



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112823012 A

(43) 申请公布日 2021.05.18

(21) 申请号 201980059571.3

(22) 申请日 2019.09.12

(30) 优先权数据

62/730,061 2018.09.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/050846 2019.09.12

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2020/056158 EN 2020.03.19

(71) 申请人 儿童医院医学中心

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 武部贵则 J·M·威尔斯

K·路易斯 J·O·穆尼拉

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 刘盈盈

(51) Int.Cl.

A61K 35/28 (2015.01)

A61P 7/06 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/0789 (2010.01)

C12N 5/071 (2010.01)

权利要求书3页 说明书23页 附图17页

(54) 发明名称

用于产生造血干细胞及其衍生物的类器官组合物

(57) 摘要

本公开涉及衍生自前体细胞的组合物,以及使用此类组合物制造造血干细胞(HSC)或衍生的免疫细胞的方法。更具体地,公开了用于从类器官组织或包含类器官的培养物获得造血干细胞的方法,其中所述类器官组织或培养物包含通过定向分化从前体细胞(例如胚胎干细胞或诱导的多能干细胞)衍生的肝或结肠组织。



1. 一种制备造血干细胞 (HSC) 或其衍生细胞的方法, 其包含
 - a. 将衍生自前体细胞的定形内胚层与wnt信号传导通路活化剂和FGF信号传导通路活化剂接触, 直至前肠细胞形成;
 - b. 在不存在视黄酸的情况下培养所述前肠细胞以形成产生造血细胞的肝脏类器官。
2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述前体细胞选自胚胎干细胞和诱导的多能干细胞 (iPSC) 中的一种或两种。
3. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述wnt信号传导通路活化剂选自Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、Wnt16、wnt信号传导通路的小分子活化剂 (例如氯化锂; 2-氨基-4, 6-二取代嘧啶 (杂) 芳基嘧啶; IQ1; QS11; NSC668036; DCA β -连环蛋白; 2-氨基-4-[3, 4-(亚甲二氧基)-苄基-氨基]-6-(3-甲氧基苯基) 嘧啶), WAY-316606; SB-216763; 或BIO(6-溴靛玉红-3'-脞), Wnt信号传导通路的siRNA和/或shRNA活化剂, GSK3抑制剂 (例如Chiron/CHIR9902) 及其组合。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述FGF信号传导通路活化剂选自小分子或蛋白质FGF信号传导通路活化剂, FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF15、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、FGF信号传导通路的siRNA和/或shRNA活化剂, 及其组合。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述前肠细胞在形成所述肝脏类器官之前形成球状体。
6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述前肠细胞在形成所述肝脏类器官之前形成球状体, 并且其中所述方法还包含破碎所述球状体以形成多个细胞。
7. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述破碎通过化学破坏和机械破坏中的一种或两种进行。
8. 根据权利要求6或7所述的方法, 其中所述破碎包含用酶处理, 优选地其中所述酶是具有蛋白水解酶活性和胶原水解酶活性中的一种或两种的酶, 优选地一种或多种选自accutase、胰蛋白酶、胶原酶、透明质酸酶、脱氧核糖核酸酶、木瓜蛋白酶、trypzean (Sigma制造) 或其组合的酶。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述前肠在选自转铁蛋白、干细胞因子 (SCF)、白细胞介素3 (IL-3)、白细胞介素6 (IL-6)、红细胞生成素 (EPO)、粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 及其组合的细胞因子存在的条件下培养, 优选地其中所述前肠在所述培养之前解离成单细胞, 其中用细胞因子进行所述培养, 持续约1天, 或约2天, 或约3天, 或约4天, 或约5天, 或约6天, 或约7天, 或约8天, 或约9天, 或约10天, 或约11天, 或约12天, 或约13天, 或约14天, 或约15天, 或约16天, 或约17天, 或约18天, 或约19天, 或约20天, 或约21天, 或约三周, 或约四周, 或约五周, 或约六周, 或约七周, 或约八周, 或约九周, 或约10周, 或约11周, 或约12周, 或大于12周。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其进一步包含使所述人类肝脏类器官与血小板生成素 (TPO) 和干细胞因子 (SCF) 中的一种或两种接触, 其中所述与血小板生成素 (TPO) 和干细胞因子 (SCF) 中的一种或两种接触持续约1天, 或约2天, 或约3天, 或约4天, 或约5天, 或约6天, 或约7天, 或约8天, 或约9天, 或约10天, 或约11天, 或约12天, 或约13天, 或

约14天,或约15天,或约16天,或约17天,或约18天,或约19天,或约20天,或约21天,或约三周,或约四周,或约五周,或约六周,或约七周,或约八周,或约九周,或约10周,或约11周,或约12周,或大于12周。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述人类肝脏类器官处于胎儿状态。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中与用视黄酸处理的人类肝脏类器官相比,所述人类肝脏类器官产生减少的白蛋白。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述人类肝脏类器官产生甲胎蛋白(AFP)。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中与用视黄酸处理的人类肝脏类器官相比,所述人类肝脏类器官具有增加的内皮标记物CD34和KDR。

15. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中与用视黄酸处理的人类肝脏类器官相比,所述人类肝脏类器官具有增加的红细胞生成素(EPO)和血红蛋白 γ (HBG)。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述前肠细胞悬浮在基底膜基质(Matrigel)中。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述前肠细胞在来自骨髓的基质细胞系上培养。

18. 根据权利要求1所述的方法,其中所述衍生细胞选自骨髓细胞(如单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、红细胞和生成血小板的巨核细胞),淋巴样细胞(如T细胞、B细胞和天然杀伤细胞)及其组合。

19. 一种方法,其包含

培养结肠类器官以形成类器官培养物;

从所述结肠类器官培养物中收获一种或多种免疫细胞。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述结肠类器官培养约1天,或约2天,或约3天,或约4天,或约5天,或约6天,或约7天,或约8天,或约9天,或约10天,或约11天,或约12天,或约13天,或约14天,或约15天,或约16天,或约17天,或约18天,或约19天,或约20天,或约21天,或约三周,或约四周,或约五周,或约六周,或约七周,或约八周,或约九周,或约10周,或约11周,或约12周,或大于12周,或直到所述结肠类器官包含产生造血祖细胞/干细胞的生血内皮和内皮管中的一种或多种。

21. 根据权利要求19或20所述的方法,其进一步包含从所述结肠类器官培养物中分离间充质并培养所述间充质,优选地其中所述间充质培养步骤持续约四天至三个月,或约五天至两个月,或约6天至约一个月,或约七日至约21天的时段,更优选地其中所述间充质培养物是悬浮培养物。

22. 根据权利要求19至21中任一项所述的方法,其中所述结肠类器官包含间充质,并且其中所述培养步骤持续约四天至三个月,或约五天至两个月,或约6天至约一个月,或约七日至约14天的时段,任选地,其中所述培养步骤以悬浮培养形式持续约一周至四周,或约一周的时间段以允许间充质扩展。

23. 根据权利要求19至22所述的方法,其中所述免疫细胞选自红系、髓系和混合髓系集落。

24. 根据权利要求19至23所述的方法,其中所述免疫细胞选自巨噬细胞、嗜中性粒细

胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、红细胞、白细胞和单核细胞中的一种或多种。

25. 根据权利要求19至24所述的方法,其中所述结肠类器官衍生自定形内胚层,所述定形内胚层衍生自前体细胞,优选地胚胎干细胞或诱导的多能干细胞。

26. 根据权利要求19至25中任一项所述的方法,其进一步包含用T细胞诱导生长因子来进行培养。

27. 根据权利要求19至26中任一项所述的方法,其进一步包含破坏所述培养物以分散所述结肠类器官,并破坏所述培养物中的间充质,随后在基底膜基质中培养约一周至约四周,或约两周至约三周的时间段。

28. 一种建模疾病状态的方法,所述疾病状态选自坏死性小肠结肠炎、非常早发性IBD30、来自细菌病原体(例如艰难梭菌)的感染、来自病毒病原体(例如HIV,其易于感染胎儿肠巨噬细胞)的感染,所述方法包含在根据权利要求19至27中任一项所述的方法制备的结肠类器官中引发所述疾病状态。

29. 一种用于建模先天免疫机制的方法,其包含根据权利要求19至27中任一项所述的方法制备的结肠类器官。

30. 一种人类肝脏类器官(HLO),其特征在于所述HLO包含胎儿肝脏组织,其中所述HLO产生造血细胞。

31. 一种人类结肠类器官(HCO),其包含生血内皮。

32. 根据权利要求30或31所述的HCO,其中所述生血内皮产生免疫细胞,优选地红细胞-骨髓祖细胞,淋巴祖细胞和巨噬细胞中的一种或多种。

33. 根据权利要求31或32所述的HCO,其中所述生血内皮产生分泌促炎细胞因子的巨噬细胞。

34. 根据权利要求32所述的HCO,其中所述免疫细胞具有骨髓潜能。

35. 根据权利要求30所述的HCO,其中所述HCO包含具有T细胞潜能的生血祖细胞。

36. 根据权利要求30所述的HCO,其中所述HCO包含造血祖细胞,其中所述祖细胞是CD34+,其中所述CD34祖细胞在类器官间充质中,其中所述造血祖细胞有能力形成T细胞。

37. 根据权利要求30至36中任一项所述的方法,其中所述HCO包含内皮管,其中所述ET对CD34+呈阳性,并且其中所述ET包含RUNX1+细胞。

38. 一种制备能够产生造血干细胞(HSC)的HCO/HIO的方法,其包含将衍生自前体细胞的定形内胚层与一种或多种因子接触足够长的时间段以产生中/后肠球状体,并任选地将所述中/后肠球状体包埋在基底膜基质中,以及将所述DE与包含FGF、CHIR、头蛋白和SMAD抑制剂的因子组合接触,因子量和接触持续时间段足以产生前部前肠球状体;

其中所述中/后肠球状体或前部前肠球状体产生HSC。

39. 一种治疗需要免疫细胞的个体的方法,其包含

a. 根据前述权利要求中任一项,从HCO或HLO收获造血干细胞(HSC)或衍生细胞;以及

b. 将所述HSC或其衍生细胞施用于有需要的个体,其中所述施用包含将所述HSC移植到所述个体的骨髓中。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中所述治疗是对贫血(包括再生障碍性贫血、范可尼贫血),免疫缺陷,癌症(如淋巴瘤、白血病、癌、实体瘤),造血功能的遗传性疾病,遗传性贮积病,重型地中海贫血,镰状细胞疾病,骨质疏松症或其组合的治疗。

用于产生造血干细胞及其衍生物的类器官组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年9月12日提交的序列号为62/730,061的美国临时申请的优先权和权益,该申请的全部内容以引用的方式并入本文中。

背景技术

[0003] 目前,在需要重建造血系统的个体中,骨髓移植是治疗的主要手段。捐献的骨髓中的干细胞和祖细胞能够增殖并取代负责保护性免疫、组织修复、凝血和血液的其它功能的血细胞。在成功的骨髓移植中,血液、骨髓、脾脏、胸腺和其它免疫器官能够用来自供体的细胞重新增殖。骨髓已经越来越成功地用于治疗各种疾病,包括某些类型的贫血症,如再生障碍性贫血、范可尼贫血、免疫缺陷、癌症,如淋巴瘤或白血病,癌,各种实体瘤和造血功能的遗传性疾病。骨髓移植也已用于治疗遗传性贮积病、重型地中海贫血、镰状细胞疾病和骨质疏松症。

[0004] 虽然造血干细胞(HSC)具有分化成所有类型血细胞的能力并且能够被移植以治疗血液紊乱,但是由于供体的缺乏,难以大量获得HSC。此外,由于完全匹配的(遗传上相同的)供体很少,所以使用骨髓移植为有需要的个体提供免疫细胞受到严重限制。

[0005] 因此,本领域仍然需要适于移植的HSC组合物以及能够提供HSC的方法。此外,开发这样的组合物将会有助于研究目的,因为目前的HSC数量不足。本公开试图解决本领域的一个或多个上述需要。

发明内容

[0006] 本公开涉及衍生自前体细胞的组合物,以及使用此类组合物制造造血干细胞(HSC)或衍生的免疫细胞的方法。更具体地,公开了用于从类器官组织或包含类器官的培养物获得造血干细胞的方法,其中所述类器官组织或培养物包含通过定向分化从前体细胞(例如胚胎干细胞或诱导的多能干细胞)衍生的肝或结肠组织。

附图说明

[0007] 本领域技术人员将理解,下面描述的附图仅用于说明目的。附图不打算以任何方式限制本发明的范围。

[0008] 图1.培养第21天人类肝脏类器官(HLO)基因表达的特征A.与以前分化成熟肝脏类器官的方法(Ouchi等人,2019)相比,白蛋白表达适度降低,而甲胎蛋白(AFP)表达增加。B.内皮标记物CD34和KDR(VEGFR2)增加。C.红细胞生成素(EPO)和血红蛋白 γ (HBG)都增加。

[0009] 图2.从HLO培养物分化骨髓系A.在第8-20天,将HLO培养物解离成单细胞悬浮液,并涂在含有细胞因子的甲基纤维素上以促进骨髓分化,7-14天后分析集落。B.代表性Giemsa染色,显示产生了多种细胞类型。C.CFC集落定量比较来自HLO培养物的细胞与脐带血(UCB)CD34⁺细胞和未分化的iPSC(N.D.=不可检测)。

[0010] 图3.从HLO培养物分化B细胞。A.在第8-20天,将HLO培养物解离成单细胞悬浮液,

并与汇合的MS-5细胞共培养。B. 与MS-5共培养后,UCBCD34⁺细胞和HLO的流式细胞仪。细胞首先在CD45上选门,随后门控到CD19和CD11b,以分别分离B细胞和骨髓细胞。

[0011] 图4.生血内皮在人结肠类器官培养物中共同发育。(A) 背主动脉中e10.5小鼠胚胎细胞核RUNX1染色的全样RUNX1 (红色)、内皮粘蛋白(绿色)和CDX2(白色)染色(n=3)。(B,C)来自(A)的光学切片。(d)在22日龄的HCO中进行的全样RUNX1(红色)、CD34(绿色)和CDH1(白色)染色,显示了在CD34⁺内皮管中的核RUNX1染色(n=3)。(E,F)来自(D)的光学切片。DA=背主动脉。(G)来自21日龄的HIO和HCO的RNAseq数据的TPM(每百万转录物)值的图(对于每一组,n=3)。(H)用CD45和CD73染色的门控CD34⁺细胞的流式细胞仪图。CD34⁺/CD45⁻/CD73⁻细胞被置于框中,并且是黑色。CD34⁺/CD45⁺/CD73⁻细胞被置于框中,并且是绿色。

[0012] 图5.红细胞-骨髓和淋巴祖细胞在HCO培养物中生成。(A)来自HCO培养物的细胞离心涂片细胞的显微照片。(B)在MethocultTM培养基中形成集落的实例。来自源自(C)H1人类胚胎干细胞的HCO和(D)IPSC 263-10的细胞在MethocultTM中集落形成的定量。(E)用和不用T细胞分化诱导细胞因子处理的,用CD3和CD4染色的CD45⁺细胞的流式细胞仪图。

[0013] 图6.HCO包含共同发育的巨噬细胞。(A)用DAPI复染的CD163(红色)和CDH1(绿色)的人类结肠活组织检查的免疫荧光染色。(A') (A)中方框区域的插图。用DAPI复染的已染色CD163(红色)和CDH1(绿色)的(B)HIO和(C)HCO的全样。(D)SPI1(PU.1)和(E)CD163的TPM(每百万的转录物)值的图,来自35日龄的HIO和HCO的RNAseq数据(对于每一组,n=3)。用DAPI复染的已染色hCD163(红色)和F4/80(绿色)的(F)小鼠结肠,(G)人类结肠活组织检查和移植的HCO的免疫荧光染色。

[0014] 图7.HCO具有能够分泌促炎细胞因子的炎性巨噬细胞。(A)从35日龄的HIO和HCO的RNAseq数据生成炎症相关基因的热图。(B)用DAPI复染的CD163(绿色)、iNOS(红色)和CDH1(白色)的35日龄的HCO的免疫荧光染色。(B')B中方框区域的插图,DAPI除外。(C-D)IL-6、IL-8、MIP1A(CCL3)和MIP1B(CCL4)的Luminex(路明克斯)阵列数据。每个点代表来自个体分化的Luminex值。成对的HIO和HCO样品(来自相同的分化)用线表示。

[0015] 图8.HCO巨噬细胞是功能性的。(A)用LPS处理的HCO的活体成像时程显微照片(B-E)HCO或用LPS处理的HCO的IL-6、IL-8、MIP1A(CCL3)和MIP1B(CCL4)的Luminex阵列数据。(F)-/+pHRODO大肠杆菌颗粒(绿色)和CD14(红色)的35日龄的HCO的免疫荧光染色。(G)吞噬颗粒(绿色)的定量(n=每组3孔类器官)。

[0016] 图9.HCOMacs响应细菌而转移到类器官腔中。在注射(A)PBS,(B)共生体大肠杆菌和(C)EHEC后24小时,用DAPI复染的CDH1(绿色)和MUC2(红色)的35日龄的HCO的免疫荧光染色。在注射(D)PBS,(E)共生体大肠杆菌和(F)EHEC后24小时,用DAPI复染的CDH1(绿色)、HAM56(红色)和大肠杆菌的35日龄的HCO的免疫荧光染色。(G)MUC2荧光强度的定量(每组n=3)。(H)大肠杆菌荧光强度的定量(每组n=3)。(I)HAM56巨噬细胞分布的定量(每组n=3类器官)。

[0017] 图10.实验工作流程。

[0018] 图11.BMP信号传导指定生血内皮。

[0019] 图12.内皮细胞和造血细胞在HCO培养物中共同发育。

[0020] 图13.HCO培养物衍生的红细胞中血红蛋白的表达。

[0021] 图14.HCO中存在的免疫细胞的细胞荧光分析。

- [0022] 图15.Wells图S6。在移植到小鼠肾荚膜后,巨噬细胞在HCO中持续存在。
- [0023] 图16.Wells图S7。基因本体分析揭示了HCO中的平行细胞分化、巨噬细胞成熟和炎症。
- [0024] 图17.HCO内的巨噬细胞能够响应于大肠杆菌颗粒,延伸丝状伪足。
- [0025] 图18。胎盘、肝、肺和结肠的成像。

具体实施方式

[0026] 定义

[0027] 除非另有说明,术语应根据相关领域普通技术人员的常规用法来理解。如果发生冲突,以本文件(包括定义)为准。优选的方法和材料描述如下,尽管类似于或等同于本文所述的方法和材料可用于本发明的实践或测试中。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献均以引用的方式并入本文中。本文公开的材料、方法和实例仅是说明性的,而不是限制性的。

[0028] 如本文和所附权利要求书中所用,单数形式“一”、“一个”和“所述”包括复数指示物,除非上下文另外清楚地指示。因此,例如,提及“一种方法”包括多种此类方法,提及“一种剂量”包括提及一种或多种剂量及其本领域技术人员已知的等效的表达等。

[0029] 术语“约”或“大约”是指在由本领域普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内,该误差范围将部分取决于如何测量或确定该值,例如测量系统的局限性。例如,根据本领域的实践,“约”可以是指1或大于1个标准偏差内。或者,“约”可以指围绕给定值的高达20%,或高达10%,或高达5%,或高达1%的范围。或者,特别是对于生物系统或过程,该术语可以指一个值的某一数量级内,优选地5倍内,更优选地2倍内。在本申请和权利要求书中描述了特定值的情况下,除非另有说明,否则应当假定术语“约”在特定值的可接受误差范围内。

[0030] 如本文所用,术语“全能干细胞”(也称为“万能干细胞”)是能够分化成胚胎细胞和胚胎外细胞类型的干细胞。此类细胞能够构建完整的,有活力的生物体。这些细胞由卵和精子细胞融合产生。由受精卵的最初几次分裂产生的细胞也是全能的。

[0031] 如本文所用,术语“多能干细胞(PSC)”,通常也称为PS细胞,包括能够分化成几乎所有细胞的任何细胞,即衍生自三个胚层(生殖上皮)中的任一个[包括内胚层(胃内衬、胃肠道、肺),中胚层(肌肉、骨、血液、泌尿生殖)和外胚层(表皮组织和神经系统)]的细胞。PSC可以是全能细胞的后代,衍生自胚胎干细胞(包括胚胎生殖细胞)或通过诱导非多能细胞(如成熟体细胞),通过强制表达某些基因而获得。

[0032] 如本文所用,术语“诱导的多能干细胞(iPSC)”,通常也缩写为iPS细胞,是指通过诱导某些基因的“强制”表达而人工衍生自通常的非多能细胞(如成熟体细胞)的一类多能干细胞。

[0033] 如本文所用,术语“胚胎干细胞(ESC)”,通常也缩写为ES细胞,是指多能的细胞,其衍生自胚泡(即早期胚胎)的内细胞团。为了本发明的目的,术语“ESC”有时被广泛用来涵盖胚胎生殖细胞。

[0034] 如本文所用,术语“前体细胞”涵盖可用于本文所述方法的任何细胞,通过这些方法,一个或多个前体细胞获得更新自身或分化成一种或多种特定细胞类型的能力。在一些

方面,前体细胞是多能的或具有变成多能的能力。在一些方面,对前体细胞进行外部因子(例如生长因子)的处理以获得多能性。在一些方面,前体细胞可以是全能(或万能)干细胞;多能干细胞(诱导的或非诱导的);多潜能干细胞;寡能干细胞和单能干细胞。在一些方面,前体细胞可以来自胚胎、婴儿、儿童或成人。在一些方面,前体细胞可以是经过处理的体细胞,以便通过遗传操作或蛋白质/肽处理赋予其多能性。

[0035] 如本文所用,术语“细胞成分”是单个基因、蛋白质、表达mRNA的基因,和/或任何其它可变细胞组分或蛋白质活动,如蛋白质修饰(例如磷酸化)的程度,例如,所述程度通常由本领域技术人员在生物学实验中测量(例如通过微阵列或免疫组织化学)。与作为生命系统,常见人类疾病基础的生化过程的复杂网络以及基因发现和结构确定有关的重大发现在现在可以归结为作为研究过程一部分的细胞成分丰度数据的应用。细胞成分丰度数据可以帮助识别生物标记物,区分疾病亚型和识别毒性机制。

[0036] FGF信号传导通路活化剂:成纤维细胞生长因子(FGF)是参与血管生成、伤口愈合和胚胎发育的生长因子家族。在一些方面,本领域技术人员可以理解,任何FGF都可以与来自Wnt信号传导通路的蛋白质联合使用。示范性FGF信号传导通路活化剂可以包括小分子或蛋白质FGF信号传导通路活化剂,FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF15、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23,及其组合。可以使用与FGF信号传导通路相关联的siRNA和/或shRNA靶向细胞成分来激活这些通路。本领域普通技术人员将容易地理解适当的量和持续时间。

[0037] WNT信号传导通路活化剂:Wnt信号传导通路的调节剂/活化剂可以包括Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11和Wnt16。在一些方面,对通路的调节可以通过使用激活上述通路的小分子调节剂或蛋白质调节剂或激活上述通路的蛋白质。例如,Wnt通路的小分子调节剂包括但不限于氯化锂;2-氨基-4,6-二取代嘧啶(杂)芳基嘧啶;IQ1;QS11;NSC668036;DCA β -连环蛋白;2-氨基-4-[3,4-(亚甲二氧基)-苄基-氨基]-6-(3-甲氧基苯基)嘧啶。在一些方面,非固有分子可以包括小分子,如WAY-316606;SB-216763;或BIO(6-溴靛玉红-3'-脞)。在一些方面,可以使用与Wnt和/或FGF信号传导通路相关联的siRNA和/或shRNA靶向细胞成分来激活这些通路。本领域技术人员应理解靶细胞成分包括但不限于SFRP蛋白;GSK3、Dkk1和FrzB。其它调节剂包括抑制激活Wnt信号传导通路的GSK3的分子或蛋白质。示范性GSK3抑制剂可包括例如Chiron/CHIR99021,其抑制GSK3 β 。本领域普通技术人员将认识到适用于实施所公开的方法的GSK3抑制剂。WNT信号传导通路活化剂可以以足以实施公开的方法的量施用。本领域普通技术人员容易理解合适的量和持续时间。

[0038] BMP活化剂:示范性BMP信号传导通路活化剂可以选自BMP2、BMP4、BMP7、BMP9,激活BMP通路的小分子,激活BMP通路的蛋白质,并且可以包括下列物质:头蛋白、Dorsomorphin、LDN189、DMH-1、ventromorphins及其组合。

[0039] 类器官技术是一种发展中的领域。简而言之,类器官是“器官样组织”,或具有类似于相应天然器官的结构组织的三维组织。类器官可以衍生自诸如胚胎干细胞或诱导的多能干细胞之类的前体细胞。类器官通常使用生长因子操作的时间序列在体外培养,所述操作模拟感兴趣器官组织的胚胎发育-通常称为前体细胞的定向分化的过程。通常,类器官可以含有分化的细胞类型,其在许多情况下是功能性的,例如,能够分泌酸的胃壁细胞。也就是

说,目前,文献中描述的一类器官在范围上与天然存在的器官组织不同。例如,类器官可能缺乏脉管系统或类器官可能打算模拟的天然器官的一个或多个其它特征。迄今为止,还没有认识到类器官具有发育的造血系统或产生大量的免疫细胞。本公开试图解决本领域的一个或多个此类需要。

[0040] 如本文所述,方法和系统使用生长因子操作的时间序列,以在培养物中模拟组织的胚胎发育,进行修饰以允许免疫系统细胞的发育,本文描述了其变化。

[0041] 造血干细胞和祖细胞

[0042] 血细胞的产生源于单一类型的细胞,即造血干细胞,其通过增殖和分化,产生整个造血系统。人们认为,造血干细胞能够自我更新,扩增它们自己的干细胞群,并且它们是多能的(能够分化成造血系统中的任何细胞)。从这种罕见的细胞群体中,形成了完整的成熟造血系统,包含淋巴细胞(免疫系统的B和T细胞)和骨髓细胞(红细胞、巨核细胞、粒细胞和巨噬细胞)。包含B细胞和T细胞的淋巴系有助于抗体的产生,细胞免疫系统的调节,血液中外来物质的检测,宿主外来细胞的检测等。骨髓系包括单核细胞、粒细胞、巨核细胞以及其它细胞,监测异物的存在,提供对抗肿瘤细胞的保护,清除异物,产生血小板等。红细胞系提供作为氧载体的红细胞。

[0043] 如上所述,目前替代HSC的疗法涉及骨髓移植。因为患者的“配型”困难,所以本领域需要满足这种需要的组合物和方法。为此,本文公开了产生造血细胞的类器官组合物和制备产生造血细胞的类器官的方法。

[0044] 所公开的组合物和方法可用于产生造血细胞,其可用于治疗其中施用造血细胞是有利的任何疾病状态。因此,方法可进一步包含从公开的类器官组合物中分离或收集造血细胞。可以使用公开的类器官衍生的造血细胞来治疗的疾病状态可以包括例如遗传疾病,例如 β -地中海贫血、镰状细胞性贫血、腺苷脱氨酶缺乏症、重组酶缺乏症、重组酶调节基因缺乏症,方法是通过例如使用CRISPR技术,将野生型基因导入干细胞中。在某些方面,本文公开的类器官和/或造血细胞可用于重建受辐射的宿主或接受化疗的宿主。

[0045] 组合物

[0046] 本文还公开了造血干细胞组合物,例如高度浓缩的造血干细胞组合物,其基本上不含分化的或专门的造血细胞。“基本上不含”指群体中存在少于10%,或少于5%或少于1%的细胞。衍生自类器官组合物的造血细胞可以是基本上同质的活的哺乳动物或人类造血细胞组合物,并且可以出于多种目的而产生,例如骨髓移植,其中细胞可以不含肿瘤细胞或其它致病细胞,例如感染了HIV的细胞,其中希望避免移植抗宿主病的移植。“基本上同质”是指组合物中的大多数细胞是相同的细胞类型,例如至少70%,或至少75%,或至少80%,或至少85%,或至少90%,或在某些情况下,大于95%的所需细胞类型,其中所述细胞类型可以是造血干细胞。在某些方面,可以通过适当的同系或非同系重组来修饰造血细胞,以纠正遗传缺陷或提供干细胞中天然缺乏的遗传能力,无论是对个体还是对一般的干细胞。此类遗传修饰的细胞(即,使用本领域熟知的CRISPR方法)可以进一步施用于有需要的个体。

[0047] 产生免疫细胞的HCO培养物

[0048] 在第一个方面,公开了一种制备造血干细胞(HSC)或其衍生细胞的方法。所述方法可包含将衍生自前体细胞的定形内胚层与wnt信号传导通路活化剂和FGF信号传导通路活

化剂接触,直至前肠细胞形成;以及,在不存在视黄酸的情况下培养前肠细胞以形成产生造血细胞的肝脏类器官。

[0049] 在一个方面,前述任一段的前体细胞可以选自胚胎干细胞和诱导的多能干细胞(iPSC)中的一种或两种。

[0050] 在一个方面,前述任一段的wnt信号传导通路活化剂可以选自Wnt1、Wnt2、Wnt2b、Wnt3、Wnt3a、Wnt4、Wnt5a、Wnt5b、Wnt6、Wnt7a、Wnt7b、Wnt8a、Wnt8b、Wnt9a、Wnt9b、Wnt10a、Wnt10b、Wnt11、Wnt16、wnt信号传导通路的小分子活化剂(例如氯化锂;2-氨基-4,6-二取代嘧啶(杂)芳基嘧啶;IQ1;QS11;NSC668036;DCA β -连环蛋白;2-氨基-4-[3,4-(亚甲二氧基)-苄基-氨基]-6-(3-甲氧基苯基)嘧啶),WAY-316606;SB-216763;或BI0(6-溴靛玉红-3'-胍)),Wnt信号传导通路的siRNA和/或shRNA活化剂,GSK3抑制剂(例如Chiron/CHIR9902)及其组合。

[0051] 在一个方面,前述任一段的FGF信号传导通路活化剂可以选自小分子或蛋白质FGF信号传导通路活化剂,FGF1、FGF2、FGF3、FGF4、FGF10、FGF11、FGF12、FGF13、FGF14、FGF15、FGF16、FGF17、FGF18、FGF19、FGF20、FGF21、FGF22、FGF23、FGF信号传导通路的siRNA和/或shRNA活化剂,及其组合。

[0052] 在一个方面,前述任一段可进一步包含在形成肝脏类器官之前从前肠细胞形成球状体。在其它方面,前肠细胞可以在形成肝脏类器官之前形成球状体,并且所述方法可以进一步包含破碎球状体以形成源自球状体的多个细胞。可以通过化学破坏和/或机械破坏中的一种或两种完成破碎。例如,在一个方面,破碎可包含用酶处理,例如具有蛋白水解酶活性和胶原水解酶活性中的一种或两种的酶,例如一种或多种选自accutase、胰蛋白酶、胶原酶、透明质酸酶、脱氧核糖核酸酶、木瓜蛋白酶、trypzean(Sigma制造)或其组合的酶。

[0053] 在一个方面,前述任一段可以进一步包含在存在细胞因子的情况下培养前肠。细胞因子可以是本领域可接受的任何细胞因子,例如,选自运铁蛋白、干细胞因子(SCF)、白细胞介素3(IL-3)、白细胞介素6(IL-6)、红细胞生成素(EPO)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)及其组合。在某些方面,前肠可在培养前解离成单细胞。用细胞因子培养可以持续一定时间段,例如约1天,或约2天,或约3天,或约4天,或约5天,或约6天,或约7天,或约8天,或约9天,或约10天,或约11天,或约12天,或约13天,或约14天,或约15天,或约16天,或约17天,或约18天,或约19天,或约20天,或约21天,或约三周,或约四周,或约五周,或约六周,或约七周,或约八周,或约九周,或约10周,或约11周,或约12周,或大于12周。

[0054] 在一个方面,前述任一段的方法可以进一步包含使所述肝脏类器官(例如人类肝脏类器官)与血小板生成素(TPO)和干细胞因子(SCF)中的一种或两种接触,其中与血小板生成素(TPO)和干细胞因子(SCF)中的一种或两种接触持续一定时间段,例如选自约1天,或约2天,或约3天,或约4天,或约5天,或约6天,或约7天,或约8天,或约9天,或约10天,或约11天,或约12天,或约13天,或约14天,或约15天,或约16天,或约17天,或约18天,或约19天,或约20天,或约21天,或约三周,或约四周,或约五周,或约六周,或约七周,或约八周,或约九周,或约10周,或约11周,或约12周,或大于12周的时间段。

[0055] 在一个方面,前述任一段的肝脏类器官可以是被理解为处于胎儿状态的肝脏类器官,例如,派生自人类前体细胞的人类肝脏类器官,此类类器官包含胎儿肝脏组织。例如,在

一个方面,与用视黄酸处理的人类肝脏类器官相比,肝脏类器官可以产生减少的白蛋白。在一个方面,肝脏类器官产生甲胎蛋白(AFP)。在一个方面,与用视黄酸处理的肝脏类器官相比,肝脏类器官具有增加的内皮标记物CD34和KDR。在一个方面,与用视黄酸处理的肝脏类器官相比,肝脏类器官具有增加的红细胞生成素(EPO)和血红蛋白 γ (HBG)。

[0056] 在一个方面,所述方法可以包含前述任一步骤,并且进一步,将前肠细胞悬浮在基底膜基质(例如Matrigel™)中。前肠细胞可以进一步在基质细胞系(例如衍生自骨髓的基质细胞系)上培养。

[0057] 根据权利要求1所述的方法,其中所述衍生细胞选自骨髓细胞(如单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、红细胞和生成血小板的巨核细胞),淋巴样细胞(如T细胞、B细胞和天然杀伤细胞)及其组合。

[0058] 产生免疫细胞的HCO和HCO培养物

[0059] 在一个方面,公开了包含生血内皮的人类结肠类器官(HCO)及其制备方法。在一个方面,本文所述的HCO的生血内皮产生免疫细胞,例如红细胞-骨髓祖细胞,淋巴祖细胞和巨噬细胞中的一种或多种。在一个方面,所公开的HCO的生血内皮产生分泌促炎细胞因子的巨噬细胞。所公开的HCO可以包含造血祖细胞,其中所述祖细胞是CD34+,其中CD34祖细胞在类器官间充质中,其中所述造血祖细胞有能力形成T-细胞。在其它方面,所公开的HCO可包含内皮管,其中内皮管(ET)对CD34+是阳性的,并且其中ET包含RUNX1+细胞。

[0060] 结肠类器官可衍生自前体细胞,如人类前体细胞,可用于获得免疫细胞。在这一方面,一种方法包含培养结肠类器官以形成类器官培养物;还公开了从所述结肠类器官培养物中收获一种或多种免疫细胞。

[0061] 在这一方面,结肠类器官可培养约1天,或约2天,或约3天,或约4天,或约5天,或约6天,或约7天,或约8天,或约9天,或约10天,或约11天,或约12天,或约13天,或约14天,或约15天,或约16天,或约17天,或约18天,或约19天,或约20天,或约21天,或约三周,或约四周,或约五周,或约六周,或约七周,或约八周,或约九周,或约10周,或约11周,或约12周,或大于12周,或直至结肠类器官包含产生造血祖细胞/干细胞的生血内皮和内皮管中的一种或多种。

[0062] 在一个方面,所述方法可以包括从所述结肠类器官培养物中分离间充质并培养所述间充质。在一个方面,间充质培养步骤可以持续约四天至三个月,或约五天至两个月,或约6天至约一个月,或约七天至约21天的时段。在另一个方面,间充质培养可以是悬浮培养。

[0063] 在一个方面,所述结肠类器官可包含间充质,并且其中培养步骤可持续一定时间段,例如约四天至三个月,或约五天至两个月,或约6天至约一个月,或约七天至约14天。培养步骤可以以悬浮培养形式持续约一周至四周,或约一周的时间段,以允许间充质的扩增。

[0064] 在一个方面,所公开的方法的免疫细胞可以选自红系,髓系和混合髓系集落。在其它方面,免疫细胞可以是巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、红细胞、白细胞和单核细胞中的一种或多种。

[0065] 在一个方面,结肠类器官可衍生自定形内胚层,所述定形内胚层衍生自本文所述的前体细胞。在一个方面,前体细胞是胚胎干细胞或诱导的多能干细胞。

[0066] 在一个方面,所述方法可进一步包含用T细胞诱导生长因子来培养类器官培养物。在其它方面,所述方法可包含破坏培养物以将结肠类器官分散成单个结肠类器官并破坏培

养物中的间充质。该步骤可通过在基底膜基质(例如,Matrigel)中培养所得到的破坏的类器官和间充质,持续约一周至约四周,或约两周至约三周的时间段。

[0067] 在其它方面,结肠类器官,特别是人类结肠类器官,可用于建模疾病状态。例如,公开了一种建模疾病状态的方法,所述疾病状态选自坏死性小肠结肠炎,非常早发性IBD30,来自细菌病原体(例如艰难梭菌)的感染,来自病毒病原体(例如HIV,其易于感染胎儿肠巨噬细胞)的感染。在这一方面,所述方法可包含在根据本文公开的方法制备的结肠类器官(例如人类结肠类器官)中引发疾病状态。

[0068] 在一个方面,公开了一种制备能够产生造血干细胞(HSC)的HCO或HI0的方法,其中所述方法可包含将衍生自前体细胞的定形内胚层与一种或多种因子接触足够长的时间段以产生中/后肠球状体,任选地将所述中/后肠球状体包埋在基底膜基质中,并将所述DE与包含FGF、CHIR、头蛋白,以及SMAD抑制剂的因子组合接触,量和持续时间足以产生前部前肠前球体;其中所述中/后肠球状体或前部前肠球状体产生HSC。

[0069] 在另一个方面,公开了一种治疗需要免疫细胞的个体的方法。所述方法可包含根据前述任一段从HCO或HLO中收获造血干细胞(HSC)或衍生细胞;以及将所述HSC或其衍生细胞施用于有需要的个体,其中所述施用包含将所述HSC移植到所述个体的骨髓中。在一个方面,所述治疗可以是对贫血(包括再生障碍性贫血、范可尼贫血),免疫缺陷,癌症(例如淋巴瘤、白血病、癌、实体瘤),造血功能的遗传性疾病,遗传性贮积病,重型地中海贫血,镰状细胞疾病,骨质疏松症或其组合的治疗。

[0070] 前体细胞

[0071] 在一些方面,可以使用多能的或可以被诱导成为多能的干细胞。在一些方面,多能干细胞衍生自胚胎干细胞,所述胚胎干细胞又衍生自早期哺乳动物胚胎的全能细胞,并且能够在体外无限地,未分化地增殖。胚胎干细胞是衍生自胚泡(即早期胚胎)内细胞团的多能干细胞。从胚细胞衍生胚胎干细胞的方法是本领域熟知的。例如,三种细胞系(H1、H13和H14)具有正常的XY核型,两种细胞系(H7和H9)具有正常的XX核型。人类胚胎干细胞H9(H9-hESC)用于本申请所述的示范性方面,但本领域技术人员应理解,本文所述的方法和系统适用于任何干细胞。可用于根据本发明的各方面的另外的干细胞包括但不限于由以下机构提供的或托管的数据库中描述的那些:国家干细胞库(National Stem Cell Bank, NSCB),旧金山加利福尼亚大学人类胚胎干细胞研究中心(Human Embryonic Stem Cell Research Center at the University of California, San Francisco, UCSF); WiSC Cell Bank at Wi Cell Research Institute; 威斯康星大学干细胞和再生医学中心(the University of Wisconsin Stem Cell and Regenerative Medicine Center, UW-SCRMC); 诺沃塞尔公司(Novocell, Inc.) (加利福尼亚圣地亚哥); Cellartis AB (哥德堡, 瑞典); ES Cell International Pte Ltd (新加坡); 以色列技术研究所(Technion at the Israel Institute of Technology, 以色列海法); 以及由普林斯顿大学和宾夕法尼亚大学托管的干细胞数据库。可用于根据本发明的各方面的示范性胚胎干细胞包括但不限于SA01(SA001); SA02(SA002); ES01(HES-1); ES02(HES-2); ES03(HES-3); ES04(HES-4); ES05(HES-5); ES06(HES-6); BG01(BGN-01); BG02(BGN-02); BG03(BGN-03); TE03(I3); TE04(I4); TE06(I6); UC01(HSF1); UC06(HSF6); WA01(H1); WA07(H7); WA09(H9); WA13(H13); WA14(H14)。在一些方面,干细胞被进一步修饰以引入额外的特性。示范性的经修饰的细胞系包括但不限

于H1 OCT4-EGFP;H9 Cre-LoxP;H9 hNanog-pGZ;H9 hOct4-pGZ;H9 inGFP_{hES};和H9 Syn-GFP。关于胚胎干细胞的更多细节可见于,例如,Thomson等人,1998,《衍生自人类胚胎的胚胎干细胞系 (Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts)》《科学 (Science)》282 (5391):1145-1147;Andrews等人,2005,《胚胎干 (ES) 细胞和胚胎癌 (EC) 细胞:同一硬币的相对侧 (Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin)》,Biochem Soc Trans 33:1526-1530;Martin 1980,《畸胎癌和哺乳动物胚胎发生 (Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis)》,《科学 (Science)》209 (4458):768-776;Evans和Kaufman,1981,《小鼠胚胎多能细胞培养物的建立 (Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos)》,《自然 (Nature)》292 (5819):154-156;Klimanskaya等人,2005,《无饲养细胞的衍生的人类胚胎干细胞 (Human embryonic stem cells derived without feeder cells)》《柳叶刀 (Lancet)》365 (9471):1636-1641;它们中的每一个全部并入本文中。或者,多能干细胞可衍生自胚胎生殖细胞 (EGC),其是产生有性繁殖的生物体的配子的细胞。EGC衍生自在晚期胚胎的性腺嵴中发现的原始生殖细胞,具有胚胎干细胞的许多特性。胚胎中的原始生殖细胞发育成干细胞,在成体中生成生殖配子 (精子或卵子)。在小鼠和人类中,可以在合适的条件下在组织培养中生长胚胎生殖细胞。EGC和ESC都是多能的。为了本发明的目的,术语“ESC”有时被广泛用来涵盖EGC。

[0072] 诱导的多能干细胞 (iPSC)

[0073] 在一些方面,iPSC是通过将某些干细胞相关基因转染到非多能细胞 (如成体成纤维细胞) 中而衍生的。转染是通过病毒载体 (如逆转录病毒) 实现的。转染的基因包括主要的转录调节剂Oct-3/4 (Pouf51) 和Sox2,尽管暗示其它基因增强诱导效率。3-4周后,少量转染细胞开始在形态学和生物化学上变得与多能干细胞相似,并且通常通过形态学选择,倍增时间或通过报道基因和抗生素选择来分离。如本文所用,iPSC包括但不限于小鼠的第一代 iPSC,第二代 iPSC 和人类诱导的多能干细胞。在一些方面,可采用基于非病毒的技术来生成 iPSC。在一些方面,腺病毒可用于将必需的四个基因转运到小鼠皮肤和肝细胞的DNA中,产生与胚胎干细胞相同的细胞。由于腺病毒不将其自身的任何基因与靶宿主结合,消除了产生肿瘤的危险。在一些方面,重编程可以在根本没有任何病毒转染系统的情况下通过质粒来完成,尽管效率非常低。在其它方面,蛋白质的直接递送用于生成 iPSC,因此消除了对病毒或遗传修饰的需要。在一些实施例中,使用类似的方法生成小鼠 iPSC 是可能的:用通过聚精氨酸锚导入细胞的某些蛋白来重复处理细胞足以诱导多能性。在一些方面,多能性诱导基因的表达也可以通过在低氧条件下用 FGF2 处理体细胞来增加。关于胚胎干细胞的更多细节可见于,例如,Kaji 等人,2009,《多能性的无病毒诱导和随后的重编程因子切除 (Virus free induction of pluripotency and successive excision of reprogramming factors)》《自然 (Nature)》458:771-775;Woltjen 等人,2009,《通过转座将成纤维细胞重编程为诱导的多能干细胞 (piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells)》,《自然 (Nature)》458:766-770;Okita 等人,2008,《无病毒载体小鼠诱导多能干细胞的生成 (Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors)》《科学 (Science)》322 (5903):949-953;Stadtfield 等人,2008,《不经病毒整合生成的诱导多能干细胞 (Induced pluripotent stem cells generated

without Viral integration)》《科学 (Science)》322 (5903):945-949;以及Zhou等人, 2009,《利用重组蛋白生成诱导多能干细胞 (Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins)》《细胞干细胞 (Cell Stem Cell)》4 (5):381-384;它们中的每一个全部并入本文中。在某些方面,示范性iPS细胞系包括但不限于iPS-DF19-9; iPS-DF19-9; iPS-DF4-3; iPS-DF6-9; iPS (包皮); iPS (IMR90); 和iPS (IMR90)。

[0074] 定形内胚层。本文所述的球状体、类器官和/或组织可衍生自称为定形内胚层 (DE) 的单层细胞。由前体细胞衍生定形内胚层的方法为本领域所熟知,如D' Armour等人2005和Spence等人所教导。从多能细胞 (例如iPSCs或ESC) 产生定形内胚层的任何方法均适用于本文所述的方法。在一些方面,多能细胞衍生自桑椹胚。在一些方面,多能干细胞是干细胞。这些方法中使用的干细胞可包括但不限于胚胎干细胞。胚胎干细胞可以衍生自胚胎内细胞团或胚胎性腺脊。胚胎干细胞或生殖细胞可以衍生自各种动物物种,包括但不限于各种哺乳动物物种,包括人类。在一些方面,人类胚胎干细胞用于产生定形内胚层。在一些方面,人类胚胎生殖细胞用于产生定形内胚层。在某些方面,iPSC用于产生定形内胚层。在一些方面,在从多能干细胞到DE细胞的分化过程中使用一种或多种生长因子。用于分化过程的一种或多种生长因子可包括来自TGF- β 超家族的生长因子。在这些方面,所述一种或多种生长因子可包含TGF- β 超家族的Nodal/活化素和/或BMP亚组。在一些方面,一种或多种生长因子选自以下组成的组:Nodal、活化素A、活化素B、BMP4、Wnt3a或任何这些生长因子的组合。在一些方面,用一种或多种生长因子处理胚胎干细胞或生殖细胞和iPSC 6小时或更长时间;12小时或更长时间;18小时或更长时间;24小时或更长时间;36小时或更长时间;48小时或更长时间;60小时或更长时间;72小时或更长时间;84小时或更长时间;96小时或更长时间;120小时或更长时间;150小时或更长时间;180小时或更长时间;或240小时或更长时间。在一些方面,用以下浓度的一种或多种生长因子来处理胚胎干细胞或生殖细胞和iPSC:10ng/ml或更高;20ng/ml或更高;50ng/ml或更高;75ng/ml或更高;100ng/ml或更高;120ng/ml或更高;150ng/ml或更高;200ng/ml或更高;500ng/ml或更高;1,000ng/ml或更高;1,200ng/ml或更高;1,500ng/ml或更高;2,000ng/ml或更高;5,000ng/ml或更高;7,000ng/ml或更高;10,000ng/ml或更高;或15,000ng/ml或更高。在一些方面,生长因子的浓度在整个处理期间保持在恒定水平。在其它方面,生长因子的浓度在处理过程中是变化的。在一些方面,生长因子悬浮在包括胎牛丝氨酸 (FBS) 和不同胎牛血清浓度的培养基中。本领域技术人员将理解本文所述的方案可单独或组合应用于任何已知的生长因子。当使用两种或多种生长因子时,每种生长因子的浓度可以独立变化。在一些方面,使用富集定形内胚层细胞的细胞群。在一些方面,分离或基本纯化定形内胚层细胞。在一些方面,分离或基本纯化的定形内胚层细胞表达SOX17、FOXA2和/或CXRC4标记物的程度高于OCT4、AFP、TM、SPARC和/或SOX7标记物。也考虑富集具有定形内胚层的细胞群的方法。在一些方面,定形内胚层细胞可通过将细胞与试剂接触而从混合细胞群中分离或基本纯化,所述试剂与存在于定形内胚层细胞表面但不存在于混合细胞群中其它细胞表面的分子结合,然后分离与试剂结合的细胞。在某些方面,存在于定形内胚层细胞表面的细胞成分为CXCR4。可用于本发明的获得或产生DE细胞的其它方法包括但不限于以下文献中所述的那些方法:D' Armour等人的美国专利No. 7, 510, 876;Fisk等人的美国专利No. 7, 326, 572;Kubol等人, 2004,《胚胎干细胞在培养过程中形成定形内胚层 (Development of deformic endoderm from embryonic stem cells in

culture)》《发展(Development)》131:1651-1662;D'Amour等人,2005,《Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm(人类胚胎干细胞向定形内胚层的有效分化)》《自然生物技术(Nature Biotechnology)》23:1534-1541;以及Ang等人,1993,《小鼠畸形内胚层系的形成和维持:HNF3/叉头蛋白的参与(The formation and maintenance of the deformed endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins)》《发展(Development)》119:1301-1315;它们中的每一个全部以引用的方式并入本文中。在一些方面,可溶性FGF和Wnt配体用于模拟培养中的早期后肠特化,通过定向分化将从iPSC或ESC发育的DE转化为有效产生所有主要肠细胞类型的后肠上皮。在人类中,DE的定向分化是通过选择性激活某些对肠发育重要的信号传导通路而实现的。本领域技术人员应当理解,改变任何Wnt信号传导蛋白与任何FGF配体结合的表达可以引起本文所述的定向分化。在一些方面,用本文所述的信号传导通路的一种或多种调节剂来处理DE培养物6小时或更长时间;12小时或更长时间;18小时或更长时间;24小时或更长时间;36小时或更长时间;48小时或更长时间;60小时或更长时间;72小时或更长时间;84小时或更长时间;96小时或更长时间;120小时或更长时间;150小时或更长时间;180小时或更长时间;200小时或更长时间;240小时或更长时间;270小时或更长时间;300小时或更长时间;350小时或更长时间;400小时或更长时间;500小时或更长时间;600小时或更长时间;700小时或更长时间;800小时或更长时间;900小时或更长时间;1,000小时或更长时间;1,200小时或更长时间;或1,500小时或更长时间。

[0075] 在一些方面,用以下浓度的一种或多种本文所述的信号传导通路的调节剂来处理DE培养物:10ng/ml或更高;20ng/ml或更高;50ng/ml或更高;75ng/ml或更高;100ng/ml或更高;120ng/ml或更高;150ng/ml或更高;200ng/ml或更高;500ng/ml或更高;1,000ng/ml或更高;1,200ng/ml或更高;1,500ng/ml或更高;2,000ng/ml或更高;5,000ng/ml或更高;7,000ng/ml或更高;10,000ng/ml或更高;或15,000ng/ml或更高。在一些方面,在整个处理过程中信号传导分子的浓度保持恒定。在其它方面,信号传导通路调节剂的浓度在处理过程中是变化的。在一些方面,根据本发明的信号传导分子悬浮于包含DMEM和胎牛丝氨酸(FBS)的培养基中。FBS的浓度可以在2%或更高;5%以及更高;10%或更高;15%或更高;20%或更高;30%或更高;或50%或更高。本领域技术人员将理解,本文所述的方案可单独或联合应用于本文所述信号传导通路的任何已知调节剂,包括但不限于Wnt和FGF信号传导通路中的任何分子。

[0076] 在用两种或多种信号传导分子来处理DE培养物的方面,信号传导分子可以同时或分别加入。当使用两种或多种分子时,每种分子的浓度可以独立地变化。

[0077] 实例

[0078] 提供下列非限制性实例以进一步说明本文公开的本发明的实施例。本领域技术人员应当理解,以下实例中公开的技术代表了已经发现在本发明的实践中很好地起作用的方法,因此可以认为构成了其实践的模式实例。然而,根据本公开,本领域技术人员应当理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以对所公开的特定实施例进行许多改变,并且仍然获得相同或相似的结果。

[0079] 衍生自人类多能干细胞的结肠类器官培养物中功能性免疫细胞的建立

[0080] 定形造血祖细胞产生于在胚胎结肠附近发育的生血内皮。这里,申请人已经设计

了衍生自人类多能干细胞的结肠类器官培养物,这些培养物共同发育有能力形成骨髓和淋巴衍生物的生血内皮和造血祖细胞。BMP信号传导可用于生成后肠间充质,其能形成生血内皮的,并产生表达RUNX1的造血祖细胞。经过三周的培养,存在多种骨髓细胞类型和淋巴细胞。在扩展的体外培养后,巨噬细胞可以维持在HCO的发育的间充质中。在移植HCO并且在体内生长3个月后,PSC衍生的人类巨噬细胞与结肠上皮建立了紧密的联系,并且没有被宿主衍生的巨噬细胞取代。HCO-相关联的巨噬细胞是功能性的,并且通过产生炎性细胞因子,经历跨上皮迁移和吞噬细菌(组织驻留巨噬细胞的所有特性),对LPS和致病细菌作出反应。与在胚胎中一样,申请人设计的人类后肠/结肠类器官培养物支持生血内皮的形成,所述生血内皮产生骨髓和淋巴系,包括在发育中的人类结肠中建立长期驻留的巨噬细胞。

[0081] 有各种各样的免疫细胞分布在成人肠道中。这些包括骨髓和淋巴样细胞类型,它们与上皮和ENS协调以维持屏障功能,与微生物组通讯,以及区分有益的和有害的抗原。大多数肠疾病,特别是炎性肠病(IBD)涉及免疫系统。教条认为肠道的所有免疫细胞都衍生自骨髓来源的造血干细胞(HSC)。然而,来自动物研究的越来越多的证据支持这样的结论,即某些器官含有在胚胎发育期间共同发育的组织驻留巨噬细胞群¹⁻³。最近显示结肠含有稳定的,自我维持的巨噬细胞群,其衍生自胚胎祖细胞和成年HSC⁴。

[0082] 造血细胞从三个位点发育。原始造血细胞在原肠胚形成过程中产生,迁移到卵黄囊并存活很短⁵。定形造血祖细胞(HPC)衍生自生血内皮,位于卵黄囊或胚胎的主动脉-性腺-中肾(AGM)区,邻近发育中的结肠。原始造血细胞的一个显著特征是它们具有有限的分化潜能,并且不具有淋巴样潜能。衍生自AGM区域的胚内HPC表达类似Runx1和Tek的标记物,并从主动脉内皮和邻近后肠的周围血管中出现⁶。胚胎后部区域的发育需要BMP信号传导⁷⁻¹⁰。此外,BMP信号传导调节生血内皮形成所需的GATA2转录因子的表达¹¹。

[0083] 申请人先前已经完成了通过人类多能干细胞的定向分化来设计人类结肠类器官(HCO)¹⁰。此类HCO含有结肠上皮和周围间充质衍生物,包括成纤维细胞,肌成纤维细胞和平滑肌细胞。在HCO分化阶段发生的转录变化的生物信息学分析揭示了与造血发育相关联的基因的惊人富集。本文公开了处理培养物以识别HCO中存在的细胞类型的程度的方法,如图10所示。

[0084] 造血祖细胞从尾侧中胚层发育。为了确定是否已经指定了尾侧中胚层,申请人检查了向前和向后表达的HOX基因的表达。与以前的发现一致,后hox基因通过BMP处理显著上调(图11,图D)。此外,与H10相比,包括HOXA3在内的抑制EHT12的前hox因子在HCO中下调。当通过瞬时激活BMP信号传导来诱导后肠和结肠命运的形成时(BMP2处理发生在方案的第7-10天之间),观察到血管标记物,包括GATA2、KDR/FLK1以及全内皮标记物CD34和VEGFR1的表达,类似于在小鼠胚胎发育的后肠中所观察到的(图11)。

[0085] 在HCO培养物中免疫细胞的存在引起这些细胞是原始的还是衍生自生血内皮的问题。没有观察到标记原始造血祖细胞的GYPA(CD235)(图11,F)的表达¹³,表明造血细胞来源是生血内皮。可以看到表达RUNX1的造血祖细胞从e10.5小鼠胚胎的AGM区域的内皮中出现(图4(A-C))。HCO培养物类似地具有CD34⁺内皮管和相关的RUNX1⁺细胞簇(图4(D-G))。生血内皮与非生血内皮的区别还在于缺乏CD73表达¹⁴。通过流式细胞仪对21日龄HCO培养物的分析揭示存在CD34⁺/CD73⁻内皮细胞,表明存在生血内皮(图4(H))。到培养21天,与H10相比,HCO的转录模式揭示了与免疫细胞及其功能相关的通路术语。这些包括嗜中性粒细胞脱粒、

先天免疫系统,血小板活化和白细胞跨内皮迁移。通过免疫荧光染色(IF)对21日龄HCO培养物的分析证实,存在PU.1⁺细胞和CD34⁺内皮管,它们包埋在结肠类器官的间充质中,而不是肠类器官(图12)。对22日龄HCO培养物的明视野活体成像揭示了在内皮细胞管内迁移的难处理细胞,它们在间充质中和在培养基中自由漂浮出现,并且可以发现。综合这些数据表明,HCO培养物含有能够生成造血细胞的生血内皮。

[0086] 为了确定HCO培养物中的细胞类型,对培养基取样并进行细胞离心涂片(cytospins)和giemsa染色,其识别类似巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞的细胞(图5A)。培养物中不加入外源因子或小鼠骨髓基质细胞,表明HCO中的间充质细胞类型能够支持骨髓细胞类型的分化。为了确定是否有HCO产生的红系髓系祖细胞,进行MethoCult™分析。HCO,但不是HI0培养物,含有能够生成红细胞系、骨髓和混合骨髓集落的祖细胞(图5,B)。来自人类胚胎和诱导的多能干细胞系的HCO有能力生成红系髓系衍生物,证明所述方法在PSC系中是有效的。从HCO生成的红细胞表达胎儿(HBG1和2)和胎儿/成人(HBA1、HBA2)血红蛋白,但不表达可感知水平的胚胎血红蛋白(HBE1、HBZ),这表明HCO培养物含有定形红系髓系祖细胞。

[0087] 表.发育期间的人类血红蛋白同种型

[0088]	红细胞生成部位	血红蛋白类型	珠蛋白链	基因
	卵黄囊	Gower 1	ζ ₂ ε ₂	HBE, HBZ
	卵黄囊	Gower 2	α ₂ ε ₂	HBA1, HBA2, HBE
[0089]	卵黄囊	波特兰	ζ ₂ γ ₂	HBZ, HBG1, HBG2
	胎儿肝脏	胎儿	α ₂ γ ₂	HBA1, HBA2, HBG1, HBG2
	胎儿肝脏到骨髓	成人	α ₂ β ₂	HBA1, HBA2, HBB1, HBB2

[0090] 胚胎内定形造血细胞的标志之一是能够形成淋巴样细胞类型,如T细胞^{13,15}。鉴于具有淋巴样潜能的造血祖细胞在胚胎发育的后期阶段出现,申请人假定这些祖细胞在HCO间充质的延长培养之后出现。因此,申请人开发了一种允许长期维持完整的生血内皮管的培养方法(图10,C)。使HCO培养物生长额外的一周,以允许间充质的扩展,从平板上刮下间充质并在悬浮培养物中生长额外的3周。为了测试淋巴样潜能,加入了T细胞诱导生长因子IL7和FLT3。没有T-细胞诱导,HCO培养物含有0.2%CD3⁺/CD4⁺细胞。加入T-细胞诱导生长因子使T-细胞的数量增加4倍(图5,E)。T细胞潜能的存在进一步支持了从HCO培养物形成的造血细胞是定形结论。

[0091] 当定形造血功能在发育过程中转移到其它器官,包括胎儿肝脏,然后骨髓时,组织驻留巨噬细胞能够在发育早期在器官中生长并持续到出生。在一些器官如肺和肝中,胚胎巨噬细胞在整个生命中持续存在5。在其它器官中,出生后骨髓中的HSC产生替代胚胎巨噬细胞的巨噬细胞。在结肠中,一些数据表明,胚胎巨噬细胞被HSC衍生的巨噬细胞所取代^{16,17}。然而,胚胎巨噬细胞的最近谱系追踪表明,它们在出生后与HSC衍生的巨噬细胞一起持续存在。结肠类器官在第21天通过研磨传代,这导致间充质的破坏和单个HCO的分散。然后将HCO重新涂在Matrigel中并再培养14天。当通过基因本体论分析来检测转录模式时,观察到与包括白细胞、嗜中性粒细胞以及防御和炎症反应的骨髓细胞类型相关联的GO项的富集。

[0092] 表.35天HCO上调

[0093]	类别	ID	名称	P值
	GO:细胞组分	GO:0005615	细胞外空间	8.76E-26
	GO:细胞组分	GO:0031226	质膜的固有组分	5.53E-19
	GO:生物过程	GO:0006954	炎症反应	4.79E-18
	GO:生物过程	GO:0006952	防御反应	3.13E-17
	GO:细胞组分	GO:0005887	质膜的整体组分	9.87E-17
	GO:生物过程	GO:1903034	对伤害反应的调节	3.01E-16
	GO:生物过程	GO:0009611	对伤害的反应	1.07E-15
	GO:生物过程	GO:0030198	细胞外基质组织	5.09E-15
	GO:生物过程	GO:0043062	细胞外结构组织	5.78E-15
	GO:细胞组分	GO:0098589	膜区	5.48E-13
	GO:细胞组分	GO:0045177	细胞顶端部分	4.32E-12

[0094] 第35天HCO的免疫染色揭示,巨噬细胞表达标记物CD68和HAM56(数据未示出)以及组织驻留巨噬细胞标记物CD163(图12)^{18,19}。在几种组织驻留巨噬细胞群体中,包括肺泡巨噬细胞,肝脏中的Kupffer细胞和胎盘中的Hofbauer细胞,CD163被表达²⁰⁻²²。通过共染色CD163和iNOS,研究炎性巨噬细胞的存在,iNOS是一种炎性巨噬细胞的已知标记物(图7)。有趣的是,大多数CD163+巨噬细胞也对iNOS呈阳性,表明这些细胞是炎性的。综合这些数据表明HCO含有共表达组织驻留和炎性巨噬细胞标记物的共发育巨噬细胞。

[0095] 人类肠由多个巨噬细胞亚型组成。为了确定HCO中的巨噬细胞是否异质,使用CYTOF来检测细胞表面标记物的表达。CYTOF分析揭示,存在至少4种不同的单核细胞群,包括CD11bhi群,CD14-/CD16+群,CD14+/CD16+群和CD14+/CD16-群。这些数据表明,HCO培养物能够生成类似于天然人类肠的不同组的单核细胞/巨噬细胞。

[0096] 已经假定结肠中的组织驻留巨噬细胞被衍生自骨髓的单核细胞(BMDM)连续补充^{16,17}。然而,最近的研究对该范例提出了挑战,并表明尽管一些巨噬细胞亚型持续被BMDM补充,但其它亚型具有长期存活和自我维持的胚胎来源^{4,23,24}。为了确定HCO巨噬细胞("HCOMac")是否可以长期维持,在将HCO移植到小鼠肾荚膜(图8)后检查人类CD163+巨噬细胞的存在。申请人假设短寿巨噬细胞将被表达小鼠特异性标记物F/480的宿主衍生的鼠巨噬细胞替代。在对照中只检测到少数hCD163+细胞,但在NOG H10移植物中未检测到,并且F/480+巨噬细胞浸润所有间充质层直至绒毛顶部(图5)。相反,hCD163巨噬细胞在HCO中甚至在移植后12周也容易检测到。这些巨噬细胞主要位于缺乏F/480+巨噬细胞浸润的固有层中。在肌层中,hCD163+细胞散布有F/480+,表明宿主巨噬细胞在这些组织层中生长。对HCO移植小鼠的血液和骨髓的检查揭示,缺乏人类来源的细胞,表明hCD163巨噬细胞在HCO中自我维持,并且没有被在骨髓中生长的人类细胞补充(图14)。这些数据表明HCO生成独立于BMDM的自我维持的巨噬细胞。

[0097] 与H10相比,对来自35天HCO的RNAseq数据的检查揭示了炎症特征。为了证实HCO确实显示功能性炎症,使用Luminex多重ELISA来检测促炎症细胞因子分泌到HCO培养基中(图13)。据报道,IL1B、IL6和IL8都在体外由上皮细胞表达,表明上皮细胞可能有助于在HCO中看到的炎症特征。为了确保巨噬细胞是炎性的,检查巨噬细胞炎性蛋白1A(MIP1A)和1B(MIP1B)的分泌。HCO分泌更高水平的MIP1A和MIP1B,表明HCO内的巨噬细胞显示基础水平的

炎症。

[0098] 成体结肠巨噬细胞通常抵抗革兰氏阴性细菌细胞壁组分脂多糖 (LPS) 的刺激²⁵。相反,胎儿巨噬细胞对LPS刺激有反应,表明在出生后实现耐受²⁶。为了确定HCO内的巨噬细胞是否对LPS刺激敏感,用LPS处理HCO,并检测细胞运动和炎性细胞因子的分泌。活体成像揭示,巨噬细胞响应于LPS而增加它们的运动性,并且它们能够经历趋化到类器官内的病灶(图8(A))。对细胞因子分泌的检查揭示,IL6、IL8、MIP1A、MIP1B和TNFA显著增加,表明细胞因子的产生可能是巨噬细胞运动性的驱动因素(图8(B-E))。

[0099] LPS直接刺激HCO表明类器官内的巨噬细胞能够对细胞因子和细菌因子作出反应。巨噬细胞通过吞噬细菌在先天免疫中起直接作用。为了确定HCO巨噬细胞(“HCOmac”)是否能够吞噬细菌,用标记有对pH敏感的荧光团的大肠杆菌颗粒来处理HCO。活体成像揭示,HCOMac持续延伸丝状伪足并观察微环境。HCOMac吞噬酸性吞噬溶酶体内的细菌颗粒,正如对pH敏感的荧光的增加所表明的那样(图8(F-G))。另外,显微注射活共生体大肠杆菌和EHEC诱导巨噬细胞迁移到HCO的腔中(图9(A-F)),类似于在感染沙门氏菌的小鼠中观察到的²⁷。此外,将细菌引入HCO的腔中导致MUC2染色减少,可能是由于细菌对粘液的降解(图9(G))。总之,我们的数据表明,HCOMac是能够对细菌颗粒和活细菌作出反应的功能性驻留样巨噬细胞。

[0100] 哺乳动物后肠和主动脉-性腺-中肾区域的发育彼此非常接近。BMP信号传导被证明既激活后肠内胚层和间充质的后HOX模式,也激活生血内皮转录因子GATA2的表达。使用先前描述的生成HCO的方法,BMP信号传导还指定具有定形造血潜能的生血内皮。这与正常的人类发育是一致的,确定的造血祖细胞是从腹后中胚层形成的。因此,据信本文所述的HCO培养物比最初认为的更接近地模拟后部胚胎的更大部分。

[0101] 来自HCO培养物的造血祖细胞即使在缺乏造血生长因子和小鼠来源的骨髓基质细胞(OP9-DLL4细胞)的情况下也具有红系-髓系和淋巴样潜能。这表明在HCO培养物中共同发育的中胚层补偿了这些信号和细胞类型的缺乏。有趣的是,造血生长因子在HIO培养物中表达,表明表达这些因子的细胞的发育不依赖于BMP信号传导。这些细胞类型可以替代使用来源于鼠的OP9-DLL4细胞,因此可能赋予人类造血祖细胞免疫原性^{28,29}。此外,这些细胞类型也可以存在于正常的肠组织中,因为最近的研究已经表明巨噬细胞的亚群在肠中自我维持⁴。

[0102] 在HCO中共同发育的巨噬细胞的存在为检测先天免疫细胞和结肠上皮之间的相互作用提供了新的工具。此外,HCO可用于确定允许维持组织驻留巨噬细胞的生态位因子。HCO应当允许建模炎性疾病,例如坏死性小肠结肠炎,非常早发性IBD³⁰,细菌病原体,例如艰难梭菌,病毒病原体,例如HIV,其容易感染胎儿肠巨噬细胞³¹。此外,其它免疫细胞类型的掺入可用于研究其它先天免疫机制,例如嗜中性粒细胞驱动的炎性缺氧³²。

[0103] 方法

[0104] DE诱导。将人类ES和iPS细胞作为单细胞涂于mTesR1培养基上,添加ROCK抑制剂Y27632(10 μ M;Stemgent),置于Matrigel(BD Biosciences)包被的24孔板中,每孔150,000个细胞。第二天开始,用活化素A(100ng ml⁻¹;Cell Guidance Systems),在RPMI 1640(Invitrogen)中对细胞进行处理,处理持续三天,其中含有浓度递增的(0%、0.2%和2.0%)定形胎牛血清(dFBS;Invitrogen)。内胚层模式化和肠管形态发生。DE诱导后,在具

有2.0% dFBS的RPMI 1640中用生长因子/拮抗剂对细胞进行处理,处理持续三天。为了生成后部前肠球状体,利用以下物质对DE进行处理,处理持续4天:FGF4 (500ng ml⁻¹;R&D Systems),CHIR99021 (3μM;Stemgent)。三维生长。如先前描述的^{10,12},将中后肠球状体包埋在Matrigel (BD Biosciences)中,随后在Advanced DMEM/F12 (Invitrogen)中生长,其中补充有N2 (Invitrogen),B27 (Invitrogen),L-谷氨酰胺,10μM HEPES,青霉素/链霉素和EGF (100ng ml⁻¹;R&D Systems)。对于近侧肠特化,加入Noggin (100ng ml⁻¹;R&D Systems),在三维生长的头三天加入。对于结肠特化,加入BMP2 (100ng ml⁻¹;R&D Systems),在三维生长的头三天加入。

[0105] 生成具有增加的免疫细胞产生的人类肠类器官(HIO)的方法

[0106] 人类胚胎干细胞和诱导的多能干细胞在Matrigel (BD Biosciences)上在无饲养细胞的mTesR1培养基中维持。分化为定形内胚层如先前所述进行(D'AmourKA等人《人类胚胎干细胞向定形内胚层的有效分化(Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm)》《自然生物技术(Nat Biotechnol)》2005;23:1534-1541.)简言之,使用3天活化素A(R&D Systems)分化方案。用活化素A(100ng/mL)在RPMI 1640培养基(Invitrogen)中对细胞连续处理三天,所述培养基中含有浓度递增的(0%、0.2%、2%)HyClone定形胎牛血清(dFBS)(Thermo Scientific)。为了进行后肠分化,DE细胞在2% dFBS-DMEM/F12(其中含有500ng/ml FGF4和500ng/ml Wnt3a(R&D Systems))中培养长达4天。在用生长因子处理2-4天之间,形成3-维漂浮球状体,然后转移到先前显示促进肠生长和分化的三维培养物中(Gracz AD,Ramalingam S,Magness ST.《Sox9-表达标记了在体外形成类器官的表达CD24的小肠上皮干细胞的亚群(Sox9-Expression Marks a Subset of CD24-expressing Small Intestine Epithelial Stem Cells that Form Organoids in vitro)》Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.2010;298:G590-600;16.Sato T,等人《单个Lgr5干细胞在体外构建隐窝绒毛结构而没有间充质生态位(Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche)》《自然(Nature)》2009;459:262-265.)简而言之,将球状体包埋在含有500ng/mL R-Spondin1(R&D Systems),100ng/mL头蛋白(R&D Systems)和50ng/mL EGF(R&D Systems)的Matrigel (BD Bioscience)中。在Matrigel固化后,每4天覆盖并更换培养基(补充有L-谷氨酰胺,10μM Hepes,N2补充物(R&D Systems),B27补充物(Invitrogen)和含有生长因子的Pen/Strep的Advanced DMEM/F12(Invitrogen))。

[0107] 生成具有增加的免疫细胞产生的人类结肠类器官(HCO)的方法

[0108] 人类胚胎干细胞和诱导的多能干细胞在包被有Matrigel (BD Biosciences)的六孔Nunclon表面板(Nunc)中在无饲养细胞条件下生长,并在mTESR1培养基(干细胞技术)中维持。为了诱导定形内胚层(DE),将人类ES或iPS细胞用Accutase (Invitrogen)传代,并以每孔100,000个细胞的密度接种于Matrigel包被的Nunclon表面24孔板中。对于Accutase裂解细胞,第一天向培养基中加入10μM Y27632化合物(Sigma)。第一天后,培养基改为mTESR1,细胞再生长24小时。然后,如前所述,用100ng/mL活化素A来处理细胞,处理持续3天,(Spence等人,2011)。DE诱导后,用后肠诱导培养基(RPMI 1640,2mM L-谷氨酰胺,2%去补体FBS,青霉素-链霉素),用500ng/mL FGF4(R&D)和3μM Chiron 99021(Tocris,WNT通路活化剂;Inhibits GSK3)处理DE,处理持续4天,以诱导中后肠球状体的形成。如前所述,从

24孔板收集中/后肠球状体,并涂于Matrigel(BD)中,随后Advanced DMEM/F12(Invitrogen)中生长,其中补充有N2(Invitrogen),B27(Invitrogen),L-谷氨酰胺,10 μ M HEPES,青霉素/链霉素和EGF(100ng ml⁻¹;R&D Systems)。为了生成人类结肠类器官(HCO),用100ng/mL EGF加100ng/mL BMP(也可以使用BMP2或4,R&D或其它BMP通路活化剂)覆盖球状体至少3天。3天后更换培养基,在所有模式条件下培养基中只维持EGF。然后每周更换培养基两次。

[0109] 从HCO培养物中分离人类造血细胞

[0110] 在BMP通路活化至少3天后(例如,第9天),HCO开始含有表达标记物(如KDR、FLT1和GATA2)的血管中胚层细胞。在Matrigel中持续生长导致表达CD31、CD34的生血内皮的形成。在第15天和第20天之间,培养物具有产生表达RUNX1的造血祖细胞/干细胞的内皮管。收集HCO培养物的培养基识别了广泛的分化造血细胞的范围,包括骨髓细胞(嗜碱性粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞)和单核细胞和巨噬细胞。使用流式细胞仪,也可以观察到表达未成熟B和T细胞标记物的细胞。

[0111] 表.21天HCO上调

[0112]	类别	ID	名称	P 值
	GO: 生物过程	GO:1903047	有丝分裂细胞周期过程	2.62E-41
	GO: 生物过程	GO:0000278	有丝分裂细胞周期	1.08E-40
	GO: 生物过程	GO:0022402	细胞周期过程	5.75E-34
	GO: 生物过程	GO:0007049	细胞周期	6.74E-33
[0113]	GO: 细胞组分	GO:0005694	染色体	2.88E-28
	GO: 细胞组分	GO:0044427	染色体部分	1.46E-26
	GO: 细胞组分	GO:0000280	核分裂	7.43E-26
	GO: 细胞组分	GO:0048285	器官裂变	5.96E-25
	GO: 细胞组分	GO:0044770	细胞周期相变	8.25E-25
	GO: 细胞组分	GO:0051301	细胞分裂	1.04E-22

[0114] Methocult™ H4434 Classic中收获培养基的细胞生长导致形成由红细胞、粒细胞和巨噬细胞组成的集落。Methocult™ H4434 Classic包含Iscove's MDM中的甲基纤维素,胎牛血清,牛血清白蛋白,2-巯基乙醇,重组人类干细胞因子(SCF),重组人类白细胞介素-3(IL-3),重组人类促红细胞生成素(EPO),重组人类粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。

[0115] HCO中功能性巨噬细胞的形成

[0116] 将HCO传代到新鲜Matrigel中,并继续培养,导致功能性巨噬细胞的形成(从约第20天到约第34天或更多)。巨噬细胞对感染性刺激(如脂多糖(LPS)或细菌)有功能反应,能吞噬细菌,并自发地和响应LPS而产生炎性细胞因子,包括IL6、IL8、CCL3、CCL4和TNF- α 。巨噬细胞对IL10也有反应,导致炎性细胞因子产生减少。巨噬细胞也对M-CSF抑制或添加有反应,分别具有减少的和增加的巨噬细胞数目。

[0117] 生成具有增加的免疫细胞产生的人类肝脏类器官的方法

[0118] hiPSC向定形内胚层的分化是用先前描述的方法,再经过若干修改,而诱导的(Spence等人,2011)。简而言之,在Accutase(Thermo Fisher Scientific Inc.,Waltham, MA,USA)中分离hiPSC的集落,并将150,000-300,000细胞涂在Matrigel或层粘连蛋白包被

的组织培养物24孔板(Corning, Durham, NC)上。当细胞变成高密度(超过90%的孔被细胞覆盖)时,将培养基换成RPMI 1640培养基(Life Technologies, Carlsbad, CA),其含有100ng/mL活化素A(R&D Systems, Minneapolis, MN)和50ng/mL骨形态发生蛋白4(BMP4; R&D Systems)(在第1天),100ng/mL活化素A和0.2%胎牛血清(FCS; Thermo Fisher Scientific Inc.) (在第2天),和100ng/mL活化素A和2%FCS(在第3天)。对于第4-6天,通过在Advanced DMEM/F12(Thermo Fisher Scientific Inc.)中培养,将细胞分化成后部中肠,所述培养基含有2%B27(Life Technologies),1%N2(Gibco, Rockville, MD),2mM L-谷氨酰胺(Gibco)和1mM HEPES(Gibco),1%青霉素/链霉素(Gibco),含有500ng/ml成纤维细胞生长因子(FGF4; R&D Systems)和3 μ M CHIR99021(Stemgent, Cambridge, MA, USA)。用于细胞分化的培养物保持在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂/95%空气的环境中,每天更换培养基。分化的定形内胚层在第7天在平板上显示出芽。如果球状体不足以被包埋到Matrigel中,则再次加入第4-6天的培养基,并在37 $^{\circ}$ C培养过夜。

[0119] 分化为肝脏类器官可以使用以下四种方法来将DE分化为肝脏类器官:“Matrigel点滴法”,“Matrigel夹层法”,“无Matrigel法”和“球体生成Transwell法”,其中每一种方法在下面描述。

[0120] Matrigel点滴法:在第7-8天,轻轻地吸移带有所涂细胞的定形内胚层类器官以从培养皿上分层。以800rpm的转速,将分离的球状体离心3分钟,除去上清液后,包埋在培养皿上的100%Matrigel液滴中。将250 μ L Matrigel(Corning)用于内胚层培养物的24孔板的每孔。制备80 μ L Matrigel液滴,24孔板(VWR Scientific Products, West Chester, PA)的每个孔1滴。将平板在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂/95%空气的环境中放置5-15分钟。Matrigel固化后,加入Advanced DMEM/F12,以及B27, N2, L-谷氨酰胺, HEPES, 青霉素/链霉素和视黄酸(RA; Sigma, St. Louis, MO) 2 μ M, 放置1-5天。每隔一天更换一次培养基。RA处理后,将Matrigel液滴中包埋的类器官在肝细胞培养基(HCM Lonza, Walkersville, MD)中培养,所述培养基中有10ng/mL肝细胞生长因子(HGF; Peprotech, Rocky Hill, NJ), 0.1 μ M地塞米松(Dex; Sigma)和20ng/mL制瘤素M(OSM; R&D Systems)。用于细胞分化的培养物保持在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂/95%空气的环境中,每3天更换培养基。约第20-30天,可通过刮擦和轻轻的移液操作来分离包埋在Matrigel液滴中的类器官,用于进行任何分析。

[0121] Matrigel夹层法:在第7-8天,轻轻地吸移具有所涂细胞的定形内胚层类器官以从培养皿上分层。以800rpm的转速,将分离的球状体离心3分钟,除去上清液后,与100%Matrigel混合。同时,将具有所有补充物的肝细胞培养基与相同体积的100%Matrigel混合。将HCM和Matrigel混合物涂到培养皿的底部以在板上形成厚涂层(0.3-0.5cm),并在37 $^{\circ}$ C下在5%CO₂/95%空气的环境中放置15-30分钟。在Matrigel固化后,将与Matrigel混合的球状体接种在带Matrigel厚涂层的板上。将该板在37 $^{\circ}$ C下在5%CO₂/95%空气的环境中放置5分钟。加入Advanced DMEM/F12,以及B27, N2, L-谷氨酰胺, HEPES, 青霉素/链霉素和视黄酸(RA; Sigma, St. Louis, MO) 2 μ M, 放置1-5天。每隔一天更换一次培养基。RA处理后,将Matrigel液滴中包埋的类器官在肝细胞培养基(HCM Lonza, Walkersville, MD)中培养,所述培养基中有10ng/mL肝细胞生长因子(HGF; Peprotech, Rocky Hill, NJ), 0.1 μ M地塞米松(Dex; Sigma)和20ng/mL制瘤素M(OSM; R&D Systems)。用于细胞分化的培养物保持在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂/95%空气的环境中,每3天更换培养基。约第20-30天,通过刮擦和轻轻的移液操作

来分离包埋在Matrigel液滴中的类器官,用于进行任何分析。

[0122] 无Matrigel法:在第7-8天,具有所涂细胞的定形内胚层类器官在具有Advanced DMEM/F12(Thermo Fisher Scientific Inc.)和B 27(Life Technologies),N2(Gibco, Rockville,MD),L-谷氨酰胺,HEPES,青霉素/链霉素和视黄酸(RA;Sigma,St.Louis,MO),(2 μ M)的平面培养物中持续4天。每隔一天更换一次培养基。平面培养4天后,类器官开始出芽,而2D细胞分化为肝细胞。类器官和肝细胞两者在肝细胞培养基(HCM Lonza,Walkersville, MD)中维持超过60天,所述培养基具有10ng/mL肝细胞生长因子(HGF;Peprotech, RockyHill,NJ),0.1 μ M地塞米松(Dex;Sigma)和20ng/mL制瘤素M(OSM;R&D Systems),10天。对于类器官分析,可将漂浮的类器官收集在超低附着的6孔板中,并在适当时用于随后的分析。用于细胞分化的培养物保持在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂/95%空气的环境中,每3天更换培养基。

[0123] 球体生成Transwell方法:如上所述创建后部中肠球体。前部前肠球体是通过d4-6分化的轻微改变创建的。对于前部前肠球体,加入Advanced DMEM/F12(Thermo Fisher Scientific Inc.)和B27(LifeTechnologies),N2(Gibco,Rockville,MD),L-谷氨酰胺,HEPES,青霉素/链霉素,500ng/ml FGF4,2 μ M CHIR99021和200ng/ml头蛋白,在4-7天内,每天更换。在第8天,用移液操作和胰蛋白酶消化将来自前部和后部的细胞解离成单细胞悬浮液,并接种在96孔超低附着平板上并培养过夜。在第9天,收集细胞聚集体,合并前部和后部并培养过夜。在第10天,前部和后部Matrigel滴剂彼此附着。将12孔板(Denville)用50 μ l Matrigel包被,并在37 $^{\circ}$ C培养2分钟。用大孔10 μ L移液管,用最小量Matrigel小心挑取附着的前部和后部聚集体的球状体,并置于Matrigel包被的12孔板上。在每个球状体上再放置5 μ L的Matrigel。加入Advanced DMEM/F12和B27,N2,L-谷氨酰胺,HEPES和青霉素/链霉素。在第13天,用大孔移液管收集球状体并转移到transwell板上,用另外的5 μ L Matrigel覆盖。将Advanced DMEM/F12与B27,N2,L-谷氨酰胺,HEPES和青霉素/链霉素一起加入到底部孔中,每5天更换一次。

[0124] 含有造血细胞的包埋的肝脏类器官培养物:在第7-8天,轻轻地吸移具有所涂细胞的定形内胚层类器官以从培养皿上分层。使用上述“Matrigel点滴法”,“Matrigel夹层法”或“球体生成Transwell方法”中任一方法来制备细胞。加入Advanced DMEM/F12和B27,N2,L-谷氨酰胺,HEPES和青霉素/链霉素,不加视黄酸用于细胞分化的培养物保持在37 $^{\circ}$ C和5% CO₂/95%空气的环境中,每4天更换此培养基。在第13-15天在iPSC培养物中红细胞变得可见。在第7天向培养基中加入血小板生成素(TPO)(10ng/ml)和干细胞因子(SCF)(100ng/ml),增加造血细胞的产生(其可以保持在培养基中,直到收集时)。

[0125] 在肝脏类器官培养物中体外分化为多个造血谱系的分析:在培养第8-18天,通过移液操作,用机械力解离类器官,并用PBS洗涤。然后用0.05%胰蛋白酶-EDTA(LifeTechnologies)来处理细胞以除去Matrigel,并产生单细胞悬浮液。将细胞接种到含有甲基纤维素和细胞因子的平板上,所述细胞因子包括转铁蛋白,干细胞因子(SCF),白细胞介素3(IL-3),白细胞介素6(IL-6),促红细胞生成素(EPO),粒细胞集落刺激因子(G-CSF),粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)(干细胞技术),并在培养箱内部的潮湿室中,并保持37 $^{\circ}$ C和5%CO₂/95%空气的环境中10天,此时观察到包括红细胞系细胞,巨噬细胞和嗜碱细胞的集落。通过Wright-Giemsa染色来识别细胞。

[0126] 参考文献

- [0127] 1. Gomez Perdiguero, E. 等人组织驻留巨噬细胞衍生自卵黄囊衍生的红-骨髓祖细胞 (Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors) 《自然 (Nature)》518, 547-551, doi:10.1038/nature13989 (2015) .
- [0128] 2. Hoeffel, G. 等人 C-Myb (+) 红系-骨髓祖细胞衍生的胎儿单核细胞产生成人组织驻留巨噬细胞 (C-Myb (+) erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages) 《免疫 (Immunity)》42, 665-678, doi:10.1016/j.immuni.2015.03.011 (2015) .
- [0129] 3. Sheng, J., Ruedl, C. & Karjalainen, K. 除小胶质细胞外, 大多数组织驻留巨噬细胞衍生自胎儿造血干细胞 (Most Tissue-Resident Macrophages Except Microglia Are Derived from Fetal Hematopoietic Stem Cells) 《免疫 (Immunity)》43, 382-393, doi:10.1016/j.immuni.2015.07.016 (2015) .
- [0130] 4. De Schepper, S. 等人自我维持的肠巨噬细胞是肠稳态所必需的 (Self-Maintaining Gut Macrophages Are Essential for Intestinal Homeostasis) 《细胞 (Cell)》175, 400-415, doi:10.1016/j.cell.2018.07.048 (2018) .
- [0131] 5. Perdiguero, E. G. & Geissmann, F. 驻留巨噬细胞的发育和维持 (The development and maintenance of resident macrophages) 《天然免疫学 (Nat Immunol)》17, 2-8, doi:10.1038/ni.3341 (2016) .
- [0132] 6. Cumano, A., Dieterlen-Lievre, F. & Godin, I. 在小鼠循环前探查的淋巴样潜能限于尾部胚胎内的胚胎壁 (Lymphoid potential, probed before circulation in mouse, is restricted to caudal intraembryonic splanchnopleura) 《细胞 (Cell)》86, 907-916 (1996) .
- [0133] 7. Wills, A., Dickinson, K., Khokha, M. & Baker, J. C. BMP 信号传导对于爪蟾腹外侧内胚层的特化是必要和充分的 (Bmp signaling is necessary and sufficient for ventrolateral endoderm specification in *Xenopus*) 《发展动态: 美国解剖学家协会的正式出版物 (Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists)》237, 2177-2186, doi:10.1002/dvdy.21631 (2008) .
- [0134] 8. Tiso, N., Filippi, A., Pauls, S., Bortolussi, M. & Argenton, F. BMP 信号传导调节斑马鱼的前后内胚层模式 (BMP signalling regulates anteroposterior endoderm patterning in zebrafish) 《发育机制 (Mech Dev)》118, 29-37 (2002) .
- [0135] 9. Roberts, D. J. 等人音猬因子是在鸡后肠诱导和分区过程中诱导 Bmp-4 和 Hox 基因的内胚层信号 (Sonic Hedgehog Is an Endodermal Signal Inducing Bmp-4 and Hox Genes during Induction and Regionalization of the Chick Hindgut) 《发展 (Development)》121, 3163-3174 (1995) .
- [0136] 10. Munera, J. O. 等人人类多能干细胞通过 BMP 信号的瞬时活化而分化为结肠类器官 (Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Colonic Organoids via Transient Activation of BMP Signaling) 《细胞干细胞 (Cell Stem Cell)》21, 51-64, doi:10.1016/j.stem.2017.05.020 (2017) .
- [0137] 11. Maeno, M. 等人 BMP-4 和 GATA-2 在非洲爪蟾造血中胚层诱导分化中的作用 (The role of BMP-4 and GATA-2 in the induction and differentiation of hematopoietic

mesoderm in *Xenopus laevis*)《血液 (Blood)》88,1965-1972 (1996) .

[0138] 12. Iacovino, M. 等人 HoxA3 是生血内皮的顶端调节剂 (HoxA3 is an apical regulator of haemogenic endothelium)《自然细胞生物学 (Nature cell biology)》13, 72-78 (2011) .

[0139] 13. Sturgeon, C.M., Ditadi, A., Awong, G., Kennedy, M. & Keller, G. Wnt 信号传导控制来自人类多能干细胞的定形原始造血的特化 (Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells)《自然生物技术》32, 554-561 (2014) .

[0140] 14. Choi, K.D. 等人人类多能干细胞分化培养中生血内皮祖细胞及其直接前体的识别 (Identification of the hemogenic endothelial progenitor and its direct precursor in human pluripotent stem cell differentiation cultures)《细胞报告 (Cell Rep)》2, 553-567, doi:10.1016/j.celrep.2012.08.002 (2012) .

[0141] 15. Kennedy, M. 等人 T 淋巴细胞的潜能标志着人类多能干细胞分化培养物中定形造血祖细胞的出现 (T lymphocyte potential marks the emergence of definitive hematopoietic progenitors in human pluripotent stem cell differentiation cultures)《细胞报告 (Cell Rep)》2, 1722-1735, doi:10.1016/j.celrep.2012.11.003 (2012) .

[0142] 16. Bain, C.C. 等人在结肠中的驻留和促炎巨噬细胞代表了相同 Ly6Chi 单核细胞前体的备选环境依赖性命运 (Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors)《黏膜免疫学 (Mucosal Immunol)》6, 498-510, doi:10.1038/mi.2012.89 (2013) .

[0143] 17. Bain, C.C. 等人来自循环单核细胞的持续补充维持了成年小鼠肠中的巨噬细胞库 (Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in the intestine of adult mice)《天然免疫学 (Nat Immunol)》15, 929-937, doi:10.1038/ni.2967 (2014) .

[0144] 18. Bain, C.C. 等人在结肠中的驻留和促炎巨噬细胞代表了相同 Ly6Chi 单核细胞前体的备选环境依赖性命运 (Resident and pro-inflammatory macrophages in the colon represent alternative context-dependent fates of the same Ly6Chi monocyte precursors)《粘膜免疫学 (Mucosal immunology)》6, 498-510 (2013) .

[0145] 19. Takata, K. 等人诱导多能干细胞衍生的原始巨噬细胞为组织驻留巨噬细胞的分化和功能建模提供了平台 (Induced-Pluripotent-Stem-Cell-Derived Primitive Macrophages Provide a Platform for Modeling Tissue-Resident Macrophage Differentiation and Function)《免疫 (Immunity)》47, 183-198. e186 (2017) .

[0146] 20. Uhlen, M. 等人基于抗体蛋白质组学的正常组织和癌组织的人类蛋白质图谱 (A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics)《分子&细胞蛋白质组学: MCP (Molecular&cellular proteomics: MCP)》4, 1920-1932 (2005) .

[0147] 21. Bulmer, J.N. & Johnson, P.M. 人类胎盘和羊膜绒毛膜中的巨噬细胞群

(Macrophage populations in the human placenta and amniochorion)《临床与实验免疫学(Clin Exp Immunol)》57,393-403(1984) .

[0148] 22.Davies,L.C.,Jenkins,S.J.,Allen,J.E.&Taylor,P.R.组织驻留巨噬细胞(Tissue-resident macrophages)《天然免疫学(Nat Immunol)》14,986-995,doi:10.1038/ni.2705(2013) .

[0149] 23.Shaw,T.N.等人肠中的组织驻留巨噬细胞寿命长,并由Tim-4和CD4表达确定(Tissue-resident macrophages in the intestine are long lived and defined by Tim-4and CD4expression)《实验医学杂志(J Exp Med)》215,1507-1518(2018) .

[0150] 24.Bujko,A.等人转录和功能图谱确定了人类小肠巨噬细胞亚群(Transcriptional and functional profiling defines human small intestinal macrophage subsets)《实验医学杂志》215,441-458(2018) .

[0151] 25.Smith,P.D.等人肠巨噬细胞缺乏CD14和CD89,因此下调LPS-和IgA-介导的活性(Intestinal macrophages lack CD14 and CD89 and consequently are down-regulated for LPS-and IgA-mediated activities.)《免疫学杂志(J Immunol)》167,2651-2656(2001) .

[0152] 26.Maheshwari,A.等人TGF-β2抑制正在发育的肠中巨噬细胞细胞因子的产生和粘膜炎症反应(TGF-beta2 suppresses macrophage cytokine production and mucosal inflammatory responses in the developing intestine)《胃肠病学(Gastroenterology)》140,242-253(2011) .

[0153] 27.Man,A.L.等人CX3CR1+细胞介导的沙门氏菌排斥在感染初期保护肠粘膜(CX3CR1+Cell-Mediated Salmonella Exclusion Protects the Intestinal Mucosa during the Initial Stage of Infection)《免疫学杂志》198,335-343,doi:10.4049/jimmunol.1502559(2017) .

[0154] 28.Martin,M.J.,Muotri,A.,Gage,F.&Varki,A.人类胚胎干细胞表达免疫原性非人唾液酸(Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid)《自然·医学(Nat Med)》11,228-232,doi:10.1038/nm1181(2005) .

[0155] 29.Lanctot,P.M.,Gage,F.H.&Varki,A.P.干细胞的聚糖(The glycans of stem cells)《化学生物学新见(Curr Opin Chem Biol)》11,373-380,doi:10.1016/j.cbpa.2007.05.032(2007) .

[0156] 30.Glocker,E.-O.等人炎症肠病和影响白细胞介素-10受体的突变(Inflammatory bowel disease and mutations affecting the interleukin-10receptor)《新英格兰医学杂志(N Engl J Med)》361,2033-2045(2009) .

[0157] 31.Tugizov,S.M.等人HIV通过胎儿口腔/肠上皮和成人口腔上皮的差异传播(Differential transmission of HIV traversing fetal oral/intestinal epithelia and adult oral epithelia)《病毒学杂志(J Virol)》86,2556-2570,doi:10.1128/JVI.06578-11(2012) .

[0158] 32.Campbell,E.L.等人迁移的嗜中性粒细胞通过局部氧消耗形成粘膜微环境以影响炎症的消退(Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation)

《免疫 (Immunity)》40,66-77,doi:10.1016/j.immuni.2013.11.020 (2014) .

[0159] 除非另有说明,所有百分比和比率均按重量计算。

[0160] 除非另有说明,所有百分比和比率均基于全量组成计算。

[0161] 应当理解,在整个说明书中给出的每个最大数值限度包括每个较低的数值限度,如同此类较低的数值限度在本文中明确地写出一样。在整个说明书中给出的每个最小数值限度将包括每个更高的数值限度,如同此类更高的数值限度在本文中明确地写出一样。在整个说明书中给出的每个数值范围将包括落入此类更宽的数值范围内的每个更窄的数值范围,如同此类更窄的数值范围在本文中明确地写出一样。

[0162] 本文所公开的尺寸和数值不应被理解为严格限于所述的精确数值。相反,除非另外指明,每个此类尺寸旨在表示所述值和围绕该值的功能上等同的范围。例如,公开为“20mm”的尺寸旨在表示“约20mm”。

[0163] 本文引用的每篇文献,包括任何交叉引用的或相关的专利或申请,在此全文引入作为参考,除非明确排除或另外限制。任何文献的引用并不是承认其是相对于本文公开或要求保护的发明的现有技术,或者其单独或与任何其它参考文献的任何组合,教导、建议或公开任何此类发明。此外,当本文中术语的任何含义或定义与引入作为参考的文献中相同术语的任何含义或定义冲突时,将以赋予本文中术语的含义或定义为准。

[0164] 虽然已经说明和描述了本发明的特定实施例,但是对于本领域的技术人员显而易见的是,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,可以进行各种其它改变和修改。因此,希望在所附权利要求书中涵盖属于本发明范围内的所有此类变化和修改。

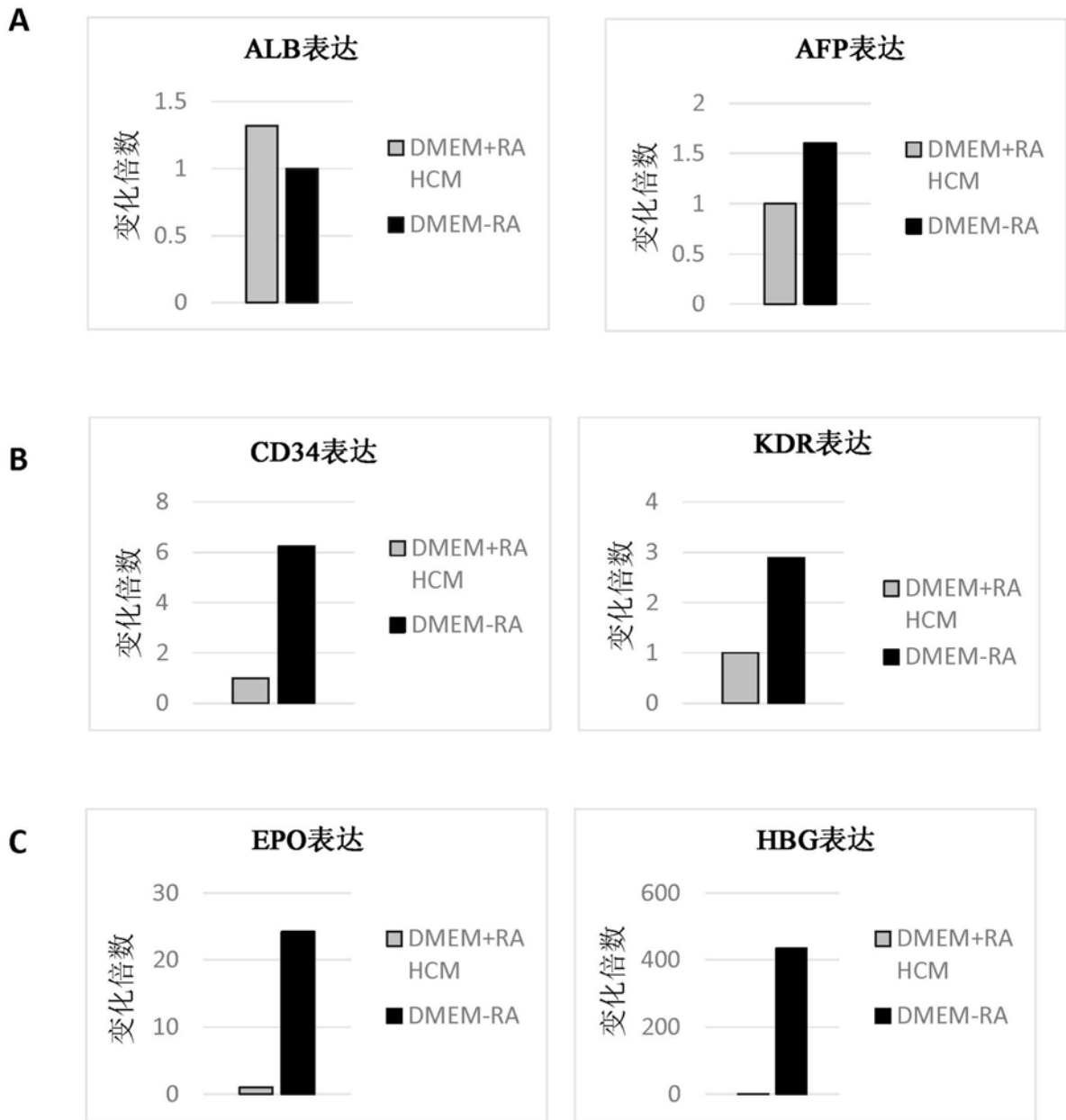
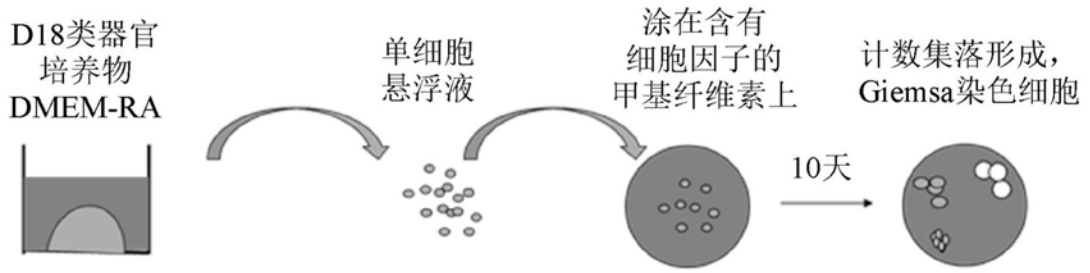


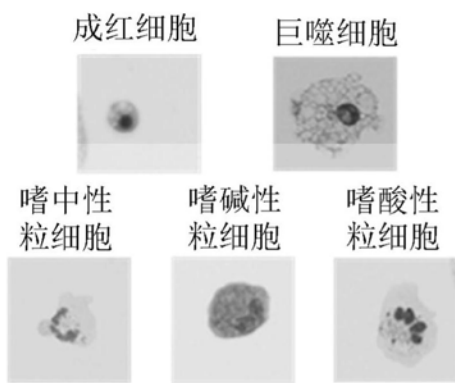
图1

A



B

Giemsa染色



C

CFC分析

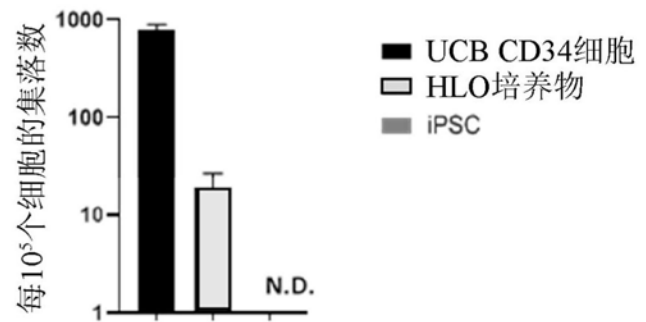
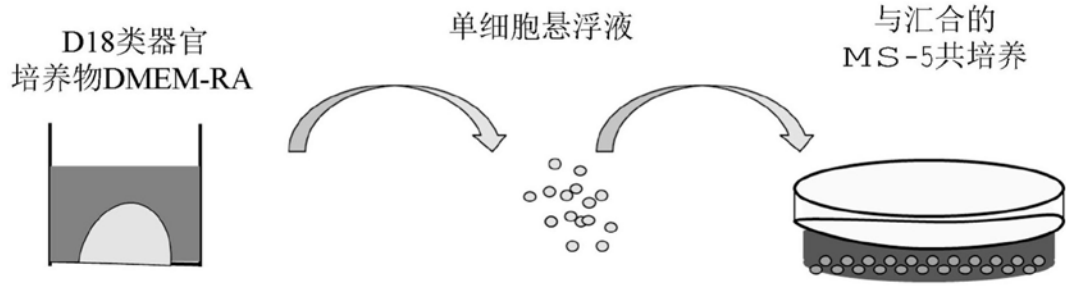


图2

A



B

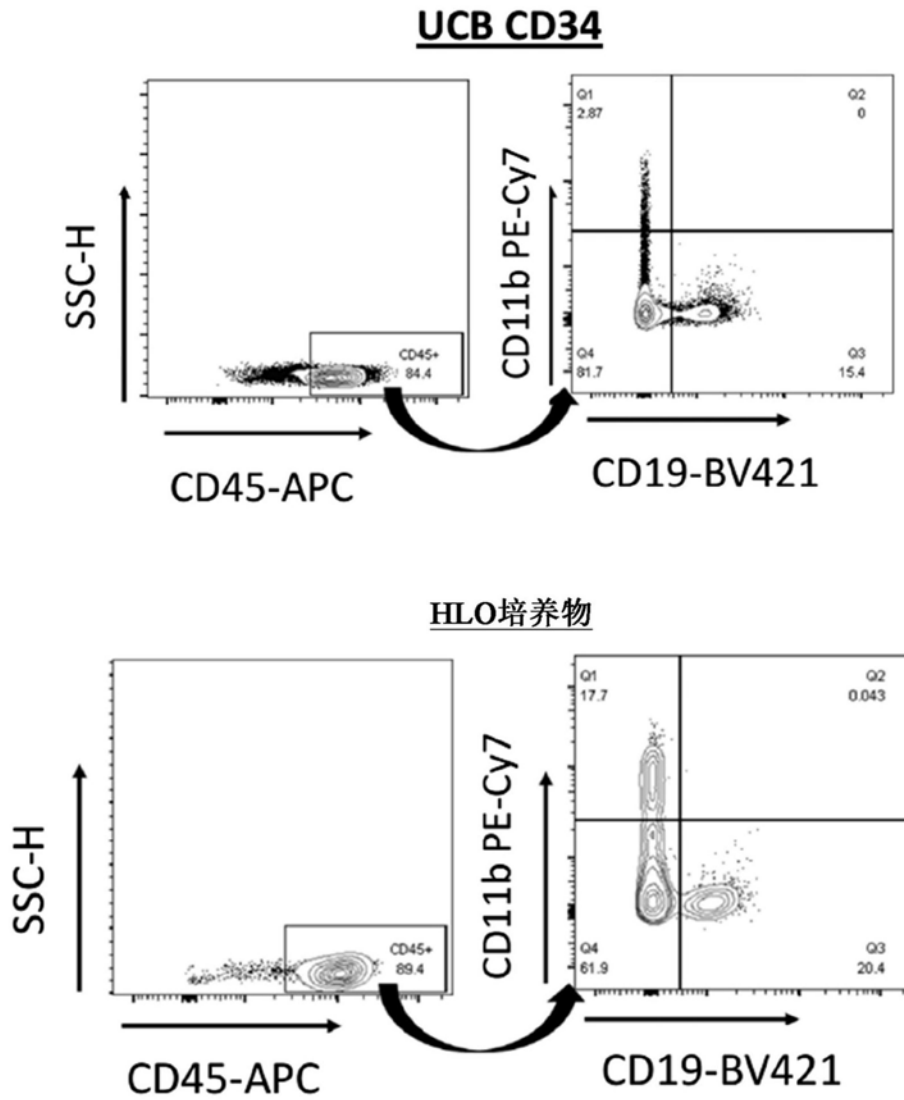


图3

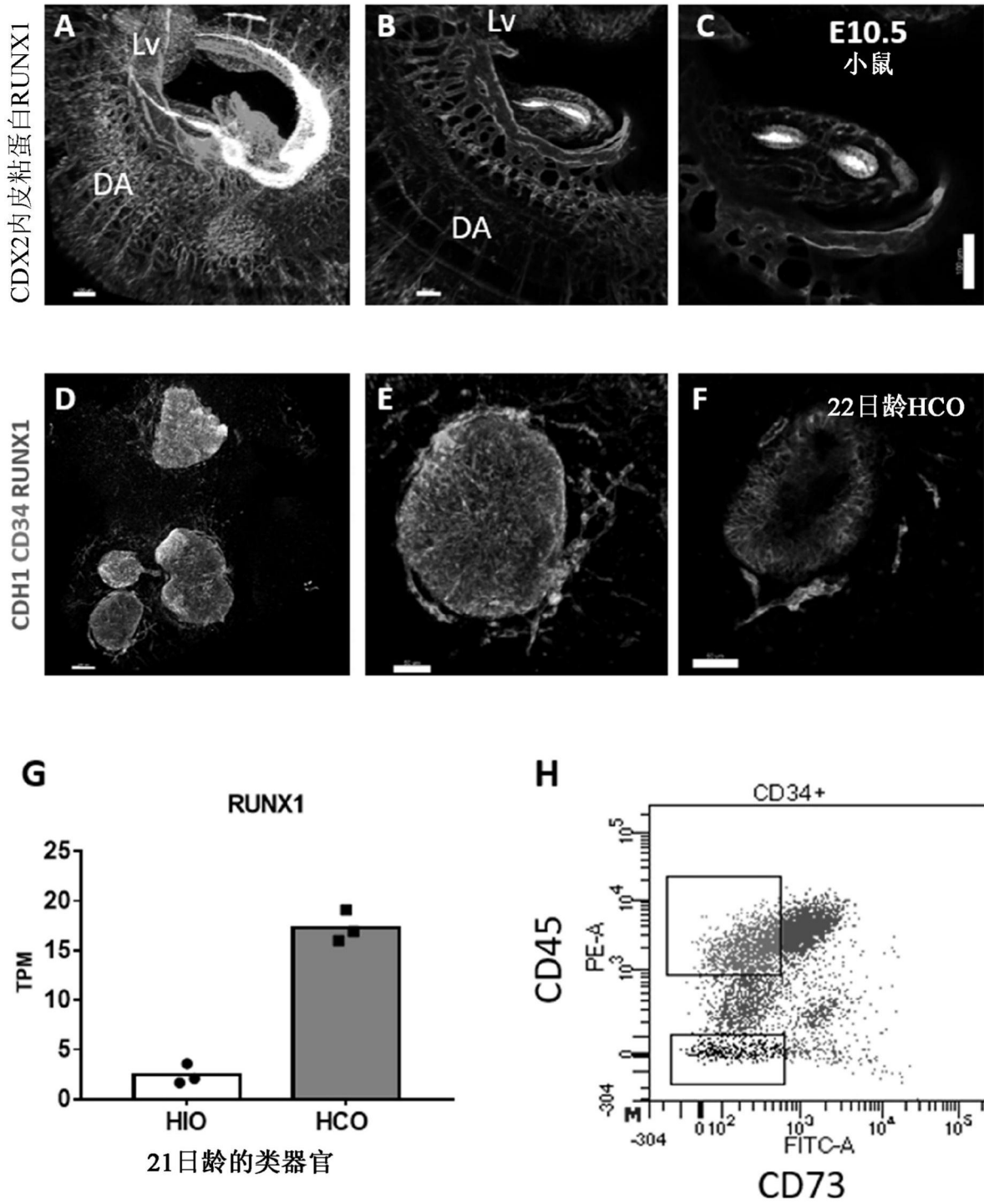
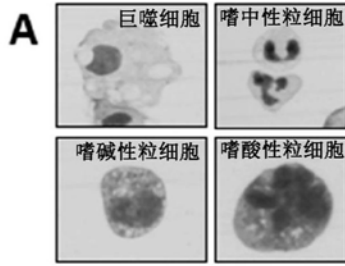


图4

细胞离心涂片 (Cytospins)



B Methocult

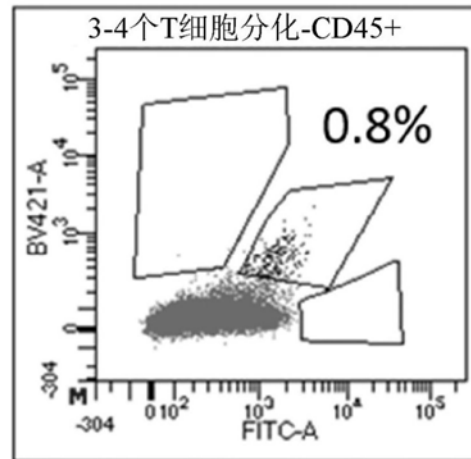
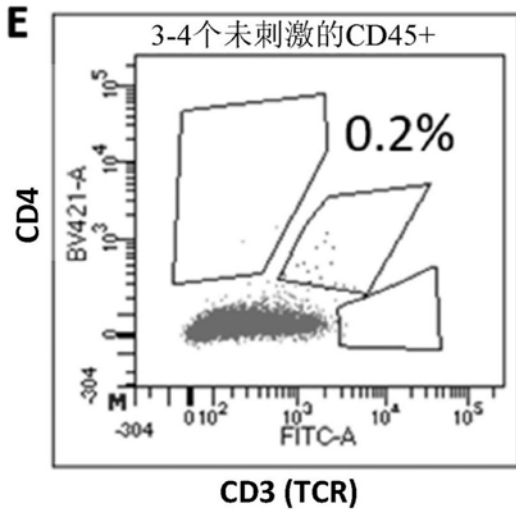
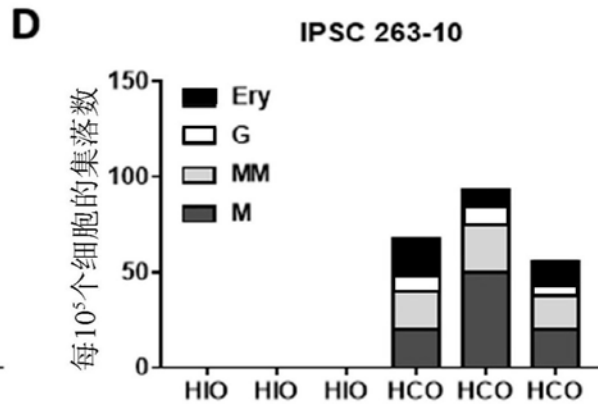
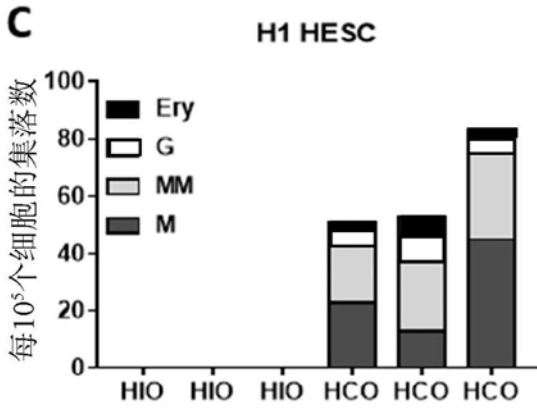
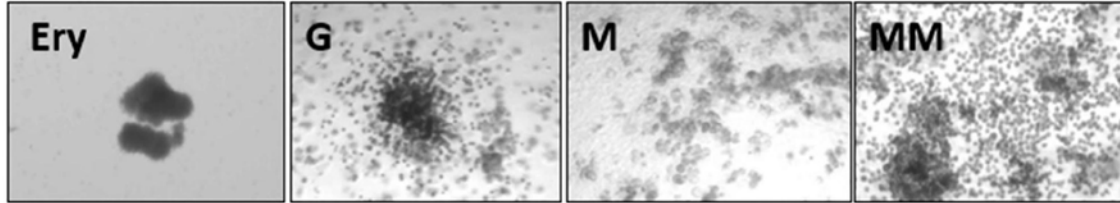


图5

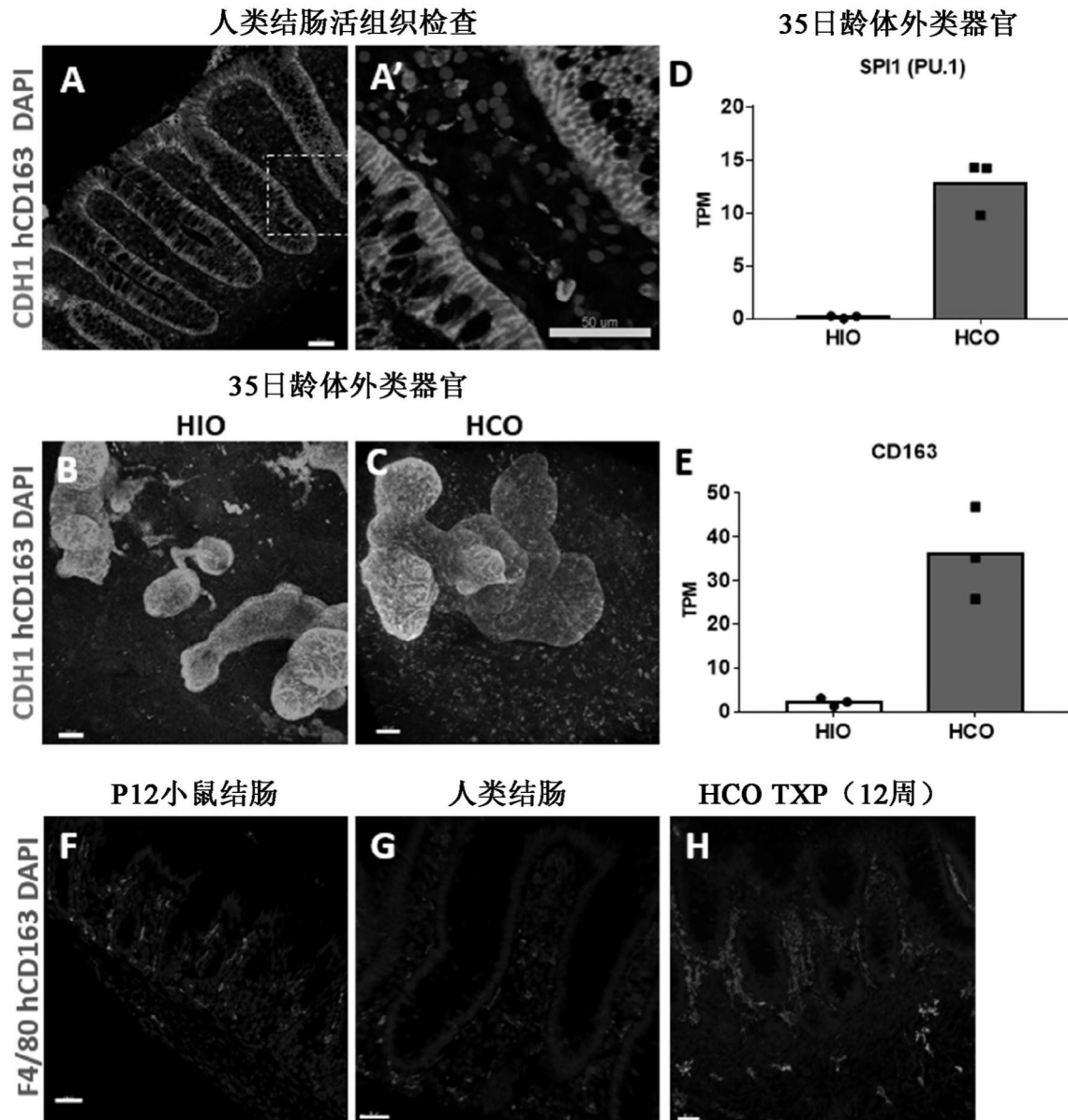


图6

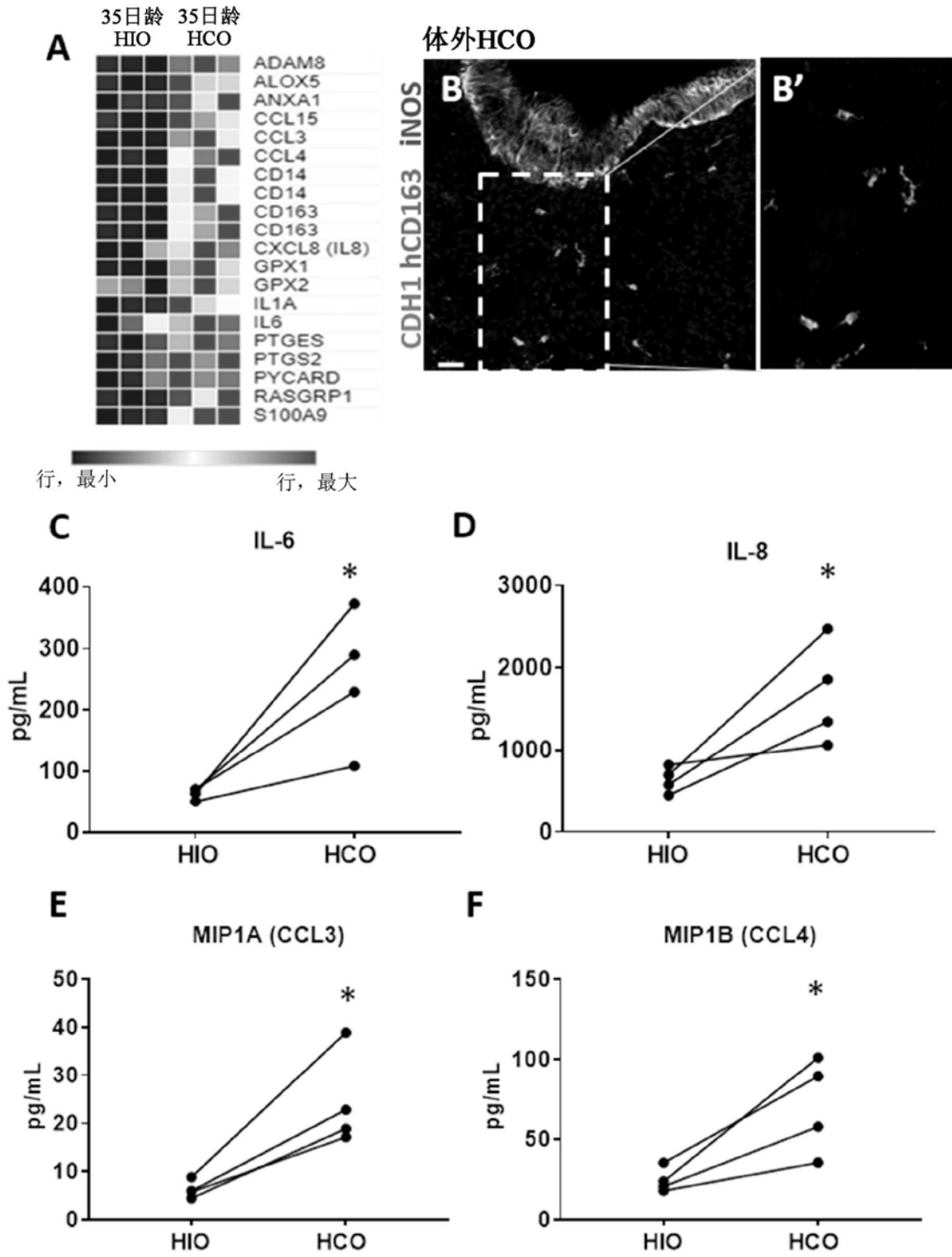


图7

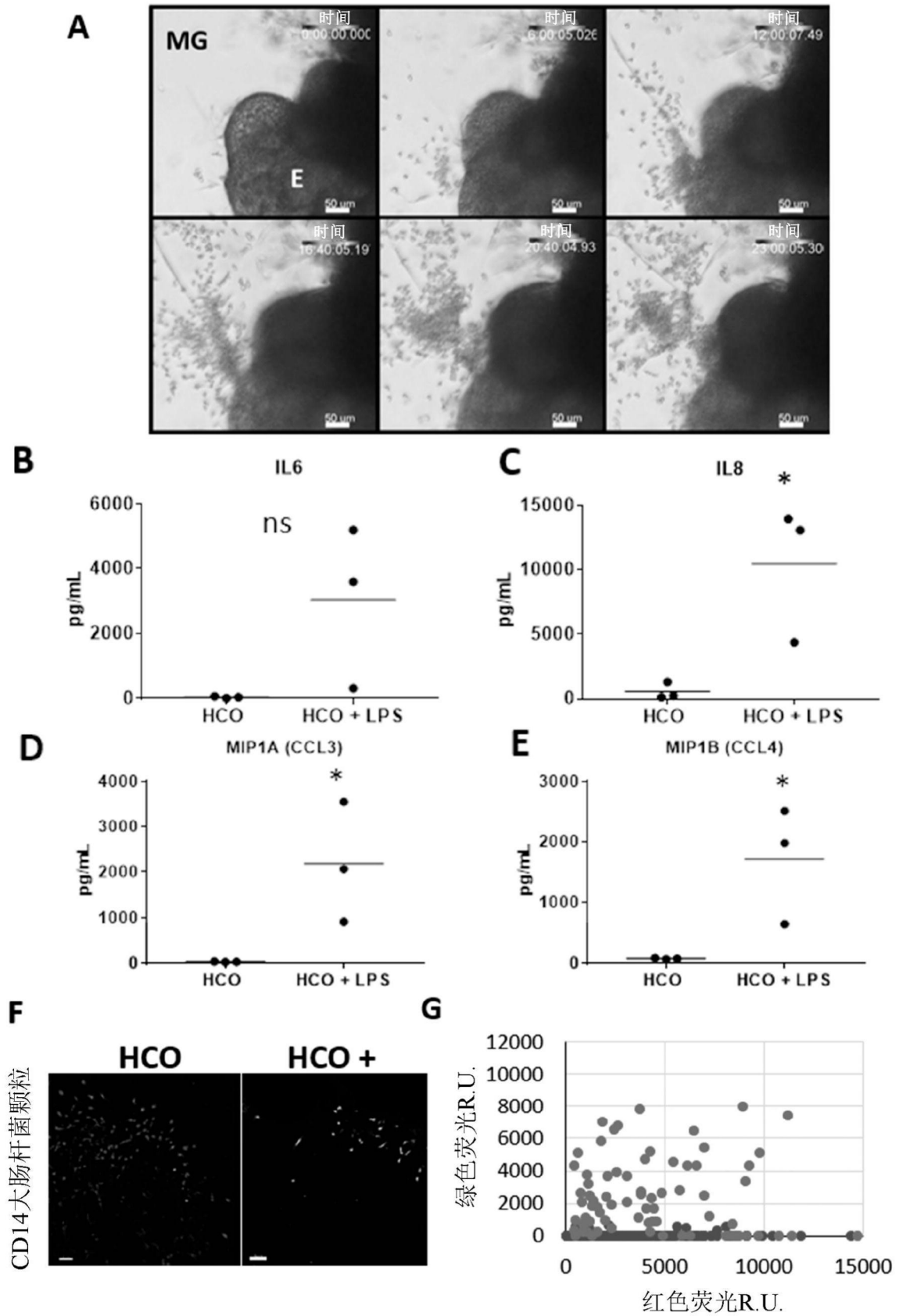


图8

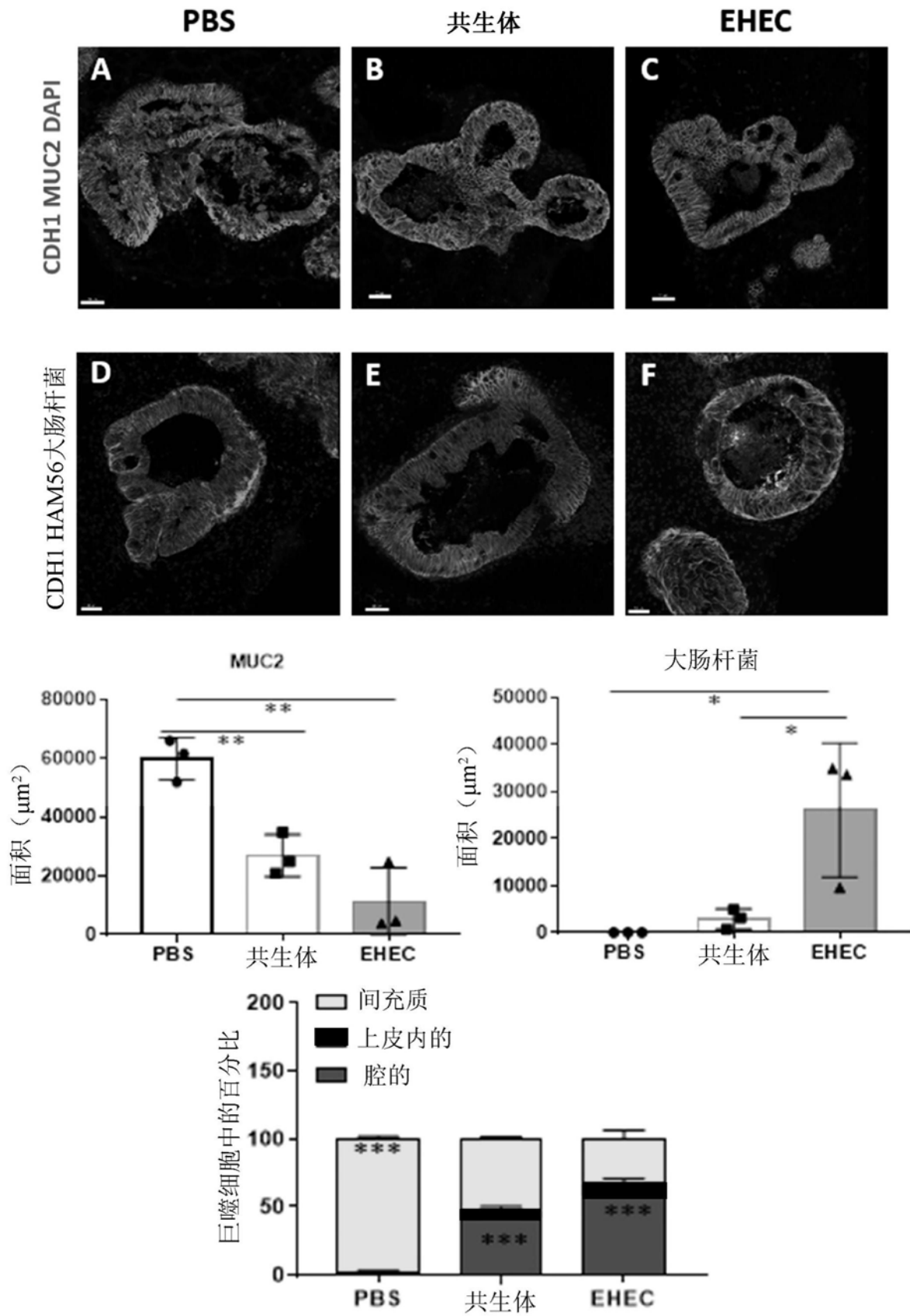


图9

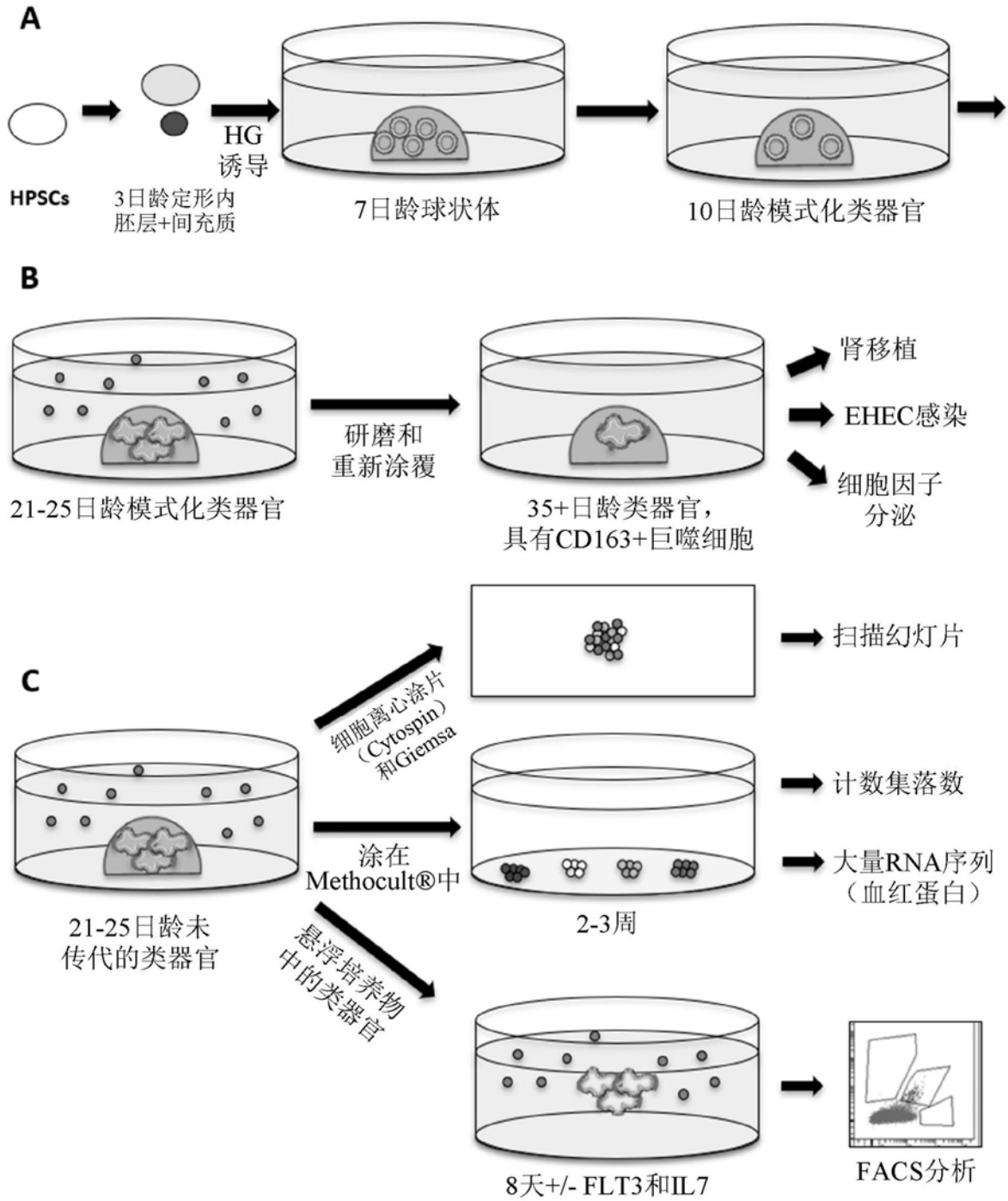


图10

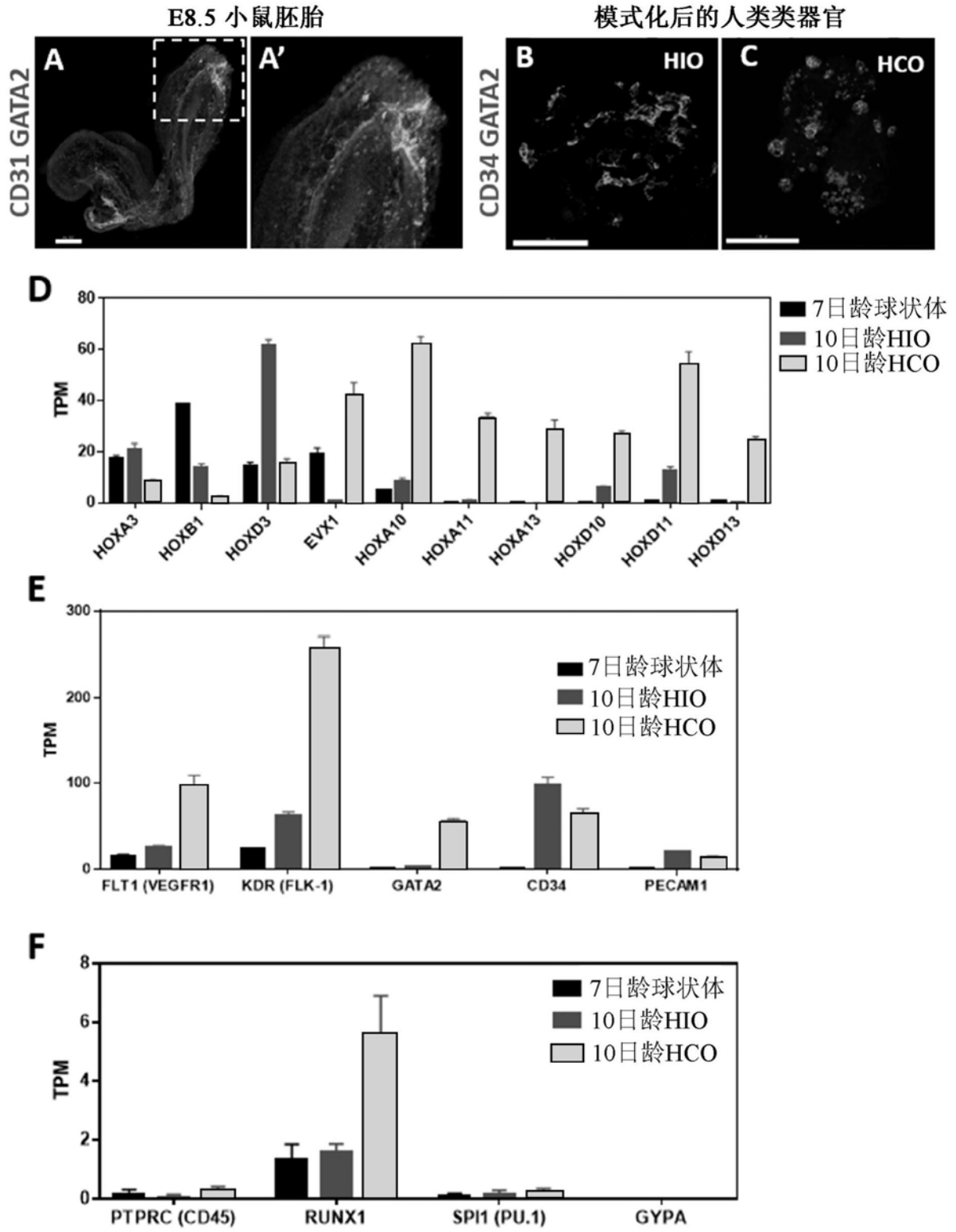


图11

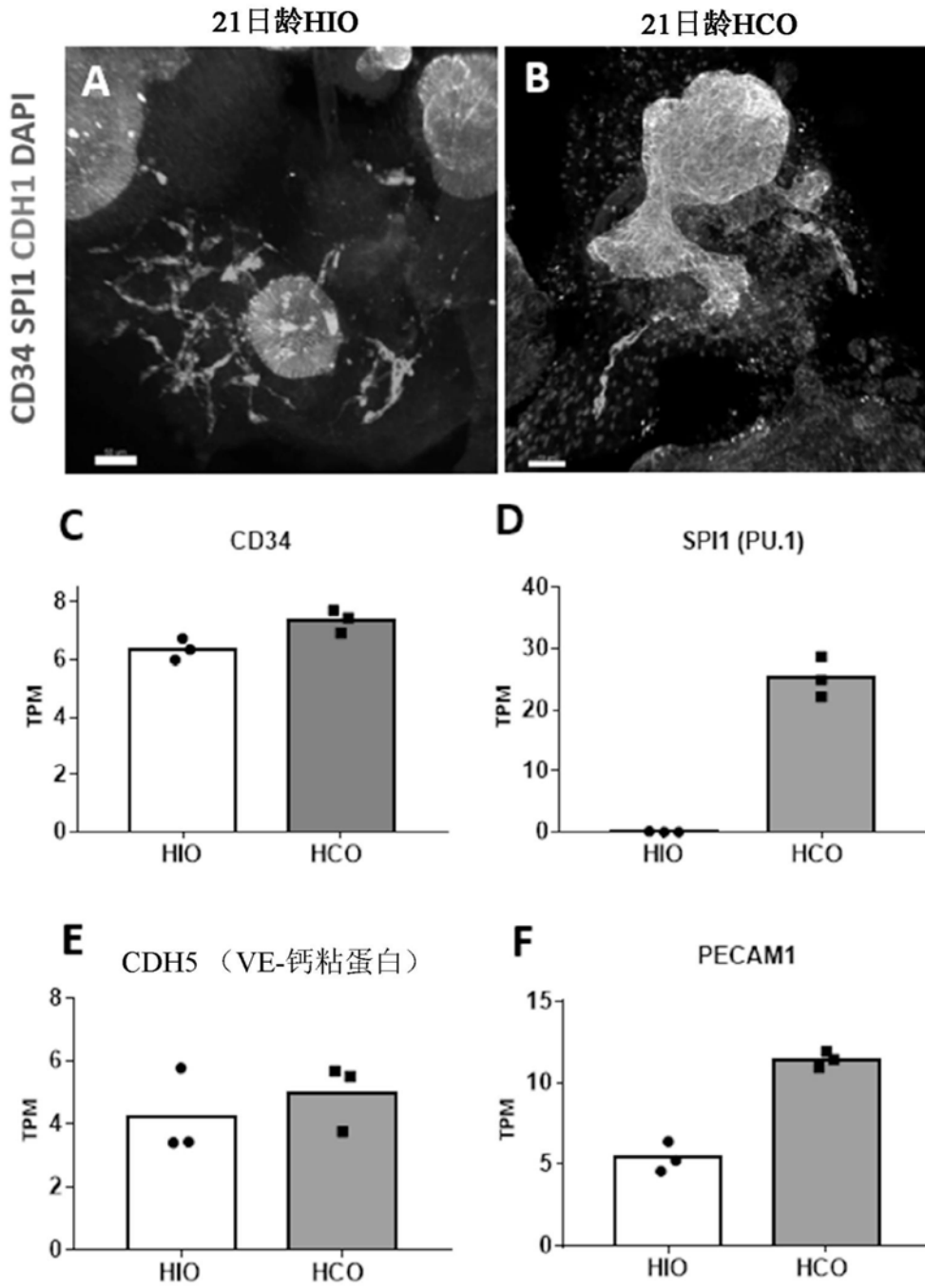


图12

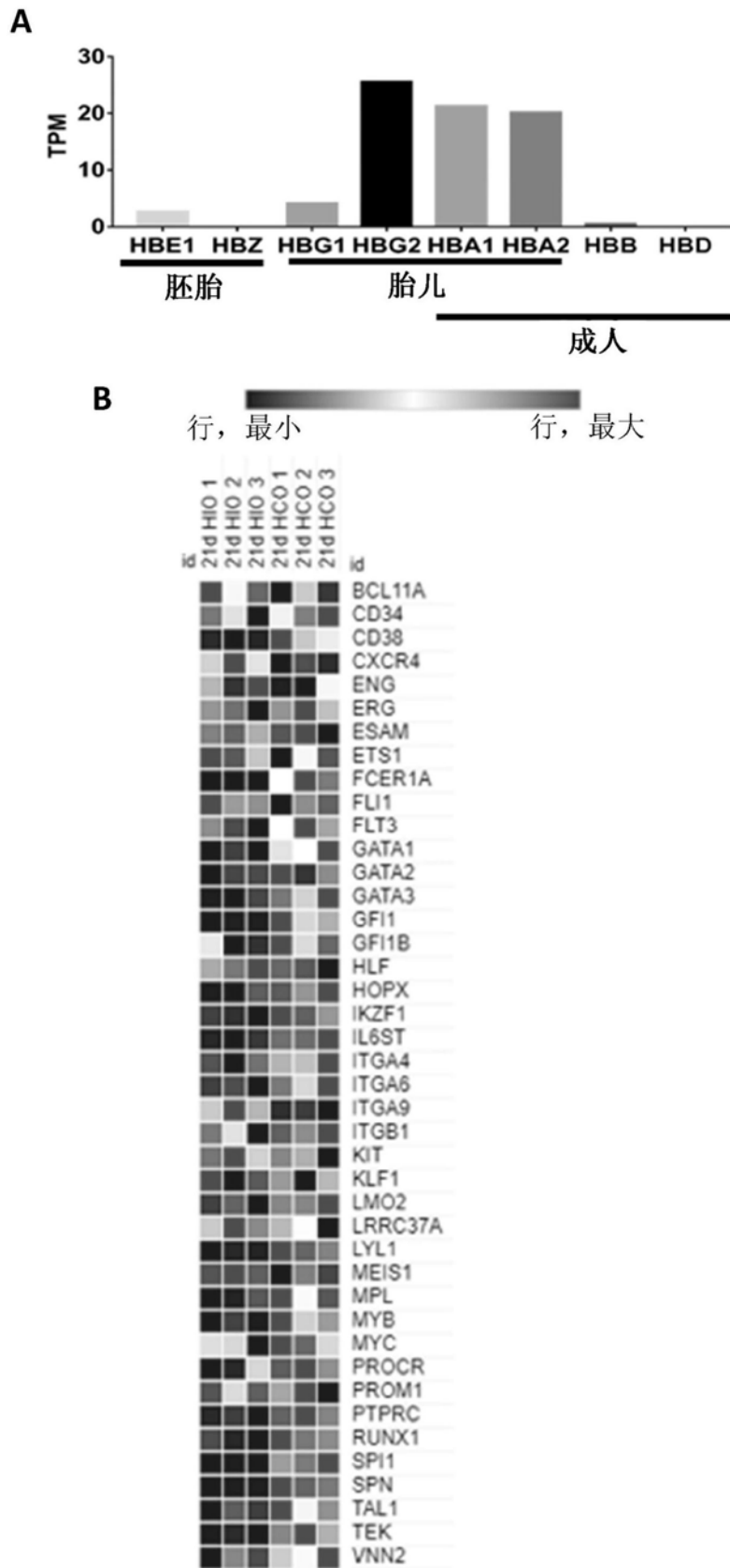


图13

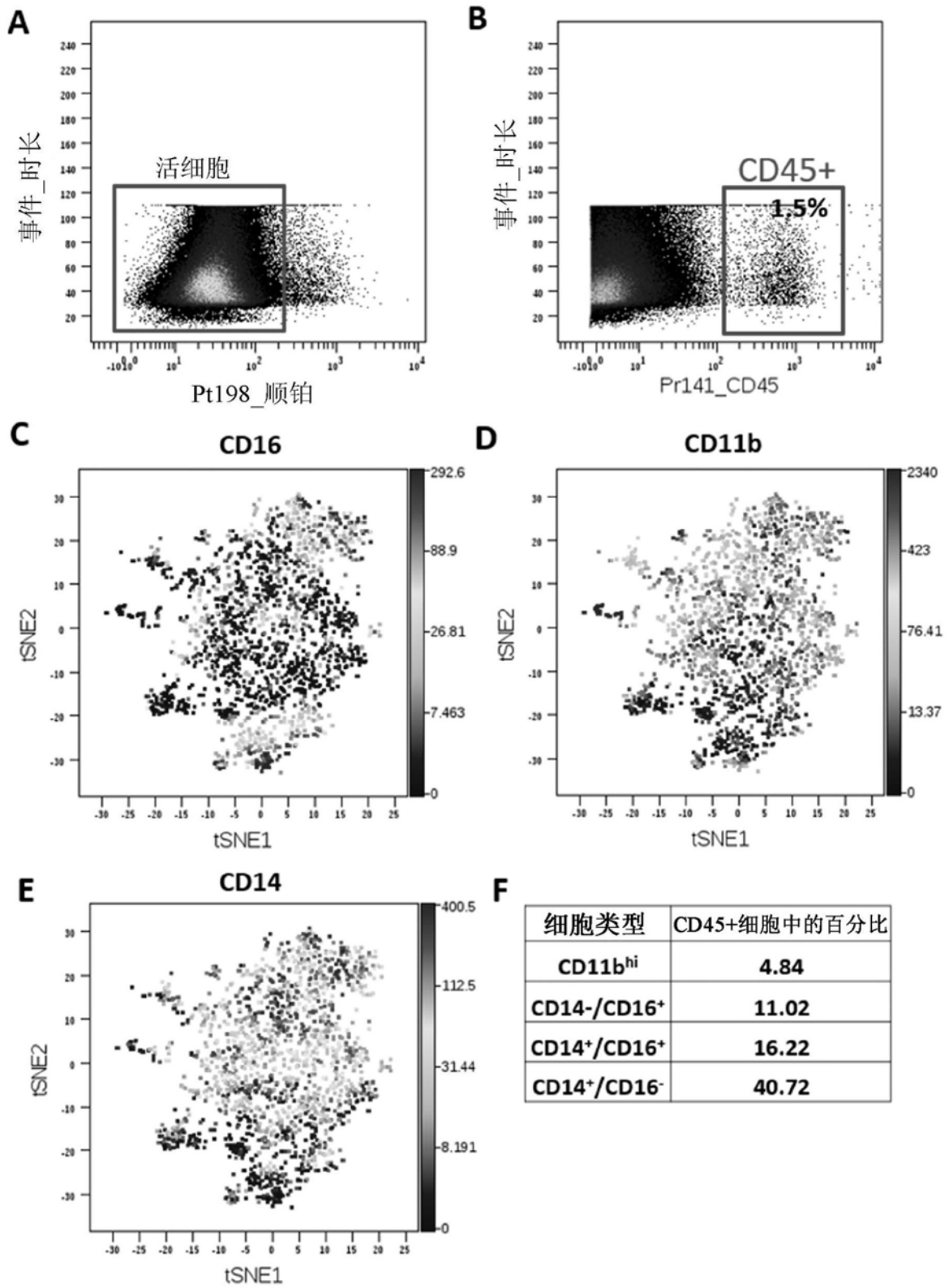


图14

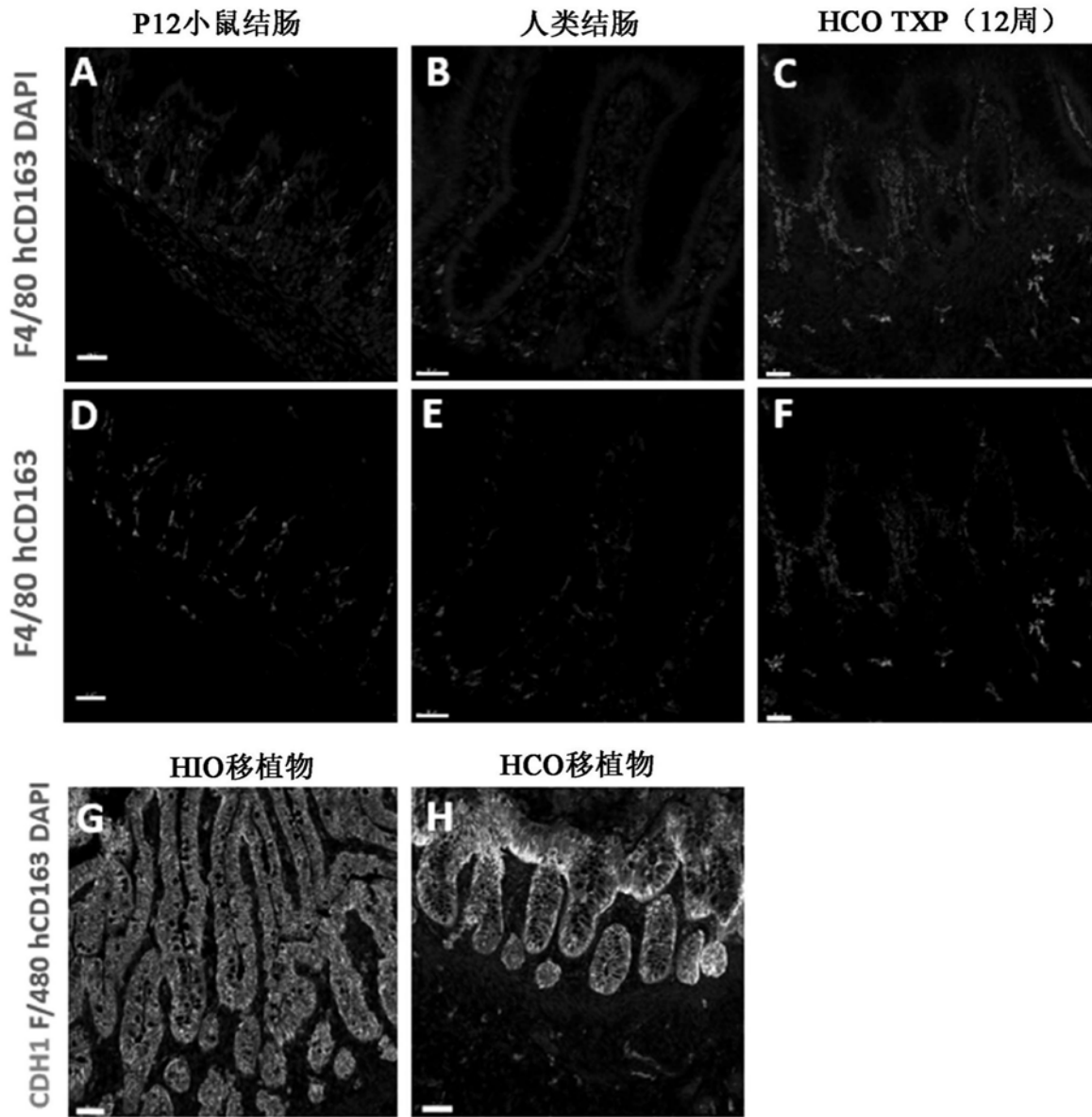


图15

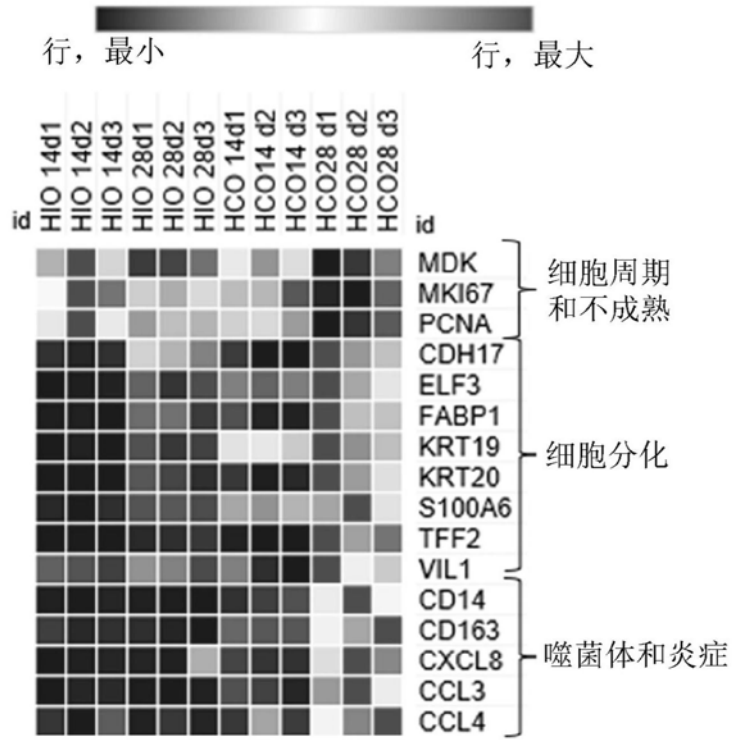


图16

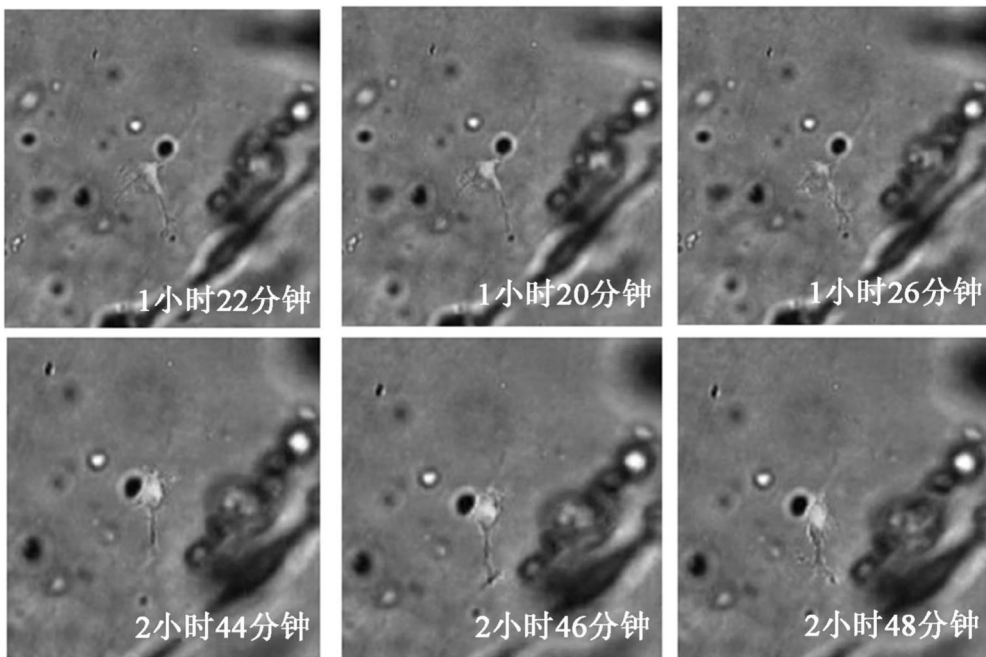


图17

人类蛋白质图谱信息	
RNA组织类别 ¹	HPA: 混合 GTEx: 组织增强 (脾脏) FANTOM5: 全部表达
蛋白质证据 ¹	蛋白质水平的证据
蛋白质表达 ¹	在所有组织的免疫细胞中的选择性细胞质表达，包括Hofbauer细胞和Kupffer细胞以及肺泡巨噬细胞。

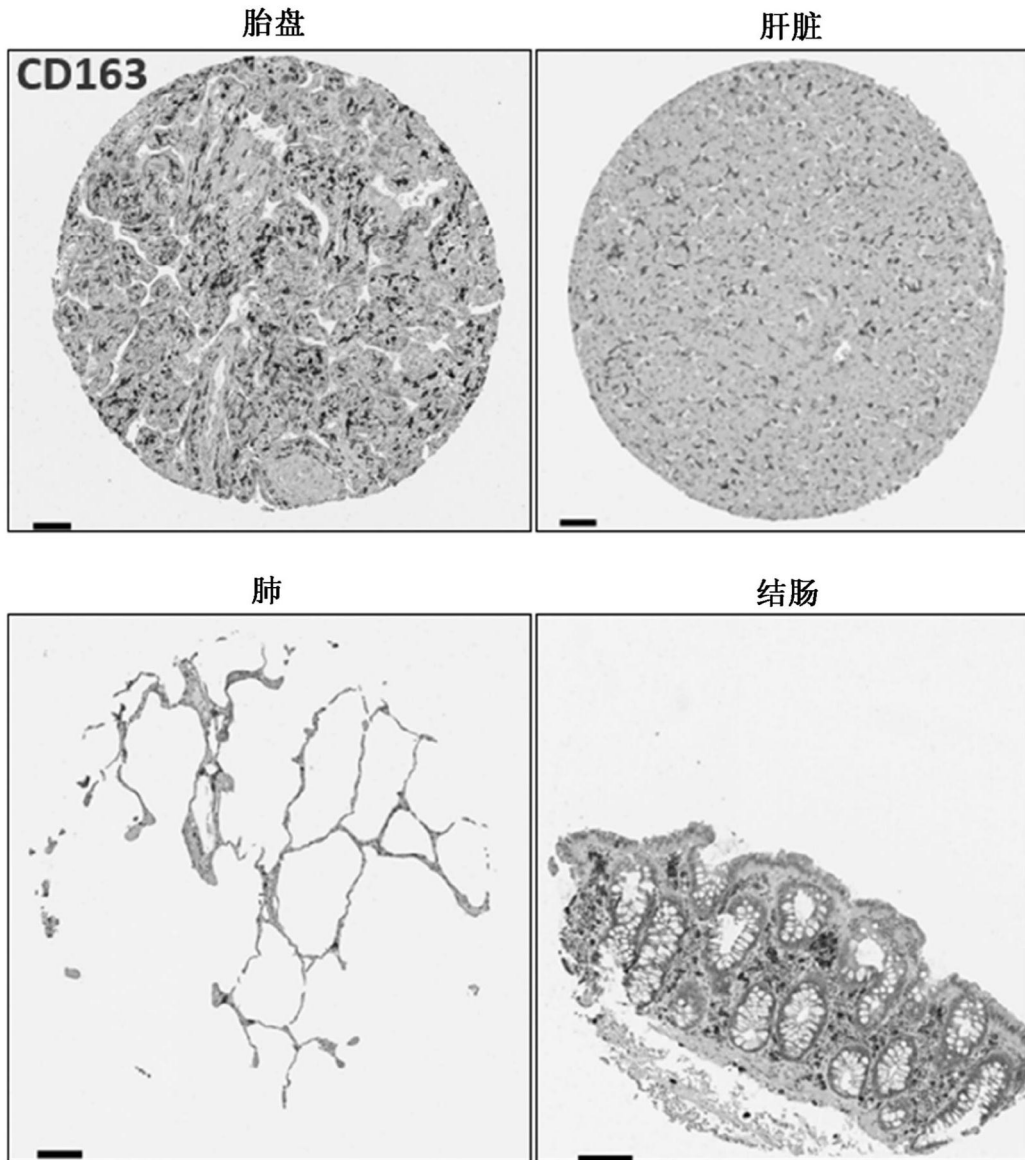


图18