



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102083964 B

(45) 授权公告日 2013. 06. 12

(21) 申请号 200980126007. 5

(22) 申请日 2009. 05. 08

(30) 优先权数据

61/052, 098 2008. 05. 09 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 01. 05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/GB2009/001149 2009. 05. 08

(87) PCT申请的公布数据

W02009/136168 EN 2009. 11. 12

(73) 专利权人 格拉斯哥大学大学行政评议会

地址 英国格拉斯哥

(72) 发明人 保罗·希尔斯

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限

责任公司 11240

代理人 李丙林 张英

(51) Int. Cl.

C12N 5/06 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2006120476 A1, 2006. 11. 16, 权利要求

1, 权利要求 3-6, 说明书第 37 页第 19 行 - 第 20

行, 第 44 页第 12 行 - 第 15 行, 第 47 页第 10
行 - 第 12 行, 表 3.

US 6878543 B1, 2005. 04. 12, 全文.

Karen L Seeberger et al. Expansion
of mesenchymal stem cells from human
pancreatic ductal epithelium. 《Laboratory
Investigation》. 2006, 第 86 卷 141-153.

审查员 王婷

权利要求书1页 说明书17页 附图4页

(54) 发明名称

与基于细胞的疗法相关的材料和方法

(57) 摘要

本发明涉及提供一种新型细胞群, 其可用于
与细胞变性或年龄有关的组织变化相关的疾病状
态的组织再生和治疗。该细胞群来源于成体干细
胞 / 祖细胞, 其特征在于其对于 Thy1. 1 细胞标记
物呈阳性或阴性。

1. 一种起源于胰腺组织的分离的双潜能细胞群,其中,所述细胞群为 Thy1.1 和 PDX-1 阳性,并且所述细胞群的特征在于,所述群中的 Thy1.1 阳性细胞的百分比大于 50%,并且进一步地,其中所述细胞群的特征在于,所述细胞能够分化成胰腺细胞和肝细胞类型。
2. 根据权利要求 1 所述的分离的双潜能细胞群,其中,所述细胞群的特征在于,所述群中的 Thy1.1 阳性细胞的百分比大于 80%。
3. 根据权利要求 1 所述的分离的双潜能细胞群,其中,所述细胞群的特征在于,所述群中的 Thy1.1 阳性细胞的百分比大于 98%。
4. 根据权利要求 1 所述的分离的双潜能细胞群,其中,所述细胞群为 GATA 4 阳性。
5. 根据权利要求 1 所述的分离的双潜能细胞群,其中,所述细胞群为 HNF3 β 阳性。
6. 根据权利要求 1 所述的分离的双潜能细胞群,其中,所述胰腺组织来自人。
7. 根据权利要求 1 所述的分离的双潜能细胞群,其中,所述胰腺组织来自大鼠。
8. 一种在培养物中生产肝细胞群的方法,所述方法包括在肝谱系分化培养基中培养根据权利要求 1-7 中任一项所述的分离的双潜能细胞群。
9. 根据权利要求 8 所述的方法,其中,所述肝谱系分化培养基无血清且含有 FGF-4。
10. 一种在培养物中生产胰腺细胞群的方法,所述方法包括在胰腺谱系分化培养基中培养根据权利要求 1-7 中任一项所述的分离的双潜能细胞群。

与基于细胞的疗法相关的材料和方法

[0001] 相关申请的参考

[0002] 本申请是与于 2008 年 5 月 9 日提交的美国临时专利申请第 61/052,098 号的共同未决申请,其与该美国临时专利申请具有至少一个共同的发明人,并要求该美国临时专利申请的优先权。该在先申请的全文通过引用结合于此。

技术领域

[0003] 本发明涉及提供新型细胞群,其可用于与细胞变性或年龄相关的组织变化相关的疾病状态的组织再生和治疗。具体地,但不限于,本发明提供了由确定新型细胞群而产生的材料和方法,该新型细胞群表现出分化成胰腺细胞类型和肝细胞类型的双潜能。

背景技术

[0004] 干细胞是非特化细胞,其具有在培养物中长期增殖的能力并可被诱导从而变成特化的细胞类型。干细胞主要可以从胚胎或成体中分离,但这些细胞表现出不同的性质和功能。

[0005] 干细胞已从许多哺乳动物物种的胚胎(胚胎的/胚胎干细胞-ESC)中分离出来。二十多年来,来自小鼠的胚胎干细胞是人们集中研究的对象,并为人 ESC 的分离铺平了道路,自 1998 年以来已经实现了人 ESC 的分离和研究。

[0006] ESC 典型地来源于胚胎的胚泡(blastocyst),它们在体内继续产生所有随后发育的细胞类型。另一方面,成体干细胞(ASC)存在于许多组织中,它们能够代替由于创伤和,或,损耗和损伤而损失的细胞。这些细胞具有提供用于治疗疾病例如是糖尿病和帕金森病的基于细胞的疗法的潜能,在这些疾病中存在导致特定病理的细胞损失和损害。它们也具有用于筛选药物、毒理学研究、研究发育进程、治疗年龄相关的组织缺失和变性的潜能。它们也具有手术切除、创伤后的或作为整容外科手术的一部分的组织再生的潜能。

[0007] ASC 是在成体组织或器官中的分化细胞当中发现的未分化细胞,它们是非特化的并且能够自我更新,维持分化从而产生组织或器官的主要细胞类型的能力。ASC 被认为维持和实现组织修复。成熟组织中成体干细胞的起源是未知的,并且它们的可塑性程度仍有待确定。它们在移植中的应用是众所周知的。来自骨髓的 ASC 用于移植已有 30 余年。成体非 HSC 的用途、其效能、可塑性和长期随访(long-term follow up)的安全性仍未得到证实。非间质 ASC 的报道在本领域中仍然存在争议,但神经干细胞现已得到确认并被认为是一种真正的(bone fide)ASC 类型。

[0008] ECS 的被证实的多能性和使它们大量生长的能力使得它们成为有吸引力的基于细胞的疗法候选物。在认为 ASC 稀少并且没有对于它们的生长条件充分限制以产生用于潜在疗法的足够数量的合适细胞的情况下,ASC 的应用受到严重限制。

[0009] 但是,ASC 确实具有重要的优势,因为它们可以来源于“自身”,因此任何患者都能接受其自身的细胞,而不需要经受为了防止排斥反应的免疫抑制的有害副作用,包括显著增大的癌症风险。有限的效力/可塑性也被认为是提高的安全系数,因为异常的细胞分化

会受到限制并且瘤形成的风险降低。

[0010] 肝和胰腺的共同发育起源揭示了这些器官可以共用共同的干细胞 / 祖细胞群。有相当多的间接证据支持这种假说。外植体实验已证明表达 Pdx-1 的腹侧内胚层在接近心脏中胚层后转化成 (diverted to) 肝谱系 (hepatic lineage) (Deutsch 等人, 2001)。在鼠科动物胰腺内的导管区域中也观察到具有肝细胞特性的细胞。用缺乏铜的食物喂养的小鼠的胰腺会受损伤、腺泡细胞缺失, 并且在 4-6 周之后, 观察到肝卵圆细胞 (Rao 等人, 1986 ; Rao 和 Reddy, 1995)。此外, 已证明, 将经受缺乏铜的食物的大鼠中分离的胰腺细胞移植到脾中, 通过整合到薄壁组织结构 (parenchymal structure) 中并表达成熟肝特异蛋白, 在形态和功能上都表现出分化成肝细胞 (Dabeva 等人, 1997)。也已报道, 移植到缺乏富马酰乙酰乙酸酯 / 盐水解酶并随后发生酪氨酸血症的同系受体中的野生型小鼠胰腺细胞悬浮液导致通过肝功能正常化的供体来源的细胞进行生物化学救护 (Wang 等人, 2001)。此外, 成体小鼠胰腺中 KGF 的转基因过表达导致胰岛内出现肝细胞并伴有胰腺管增生 (Krakowski 等人, 1999b ; Krakowski 等人, 1999a)。

[0011] 已由胰腺导管和胰岛细胞表征了几种推定的胰腺祖细胞 (Abraham 等人, 2004 ; Cornelius 等人, 1997 ; Lechner 等人, 2002 ; Ramiya 等人, 2000)。在体外分化之后, 已观察到这些细胞群之一表达甲胎蛋白和 c-Met, 这些蛋白通常是由肝细胞表达的蛋白质 (Zulewski 等人, 2001)。近期报道了从人胰腺导管上皮中分离的间充质干细胞群具有胰腺、肝和中胚层分化的潜能 (Seeberger 等人, 2006)。虽然这些细胞可被诱导从而表达 Gata 4、白蛋白和 TAT (酪氨酸氨基转移酶), 但是无功能评价的报道。

[0012] 本发明人先前已确定了另外的细胞类型, 从成年大鼠胰腺导管中分离出的胰腺来源探路细胞 (pathfinder cell) (PDPC), 其表现出在 STZ 糖尿病模型中的多潜能和功能效能 (Shiels 2004 ; 和 WO 2006/120476, 以引用的方式合并在此)。在成年大鼠肝中, 推定的干细胞群可在通过化学损伤或部分肝切除术诱导之后被诱导 (Petersen 等人, 1998 ; Petersen 等人, 2003)。

发明内容

[0013] 现在依然需要提供可用于基于细胞的疗法的细胞群来治疗疾病, 特别是与细胞变性相关的疾病。糖尿病是此种疾病的实例。胰腺中的胰岛素由分泌胰岛素的 β -细胞构成。尽管对代替细胞的起源存在争议, 在体内, β -细胞更新 (turnover) 被认为是发生于整个生命期间。因此, 糖尿病为这种疾病的一个实例, 其中与完全起作用的原生细胞 (fully functioning native cell) 类似的细胞 (特别是自身来源的细胞) 的供给提供了治疗的重要替代方式。在糖尿病中, 与 β -细胞类似的细胞的供给 (因为它们可以生成胰岛素) 提供了一种对于疾病重要的基于细胞的疗法。

[0014] 考虑到这种和其他疾病, 本发明人已从成体胰腺导管中分离出干细胞 / 祖细胞群来源的细胞亚群。

[0015] 在一些实施方式中, 本文提供的细胞亚群是 Pdx-1 (HUMAN : NP_000200.1GI : 4557673 ; RAT : NP_074043.3GI : 50838802) 阳性。Pdx-1 表达的存在表明细胞具有作为非 β -细胞源胰岛素的来源的潜能。

[0016] 在一些实施方式中, 本文提供的成体干细胞 / 祖细胞亚群由 Thy1.1 (CD90)

(HUMAN:NP_006279) 的存在或缺乏来表征。下面讨论 Thy1.1 阳性和阴性亚群的性质。

[0017] 1. Thy1.1 阳性细胞

[0018] 在维持（非分化）培养基中，Thy1.1 阳性细胞亚群为 Pdx-1 阳性、胰岛素阴性和胰高血糖素阴性。当置于胰腺分化培养基中时，Thy1.1 阳性细胞群起初表现出成纤维细胞样形态，然后形成缠结的细胞簇 (matted cellcluster)，其最终与亲代细胞层分开。所产生的分化的细胞簇为 Pdx-1、胰岛素和胰高血糖素阳性（图 4，组 B）。

[0019] 与本文描述的 Thy 1.1 阳性细胞亚群的出人意料的测定结果是它们至少具有双潜能。具体地，当具有适当的分化培养基时，Thy 1.1 阳性细胞能够分化成胰腺细胞或肝细胞类型。

[0020] 2. Thy 1.1 阴性细胞

[0021] 在非分化状态下，Thy 1.1 阴性细胞群是 Pdx-1 阳性的，但为胰岛素和胰高血糖素阴性。当在分化培养基中生长时，Thy 1.1 阴性细胞未表现出形态变化，但检测到胰岛素转录。因此，Thy 1.1 阴性群提供了非 β -细胞源胰岛素的新来源。

[0022] 因此，在最一般的意义上说，本发明提供了利用多潜能成体干细胞群来源的新型细胞亚群基于细胞的治疗来治疗老化疾病和病症的材料和方法，该细胞亚群为 Pdx-1 阳性。

[0023] 这样的细胞群提供了用于诸如糖尿病和诸如帕金森病之类的神经退行性障碍的基于细胞的治疗的潜能。

[0024] 成体干细胞群（也被称为祖细胞）可以来源于成体胰腺组织，例如人、大鼠、小鼠、灵长类动物、猪等。该成体组织优选为胰腺组织，但也可以是其他器官来源的组织，如乳腺、骨髓、心脏、肝脏或肾脏。

[0025] 在本发明的一种实施方式中，成体干细胞来源于成体大鼠胰腺，格拉斯哥大学理事会 (University Court of the University of Glasgow) 根据布达佩斯条约 (1997)，于 2005 年 5 月 12 日将其保藏在欧洲细胞培养物保藏中心 (European Collection of Cell Cultures), Porton Down, Salisbury Wiltshire, UK, SP4 0JG, 保藏编号为 ECACC No. Q6203。这些细胞在下文中被称为 PDPC (胰腺来源的祖细胞)。

[0026] 如上所述，本发明人还确定了与标记物 Thy1.1 (CD90) (HUMAN:NP_006279) 有关的两个另外的亚群。这两个亚群具有不同但同等重要的性质。具体地，Thy1.1 阳性细胞具有分化成胰腺细胞和肝细胞类型的双潜能。在一些实施方式中，本文描述的细胞亚群提供了胰岛素的非 β -细胞来源。在一些实施方式中，本文描述的细胞亚群提供了用于评价测试物质毒性的细胞类型（例如，用于毒性测试）。

[0027] 因此，第一方面，提供了起源于成体组织的干细胞 / 祖细胞群，其中所述细胞在血清的存在下能够在无基质胶的培养体系中生长，并且其中该细胞为 Thy1.1 阳性。在一些实施方式中，Thy1.1 阳性细胞也是 Pdx-1 阳性的。在一些实施方式中，Thy1.1 阳性细胞为巢蛋白 (Nestin) (RAT:NP_037119.1GI:6981262、HUMAN:NP_006608.1GI:38176300) 阳性。

[0028] 在一些实施方式中，按照流式细胞分析术确定，在该群中巢蛋白阳性细胞的百分比少于 50%（例如，少于 40%、30%、20%、10%、5%、2% 或 1%）。在一些实施方式中，可通过巢蛋白核酸的表达（例如，通过 PCR）将细胞区分为巢蛋白阳性细胞。

[0029] 当 Thy1.1 阳性细胞的百分比大于 50%，优选大于 60%，更优选大于 70%，

80 %、90 %、或 95 % 时,可以认为该细胞群为 Thy1.1 阳性 (CD90 阳性) (RAT :LOCUS : P01830GI135832、NP_006279GI :19923362)。在一些实施方式中,Thy1.1 阳性细胞群的纯度大于 98%。Thy1.1 阳性细胞的百分比可以通过例如流式细胞术或 PCR 来确定。

[0030] 在一些实施方式中,根据本发明的 Thy1.1 阳性细胞群对于 Pdx-1、CD49f、CD147、CD44、c-Met 和巢蛋白中一种或多种的表达呈阳性。在一些实施方式中,Thy1.1 阳性细胞群对于 CD24、CD45、CD31、c-kit 和 CK19 中一种或多种的表达呈阴性。在一些实施方式中,根据本发明的 Thy1.1 阳性细胞群具有下面的细胞表面标记物谱 (profile) :

[0031]	Thy1.1 (CD90)	阳性
[0032]	Pdx-1	阳性
[0033]	CD49f	~ 95% +
[0034]	CD24	阴性
[0035]	CD147	~ 90% +
[0036]	CD45	阴性
[0037]	CD44	~ 85% +
[0038]	CD71	低
[0039]	CD31	阴性
[0040]	C-KIT	阴性
[0041]	CK19	阴性
[0042]	c-Met	阳性
[0043]	巢蛋白	阳性

[0044] (低 = 约小于或等于表达标记物的细胞的 5%)

[0045] 本发明还提供了一种药物组合物,其包含根据本发明这个方面所述的细胞群,还有药用载体。

[0046] 在本发明的第二方面,提供了一种生产从成体哺乳动物组织中分离的双潜能干细胞群的方法,所述方法包括:培养所述成体哺乳动物组织;获得出现的 (emergent) 细胞群单层;以及分离包含对于 Thy1.1 呈阳性细胞的亚群。在一些实施方式中,该亚群的至少 50%、60%、70%、80%、90%、95% 为 Thy1.1 阳性。

[0047] 该方法还包括分离与一种或多种提供在上述谱中的其他细胞表面标记物结合的那些对于 Thy1.1 呈阳性的细胞 (例如, Pdx-1、CD49f、CD147、CD44、c-Met 和巢蛋白中一种或多种呈阳性和 / 或 CD24、CD45、CD31、c-kit 和 CK19 中一种或多种呈阴性)。在一些实施方式中,该成体哺乳动物组织是来源于胰腺的,例如来源于胰腺导管的。在一些实施方式中,该成体哺乳动物组织是乳腺、肝脏或肾脏。在一些实施方式中,该成年哺乳动物组织是人组织。

[0048] 除了通过获得成年哺乳动物组织而获得出现的细胞群单层,一种方法可能涉及获得已分离的成体干细胞,例如,于 2005 年 5 月 12 日以登录号为 Q6203 保藏在 ECACC 的那些细胞。

[0049] 第三方面,提供了一种在培养物中生产肝细胞群的方法,所述方法包括在适于肝谱系分化的培养基中培养根据本发明的 Thy1.1 阳性细胞群。作为一个实例 (本领域技术人员知道其他的实例),该培养基可以是含有 FGF-4 的无血清分化培养基。

[0050] 第四方面,提供了一种在培养物中生产胰腺细胞群的方法,所述方法包括在适于胰腺谱系分化的培养基中培养根据本发明的 Thy1.1 阳性细胞群。

[0051] 本发明可以扩展到由本文描述的方法获得或可由本文描述的方法获得的细胞或细胞群。

[0052] 在本发明的第五方面,提供了一种治疗与细胞变性或年龄有关的组织变化相关的疾病状态的方法,所述方法包括向患有所述疾病或年龄相关病症的患者,给予根据本发明的 Thy1.1 阳性成年干细胞群或包含所述 Thy1.1 阳性细胞群的药物组合物。

[0053] Thy1.1 阳性细胞群可以静脉内给予或可以将其移植到患病部位中。

[0054] 在一些实施方式中,该疾病与胰腺细胞、神经元细胞、心血管细胞(例如,心肌细胞)、上皮细胞、肝细胞或肾细胞的变性相关。

[0055] 待治疗的疾病状态可包括糖尿病(I型和II型)、肝病、肾病、眼病、帕金森病和心血管病,以及年龄相关的身体器官和组织的退化性病症。本发明的这个方面也可用作美容手术形式,例如组织的细胞再生和用于阻止衰老形成。

[0056] 在一些实施方式中,该细胞的供体和受体为同一物种(例如,都是人)。在一些实施方式中,该细胞的供体和受体为不同物种。因此,本发明的实施方式包括利用大鼠来源的成体干细胞群治疗人类患者。

[0057] 在本发明的第六方面,提供了一种生产特异性分化的细胞群(例如胰腺细胞或肝细胞)的方法,所述方法包括以下步骤:提供成体干细胞群;利用 Pdx-1 和/或 Thy1.1 标记物和可选的一种或多种本文鉴定的与 Thy1.1 亚群细胞表面标记物谱有关的其他标记物来选择细胞亚群;以及在有助于细胞分化的条件下培养所述细胞亚群。

[0058] 本发明进一步提供了用于医学治疗方法的根据本发明第一方面的细胞群,该医学治疗包括整容手术。该方法可以治疗与细胞损失或变性相关的疾病状态或老化病症,例如,糖尿病或帕金森病。

[0059] 在本发明的第六方面,提供了起源于成体组织的细胞群,其中所述细胞能够在血清的存在下在无基质胶的培养体系中生长,并且其中该细胞为 Thy1.1 阴性。

[0060] 在一些实施方式中,所述细胞群为 Pdx-1 阳性。该细胞群也可以为巢蛋白阳性。

[0061] 本发明还提供了一种药物组合物,其包含成体干细胞 Thy1.1 阴性细胞群,还有药用载体。

[0062] 在本发明的第七方面,提供了一种从成体哺乳动物组织中生产分离干细胞群的方法,所述方法包括:培养所述成体哺乳动物组织;获得出现的细胞群单层;以及分离对于 Thy1.1 呈阴性的细胞亚群。在一种实施方式中,该方法进一步包括分离 Pdx-1 阳性和/或巢蛋白阳性的细胞亚群。

[0063] 在一种实施方式中,Thy1.1 阴性细胞亚群对于 CD49f、CD24、CD147、CD44、c-Met 中一种或多种的表达呈阳性,和/或对于 CD31、c-kit 和 ck7 中一种或多种的表达呈阴性。在一种实施方式中,分离的 Thy1.1 阴性细胞亚群具有下面细胞表面标记物谱:

[0064] Thy1.1 (CD90) 阴性

[0065] Pdx-1 阳性

[0066] CD49f ~ 95% +

[0067] CD24 ~ 80% +

[0068]	CD147	~ 80% +
[0069]	CD45	阴性
[0070]	CD44	~ 60% +
[0071]	CD71	低
[0072]	CD31	阴性
[0073]	c-KIT	阴性
[0074]	ck7	阴性
[0075]	CK19	弱阳性
[0076]	c-Met	阳性

[0077] (低=约小于或等于表达标记物的细胞的 5%)

[0078] 除了通过获得成体哺乳动物组织来获得出现的细胞群单层,该方法可能涉及获得已分离的成体干细胞/祖细胞,例如,于 2005 年 5 月 12 日以登录号为 Q6203 保藏在 ECACC 的那些细胞。

[0079] 在本发明的第八方面,提供了一种治疗糖尿病或与胰岛素产生减少相关的疾病状态的方法,所述方法包括向患有所述疾病或年龄相关病症的患者给予根据本发明的 Thy1.1 阴性细胞群或包含所述 Thy1.1 阴性细胞群的药物组合物。

[0080] Thy1.1 阴性细胞群可以静脉内给予或可以将其移植到患病部位中。

[0081] 在一些实施方式中,该细胞的供体和受体为同一物种,例如,人。在一些实施方式中,该细胞的供体和受体为不同物种。因此,本发明的实施方式包括利用成体大鼠干细胞/祖细胞来治疗人类患者。

[0082] 在本发明的第九方面,提供了一种生产能够产生胰岛素的特异性分化的细胞群的方法,所述方法包括以下步骤:提供成体干细胞群;选择 Pdx-1 阳性和 Thy1.1 标记物阴性的成体干细胞亚群;以及在有助于细胞分化的条件下培养所述细胞亚群。该方法进一步包括,基于作为 Thy1.1 细胞表面标记物谱的一部分的一种或多种上文中所鉴定的其他标记物来选择成体干细胞群。

[0083] 本发明进一步提供了一种用于医学治疗方法的根据本发明的成体干细胞 Thy1.1 阴性细胞群。特别地,该方法可以治疗糖尿病。

[0084] 本文还提供了生产胰岛素的方法。生产胰岛素的方法可以包括在产生胰岛素的条件下,培养本文描述的 Thy1.1 阴性、Pdx-1 阳性细胞群(例如,成体组织,如成体胰腺组织来源的 Thy1.1 阴性、Pdx-1 阳性细胞群)。该方法可进一步包括从该培养物中分离胰岛素。在一些实施方式中,Thy1.1 阴性细胞对于 CD49f、CD24、CD147、CD44、c-Met 中一种或多种的表达呈阳性,和/或对于 CD31、c-kit 和 ck7 中一种或多种的表达呈阴性。

[0085] 在另一种实施方式中,生产胰岛素的方法包括在生产胰岛素的条件下,培养本文描述的 Thy1.1 阳性、Pdx-1 阳性细胞群(例如,成体组织,如成体胰腺组织来源的分化的 Thy1.1 阳性、Pdx-1 阳性细胞群)。该方法可进一步包括从该培养物中分离胰岛素。在一些实施方式中,Thy1.1 阳性细胞群对于 Pdx-1、CD49f、CD147、CD44、c-Met 和巢蛋白中一种或多种的表达呈阳性,和/或对于 CD24、CD45、CD31、c-kit 和 CK19 中一种或多种的表达呈阴性。

[0086] 本发明的方面和实施方式将参考附图通过实施例来说明。其他的方面和实施例对

本领域技术人员是显而易见的。本文提及的所有文献以引用的方式结合于本文。

附图说明

[0087] 图 1. 体外未分化的 Thy1.1 阳性和 Thy1.1 阴性群的形态。Thy1.1 阳性和 Thy1.1 阴性 PDPC 群的体外肝和胰腺分化 (图 1A-图 1C): 分化期间在 Thy1.1 阴性群中几乎没有观察到形态变化。(图 1A) 未分化的 Thy1.1 阴性 PDPC。(图 1B) 诱导 Thy1.1 阴性 PDPC 胰腺分化后 28 天。(图 1C) 诱导 Thy1.1 阴性 PDPC 肝分化后 28 天。(图 1D-I): 在诱导 Thy1.1 阳性 PDPC 肝分化时观察到显著的形态变化。(图 1D) 未分化的 Thy1.1 阳性 PDPC (成纤维细胞样形态)。(图 1E) 诱导 Thy1 阳性 PDPC 肝分化后 14 天。(图 1F) 诱导 Thy1.1 阳性 PDPC 肝分化后 28 天——内腔结构 (luminal structure) 存在并占主导地位的上皮形态。(图 1G) 肝诱导后 28 天 thy1 阳性 PDPC 的立方形态 (Cuboidal morphology)。(图 1H) 诱导 Thy1.1 阳性 PDPC 胰腺分化 14 天后。(图 1I) 诱导 Thy1.1 阳性 PDPC 胰腺分化 28 天后——胰岛样簇 (Islet-like cluster) 形成并随后分离到培养基中。

[0088] 图 2. 通过流式细胞术分析的 MACS 分选的 PDPC 的细胞表面特征。(图 2A) Thy1 (CD90) 阳性群对于 CD24、CD31、CD45、c-kit 的表达呈阴性且对于 CD71 的表达低,但对于 CD147、CD44 和 CD49f 的表达呈阳性。(图 2B) Thy1 (CD90) 阴性群对于 CD31、CD45、c-kit 的表达呈阴性,其对于 CD71 的表达低,但对于 CD24、CD147、CD44 和 CD49f 的表达呈阳性。

[0089] 图 3. Thy1.1 分选的 PDPC 群的免疫细胞化学分析。所示出的阳性对照为白蛋白 (图 3A)、细胞角蛋白 7 (图 3E)、波形蛋白 (图 3I) 和细胞角蛋白 19 (图 3M)。未分化的 Thy1.1 阴性 PDPC 群表现出对白蛋白染色呈阴性 (图 3B)、对细胞角蛋白 7 染色呈阴性 (图 3F)、对波形蛋白染色呈阴性 (图 3J),但对细胞角蛋白 19 染色较弱 (图 3N)。未分化的 Thy1.1 阳性群为白蛋白 (图 3C)、细胞角蛋白 7 (图 3G)、波形蛋白 (图 3K) 和细胞角蛋白 19 (图 3O) 阴性。但是到 14 天时,在肝分化培养基中, Thy1.1 阳性 PDPC 为白蛋白阳性 (图 3D),并且在内腔样区域中,为波形蛋白阳性 (图 3L) 和细胞角蛋白 19 阳性 (图 3P),但细胞角蛋白 7 始终为阴性 (图 3H)。

[0090] 图 4. 胰腺分化培养基中 Thy1.1 阳性 PDPC (图 4A) 和 Thy1.1 阴性 PDPC (图 4B) 的 RT-PCR。Thy1.1 阴性和阳性 PDPC 在胰腺分化培养基中培养 28 天。柱:(1) 阳性对照、(2) 未分化 PDPC、(3) 28 天分化的 PDPC、(4-6) 样品 1-3 的无 RT 对照。

[0091] 图 5. 肝分化培养基中 Thy1.1 阳性 PDPC 和 Thy1.1 阴性 PDPC 的 RT-PCR。Thy1.1 阳性 (图 5A) 和阴性 (图 5B) PDPC 在肝分化培养基中培养 28 天。柱:(1) 阳性对照、(2) 未分化的 PDPC、(3) 第 7 天、(4) 第 14 天、(5) 第 21 天、(6) 第 28 天、(7-13) 样品 1-6 的无 RT 对照。白蛋白、CK19 和 HNF1 α 的表达在 Thy1.1 阳性群中被诱导,但在 Thy1.1 阴性群中未观察到。

[0092] 图 6. 未分化的 Thy1.1 阳性 PDPC (图 6B) 或 Thy1.1 阴性 PDPC 群 (图 6C) 没有贮积糖原。在含有 FGF-4 的培养基中培养之后 Thy1.1 阳性 PDPC 产生贮积糖原 (图 6D 和图 6E)。当用高碘酸-希夫染色时,可看到糖原贮积有品红染色的累积。在含有 FGF-4 的肝分化培养基中培养之后, Thy1.1 阴性 PDPC 没有看到染色 (图 6F)。阳性对照 (图 6A)。

具体实施方式

[0093] 材料和方法**[0094] 大鼠 PDPC 的分离和维持培养**

[0095] 在接种到 CMRL 培养基之前,通过解剖和切碎从 12 个月大的瑞士白化大鼠 (Glasgow) 中分离胰腺导管。在培养约 5 周之后, PDP 细胞以融合单层 (confluent monolayer) 形式出现。然后收集这些细胞并在 PBS 中冲洗。在 37℃, 5% CO₂ 气氛中, 在带 0.2 μm 过滤帽的 T75 培养瓶 (Corning, UK) 中的 20ml CMRL 1066 培养基 (Invitrogen, Paisley, UK.) 中持续培养 PDPC, 该培养基含有 10% 胎牛血清 (Sigma, Poole, UK)、2mM glutamax (谷丙氨酸二肽)、1.25 μg/ml 两性霉素 B 和 100u/ml 青霉素、100 μg/ml 链霉素 (都为 Invitrogen 的, Paisley, UK)。通过用移液管彻底除去培养基并在室温下 5 分钟内向该瓶中加入 10ml 无钙和镁的汉克斯平衡盐溶液 (HBSS), (Cambrex Bio-Science, Wokingham, UK) 传代亚融合培养物。在通过移液管从该瓶中除去 HBSS 之后, 将 2ml 胰蛋白酶-维尔烯溶液 (200mg/L 维尔烯、500mg/L 胰蛋白酶) 加入到该瓶中。用显微镜定期检查该瓶直至确定该细胞单层分离 (dissociation)。然后用移液管转移细胞, 并且如上根据需以 1/5 ~ 1/10 的密度通过加入 20ml 新鲜培养基重新培养。

[0096] 在 37℃, 5% CO₂ 气氛下, 将 PDPC 长期维持在带 0.2 μm 过滤帽的 T75 中的 CMRL 1066 培养基 (Invitrogen, Paisley, UK) 中, 该培养基含有 5% 胎牛血清 (Sigma, Poole, UK)、2mM Glutamax、1.25 μg/ml 两性霉素 B 和 100u/ml 青霉素 / 链霉素 (都为 Invitrogen, Paisley)。PDPC 在 37℃, 加湿的 5% CO₂ 气氛下生长为单层, 并在 90% 融合时用胰蛋白酶-EDTA (Invitrogen) 进行传代。对细胞进行计数并以 3300 细胞 / cm² 的密度再接种。

[0097] 磁性活化细胞分选

[0098] 按照制造商的方案 (免疫磁珠羊抗鼠 IgG (Dynabeads Goat anti mouse IgG) (Dyna1 Biotech)), 在 4℃ 下利用每 10⁶ 个靶细胞 1 μg 一抗 (primary antibody), 小鼠抗大鼠 Thy1.1 (CD90) (Serotec), 用磁性活化细胞分选 (MACS) 进行分离和消耗 (depletion), 持续 20 分钟。分选的细胞群是在维持培养基中的重悬细胞并再接种于组织培养瓶中。在实验中使用之前, 对每个阳性和阴性分选的群实施两次 MACS。在随后的分化实验中使用之前, 利用荧光活化流式细胞术来检查所有分选的群。

[0099] 细胞表面抗原的流式细胞术评估

[0100] 将细胞重悬在 HBSS 中的 0.5% BSA 中。然后在 1000x rpm 下离心 10 分钟, 并将所得的细胞团 (cell pellet) 重悬在 HBSS 中。在用台盘蓝 (Invitrogen, Paisley, UK) 进行活细胞计数 (viability count) 之后, 用 100 μl 一抗标记 1x 10⁶ 细胞 / ml。所使用的一抗是抗 CD90 (Serotec MCA47R, 1 : 75)、CD44 (Serotec MCA643, 1 : 10)、CD49f (Serotec MCA2034, 1 : 50)、CD147 (Serotec MCA729, 1 : 10)、c-KIT (Santa Cruz SC-19983, 1 : 20)、CD71 (Serotec MCA 155FT, 1 : 10)、CD24 (BD Biosciences 551133, 1 : 50)、CD45 (BD Biosciences 554875, 1 : 50)、CD31 (Serotec MCA1334GA, 1 : 50) 和 CD34 (Santa Cruz sc-7324, 1 : 50) 的。在黑暗中, 于 4℃ 下用 45 分钟将二抗加入到 0.2% BSA/PBS 中。然后在 0.2% BSA/PBS 中冲洗该细胞并以 1000x rpm 离心 3 次, 之后在黑暗中于 4℃ 下用 45 分钟向 2% BSA 中加入 100 μl 兔抗鼠免疫球蛋白的结合 FITC 的 Fab2 片段 (Dako Cytomation, Ely, UK 1 : 20) 进行标记。同时进行同种型 FITC 对照。在如前所述冲洗 3 次并离心之后, 将所得的细胞团重悬在 1ml HBSS 中并利用 BeckmanCoulter XL 流式细胞仪 (Beckman

Coulter, High Wycombe, UK) 分析细胞。

[0101] 分化实验

[0102] 为了进行胰腺分化,以 6600 细胞/cm² 的细胞密度接种 Thy1.1 阳性和 Thy1.1 阴性细胞群 (30 代)。24 小时之后,移去维持培养基,并用 HBSS 冲洗单层三次。随后在补充 1xITS、1.25 μg/ml 两性霉素 B 和 100 μ/ml 青霉素/链霉素 (都为 Invitrogen, UK)、10mM 烟酰胺 (Sigma)、10ng/ml KGF (Sigma) 和 0.2% BSA (Sigma) 的 DMEM:F12 (Lonza) 中培养细胞。

[0103] 为了进行肝分化,以 6600 细胞/cm² 将细胞接种于 T75 和 6 孔板中,并以 2500 细胞/cm² 将细胞接种于腔室玻片 (Nunc) 中维持 24 小时,用 HBSS 冲洗 3 次之后,替换为补充有成纤维细胞生长因子 -410ng/ml (Sigma)、1x ITS、100 μ/ml 青霉素/链霉素 (Invitrogen) 和 0.2% 牛血清白蛋白 (Sigma) 的 DMEM:F12 (Lonza)。每周更换培养基三次,在胰腺分化的 0 和 28 天,且在肝分化的 0、7、14、21 和 28 天收集细胞,以从未分化的 Thy1.1 阳性和 Thy1.1 阴性细胞中提取 RNA。将腔室玻片中经历了肝分化的细胞用 PBS 冲洗 2 次,并在 10-14 天之间于室温下用 4% 多聚甲醛固定 15 分钟。未分化的 Thy1.1 阳性和阴性群也同时在腔室玻片中生长,并在 90% 融合时如上所述进行固定。

[0104] 免疫荧光

[0105] 为了进行细胞内蛋白质染色,如上所述固定细胞。在 PBS 中冲洗细胞 3 次,并用 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) 渗透化处理 10 分钟。用驴血清孵化玻片 20 分钟,并用预先优化的在 0.5% BSA/PBS 中稀释的抗大鼠白蛋白 (Abcam ab14255, 1 : 100)、CK19 (Biodesign Int. M08029M, 1 : 100)、CK7 (Chemicon MAB3226, 1 : 100)、CK 18 (Sigma F-4772) 和波形蛋白 (Abcam ab8979, 1 : 50) 的一抗孵化 1 小时。玻片在 PBS 中冲洗三次,接着用适当 FITC 标记的二抗冲洗 (Abcam ab6749 或 Dako Cytomation F0313, Ely, UK)。省略一抗的实验组作为阴性对照。冷冻的大鼠肝切片用作阳性对照。在 Vectashield 中封固之前冲洗玻片 3 次,并利用荧光显微术使其可视化并拍照。

[0106] RT-PCR

[0107] 根据制造商说明书,利用 Trizol[®] 提取总 RNA,并通过 GeneQuant 分析器量化。用 DNA 酶 (Ambion) 处理样品并根据制造商说明书,利用 SuperScript II 逆转录酶 (Invitrogen) 使其逆转录为 cDNA。对所有样品执行无 RT 的阴性对照。利用 Taq 聚合酶 (Invitrogen) 执行 RT-PCR。利用管家基因 Bactin 评估模板质量。所有 PCR 反应都利用 Peltier Thermal Cycler-200 执行。对于胰腺分化实验,实施巢式 PCR。

[0108] 使用了以下的特定寡核苷酸引物:PDX 1、胰岛素 II 和胰高血糖素 (PDX-1 正向, 5-cggccacacagctctacaagg-3 (SEQ ID NO:1), 反向, 5-ctccggttctgctgcgtatgc-3 (SEQ ID NO:2), 巢式反向 5-ttccaggccccagctctcgg-3 (SEQ ID NO:3) (305bp), 胰岛素, 正向 5-atggccctgtggatccgctt-3 (SEQ ID NO:4); 反向, 5-tgccaaggtctgaaggtcac-3 (SEQ ID NO:5); 巢式正向, 5-cctgctcatcctctgggagcc-3 (SEQ ID NO:6) (209bp); 胰高血糖素, 正向, 5-gaccgtttacgtggctgg-3 (SEQ ID NO:7); 反向, 5-cggttcctcttggtgttcatcaag-3 (SEQ ID NO:8); 巢式正向, 5-acaaggcagctggcagcatgc-3 (SEQ ID NO:9) (210bp)。大鼠胰腺总 RNA 被逆转录并用作阳性对照。以下的特定寡核苷酸引物用于肝分化实验: 白蛋白 (141bp) 正向 5-ctgggagtgtgcagatatcagagt-3 (SEQ ID NO:10), 反向 5-gagaa

ggtcaccaagtgtgtagt-3 (SEQ ID NO:11), HNF3 β (63bp) 正向 5-cctactcgtacatctcgctcatca-3 (SEQ ID NO:12), 反向 -cgctcagcgtcagcatctt (SEQ ID NO:13), HNF1 (138bp) α 正向 5-agctgtctctccatcatcaga-3 (SEQ ID NO:14), 反向 5-tgttccaagcattaagttttctattctaa-3 (SEQ ID NO:15), Gata4 (173bp) 正向 5-catgcttgacagttgtgtag-3 (SEQ ID NO:16), 反向 5-attctctgctacggccagta-3 (SEQ ID NO:17), 甲胎蛋白 (124bp) 正向 5-gtcctttcttctctctggagat-3 (SEQ ID NO:18), 反向 5-ctgtcactgctgatttctcttg-3 (SEQ ID NO:19), CYP2B1 (549bp) 正向 5-gagttcttctcttggttctctg-3 (SEQ ID NO:20), 反向 5-actgtgggtcatggagagct-3 (SEQ ID NO:21), CK19 (193bp) 正向 5-agtaacgtgcgtgctgacac-3 (SEQ ID NO:22), 反向 5-agtcgcactggttagcaaggt-3 (SEQ ID NO:23), CK18 (70bp) 正向 5-ggacctcagcaagatcatggc-3 (SEQ ID NO:24), 反向 5-ccacgatcttacgggtagttg-3 (SEQ ID NO:25)。PCR 产物然后进行琼脂糖凝胶电泳并通过溴化乙锭染色而可视化。大鼠肝组织用作阳性对照。

[0109] 高碘酸-希夫染色 (Periodic Acid Schiff Staining)

[0110] 在肝分化的第 21 天, 对未分化的 Thy1.1 阳性和 Thy1.1 阴性细胞以及 Thy1.1 阳性和阴性群实施糖原贮积的高碘酸-希夫染色。人肝切片用作阳性对照。在室温下在 4% 多聚甲醛中固定细胞 10 分钟。在 PBS 中冲洗细胞 3 次, 用 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) 透化处理 10 分钟, 用 PBS 冲洗 2 次并用 ddH₂O 冲洗 1 次。在室温下将细胞浸泡在高碘酸溶液 (1g/dL) 中 5 分钟。用蒸馏水漂洗 3 次。在室温下将细胞浸泡在希夫试剂中 15 分钟。用流动自来水冲洗细胞 5 分钟。在苏木精溶液中对细胞复染色 90 秒。在流动自来水中漂洗细胞 15-30 秒。

[0111] 结果

[0112] Thy1.1 阳性和阴性群的表征

[0113] PDPC 的 MAC 分选分别用来以大于 98.5% 的纯度分离表达 Thy1.1 阳性细胞群并以大于 98.7% 的纯度分离 Thy1.1 阴性细胞群。然后对这些群进行培养并规律地每隔 10-12 天和在任何分化或表征实验之前, 通过流式细胞术进行再评估。

[0114] 在表型上, Thy1.1 阳性群和 Thy1.1 阴性群的形态表现出明显差异: Thy1.1 阳性群表现为成纤维细胞样形态 (图 1, 组 A), 而 Thy1.1 阴性群表现为更类似上皮细胞样的形态 (图 1, 组 D)。

[0115] 也观察到 Thy1.1 阳性和 Thy1.1 阴性细胞群之间的细胞表面标记物的表达的一些差异。两个细胞系都表达 CD147、CD44 和 CD49f。二者 CD71 的表达均较低, 并且均不表达造血 (haematopoietic) 标记物 CD31、CD34、CD45 和 c-kit。与 Thy1.1 阳性分选细胞群相反, Thy1.1 阴性群为 CD24 阳性 (图 2a 和图 2b)。还通过免疫细胞化学评估亚群的肝、胆和间质细胞标记物白蛋白、波形蛋白、CK7 和 CK19 (图 3)。

[0116] 两个 Thy1.1 分选的群都为白蛋白、CK 7 和波形蛋白阴性 (图 3- 组 B、C、F、G、J 和 K)。Thy1.1 阳性群还是 CK 19 阴性 (图 3, 组 O), 而 Thy1.1 阴性细胞为弱阳性 (图 3, 组 N)。通过 RT-PCR, 两个群都为 c-Met 和巢蛋白阳性 (数据未示出)。

[0117] 总之, Thy1.1 阴性细胞群表达以下的细胞表面标记物谱:

[0118] Thy1.1 (CD90) 阴性

[0119] Pdx-1 阳性

[0120]	CD49f	~ 95% +
[0121]	CD24	~ 80% +
[0122]	CD147	~ 80% +
[0123]	CD45	阴性
[0124]	CD44	~ 60% +
[0125]	CD71	低
[0126]	CD31	阴性
[0127]	c-Kit	阴性
[0128]	ck7	阴性
[0129]	CK19	弱阳性
[0130]	c-Met	阳性
[0131]	Thy1. 1 阳性细胞表达以下的细胞表面标记物谱：	
[0132]	Thy1. 1 (CD90)	阳性
[0133]	Pdx-1	阳性
[0134]	CD49f	~ 95% +
[0135]	CD24	阴性
[0136]	CD147	~ 90% +
[0137]	CD45	阴性
[0138]	CD44	~ 85% +
[0139]	CD71	低
[0140]	CD31	阴性
[0141]	C-KIT	阴性
[0142]	CK19	阴性
[0143]	c-Met	阳性
[0144]	巢蛋白	阳性

[0145] Thy1. 1 阳性和 Thy1. 1 阴性群的分化能力

[0146] 胰腺分化

[0147] 在胰腺分化培养基中, Thy1. 1 阳性和 Thy1. 1 阴性群表现出明显不同的形态变化。起初为成纤维细胞样形态的 Thy1. 1 阳性群, 到 14-21 天时形成缠结的细胞簇, 并且到 28 天时形成胰岛样球状簇, 其最终与亲代细胞层分开 (图 1, 组 D、H、I)。相反, Thy1. 1 阴性细胞仍然为具有小上皮细胞样形态的单层, 无三维结构形成 (图 1, 组 A 和组 B)。

[0148] 未分化的 Thy1. 1 阳性细胞的 RT-PCR 分析证实了阳性 Pdx-1 表达, 但是不表达胰岛素或胰高血糖素 (图 4-B)。分化的细胞簇对全部三个标记物的转录表达均呈阳性 (图 4, 组 B)。

[0149] 但是, 当在维持培养基或分化培养基中生长时, Thy1. 1 阴性细胞表达 Pdx-1。尤其是, 当在分化培养基中生长时, 虽然没有表现出形态变化, 但在 Thy1. 1 阴性群中检测到胰岛素转录。胰高血糖素在未分化的 Thy1. 1 阴性细胞中未被表达, 在分化之后也未被体外诱导 (图 4, 组 A)。

[0150] 肝分化

[0151] 在含有 FGF4 的无血清培养基中培养 Thy1.1 阳性和阴性 PDPC,从而评估肝潜能。Thy1.1 阳性细胞表现出从成纤维细胞样形态到上皮细胞 / 立方形态的形态变化。此外,到 28 天,整个培养期间带有扁平上皮的内腔结构明显。在肝分化板中也观察到类似于在胰腺分化板中观察到的偶尔出现的三维胰岛样结构。Thy1.1 阴性群仍然为单层,无三维结构或内腔样结构的证据,并且形态没有明显变化(图 1A, C)。

[0152] 在 28 天的时间内,本发明人通过 RT-PCR 进一步检查该两个群的分化。对内胚层特异性基因 HNF3- β 及 GATA 4、早期肝标记物甲胎蛋白和 CK18、成熟肝标记物 HNF1 α 、白蛋白和细胞色素 P450 酶 CYP2B1 执行 RT-PCR。通过 RT-PCR,未分化的 Thy1.1 阴性细胞表达 HNF3- β 和 CK19,但不表达白蛋白、CK18、HNF1 α 、CY2B1、Gata4 或甲胎蛋白(图 5,组 B)。其他的早期或成熟肝标记物,或者 CY2B1 在 Thy1.1 阴性群中无一被诱导。有趣的是,未分化的 Thy1.1 阳性 PDPC 表达早期内胚层标记物 HNF3- β 、GATA 4 和甲胎蛋白,但直到肝分化的第 14 天才表达肝细胞分化的晚期标记物、HNF1- α 和白蛋白(图 5,组 A)。培养中,与内腔结构的外观一致,正常被胆细胞(biliary cell)表达的 CK 19 也在 14-28 天期间被诱导。白蛋白表达的诱导通过免疫细胞化学得到证实。未分化的细胞对于白蛋白含量染色呈阴性(图 3,组 A),而 14 天分化的细胞对于白蛋白染色呈强阳性(图 3,组 D)。有趣的是,在第 10 天和第 14 天时间点,分化的细胞对胆标记物 CK19 和 CK7 染色呈阴性(图 3,组 N 和组 G),但是仅对内腔样结构中的波形蛋白染色呈阳性(图 3,组 L)。CK 18 也在未分化的 Thy1.1 阳性细胞中和整个 28 天分化期间被表达。CYP2B1 存在于未分化的 Thy1.1 阳性细胞中和整个分化期间。

[0153] 通过免疫细胞化学分析,未分化的 Thy1.1 阴性细胞对 CK7、波形蛋白和白蛋白的表达呈阴性,并且 CK19 呈弱阳性。Thy1.1 阳性群为 CK19 阴性。

[0154] 糖原贮积的高碘酸-希夫(PAS)染色

[0155] 如通过 PAS 染色法所确定的,在 Thy-1.1 阳性或阴性 PDPC 中未观察到贮积糖原的存在,也未在 21 天分化的 Thy-1.1 阴性细胞中观察到贮积糖原。但是到 21 天时,在 Thy-1.1 阳性分化的细胞中观察到指示糖原贮积的 PAS 染色阳性(图 6)。

[0156] 糖尿病动物模型中细胞亚群的检查

[0157] 本文描述的细胞亚群(例如, Thy1.1 阳性或 Thy1.1 阴性细胞群)可用于诸如糖尿病之类的疾病动物模型中。在一种实施方式中,细胞亚群用于链脲霉素(STZ)诱导的糖尿病的啮齿动物相似的异种移植(concordant xenograft)模型。通过在第 0 天注射 STZ 使 C57BL/6 小鼠患糖尿病,并在第 3 天将 750,000 个细胞(例如, Thy1.1 阳性细胞)注射到经处理动物的尾静脉中。给对照动物注射盐水或相当数目的 C57BL/6 骨髓细胞。每 3 天监测一次血糖。相对于对照组,血糖的稳定和 / 或存活者增加表明所给予的细胞在该动物中产生胰岛素。

[0158] 讨论

[0159] 本文提供了关于 Thy1.1 阳性和 Thy1.1 阴性 PDPC 亚群的体外培养、选择和表征的详细情况。此外,公开了关于它们分化为胰腺和肝谱系的潜力的详细情况,并提供了利用标记物 Thy1.1 分选的细胞群,其在体外显示出谱系双潜能(lineage bipotentiality)。

[0160] Thy1.1 是一种细胞表面蛋白,对其功能没有清楚的了解。但是,已揭示它涉及细胞再生(Gunter 等人,1984;Williams,1985)、细胞粘附(He 等人,1991;Hueber 等人,1992)和

信号转导 (Kroczeck 等人, 1986)。在各种干细胞群, 尤其是成年大鼠肝中的卵圆细胞群中观察到 Thy1.1 的表达得出这样的推断, 即, Thy1.1 能够识别细胞并粘附到间质组织, 可潜在地作为损伤后的修复细胞。(Masson 等人, 2006 ; Petersen 等人, 1998 ; Terrace 等人, 2007)。Thy1.1 也在人、小鼠和大鼠的胚胎肝干细胞、脐血干细胞和间质干细胞上被表达。本研究发现的 Thy1.1 阳性群内的体外效力更大与该观察结果一致。这也证实了利用这样的分离和纯化的方法以使能够进一步使用这样的细胞。

[0161] 先前的研究已证明一些不同细胞类型的肝分化, 包括骨髓来源的 MSC、MAPC、子宫内膜和胰腺来源的 MSC (Jiang 等人, 2002 ; Meng 等人, 2007 ; Schwartz 等人, 2002 ; Seeberger 等人, 2006)。PDPC 的 Thy1.1 阳性亚群具有共同的形态表型, 并且这些群表达一些细胞表面标记物, 这些细胞表面标记物包括 CD44⁺、CD24⁻、CD45⁻、CD31⁻ 和 CD34。然而, 与之相反, Thy1.1 阳性 PDPC 似乎是表达 GATA4、HNF3- β 和甲胎蛋白的独特细胞类型, 这些还没有被描述成表达在任一种的这些其他细胞类型上。

[0162] HNF3- β 是一种被认为在内胚层能力 (endoderm competency) 中发挥重要作用的决定性内胚层标记物 (Gualdi 等人, 1996), 而 GATA4 是腹侧前肠内胚层发育和早期肝基因表达所需的转录因子 (Gualdi 等人, 1996 ; Rossi 等人, 2001)。已证实 HNF3- β 可引导核小体在白蛋白增强子环境中的定位 (McPherson 等人, 1996 ; Cirillo 和 Zaret, 1999), 随后使得 GATA4 与该白蛋白增强子的结合变得容易。GATA4^{-/-} 和 HNF3- β ^{-/-} 胚胎在前肠形态中均表现出缺陷 (Duncan 等人, 1997)。因此, 未分化的 PDPC 中 HNF3- β 和 GATA4 的表达以及随后 FGF 刺激的肝特异基因 (如白蛋白和 HNF1- α) 表达的诱导与这种方案相一致, 即, HNF3- β 和 GATA 4 配合从而控制这些细胞定向分化为肝细胞命运的潜能。而且, 在分化 21 天之后, 在 Thy1.1 阳性群中存在 PAS 染色表明更成熟的肝细胞的功能特征, 其与 HNF1- α 的表达一致。已知 HNF1- α 结合于产物与成熟肝功能相关的基因, 成熟肝功能包括碳水化合物贮积以及合成和脂质代谢 (Odom 等人, 2004)。

[0163] 未分化的 Thy1.1 阳性 PDPC 表达 AFP。这个观察结果与描述了在早期腹侧前肠内胚层中肝形成 (hepatogenesis) 之前, 在巢蛋白阳性胰岛来源的祖细胞中表达 AFP 以及 AFP 和 TTR 低水平的表达的报道一致。这种表达随后在从心脏中胚层信号转导分离的内胚层中缺失 (Gualdi 等人, 1996 ; Jung 等人, 1999 ; Zulewski 等人, 2001)。也揭示了, 这是腹侧前肠内胚层的默认胰腺命运 (default pancreatic fate) 的特征, (Deutsch 等人)。AFP 在 Thy1.1 阳性 PDPC 群中的表达证明了胰腺和肝谱系的能力, 它与本研究的结果不一致。(Deutsch 等人, 2001)。

[0164] 重要的是, 未分化的 Thy1.1 阴性群在表达 HNF3 β 时, 不表达 GATA4 或甲胎蛋白, 也没有在分化实验期间被诱导。在 Thy1.1 阴性群中没有观察到肝能力 (hepatic competency) 的证据。这与在这种未分化的群内存在 Pdx-1 表达而不存在 Gata4 表达相一致。在肝分化期间, 波形蛋白在未分化的 Thy1.1 阳性或阴性群中未被表达, 但在形成导管样结构的细胞中被表达。波形蛋白被认为代表间质细胞标记物。但是, Masson 等人观察到 Thy1.1 和波形蛋白在肝门结构 (portal structure) 中的共表达, 这也证明波形蛋白在组织切片中的上皮细胞中以及胚胎肝上皮细胞培养物中的表达。(Masson 等人, 2006)。

[0165] 有关胰腺分化的数据是有趣的。在 Thy1.1 阴性群中未观察到胰岛样簇的形态学证据。相反, Thy1.1 阳性 PDPC 容易被诱导为胰腺谱系, 其特征形态发生变化, 形成三维胰

岛样结构并且 PDX-1、胰岛素和胰高血糖素的转录表达。

[0166] 两个群中 Pdx-1 转录表达的检测表示出它们具有成为产生胰岛素的细胞的潜能。尤其注意的是,当 Thy1.1 阴性细胞在分化培养基中生长时,尽管未出现形态变化,但表达胰岛素。胰高血糖素在未分化的 Thy1.1 阴性细胞中未被表达,在体外分化之后也未被诱导(图 4 组)。

[0167] 先前已经描述了各种不同的胰腺祖细胞/干细胞候选群,包括表达巢蛋白或其他神经元干细胞标记物的胰岛祖细胞(Abraham 等人,2004;Cornelius 等人,1997;Lechner 等人,2002;Ramiya 等人,2000)。已示出了另外的群可以表达 PDX-1(其是一种产生胰岛素的细胞的已知标记物),并且这些细胞在适当条件下能够刺激导管和内分泌细胞体外分化(Bonner-Weir 等人,2000;Otonkoski 等人,1993)。而且,有证据表明,胰腺导管上皮细胞具有去分化成能够增殖和形成新胰岛和腺泡的祖细胞的潜能(Bonner-Weir 等人,2004),并且最近报道了,当存在胚胎胰腺组织时,可在体内诱导 CK19+ 非内分泌胰腺上皮细胞(NEPC)部分地分化成产生胰岛素的细胞(Hao 等人,2006)。

[0168] 这些细胞发挥的确切生理作用已受到质疑。Dor 等人对从导管或祖细胞产生新生的观点提出异议,而是争论 β 细胞复制而不是新胰岛生成是胰腺内分泌组织在几乎全部胰切除术后再生的主要机制(Dor 等人,2004),尽管这种解释仍存在争议(Bonner-Weir 和 Weir,2005)。本研究结果与能够产生胰岛素的非 β 细胞的作用一致,因为潜在地促进此种过程。很明显这些细胞提供了用于移植疗法的可替代的产生胰岛素的细胞来源。

[0169] 通过利用含有 FGF-4 的无血清分化实验方案,本发明人观察到表示肝谱系分化的形态变化和基因表达变化的时间过程。胚胎腹侧内胚层的胰腺和肝分化的双潜能已在外植体实验中进行研究,其中腹侧内胚层分化成接近心脏中胚层的肝谱系。心脏中胚层分泌的诱导因子,如 FGF-1、FGF-2 和 FGF-4 的缺乏使得腹侧内胚层的默认胰腺途径得以继续进行(Deutsch 等人,2001),而一般 FGF 信号拮抗剂抑制体外肝形成(Jung 等人,1999)和 FGF-4(Zhu 等人,1999)。本发明的数据与这种概念完全一致。

[0170] 本发明人已经说明了 PDPC 的分离和特征,其在体外表现出与双潜能内胚层祖细胞群一致的效力和对信号传输的转录响应。之前,给予链脲霉素诱导的鼠科动物糖尿病模型中未分选的 PDPC 群,证明了大鼠胰岛素的分化和产生与小鼠胰腺再生刺激同时发生(Shiels 2005 和 W02006/120476,均以引用的方式结合于此)。

[0171] 参考文献列表:

[0172] 1. Abraham, E. J., S. Kodama, J. C. Lin, M. Ubeda, D. L. Faustman and J. F. Habener: Human pancreatic islet-derived progenitor cell engraftment in immunocompetent mice. *Am. J. Pathol. Dev.* 164, 817-830 (2004).

[0173] 2. Bonner-Weir, S., E. Toschi, A. Inada, P. Reitz, S. Fonseca, T. Aye and A. Sharma: The pancreatic ductal epithelium serves as a potential pool of progenitor cells. *Paediatric Diabetes Dev.* 5, 16-22 (2004).

[0174] 3. Bonner-Weir, S., M. Taneja, G. C. Weir, K. Tatarkiewicz, K. H. Song, A. Sharma and J. J. O'Neil: In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A Dev.* 97, 7999-8004 (2000).

[0175] 4. Bonner-Weir, S. and G. C. Weir: New sources of pancreatic beta-cells. *Nat.*

Biotechnol. Dev. 23, 857–861 (2005).

[0176] 5. Cirillo, L. A. and K. S. Zaret :An early developmental transcription factor complex that is more stable on nucleosome core particles than on free DNA. Mol. Cell Dev. 4, 961–969 (1999).

[0177] 6. Cornelius, J. G. , V. Tchernev, K. J. Kao and A. B. Peck :In vitro-generation of islets in long-term cultures of pluripotent stem cells from adult mouse pancreas. Horm. Metab Res. Dev. 29, 271–277 (1997).

[0178] 7. Dabeva, M. D. , S. G. Hwang, S. R. Vasa, E. Hurston, P. M. Novikoff, D. C. Hixson, S. Gupta and D. A. Shafritz :Differentiation of pancreatic epithelial progenitor cells into hepatocytes following transplantation into rat liver. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A Dev. 94, 7356–7361 (1997).

[0179] 8. Deutsch, G. , J. Jung, M. Zheng, J. Lora and K. S. Zaret :A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm. Development Dev. 128, 871–881 (2001).

[0180] 9. Dor, Y. , J. Brown, O. I. Martinez and D. A. Melton :Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation 1. Nature Dev. 429, 41–46 (2004).

[0181] 10. Duncan, S. A. , A. Nagy and W. Chan :Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos. Development Dev. 124, 279–287 (1997).

[0182] 11. Gualdi, R. , P. Bossard, M. Zheng, Y. Hamada, J. R. Coleman and K. S. Zaret :Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. Genes Dev. Dev. 10, 1670–1682 (1996).

[0183] 12. Gunter, K. C. , T. R. Malek and E. M. Shevach :T cell-activating properties of an anti-Thy-1 monoclonal antibody. Possible analogy to OKT3/Leu-4. J. Exp. Med. Dev. 159, 716–730 (1984).

[0184] 13. Hao, E. , B. Tyrberg, P. Kin-Ansari, J. Key, I. Ron, E. Nosov, M. Rcova, M. Rcola and F. Vine :Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelial cells of the adult human pancreas. Nat. Med. Dev. 12, 310–316 (2006).

[0185] 14. He, H. H. , T. Naquet, D. Caillol and M. Pierres :Thy-1 supports adhesion of mouse thymocytes to thymic epithelial cells through a Ca²⁺(+)-independent mechanism. J. Exp. Med. Dev. 173, 515–518 (1991).

[0186] 15. Hueber, A. O. , M. Pierres and H. T. He :Sulfated glycans directly interact with mouse Thy-1 and negatively regulate Thy-1-mediated adhesion of thymocytes to thymic epithelial cells. J. Immunol. Dev. 148, 3692–3699 (1992).

[0187] 16. Jiang, Y. , B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada and C. M. Verfaillie :Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature Dev. 418, 41–49 (2002).

- [0188] 17. Jung, J. , M. Zheng, M. Goldfarb and K. S. Zaret :initiation of mammalianliver development from endoderm by fibroblast growth factors.Science Dev. 284,1998–2003(1999).
- [0189] 18. Krakowski, M. L. , M. R. Kritzik, E. M. Jones, T. Krah1, J. Lee, M. Arnush, D. Gu, B. Mroczkowski and N. Sarvetnick :Transgenic expression of epidermalgrowth factor and keratinocyte growth factor in beta-cells results in substantialmorphological changes. J. Endocrinol. Dev. 162,167–175(1999a).
- [0190] 19. Krakowski, M. L. , M. R. Kritzik, E. M. Jones, T. Krah1, J. Lee, M. Arnush, D. Gu and N. Sarvetnick :Pancreatic expression of keratinocyte growth factor leadsto differentiation of islet hepatocytes and proliferation of duct cells. Am. J. Pathol. Dev. 154,683–691(1999b).
- [0191] 20. KroczeK, R. A. , K. C. Gunter, B. Seligmann and E. M. Shevach :Inductionof T cell activation by monoclonal anti-Thy-1 antibodies. J. Immunol. Dev. 136, 4379–4384(1986).
- [0192] 21. Lechner, A. , C. A. Leech, E. J. Abraham, A. L. Nolan and J. F. Habener : Nestin-positive progenitor cells derived from adult human pancreatic islets ofLangerhans contain side population(SP)cells defined by expression of the ABCG2 (BCRP1)ATP-binding cassette transporter. Biochem. Biophys. Res. Commun. Dev. 293,670–674(2002).
- [0193] 22. Masson, N. M. , I. S. Currie, J. D. Terrace, O. J. Garden, R. W. Parks andJ. A. Ross :Hepaticprogenitor cells in human fetal liver express the oval cell markerThy-1. Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol Dev. 291, G45–G54(2006).
- [0194] 23. McPherson, C. E. , R. Horowitz, C. L. Woodcock, C. Jiang and K. S. Zaret : Nucleosome positioning properties of the albumin transcriptional enhancer. Nucleic Acids Res. Dev. 24,397–404(1996).
- [0195] 24. Meng, X. , T. E. Ichim, J. Zhong, A. Rogers, Z. Yin, J. Jackson, H. Wang, W. Ge, V. Bogin, K. W. Chan, B. Thebaud and N. H. Riordan :Endometrial regenerativecells :A novel stem cell population. J. Transl. Med. Dev. 5,57(2007).
- [0196] 25. Odom, D. T. , N. Zizlsperger, D. B. Gordon, G. W. Bell, N. J. Rinaldi, H. L. Murray, T. L. Volkert, J. Schreiber, P. A. Rolfe, D. K. Gifford, E. Fraenkel, G. I. Belland R. A. Young :Control of pancreas and liver gene expression by HNFtranscription factors. Science Dev. 303,1378–1381(2004).
- [0197] 26. Otonkoski, T. , G. M. Beattie, M. I. Mally, C. Ricordi and A. Hayek : Nicotinamide is a potent inducer of endocrine differentiation in cultured humanfetal pancreatic cells J. Clin. Invest Dev. 92,1459–1466(1993).
- [0198] 27. Petersen, B. E. , J. P. Goff, J. S. Greenberger and G. K. Michalopoulos : Hepaticoval cells express the hematopoietic stem cell marker Thy-1 in the rat. Hepatology Dev. 27,433–445(1998).
- [0199] 28. Petersen, B. E. , B. Grossbard, H. Hatch, L. Pi, J. Deng and E. W. Scott :

Mouse A6-positive Hepaticoval cells also express several hematopoietic stem cellmarkers. *Hepatology Dev.* 37,632-640(2003).

[0200] 29. Ramiya, V. K. , M. Maraist, K. E. Arfors, D. A. Schatz, A. B. Peck and J. G. Cornelius :Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitrofrom pancreatic stem cells. *Nat. Med. Dev.* 6,278-282(2000).

[0201] 30. Rao, M. S. and J. K. Reddy :Hepatictransdifferentiation in the pancreas. *Semin. Cell Biol. Dev.* 6,151-156(1995).

[0202] 31. Rao, M. S. , V. Subbarao and J. K. Reddy :Induction of hepatocytes in thepancreas of copper-depleted rats following copper repletion. *Cell Differ. Dev.* 18,109-117(1986).

[0203] 32. Rossi, J. M. , N. R. Dunn, B. L. Hogan and K. S. Zaret :Distinct mesodermalsignals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required incombination for hepatogenesis from the endoderm. *Genes Dev. Dev.* 15, 1998-2009(2001).

[0204] 33. Schwartz, R. E. , M. Reyes, L. Koodie, Y. Jiang, M. Blackstad, T. Lund, T. Lenvik, S. Johnson, W. S. Hu and C. M. Verfaillie :Multipotent adult progenitor cellsfrom bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. InvestDev.* 109,1291-1302(2002).

[0205] 34. Seeberger, K. L. , J. M. Dufour, A. M. Shapiro, J. R. Lakey, R. V. Rajotte andG. S. Korbutt :Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductalepithelium. *Lab Invest Dev.* 86,141-153(2006).

[0206] 35. Shiels PG Adult stem cells mitigate the effects of STZ diabetes. *Horizons in Medicine* 17 :241-249 Royal College of Physicians(D Haskard Ed)

[0207] 36. Terrace, J. D. , I. S. Currie, D. C. Hay, N. M. Masson, R. A. Anderson, S. J. Forbes, R. W. Parks and J. A. Ross :Progenitor cell characterization and location inthedeveloping human liver. *Stem Cells Dev. Dev.* 16,771-778(2007).

[0208] 37. Wang, X. , M. Al Dhalimy, E. Lagasse, M. Finegold and M. Grompe : Liverrepopulation and correction of metabolic liver disease by transplanted adult mousepancreatic cells. *Am. J. Pathol. Dev.* 158,571-579(2001).

[0209] 38. Williams, A. F. :Immunoglobulin-related domains for cell surfacerecognition. *Nature Dev.* 314,579-580(1985).

[0210] 39. Zhu, X. , J. Sasse and J. Lough :Evidence that FGF receptor signaling isnecessary for endoderm-regulated development of precardiac mesoderm. *Mech. Ageing Dev. Dev.* 108,77-85(1999).

[0211] 40. Zulewski, H. , E. J. Abraham, M. J. Gerlach, P. B. Daniel, W. Moritz, B. Muller, M. Vallejo, M. K. Thomas and J. F. Habener :Multipotential nestin-positivestem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreaticendocrine, exocrine, and Hepaticphenotypes. *Diabetes Dev.* 50, 521-533(2001).

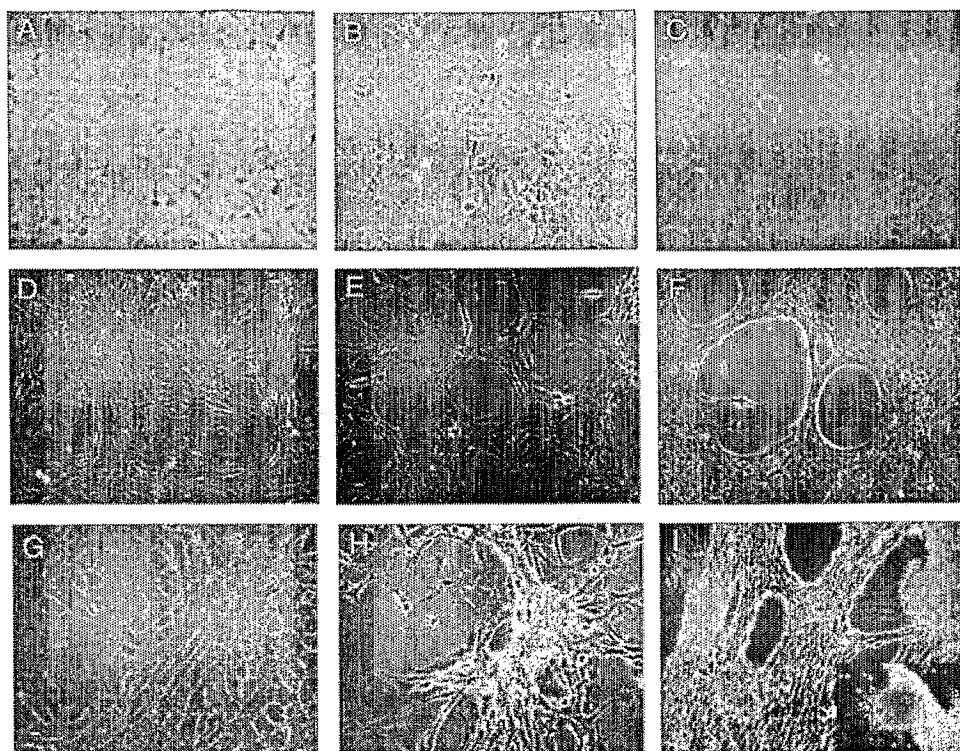


图 1

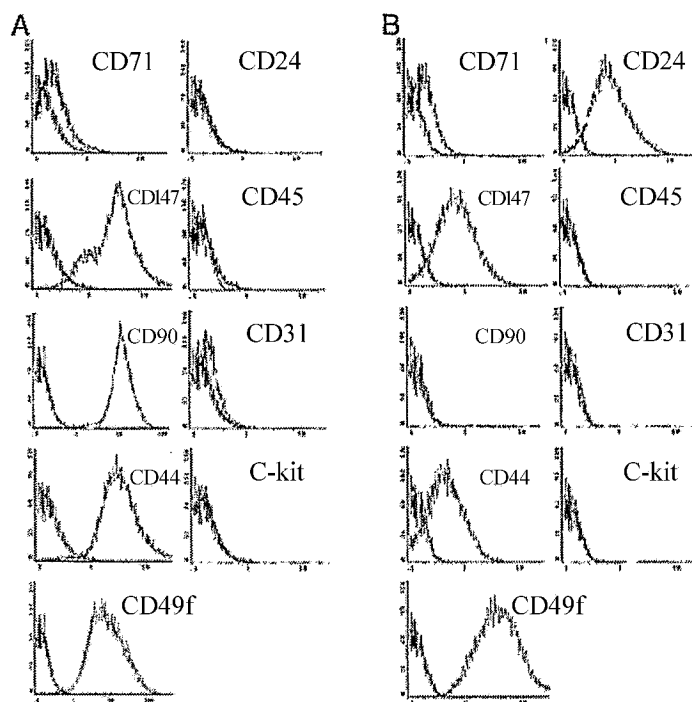


图 2

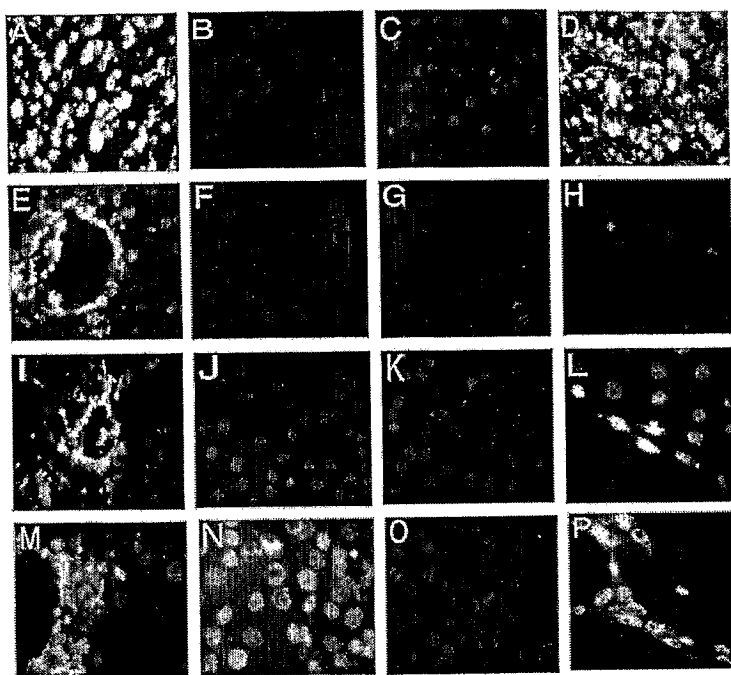


图 3

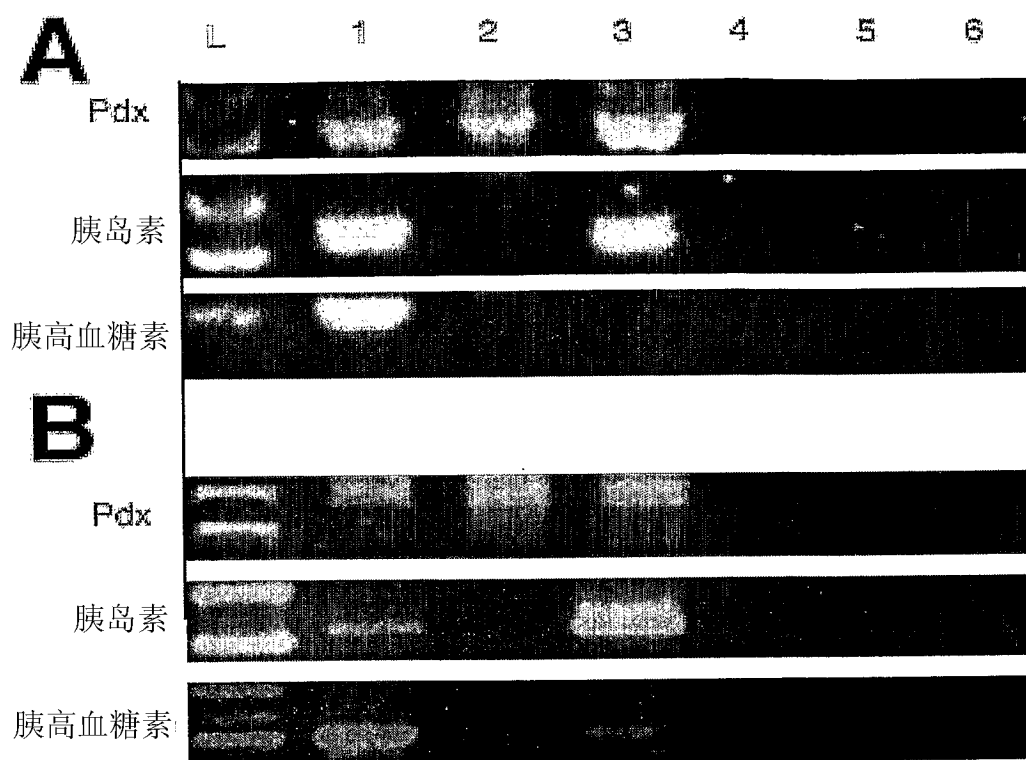


图 4

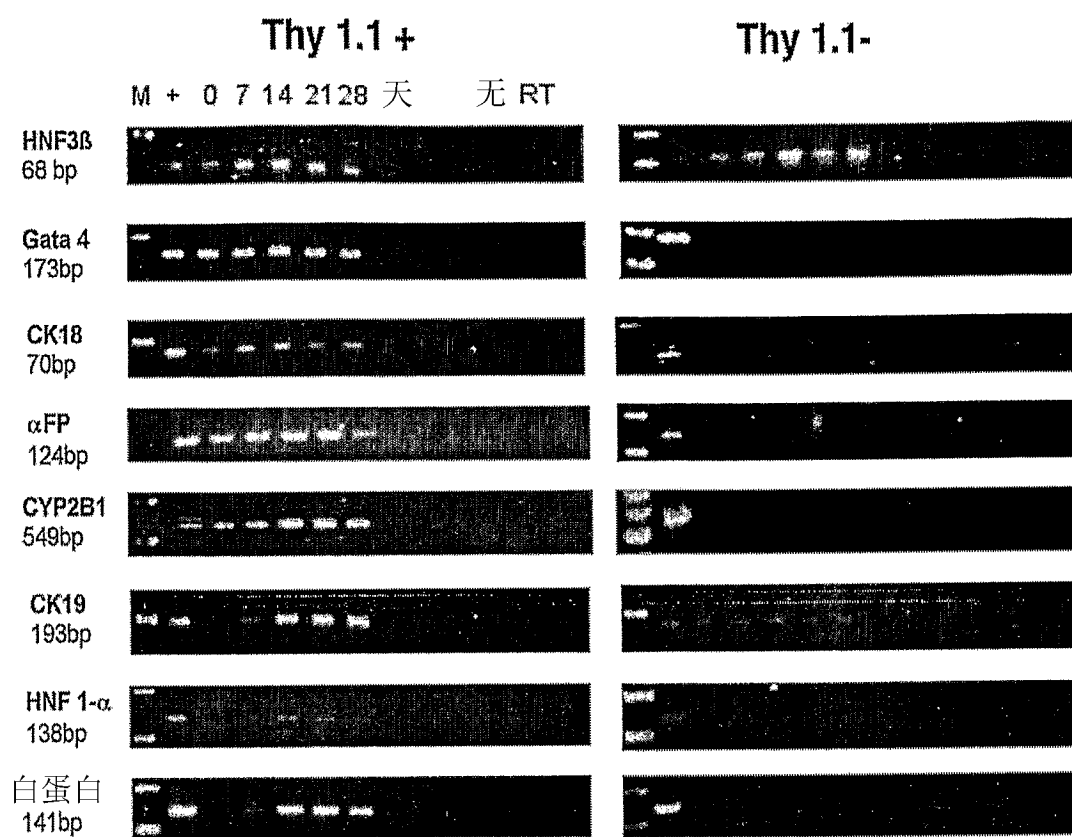


图 5

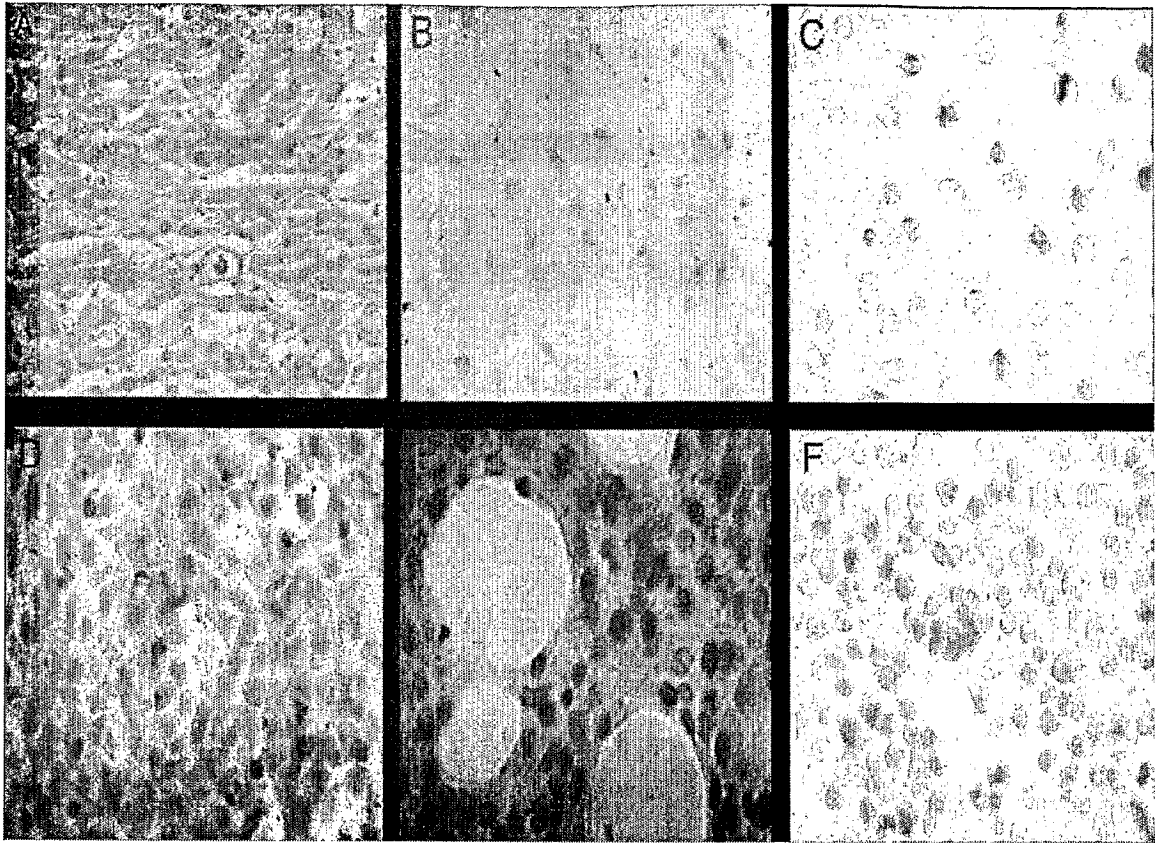


图 6