

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C12N 5/08 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03809989.6

[43] 公开日 2006 年 3 月 1 日

[11] 公开号 CN 1742082A

[22] 申请日 2003.3.14 [21] 申请号 03809989.6

[30] 优先权

[32] 2002.3.15 [33] US [31] 60/365,361

[86] 国际申请 PCT/US2003/007852 2003.3.14

[87] 国际公布 WO2003/078588 英 2003.9.25

[85] 进入国家阶段日期 2004.11.2

[71] 申请人 北卡罗来纳大学查伯山分校

地址 美国北卡罗来纳州

共同申请人 维思塔治疗有限公司

[72] 发明人 洛拉·里德 尼古拉斯·G·莫斯

马克·E·福斯 约翰·W·拉德洛

安德鲁·T·布鲁斯

[74] 专利代理机构 北京金信立方知识产权代理有限公司

代理人 南 霆

权利要求书 10 页 说明书 46 页 附图 21 页

[54] 发明名称

原肝干细胞和近肝干细胞

[57] 摘要

肝祖细胞包括两个类群的人类肝干细胞，即原肝干细胞和近肝干细胞，以及两个类群的定向祖细胞，一群是胆管细胞，一群是肝细胞。人类原肝干细胞是肝脏细胞群中非常小的部分，产生近肝干细胞，后者构成大部分的肝。人类原肝干细胞生成胆管细胞及肝细胞定向祖细胞。原干细胞和近干细胞是人类肝中主要的干细胞。人类原肝干细胞可通过免疫选择从人类肝中分离，或者通过在选择人类原肝干细胞的条件下培养人类肝脏细胞分离。近肝干细胞可通过免疫选择或通过包括发育因子的条件下培养人类肝脏细胞分离。近肝干细胞也可以通过培养在包括发育因子的条件下培养包含原肝干细胞的集落分离。所得的组合物可用于治疗肝紊乱和用于生产生物人工器官。

1. 一种含有人类原肝干细胞的组合物，其中所述原肝干细胞是近肝干细胞、肝细胞祖细胞或胆管祖细胞的前身。

5

2. 如权利要求 1 所述的原肝干细胞，其中所述原肝干细胞表达 Ep-CAM、AC 133 和白蛋白。

3. 如权利要求 2 所述的原肝干细胞，其中所述原肝干细胞还表达  
10 细胞角蛋白 8/18、细胞角蛋白 19 或者它们的组合。

4. 如权利要求 3 所述的原肝干细胞，其中所述原肝干细胞还表达 N-CAM、CAM5.2、*c-kit*、CD146 或者它们的组合。

15 5. 如权利要求 1 所述的原肝干细胞，其中所述原肝干细胞是近肝干细胞的前身。

6. 如权利要求 1 所述的原肝干细胞，其中所述原肝干细胞是肝细胞祖细胞的前身。

20

7. 如权利要求 1 所述的原肝干细胞，其中所述原肝干细胞是胆管祖细胞的前身。

8. 如权利要求 5 所述的原肝干细胞, 其中所述的近肝干细胞表达  
 $\alpha$ -胎蛋白、白蛋白和细胞角蛋白 19。

9. 如权利要求 8 所述的原肝干细胞, 其中所述的近肝干细胞还表  
5 达 Ep-CAM、AC133、细胞角蛋白 8/18 或者它们的组合。

10. 一种含有人类近肝干细胞的组合物, 其中所述的近肝干细胞  
是肝细胞或胆管祖细胞的前身。

10 11. 如权利要求 10 所述的近肝干细胞, 其中所述的近肝干细胞表  
达  $\alpha$ -胎蛋白、白蛋白和细胞角蛋白 19。

12. 如权利要求 11 所述的近肝干细胞, 其中所述的近肝干细胞还  
表达 Ep-CAM、AC133、细胞角蛋白 8/18 或者它们的组合。

15

13. 一种分离来源于人类肝组织的人类肝祖细胞的方法, 该方法  
包括鉴定表达 Ep-CAM 和 AC133 的细胞。

20

14. 如权利要求 13 所述的方法, 其中所述的祖细胞还表达白蛋白。

15. 如权利要求 14 所述的方法, 其中所述的祖细胞还表达细胞角  
蛋白 19。

16. 如权利要求 14 所述的方法，其中所述的祖细胞是干细胞。

17. 如权利要求 15 所述的方法，其中所述的祖细胞是干细胞。

5        18. 如权利要求 13、14 或 15 所述的方法，该方法还包括除去表达 CD45 的细胞。

19. 如权利要求 13、14 或 15 所述的方法，其中所述的肝组织获  
自于胎儿或新生儿。

10

20. 如权利要求 13、14 或 15 所述的方法，其中所述的肝组织获  
自于儿童或成人。

21. 通过如权利要求 19 或 20 所述的方法分离的人类肝祖细胞，  
15        其中所述的肝祖细胞是原肝干细胞。

22. 通过如权利要求 19 或 20 所述的方法分离的人类肝祖细胞，  
其中所述的肝祖细胞是还表达 N-CAM、CAM5.2、*c-kit*、CD146 或其  
组合的原肝干细胞。

20

23. 通过如权利要求 19 或 20 所述的方法分离的人类肝祖细胞，  
其中肝所述的祖细胞是近肝干细胞。

24. 通过如权利要求 19 或 20 所述的方法分离的人类肝祖细胞，其中所述的肝祖细胞是还表达  $\alpha$ -胎蛋白、白蛋白和细胞角蛋白 19 的近肝干细胞。

5        25. 一种分离来源于人类肝组织的人类肝祖细胞的方法，包括鉴定表达 Ep-CAM 的细胞。

26. 如权利要求 25 所述的方法，该方法还包括除去表达 CD45 的细胞。

10

27. 如权利要求 25 所述的方法，其中所述的祖细胞还表达白蛋白。

28. 如权利要求 25 所述的方法，其中所述的肝组织获自于成人。

15        29. 如权利要求 25 或 27 所述的方法，其中所述的肝祖细胞是原肝干细胞。

30. 如权利要求 25 或 27 所述的方法，其中所述的肝祖细胞是近肝干细胞。

20

31. 如权利要求 25 或 27 所述的方法，其中所述的祖细胞还表达 AC133。

32. 通过如权利要求 28 所述的方法分离的人类肝干细胞，其中所述的肝干细胞是近肝干细胞。

33. 通过如权利要求 28 所述的方法分离的人类肝干细胞，其中所述  
5 述的肝干细胞是还表达 AC133 的近肝干细胞。

34. 一种分离人类原肝干细胞的方法，该方法包括：

(a) 提供来源于人类肝组织的细胞混合物；和

(b) 在选择人类原肝干细胞的条件下，在含有无血清培养基的表  
10 面上培养所述细胞混合物，而形成包括人类原肝干细胞的集落，所述  
无血清培养基包括碳水化合物代谢调解剂、铁载脂蛋白和膜产生因子。

35. 如权利要求 34 所述的方法，其中所述的肝组织获自于胎儿、  
新生儿、婴儿、儿童或成人。

15

36. 如权利要求 34 所述的方法，其中所述的细胞混合物来源于富  
集了实质细胞的人类肝组织。

37. 如权利要求 34 所述的方法，其中所述的表面未被涂敷。

20

38. 如权利要求 37 所述的方法，其中所述的未涂敷的表面是塑胶  
表面。

39. 如权利要求38所述的方法,其中所述的塑胶表面是带电荷的。

40. 如权利要求39所述的方法,其中所述的带电荷的塑胶表面是组织培养塑胶。

5

41. 如权利要求34所述的方法,其中所述的碳水化合物代谢调解剂是胰岛素。

42. 如权利要求34所述的方法,其中所述的铁载脂蛋白是转铁蛋白。  
10

43. 如权利要求34所述的方法,其中所述的膜产生因子是含有一种或多种脂类的组合物。

15 44. 如权利要求43所述的方法,其中所述的脂类是游离脂肪酸。

45. 如权利要求34所述的方法,其中所述的无血清培养基还包括皮质醇。

20 46. 如权利要求34所述的方法,其中所述的无血清培养基还包括抗氧化剂。

47. 如权利要求 46 所述的方法，其中所述的抗氧化剂是硒。

48. 如权利要求 34 所述的方法，其中所述的原肝干细胞是近肝干细胞、肝细胞祖细胞或胆管祖细胞的前身。

5

49. 通过如权利要求 34 所述的方法分离的人类原肝干细胞。

50. 通过如权利要求 34 所述的方法分离的人类原肝干细胞，其中所述的原肝干细胞表达 Ep-CAM、AC133 和白蛋白。

10

51. 通过如权利要求 34 所述的方法分离的人类原肝干细胞，其中所述的原肝干细胞表达 Ep-CAM、AC133、白蛋白、细胞角蛋白 8/18 和细胞角蛋白 19。

15        52. 通过如权利要求 34 所述的方法分离的人类原肝干细胞，其中所述的原肝干细胞还表达 (i) Ep-CAM、AC133、白蛋白、细胞角蛋白 8/18 和细胞角蛋白 19；以及 (ii) N-CAM、CAM5.2、*c-kit*、CD146 或者它们的组合。

20        53. 通过如权利要求 34 所述的方法分离的人类原肝干细胞，其中所述的原肝干细胞是近肝干细胞的前身。

54. 通过如权利要求 34 所述的方法分离的人类原肝干细胞，其中所述的原肝干细胞是子代肝干细胞的前身，其中所述的子代肝干细胞表达  $\alpha$ -胎蛋白、白蛋白和细胞角蛋白 19。

5 55. 一种分离人类近肝干细胞的方法，该方法包括：

(a) 提供来源于人类肝组织的细胞混合物；

(b) 在选择人类原肝干细胞的条件下，在含有无血清培养基的塑胶表面上培养所述细胞混合物，而形成包括人类原肝干细胞的集落，所述无血清培养基包括碳水化合物代谢调解剂、铁载脂蛋白和膜产生因子；和

(c) 在包括至少一种发育因子的培养基中培养来自所述集落的细胞，从而产生包括人类近肝干细胞的细胞。

56. 一种分离人类近肝干细胞的方法，该方法包括：

15 (a) 提供来源于人类肝组织的细胞混合物；

(b) 在选择人类原肝干细胞的条件下，在含有无血清培养基中培养所述细胞混合物，而形成包括人类原肝干细胞的集落，所述无血清培养基包括碳水化合物代谢调解剂、铁载脂蛋白和膜产生因子；和

(c) 在包括至少一种发育因子的培养基中培养来自所述集落的细胞，从而产生包括人类近肝干细胞的细胞。

57. 如权利要求 55-56 所述的方法，其中所述的发育因子由第二

细胞提供。

58. 如权利要求 57 所述的方法,其中所述的第二细胞是饲养细胞。

5        59. 如权利要求 58 所述的方法,其中所述的饲养细胞是 STO 饲养细胞。

60. 如权利要求 58 所述的方法,其中所述的饲养细胞是内皮细胞。

10       61. 如权利要求 58 所述的方法,其中所述的饲养细胞是基质细胞。

62. 如权利要求 61 所述的方法,其中所述的基质细胞是胚胎细胞。

63. 如权利要求 62 所述的方法,其中所述的胚胎细胞是胚肝基质  
15    细胞。

64. 如权利要求 55-56 所述的方法,其中所述的近肝干细胞是肝  
细胞或胆管祖细胞的前身。

20       65. 通过如权利要求 55 或 56 所述的方法分离的人类近肝干细胞。

66. 通过如权利要求 55 或 56 所述的方法分离的人类近肝干细胞,

其中所述的近肝干细胞表达  $\alpha$ -胎蛋白、白蛋白和细胞角蛋白 19。

67. 如权利要求 1-8 任一项所述的组合物，其中所述的人类原肝干细胞含有外源核酸。

5

68. 如权利要求 10-11 任一项所述的组合物，其中所述的人类近肝干细胞含有外源核酸。

69. 一种治疗肝机能障碍或疾病的方法，该方法包括向受试者给  
10 药有效量的如权利要求 1-8、49-54 或 67 任一项所述的人类原肝干细胞。

70. 一种治疗肝机能障碍或疾病的方法，该方法包括向受试者给  
15 药有效量的如权利要求 10-11、65-66 或 68 任一项所述的人类近肝干细胞。

71. 分离的人类原肝干细胞。

72. 分离的人类近肝干细胞。

20

## 原肝干细胞和近肝干细胞

### 5 发明领域

本发明涉及人类肝干细胞，产生成熟肝脏细胞的多能细胞。这些细胞包括两个干细胞群：真正的原祖细胞，即生成近肝干细胞的管板干细胞，以及生成肝细胞和胆管细胞的近干细胞。本发明也涉及分离人类肝管板干细胞以及分离近肝干细胞和定向肝细胞祖细胞和定向胆管祖细胞的方法；包括本发明的细胞的组合物可用于细胞和基因治疗以及用于建立生物人工器官。

### 发明背景

#### 1. 人类肝的解剖学

成熟肝的基本结构和功能单位是腺泡，其在横截面上的组织形式象围绕两个独特血管床的轮子：周边是3-7组肝门三联体(protal triad) (每组各具有门静脉、肝动脉和胆管)，而中心是中央静脉。肝细胞组织为细胞板结构，两侧均毗邻有孔内皮，形成一系列与肝门和中央脉管系统相邻近的窦状隙。最近的数据表明赫令氏管(Canals of Hering)，即一种位于肝门三联体周围的小管，在I带各处产生细小的小管，它们延伸并切入肝板，形成类似于瓶刷的模式(Theise, N. 1999 Hepatology. 30: 1425-1433)。

称之为狄氏隙（space of Disse）的狭窄空间沿着窦状隙将内皮与肝细胞分隔开来。作为这种组织结构的结果是，肝细胞具有两个基部结构域（各自面对一个窦状隙）和一个顶部结构域（由毗邻肝细胞的接触区形成）。该基部结构域和血液接触并参与血浆成分的吸收和分泌，而顶部结构域则形成胆汁小管，专营胆汁盐的分泌，并且通过交联的网络与胆管相联。血管从门静脉和肝动脉流过窦状隙到达终末肝静脉和中央静脉。

根据这种微循环模式，将腺泡分成三个带：1带，门周区；2带，腺泡中区；以及3带，中心周围区。增殖潜能、形态标准、（染色体）倍性以及多数肝脏特异性基因与带状分布相互关联(Gebhardt, R 等, 1988. FEBS Lett. 241: 89-93; Gumucio, J. J. 1989, Vol. 19. Springer International, Madrid; Traber, P. 等, 1988. Gastroenterology. 95: 1130-43)。跨腺泡并且是沿着从肝门三联体到中央静脉血流方向上的血液成分（包括氧气）浓度的梯度，负责这种成带现象中一部分，例如糖酵解和糖异生的互逆区室化。然而，间隙衔接蛋白连接蛋白26的门周区成带现象以及谷氨酰胺合成酶的中心周围区成带现象等（此处仅举两例），对此类梯度是不敏感的，而代表了多数组织特异性基因，并且似乎是由微环境中对细胞或者除血流以外的变量而言所固有的因子决定的。

除了肝细胞、胆管上皮细胞（胆管细胞）和内皮细胞外，肝门和中央胆管之间的区域还含有其它细胞类型，例如贮脂细胞（Ito cell）和枯否细胞（Kupffer cell）。这些细胞在肝脏病理状况下起着突出的

作用，尤其是在炎症和纤维症中，但它们对正常器官主要稳态功能的直接贡献明显要小。

## 2. 人类肝的发育

肝脏是由尾前肠和横隔（内脏间充质的一部分）形成的憩室汇聚发育的结果。肝细胞的形成很可能是通过成纤维细胞生长因子，起始于内胚层上皮细胞与生心中胚层相互作用之后。特化的肝细胞随之增殖并以索状方式穿入横隔的间充质，形成肝脏原基。上皮-间充质的直接相互作用在肝脏的这些早期发育阶段中是关键性的，并规定哪些细胞将分别成为肝细胞或胆管细胞以及有孔内皮细胞。间充质特异性基因 *hlx* 和 *jumonji* 的突变将阻断肝脏发育，从而阐释了该组织贡献的重要性。在其发育早期，肝脏由成簇的近肝干细胞组成，其由缺乏基膜的连续内皮细胞和丰富的造血细胞包围。在内皮细胞转化成为非连续的有孔内皮细胞时，维管结构尤其是肝门维管结构随着基膜的产生发育程度更高。肝门条间部可能为胆管发育提供引发机制，并且由于它环绕门静脉、肝动脉和胆管，而形成了肝门三联体。很可能是为了应答诸如 C-CAM 105、Agp110、E-钙粘连蛋白和连接蛋白的组织形成分子在数量和分布上的变化，近肝干细胞迅速增殖并且形成实质肝板，同时伴有多数但并非所有造血细胞再定位于骨髓之中。最近的研究提示某些造血祖细胞存留于成年静息的啮齿类动物的肝脏中，并且已从成年人类和鼠的肝脏中都分离到造血干细胞(Crosbie, O. M.等 1999. Hepatology. 29: 1193-8)。

大鼠肝脏在胚胎周期的大约第 10 天形成，称之为“胚胎第 10 天”或 E10，其中位于胚胎中肠区的内胚层的心脏间充质内陷(Zaret, K. 1998. *Current Opinion in Genetics & Development*. 8: 526-31)。胚胎中肝脏细胞的最早识别是利用编码  $\alpha$ -胎蛋白(AFP)的 mRNA 的原位杂交研究实现的 (ZARET, K. 1998. *Current Opinion in Genetics & Development*. 8: 526-31; Zaret, K. 1999 *Developmental Biology* (Orlando). 209: 1-10)。在第 9-10 天，在所有测定的大鼠和小鼠肝脏中接近于产生心脏的间充质的胚胎中肠区观察到 AFP 表达细胞。到 E12 时，肝脏肉眼可见，并且到 E13 时直径大约为 1 mm。

与之并行的是，随着第一个可识别的造血细胞在 E15-E16 (啮齿类动物)以及第 3 到第 4 个月(人类)的出现而产生造血作用，并且红细胞生成(红细胞样细胞或红细胞的形成)的高峰发生在 E18 (啮齿类动物)以及第 5 到第 6 个月(人类)。在红细胞生成高峰时，红细胞的数目在肝脏中占优势地位，并且占肝脏中多于 70%的细胞数目。妊娠期结束时在啮齿类动物中是第 21 天，而在人类中是第 9 个月。在分娩的几个钟头内，造血细胞的数目急剧下降，以至于到出生后周期的第 2 天(啮齿类动物)以及一周或两周内(人类)，绝大多数造血细胞消失迁往骨髓。无人知晓造血细胞迁移的原因。不过存在两种主要的猜测。

第一种，造血祖细胞偏好相对厌氧的条件，并且随着肝脏中氧气水平因肺活动的升高，它们中的多数迁往骨髓(这里相对是厌氧的)。另外，存在孕激素的丧失也可能是迁移因素的猜测。出生后，肝脏中造血祖细胞的丧失与肝祖细胞数目的显著下降以及成熟肝细胞和胆管

细胞数目的并行上升有关。肝脏的完全成熟在出生后周期的 2-3 周（啮齿类动物）以及数月内（人类）完成。此时残余的肝祖细胞分布在赫令氏管区，而主要数目的肝祖细胞存在于各肝腺泡外周的肝门三联体中(Thiese 等, Crawford 等)。

- 5        此后，肝腺泡的典型构造得以确立，其中各肝腺泡外周由 6 组肝门三联体保卫，每组具有胆管、肝动脉和肝经脉，并且中心是与腔静脉相连接的中央静脉。肝脏细胞板象轮子的辐条一样，自中心向外周延伸。按照惯例，将所述板分为三个区：1 区靠近肝门三联体；2 区在腺泡中；而 3 区靠近中央静脉。肝脏中仅有的双倍体细胞位于 1 区中；
- 10    四倍体细胞位于 2 区；而四倍体、八倍体及多核细胞位于 3 区。该模式高度暗示了一种终止于细胞凋亡程序的成熟谱系(Sigal, S. H., S.等 1995. Differentiation. 59: 35-42)。

### 3. 肝脏疾病

- 在美国，每年有大约 250,000 人因肝脏衰竭而住院。肝脏移植能够有效地治疗某些类型的肝脏衰竭，每年在美国进行大约 4,100 例移植。肝脏移植的限制因素之一是供体肝脏的可获得性，特别考虑到用于器官移植的供体肝脏必须是源自经历脑死亡而非心脏停滞的患者的限制。来自尸体供体的肝脏未曾成功过，尽管最近使用此类供体的努力已经支持了如果在死亡 1 小时之内获得肝脏，则可以使用它们的可能性。
- 20    能性。

对多数肝脏疾病而言，将细胞移植到肝脏中是有吸引力的替代性疗法。用于细胞移植的手术操作相对于全器官移植所需的手术操作是

微不足道的，因而可用于具有多种手术风险的患者，例如老年或体弱者。使用人类肝脏细胞优于源自其它哺乳动物的肝脏细胞，因为潜在的病原（如果有的话）是人源的，可被患者更好地耐受，且在用前可容易地加以筛选。

- 5        进行肝脏细胞移植的尝试中使用过未分级的成熟肝脏细胞，并已显示出某些程度的功效 (Fox, 1. J.等, 1998. *New England Journal of Medicine*. 338: 1422-1426)。然而，由于这些细胞在体内不生长，所以需要注射大量的细胞( $2 \times 10^{10}$ )才能成功。而且，引入大量成熟的大肝脏细胞（平均细胞直径 30-50  $\mu\text{m}$ ）由于在注射时倾向于形成巨大的聚集体而复杂化，导致潜在的致死性的栓子。另外，这些细胞引起显著的免疫注射反应，从而使患者需要免疫抑制性药物才能维持其剩余的肝脏。最后，成熟的肝脏细胞还不能成功地低温保藏，因而需要复杂的后勤来协调合适的肝脏组织的可获得性、细胞悬液的制备以及用于临床治疗的细胞的即刻递送。
- 10

#### 15        4. 全能干细胞

干细胞是基于细胞的肝脏疾病的替代性疗法。全能干细胞是能够自我复制、多能，即能产生多种命运的子代细胞的原始细胞，其能够广泛地发育，产生能重建组织（一种或多种）的定向干细胞。多数关于干细胞的文献来自于有关胚胎的文献或者有关造血、表皮或肠组织的文献。

20

最近，该定义得到了修正，以区别特定类型的干细胞。具有参与所有细胞类型，如生殖细胞的发育的潜能的那些干细胞被称之为全能

干细胞，包括受精卵和达 8 细胞阶段(桑椹胚)的正常胚胎细胞。胚胎干细胞也称为"ES"细胞，包括源于胚泡中全能的正常细胞的永久细胞群，最初报道于 20 世纪 80 年代早期。ES 细胞系可在体外培养并保持全能性。当将 ES 细胞注射回到正常的胚泡中时，它们能够继续胚胎发育，并参与形成正常但嵌合的小鼠。尽管已用许多物种（小鼠、大鼠、猪等）建立了 ES 细胞系，但只有小鼠系统，通过将培养的修饰 ES 细胞与胚泡合并，然后将所述胚泡植入到假孕宿主中而被常规地用于产生具有新表型(敲除、转基因)的动物。胚胎生殖(EG)细胞系，其表现出 ES 细胞的多种特征，可在体外直接地从原生殖细胞群中分离。与 ES 细胞一样，当注射到胚泡中时，EG 细胞促成嵌合体包括生殖细胞系的形成。

最近，大量公开的实验报道了人类 ES 细胞培养物可用人类胚胎建立。已有提示这些人类 ES 细胞可注射到组织中，希望它们能够重建受损的器官和组织。然而，如果将 ES 和 EG 细胞引入到免疫受损宿主中除子宫以外的任何部位，都将导致肿瘤发生，形成畸胎瘤。所以将人类 ES 细胞接种到患者中是不现实的，并具有在患者中造成肿瘤的严重可能性。为了克服这种僵局，某些研究小组正寻求在限定的微环境条件下分化 ES 细胞，使之成为能够安全地接种到患者中的定向干细胞。例如，在产生造血祖细胞方面已有某些程度的成功。不过，如果将培养物接种到患者中，仍然存在培养物中残留的 ES 细胞可能构成肿瘤发生风险的顾虑。总之，在发育生物学将胚胎发生期间决定细胞命运的种种控制揭示出来以前，ES 细胞仍将作为用于细胞或基因

治疗的临床项目的几乎没有希望的实验工具。细胞和基因治疗的临床项目的唯一现实的选择是使用遗传潜能限于有限数目的细胞类型的定向干细胞。

## 5. 定向干细胞

- 5       定向干细胞是将其遗传潜能限于有限数目的细胞类型并具有广泛的发育潜能的多能细胞。越来越多的证据（例如来自端粒酶领域的证据）表明定向干细胞严格地说来并不能自我复制，也就是说它们的子代比亲代具有更小的发育潜能。定向干细胞产生定向祖细胞，即通过将其遗传潜能限于单一命运而丧失多能性的子代细胞，例如其定向祖
- 10   细胞被称为定向肝细胞祖细胞的肝细胞。在肝谱系中，存在定向肝细胞祖细胞（产生肝细胞）和定向胆管祖细胞（产生胆管）。

- 干细胞向成人细胞的转变以阶梯式的进程进行，产生成熟谱系，其中细胞大小、形态、发育潜能和基因表达有赖于该谱系。衰老的比喻说法可用于定义该进程。“年轻”细胞具有早期基因表达和最大的发育潜能；谱系中的晚期细胞具有“晚期”基因表达，且通常发育受限或根本不发育。所述晚期细胞可看作是“老年”细胞，或者生物学术语中的凋亡细胞，其最终被抛弃。成熟谱系进程引起组织的自然周转，并允许损伤后的再生。组织在成熟进程的动力学方面有所差异。肠的成熟谱系相当迅速，完整的一个循环在不到一周的时间内完成；而肝脏
- 15   的成熟谱系缓慢发生，在大鼠肝脏中大约是 1 年。
- 20

由于此类细胞群在肝脏疾病的治疗中可能具有效果，所以对从肝脏中分离和鉴定未成熟祖细胞有着强烈的临床和商业兴趣。在细胞和

基因治疗中使用肝祖细胞能够克服上述与使用成熟肝脏细胞相关的缺点。所述细胞不大 (7-15  $\mu\text{M}$ )，从而使得巨大栓子的形成最小化。并且，所述细胞具有广泛的发育潜能，这意味着重建患者的肝脏组织需要更少的细胞。最后，祖细胞具有最小限度的可能引发免疫排斥的抗原标志，提供了可能需要很少或者无需免疫抑制药物的希望。

## 6. 肝祖细胞的分离

已知从肝脏中分离肝脏祖细胞是极具挑战性的任务，这是由于肝脏细胞缺乏阳性选择标记。候选肝祖细胞唯一可用的抗体是针对肝祖细胞亚群（如果是从暴露于致癌剂侵害后的宿主中分离的则被称之为卵形细胞）制备的单克隆抗体。然而，这些抗体与存在于造血细胞中的抗原发生交叉反应。

术语卵形细胞来自于致癌作用和肿瘤发生领域的无数研究。暴露于致癌物或其它致癌剂侵害的动物会发生成熟肝脏细胞的显著丧失（被多种侵害杀死），并且继发地，具有卵形细胞核并携带有由肝细胞抗原及造血细胞抗原组成的标记的小细胞（直径 7-15  $\mu\text{M}$ ）发生扩增 (Grisham 和 Thorgeirsson, 1998)。对卵形细胞的研究形成了这样的假说，即它们是肝祖细胞，在致癌剂侵害的条件下被激发扩增，而且在合适的条件下可发展为肿瘤细胞。卵形细胞的表型以细微或者非细微的方式变化，这取决于致癌剂侵害。而且，已知它们在培养物中可容易地建立，无需特殊的饲养细胞或培养基条件 (J. Grisham 和 S. Thorgeirsson, 1998, Hepatic Stem Cells, In: *Stem Cells*, C Potten, editor, Academic Press, NY)。基于这些发现以及有关描述来自致癌剂处理的

某些细胞系的特征的研究,人们了解到肝脏肿瘤是恶性转化的祖细胞,而且卵形细胞是部分或者完全转化的祖细胞 (Zvibel I, Fiorino A, Brill S 和 Reid LM. Phenotypic characterization of rat hepatoma cell lines and lineage-specific regulation of gene expression by differentiation agents. 5 Differentiation 63: 215-223, 1999)。

过去曾尝试获取肝祖细胞群,其被认为是用于肝脏的细胞和基因治疗的最为通用的细胞群。美国专利 No 5,576,207 和 5,789,246 (Reid 等)使用细胞表面标志和侧向散射流式细胞仪提供了肝脏中限定的亚群。通过去除谱系的定向细胞,接着选择未成熟肝祖细胞已经分离了 10 大鼠肝脏细胞亚群,所述未成熟肝祖细胞是作为携带 OC.3-阳性 (卵形细胞抗原标志)、AFP-阳性、白蛋白-阳性和 CK19 阴性 (细胞角蛋白 19)细胞标志的非粒细胞检测的。前述大鼠肝脏亚群显示了在从啮齿类肝脏中分离和鉴定富集的肝祖细胞中很重要的特定特征。

从而,存在着发展分离人类肝祖细胞的方法的需求,它可用于治疗具有肝脏疾病或机能障碍的患者。本发明满足这种需求,而且也提供了治疗方法。 15

## 发明概述

本发明涉及包括人类原肝干细胞的组合物,所述原肝干细胞是近 20 肝干细胞、肝细胞祖细胞或胆管祖细胞的前身。本发明的人类原肝干细胞表达 ep-CAM、AC133 和白蛋白。

本发明的另一个实施方案是包括人类近肝干细胞的组合物，所述近肝干细胞是干细胞或胆管祖细胞的前身。本发明的人类近肝干细胞表达  $\alpha$ -胎蛋白、白蛋白和细胞角蛋白 19。

本发明的另一个实施方案是分离人类肝祖细胞的方法，包括鉴定  
5 表达 ep-CAM 和 AC133 的细胞。由本方法分离到的人类肝祖细胞优选表达白蛋白。在本发明优选的实施方案中，分离的人类肝祖细胞是干细胞，优选为原肝干细胞或近肝干细胞。

本发明的另一个实施方案是分离人类肝祖细胞的方法，包括在选择人类原肝干细胞的条件下，用无血清培养基表面培养来源于人类肝  
10 组织的细胞混合物，所述培养基包括碳水化合物代谢调节剂、铁载脂蛋白和膜产生因子，藉此形成含有人类原肝干细胞的集落。在本发明优选的实施方案中，分离的人类原肝干细胞表达 ep-CAM、AC133 和白蛋白，并且优选还表达细胞角蛋白 8/18 和细胞角蛋白 19。

本发明的另一个实施方案是分离人类近肝干细胞的方法，包括在  
15 选择人类肝干细胞的条件下，用无血清培养基表面培养来源于人类肝组织的细胞混合物，所述培养基包括碳水化合物代谢调节剂、铁载脂蛋白和膜产生因子，藉此形成包括人类原肝干细胞的集落，并用发育因子培养来自该集落的细胞。在本发明优选的实施方案中，分离的人类近肝干细胞表达  $\alpha$ -胎蛋白、白蛋白和细胞因子 19。在本发明优选的  
20 实施方案中，发育因子由第二细胞提供，优选为饲养细胞，优选是 STO 饲养细胞、内皮细胞或基质细胞。

本发明的另一个实施方案是分离人类近肝干细胞的方法，包括在  
选择人类肝干细胞的条件下，用无血清培养基培养来源于人类肝组织  
的细胞混合物，所述培养基包括碳水化合物代谢调节剂、铁载脂蛋白  
和膜产生因子，藉此形成包括人类原肝干细胞的集落，并用发育因子  
5 培养来自该集落的细胞。在本发明优选的实施方案中，分离的人类近  
肝干细胞表达  $\alpha$ -胎蛋白、白蛋白和细胞因子 19。在本发明优选的实  
施方案中，发育因子由第二细胞提供，优选为饲养细胞，优选是 STO 饲  
养细胞、内皮细胞或基质细胞。

本发明的另一个实施方案是分离的原肝干细胞。而本发明的又一  
10 个实施方案是分离的人类近肝干细胞。

#### 附图的简短说明

图 1 显示了塑胶培养基上塑胶培养富集的胎儿实质细胞第 1 天(上  
图)和第 5 天(下图)形成的集落。

15 图 2 显示了从第 5 天到第 14 天在塑胶培养基上形成的集落。

图 3 显示了塑胶培养基上的集落形态。

图 4 显示了塑胶上集落细胞白蛋白(第 1 排)、CK19 (第 2 排)、  
ep-CAM (第 3 排)和 NCAM (第 4 排)的染色。

图 5 塑胶上培养的集落的 CD146 和 CD133 (顶部)以及 AC133 (底  
20 部)的染色。

图 6 显示了近干细胞在 STO 饲养层原代培养 7 天后的白蛋白(第 1  
排)、 $\alpha$ -胎蛋白(第 2 排)和 CK19 (第 3 排)染色。

图7显示了从塑胶培养物中取出并涂布到STO细胞饲养层上的集落细胞的发育。

图8-11显示了在STO饲养层上集落细胞的萌发。

图12和13显示了人类肝脏细胞中AFP表达细胞的富集。

5 图14-18显示了共表达白蛋白、CD133和EP-CAM的成人肝脏细胞亚群的分离。

图19描绘了在塑胶上培养的来自3个肝的9个干细胞在3周内的生长曲线。生长测量起始于培养12天后。曲线表明细胞生长增倍时间为5.2天。

10 图20描绘了新分离的胎儿肝脏细胞中及其随后在塑胶基质上培养期间的白蛋白(ALB, 上组)和 $\alpha$ -胎蛋白(AFP, 下组)表达的蛋白质印迹。

左边的组中显示了基于FICOLL离心的两种细胞级分(P和I)。沉淀在FICOLL中的细胞被命名为P, 而分层在水相介质和FICOLL之间的细胞被命名为I。单个居中的斑点显示了在塑胶上培养3周的纯化的集落细胞(原肝干细胞)中白蛋白和AFP的表达。右边的图表显示了没有蛋白(空白)、有白蛋白(ALB)或胎蛋白(AFP)标准的对照泳道。各泳道中加样10 ug 蛋白。

## 20 发明详述

### 1. 定义

在随后的描述中，广泛使用了大量术语以描述本发明。为了对说明书和权利要求书，包括此类术语所给出的范围，提供清楚和一致的理解，提供如下定义。

**CD**：“分化簇”或“共同决定簇”，在本文中用来指被单克隆抗体识别的细胞表面分子。某些 CD 的表达对特定谱系或成熟路径的细胞具有特异性，而其它 CD 的表达则随着同一细胞的激活、位置或分化的状态而变化。

**细胞治疗**：在本文中，术语“细胞治疗”是指将用作自体或同种异体材料的已知细胞群在体内或离体转移，并移植到患者特定的靶细胞或其附近。细胞可在任何合适的培养基、载体或稀释剂中，或者在包括有微载体、珠子、微粒体、微球体、囊泡等的任何类型的药物递送系统中移植。它们也可用在生物反应器中，在那里它们提供关键的功能，并且生物反应器作为辅助装置用于肝脏机能障碍的患者。

**定向祖细胞**：产生只有一种命运的子代细胞的高度增殖细胞。“胆管定向祖细胞”产生胆管，并且可通过细胞角蛋白 19 而不是 AFB 的表达来从抗原上识别。“肝细胞定向祖细胞”产生肝细胞，并且可通过 AFP 和白蛋白而不是细胞角蛋白 19 的表达来从抗原上识别。定向过程在分子水平上还不了解。而仅凭经验认识到当细胞的命运较之于其祖先狭窄时，就发生了定向过程。

**基因治疗**：在本文中，术语“基因治疗”是指将已知遗传物质在体内或离体转移到患者特定的靶细胞中，从而改变了基因型，在大多数情况下，还改变那些靶细胞的表型，用于实现预防或改变特定疾病状

态的最终目的。这可包括离体修饰靶细胞并将细胞引入到患者中。可选地，以肝祖细胞为靶的载体可以在体内运输外源遗传物质和转染祖细胞。此外，遗传工程化的祖细胞可用于生物反应器以治疗患者或作为生物制品的来源。正如本定义所陈述的那样，根本的前提是这些治疗性的基因操作设计的最终目的是用于预防、治疗或改变明显的或隐性的病理状态。在多数情况下，基因操作的最终治疗目的是改变特定靶细胞群的表型。

**肝细胞：**肝脏细胞亚群，包括肝细胞和胆管细胞。

**肝祖细胞：**干细胞亚群，这些细胞最终产生包括肝细胞和胆管细胞的成熟实质细胞。肝祖细胞包括如下两个亚群：(a) 肝干细胞和 (b) 定向祖细胞。

**肝干细胞：**肝祖细胞亚群，包括“原肝干细胞”和“近肝干细胞”。

**前身：**如本文所用，术语“前身”是指产生第二类细胞的第一类细胞。前身可直接产生第二类细胞。前身也可通过一个或多个其它中间细胞类型产生第二类细胞。

**原肝干细胞：**在本文中，术语“原肝干细胞”是指产生近肝干细胞的肝干细胞。

**近肝干细胞：**在本文中，术语“近肝干细胞”是指产生肝细胞和胆管上皮细胞的肝干细胞。

**肝脏细胞：**在本文中，术语“肝脏细胞”是指存在于正常肝脏中的所有类型的细胞，不管其来源或命运如何。

**干细胞：**在本文中，术语“干细胞”是指能够产生具有不止一种命运的子代细胞的高度增殖细胞，也就是它们是多能的。全能干细胞，例如胚胎干细胞(ES 细胞)或哺乳动物胚胎达 8 细胞阶段的胚胎细胞，具有自我更新（自我维持）的能力，其中的干细胞产生与其自身完全相同的子代细胞。相比之下，定向干细胞，例如造血、神经元、皮肤或肝干细胞，是多能的并且具有广泛的发育能力，但具有可疑的自我更新能力。对于全能干细胞，其有些子代细胞与亲代完全相同，而有些则“定向”于特定命运（一种或数种），将其遗传潜能局限得比亲代少。对于定向干细胞，有些子代细胞保留了多能性，而有些则丧失了，而定向于单一的特定命运。

当术语“一种”、“一”或“一个”用于该公开文本中时，它们的是指“至少一种”或者“一个或多个”，除非另行指出。

## 2. 肝谱系的诊断标志

$\alpha$ -胎蛋白 (AFP) 和白蛋白均为胞浆蛋白质，当作为蛋白测定时，是特别可靠的肝谱系标志。编码这些蛋白变体形式的信使 RNA 在造血祖细胞中表达但不翻译；例如，AFP mRNA 的变体形式与肝细胞中的不同，外显子 1 的编码序列被选择性外显子 1 或两外显子替换 (Kubota, Storm 和 Reid, 已递交，也在专利申请中)。因此，这两种蛋白质的表达是从肝脏的其它细胞类型中鉴定肝亚群的基础。在发育中的肝脏内，AFP 和白蛋白的存在被当作肝祖细胞的强阳性指示剂。在肝脏发育的最早期，这些细胞能够产生进入胆管和肝细胞两种谱系的后代。如果这些子代细胞定向于胆管谱系，则 AFP 的表达终止。不过，

AFP 的表达继续存在于肝细胞谱系中,直到围产期期间它被抑制为止,使得白蛋白的表达成为成年肝细胞的主要特征之一。

### 3. 人类肝脏祖细胞的加工

肝脏细胞的分离通常包括将组织酶促和机械解离为单细胞悬液,接着是密度梯度离心、离心式淘洗、差异性酶促消化(即肝卫星细胞)分级,和/或进行细胞培养选择(在 Freshney, "Culture of Animal Cells, A MANUAL of Basic Technique" 1983, ALAN R LISS, Inc. NY 中有综述)。肝脏组织可从胎儿、新生儿和婴儿(出生到1岁左右)、儿童(1岁至青春期)或成人(青春期后)处获得。优选使用密度梯度离心分级和分离不同的细胞群(如成肝细胞)。

### 4. 近肝干细胞及其它祖细胞的培养

近肝干细胞和定向肝祖细胞需要胚胎肝脏基质饲养细胞和补充有已知激素和生长因子的无血清培养基[1-6]。如果将胚胎肝脏基质饲养细胞替换为 STO 饲养细胞,并与补充有胰岛素、转铁蛋白/Fe 和优选的皮质醇激素的成分确定的无血清培养基混合,就会发生近肝干细胞、定向祖细胞以及双倍体成年肝脏细胞关键标志的集落扩增和增长维持[7]。假设这些条件支持不同种范围的来自胎儿组织的祖细胞,甚至支持双倍体成年细胞的集落形成[7],则需要不同的条件选择原肝干细胞。

### 5. 原肝干细胞的分离

本发明涉及从人类肝脏组织中分离原肝干细胞的方法,包括将来自肝脏组织的细胞悬液,优选富集了实质细胞的细胞悬液施加到塑胶

表面并将细胞置于消除成熟肝脏细胞、近肝干细胞和定向祖细胞的严格培养条件下。严格培养条件包括使用无血清培养基，补充有碳水化合物代谢调节剂、铁源、膜产生因子，优选补充有抗氧化剂。

优选的碳水化合物代谢调节剂是胰岛素。优选的铁源是转铁蛋白。

- 5 优选的膜产生因子是包括一种或多种脂肪的组合物，最优选是游离脂肪酸。优选的抗氧化剂是硒。无血清培养基优选还补充有皮质醇。肝脏组织优选获自于胎儿、新生儿、婴儿、儿童、青少年或成人，最优选来自胎儿。

原肝干细胞通过在塑胶表面上以低细胞密度(例如 1000-2000 细胞  
10 /cm<sup>2</sup>)培养肝脏来源的细胞悬液来分离。严格培养条件使来自人类肝脏的原肝干细胞出现，它是近肝干细胞的前身。这些来自人类肝脏的原肝干细胞共表达 Ep-CAM、AC133、CK8/18、CK19 和白蛋白，并且它们的亚群表达 N-CAM、CAM 5.2 和 c-kit。

本领域技术人员将会意识到本发明可用于分离来自其它组织类型  
15 的原代细胞。

## 6. 近肝干细胞的分离

人类近肝干细胞产生肝细胞或胆管上皮，或者它们的组合。人类近肝干细胞共表达 Ep-CAM、CK8/18、细胞角蛋白 19、 $\alpha$ -胎蛋白，且亚群表达 AC133。人类近肝干细胞可通过多种方法分离，包括 (i) 免疫选择共表达 EP-CAM 的细胞，(ii) 用发育诱导因子培养肝脏来源的  
20 细胞悬液，优选富集了实质细胞的细胞悬液，或者 (iii) 用发育诱导因

子培养人类原肝干细胞。所述发育诱导因子优选由第二细胞提供。优选的第二细胞包括 STO 饲养细胞、胚胎肝脏基质细胞或内皮细胞。

## 7. 通过免疫选择分离肝祖细胞

本发明也涉及基于肝祖细胞特异性的免疫选择性细胞表面标志而  
5 从肝脏来源的细胞悬液中分离肝祖细胞的方法。肝祖细胞可根据本发明选择表达 ep-CAM 的细胞而得到分离，并且优选选择还表达 AC133 的那些细胞。本发明免疫选择的肝祖细胞优选还表达白蛋白，并且最优选还表达细胞角蛋白 19。优选地，免疫选择的肝祖细胞是干细胞。

在本发明的一个实施方案中，分离的肝祖细胞是原肝干细胞。在  
10 本发明的另一个实施方案中，分离的肝祖细胞是近肝干细胞。

## 8. 肝祖细胞的生产

本发明也涉及由肝原肝干细胞生产近肝干细胞和定向祖细胞的方法，包括直接将原肝干细胞涂布到 STO 饲养层上和 HDM 中，或者通过将来自培养塑胶上的菌落中的原肝干细胞转移到 STO 饲养层上，而  
15 使近肝干细胞从原肝干细胞菌落中显现出来。

近肝干细胞和定向祖细胞也可以通过在未涂敷的表面上培养而从原肝干细胞中产生，包括在皮氏培养皿（优选是不带电荷的聚苯乙烯表面）、组织培养塑胶（优选是暴露于电离气的聚苯乙烯表面，从而该聚苯乙烯朝细胞连接的一侧被极化，带有优势的阴性（或阳性）电  
20 荷取向）、微载体（优选是细胞能够结合到上面的培养珠）、纺织品（优选尼龙、棉线、聚酯）、合成支架（优选由聚丙交酯、聚（丙烯

延胡索酸酯)、聚(邻酯)或其它合成材料制成)或者海绵(优选天然或合成海绵)上培养。

近肝干细胞和定向祖细胞也可以通过在生物学表面上培养而从原肝干细胞中产生。生物学表面可以涂敷到或制备到上述范畴的表面上。

5 从而,例如,人们可将胞外基质涂层涂敷到皮氏培养皿、微载体或纺织品上。本发明所用的生物学表面包括 (i) 胞外基质(由细胞产生的且位于外部及细胞之间的蛋白质和碳水化合物的复杂混合物,并且包括胶原、粘附蛋白、蛋白聚糖及其它蛋白), (ii) 胞外基质组分(个别纯化的基质组分,单独或者联合使用以优化细胞的连接、生长和/

10 或组织特异性功能的表达,包括纤连蛋白,层粘连蛋白,胶原(存在20多种胶原家族),包括I型胶原、III型胶原、IV型胶原(这三种是现今细胞培养中最常用的),细胞粘附分子或"CAM",其中某些是钙依赖性的,而某些不是,以及蛋白聚糖(由其上连接了一个或多个粘多糖链(葡糖醛酸或艾杜糖醛酸+氨基糖二聚体单元的聚合物)的

15 核心蛋白组成的分子)的表达。包括硫酸软骨素蛋白聚糖、硫酸皮肤蛋白多聚糖、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖、肝磷脂蛋白聚糖), (iii) 富集了胞外基质的组织提取物,包括 Matrigel (可移植鼠胚胎细胞癌的尿素提取物,可涂敷到组 I 给出的任何表面上)、ECM (使用稀碱、稀去污剂、高盐抽提、尿素等的培养细胞的提取物,并留下富集了胞外基质

20 组分的浸出物涂敷表面(组 I 中任一种))、羊膜基质(用稀碱、稀去污剂、高盐抽提、尿素等提取羊膜,并留下羊膜中存在的基质组分)以及生物基质(用高盐(如>3 M NaCl)和核酸酶提取组织,以留下所有

的组织胶原及任何结合的组分例如粘附蛋白），(iv) 血清涂层（如用血清涂敷皮氏培养皿或组织培养皿，则要添加粘附蛋白，特别是纤粘连蛋白，以高水平存在于血清之中），和(v) 多聚赖氨酸或多聚亮氨酸（具有这些正电荷氨基酸的涂层被用来优势地连接上皮细胞）。

- 5        近肝干细胞和定向祖细胞也可以通过在 Atala 和 Robert P. Lanza 编辑, *Methods of Tissue Engineering*. Academic Press, New York 2002 中所述的条件下培养而从原肝干细胞中产生，在此并入作为参考。本发明生产的肝祖细胞包括原肝干细胞和近肝干细胞、肝细胞定向祖细胞以及胆管定向祖细胞。

## 10        9. 治疗方法

- 本发明分离的祖细胞可用于肝脏指向的细胞和/或基因治疗，或作为生产病毒（如丙型肝炎）的宿主细胞来产生疫苗。并且，本发明的祖细胞可自肝脏生检（如穿孔活组织切片检查）离体扩增，并且扩增的细胞可用于自体或同种异体细胞或基因治疗，或者用于种植到生物
- 15    反应器中以建立生物人工肝脏，其可用于临床或用于学术研究。这将消除侵入性大外科手术切除患者肝脏的必要。

- 祖细胞一旦在培养物中建立，就可利用多种不同基因递送载体系统中的任一种来进行基因转移。本发明的祖细胞的生长特征允许在离体基因转移中使用某些基因递送载体（即逆转录病毒载体），这就要
- 20    求细胞增殖，以用于有效的基因插入和表达。

基因治疗的替代途径是设计祖细胞的特异性靶向载体，然后直接地注射给患者，使该载体与目的基因偶联，该载体就会靶向并修饰内源祖细胞群。

本发明的祖细胞可用于自体或同种异体肝脏指向的细胞或基因治疗。显然，使用自体肝祖细胞将消除有关移植细胞排斥的重大顾虑。本发明的祖细胞对于同种异体细胞转移尤其具有吸引力，因为它们

5 的抗原特性意味着最小化的免疫排斥现象。

一旦分离纯化并培养了自体或同种异体祖细胞，它们就能够被遗传修饰或保持完整，在体外扩增，然后植回到宿主中。如果遗传修饰

10 是有益的，那么在遗传修饰后和移植前，那些遗传修饰的细胞就可以扩增和/或基于显性选择性标记的掺入和表达予以选择。移植可返回到肝区室或者异位或异位移植部位。对于移植到肝区室，可使用肝门静脉输注或脾内注射。脾内注射是可选的给药路径，是因为经由脾内注射移植的肝祖细胞移往肝区室。

另外的医学操作可能有助于移植的肝祖细胞肝嫁接的功效。动物模型已证明在部分肝切除术中，给药血管生成因子及其它生长因子可有助于移植的肝细胞的嫁接和生存能力。替代途径是将遗传修饰的祖细胞移植到异位。

15

迄今为止，存在着与肝细胞治疗途径相关的问题，包括细胞来源、不能低温保藏细胞、栓子形成以及免疫排斥等。当前肝细胞治疗途径

20 的问题可能是归因于所用的供体细胞主要为成人肝脏细胞并且分离和再注射后生命短的事实。另外，使用成人细胞导致强烈的免疫排斥。

本发明的祖细胞提供了极大的功效，这是因为它们引发免疫排斥现象的能力有限，它们能够低温保藏，从而提供了对其组织分类的时机（从而使供体细胞与受体匹配）并且提供了“离架”（off-the shelf）产品，还因为它们具有广泛的再生潜能。

5       有关基因治疗，现行的努力是使用“靶向可注射载体”，这是发展中的最流行的临床治疗路径。这些途径由于免疫学问题和载体的瞬时表达而具有有限的功效。证明有价值的唯一基因治疗路径是离体基因治疗，并且该路径几乎是专一性地在造血祖细胞中进行。我们预言使用祖细胞的离体基因治疗（或使用在某种程度上靶向那些祖细胞的可  
10   注射载体）将证明更为有效，因为载体可被离体引入到纯化的祖细胞、体内选择和再引入的修饰细胞中。祖细胞的优势在于它们巨大的扩增潜能，它们最小程度地（如果有的话）诱发免疫学反应，或者它们对与受体的免疫学表型类型相同或匹配的组织的能力，以及它们分化产生肝细胞和胆管细胞的能力。

## 15       **10. 其它用途**

人类肝原肝干细胞和近肝干细胞的用途众多并且多样。它们包括：  
1) 研究人类细胞；2) 生产疫苗或抗病毒剂；3) 毒物学研究；4) 药物  
研发；5) 蛋白质生产（利用细胞作为宿主，生产多种人类特异性因子）；  
6) 肝脏细胞治疗；7) 肝脏基因治疗；和 8) 可用于科研、毒物学和抗  
20   微生物研究、蛋白质生产、或临床上作为肝脏辅助系统的生物人工肝  
脏。考虑到原肝干细胞和近肝干细胞分化为肝细胞和胆管细胞的能力，  
本发明的细胞可用于肝或胆命运，取决于它们所置于的微环境。

人类肝祖细胞（所有四类）的可获得性将使得能够对人类细胞进行更为深入的研究，将促进成功形式的肝脏细胞及基因治疗的发展，并且应当能够发展人类生物人工肝脏用于科研和作为临床辅助装置。目前，有限的健康人类组织的供应排除了肝脏细胞治疗和人类生物人工肝脏的临床项目。所述祖细胞群应当具有足够的扩增潜能来克服，至少极大地缓解这种有限的供应。而且，相对于成熟肝脏细胞，这些细胞及其中间后代在冷热情况下均表现出对局部缺血的偏好性存活，说明不能用于肝脏移植或用于生产健康成熟肝脏细胞的肝脏是祖细胞的来源。

10 本发明将通过如下非限制性的实施例举例说明。

### 实施例 1

#### 由胎儿组织制备肝细胞悬液

肝脏组织通过选择性终止妊娠从 18-22 周妊娠龄的胎儿中获得。

15 肝脏组织样品在补充有 180%胎牛血清的 RPMI 1640 中过夜运送。

在细胞缓冲液(补充有牛血清白蛋白(BSA 级分 V, 0.1%, Sigma, St. Louis, Mo. )、亚硒酸(300 PM)和抗微生物剂混合物 AAS (Gibco BRL/Invitrogen Corporation, Carlsbad, California)的 RPMI )中初步洗涤后,组织体积的范围从 2 到 12 mL。根据需要肝脏组织再细分为 3 mL 或更少的级分,用于在 25 mL 含 IV 型胶原酶和脱氧核糖核酸酶(Sigma, St Louis, Mo.;均为 6 mg/mL) 的细胞缓冲液中消化。温育于 32℃ 频繁搅动进行 15-20 分钟, 并产生均质的细胞聚集体悬液。然后使悬液穿

过 40 的标准筛并于 1200 RPM 旋转 5 分钟,之后重悬于 Hanks 缓冲盐溶液的无钙溶液中,补充有 EGTA (0.2 mM, Sigma)、Hepes (20 mM, Boehringer Mannheim)、BSA (0.1% Sigma)、DNase (0.01% Sigma), 并称之为 HBSS mod。

5 酶促消化的悬液包括造血和肝亚群。酶促消化悬液的抗原特性示于表 1, 其中 AFP 表达细胞为原始细胞悬液的 6-9% (图 12), 并具有相当比例的白蛋白表达细胞和显著污染的造血细胞 (见表 1 中 CD45 和血型糖蛋白 A 表达细胞的百分比)。如果低温保藏原始细胞悬液, 某些细胞例如红细胞就会丢失, 使得白蛋白和 AFP 表达细胞富集至  
10 15-20% (表 1)。不过, 最显著的富集随着胶原酶的部分酶促消化发生, 产生实质细胞的聚集体, 其随后如下文所述通过反复低速离心从非实质 (漂游) 细胞中分离, 并产生多于 80% 的白蛋白和 AFP 表达细胞的细胞悬液(表 1)。

然后通过 HBSS mod 中以 30 g (300 RPM) 反复低速离心 5 分钟  
15 从实质细胞级分中分离造血细胞 (主要是红细胞和成红细胞) 和漂游非实质细胞。将沉淀重悬于 40 ml HBSS mod 中并重新离心, 直至颜色显示最小程度的红血细胞污染。正常地, 如他人所报道的那样, 这需要 4 或 5 个循环的离心和重悬 [14,15]。通过在新鲜胶原酶溶液中进行另一轮酶促消化使结块最小化, 然后通过 50  $\mu$ m 的尼龙网过滤, 并  
20 将细胞返至无钙缓冲液中。

将所得的细胞悬液洗涤两次, 随后将 5 mL 各含大约  $2 \times 10^7$  个细胞的小份铺层到 50 mL Falcon 管中的 5 mL Ficoll Hypaque (Amersham

Pharmacia, Piscataway, NJ)上, 并于 3000 RPM 旋转 20 分钟。来自界面和沉淀的细胞分别重悬于涂板培养基(含补充物的 RPMI)中, 并且每种的一小份用锥虫蓝染色计数, 并由血球计评估存活力。细胞存活力常规地高于 95%。用于富集实质细胞的低速离心法除去了造血细胞成分, 留下大约为 80% AFP 表达细胞的细胞悬液。由于它们表达 AFP、白蛋白和 CK19 而不表达造血细胞标志, 因此大多数 AFP 表达细胞是近肝干细胞(表 1)。

表 1. 对新分离的胎儿肝脏细胞的流式细胞仪分析

| 标志             | 分布 | 原始细胞悬液中的阳性百分比, OCS (C-OCS 中的百分比) | 富集的实质制备物中阳性百分比 |
|----------------|----|----------------------------------|----------------|
| AFP            | 胞浆 | 6.4±0.8% (~15-20%)               | 75.5%          |
| 白蛋白            | 胞浆 | 9.3% (~15-20%)                   | >80%           |
| CD45           | 表面 | 1.4%±0.4                         |                |
| 血型糖蛋白 A        | 表面 | >50% (37.5±9%)                   | 可忽略的           |
| CD34           | 表面 | (2.7±0.5%)                       |                |
| CD38           | 表面 | (1.2±0.3%)                       |                |
| CD14           | 表面 | 3.0±                             |                |
| CD 117 (c-kit) | 表面 | ~1%                              |                |
| Ep-CAM         | 表面 | n.d.                             |                |
| CD146          | 表面 | n.d.                             |                |
| N-CAM          | 表面 | n.d.                             |                |
| CAM-5.2        | 表面 | n.d.                             |                |
| PE-CAM         | 表面 | n.d.                             |                |
| CD 133         | 表面 | n.d.                             |                |

|            |    |      |  |
|------------|----|------|--|
| 细胞角蛋白 19   | 胞浆 | n.d. |  |
| 细胞角蛋白 8/18 | 胞浆 | n.d. |  |

OCS = 原始细胞悬液; C-OCS = 在专利缓冲液中低温保藏的原始细胞悬液。细胞稍后融化, 然后分析标志的表达。许多细胞特别是红细胞(去核亚群)低温保藏不存活。实质细胞制备物 = 通过反复低速旋转离心消除红细胞和其它漂游非实质细胞之后; n.d. = 未作分析。

5

实施例 2

由成人组织制备肝细胞悬液

人类肝脏获自于经授权的器官获取机构。供体为遭遇脑死亡的 13 岁女子。肝脏利用全器官灌注技术消化。然后在 Cobe 2991 细胞洗涤器中使用 2 步 Optiprep 梯度(9-12.5%) 将单细胞悬液分级分离以获取存活细胞。然后从残留的死亡细胞中通过将 9% (带 1) 和 12.5% (带 2) 的分级细胞分别地与 25% Optiprep 混合进一步在 Cobe 2991 中分级分离而分离肝脏细胞。根据正向和侧向散射参数的流式细胞仪分析, 带 1 和带 2 的细胞组成似乎相似。细胞被低温保藏。

10

实施例 3

成年人类肝脏细胞的集落形成

为通过集落形成评估肝脏干细胞的存在, 将实施例 2 的细胞融化并以 12,500 个肝脏细胞/孔的密度涂布到 6 孔板的 STO-5 饲养层上, 一式三份。所用的组织培养基为 DMEM F12, 含有青霉素/链霉素(50 U/ml/50ug/ml)、牛血清白蛋白(0.2% w/v)、转铁蛋白(10 ug/ml)、游离脂肪酸(7.6 uEq/L)、烟酰胺(4.4 mM)、硒( $3\times 10^{-8}$  M)、铜( $1\times 10^{-6}$  M)、

20

2-巯基乙醇( $5 \times 10^{-5}$  M)、L-谷氨酰胺 (2 mM)、胰岛素(5 ug/ml)、皮质醇( $10^{-7}$  M), 添加(+EGF)或不添加(-EGF)表皮生长因子。

细胞培养 5 天、固定、并通过光学显微镜观察计数。在未分级分离细胞的任何孔中都未观察到集落。这可能是由于死亡或即将死亡的细胞、或者在 Optiprep 梯度离心前的某些其它细胞制备物组分的抑制效应。不过, 在带 1 和带 2 的细胞级分中均观察到集落。在含有来自带 1 的细胞的 3 个孔中观察到总共 8 个集落 (4 个来自+EGF 培养基, 4 个来自-EGF 培养基), 而在来自带 2 的 3 个孔中观察到总共 13 个聚落 (11 个来自+EGF 培养基, 2 个来自-EGF 培养基)。计算的本实验的总体集落形成细胞频率为 0.03%。

#### 实施例 4

##### 白蛋白、CD133 和 Ep-CAM 在成人肝脏细胞亚群中的共表达

细胞基本上如实施例 2 所述从供体肝脏中分离。利用抗-CD45 单克隆抗体通过荧光激活细胞分选术(FACS)评估表达 CD45 细胞表面抗原或者说是白血球共同抗原 (在白血细胞 (白细胞) 中广泛表达的一种酪氨酸磷酸酯酶) 的细胞的存在。大约 17%的细胞是 CD45-阳性的(图 14a)。利用抗-CD45 单克隆抗体和超常磁 MACS MicroBeads 以及 autoMACS (一种台式自动化磁性细胞分选仪) 通过磁性细胞分选排除 CD45-阳性细胞。磁珠标记的抗体和仪器都由 Miltenyi Biotec 供应。CD45-阳性细胞也可以通过“淘选”、荧光激活细胞分选或其它阴性免疫选择模式排除。排除后, 残留在肝脏细胞制备物中的 CD45-阳性细

胞降至大约 1%（图 14B）。排除 CD45-阳性细胞促进了对肝细胞和肝祖细胞以及干细胞上的抗原的进一步分析。它应当也会促进富集的这些细胞群的分离。

#### a. 白蛋白

5 排除 CD45-阳性细胞后，分析肝脏细胞样品人类血清白蛋白的表达。细胞用聚甲醛固定，通过用去 0.2% Triton X-100 污剂处理浸透、并通过依次与抗人白蛋白的鼠 IgG<sub>1</sub> 单克隆抗体、亲和纯化的由荧光染料 A647 标记的抗鼠免疫球蛋白 G<sub>1</sub> (IgG<sub>1</sub>) 的羊抗体温育而染色。细胞的本底染色和自发荧光通过使用纯化的对人类抗原无特异性结合活性  
10 的小鼠骨髓瘤蛋白（也是 IgG<sub>1</sub>）代替抗白蛋白单克隆抗体确定。大约 97.5%的细胞是白蛋白阳性的（图 15A）。阳染(红色轮廓)的阈值通过与小鼠骨髓瘤蛋白对照（未显示）相比较确定。

通过 FACS 测量正向光散射和侧向光散射可用于描述细胞群的特征。正向和侧向散射分别主要地是细胞大小和胞外结构复杂性的函数。  
15 如图 15B 所示，来自成人肝脏的白蛋白阳性细胞群构成了具有相对高的正向(FSC)和侧向散射(SSC)的主要的一类细胞。大小和形态学以及附加的生物化学和抗原标志（未显示）的分析，证明这些细胞具有与成熟的小肝细胞（平均大约 18-22 微米的直径）一致的性能。来自正常成人肝脏的最大肝细胞（大约> 30 微米的直径）明显地不为我们的  
20 制备物所体现，这很可能是因为在收获器官和灌注期间更易于死亡，和/或在分离操作期间更易于损伤。不过，图 15B 也证明，除了成熟的小肝细胞，许多以较低的正向和侧向散射为特征的细胞也表达白蛋白。

制备物中的(大约 2.5%)白蛋白阴性细胞几乎无一例外地表现出极低的正向和侧向散射(图 15C)。这些可能是死亡细胞或者及小的细胞,例如红血细胞前身的晚期。

### **b. CD133**

- 5        抗原 CD133 (AC133)是 120 kD 的细胞表面糖蛋白,其具有 5 个跨膜结构域。该蛋白与小鼠蛋白 prominin 相似或类似。人类 CD133 抗原最初是作为早期祖细胞亚群(包括干细胞)在血液形成(造血)细胞谱系中鉴定的。某些其它未成熟细胞表达 CD133,包括发育中的人类胚胎上皮(第 5 周)、内皮细胞前身以及神经元祖细胞或干细胞。
- 10      CD133 的表达也在某些人类肿瘤及肿瘤来源的细胞系中报道,例如成视网膜细胞瘤和结肠癌细胞系 CaCo-2。发现该蛋白喜好集中在质膜丰富之处例如微绒毛中。当见于上皮细胞中时,它优选位于顶部,但不是嗜碱侧膜表面。以前的研究,尤其是免疫组织化学的研究,未能证明成人上皮组织中的 CD133 蛋白表达,尽管在许多人类组织,包括成人
- 15      人肝脏中存在可检测的该蛋白的信使 RNA。

我们利用荧光标记的单克隆抗体染色并通过 FACS 分析来在我们的排除 CD45 的成人肝脏细胞制备物中寻找表达 CD133 抗原的细胞。以在前的否定报道的观点看,令人惊讶地,我们观察到多数排除 CD45 的肝脏细胞(见图 14B)表现出 CD133 阳染。图 16A 揭示在来自青

20      少年(2 岁)个体肝脏的制备物中有大约 58%的 CD133-阳性细胞。已在其它个体包括成人的细胞制备物中观察到大量 CD133-阳性细胞群的存在,包括具有小成熟肝细胞大小的细胞。根据侧向光散射(图 16A)

和正向光散射（未显示），CD133-阳性群（图 16A 中上面的图框）包括制备物中大概一半经鉴定为成熟（小）肝细胞的细胞。它也包括比成熟肝细胞更小且形态上截然不同的许多细胞，如通过光散射所判断的那样。

- 5        磁性细胞分选可用于阳性选择表达 CD133 的肝脏细胞。图 16B 表明在使用 autoMACS 设备 (Miltenyi Biotec) 进行一个循环的磁性分选之后，CD133-阳性细胞被富集至大约回收细胞的 75%。使用更高量的抗体偶联的 MACS 微珠以及分选条件的调整将允许以几乎可定量的收率分离到更为高度富集的 CD133-阳性细胞群。其它阳性免疫选择
- 10    的方法可用于富集 CD133-阳性细胞。如通过侧向散射（图 16B）和正向散射（未显示）所判断的那样，富集的 CD133-阳性细胞包括所有在排除 CD45 的肝脏细胞制备物中鉴定到的 CD133 亚群。

### **c. Ep-CAM**

- 上皮细胞粘附分子 (Ep-CAM，也被称之为 GA733-2、CO17-1A、
- 15    EGP40、KS1-4 及 KSA) 是牵涉类似的钙离子依赖性细胞-细胞粘附的糖蛋白。该蛋白在许多人类上皮组织中表达，并且在增殖的上皮细胞包括肿瘤细胞中似乎是上调的。C. J. de Boer 及其同事报道在 8 周的人类胚胎肝脏中，多数肝细胞表达可检测的 Ep-CAM 蛋白[de Boer CJ, van Krieken JH, Janssen-van Rhijn CM, Litvinov SV. (1999). "Expression
- 20    of Ep-CAM in normal, regenerating, metaplastic, and neoplastic liver," *journal of pathology* 188: 201-6]。相比之下，他们在正常成人肝脏中未能检测到肝细胞中的 Ep-CAM 表达，并且报道仅有胆管上皮细

胞的该抗原染色是阳性的。最后，在因胆硬化诱导的肝脏再生和修复的情况下经鉴定为肝前体的细胞中，以及在某些肝脏肿瘤尤其是胆管细胞癌

我们通过 FACS 分析，在未分级分离的来自青少年和成人的人类  
5 肝脏细胞制备物中均一致地检测到一小群 Ep-CAM-阳性细胞。所述  
Ep-CAM-阳性群构成大约 0.4 到 2.5%的细胞。如图 17 所示，Ep-CAM-  
阳性细胞也能够在排除 > 95%的 CD45-阳性细胞后的肝脏细胞群中观  
察到。图 17B 显示了来自一种这样的人类肝脏制备物的 Ep-CAM-阳性  
细胞(如红色轮廓线所示的门控图中 0.57%的区域，相比于图 17A 中不  
10 对任何人类抗原染色的对照抗体的相同门控区中的 0.15%；从而大约  
 $0.57 - 0.15 = 0.42\%$ 的细胞为 Ep-CAM-阳性)。双标记分析(数据未显示)  
证明排除了 CD45 的群中绝大多数的 Ep-CAM-阳性细胞如预期的那  
样，是 CD45-阴性的。不过，我们的人类肝脏制备物中似乎有些 (大  
概 1%) CD45-阳性细胞也表达 Ep-CAM (数据未显示)。

#### 15 **d. Ep-CAM、CD133 和白蛋白的共表达**

我们在成人肝脏中寻找了表达 Ep-CAM 和 CD133 两者的肝脏细  
胞。细胞与针对 CD133 和 Ep-CAM 的分别直接偶联于不同的荧光染  
料单克隆抗体温育。如图 17C 所示，该特定的排除 CD45 的成人肝脏  
细胞制备物中大约 42%的细胞可检测地被 CD133 染色。(这里比图 16A  
20 所示的实验中稍微更低程度的 CD133 染色可能是由于来自不同供体  
的肝脏细胞制备物作为年龄或其它变量的结果的实际差异，或者由于  
未认识到的实验技术的变化)。在群中 Ep-CAM 强烈染色的细胞(示于

图 17B 的红色边界之内)中, 大约 70%也被 CD133 阳染(图 17D)。从而, 在该特定的肝脏制备物中, 大约 0.3%的全部 CD45-阴性细胞共表达 Ep-CAM 和 CD133。

用于如图 17 所示的实验的细胞制备物与图 14 和 15 所示的白蛋白  
5 表达分析中所用的完全相同。正如上文所指出的那样, 排除 CD45 的细胞群中大约 97.5%的细胞白蛋白染色阳性, 并且少数白蛋白阴性细胞表现出截然不同的低正向散射和侧向散射模式。如图 17E 所示, 事实上所有(大约 99.5%)发现共表达 CD133 和 Ep-CAM 的细胞表现出白蛋白阳性细胞所特有的正向散射和侧向光散射; 它们完全落在正向散  
10 射对侧向散射绘图的包含所有白蛋白阴性细胞的边界区外侧(见图 15C)。因此, 出生后共表达 Ep-CAM 和 CD133 的人类肝脏细胞也表达人类血清白蛋白。

#### **e. CD133 和 Ep-CAM 表达细胞的共富集**

如图 16B 所示, 阳性免疫选择例如磁性细胞分选允许从人类肝脏  
15 细胞制备物中富集 CD133-阳性细胞。我们评估了起始群(已排除 CD45)和 CD133-富集制备物中细胞的 Ep-CAM 表达。图 17A 显示小于 1.1% (故意牢固地门控)的起始群表达 Ep-CAM。在富集 CD133-阳性细胞后, 所得的群(图 5B)含有至少 4.5%的 Ep-CAM-阳性细胞。这证实了 CD133 和 Ep-CAM 在成人肝脏细胞亚群中的共表达, 并表明  
20 这些细胞可通过阳性免疫选择富集。共表达这两种表面抗原的细胞的正向和侧向散射分析(如图 17 的实验那样)再次表明几乎 100%的这些细胞一定也是白蛋白阳性的。

上文所述的成人肝脏细胞共表达白蛋白(肝细胞谱系的一种原型)和 CD133 或 Ep-CAM, 因此具有与本文所述的来自人类胎儿肝脏的某些肝干细胞相同的表型特点。而且, 本文所述的成人肝脏细胞是比成熟肝细胞(甚至是直径 18-22 微米的“小肝细胞”)尺寸小的肝脏细胞。

5 与成人肝脏含有能够在可操作地限定肝干细胞的条件下(即在具有 STO 饲养细胞的无血清培养基中)形成集落的细胞的发现综合起来, 白蛋白、Ep-CAM 和 CD133 的共表达证明了此类干细胞在成人肝脏中的存在。本文所述的阳性免疫选择方法可用于分离同时表达两种表面标志 Ep-CAM 和 CD133 的细胞, 以从人类肝脏, 包括来源于儿童或

10 成人的组织中获得高度富集的肝干细胞群。

## 实施例 5

### STO 饲养层上的近肝干细胞原代培养物

多数肝祖细胞, 除了原肝干细胞以外, 与胚胎肝脏基质饲养细胞

15 共培养时不能长期存活; 来自新生儿肝脏、成人肝脏或多种成人组织的饲养细胞都不成功(Sigal 等, 1994; Brill 等, 1995; Sigal 等, 1995; (Brill S, Zvibel I 和 Reid LM. Expansion conditions for early hepatic progenitor cells from embryonal and neonatal rat livers. Digestive Diseases and Sciences 44: 364-371,1999)。胚胎肝脏基质饲养细胞可被 STO 细胞代

20 替, STO 细胞为胚胎基质细胞系, 用作为胚胎干细胞的常规饲养细胞, 并被发现支持新鲜分离的正常啮齿类肝干细胞和双倍体成年大鼠肝脏细胞的克隆扩增(Kubota 和 Reid, 2000)。发现这些条件对来自人类胎儿

肝脏的所有祖细胞也是必需的，除了有和无饲养细胞都将扩增的原肝干细胞以外(Moss 等，已投稿)。也证明 STO 饲养细胞对来自新生儿和成人肝脏的肝祖细胞是成功的(Ludlow 等，准备中)。该胚胎基质饲养细胞所供应的以及祖细胞所必需的因子尚未知晓。

- 5 将最初来自 ATCC 的 STO 饲养细胞由 75 cm 烧瓶的贮备细胞在 DMEM/F12 (Gibco/Brl/Invitrogen Corporation, Carlsbad, California)中扩增，补充有 10%胎牛血清 FBS (Hyclone, Logan, UT)和 1% DMSO (Sigma, St. Louis, Mo.)。在经 3 次传代以提供 9 成融合性烧瓶后，细胞用 10  $\mu\text{g/mL}$  丝裂霉素 C (Sigma, St. Louis, Mo; 以及 Biomol, Plymouth
- 10 Meeting, PA)处理 2 小时，以诱导细胞周期停滞，并用培养基洗涤两次。细胞用胰蛋白酶消化，并重悬于低温保藏培养基中 (50% DMEM/F12, 40% FBS, 10% DMSO)，之后以 1 mL  $5 \times 10^6$  个细胞的小份冷冻并贮存于  $-80^\circ\text{C}$ 。饲养细胞通过将  $6 \times 10^4$  个融化细胞/ $\text{cm}^2$  种植到由 0.1%白明胶 (Sigma, St. Louis, Mo.)预涂敷的培养板上制备。在此将[16]中描述的详
- 15 细方案并入作为参考。

- 转到 STO 细胞上的细胞在无血清激素成分确定的培养基(HDM)中培养，包括 RPMI 1640 (GIBCO/BRL/InVitrogen Corporation, Carlsbad, California)，补充有 0.2%牛血清白蛋白(级分 V，无脂肪酸，Sigma, St. Louis)、胰岛素(5  $\mu\text{g/ml}$ )、转铁蛋白/Fe (10  $\mu\text{g/ml}$ )、硒
- 20 ( $3 \times 10^{-8}\text{M}$ )、2 巯基乙醇( $5 \times 10^{-5}\text{M}$ )、游离脂肪酸复合混合物(7.6  $\mu\text{Eq}$ ; [16, 17])、皮质醇( $10^{-7}\text{M}$ )、谷氨酰胺(2 mM)、烟酰胺 (4 mM)和 AAS (青霉素 1000  $\mu\text{g/mL}$ 、链霉素 100  $\mu\text{g/ml}$  以及两性霉素 B 250 ng/mL,

Sigma)。优选地，既不使用细胞因子类肝生长因子（如表皮生长因子 EGF、肝是指西部生长因子 HGF），也不使用胰岛素样生长因子（IGFI 和 IGFII）。

将实施例 1 中分散的富集的实质细胞的原代培养物涂板到 STO 饲养层上，产生表达白蛋白、AFP 和 CK19 的近肝干细胞的稳定聚集体。典型的细胞白蛋白、AFP 和 CK19 染色示于图 6a-6c 中。这些细胞也是 CK8/18 阳性的。与实施例 6 中描述的培养在塑胶基质上的细胞不同，种植到 STO 饲养细胞上的近肝干细胞保留一致的形态并维持 AFP 的表达数周之久。由于这些条件支持近肝干细胞和更为分化的细胞包括二倍体成人肝脏细胞([7])，与 STO 饲养细胞共培养不能为真正的原始集落形成细胞提供合适的选择。

## 实施例 6

### 原肝干细胞的选择

将实施例 1 中富集的实质细胞悬液以 2000-5000 细胞/cm<sup>2</sup> 的密度涂布到组织培养塑胶上的无血清培养基中，补充有脂肪、胰岛素和转铁蛋白/Fe (HDM)。对于涂板后的头 12 个小时，培养基中含 10% FBS 以促进细胞贴壁，之后的培养保持无血清。培养基更换以 3 天的间隔进行。

就在贴壁之后，存在于培养物中的占支配地位的细胞是近肝干细胞和定向祖细胞，为具有经典实质细胞形态的细胞聚集体，且表达白蛋白、AFP 和/或 CK19；近肝干细胞将展示白蛋白、AFP 和 CK19 (图

2a)。数天后，近肝干细胞和定向祖细胞停止表达 AFP，取而代之的是分散在皿中的具有肌成纤维细胞外表的孤立的运动细胞类型。除了近肝干细胞，培养物中存在若干其它细胞类型，有些是孤立的，有些形成广泛融合的单层，而其它的形成不连续的圆形细胞组。在这些类型的细胞中，白蛋白阳染仅在近肝干细胞、定向祖细胞中、以及在环状紧密聚集的集落即原肝干细胞（它随着近肝干细胞和定向祖细胞的逐渐衰亡而共同在培养物中出现）中观察到。

集落形成表现了可预测的事件顺序。最初的集落波在培养的头几天内出现，并且似乎是由事先存在的细胞的聚集引起的（图 1b）。不过，在 5-7 天后，新的集落形成波自散布在整个培养皿中的孤立细胞开始。这些集落首先作为 4-8 个小的黑色密堆积的细胞辨别，外周是薄层突出形成狭窄的连续边缘（图 2a）。集落扩增为广泛成组的紧密聚集的直径 8-10  $\mu\text{M}$  的圆形细胞（图 2b-2e）。这些晚期形成的集落的一般外观与培养头几天形成的由更大的细胞组成的集落截然不同，并且不同于最初构成胎儿肝脏主要实质细胞的近肝干细胞的聚集体。

原肝干细胞在组织培养塑胶的 HDM 中生长良好，并且在培养数周后获得长达 1 cm 的直径。选择性地取出众多集落，并通过胰蛋白酶消化分散，以产生平均每集落的细胞数目范围从直径 3 mm 集落的 1000 个细胞到直径 1 cm 的巨大集落的 15,000- 20,000 个细胞。

典型地，集落最外侧的细胞转变为扁平的表型，其变得从集落中分开，并形成孤立的大直径细胞，分散在整个培养皿中（图 3a）。在其它集落中，周界的细胞假定是伸长的成纤维细胞外表，其最初紧密包

绕在集落的周边，很可能与间充质细胞紧密结合(图 3b)。这些细胞也远离集落迁移成为单独的梭状细胞。这些分散的细胞保留高度增生性，并且通常成为培养物中占支配地位的细胞类型，形成遍布皿延伸的密堆积层。集落被该细胞层包围，但不被其超过，尽管在各集落边缘处

5 两种细胞类型变得散布的地方形成过渡区(图 3c)。

## 实施例 7

### 塑胶培养物中集落形成细胞的抗原特点

用与肝器官发生相关的标志的免疫细胞化学染色研究了实施例 6

10 中培养的细胞的抗原特征。细胞培养用 50/50 (V/V)的甲醇和丙酮混合物于室温下固定 2 分钟。用 PAP 记号笔(Research Products International Corp, Mt. Prospect, Illinois)在各皿的表面建立若干染色区，以允许相同培养物内的多种抗体组合。非特异性结合位点通过与 10%山羊血清

(GIBCO/BRL/IN Vitrogen, Carlsbad, California) 的 PBS 溶液在室温下

15 温育 30 分钟而封闭。在用 PBS 冲洗两次后，将第一单克隆抗体施加于各染色区（正常为各区域 0.1-0.3 mL）并温育过夜。在于 4℃温育过夜后，细胞用 PBS 洗涤两次，然后与偶联于 Alexa 488 (1:750) 或 Alexa 594 (1:1250) (Molecular Probes, Eugene OR)的二抗温育。在某些情况下，可获得偶联于 FITC 或 PE 的第一单克隆抗体，并且通过在完成标

20 记方案后用该抗体与未偶联的一抗温育提供了双标记的方法。

抗原特性总结于表 2 之中。集落对于许多以前与肝细胞类型有关的标志是阳性染色的，包括白蛋白(图 4a)、CK19 (图 4b)、epCAM (图

4c)、NCAM (CD56, 图 4d), 但不是 PECAM (CD31; 数据未显示)。在若干集落中看到 *c-kit* 染色, 一般位于集落边缘狭窄的部分(图 5a)。并且, 集落对于推断的干细胞标志 CD133 (AC133, 图 5c)是阳性的。有意思的是, 集落边缘过渡区的细胞对于最近描述的内皮标志 CD146 (M-CAM, 图 5c)是阳染的, 并且在邻近集落时, 仍保持该蛋白阳性, 有可能标识着紧密结合的间充质细胞类型, 有可能是内皮祖细胞。作为集落出现的原肝干细胞是 AFP 阴性的, 表明原肝干细胞是近肝干细胞的前身, 后者依次是肝细胞祖细胞和胆管祖细胞的前身。

表 2. 培养细胞的表型

| 表型                     | 管层干细胞                         | 近肝干细胞          | 肝细胞                            | 胆上皮细胞 |
|------------------------|-------------------------------|----------------|--------------------------------|-------|
| 严格条件下的形态学: 组织培养塑胶和 HDM | 深色密堆积细胞, 直径 7-10, 具有“针垫”形态    | 瞬间为运动型的小矩形细胞团粒 | 在严格条件下不存活                      |       |
| 在 STO 饲养细胞上和 HDM 中的形态学 | 深色密堆积细胞, 直径 7-10, 具有“针垫”形态    | 稳定密堆积的细胞团粒     | 二倍体亚群变平且具有明显的细胞边界; 多倍体细胞存活但不生长 |       |
| α-胎蛋白                  | 不表达                           | +++            | 不表达                            | 不表达   |
| 白蛋白                    | +++                           | +++            | +++                            | 不表达   |
| CK8/18                 | +++                           | +++            | +++                            | +++   |
| CK19                   | +++                           | +++            | 不表达                            | +++   |
| c-Kit                  | +++ (集落边缘的细胞)                 | 不表达            | 不表达                            | 不表达   |
| Ep-CAM                 | +++                           | +++            |                                |       |
| N-CAM                  | +++ (集落边缘的细胞)                 | 不表达            | 不表达                            | 不表达   |
| CAM-5.2                | +++ (某些但不是所有细胞)               | 不表达            |                                |       |
| CD133(AC133)           | +++                           | +++            | 不表达                            | 不表达   |
| CD 146                 | 集落边缘(不知其是否为相关的间充质细胞或来源于原肝干细胞) | 不表达            | 不表达                            | 不表达   |
| PE-CAM                 | 不表达                           | 不表达            | 不表达                            | 不表达   |

## 实施例 8

### 集落细胞由塑胶基质向 STO 饲养细胞的传代

在从塑胶基质上选择性传代后,利用 STO 饲养细评估原肝干细胞的命运。培养 1-2 周后,通过在双目镜放大倍数下将实施例 6 中塑胶  
5 基质上的集落抽到 100 uL 移液管中从塑胶基质上物理挑取。将多达 50 个集落收集在 HBSS mod 中,然后在胶原酶溶液中消化长达 20 分钟,伴有搅拌以将细胞分散到悬液中。

从塑胶传代到 STO 饲养层以后的集落形成效率很低,对以 500 或 50 个细胞/cm<sup>2</sup> 的密度传代的细胞,范围在 0.5 和 1%之间。传代的  
10 集落形成细胞的最初贴壁因涂板培养基中 EGF (20 ng/mL)的存在而提高。低的集落形成效率可能部分地是由于需要将细胞置于漫长(长达 20 分钟)的胶原酶消化以获得单细胞悬液的缘故。

在传代到 STO 饲养细胞上之后,原祖细胞融入到 STO 细胞层,并在培养 4-5 天之后作为密堆积的小细胞集落重新出现(图 6a)。新集  
15 落在随后的数周的时间内增大,产生牢固聚集的圆形组,通常在周边稍稍增厚(图 6c)。在有些集落中,发生二次增殖期,其中细胞的冒出自集落边缘的某点发生,并盐 STO 层扩散,通常围绕原始的集落(图 6c)。

形成在 STO 细胞上的集落的免疫细胞化学性能与上文所述的塑胶  
20 胶基质上集落形成细胞的那些特性相同。这包括白蛋白、CK19、CK18 和 CD133 阳染。由于最初集落是在塑胶上培养的,诸如 CD146 和 NCAM 的标志在形成在 STO 细胞的集落的外围表达最为清晰。当集

落被由原代集落增殖的细胞围绕时，这种边际表达模式变得甚至更为突出。这这在图 9 的 NCAM 中清晰显示，其中形成自传代细胞的原始集落和二次增殖集落之间的界面以具有强阳性 NCAM 表达的细胞带为标志。该模式也在见于泛细胞角蛋白标志 CAM 5.2 的表达，并且  
5 NCAM 和 CAM 5.2 双标记证明这两种标志以高水平在边际细胞的相同区域表达（图 9）。

最后，冒出的细胞类型的特征是有意义的，因为它们以截然不同的重排自集落中出现，包括并行排列的细胞，其扩大成具有清楚胞间空间的线性排列细胞的分枝模式(图 8)。当这些细胞扩大成围绕原始细胞集落的广泛的薄层时，它们在出现之际在外观上似乎丢失了线性结构。不过，白蛋白染色揭示组织为成列细胞的模式维持在细胞量内(图 10a)，并且 CD146 共染色显示该标记也以高水平在增殖的细胞组中表达(图 10b)。可能这些细胞中最重要的是在出现的细胞周边 AFP 染色  
10 的出现(图 11)。这代表了本文所述的离体操作的第一点，其中 AFP 表达可与初始的集落形成细胞的子代联系起来。这些数据表明实施例 6  
15 中分离的原肝干细胞可用于生产肝定向祖细胞。

## 实施例 9

### 来自新生儿供体的肝脏中原肝干细胞和近肝干细胞的存在

20 肝脏获自于在妊娠大约 28 周后出生且存活仅 1 天的供体。心脏停止与收集并冲洗供体器官之间的温和缺血周期在 6 和 7 小时之间。之后器官于冰上维持大约 12 小时。对整个器官(湿重大约 100 克)进行灌

注并用 Liberase 消化，制备细胞悬液，基本上如同获自于儿童或成人的肝脏那样。利用 Optiprep 通过预备离心除去非存活细胞及许多红血细胞。不过，难以确定最终制备物中存活的非红细胞的实际产率和百分比。

- 5       部分回收细胞通过差速离心进一步排除红血细胞，基本上如同胎儿肝脏细胞中所描述的那样，然后在适于测定原肝干细胞的存在的条件下（即，涂板到组织培养塑胶基质的激素成分确定的无血清培养基中）种植到培养物中。其它的部分细胞无需进一步纯化，在测定近肝干细胞的条件下（即，涂板到具有 STO 饲养细胞的化学成分确定的无血清培养基中）涂板。另外部分的细胞则种植到由 I 型胶原涂敷的组织培养塑胶的化学成分确定的无血清培养基中，含有或缺乏补充性的
- 10       5 ng/ml 表皮生长因子(EGF)。

- 在合适的温育期之后，在所有测试条件下观察到肝集落的生长。在原肝干细胞和近肝干细胞各自的测定中，集落形态和生长速率类似于在相同条件下在由人类胎儿肝脏（通常在妊娠小于 22 周之后获得）
- 15       培养的细胞中观察到的。通过免疫荧光染色测试了代表性集落的人类白蛋白表达，并且该标志都是阳性的。

- 具有明显上皮（假定是肝上皮）形态的集落在 EGF 的存在下出现在胶原涂敷的板上。另外的具有不太好定义的形态的细胞也在这些培养物中迅速生长，但尚未被详细表述特征。
- 20

假定是上皮细胞的集落也在不存在补充性 EGF 时出现在胶原涂敷的板上。这些集落中有些利用人工移液管装置单个挑取，并转移到

96 孔板的新鲜培养基中。来自某些集落的细胞在此类培养物中继续增殖, 并且作为细胞株传代。看起来很可能这些代表可繁殖的肝前身(可能是干细胞)潜在的克隆株。进一步描述包括 CD133、Ep-CAM、白蛋白、AFP 和 CK19 在内的抗原的特征, 将可确定这些推断的肝干细胞系的相对分化状态。

## 实施例 10

### 流式细胞仪分选和流式细胞仪分析(FACScans)

胞质抗原(例如, 白蛋白、AFP)的 FACScans 用由 3%聚甲醛固定和浸透的细胞在用抗血清染色之前进行。细胞如所显示的那样免疫荧光染色, 但使用由相关荧光探针直接标记的抗体(见表 3 和 4)。流式细胞术在 Cytomation "Moflow"流式细胞仪 (Fort Collins, Colorado) (由 Dr. Larry Arnold 指导的 FAC 设备)上进行。屏极流体为未修饰的 HBSS。MoFlow 细胞仪能够分析或分选 40,000 个细胞/秒, 并行的参数达 12 个 (6 种“颜色”与正向散射和/或侧向散射的组合)并且精确度大于 99%。对于多数分选, 使用 4W 氩激光和 60 mW 功率以及 100  $\mu$ m 喷嘴。在穿过 530/30 nm 的 FITC 带通过滤器后收集 488 nm 激发的荧光发射。荧光通过对数放大测量。当荧光大于阴性对照细胞的 95%时, 则认为细胞是阳性的。中程放大倍数的 E-1 检测器值用于正向散射 (FSC), 而中程检测器以放大倍数 1 用于侧向散射(SSC)。通过线性放大进行 SSC 门控, 将参数分成 256 个任一的氮源。未染色的细胞、以及由无关抗体和相同的荧光探针、或者用相同抗体但不用荧光探针染

色的细胞用作为阴性对照。在每个样品中,测定 30,000-50,000 个细胞。具有比阴性对照更大的荧光的阳性细胞,被进一步评价粒度、大小和荧光程度。分选前后的细胞于 4℃ 维持在 HDM 中,其中添加 10%血清。

5 表 3. 单克隆抗体

| 抗体(均在小鼠中制备)                 | 同型/稀释度                           | 靶抗原(均为人类)                  | 商业来源                     |
|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------|--------------------------|
| CD45 (31254X; 31255X)       | IgG <sub>1</sub> Kappa/1:        | 所有造血细胞上的通用白细胞抗原            | Pharmingen               |
| CD 235A (32591A)            | IgG <sub>2b</sub> Kappa/1:       | 血型糖蛋白 A (红细胞抗原)            |                          |
| CD14 (APC)                  | IgG <sub>2a</sub> Kappa/1:       | 提呈在单核细胞、树突细胞上的抗原(内毒素受体之一)  |                          |
| CD34 (34374X)               | IgG <sub>1</sub> Kappa/1:        | 提呈在多种祖细胞群上的干细胞抗原           |                          |
| CD38 (31015X; 31014X)       | IgG <sub>1</sub> Kappa/1:        | 提呈在 B 细胞、胸腺细胞和激活的 T 细胞上的抗原 |                          |
| CAM 5.2                     | IgG <sub>2a</sub> /1:500         | 管层上的 CAM                   |                          |
| CD117 (CD11704)<br>(MHCK04) | IgG <sub>1</sub> /1:             | c-kit: 干细胞因子受体             | Caltag                   |
| CD31                        | IgG <sub>1</sub> /1:250          | PE-CAM: 内皮细胞上的 CAM         |                          |
| ALB (A-6684)                | IgG <sub>2a</sub> /1:120         | 白蛋白                        | Sigma, St.<br>Louis, Mo. |
| CD56                        | IgG <sub>1</sub> /1:250          | N-CAM: 某些神经元和管层上的 CAM      |                          |
| AFP (18-0003)               | IgG <sub>1</sub> Kappa<br>/1:250 | AFB                        | Zymed                    |
| CK 8/18                     | IgG <sub>1</sub> /1:1000         | 上皮细胞的细胞角蛋白类                |                          |
| CD146                       | IgG <sub>1</sub> /1:250          | M-CAM: 见于内皮细胞              | Chemicon,                |

|        |                         |                           |                    |
|--------|-------------------------|---------------------------|--------------------|
| CD133  | IgG <sub>1</sub> /1:    | AC133, 干细胞标志              | Mylteni<br>Biotek, |
| Ep-CAM | IgG <sub>1</sub> /1:750 | 多数上皮祖细胞上的 CAM             | Neomarkers         |
| CK-19  | IgG <sub>1</sub> /1:300 | 细胞角蛋白-19,胆上皮细胞<br>特异性的角蛋白 | NovCastra          |

表 4. 荧光探针

| 荧光探针                                  | 颜色  | 最大吸光度/最大发射 | 11.来源                                   |
|---------------------------------------|-----|------------|-----------------------------------------|
| FITC                                  | 绿   | 494/525    | Sigma, St. Louis, Mo                    |
| 藻红蛋白(PE)                              | 黄   | 480/578    | Molecular Probes,<br>Eugene, Oregon     |
| Alexa 488                             | 绿   | 495/519    |                                         |
| 7-AAD (A-1310)<br>不带抗体使用, 以消除<br>死亡细胞 | 红   | 488/650    |                                         |
| Cy-5                                  | 远红外 | 649/670    | Jackson Labs, West<br>Row, Pennsylvania |
| AMCA                                  | 蓝   | 350/450    |                                         |

对于胞浆抗原（如白蛋白、AFP）的流式细胞仪分析，在由抗血

5 清染色前，细胞用 3%多聚甲醛固定并浸泡。对于使用双标志的分析，

将使用由截然不同的荧光探针并且波长不重叠的第二抗体。分析利用

Becton Dickenson FACscan 进行。仅被第二抗体染色的细胞用作为阴

性对照。在各样品中，测定 30,000-50,000 个细胞。比阴性对照具有更

大荧光的阳性细胞被进一步评估粒度、大小和荧光程度。

## 实施例 11

### 在获自于胚胎组织的肝细胞悬液中白蛋白和 $\alpha$ -胎蛋白表达的测定

在该实验中，检查了白蛋白和  $\alpha$ -胎蛋白在近肝干细胞和原肝干细  
5 胞中的表达。最初确定了沉淀级分中富集肝母细胞（近肝干细胞），  
而界面富集集落形成细胞（原肝干细胞）。

在新鲜分离的细胞以及培养 10 天后的细胞中，白蛋白表达在界面  
和沉淀细胞中都不相上下。不过，培养物中的表达消失。这可能是归  
因于（白蛋白）更低的表达或者白蛋白阴性的非实质细胞的增殖。对  
10 培养物的观察显示两者都促成了这种模式(图 20)。

AFP 在新鲜分离的沉淀级分中强烈表达，而在界面细胞中微弱表  
达。这与观察到的 AFP 不在集落细胞中表达是一致的。培养 10 天后，  
AFP 在沉淀或界面细胞中不可检测。培养物中的集落细胞表达白蛋白  
而非 AFP。这可能是由于导致 AFP 在所有细胞中的表达抑制的条件  
15 （塑胶培养）所致。然而，界面细胞中的低 AFP 表达提示 AFP 在这  
些细胞中从不强烈表达(图 20)。并且，当集落细胞在支持沉淀细胞中  
延长的 AFP 表达的条件(STO 共培养)下培养时，它们仍然是 AFP 表达  
阴性的。与白蛋白或  $\alpha$ -胎蛋白结合的抗体之间没有交叉反应性，而且  
在空泳道上未观察到信号。

20 因此这些实验的结果证明 AFP 在新鲜分离的沉淀级分中强烈表  
达，而在界面细胞中仅微弱表达。这与观察到的 AFP 不在集落细胞中  
表达是一致的。

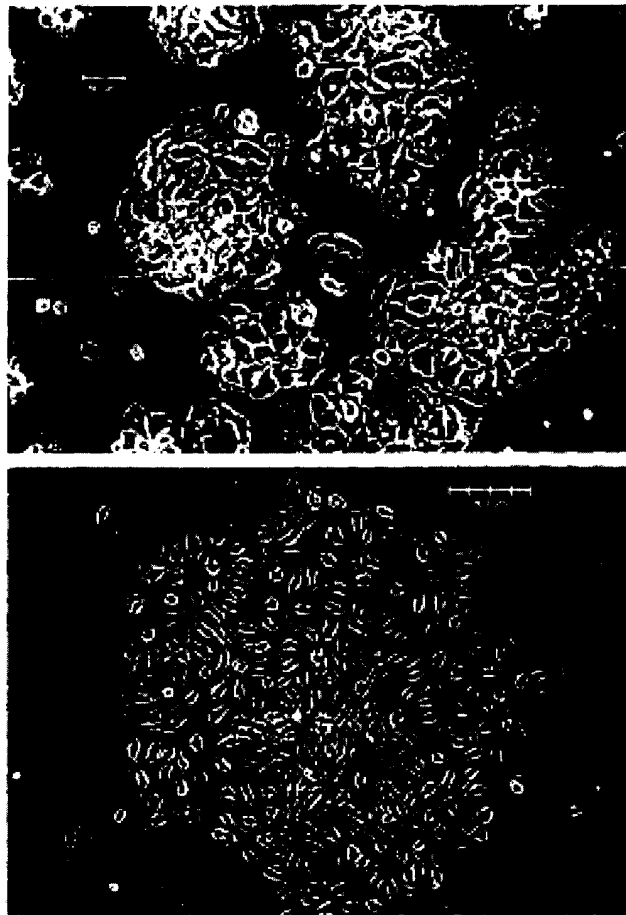


图1

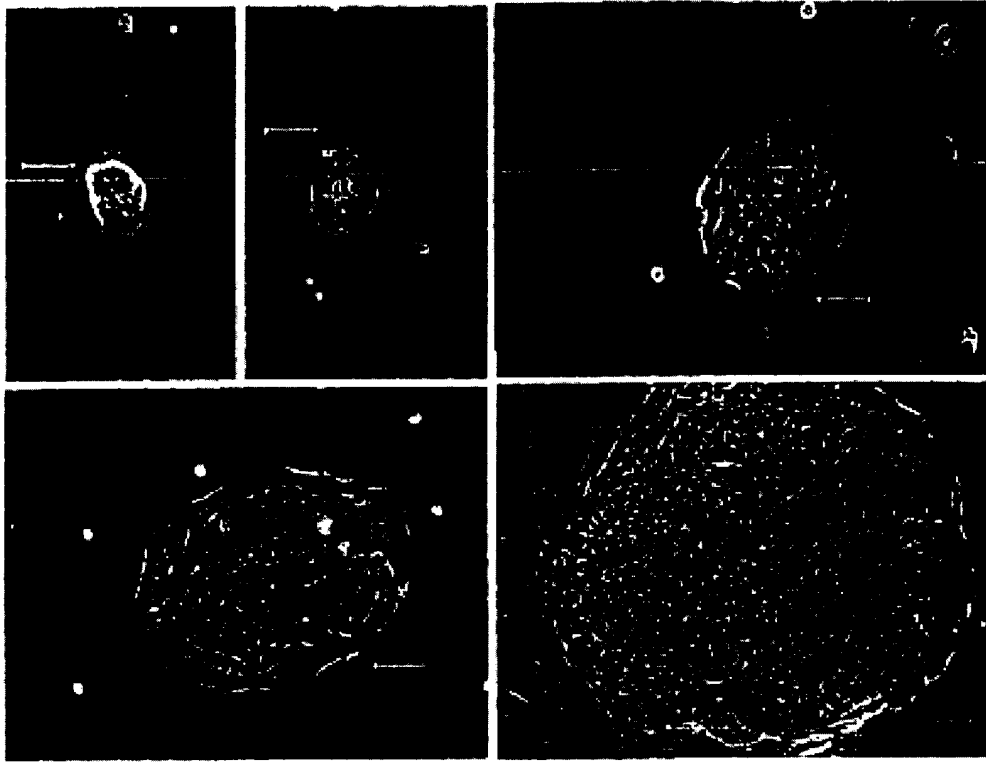


图2

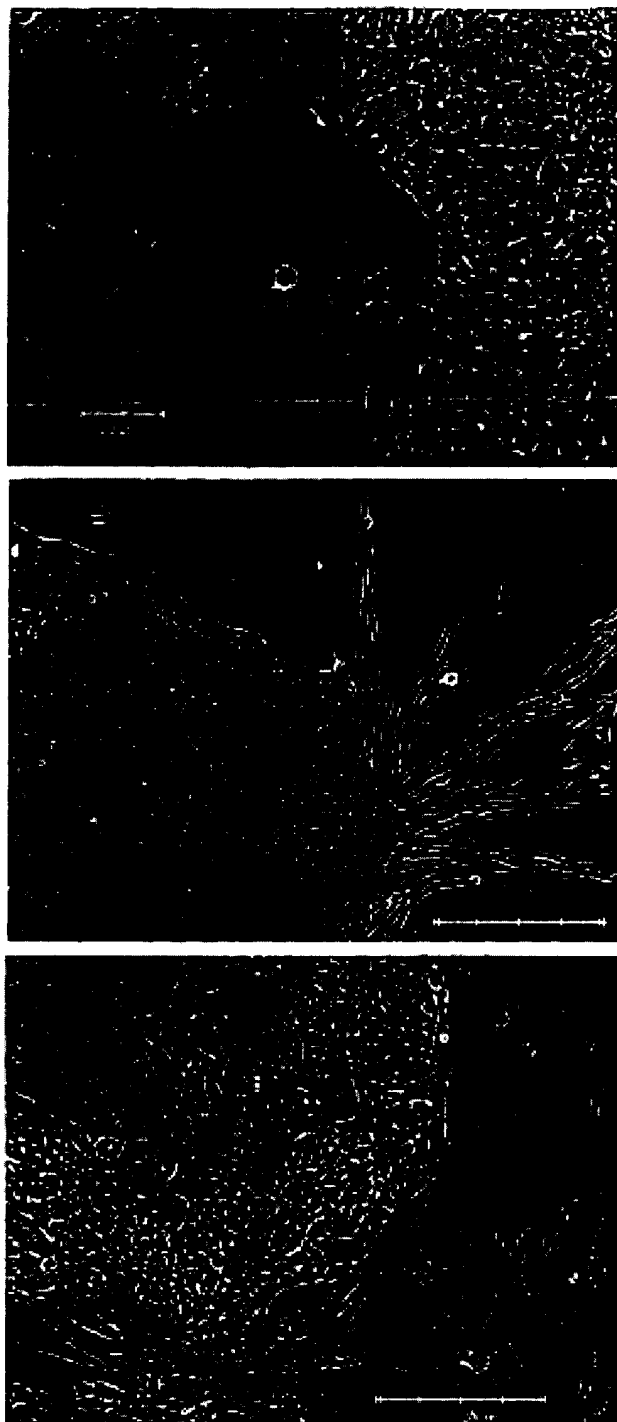


图3

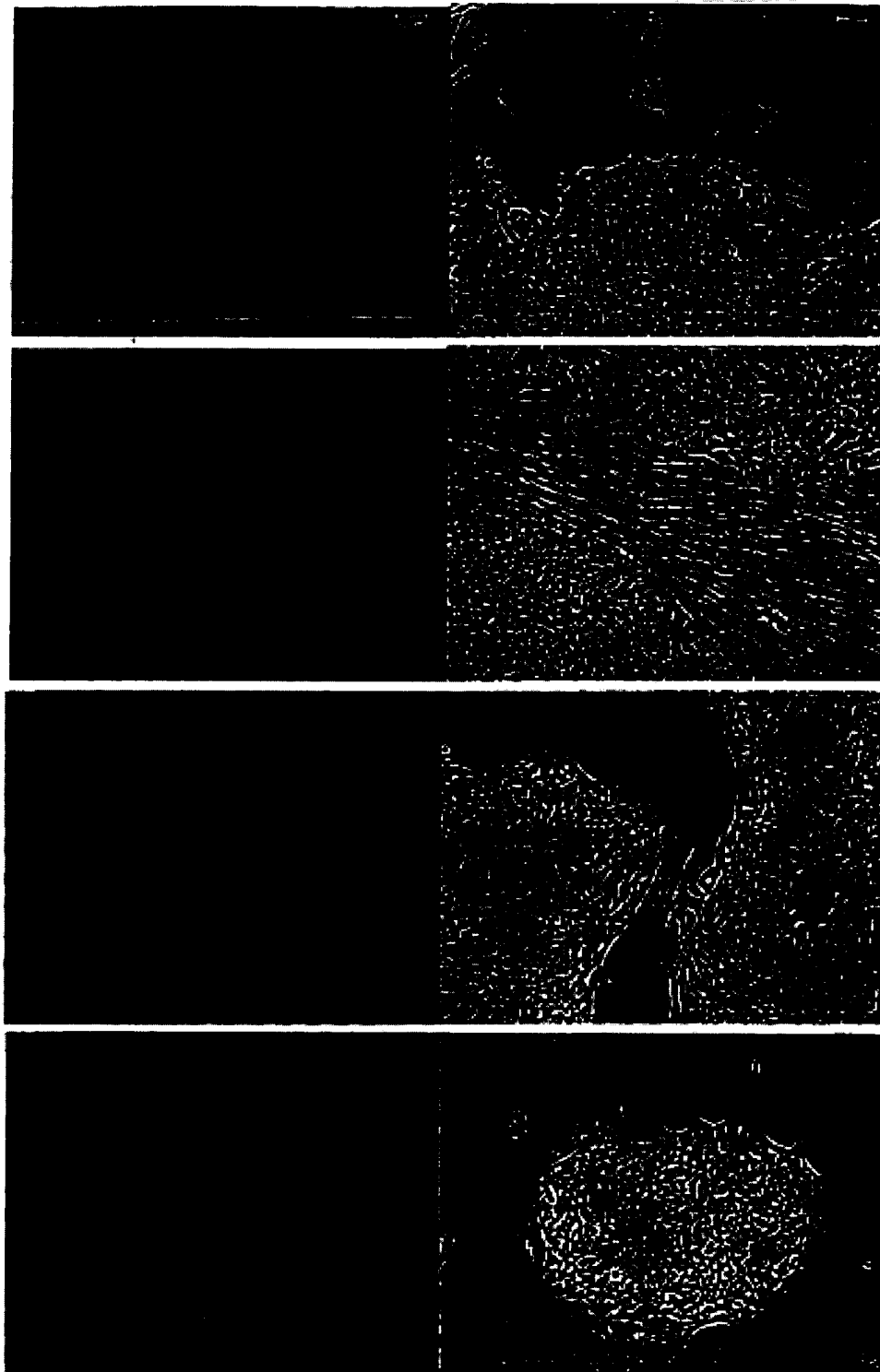


图4

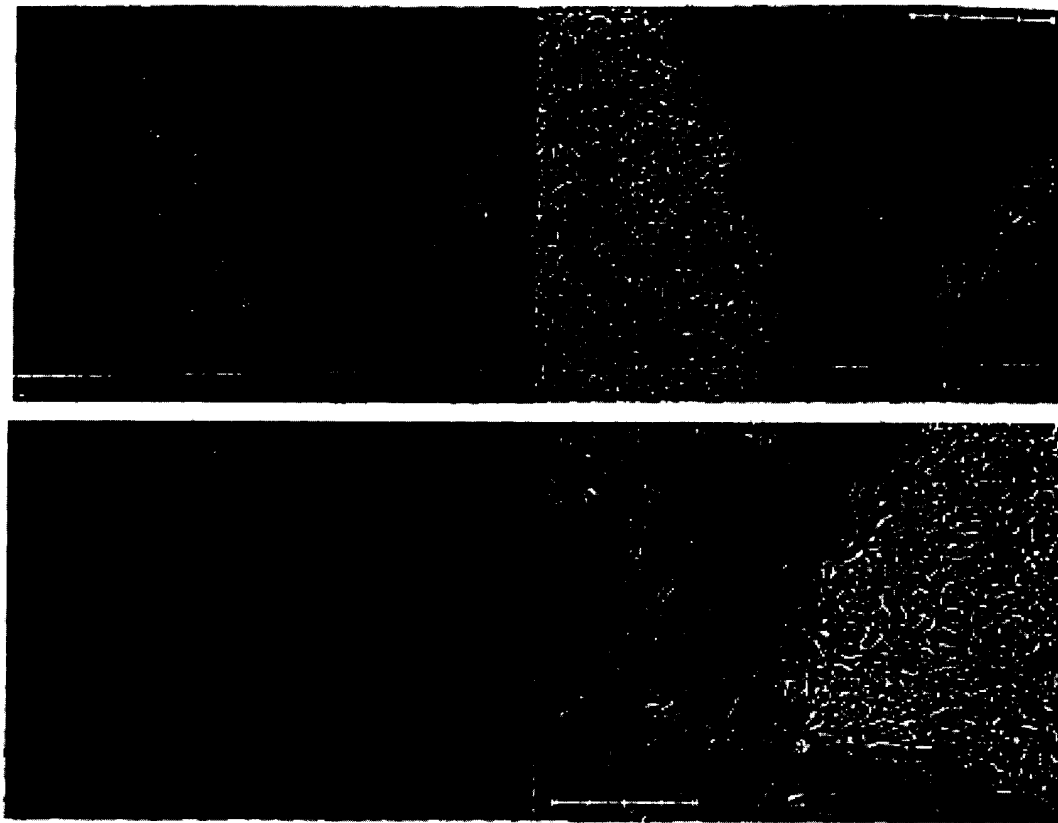


图5

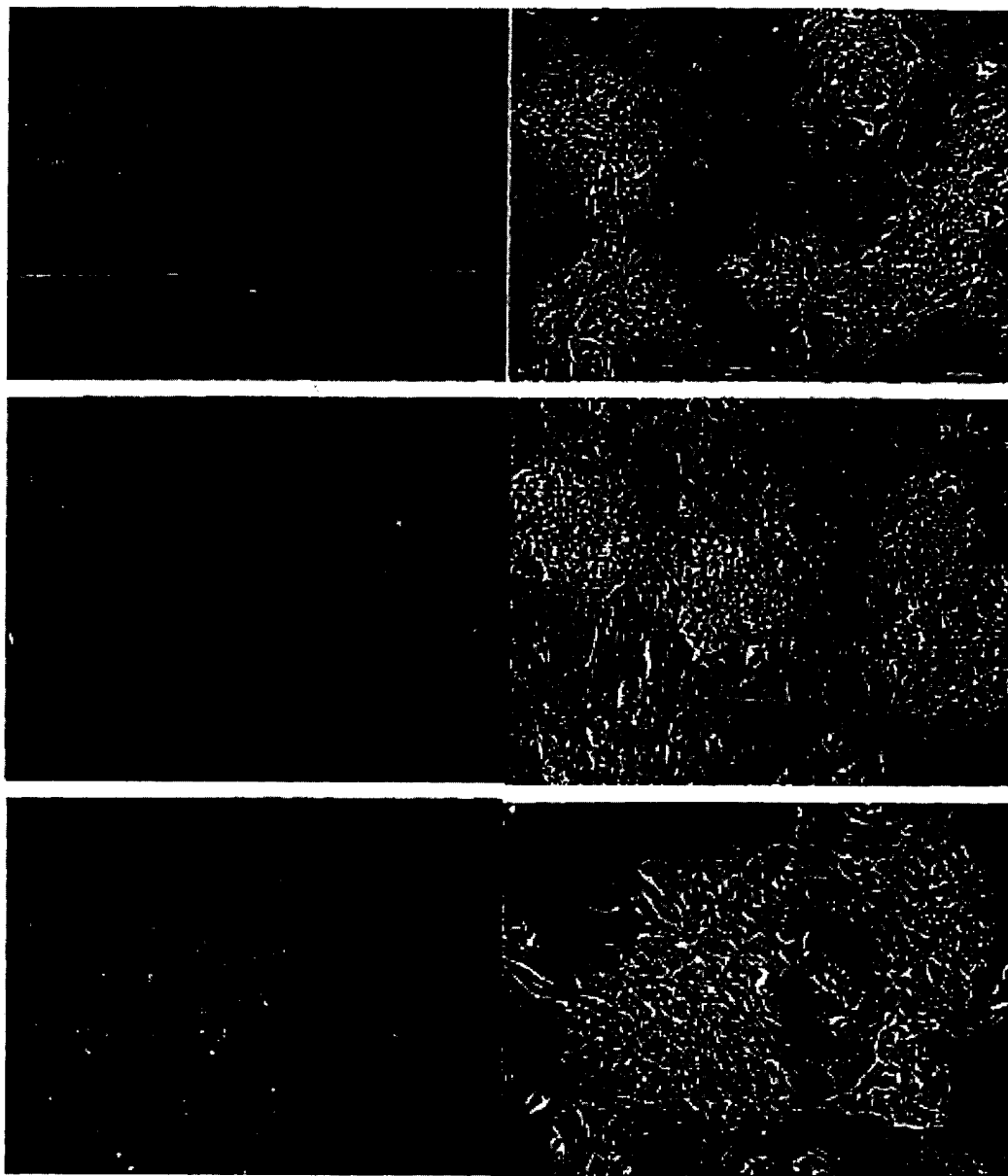


图6

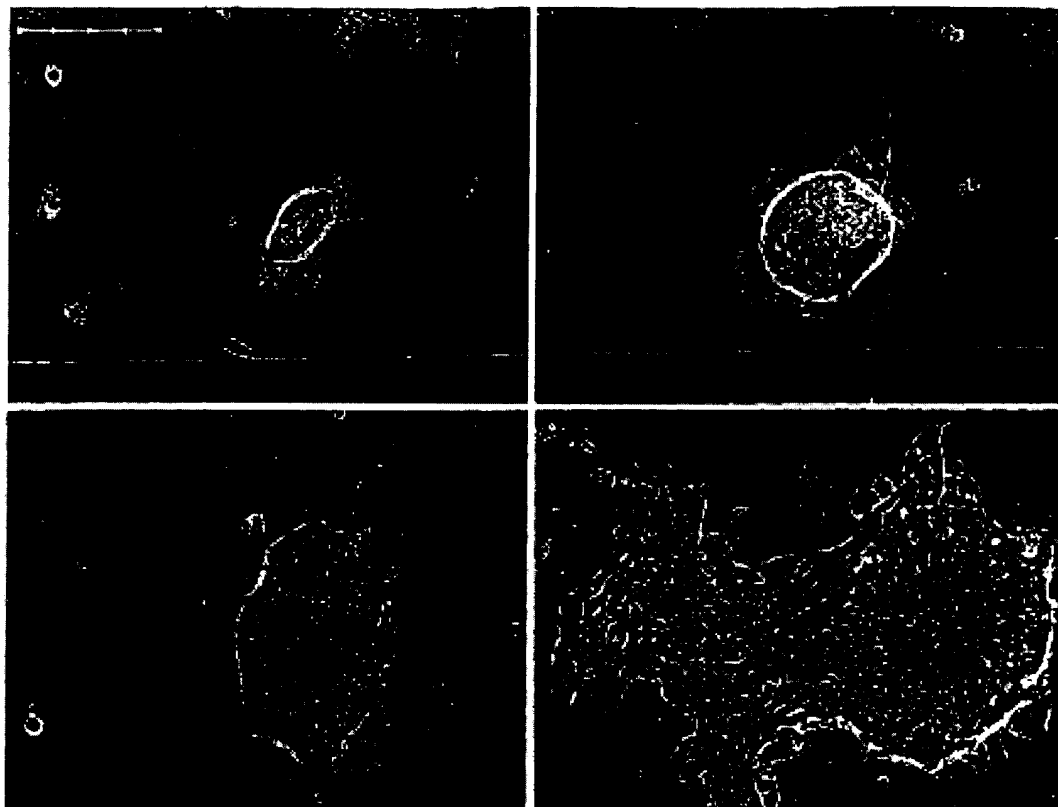


图7

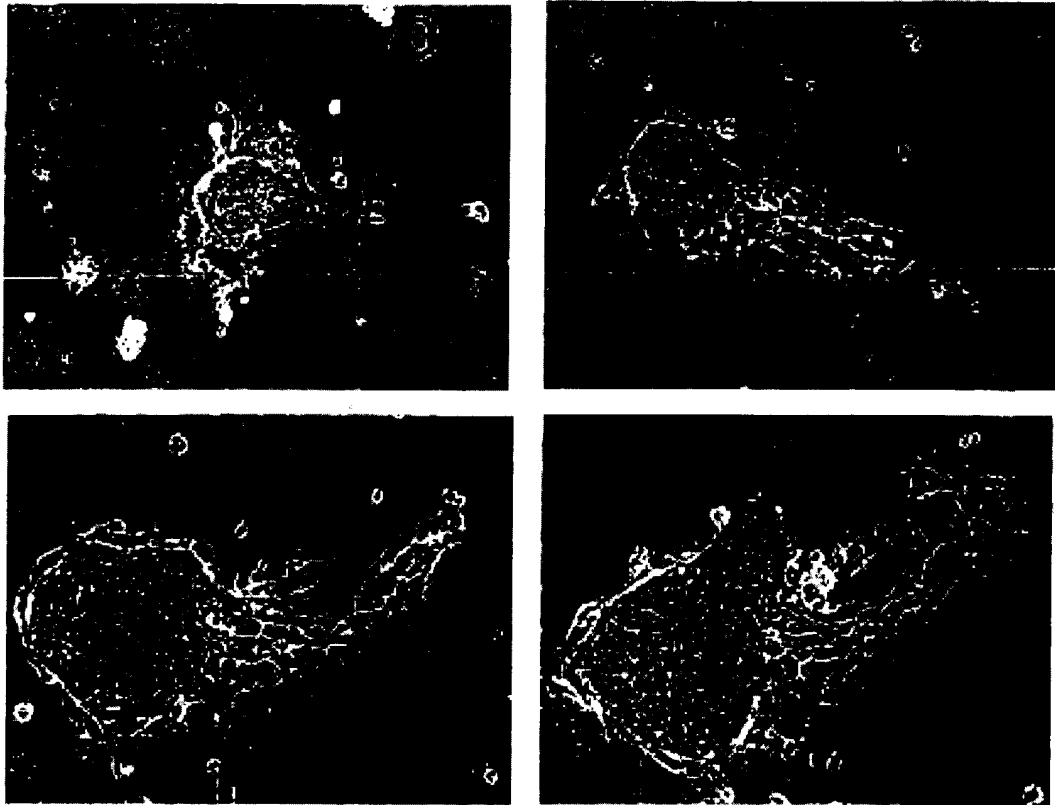


图8

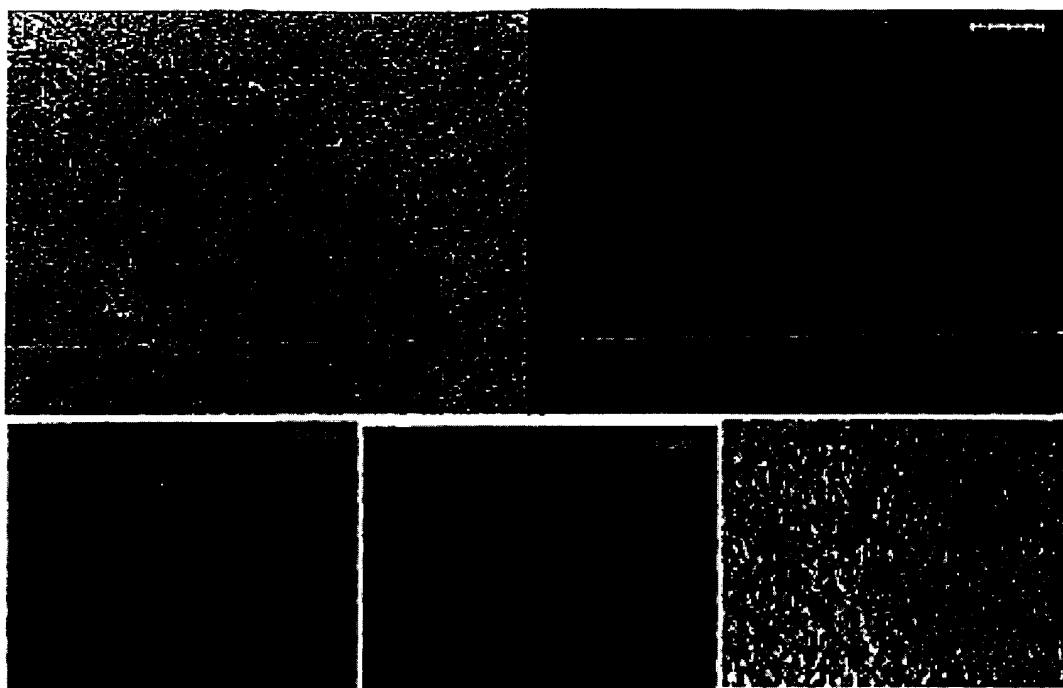


图9

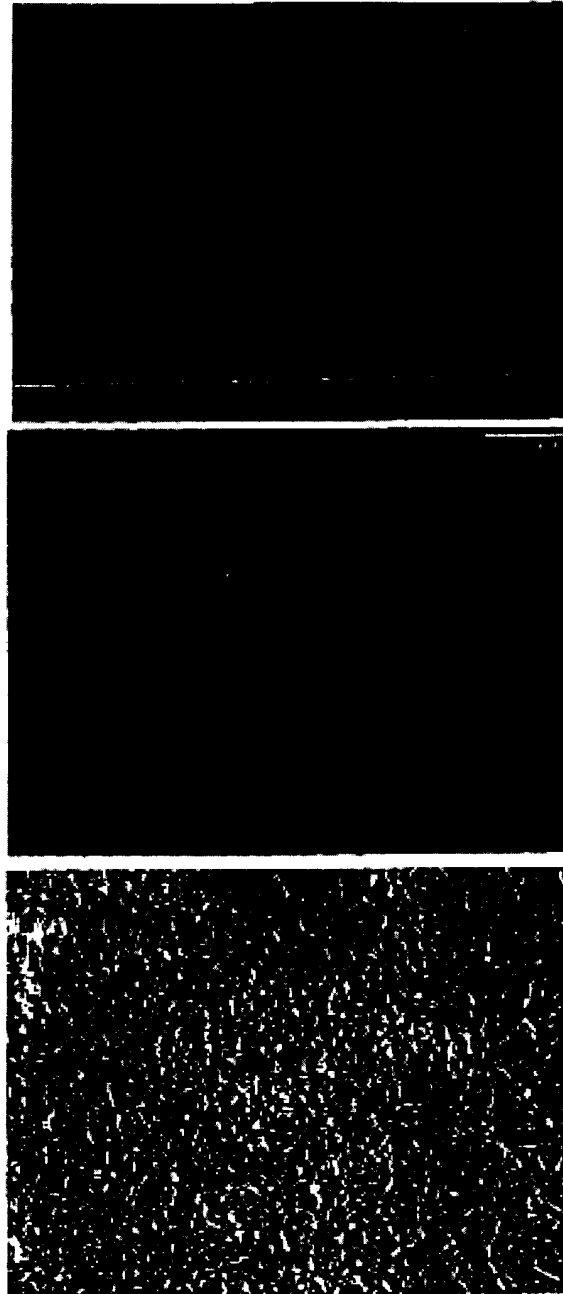


图10

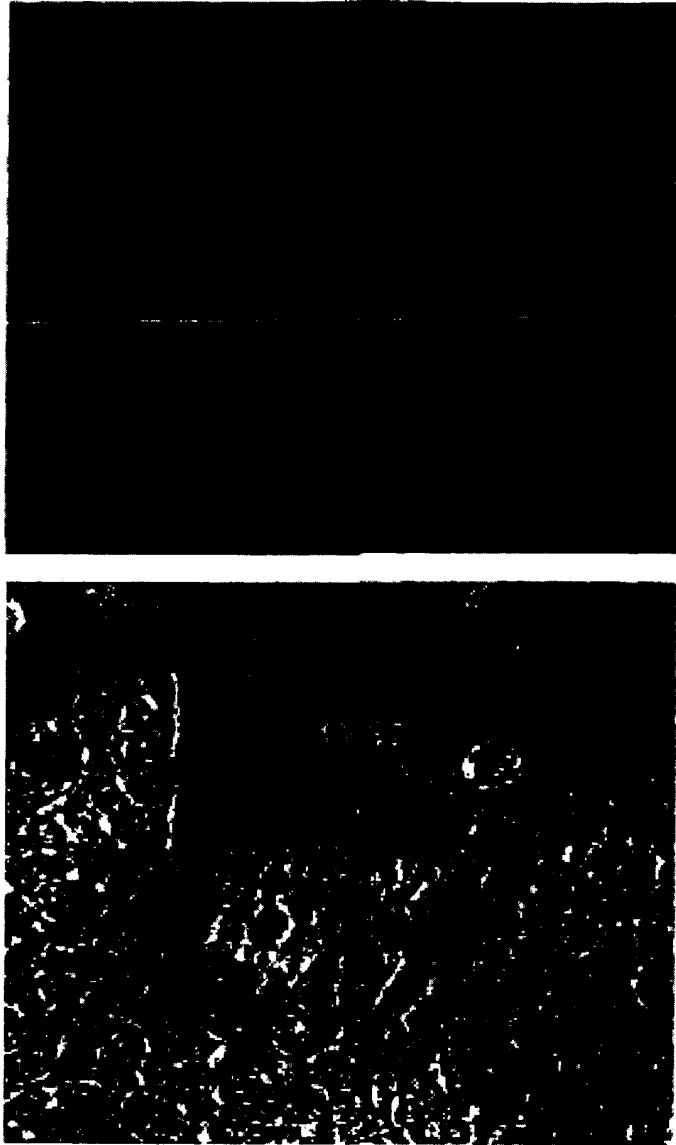


图11

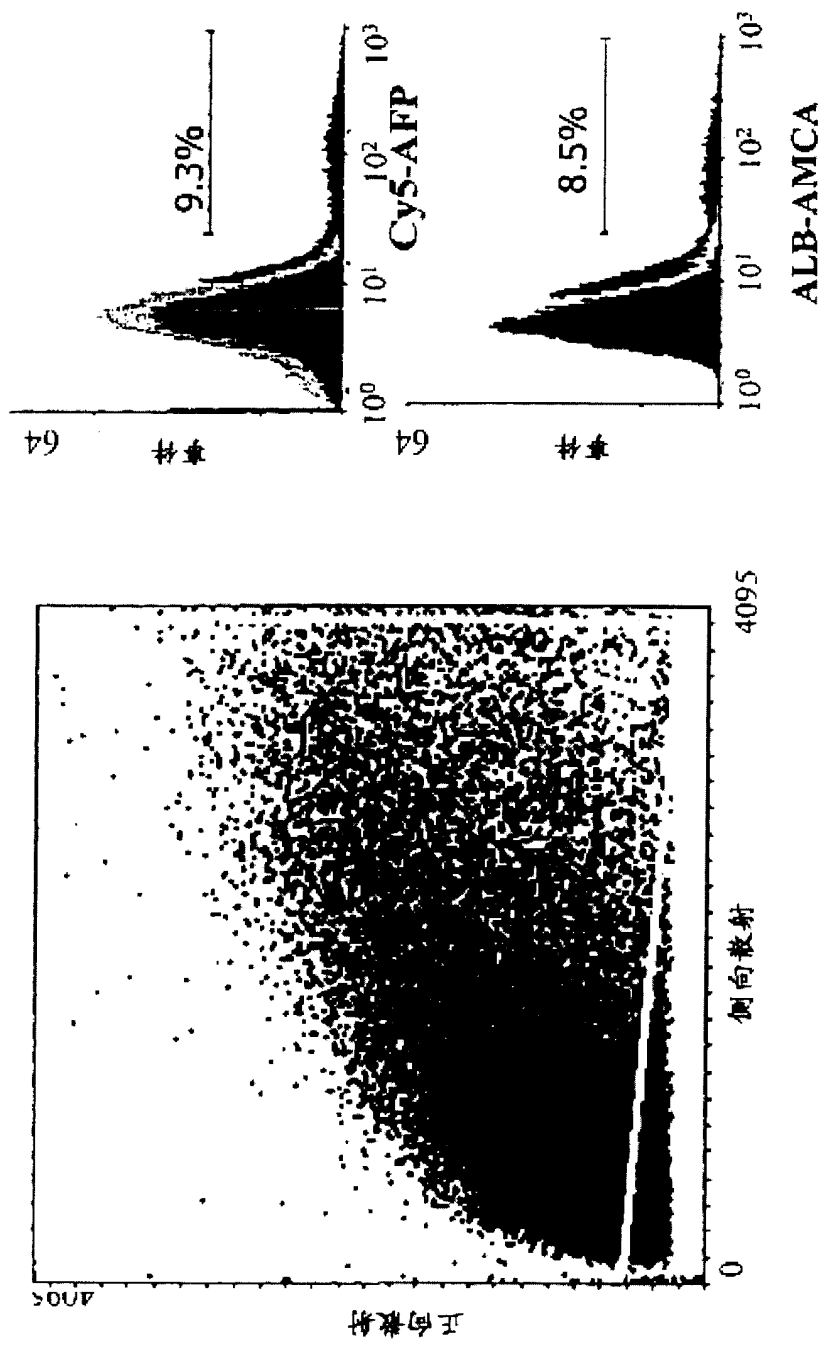


图 12 原始细胞悬液中 AFP 和蛋白质的表达

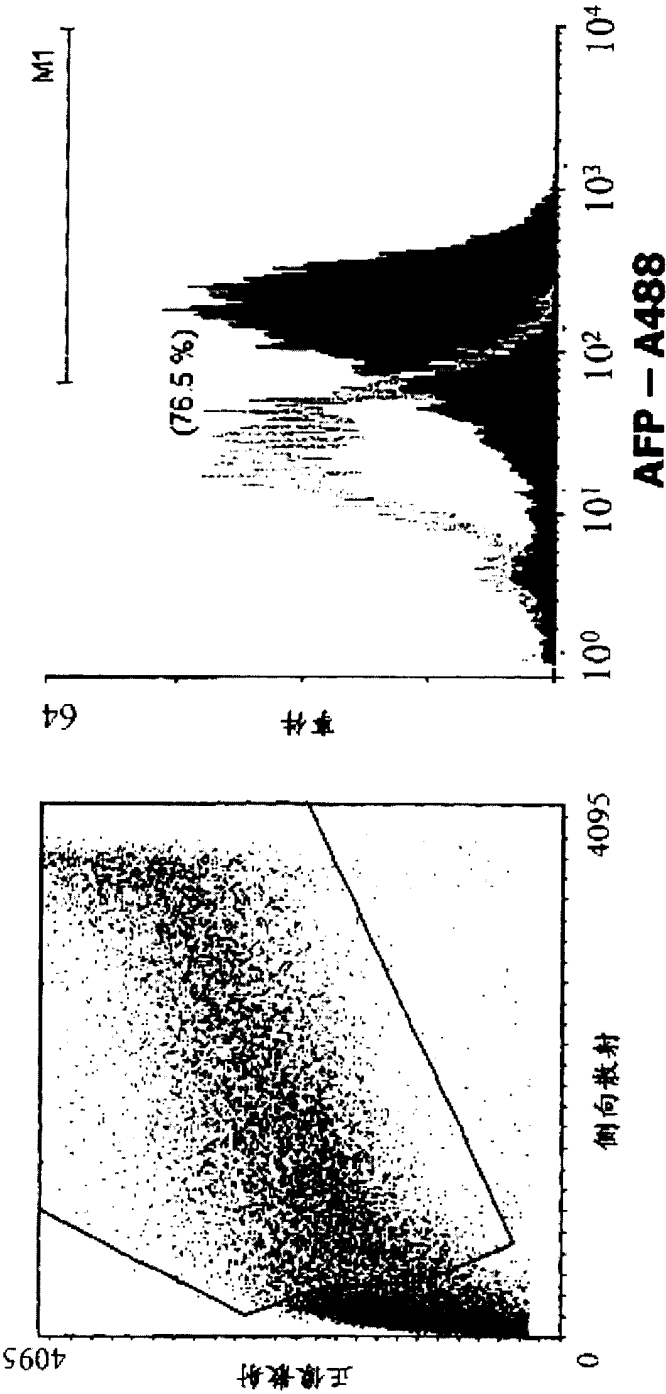


图 13 肝实质细胞制备物中的 AFP 表达

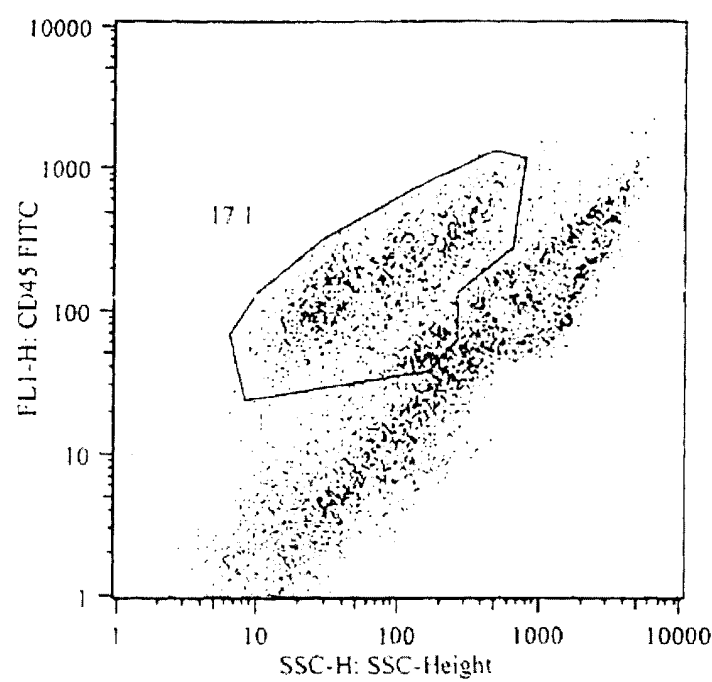


图14A

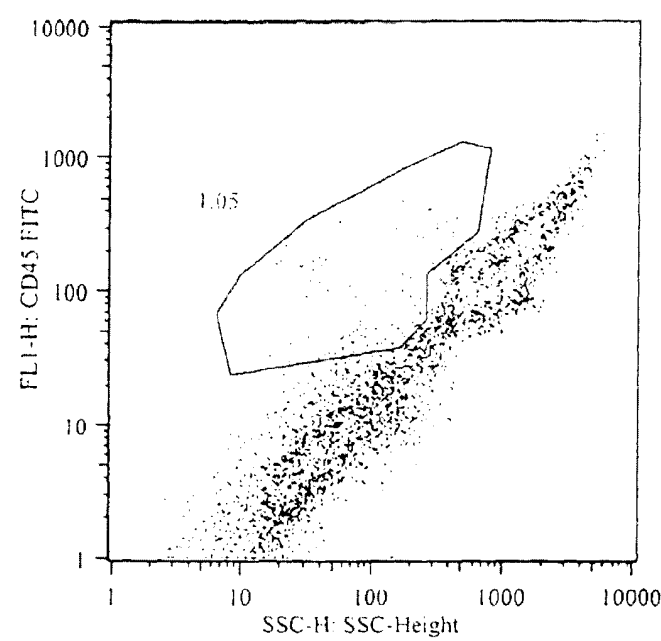


图14B

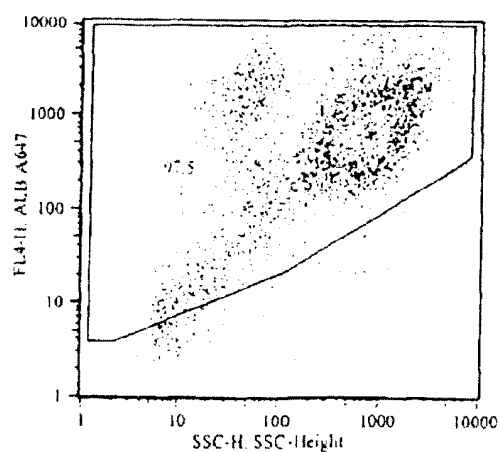


图15A 白蛋白在CD-45排除人肝细胞中的表达

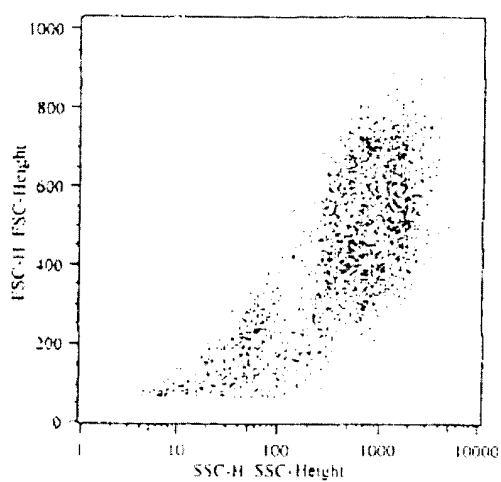


图15B 白蛋白阳性人肝细胞的光散射（正向和侧向）

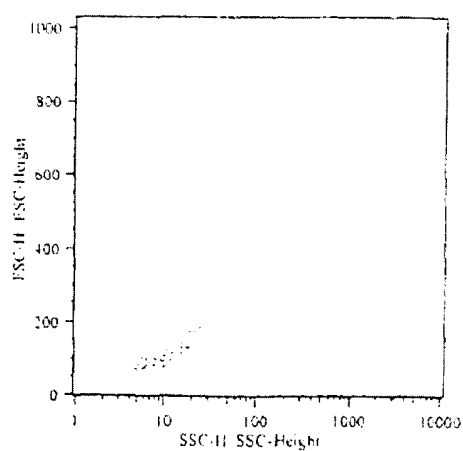


图15C 白蛋白阴性人肝细胞的光散射（正向和侧向）

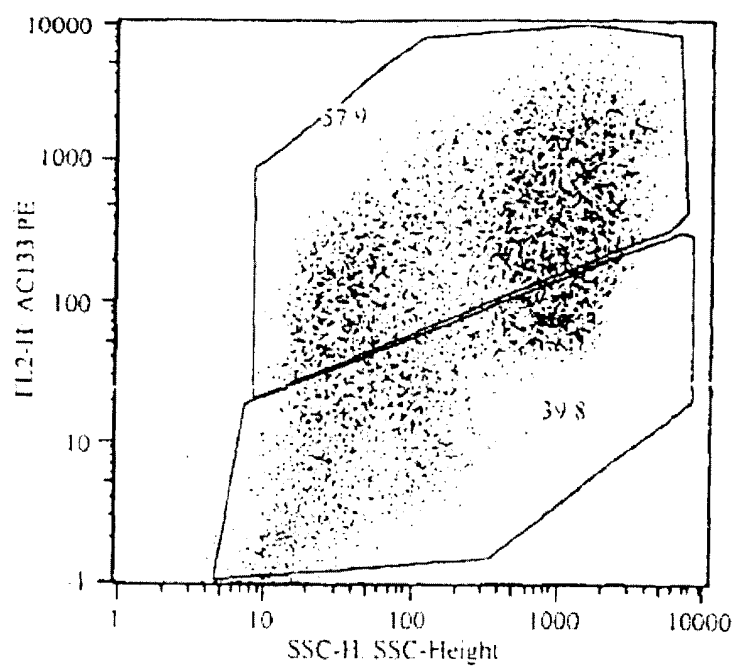


图16A CD133在成人肝细胞中的表达

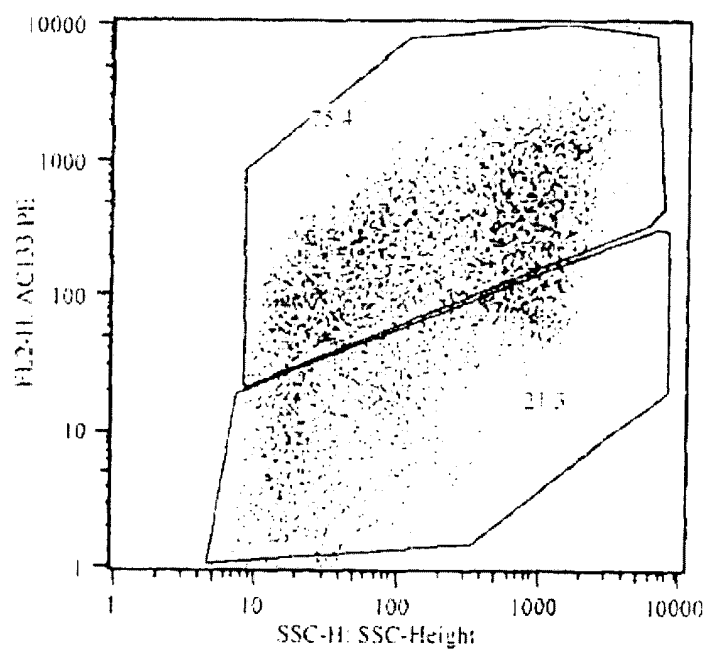
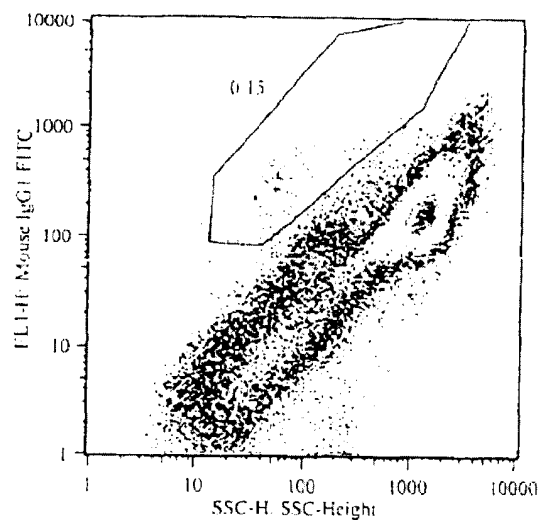
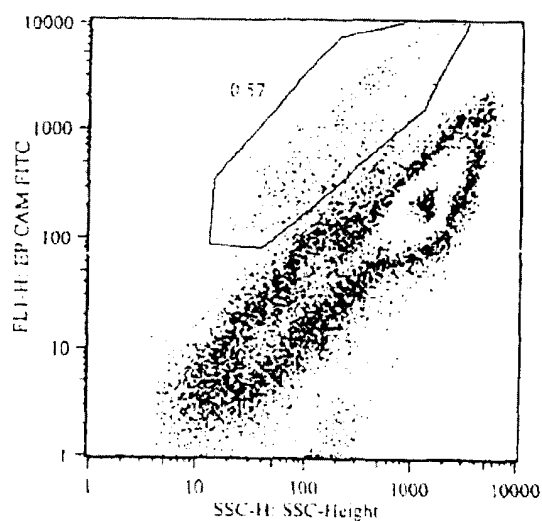


图16B CD133阳性成人肝细胞通过磁性细胞分选的富集

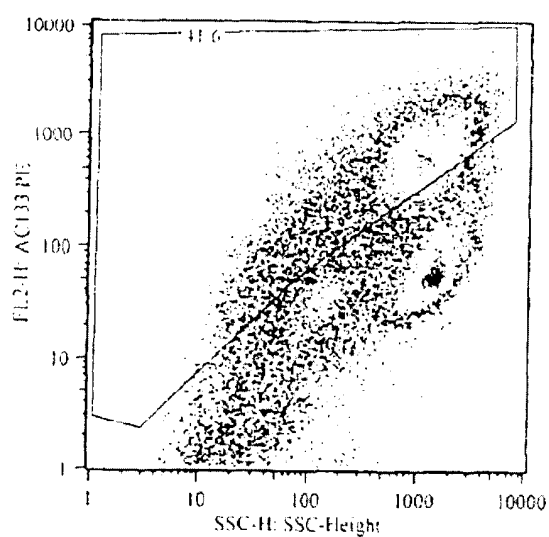


A

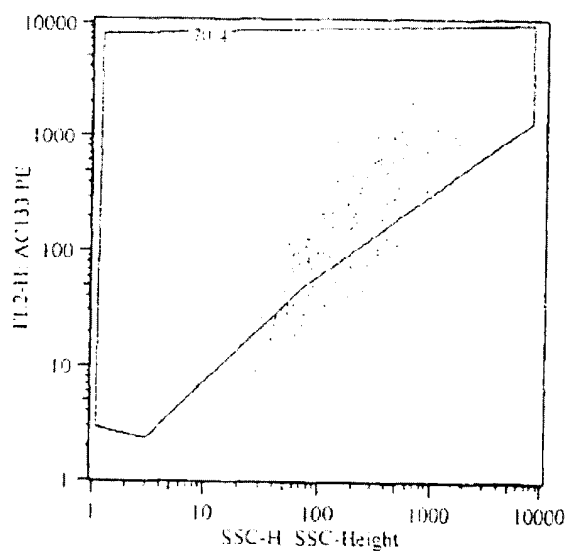


B

图17A和B 具有阳性对照抗体(A)及EP-CAM抗体(B)的CD45排除人肝细胞的着色的FACS分析



C



D

图17C和D 具有CD133抗体的CD45排除人肝细胞(C)和共达CD133的EP-CAM的阳性细胞(D)的着色的FACS分析

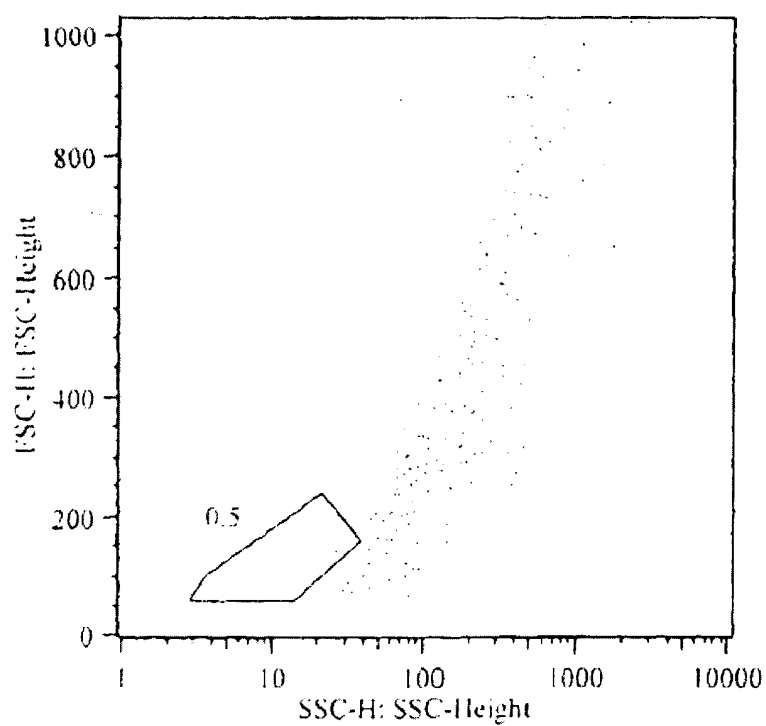
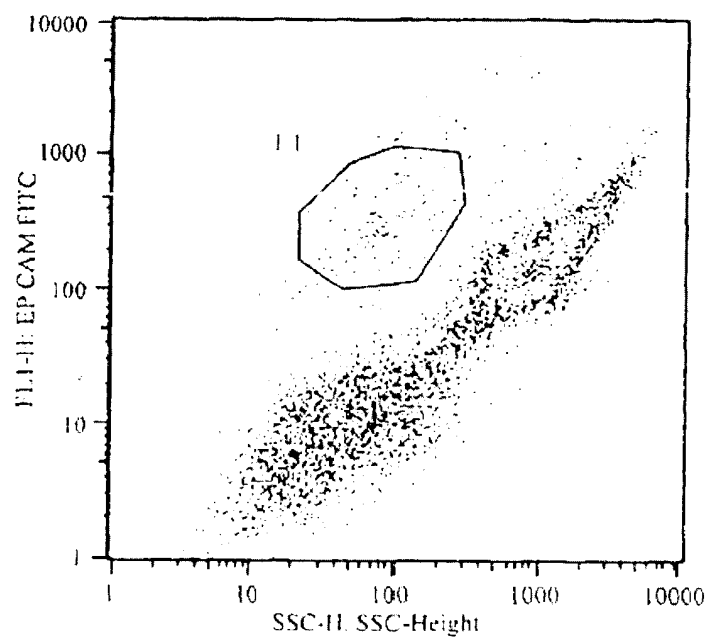
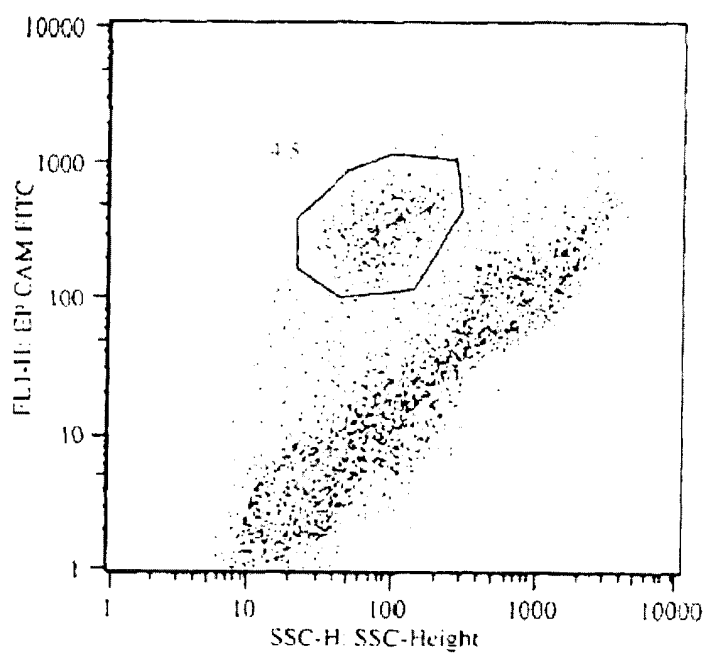


图17E CD133阳性和EP-CAM阳性细胞的双重光散射分析



A



B

图18 具有阳性对照抗体(A)和EP-CAM抗体(B)的CD45排除人肝细胞的着色的FACS分析

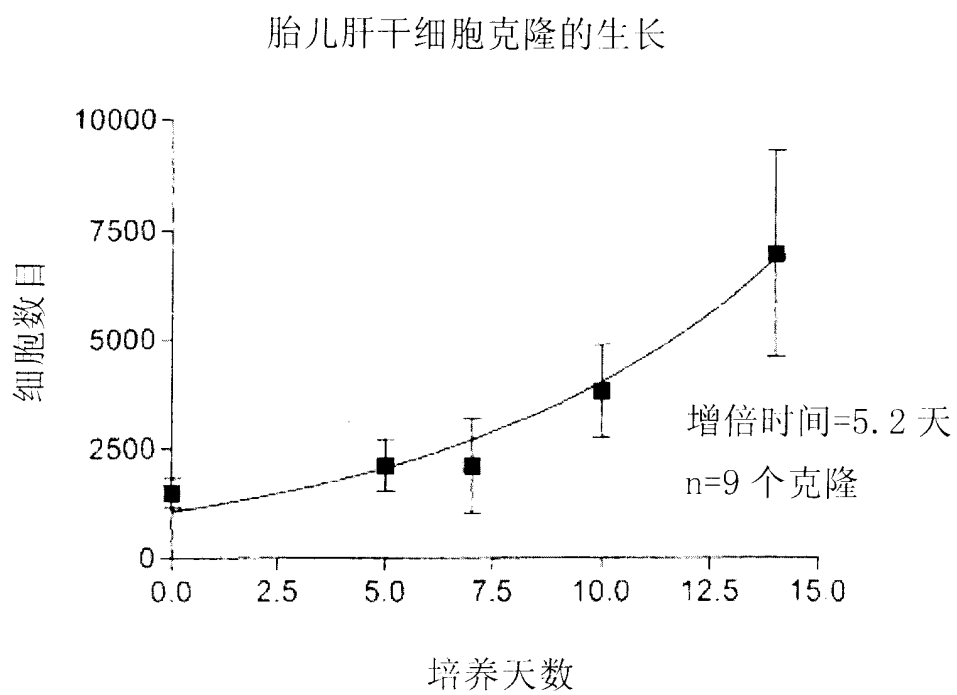
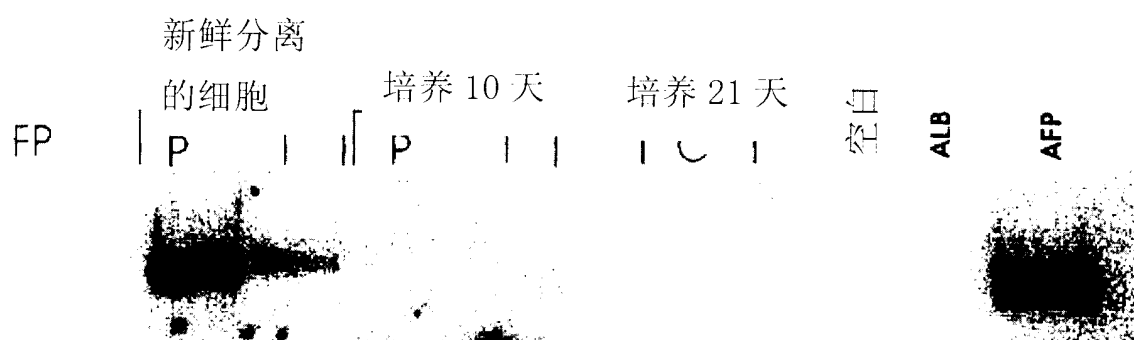
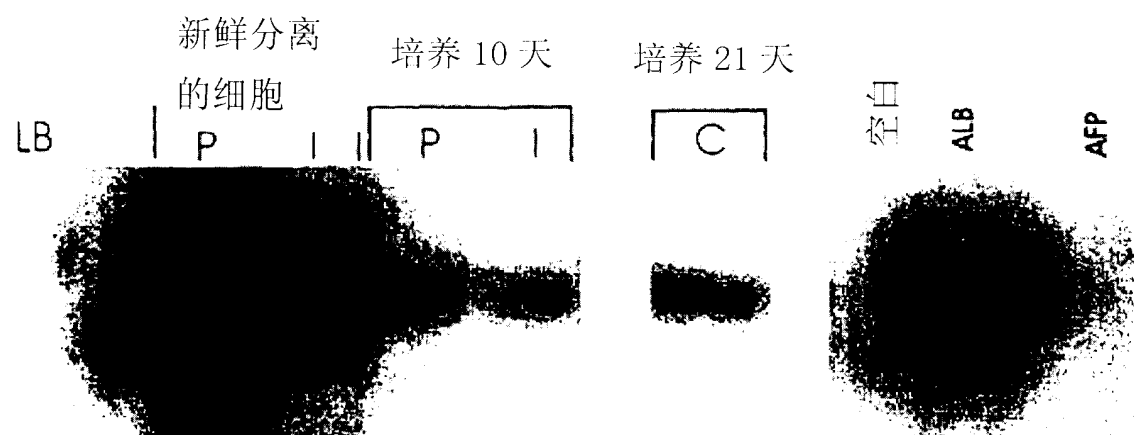


图19



P: Ficoll 沉淀组分

I: Ficoll 界面组分

C: 挑选的克隆细胞

在塑胶上培养细胞

10ug 蛋白/井

图20