

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2006年11月9日 (09.11.2006)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2006/117925 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 5/10 (2006.01) A61P 3/08 (2006.01)  
A61K 35/14 (2006.01) A61P 3/10 (2006.01)  
A61K 35/28 (2006.01) A61P 5/48 (2006.01)  
A61K 35/39 (2006.01) A61P 5/50 (2006.01)  
A61K 35/44 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)  
A61K 35/48 (2006.01) C12M 3/00 (2006.01)  
A61K 35/50 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)  
A61K 35/55 (2006.01) C12N 15/16 (2006.01)  
A61L 27/00 (2006.01) C12N 15/17 (2006.01)  
A61P 1/18 (2006.01)

(SHIMIZU, Hiromichi) [JP/JP]; 〒1250033 東京都葛飾区東水元 2-16-7-303 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号京橋日殖ビル8階 Tokyo (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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, 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, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(21) 国際出願番号:

PCT/JP2006/303948

(22) 国際出願日:

2006年3月2日 (02.03.2006)

(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2005-127686 2005年4月26日 (26.04.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社日立メディコ (HITACHI MEDICAL CORPORATION) [JP/JP]; 〒1010047 東京都千代田区内神田一丁目1番14号 Tokyo (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 里村 一人 (SATOMURA, Kazuhito) [JP/JP]; 〒7708051 徳島県徳島市沖浜町栄開399-1 サンライズアベニュー504 Tokushima (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 清水 博道

(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), ユーロッパ (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 AND DEVICE FOR REGENERATING PANCREATIC  $\beta$ -CELLS

(54) 発明の名称: 膵臓  $\beta$  細胞再生方法および装置

(57) Abstract: It is intended to provide a method for regenerating pancreatic  $\beta$ -cells for cell transplantation therapy from an easily collectable cell such as a bone marrow cell. According to the invention, a method for regenerating pancreatic  $\beta$ -cells by culturing a stem cell collected from the stroma in a medium supplemented with a differentiation-inducing factor.

(57) 要約: 本発明の目的は、細胞移植治療のための膵臓  $\beta$  細胞を、骨髄細胞などの採取容易な細胞から再生する方法を提供することである。本発明によれば、間質から採取した幹細胞を分化誘導因子を添加した培地で培養することにより、膵臓  $\beta$  細胞を再生する方法が提供される。

WO 2006/117925 A1

## 明 細 書

### 膵臓 $\beta$ 細胞再生方法および装置

#### 技術分野

[0001] 本発明は、骨髄の幹細胞を培養し分化誘導することによってインスリン産生細胞である膵臓  $\beta$  細胞を高効率に再生する技術に関する。

#### 背景技術

[0002] 糖尿病は20世紀後半以降急激に増大し、今では、日本における患者人口は予備軍を含めると1300万人と推定され、大きな国民的問題になりつつある。I型糖尿病は膵臓のインスリン産生が阻害される疾患で、インスリン注射が必要になる。II型糖尿病は糖尿病の90%以上を占め、インスリンは産生されるものの体細胞がインスリン抵抗性を示す疾患である。II型糖尿病においても症状が進むとインスリンの補充が必要になる。

[0003] 糖尿病の主な治療法は、膵臓のインスリン産生の低下を補うためのインスリン注射であるが、最近では経口のインスリン製剤も開発され、また  $\beta$  細胞(膵臓のインスリン産生細胞)の同種移植や、動物の  $\beta$  細胞を免疫隔離カプセルへ封入した人工膵島の移植も検討されている。一方、近年、再生医療の進展とともに  $\beta$  細胞自体を再生させようとする研究も盛んになってきた。 $\beta$  細胞をin vitroで作るための細胞源としては、膵臓、肝臓、腸管、ES細胞、骨髄などが研究されている。

[0004] 膵導管細胞からの  $\beta$  細胞再生では、レチノイン酸のDDS製剤、アクチビン、ベータセルリン等の増殖因子、pdx-1等の転写因子タンパクの利用、並びにpdx-1遺伝子又はNeuroD遺伝子等の遺伝子導入が検討されており、膵導管上皮細胞から約70%という高効率でインスリン発現細胞を分化誘導した例がある( $\beta$  細胞関連転写因子、分化増殖因子発現アデノウイルスベクターの膵管内投与によるインスリン賛成細胞の再生、及川洋一 他 第3回日本再生医療学会総会(2004年3月))。

[0005] 肝臓からの  $\beta$  細胞再生では、藤宮らはマウスへウイルスベクターでNeuroD、ベータセルリン遺伝子を導入し、肝臓内へ膵ラ氏島を再生した。血糖値は4ヶ月以上にわたって正常値が維持された。また、in vitroで肝細胞を分化することができた(成体ラット

肝幹様細胞を用いた膵内分泌細胞への分化誘導, 山田聡子 他 第3回日本再生医療学会総会(2004年3月))。

[0006] 腸管上皮からの $\beta$ 細胞再生では、谷口らはマウス腸管上皮細胞を採取し、glucagon様ペプチドを添加して培養することによりインスリン発現細胞へ分化できた(小腸上皮細胞におけるインスリン分泌細胞の分化誘導, 谷口英樹 第3回日本再生医療学会総会(2004年3月))。

[0007] ES細胞からの $\beta$ 細胞再生では、城井らはマウスES細胞へ $nhx2.2$ 遺伝子を導入し、高効率にインスリン産生細胞へ分化誘導できた( $nkx2.2$ 遺伝子導入ES細胞からインスリン産生細胞への分化誘導と治療の試み, 城井啓 他 第3回日本再生医療学会総会(2004年3月))。しかし、 $1 \times 10^6$ 個をマウス腎へ移植したが、血糖値正常化は得られなかった。

[0008] 骨髄の間葉系細胞(以下、MSC)からの $\beta$ 細胞再生では、中田らはICRマウス骨髄から骨髄細胞を採取し、マウス膵島細胞培養条件下で培養し、bFGF等の増殖因子を用いて分化誘導し、インスリン発現細胞を再生することができた(骨髄細胞からグルコース応答インスリン分泌細胞分化誘導の試み, 中田正範 他 第3回日本再生医療学会総会(2004年3月))。グルコース応答性もみられたが不完全であった。また、分化できたのは骨髄MSCの数%程度と少ない

[0009] In vitroでの $\beta$ 細胞再生では、泉田らは高血糖モデルラットへ同種のラット大腿骨から採取した骨髄細胞をPKH-26染色で標識したものを尾静脈より移植し、48日後に膵臓を摘出しインスリン染色を行い、移植した骨髄細胞由来のインスリン産生細胞が存在していることを確認した(ラット糖尿病モデルにおける骨髄細胞のインスリン産生細胞への分化誘導に関する検討, 泉田欣彦 第3回日本再生医療学会総会(2004年3月))。しかし、分化誘導は行っていない。

[0010] 胎盤細胞からの $\beta$ 細胞再生では、松本らは、マウス胎盤由来細胞をEGF、bFGF、Nicotinamideを添加した無血清培地で浮遊培養することによりsphereを形成するインスリン産生細胞を誘導した(胎盤由来インスリン分泌細胞の糖尿病治療への可能性, 松本秀一朗 他 第3回日本再生医療学会総会(2004年3月))。この細胞はIn vitroでは増殖しなかった。

[0011] 以上のようなin vitroで $\beta$ 細胞を再生してこれを機能が低下している膵臓へ移植することによって治療する方法とは別に、体内の幹細胞へ刺激を加えることによってin vivoで $\beta$ 細胞を再生させようとする研究も行われている。山口らは、I型糖尿病モデルラットへall trans retinoic acid DDS製剤を投与し、インスリン分泌能を改善した(ビタミンA活性体及びそのDDS製剤による体性幹細胞の膵 $\beta$ 細胞への分化誘導の可能性, 川上麻理子 他 第3回日本再生医療学会総会(2004年3月))。これは体性幹細胞が $\beta$ 細胞へ分化したものと推測されている(以上、2004年第3回再生医療学会総会より)。

### 発明の開示

#### 発明が解決しようとする課題

[0012] 膵臓 $\beta$ 細胞の再生を目指した研究の多くは膵臓の細胞やES細胞を元にした再生を目指しているが、これらの細胞源は入手が容易でなかったり、倫理面の問題があるため臨床応用に向いているとはいえない。最も現実的な幹細胞源は骨髄間葉系幹細胞(MSC)であると考えられる(ここでは多能性幹細胞:MAPCも含む)。最近は同等の分化能を有する細胞が脂肪組織や胎盤にも存在することが明らかになってきており、さらに臍帯血や末梢血中での存在も示唆されている。これらの細胞はいずれも非侵襲的に採取できることから、臨床応用に適した細胞源であるといえる。本発明の目的は、細胞移植治療のための膵臓 $\beta$ 細胞を、骨髄細胞などの採取容易な細胞から再生する方法を提供することである。

#### 課題を解決するための手段

[0013] 骨髄MSCからの $\beta$ 細胞誘導も研究されているが、分化できたのは骨髄MSCのうちの数%程度と非常に少ないのが現状である。本発明は、MSCからの $\beta$ 細胞のより効率的な分化誘導方法を提供するものである。本発明者らは、マウスおよびヒトで骨髄細胞の継代培養とコロニーアッセイにより自然株化細胞を得ることに成功した。この株細胞は適当な増殖因子の組み合わせにより、インスリン陽性細胞に10数%以上の高い効率で分化誘導できることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

[0014] 即ち、本発明によれば、間質から採取した幹細胞を分化誘導因子を添加した培地

で培養することによりインスリン発現細胞を取得することを含む、膵臓β細胞を再生する方法が提供される。

[0015] 好ましくは、株化した間質幹細胞を分化誘導因子を添加した培地で培養することによりインスリン発現細胞を取得する。

好ましくは、間葉組織から採取し株化した間質幹細胞を分化誘導因子を添加した培地で培養することによりインスリン発現細胞を取得する。

好ましくは、間葉組織は、骨髄、脂肪組織、末梢血、臍帯血、又は胎盤である。

[0016] 好ましくは、間質から採取した幹細胞を、Transferrin、Insulin、sodium selenite、血清アルブミン、Ascorbic acid、dexamethasone、EGF、Progesterone、及びNicotinamideのいずれか1種以上を添加した培地で培養することによりインスリン発現細胞を取得する。

[0017] 好ましくは、間質から採取した幹細胞を、Transferrin、sodium selenite、血清アルブミン、Ascorbic acid、dexamethasone、及びProgesteroneのいずれか1種以上を添加した培地で培養することによりインスリン発現細胞を取得する。

[0018] 好ましくは、骨髄より採取した細胞を継代培養して骨髄間質細胞株を作製し、この骨髄間質細胞株をFBS、Ascorbic acid、及びdexamethasoneを加えた培地で培養し、その後、培地をFBS、Transferrin、Insulin、sodium selenite、BSA、Ascorbic acid、dexamethasone、EGF、Progesterone、及びNicotinamideを加えた培地に変更して培養を行うことによってインスリン発現細胞を取得する。

[0019] 本発明の別の態様によれば、体性幹細胞、ES細胞または脱分化させた成熟細胞をTransferrin、Insulin、sodium selenite、血清アルブミン、Ascorbic acid、dexamethasone、EGF、Progesterone、及びNicotinamideのいずれか1種以上を添加した培地で培養することによりインスリン発現細胞を取得することを含む、膵臓β細胞を再生する方法が提供される。

[0020] 本発明のさらに別の態様によれば、体性幹細胞、ES細胞または脱分化させた成熟細胞を培養する密閉された容器と、Transferrin、Insulin、sodium selenite、血清アルブミン、Ascorbic acid、dexamethasone、EGF、Progesterone、及びNicotinamideのいずれか1種以上を時間的に制御された順序かつ制御された量で、該容器へ添加す

る機構と、制御された時間に培地を交換する機構と、滅菌された空気を循環させる機構と、該容器の温度を制御する機構と、該細胞の培養状態をモニターする機構と、該細胞を該容器へ充填および容器から排出する機構とを備えた、膵臓β細胞の再生装置が提供される。

- [0021] 本発明のさらに別の態様によれば、体性幹細胞、ES細胞または脱分化させた成熟細胞を増殖させ、Transferrin、Insulin、sodium selenite、血清アルブミン、Ascorbic acid、dexamethasone、EGF、Progesterone、及びNicotinamideのいずれか1種以上を加えた培地で培養することにより膵臓β細胞を再生し、再生した膵臓β細胞を糖尿病患者に移植することを含む、糖尿病の治療方法が提供される。

#### 発明を実施するための最良の形態

- [0022] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本発明による膵臓β細胞を再生する方法は、間質から採取した幹細胞を分化誘導因子を添加した培地で培養することによりインスリン発現細胞を取得することを特徴とする方法である。

- [0023] 間質とは、骨髄などに含まれる支持組織であり、一般的には、間質細胞と細胞外基質から構成される。本発明では、間質などの組織中に存在する幹細胞を採取して使用する。採取する幹細胞は好ましくは間葉系幹細胞である。間葉とは、各胚葉の間を埋める疎性結合組織であり、一般には中胚葉由来であるが、外胚葉由来のものもある。間葉系幹細胞を含む組織としては、骨髄、脂肪組織、末梢血、臍帯血、胎盤などを挙げることができる。

- [0024] 幹細胞とは、外胚葉(歯髓細胞(歯髓線維芽細胞を含む)、上皮細胞(歯)、エナメル上皮基底膜細胞、神経細胞、象牙芽細胞、セメント芽細胞など)、中胚葉(骨芽細胞、軟骨細胞、骨細胞、腎基底膜細胞、血液系細胞)、内胚葉(消化管上皮細胞、消化管実質細胞)などの細胞へと分化しうる又はそれらの修復を促進しうる多能性を有する未分化な細胞である。幹細胞としては、各組織・臓器に含まれ、分化の方向性がある程度決定されている体性幹細胞を使用してもよいし、胚性幹細胞をはじめとする多能性幹細胞を使用してもよい。また、本発明では、幹細胞として、脱分化させた成熟細胞を用いてもよい。

- [0025] 本発明において幹細胞は、当該細胞を有する任意の間質から採取することができるが、好ましくは骨髄、脂肪組織、末梢血、臍帯血、又は胎盤などから採取することができる。多量の細胞が採取可能であること及び採取が容易であるという観点から、大腿骨、脛骨又は骨盤(腸骨)から採取することが好ましい。骨髄由来の間葉系幹細胞の採取方法は当業者に公知であり、例えば医療において用いられている通常の採取方法を用いることができる。具体的には、ヒトに対しては、患者に対するインフォームドコンセントのもとに、ヒト大腿骨、腸骨、顎骨、末梢血管等の幹細胞が存在する組織および器官より、注射器や穿刺針などを用いて骨髄や末梢血を無菌的に必要量採取し、そのまま、培養容器に播種し浮遊系細胞と接着系細胞を分離することで使用するか、フローサイトメトリー、または密度勾配遠心法などの手法を用いることで、幹細胞を採取分離することができる。ヒト以外の哺乳動物の骨髄から間葉系幹細胞を採取する際には、例えば骨(大腿骨、脛骨)の両端を切断し、間葉系幹細胞の培養に適する培地で骨内を洗浄して、洗い出された該培養液から間葉系幹細胞を取得することができる。
- [0026] 間葉系幹細胞の初代培養及び／又は継代培養を行うには、採取分離した細胞を適当な培地(例えば、DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 培地、又は $\alpha$ -MEM培地など)を用い、組織培養用培養皿に細胞を播種して初代培養及び継代培養する。培養に用いる血清としては、ウシ胎児血清(FBS)を用いることができる。
- [0027] 細胞の培養は、動物細胞の培養に用いる通常の血清入り培地や無血清培地を用いて、通常の動物細胞の培養条件(例えば、室温から37°Cの温度;5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内など)の下で行なうことができる。培養の形態は特に限定されないが、例えば、静置培養で行なうことができる。
- [0028] 本発明において、幹細胞からインスリン産生細胞である膵臓 $\beta$ 細胞への分化誘導培養は、初代培養及び継代培養した幹細胞を、分化誘導培地を用いて培養し、細胞を分化誘導することにより行うことができる。ここで分化誘導培地とは、以下に説明する分化誘導因子を添加した培地のことを言う。
- [0029] 本発明で用いる分化誘導因子としては、幹細胞をインスリン発現細胞へと分化させることができる因子であれば、その種類は特に限定されない。分化誘導因子としては

、具体的には、トランスフェリン(Transferrin)、インスリン(Insulin)、亜セレン酸ナトリウム(sodium selenite)、血清アルブミン、アスコルビン酸(Ascorbic acid)、デキサメタゾン(dexamethasone)、EGF(上皮増殖因子)、プロゲステロン(Progesterone)、及びニコチンアミド(Nicotinamide)などを用いることができる。本発明では、上記9種の分化誘導因子のいずれか1種以上を用いることができ、好ましくは、上記9種の分化誘導因子のうちの2種類以上(さらに好ましくは3種類以上)を組み合わせ使用することができ、特に好ましくは上記9種の全ての分化誘導因子を使用することができる。また別の好ましい実施態様によれば、トランスフェリン(Transferrin)、亜セレン酸ナトリウム(sodium selenite)、血清アルブミン、アスコルビン酸(Ascorbic acid)、デキサメタゾン(dexamethasone)、及びプロゲステロン(Progesterone)の6種の分化誘導因子を組み合わせ使用することができる。

- [0030] トランスフェリン(Transferrin)を使用する場合、トランスフェリンの培地中の濃度は、本発明の効果を達成できる限り特に限定されないが、一般的には、5～500  $\mu$  g/mlであり、好ましくは10～200  $\mu$  g/mlである。
- [0031] インスリンを使用する場合、インスリンの培地中の濃度は、本発明の効果を達成できる限り特に限定されないが、一般的には、0.5～50  $\mu$  g/mlであり、好ましくは1～20  $\mu$  g/mlである。
- [0032] 亜セレン酸ナトリウムを使用する場合、亜セレン酸ナトリウムの培地中の濃度は、本発明の効果を達成できる限り特に限定されないが、一般的には、0.5～50ng/mlであり、好ましくは1～20ng/mlである。
- [0033] 血清アルブミンを使用する場合、血清アルブミンの培地中の濃度は、本発明の効果を達成できる限り特に限定されないが、一般的には、0.1～10mg/mlであり、好ましくは0.2～5mg/mlである。
- [0034] アスコルビン酸を使用する場合、アスコルビン酸の培地中の濃度は、本発明の効果を達成できる限り特に限定されないが、一般的には、5～500  $\mu$  g/mlであり、好ましくは10～200  $\mu$  g/mlである。
- [0035] デキサメタゾンをを使用する場合、デキサメタゾンの培地中の濃度は、本発明の効果を達成できる限り特に限定されないが、一般的には、1～100nMであり、好ましくは2



～50nMである。

- [0036] EGFを使用する場合、EGFの培地中の濃度は、本発明の効果を達成できる限り特に限定されないが、一般的には、0.2～20ng/mlであり、好ましくは0.5～10ng/mlである。
- [0037] プロゲステロンを使用する場合、プロゲステロンの培地中の濃度は、本発明の効果を達成できる限り特に限定されないが、一般的には、2.5～250ng/mlであり、好ましくは5～100ng/mlである。
- [0038] ニコチンアミドを使用する場合、ニコチンアミドの培地中の濃度は、本発明の効果を達成できる限り特に限定されないが、一般的には、1～100mMであり、好ましくは2～50mMである。
- [0039] 上記した本発明の方法に従って幹細胞を培養して、これを分化誘導することによって、インスリン産生細胞を取得することができる。分化誘導された細胞におけるインスリンの発現の有無については、mRNAレベルの発現についてはRT-PCR又はノザンブロット、あるいはin situ hybridizationなどにより確認でき、タンパク質レベルの発現についてはウェスタンブロット、免疫染色などにより確認できる。RT-PCR及びノザンブロット、in situ hybridizationは、インスリン遺伝子の特異的に検出できるプライマー又はプローブ（プロインスリンを検出するためのプライマー又はプローブを使用してもよい）を用いて、当業者の公知の常法により行うことができる。また、ウェスタンブロット及び免疫染色は、抗インスリン抗体を用いて、当業者の公知の常法により行うことができる。また、Pdx1遺伝子（膵臓の発生にかかわる重要な遺伝子であり、インスリン産生細胞の発生及び機能維持の役割も担っていると考えられている）の発現の有無を指標とすることによって、膵臓β細胞の再生を確認することもできる。
- [0040] 本発明の方法で再生した膵臓β細胞は、インスリンを発現することができ、糖尿病患者に移植することによって糖尿病を治療することができる。
- [0041] さらに本発明は、体性幹細胞、ES細胞または脱分化させた成熟細胞を培養する密閉された容器と、Transferrin、Insulin、sodium selenite、血清アルブミン、Ascorbic acid、dexamethasone、EGF、Progesterone、及びNicotinamideのいずれか1種以上を時間的に制御された順序かつ制御された量で、該容器へ添加する機構と、制御された

時間に培地を交換する機構と、滅菌された空気を循環させる機構と、該容器の温度を制御する機構と、該細胞の培養状態をモニターする機構と、該細胞を該容器へ充填および容器から排出する機構とを備えた、膵臓β細胞の再生装置に関する。

[0042] 採取された細胞から膵臓β細胞を再生する一連の工程を自動的に行うための培養装置の一例を図4に示す。体性幹細胞、ES細胞または脱分化させた成熟細胞を選別、希釈または濃縮などの必要な措置を施した後、細胞容器1から装置の中へ注入する。注入口から配管2を通して細胞は培養容器3へ導かれる。Transferrin、Insulin、sodium selenite、血清アルブミン、Ascorbic acid、dexamethasone、EGF、Progesterone、Nicotinamideのいずれか、あるいは複数の組み合わせを備えた分化誘導因子リザーバー群4から時間的に制御された順序で、制御された量が培養容器3へ添加される。また、培地のリザーバー5から制御された時間に培地が培養容器3へ供給され、老廃物を含んだ培地が排出される。分化誘導因子と培地の供給、排出はコンピュータ6で制御されたポンプ機構7によって行われる。培養容器へは、循環機構8によって滅菌された空気と二酸化炭素が供給される。培養容器の温度は温度センサーと加熱・冷却機構9によって制御される。培養容器内の細胞の形状や数、増殖速度は光学的モニター系10によりモニターされる。培地のpHやグルコース濃度は廃液流路で化学センサー11によりモニターされる。必要な数に増殖したβ細胞は酵素処理などにより剥離後、ポンプ系7により容器12の中へ排出される。

[0043] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

## 実施例

### [0044] 実施例1

マウス(C57B1/6, 雄性, 6週齢)から採取した骨髓細胞を継代培養し、自発株化による骨髓間質細胞株を得た(2株)。骨髓間質細胞株を得るには、クローニングリングを用いたシリンダー法を行った。薄蒔きにシャーレに播種した骨髓間質細胞の中から、任意の一個の細胞をクローニングリングで囲い、そこで剥離した一個の細胞を24穴プレートに継代した。24穴プレートの中で、一個の細胞からコンフルエントに達した細胞を、やや培養面積の広い6穴プレートに継代し、その中でコンフルエントになるまで

培養した。さらに、6穴プレートでコンフルエントに達した細胞を、さらに培養面積の広いT-75フラスコに継代し、培養を続けることで、一個の骨髄間質細胞由来の細胞を得ることができた。また、この細胞を半年から1年程度培養し、公知の方法により培養前と培養後で分化能や増殖能が安定していることを確認し、骨髄間質細胞株として使用することとした。

- [0045] 上記で得た骨髄間質細胞株を継代後、10%FBS、50  $\mu$ g/ml Ascorbic acid、10nM dexamethasoneを加えた  $\alpha$ -MEM培地で12時間培養した。その後、培地を5%FBS、50  $\mu$ g/ml Transferrin、5  $\mu$ g/ml Insulin、5ng/ml sodium selenite、1mg/ml BSA、50  $\mu$ g/ml Ascorbic acid、10 nM dexamethasone、2ng/ml EGF、25ng/ml Progesterone、10 mM Nicotinamideを加えたDMEM培地に変更した。
- [0046] 培地交換後7~10日後に、第1図に示すように細胞が密集するコロニーが形成され、細胞質内に多数の顆粒が形成された。遺伝子発現を以下の8つの遺伝子について調べた。即ち、配列番号1から10に記載した塩基配列を有するプライマーをそれぞれ使用して、RT-PCRにより遺伝子発現を調べた。RT-PCRは以下の通り行った。
- [0047] 培養した細胞より、RNA採取キット (TRIzol Reagent: Invitrogen) を用いて、Total RNAを採取。cDNA合成キット (Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR: Invitrogen) を用いて2  $\mu$ gのTotal RNAからcDNAを合成した。次に、サンプルチューブ1本あたり、cDNA 1  $\mu$ l、滅菌水11.3  $\mu$ l、10 $\times$ PCR buffer (タカラバイオ製) 2  $\mu$ l、dNTP (タカラバイオ製) 1.6  $\mu$ l、センスプライマー (終濃度 0.5  $\mu$ M、下記参照) 2  $\mu$ l、アンチセンスプライマー (終濃度 0.5  $\mu$ M、下記参照) 2  $\mu$ l、Taqポリメラーゼ (タカラバイオ製) を混和し、総量20  $\mu$ lのサンプルを調整した。調整したサンプルをサーマルサイクラーにセットし、検出目的の遺伝子に応じて20~35サイクルでPCR反応を実施、最後に電気泳動法により目的の遺伝子を検出した。
- [0048] 1. Proinsulin 1 (gttggtgcac ttctacccc tg (配列番号1) 及び gtagaggag cagatgctgg t g (配列番号2)、300bp)  
2. Proinsulin 2 (gtggatgcgc ttctgcccc tg (配列番号3) 及び gtagaggag cagatgctgg t g (配列番号4)、300bp)

3. Glucagon (tcattgacgtt tggcaagtt (配列番号5) 及び cagaggagaa ccccagatca (配列番号6)、202bp)
4. Somatostatin (gacctgcaa ctgactgac (配列番号7) 及び ttgggggag agggatcag (配列番号8)、294bp)
5. Pax 4 (gctttgtacc caggacaagg ct (配列番号9) 及び gaggtgtcac tggaacatct ac (配列番号10)、552bp)
6. Pax 6 (aaccagagaa gacaggccag (配列番号11) 及び aggttcactc ccggaagaa (配列番号12)、420bp)
7. PDX1 (ggccacacag ctctacaagg (配列番号13) 及び ttccacttca tgcgacggtt (配列番号14)、582bp)
8. G3PDH (accacagtcc atgcatcac (配列番号15) 及び tccaccacc tgttgctgta (配列番号16)、452bp)

[0049] 結果を図2に示す。Proinsulin 1、Proinsulin 2およびPDX-1のmRNAの発現が明瞭に認められた。また、タンパクの発現をWestern Blotにより調べた結果を図3に示す。Western Blotは以下の通り行った。培養した細胞について、培地を除去し、タンパク質溶解剤(Cytobaster Novagen製など)を用いてタンパク質を回収した。ソニケーターで懸濁・加温し、タンパク質濃度1mg/mlに調整したものをサンプルとし、サンプルを10%アクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。電気泳動したゲルに含まれるタンパク質分画をPVDFメンブレンに転写し、最後に抗インスリンの1次抗体およびペルオキシダーゼ標識した抗1次抗体の2次抗体で目的のタンパク質を検出した。

[0050] 一次抗体:Goat anti-Insulin抗体(Santa Cruz sc-7838, 1:200)

二次抗体:Horseradish peroxides-conjugated anti-Goat IgG抗体(Pierce 31402, 1:5000)

とした。図3に示す通り、Insulinの発現が認められた。

[0051] 分化した細胞の割合について顕微鏡の目視で確認した結果、本発明の方法ではインスリン陽性細胞が高い割合であった。

[0052] 骨髄間質細胞株を分化誘導することにより、膵臓発生のマスター遺伝子pdx-1やProinsulin 1、Proinsulin 2の発現が見られ、さらに、Insulinタンパクの発現が見られたこ

とから、この細胞は $\beta$ 細胞へ分化したことが確認できた。細胞株からの分化誘導であるため、この実験では周囲に存在していた膵臓細胞との細胞融合の可能性はない。また、培地へ添加したInsulinが細胞内へ取り込まれたものを検出した可能性があるが、分化した細胞内に顆粒が観察され、ProinsulinのmRNAの発現が見られたことから、培地のInsulin以外の寄与が認められる。

[0053] 以上、骨髄間質細胞からの株化細胞について述べたが、脂肪組織、胎盤、臍帯血や末梢血中の細胞にも骨髄間質細胞と近似した分化能を有する細胞が存在することから、同様の処理により $\beta$ 細胞へ分化可能であることが予想される。さらに一般の体性幹細胞やES細胞または脱分化させた成熟細胞を同様の処理により $\beta$ 細胞へ分化させることも可能と予想される。

#### 産業上の利用可能性

[0054] 本発明の方法によれば、骨髄間質などの採取が容易な間葉系幹細胞から膵臓 $\beta$ 細胞を再生することができるので、本発明の方法で再生した膵臓 $\beta$ 細胞は、糖尿病に対する $\beta$ 細胞の移植治療のための細胞源として有効である。また、本発明では株化細胞を用いるので、継代を繰り返すことにより大量の細胞を得ることができる。また保存しておき必要時に再度分化させて移植することもできる。本発明の方法では、遺伝子導入や特殊なタンパク質やサイトカインを用いないことから、臨床応用が容易である。

#### 図面の簡単な説明

[0055] [図1]図1は、再生した $\beta$ 細胞を示す。

[図2]図2は、再生した $\beta$ 細胞のmRNA発現を示す。

[図3]図3は、再生した $\beta$ 細胞のタンパク発現を示す。

[図4]図4は、 $\beta$ 細胞の分化・培養装置図を示す。1 細胞容器、2 配管、3 培養容器、4 分化誘導因子リザーバー群、5 培地のリザーバー、6 コンピュータ、7 ポンプ機構、8 循環機構、9 加熱・冷却機構、10 光学的モニター系、11 化学センサー、12 容器

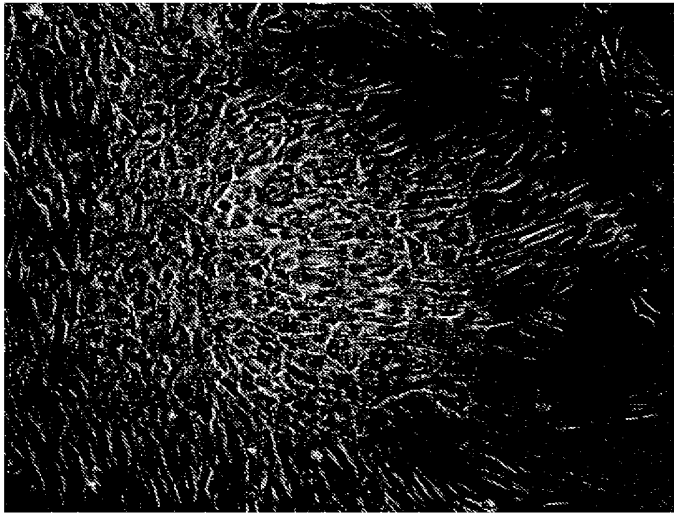
## 請求の範囲

- [1] 間質から採取した幹細胞を分化誘導因子を添加した培地で培養することによりインスリン発現細胞を取得することを含む、膵臓β細胞を再生する方法。
- [2] 株化した間質幹細胞を分化誘導因子を添加した培地で培養することによりインスリン発現細胞を取得する、請求項1に記載の方法。
- [3] 間葉組織から採取し株化した間質幹細胞を分化誘導因子を添加した培地で培養することによりインスリン発現細胞を取得する、請求項1及び2に記載の方法。
- [4] 間葉組織が、骨髄、脂肪組織、末梢血、臍帯血、又は胎盤である、請求項1から3の何れかに記載の方法。
- [5] 間質から採取した幹細胞を、Transferrin、Insulin、sodium selenite、血清アルブミン、Ascorbic acid、dexamethasone、EGF、Progesterone、及びNicotinamideのいずれか1種以上を添加した培地で培養することによりインスリン発現細胞を取得する、請求項1から4の何れかに記載の方法。
- [6] 間質から採取した幹細胞を、Transferrin、sodium selenite、血清アルブミン、Ascorbic acid、dexamethasone、及びProgesteroneのいずれか1種以上を添加した培地で培養することによりインスリン発現細胞を取得する、請求項1から4の何れかに記載の方法。
- [7] 骨髄より採取した細胞を継代培養して骨髄間質細胞株を作製し、この骨髄間質細胞株をFBS、Ascorbic acid、及びdexamethasoneを加えた培地で培養し、その後、培地をFBS、Transferrin、Insulin、sodium selenite、BSA、Ascorbic acid、dexamethasone、EGF、Progesterone、及びNicotinamideを加えた培地に変更して培養を行うことによりインスリン発現細胞を取得する、請求項1から6の何れかに記載の方法。
- [8] 体性幹細胞、ES細胞または脱分化させた成熟細胞をTransferrin、Insulin、sodium selenite、血清アルブミン、Ascorbic acid、dexamethasone、EGF、Progesterone、及びNicotinamideのいずれか1種以上を添加した培地で培養することによりインスリン発現細胞を取得することを含む、膵臓β細胞を再生する方法。
- [9] 体性幹細胞、ES細胞または脱分化させた成熟細胞を培養する密閉された容器と、Transferrin、Insulin、sodium selenite、血清アルブミン、Ascorbic acid、dexamethasone、

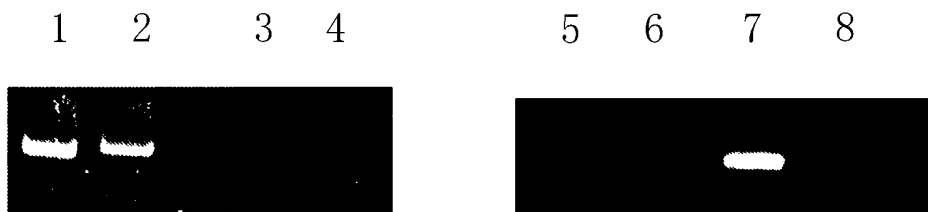
EGF、Progesterone、及びNicotinamideのいずれか1種以上を時間的に制御された順序かつ制御された量で、該容器へ添加する機構と、制御された時間に培地を交換する機構と、滅菌された空気を循環させる機構と、該容器の温度を制御する機構と、該細胞の培養状態をモニターする機構と、該細胞を該容器へ充填および容器から排出する機構とを備えた、膵臓β細胞の再生装置。

- [10] 体性幹細胞、ES細胞または脱分化させた成熟細胞を増殖させ、Transferrin、Insulin、sodium selenite、血清アルブミン、Ascorbic acid、dexamethasone、EGF、Progesterone、及びNicotinamideのいずれか1種以上を加えた培地で培養することにより膵臓β細胞を再生し、再生した膵臓β細胞を糖尿病患者に移植することを含む、糖尿病の治療方法。

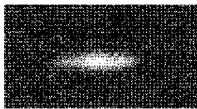
[図1]



[図2]

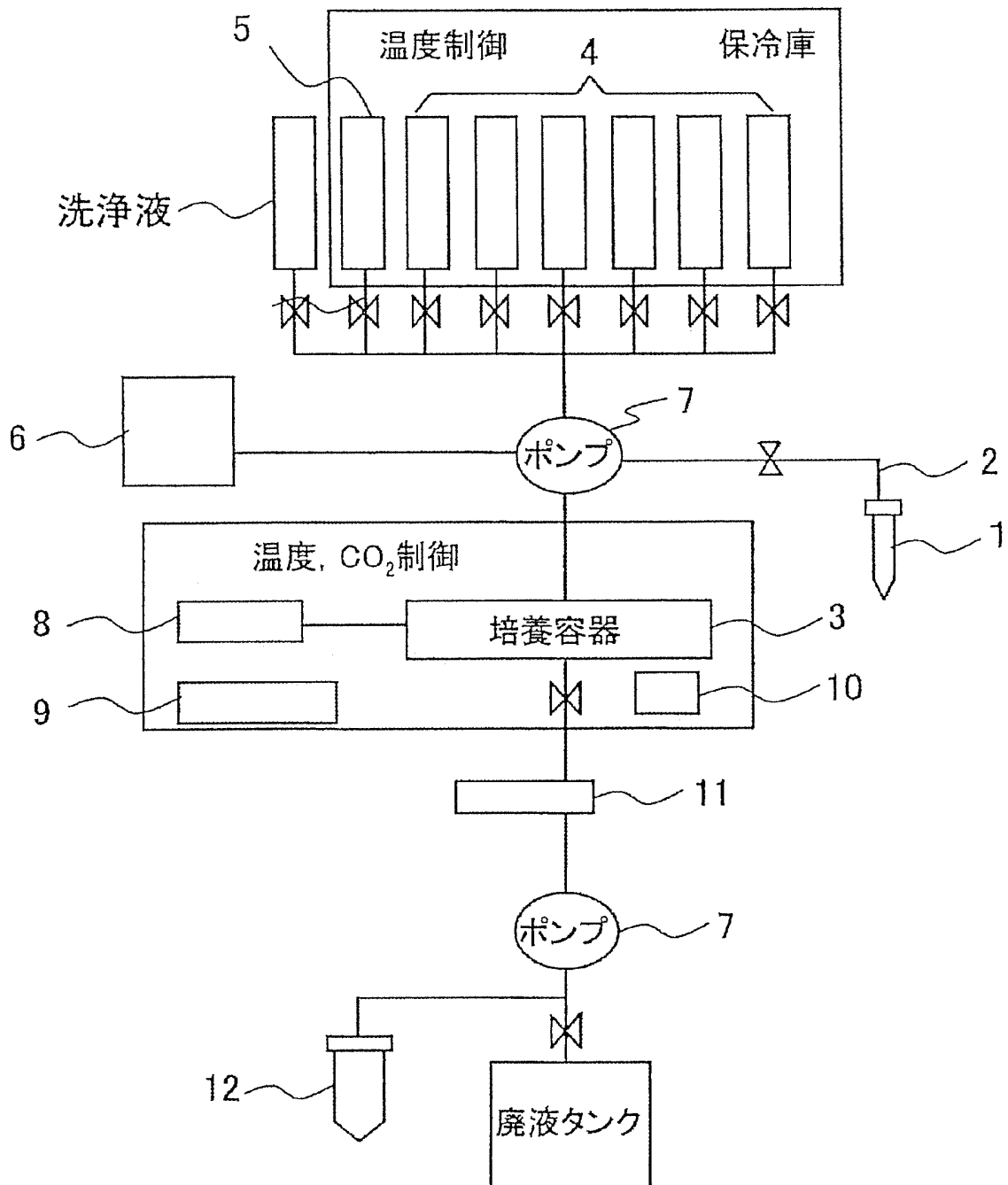


[図3]





[図4]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/303948

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <b>C12N5/10</b> (2006.01), <b>A61K35/14</b> (2006.01), <b>A61K35/28</b> (2006.01), <b>A61K35/39</b> (2006.01), <b>A61K35/44</b> (2006.01), <b>A61K35/48</b> (2006.01), <b>A61K35/50</b> (2006.01), <b>A61K35/55</b> (2006.01), <b>A61L27/00</b> (2006.01), <b>A61P1/18</b> (2006.01), According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N5/00-5/10, A61K35/14, A61K35/28, A61K35/39, A61K35/44, A61K35/48, A61K35/50, A61K35/55, A61L27/00, A61P1/18, A61P3/08, A61P3/10, A61P5/48, A61P5/50, A61P43/00, C12M3/00, C12N15/00-15/90		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), Medline (STN), IGAKU·YAKUGAKU YOKOSHU ZENBUN DATABASES (JDreamII), JSTPlus (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/A	TANG D-Q et al., In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow., Diabetes, 2004, Vol.53, pages 1721 to 1732	1, 4, 5/2, 3, 5, 6/7
X/Y/A	Masanori TANAKA et al., "Kotsuzui Kanshitsu Saibo kara no Insulin Yosei Saibo Bunka", The Journal of the Japan Diabetic Society, 05 April, 2003 (05.04.03), Vol.46, Suppl. 1, p.S-173 (I-K2-1)	1, 4/2, 3, 5, 6/7
Y/A	GOTO S. et al., In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells., Exp. Cell Res., 2003, Vol.288, pages 51 to 59	2, 3/7
<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 11 May, 2006 (11.05.06)		Date of mailing of the international search report 23 May, 2006 (23.05.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/303948

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	MIYAZAKI S. et al., Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells., Diabetes, 2004, Vol.53, pages 1030 to 1037	5, 6/7
A	OH S-H et al., Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes., Lab.Invest., 2004, Vol.84, pages 607 to 617	1-7

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2006/303948

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
(International Patent Classification (IPC))

**A61P3/08**(2006.01), **A61P3/10**(2006.01), **A61P5/48**(2006.01), **A61P5/50**  
(2006.01), **A61P43/00**(2006.01), **C12M3/00**(2006.01), **C12N15/12**(2006.01),  
**C12N15/16**(2006.01), **C12N15/17**(2006.01)

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national  
classification and IPC)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2006/303948

**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.: 10

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention as set forth in claim 10 is deemed to be concerned with methods for treatment of the human body. The invention as set forth in this claim is relevant to "methods for treatment of the human body by surgery or therapy" and thus relates to a subject matter (continued to extra sheet)

2.  Claims Nos.:

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:

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:

The inventions described in claims 1-7 (invention group 1) relate to "a method for regenerating pancreatic  $\beta$ -cells by culturing a stem cell collected from the stroma". The inventions described in claims 8-10 (invention group 2) relate to "a method for regenerating pancreatic  $\beta$ -cells by culturing a somatic stem cell, an ES cell or a dedifferentiated mature cell". The invention group 1 and the invention group 2 are common in the object of "providing a method for regenerating pancreatic  $\beta$ -cells by culture using an undifferentiated cell as a material", however, the object had been achieved before the priority date of this application as described in, for example, document 1. Accordingly, being common only (continued to 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.: 1 - 7

**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/JP2006/303948

Continuation of Box No. II-1 of continuation of first sheet (2)

which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2) (a) (i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

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

in a method for regenerating pancreatic  $\beta$ -cells by culture using an undifferentiated cell as a material and providing a method for regenerating pancreatic  $\beta$ -cells in which the origins of cells to be used as a material for culture are different are not a special technical feature under PCT Rule 13.2. Thus, the invention group 1 and the invention group 2 are not considered to be a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept, and this application is considered to include two inventions corresponding to the invention group 1 and the invention group 2. Document 1: Tang DQ et al., Diabetes 53 (2004) pp. 1721-1732

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. (特別ページを参照)		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N5/00 - 5/10, A61K35/14, A61K35/28, A61K35/39, A61K35/44, A61K35/48, A61K35/50, A61K35/55, A61L27/00, A61P1/18, A61P3/08, A61P3/10, A61P5/48, A61P5/50, A61P43/00, C12M3/00, C12N15/00 -15/90		
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		
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) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), Medline (STN), 医学・薬学予稿集全文データベース (JDreamII), JSTPlus (JDreamII)		
C. 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/ Y/ A	TANG D-Q et al., In vivo and in vitro characterization of insulin-producing cells obtained from murine bone marrow., Diabetes, 2004, Vol. 53, p. 1721-1732.	1, 4, 5/ 2, 3, 5, 6/ 7
X/ Y/ A	中田正範 他、 骨髄間質細胞からのインスリン陽性細胞分化、 糖尿病, 2003. 04. 05, Vol. 46, Suppl. 1, p. S-173 (I-K2-1)	1, 4/ 2, 3, 5, 6/ 7
<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。		
* 引用文献のカテゴリー 「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 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 11. 05. 2006	国際調査報告の発送日 23. 05. 2006	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 中村 正展 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 3537

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
Y/ A	GOTO S et al., In vivo cardiovascularogenesis by direct injection of isolated adult mesenchymal stem cells., Exp. Cell Res., 2003, Vol. 288, p. 51-59.	2, 3/ 7
Y/ A	MIYAZAKI S et al., Regulated expression of pdx-1 promotes in vitro differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells., Diabetes, 2004, Vol. 53, p. 1030-1037.	5, 6/ 7
A	OH S-H et al., Adult bone marrow-derived cells trans-differentiating into insulin-producing cells for the treatment of type I diabetes., Lab. Invest., 2004, Vol. 84, p. 607-617.	1-7



## 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 10 は、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。つまり、請求の範囲10に記載された発明は、ヒトの治療方法を含むものと認められる。そうすると、該請求の範囲に記載された発明は「手術又は治療による人体の処置方法」に該当するから、PCT第14条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が調査することを要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ 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、
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きの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1-7に記載された発明(「発明群1」)は、いずれも「間質から採取した幹細胞を培養することにより膵臓β細胞を再生する方法」に係るものである。請求の範囲8-10に記載された発明(「発明群2」)は、いずれも「体性幹細胞、ES細胞または脱分化させた成熟細胞を培養することにより膵臓β細胞を再生する方法」に係るものである。発明群1と発明群2とは、「未分化な細胞を材料とした培養により膵臓β細胞を再生する方法を提供する」という課題においてのみ共通するが、該課題は例えば文献1に記載されているように、本願優先日前に解決されていた。してみれば、未分化な細胞を材料とした培養により膵臓β細胞を再生する方法という点でのみ共通し、培養の材料とする細胞の由来が異なる膵臓β細胞再生方法を提供することは、PCT規則13.2における特別な技術的特徴であるとは言えない。よって、発明群1と発明群2とは単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは言えず、本出願は発明群1及び発明群2に対応する2個の発明を含むものと認められる。文献1:Tang DQ et al., Diabetes 53 (2004) p. 1721-1732.

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ので、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ので、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。

請求の範囲 1-7

## 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。

発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. Cl.

*C12N5/10*(2006.01), *A61K35/14*(2006.01), *A61K35/28*(2006.01), *A61K35/39*(2006.01), *A61K35/44*(2006.01),  
*A61K35/48*(2006.01), *A61K35/50*(2006.01), *A61K35/55*(2006.01), *A61L27/00*(2006.01), *A61P1/18*(2006.01),  
*A61P3/08*(2006.01), *A61P3/10*(2006.01), *A61P5/48*(2006.01), *A61P5/50*(2006.01), *A61P43/00*(2006.01),  
*C12M3/00*(2006.01), C12N15/12(2006.01), C12N15/16(2006.01), C12N15/17(2006.01)