞分离，扩增并移植为同种异体，同基因或异种的有需要的患者，以产生丢失或损伤的促胰岛素细胞或其他描述了可以提供细胞替代的方法。

【 图 1 B 】

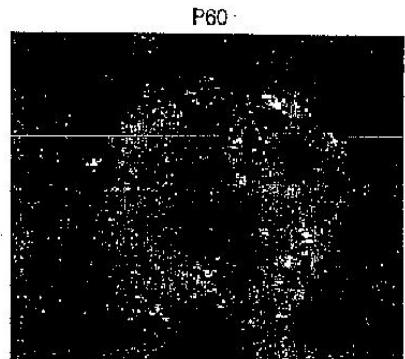


FIG. 1B