



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108601799 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201680077403.3

(22)申请日 2016.11.04

(30)优先权数据

62/250,664 2015.11.04 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.06.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/060624 2016.11.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/079621 EN 2017.05.11

(71)申请人 德克萨斯大学系统董事会

地址 美国得克萨斯州

(72)发明人 特拉维斯·布洛克

米洛斯·马林科维奇 陈晓东

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 郑斌 彭鲲鹏

(51)Int.Cl.

A61K 35/28(2015.01)

C12N 5/0775(2010.01)

C12Q 1/02(2006.01)

A61P 39/06(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

A61P 19/08(2006.01)

A61P 19/10(2006.01)

A61P 21/00(2006.01)

A61P 9/10(2006.01)

A61P 25/16(2006.01)

A61P 25/28(2006.01)

A61P 1/02(2006.01)

A61P 27/02(2006.01)

A61P 11/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书26页 附图31页

(54)发明名称

从年长细胞群中富集和扩增高潜能人间充质干细胞

(57)摘要

用于恢复间充质干细胞的再生能力以及从间充质干细胞的质量和/或数量降低的人(例如年长者)的骨髓基质细胞中分离和扩增缺陷较低的间充质干细胞的小亚群的方法、使用其的治疗和用于其的装置。

1. 向对象施用小尺寸骨髓来源间充质干细胞 (BM-MSC) 的方法, 所述方法包括:
 - (a) 从第一供体收获第一 BM-MSC 组群,
 - (b) 根据尺寸和任选的 SSEA-4 表达来分选来自步骤 (a) 的所述 BM-MSC,
 - (c) 分离所述小尺寸 BM-MSC,
 - (d) 将所述小尺寸 BM-MSC 平板接种以进行培养,
 - (e) 扩增培养中的所述小尺寸 BM-MSC,
 - (f) 任选的储存来自步骤 (e) 的所述小尺寸 BM-MSC, 以及
 - (g) 将来自步骤 (e) 和/或 (f) 的所述小尺寸 BM-MSC 施用于所述对象。
2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其中所述对象与所述第一供体相同。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法, 其中所述小尺寸 BM-MSC 当在悬浮液中测量时具有小于 30 微米的中值直径。
4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法, 其中所述小尺寸 BM-MSC 在分离时表达 SSEA-4 (SSEA-4+)。
5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法, 其中所述对象为 50 岁或更年长。
6. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法, 其中所述对象为 65 岁或更年长。
7. 根据权利要求 1 至 4 中任一项所述的方法, 其中所述对象为 70 岁或更年长。
8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项所述的方法, 其中将所述小 BM-MSC 培养在 TCP 上或培养在来源于从第二供体获得的第二 BM-MSC 组群的细胞外基质 (ECM) 上。
9. 根据权利要求 8 所述的方法, 其中所述第二供体为 25 岁或更年轻。
10. 根据权利要求 1 至 8 中任一项所述的方法, 其中所述对象具有降低的 BM-MSC 数量和/或质量, 和/或需要干细胞治疗。
11. 根据权利要求 1 至 10 中任一项所述的方法, 其中所述对象患有年龄相关性退行性疾病, 和/或患有损害 BM-MSC 的数量或质量的疾病或病症, 和/或已经或将接受损害 BM-MSC 的数量或质量的治疗。
12. 细胞培养系统, 其包含培养基和分离自从第一供体获得的第一 BM-MSC 组群的分离的小尺寸 BM-MSC, 其中所述分离的小尺寸 BM-MSC 在分离时表达 SSEA-4 (SSEA-4+), 其中所述细胞培养系统不包含在分离时不是小尺寸的 BM-MSC 或在分离时不表达 SSEA-4 的 BM-MSC, 并且其中所述第一供体在提供所述第一 BM-MSC 组群时为 65 岁或更年长。
13. 根据权利要求 12 所述的细胞培养系统, 其中所述分离的小尺寸 BM-MSC 当在悬浮液中测量时具有小于 30 微米的中值直径。
14. 根据权利要求 12 或 13 所述的细胞培养系统, 其中所述细胞培养系统还包含来源于第二 BM-MSC 组群的细胞外基质 (ECM) 。
15. 根据权利要求 14 所述的细胞培养系统, 其中所述第二 BM-MSC 组群从 25 岁或更年轻的第二供体获得。
16. 根据权利要求 12 至 15 中任一项所述的细胞培养系统, 其中所述第一供体在提供所述第一 BM-MSC 组群时具有降低的 BM-MSC 数量和/或质量, 和/或患有年龄相关性退行性疾病, 和/或患有损害 BM-MSC 的数量或质量的疾病或病症。
17. 组合物, 其包含分离自从第一供体获得的第一 BM-MSC 组群的分离的小尺寸 BM-MSC, 其中所述分离的小尺寸 BM-MSC 在分离时表达 SSEA-4 (SSEA-4+), 其中所述组合物不包含在

分离时不是小尺寸的BM-MSc或在分离时不表达SSEA-4的BM-MSc,并且其中所述第一供体在提供所述第一BM-MSc组群时为65岁或更年轻。

18.根据权利要求17所述的组合物,其中所述分离的小尺寸BM-MSc当在悬浮液中测量时具有小于30微米的中值直径。

19.根据权利要求17或18所述的组合物,其中所述组合物还包含载体。

20.根据权利要求17至19中任一项所述的组合物,其中所述分离的小尺寸BM-MSc在来源于第二BM-MSc组群的ECM上培养。

21.根据权利要求20所述的组合物,其中所述第二BM-MSc组群从25岁或更年轻的第二供体获得。

22.根据权利要求17至21中任一项所述的组合物,其中所述第一供体在提供所述第一BM-MSc组群时具有降低的BM-MSc数量和/或质量,和/或患有年龄相关性退行性疾病,和/或患有损害BM-MSc的数量或质量的疾病或病症。

23.获得适于向对象施用的小尺寸BM-MSc的方法,所述方法包括:

- (a) 从第一供体收获第一BM-MSc组群,
- (b) 根据尺寸和任选的SSEA-4表达来分选来自步骤(a)的所述BM-MSc,
- (c) 分离所述小尺寸BM-MSc,
- (d) 对所述小尺寸BM-MSc进行平板接种以进行培养,
- (e) 扩增培养中的所述小尺寸BM-MSc,以及
- (f) 任选的储存来自步骤(e)的所述小尺寸BM-MSc。

24.根据权利要求23所述的方法,其中所述小尺寸BM-MSc当在悬浮液中测量时具有小于30微米的中值直径。

25.根据权利要求23或24所述的方法,其中步骤(b)和(c)使用流式细胞仪来进行。

26.根据权利要求23至25中任一项所述的方法,其中所述小尺寸BM-MSc在分离时表达SSEA-4 (SSEA-4+)。

27.根据权利要求23至26中任一项所述的方法,其中所述第一供体为50岁或更年轻。

28.根据权利要求23至26中任一项所述的方法,其中所述第一供体为65岁或更年轻。

29.根据权利要求23至26中任一项所述的方法,其中所述第一供体为70岁或更年轻。

30.根据权利要求23至29中任一项所述的方法,其中将所述小BM-MSc培养在TCP上或培养在来源于从第二供体获得的第二BM-MSc组群的细胞外基质(ECM)上。

31.根据权利要求30所述的方法,其中所述第二供体为25岁或更年轻。

32.根据权利要求23至30中任一项所述的方法,其中所述第一供体具有降低的BM-MSc数量和/或质量,和/或需要干细胞治疗。

33.根据权利要求23至32中任一项所述的方法,其中所述第一供体患有年龄相关性退行性疾病,和/或患有损害BM-MSc的数量或质量的疾病或病症,和/或已经或将接受损害BM-MSc的数量或质量的治疗。

34.测试物质的生物活性的方法,所述方法包括:

- (a) 获得权利要求12至16中任一项所述的细胞培养系统,
- (b) 向所述细胞培养系统中添加所述物质;以及
- (c) 测量所述细胞培养系统和/或细胞的参数以确定将所述物质添加到所述细胞培养

系统中的作用。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中所述物质是治疗疾病和/或病症的候选治疗剂。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述疾病和/或病症由BM-MSC的数量或质量引起或损害BM-MSC的数量或质量。

37. 根据权利要求34至36中任一项所述的方法,其中所述物质是细胞生长因子或细胞分化因子。

从年长细胞群中富集和扩增高潜能人间充质干细胞

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年11月4日提交的美国临时申请No.62/250,664的权益,其内容通过引用并入本申请。

[0003] 关于联邦资助的研究或开发的声明

[0004] 本发明是在由美国退伍军人事务部(U.S.Department of Veterans Affairs)授予的优异评审奖励计划(Merit Review Award Program)(资助号1-01BX002145-01)的美国政府支持下进行的。政府对本发明享有一定的权利。

背景技术

1. 技术领域

[0005] 本发明总体上涉及细胞生物学和医学领域。更特别地,本发明涉及用于恢复间充质干细胞的再生能力以及从骨髓来源间充质干细胞的数量和/或质量降低的人(例如年长者)的骨髓基质细胞中分离和扩增缺陷较低的间充质干细胞的亚群的方法、使用其的治疗和用于其的装置。

[0006] 2. 相关技术描述

[0007] 由于现代医学已经消除早期生命死亡的许多原因,因此人预期寿命迅速增加。正因为如此,现在大多数人的寿命足够长以致于以比以往高得多的比率经历由年龄相关性退行性疾病引起的残疾。由于世界人口持续老龄化,这代表着重大的全球健康问题。基于间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)的治疗对于治疗这些疾病具有巨大潜力。然而,间充质干细胞的数量和质量随着年龄而下降并且限制了干细胞治疗用于该老龄化群体的有效性和潜力。

[0008] 骨髓来源间充质干细胞(bone marrow-derived mesenchymal stem cell, BM-MSC)能够自我更新并分化为多个细胞谱系。由于这些能力, BM-MSC在大多数组织类型的持续维持和修复中发挥重要作用。一般来说, MSC的数量和质量随着衰老而降低,这进而又与组织和器官功能的进行性衰竭有关。基于BM-MSC的治疗已经显示出治疗许多年龄相关性退行性疾病的巨大潜力。由于生物安全性和FDA规定,患者的自身(自体)干细胞被认为对基于细胞的治疗是优选的。此外,患者的年龄和疾病严重程度、提供BM-MSC的供体的年龄和健康以及用于分离和扩增BM-MSC的方法的差异可能会影响治疗结果。然而, BM-MSC的数量和质量随着衰老而降低,从而限制患者自身干细胞的治疗潜力。目前,许多干细胞储库公司(stem cell banking company)要求客户提早捐赠,因为年长的干细胞丧失其潜能。因此,为了使这些治疗成功地用于许多患者,必须开发用于拯救衰老干细胞群的再生能力的策略。

[0009] 已经建议尽可能从衰老个体中分离出一些与年轻细胞相同的造血干细胞,尽管在群体水平下其潜能严重降低。(Cho,等,2008)。本发明人先前已经表明通过使衰老的鼠干细胞暴露于组织特异性基质能够拯救其再生潜能。(Chen,2010)。然而,对于人MSC尚未证实这

一点。

[0010] 细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 是组织中细胞微环境 (cellular niche) 的重要组分, 其提供启动或维持细胞功能的关键生物化学和物理信号 (Chen, 等, 2007; Lai, 等, 2010)。组织特异性ECM微环境在体内和体外可能是提供化学和物理提示以指导/控制多能干细胞用于组织再生和修复所必需的 (Chen, 2010; Costa, 等, 2012)。随着组织工程的发展, 多种支架生物材料已被开发以模拟ECM用于组织再生或修复 (Nagaoka, 等, 2010)。其中, 已用于支持祖细胞增殖和分化的材料包括壳聚糖、聚乙醇酸 (PGA)、聚-(1)-乳酸 (PLLA)、聚(乳酸-乙醇酸共聚物) (PLAG) 和聚(乙二醇)-对苯二甲酸酯 (PEFT/聚(对苯二甲酸丁二醇酯) (PBT)) (Kagami, 等, 2008; Chan, 等, 2012; Chen, 等, 2005)。然而, 这些聚合物支架可诱发由其降解产物的酸度引起的炎症 (Athanasios, 等, 1996; Cancedda, 等, 2003)。

[0011] 另一种潜在的支架材料Matrigel包含由EHS小鼠肉瘤细胞分泌的基底膜蛋白, 并且已用于在培养中生长原代上皮细胞 (Maria, 等, 2011)。虽然这种产品已取得不同程度的成功, 但与复活骨髓基质细胞的长期目标不一致。

[0012] 天然支架材料 (特别是丝) 由于其宽范围的弹性 (允许形成组织特异性支架)、孔尺寸 (允许获取组织特异性营养和氧)、低细菌黏附、生物可降解性以及低毒性和免疫原性而是可期望的 (Leal-Egana & Scheibel, 2010)。最近, 已报道, 由骨髓 (BM) 细胞产生的天然细胞外基质 (ECM) 增强人和小鼠骨髓来源间充质干细胞 (BM-MSC) 的附着和增殖 (Chen, 等, 2007; Lai, 等, 2010)。

[0013] 然而, 仍然需要可用于从MSC的数量和质量降低的对象 (例如年长对象) 分离和/或产生能够细胞再生的MSC的方法、组合物和装置。此外, 仍需要用于获得这些MSC以及将其施用于可能患有年龄相关性退行性疾病的需要干细胞治疗的对象的方法。

[0014] 发明概述

[0015] 有利的是, 本发明人已开发了一种新方法, 其允许从骨髓来源间充质干细胞的数量和/或质量降低的人 (例如年长者) 的骨髓基质细胞中分离和扩增临床上有价值的间充质干细胞 (MSC) 亚群。此外, 本发明人已经公开了包含前述MSC的细胞培养系统和组合物。另外, 本发明人已经开发了获得这些MSC的方法和将其施用于可患有年龄相关性退行性疾病和病症的需要干细胞治疗的对象的方法。此外, 本发明人已开发了恢复骨髓基质细胞的再生能力的新方法。本文所述的方法、组合物和技术还可以应用于来源于除骨髓以外的来源例如脂肪组织、脐带血等的MSC。

[0016] 来自年长和年轻供体的MSC细胞的表型是不同的, 但是存在重叠。本发明人在本文中公开了小尺寸骨髓来源间充质干细胞 (BM-MSC) 更可能表达早期干细胞的标志物, 并且大细胞比小细胞更可能表达衰老标志物, 例如活性氧类 (reactive oxygen species, ROS) 的水平。本发明人在本文中描述了在从较年长供体分离的BM-MSC中发现的小细胞群, 其尺寸与来自年轻供体的BM-MSC的尺寸相似。本发明人公开了来自较年长供体的小尺寸细胞可以在数个方面与年轻细胞更相似, 包括增殖、分化、蛋白质表达和ROS谱。本发明人还公开了较年长对象中细胞的环境条件可以抑制较年长对象中细胞的增殖能力。

[0017] 本发明人在此公开了: 为了改善从年长供体分离的BM-MSC的性能, 可期望分离尺寸小并且还表达SSEA-4 (SSEA+) 的细胞。该群体在数个特性方面与来自年轻供体的细胞更紧密地相似, 所述特性包括提高的增殖速率、提高的每细胞的三磷酸腺苷 (ATP) 含量、较高

的端粒酶水平和较大的干细胞浓度。

[0018] 本发明人还公开了在ECM、尤其是来源于BM-MSC的ECM上培养细胞使得扩大SSEA-4阳性的小细胞之间的差异。本发明人还公开了SSEA-4阴性的小细胞当在ECM、尤其是来源于BM-MSC的ECM上培养时也显示显著恢复。因此，SSEA-4阳性群体和SSEA-4阴性群体二者均具有潜在的临床应用价值。

[0019] 在本发明的一方面，本文公开了向对象施用小尺寸骨髓来源间充质干细胞 (BM-MSC) 的方法，所述方法包括：

[0020] (a) 从第一供体收获第一BM-MSC组群，

[0021] (b) 根据尺寸和任选的SSEA-4表达来分选来自步骤(a)的BM-MSC，

[0022] (c) 分离小尺寸BM-MSC，

[0023] (d) 对小尺寸BM-MSC进行平板接种以进行培养，

[0024] (e) 扩增培养中的小尺寸BM-MSC，

[0025] (f) 任选的储存来自步骤(e)的小尺寸BM-MSC，以及

[0026] (g) 将来自步骤(e)和/或(f)的小尺寸BM-MSC施用于对象。

[0027] 在一些实施方案中，所述对象与第一供体相同，由此小尺寸BM-MSC是自体的。在另一些实施方案中，小尺寸BM-MSC当在悬浮液中测量时具有小于30微米的中值直径。在一些实施方案中，小尺寸BM-MSC在分离时表达SSEA-4 (SSEA-4+)。在多个实施方案中，所述对象为50岁或更年长、65岁或更年长、或70岁或更年长。在一些实施方案中，将小BM-MSC培养在TCP上或培养在来源于从第二供体获得的第二BM-MSC组群的细胞外基质 (ECM) 上。在一些实施方案中，第二供体为25岁或更年轻。在另一些实施方案中，所述对象具有降低的BM-MSC数量和/或质量，和/或需要干细胞治疗。在另一些实施方案中，所述对象患有年龄相关性退行性疾病，和/或患有损害BM-MSC的数量或质量的疾病或病症，和/或已经或将接受损害BM-MSC的数量或质量的治疗。

[0028] 在本发明的另一方面，本文公开了细胞培养系统，其包含培养基和分离自从第一供体获得的第一BM-MSC组群的分离的小尺寸BM-MSC，其中分离的小尺寸BM-MSC在分离时表达SSEA-4 (SSEA-4+)，并且其中第一供体在提供第一BM-MSC组群时为65岁或更年长。在一些实施方案中，细胞培养系统不包含在分离时不是小尺寸的BM-MSC。在一些实施方案中，细胞培养系统不包含在分离时不表达SSEA-4的BM-MSC。在一些实施方案中，分离的小尺寸BM-MSC当在悬浮液中测量时具有小于30微米的中值直径。在另一些实施方案中，细胞培养系统还包含来源于第二BM-MSC组群的细胞外基质 (ECM)。在另一些实施方案中，第二BM-MSC组群从25岁或更年轻的第二供体获得。在多个实施方案中，第一供体在提供第一BM-MSC组群时具有降低的BM-MSC数量和/或质量，和/或患有年龄相关性退行性疾病，和/或患有损害BM-MSC的数量或质量的疾病或病症。

[0029] 在本发明的另一方面，本文公开了组合物，其包含分离自从第一供体获得的第一BM-MSC组群的分离的小尺寸BM-MSC，其中分离的小尺寸BM-MSC在分离时表达SSEA-4 (SSEA-4+)，并且其中第一供体在提供第一BM-MSC组群时为65岁或更年长。在一些实施方案中，所述组合物不包含在分离时不是小尺寸的BM-MSC。在一些实施方案中，所述组合物不包含在分离时不表达SSEA-4的BM-MSC。在一些实施方案中，分离的小尺寸BM-MSC当在悬浮液中测量时具有小于30微米的中值直径。在另一些实施方案中，所述组合物还包含载体。在另一些

实施方案中,分离的小尺寸BM-MSc在来源于第二BM-MSc组群的ECM上进行培养。在另一些实施方案中,第二BM-MSc组群从25岁或更年轻的第二供体获得。在多个实施方案中,第一供体在提供第一BM-MSc组群时具有降低的BM-MSc数量和/或质量,和/或患有年龄相关性退行性疾病,和/或患有损害BM-MSc的数量或质量的疾病或病症。

[0030] 在本发明的另一方面,本文公开了获得适于向对象施用的小尺寸BM-MSc的方法,所述方法包括:

[0031] (a) 从第一供体收获第一BM-MSc组群,

[0032] (b) 根据尺寸和任选的SSEA-4表达来分选来自步骤(a)的BM-MSc,

[0033] (c) 分离小尺寸BM-MSc,

[0034] (d) 对小尺寸BM-MSc进行平板接种以进行培养,

[0035] (e) 扩增培养中的小尺寸BM-MSc,以及

[0036] (f) 任选的储存来自步骤(e)的小尺寸BM-MSc。

[0037] 在一些实施方案中,小尺寸BM-MSc当在悬浮液中测量时具有小于30微米的中值直径。在一些实施方案中,步骤(b)和(c)使用流式细胞仪来进行。在另一些实施方案中,小尺寸BM-MSc在分离时表达SSEA-4 (SSEA-4+)。在多个实施方案中,第一供体为50岁或更年轻,或者第一供体为65岁或更年轻,或者第一供体为70岁或更年轻。在一些实施方案中,将小BM-MSc培养在TCP上或培养在来源于从第二供体获得的第二BM-MSc组群的细胞外基质(ECM)上。在一些实施方案中,第二供体为25岁或更年轻。在另一些实施方案中,第一供体具有降低的BM-MSc数量和/或质量,和/或需要干细胞治疗。在多个实施方案中,第一供体患有年龄相关性退行性疾病,和/或患有损害BM-MSc的数量或质量的疾病或病症,和/或已经或将接受损害BM-MSc的数量或质量的治疗。

[0038] 体外产生但仍保留体内组织的生理学特征的组织提供了用于监测所提出治疗或分子对组织的生理功能的作用的特别有用工具。因此,公开了测试物质的生物活性的方法,所述方法包括:

[0039] (a) 获得如本文所述的任何细胞培养系统,

[0040] (b) 向细胞培养系统中添加物质;以及

[0041] (c) 测量细胞培养系统和/或细胞的参数以确定将所述物质添加到所述细胞培养系统中的作用。

[0042] 在一些实施方案中,所述物质是治疗疾病和/或病症的候选治疗剂。在一些情况下,所述疾病和/或病症由BM-MSc的数量或质量引起或损害BM-MSc的数量或质量。在一些情况下,所述疾病和/或病症是年龄相关性疾病或衰老过程本身。在一些情况下,所述病症是衰老干细胞群的再生能力降低,或者药物或放射治疗的副作用。在另一些实施方案中,所述物质是细胞生长因子或细胞分化因子。向细胞培养系统中添加物质可以包括将该物质添加到培养基中。所述培养基可以被更换成包含特定物质或物质组合的培养基以监测培养基变化对细胞的生理功能的作用。测量细胞培养系统的参数可以包括例如观察细胞的生长速率或形态特征。可以测量和监测任何生物学相关参数以确定使细胞暴露于物质或改变任何生长条件的生物学作用。如果对应对照未显示出相同的变化,则所测量或监测参数的变化可以归因于物质的存在或生长条件的变化。

[0043] 除非明确指出仅指替代方案或者替代方案相互排斥,否则术语“或”在权利要求

书中的使用用于意指“和/或”，但是本公开内容支持指代仅替代方案以及“和/或”的限定。如本文所用的，“另一个”可以意指至少第二个或更多个。

[0044] 术语“约”或“大约”被限定为接近本领域普通技术人员所理解的。在一个非限制性实施方案中，这些术语被限定为在10%内，优选在5%内，更优选在1%内，并且最优选在0.5%内。

[0045] 对于该申请，可以使用标准四舍五入准则将具有一个或更多个小数位的数值舍入为最接近的整数，即：如果被舍入的数字是5、6、7、8或9，则向上进位；并且如果被舍入的数字是0、1、2、3或4，则舍去。例如，3.7可以舍入为4。

[0046] 词语“包含”（及其任何变化形式）、“具有”（及其任何变化形式）、“包括”（及其任何变化形式）或“含有”（及其任何变化形式）是包括性或开放式的，并且不排除另外的未列举要素或方法步骤。

[0047] 没有数量词修饰的名词的使用当与术语“包含”、“具有”、“包括”或“含有”（或这些词语的任何变化形式）结合使用时可以意指“一个/种”，但其也与“一个/种或更多个/种”、“至少一个/种”和“一个/种或多于一个/种”的含义一致。

[0048] 所述组合物和方法根据其用途可以“包含”在本说明书通篇公开的任何成分或步骤、“基本上由其组成”或“由其组成”。

[0049] 在本申请通篇，MSC和BM-MSC包括其产生的任何子代细胞。术语“子代细胞”用于表示来源于另一细胞，例如亲本细胞的细胞。子代细胞可以保留与亲本细胞相同的特征或可以具有不同的特征，例如已分化的子代细胞。

[0050] 在本申请通篇，骨髓来源间充质干细胞的“数量和/或质量降低”用于表示，相对于年轻的健康对象群体的那些，干细胞的数目减少和/或干细胞功能在一个或更多个方面降低。本文示出了干性特性（即SSEA-4、自我更新、分化能力）和老化特性（衰老、活性氧类、膜联蛋白-5）的非限制性实例。在一个非限制性实例中，衰老可以导致骨髓来源间充质干细胞的数量和/或质量降低。

[0051] 在本申请通篇，术语“衰老”用于表示干细胞群在数量和/或质量上降低的过程的总和。

[0052] 在本申请通篇，术语“年轻的”是指年龄为25岁及以下的人（男性或女性），并且也指从他们获得的细胞。

[0053] 在本申请通篇，术语“年长的”、“年老的”或“较年长的”是指年龄为65岁及更年长的人（男性或女性），并且也指从他们获得的细胞。然而，在文献中有一些实例表明早在50岁时就出现MSC功能的下降（Zhou等，2008）。

[0054] 在本申请通篇，术语“对象”、“患者”或“供体”是指男性或女性的人。

[0055] 在本申请通篇，骨髓来源间充质干细胞的“分离”和“分离的”骨髓来源间充质干细胞表示细胞已经从生物体和/或具有不同特征的其他骨髓来源间充质干细胞中移出。在一个非限制性实例中，骨髓来源间充质干细胞可以从人中分离。在另一个非限制性实例中，尺寸小和/或表达SSEA-4的骨髓来源间充质干细胞可以与不是小尺寸和/或不表达SSEA-4或与分离的细胞相比在较低程度上表达SSEA-4的骨髓来源间充质干细胞分离。

[0056] 在本申请通篇，当涉及BM-MSC细胞尺寸使用时，术语“小”和“小尺寸”意指与在给定时间从供体获得的BM-MSC组群的平均悬浮直径相比，“小尺寸”BM-MSC在悬浮于溶液中时

具有较小的直径(“悬浮直径”)。在多个实施方案中,小尺寸BM-MSc分离自从供体获得的BM-MSc组群。在多个实施方案中,当涉及BM-MSc细胞尺寸使用时,术语“小”和“小尺寸”意指当在悬浮液中测量时具有小于33微米、或小于30微米、或小于25微米、或小于20微米、或小于19微米的中值细胞直径的BM-MSc。

[0057] 在本申请通篇,当涉及BM-MSc细胞尺寸使用时,术语“大”和“大尺寸”意指与在给定时间从供体获得的BM-MSc组群的平均悬浮直径相比,“大尺寸”BM-MSc在悬浮于溶液中时具有较大的直径(“悬浮直径”)。在多个实施方案中,当涉及BM-MSc细胞尺寸使用时,术语“大”和“大尺寸”意指当在悬浮液中测量时具有大于35微米、或33微米以及更大的中值直径的BM-MSc。

[0058] 在本申请通篇,表达SSEA-4、“SSEA-4阳性”、SSEA-4+或“SSEA-4表达阳性”的细胞或这些术语的任何变化形式表示细胞表达SSEA-4或与阴性对照相比以在细胞中可测量的程度表达SSEA-4。在多个实施方案中,表达SSEA-4的BM-MSc分离自从供体获得的BM-MSc组群。

[0059] 在本申请通篇,不表达SSEA-4、“SSEA-4阴性”、SSEA-4-、或SSEA-4表达阴性的细胞或这些术语的任何变化形式表示细胞不表达SSEA-4或与阴性对照相比以在细胞中不可测量的程度表达SSEA-4。在多个实施方案中,不表达SSEA-4的BM-MSc分离自从供体获得的BM-MSc组群。

[0060] 在本发明的背景下还公开了以下实施方案1至37:

[0061] 实施方案1是向对象施用小尺寸骨髓来源间充质干细胞(BM-MSc)的方法,所述方法包括:

[0062] (a) 从第一供体收获第一BM-MSc组群,

[0063] (b) 根据尺寸和任选的SSEA-4表达来分选来自步骤(a)的所述BM-MSc,

[0064] (c) 分离所述小尺寸BM-MSc,

[0065] (d) 对所述小尺寸BM-MSc进行平板接种以进行培养,

[0066] (e) 扩增培养中的所述小尺寸BM-MSc,

[0067] (f) 任选的储存来自步骤(e)的所述小尺寸BM-MSc,以及

[0068] (g) 将来自步骤(e)和/或(f)的所述小尺寸BM-MSc施用于所述对象。

[0069] 实施方案2是实施方案1所述的方法,其中所述对象与所述第一供体相同。

[0070] 实施方案3是实施方案1或2所述的方法,其中所述小尺寸BM-MSc当在悬浮液中测量时具有小于30微米的中值直径。

[0071] 实施方案4是实施方案1至3中任一项所述的方法,其中所述小尺寸BM-MSc在分离时表达SSEA-4(SSEA-4+)。

[0072] 实施方案5是实施方案1至4中任一项所述的方法,其中所述对象为50岁或更年长。

[0073] 实施方案6是实施方案1至4中任一项所述的方法,其中所述对象为65岁或更年长。

[0074] 实施方案7是实施方案1至4中任一项所述的方法,其中所述对象为70岁或更年长。

[0075] 实施方案8是实施方案1至7中任一项所述的方法,其中将所述小BM-MSc培养在TCP上或培养在来源于从第二供体获得的第二BM-MSc组群的细胞外基质(ECM)上。

[0076] 实施方案9是实施方案8所述的方法,其中所述第二供体为25岁或更年轻。

[0077] 实施方案10是实施方案1至8中任一项所述的方法,其中所述对象具有降低的BM-

MSC数量和/或质量,和/或需要干细胞治疗。

[0078] 实施方案11是实施方案1至10中任一项所述的方法,其中所述对象患有年龄相关性退行性疾病,和/或患有损害BM-MSC的数量或质量的疾病或病症,和/或已经或将接受损害BM-MSC的数量或质量的治疗。

[0079] 实施方案12是细胞培养系统,其包含培养基和分离自从第一供体获得的第一BM-MSC组群的分离的小尺寸BM-MSC,其中所述分离的小尺寸BM-MSC在分离时表达SSEA-4 (SSEA-4+),其中所述细胞培养系统不包含在分离时不是小尺寸的BM-MSC或在分离时不表达SSEA-4的BM-MSC,并且其中所述第一供体在提供所述第一BM-MSC组群时为65岁或更年长。

[0080] 实施方案13是实施方案12所述的细胞培养系统,其中所述分离的小尺寸BM-MSC当在悬浮液中测量时具有小于30微米的中值直径。

[0081] 实施方案14是实施方案12或13所述的细胞培养系统,其中所述细胞培养系统还包含来源于第二BM-MSC组群的细胞外基质(ECM)。

[0082] 实施方案15是实施方案14所述的细胞培养系统,其中所述第二BM-MSC组群是从25岁或更年轻的第二供体获得的。

[0083] 实施方案16是实施方案12至15中任一项所述的细胞培养系统,其中所述第一供体在提供所述第一BM-MSC组群时具有降低的BM-MSC数量和/或质量,和/或患有年龄相关性退行性疾病,和/或患有损害BM-MSC的数量或质量的疾病或病症。

[0084] 实施方案17是组合物,其包含分离自从第一供体获得的第一BM-MSC组群的分离的小尺寸BM-MSC,其中所述分离的小尺寸BM-MSC在分离时表达SSEA-4 (SSEA-4+),其中所述组合物不包含在分离时不是小尺寸的BM-MSC或在分离时不表达SSEA-4的BM-MSC,并且其中所述第一供体在提供所述第一BM-MSC组群时为65岁或更年长。

[0085] 实施方案18是实施方案17所述的组合物,其中所述分离的小尺寸BM-MSC当在悬浮液中测量时具有小于30微米的中值直径。

[0086] 实施方案19是实施方案17或18所述的组合物,其中所述组合物还包含载体。

[0087] 实施方案20是实施方案17至19中任一项所述的组合物,其中所述分离的小尺寸BM-MSC在来源于第二BM-MSC组群的ECM上进行培养。

[0088] 实施方案21是实施方案20所述的组合物,其中所述第二BM-MSC组群从25岁或更年轻的第二供体获得。

[0089] 实施方案22是实施方案17至21中任一项所述的组合物,其中所述第一供体在提供所述第一BM-MSC组群时具有降低的BM-MSC数量和/或质量,和/或患有年龄相关性退行性疾病,和/或患有损害BM-MSC的数量或质量的疾病或病症。

[0090] 实施方案23是获得适于向对象施用的小尺寸BM-MSC的方法,所述方法包括:

[0091] (a) 从第一供体收获第一BM-MSC组群,

[0092] (b) 根据尺寸和任选的SSEA-4表达来分选来自步骤(a)的所述BM-MSC,

[0093] (c) 分离所述小尺寸BM-MSC,

[0094] (d) 对所述小尺寸BM-MSC进行平板接种用于进行培养,

[0095] (e) 扩增培养中的所述小尺寸BM-MSC,以及

[0096] (f) 任选的储存来自步骤(e)的所述小尺寸BM-MSC。

[0097] 实施方案24是实施方案23所述的方法,其中所述小尺寸BM-MSc当在悬浮液中测量时具有小于30微米的中值直径。

[0098] 实施方案25是实施方案23或24所述的方法,其中步骤(b)和(c)使用流式细胞仪来进行。

[0099] 实施方案26是实施方案23至25中任一项所述的方法,其中所述小尺寸BM-MSc在分离时表达SSEA-4 (SSEA-4+)

[0100] 实施方案27是实施方案23至26中任一项所述的方法,其中所述第一供体为50岁或更年长。

[0101] 实施方案28是实施方案23至26中任一项所述的方法,其中所述第一供体为65岁或更年长。

[0102] 实施方案29是实施方案23至26中任一项所述的方法,其中所述第一供体为70岁或更年长。

[0103] 实施方案30是实施方案23至29中任一项所述的方法,其中将所述小BM-MSc培养在TCP上或培养在来源于从第二供体获得的第二BM-MSc组群的细胞外基质(ECM)上。

[0104] 实施方案31是实施方案30所述的方法,其中所述第二供体为25岁或更年轻。

[0105] 实施方案32是实施方案23至30中任一项所述的方法,其中所述第一供体具有降低的BM-MSc数量和/或质量,和/或需要干细胞治疗。

[0106] 实施方案33是实施方案23至32中任一项所述的方法,其中所述第一供体患有年龄相关性退行性疾病,和/或患有损害BM-MSc的数量或质量的疾病或病症,和/或已经或将接受损害BM-MSc的数量或质量的治疗。

[0107] 实施方案34是测试物质的生物活性的方法,所述方法包括:

[0108] (a) 获得实施方案12至16中任一项所述的细胞培养系统,

[0109] (b) 向所述细胞培养系统中添加所述物质;以及

[0110] (c) 测量所述细胞培养系统和/或细胞的参数以确定将所述物质添加到所述细胞培养系统中的作用。

[0111] 实施方案35是实施方案34所述的方法,其中所述物质是治疗疾病和/或病症的候选治疗剂。

[0112] 实施方案36是实施方案35所述的方法,其中所述疾病和/或病症由BM-MSc的数量或质量引起或损害BM-MSc的数量或质量。

[0113] 实施方案37是实施方案34至36中任一项所述的方法,其中所述物质是细胞生长因子或细胞分化因子。

[0114] 通过以下详细描述,本发明的其他目的、特征和优点将变得显而易见。然而,应当理解,详细描述和具体实例尽管表示本发明的一些优选实施方案但是仅作为举例说明给出,因为通过该详细描述,在本发明的精神和范围内的不同变化方案和修改方案对于本领域技术人员将变得明显。

[0115] 附图简述

[0116] 以下附图构成本说明书的一部分并且被包括在内以进一步表明本发明的某些方面。通过参照这些附图中的一个或多个并结合对本文给出的具体实施方案的详细描述可以更好地理解本发明。

[0117] 图1-来自年长和年轻供体的MSC表达独特的表型。示出了来自年长供体(左柱)和年轻供体(右柱)的BM-MSC之间对阶段特异性胚胎抗原4(stage-specific embryonic antigen 4, SSEA-4)、人II类主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) HLA-DR和活性氧类(ROS)呈阳性的细胞的百分比差异。

[0118] 图2-大MSC更可能表达衰老标志物。根据尺寸(大和小)和存在ROS(阳性)或不存在ROS(阴性)分选的BM-MSC细胞的散点图。大MSC显著地更可能表达衰老标志物。UL-Quad表示左上象限(Q1), UR-Quad表示右上象限(Q2-2), LL-Quad表示左下象限, LR-Quad表示右下象限。

[0119] 图3-测量在TCP上培养的细胞的细胞铺展面积。在此作为在不同铺展面积下BM-MSC的相对频率报道年轻和年长BM-MSC的铺展面积。相对于年轻的, 年长MSC的中值铺展面积显著更大。

[0120] 图4A至4D-年轻ECM有益于来自年轻供体而不是年长供体的MSC。(A)通过光学显微术在6天后在培养物中对年轻和年长BM-MSC进行成像。在ECM上培养的年轻BM-MSC显示高度汇合。年长BM-MSC无论底物如何都在培养6天后保持稀疏。(B)培养7天后将细胞分离并计数以确定细胞密度。(C)计数后,以克隆密度重新接种细胞用于集落形成单位测定。(D)CFU的总数通过使平均CFU频率乘以细胞的总数来计算。 $*P < 0.05$, 相对于在相同底物上的年轻BM-MSC。 $\clubsuit P < 0.05$, 相对于在TCP上培养的同细胞群。(n=11)

[0121] 图5A至5D-年轻和年长MSC可以在多种参数中有所区别。(A)在达到汇合之前通过光学显微术在培养物中对年轻和年长BM-MSC进行成像。年长MSC具有更大、更圆、更平的铺展图样。(B)测量年轻和年长BM-MSC的ATP浓度。与年长MSC相比,年轻MSC具有大致2倍多的ATP。(C)培养后通过流式细胞术分析年轻和年长BM-MSC。年长MSC的一些级分表达高水平的膜联蛋白-5和细胞内ROS。尽管年长MSC表达较低水平的SSEA-4,但相当大的级分确实表达SSEA-4。在每个图中,将样品(黑线)与阴性对照(阴影区域)进行比较以量化表达。(D)使用流式细胞术中的前向散射参数测量悬浮细胞的尺寸。细胞尺寸的分布反映细胞铺展面积的分布。 $*P < 0.05$, 相对于在相同底物上的年轻MSC。

[0122] 图6A至6C-年长MSC通过表达衰老相关分泌表型而能够抑制健康细胞的功能。(A)年长MSC群相对于年轻MSC群具有显著更高的衰老细胞频率。(B)从年长BM-MSC中收集的条件化培养基相对于对照包含减慢年轻MSC增殖的因子。(C)年长MSC分泌指示衰老相关分泌表型的细胞因子谱。该图表总结了相对于年轻BM-MSC在年长BM-MSC中测量的44种SASP相关细胞因子的细胞因子表达。 $*P < 0.05$, 相对于年轻BM-MSC。 $**P < .01$, 相对于年轻BM-MSC。

[0123] 图7A至7B-荧光活化细胞分选以分离年轻亚群。(A)流式细胞术揭示,虽然年轻BM-MSC可靠地表达小尺寸、SSEA-4(+)表型,但是年长BM-MSC在这些方面具有大得多的异质性。(B)使用FACS分析能够使得从年长供体获得“年轻”表型亚群。经过双联体鉴别后,基于尺寸(小与大)和SSEA-4表达(阳性与阴性)分离细胞。大约5%至10%的年长MSC表达“年轻”(小(+))表型。

[0124] 图8-确定来自年轻供体的BM-MSC的细胞增殖,所述BM-MSC在生长培养基(常规GM作为对照)、用来自年轻供体BM-MSC的分泌物条件化的生长培养基(年轻CM)和用来自年长供体BM-MSC的分泌物条件化的生长培养基(年长CM)中生长。年长条件化培养基抑制年轻MSC的增殖。当在年长CM中培养时,来自年轻供体的BM-MSC的增殖速率受到抑制,如通过在

设定时间后进行细胞计数确定的,而在年轻CM中培养显示几乎没有差异至没有差异。

[0125] 图9-来自较年长供体的小细胞的自我更新能力。对来自年长供体的未经分选BM- MSC、小尺寸BM- MSC和大尺寸BM- MSC确定细胞增殖。在相同时间内,小细胞比大细胞多生长65%的细胞。小细胞还比未按尺寸分选的细胞生长得更快。

[0126] 图10A至10E-小(+) MSC表现出更年轻MSC的特征。(A) 在TCP上培养的年轻和年长BM- MSC的CFU-F、CFU-AD和CFU-OB测定的培养板的照片。在分离亚群之后立即将来自亚群以及未经分选年轻和年长BM- MSC群体的细胞以克隆密度培养用于CFU测定。观察到,与其他年长BM- MSC相比,小BM- MSC (尤其是小+BM- MSC) 以更大的分化潜能形成更大、更密集且数量更多的集落。(B) 对CFU测定量化并报道为频率/100个细胞。在针对分化为成纤维细胞(CFU-F)、成骨细胞(CFU-OB)和脂肪细胞(CFU-AD)的标志物染色的任何CFU测定中,小(+) BM- MSC和年轻BM- MSC之间都没有统计学显著性差异。(C) 相对于大尺寸亚群,在来自年长供体的小BM- MSC中,ATP水平与更年轻水平相似。(D) 小MSC并且特别是小(+) MSC表达与年轻细胞类似的 β -Gal水平,表明在小尺寸亚群中存在极少的衰老细胞。(E) 收集条件化培养基以分析细胞因子谱。热图总结了年轻MSC、年长MSC和小(+) MSC中SASP细胞因子的表达。其显示,来自较年长供体的小(+) MSC不表达SASP。 $*P < 0.05$,相对于在相同底物上的年轻MSC。

[0127] 图11-通过测量集落形成单位(CFU-F)的数目确定来自年长供体的未经分选、大-、大+、小-和小+BM- MSC细胞群的干细胞浓度。与其他细胞群相比,表达SSEA-4的小细胞具有大得多的干细胞浓度。

[0128] 图12-来自较年长供体的小尺寸、大尺寸和未经分选细胞的表达和ROS表型。在具有小尺寸(小)、大尺寸(大)和未经分选尺寸(未经分选)的来自年长供体的细胞中确定表达数种与年轻和衰老相关的蛋白质的细胞的百分比和具有可检测ROS水平的细胞的百分比。与大细胞相比,具有小尺寸的细胞表达更高的SSEA-4和血小板衍生生长因子PDGF,并且表达更低的HLA-DR和细胞内ROS。

[0129] 图13-培养前在细胞亚群中具有较高ATP浓度的细胞。从年长者和年轻者(年轻)收获骨髓基质细胞。不分离(Unf)或根据尺寸(L=大,S=小)和SSEA-4的存在(+ =存在,- =不存在)分离来自年长者的骨髓基质细胞。表明,与来自年长者骨髓基质细胞的其他细胞组群相比,小尺寸和SSEA-4的存在与ATP含量提高的细胞的数目增加相关。

[0130] 图14-培养前细胞亚群的ATP浓度。从年长者收获骨髓基质细胞。不分离(Unf)或根据尺寸(L=大,S=小)和SSEA-4的存在(+ =存在,- =不存在)分离来自年长者的骨髓基质细胞。其表明,与来自年长者骨髓基质细胞的其他细胞组群相比,小尺寸和SSEA-4的存在与ATP含量提高相关。

[0131] 图15-对年轻和年长BM- MSC、以及来自年长供体的大-、大+、小-和小+BM- MSC群测量的端粒酶水平的图。对于表达SSEA-4的小细胞,端粒酶水平略高。

[0132] 图16-大细胞尺寸条件化培养基抑制年轻MSC的增殖。确定在以下生长培养基中生长的来自年轻供体的MSC的细胞增殖:用来自小尺寸细胞条件化的分泌物的生长培养基(小)、用来自大尺寸细胞的分泌物条件化的生长培养基(大)、用来自未按尺寸分选的细胞的分泌物条件化的生长培养基(未经分选),和用来自年轻供体MSC的分泌物条件化的生长培养基(年轻CM)。当在大且未经分选的条件化培养基中培养时,来自年轻供体的MSC的增殖速率受到抑制,如通过在设定时间后进行细胞计数确定的,而在小和年轻条件化培养基中

培养显示几乎没有差异至没有差异。

[0133] 图17-拯救来自年轻供体的BM-MSc以及来自年长供体的小尺寸、大尺寸和未经分选尺寸BM-MSc中的干细胞。通过在组织培养塑料 (tissue culture plastic, TCP) 和骨髓细胞外基质 (bone marrow extracellular matrix, BM-ECM) 上培养之前和之后计数集落形成单位的数目来确定来自年轻供体的BM-MSc以及来自年长供体的小尺寸、大尺寸和未经分选尺寸BM-MSc中干细胞的数目。与来自年长供体的大细胞和未经分选细胞相比, 培养来自年长供体的小细胞显示拯救的干细胞增加。此外, 与在TCP上培养相比, 在BM-ECM中的培养显示干细胞增加。

[0134] 图18-使来自年轻供体和年长供体的未经分选BM-MSc、来自年长供体的大尺寸细胞和来自年长供体的小尺寸细胞的CFU在ECM和TCP上生长, 并针对分化为成纤维细胞 (CFU-F)、成骨细胞 (CFU-OB) 和脂肪细胞 (CFU-AD) 的标志物进行染色。来自年长供体的小细胞的CFU显示出与来自年轻供体的细胞相似的分化能力。

[0135] 图19A至19F-ECM扩增增强小MSc的复制。(A) 小MSc在ECM上迅速增殖并且在培养6天后成为高度汇合。(B) 在TCP与来源于来自年轻供体的BM-MSc的ECM (年轻ECM) 上培养7天后未经分级BM-MSc (年轻; 年长) 和经分级年长BM-MSc的细胞密度的图。每个群体的总细胞增殖表示为以相等接种密度 (3,000个细胞/cm²) 培养7天后的细胞密度。细胞增殖通过在TCP或年轻ECM上培养BM-MSc亚群7天后计数培养皿中细胞的数目来定量确定。受试群体包括未分离的BM-MSc (年轻和年长)、针对SSEA-4的存在呈阳性的大细胞 (大+) 或对SSEA-4呈阴性的大细胞 (大-), 以及针对SSEA-4的存在呈阳性的小细胞 (小+) 或对SSEA-4呈阴性的小细胞 (小-)。小+细胞显示在TCP和年轻ECM二者上的细胞增殖均提高, 并且当与在TCP上生长的未分离细胞相比时显示细胞数目增加4倍。结果表明, 年轻ECM提高所有亚群的增殖速率。此外, 小细胞尺寸也显示提高增殖速率。(C) 在TCP或ECM上扩增后, 以克隆密度接种细胞以用于CFU测定。在所有3种测定中, 小 (+) MSc均产生更大、更密集且数量更多的集落。(D至F) 通过将CFU频率乘以细胞总数来量化CFU。倍数变化报道在图表上。*P<0.05, 相对于在相同底物上的年轻BM-MSc。♣P<0.05, 相对于在TCP上培养的同细胞群。

[0136] 图20-间充质干细胞可以从具有较低MSc质量和数量的对象中收获。细胞基于尺寸和阶段特异性胚胎抗原4 (SSEA-4) 表达通过流式细胞术进行分选。将SSEA-4阳性的小细胞 (小+) 平板接种在由来自年轻供体的骨髓基质细胞制成的ECM (年轻ECM) 上。然后, 将细胞使用年轻ECM扩增, 分离, 并储存。使用这种方法, 可以从MSc的质量和数量较低的供体 (例如年长供体) 获得大量“年轻”MSc, 用于基于自体MSc的治疗和自体MSc建库。

[0137] 图21A至21C-获得SSEA-4阳性的小细胞的示例性设门策略。

[0138] 图22-在TCP和来源于来自年轻供体的BM-MSc的ECM (年轻ECM) 上培养7天的来自71岁男性供体的BM-MSc亚群的光学显微术显微图。在两种条件下, SSEA-4阳性的小细胞均显示细胞增殖提高。此外, 与在TCP上培养的同细胞相比, 在年轻ECM上培养的同细胞显示细胞增殖提高。

[0139] 图23-细胞增殖通过在TCP或年轻ECM上培养BM-MSc亚群7天后计数培养皿中细胞的数目来定量确定。受试群体包括未分离的BM-MSc (Unf)、针对SSEA-4的存在呈阳性的大细胞 (L+) 或对SSEA-4呈阴性的大细胞 (L-), 以及针对SSEA-4的存在呈阳性的小细胞 (S+) 或对SSEA-4呈阴性的小细胞 (S-)。S+细胞显示在TCP和年轻ECM二者上的细胞增殖均提高, 并且

与在TCP上生长的未分离细胞相比时显示细胞数目增加8倍。结果表明,年轻ECM提高所有亚群的增殖速率。此外,小细胞尺寸也显示提高增殖速率(S-)。

[0140] 图24-细胞增殖通过在TCP (2D) (左柱) 或ECM (右柱) 上培养年轻和年长BM-MSC (分别为年轻和年长) 以及年长BM-MSC亚群 (S+、L+、S-和L-) 后计数培养皿中细胞的数目来定量确定。S+细胞显示在TCP和年轻ECM二者上的细胞增殖都提高并且S-细胞也显示细胞增殖提高。

[0141] 图25-在TCP (左柱) 或ECM (右柱) 上培养年轻和年长BM-MSC (分别为年轻和未经分选) 以及年长BM-MSC亚群 (小 (+)、小 (-)、大 (+) 和大 (-)) 之后确定细胞表达SSEA-4的百分比。小 (+) 细胞显示出高SSEA-4表达, 并且在大多数组群中, 在ECM上的培养提高SSEA-4表达。

[0142] 图26-在TCP (左柱) 或ECM (右柱) 上培养年轻和年长BM-MSC (分别为年轻和未经分选) 以及年长BM-MSC亚群 (小 (+)、小 (-)、大 (+) 和大 (-)) 之后确定ROS表达。与其他组群相比, 小 (+) 细胞表现出较低的细胞内ROS, 并且在ECM上的培养进一步降低大多数组群的平均细胞内ROS。

[0143] 图27-在TCP (左柱) 或ECM (右柱) 上培养年轻和年长BM-MSC (分别为Y和U) 以及年长BM-MSC亚群 (小 (+)、小 (-)、大 (+) 和大 (-) (分别为S+、S-、L+和L-)) 之后确定ATP表达。在组织培养塑料 (TCP) 上培养的S+细胞具有显著更高的ATP浓度。ECM在大多数组群中提高ATP含量。

[0144] 图28-在TCP (左柱) 或ECM (右柱) 上培养年轻和年长BM-MSC (分别为Y和U) 以及年长BM-MSC亚群 (小 (+)、小 (-)、大 (+) 和大 (-) (分别为S+、S-、L+和L-)) 之后确定端粒酶活性。在组织培养塑料 (TCP) 上培养的S+细胞具有显著更高的端粒酶活性。

[0145] 图29-在ECM和组织培养塑料 (2D) 上培养后确定来自年轻供体的BM-MSC以及来自年长供体的小尺寸、大尺寸和未经分选尺寸BM-MSC在5次传代后SSEA-4阳性细胞的数目。与来自年长供体的大细胞和未经分选细胞相比, 培养来自年长供体的小细胞在5次传代后显示SSEA-4阳性细胞增加。此外, 与在2D上培养相比, 在ECM中的培养显示干细胞增加。

[0146] 图30A至30C-在ECM上扩增的小 (+) MSC维持年轻表型。(A) 未经分级BM-MSC (年轻; 年长) 和经分级年长BM-MSC的 β -半乳糖苷酶表达图。 β -半乳糖苷酶表达是在TCP或来源于来自年轻供体的BM-MSC的ECM (年轻ECM) 上培养之后在年轻、年长、小+和小-群体中测量的。小尺寸亚群在培养期间维持低水平的衰老。从年长供体分离的小细胞在培养期间维持低表达。(B) 在TCP和来源于来自年轻供体的BM-MSC的ECM (年轻ECM) 上培养之后未经分级BM-MSC (年轻, 年长) 和经分级年长BM-MSC的ATP水平图。ATP表达是在TCP或年轻ECM上培养年轻和年长BM-MSC以及年长BM-MSC亚群 (S+、S-) 之后确定的。在组织培养塑料 (TCP) 上培养的S+细胞具有显著更高的ATP浓度。年轻ECM在大多数组群中提高ATP含量。(C) 热图中示出了ECM上细胞的SASP细胞因子谱。进行多因素ANOVA之后进行Tukey真实显著性差异程序揭示年长BM-MSC相对于年轻或小 (+) BM-MSC在SASP细胞因子表达方面的统计学显著性提高。 $*P < 0.05$, 相对于在相同底物上的年轻BM-MSC。 $\clubsuit P < 0.05$, 相对于在TCP上培养的同细胞群。

[0147] 图31-未经分级BM-MSC (年轻; 年长) 和年长经分级BM-MSC中SSEA-4、ROS和膜联蛋白-5的流式细胞术分析的直方图。在TCP或来源于来自年轻供体的BM-MSC的ECM (年轻ECM) 上培养后SSEA-4、ROS和膜联蛋白-5的表达。表达通过在TCP或年轻ECM上培养年轻和年长

BM-MSc以及年长BM-MSc亚群(小+、小-)之后进行流式细胞术来确定。相对于TCP,在年轻ECM上培养的小+MSc显示出提高的SSEA-4表达、降低的ROS表达和降低的膜联蛋白-5表达。表达通过比较样品(黑线)与阴性对照(阴影区域)的荧光强度来量化。

[0148] 图32-4次传代后未经分级BM-MSc(年轻;年长)和经分级年长BM-MSc的总倍数变化的图。使用1500个细胞/cm²的接种密度使细胞在TCP与来源于来自年轻供体的BM-MSc的ECM(年轻ECM)上培养中每7天传代。来自年轻和年长BM-MSc以及年长BM-MSc亚群(小+、小-)的BM-MSc在TCP或年轻ECM上传代4次后SSEA-4阳性细胞数目显著增加。当在年轻ECM上扩增小+细胞时,在年轻ECM上的连续传代使得倍数变化为约6,000。

具体实施方式

[0149] 本申请的发明人已经开发了允许从骨髓来源间充质干细胞(BM-MSc)的数量和/或质量降低的人(例如年长者)的骨髓基质细胞中分离和扩增缺陷较低的间充质干细胞(MSc)的亚群的新方法,并且因此已经发现了用于拯救衰老干细胞群的再生能力的策略。此外,本发明人已经公开了前述MSc的细胞培养系统、技术和组合物,其可以非常有效地拯救来自人干细胞的数量和/或质量降低的供体的人干细胞。另外,本发明人已经开发了获得这些MSc的方法以及将其施用于可患有年龄相关性退行性疾病和病症的需要干细胞治疗的对象的方法。另外,本发明人已经开发了恢复骨髓基质细胞的再生能力的新方法。

[0150] 来自年长和年轻供体的MSc细胞的表型是不同的,但存在重叠。参见图1和图4。本发明人在本文公开了小BM-MSc更可能表达早期干细胞的标志物,而大细胞比小细胞更可能表达衰老标志物。对于基于尺寸和ROS水平分选的细胞,参见图2。本发明人在本文中描述了在从较年长供体分离的BM-MSc中发现的小细胞群,其尺寸与来自年轻供体的BM-MSc的尺寸相似。参见图3。本发明人公开了来自较年长供体的小尺寸MSc可以在数个方面与年轻细胞更相似,包括增殖、分化、蛋白质表达和ROS谱。本发明人还公开了较年长对象中细胞的环境条件可以抑制较年长对象中细胞的增殖能力。参见图6B、8和16。

[0151] 本发明人在此公开了,为了改善从供体分离的MSc细胞的性能,可期望分离尺寸小并且还表达SSEA-4的细胞。对于获得SSEA-4阳性的小细胞的设门策略的一个实施方案,参见图21。该群体在数种特性方面更接近地类似于来自年轻供体的细胞,所述特性包括增加的具有较高ATP含量的细胞的数目、提高的ATP含量/细胞、较高的端粒酶水平、较低的 β -半乳糖苷酶表达、以及较大的干细胞浓度。参见图10、11、13至15。

[0152] 本发明人还公开了在来源于来自年轻供体的BM-MSc的ECM(年轻ECM)上培养细胞扩大SSEA-4阳性小细胞之间的差异。参见图17至19和22至32。

[0153] 本发明人还公开了SSEA-4阴性的小细胞当在年轻ECM上培养时也显示显著恢复。该群体对临床应用也具有价值。

[0154] 在一方面,本文的公开内容可用于成体自体干细胞建库。利用本文公开的技术,可能能够找到并扩增来自任何人的健康细胞(不论年龄),用于干细胞建库和未来的治疗应用。这些技术可以是拯救衰老干细胞群的再生能力的策略,或者与稳健培养系统一起使用构成解决方案的一部分。干细胞库、诊所和患有可潜在地用干细胞治疗的病症的成人患者是可能发现本发明有用的组群的一些非限制性实例。作为一个非限制性实例,使用本文公开地发现,可以仅选择来自客户的最佳细胞用于干细胞建库,这将使得该库能够提供更高

质量的服务,和/或向其以前认为年龄太大的个体提供服务。

[0155] 有利的是,本文公开了允许从低质量和数量的MSC(例如年长者的细胞)中分离和扩增缺陷较低的MSC的小亚群的新方法。在一个实施方案中,缺陷较低的MSC表达阶段特异性胚胎抗原4(SSEA-4)和/或是小尺寸的。此外,本文公开了恢复MSC的再生能力的新方法。该方法提供了治疗年龄相关性疾病的新范例。作为一个非限制性实例,更生自体BM-MSC(通过预先暴露于我们的新培养系统)的连续施用不仅可以替代年长BM-MSC,而且还逐渐逆转老化的微环境。最终目标是减慢年龄相关性退行性疾病、损害MSC或其子代细胞的数量或质量的疾病和/或病症或治疗或衰老过程本身的进程,和/或逆转其退化效应。

[0156] 年龄相关性退行性疾病以及损害MSC数量或质量的疾病和/或病症的非限制性实例包括但不限于骨关节炎和骨质疏松症、肌肉减少症、动脉粥样硬化、帕金森病(Parkinson's)、阿尔茨海默病(Alzheimer's)、口腔干燥、黄斑变性、骨折不愈合、化学治疗或放射治疗引起的骨髓消融,和/或肺炎。

[0157] 即使在年轻细胞中,以前旨在以较大纯度分离干细胞的工作的焦点已集中于使用细胞表面上的标志物,其被证明在大多数情况下是不可靠的。本文公开的操作使得能够分离以前未被认识到存在的成体干细胞亚群。在一些实施方案中,该方法包括从受损群体、例如来自年长对象的群体中分离健康细胞。

[0158] 本文所述的研究表明,可以从年长者的衰老骨髓细胞中分离缺陷较低的BM-MSC的小亚群。此外,BM-MSC的增殖能力通过提供由来自年轻供体的BM-MSC产生的ECM(年轻ECM)而得到显著提高。基于本文公开的实验数据,预期在缺陷较低的MSC的亚群中,分化能力以及组织修复和再生效力将提高,并且通过在年轻ECM上培养细胞将进一步提高。

[0159] 细胞尺寸可以通过本领域技术人员已知的手段来确定。一个非限制性实例包括通过流式细胞术确定细胞尺寸。在一些情况下,如果与在给定时间从供体获得的MSC组群的平均悬浮直径相比,细胞在悬浮于溶液中时具有较小的直径(“悬浮直径”),则MSC可以被认为是小的。

[0160] 在本发明的数个方面,公开了获得和/或向对象施用小尺寸骨髓来源间充质干细胞(BM-MSC)的方法,所述方法包括:从第一供体收获第一BM-MSC组群,根据尺寸和任选的SSEA-4表达分选BM-MSC,分离小尺寸BM-MSC,对小尺寸BM-MSC进行平板接种用于进行培养,扩增培养中的小尺寸BM-MSC,以及将小尺寸BM-MSC施用于对象。在一些实施方案中,使用流式细胞仪分选BM-MSC。任选的,可以将扩增的细胞分离和/或储存在细胞库中以备将来使用。在一些实施方案中,所述对象与第一供体相同,并且在这些情况下,小尺寸BM-MSC将是自体的。在另一些实施方案中,小尺寸BM-MSC当在悬浮液中测量时具有小于33微米、或小于30微米、或小于25微米、或小于20微米、或小于19微米的中值直径。在一些实施方案中,小尺寸BM-MSC在分离时表达SSEA-4(SSEA-4+)。在多个实施方案中,所述对象为50岁或更年长、65岁或更年长、或70岁或更年长。在一些实施方案中,将细胞培养在TCP上或培养在来源于第二供体获得的第二BM-MSC组群的细胞外基质(ECM)上。在一些实施方案中,第二供体为25岁或更年轻(提供“年轻”ECM)。在另一些实施方案中,所述对象具有降低的BM-MSC数量和/或质量,和/或需要干细胞治疗。在另一些实施方案中,所述对象患有年龄相关性退行性疾病,和/或患有损害BM-MSC的数量或质量的疾病或病症,和/或已经或将接受损害BM-MSC的数量或质量的治疗。

[0161] 在本发明的另一些方面,公开了组合物和/或细胞培养系统,其包含分离自从第一供体获得的第一BM-MSc组群的分离的小尺寸BM-MSc,其中第一供体在提供第一BM-MSc组群时为50岁、65岁或70岁或更年轻。在一些实施方案中,小尺寸MSc在分离时表达SSEA-4 (SSEA-4+)。在一些实施方案中,细胞培养系统不包含在分离时不是小尺寸的MSc。在一些实施方案中,细胞培养系统不包含在分离时不表达SSEA-4的MSc。在一些实施方案中,分离的小尺寸MSc当在悬浮液中测量时具有小于33微米、或小于30微米、或小于25微米、或小于20微米、或小于19微米的中值直径。在另一些实施方案中,将分离的小尺寸MSc在来源于第二BM-MSc组群的ECM上进行培养。在另一些实施方案中,第二BM-MSc组群从25岁或更年轻的第二供体获得(年轻ECM)。在多个实施方案中,第一供体在提供第一MSc组群时具有降低的MSc数量和/或质量,和/或患有年龄相关性退行性疾病,和/或患有损害MSc的数量或质量的疾病或病症。对于细胞培养系统,所述培养系统包含培养基。合适的培养基是本领域技术人员已知的。对于组合物,所述组合物还可以包含载体。载体可以是水基的。所述组合物和细胞培养系统可以包含辅助剂,例如以保存组合物或维持细胞的生存力。组合物和细胞培养系统可以储存在致冷和/或低温条件下,例如在细胞库中,并且可以包含有助于在这些条件下保存的成分,例如冷冻保护剂。

[0162] 在一些非限制性方面,本文所述的来源于BM-MSc的细胞外基质(ECM)可以通过在美国专利US 8,084,023、US 8,388,947、US 8,961,955和国际专利申请WO 2016/070057中公开的方法产生,其所有通过引用并入本文。所述方法包括如下产生3D ECM:在TCP或载体(例如微载体)上培养骨髓基质细胞(其可以包含BM-MSc)以产生ECM,然后从ECM中使细胞去细胞化(裂解和/或洗涤/去除)。在多个实施方案中,ECM包含I型胶原、III型胶原、纤连蛋白、饰胶蛋白聚糖(decorin)、双糖链蛋白聚糖、串珠蛋白聚糖(perlecan)和层黏连蛋白。在另一些实施方案中,ECM包含I型胶原、III型胶原、纤连蛋白、饰胶蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、串珠蛋白聚糖和层黏连蛋白,并且还包含黏结蛋白聚糖-1、V型胶原或VI型胶原中的至少一种。在另一些实施方案中,ECM包含胶原 α -1(XII)、胶原 α -3(VI)、EMILIN-1、丝氨酸蛋白酶抑制蛋白HI、血小板反应蛋白-1、腱生蛋白前体(TN)(人)、转化生长因子 β -诱导蛋白和波形蛋白。在另一些实施方案中,ECM包含胶原 α -1(XII)、胶原 α -3(VI)、EMILIN-1、丝氨酸蛋白酶抑制蛋白HI、血小板反应蛋白-1、腱生蛋白前体(TN)(人)、转化生长因子 β -诱导蛋白、波形蛋白、I型胶原、III型胶原、纤连蛋白、饰胶蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、串珠蛋白聚糖和层黏连蛋白。在另一些实施方案中,ECM包含胶原 α -1(XII)、胶原 α -3(VI)、EMILIN-1、丝氨酸蛋白酶抑制蛋白HI、血小板反应蛋白-1、腱生蛋白前体(TN)(人)、转化生长因子 β -诱导蛋白、波形蛋白、I型胶原、III型胶原、纤连蛋白、饰胶蛋白聚糖、双糖链蛋白聚糖、串珠蛋白聚糖、层黏连蛋白,并且还包含黏结蛋白聚糖-1、V型胶原或VI型胶原中的至少一种。

[0163] 体外产生但仍保留体内组织的生理学特征的组织提供了用于监测所提出治疗或分子对组织的生理功能的作用的特别有用工具。因此,本发明公开了测试物质的生物活性的方法,其包括:获得上述任何细胞培养系统;向细胞培养系统中添加物质;以及测量细胞培养系统或细胞的参数以确定将物质添加到细胞培养系统中的作用。向细胞培养系统中添加物质可以包括将物质添加到培养基中。所述培养基可以被更换成包含特定物质或物质组合的培养基以监测培养基变化对细胞生理功能的作用。测量细胞培养系统的参数可以包括例如观察细胞的生长速率或形态特征。可以测量和监测任何生物学相关参数以确定使细胞

暴露于物质或改变任何生长条件的生物作用。如果对应的对照未显示出相同的变化,则所测量或监测参数的变化可以归因于物质的存在或生长条件的变化。在一些实施方案中,所测试的物质是治疗疾病和/或病症(包括例如年龄相关性疾病或衰老过程本身)的候选治疗剂。在一些实施方案中,所述病症是衰老干细胞群的再生能力降低,或者药物或放射治疗的副作用。在一些实施方案中,所述疾病和/或病症由MSC的数量或质量引起,或者损害MSC的数量或质量。在一些实施方案中,所述物质是细胞生长因子或细胞分化因子。

[0164] 实施例

[0165] 包括以下实施例以说明本发明的一些优选实施方案。本领域技术人员应当理解,在以下实施例中公开的技术代表本发明人发现在本发明的实践中发挥良好作用的技术,并且因此可以认为构成本发明实践的一些优选模式。然而,根据本公开内容,本领域技术人员应当理解,可以在不偏离本发明的精神和范围的情况下对所公开的具体实施方案做出许多改变,并且仍然获得相似或类似的结果。

[0166] 本发明人在本文中公开了使用所公开的方法允许从低质量和数量的骨髓基质细胞(例如年长者的细胞)中分离和扩增缺陷较低的MSC的小亚群。此外,本发明人公开了恢复MSC的再生能力的新方法。

[0167] 实施例1

[0168] 分离和培养S+BM-MSC

[0169] 从年长对象(≥ 65 岁)收获骨髓来源间充质干细胞(BM-MSC)。基于尺寸和SSEA-4表达使用流式细胞术分选细胞。收获的BM-MSC中约5%至10%是SSEA-4阳性的小细胞(小+)。参见图4和图7。本发明人发现,与其他亚群相比,在细胞分选后小+富含级分在干细胞中富集,如通过集落形成单位(CFU-F)测定所确定的。然后,将这些亚群平板接种于由来自年轻供体(≤ 23 岁)的髓基质细胞制成的ECM(年轻ECM)或TCP上。使用来自年轻供体的BM-MSC作为对照。然后,使用年轻ECM或TCP培养细胞,并基于自我更新、免疫表型和分化能力进行比较。培养后,将细胞分离并储存。图20示出了上面解释的一般方法的一个实施方案。

[0170] 简言之,将BM-MSC以3,000个细胞/ cm^2 接种到TCP或年轻ECM上并培养7天。图4A示出了在第6天培养物中细胞的明视场显微术。年轻间充质干细胞(MSC)相对于年长细胞显示具有更大数目的细胞并且显示出更加类似于纺锤的形态。对于年长细胞,在TCP与ECM上,细胞总数基本上没有差异,培养物的整体外观也基本上没有差异。这由培养7天后的细胞密度证实(图4B)。细胞计数表明,相对于TCP,年轻细胞在ECM上更显著增殖($p = .015$),而在年长MSC的细胞密度中观察到的小差异没有统计学显著性($p = .0781$)。这与先前报道的在小鼠模型中的观察结果不一致,其中在年轻ECM上年长MSC的增殖提高2倍。

[0171] 培养7天后,将细胞分离并以克隆密度重新接种在TCP上用于集落形成单位-成纤维细胞(CFU-F)、-脂肪细胞(-AD)和-成骨细胞(-OB)测定或用于通过流式细胞术进行免疫表型分析。如图4C所示,年长BM-MSC的集落形成和分化基本上不受在ECM上预扩增影响。此外,两组的集落形成均低于年轻BM-MSC。相反,在ECM上预扩增的年轻BM-MSC在每种条件下都形成更大、更密集且数量更多的集落。虽然增殖和分化测定揭示了4组之间的明显差异,但与MSC相关的标准表面标志物没有明显差异。CD73、CD90和CD105的表达对于任一种培养条件和对于两个年龄组都是相似的(未示出)。这与以下启发一致:不管年龄和/或分化能力如何,MSC标志物的表达都保持高(Bonab,等,2006)。年长BM-MSC的复制和骨生成不能通过

在年轻ECM上培养而可靠地拯救。

[0172] 材料和方法:下面简要描述在该实施例和下面的实施例中使用的材料和方法:

[0173] 来自年轻供体的骨髓-来自年轻供体的骨髓购买自LONZA (Walkersville, MD, USA)。骨髓样品从23岁以下的健康男性供体获得。将新鲜、未经加工的样品在冰上过夜运输,并且在收到后,将红细胞裂解并将单核细胞接种到TCP容器 (5×10^5 个细胞/ cm^2) 中的标准生长培养基(组成在下文进行描述)中。当集落开始形成时,去除培养基,使用PBS轻轻地洗去非黏附细胞,并添加新鲜培养基。将这些细胞扩增一代或两代(P1, P2)并用于实验。或者,为了将来使用,将细胞在含有20%血清的培养基+10% (v/v) 二甲基亚砜(DMSO)中以 2×10^6 个细胞/mL储存在液氮中。这些研究中使用的细胞来自5个不同的供体。

[0174] 来自年长供体的骨髓-来自年长供体(年龄65岁或更年长)的骨髓细胞从接受全膝/髌置换的同意患者获得。将来自手术部位的松质骨移出,并立即在4℃下置于分离缓冲液(Hank缓冲盐水溶液+5% (v/v) 胎牛血清)中。将临床样品在从患者取出后3至4小时内带回实验室,使用锋利的剪刀在4℃下切成小块,然后在37℃下在搅拌下使用溶解于磷酸缓冲盐水(PBS)中的2型胶原酶(400单位/mL)消化30分钟。完成后,将消化物在4℃下离心($600 \times g$) 5分钟并去除上清液。然后,将沉淀物重悬于分离缓冲液中并通过100微米细胞过滤器过滤以去除骨碎片。将收集在细胞过滤器上的骨碎片洗涤直至颜色为亮白色。将包含细胞的剩余溶液在4℃下离心($600 \times g$) 5分钟并将细胞沉淀物重悬于生长培养基中。将细胞接种(5×10^5 个细胞/ cm^2) 到TCP容器中的生长培养基中,并在标准条件下培养直至集落开始形成。一旦出现集落,去除完全培养基,使用PBS轻轻地洗去非黏附细胞,并添加新鲜培养基。使这些细胞扩增(P1, P2)并立即用于实验或放置在液氮中以供将来使用。测试了来自13个供体的细胞,但仅使用了11个。两个供体由于表型组成不允许将足够数目的细胞分选成所有4个亚群而未使用。

[0175] 细胞外基质-骨髓来源细胞外基质由StemBioSys, Inc. (San Antonio, TX, USA) 提供。

[0176] 细胞培养-将骨髓MSC在37℃和5% CO_2 下在湿润培养箱中培养。除非另有说明,否则细胞在包含以下的“标准生长培养基”中培养: α -最低必需培养基(MEM)、15% 预选FBS (Atlanta Biologics, Flowery Branch, GA, USA)、2mM L-谷氨酰胺(Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 和1% (v/v) 链霉素/青霉素(Life Technologies, Grand Island, NY, USA)。在培养期间每三天进行一半培养基的更换。

[0177] 集落形成单位测定-对于CFU-成纤维细胞(CFU-F)测定,将细胞以10和30个细胞/ cm^2 接种到6孔板中的标准生长培养基中。当形成致密集落(通常,培养第10至14天)时,去除培养基,用PBS洗涤一次孔,并将细胞在室温下固定(100%甲醇10分钟)。固定后,将细胞用PBS洗涤一次并使其在室温下干燥10分钟。然后,将集落用甲基紫(MP Biomedicals, Solon, OH, USA)染色10分钟。收集染色溶液以供重新使用并用去离子水洗掉残余染料直至背景干净。

[0178] 对于CFU-脂肪细胞(AD)和成骨细胞(OB)测定,将细胞以20和60个细胞/ cm^2 接种到6孔板上。CFU-AD和CFU-OB培养与CFU-F测定的培养同时开始。在染色CFU-F板时,将CFU-AD和CFU-OB板转换到其各自的诱导培养基。对于CFU-AD培养,向培养基补充5mM 3-异丁基-L-甲基黄嘌呤(IBMx)、1mM吡啶美辛、1 μ M地塞米松和10 μ g/mL胰岛素。对于CFU-OB培养,向培养

基补充100nM地塞米松、10mM β -甘油磷酸盐和50 μ M L-抗坏血酸2-磷酸盐。用于AD和OB诱导的所有培养基补充剂均购买自Sigma-Aldrich (St.Louis,MO,USA)。

[0179] 如通过光学显微术观察的,当分别可视地观察到集落包含脂质或矿物质时,将CFU-AD和CFU-OB板染色。这通常在10至14天(对于脂肪生成)或17至21天(对于骨生成)后。CFU-AD培养物如下染色:在室温下用10%福尔马林固定细胞1小时,然后用去离子水温和洗涤,然后在室温下用新鲜制备的油红O染色1小时。染色后,去除溶液并用去离子水温和洗涤孔直至背景干净。对于CFU-OB,使用10%福尔马林在室温下将细胞固定1小时,用去离子水洗涤,然后在室温下在紫外光下用1%硝酸银(AgNO_3)染色过夜。第二天,去除 AgNO_3 溶液并通过用5%硫代硫酸钠处理2分钟来去除过量的银。然后,用去离子水洗涤孔以防止去除过多的染料。

[0180] 荧光激活细胞分选-异硫氰酸荧光素(FITC)缀合的抗SSEA-4和IgG3同种型对照抗体购买自BD Biosciences (San Jose,CA,USA)。用于选择小和大BM-MSC群的设门策略是使用来自多个年轻和年长供体的细胞在数周内开发的,其中年轻供体细胞用作小细胞的对照。基于前向散射(FSC)的电压和尺寸设门对于所有细胞种类保持不变。每次基于我们的同种型对照重新评估FITC设门。使用双联体鉴别去除细胞双联体。

[0181] 使用10 μ g/mL的抗体对单细胞悬浮液(10×10^6 个细胞/mL)进行染色,并在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1小时。将细胞用分离缓冲液洗涤两次并置于冰上(<3小时)直至使用来自BD Biosciences (San Jose,CA,USA)的FACSAria细胞分选器进行无菌分选。使用FACSDiva软件系统运行分选。

[0182] 流式细胞术-小鼠-抗人非缀合抗体购买自BD Biosciences (San Jose,CA,USA)。将单细胞悬浮液(1×10^5 个在100 μ L中)与一抗(10 μ g/mL)一起在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育至少1小时。用染色缓冲液(PBS+5%v/v FBS+0.01% m/v叠氮化钠)将染色的细胞洗涤2次,然后与FITC缀合的山羊抗小鼠IgG一起在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30分钟。然后,将细胞用染色缓冲液洗涤两次并立即分析,或用新鲜制备的1%多聚甲醛固定并在72小时内分析。使用BD Bioscience LSRII流式细胞仪进行分析。使用FACSDiva软件系统运行样品,随后分析生成的数据并使用FlowJo软件包创建图表。对每个样品分析10,000个事件,并且主要结果是相对于同种型对照的阳性细胞百分比。在测定膜联蛋白-5时,对所述方案进行改进以包括二甲基亚砜与抗体以使膜透化。

[0183] 中值直径-培养后,将细胞分离并悬浮放置。将悬浮的细胞涂布于在盖片下面的载玻片上。通过明视场显微术拍摄图像并使用Olympus CellSens软件分析以分析每种条件下至少100个细胞的铺展形态。对于年长细胞, $n=150$;对于年轻细胞, $n=276$ 。使用MATLAB技术计算软件计算描述性统计量。

[0184] 细胞内活性氧类-使用CellROX绿色流式细胞术测定试剂盒(ThermoFisher Scientific,Bedford,MA,USA)分析细胞内活性氧类(ROS)。准备三个管,每个管含有大约100 μ L的 5×10^5 个细胞/mL。向阴性对照管中添加1mM N-乙酰半胱氨酸(NAC)以提高样品的抗氧化剂能力。对于阳性对照,使用叔丁基氢过氧化物(TBHP;200 μ M)诱导氧化应激。将所有三个管在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1小时,然后用CellROX ROS检测试剂染色。立即使用BD Bioscience LSRII流式细胞仪分析(在1小时内)染色的样品。

[0185] 三磷酸腺苷-使用ATP确定试剂盒(Molecular Probes,Eugene,OR,USA)测量三磷

酸腺苷 (ATP) 水平。一式三份地测量来自受试培养物的25,000个细胞,并与使用随试剂盒提供的ATP标准品建立的ATP标准曲线进行比较。发光是由于萤火虫萤光素酶的活性,并且使用标准曲线确定每个样品的平均ATP浓度。

[0186] β -半乳糖苷酶- β -半乳糖苷酶 (β -Gal) 使用96孔细胞衰老测定试剂盒 (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) 测量。

[0187] 将在96孔板中的细胞与细胞裂解缓冲液一起在4℃下孵育5分钟。将全细胞裂解物转移至微量离心管中并以 $2,000 \times g$ 离心10分钟。收集细胞裂解物的上清液用于分析。将50 μ L样品与50 μ L新鲜制备的测定缓冲液(随试剂盒提供)一起在37℃下避光孵育3小时。3小时后,将50 μ L的反应溶液添加到在96孔板中的200 μ L终止溶液中。立即在360nm激发/465nm发射下测量荧光。

[0188] 端粒酶活性-使用TeloTAGGG端粒酶PCR ELISA^{PLUS}试剂盒 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) 量化端粒酶活性。该测定试剂盒是一个两步过程。在第一步中,端粒酶将端粒重复序列添加到经生物素标记引物的末端,然后通过PCR扩增引物和延伸产物。在下一步中,使PCR产物与对端粒重复序列具有特异性的经地高辛配基 (DIG) 标记检测探针杂交,然后通过生物素标记固定到微板上。然后,用与辣根过氧化物酶 (HRP) 缀合的抗体对其进行检测。利用样品以及所有实验对照的吸光度值,能够计算给定实验中不同样品的相对端粒酶活性。

[0189] 细胞形态学-使用Olympus IX73倒置显微镜 (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan) 在不同的细胞增殖阶段拍摄图像。为了测量细胞形态,在汇合前拍摄图像,使得细胞形态基本上不受细胞-细胞接触影响。使用Olympus的CellSens Dimension软件分析图像。使用手绘多边形工具绘制细胞的轮廓;自动计算圆度和面积的测量结果。

[0190] 统计学分析-每个独立实验一式三份地进行细胞计数、CFU、 β -半乳糖苷酶、ATP和端粒酶测定。对于每个独立实验中每个组中的每种标志物进行一次流式细胞术。使用来自不同组织供体的细胞重复所有类型的实验至少3次。

[0191] 汇集每个测定的重复数据(即增殖、CFU测定、端粒酶活性、ATP水平和基因表达),然后分析。计算平均值、标准偏差和置信区间,并在必要时使用ANOVA分析和事后检验比较各组。

[0192] 以CFU-AD和-OB对CFU-F的比例计算分化能力,并使用改进的Wald方法确定置信区间。

[0193] 由于非常大的样品大小,流式细胞术数据被认为代表整个群体中表达不同标志物的细胞的数目。对每组中来自不同供体的结果进行平均,并使用ANOVA进行比较,如针对增殖研究所述的。使用Fisher精确检验来确定大细胞是否比小细胞更可能表达衰老标志物。

[0194] 实施例2

[0195] 鉴别形态学差异和SSEA-4的表达

[0196] 对年轻和年长BM-MSC的特性进行比较和对比以确定可以用作阻止年长MSC群拯救的限制性因素的特性,并确定最可靠地阐明年轻和年长MSC之间的差异的测定,使得年轻MSC的这些特性可以用作测量其他MSC群体的功能的基准。

[0197] 年长MSC的增殖速率相对于年轻MSC慢得多。参见图4。另外,相对于年轻MSC,年长BM-MSC的形态学表型显示较大但更不类似于纺锤。参见图4。然而,形态学差异可能仅仅是

归因于较年轻细胞汇合程度的细胞-细胞接触的结果。为了确定这些形态学差异是否在年轻BM-MSc达到汇合之前就已存在,在培养3天后拍摄图像,此时细胞-细胞接触的影响最小。在细胞达到汇合之前通过明视场显微术定性地观察到年轻BM-MSc与年长BM-MSc在形态学上的大差异。参见图5A。这种差异可以通过比较细胞铺展面积的比率与具有等效周长的圆的比率(圆度)来量化。年长BM-MSc相对于年轻MSc为 $>25\%$ 更接近圆形(较不类似于纺锤)($p<.00001$)。

[0198] 在测量培养期间细胞形状的差异之后,探索年轻和年长BM-MSc在代谢活性方面的差异。年长BM-MSc显示包含比年轻BM-MSc低约50%的ATP水平($p=.023$) (图5B)。这并不令人惊讶,并且已知代谢活性随年龄而降低。另外,由于许多细胞过程需要ATP形式的能量,因此这种降低可能对于在MSc中观察到的年龄相关性功能丧失是关键的。

[0199] 由于已知MSc是一个异质群体,并且最近对造血细胞的许多研究已经将细胞的群体水平衰老描述为克隆组成的变化而不是所有细胞单独衰老。进行广泛的免疫表型分析以了解年长BM-MSc群相对于年轻的表型组成。在BM-MSc的传统免疫表型标志物方面未观察到差异;然而,通过流式细胞术,标志物表达方面的数个差异与干性和衰老相关(图5C)。尽管代谢活性降低,但显著数目的年长BM-MSc仍具有非常高的细胞内活性氧类(ROS)含量。这表明,这些细胞消除细胞内ROS的能力显著降低。虽然还不清楚在这种情况下是否存在因果关系,但类似分数的细胞也表达膜联蛋白-5(一种早期凋亡标志物)。这表明,培养物中相当大部分的年长MSc正在准备经历凋亡。不受理论束缚,这是相对大部分的年长BM-MSc表达SSEA-4的一种可能解释。

[0200] SSEA-4已被用作有效MSc的标志物,并且可以是干性(stemness)的可靠标志物(Sun,等,2011;Gang,等,2007;Kawanabe,等,2014;Pipino,等,2015)。然而,如果这是真的,可以预期在具有相对小分数的SSEA-4(+)MSc的细胞群中,SSEA-4表型将通过比其他细胞更快地增殖而成为显性表型。实际上,情况并非如此。在年长MSc群中,在连续传代期间SSEA-4表达趋于降低,并且培养最终失败。不受理论束缚,如果年长供体中大分数的MSc正在经历凋亡,则可能是正快速分裂的细胞也正快速凋亡,从而阻止其成为培养物的显性表型。

[0201] 第二种可能的解释通过年长BM-MSc的形态学提出。除形状改变之外,年长BM-MSc还具有高得多的中值铺展面积($14,326\mu\text{m}^2$ 相对于 $2,123\mu\text{m}^2$)和中值直径($33.10\mu\text{m}$ 相对于 $18.20\mu\text{m}$ -表1)。图3和图5D分别示出了年长和年轻BM-MSc的细胞铺展面积和细胞尺寸的分布(如通过流式细胞术中的前向散射测量的)。虽然相对于年轻,在年长MSc中中值尺寸显示显著更大,但在群体之间存在显著的重叠,并且其显示占据相似的范围。来自年长供体的小尺寸BM-MSc在尺寸上与见于年轻供体中的BM-MSc的尺寸相似。在此对来自年长供体的BM-MSc观察到的细胞尺寸和形状变化是获得衰老表型的细胞的特征(Zhou,等,2008;Wagner,等,2008)。在过去的十年中,在了解衰老在老化中的作用方面已取得显著进展。这之中大部分集中于确定多效性机制和显示衰老细胞可以通过被称之为衰老相关分泌表型的表型经由旁分泌效应而损伤邻近细胞(Campisi,等,2011;Freund,等,2010;Coppé,等,2008)。不受理论束缚,可能的是,如果这些更大、更平坦、更圆形的细胞已变得衰老,则其通过分泌因子而抑制“年轻”邻近细胞。

[0202] 表1

	中值直径 (μm)	标准偏差
[0203]		
年轻	18.20	1.50
[0204]		
年长	33.10	4.90
[0205]	实施例3	
[0206]	鉴定来自年长BM-MSC细胞的增加的分泌因子及其对细胞增殖的影响	
[0207]	为了测试年长MSC群包含被由衰老细胞分泌的可溶性因子抑制的“年轻”MSC亚群是否合理,确定年长群体和年轻群体中衰老BM-MSC的群体。	
[0208]	为了比较年轻和年长群体中衰老细胞的相对数目,收集相等数目的年轻和年长BM-MSC并测量 β -半乳糖苷酶表达。 β -半乳糖苷酶表达是衰老的标记。与年轻BM-MSC相比,来自年长供体的BM-MSC具有更高的衰老细胞频率。(图6A) ($p=.017$)。	
[0209]	接下来,用从年轻或年长MSC收集的条件化培养基处理年轻BM-MSC,以确定来自年长BM-MSC的分泌因子是否能够抑制“年轻”MSC的功能。来自年长MSC的条件化培养基(年长CM)相对于对照或来自年轻BM-MSC的条件化培养基显著抑制年轻BM-MSC的增殖(图6B) (分别为 $p=.004$ 或 $p=.007$)。也参见图8。不受理论束缚,该数据足以允许年长MSC可能包含被邻近衰老细胞抑制的“年轻”亚群的可能性。	
[0210]	为了鉴定可能引起这种效应的具体因子,使用细胞因子微阵列来分析来自年长和年轻供体的条件化培养基以测试80种细胞因子的相对浓度。受试细胞因子中有44种已被鉴定为衰老相关分泌表型的一部分。如预期的那样,来自年长MSC的条件化培养基包含较高浓度的衰老相关分泌表型的大部分组分。44种细胞因子中有36种(81.8%) 在年长BM-MSC群中升高。这36例中有19例的差异是统计学上显著的。该数据总结在图6C中。	
[0211]	总之,这些数据表明,年长MSC确实包含较高浓度的衰老细胞,这些细胞表达类似于之前研究中针对其他细胞类型描述并在Freund,等,2010中总结的那些的衰老相关分泌表型,并且这些分泌的因子能够抑制“年轻”MSC的增殖。	
[0212]	实施例4	
[0213]	类似于年轻MSC的年长MSC细胞亚群的分离	
[0214]	由于年长MSC显示抑制健康MSC的增殖,并且一些年长MSC表现出指示年轻MSC的表型标志物,因此认为与年轻MSC表型相似的年长MSC亚群可能具有独立于年龄的保守功能。使用流式细胞术将年轻和年长BM-MSC的SSEA-4表达相对于细胞尺寸绘图,观察到在这些方面年轻BM-MSC相对同质,其中绝大多数细胞表达小尺寸、SSEA-4 (+) 表型(小(+))。参见图7A。相比之下,年长BM-MSC更为异质,并且可以基于尺寸和SSEA-4表达容易地分成四个群体(图7A)。将年长BM-MSC分选成4个群体以确定年长BM-MSC的小(+) 亚群是否具有年轻功能,以及这两种标记是否确实与细胞功能相关。参见图7B中的分选策略。在双联体鉴别之后,基于SSEA-4的表达(阳性与阴性)和细胞尺寸(小与大)将细胞分成四个群体,如通过FSC测量的。为了获得纯度较大的群体,丢弃具有中等FSC或FITC强度的细胞。通过分选,确定来自65岁以上个体的MSC中仅 $8.24\% \pm 3.63\%$ 当在这些方面测量时具有年轻表型。	
[0215]	实施例5	
[0216]	来自年长供体的BM-MSC亚群的表征	
[0217]	使用体外测定将所得群体与年轻BM-MSC以及来自年长供体的未经分级BM-MSC进行比较。通过检查,年轻细胞显示在每种条件下具有最多的集落,而小(+) 群体相对于从年	

长供体分离的BM-MSc显著增加(图10A)。这通过人工计数集落而证实(图10B和图11)。事实上,小(+)BM-MSc和年轻BM-MSc之间在集落形成方面没有统计学显著性差异。这表明,相对于年轻细胞,小(+)年长亚群中MSc的数目和潜能可能差异很小(如果有的话)。还通过细胞计数确定了来自年长供体的未经分选BM-MSc、小尺寸BM-MSc和大尺寸BM-MSc的细胞增殖。在相同时间内,小细胞比大细胞多生长65%的细胞。小细胞也比未按尺寸分选的细胞生长得更快(图9)。

[0218] 在具有小尺寸、大尺寸和未经分选尺寸的来自年长供体的细胞中确定表达数种与年轻和衰老相关之蛋白质的细胞的百分比以及具有可检测ROS水平的细胞的百分比。与大细胞相比,具有小尺寸的细胞表达更高的SSEA-4和血小板衍生生长因子PDGF,并且表达更低的HLA-DR和细胞内ROS。参见图12。这证明小尺寸细胞具有与年轻细胞更相似的表型,例如更高的SSEA-4、更低的HLA-DR和更低的细胞内活性氧类(ROS)。

[0219] 确定了来自年长供体的BM-MSc细胞的四个亚群的ATP浓度、具有高ATP水平的细胞数目、细胞的ATP含量、端粒酶水平和 β -半乳糖苷酶表达。小BM-MSc独立于SSEA-4表达表现出与年轻BM-MSc相当的ATP浓度。然而,大BM-MSc不论SSEA-4表达如何都具有大约为年轻BM-MSc的一半的ATP水平(图10C、图14和图30B)。发现,与来自年长者骨髓基质细胞的其他细胞组群相比,小尺寸和SSEA-4的存在与ATP含量较高的细胞的数目增加、较高ATP含量/细胞、略微提高的端粒酶水平相关(图13至15)。适当地,大BM-MSc比小BM-MSc或年轻BM-MSc具有显著更多的衰老细胞,其中大(-)细胞显示出最高的 β -半乳糖苷酶(β -Gal)表达, β -Gal是衰老的标志物并且表达使用荧光测定被报道为相对荧光(图10D)。虚线代表年轻BM-MSc的平均 β -半乳糖苷酶表达。小BM-MSc在统计学上等同于年轻BM-MSc。不受理论束缚,小(+)细胞具有低频率衰老细胞的证据符合以下理论:其可能代表在正常条件下被其衰老邻近细胞抑制的年长MSc亚群。

[0220] 测试表征衰老相关分泌表型的细胞因子的表达以确定小(+)细胞是否比年长MSc更加类似于年轻MSc。图10E中的热图示出了已知为SASP之一部分的44种受试细胞因子的表达。进行多因素ANOVA之后进行Tukey真实显著性差异程序揭示,年长BM-MSc比年轻或小(+)BM-MSc具有更高的SASP细胞因子表达(分别为 $p < .0001$ 或 $p = .039$)。年轻和小(+)BM-MSc之间在SASP因子的表达方面没有显著性差异($p = .068$)。

[0221] 还确定了在用以下分泌物条件化的生长培养基中生长的来自年轻供体的BM-MSc的细胞增殖:来自具有小细胞尺寸(小)或大细胞尺寸(大)的年长供体BM-MSc亚群的分泌物、来自未按尺寸分选的年长供体BM-MSc的分泌物(未经分选)和来自年轻供体BM-MSc的分泌物(年轻CM)。参见图16。当在大且未经分选的条件化培养基中培养时,来自年轻供体的BM-MSc的增殖速率受到抑制,如通过细胞计数确定的,而在小和年轻条件化培养基中培养显示几乎没有差异至没有差异。这表明,年长供体中抑制MSc生长的环境因素可能至少部分地取决于由大MSc引入的有害因素。

[0222] 实施例6

[0223] 在TCP和BM-ECM上培养干细胞

[0224] 表明可以从功能受损的年长MSc群中分离出MSc级分的结果是有希望的。然而,一些基于细胞的治疗需要大量的高质量细胞。即使能够获得非常高质量的细胞级分,但其也可能是原始群体的小亚群,使得难以获得足够数目的细胞用于临床相关性。为了克服这一

点,可以扩增细胞。然而,这种方法具有其自身的缺陷。传统上,质量和数量是竞争性需求,因为随着MSC在TCP上扩增,其可能经历自发分化,产生与最初分离的这些细胞具有非常不同表型的群体。为了解决这个问题,在已经显示允许细胞增殖同时维持干性的年轻ECM上扩增亚群(Sun,等,2011)。来自年轻供体的BM-MSC以及来自年长供体的小尺寸、大尺寸和未经分选尺寸BM-MSC中干细胞的数目通过在组织培养塑料(TCP)和骨髓细胞外基质(BM-ECM)上培养之前和之后计数集落形成单位(CFU)的数目来确定。与来自年长供体的大细胞和未经分选细胞相比,培养来自年长供体的小细胞显示拯救的干细胞增加。而且,与在TCP上培养相比,在BM-ECM中的培养显示干细胞增加(图17)。

[0225] 还测试了来自年轻供体的BM-MSC以及来自年长供体的小尺寸、大尺寸和未经分选尺寸BM-MSC的CFU以确定其分化能力,如通过针对分化为成纤维细胞(CFU-F)、成骨细胞(CFU-OB)和脂肪细胞(CFU-AD)的标志物染色所表明的。来自年长供体的小细胞的CFU显示出与来自年轻供体的细胞相似的分化能力(图18)。

[0226] 对在TCP和BM-ECM上培养的分离成四个亚群的来自年长供体的BM-MSC确定细胞增殖、集落形成能力和分化能力。对于培养7天的细胞,在TCP和BM-ECM上培养的小(+) BM-MSC相对于未经分选的年长MSC表现出显著的恢复(图19A和图22)。其显示在形态上与来自年轻供体的细胞类似,并且在培养7天后高度汇合。令人感兴趣的是,小(-) BM-MSC也显示比年长BM-MSC群显著更健康,并且能够相对快速地增殖。与在TCP上培养的细胞相比,在年轻ECM上培养的细胞显示出细胞增殖的提高。与大尺寸BM-MSC和未分离的BM-MSC相比,小细胞也表现出增殖速率的提高。小+细胞显示在TCP和年轻ECM二者上的细胞增殖均提高。对于小细胞,当细胞在BM-ECM上扩增时显著改善(图19B、图23和图24)。在BM-ECM上培养的小(+)细胞实际上比在TCP或BM-ECM上扩增的年轻细胞增殖得更快(图19B和图24)。结果表明,年轻ECM提高所有亚群和来自年轻供体的细胞的增殖速率。另外,小细胞尺寸也显示提高增殖速率。

[0227] 培养7天后,将细胞分离并以克隆密度重新接种用于CFU-F、CFU-AD和CFU-OB测定(图19C)。CFU测定的结果与观察到的增殖一致。在ECM上扩增的小细胞形成更大、更密集且数量更多的集落。对于任一个大细胞群来说都不是这样,值得注意的例外是,在年轻ECM上培养之后,大(+)细胞显示骨生成提高。还值得提及的是,大(+)群体确实显示总体上具有显著的骨生成潜能。不受理论束缚,该群体可能已经定型于骨生成命运。在图19D至19F中,CFU的结果是量化的。在此,小阳性细胞显示在ECM上培养后在所有3种测定的CFU总数方面均一致地具有高倍数变化。

[0228] 此外,在传代4次后确定未经分级BM-MSC(年轻;年长)和经分级年长BM-MSC的总倍数变化。使细胞在TCP与来源于来自年轻供体的BM-MSC的ECM(年轻ECM)上培养中每7天传代。接种密度为1500个细胞/cm²。在使来自年轻和年长BM-MSC以及年长BM-MSC亚群(小+、小-)的BM-MSC在TCP或年轻ECM上传代后SSEA-4阳性细胞的数目显著增加。当小+BM-MSC在年轻ECM上扩增时,在年轻ECM上的连续传代使得倍数变化为约6,000(图32)。

[0229] 因此,数据表明,可以从年长者的衰老骨髓细胞中分离出缺陷较低的BM-MSC的小亚群(约10%),并且其增殖能力可以通过提供由来自年轻供体的髓基质细胞制备的ECM而显著提高。

[0230] 实施例7

[0231] 在BM-ECM和TCP上培养的BM-MSC的表征

[0232] 还表征了在年轻BM-ECM和TCP上培养的未经分选和经分级BM-MSc。

[0233] SSEA-4是早期状态MSC的标志物。在BM-ECM和组织培养塑料(2D)上培养后,确定使来自年轻供体的BM-MSc以及来自年长供体的小尺寸BM-MSc、大尺寸BM-MSc和未经分选尺寸BM-MSc传代5次后SSEA-4阳性细胞的数目。与来自年长供体的大细胞和未经分选细胞相比,培养来自年长供体的小细胞在5次传代后显示SSEA-4阳性细胞增加(图29)。此外,与在2D上培养相比,在BM-ECM中的培养显示干细胞增加。

[0234] 还确定了在TCP或来源于来自年轻供体的BM-MSc的ECM上培养的从年长供体分离的四个BM-MSc亚群(S⁺、S⁻、L⁺、L⁻)以及来自年轻和年长供体的未经分选BM-MSc细胞的SSEA-4表达、ROS浓度、ATP含量/细胞和端粒酶水平。发现,小(+)细胞具有高SSEA-4表达,并且在大多数组群中,在年轻ECM上的培养提高SSEA-4表达。参见图25和31。此外,小BM-MSc具有比其他组群更低的细胞内ROS,并且在年轻ECM上的培养进一步降低平均细胞内ROS(图26和31)。另外,在TCP上培养的小(+)BM-MSc具有显著更高的ATP浓度,并且在年轻ECM上培养提高大多数细胞组群的ATP浓度(图27)。另外,小(+)细胞具有高得多的端粒酶活性(图28)。

[0235] 当在TCP或来源于来自年轻供体的BM-ECM的ECM(年轻ECM)上培养时,将小(+)和小(-)MSc群进一步与未经分选的年轻和年长BM-MSc进行比较和对比。 β -Gal表达结果表明小尺寸亚群在培养期间维持低衰老水平。具体而言,从年长供体分离的小BM-MSc在培养期间维持低 β -Gal表达。另外,年轻MSc与小MSc的 β -gal水平没有显著差异(图30A)。这表明,该群体不是暂时的,并且可以在培养中维持。当在ECM上培养BM-MSc时,ATP水平平均提高,使得对于所有组群而言相对于在TCP上的培养平均ATP水平提高(图30B)。这一差异在4个受试组群中的3个中具有统计学显著性。另外,在TCP上培养的小(+)BM-MSc具有显著更高的ATP浓度(图30B)。

[0236] 比较年轻BM-MSc、年长BM-MSc和小(+)BM-MSc的细胞因子谱(图30C)。出现类似的趋势,其中与年轻BM-MSc或小(+)BM-MSc相比,年长BM-MSc表达高得多的SASP细胞因子水平(分别为 $p = .0001$ 和 $.011$),而年轻BM-MSc和小(+)BM-MSc的SASP谱没有显著差异($p = .2756$)。

[0237] 为了确定BM-ECM是否允许大量高质量MSC的扩增,在TCP和ECM上扩增后对小BM-MSc进行免疫表型分析并与年轻MSc和年长MSc进行比较(表2和图31)。在ECM上培养的小(+)BM-MSc在SSEA-4表达方面超过所有其他组群,同时具有最低水平的细胞内活性氧类(ROS)。虽然在ECM上培养的所有组群都具有相似的膜联蛋白-5表达,但值得注意的是,相对于TCP,小(+)BM-MSc在ECM上表达显著更低的水平。同时,流式细胞术显示小(+)BM-MSc组群在年龄相关的表型变化方面显著逆转。相对于TCP培养,在ECM上培养的小(+)BM-MSc具有更高的SSEA-4表达以及更低的ROS和膜联蛋白-5。这表明小尺寸BM-MSc具有与年轻细胞更相似的表型,例如更高的SSEA-4、更低的膜联蛋白-5和更低的细胞内活性氧类(ROS)。这些数据还表明,“年轻”MSc亚群可以扩增,同时维持“年轻”表型。

[0238] 表2

[0239]

	SSEA-4		ROS		膜联蛋白5	
	TCP	BM-ECM	TCP	BM-ECM	TCP	BM-ECM
年轻	86%	84%	9%	6%	16%	11%
年长	77%	70%	23%	17%	5%	11%
小 (+)	87%	93%	12%	3%	23%	14%
小 (-)	86%	87%	9%	14%	14%	6%

[0240] 实施例8

[0241] 分化能力以及组织修复和再生效力

[0242] 基于上面提供的数据,本发明人预测与其他MSC亚群相比并且与未经分选的MSC相比,在小+细胞中分化能力以及组织修复和再生效力将提高。还预测,在ECM上培养的细胞并且特别是小+细胞比在TCP上培养的细胞具有更大的分化能力以及组织修复和再生效力。

[0243] 分离的MSC的细胞分化能力可以通过本领域技术人员公知的方法来确定。预期,相对于其他MSC亚群并且与未经分选的MSC相比,小+细胞将显示出提高的细胞分化能力。此外,预期,与在TCP上培养的小+细胞相比,在年轻ECM上培养的细胞并且特别是小+细胞在细胞分化能力方面将具有更大的提高。

[0244] 分离的MSC的组织修复和再生可以通过本领域技术人员公知的方法来确定。预期,相对于其他MSC亚群并且与未经分选的MSC相比,小+细胞将显示出提高的组织修复和再生效力。此外,预期与在TCP上培养的小+细胞相比,在年轻ECM上培养的细胞并且特别是小+细胞在组织修复和再生效力方面将具有更大的提高。

[0245] ***

[0246] 根据本公开内容,可以获得和执行本文公开和要求保护的所有方法,而无需过度的实验。虽然本发明的组合物和方法已经根据一些优选实施方案进行了描述,但是对本领域技术人员显而易见的是,可以对本文所述方法和本文所述方法的步骤或步骤顺序进行改动,而不背离本发明的构思、精神和范围。更具体地,显然某些在化学和生理学上均相关的试剂可以替代本文所述的试剂而获得相同或相似的结果。所有这些对于本领域技术人员来说显而易见的类似替代方案和修改方案均被视为在由所附权利要求书限定的本发明精神、范围和构思之内。

[0247] 参考文献

[0248] 以下参考文献根据其提供补充本文所述内容的示例性操作细节或其他细节的程度特别地通过引用并入本文。

[0249] Athanasiou, et al., Biomaterials. 17 (2): 93-102, 1996.

[0250] Bonab, et al., BMC Cell Biol. 7: 14, 2006.

[0251] Campisi, et al., Semin Cancer Biol. 21 (6): 354-59, 2011.

[0252] Cancedda, et al., Matrix Biol. 22 (1): 81-91, 2003.

[0253] Chan, et al., Biomaterials. 33 (2): 464-72, 2012.

[0254] Chen, et al., Tissue Eng. 11 (3-4): 526-34, 2005.

[0255] Chen, et al., J. Bone Miner. Res. 22: 1943-1956, 2007.

- [0256] Chen,Birth Defects Res C Embryo Today.90 (1) :45-54,2010.
- [0257] Cho,et al.,Blood.111 (12) :5553-61,2008.
- [0258] Coppé,et al.,PLoS Biol.6 (12) :2853-68,2008.
- [0259] Costa,et al.,Int J Biochem Cell Biol.44 (12) :2233-7,2012.
- [0260] Freund,et al.,Trends Mol Med.16 (5) :238-46,2010.
- [0261] Gang,et al.,Blood.109 (4) :1743-51,2007.
- [0262] Kagami,et al.,Oral Dis.14 (1) :15-24,2008.
- [0263] Kawanabe,et al.,Clin.Oral Investig.,19 (2) :363-71,2015.
- [0264] Lai,et al.,Stem Cells Dev.19:1095-1107,2010.
- [0265] Leal-Egana&Scheibel,Biotechnol Appl Biochem.55 (3) :155-67,2010.
- [0266] Maria,et al.,Tissue Eng Part A.17 (9-10) :1229-38,2011.
- [0267] Nagaoka,et al.,Ann Biomed Eng.38 (3) :683-93,2010.
- [0268] Pipino,et al.,Stem Cells Dev.24 (12) :1415-28,2015.
- [0269] Sun,et al.,FASEB J.25 (5) :1474-85,2011,
- [0270] Wagner,et al.,PLoS ONE.3 (5) :e2213.
- [0271] Zhou,et al.,Aging Cell.7 (3) :335-43,2008.
- [0272] US专利8,084,023,Chen et.al.
- [0273] US专利8,388,947,Chen et.al.
- [0274] US专利8,961,955,Chen et.al.
- [0275] PCT公开WO 2016/070057,Zamilpa et al.

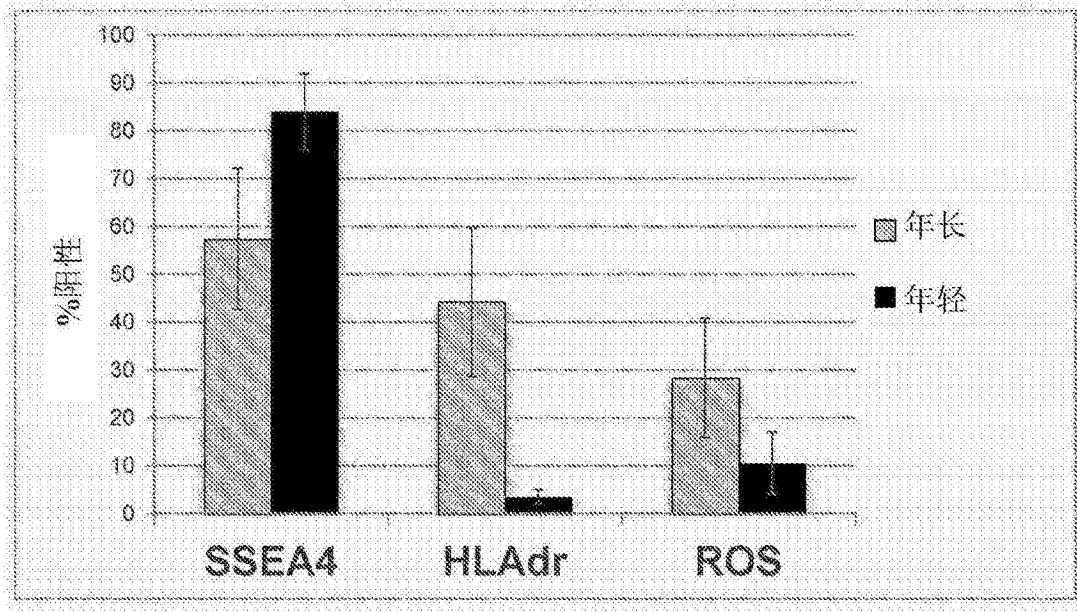


图1

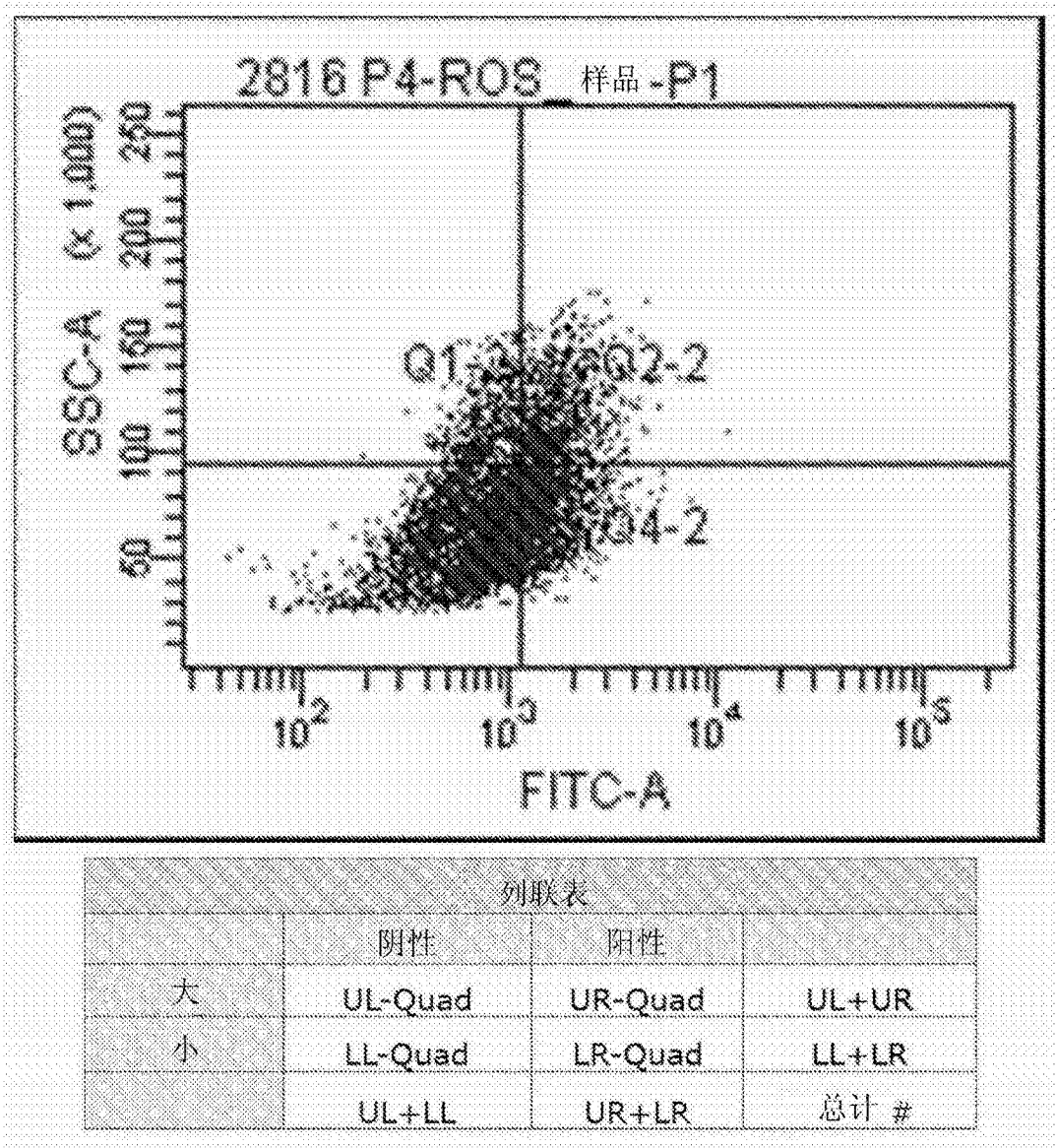


图2

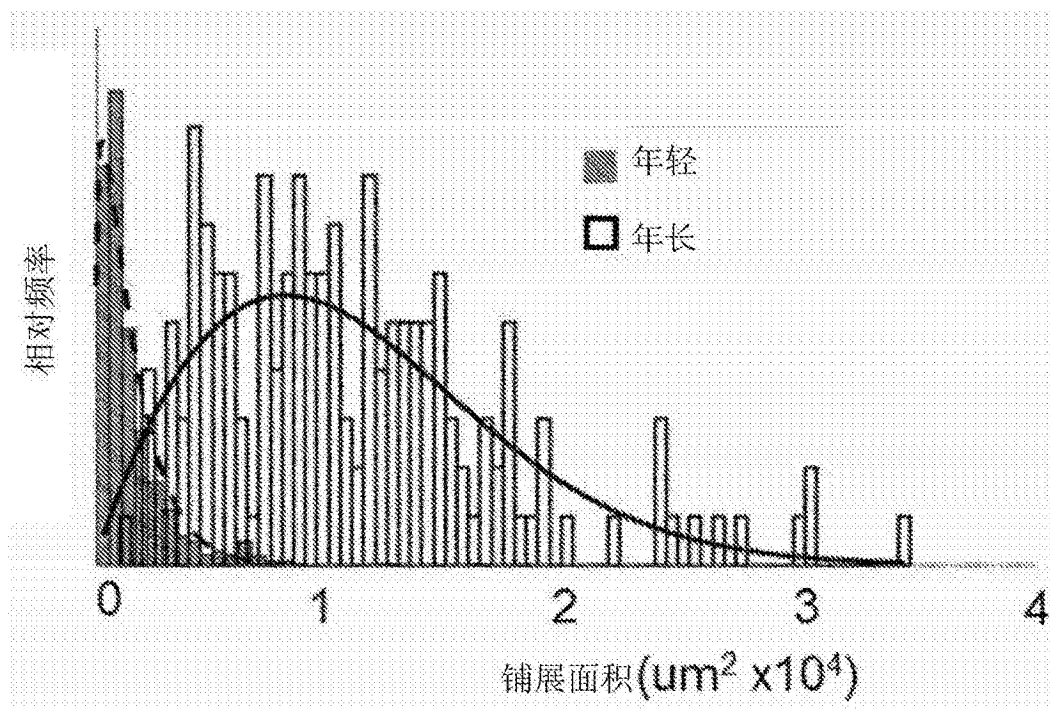


图3

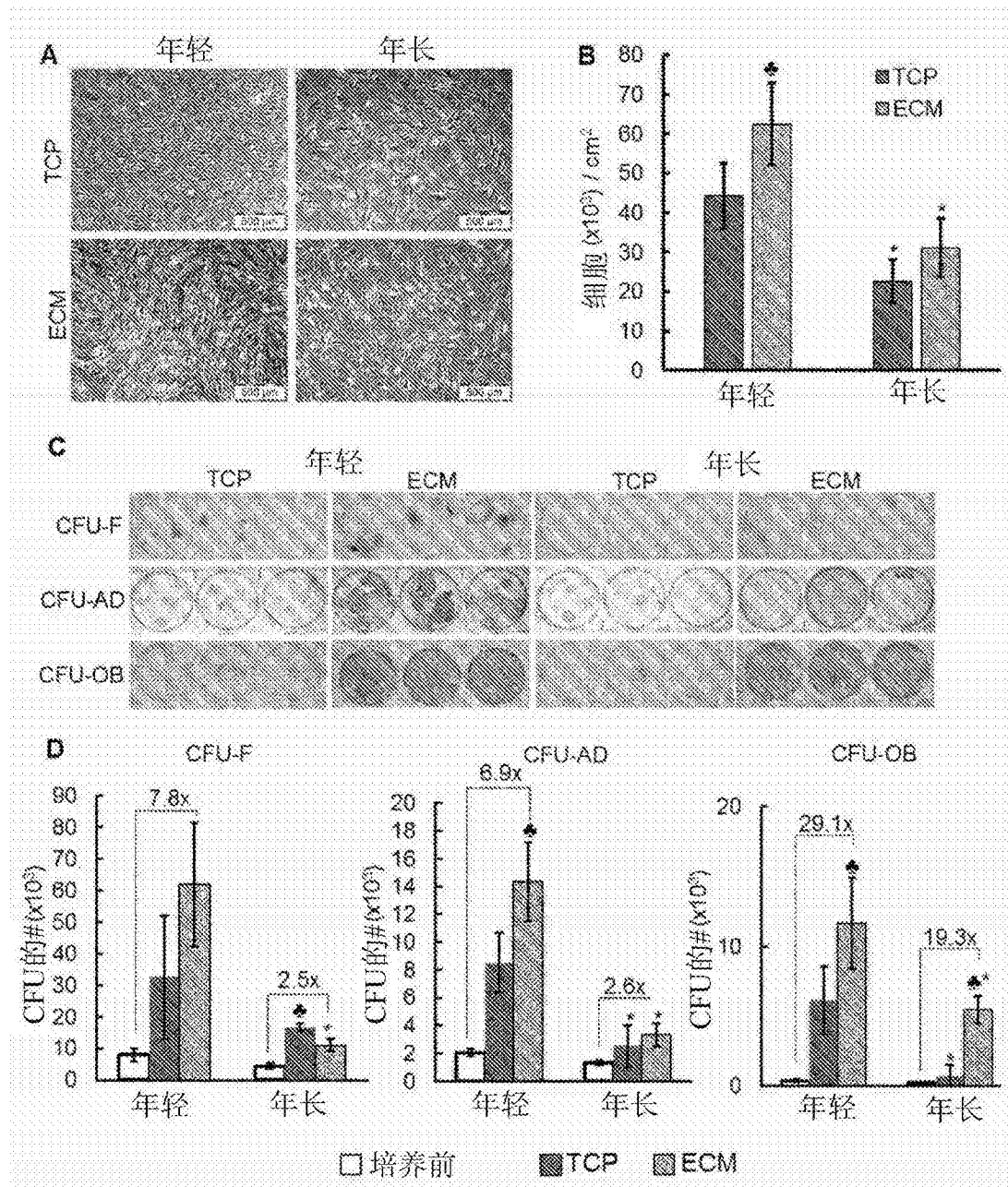


图4

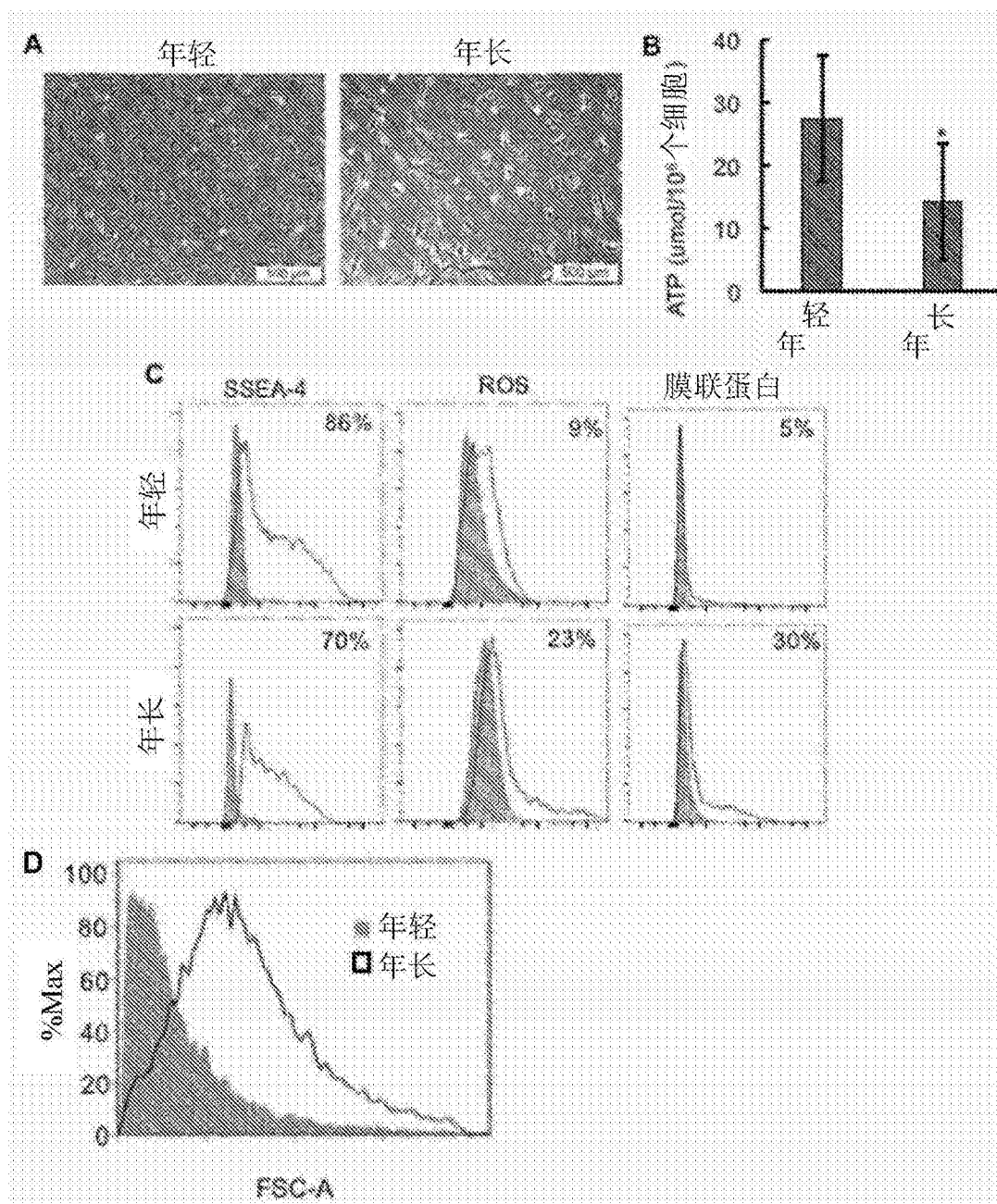


图5

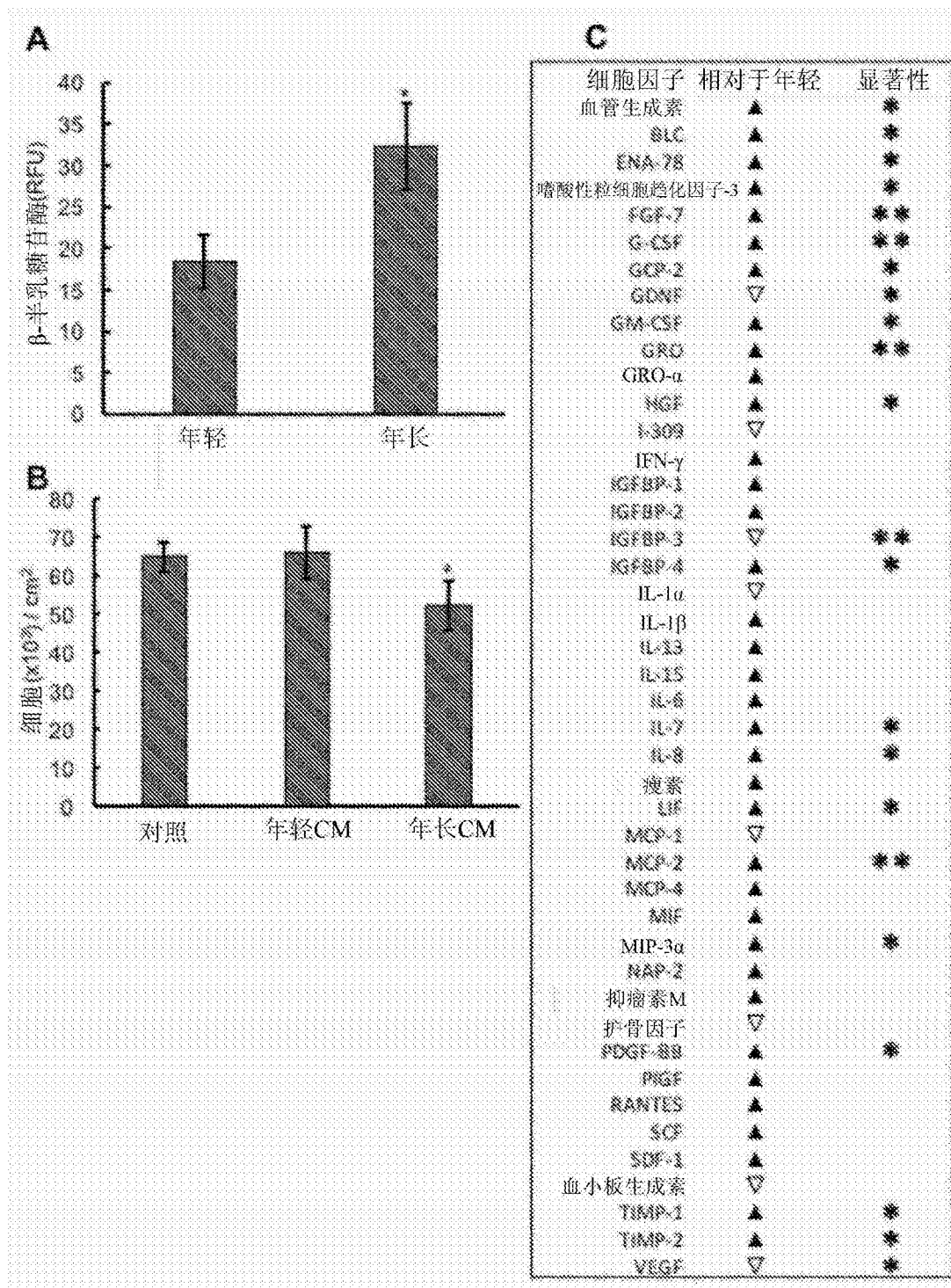


图6

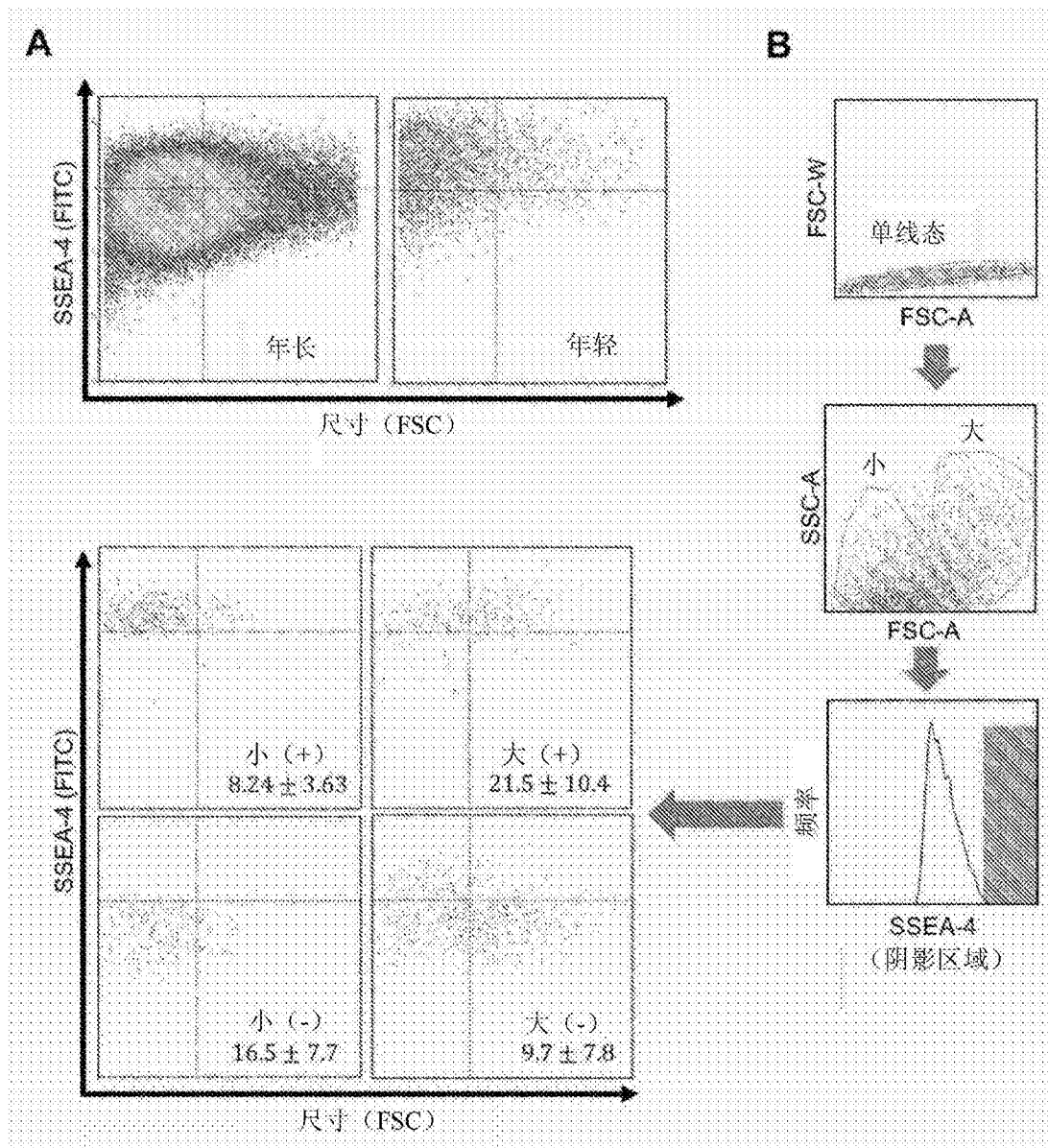


图7

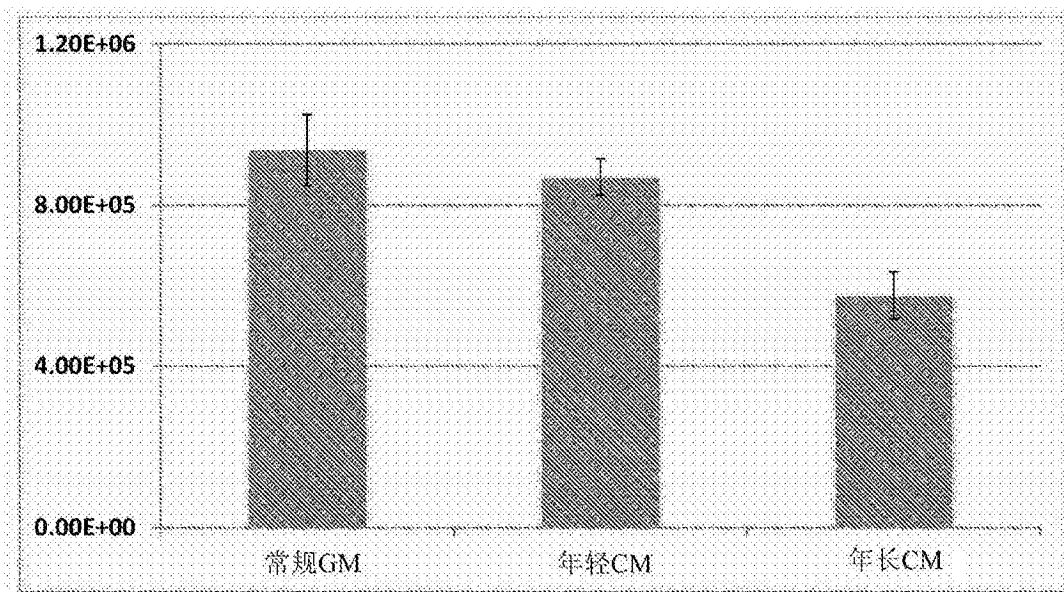


图8

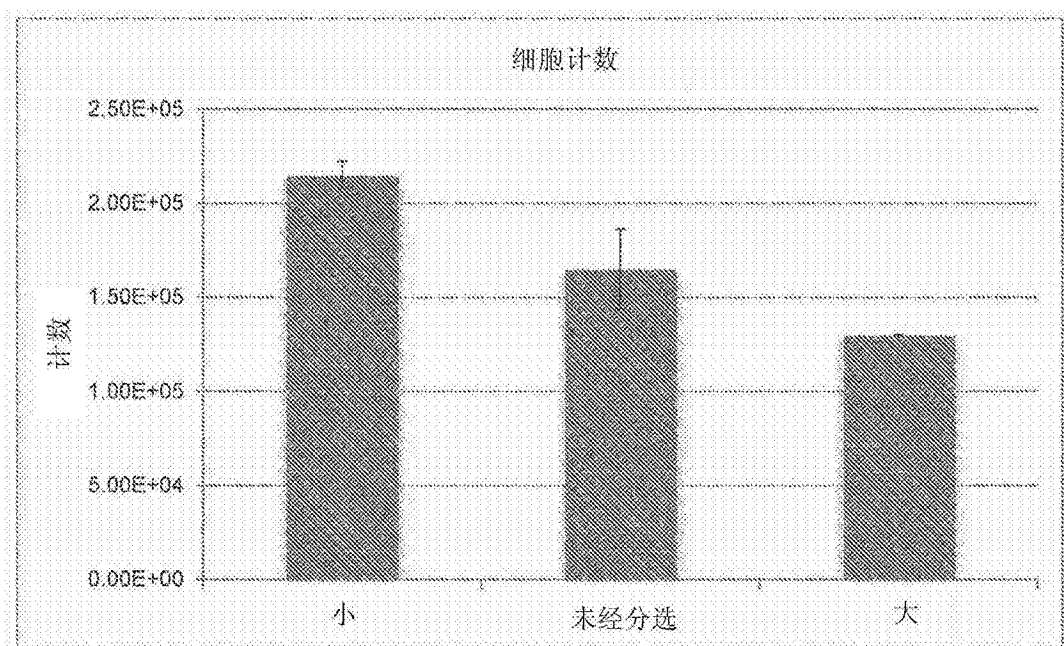


图9

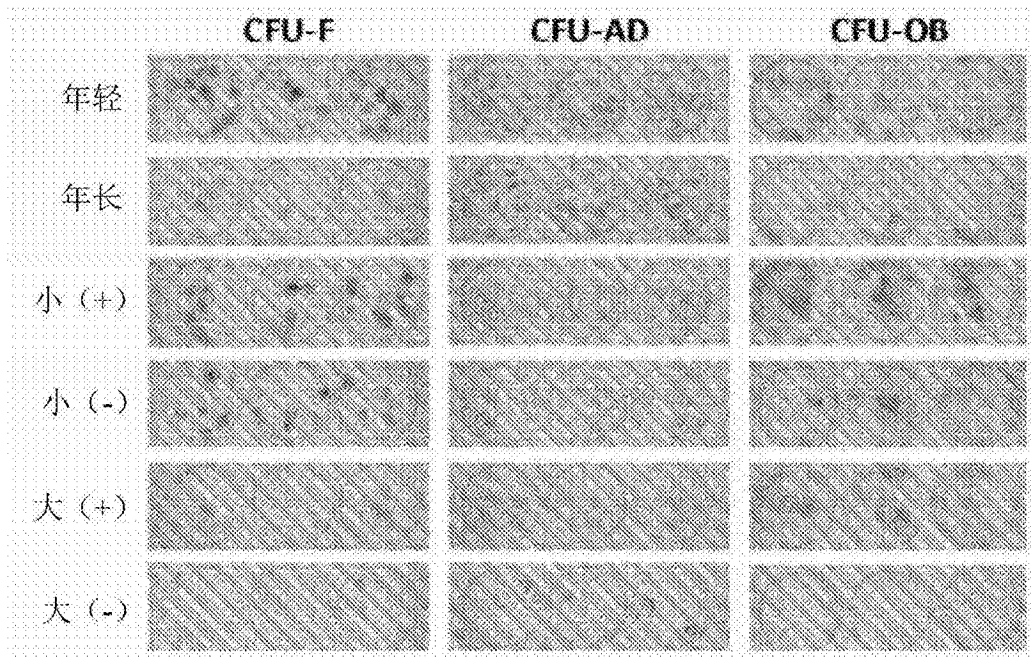


图10A

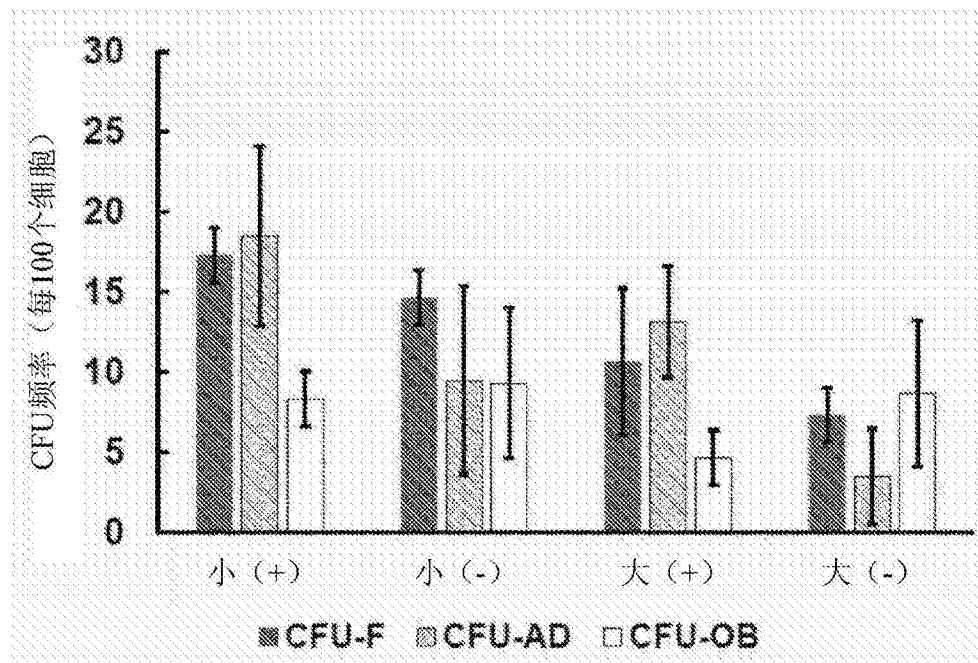


图10B

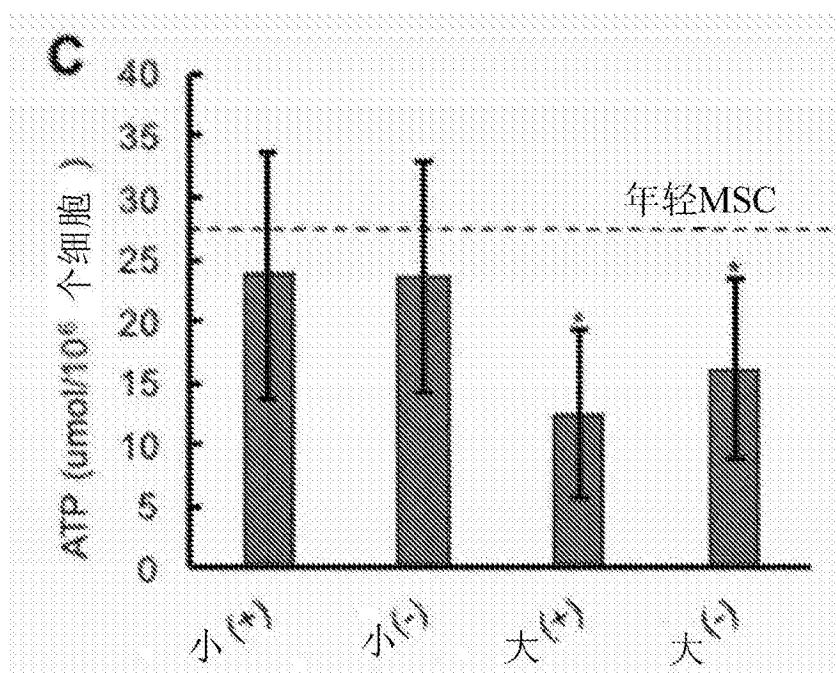


图10C

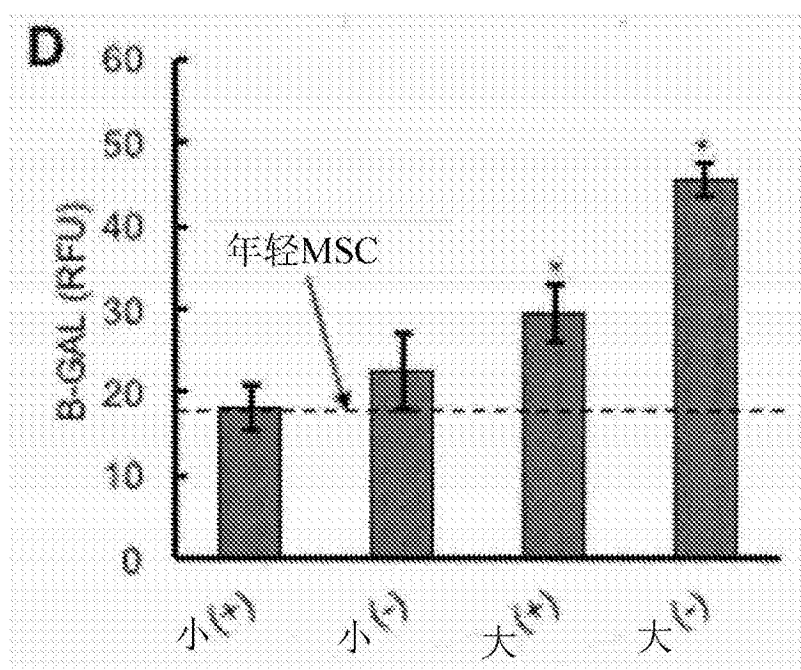


图10D

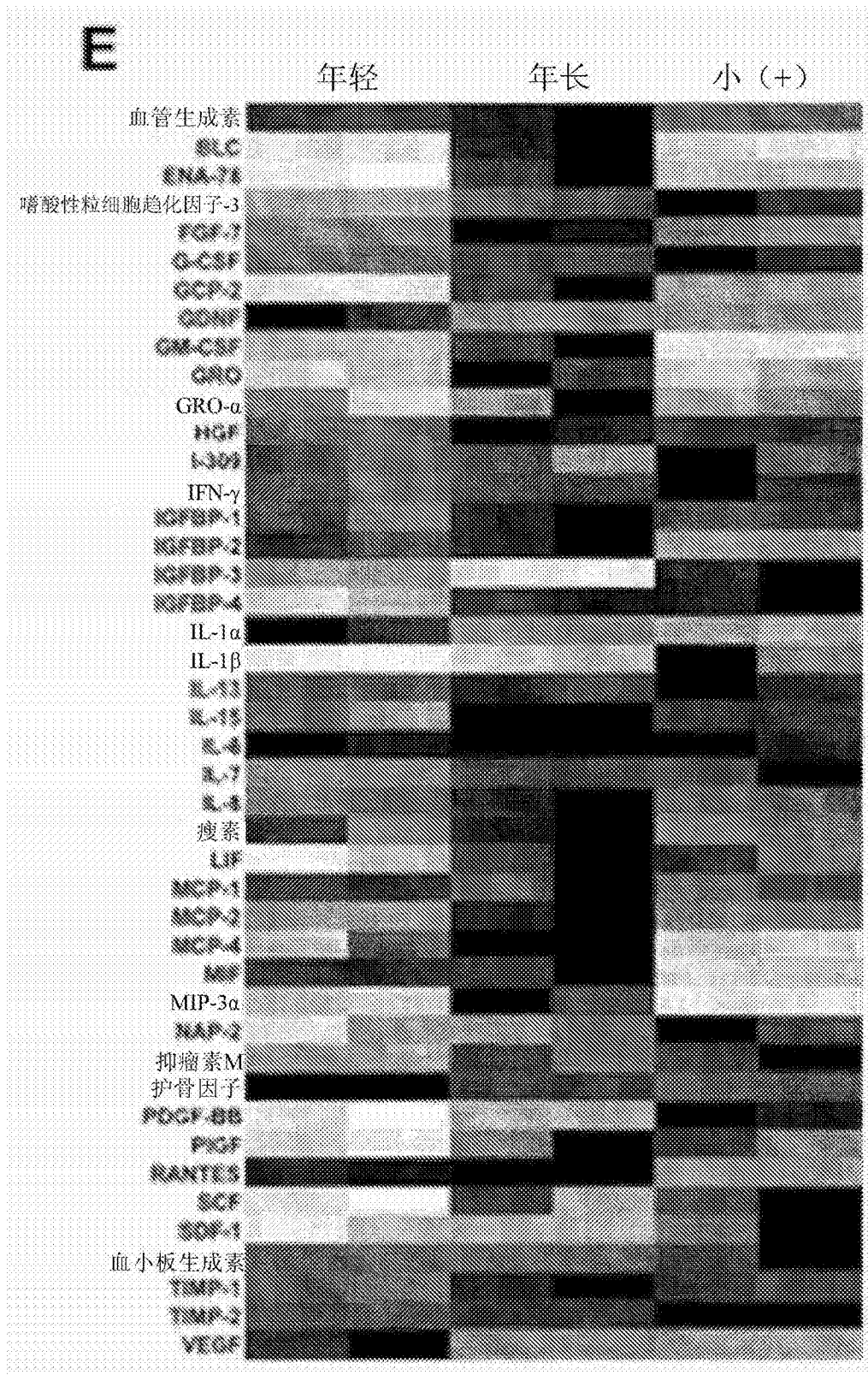


图10E

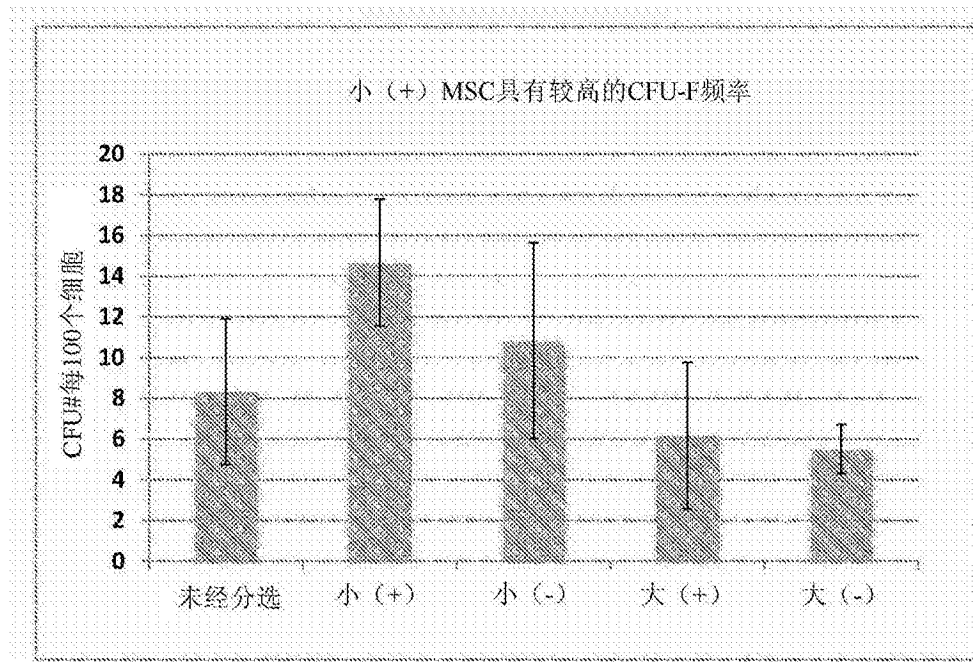


图11

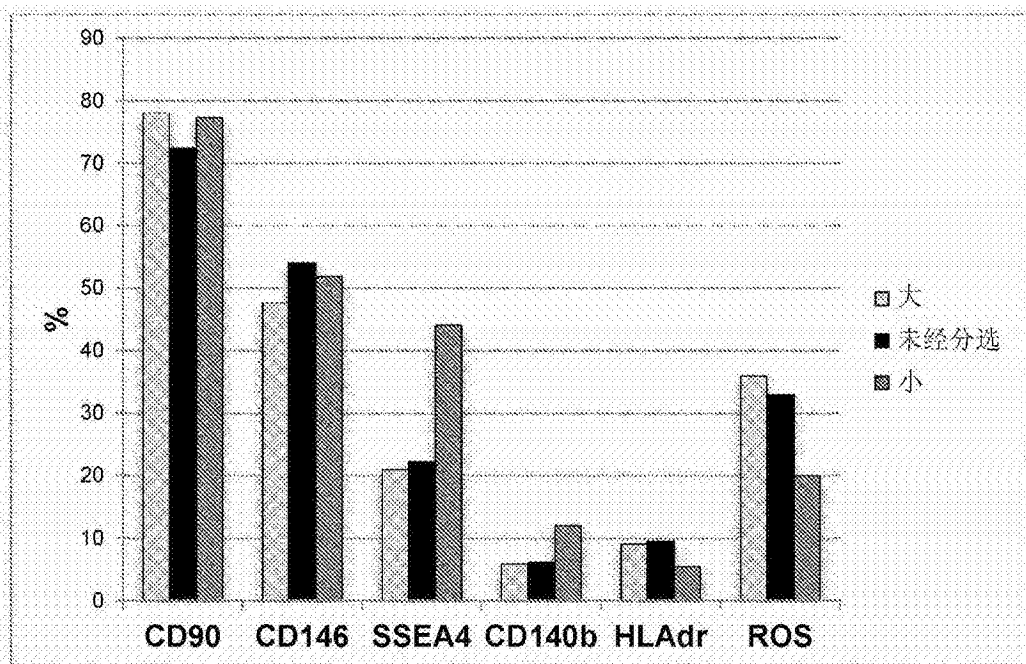


图12

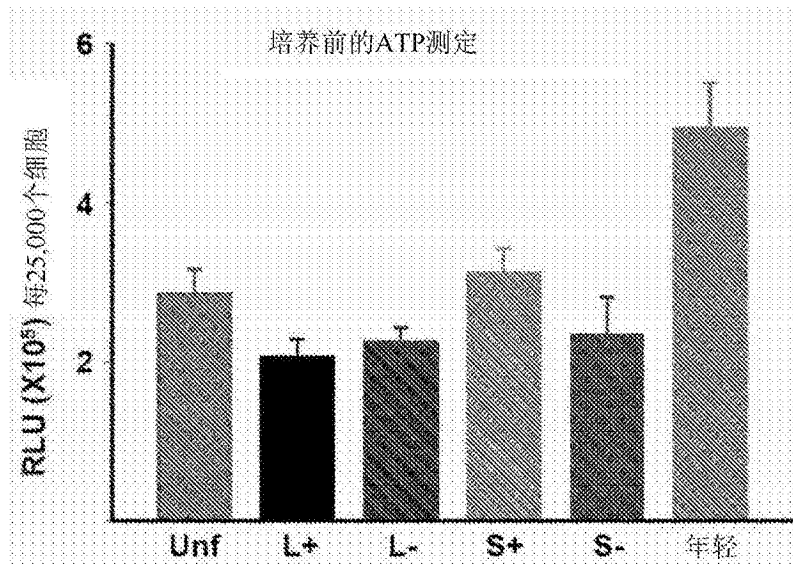


图13

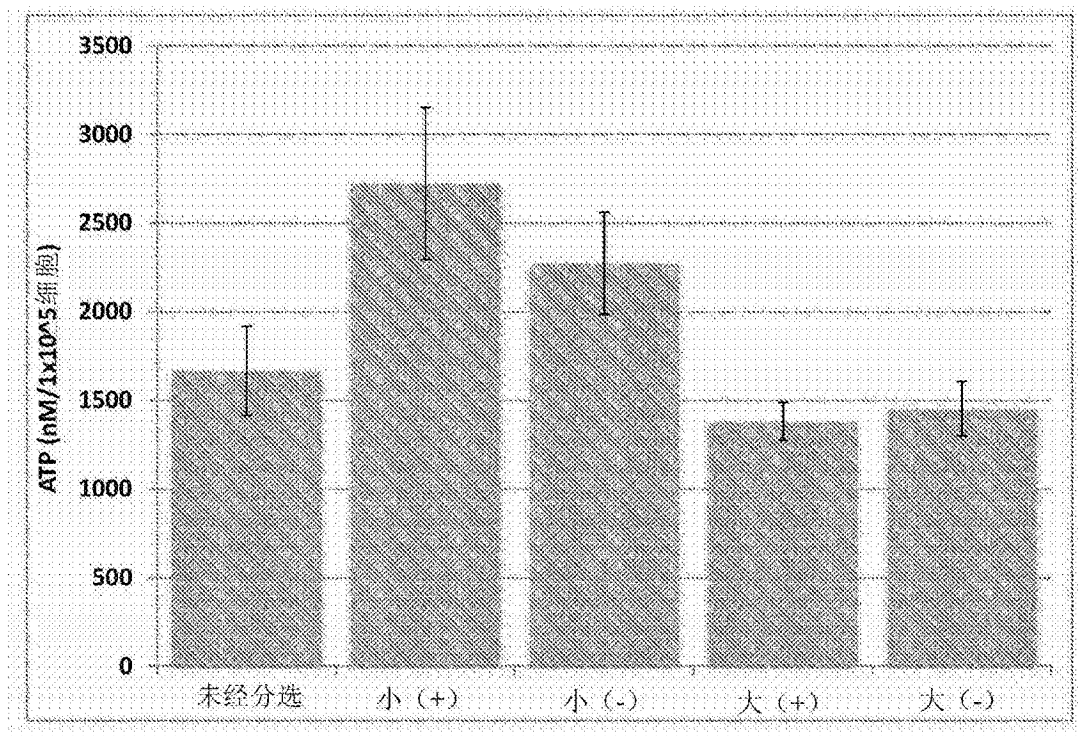


图14

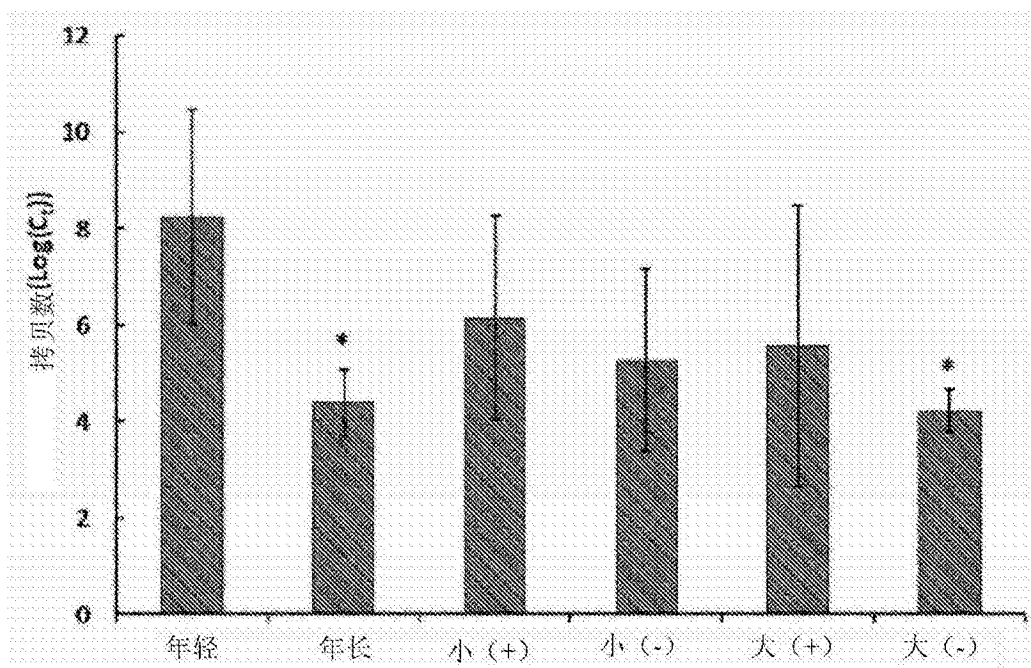


图15

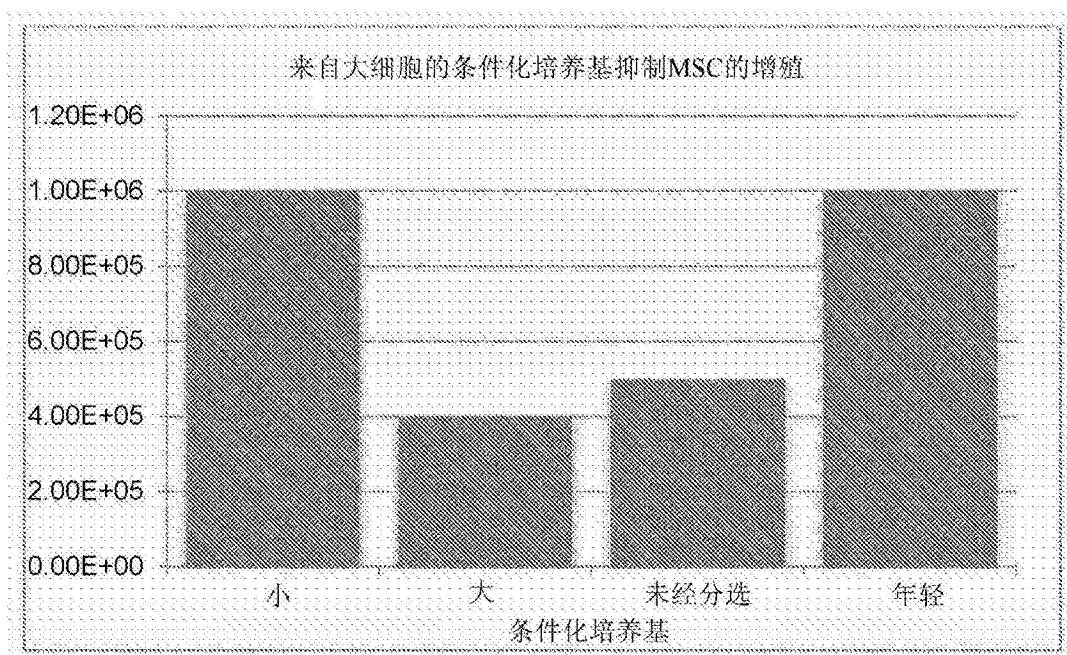


图16

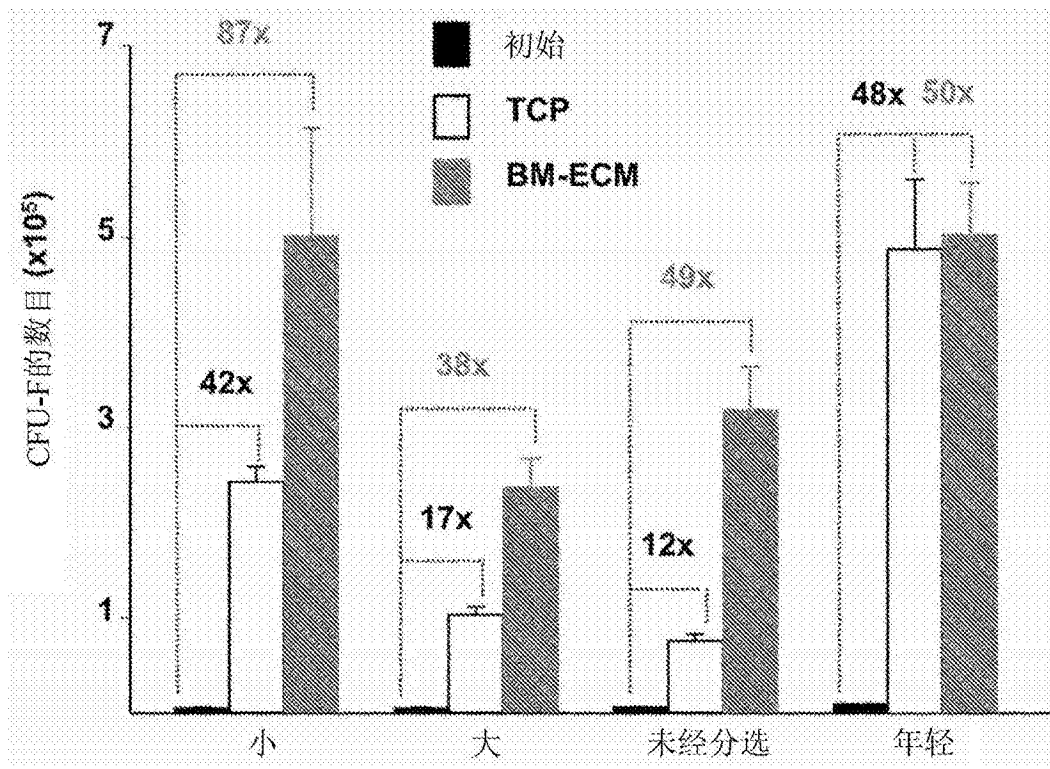


图17

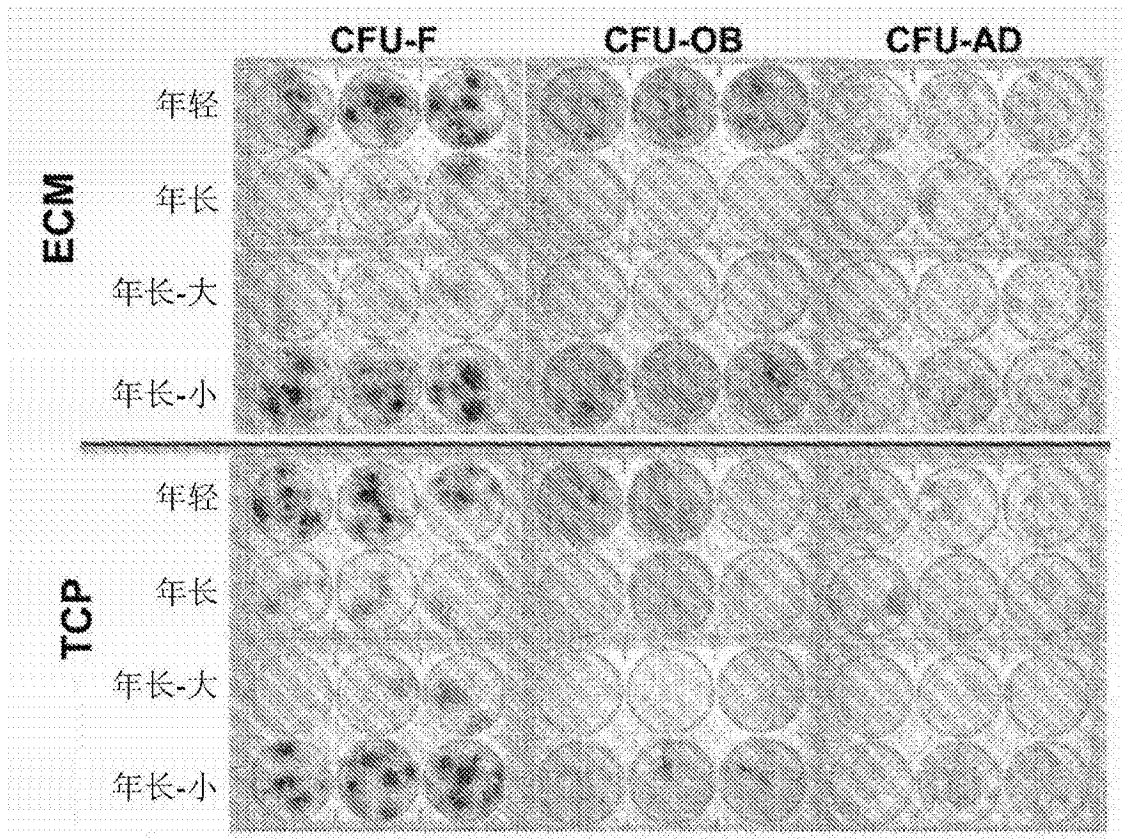


图18

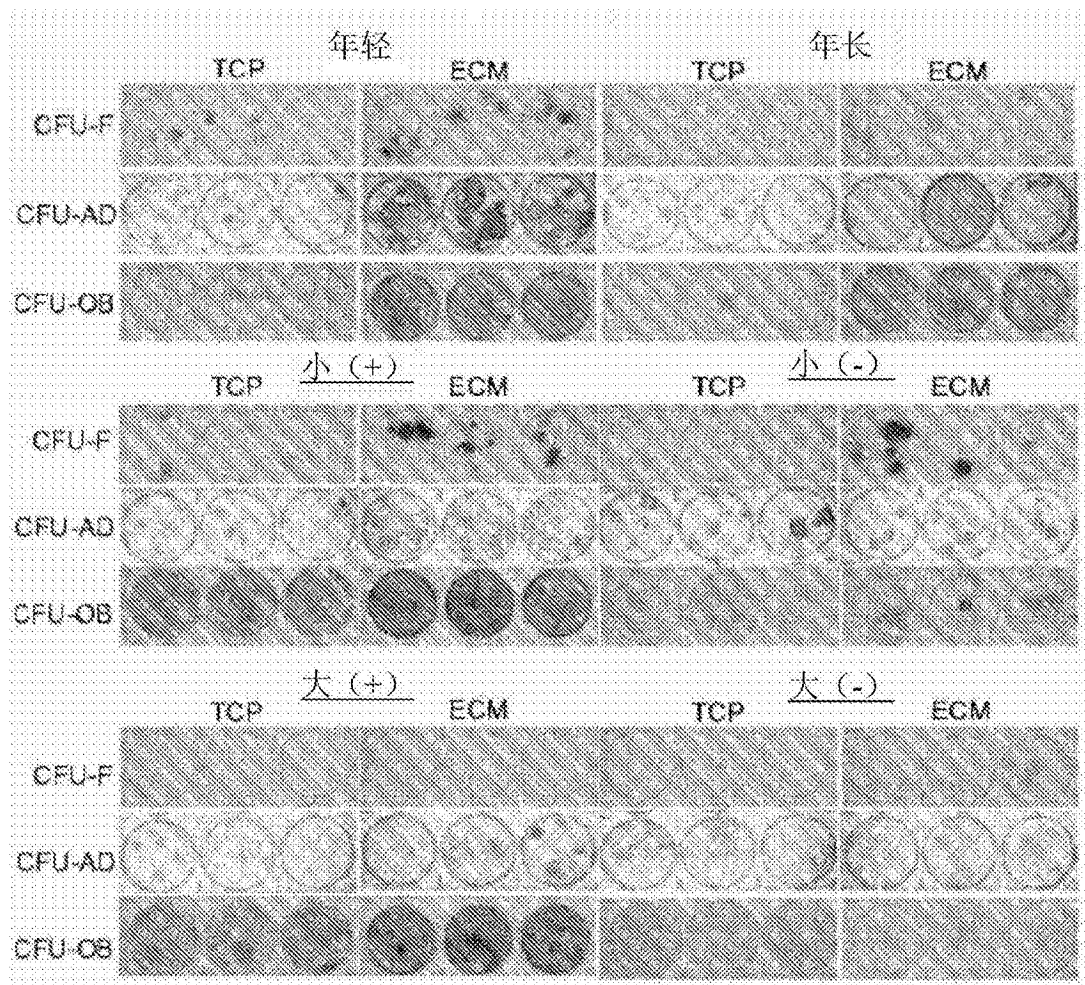


图19C

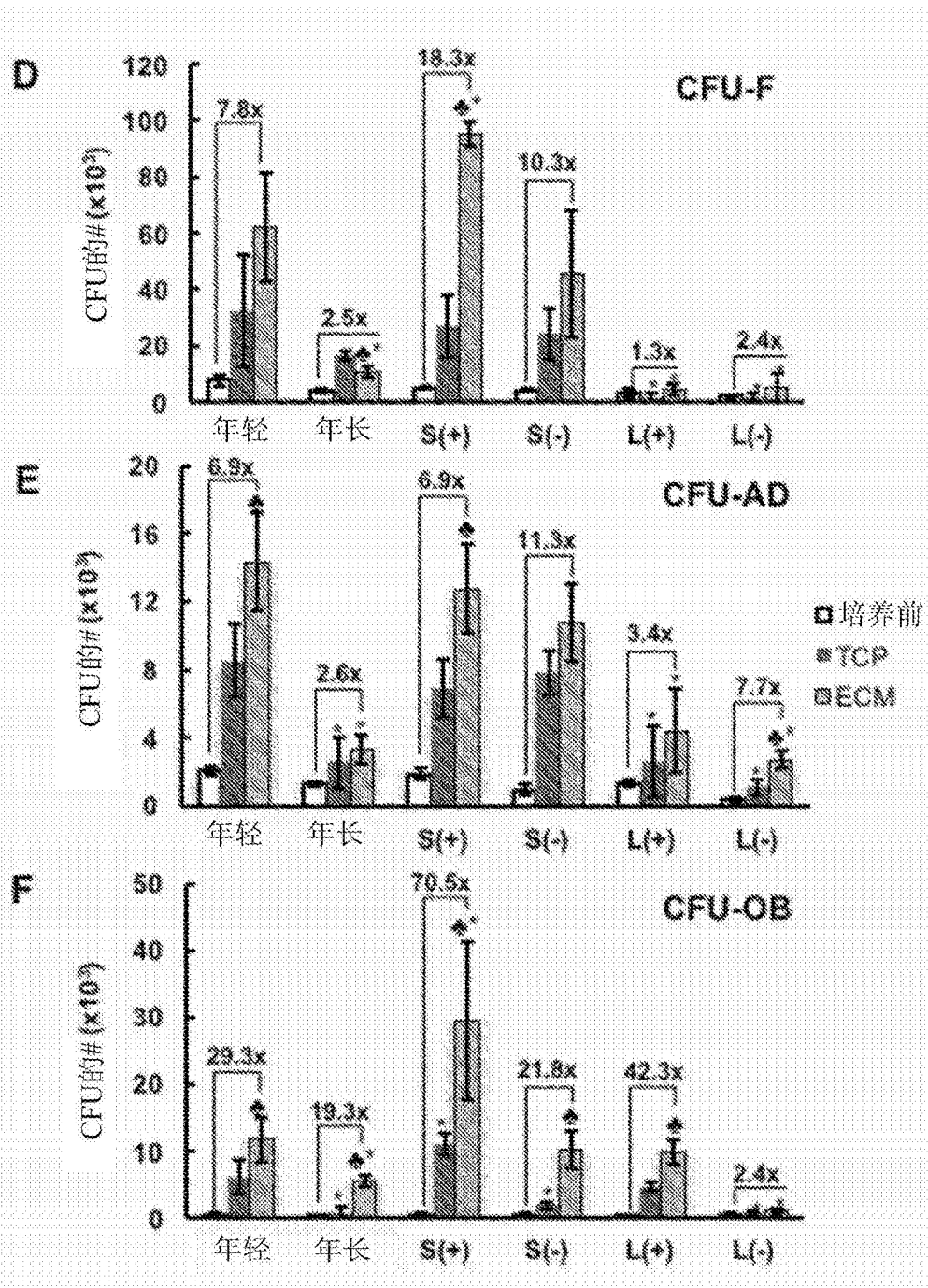


图19D-19F

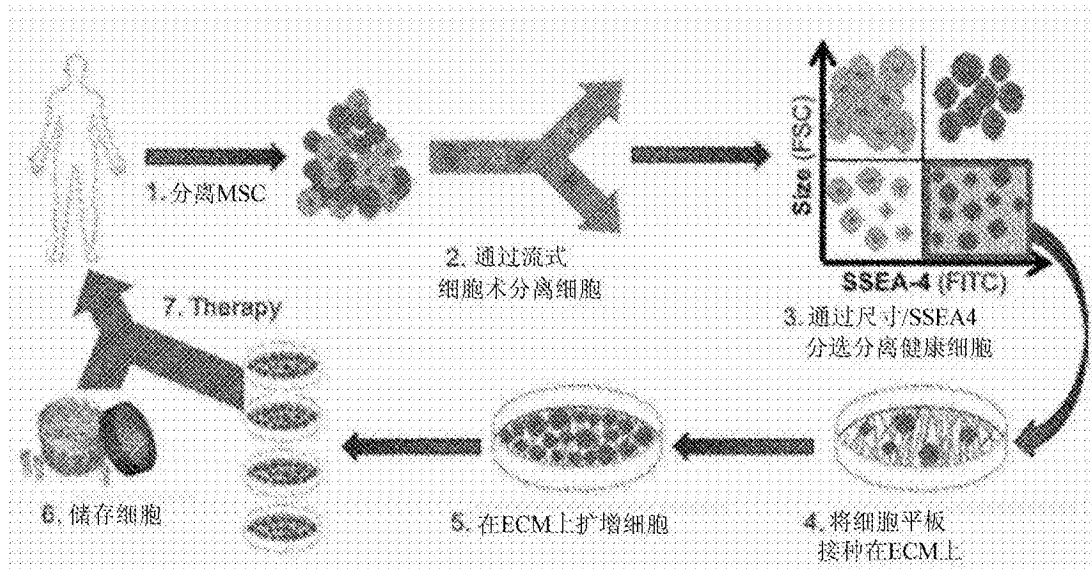


图20

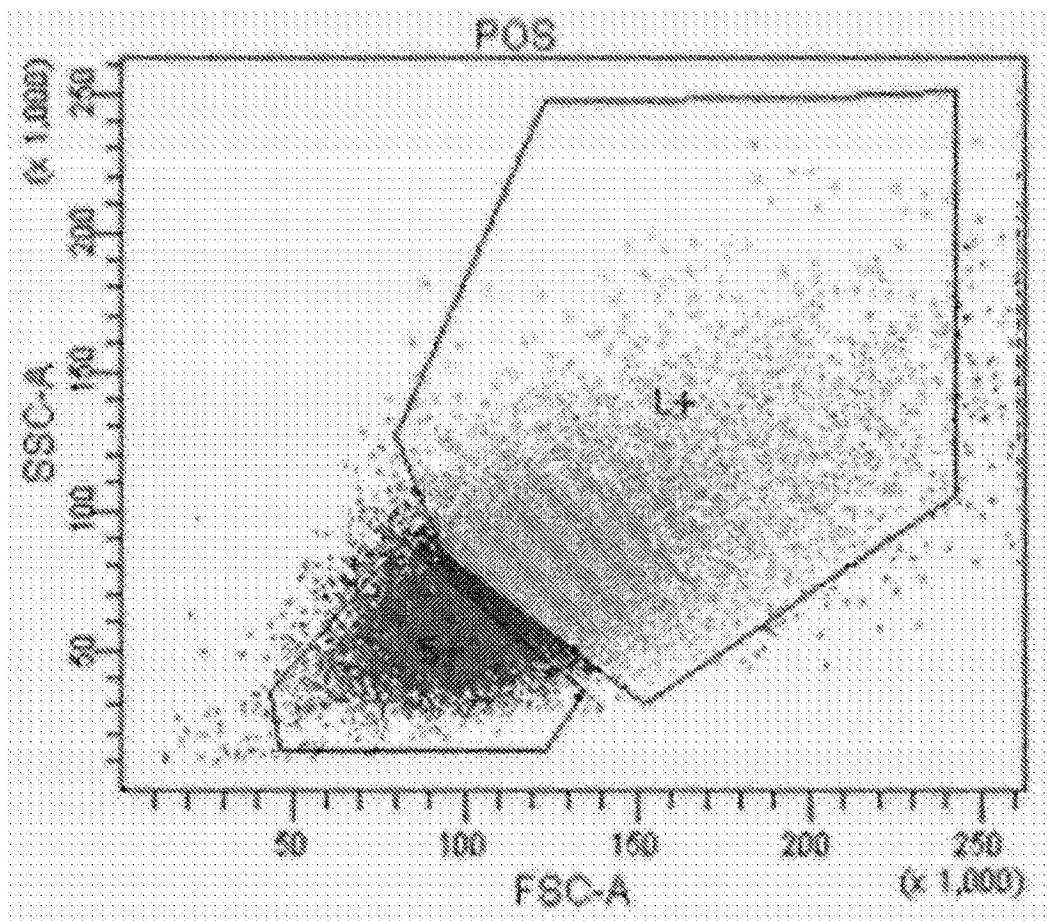


图21A

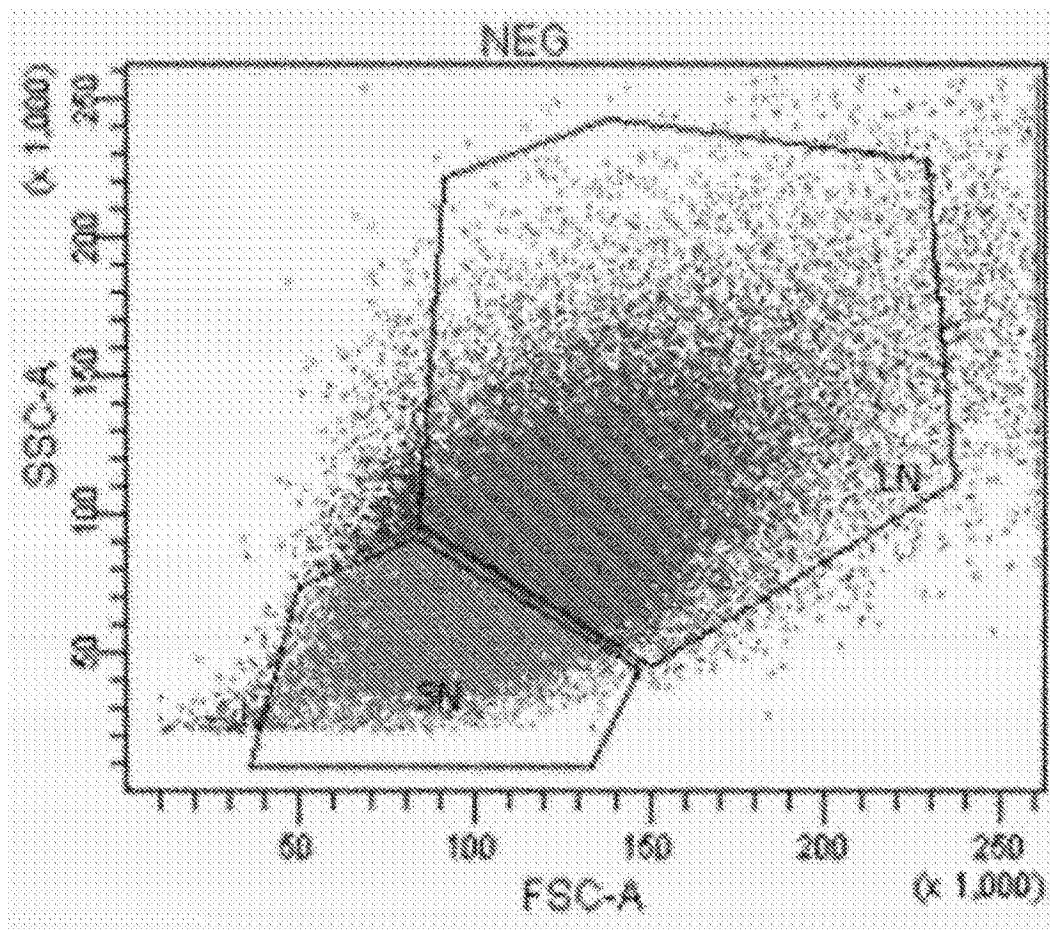


图21B

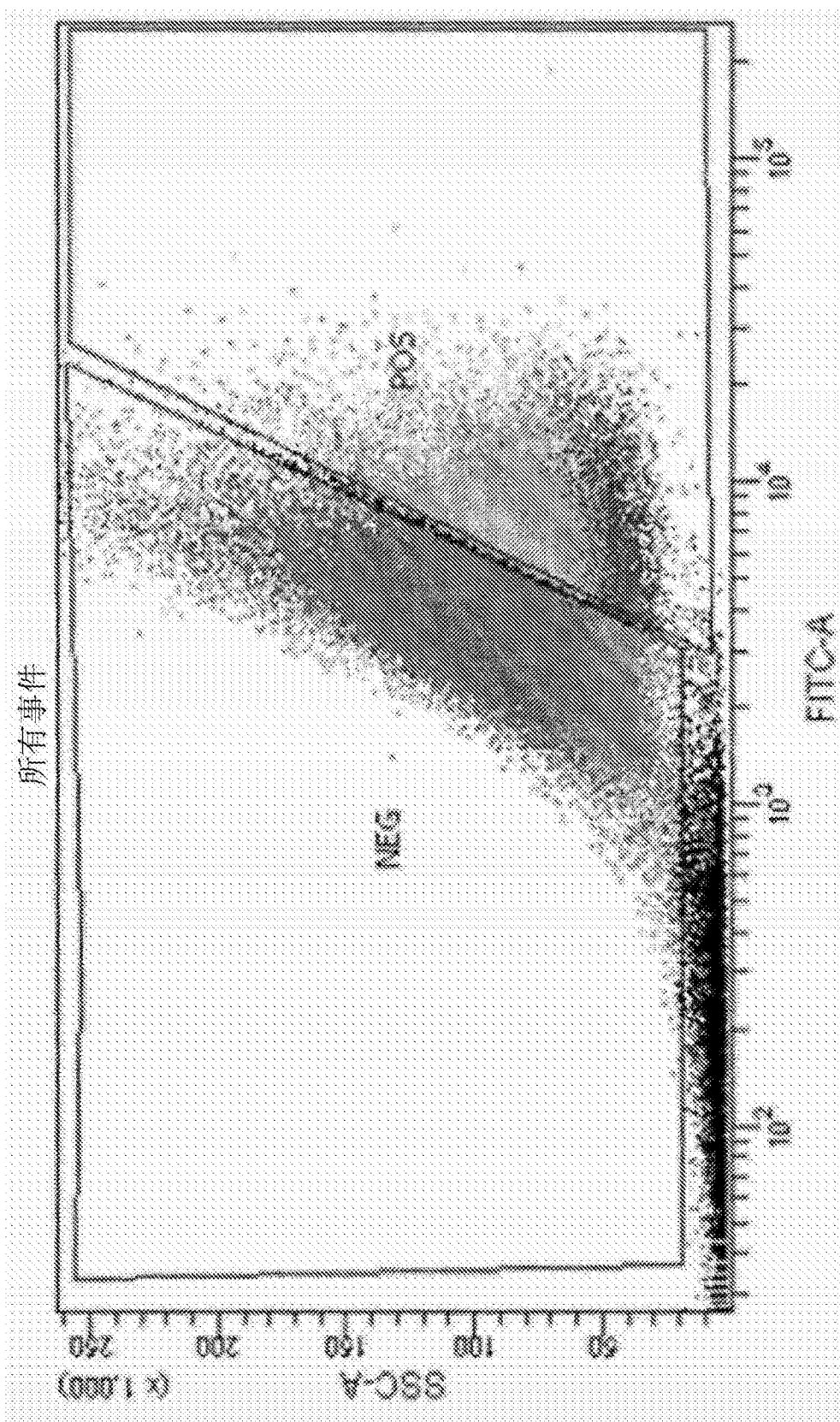


图21C

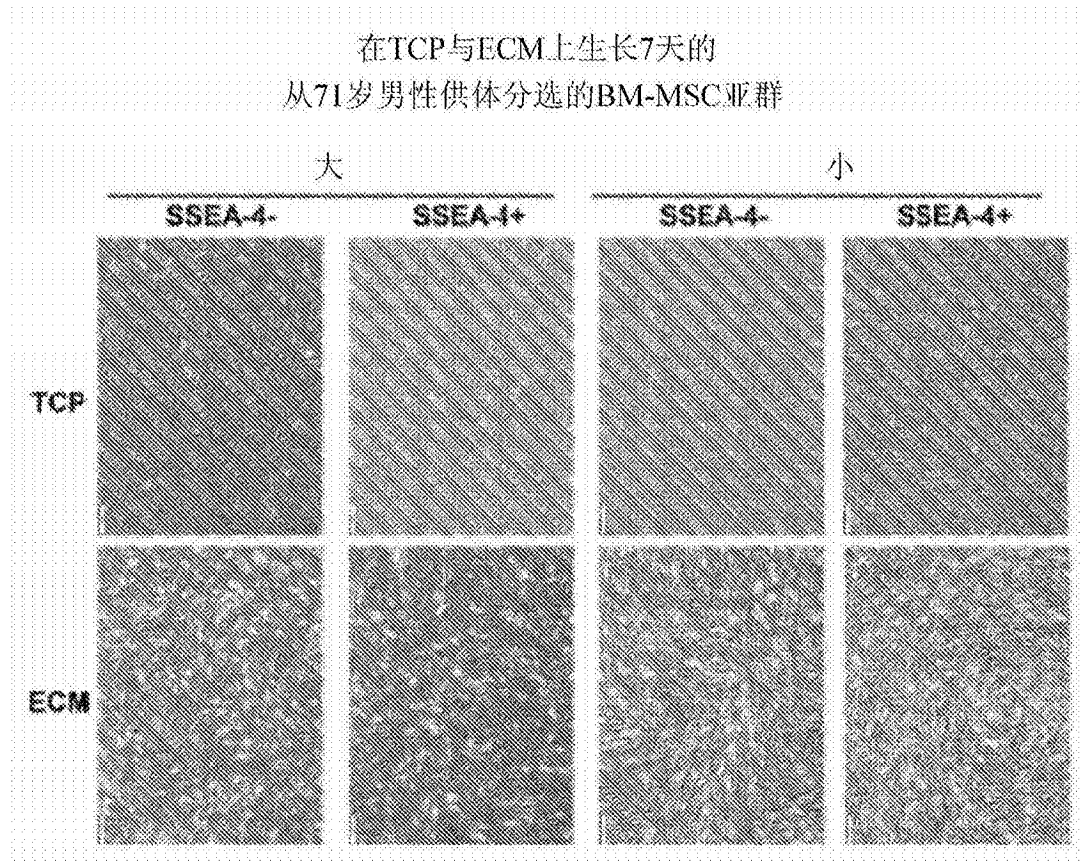


图22

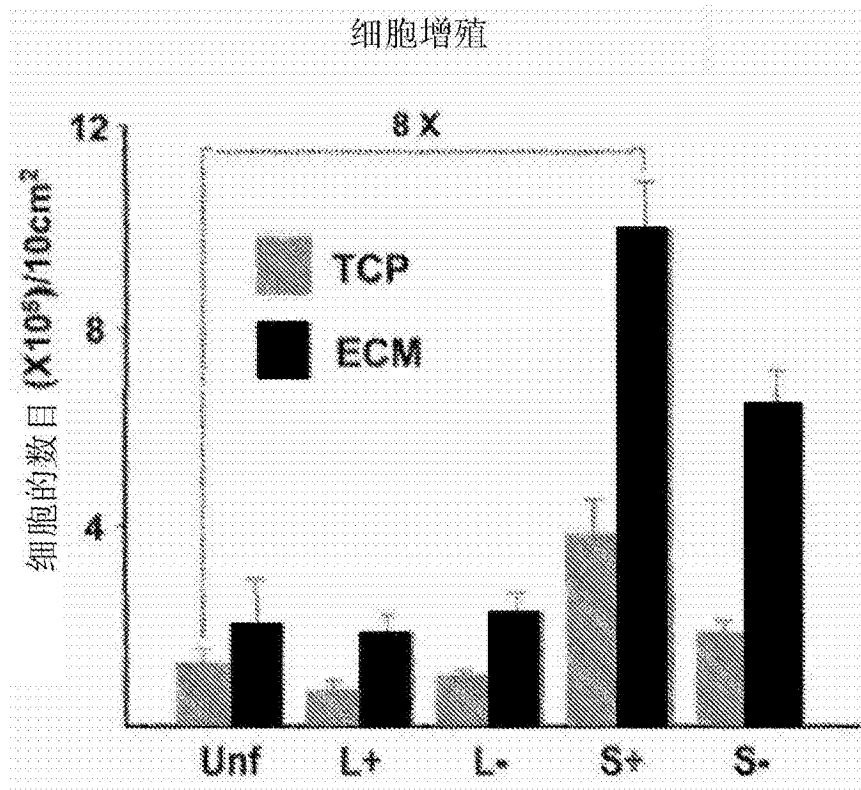


图23

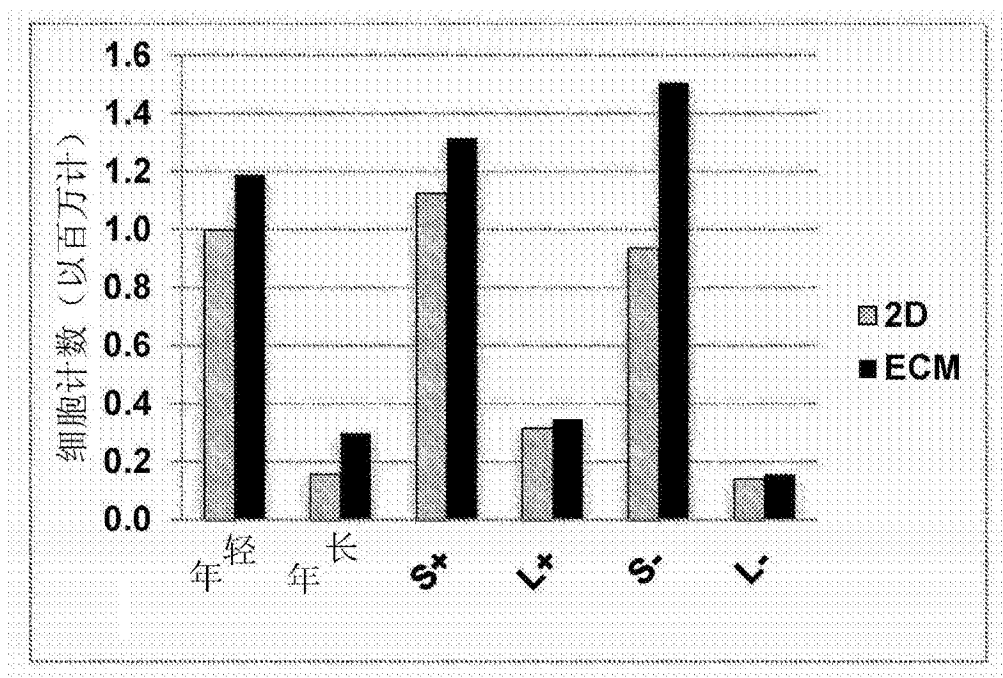


图24

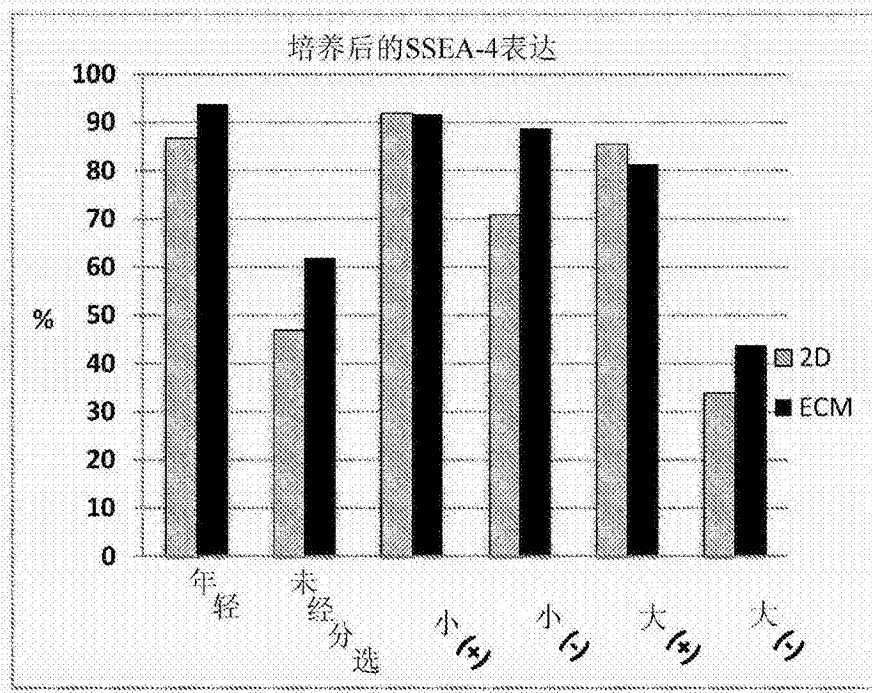


图25

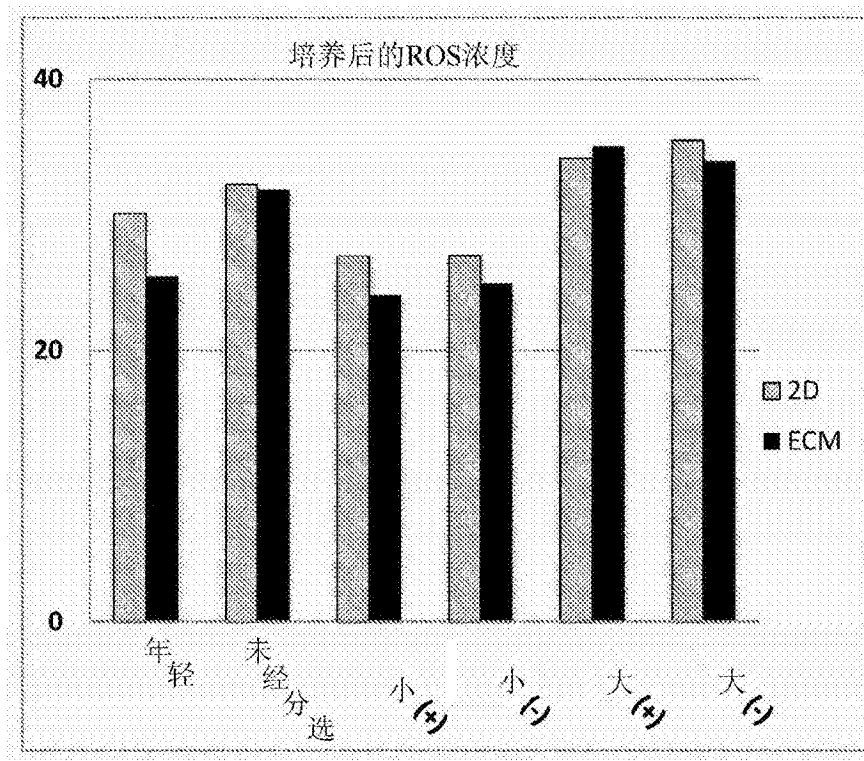


图26

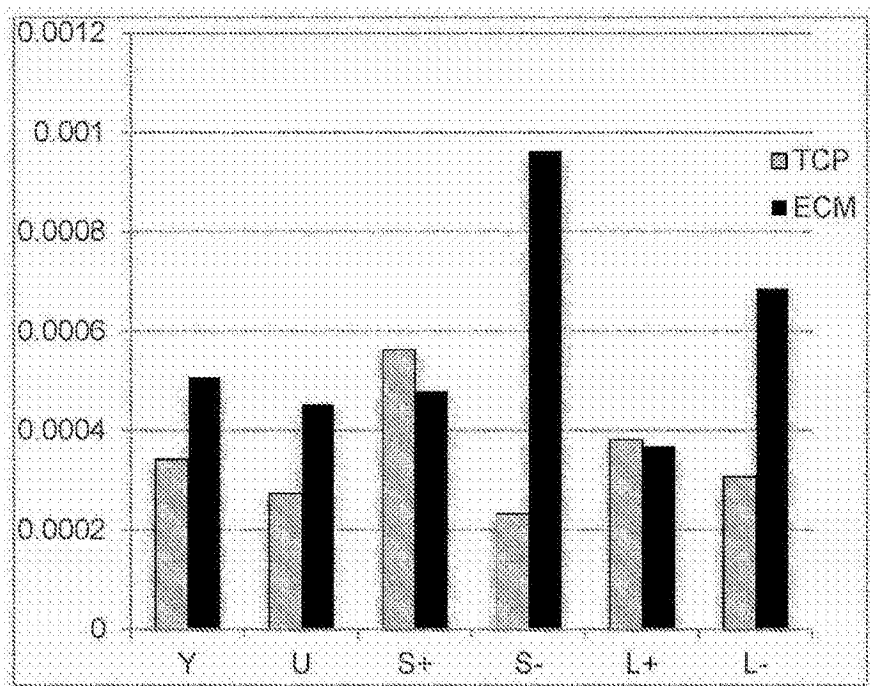


图27

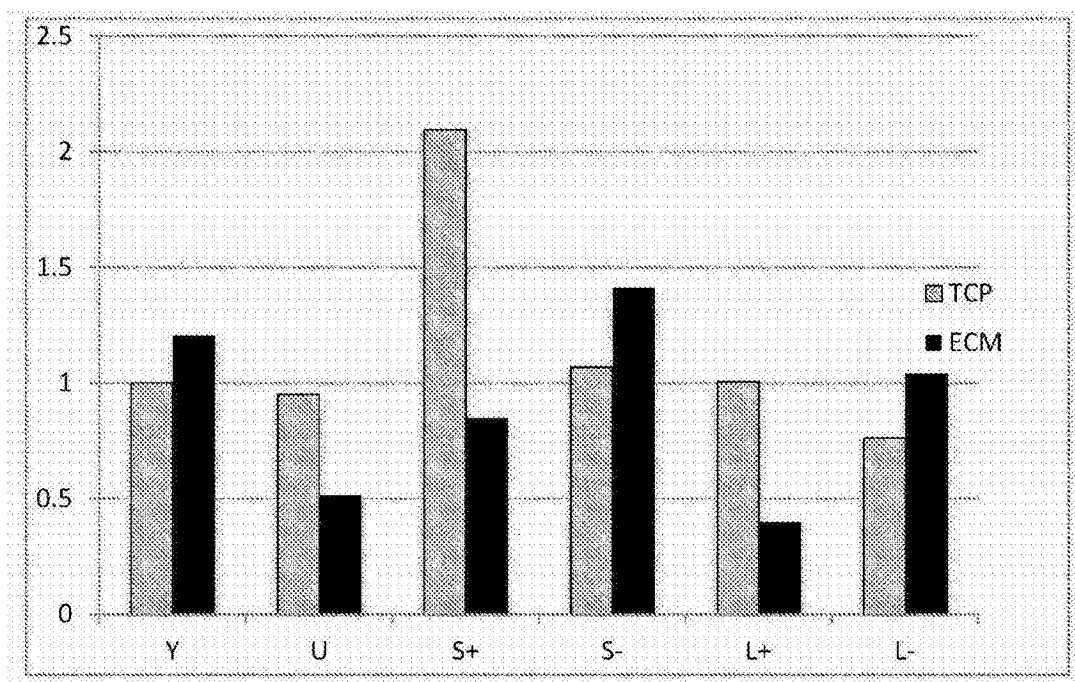


图28

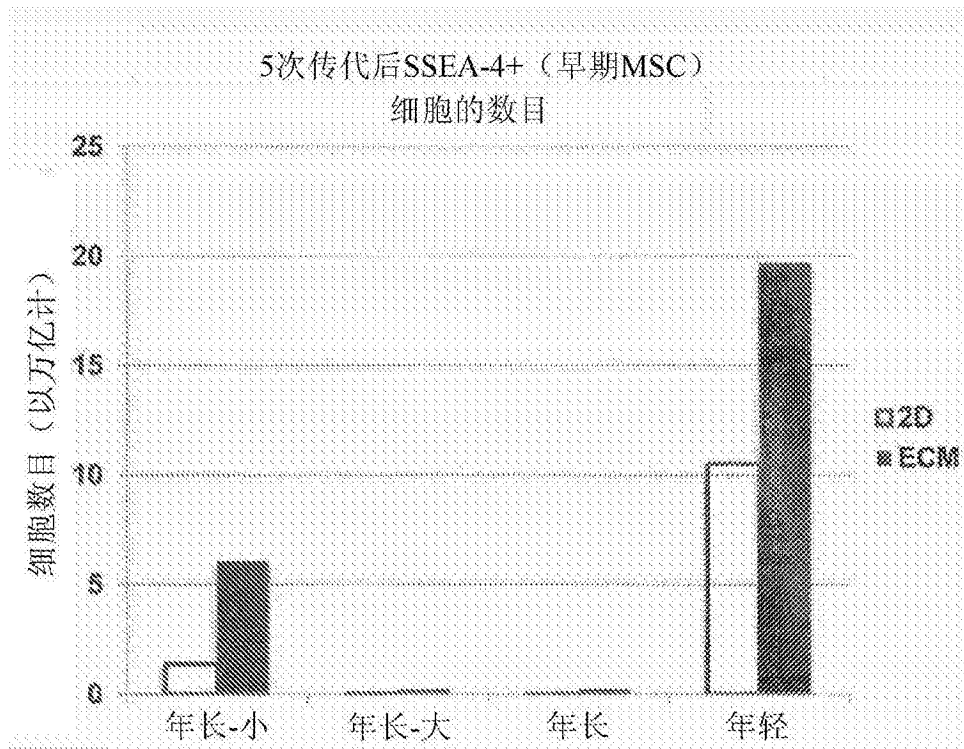


图29

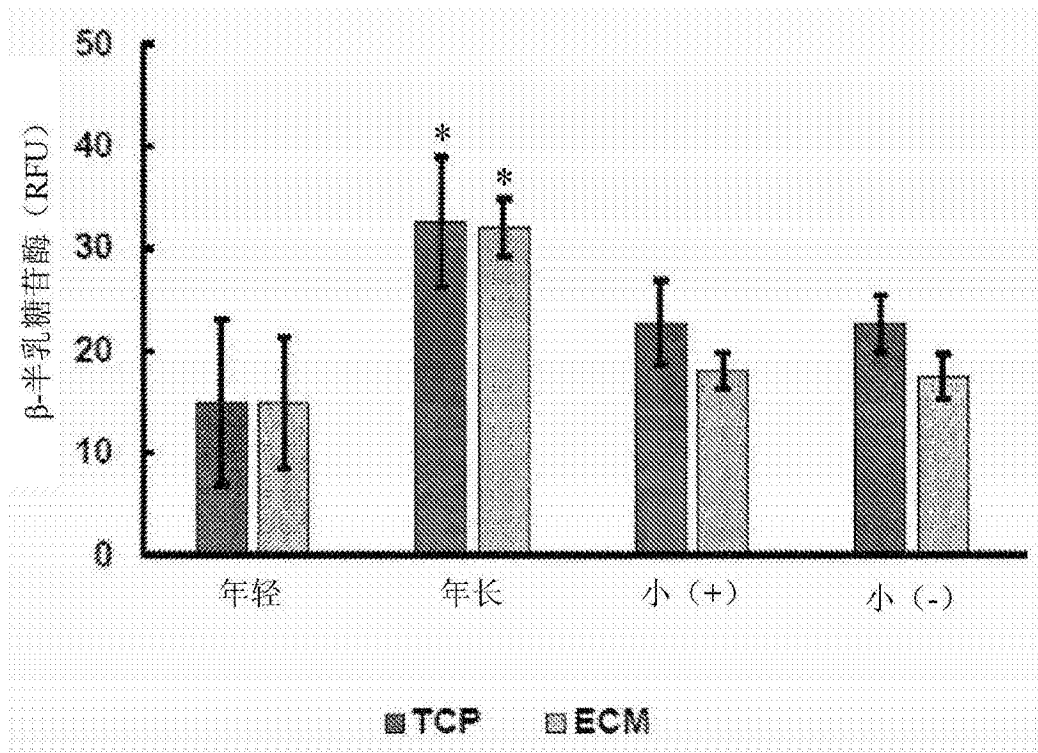


图30A

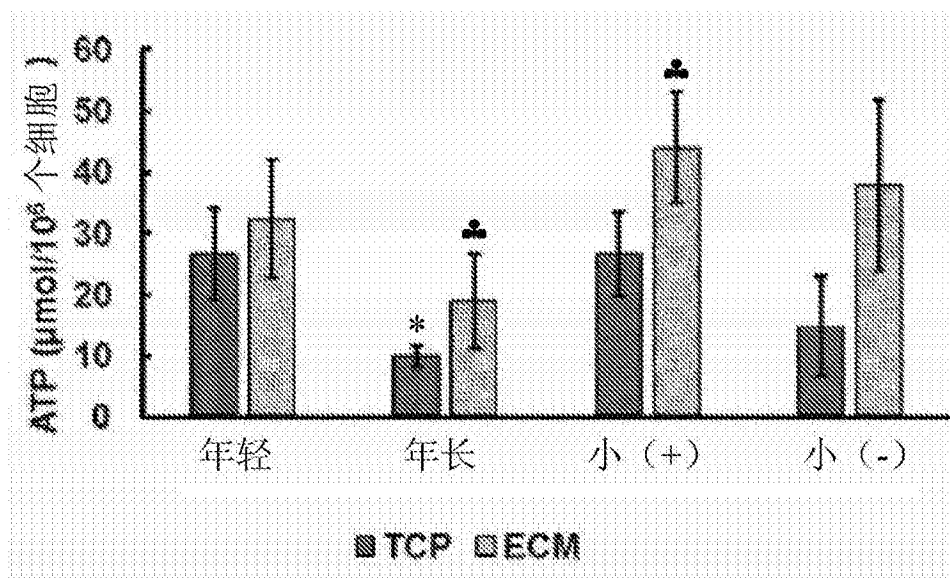


图30B

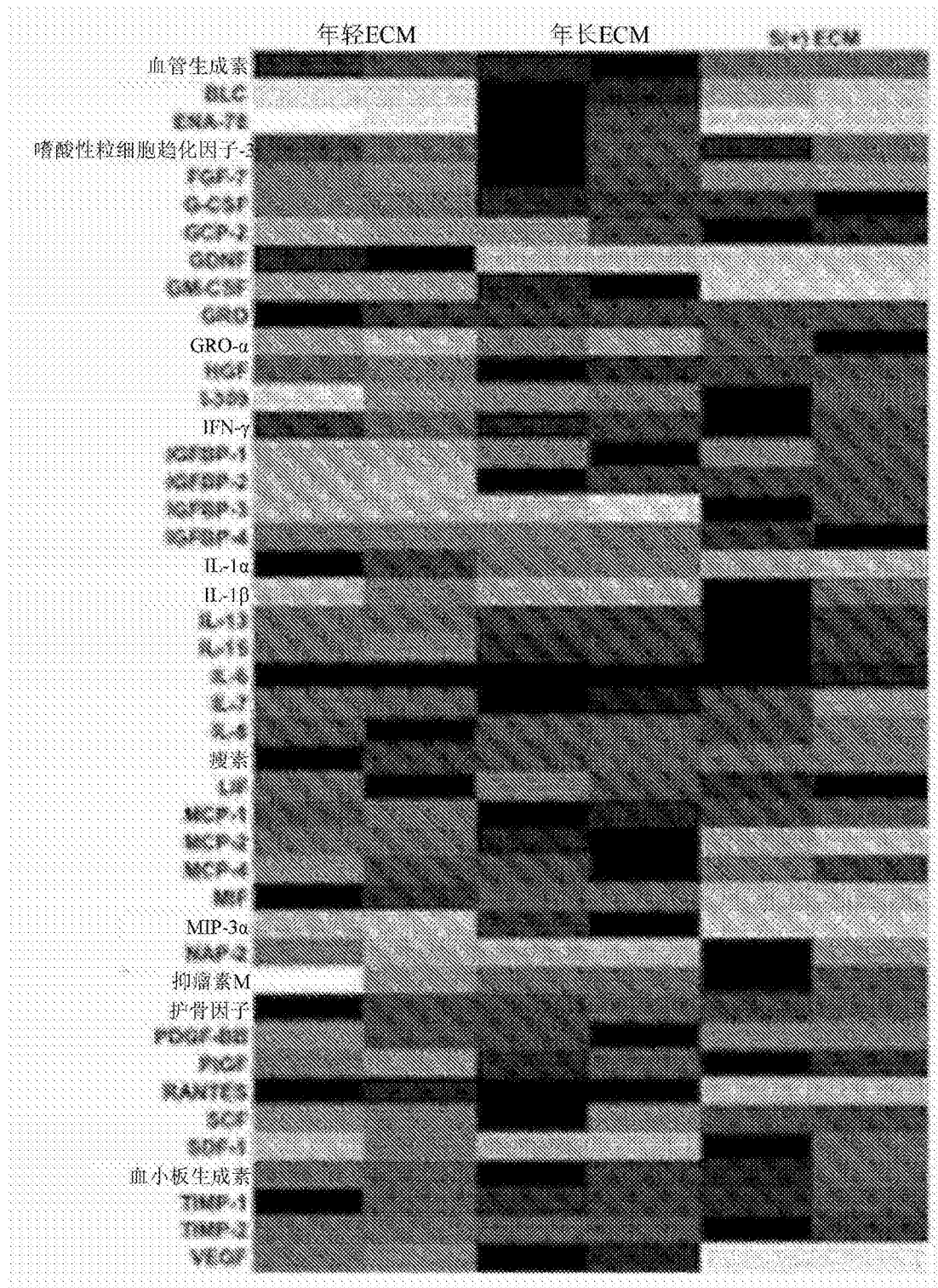


图30C

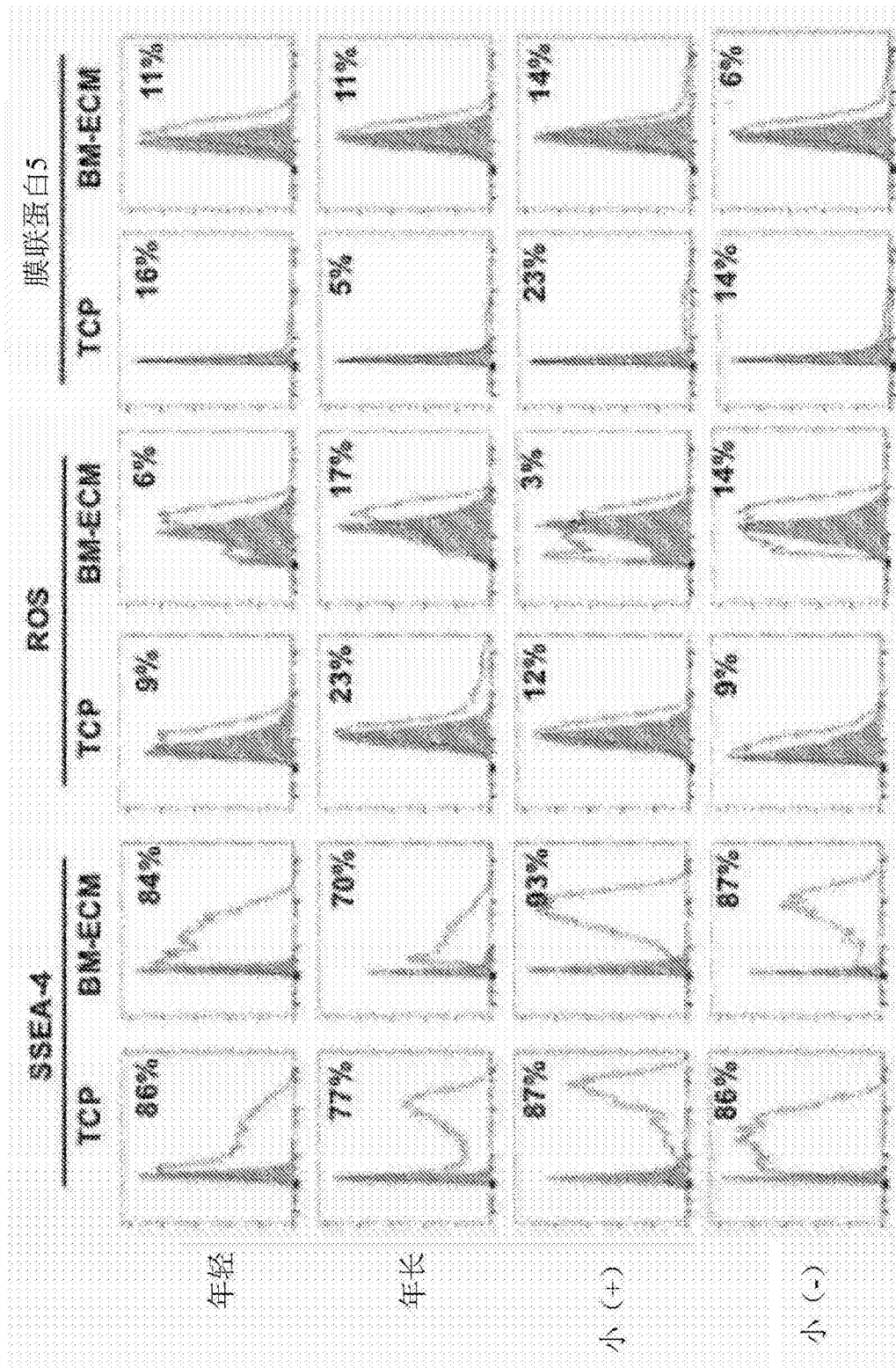


图31

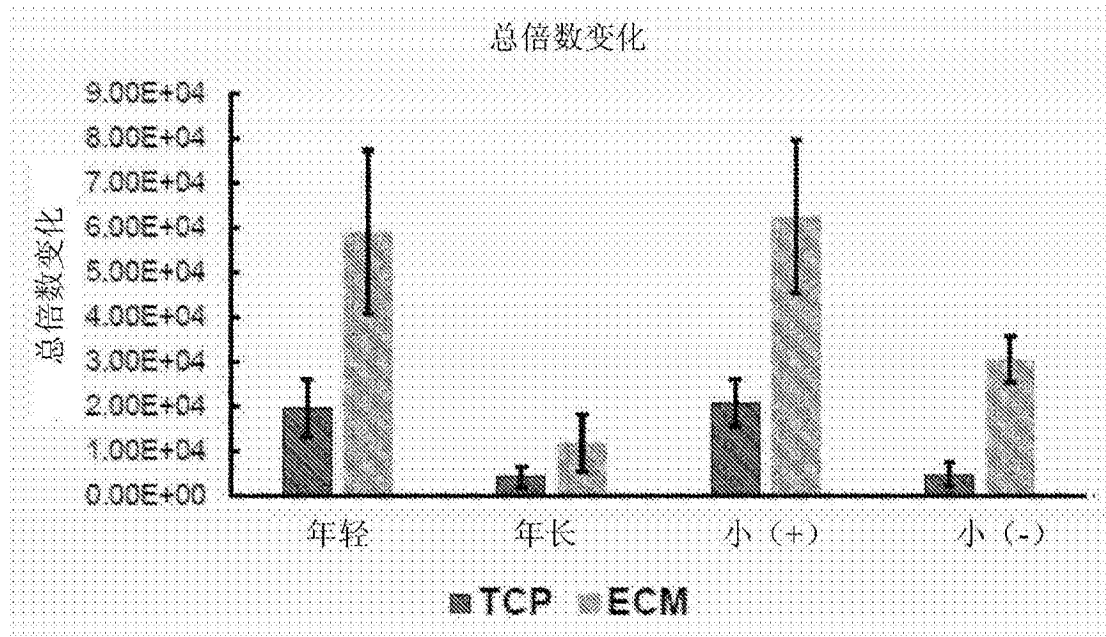


图32