



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105456292 B

(45)授权公告日 2019.03.26

(21)申请号 201510994055.3

(22)申请日 2010.10.28

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105456292 A

(43)申请公布日 2016.04.06

(30)优先权数据

61/256,846 2009.10.30 US

(62)分案原申请数据

201080058598.X 2010.10.28

(73)专利权人 北卡罗来纳大学教堂山分校

地址 美国北卡罗来纳州

专利权人 罗马大学

(72)发明人 L·M·雷德 Y·王 V·卡迪拉尔
E·戈迪奥 G·卡佩罗 (续)(74)专利代理机构 广州文冠倪律知识产权代理
事务所(普通合伙) 44348

代理人 倪小敏 何锦标

(51)Int.Cl.

C12N 5/074(2010.01)

(56)对比文件

US 2003032182 A1,2003.02.13,
 US 2004018621 A1,2004.01.29,
 US 2002182188 A1,2002.12.05,
 US 2003229045 A1,2003.12.11,
 US 6069005 A,2000.05.30,
 US 2009092586 A1,2009.04.09,
 US 2007036765 A1,2007.02.15,
 US 2009191159 A1,2009.07.30,
 Liu C 等.Presence of markers for
 liver progenitor cells in human-derived
 intrahepatic biliary epithelial cells.
 《Liver International》.2004,第24卷(第6期),
 第669-678页. (续)

审查员 马家兴

权利要求书3页 说明书16页 附图35页

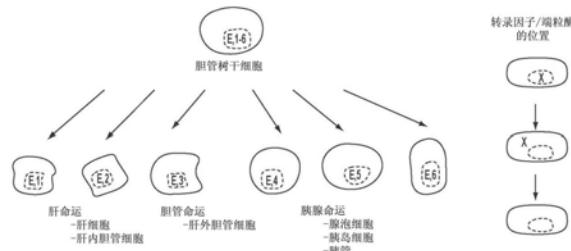
(54)发明名称

来自肝外胆管树的专能干细胞及其分离方法

(57)摘要

本发明涉及专能干细胞、专能细胞群及富集专能细胞的群,每一个在新生儿、儿童和成人胆管组织及死后72小时内的死人(尽管优选死后10小时内)中发现并能够成熟至包括肝、胆管或胰腺组织的多个内胚层组织。专能干/祖细胞及细胞群在胆管周围腺体中发现,从它们派生的祖细胞遍及包括胆囊的胆管树存在。高量的胆管周围腺体在胆管树的分支位置如门、肝总管、胆囊管、总管、肝胰总管和胆囊中发现。有关的专能细胞、专能细胞群及它们派生的祖细胞在遍及包括胆囊的胆管树中发现,其没有胆管周围腺体。本发明还提供包括这些细胞的组成、鉴定和分离这

些细胞的方法、在培养物中培养这些细胞的方法、在培养物中扩增这些细胞的方法、及体外或体内分化或谱系限制这些细胞至肝、胆管或胰腺命运(如肝细胞、胆管细胞和/或胰岛细胞)的方法。还提供使用专能细胞和/或专能细胞群的方法。



CN 105456292 B

[转续页]

[接上页]

(72)发明人 D·艾尔瓦罗 C·崔

(56)对比文件

Kuwahara R 等.The hepatic stem cell niche: identification by label-retaining cell assay.《Hepatology》.2008,第47卷(第6期),第1994-2002页.

Golding M 等.Reactive biliary epithelium: The product of a

pluripotential stem cell compartment?.
《Human Pathology》.1996,第27卷(第9期),第872-884页.

Alison MR 等.Pluripotential liver stem cells: facultative stem cells located in the biliary tree.《Cell Proliferation》.1996,第29卷(第7期),第373-402页.

1. 分离的哺乳动物专能干/祖细胞,其能够分化至多个内胚层谱系,其中所述细胞从哺乳动物的胆管树组织获得,及其中所述细胞对下述标记物呈阳性:

(i) 至少一干细胞表面标记物,其中所述干细胞表面标记物选自下组:EpCAM、N-CAM、CXCR4和CD133;

(ii) 指示肝细胞谱系的至少一标记物,其中指示肝细胞谱系的至少一标记物选自HNF6、HES1、CK19、白蛋白或AFP;

(iii) 指示胰腺细胞谱系的至少一标记物,其中指示胰腺细胞谱系的至少一标记物选自PDX1、PROX1、NGN3或胰岛素;及

(iv) 内胚层谱系的至少一标记物,其中所述内胚层谱系的至少一标记物选自CD133、N-CAM、CXCR4或EpCAM;

其中所述的哺乳动物专能干/祖细胞不属于哺乳动物胚胎来源。

2. 根据权利要求1所述的分离的哺乳动物专能干/祖细胞,其中所述专能干/祖细胞为专能干细胞。

3. 根据权利要求1所述的分离的哺乳动物专能干/祖细胞,其中所述内胚层谱系为肝谱系、胆管谱系、胰腺谱系或其组合。

4. 根据权利要求1所述的分离的哺乳动物专能干/祖细胞,其中所述胆管树组织为胆管树的任何部分。

5. 根据权利要求4所述的分离的哺乳动物专能干/祖细胞,其中所述胆管树的任何部分包括门、肝总管、胆囊管、总管、肝胰总管和胆囊。

6. 根据权利要求1所述的分离的哺乳动物专能干/祖细胞,其中所述哺乳动物为人。

7. 根据权利要求6所述的分离的哺乳动物专能干/祖细胞,其中所述人为婴儿、儿童、成人、或死后72小时内的死人。

8. 根据权利要求7所述的分离的哺乳动物专能干/祖细胞,其中所述人为死后10小时内的死人。

9. 根据权利要求1所述的分离的哺乳动物专能干/祖细胞,其中所述胆管树组织包含胆管周围腺体或源自胆管周围腺体或胆囊的祖细胞或干细胞。

10. 根据权利要求1所述的分离的哺乳动物专能干/祖细胞,其中所述胆管树组织包括胆管树在其处分支的位置。

11. 根据权利要求1所述的分离的哺乳动物专能干/祖细胞,其中所述哺乳动物专能干/祖细胞表达:

(i) 指示肝细胞谱系的至少一标记物,所述指示肝细胞谱系的至少一标记物选自HNF6、HES1、CK19、白蛋白或AFP;

(ii) 指示胰腺细胞谱系的至少一标记物,所述指示胰腺细胞谱系的至少一标记物选自PDX1、PROX1、NGN3或胰岛素;及

选自(a)或(b)类别的至少一标记物:

(a) 在干/祖细胞上发现的至少一内胚层表面标记物,所述至少一内胚层表面标记物选自CD133、N-CAM、CXCR4或EpCAM;

(b) 指示内胚层干/祖细胞的至少一转录因子,其中指示内胚层干/祖细胞的至少一转录因子选自SOX 9、SOX17或FOXA2。

12. 分离的哺乳动物专能干/祖细胞,其至少表达下述之一:

- (i) 端粒酶蛋白的核表达;
- (ii) 多能基因的中低水平表达;
- (iii) 典型内胚层转录因子的核或核周表达;
- (iv) 内胚层干/祖细胞表面标记物的表达;

(v) 成熟肝脏、成熟胆管或成熟内分泌胰腺的谱系标记物的缺乏表达或低及可变水平的表达;

- (vi) 间质细胞、内皮细胞或造血细胞的标记物的缺乏表达;

其中所述的哺乳动物专能干/祖细胞不属于哺乳动物胚胎来源。

13. 根据权利要求12所述的分离的哺乳动物专能干/祖细胞,其中所述成熟肝脏为肝细胞,成熟胆管为胆管细胞,成熟内分泌胰腺为胰岛细胞。

14. 根据权利要求12所述的分离的哺乳动物专能干/祖细胞,其中:

所述内胚层干/祖细胞表面标记物包括下述之一:CD326/上皮细胞黏附分子EpCAM、CD56/神经细胞黏附分子NCAM、CD 133、CXCR4或其组合;或者

所述典型内胚层转录因子包括下述之一:SOX17、SOX9、FOXA2、HES1、HNF6、PROX1、HNF3B、PDX1、NGN3或其组合;或者

成熟肝脏的谱系标记物包括下述之一:P450系;成熟胆管的谱系标记物包括下述之一:分泌素受体、水通道蛋白或其组合;及成熟胰腺的谱系标记物包括下述之一:高水平的胰岛素、高血糖素、生长抑制激素、淀粉酶或其组合;或者

间质细胞的标记物为肌间线蛋白;内皮细胞的标记物为VEGF受体;及造血细胞的标记物为CD45。

15. 根据权利要求14所述的分离的哺乳动物专能干/祖细胞,其中P450系为P450-3A4。

16. 一种组合物,包括:

一群包含根据权利要求1-15任一所述的哺乳动物专能干/祖细胞的细胞;或者

一群富集根据权利要求1-15任一所述的专能干/祖细胞的哺乳动物细胞。

17. 获取哺乳动物专能干/祖细胞的方法,所述细胞能够分化至多个内胚层谱系,其中所述细胞从哺乳动物的胆管树组织获得,所述方法包括顺序地以任何次序或实质上同时地选择对下述标记物呈阳性的细胞:

- (i) 至少一干细胞表面标记物如EpCAM、N-CAM、CXCR4或CD133;

(ii) 指示肝细胞谱系阶段的至少一标记物,其中指示肝细胞谱系的至少一标记物选自HNF6、HES1、CK19、白蛋白或AFP;

(iii) 指示胰腺细胞谱系阶段的至少一标记物,其中指示胰腺细胞谱系的至少一标记物选自PDX1、PROX1、NGN3或胰岛素;

(iv) 内胚层谱系的至少一标记物,其中所述内胚层谱系的至少一标记物选自CD133、N-CAM、CXCR4或EpCAM;

及非必须地,选自(a)或(b)的至少一标记物:

- (a) 至少一表面标记物,所述至少一标记物选自CD133、N-CAM、CXCR4或EpCAM;及

(b) 指示内胚层谱系的至少一转录因子,其中指示内胚层谱系的至少一转录因子选自SOX 9、SOX17或FOXA2。

18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述哺乳动物专能干/祖细胞经免疫选择技术和/或选择性培养条件获得。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中免疫选择技术包括筛选法、磁珠选择法、流式细胞计数法或其组合。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中免疫选择技术包括流式细胞计数。

21. 根据权利要求18所述的方法,其中所述选择性培养条件包括将所述细胞放在塑料上、透明质酸上、或非必须地用胶原蛋白 IV、胶原蛋白 III、层粘连蛋白、透明质酸、来自新生儿、小儿或成人组织或其组合的其它早期谱系基质成分包覆的塑料上。

22. 根据权利要求18所述的方法,还包括在无血清培养基中孵育所述细胞,所述无血清培养基包括具有低钙的基础培养基、无铜、及补充有胰岛素、转铁蛋白/Fe、硒、锌、与血清白蛋白结合的游离脂肪酸、及非必须地补充高密度脂蛋白。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述基础培养基包括RPMI 1640。

24. 根据权利要求22所述的方法,其中所述基础培养基包括少于0.5mM的钙。

25. 根据权利要求18所述的方法,其中所述细胞被培养7-21天或更长时间。

26. 根据权利要求17所述的方法,其中所述胆管树组织包括门、肝总管、胆囊管、总管、肝胰总管和胆囊或其组合。

27. 根据权利要求17所述的方法,其中所述胆管树组织源自胆管树在其处分支或包含高量的胆管周围腺体的部位。

28. 权利要求1-15任一所述的哺乳动物专能干/祖细胞的细胞在分化至多个内胚层谱系中的用途。

来自肝外胆管树的专能干细胞及其分离方法

[0001] 本申请是2010年10月28日申请的、申请号为“201080058598.X”、名称为“来自肝外胆管树的专能干细胞及其分离方法”的中国申请的分案申请。

[0002] 相关专利申请交叉引用

[0003] 本申请要求2009年10月30日申请的美国临时申请61/256,846的优先权，其通过引用全部组合于此。

技术领域

[0004] 本发明总体上涉及胆管树、肝和胰中的专能祖细胞，包括专能干细胞，及包括前述祖细胞或干细胞的细胞群。更具体地，本申请涉及采自肝外胆管树部分的专能祖细胞或干细胞及包括前述祖细胞或干细胞的细胞群。本申请包括：包括前述祖细胞或干细胞及相应细胞群的组成及在体外及体内鉴定、分离、培养、扩增和分化这些细胞及细胞群的方法。

背景技术

[0005] 死细胞、垂死的细胞或功能障碍的系统是许多已知疾病的起因，包括糖尿病和阿尔茨海默氏病。治疗这些疾病的一种方法为从供体移植整个器官或其部分以替代“患病”细胞的部分或所有功能。尽管通常在遏制或延缓一些疾病的进程方面成功，但器官移植伴随相当大的发病率/死亡率，与所有主要外科手术干预一样，移植的器官的存活取决于长期给服强效的、系统的免疫抑制剂，这些免疫抑制剂通常导致不合需要的副作用。然而，无论这些方法成功与否，它们固有地受供体可用性的限制。

[0006] “再生医学”中的替代方法是使用干细胞及祖细胞重新填充整个器官或其部分，或至少其功能。实际上，干细胞可以相当小的外科手术注入或植入，通常不利事件的发生率可忽略。由于干细胞不产生免疫性（或最低程度地产生免疫性），对于这些细胞的初始种植，它们需要相当少的免疫抑制剂（如果需要的话）。

[0007] 干细胞是罕见的、需要精确的分离技术和严格定义的体内和体外增殖条件的细胞。因此，迫切需要建立备选及互补的、可移植功能性干细胞和祖细胞及组织源以用于临床使用。

发明内容

[0008] 根据本发明的一实施例，提供包括能够分化至多个内胚层谱系（如肝谱系、胆谱系、胰腺谱系或其组合）的哺乳动物专能干/祖细胞的组成，其中这些细胞从哺乳动物的胆管树组织（例如，胆管树的任何部分，包括门、肝总管、胆囊管、总管、肝胰总管、胆囊和胆管周围腺体或采自胆管周围腺体的祖细胞或干细胞）获得，前述哺乳动物包括人哺乳动物、婴儿、儿童（小儿科）、成人或死后72小时内的死人。还提供包括含前述哺乳动物专能干/祖细胞的细胞群和/或富集前述专能干/祖细胞的哺乳动物细胞群的组成。

[0009] 专能干/祖细胞可表达：(i) 指示早期肝细胞谱系（如HNF6、HES1、CK19、白蛋白或 AFP）的至少一标记物；(ii) 指示早期胰腺细胞谱系（如PDX1、PROX1、NGN3或胰岛素）的至少

一标记物；及选自(a)–(c)类别的至少一标记物：(a)在干/祖细胞上发现的至少一表面标记物(如CD 133(prominin)、CD44H(透明质酸受体)、N-CAM、CXCR4或EpCAM)；(b)指示内胚层干/祖细胞(SOX 9、SOX17或FOXA2)的至少一转录因子；及(c)多能基因(如SOX2、NANOG、LF4、OCT4A或OCT4)的中弱表达。在一些情形下，专能干/祖细胞可表达来自每一类别(i)、(ii)或(a)–(c)的一标记物。表达可通过体内组织、刚分离的细胞或培养的细胞的端点和数量RT-PCT化验分析和/或免疫组织化学进行确定。

[0010] 专能细胞也可表达至少下述之一：(i)端粒酶蛋白的核表达；(ii)多能基因的中低水平表达；(iii)典型内胚层转录因子(如SOX17、SOX 9、FOXA2、HES 1、HNF6、PROX1、HNF3B(肝细胞核因子-3B)、FOXA2、SALL4(Sal类蛋白4)、PDX 1、NGN3或其组合)的核或核周表达；(iv)内胚层干/祖细胞表面标记物的表达；(v)成熟肝脏(P450-3A4，转铁蛋白，酪氨酸转氨酶(TAT)及高水平白蛋白；用于成熟胆管的谱系标记物包括AE2、CFTR，分泌素受体，水通道蛋白或其组合)、成熟胆管或成熟内分泌胰腺(如胰岛素，高血糖素，生长抑制激素，淀粉酶)的谱系标记物的缺乏表达或低及可变水平的表达；(vi)间质细胞、内皮细胞或造血细胞的标记物的缺乏表达。

[0011] 在本发明的另一实施例中，提供获取、分离和/或鉴定能够分化至多个内胚层谱系的哺乳动物专能干/祖细胞的方法，其中这些细胞从哺乳动物的胆管树组织(例如，胆管树组织包括门、肝总管、胆囊管、总管、肝胰总管、胆囊或其组合)获得，该方法包括获取胆管树组织，然后依次、以任何顺序或实质上同时获取对下述标记物呈阳性的细胞：(i)指示早期肝细胞谱系(如HNF6、HES1、CK19、白蛋白或AFP)的至少一标记物；(ii)指示早期胰腺细胞谱系(如PDX1、PROX1、NGN3或胰岛素)的至少一标记物；及非必须地，选自(a)–(c)的至少一标记物：(a)在干/祖细胞上发现的至少一表面标记物(如CD133(prominin)、CD44H(透明质酸受体)、N-CAM、CXCR4或EpCAM)；(b)指示内胚层干/祖细胞(SOX 9、SOX17或FOXA2)的至少一转录因子；及(c)多能基因(如SOX2、NANOG、LF4、OCT4A或OCT4)的中弱表达。还提供鉴定和分离富集哺乳动物专能干/祖细胞的哺乳动物专能细胞群的方法。

[0012] 根据本发明方法，基础培养基可以是营养物丰富、没有铜及低钙(低于0.5mM)的任何基础培养基，优选补充胰岛素、转铁蛋白/Fe、硒、锌、与血清血蛋白结合的游离脂肪酸，及非必须地，高密度脂蛋白。基础培养基的例子为RPMI 1640。非必须地，这些细胞可在塑料上或涂覆胶原蛋白IV、胶原蛋白III、层粘连蛋白、透明质酸、来自新生组织或其组合的其它基质成分的塑料上培养。这些细胞培养至少24小时，优选7–21天。根据本发明方法，分离的细胞为80%、90%、95%优选100%富集本发明的干细胞。分离可经免疫选择技术(如筛选、磁珠选择、流式细胞计数或其组合)和/或选择性培养条件进行。

[0013] 在本发明的又一实施例中，增殖和/或扩增新的哺乳动物专能干/祖细胞或包括前述细胞或富集前述细胞或其同伴细胞(如间质细胞、成血管细胞及星状细胞前体)的群的方法，包括：在塑料或透明质酸上培养这些细胞，或非必须地，在涂覆III或IV型胶原蛋白或透明质酸或来自新生或胚性组织的其它基质成分的塑料上，在基础培养基中不含铜、低钙(<0.5mM)、包含胰岛素、转铁蛋白/Fe、游离脂肪酸与血清血蛋白结合的混合物，及非必须地，包含高密度脂蛋白。

[0014] 在本发明的另一实施例中，提供新的专能干/祖细胞至成熟肝细胞命运的谱系限制方法。该方法包括(a)获取能够分化至多个内胚层谱系的哺乳动物专能干/祖细胞的

细胞悬液,其中这些细胞从哺乳动物的胆管树组织获取;(b)将细胞悬液埋入包括透明质酸或包括与其它基质成分(如IV型胶原蛋白、层粘连蛋白或二者)组合的透明质酸的水凝胶内;及(c)在补充铜、钙($\geq 0.5\text{mM}$)、胰岛素、转铁蛋白/Fe、bFGF、氢化可的松、高血糖素、半乳糖、三碘甲状腺原氨酸(T3)、表皮生长因子(EGF)、肝细胞生长因子(HGF)、高密度脂蛋白、及游离脂肪酸与血蛋白结合的混合物的基础培养基中培养细胞悬液足够的时间以使它们能分化至肝细胞。

[0015] 在本发明的另一实施例中,提供新的专能干/祖细胞至成熟胰腺细胞命运的谱系限制方法。该方法包括(a)获取包括能够分化至多个内胚层谱系的哺乳动物专能干/祖细胞的细胞悬液,其中这些细胞从哺乳动物的胆管树组织获取;(b)将细胞悬液埋入包括透明质酸或包括与其它基质成分组合的透明质酸的水凝胶内;及(c)在补充铜、钙($\geq 0.5\text{mM}$)、B27、抗环血酸、胰岛素、转铁蛋白/Fe、bFGF、环巴胺、视黄酸、艾塞那肽-4、高密度脂蛋白、及游离脂肪酸与血蛋白结合的混合物且缺少氢化可的松的基础培养基中培养细胞悬液足够的时间以使它们能分化至胰腺细胞。

[0016] 在本发明的另一实施例中,提供新的专能干/祖细胞至成熟胆细胞命运的谱系限制方法。该方法包括(a)获取包括能够分化至多个内胚层谱系的哺乳动物专能干/祖细胞的细胞悬液,其中这些细胞从哺乳动物的胆管树组织获取;(b)将细胞悬液埋入包括透明质酸或包括与其它基质成分(如I型胶原蛋白)组合的透明质酸的水凝胶内;及(c)在补充铜、钙($\geq 0.5\text{mM}$)、胰岛素、转铁蛋白/Fe、氢化可的松、bFGF、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、肝细胞生长因子(HGF)、高密度脂蛋白、及游离脂肪酸与血蛋白结合的混合物的基础培养基中培养细胞悬液足够的时间以使它们能分化至胆管细胞。

[0017] 在本发明的又一实施例中,提供体内分化细胞的方法,包括将哺乳动物专能干/祖细胞或包括前述细胞或富集前述细胞的群按细胞悬液或移植物或移植片移植到肝脏内,具有或没有先前的、适当培养条件下的谱系限制,在那里它们分化至肝组织。

[0018] 在本发明的又一实施例中,提供体内分化细胞的方法,包括将权利要求1的哺乳动物专能干/祖细胞或包括前述细胞或富集前述细胞的群按细胞悬液或移植物或移植片移植到胆管内,具有或没有先前的、适当培养条件下的谱系限制,在那里它们分化至胆管树组织。

[0019] 在本发明的又一实施例中,提供体内分化细胞的方法,包括将权利要求1的哺乳动物专能干/祖细胞或包括前述细胞或富集前述细胞的群按细胞悬液或移植物或移植片移植到胰腺内、肾囊下方或附睾脂垫内,具有或没有先前的、适当培养条件下的谱系限制,在那里它们分化至功能性胰腺组织。

[0020] 在详细阐述本发明的至少一实施例之前,应当理解,本发明不受在下面的描述中提出的或图中所示的构造详图及成分安排的限制。除了所描述的以外,本发明能够以不同的方式实施和实现。同样,应当理解,在此采用的措词和术语及摘要均用于描述的目的,而不应视为限制。

[0021] 同样,本领域的技术人员将意识到,本发明基于其上的概念可容易地用作设计实现本发明的几个目的的其它结构、方法和系统的基础。因此,权利要求应视为包括这样的等效构造,因为它们并未脱离本发明的精神和范围。

附图说明

[0022] 图1为本发明的、具有分化至几种类型的内胚层组织的能力的专能胆干细胞的示意图。所有这些细胞表达“内胚层”(E)转录因子(如SOX 9, SOX 17, FOXA2)和干/祖细胞群的其它标记物(表面抗原如CD133, CD44H, EpCAM, CXCR4, NCAM)。谱系限制导致不同的成熟命运,包括肝脏、胰腺和胆管树。

[0023] 图2为胆管树的示意图,示出了其与肝脏、胰腺和十二指肠的连接。在其处可发现高量的胆管周围腺体、胆管树的干细胞龛的地方由五角星指示。

[0024] 图3为胆管树的不同区域的组织学和免疫组织化学图像的合成,其用于鉴定标记物和遍及胆管树的胆管周围腺体的数量及大小。(a) 肝外胆管树中的胆管周围腺体(PBG)的分布和特征。PBG存在于胆管树的管壁中且为胆管树干/祖细胞的部位。测量(n=5个检查的人胆管树)在胆管树内不同部位处胆管周围腺体的数量和大小、PBG的标记物轮廓。PBG的密度,表达为PBG腺泡占用的表面除以总面积,通过成像分析进行估计;在人肝外胆管树的不同部位中组织学上分析数量和圆周。肝胰管壶腹表现出最高密度和数量的PBG;在胆囊管和门中发现大约相等的数量;在胆管中发现较少;及在胆囊中没有。 $*p<0.01$ 。初始放大倍率 $\times 10$ 。b:原位置的PBG免疫组织化学图像。PBG对CK7、CK19、NCAM、CD 133、胰岛素、EpCAM、SOX9、SOX 17和PDX1呈阳性,但对血蛋白呈阴性(或非常低的水平)。这些早期谱系标记物的变化(如血蛋白)在多个胆管周围腺体之中看到(参见图7关于血蛋白的证据)。初始放大倍率 $\times 40$ 。

[0025] 图4示出了干细胞主要位于胆管周围腺体(PBG)内。应注意,在单一胆管周围腺体内表达干细胞标记物(在该例子中为PDX1)有可变性。红色箭头指示表达转录因子的细胞核;黑色箭头指示未表达转录因子的细胞核。

[0026] 图5示出了胆囊管的胆管周围腺体中的SOX17(A)和PDX1(B),连同EpCAM(绿色)和具有4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)的核染色蓝。

[0027] 图6提供人胆管组织上的免疫组织化学数据并示出了胆囊管和门中的胆管周围腺体中的EpCAM、SOX 9和SOX 17表达。

[0028] 图7提供专能胆管树干细胞的关键性质的概览。这些包括干/祖细胞的表面标记物;内胚层祖细胞的典型转录因子;肝脏、胆管树及胰腺的早期谱系标记物的可变表达;及在图8中示出了多能基因的中弱表达。肝门的代表性RT-PCR化验分析指示广泛的内胚层转录因子(SOX 9, SOX 17, FOXA2, PDX1, NGN3等)和典型干/祖细胞表面标记物(如EpCAM, NCAM, CXCR4, CD 133)。

[0029] 图8示出了通过胆囊管和门组织指示多能基因的表达的RT-PCR数据。它们的中弱表达为胆管树干细胞自我复制的能力提供另外的证据。多能基因为在胚胎干(ES)细胞中表达的基因且为能够产生诱导的多能干(iPS)细胞的基因,如果这些基因的变化的组合转染为体细胞的话。至少5个基因已被鉴定:OCT 4、SOX2、NANOG、KLF4和c-MYC。对于OCT 4、SOX2、NANOG、KLF4,表达的中弱水平发生在胆管树组织中和分离的胆管树干细胞中,但对c-MYC并非如此。

[0030] 图9,胆囊不包含胆管周围腺体(如图3中所示)。然而,表达部分干/祖细胞转录因子和表面标记物的细胞存在于胆囊细胞中。应注意,指示所化验的标记物(EpCAM或PDX1)的表达的呈褐色染色出现在胆囊表面的细胞中。

[0031] 图10示出了没有胆管周围腺体的胆囊组织的免疫组织化学数据。(a,c,d)。这些细胞对EpCAM呈阳性(绿色)及对于内胚层转录因子具有核周染色(所示为SOX17-红色)。(b)这些细胞也表达PDX1(粉红色)且按Ki67染色所示明显增殖(绿色)。

[0032] 图11,来自胆管树组织的干/祖细胞集落。细胞在无血清Kubota培养基中及培养塑料上进行分离和培养。三种不同的集落类型即类型1-3在对成熟细胞不允许相反对内胚层干/祖细胞选择的条件下进行观察。免疫组织化学染色按标记物标示的颜色指示特定基因。所有切片均用提供指示核的蓝色的4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色。集落类型1(a)聚集强表达EpCAM、NCAM和ASBT的细胞。这些细胞生长缓慢(每3-4天或更长时间才分裂)。集落类型2细胞(b)具有与hHpSC极类似的显型及具有100%的EpCAM、NCAM细胞表达但不表达AFP(每36-40小时分裂)。集落类型3(c)由波动旋涡细胞组成,其在集落边缘处具有EpCAM表达但在集落内部没有及在内部细胞中具有高水平的SOX 17、PDX1或SOX 9表达(每36-40小时分裂)。所有图像的放大倍率为20倍。这些图片为从集落被监视4-8周的、10个以上实验中找到的代表图片。

[0033] 集落类型2和3的细胞之间的关系的证据在低放大倍率(4倍)图像(d)中示出。不知道一个是否为另一个的前体。RT-PCR化验分析指示来自胆囊管对来自胆囊的集落中的不同基因的表达。两个组织的RT-PCR化验分析非常类似,但来自胆囊管的组织具有白蛋白和胰岛素弱表达,两个基因未被从胆囊取得并在无血清Kubota培养基中和塑料上生长的祖细胞表达。

[0034] 图12,胆管树干细胞,尤其类型2和3集落的胆管树干细胞,稳定扩增几个月,从而导致细胞集落具有稳定的干/祖细胞标记物表达。这是细胞自我复制的部分证据;另外的证据由多能基因的表达提供(图8)。在此示出了类型3的集落维持培养一个月后集落中心处的细胞中PDX1的表达(橙/红)及在集落边缘处仅表达EpCAM(绿),所在部位稍有区别。DAPI染色(蓝)指示细胞核。

[0035] 图13,在培养塑料上及无血清Kubota培养基中培养8周以上的胆管树干细胞集落的相显微图。该集落从取自成人胆管树组织的1-2个细胞开始。为估计该集落内的细胞数量,从该集落的多个区域(代表性区域为彩色边框划分的矩形区域)准备放大的图像,及这些区域用Metamorph软件成像并用于获得细胞数量。这些区域的采样导致集落中有500000个以上细胞的估计量。从胆管树组织,常规观察到>50个这样的集落;从成人的胆囊管和门组织,常规获得>100个这样的集落。

[0036] 图14,组织(原位)中或胆管树干细胞的培养物中转录因子(或端粒酶蛋白)的位置。免疫组织化学表明转录因子和端粒酶蛋白存在于一些细胞的细胞核内,而在其它细胞中存在于细胞核周围或细胞质中。其意义尚不知道,尽管我们假定核定位暗示起作用的因素及核周或细胞质位置为储存形式。在这些图像中,SOX17表达在体内胆管周围腺体的部分但不是所有细胞的核内(原位数据)及表达在在塑料上和Kubota培养基中培养的所有胆管树干细胞的核内。在培养物的图像中,细胞核因DAPI染色而为蓝色;一些细胞表达EpCAM(绿);但所有细胞均具有SOX17的细胞核内定位(红)。当合并图像时,细胞核显现粉红色(蓝色和红色的混合颜色)。

[0037] 图15,胆管树干细胞的类型3集落显示转录因子、SOX17(红/粉红)的核和核周定位。在集落周边处的细胞对EpCAM呈阳性(绿)。细胞核因DAPI染成蓝色。

[0038] 图16,胆囊细胞的原位染色仅显示SOX17的核周和细胞质染色(红/橙)。细胞膜对EpCAM呈阳性(绿),及细胞核因DAPI染成蓝色。

[0039] 图17,胆管树干细胞的专能性。激素确定的培养基(HDM)独自对分化至肝细胞或胆管细胞命运的影响。如果在塑料上和Kubota培养基中培养,干细胞无限期地保留为干/祖细胞。如果培养基改成为成熟命运改变的HDM,它们将朝向成熟命运分化。如果HDM的使用与细胞在细胞外基质上平皿培养或将细胞埋入细胞外基质内结合(图20-22),它们将更快且更有效率地分化至成熟命运。在这些研究中,展现了表明特定HDM对胆管树干/祖细胞朝向肝细胞(HDM-L)对胆管细胞(HDM-C)命运分化的影响的代表性数据。

[0040] 来自在自我复制条件(培养塑料和无血清Kubota培养基或其等价物)下培养的集落的胆管树干/祖细胞在为肝细胞(HDM-L)改变的HDM中(上排图像)或为胆管细胞(HDM-C)改变的HDM中(下排图像)。HDM-L影响:7天后免疫荧光(a)。细胞对CK18(红)和/或血蛋白(蓝-绿)广泛呈阳性。放大倍率:20X。半定量数据(c)比较自我复制条件下(分:0)对HDM-L(分:2.2±0.8)的肝细胞数量(CK18+/白蛋白+细胞),发现>20%的细胞具有至肝细胞命运的谱系限制。HDM-C影响:7天后免疫荧光(b)。细胞对CK7、分泌素受体(SR)和CFTR广泛呈阳性。它们共表达CK7/SR和CK7/CFTR。除c4和c5为40倍以外,初始放大倍率均为20倍。自我复制条件下(0.2±0.4;细胞的<5%)对HDM-C(3±0.7,这相当于细胞的30%以上具有至胆管细胞的谱系限制)的SR+/CFTR+细胞的百分比半定量估计量(c)。

[0041] 图18,胆管树干细胞的专能性。针对胰腺改变的HDM(HDM-P)独自对分化至胰腺命运的影响。HDM-P影响:在HDM-P中培养7天后对胰腺标记物进行免疫荧光。在集落的周边处,出现的细胞聚集和凝缩形成包含C肽(a,b)、PDX-1(c)和胰岛素(d)的小岛状结构(a-d)。在集落中心内发现未分化细胞(EpCAM+细胞)。初始放大倍率为20倍。在自我复制条件下发现的小岛状结构的数量(f)(1±0.7;细胞的<10%)远低于HDM-P情形的数量(3.8±1.3;细胞的~40%)。在所有RPMI 1640配方(11.1mM)中孵育2小时后在多个葡萄糖浓度下发现的蛋白质的按ng/μg计的C肽水平(g),在自我复制条件下为4.5±2.25ng/μg,而在HDM-P情形为12.3±1.9ng/μg。数据表示为均值±标准误差,N=4;*p<0.05。(h)葡萄糖刺激的C肽分泌物在HDM-P控制下进行观察,即观察培养基中的C肽水平(μg/l),从低葡萄糖水平(5.5mM)下的1.10±0.32μg/l到高葡萄糖水平(22mM)下的1.92±0.43μg/l,n=7;*p<0.01。

[0042] 图19,胆管树干细胞的专能性。培养基独自的影响的定量(q)-RT-PCR分析。对维持在自我复制条件下(培养塑料和Kubota培养基)对单为肝细胞、胆管细胞或胰腺细胞改变的无血清HDM(HDM-L、HDM-C或HDM-P)下的胆管树干细胞培养物进行化验分析。mRNA相对表达水平通过对以三个最稳定的管家基因的几何平均为基础的归一化ΔCt值排序而进行计算。数据被标示加或减(±)标准偏差。这些中的每一个的显著性水平为*p<0.05。n=进行的实验的次数。

[0043] 图20,胆管树干细胞的专能性。HDM和细胞外基质成分对胆管树干细胞分化的影响。胆管树干细胞在塑料上和Kubota培养基或其等价物中(自我复制条件)培养一个月以上,导致如(a)中的集落。该代表性集落被驱散,细胞转移到3个分化条件之一,以三维(3-D)形式存在并由为所希望的成熟命运改变的HDM+基质成分组成:为胆管细胞(b)、肝细胞(c)、或为胰腺β细胞(d)。它们在培养物中培养长达9天,然后化验组织特异性命运,其表明这些胆管树干细胞根据培养条件可谱系限制至多个成熟命运(在此提供胆管细胞、肝细胞或胰

腺β细胞的例子)。第3排=双硫腙(DTZ)染色(胰腺α和β细胞的指示)。D=培养天数;Glu=高血糖素;C-P=C肽,胰岛素分泌物的指示。

[0044] 图21,在自我复制条件下(a-b)对为产生成熟肝细胞的3-D分化条件下(c-d)胆管干细胞的透射电子显微图。存在大的多角形细胞,及细胞核显现一个或多个核。(c)相邻的细胞形成清晰可辨的毛细胆管(箭)。毛细胆管由联结复合体(箭头)封闭。很少的微绒毛出现在腔中(d)。因此,这些细胞能够长成成熟肝细胞和肝内胆管细胞。

[0045] 图22,由自我复制对3-D分化条件下培养物的定量(q)-RT-PCR分析给出的胆管树干/祖细胞的专能性的证据。a.胆管树干/祖细胞在Kubota培养基中和塑料上培养2个月(自我复制条件)。集落或维持在这些条件下从而产生胆管干/祖细胞(BP),或转移到针对肝细胞(B-L)、胆管细胞(B-C)或胰岛(B-P)的3-D分化条件,全部均另外培养2周。然后,准备培养物进行相应于每一成熟命运的基因qRT-PCR分析。数据准备为柱状图,其中在自我复制条件下(BP)的基因表达水平由值1.0给出,在分化至成熟命运之后细胞中每一基因的值定为相对于BP下的该值的倍数变化。一些柱状图上的星号表明那些柱状图具有统计显著性($p < 0.01$ 或 $p < 0.001$)。N=2,每一实验具有一式三份样本。BP=胆管干/祖细胞;B-C=谱系限制至胆管的细胞(胆管细胞);B-L=谱系限制至肝脏的细胞(肝细胞);B-P=谱系限制至胰腺的细胞(小岛)。化验的基因为GGT1=γ谷氨酰转移酶-1;AE2=阴离子交换蛋白2;CFTR=囊性纤维化跨膜转运调节因子;HNF4a=肝细胞细胞核因子4A;AFP=α-胎蛋白;ALB=白蛋白;TF=转铁蛋白;TAT=酪氨酸转氨酶;CYP3A4=细胞色素P450 3A4;pdx1=胰腺和十二指肠同源框1;ISL-1=ISL LIM同源框1;NGN3=神经元素3;INS=胰岛素;GCG=高血糖素。

[0046] 图23,体内研究表明的胆管干细胞的专能性:肝命运。胆管干细胞在自我复制条件下的培养物中(Kubota培养基或其等价物及培养塑料)培养,然后注入具有静息肝的免疫减弱的成年鼠的肝内(即不引起肝损伤)。从该鼠制备的肝切片然后通过免疫组织化学针对指示肝细胞的人特异标记物进行分析。在该图像中,该切片针对Dako的人肝-1抗体染色。这些切片表明可鉴定人肝细胞占用的总面积的 $6.52 \pm 2.5\%$ 对典型的肝细胞标记物人肝-1呈阳性。

[0047] 图24,体内移植表明的胆管干细胞的专能性:胆管命运。胆管干细胞在自我复制条件下的培养物中(Kubota培养基或其等价物及培养塑料)培养,然后注入具有静息肝的免疫减弱的成年鼠的肝内(即不引起肝损伤)。从该鼠制备的肝切片然后通过免疫组织化学针对指示胆管细胞的人特异标记物进行分析。Dako的人CK7抗体,胆管细胞标记物,被发现所有胆管细胞平均 $12.7 \pm 5.5\%$ 对其呈阳性。比较小胆管和大膽管中的人胆管细胞的证据,发现大膽管中 $\sim 14.92 \pm 5.9\%$ 的细胞对人CK7呈阳性及小胆管中 $\sim 5.02 \pm 1.95\%$ 的细胞对人CK7呈阳性。

[0048] 图25,由体内移植表明的胆管干细胞的专能性:胰腺命运。胆管干细胞在自我复制条件下的培养物中(Kubota培养基或其等价物及培养塑料)培养,然后注入雄性Balb/C Rag2^{-/-}I12rg^{-/-}鼠的附睾脂垫(EFP)内。每一只鼠被注入200-400个新岛,在HDM-P+包含透明质酸、IV型胶原蛋白和层粘连蛋白的水凝胶的3-D分化条件下胆管干细胞的细胞集合体朝向胰岛命运谱系限制7-14天。每一新岛由1000个以上的细胞组成。控制鼠被移植没有细胞的Matrigel。每日监测鼠的葡萄糖水平且其血糖过多(600-750mg/dl)约3个月。到3个月结束时,移植过的老鼠中的葡萄糖水平下降到低于控制情形的一半的水平。在术后第68天

和第91天进行葡萄糖耐量试验,表明在实验鼠中具有可观的血液人C肽水平,及这些水平可通过葡萄糖调节。

具体实施方式

[0049] 本发明源自此前意想不到的、专能干细胞或祖细胞及包括前述专能干细胞或祖细胞的细胞群的发现,其在胆管树内发现并具有分化至多个内胚层谱系包括肝、胰腺和胆管树谱系的能力(图1)。为使本申请清晰,术语“胆管树干细胞”在此将用于指创新的哺乳动物专能干细胞或祖细胞、包括前述创新细胞的细胞群、及富集前述创新细胞的细胞群。

[0050] 新的专能胆管树干细胞可从胆管树组织的任何部分分离,但尤其在胆管周围腺体中及胆管树的分支点处发现高数量的专能胆管树干细胞,其在图2的示意图像上以星号指示。在肝内的最小分支末端上发现的星号指肝闰管,肝内肝干细胞的干细胞龛。胆管树干细胞为肝内肝干细胞的前体。

[0051] 细胞来源-胆管树

[0052] 胆管树或肝外胆管树系统由将十二指肠连接到肝、胰腺及包括胆囊的一系列管组成(参见图2中的示意图)。胆管周围腺体(图3-11)遍及胆管树的管壁内,尤其可在分支部位如门、肝总管、胆囊管、总管、肝胰总管和胆囊处发现高数量的胆管周围腺体。来自肝或腹胰的液体经乏特壶腹清空到十二指肠内。这整组结构,包括胆囊,在此称为胆管树。

[0053] 胆管树的所有组成部分(如门、肝总管、胆囊管、总管、肝胰总管和胆囊)均具有由密集的纤维结缔组织和腔组成的壁,腔衬以一层由常规基膜支撑的高度柱状的胆管上皮。平滑肌细胞沿管尤其在乏特壶腹附近分散。偶尔在管壁中发现血管、神经纤维和一些淋巴样细胞。沿胆管树的整个长度发现胆管周围腺体,尤其在肝胰总管和门、肝总管、胆囊管、总管及胆囊中发现高数量的胆管周围腺体。图3-7。

[0054] 胆囊具有不同的特征(图9、10)。腔衬以柱状上皮、适当的肌肉层和浆膜下结缔组织。在胆囊中不存在胆管周围腺体(图3、9)。然而,胆囊具有与胆管周围腺体内发现的胆管树干细胞群的那些短暂扩充细胞和/或定向祖细胞具有重叠显型的细胞。

[0055] 本发明的细胞可从任何发育阶段的胆管树组织分离。因而,本发明可用新生儿、小儿或成人组织实施,包括来自最近死亡的个体的组织(优选地,在10小时内,但本发明创新的细胞在死亡后72小时内均保持可进行分离)。实际上,胆管树组织很独特,因为其易从小儿及成年供体获得。此外,本发明可用来自肝和胰腺器官的组织实施,其为移植而取得但之后被排斥,或来自活检组织、来自切除组织。

[0056] 同样,在此给出的教导并不限于任一哺乳动物种类。实际上,应当理解,在此提供的例子仅为示例性的,不应视为限制。这样,本发明不受胆管树组织的哺乳动物源限制。可从其取得胆管树干细胞的哺乳动物包括但不限于人、啮齿目动物(如大老鼠、小老鼠、仓鼠)、兔子、牛、马、猪、羊、狗和猫。优选地,胆管树干细胞采自人以用于人类。

[0057] 如已提及的,本发明的新类的胆管树干细胞可分化至多个内胚层命运。实际上,本发明的胆管树干细胞可被诱导分化至成熟细胞类型的几个内胚层谱系,包括肝、胆管树和胰腺。图17-25。

[0058] 胆管树组织的样本可因移植而从肝或胰腺通过外科手术解剖取得,之后由于脂肪变性、解剖异常或主血管病而被排斥;或它们可从切除材料取得。它们可来自因不同原因切

除的胆囊。胆管树组织可与腹部的结缔组织分开。之后，该组织分成多段并进行进一步处理。其中胆管树干细胞尤其丰富的段包括：门、肝总管、胆囊管、总管、肝胰总管和胆囊。每一部分可沿纵向直径切割而进一步解剖为多片。

[0059] 胆管树干细胞已展现导致包括肝、胆管树和胰腺细胞的多个内胚层命运(图17-25)。胆管树干细胞表达端粒酶蛋白；中低水平的多能基因(Nanog、SOX2、KLF4和OCT4--图8)；典型的内胚层转录因子(如SOX 17、SOX 9、FOXA2、HNF6、PROX1、HNF3B(肝细胞核因子-3B(a.k.a.FOXA2)、SALL4(Sal类蛋白4)、PDX 1和NGN3)；内胚层表面标记物(CD326/上皮细胞黏附分子或EpCAM；CD56/神经元细胞黏附分子或NCAM)；CXCR4；及几个干/祖细胞基因(如CD44H--透明质酸受体，及CD133，也称为prominin)。图7、8、9、13。

[0060] 此外，表面上由于它们的专能性，胆管树干细胞表达低且可变水平的肝早期谱系标记物(如HNF6、HES1、FOXA2和可变白蛋白)、胆管早期谱系标记物(如细胞角蛋白19)和内分泌胰腺早期谱系标记物(如PDX1、NGN3、SALL4、胰岛素)。图7、22。

[0061] 应注意，胆管树干细胞表达转录因子PDX1和NGN3(图3、4、7、11)，已知分别对胰腺和内分泌胰腺的发育必不可少。然而，胆管树干细胞不表达或仅弱表达胆管细胞(如分泌素受体、水通道蛋白)、肝细胞(如白蛋白、酪氨酸转氨酶或TAT、转铁蛋白、“晚期”P450如P450-3A4)或胰岛细胞(如高血糖素、生长抑制激素、淀粉酶或高水平的胰岛素)的成熟标记物(图3、7、13)。它们根本不表达间质细胞(如CD 146、结蛋白)、内皮细胞(如VEGF受体、CD31、Van Willebrand因子)或造血细胞(如CD45)。只要它们维持在由Kubota培养基或其等价物组成并具有培养塑料或透明质酸底层的自我复制条件下，抗原的表达模式在培养物的寿命期间稳定。

[0062] 这些表达模式可使用新分离的细胞或培养的细胞的端点和定量(q)-RT-PCR化验分析及通过体内组织的免疫组织化学进行确定。内胚层干/祖细胞的多个标记物(如SOX9、SOX17、PDX1、NGN3、FOXA2)在同一胆管周围腺体内的细胞中的共表达是独一无二且令人惊讶的特征，其不同于关于经历谱系限制至胰腺的胚胎干(ES)细胞的结果，其中这些转录因子依次进行观察，而非所有转录因子同时观察。此外，在胆管的腔表面处的成熟胆管细胞中不存在这些转录因子的表达。

[0063] 如上所述，本发明的胆管树干细胞为将长成内胚层组织的祖细胞并与它们可引起的多个组织的细胞共享标记物，前述多个组织包括肝、胆管树和胰腺。

[0064] 除了它们的相对表达水平之外，胆管树干细胞内表达的端粒酶和转录因子(如SOX 17、PDX1)的细胞定位在成熟期间从核定位变为核周/细胞质定位(参见图7及图14-16)。在单一胆管周围腺体内，观察到具有核的一些细胞及具有核周定位或不表达特定标记物的一些细胞(图4、6、7、14)。不受限于理论，核内定位相较转录因子核周定位情形与更多的原胞相关联。后者的细胞假定转变到随后的谱系阶段。作为备选，核周定位可表明该因子处于不活动的储存形式，其在适当的再生需求下可转移到细胞核。

[0065] 本发明提供分离和增殖胆管树干细胞的技术。来自人胆管树组织的干细胞群通过培养选择技术进行鉴定，但也可通过免疫选择技术(如流式细胞计、筛选、磁珠分离)进行分离。作为备选，或除了免疫选择之外，本发明的胆管树干细胞可借助于组织培养条件分离。例如，从胆管树组织制得的细胞悬液可放在塑料或透明质酸上而制成显微片。在其它实施例中，塑料非必须地涂覆胶原蛋白IV、胶原蛋白III、层粘连蛋白、透明质酸、组织中发现的

其它基质成分、或其组合。

[0066] 用于培养选择的培养基,无血清Kubota培养基或其等价物,对于胆管树干细胞及其同伴间质细胞、成血管细胞和星状细胞前体强烈选择该培养基,但对于胆管树的成熟细胞不选择给培养基。该培养基的实质在于其为不包含铜、低钙(<0.5mM)、胰岛素、转铁蛋白/Fe、与纯化血蛋白结合的游离脂肪酸、及(非必须地)高密度脂蛋白的任何基础培养基。

[0067] Kubota培养基或其等价物无血清且仅包含纯化和规定的激素类、生长因子和营养物的混合。更具体地,该培养基由无血清基础培养基(如RPMI 1640)组成,其不包含铜、低钙(<0.5mM)、补充有胰岛素(5 μ g/ml)、转铁蛋白/Fe(5 μ g/ml)、高密度脂蛋白(10 μ g/ml)、硒(10 $^{-10}$ M)、锌(10 $^{-12}$ M)、烟酰胺(5 μ g/ml)、及游离脂肪酸与纯化血蛋白结合的混合物。制备该培养基的详细方法已在别处公开,例如Kubota H, Reid LM, Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 2000;97:12132-12137,其公开内容通过引用全部组合于此。

[0068] 这些条件产生快速生长几周(8周以上)的胆管树干细胞集落,增殖率估计为每36-40小时分裂一次。图11-13。培养物能够稳定地保留干/祖细胞经历自我复制的证据8周以上(图13)。该自我复制证据还得到多能基因的中弱水平的表达结果的支持。图8。获得的集落数量在来自具有大量胆管周围腺体的胆管树部分的培养物中最高,在来自胆管树分支点之外的部位或来自没有胆管周围腺体的胆囊的培养物中中等。

[0069] 谱系限制和分化至成熟命运

[0070] 与胆管树干细胞的专能性一致,如果集落在自我复制条件下培养几周(如在培养物中培养一个月以上)然后培养基改为针对特定成熟细胞类型改变的无血清、激素限定的培养基(HDM),细胞将部分朝向指定的成熟细胞类型分化(图17-19)。在用于肝的HDM中(HDM-L),20-30%的细胞获得细胞角蛋白8和18及白蛋白的表达;而在用于胆管细胞的HDM(HDM-C)中,一半以上长成表达分泌素受体和CFTR的细胞。图17。从使用定量RT-PCR的化验分析可以看出(图19),在HDM-L培养物中人白蛋白的表达水平及HDM-C培养物中分泌素受体的表达均明显高于Kubota培养基或其等价物(自我复制条件)中的表达。

[0071] 如果胆管树干细胞在用于胰腺的HDM(HDM-P)中进行培养,则出现细胞朝向胰岛命运的部分谱系限制。图18。分化主要出现在集落边缘处,在其处形成细胞集合体及在其内发现人C肽、PDX1和胰岛素的部位。一半以上的细胞集落获得产生人C肽的能力(图18h和18g),这指示人胰岛素合成,及该C肽合成可通过葡萄糖水平调节(图18h)。所产生的胰岛素水平在HDM-P培养物中明显高于保持为干细胞自我复制条件的培养物中的水平(图19)。

[0072] 如果细胞放到由特定HDM(HDM-L,HDM-C,HDM-P)组成的独特3-D分化条件下并结合将细胞埋入包含针对感兴趣的成熟细胞类型改变的特定细胞外基质成分的水凝胶中,专能程度得以更引人注目地证明(图20)。细胞快速(如7-10天)分化至特定成熟细胞类型,在与包含IV型胶原蛋白和层粘连蛋白的透明质酸水凝胶结合的HDM-L中产生肝细胞索;在与包含I型胶原蛋白的透明质酸水凝胶结合的HDM-C中产生分支胆管即胆管树;或如果在HDM-P中及在包含IV型胶原蛋白和层粘连蛋白的水凝胶中产生胰岛(内分泌胰腺)。

[0073] 在3-D培养条件下分化的另一证据通过自我复制条件下的胆管树干细胞(图21,a和b)与为肝细胞改变的条件(图21,c和d)的对比发现,并通过透射电子显微镜术表征。自我复制条件下的胆管树干细胞(a-b)对肝细胞(c-d)的透射电子显微镜检查。在分化条件下,存在大的多角形细胞,及细胞核展现一个或多个核。相邻细胞形成清晰可辨的胆小管(箭)。

胆小管由联络复合体(箭头)封闭。少量微绒毛存在于腔中。图中的条等于 $2\mu\text{m}$ 。

[0074] 分化条件导致功能性成熟细胞的证据在图22中提供,其包含来自产生胆管干/祖细胞(BP)的自我复制条件下的培养物对针对肝(B-L)、胆管树/胆管细胞(B-C)或胰腺(B-P)的3-D条件下的培养物的定量RT-PCR数据。第一排表明,在针对肝的条件下而非针对干/祖细胞或胆管树或胰腺的条件下的培养物中,典型肝基因的HNF4、AFP、白蛋白、酪氨酸转氨酶(TAT)、转铁蛋白(TF)或P450-3A4的表达戏剧性增加。相反,针对胰腺的条件下的数据(第二排)表明,在针对胰腺的条件下(B-P)而非针对干/祖细胞或肝或胆管树的条件下,PDX-1、ISL-1、NGN3、胰岛素、高血糖素(GCG)的基因表达极为显著的增加。针对胆管树的条件下的数据证明GGT1、AE2、CFTR的表达增加。胆管干细胞的培养物在自我复制条件下再次转变,维持EpCAM的高水平和所有成熟特异性基因的低水平。

[0075] 该专能性也在细胞体内移植时得以证明(图23-25)。人胆管树干细胞移植到免疫减弱的老鼠内,然后评估组织中移植的成熟人细胞的存在。即使在具有休眠状态肝脏的老鼠中,其未遭受肝伤害,细胞能够移植并长成为大量肝细胞(图23)和胆管细胞(图24)。此外,移植了驱动至胰腺命运的细胞的老鼠接受使它们患糖尿病的药物,移植的细胞能够使它们从糖尿病条件复原,这些细胞被证明在产生人C肽方面受葡萄糖水平控制(图25)。

[0076] 尽管多个前体已鉴定和表明分化至成熟肝细胞,但本申请中鉴定的、存在于、婴儿、小儿和成人组织中的胆管树干细胞为迄今鉴定的、可从成人组织分离并证明能分化至成熟胰腺细胞类型的第一干细胞和细胞群。这些细胞也是首次鉴定的、可立即用在糖尿病临床程序中的细胞,这归因于其已得以证明的能分化至胰岛细胞的能力、其没有致瘤可能性(像ES细胞或用对分化至胰腺至关重要的基因转染的细胞存在的那样)、及没有免疫原性。

[0077] 胆管树干细胞为胰腺的天然前体及通过使用特定微环境条件即可容易和快速地(在培养物中几天内)分化至胰腺命运。此外,由于所需要的微环境条件可以GMP形式获得且现在为现存临床治疗的一部分,这也有助于过渡到临床。因此,至少一临床应用为在此所述的胆管树干细胞用于完全或部分再增、抢救、支持、修复、替代或引入胰腺 β 类细胞以治疗糖尿病(图25),或用于肝功能衰竭、不足或退化的形式(图23和24)。

[0078] 对于本领域一般技术人员而言,在此公开的胆管树干细胞在临床治疗时具有多个应用显而易见。胆管树干细胞的获得可为相对非侵害的程序及对患者相对无害。体外增殖这些胆管干细胞的能力有助于为临床程序获得足够细胞的能力(如 10^6 - 10^9 个细胞)。细胞疗法所需要的干细胞数量易于在细胞按图13中所示取得、处理和培养后的几周内产生。

[0079] 用于治疗的胆管树干细胞可从特定供体取得然后回到同一人内,由于细胞和接受者遗传学上相同,构成在细胞排斥方面没有免疫学问题的自体治疗。作为备选,用于治疗的胆管树干细胞或细胞群也可从特定供体取得然后给予另一人,由于胆管树干细胞不产生免疫性或产生最低限度的免疫性,构成同种异体治疗。最后,根据本发明的胆管树干细胞在动物实验中及在培养物中在致瘤可能性方面相对无风险。在迄今的所有体内研究中,尚未有致瘤可能性的证据。

[0080] 在本发明的另一实施例中,胆管树干细胞或细胞群用于体外产生目标内胚层细胞和目标内胚层组织(如胰腺、肝、胆管)。因而,本发明提供和包括从胆管树干细胞或细胞群产生“目标”细胞和组织的方法,该方法包括分离胆管树干细胞、在驱动它们分化至目标组

织或该组织的细胞的条件下繁殖、及将这些细胞引入需要其的患者中。因此，通过根据本发明的胆管树干细胞的分化获得的、分化的组织细胞也是本发明的主题。

[0081] 如上所述及如图14-16中所示，根据本发明，对于胆管树干细胞朝向特定成熟命运的部分分化，可使用包含营养物、激素类和生长因子的特定混合的限定培养基(也称为激素限定的培养基或HDM)，理想地，无血清且为驱动细胞至感兴趣的成熟命运而改变。用于肝细胞、胆管细胞对胰岛的代表性HDM在下面给出。HDM独自引出朝向所希望成熟命运的一些谱系限制但不引出全部分化。全部分化出现在体内移植之后，或者，如果细胞在体外，还需要使用特定的HDM与细胞外基质成分的混合物结合，混合物的精确组成对所希望的成熟细胞类型独一无二，及这些细胞必须以在此所述的三维格式建立。图17-19。

[0082] 根据本发明的胆管树干细胞或细胞群的体内分化的特别优选的形式为通过胆管树干细胞或细胞群的移植方法注入、输入或移植到身体的一区域内，以使胆管树干细胞能在那分化，通过与目标谱系的细胞直接接触或胆管树干细胞或细胞群的输注，使胆管树干细胞或细胞群能到达目标组织。对于注入或输入，胆管树干细胞可在与其相容的培养基如Kubota培养基(或其等价物)或HDM之一中进行输注，或在由与其相容的基质成分组成的条件下的移植物中。

[0083] 治疗应用

[0084] 根据本发明，对于可从胆管树干细胞或细胞群获得的目标细胞的治疗用途，多个概念可用(参见Science 287;1442-1446,2000)，这些概念包括在本发明中。关于这一点，相应指示的例子为：先天性代谢缺陷、肝功能衰竭、肝硬化、胰功能不全及糖尿病。

[0085] 胆管树干细胞或细胞群可直接引入将要再造、复原或修复的器官之内或之上。引入可按细胞悬液、按由胆管树干细胞或细胞群连同HDM组合到细胞外基质成分的混合物中组成的移植物、或按其他类型的支架(如微载体、聚交酯)、或按输入进行。支架优选可生物分解，使得它们从身体“消失”，同时新引入的细胞或细胞群连同现有细胞一起生长。优选通过自体移植以这种方式再造、抢救、支持、修复、替代或引入细胞，包括胰岛细胞或其他胰腺细胞、肝细胞、和胆管细胞或其他胆管树细胞。再造、抢救、修复、支持、替代或引入可在损伤后修复或支持用器官的部分外科手术切除之后，例如在器官功能缺乏或不全的情形下。

[0086] 根据本发明的胆管树干细胞或细胞群及从它们获得的目标细胞可进一步与可植入材料结合，以增加生物相容性。因此，当被覆有胆管树干细胞时，可植入材料也是本发明的主题。可植入材料也可以是人造和/或生物载体或支承材料，其包含胆管树干细胞或细胞群和/或源自其的目标细胞。载体材料或支承材料可以是用于插入或植入人体内的微载体、支撑物、容器或室。

[0087] 在本发明的一前述实施例中，具有源自胆管树干细胞或细胞群的胰岛细胞的容器用于产生制药结构，用作人造胰岛细胞入口室以在体内提供胰岛素。在本发明的另一实施例中，胆管树干细胞或细胞群的输入或移植用于在体内再造、抢救、修复、支持、替代或引入胰岛或胰岛细胞。对源自本发明胆管树干细胞的肝细胞或胆管细胞，可制造类似的结构。

[0088] 此外，从根据本发明的胆管树干细胞获得的目标细胞或细胞群可用作生物反应器(如身体外部)中的细胞培养物，例如以完成解毒反应或产生通常由目标细胞或组织在体内产生的物质。在急性情形下，例如在急性肝功能衰竭而使用生物人工肝或严重糖尿病而使用生物人工内分泌胰腺的情形，上述形式的使用特别适宜。

[0089] 最后,根据本发明的专能胆管树干细胞或细胞群可广泛应用于转基因修饰和治疗。根据本发明的一实施例,胆管树干细胞或从其分化的细胞或组织用一个或多个基因转染。这样,维持某些器官如肝脏或胰腺的新陈代谢所需要的一个或多个基因被再生和/或供养或再引入。例如,干细胞或肝细胞可用FAH(延胡索酰乙酰乙酸水解酶)基因转染。在缺乏FAH的老鼠中,脾内注入1000个FAH阳性供体肝细胞足以完全还原肝脏并完全补偿导致肝硬变的新陈代谢缺陷。Overturf,K.,M.Al-Dhalimy,C.-N.Ou,M.Finegold, and M.Grompe.American Journal of Pathology 151:1273-1280(1997)。作为备选,胆管树干细胞或细胞群可从特定供体取得并供给另一人,构成异基因治疗,以在受体中还原、供养或引入维持某些器官如肝脏或胰腺的新陈代谢所需要的一个或多个基因。

[0090] 下面的例子用于说明本发明,但本发明绝不限于这些具体的例子。本领域技术人员将在这些例子中发现实施本发明的其它手段。此外,在这些例子为实验方便而在非人类背景中呈现的同时,本领域技术人员从下面公开的教导很容易将在此所述的方法和试剂转移到人类应用。

[0091] 例子

[0092] 例I-细胞制备

[0093] 酶离解可在存在蛋白酶如胶原蛋白酶和/或核酸酶如脱氧核糖核酸酶时完成。肝细胞的酶离解方法已在本领域描述和实施。作为例子,肝祖细胞的分离和鉴定方法已在USP 6,069,005和USP 09/487,318、10/135,700及10/387,547中描述,其公开内容通过引用全部组合于此。实际上,用于制备细胞悬液的多个程序存在。因此,应当理解,本发明的范围不限于取得整个组织或制备其细胞悬液的具体方法。

[0094] 例II-3D培养条件

[0095] 3维(3-D)凝胶可通过将基质成分、激素类、细胞活素类、生长因子、营养物及基础培养基混合为透明质酸而形成,其在未交联时为液体及在交联时变成凝胶。这些的制备细节在别处公开,如W.S.Turner,E.Schmelzer,R.McClelland et al.,J Biomed Mater Res B Appl Biomater 82B(1),156(2006);及W.S.Turner,C.Seagle,J.A.Galanko et al.,Stem Cells 26(6),1547(2008),其公开内容通过引用全部组合于此。培养物通常维持2-4周或更长时间,之后通过组织学、基因表达化验如端点和定量RT-PCR、免疫荧光、和蛋白质表达化验如蛋白印迹法及代谢足迹法进行分析。

[0096] 凝胶复合物的主要成分为化学改性透明质酸的形式。Carbylan-S(或CMHA-S)为羧甲基化透明质酸衍生物,为了交联其已用多个硫醇改性。所有材料均至少可从Glycosan Biosciences(犹他州,盐湖城)购得。

[0097] 简要地,在一实施例中,通过将作为干试剂的透明质酸溶解在Kubota培养基中以得到2.0%溶液(重量/体积)而制备透明质酸基质。之后,可添加1.5mg/ml浓度的层粘连蛋白(Sigma,St.Louis,Mo)和6mg/ml浓度的IV型胶原蛋白(Becton Dickenson,Bedford,Ma)。在暴露给空气中的氧时交联在室温下在数小时内出现,或者如果暴露给交联试剂如PEGDA(聚乙二醇二丙烯酸酯),交联在数分钟内出现。这样,如果不希望交联,溶液应保持在4℃冷藏并避免与氧和/或PEGDA接触。

[0098] 在完成实验后,细胞可通过提炼水凝胶进行恢复,其首先用在Kubota培养基中制备的透明质酸酶(1mg/ml)、脱氧核糖核酸酶(0.5mg/ml)和二硫苏糖醇(40mgs/ml)的混合

(没有转铁蛋白),之后用在Kubota培养基中制备的释放酶(0.5mg/ml)但没有胰岛素和转铁蛋白。以这种方式获得的细胞适合通过流式细胞计、RT-PCR或免疫组织化学表征。

[0099] 例III-专能性证据

[0100] 在自我复制条件下(Kubota培养基或其等价物,与培养塑料或透明质酸结合)培养胆管树干细胞或细胞群7-30天或更长时间之后,留下的细胞(即胆管树干细胞)的单层培养物转移到分化培养基,其中干细胞在48小时内经历快速的形状变化和基因表达变化。所有分化培养基由用于自我复制的培养基(如Kubota培养基或其等价物)的变体组成,使得激素确定的培养基将包含自我复制培养基中的成分并补充有钙($\geq 0.5\text{mM}$)、铜、bFGF,其称为“改性培养基”。为实现特定的成熟细胞类型,需要满足下述要求:

[0101] 肝:谱系限制至肝命运(如肝细胞)可通过将胆管树干细胞埋入透明质酸的水凝胶内而实现,其IV型胶原蛋白和层粘连蛋白与“改性培养基”的混合,改性培养基还补充有高血糖素、半乳糖、三碘甲状腺原氨酸、表皮生长因子(EGF)和肝细胞生长因子(HGF)。在一实施例中,成分的量如下:MKM补充有7 $\mu\text{g}/\text{L}$ 高血糖素、2g/L半乳糖、 10^{-9}M 三碘甲状腺原氨酸3、10ng/ml EGF和20ng/ml HGF。

[0102] 胰腺组织:谱系限制至胰腺命运(如胰岛)可通过将胆管树干细胞埋入透明质酸的水凝胶内而实现,其包含IV型胶原蛋白和层粘连蛋白并具有“改性培养基”,改性培养基改变为去除氢化可的松但包含B27、抗坏血酸、环巴胺、视黄酸和艾塞那肽-4(exendin 4)。在一实施例中,成分的量如下:MKM改为去除氢化可的松及包含2% B27、0.1mM抗坏血酸、0.25 μM 环巴胺、0.5 μM 视黄酸和50ng/ml艾塞那肽。

[0103] 胆管树/胆管细胞:类似地,胆管树干细胞可通过将干细胞埋入与I型胶原蛋白混合的透明质酸内及“改性培养基”中而谱系限制至胆管命运(如胆管细胞),改性培养基还补充有血管内皮细胞生长因子(VEGF) 165和HGF。在一实施例中,成分的量如下:MKM还补充有20ng/ml血管内皮细胞生长因子(VEGF) 165和10ng/ml HGF。

[0104] 例IV-移植

[0105] 经移植法移植来自可靠器官的细胞对于许多应用优选经注入或输注进行,尽管任一递送模式均可行。已发现上面描述的水凝胶培养物为移植提供好的条件。细胞可悬浮在未交联的透明质酸中、与培养基中的其他基质成分混合,培养基包括基础培养基加针对扩增和/或分化调整的激素、生长因子和其他可溶信号。

[0106] 用于移植的细胞群优选包括胆管树干细胞或细胞群,其取自用于移植的目标组织(或其他源)、以与体内所发现相当的比例、连同(或没有)其天然间质细胞同伴(如成血管细胞、星状细胞)一起移植。不受限于理论,干细胞和同伴间质细胞的这种组合为血管化并能够生理运行的组织的完全成熟提供适当的微环境。

[0107] 在一实施例中,对于胰腺移植、植入或注入,移植植物的细胞成分可包括与从新生儿组织取得的成血管细胞(VEGFR⁺、CD117⁺细胞)和星状细胞(CD146⁺细胞)、以组织中体内发现的这些细胞群的估计比例共种入移植植物的胆管树干细胞或细胞群。干细胞群可从在此所述的培养物中的扩增细胞获得。成血管细胞和星状细胞可用磁激活细胞分选(MACS)系统或流式血细胞计数分选而从新鲜制取的新生儿胰腺组织的细胞悬液进行免疫选择。

[0108] 所有胆管树干细胞群可免疫选择对常用的干/祖细胞表面标记物(如CD133、CD44H、EpCAM、NCAM)呈阳性的细胞。在一实施例中,这些细胞在包含0.5%牛血清白蛋白和

具有FITC结合一抗的2mM EDTA的500μl磷酸盐缓冲盐水(PBS)中、以50μl 50x 10⁶总细胞的浓度、在4℃下孵育20分钟。这些标记的细胞与使用FITC抗体抗原的磁珠反应,然后通过MidiMACS或MiniMACS塔和分离装置选择。所有孵育和选择步骤应在冰上进行并添加10% ACCUTASE (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA)以防止细胞聚集。作为备选,细胞可用fluoroprobe标记的抗体进行标记,及细胞使用流式血细胞计数器进行免疫选择。

[0109] 例V-培养基

[0110] 所有培养基均进行无菌过滤(0.22μm滤器)并在使用前保持在4℃的黑暗中。Kubota培养基(KM)由任何基础培养基(如RPMI 1640)组成,其没有铜、低钙(<0.5mM)、10⁻⁹M硒、4.5mM烟碱、0.1nM硫酸锌、10⁻⁸M氢化可的松、5μg/ml转铁蛋白/Fe、5μg/ml胰岛素、添加的游离脂肪酸与血清蛋白(0.1%)及(非必须地)10μg/ml高密度脂蛋白的混合物。

[0111] 例VI-分化条件

[0112] 三维培养物用包含透明质酸、其它基质分子、激素、生长因子、细胞活素建立,所有这些制成培养基。所有水凝胶使用改性Kubota培养基(或其等价物)制取,其补充有钙以达到0.6mM的浓度、10⁻¹²M铜、10μm基本成纤维细胞生长因子(bFGF)(称为改性KM或MKM)。

[0113] 肝细胞:MKM-L,具有7μg/L高血糖素、2g/L半乳糖、10⁻⁹M三碘甲状腺原氨酸3、10ng/ml表皮生长因子(EGF)和20ng/ml肝细胞生长因子(HGF)。基质骨架包括60% IV型胶原蛋白和层粘连蛋白及40%透明质酸。

[0114] 胆管树/胆管细胞:MKM-C,补充20ng/ml血管内皮细胞生长因子(VEGF) 165和10ng/ml HGF。基质骨架包括60% I型胶原蛋白和40%透明质酸。

[0115] 胰腺、胰岛:MKM-P(没有氢化可的松),还补充2% B27、0.1mM抗坏血酸、0.25μM环巴胺、0.5μM RA和50ng/ml艾塞那肽-4。基质骨架包括60% IV型胶原蛋白和层粘连蛋白及40%透明质酸。

[0116] 例VII-细胞分离和表型

[0117] 为移植到患者内取得和排斥的人胆管组织从肝和胰腺获得。人胆管组织的细胞悬液使用补充有0.1%牛血清白蛋白、1nM硒和抗生素的RPMI 1640处理。酶处理缓冲包含300U/ml IV型胶原蛋白酶和0.3mg/ml脱氧核糖核酸酶,在32℃下频繁搅动15–20分钟。富集的悬液通过75规格的网挤压并在再悬浮之前以1200RPM旋转5分钟。通过锥虫蓝排除估计的细胞生产能力通常高于95%。

[0118] 约3x10⁵个细胞放在10cm组织培养皿上及无血清Kubota培养基中,其每3天更换一次。集落在5–7天内形成并观察高达3个月。使用倒置显微镜在变化的时间用手拾取集落。

[0119] 专能胆管树干细胞也通过免疫选择从新制取的细胞悬液分离,其基于常用的一个或多个干/祖细胞表面标记物(CD133、CD44H、NCAM、EpCAM、CD326)的阳性表达,其按照制造商的指令使用具有Miltenyi Biotech MACS系统(Bergisch Gladbach, Germany)的磁珠免疫选择技术。简要地,分离的细胞用与磁微珠结合的EpCAM抗体在4℃下孵育30分钟,及按照制造商推荐的程序使用来自Miltenyi的磁柱分离系统进行分离。培养基每天更换,及收集的培养基在-20℃保存用于进一步分析。

[0120] 对于荧光染色,细胞用4%多聚甲醛(PFA)在室温下固定20分钟,用HBSS冲洗,用10%羊血清在HBSS中封固2小时,及冲洗。固定细胞用一抗在4℃下孵育一整夜、清洗、用标记的同型特异性二抗孵育1小时、清洗、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)复染以能看见细胞

核。

[0121] 对于免疫组织化学,组织在4%多聚甲醛(PFA)中固定一整夜,保存在70%乙醇中,随后包埋在石蜡中并切割为5μm段。去除这些段的石蜡,及抗原被恢复。内生过氧化物酶通过在0.3%H₂O₂溶液中孵育30分钟进行封固。在用10%马血清封固之后,在4℃下施加一抗一整夜;二抗和ABC染色使用RTUVectastain Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA) 进行。Vector Nova RED用作底物。对这些段进行脱水、固定并包埋在Eukitt Mounting Media (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) 中,及使用倒置显微镜进行分析。

[0122] 对于定量反转录聚合酶链反应(RT-PCR)分析,培养的胆管树组织或细胞进行细胞溶解并使用RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen GmbH, Valencia CA) 按制造商的指令进行全部RNA提取。反转录用针对RT-PCR的Superscript First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, CA) 进行。HotStarTaq Master Mix Kit (Qiagen) 用于PCR。

[0123] 细胞通过装备有双相干I-90激光器的FACStar Plus细胞分类器(BD Biosciences)进行分析和分类。荧光结合的抗体在488nm下进行刺激,它们的荧光发射通过标准滤光片检测。

[0124] 在本发明已结合具体实施例进行描述的同时,应当理解,其能够进一步修改,且本申请意于覆盖本发明的任何变化、使用或修改,如为从细胞引出精确的响应而对基质成分或生长因子或激素的精确浓度进行的变化。总的来说,本发明的原理,包括那些在本发明所属领域的已知或常规实践内的内容,均可应用于此前提出的实质特征并在所附权利要求的范围内。

[0125] 缩写词:AE2,阴离子交换剂2; AFP, α-胎蛋白; ALB, 白蛋白; ASMA, α-平滑肌肌动蛋白; ASBT, 顶端钠依赖性胆汁酸转运体; bFGF, 基本成纤维细胞生长因子; CD, 共同决定簇; CD133, prominin; CD146, 黑色素瘤细胞粘附分子(Me1-CAM); CD31, PECAM; CD44H, 透明质酸受体; CD45, 共同白细胞抗原; CFTR, 囊性纤维化跨膜转运调节因子; CK, 细胞角蛋白; CXCR4, CXC-趋化因子受体4; CYP450, 细胞色素P450; EGF, 表皮生长因子; EpCAM, 上皮细胞黏附分子; FOXa2, 叉头框转录因子a2; GGT, γ 谷氨酰转移酶; HDM, 激素确定的培养基, 针对特定细胞类型调整; HDM-L, 用于肝的激素确定的培养基; HDM-C, 用于胆管细胞(胆管树)的激素确定的培养基; HDM-P, 用于胰腺的激素确定的培养基; HGF, 肝细胞生长因子; HNF, 肝细胞核因子; KM, Kubota培养基, 为干/祖细胞设计的无血清培养基; NCAM, 神经细胞黏附分子; NGN3, 神经元素3; PDX1, 胰腺和十二指肠同源框1; PROX1, Prospero同源框蛋白1; SALL4, Sa1类蛋白4; SOX, Sry有关的HMG框; SR, 分泌素受体; VEGF, 血管内皮细胞生长因子。

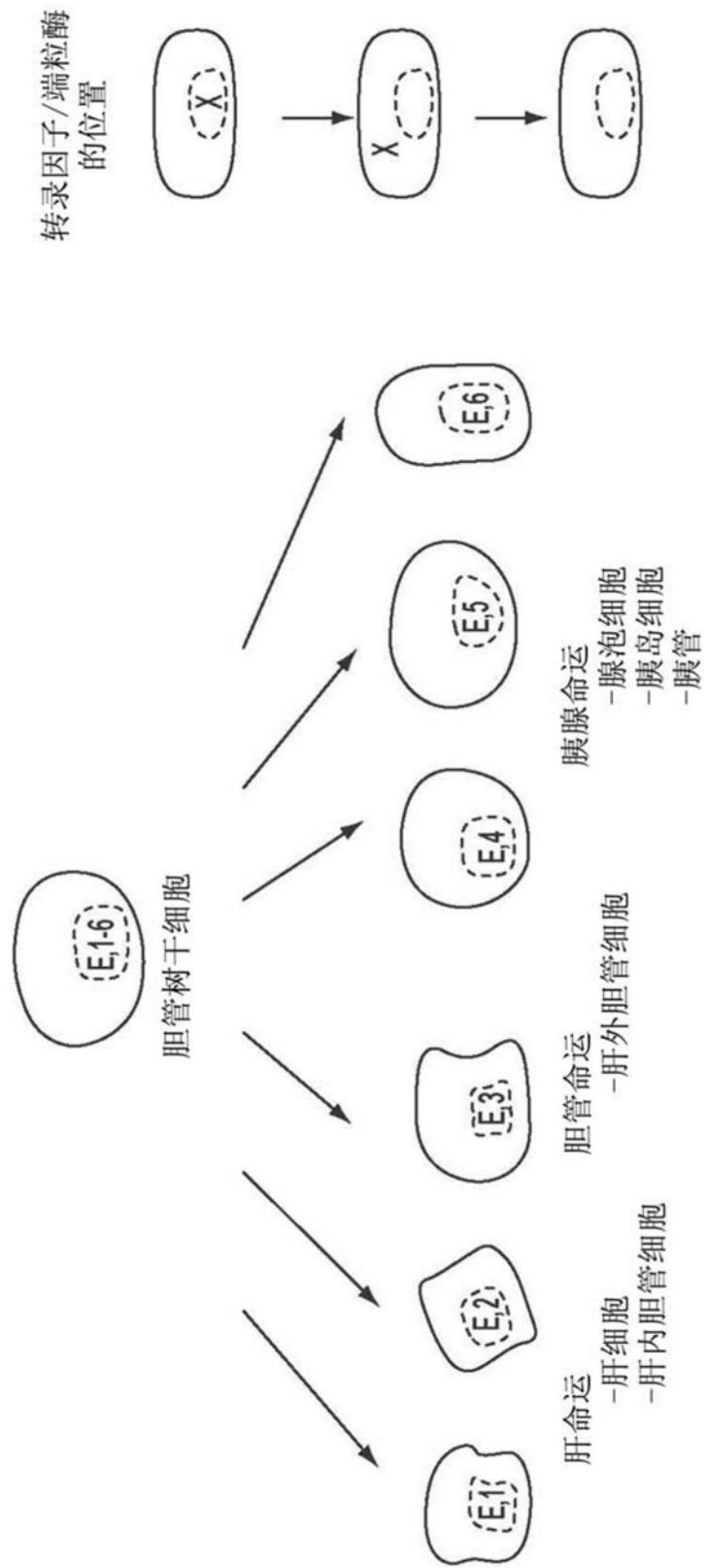


图1

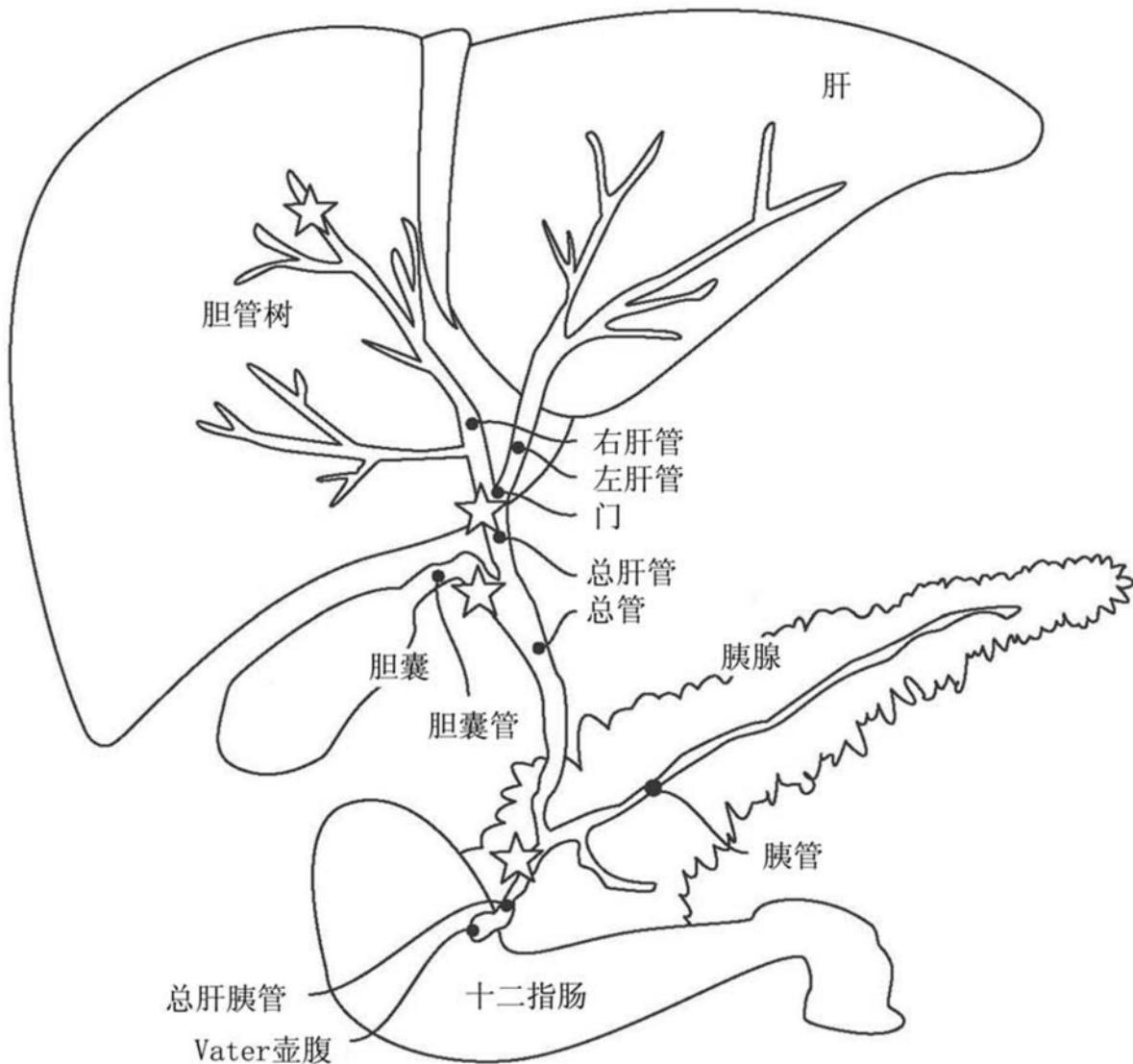
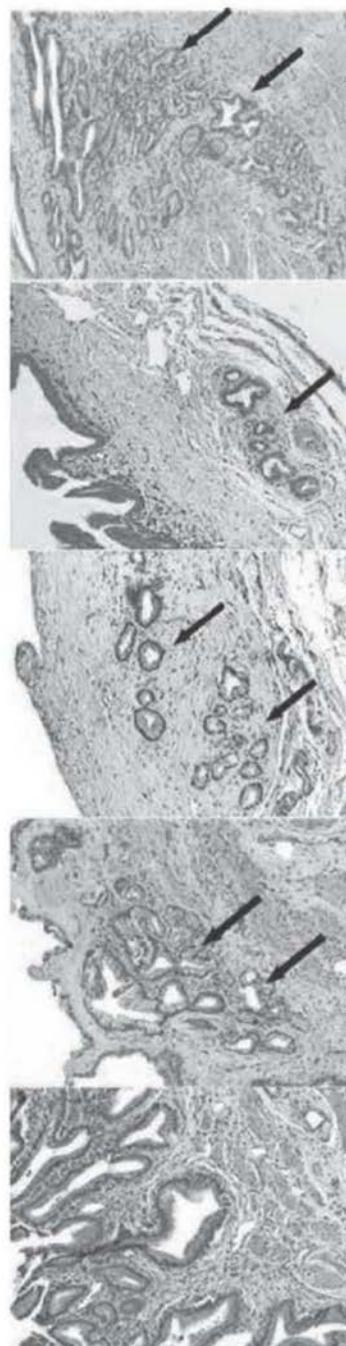


图2



肝外胆管树 (N=5)	胆囊	胆囊管	肝门 (总肝管)	胆管	肝胰壶腹
PBG占用的表面 (%)	/	322±0.87 (0.39)	3.68±0.79 (0.35)	1.29±0.37 (0.16)*	7.47±2.20 (0.98)*
PBG/场的平均数 (20x)	/	8.15±2.03 (0.91)	10.25±2.27 (1.01)	4.37±1.15 (0.51)*	21.83±3.16 (1.41)*
PBG的平均圆周 (μm)	/	115.07±9.11 (4.07)	106.44±19.79 (8.65)	101.01±10.44 (4.67)	130.95±14.22 (6.36)*

图3a

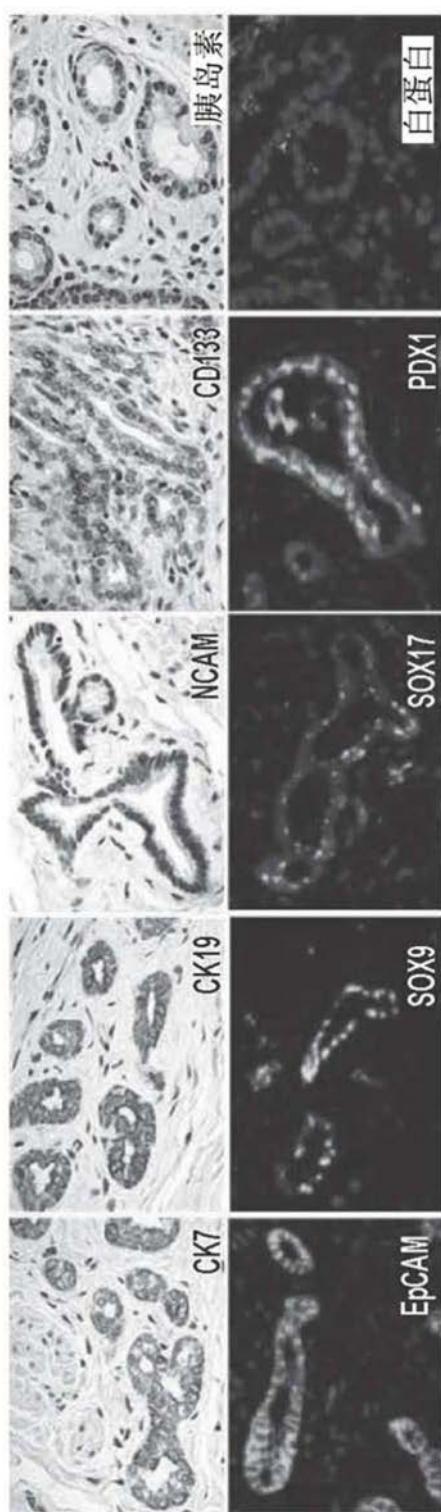


图3b

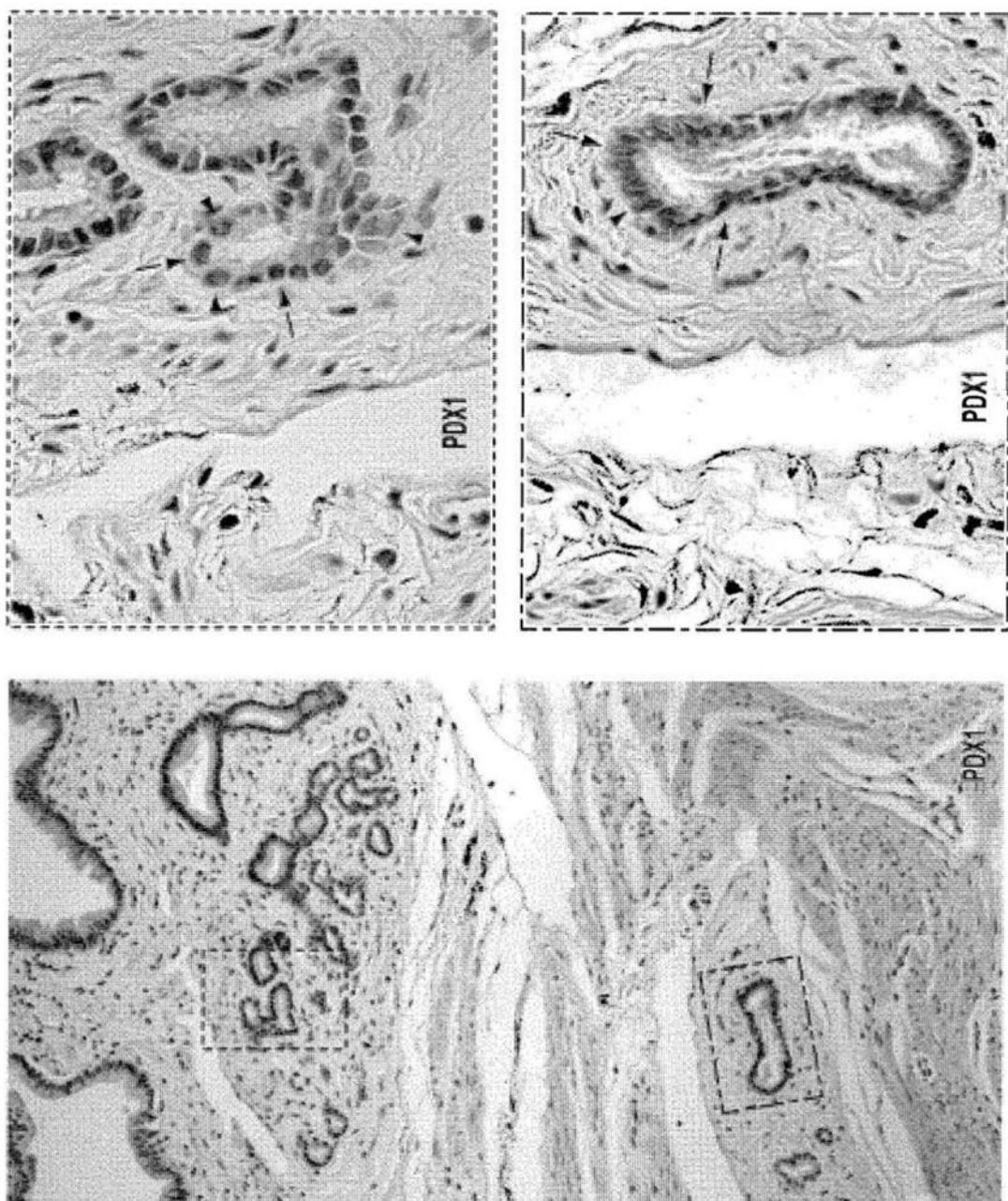


图4

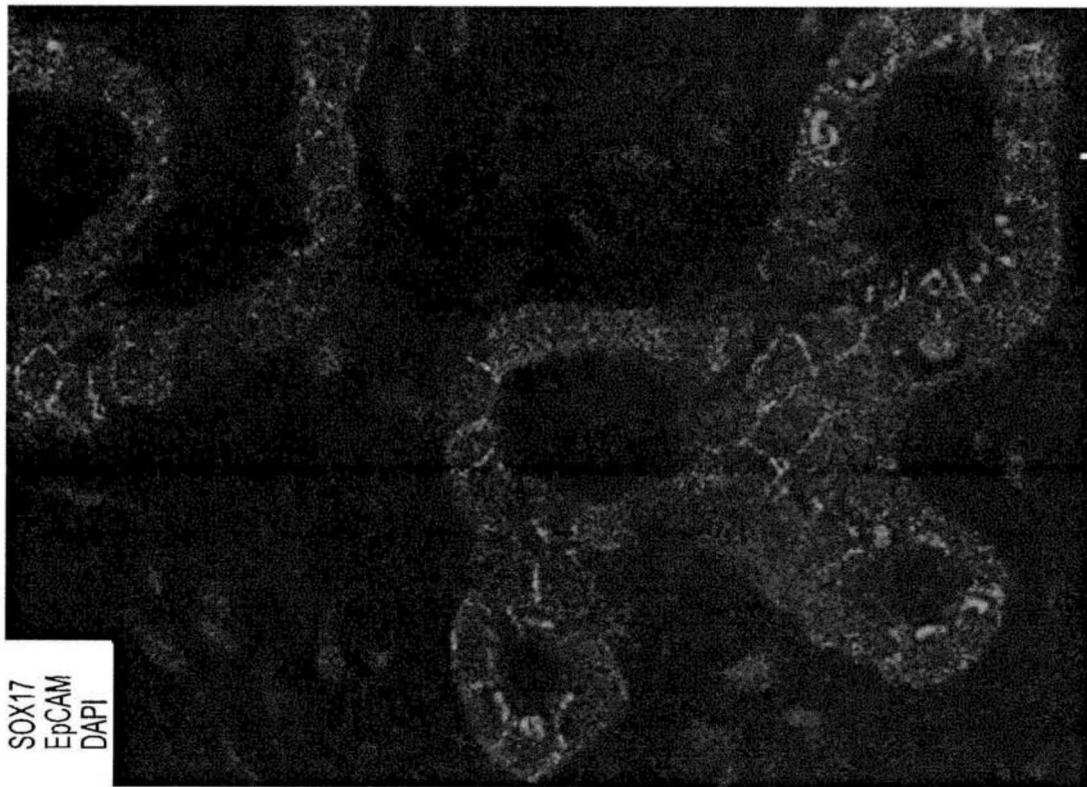


图5a

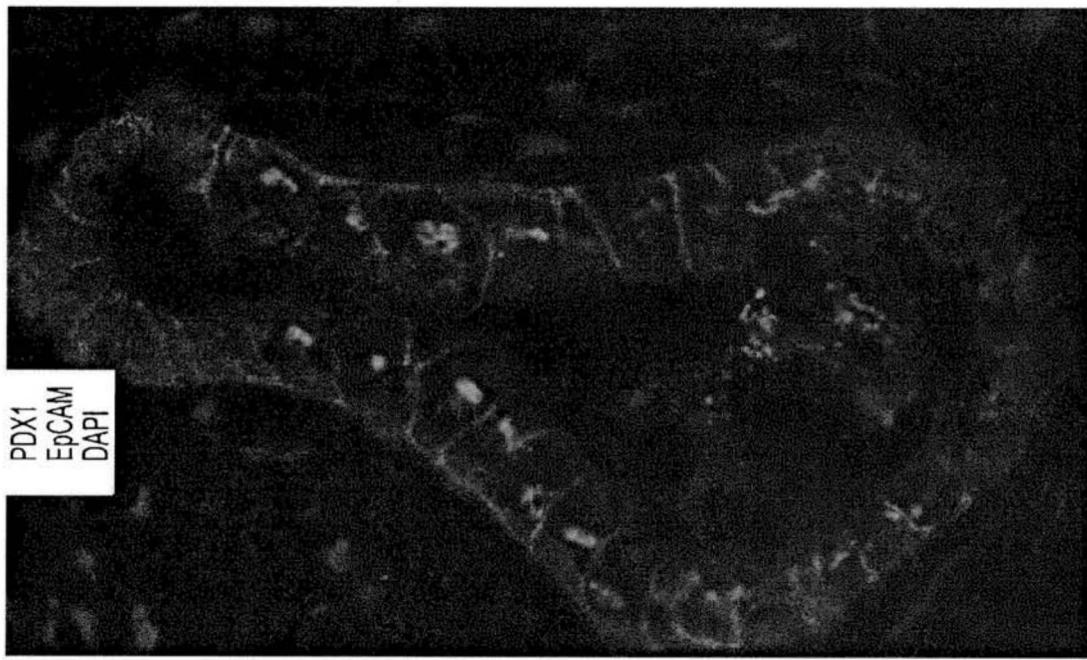


图5b

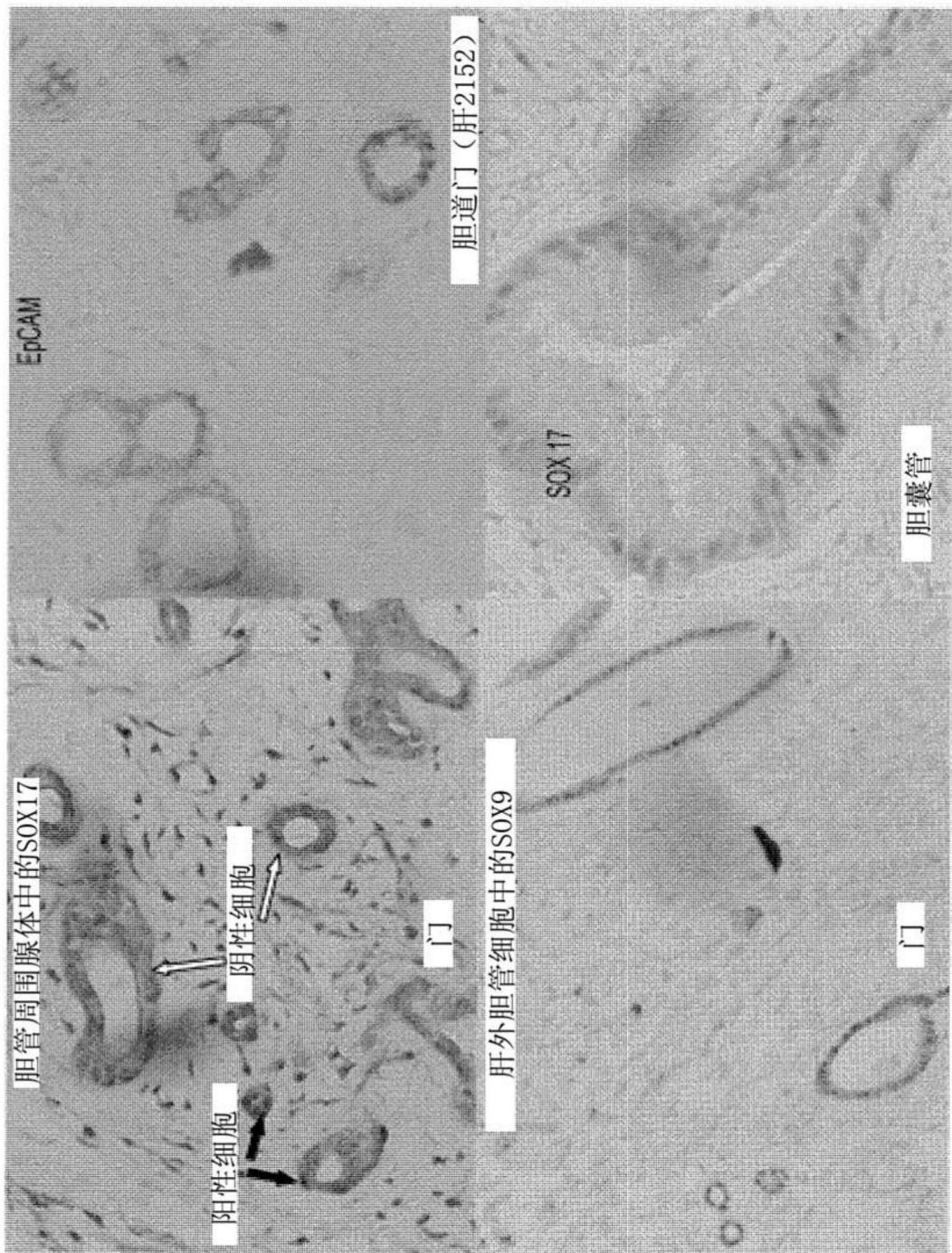


图6

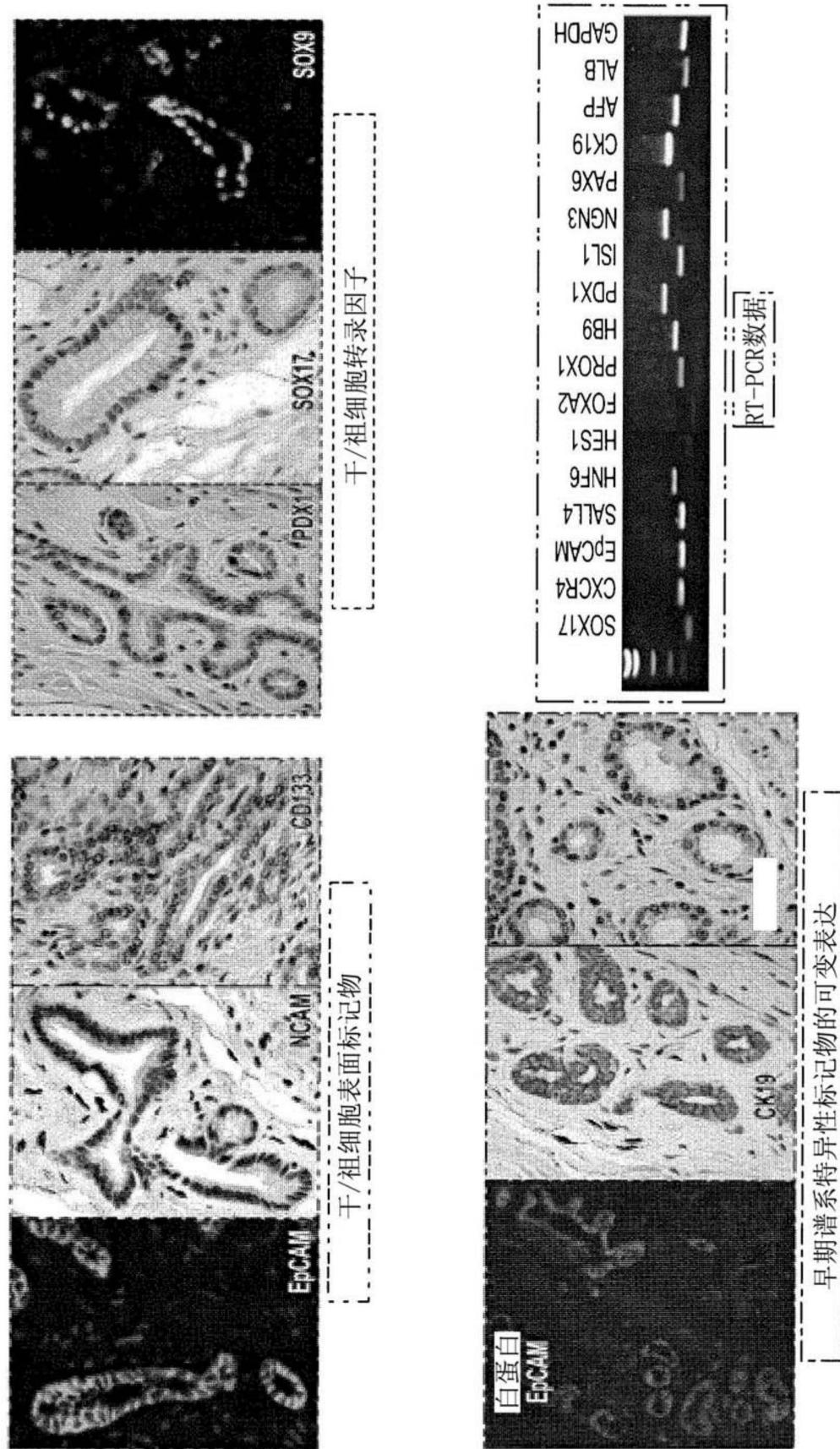


图7

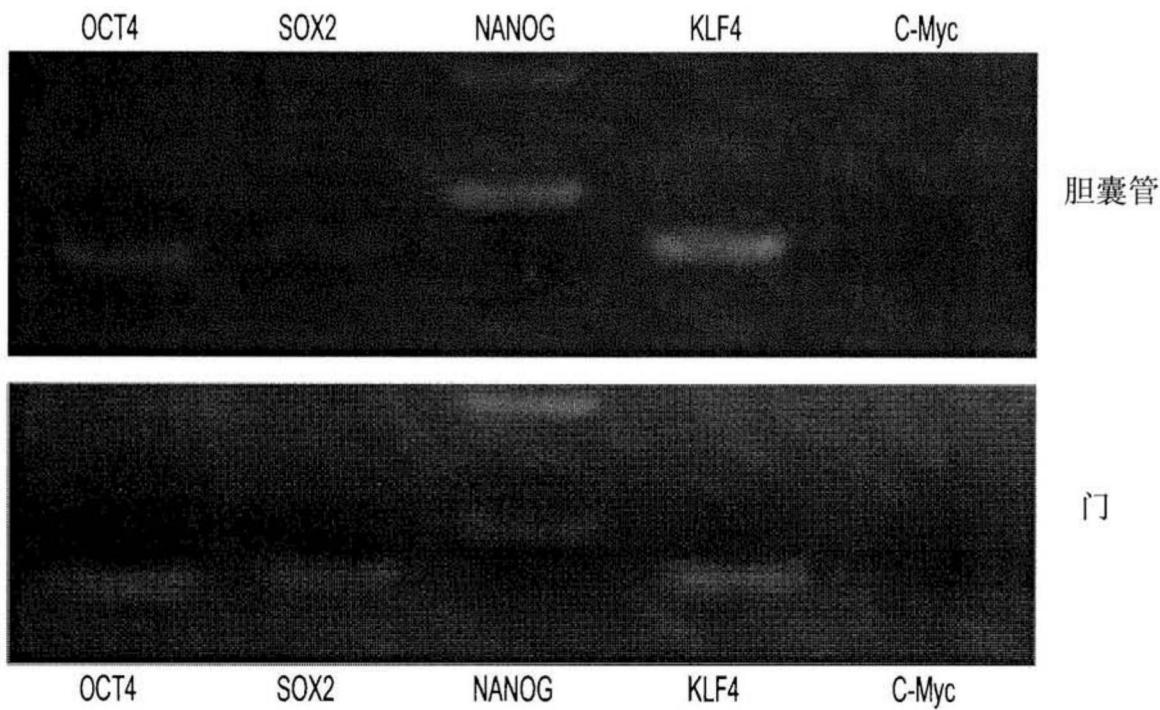


图8

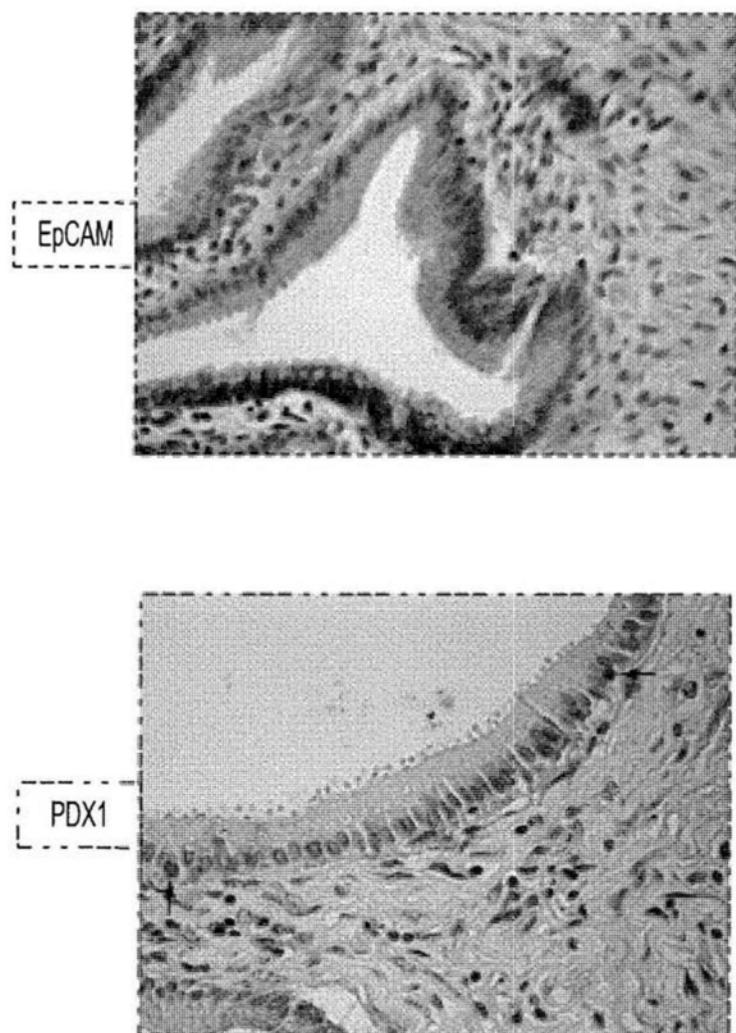


图9

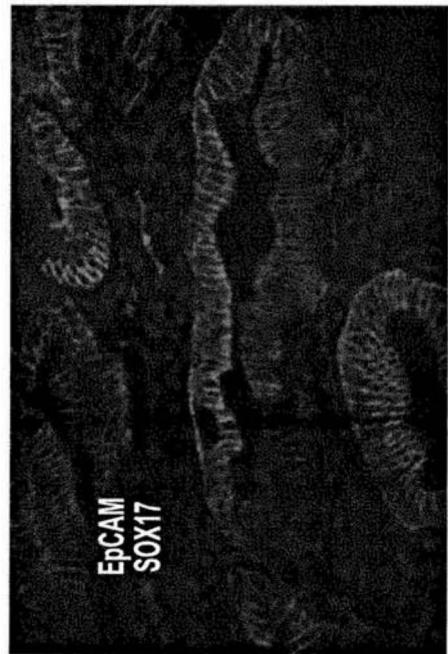


图10a

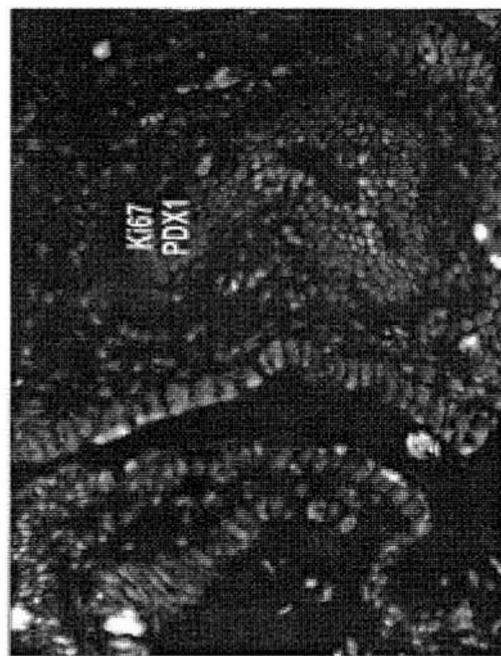


图10b

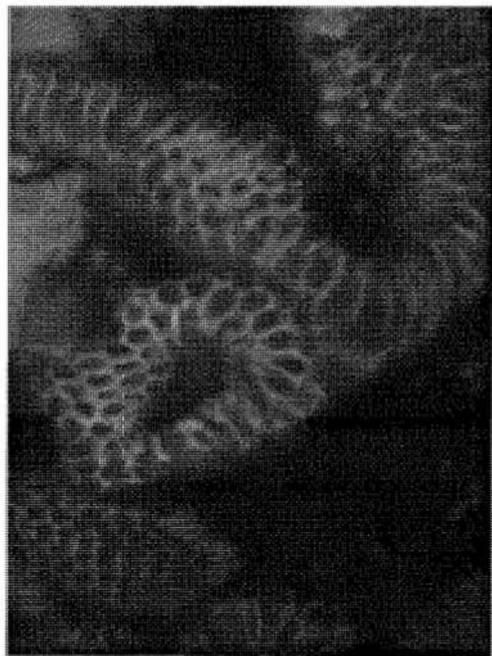


图10c

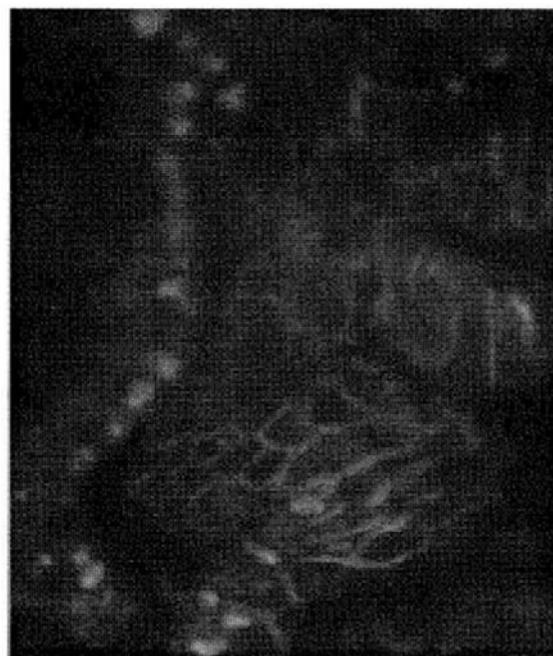


图10d

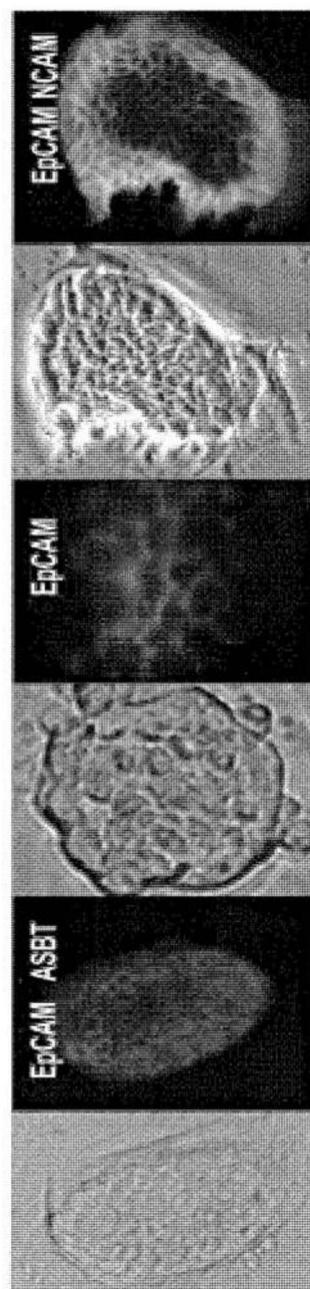


图11a

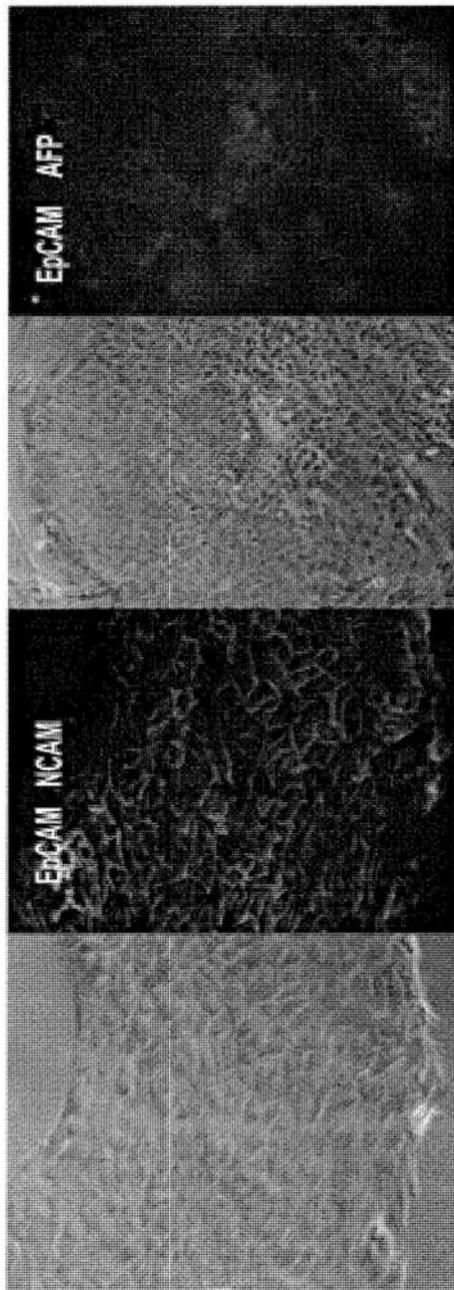


图11b

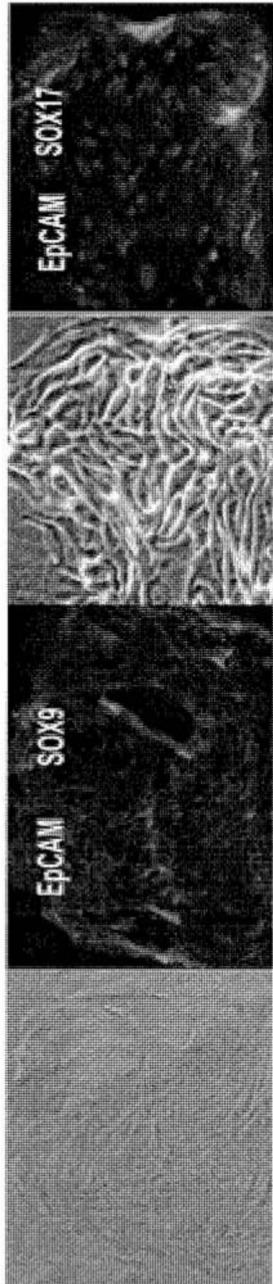


图11c

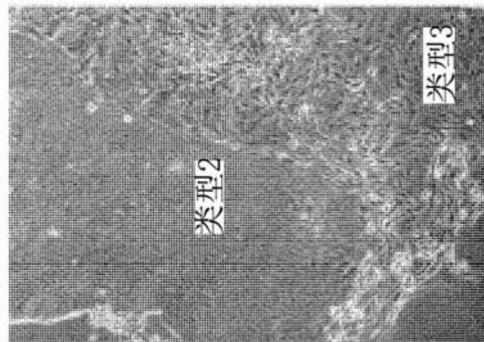


图11d

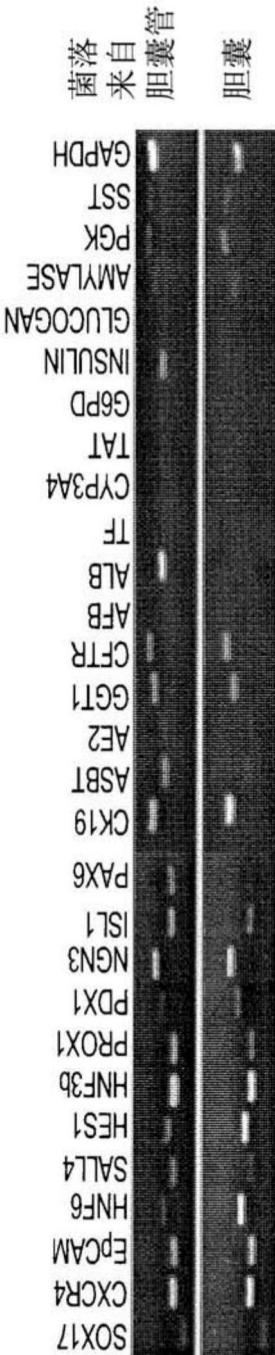


图11e

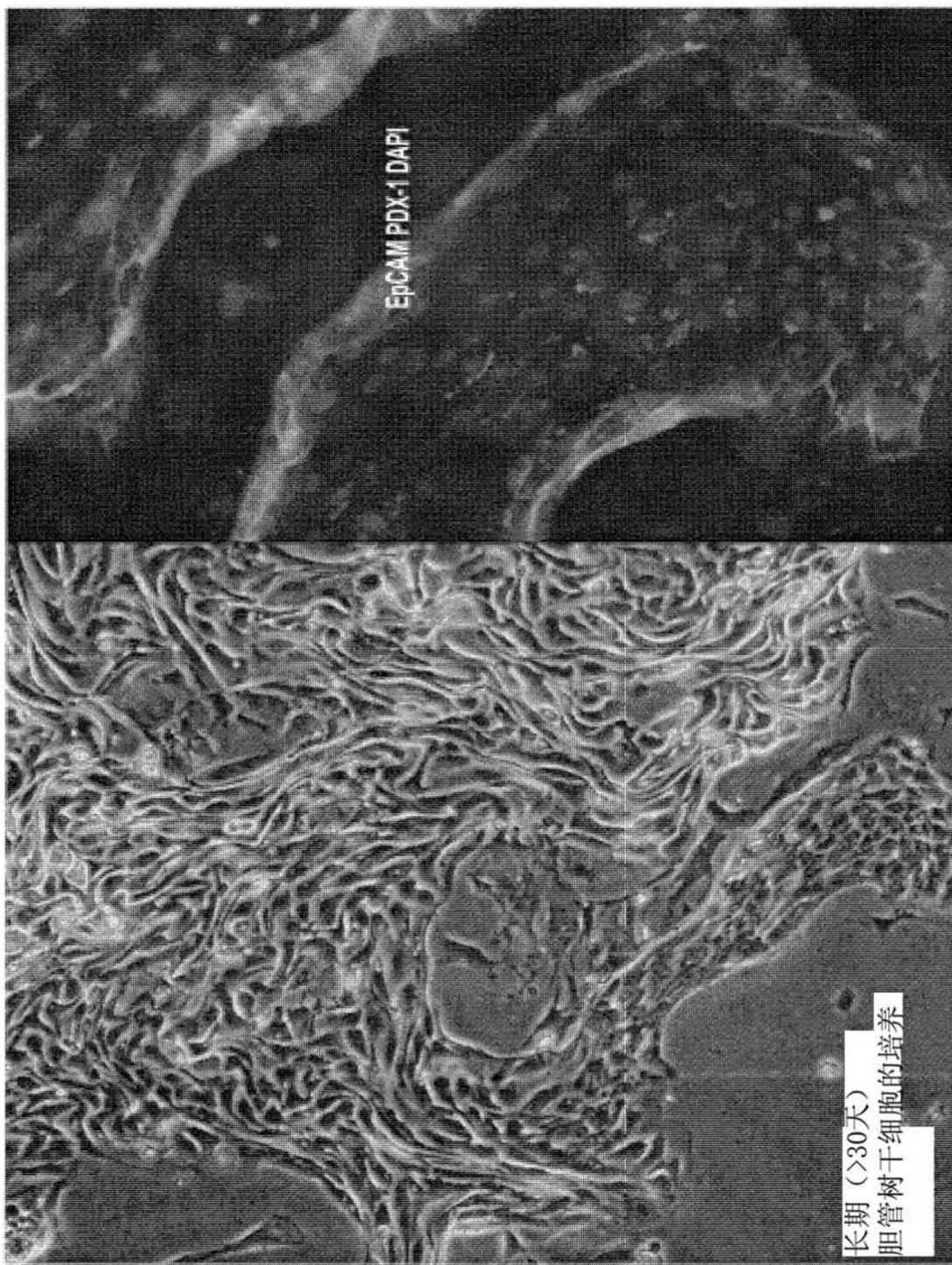


图12

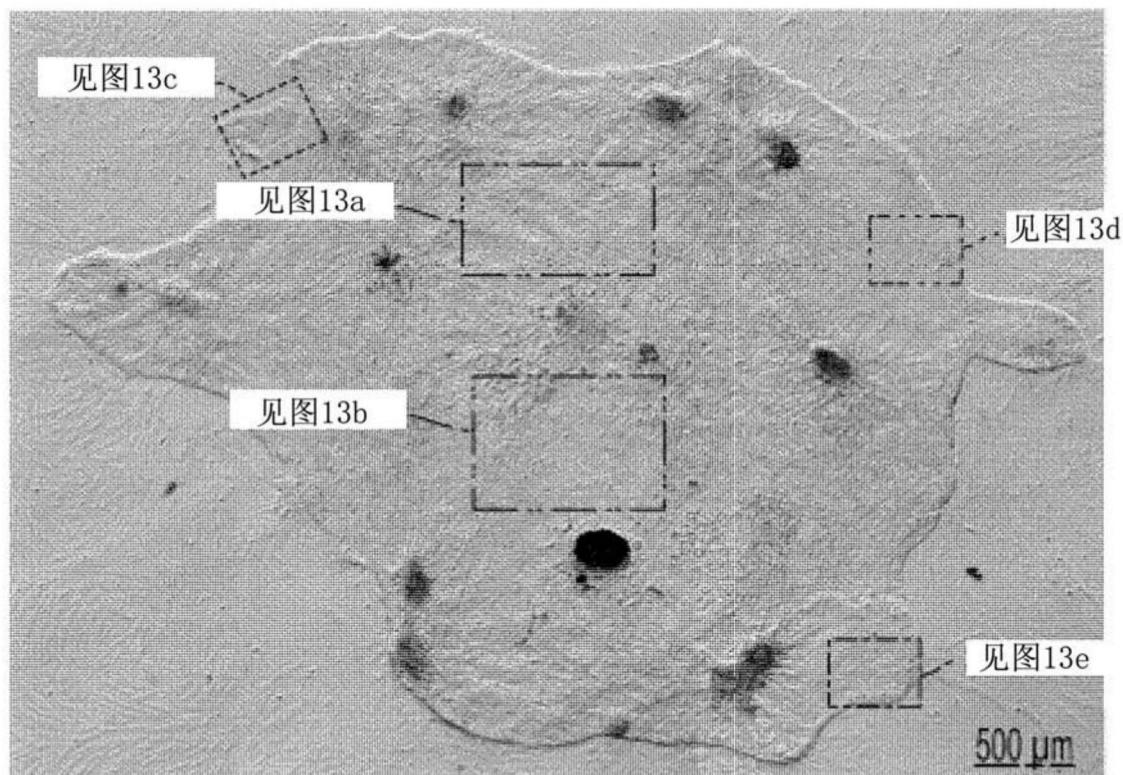


图13

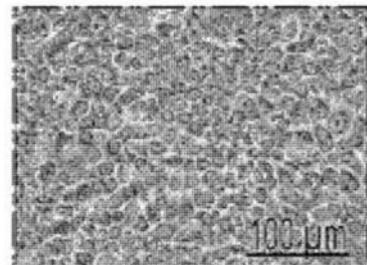


图13a

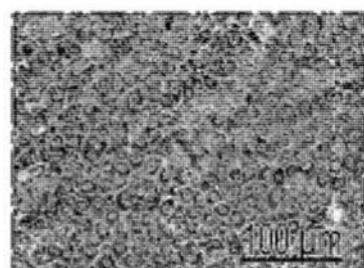


图13b

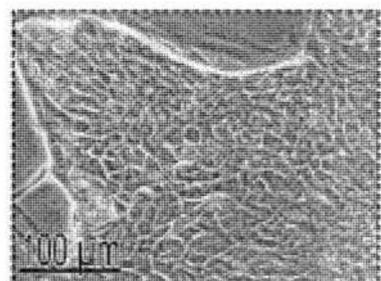


图13c

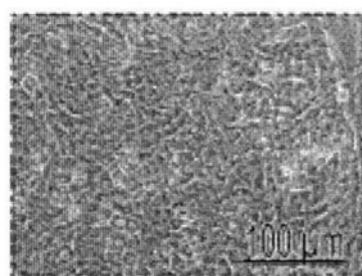


图13d

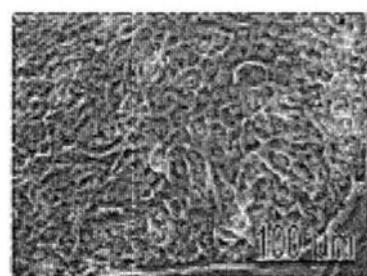


图13e

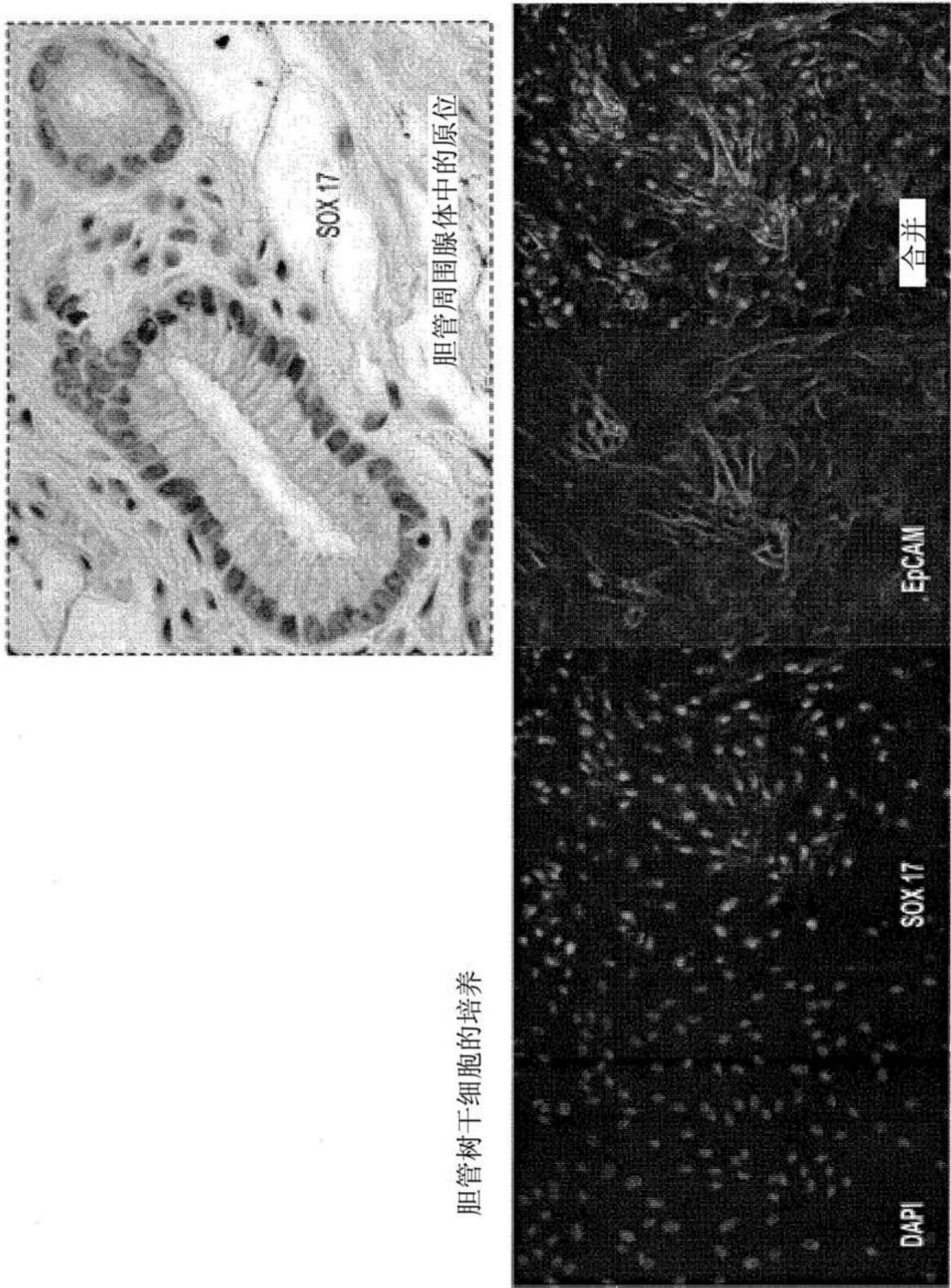


图14

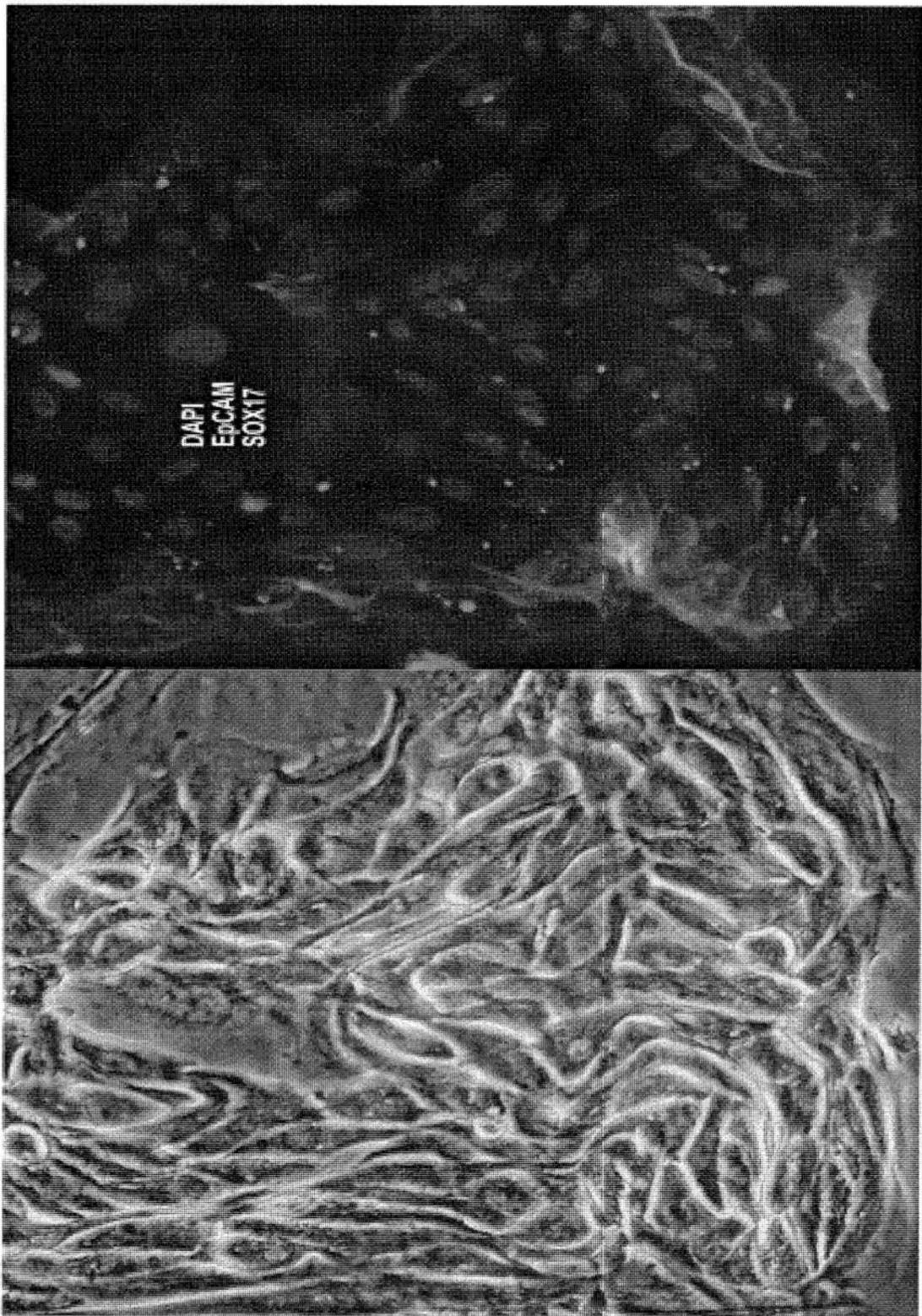


图15

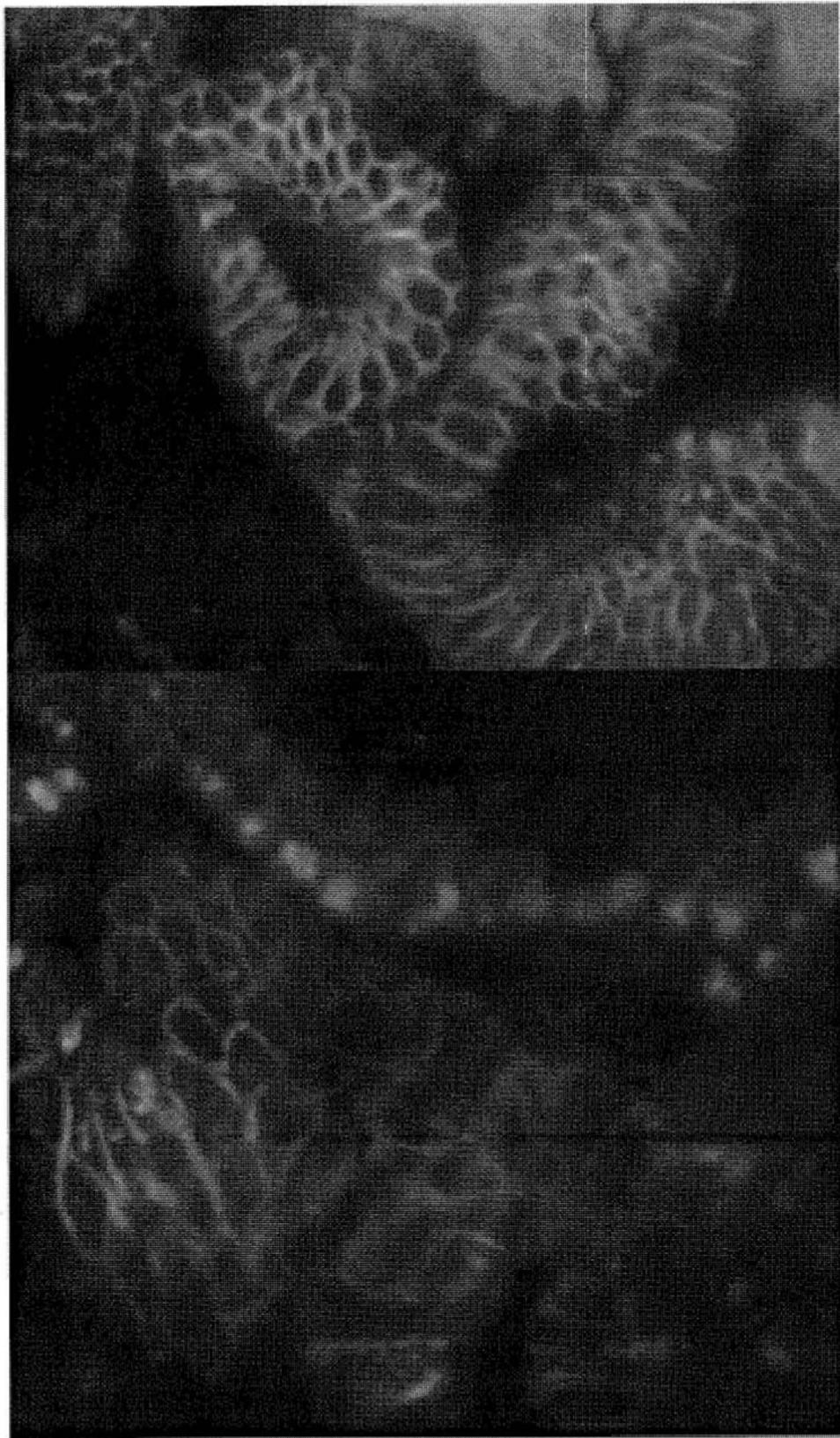


图16

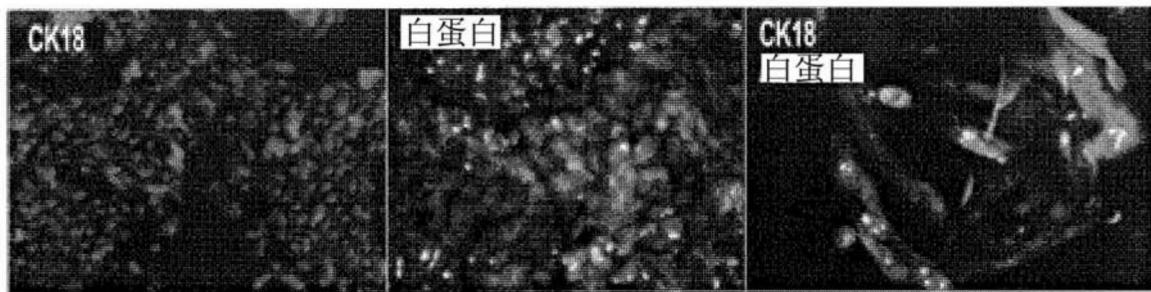


图17a

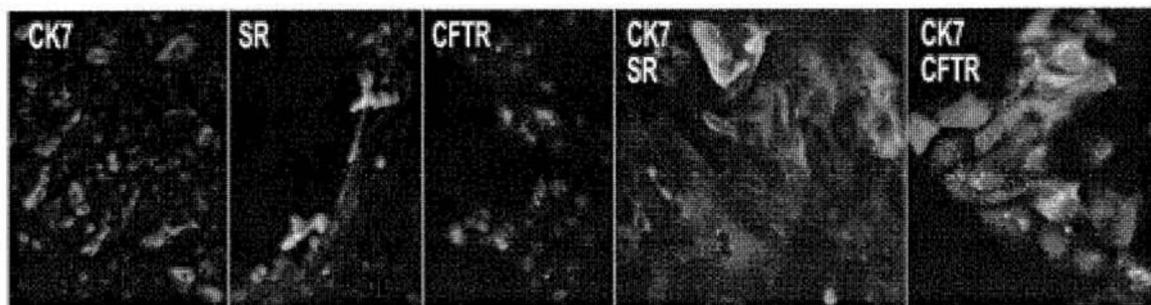


图17b

控制条件	计分：胆管细胞或肝细胞的半定量估计	
	SR+/CFTR+	ALB+/CK18+
干细胞控制	0.2±0.4	0
HDM控制	3±0.7*	2.2±0.8*

图17c

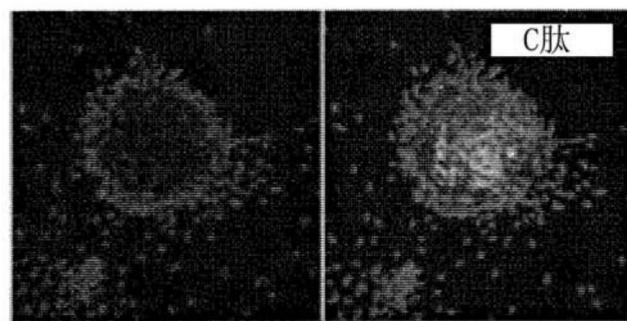


图18a

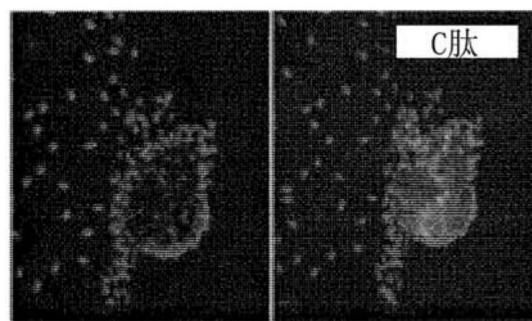


图18b

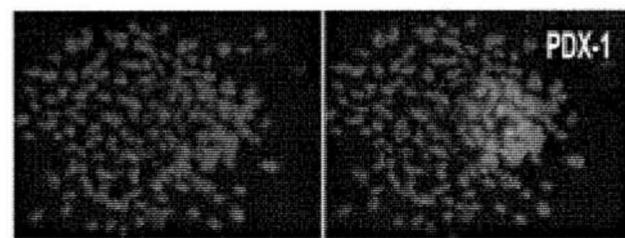


图18c

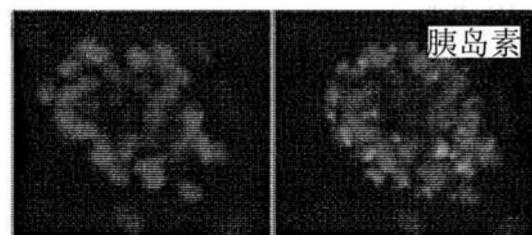


图18d

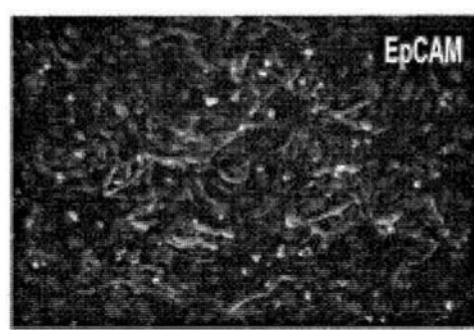


图18e

岛状结构 (c-pep+)	
干细胞控制	1±0.7
HDM-P控制	3.8±1.3*

图18f

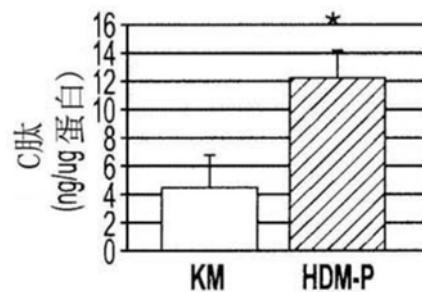


图18g

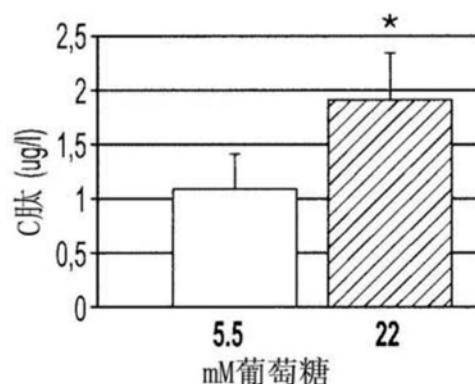


图18h

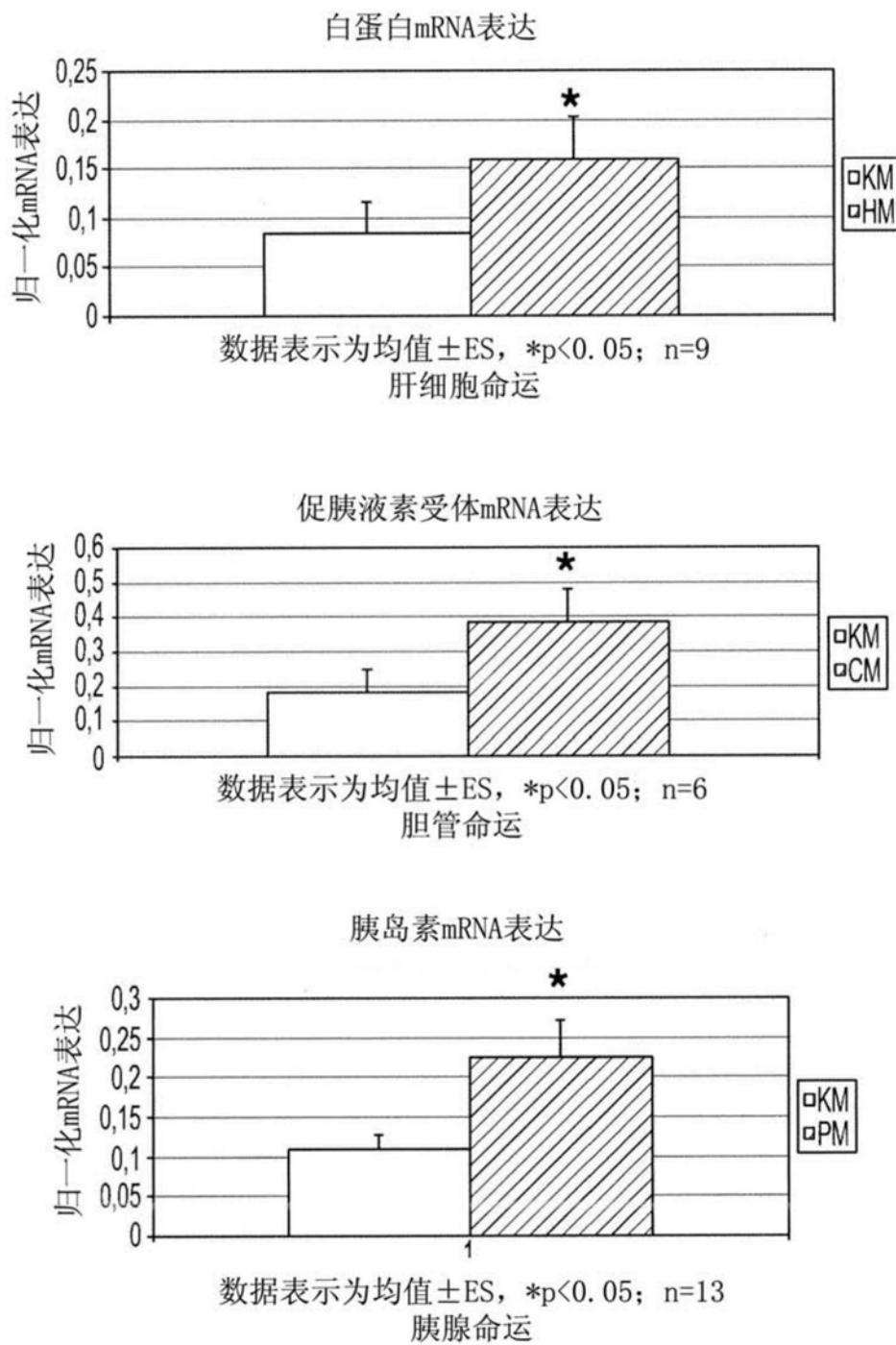


图19

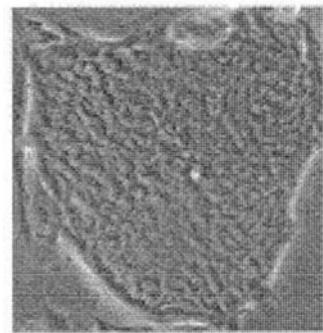


图20a

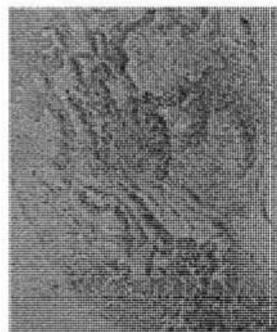


图20b

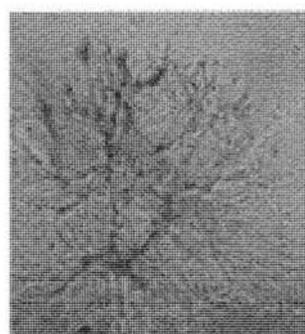


图20c

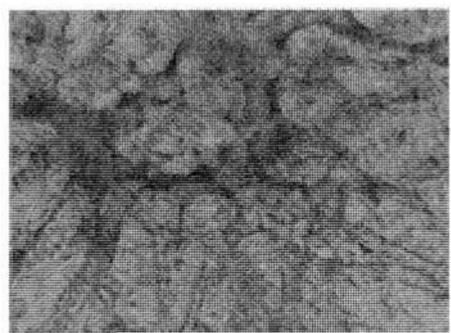


图20d

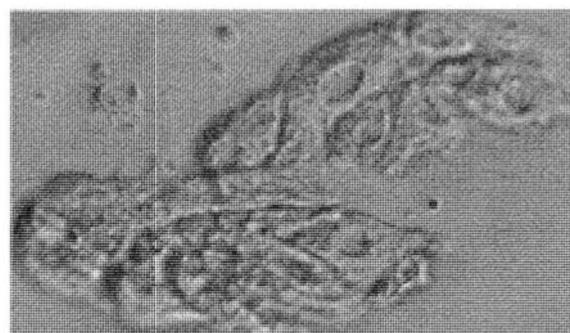


图20e

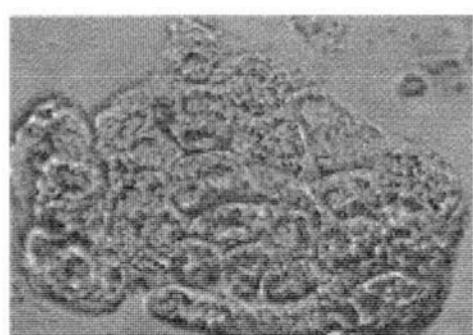


图20f

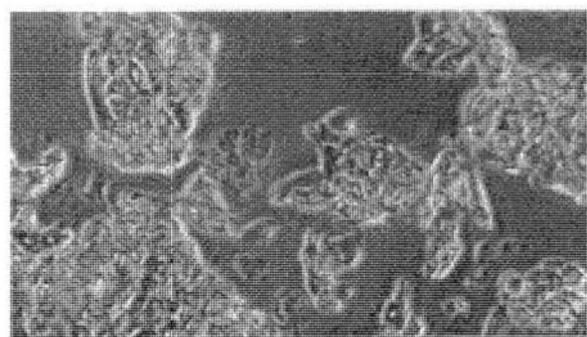


图20g

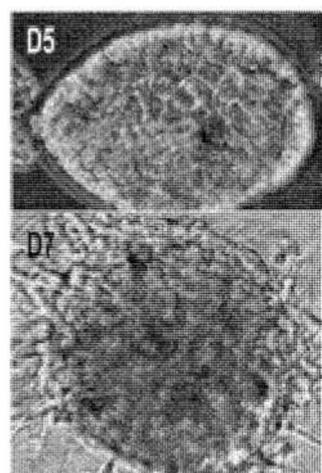


图20h

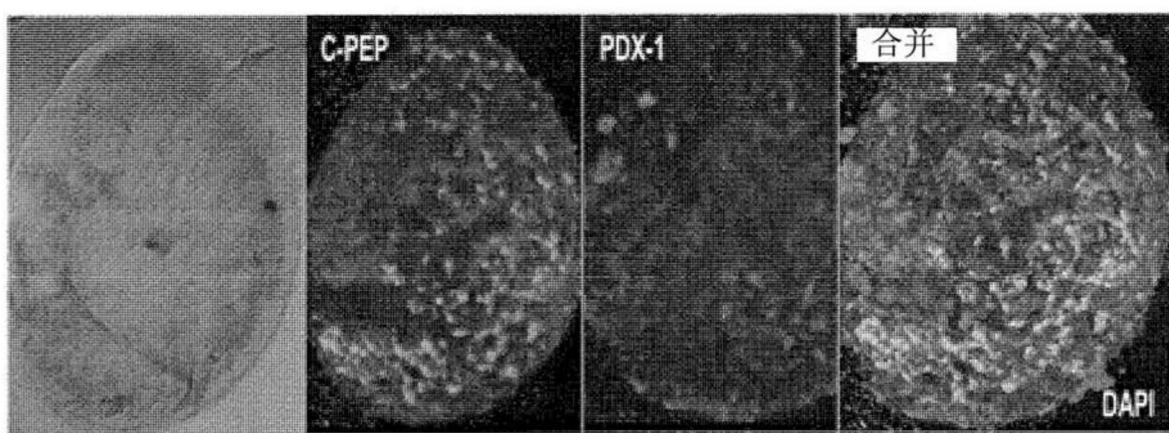


图20i

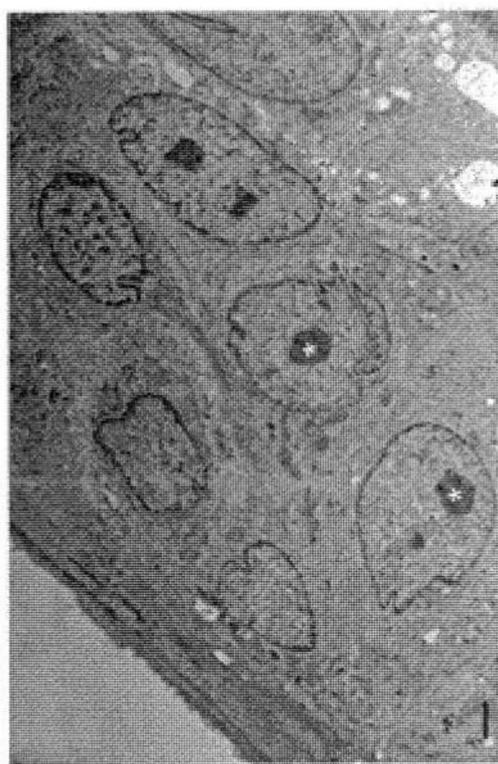


图21a

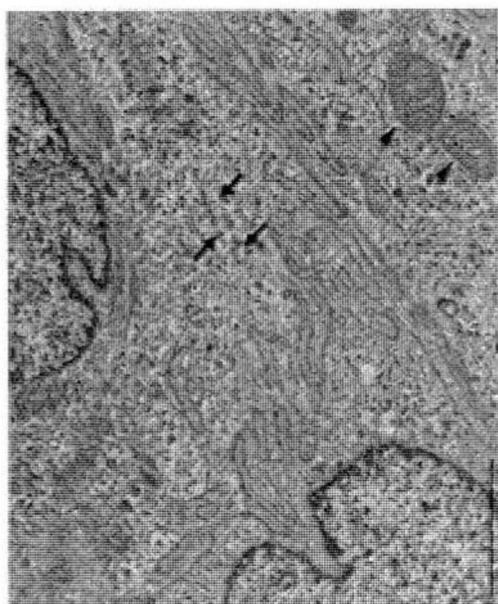


图21b

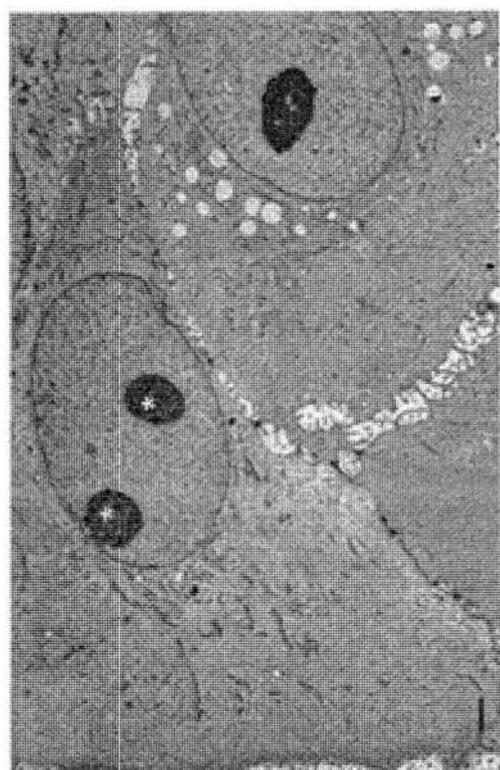


图21c

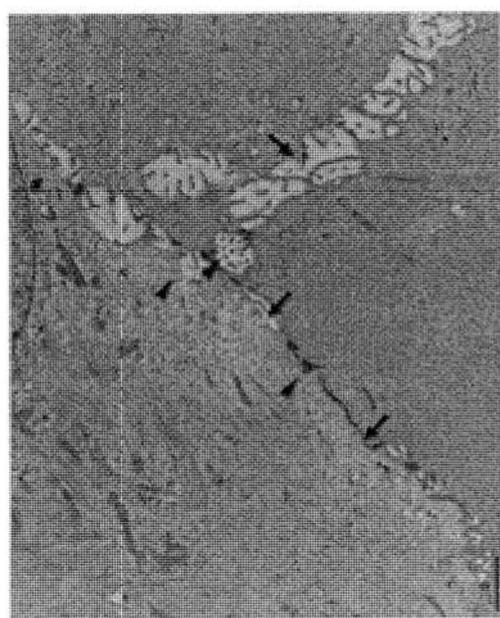


图21d

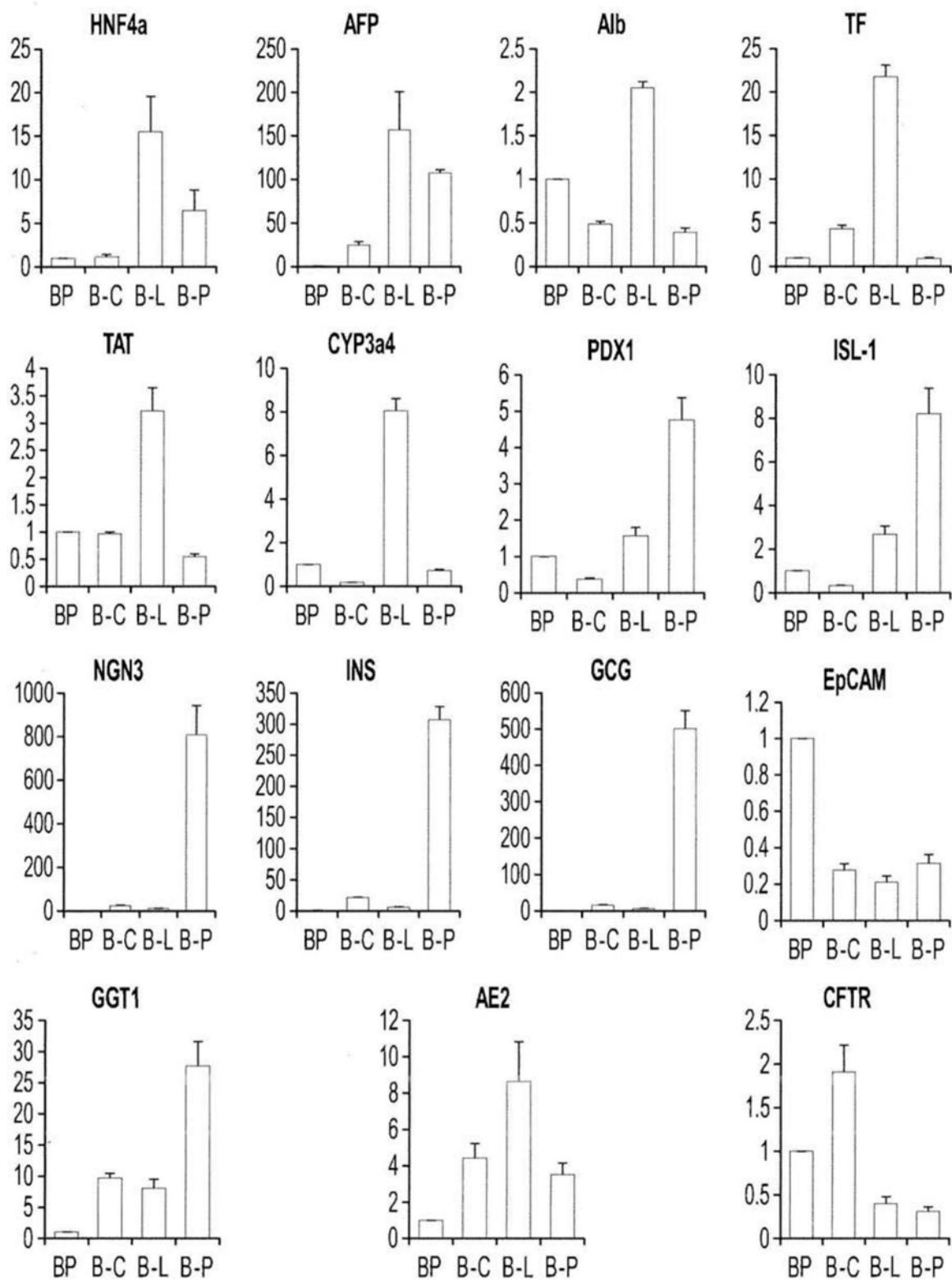


图22

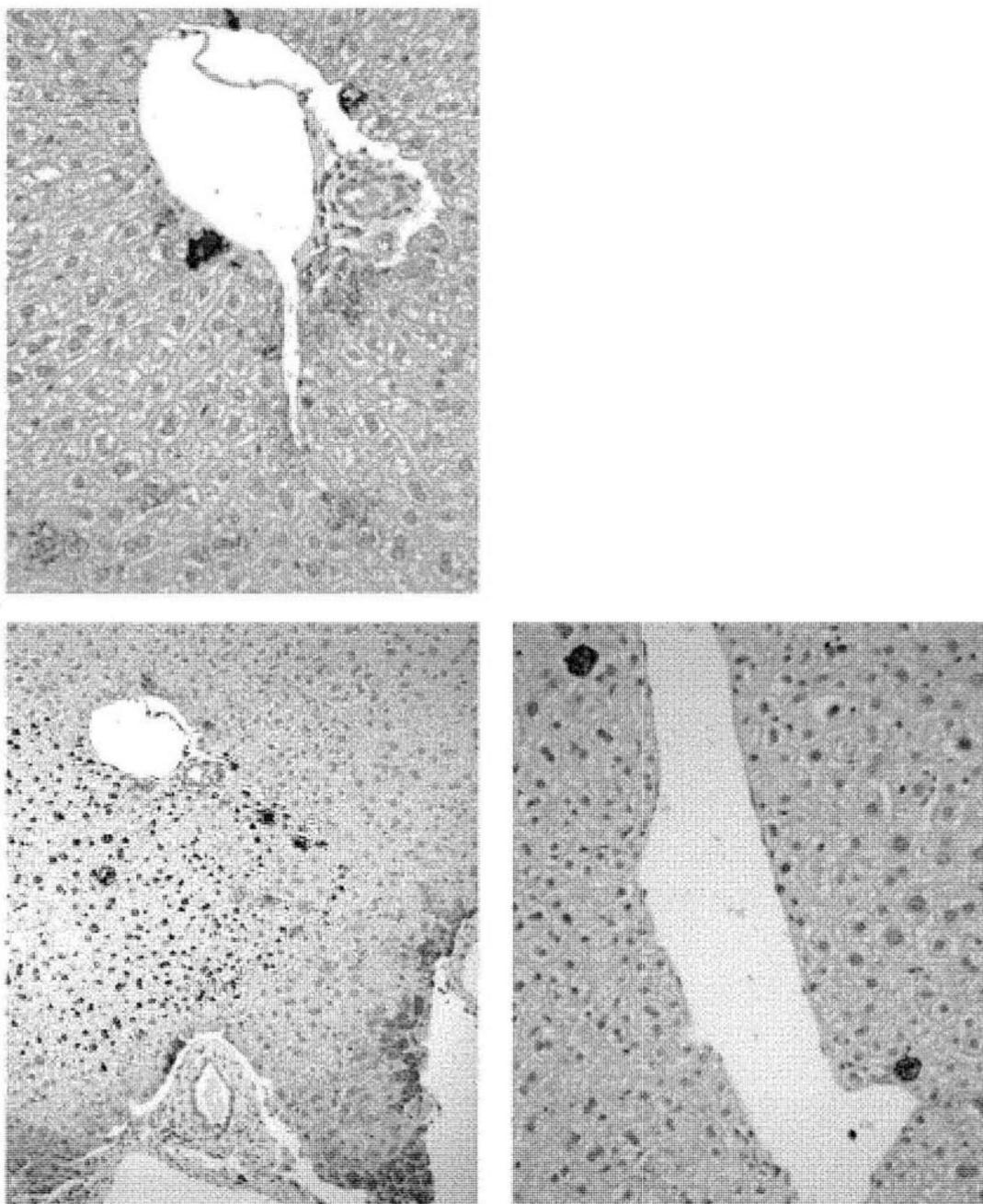


图23

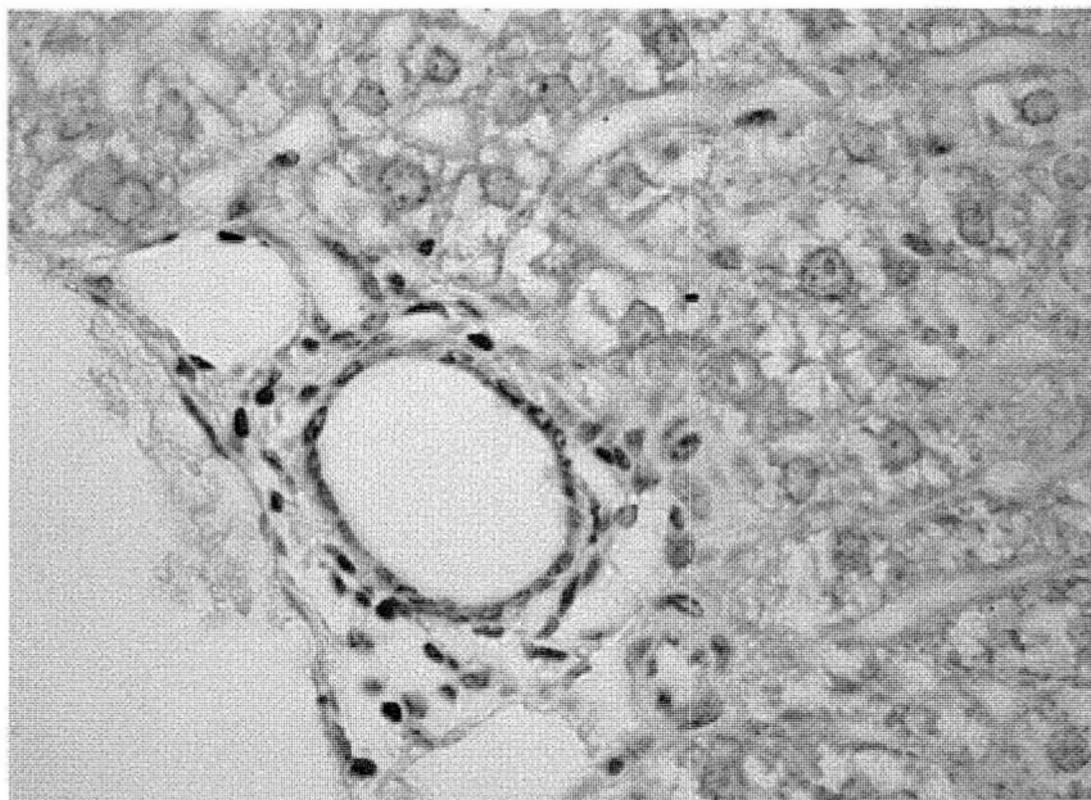


图24

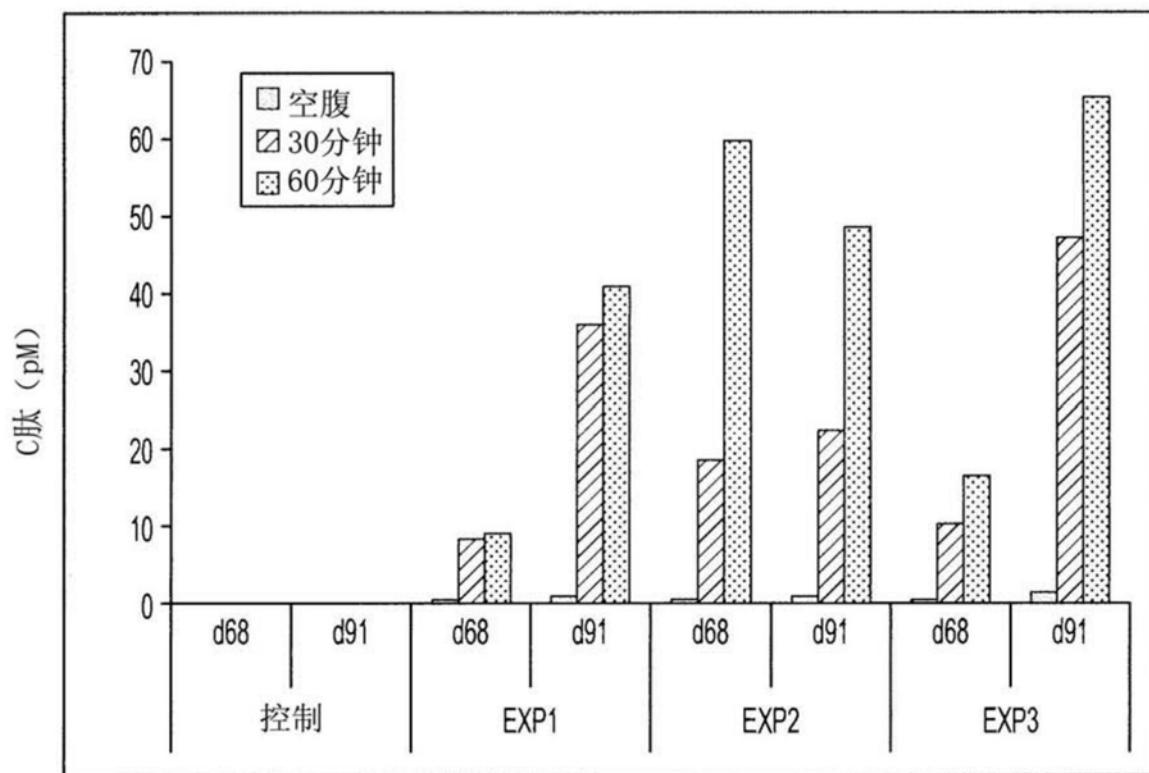


图25