



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102317443 B

(45)授权公告日 2018.09.14

(21)申请号 200880108821.X

(22)申请日 2008.07.31

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102317443 A

(43)申请公布日 2012.01.11

(30)优先权数据
60/952937 2007.07.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2010.03.26

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2008/071775 2008.07.31

(87)PCT国际申请的公布数据
W02009/048675 EN 2009.04.16

(73)专利权人 生命扫描有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 J·J·奥奈尔

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李波 付磊

(51)Int.Cl.
C12N 5/06(2006.01)

(56)对比文件
WO 2006016999 A, 2006.02.16,
WO 2007082963 , 2007.07.26,
Kevin A D'Amour et al..Production of
pancreatic hormone-expressing endocrine
cells from human embryonic stem cells.
《NATURE BIOTECHNOLOGY》.2006,第1399页,图1-4.

José Inzunza et al..Derivation of
Human Embryonic Stem Cell Lines in Serum
Replacement Medium Using Postnatal Human
Fibroblasts as Feeder Cells.《Stem Cells》
.2005,第546页,图3.

审查员 沈晶晶

权利要求书1页 说明书19页 附图7页

(54)发明名称

用人饲养细胞进行的多能干细胞分化

(57)摘要

本发明涉及多能干细胞分化的领域。本发明提供了用于多能干细胞在人饲养细胞层上分化的方法。具体而言,本发明提供了一种使用人饲养细胞层使多能干细胞分化成胰腺内分泌细胞的改进方法。

1. 一种使多能干细胞分化的方法,包括如下步骤:
 - a. 培养所述多能干细胞,
 - b. 将所述多能干细胞接种到人饲养细胞层上,和
 - c. 用至少一种促进所述多能干细胞分化成表达胰腺内胚层谱系或胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞的因子处理所述接种到人饲养细胞层上的多能干细胞,其中所述多能干细胞选自人胚胎干细胞系H1、H7、H9和BG01v。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述人饲养细胞层包含真皮成纤维细胞。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述人饲养细胞层包含包皮成纤维细胞。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述人饲养细胞层包含胰腺衍生的基质细胞。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述胰腺衍生的基质细胞在至少一种选自如下的蛋白质标志物的表达上基本上是阴性的:NCAM、ABCG2、细胞角蛋白7、细胞角蛋白8、细胞角蛋白18和细胞角蛋白19。
6. 根据权利要求4所述的方法,其中所述胰腺衍生的基质细胞在至少一种选自如下的蛋白质标志物的表达上基本上是阳性的:CD44、CD73、CD90和CD105。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中培养所述多能干细胞的步骤是在胞外基质上完成。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中培养所述多能干细胞的步骤是在人饲养细胞层上完成。
9. 用于治疗糖尿病的由多能干细胞分化的细胞,其特征在于:所述细胞通过包括如下步骤的方法获得:
 - a. 培养所述多能干细胞,
 - b. 将所述多能干细胞接种到人饲养细胞层上,
 - c. 用至少一种促进所述多能干细胞分化成胰腺内分泌谱系细胞的因子处理所述接种到人饲养细胞层上的多能干细胞,其中所述多能干细胞选自人胚胎干细胞系H1、H7、H9和BG01v。
10. 根据权利要求9所述的细胞,其中所述多能干细胞的分化是在两个或更多个步骤中完成,每个步骤需要通过至少一种促进细胞分化成定形内胚层谱系、胰腺内胚层谱系和胰腺内分泌谱系中的一种或更多种的因子对细胞进行处理。

用人饲养细胞进行的多能干细胞分化

技术领域

[0001] 本发明涉及多能干细胞分化领域。本发明提供在人饲养细胞层上分化多能干细胞的的方法。具体地讲,本发明提供用人饲养细胞层将多能干细胞分化成胰腺内分泌细胞的改进方法。

背景技术

[0002] 多能干细胞例如胚胎干细胞具有分化成所有成人细胞类型的能力。因此,胚胎干细胞对于已因疾病、感染或者先天异常受损的器官来说可能是替代细胞和组织的来源。在将胚胎干细胞有效分化成特选的细胞类型方面的困难,妨碍了胚胎干细胞用作替代细胞来源的潜力。

[0003] 在一个实例中,Hori等人(PNAS 99:16105,2002)揭示,用磷酸肌醇3-激酶(LY294002)的抑制剂处理小鼠胚胎干细胞,产生了类似 β 细胞的细胞。

[0004] 在另一个实例中,Blyszczuk等人(PNAS 100:998,2003)报道从组成型表达Pax4的小鼠胚胎干细胞产生胰岛素的细胞。

[0005] Micallef等人报道说,视黄酸能调节胚胎干细胞定向形成Pdx1阳性胰腺内胚层(Diabetes 54:301,2005)。

[0006] Skoudy等人报道说,激活蛋白A(TGF β 超家族的成员)能上调小鼠胚胎干细胞中的胰腺外分泌基因(p48和淀粉酶)和内分泌基因(Pdx1、胰岛素和胰高血糖素)的表达(Biochem.J.379:749,2004)。

[0007] Shiraki等人研究了能特异性增强胚胎干细胞分化成Pdx1阳性细胞的生长因子的作用。他们观察到TGF β 2可再现地产生更高比例的Pdx1阳性细胞(Genes Cells.2005 Jun; 10(6):503-16.)。

[0008] Gordon等人证明了在血清不存在下和在激活蛋白连同Wnt信号转导抑制剂的存在下从小鼠胚胎干细胞诱导brachyury⁺/HNF-3 β ⁺内胚层细胞(US 2006/0003446A1)。

[0009] Gordon等人(PNAS 103:16806,2006)说道:“Wnt和TGF- β /nodal/激活蛋白信号转导同时为前原条的产生所必需”。

[0010] Thomson等人从人胚泡分离了胚胎干细胞(Science 282:114,1998)。同时,Gearhart及其同事从胎儿生殖腺组织衍生了人胚胎生殖(hEG)细胞系(Shamblott等人、Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:13726,1998)。与可简单通过与白血病抑制因子(LIF)一起培养来防止分化的小鼠胚胎干细胞不一样,人胚胎干细胞必须维持在非常特殊的条件下(美国专利No.6,200,806、WO 99/20741、WO 01/51616)。

[0011] D'Amour等人描述了在高浓度激活蛋白和低血清的存在下产生人胚胎干细胞衍生的定形内胚层的富集培养物(Nature Biotechnology 2005)。将这些细胞移植到小鼠的肾囊下,导致了分化成具有有一些内胚层器官的特性的更成熟细胞。在加入FGF-10之后,人胚胎干细胞衍生的定形内胚层细胞可进一步分化成Pdx1阳性细胞(US 2005/0266554A1)。

[0012] D'Amour等人(Nature Biotechnology-24,1392-1401(2006))说道:“我们已开发

出一种将人胚胎干(hES)细胞转化成能够合成胰腺激素即胰岛素、胰高血糖素、促生长素抑制素、胰多肽和生长素释放肽的内分泌细胞的分化方法。这个方法通过引导细胞经过通向能表达内分泌激素的细胞的类似定形内胚层、肠管内胚层、胰腺内胚层和内分泌前体的各阶段,来模拟体内胰腺器官发生。

[0013] 在另一个实例中,Fisk等人报道了用于从人胚胎干细胞产生胰岛细胞的系统(US2006/0040387A1)。在这个情况中,分化途径分成三个阶段。首先用丁酸钠和激活蛋白A的组合将人胚胎干细胞分化成内胚层。然后将细胞与TGF β 拮抗剂如Noggin并结合EGF或 β 细胞素(betacellulin)一起进行培养,以产生Pdx1阳性细胞。通过烟酰胺诱导终末分化。

[0014] 在一个实例中,Benvenistry等人说道:“我们得出结论认为,Pdx1 的过量表达增强了胰腺富集基因(pancreatic enriched genes)的表达,胰岛素表达的诱导可能需要另外的仅存在于体内的信号(Benvenistry等人, Stem Cells 2006;24:1923-1930)”。

[0015] 在另一个实例中,Condie等人公开道:“饲养层含有或表达能抑制 γ -分泌酶或Notch信号转导以增强多能细胞维持在多能状态的配体或其他化合物,饲养层含有或表达能抑制 γ -分泌酶或Notch信号转导以增强多能细胞维持在多能状态的配体或其他化合物”(WO2004090110)。

[0016] 在另一个实例中,Mitalipova等人公开道:“将人胚胎干细胞与人粒层饲养细胞、肌肉细胞、输卵管上皮细胞、骨髓基质细胞和皮肤成纤维细胞一起培养,胚胎干细胞能维持它们的多能表型”(US20050037488)。

[0017] 在另一个实例中,Xu等人公开了从胚胎组织获得或者从胚胎干细胞分化出间叶细胞样和成纤维细胞样细胞系。衍生这种细胞系、处理培养基和用饲养细胞或调理培养基(conditioned media)培育干细胞的方法已有描述(US20020072117)。

[0018] 因此,仍明显需要开发用于建立能扩增以满足目前临床需要,同时又保持分化成胰腺内分泌细胞、胰腺激素表达细胞或胰腺激素分泌细胞的潜力的多能干细胞系的条件。我们采取了替代性方法来改进将多能干细胞分化成胰腺内分泌细胞的效率。

发明内容

[0019] 本发明涉及多能干细胞分化的领域。本发明提供在人饲养细胞层上分化多能干细胞的方法。具体地讲,本发明提供用人饲养细胞层将多能干细胞分化成胰腺内分泌细胞的改进方法。

[0020] 在一个实施例中,本发明提供分化多能干细胞的方法,所述方法包括以下步骤:

[0021] a. 培养多能干细胞,

[0022] b. 将多能干细胞接种到人饲养细胞层上,和

[0023] c. 用至少一种能促进多能干细胞的分化的因子处理多能干细胞。

附图说明

[0024] 图1显示与分化相关的标志即CXCR4、Sox-17、FoxA2、HNF-4a、HNF6 和AFP在人胚胎干细胞系H9的群体中的表达,所述细胞系是在第46次传代,是在MATRIGEL上与MEF调理培养基一起培养,并与转移到小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)、市售的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF-SM)、人真皮成纤维细胞(D551)、人包皮成纤维细胞(Hs27)和人胰腺衍生基质细胞(HP)的细

胞进行比较。

[0025] 图2显示人饲养细胞层对人胚胎干细胞向表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的分化的作用。图中显示CXCR4、Sox-17和FoxA2在人胚胎干细胞系H1的群体中的表达(由实时PCR测定),所述细胞系是在第48次传代分化成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞,是在小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)、市售的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF-SM)、人真皮成纤维细胞(D551)、人包皮成纤维细胞(Hs27)和人胰腺衍生基质细胞(HP)上培养。

[0026] 图3显示人饲养细胞层对表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞的形成的作用。图中显示FoxA2、HNF-4a、HNF-6和PDX-1在人胚胎干细胞系H1的群体中的表达(由实时PCR测定),所述细胞系是在第48次传代分化成表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞,是在小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)、市售的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF-SM)、人真皮成纤维细胞(D551)、人包皮成纤维细胞(Hs27)和人胰腺衍生基质细胞(HP)上培养。

[0027] 图4显示人饲养细胞层对表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞的形成的作用。图中显示FoxA2、HNF-4a、HNF-6、NeuroD1、Nkx 2.2、Pax-4、Nkx 6.1、PDX-1、胰高血糖素(GCG)和胰岛素(INS)在人胚胎干细胞系H1的群体中的表达(由实时PCR测定),所述细胞系是在第48次传代分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞,是在小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)、市售的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF-SM)、人真皮成纤维细胞(D551)、人包皮成纤维细胞(Hs27)和人胰腺衍生基质细胞(HP)上培养。

[0028] 图5显示人饲养细胞层对人胚胎干细胞向表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的分化的作用。图中显示CXCR4、Sox-17和FoxA2在人胚胎干细胞系H9的群体中的表达(由实时PCR测定),所述细胞系是在第46次传代分化成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞,是在小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)、市售的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF-SM)、人真皮成纤维细胞(D551)、人包皮成纤维细胞(Hs27)和人胰腺衍生基质细胞(HP)上培养。

[0029] 图6显示人饲养细胞层对表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞的形成的作用。图中显示FoxA2、HNF-4a、HNF-6和PDX-1在人胚胎干细胞系H9的群体中的表达(由实时PCR测定),所述细胞系是在第46次传代分化成表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞,是在小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)、市售的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF-SM)、人真皮成纤维细胞(D551)、人包皮成纤维细胞(Hs27)和人胰腺衍生基质细胞(HP)上培养。

[0030] 图7显示人饲养细胞层对表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞的形成的作用。图中显示FoxA2、HNF-4a、HNF-6、NeuroD1、Nkx 2.2、Pax-4、Nkx 6.1、PDX-1、胰高血糖素(GCG)和胰岛素(INS)在人胚胎干细胞系H9的群体中的表达(由实时PCR测定),所述细胞系是在第46次传代分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞,是在小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)、市售的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF-SM)、人真皮成纤维细胞(D551)、人包皮成纤维细胞(Hs27)和人胰腺衍生基质细胞(HP)上培养。

具体实施方式

[0031] 将本发明的具体实施方式部分分成以下几个分部分,来描述或说明本发明的某些特征、实施例或应用,这是为了使公开内容清楚起见,并非限制本发明。

[0032] 定义

[0033] 干细胞是由它们在单细胞水平上既自我更新又分化产生子代细胞的能力来定义

的未分化细胞,包括自我更新祖细胞、非更新祖细胞和末端分化细胞。干细胞还由它们的以下能力来表征:从多个胚层(内胚层、中胚层和外胚层)体外分化成各种细胞谱系的功能细胞的能力,以及在移植后产生多个胚层的组织的能力和在注射到胚泡后基本上促成大多数的组织(如果不是所有的组织的话)的能力。

[0034] 干细胞按它们的发育潜力分成以下几类:(1)全能(totipotent)干细胞,意思是能够产生所有的胚胎和胚胎外细胞类型;(2)多能(pluripotent)干细胞,意思是能够产生所有的胚胎细胞类型;(3)专能(multipotent)干细胞,意思是能够产生一部分细胞谱系,但都在特定的组织、器官或生理系统当中(例如,造血干细胞(HSC)能产生包括HSC(自我更新)、血细胞局限寡能祖细胞和所有属血液的正常组分的细胞类型和成分(例如血小板));(4)寡能(oligopotent)干细胞,意思是能够产生比专能干细胞更局限的一部分细胞谱系;和(5)单能(unipotent)干细胞,意思是能够产生单一细胞谱系(例如精原干细胞)。

[0035] 分化是未特化的(“未定向的”)或特化不足的细胞获得特化细胞(如神经细胞或肌肉细胞)的特征的过程。分化的或分化诱导的细胞是在细胞的谱系当中具有较为特化的(“定向的”)地位的细胞。术语“定向的”当应用到分化的过程时,指在分化途径中已经进行到这么一种程度的细胞:在正常环境下,它会继续分化成特定的细胞类型或细胞类型子集,且在正常环境下不能分化成另一细胞类型或回复到分化不足的细胞类型。去分化指细胞回复到细胞的谱系当中特化(或定向)不足的地位的过程。本文所用的“细胞的谱系”限定细胞的遗传关系,即它来自哪些细胞和它能产生什么细胞。细胞的谱系将该细胞置于发育和分化的遗传安排(hereditary scheme)当中。谱系特异性标志指与目的谱系的细胞的表型明确相关的特征,可用来评估未定向细胞向目的谱系的分化。

[0036] 有不同的术语用来描述培养中的细胞。“维持”通常指将细胞在有利于细胞生长和/或分裂的条件下置于生长培养基中,这可能或可能不导致产生更大的细胞群体。“传代”指将细胞从一个培养容器移取并将它们在有利于细胞生长和/或分裂的条件下置于第二培养容器中的过程。

[0037] 细胞的特定群体或者说细胞系,有时由它已被传代的次数来指称或表征。例如,已被传代十次的培养细胞群体可称为P10培养物。原代培养物,即从组织分离细胞后的第一培养物,称为P0。在第一亚培养后,将细胞描述为继代培养物(P1或传代1)。在第二亚培养后,细胞变成三代培养物(P2或传代2),依此类推。本领域技术人员会理解,在传代期间可能有多次群体倍增;因此培养物的群体倍增数目大于传代数目。细胞在各次传代之期间的扩增(即群体倍增数目)取决于许多因素,包括但不限于接种密度、基质(substrate)、培养基、生长条件和各次传代之间的时间。

[0038] “β-细胞谱系”指对于转录因子PDX-1和至少一种以下转录因子具有阳性基因表达的细胞:NGN-3、Nkx2.2、Nkx6.1、NeuroD、Isl-1、HNF-3 beta、MAFA、Pax4和Pax6。表达β细胞谱系特征性标志物的细胞包括β细胞。

[0039] 本文所用的“表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞”指表达至少以下标志物之一的细胞:SOX-17、GATA-4、HNF-3 beta、GSC、Cer1、Nodal、FGF8、Brachyury、Mixlike同源盒蛋白、FGF4 CD48、eomesodermin (EOMES)、DKK4、FGF17、GATA-6、CXCR4、C-Kit、CD99或OTX2。表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞包括原条前体细胞、原条细胞、中内胚层细胞和定形内胚层细胞。

[0040] 本文所用的“表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞”指表达至少以下标志物之一的细胞：PDX-1、HNF-1beta、HNF-3beta、PTF-1alpha、HNF-6或HB9。表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞包括胰腺内胚层细胞。

[0041] 本文所用的“表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞”指表达至少以下标志物之一的细胞：NGN-3、NeuroD、Islet-1、PDX-1、NKX6.1、Pax-4、Ngn-3或PTF-1alpha。表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞包括胰腺内分泌细胞、胰腺激素表达细胞和胰腺激素分泌细胞以及 β -细胞谱系的细胞。

[0042] 本文所用的“定形内胚层”指带有在原肠胚形成过程中从上胚层产生的细胞的特性并形成胃肠道及其衍生物(derivative)的细胞。定形内胚层细胞表达以下标志物：CXCR4、HNF-3 beta、GATA-4、SOX-17、Cerberus、OTX2、gooseoid、c-Kit、CD99和Mixl1。

[0043] 本文所用的“胚胎外内胚层”指表达至少一种以下标志物的细胞群体：SOX-7、AFP和SPARC。

[0044] 本文所用的“标志物”是在目的细胞中差异表达的核酸或多肽分子。在这个情形中，差异表达意思是阳性标志物的水平增加，而阴性标志物的水平降低。标志物核酸或多肽的可检测水平，在目的细胞中充分地高于或低于在其他细胞中，使得可使用多种本领域公知的方法中的任何一种将目的细胞与其他细胞鉴别和区分开来。

[0045] 本文所用的术语“中内胚层细胞”指表达至少以下标志物之一的细胞：CD48、eomesodermin (EOMES)、SOX-17、DKK4、HNF-3 beta、GSC、FGF17、GATA-6。

[0046] 本文所用的“胰腺内分泌细胞”或“胰腺激素表达细胞”指能够表达至少一种以下激素的细胞：胰岛素、胰高血糖素、促生长素抑制素、胰多肽和生长素释放肽。

[0047] 本文所用的“胰腺激素分泌细胞”指能够分泌至少一种以下激素的细胞：胰岛素、胰高血糖素、促生长素抑制素和胰多肽。

[0048] 本文所用的“前原条细胞”指表达至少一种以下标志物的细胞：Nodal 或FGF8。

[0049] 本文所用的“原条细胞”指表达至少一种以下标志物的细胞：Brachyury、Mix-like同源盒蛋白或FGF4。

[0050] 本发明涉及多能干细胞分化的领域。本发明提供在人饲养细胞层上增殖多能干细胞的方法。本发明还提供在人饲养细胞层上分化多能干细胞的方法。具体地讲，本发明提供用人饲养细胞层将多能干细胞分化成胰腺内分泌细胞的改进方法。

[0051] 在一个实施例中，本发明提供分化多能干细胞的方法，所述方法包括以下步骤：

[0052] a. 培养多能干细胞，

[0053] b. 将多能干细胞接种到人饲养细胞层上，和

[0054] c. 用至少一种能促进多能干细胞的分化的因子处理多能干细胞。

[0055] 本发明的方法提供分化多能干细胞的改进方法，其中在分化多能干细胞之前将多能干细胞接种到人饲养细胞层上。可通过本领域的任何合适方法培养多能干细胞。同样，可通过本领域的任何合适方法将多能干细胞接种到人饲养细胞层上。可在接种到人饲养细胞层之后，立即用至少一种能促进多能干细胞的分化的因子处理多能干细胞。或者，可在多能干细胞已在人饲养细胞层的存在下培养一段时间后，用至少一种能促进多能干细胞的分化的因子处理多能干细胞。例如，可将多能干细胞在人饲养细胞层的存在下培养一段足以让多能干细胞形成单层的时间。

[0056] 多能干细胞可以以任何密度接种到人饲养细胞层上。但是,最佳密度可取决于诸如以下的因素:所用的多能干细胞、构成人饲养细胞层的细胞、分化的细胞类型、培养容器的大小等。在一个实例中,将多能干细胞以能使得多能干细胞在人饲养细胞层上培养5天后达到约60%至约80%铺满的密度进行接种。

[0057] 适用于本发明的多能干细胞包括例如人胚胎干细胞系H9 (NIH编码:WA09)、人胚胎干细胞系H1 (NIH编码:WA01)、人胚胎干细胞系H7 (NIH编码:WA07) 和人胚胎干细胞系SA002 (Cellartis,瑞典)。能表达至少一种以下多能细胞特有标志物的细胞也适用于本发明:ABCG2、cripto、CD9、FoxD3、连接蛋白43、连接蛋白45、Oct4、Sox2、Nanog、hTERT、UTF-1、ZFP42、SSEA-3、SSEA-4、Tra1-60、Tra1-81。

[0058] 构成人饲养细胞层的细胞可以是任何能够促进多能干细胞的分化的人细胞。构成人饲养细胞层的细胞可以是成人细胞。或者,构成人饲养细胞层的细胞可以是胎儿细胞或胚胎细胞。在一个实施例中,人饲养细胞层由成纤维细胞构成。在一个实施例中,成纤维细胞是真皮成纤维细胞。真皮成纤维细胞可以是人真皮成纤维细胞系Detroit 551 (CCL-110 ATCC)。在另一个实施例中,成纤维细胞是包皮成纤维细胞。人包皮成纤维细胞可以是人包皮成纤维细胞系Hs27 (CRL-1634 ATCC)。

[0059] 或者,人饲养细胞层由胰腺衍生基质细胞构成。在一个实施例中,胰腺衍生基质细胞是US20040241761中公开的细胞。在另一个实施例中,胰腺衍生基质细胞是Science 306:2261-2264,2004中公开的细胞。在另一个实施例中,胰腺衍生基质细胞是Nature Biotechnology 22:1115-1124,2004中公开的细胞。在另一个实施例中,胰腺衍生基质细胞是US20030082155中公开的细胞。在另一个实施例中,胰腺衍生基质细胞是US5834308中公开的细胞。在另一个实施例中,胰腺衍生基质细胞是Proc Nat Acad Sci 97:7999-8004,2000中公开的细胞。在另一个实施例中,胰腺衍生基质细胞是W02004011621中公开的细胞。在另一个实施例中,胰腺衍生基质细胞是W003102134中公开的细胞。在另一个实施例中,胰腺衍生基质细胞是US2004015805中公开的细胞。在另一个实施例中,胰腺衍生基质细胞是US6458593中公开的细胞。在另一个实施例中,胰腺衍生基质细胞是W02006094286中公开的细胞。在另一个实施例中,胰腺衍生基质细胞属已被分配ATCC No.PTA-6974的H5f3P6细胞系。

[0060] 饲养细胞层的产生

[0061] 本申请中描述的人饲养细胞层可用于分化多能干细胞。认识到,其他类型的细胞也可得益于在这些饲养细胞层上进行分化,因此本发明的组合物可无限制地用于这些目的。

[0062] 在本发明的一个方面,通过基本上涉及以下步骤的方法产生饲养细胞层:

[0063] a. 培养会形成饲养细胞层的细胞,和

[0064] b. 使所述细胞失活。

[0065] 可在合适的培养基质上培养会形成饲养细胞层的细胞。在一个实施例中,合适的培养基质是胞外基质成分,例如源自基膜的成分,或者可形成黏着分子受体-配体偶联物的一部分的成分。在一个实施例中,合适的培养基质是**MATRIGEL[®]** (Becton Dickenson)。**MATRIGEL[®]**是得自Engelbreth-Holm-Swarm肿瘤细胞的可溶性制品,其在室温下胶凝而形成重构的基膜。在另一个实施例中,合适的培养基质是明胶 (Sigma)。

[0066] 其他的胞外基质组分和组分混合物适合作为替代物。取决于所扩增的细胞类型，这可包括单独的层粘连蛋白、纤连蛋白、蛋白聚糖、巢蛋白、硫酸乙酰肝素等或者它们的各种组合。

[0067] 用来形成喂养细胞层的细胞可通过例如辐射、用化学失活剂(如丝裂霉素c)处理或者通过任何其他有效方法来失活(也就是使其不能够大量复制)。

[0068] 用来培养用于形成喂养细胞层的细胞的培养基可具有几种不同配方中的任一种。培养基必须能够支持至少用于形成喂养细胞层的细胞系的增殖。便利的是，培养基还能支持多能干细胞的增殖。但是，作为另选方案，培养基可补充有其他的因子或者另作加工以使其适应于增殖多能干细胞。

[0069] 在一个实施例中，胰腺衍生基质细胞是W02006094286中公开的细胞。

[0070] 胰腺衍生细胞的分离：在本发明的一个方面，通过多阶段方法分离胰腺细胞，所述方法基本上涉及：

[0071] a. 用酶溶液灌注死胰腺、活供体或自体同源胰腺，

[0072] b. 机械解离经灌注的胰腺，

[0073] c. 将经消化的组织层加(layer)在聚蔗糖或Ficoll梯度上，然后离心产生三个明显的界面，

[0074] d. 移取每个界面处的组织和细胞，

[0075] e. 将组织和细胞在标准的组织培养板中在含有小于5%血清的富营养物选择培养基中进行培养，

[0076] f. 让培养物保持不受干扰约2-4周，不进行任何培养基更换。

[0077] 死胰腺的灌注可用本领域技术人员公知的酶溶液中的任何一种来实现。适用于本发明的酶溶液的一个实例含有LIBERASE HI™(Roche-0.5 mg/ml)和DNA酶I(0.2mg/ml)。

[0078] 可用组织处理器快速进行胰腺组织的机械解离。或者，可用Ricordi室(Ricordi Chamber)或与其他方法相比能使得组织进行破坏性较低的分解的其他等效装置来进行胰腺组织的机械解离。

[0079] 然后使经消化的胰腺组织进行聚蔗糖或Ficoll梯度离心以产生三个明显的界面，所述三个界面分别富集来自胰岛、腺管组织(ductal tissue)和腺泡组织的细胞。在一个实施例中，从每个界面移取组织和细胞，分别进行培养。在另一个实施例中，将来自所有界面的组织和细胞合并和进行培养。根据本发明已确知胰腺基质细胞可源自这三个界面的任何一个。或者，可采用连续梯度并选出特选的细胞群体，以产生胰腺基质细胞。

[0080] 根据本发明，将从一个或多个界面收集的组织和细胞在选择培养基中进行培养，以选择性富集细胞群体中的基质细胞。选择培养基富含营养物和含有低水平的葡萄糖和血清。一般来讲，选择培养基含有小于5%血清，或者1-3%血清，或者约2%血清；和小于30mM葡萄糖。在一个实施例中，选择培养基补充有源自与收获供体胰腺的哺乳动物相同物种的2%血清。或者，可使用胎牛或小牛血清、来自其他物种的血清、或者其他血清补充物或替代物来选择培养基进行补充。合适的选择培养基的一个实例由以下成分组成：DMEM(5mM葡萄糖)、2%胎牛血清(FBS)、100U/μg青霉素/链霉素、胰岛素-转铁蛋白-硒(ITS)、2mM L-谷氨酰胺、0.0165mM ZnSO₄和 0.38μM 2-巯基乙醇。

[0081] 在选择培养基中培养过程中(“选择期”)，细胞可在低氧或常氧条件下进行培养。

在低氧条件下,氧水平低于20%,或者低于10%,或者低于 5%,但超过1%。

[0082] 优选地,应让培养物保持在选择培养基中不受干扰约2-4周,不进行任何培养基更换,到时间时细胞通常已贴附到所用的培养基质。当贴附细胞的数目不再增加时,认为选择期完成。

[0083] 已发现根据本发明的组织收获和培养方法能导致产生富集胰腺基质细胞的细胞群体。所谓“富集”是指胰腺基质细胞占群体中所有细胞的至少约 30%,或者约40%,或者约50%。

[0084] 或者,将从一个或多个界面收集的组织和细胞在选择培养基中进行培养,以选择性富集细胞群体中的基质细胞。选择培养基富含营养物和含有低水平的葡萄糖。一般来讲,选择培养基含有小于20%血清,或者10至5%血清,或者约10%血清;和小于30mM葡萄糖。在一个实施例中,选择培养基补充有源自与收获供体胰腺的哺乳动物相同物种的10%血清。或者,可使用胎牛或小牛血清、来自其他物种的血清、或者其他血清补充物或替代物来对选择培养基进行补充。合适的选择培养基的一个实例由以下成分组成: DMEM (5mM葡萄糖)、10%胎牛血清 (FBS)、100U/ μ g青霉素/链霉素。

[0085] 在选择培养基中培养过程中(“选择期”),细胞可在低氧或常氧条件下进行培养。低氧条件下,氧水平低于20%,或者低于10%,或者低于 5%,但超过1%。

[0086] 在这些培养条件下,每隔2-4天定期更换培养基。

[0087] 已发现根据本发明的组织收获和培养方法能导致产生富集胰腺基质细胞的细胞群体。所谓“富集”是指胰腺基质细胞占群体中所有细胞的至少约 30%,或者约40%,或者约50%。

[0088] 在初期的选择和细胞贴附后,将细胞(富集基质细胞)在下文进一步描述的条件下进行扩增。

[0089] 如果需要,可将富集基质细胞的细胞群体暴露于例如能特异性识别基质细胞所表达的蛋白质标志的物质(如抗体),以鉴定和选择胰腺基质细胞,从而获得基本上纯的胰腺基质细胞群体。

[0090] 分离的胰腺基质细胞的表征:评估蛋白质标志物和核酸标志物在培养的或分离的细胞中的表达的方法是本领域的标准方法。这些方法包括定量反转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)、RNA印迹法、杂交法(参见例如Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人编辑,2001增补版)) and 免疫测定法(如对切片材料的免疫组织化学分析)、蛋白质印迹法,对于在完整细胞中可接近的标志物而言有流式细胞术分析(FACS)(参见例如 Harlow和 Lane,Using Antibodies:A Laboratory Manual,New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press(1998))。

[0091] 按照本发明分离的胰腺基质细胞主要表征为基本上缺乏至少一种以下蛋白质标志物:CD117,NCAM,ABCG2,细胞角蛋白7、8、18或19。在某些具体的实施例中,按照本发明分离的胰腺基质细胞表征为对至少一种以下蛋白质标志物基本上阳性:CD44、CD73、CD90和CD105。

[0092] 胰腺基质细胞的扩增:在又一方面,本发明提供扩增按照本发明获得的胰腺基质细胞的方法。如上所述,将含有胰岛、胰管片断和外分泌组织的非均质混合物的胰腺消化物在低血清选择培养基中培养2-4周,优选不进行任何培养基更换,以选择性富集所需的基质

细胞。然后将所得的细胞群体（现富集了胰腺基质细胞）转到生长培养基，以扩增细胞群体中的胰腺基质细胞。

[0093] 适用于本发明的生长培养基可由培养基如含有青霉素/链霉素(P/S)的DMEM和浓度在2%至20%、优选约5至10%的血清组成。在一个实施例中，生长培养基由DMEM(1000mg/L D-葡萄糖;862mg/L谷氨酰胺)和10%胎牛血清组成。在另一个实施例中，选择培养基补充有源自与收获供体胰腺的哺乳动物相同物种的血清。或者，可使用胎牛或小牛血清、或者其他血清补充物或替代物(例如血清白蛋白)来对生长培养基进行补充有。

[0094] 此外，可通过在含有能刺激本发明细胞的增殖的物质的确定成分生长培养基中进行培养，来扩增基质细胞。这些因子可包括例如烟酰胺、TGF- β 家族的成员(包括TGF- β 1、2和3)、骨形态发生蛋白(BMP-2、-4、6、-7、-11、-12和-13)、血清白蛋白、成纤维细胞生长因子家族、血小板衍生生长因子-AA和-BB、富含血小板的血浆、胰岛素生长因子(IGF-I、II)、生长分化因子(GDF-5、-6、-8、-10、11)、胰高血糖素样肽I和II(GLP-I和II)、GLP-1和GLP-2模拟抗体(mimetobody)、毒蜥外泌肽-4、视黄酸、甲状旁腺激素、胰岛素、孕酮、抑蛋白酶肽(aprotinin)、氢化可的松、乙醇胺、 β -巯基乙醇、表皮生长因子(EGF)、胃泌素I和II、铜螯合剂如三乙烯五胺、TGF- α 、毛喉素、丁酸钠、激活蛋白、 β 细胞素、胰岛素/转铁蛋白/硒(ITS)、肝细胞生长因子(HGF)、角质形成细胞生长因子(KGF)、牛垂体提取物、胰岛新生相关蛋白(INGAP)、蛋白酶体抑制剂、notch途径抑制剂、sonic hedgehog抑制剂或者它们的组合。或者，可将基质细胞在调理培养基中进行培养来扩增。所谓“调理培养基”是指一群细胞生长在基本的确定成分细胞培养基中，给该培养基赋予可溶性因子。在一个这种应用中，将细胞从培养基移除，而细胞所产生的可溶性因子保留。这个培养基然后用来培育另一群细胞。

[0095] 在某些实施例中，将胰腺基质细胞在标准的组织培养板上进行培养。或者，可用胞外基质蛋白包被培养板，所述胞外基质蛋白例如MATRIGEL[®]、生长因子减低的MATRIGEL[®]、层粘连蛋白、胶原、明胶、生腱蛋白、纤连蛋白、玻连蛋白、血小板反应蛋白、胎盘提取物或者它们的组合。

[0096] 此外，胰腺基质细胞可在低氧或常氧条件下进行体外扩增。

[0097] 多能干细胞的分化

[0098] 在本发明的一个实施例中，将多能干细胞在培养中进行扩增，同时保持它们的多能性。然后将多能干细胞转移到人饲养细胞层上以随后进行分化。可通过检测与多能性相关的标志物的表达水平的变化，来确定细胞的多能性随时间的变化。或者，可通过检测与分化相关的标志物或者与别的细胞类型相关的标志物的表达水平的变化，来监测多能性的变化。

[0099] 将多能细胞用至少一种能促进它们分化成别的细胞类型的因子进行处理。别的细胞类型可以是表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞。或者，细胞类型可以是表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞。或者，细胞类型可以是表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。或者，细胞类型可以是表达 β -细胞谱系特征性标志物的细胞。

[0100] 可通过本领域任何合适的方法，使按照本发明方法处理的多能干细胞分化成多种别的细胞类型。例如，可使按照本发明方法处理的多能干细胞分化成神经细胞、心脏细胞、肝细胞等。

[0101] 例如，可按照W02007030870中公开的方法，使按照本发明方法处理的多能干细胞

分化成神经祖细胞和心肌细胞。

[0102] 在另一个实例中,可按照美国专利6,458,589中公开的方法,使按照本发明方法处理的多能干细胞分化成肝细胞。

[0103] 多能干细胞向表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞的分化

[0104] 在本发明的一个方面,通过多阶段方法从多能干细胞形成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞,所述方法包括以下步骤:

[0105] a. 培养多能干细胞,

[0106] b. 将多能细胞接种在人饲养细胞层上,

[0107] c. 使多能干细胞分化成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞,

[0108] d. 使表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化成表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞,

[0109] e. 使表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。

[0110] 定形内胚层谱系特征性标志物选自SOX-17、GATA4、Hnf-3beta、GSC、Cer1、Noda1、FGF8、Brachyury、Mix-like同源盒蛋白、FGF4CD48、eomesodermin (EOMES)、DKK4、FGF17、GATA6、CXCR4、C-Kit、CD99和 OTX2。适用于本发明的是表达至少一种定形内胚层谱系特征性标志物的细胞。在本发明的一个方面,表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞是原条前体细胞。在另一方面,表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞是中内胚层细胞。在另一方面,表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞是定形内胚层细胞。

[0111] 胰腺内胚层谱系特征性标志物选自Pdx1、HNF-1beta、PTF1a、HNF-6、HB9和PROX1。适用于本发明的是能表达至少一种胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞。在本发明的一个方面,表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞是胰腺内胚层细胞。

[0112] 胰腺内分泌谱系的特有标志物选自NGN-3、NeuroD、Islet-1、Pdx-1、NKX6.1、Pax-4、Ngn-3和PTF-1alpha。在一个实施例中,胰腺内分泌细胞能够表达以下激素中的至少一种:胰岛素、胰高血糖素、促生长素抑制素和胰多肽。适用于本发明的是表达至少一种胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。在本发明的一个方面,表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞是胰腺内分泌细胞。胰腺内分泌细胞可以是胰腺激素表达细胞。或者,胰腺内分泌细胞可以是胰腺激素分泌细胞。

[0113] 在本发明的一个方面,胰腺内分泌细胞是表达 β 细胞谱系特征性标志物的细胞。表达 β 细胞谱系特征性标志物的细胞能表达Pdx1和至少一种以下转录因子:NGN-3、Nkx2.2、Nkx6.1、NeuroD、Isl-1、HNF-3beta、MAFA、Pax4和Pax6。在本发明的一个方面,表达 β 细胞谱系特征性标志物的细胞是 β 细胞。

[0114] 例如,可根据D' Amour等人,Nature Biotechnology 24,1392-1401 (2006)中公开的方法,使多能干细胞分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。

[0115] 表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的形成:可通过本领域的任何方法或通过本发明提出的任何方法,使多能干细胞分化成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞。

[0116] 例如,可根据D' Amour等人,Nature Biotechnology 23,1534-1541 (2005)中公开的方法,使多能干细胞可分化成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞。

[0117] 例如,可根据Shinozaki等人,Development 131,1651-1662 (2004)中公开的方法,使多能干细胞可分化成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞。

[0118] 例如,可根据McLean等人,Stem Cells 25,29-38 (2007)中公开的方法,使多能干细胞可分化成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞。

[0119] 例如,可根据D' Amour等人,Nature Biotechnology 24,1392-1401 (2006)中公开的方法,使多能干细胞可分化成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞。

[0120] 例如,可通过将多能干细胞在含有激活蛋白A的培养基中在血清不存在下进行培养,然后将所述细胞与激活蛋白A和血清一起培养,再然后将所述细胞与激活蛋白A和另一浓度的血清一起培养,使多能干细胞分化成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞。这个方法的一个实例在Nature Biotechnology 23,1534-1541 (2005)中公开。

[0121] 例如,可通过将多能干细胞在含有激活蛋白A的培养基中在血清不存在下进行培养,然后将所述细胞与激活蛋白A和另一浓度的血清一起培养,使多能干细胞分化成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞。这个方法的一个实例在D' Amour等人,Nature Biotechnology,2005中公开。

[0122] 例如,可通过将多能干细胞在含有激活蛋白A和Wnt配体的培养基中在血清不存在下进行培养,然后移除Wnt配体并将所述细胞与激活蛋白A和血清一起培养,使多能干细胞分化成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞。这个方法的一个实例在Nature Biotechnology 24,1392-1401 (2006)中公开。

[0123] 表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞的形成:可通过本领域的任何方法或通过本发明提出的任何方法,使表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化成表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞。

[0124] 例如,可根据D' Amour等人,Nature Biotechnology 24,1392-1401 (2006)中公开的方法,使表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞分化成表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞。

[0125] 可通过用成纤维细胞生长因子和hedgehog信号转导途径抑制剂KAAD-环巴胺处理表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞,然后移除含有纤维细胞生长因子和KAAD-环巴胺的培养基,并随后将所述细胞在含有视黄酸、成纤维细胞生长因子和KAAD-环巴胺的培养基中进行培养,来使表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞进一步分化成表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞。这个方法的一个实例在Nature Biotechnology 24,1392-1401 (2006)中公开。

[0126] 表达胰腺内分泌谱系的标志物的细胞的形成:可通过本领域的任何方法或通过本发明公开的任何方法,使表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。

[0127] 例如,可根据D' Amour等人,Nature Biotechnology 24,1392-1401 (2006)中公开的方法,使表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。

[0128] 例如,可通过将表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞在含有DAPT 和毒蜥外泌肽-4的培养基中进行培养,然后移除含有DAPT和毒蜥外泌肽-4 的培养基,并随后将所述细胞在含有毒蜥外泌肽1、IGF-1和HGF的培养基中进行培养,来使表达胰腺内胚层谱系特征

性标志物的细胞进一步分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。这个方法的一个实例在Nature Biotechnology 24,1392-1401 (2006)中公开。

[0129] 例如,可通过将表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞在含有毒蜥外泌肽4的培养基中进行培养,然后移除含有毒蜥外泌肽4的培养基,并随后将所述细胞在含有毒蜥外泌肽4、IGF-1和HGF的培养基中进行培养,来使表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞进一步分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。这个方法的一个实例在D' Amour等人,Nature Biotechnology,2006中公开。

[0130] 例如,可通过将表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞在含有DAPT 和毒蜥外泌肽4的培养基中进行培养,来使表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞进一步分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。这个方法的一个实例在D' Amour等人,Nature Biotechnology,2006中公开。

[0131] 例如,可通过将表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞在含有毒蜥外泌肽4的培养基中进行培养,来使表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞进一步分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞。这个方法的一个实例在D' Amour等人,Nature Biotechnology,2006中公开

[0132] 多能干细胞的分离、扩增和培养

[0133] 多能干细胞的表征

[0134] 多能干细胞可表达阶段特异性胚胎抗原 (SSEA) 3和4以及可用称为 Tra-1-60和Tra-1-81的抗体检测的标志物中的一种或多种(Thomson等人,Science 282:1145,1998)。多能干细胞体外分化导致丧失SSEA-4、Tra-1-60和Tra-1-81的表达(如果存在的话),并增加SSEA-1的表达。未分化的多能干细胞通常具有碱性磷酸酶活性,该酶可通过用4%多聚甲醛固定细胞,然后用Vector Red作为底物显影来检测,如生产商所描述的(Vector Laboratories,Burlingame Calif)。未分化的多能干细胞还通常表达Oct-4和TERT,这可通过实时PCR检测。

[0135] 增殖的多能干细胞的另一理想表型是分化成所有三个胚层即内胚层、中胚层和外胚层组织的细胞的潜能。多能干细胞的多能性可例如通过这样来证实:将细胞注射进重症联合免疫缺陷(SCID)小鼠中,用固定剂例如4%多聚甲醛固定所形成的畸胎瘤,然后对它们进行组织学检验以确定是否存在来自三个胚层的细胞类型。作为另一种选择,多能性可通过这样来确定:产生胚状体并评价该胚状体是否存在与三个胚层相关的标志物。

[0136] 增殖的多能干细胞系可以用标准G-显带技术进行核型分析与所公开的相应灵长类物种的核型相比较。理想的是获得具有“正常核型”的细胞,“正常核型”的细胞意指该细胞是整倍体,其中所有人染色体都存在并且没有显著改变。

[0137] 多能干细胞的来源

[0138] 多能干细胞选自人胚胎干细胞系H1、H7和H9(WiCell)以及突变型人胚胎干细胞系BG01v(BresaGen,Athens,GA)。

[0139] 多能干细胞的培养

[0140] 在一个实施例中,通常在饲养细胞层上培养多能干细胞,饲养细胞可以多种方式支持多能干细胞。或者,在培养系统中培养多能干细胞,所述培养系统基本上不含饲养细胞,但同样支持多能干细胞的增殖而不会进行显著的分化。使用通过此前培养另一细胞类

型而调理过的培养基来支持多能干细胞在无饲养细胞的培养物中生长而不分化。作为另一种选择,用化学成分确定的培养基来支持多能干细胞在无饲养细胞的培养物中生长而不分化。

[0141] 例如,Reubinoff等人(Nature Biotechnology 18:399-404(2000))和Thompson等人(Science,1998年11月6日:第282卷,no.5391,第1145-1147页)公开了用小鼠胚胎成纤维细胞饲养细胞层来培养来自人胚泡的多能干细胞系。

[0142] Richards等人(Stem Cells 21:546-556,2003)对一组11个不同的成人、胎儿和新生儿饲养细胞层支持人多能干细胞培养的能力进行了评价。Richards等人声称:“在成人皮肤成纤维细胞饲养层上培养的人胚胎干细胞系保持了人胚胎干细胞形态并保持了多能性”。

[0143] US20020072117公开了可产生支持灵长类多能干细胞在无饲养细胞的培养物中生长的培养基的细胞系。所采用的细胞系是从胚胎组织获得或从胚胎干细胞分化而来的间质细胞系和成纤维细胞样细胞系。US20020072117还公开了所述细胞系作为原代饲养细胞层的用途。

[0144] 又如,Wang等人(Stem Cells 23:1221-1227,2005)公开了用于人多能干细胞在衍生自人胚胎干细胞的饲养细胞层上长期生长的方法。

[0145] 又如,Stojkovic等人(Stem Cells 2005 23:306-314,2005)公开了一种衍生自人胚胎干细胞的自发分化的饲养细胞系统。

[0146] 在另一实例中,Miyamoto等人(Stem Cells 22:433-440,2004)公开了从人胎盘获得的饲养细胞的来源。

[0147] Amit等人(Biol.Reprod 68:2150-2156,2003)公开了衍生自人包皮的饲养细胞层。

[0148] 又如,Inzunza等人(Stem Cells 23:544-549,2005)公开了来自人出生后包皮成纤维细胞的饲养细胞层。

[0149] US6642048公开了可支持灵长类多能干(pPS)细胞在无饲养细胞的培养物中生长的培养基以及可用于产生这种培养基的细胞系。US6642048声称:“本发明包括从胚胎组织获得或从胚胎干细胞分化而来的间质细胞系和成纤维细胞样细胞系。在本公开中描述并阐明了用于衍生这种细胞系、处理培养基以及用该调理培养基培育干细胞的方法”。

[0150] 又如,W02005014799公开了一种用于哺乳动物细胞的维持、增殖和分化的调理培养基。W02005014799声称:“通过鼠细胞(特别是分化并永生化的转基因肝细胞,称为MMH(Met鼠肝细胞))的细胞分泌活性对根据本发明制备的培养基进行调理”。

[0151] 又如,Xu等人(Stem Cells 22:972-980,2004)公开了一种从人胚胎干细胞衍生物获得的调理培养基,所述干细胞衍生物已经过遗传修饰而过表达人端粒酶逆转录酶。

[0152] 又如,US20070010011公开了一种用于维持多能干细胞的化学成分确定的培养基。

[0153] 一种可供选择的培养系统采用补充有能促进胚胎干细胞增殖的生长因子的无血清培养基。例如,Cheon等人(BioReprod DOI:10.1095/biolreprod.105.046870,2005年10月19日)公开了一种无饲养细胞的无血清培养系统,其中胚胎干细胞维持在补充有能引发胚胎干细胞自我更新的不同生长因子的未经调理的血清替代(SR)培养基中。

[0154] 又如,Levenstein等人(Stem Cells 24:568-574,2006)公开了使用补充有bFGF的

培养基,在不存在成纤维细胞或调理培养基的情况下长期培养人胚胎干细胞的方法。

[0155] 又如,US20050148070公开了一种在无血清且无成纤维细胞饲养细胞的成分确定的培养基中培养人胚胎干细胞的方法,该方法包括:在含有白蛋白、氨基酸、维生素、矿物质、至少一种转铁蛋白或转铁蛋白替代品、至少一种胰岛素或胰岛素替代品的培养基中培养干细胞,该培养基基本上无哺乳动物胎儿血清且含有至少约100ng/ml能激活成纤维细胞生长因子信号转导受体的成纤维细胞生长因子,其中该生长因子的供给来源不是仅为成纤维细胞饲养层,该培养基支持干细胞在无饲养细胞或调理培养基的情况下以未分化状态增殖。

[0156] 又如,US20050233446公开了一种可用于培养干细胞的成分确定的培养基,所述干细胞包括未分化的灵长类原始干细胞。在溶液中,该培养基与被培养的干细胞基本上等渗。在给定的培养物中,特定的培养基包含基础培养基和各为一定量的bFGF、胰岛素和抗坏血酸,所述bFGF、胰岛素和抗坏血酸为支持原始干细胞进行基本上非分化性生长所必需。

[0157] 又如,US6800480声称“在一个实施例中,提供了用于培养处于基本上未分化状态的衍生自灵长类的原始干细胞的细胞培养基,其包括可有效支持衍生自灵长类的原始干细胞生长的低渗透压、低内毒素的基础培养基。该基础培养基与可有效支持衍生自灵长类的原始干细胞生长的营养血清和选自饲养细胞和衍生自饲养细胞的胞外基质组分的基质物质相混合。该培养基还包括非必需氨基酸、抗氧化剂和选自核苷和丙酮酸盐的第一生长因子”。

[0158] 又如,US20050244962声称:“在一个方面,本发明提供了培养灵长类胚胎干细胞的方法。可在基本上无哺乳动物胎儿血清(优选还基本上无任何动物血清)的培养物中且在存在成纤维细胞生长因子的情况下培养所述干细胞,该成纤维细胞生长因子的供给来源不是仅为成纤维细胞饲养层。在优选的形式中,通过添加足量的成纤维细胞生长因子,使得之前为维持干细胞培养物所需的成纤维细胞饲养层变得非必需”。

[0159] 在又一个实例中,W02005065354公开了一种基本上无饲养细胞和无血清的成分确定的等渗培养基,包含:a.基础培养基;b.bFGF,其量足以支持基本上未分化的哺乳动物干细胞生长;c.胰岛素,其量足以支持基本上未分化的哺乳动物干细胞生长;和d.抗坏血酸,其量足以支持基本上未分化的哺乳动物干细胞生长。

[0160] 又如,W02005086845公开了一种维持未分化的干细胞的方法,所述方法包括使干细胞暴露于转化生长因子- β (TGF β) 蛋白家族的成员、成纤维细胞生长因子(FGF)蛋白家族的成员或烟酰胺(NIC),所述成员或烟酰胺的量足以维持细胞处于未分化状态达足以实现所需结果的一段时间。

[0161] 可将多能干细胞接种至合适的培养基质上。在一个实施例中,合适的培养基质是胞外基质成分,例如源自基膜的成分,或者可形成黏着分子受体-配体偶联物的一部分的成分。在一个实施例中,合适的培养基质是**MATRIGEL[®]** (Becton Dickenson)。**MATRIGEL[®]**是来自Engelbreth-Holm-Swarm肿瘤细胞的可溶性制品,其在室温下胶凝而形成重构的基底膜。

[0162] 其他胞外基质组分和组分混合物适合作为替代物。取决于所扩增的细胞类型,这可包括单独的层粘连蛋白、纤连蛋白、蛋白聚糖、巢蛋白、硫酸乙酰肝素等或者它们的各种组合。

[0163] 可在存在促进细胞存活、增殖和保持理想特性的培养基存在的情况下,以合适的分布将多能干细胞接种于所述基质上。所有这些特性可得益于对接种分布的认真考虑并可容易地由本领域技术人员确定。

[0164] 合适的培养基可用如下组分制备,例如达尔伯克氏改良伊格尔培养基(DMEM), Gibco # 11965-092; Knockout达尔伯克氏改良伊格尔培养基(KO DMEM), Gibco # 10829-018; Ham's F12/50%DMEM基础培养基; 200mM L- 谷氨酰胺, Gibco # 15039-027; 非必需氨基酸溶液, Gibco 11140-050; β -巯基乙醇, Sigma # M7522; 人重组碱性成纤维细胞生长因子(bFGF), Gibco # 13256-029。

[0165] 本发明进一步通过如下实例举例说明,但不受限于如下实例。

[0166] 实例

[0167] 实例1

[0168] 人胰腺细胞系的建立

[0169] 胰腺制备-在取得有关用于研究用途的适当同意后,从全国疾病研究交流中心(The National Disease Research Interchange, Philadelphia, PA)获得不适于临床移植的人胰腺。用器官保存液将胰腺转移至冰上的不锈钢盘中,并修剪掉所有的外部组织。用18号导管插入胰管中,并用酶溶液注入胰腺中,该酶溶液含有溶解于杜伯科氏磷酸缓冲盐水(DPBS)中的 LIBERASE HI™酶(Roche-0.5mg/ml)和DNA酶I(0.2mg/ml)。

[0170] 快速机械解离后进行酶消化-将酶灌注的胰腺在组织处理器中匀化,脉冲3-5次,每次脉冲3-5秒,并将解离的组织转移至两个装有磁力搅拌棒的500ml胰酶培养瓶(Bellco)中。然后,将50-100ml所述酶溶液加至每个培养瓶中。将培养瓶在37°C水浴中置于可沉入水中的搅拌板上,并让其以中等搅拌速率温育10分钟。停止搅拌,将细小的经消化组织从培养瓶移出并转移进4°C的装有DPBS、5%胎牛血清(FBS)和0.1mg/ml DNA酶I(DPBS+)的250ml管中,以猝灭该消化过程。给培养瓶补充50-100ml该酶溶液并返回水浴中,再搅拌十分钟。再次,移出培养瓶,收集细小的消化物并转移至冰上的250ml管中。再重复该过程3-5次,直至胰腺完全消化。

[0171] 逐步机械解离,同时进行酶消化-根据Diabetes 37:413-420(1988)中所述的方法对酶灌注的胰腺进行处理。简而言之,清除胰腺的外部组织并注入如上所述的酶溶液。然后将胰腺置于具有小珠的Ricordi室中,并用目尺寸为400-600 μ m的筛网覆盖以保留较大的组织簇。覆盖该室并在大约37°C下使酶溶液循环通过该室,并且摇动该室以让小珠使胰腺组织破裂,同时酶对胰腺进行消化。一旦实现足够的解离和消化,则终止消化并收集组织。

[0172] 组织分离-将收集的组织在4°C下以150 \times g离心5分钟。吸出上清液并在DPBS+中额外洗涤组织两次。最后一次洗涤后,将组织施加到不连续的梯度以进行纯化。将消化的组织悬浮于密度为1.108g/ml的聚蔗糖(Mediatech, VA)中,比率为每10ml聚蔗糖溶液对1-2ml组织粒料。然后将组织悬浮液转移至圆底聚碳酸酯离心管中,并将密度为1.096和1.037的聚蔗糖溶液小心地施加至该管内。最后施加一层DMEM,完成该不连续的纯化梯度。将该梯度管在4°C下以2000rpm离心20分钟,不要进行制动。离心后,从每个界面(三个界面)收集组织,并如上所述在DPBS+中洗涤数次,并收集于50ml试管中。

[0173] 进一步的细胞簇解离-可任选地,可用上述规程将所获得的大的细胞簇进一步解离成较小的簇或单细胞悬浮液。最后一次洗涤后,将来自每个级分的组织悬浮于10ml含有

200U/ml DNA酶I的1X胰蛋白酶/EDTA溶液中。将所述管置于水浴中并用10ml血清学吸管反复吸入和排出5-6分钟,直至实现接近单细胞悬浮。加入4℃DPBS+对消化进行猝灭,并以800rpm将管离心5分钟。用DPBS+洗涤细胞悬浮液并如下所述进行培养。

[0174] 胰腺细胞培养-最后一次洗涤后,将来自每个界面的细胞再悬浮于DMEM、2%FBS、100U/ μ g青霉素/链霉素、ITS、2mM L-谷氨酰胺、0.0165mM ZnSO₄(Sigma)和0.38 μ M 2-巯基乙醇(Invitrogen,CA)(下文称为“选择培养基”)中。将6ml细胞悬浮液接种于T-25组织培养瓶中,将12ml细胞悬浮液接种于T-75培养瓶中。将培养瓶置于具有5%CO₂的37℃培养箱中。培养2-4周后,进行一次完全的培养基更换,将粘附的细胞返回具有5%FBS(HyClone,UT)、1%P/S、0.0165mM ZnSO₄的DMEM(2750mg/L D-葡萄糖、862mg/L谷氨酰胺)(Gibco,CA)(下文称为“生长培养基”)中培养,并让其达到接近铺满(该阶段称为“第0代”或“P0”),在该时间点将它们进行传代。随后在生长培养基中以5000个细胞/cm²培养细胞。每7-10天在大约70-90%铺满时将培养物进行传代。据证实,在梯度纯化后所得的三个级分的每一者均分离得到了基质细胞。

[0175] 实例2

[0176] 胰腺基质细胞的培养

[0177] 将根据实例1分离的胰腺细胞在选择培养基中,在低氧条件(5%CO₂、3%O₂和92%N₂)下或在常氧条件(5%CO₂、20%O₂和75%N₂)下培养2-4周。然后将培养物转换至生长培养基,并且每周加料二至三次。在该初始培养周期后,在缺氧和常氧条件下培养的平板中观察到了粘附的细胞。此外,在该初始的2-4周培养后,平板中留下的胰岛样结构或管状结构十分少。

[0178] 实例3

[0179] 与分化相关的基因在饲养细胞层上培养的多能干细胞中的表达

[0180] 从WiCell Research Institute, Inc., (Madison, WI) 获得人胚胎干细胞系H9,并根据该来源公司提供的说明进行培养。将已在失活的原代小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)上维持的未分化的H9人胚胎干细胞在60%FBS、20%DMSO和20%DMEM/F12(Invitrogen/GIBCO)中以-1℃/分钟的速率冷藏,并保存在气相氮中,所述DMEM/F12补充有20%knockout血清替代品、100nM MEM非必需氨基酸、0.5mM β -巯基乙醇、具有4ng/ml人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的2mM L-谷氨酰胺(全部得自Invitrogen/GIBCO)。将所述细胞解冻,并涂布于经丝裂霉素C处理的以52,000个细胞/cm²的密度接种的D551人真皮成纤维细胞上。在D551细胞上传代三次后,采集多能细胞并然后转移至调理培养基中的MATRIGEL上,该调理培养基来自补充有8ng/ml bFGF的灭活MEF的培养物。将接种于MATRIGEL上的人胚胎干细胞(1:30)在37℃的5%CO₂的气氛中,在调湿的组织培养箱内在60mm组织培养平板中进行培养。当铺满时(涂布后大约5-7天),用1mg/ml分散酶(Invitrogen/GIBCO)处理人胚胎干细胞25-40分钟。一旦细胞从培养平板脱离,就用2ml血清学吸移管反复抽吸,直到达到所需的集落大小。将细胞以1000rpm离心5分钟,然后将沉淀物以细胞在新鲜培养基中为1:3至1:4的比率重新悬浮,并接种于MATRIGEL包被的细胞培养平板上。在MATRIGEL上传代5至10次后,将多能H9细胞转移至多种不同的饲养细胞上。简而言之,将细胞在组织培养物处理过的6孔板中在ES细胞培养基中的饲养细胞上进行培养,该培养基由补充有20%knockout血清替代品、100nM MEM非必需氨基酸、0.5mM β -巯基乙醇、具有4ng/ml人碱性成纤维细胞生长因子

(bFGF)的2mM L-谷氨酰胺(全部得自Invitrogen/GIBCO)的DMEM/F12 (Invitrogen/GIBCO)组成。该板通过这样制备:在接种饲养细胞前用0.1%明胶(Sigma)包被并在37℃下温育最少4小时。将即将接种前,抽吸明胶并将饲养细胞悬浮液递送至该6孔板的每个孔。在开始进行分化规程前,让细胞扩增5天。

[0181] 对人表皮成纤维细胞系D551(ATCC No.CCL-110)、人包皮成纤维细胞系Hs27(ATCC No.CRL-1634)和人胰腺衍生的基质细胞系(在W02006094286中公开)维持多能性的能力进行评价。将D551人饲养细胞在补充有10%FBS的EMEM(ATCC 30-2003)中培养。一旦铺满,则通过丝裂霉素-C处理使细胞灭活,并在EMEM、10%FBS和5%DMSO中以-1℃/分钟的速率冷藏并保存于气相氮中。将细胞在37℃下解冻,并在具有10%FBS的EMEM中以52,000/cm²接种于明胶包被的组织培养平板上。将Hs27人饲养细胞在补充有10%FBS的DMEM(ATCC 30-2002)中培养。一旦铺满,则通过丝裂霉素-C处理使细胞灭活,并在DMEM、10%FBS和5%DMSO中以-1℃/分钟的速率冷藏并保存于气相氮中。将细胞在37℃下解冻,并在具有10%FBS的DMEM中以55,000/cm²接种于明胶包被的组织培养平板上。将人胰腺衍生的基质细胞系在DMEM和10%FBS中培养直至铺满,并用丝裂霉素C处理。将细胞在90%FBS和10%DMSO中以-1℃/分钟的速率冷藏并在气相氮中保存。使细胞在37℃下解冻,并在具有10%FBS的DMEM中以43,000/cm²接种于明胶包被的组织培养平板上。将接种于市售小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)和新鲜衍生的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)上的人胚胎干细胞培养物作为对照。

[0182] 用PBS洗涤灭活的人饲养细胞的平板,并用ES培养基中的胚胎干细胞接种。将胚胎干细胞在人饲养细胞层上培养5天。随后,通过实时PCR测定在小鼠胚胎成纤维细胞(MEF,图1)、市售的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF-SM,图1)、人表皮成纤维细胞(D551,图1)、人包皮成纤维细胞(Hs27,图1)和W02006094286中所公开的人胰腺衍生的基质细胞系(HP,图1)上培养的人胚胎干细胞中CXCR4、Sox-17、Fox-A2、HNF-4a、HNF-6和AFP的表达。图1中示出了代表性实验的结果。将结果相对于在MATRIGEL(Off MG,图1)上培养的人胚胎干细胞进行归一化。CXCR4、Sox-17、Fox-A2、HNF-4a、HNF-6和AFP是与分化相关的标志物。在人饲养细胞层上培养人胚胎干细胞导致这些标志物的表达降低。这些数据表明,人表皮成纤维细胞系D551、人包皮成纤维细胞Hs27和W02006094286中所公开的人胰腺衍生的基质细胞系保持了人胚胎干细胞的多能性。

[0183] 实例4

[0184] 人胚胎干细胞在人饲养细胞层上分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞

[0185] 从WiCell Research Institute, Inc., (Madison, WI) 获得人胚胎干细胞系H1和H9,并根据该来源公司提供的说明进行培养。将已在灭活的原代小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)上维持的未分化的H1和H9人胚胎干细胞在60%FBS、20%DMSO和20%DMEM/F12 (Invitrogen/GIBCO)中以-1℃/分钟的速率冷藏,并保存在气相氮中,所述DMEM/F12补充有20%knockout血清替代品、100nM MEM非必需氨基酸、0.5mMβ巯基乙醇、具有4ng/ml人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的2mM L-谷氨酰胺(全部得自Invitrogen/GIBCO)。将所述细胞解冻,并涂布于经丝裂霉素C处理的以52,000个细胞/cm²的密度接种的D551人真皮成纤维细胞上。在D551细胞上传代三次后,采集多能细胞并然后转移至调理培养基中的MATRIGEL上,该调理培养基来自补充有8ng/ml bFGF的灭活MEF的培养物。在37℃的5% CO₂

的气氛中,将接种于MATRIGEL上的人胚胎干细胞(1:30)在调湿的组织培养箱内在60mm组织培养平板中进行培养。当铺满时(涂布后大约5-7天),用1mg/ml分散酶(Invitrogen/GIBCO)处理人胚胎干细胞25-40分钟。一旦细胞从培养平板脱离,就用2ml血清学吸移管反复抽吸,直到达到所需的集落大小。将细胞以1000rpm离心5分钟,然后将沉淀物以细胞在新鲜培养基中为1:3至1:4的比率重新悬浮,并接种于MATRIGEL包被的细胞培养平板上。在MATRIGEL上传代11次后,将多能H1和H9细胞转移至下述多种不同的饲养细胞上。简而言之,在组织培养物处理过的6孔板中将细胞在ES细胞培养基中的饲养细胞上进行培养,该培养基由补充有20% knockout血清替代品、100nM MEM非必需氨基酸、0.5mMβ-巯基乙醇、具有4ng/ml人碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的2mM L-谷氨酰胺(全部得自Invitrogen/GIBCO)的DMEM/F12(Invitrogen/GIBCO)组成。该板通过这样制备:在接种饲养细胞前用0.1%明胶(Sigma)包被并在37℃下温育最少4小时。将即将接种前,抽吸明胶并将饲养细胞悬浮液递送至该6孔板的每个孔中。在开始进行分化规程前,让细胞扩增5天。

[0186] 对人饲养细胞层支持人胚胎干细胞分化的能力进行评价。将胚胎干细胞在丝裂霉素C灭活的人饲养细胞层上培养5天。将接种于市售小鼠胚胎成纤维细胞(MEF-SM)和新鲜衍生的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)上的人胚胎干细胞培养物作为对照。

[0187] 对人真皮成纤维细胞(D551,图2和5)、人包皮成纤维细胞(HS27,图2和5)和W02006094286中所公开的人胰腺衍生的基质细胞系(HP,图2和5)支持人胚胎干细胞系H9(图2)和H1(图5)群体分化成表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞的能力进行评价。将在市售的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF-SM,图2和5)和新鲜衍生的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF,图2和5)上培养的胚胎干细胞群体作为对照。将激活蛋白A(100ng/ml)加入在饲养细胞层上培养的人胚胎干细胞群体中。将细胞在存在激活蛋白A的情况下连续培养并在3天后采集。通过实时PCR分析定形内胚层谱系特征性标志物的表达水平(图2和5)。图2和5中所示的结果相对于在开始分化规程前的细胞(D0)进行了归一化。

[0188] 激活蛋白A诱发了在小鼠胚胎成纤维细胞和人饲养细胞层上培养的细胞中CXCR4、Sox-17和Fox-A2表达的增加。这些数据表明,人饲养细胞能够支持人胚胎干细胞分化成表达定形内胚层特征性标志物的细胞。

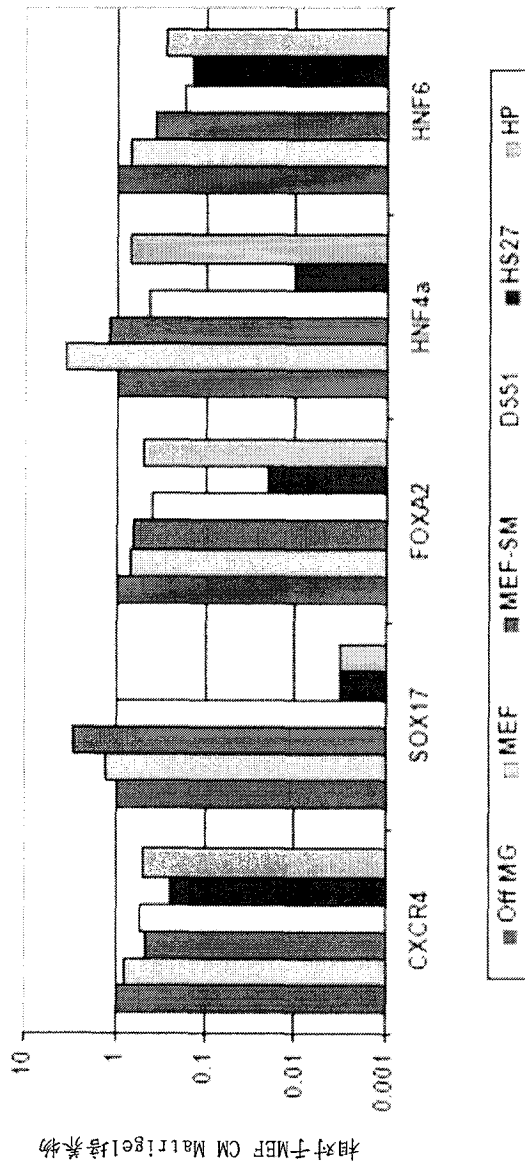
[0189] 对人真皮成纤维细胞(D551,图3和6)、人包皮成纤维细胞(HS27,图3和6)和W02006094286中所公开的人胰腺衍生的基质细胞系(HP,图3和6)支持衍生自人胚胎干细胞系H9(图3)和H1(图6)的群体的、表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞群体分化成表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞的能力进行评价。将在市售的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF-SM,图3和6)和新鲜衍生的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF,图3和6)上培养的胚胎干细胞群体作为对照。将1μM视黄酸、0.25μM KAAD-环巴胺和FGF-10(50ng/ml)加入衍生自在饲养细胞层上培养的人胚胎干细胞的、表达定形内胚层谱系特征性标志物的细胞群体中。在8天后采集细胞。通过实时PCR分析胰腺内胚层谱系特征性标志物的表达水平(图3和6)。图3和6中所示的结果相对于D0基因表达进行了归一化。

[0190] 视黄酸、0.25μM KAAD环巴胺和FGF-10处理诱发了在小鼠胚胎成纤维细胞和人饲养细胞层上培养的细胞中Fox-A2、HNF-4a、HNF-6和PDX-1表达的增加。这些数据表明,人饲养细胞层能支持衍生自人胚胎干细胞系H9(图3)和H1(图6)的、表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞分化成可表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞。

[0191] 对人真皮成纤维细胞(D551,图4和7)、人包皮成纤维细胞(HS27,图4和7)和W02006094286中所公开的人胰腺衍生的基质细胞系(HP,图4和7)支持衍生自人胚胎干细胞系H9(图4)和H1(图7)的群体的、表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞分化成表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞的能力进行了评价。将在市售的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF-SM,图4和7)和新鲜衍生的小鼠胚胎成纤维细胞(MEF,图4和7)上培养的胚胎干细胞群体作为对照。将1 μ M的 γ -分泌酶抑制剂DAPT、毒蜥外泌肽-4、IGF-1和HGF(全部为50ng/ml)加入衍生自在饲养细胞层上培养的人胚胎干细胞的、表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞群体中。在培养9天后,通过实时PCR对胰腺内分泌细胞特征性标志物的表达水平进行分析(图4和7)。图4和7中所示的结果相对于D0基因表达进行了归一化。

[0192] γ -分泌酶抑制剂、毒蜥外泌肽-4、IGF-1和HGF处理诱发了在小鼠胚胎成纤维细胞和人饲养细胞层上培养的细胞中Fox-A2、HNF-4a、HNF-6、neuro-D1、Nkx2.2、Pax-4、Nkx6.1、PDX-1、胰高血糖素和胰岛素表达的增加。这些数据表明,人饲养细胞层能支持衍生自人胚胎干细胞系H9(图3)和H1(图6)的、表达胰腺内分泌谱系特征性标志物的细胞分化成表达胰腺内胚层谱系特征性标志物的细胞。在人饲养细胞层上培养的细胞中胰岛素和胰高血糖素的表达比在小鼠饲养细胞层上培养的细胞中的要高。这些数据表明,人饲养细胞层更能够支持人胚胎干细胞的分化。

[0193] 将本文通篇中所引用的出版物的全文以引用的方式并入本文。尽管已通过参考实例和优选的实施例对本发明的多个方面进行了阐述,但应当理解,本发明的范围不由前面的描述限定,而是由专利法的原理正确解释的权利要求书所限定。

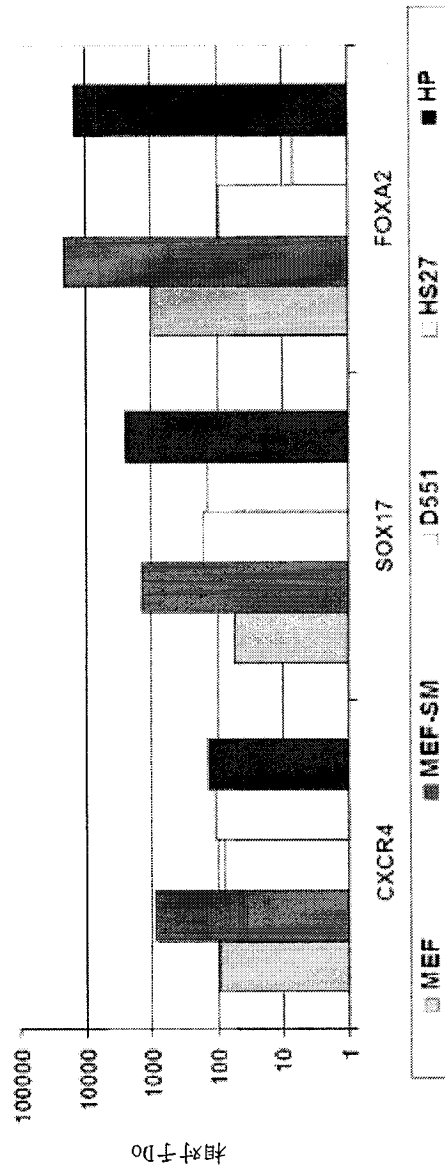


LFS5164USNP

J. 奥奈尔

多能干细胞分化

图1

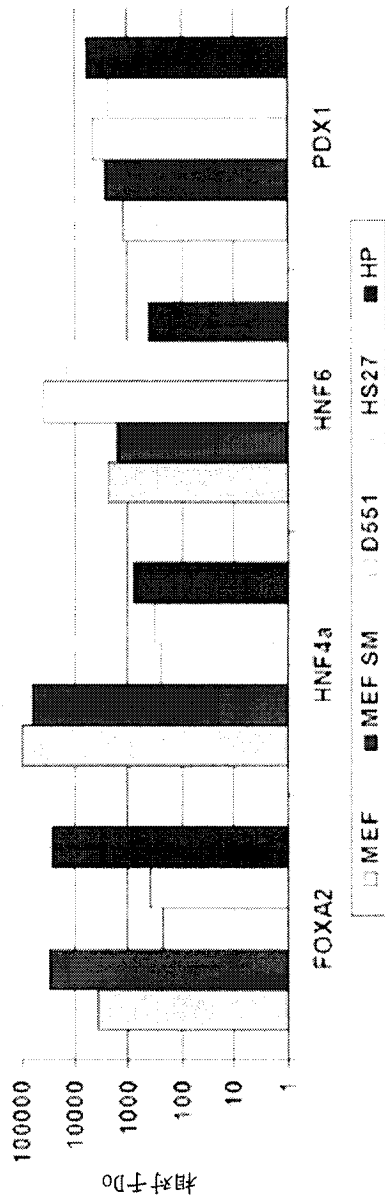


LFS5164USNP

J. 奥奈尔

多能干细胞分化

图2

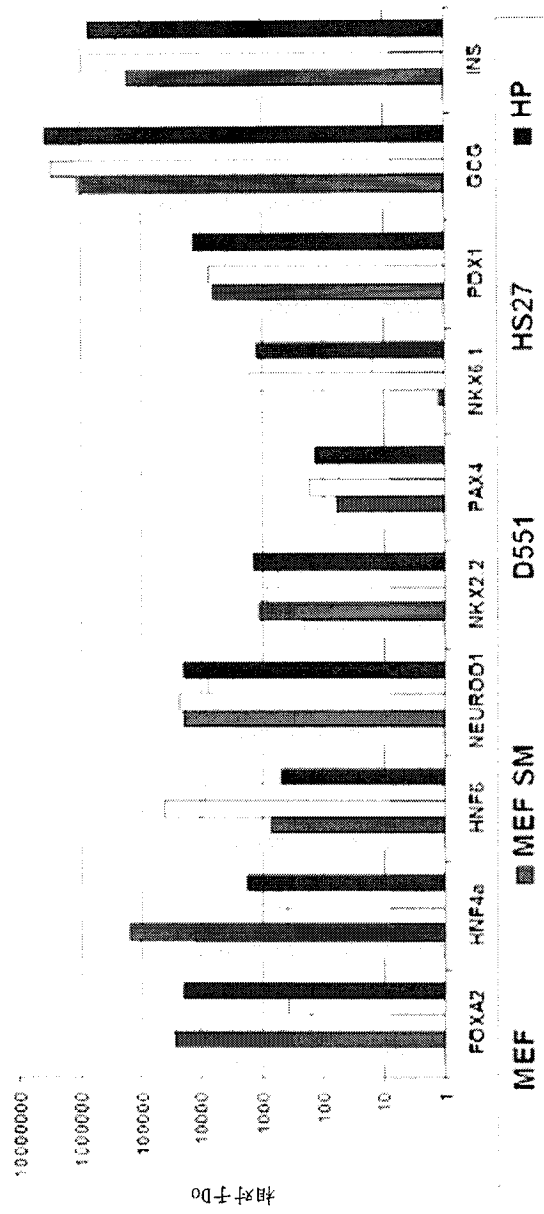


LFS5164USNP

J. 奥奈尔

多能干细胞分化

图3

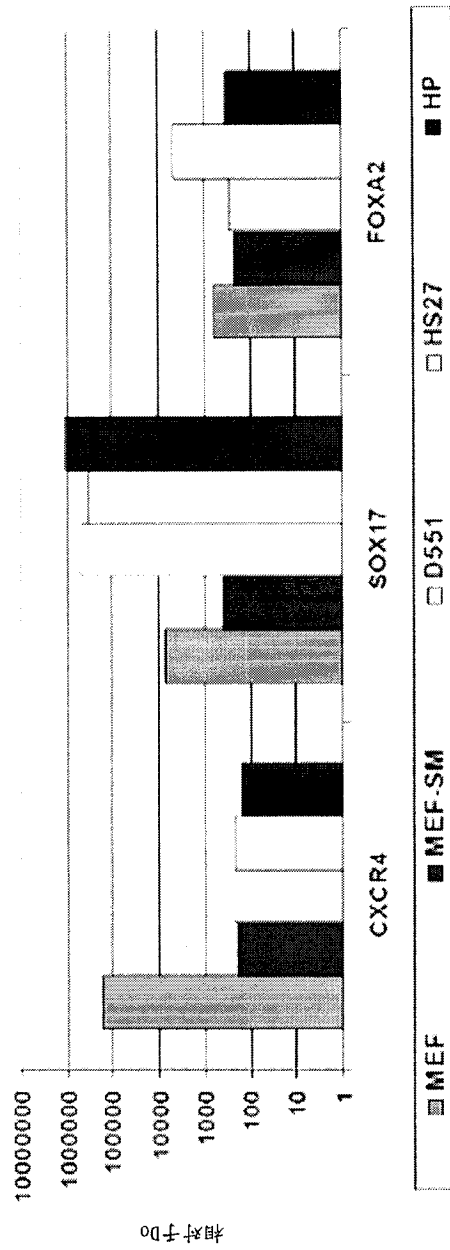


LFS5164USNP

J. 奥奈尔

多能干细胞分化

图4

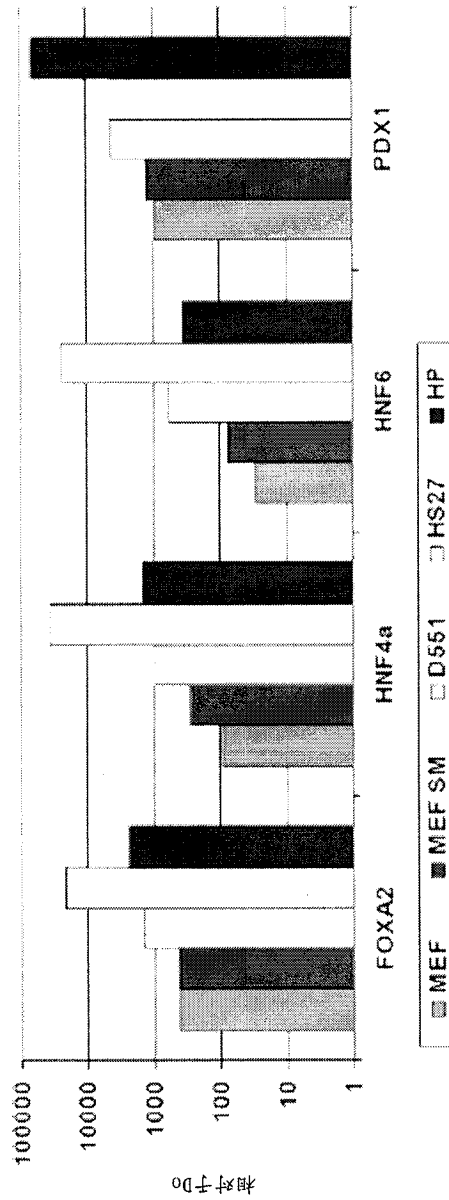


LFS5164USNP

J. 奥奈尔

多能干细胞分化

图5

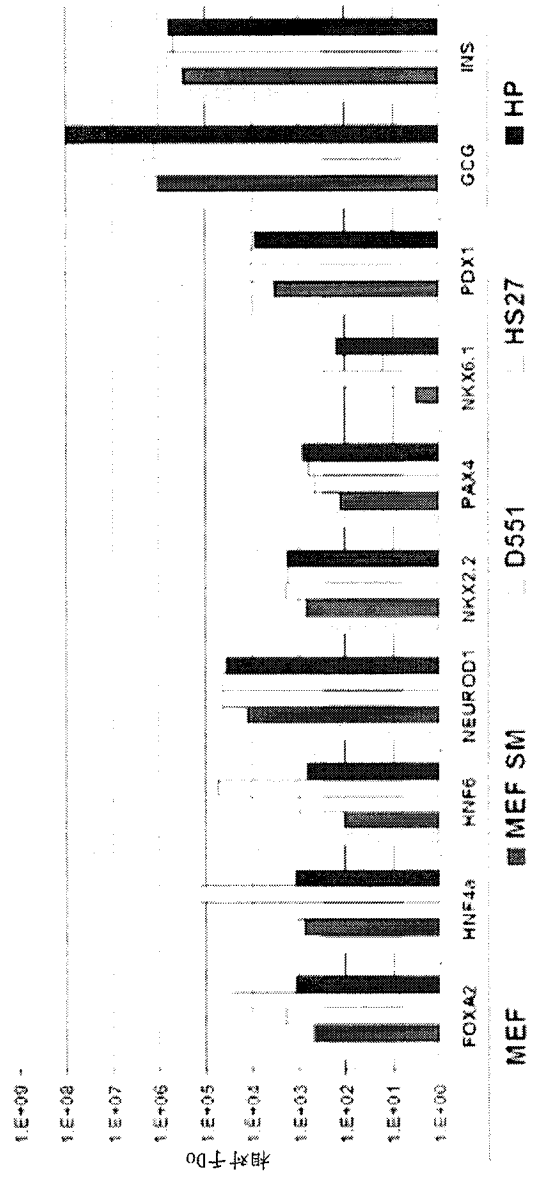


LFS5164USNP

J. 奥奈尔

多能干细胞分化

图6



LFS5164USNP

J. 奥奈尔

多能干细胞分化

图7