



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00816754.0

[43] 公开日 2003 年 6 月 11 日

[11] 公开号 CN 1423563A

[22] 申请日 2000.12.6 [21] 申请号 00816754.0

[30] 优先权

[32] 1999.12.6 [33] US [31] 60/169,082

[32] 2000.6.28 [33] US [31] 60/215,109

[32] 2000.10.6 [33] US [31] 60/238,880

[86] 国际申请 PCT/US00/33031 2000.12.6

[87] 国际公布 WO01/39784 英 2001.6.7

[85] 进入国家阶段日期 2002.6.6

[71] 申请人 通用医疗公司

地址 美国麻省

[72] 发明人 伊丽莎白·J·亚伯拉罕

丹尼斯·福斯特曼 乔·L·哈本娜

马里奥·瓦立乔

亨德里克·祖里乌斯基

梅利莎·K·托马斯

[74] 专利代理机构 北京集佳专利商标事务所

代理人 王学强

权利要求书 17 页 说明书 64 页 附图 18 页

[54] 发明名称 胰腺干细胞及其在器官移植中的用途

[57] 摘要

治疗 I 型胰岛素依赖型糖尿病及其他使用新辨认的能够分化为不同的胰岛细胞，包括胰岛素生产的 β 细胞以及肝实质细胞的干细胞的情况的方法及组合物。Nestin 已被鉴别为胰腺干细胞的一个分子标记，而细胞角蛋白 19 作为胰导管细胞的一个明确的类的标记。本发明同样也描述了 nestin 阳性干细胞可分离自胰岛且培养以获得干细胞或假胰岛类似结构的方法。同样也描述了胰腺干细胞的体外分化的方法。分离，扩展及移植胰腺干细胞进入患者以或者同种异体移植，或者同种移植或者异种异体移植以取代丢失或损坏胰岛素分泌细胞或其它细胞的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1.治疗糖尿病患者的方法，包括以下步骤：

(a) 从供体的胰岛中分离出 nestin 阳性胰腺干细胞；且

(b) 将该干细胞转移进患者中，其特征在于干细胞分化形成胰岛素产生细胞。

2.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于患者作为步骤 a 所述干细胞的供体。

3.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于患者并不作为步骤 a 所述干细胞的供体。

4.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于患者是人而步骤 a 所述干细胞的供体是非人哺乳动物。

5.如权利要求 3 或 4 所述的方法，其特征在于在步骤(b)之前患者并不使用免疫抑制剂进行处理。

6.如权利要求 1 所述的方法其特征在于，在转移步骤之前，使用选自含有下列组分的组的试剂体外处理干细胞：EGF，bFGF-2，高葡萄糖，KGF，HGF/SF，GLP-1，exendin-4，IDX-1，编码 IDX-1 的核酸分子，betacellulin，activin A，TGF-P，及其结合体。

7.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于转移步骤是通过内向倒退注射法进行。

8.如权利要求 1 所述的方法，此外又包括步骤：

(c)使用免疫抑制剂处理患者。

9.如权利要求 8 所述的方法，其特征在于免疫抑制剂可以防止免疫反应。

10.如权利要求 8 所述的方法，其特征在于免疫抑制剂可以延缓已经发生的免疫反应。

11.如权利要求 8 所述的方法，其特征在于免疫抑制剂降低了免疫反应发生的程度。

12.如权利要求 8, 9, 10 或 11 所述的方法，其特征在于免疫反应是移植排斥反应。

13.如权利要求 8 所述的方法，其特征在于免疫抑制剂选自下列组份： FK-506，环孢霉素，及 GAD65 抗体。

14.治疗糖尿病患者的一个方法，包括下列步骤：

(a) 从供体胰岛中分离一个 nestin 阳性胰腺干细胞；

(b) 体外培养干细胞；且

(c) 将祖细胞转移进入患者，其特征在于祖细胞分化形成一个胰岛素生产 β 细胞。

15.治疗糖尿病患者的一个方法，包括下列步骤：

(a) 从供体胰岛中分离一个 nestin 阳性胰腺干细胞；

(b) 体外扩展干细胞以产生祖细胞；且

(c) 将祖细胞转移进入患者，其特征在于祖细胞分化形成一个胰岛素生产 β 细胞。

16.如权利要求 14 或 15 所述的方法，其特征在于患者作为步骤 a 所述干细胞的供体。

17.如权利要求 14 或 15 所述的方法，其特征在于患者并不作为步骤 a 所述干细胞的供体。

18.如权利要求 14 或 15 所述的方法，其特征在于患者是人而步骤 a 所述干细胞的供体是非人哺乳动物。

19.如权利要求 17 或 18 所述的方法，其特征在于患者在步骤(b)之前并不为免疫抑制剂处理。

20.如权利要求 15 所述的方法，其特征在于扩展步骤是在选自含有下列组份的组的情况下进行的：EGF，bFGF-2，高葡萄糖，KGF，HGF/SF，GLP-1，exendin-4，IDX-1，编码 IDX-1 的核酸分子，betacellulin，activin A，TGF- β ，及其结合体。

21.如权利要求 14 或 15 所述的方法，其特征在于转移步骤是通过内向倒退注射法进行。

22.如权利要求 14 所述的方法，此外又包括步骤：(d)使用免疫抑制剂处理患者。

23.如权利要求 15 所述的方法，此外又包括步骤：(d)使用免疫抑制剂处理患者。

24.如权利要求 22 或 23 所述的方法，其特征在于免疫抑制剂可以防止免疫反应的发生。

25.如权利要求 22 或 23 所述的方法，其特征在于免疫抑制剂延缓了免疫反应的发生。

26.如权利要求 22 或 23 所述的方法，其特征在于免疫抑制剂降低了免疫反应发生的程度。

27.如权利要求 24 所述的方法，其特征在于所述免疫反应是移植排斥反应。

28.如权利要求 25 所述的方法，其特征在于所述免疫反应是移植排斥反应。

29.如权利要求 26 所述的方法，其特征在于所述免疫反应是移植排斥反应。

30.如权利要求 22 或 23 所述的方法，其特征在于免疫抑制剂选自含有下列组份的组：FK-506，环孢霉素，及 GAD65 抗体。

31.治疗糖尿病患者的方法，包含下列步骤：

- (a) 从供体胰岛中分离一个 nestin 阳性胰腺干细胞；
- (b) 扩展干细胞以产生祖细胞；
- (c) 在培养基中分化祖细胞以形成假胰岛类似聚合体；且
- (d) 将假胰岛类似聚合体转移进入患者。

32.如权利要求 31 所述的方法，其特征在于患者作为步骤 a 所述干细胞的供体。

33.如权利要求 31 所述的方法，其特征在于患者并不作为步骤 a 所述干细胞的供体。

34.如权利要求 31 所述的方法，其特征在于患者是人而步骤 a 所述干细胞的供体是非人哺乳动物。

35.如权利要求 33 或 34 所述的方法，其特征在于患者在步骤(b)之前并不为免疫抑制剂处理。

36.如权利要求 31 所述的方法，其特征在于扩展步骤是在选自含

有下列组份的组的情况下进行的：EGF，bFGF-2，高葡萄糖，KGF，HGF/SF，GLP-1，exendin-4，IDX-1，编码 IDX-1 的核酸分子，betacellulin，activin A，TGF- β ，及其结合体。

37.如权利要求 31 所述的方法，其特征在于转移步骤是通过内向倒退注射法进行。

38.如权利要求 31 所述的方法此外还包括步骤：

(e) 使用免疫抑制剂处理患者。

39.如权利要求 38 所述的方法，其特征在于免疫抑制剂防止免疫反应。

40.如权利要求 38 所述的方法，其特征在于免疫抑制剂延缓了免疫反应的发生。

41.如权利要求 38 所述的方法，其特征在于免疫抑制剂降低了免疫反应发生的程度。

42.如权利要求 39，40 或 41 所述的方法，其特征在于免疫反应是移植排斥反应。

43.如权利要求 38 所述的方法，其特征在于免疫抑制剂选自含有下列组份的组：FK-506，环孢霉素，及 GAD65 抗体。

44.从胰岛中分离干细胞的方法，包括下列步骤：

(a) 从供体中转移出胰岛；

(b) 培养来自胰岛的细胞；且

(c) 从培养物中挑选 nestin 阳性克隆。

45.如权利要求 44 所述的方法，其特征在于培养是首先在一个伴

刀豆球蛋白 A 包覆的容器中进行，然后再在没有伴刀豆球蛋白 A 包覆的容器中进行培养。

46.如权利要求 44 所述的方法，此外还包括下列步骤：

(d) 通过使用选自含有 EGF, bFGF-2, 高葡萄糖, KGF, HGF/SF, GLP-1, exendin-4, IDX-1, 编码 IDX-1 的核酸分子, betacellulin, activin A, TGF-P, 及其结合体的组的试剂进行处理扩展 nestin 阳性克隆。

47.一种诱导 nestin 阳性胰腺干细胞分化成为胰腺祖细胞的方法. 包括下列步骤：干细胞使用选自含有下列组分的组的试剂进行处理: EGF, bFGF-2, 高葡萄糖, KGF, HGF/SF, GLP-1, exendin-4, IDX-1, 编码 IDX-1 的核酸分子, betacellulin, activin A, TGF-P, 及其结合体, 干细胞随后分化为胰腺祖细胞。

48.如权利要求 47 所述的方法，其特征在于胰腺祖细胞随后形成假胰岛类似聚合体。

49.移植进入哺乳动物的方法，包括下列步骤：

(a)从供体胰腺中分离出一个 nestin 阳性胰腺干细胞：且

(b)将干细胞转移进入哺乳动物，其特征在于干细胞分化形成胰岛素产生细胞。

50.如权利要求 49 所述方法，其特征在于哺乳动物作为步骤 a 所述干细胞的供体。

51.如权利要求 49 所述方法，其特征在于哺乳动物并不作为步骤 a 所述干细胞的供体。

52.如权利要求 49 所述方法，其特征在于哺乳动物是人，而步骤

a 所述干细胞的供体是非人哺乳动物。

53.如权利要求 51 或 52 所述的方法，其特征在于在步骤(b)之前并不使用免疫抑制剂处理哺乳动物。

54.如权利要求 49 所述的方法，其特征在于在转移步骤之前，使用选自含有下列组分的组的试剂体外处理干细胞: EGF, bFGF-2, 高葡萄糖, KGF, HGF/SF, GLP-1, exendin-4, IDX-1, 编码 IDX-1 的核酸分子, betacellulin, activin A, TGF-P, 及其结合体。

55.如权利要求 49 所述的方法，其特征在于转移步骤是通过内向倒退注射法进行。

56.如权利要求 49 所述的方法，此外还包括步骤：

(c)使用免疫抑制剂处理哺乳动物。

57.如权利要求 56 所述的方法，其特征在于所述免疫抑制剂防止免疫反应的发生。

58.如权利要求 56 所述的方法，其特征在于所述免疫抑制剂延缓了免疫反应的发生。

59.如权利要求 56 所述的方法，其特征在于所述免疫抑制剂降低了免疫反应发生的程度。

60.如权利要求 56, 57, 58, 或 59 所述的方法，其特征在于免疫反应是移植排斥反应。

61.如权利要求 56 所述的方法，其特征在于所述免疫抑制剂选自含有 FK-506, 环孢霉素, 及 GAD65 抗体的组。

62.移植进入哺乳动物的一个方法，包括下列步骤：

- (a) 从供体胰岛中分离一个 nestin 阳性胰腺干细胞;
- (b) 体外培养干细胞 ;且
- (c) 将祖细胞转移进入哺乳动物, 其特征在于祖细胞分化形成一个胰岛素生产 β 细胞。

63.移植进入哺乳动物的一个方法, 包括下列步骤:

- (a) 从供体胰岛中分离一个 nestin 阳性胰腺干细胞;
- (b) 体外扩展干细胞以产生祖细胞 ;且
- (c) 将祖细胞转移进入哺乳动物, 其特征在于祖细胞分化形成一个胰岛素生产 β 细胞。

64.如权利要求 62 或 63 所述的方法, 其特征在于哺乳动物作为步骤 a 所述干细胞的供体。

65.如权利要求 62 或 63 所述的方法, 其特征在于哺乳动物并不作为步骤 a 所述干细胞的供体。

66.如权利要求 62 或 63 所述的方法, 其特征在于哺乳动物是人而步骤 a 所述干细胞的供体是非人哺乳动物。

67.如权利要求 65 所述的方法, 其特征在于在步骤(b)之前使用免疫抑制剂处理哺乳动物。

68.如权利要求 66 所述的方法, 其特征在于在步骤(b)之前并不使用免疫抑制剂处理哺乳动物。

69.如权利要求 63 所述的方法, 其特征在于扩展步骤是在选自含有下列组份的组的情况下进行的: EGF, bFGF-2, 高葡萄糖, KGF, HGF/SF, GLP-1, exendin-4, IDX-1, 编码 IDX-1 的核酸分子,

betacellulin, activin A, TGF- β , 及其结合体。

70.如权利要求 62 或 63 所述的方法, 其特征在于转移步骤是通过内向倒退注射法进行。

71.如权利要求 62 所述的方法此外还包括步骤: (d)使用免疫抑制剂处理哺乳动物。

72.如权利要求 63 所述的方法此外还包括步骤: (d)使用免疫抑制剂处理哺乳动物。

73.如权利要求 71 或 72 所述的方法, 其特征在于所述免疫抑制剂防止免疫反应的发生。

74.如权利要求 71 或 72 所述的方法, 其特征在于所述免疫抑制剂延缓了免疫反应的发生。

75.如权利要求 71 或 72 所述的方法, 其特征在于所述免疫抑制剂降低了免疫反应发生的程度。

76.如权利要求 73 所述的方法, 其特征在于免疫反应是移植排斥反应。

77.如权利要求 74 所述的方法, 其特征在于免疫反应是移植排斥反应。

78.如权利要求 75 所述的方法, 其特征在于免疫反应是移植排斥反应。

79.如权利要求 71 或 72 所述的方法, 其特征在于免疫抑制剂选自含有 FK-506, 环孢霉素, 及 GAD65 抗体的组。

80.移植进入哺乳动物的方法, 包括步骤:

- (a) 从供体胰岛中分离出一个 nestin 阳性胰腺干细胞;
- (b) 扩展干细胞以生产一个祖细胞;
- (c) 在培养基中分化祖细胞以形成一个假胰岛类似聚合体; 且
- (d) 将该假胰岛类似聚合体转移进入哺乳动物。

81.如权利要求 80 所述的方法, 其特征在于哺乳动物作为步骤 a 所述干细胞的供体。

82.如权利要求 80 所述的方法, 其特征在于哺乳动物并不作为步骤 a 所述干细胞的供体。

83.如权利要求 80 所述的方法, 其特征在于哺乳动物是人而步骤 a 所述干细胞的供体是非人哺乳动物。

84.如权利要求 82 或 83 所述的方法, 其特征在于在步骤(b)之前并不使用免疫抑制剂处理哺乳动物。

85.如权利要求 80 所述的方法, 其特征在于扩展步骤是在选自含有下列组份的组的情况下进行的: EGF, bFGF-2, 高葡萄糖, KGF, HGF/SF, GLP-1, exendin-4, IDX-1, 编码 IDX-1 的核酸分子, betacellulin, activin A, TGF- β , 及其结合体。

86.如权利要求 80 所述的方法, 其特征在于转移步骤是通过内向倒退注射法进行。

87.如权利要求 80 所述的方法此外还包括步骤:

- (e)使用免疫抑制剂处理哺乳动物。

88.如权利要求 87 所述的方法, 其特征在于所述免疫抑制剂可以防止免疫反应的发生。

89.如权利要求 87 所述的方法，其特征在于所述免疫抑制剂可以延缓免疫反应的发生。

90.如权利要求 87 所述的方法，其特征在于所述免疫抑制剂可以降低免疫反应发生的程度。

91.如权利要求 88, 89 或 90 所述的方法，其特征在于免疫反应是移植排斥反应。

92.如权利要求 87 所述的方法，其特征在于免疫抑制剂选自含有 FK-506, 环孢霉素, 及 GAD65 抗体的组。

93.一个分离的，非神经干细胞的 nestin 阳性人类胰腺干细胞。

94.如权利要求 93 所述的分离干细胞其分化形成胰岛素生产的 β 细胞。

95.如权利要求 93 所述的分离干细胞其分化形成胰高血糖素生产的 β 细胞。

96.如权利要求 93 所述的分离干细胞其分化形成假胰岛类似聚集体。

97.如权利要求 93 所述的分离干细胞其分化形成肝实质细胞。

98.权利要求 93 的分离干细胞是免疫优势的。

99.如权利要求 93 所述的分离干细胞其并不表达 I 型 MHC 抗原。

100.如权利要求 93 所述的分离干细胞其并不表达 II 型 MHC 抗原。

101.如权利要求 93 所述的分离干细胞其并不表达 I 型或 II 型 MHC 抗原。

102.鉴别胰腺细胞是否干细胞的方法，其包括步骤：

接触细胞以标记的 nestin 特异性抗体，如果细胞也被抗体标记该细胞也就被鉴别为干细胞。

103.如权利要求 102 所述的方法其进一步包括步骤：

接触细胞以标记的细胞角蛋白 19 特异性抗体，如果细胞没有被抗体标记该细胞也就被鉴别为干细胞。

104.如权利要求 102 或 103 所述的方法其进一步包括步骤：

接触细胞以标记的胶原质 IV 特异性抗体，如果细胞没有被抗体标记该细胞也就被鉴别为干细胞。

105.一种诱导 nestin 阳性胰腺干细胞分化为肝实质细胞的方法，包括下列步骤：

使用可以诱导干细胞分化为肝实质细胞或分化为肝实质细胞的祖细胞的有效剂量的试剂处理 nestin 阳性的胰腺干细胞。

106.如权利要求 105 所述的方法，其特征在于试剂是 cyclopamine。

107.治疗肝病患者的方法，包括下列步骤：

(a)从供体胰岛中分离一个 nestin 阳性胰腺干细胞;且

(b) 转移干细胞进入患者，其特征在于干细胞分化形成肝实质细胞。

108.如权利要求 107 所述的方法，其特征在于患者作为步骤 a 所述的干细胞的供体。

109.治疗肝病患者的方法，包括下列步骤：

- (a)从供体胰岛中分离一个 nestin 阳性胰腺干细胞;
- (b)体外扩展干细胞以形成祖细胞;且
- (c)转移祖细胞进入患者,其特征不在于祖细胞分化形成一个肝实质细胞。

110.如权利要求 109 所述的方法,其特征不在于患者作为步骤 a 所述干细胞的供体。

111.治疗肝病患者的一个方法,包括下列步骤:

- (a) 从供体胰岛中分离一个 nestin 阳性胰腺干细胞;
- (b) 体外分化干细胞以产生一个肝实质细胞;且
- (c) 转移肝实质细胞进入患者。

112.如权利要求 111 所述方法,其特征不在于患者作为步骤 a 所述干细胞的供体。

113.如权利要求 107, 109 或 111 所述方法,其特征不在于患者并不作为步骤 a 所述干细胞的供体。

114.如权利要求 107, 109 或 111 所述方法,其特征不在于患者是人而步骤 a 所述干细胞的供体是非人哺乳动物。

115.如权利要求 113 所述的方法,其特征不在于患者在步骤(b)之前并不使用免疫抑制剂处理。

116.如权利要求 114 所述的方法,其特征不在于患者在步骤(b)之前并不使用免疫抑制剂处理。

117.如权利要求 113 所述的方法此外还包括步骤 :

- (c) 使用免疫抑制剂处理患者。

118.如权利要求 114 所述的方法此外还包括步骤：

(c) 使用免疫抑制剂处理患者。

119.如权利要求 117 所述的方法，其特征在于免疫抑制剂可以防止免疫反应。

120.如权利要求 117 所述的方法，其特征在于所述免疫抑制剂延缓免疫反应的发生。

121.如权利要求 117 所述的方法，其特征在于所述免疫抑制剂降低了免疫反应发生的程度。

122.如权利要求 117 所述的方法，其特征在于所述免疫反应是移植排斥反应。

123.如权利要求 118 所述的方法，其特征在于所述免疫反应是移植排斥反应。

124.如权利要求 119 所述的方法，其特征在于所述免疫反应是移植排斥反应。

125.如权利要求 120 所述的方法，其特征在于所述免疫反应是移植排斥反应。

126.如权利要求 121 所述的方法，其特征在于所述免疫反应是移植排斥反应。

127.移植进入哺乳动物的方法，包括下述步骤：

(a)从供体胰岛中分离一个 nestin 阳性胰腺干细胞;且

(b) 转移干细胞进入所述哺乳动物，其特征在于干细胞分化形成一个肝实质细胞。

128.如权利要求 127 所述的方法，其特征在于所述哺乳动物作为步骤 a 干细胞的供体。

129.移植进入哺乳动物的一个方法，包括下列步骤：

- (a)从供体胰岛中分离一个 nestin 阳性的胰腺干细胞；
- (b)体外扩展干细胞以产生一个祖细胞；且
- (c)转移祖细胞进入所述哺乳动物，其特征在于祖细胞分化形成一个肝实质细胞。

130.如权利要求 129 所述的方法，其特征在于所述哺乳动物作为步骤 a 所述干细胞的供体。

131.移植进入一个哺乳动物的方法，包括下列步骤：

- (a)从供体胰岛中分离出一个 nestin 阳性胰腺干细胞；
- (b)体外分化干细胞以产生一个肝实质细胞；且
- (c)转移肝实质细胞进入所述哺乳动物。

132.如权利要求 131 所述的方法，其特征在于所述哺乳动物作为步骤 a 所述干细胞的供体。

133.如权利要求 127，129 或 131 所述的方法，其特征在于所述哺乳动物并不作为步骤 a 所述干细胞的供体。

134.如权利要求 127，129 或 131 所述的方法，其特征在于所述哺乳动物是人而步骤 a 所述干细胞的供体是非人哺乳动物。

135.如权利要求 133 所述的方法，其特征在于所述哺乳动物在步骤(b)之前并不使用免疫抑制剂处理。

136.如权利要求 134 所述的方法，其特征在于所述哺乳动物在步

骤(b)之前并不使用免疫抑制剂处理。

137.权利要求 133 所述的方法此外还包括步骤:

(c) 使用免疫抑制剂处理所述哺乳动物。

138.权利要求 134 所述的方法此外还包括步骤:

(c) 使用免疫抑制剂处理所述哺乳动物。

139.如权利要求 137 所述的方法,其特征在於所述免疫抑制剂可以防止免疫反应的发生。

140.如权利要求 137 所述的方法,其特征在於所述免疫抑制剂延缓了免疫反应的发生。

141.如权利要求 137 所述的方法,其特征在於所述免疫抑制剂降低了免疫反应发生的程度。

142.如权利要求 137 所述的方法,其特征在於免疫反应是移植排斥反应。

143.如权利要求 138 所述的方法,其特征在於免疫反应是移植排斥反应。

144.如权利要求 139 所述的方法,其特征在於免疫反应是移植排斥反应。

145.如权利要求 140 所述的方法,其特征在於免疫反应是移植排斥反应。

146.如权利要求 141 所述的方法,其特征在於免疫反应是移植排斥反应。

147.一个分离的,非神经干细胞的 nestin 阳性人类肝脏干细胞。

- 148.如权利要求 147 所述的分离的干细胞其是免疫优先的。
- 149.如权利要求 147 所述的分离的干细胞其并不表达 I 型 MHC 抗原。
- 150.如权利要求 147 所述的分离的干细胞其并不表达 II 型 MHC 抗原。
- 151.如权利要求 147 所述的分离的干细胞其并不表达 I 型或 II 型 MHC 抗原。
- 152.一个分离的，非神经干细胞的 nestin 阳性人类干细胞其可以移植进入动物而并不导致移植物对寄主的移植排斥反应。
- 153.如权利要求 152 所述的分离的，nestin 阳性人类干细胞其并不是主要组织相容性复合体 I 型或 II 型限制的。
- 154.含有如权利要求 93 所述的分离干细胞且混和有一个生理学上适宜的载体的药物组合物。
- 155.含有如权利要求 147 所述的分离干细胞且混和有一个生理学上适宜的载体的药物组合物。
- 156.含有如权利要求 152 所述的分离干细胞且混和有一个生理学上适宜的载体的药物组合物。

胰腺干细胞及其在器官移植中的用途

技术领域

本发明涉及到干细胞及其分化领域，尤其是涉及到胰腺胰岛 β 细胞及 nestin 阳性肝脏干细胞及其从干细胞及祖细胞的分化，以及胰腺干细胞，祖细胞，及已分化的 β 细胞或 nestin 阳性肝脏干细胞或祖细胞在器官移植中的用途。

背景技术

本发明是在得到至少部分美国政府基金的资助下完成的，其得到国立卫生研究所授予的 DK30457 及 DK30834，因此，美国政府享有本发明的一定权利。

胰岛细胞的起源，包括其在胚胎发育还是在成熟哺乳动物细胞阶段，尽管已作了许多研究，但依然不确定。一些导管上皮细胞能够分化或者反分化以形成在成熟胰岛中的 β 细胞及其他类型的细胞 (Bouwens, 1998)。

来自分离胰岛的导管细胞可以在培养物中增殖且如果移植进入动物体内，可以分化成功能性 β 细胞 (Cornelius et al., 1997)。

已经可以证明 exendin-4，一个长期作用的 GLP-1 拮抗剂，当给予鼠类时激发了来自导管祖细胞的(新生)的 β 细胞的分化及 β 细胞的增殖。在一个 2 型糖尿病鼠模型的部分胰切手术中胰切后 10 天每天给予 exendin-4 可以减缓糖尿病的发展。已经可以证明 exendin-4

刺激了胰腺的再生及新生的 β 细胞群体的扩展及 β 细胞的增殖 (Xu et al., 1999, *Diabetes*, 48: 2270-2276)。

Ramiya 等, 已经证明分离自成人前驱糖尿病非肥胖糖尿病(NOD) 鼠的胰腺导管的多能性干细胞的体外产生的胰岛分化形成葡萄糖响应性胰岛其可以在不管是以囊装是否进入糖尿病 NOD 鼠类(Ramiya et al., 2000, *Nature Med.*, 6: 278-282)移植后反转胰岛素依赖型糖尿病。

促胰岛激素, 肠生胰高血糖素相似性多肽(GLP)-1 可以提高有助于胰腺发育的同源区转录因子 IDX-1 的胰腺表达及胰岛素基因的转录调控。与此同时, GLP-1 被给予糖尿病小鼠刺激胰岛素的分泌且可以有效地降低其血糖水平。GLP-1 同样可以提高 β 细胞的再生及胰岛的大小(Stoffers et al., 2000, *Diabetes*, 49: 741-748)。

Ferber 等, 已经证明了腺病毒介导的体外 PDX-1 (同样也为 IDX-1) 转移基因转移进入小鼠肝细胞结果使得肝实质细胞数量向 β 细胞显型反转。其表明使用 PDX-1 腺病毒载体静脉内输入小鼠后有超过 60% 的肝实质细胞合成 PDX-1。处理小鼠的血清及肝脏中免疫反应性胰岛素浓度大量增加。使用 PDX-1 处理的小鼠存活于链脲霉素诱导的糖尿病且可以调节血糖过高症(Ferber et al., 2000, *Nature Med.*, 6: 568-572)。

获自分离胰岛的导管细胞培养物明显含有可以提高胰岛素分泌的细胞量, 其还不清楚是否这些细胞是真正的干细胞或仅仅是导管上皮细胞所经历的反分化状态。即使这些物质中含有真正的干细胞,

尚不清楚哪一部分代表干细胞及可以被描述的细胞类型。因此需要从胰腺组织中分离出特定的细胞类型，使用分子标记证明哪一部分是干细胞的细胞类型且证明其是多能性的且可以长期增殖。

在大脑中已发现能够分化成为神经元及神经胶质组织的多能性干细胞。神经干细胞特定表达 nestin，一个中间丝状体蛋白(Lendahl et al., 1990; Dahlstrand et al., 1992)。在第 E11 天 Nestin 表达于发育小鼠胚胎神经管中，其在第 E16 天在大脑皮层达到表达量的最高水平，然后在成人脑皮层降低，局限于室管膜细胞群体(Lendahl et al., 1990)。发育中的神经系统及胰腺胰岛细胞显示出其与普通细胞特征相似的表型。

本发明涉及到胰腺胰岛干细胞/祖细胞(IPCs)群体其与神经元及肝脏干细胞相似且分化成胰岛 α 细胞(胰高血糖素)及 β 细胞(胰岛素)。本发明同样涉及 nestin 阳性肝脏细胞。按照本发明的 IPCs 是免疫不容性型还是免疫优势型通过其自身作为移植受体来证实。按照本发明的 IPCs 可以被用于同种异基因或经过异源基因载体移植。

本领域需要通过同种异基因或经过异源基因载体的方法移植干细胞。

本领域同样需要治疗 I 型糖尿病 mellitus 的方法其中胰岛，nestin 阳性胰腺干细胞或者 nestin 阳性肝脏干细胞通过同种异基因或异种基因的载体方法被转移进入受体细胞且并未发生移植排斥反应。

本领域同样需要移植进入一个哺乳动物细胞的方法其中胰岛，nestin 阳性胰腺干细胞或者 nestin 阳性肝脏干细胞通过同种异基因

或异种基因的载体方法被转移进入受体细胞且并未发生移植排斥反应。

发明内容

本发明的目的是提供一个哺乳动物胰腺或肝脏干细胞用于治疗糖尿病 mellitus 及其他病症。提供鉴别，定位及分离胰腺干细胞的方法也是本发明的目的，同样为本发明目的的还有提供一个分化胰腺干细胞以获得可产生胰岛素及其他激素的细胞的方法。本发明的另外一个目的是提供可使用哺乳动物胰腺或肝脏干细胞移植进入哺乳动物的方法。这些及其他的本发明的目的可通过下述一个或多个具体的技术方案来体现。

本发明的一个技术方案是提供一个治疗糖尿病 mellitus 的患者的方法。一个 nestin 阳性胰腺干细胞分离自一个供体的一个胰腺胰岛。干细胞转移进入患者其中其分化成为一个胰岛素生产细胞，另一个技术方案提供了另一种治疗糖尿病患者的方法。一个 nestin 阳性胰腺干细胞分离自一个供体的一个胰腺胰岛然后扩展至体外以产生一个祖细胞。祖细胞被转移进入患者其中其分化成为一个可产生胰岛素的 β 细胞。另一个技术方案依然提供了另一种治疗糖尿病患者的方法。一个 nestin 阳性胰腺干细胞分离自一个供体的一个胰腺胰岛然后扩展至体外以产生一个祖细胞。祖细胞在培养基中分化形成假胰岛相似性聚合体其被转移进患者。

另一个技术方案提供了另一种治疗具有糖尿病 mellitus 的患者的方法。一个 nestin 阳性胰腺干细胞分离自一个供体的一个胰腺胰

岛然后扩展至体外以产生一个祖细胞。祖细胞被转移进入患者其中其分化成为一个可产生胰岛素的 β 细胞。

在这些方案中，患者同样作为胰岛组织的供体，提供细胞的同系移植物或已分化的组织。

在一个优选的方案中，患者本身并不作为胰岛组织的供体。

在另一个优选的技术方案中，患者是人且供体是非人哺乳动物。

在另一个优选的技术方案中，在转移步骤之前对患者并不使用免疫抑制剂进行处理。

在另一个优选的技术方案中，在转移步骤之前，使用选自含有下列组分的组的试剂体外处理干细胞：EGF， bFGF-2， 高葡萄糖， KGF， HGF/SF， GLP-1， exendin-4， IDX-1， 编码 IDX-1 的核酸分子， betacellulin， activin A， TGF-P， 及其结合体。

在另一个优选的技术方案中，转移步骤是通过内向倒退注射法进行。

在另一个优选的技术方案中， 治疗具有糖尿病 mellitus 的患者 的方法此外还包括使用免疫抑制剂处理患者的步骤。

在另一个优选的技术方案中， 免疫抑制剂可以防止免疫反应。

在另一个优选的技术方案中， 免疫抑制剂减缓了已经发生的免疫反应。

在另一个优选的技术方案中， 免疫抑制剂减弱了免疫反应的强度。

在另一个优选的技术方案中， 免疫反应是免疫移植排斥反应。

在另一个优选的技术方案中，免疫抑制剂选自含有下列组分的组：FK-506， cyclosporin， 及 GAD65 抗体。

在另一个优选的技术方案中，其提供了一个从胰岛中分离干细胞的方法。从供体中分离出胰岛，然后对其细胞进行培养。从培养基中选出 Nestin 阳性干细胞克隆。可选择的是，通过在使用伴刀豆球蛋白 A 包裹的容器中的非胰岛细胞中清洗出去可结合在非胰岛细胞的胰岛细胞。

在一个优选的技术方案中，分离干细胞的方法进一步包括通过使用选自含有 EGF， bFGF-2， 高葡萄糖， KGF， HGF/SF， GLP-1， exendin-4， IDX-1， 编码 IDX-1 的核酸分子， betacellulin， activin A， TGF-P， 及其结合体的组的试剂进行处理扩展 nestin 阳性克隆的步骤。

进一步的技术方案提供了一种诱导 nestin 阳性胰腺干细胞分化成为胰腺祖细胞的方法。正如这儿所使用到的，"分化"指的是这样一个过程其中细胞经历一种变化至一个特定的细胞类型，例如一个专门的细胞类型。干细胞使用选自含有下列组分的组的试剂进行处理：EGF， bFGF-2， 高葡萄糖， KGF， HGF/SF， GLP-1， exendin-4， IDX-1， 编码 IDX-1 的核酸分子， betacellulin， activin A， TGF-P， 及其结合体，干细胞随后分化为胰腺祖细胞。

在一个优选的技术方案中，胰腺祖细胞随后形成假胰岛类似性聚集体。

本发明的一个技术方案提供了一种移植进入哺乳动物体内的方

法。一个 nestin 阳性胰腺干细胞分离自一个供体的胰岛。干细胞转移进入哺乳动物体内其中其分化成为胰岛素生产细胞。

另一个技术方案提供了另一种移植进入哺乳动物体内的方法。一个 nestin 阳性胰腺干细胞分离自一个供体的一个胰腺胰岛然后扩展至体外以产生一个祖细胞。祖细胞被转移进入哺乳动物其中其分化成为一个可产生胰岛素的 β 细胞。另一个技术方案也提供了另一种移植进入哺乳动物体内的方法。一个 nestin 阳性胰腺干细胞分离自一个供体的一个胰腺胰岛然后扩展以产生一个祖细胞。祖细胞在培养基中分化形成假胰岛相似性聚合体其被转移进哺乳动物。

另一个技术方案提供了另一种移植进入哺乳动物的方法。一个 nestin 阳性胰腺干细胞分离自一个供体的一个胰腺胰岛然后扩展至体外以产生一个祖细胞。祖细胞被转移进入哺乳动物其中其分化成为一个可产生胰岛素的 β 细胞。

在这些方案中，哺乳动物同样作为胰岛组织的供体，提供细胞的同系移植物或已分化的组织。

在一个优选的方案中，哺乳动物本身并不作为胰岛组织的供体。

在另一个优选的技术方案中，哺乳动物是人且供体是非人哺乳动物。

在另一个优选的技术方案中，在转移步骤之前对哺乳动物并不使用免疫抑制剂进行处理。

在另一个优选的技术方案中，在转移步骤之前，使用选自含有下列组分的组的试剂体外处理干细胞：EGF， bFGF-2， 高葡萄糖，

KGF, HGF/SF, GLP-1, exendin-4, IDX-1, 编码 IDX-1 的核酸分子, betacellulin, activin A, TGF-P, 及其结合体。

在另一个优选的技术方案中, 转移步骤是通过内向倒退注射法进行。

在另一个优选的技术方案中, 移植进入哺乳动物的方法此外还包括使用免疫抑制剂处理哺乳动物的步骤。

在另一个优选的技术方案中, 免疫抑制剂可以防止免疫反应。

在另一个优选的技术方案中, 免疫抑制剂减缓了已经发生的免疫反应。

在另一个优选的技术方案中, 免疫抑制剂减弱了免疫反应的强度。

在另一个优选的技术方案中, 免疫反应是免疫移植排斥反应。

在另一个优选的技术方案中, 免疫抑制剂选自含有下列组分的组: FK-506, cyclosporin, 及 GAD65 抗体。

而另一个技术方案提供了一种分离的, nestin 阳性人类胰腺干细胞, 在这个技术方案中, 干细胞分化成为或者一个 β 细胞, 一个 α 细胞, 一个假胰岛类似聚合体或者一个肝实质细胞。在该技术方案中, 干细胞是优先免疫的。在一个技术方案中, 干细胞并不表达 I 型 MHC 抗原, 在一个技术方案中, 干细胞并不表达 II 型 MHC 抗原, 在一个技术方案中, 干细胞并不表达 I 型或 II 型 MHC 抗原。

另一个技术方案也提供了一种鉴别胰腺细胞作为干细胞的方法。一个细胞使用一个标记的 nestin 特异性抗体接触, 如果细胞也为该抗

体标记，那么细胞就被鉴别为干细胞。可选择的另外的步骤包括使用抗细胞角蛋白 19 及抗胶原质 IV 的抗体接触细胞；如果其并未被或者细胞角蛋白 19 或者胶原质 IV 的抗体标记的话其就被鉴别为干细胞。

另一个技术方案提供了一个诱导 nestin 阳性胰腺干细胞分化成为肝实质细胞的方法，nestin 阳性胰腺干细胞使用有效量的可以诱导干细胞分化成为肝实质细胞或可以分化成为肝实质细胞的祖细胞的试剂进行处理。在一个优选的技术方案中，该试剂是 cyclopamine。

而另一个技术方案提供了一个治疗具有肝脏疾病的患者的方法。一个分离自供体胰岛的 nestin 阳性胰腺干细胞且转移进入患者其中干细胞分化成为肝实质细胞。

在一个相关的技术方案中，干细胞体外扩展至一个祖细胞，其被转移进入患者然后进一步分化成为肝实质细胞。

在另一个相关的技术方案中，干细胞体外分化成为一个祖细胞，其被转移进入患者，然后进一步分化成为肝实质细胞。在另一个相关的技术方案中，干细胞体外分化成为肝实质细胞，其再被移植进入患者。

在这些技术方案中，患者可以作为胰岛组织的受体，以提供细胞的同系移植物或分化组织。

在一个优选的技术方案中，患者并不作为胰岛组织的供体。

在另一个优选的技术方案中，患者是人且供体是非人哺乳动物。

在另一个优选的技术方案中，在转移步骤之前对患者并不使用免疫抑制剂进行处理。

另一个优选的技术方案中，治疗具有肝病的患者的方法此外还包括使用免疫抑制剂处理患者的步骤。

在另一个优选的技术方案中，免疫抑制剂可以防止免疫反应。

在另一个优选的技术方案中，免疫抑制剂减缓了已经发生的免疫反应。

在另一个优选的技术方案中，免疫抑制剂减弱了免疫反应的强度。

在另一个优选的技术方案中，免疫反应是免疫移植排斥反应。

然而另一个技术方案提供了一种移植进入哺乳动物细胞的方法。一个分离自一个供体胰岛的 nestin 阳性胰腺干细胞被转移进入哺乳动物细胞，其中干细胞分化成为肝实质细胞。在另一个相关的技术方案中，干细胞被被体外扩展成为祖细胞，其被转移进入哺乳动物细胞并进一步分化成为一个肝实质细胞。

在另一个相关的技术方案中，干细胞被体外分化成为祖细胞，其被转移进入哺乳动物细胞并进一步分化成为一个肝实质细胞。在另一个相关的技术方案中，干细胞体外分化成为祖细胞，然后被转移进入哺乳动物细胞。

在这些技术方案中，哺乳动物可以作为胰岛组织的供体，其提供一个细胞的同系移植物或分化组织。

在一个优选的技术方案中，哺乳动物并不作为胰岛组织的供体。

在另一个优选的技术方案中，哺乳动物是人而供体是非人哺乳动物。

在另一个优选的技术方案中，在转移步骤之前对哺乳动物并不使用免疫抑制剂进行处理。

在另一个优选的技术方案中，移植进入哺乳动物的方法此外还包括使用免疫抑制剂处理哺乳动物的步骤。

在另一个优选的技术方案中，免疫抑制剂可以防止免疫反应。

在另一个优选的技术方案中，免疫抑制剂减缓了已经发生的免疫反应。

在另一个优选的技术方案中，免疫抑制剂减弱了免疫反应的强度。

在另一个优选的技术方案中，免疫反应是免疫移植排斥反应。

然而另一个技术方案提供了一种分离的，nestin 阳性人类肝脏干细胞，在这个技术方案中，干细胞是优先免疫的。在一个技术方案中，干细胞并不表达 I 型 MHC 抗原，在一个技术方案中，干细胞并不表达 II 型 MHC 抗原，在一个技术方案中，干细胞并不表达 I 型或 II 型 MHC 抗原。

然而另一个技术方案提供了一种分离的，nestin 阳性人类干细胞其并非是神经干细胞其可以移植进入动物而并不导致移植过程中寄主的排斥反应。在该技术方案中，干细胞并非主要组织相容性复合体 I 型或 II 型限制的。

这儿所使用的“干细胞”意指未分化细胞其可以在体内外无限制性地繁殖并能够分化成为其他细胞类型。其可以是某种分化细胞，定向型细胞，不成熟细胞，祖细胞或成熟细胞类型，例如红血球及淋

巴细胞其来源于相同的祖细胞，甚至是组织发育各阶段的细胞类型其完全不同于干细胞时的组织。例如，血液干细胞可以变为脑细胞或肝细胞，神经细胞可以变为肝细胞，如此干细胞是多功能性的，假如从周围环境中获得一定的信号，其可以分化成为机体的任何组织。

在一个技术方案中，本发明所述的“干细胞”是免疫盲或免疫优先的。正如这儿所使用的“免疫盲或免疫优先”指的是细胞并不诱发免疫反应。正如这儿所使用的，“免疫反应”指的是由免疫系统针对外源物质所发生的反应。正如这儿所使用的，包括但不限于移植排斥，抗体产生，感染及抗原特异性淋巴细胞对抗原的反应。按照本领域的已知技术如果移植物志被成功移植或排斥都可以检测到免疫反应，正如在移植排斥反应分析的部分进行定义那样。在一个技术方案中，按照本发明一个“免疫盲的干细胞”或者一个“免疫优先的干细胞”可以被同种异体移植或者异种移植而不发生移植排斥反应在移植受体或寄主中可以被识别为自身。

如果寄主对移植物质不是免疫不容性的或者并未使用免疫抑制药剂以防排斥移植物质可能要遭受到移植受体或者寄主的排斥。

正如这儿所使用的，按照本发明，一个寄主如果是免疫不容性的，正如这儿所定义的那样，其不会马上发生免疫反应。在一个技术方案中，免疫不容性寄主并不排斥或破坏移植物质。在一个技术方案中，免疫不容性寄主对抗原并不发生通过产生抗体结合在抗原上的反应。

正如这儿所使用的，“排斥”指的是由寄主免疫系统排斥抑制物

质。在一个技术方案中，"排斥意指针对寄主免疫反应的结果移植物有超过 90%的细胞或组织坏死现象发生"。在另一个技术方案中，"排斥"意指生存能力的降低而且移植物针对寄主免疫反应的结果其生存能力与移植前相比降低 90%甚至更多。生存能力的降低可由本领域的普通技术来确定其包括但并不限于 trypan 蓝色排斥染色。在另一个技术方案中，"排斥"意指移植物不能增殖。增殖可以通过本领域的已知技术其包括但并不限于苏木精 / 曙红染色来测量。移植排斥的发生和 / 或移植后排斥发生的速度将依赖于各种因素，其包括但并不限于移植物(也就是说，细胞类型，细胞数量)或寄主(也就是说，不管寄主是否免疫不容性的和 / 或已经使用免疫抑制剂处理过)。正如这儿所使用到的，"移植物对寄主的排斥"或"移植物对寄主的反应"指的是移植物与寄主抗原发生的 T 细胞介导的反应。

正如这儿所使用到的，"寄主对移植排斥"或"寄主对移植反应"指的是寄主免疫系统抵抗外来移植物的细胞介导的免疫反应。

在另一个技术方案中，特异性抗体的产生发生免疫反应(例如特异性连接在移植物抗原上的抗体或特异性连接在外源物质或外源物质产品上的抗体)通过本领域已知的免疫方法检测，包括但并不限于 ELISA，免疫染色，免疫沉降反应及蛋白质印迹分析。

干细胞在细胞表面表达形态发生或生长因子受体，且可以感觉到，例如，受伤相关因子然后定位于组织受伤位点，或感受到其周围的微环境及分化成为合适的细胞类型。

"基本无限制性增殖"可以被确定，例如，通过分离干细胞在细胞

培养系统中通过至少 50, 最好是 100, 甚至 200 或者更多的细胞分化进行增殖的能力。干细胞可以是"全能的,"意指其可以成为所有的有机体细胞例如细菌细胞。干细胞也可以是"多能性的,"意指其可以成为不同类型的细胞但并不是所有的有机体细胞, 当一个干细胞分化时, 其一般成为一个更加成熟的细胞类型, 其可以成为部分分化的细胞例如祖细胞, 一个分化的细胞或者一个终止分化的细胞。干细胞可以是高度活动性的。

"Nestin"指的是中间纤维蛋白其序列已在 Genbank 上登记, 号为 X65964 (图 7)。

一个"胰腺"干细胞指的是分离自胰腺组织的干细胞和 / 或具备下述特征的细胞: nestin 阳性染色, nestin 基因表达, cytokeratin-19 负染色, 培养基中的长期增殖, 及分化成为假胰岛细胞的能力。

一个"肝"干细胞指的是分离自肝组织的干细胞和或 nestin 阳性染色特征的细胞, nestin 基因表达, 及其在培养物中的长期增殖。

一个"祖细胞"指的是一个通过分化获自干细胞的细胞其能够进一步分化成为更加成熟的细胞类型。

正如这儿所使用的, 词组"胰岛素产生的 β 细胞"指的是能够产生分泌与人类胰脏胰岛细胞 β 细胞分泌的相同数量的胰岛素的所有细胞。

更加适宜的是, 胰岛素产生的 β 细胞胰岛素的分泌同样以人类 β 细胞原位胰岛素的分泌调控相似的方式进行调控; 例如, 胰岛素的分泌同样可为在胰岛素产生的 β 细胞周围葡萄糖浓度的提高而刺激。

"假胰岛相似性"聚合体是一个胰岛素分泌细胞的人工聚合体其在形态与功能上与胰岛细胞相似。假胰岛相似性聚合体在细胞培养条件下体外产生。其直径大约为 50-150 μm (与胰岛平均直径 100 μm 相比较) 且形状为球形体。

"分离"一个干细胞指的是从组织样品中移出干细胞且与另外的非组织干细胞分开。一个分离的干细胞可以从其他类型的细胞中自由分出且具有增殖能力而分化成为组织中的成熟细胞。然而, 当处理干细胞的收集时, 例如干细胞的培养, 已经得知其有部分可能性获得 100%纯度的干细胞。因此, 一个分离的干细胞可以存在于其他类型的细胞仅有一部分时且并不与干细胞的分析或生产其它分化种类的细胞类型使用相冲突时, 分离的干细胞一般至少为 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 或 99% 纯度。最好是, 按照本发明分离干细胞至少有 98%或 99%的纯度。

一个干细胞是"扩展的"当其在培养物中增值时且通过细胞分化变为其他类型的干细胞和 / 或祖细胞。干细胞的扩展可以在干细胞的增殖的同时进行其也可能需要某种特定的生长环境, 例如最小的细胞浓度, 容器表面的细胞汇集度或者加入化学因子例如生长因子, 分化因子或信号因子。

一个干细胞, 祖细胞或分化细胞被移植或者引入一个哺乳动物细胞当其从一个培养器中转移至一个患者时。这儿所使用到的移植可以包括按照本发明所述的干细胞分离步骤及将干细胞转移进入哺乳动物或患者体内。移植可能涉及到通过注射细胞悬液进入哺乳动物或者

患者，外科手术将细胞移植进入哺乳动物或患者体内的组织或器官，使用细胞悬浮灌注组织或器官等将干细胞转移进入哺乳动物或患者体内。转移干细胞或移植的路径将通过细胞在特定组织或器官中的定位的需要及细胞为靶定组织或器官所发现或获得的能力来确定。在一个案例中移植细胞定位于特定的位点，其可以被外科转移进入组织或器官或者简单地注射进入血流如果该细胞在靶定细胞中有移植的能力。

正如这儿所使用的，移植可以包括按照本发明分离干细胞，培养和转移干细胞进入哺乳动物或者患者体内去的步骤。正如这儿所使用的，移植可以包括按照本发明分离干细胞，分化干细胞，转移干细胞进入哺乳动物或者患者体内去的步骤。正如这儿所使用的，移植可以包括按照本发明分离干细胞，分化和扩展干细胞，转移干细胞进入哺乳动物或者患者体内去的步骤。

这儿所使用到的一个"移植物质"按照本发明指的是至少 10^5 干细胞甚至到 10^8 或 10^9 个干细胞。

通过给予患者人以试剂其可以预防延缓如移植细胞组织器官的排斥等免疫反应的发生或已发生免疫反应强度的降低的免疫抑制剂。

正如这儿所使用到的，"免疫抑制反应"指的是防止免疫反应（例如如这儿所定义的给予免疫抑制剂）以至于免疫反应并不能检测到。正如这儿所使用到的，免疫反应的预防指的是免疫反应检测不到。一个免疫反应（例如移植排斥或抗体产生）按照本领域已知技术检测到。

按照本发明"免疫抑制"同样意指与任一并未受到免疫抑制试剂

的移植受体或者不是“免疫盲的”或“免疫优先”的如这儿所定义的那样的移植物质移植的受体相比较免疫反应发生的延缓。免疫反应的延缓发生可以是短期延缓，例如1小时至10天例如1小时，2，5或10天。免疫反应发生的延缓也可以是长期延缓例如10天至10年（例如30天，60天，90天，180天，1，2，5，10年）。

按照本发明“免疫抑制反应”同样意指免疫反应强度的减少，按照本发明免疫反应强度可以减少例如5—100%，最好是25—100%及最好是75—100%任一并未受到免疫抑制试剂的移植受体或者不是“免疫盲的”或“免疫优先”的如这儿所定义的那样的移植物质移植的受体的免疫反应强度。免疫反应强度的减少通过确定移植物质被排斥的时间点来测量。例如一个含有移植物质在移植后1天被排斥的免疫反应比较在移植后30天被排斥的免疫反应强度要大。

免疫反应的强度同样可以通过定量可特异性结合至移植物质上的抗体的数量来测量其中所产生抗体的水平与免疫强度正相关。此外，免疫反应强度可以通过确定检测到的特异性抗体可特异性结合至移植物质上的时间点来确定。

不同的方法和试剂可被用于免疫抑制。例如淋巴细胞的增殖和活化一般可通过使用这样的试剂例如FK-506，环孢霉素或其他免疫抑制剂进行抑制。另外的可能的的方法是给予抗体例如抗GAD65单抗或其他的化合物其可以掩盖移植细胞表面上的抗原并因此使得部分细胞为寄主免疫系统所看不到。

一个“免疫抑制试剂”是这样的一个试剂其可以预防延缓寄主中

外源细胞尤其是移植细胞的免疫反应强度。最好是这样的免疫抑制试剂其可以抑制细胞介导为其免疫系统鉴别为非自身的免疫反应，免疫抑制试剂例如包括但并不限于环孢霉素，环磷酰胺，强的松，地塞米松，甲氨喋呤，咪唑硫嘌呤，mycophenolate，镇静剂，FK506，系统类固醇，及其他的大范围内的抗体，受体拮抗剂，及其他本领域已知的试剂。

一个"促有丝分裂剂"可以是任一试剂其可以刺激细胞的有丝分裂及增殖。

一个"分化因子"指的是可以导致干细胞或祖细胞分化为另外细胞类型的试剂。分化一般通过改变干细胞或祖细胞一个或多个基因的表达来实现其结果在于细胞改变了结构及功能。

正如这儿所使用到的一个"信号因子"为一个细胞所分泌的试剂其可以作用于相同或不同的细胞。例如一个信号因子其可以抑制或诱导生长，增殖或其本身的分化，机体中的相邻细胞或距离较远的细胞。信号因子可以例如在组织中传递位置信息，调控结构形成，或影响各种解剖学构造的大小，形状及功能。

正如这儿所使用到的，哺乳动物指的是任一哺乳动物包括但不限于人类，鼠，羊，猴，山羊，兔子，硕鼠，马，牛或猪。

一个"非人哺乳动物"，正如这儿所使用到的，意指非人的任一哺乳动物。

正如这儿所使用到的，"同种异源基因"指的是同种遗传性不同的成员。

正如这儿所使用到的, "同基因"指的是同样的遗传构造。

正如这儿所使用到的, "异基因"指的是不同种的成员。

正如这儿所使用到的, "培养"指的是增殖或营养一个细胞, 细胞, 组织或器官的收集通过在一定环境下孵育一段时间并在此条件下支持细胞的增殖或存活。培养包括一个或多个扩展或增殖细胞, 按照本发明收集细胞组织或器官的步骤。

本发明同样提供了一个药物组合物其包括本发明的分离干细胞以及药理学上合适的载体。

附图说明

图 1A 及 1B 显示了鼠胰岛在胚胎 16 天双重荧光免疫细胞化学染色(图 1 A)及在出生后 60 天(图 1 B)。Nestin 的抗体免疫染色以白色显示(一开始是红色, 使用 Cy3 作为荧光团) 且抗胰岛素抗体是以灰色显示(一开始是绿色, 使用 Cy2 作为荧光团)。

图 2 显示了使用获自 50 个鼠胰岛 mRNA 进行的 RT-PCR 结果, 前后引物都已被标明。834 bp 的单链被测序且被标明为 nestin 序列。

图 3 显示了 nestin 阳性细胞其已从培养的鼠胰岛中增殖。

图 4 显示了鼠胰岛类似物在培养物中的发育。

图 5 显示了培养物中产生的胰岛类似结构的 RT-PCR 的分析结果。NCAM 及 cytokeratin-19 (CK19)的表达都被检测到。

图 6 显示了高葡萄糖刺激 nestin mRNA 的表达。APRT 作为对照进行鉴定。

图 7 是 nestin 的氨基酸及核苷酸序列。

图 8 描述了在胰岛中独特的细胞群体的神经干细胞特异性标记 nestin 的表达如免疫细胞化学或 RT-PCR 所确定的那样。

图 9 描述的是通过免疫细胞化学或 RT-PCR 从胰腺中分离的干细胞 nestin。

图 10 描述的是获自 nestin 阳性胰岛祖细胞(NIPs)的人类胰岛类似性聚合体中的同族区域蛋白 IDX-1 及 proglucagon 的表达。

图 11 证明了 nestin 阳性细胞在鼠胰腺管区域定位。

图 12 描述其为胰岛内分泌细胞祖先的胰管细胞的起源的替代模型。

图 13A 及 B 描述了 nestin 阳性肝脏干细胞的免疫荧光染色。

图 14 描述了在鼠内分泌胰腺发育期间转录因子的序列。

图 15 描述了在含有干细胞的人类 NIP 培养物中神经内分泌，外分泌胰腺及肝脏标记。

图 16 描述了通过 RT-PCR 确定的 proglucagon 及胰岛素 mRNA 的表达。

具体实施方式

现在的发明家已经鉴别且分离出了来自具有干细胞功能及分子特征的哺乳动物胰腺胰岛管细胞的一个特定的亚簇。尤其是，这些新发现的胰腺干细胞通过一个或多个(最好是全部)的其他事物来描述：nestin 阳性染色， nestin 基因表达， cytokeratin-19 阴性染色， 培养物中的长期增殖，分化成为培养物中假胰岛的能力。这些发明者同样

也鉴别出展示 nestin 阳性染色的肝细胞。

在一个技术方案中，本发明提供了用于不同应用的干细胞，其包括但并不限于当研究工具发展至可以研究不同糖尿病条件下，荷尔蒙异常及遗传疾病或条件例如具有特定生理及病理特征的多态性等条件下治疗I型胰岛素依赖型的糖尿病及其他类型的糖尿病的细胞替换。本发明的干细胞被同样用于内分泌腺及其他组织在同系移植、同种异体移植或异种移植移植时的基因治疗。而且，这儿所描述的干细胞可被用于产生重组细胞，人工组织及器官替换。

他们同样可用于体外产生胰岛素及其他激素。

本发明者所发现的胰腺干细胞的分子特征例如 nestin 阳性及 cytokeratin-19 阴性染色，或者肝干细胞，例如 nestin 阳性染色，其可被用于各种诊断，病理或调查性的方法以鉴别，定位及计量患者或实验动物组织中干细胞的数量。

胰岛干细胞的鉴别

以前的研究都聚焦于胰岛管上皮细胞或者外分泌组织作为干细胞可能的来源以用于胰岛外分泌细胞的再生。Nestin 是一个中间纤维蛋白其通过从一个 E 15 鼠胚胎使用一个单克隆抗体 R. 401 (Hockfield & McKay, 1985; Lendahl et al., 1990)筛选一个 cDNA 文库进行克隆。Nestin 最初发现于神经上皮干细胞且其在发育中的中枢神经系统中表达。在鼠胚胎 E16 中达到最高水平后，nestin 表达量在成人脑皮层降低至几乎不可检测的水平，其正好与早期 nestin 表达祖细胞的终止分化相一致 (Lendahl et al., 1990)。Nestin 起初

仅发现于胚胎发育的脑及骨骼肌中的干细胞中 (Lendahl et al., 1990)。最近的研究表明在成人哺乳动物前脑中室管膜下层 nestin 阳性神经干细胞 (Morshead et al., 1994)。

Nestin 阳性干细胞已被证明其是一个多能性的甚至当其分离出成熟小鼠大脑中。例如, nestin 阳性干细胞可以产生所有三种主要类型神经细胞: 神经元, 星形胶质细胞及少突细胞(Reynolds & Weiss, 1996)。Nestin 阳性神经干细胞反应脊髓的损伤是通过可以分化成为星形胶质细胞的迁移细胞的增殖及降解, 其也参与疤的形成 (Johansson et al., 1999)且在输入照射鼠后储存骨髓造血细胞 (Bjornson et al., 1999)。

干细胞的特征:

按照本发明所述的干细胞可以通过 nestin 的表达, 例如 FACS, 免疫细胞化学染色, RT-PCR,

DNA 印迹及蛋白质印迹分析, 及其他的本领域已知的细胞鉴别技术进行鉴别。

免疫细胞化学染色, 例如, 按照下述方法进行: 准备自胰腺或肝脏的 Cryosections (6 μ M)以及细胞在磷酸溶液的 4%的多聚甲醛中固定。细胞首先使用 3 % 正常的驴血清室温下凝固 30 分钟且与最初的抗相关蛋白的抗血清在 4°C 下过夜孵育培养。抗血清使用 PBS 洗涤且在合适的荧光标记的第二抗体下室温下孵育 1 小时。然后使用 PBS 再次洗涤斜面且使用荧光封固剂涂附斜面 (Kirkegaard and Perry Labs, Gaithersburg, MD)。使用装有界面上有一个 PowerMac 7100

装有 IP 实验光谱分析软件 (Signal Analytics Corp, Vienna, VA) 的光学 TEC-470 CCD 照相机(Optronics Engineering, Goleta, CA) 的 Zeiss Epifluorescence 显微镜获取荧光图片。

按照本发明所述的有用的抗血清包括下列：抗人细胞角蛋白 19(clone K4.62, Sigma, St. Louis, MO)的鼠单抗，抗鼠 nestin 的兔多克隆抗血清以及抗鼠 IDX-1 (使用纯化的 GST-nestin 融合蛋白或鼠 IDX-1 最后十二个氨基酸分别免疫兔子所准备) (McManus et al., 1999, J.Neurosci., 19: 9004-9015)的兔多克隆抗血清，豚鼠抗胰岛素及抗胰腺多肽抗血清，获自 Linco, St. Charles, MO, 且鼠抗胰高血糖素及兔抗生长激素抑制素，分别购买自 Sigma (St.Louis, MO) 及 DAKO (Carpinteria, CA), 鼠抗人 galanin (Peninsula Laboratories, Belmont, CA), 角原质 IV 抗血清 (Caltag Laboratories, San Francisco, CA), 鼠抗鼠 MHC I 型血清 (Serotek), 及抗鼠 MHC II 型抗血清。本发明预期这些指向一定标记的抗血清是可获得的, 另外的一些抗血清的使用也在本发明的保护范围之内。

RT-PCR 及 DNA 印迹法按照下述方法进行。获自鼠或人胰岛的总的细胞 RNA 被反转录且通过 PCR 扩增按照扩增的预期程度大约 35 个循环, 正如前所述 (Daniel, et al., 1998, Endocrinology, 139: 3721-3729)。用作 PCR 引物或扩增引物以及 RNA 印迹杂交的探针的寡聚核苷酸可以为:

鼠 nestin: 正向, 5'gcgggcggtgcgtgactac3' ;

反向, 5'aggcaagggggaagagaaggatgt3' ;
杂交, 5'aagctgaagccgaatttccttgggataccagagga3'。
鼠角蛋白 19: 正向, 5'acagccagtacttcaagacc3' ;
反向, 5'ctgtgtcagcacgcacgtta3' ;
杂交, 5'tggattccacaccaggcattgacctgcca3'。
Rat NCAM : 正向, 5'cagcgttgagagtccaat3' ;
反向, 5'ttaactcctgtggggttg3' ;
杂交, 5'aaaccagcagcgatctcagtgggtggaacgatgat3'。
Rat IDX-1 正向, 5'atcactggagcagggagt3'
反向, 5'gctactacgtttcttatct3'
杂交, 5'gcgtggaaaagccagtgagg3'
人类 nestin: 正向, 5'agaggggaattcctggag3' ;
反向, 5'ctgaggaccaggactctcta3' ;
杂交, 5'tatgaacgggctggagcagtctgaggaaagt3'。
人类角蛋白: 正向, 5'cttttcgcgcgcccagcatt3' ;
反向, 5'gatcttctgtccctcgagc3' ;
杂交 5'aacctgaggaggaaatcagtacgctgagg3'。
人类胰高血糖素: 正向, 5'atctggactccaggcgtgcc3' ;
反向, 5'agcaatgaattccttggcag3' ;
杂交, 5'cacgatgaatttgagagacatgctgaagg3' ;
人 E-Cadherin 正向, 5'agaacagcacgtacacagcc 3'
反向, 5'cctccgaagaacagcaaga 3'

杂交, 5'tctcccttcacagcagaactaacacacggg 3'

人 transthyretin 正向, 5'gcagtcctgccatcaatgtg 3'

反向, 5'gttgctgtgaataccacct 3'

杂交, 5'ctggagagctgcatgggctcacaactgagg 3'

人胰淀粉酶正向, 5'gactttccagcagtccata 3'

反向, 5'gtttacttctgcaggaac 3'

杂交, 5'ttgactggagaaggattacgtggcgttcta 3'

人羧肽酶原正向, 5'tgaaggcgagaagggttcc 3'

反向, 5'ttcgagatacaggcagatat 3'

杂交, 5'agttagacttttatgtcctgctgtgctca 3'

人 Synaptophysin 正向, 5'cttcaggctgcaccaagtgt 3'

反向, 5'gttgaccatagtcaggctgg 3'

杂交, 5'gtcagatgtgaagatggccacagaccaga 3'

人类肝实质细胞生长因子 (HGF)

正向, 5'gcatcaaatgtcagccctgg 3'

反向, 5'caacgctgacatggaattcc 3'

杂交, 5'tcgaggtctcatggatcatacagaatcagg 3'

人 cMET (HGF-receptor)正向, 5'caatgtgagatgtctccagc 3'

反向, 5'cctttagattgcaggcaga 3'

杂交, 5'ggactccatccagtgtctccagaagtgat 3'

人 XBP-1 正向, 5'gagtagcagctcagactgcc 3'

反向, 5'gtagacctctgggagctcct 3'

杂交, 5'cgcagcactcagactacgtgcacctctgca 3'

人 Glut-2 正向, 5'gcagctgctcaactaatcac 3'

反向, 5'tcagcagcacaagtcccact 3'

杂交, 5'acgggcattcttattagtcagattattggt 3'

人胰岛素正向, 5'aggcttctctacaca3'

反向, 5'caggctgctgcacca 3'

杂交, 5'aggcagaggacctgca 3'

其他的一些这样的一些序列是可能的且这些序列被认为在本技术方案的范围之内。正如普通教导, 选自两个不同外显子的引物其包含至少一个内含子序列。此外, 一个 RT 负对照也用于许多样品。PCR 扩增在 94°C 下 1 分钟随后再在 94°C 下 10 秒钟, 58/56 °C 下 10 秒, 72°C 下 1 分钟, 35 个循环, 及在 72 °C 下 2 分钟。退火温度是 58 °C 对于鼠 nestin 来讲且对于其他的引物碱基对来讲为 56 °C。

对于分离自非鼠或人的哺乳动物的 mRNA 的 RT-PCR, 特异于来自要准备分析的哺乳动物种的扩增核酸的寡聚核苷酸。这些引物的选择及使用为本领域技术人员所共知。

对于 DNA 杂交寡聚核苷酸探针使用合适的放射性核来进行标记, 例如 γ -³²P ATP, 其使用传统的技术。

放射性标记探针在 37°C 下杂交于转移进入尼龙膜的 PCR 产品一小时, 然后在 1 x SSC + 0.5% SDS 在 55 °C 下洗涤 10-20 分钟或在 0.5 x SSC + 0.5% SDS 在 42°C 下对于人类的 PCR 产品。

Nestin 作为胰腺干细胞的标记

发明家已经出乎意料地发现成人哺乳动物包括人类的胰脏含有表达 nestin 的细胞。重要的是，nestin 阳性细胞在胰脏中的分布并不相应于激素产生细胞。例如特异性反应与胰岛素或胰高血糖素的荧光标记抗体分别标记有胰岛的 β 及 α 细胞，其中发明者已经发现在老鼠及人类中荧光标记的 nestin 抗体仅位于管上皮的某些细胞中且并不是 α ， β ，delta，及产生于胰岛的胰脏多肽 (图 1)。发明者同样发现特异于胶原质 IV 的抗体，动脉管 endothelial 细胞 galanin，神经末梢的一个标记及细胞角蛋白 19，管细胞的一个标记，其并不共位于 nestin 抗体。此外，发明家已经发现 nestin 阳性胰岛细胞并不与抗胰岛素，胰高血糖素，生长激素抑制素或者胰多肽共标记(图 1)。这表明这些 nestin 包含细胞并非内分泌细胞，管细胞，神经细胞或者动脉 endothelial 细胞，但是其却代表一个先前并未描述的胰岛中的真正独特的细胞类型。发明者已经发现胰岛中的 nestin 阳性细胞正如胰脏导管中的其他区域一样且位于外分泌胰脏的 centroacinar 区域。

nestin mRNA 在胰岛中的表达通过使用 RT-PCR 使用分离自鼠胰岛的 RNA (图 2) 进行检测。nestin 阳性胰脏细胞的功能性特点使用通过从胰岛中分离出 nestin 阳性细胞且细胞培养技术进行检测，这些下面进一步描述。

发明家同样发现了鼠肝含有可以表达 nestin 的细胞 (图 13)。

细胞角蛋白-19 作为管上皮细胞截然不同的细胞特征的标记

细胞角蛋白-19 (CK-19)是另一种中间纤维蛋白。CK-19 及相关

的细胞角蛋白先前已经被发现在胰脏导管细胞中表达 (Bouwens et al., 1994)。发明家已经发现, 虽然如此但是 CK-19 表达限制于小导管, 特异于 CK-19 的荧光抗体完全不同于 nestin 特异性抗体标记的导管细胞。这表明胰岛中的 nestin 阳性细胞可能是一种很特别的导管细胞类型其不同于 CK-19 阳性细胞。

从胰岛中分离干细胞及其用途

干细胞可分离自准备的胰腺组织, 例如, 获自糖尿病患者组织的活组织切片的胰岛。干细胞然后被体外扩展然后结果产生的移植细胞再回到供体作为移植物。在供体内, 其可以分化成为胰岛素分泌细胞例如 β 细胞以取代可因自身免疫反应导致糖尿病的 β 细胞丢失。该方法可以克服来自于移植组织的免疫排斥问题, 例如, 来自于另一可能作为供体的个体的胰岛。在本发明的一个技术方案中, 同系移植干细胞的使用促使开发别的方法以避免免疫排斥, 也就是移植细胞的基因治疗以实施其对免疫排斥的抵抗, 例如 I 型糖尿病中的自身免疫性疾病。在整个胰岛中使用干细胞的一个优势是移植干细胞可以原位分化以更好地适应寄主细胞的环境, 例如提供合适的微循环及反应于寄主生理需要的不同胰岛细胞类型的互补。本发明另一个技术方案中设计了部分分化干细胞体外的用途, 例如, 形成祖细胞, 其进一步被移植进入寄主再在寄主中选择性进一步分化。尽管干细胞, 祖细胞或假胰岛细胞同系移植物的用途, 另一个技术方案也设计了获自其他的个体或种的哺乳动物的干细胞, 祖细胞或假胰岛细胞的同种异体移植物。

在本发明的另外的技术方案中，干细胞是免疫盲的或免疫优先的。在本发明的一个技术方案中，免疫优先的干细胞并不表达足够量的 I 型和 / 或 II 型主要组织相容性抗原(a. k. a. HLA 或者人类白细胞抗原)以诱导来自寄主的免疫反应。例如，这些干细胞获自同种异基因或异种异基因来源其在免疫活性的移植受体中并不诱发寄主抗移植反应。

在本发明的另外的技术方案中，免疫优先的干细胞并不表达 I 型 MHC 抗原和 / 或 II 型 MHC 抗原。这些干细胞，获自同种异基因或异种异基因来源的其在免疫活性的移植受体中并不诱发寄主抗移植反应。

在本发明的另外的技术方案中，人类组织移植包括表达人类特异性的 I 型和 II 型 MHC 抗原的干细胞，但是却为免疫活性鼠本身所识别而且并不忍受寄主对移植物的排斥。这些干细胞，获自同种异基因或异种异基因来源的其在免疫活性的移植受体中并不诱发寄主抗移植反应。

本发明同样提供了从异种异基因供体中分离干细胞及将结果的干细胞移植进入其他种的哺乳动物细胞中去的方法(例如鼠干细胞被移植进入人体例如一个人糖尿病患者) 作为异种移植。

本发明提供了进行 nestin 阳性干细胞的同基因，同种异基因，及异源异基因的移植方法其特征在于干细胞在移植前已被培养了很长一段时间，例如， 2-4 小时， 4-5 小时， 5-10 小时或 1-3 天。

本发明同样提供了进行 nestin 阳性干细胞的同基因，同种异基因，

及异源异基因的移植方法其特征在于干细胞在移植前已扩展了一段时间，例如， 2-4 小时， 4-5 小时， 5-10 小时或 1-3 天通过细胞分化成为其他的干细胞或祖细胞。

本发明同样提供了干细胞的同基因，同种异基因，及异源异基因的移植方法其特征在于 nestin 阳性干细胞通过使用选自下列组份的组的试剂：EGF， bFGF-2， 高葡萄糖， KGF， HGF/SF， IDX-1， 编码 IDX-1 的一个核酸分子， GLP-1， exendin-4， betacellulin， activin A， TGF- β ， 或其组合在移植前一段时间例如 2-4 小时， 4-5 小时， 5-10 小时或 1-3 天诱导其分化成为祖细胞。以胰脏干细胞为例，干细胞最终分化成为胰脏祖细胞。

本发明同样提供了同基因，同种异基因，及异源异基因的移植方法其特征在于 nestin 阳性干细胞在移植前并不培养扩展或分化成为祖细胞或者其特征在于 nestin 阳性干细胞在移植前被培养和 / 或扩展和 / 或分化。

Nestin 阳性细胞在来自分离胰岛的培养物中被增殖随后被分离以形成可以无限增殖的干细胞系。

发明家发现了 nestin 表达细胞在培养胰岛中生长且在培养后 4 天就发现在其周围生长。这些细胞具有神经元类似的形态 (图 3)，表现出 nestin 阳性染色，且表达 nestin mRNA。含有 nestin 阳性细胞的胰岛也可分离自其他细胞，例如纤维原细胞其通过使用伴刀豆球蛋白培养胰岛使其增殖。这些含有 nestin 阳性干细胞的胰岛将不再粘附在伴刀豆球蛋白包覆的容器表面例如，这样可使胰岛被简单移出而其他

类型细胞却被粘附在容器上。胰岛然后被移至不含伴刀豆球蛋白包
覆的容器中。以鼠细胞为例的具体的培养及分离方法详见实施例 1 所
述。相似的结果获自人类细胞。

培养物中假胰岛及导管结构的形成

本发明的一个技术方案提供了通过使其形成假胰岛类似聚合体
以至于可被移植进入胰岛细胞数量在不给予激素治疗时不足以维持
正常的生理学调控的患者移植干细胞或祖细胞的替代途径。胰岛衍
生干细胞可如上所述获自培养物胰岛或获自增殖的干细胞系。将干
细胞暴露于不同的生长因子条件下以诱导其分化,这个过程在实施例
2 和 3 中进行描述。

干细胞或祖细胞分化成为胰岛细胞

可以诱导胰脏干细胞分化的生长因子包括但不限于 EGF-2,
碱性 FGF, 高葡萄糖, KGF, HGF/SF, GLP-1, exendin-4,
betacellulin, activin A, TGF-P, 及其组合。

GLP-1 指的是胰高血糖素类似的多肽-1。高葡萄糖指的是比培
养干细胞所使用的正常的浓度要高的葡萄糖浓度。例如,干细胞在大
约 5.6 mM 浓度葡萄糖下可以正常培养及增殖,而高葡萄糖浓度指
的是另外的高于 5.6 mM 的葡萄糖浓度。在一个优选的技术方案中,
设计了一个 16.7 mM 的葡萄糖浓度。在实施例 2 中,可能还要使用
这样的生长因子如碱性纤维生长因子(bFGF) 及上皮生长因子(EGF)。

在培养基中除了加入生长因子之外还包括在干细胞被移植进入
动物或人体时其他有助于分化的生长因子。在这种情况下许多生长

因子不管是已知的还是未知的都能被内生细胞所分泌且暴露于干细胞周围。移植干细胞通过内源或外源给予的与预期目标也就是说最终的分化的细胞类型或形成的解剖学特征(如组织或器官)相适应的生长因子的任意组合诱导其分化。

一个技术方案提供了一个刺激分化的方法给予生长因子的下游感受器或使用编码该感受器的核酸分子转染干细胞或祖细胞。一个例子是 IDX-1, 其是一个可为 GLP-1 或 exendin-4 诱导的转录因子。

引入的感受器例如 IDX-1 可以引发分化以形成内分泌胰岛细胞。

移植排斥分析

本发明提供了一个体内评估移植物存活的方法。按照本发明通过移植一个干细胞或一个假胰岛类似性聚合体入一个免疫抑制的或非免疫抑制的哺乳动物分析实验性移植排斥反应。

例如, 非免疫抑制的 C57BL/6 小鼠按照本发明被使用人类干细胞移植 (例如在肾囊中), 通过牺牲移植受体且对存活移植物染色或在移植物上(例如移植物上的一个器官或组织)在移植后合适的时间点进行免疫细胞化学染色对移植排斥进行分析。在该时间点对移植物的染色 (例如苏木精/曙红或免疫染色) 可以变化, 例如按照移植哺乳动物平均的存活时间或预期的存活时间。通过染色分析移植位点, 移植后 1 天至 10 年(例如, 1, 5, 10, 30, 100 或更多天, 1, 2, 5, 或 10 年), 最好是 10 天至 1 年且更好是 10-100 天。例如, 如果移植物在鼠肾囊中被引入, 检查移植鼠的肾。如果移植物被

检测到和 / 或移植物在组织中进行增殖的话说明移植物被成功移植(也就是说没有被排斥)。

移植物的增殖及检测例如通过准备自移植位点的冷冻部分(例如肾)的苏木精 / 曙红染色及并不起源于移植受体的新生长(例如不是寄主肾获得的)的检测进行。在异种移植的情况下, 使用特异于获自移植物起源的种的抗原的抗血清进行的特异性的免疫染色的话移植物被成功移植, 按照本领域已知的且这儿所描述的免疫细胞化学染色方法鉴别阳性细胞。此外, 在一个技术方案中进行的异种移植, 如果获自移植种的(从其中移植物物质所获得的种)分子(例如蛋白或抗原)在移植受体的血液中检测到的话移植物被成功移植。

正如这儿所使用到的, "排斥"指的是寄主免疫系统对移植物的排斥。在一个技术方案中, "排斥"意指移植物中有超或 90%的细胞或组织因为寄主免疫反应坏死的发生。在另一个技术方案中, "排斥"意指生存能力的降低也就是说因为寄主的免疫反应移植物中有 90%甚至更多与移植前相比较生存能力降低。生存能力的降低可通过本领域已知的技术检测到, 包括但并不限于 trypan 蓝专一染色。在另一个技术方案中, "排斥"意指移植物增殖的失败。增殖可通过本领域已知的技术包括但并不限于苏木精 / 曙红染色检测到。移植排斥的发生和 / 或移植后排斥发生的速度将因各种因素而变化, 包括但并不限于移植物物质 (例如细胞类型或细胞数量) 或寄主 (也就是说不管寄主是免疫不容性的和 / 或使用免疫抑制剂处理过的)。

移植方法

本发明提供了移植进入哺乳动物的方法。一个干细胞，祖细胞或分化细胞被“移植”或“引入”进入一个哺乳动物细胞当期从培养器皿中进入患者时。

按照本发明，移植包括按照本发明所述分离干细胞的步骤且转移干细胞进入哺乳动物或患者的步骤。按照本发明，移植还涉及到转移干细胞进入哺乳动物或患者通过注射细胞悬液进入哺乳动物或患者的途径，外科输入哺乳动物或患者的组织或器官的细胞，或使用细胞悬液注入组织或器官。转移干细胞或移植的路径，将按照细胞在特定组织或器官中的位置需要及细胞发现且滞留在预期目标组织或器官位置的能力确定。当移植细胞停留在特定的位置时，其可以通过外科手术方法进入组织或器官或简单地注入到血浆中去如果细胞具有移动至目标靶器官的能力的话。按照本发明所述的移植包括分离干细胞的步骤以及培养且转移干细胞进入哺乳动物或患者体内去的步骤。在另一个实施例中，这儿所使用的移植还包括分离干细胞，分化干细胞，转移干细胞进入哺乳动物或患者体内去的方法。这儿所使用的移植还包括按照本发明分离干细胞，分化及扩展干细胞且转移干细胞进入哺乳动物或患者体内去的方法。

使用胰脏干细胞治疗胰岛素依赖型糖尿病患者的方法

干细胞对于取代I型糖尿病患者的丧失的 β 细胞或提高II型糖尿病患者的 β 细胞的总的数量是非常有用的。糖尿病患者更适宜作为用于产生干细胞，祖细胞或假胰岛类似物聚合体的供体。干细胞存在成人胰岛或胰脏导管。对糖尿病患者进行活组织检查后，从活组织中

分离出胰岛且体外准备 24 小时，干细胞然后使用上述方法在 2—3 周内分离且增殖。分离后或经过一段时间生长因子诱导的分化干细胞可被直接移回患者。胰岛可通过如实施例 2 所述的亚培养产生。胰脏外科手术活组织分析的整个过程在大约 30 天内进行。

在本发明的一个技术方案中可用到多功能干细胞。这些细胞是免疫盲的或免疫优先的例如在异源或异种移植物中，其可以被受体作为自身识别而不是限制于 I 型或 II 型抗原的 MHC。在本发明该技术方案的一方面，这些细胞并不表达 MHC 型和 / 或 II 型抗原。

在本发明另一个技术方案中，移植物受体可以证明寄主对其它移植细胞的移植排斥其可以通过给予抗体激起反应，例如一个自身抗原如 GAD65，通过给予一个或多个这里所述的免疫抑制剂或使用本领域已知的技术以预防或减缓自身免疫排斥反应。

此外，按照本发明分离自非人哺乳动物的干细胞移植进入人糖尿病患者。在移植步骤之前，干细胞可被培养和 / 或扩展和 / 或分化。

使用胰脏干细胞治疗肝病患者的方法

胰脏干细胞或祖细胞分化形成肝实质细胞的能力是众所周知的 (Bisgaard & Thorgeirsson, 1991)。本发明的胰脏干细胞可以用于提供肝实质细胞以治疗肝病患者所遭受的肝病例如 cirrosis, 肝炎, 或肝癌其中功能性肝组织已经被减少。本发明所述的干细胞同样可被经过基因治疗处理遗传缺陷并引入患者恢复肝功能。Nestin 阳性干细胞可以在培养物中被分化也可在体内使用一个或多个生长因子或其它的处理例如使用核酸分子转染其结果是干细胞分化形成肝实质细

胞。在一个技术方案中,发明设计了使用 cyclopamine 以抑制例如 sonic hedgehog, 结果使得肝实质细胞形成。在本发明另一个技术方案中,干细胞可不经过任何体外处理移植且在患者体内使用合适的生长因子。在另一个技术方案中,干细胞使用生长因子或其它试剂体外处理结果以部分分化或结果分化的状态移植进入患者。在发明的另一个方面,包括转染干细胞或祖细胞的方法,注射的剂量及途径,药物组合物,供体一同系移植物的方法及免疫抑制方法可用与反分化为肝实质细胞就像分化为胰脏组织一样。

本发明专门设计了移植进入患者的同基因移植,异基因移植或异种异基因移植干细胞或其组合。

干细胞转染的方法

有不同的方法基因转移进入胰脏干细胞。磷酸钙沉降 DNA 法已被使用但转化效率很低,尤其是对非粘附性细胞来讲。此外,磷酸钙沉降 DNA 法经常导致多种反复子的插入,增加了内外源 DNA 功能的损害的可能性 (Boggs, 1990)。阳离子脂类例如以脂质体的形态,同样是包装 DNA 以转染真核细胞的有效方法且几种商业阳离子脂类试剂也是可获得的。电穿孔法相比较磷酸钙沉降法提高了转化效率,其具有在基因组单一位点提供单一拷贝插入子的优势。DNA 直接微注射进入细胞核是另外一种基因转移的方法,其已经显示可提供对于短期转染来讲将近 100%的效率且对于稳定的 DNA 整合有 20%的效率。微注射有时避免了外源 DNA 通过细胞质的细胞运输的问题。该方法要求转移物体积小,其还要考虑到在每细胞中引入已知量的

DNA。获取事实上较纯的干细胞的能力将提高微注射途径用于靶定胰脏干细胞基因修饰的可行性。尽管如此，微注射也是一项沉闷的，高度专一的技术。该技术的这一特征限制了在一定时间内注射进入细胞的数量，因此其在大范围内的使用是很受限制的。是用逆转录病毒的方法将基因插入胰脏干细胞是较为理想的方法。逆转录病毒提供了一个任意的，单拷贝的单位点插入子且转染效率很高。其它的一些转染方法对于本领域技术人员来讲是已知的且被认为是在本发明的保护范围之内。

胰脏干细胞的逆转录病毒转化

胰脏细胞基因转化涉及到逆转录病毒也作“辅助病毒”（也就是说，膜缺陷型病毒基因组其携有相关外源基因但是不能形成完整的病毒颗粒）。例外的载体例如 DNA 介导的转移，腺病毒，SV40，腺病毒相关病毒，及单纯疱疹病毒载体也可被用到。当选择不同的载体用于转染时要考虑到各种因素，有时最好使用一个病毒长末端重复子或者一个强的内源启动子以表达外源基因而不是简单依靠拼接的亚基因簇 RNA。

干细胞转化的两种最基本的方法是共培养或上清感染。上清感染涉及到将干细胞重复暴露于病毒上清液中。共培养涉及到干细胞及一感染的“组装细胞系”（参见下面）混合 24—48 小时，共培养一般要较上清感染对于干细胞转化来讲更为有效。共培养后，感染的干细胞进一步被培养以建立一个长期培养物 (LTC)。

含有辅助病毒的细胞系指的是包装细胞系，不同的包装细胞系也

是可获得的。包装细胞系的一个重要的特点是其并不能产生复制完整的辅助病毒。

在本发明的一个技术方案中从中获得干细胞的动物或患者在抽取干细胞前使用 5-fluorouracil (5-FU) 对其进行处理，相比较未处理的细胞来讲，5-FU 处理的干细胞更易于逆转录病毒的转染。然而，5-FU 干细胞很大程度地减少了克隆基因起源的数量。

在另一个技术方案中，收获的干细胞暴露于不同的生长因子条件下，例如那些用于提高胰脏干细胞增殖及分化的生长因子。生长因子在转染之前，其中或之后被引入培养物以提高细胞的复制及转导。研究表明生长因子的使用提高了转化效率从 30 到 80% 不等。

典型的逆转录病毒转化方案

哺乳动物胰脏干细胞的体外转导及随后移植进入未被切除的受体以充分获得可能的移植及基因表达在含有已显示于小鼠的后裔细胞的不同组织中。靶细胞在输入受体之前在含有相关基因的合适载体的存在下培养 2-4 天。

更确切地讲，骨髓干细胞获自雄性供体(4-8 周年龄时) BALB/c AnNCr 小鼠 (National Cancer Institute, Division of Cancer Treatment Animal Program, Frederick, MD)。这些细胞被培养在一个密度为 $1-2 \times 10^7$ cells/10 cm 的平皿上且在含有 10% 热失活的牛胎血清，谷氨酸盐，Pen/Strep，100 U/ml 的白细胞介素-6 (IL-6) 及以激活细胞生长的干细胞因子(SCF; Immunex, Seattle, WA) (Schiffmann, et. al., 1995)的 DMEM 培养基上培养 48 小时，

与此同时，培养一个病毒包装细胞系 24 小时，该包装细胞系为 Schiffmann, 等所使用。其为 GP + E86 且病毒载体为基于逆转录病毒载体 LN 系列的 LG 逆转录病毒载体。

经过一段合适的培养时间， $1-2 \times 10^7$ 干细胞被培养在一个 10 cm 的含有病毒包装细胞的平皿上然后在 8 g/ml polybrene 的存在下共培养 48 小时然后在相同的生长因子刺激的环境下其作为供体干细胞。收获该干细胞，洗涤生长培养基注入受体鼠以 2×10^7 细胞 / 注射的剂量并进行多次注射（总共 5 次以每天或每周计）。

干细胞的转导及移植的成功可通过例如 PCR 分析，免疫细胞化学染色，DNA 印迹法或蛋白质印迹法或其它本领域已知技术来进行。

哺乳动物

本发明所述的哺乳动物可以是任意哺乳动物（例如，人，小鼠，鼠，绵羊，兔子，山羊，猴子，马，东欧鼠，猪或牛）。本发明所述非人哺乳动物可以是任意非人哺乳动物包括但不限于小鼠，鼠，绵羊，兔子，山羊，猴子，马，东欧鼠，猪或牛。

给予的剂量及模式

作为一个例子，这儿所述的需要胰脏干细胞的患者可以如下进行处理，本发明的细胞可被给予患者，最好以生物学上适宜的溶液形式或药物学上可接受的输入载体，通过摄取，注射，吸入或其它的一些方法。一个可行的方法是内向倒退注射。另外的方法是注射或取代细胞或假胰岛类似性聚合体进入肾囊中。给予的药剂量可因患者而不同，一个“治疗有效性剂量”可被确定，例如但不限于通过功能性增

强的水平(例如, 胰岛素产量或血浆葡萄糖水平)。干细胞引入水平的监控, 由该转移影响的某些基因的表达水平, 和 / 或编码产品的存在及表达, 同样也使得本领域技术人员选择及调整给予的剂量。一般来讲一个含有干细胞的药物组合物以 $10^5 - 10^8$, 最好是 $10^6 - 10^7$ 个细胞每公斤体重的范围以单一剂量给予患者。这些剂量可以以每天, 每周, 每月, 每年计或者由治疗医师确定合适的剂量。本发明提供了同样可被移出患者体内的细胞群体或者通过体外扩展, 使用含有预期治疗基因的质粒转染, 然后再重新输入患者体内。

药物组合物

本发明提供了包含如本发明所述干细胞混合有生理学上可接受载体的药物组合物。正如这儿所使用的, "生理学上适宜的载体"指的是生理学上可接受的稀释剂例如水, 磷酸缓冲盐或盐及进一步包括佐剂, 佐剂例如有不完整的傅氏佐剂, 正磷酸铝, 氢氧化铝, 以及明矾等本领域已知的物质。

本发明同样也提供了药物组合物。除了活性成分以外, 这些药物组合物还包括合适的药学载体其可以被药理学上使用。

用于口服的药物组合物可使用本领域已知的适于口服的药物载体一起包装。这些载体使得药物组合物以片剂, 药丸, 糖衣, 胶囊, 液体, 凝胶体, 糖浆, 浆液, 悬浮液及其类似的形式为患者所摄取。

用于口服的药剂可通过结合活性成分与固体赋形剂, 加入合适的辅助剂后, 例如为了获得片剂或糖衣核心混合后选择性碾磨, 处理混合细粒。相应的赋形剂可为糖类或蛋白类例如糖包括乳糖, 蔗糖,

甘露糖或山梨糖糖，玉米淀粉，小麦，大米，马铃薯及其他植物；维生素例如甲基纤维素，羟丙基甲基纤维素，或者羧甲基纤维素钠；以及橡胶包括阿拉伯胶及黄芪胶；以及蛋白例如凝胶及胶原质。如果需要，加入溶解剂或分解剂例如交联的乙烯聚合物 pyrrolidone，琼脂，褐藻酸，或其盐例如藻酸钠。

所提供的糖衣核心具有合适的糖衣例如浓缩的糖溶液，其也含有阿拉伯树胶，云母，聚乙烯吡咯烷酮（PVP），carbopol 凝胶，聚乙二醇，和 / 或二氧化钛漆溶液，及合适有机溶液及溶液混合物。染料或色料加入到片剂中或糖衣上用于产品识别或表明活性成分的数量例如剂量。

可被用于口服的药物制剂包括由凝胶制成的推入契合胶囊以及软的由凝胶制成的封闭胶囊一样以及衣被甘油或山梨糖醇。推入契合胶囊包括混有诸如乳糖或淀粉的添加剂，诸如云母或硬脂酸镁的润滑剂以及可选择性的稳定剂的活性成分。在软的胶囊中，活性化合物可被溶解或悬浮在合适的液体中例如油脂，液体石蜡或液体聚乙二醇有或无稳定剂。

肠胃外投药的药剂包括活性成分的液体溶液。对于注射，本发明的药物组合物可以溶液形式，最好在生理学上适宜的缓冲剂例如 Hank's 溶液，Ringer'溶液，或生理缓冲盐的存在下制成。液体注射悬浮液可以包括可提高悬浮液粘度的物质例如羧甲基钠纤维素，山梨糖，或右旋糖酐。此外，活性溶剂或载体的悬浮液包括油脂例如香油，或合成的脂肪酸酯例如乙基油酸盐或甘油三酸酯，或脂质体。

可选择地，该悬浮液也包括适宜的稳定剂或可以提高化合物溶解度以形成高浓度溶液的化合物。

对于鼻给药形式，适于特定屏障的渗透剂在制药时考虑使用，该渗透剂对于本领域技术人员来说均为已知。

本发明的药物组合物可以本领域已知技术生产例如通过传统的混合，溶解，粒化，糖衣制备，悬浮，乳化，形成胶囊，包载及冻干途径。

药物组合物可以盐的形式提供也可以许多酸的形式形成，包括但不限于盐酸，硫酸，醋酸，乳酸，酒石酸，苹果酸，琥珀酸等等。适宜在液体情况下更易溶解的盐及其他的质子溶剂其也具有相应自由的碱基。在另外的情况下，首选的试剂也可以是一冻干的干粉其在 1mM-50 mM 组氨酸，0.1%-2% 蔗糖，2%-7% 甘露醇在 PH 值 4.5 至 5.5 其在使用前使用缓冲液混合。

在含有本发明化合物的药物组合物以一合适载体形成完成时，其可放置于合适的容器标签上给药的条件包括数量，频率及途径。

上述基本描述了本发明，其通过下述实施例可以更好地完整理解，其在这里仅仅是证明本发明而不是限制本发明的范围。

实施例 1

从鼠胰脏中分离 Nestin 阳性干细胞

鼠胰岛分离自 2-3 个月的老的 Sprague-Dawley 鼠使用如 Lacy 及 Kostianovsky 所述的胶原酶溶解的方法。人体胰岛由糖尿病研究所，迈阿密，FL 提供使用胶原酶溶解法获得。胰岛在 37°C 下在 12

孔平板培养 96 小时 (Falcon 3043 plates, Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ) 在该平板上涂覆有伴刀豆球蛋白 A。培养基为 RPMI 1640 补充有 10% 牛胎血清, 1mM 丙酮酸钠, 10mM HEPES 缓冲液, 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素, 100 units/ml 青霉素, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 两性霉素 B (GIBCO BRL, Life Science Technology, Gaithersburg, MD), 及 71.5 mM β 巯基乙醇 (Sigma, St. Louis, MO)。

96 小时后, 纤维原细胞及其他非胰岛细胞粘附在伴刀豆球蛋白 A 涂覆的培养孔表面上而胰岛在漂浮 (并未附在表面)。这时, 含有胰岛的培养基被移走, 离心分离, 将纯化的胰岛重新种植在没有伴刀豆球蛋白 A 涂覆的 12 孔平板上。胰岛然后在上述 RPMI 1640 培养基补充有 20 ng/ml 碱性纤维原细胞生长因子-2 及 20 ng/ml 上皮生长因子下培养。

粘附在平板表面的胰岛及长出且离开胰岛的细胞在一个单层。这些形成单层的细胞使用麻州普通医院的 Dr. Mario Vallejo 所创立的兔抗鼠 nestin 抗血清免疫染色为 nestin 阳性。另外的 nestin 抗体也可能被用到, 例如这儿所述的 R. 401 抗体, 或 MAB533 抗体。特异于鼠胚胎脊髓 nestin 的单抗, MAB353, ATCC No. 1023889; 描述于神经系统科学杂志 1996; 16: 1901-100; 其同样可获自 Chemicon International, Single Oak Dr., Temecula, CA 92590 USA。培养后两周, 几个 (3-5) nestin 阳性单层细胞通过毛细管采摘移出 (cylinder cloning) 且在 12 孔平板上重新种植(其上不再涂覆有伴刀豆球蛋白 A) 且培养在 RPMI 1640 培养基进一步补充有 bFGF-2 及 EGF。

细胞以很快的速度进行增殖且培养后六天覆盖平板。培养后 12 天细胞单层形成波动其中其开始以 co-linear 型式叠加。培养第 15 天，细胞波开始浓缩，移入球形体后在第 17 天形成含有球形体的孔表面 (ca.直径为 100 μm)，中空，一部分保留有单层细胞，重新挑选几个这样的单层细胞且重新克隆，然后上述途径在相同的时间段再次进行。

实施例 2

胰腺干细胞分化形成胰岛

鼠胰岛首先在含有 10%的牛胎血清的 RPMI 培养基上在伴刀豆球蛋白 A 包覆的 12 孔平板上培养，胰岛在除了牛胎血清外未加入培养因子的情况下培养三天。经过这个期间，其中胰岛并未粘附，胰岛被转移至不含伴刀豆球蛋白 A 的新的平板。

干细胞然后通过暴露其于 bFGF-2 (20 ng/ml)及 EGF (20 ng/ml)24 天被刺激从干细胞中增殖形成单层。24 天以后，单层达到丰度其中围绕着胰岛的是一群细胞，这些细胞被挑选然后被亚克隆进入新的 12 孔平板并再次在含有 bFGF 及 EGF 的培养基中培养。

亚克隆快速以无性繁殖的形式增殖进入单层，并从中心向外延扩展。细胞在第 6 天达到丰度并在第 12 天重叠细胞波。在第 17 天细胞几乎被全部移植进入球形结构体及关系型结构体等胰岛类似结构(假胰岛类似聚合体)及管状类似结构(假导管)(图 4)。RT-PCR 分析表明假胰岛类似聚合体表达 NCAM (内分泌细胞的一个标记，参见图 5)，细胞角蛋白 19 (导管细胞的一个标记，参见图 5)，以及转录因

子 brain-4 (一个贝塔细胞标记)。使用生长因子处理以实现其最终分化成为成熟胰岛细胞的目的。

实施例 3

人或鼠胰岛的分离及培养

分离及培养人类胰岛，人类胰岛组织获自细胞移植中心，糖尿病研究所，迈阿密大学医学院哈佛医学院，Boston, MA 的用于胰岛移植的青少年糖尿病基金的胰岛分配程序，手工挑选彻底洗涤的胰岛，在修饰的 RPMI 1640 培养基(11.1 mM 葡萄糖)补充有 10%牛胎血清，10 mM HEPES 缓冲液的，1 mM 丙酮酸钠，100 U 每 mL 青霉素 G 钠盐，100 μ g / mL 链霉素硫酸盐，0.25 ng / mL 两性霉素 B，及 71.5 μ M β 巯基乙醇，及加入鹰 3043 且包覆有伴刀豆球蛋白 A(ConA)的 12 孔组织培养平板。胰岛在 37°C 下在有 5% 空气及 5% CO₂ 下孵育 96 小时。在这种条件下，更多的胰岛依然保留在悬浮液中（漂浮），而纤维原细胞及其他的非胰岛细胞黏附在培养基上，孵育后 96 小时，含有悬浮胰岛的培养基被小心移出，手工挑选胰岛然后在修饰的 RPMI1640 补充有 20 ng/mL 碱性纤维原细胞生长因子(bFGF)及上皮生长因子(EGF)中重悬浮。胰岛悬浮液(包含有 20-30 个胰岛的平板)被加入到 12 孔并不附有 ConA 的组织培养平板上，胰岛快速黏附在平板表面。

在几天内，发现细胞单层从胰岛中长出。在有些情况下，人源细胞被培养在含有 2.5 mM 葡萄糖及几种包括 activin-A (2 nM)，肝实质细胞生长因子(100 pM)，或 betacellulin (500 pM)的生长因子的组

合的修饰的 RPMI 培养基中培养。这些实验中细胞使用 10 mM 烟碱处理，培养基不含有血清及生长因子。

实施例 4

葡萄糖及 GLP-1 对胰腺干细胞分化的影响。

可使胰岛尺寸增加的血浆葡萄糖浓度的评估。培养基中葡萄糖的浓度使用含有 nestin 阳性干细胞的分离的胰岛来调查。鼠胰岛被培养在含有高葡萄糖浓度(16.7 mM) 的培养基或正常的 (5.6 mM) 葡萄糖浓度中。四天后，使用 RT-PCR 确定 nestin mRNA 的水平。结果表明与正常葡萄糖浓度培养的胰岛相比高浓度葡萄糖浓度培养下的胰岛 nestin mRNA 的水平提高了 3 倍 (图 6)。

类似的，注入 glucagon 类似的多肽-1 (GLP-1) 进入小鼠发现 48 小时后胰岛数提高了 2 倍。具有编码 GLP-1 受体的分裂的基因的晕的小鼠再次检查其胰岛 nestin 的表达。

使用一 nexin 抗体进行的免疫染色被发现可以大大减少其与正常小鼠的 GLP-1 受体相比较。

糖尿病动物模型

给予结果是其症状的减少的糖尿病类型的治疗在一个其可展示糖尿病症状的动物中进行测试。所设计的进行试剂或方法测试的动物有益于人体的糖尿病的治疗。糖尿病的潜在治疗首先在动物模型中测试并观察其效果并比较其与未处理的对照组的区别。

非肥胖的糖尿病(NOD)小鼠对于 I 型糖尿病或胰岛素依赖的糖尿病来说是重要的(参见 Kikutano and Makino, 1992, Adv.Immunol.

52: 285 and references cited therein, herein incorporated by reference)。

在 NOD 小鼠中 I 型糖尿病的发展不需要外界的任何刺激可以自然发生也可突然发生，当 NOD 小鼠发展糖尿病时，其遭到 β 细胞的程序性破坏其由慢性自身免疫性疾病所致。在 NOD 小鼠中胰岛素依赖型的糖尿病的发展可以被大概分为两个阶段：自身免疫刺激的诱发（胰岛中淋巴细胞感染）及胰岛破坏的加速并爆发糖尿病。糖尿病 NOD 小鼠以 euglycemia 开始其生命，或正常的血液葡萄糖水平，但是在大约过了 15 至 16 周时 NOD 小鼠开始变成 hyperglycemic，表明其大部分胰腺 β 细胞的破坏且胰腺丧失产生足够量的胰岛素的能力。除了胰岛素缺乏及多糖症外，糖尿病 NOD 小鼠也要遭受严重的糖尿，polydypsia，及多尿症，伴随有体重的快速减少。这样，该疾病的发生及进程非常类似于遭受胰岛素依赖型的糖尿病的人体患者。自然康复很少发生于 NOD 小鼠上，且这些糖尿病动物在糖尿病发生后 1—2 个月如果不接受胰岛素治疗的话均死去。

NOD 小鼠被用作动物模型以测试按照本发明给予干细胞治疗糖尿病的不同方法的有效性。同样地，通过给予干细胞治疗在 NOD 小鼠中也进行测试以验证其对 I 型糖尿病的有效性。

干细胞被给予一个 NOD 小鼠，一般是通过腹腔进行，按照下述的剂量。NOD 小鼠被给予大约每个小鼠 1×10^1 至 1×10^4 个细胞每小鼠。在 NOD 小鼠中在大约 4 周给予小鼠，然后从 8 至 10 周，每周 3 次。用于检测糖尿病的小鼠在大约 13 周时开始，按照下述方法一周两次。治疗效果可比较处理及未处理的 NOD 小鼠得出。

在 NOD 的小鼠中对糖尿病的治疗效果可通过分析 NOD 小鼠中糖尿病进行其使用本领域已知技术, 例如, 检查 NOD 小鼠是否多渴, 多尿, 糖尿, 多糖症及胰岛素缺乏症或者体重减少。例如, 葡萄糖尿的水平 (糖尿) 可通过 Testape (Eli Lilly, Indianapolis, IN.) 进行检测且血浆葡萄糖水平使用如 Burkly, 1999, U. S. Patent 5, 888, 507, 这儿被引用作为参考等所述的 Glucometer 3 血糖仪 (Miles, Inc., Elkhart, IN.)。通过这些方法检测尿糖及血糖水平, NOD 小鼠被认为是糖尿病患者在经过两个连续的尿阳性测试使用 Testape 值+1 或更高或血浆葡萄糖水平 > 250 mg/dL (Burkly, 1999, supra)。在 NOD 小鼠中另外的检测糖尿病的方法在 NOD 小鼠中检测胰岛素水平, 例如胰岛素水平可由免疫测定且在处理及对照组比较后确定 (Yoon, U. S. Patent 5, 470, 873, herein incorporated by reference)。在这种情况下, 从鼠胰脏中抽取的胰岛素及其浓度可由免疫活性例如放射性免疫测定来进行确定, 使用鼠胰岛素作为一个标准。

除了一般使用 NOD 小鼠检测糖尿病外, 治疗方法效果如果干细胞被使用外源基因转化或转染通过基因特异性或基因产品特异性来进行检测, 因此, 考虑到在外源基因表达及其对糖尿病的效果之间有一定的关联。例如, 外源基因产品的存在可以通过产生基因产品及胰岛素的 NOD 小鼠胰脏 β 细胞的胰岛的免疫组织化学而确定。通过检测 RNA 转录补丁或平滑受体在 NOD 小鼠中进一步测定补丁及平滑基因的表达。反转录聚合酶链式反应 (RT-PCR) 扩增是通过已知技术扩增一个鼠补丁或平滑 cDNA 片段来进行的, 且按照标准技术进行

琼脂糖凝胶电泳。扩增 cDNA 片段的鉴别通过杂交扩增片段与用于补丁或者平滑基因的荧光标记的内寡聚核苷酸探针, 或者通过本领域已知的其它技术进行。

实施例 5

nestin 阳性的人或鼠胰腺干细胞的免疫细胞化学鉴别

通过分析 nestin 的表达来分析胰岛。胰岛及干细胞如上进行分离。Nestin 的表达通过在胚胎第 16 天 (E16) 鼠胰腺中 (图 8A) 及在成人胰腺胰岛中 (出生后 60 天) (图 8B) 发育的胰岛群中明显的免疫细胞化学染色来观察。免疫细胞化学染色如下进行。

取自胚胎第 16 天及成人 (60 天) 的鼠胰腺 Cryosections (6 M) 与细胞一样使用 4% 多聚甲醛磷酸溶液固定。

细胞首先使用 3 % 正常的猴血清在室温下处理 30 分钟且在 4°C 下使用第一抗体过夜培养。抗血清使用 PBS 洗涤且分别使用 Cy-3 及 Cy-2 标记的第二抗体在室温下孵育一小时。再使用 PBS 洗涤斜面 PBS 且使用荧光封固剂(Kirkegaard and Perry Labs, Gaithersburg, MD)重新覆盖斜面。组织部分在 4°C 下使用第一抗体过夜培养。第一抗血清使用 PBS 洗涤, 且斜面使用 3 % 正常猴血清在室温下孵育 10 分钟在其使用猴抗 Cy3 (indocarbocyanine) 及抗豚鼠猪(胰岛素), 抗鼠 (胰高血糖素), 或抗绵羊 (生长激素抑制素) sera DTAF (Jackson Immuno Research Laboratories, West Grove, PA) 在室温下孵育 30 分钟。斜面然后再使用 PBS 洗涤并使用荧光封固剂 (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)重新覆盖。使

用装有界面上有一个 PowerMac 7100 装有 IP 实验光谱分析软件 (Signal Analytics Corp, Vienna, VA) 的光学 TEC-470 CCD 照相机 (Optronics Engineering, Goleta, CA) 的 Zeiss Epifluorescence 显微镜获取荧光图片。

Nestin 阳性细胞区别于 β -、 α -、 δ - 及 PP 细胞因为其并不与抗荷尔蒙胰岛素，胰高血糖素，生长激素抑制素，或者胰腺多肽的抗血清共染色- (图 8A & B)。Nestin 阳性细胞同样也并不与抗胶原质 IV，动脉 endothelial 细胞标记(图 8C)的抗血清共染色，也不与抗 galanin，神经细胞的一个标记或者细胞角蛋白 19 也即导管细胞的一个单抗 (图 8) 的一个单抗共染色。Nestin 阳性染色与核共染色所清楚观察到的胰岛的截然不同细胞相关(图 4D)。

实施例 6

通过 RT-PCR 鉴别 nestin 阳性人及鼠干细胞

为了证实胰岛中 nestin 表达的免疫细胞化学鉴别，我们使用准备自新的分离鼠胰岛及人类胰岛组织的总的 RNA 进行的 nestin mRNA 的 RT-PCR。按照下述方法进行 RT-PCR：

取自鼠及人胰岛的总的细胞 RNA 被反转录且通过 PCR 扩增 35 个循环如前所述 (Daniel 等., 1998, Endocrinology, 139: 3721-3729)。用作 PCR 的引物或扩增引物以及随后 DNA 印迹杂交的探针的寡聚核苷酸如下：

鼠 nestin: 正向, 5'gcggggcggtgcgtgactac3' ;

反向, 5'aggcaagggggaagagaaggatgt3' ;

杂交, 5'aagctgaagccgaatttccttgggataccagagga3'。

鼠角蛋白 19: 正向, 5'acagccagtacttcaagacc3' ;

反向, 5'ctgtgtcagcacgcacgta3' ;

杂交, 5'tggattccacaccaggcattgaccatgccca3'。

鼠 NCAM : 正向 5'cagcgttggagagtccaaat3' ;

反向 5'ttaaactcctgtgggggttg3' ;

杂交, 5'aaaccagcagcggatctcagtgggtgtggaacgatgat3'。

鼠 IDX-1 正向, 5'atcactggagcaggaagt3'

反向, 5'gctactacgtttcttatct3'

杂交, 5'gcgtggaaaagccagtggg3'

人类 nestin: 正向, 5'agaggggaattcctggag3' ;

反向, 5'ctgaggaccaggactctcta3' ;

杂交, 5'tatgaacgggctggagcagtctgaggaaagt3'。

人类角蛋白 正向, 5'cttttcgcgcgccagcatt3' ;

反向, 5'gatcttctgtccctcgagc3' ;

杂交, 5'aacctgaggaggaaatcagtacgctgagg3'。

人类胰高血糖素: 正向, 5'atctggactccaggcgtgcc3' ;

反向, 5'agcaatgaattccttggcag3' ;

杂交, 5'cacgatgaatttgagagacatgctgaagg3'。

选自两个不同外显子的引物包含至少一个内含子序列。此外, 一个 RT 负的对照也有很多例子。PCR 循环在 94°C 下 1 分钟然后再在 94°C 下 10 秒, 58/56°C 下 10 秒, 72 °C 下 1 分钟, 35 个循环且在

72°C下 2 分钟。退火温度为 58 °C对于鼠 nestin 来讲且在 56°C下对其它的引物碱基。

对于 DNA 杂交寡聚核苷酸探针使用荧光标记的 T4 多聚核苷酸激酶及 γ -³²P ATP。荧光标记探针杂交于 PCR 产品其转移到尼龙膜上在 37°C下 1 小时，然后使用 1 x SSC + 0.5% SDS 在 55°C下洗涤 10-20 分钟或在 0.5 x SSC + 0.5% SDS 在 42°C下洗涤对于人类 PCR 产品来讲。

合适预期尺寸的 RT-PCR 产生的产品(图 8E, 上面板)且通过 DNA 印迹法证实 (图 8E, 较低面板)且通过产品的 DNA 测序。这些数据证明表达 nestin 的且可能代表胰岛多功能性干细胞其相似于中枢神经系统的 nestin 阳性干细胞的胰岛中新的细胞类型的鉴别。

实施例 7

nestin 阳性干细胞的体外增殖

nestin 阳性干细胞的体外增殖能力的确定。

获自 60 天大的小鼠或正常成人的胰岛首先种植在伴刀豆球蛋白 A 包覆的盘子上然后在修饰的含有 10%牛胎血清的 RPMI1640 培养基上培养四天以洗涤去胰岛中的粘附在 ConA 一包覆的盘子上的纤维原细胞及其他非胰岛细胞。在这些培养基条件下并不黏附在盘子上的胰岛被收集然后转移进入一个 12 孔平板上(并不含有 ConA 包覆)其含有相同的修饰 RPMI 1640 培养基此外补充有 bFGF 及 EGF (20 ng/mL 每一个)。生长因子 bFGF 及 EGF 一起被选择因为其已知可以刺激获自大脑室管膜的神经干细胞的增殖 (Reynolds and Weiss,

1996, *Dev. Biol.*, 175: 1-13)。粘附在平板上的胰岛及细胞慢慢地长出胰岛形成单层 (在人类细胞中估计细胞有两倍的时间 40-45 小时)。长出的细胞单层表型同类 (图 9A, 平板 1) 且表达 nestin (图 9A, 平板 12)。鼠细胞从单层中挑出 (一批至少 20-30 个细胞), 亚克隆进入一个 12 孔平板上, 及在含有 bFGF 及 EGF 的修饰的 RPMI 1640 培养基中(11.1 mM 葡萄糖浓度) 下培养。亚克隆细胞快速生长且在第 6 天达到丰度估计细胞数加倍的时间为 12-15 小时 (图 9A, 平板 3), 且在第 12 天形成波状结构。培养后 15-17 天, 细胞形成胰岛类似性聚合体(ILCs) (图 9A, 平板 14)。相同的细胞克隆自人类细胞(图 9B)。在达到丰度时 (图 9B, 平板 1), 人类细胞迁移以形成大空泡结构 (图 9B, 平板 2 及 3)。大范围的细胞形态改变, 圆的聚集形成三维 ILCs (图 9B, 平板 4-6)。

这些形成 ILCs 的 nestin 阳性胰岛祖细胞(NIPs)的分化的指示剂通过 RT-PCR 及 DNA 印迹法进行确定发现其可以表达内分泌标记 NCAM (神经细胞黏附分子) (Cirulli et al., 1994, *J. Cell Sci.*, 107: 1429-36) (图 9C, 右边的盘子)且导管细胞标记 CK19 (细胞角蛋白 19) (Bouwens et al., 1998, *J. Pathol.*, 184: 234-9; Bouwens et al., 1995, *J. Histochem. Cytochem.*, 43: 245-53 ; Bouwens et al., 1994, *Diabetes*, 43: 1279-93) (图 9C, 左边盘子)。在研究的这个阶段其得出结论当 NIPs 形成丰度并聚合进胰岛类似性细胞聚合物, 其开始表达胰腺基因 (NCAM 及 CK19), 但是因为缺乏其分化为内分泌细胞的生长因子胰岛基因的表达很受局限性, 同样发现祖细胞群体的分

化一般需要首先一个增殖阶段然后在分化特异成胰岛素生长因子的存在下增殖静止阶段。因此培养条件在某些情况下是需要修饰的例如更替含有其诱导细胞的增殖的 11.1 mM 葡萄糖, bFGF 及 EGF 的培养基, 取而代之的是包含低浓度葡萄糖 (2.5 mM), 其是低增殖活性的, 且生长因子 HGF/散开因子或 betacellulin 及 Activin A 的培养基。对于胰岛 β 细胞来讲葡萄糖是已知的增殖因子 (Swenne, 1992, *Diabetologia*, 35: 193-201; Bonner-Weir, 1989, *Diabetes*, 38: 49-53) 且包括 HGF/分散因子及 Activin A 表明可以分化胰腺导管细胞系 AR42J 以形成一个可分泌胰岛素, 胰高血糖素及其它胰腺内分泌细胞蛋白的内分泌表型(Mashima et al., 1996, *Endocrinology*, 137: 3969-76; Mashima et al., 1996, *J. Clin. Invest.*, 97: 1647-54)。

含有 ILCs 的培养物表达胰腺特异性 homeodomain 蛋白 IDX-1 通过免疫细胞化学(图 10A, 上层), RT-PCR 及 DNA 印迹法(图 10B), 及通过蛋白质印迹(图 10C)。ILCs 同样表达编码如 RT-PCR (Fig. 10D) 所示胰高血糖素前体且产生免疫反应性的胰高血糖素, 胰高血糖素类似性多肽-1 及胰岛素。在几个正好给定值为 40-80 pg/ml GLP-1, 30-70 pg/ml 胰高血糖素, 29-44 pg/ml 胰岛素的胰岛类似聚合体培养后 72-96 小时后获得的培养基的放射性免疫测定。放射性免疫测定如下进行。

培养基中胰岛素及胰高血糖素的浓度分别通过购买自 Linco 研究公司以及 DPC 公司的超敏感性放射性免疫试剂盒来确定。在各自的试剂盒中的抗血清是豚鼠抗人胰岛素及兔抗人胰高血糖素。GLP-1

分泌物使用合成多肽 CFI₁AWLVKGR 氨基化合物配对 keyhole limpet 血蓝质免疫兔形成的抗人 GLP-1 (7-36)氨基化合物兔多克隆抗血清进行测量。该抗血清对于 GLP-1 (7-36)氨基化合物的检测是高度特异性的而且仅仅是每周检测胰高血糖素前体, 这些测试的敏感水平分别是 6 pg/mL, 13 pg/mL 及 10.2 pg/mL。

在 10 mM 盐碱中孵育 ILCs 7 天, 正如 Ramiya 等 (Ramiya et al., 2000, Nat. Med., 6: 278-282)所述那样, 可以将胰岛素的分泌提高 2 至 3 倍。

几个额外的胰腺标记在分化的 NIPs 例如葡萄糖运输子-2 (Wang et al., 1998), synaptophysin, 及 HGF (Menke et al., 1999)如图 15 所示进行表达。为了确定分化的 NIPs 是否具有胰腺外分泌组织的特点, 我们使用 RT-PCR 以及检测淀粉酶以及羧肽酶原的表达(图 15)。

含有干细胞的一些 NIPs 培养物通过 RT-PCR 同样表达编码如 16A 及 B 所示的胰岛素及胰高血糖素前体的 mRNA。

IDX-1 的表达显得尤为重要因为其被鉴别为一个胰腺发育的主要调控子且尤其是在可产生胰岛素的胰岛 β 细胞成熟及形成功能所必需的因子(Stoffers et al., 1997, Trends Endocrinol. Metab., 8: 145-151)。

在胰管中尤其是在新生阶段(鼠及小鼠)甚至在有些情况下整个成人阶段(Bonner-weir et al., 1993, Diabetes, 42: 1715-1720; Rosenberg, 1995, Cell Transplant, 4: 371-383; Bouwens et al., 1996, Virchows Arch., 427: 553-560)由细胞分化所形成新的胰岛已为大家

所共知，在成熟数的胰管中分析 nestin 的表达。通过双重抗 nestin 及抗细胞角蛋白荧光免疫细胞化学抗血清，一个导管上皮细胞标记，nestin 都是很强地表达于大小导管的一定区域以及在一些外分泌腺泡组织中的 centrolobular 导管(图 11A 及 11B)。尤其是，导管中 nestin 表达的一定区域 大部分没有使用抗 CK19 抗血清染色。更进一步讲，nestin 阳性细胞表现出具有一定的形态其区别于包含有同系立体，圆柱细胞的上皮细胞。Nestin 阳性细胞是有核的，匍行的且停留在上皮细胞中或其周围的裂缝中。(图 11C)。

这样，CK19 并未表达于大多数的表达 nestin 的导管细胞中其表明这些 nestin 表达细胞位于胰脏导管中其为一个过客细胞不同于导管上皮细胞且为尚未分化进入导管或内分泌表型的干细胞。胰腺导管中及成熟鼠胰岛中 nestin 表达细胞的定位的发现进一步支持了这样的观点鼠胰管包含有胰岛细胞(新生)的祖细胞，但是这些祖细胞却并不是导管上皮细胞本质上的亚簇。

实施例 8

所设计的在糖尿病患者的人体中表达 IDX-1 的胰腺干细胞的移植

分离自猪或人供体胰脏的胰岛，或来自最终的人体转移受体的胰腺活组织的胰岛在体外培养，培养条件是可以刺激干细胞的增殖的条件。干细胞从胰岛中分离(克隆的)，在含有 bFGF-2, EGF, 及 11.1 mM 葡萄糖的增殖培养基中体外扩展，使用含有编码转录因子 IDX-1 的 DNA 的表达载体转染或注入并转录进入糖尿病受体中。

作为一种选择，在移植以激发设计干细胞分化形成 β 细胞之前 IDX-1 转染干细胞使用 GLP-1 处理 1-3 天或其他分化的成形素或生长因子。在一个技术方案中，干细胞在给予受体之前既不扩展也不分化或者仅仅在给予受体之前扩展或分化。在一个技术方案中，在移植以刺激干细胞分化期间或之后几天 GLP-1 给予受体并使得其成功移植。按照这种方法，xenographs (猪胰岛)或 allographs (来自人供体而不是受体的人胰岛)，也正如进行的 isographs (获自受体的胰岛) 一样。假定当移植进入寄主受体时干细胞遗传库被重新设计以至于寄主将干细胞识别为自身 (在所有的 xenographs 或 allographs 情况下)，以至于由自身免疫反应所形成的免疫不容或破坏以及移植排斥不发生。

实施例 9

在患有糖尿病的人体中移植培养的胰腺干细胞以激发 IDX-1 的表达

所述分离胰岛体外培养几天首先激发胰岛中干细胞的扩展或增殖然后表达转录因子 IDX-1。干细胞的增殖通过在含有 bFGF-2, EGF, 及 11.1 mM 葡萄糖的培养基中培养胰岛实现。经过预处理的上述胰岛被移植进入受体。此外，移植后几天或期间寄主受体可被给予 GLP-1 以进一步分化或扩展干细胞形成胰岛素产生细胞以提高移植的成功性。

按照这种方法，xenographs (猪胰岛)，allographs (来自人体供体而不是受体的人胰岛)，正如 isographs (获自受体的胰岛) 一起进行。

实施例 10

胰腺干细胞异种移植进入肾

人类 nestin 阳性胰岛祖细胞(NIPS)如所述进行分离并在非免疫抑制的 8 个 C57B 16 小鼠的肾囊中移植。移植的人体细胞并不为鼠受体所排斥。一般的理解是一个异种植物例如人体组织将在 5—10 天内为鼠所排斥。与该理解相反的是,我们发现 8 个非免疫抑制的小鼠中有 8 个如期测试所有的移植物成功移植且在大约移植 10^5 — 10^6 个细胞之后一个月(30—38 天)吸附肾的组织中增殖。

一个 C57B16 小鼠作为试验以确定在移植位点大范围的新的生长。具有新组织的部分肾被分为两部分被冷冻为组织冷冻切片,另一部分组织学石蜡切片在多聚甲醛中固定。准备冷冻切片使用苏木精和曙红(H & E)及抗不同胰岛细胞抗原的抗血清染色。

检查 H & E 染色的肾部分证明其不是部分肾的新的生长的存在,显示了含有混合间叶细胞以及含有肝,神经系统,导管, adipodipic 及 hematopoetic 组份的多态性。肾切片的显微图片证明了新的生长的肾 parenchyme, 及 glomeruli。使用人体(非鼠)特异的抗血清的免疫染色揭示了许多人类特异性的角蛋白, vimentin 及 CD45 白细胞抗原特异于人类造血淋巴细胞的免疫细胞染色。另外一个 C57B16 小鼠的肾同样具有 NIP 移植位点相似外观的新生长。

C57B16 小鼠的 NIP 移植肾的石蜡切片(杀死第一小鼠)被检测。被检测的凝血组织来自肾的顶部其在没有显示进入肾实质中的肾囊中显示出外源组织很好的相容性。显著的是,在多态相似性移植组

织中为肾实质区域。不局限于任一理论的是含有干细胞的移植物分化该干细胞不是侵入而只是简单的转移且增殖一个小生境，即间叶细胞结构中。其可从肾脏中获取某种诱导并分化为肾。移植细胞不是恶性的，但却是具有其功能的干细胞。

实施例 11

胰腺干细胞异种移植进入胰脏

人类 nestin 阳性胰岛祖细胞(NIPS)如上所述被分离并移植进入非免疫抑制的小鼠的胰脏且(a)使用链脲霉素(产生链脲霉素诱导的糖尿病)处理或 (b) NOD 小鼠中胰岛正在发炎。

移植动物的胰腺被检测以确定是否 NIPs 发现其合适的小生境并接受来自胰岛区域的诱导分化为胰岛 β 细胞。

实施例 12

通过异种移植胰腺干细胞治疗糖尿病

人类胰岛如上进行分离然后体外培养几天以扩展干细胞数目，人类 NIPS 通过静脉移植进入肝脏(按照本领域已知的移植进入肝脏的技术)。

作为一种选择，一定数量的人类 NIPs (如上所述进行分离)被引入血管。在一些技术方案中，人类 NIPS 通过胰腺动脉被引入并将其导向糖尿病胰腺。

对照组(未移植动物)及移植动物被用于分析糖尿病症状的改善(例如血糖水平，胰岛素水平，胰腺 β 细胞数量)。

实施例 13

肝脏中 Nestin 阳性干细胞的鉴别

按照本领域已知技术及这里所描述的技术分离鼠肝脏且冻结切片。

鼠肝冻结切片(6 μ M)使用兔抗 nestin 多克隆抗体免疫染色。免疫荧光信号通过反应标记有荧光团 Cy3 (黄橙颜色)的抗猴 IgG 血清来进行测定。围绕在一个大的胆管的 Nestin 阳性细胞如图 13A 所示。围绕在几个小的胆管的 nestin 阳性细胞如图 13B 所示。

实施例 14

NIPs 向肝显型分化

因为报道的肝干细胞(卵形细胞),肝星细胞,及胰腺祖细胞的外观相似性,随后一些损伤的观察,再生的胰腺经历了肝的转化(Slack, 1995; Reddy et al., 1991; Bisgaard et al., 1991; Rao et al., 1996), 我们进行 RT-PCR 异在干细胞中检测肝表达基因。PCR 产品获得 XBP-1, 一个肝实质细胞发育中所需要的转录因子(Reimold 等., 2000), 以及 transthyretin, 一个肝急性状态蛋白。几个其他的肝标记同样被表达例如胎蛋白(Dabeva et al., 2000), E-Cadherin (Stamatoglou et al., 1992), c-MET (Ikeda et al., 1998), HGF (Skrtic et al., 1999)以及 synaptophysin (Wang et al., 1998); see Fig.15)。胰腺及肝脏所共同进行的蛋白表达,例如 HGF 及 synaptophysin, 可以反映出其共同起源于胚胎前肠内胚叶且表明其分化为或者胰腺或者肝的显型。

参考文献

Bisgaard, H. C. and Thorgeirsson, 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. et al. 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. et al. 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., et al. 1997. In vitro-generation of islets in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas. *Horm. Metab. Res.* 29: 271-277.

Dahlstrand, J., et al. 1992. Characterization of the human nestin gene reveals a close evolutionary relationship to neurofilaments. *J. Cell Sci.* 103: 589-597.

Dabeva, M. D. et al., 2000. Proliferation and differentiation of

fetal liver epithelial progenitor cells after transplantation into adult rat liver. *Am. J. Pathol.* 156: 2017-2031.

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

Ikeda et al., 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. et al. 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., et al. 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. et al. 1994. Neural stem cells in the adult mammalian forebrain : a relatively quiescent subpopulation of subependymal cells. *Neuron* 13: 1071-1082.

Rao. M. S. et al., 1996. Expression of transcription factors and stem

cell factor precedes hepatocyte differentiation in rat pancreas. *Gene Expr* 6: 15-22.

Reddy, J. K. et al., 1991. Pancreatic Hepatocytes. An in vivo model for cell lineage in pancreas of adult rat. *Dig. Dis. Sci.* 36: 502-509.

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

Reynolds, B. A. and 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, et. al. 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., et al., 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. et al., 1992. Temporal changes in the expression and distribution of adhesion molecules during liver development and regeneration. *J.Cell. Biol.* 116: 1507-1515.

Wang, Z. et al., 1998. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target

molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 47: 5056.

Williams, D. A. 1990. Expression of introduced genetic sequences in hematopoietic cells following retroviral-mediated gene transfer. *Hum. Gene Therapy* 1: 229.

其他的一些技术方案

权利要求书中所出现的其它的技术方案如下。

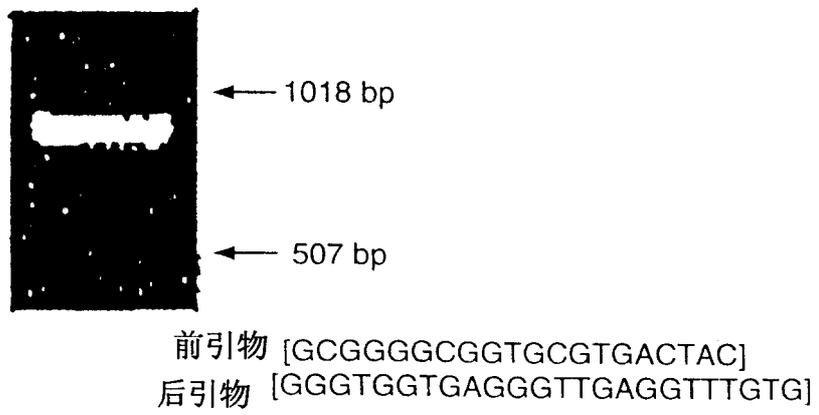
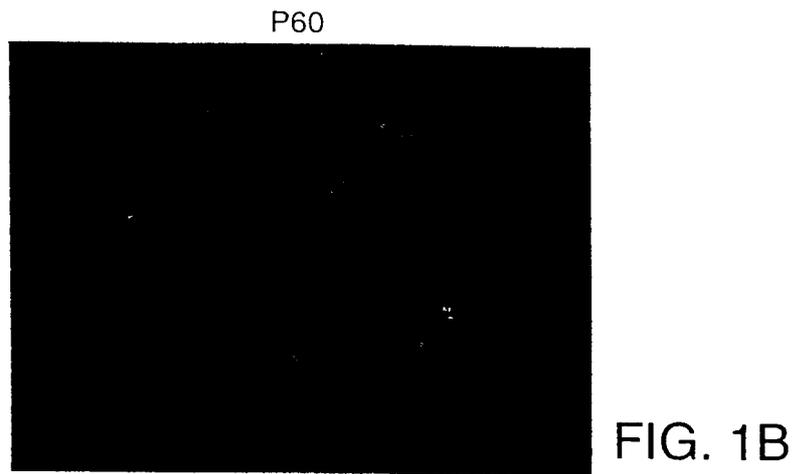
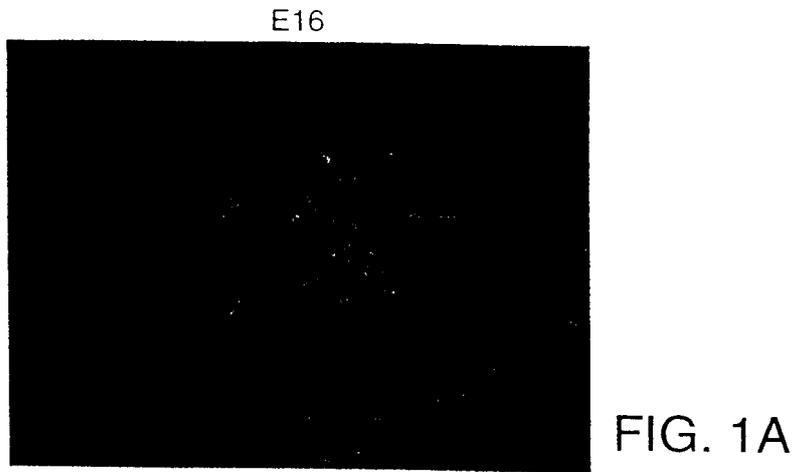


FIG. 2

体外胰岛周围 Nestin 阳性细胞的增殖

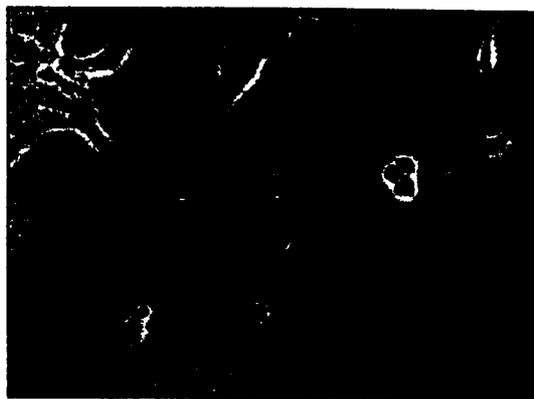


FIG. 3

100x

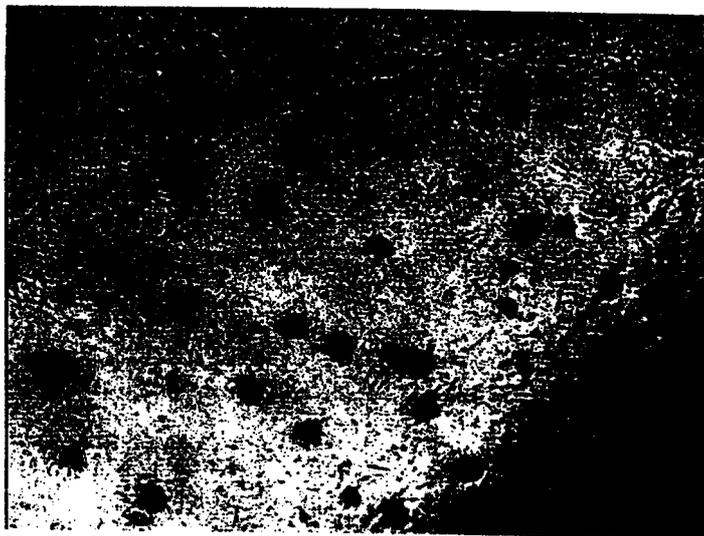


FIG. 4A

200x

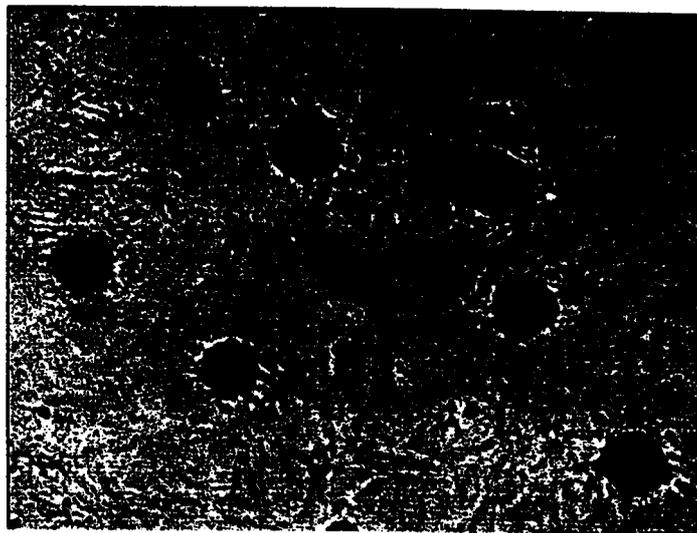


FIG. 4B

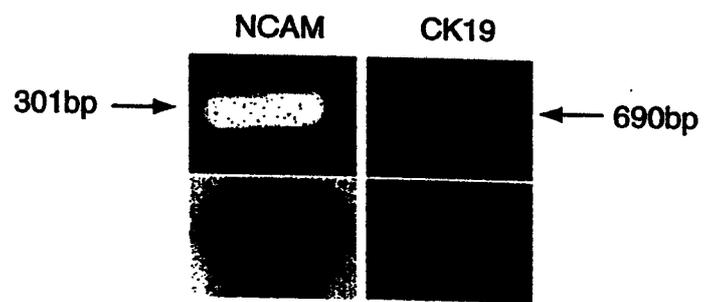


FIG. 5

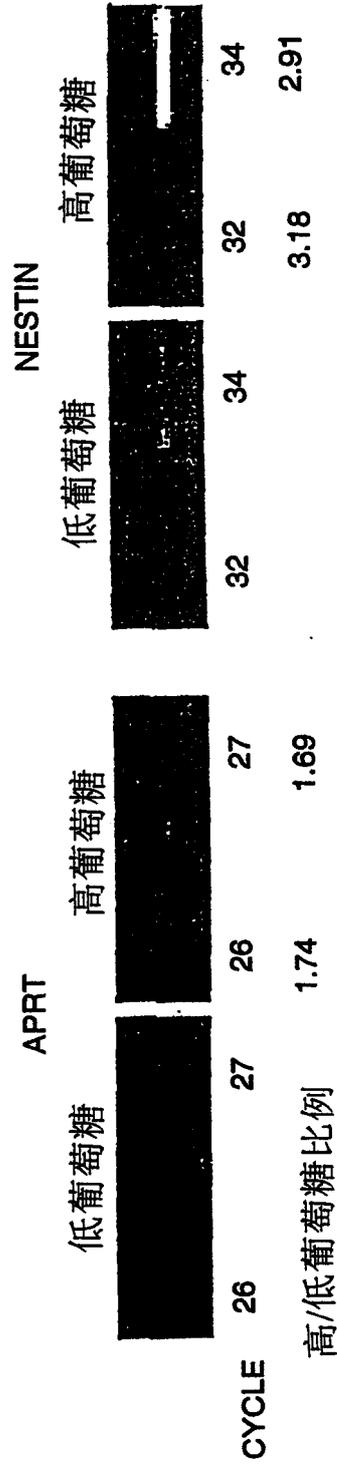


FIG. 6

Nestin 氨基酸序列

"MEGCMGEESFQMWELNRRLEAYLGRVKALEEQNELLSAGLGGLR
 RQSADTSWRAHADDELAALRALVDQRWREKHAAEVARDNLAELEGVAGRCEQLRL
 ARERTTEEVARNRRAVEAEKCARAWLSSQGAELERELEALRVAHEEERVGLNAQAAC
 APRLPAPPRPPAPAPEVEELARRLGEAWRGAVRGYQERVAHMETSLDQTRERLARAVQ
 GAR
 EVRLELQQLQAERGGLLERRAALEQRLEGRWQERLRATEKFQLAVEALEQEKQGLQSQ
 IAQVLEGRQQLAHLKMSLSLEVATYRTLLEAENSRLQTPGGGSKTSLSFQDPKLELQF
 PRTPEGRRLGSLPVLSPATLETVPVAFLNQEFQARTPTLASTPIPT
 PQAPSPAVIDAEIRAQDAPLSLLQTQGGKQQAPEPLRAEARVAIPASVLPGPEEPGGQR
 QEASTGQSPEDHASLAPPLSPDHSSLEAKDGESGGSRVFSICRGEQEWGLVEKET
 AIEGKVVSSLQQEIWEEEDLNRKEIQDSQVPLEKETLKSLGEEIQESLKTLENQSHET
 LERENQECPRSLEEDLETLSLEKENKRAIKGCGGSETSRKRGRQLKPTGKEDTQTL
 QSLQKENQELMKSLEGNLETFLFPGTENQELVSSLQENLESLEALEKENQEPLRSPEV
 GDEEALRPLTKENQEPLRSLEDENKEAFRSLEKENQEPLKTLLEEDQSIVRPLETENH
 KSLRSLEEQDQETLRTLEKETQQRRLSLGEQDQMTLRPPEKVDLEPLKSLDQEIARPL
 ENENQEFKSLKEESVEAVKSLETEILESLSKAGQENLETLSKSPETQAPLWTPPEINK
 SGGNESSRKGNRRTTGVCGSEPRDIQTPGRGESGIIISGSMPEGFEISRGVDKESQ
 RNLEEEENLKGGEYQESLRSLEEEGQELPQADVQRWEDTVEKDQELAQESPPGMAGV
 ENKDEAELNLRQDGFQKEEVVEQELNATEEVWFPGEHPENPEPKQORGLVEGAS
 VKGGAEGLDQPEGQSQQVGTPLQAPQGLPEAIEPLVEDDVAPGGDQASPEVMLGSEP
 AMGESAAGAEPGLGQGVGGLGDPGHLTREEVMEPPLEESLEAKRVQGLEGPRKDLEE
 AGGLGTEFSELPGKSRDPWEPPREGRESEAEAPRGAEAEAFPAETLGHGSDAPSPWP
 LGSEAEEDVPPVLVSPSPTYTPILEDAPGLQPAEGSQEASWVQGRAEAGKVESEQ
 EELGSGEIPEGLQEEGESRESEEDDELGETLPDSTPLGFYLRSPSPRWTPLESRGH
 PLKETGKEGWDPAVLASEGLEPSEKEEGEEGEECCGRSDSLEEFEDLGTAPFLPG
 VPGEVAEPLGQVPQLLLDPAAWDRDGEDGFADDEESGEEGEEEDQEEGREPGAGRWP
 GSSVGSLLQALSSSRGFELESDSVSVSPWDDSLRGAVAGAPKTALETESQDSAEPSPG
 SEESDPVSLEREDKVPGLPSPGMEDAGPGADIIGVNGQPNLEGKSHVNGGVMN
 GLEQSEESGARNALVSEGDRGSPFQEEEGSALKRSSAGAPVHLGQGQFLKFTQREGDR
 ESWSSGED"

Nestin 核苷酸序列

BASE COUNT 1238 a 1176 c 1676 g 764 t ORIGIN 1

atggagggt gcatggggga ggagtcgtt cagatgtgg agctcaatcg ggcctggag 61
 gctacctgg gccgggtcaa ggcgctggag gacgagaatg agctgctcag cgccggactc 121
 ggggggctcc ggcgacaatc cgcggacacc tctggcggg cgcgaccca cgacgagctg 181
 gcggccctgc gtgcgctcgt tgaccaacgc tggcgggaga agcacgcggc cgaggtggcg 241
 cgcgacaacc ttgctgaaga gctggagggc gtggcaggcc galgcgagca gctgcggctg 301
 gcccgggagc ggacgacgga ggaggtagcc cgcaaccggc gcgccgtcga ggcagagaaa
 361 tgcgcccggg cctggctgag tagccagggg gcagagctgg agcgcgagct agaggctcta
 421 cgcgtggcgc acgaggagga ggcgctcgt ctgaacgcgc aggcctgctg tgccccccgc

FIG. 7A

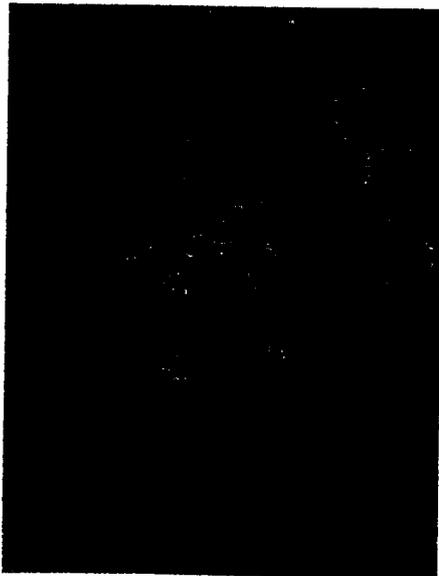
481 ctgcccgcgc cgccccggcc tcccgcgccg gccccggagg tagaggagct ggcaaggcga
 541 ctgggcgagg cgtggcgcgg ggcagtgcgc ggctaccagg agcgcgtggc acacatggag
 601 acgtcgttg accagaccg cgagcgcctg gcccggcggg tgcagggtgc ccgcgaggtc
 661 cgctggagc tgcagcagct ccaggctgag cgcggaggcc tctggagcg cagggcagcg
 721 ttggaacaga ggtggaggg ccgctggcag gagcggctgc gggctactga aaagtccag
 781 ctggctgtgg aggccctgga gcaggagaaa caggccctac agagccagat cgctcaggtc
 841 ctggaaggtc ggcagcagct ggcgcacctc aagatgtccc tcagcctgga ggtggccacg
 901 tacaggacc tctggaggc tgagaactcc cggctgcaaa cacctggcgg tggctccaag
 961 acttccctca gcttcagga cccaagctg gagctgcaat tcctaggac ccagaggggc
 1021 cgcgctctg gatcttctg cccagctctg agcccaactt cctccccctc acccttgcct
 1081 gctacccttg agacacctg gccagcctt ctaagaacc aagaattct ccaggcccg
 1141 accctacct tggccagcac cccatcccc cccacacctc aggcacctc tctgtctga
 1201 gatgcagaga tcagagcca ggatgctct ctctctctc tccagacaca ggtggggagg
 1261 aaacaggctc cagagccct ggggctgaa gccagggtg ccattcctgc cagctcctg
 1321 cctggaccag aggagcctgg gggccagcgg caaggagcca gtacaggcca
 gtccccagag 1381 gaccatgct cctggcacc accctcagc cctgaccact ccagtttaga
 ggctaaggat 1441 ggagaatccg gtgggtctag agtgttcagc atatgccgag ggggaagtga
 agggcaaatc 1501 tgggggttgg tagagaaaga aacagccata gagggcaaag tggtaagcag
 cttgcagcag 1561 gaaatatggg aagaagagga tctaacagg aaggaaatcc aggactccca
 gtttctttg 1621 gaaaaagaaa ccctgaagtc tctgggagag gagattcaag agtctctgaa
 gactctgaa 1681 aaccagagcc atgagacact agaaaggag aalcaagaat gtccgaggtc
 tttagaagaa 1741 gacttagaaa cactaaaaag tctagaaaag gaaaataaaa gagctattaa
 aggatgtgga 1801 ggtagtgaga cctctagaaa aagaggctgt aggcaactta agcctacagg
 aaaagaggac 1861 acacagacat tgcaatccct gcaaaaggag aalcaagaac taatgaaatc
 tctgaagggt 1921 aatctagaga catttttatt tccaggaacg gaaaatcaag aattaglaag
 ttctctgcaa 1981 gagaacttag agtcattgac agctctgga aaggagaatc aagagccact
 gagatccca 2041 gaagtgggg atgaggaggc actgagacct ctgacaaagg agaatcagga
 acccctgagg 2101 tctctgaag atgagaacaa agaggcctt agatctctag aaaaagagaa
 ccaggagcca 2161 ctgaagatic tagaagaaga ggaccagagt atgtgagac ctctagaaac
 agagaatcac 2221 aatcactga ggtctttaga agaacaggac caagagacat tgagaactct
 tgaaaaagag 2281 actcaacagc gacggaggtc tctaggggaa caggatcaga tgacattaag
 acccccagaa 2341 aaagtggatc tagaaccact gaagtcctt gaccaggaga tagctagacc
 tcttgaanaa 2401 gagaatcaag agttcttaaa gtcactcaa gaagagagcg tagaggcagt
 aaaaacttta 2461 gaaacagaga tcttagaatc actgaagctc gcgggacaag agaacttga
 aacactgaaa 2521 tctccagaaa ctcaagcacc actgtggact ccagaagaaa taataaatc
 agggggcaat 2581 gaatcctcta gaaaaggaaa tcaagaacc actggagtct gtggaagtga
 accaagagac 2641 attcagatic ctggaagagg agaatcagga atcattgaga tctctgggag
 catggaacct 2701 ggagaattg agatccag aggagtagac aaggaaagtc aaaggaaatc
 ggaagaggaa 2761 gagaacctgg gaaagggaga gtaccaagag tcactgaggt ccttggagga
 ggaggagacg 2821 gagctgccg agtctgcaga tgtgcagagg tgggaagata cgttggagaa
 ggaccaagaa 2881 ctggctcagg aaagccctcc tgggatggct ggagtggaaa ataaggatga
 ggcagagctg 2941 aatctaagg agcaggatgg ctctactggg aaggaggagg tggtagagca
 gggagagctg 3001 aatcccacag aggaggtctg gttcccaggc gaggggcacc

FIG. 7B

cagagaaccc tgagccaaa 3061 gagcagagag gcctggtga gggagccagt
 gtgaagggag gggctgaggg cctccaggac 3121 cctgaagggc aatcacaaca
 ggtggggacc ccaggcctcc aggcctccca ggggctgcca 3181 gaggcgatag agccccgtgt
 ggaagatgat gtggccccag ggggtacca agcctccca 3241 gaggtcatgt tggggtcaga
 gcctgccatg ggtgagtctg ctgaggagc tgagccaggc 3301 ctggggcagg ggggtggagg
 gctgggggac ccaggccatc tgaccaggga agaggtgatg 3361 gaaccacccc
 tgaagagga gagtttgag gcaagaggg ticagggtt ggaagggcct 3421 agaaaggacc
 tagaggaggc aggtggtctg gggacagagt tctccagct gcctgggaag 3481 agcagagacc
 cttgggagcc tccagggag ggtaggagg agtcagaggc tgaggcccc 3541
 aggggagcag aggaggcgtt cctgctgag accctggcc acactggaag tgatcccc 3601
 tcacctggc ctctggggtc agaggagct gaggaggatg taccaccagt gctggtctcc 3661
 ccagccca cgtacacccc gatcctgga gatgccctg ggctccagcc tcaggctgaa 3721
 gggagtcagg aggctagctg gggggtgag gggagggtc aagctggga agtagagagc 3781
 gagcaggagg agttgggtc tgggagatc cccgaggcc tccaggagga agggaggag 3841
 agcagagaag agagcgagga ggtagctc ggggagacc tccagact cactcccc 3901
 ggcttctacc tcaggtcccc cactcccc aggtggacc cactggagag cagaggccac 3961
 cccctcaagg agactggaaa ggagggtgg gatcctgctg tctggctc cgagggcctt 4021
 gaggaacct cagaaaagga ggagggggag gagggagaag aggagtgtg cctgactct.
 4081 gacctgicag aagaattga ggacctggg actgaggcac ctttctcc tgggtcct
 4141 gggagggtg cagaacctc gggccaggc cccagctgc tactggatcc tgcagcctg
 4201 gatcgatag gggagtctga tgggttgca gatgaggaag aaagtggga ggaggagag
 4261 gaggatcagg aggagggag ggagccagg gctggcggg gggggccagg gtctctgt
 4321 ggcagctcc aggcctgag tagctccag agagggaat tctggagtc tgattctga
 4381 agtgcagcg tcccctggga tgacagctg aggggtgag tggctggtc cccaagact
 4441 gcctggaaa cggagtcca ggacagtct gacctctg gctcagagga agagtctac
 4501 cctgttctc tggagagga ggacaaagc cctggccctc tagatccc cagtgggatg
 4561 gaggatcag gccagggg agacatcatt ggtgtaatg gccagggicc caactggag
 4621 gggaagtcac agcatgtaa tgggggagta atgaacggc tggagcagtc tgaggaaagt
 4681 gggcaagga atgcgctagt cctgagga gaccagga gcccttca ggaggagg
 4741 gggagtctc tgaagaggtc ttcggcagg gctcctgct acctggcca ggtcagtc
 4801 ctgaagtca ctcagagga aggagataga ggtcctggt cctcagggga ggac //

FIG. 7C

Nestin/胰岛素



E16

FIG. 8A

Nestin/胰岛素



P60

FIG. 8B

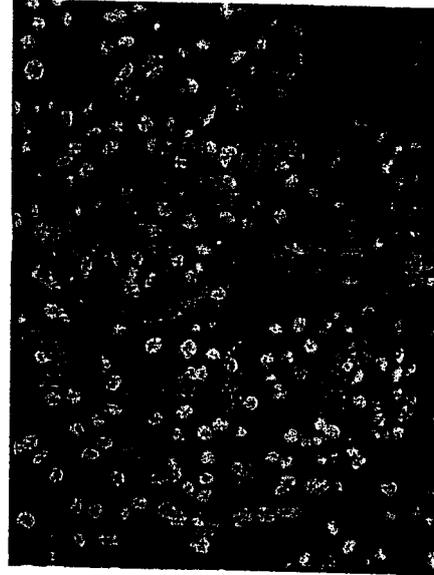
Nestin/胶质IV



P60

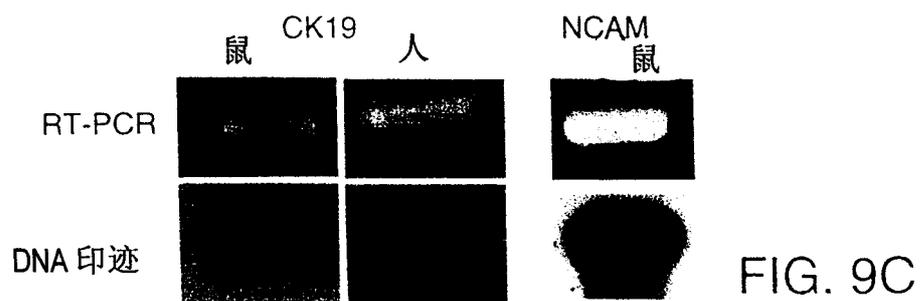
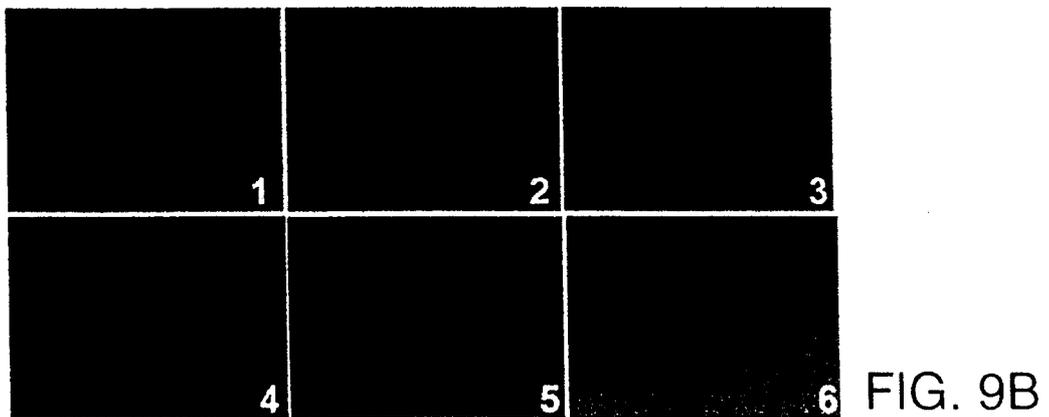
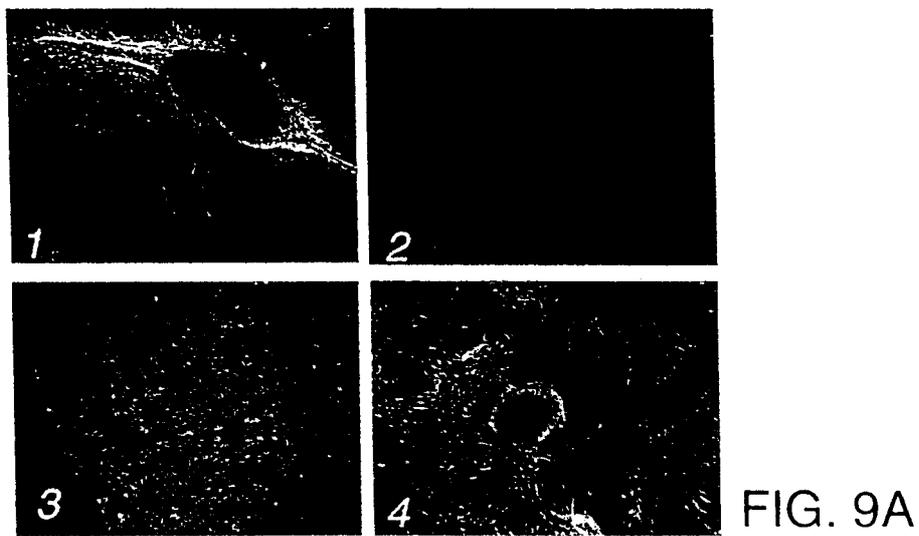
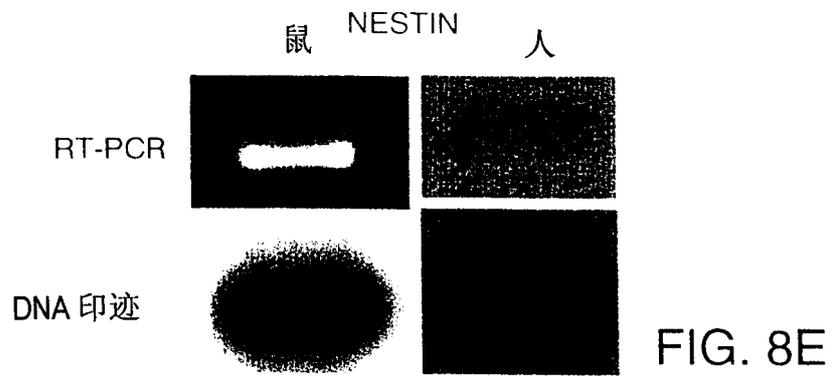
FIG. 8C

Nestin/核



P60

FIG. 8D



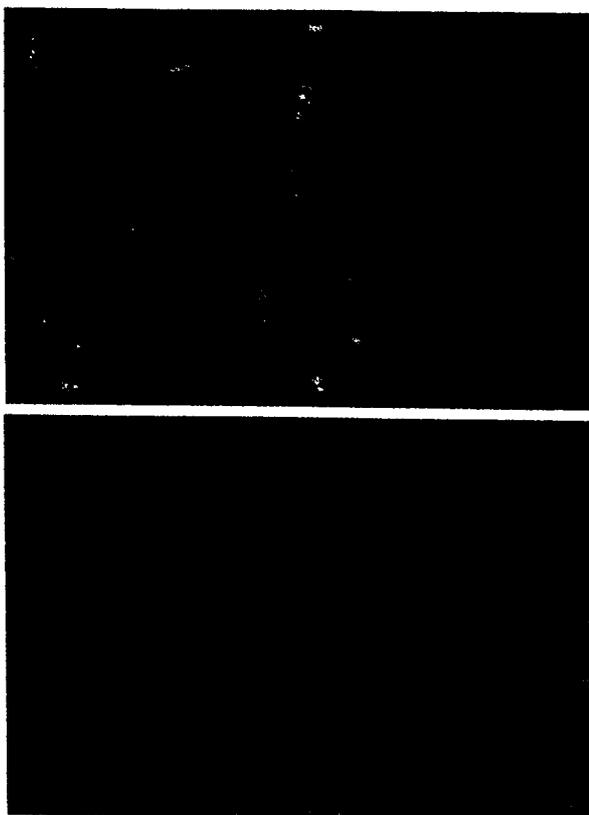


FIG. 10A

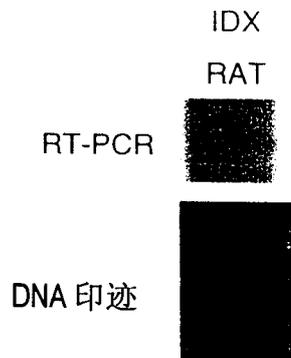


FIG. 10B

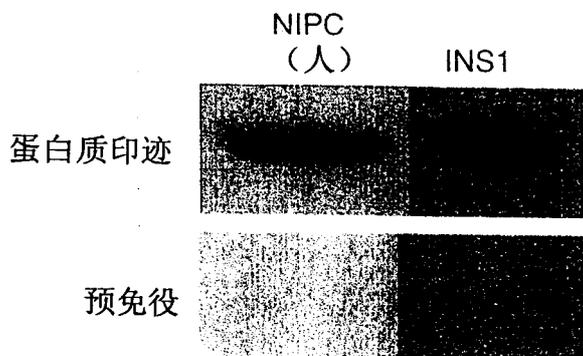


FIG. 10C

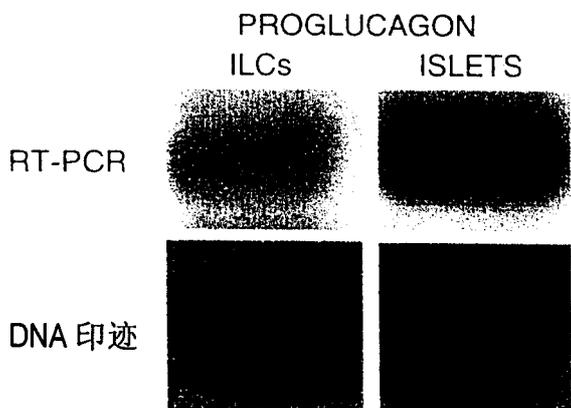
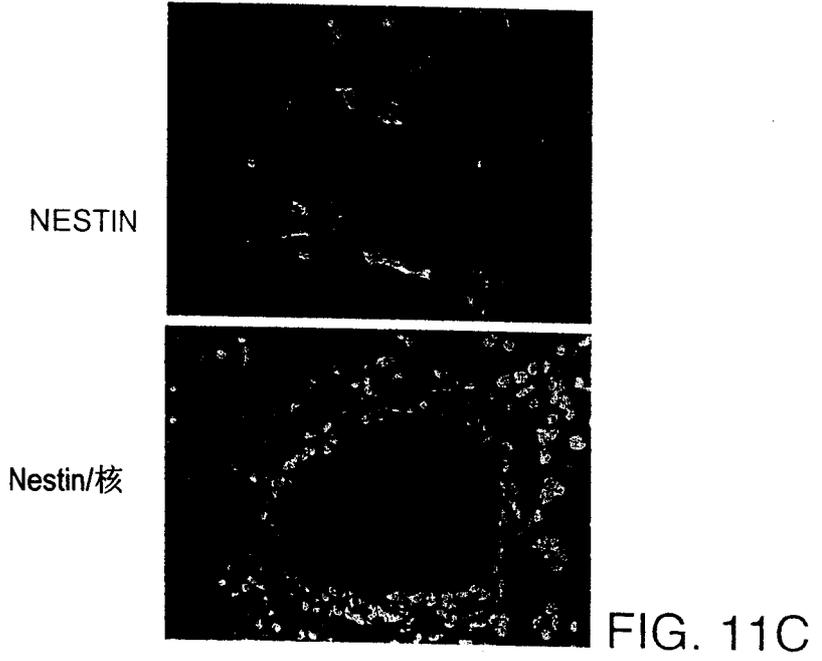
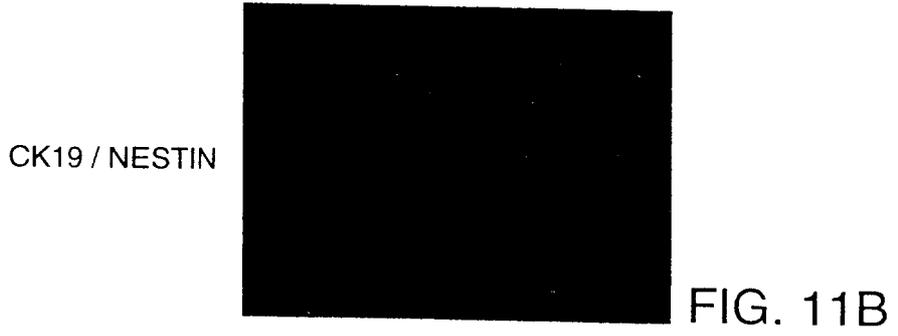
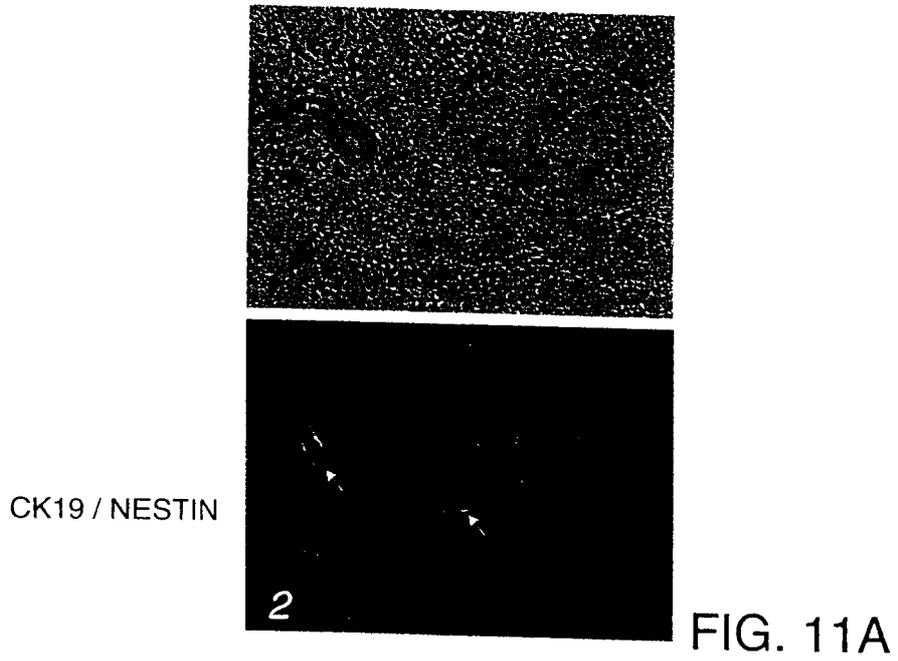


FIG. 10D



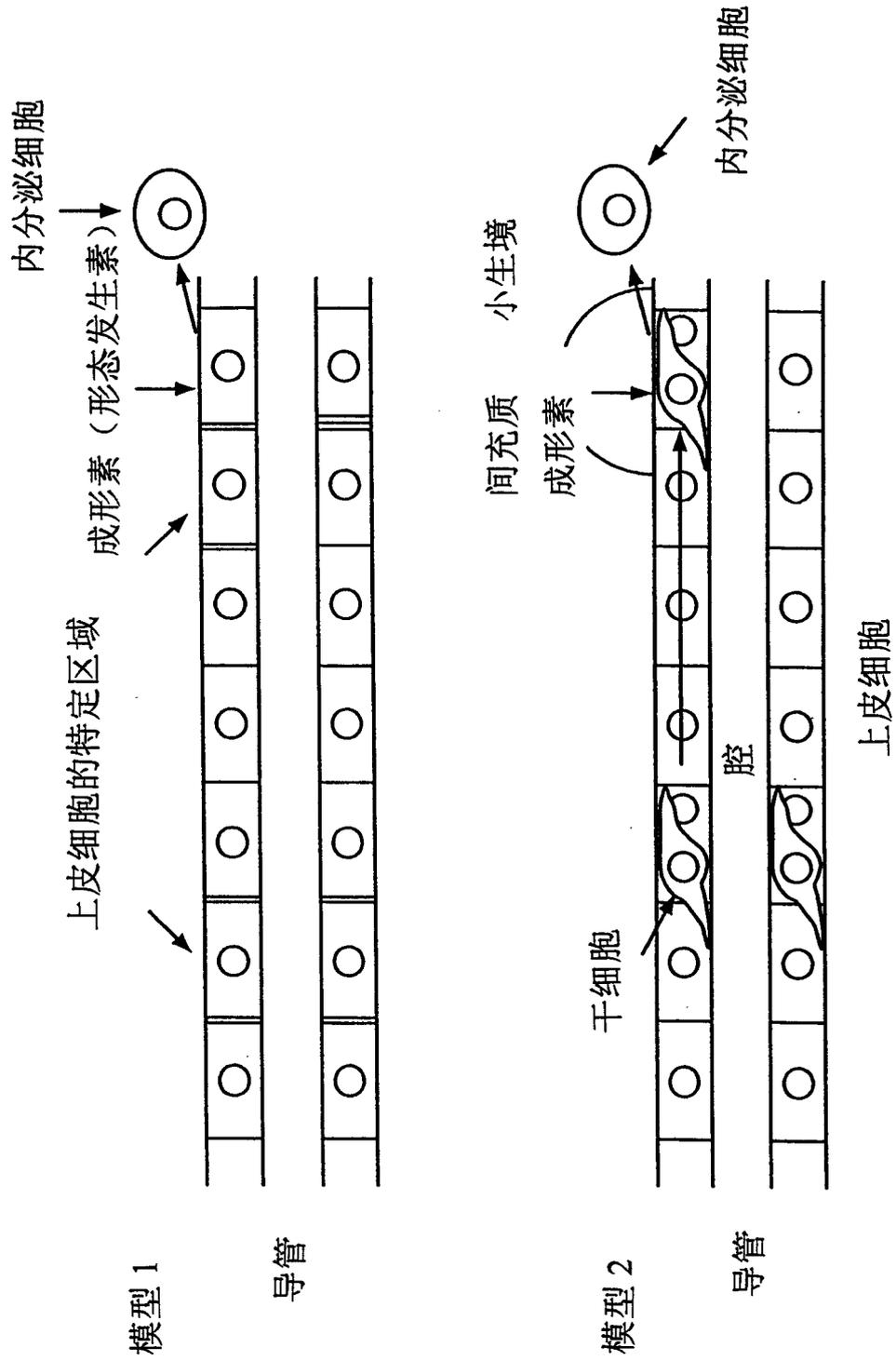


FIG. 12

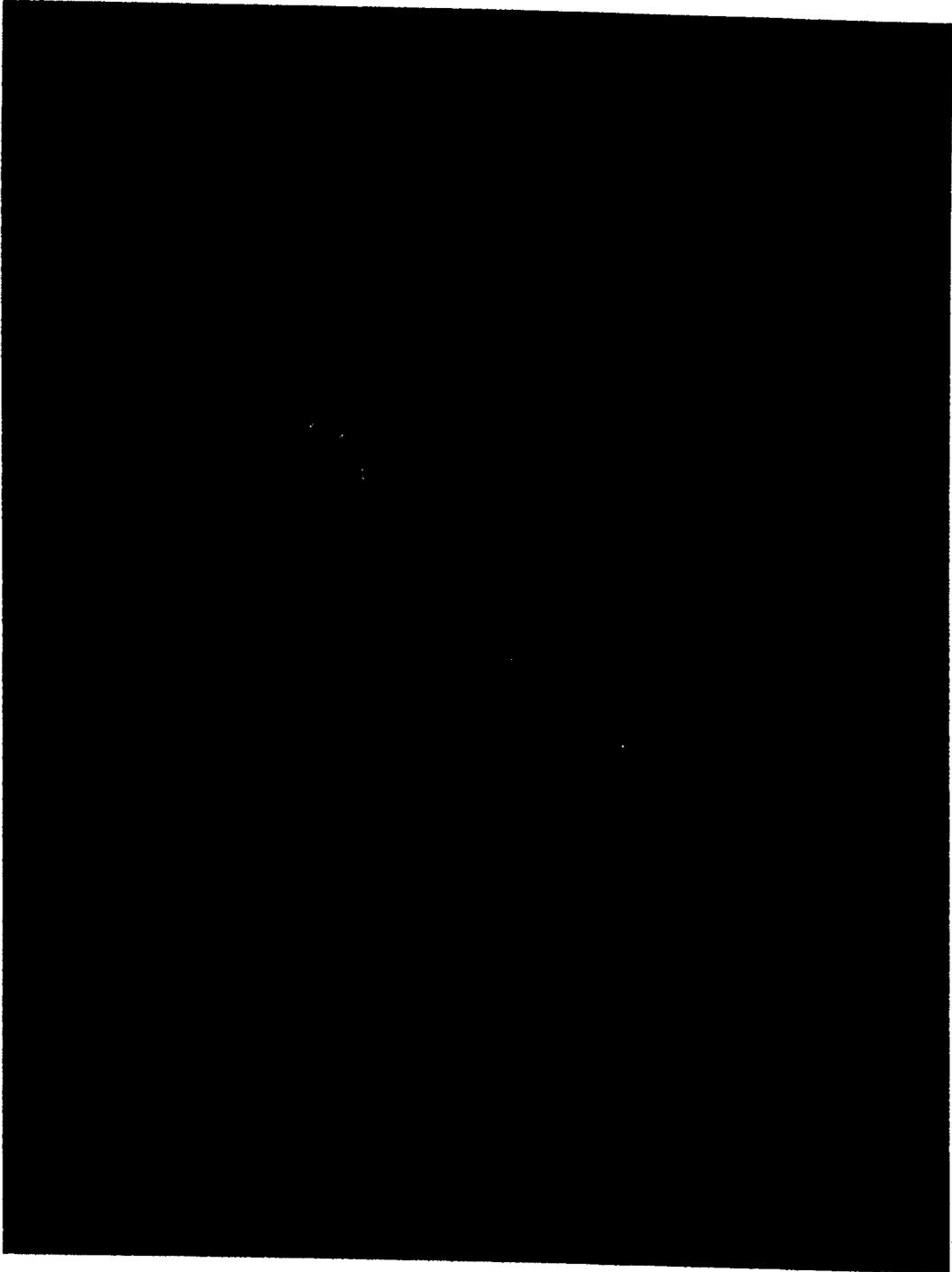


FIG. 13A

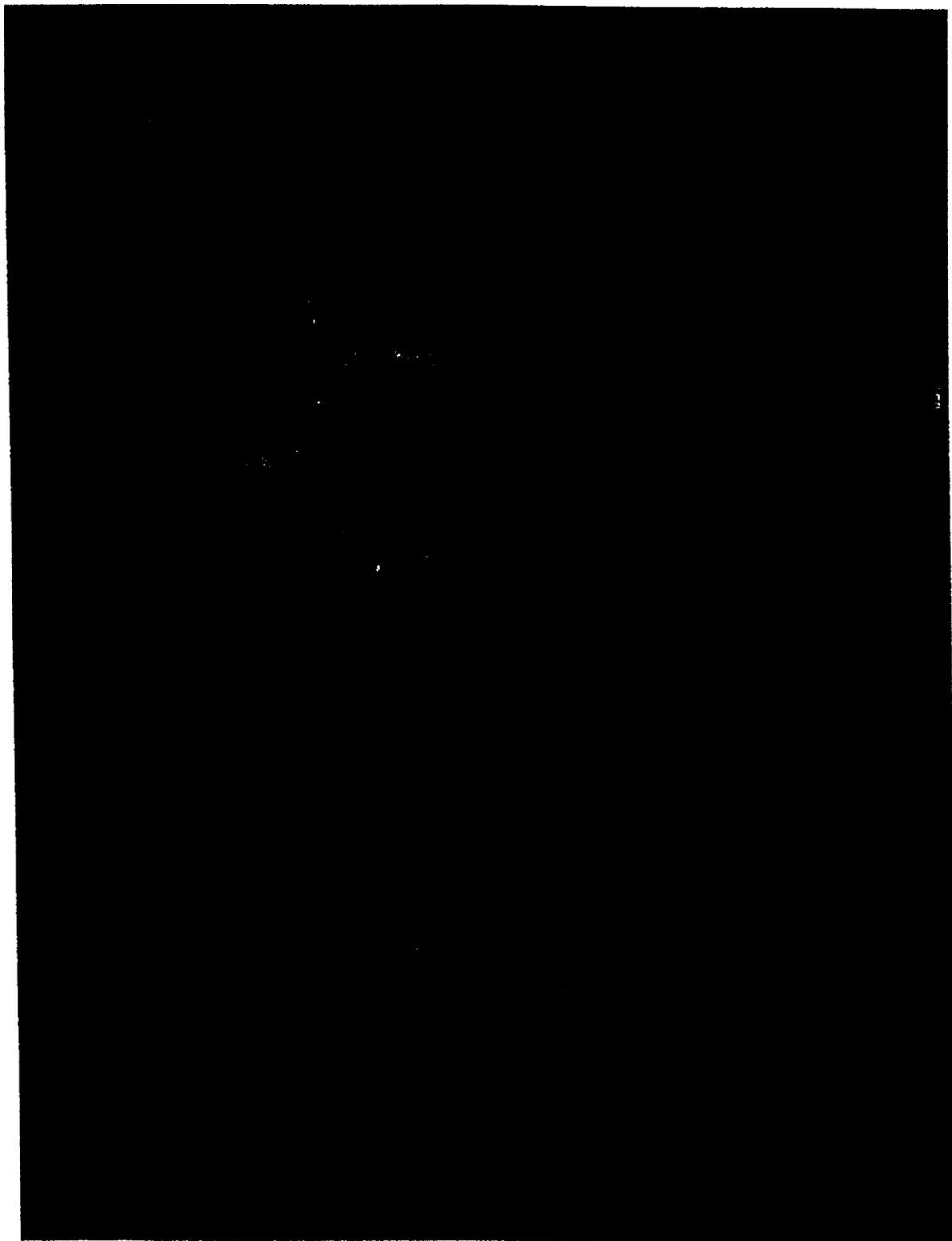


FIG. 13B

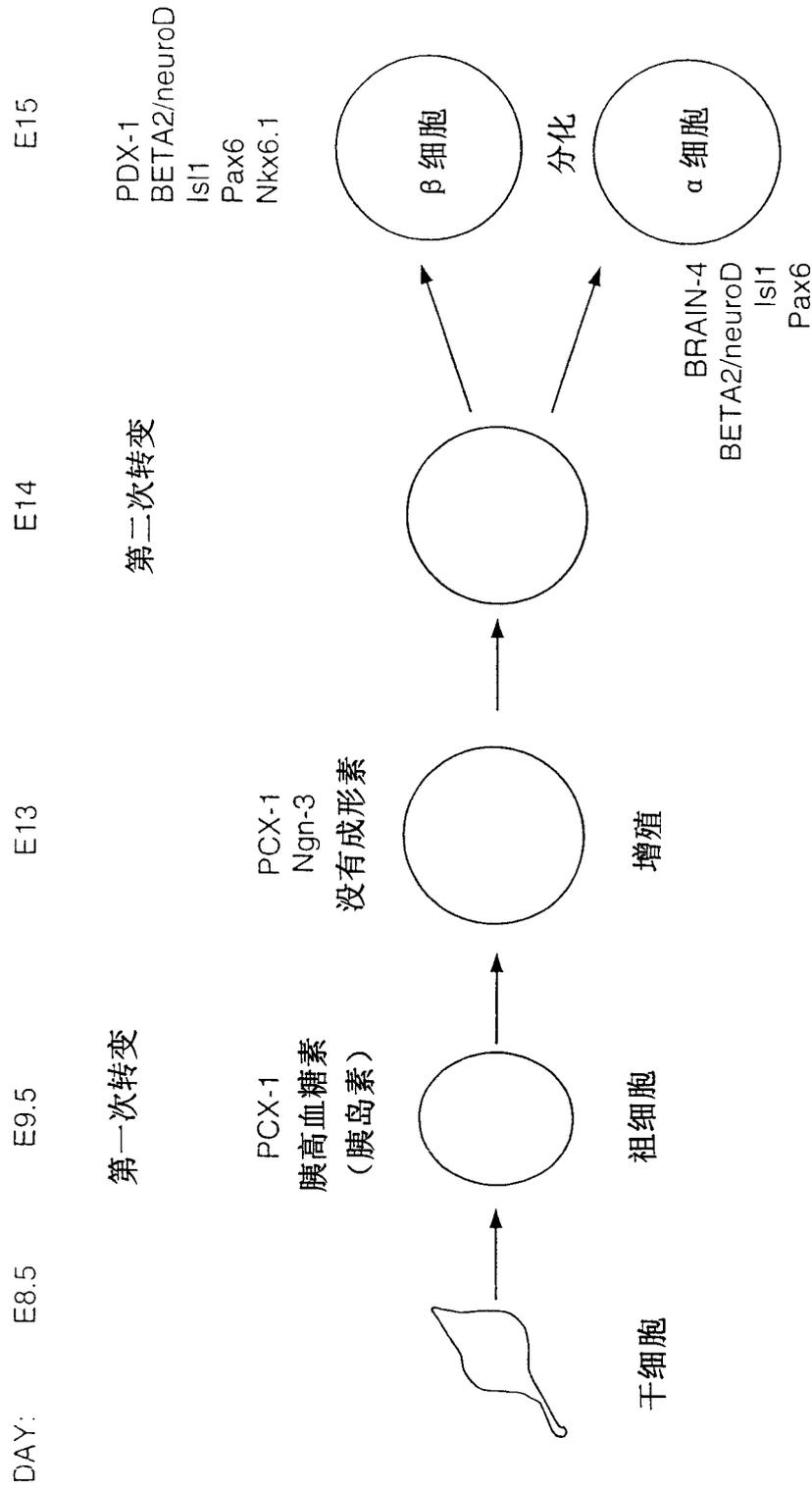
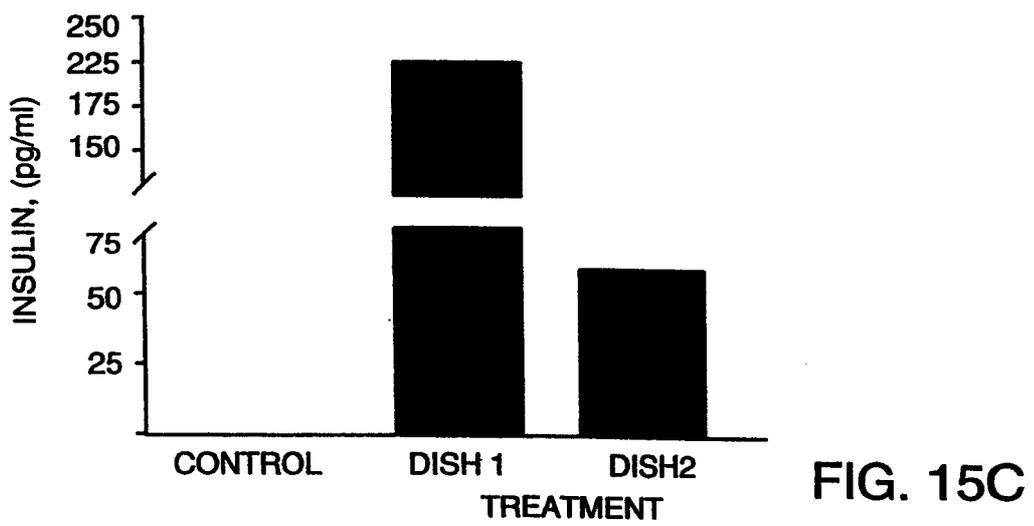
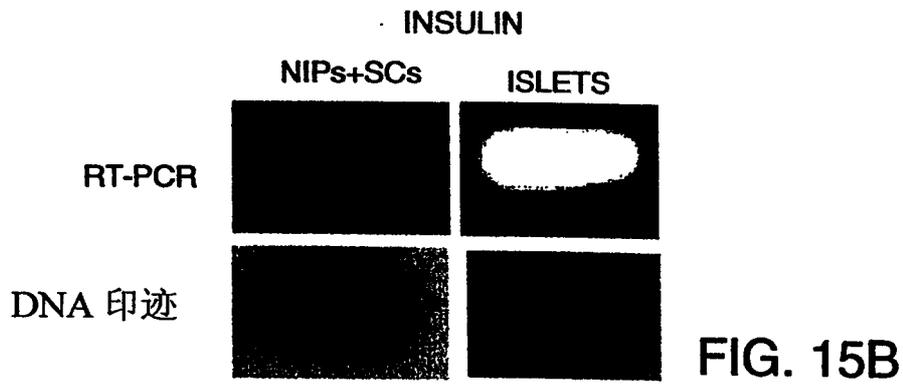
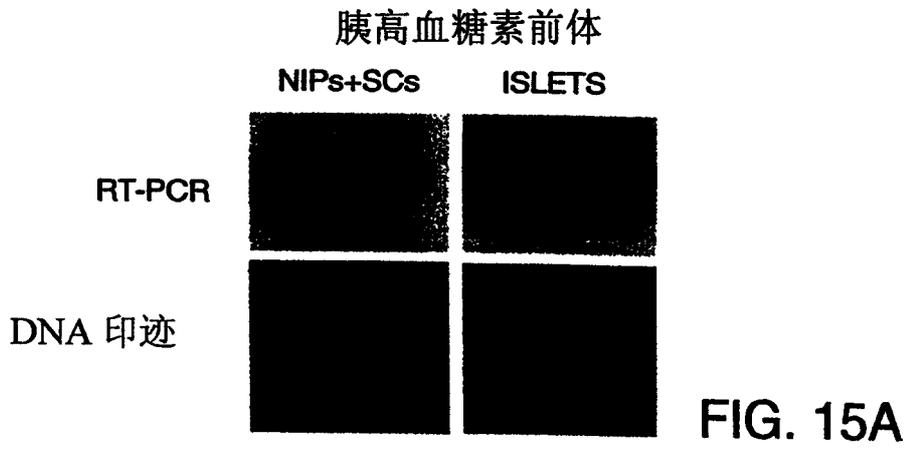


FIG. 14



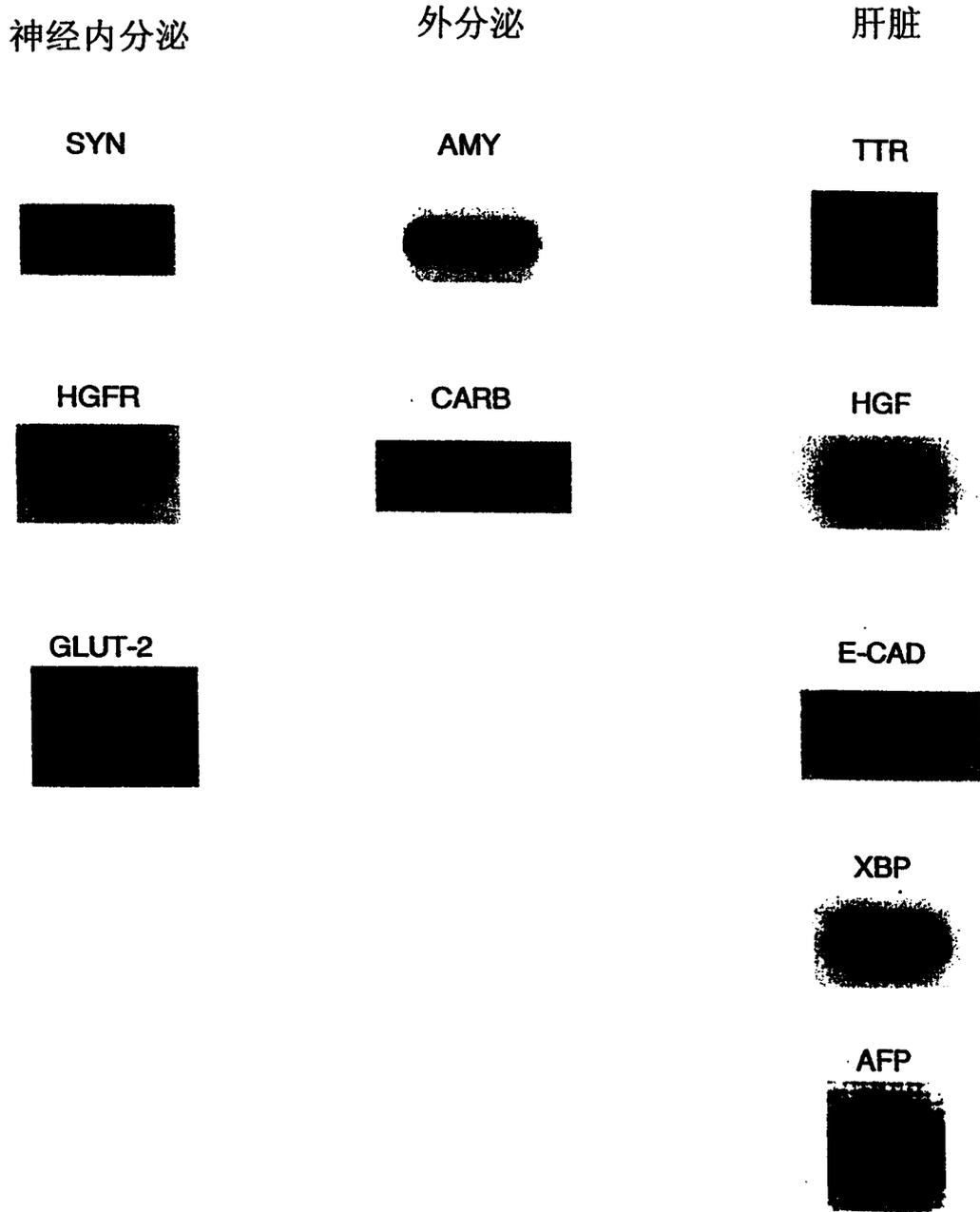


FIG. 16

专利名称(译)	胰腺干细胞及其在器官移植中的用途		
公开(公告)号	CN1423563A	公开(公告)日	2003-06-11
申请号	CN00816754.0	申请日	2000-12-06
[标]申请(专利权)人(译)	通用医疗公司		
申请(专利权)人(译)	通用医疗公司		
当前申请(专利权)人(译)	通用医疗公司		
[标]发明人	伊利莎白J亚伯拉罕 丹尼斯福斯特曼 乔L哈本娜 马里奥瓦立乔 亨德里克祖里乌斯基 梅利莎K托马斯		
发明人	伊利莎白·J·亚伯拉罕 丹尼斯·福斯特曼 乔·L·哈本娜 马里奥·瓦立乔 亨德里克·祖里乌斯基 梅利莎·K·托马斯		
IPC分类号	C12N15/09 A01K67/027 A61K A61K31/436 A61K31/7088 A61K35/12 A61K35/39 A61K38/00 A61K38/22 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P3/10 A61P37/06 A61P43/00 C12N C12N5/02 C12N5/071 C12N5/074 C12Q1/00 G01N33/53 A61K35/00 C12N15/85		
CPC分类号	C12N5/0678 C12N2500/34 A01K67/0271 C12N2501/115 C12N2501/11 A61K2035/122 C12N2501/335 A61K35/12 C12N2510/02 C12N5/0677 C12N5/0676		
代理人(译)	王学强		
优先权	60/169082 1999-12-06 US 60/215109 2000-06-28 US 60/238880 2000-10-06 US		
其他公开文献	CN100475953C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

治疗I型胰岛素依赖型糖尿病及其他使用新辨认的能够分化为不同的胰岛细胞,包括胰岛素生产的 β 细胞以及肝实质细胞的干细胞的情况的方法及组合物。Nestin已被鉴别为胰腺干细胞的一个分子标记,而细胞角蛋白19作为胰导管细胞的一个明确的类的标记。本发明同样也描述了nestin阳性干细胞可分离自胰岛且培养以获得干细胞或假胰岛类似结构的方法。同样也描述了胰腺干细胞的体外分化的方法。分离,扩展及移植胰腺干细胞进入患者以或者同种异体移植,或者同种移植或者异种异体移植以取代丢失或损坏胰岛素分泌细胞或其它细胞的方法。

E16

