(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 114391039 A
(43)申请公布日 2022.04.22

(21)申请号 202080042494.3
(22)申请日 2020.04.09
(30)优先权数据
10-2019-0041289 2019.04.09 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.12.09
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2020/004835 2020.04.09
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/209636 KO 2020.10.15
(71)申请人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔
(72)发明人 刘承权 金仁勇 高威威 姜泌俊 尹愿真 朴圭万
(74)专利代理机构 华进联合专利商标代理有限公司 44224
代理人 黄爱娇
(51)Int.Cl.
C12N 5/10(2006.01)
A61K 35/22(2015.01)
A61P 13/12(2006.01)

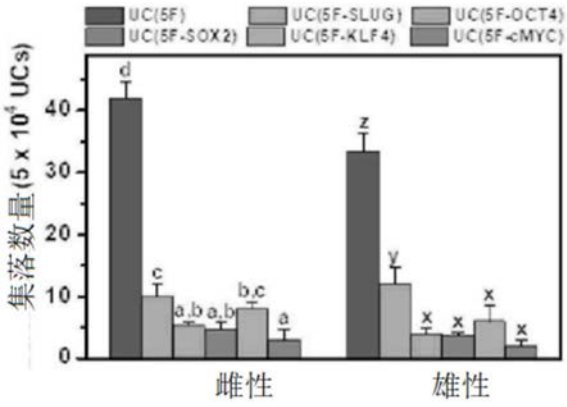
权利要求书1页 说明书12页
序列表5页 附图19页

(54)发明名称

用于诱导尿液细胞直接重编程为肾祖细胞的方法和包含通过相同方法重编程的肾祖细胞的、用于预防或治疗肾细胞损伤疾病的药物组合物

(57)摘要

本发明涉及诱导尿液细胞直接重编程为肾祖细胞的方法，以及包含通过该方法重编程的肾祖细胞的、用于预防或治疗肾细胞损伤疾病的药物组合物。本发明可以通过使用尿液细胞，一种可以轻易重复地获得而无不便和痛苦的体细胞，来进行定制的重编程的肾祖细胞的大规模生产，因此可以应用于可扩展到肾损伤治疗和肾脏再生领域的不治之症领域，并应用于细胞治疗产品的生产。



CN 114391039 A

1.诱导尿液细胞直接重编程为肾祖细胞的方法,所述方法包括:

(a)培养从尿液中分离的尿液细胞;

(b)将重编程因子引入到培养的尿液细胞中,所述重编程因子如i)编码Oct4蛋白的核酸、ii)编码Sox2蛋白的核酸、iii)编码Klf4蛋白的核酸、和iv)编码c-Myc蛋白的核酸,以及v)编码Slug蛋白的核酸;

(c)在肾祖细胞培养基中培养引入重编程因子的尿液细胞以诱导重编程为肾祖细胞;和

(d)从被诱导直接重编程为肾祖细胞的细胞中选择具有肾祖细胞特征的重编程的肾祖细胞。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述尿液细胞是尿液来源的体细胞。

3.根据权利要求1所述的方法,其中在步骤(b)中,将插入了重编程因子的病毒载体直接引入尿液细胞中。

4.根据权利要求1所述的方法,其中步骤(c)中的培养基含有FGF9、BMP7、CHIR99021和Y-27632。

5.根据权利要求4所述的方法,其中所述培养基还含有肝素、LDN-193189或L-谷氨酰胺。

6.根据权利要求4所述的方法,其中在Matrigel、层粘连蛋白、纤连蛋白、明胶或胶原蛋白包被的培养板中培养细胞。

7.用于预防或治疗肾细胞损伤疾病的药物组合物,所述药物组合物包含通过权利要求1所述的方法重编程的肾祖细胞作为活性成分。

8.根据权利要求7所述的组合物,其中所述肾细胞损伤疾病选自由急性/慢性肾功能衰竭、肾小球肾炎、肾病综合征、肾盂炎、多囊肾病和终末期肾病组成的组。

用于诱导尿液细胞直接重编程为肾祖细胞的方法和包含通过相同方法重编程的肾祖细胞的、用于预防或治疗肾细胞损伤疾病的药物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于诱导尿液细胞直接重编程为肾祖细胞的方法和包含通过上述方法重编程的肾祖细胞的、用于预防或治疗肾细胞损伤疾病的药物组合物。

背景技术

[0002] 干细胞是指具有无限的与身体所需的特定细胞和组织相关的、自我更新或分化的潜力的细胞。干细胞分为三种类型:从早期胚胎中分离出的胚胎干细胞(ES细胞)、从胚胎原始生殖细胞中分离出的胚胎生殖细胞(EG细胞)和从成体组织中分离出的多能成体祖细胞(MAPC细胞)。

[0003] 由于干细胞有发育成具备特殊功能的细胞的潜力,因此作为用于各种器官功能恢复和组织再生的细胞疗法,对它们进行了研究,最近,它们的应用范围扩大到包括整形外科和美容。

[0004] 成体干细胞在活体内的作用可以大致概括为两种方式。首先,干细胞本身在我们体内分化成组织和细胞,使受损的组织和细胞再生;其次,干细胞在其生命周期中不断分泌生长因子和蛋白如细胞因子,以帮助邻近细胞的生长和再生。

[0005] 同时,直接重编程方法是一种针对这样的体细胞的技术:可以被转化以产生具有不同类型的所需内在功能的细胞。与山中教授(Professor Yamanaka;日本)发现的重编程诱导的多能干细胞(iPSC)不同,由于不经历多能状态,因而直接重编程在核型稳定性、靶细胞的同质性、细胞来源之间的可变性、肿瘤发生风险、取决于患者的特异性,以及时间和精力的效率方面具有优势。然而,目前的直接重编程方法主要使用小鼠细胞为细胞来源,因此在人体细胞中同样重现的概率并不高。在人体细胞中,经常使用的是皮肤细胞(成纤维细胞),但在这种情况下,收集细胞来源的侵入性方法是必须的,因而给捐赠者造成了痛苦和安全风险,并降低了便利性。

[0006] 虽然肾脏中是否存在损伤后自发再生的能力非常有限的肾祖细胞直到现在仍然是个问题,但在学术界中,肾脏再生的机制如下。受伤后存活的肾细胞可能会暂时去分化并生长,这是基于可替代受损组织的肾祖细胞的关键作用(Benigni A et al.,Lancet 375(9722):1310-7,2010;Sallustio F et al.,Biores Open Access 4(1):326-33,2015)。即,在再生过程中,由肾祖细胞增殖而来的祖细胞迁移至受损部位,通过生长和分化重建为功能性肾组织。此外,在再生过程中,通过干细胞的自分泌、旁分泌和内分泌相互作用,促进肾脏的生理性细胞转化和各肾室的再生(Bussolati B et al.,Am J Pathol.66(2):545-55,2005;Sagrinati C et al.,J Am Soc Nephrol.17(9):2443-56,2006)。

[0007] 使用祖细胞的治疗方法促进减少炎症反应。肾损伤后,炎症因子和相关血管内效应物引起的ROS应激被认为是组织再生的另一个障碍。这不仅会扩大肾损伤,而且还有导致肾功能衰竭患者发生心血管疾病的风险。

[0008] 在肾损伤方面,由体细胞诱导产生肾祖细胞,并且利用该肾祖细胞来开发药物材料的技术在效率、患者特异性治疗和治疗功效方面对肾组织治疗和再生具有高价值,并且意义在于,他们提出了一种新的生物产业模式,同时开拓了一个新市场(Takasato M et al.,Semin Nephrol.4(4):462-80,2014;Sallustio F et al.,Biores Open Access.4(1):326-33,2015)。

[0009] 由于肾祖细胞不仅替代细胞,还分泌在肾再生中起重要作用的治疗因子,因此利用肾脏特异性肾祖细胞来开发用于预防和再生治疗肾损伤的药剂是一种非常自然的科学方法,甚至在预期的治疗效果方面。

[0010] 因此,发明人煞费苦心地制备可再生或替代受损肾组织的肾祖细胞,从而通过在包括被认为对肾发育重要的因子的环境(小生境)中,培养引入了重编程因子如Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug而过表达的尿液细胞,将尿液细胞诱导为具有与肾祖细胞相似特征的重编程的肾祖细胞,并且使用重编程的肾祖细胞来确认组织再生功效,从而完成了本发明。

发明内容

[0011] [技术问题]

[0012] 本发明旨在提供诱导尿液细胞直接重编程为肾祖细胞的方法,该方法包括将重编程因子如Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug引入尿液细胞中,并在包括被认为对肾发育重要的因子的环境(小生境)中培养该细胞,以将具有相似特征的重编程的肾祖细胞诱导成适用于肾损伤愈合、肾再生和治疗肾细胞损伤疾病的肾祖细胞。

[0013] [技术方案]

[0014] 为实现该目的,本发明提供诱导由尿液细胞直接重编程为肾祖细胞的方法,该方法包括:(a)培养从尿液中分离的尿液细胞;(b)将重编程因子引入到培养的尿液细胞中,所述重编程因子如i)编码Oct4蛋白的核酸、ii)编码Sox2蛋白的核酸、iii)编码Klf4蛋白的核酸、和iv)编码c-Myc蛋白的核酸、以及v)编码Slug蛋白的核酸;(c)在肾祖细胞培养基中培养引入重编程因子的尿液细胞以诱导重编程为肾祖细胞;和(d)从被诱导直接重编程为肾祖细胞的细胞中选择具有肾祖细胞特征的重编程的肾祖细胞。

[0015] 本发明还提供用于预防或治疗肾细胞损伤疾病的组合物,该组合物包括重编程的肾祖细胞作为活性成分。

[0016] 本发明还提供预防或治疗肾细胞损伤疾病的方法,该方法包括将含有通过上述方法重编程的肾祖细胞作为活性成分的组合物施用于对象。

[0017] 本发明还提供包含通过上述方法重编程的肾祖细胞作为活性成分的组合物用于预防或治疗肾细胞损伤疾病的用途。

[0018] 本发明还提供包含通过上述方法重编程的肾祖细胞作为活性成分的组合物在制备用于预防或治疗肾细胞损伤疾病的药物上的用途。

附图说明

[0019] 图1A显示了用于尝试使用直接重编程技术来诱导重编程为肾祖细胞的转录因子的组合,以及由此诱导的细胞的集落形成能力和自我更新能力。

[0020] 图1B显示了根据Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug转录因子的组合诱导的雌性和雄

性来源的尿液细胞集落形成能力的比较结果(5F:Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug的组合;5F-Slug:Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc的组合)。

[0021] 图1C显示了根据Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug的组合,作为肾祖细胞标记基因的SIX2的表达水平的比较结果。

[0022] 图2示出了使用直接重编程技术通过将尿液细胞诱导为肾祖细胞来获得集落,通过相应的集落培养使肾祖细胞数量扩大,然后肾祖细胞分化为肾细胞的整个过程。

[0023] 图3显示了使用来源于胚胎干细胞的肾祖细胞作为阳性对照,在通过引入OCT4、SOX2、KLF4、cMYC和SLUG基因从尿液细胞中诱导重编程的肾祖细胞后,通过RT-PCR经mRNA水平分析,来确认肾祖细胞标志基因如SIX2、CITED1和WT1是否表达的结果。

[0024] 图4显示了在选择将雌性或雄性来源的尿液细胞诱导为重编程的肾祖细胞的集落后,经扩增培养,通过RT-PCR经mRNA水平分析来确认肾祖细胞标志基因如SIX2、CITED1和WT1是否表达的结果。

[0025] 图5显示了在使用尿液细胞诱导重编程的肾祖细胞后,通过RT-PCR经mRNA水平分析,来确认多能标记基因如NANOG和OCT4是否表达,从而确认免于肿瘤发生风险(多能干细胞具有该风险)的稳定性的结果。

[0026] 图6显示了通过免疫测定来确认重编程的肾祖细胞是否表达肾祖细胞标记基因如SIX2和CITED1的结果。

[0027] 图7显示了使用雌性或雄性来源的尿液细胞来确认重编程的肾祖细胞是否表达肾祖细胞标记蛋白如SIX2和CITED1的蛋白质印迹结果。

[0028] 图8显示了使用雌性或雄性来源的尿液细胞来确认重编程的肾祖细胞是否保留了正常染色体的随时间而变化的核型分析结果。

[0029] 图9显示了确认在重编程的肾祖细胞中,在肾祖细胞扩增培养基中肾祖细胞标记基因如SIX2和CITED1的表达是否长时间保持的mRNA水平分析和FACS结果。

[0030] 图10A至10D显示了通过总RNA测序,确认重编程的肾祖细胞在全局基因表达水平上是否显示与来源于H9和BG01胚胎干细胞的肾祖细胞而非原始的雌性或雄性尿液来源的细胞相似的mRNA和长非编码RNA(lnc-RNA)表达模式的结果。

[0031] 图11显示了确认重编程的肾祖细胞在所有基因中,于肾发育相关基因的表达水平上,是否显示与来源于H9和BG01胚胎干细胞的肾祖细胞而非原始的雌性或雄性尿液来源的细胞相似的mRNA和lnc-RNA表达模式的结果。

[0032] 图12显示了通过总RNA测序得到的由雌性或雄性尿液细胞重编程的肾祖细胞与来源于BG01胚胎干细胞的肾祖细胞之间在全局基因表达水平上的肾发育相关mRNA表达共性的维恩图。

[0033] 图13显示了通过总RNA测序得到的,由尿液细胞诱导的肾祖细胞和来源于BG01胚胎干细胞的肾祖细胞在对所有表达的基因进行详细划分而成的各组的肾发育相关基因的表达水平上的相似性的比较结果。

[0034] 图14显示了通过RT-PCR经mRNA水平分析来确认肾小球足细胞基因标记如肾病蛋白(nephrin)、突触足细胞素(synaptopodocin)、足盂蛋白(podocalyxin)的表达以验证重编程的肾祖细胞向肾小球足细胞的分化能力的结果。

[0035] 图15显示了通过显微镜比较肾小球足细胞的特定形状与其分化前的形状,并通过

免疫染色来确认肾小球足细胞基因标记如突触足细胞素和POXDL的表达以验证重编程的肾祖细胞向肾小球足细胞的分化能力的结果。

[0036] 图16显示了通过RT-PCR经mRNA水平分析来确认肾小管细胞基因标记如CD13和AQP1的表达以验证重编程的肾祖细胞向肾小管细胞的分化能力的结果。

[0037] 图17显示了通过免疫染色来确认肾小管细胞基因标记如AQP1和LTL的表达以验证重编程的肾祖细胞向肾小管细胞的分化能力的结果。

[0038] 图18显示了通过免疫染色来确认肾元样组织的特定形状以及肾小球足细胞基因标记如PODXL和肾小管细胞基因标记如LTL的表达以验证重编程的肾祖细胞向肾元样组织的分化能力的结果。

具体实施方式

[0039] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。通常,本文使用的命名法是本领域公知的和常用的。

[0040] 在本发明中,从尿液中分离尿液细胞并培养,并将引入了Oct4、Klf4、Sox2、c-Myc和Slug重编程因子的组合的载体引入到尿液细胞中。通过将FGF9、BMP7、CHIR99021和Y-27632添加到含有肝素、LDN-193189和L-谷氨酰胺的Advanced RPMI 1640培养基中,来培养引入了重编程因子的尿液细胞,从而诱导重编程为肾祖细胞。

[0041] 因此,在一方面,本发明提供诱导由尿液细胞直接重编程为肾祖细胞的方法,该方法包括:(a)培养从尿液中分离的尿液细胞;(b)将重编程因子引入到培养的尿液细胞中,如i)编码Oct4蛋白的核酸,ii)编码Sox2蛋白的核酸,iii)编码Klf4蛋白的核酸,和iv)编码c-Myc蛋白的核酸,以及v)编码Slug蛋白的核酸;(c)在肾祖细胞培养基中培养引入重编程因子的尿液细胞以诱导重编程为肾祖细胞;和(d)从被诱导直接重编程为肾祖细胞的细胞中选择具有肾祖细胞特征的重编程的肾祖细胞。

[0042] 本文所用术语“重编程的肾祖细胞”是指使用重编程技术按照由已分化的细胞建立具有与肾干细胞相似或相同多能性的未分化的干细胞的方式制备的细胞。诱导的肾祖细胞具有与肾祖细胞相同或相似的特性,具体地,表现出相似的细胞形态,且在活体内和活体外具有相似的基因和蛋白表达模式以及多能性。因此,本发明的重编程的肾祖细胞能够分化为肾小球足细胞或肾小管细胞。

[0043] 本文所用的术语“肾祖细胞”是指能够分化为构成肾组织的细胞的多能未分化细胞(干细胞和/或祖细胞),也包括能够分化为足细胞和肾小管细胞的未分化细胞。

[0044] 本文使用的“重编程(去分化)”是指在已分化细胞分化为一种或多种不同组织类型之前获得‘干细胞’样或多能细胞状态的现象。

[0045] 本文使用的术语“分化”是指细胞分裂和增殖后在生长过程中细胞的结构或功能特化的现象。多能间充质干细胞在分化为谱系受限的祖细胞(如中胚层细胞)后,可进一步分化为不同类型的祖细胞,再分化为在特定组织中发挥特定作用的终末分化细胞(如脂肪细胞、骨细胞、软骨细胞等)。

[0046] 本文使用的“肾祖细胞”可以分化为终末分化细胞,即构成肾脏的细胞,其在特定组织(例如,肾组织)中发挥特定作用。

[0047] 本文使用的术语“尿液细胞(UCs)”无论患者的年龄、性别或健康状况如何,都可以

在任何时间轻易地重复获取，而无任何不便和痛苦，安全、简单且成本低，并且被称为无需任何特殊分离工艺即可从尿液中获得的体细胞。

[0048] 在本发明中，尿液细胞可以是尿液来源的体细胞。

[0049] 在本发明中，当重编程因子例如Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc以及转录因子Slug在尿液细胞中表达时，发现了将已经分化的细胞类型，即尿液细胞，重编程(去分化)为具有分化能力的肾祖细胞的可能性。

[0050] 本文所用的“重编程因子”一词始于重编程，这是山中教授(Professor Yamanaka)团队在2006年提出的概念。所有类型的成体组织在整个正常发育过程中从未分化状态(没有分化)逐渐分化，并变化成专用于各功能的细胞。其中，受精卵的细胞是全能的，并且随着发育的进行成为囊胚时，可分为内细胞团和外细胞。此时，内细胞团细胞可发育成胚胎体细胞和生殖细胞，称为多能细胞。胚胎干细胞显示出多能性特有的基因表达模式，其代表性实例包括Oct4、Sox2、Nanog和Lin28。重编程是诱导体细胞中特定基因的表达并恢复与未分化细胞(如胚胎和成体干细胞)相似的特性的技术。Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc是已经在其一系列研究中使用的各种因子，并且在本发明中用于由尿液细胞重编程为肾祖细胞

[0051] 本文所用的“Slug”也称为“Snai2”，并且可以将Slug和Snai2理解为相同的。

[0052] 根据本发明的Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)包括来源于动物如人、马、绵羊、猪、山羊、骆驼、羚羊和狗的所有Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)，并且优选人Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)。此外，用于重编程为肾祖细胞的本发明的Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)蛋白不仅可以包括具有野生型氨基酸序列的蛋白质，还可以包括Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)蛋白的突变体。

[0053] 在一个示例性实施方案中，Cell 2007Nov 30;131(5):861-72中公开了在本发明中用于重编程的Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)基因的序列。

[0054] Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)蛋白的突变体是指由于一个或多个氨基酸残基或其组合的缺失、插入、非保守或保守取代而具有与Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)的天然氨基酸序列不同的序列的蛋白。突变体可以是表现出与天然蛋白质相同的生物活性的功能等价物，或者根据需要对其理化性质进行了修饰的突变体。突变体是增加了对物理和化学环境的结构稳定性或增加了生理活性的突变体。

[0055] 由编码Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc或Slug(或Snai2)蛋白的核苷酸序列组成的核酸是由编码如上所述的突变型Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc或Slug(或Snai2)蛋白的核苷酸序列组成的核酸。核酸可以通过取代、缺失、插入一个或多个碱基或其组合来修饰，并且可以从自然界中分离或使用化学合成方法来制备。

[0056] 具有编码Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc或Slug(或Snai2)蛋白的核苷酸序列的核酸可以是单链或双链的，并且可以是DNA分子(基因组或cDNA)或RNA分子。

[0057] 在一个优选的方面，根据本发明的诱导尿液细胞重编程为肾祖细胞的重编程因子可以包括表达Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)蛋白的载体，在该载体中引入了具有编码Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)蛋白的核苷酸序列的核酸。

[0058] 在本发明中，步骤(b)中，可以将插入重编程因子的病毒载体直接引入尿液细胞中。

[0059] 本文使用的术语“载体”是指能够在合适的宿主细胞中表达靶蛋白以及基因构建

体的表达载体,所述基因构建体包含可操作地连接的必需调控元件以表达基因插入物。

[0060] 本文使用的术语“可操作地连接”是指编码所需蛋白的核酸序列与核酸表达调控序列的功能性连接。与重组载体的可操作连接可以使用相关领域公知的基因重组技术以及位点特异性DNA切割来形成,并且该连接使用相关领域公知的酶。

[0061] 除了表达调控元件如启动子、操纵子、起始密码子、终止密码子、聚腺苷酸化信号和增强子之外,本发明的载体还可以包括用于膜靶向或分泌的信号序列或前导序列,并且可以根据其目的制备成各种类型。载体的启动子可以是组成型或诱导型载体。此外,表达载体包括用于选择含有载体的宿主细胞的选择标记,并且可复制的表达载体包括复制起点。载体可以自我复制或整合到宿主DNA中。

[0062] 载体包括质粒载体、粘粒载体和病毒载体。优选地,载体是病毒载体。病毒载体包括来源于逆转录病毒的载体,例如人类免疫缺陷病毒(HIV)、鼠白血病病毒(MLV)、禽肉瘤/白血病病毒(ASLV)、脾坏死病毒(SNV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)和小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、腺病毒、腺相关病毒和单纯疱疹病毒,但本发明不限于此。在本发明的示例性实施方案中,使用pMXs载体作为基于鼠莫洛尼白血病病毒(MMLV)的病毒载体。

[0063] 在本发明中,可以通过本领域已知的方法,例如,凭借载体型裸DNA(Wolff et al.Science,1990:Wolffet al.J Cell Sci.103:1249-59,1992),或使用脂质体或阳离子聚合物,将具有编码Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)蛋白的核苷酸序列的核酸递送到细胞中。脂质体是通过混合阳离子磷脂如DOTMA或DOTAP而制成的用于基因递送的磷脂膜,并且当阳离子脂质体和阴离子核酸按预定量混合时,会形成核酸-脂质体复合物。

[0064] 在又另一方面,用于诱导尿液细胞重编程为肾祖细胞的组合物可以包括表达Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)蛋白的病毒,该病毒包括由编码Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)蛋白的核苷酸序列组成的核酸。

[0065] 本文使用的术语“病毒”是指通过用病毒载体转化和感染包装细胞而构建的表达Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)的病毒,所述病毒载体包括具有编码Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)蛋白的核苷酸序列的核酸。

[0066] 可用于制备表达-Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)蛋白的病毒的本发明的病毒可以是逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒或疱疹单纯病毒,但本发明不限于此。优选地,病毒是逆转录病毒。

[0067] 在本发明的一个示例性实施方案中,通过用载体转化包装细胞,即293GPG细胞,来制备表达Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)蛋白的病毒,所述载体通过将编码Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)蛋白的核酸序列插入到pMXs载体(pMXs-Oct4、pMXs-Sox2、pMXs-Klf4、pMXs-c-Myc和pMXs-Slug(或pMXs-Snai2))以感染尿液细胞来制备,该293GPG细胞产生能够与Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug(或Snai2)一起感染各种宿主细胞的高滴度病毒。

[0068] 在本发明中,在步骤(a)中,尿液细胞的培养可以在含有胎牛血清(FBS)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)或上皮生长因子(EGF)的培养基中进行。

[0069] 本文所用的术语“培养基”是指可支持细胞体外生长和存活的培养基,包括本领域中使用的适于诱导以及培养尿液细胞和重编程的肾祖细胞的所有常规培养基。培养基和培养条件可根据细胞类型进行选择。用于培养的培养基优选为细胞培养基本培养基(CCMM),

并且一般含有碳源、氮源和痕量元素。此类细胞培养基本培养基包含例如杜氏改良Eagle培养基(DMEM)、基本必需培养基(MEM)、Eagle基础培养基(BME)、RPMI1640、F-10、F-12、α-基本必需培养基(αMEM)、格拉斯哥基本必需培养基(Glasgow's Minimal essential Medium;GMEM)和Iscove改良Dulbecco培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Medium;IMEM),但本发明不限于此。此外,培养基中可以含有抗生素,如青霉素、链霉素、庆大霉素。

[0070] 在本发明的一个示例性实施方案中,从尿液中分离的细胞可以通过在含有FBS、bFGF和EGF的基础培养基中培养来获得,具体地,可以通过添加bFGF和EGF在含有FBS的高葡萄糖DMEM和肾上皮细胞生长培养基(Renal Epithelial Cell Growth Medium;REGM,Lonza)中培养。更优选地,高葡萄糖DMEM和REGM培养基还含有L-谷氨酰胺和青霉素-链霉素。

[0071] 在本发明中,在步骤(b)中,将重编程因子引入尿液细胞的方法可以是本领域常规使用而无限制的向细胞提供核酸分子或蛋白的任何方法,优选将重编程因子施用于细胞培养物的方法或将重编程因子直接注入分化细胞的方法。本文使用的重编程因子可以是:从用插入了相应因子的基因的病毒载体转染的包装细胞获得的病毒、通过体外转录产生的mRNA或在各种细胞系中的每一种中产生的蛋白。在本发明的一个示例性实施方案中,将重编程因子引入尿液细胞使用编码Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc或Slug(或Snai2)的DNA。

[0072] 将DNA直接注射到已分化的细胞中的方法可以适当地选自本领域已知的方法,例如显微注射、电穿孔、粒子轰击、直接肌肉注射以及使用隔离子和转座子的方法,但不限于此。具体地,在本发明的一个实施方案中,使用电穿孔将重编程因子的DNA引入到尿液细胞中。

[0073] 在本发明中,步骤(c)中,将引入了编码Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc和Slug蛋白的核酸的尿液细胞诱导为肾祖细胞的培养基(肾祖细胞诱导培养基)可以通过在含有LDN-193189、CHIR99021、FGF9和BMP7中的一种或多种的基础培养基中培养来诱导重编程为肾祖细胞,并且在本发明的示例性实施方案中,证实了在通过将Y-27632、CHIR99021、FGF9和BMP7全部添加到Advanced RPMI 1640培养基并另外添加LDN-193189、肝素和L-谷氨酰胺而制备成的培养基中,该培养基具有最高的肾祖细胞转化率。

[0074] 在本发明中,步骤(c)中的培养基优选包括FGF9、BMP7、CHIR99021和Y-27632,更优选还包括肝素、LDN-193189或L-谷氨酰胺,并包括在Advanced RPMI 1640基础培养基中,但本发明不限于此。

[0075] 此外,当在Matrigel、层粘连蛋白、纤连蛋白、明胶和胶原蛋白中的一种或多种包被条件下进行时,培养基中的培养物的诱导效率可提高。

[0076] 在本发明中,步骤(d)中的诱导的肾祖细胞的选择可以是收集进行步骤(c)后产生的肾祖细胞集落,并且选择的肾祖细胞可以在肾祖细胞培养基中培养。.

[0077] 肾祖细胞培养基可以是将FGF9、BMP7、Y-27632、CHIR99021、肝素、LDN-193189和L-谷氨酰胺全部添加到Advanced RPMI 1640培养基中的培养基。此外,重编程的肾祖细胞可以使用0.5mM EDTA溶液或Accutase溶液进行传代培养。

[0078] 在另一方面,本发明提供用于预防或治疗肾细胞损伤疾病的药物组合物,该药物组合物包括通过上述方法重编程的肾祖细胞作为活性成分。

[0079] 在另一方面,本发明提供预防或治疗肾细胞损伤疾病的方法,该方法包括施用由

上述方法诱导的肾祖细胞。

[0080] 在另一方面，本发明提供通过上述方法重编程的肾祖细胞以用于预防或治疗肾细胞损伤疾病的方法。

[0081] 在另一方面，本发明提供药物组合物，该药物组合物包含通过上述方法重编程以用于预防或治疗肾细胞损伤疾病的方法的肾祖细胞。

[0082] 在另一方面，本发明提供包含作为活性成分的通过上述方法重编程的肾祖细胞的组合物用于预防或治疗肾细胞损伤疾病的用途。

[0083] 在另一方面，本发明提供通过上述方法重编程的肾祖细胞在制备用于预防或治疗肾细胞损伤疾病的药物中的用途。

[0084] 本发明的重编程肾祖细胞是具有多能性的细胞，能够分化为肾小球足细胞或肾小管细胞，并且可以恢复受损或失去的肾细胞，从而治疗由肾细胞损伤或失去引起的疾病而不受限制。

[0085] 具体地，由肾细胞损伤产生的疾病可以选自由急性/慢性肾功能衰竭、肾小球肾炎、肾病综合征、肾盂炎、多囊肾病和终末期肾病组成的组。

[0086] 本发明的药物组合物可进一步引入药物递送系统以不断提高其功效。例如，本发明的药物组合物可以以聚合物水凝胶、聚合物胶束、乳剂、脂质体、聚合物颗粒或微针的形式包含在递送系统中，并且可以包括天然和合成聚合物以及无机材料作为构成这种系统的材料。

[0087] 本发明的药物组合物还可以包括通常用于制备本发明的药物组合物的合适的运载体、赋形剂或稀释剂。具体地，按照常规方法，所述药物组合物可以用于口服制剂，例如散剂、颗粒剂、片剂、胶囊剂、混悬剂、乳剂、糖浆或气雾剂、准药物、栓剂或无菌注射溶液。在本发明中，可包含在药物组合物中的运载体、赋形剂和稀释剂可以是乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露糖醇、木糖醇、赤藓糖醇、麦芽糖醇、淀粉、阿拉伯胶、藻酸盐、明胶、磷酸钙、硅酸钙、纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、水、羟基苯甲酸甲酯、羟基苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油。制备时，使用稀释剂或赋形剂，例如填充剂、膨胀剂、结合剂、润湿剂、崩解剂或表面活性剂。用于口服的固体制剂包括片剂、丸剂、散剂、颗粒剂和胶囊剂，这些固体制剂通过混合至少一种赋形剂，例如淀粉、碳酸钙、蔗糖或明胶来配制。此外，除简单的赋形剂外，还使用润滑剂，如硬脂酸镁和滑石。作为用于口服的液体制剂，可以使用混悬剂、内服液体、乳剂或糖浆，并且可以包括常用的简单稀释剂如水或液体石蜡，以及各种类型的赋形剂，例如，润湿剂、甜味剂、香料和防腐剂。肠胃外施用的制剂可以是无菌水溶液、非水溶剂、混悬剂、乳剂、冻干剂或栓剂。作为非水溶剂或悬浮液，可以使用丙二醇、聚乙二醇、植物油如橄榄油、或可注射的酯如油酸乙酯。可以使用Witepsol、吐温61、可可脂、月桂酯(laurinum)或甘油明胶作为栓剂基质。

[0088] 根据本发明的一个实施方案的药物组合物中包含的制剂的含量没有特别限制，但基于最终组合物的总重量可以为0.0001wt％至50wt％，更优选为0.01wt％至10wt％。

[0089] 本发明的药物组合物可以以药学有效量施用，本文所用的术语“药学有效量”是指在适用于医学治疗或预防的、以合理的收益/风险比足够治疗或预防疾病的量，有效剂量可以通过包括以下的参数来确定：疾病的严重性，药物的活性，患者的年龄、体重、健康状况和性别，患者对药物的敏感性，本文使用的本发明的组合物的施用时间、途径和释放速率，治

疗周期，与本发明的组合物混合或同时使用的药物，以及医学领域公知的其他参数。本发明的药物组合物可以作为独立的疗法单独施用或与另一种疗法组合施用，并与常规疗法依次或同时施用。此外，本发明的药物组合物可以以单剂量或多剂量施用。考虑到上述所有参数，重要的是要以最小的剂量达到最大的效果而没有副作用。

[0090] 本发明药物组合物的剂量可由本领域普通技术人员根据使用目的，疾病的严重性，患者的年龄、体重和性别，病史或用作活性成分的物质的类型来确定。例如，本发明的药物组合物可以以每天10mg/kg至100mg/kg，更优选地10mg/kg至30mg/kg施用于哺乳动物，包括人，并且本发明的组合物的施用频率可以是但不特别限于一天一次至三次或若干份若干次。

[0091] 本文所用的术语“预防”是指所有通过施用根据本发明的药物组合物来抑制或延迟肾细胞损伤疾病的发生的作用。

[0092] 本文所用的术语“治疗”是指所有通过施用本发明的药物组合物来参与改善或有益地改变肾细胞损伤疾病的作用。

[0093] 本文所用的术语“施用”是指通过合适的方法将本发明的药物组合物引入对象，并且施用可以通过可到达靶组织的多种口服或胃肠外途径来施用。

[0094] 本发明的药物组合物可通过任何常见途径来施用，只要可到达靶组织即可。本发明的药物组合物可以根据需要通过腹膜内、静脉内、肌肉内、皮下、皮内、口服、鼻内、肺内或直肠内施用，但本发明不限于此。

[0095] 在下文中，将参考实施例更详细地描述本发明。提供实施例只是为了更全面地描述本发明，对于本领域普通技术人员来说，本发明的范围不限于以下实施例是显而易见的。

[0096] 实施例1:从尿液中分离尿液细胞

[0097] 从尿液中分离尿液细胞的方法是基于英国的Sutherland和Bain于1972年开发的技术，具体如下。

[0098] 首先，将捐献者提供的1000g尿液离心10分钟。去除上清液后，将下层残留的团块稀释于含有抗生素如1％青霉素/链霉素/两性霉素B的20mL的PBS溶液中。然后，将稀释的PBS+团块溶液共1000g离心10分钟。去除上清液后，将下层残留的团块用含有1％青霉素/链霉素/两性霉素B、1％L-谷氨酰胺和10％FBS的基于DMEM/F12的1mL基础培养基稀释，并接种在明胶包被的12孔细胞培养板中。之后，在加入基础培养基1mL来培养3天后，将基础培养基改为生长培养基来培养所得的细胞，该生长培养基通过将1％青霉素/链霉素、1％L-谷氨酰胺、5％FBS、10ng/ml bFGF和10g/ml EGF添加到DMEM和REGM(Lonza)以1:1混合的基础培养基中制备而成。

[0099] 实施例2:将重编程因子引入尿液细胞

[0100] 使用人293来源的逆转录病毒包装细胞系293GPG，通过将重编程因子的组合引入到载体pMXs-Oct4、pMXs-Klf4、pMXs-Sox2、pMXs-cMyc、pMXs-Slug、pMXs-Six1、pMXs-Six2、pMXs-Osr1、pMXs-Pax2和pMXs-Eya1中来制备载体，该载体pMXs-Oct4、pMXs-Klf4、pMXs-Sox2、pMXs-cMyc、pMXs-Slug、pMXs-Six1、pMXs-Six2、pMXs-Osr1、pMXs-Pax2和pMXs-Eya1通过将编码Oct4、Klf4、Sox2、c-Myc、Slug、Six1、Six2、Osr1、Pax2和Eya1蛋白的核苷酸序列分别插入pMXs载体中制备而成。使用Lipofectamine 2000(Life Technologies)，将引入了重编程因子的组合的载体注射到实施例1中分离并培养的尿液来源细胞中，来制备引入重编

程因子的尿液细胞。

[0101] 引入重编程因子的尿液细胞在DMEM和REGM按1:1混合的培养基的基础上于明胶包被的6孔细胞培养板内含1％青霉素/链霉素、1％L-谷氨酰胺、5％FBS、10ng/ml bFGF和10g/ml EGF的环境中，培养2天。

[0102] 实施例3:诱导尿液来源的重编程的肾祖细胞

[0103] 将引入重编程因子的尿源细胞接种在Matrigel包被的细胞培养板上，然后在向含有1μg/ml肝素、125nM LDN-193189和0.5％L-谷氨酰胺的Advanced RPMI 1640培养基(Gibco)中添加了100ng/ml FGF9、30ng/ml BMP7、1.25μM CHIR99021和10μM Y-27632的肾祖细胞诱导和扩增培养基中，培养10至13天。完成诱导时，能够证实肾祖细胞集落的产生(图1A和图2)。

[0104] 特别地，证实了山中因子(Yamanaka factor;Oct4、Klf4、Sox2和c-Myc)的组合中添加了Slug的组合(5F:Oct4、Klf4、Sox2、c-Myc、Slug)具有优异的自我更新能力和集落形成能力(图1B)。然而，与五种因子全部引入的情况相比，将每种因子逐一去除的四因子组合诱导的雄性和雌性来源的肾祖细胞显示出非常低的集落形成能力(图1B)。此外，即使在代表性肾祖细胞标记基因SIX2的mRNA水平分析中，引入所有五种因子的肾祖细胞也显示出比由四因子组合诱导时或胚胎干细胞高得多的表达水平(图1C)。

[0105] 收集经诱导的重编程的肾祖细胞集落，并在含有肾祖细胞诱导和扩增培养基的Matrigel包被的细胞培养板中培养。使用0.5mM EDTA溶液或Accutase溶液对重编程的肾祖细胞进行继代培养，并且在以下实施例中，验证了重编程的肾祖细胞的各种特征。

[0106] 实施例4:重编程的肾祖细胞的分子生物学特征分析

[0107] 4-1:确认肾祖细胞标记基因的表达

[0108] 通过RT-PCR对作为阳性对照的胚胎干细胞来源的肾祖细胞进行mRNA水平分析，证实重编程的肾祖细胞表达肾祖细胞标记基因，如SIX2、CITED1、WT1和NCAM1(图3和4)。在此使用的引物序列如下。

[0109] SIX2:正向-CTCAAGGCACACTACATCGAG(SEQ ID NO:1)

[0110] 反向-GTTGTGGCTGTTAGAATTGGA(SEQ ID NO:2)

[0111] CITED1:正向-CAGCATCACTTCCCGCCAATTT(SEQ ID NO:3)

[0112] 反向-TTGCGATCTTTCACCGCAAGG(SEQ ID NO:4)

[0113] WT1:正向-TGTGTGCTTACCCAGGCTGCAA(SEQ ID NO:5)

[0114] 反向-CCGGGAGAACTTTCGCTGACAA(SEQ ID NO:6)

[0115] NCAM1:正向-CGATCTCATGGTTTCGGGATGG(SEQ ID NO:7)

[0116] 反向-TCATCAAACTGCACCTGGGCTG(SEQ ID NO:8)

[0117] 4-2:确认多能标记基因的表达

[0118] 根据多能标记基因如NANOG和OCT4的表达，确认了免于肿瘤发生风险(诱导多能干细胞具有该风险)的安全性。

[0119] 通过RT-PCR对作为阳性对照的经诱导的多能干细胞进行mRNA水平分析，以确认多能标记基因如NANOG和OCT4在重编程的肾祖细胞中的表达(图5)。在此使用的引物序列如下。

[0120] NANOG:正向-ATAGCAATGGTGTGACGCAG(SEQ ID NO:9)

[0121] 反向-GATTGTTCCAGGATTGGGTG(SEQ ID NO:10)

[0122] OCT4:正向-GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG(SEQ ID NO:11)

[0123] 反向-CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCCAAAC(SEQ ID NO:12)

[0124] 4-3:在蛋白质水平上确认肾祖细胞标记的表达

[0125] 通过免疫染色证实重编程的肾祖细胞中肾祖细胞标记如SIX2和CITED1的蛋白质水平表达(图6)。使用SIX2(11562-1-AP,Proteintech)和CITED1(H00004435,Abnova)作为抗体。

[0126] 此外,蛋白质印迹显示,由雌性和雄性尿液来源的细胞重编程的肾祖细胞表达肾祖细胞标记蛋白,如SIX2和CITED1(图7)。

[0127] 4-4:肾祖细胞标记的核型分析和mRNA定量分析

[0128] 为了验证重编程的肾祖细胞的分子生物学特征,通过核型分析证实重编程的肾祖细胞随时间保留有正常染色体(图8)。

[0129] 随后,经mRNA定量分析,通过qRT-PCR和FACS证实重编程的肾祖细胞随时间保持一定量的肾祖细胞标记基因(如SIX2)表达(图9)。

[0130] 4-5:确认肾发育相关基因表达水平

[0131] 通过总RNA测序,证实重编程的肾祖细胞在肾脏发育相关基因表达水平(全局基因表达水平)上显示出与来源于胚胎干细胞的肾祖细胞而非原始的尿液来源细胞相似的mRNA和lnc-RNA表达模式(图10)。

[0132] 另外,通过总RNA测序,确认重编程的肾祖细胞在所有基因中的肾发育相关基因的表达水平上是否表现出与来源于胚胎干细胞的肾祖细胞而非原始的雌性或雄性尿液来源细胞相似的mRNA和lnc-RNA表达模式,并且通过维恩图分析证实肾发育相关mRNA表达的共性(图11和12)。

[0133] 此外,通过总RNA测序,在表达的所有基因中,对与肾脏发育相关的基因进行了详细划分,并针对每组在基因表达水平上证实由尿液细胞重编程的肾祖细胞与来源于BG01胚胎干细胞的肾祖细胞之间的相似性(图13)。

[0134] 实施例5:重编程的肾祖细胞的分化能力的分析

[0135] 5-1:向肾小球足细胞的分化能力分析

[0136] 为了将重编程的肾祖细胞分化为肾小球足细胞,将肾祖细胞在肾小球足细胞分化培养基中培养7天以诱导分化,该肾小球足细胞分化培养基通过将1%青霉素/链霉素、1%L-谷氨酰胺、10%FBS、100nM维生素D3和60μM全反式视黄酸添加到DMEM/F12培养基中制备而成。结果,证实表达了肾小球足细胞标记基因如肾病蛋白、突触足细胞素(synaptopodocin)和足孟蛋白(图14)。

[0137] 用于肾小球足细胞标记基因分析的RT-PCR引物序列如下:

[0138] 肾病蛋白:正向-TGGCTCGGACCAAACCAACATT(SEQ ID NO:13)

[0139] 反向-AGGGCCTCATACCTGATGCAGA(SEQ ID NO:14)

[0140] 突触足细胞素:正向-CGCTCACCACACCAACTTCTAA(SEQ ID NO:15)

[0141] 反向-CTAGAAAGTGGCAGGCTCTGTG(SEQ ID NO:16)

[0142] 足孟蛋白:正向-CTTGAGACACAGACACAGAG(SEQ ID NO:17)

[0143] 反向-CCGTATGCCGCACTTATC(SEQ ID NO:18)

[0144] 此外,通过免疫染色,突触足细胞素和POXDL均被染色,证实重编程的肾祖细胞可以分化为肾小球足细胞(图15)。使用naptopodocin(SC-21537,Santa Cruz Biotechnology)和POXDL(AF1658,R&D Systems)作为抗体。

[0145] 5-2:分析向肾小管细胞的分化能力

[0146] 在向DMEM/F12培养基添加了1%青霉素/链霉素、1%L-谷氨酰胺、10%FBS、1×ITS、20ng/mL hEGF(人表皮生长因子)、1nM三碘甲状腺原氨酸和100ng/ml氢化可的松的肾小管细胞分化培养基中,培养肾祖细胞21天来诱导向肾小管细胞的分化。结果,证实表达了肾小管细胞标记基因如CD13和AQP1(图16)。

[0147] 用于分析肾小管细胞标记基因的RT-PCR引物序列如下。

[0148] CD13:正向-CCATGAAGGCCGAGTTCAACA(SEQ ID NO:19)

[0149] 反向-ATGAAGGCCAGCAAGTACGTG(SEQ ID NO:20)

[0150] AQP1:正向-ATGCCGACGACATCAACTCCAG(SEQ ID NO:21)

[0151] 反向-TGAGTCGGTGAGCAACTTTGGG(SEQ ID NO:22)

[0152] 此外,通过免疫染色,LTL、AQP1和E-钙粘蛋白均被染色,证实重编程的肾祖细胞可以分化为肾小管细胞(图17)。使用LTL(B-1325,Vector Labs)、AQP1(SC32737,Santa Cruz Biotechnology)或E-钙粘蛋白(610181,BD Biosciences)作为抗体。

[0153] 5-3:向肾元样组织的分化能力分析

[0154] 肾祖细胞在向advanced RPMI 1640(Gibco)添加了1%青霉素/链霉素(P/S)、1%L-谷氨酰胺(L/G)、100ng/ml FGF9、30ng/ml BMP7、1.25μM CHIR、125nM LDN、10μM Y27632和10ng/ml肝素的NPEM中培养1天,在向ARPMI培养基添加了1%P/S、1%L/G、10ng/ml FGF9和3μM CHIR的分化培养基中培养2天,在向ARPMI培养基添加了1%P/S、1%L/G和10ng/ml FGF9的分化培养基中培养3天,并在向ARPMI培养基添加了1%P/S和1%L/G的培养基培养7至14天,从而诱导向肾元样组织的分化。结果,通过免疫染色,证实肾祖细胞表达了肾小球足细胞标记基因PODXL和肾小管细胞标记基因LTL(图18)。使用PODXL(AF1658,R&D Systems)和LTL(B-1325,Vector Labs)作为抗体。

[0155] [工业适用性]

[0156] 由于本发明可以使用尿液细胞,一种可以轻易重复获得而无不便且无痛苦的体细胞,大规模生产个性化的重编程的肾祖细胞,因而该重编程的肾祖细胞可以应用于不治之症领域和细胞治疗产品的生产,这可扩展至肾损伤愈合和肾更新领域。

[0157] 上文详细描述了说明书的具体部分,虽然本领域技术人员清楚该具体技术只是优选实施例,但说明书的范围不限于此。因此,说明书的实质范围将由所附权利要求及其等同物来限定。

[0158] 序列表自由文字

[0159] 已随附电子文档。

序列表

<110> 高丽大学校产学协力团

<120> 用于诱导尿液细胞直接重编程为肾祖细胞的方法和包含通过相同方法重编程的肾祖细胞的、用于预防或治疗肾细胞损伤疾病的药物组合物

<130> G21U13C0678P/CN

<150> KR 10-2019-0041289

<151> 2019-04-09

<160> 22

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SIX2 forward

<400> 1

ctcaaggcac actacatcga g 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SIX2 reverse

<400> 2

gttgtggctg ttagaattgg a 21

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CITED1 forward

<400> 3

cagcatcact tcccgccaat tt 22

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CITED1 reverse
<400> 4
ttgcgatctt tcaccgcaag g 21
<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> WT1 forward
<400> 5
tgtgtgctta cccaggctgc aa 22
<210> 6
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> WT1 reverse
<400> 6
ccgggagaac tttcgctgac aa 22
<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> NCAM1 forward
<400> 7
cgatctcatg gtttcgggat gg 22
<210> 8
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> NCAM1 reverse
<400> 8
tcatcaaact gcacctgggc tg 22
<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> NANOG forward
<400> 9
atagcaatgg tgtgacgcag 20
<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> NANOG reverse
<400> 10
gattgttcca ggattgggtg 20
<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> OCT4 forward
<400> 11
gacaggggga ggggaggagc tagg 24
<210> 12
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> OCT4 reverse
<400> 12
cttccctcca accagttgcc ccaaac 26
<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Nephrin forward
<400> 13
tggctcggac caaaccaaca tt 22
<210> 14
<211> 22
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Nephrin reverse
<400> 14
agggcctcat acctgatgca ga 22
<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synaptopodocin forward
<400> 15
cgctcaccac accaacttct aa 22
<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synaptopodocin reverse
<400> 16
ctagaaagtg gcaggctctg tg 22
<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> podocalyxin forward
<400> 17
cttgagacac agacacagag 20
<210> 18
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> podocalyxin reverse
<400> 18
ccgtatgccg cacttatc 18
<210> 19
<211> 21

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> CD13 forward
<400> 19
ccatgaaggc cgagttcaac a 21
<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> CD13 reverse
<400> 20
atgaaggcca gcaagtacgt g 21
<210> 21
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> AQP1 forward
<400> 21
atgccgacga catcaactcc ag 22
<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> AQP1 reverse
<400> 22
tgagtcggtg agcaactttg gg 22

测试的转录因子组合	来源细胞	用于肾干细胞/祖细胞的代表性表达标记						自我更新能力/集落形成能力
		SIX2	CITED1	WT1	GNDP	NCAM	SALL1	
OCT4, KLF4, SOX2, c-MYC, SLUG, SIX1, SIX2, OSR1, PAX2, EYA1	皮肤成纤维细胞	O	O	O	O	O	O	X/O
	尿液细胞	O	O	O	O	O	O	X/O
OCT4, KLF4, SOX2, c-MYC, SLUG, SIX2, OSR1, PAX2, EYA1	尿液细胞	O	O	O	X	O	O	X/O
SLUG, SIX1, SIX2, OSR1, PAX2, EYA1	尿液细胞	X	O	X	X	O	N/A	X/X
OCT4, KLF4, SOX2, c-MYC,	尿液细胞	O	O	O	O	O	O	O/O（集落形成少）
OCT4, KLF4, SOX2, c-MYC, SLUG	皮肤成纤维细胞	O	O	O	O	O	O	X/O
	尿液细胞	O	O	O	O	O	O	O/O

图1a

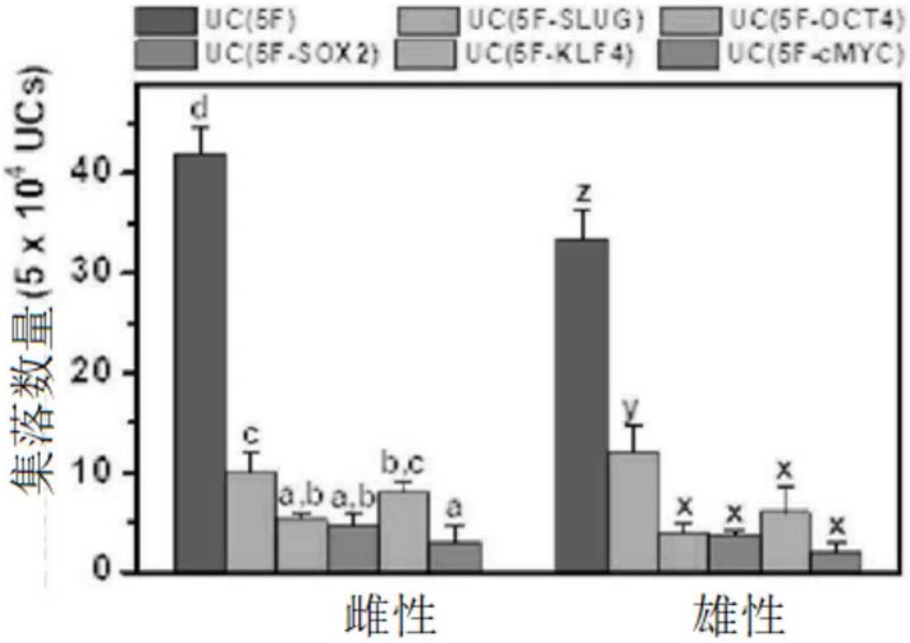

UC(5F)
UC(5F-SLUG)
UC(5F-OCT4)
UC(5F-SOX2)
UC(5F-KLF4)
UC(5F-cMYC)
集落数量(5 x 10⁴ UCs)
雌性
雄性

图1b

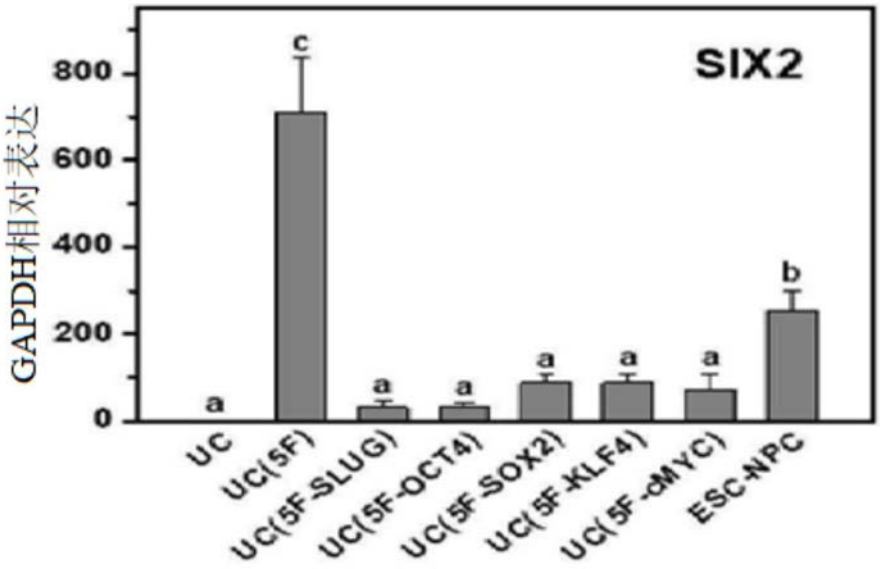

SIX2
GAPDH相对表达
UC
UC(5F)
UC(5F-SLUG)
UC(5F-OCT4)
UC(5F-SOX2)
UC(5F-KLF4)
UC(5F-cMYC)
ESC-NPC

图1c

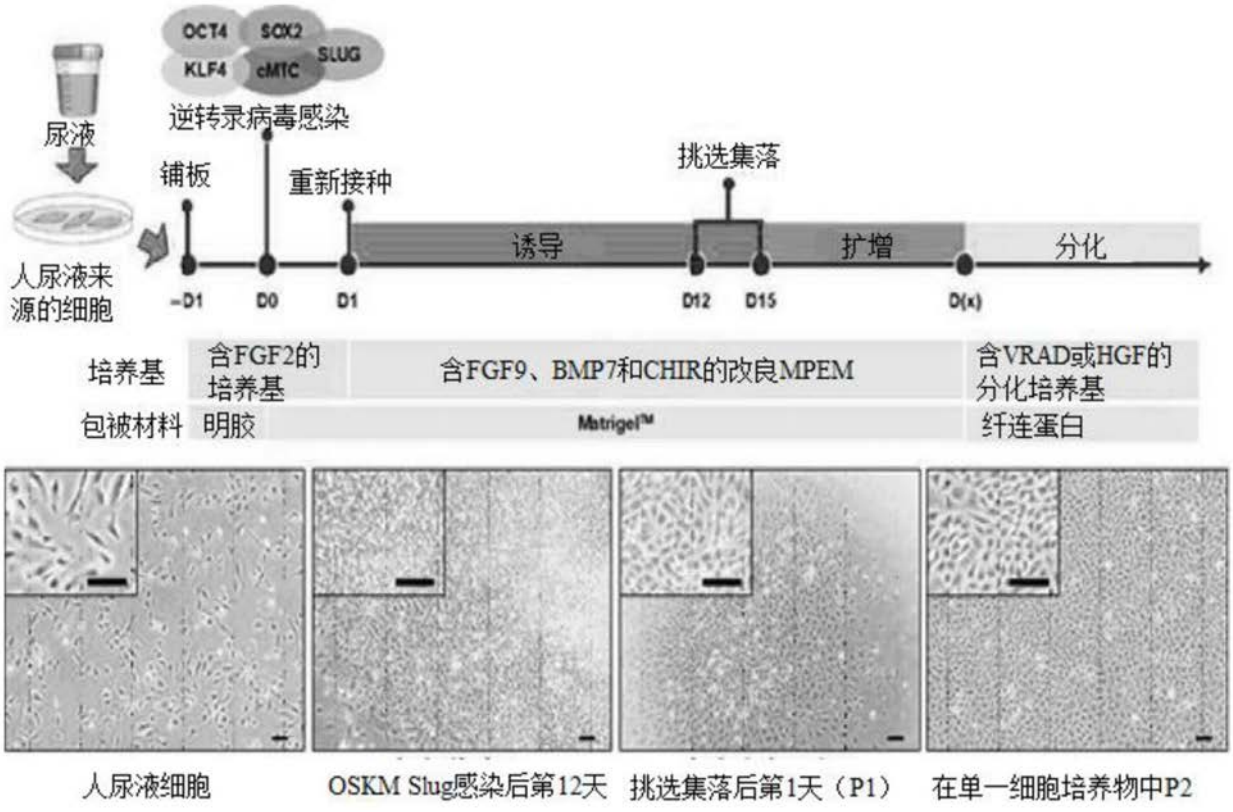

OCT4
SOX2
KLF4
cMTC
SLUG
逆转录病毒感染
尿液
铺板
重新接种
挑选集落
人尿液来源的细胞
-D1
D0
D1
D12
D15
D(x)
诱导
扩增
分化
培养基
含FGF2的培养基
含FGF9、BMP7和CHIR的改良MPEM
含VRAD或HGF的分化培养基
包被材料
明胶
Matrigel™
纤连蛋白
人尿液细胞
OSKM Slug感染后第12天
挑选集落后第1天（P1）
在单一细胞培养物中P2

图2

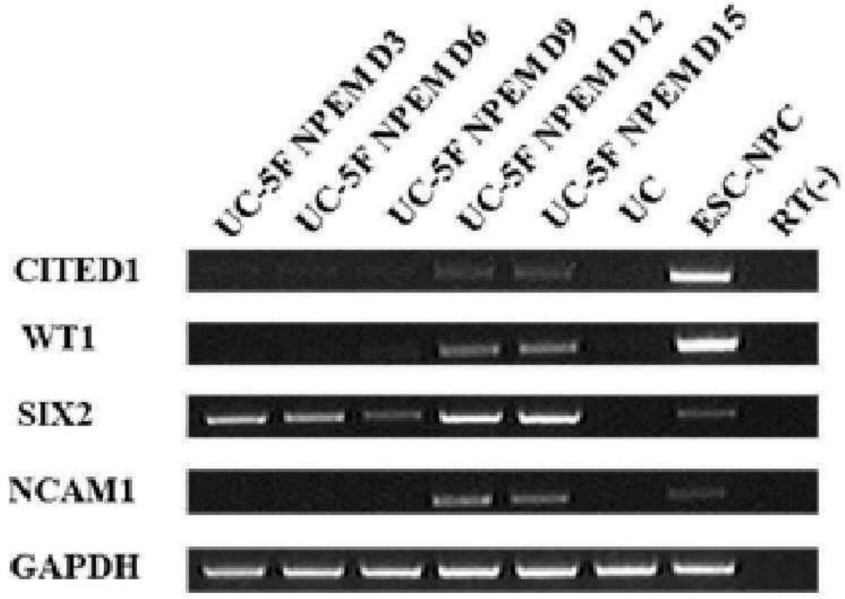

UC-5F NPEM D3
UC-5F NPEM D6
UC-5F NPEM D9
UC-5F NPEM D12
UC-5F NPEM D15
UC
ESC-NPC
RT(-)
CITED1
WT1
SIX2
NCAM1
GAPDH

图3

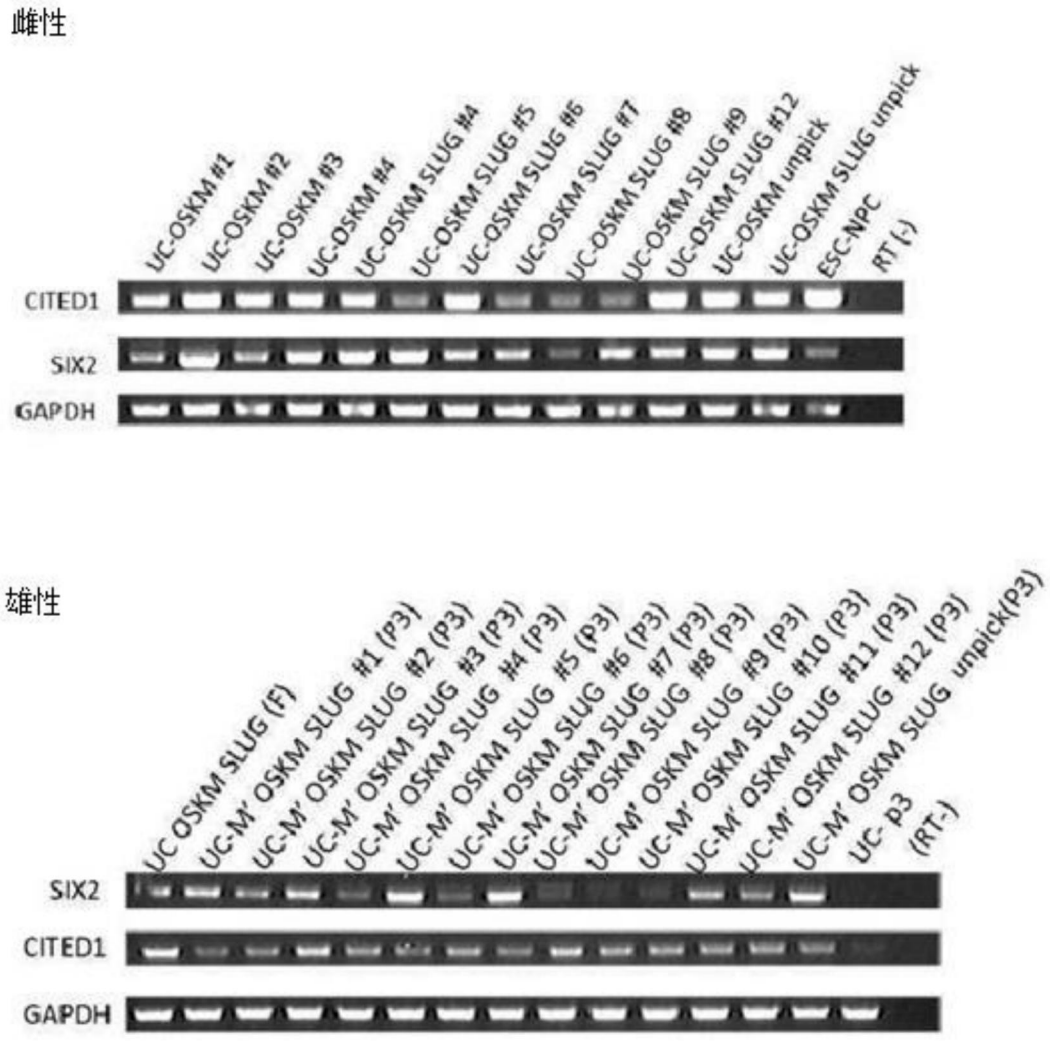

雌性
UC-OSKM #1
UC-OSKM #2
UC-OSKM #3
UC-OSKM #4
UC-OSKM SLUG #4
UC-OSKM SLUG #5
UC-OSKM SLUG #6
UC-OSKM SLUG #7
UC-OSKM SLUG #8
UC-OSKM SLUG #9
UC-OSKM SLUG #12
UC-OSKM unpick
UC-OSKM SLUG unpick
ESC-NPC
RT (-)
CITED1
SIX2
GAPDH
雄性
UC OSKM SLUG (F)
UC-M' OSKM SLUG #1 (P3)
UC-M' OSKM SLUG #2 (P3)
UC-M' OSKM SLUG #3 (P3)
UC-M' OSKM SLUG #4 (P3)
UC-M' OSKM SLUG #5 (P3)
UC-M' OSKM SLUG #6 (P3)
UC-M' OSKM SLUG #7 (P3)
UC-M' OSKM SLUG #8 (P3)
UC-M' OSKM SLUG #9 (P3)
UC-M' OSKM SLUG #10 (P3)
UC-M' OSKM SLUG #11 (P3)
UC-M' OSKM SLUG #12 (P3)
UC-M' OSKM SLUG unpick(P3)
UC- P3
(RT-)
SIX2
CITED1
GAPDH

图4

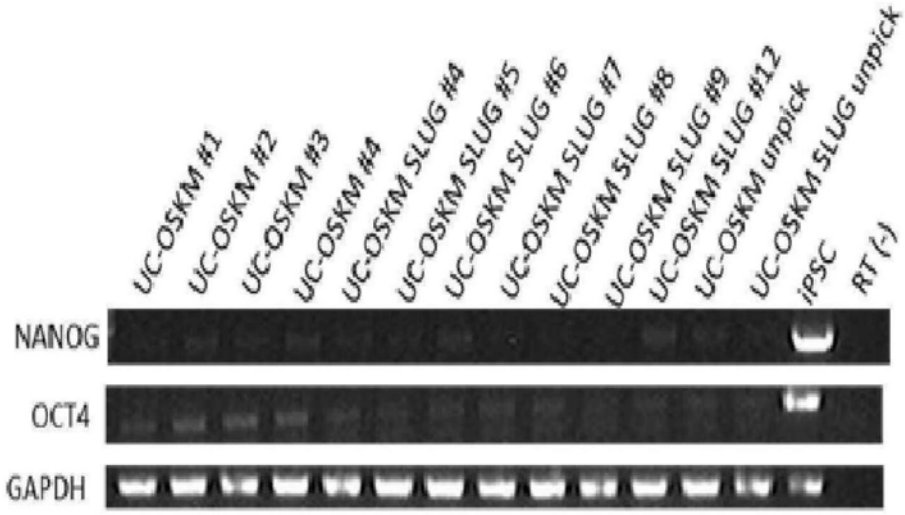

UC-OSKM #1
UC-OSKM #2
UC-OSKM #3
UC-OSKM #4
UC-OSKM SLUG #4
UC-OSKM SLUG #5
UC-OSKM SLUG #6
UC-OSKM SLUG #7
UC-OSKM SLUG #8
UC-OSKM SLUG #9
UC-OSKM SLUG #12
UC-OSKM unpick
UC-OSKM SLUG unpick
iPSC
RT (-)
NANOG
OCT4
GAPDH

图5

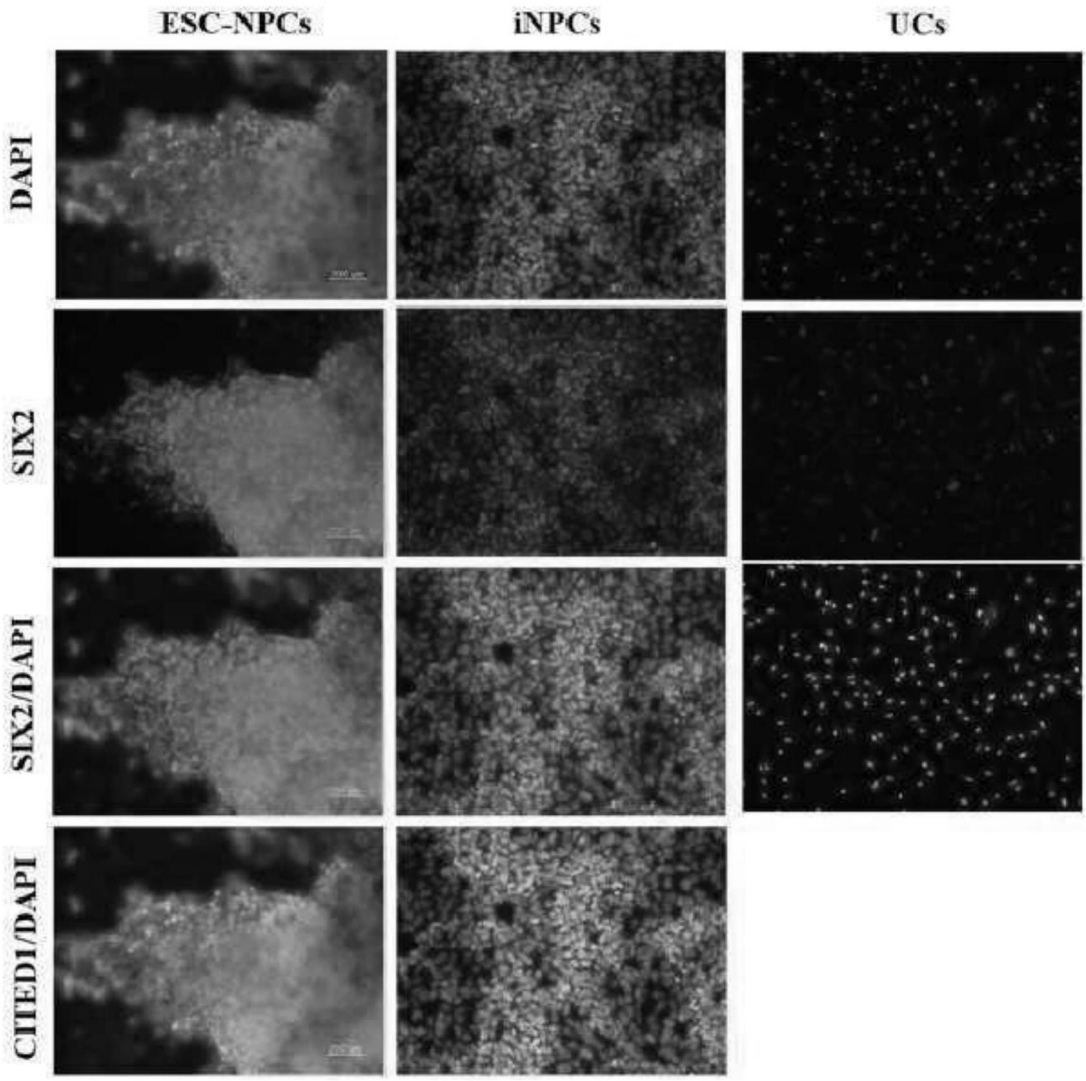


图6

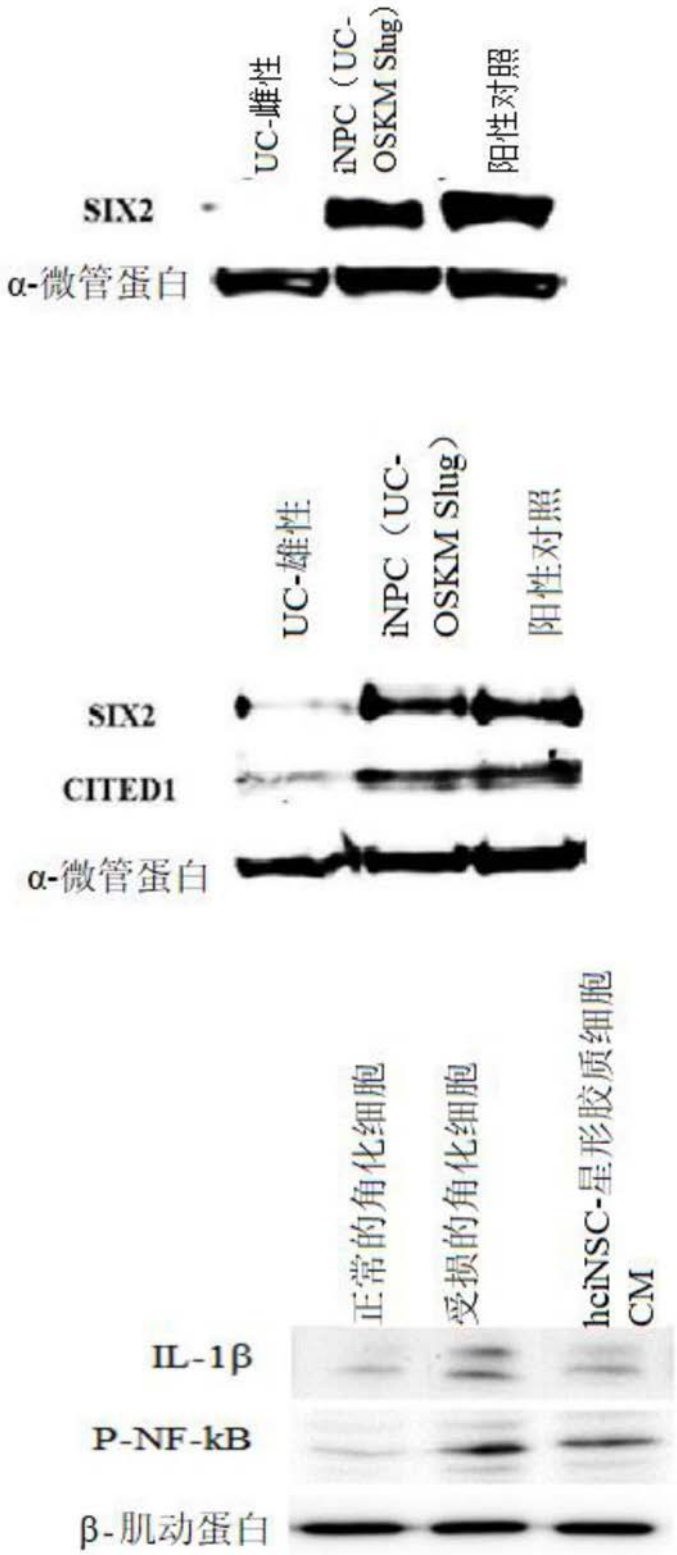

UC-雌性
iNPC（UC-OSKM Shg）
阳性对照
SIX2
α-微管蛋白
UC-雄性
iNPC（UC-OSKM Shg）
阳性对照
SIX2
CITED1
α-微管蛋白
正常的角化细胞
受损的角化细胞
hciNSC-星形胶质细胞CM
IL-1β
P-NF-kB
β-肌动蛋白

图7

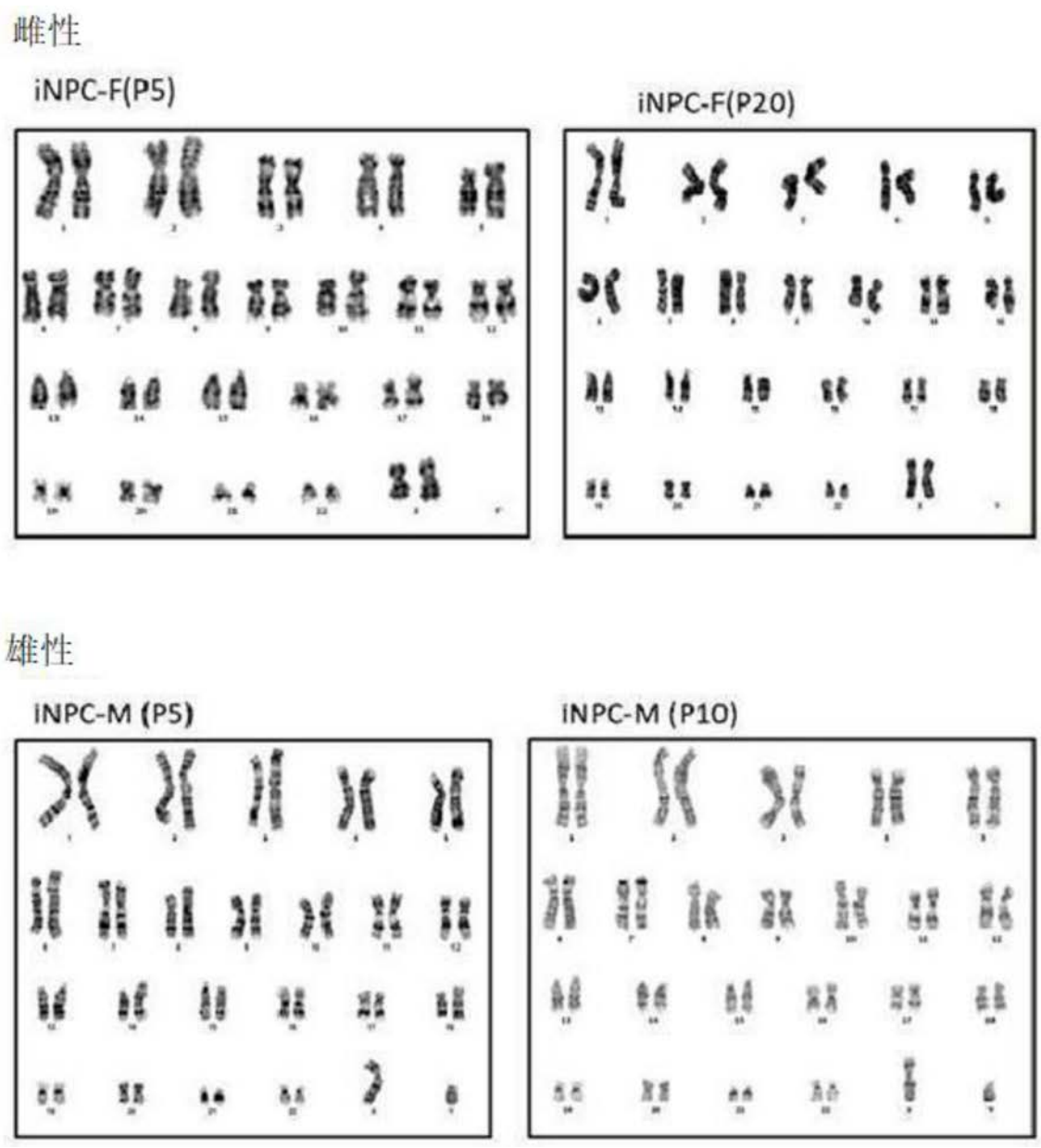


图8

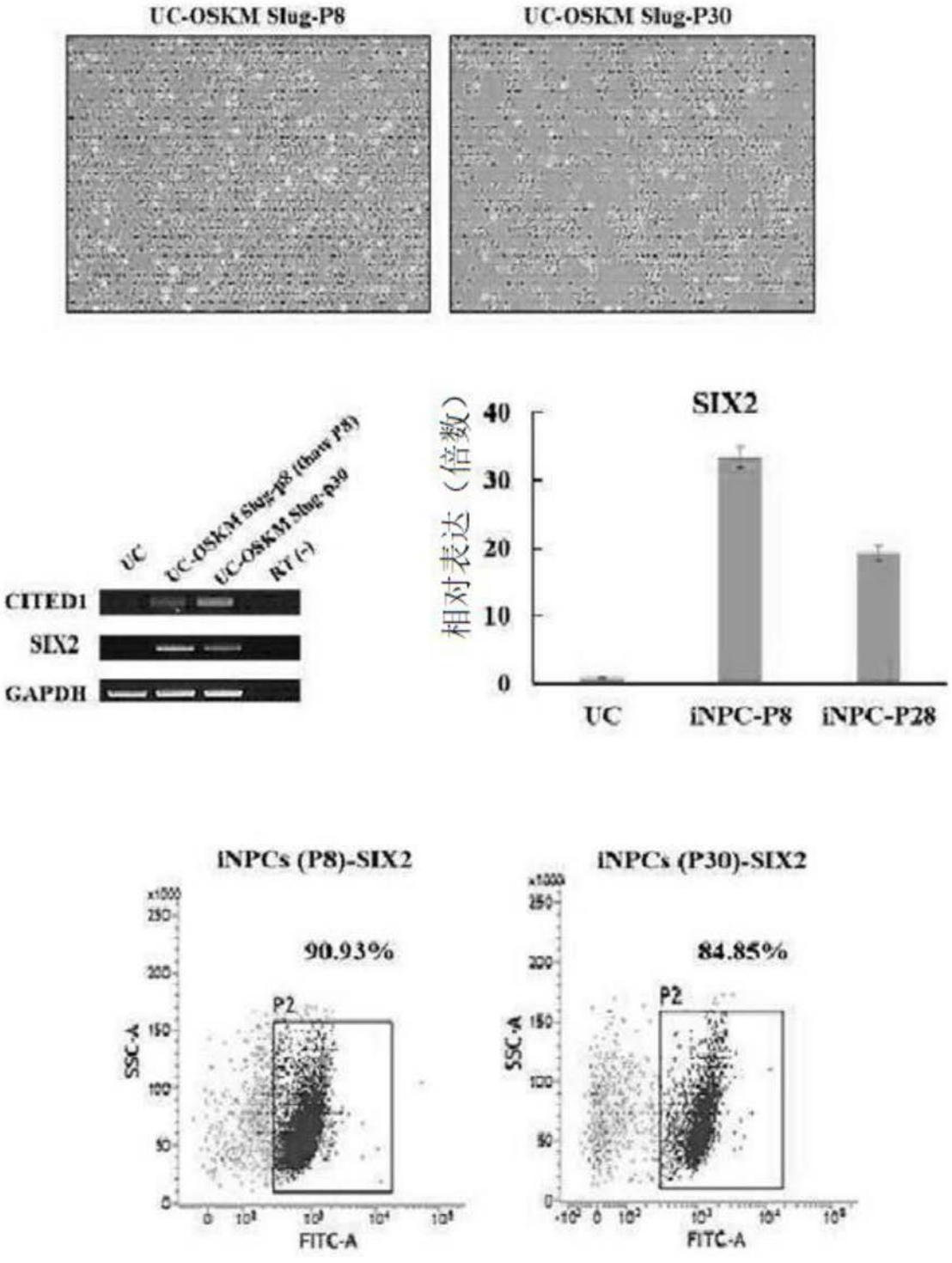

UC-OSKM Slug-P8
UC-OSKM Slug-P30
UC
UC-OSKM Slug-p8 (Same P8)
UC-OSKM Slug-p30
RT (-)
CITED1
SIX2
GAPDH
SIX2
相对表达（倍数）
40
30
20
10
0
UC
iNPC-P8
iNPC-P28
iNPCs (P8)-SIX2
90.93%
P2
SSC-A
FITC-A
iNPCs (P30)-SIX2
84.85%
P2
SSC-A
FITC-A

图9

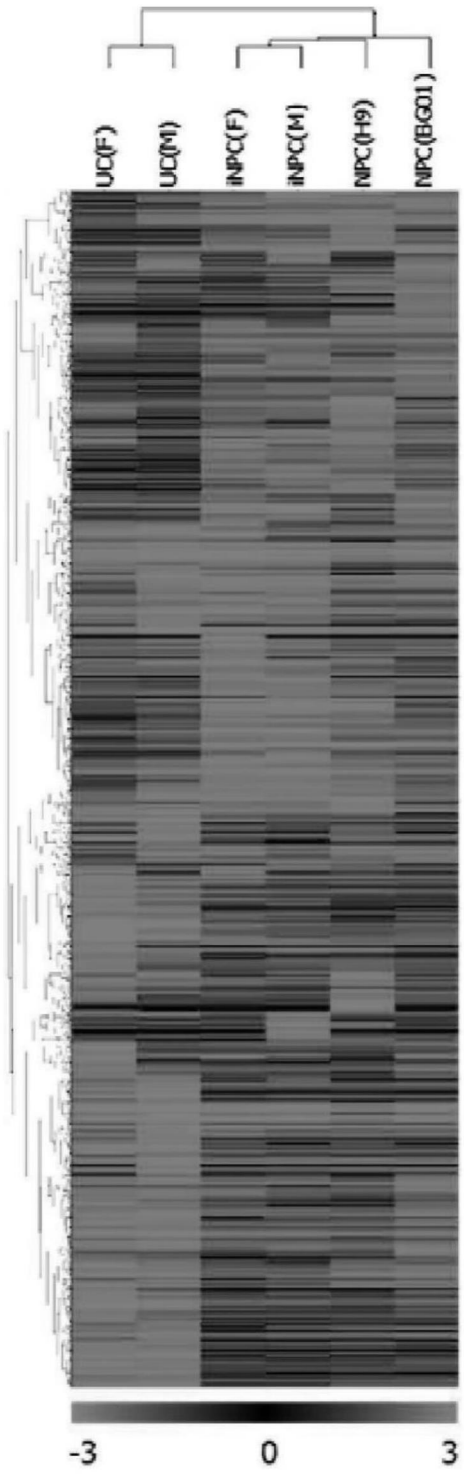


图10a

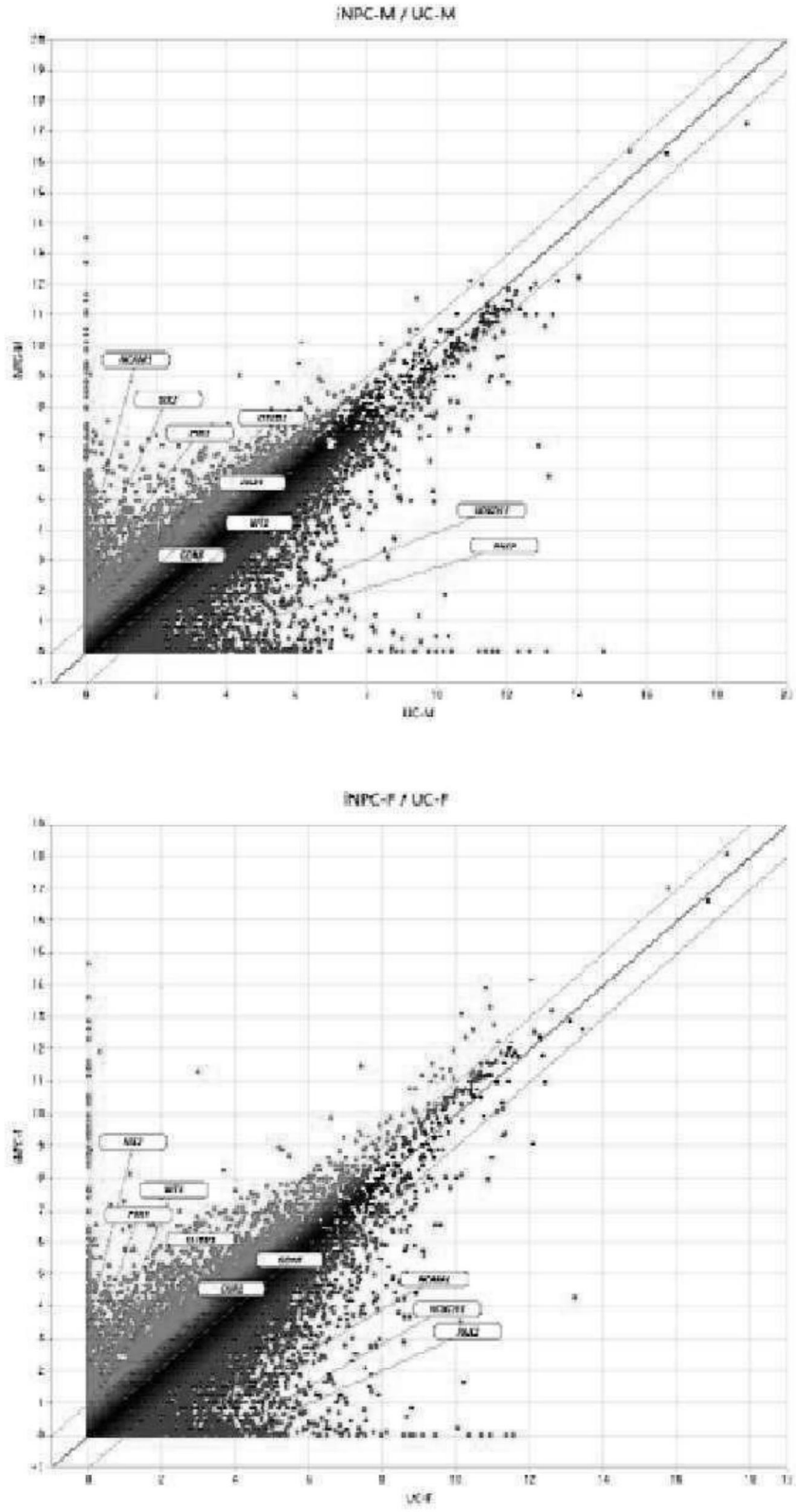
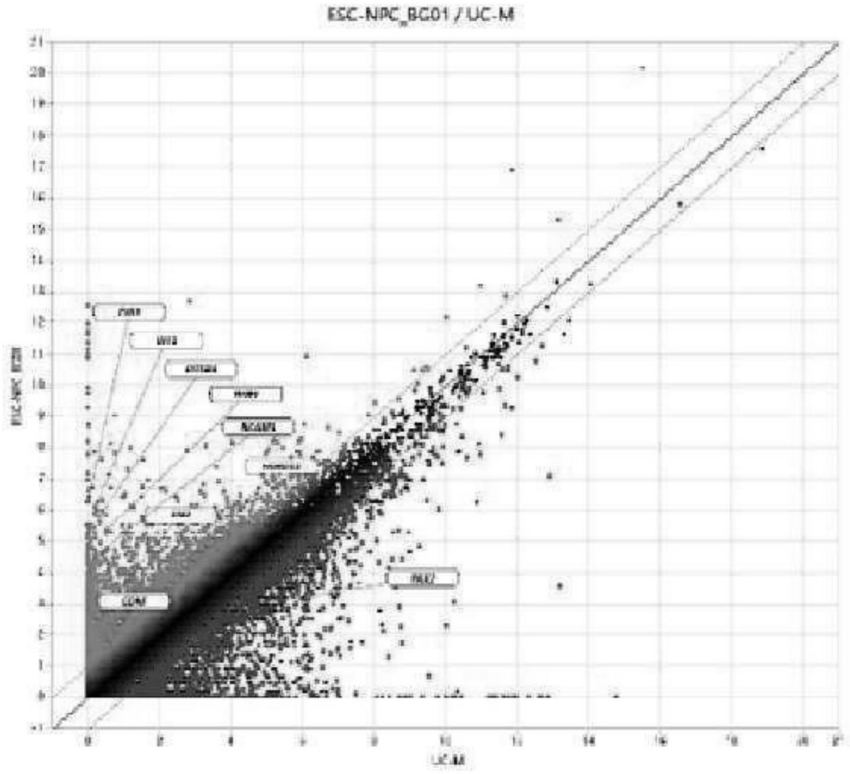


图10b



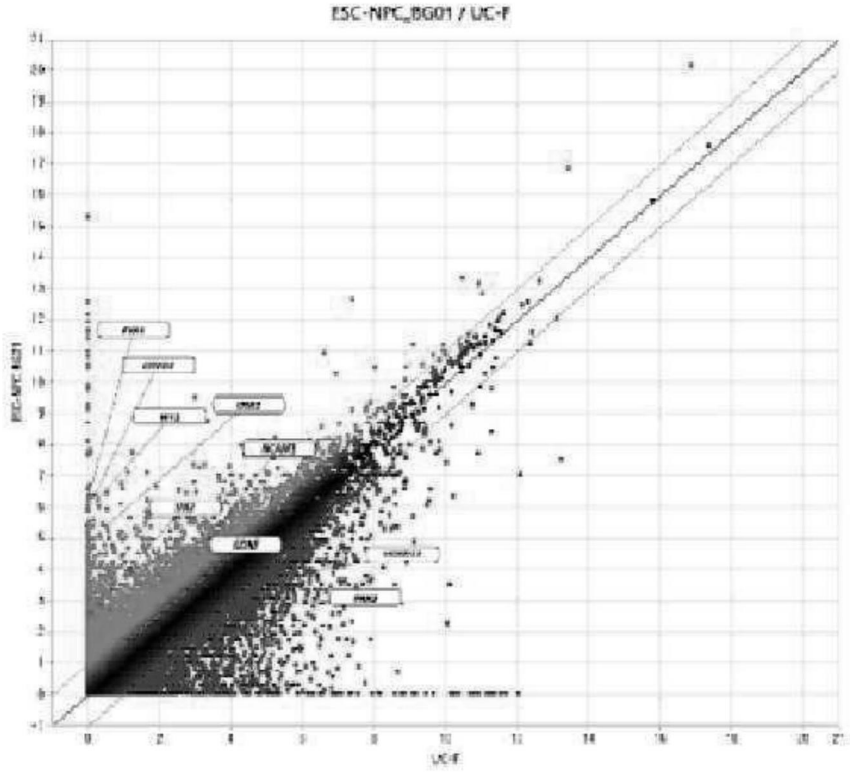
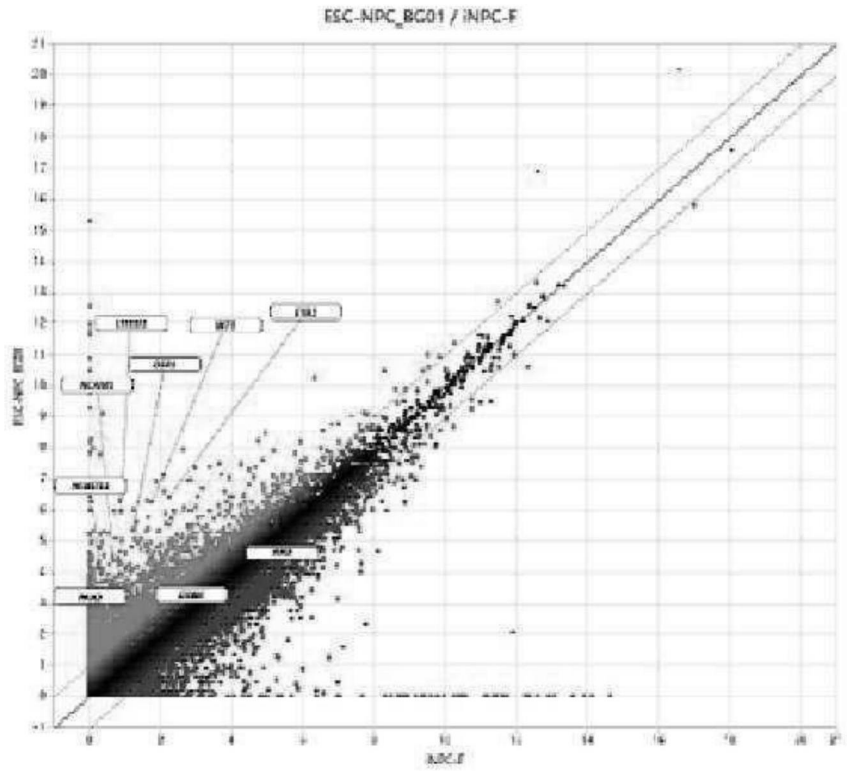


图10c



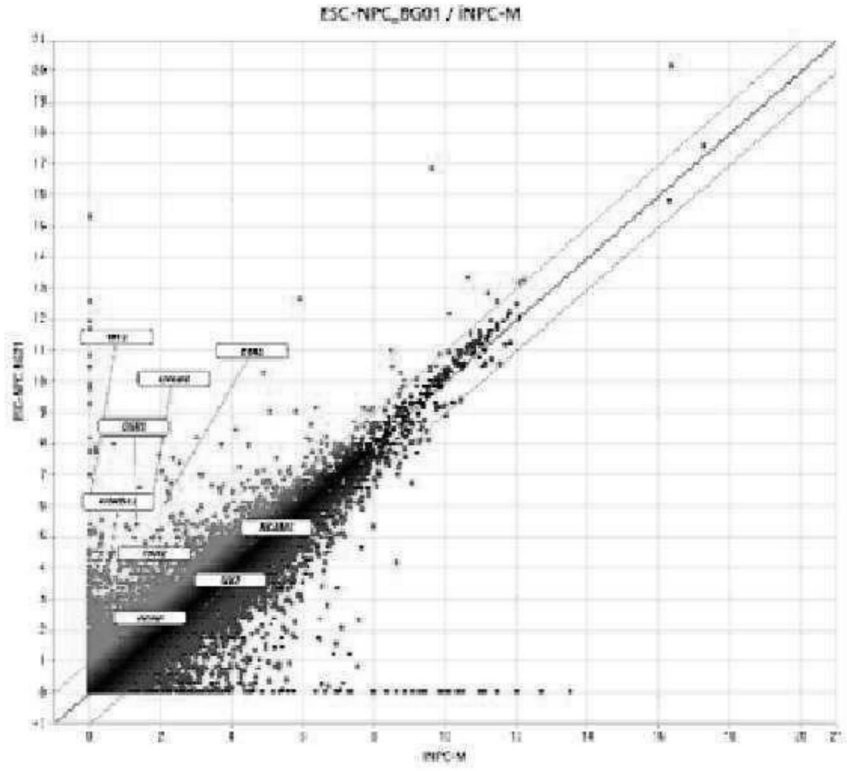


图10d

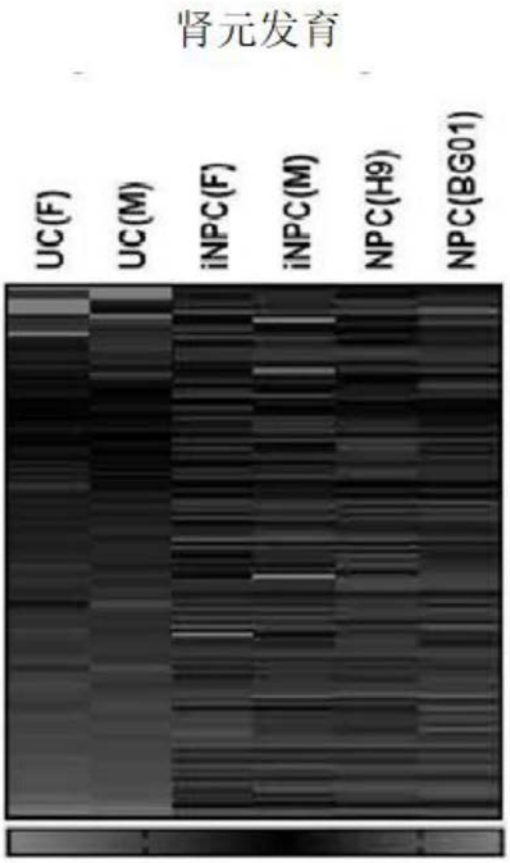


图11

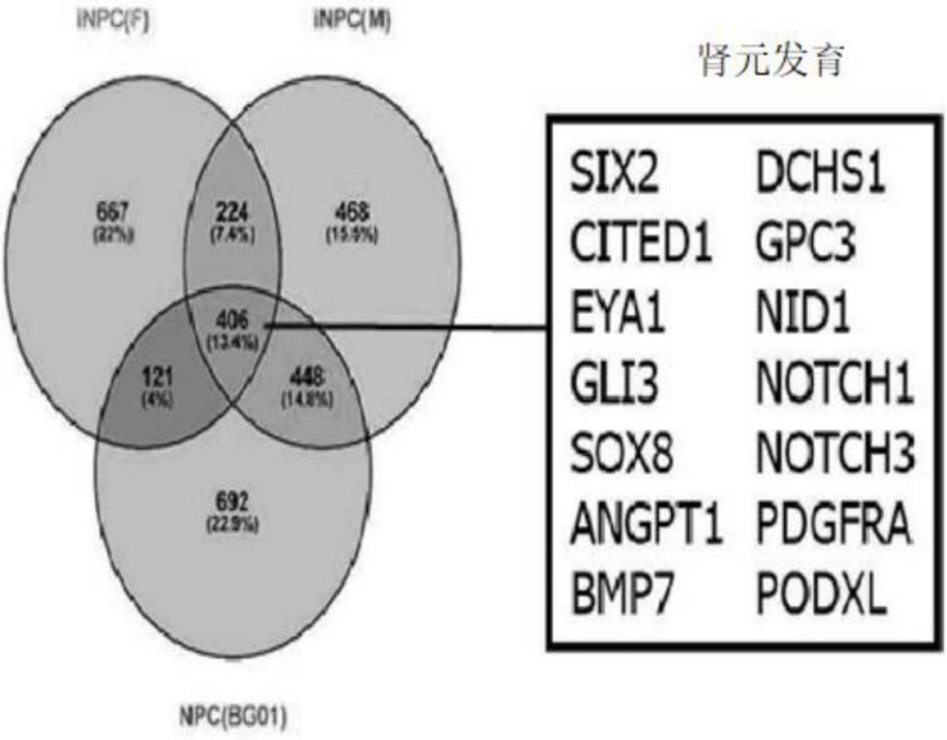

iNPC(F)
iNPC(M)
667
(22%)
224
(7.4%)
468
(15.9%)
406
(13.4%)
121
(4%)
448
(14.8%)
692
(22.9%)
NPC(BG01)
肾元发育
SIX2
CITED1
EYA1
GLI3
SOX8
ANGPT1
BMP7
DCHS1
GPC3
NID1
NOTCH1
NOTCH3
PDGFRA
PODXL

图12

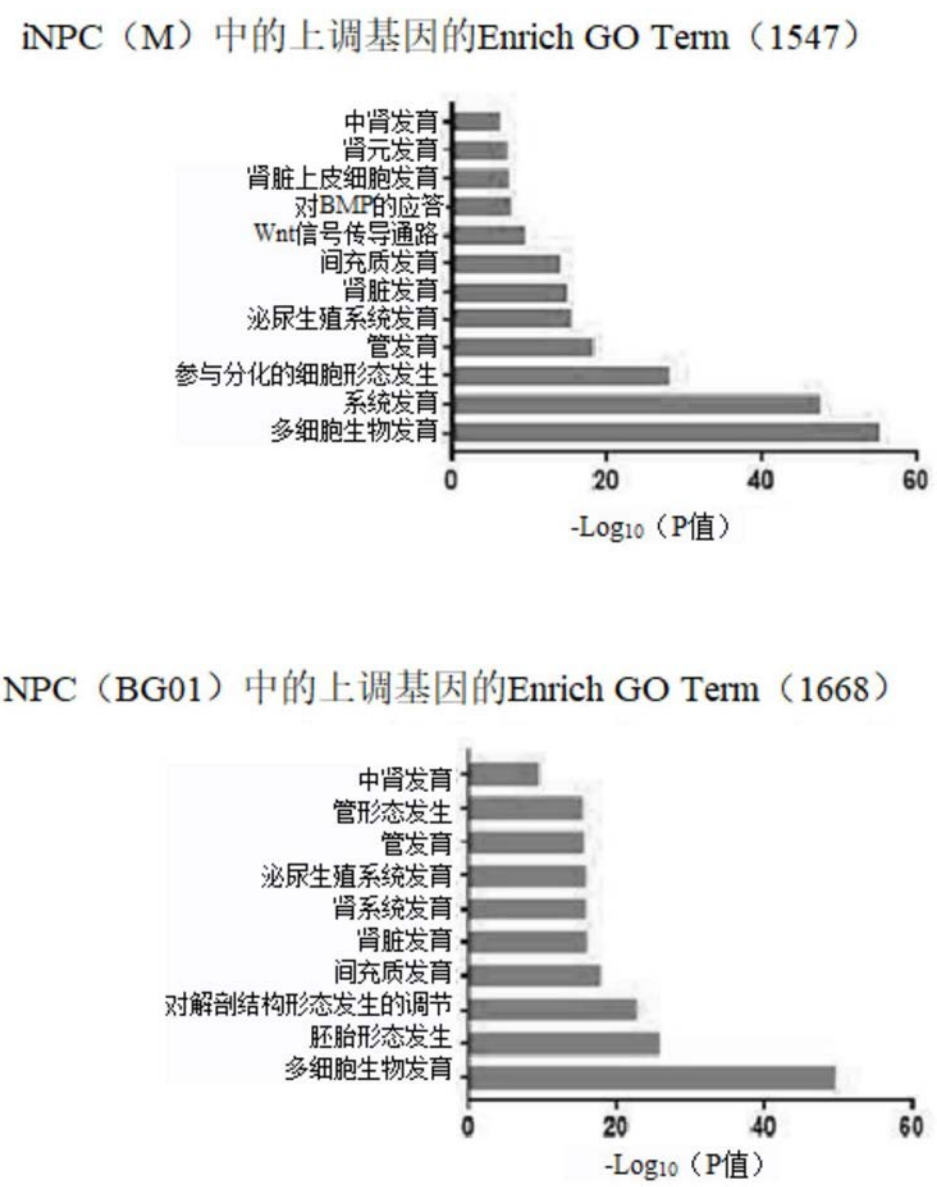

iNPC（M）中的上调基因的Enrich GO Term（1547）
中肾发育
肾元发育
肾脏上皮细胞发育
对BMP的应答
Wnt信号传导通路
间充质发育
肾脏发育
泌尿生殖系统发育
管发育
参与分化的细胞形态发生
系统发育
多细胞生物发育
0
20
40
60
-Log10（P值）
NPC（BG01）中的上调基因的Enrich GO Term（1668）
中肾发育
管形态发生
管发育
泌尿生殖系统发育
肾系统发育
肾脏发育
间充质发育
对解剖结构形态发生的调节
胚胎形态发生
多细胞生物发育
0
20
40
60
-Log10（P值）

图13

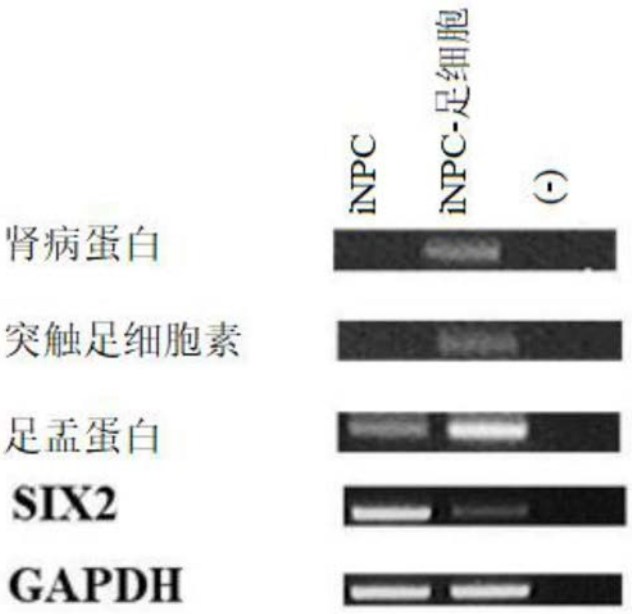


图14

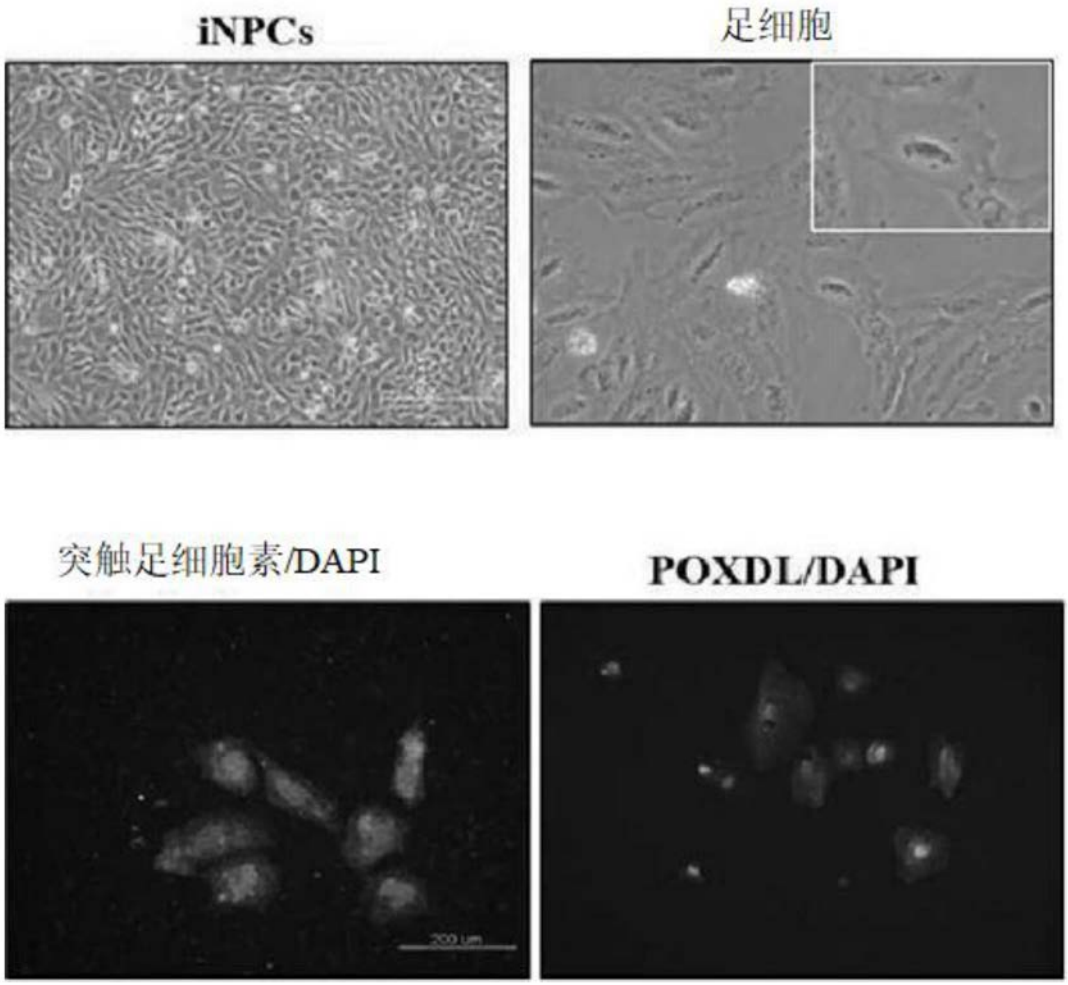

iNPCs
足细胞
突触足细胞素/DAPI
POXDL/DAPI

图15

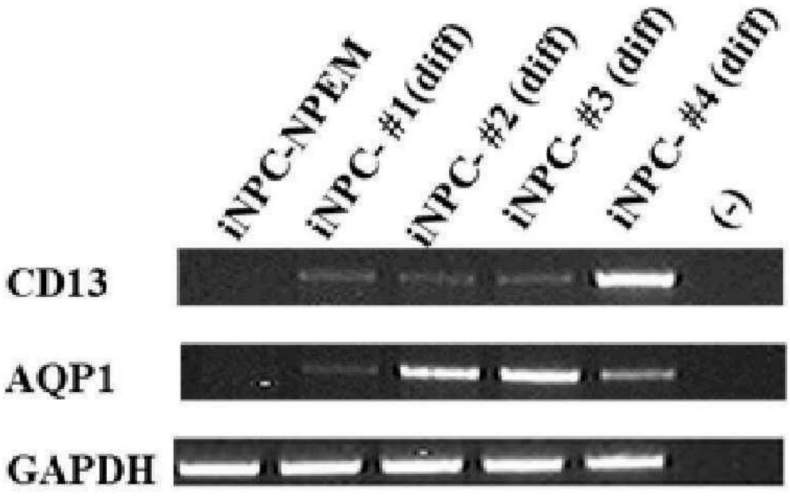

iNPC-NPEM
iNPC- #1(diff)
iNPC- #2 (diff)
iNPC- #3 (diff)
iNPC- #4 (diff)
(-)
CD13
AQP1
GAPDH

图16

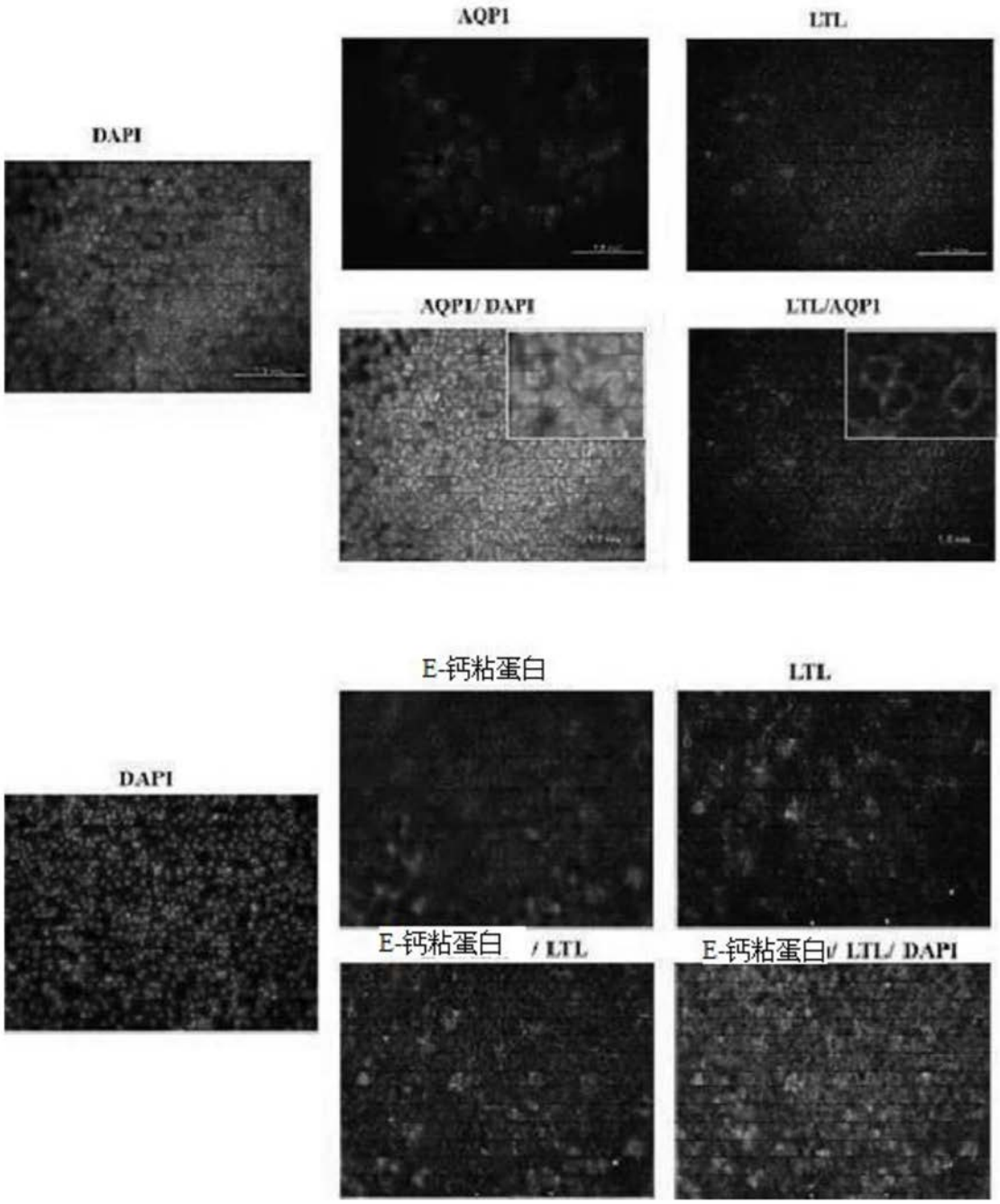

AQP1
LTL
DAPI
AQP1/ DAPI
LTL/AQP1
E-钙粘蛋白
LTL
DAPI
E-钙粘蛋白 / LTL
E-钙粘蛋白/ LTL/ DAPI

图17

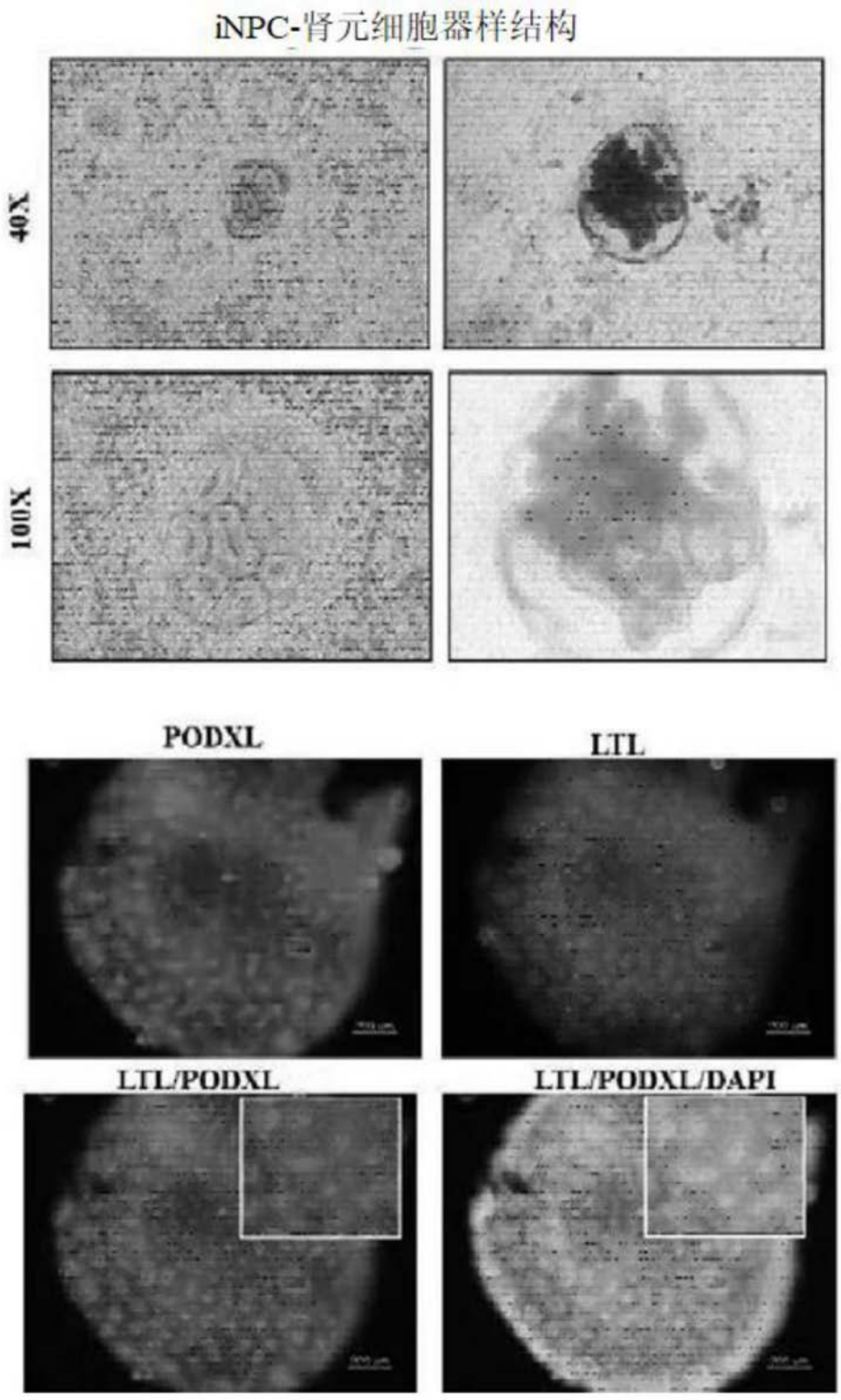


图18