



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111065731 B

(45) 授权公告日 2024. 03. 12

(21) 申请号 201880040207.8

(22) 申请日 2018.06.15

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111065731 A

(43) 申请公布日 2020.04.24

(30) 优先权数据
17176335.2 2017.06.16 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.12.16

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/065949 2018.06.15

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/229251 EN 2018.12.20

(73) 专利权人 IMBA-莫利库尔生物技术研究所
地址 奥地利维也纳

(72) 发明人 J.佩宁格 R.威默 D.克尔雅施基

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105
专利代理师 曹立莉

(51) Int. Cl.
C12N 5/071 (2010.01)
A01K 67/027 (2024.01)
A61K 35/44 (2015.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2016174604 A1, 2016.11.03
US 2014273220 A1, 2014.09.18
CN 102089426 A, 2011.06.08
CN 102165058 A, 2011.08.24
CN 102858956 A, 2013.01.02
CN 103620024 A, 2014.03.05
CN 103834613 A, 2014.06.04
CN 104024401 A, 2014.09.03
CN 104254337 A, 2014.12.31
CN 105002143 A, 2015.10.28
CN 105209609 A, 2015.12.30
CN 105670987 A, 2016.06.15
CN 105814192 A, 2016.07.27
US 2010233132 A1, 2010.09.16
US 2012135051 A1, 2012.05.31
US 2014369968 A1, 2014.12.18
US 2016002602 A1, 2016.01.07
US 2016115453 A1, 2016.04.28 (续)

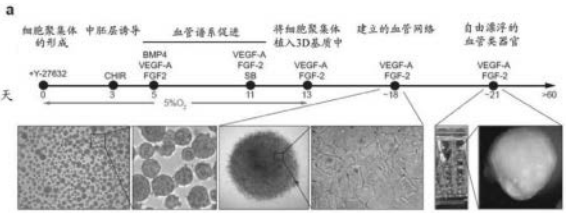
审查员 周夏恒

权利要求书3页 说明书32页
序列表4页 附图23页

(54) 发明名称
血管类器官、产生和使用所述类器官的方法

(57) 摘要
本发明涉及产生人工血管类器官的方法,其包括提供能够血管分化的干细胞,刺激所述干细胞中的中胚层分化,刺激所述干细胞中的血管分化,从所述干细胞形成细胞聚集体,在胶原3D基质中包埋所述细胞聚集体,并刺激所述胶原3D基质中所述聚集体的血管分化;能从所述方法获得的类器官,所述方法和类器官在所研究的操作和

筛选中的用途和用于进行所述方法的试剂盒。



111065731 B

[接上页]

(56) 对比文件

Sravanti Kusuma et al..Self-organized vascular networks from human pluripotent stem cells in a synthetic matrix.PNAS.2013,第110卷(第31期),12601-12606.

GAN SHEN et al..Tissue engineering of blood vessels with endothelial cells differentiated from mouse embryonic stem cells.Cell Research.2003,第13卷(第5期),335-341.

1. 产生人工血管类器官的方法,其包括提供能够血管分化的干细胞,刺激所述干细胞中的中胚层分化,其中中胚层分化包括用Wnt激动剂或GSK抑制剂处理所述干细胞,刺激所述干细胞中的血管分化,其中所述干细胞中的血管分化包括用VEGF处理所述干细胞,从所述干细胞形成细胞聚集体,在胶原3D基质中包埋所述细胞聚集体,并刺激所述胶原3D基质中所述聚集体的血管分化,其中所述聚集体的血管分化包括用VEGF处理所述聚集体的细胞。

2. 根据权利要求1的方法,其中在胶原3D基质中包埋的所述细胞聚集体包含至少30个细胞。

3. 根据权利要求1或2的方法,其中所述中胚层分化包括用Wnt激动剂或GSK抑制剂处理所述干细胞。

4. 根据权利要求3的方法,其中所述中胚层分化包括用CHIR99021处理所述干细胞。

5. 根据权利要求1或2的方法,其中所述干细胞中的血管分化包括用VEGF,和/或FGF,和/或BMP,和/或12%(v/v)或更小的大气氧气的低氧条件处理所述干细胞。

6. 根据权利要求5的方法,其中所述VEGF为VEGF-A。

7. 根据权利要求5的方法,其中所述FGF为FGF-2。

8. 根据权利要求5的方法,其中所述BMP为BMP4。

9. 根据权利要求1或2的方法,其中所述聚集体的血管分化包括用VEGF和/或FGF处理所述聚集体的细胞。

10. 根据权利要求9的方法,其中所述VEGF为VEGF-A。

11. 根据权利要求9的方法,其中所述FGF为FGF-2。

12. 根据权利要求1或2的方法,其中所述胶原3D基质包含至少50重量%的胶原;和/或其中所述胶原3D基质包含10%-50%层粘连蛋白、20%-70%胶原I和/或2%-30%胶原IV,均为重量%。

13. 根据权利要求12的方法,其中所述胶原3D基质进一步包含0.5%-10%巢蛋白,0.5%-10%的类肝素硫酸蛋白聚糖和/或0.5%-10%内毒素,均为重量%。

14. 根据权利要求1或2的方法,其中所述胶原3D基质是水凝胶。

15. 根据权利要求14的方法,其中所述水凝胶具有10至30的粘弹性储能模量G'。

16. 根据权利要求1或2的方法,其中所述血管经历发病机制,并且所述类器官是病理学模型。

17. 根据权利要求16的方法,其中所述发病机制包括高血糖和/或炎症和/或其中所述病理学是糖尿病。

18. 根据权利要求17的方法,其中所述炎症包括暴露于一种或多种炎性细胞因子。

19. 根据权利要求18的方法,其中所述炎性细胞因子包含TNF- α 和/或IL-6。

20. 人工血管类器官培养物,其包含血管毛细血管的相互连接的网络,所述血管毛细血管包含内皮和具有血管周的周细胞的基底膜。

21. 根据权利要求20的人工血管类器官培养物,其中所述类器官通过权利要求1至15中任一项的方法产生。

22. 根据权利要求20或21的人工血管类器官培养物,其中所述毛细血管包埋于胶原3D基质中,所述胶原3D基质包含具有胶原的水凝胶。

23. 根据权利要求20或21的人工血管类器官培养物,其中所述类器官培养物包含40至1000个血管,所述血管是通过计数个别血管和毛细血管交叉之间的血管进行计数的。

24. 根据权利要求20或21的人工血管类器官培养物,其中所述血管毛细血管具有1 μ m至30 μ m的平均直径;和/或其中内皮细胞与血管周的周细胞的比率为100:1至1:5之间;和/或其中所述血管毛细血管包含成熟的内皮细胞和/或成熟的周细胞。

25. 根据权利要求20或21的培养物,其中所述血管或毛细血管经历发病机制,并且所述类器官是病理学模型。

26. 根据权利要求25的培养物,其中所述发病机制包括高血糖和/或炎症和/或其中所述病理学是糖尿病。

27. 根据权利要求26的培养物,其中所述炎症包括暴露于一种或多种炎性细胞因子。

28. 根据权利要求27的培养物,其中所述炎性细胞因子包含TNF- α 和/或IL-6。

29. 提供具有人血管毛细血管的非人动物模型的方法,其中所述人血管毛细血管包括内皮和具有血管周的周细胞的基底膜,所述方法包括将权利要求20至24中任一项的人血管类器官培养物引入非人动物中并且使所述类器官生长出其血管毛细血管的步骤。

30. 根据权利要求29的方法,其中将所述人血管类器官培养物引入所述非人动物的肾之上或之中。

31. 根据权利要求29或30的方法,其中所述血管或毛细血管经历发病机制,并且所述类器官或非人动物模型是病理学模型。

32. 根据权利要求31的方法,其中所述发病机制包括高血糖和/或炎症和/或其中所述病理学是糖尿病。

33. 根据权利要求32的方法,其中所述炎症包括暴露于一种或多种炎性细胞因子。

34. 根据权利要求33的方法,其中所述炎性细胞因子包含TNF- α 和/或IL-6。

35. 生产非人动物模型的方法,其中所述非人动物模型包含插入的权利要求20至24中任一项的人工血管类器官培养物;或所述非人动物模型具有人血管毛细血管,其中所述人毛细血管包括内皮和具有血管周的周细胞的基底膜;其中通过所述非人动物的血液循环系统灌注所述人工血管类器官培养物的血管毛细血管或所述人血管毛细血管。

36. 根据权利要求35的方法,其中所述血管或毛细血管经历发病机制,并且所述类器官或人动物模型是病理学模型。

37. 根据权利要求36的方法,其中所述发病机制包括高血糖和/或炎症和/或其中所述病理学是糖尿病。

38. 根据权利要求37的方法,其中所述炎症包括暴露于一种或多种炎性细胞因子。

39. 根据权利要求38的方法,其中所述炎性细胞因子包含TNF- α 和/或IL-6。

40. 筛选用于影响发病机制或病理学的候选化合物的方法,其包括对根据权利要求20-24中任一项所述的培养物或者在根据权利要求1至15中任一项所述的方法产生类器官期间或在根据权利要求29-30和35中任一项所述的方法提供非人动物模型期间施用所述候选化合物,并且监测与没有施用所述候选化合物的情况下的所述培养物或动物模型相比所述培养物或动物模型中的生理学差异。

41. 适用于根据权利要求1至15中任一项的方法产生人工血管类器官的试剂盒,其包含(i) Wnt激动剂或GSK抑制剂;(ii) 血管分化因子,其选自VEGF,FGF,BMP;(iii) 胶原3D基

质。

42. 根据权利要求41的试剂盒,其中所述VEGF为VEGF-A。

43. 根据权利要求41的试剂盒,其中所述FGF为FGF-2。

44. 根据权利要求41的试剂盒,其中所述BMP为BMP4。

45. 根据权利要求41的试剂盒,其中所述胶原3D基质包含10%-50%层粘连蛋白、20%-70%胶原I和/或2%-30%胶原IV,均为重量%。

46. 根据权利要求20至24中任一项的人工血管类器官在制备组织替代疗法中的植入物中的用途。

47. 根据权利要求46的用途,其中所述疗法包括将所述人工血管类器官置于伤口中并使所述人工血管类器官培养物整合进入所述伤口中。

血管类器官、产生和使用所述类器官的方法

[0001] 本发明涉及人工血管类器官的领域。

[0002] 发明背景

[0003] 血管易于发生称为血管疾病的各种疾病。血管网络中的病症可以引起一系列健康问题,这些问题可以是严重的或证明致命的。此类疾病可能是由于环境原因发病机制或由于发育缺陷所致。

[0004] Goodwin (Microvasc Res.2007;74(2-3):172-183)描述了一种体外血管发生测定法以评估在许多疾病的发病机制中影响血管发生的试剂的活性。

[0005] Duffy et al.(European Cells and Materials 21,2011:15-30)描述了在表面粘附的2D培养物中胶原-糖胺聚糖支架的体外血管化。

[0006] Nakagami et al.(Hypertension 2006;48:112-119)提供了一种使用基质胶通过细胞-基质相互作用进行血管化的方法,所述基质胶将胚胎干细胞迫使成含有内皮和血管平滑肌细胞的出芽血管的发育。

[0007] Kusuma et al.(PNAS 110(31),2013:12601-12606),Gerecht-Nir et al.(Laboratory Investigation 83(12),2003:1811-1820),W02007/140340A2,W02014/145871A1,US 2014/273220A1和W02017/015415A1描述了在工程化基质中的分离的早期血管细胞外血管结构的形成。在引入基质中之前,细胞可以源自人多能(pluripotent)干细胞,它们分化为早期的血管细胞,然后进行个体化(通过胰蛋白酶消化和/或40 μ m滤网过滤)。个别细胞在基质中生长并在那里组装形成血管网络。这些论文的目的是提供可用于再生医学的自组装细胞。

[0008] W02011/115974A1涉及一种在表面上形成2D培养的血管网络的装置。

[0009] Shen et al.(Cell Research 13(5)(2003):335-341)描述了从成年兔平滑肌细胞和来自小鼠的分化的内皮细胞形成工程化血管。

[0010] 先前的血管模型与天然的体内形成的血管网络仍缺乏足够的相似性,并且需要改善的、更真实的血管模型。

[0011] 因此,本发明的目的是提供改善的血管模型,此外还提供允许更广泛用途的模型,例如疾病模型和筛选程序中的测试。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明提供了一种产生人工血管类器官的方法,包括提供能够进行血管分化的干细胞,刺激所述干细胞中的中胚层分化,刺激所述干细胞中的血管分化,从所述干细胞形成细胞聚集体,在胶原3D基质中包埋所述细胞聚集体,和刺激所述胶原3D基质中所述聚集体的血管分化。

[0014] 在密切相关的方面,本发明提供了产生人工血管类器官的方法,其包括在包含10%-50%层粘连蛋白,20%-70%胶原I和/或2%-30%胶原IV的胶原3D基质中包埋血管干细胞并且刺激所述胶原3D基质中所述干细胞的血管分化。

[0015] 此类方法可用于提供形成本发明的进一步方面的血管类器官。特别地,本发明提供了包含血管毛细血管的互连网络的人工血管类器官培养物,所述毛细血管包括内皮和具

有血管周的周细胞的基底膜, (i) 其中所述类器官是通过本发明的方法产生的和/或(ii) 其中在包含具有胶原的水凝胶的人工3D基质中包埋毛细血管和/或(iii) 其中类器官培养物包含40至1000个血管, 如通过计数个别血管和毛细血管交叉之间的血管所计数的。(i)、(ii) 和(iii) 的所有三个特征是本发明的标志, 其可以是本发明的人工血管类器官培养物个别需要的或组合的。

[0016] 本发明进一步提供了提供具有人血管毛细血管的非人动物模型的方法, 其中所述人毛细血管包括内皮和具有血管周的周细胞的基底膜, 所述方法包括将本发明的人血管类器官引入非人动物中并且使所述类器官生长出其血管毛细血管的步骤。

[0017] 本发明还涉及非人动物模型, 其包含此类人工血管类器官培养物, 例如作为插入物。此外, 提供了具有人血管毛细血管的非人动物模型, 其中所述人毛细血管包含内皮和具有血管周的周细胞的基底膜。

[0018] 本发明还涉及本发明的培养物或非人动物模型或方法在作为病理学(例如糖尿病) 模型产生它们中的用途, 其中使方法中的细胞、类器官或非人动物模型中的类器官经历发病机制以形成所述病理学, 例如在糖尿病的情况下高血糖或胰腺 β 细胞的破坏。

[0019] 本发明进一步提供了筛选用于影响发病机制或病理学的候选化合物的方法, 其包括对根据本发明的任何方面的培养物或非人动物模型或者在产生所述培养物或非人动物模型期间施用所述候选化合物, 并且监测与没有施用所述候选化合物的情况下的所述培养物或动物模型相比所述培养物或动物模型中的生理学差异。

[0020] 本发明提供了糖尿病的新治疗模型。因此, 本发明提供了Notch3激活途径抑制剂(例如 γ -分泌酶抑制剂、Notch3抑制剂、DLL4抑制剂或其组合) 在治疗或预防增厚的毛细血管基底膜中的用途, 如在糖尿病性血管病变(diabetic vasculopathy)、闭塞性血管病(occlusive angiopathy)、血管通透性改变、组织缺氧、心脏病、中风、肾脏疾病、失明、伤口愈合受损或慢性皮肤溃疡中。还提供了用于此类治疗或预防的Notch3激活途径抑制剂(例如 γ -分泌酶抑制剂、Notch3抑制剂、DLL4抑制剂); 或Notch3激活途径抑制剂(例如, γ -分泌酶抑制剂、Notch3抑制剂、DLL4抑制剂) 在制备用于此类治疗或预防的药物或药物组合物中的用途。

[0021] 最后, 本发明提供了适合于根据任何本发明方法产生人工血管类器官的试剂盒, 其包含: (i) Wnt激动剂或GSK抑制剂; (ii) 选自VEGF、FGF、BMP的血管分化因子; (iii) 胶原3D基质。

[0022] 在以下详细描述中一起描述了本发明的所有实施方案, 并且所有优选的实施方案均同样涉及所有实施方案、方面、方法、类器官、动物模型、用途和试剂盒。例如。试剂盒或其组分可用于或适合于本发明的方法。所述方法中使用的任何组分都可以在试剂盒中。本发明的类器官是本发明方法的结果, 或可以用于本发明方法和用途。本发明方法的优选的和详细的描述同样对本发明的所得或使用的类器官或动物模型的适合性解读。除非另有说明, 否则所有实施方案可以彼此组合。

[0023] 发明详述

[0024] 本发明提供了产生人工血管类器官的方法。此类人工类器官在体外培养, 但是与体内毛细血管结构高度相似。类器官是在三维中体外产生的器官的微型化和简化形式, 其显示真实的微观解剖结构。它们源自来自组织的一种或几种细胞、胚胎干细胞或诱导的多

能干细胞,由于它们的自我更新和分化能力,它们可以在三维培养中自组织。

[0025] 源自人干细胞的本发明类器官重演了人血管的结构和功能。提供了来自胚胎和诱导多能干细胞的3D血管类器官。这些血管类器官包含内皮、血管周的周细胞和基底膜,并自组装为腔化的相互连接的毛细血管网络。移植到小鼠中的人血管类器官形成灌注的人血管树,包括人小动脉和小静脉。有趣的是,体外将血管类器官暴露于高血糖和炎性细胞因子诱导基底膜增厚和内皮细胞中的转录变化,从而模拟糖尿病患者的微血管变化。药物筛选揭示了 γ -分泌酶抑制剂,该抑制剂减轻血管类器官中的此种“糖尿病”血管病变。血管类器官可用于生成药物发现的疾病模型,正如我们通过鉴定 γ -分泌酶为糖尿病血管病变的潜在治疗靶物显示,该糖尿病血管病变影响数亿患者。

[0026] 产生此类类器官的方法包括以下步骤:提供能够血管分化的干细胞,刺激所述干细胞中的中胚层分化,刺激所述干细胞中的血管分化,从所述干细胞形成细胞聚集体,在胶原3D基质中包埋所述细胞聚集体,并刺激所述胶原3D基质中所述聚集体的血管分化。

[0027] 例如,能够血管分化的干细胞是多能干细胞。多能干细胞可以源自胚胎干细胞,或者可以可以是诱导的多能干细胞(iPS)。iPS是优选的。

[0028] 干细胞分化为中胚层-血管路径。分化可以通过使细胞与组织(中胚层/血管)特异性生长或分化因子接触来实现。然后,细胞可以发育成期望的组织。此类组织特异性生长或分化因子可以是中胚层和/或血管分化因子,优选在本发明方法的不同阶段使用。这将决定在以后的发育中发育成各种类型的细胞组织。因此,细胞将从多能细胞转变为专能(multipotent)细胞。然后,其他组织类型不能或仅通过恢复成多能状态再次成为可能。通常,并非所有细胞都能分化为所选定的组织类型。通常足够的是约50%或更多或至少55%或至少60%,或至少65%或至少70%或至少75%的细胞开始向所选定的组织类型(特别是中胚层)分化,并且首先通过具有相应组织命运的专能细胞进行转化以降低其分化潜能(%值为细胞数量的分数)。当然,此分化命运仅适用于通过使用人工生长和去分化刺激而未恢复到未分化或不太分化的状态的细胞。显然,甚至体细胞也可以恢复成多能细胞,并且这不意味着在本文中定义分化状态。优选地,一旦开始中胚层或血管分化,就不对细胞引入将使细胞恢复成多能细胞的因子。

[0029] 可以从培养多能干细胞获得本发明的类器官。原则上,若伦理原因允许,则细胞也可以是全能的。

[0030] “全能”细胞可以在体内分化为任何细胞类型,包括暴露于刺激物后的种系,如发育中通常存在的。因此,全能细胞可以定义为能够生长,即发育为整个生物体的细胞。

[0031] 在根据本发明的方法中使用的细胞优选不是全能的,而是(严格地)多能的。

[0032] 在一个特定的优选实施方案中,本发明的细胞(包括与其有关的所有其他实施方案)是多能的。

[0033] “多能”干细胞不能生长成完整的生物体,但是能够产生源自所有三个胚层,即中胚层、内胚层和外胚层的细胞类型,并且可以能够产生生物体的所有细胞类型。多能性可以是每次见到的细胞特征,例如在某些干细胞中,或者它可以人工诱导。例如,在本发明的优选实施方案中,多能干细胞源自体细胞、专能、单能或祖细胞,其中诱导了多能性。此类细胞在本文中称为诱导性多能干细胞。例如,可以使用来自患者的体细胞、专能细胞、单能细胞或祖细胞,其被转变成多能细胞,该多能细胞进行本发明的方法。可以研究此类细胞或所得

的类器官培养物的异常情况,例如根据本发明方法的类器官培养物形成期间。患者可以例如患有血管病症。所述病症的特征可以在本发明的类器官中再现并研究。

[0034] “专能”细胞能够从生物体的两个或更多个不同器官或组织中的每一个产生至少一种细胞类型,其中所述细胞类型可以源自相同或不同的胚层,但是不能引起生物体的所有细胞类型。

[0035] 相反,“单能”细胞能够分化为仅一种细胞谱系的细胞。

[0036] “祖细胞”是与干细胞一样具有分化成特定类型细胞的能力,具有有限的分化选项,通常仅有一种靶细胞的细胞。祖细胞通常是单能细胞,它也可以是专能细胞。

[0037] 随着分化能力的降低,干细胞按以下顺序分化:全能、多能、专能、单能。在本发明的类器官的发育期间,干细胞从多能(也可能是全能细胞)分化为专能中胚层、血管或内皮干细胞,进一步分化为内皮细胞和周细胞的单能干细胞。

[0038] 优选地,干细胞来自脊椎动物,例如哺乳动物、爬行动物、鸟类、两栖动物或鱼类。特别优选的是陆地脊椎动物。非人的动物和人是可能的。对于本发明的所有方面和实施方案,特别优选的是哺乳动物,例如小鼠、牛、马、猫、狗、非人灵长类;人细胞是最优选的。包含类器官的非人动物模型可以选自相同的动物。干细胞和动物模型可以不是同一生物体。

[0039] 干细胞的分化已成为本领域的标准技术。例如,在W02016/094166A1中公开了形成血管移植物的分化和生长因子。此类生长因子也可以根据本发明用作分化因子。

[0040] 本发明的方法包括诱导中胚层分化的步骤。存在有特异性将分化驱动到一个方向(例如中胚层)的分化刺激物和驱动非特异性分化(中胚层是几种其他分化路径之一)的分化刺激物。此类非特异性分化可以通过血清来实现,例如Gerecht-Nir等人(参见背景部分)所用的FBS(胎牛血清)。非特异性分化可导致存在的各种胚层,包括外胚层,包括神经外胚层和内胚层。

[0041] 根据本发明的优选方案,例如通过中胚层特异性分化因子进行特异性中胚层分化。或者,但不太优选的是,中胚层可以选自分化的细胞。选择可以与特异性分化刺激组合。细胞的选择是不期望的,因为这将需要细胞的分离和个体化。根据本发明,此类个体化是不利的,因为在该阶段细胞应当形成或开始形成聚集体。优选地,中胚层刺激后的细胞在中胚层分化中具有其细胞的至少50%,优选至少60%,甚至更优选至少70%或甚至至少80%。优选地,中胚层分化包括用Wnt激动剂或GSK抑制剂,优选CHIR99021处理干细胞。Wnt激动剂或GSK抑制剂可实现较高的中胚层分化率。Wnt激动剂可以是WIR刺激物,如CHIR99021。

[0042] 干细胞也通过血管分化处理。在本发明的方法中连续或重复地刺激血管分化,特别是在3D基质内,而且还在细胞的聚集体导入3D基质前(当细胞在形成所述聚集体时)。

[0043] 血管分化可包括内皮分化并导致小的毛细血管或毛细血管前体形成。在该方法的早期阶段,例如在3D基质处理之前,此类内皮/血管分化可以不导致相同的轮廓清晰且逼真的毛细血管,它们会改变3D基质中的形式。

[0044] 如同中胚层分化一样,优选地,血管分化是特异性的血管分化,优选具有至少50%,优选至少60%,甚至更优选至少70%或甚至至少80%其处于血管分化的细胞。优选地,所述干细胞中的血管分化包括用VEGF和/或FGF和/或BMP和/或12%(v/v)或更少的大气氧的低氧条件处理干细胞。VEGF、FGF、BMP和低氧可组合。优选的VEGF是VEGF-A。优选的FGF是FGF-2。优选的BMP是BMP4。低氧条件是12%(v/v)或更少的大气氧,即对细胞供应的气相

氧。气相优选在大气压下。优选地,氧含量甚至更小,优选地为10%或更小,更优选地为8%或更小,例如6%或更小(所有%以v/v计)。氧含量优选为2%或更多,例如2%-12%(所有%以v/v计)。优选地,将细胞在具有浓度10ng/ml至50ng/ml,优选约30ng/ml的VEGF的培养基中培养。优选地,将细胞在具有浓度10ng/ml至50ng/ml,优选约30ng/ml的FGF的培养基中培养。优选地,将细胞在具有浓度10ng/ml至50ng/ml,优选约30ng/ml的BMP的培养基中培养。

[0045] 导入3D基质之前的干细胞正在形成细胞聚集体。优选地,这些细胞处于允许此类聚集的悬浮培养中。这意味着为了中胚层和/或血管分化而处理的干细胞已经为小聚集体。此类聚集体通常较小而能够在没有稳定的3D基质的情况下悬浮在液体培养基中的悬浮培养物中。

[0046] 分化后,在将分化的干细胞(现在在聚集体中)包埋到3D基质中之前,通常聚集体中的至少30%,优选至少40%,例如约50%的细胞是内皮细胞。优选地,聚集体中的至少20%,例如30%的细胞是周细胞。优选地至少60%,优选地至少70%,例如约80%的细胞一起是血管细胞。

[0047] 一旦将聚集体包埋到3D基质中,本发明的方法还包括所述3D基质中聚集体的血管分化。优选地,此血管分化还包括特异性血管分化。聚集体的特别优选的血管分化包括用VEGF和/或FGF处理聚集体的细胞。优选的VEGF是VEGF-A。优选的FGF是FGF-2。优选地,将基质中的聚集体在具有60ng/ml至150ng/ml,优选约100ng/ml浓度的VEGF的培养基中培养。优选地,将基质中的聚集体在具有60ng/ml至150ng/ml,优选约100ng/ml浓度的FGF的培养基中培养。

[0048] 将培养后,特别是在中胚层和/或血管分化期间从干细胞形成的细胞聚集体包埋到3D基质中。包埋到3D基质中的此种聚集体具有至少30个细胞或至少50个细胞,优选至少100个细胞,特别优选至少300个细胞,例如约1000个细胞的大小。优选地,大小小于100000个细胞,例如小于30000个细胞。细胞聚集体应具有建立的大小,但不能太大,以免受液体悬浮培养物中的低稳定性。聚集体是彼此附着的细胞的积累,特别是通过细胞间键和细胞间连接彼此附着。

[0049] 优选地,从形成聚集体开始起的第7至15天将所述聚集体在胶原3D基质中包埋。此时,聚集体通常具有合适的大小和分化状态。优选的时间线在图1a中显示。优选地,中胚层分化刺激(中胚层诱导)在第2-6天,优选地血管分化刺激(血管谱系促进)在第4-14天。

[0050] 可以通过本领域已知的任何方法将细胞包埋到3D基质中。一种优选的方法是使3D基质材料流体化并使3D基质在细胞聚集体周围固化或胶凝。

[0051] 3D基质是胶原基质,其优选具有至少50重量%的胶原。胶原包含胶原I、胶原II、胶原III和胶原IV。胶原I和胶原IV是最优选的。优选地,至少50%由胶原I或胶原IV组成,最优选地由胶原I和胶原IV的混合物组成。

[0052] 将聚集体在三维(3D)基质中培养。3D基质不同于2D培养物,例如在平坦表面上的皿中的2D培养物。“3D培养物”是指培养物可以在所有三个维度上扩展,而不被一侧壁(例如皿的底板)阻挡。此类培养物(优选包括3D基质)优选为悬浮。3D基质可以是凝胶,尤其是刚性稳定的凝胶,其导致生长的细胞培养物/组织的进一步扩展和分化。凝胶可以是水凝胶。根据本发明的合适的3D基质包含胶原。更优选地,3D基质包括胞外基质(ECM)或选自胶原、层粘连蛋白、内功素(entactin)和肝素硫酸化蛋白聚糖的其任何组分或其任何组合。胞外

基质可以来自Engelbreth-Holm-Swarm肿瘤或其任何组分,例如层粘连蛋白、胶原,优选4型胶原、内毒素,以及任选地进一步类肝素硫酸化蛋白聚糖或其任何组合。此类基质是基质胶。基质胶在本领域中是已知的(US 4,829,000),并且已经用于先前对3D心脏组织(WO 01/55297 A2)或神经元组织(WO 2014/090993)进行建模。优选地,基质包含层粘连蛋白、胶原和内毒素,优选浓度为20%-85%层粘连蛋白、3%-50%胶原和足够的内毒素,以使基质形成凝胶,通常为0.5%-10%内毒素。若胶原的量不足以形成凝胶,则层粘连蛋白可以需要内毒素的存在以形成凝胶。富含基质胶的基质可以包含至少3.7mg/ml的浓度,其以重量份计含有约50%-85%的层粘连蛋白、5%-40%的胶原IV,任选地1%-10%巢蛋白,任选地1%-10%类肝素硫酸蛋白聚糖和1%-10%内毒素。根据本发明,胶原含量优选增加,特别是胶原I优选。在所有实施方案中,本发明特别优选的基质包含10%-50%层粘连蛋白、20%-70%胶原I和/或2%-30%胶原IV;优选进一步0.5%-10%的巢蛋白、0.5%-10%的类肝素硫酸蛋白聚糖和/或0.5%-10%内毒素(全部重量%)。这些百分比仅涉及固体蛋白质型成分,即不是液体成分如水,其可能是水凝胶中的主要成分。基质胶的固体成分通常包含约60%层粘连蛋白、30%胶原IV和8%内毒素。3D基质可以是基质胶和胶原的混合物,例如基质胶:胶原I的2:1至1:3,优选为约1:1的混合物。对于基质组分给出的所有%值均以重量%计。根据来源,这些值可以变化例如+/-30%。内毒素是与层粘连蛋白和胶原相互作用的桥接分子。可以在步骤r)中添加此类基质成分。这些组分也是本发明试剂盒的优选部分。3D基质可以进一步包含生长因子,例如EGF(表皮生长因子)、FGF(成纤维细胞生长因子)、NGF、PDGF、IGF(胰岛素样生长因子),尤其是IGF-1、TGF- β 、组织血纤维蛋白溶酶原激活剂中的任一种。3D基质也可以没有任何这些生长因子。

[0053] 通常,3D基质是生物相容性基质的三维结构。它优选包含胶原、明胶、壳聚糖、透明质酸、甲基纤维素、层粘连蛋白和/或藻酸盐。基质可以是凝胶,特别是水凝胶。有机化学水凝胶可包含聚乙烯醇、聚丙烯酸钠、丙烯酸酯聚合物和具有大量亲水基团的共聚物。水凝胶包含亲水的聚合物链网络,有时作为水是分散介质的胶体凝胶发现。水凝胶是高吸收性的(它们可以含有超过99重量%水)天然或合成聚合物。水凝胶由于其大量的水含量,也拥有与天然组织非常相似的柔性度。三维维度基质或其组分(尤其是ECM或胶原)可能仍保留在产生的组织培养物中。优选地,3D基质是胶原基质,优选地其包含I型和/或IV型胶原。

[0054] 优选地,3D基质是水凝胶。基质(特别是水凝胶)可以具有10至30的粘弹性储能模量 G' 。粘弹性材料中的储能模量测量代表弹性部分的储存能量,以及代表粘性部分的作为热耗散的能量。一种确定储能模量的方法(其可以根据本发明使用,例如通过流变仪进行)在Anguiano et al. PLoS ONE 2017,12(2):e0171417中给出。

[0055] 优选地,胶原3D基质包含10%-50%层粘连蛋白、20%-70%胶原I和/或2%-30%胶原IV;优选进一步0.5%-10%的巢蛋白、0.5%-10%的类肝素硫酸蛋白聚糖和/或0.5%-10%内毒素(全部重量%)。基质胶通常包含50%-85%层粘连蛋白、5%-40%胶原IV、1%-10%巢蛋白、1%-10%类肝素硫酸蛋白聚糖和1%-10%内毒素(仅固体,蛋白质性成分)。

[0056] 本发明还提供了产生人工血管类器官的方法,该方法包括在包含10%-50%层粘连蛋白、20%-70%胶原I和/或2%-30%胶原IV的胶原3D基质中包埋血管干细胞,并刺激所述胶原3D基质中所述干细胞的血管分化。到目前为止讨论的所有方面和优选实施方案也适用于该方法,该方法也形成本发明的独立方面。本文已经显示了此类3D基质产生非常有利

的血管网络,类似于体内血管网络。特别地,此类网络具有大的内腔并且能够掺入模型动物中,与模型动物的循环系统结合。优选地,通过将中胚层干细胞分化为血管干细胞来产生血管干细胞,特别是如上所述,其中中胚层干细胞已经通过刺激多能干细胞中的中胚层分化而获得。所有这些方面都可与以上描述组合。

[0057] 在本发明的所有实施方案和方面中,优选将聚集体的细胞在所述3D基质中培养至少5天,优选至少7天。在3D基质中的培养可以持续5-60天或更多,优选至少10天。

[0058] 3D基质本身可以悬浮在悬浮培养物中。

[0059] 在3D基质中,聚集体形成血管网络,其包含由内皮细胞形成的内皮,被形成基底膜的血管周的周细胞围绕,这将在下文中进一步描述。血管网络的自组装通常通过将血管发芽到基质中经由发芽血管生成而发生。

[0060] 本发明进一步提供了包含血管毛细血管的互连网络的人工血管类器官培养物,所述毛细血管包含内皮和具有血管周的周细胞的基底膜,(i)其中所述类器官通过本发明的方法产生和/或(ii)其中毛细血管包埋在包含具有胶原的水凝胶的人工3D基质中和/或(iii)其中类器官培养物包含40到1000个血管,如通过对个别血管和毛细交叉之间的血管进行计数来计数。(i)、(ii)和(iii)的所有三个特征是本发明的标志,它们是本发明的人工血管类器官培养物个别需要或组合的。类器官可以仍然包含3D基质或其部分(ii)。上文对方法中的3D基质描述的内容适用于类器官。

[0061] 认为类器官是人工组织。“人工的”是指它在体外培养,并具有人工培养物的某些特征,例如大小、稠度、形状和细胞组织。形状可以是不规则的,并且与天然存在的组织不同,并且由于大小限制,细胞组织可以有所不同。特别地,“人工的”排除天然存在的组织和器官及其部位,例如天然组织切片。3D基质可以仍然在培养物中和/或类器官可以具有通过在此类基质中生长确定的形状。例如,类器官可以通过在3D基质中生长获得,尤其是如上文所述的那些。特别地,人工类器官培养物不是体内发育的血管系统或其组织样品的培养物。

[0062] 类器官中的血管数量是高得令人惊讶的,并且在人工培养物(iii)之前尚未实现。优选地,类器官培养物包含至少40个,甚至更优选至少60个,至少100个,至少200个或至少300个或更多的血管,如通过对个别血管和毛细血管交叉之间的血管进行计数来计数。1000个毛细血管的上限值仍是具有小的可管理大小的常见类器官的结果,例如用于细胞培养孔板的筛选方法,但是当然甚至更大的大小和毛细血管数通过继续类器官培养是可能的。毛细血管数通常在场内原样计数,即通过对个别血管和毛细血管交叉之间的血管进行计数。可以从计数类器官的小部分并将该数目外推到整个类器官来推断该数目。

[0063] 优选地,人工血管类器官培养物的血管毛细血管具有1 μ m至30 μ m,优选5 μ m至20 μ m的平均直径。毛细血管的此类大的直径和体积允许在循环动物模型中进行灌注。优选地,血管毛细血管的平均直径为至少1 μ m,更优选至少2 μ m,甚至更优选至少3 μ m,至少4 μ m,至少5 μ m,至少6 μ m或更多。

[0064] 人工血管类器官在其最长维度上具有100 μ m至10mm的大小。优选的是250 μ m至10mm或500 μ m至5mm的大小。此大小是类器官本身的大小,即包含整个血管网络的培养物,优选类器官仍处于3D基质中。

[0065] 此类尺寸(特别是约1-2mm)使得类器官对于细胞培养孔板(例如96孔板)是可管理的,所述板可以用于大规模测试目的。类器官是稳定的并且可以忍受允许运输(例如通过移

液器)的物理应力,因此它们适用于常规实验室处理或筛选机器人中的自动化处理。

[0066] 人工血管类器官可以以球状体的形式提供,例如特别地,最短维度是最长维度的不小于20%,特别是最长维度的不小于30%或不小于40%。优选地,人工血管类器官的体积为至少 $1 \times 10^6 \mu\text{m}^3$,特别优选至少 $2 \times 10^6 \mu\text{m}^3$,至少 $4 \times 10^6 \mu\text{m}^3$,至少 $6 \times 10^6 \mu\text{m}^3$,至少 $8 \times 10^6 \mu\text{m}^3$,至少 $10 \times 10^6 \mu\text{m}^3$,至少 $15 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ 和/或尺寸至少为250 μm ,特别优选至少350 μm 。

[0067] 类器官也可以以盘形式提供,其可以悬浮在自由浮动的环境中以便于处理。

[0068] 在本发明的人工类器官中足够的血管周的周细胞的存在是特别令人惊讶的,并且显示类器官中的本发明的血管网络已经实现了体内特性。血管周的周细胞支持内皮细胞。内皮细胞和血管周周细胞的比率可随类器官的培养时间而变化。优选地,人工血管类器官培养物中的内皮细胞与血管周周细胞的比率为100:1至1:10。优选地,该比率是50:1至1:5,或25:1至1:4或10:1至1:3或5:1至1:2。通常,在幼类器官中,内皮细胞过量,而在较老的类器官中,该比率可以是约1:1:或甚至导致相对于内皮细胞的周细胞过量。

[0069] 优选地,人工血管类器官培养物的血管毛细血管包括成熟的内皮细胞。成熟的内皮细胞可通过ICAM-1表达响应而对TNF- α 反应。优选地,人工血管类器官培养物的血管毛细血管包括成熟的周细胞。可通过确定成熟周细胞的表达标志物来检测周细胞的成熟度。

[0070] 内皮细胞可以被基底膜(也称为基底膜)围绕。基底膜可包含胶原IV、纤连蛋白和/或层粘连蛋白;它可以富含胶原IV。基底膜厚度可以是毛细血管健康的标志,并可以确定为筛选或其他测试方法的指标。取决于毛细血管的大小,人工血管类器官培养物的血管毛细血管的基底膜的厚度范围可以为0.1 μm 至3 μm ,优选0.3 μm 至2.5 μm 。人工血管类器官的血管毛细血管的基底膜的平均厚度为0.3 μm 至2.5 μm ,优选为0.6 μm 至2.1 μm ,特别优选为0.8 μm 至1.8 μm ,最优选为约1.2 μm 。在此种情况下,“约”是指 $\pm 30\%$ 。

[0071] 本发明的另一个标志是类器官形成如体内血管树中发现的小静脉和小动脉。

[0072] 本发明进一步提供了提供具有人血管毛细血管的非人动物模型的方法,其中所述人毛细血管包括内皮和具有血管周周细胞的基底膜,包括如下的步骤:将本发明的人血管类器官(特别是如上所述的)导入非人动物中,并使所述类器官生长其血管毛细血管。优选地,将所述人器官导入到非人动物的肾之上或之中。本发明还提供了非人动物模型,其包含插入的根据本发明的人工血管类器官培养物。如所述,本发明的类器官的优点是其通用性和血管毛细血管的体内样结构。可以通过导入非人动物中研究这些毛细血管在体内的行为。

[0073] 研究和调查血管疾病诸如糖尿病的动物模型在本领域中是已知的(例如,WO 2015/044339 A1)。这些模型通常基于具有遗传变化的动物,该遗传变化引起疾病状态。然而,此类突变也改变研究前提,并且潜在不仅改变疾病的发生,而且还改变了对任何经测试的治疗选项的响应。因此,需要研究逼真的情况。特别优选的是人血管系统的模型。本发明通过提供适合于植入测试动物中的类器官来实现该目标。如上所述,在体外培养的本发明的类器官具有体内形成的血管网络的高相似性,但是在人工且可控的环境中(例如仍在3D基质中而不是结缔组织中)。现在可以在非人动物中导入的本发明血管系统的特性是具有内皮的毛细血管和具有血管周周细胞的基底膜。因此,本发明还提供了具有人血管毛细血管的非人动物模型,其中所述人毛细血管包括内皮和具有血管周周细胞的基底膜。一起描述了所有这些种类的动物模型,并且在所有本发明的动物模型上阅读每个优选的或进一步

的实施方案。

[0074] 现在,本发明允许研究非人动物中的人血管毛细血管。因此,优选地,类器官来自非人动物中的人细胞,即具有人血管毛细血管。非人动物优选是脊椎动物,例如哺乳动物、爬行类、鸟类、两栖类或鱼。特别优选的是陆生脊椎动物。对于本发明的所有方面和实施方案,特别优选的是哺乳动物,例如小鼠、牛、马、猫、狗、非人灵长类。当然,也可以将任何脊椎动物用作类器官并因此血管毛细血管的来源。但是,当然,明显的优点与人类器官相关,因为有可能创建非人动物作为模型生物体,而不必使用类器官。优选地,非人动物是免疫受损的,以避免类器官排斥。

[0075] 与在如背景技术部分中总结的包含人内皮细胞的先前非人动物相反,本发明不仅将人细胞导入非人动物中,而且将人充分发育的毛细血管系统导入非人动物中。即,在类似人毛细血管树的结构中,特别是包括小静脉和小动脉的毛细血管系统中在人基底膜和人周细胞的周围研究人内皮。

[0076] 优选地,动物模型中的人工血管类器官培养物的血管毛细血管或人血管毛细血管由非人动物的血液循环系统灌注。如所述,类器官的毛细血管能够连接到非人动物模型的血管系统是本发明的优点之一。一旦植入到动物的合适位置,将形成此类连接。非常反应性的位置是肾膜,但是其他位置也是合适的,并且在本领域中已知用于组织移植和反移植(trans-grafting)研究技术。可以使用其他器官,例如腹腔中的任何器官或通过皮下移植。在某些情况下,给定的位置可以需要进一步刺激毛细血管的生长,例如通过提供生长因子,例如在合适的基质中,例如水凝胶或海绵。

[0077] 本发明的人工血管类器官培养物也可以用作研究工具来研究任何外部(例如药物或其他刺激物)或内部(突变)对类器官中细胞的生长和活性的影响。因此,在另一方面,本发明提供了研究发育性血管组织效应,例如缺陷,特别是发育缺陷的方法,包括(i)在本发明方法期间或到已发育的(完成的)类器官或动物模型的任何阶段降低或增加细胞中目的基因的表达,或(ii)在本发明方法期间或到已发育的(完成的)类器官或动物模型的任何阶段对细胞施用目的候选化合物。目的基因可以是在发育健康血管组织期间有活性时疑似必需或不利的基因。优选的基因是与疾病相关的基因,例如是遗传疾病中的致病原的基因。减少或增加基因表达的方法是本领域已知的,并且包括敲除、敲低方法或诱变(特别是RNA干扰、反义抑制、shRNA沉默、CRISPR-Cas诱变等),或转基因的导入(例如敲入)。此类减少或增加可以是条件性的,例如通过导入具有诱导型启动子和/或条件性敲除或敲除或敲低或敲入的遗传构建体。可以通过使用合适的条件性突变载体(例如包含可逆基因陷阱(reversible gene trap))导入必需基因的条件性突变或者导入致死基因。条件型突变优选促进可逆突变,其可在例如刺激后分别逆转为基因有活性或无活性的状态,例如如在双重-Flex系统中一样(WO 2006/056615 A1;WO 2006/056617 A1;WO 2002/88353 A2;WO 2001/29208 A1)。突变可以是随机的或者在特定基因处定点的。因此,在本发明的优选实施方案中,通过随机(正向)或定点(反向)诱变将可逆突变引入多能干细胞中。合适的载体包含具有可逆突变的插入盒。可以在本发明方法的任何阶段打开或关闭突变。可以通过本领域已知的任何方法,例如电穿孔将载体或其他核酸导入细胞中。当然也可以提供具有给定突变的细胞。可以从患者分离此类细胞,然后进行诱导多能干细胞状态的步骤,并使细胞发育成本发明的组织,例如通过上述方法。患者可以患有特定的目标疾病,尤其是血管缺陷或

毛细血管畸形。下面就候选治疗潜力而言进一步解释候选化合物。但是,也可以测定任何候选化合物对细胞、毛细血管或整个类器官的任何期望效应。优选的候选化合物是有机小分子。

[0078] 在本发明的任何方法或培养物或非人动物模型中,优选使血管或毛细血管经受发病机制,并且所述类器官或人动物模型是病理学模型。

[0079] 本发明的毛细血管形成过程可以经历病症。或者,可以在类器官本身(例如在培养物中)中诱导病理状态,或作为在动物模型中的植入物诱导。

[0080] 用于研究目的的病理学诱导在本领域中是已知的,并且可以暴露于有害化合物或病原体、不利的饮食或机械应力或损失或这些的组合(例如,如US2010/124533A1中所公开)。病原体包括微生物,特别是细菌或真菌和病毒。病理学也可以是遗传病症或功能障碍的结果。

[0081] 发病机制可以包括高血糖和/或炎症。例如,两者均可在糖尿病中发现。特别优选地,病理学是糖尿病。炎症可包括对一种或多种炎性细胞因子,优选TNF- α 和/或IL-6的暴露或其诱导。高血糖意味着葡萄糖水平升高,使人联想到2型糖尿病。此类葡萄糖水平可以是至少50mM,优选至少为70mM。诱发糖尿病的示例条件是75mM D-葡萄糖+1ng/mL TNF- α +1ng/mL IL-6,持续1-2.5周。类器官的血管中的糖尿病性变化包括基底膜增厚(IV型胶原、纤连蛋白、层粘连蛋白、基底膜聚糖(Perlecan)增加)、血管生长减少和内皮/周细胞死亡。在动物模型中,糖尿病也可以通过选择具有糖尿病性有机病因(例如胰腺 β 细胞缺乏)的动物来诱发;或通过引起胰腺 β 细胞功能不足来诱发。 β 细胞功能不足可以由自身免疫破坏造成的,例如在1型糖尿病中,或者由化学毒性引起的,例如由链脲霉素诱发。

[0082] 自身免疫性1型,尤其是2型糖尿病(T2D)的患病率在不断增加,导致已经超过4.2亿患者的全球流行。除了不同人群的遗传易感性外,还有各种T2D风险因素,例如肥胖、衰老、营养状况和身体不活动。高血糖的后果包括血管受损,导致动脉硬化和慢性糖尿病性微血管病。糖尿病性微血管病的结构标志是由于胞外基质蛋白,特别是IV型胶原的表达和沉积增加,毛细血管基底膜增厚。这些变化导致闭塞性血管病、血管通透性改变或组织缺氧,从而导致并发症,例如心脏病、中风、肾脏疾病、失明、伤口愈合受损、慢性皮肤溃疡或截肢。可以在本发明的类器官中研究此类状况,例如但不一定在动物模型中。

[0083] 尽管糖尿病性微血管变化可以在狗、仓鼠或猴中发生,但是无单一实验动物模型表现出人患者中看到的血管变化的所有临床特征。此外,在先前的人体外细胞培养模型中不充分重演这些血管变化。因此,仍然缺乏对影响数亿糖尿病患者的血管变化的全面了解,所述血管变化引起改变生命的患病率和不断增加的死亡率。本发明的3D人血管类器官表现出真正的人微血管系统的形态特征和分子标签。这些人3D血管可以在非人动物(如小鼠)中体内生长出血管树。重要的是,这些类器官可用于对糖尿病性微血管病建模,并筛选可以被靶向以预防“糖尿病”诱导性血管损伤的途径。

[0084] 本发明进一步涉及筛选用于影响发病机制或病理学的候选化合物的方法,该方法包括将所述候选化合物施用于培养物或非人动物模型或在根据本发明的任何方面和实施方案的所述培养物或非人动物模型的生成期间施用,并且监测与不施用候选化合物的所述培养物或动物模型相比所述培养物或动物模型中的生理学差异。如上所述,在用于筛选的方法、类器官或非人动物模型中使用的干细胞可以具有病理学或正在形成病理学,或经历

发病机制。提供了测试或筛选用于影响血管毛细血管及其网络的特性、修饰和发育的候选化合物的方法,所述方法包括使本发明的任何一种方法中的细胞或类器官或动物与候选化合物接触或者使本发明的类器官与候选化合物接触并在培养物中或体内维持所述接触该类器官,并且观察与不与所述候选化合物接触的情况下的类器官相比所述类器官的毛细血管的任何变化,例如发育变化,包括类器官的已发育或在发育的毛细血管中的变化(例如生理变化或基因表达变化)。

[0085] 接触步骤是待发育成本发明的类器官的细胞或类器官或其前体细胞聚集体的处理步骤。候选化合物可以是有机小分子,例如质量为100Da至5000Da的分子。其他候选化合物可以是生物分子,例如蛋白质、核酸或碳水化合物。进一步的候选化合物可以是散装化学品,例如溶剂,如乙醇——当然以通常可用于细胞的浓度使用——或聚合物。处理应当在可以预期化合物的特定效应的浓度下进行。可以并行测试各种浓度。通常,候选化合物的浓度为1ng/ml至100mg/ml,例如100ng/ml至1mg/ml。

[0086] 还提供了在目标类器官中筛选或测试适合于治疗病理学的候选治疗剂的方法,包括提供本发明的类器官,例如通过进行本发明的分化方法并在该方法(如上述)期间的任何阶段,优选在所有阶段对所述细胞或对病理学影响的类器官施用候选试剂。如上述,与没有此类候选试剂的情况相比,观察到类器官的血管网络的变化。此类改变可以是例如在基底膜的厚度中,如例如在糖尿病的情况下观察到的。

[0087] 此方法已在上述糖尿病模型中使用。因此,将Notch3激活途径,特别是 γ -分泌酶及其途径鉴定为适合于治疗糖尿病的改善剂。因此,本发明还提供了Notch3激活途径抑制剂(例如 γ -分泌酶抑制剂、Notch3抑制剂、DLL4抑制剂或其组合)在治疗或预防增厚的毛细血管基底膜中的用途,例如在糖尿病性血管病变、闭塞性血管病、血管通透性改变、组织缺氧、心脏病、中风、肾疾病、失明、伤口愈合受损或慢性皮肤溃疡中。

[0088] 示例性Notch3激活途径抑制剂,特别是 γ -分泌酶、Notch3或DLL4的抑制剂是 γ -分泌酶、Notch3或DLL4的抑制性抗体和结合配偶体。抗体包括其任何功能等同物和衍生物,包括抗体片段,例如Fab、F(ab)₂、Fv、单链抗体(scAb)、纳米抗体或类似的骆驼科抗体,或抗体抗原结合域。本发明包括特异性结合 γ -分泌酶、Notch3或DLL4的抗体。可以通过用全长蛋白质、蛋白质的可溶形式或其片段免疫来产生抗体。本发明的抗体可以是多克隆的或单克隆的,或者可以是重组抗体,例如嵌合抗体,其中轻链和重链上的鼠恒定区被人序列替代,或植入有CDR的抗体,其中仅互补决定区是鼠源的。本发明的抗体也可以是人抗体,其例如通过免疫能够产生人抗体的转基因动物来制备(WO 93/12227)。抗体可用于检测生物样品中的 γ -分泌酶、Notch3或DLL4,从而允许鉴定产生蛋白质的细胞或组织,此外,结合 γ -分泌酶、Notch3或DLL4(并阻断与其他结合化合物的相互作用)的抗体具有作为 γ -分泌酶、Notch3或DLL4抑制剂的治疗用途。特别优选的是抗 γ 分泌酶抗体。优选的抗Notch3抗体是他瑞妥单抗(tarextumab)。Abcam抗DLL4抗体是例如ab7280、ab176876、ab183532。

[0089] 这些组分的其他抑制剂可以是任何(生理)结合配偶体,例如螯合 γ -分泌酶、Notch3或DLL4并因此降低生物活性的受体或配体。优选地,结合配偶体是结合蛋白。Notch3的示例配体是重组可溶性DLL4蛋白。此类结合配偶体(其优选不与底物或膜交联,例如在板上交联)会在不活化的情况下结合相应的Notch受体。因此,重组DLL4蛋白可以起抑制剂的作用,因为它不在细胞表面如内皮细胞表面上呈现(Scehnet et al. Blood 2007 109

(11):4753-4760;Noguera-Troise et al.Nature 2006 444(7122):1032-1037)。先前,此类结合蛋白以可溶形式提供,不固定化在固体表面或细胞膜上,特别是也不与另一种蛋白质复合。Suc可溶性形式结合相应的靶标(例如, γ -分泌酶、Notch3或DLL4),但无法激活信号级联,而是通过阻断靶标抑制它。结合蛋白也可以作为螯合剂或掩蔽剂提供,其结合靶标并由于复合物形成而掩盖其效应,所述复合物形成阻止激活信号传导分子的结合。

[0090] 另外的Notch3激活途径抑制剂,特别是 γ -分泌酶、Notch3或DLL4抑制剂是小分子抑制剂。小分子通常是具有5000道尔顿或更小,例如2500道尔顿或更小,或甚至1000道尔顿或更小的大小的有机小化合物。小分子抑制剂抑制 γ -分泌酶、Notch3或DLL4对糖尿病性类器官的活性,如可以通过本文公开的方法容易地测试。 γ -分泌酶抑制剂的实例是Semagacestat,Avagacestat,R04929097,DAPT,LY3039478(Crenigacestat),LY411575,Dehydroxy-LY411575,LY 450139,MK-0752,IMR-1,二苯并氮卓,PF-03084014(Nirogacestat),L-685,458,FLI-06,NGP 555,氟比洛芬和舒林酸。

[0091] 其他抑制剂是抑制性核酸,如siRNA、shRNA或sgRNA(与CRISPR-Cas组合)。RNA干扰(RNAi)是一种以序列特异性方式抑制基因表达的机制。RNA干扰(RNAi)是抑制真核细胞中特定基因功能的高效方法。当应用于细胞和生物体时,RNAi包括短干扰RNA(siRNA)寡聚物或短发夹RNA(shRNA)编码载体转染后靶mRNA的降解。已经描述了RNAi的各种方法,并且对于改变植物细胞、果蝇和人黑素瘤细胞中基因表达是公知的,如记载于例如US 2002/0162126和US 2002/0173478。选择用于本发明的方法和组合物中的siRNA以靶向 γ -分泌酶、Notch3或DLL4信号传导途径的期望分子或此类分子的组合。以此种方式,它们被靶向到对应于靶基因的各种RNA。本领域技术人员应理解,如本文所述的siRNA还可以包括作为杂合DNA/RNA构建体或其任何等同物的改变的siRNA、双链RNA、微小RNA(miRNA)以及siRNA形式,诸如siRNA重复、病毒和非病毒载体中的小发夹RNA(shRNA)和载体中的siRNA或shRNA。

[0092] 在本领域中存在几种使用RNAi抑制基因表达的方法,例如WO 02/055692,WO 02/055693,EP 1 144 623B1和WO 03/074654中所述。通过使用siRNA疗法,可以靶向并抑制任何细胞因子,用于本发明的 γ -分泌酶、Notch3或DLL4拮抗和抑制疗法。因此,任何此类化合物可以用作 γ -分泌酶、Notch3或DLL4抑制剂。

[0093] 还提供了编码核酸形式的抑制剂。抑制性核酸、抗体或结合配偶体(例如受体或配体)可以在细胞中表达所述抑制剂的核酸上编码,从而表现出抑制性作用。

[0094] 抑制剂通常以治疗有效量(降低 γ -分泌酶、Notch3或DLL4活性以显著降低糖尿病性形态的量)施用。优选地,与没有治疗(但在其它方面类似的条件下)的情况下的量相比,将 γ -分泌酶、Notch3或DLL4活性降低至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。在优选的实施方案中,此种降低等同于 γ -分泌酶、Notch3或DLL4胞内水平。

[0095] 抑制剂可以在药物组合物中提供。用于治疗或预防用途的药物组合物或制剂可包含药学上可接受的稀释剂、载体、增溶剂、乳化剂、防腐剂和/或佐剂。本发明还提供了包含治疗有效量的 γ -分泌酶、Notch3或DLL4抑制剂的药物组合物。术语“治疗有效量”是指为规定状况和施用途径提供治疗效果的数量。组合物可以是液体或冻干形式,并包含具有各种pH值和离子强度的稀释剂(Tris、乙酸盐或磷酸盐缓冲剂)、增溶剂(例如Tween或Polysorbate)、载体(例如人血清白蛋白或明胶)、防腐剂(例如硫柳汞或苯甲醇),以及抗氧

化剂,如抗坏血酸或焦亚硫酸钠。具体组合物的选择将取决于许多因素,包括所治疗的状况、施用途和期望的药代动力学参数。siRNA制剂优选以脂质体制剂施用。

[0096] 本发明进一步提供了根据本发明的人工血管类器官作为组织替代疗法中的植入物的用途,所述人工血管类器官例如从本发明的培养物中获得,优选地在具有胶原的水凝胶的情况下。使用本发明的类器官的疗法可包括将人工血管类器官置于伤口中,并使所述人工血管类器官培养物整合到伤口中。作为植入物的用途可包括将类器官置于待治疗的受试者中,特别是在需要结缔组织再生长的位置处。此类再生长可以停止,例如由于损害再生长的疾病,如糖尿病,或者药物或其它疗法,诸如在化学疗法或放射中,例如如在化学疗法或放射事故中。优选地,治疗伤口。此类伤口可以是慢性伤口,特别是在30天或60天或甚至90天内不能闭合的伤口。慢性伤口可以是由于上述情况、疾病、药物或疗法所致。特别地,伤口是糖尿病性伤口,例如糖尿病性足溃疡,或烧伤,例如三度烧伤。伤口可包括皮肤伤口。皮肤伤口可包括对表皮层和真皮层两者的损害。任何伤口(包括皮肤伤口)可以包含对基础的肌肉、骨骼和肌腱的创伤。疗法可以包括伤口清洁,特别是除去死组织以减轻再生长。

[0097] 在此类疗法中,将一个或多个类器官(数量取决于伤口的大小)放置在待治疗的体积诸如伤口中,并使类器官与体积周围的组织整合。所述体积优选在面向所述一个或多个类器官的外侧的一个或多个类器官表面积的至少50%,优选至少75%(在面向其它类器官的超过一个类器官的情况下,则不计内表面积)中被患者的组织围绕。这意味着体积主要是内部的,并且能够在受试者内整合。伤口可以是内部或开放性伤口。甚至开放伤口也可以具有面对开放表面的此类体积,例如皮肤伤口。

[0098] 使类动物器官整合到伤口中通常包括通过本发明类器官的血管的存在而改善的再生过程。所述血管能够与患者的循环系统连接,并改善受损组织的氧合,因此改善其再生。

[0099] 为了避免针对类器官及其细胞的免疫反应,类器官的细胞优选与患者属于相同生物体(优选都是人,或者两者是相同的非人动物,优选是哺乳动物),并且与患者是MHC匹配。为了快速提供此类合适的类器官,可以创建具有各种已记录的MHC类型的类器官库。它的类器官可以快速提供给患者。

[0100] 还提供了化合物和物质的试剂盒。试剂盒可包括进行任何本发明方法的手段。当然,由于某些是标准化学品或通常可用,因此不需要包括所有物质。然而,优选地提供核心物质。在其他试剂盒中,提供了较为罕见的物质。可以组合本发明的试剂盒或其物质。试剂盒中的组分通常在分开的容器,例如小瓶或烧瓶中提供。容器可以包装在一起。优选地,试剂盒包含用于进行本发明方法或其步骤的手册或说明书。

[0101] 提供了试剂盒,其适合于根据任何本发明方法产生人工血管类器官。试剂盒可包含(i)Wnt激动剂或GSK抑制剂;(ii)选自VEGF,优选VEGF-A,FGF,优选FGF-2,BMP,优选BMP4的血管分化因子;(iii)胶原3D基质,优选包含10%-50%层粘连蛋白、20%-70%胶原I和/或2%-30%胶原IV(全部重量%)。

[0102] 优选地,试剂盒包含如上所述的3D基质,或它们的成分以产生此类3D基质。可以以固态(例如冻干状态)提供基质成分,以重建到基质,例如通过水合。试剂盒中可包含如上述的任何基质或其成分。优选地,基质是水凝胶,尤其是如上所述的胶原水凝胶。试剂盒可包含此类可重建的(优选胶原性的)组分。进一步优选的基质组分是碳水化合物,特别是聚合

形式(多糖)。优选的多糖是琼脂糖。

[0103] 任何试剂盒可进一步包含细胞生长营养物,优选DMEM/F12,敲除血清替代品(KOSR)培养基,Glutamax或必需氨基酸和/或非必需氨基酸(NEAA)或其任何组合。实施例中提及的任何化合物均可包含在试剂盒中。

[0104] 预期可以就本文描述的任何其他方法或产品而言实施本文描述的任何方法或产品,并且可以组合不同的实施方案。

[0105] 试剂盒可进一步包括用于进行本发明方法的说明书。此类指令可以以印刷形式或以合适的载体上的计算机可读格式提供。

[0106] 最初提交的权利要求书设想涵盖对任何提交的权利要求或提交的权利要求的组合多项引用的权利要求。可以想到,可以就本发明的任何方法或产品而言实施本文所讨论的任何实施方案,反之亦然。就特定条件而言讨论的任何实施方案可以就不同条件而言应用或实施。此外,本发明的组合物和试剂盒可用于实现本发明的方法。

[0107] “包括”理解为开放式术语,即允许进一步的成分或实质步骤。“由...组成”应理解为封闭式术语,没有任何其他成分或实质步骤。

[0108] 在整个本申请中,术语“约”可用于指示值包括用于确定该值的装置或方法的误差的标准偏差,或者在设定值中可指 $\pm 10\%$ 。

[0109] 在均与上文详述的描述可组合的以下优选实施方案和定义中进一步定义本发明:

[0110] 1.产生人工血管类器官的方法,其包括提供能够血管分化的干细胞,刺激所述干细胞中的中胚层分化,刺激所述干细胞中的血管分化,从所述干细胞形成细胞聚集体,在胶原3D基质中包埋所述细胞聚集体,并刺激所述胶原3D基质中所述聚集体的血管分化。

[0111] 2. 1的方法,其中所述胶原3D基质包含至少50重量%的胶原。

[0112] 3. 1或2的方法,其中所述胶原3D基质包含10%-50%层粘连蛋白、20%-70%胶原I和/或2%-30%胶原IV;优选进一步包括0.5%-10%的巢蛋白、0.5%-10%的类肝素硫酸蛋白聚糖和/或0.5%-10%内毒素(全部重量%)。

[0113] 4.产生人工血管类器官的方法,其包括在包含10%-50%层粘连蛋白、20%-70%胶原I和/或2%-30%胶原IV的胶原3D基质中包埋血管干细胞,并且刺激所述胶原3D基质(全部重量%)中所述干细胞的血管分化。

[0114] 5. 4的方法,其中通过将中胚层干细胞分化为血管干细胞产生所述血管干细胞,优选地,其中所述中胚层干细胞已经通过刺激多能干细胞中的中胚层分化获得。

[0115] 6. 1至5中任一项的方法,其中能够血管分化的干细胞是多能干细胞,优选诱导的多能干细胞。

[0116] 7. 1至6中任一项的方法,其中在胶原基质中包埋的所述细胞聚集体包含至少50个细胞。

[0117] 8. 1至7中任一项的方法,其中所述中胚层分化包括用Wnt激动剂或GSK抑制剂,优选CHIR99021处理所述干细胞。

[0118] 9. 1至8中任一项的方法,其中所述干细胞中的血管分化包括用VEGF,优选VEGF-A,和/或FGF,优选FGF-2,和/或BMP,优选BMP4,和/或12% (v/v) 或更小的大气氧气的低氧条件处理所述干细胞。

[0119] 10. 1至9中任一项的方法,其中所述聚集体的血管分化包括用VEGF,优选VEGF-A

和/或FGF,优选FGF-2处理所述聚集体的细胞。

[0120] 11. 1至10中任一项的方法,其中在从形成聚集体开始的第7至15天,将所述聚集体包埋在胶原3D基质中。

[0121] 12. 1至11中任一项的方法,其中将所述聚集体的细胞在所述3D基质中培养至少5天,优选至少7天。

[0122] 13. 1至12中任一项的方法,其中所述3D基质是水凝胶,优选地具有10至30的粘弹性储能模量G'。

[0123] 14. 人工血管类器官培养物,其包含血管毛细血管的相互连接的网络,所述毛细血管包含内皮和具有血管周的周细胞的基底膜,其中所述类器官通过1至13中任一项的方法产生和/或其中所述毛细血管包埋于包含具有胶原的水凝胶的人工3D基质中和/或其中所述类器官培养物包含40至1000个血管,如通过计数个别血管和毛细血管交叉之间的血管所计数的。

[0124] 15. 14的人工血管类器官培养物,其中所述血管毛细血管具有1 μ m至30 μ m的平均直径。

[0125] 16. 14或15的人工血管类器官培养物,其中内皮细胞与血管周的周细胞的比率为100:1至1:5之间。

[0126] 17. 14至16中任一项的人工血管类器官培养物,其中所述血管毛细血管包含成熟的内皮细胞和/或成熟的周细胞。

[0127] 18. 提供具有人血管毛细血管的非人动物模型的方法,其中所述人毛细血管包括内皮和具有血管周的周细胞的基底膜,所述方法包括将14至17中任一项的人血管类器官引入非人动物中并且使所述类器官生长出其血管毛细血管的步骤,优选地,其中将所述人类器官引入所述非人动物的肾之上或之中。

[0128] 19. 非人动物模型,其包含插入的14至18中任一项的人工血管类器官培养物。

[0129] 20. 具有人血管毛细血管的非人动物模型,其中所述人毛细血管包括内皮和具有血管周的周细胞的基底膜。

[0130] 21. 19或20的非人动物模型,其中通过所述非人动物的血液循环系统灌注所述人工血管类器官培养物的血管毛细血管或所述人血管毛细血管。

[0131] 22. 1至21中任一项的方法或培养物或非人动物模型,其中所述血管或毛细血管经历发病机制,并且所述类器官或人动物模型是病理学模型。

[0132] 23. 22的方法或培养物或非人动物模型,其中发病机制包括高血糖和/或炎症和/或其中所述病理学是糖尿病,优选地其中所述炎症包括暴露于一种或多种炎性细胞因子,优选TNF- α 和/或IL-6。

[0133] 24. 筛选用于影响发病机制或病理学的候选化合物的方法,其包括对根据1至23中任一项所述的培养物或非人动物模型或者在产生培养物或非人动物模型期间施用所述候选化合物,并且监测与没有施用所述候选化合物的情况下的所述培养物或动物模型相比所述培养物或动物模型中的生理学差异。

[0134] 25. 调查发育性血管组织效应(例如缺陷,特别是发育缺陷)的方法,包括(i)在权利要求1至21中任一项的方法或类器官或动物期间的任何阶段,减少或增加细胞中目的基因的表达,或(ii)在权利要求1至21中任一项的类器官或动物期间的任何阶段中在类器官

的发育期间对细胞施用目的候选化合物。

[0135] 26. 权利要求14至17中任一项的人工血管类器官作为组织替代疗法中的植入物的用途,特别优选是下述疗法,其包括将所述人工血管类器官置于伤口中并使所述人工血管类器官培养物整合进入所述伤口中。

[0136] 27. Notch3激活途径抑制剂(例如 γ -分泌酶抑制剂、Notch3抑制剂、DLL4抑制剂或其组合)在治疗或预防增厚的毛细血管基底膜中的用途,例如在糖尿病性血管病变、闭塞性血管病、血管通透性改变、组织缺氧、心脏病、中风、肾脏疾病、失明、伤口愈合受损或慢性皮肤溃疡中。

[0137] 28. 适用于根据1至13中任一项的方法产生人工血管类器官的试剂盒,其包含(i) Wnt激动剂或GSK抑制剂;(ii) 血管分化因子,其选自VEGF,优选VEGF-A,FGF,优选FGF-2, BMP,优选BMP4;(iii) 胶原3D基质,优选包含10%-50%层粘连蛋白、20%-70%胶原I和/或2%-30%胶原IV(均为重量%)。

[0138] 通过以下附图和实施例进一步举例说明本发明,而限于本发明的这些具体实施方案。

[0139] 附图简述

[0140] 图1:从人干细胞生成血管网络。a,将人胚胎干细胞(ESC)和人iPSC分化为血管网络和自由漂浮的类器官的方案示意图。底部图显示了在指示的分化步骤观察到的代表性形态。b,c,表达CD31的内皮细胞的免疫荧光显示胶原I/基质胶基质中复杂、相互连接的血管网络的建立。d,基于共焦成像的CD31⁺血管网络的3D重建。重建比例尺在3个轴上指示。e,通过诱导ICAM-1表达揭示的TNF α 介导的3D内皮网络的激活。f-h由CD31⁺内皮和周细胞特异性标志物CNN1、PDGFR β 和SMA确定的血管网络的内皮(绿色)和周细胞(红色)覆盖。通过IV型胶原(Co1IV)表达显示了基底膜的形成。i,通过针对IV型胶原(Co1IV)的免疫荧光显示的自组织人毛细血管类器官以显现包被内皮管的基底膜的沉积。值得注意的是,b-i中的数据来自源自人胚胎干细胞的血管类器官。显示DAPI染色以对细胞核成像。放大率显示在每个图中。

[0141] 图2:成熟的、连续的人毛细血管的生成。a,自由浮动的类器官显示被周细胞紧密覆盖的密集的内皮网络(CD31⁺),如由PDGFR β 表达确定。还显示了整个自由浮动类器官的3D重建(左上图)。b,通过针对CD31⁺内皮的免疫荧光和H&E染色显示的自由漂浮的血管类器官中的内皮腔形成。c,自由漂浮的血管类器官的代表性电子显微术。注意,腔化的连续的毛细血管状结构的生成,具有紧密的接合(白色箭头)和基底膜(黑色箭头)的外观。L,腔;E,内皮细胞。d,CD31⁺端细胞(箭头)标记新形成的细胞。注意在血管发生部位处不存在Co1IV⁺基底膜。放大率显示在每个图中。

[0142] 图3:在小鼠中建立功能性人血管树。a,将人血管类器官移植到NOD/SCID小鼠的肾囊中。左上方图指示移植部位(箭头)。人类器官衍生的血管系统通过不与鼠内皮发生交叉反应的人特异性CD31抗体显现,以小鼠肾的染色示例(插图)。b-c, FITC-葡聚糖灌注(绿色)揭示的小鼠中功能性人血管系统(通过人特异性抗CD31免疫染色检测, hCD31, 红色)。d, 灌注人特异性抗CD31抗体以标记经灌注的人血管。通过小鼠特异性抗CD31抗体(mCD31, 绿色)显现小鼠血管。e, 通过经H&E染色的组织切片显示,在人血管类器官移植植物中出现的代表性小动脉(A)和小静脉(V)。f, 在人移植的血管类器官中产生人小动脉(A)和小静脉(V)。小动

脉通过对人CD31⁺内皮细胞(红色)染色而显示,该细胞被通过SMA、钙调理蛋白和MYH11免疫染色检测的血管平滑肌细胞(vSMC)紧密覆盖。小静脉显示典型的平内皮表型和稀疏的vSMC覆盖。鼠小动脉内皮细胞不与人特异性CD31抗体发生交叉反应,如对肾血管所示(右下图)。放大率显示在每个图中。g,代表性轴向T₂加权图像,血流(灌注),相对血量(rBV),平均传输时间(mean transit time,MTT)和渗漏(K₂),其通过MRI测量。选择轴向平面,以便可见肾(以白色画轮廓)和植入物(以红色画轮廓)两者。肌肉组织以绿色画轮廓。下表给出了灌注、rBV、MTT和K₂的定量值(+/-SD)。n=3只分析的小鼠。

[0143] 图4:在人体血管类器官中对糖尿病性微血管病变建模。a,通过PAS染色(左)、CD31⁺内皮细胞和ColIV染色检测基底膜显示的晚期2型糖尿病患者皮肤活组织检查中真皮毛细血管的基底膜增厚。来自非糖尿病患者的皮肤血管显示为对照。b,晚期2型糖尿病和非糖尿病患者的皮肤毛细血管的代表性电子显微镜术显示,与非糖尿病对照中的基底膜(箭头)相比,糖尿病患者中形成异常厚的基底膜(双侧箭头)。L,腔;E,内皮细胞;P,周细胞。条形图显示了基底膜增厚的定量(平均值+/-SD)。n = 6。***p<0.001(未配对的两尾t检验)。c-d,人血管类器官在高血糖[75mM葡萄糖]时显示IV型胶原沉积增加,其通过用高葡萄糖与促炎细胞因子IL6[1ng/mL]和TNF α [1ng/mL]的组合(“糖尿病混合物”)处理显著进一步增加。c,基底膜增厚的代表性图像;插图指示腔血管的共焦横截面。d,使用共焦横截面定量IV型胶原的增厚;个别测量的血管显示为点。从3个独立的生物学重复中,针对每种实验条件分析了>130个血管腔。***p<0.001(Student t检验)。e,高葡萄糖/IL6/TNF α 处理导致作为人毛细血管衬里的Col IV阳性基底膜的明显扩展。右图显示了直接包被CD31⁺内皮管的基底膜增厚的3D重建。钙调理蛋白免疫染色标记周细胞。f,在“糖尿病性”和非糖尿病性条件下培养的血管类器官的代表性电子显微术图像证实了糖尿病性处理后明显的基底膜增厚。注意糖尿病性条件下的多层基底膜(双侧箭头),其无法在对照类器官(箭头)中观察到。L,腔;E,内皮细胞;P,周细胞。显示所有放大率。

[0144] 图5: γ -分泌酶的抑制消除糖尿病性血管类器官中血管基底膜的增厚。a,从在糖尿病性(高葡萄糖/IL6/TNF α)和非糖尿病性条件下培养的血管类器官分选的CD31⁺内皮细胞FACS的转录组分析。显示了差异表达基因和前5个上调基因(按p值排序)的热图和上调基因的GO:生物学过程,比较了糖尿病性条件和非糖尿病性条件。比较来自“糖尿病性”血管类器官和II型患者衍生的皮肤内皮CD31⁺细胞的上调基因的常见的GO:分子功能术语与其相应的p值一起绘图。与非糖尿病个体中的那些相比,患者中的上调基因源自来自II型糖尿病患者的分选CD31⁺内皮细胞。b,c,通常规定的糖尿病药物不影响用糖尿病性混合物(高葡萄糖/IL6/TNF α)处理人血管类器官后的基底膜增厚。b,使用胶原IV(ColIV)染色的基底膜增厚的代表性图像。插图指示胶原IV覆盖的腔血管的共焦横截面(绿色)。c,光学横截面用于定量基底膜增厚。每个腔化的血管显示为点。对于从3个独立的生物学重复的每种实验条件分析了>130个腔。***p<0.001(Student的t检验,比较了媒介物和药物处理的类器官与在非糖尿病性条件下平行培养的类器官)。除了指示的比较之外,所有其他药物处理与非糖尿病性条件相比均为p<0.001,并且与它们相应的媒介物糖尿病性条件对照相比均不显著。方法中描述了药物剂量和培养条件。d,e,DAPT对 γ -分泌酶的抑制消除了“糖尿病性”条件下培养的血管类器官中血管基底膜的增厚,其通过ColIV显现。d,用各种信号传导途径的小分子抑制剂处理的糖尿病性血管中基底膜增厚的代表性图像。插图显示被胶原IV(ColIV,绿

色)包围的腔血管共焦横截面。e,共焦横截面用于定量基底膜的增厚。对于来自3个独立的生物学重复的每种实验条件分析了>130个腔化的血管(每个血管显示为个别点)。 $**p<0.01$; $***p<0.001$ (Student的t检验)。值得注意的是,除了所示的比较之外,与非糖尿病性条件相比,所有其他药物处理均为 $p<0.001$,并且与媒介物糖尿病性条件对照相比不显著。方法中描述了药物剂量和培养条件。f,g,通过 γ -分泌酶抑制剂DAPT防止基底膜增厚是剂量依赖性的。定量显示来自暴露于指定条件的至少不同类器官的>130个腔腔化结构(点)的ColIV厚度。 $***p<0.001$ (Student的t检验)。

[0145] 图6:人ES细胞向血管类器官的分化。a,在3D内皮管中共表达内皮标志物CD31和VE-钙粘蛋白。自在胶原I基质中培养的ESC衍生的类器官显示代表性数据。b,c人iPS细胞在CD31⁺阳性管中有效分化。b,显示重复进行超过20次的实验的代表性图像。c,基于共焦成像的源自iPS细胞的CD31⁺血管网络的3D重建。重建比例尺在3个轴上指示。b和c中的数据来自胶原基质中培养的类器官。d,显示了源自iPS细胞的整个自由漂浮类器官的3D重建。数据使用用抗CD31抗体成像的整个类器官的共焦成像得出。重建比例尺在3个轴上指示。所有放大率均在图中指示。

[0146] 图7:血管类器官的分子表征。a,与来自指定组织的基因型组织表达(GTEx)RNASeq数据相比,FACS分选的来自血管类器官的CD31⁺内皮细胞的转录物组(RNAseq)的热图。体外生成的内皮管的基因表达概况与人血管组织(GTEX_冠状动脉,GTEX_主动脉,GTEX_胫动脉)最紧密地聚簇在一起。b,多能性,血管周细胞和内皮细胞的标志物基因的热图。将来自血管类器官的FACS分选的CD31⁺内皮细胞与先前发表的2D培养条件下源自iPS细胞的原代和分化内皮细胞(Patsch et al.Nat.Cell Biol.17,994-1003(2015).)进行比较。c,层粘连蛋白表达(蓝色)以成像包围血管类器官中CD31⁺内皮管的基底膜(绿色)。显示了在胶原I基质中培养的人ESC衍生的血管类器官的代表性图像。放大率显示在图上。

[0147] 图8:常见糖尿病性啮齿动物模型在皮肤微血管系统中未显示基底膜增厚。a,在指定的糖尿病大鼠和小鼠模型中,与其非糖尿病对照分组相比,皮肤血管毛细血管的基底膜厚度的量化。有关详细信息,参见补充表2。数据显示为分析血管的平均值 $\pm$ SD。每分组 $n>5$ 只动物。使用年龄匹配的C57BL/KsJ和C57 BL/Ks WT小鼠作为对照。对于ZDF大鼠模型,将杂合大鼠(fa/+)用作对照。基于胶原IV免疫染色的形态分析来确定基底膜增厚。b,各种小鼠模型的皮肤切片的代表性图像,以证明涵盖CD31⁺(红色)阳性血管的ColIV(绿色)沉积。

[0148] 图9.人ESC衍生的血管类器官中的基底膜增厚。a,用糖尿病性介质(高葡萄糖/IL6/TNF α)处理ES细胞衍生的血管系统或在正常条件(非糖尿病性)下培养。在CD31阳性(红色)内皮管周围用Col IV特异性抗体(绿色)显现基底膜的增厚。插图显示共焦横截面。CNN1标记周细胞。b,在糖尿病性血管类器官中Col IV表达增强。通过qPCR测定已经用糖尿病性介质(高葡萄糖/IL6/TNF α)处理2周的血管类器官中的Col4a1和Col4a2表达,并与未处理的对照类器官进行比较。值显示为平均值 $\pm$ SD。 $*p<0.05$ (Student的t检验)。在两个独立的实验中使用>15个血管类器官的合并物。

[0149] 图10:将多能干细胞有效分化为血管类器官中的内皮细胞和周细胞。a,通过FACS分析在第18天建立的血管网络和在第30天的晚期血管类器官的内皮细胞和周细胞含量。在这两种情况下,分化后>80%的细胞群均存在内皮细胞(CD31⁺)和周细胞(CD140b⁺)。P,周细胞;EC,内皮细胞

[0150] b,仅产生少量(约1%)造血细胞($CD45^+$),并且分化后发现的细胞的约10%为间充质干细胞样细胞($CD73^+$, $CD90^+$)。

[0151] 图11:血管类器官中的成熟内皮细胞。a,血管类器官中的内皮细胞表达von Willebrand因子(vWF)并显示Weibel-Palade体的形成(右图)。b,Ulex Europaeus凝集素1(UEA-1)与血管类器官中毛细血管结构的结合指示存在成熟的内皮细胞。c,自由漂浮的血管类器官中的成熟内皮细胞有效吸收乙酰化的LDL(ac-LDL)。

[0152] 图12:糖尿病性小鼠中移植的人血管的基底膜增厚。将血管类器官移植到免疫受损的NOD/SCID/Gamma(NSG)小鼠中,随后将其(1个月后)用链脲霉素(STZ)处理,以诱导严重的高血糖。3个月后,收获人移植物并分析糖尿病性基底膜增厚。使用人特异性CD31(hCD31)抗体鉴定移植的类器官衍生的血管。与IV型胶原染色(上图)和电子显微术(中图;箭头表示沉积的胶原原纤维)显示的正常血糖小鼠(Ctrl)相比,源自糖尿病小鼠(STZ)的人血管类器官中的严重基底膜增厚。相反,鼠肾的内源性血管在该阶段未显示基底膜的变化(下图;A,小动脉,C毛细血管)。肾中CD31信号的缺乏证明了抗体的人特异性。

[0153] 图13:在人血管类器官移植物中重演了糖尿病性血管消退。将人血管类器官移植到NSG小鼠中,所述小鼠用STZ处理的1个月后诱发糖尿病。与正常血糖小鼠(Ctrl)相比,来自糖尿病小鼠(STZ)的移植物在诱导糖尿病后3个月显示总体降低的血管密度,其通过内皮细胞(CD31)和周细胞(SMA)染色(上图)显示。糖尿病小鼠(STZ)中的人血管显示血管消退的迹象,例如由圆形细胞(实心箭头)指示的内皮凋亡和SMA阳性血管壁上的内皮细胞缺乏(空箭头)。

[0154] 图14:阻断Notch3受体或配体D114抑制糖尿病性基底膜增厚。血管类器官在体外用糖尿病性介质(高血糖+IL-6+TNF- α)处理2周,这导致与对照介质(Ctrl)相比毛细血管的大量基底膜增厚,其通过IV型胶原染色显示。为了揭示先前鉴定的可以防止糖尿病血管基底膜增厚的 γ -分泌酶抑制剂DAPT的直接靶标,在糖尿病性条件下使用功能性阻断抗体(α -Notch1、 α -Notch3、 α -Jagged1)和非交联重组蛋白(D111,D114)抑制Notch途径的特定成员。阻断Notch-1、Jagged-1或D111不影响糖尿病介导的血管基底膜增厚,而阻断Notch-3或D114完全阻断了基底膜增厚。在血管系统中,Notch3受体在周细胞上特异性表达,并且Notch配体D114在内皮细胞上特异性表达,这表明现在经由Notch3/D114在这两种细胞类型之间的串扰介导糖尿病性血管基底膜增厚。

[0155] 图15:血管类器官的细胞和功能表征。a,FACS分析,以确定最初产生的血管网络和晚期血管类器官(NC8)中存在的不同细胞群。 $CD31^+$ 内皮细胞, $PDGFR-\beta^+$ 周细胞, $CD45^+$ 造血细胞和 $CD90^+CD73^+$ 间充质干细胞(MSC)样细胞的百分比。右侧图中的条形图指示血管网络和血管类器官中内皮细胞(EC)和周细胞(P)的相对群体。图代表来自n=2个独立实验的平均值 $\pm$ S.E.M,每个实验中>50个血管网络/类生物体。b,用于多能性、周细胞和内皮细胞的原型标志物基因的热图。通过RNAseq分析来自血管网络或血管类器官的FACS分选的 $CD31^+$ 内皮细胞(EC)和 $PDGFR-\beta^+$ 周细胞(P),并与亲本iPSC系(NC8)进行比较。c,通过诱导ICAM-1表达揭示了TNF α 介导的血管类器官(NC8)的活化。加入TNF α (剂量)后24小时测定ICAM-1诱导。DAPI用于对核进行复染色。d,来自血管类器官(NC8)的内皮细胞($CD31^+$)中的von Willebrand因子(vWF)表达。也显示Col IV染色以对基底膜画轮廓。右图显示了电子显微术,揭示了Weibel Palade体的外观。e,血管类器官(NC8)的内皮网络($CD31^+$)吸收了乙酰化

的低密度脂蛋白 (ac-LDL) f, 血管性类器官 (NC8) 染色在凝集素 *Ulex europaeus* 凝集素 1 (UEA-1) 上呈阳性。比例尺: d = 50 μ m, 500nm (EM 上图), 100nm (EM 下图), e, f = 100 μ m 或如图中所示。

[0156] 图16: 糖尿病性血管类器官的分析。a, b 对血管类器官 (H9) 的FACS分析, 以确定 (a) 在非糖尿病和糖尿病 (高葡萄糖/IL6/TNF α) 介质中培养的CD31⁺内皮细胞级份和 (b) PDGFR- β ⁺周细胞的百分比。

[0157] 图17: γ -分泌酶的抑制消除人血管类器官的糖尿病微血管病。a, 通过 i.v. 注射 FITC-D葡聚糖并与 hCD31 共染色以显现人的血管系统评估血管通透性。注意糖尿病性 STZ 小鼠中弥漫的 FITC 信号, 其指示血管渗漏。DAPT 处理使糖尿病血管通透性正常化。b, 通过 FITC-葡聚糖外渗确定的血管渗漏的定量。n = (对照 = 3, STZ = 7, STZ+DAPT = 5) 小鼠。***p < 0.01, *p < 0.05 (单因素 ANOVA)。c, d, DAPT 处理恢复糖尿病 STZ 小鼠的人血管密度。人血管移植物的毛细血管密度通过用人特异性抗 CD31 抗体染色 (黑色) 确定。c, 移植的血管类器官中的人血管密度的定量。n = (对照 = 3, STZ = 5, STZ+DAPT = 4) 小鼠。***p < 0.001 (单因素 ANOVA)。d, 对照, STZ 和 STZ+DAPT 处理的小鼠中人 CD31⁺ 血管密度的代表性图像。比例尺, a, d = 50 μ m 或如图中所示。

[0158] 图18: 鉴定 D114-Notch3 为糖尿病血管基底膜增厚的候选途径

[0159] a, 暴露于高葡萄糖/IL6/TNF α (糖尿病性) 并用针对 Jagged-1、Notch1、Notch3 或重组 D111 和 D114 的抗体处理的血管类器官 (源自 NC8 iPSC) 中 Col IV 染色的基底膜的代表性图像。插图显示被 IV 型胶原 (Col IV, 绿色) 包围的个别血管的共焦横截面。在光学横截面中测量由 Col IV 连续包围的腔的厚度。为了进行定量 (右图), 对于来自 3 个独立的具有相同样本大小的生物重复的每种实验条件分析总共 >130 个腔。来自腔化血管的每个个别测量均显示为点。非糖尿病性类器官的代表性图像和定量显示为对照。***p < 0.001 (单因素 ANOVA)。b, 暴露于高葡萄糖/IL6/TNF α (糖尿病性) 或在标准培养条件 (非糖尿病性) 下维持的对照、D114 KO 和 Notch3 KO 血管类器官 (NC8 iPSC) 的 Col IV 染色的基底膜的代表性图像。在光学横截面中测量由 Col IV 连续包围的腔的厚度。来自腔化血管的每个个别测量在右侧图中显示为点。对于来自 3 个独立的具有相同样本大小的生物重复的每种实验条件分析总共 >180 个腔。***p < 0.001 (单因素 ANOVA)。c, 用 Notch3 阻断抗体处理移植有人血管类器官 (H9 ESC) 的 STZ 小鼠, 并移植在基底膜标志物 Col IV 和人特异性 CD31 上染色以显现人血管。基于 Col IV 染色确定个别人血管的基底膜厚度 (hCD31⁺)。n > 140 个血管。***p < 0.001 (单因素 ANOVA)。n = (对照 = 3, STZ = 3, STZ+Notch3 = 2) 小鼠。比例尺, a, b, c = 50 μ m, c 插图 = 10 μ m。

[0160] 图19: D114 和 Notch3 敲除 iPSC 的创建和内皮细胞和周细胞中 Notch 受体/配体的表达。a, b, CRISPR/Cas9 基因组编辑用于生成 D114 和 Notch3 敲除 iPSC (NC8)。Notch3/D114 序列以及产生的插入/缺失中指示单引导 RNA (sgRNA)。c, Western 印迹显示在靶 iPSC 中 Notch3 表达的消融。克隆 #4 (红色) 用于功能分析。FL, 全长 Notch3; TTM, 跨膜 Notch3 亚基。d, 血管类器官中的免疫染色显示内皮细胞 (CD31⁺) 中, 而非经 CRISPR/Cas9 基因组编辑的 iPSC 中的 D114 表达。比例尺: e = 50 μ m。e, 通过 FACS 分选从血管类器官分离的内皮细胞 (EC) 和周细胞中表达的 Notch 受体/配体的热图。比例尺显示对数 (标准化 FKPM)。

[0161] 图20: 血管类器官的表型表征。a, 胶原 1/基质胶基质中分化的 (NC8) 内皮细胞和周细胞的共培养。形成的内皮网络 (CD31⁺) 仅显示与周细胞 (PDGFR- β ⁺) 的弱相互作用, 并且未

被Col IV⁺基底膜包裹。b,从胚胎干细胞(H9)和两个独立的iPS细胞系成功生成血管网络。注意PDGFR- β ⁺周细胞是如何紧密靠近内皮管(CD31⁺)以及Col IV⁺基底膜的形成。

[0162] 图21:几种 β -分泌酶抑制剂预防糖尿病诱导的人血管类器官中的血管基底膜增厚。在存在或不存在 β -分泌酶抑制剂(10 μ M R04929097、1 μ M脱羟基-LY411575、1 μ M LY411575)的情况下,在糖尿病性介质(75mM葡萄糖,1ng/mL IL-6、1ng/mL TNF- α)中培养血管类器官。随后,对类器官进行固定,并对内皮细胞(CD31),周细胞(PDGFR β)和血管基底膜蛋白Col IV染色。显示了代表性图像。糖尿病性条件增加Col IV⁺基底膜(血管)的量。用3种独立的 γ -分泌酶抑制剂处理预防糖尿病性条件下基底膜(Col IV)的增加。比例尺50 μ m。

实施例

[0163] 实施例1:材料和方法

[0164] 人干细胞和分化为血管类器官。

[0165] 呈现的所有实验均在人iPS细胞系NC8(Pripuzova et al.Stem Cell Res.14, 323-338 (2015))或人胚胎干细胞(ESC)H9系(Thomson et al.Science 282,1145-1147 (1998))中进行。所有干细胞均在化学确定的无饲养细胞条件下培养,如先前描述(Chen et al.Nat.Methods 8,424-9(2011))。为了分化,使用0.5mM EDTA解聚H9 ESC或NC8 iPS细胞2分钟,然后与0.1%Stempro Accutase(Life Technologies)温育3分钟。将2 $\times$ 10⁵个细胞重悬于包含50 μ M Y-27632(Calbiochem)的分化培养基(DMEM:F12培养基,20%KOSR, Glutamax,NEAA;均来自Gibco)中,并分配到超低附着表面6孔板(Corning)的1个孔中进行细胞聚集。在第3天用12 μ M CHIR99021(Tocris)处理细胞聚集体,在第5、7和9天添加BMP4(30ng/mL,Stemcell Tech.)、VEGF-A(30ng/mL,Peprotech)和FGF-2(30ng/mL,Miltenyi)处理细胞聚集体。在第11天,将细胞更换至含有VEGF-A(30ng/mL)、FGF-2(30ng/mL)和SB43152(10 μ M)的培养基,以平衡内皮/周细胞比率。在第13天将得到的细胞聚集体包埋在基质胶:胶原I(1:1)凝胶中,并用含有100ng/mL VEGF-A和100ng/mL FGF-2的分化培养基覆盖。每2至3天更换此种分化培养基。在第18天左右,建立了血管网络,并直接分析或者从凝胶中切出来自个别细胞聚集体的网络,并且在96孔低附着板(Sumilon,PrimeSurface 96U)中作为自由漂浮血管类器官进一步培养长达3个月。

[0166] 人iPSC的再编程和表征。如先前所述(Agu et al.Stem cell reports 5,660-71 (2015)),对人皮肤成纤维细胞(ATCC)和血液样本进行了再编程。为了检查染色体的完整性,如Agu等人所述,进行了多重荧光原位杂交(M-FISH)。对于基因型分型,根据如Illumina Inc.推荐的Infinium HTS方案指南进行样品前制备。使用Illumina iScan系统扫描的Illumina Infinium PsychArray-24珠芯片根据制造商的说明进行基因型分型。使用Illumina GenomeStudio(Illumina, San Diego, CA, USA)与基因型分型软件(模块2.0.1)调用基因型,排除具有调用率<0.995的样品。为了进行分析,我们应用了Illumina的默认设置,InfiniumPsychArray-24v1-1_A1 manifest和Infinium PsychArray-24v1-1_A1_ClusterFile集群文件。通过使用bcftools cnv进行CNV分析和绘图。

[0167] 免疫细胞化学。将胶原I:基质胶凝胶中的血管网络固定20分钟,在室温(RT)下用4%PFA将自由漂浮血管类器官固定1h,然后用3%FBS、1%BSA、0.5%Triton和0.5%Tween在摇动器上于室温封闭2h。值得注意的是,血管类器官比3D凝胶中最初形成的血管网络更

稳定,因此可用于标准免疫组织化学程序。将一抗在封闭缓冲液中以1:100-1:200稀释,并在4℃下温育过夜。在这些研究中使用了以下抗体:抗CD31(DAKO,M082329)、抗VE-钙粘蛋白(Santa Cruz,sc-9989)、抗ICAM-1(Sigma,HPA002126)、抗PDGFR-β(CST,3169S)、抗SMA(Sigma,A2547)、抗钙调蛋白(Abcam,AB46794)、抗胶原IV型(Merck AB769)、抗层粘连蛋白(Merck,19012)、抗MYH11(Sigma HPA014539)。在PBS-T(0.05%Tween)中洗涤3x 10分钟后,将样品与封闭缓冲液中1:250的来自Life Technologies的相应二抗:Alexa Fluor 555驴抗鼠(A31570)、Alexa Fluor 647驴抗兔(A31573)、Alexa Fluor 488驴抗山羊(A11055)、Alexa Fluor 488驴抗绵羊(A11015)在室温下温育2小时。在TBST中洗涤3次20分钟后,将样品用DAPI复染色。将样品封固(DAKO S302380),干燥过夜,然后用Zeiss 780激光扫描显微镜成像。

[0168] 血管类器官移植。将血管类器官移植到12-15周龄NSG小鼠的肾囊下。所有手术程序均按照奥地利法律和道德标准进行。使用MRI对小鼠进行成像,以随时间监测移植物。为了测试人血管植入物的灌注,对小鼠静脉内注射FITC-葡聚糖(1.25mg/小鼠,Invitrogen D1822)或抗人CD31-Alexa 647(2μg/小鼠,BD 558094)。切除的移植物在室温下用4%PFA固定2h,并按上文对血管类器官所述进行整体染色,或进行免疫组织化学或标准H&E组织学处理。为了区分内源性小鼠和移植的人血管系统,使用特异性的抗人CD31抗体(DAKO,M082329),并且为了显现鼠血管,我们使用了特异性的抗小鼠CD31抗体(Abcam,AB56299)。为了排除可能的交叉反应性,在人和小鼠对照切片两者上测试了这些抗体,从而验证了特异性。用Zeiss 780激光扫描显微镜对样品成像。

[0169] MRI成像。在具有35mm正交鸟笼线圈的15.2T Bruker系统(Bruker BioSpec, Ettlingen Germany)上进行MRI。成像前,插入尾线以递送造影剂(具有硅管的30号针)。用异氟烷麻醉所有动物(N=3)(4%诱导,以1.5%维持)。在成像期间,监测呼吸并且若呼吸每分钟为<50或>80次呼吸,则调整异氟烷水平。用使用水泵循环的加热到37℃的水对小鼠保温。为了对植入物进行解剖学定位和显现,使用了多层多回波(MSME)自旋回波顺序(重复时间(TR)/回波时间(TE)=3000/5.8-81.18ms,14次回波,117μm²平面内分辨率,0.5mm切片厚度,实验次数[NEX]=1)。注射0.05ml的0.01mol/l钆基造影剂(Magnevist,Berlex)的前推注,以校正造影剂渗漏。在尾静脉注射0.05mL 0.25mol/L Magnevist后,使用快速成像以稳定状态进动(steady-state precession,FISP),以500.6ms时间分辨率(1切片;TR/TE=500/1.7ms;翻转角度=5度;468X468μm²平面内分辨率;1-mm切片厚度;NEX=2;360次重复)收集动态易感性造影剂(DSC)灌注MRI。DSC数据用于计算灌注,相对血量(rBV)、平均传输时间(MTT)和渗漏(K₂)。使用ImageJ(National Institutes of Health;rsbweb.nih.gov/ij/)和DSCoMAN插件(Duke University,dblab.duhs.duke.edu/wysiwyg/downloads/DSCoMAN_1.0.pdf)离线进行处理。该分析包括截短DSC-MRI时间序列中的前5个时间点以确保稳态磁化,按像素计算推注前信号强度(S₀),将截短的DSC-MRI时间系列转换为弛豫时间曲线(relaxivity-time curve)($\Delta R_2^*(t) = -(1/\tau_F)\ln(S(t)/S_0)$),S(t)是动态信号强度曲线,并如先前所述(Boxerman et al.Am.J.Neuroradiol.27,859-867(2006))校正钆泄漏(K₂)。

[0170] 在人血管类器官中对糖尿病性血管病变建模。在非糖尿病性对照介质(17mM葡萄

糖)或糖尿病性介质(75mM葡萄糖,在存在或不存在人TNF α (1ng/mL,Invitrogen PHC3011)和/或IL-6(1ng/mL,Peprotech 200-06)的情况下)中培养血管类器官中已建立的内皮网络长达3周,然后通过IV型胶原免疫染色和电子显微术调查基底膜。在非糖尿病性介质中使用D-甘露醇以控制高渗效应。对于基底膜定量,分析了获得的z栈(z-stacks),并使用ImageJ软件测量了腔结构周围的ColIV涂层厚度。为了药物处理,在存在或不存在以下药物的情况下,将类器官暴露于糖尿病性介质(75mM葡萄糖,1ng/mL人TNF α 和1ng/mL IL-6):2,4-噻唑烷二酮(5mM,Abcam ab144811)、二甲双胍(5mM,Abcam ab120847)、阿卡波糖(80 μ g/mL, Sigma A8980)、那格列奈(100 μ M, Sigma N3538)、二亚苯基碘鎓(Diphenyleneiodonium)(10 μ M)、格列美脲(30nM, Sigma G2295)、吡格列酮(10 μ M, Sigma E6910)。使用了以下小分子抑制剂:N-乙酰-L-半胱氨酸(500 μ M, Sigma, A7250)、CHIR99021(10 μ M, Tocris 4423)、Goe6976(100nM, Merck US1365250)、MK2206(10 μ M, Eubio S1078)、QNZ(10 μ M, Eubio S4902)、SB203580(10 μ M, Eubio S1076)、SCH772984(500nM, Eubio S7101)、SP600125(10 μ M, Eubio S1460)、Y-27632(10 μ M, Calbiochem 688000)、DAPT(25 μ M, Sigma D5942)、SB431542(10 μ M, Abcam ab120163)。

[0171] 血管类器官的FACS分析。于37℃使用PBS中的25 μ g/mL透明质酸酶(Worthington)、3U/mL分散酶(Gibco)、2U/mL Liberase(Roche)和100U DNA酶(Stemcell Tech)将非糖尿病性和糖尿病性血管类器官解聚45-60分钟。随后,将单细胞用以下抗体染色:抗CD31(BD, 558094)、抗PDGFR- β (BD, 558821)、抗CD90(Biolegend, 328117)、抗CD45(ebioscience, 11-0459-41)和抗CD73(BD 742633)。DAPI染色用于排除死细胞。BD FACS Aria III用于细胞分选,而BD FACS LSR Fortessa II用于细胞分析。

[0172] 使用CRISPR/Cas9的基因组编辑。在U6启动子之后不久,用BbSI(Thermo Fisher ER1011)切割带有2A-Puro盒¹³的表达来自酿脓链球菌的Cas9的哺乳动物表达载体(Addgene质粒:#62988;)。随后,将质粒再连接,引入用于神经源性基因座notch同源蛋白3(Notch3)或Delta样蛋白4(Dll4)的sgRNA。以下引物用于sgRNA退火:Notch3:正向,caccgGCCACTATGTGAGAACCCCG(SEQ ID NO:7);Notch3:反向,aaacCGGGGTTCTCACATAGTGGCc(SEQ ID NO:8);Dll4:正向,caccgCAGGAGTTCATCAACGAGCG(SEQ ID NO:9);反向,aaacCGCTCGTTGATGAACCTCTGc(SEQ ID NO:10)。sgRNA质粒通过Sanger测序验证,并用于用4D-Nucleofector系统(Lonza)对iPSC(NC8)的电穿孔。使用P3 Primary Cell 4D-Nucleofector试剂盒转染2 μ g质粒DNA。将经转染的NC8细胞接种在含有50 μ M Y27632(Calbiochem)的Essential 8培养基(Gibco)中的经基质胶包被的6孔板上,并培养24小时,之后嘌呤霉素处理(0.2 μ g/ml)48小时。培养剩余细胞,直到观察到集落形成,并进一步扩增单一集落用于用Sanger测序进行基因型分型。通过Western印迹或免疫荧光染色验证敲除细胞系。

[0173] 在体内在人血管类器官中对糖尿病血管病变建模。每天对携带人血管类器官移植物的免疫缺陷的NSG小鼠i.p.注射40mg/kg链脲霉素(STZ)(Merck, 572201)达连续5天。每天,将STZ新鲜溶解在柠檬酸盐缓冲液(pH4.6)中并立即使用。通过使用OneTouch UltraEasy系统(Lifetouch, AW 06637502C)测量非空腹葡萄糖来确认糖尿病(血糖>300mg/dL)。将DAPT(Selleckchem S2215)溶解在乙醇中,并以5mg/kg连续5天注射90%的玉米油,每周2天无处理。以3次/周以1mg/kg注射抗Notch3阻断抗体(R&D AF1559)。为了定量血管渗

漏,测量FITC-葡聚糖⁺面积并使用FIJI软件相对于灌注的人血管(hCD31⁺)面积标准化。然后,相对于对照非糖尿病小鼠进一步标准化此比率。在处理停止2天后测量长期DAPT处理的血管的通透性,以避免测量DAPT对血管通透性的急性影响。

[0174] 下一代测序和qRT-PCR分析。在37℃使用PBS中的25μg/mL透明质酸酶(Worthington)、3U/mL分散酶(Gibco)、2U/mL Liberase (Roche)和100U DNA酶(Stemcell Tech)将非糖尿病和糖尿病性血管类器官的血管网络解聚45-60分钟。随后,针对CD31表达(BD 558094)对单细胞染色,并使用FACS Aria III仪对DAPI阴性(=活细胞)进行FACS分选。将CD31阳性、DAPI阴性的内皮细胞直接分选到Trizol LS缓冲液(Invitrogen)中,并进一步处理以分离RNA。对于RNASeq,通过多聚A富集(NEB)来富集mRNA,并在Illumina HiSeq2500上测序。对于qRT-PCR分析,使用Trizol (Invitrogen)从整个血管类器官中提取总RNA,并使用iscript cDNA合成试剂盒(Biorad)合成cDNA,在Biorad CFX实时PCR仪上用SYBR Green主混合物(Thermo)进行。首先将所有数据相对于GAPDH标准化,然后与非糖尿病性对照样品进行比较。使用了以下引物:

[0175] Col4a1-FWD: TGCTGTTGAAAGGTGAAAGAG (SEQ ID NO:1)

[0176] Col4a1-REV: CTTGGTGGCGAAGTCTCC (SEQ ID NO:2)

[0177] Col4a2-FWD: ACAGCAAGGCAACAGAGG (SEQ ID NO:3)

[0178] Col4a2-REV: GAGTAGGCAGGTAGTCCAG (SEQ ID NO:4)

[0179] GAPDH-FWD: TCTTCTTTTGCCTCGCCAG (SEQ ID NO:5)

[0180] GAPDH-REV: AGCCCCAGCCTTCTCCA (SEQ ID NO:6)

[0181] FN1-FWD: ACACAAGGAAATAAGCAAATG (SEQ ID NO:11)

[0182] FN1-REV: TGGTCGGCATCATAGTTC (SEQ ID NO:12)

[0183] TUBB-FWD: CCAGATCGGTGCCAAGTTCT (SEQ ID NO:13)

[0184] TUBB-REV: GTTACCTGCCCCAGACTGAC (SEQ ID NO:14)

[0185] 生物信息学分析。使用Tophat v2.0.10和bowtie2/2.1.0将RNA-seq读段与人基因组(GRCh38/hg38)进行比对,在TPM,FPKM中进行基因和转录水平丰度估算,并使用RSEM v1.2.25进行预期计数,使用HTSeq v0.6.1p1计算对比读段,并以Feq阈值为0.05使用DESeq2 v1.10.1进行差异表达分析。使用Enrichr (Kuleshov et al. Nucleic Acids Res. 44, W90-7 (2016)) 鉴定上调基因的GO术语。使用表达概况相似性搜索服务器-CellMontage v2(cellmontage2.cira.kyoto-u.ac.jp; Fujibuchi et al. Bioinformatics 23, 3103-3104 (2007)) 相对于正常细胞类型对iPS.EC细胞的表达概况进行分类。将TPM中的平均iPS.EC细胞转录物相对丰度与2919个预处理的人基因表达数据集进行比较。根据获得的结果,iPS.EC与内皮细胞最相似-关联性最高的75个数据集全部源自内皮细胞-55个源自静脉内皮细胞,13个源自微血管内皮细胞,5个源自动脉内皮细胞,2个源自淋巴管细胞血管内皮细胞,相关系数范围为0.69至0.64之间,p值范围为5.38e-2212至6.39e-1828。为了将iPS.EC表达概况与已发表的人组织RNA序列数据进行比较(Lonsdale et al. Nat. Genet. 45, 580-5 (2013)),我们将我们的表达概况和如先前描述(Danielsson et al. Brief. Bioinform. 16, 941-949 (2015).)的可用的表达概况组合,其使用对数转换的2338个组织特异性基因的F/RPKM值(Cavalli et al. Genome Biol. 12, R101 (2011)),使用ComBat除去测序研究批效果,并在相关性热图中检查样品聚簇来进行。发现iPS.EC的表达

概况与GTEx动脉样品的那些表达概况成簇。

[0186] 来自II型糖尿病和血糖正常对照患者的皮肤样品。从T2D和非糖尿病患者中采集人皮肤的手术样品。从腿截肢获取非坏死健康的皮肤。由于糖尿病足综合征,T2D患者的腿截肢是必需的。非糖尿病患者的腿截肢是由于事故,静脉溃疡或其他与T2D无关的血管疾病所致。本研究得到当地伦理委员会的批准,所有纳入的患者给予他们的知情同意(no.449/2001;81/2008)。值得注意的是,我们包括在腿截肢的任何溃疡或坏死的最大可能距离处分离的皮肤。下表1中显示了患者集体的详细信息。

[0187] 表1.有和没有2型糖尿病(T2D)的患者之间的患者特征和实验室参数比较。

参数	T2D	对照	P
n	13	13	-
性别m/f	5/8	4/9	
年龄(年,均值±SD)	54,6±16	47,4±15,5	n.s.**
BMI(kg/m ² ,均值±SD)	27,9±3,3	27,75±3,4	n.s.**
T2D持续时间(年,均值±SD)	9,1±6,1	-	
HbA1c(% ,均值±SD)*	8,0±2,1	5,48±0,34	<0.001**
肌酸酐(mg/dl,均值±SD)	1,15±0,6	0,80±0,23	n.s.**
吸烟(n%)	7(54%)	6(46%)	

[0189] 值是平均值±SD。n:数目,m:男性,f:女性,SD:标准差,BMI:体重指数,P:p值,n.s.:不显著,**t检验,*以百分比(%)计的糖化血红蛋白。

[0190] 患者皮肤中的免疫组织化学。将人皮肤材料冷冻固定在Gelto1中并在-80℃贮存,或在4%多聚甲醛固定后在石蜡中包埋。切成2-5μm的切片,用于随后的免疫荧光或免疫组织化学染色。将石蜡切片脱蜡,水合,并进行热诱导的抗原恢复。通过微波(3x5分钟,620W)或通过在高压釜中在10mM柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中加热切片(60分钟)来恢复抗原性。将冷冻切片在-20℃下贮存,在使用时解冻并干燥,并在冰冷的丙酮中固定20分钟。这继之以与指定的一抗一起温育,并通过生物素-链霉亲和素-辣根过氧化物酶方法或使用荧光标记的二抗显现。

[0191] 人患者衍生的内皮细胞制备物。分析了4名T2D和6名非糖尿病患者。对于BEC的离体制备(拼出),使用机械和酶促微量制备方案,包括使用分散酶I(Roche Inc.,#210455),如先前所述¹¹。将所得的单细胞悬液用1x PBS-1%FCS封闭,并在三步程序中与抗CD31、抗CD45和抗平足蛋白(podoplanin)抗体一起进行温育,中间有清洗步骤。关于抗体,参见上文部分。随后,使用FACStar Plus(Becton Dickinson)对细胞进行细胞分选。分离总CD31⁺平足蛋白⁻内皮细胞,再分析,两次沉淀(200g),在RLT缓冲液(Qiagen;#74104)中裂解,并进一步处理RNAseq。

[0192] 电子显微术。在室温使用在0.1M磷酸钠缓冲液(pH 7.2)中的2.5%戊二醛固定血管类器官达1小时。对于来自糖尿病和非糖尿病腿截肢的皮肤血管的电子显微术,将人皮肤固定在4%PFA和0.1%戊二醛中,并包埋在Lowicryl-K4M中。然后,将样品用相同的缓冲液冲洗,后固定在ddH2O中的1%四氧化锇中,在分级丙酮系列中脱水,并包埋在Agar 100树脂中。对于来自糖尿病和非糖尿病腿截肢的皮肤血管的电子显微术,将人皮肤固定在4%PFA和0.1%戊二醛中,并包埋在Lowicryl-K4M中。切下70nm的切片,并用2%乙酸铀酰和

Reynolds柠檬酸铅进行后染色。使用在80kV下运行的FEI Morgagni 268D (FEI, Eindhoven, The Netherlands) 检查切片。使用11兆像素Morada CCD相机 (Olympus-SIS) 采集图像。

[0193] 糖尿病的啮齿类模型。表2中列出了本研究和相应参考文献中使用的啮齿类模型。对照是年龄匹配的WT动物或未处理的品系,如表中所示。将所有啮齿类模型的石蜡包埋的皮肤样品的切片进行HE和PAS染色以显现血管形态。

[0194] 表2. 在我们的研究中分析的啮齿类模型概述。

物种	品系	遗传学 / 模型	对照	类型	持续时间	表型
小鼠	C57	<i>lepr db/db</i>	WT	遗传	28周	2 型 糖
	BL/KsJ					尿病
小鼠	C57	<i>lep ob/ob</i>	WT	遗传	28周	2 型 糖
	BL/KsJ					尿病
小鼠	C57	STZ	WT	化学	17周	1 型 糖
	BL/KsJ					尿病
小鼠	C57	STZ	WT	化学	24周	1 型 糖
	BL/KsJ					尿病
小鼠	C57	<i>Insr ko</i> + 多	无	遗传	24周	2 型 糖
	BL/KsJ	西环素	多西环素			尿病
小鼠	C57	LDLR ko +	正常饮食	遗传	16周	肥胖
	BL/6	高脂肪 + 葡萄糖饮食				
小鼠	C57	高脂肪饮食	WT	饮食	16周	2 型 糖
	BL/6					尿病
大鼠	ZDF	<i>Lepr, Zucker</i>	瘦同胞仔	遗传	6个月	2 型 糖
		糖尿病性肥胖				尿病
大鼠	SD	STZ	WT	化学	6个月	1 型 糖
						尿病

[0197] (参考文献:Goldman, O. et al. Stem Cells 27, 1750-1759 (2009); Watabe, T. et al. J. Cell Biol. 163, 1303-11 (2003); Potente et al. Cell 146, 873-887 (2011); Kern et al. Am. J. Physiol. Metab. 280, E745-51 (2001); Pickup et al. Life Sci. 67, 291-300 (2000); Wellen et al. Journal of Clinical Investigation 115, 1111-1119 (2005); Li et al. J. Diabetes Complications 29, 568-571 (2015); Lieb, W. et

al.Circ.Cardiovasc.Genet.3,300-306 (2010);Lim et al.Atherosclerosis 180,113-118 (2005))

[0198] 统计学。除非另有说明,否则所有值均以平均值 $\pm$ SEM表示。使用GraphPad Prism 进行统计分析。图例中描述了所有使用的统计检验。 $P<0.05$ 公认是统计学显著的。

[0199] 实施例2:建立人3D血管类器官。

[0200] 毛细血管由形成壁的内衬里的内皮细胞和包埋在周围基底膜内的周细胞构成。人内皮细胞先前已经源自人胚胎干细胞(hESC)和诱导多能干细胞(iPSC)(James et al.Nat Biotechnol 28,161-6(2010);Patsch et al.Nat.Cell Biol.17,994-1003(2015))。此外,可以从人ESC和iPSC产生血管周细胞,例如血管平滑肌细胞(Cheung et al.Nat.Biotechnol.30,165-73(2012))。然而,为了研究复杂的血管疾病的机制,需要一种高度复杂的模型,该模型类似于人微血管系统的所有特征,例如腔化的内皮、内皮-周细胞相互作用以及共同的基底膜的形成,并且适用于高通量药物筛选。因此,我们着手从hESC和iPS细胞建立3D人血管类器官。

[0201] 为实现这点,我们开发了一个多步骤方案来调节中胚层发育和血管规格中涉及的信号传导途径(图1)。我们首先在低氧条件下培养人ES细胞聚集体,并通过将这些细胞聚集体暴露于GSK抑制剂CHIR99021以激活Wnt途径来诱导中胚层分化(Pasch et al.,同上;Sumi et al.Development 135,2969-2979(2008))。随后,用BMP4、VEGF-A和FGF-2处理细胞聚集体以促进血管分化(Bai et al.J.Cell.Biochem.109,363-374(2010);Goldman et al.Stem Cells 27,1750-1759(2009)),接着用VEGF-A、FGF-2和SB431542处理(以阻断TGF β 信号传导)(James et al.,同上;Watabe et al.J.Cell Biol.163,1303-11(2003))。然后,将这些细胞聚集体包埋在3D基质中,并进一步用VEGF-A和FGF-2刺激以驱动血管分化。在多个先导实验(pilot)测试限定的实验条件后,我们开发了3D基质胶/胶原I基质,其允许类似于血管树的结构的高度可再现长出(图1a)。血管标志物CD31的免疫染色证实,这些长出物含有高比例的内皮管(图1b,c)。我们还观察到VE-钙粘蛋白的染色(图6a),所述VE-钙粘蛋白是内皮细胞的另外的原型标志物。共焦成像显示了CD31⁺内皮结构的复杂、相互连接的网络的形成(图1d)。我们还能够使用此种方法从人iPSC中开发CD31⁺血管类器官(图6b-d)。

[0202] 接下来,我们验证了CD31⁺血管类器官在体内重演人血管的特征。为了确定基因表达的概括,我们解聚类器官,对CD31⁺内皮细胞进行分选,并进行RNAseq。实际上,来自我们3D培养物的CD31⁺内皮细胞的基因表达概况确实与人血管的基因表达概况(GTEx)最紧密地聚簇在一起(图7a)。SHOGoin Cellmontage2分析进一步显示了我们的类器官内皮细胞仅与人内皮细胞匹配(未显示)。此外,从类器官分离的内皮细胞不表达原型hESC标志物SOX2和Nanog,也不表达平滑肌标志物抗肌萎缩蛋白、结蛋白和肌形成蛋白;然而,重要的是,它们确实表达了原代人内皮细胞或先前报道的2D体外人内皮培养物的生物标志,例如CD34、CDH5、vWF、PECAM1、NOS3或RAMP2(图7b)。从类器官分离的内皮细胞还通过诱导细胞粘附分子ICAM1来响应TNF α 刺激(图1e),指示它们的功能能力。最重要的是,这些3D血管类器官是自组织的,并且我们观察到了如由分子标志物CNN1、SMA和PDGFR β 定义的周细胞的形成和适当的定位(图1f-h)。3D结构也被基底层包围,如通过对原型血管基底膜标志物胶原IV(图1h,i)和层粘连蛋白(图7c)进行免疫染色确定。值得注意的是,在相同条件下纯化的、分化的内皮细胞和周细胞的共培养导致脆弱的内皮网络,该网络仅显示很少的周细胞相互作用

用,并且未被胶原IV覆盖(图20a)。重要的是,我们能够使用人胚胎干细胞系H9以及另外两个测试的iPSC系可重现地生成类似的3D血管网络(图20b)。

[0203] 为了进一步改善和标准化这些体外微血管系统以进行药物筛选方法,我们开发了96微孔格式的自由漂浮3D类器官培养物(图1a)。这些1-2mm自由漂浮的类器官形成了复杂的/分支的3D毛细血管网络,该网络由CD31⁺内皮细胞以及紧密相关的周细胞组成(图2a)。从人ESC和iPSC产生自由漂浮的类器官是稳健且可重现的。重要的是,自由漂浮的类器官培养物能够将单个类器官分离到孔中,以便通过免疫组织学和电子显微术(EM)进行处理。免疫组织学和EM成像确实显示了具有内皮细胞、周细胞和基底膜的立体型(stereotypical)毛细血管的形成,以及内皮细胞之间典型的紧密连接的形成(图2b,c)。我们还观察到了正在生长的血管边缘的CD31⁺端细胞,指示新形成的血管(图2d)。如预期,这些端细胞没有仅仅在成熟毛细血管中形成的基底膜包围(图2d)。自由漂浮的血管类器官在培养中扩充约3-4周,然后生长停滞,并且此后可维持至少两个月。

[0204] 接下来,我们使用FACS评估了血管网络和自由漂浮类器官的细胞组成。两者都不同程度包含PDGFR- β ⁺周细胞以及CD31⁺内皮。剩余细胞主要是CD90⁺CD73⁺间充质干样细胞和少量CD90⁻CD45⁺造血细胞(图15a)。从我们的血管网络和自由漂浮的类器官分离的CD31⁺内皮细胞的基因表达概括证实,这些细胞表达成熟的内皮标志物,如von-Willebrand因子(vWF),并有效下调了亲本iPSC多能性标志物(图15b)。来自3D培养物的PDGFR- β ⁺分离细胞在早期血管网络阶段表现出内皮/周细胞标志物混合表达,其在血管类器官中朝着典型的周细胞标志改变,例如表达NG2(GSPG4)、SMA(Acta2)或钙调蛋白-1(CNN1)(图15b)。在此阶段,我们还发现了Oct-4和Nanog的某些表达,其可能源自早期PDGFR- β ⁺周细胞祖细胞,它们仍可以存在于血管类器官中。重要的是,我们的自由漂浮类器官中的内皮细胞通过诱导细胞粘附分子ICAM1来响应TNF- α 刺激(图15c),反映了功能能力。此外,我们观察到了von Willebrand因子(vWF)的免疫染色和Weibel-Pallade体的生成,乙酰化LDL的摄取以及用凝集素UEA-1的染色(图15d-f),均指示成熟内皮细胞。因此,我们已经从hESCs和iPSCs建立了自组织的3D人血管类器官,它们表现出真正的人微血管系统的形态特征和分子标签。

[0205] 因此,我们已经从hESCs和iPSCs建立了自组织的3D人血管类器官,它们表现出真正的人微血管系统的形态特征和分子标签

[0206] 实施例3:血管类器官在小鼠中建立功能性人血管系统

[0207] 为了测试血管类器官是否可以在体内形成功能性血管,我们在体外将hiPSCs和hESCs分化为血管内类器官,并将它们移植到免疫缺陷宿主小鼠的肾囊下。人类器官由于其紧凑的结构可以可再现地移植,并且确实小鼠环境中生长和存活,在某些情况下超过6个月。我们用人特异性抗CD31对类器官和肾脏组织进行染色,这显示人血管系统已在内源性小鼠血管旁建立(图3a)。我们还观察到人血管的出芽,如由端细胞的形成和人血管向邻近组织中的生长所决定的。为了评估血液循环,我们用FITC-葡聚糖灌注受体小鼠。我们发现人血管已经接近内源性小鼠血管系统(图3b,c)。类似地,当我们给小鼠灌注人特异性抗CD31抗体时,我们观察到了与小鼠内源性血管系统不同的血管的灌注和染色,如通过鼠特异性抗CD31染色确定的(图3d)。

[0208] 重要的是,组织学切片切出显示,这些人血管已特化为小动脉、毛细血管和小静脉(图3e)。使用针对人CD31⁺内皮以及平滑肌肌动蛋白(SMA)或钙调蛋白的免疫组织化学作

为内皮周围的平滑肌细胞的标志物,进一步证实了该特化(图3f)。我们还用对人肌球蛋白重链11 (MYH11) 特异的抗体检测平滑肌细胞(图3f)。此外,用MRI成像证实了移植的人血管类器官的灌注,该成像检测到对移植人血管类器官的流入,并且重要的是,血液也从血管树中流出(图3g)。灌注速率和血量的MRI定量测量显示良好血管化和灌注的植入物;此外,与相邻内源性小鼠肾和肌肉中的血流参数相比,平均传输时间(MTT)和低血管渗漏(K_2)证实人血管的表现正常组织和功能(图3g)。这些数据显示了我们的3D毛细血管类器官可以在体内特化为小动脉和小静脉,并在受体小鼠中形成灌注的功能性人血管系统。

[0209] 实施例4:人血管类器官中的糖尿病性血管病变

[0210] 糖尿病是失明、肾衰竭、心脏病、中风或下肢截肢的主要原因;在很大程度上是由于血管的明显变化,其由基底膜的扩展限定。在人的肾脏或肌肉活组织检查中已经观察到由于糖尿病性微血管病引起的此类结构变化。为了确认人的糖尿病性微血管变化,我们检查了正常血糖个体和2型糖尿病(T2D)患者的手术标本中的真皮皮肤微血管系统。表1中显示了包括年龄、性别、身体质量指数(BMI)、血清肌酸酐水平和疾病年数的临床特征。在正常血糖对照的皮肤血管中,CD31⁺毛细血管内皮由薄的基底包围,如通过胶原IV和PAS染色(图4a)和电子显微术(图4b)确定。我们研究中包括的所有2型糖尿病患者的皮肤微血管系统均揭示了胞外细胞基质蛋白沉积的明显改变以及洋葱皮样(onion-skin-like)薄层的大量增厚以及基底膜层的典型分裂(图4a, b)。因此,如预期,我们观察到了T2D患者的皮肤毛细血管的大量基底膜增厚。

[0211] 尽管糖尿病性微血管病在糖尿病患者的皮肤中是明显的,但是它先前在糖尿病的各种啮齿类模型中都没有观察到。因此,我们对多种遗传和环境诱导的小鼠和大鼠糖尿病模型的皮肤微血管系统进行了全面评估。但是,在任何这些模型中,我们都未能检测到指示皮肤血管病变的基底膜增加,这些模型包括瘦蛋白和瘦蛋白受体突变体ob/ob和db/db小鼠、链脲霉素处理的小鼠、多西环素诱导的小鼠胰岛素受体敲除、LDLR突变体小鼠中的高脂饮食、高脂肪和葡萄糖、或Zucker糖尿病肥胖大鼠(携带瘦蛋白受体突变)和链脲霉素处理的大鼠(图9a, b和表2)。因此,这些非常严重和长期的1型和2型糖尿病啮齿类模型均未表现出人糖尿病性血管病变的关键标志,毛细血管基底膜增厚。

[0212] 鉴于糖尿病的啮齿类模型不重演糖尿病患者中存在的皮肤血管病变,因此我们想要测试我们是否可以在我们的人血管类器官中对此种关键表型进行建模。为实现这点,我们在具有升高的葡萄糖的培养基中培养我们的3D血管类器官,并与人皮肤样品类似地监测基底膜扩展,如通过胶原IV测定。有趣的是,高血糖导致人血管类器官中胶原IV的显著增加(图4c, d)。由于糖尿病伴有炎症状态,包括促炎性细胞因子(如TNF- α 和IL-6)的血清水平升高,因此我们也在正常血糖或高血糖条件下在有或没有TNF α 和IL6的情况下培养血管类器官。在正常血糖条件下,通过暴露于单独或组合的TNF α 和IL6,不显著改变血管类器官中胶原IV的表达。然而,胶原IV沉积在暴露于升高的葡萄糖以及TNF- α 和IL-6两者的血管类器官中明显增强(图4c, d)。这些类器官的共焦横截面证实了响应TNF α 、IL6和高葡萄糖“糖尿病性混合物”处理的胶原IV的明显扩展和基底膜的增厚(图4e)。此外,与我们在人T2D患者的发现一致(图4b),我们观察到EM使基底膜层大量增厚和分裂(图4f)。用源自人iPSC(图4c-f)以及人ESC的血管类器官,观察到响应糖尿病性混合物的血管基底膜的此种增厚。

[0213] 接下来,我们基于基因表达来表征暴露于高葡萄糖/TNF α /IL6的“糖尿病性类器

官”。我们观察到暴露于TNF- α 、IL6和高葡萄糖的血管类器官中内皮细胞的明显减少以及周细胞的损失(图16a,b)。我们对从对照和糖尿病人血管类器官分选的CD31⁺内皮细胞进行了RNAseq。先前暗示为人糖尿病标志物的基因(包括血管生成素2、Apelin、ESM1和TNFRSF11B)是相对于对照类器官,糖尿病性类器官中前5个最上调的基因中(图5a)。确实,从糖尿病性相对于对照类器官以及T2D患者相对于来自正常血糖个体的皮肤血管产生的差异基因表达概况揭示了糖尿病性类器官与T2D患者之间的明显重叠,标注到细胞外基质、细胞粘附和生长因子活性/结合(图5a)。我们还发现与对照组相比,糖尿病性类器官中胶原IV的mRNA水平升高(图9b),并且来自对照和糖尿病性类器官的CD31⁺内皮之间差异表达基因的前五个基因本体论(GO)途径都与胶原生物合成和胞外基质重组织有关(图5a)。与血管类器官相反,在有或无TNF α /IL6的情况下暴露于高葡萄糖的各种内皮细胞不上调胞外基质和胶原生物合成成分,包括HUVEC、永生化的人微血管内皮细胞系HMEC1以及原代或TERT永生化的人血管内皮细胞(BEC)。因此,人血管类器官暴露于高葡萄糖和炎性环境导致基底血管膜的大量增厚和基因表达概况的改变,从而对人糖尿病性微血管病建模。

[0214] 实施例5:抑制 γ -分泌酶活性消除了血管类器官中的“糖尿病性”变化。

[0215] 工程化改造了人糖尿病性血管病变的体外类器官模型,我们接下来想要鉴定药物,该药物可阻断用高葡萄糖/TNF α /IL6处理的人血管类器官中基底膜的增厚和扩展。为此,我们首先测试了多种目前在临床上用于治疗糖尿病的已批准药物。但是,我们测试的药物(即二甲双胍、吡格列酮、格列美脲、阿卡波糖、那格列奈、噻唑烷二酮或二亚苯基碘鎓)无一对血管类生物体中高葡萄糖/TNF α /IL6诱导的血管基底膜增厚具有任何影响(图5b,c)。

[0216] 接下来,我们使用各种常见信号传导和下游途径(即GSK3、PKC、AKT、NFkB、ROS、p38-MAPK、JNK、ROCK和ERK)的小分子抑制剂筛选了糖尿病性血管类器官。我们发现这些抑制剂无一对胶原IV扩展和毛细血管基底膜的增厚具有任何显著影响(图5d,e)。值得注意的是,阻断NFkB实际上明显增加基底膜的增厚。接下来,我们评估了 γ -分泌酶(该酶切割不同受体以激活包括Notch在内的不同信号传导途径)的抑制剂。我们发现, γ -分泌酶抑制剂DAPT完全消除了暴露于“糖尿病性混合物”的人血管类器官中胶原IV扩展和基底膜增厚(图5c,d)。另外, γ -分泌酶抑制剂的效果是剂量依赖性的(图5e),进一步证实了其特异性和功效。重要的是,我们还观察到糖尿病性小鼠中人的血管变得渗漏,这提供了直接的证据,即我们观察到的形态学变化也与血管功能受损有关;通过DAPT治疗挽救过度的血管渗漏(图17a,b)。此外,体内DAPT处理挽救糖尿病性小鼠中CD31⁺人血管的丧失(图17c,d)。这些数据显示了抑制 γ -分泌酶活性在体外和体内抑制糖尿病性血管的结构和功能变化。

[0217] 实施例6:鉴定D114-Notch3为糖尿病性基底膜增厚的候选途径

[0218] γ -分泌酶是一种可以切割多种不同受体以激活不同信号传导途径(包括Notch)的酶。为了鉴定参与提供保护而免于我们的实验性糖尿病性血管变化的分子DAPT靶标,我们阻断了Notch配体Jagged1、D111和D114以及Notch1和Notch3,它们均在血管中突出表达。抑制Jagged1、D111以及Notch1对我们的自由漂浮类器官中的“糖尿病性”变化没有明显影响;但是,D114以及Notch3的阻断显著提供挽救而免于基底膜增厚(图18a)。为了证实这些发现,我们使用CRISPR/Cas9生成了D114和Notch3突变型人iPS细胞(图19a-d)。从这些突变体iPS细胞中,我们可以容易衍生血管网络和自由漂浮的血管类器官(图18b)。重要的是,与暴露于高葡萄糖、IL6和TNFa的对照类器官相比,D114和Notch3突变型血管两者均表现出基

底膜的明显减少的扩展(图18b)。最后,用抗Notch3抗体对经STZ处理的携带人血管树的小鼠进行体内处理显示,Notch3阻断减轻了暴露于糖尿病性环境的人血管的基底膜变化(图18c)。因此,不排除其他途径,我们已经揭示D114-Notch3是关键的配体-受体对,其可以介导糖尿病性血管病变中的基底膜增厚。

[0219] 结论

[0220] 血管促成实际上所有器官系统的发育,并且范围为中风至心脏病发作或癌症的多种疾病中具有关键作用。由于它们的重要性,已经开发出多种细胞系统来研究发育和疾病期间的血管生物学,包括使用经典的内皮细胞系,例如HUVEC细胞。此外,内皮细胞和周细胞已经各自从人干细胞发育。

[0221] 现在,我们已经开发出了一种稳健且可重现的系统,以从hESC和iPSC中生长出真正的人毛细血管。这些血管类器官满足所有先前定义的人类器官标准。有趣的是,移植到免疫缺陷小鼠中的类器官导致人血管与小鼠循环系统之间的连接,如通过葡聚糖灌注、抗体注射以及血流MRI证明的,其揭示了与内源性小鼠器官相当的灌注和渗漏率。将人血管系统连接到小鼠循环系统显示独特的血管树。最重要的是,移植的人类器官在体内进一步发育为小动脉和小静脉,从而形成了真正的血管树,这是以前从未证明过的。因此,这些类器官也可用于开发更复杂多谱系的类器官,例如与心肌细胞形成血管,或尝试在脑或肝类器官中形成血管。它们还可用于使用患者衍生的iPSC研究罕见的血管疾病。

[0222] 在过去的三十年中,全球糖尿病的患病率几乎倍增,目前估计约有4.2亿糖尿病患者以及多得多的前驱糖尿病患者,其通常导致长期患病率和增强的死亡率。糖尿病是失明、肾衰竭、心脏病发作、中风和下肢截肢的主要原因,在许多情况下,是由于血管病变,例如基底膜的大量增厚,它们导致组织氧合不足、细胞运输受损或血管破裂。可以对啮齿类动物的视网膜和肾脏中糖尿病性血管变化的某些方面进行建模,尽管到目前为止,没有表现出人中所见到的糖尿病性血管变化的所有临床特征的单一模型。此外,在我们研究的任何糖尿病性啮齿类模型中不发生皮肤微血管变化,因此开发新的系统以鉴定在这些微血管变化中起作用的途径和潜在药物靶标是至关重要的。为了证明我们的血管类器官的效用,我们将它们暴露于含有高葡萄糖、IL6和TNF α 的“糖尿病性混合物”,其导致胶原基底膜的明显扩展和类似于在T2D患者的皮肤毛细血管中观察到的微血管变化的基因表达概况。

[0223] 我们测试了许多当前的抗糖尿病药物,以及多种常见信号传导途径的小分子抑制剂,但只有少数对糖尿病性类器官中的基底膜的扩展具有任何影响。有趣的是,我们发现在我们的类器官培养物中, γ -分泌酶抑制剂DAPT几乎完全阻止了基底膜的增厚。 γ -分泌酶抑制剂已经针对阿尔茨海默氏病进行了临床试验,并且目前正在接受癌症治疗测试。可以再提出这些药物用于治疗人中的糖尿病性血管病变。重要的是,这些数据提供了原理证明,即糖尿病性微血管病变的人血管类器官模型是发现缓解微血管变化的新药的有用筛选工具。

[0224] γ -分泌酶抑制剂已经针对阿尔茨海默氏病进行了临床试验,并且 γ -分泌酶抑制剂以及Notch2/3阻断剂目前正在接受癌症治疗测试。此外,通过 γ -分泌酶抑制剂抑制Notch途径在糖尿病性大鼠中减少糖尿病诱导的肾小球硬化和通过凋亡引起的周细胞损失。因此,可以再提出这些药物用于治疗人中的糖尿病性血管病变。重要的是,这些数据提供了原理证明,人血管类器官和我们的体内糖尿病性微血管病变模型可以是开发减轻糖尿

病中的微血管变化的新药物的有用筛选工具。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> IMBA - IMBA-莫利库尔生物技术研究所
- [0003] <120> 血管类器官、产生和使用所述类器官的方法
- [0004] <130> r72775
- [0005] <150> EP 17176335.2
- [0006] <151> 2017-06-16
- [0007] <160> 18
- [0008] <170> PatentIn version 3.5
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 21
- [0011] <212> DNA
- [0012] <213> 人工序列
- [0013] <220>
- [0014] <223> 引物
- [0015] <400> 1
- [0016] tgctgttgaa aggtgaaaga g 21
- [0017] <210> 2
- [0018] <211> 18
- [0019] <212> DNA
- [0020] <213> 人工序列
- [0021] <220>
- [0022] <223> 引物
- [0023] <400> 2
- [0024] cttggtggcg aagtctcc 18
- [0025] <210> 3
- [0026] <211> 18
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列
- [0029] <220>
- [0030] <223> 引物
- [0031] <400> 3
- [0032] acagcaaggc aacagagg 18
- [0033] <210> 4
- [0034] <211> 19
- [0035] <212> DNA
- [0036] <213> 人工序列
- [0037] <220>
- [0038] <223> 引物

[0039]	<400> 4
[0040]	gagtaggcag gtagtccag 19
[0041]	<210> 5
[0042]	<211> 19
[0043]	<212> DNA
[0044]	<213> 人工序列
[0045]	<220>
[0046]	<223> 引物
[0047]	<400> 5
[0048]	tcttcttttg cgtcgccag 19
[0049]	<210> 6
[0050]	<211> 17
[0051]	<212> DNA
[0052]	<213> 人工序列
[0053]	<220>
[0054]	<223> 引物
[0055]	<400> 6
[0056]	agccccagcc ttctcca 17
[0057]	<210> 7
[0058]	<211> 25
[0059]	<212> DNA
[0060]	<213> 人工序列
[0061]	<220>
[0062]	<223> 引物
[0063]	<400> 7
[0064]	caccggccac tatgtgagaa ccccg 25
[0065]	<210> 8
[0066]	<211> 25
[0067]	<212> DNA
[0068]	<213> 人工序列
[0069]	<220>
[0070]	<223> 引物
[0071]	<400> 8
[0072]	aaaccggggt tctcacatag tggcc 25
[0073]	<210> 9
[0074]	<211> 25
[0075]	<212> DNA
[0076]	<213> 人工序列
[0077]	<220>

[0078]	<223> 引物
[0079]	<400> 9
[0080]	caccgcagga gttcatcaac gagcg 25
[0081]	<210> 10
[0082]	<211> 25
[0083]	<212> DNA
[0084]	<213> 人工序列
[0085]	<220>
[0086]	<223> 引物
[0087]	<400> 10
[0088]	aaaccgctcg ttgatgaact cctgc 25
[0089]	<210> 11
[0090]	<211> 21
[0091]	<212> DNA
[0092]	<213> 人工序列
[0093]	<220>
[0094]	<223> 引物
[0095]	<400> 11
[0096]	acacaaggaa ataagcaaat g 21
[0097]	<210> 12
[0098]	<211> 18
[0099]	<212> DNA
[0100]	<213> 人工序列
[0101]	<220>
[0102]	<223> 引物
[0103]	<400> 12
[0104]	tggtcggcat catagttc 18
[0105]	<210> 13
[0106]	<211> 20
[0107]	<212> DNA
[0108]	<213> 人工序列
[0109]	<220>
[0110]	<223> 引物
[0111]	<400> 13
[0112]	ccagatcggt gccaaagttct 20
[0113]	<210> 14
[0114]	<211> 20
[0115]	<212> DNA
[0116]	<213> 人工序列

[0117]	<220>
[0118]	<223> 引物
[0119]	<400> 14
[0120]	gttacctgcc ccagactgac 20
[0121]	<210> 15
[0122]	<211> 31
[0123]	<212> DNA
[0124]	<213> 人工序列
[0125]	<220>
[0126]	<223> Notch 3 gRNA基因座
[0127]	<400> 15
[0128]	ccgcgggggtt ctcacatagt ggccctgtgt a 31
[0129]	<210> 16
[0130]	<211> 29
[0131]	<212> DNA
[0132]	<213> 人工序列
[0133]	<220>
[0134]	<223> Notch3 K0突变
[0135]	<400> 16
[0136]	ccgcggttcc cacataaggg ccctgggta 29
[0137]	<210> 17
[0138]	<211> 28
[0139]	<212> DNA
[0140]	<213> 人工序列
[0141]	<220>
[0142]	<223> DLL4 gRNA基因座
[0143]	<400> 17
[0144]	ccgcgctcgt tgatgaactc ctgcagct 28
[0145]	<210> 18
[0146]	<211> 29
[0147]	<212> DNA
[0148]	<213> 人工序列
[0149]	<220>
[0150]	<223> DLL4 K0突变
[0151]	<400> 18
[0152]	ccgcgcttcg ttgatgaact cctgcagct 29

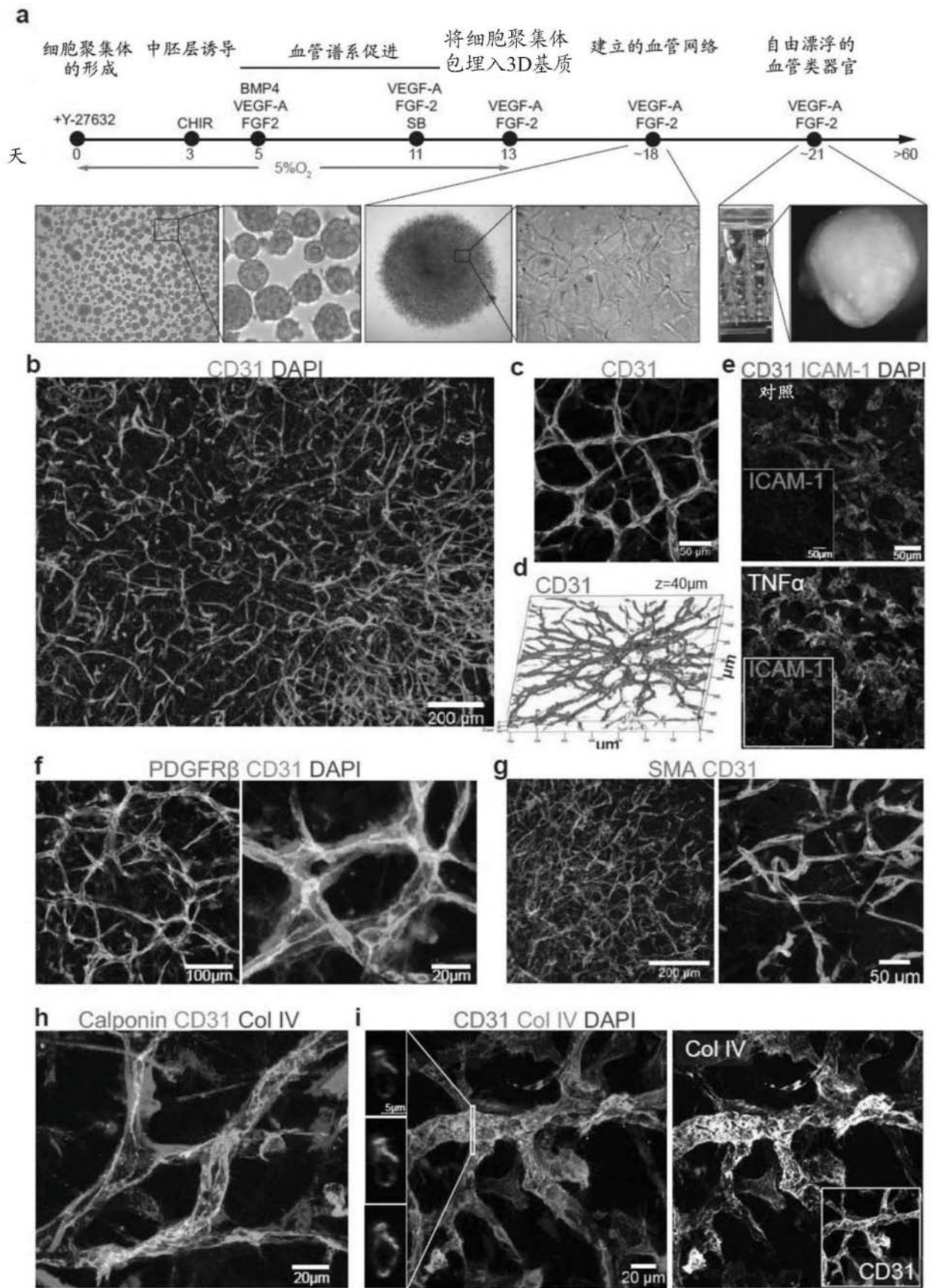


图1

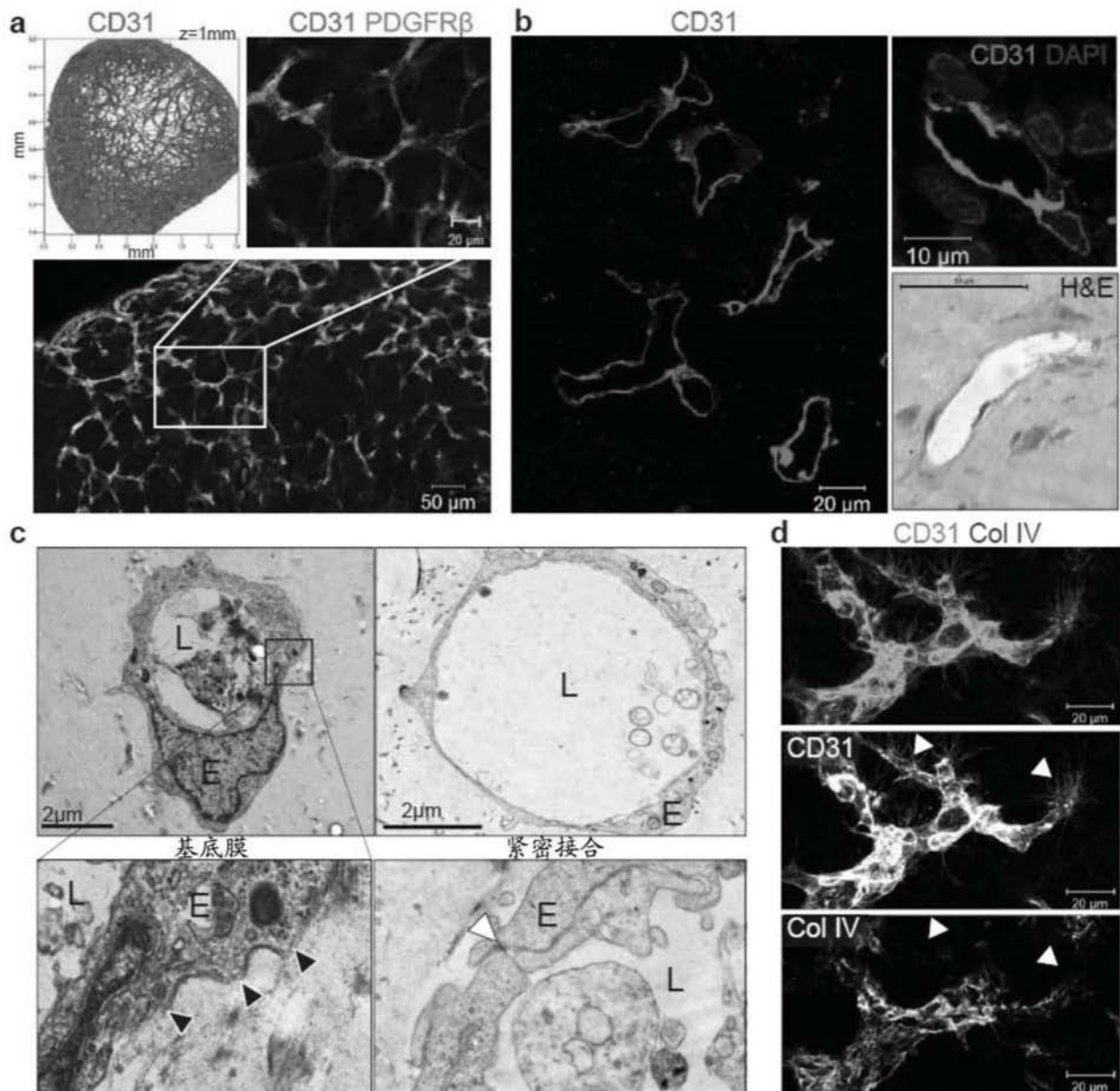


图2

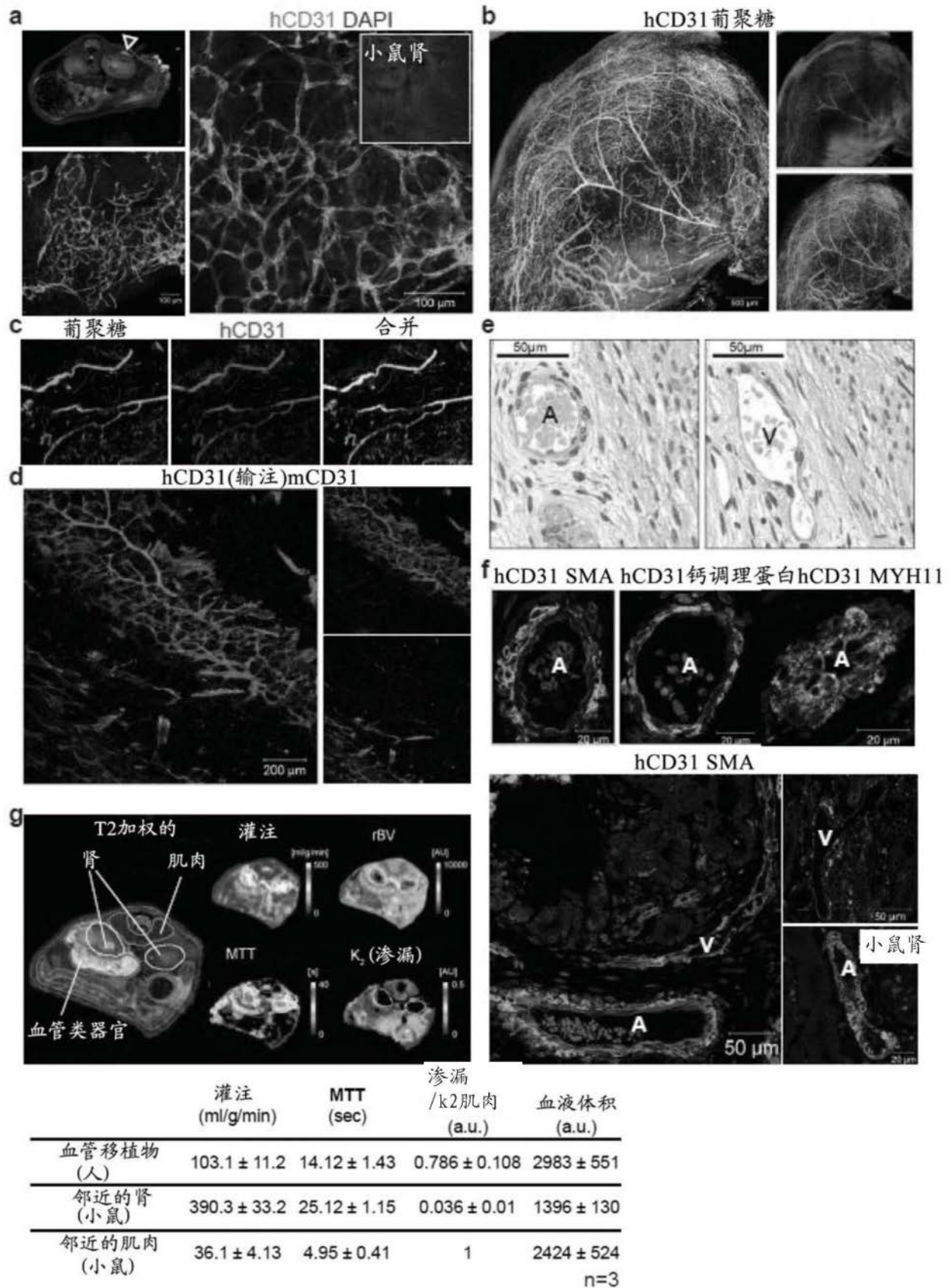


图3

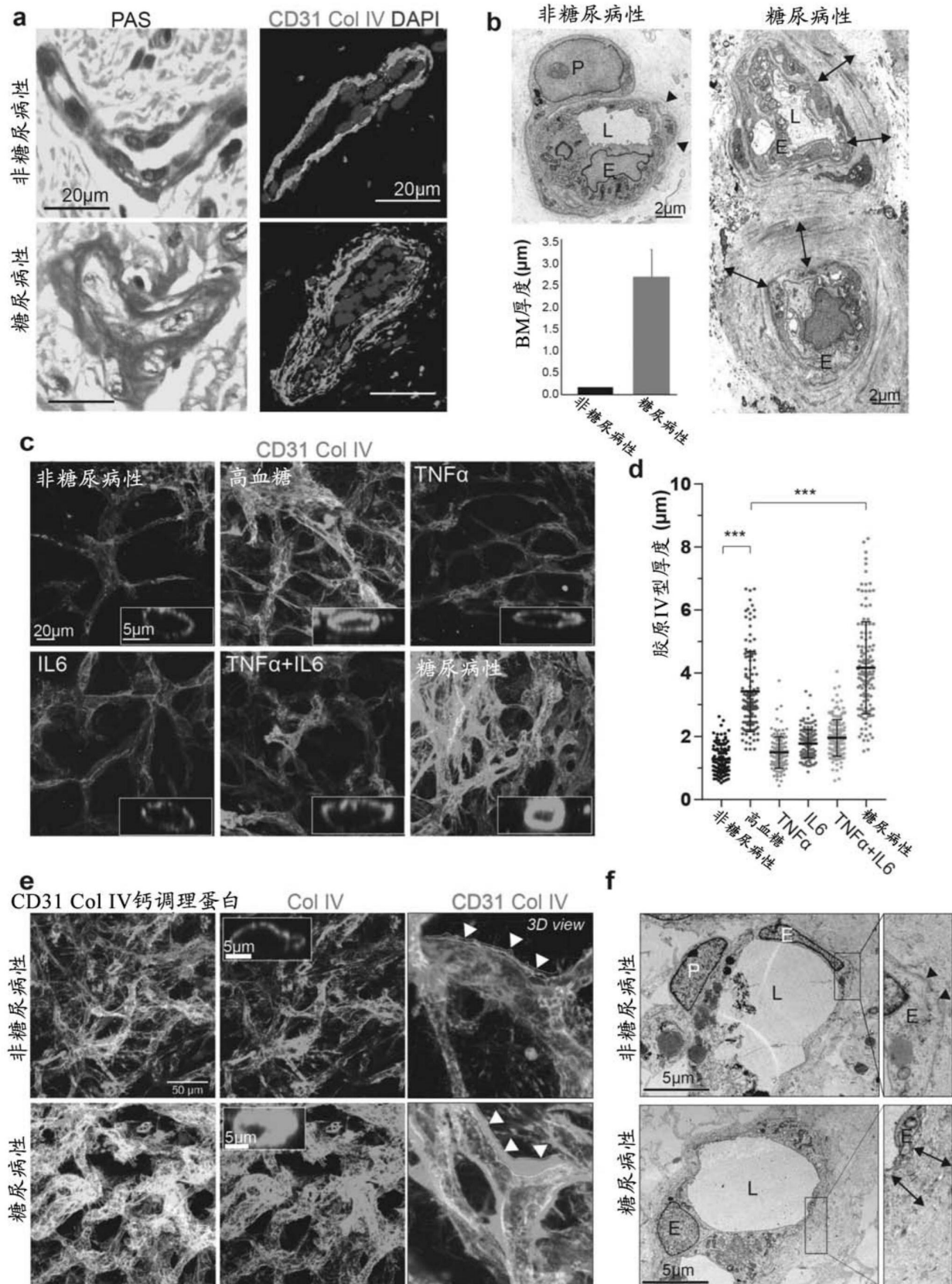


图4

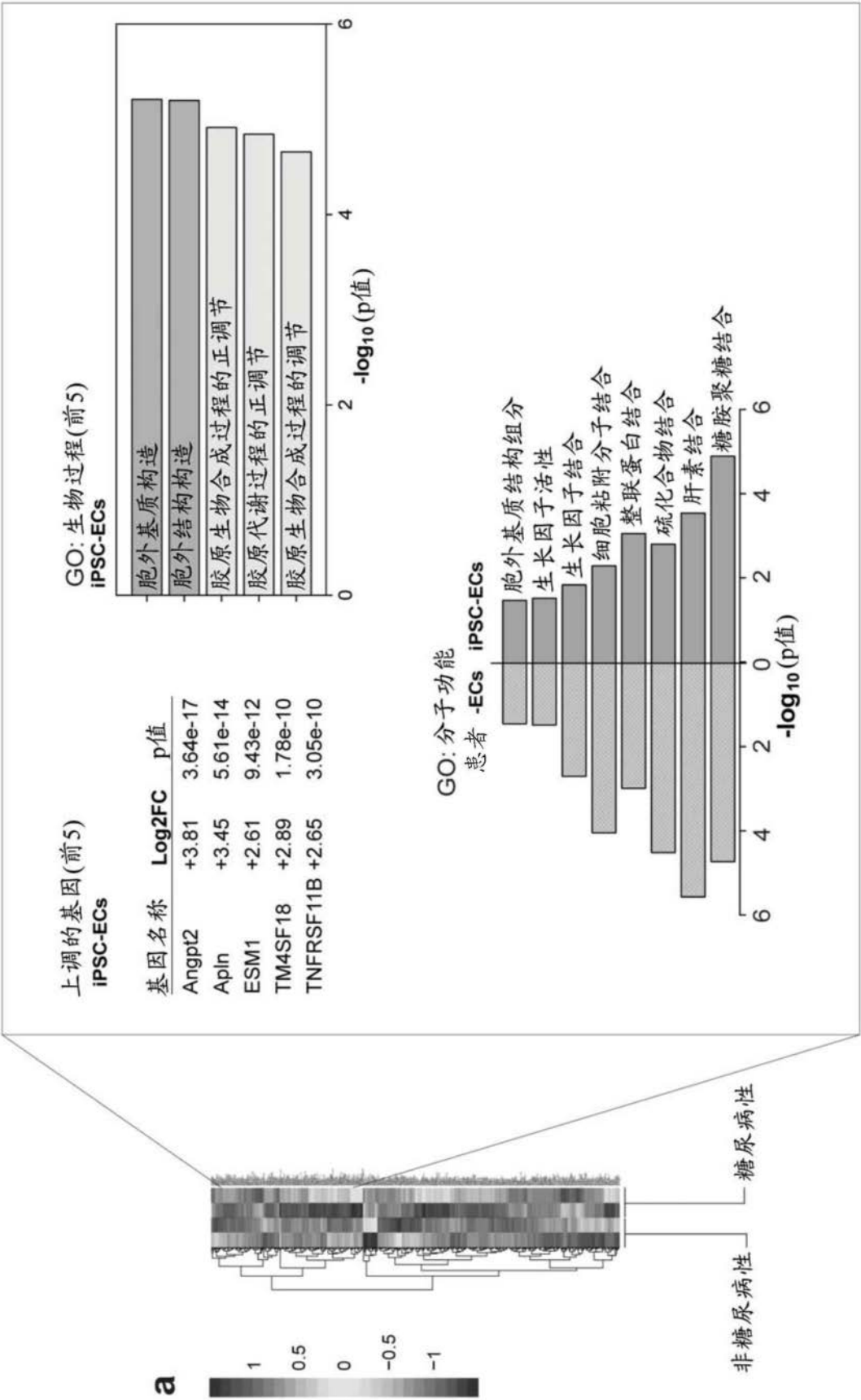


图5

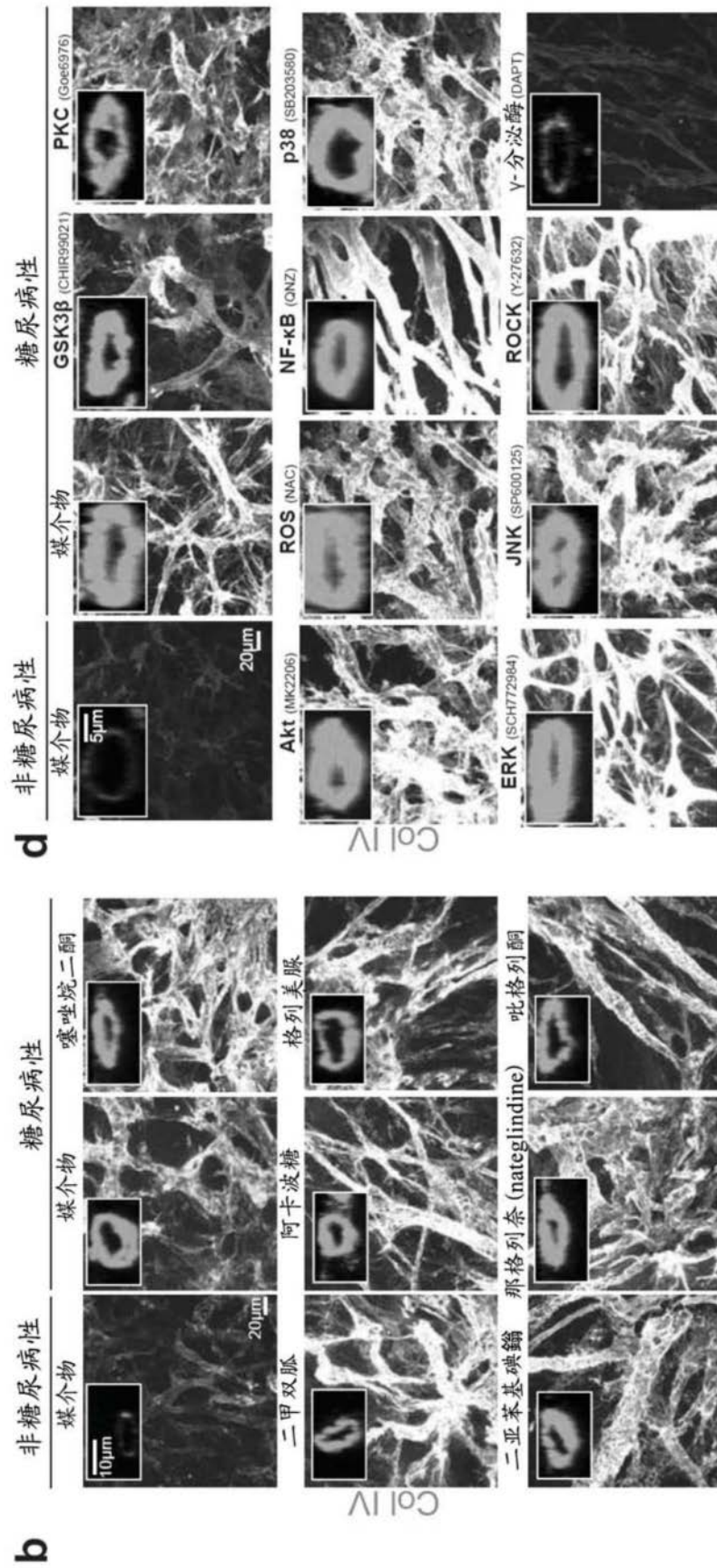


图5 (续)

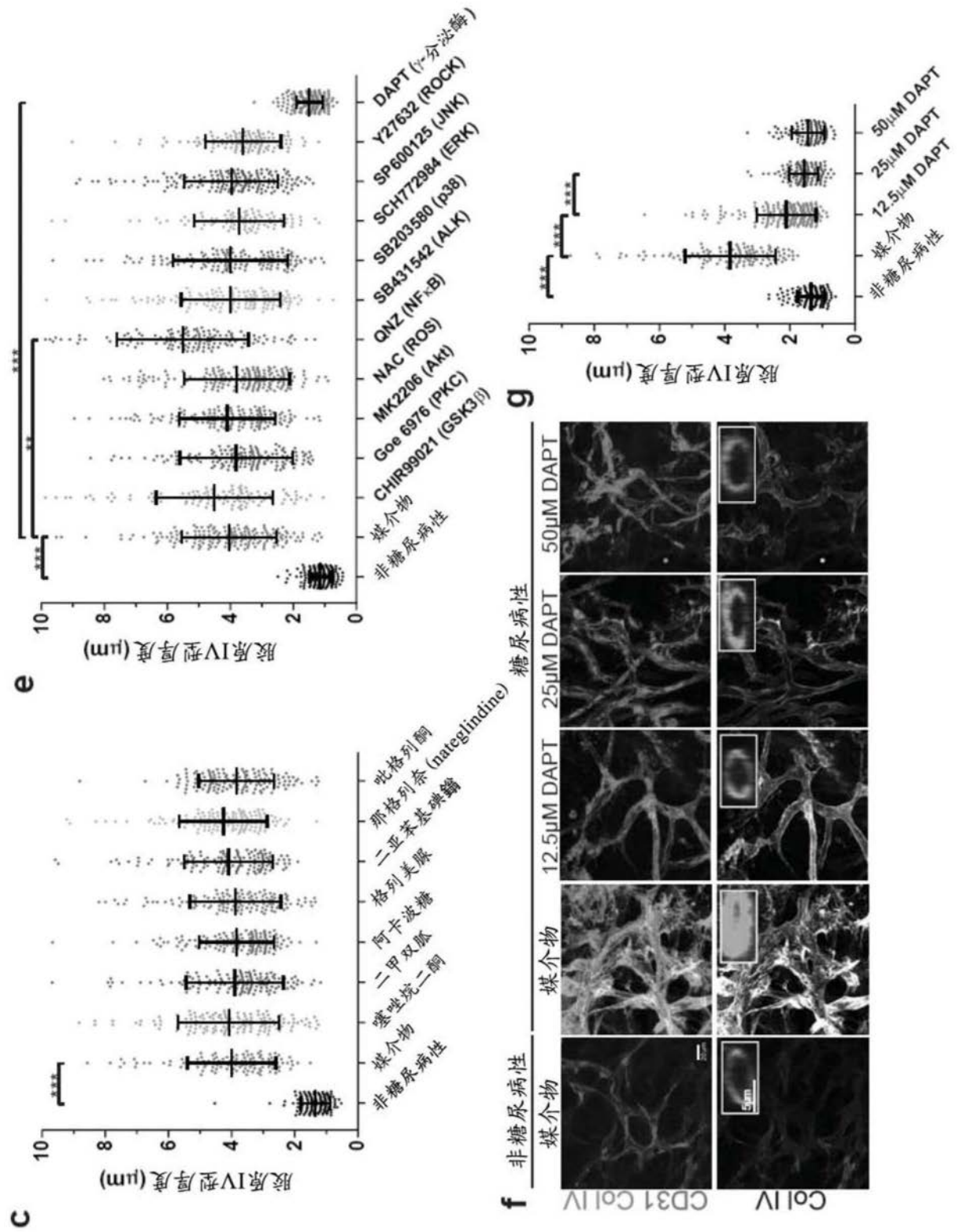


图5(续)

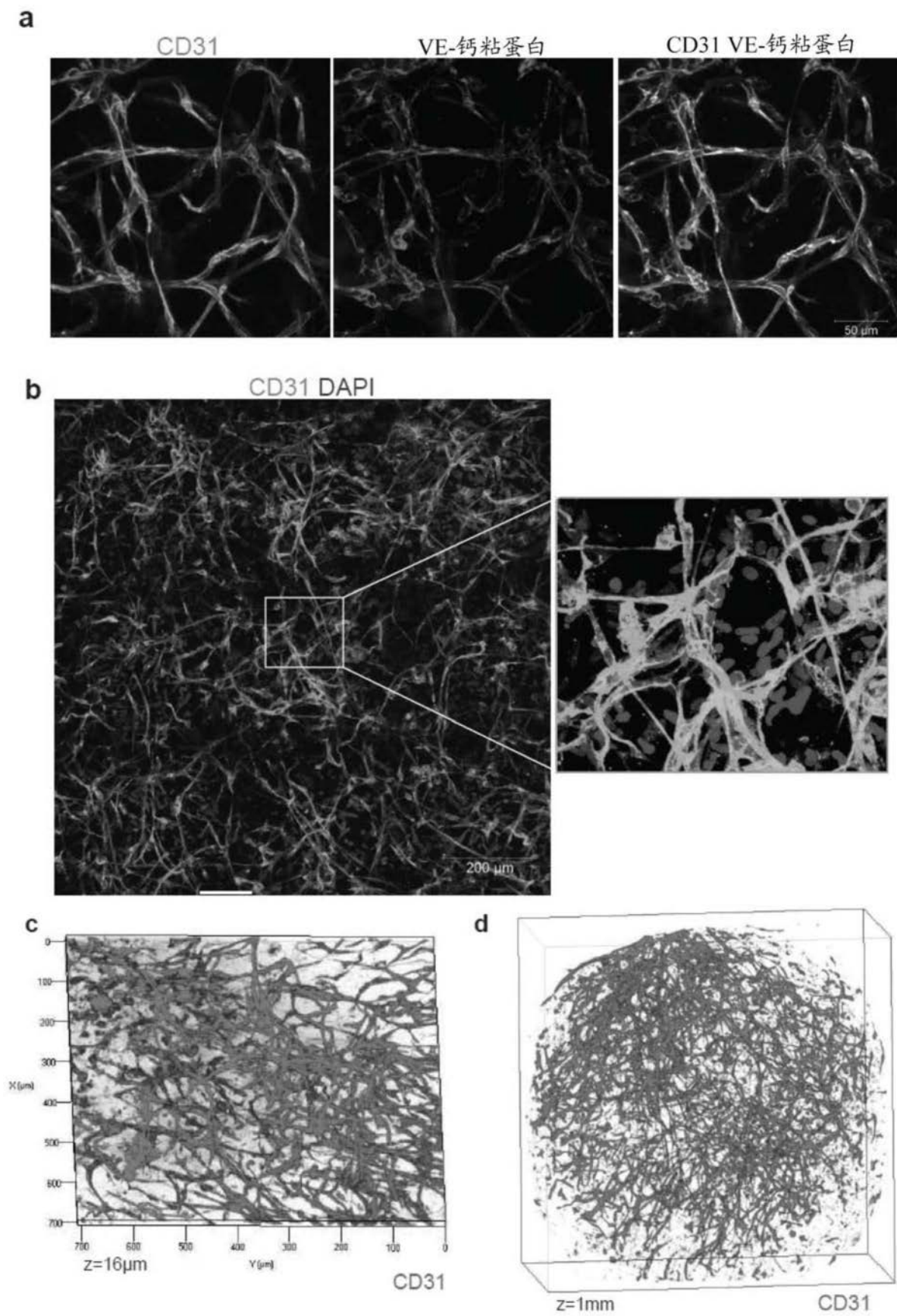


图6

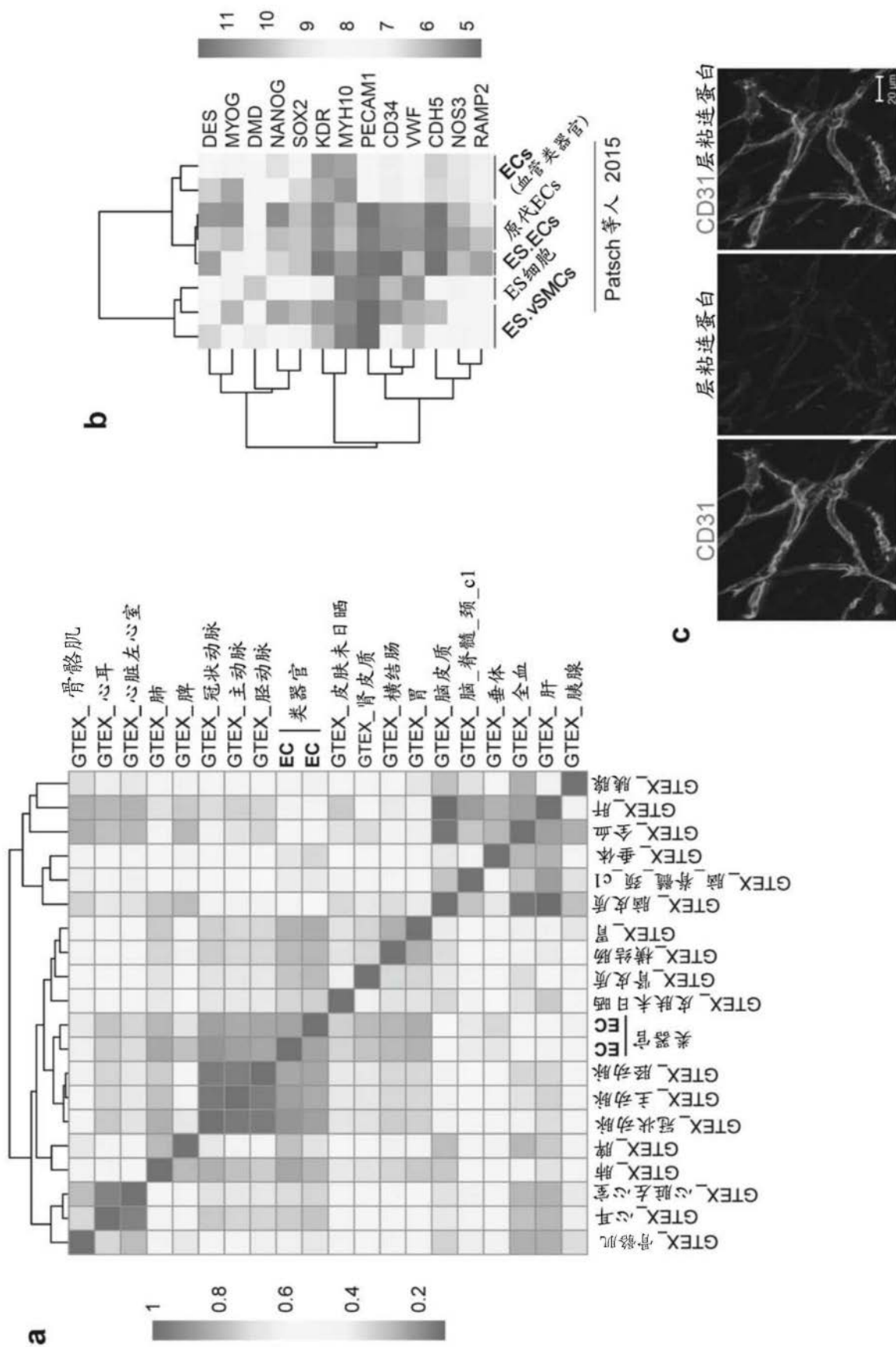


图7

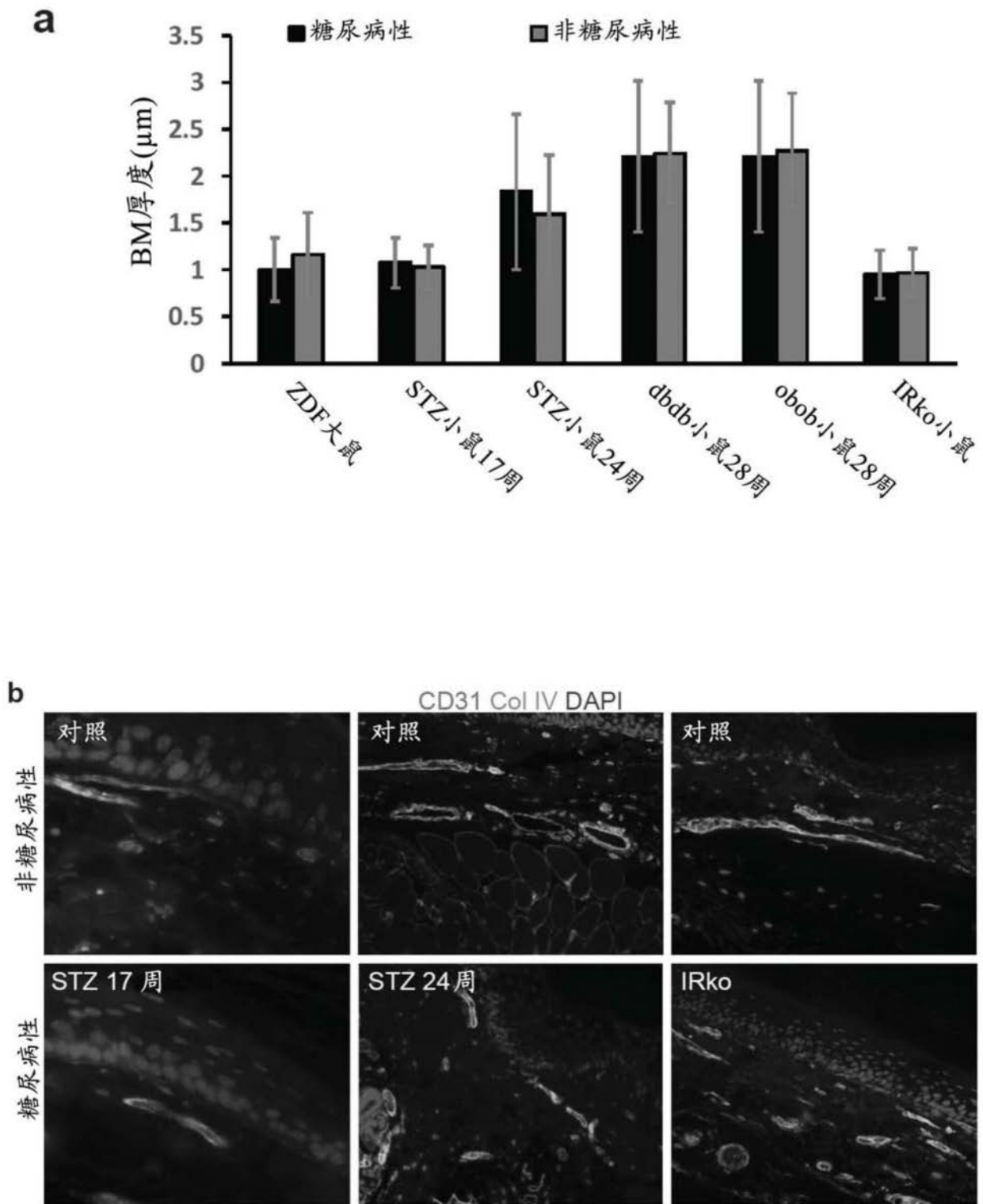


图8

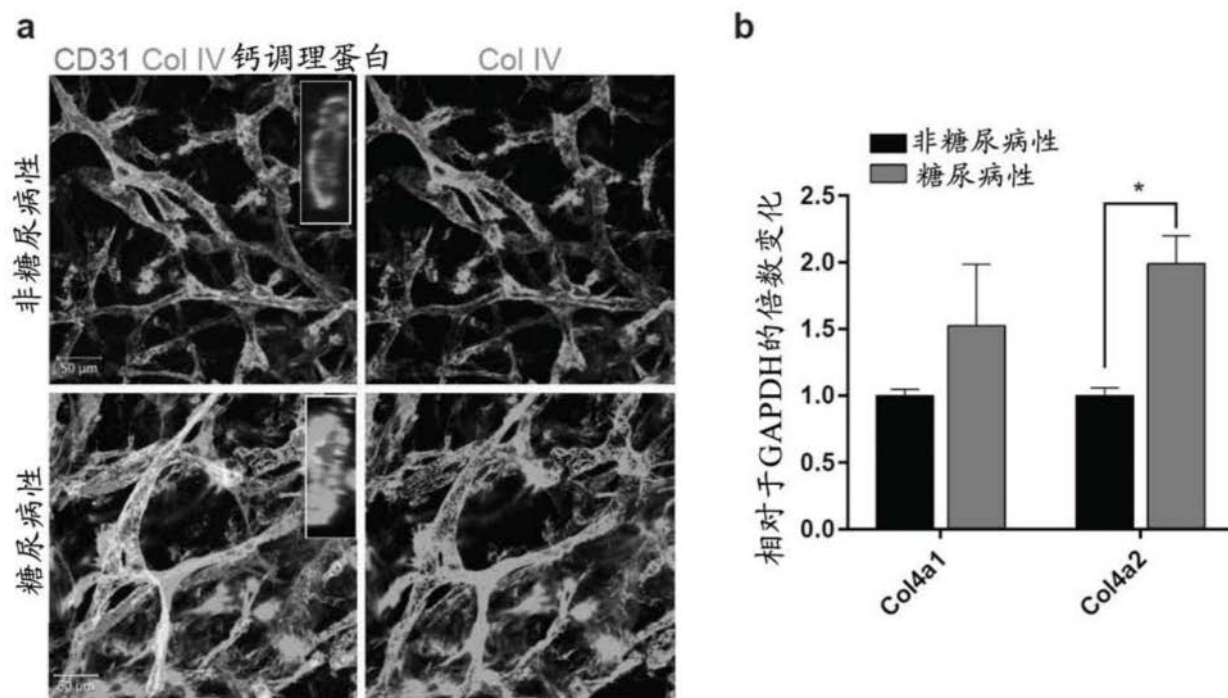


图9

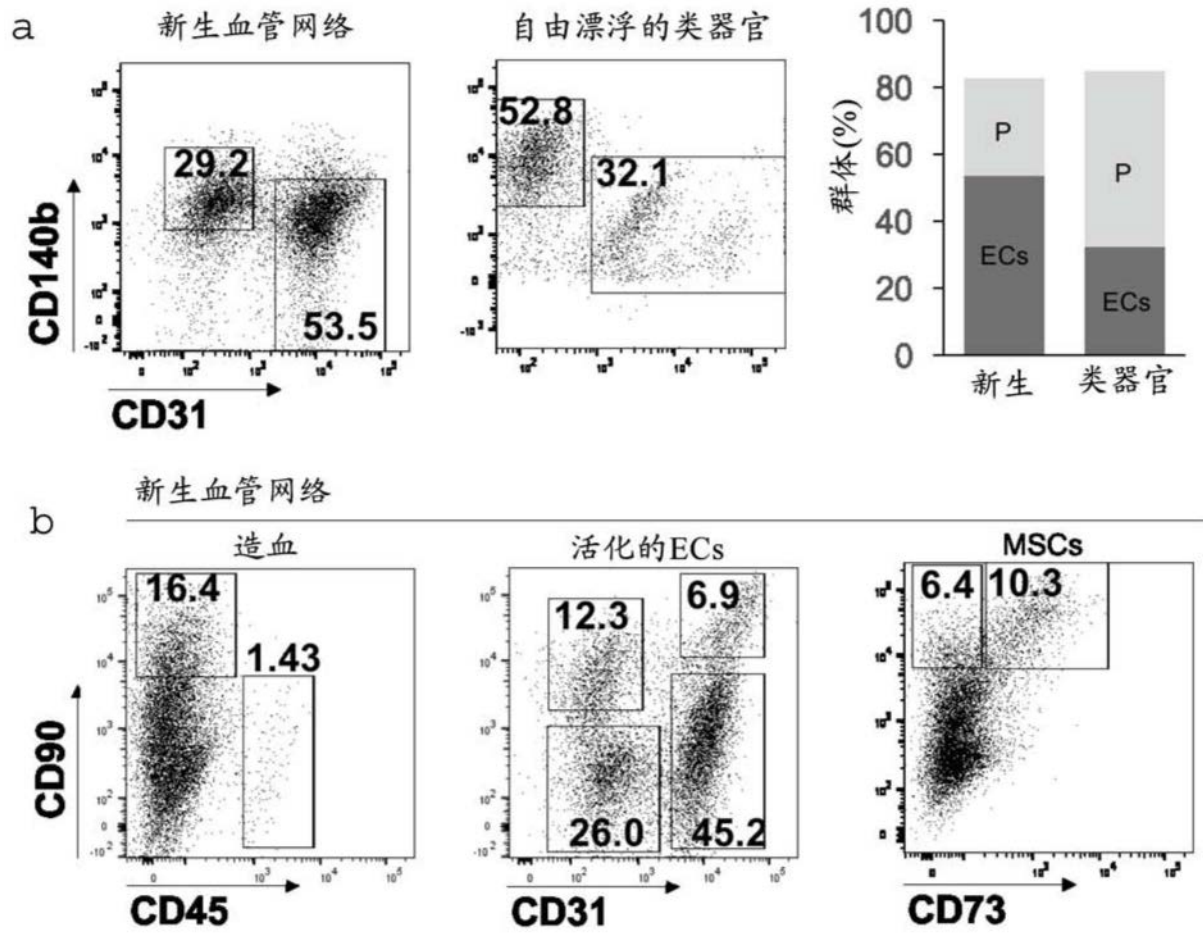


图10

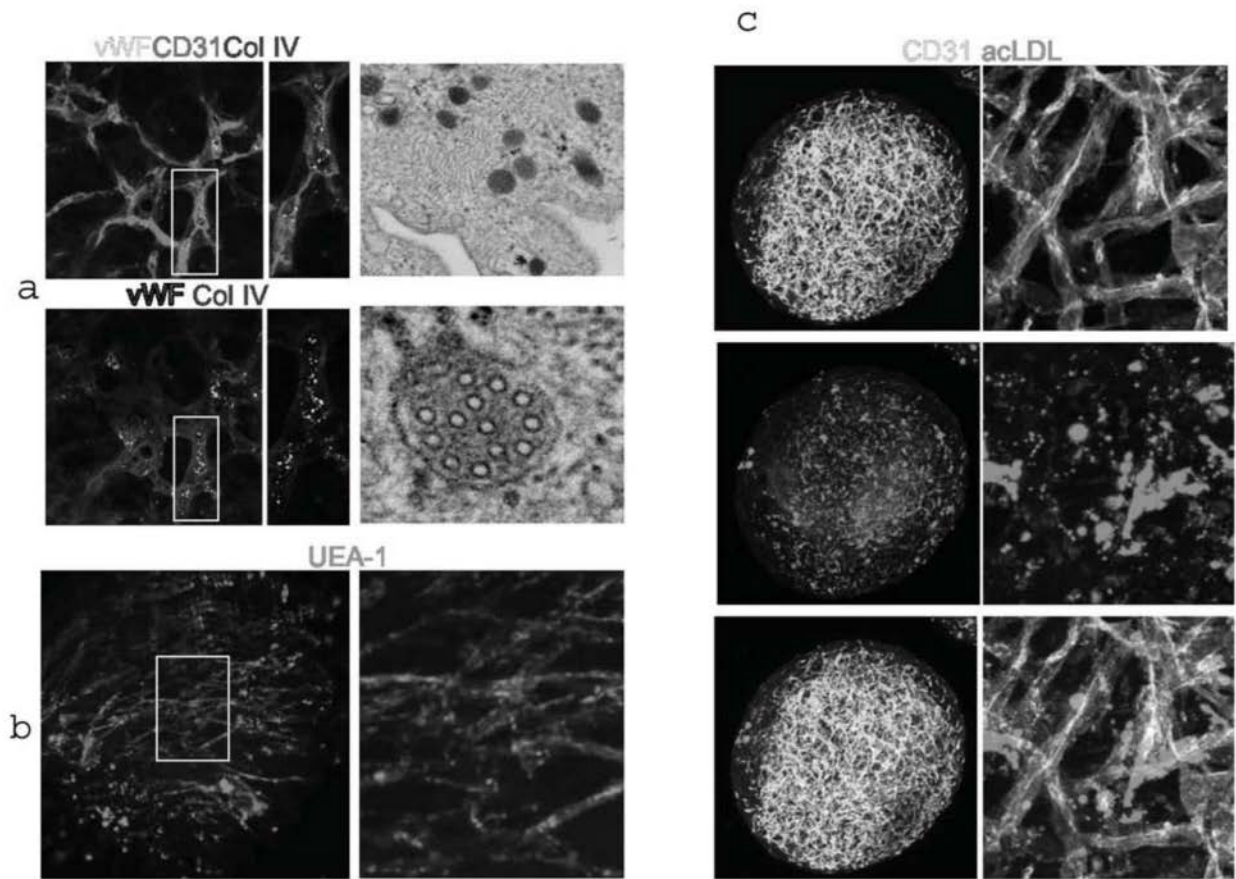


图11

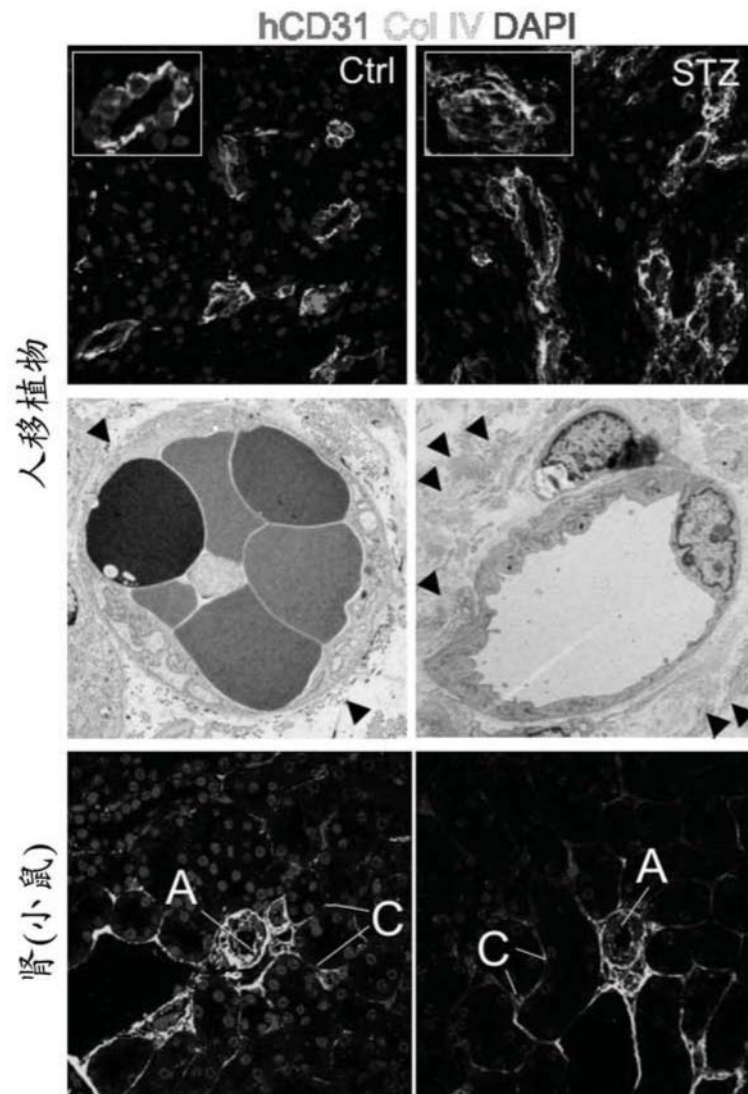


图12

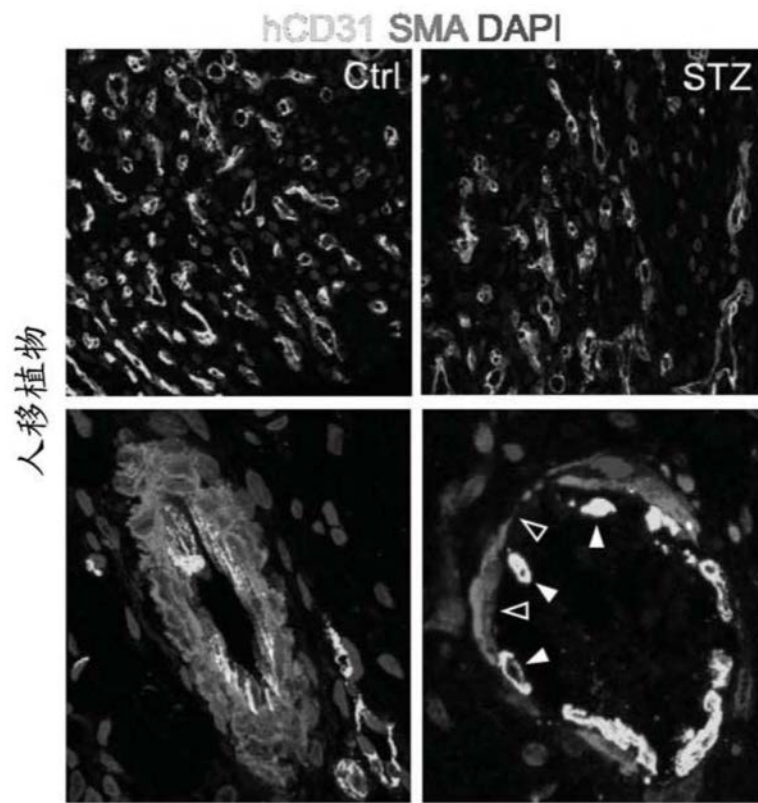


图13

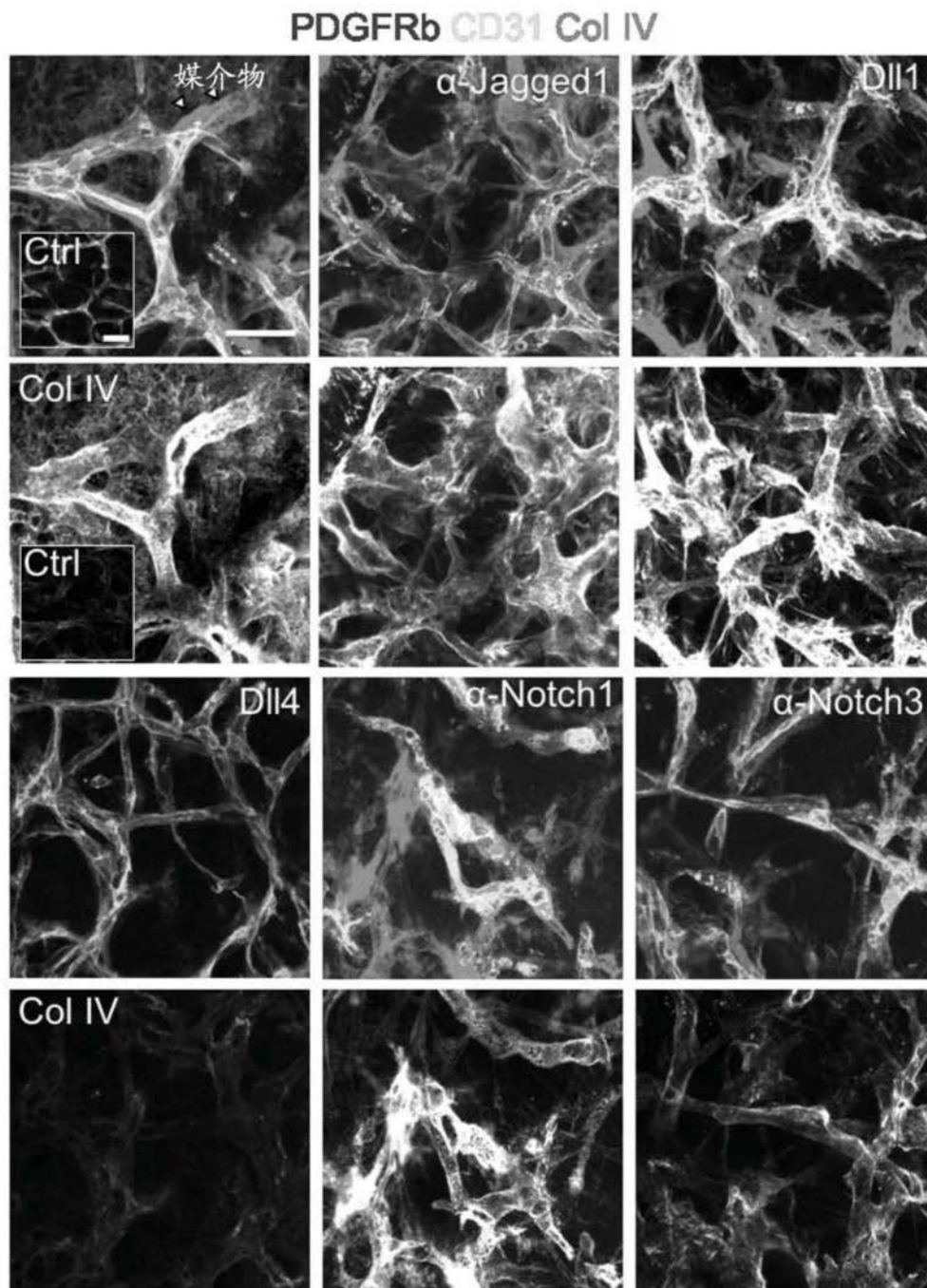


图14

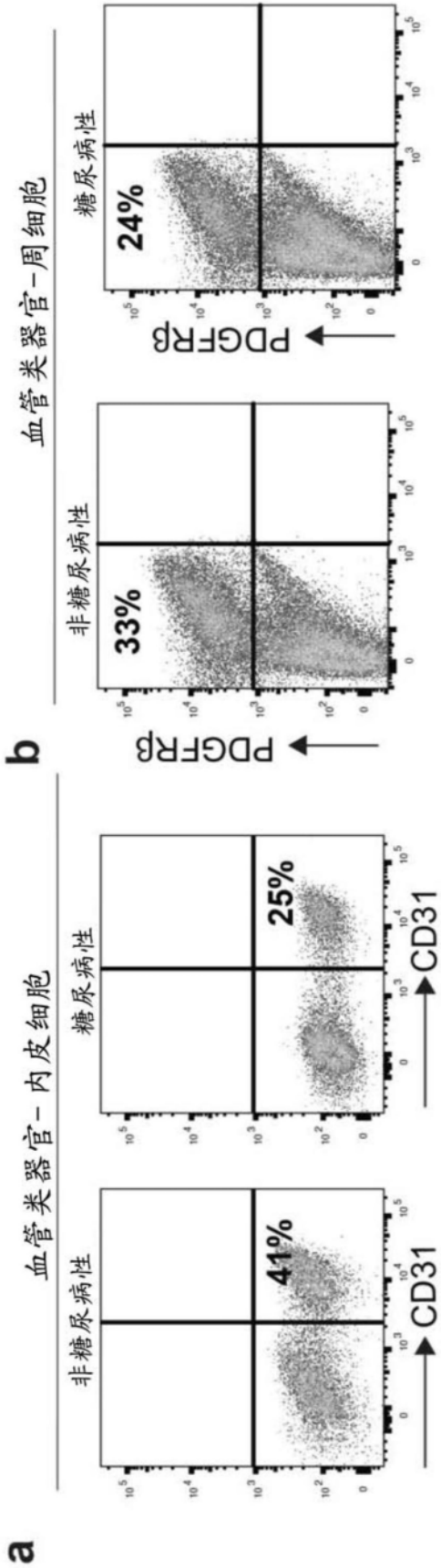


图16

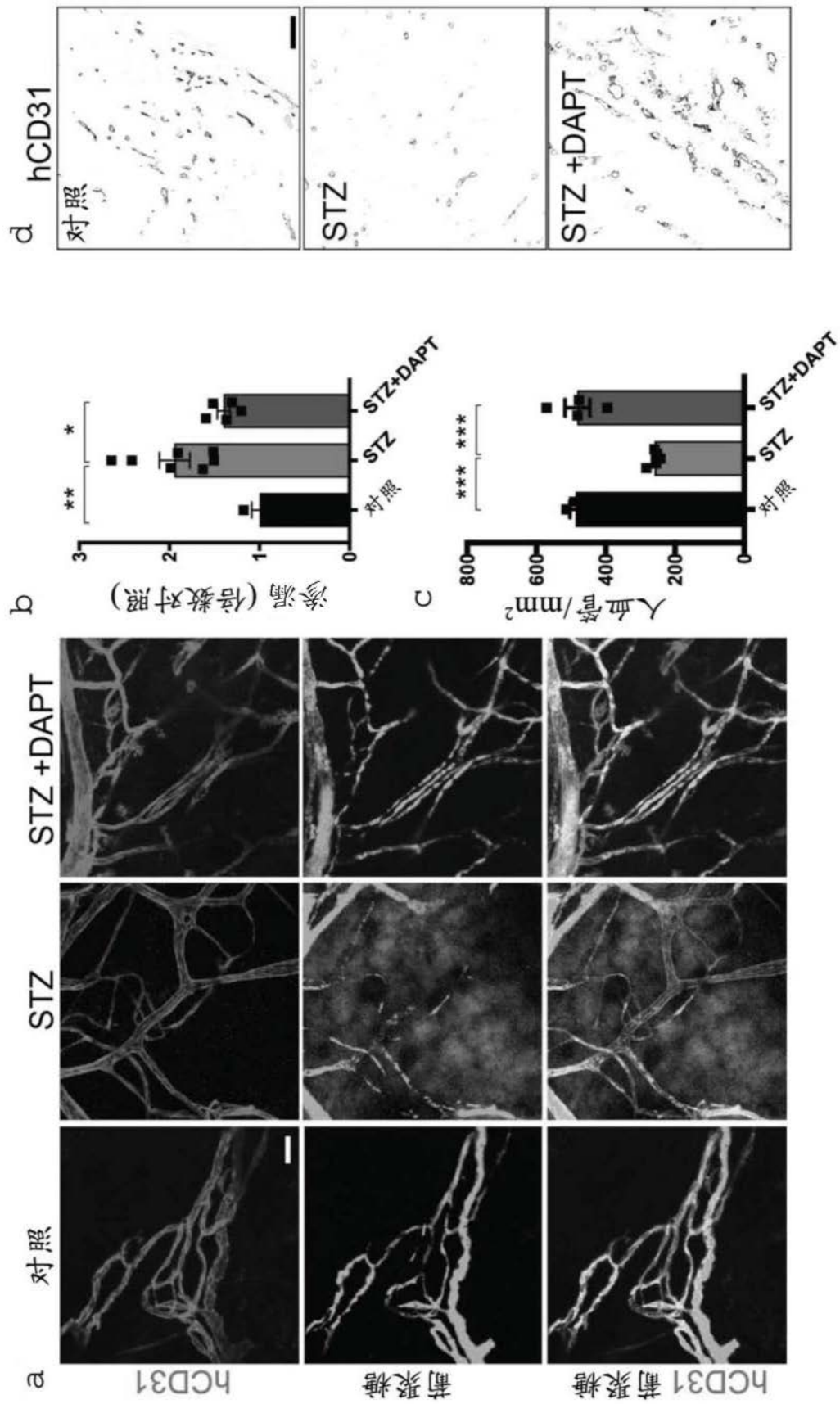


图17

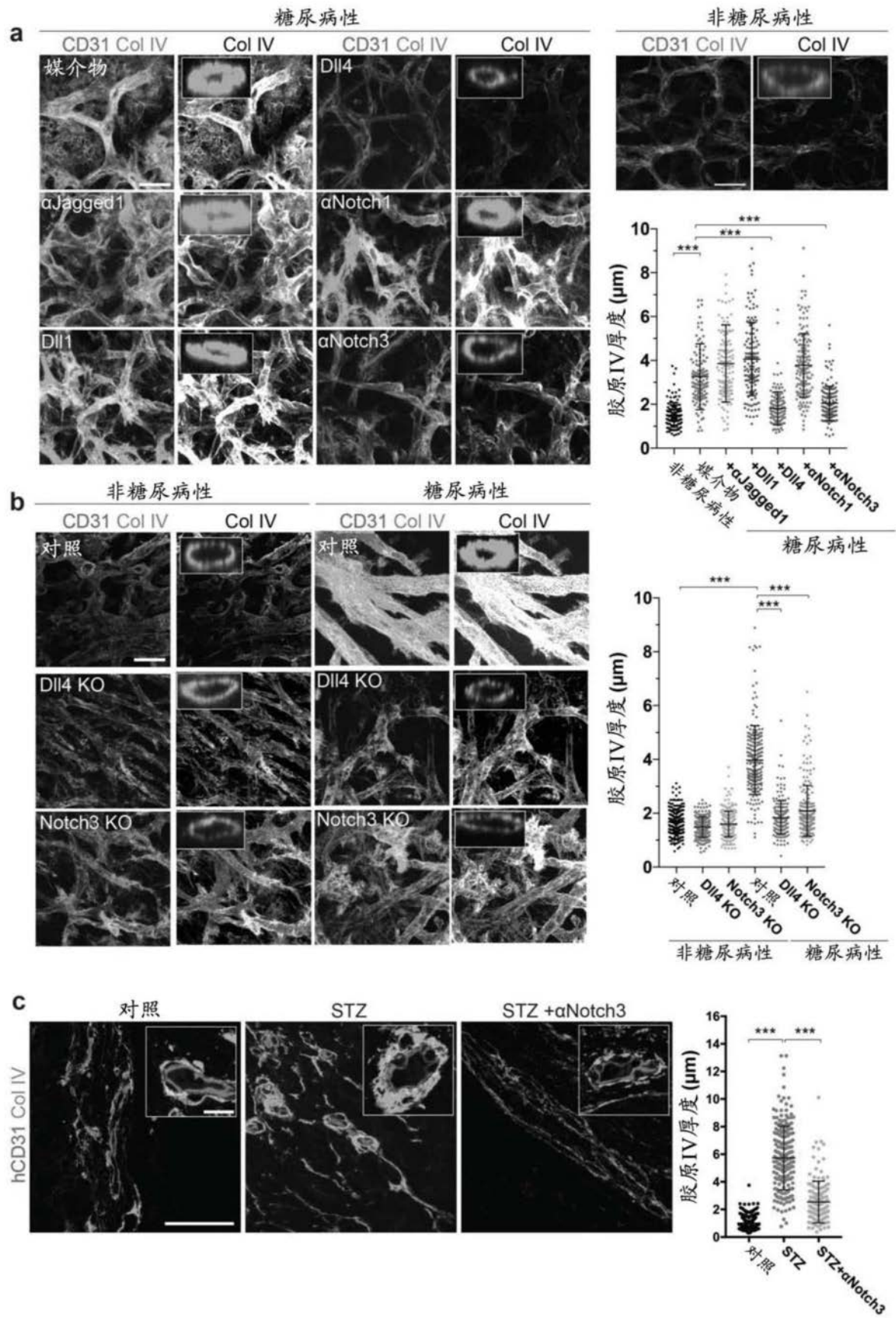
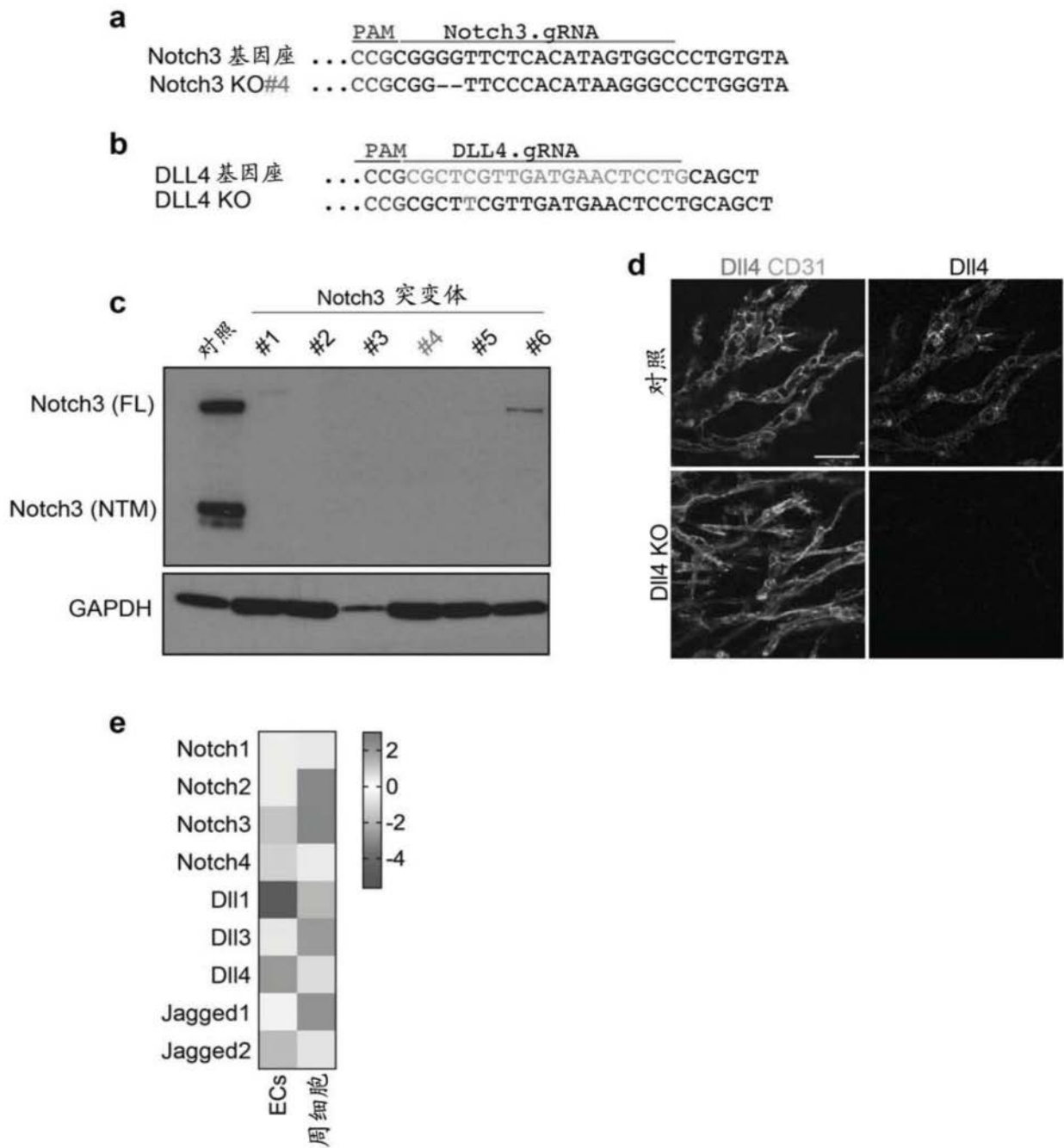


图18



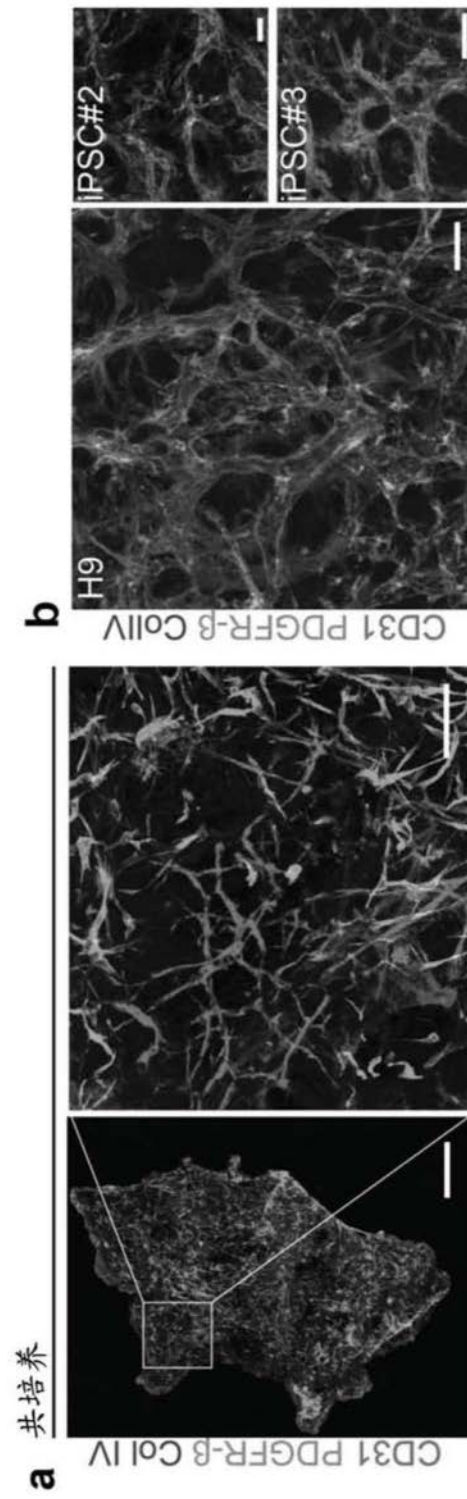


图20

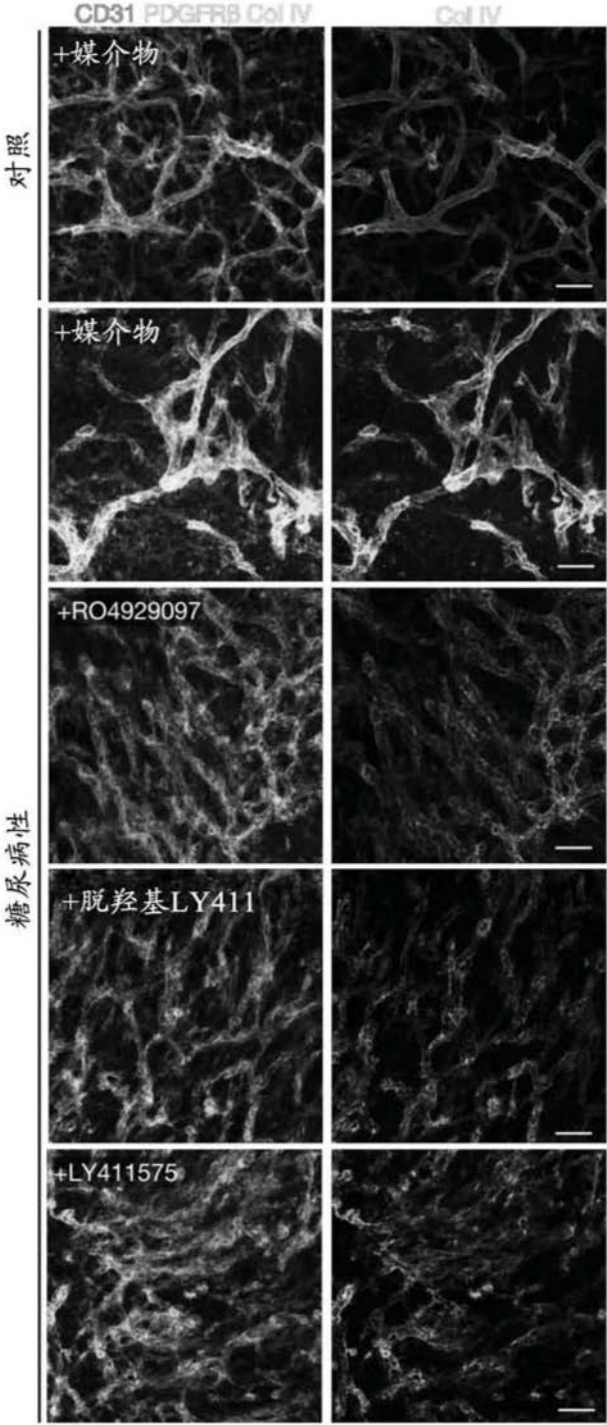


图21