(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119384510 A
(43)申请公布日 2025.01.28

(21)申请号 202380046543.4
(22)申请日 2023.04.18
(30)优先权数据
10-2022-0049115 2022.04.20 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.12.11
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2023/005222 2023.04.18
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/204567 KO 2023.10.26
(71)申请人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔
(72)发明人 洪性会 南宫容
(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270
专利代理师 张铮铮 李雪
(51)Int.Cl.
C12N 15/86(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
C12N 5/0797(2010.01)
C12N 5/077(2010.01)
A61K 35/30(2015.01)
A61P 25/28(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 25/14(2006.01)
A61P 25/16(2006.01)
A61P 25/08(2006.01)

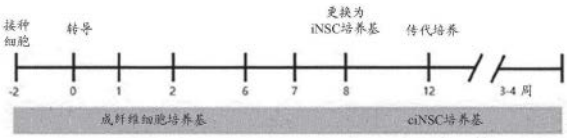
权利要求书1页 说明书12页 附图21页

(54)发明名称

将人类体细胞转化为可增殖的神经干细胞的方法

(57)摘要

本发明涉及一种将人成纤维细胞转化为神经干细胞的方法,更详细地,涉及利用仙台病毒(Sendai virus)、干细胞相关因子的mRNA或miRNA与小分子化合物的组合通过直接转分化将人成纤维细胞转化为神经干细胞的方法及其用途。根据本发明,可以通过直接转分化在短时间内由人成纤维细胞诱导高质量的神经干细胞,因此可以获得足够量的细胞用于细胞治疗,并且没有形成肿瘤的副作用,因此可以用作针对脑部疾病的细胞治疗剂。



CN 119384510 A

1.一种用于诱导成纤维细胞直接转化为神经干细胞的直接转分化诱导组合物,其特征在于,包含选自由Thiazovivin、丙戊酸、嘌吗啡胺、A8301、SB43154、CHIR99021、5-氮杂-2'-脱氧胞苷及DZNep组成的组中的一种以上小分子化合物以及仙台病毒。

2.根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,上述组合物还包含用于细胞培养的培养基。

3.根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,上述仙台病毒包含山中因子。

4.根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,上述成纤维细胞来源于人类。

5.根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,上述神经干细胞分化为选自由星形胶质细胞、少突胶质细胞、神经元、多巴胺能神经元、γ-氨基丁酸能神经元、运动神经元及胆碱能神经元组成的组中的一种以上。

6.一种神经干细胞的制备方法,其特征在于,包括在包含选自由Thiazovivin、丙戊酸、嘌吗啡胺、A8301、SB43154、CHIR99021、5-氮杂-2'-脱氧胞苷及DZNep组成的组中的一种以上小分子化合物以及仙台病毒的培养基中培养人成纤维细胞的步骤。

7.根据权利要求6所述的神经干细胞的制备方法,其特征在于,上述仙台病毒包含山中因子。

8.根据权利要求6所述的神经干细胞的制备方法,其特征在于,上述培养基为包含N2、B27、碱性成纤维细胞生长因子及表皮生长因子的DMEM/F12。

9.根据权利要求6所述的神经干细胞的制备方法,其特征在于,上述培养进行10天至20天。

10.根据权利要求6所述的神经干细胞的制备方法,其特征在于,上述神经干细胞分化为选自由星形胶质细胞、少突胶质细胞、神经元、多巴胺能神经元、γ-氨基丁酸能神经元、运动神经元及胆碱能神经元组成的组中的一种以上。

11.一种细胞治疗剂,其特征在于,包含根据权利要求1至5中任一项所述的培养液组合物;或通过根据权利要求6至10中任一项所述的制备方法制备的神经干细胞。

12.一种用于治疗脑部疾病的药物组合物,其特征在于,包含根据权利要求11所述的细胞治疗剂。

13.根据权利要求12所述的药物组合物,其特征在于,上述脑部疾病选自由脑卒中、中风、脑出血、脑梗塞、阿尔茨海默病、痴呆、亨廷顿病、帕金森病、多发性硬化、多系统神经萎缩、癫痫、皮克氏病及克雅病组成的组中。

将人类体细胞转化为可增殖的神经干细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种将人成纤维细胞转化为神经干细胞的方法,更详细地,涉及分别利用仙台病毒(Sendai virus)或mRNA或miRNA与小分子化合物的组合通过直接转分化将人成纤维细胞转化为神经干细胞的方法及其用途。

背景技术

[0002] 自从在2007年进行将人成纤维细胞诱导为诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell)的研究,开始对细胞的重编程(reprogramming)进行研究。以往干细胞研究中使用的人胚胎干细胞来源神经干细胞存在可能因使用人类的胚胎而引起的伦理问题、免疫排斥反应以及移植未分化的胚胎干细胞时形成肿瘤等问题,成体干细胞存在难以获得细胞且其分化能力受限的问题。然而,虽然诱导性多能干细胞避免了伦理问题,也没有免疫排斥反应问题,但当移植未分化的干细胞时可能存在形成畸胎瘤的问题。并且,近期发表的直接转分化的神经干细胞与诱导性多能干细胞及胚胎干细胞来源神经干细胞具有相似的性质,但作为主要用于形成神经干细胞的方法的病毒系统由于基因的随机插入而可能形成突变,当移植到人体内时使用质粒、蛋白质、RNA等来解决由病毒引起的问题,但当使用它们时,由于分化为神经干细胞的分化效率低并利用癌症基因,因此可能产生未确认的新问题。

[0003] 作为解决这种诱导性多能干细胞的问题的方案,已报道利用直接转分化方法将人成纤维细胞直接转化(direct conversion)为所需细胞的研究。其中,以治疗顽固性脑部疾病为目的,积极进行利用成纤维细胞直接分化为神经细胞的研究,并且通过将各种组合的神经细胞相关转录因子引入人类的成纤维细胞中,使得形成神经细胞的研究取得成功。这表明可以用作顽固性脑部疾病的细胞治疗剂,但由于神经细胞为已经分化的细胞,因此难以获得足够量的细胞用于细胞治疗。

[0004] 由于如上所述的问题,最近正在研究利用成纤维细胞直接分化为神经干细胞的方法。例如,包括通过利用病毒系统引入各种转录因子来由成纤维细胞诱导神经干细胞的方法等。在本发明人先前的发明“利用小分子化合物将人成纤维细胞直接转化为神经干细胞的方法(PCT/KR2016/003819)”中提出利用8种小分子化合物诱导成纤维细胞直接分化为神经干细胞的过程(直接转分化)的方法,对于如上所述的直接转分化,进一步需要研究可以通过进一步缩短分化周期并提高效率性来增殖足够量的神经干细胞以用作治疗剂的方法。

发明内容

[0005] 技术问题

[0006] 因此,本发明人在研究制备缩短直接转分化周期且高效率、高质量的神经干细胞的方法的过程中,通过利用未插入外源基因的仙台病毒、mRNA或miRNA中的一种以上;以及小分子化合物来诱导可以增殖移植所需的足够量的细胞,并具有遗传稳定性(基因组DNA稳定性(genomic DNA stability))而不形成肿瘤的神经干细胞,从而完成了本发明。

[0007] 因此,本发明的目的在于,提供一种用于诱导成纤维细胞直接转化为神经干细胞的直接转分化诱导组合物,其包含选自由Thiazovivin、丙戊酸(Valproic acid)、嘌吗啡胺(Purmorphamine)、A8301、SB43154、CHIR99021、5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine)及DZNep组成的组中的一种以上小分子化合物以及仙台病毒、mRNA或miRNA中的一种以上。

[0008] 本发明的再一目的在于,提供一种神经干细胞的制备方法,上述方法包括在包含选自由Thiazovivin、丙戊酸(Valproic acid)、嘌吗啡胺(Purmorphamine)、A8301、SB43154、CHIR99021、5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine)及DZNep组成的组中的一种以上小分子化合物以及仙台病毒、mRNA或miRNA中的一种以上的培养液中培养体细胞的步骤。

[0009] 本发明的另一目的在于,提供一种用于治疗脑部疾病的细胞治疗剂,其包含通过上述制备方法制备的神经干细胞。

[0010] 技术方案

[0011] 为了实现如上所述的目的,本发明提供一种用于诱导成纤维细胞直接转化为神经干细胞的直接转分化诱导组合物,其包含选自由Thiazovivin、丙戊酸(Valproic acid)、嘌吗啡胺(Purmorphamine)、A8301、SB43154、CHIR99021、5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine)及DZNep组成的组中的一种以上小分子化合物以及仙台病毒、mRNA或miRNA中的一种以上。

[0012] 为了实现本发明的再一目的,本发明提供一种神经干细胞的制备方法,上述方法包括在包含选自由Thiazovivin、丙戊酸(Valproic acid)、嘌吗啡胺(Purmorphamine)、A8301、SB43154、CHIR99021、5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine)及DZNep组成的组中的一种以上小分子化合物以及仙台病毒、mRNA或miRNA中的一种以上的培养液中培养人成纤维细胞的步骤。

[0013] 为了实现本发明的另一目的,本发明提供一种用于治疗脑部疾病的细胞治疗剂,其包含通过上述制备方法制备的神经干细胞。

[0014] 以下,将详细说明本发明。

[0015] 本发明为利用仙台病毒、mRNA或miRNA及最佳的小分子化合物组合从成纤维细胞制备神经干细胞的方法,以由人成纤维细胞诱导神经干细胞。

[0016] 为了在没有额外的基因引入过程的情况下将成纤维细胞分化为神经干细胞,本发明选择直接转分化方法,为此,使用组合用于分化的小分子化合物的培养液,并且可以通过进一步使用仙台病毒、mRNA或miRNA来缩短分化周期并提高效率性,以提高转分化效率。如本发明所述,可以通过利用小分子物质及仙台病毒、mRNA或miRNA的转分化来克服使用胚胎干细胞时出现的各种问题,并且可以通过减少使用诱导性多能干细胞的细胞治疗剂的副作用(肿瘤形成等)来用作安全性得到提高的细胞治疗剂。

[0017] 在本发明中,"神经干细胞"为具有自我复制能力并具有分化为如星形胶质细胞(astrocyte)、少突胶质细胞(oligodendrocyte)和/或施万细胞(Schwann cell)等神经元(neuron)和/或神经胶质(glia)的多能性的未分化细胞。神经干细胞通过产生特定神经系统细胞的神经祖细胞或神经胶质祖细胞的阶段分化为神经细胞(neural cell),例如神经元或神经胶质等。上述神经干细胞的特征可以为分化为选自由星形胶质细胞(astrocyte)、

少突胶质细胞(oligodendrocyte)、神经元(neuron)、多巴胺能神经元、γ-氨基丁酸能神经元、运动神经元及胆碱能神经元组成的组中的一种以上,但不限于此。

[0018] “直接转分化”为细胞重编程技术之一,是指直接对已经成熟的分化细胞直接重编程,使其恢复为干细胞的技术。本发明涉及一种可以通过直接转分化对作为人类体细胞的成纤维细胞进行重编程来将其直接分化为神经干细胞的技术,尤其,由于它直接分化为神经细胞而不经过去分化为诱导性多能干细胞的过程,因此可以克服诱导性多能干细胞的分化过程中出现的许多缺点并提高细胞分化效率。

[0019] 作为本发明一实施方式,本发明涉及一种神经干细胞的制备方法,以对人成纤维细胞进行重编程并通过直接转分化将其分化为神经干细胞,上述方法包括在包含Thiazovivin、丙戊酸(Valproic acid)、嘌吗啡胺(Purmorphamine)、A8301、SB43154、CHIR99021、5-氮杂-2’-脱氧胞苷(5-Aza-2’-deoxycytidine)及DZNep中的一种以上小分子化合物以及仙台病毒、mRNA或miRNA中的一种以上的培养基中培养人成纤维细胞的步骤。

[0020] 在本发明中,已知“Thiazovivin”阻断诱导神经细胞及神经干细胞的细胞凋亡的Rho/ROCK信号并阻断抑制神经干细胞的增殖的PTEN信号,因此预计可以抑制神经干细胞的细胞凋亡,并且可以增加自我再生能力及自我增殖能力(Matthias Groszer,et al.,Science 294:2186,2001)。上述Thiazovivin为ROCK抑制剂(Rho相关激酶抑制剂(inhibitor of Rho-associated kinase,ROCK)),是一种起到选择性抑制Rho相关激酶(Rho-associated kinase,ROCK)的作用的物质,除了Thiazovivin以外,可以使用Y-27632等。

[0021] 在本发明中,“2-丙基戊酸(valproic acid,VPA)”为组蛋白去乙酰化酶抑制剂(histone deacetylase inhibitor),是指抑制组蛋白去乙酰化酶的物质,并且已知通过使染色质处于高乙酰化状态来促进细胞增殖抑制因子及诱导分化所必需的基因的表达,从而诱导细胞(癌细胞)的分化并抑制血管生成(angiogenesis),并且将细胞周期固定在G1状态并诱导癌细胞(cancer cell)的细胞凋亡(apoptosis),从而表现出强大的细胞增殖抑制(cytostatic)抗癌活性。众所周知,组蛋白去乙酰化酶(HDAC)通过pRB/E2F抑制基因转录(gene transcription),并且组蛋白乙酰化(histone acetylation)的破坏与各种癌症的发生有关,并且HDAC在低氧、低糖、细胞癌变等恶劣环境条件下高表达以抑制细胞增殖抑制因子的表达,从而起到促进细胞增殖的作用,因此HDAC被认为是细胞癌变及分化调节的重要调节因子。除了VPA以外,还可以使用曲古柳菌素(trichostatin,TSA)或其衍生物作为组蛋白去乙酰化酶。

[0022] 在本发明中,“嘌吗啡胺(purmorphamine)”为嘌呤化合物,已知为参与Shh信号系统的物质。上述嘌吗啡胺没有特别的限制,只要能够诱导Shh信号即可,并且可以使用各种衍生物。例如,可以使用市售的2-(1-萘氧基)-6-(4-吗啉苯胺基)-9-环己基嘌呤)(2-(1-Naphthoxy)-6-(4-morpholinoanilino)-9-cyclohexylpurin))等。上述嘌吗啡胺可以在通常用于诱导去分化为神经干细胞样细胞的培养基中处理。像这样,当使用作为Shh类似物的嘌吗啡胺处理时,其优点在于无需引入基因用于从人成纤维细胞制备神经干细胞。

[0023] 在本发明中,“A-8301”为TGF-βI型受体抑制剂(TGF-βtype I receptor inhibitor),是指通过与TGF-βI型受体来干扰TGF-βI型的正常信号传导过程的物质(Tojo M et al.,CancerSci.96:791-800,2005)。众所周知,TGF-βI型(转化生长因子-βI型

(Transforming growth factor-βtype I))为对细胞的增殖、分化及各种类型的细胞起到各种作用的多功能肽,这种多功能性在如脂肪细胞形成、肌细胞形成、骨细胞形成、上皮细胞分化等各种组织的生长及分化中起到核心作用,并抑制神经干细胞的增殖。除了上述TGF-βI型受体抑制剂A-8301以外,还可以使用包含SB432542的所有TGF-βI型受体抑制剂,上述低分子量物质TGF-βI型受体抑制剂A-8301可以使用市售的或制备的,并且通过用上述抑制剂处理来促进神经干细胞增殖。

[0024] 在本发明中,“SB431542”为激活素受体样激酶-5(Activin Receptor-Like Kinase-5,ALK5)抑制剂,起到通过诱导快速去分化来提高染色体稳定性的作用。

[0025] 在本发明中,“CHIR99021”为糖原合成酶激酶(glycogen synthase kinase,GSK)抑制剂,是靶向作为参与GSK信号传导过程的GSK1/2的上游(upstream)分子的GSK1/2的物质。上述CHIR99021表示为氨基嘧啶(aminopyrimidine),除了CHIR99021以外,可以使用所有GSK抑制剂。

[0026] 在本发明中,“5-氮杂-2’-脱氧胞苷(5-Aza-2’-deoxycytidine)”为被称为地西他滨(decitabine)的胞苷类似物,充当DNA去甲基化剂(DNA demethylating agent)。DNA去甲基化剂参与DNA的复制过程,并通过去除DNA上存在的甲基(-CH_3)来调节基因的表达。可以使用5-氮杂胞苷(5-azacytidine)作为如地西他滨等胞苷类似物。

[0027] 在本发明中,“3-去氮腺嘌呤A(3-Deazaneplanocin A,DZNep)”为S-腺苷同型半胱氨酸水解酶抑制剂及组蛋白甲基转移酶EZH2抑制剂,其通过启动被抑制的肿瘤抑制基因并抑制EZH2的表达来诱导细胞凋亡,并且在体外阻断组蛋白H3的赖氨酸27的EZH2活性及三甲基化。起到诱导癌细胞的细胞凋亡、抑制S-腺苷同型半胱氨酸(SAH)水解酶、减少整体DNA甲基化、增强化学诱导的多能干细胞(CiPSC)中的Oct 4表达的作用。

[0028] 在本发明中,上述各小分子可以以有效浓度包含在培养基中,并且可以根据培养基的种类及培养方法等本技术领域公知的因素调节并包含有效浓度,以使成纤维细胞分化为神经干细胞。

[0029] 本发明的用于直接转分化的培养液中包含的仙台病毒用于对作为体细胞的成纤维细胞进行重编程,由于包含山中(Yamanaka)因子,因此具有能够被诱导为具有多能性的细胞的特征。在本发明一实施例中,使用CytoTune-ips 2.0仙台重编程试剂盒,其包含仙台病毒,包括Oct4、Sox2、Klf4、C-myc。在本发明中,通过用上述CytoTune-ips 2.0仙台重编程试剂盒处理人成纤维细胞来进行用于转分化为神经干细胞的重编程。

[0030] 并且,在本发明中,用于神经干细胞的分化的培养基包含用于OCT4和/或SOX4表达的mRNA及小分子化合物,因此确认到即使与诱导直接转分化的情况相比,转分化效率也更高。众所周知,OCT4为维持干细胞的多能性所需的转录因子,SOX2为神经干细胞的代表性标志物,也是将体细胞转化为诱导性多能干细胞时所需的因子之一。在本发明一实施例中,通过用OCT4 mRNA及SOX2 mRNA转染人胎儿成纤维细胞来调节基因表达,然后进行实验以比较使用现有的iNSC培养基诱导直接转分化为神经干细胞的结果与在本发明的培养基中诱导直接转分化的结果。

[0031] 并且,可以利用miRNA302/367诱导直接转分化,上述miRNA302/367起到抑制NR2F2基因的表达作用,上述NR2F2基因抑制作为维持干细胞的多能性的基因的OCT4。miRNA302/367为一种可以通过抑制NR2F2来诱导OCT4的表达并诱导直接转分化为干细胞的重要的簇。

因此,在本发明一实施例中,通过用miRNA302/307簇转染人亨廷顿皮肤成纤维细胞来调节基因,然后通过使用现有的iNSC培养基诱导直接转分化为神经干细胞的实验来与在本发明的培养基中诱导直接转分化的分化效率进行比较。

[0032] 并且,在本发明中,培养基包括所有常用于培养神经干细胞的培养基。用于培养的培养基通常包含碳源、氮源及微量元素成分。上述培养基可以包括DMEM/F12、N2、B27、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)及表皮生长因子(epidermal growth factor,EGF),但不限于此。

[0033] 用于培养本发明的被诱导的干细胞的培养基可以不受限制地使用本领域公知的基础培养基。基础培养基可以通过人工合成来制备,或者也可以使用市售的培养基。市售的培养基的例子包括达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基(Dulbecco's Modified Eagle'sMedium,DMEM)、最低必需培养基(Minimal Essential Medium,MEM)、伊格尔基础培养基(Basal Medium Eagle,BME)、RPMI 1640、F-10、F-12、α-最低必需培养基(α-Minimal essential Medium,α-MEM)、格拉斯哥氏最低必需培养基(Glasgow's Minimal Essential Medium,G-MEM)及伊思柯夫氏改良达尔伯克氏培养基(Isocove's Modified Dulbecco's Medium)等,但不限于此。

[0034] 在本发明中,用于直接转分化的成纤维细胞的培养周期优选为10～20天,可以确认成纤维细胞在15天之内分化为神经干细胞。在本发明一实施例中,在培养13天后开始观察到神经干细胞,并且可以确认在15天至19天之间形成神经干细胞集落。并且,通过免疫染色确认到作为神经干细胞标志物的Sox1、Sox2、MSH1、巢蛋白(Nestin)表达而分化为神经干细胞。

[0035] 在本发明中,上述神经干细胞的特征在于,可以维持染色体稳定性并可以维持未分化状态10次传代以上,但不限于此。

[0036] 作为本发明另一实施方式,本发明涉及一种细胞治疗剂,其包含通过上述方法培养的神经干细胞。

[0037] 上述细胞治疗剂为通过从人体中分离、培养及重组来制备的细胞及组织,是以治疗、诊断及预防目的使用的药物,是指通过基因修饰或改变生物学特性来使细胞用于诊断、预防或治疗疾病的目的。

[0038] 本发明的上述细胞治疗剂可以为用于预防或治疗脑部疾病的药物组合物。

[0039] 在本说明书中,术语“预防”是指可以通过给药本发明的上述药物组合物来抑制或延迟血管钙化发生的所有行为。

[0040] 在本说明书中,术语“治疗”是指可以通过给药本发明的上述药物组合物来使症状好转或有益地改变的所有行为。

[0041] 本发明的上述药物组合物可以根据常规方法配制成散剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、混悬剂、乳剂、糖浆剂、气雾剂等口服剂型、外用剂、栓剂及无菌注射溶液的形式来使用,可以进一步包含上述配制所需的载体或赋形剂等。可以进一步包含在上述有效成分中的药学上可接受的载体、赋形剂及稀释剂包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯树胶、海藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、硬脂酸镁及矿物油等。当配制时,通过使用常用的填充剂、增量剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂、表面活性剂等稀

释剂或赋形剂来制备。

[0042] 例如,用于口服给药的固体制剂包括片剂、丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂等,这种固体制剂通过在上述提取物或化合物中混合一种以上如面粉、淀粉、碳酸钙(calciumcarbonate)、蔗糖(sucrose)或乳糖(lactose)、明胶等赋形剂来制备。并且,除了简单的赋形剂以外,还可以使用如硬脂酸镁、滑石粉等润滑剂。用于口服给药的液体制剂包括混悬剂、内用液剂、乳剂、糖浆剂等,除了常用的水、液体石蜡等简单稀释剂以外,还可以包含如润湿剂、甜味剂、芳香剂、保存剂等各种赋形剂。

[0043] 用于肠胃外给药的制剂包括无菌的水溶液、非水溶性溶剂、混悬剂、乳剂、冻干制剂、栓剂等。可以使用丙二醇(propylene glycol)、聚乙二醇、如橄榄油等植物油、如油酸乙酯等可注射的酯等作为非水溶性溶剂及混悬剂。可以使用半合成脂肪酸酯(witepsol)、聚乙二醇、吐温(tween)61、可可脂、月桂酸甘油酯、甘油明胶等作为栓剂的基质。

[0044] 本发明的药物组合物可以根据所需的方法以口服或肠胃外给药(静脉注射、皮下、腹腔内或局部给药)的方式给药,给药量根据患者的状态及体重、疾病的严重程度、药物形式、给药途径及时间而变化,并且可以由本领域的普通技术人员选择合适的形式。尤其,由于本发明的药物组合物包含细胞治疗剂,因此可以通过能够使上述细胞治疗剂移动至靶细胞的任何装置来给药。

[0045] 本发明的上述药物组合物以药学上有效量给药。在本发明中,“药学上有效量”是指以可应用于医学治疗的合理的量足以治疗疾病的量,其标准可以取决于患者的疾病、严重程度、药物活性、对药物的敏感性、给药时间、给药途径、排泄率、治疗周期、联合使用的成分及其他事项。本发明的上述药物组合物可以以单独的治疗剂给药或与其他治疗剂联合给药,并且可以与现有的治疗剂依次或同时给药。考虑到所有上述因素,可以将给药量确定在能够使副作用最小化的水平,并且这可以由本领域的普通技术人员以容易的水平确定。

[0046] 具体地,上述药物组合物的给药量可以根据患者的年龄、体重、严重程度、性别等而变化,例如,以1.0×10^{4}至1.0×10^{10}个细胞/kg体重,优选地,以1.0×10^{5}至1.0×10^{9}个细胞/kg体重的量一次或分多次给药。然而,有效成分的实际给药量应考虑所要治疗的疾病、疾病的严重程度、给药途径、患者的体重、年龄及性别等各种相关因素来确定,并且上述给药量可以根据需要进行不同的设置,但并不限于上述规定的用量。

[0047] 发明的效果

[0048] 本发明涉及一种将人成纤维细胞转化为神经干细胞的方法,更详细地,涉及利用仙台病毒(Sendai virus)、mRNA或miRNA与小分子化合物的组合通过直接转分化将人成纤维细胞转化为神经干细胞的方法及其用途,当利用仙台病毒、mRNA或miRNA与小分子化合物的组合将人成纤维细胞直接转化为神经干细胞时,由于没有基因的插入,因此可以诱导高质量的神经干细胞,并且可以获得足够量的细胞用于细胞治疗,由于没有发生肿瘤的副作用,因此具有用作脑部疾病的细胞治疗剂的理想的效果。

附图说明

[0049] 图1为利用cytotune-ips 2.0仙台病毒使人胎儿成纤维细胞表达Oct4、Sox2、Klf4、C-myc(或L-myc)基因而没有额外的插入,并利用小分子化合物分化为神经干细胞的实验的简图。

[0050] 图2示出包含仙台病毒(SeV)及8种小分子化合物(8SMs)并培养19天时观察诱导人成纤维细胞分化为神经干细胞的过程的结果。

[0051] 图3示出对用于利用人胎儿成纤维细胞诱导直接转分化为神经干细胞的包含小分子化合物及仙台病毒的培养液的各种组合进行实验的结果。

[0052] 图4示出由人胎儿成纤维细胞直接转分化的神经干细胞的干细胞标志物的qRT-PCR结果。

[0053] 图5为示出用于确认由人胎儿成纤维细胞直接转分化的神经干细胞的神经干细胞标志物的免疫荧光染色图像。

[0054] 图6示出为了确认所诱导的神经干细胞的遗传稳定性,进行传代培养并在第2次级第10次培养时分别确认染色体稳定性的结果。

[0055] 图7为示出确认由成人成纤维细胞诱导直接转分化的神经干细胞的培养结果(集落)的图。

[0056] 图8示出用于确认由成人成纤维细胞诱导直接转分化的神经干细胞的干细胞标志物的免疫荧光染色结果。

[0057] 图9示出由成人成纤维细胞直接转分化的神经干细胞的神经干细胞标志物的qRT-PCR结果。

[0058] 图10为确认由亨廷顿病患者的人成纤维细胞诱导直接转分化的神经干细胞的培养结果(集落)的图。

[0059] 图11示出用于确认由亨廷顿病患者的人成纤维细胞诱导直接转分化的神经干细胞的干细胞标志物的免疫荧光染色结果。

[0060] 图12示出由亨廷顿病患者的人成纤维细胞直接转分化的神经干细胞的神经干细胞标志物的qRT-PCR结果。

[0061] 图13为分别比较人成纤维细胞(胎儿成纤维细胞、成人成纤维细胞、亨廷顿病患者人成纤维细胞)中确认的神经干细胞转化效率的图。

[0062] 图14示出分化为γ-氨基丁酸能(GABAergic)神经细胞的结果,以确认本发明中所诱导的神经干细胞的分化能力。

[0063] 图15为示出对所分化的γ-氨基丁酸能(GABAergic)神经细胞进行细胞免疫染色的结果,确认到表达作为神经细胞初始标志物的Tuj1以及表示γ-氨基丁酸能(GABAergic)神经细胞的GABA标志物的图。

[0064] 图16示出通过注入375ng的OCT4 mRNA及125ng的SOX2 mRNA来诱导直接转分化为神经干细胞的结果。

[0065] 图17为示出确认通过用OCT4及SOX2 mRNA转导来诱导分化的神经干细胞的干细胞基因是否表达的图。

[0066] 图18为示出确认通过用miRNA302/367转染来诱导分化的神经干细胞的培养过程及其结果的图。

[0067] 图19为示出确认通过用miRNA302/367转染来诱导分化的神经干细胞的干细胞基因是否表达的图。

具体实施方式

[0068] 作为本发明一实施方式,本发明涉及一种用于诱导成纤维细胞直接转化为神经干细胞的直接转分化诱导组合物,其包含选自由Thiazovivin、丙戊酸(Valproic acid)、嘌吗啡胺(Purmorphamine)、A8301、SB43154、CHIR99021、5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine)及DZNep组成的组中的一种以上小分子化合物以及仙台病毒。

[0069] 作为本发明再一实施方式,本发明涉及一种神经干细胞的制备方法,上述方法包括在包含选自由Thiazovivin、丙戊酸(Valproic acid)、嘌吗啡胺(Purmorphamine)、A8301、SB43154、CHIR99021、5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine)及DZNep组成的组中的一种以上小分子化合物以及仙台病毒的培养基中培养人成纤维细胞的步骤。

[0070] 作为本发明另一实施方式,本发明涉及一种细胞治疗剂,其包含通过神经干细胞的制备方法制备的神经干细胞,上述神经干细胞的制备方法包括在上述直接转分化诱导组合物;或包含上述组合物的培养基中培养人成纤维细胞的步骤。

[0071] 作为本发明还有一实施方式,本发明涉及一种用于治疗选自由脑卒中、中风、脑出血、脑梗塞、阿尔茨海默病、痴呆、亨廷顿病、帕金森病、多发性硬化、多系统神经萎缩、癫痫、皮克氏病及克雅病组成的组中的脑部疾病的药物组合物,其包含上述细胞治疗剂。

[0072] 实施方式

[0073] 以下,将通过实施例进行详细说明,以具体地说明本说明书。然而,根据本说明书的实施例可以修改为各种其他形式,并且本说明书的范围不被解释为限于下面详述的实施例。本说明书的实施例为了向本领域的普通技术人员更完整地说明本说明书而提供。

[0074] 实施例1.诱导人胎儿成纤维细胞直接转分化为神经干细胞

[0075] 为了诱导人成纤维细胞转化为神经干细胞,在60mm的培养皿(dish)中准备1×10^5个人胎儿成纤维细胞,然后将与重编程相关的8种小分子化合物(Thiazovivin、丙戊酸(Valproic acid)、嘌吗啡胺(Purmorphamine)、A8301、SB431542、CHIR99021、5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine)及DZNep)以及仙台病毒(OSKM,cytotune-ips2.0仙台重编程试剂盒(sendai reprogramming kit))添加至由DMEM/F12、N2补充剂(supplement)、B27补充剂(supplement)、bFGF及EGF组成的神经基础培养基(neurobasal medium)中并培养准备的细胞。上述8种小分子化合物各自的特性如现有专利(PCT/KR2016/003819)中所述。

[0076] 在上述培养基中诱导分化持续19天,每2~3天更换一次培养液,并如图2所示地确认成纤维细胞分化为神经干细胞的过程。如图2所示,培养后地13天观察到小神经干细胞形状的细胞,第15天确认到神经干细胞集落,第19天确认到足够的集落以能够获得神经干细胞的单集落。

[0077] 在以往的研究中,可知在未添加仙台病毒的情况下,成纤维细胞直接转分化为神经干细胞所需的时间为约60天,但在与仙台病毒一起处理的情况下其时间显著缩短。

[0078] 实施例2.比较小分子化合物与仙台病毒的直接转分化效率

[0079] 用如下表1所示的组合进行实验,以比较仅利用小分子化合物的以往的研究结果与根据本发明的包含仙台病毒及小分子化合物的培养液组成的直接转分化效率。

[0080] 表1

[0081]

1	仅 SeV	仅利用 SeV（OSKM）直接转化为神经干细胞
2	3SMs	仅利用 SB431542、CHIR99021、hLIF 直接转化为神经干细胞
3	4SMs	仅利用 A8301、噻吗啡胺（Purmorphamine）、丙戊酸（Valproic acid）直接转化为神经干细胞
4	8SMs	仅利用 Thiazovivin、丙戊酸（Valproic acid）、噻吗啡胺（Purmorphamine）、A8301、SB431542、CHIR99021、5-氮杂-2'-脱氧胞苷（5-Aza-2'-deoxycytidine）及DZNep 直接转化为神经干细胞
5	SeV+3SMs	利用经 SeV（OSKM）处理 2）的条件培养液的培养液直接转化为神经干细胞
6	SeV+4SMs	利用经 SeV（OSKM）处理 3）的条件培养液的培养液直接转化为神经干细胞
7	SeV+8SMs	利用经 SeV（OSKM）处理 4）的条件培养液的培养液直接转化为神经干细胞

[0082] 在包含上述7中条件的小分子化合物的培养液条件下,诱导人胎儿成纤维细胞的直接转分化持续15天的结果,如图3所示,在其他条件下未观察到神经干细胞形状的集落,但在如7)所示的培养液条件下,从第13天开始出现神经干细胞形状的细胞,并且第15天可以确认小神经干细胞集落。

[0083] 实施例3.确认直接转分化的神经干细胞的标志物表达

[0084] 通过qRT-PCR确认神经干细胞标志物是否表达,以确认利用仙台病毒及8种小分子化合物诱导的人神经干细胞是否表现出一般神经干细胞的特征。

[0085] 首先,在用仙台病毒处理人胎儿成纤维细胞之后,在由DMEM F12、N2补充剂(supplement)、B27补充剂(supplement)、bFGF及EGF组成的神经基础培养基(neurobasal medium)中培养19天以诱导神经干细胞(仅SeV iNSC(仅有SeV iNSC)),在用仙台病毒处理人成纤维细胞之后,在由DMEM F12、N2补充剂(supplement)、B27补充剂(supplement)、bFGF及EGF组成的神经基础培养基(neurobasal medium)中添加8种小分子化合物Thiazovivin、丙戊酸(Valproic acid)、噻吗啡胺(Purmorphamine)、A8301、SB431542、CHIR99021、5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine)及DZNep并培养19天以诱导神经干细胞(SeV+8SMs iNSC)。

[0086] 并且,在没有用仙台病毒处理的过程的情况下,将人成纤维细胞用在由DMEM F12、N2补充剂(supplement)、B27补充剂(supplement)、bFGF及EGF组成的神经基础培养基(neurobasal medium)中添加8种小分子化合物Thiazovivin、丙戊酸(Valproic acid)、噻吗啡胺(Purmorphamine)、A8301、SB431542、CHIR99021、5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine)及DZNep的培养液培养60天以诱导神经干细胞(仅8SMs iNSC(仅有8SMs iNSC))。

[0087] 对于通过上述方法诱导的每种神经干细胞(仅SeV iNSC/SeV+8SMs iNSC/仅8SMs iNSC),通过qRT-PCR确认作为神经干细胞标志物的Sox2、巢蛋白及MSH1的表达量。结果,如图4所示,可以确认与作为对照组的新生儿成纤维细胞(Neonatal fibroblast)相比,所诱导的上述神经干细胞中的神经干细胞标志物增加约200倍至600倍。并且,与仅SeV iNSC相比,SeV+8SMs iNSC及仅8SMs iNSC的Sox2、MSH1表现出3倍以上高的表达量。然而,对于诱导分化的时间,确认到SeV+8SMs iNSC可以在19天后得到大量的神经干细胞(实施例1),这如先前发明(PCT/KR2016/003819)中所述,诱导神经干细胞的速度比仅利用8种小分子化合物时快约40天。

[0088] 并且,如上所述,对由人胎儿成纤维细胞诱导的神经干细胞标志物,利用作为神经干细胞标志物的Sox1、Sox2、MSH1、巢蛋白进行细胞免疫染色(免疫细胞化学(immunocytochemistry,ICC))的结果,在所有筛选的神经干细胞中均确认到神经干细胞标志物,并且可以确认分化的细胞为神经干细胞。(图5)。

[0089] 实施例4.通过传代培养确认染色体稳定性

[0090] 进行传代培养旨在增加由人胎儿成纤维细胞诱导的神经干细胞的干细胞特性。为了确认遗传稳定性,总共进行10次传代培养,并确认第2次传代培养及第10次传代培养的神经干细胞的染色体稳定性。结果,如图6所示,确认到均具有正常的染色体稳定性。

[0091] 实施例5.利用成人成纤维细胞诱导神经干细胞

[0092] 上述实施例1至实施例4利用胎儿成纤维细胞诱导神经干细胞,但为了确认是否由成人的成纤维细胞同样诱导神经干细胞,利用成人成纤维细胞以与上述实施例1至实施例4相同的方法诱导神经干细胞并确认其特征。

[0093] 结果,如图7所示,与上述实施例1相同地诱导分化19天并进行观察的结果,从第13天开始观察到神经干细胞的形状,并在第19天可以确认神经干细胞的集落。

[0094] 并且,所诱导的神经干细胞的细胞免疫染色结果,可以确认到作为神经干细胞标志物的Sox1、Sox2、MSH1及巢蛋白(图8),进行qRT-PCR并观察的结果,与成人的成纤维细胞相比,确认到Sox2、巢蛋白及MSH1的表达水平高(图9),因此确认到可以利用成人的成纤维细胞成功诱导神经干细胞。

[0095] 实施例6.利用亨廷顿病患者的成纤维细胞诱导神经干细胞

[0096] 为了确认是否可以利用实际脑部疾病患者的成纤维细胞通过直接转分化诱导神经干细胞,以与上述实施例1至实施例4相同的方法诱导神经干细胞并确认其特征。

[0097] 结果,如图10所示,与实施例1相同地诱导分化19天并进行观察的结果,从第13天开始观察到神经干细胞的形状,并在第19天可以确认神经干细胞的集落。

[0098] 并且,所诱导的神经干细胞的细胞免疫染色结果,可以确认作为神经干细胞标志物的Sox1、Sox2、MSH1及巢蛋白(图11),进行qRT-PCR并观察的结果,与成人的成纤维细胞相比,确认到Sox2、巢蛋白及MSH1的表达水平高(图12),因此确认到可以利用成人的成纤维细胞成功诱导神经干细胞。

[0099] 结果,确认到通过利用本发明的包含仙台病毒及8种小分子化合物的培养液从所有人胎儿成纤维细胞、成人成纤维细胞及亨廷顿病患者的成纤维细胞中均成功诱导神经干细胞,并且比较每种成纤维细胞的转化效率的结果,如图13所示,人胎儿成纤维细胞表现出约1.2%的转化效率,成人及亨廷顿病患者的成纤维细胞表现出约0.4%的转化效率。

[0100] 实施例7.确认所诱导的神经干细胞的分化能力

[0101] 为了确认由上述实施例诱导的神经干细胞的分化能力,在体外(in vitro)诱导分化为γ-氨基丁酸能(GABAergic)神经细胞。γ-氨基丁酸能(GABAergic)神经细胞在大脑中分泌GABA,γ-氨基丁酸(γ-aminobutyric acid,GABA)是一种分布在自然界中的非蛋白质氨基酸,已知为存在于哺乳动物的大脑或脊髓中的神经递质。

[0102] 第一天(-Day1)将通过本发明的实施例诱导的神经干细胞以5×10^4个细胞/孔(cell/well)接种(seeding)于涂抹(coating)有聚L-鸟氨酸/纤连蛋白(poly-L-ornithine/fibronectin,PLO/FN)的24孔板(well plate)中,并在以1:1混合DMEM F12和神经基础培养基(Neurobasal media)的培养基(media)中添加0.5X N2补充剂(supplement)、0.5X B27补充剂(supplement)、1X MEM-NEAA、100ug/ml的青霉素及链霉素(Penicillin and streptomycin)、10uM的丙戊酸(Valpronic acid)、0.65uM的嘌吗啡胺(Purmorphamine)、2uM的SB431542、0.1uM的维甲酸(Retinoic acid)、1uM的CHIR99021、200nM的多索吗啡(Dosormorphin)、100nM的LDN193189、200uM的抗坏血酸(Ascorbic acid)的培养基中培养0~7天,然后在第7~21天,在以1:1混合DMEM F12和神经基础培养基(Neurobasal media)的培养基(media)中添加0.5X N2补充剂(supplement)、0.5X B27补充剂(supplement)、1X MEM-NEAA、100ug/ml的青霉素及链霉素(Penicillin and streptomycin)、200uM的抗坏血酸(Ascorbic acid)的培养基(media)中进行培养直到分化第21天,确认到分化为神经元形状的神经细胞(GABA neuron)。(图14)。

[0103] 并且,利用所分化的上述γ-氨基丁酸能(GABAergic)神经细胞进行细胞免疫染色的结果,确认到表达作为神经细胞初始标志物的Tuji及表示γ-氨基丁酸能(GABAergic)神经细胞的GABA标志物(图15)。即,确认到通过本发明的包含仙台病毒及8种小分子化合物的培养液诱导直接转分化来生产的神经干细胞可以成功分化为神经细胞。

[0104] 实施例8.通过利用nRNA的基因导入诱导神经干细胞

[0105] 当利用人胎儿成纤维细胞诱导直接直接转分化为神经干细胞时,为了确认用于维持干细胞的多能性的转录因子OCT4以及将体细胞转化为诱导性多能细胞时所需的因子SOX2的影响,用作为干细胞基因的OCT4 mRNA、SOX2 mRNA直接转染人胎儿成纤维细胞以引入基因,然后利用本发明的iNSC培养基(media)诱导直接转化为神经干细胞。

[0106] 将人胎儿成纤维细胞以每孔(well)5×10^4个细胞接种(seeding)于24孔板(well plate)中,并在DMEM+10%FBS培养基(medium)中培养过夜。第二天,将符合各条件的Lipofectamine messengerMAX试剂(reagent)及OptiMEM培养基(medium)(25ul)涡旋(voltex)并在常温下培养(incubate)10分钟(混合物1)。在Opti-MEM培养基(media)(50ul)中稀释所需量的OCT4 mRNA及SOX2 mRNA(混合物2),将混合物1和混合物2混合并在常温下培养(incubate)5分钟。然后,放入各24孔板(well plate)中转染(transfection)6小时或24小时。然后,更换为iNSC培养基(medium),并诱导直接转分化。

[0107] 在上述iNSC中添加DMEM F12、N2补充剂(supplement)、B27补充剂(supplement)、Thiazovivin、丙戊酸(Valproic acid)、嘌吗啡胺(Purmorphamine)、A8301、SB431542及CHIR99021并进一步培养14天,结果,如图16所示,细胞的大小减小直到转染第3天,然后开始变长,但在14天后形状也没有变为神经干细胞。

[0108] 对于在上述SOX2+OCT+8SMs条件下诱导分化的人胎儿成纤维细胞,在第7天、第14

天利用qRT-PCR确认强烈表达的RNA并比较其表达量。

[0109] 将人胎儿成纤维细胞(NEOhDF D0)用作对照组,确认到在NEOhDF D7SOX2+OCT4、NEOhDF D14 SOX2+OCT4条件下SOX2表达量增加100倍以上。(图17)。

[0110] 实施例9.利用miRNA诱导神经干细胞

[0111] 通过miRNA302/367的表达来抑制会抑制OCT4基因的NR2F2基因以进行诱导直接转分化为神经干细胞的实验。通过用miRNA302/307簇(cluster)转染人亨廷顿皮肤成纤维细胞(human Huntington Dermal Fibroblast)来调节基因,然后使用现有的iNSC培养基诱导直接转分化为神经干细胞(neural stem cell)并确认诱导效率。将人亨廷顿皮肤成纤维细胞(human Huntington Dermal Fibroblast)以2×10^5个细胞接种(seeding)于6孔板(well plate)中,并添加5ul的Lipofectamin RNAiMAX、5nM的miRNA302/307,然后在常温下培养(incubate)5分钟。然后,与Opti-MEM培养基(media)(1ml)混合并转染(transfection)5小时。然后,更换为DMEM+培养基(media)并培养1天(T1)、2天(T2)、3天(T3),并更换为包含8SMs的培养基并培养16天以观察是否诱导分化。第7天传代(subculture)后观察细胞的结果,细胞形状小并变为圆形,但细胞量减少且不增殖。(图18)。

[0112] 并且,为了确认所培养的上述细胞的神经干细胞基因是否表达,在表达第7天、第14天利用OCT4、SOX1、SOX2、巢蛋白、Musashi-1进行RT-PCR实验。结果,确认到与对照组(contorl)相比,干细胞相关标志物的表达在第三天最高。经确认,由于相关标志物的表达增加,因此miRNA302/367簇(cluster)有助于直接转分化为干细胞(图19)。

[0113] 至此,以本发明的优选实施例为中心对本发明进行研究。本发明所属技术领域的普通技术人员可以理解本发明可以在不脱离本发明的本质特征的范围内以修饰的形式实现。因此,应从说明性观点而非限定性观点来考虑所公开的实施例。本发明的范围应被解释为在权利要求中指示而不是上述说明,并且与其等同的范围内的所有差异包括在本发明中。

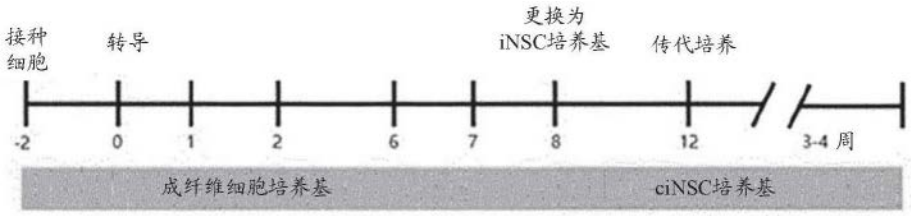


图1

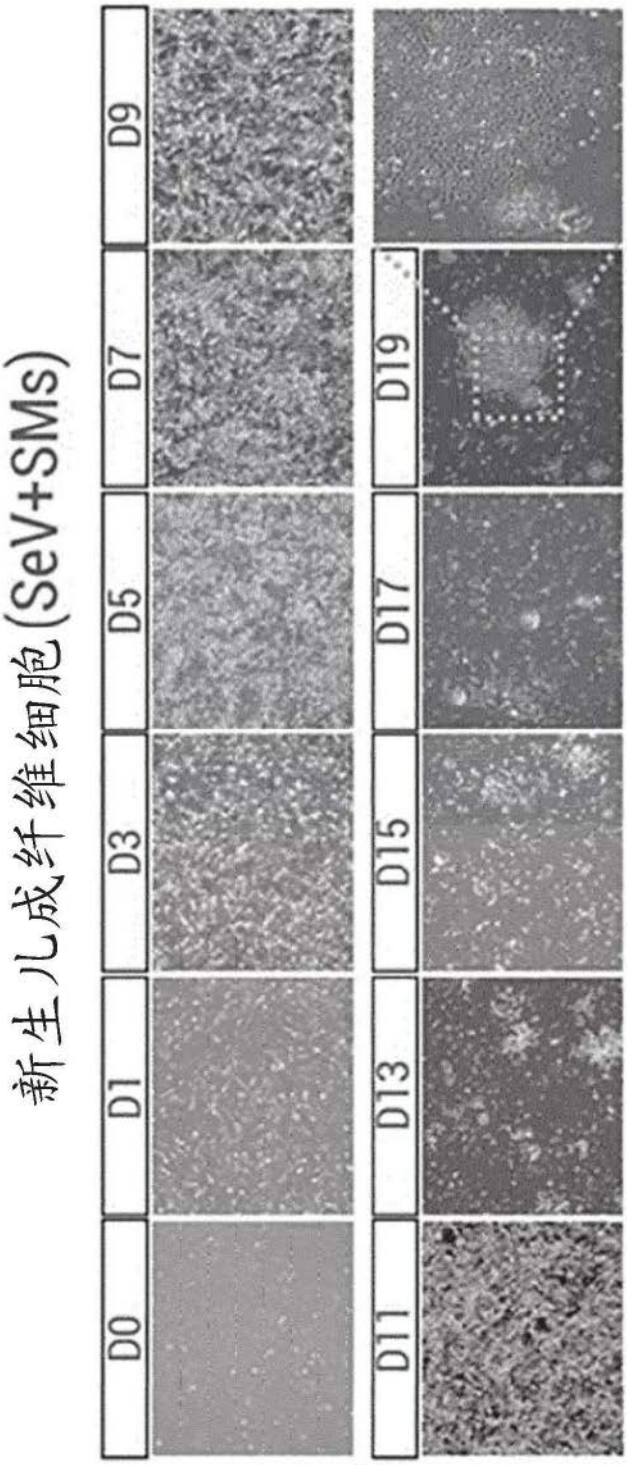


图2

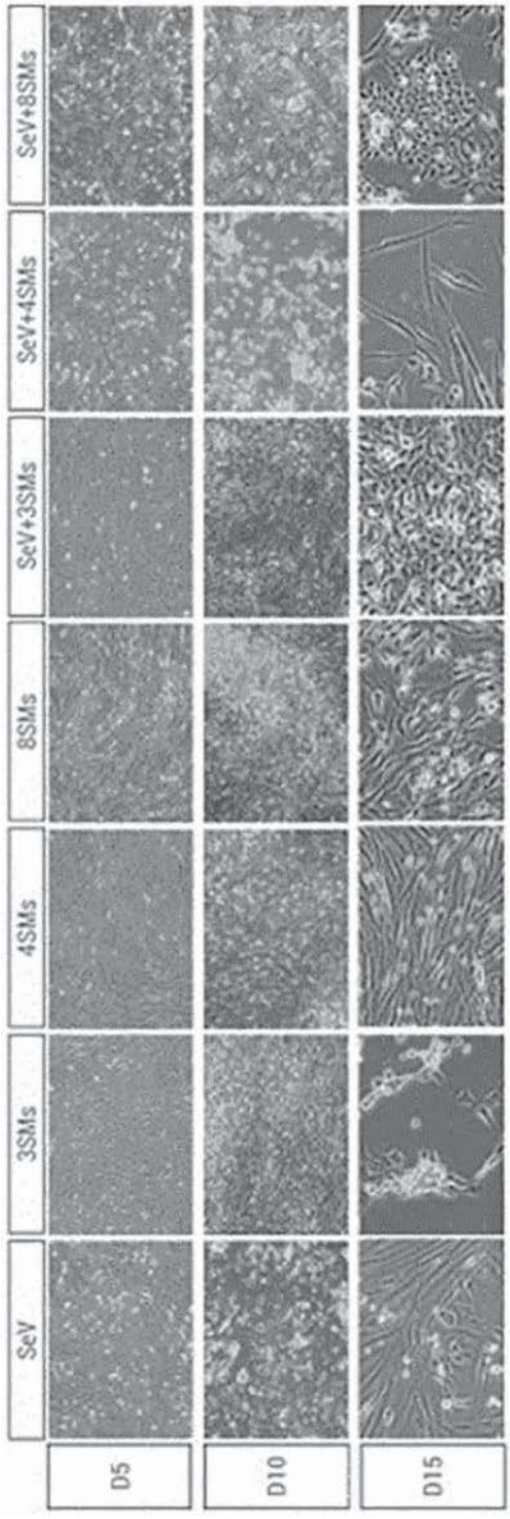


图3

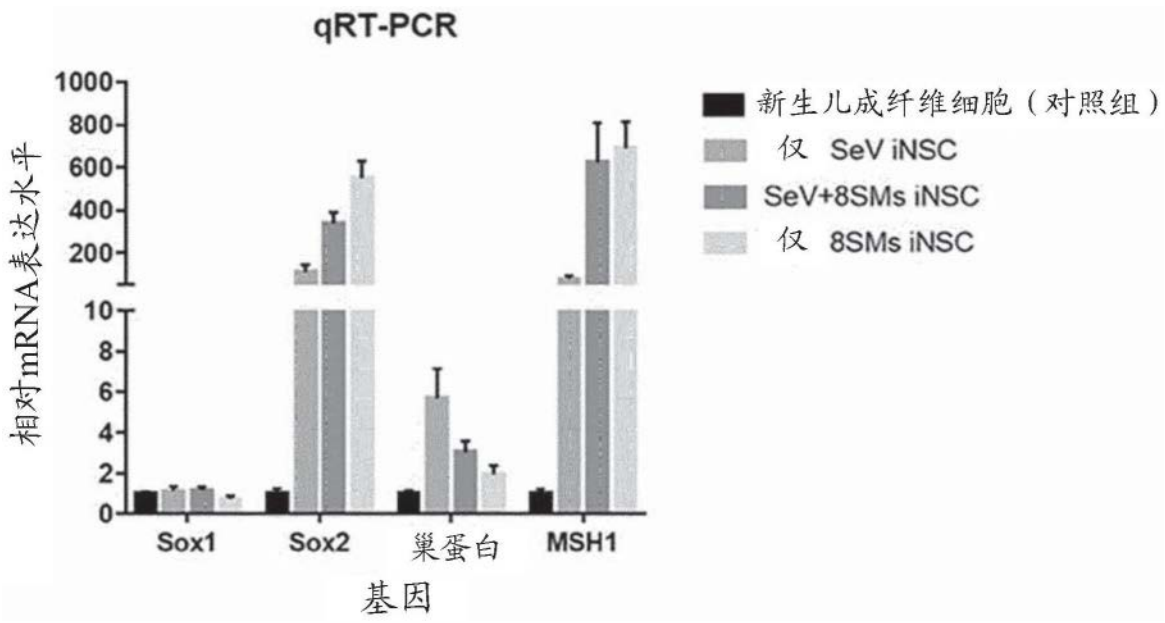

qRT-PCR
相对mRNA表达水平
1000
800
600
400
200
10
8
6
4
2
0
Sox1
Sox2
巢蛋白
MSH1
基因
新生儿成纤维细胞（对照组）
仅 SeV iNSC
SeV+8SMs iNSC
仅 8SMs iNSC

图4

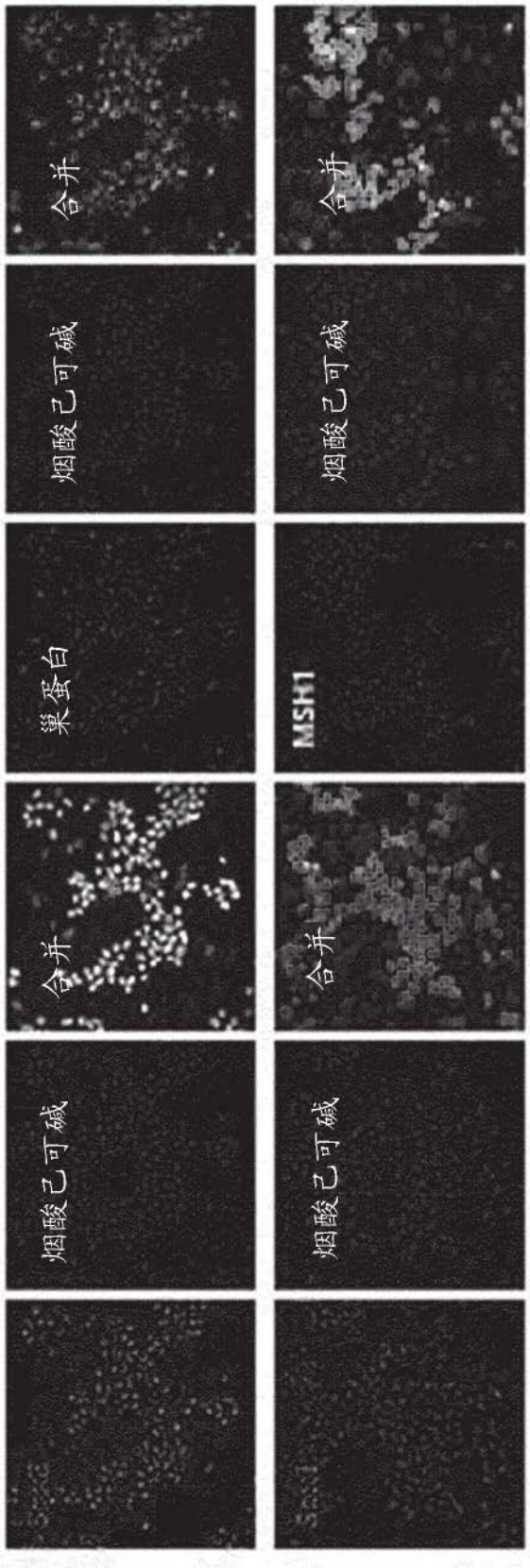


图5

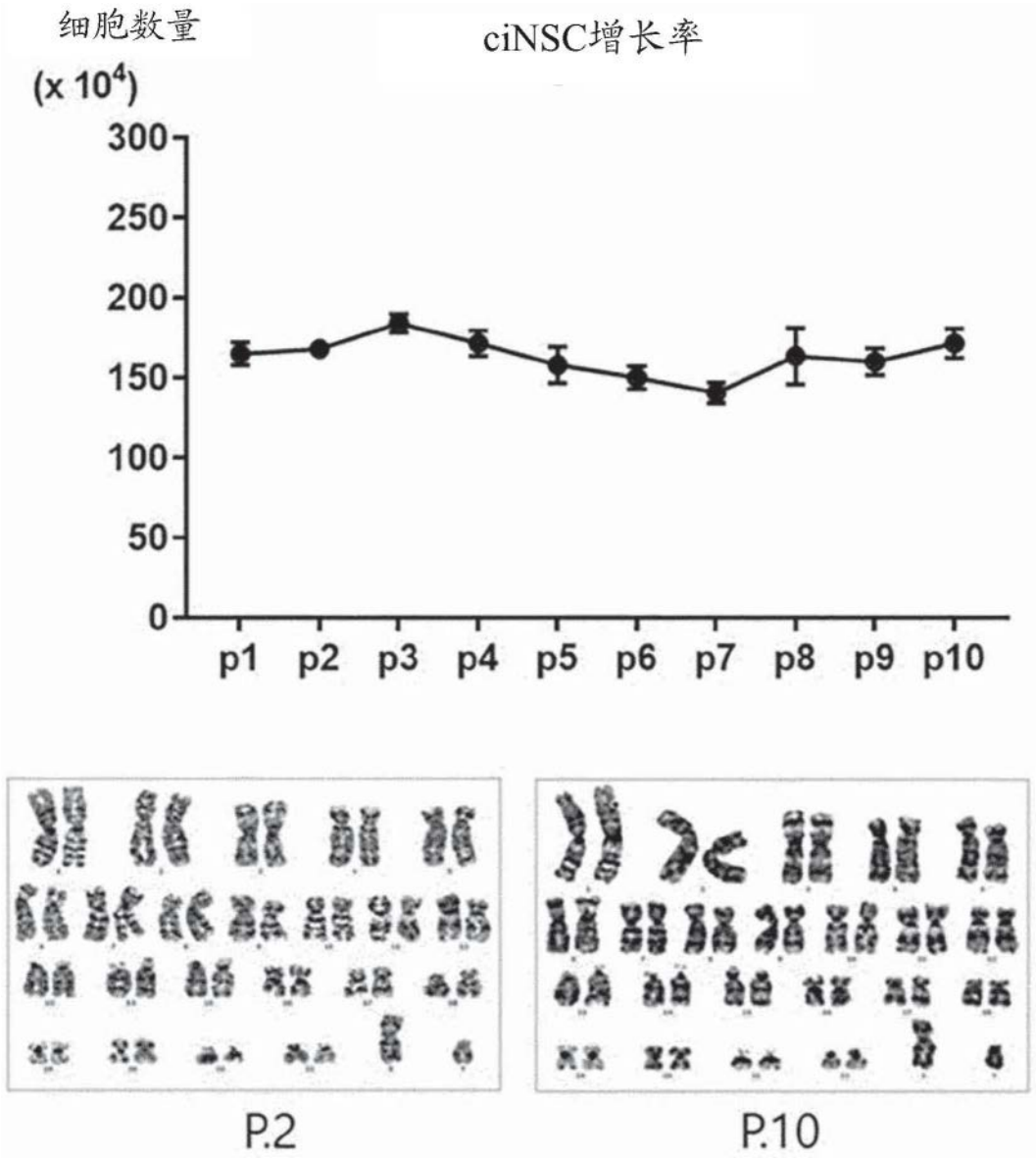

细胞数量
(x 10^4)
ciNSC增长率
300
250
200
150
100
50
0
p1
p2
p3
p4
p5
p6
p7
p8
p9
p10
P.2
P.10

图6

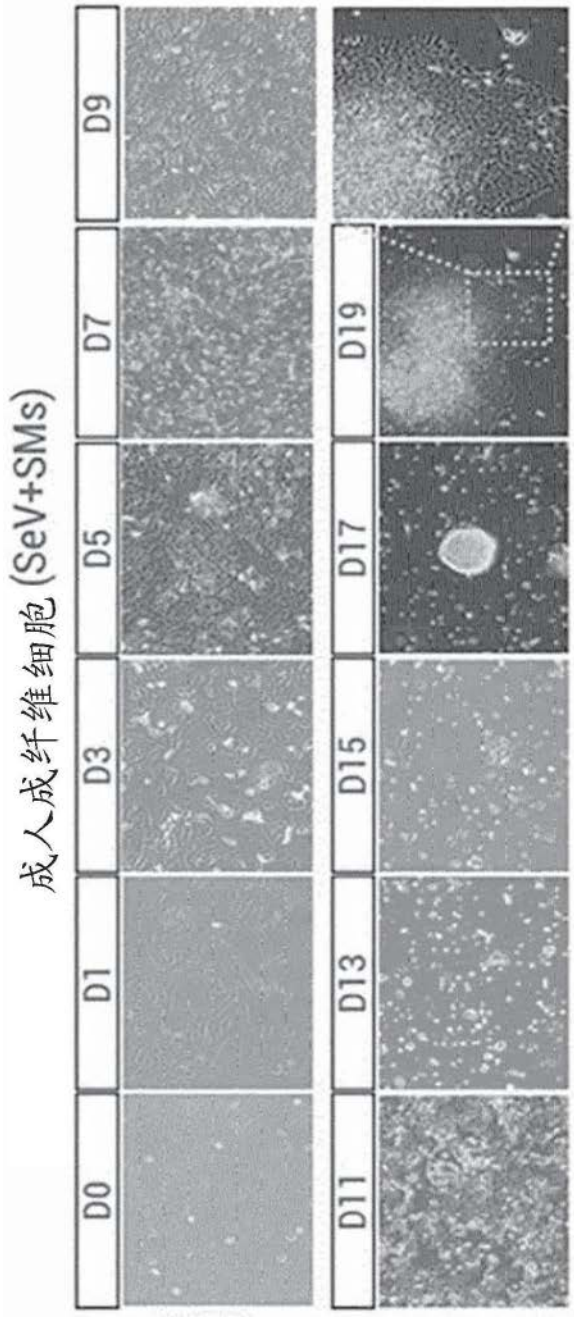


图7

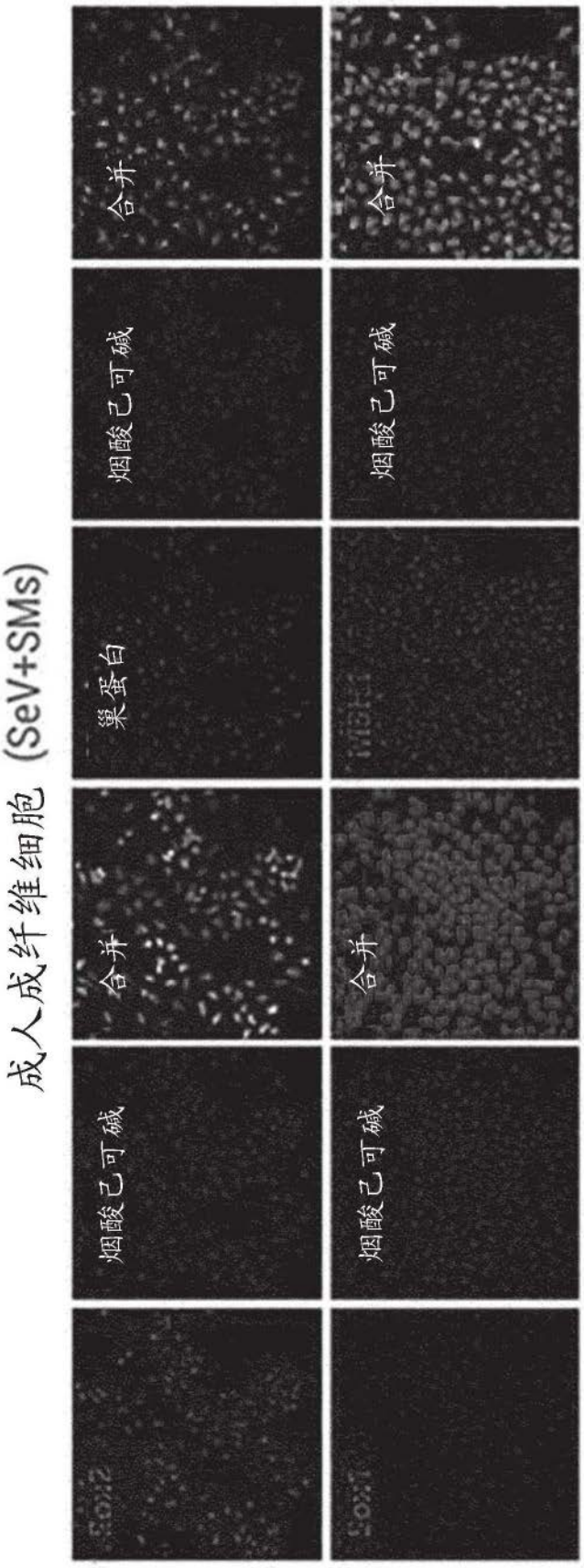


图8

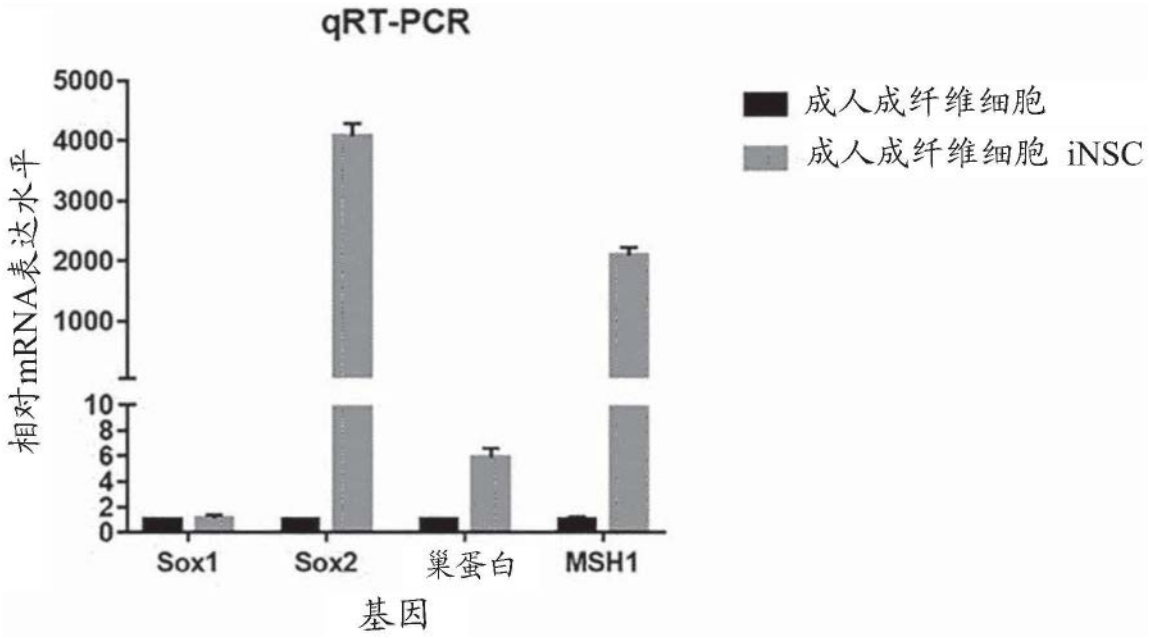

qRT-PCR
5000
4000
3000
2000
1000
10
8
6
4
2
0
相对mRNA表达水平
成人成纤维细胞
成人成纤维细胞 iNSC
Sox1
Sox2
巢蛋白
MSH1
基因

图9

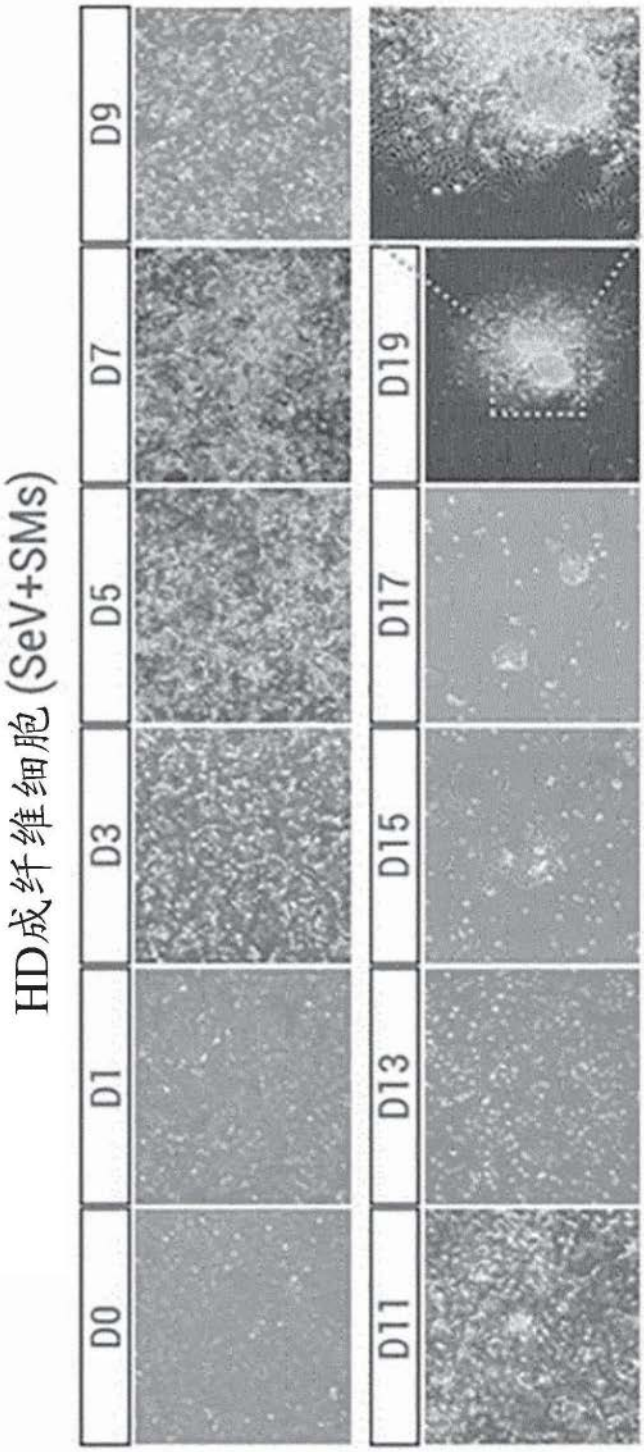


图10

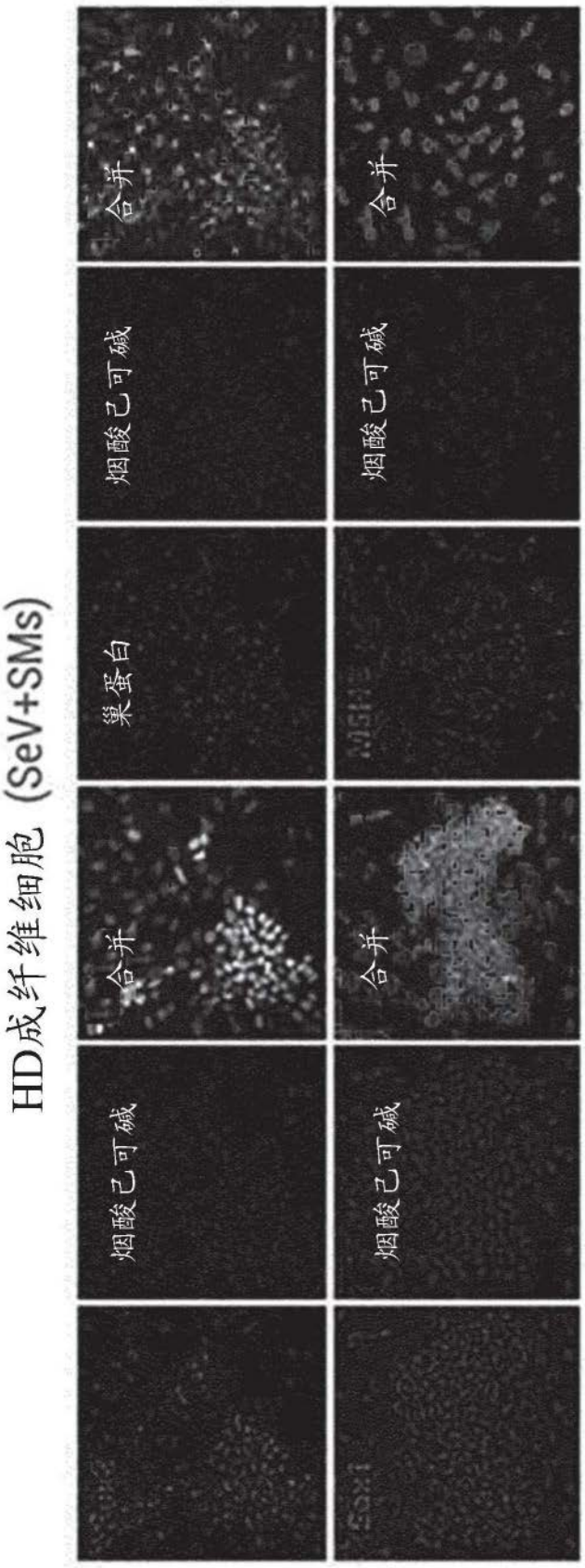


图11

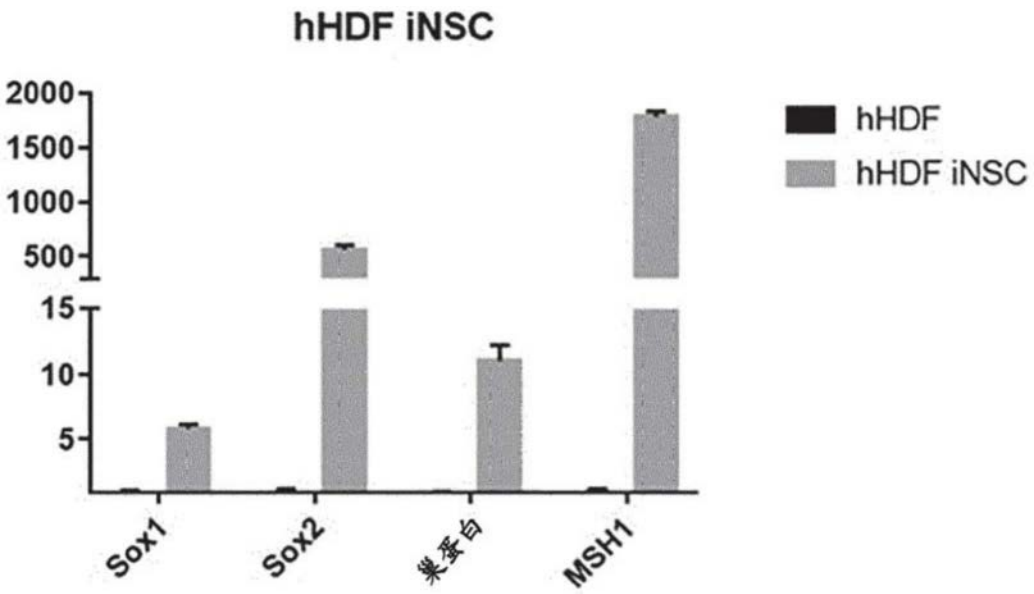

hHDF iNSC
2000
1500
1000
500
15
10
5
hHDF
hHDF iNSC
Sox1
Sox2
巢蛋白
MSH1

图12

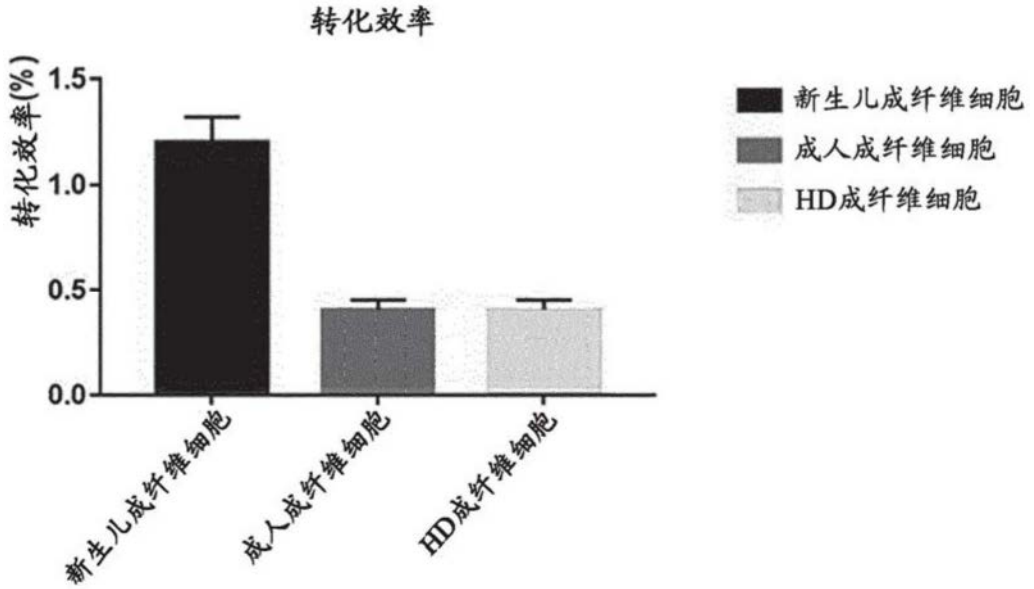

转化效率
转化效率(%)
1.5
1.0
0.5
0.0
新生儿成纤维细胞
成人成纤维细胞
HD成纤维细胞
新生儿成纤维细胞
成人成纤维细胞
HD成纤维细胞

图13

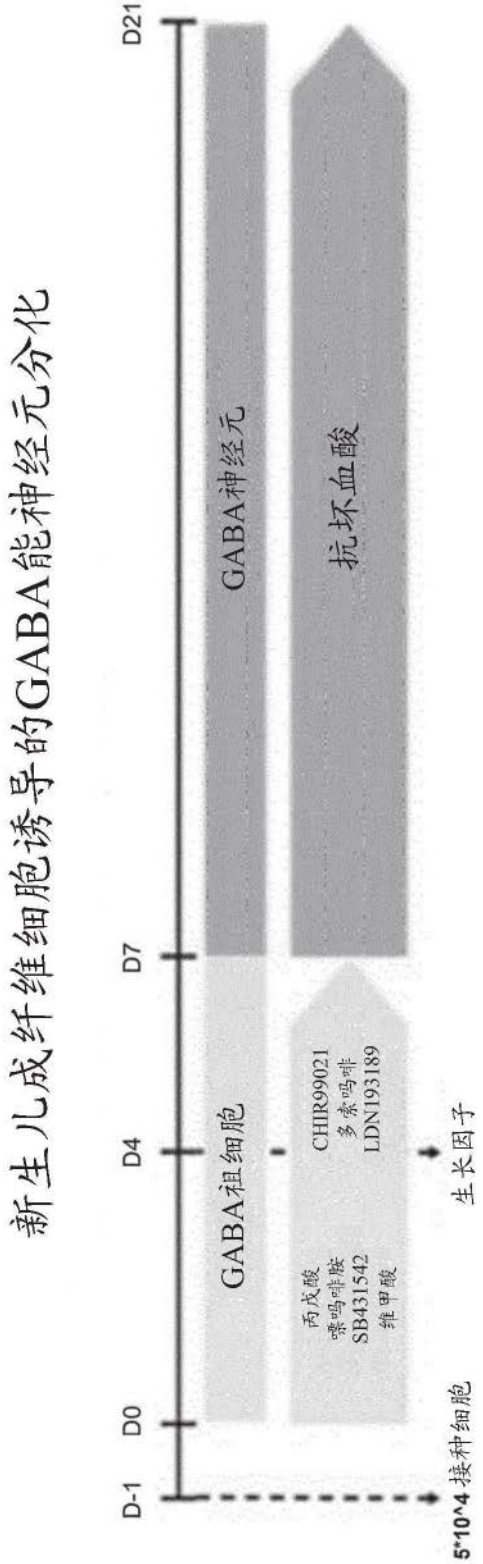

新生儿成纤维细胞诱导的GABA能神经元分化
D-1
D0
D4
D7
D21
5*10^4 接种细胞
丙戊酸
噻吗啡胺
SB431542
维甲酸
CHIR99021
多索吗啡
LDN193189
生长因子
GABA祖细胞
GABA神经元
抗坏血酸

图14a

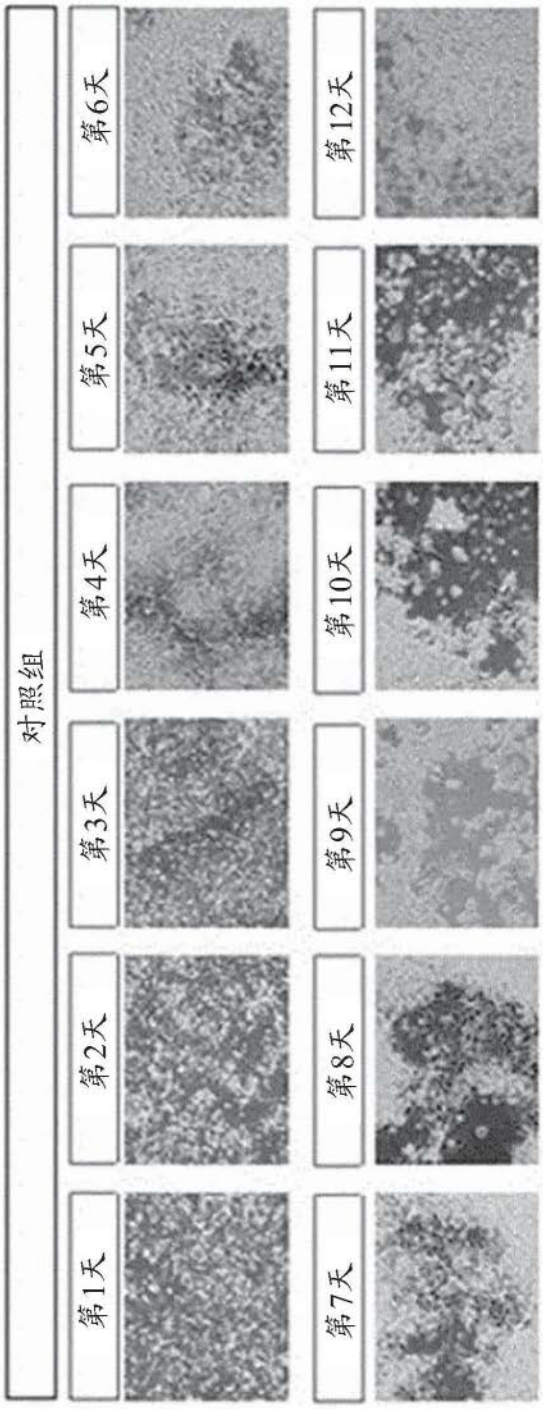


图14b

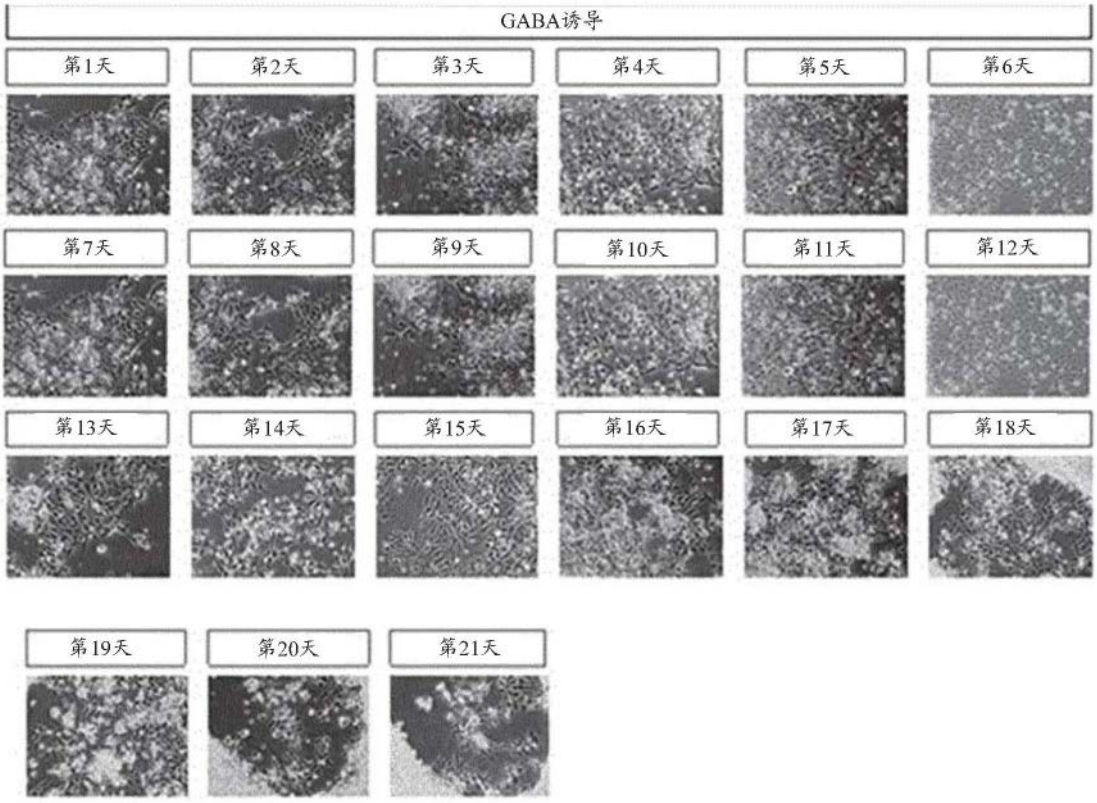

GABA诱导
第1天
第2天
第3天
第4天
第5天
第6天
第7天
第8天
第9天
第10天
第11天
第12天
第13天
第14天
第15天
第16天
第17天
第18天
第19天
第20天
第21天

图14c

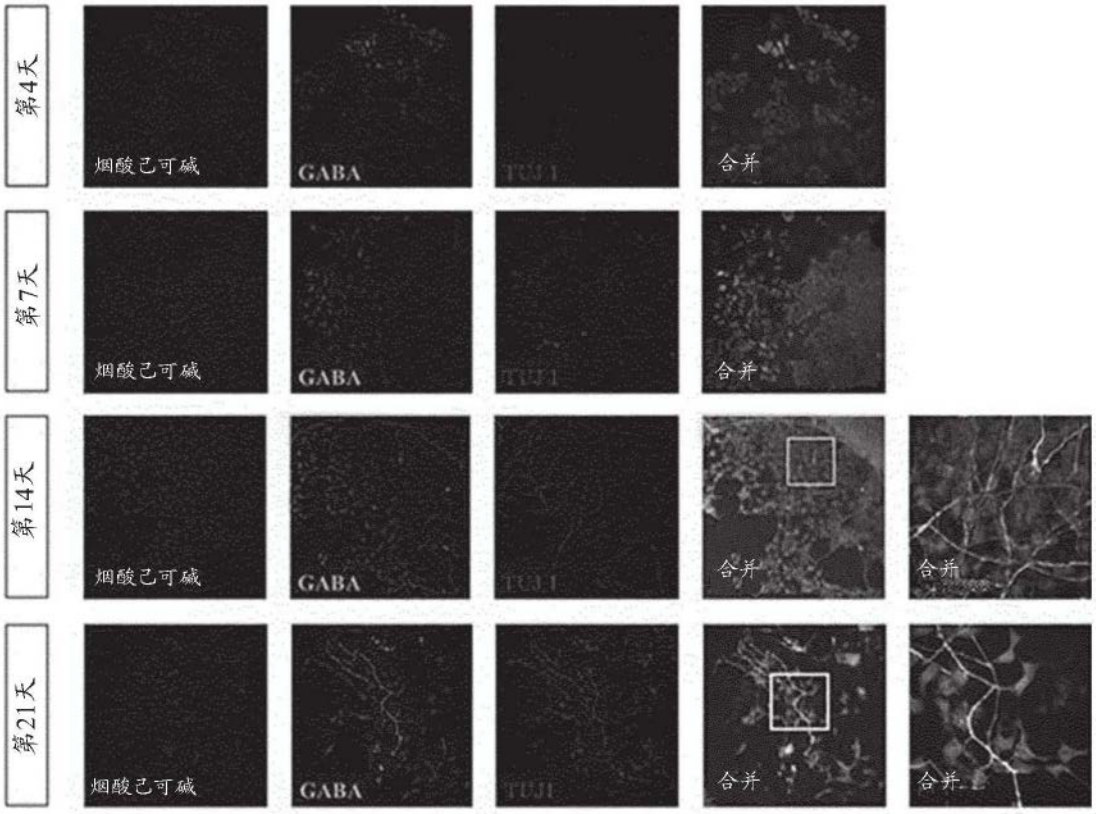

第4天
烟酸己可碱
GABA
TUJ1
合并
第7天
烟酸己可碱
GABA
TUJ1
合并
第14天
烟酸己可碱
GABA
TUJ1
合并
合并
第21天
烟酸己可碱
GABA
TUJ1
合并
合并

图15a

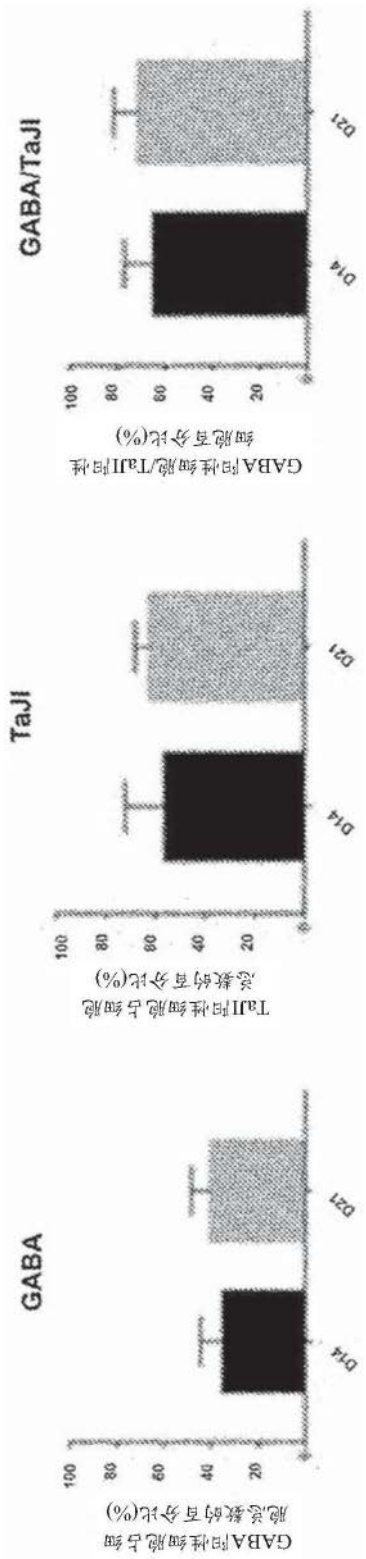

GABA/TaJI
D21
D14
100
80
60
40
20
GABA阳性细胞/TaJI阳性
细胞百分比(%)
TaJI
D21
D14
100
80
60
40
20
TaJI阳性细胞占细胞
总数的百分比(%)
GABA
D21
D14
100
80
60
40
20
GABA阳性细胞占细
胞总数的百分比(%)

图15b

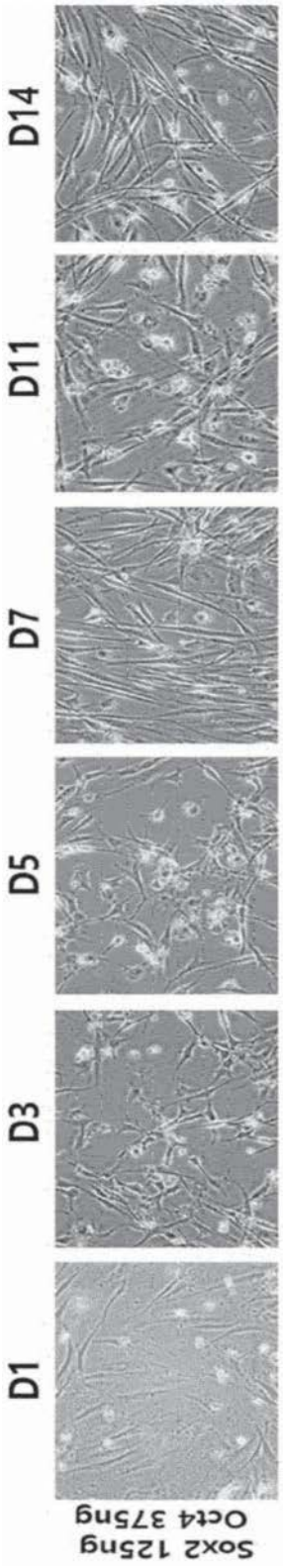


图16

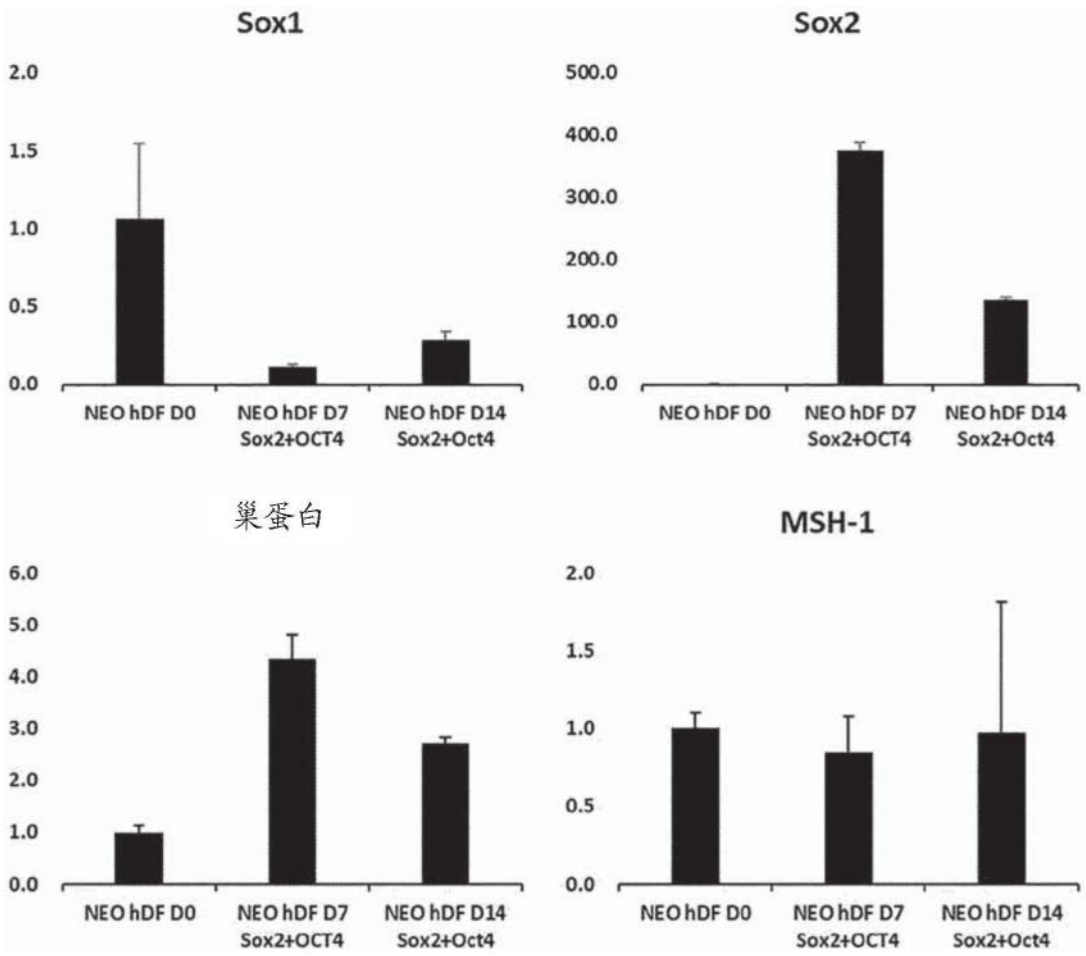

Sox1
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
NEO hDF D0
NEO hDF D7 Sox2+OCT4
NEO hDF D14 Sox2+Oct4
Sox2
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
NEO hDF D0
NEO hDF D7 Sox2+OCT4
NEO hDF D14 Sox2+Oct4
巢蛋白
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
NEO hDF D0
NEO hDF D7 Sox2+OCT4
NEO hDF D14 Sox2+Oct4
MSH-1
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
NEO hDF D0
NEO hDF D7 Sox2+OCT4
NEO hDF D14 Sox2+Oct4

图17

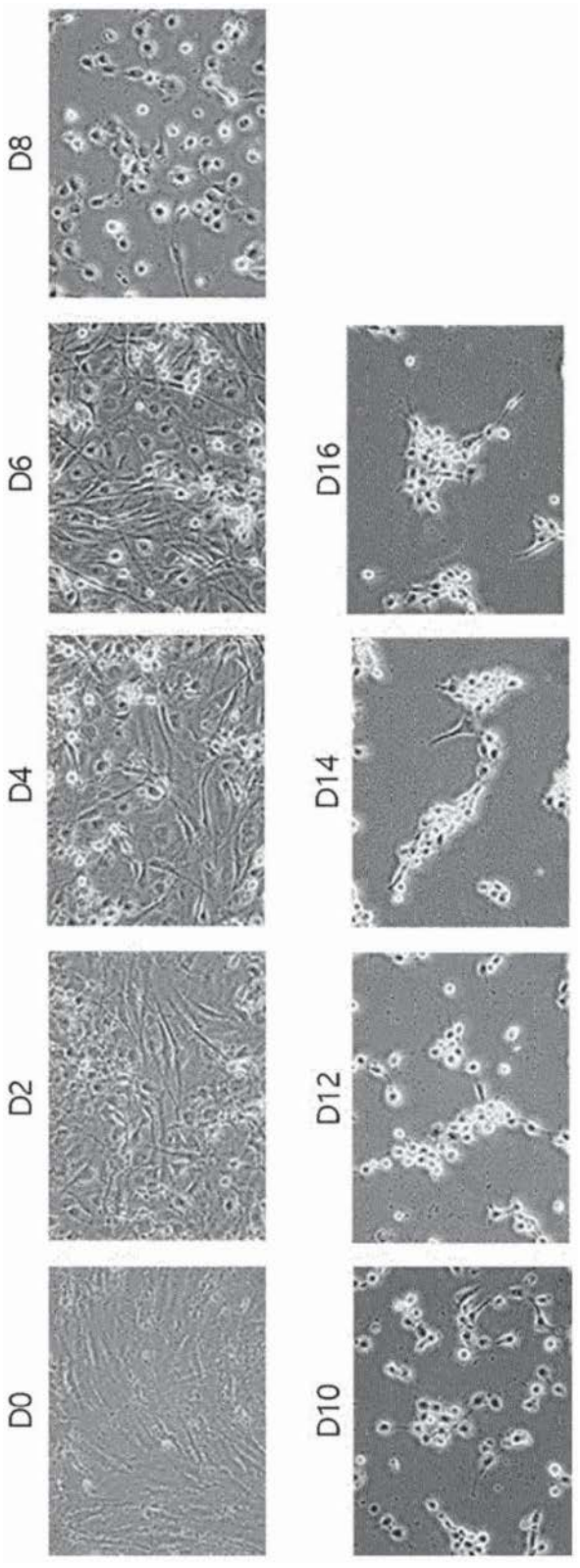


图18

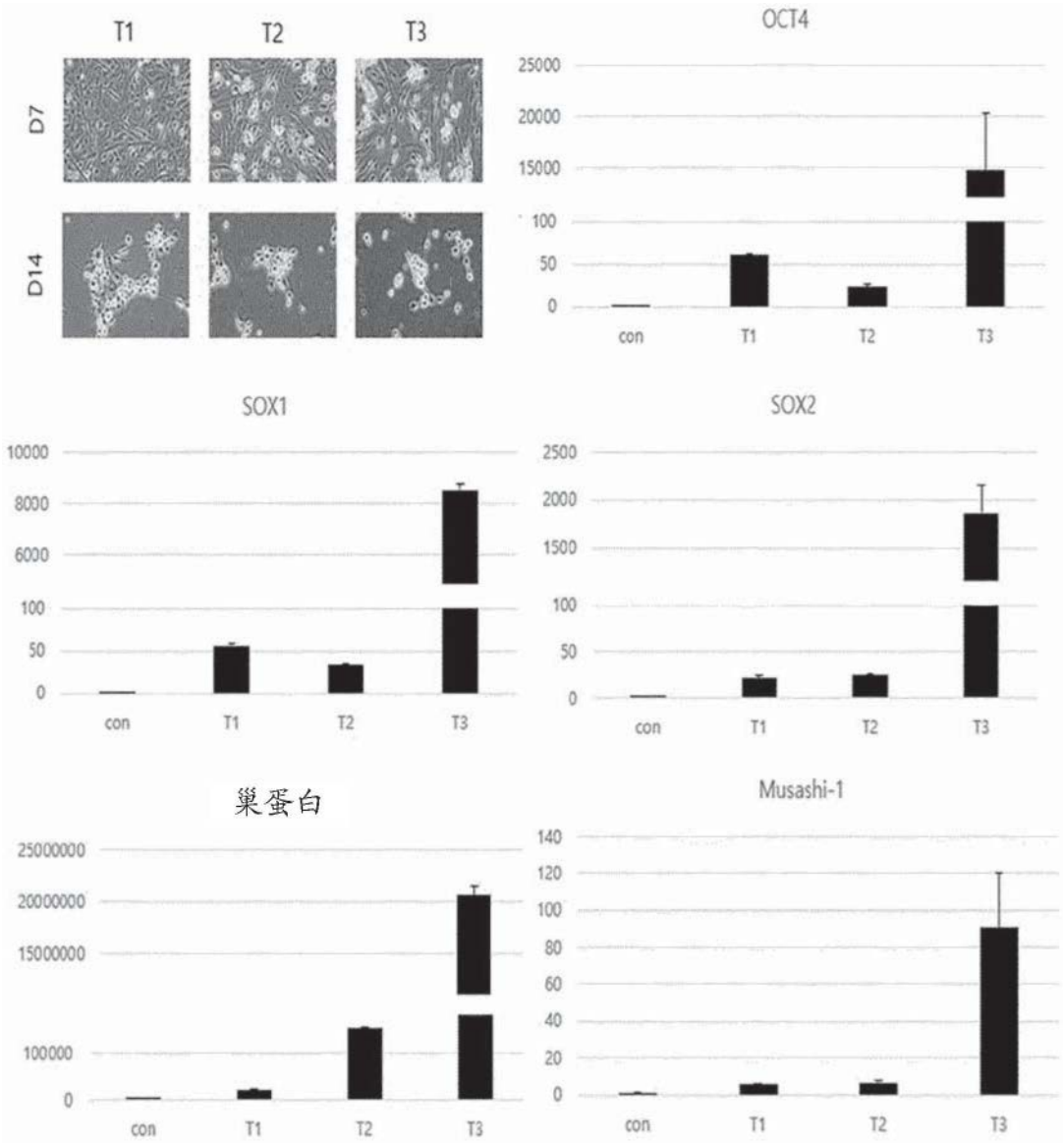

T1
T2
T3
D7
D14
OCT4
25000
20000
15000
100
50
0
con
T1
T2
T3
SOX1
10000
8000
6000
100
50
0
SOX2
2500
2000
1500
巢蛋白
25000000
20000000
15000000
100000
Musashi-1
140
120
100
80
60
40
20

图19