

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2007年4月12日 (12.04.2007)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2007/039986 A1

- (51) 国際特許分類:  
C12N 5/10 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)  
C12N 5/06 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)  
C12Q 1/02 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)  
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2006/316007
- (22) 国際出願日: 2006年8月14日 (14.08.2006)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2005-292613 2005年10月5日 (05.10.2005) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人大阪大学 (OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 松山 晃文 (MAT-SUYAMA, Akifumi) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 菟田 弘 (KOMODA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 澤 芳樹 (SAWA, Yoshiki) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 金倉 譲 (KANAKURA, Yuzuru) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 河宮 治, 外(KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書  
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF OBTAINING PANCREATIC ENDOCRINE CELLS FROM ADIPOSE TISSUE-ORIGIN CELLS

(54) 発明の名称: 脂肪組織由来細胞から膵内分泌細胞を得る方法

(57) Abstract: A method of obtaining pancreatic endocrine cells from cells originating in an adipose tissue characterized by comprising culturing the adipose tissue-origin cells; the pancreatic endocrine cells that can be obtained thereby; a method of treating or preventing a disease caused by the hypofunction in pancreatic endocrine cells wherein the above-described pancreatic endocrine cells are used; a method of screening a substance capable of promoting or inhibiting the differentiation into pancreatic endocrine cells characterized by comprising adding a candidate substance to a medium in the course of culturing adipose tissue-origin cells to obtain the pancreatic endocrine cells; and so on.

(57) 要約: 本発明は、脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から膵内分泌細胞を得る方法およびそれにより得ることのできる膵内分泌細胞、かかる膵内分泌細胞を用いた膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法、および脂肪組織由来細胞を培養して膵内分泌細胞を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とする、膵内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質のスクリーニング方法などに関する。

WO 2007/039986 A1

## 明 細 書

### 脂肪組織由来細胞から膵内分泌細胞を得る方法

#### 技術分野

[0001] 本発明は、脂肪組織由来細胞から膵内分泌細胞を得る方法およびそれにより得ることのできる膵内分泌細胞、かかる膵内分泌細胞を用いた膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法、膵内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法、ならびにそのためのキットなどに関する。

#### 背景技術

[0002] 糖尿病はインスリンの絶対的あるいは相対的作用不足により高血糖を生じる疾患群である。高血糖の持続は神経障害、網膜障害、腎障害、さらには動脈硬化性疾患を惹起するため、その予防治療は今日の医学にとって重要な標的の一つである。糖尿病は、その発症機序により1型糖尿病と2型糖尿病に二分される。1型糖尿病は膵 $\beta$ 細胞が自己免疫により破壊され消滅する疾患であり、インスリンの絶対的不足が特徴である。従って、インスリン療法が一般的であるが、一部ブリットル(Brittle)型などコントロールが難しいタイプも存在する。2型糖尿病は、インスリンの相対的作用不足を特徴とし、いわゆる代謝症候群に合併する。従って、その治療法は、主にインスリン作用を妨げているインスリン抵抗性を改善する薬剤、および膵 $\beta$ 細胞からのインスリン分泌を亢進させる薬剤の投与である。しかしながら、欧米における2型糖尿病患者においてはインスリン抵抗性が主要な病態であるのに対して、本邦における2型糖尿病患者においてはさらに膵 $\beta$ 細胞の疲弊、枯渇、消滅も認められるとされる。従って、本邦では1型糖尿病においても2型糖尿病においてもインスリンを補充する治療は欠くべからざるものである。

[0003] 最近になって、膵島移植が施行されるようになり、一部の症例でインスリンからの離脱、あるいはインスリンからの離脱には至らないまでもインスリンコントロールの改善が認められている(非特許文献1、2および3)。しかし、膵島移植には死体由来あるいは生体由来いずれにせよドナーが必要であるため、その医療資源は限られている。この問題点をクリアするために、膵島を再生する試みが開始された。そして近年、ES

細胞からの膵島の再生に成功したとの報告がなされている(非特許文献4)。しかし、これらの細胞由来のインスリン分泌細胞の移植は、膵島移植と同様にHLA不適合の問題が有ることに加え、倫理的問題、あるいは異種動物由来のウイルスまたは抗原が存在する可能性もある。また、確立されているES細胞の種類・量にも限界が有り、インスリン分泌細胞の移植を必要としている患者に行きわたらせるのは困難である。

[0004] 自己由来の体性幹細胞を用いて得られたインスリン分泌細胞であれば、HLA不適合の問題を考慮する必要はなく、また倫理的問題よりも医学的・社会的利益が大きいと考えられる。しかし、体性幹細胞から膵島の再生に成功したとの報告はなかった。

非特許文献1:Shapiro AM et al., N Engl J Med. 2000 Jul 27; 343(4): 289-90

非特許文献2:Ryan EA et al., Diabetes. 2005 Jul; 54(7): 2060-9

非特許文献3:Matsumoto S et al., Lancet. 2005 May 7-13; 365(9471): 1603-1604

非特許文献4:Segev H et al., Stem Cells 2004; 22: 265-274

## 発明の開示

### 発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の解決課題は、上述のような問題のない、糖尿病治療を提供することである。具体的には、脂肪組織由来細胞から膵内分泌細胞を得る方法およびそれにより得ることのできる膵内分泌細胞、膵内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法、ならびにそのためのキットなどを提供することにある。

### 課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは、上記事情に鑑み鋭意研究を重ねた結果、脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得て、該未分化細胞を膵前駆細胞、膵内分泌前駆細胞、前膵内分泌細胞へと分化させ、最終的に膵内分泌細胞を得られることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0007] すなわち、本発明は、

- (1)脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から膵内分泌細胞を得る方法、
- (2)脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程を含む、(1)記載の方法、
- (3)前膵内分泌細胞を膵内分泌細胞に分化させる工程をさらに含む、(2)記載の方

法、

- (4) (a) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得て、
- (b) 該未分化細胞を膵前駆細胞に分化させ、
- (c) 該膵前駆細胞を膵内分泌前駆細胞に分化させ、
- (d) 該膵内分泌前駆細胞を前膵内分泌細胞に分化させ、次に、
- (e) 該前膵内分泌細胞を膵内分泌細胞に分化させる、

工程を含む、(3)記載の方法、

(5) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程が、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させるものである、(2)から(4)のいずれか記載の方法、

(6) 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、(1)から(5)のいずれか記載の方法、

(7) 膵内分泌細胞が膵島を形成しているものである、(1)から(6)のいずれか記載の方法、

(8) (1)から(7)のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵内分泌細胞、

(9) インスリン分泌細胞である、(8)記載の細胞、

(10) 膵島を形成しているものである、(8)または(9)記載の細胞、

(11) (1)から(7)のいずれか記載の方法により得ることのできる膵内分泌細胞を対象に投与することを特徴とする、膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法、

(12) 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、(11)記載の方法、

(13) 膵内分泌細胞が膵島を形成しているものである、(11)または(12)記載の方法、

、

(14) 疾病が糖尿病である、(11)から(13)のいずれか記載の方法、

(15) 脂肪組織由来細胞を培養して膵内分泌細胞を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、膵内分泌細胞への分化が、候補物質不含系における分化と比較して促進されている場合に、該候補物質が膵内分泌細胞への分化を促進する物質であることを示す、膵内分泌細胞への分化を促進する物質をスクリーニングする

方法、

(16) 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、(15)記載の方法、

(17) 膵内分泌細胞が膵島を形成しているものである、(15)または(16)記載の方法

、  
(18) (15)から(17)のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵内分泌細胞への分化を促進する物質、

(19) 脂肪組織由来細胞を培養して膵内分泌細胞を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、膵内分泌細胞への分化が、候補物質不含系における分化と比較して抑制されている場合に、該候補物質が膵内分泌細胞への分化を抑制する物質であることを示す、膵内分泌細胞への分化を抑制する物質をスクリーニングする方法、

(20) 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、(19)記載の方法、

(21) 膵内分泌細胞が膵島を形成しているものである、(19)または(20)記載の方法

、  
(22) (19)から(21)のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵内分泌細胞への分化を抑制する物質、

(23) (15)から(17)、または(19)から(21)のいずれか記載の方法に用いられる、膵内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングするためのキット、

(24) 脂肪組織由来細胞を培養して得られた膵内分泌細胞を候補物質を含む培地中で培養し、膵内分泌細胞から分泌される物質の量が、候補物質不含系における量と比較して、変化している場合に、該候補物質が膵内分泌細胞の活性を上昇させる物質であることを示す、膵内分泌細胞の活性を上昇させる物質をスクリーニングする方法、

(25) 膵内分泌細胞から分泌される物質が、インスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン、または膵ペプチドである、(24)記載の方法、

(26) 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、(24)または(25)記載の方法、

(27) 膵内分泌細胞が膵島を形成しているものである、(24)から(26)のいずれか記載の方法、

(28) (24)から(27)のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵内分泌細胞の活性を上昇させる物質、

(29) 脂肪組織由来細胞を培養して得られた膵内分泌細胞を候補物質を含む培地中で培養し、膵内分泌細胞から分泌される物質の量が、候補物質不含系における量と比較して、変化している場合に、該候補物質が膵内分泌細胞の活性を低下させる物質であることを示す、膵内分泌細胞の活性を低下させる物質をスクリーニングする方法、

(30) 膵内分泌細胞から分泌される物質が、インスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン、または膵ペプチドである、(29)記載の方法、

(31) 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、(29)または(30)記載の方法、

(32) 膵内分泌細胞が膵島を形成しているものである、(29)から(31)のいずれか記載の方法、

(33) (29)から(32)のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵内分泌細胞の活性を低下させる物質、

(34) (24)から(27)、または(29)から(32)のいずれか記載の方法に用いられる、膵内分泌細胞の活性を上昇または低下させる物質をスクリーニングするためのキット、

(35) 脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から膵島を得る方法、

(36) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程を含む、(35)記載の方法、

(37) 前膵内分泌細胞から膵島を形成させる工程をさらに含む、(36)記載の方法、

(38) (a) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得て、

(b) 該未分化細胞を膵前駆細胞に分化させ、

(c) 該膵前駆細胞を膵内分泌前駆細胞に分化させ、

(d) 該膵内分泌前駆細胞を前膵内分泌細胞に分化させ、次に、

(e) 該前膵内分泌細胞から膵島を形成させる、

工程を含む、(37)記載の方法、

(39) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程が、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させるものである、(36)から(38)の

いずれか記載の方法、

(40) 前膵内分泌細胞から膵島を形成させる工程が、前膵内分泌細胞を膵内分泌細胞に分化させ、該膵内分泌細胞から膵島を形成させるものである、(37)から(39)のいずれか記載の方法、

(41) 膵島が膵内分泌細胞を含むものである、(35)から(40)のいずれか記載の方法、

(42) 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、(41)記載の方法、

(43) (35)から(42)のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵島、

(44) (43)記載の膵島に含まれる、膵内分泌細胞、

(45) インスリン分泌細胞である、(44)記載の細胞、

(46) (35)から(42)のいずれか記載の方法により得ることのできる膵島を対象に投与することを特徴とする、膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法、

(47) 膵島が膵内分泌細胞を含むものである、(46)記載の方法、

(48) 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、(47)記載の方法、

(49) 疾病が糖尿病である、(46)から(48)のいずれか記載の方法、

(50) 脂肪組織由来細胞を培養して膵島を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、膵島の形成が、候補物質不含系における形成と比較して促進されている場合に、該候補物質が膵島の形成を促進する物質であることを示す、膵島の形成を促進する物質をスクリーニングする方法、

(51) 膵島が膵内分泌細胞を含むものである、(50)記載の方法、

(52) 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、(51)記載の方法、

(53) (50)から(52)のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵島の形成を促進する物質、

(54) 脂肪組織由来細胞を培養して膵島を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、膵島の形成が、候補物質不含系における形成と比較して抑制されている場合に、該候補物質が膵島の形成を抑制する物質であることを示す、膵島の形成を抑制する物質をスクリーニングする方法、

- (55) 膵島が膵内分泌細胞を含むものである、(54) 記載の方法、
- (56) 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、(55) 記載の方法、
- (57) (54) から (56) のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵島の形成を抑制する物質、
- (58) (50) から (52)、または (54) から (56) 記載の方法に用いられる、膵島の形成を促進または抑制する物質をスクリーニングするためのキット、
- (59) 脂肪組織由来細胞を培養して得られた膵島を候補物質を含む培地中で培養し、膵島から分泌される物質の量が、候補物質不含系における量と比較して、変化している場合に、該候補物質が膵島の活性を上昇させる物質であることを示す、膵島の活性を上昇させる物質をスクリーニングする方法、
- (60) 膵島から分泌される物質が、インスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン、または膵ペプチドである、(59) 記載の方法、
- (61) 膵島が膵内分泌細胞を含むものである、(59) または (60) 記載の方法、
- (62) 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、(61) 記載の方法、
- (63) (59) から (62) のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵島の活性を上昇させる物質、
- (64) 脂肪組織由来細胞を培養して得られた膵島を候補物質を含む培地中で培養し、膵島から分泌される物質の量が、候補物質不含系における量と比較して、変化している場合に、該候補物質が膵島の活性を低下させる物質であることを示す、膵島の活性を低下させる物質をスクリーニングする方法、
- (65) 膵島から分泌される物質が、インスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン、または膵ペプチドである、(64) 記載の方法、
- (66) 膵島が膵内分泌細胞を含むものである、(64) または (65) 記載の方法、
- (67) 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、(66) 記載の方法、
- (68) (64) から (67) のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵島の活性を低下させる物質、
- (69) (59) から (62)、または (64) から (67) のいずれか記載の方法に用いられる、膵島の活性を上昇または低下させる物質をスクリーニングするためのキット、



- (70) 脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る方法、
- (71) 培養が、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させるものである、(70)記載の方法、
- (72) (70)または(71)記載の方法により得ることのできる、未分化細胞、
- (73) (70)または(71)記載の方法により得ることのできる未分化細胞を対象に投与することを特徴とする、膵臓、肝臓、または心臓の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法、
- (74) 脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から膵前駆細胞を得る方法、
- (75) (a) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得て、次に、  
(b) 該未分化細胞を膵前駆細胞に分化させる、  
工程を含む、(74)記載の方法、
- (76) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程が、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させるものである、(75)記載の方法、
- (77) (74)から(76)のいずれか記載の方法により得ることのできる膵前駆細胞、
- (78) (74)から(76)のいずれか記載の方法により得ることのできる膵前駆細胞を対象に移植することを特徴とする、膵臓の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法、
- (79) 脂肪組織由来細胞を培養して膵前駆細胞を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、膵前駆細胞への分化が、候補物質不含系における分化と比較して促進または抑制されている場合に、該候補物質が膵前駆細胞への分化を促進または抑制する物質であることを示す、膵前駆細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法、
- (80) (79)記載の方法により得ることのできる、膵前駆細胞への分化を促進または抑制する物質、
- (81) (79)記載の方法に用いられる、膵前駆細胞への分化を促進または抑制する物

質をスクリーニングするためのキット、

(82) 脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から腩内  
分泌前駆細胞を得る方法、

(83) (a) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得て、

(b) 該未分化細胞を腩前駆細胞に分化させ、次に、

(c) 該腩前駆細胞を腩内分泌前駆細胞に分化させる、

工程を含む、(82)記載の方法、

(84) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程が、脂肪組織由来細胞を浮遊  
化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させるものである、(83)記載の方法

、

(85) (82)から(84)のいずれか記載の方法により得ることのできる、腩内分泌前駆  
細胞、

(86) (82)から(84)のいずれか記載の方法により得ることのできる、腩内分泌前駆  
細胞を対象に投与することを特徴とする、腩内分泌細胞の機能低下により生じる疾病  
の治療または予防方法、

(87) 脂肪組織由来細胞を培養して腩内分泌前駆細胞を得る際に、候補物質を培地  
に添加することを特徴とし、腩内分泌前駆細胞への分化が、候補物質不含系におけ  
る分化と比較して促進または抑制されている場合に、該候補物質が腩内分泌前駆細  
胞への分化を促進または抑制する物質であることを示す、腩内分泌前駆細胞への分  
化を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法、

(88) (87)記載の方法により得ることのできる、腩内分泌前駆細胞への分化を促進ま  
たは抑制する物質、

(89) (87)記載の方法に用いられる、腩内分泌前駆細胞への分化を促進または抑  
制する物質をスクリーニングするためのキット、

(90) 脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から前腩  
内分泌細胞を得る方法、

(91) (a) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得て、

(b) 該未分化細胞を腩前駆細胞に分化させ、

- (c) 該腩前駆細胞を腩内分泌前駆細胞に分化させ、
- (d) 該腩内分泌前駆細胞を前腩内分泌細胞に分化させる、
- 工程を含む、(90)記載の方法、
- (92) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程が、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させるものである、(91)記載の方法、
- (93) (90)から(92)のいずれか記載の方法により得ることのできる、前腩内分泌細胞、
- (94) (90)から(92)のいずれか記載の方法により得ることのできる、前腩内分泌細胞を対象に投与することを特徴とする、腩内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法、
- (95) 脂肪組織由来細胞を培養して前腩内分泌細胞を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、前腩内分泌細胞への分化が、候補物質不含系における分化と比較して促進または抑制されている場合に、該候補物質が前腩内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質であることを示す、前腩内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法、
- (96) (95)記載の方法により得ることのできる、前腩内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質、
- (97) (95)記載の方法に用いられる、前腩内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングするためのキット、
- を提供するものである。

### 発明の効果

- [0008] 本発明により、脂肪組織由来細胞から腩内分泌細胞を得る方法およびそれにより得ることのできる腩内分泌細胞、かかる腩内分泌細胞を用いた腩内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法、腩内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法、ならびにそのためのキットなどが提供される。それゆえ本発明の好ましい態様によれば、同一種、あるいは同一個体由来の組織や細胞から腩内分泌細胞が得られるので、上で述べた種々の問題点を解決すること

ができる。

### 図面の簡単な説明

- [0009] [図1]図1は、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、形成されたアディポスフェアの顕微鏡像である。スケールバーは502  $\mu$  mである。
- [図2]図2は、アディポスフェアから誘導された膵前駆細胞の顕微鏡像である。スケールバーは502  $\mu$  mである。
- [図3]図3は、得られた膵島の顕微鏡像である。スケールバーは100  $\mu$  mである。
- [図4]図4は、ステージI～VIの細胞由来のRNAを用いたRT-PCRの結果を示す電気泳動像である。
- [図5a]図5aは、膵島に含まれるC-ペプチド陽性細胞を免疫染色により示す顕微鏡像である。
- [図5b]図5bは、膵島におけるC-ペプチド陽性細胞の存在を示す模式図である。
- [図6a]図6aは、膵島に含まれるインスリン陽性細胞を免疫染色により示す顕微鏡像である。
- [図6b]図6bは、膵島におけるインスリン陽性細胞の存在を示す模式図である。
- [図7a]図7aは、膵島に含まれるC-ペプチド陽性細胞およびインスリン陽性細胞を免疫染色により示す顕微鏡像である。C-ペプチドとインスリンが共存する細胞の一部を矢頭で示す。
- [図7b]図7bは、膵島におけるC-ペプチド陽性細胞の存在を左下斜線により、インスリン陽性細胞の存在を右下斜線により示す模式図である。両方の斜線が重なっている部分がC-ペプチドとインスリンが共存する細胞である。
- [図8a]図8aは、膵島に含まれるグルカゴン陽性細胞を免疫染色により示す顕微鏡像である。
- [図8b]図8bは、膵島におけるグルカゴン陽性細胞の存在を示す模式図である。
- [図9a]図9aは、膵島に含まれるインスリン陽性細胞を免疫染色により示す顕微鏡像である。
- [図9b]図9bは、膵島におけるインスリン陽性細胞の存在を示す模式図である。
- [図10a]図10aは、膵島に含まれるグルカゴン陽性細胞およびインスリン陽性細胞を

免疫染色により示す顕微鏡像である。

[図10b]図10bは、膵島におけるグルカゴン陽性細胞の存在を左下斜線により、インスリン陽性細胞の存在を右下斜線により示す模式図である。

[図11a]図11aは、膵島に含まれるソマトスタチン陽性細胞を免疫染色により示す顕微鏡像である。

[図11b]図11bは、膵島におけるソマトスタチン陽性細胞の存在を示す模式図である。

[図12a]図12aは、膵島に含まれるインスリン陽性細胞を免疫染色により示す顕微鏡像である。

[図12b]図12bは、膵島におけるインスリン陽性細胞の存在を示す模式図である。

[図13a]図13aは、膵島に含まれるソマトスタチン陽性細胞およびインスリン陽性細胞を免疫染色により示す顕微鏡像である。ソマトスタチンとインスリンが共存する細胞の一部を矢頭で示す。

[図13b]図13bは、膵島におけるソマトスタチン陽性細胞の存在を左下斜線により、インスリン陽性細胞の存在を右下斜線により示す模式図である。両方の斜線が重なっている部分がソマトスタチンとインスリンが共存する細胞である。

[図14]図14は、得られた膵島によるインスリン分泌量を示すグラフである。3.3mM グルコース下での分泌量を黒色で、16.7mM グルコース下での分泌量を白色で表す。

[図15]図15は、16.7mM グルコース下でのC-ペプチド分泌量を示すグラフである。

[図16]図16は、3.3mM グルコース下でのインスリン分泌指数を示すグラフである。

[図17]図17は、インスリン分泌促進物質が膵島のインスリン分泌を促進することを示すグラフである。3.3mM グルコース下での分泌量を黒色で、16.7mM グルコース下での分泌量を白色で表す。

[図18]図18は、膵島の移植による血糖値の低下を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

[0010] 本発明は、1の態様において、脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂

脂肪組織由来細胞から膵内分泌細胞を得る方法に関するものである。本発明は、遺伝子組換えを行うことなく、培養液の組成をはじめとする培養条件の操作を主体として膵内分泌細胞を得ることができる点で非常に優れている。脂肪組織由来細胞とは、内臓脂肪組織または皮下脂肪組織から得られる細胞または細胞集団、あるいは間葉系幹細胞、ES細胞の様な幹細胞から分化誘導された生体内の脂肪組織に含まれる細胞に類似した細胞または細胞集団をいう。通常には、脂肪組織由来細胞とは、脂肪組織由来幹細胞、脂肪組織由来間質細胞、脂肪前駆細胞またはこれらに類似する細胞のいずれか、あるいはこれら全てまたは一部からなる混合物を含む細胞集団をいう。脂肪組織由来細胞は、当業者に公知の手段・方法により脂肪組織などから得ることができる。さらに、得られた脂肪組織由来細胞を、当業者に公知の手段・方法を用いて増殖させ、例えば、形質を安定させてもよい。脂肪組織由来細胞を、デキサメサゾンおよびアスコルビン酸を含む培地、例えば、60% DMEM(低グルコース)、40% MCDB201、ITS(10.0ng/L インスリン、5.5mg/L トランスフェリン、6.7mg 亜セレン酸ナトリウム)、10ng/mL EGF、1nM デキサメサゾン、0.1mM アスコルビン酸、および5% FCSを含む培地中、フィブロネクチンコートディッシュなどの培養器にて培養することにより、脂肪組織由来細胞を増殖させてもよい。

[0011] 脂肪組織由来細胞が由来する動物種は、特に限定されず、好ましくは、例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、サルなどを含む哺乳類、より好ましくは、ヒトである。疾病を治療または予防すべき動物種と同一の動物種、あるいは同一個体の脂肪組織由来細胞を用いることがより好ましい。脂肪組織は生体内に十分量存在し、比較的容易に得られるため、例えば、死体などの限られた材料から膵島を得る方法などと比較して、本発明は非常に優れている。例えば、自己由来の脂肪組織由来細胞を用いて本発明の上記方法を行い、得られた膵内分泌細胞を自己移植することで、拒絶反応を危惧することなく、糖尿病を治療することなどが可能になる。

[0012] 膵内分泌細胞とは、インスリン分泌細胞、グルカゴン分泌細胞、ソマトスタチン分泌細胞、膵ペプチド分泌細胞などの膵島を構成する内分泌細胞、およびそれに類似する機能・形態を有する細胞をいう。本発明において、膵内分泌細胞は膵島を形成しているものであってもよい。

[0013] 本発明の、脂肪組織由来細胞からの膵内分泌細胞の取得方法は、重要な工程として、脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程(下記工程(a))を含むことが好ましい。未分化細胞とは、多種多様な細胞、例えば、膵前駆細胞、肝前駆細胞、心筋前駆細胞などに分化することのできる細胞をいう。未分化細胞を得る工程は、得られた未分化細胞を増殖させる工程をさらに含んでもよい。未分化細胞を増殖させることで、膵内分泌細胞への分化効率を増大させ、得られる膵内分泌細胞の数を増加させることなどが可能である。未分化細胞を得る工程は、例えば、ソーティング、MACS、ロゼッタ形成法などの抗原抗体反応による方法、密度勾配法、形態的に選別する方法、単一細胞クローン化などの既知の方法を用いて行われてもよいし、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させることにより行われてもよい。すでに分化した細胞を死滅させ、かつ未分化細胞を生存・増殖させることが可能であるため、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させることが好ましい。ここで、アディポスフェアとは、未分化細胞を主成分として含む球状体であると定義する。アディポスフェアの形成と次の膵前駆細胞への分化は、連続してまたは同時に生じ得るので、アディポスフェアは未分化細胞の他に膵前駆細胞を含んでもよい。

[0014] 上述の脂肪組織由来細胞の浮遊化状態での培養は、培養容器や他の細胞との接着あるいは凝集を防止あるいは抑制して遊離した状態に置いて、細胞を培養することを意味する。細胞の浮遊化は種々の公知の手段・方法で行うことができる。例えば、細胞の接着を防止あるいは抑制するように処理された、あるいは細胞の接着を防止あるいは抑制するような材料で作られた培養容器または装置を用いて細胞を浮遊化状態においてもよい。培養容器または装置としては、シリコン処理された培養容器(例えば、シリコン化フラスコ)または低接着性培養ディッシュ(例えば、ハイドロセル(CellSeed))のごとき低接着性培養容器などがある。あるいはハンギング・ドロップ培養法を用いて細胞を浮遊化させた状態で培養してもよい。また、浮遊化の開始時点において、あるいは浮遊化を継続させるために、適宜、公知の手段・方法を併用してもよい。かかる手段・方法の例としては、トリプシン/EDTA、コラゲナーゼ、Cell Dissociation Buffer(GIBCO Invitrogen)などの酵素またはキレート剤により細胞を遊離させ

ること、スクレーパーなどを用いて物理的に細胞を掻き取ること、あるいは細胞回収用温度応答性培養器材(例えば、レプセル(CellSeed))にて細胞を培養後、例えば、20°Cで30分間インキュベーションして細胞を剥離させる方法などがある。脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養することにより、上記アディポスフェアが形成される。

[0015] 本発明の、脂肪組織由来細胞からの膵内分泌細胞の取得方法はまた、重要な工程として、前膵内分泌細胞を膵内分泌細胞に分化させる工程(下記工程(e))をさらに含むことが好ましい。

[0016] さらに本発明の上記方法は、

- (a) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得て、
  - (b) 該未分化細胞を膵前駆細胞に分化させ、
  - (c) 該膵前駆細胞を膵内分泌前駆細胞に分化させ、
  - (d) 該膵内分泌前駆細胞を前膵内分泌細胞に分化させ、次に、
  - (e) 該前膵内分泌細胞を膵内分泌細胞に分化させる、
- 工程を含むものであってもよい。

[0017] 膵前駆細胞は、未分化細胞から得ることのできる細胞であって、膵内分泌前駆細胞および膵外分泌前駆細胞などへの分化能を有する細胞である。未分化細胞からの膵前駆細胞の誘導は、当業者に公知の手段・方法を用いて未分化細胞を培養することにより、行うことができる。例えば、未分化細胞を、DMEM/F-12(1:1)、ITS(10mg/L インスリン、6.7mg/L トランスフェリン、および5.5mg/L セレニウム)、1mM グルタミン、および5 $\mu$ g/mL ヒトフィブロネクチンを含む培地中、プラスチック培養プレートにて培養することにより、膵前駆細胞を誘導してもよい。

[0018] 膵内分泌前駆細胞は、膵前駆細胞から得ることのできる細胞であって、前膵内分泌細胞への分化能を有する細胞である。膵前駆細胞から膵内分泌前駆細胞への分化は、膵前駆細胞を、当業者に公知の手段・方法を用いて培養することにより、行うことができる。例えば、膵前駆細胞を、DMEM/F-12(1:1)、N2(GIBCO Invitrogen)およびB27(GIBCO Invitrogen)、1mM グルタミン、および10ng/mL bFGFを含む培地中、0.1%ゼラチンコートプラスチック組織培養プレートにて培養すること



により、膵前駆細胞を膵内分泌前駆細胞に分化させてもよい。

[0019] 前膵内分泌細胞は、膵内分泌前駆細胞から得ることのできる細胞であって、膵内分泌細胞であるインスリン分泌細胞、グルカゴン分泌細胞、ソマトスタチン分泌細胞、膵ペプチド分泌細胞などにそれぞれコミットしている細胞をいい、詳細には、インスリン遺伝子、グルカゴン遺伝子、ソマトスタチン遺伝子、または膵ペプチド遺伝子の発現は見られないが、例えば、Pdx-1、Islet-1、Pax4、Pax6などの転写因子、ネスチンなどの発現が見られる細胞である。かかる前膵内分泌細胞は、本発明の方法における膵内分泌前駆細胞から膵内分泌細胞への分化過程で得ることのできる細胞である。膵内分泌前駆細胞から前膵内分泌細胞への分化は、膵内分泌前駆細胞を、当業者に公知の手段・方法を用いて培養することにより、行うことができる。例えば、膵内分泌前駆細胞を、エキセンディン4を含む培地、例えば、DMEM(グルコース不含)/F-12(1:1)、N2およびB27、1mM グルタミン、10mM ニコチンアミド、および10nM エキセンディン4を含む培地中で培養することにより、膵内分泌前駆細胞を前膵内分泌細胞に分化させてもよい。

[0020] 前膵内分泌細胞の膵内分泌細胞への分化は、当業者に公知の手段・方法により行うことができる。例えば、DMEM(グルコース不含)/F-12(1:1)、N2およびB27、1mM グルタミン、10mM ニコチンアミド、および10nM エキセンディン4を含む培地中、低接着培養ディッシュにて前膵内分泌細胞を培養することにより、膵内分泌細胞に分化させてもよい。

[0021] 上述の通り、得られた膵内分泌細胞は膵島を形成していてもよい。膵島は、前膵内分泌細胞を膵内分泌細胞に分化させる際、あるいは前膵内分泌細胞を膵内分泌細胞に分化させた後、例えば、細胞を浮遊化させた状態で培養することにより形成される。

[0022] 本発明は、もう1つの態様において、上記方法により得ることのできる膵内分泌細胞に関するものである。例えば、糖尿病またはその素因を有する対象または該対象と同種のもの脂肪組織から採取した細胞を用いて上記方法を行い、得られた膵内分泌細胞を該対象に移植することで、糖尿病を治療または予防することなどが可能である。本発明のこの態様の膵内分泌細胞は、上述の通り膵島を形成しているものであつ

てもよい。

[0023] 本発明のなお別の態様は、上記培養方法により得ることのできる膵内分泌細胞を対象に投与することを特徴とする、膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法に関するものである。膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病とは、膵内分泌細胞の機能低下のみならず機能不全により生じる疾病を含み、例えば、糖尿病およびそれにより惹起される疾病、膵癌術後糖尿病、高脂血症、膵嚢胞症、慢性膵炎、および急性膵炎後遺症などである。糖尿病により惹起される疾病とは、高血糖の持続により惹起される疾病を含み、例えば、神経障害、網膜障害、腎障害、動脈硬化性疾患、心筋梗塞等冠動脈疾患、脳血管障害等である。拒絶反応等の点から、好ましくは、同一種、あるいは自己の脂肪組織由来細胞から得ることのできる膵内分泌細胞が用いられる。投与の手段・方法は、種々の因子に応じて適宜選択され得る。例えば、対象の門脈に膵内分泌細胞を注入してもよいし、腎被膜下に移植してもよいし、あるいは皮下・筋肉内などに移植してもよい。膵内分泌細胞の投与量、投与回数等は、例えば、対象の状態、疾病の重篤度等の種々の因子に応じて適宜選択される。

[0024] 本発明は、別の態様において、脂肪組織由来細胞を培養して膵内分泌細胞を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、膵内分泌細胞への分化が、候補物質不含系における分化と比較して促進されている場合に、該候補物質が膵内分泌細胞への分化を促進する物質であることを示す、膵内分泌細胞への分化を促進する物質をスクリーニングする方法に関するものである。

[0025] 候補物質としては種々のものがあり、例えば、GLP-1、エキセンディン4のアナログ、それらの誘導体、または変異体などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0026] 脂肪組織由来細胞から膵内分泌細胞を得る際の候補物質の培地への添加は、いずれの段階において1回または複数回行われてもよい。例えば、脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る際、未分化細胞を膵前駆細胞に分化させる際、膵前駆細胞を膵内分泌前駆細胞に分化させる際、膵内分泌前駆細胞を前膵内分泌細胞に分化させる際、および／または前膵内分泌細胞を膵内分泌細胞に分化させる際に、候補物質を培地に添加してもよい。

- [0027] 膵内分泌細胞への分化は、例えば、顕微鏡観察により誘導された膵内分泌細胞の数を計測すること、培養上清中に分泌されたインスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ペプチドを例えば、ELISAを用いて定量すること、インスリン遺伝子、グルカゴン遺伝子、ソマトスタチン遺伝子、膵ペプチド遺伝子の発現を定量的PCRにより測定すること、あるいは膵内分泌細胞への分化に伴い発現が減少または増加することが分かっているマーカー物質、例えば、IAPP、Pdx-1、Islet-1、Nkx6.1、PC1/3、およびPC2などを定量的PCRまたはELISAなどにより測定することなどにより、調べることができる。あるいは、未分化細胞から膵前駆細胞への分化、膵前駆細胞から膵内分泌前駆細胞への分化、膵内分泌前駆細胞から前膵内分泌細胞への分化、前膵内分泌細胞から膵内分泌細胞への分化を調べることにより間接的に行ってもよい。未分化細胞から膵前駆細胞への分化、膵前駆細胞から膵内分泌前駆細胞への分化、膵内分泌前駆細胞から前膵内分泌細胞への分化、前膵内分泌細胞から膵内分泌細胞への分化を調べる手段・方法を、当業者は適宜選択し、用いることができる。
- [0028] 従って、本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることのできる、膵内分泌細胞への分化を促進する物質に関するものである。かかる物質を本発明の脂肪組織由来細胞から膵内分泌細胞を得る方法に用いて、得られる膵内分泌細胞数を増加させてもよいし、膵内分泌細胞への分化速度を増大させてもよい。また、かかる物質を、膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防に用いてもよい。
- [0029] 本発明のさらに別の態様は、膵内分泌細胞への分化を抑制する物質のスクリーニング方法である。すなわち、上記スクリーニング方法において、候補物質の存在下において、膵内分泌細胞への分化の抑制が見られる場合は、候補物質は膵内分泌細胞への分化を抑制する物質であることが示される。候補物質としては、種々のものがあり、例えば、ステロイドホルモンのアナログ、誘導體、または変異体等が挙げられるが、これらに限定されない。かかるスクリーニング方法により得ることのできる物質は、例えば、膵機能亢進症、インスリノーマなどの膵内分泌細胞の機能亢進により生じる疾病の治療または予防に適していると考えられる。

- [0030] 従って、本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることのできる、膵内分泌細胞への分化を抑制する物質に関するものである。
- [0031] 本発明は、なおさらに別の態様において、膵内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングするための上記方法に用いられるキットに関するものである。本発明のキットは、脂肪組織からの細胞取得手段、培地、培養容器、並びに膵内分泌細胞への分化を調べる手段等を含んでいてもよい。通常には、取扱説明書をキットに添付する。かかるキットを用いて、上記スクリーニングを迅速かつ容易に行うことができる。
- [0032] 本発明は、もう1つの態様において、脂肪組織由来細胞を培養して得られた膵内分泌細胞を候補物質を含む培地中で培養し、膵内分泌細胞から分泌される物質の量が、候補物質不含系における量と比較して、変化している場合に、該候補物質が膵内分泌細胞の活性を上昇させる物質であることを示す、膵内分泌細胞の活性を上昇させる物質をスクリーニングする方法に関するものである。膵内分泌細胞の活性とは、膵内分泌細胞のインスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ペプチドなどを産生・分泌する作用、および膵内分泌細胞の糖反応性、詳細には、糖濃度に応じてインスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ペプチドなどの分泌量を調節する作用などをいう。膵内分泌細胞から分泌される物質とは、インスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ペプチドなどをいい、かかる物質の量が変化しているとは、該物質が膵内分泌細胞の活性の上昇に伴い増大するものであるときは、増大していることを、逆に該物質が膵内分泌細胞の活性の低下に伴い減少するものであるときは、減少していることをいう。
- [0033] 膵内分泌細胞の活性の上昇は、例えば、培養上清中に分泌されたインスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ペプチドをELISAなどを用いて定量すること、インスリン遺伝子、グルカゴン遺伝子、ソマトスタチン遺伝子、膵ペプチド遺伝子の発現を定量的PCRにより測定することなどにより、調べることができる。候補物質としては種々のものがあり、例えば、テオフィリン、IBMX、トルブタミド、カルバコールのアナログ、その誘導体、または変異体などが挙げられるが、これらに限定されない。
- [0034] 従って、本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることの

できる、膵内分泌細胞の活性を上昇させる物質に関するものである。かかる物質を、膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防に用いてもよい。

[0035] 本発明のさらに別の態様は、膵内分泌細胞の活性を低下させる物質のスクリーニング方法である。すなわち、上記スクリーニング方法において、候補物質の存在下において、膵内分泌細胞の活性の低下が見られる場合は、候補物質は膵内分泌細胞の活性を低下させる物質であることが示される。候補物質としては、種々のものがあり、例えば、ニフェジピンのようなCa遮断薬、あるいはそのアナログ、誘導體、または変異体等が挙げられるが、これらに限定されない。かかるスクリーニング方法により得ることのできる物質は、例えば、膵機能亢進症、インスリノーマなどの膵内分泌細胞の機能亢進により生じる疾病の治療または予防に適していると考えられる。

[0036] 従って、本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることのできる、膵内分泌細胞の活性を低下させる物質に関するものである。

[0037] 本発明は、なおさらに別の態様において、膵内分泌細胞の活性を上昇または低下させる物質をスクリーニングするための上記方法に用いられるキットに関するものである。本発明のキットは、膵内分泌細胞を培養するための培地、培養容器、並びに膵内分泌細胞の活性を調べる手段等を含んでいてもよい。通常には、取扱説明書をキットに添付する。かかるキットを用いて、上記スクリーニングを迅速かつ容易に行うことができる。

[0038] 本発明は、もう1つの態様において、脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から膵島を得る方法に関するものである。本発明は、遺伝子組換えを行うことなく、培養液の組成をはじめとする培養条件の操作を主体として膵島を得ることができる点で非常に優れている。

[0039] 膵島とは、生体内の膵島、およびそれに類似する機能・形態を有する細胞塊をいい、例えば、インスリン分泌細胞、グルカゴン分泌細胞、ソマトスタチン分泌細胞、膵ペプチド分泌細胞などの膵内分泌細胞、およびそれに類似する機能を有する細胞などを含む。従って、本発明のこの態様の方法は、膵島に含まれる膵内分泌細胞、および膵内分泌細胞を構成するインスリン分泌細胞、グルカゴン分泌細胞、ソマトスタチン分泌細胞、膵ペプチド分泌細胞などを得ることを包含する。本発明の膵島は、個々

の細胞と比べ、十分な量のインスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ペプチドなどを産生・分泌できる点で非常に優れているだけでなく、既知の膵島移植方法を用いて容易に生体内に移植することができる。

[0040] 本発明の、脂肪組織由来細胞からの膵島の取得方法は、重要な工程として、脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程(下記工程(a))を含むことが好ましい。

[0041] 本発明の、脂肪組織由来細胞からの膵内分泌細胞の取得方法はまた、重要な工程として、前膵内分泌細胞から膵島を形成させる工程(下記工程(e))をさらに含むことが好ましい。

[0042] さらに本発明の上記方法は、

- (a) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得て、
  - (b) 該未分化細胞を膵前駆細胞に分化させ、
  - (c) 該膵前駆細胞を膵内分泌前駆細胞に分化させ、
  - (d) 該膵内分泌前駆細胞を前膵内分泌細胞に分化させ、次に、
  - (e) 該前膵内分泌細胞から膵島を形成させる、
- 工程を含むものであってもよい。

[0043] 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程、未分化細胞を膵前駆細胞に分化させる工程、膵前駆細胞を膵内分泌前駆細胞に分化させる工程、膵内分泌前駆細胞を前膵内分泌細胞に分化させる工程については、上述の通りである。

[0044] 前膵内分泌細胞からの膵島の形成は、当業者に公知の手段・方法により行うことができるが、好ましくは、前膵内分泌細胞を浮遊化させた状態で培養し、膵島を形成させるものである。かかる浮遊化は、上述の通りである。例えば、DMEM(グルコース不含)/F-12(1:1)、N2およびB27、1mM グルタミン、10mM ニコチンアミド、および10nM エキセンディン4を含む培地中、低接着培養ディッシュにて前膵内分泌細胞を培養することにより、膵島を形成させてもよい。また、前膵内分泌細胞を膵内分泌細胞に分化させ、該膵内分泌細胞から膵島を形成させてもよい。

[0045] 本発明は、別の態様において、上記方法により得ることのできる膵島に関するものである。例えば、糖尿病またはその素因を有する対象、あるいは該対象と同種のものの脂肪組織から採取した細胞を用いて上記方法を行い、得られた膵島を該対象に

移植することで、糖尿病を治療または予防することなどが可能である。本発明のこの態様の膵島は、上述の通り膵内分泌細胞を含むものであるので、本発明のこの態様はまた、上記方法により得ることのできる膵島に含まれる膵内分泌細胞、詳細には、インスリン分泌細胞、グルカゴン分泌細胞、ソマトスタチン分泌細胞、膵ペプチド分泌細胞などに関するものである。

[0046] 本発明のなお別の態様は、上記培養方法により得ることのできる膵島を対象に投与することを特徴とする、膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法に関するものである。上記培養方法により得ることのできる膵島は膵内分泌細胞を含むものであるので、膵島を対象に投与するとは、膵内分泌細胞、および膵内分泌細胞を構成するインスリン分泌細胞、グルカゴン分泌細胞、ソマトスタチン分泌細胞、膵ペプチド分泌細胞などを対象に投与することを含む。拒絶反応等の点から、本発明のこの態様において、好ましくは、同一種、あるいは自己の脂肪組織由来細胞から得ることのできる膵島が用いられる。投与の手段・方法は、種々の因子に応じて適宜選択され得る。例えば、対象の門脈に膵島を注入してもよいし、腎被膜下に移植してもよいし、あるいは皮下筋肉内などに移植してもよい。膵島の投与量、投与回数等は、例えば、対象の状態、疾病の重篤度等の種々の因子に応じて適宜選択される。

[0047] 本発明は、別の態様において、脂肪組織由来細胞を培養して膵島を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、膵島の形成が、候補物質不含系における形成と比較して促進されている場合に、該候補物質が膵島の形成を促進する物質であることを示す、膵島の形成を促進する物質をスクリーニングする方法に関するものである。

[0048] 候補物質としては種々のものがあり、例えば、GLP-1、エキセンディン4のアナログ、それらの誘導体、または変異体などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0049] 脂肪組織由来細胞から膵島を得る際の候補物質の培地への添加は、いずれの段階において1回または複数回行われてもよい。例えば、未分化細胞を膵前駆細胞に分化させる際、膵前駆細胞を膵内分泌前駆細胞に分化させる際、膵内分泌前駆細胞を前膵内分泌細胞に分化させる際、および／または前膵内分泌細胞から膵島を

形成させる際に、候補物質を培地に添加してもよい。

- [0050] 膵島の形成は、例えば、顕微鏡観察により形成された膵島の数を計測すること、培養上清中に分泌されたインスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ペプチドを例えば、ELISAを用いて定量すること、インスリン遺伝子、グルカゴン遺伝子、ソマトスタチン遺伝子、膵ペプチド遺伝子の発現を定量的PCRにより測定すること、あるいは膵島の形成に伴い発現が減少または増加することが分かっているマーカー物質、例えば、IAPP、Pdx-1、Islet-1、Nkx6.1、PC1/3、およびPC2などを定量的PCRまたはELISAなどにより測定することなどにより、調べることができる。あるいは、未分化細胞から膵前駆細胞への分化、膵前駆細胞から膵内分泌前駆細胞への分化、膵内分泌前駆細胞から前膵内分泌細胞への分化、前膵内分泌細胞からの膵島の形成を調べることにより間接的に行ってもよい。未分化細胞から膵前駆細胞への分化、膵前駆細胞から膵内分泌前駆細胞への分化、膵内分泌前駆細胞から前膵内分泌細胞への分化、前膵内分泌細胞からの膵島の形成を調べる手段・方法を、当業者は適宜選択し、用いることができる。
- [0051] 従って、本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることのできる膵島の形成を促進する物質に関するものである。かかる物質を本発明の脂肪組織由来細胞から膵島を得る方法に用いて、得られる膵島を増加させてもよいし、膵島の形成速度を増大させてもよい。また、かかる物質を膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防に用いてもよい。
- [0052] 本発明のさらに別の態様は、膵島の形成を抑制する物質のスクリーニング方法である。すなわち、上記スクリーニング方法において、候補物質の存在下において、膵島の形成の抑制が見られる場合は、候補物質は膵島の形成を抑制する物質であることが示される。候補物質としては、種々のものがあり、例えば、ステロイドホルモンのアナログ、誘導体、または変異体等が挙げられるが、これらに限定されない。かかるスクリーニング方法により得ることのできる物質は、例えば、膵機能亢進症、インスリンノーマなどの膵内分泌細胞の機能亢進により生じる疾病の治療または予防に適していると考えられる。
- [0053] 従って、本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることの



できる、膵島の形成を抑制する物質に関するものである。

[0054] 本発明は、なおさらに別の態様において、膵島の形成を促進または抑制する物質をスクリーニングするための上記方法に用いられるキットに関するものである。本発明のキットは、脂肪組織からの細胞取得手段、培地、培養容器、並びに膵島の形成を調べる手段等を含んでいてもよい。通常には、取扱説明書をキットに添付する。かかるキットを用いて、上記スクリーニングを迅速かつ容易に行うことができる。

[0055] 本発明は、もう1つの態様において、脂肪組織由来細胞を培養して得られた膵島を候補物質を含む培地中で培養し、膵島から分泌される物質の量が、候補物質不含系における量と比較して、変化している場合に、該候補物質が膵島の活性を上昇させる物質であることを示す、膵島の活性を上昇させる物質をスクリーニングする方法に関するものである。膵島の活性とは、膵内分泌細胞、インスリン分泌細胞、グルカゴン分泌細胞、ソマトスタチン分泌細胞、膵ペプチド分泌細胞などの活性を含み、インスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ペプチドなどを産生・分泌する作用、および糖反応性、詳細には、糖濃度に応じてインスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ペプチドなどの分泌量を調節する作用などをいう。膵島から分泌される物質とは、インスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ペプチドなどをいい、かかる物質の量が変化しているとは、該物質が膵島の活性の上昇に伴い増大するものであるときは、増大していることを、逆に該物質が膵島の活性の低下に伴い減少するものであるときは、減少していることをいう。

[0056] 膵島の活性の上昇は、例えば、培養上清中に分泌されたインスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン、膵ペプチドをELISAなどを用いて定量すること、インスリン遺伝子、グルカゴン遺伝子、ソマトスタチン遺伝子、膵ペプチド遺伝子の発現を定量的PCRにより測定することなどにより、調べることができる。候補物質としては種々のものがあり、例えば、テオフィリン、IBMX、トルブタミド、カルバコールのアナログ、その誘導体、または変異体などが挙げられるが、これらに限定されない。

[0057] 従って、本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることのできる、膵島の活性を上昇させる物質に関するものである。かかる物質を、膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防に用いてもよい。

- [0058] 本発明のさらに別の態様は、膵島の活性を低下させる物質のスクリーニング方法である。すなわち、上記スクリーニング方法において、候補物質の存在下において、膵島の活性の低下が見られる場合は、候補物質は膵島の活性を低下させる物質であることが示される。候補物質としては、種々のものがあり、例えば、ニフェジピンのごときCa遮断薬、あるいはそのアナログ、誘導体、または変異体等が挙げられるが、これらに限定されない。かかるスクリーニング方法により得ることのできる物質は、例えば、膵機能亢進症、インスリノーマなどの膵内分泌細胞の機能亢進により生じる疾病の治療または予防に適していると考えられる。
- [0059] 従って、本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることのできる、膵島の活性を低下させる物質に関するものである。
- [0060] 本発明は、なおさらに別の態様において、膵島の活性を上昇または低下させる物質をスクリーニングするための上記方法に用いられるキットに関するものである。本発明のキットは、膵島を培養するための培地、培養容器、並びに膵島の活性を調べる手段等を含んでいてもよい。通常には、取扱説明書をキットに添付する。かかるキットを用いて、上記スクリーニングを迅速かつ容易に行うことができる。
- [0061] 本発明は、もう1つの態様において、脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る方法に関するものである。好ましくは、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させることにより、上記方法は行われる。
- [0062] 本発明は、さらなる態様において、上記方法により得ることのできる、未分化細胞に関するものである。
- [0063] 本発明は、なおさらなる態様において、上記培養方法により得ることのできる未分化細胞を対象に投与することを特徴とする、膵臓、肝臓、または心臓の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法に関するものである。膵臓、肝臓、または心臓の機能低下により生じる疾病とは、膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病、例えば、慢性膵炎、嚢胞膵などの膵外分泌細胞の機能低下により生じる疾病、肝硬変、肝癌などの肝細胞の機能低下により生じる疾患、心筋細胞の機能低下により生じる疾患などである。

- [0064] 本発明は、もう1つの態様において、脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から膵前駆細胞を得る方法に関するものである。かかる方法は、好ましくは、脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得て、次に、未分化細胞を膵前駆細胞に分化させる工程を含むものである。この方法により得ることのできる膵前駆細胞は、上述の方法を用いて、膵内分泌前駆細胞へ分化させることができ、かつ当業者に既知の手段・方法、例えば、Skoudy A et al., *Biochem J.* 2004 May 1; 379 (Pt 3): 749-56に記載の方法を用いて、膵外分泌前駆細胞へ分化させることが可能である。得られた膵前駆細胞は、例えば、CK18、CK19、アミラーゼ、トリプシンなどのマーカー物質により、確認することもできる。
- [0065] 本発明は、さらにもう1つの態様において、上記方法により得ることのできる膵前駆細胞に関するものである。膵前駆細胞は、膵内分泌前駆細胞のみならず、膵外分泌前駆細胞への分化能も有する細胞であるので、膵前駆細胞は、膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病のみならず、例えば、慢性膵炎のごとき膵外分泌機能不全症、嚢胞膵などの広範な疾病の治療または予防に用いることができると考えられる。
- [0066] 本発明は、なおさらにもう1つの態様において、上記方法により得ることのできる膵前駆細胞を対象に移植することを特徴とする、膵臓の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法に関する。膵臓の機能低下により生じる疾病とは、膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病、膵外分泌細胞の機能低下により生じる疾病などを含む。ここで、膵外分泌細胞の機能低下により生じる疾病とは、膵外分泌細胞の機能不全により生じる疾病を含み、例えば、慢性膵炎、膵嚢胞症などである。膵前駆細胞の投与量、投与方法、投与経路、投与回数等は、対象の状態等の種々の条件に応じて適宜選択され得る。
- [0067] 本発明は、さらなる態様において、脂肪組織由来細胞を培養して膵前駆細胞を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、膵前駆細胞への分化が、候補物質不含系における分化と比較して促進または抑制されている場合に、該候補物質が膵前駆細胞への分化を促進または抑制する物質であることを示す、膵前駆細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法に関するものである。候補物質の添加は上記の通りである。膵前駆細胞への分化の促進または抑制は、種

々の手段・方法により測定され得る。例えば、膵前駆細胞の数を計測することにより測定されてもよいし、あるいは膵前駆細胞が発現する遺伝子、産生するタンパク質を測定することにより測定されてもよい。

- [0068] 本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることのできる、膵前駆細胞への分化を促進または抑制する物質に関するものである。
- [0069] 本発明は、なおさらなる態様において、膵前駆細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングするための上記方法に用いられるキットに関するものである。キットの構成要素については上述の通りである。
- [0070] 本発明は、さらなる態様において、脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から膵内分泌前駆細胞を得る方法に関するものである。かかる方法は、好ましくは、脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得て、該未分化細胞を膵前駆細胞に分化させ、次に、該膵前駆細胞を膵内分泌前駆細胞に分化させる工程を含むものである。この方法により得られる膵内分泌前駆細胞は、前膵内分泌細胞、さらにはインスリン分泌細胞、グルカゴン分泌細胞、ソマトスタチン分泌細胞、膵ペプチド分泌細胞などの膵内分泌細胞に分化させることが可能である。
- [0071] 本発明は、さらなる態様において、上記方法により得ることのできる、膵内分泌前駆細胞に関するものである。膵内分泌前駆細胞は、前膵内分泌細胞、インスリン分泌細胞、グルカゴン分泌細胞、ソマトスタチン分泌細胞、膵ペプチド分泌細胞などの膵内分泌細胞に分化させることができるので、膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防に用いることができる。
- [0072] 本発明は、なおさらなる態様において、上記方法により得ることのできる、膵内分泌前駆細胞を対象に投与することを特徴とする、膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法に関するものである。膵内分泌前駆細胞の投与量、投与回数、投与方法等は、例えば、対象の状態等の種々の因子に応じて適宜選択される。
- [0073] 本発明は、さらなる態様において、脂肪組織由来細胞を培養して膵内分泌前駆細胞を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、膵内分泌前駆細胞への分化が、候補物質不含系における分化と比較して促進または抑制されている場合に

、該候補物質が膵内分泌前駆細胞への分化を促進または抑制する物質であることを示す、膵内分泌前駆細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法に関するものである。候補物質の添加は上述の通りである。膵内分泌前駆細胞への分化の促進または抑制は、種々の手段・方法により測定され得る。例えば、未分化細胞から膵前駆細胞への分化、または膵前駆細胞から膵内分泌前駆細胞への分化を調べることにより、あるいは膵内分泌前駆細胞が発現する遺伝子、産生するタンパク質を測定することにより測定されてもよい。

[0074] 本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることのできる、膵内分泌前駆細胞への分化を促進または抑制する物質に関するものである。

[0075] 本発明は、なおさらなる態様において、膵内分泌前駆細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングするための上記方法に用いられるキットに関するものである。キットの構成要素については上述の通りである。

[0076] 本発明は、もう1つの態様において、脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から前膵内分泌細胞を得る方法に関するものである。かかる方法は、好ましくは、脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得て、該未分化細胞を膵前駆細胞に分化させ、該膵前駆細胞を膵内分泌前駆細胞に分化させ、次に該膵内分泌前駆細胞を前膵内分泌細胞に分化させる工程を含むものである。

[0077] 本発明は、さらなる態様において、上記方法により得ることのできる、前膵内分泌細胞に関するものである。かかる前膵内分泌細胞は、インスリン分泌細胞、グルカゴン分泌細胞、ソマトスタチン分泌細胞、膵ペプチド分泌細胞に分化することができるので、膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防に用いることができる。

[0078] 本発明は、なおさらなる態様において、上記方法により得ることのできる、前膵内分泌細胞を対象に投与することを特徴とする、膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法に関するものである。前膵内分泌細胞の投与量、投与回数、投与方法等は、例えば、対象の状態等の種々の因子に応じて適宜選択される。

[0079] 本発明は、さらなる態様において、脂肪組織由来細胞を培養して前膵内分泌細胞を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、前膵内分泌細胞への分化

が、候補物質不含系における分化と比較して促進または抑制されている場合に、該候補物質が前膵内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質であることを示す、前膵内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法に関するものである。候補物質の添加は上述の通りである。前膵内分泌細胞への分化の促進または抑制は、前膵内分泌細胞が発現する、例えば、Pdx-1やIslet-1などの遺伝子の発現を測定することにより直接的に、あるいは未分化細胞からの膵前駆細胞の誘導、膵前駆細胞からの膵内分泌前駆細胞の誘導を調べることなどにより間接的に測定されてもよい。

[0080] 本発明は、さらなる態様において、上記スクリーニング方法により得ることのできる、前膵内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質に関するものである。

[0081] 本発明は、なおさらなる態様において、前膵内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングするための上記方法に用いられるキットに関するものである。キットの構成要素については上述の通りである。

[0082] 以下に実施例を示して本発明を具体的かつ詳細に説明するが、実施例は本発明を限定するものと解してはならない。

## 実施例

[0083] 脂肪組織由来細胞の単離および培養

ヒト脂肪組織を刻み、0.075% コラゲナーゼ(Sigma Chemical Co.)含有ハンクス平衡緩衝塩溶液(HBSS)中、37°Cのウォーターバスにて振盪しながら1時間消化した。切断物をCell Strainer(BD Biosciences)を用いて濾過し、濾液を800gにて10分間遠心した。切断物を赤血球溶解バッファーで処理した。次に、得られた細胞を、10% ウシ胎児血清(Hyclone)を含むDMEMを用いて播種した。12時間(この期間で複製は生じない(Djian P et al., J Clin Invest. 1983: 72: 1200-1208参照)後、付着している脂肪組織由来細胞を洗浄し、EDTA処理し、60% DMEM(低グルコース)、40% MCDB201、ITS(10.0ng/L インスリン、5.5mg/L トランスフェリン、6.7mg 亜セレン酸ナトリウム)、10ng/mL EGF、1nM デキサメサゾン、0.1mM アスコルビン酸、および5% FCS(Hyclone)を含む培地I中、ヒトフィブロネクチンコートディッシュに40,000細胞/cm<sup>2</sup>の密度で再度播種した。細胞を3~5代

継代培養し、実験に適した脂肪組織由来細胞とした(ステージI)。

[0084] 脂肪組織由来細胞からの膵島の形成、および膵内分泌細胞への分化

脂肪組織由来細胞をトリプシン/EDTA(ナカライテスク)で処理して解離させ、単一化した細胞を、80% ノックアウトDMEM(GIBCO Invitrogen)、20% ウシ胎児血清、1mM グルタミン(GIBCO Invitrogen)、および1% 非必須アミノ酸(GIBCO Invitrogen)を含む培地II中、低接着培養ディッシュ(Hydro Cell;セルシード)に播種した。細胞は自己凝集し、24時間以内にアディポスフェアを形成した。生じたアディポスフェア(図1参照)を3日毎に培地を交換しながら7日間培養した(ステージII)。

[0085] 7日目のアディポスフェア(平均約1,000個の細胞からなる)を、6ウェルプラスチック培養プレート(岩城)に300個/ウェルの密度で播種し、DMEM/F-12(1:1)(GIBCO Invitrogen)、ITS(10mg/L インスリン、6.7mg/L トランスフェリン、および5.5mg/L セレニウム(全てGIBCO Invitrogen))、1mM グルタミン、および5 $\mu$ g/mL ヒトフィブロネクチン(Roche Diagnostics)を含む培地III中でさらに1週間増殖させ、膵前駆細胞(図2参照)を得た(ステージIII)。

[0086] 1週間後、膵前駆細胞をトリプシン/EDTAにより単一細胞に解離させ、DMEM/F-12(1:1)、N2およびB27(共にGIBCO Invitrogen;製造元の指示に従い添加)、1mM グルタミン、および10ng/mL bFGF(GIBCO Invitrogen)を含む培地IV中、0.1%ゼラチンコートプラスチック組織培養プレート(BD Bioscience)に200,000個/mLの密度で播種し、7日間培養し、膵内分泌前駆細胞を得た(ステージIV)。かかる膵内分泌細胞は継代により増殖させることができるものであった。

[0087] 得られた膵内分泌前駆細胞を、DMEM(グルコース不含)/F-12(1:1)、N2およびB27、1mM グルタミン、10mM ニコチンアミド(Sigma Chemical Co.)、および10nM エキセンディン4(Sigma Chemical Co.)を含む培地V中で7日間培養し、前膵内分泌細胞を得た(ステージV)。

[0088] 7日後、得られた前膵内分泌細胞を解離させ、低接着培養ディッシュにアプライし、培地Vでの懸濁液中で3~7日間増殖させ、膵内分泌細胞を含む膵島(図3参照)を形成させた(ステージVI)。

[0089] 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)

トータルRNAを、ステージI～VIの細胞から、Mag-Extractorキット(TOYOBO)を用いて製造元の推奨プロトコールに従い、単離した。トータルRNA 500ngをDNase処理し、Superscript III逆転写酵素RNase H(-) (Invitrogen)を用いて、cDNAを合成した。インスリン、グルカゴン、ソマトスタチン、IAPP、Pdx-1、Islet-1、Nkx6.1、PC1/3、PC2、およびGAPDHについて、KOD-plus(TOYOBO)を用いて、以下の条件でRT-PCRを行った:94°Cで2分間変性、次に94°Cで15秒間の変性、前以て決定しておいた温度で30秒間のアニーリング、68°Cで30秒間の伸長を40サイクル。アニーリング温度、およびプライマー配列を表1に示す。得られた増幅産物を2% アガロースゲルにて電気泳動した。結果を図4に示す。ステージVIの細胞において、インスリンが発現していること、分化に伴い、膵島由来ホルモンであるグルカゴン、ソマトスタチン、および転写因子であるIAPP、Pdx-1、Islet-1、Nkx6.1の発現が増加していること、およびステージVIの細胞において、インスリタンパク質の変換酵素であるPC1/3およびPC2が発現していることが確認でき、脂肪組織由来細胞から膵島および膵内分泌細胞が得られたことが分かった。

[0090] [表1]

遺伝子	プライマー配列	配列番号	増幅 産物の サイズ (bp)	アニー リング 温度 (°C)
インスリン	AGCCTTTGTGAACCAACACC	配列番号1	245	60
	GCTGGTAGAGGGAGCAGATG	配列番号2		
グルカゴン	AGGCAGACCCACTCAGTGA	配列番号3	308	55
	AACAATGGCGACCTCTTCTG	配列番号4		
ソマトスタチン	TGCGCTGTCCATCGTCCT	配列番号5	257	55
	GCCATAGCCGGTTTGAGTT	配列番号6		
IAPP	GAGAGAGCCACTGAATTACTTGCC	配列番号7	471	60
	CCTGACCTTATCGTGATCGCC	配列番号8		
Pdx-1	GGATGAAGTCTACCAAAGTCACGC	配列番号9	230	60
	CCAGATCTTGATGTGTCTCTCGGTC	配列番号10		
Islet-1	GATTTCCCTATGTGTTGGTTGC	配列番号11	827	60
	CTTCCACTGGGTTAGCCTGTAA	配列番号12		
Nkx6.1	GTTCCTCCTCCTCCTTCTCCTC	配列番号13	381	55
	AAGATCTGCTGTCGGAAAAAG	配列番号14		
PC1/3	TTGGCTGAAAGAGAACGGGATACATCT	配列番号15	457	60
	ACTTCTTTGGTGATTGCTTTGGCGGTG	配列番号16		
PC2	GCATCAAGCACAGACCTACACTCG	配列番号17	309	60
	GAGACACAACCACCTTCATCCTTC	配列番号18		
GAPDH	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	配列番号19	394	60
	AGGGGAGATTCAGTGTGGTG	配列番号20		



[0091] 免疫染色によるインスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチンの膵島における局在の確認

上記方法により得られた膵島を4% パラホルムアルデヒドにて24時間固定した。PBSにて洗浄した後、OTC compoundに包埋し、凍結させた。7  $\mu$  mに薄切し、スライドグラスに貼り付けて風乾させた。作成したスライドグラスをPBSにて洗浄し、Block On e(ナカライテスク社製)にて60分ブロッキングし、PBSにて洗浄後モルモット抗インスリン抗体、テキサスレッド標識抗モルモットIgG抗体、ついでウサギ抗C-ペプチド抗体、最後にFITC標識抗ウサギIgG抗体と反応させた。同様に、モルモット抗インスリン抗体、テキサスレッド標識抗モルモットIgG抗体と反応させた後、ウサギ抗グルカゴン抗体、次にFITC標識抗ウサギIgG抗体、あるいはウサギ抗ソマトスタチン抗体、次にFITC標識抗ウサギ抗体と反応させた。洗浄後蛍光顕微鏡にて観察した。結果を図5~13に示す。インスリン染色陽性細胞は、主に膵島内部に存在し、生体内の膵島と同様であることが確認できた。また、膵島において、インスリンとC-ペプチドが共存していることが分かった。これにより、インスリンは細胞内にて生合成されたものであることが分かった。グルカゴン染色陽性細胞は、膵島を覆うように外側に存在し、生体内の膵島と同様であることが確認できた。さらに、インスリンとソマトスタチンが共存する細胞と共存しない細胞が存在することが確認できた(共存する細胞を図11a、12a、13aにおいて矢頭で示す)。これは、インスリン分泌細胞が分化する過程で一過性にインスリンとソマトスタチンを共に発現するためであるといえる。

[0092] ELISAによるインスリン分泌量、およびC-ペプチド分泌量の定量

上記方法により得られた膵島を、RPMI 1640(11879-020; GIBCO Invitrogen)を用いて3回洗浄し、0.5% ウシ血清アルブミン、および3.3mM グルコース含有RPMI1640と共に1時間、プレインキュベーションした。次に、膵島を、3.3mMまたは16.7mM グルコースを含むRPMI 1640中で2時間インキュベーションした。対照として、10mM テオフィリンを含むRPMI 1640を用いた。培養上清中のインスリンおよびC-ペプチドレベルをELISAキット(Mercodia)を用いて測定した。結果を図14、15および16に示す。インスリン分泌を促進する物質として知られているテオフィリンを含まない培地にて培養した膵島は、テオフィリンを含む培地にてインキュベーショ

ンした膵島と同等のインスリン分泌量、およびC-ペプチド分泌量を示し、脂肪組織由来細胞から得られた膵島が十分量のインスリン分泌能指数を有することが確認できた。

[0093] 上述の通り膵島を、3.3mMまたは16.7mM グルコース、および100 $\mu$ M テオフィリン、100 $\mu$ M IBMX、10 $\mu$ M トルブタミド、100 $\mu$ M カルバコール、または50 $\mu$ M ニフェジピンを含むRPMI 1640中で2時間インキュベーションし、インスリン分泌量を測定した。結果を図17に示す。インスリン分泌を促進することが知られているテオフィリン、IBMX、トルブタミド、カルバコールによりインスリン分泌が促進されることが確認できた。インスリン分泌を抑制することが知られているニフェジピンにより糖反応性インスリン分泌が抑制されることが確認できた。

[0094] インスリン分泌細胞の移植

NOD/SCIDマウス(8週齢、雄性、6匹)に50mg/kg ストレプトゾトシン(STZ)を1日1回、5日間(Day-11~-7)連続して腹腔内投与し、膵ランゲルハンス島を破壊した。Day0にて500個のインスリン分泌細胞塊を左腎被膜下に移植した。Day-11、Day0、およびDay14における血糖値を測定した。結果を図18に示す。インスリン分泌細胞塊を移植することにより血糖値を低減できることが確認できた。

#### 産業上の利用可能性

[0095] 本発明により、脂肪組織由来細胞から膵内分泌細胞を得る方法およびそれにより得ることのできる膵内分泌細胞、膵内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法およびそのためのキットなどが提供されるので、医薬品等の分野、例えば、糖尿病並びにそれにより惹起される種々の疾病の予防薬、治療薬、または診断薬の開発、製造分野等において利用可能である。

#### 配列表フリーテキスト

[0096] SEQ ID NO: 1: PCR forward primer to amplify insulin mRNA  
SEQ ID NO: 2: PCR reverse primer to amplify insulin mRNA  
SEQ ID NO: 3: PCR forward primer to amplify Glucagon mRNA  
SEQ ID NO: 4: PCR reverse primer to amplify Glucagon mRNA  
SEQ ID NO: 5: PCR forward primer to amplify Somatostatin mRNA

- SEQ ID NO: 6: PCR reverse primer to amplify Somatostatin mRNA
- SEQ ID NO: 7: PCR forward primer to amplify IAPP mRNA
- SEQ ID NO: 8: PCR reverse primer to amplify IAPP mRNA
- SEQ ID NO: 9: PCR forward primer to amplify Pdx-1 mRNA
- SEQ ID NO: 10: PCR reverse primer to amplify Pdx-1 mRNA
- SEQ ID NO: 11: PCR forward primer to amplify Islet-1 mRNA
- SEQ ID NO: 12: PCR reverse primer to amplify Islet-1 mRNA
- SEQ ID NO: 13: PCR forward primer to amplify Nkx6.1 mRNA
- SEQ ID NO: 14: PCR reverse primer to amplify Nkx6.1 mRNA
- SEQ ID NO: 15: PCR forward primer to amplify PC1/3 mRNA
- SEQ ID NO: 16: PCR reverse primer to amplify PC1/3 mRNA
- SEQ ID NO: 17: PCR forward primer to amplify PC2 mRNA
- SEQ ID NO: 18: PCR reverse primer to amplify PC2 mRNA
- SEQ ID NO: 19: PCR forward primer to amplify GAPDH mRNA
- SEQ ID NO: 20: PCR reverse primer to amplify GAPDH mRNA

## 請求の範囲

- [1] 脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から膵内分泌細胞を得る方法。
- [2] 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程を含む、請求項1記載の方法。
- [3] 前膵内分泌細胞を膵内分泌細胞に分化させる工程をさらに含む、請求項2記載の方法。
- [4] (a) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得て、  
(b) 該未分化細胞を膵前駆細胞に分化させ、  
(c) 該膵前駆細胞を膵内分泌前駆細胞に分化させ、  
(d) 該膵内分泌前駆細胞を前膵内分泌細胞に分化させ、次に、  
(e) 該前膵内分泌細胞を膵内分泌細胞に分化させる、  
工程を含む、請求項3記載の方法。
- [5] 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程が、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させるものである、請求項2から4のいずれか記載の方法。
- [6] 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、請求項1から5のいずれか記載の方法。
- [7] 膵内分泌細胞が膵島を形成しているものである、請求項1から6のいずれか記載の方法。
- [8] 請求項1から7のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵内分泌細胞。
- [9] インスリン分泌細胞である、請求項8記載の細胞。
- [10] 膵島を形成しているものである、請求項8または9記載の細胞。
- [11] 請求項1から7のいずれか記載の方法により得ることのできる膵内分泌細胞を対象に投与することを特徴とする、膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法。
- [12] 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、請求項11記載の方法。
- [13] 膵内分泌細胞が膵島を形成しているものである、請求項11または12記載の方法。
- [14] 疾病が糖尿病である、請求項11から13のいずれか記載の方法。

- [15] 脂肪組織由来細胞を培養して膵内分泌細胞を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、膵内分泌細胞への分化が、候補物質不含系における分化と比較して促進されている場合に、該候補物質が膵内分泌細胞への分化を促進する物質であることを示す、膵内分泌細胞への分化を促進する物質をスクリーニングする方法。
- [16] 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、請求項15記載の方法。
- [17] 膵内分泌細胞が膵島を形成しているものである、請求項15または16記載の方法。
- [18] 請求項15から17のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵内分泌細胞への分化を促進する物質。
- [19] 脂肪組織由来細胞を培養して膵内分泌細胞を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、膵内分泌細胞への分化が、候補物質不含系における分化と比較して抑制されている場合に、該候補物質が膵内分泌細胞への分化を抑制する物質であることを示す、膵内分泌細胞への分化を抑制する物質をスクリーニングする方法。
- [20] 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、請求項19記載の方法。
- [21] 膵内分泌細胞が膵島を形成しているものである、請求項19または20記載の方法。
- [22] 請求項19から21のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵内分泌細胞への分化を抑制する物質。
- [23] 請求項15から17、または19から21のいずれか記載の方法に用いられる、膵内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングするためのキット。
- [24] 脂肪組織由来細胞を培養して得られた膵内分泌細胞を候補物質を含む培地中で培養し、膵内分泌細胞から分泌される物質の量が、候補物質不含系における量と比較して、変化している場合に、該候補物質が膵内分泌細胞の活性を上昇させる物質であることを示す、膵内分泌細胞の活性を上昇させる物質をスクリーニングする方法。
- [25] 膵内分泌細胞から分泌される物質が、インスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン、または膵ペプチドである、請求項24記載の方法。
- [26] 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、請求項24または25記載の方法。

- [27] 膵内分泌細胞が膵島を形成しているものである、請求項24から26のいずれか記載の方法。
- [28] 請求項24から27のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵内分泌細胞の活性を上昇させる物質。
- [29] 脂肪組織由来細胞を培養して得られた膵内分泌細胞を候補物質を含む培地中で培養し、膵内分泌細胞から分泌される物質の量が、候補物質不含系における量と比較して、変化している場合に、該候補物質が膵内分泌細胞の活性を低下させる物質であることを示す、膵内分泌細胞の活性を低下させる物質をスクリーニングする方法。
- [30] 膵内分泌細胞から分泌される物質が、インスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン、または膵ペプチドである、請求項29記載の方法。
- [31] 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、請求項29または30記載の方法。
- [32] 膵内分泌細胞が膵島を形成しているものである、請求項29から31のいずれか記載の方法。
- [33] 請求項29から32のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵内分泌細胞の活性を低下させる物質。
- [34] 請求項24から27、または29から32のいずれか記載の方法に用いられる、膵内分泌細胞の活性を上昇または低下させる物質をスクリーニングするためのキット。
- [35] 脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から膵島を得る方法。
- [36] 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程を含む、請求項35記載の方法。
- [37] 前膵内分泌細胞から膵島を形成させる工程をさらに含む、請求項36記載の方法。
- [38] (a) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得て、  
(b) 該未分化細胞を膵前駆細胞に分化させ、  
(c) 該膵前駆細胞を膵内分泌前駆細胞に分化させ、  
(d) 該膵内分泌前駆細胞を前膵内分泌細胞に分化させ、次に、  
(e) 該前膵内分泌細胞から膵島を形成させる、  
工程を含む、請求項37記載の方法。

- [39] 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程が、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させるものである、請求項36から38のいずれか記載の方法。
- [40] 前膵内分泌細胞から膵島を形成させる工程が、前膵内分泌細胞を膵内分泌細胞に分化させ、該膵内分泌細胞から膵島を形成させるものである、請求項37から39のいずれか記載の方法。
- [41] 膵島が膵内分泌細胞を含むものである、請求項35から40のいずれか記載の方法。
- [42] 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、請求項41記載の方法。
- [43] 請求項35から42のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵島。
- [44] 請求項43記載の膵島に含まれる、膵内分泌細胞。
- [45] インスリン分泌細胞である、請求項44記載の細胞。
- [46] 請求項35から42のいずれか記載の方法により得ることのできる膵島を対象に投与することを特徴とする、膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法。
- [47] 膵島が膵内分泌細胞を含むものである、請求項46記載の方法。
- [48] 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、請求項47記載の方法。
- [49] 疾病が糖尿病である、請求項46から48のいずれか記載の方法。
- [50] 脂肪組織由来細胞を培養して膵島を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、膵島の形成が、候補物質不含系における形成と比較して促進されている場合に、該候補物質が膵島の形成を促進する物質であることを示す、膵島の形成を促進する物質をスクリーニングする方法。
- [51] 膵島が膵内分泌細胞を含むものである、請求項50記載の方法。
- [52] 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、請求項51記載の方法。
- [53] 請求項50から52のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵島の形成を促進する物質。
- [54] 脂肪組織由来細胞を培養して膵島を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、膵島の形成が、候補物質不含系における形成と比較して抑制されている

場合に、該候補物質が膵島の形成を抑制する物質であることを示す、膵島の形成を抑制する物質をスクリーニングする方法。

- [55] 膵島が膵内分泌細胞を含むものである、請求項54記載の方法。
- [56] 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、請求項55記載の方法。
- [57] 請求項54から56のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵島の形成を抑制する物質。
- [58] 請求項50から52、または54から56記載の方法に用いられる、膵島の形成を促進または抑制する物質をスクリーニングするためのキット。
- [59] 脂肪組織由来細胞を培養して得られた膵島を候補物質を含む培地中で培養し、膵島から分泌される物質の量が、候補物質不含系における量と比較して、変化している場合に、該候補物質が膵島の活性を上昇させる物質であることを示す、膵島の活性を上昇させる物質をスクリーニングする方法。
- [60] 膵島から分泌される物質が、インスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン、または膵ペプチドである、請求項59記載の方法。
- [61] 膵島が膵内分泌細胞を含むものである、請求項59または60記載の方法。
- [62] 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、請求項61記載の方法。
- [63] 請求項59から62のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵島の活性を上昇させる物質。
- [64] 脂肪組織由来細胞を培養して得られた膵島を候補物質を含む培地中で培養し、膵島から分泌される物質の量が、候補物質不含系における量と比較して、変化している場合に、該候補物質が膵島の活性を低下させる物質であることを示す、膵島の活性を低下させる物質をスクリーニングする方法。
- [65] 膵島から分泌される物質が、インスリン、C-ペプチド、グルカゴン、ソマトスタチン、または膵ペプチドである、請求項64記載の方法。
- [66] 膵島が膵内分泌細胞を含むものである、請求項64または65記載の方法。
- [67] 膵内分泌細胞がインスリン分泌細胞である、請求項66記載の方法。
- [68] 請求項64から67のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵島の活性を低下させる物質。



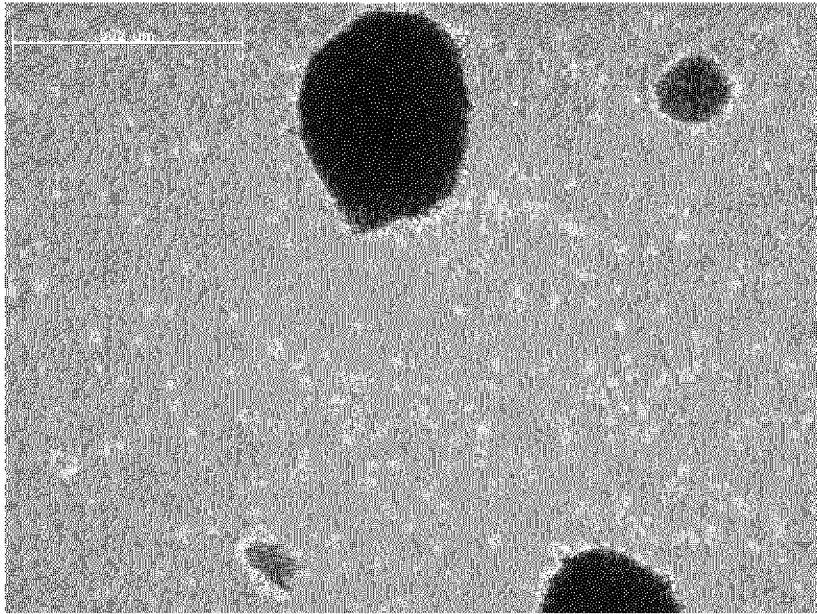
- [69] 請求項59から62、または64から67のいずれか記載の方法に用いられる、膵島の活性を上昇または低下させる物質をスクリーニングするためのキット。
- [70] 脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る方法。
- [71] 培養が、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させるものである、請求項70記載の方法。
- [72] 請求項70または71記載の方法により得ることのできる、未分化細胞。
- [73] 請求項70または71記載の方法により得ることのできる未分化細胞を対象に投与することを特徴とする、膵臓、肝臓、または心臓の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法。
- [74] 脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から膵前駆細胞を得る方法。
- [75] (a) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得て、次に、  
(b) 該未分化細胞を膵前駆細胞に分化させる、  
工程を含む、請求項74記載の方法。
- [76] 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程が、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させるものである、請求項75記載の方法。
- [77] 請求項74から76のいずれか記載の方法により得ることのできる膵前駆細胞。
- [78] 請求項74から76のいずれか記載の方法により得ることのできる膵前駆細胞を対象に移植することを特徴とする、膵臓の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法。
- [79] 脂肪組織由来細胞を培養して膵前駆細胞を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、膵前駆細胞への分化が、候補物質不含系における分化と比較して促進または抑制されている場合に、該候補物質が膵前駆細胞への分化を促進または抑制する物質であることを示す、膵前駆細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法。
- [80] 請求項79記載の方法により得ることのできる、膵前駆細胞への分化を促進または

抑制する物質。

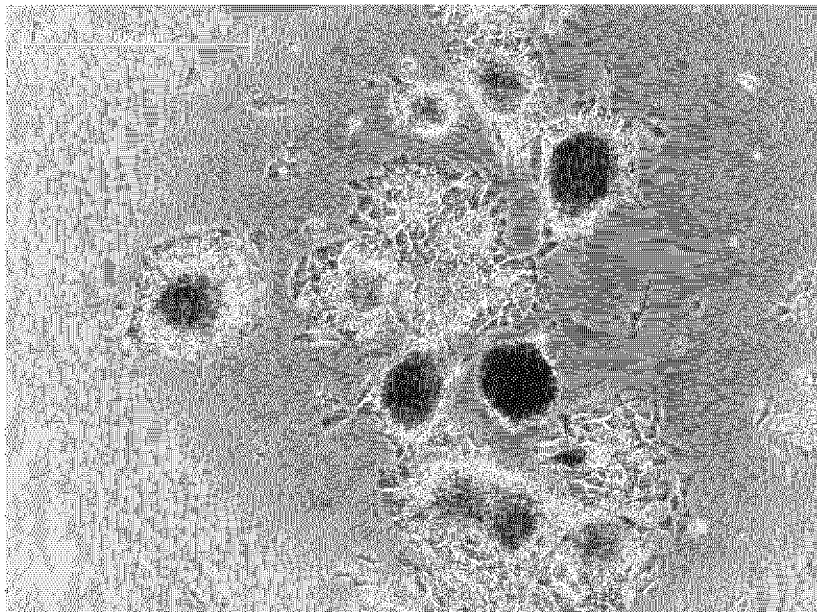
- [81] 請求項79記載の方法に用いられる、膵前駆細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングするためのキット。
- [82] 脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から膵内分泌前駆細胞を得る方法。
- [83] (a) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得て、  
(b) 該未分化細胞を膵前駆細胞に分化させ、次に、  
(c) 該膵前駆細胞を膵内分泌前駆細胞に分化させる、  
工程を含む、請求項82記載の方法。
- [84] 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程が、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させるものである、請求項83記載の方法。
- [85] 請求項82から84のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵内分泌前駆細胞。
- [86] 請求項82から84のいずれか記載の方法により得ることのできる、膵内分泌前駆細胞を対象に投与することを特徴とする、膵内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法。
- [87] 脂肪組織由来細胞を培養して膵内分泌前駆細胞を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、膵内分泌前駆細胞への分化が、候補物質不含系における分化と比較して促進または抑制されている場合に、該候補物質が膵内分泌前駆細胞への分化を促進または抑制する物質であることを示す、膵内分泌前駆細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法。
- [88] 請求項87記載の方法により得ることのできる、膵内分泌前駆細胞への分化を促進または抑制する物質。
- [89] 請求項87記載の方法に用いられる、膵内分泌前駆細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングするためのキット。
- [90] 脂肪組織由来細胞を培養することを特徴とする、脂肪組織由来細胞から膵内分泌細胞を得る方法。

- [91] (a) 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得て、  
(b) 該未分化細胞を腩前駆細胞に分化させ、  
(c) 該腩前駆細胞を腩内分泌前駆細胞に分化させ、  
(d) 該腩内分泌前駆細胞を前腩内分泌細胞に分化させる、  
工程を含む、請求項90記載の方法。
- [92] 脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る工程が、脂肪組織由来細胞を浮遊化させた状態で培養し、アディポスフェアを形成させるものである、請求項91記載の方法。
- [93] 請求項90から92のいずれか記載の方法により得ることのできる、前腩内分泌細胞。
- [94] 請求項90から92のいずれか記載の方法により得ることのできる、前腩内分泌細胞を対象に投与することを特徴とする、腩内分泌細胞の機能低下により生じる疾病の治療または予防方法。
- [95] 脂肪組織由来細胞を培養して前腩内分泌細胞を得る際に、候補物質を培地に添加することを特徴とし、前腩内分泌細胞への分化が、候補物質不含系における分化と比較して促進または抑制されている場合に、該候補物質が前腩内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質であることを示す、前腩内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングする方法。
- [96] 請求項95記載の方法により得ることのできる、前腩内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質。
- [97] 請求項95記載の方法に用いられる、前腩内分泌細胞への分化を促進または抑制する物質をスクリーニングするためのキット。

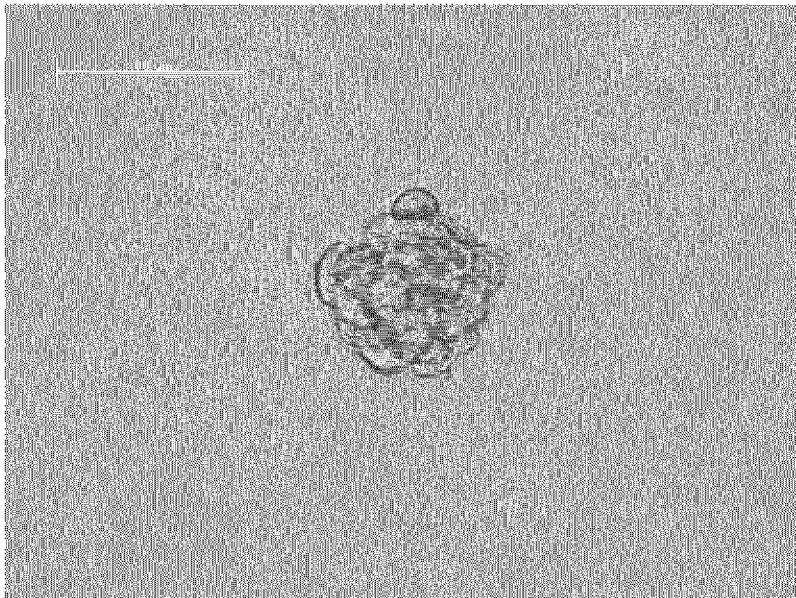
[図1]



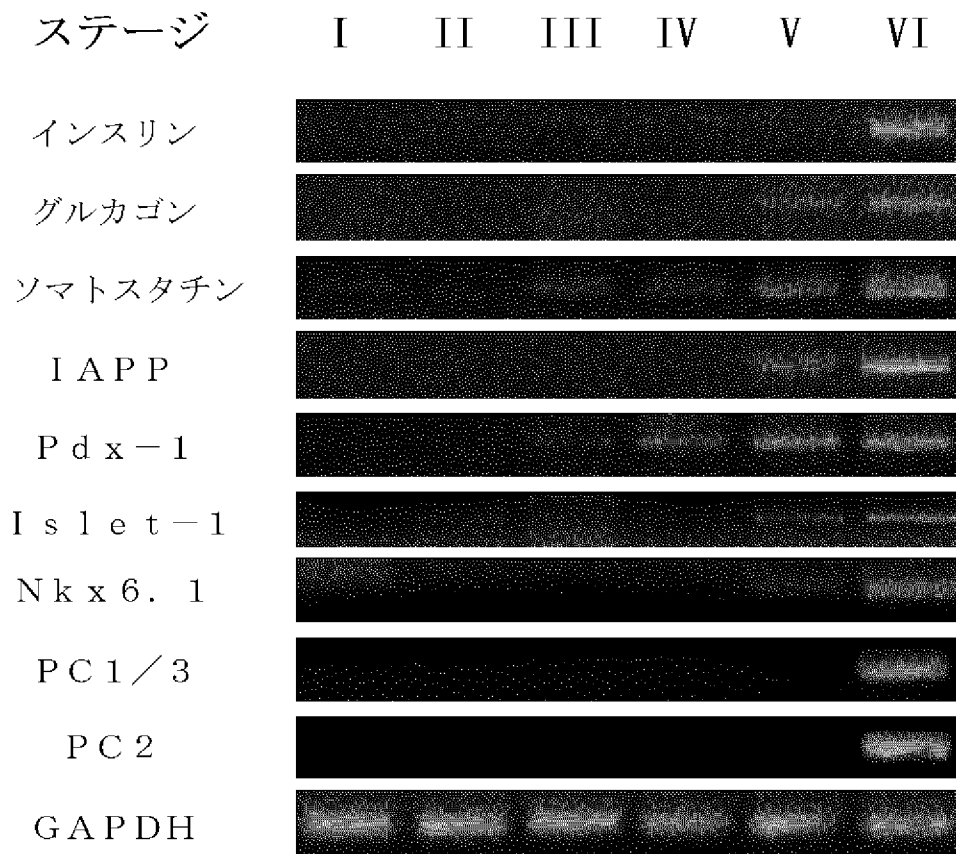
[図2]



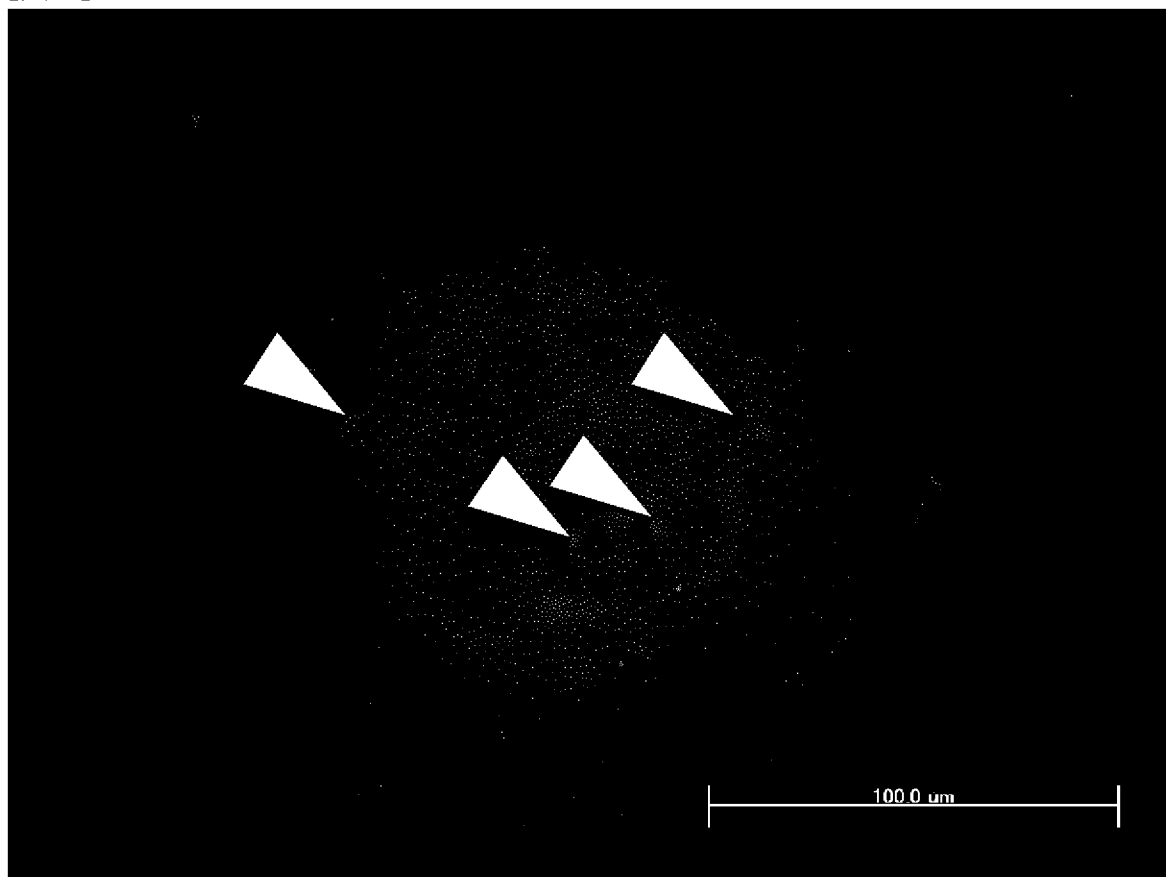
[図3]



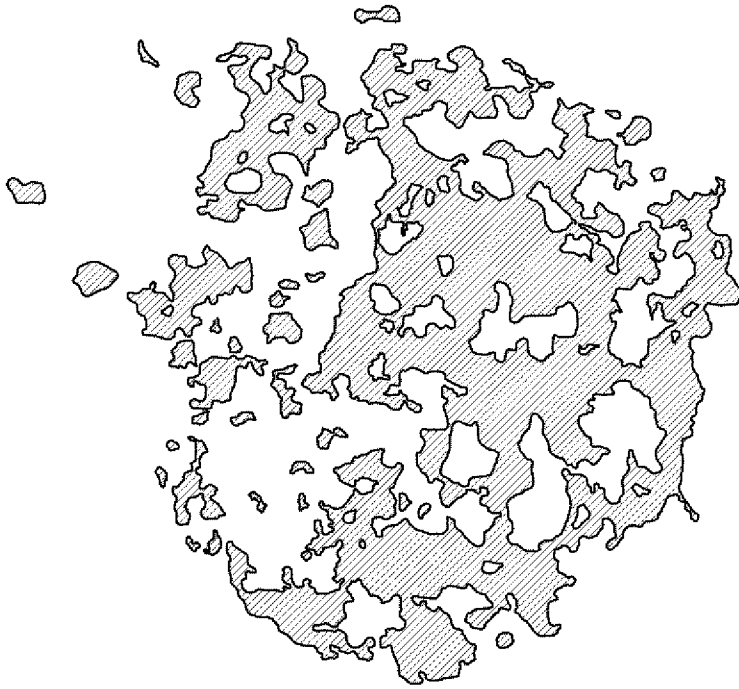
[図4]



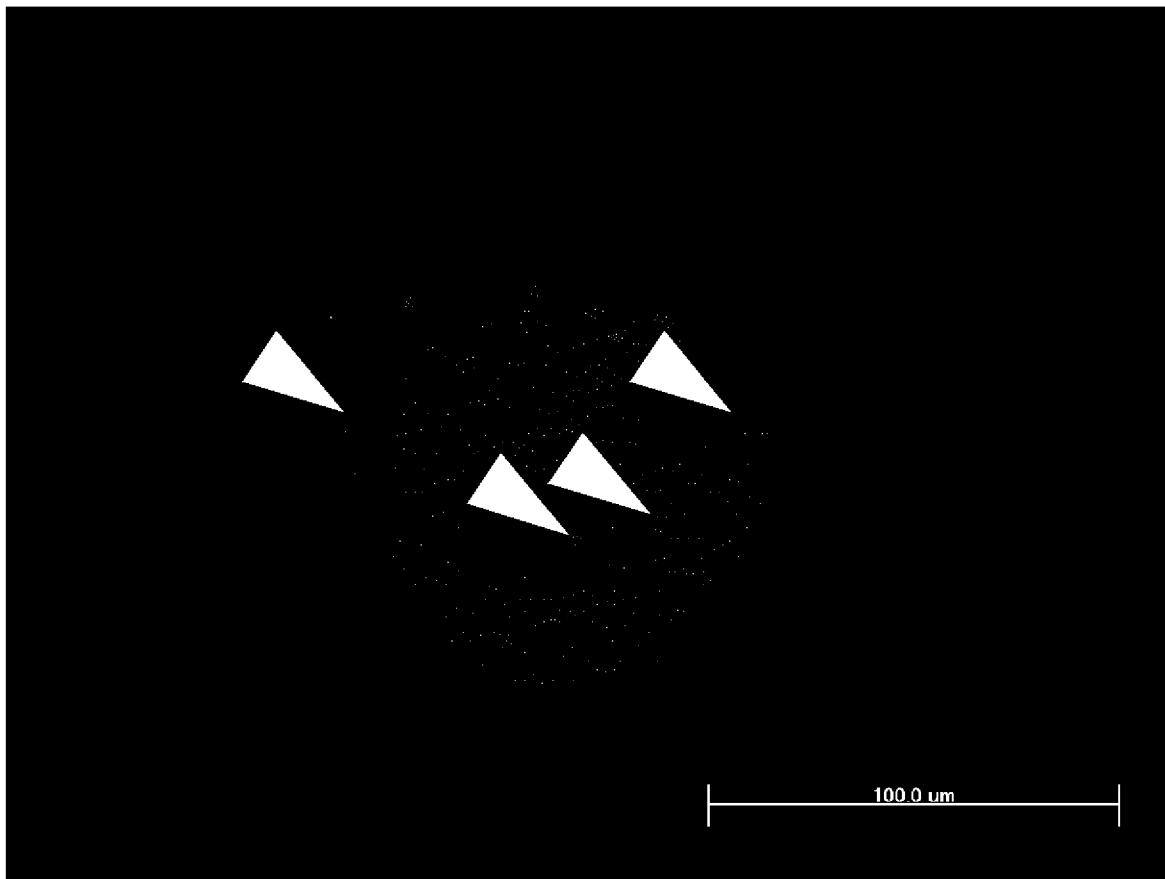
[図5a]



[図5b]



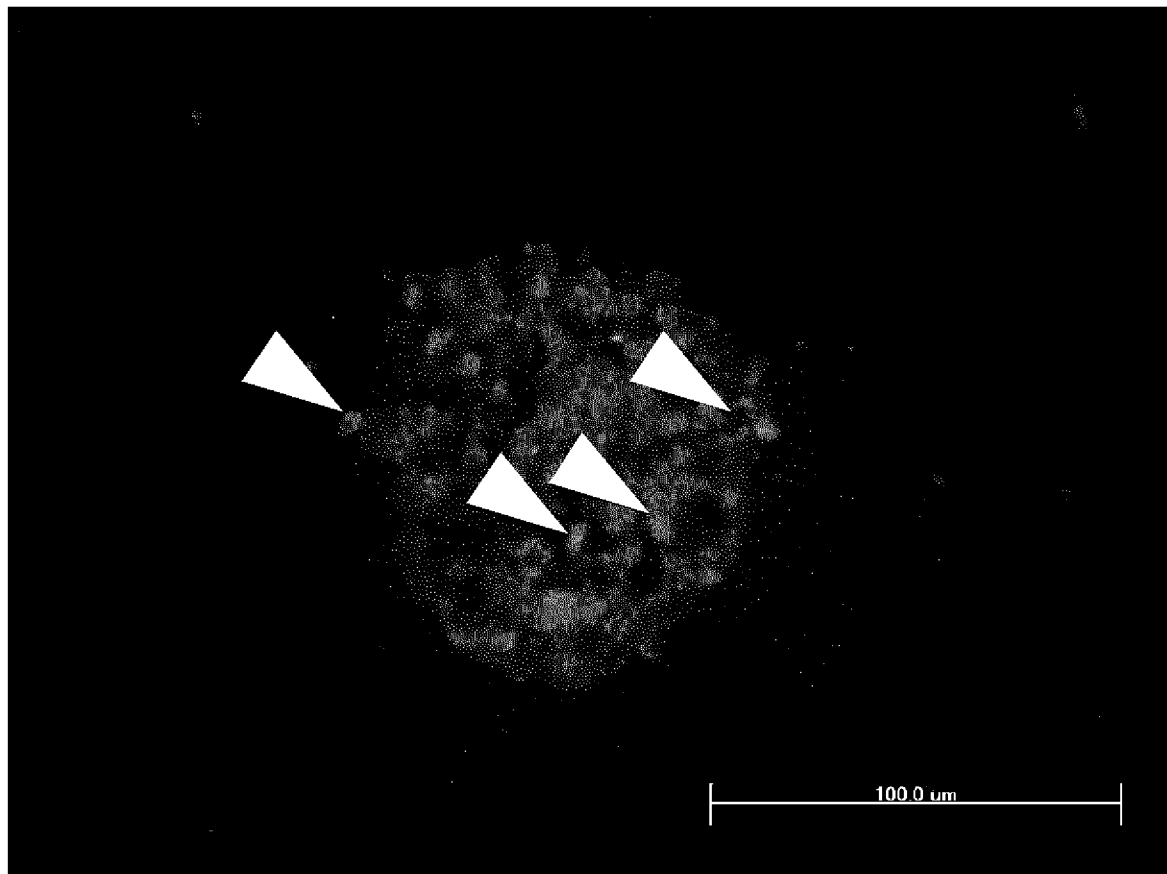
[図6a]



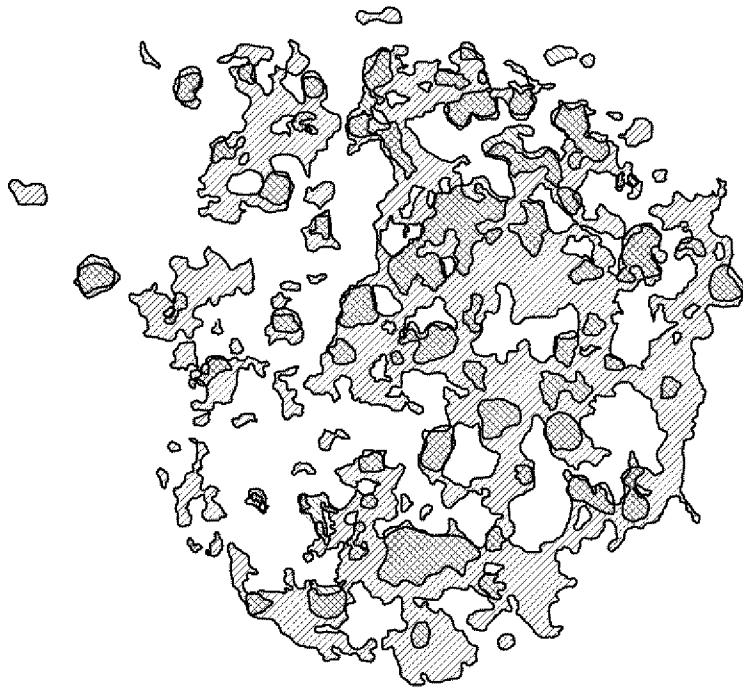
[図6b]



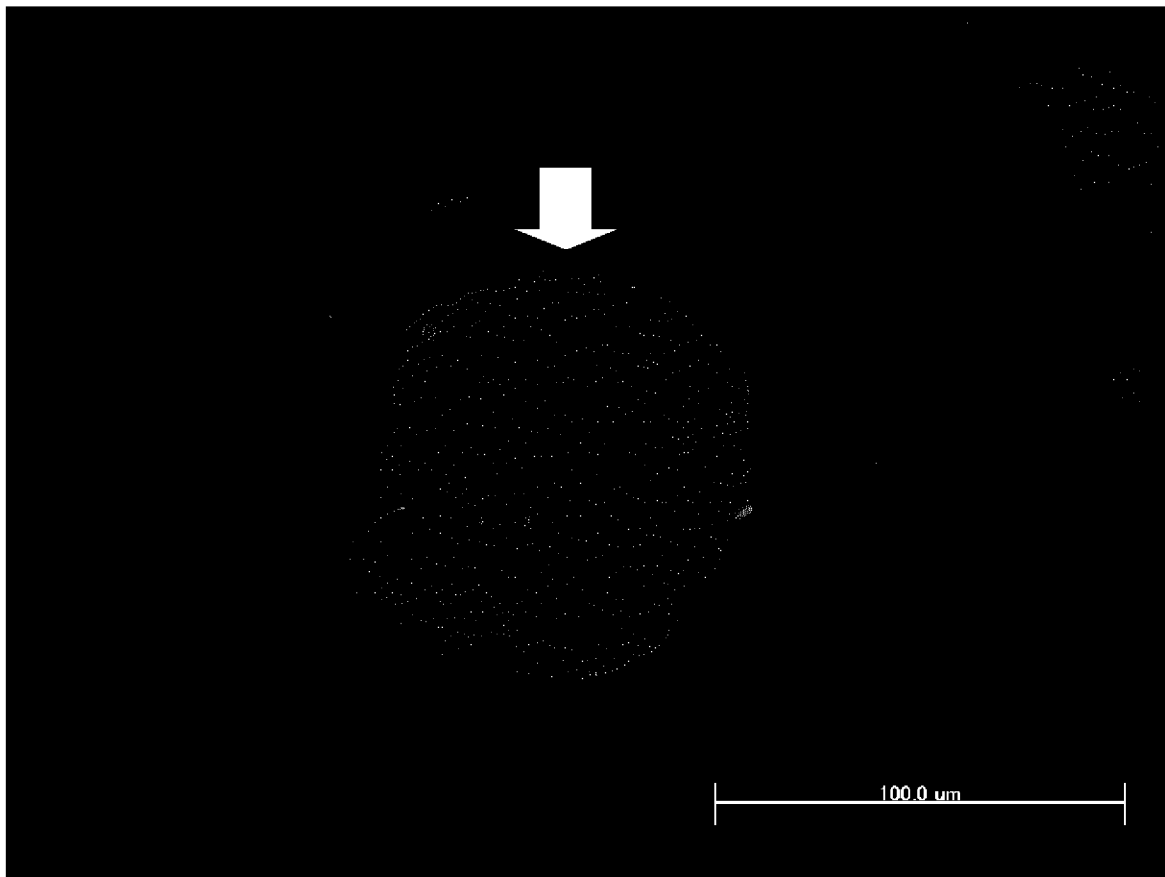
[図7a]



[図7b]

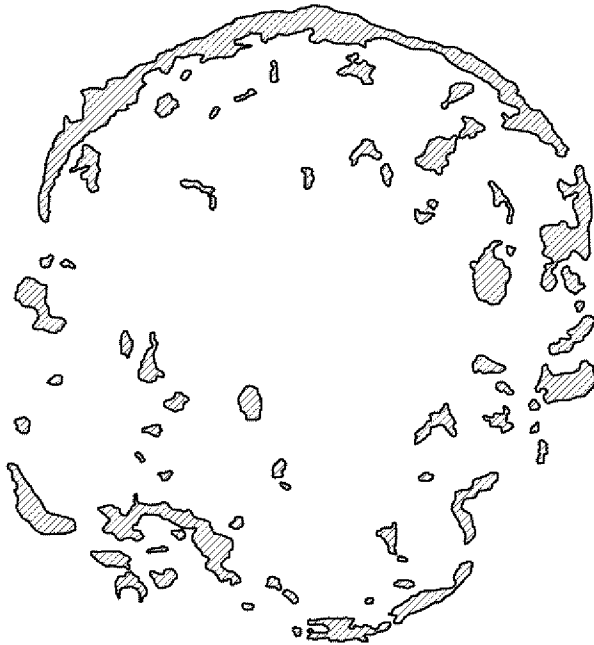


[図8a]

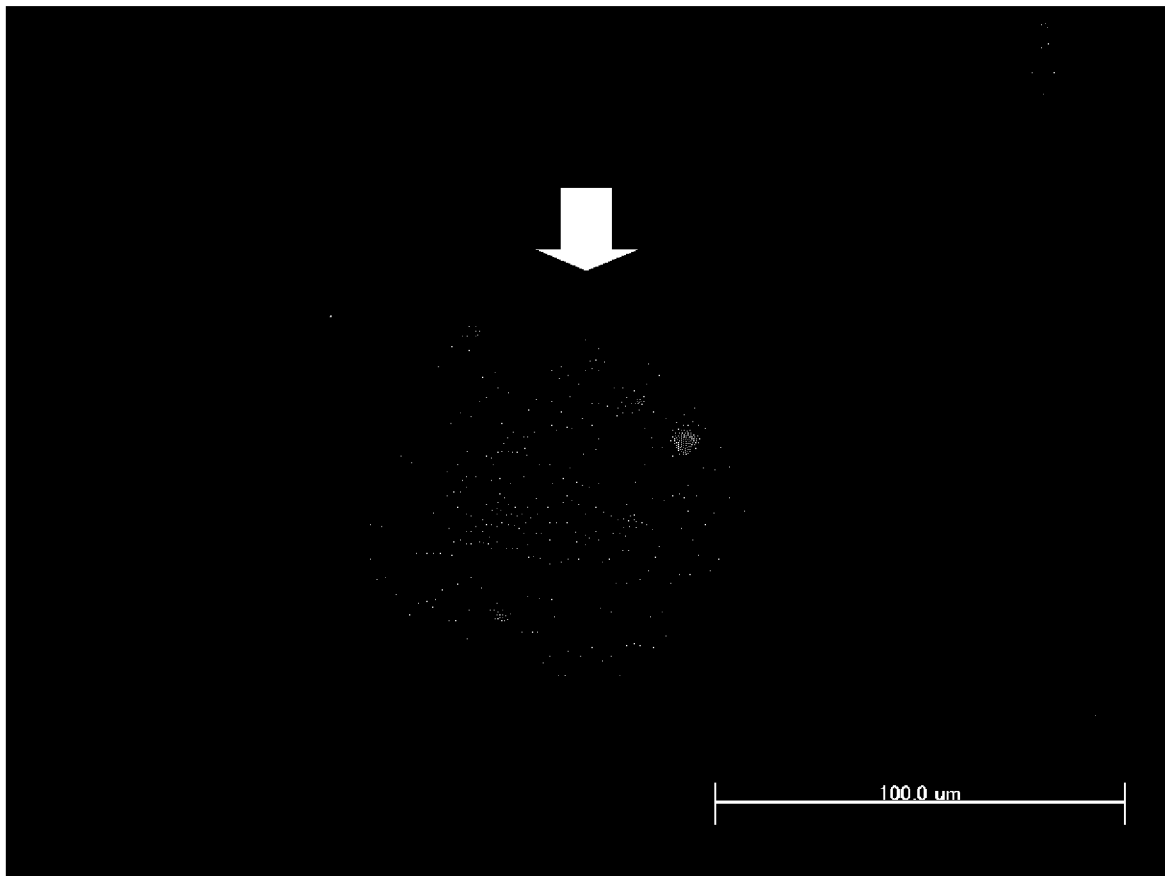




[図8b]



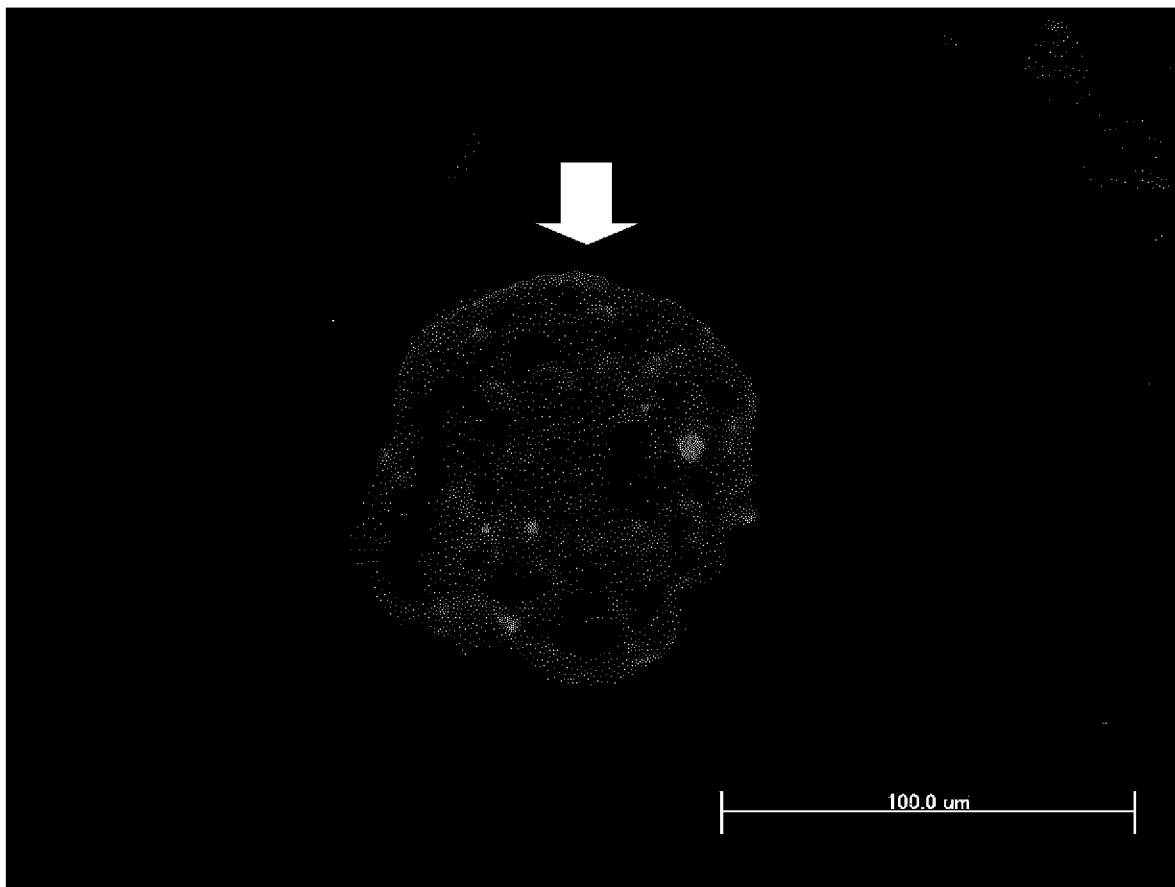
[図9a]



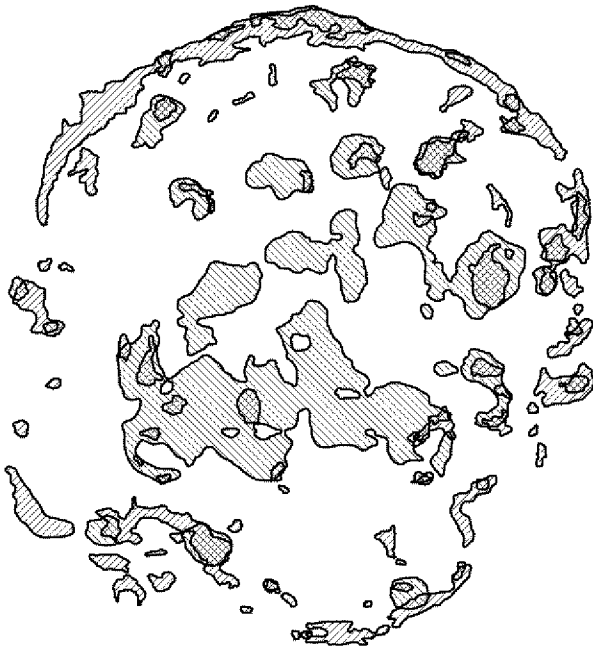
[図9b]



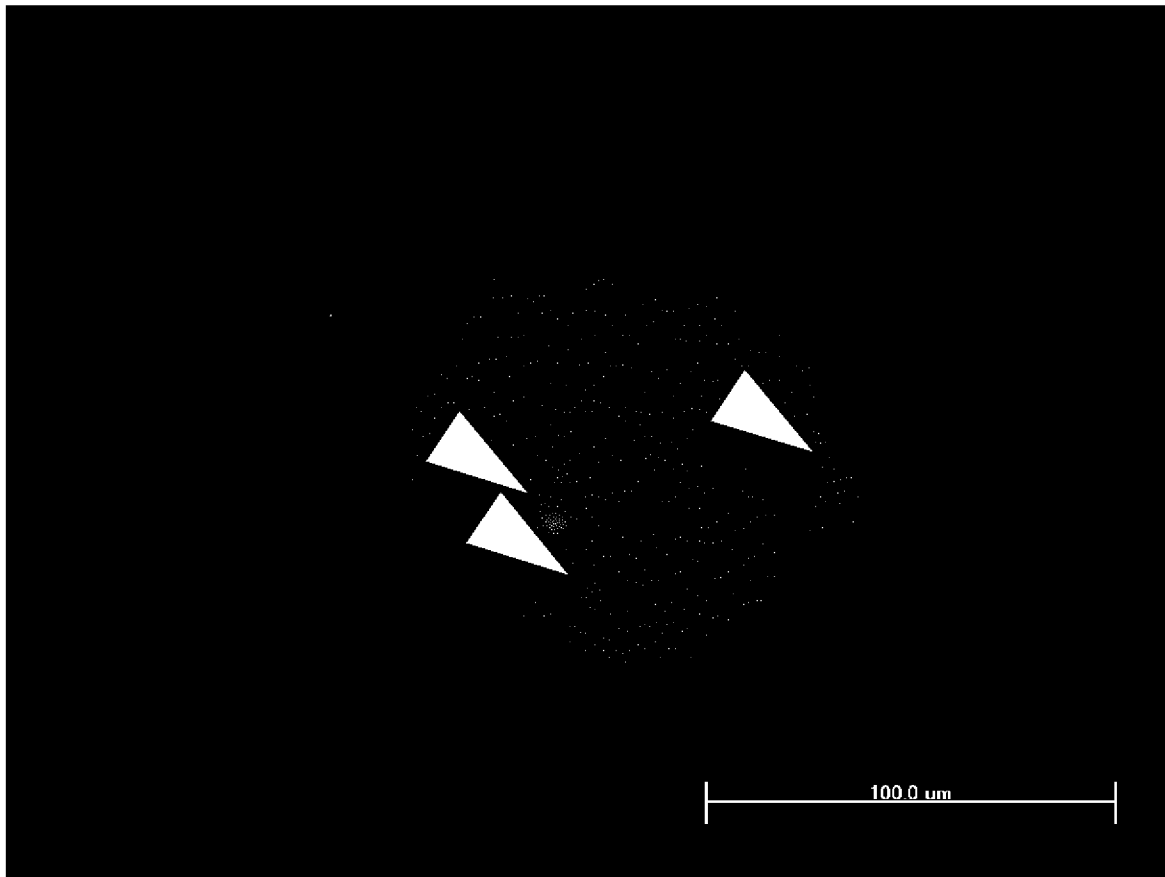
[図10a]



[図10b]



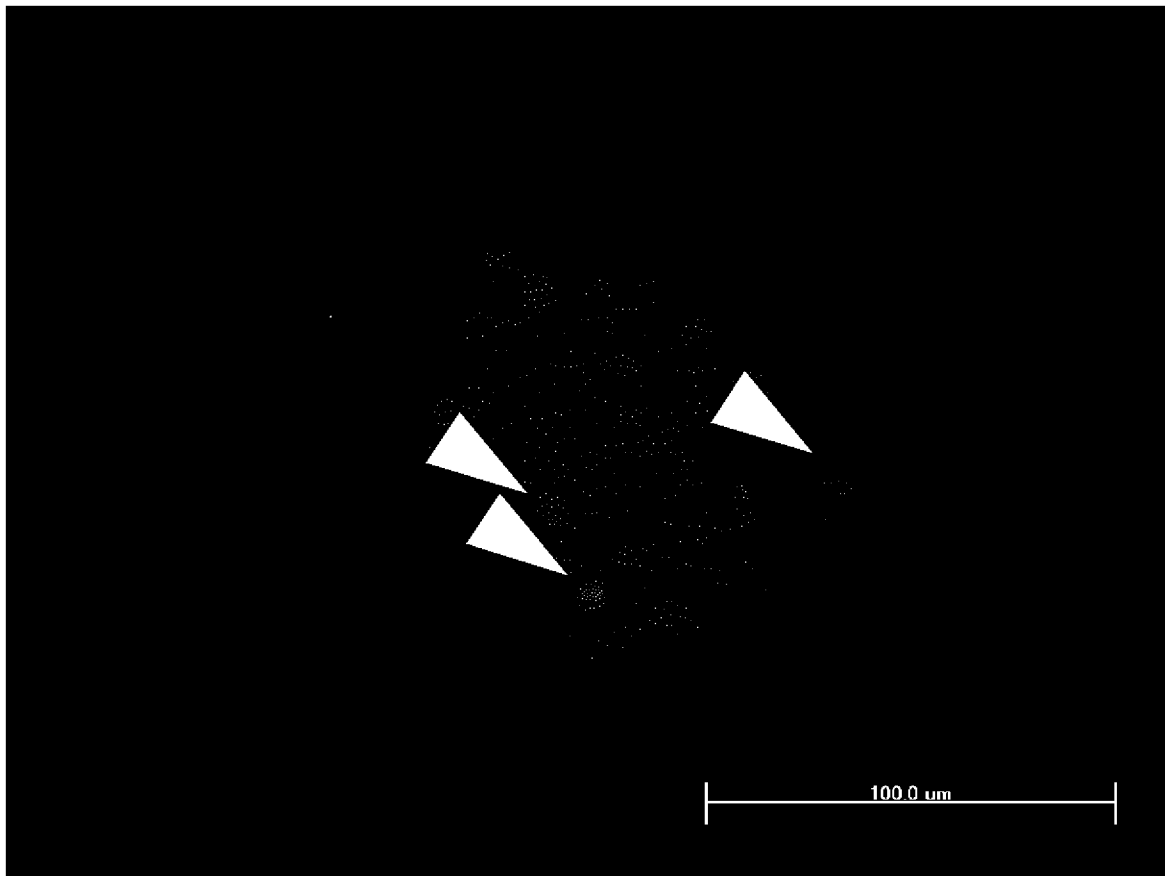
[図11a]



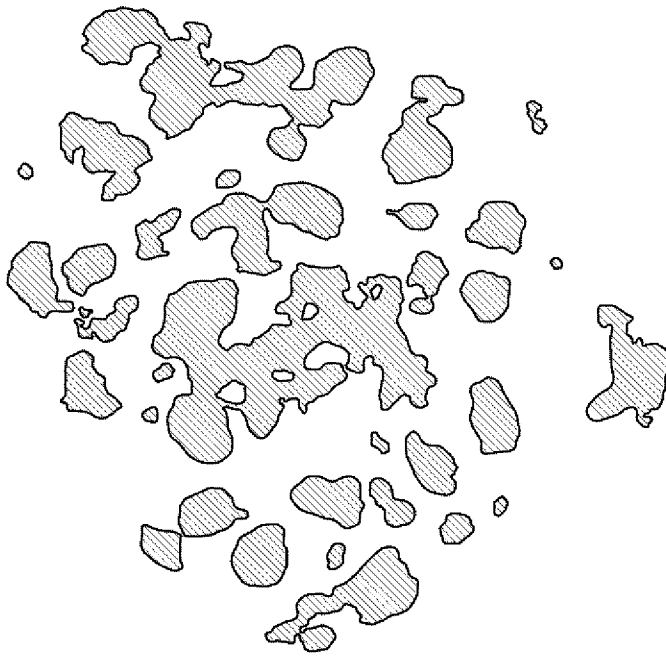
[図11b]



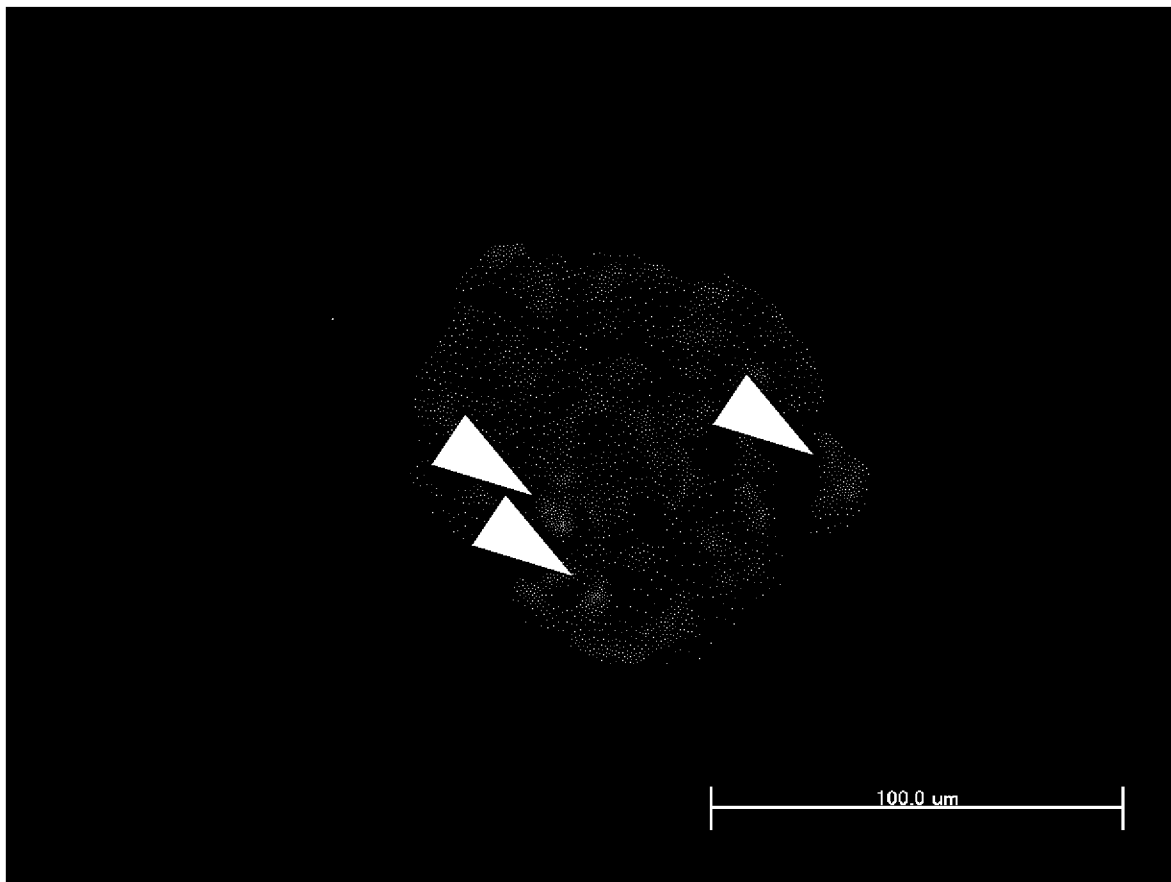
[図12a]



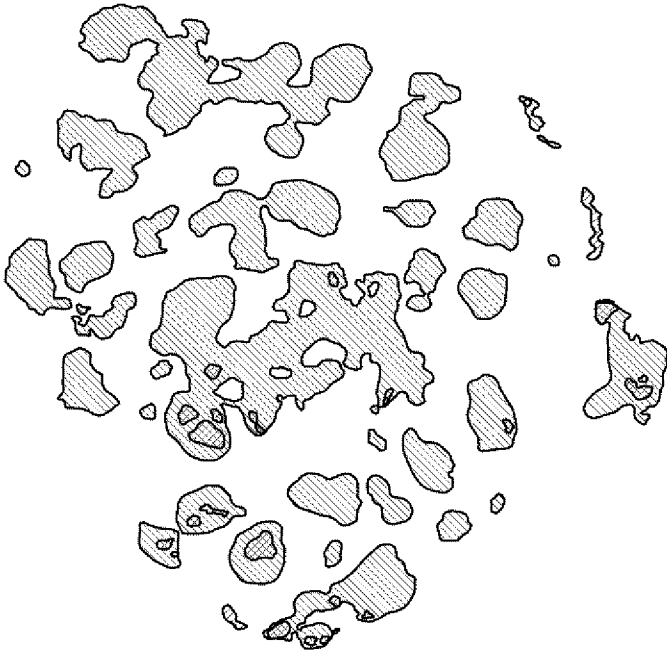
[図12b]



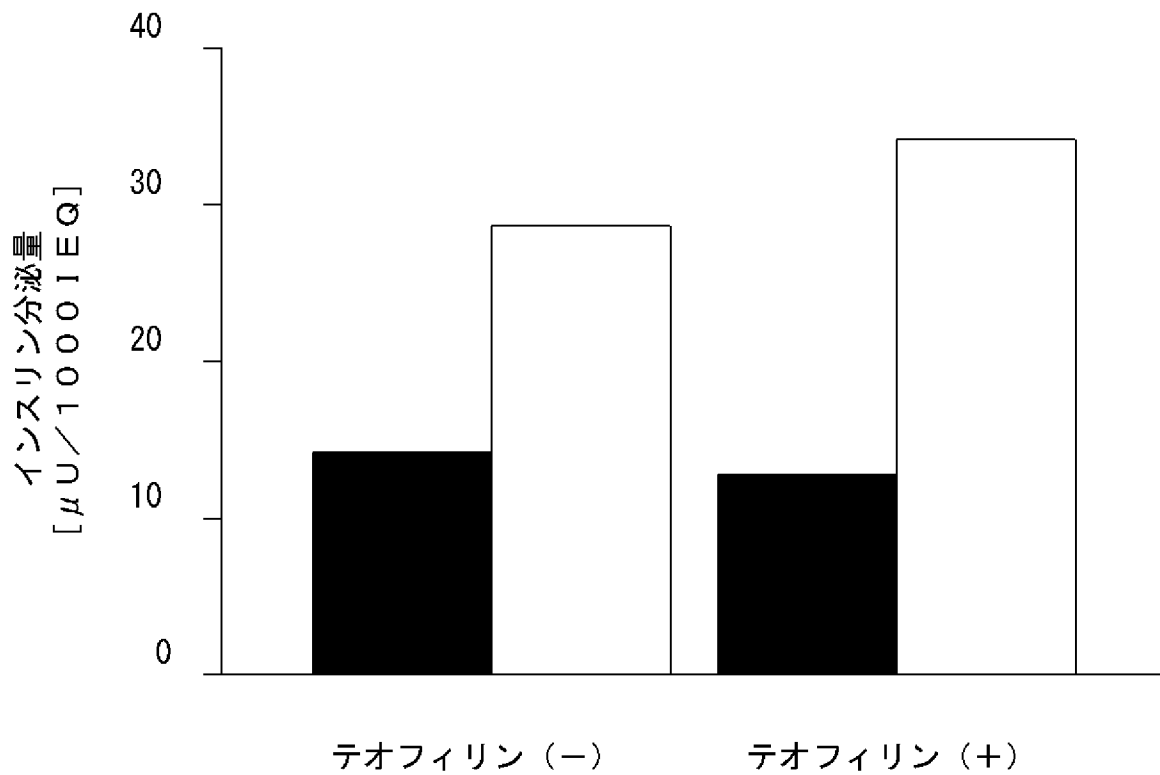
[図13a]



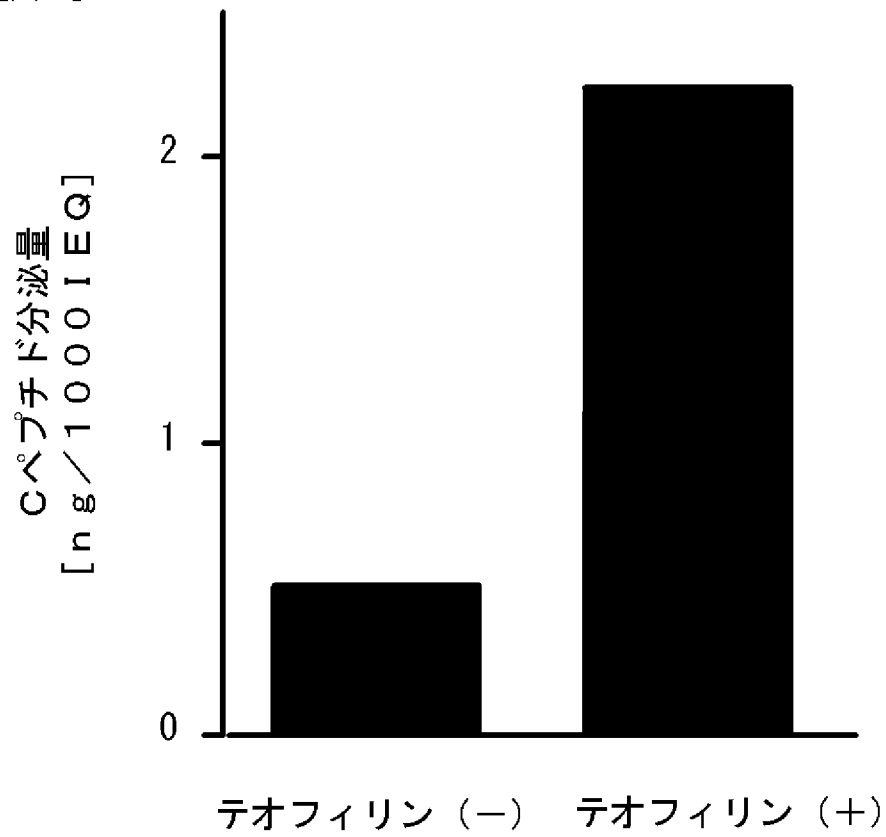
[図13b]



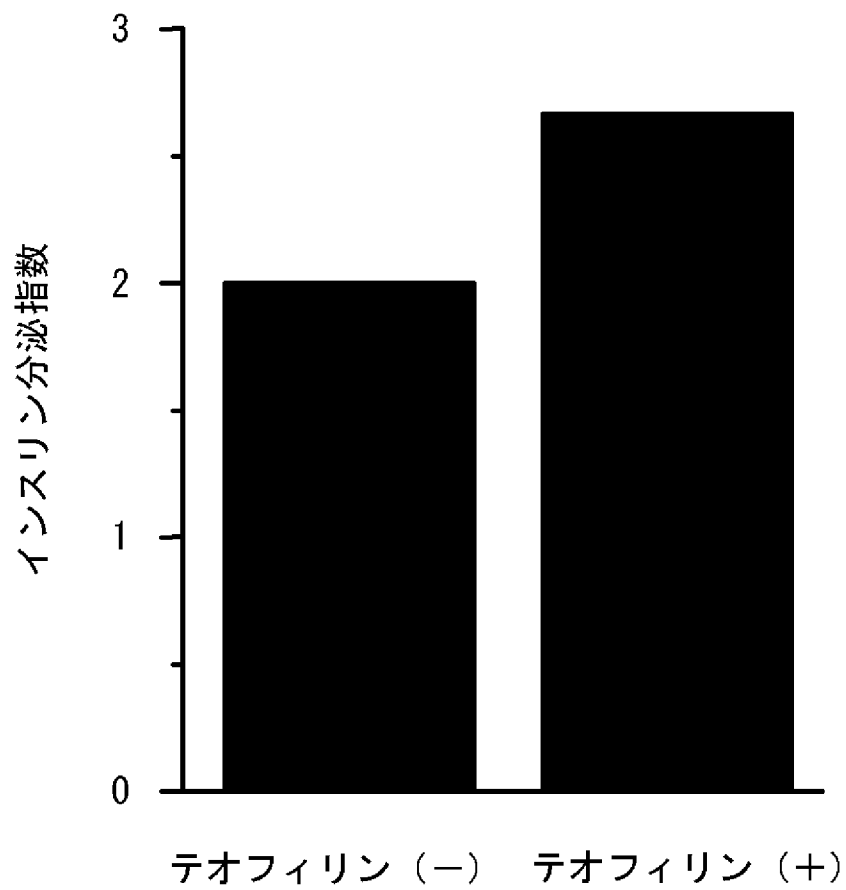
[図14]



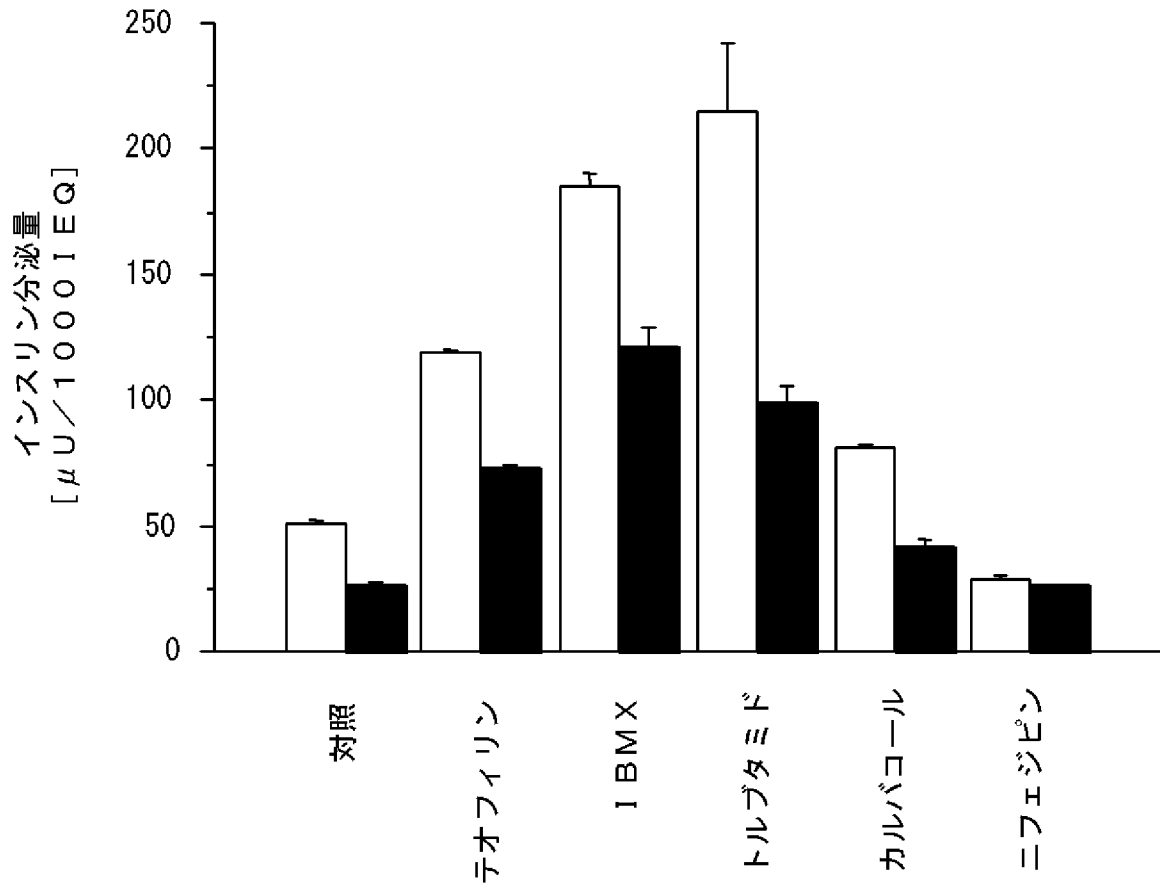
[図15]



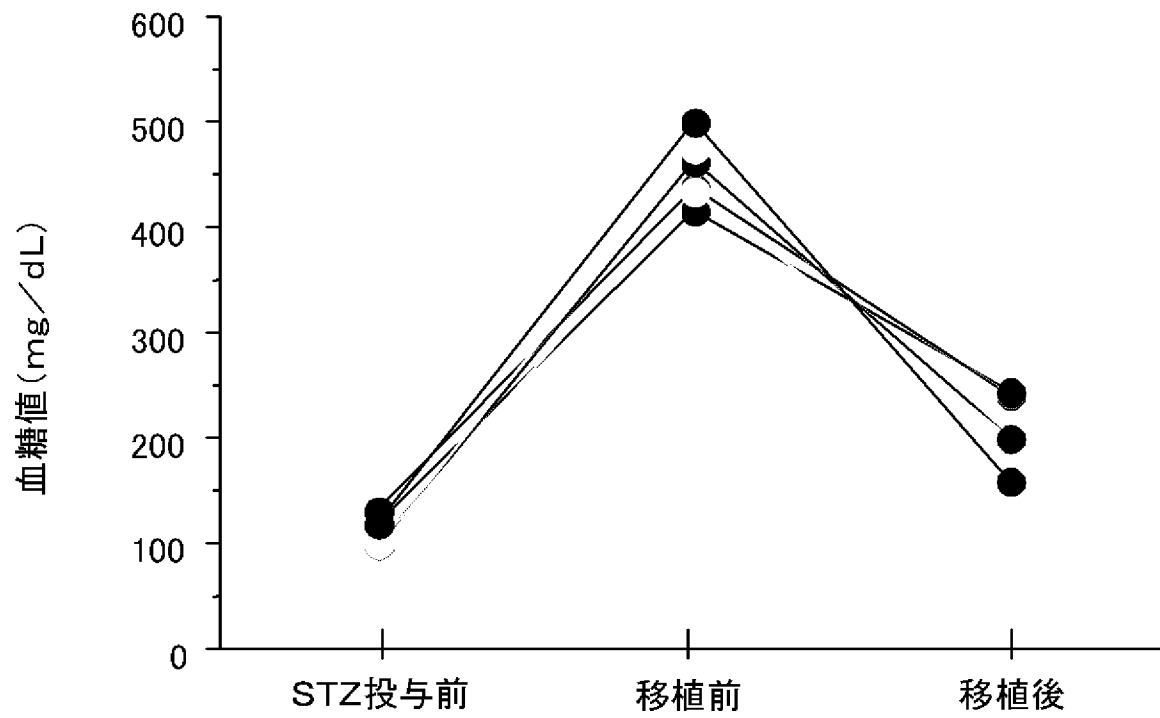
[図16]



[図17]



[図18]





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/316007

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <i>C12N5/10(2006.01) i, C12N5/06(2006.01) i, C12Q1/02(2006.01) i, C12Q1/68(2006.01) i, G01N33/15(2006.01) i, G01N33/50(2006.01) i, C12N15/09(2006.01) n</i>										
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC										
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <i>C12N5/10, C12N5/06, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, C12N15/09</i>										
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched										
<table border="0"> <tr> <td><i>Jitsuyo Shinan Koho</i></td> <td><i>1922-1996</i></td> <td><i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i></td> <td><i>1996-2006</i></td> </tr> <tr> <td><i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i></td> <td><i>1971-2006</i></td> <td><i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i></td> <td><i>1994-2006</i></td> </tr> </table>			<i>Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1922-1996</i>	<i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i>	<i>1996-2006</i>	<i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1971-2006</i>	<i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1994-2006</i>
<i>Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1922-1996</i>	<i>Jitsuyo Shinan Toroku Koho</i>	<i>1996-2006</i>							
<i>Kokai Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1971-2006</i>	<i>Toroku Jitsuyo Shinan Koho</i>	<i>1994-2006</i>							
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <i>JMEDPlus (JDream2), JST7580 (JDream2), JSTPlus (JDream2)</i>										
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>										
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.								
X	<i>WO 03/039489 A2 (ARTECEL SCIENCES INC.),            15 May, 2003 (15.05.03),            &amp; BR 0213805 A &amp; CA 2465950 A1            &amp; CN 1596305 A &amp; EP 1453954 A2            &amp; RU 2004117530 A &amp; US 2003/124721 A1            &amp; AU 2002359390 A1 &amp; JP 2005-533480 A</i>	<i>1-10, 15-17,            19-21, 23-27,            29-32, 34-45,            50-52, 54-56,            58-62, 64-67,            69-72, 74-77,            79, 81-85, 87,            89-93, 95, 97</i>								
X	<i>JP 2004-526449 A (Ixion Biotechnology, Inc.),            02 September, 2004 (02.09.04),            Particularly, Par. No. [0030]            &amp; CA 2442177 A1 &amp; EP 1385935 A1            &amp; US 2002/182728 A1 &amp; WO 02/079457 A1</i>	<i>1-10, 15-17,            19-21, 23-27,            29-32, 34-45,            50-52, 54-56,            58-62, 64-67,            69-72, 74-77,            79, 81-85, 87,            89-93, 95, 97</i>								
<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: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but 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 "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 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family										
Date of the actual completion of the international search <i>02 November, 2006 (02.11.06)</i>		Date of mailing of the international search report <i>14 November, 2006 (14.11.06)</i>								
Name and mailing address of the ISA/ <i>Japanese Patent Office</i>		Authorized officer								
Facsimile No.		Telephone No.								

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/316007

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2005-502352 A (The Regents of the University of California), 27 January, 2005 (27.01.05), Particularly, Par. No. [0166] & AU 784580 B2 & CA 2366078 A1 & BR 0008552 A & EP 1165830 A1 & US 6777231 B1 & US 2002/076400 A1	1-10,15-17, 19-21,23-27, 29-32,34-45, 50-52,54-56, 58-62,64-67, 69-72,74-77, 79,81-85,87, 89-93,95,97
X	JP 2003-523323 A (The General Hospital Corp.), 05 August, 2003 (05.08.03), & AU 778929 B2 & CA 2392615 A1 & EP 1257282 A1 & US 6866843 B2 & WO 01/39784 A1	8-10,43-45, 72,77,85,93
X	JP 11-514877 A (University of Florida Research Foundation, Inc.), 21 December, 1999 (21.12.99), Particularly, Claim 37 & AU 709165 B2 & CA 2188648 A1 & EP 0758376 A1 & US 5834308 A & WO 97/15310 A1	8-10,43-45, 72,77,85,93
A	WO 03/050249 A2 (GERON CORP.), 19 June, 2003 (19.06.03), & AU 2002364143 A1 & CA 2470539 A1 & EP 1463798 A2 & GB 2399823 A & JP 2006-500003 A & US 2003/138948 A1	1-10,15-17, 19-21,23-27, 29-32,34-45, 50-52,54-56, 58-62,64-67, 69-72,74-77, 79,81-85,87, 89-93,95,97
P,A	KODERA, T. et al., "Tonyobyto to Saisei Iryo, I Sui $\beta$ Saibo Saisei Iryo no Kinmirai, Sui $\beta$ Saibo Saisei Kiko -Overview-", July 2006, Vol.17, No.3, pages 308 to 313	1-10,15-17, 19-21,23-27, 29-32,34-45, 50-52,54-56, 58-62,64-67, 69-72,74-77, 79,81-85,87, 89-93,95,97

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2006/316007

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: 11-14, 46-49, 73, 78, 86, 94  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
It pertains to methods for treatment of human diseases by therapy or prophylaxis.
2.  Claims Nos.: 18 and so on  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
Concerning claims 18, 22, 28, 33, 53, 57, 63, 68, 80, 88 and 96, these claims are described in an extremely unclear manner. Thus, no meaningful search can be carried out on the inventions as set forth in these claims. The details are given in extra sheet. (continued to extra sheet.)
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:  
(See extra sheet.)

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  
the

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee..
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2006/316007

Continuation of Box No.II-2 of continuation of first sheet (2)

The substances as claimed in claims 18, 22, 28, 33, 53, 57, 63, 68, 80, 88 and 96 are specified by screening methods. For example, claim 18 involves substances capable of promoting the differentiation into pancreatic endocrine cells which are obtained by a screening method as claimed in any one of claims 15 to 17. However, no specific substance obtained by such a screening method is presented in the description. Thus, claim 18 is neither supported by the description nor disclosed therein. Even though the common technical knowledge at the point of the application is taken into consideration, it is unclear what specific substances are involved therein. Therefore, the above claim is described in an extremely unclear manner. The same applies to the substances as claimed in claims 22, 28, 33, 53, 57, 63, 68, 80, 88 and 96.

Such being the case, no meaningful search can be carried out on the inventions as claimed in the above claims.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

The inventions according to claims 1 to 10, 15 to 17, 19 to 21, 23 to 27, 29 to 32 and 34 relate to a method of obtaining pancreatic endocrine cells from adipose tissue-origin cells, the cells thus obtained, a screening method with the use of the obtained cells and so on; the inventions according to claims 35 to 45, 50 to 52, 54 to 56, 58 to 62, 64 to 67 and 69 relate to a method of obtaining pancreatic island from adipose tissue-origin cells and so on; the inventions according to claims 70 to 72 relate to a method of obtaining undifferentiated cells from adipose tissue-origin cells and so on; the inventions according to claims 74 to 77, 79 and 81 relate to a method of obtaining pancreatic precursor cells from adipose tissue-origin cells and so on; the inventions according to claims 82 to 85, 87 and 89 relate to a method of obtaining pancreatic endocrine precursor cells from adipose tissue-origin cells and so on; and the inventions according to claims 90 to 93, 95 and 97 relate to a method of obtaining prepancreatic endocrine cells from adipose tissue-origin cells and so on.

Although these invention groups are common to each other exclusively in aiming at obtaining pancreas-related cells, such techniques have been publicly known as reported in the following document. Thus, the inventions according to the above claims cannot be considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept but there are seemingly six invention groups differing from each other.

Document

WO 03/039489 A2 (ARTECEL SCIENCES INC.), 15 May, 2003 (15.05.03)

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N5/10(2006.01)i, C12N5/06(2006.01)i, C12Q1/02(2006.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n</p>							
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N5/10, C12N5/06, C12Q1/02, C12Q1/68, G01N33/15, G01N33/50, C12N15/09</p>							
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <p>日本国実用新案公報 1922-1996年                  日本国公開実用新案公報 1971-2006年                  日本国実用新案登録公報 1996-2006年                  日本国登録実用新案公報 1994-2006年</p>							
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)</p> <p>JMEDPlus(JDream2), JST7580(JDream2), JSTPlus(JDream2)</p>							
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求の範囲の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 03/039489 A2 (ARTECEL SCIENCES INC ) 2003.05.15 &amp; BR 0213805 A &amp; CA 2465950 A1 &amp; CN 1596305 A &amp; EP 1453954 A2 &amp; RU 2004117530 A &amp; US 2003/124721 A1 &amp; AU 2002359390 A1 &amp; JP 2005-533480 A</td> <td>1-10, 15-17, 19-21, 23-2 7, 29-32, 34-45, 50-52, 5 4-56, 58-62, 64-67, 69-7 2, 74-77, 79, 81-85, 87, 8 9-93, 95, 97</td> </tr> </tbody> </table>		引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	X	WO 03/039489 A2 (ARTECEL SCIENCES INC ) 2003.05.15 & BR 0213805 A & CA 2465950 A1 & CN 1596305 A & EP 1453954 A2 & RU 2004117530 A & US 2003/124721 A1 & AU 2002359390 A1 & JP 2005-533480 A	1-10, 15-17, 19-21, 23-2 7, 29-32, 34-45, 50-52, 5 4-56, 58-62, 64-67, 69-7 2, 74-77, 79, 81-85, 87, 8 9-93, 95, 97
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号					
X	WO 03/039489 A2 (ARTECEL SCIENCES INC ) 2003.05.15 & BR 0213805 A & CA 2465950 A1 & CN 1596305 A & EP 1453954 A2 & RU 2004117530 A & US 2003/124721 A1 & AU 2002359390 A1 & JP 2005-533480 A	1-10, 15-17, 19-21, 23-2 7, 29-32, 34-45, 50-52, 5 4-56, 58-62, 64-67, 69-7 2, 74-77, 79, 81-85, 87, 8 9-93, 95, 97					
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>							
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの                  「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの                  「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)                  「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献                  「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献                  「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの                  「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの                  「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの                  「&amp;」 同一パテントファミリー文献</p>							
<p>国際調査を完了した日</p> <p>02.11.2006</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>14.11.2006</p>						
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁 (ISA/J P)                  郵便番号100-8915                  東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>六笠 紀子</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p> <table border="1"> <tr> <td>4B</td> <td>9735</td> </tr> </table>	4B	9735				
4B	9735						

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP 2004-526449 A (イクシオン・バイオテクノロジー・インコーポレーテッド) 2004.09.02 特に【0030】参照 & CA 2442177 A1 & EP 1385935 A1 & US 2002/182728 A1 & WO 02/079457 A1	1-10, 15-17, 19-21, 23-2 7, 29-32, 34-45, 50-52, 5 4-56, 58-62, 64-67, 69-7 2, 74-77, 79, 81-85, 87, 8 9-93, 95, 97
X	JP 2005-502352 A (ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシティ オブ カリフォルニア) 2005.01.27 特に【0166】参照 & AU 784580 B2 & CA 2366078 A1 & BR 0008552 A & EP 1165830 A1 & US 6777231 B1 & US 2002/076400 A1	1-10, 15-17, 19-21, 23-2 7, 29-32, 34-45, 50-52, 5 4-56, 58-62, 64-67, 69-7 2, 74-77, 79, 81-85, 87, 8 9-93, 95, 97
X	JP 2003-523323 A (ザ ジェネラル ホスピタル コーポレーション) 2003.08.05 & AU 778929 B2 & CA 2392615 A1 & EP 1257282 A1 & US 6866843 B2 & WO 01/39784 A1	8-10, 43-45, 72, 7 7, 85, 93
X	JP 11-514877 A (ユニバーシティ オブ フロリダ リサーチ ファウンデーション インコーポレーテ ド) 1999.12.21 特に請求項 37 参照 & AU 709165 B2 & CA 2188648 A1 & EP 0758376 A1 & US 5834308 A & WO 97/15310 A1	8-10, 43-45, 72, 7 7, 85, 93
A	WO 03/050249 A2 (GERON CORP) 2003.06.19 & AU 2002364143 A1 & CA 2470539 A1 & EP 1463798 A2 & GB 2399823 A & JP 2006-500003 A & US 2003/138948 A1	1-10, 15-17, 19-21, 23-2 7, 29-32, 34-45, 50-52, 5 4-56, 58-62, 64-67, 69-7 2, 74-77, 79, 81-85, 87, 8 9-93, 95, 97
P, A	KODERA T et al, 糖尿病と再生医療, I 膵β細胞再生医療の近未来, 膵β細胞再生機構～Overview～, July 2006, Vol. 17, No. 3, p. 308-313	1-10, 15-17, 19-21, 23-2 7, 29-32, 34-45, 50-52, 5 4-56, 58-62, 64-67, 69-7 2, 74-77, 79, 81-85, 87, 8 9-93, 95, 97

## 第II欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 11-14, 46-49, 73, 78, 86, 94 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、ヒトの疾患を治療あるいは予防する方法に係るものである。
2.  請求の範囲 18他 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、請求の範囲 18, 22, 28, 33, 53, 57, 63, 68, 80, 88, 96 について、請求の範囲の記載は著しく不明確である。従って、前記請求の範囲に記載された発明について有意義な調査をすることができない。詳細は別紙参照のこと。
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。  
別紙参照。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。

(別紙)

## 第 II 欄 2. の続き

請求の範囲 1 8、2 2、2 8、3 3、5 3、5 7、6 3、6 8、8 0、8 8、9 6 に記載の物質は、スクリーニング方法によって特定されており、例えば請求の範囲 1 8 は請求の範囲 1 5 から 1 7 のいずれか記載のスクリーニング方法で得られる膵内分泌細胞への分化を促進する物質を包含するものである。しかし、明細書には当該スクリーニング方法で得られる物質としての具体的なものが一切記載されていないから、請求の範囲 1 8 は明細書による裏付けを欠き開示も欠いている。また、出願時の技術常識を勘案しても具体的にどのような物質が包含されるのか不明であって、前記請求の範囲の記載は著しく不明確である。請求の範囲 2 2、2 8、3 3、5 3、5 7、6 3、6 8、8 0、8 8、9 6 に記載の物質についても同様である。

よって、上記請求の範囲に記載された発明について有意義な調査をすることができない。

## 第 III 欄 の続き

請求の範囲 1 乃至 1 0、1 5 乃至 1 7、1 9 乃至 2 1、2 3 乃至 2 7、2 9 乃至 3 2 及び 3 4 に係る発明は脂肪組織由来細胞から膵内分泌細胞を得る方法、及び得られた細胞、得られた細胞を用いたスクリーニング方法等に関する発明であり、請求の範囲 3 5 乃至 4 5、5 0 乃至 5 2、5 4 乃至 5 6、5 8 乃至 6 2、6 4 乃至 6 7、6 9 に係る発明は脂肪組織由来細胞から膵島を得る方法等に関する発明、請求の範囲 7 0 乃至 7 2 に係る発明は脂肪組織由来細胞から未分化細胞を得る方法等に関する発明、請求の範囲 7 4 乃至 7 7、7 9、8 1 に係る発明は脂肪組織由来細胞から膵前駆細胞を得る方法等に関する発明、請求の範囲 8 2 乃至 8 5、8 7、8 9 に係る発明は脂肪組織由来細胞から膵内分泌前駆細胞を得る方法等に関する発明、請求の範囲 9 0 乃至 9 3、9 5、9 7 に係る発明は脂肪組織由来細胞から前膵内分泌細胞を得る方法等に関する発明である。

ここで、これらの発明群は脂肪組織由来細胞から膵関連細胞を得る点でのみ共通するが、下記文献に記載されたようにこのような技術は公知であるから、上記請求の範囲の発明は単一の一般的発明概念を形成しているように連関している一群の発明とはいえず、異なった 6 個の発明からなる発明群であると認める。

## 文献

WO 03/039489 A2 (ARTECEL SCIENCES INC ) 2003.05.15