



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102884177 A

(43) 申请公布日 2013. 01. 16

(21) 申请号 201180019732. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 02. 18

C12N 5/074 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12Q 1/24 (2006. 01)

10-2010-0014771 2010. 02. 18 KR

G01N 33/53 (2006. 01)

A61K 35/12 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 10. 18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/KR2011/001103 2011. 02. 18

(87) PCT申请的公布数据

W02011/102680 KO 2011. 08. 25

(71) 申请人 康干细胞控股有限公司

地址 韩国首尔

(72) 发明人 康景宣 俞炅录

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

权利要求书 2 页 说明书 21 页

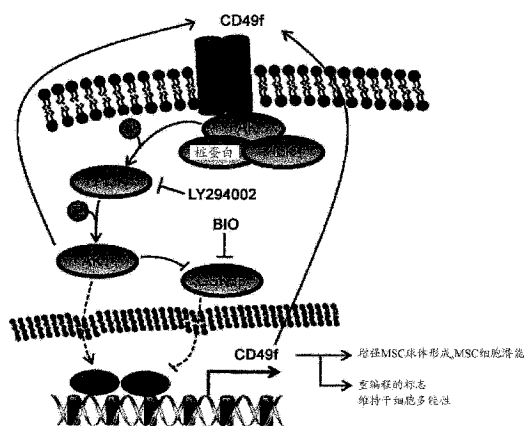
序列表 15 页 附图 39 页

(54) 发明名称

CD49F 通过 PI3K/AKT/GSK3 途径促进成体干细胞的增殖、专能性和重编程

(57) 摘要

本发明涉及用于从包含干细胞的细胞来源获得成体干细胞的方法,其中所述成体干细胞具有表面抗原 CD49f,由于球体形成而优良地形成球体以及高表达 OCT4 和 SOX2 的,还涉及含有通过该方法获得的成体干细胞或从其分化的细胞作为活性成分的细胞治疗剂。根据本发明,来源于球体的成体干细胞适用于大量培养成体干细胞,因为其由已知的附着培养方法获得的干细胞相比生长更快速,它们具有特定的表面抗原,使得通过使用该特定的表面抗原可以同质地获得,并且由于其良好的分化而可用于利用其制备细胞治疗剂。



1. 用于制备成体干细胞的方法,所述成体干细胞具有 CD49f 阳性特征并且与预培养的干细胞相比显示出改善的同质性,所述方法包括:

- (a) 第一步骤,在非附着培养条件下培养成体干细胞;和
- (b) 第二步骤,从通过球形生长形成球体的细胞群分离成体干细胞。

2. 制备同质成体干细胞的方法,其包括:

- (a) 第一步骤,制备包含干细胞的细胞来源;和
- (b) 第二步骤,从所述细胞来源分离 CD49f 阳性成体干细胞。

3. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,在进行所述第一步骤一周之后,成体干细胞球体的数目为每 1×10^4 个细胞 30-50 个球体,并且球体的平均直径为 100-150 μm 。

4. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,与在附着培养条件下培养的成体干细胞相比,在所述第二步骤中分离的成体干细胞表现出类似的或增加的 CD49f 表达水平。

5. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述第一步骤所用的成体干细胞是从细胞来源分离的具有 CD49f 阳性特征的成体干细胞。

6. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述第一步骤和第二步骤重复两次或更多次,并且所述方法还包括在第二步骤之后和重复的第一步骤之前将所述形成球体的细胞群分成单个细胞的步骤。

7. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,在所述第一步骤中通过调节 PI3K/AKT/GSK3 β 培养所述细胞,使得 CD49F 表达或超表达。

8. 如权利要求 7 所述的方法,其特征在于,在所述第一步骤中,添加 GSK3 β 抑制剂而培养所述细胞。

9. 如权利要求 1 所述的方法,其特征在于,在所述第一步骤中,在增加 OCT4、SOX2、LIN28 和 NANOG 中至少一种的表达的条件下培养所述细胞,以增加 CD49f 的表达水平。

10. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,与通过在附着培养条件下培养来源于相同的细胞来源的成体干细胞而获得的成体干细胞相比,从所述第二步骤中分离的成体干细胞具有更高的 OCT4、SOX2 或它们两者的表达潜能。

11. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,其特征在于,在所述第二步骤中的所述分离使用识别 CD49f 的表面抗原的抗体。

12. 通过权利要求 1 或 2 所述的方法获得的成体干细胞,其具有 CD49f 阳性特征。

13. 如权利要求 12 所述的成体干细胞,其特征在于,与通过在附着培养条件下培养来源于相同的细胞来源的成体干细胞而获得的纺锤形成体干细胞相比,由选自 OCT4、SOX2、c-myc、桩蛋白、ilk、pI3K 和 nanog 中的一个或多个基因编码的蛋白质高表达。

14. 如权利要求 12 所述的成体干细胞,其特征在于,与通过在附着培养条件下培养来源于相同的细胞来源的成体干细胞而获得的纺锤形成体干细胞相比,PI3K 和 GSK3 β 高度磷酸化。

15. 细胞治疗剂,其包含通过权利要求 1 或 2 所述的方法制备的且具有 CD49f 阳性特征的成体干细胞,或从其分化的细胞,作为活性成分。

16. 如权利要求 15 所述的细胞治疗剂,其特征在于,所述治疗剂具有治疗一种或多种选自以下疾病的能力:骨骼系统病症、组织重建、循环系统病症、神经系统病症和免疫病症。

17. 从成体干细胞制备分化的细胞的方法,其包括分化同质成体干细胞的步骤,所述同

质成体干细胞是通过权利要求 1 或 2 所述的方法制备的且具有 CD49f 阳性特征。

18. 用于鉴定多能性是否在用于分析的靶细胞中被重编程或用于分析的靶细胞是否维持多能性的方法,其特征在于,所述方法包括测量用于分析的靶细胞中 CD49f 表达水平的步骤。

19. 包含 CD49f 的标志物,其用于重编程为多能细胞。

20. 改善干细胞专能性的方法,其通过维持 CD49f 的表达进行。

21. 如权利要求 20 所述的方法,其特征在于 CD49f 改善 CD49f-PI3K/AKT/GSK3 β 信号转导所介导的专能性。

22. 维持干细胞多能性的方法,其特征在于将所述干细胞培养在非附着培养条件下,以通过球体形成维持细胞的 CD49f 表达。

23. 将干细胞分化成特定细胞的方法,其通过抑制或敲低 CD49f 表达。

24. 增殖干细胞的方法,其包括培养通过权利要求 1 或 2 所述的方法制备的且具有 CD49f 阳性特征的干细胞的步骤。

25. 如权利要求 24 所述的增殖干细胞的方法,其特征在于所述培养是悬浮培养或附着培养。

CD49F 通过 PI3K/AKT/GSK3 途径促进成体干细胞的增殖、专能性和重编程

发明领域

[0001] 本发明涉及用于从包括干细胞的细胞来源获得成体干细胞的方法,其中所述成体干细胞具有表面抗原 CD49f,并由于球体形成而优良地形成球体以及高表达 OCT4 和 SOX2,还涉及含有通过该方法获得的成体干细胞或从其分化的细胞作为活性成分的细胞治疗剂。

[0002] 发明背景

[0003] 胚胎干细胞,作为可以从所有三胚层来源的细胞和组织产生的细胞,从在受精后约 4-5 天形成的囊胚的内细胞团(ICM)获得,并因此涉及伦理问题。另外,因为它们的多能性,它们可以高度增殖和多样分化,但问题在于它们是难以控制的,并可转化成癌细胞。

[0004] 另一方面,成体干细胞可以从骨髓、脐带血、脂肪组织等获得,并且因此,可避免任何伦理问题。此外,已经证明虽然成体干细胞可塑性不如胚胎干细胞,但它们具有专能性(multipotency),这使它们能够分化成多种细胞,包括内皮、骨骼、肌肉、神经细胞。

[0005] 间充质干细胞是一类成体干细胞,即具有专能性的干细胞,这使得它们能够分化成造血系统的细胞和组织,包括肌肉、神经、骨、脂肪组织等。通常,它们可以通过从骨髓吸入获得,此外,可以从成年体的各个区域中获得。来源于骨髓的成人干细胞有缺点,因为它们的可塑性和增殖能力与其他干细胞相比十分差,并且提取它们的程序是侵入性的。因此,最近脐带血作为可用于代替骨髓的成体干细胞可选来源已经引起注意。虽然脐带血液来源的干细胞的特征与骨髓来源的间充质干细胞的特征基本上是相似的,但在可塑性和增殖能力上脐带血来源的干细胞具有优于骨髓来源的干细胞的特性。

[0006] 同时,间充质干细胞是成体干细胞,其特征在于:它们在细胞培养板的表面上附着和生长,并已被证明在适当的培养条件下,它们可以分化成脂肪细胞、软骨细胞、骨细胞等(Erickson et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 290 :763, 2002 ;Halvorsen et al., Tissue Eng., 7 :729, 2001 ;Wickham et al., Clin. Orthop. Relat. Res., 412 :196, 2003 ;Dragoo et al., J. Bone Joint Surg., Br., 85 :740, 2003)。此外,已经报道,间充质干细胞不仅有分化成中胚层细胞包括脂肪细胞、肌肉细胞、骨细胞、软骨细胞等的的能力,也可以分化成非中胚层细胞,包括胰腺内分泌细胞、肝细胞、血管内皮细胞和心肌细胞,并且因此,已积极努力使用间充质干细胞作为通过自我移植的细胞治疗剂或基因治疗剂的工具(Chung Jin Sup, JKorean Soc Transplant, 22 :183-196, 2008)。

[0007] 在目前的技术水平,为使用成体干细胞作为细胞治疗剂,需要标准化可以维持未分化状态的培养条件。此外,由于从组织中分离出的成体干细胞以各种细胞的混合状态存在,因此,能够大规模培养同质成体干细胞的技术也是待解决的问题之一。

[0008] 特别是,从组织或血液分离成体干细胞的方法一般可以包括,例如,利用针对众多表面抗原的抗体的细胞分选。然而,所述方法具有应当了解成体干细胞的表面抗原的限制,并且进一步,其应用因为以下问题受到很大的限制:成体干细胞的共同表面抗原(下文中,被称为“标志物”)不是已知的,并且并没有开发出各种成体干细胞的标志物,并进一步,即使已知的标志物根据分化状态而显示出不同程度的表达;并且特别是,分选设备是昂贵的。

[0009] 为了获得大量的成体干细胞,通常利用体外培养技术,同时通过利用所述细胞附着到细胞培养板的特性维持专能性。

[0010] 所述方法是通过利用 Ficoll-Paque 的密度梯度离心从骨髓或血液移除单核细胞,并在含有血清的培养液中选择性地培养附着到培养板的成体干细胞来实现的。从上述过程得到的细胞包括成体干细胞,成体干细胞可能会与其他单核细胞和其他干细胞混合在一起。然而,这种混合细胞培养条件可能会导致营养物质分布程度的不同,从而导致细胞分化状态的异质性。在最后,所述细胞不能作为同质细胞群产生的问题是致命的缺点,即当它们被用作治疗剂时,实际效果可能与预期效果不同。因此,迫切需要开发可以提供大量同质成体干细胞的有效培养技术。公开

[0011] 技术问题

[0012] 因此,本发明人已经发现,在培养和增殖来源于脐带血、脂肪组织 (HAD-MSC) 和骨髓 (HBM-MSC) 的成体干细胞的过程中,具有优异的球体形成和快速培养率的成体干细胞具有特异性表面抗原和优异的可塑性。

[0013] 另外,本发明人还发现, CD49f 通过 PI3K/AKT/GSK3 途径促进成体干细胞的增殖、专能性和重新编程。

[0014] 本发明是在该发现的基础上完成的。

[0015] 技术方案

[0016] 本发明提供了制备成体干细胞的第一种方法,所述成体干细胞具有作为细胞表面标志物的 CD49f 阳性特性,并且与预培养的干细胞相比具有改善的同质性,所述方法包括 (a) 第一步骤,在非附着培养条件下培养成体干细胞;和 (b) 第二步骤,从通过球体形成而形成球体的细胞群分离成体干细胞。

[0017] 在完成第一步骤后一周,成体干细胞球体的数目可以是每 1×10^4 个细胞 30-50 个球体,并且球体的平均直径为 100-150 μm 。

[0018] 本发明的第一方法可以通过将第一步骤和第二步骤重复两次或更多次而进行。在这样的情况下,第一方法还可以包括在第二步骤之后和重复的第一步骤之前将形成球体的细胞群分离成单个细胞的步骤。

[0019] 此外,本发明提供了用于制备同质成体干细胞的第二方法,其包括 (a) 第一步骤,制备包含干细胞的细胞来源;及 (b) 第二步骤,从所述细胞来源分离 CD49f 阳性成体干细胞。

[0020] 此外,本发明提供了通过本发明所述的第一方法和第二方法制备和分离的 CD49f 阳性成体干细胞。

[0021] 本发明还提供细胞治疗剂,其含有通过本发明所述的第一方法和第二方法制备和分离的 CD49f 阳性成体干细胞,或从其分化的细胞,作为活性成分。

[0022] 本发明提供的细胞治疗剂可以具有治疗骨骼系统病症、组织重建、循环系统病症、神经系统病症和免疫病症的能力。此外,细胞治疗剂可以一致地控制细胞的分化状态,因为它含有作为活性成分的具有 CD49f 阳性特性的同质成体干细胞。

[0023] 本发明还提供了用于增殖成体干细胞的方法,该方法包括培养通过本发明所述的第一方法和第二方法制备和分离的 CD49f 阳性成体干细胞的步骤。

[0024] 此外,本发明还提供了从成体干细胞制备分化的细胞的方法,该方法包括使通过

本发明所述的第一方法和第二方法制备和分离的 CD49f 阳性同质成体干细胞分化的步骤。

[0025] 此外,本发明提供了用于重编程为多能细胞的包含 CD49f 的标志物。

[0026] 另外,本发明提供了用于识别多能性是否在用于分析的靶细胞中被重编程或用于分析的靶细胞是否维持多能性的方法,其特征在于,所述方法包括测量用于分析的靶细胞中 CD49f 表达水平的步骤。此外,本发明提供了通过维持 CD49f 的表达而改善干细胞的专能性的方法。在这种情况下,CD49f 可以改善专能性,这是由 CD49f-PI3K/AKT/GSK3 β 信号转导介导的。

[0027] 此外,本发明提供了维持干细胞的专能性的方法,其特征在于,将该干细胞孵育于非附着培养条件下,以通过球体形成来维持 CD49f 的高水平细胞表达。

[0028] 此外,本发明提供了通过抑制或敲低 (know down) CD49f 表达而将干细胞分化成特定细胞的方法。

[0029] 在下文中,会详细说明本发明。

[0030] 间充质干细胞 (MSC) 可以来源于骨髓 (BM)、脂肪组织 (AD) 和脐带血 (UCB),是用于治疗目的干细胞来源之一。

[0031] MSC 具有专能性,这意味着多谱系可塑性,并允许它们在体外实验中分化为中胚层和外胚层神经细胞和内胚层干细胞。

[0032] 然而,MSC 通常作为异质群孵育。在增殖过程中,细胞群根据自我更新和可塑性而多样化。因此,需要分离更同质的细胞群。

[0033] 虽然这项研究的重要目的是找到来自异质细胞群的具有较高的专能性的组织特异性成体干细胞的标志物,截至目前并没有用于分离成体干细胞的准确的标志物。本发明人已经研究发现用于筛选具有较高的专能性的成体干细胞的方法,并从而鉴定 CD49f 是重要的新的标志物,其可以提高专能细胞 (multipotent cell) 的自我更新和可塑性,将专能干细胞重编程为多能细胞 (pluripotent cell),然后维持多能细胞。

[0034] 术语“锚定非依赖性”是指三维真核细胞不附着于诸如塑料培养板或微载体珠的固体基质的生长。非转化的体细胞需要细胞外基质 (ECM) 用于它们的锚定和生存。否则,细胞发生被称为失巢凋亡的细胞死亡过程。另一方面,具有强致瘤和转移特性的癌细胞往往在不与固体表面接触的情况下生存。锚定非依赖性生长经常形成被称为“球体”的三维细胞器 (organoid)。

[0035] 通过在底部涂覆有琼脂或琼脂糖的非附着培养板上,而不是使用通常的利用细胞的锚定依赖性的粘附细胞培养方法,培养来源于脐带血、脂肪组织 (HAD-MSC) 和骨髓 (HBM-MSC) 的成体干细胞,使干细胞不附着到细胞培养板的底部,本发明人已经确定,成体干细胞也可以在非附着培养条件下形成球体,并即使在形成成体干细胞球体后也维持成体干细胞的特性。

[0036] 组织可塑性,意味着子代细胞能够在体外分化成所定义的谱系的能力,这是干细胞的重要特征。本发明人已经通过组织特异性染色和标志物表达 (图 4) 证明,从单层培养得到的或来源于球体的所有成体干细胞都可以分化成脂肪组织、骨细胞系统。令人惊讶的是,与单层孵育的成体干细胞相比,来源于成体干细胞球体的细胞具有分化为脂肪细胞和骨细胞的较大可塑性。此外,来源于成年干细胞球体的细胞的增殖速度比单层孵育的成体干细胞快。

[0037] 本发明人已经建立了成体干细胞球体形成的新机制,并且还发现,CD49f 中的某一整联蛋白可以影响 PI3K/AKT/GSK3 β 的活性,以控制细胞增殖和分化。此外,CD49f 参与维持 hESC 和 hiPSC 的多能性,并在重编程过程中,OCT4、SOX2 及 CD49f 作为多能性标志物互相之间有串扰。即,本发明人已经发现,成体干细胞球体的较高增殖和专能性依赖于 CD49f-PI3K/AKT/GSK3 的信号转导(参见图 1)。

[0038] 一般来说,整联蛋白作为细胞表面标志物,是 ECM(细胞外基质)组分的相对物,并且将信号传播至与细胞存活和增殖相关的一系列信号转导途径,如 FAK(粘着斑激酶)和磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/AKT 途径。当 PI3K/AKT 信号转导下调时,hESC 的分化被诱导,并因此 PI3K/AKT 信号转导对于维持 hESC 的多能性是重要的。整联蛋白和 ECM 之间的相互作用启动的信号转导途径与生长因子的信号转导通过协同作用串扰,从而操纵细胞周期装置。

[0039] 对于分子信号转导级联,与单层孵育的细胞相比,成体干细胞球体中 PI3K 及其下游的蛋白激酶(例如,AKT 和 GSK3 β)增加。

[0040] 为了证实 PI3K 信号对于成体干细胞球体的形成是重要的,使用 PI3K 的化学抑制剂和 GSK3 β 的化学抑制剂作为 PI3K 下游效应器。BIO 作为 GSK3 β 的抑制剂增加了成体干细胞球体的数量和大小。另一方面,当与作为 PI3K 信号转导抑制剂的 LY294002 一起孵育时,球体的数目减少。这一结果表明,整联蛋白 PI3K/AKT-GSK3 β 信号转导对于形成 MSC 球体是重要的。

[0041] 基于 PI3K/AKT 生存信号对于参与球体形成的细胞-细胞相互作用是重要的这一假设,分析了整联蛋白表达水平。整联蛋白属于细胞锚定相关家族,其在 α -亚基和 β -亚基之间形成异质二聚体复合物。通过免疫细胞化学和 FACS 分析,已经证实在整联蛋白中,CD49f(α 6)和 CD104(β 4)在球源性细胞中上调。

[0042] 整联蛋白 α 6/ β 4 复合物在通过与层粘连蛋白和纤连蛋白(锚丝蛋白)的相互作用在 PI3K/AKT 激活和细胞增殖中是重要的。整联蛋白的下游信号转导器,例如 FAK 和桩蛋白(PAXILLIN),在球体细胞中是激活的。这意味着整联蛋白信号足以引发 PI3K/AKT 信号转导途径。此外,已经证实,与 CD49f 阴性细胞相比,在 CD49f 阳性细胞中,球体形成的效率和球体的大小显著增加。这意味着,CD49f-PI3K/AKT/GSK3 信号转导在锚定非依赖性生长条件下成体干细胞的存活和增殖中起着重要的作用。因此,本发明选择 CD49f 阳性细胞组变得十分丰富的球体来源的细胞,作为用于从成体干细胞的异质细胞群中筛选具有更强的增殖和可塑性的相对同质细胞组的新靶标。

[0043] 此外,本发明人已经证实,CD49f 可以直接控制成体干细胞的增殖和分化。

[0044] 整联蛋白是介导细胞对细胞的锚定或细胞对 ECM(细胞外基质)的锚定主要的受体。人们已经知道,需要整联蛋白通过加强整联蛋白和生长因子途径之间的串扰来刺激细胞周期。此外,人们还知道,与 CD49f 不丰富的其他成体干细胞相比,富 CD49f 成体干细胞可以更有效地分化并具有优越的集落形成潜力。

[0045] 与这样的研究结果相一致,本发明已经通过实验证实,超表达 CD49f 的成体干细胞表现出改善的增殖潜力、球体形成潜力和成为脂肪细胞、骨细胞系统的可塑性。

[0046] 由于来源于成体干细胞球体的细胞表现出相对高的细胞潜能活性,本发明人建立这样的假设,即成体干细胞中 CD49f 超表达激活 PI3K/AKT/GSK3 β 途径。虽然已经知道,

在肿瘤细胞中 CD49f 激活 PI3K/AKT 途径 [Gambaletta et al., 2000; Trusolino et al., 2001], 但没有证据支持 CD49f 与干细胞增殖和多能性相关的信号转导事件的任何联系。为了证实这种联系, 本发明采用了免疫印迹法和超表达 CD49f 的成体干细胞中的信号转导抑制剂。有趣的是, 当 CD49f 和 PI3K/AKT/GSK3 β 途径被激活时, 成体干细胞的增殖和球体形成被上调。由于球体形成效率与成体干细胞的增殖和专能性相一致, 因此球体形成效率可以代表成体干细胞的细胞可塑性。

[0047] 结合其中提到 PI3K/AKT 网络在成骨分化和骨生长中很重要的其他研究 (Fujita et al., 2004; Mukherjee and Rotwein, 2009) 的结果, 看起来, 通过 CD49 激活 PI3K/AKT/GSK3 β 途径促进诱导成体干细胞向骨细胞分化。此外, 本发明人已经确定, 用 BIO 作为 GSK3 抑制剂处理成体干细胞对生存潜能没有不利影响, 并且增加成体干细胞分化成骨细胞的倾向。

[0048] 虽然组成性激活 PI3K/AKT 诱导自发分化成脂肪细胞 (Kohn et al., 1996; Xu and Liao, 2004), GSK3 的抑制, 通过抑制作为调节脂肪细胞产生的主要因子的 PPAR γ , 抑制了分化成脂肪细胞 (Kang et al., 2007)。与此相同, 当 BIO 存在时, 成骨标志物基因被上调, 而脂肪生成标志物基因显著降低。在本发明的实施例已经表明, 受 CD49f 调节的信号转导激活 PI3K/AKT/GSK3 β 途径, 并因此与能够刺激成体干细胞可塑性的选择能力有关。

[0049] 此外, 本发明人已经确定, CD49f 是重编程和维持多能性的重要的、新的标志物。

[0050] 根据最近的研究, OCT4 作为多能性标志物基因可以调节 MSC 的增殖潜力、集落形成和系统可塑性 (Greco et al., 2007; Liu et al., 2009; Tondreau et al., 2005)。OCT4 和 SOX2 是对于维持未分化胚胎干细胞 (ESC) 的自我更新能力的至关重要的转录因子。在胚胎干细胞和诸如 MSC 的组织特异性成体干细胞中表达的这些基因帮助细胞维持未分化状态, 并且不分化。另外, 根据最近的研究, 已证明通过转入诸如 OCT4 和 SOX2 的外源多能基因, 甚至可以将分化的细胞转化成多能性状态。

[0051] 由于在来源于 hUCB-MSC 球体的细胞中增殖和分化能力被显著上调, 本发明人比较了多能性标志物的表达水平与单层孵育的 hUCB-MSC 的表达水平。在来源于 hUCB-MSC 球体的细胞中, OCT4/SOX2/LIN28/NANOG 表达水平更高 (图 11)。因此, 结果意味着, 球体的形成可上调多能性标志物的表达, 以增加多能性, 从而加强自我更新和可塑性。

[0052] 此外, 本发明人也沉默了 OCT4 或 SOX2 以下调 CD49f 的活性, 以及进一步加强 OCT4 和 SOX2 表达以激活 CD49f 的内在转录本和蛋白质。为确定由 OCT4 和 SOX2 调节 CD49f 是否由于直接结合所致, 进行染色质免疫沉淀测定 (CHIP)。使用对 OCT4 和 SOX2 具有特异性的抗体, 已通过 ChIP 确定这两个转录因子与 CD49f 的推测的启动子区域相结合 (图 11)。OCT4 和 SOX2 与 CD49f 的相互作用, 也可以被描述通过 PI3K/AKT/GSK3 β 的转录调节回路 (图 1)。

[0053] 有趣的是, 在 OCT4/SOX2/LIN28/NANOG- 超表达的成体干细胞中 CD49f 的表达显著提高。根据以往的研究, 已经报道, 4 种转录因子 (OCT4/SOX2/LIN28/NANOG 或 OCT4/SOX2/CMYC/KLF4) 足以将分化的细胞重编程为未分化的多能干细胞 (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007)。与 CD49f 表达上调一致, 异常 OCT4/SOX2/LIN28/NANOG- 超表达的 MSC 表现出强 AP 活性, 并表现出向 hESC 样集落的形态转变。此外, 内在 CD49f 表达的上调被显著降低, 这是由于在 hiPSC 和 hESC 中发生的胚体 (EB) 形成的诱导。这样的结果意味着, 内在

CD49f 表达可以反映重编程状态,并且可以被用作重编程标志物。

[0054] 内在 CD49f 的抑制诱导 hESC 的分化,并降低内在 OCT4、SOX2 和 NANOG 的水平。除此之外,CD49f 的阻断抑制 PI3K/AKT/GSK3 β 途径,该途径充当维持 hESC 的多能性和 / 或存活潜力的核心因子。用对 hESC 具有特异性的 PI3K 抑制剂 LY294002 处理,依赖性地抑制 NANOG 及 CD49f 的表达。图 1 示出了 CD49f-PI3K/AKT/GSK3 β 途径的概略图。与此一起,这样的发现表明,在重编程过程期间,CD49f 可以与 OCT4 和 SOX2 串扰,并且 CD49f 可以有助于由 CD49f-PI3K/AKT/GSK3 β 信号转导介导的多能性的维持。

[0055] OCT4、SOX2 和 NANOG 可以与它们的启动子,以及与彼此的启动子结合。这种自动调节环路稳定 hESC 和 / 或 hiPSC 的多能性状态和基因表达。OCT4 和 SOX2 可以共同占用及激活自动调节回路,并且作为结果,可以激活内在的多能性标志物和诱导多能性。本发明人已经证明,OCT4 和 SOX2 的自动调节环路可以调节 CD49f。

[0056] 在本说明书中,球体形式或球体意指包括完全的球体形式以及椭圆柱形式。在本说明书中,“球体形成”是指这样的特征,在培养时某些细胞即使不附着于底部也能够生长,并在成体干细胞之间形成许多聚集的球体。

[0057] 在本说明书中,“成体干细胞”存在于软骨、骨、脂肪组织、骨髓基质、肌肉、神经等,并可以与间充质基质细胞、间充质干细胞或基质细胞一起使用。

[0058] 通过本发明的第一方法或第二方法获得的“成体干细胞”是属于亚群的干细胞,其具有形成球体的能力;来源于脂肪组织、骨髓和脐带血,优选来源于脐带血的成体干细胞的 CD49f 阳性特征;以及高度表达作为多能干细胞标志物的 OCT4 和 SOX2 的能力。

[0059] 虽然通过本发明的第一方法或第二方法获得的成体干细胞在培养时以球体的状态存在,但是它们可以通过常规方法分散为单一的干细胞,该常规方法可以由本领域技术人员容易地选择,如酶处理或物理方法。

[0060] 通过第一方法制备的成体干细胞可以表达 ZNF281 或 c-MYC,或它们两者。本发明的成体干细胞表达 Oct-4、Sox-2、c-myc 和 ZNF281 这一事实意味着所述细胞维持未分化状态。

[0061] 根据本发明的第二方法获得的具有 CD49f 阳性特征的成体干细胞由于球体形成而具有形成球体的能力,并且也可以具有高表达 OCT4 和 SOX2 的能力。

[0062] 此外,与附着到细胞培养板孵育的纺锤形成体干细胞相比,本发明的成体干细胞具有高表达由一个或多个选自以下的基因编码的蛋白质的能力:c-myc、桩蛋白、ilK、pI3K 和 nanog,并且具有 PI3K 和 GSK3 β 被高度磷酸化的特点。

[0063] 判断本发明中的“高表达”的依据是,通过将来源自利用非附着培养获得的球体的成体干细胞与根据常规的培养方法附着在细胞培养板的底部孵育的纺锤形成体干细胞的相同性质进行比较,确定高表达。在本发明的成体干细胞中,OCT4 和 SOX2 的表达分别显示出增加超过约 9 倍和 7 倍。

[0064] “包含干细胞的细胞来源”可以包括孵育的成体干细胞,以及包含成体干细胞的脂肪组织、骨髓、外周血、脐带血等,优选使用脐带血。来源于脂肪组织、骨髓和脐带血的所述细胞可以是混合状态的 MSC(骨髓间充质干细胞),以及血细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞、前体脂肪细胞等。

[0065] 同时,分离具有某些细胞表面抗原和免疫学性质的成体干细胞,例如,通过用抗体

处理分离,可以利用检测荧光、磁铁和纳米粒子的工具(means)。

[0066] 所述检测荧光、磁铁和纳米粒子的工具附着在抗体上,所述抗体可以通过利用细胞的免疫学性质的方法分离,包括,但不限于荧光激活细胞分选术(FACS)或磁激活细胞分选术(MACS),其中所述方法可以由本领域技术人员容易地选择。

[0067] 通过本发明的第一方法或第二方法获得的成体干细胞可以用作细胞治疗剂,由于其优异的可塑性而具有治疗一种或多种选自以下的病症的能力:骨骼系统病症、组织重建、循环系统病症、神经系统病症和免疫病症。根据本发明的细胞治疗剂的活性成分可以是处于未分化状态或成特定细胞的分化状态的干细胞。

[0068] 作为本发明的细胞治疗剂的活性成分的成体干细胞是属于MSC的亚群的细胞,并且因此可以根据MSC中相同的方法分化。

[0069] 通过加入地塞米松、抗坏血酸磷酸酯、 β -甘油磷酸等,即使在体外也可以将MSC分化成成骨细胞。众所周知,利用这种可塑性,所述细胞单独或与载体一起可以治疗多种骨折。特别是,尽管MSC可以被移植到受损区域,以获得直接分化的效果,但是已经确定在患者患有特点是I型胶状形成病症的先天性疾病——成骨不全症的情况下,通过血液流动全身移植同源干细胞可以提供治疗效果。

[0070] 此外,包含胰岛素、转铁蛋白、亚硒酸等的软骨来源的培养液可以用于容易地将MSC分化成软骨组织。已经知道利用这种可塑性,可以将MSC与诸如PCL、PLA、纤维蛋白胶等的载体一起移植,以恢复药物治疗有限的关节炎中的软骨组织,或关节软骨损伤。

[0071] 通过使用地塞米松、吡哆美辛、异丁基黄嘌呤、胰岛素等并利用这种可塑性,可以将间充质干细胞体外分化成脂肪细胞,它们的应用已经在利用脂肪细胞的整形手术领域中的组织重建中逐渐增加。

[0072] 此外,已经知道通过用5-氮杂胞苷处理,MSC可以分化成心肌细胞,并且当MSC被注射进脑时,它们不仅被转移到额叶和小脑,还提供神经丝阳性反应。因此,已经鉴定到所述细胞具有再生神经组织的能力。因此,已经知道它们可以用作诸如帕金森氏病、亨廷顿氏病、阿尔兹海默病、多发性硬化症和脊髓损伤等神经退行性疾病的治疗剂。

[0073] 除此之外,MSC可以由MHC I+、MHC II、CD40-、CD80-、CD86代表,并且其特征在于它们可以通过MHC I激活T细胞,但没有共刺激因子,使得它们不能诱导由于T细胞所致的免疫应答。因此,已经知道对于同种移植物不需要给予免疫抑制剂。此外,它们特征在于,它们抑制树突细胞的分化和功能,并进一步抑制B细胞的增殖、分化和趋化。利用MSC的这种免疫抑制功能,已经鉴定到MSC治疗包括类风湿性关节炎、急性炎症反应等免疫病症的潜力。

[0074] 本发明还提供了用于增殖成体干细胞的方法,该方法包括培养通过本发明所述的第一方法或第二方法制备的具有CD49f阳性特征的成体干细胞的步骤。

[0075] 在本发明的增殖方法中,所述成体干细胞的培养可以通过悬浮培养或附着培养进行。

[0076] 所述悬浮培养可以使用底部涂覆有琼脂糖的培养板,使得干细胞不粘附到细胞培养装置的底部,并且所述附着培养可以通过培养细胞的常用方法完成。

[0077] 通常,细胞培养板被特异性的处理以诱导细胞锚定。因此,除了1%-10%琼脂糖涂覆方法外,细胞不与其粘附并且在其中可能悬浮培养细胞的培养板,例如用于培养微生物的皮氏培养皿、玻璃制容器等,可以用于培养。所述琼脂糖的浓度和培养板可以由本领域

技术人员容易地选择。

[0078] 在本发明的增殖方法中使用的培养基包括领域内用于所述细胞培养的所有普通培养基,而达尔伯克氏改良伊格尔培养基(DMEM)是最常用的。此外,抗生素、胎牛血清(FBS)和生长因子可以添加到基础培养基中。包括孵育温度和孵育期的培养条件可以由本领域技术人员容易地选择。

[0079] 可以添加到培养基中用于本发明的增殖方法的生长因子包括但不限于,骨形态发生蛋白(BMP)、EGF家族、生长分化因子(GDF)、IGF家族、VEGF/PDFG家族等。

[0080] 当需要大量干细胞用作细胞治疗剂时,本发明的增殖方法可以用于增殖所述干细胞。

[0081] 本发明可以获得大量的具有同质细胞学特征的干细胞,因为在本发明中分离和孵育具有CD49f阳性特征的成体干细胞。

[0082] 此外,如果根据本发明的增殖方法扩增干细胞,本发明可以比现有方法更快速地获得大量成体干细胞,这是由于与CD49f阴性干细胞相比细胞生长快速。

[0083] 有益效果

[0084] 根据本发明,来源于球体的成体干细胞适用于大量培养成体干细胞,因为其由已知的附着培养方法获得的干细胞相比更快速地生长,它们具有特定的表面抗原,使得通过使用该特定的表面抗原可以同质地获得,并且由于其良好的分化而可用于利用其制备细胞治疗剂。

[0085] 附图简要说明

[0086] 图1是展示CD49f在MSC球体和重编程中作用的图表。其简述了CD49f在成体干细胞中的作用,并且显示了CD49f激活如何引起PI3K/AKT的磷酸化并参与增强MSC球体形成和MSC细胞潜能。

[0087] 图2显示了通过培养各个组织获得的球体和所述球体中干细胞标志物的鉴定结果。图2A是从脐带血(hUCB-MSC)、脂肪组织(hAD-MSC)和骨髓(hBM-MSC)培养的成体干细胞的显微照片。图2(B)是通过FACS测量的单层孵育的成体干细胞和来源于成体干细胞中的球体,诸如CD44(上面板)和CD90(下面板)的成体干细胞阳性表面标志物的表达情况。图2(C)是通过FACS测量的单层孵育的MSC和来自MSC的球体中,CD34和CD117的表达情况,它们是造血细胞特异性标志物。

[0088] 图3(A)是显示单层孵育的细胞(比较实施例1)和球体来源的细胞(实施例1)的细胞增殖能力(CPDL)的图表(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。图3(B)表示在单层孵育的细胞(比较实施例1)和球体来源的细胞(实施例1)的基因表达的变化。

[0089] 图4(A)表示在比较实施例1(附着培养-单层形成)与实施例1(非附着培养-球体形成)中孵育的成体干细胞的相差图像。平均而言,每1mL培养基接种15,000个细胞。比例尺=100 μ m。

[0090] 图4(B-E)显示在诱导成特定组织后的单层细胞(左图)和球体来源的细胞(右图)的相差图像。在诱导脂肪细胞3周后,通过油红O染色可见在已分化细胞中的脂滴积累(B, C)。骨细胞诱导3周后,用茜素红S染色矿物质沉积(D, E)。图4(F)显示通过用100%的异丙醇洗脱油红O染色的染料,然后在500nm波长处测量吸光度得到的结果(*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。图4(G)示出了通过使用了总浓度100nM的西吡氯铵洗脱茜素红

S 染料,并在 570nm 波长处测量吸光度的结果 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。图 4(H) 是通过诸如 C/EBP β 、AP2、PPAR γ 和瘦素 (LEPTIN) 的脂肪细胞标志物基因的表达测量的脂肪细胞分化效率。图 4(I) 显示骨特异性骨钙蛋白 (OSTEOCALCIN) 和成骨细胞特异性转录因子 RUNX2 的表达水平,其鉴定用于确定骨细胞诱导效率。

[0091] 图 5 表示在比较实施例 1 (附着培养 - 单层形成) 与实施例 1 (非附着培养 - 球体形成) 中孵育的成体干细胞成神经细胞的可塑性。

[0092] 图 6(A) 是在球体培养后 7 天进行的免疫印迹的结果,其中通过 40 μm 过滤器收集 MSC 球体接着冲洗两次,在单层细胞、球体、用 0.2 μM BIO 处理的球体和用 30 μM LY294002 处理的球体中分析 PI3K 及其顺序下游效应器 AKT 和 GSK3 β 的磷酸化水平。图 6(B) 显示在包含 0 μM 、0.2 μM 或 0.5 μM 的 GSK3 抑制剂 BIO 的生长培养基中孵育的 MSC 球体的数目 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。图 6(C) 显示在包含指定浓度的 BIO 的培养基中孵育的 MSC 球体的相差图像。图 6(B) 显示在包含 0 μM 、30 μM 或 50 μM 的 PI3K 抑制剂 LY294002 的生长培养基中孵育的 MSC 球体的数目 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。图 6(C) 显示在包含指定浓度的 LY294002 的培养基中孵育的 MSC 球体的相差图像。

[0093] 图 7 是附着培养的单层形成 (比较实施例 1) 和球体来源的细胞 (实施例 1) 中的整联蛋白相关表面抗原的表达的观察结果。也就是说,通过 FACS 测量的 MSC 球体来源的细胞 (实施例 1) 和单层孵育的 MSC (比较实施例 1) 中 CD49a、CD49b、CD49e 和 CD104 的表达水平。在进行三次 FACS 分析后绘制结果 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。

[0094] 图 8(A) 示出在单层孵育的成体干细胞 (比较例 1) 和球体来源的成体干细胞 (实施例 1) 中 CD49f 表达的免疫细胞化学分析结果。将单层 MSC 和分离的 MSC 球体以相同的起始数目接种于 4 孔室玻片中。3 天后,固定细胞并使用指定的抗体分析。比例尺 = 100 μm 。图 8(B) 表示通过利用 FITC 缀合的抗体从 CD49f 表达水平的 FACS 分析得到的结果。测量重复三次 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。图 8(c) 表示通过用免疫印迹鉴定整联蛋白下游信号转导器如 FAK 和桩蛋白的活性获得的结果。图 8(D) 显示将成体干细胞分选成 CD49f 阴性和 CD49f 阳性的细胞群的结果。图 8(e) 显示通过对 CD49f 阴性和 CD49f 阳性的细胞组进行 RT-PCR,以分析整联蛋白相关标志物 CD49f、桩蛋白、FAK、ILK 的表达水平获得的结果。图 8(F) 显示通过用流式细胞仪将细胞分选成 CD49f 阴性和 CD49f 阳性的细胞,然后鉴定各个细胞组的球体形成效率获得的结果 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。图 8(G) 是测量 CD49f 阴性和阳性细胞组中球体的尺寸的结果。为了测量球体尺寸,随机选择 15 个球体,并进行统计学分析 (*: $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)。图 8(H) 示出了来源于 CD49f 阴性或阳性细胞的一个代表性球体的相差图像。

[0095] 图 9(A) 表示在存在或不存在 CD49f、LY294002、BIO 的情况下,MTT 细胞增殖分析的结果。将细胞接种在 24 孔板上,然后在 24 小时和 48 小时后,测定光密度 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。图 9(B) 是在存在或不存在 CD49f、LY294002、BIO 的情况下,测量球体尺寸的结果 (*, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)。图 9(C) 是 PI3K/AKT/GSK3 β 的免疫印迹分析结果。将 CD49f 表达载体转导到细胞中,然后用 LY294002 和 BIO 处理。使用各个蛋白质的磷酸化特异性抗体,通过免疫印迹鉴定蛋白激酶的磷酸化水平。将 20 μg 蛋白质裂解液加载到每个孔中。

[0096] 图 10(A) 表示在存在或不存在 CD49f、LY294002、BIO 的情况下,成骨条件培养基中

成体干细胞的培养。通过茜素红 S 染色证实成骨。图 10 (B) 示出了通过将茜素红 S 染色的板与西吡氯铵孵育,然后通过 ELISA 在 570nm 鉴定洗脱的茜素红 S 获得的结果 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。图 10 (C) 表示通过诸如 BGLAP、VDR、MSX2、骨钙蛋白、RUNX2 等成骨细胞标志物基因鉴定的骨细胞分化效率。图 10 (D) 示出通过在存在或不存在 CD49f、LY294002、BIO 的脂肪细胞诱导培养基中孵育成体干细胞,并在诱导后 2 周,通过油红 O 染色在细胞质中可视化脂滴积累获得的结果。图 10 (E) 显示通过用 100% 的异丙醇洗脱油红 O,然后在 500nm 处光学测量吸光度得到的结果 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。图 10 (F) 是通过诸如 CEBP- β 、AP2、PPAR γ 和瘦素的脂肪细胞标志物基因的表达鉴定的脂肪细胞分化效率。

[0097] 图 11 (A) 表示通过实时 PCR 定量测量 mRNA 的表达得到的结果。在该图中,展示了单层细胞 (比较实施例 1) 和 MSC 球体 (实施例 1) 的多能性标志物的相对 mRNA 表达水平。所有的分析均重复 3 次,然后用内在 β -肌动蛋白标准化 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。图 11 (B, C) 示出通过将靶向 OCT4 或 SOX2 的 siRNA 转染进成体干细胞,然后通过实时 PCR 分析 OCT4 和 SOX2 的表达水平得到的结果 (* $P < 0.05$, **, $P < 0.01$)。非靶向 siRNA (siCON) 被用作对照组。图 11 (D) 示出通过在转导后 48 小时收集细胞,然后通过实时 PCR 鉴定 CD49f 的表达得到的结果。图 11 (E) 表示在 siRNA 转染的细胞和对照转导的细胞中测定的球体形成效率 (*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$)。图 11 (F) 示出了使用抗 -OCT4、抗 SOX2 抗体进行染色质免疫沉淀的结果。靶向 CD49f 启动子的三个结构域的特异性引物集在表 1 中列出。图 11 (G) 示出在用对照病毒及 OCT4、SOX2 病毒感染的细胞中 CD49f、OCT4、SOX2 的免疫细胞化学分析的结果。用 Hoechst (蓝) 染色细胞核。比例尺 = 50 μ m。图 11 (H) 示出了通过 FACS 鉴定,在对照组和其中 OCT4 和 SOX2 被超表达的细胞中的 CD49f 阳性细胞组。图 11 (I) 示出通过定量测量与对照组相比的 CD49f 表达得到的结果。其中指示了 OCT4、SOX2、NANOG、LIN28 被超表达的细胞的组合。图 11 (J) 示出用于鉴定用病毒感染的细胞的指定组合中 CD49f 蛋白表达的免疫印迹结果。

[0098] 图 12 示出了通过 GFP 表达确定的病毒感染效率。足够的感染效率对于产生 iPSC 是必要的。使用 GFP 病毒确定信号转导效率。

[0099] 图 13 (A) 示出用指定基因的组合感染成体干细胞。在该图中,展示了明视场图像和碱性磷酸盐反应性。图 13 (B) 示出 iPSCs-来源的畸胎瘤的苏木精和曙红染色 (H&E 染色) 结果,其中展示了外胚层 (神经上皮,神经玫瑰花状结构)、中胚层 (平滑肌) 和内胚层 (脂肪组织,肠上皮) 的组织学概况。图 13 (C) 示出了通过利用 RT-PCR 分析多能性标志物基因及 CD49f、 β -肌动蛋白的表达水平得到的结果。图 13 (D) 展示其中转导了 CD49f、多能性标志物、siCon 以及 siCD49f 的 hESC 的三胚层标志物的表达水平。图 13 (E) 表示用非靶向 siRNA 和靶向 CD49f 的 siRNA 转导 hESC 得到的结果,成功重复该转导三次,收集细胞裂解液,然后使它们接受 PI3K/AKT/GSK3 β 的免疫印迹分析。图 13 (F) 显示了通过用指定浓度的 PI3K 抑制剂 LY294002 处理 hESC,然后利用实时 PCR 测量 NANOG 和 Cd49f 的表达得到的结果。

[0100] 图 14 (A) 示出了人 iPSC 和 hESC 的相差图像。为了自发分化,使 hiPSC 和 hESC 接受 8 天悬浮培养以形成胚状体 (EB)。为进行补充分化,将 EB 转移到涂覆明胶的板,然后维持 8 天。图 14 (B) 示出了其中转导了对照 siRNA 和靶向 CD49f 的 siRNA 的 hESC 的相差图像。

[0101] 最佳实施方式

[0102] 在下文中,意图通过下面的实施例更详细地描述本发明。提供下面的实施例只是为了更具体地解释本发明,并且对本领域技术人员显而易见的是,本发明的范围并不限于根据本发明的主旨的这些实施例。

[0103] 制备例 1:从脐带血中分离 MSC

[0104] 遵从 Boramae 医学中心及产科的伦理审查委员会 (IRB),从分娩后获得的 hUCB 中提取的成体干细胞。将 UCB 样品与 HetaSep 溶液 (Stem Cell Technology, Vancouver, Canada) 以 5 : 1 的比例混合,并将该混合物在室温下孵育,直到除去血细胞。收集上清并用 Ficoll 密度梯度以 2,500rpm 离心 20 分钟。得到单核细胞,然后在正常培养条件下接种到培养板。

[0105] 生长培养基为 DMEM (Invitrogen, Carlsbad, USA), 含有 10% FBS、10ng/ml 的 bFGF、5ng/ml EGF、20ng/ml 的长 R3-IGF-1 和 1 μ g/ml 的抗坏血酸。所有的程序获得汉城国立大学 IRB 的批准 (IRB 号 0603/001-002-07C1)。

[0106] 制备例 2:制备人类胚胎干细胞

[0107] 根据材料转让协定从 CHA 干细胞研究实验室获得人类胚胎干细胞 (hESC)。使用人 ES/iPS 细胞培养基,在用丝裂霉素 C 处理的 STO 饲养层细胞中维持 hESC 和人类诱导式多能干细胞 (hiPSC)。如参考文献 (Cowan et al., 2004) 所述,将 20% knockout 血清替代物、20ng/ml bFGF、1% 非必需氨基酸、1% GlutaMAX、1% 青霉素 / 链霉素和 0.1mM β -巯基乙醇加入到 Knockout DMEM。所有的程序获得汉城国立大学 IRB (IRB 号 1008/001-001) 的批准。

[0108] 实施例 1:来源于脐带血的成体干细胞的球体形成

[0109] 为形成成体干细胞球体并防止细胞附着在塑料容器的底部,使用涂有 1% 的琼脂糖 (Nunc, Rochester, NY) 的 100mm 培养板,并且如制备例 1 中所述在生长培养基中孵育 1.5×10^5 个成体干细胞。每 1ml 培养基中共接种 15,000 个细胞,并将成体干细胞球体孵育一周。为了防止细胞损失,培养溶液仅每周两次部分替换。7 天之后,通过 40 μ m 孔径的细胞过滤网收集成体干细胞球体。用 PBS 洗涤收集的成体干细胞球体,然后轻轻地离心 (800rpm/5min (分钟)) 用于后续实验。

[0110] 实施例 2:来自脂肪组织和骨髓的成体干细胞的球体形成

[0111] 根据与实施例 1 相同的方法收集成体干细胞球体,不同的是使用来自于脂肪组织和骨髓的成体干细胞,而不是使用 hUCB 来源的成体干细胞。

[0112] 比较实施例 1:来源于脐带血的成体干细胞的单层培养

[0113] 从制备例 1 获得的细胞在塑料培养板中进行单层培养。

[0114] 实验 1:成体干细胞球体表面抗原的确定

[0115] 与在比较实施例 1 中一样,当单层孵育细胞时,成体干细胞显示出扁平 and 纺锤形的形态,而在与实施例 1 和实施例 2 相同的非附着培养的情况下,形成浮动的球体状菌落 (成体干细胞球体)。为了鉴定在从比较实施例 1 和实施例 1 与 2 收集的成体干细胞球体获得的细胞中显示成体干细胞特性的表面抗原,通过离心收集各自的细胞,用 CD44-FITC, CD90-Alexa Fluor 647, CD34-PE 和 CD 117-PE (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) 作为荧光染料缀合的鼠抗人单克隆抗体处理来染色,然后用 FACS Aria (BD Bioscience, San Jose,

CA, U SA) 和 FACSDiva 软件 (BDBioscience, San Jose, CA, USA) 分析细胞表面标志物。

[0116] 作为结果,确定了即使在球体状态培养的情况下,干细胞的表面抗原(图2)没有变化。

[0117] 通过 FACS 分析,确定 MSC 标志物是否在来源于成体干细胞的单层孵育的细胞和成体干细胞来源的球体的表面上表达。如在图 2B 中所示,单层孵育的细胞和 MSC 球体均对 MSC 标志物 (CD44 和 CD90) 呈阳性反应,但与造血干细胞标志物一样对 CD34 和 CD117 呈阴性反应(图 2C)。

[0118] 实验 3:成体干细胞球体的细胞分裂潜力

[0119] 在实施例 1 中收集的球体被改变成单个细胞,然后与比较实施例 1 中的成体干细胞一起维持在含 10% FBS 的培养基中,以每星期的间隔继代培养。使用参考文献 (Park et al., 2009, Histone deacetylase inhibitors decrease proliferation potential and multilineage differentiation capability of human mesenchymal stem cells (组蛋白去乙酰化酶抑制剂降低人间充质干细胞的增殖潜力和多系分化能力), Cell Prolif 42, 711-720) 中所描述的下列等式,通过确定累积群体倍增水平 (CPDL) 来测量估计的增殖潜力。

[0120] $CPDL = \ln(N_f/N_i)/\ln 2$

[0121] 在上面的等式中, N_i 和 N_f 分别是初始和最终的细胞数。最初共有 50,000 个细胞接种于 6 孔培养板 (Nunc, Rochester, NY) 中,然后每周一次对细胞计数。

[0122] 根据 CPDL 评估,对单层孵育的细胞(比较实施例 1)和球体来源的细胞(实施例 1)的增殖潜力进行了比较。2 周后,在 CPDL 7.7 时,球体来源的细胞与单层孵育的细胞(图 3A)相比显示出快速的细胞增殖。这样的数据表明,成体干细胞球体与成体干细胞共享免疫学特性,并且球体来源的细胞与单层培养细胞相比更猛烈地分裂。

[0123] 实验 4:来自成体干细胞的细胞构成球体的基因表达的变化

[0124] 根据与实施例 1 相同的方法,使成体干细胞接受非附着培养。在培养开始后的 7 天,收集由此得到的球体,通过 40 μ m 细胞过滤网,用 PBS 洗涤,然后离心,以得到第一球体。用胰蛋白酶-EDTA 将所述第一球体 (P6) 分离成单个细胞的状态,并转移到涂有琼脂糖的新培养板,以制备第二球体 (P12)。

[0125] 使用 Trizol Reagent™ (Invitrogen, USA), 根据制造商推荐的规程,从所述球体 (球体 (P6) 和球体 (P12)) 和比较实施例 1 中收集的单层孵育的成体干细胞提取总 RNA, 然后与寡聚 dT 引物和 Accupower RT 预混合液 (Bioneer, Korea) 混合,以合成 cDNA。利用 Accupower PCR 预混合液 (Bioneer, Korea), 根据制造商推荐的规程,使用所述 cDNA 作为模板进行 PCR。

[0126] 作为结果,确定了与单层培养相比,从非附着培养获得的第一和第二球体表现出 OCT4、SOX2 和 NANOG 表达的改善,并且没有显示 ZNF281 和 c-MYC 表达的变化(图 3B)。

[0127] 实施例 3:成体干细胞来源的球体的细胞可塑性的鉴定

[0128] 观察了单层孵育的细胞(比较实施例 1)和球体来源的细胞(实施例 1)向脂肪组织、骨组织和神经组织的可塑性。

[0129] 3-1. 分化成脂肪组织

[0130] 使用含 5% FBS、1 μ M 地塞米松、10 μ M 胰岛素、200 μ M 吡啶美辛和 0.5mM 异丁基甲

基黄嘌呤的 DMEM 进行单层孵育的细胞（比较实施例 1）和球体来源的细胞（实施例 1）的细胞培养，以诱导分化成脂肪组织。

[0131] 为根据细胞中存在的脂肪积累确定细胞的分化程度，用油红 O (OilRed O) 染色孵育的细胞，然后用 100% 异丙醇萃取渗透到细胞中的油红 O，并用酶标仪 (EL800, Bio-Tek Instruments, USA) 在 OD 500 定量。此外，使用 RT-PCR 检测脂肪组织特异性基因 C/EBP β 、AP2 和 PPAR γ 的表达。

[0132] 结果发现，球体中油红 O 染色的程度更高，特别是脂肪组织特异性基因 C/EBP β 、AP2、PPAR γ 和瘦素在球体中的表达远高于单层孵育的 MSC (图 4C, 4F, 4H)。这表明 MSC 球体来源的细胞具有更高的分化成脂肪细胞系统的潜力。

[0133] 3-2. 分化成骨组织

[0134] 在含有 5% FBS、50 μ M L-抗坏血酸-2-磷酸、0.1 μ M 地塞米松和 10 μ M 磷酸甘油的 DMEM 中培养单层孵育的细胞（比较实施例 1）和球体来源的细胞（实施例 1），以诱导分化成骨组织。用对钙特异性的茜素红 (AlizarinRed) 将细胞染色，然后通过用 100mM 西吡氯铵 (Sigma-Aldrich) 处理一小时萃取染料，并用于定量分析。通过分光光度计在 570nm 处测定溶解的茜素红 S 的发射。

[0135] 此外，使用 RT-PCR 检查了骨组织特异性的基因骨钙蛋白和 RUNX2 的表达。

[0136] 通过茜素红 S 染色，经鉴定，球体来源的 MSC 更有效地分化成骨细胞。骨细胞诱导后，球体来源的细胞表现出骨钙蛋白和 RUNX2 表达水平的增加（图 4E, 4G 和 4I）。这表明 MSC 球体来源的细胞具有更高的分化成骨细胞系统的潜力。

[0137] 3-3. 分化成神经组织

[0138] 在培养的最初阶段，将单层孵育的细胞（比较实施例 1）和球体来源的细胞（实施例 1）维持在 DMEM 预诱导培养基中，其含有 5% FBS 和 10ng/ml β FGF，然后用含有 100 μ M MBHA、50 μ M 毛喉素、2% DMSO、25mM KCl 中、2mM 的丙戊酸、1X B27 添加剂、10ng/ml β FGF 和 10ng/ml 的 PDGF 的 DMEM 孵育 24 小时以分化成神经细胞。

[0139] 从根据该方法分化的细胞提取 RNA，并用作模板进行 RT-PCR。检查对神经细胞特异性的基因 MAP2、TUJ-1 和 PAX6 的表达。

[0140] 结果发现，从球体来源的细胞分化的细胞与从单层孵育的细胞分化的细胞相比，对神经细胞特异性的基因 MAP2、TUJ-1 和 PAX6 的表达显著增加（图 5）。

[0141] 实验 5：成体干细胞球体通过 PI3K/AKT/GSK3 β 途径调节 MSC 球体的细胞增殖和生存。

[0142] 为鉴定 GSK3 和 PI3K 信号转导对于球体形成的影响，进行抑制实验。在用 GSK3 抑制剂 BIO (Sigma-Aldrich) 以 0 μ M、0.2 μ M 或 0.5 μ M 的浓度处理后，或用 PI3K 抑制剂 LY294001 (Calbiochem, La Jolla, CA) 以 0 μ M、10 μ M、30 μ M 或 50 μ M 的浓度处理后，观察成体干细胞球体的形成。从培养后七天对成体干细胞球体的数量进行计数。

[0143] 根据参考文献 (Park et al., 2009) 进行 PI3K、AKT 和 GSK3 β 的免疫印迹分析。在含有 1% 的 Triton X-100、137mM NaCl、2mM EDTA 和 0.1% SDS 的 50mM Tris-HCl 缓冲液中，其中添加了 1mM 抑肽酶、1mM 亮肽素、1mM 抗蛋白酶和 0.1mM 原钒酸钠，将作为单层或球体孵育的成体干细胞粉碎。使用 DC 测定试剂盒 (Bio-Rad, USA) 测定蛋白质的含量，然后在 0 ~ 15% 聚丙烯酰胺凝胶上加载给定量的蛋白质进行 SDS-PAGE。然后在 50V, 350mA

将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上,持续 5 个小时。所有的抗体,根据制造商的说明使用,并使用增强的化学发光检测试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK) 确定蛋白条带。

[0144] 如图 6A 中所示,相比于单层孵育的成体干细胞, BIO 处理过的和未经处理的成体干细胞球体中磷酸 -PI3K 和磷酸 -AKT 增加,但用 LY294002 处理基本上引起 GSK3 β (Ser9) 去磷酸化作为激活状态。

[0145] 随后,确定用 BIO 或 LY294002 处理后的球体形成的效率,以鉴定 PI3K/AKT/GSK3 β 途径是否与成体干细胞球体形成有关。7 天之后,在用浓度为 0.2 μ M-0.5 μ M 的 BIO 处理的组中,形成的球体的数目以及球体的大小显著增加,这表明 GSK3 β 的活性抑制球体形成 (图 6B 和 6C)。另一方面,在用浓度为 30 μ M 至 50 μ M 的 LY294002 处理的组中,成体干细胞球体的数量和大小显著下降 (图 6D 和 6E)。这样的结果,以及与此,表明 PI3K/AKT/GSK3 β 信号转导途径对于球体形成是至关重要的,并促进锚定非依赖性生存。

[0146] 实验 6:来自成体干细胞的球体的表面标志物表达的变化

[0147] 为了定量分析单层孵育的细胞 (比较实施例 1) 和球体来源的细胞 (实施例 1) 的表面标志物的表达,通过离心收集各自的细胞,然后用 CD49a-PE, CD49b-PE, CD49f-FITC, CD49e-PE, CD 104-PE (BDBioscience, San Jose, CA, USA) 作为荧光染料缀合的鼠抗人单克隆抗体染色,以使用 FACS Aria (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) 和 FACSDiva 软件 (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) 进行细胞的表面标志物的分析。

[0148] 从所述 FACS 分析的结果,确定了球体来源的细胞 (实施例 1) 与单层孵育的细胞 (比较实施例 1) 相比表现出更高的 CD49f 和 CD104 表达 (图 7)。所述实验在相同的条件下重复 3 次,并且结果来自其平均值。

[0149] 实验 7:CD49f 上调有助于通过 FAK/ 桩蛋白的磷酸化作用的成体干细胞球体形成。

[0150] 整联蛋白是与细胞外基质相互作用并通过局部蛋白激酶包括 FAK 和桩蛋白 (Paxillin) 在内启动生存和生长相关的信号转导途径如 PI3K/AKT 的一个重要分子。因此,使单层孵育的成体干细胞 (比较实施例 1) 和球体来源 de 成体干细胞 (实施例 1) 都接受 FACS 分析,以鉴定整联蛋白的表达谱。

[0151] 按照以下进行 CD49f 的免疫细胞化学分析。将单层孵育的细胞和球体来源的 MSC 在 4% 多聚甲醛中固定,然后用 0.2% 的 Triton X-100 (SigmaAldrich, USA) 渗透。将细胞与 10% 的用一抗标记的正常山羊血清 (ZymedLaboratories Inc., USA)、一起孵育,然后与 Alexa 488 标记的二抗 (1 : 1000 ;Molecular Probes, USA) 一起孵育一小时。用 Hoechst 33258 (1 μ g/ml ;10 分钟) 染色细胞核。用共聚焦显微镜 (Nikon, Eclipse TE200, Japan) 捕获细胞图像。

[0152] 尽管在两种条件下 CD49a 和 CD49b 的表达水平没有显著差异,但 CD49e 在 MSC 球体中显著降低。然而,形成异源二聚物的 CD49f 和 CD104 在来源于成体干细胞球体的细胞中上调 (图 7, 图 8B)。成体干细胞球体中 CD49f 阳性细胞的概率比在塑料培养板上生长的成体干细胞高 167%。免疫细胞化学结果与 FACS 分析结果一致。观察到与单层孵育的 (即正常培养的) 成体干细胞相比,球体来源的成体干细胞表现出 CD49f 表达增加和对这类细胞标志物阳性的细胞数目的增加 (图 8A)。通过免疫印迹分析,观察到在成体干细胞球体中,磷酸化桩蛋白和磷酸化 FAK 的蛋白水平提高,并且 CD49f 蛋白水平也提高 (图 8C)。

[0153] 此外,为了鉴定整联蛋白的表达是否影响球体形成的效率,从全 MSC 组收集 CD49f 阳性细胞组,然后在 CD49f 表达谱的基础上进行 FACS 分选(图 8D)。收集 hUCB-MSC 和成体干细胞球体,并利用胰岛素-EDTA 改变成单个细胞。将胰蛋白酶处理的细胞在添加 5% FBS 的 PBS 中处理 10 分钟以重新表达细胞表面标志物。然后,通过离心收集细胞,并用荧光染料缀合的鼠抗人单克隆抗体(CD49a-PE、CD49b-PE、CD49f-FITC、CD49e-PE、CD 104-PE、CD34-FITC 和 CD44-FITC,均来自于 BD Bioscience, San Jose, CA;CD90-Alexa Fluor 647 和 CD117-PE,均来自于 BioLegend)标记。通过荧光激活的细胞分选仪 FACS Aria(BD Biosciences),利用 FACSDiva 软件(BD Biosciences),分选和分析标记的细胞。

[0154] 通过 RT-PCR 确定参与整联蛋白信号转导的 OCT4、C-MYC、CD49b、CD49f、桩蛋白、FAK 和 ILK 的表达水平。

[0155] 作为整联蛋白的下游酪氨酸激酶的桩蛋白、FAK 和 ILK 的 mRNA 水平在 CD49f 阳性细胞组中增加(图 8E)。Cd49f 阳性细胞对于球体形成更有效,并且与 CD49f 阴性细胞的球体直径相比,球体直径增加约 2.2 倍(图 8F、8G 和 8H)。根据这些结果,可以推导出 CD49f 表达水平增加与整联蛋白信号的激活有关,并且允许成体干细胞在锚定非依赖性生长中存活。

[0156] 实验 8:CD49f 的超表达通过 PI3K/AKT/GSK3 途径调节细胞增殖和分化。

[0157] 为了进一步确认 CD49f 基因表达是否依赖于 PI3K/AKT/GSK3 途径的激活,用 LY294002 或 BIO 将超表达 CD49f 的成体干细胞处理 24 小时和 48 小时。

[0158] 通过 MTT 测定分析根据活细胞将四唑盐转化成紫甲贲的能力,测量细胞的增殖潜力。用对照载体或 CD49f 表达载体转导成体干细胞。转导后 24 小时,将细胞接种在 24 孔板上,并在包含 LY294002 和 BIO 的培养基中孵育。培养 24 小时和 48 小时后,向每个孔加入 20ml MTT 贮存液(5mg/ml, Sigma),然后在 37°C 进一步孵育 4 小时。在移除上清之后,向每个孔加入 200ml DMSO,使得不溶性紫甲贲晶体可以溶解于水中。然后,将细胞转移到 96 孔微板上,并使用 EL800 酶标仪(BIO-TEK Instruments, Winooski, VT, U. S. A.) 在 540nm 波长处测量吸光度。所有测量重复三次。

[0159] 在超表达 CD49f 的成体干细胞中,通过 MTT 分析鉴定到 BIO 处理的成体干细胞的生长速率高于未用 BIO 处理的成体干细胞,但是 LY294002 抑制细胞增殖(图 9A)。与此一致,在球体形成的测定中, BIO 增加成体干细胞球体的数目,但 LY294002 抑制超表达 CD49f 的成体干细胞的球体形成(图 9B)。通过免疫印迹分析,证明了 CD49f 超表达诱导成体干细胞中 PI3K、AKT 和 GSK3 β 磷酸化水平的提高。BIO 处理诱导 AKT 和 GSK3 的磷酸化,而 LY294002 处理抑制超表达 CD49f 的成体干细胞中 AKT 磷酸化(图 9C)。根据这些数据,可以推导出在介导细胞增殖时 CD49f 的上调利用了 PI3K/AKT/GSK3 途径。

[0160] 随后,鉴定了在成体干细胞向骨细胞和脂肪细胞分化时 CD49f 表达是否可以由 PI3K/AKT/GSK3 途径调节。用 LY294002 和 BIO 处理超表达 CD49f 的成体干细胞,然后分别在骨细胞和脂肪细胞培养基中孵育,以诱导向骨细胞系和脂肪细胞系的分化。

[0161] 通过茜素红染色,确定了 CD49f 增加骨细胞诱导细胞中矿物质积累,并且 BIO 处理进一步提高超表达 CD49f 的 MSC 中矿物质积累,而 LY294002 处理显著降低超表达 CD49f 的 MSC 中矿物质积累水平(图 10A 和 10B)。与此一致,可以通过 RT-PCR 确定作为骨细胞特异性标志物 BGLAP、VDR、MSX2、骨钙蛋白和 RUNX2 的 mRNA 水平被 CD49f 超表达提高,并且

在 BIO 处理的成体干细胞中进一步提高,但对于 LY294002 处理的情况,骨细胞特异性标志物的 mRNA 水平降低(图 10C)。

[0162] 对于分化成脂肪细胞,通过油红 O 染色确定在超表达 CD49f 的细胞中脂质水平显著提高,但与未处理的对照组相比, BIO 和 LY294002 抑制脂质积累(图 10D 和 10E)。在 RT-PCR 中,作为主要脂肪细胞转录因子的 C/EBP β 、aP2、PPAR γ 和瘦素的 mRNA 水平在 CD49f 超表达的情况下提高,但 BIO 和 LY294002 抑制脂肪细胞转录因子的 mRNA 水平(图 10F)。根据这些数据可知,在超表达 CD49f 的成体干细胞中,PI3K/AKT/GSK3 途径的上调促进向骨细胞的分化比促进向脂肪细胞的分化更具特异性。

[0163] 实验 9:OCT4 和 OSX2 与 CD49f 结合,并且通过 CD49f 启动子结构域上调 CD49f 转录。

[0164] 由于确定 CD49f 表达与成体干细胞球体形成时整联蛋白信号的上调有关,因此本发明人检查了 CD49f 对于干细胞的多能性是否是必不可少的。

[0165] 用 TRIzol™ 试剂 (Invitrogen) 根据生产商的说明书,提取总 RNA,并与寡聚 dT 引物混合。根据生产商的说明书,利用 SuperScript iiiFirst-Strand Synthesis System (Invitrogen) 进行 RT-PCR,从该混合物合成 cDNA。使用 Accupower PCR 预混合液 (Bioneer, Daejeon, Republic of Korea) 进行 PCR。该研究所用的引物集在表 1 中列出,通过凝胶电泳使用 1.5% 琼脂糖凝胶和溴化乙锭染色分析所有 PCR 产物,并且通过 Bio-Rad GelDoc XR 系统 (Bio-Rad) 进行荧光数字化。将 cDNA 与每个 cDNA 相关引物和 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) 混合,以进行实时 PCR。通过给定的软件 (Applied Biosystems) 和 ABI 7300 序列测定系统根据制造商的说明书,对基因的表达进行定量。用 β -肌动蛋白或 RPL13A 作为内参对照 (housekeeping control) 标准化各个基因。对于各个基因将实验重复进行至少三次。

[0166] 首先,在成体干细胞球体中鉴定多能性标志物的表达。与单层孵育的成体干细胞相比,成体干细胞球体中可以将人体细胞重编程为多能干细胞的 OCT4、SOX2、NANOG 和 LIN28 的 mRNA 水平增加。

[0167] 为了鉴定 OCT4 和 SOX2 是否对 CD49f 有影响,将 siOCT4 和 siSOX2 转导到成体干细胞中。

[0168] 为了特异性抑制 OCT4、SOX2 和 CD49f,使用靶向 OCT4、SOX2 和 CD49f 的商业 siRNA (Dharmacon, ON Target plus SMART pool, OCT4: 目录号 L-019591-00, SOX2: 目录号 L-011778-00, CD49f: 目录号 L-007214-00-0005) 和非靶向性 siRNA (Dharmacon, ON Target plus SMART pool, 目录号 D-001810-01) 进行 siRNA 敲低研究。根据制造商的说明书转导 siRNA。简而言之,以 5×10^4 /孔的水平接种细胞,并且当细胞达到 50% 汇合时,添加包含 siRNA 的培养基(抗生素)。将细胞与 100nM siRNA 一起孵育 48 小时以增强 mRNA 表达,并孵育 72 小时以增强蛋白表达,然后提取 RNA 和蛋白用于基因和蛋白分析。

[0169] OCT4 和 SOX2 siRNA 处理特异性地阻断 OCT 和 SOX2 mRNA 的表达(图 11B 和 11C)。此外,靶向 OCT4 和 SOX2 的 siRNA 显著下调 CD49f mRNA 的表达,并且如通过球体形成的分析所确定的,其减少成体干细胞的数目(图 11D 和 11E)。为了确认 OCT 和 SOX2 如何调节 CD49f 表达,用超表达 OCT4 和 SOX2 的慢病毒感染成体干细胞,然后通过免疫细胞化学鉴定 OCT4、SOX2 和 CD49f 的表达。当 OCT4 和 SOX2 均超表达时,CD49f 的表达增加(图 11G)。成

体干细胞中也通过 FACS 分析在蛋白水平鉴定 CD49f 的超表达。

[0170] 如图 11H 所示,当 OCT4 和 SOX2 超表达时,CD49f 阳性亚群增加。为确认 OCT4 和 SOX2 的活性如何调节 CD49f 表达,使用对 OCT4 和 SOX2 具有特异性的抗体对 CD49 启动子位点进行 ChIP。与抗体结合的片段 DNA 被用于 RT-PCR,其中还使用了设计为靶向 CD49f 启动子位点的引物。如图 11F 所示,CD49f 启动子中的特定结构域以及 OCT4 和 SOX2 蛋白增加了,这表明 OCT4 和 SOX2 与 CD49f 启动子结合并激活 CD49f 的表达。随后,进行实验以鉴定成体干细胞中 CD49f 表达是否可以由 OCT4、SOX2、LIN28 和 NANOG 调节。用 OCT、SOX2、LIN28 和 NANOG 的慢病毒感染成体干细胞,并使用实时 PCR 鉴定 CD49f 的 mRNA 水平。当 OCT4/SOX2 或 OCT4/SOX2/LIN28/NANOG 超表达时,CD49f 的 mRNA 水平显著提高(图 11H)。根据免疫印迹分析,随着 Oct4/Sox2 或 OCT4/SOX2/LIN28/NANOG 的超表达,成体干细胞中 CD49f 的蛋白水平和 FAK 的磷酸化都提高了(图 11I)。因此,这些数据表明 OCT4、SOX2、LIN28 和 NANOG 具有正反馈回路,其改善成体干细胞中整联蛋白信号转导途径。

[0171] 表 1

[0172]

RT-PCT 和 qRT-PCR 测定的引物的名称与序列		
基因名称	引物序列	
β-肌动蛋白	正向:	AGA GCT ACG AGC TGC CTG AC
	反向:	AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG
C/EBP-β	正向:	GCG CGC TTA CCT CGG CTA CC
	反向:	TGG CCT TGT CGC GGC TCT TG
AP2	正向:	GGG TCA CAG CAC CCT CCT GA
	反向:	GGT TTG GCC ATG CCA GCC AC
PPAR-γ	正向:	CCT CCG GGC CCT GGC AAA AC
	反向:	CTC CTG CAC AGC CTC CAC GG
瘦素	正向:	GAA GAC CAC ATC CAC ACA CG
	反向:	AGC TCA GCC AGA CCC ATC TA
骨钙蛋白	正向:	CCT ATT GGC CCT GGC CGC AC
	反向:	GAC ACC CTA GAC CGG GCC GT
RUNX2	正向:	CTT GAC CAT AAC CGT CTT CA
	反向:	GTC ATC AAT CTT CTG TCT GT
桩蛋白	正向:	AAC TGG TTG AAG GGT GTT GC
	反向:	AGG TTC AGT GGG TTC ACA GG
FAK	正向:	CGA GAG ATT GAG ATG GCA CA
	反向:	TAC TCT TGC TGG AGG CTG GT
ILK	正向:	AAG GTG CTG AAG GTT CGA GA
	反向:	ATA CGG CAT CCA GTG TGT GA
VDR	正向:	CGG CCG GAC CAG AAG CCT TT
	反向:	CTG GCA GTG GCG TCG GTT GT
MSX2	正向:	CCC TGG AGC GCA AGT TCC GT
	反向:	GGC GGG ATG GGA AGC ACA GG

[0173]

<i>CD49f</i>	正向:	TCA TGG ATC TGC AAA TGG AA
	反向:	AGG GAA CCA ACA GCA ACA TC
<i>OCT4</i>	正向:	GTG GAG GAA GCT GAC AAC AA
	反向:	ATT CTC CAG GTT GCC TCT CA
<i>SOX2</i>	正向:	TGG CGA ACC ATC TCT GTG GT
	反向:	CCA ACG GTG TCA ACC TGC AT
<i>LIN28</i>	正向:	GGG GAA TCA CCC TAC AAC CT
	反向:	CTT GGC TCC ATG AAT CTG GT
<i>NANOG</i>	正向:	ACC TTG GCT GCC GTC TCT GG
	反向:	AGC AAA GCC TCC CAA TCC CAA
<i>CMYC</i>	正向:	AAG ACA GCG GCA GCC CGA AC
	反向:	TGG GCG AGC TGC TGT CGT TG
<i>KLF4</i>	正向:	GGC TGC ACA CGA CTT CCC CC
	反向:	GGT GGC GGT CCT TTT CCG GG
<i>CK18</i>	正向:	AAT GGG AGG CAT CCA GAA CGA GAA
	反向:	GGG CAT TGT CCA CAG TAT TTG CGA
<i>FOXA2</i>	正向:	TGG GAG CGG TGA AGA TGG AA
	反向:	TCA TGC CAG CGC CCA CGT AC
<i>PEPCK</i>	正向:	TTA GAT GGG ACA AAG CCT G
	反向:	GCA AGA CGG TGA TTG TAA CT
<i>HNF4a</i>	正向:	GGA ACA TAT GGG AAC CAA CG
	反向:	AAC TTC CTG CTT GGT GAT GG
<i>AFP</i>	正向:	GAA TGC TGC AAA CTG ACC AC
	反向:	TGG CAT TCA AGA GGG TTT TC
<i>TUJ-1</i>	正向:	CAG TGA CCT GCA ACT GGA GA
	反向:	GAT TGG CCA AAC ACG AAG TT
<i>MUSASHI</i>	正向:	GCC CAA GAT GGT GAC TCG
	反向:	ATG GCG TCG TCC ACC TTC
巢蛋白(<i>NESTIN</i>)	正向:	AAC AGC GAC GGA CTG TCT CTA
	反向:	TTC TCT TGT CCC GCA GAC TT

[0174]

<i>MAP2</i>	正向:	CCA ATG GAT TCC CAT ACA GG
	反向:	TCT CCG TTG ATC CCA TTC TC
<i>PAX6</i>	正向:	ACC CAT TAT CCA GAT GTG TT
	反向:	ATG GTG AAG CTG GGC ATA GG
<i>MSX1</i>	正向:	CGA GAG GAC CCC GTG GAT GC
	反向:	GGC GGC CAT CTT CAG CTT CT
<i>BRACHYURY</i>	正向:	GCC CTC TCC CTC CCC CTC CAC
	反向:	GGC GCC GTT GCT CAC AGA CC
<i>Col1A2</i>	正向:	CTG GTG CTG CTG GCC GAG TC
	反向:	GGG ACC AGG GGG ACC ACG TT

ChIP 测定的引物的名称与序列

CD49f 引物-1	正向:	AGAACAACGGGCTCATTTCAG
	反向:	CGACAGGTAGAGCAAGCACA
CD49f 引物-2	正向:	TAGGAAAGAACGGCATCGTC
	反向:	CTAGGATTTTGCCCAGGTGA
CD49f 引物-3	正向:	AACCCCTGCAGGATAAGGTT
	反向:	AGTTGTGGGGAGAACTGCTG
CD49f 引物-4	正向:	TGATGTTTCACGCAGCTTTTC
	反向:	GGAATCTGACATCCCTGCAT
CD49f 引物-5	正向:	ACATGGGGATATCCAAGCAG
	反向:	TGCCCTTAGTTCCTCACAGG
CD49f 引物-6	正向:	CTGGCCAAACTTGATGGTT
	反向:	CCATCGCAAATGGAAAACCTT

[0175] 实验 10 :CD49f 通过 PI3K/AKT/GSK3 β 途径维持 iPSC 和 hESC 的多能性。

[0176] 因为确定了 CD49f 与多能性标志物密切相关,因此检测 CD49f 在多能性状态干细胞中的作用。

[0177] 用慢病毒(从 Addgene 的质粒 pSin-EF2-Oct4-Pur、pSin-EF2-Sox2-Pur、pSin-EF2-Nanog-Pur 和 pSin-EF2-Lin28-Pur13(Cambridge, USA) 产生的病毒)感染成体干细胞,所述慢病毒表达有效地将人成纤维细胞重编程为多能干细胞的 OCT4、SOX2、LIN28 和 NANOG。

[0178] 如参考文献(Yu et al., (2007), Induced pluripotent stem cell lines derived

from human somatic cells. Science 318, 1917-1920) 所述, 进行病毒产生和转导过程。

[0179] 为产生 iPSC, 使用 GFP 病毒的感染效率必须为至少 50%。观察到全部细胞的约 50% - 70% 是 GFP 阳性细胞 (图 12)。将用 OCT4/SOX2/LIN28/NANOG 病毒感染的成体干细胞转移到包含 STO 饲养细胞的 hES 培养基中。

[0180] 在 10-20 天内, 出现 hESC 样集落, 并观察到高水平的碱性磷酸酶 (AP) 活性。追加分析最低限度分化的成体干细胞来源的 iPSC (诱导的多能干细胞) 的两个克隆。iPSC 表现出通常的 hESC 集落形态, 并且在再扩张 4 周后在 AP 染色下表现出阳性反应。仅用 OCT4 和 SOX2 感染的成体干细胞表现出弱 AP 活性, 但不形成 ES 样集落 (图 13A)。为了查明 iPSC 的多能性, 进行畸胎瘤形成分析。

[0181] 收集 STO 饲养细胞中生长的人 iPS 细胞, 然后皮下注射到非肥胖型糖尿病 - 重症联合免疫缺陷 (NOD-SCID) 小鼠中。6-8 周后, 观察到畸胎瘤。收集肿瘤样品并根据下述标准程序使之接受石蜡包埋和苏木精和曙红染色。

[0182] 通过苏木精和曙红染色, 确定细胞分化成中胚层所产生的各种组织, 包括神经细胞、神经玫瑰花状结构 (neural rosette)、平滑肌、脂肪组织和肠上皮 (图 13B)。根据 RT-PCR 分析可知, 多能性标志物基因如 OCT4、SOX2、NANOG 和 CD49f 等的内在 mRNA 表达水平与 hESC 的那些类似, 并且与亲本成体干细胞相比显著增加。使 hESC 和 hiPSC 接受 8 天悬浮培养以形成胚状体 (EB), 然后附着在凝胶涂覆的容器中追加孵育 8 天以分化 (图 14A)。在分化阶段多能性标志物和 CD49f 的表达降低, 这表明, CD49f 表达与多能性密切相关。相反, 在分化阶段 CMYC 和 KLF4 表达未受影响 (图 13C)。

[0183] 随后, 在诱导 hESC 中 CD49f 敲低后, 检测 CD49f 对多能性的作用。用 100nM siCD49f 转导 hESC 两次, 持续三天, 并使之进行 RT-PCR, 以分析多能性标志物和系统标志物。siCD49f 转导的 hESC 表现出部分分化的形式 (图 14B), 并变现出多能性标志物基因的显著降低。与此相反, 在转导了 siCD49f 的 hESC 中, 系统特异性标志物基因上调。这表明 CD49f 在维持 hESC 的多能性中起重要作用 (图 13D)。图 6 和 8 表明, 在成体干细胞球体中, PI3K/AKT/GSK3 β 途径被激活, 并且 CD49f 阳性细胞群变得丰富。与成体干细胞球体一致, CD49f 敲低在 hESC 中诱导 PI3K/AKT/GSK3 β 途径的抑制 (图 13E)。为追加确认 CD49f 维持 hESC 的未分化状态中是否需要通过 PI3K 途径, 用 PI3K/AKT 的选择性抑制剂 LY294002 处理细胞。PI3K/AKT 抑制显著降低 NANOG 和 CD49f 的表达 (图 13F)。这样的发现意味着 CD49f 通过 PI3K/AKT/GSK3 β 途径有助于 hiPSC 和 hESC 的重编程和维持。

[0184] 虽然在上文具体描述了本发明的特定部分, 本领域技术人员显然应理解, 这些具体描述仅仅是优选的本发明的实施方式, 但本发明的范围并不受它们限制。因此, 应当理解, 本发明的实际范围仅由所附的权利要求书和其等效方式限定。

[0001]

序列表

<110>	SNU R&DB FOUNDATION	
<120>	CD49F通过PI3K/AKT/GSK3途径促进成体干细胞的增殖、专能性和重编程	
<130>	OPA11010PCT	
<150>	KR10-2010-0014771	
<151>	2010-02-18	
<160>	76	
<170>	KopatentIn 1.71	
<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	β -肌动蛋白的正向引物	
<400>	1	
	agagctacga gctgctgac	20
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	β -肌动蛋白的反向引物	
<400>	2	
	agcactgtgt tggcgtacag	20
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	C/EBP- β 的正向引物	
<400>	3	
	gcgcgcttac ctcgctacc	20
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	C/EBP- β 的反向引物	
<400>	4	
	tggccttgte gegctcttg	20
<210>	5	
<211>	20	
<212>	DNA	

[0002]

<213>	人工序列	
<220>		
<223>	AP2的正向引物	
<400>	5	
	gggtcacagc accctcctga	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	AP2的反向引物	
<400>	6	
	ggtttggcca tgccagccac	20
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PPAR- γ 的正向引物	
<400>	7	
	cctcggggcc ctggcaaaac	20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PPAR- γ 的反向引物	
<400>	8	
	ctcctgcaca gcctccacgg	20
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	瘦素的正向引物	
<400>	9	
	gaagaccaca tccacacacg	20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	瘦素的反向引物	

[0003]

<400>	10	
agctcagcca gaccatctta		20
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	骨钙蛋白的正向引物	
<400>	11	
cctattggcc ctggcgcac		20
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	骨钙蛋白的反向引物	
<400>	12	
gacaccctag accgggcgt		20
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	RUNX2的正向引物	
<400>	13	
cttgaccata accgtcttca		20
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	RUNX2的反向引物	
<400>	14	
gtcatcaatc ttctgtctgt		20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	桩蛋白的正向引物	
<400>	15	
aactggttga aggtgttgc		20

[0004]

<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	桩蛋白的反向引物	
<400>	16	
	aggttcagtg ggttcacagg	20
<210>	17	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	FAK的正向引物	
<400>	17	
	cgagagattg agatggcaca	20
<210>	18	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	FAK的反向引物	
<400>	18	
	tactcttgct ggaggctggt	20
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	ILK 的正向引物	
<400>	19	
	aagtgctga aggttcgaga	20
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	ILK的反向引物	
<400>	20	
	atacggcacc cagtgtgtga	20
<210>	21	
<211>	20	

[0005]

<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	VDR的正向引物	
<400>	21	
	cggcgcggacc agaagccttt	20
<210>	22	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	VDR的反向引物	
<400>	22	
	ctggcagtgg cgtcggttgt	20
<210>	23	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	MSX2的正向引物	
<400>	23	
	ccctggagcg caagttccgt	20
<210>	24	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	MSX2的反向引物	
<400>	24	
	ggcgggatgg gaagcacagg	20
<210>	25	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD49f的正向引物	
<400>	25	
	tcatggatct gcaaattgaa	20
<210>	26	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		

[0006]

<223>	CD49f的反向引物	
<400>	26	
	agggaaccaa cagcaacatc	20
<210>	27	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	OCT4的正向引物	
<400>	27	
	gtggaggaag ctgacaacaa	20
<210>	28	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	OCT4的反向引物	
<400>	28	
	attctccagg ttgcctetca	20
<210>	29	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	SOX2的正向引物	
<400>	29	
	tggcgaacca tctctgtggt	20
<210>	30	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	SOX2的反向引物	
<400>	30	
	ccaacggtgt caacctgcat	20
<210>	31	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	LIN28的正向引物	
<400>	31	

[0007]

ggggaatcac cctacaacct	20
<210> 32	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> LIN28的反向引物	
<400> 32	
cttggcteca tgaatctggt	20
<210> 33	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> NANOG的正向引物	
<400> 33	
accttggetg cegtetctgg	20
<210> 34	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> NANOG的反向引物	
<400> 34	
agcaaaagcct cccaatccca a	21
<210> 35	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> CMYC的正向引物	
<400> 35	
aagacagcgg cagcccgaac	20
<210> 36	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> CMYC的反向引物	
<400> 36	
tgggcgagct gctgtcgttg	20
<210> 37	

[0008]

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	KLF4的正向引物	
<400>	37	
	ggctgcacac gacttccccc	20
<210>	38	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	KLF4的反向引物	
<400>	38	
	ggtggcggtc cttttccggg	20
<210>	39	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CK18的正向引物	
<400>	39	
	aatgggaggc atccagaacg agaa	24
<210>	40	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CK18的反向引物	
<400>	40	
	gggcattgtc cacagtattt gcga	24
<210>	41	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	FOXA2的正向引物	
<400>	41	
	tgggagcggg gaagatggaa	20
<210>	42	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0009]

<220>		
<223>	F0XA2的反向引物	
<400>	42	
	tcatgccagc gccacgtac	20
<210>	43	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PEPCK的正向引物	
<400>	43	
	ttagatggga caagcctg	19
<210>	44	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PEPCK的反向引物	
<400>	44	
	gcaagacggt gattgtaact	20
<210>	45	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	HNF4a的正向引物	
<400>	45	
	ggaacatatg ggaaccaacg	20
<210>	46	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	HNF4a的反向引物	
<400>	46	
	aacttcctgc ttggtgatgg	20
<210>	47	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	AFP的正向引物	

[0010]

<400>	47	
gaatgetgca aactgaccac		20
<210>	48	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	AFP的反向引物	
<400>	48	
tggcattcaa gagggttttc		20
<210>	49	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	TUJ-1的正向引物	
<400>	49	
cagtgacctg caactggaga		20
<210>	50	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	TUJ-1的反向引物	
<400>	50	
gattggccaa acacgaagtt		20
<210>	51	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	MUSASHI的正向引物	
<400>	51	
gccaagatg gtgactcg		18
<210>	52	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	MUSASHI的反向引物	
<400>	52	
atggcgtcgt ccaccttc		18

[0011]

<210>	53	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	巢蛋白的正向引物	
<400>	53	
aacagcgacg gactgtctct a		21
<210>	54	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	巢蛋白的反向引物	
<400>	54	
ttctcttctgc ccgcagaatt		20
<210>	55	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	MAP2的正向引物	
<400>	55	
ccaatggatt cccatacagg		20
<210>	56	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	MAP2的反向引物	
<400>	56	
tctccgttga tccattctc		20
<210>	57	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	PAX6的正向引物	
<400>	57	
accattatc cagatgtgtt		20
<210>	58	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	

[0012]

<220>		
<223>	PAX6的反向引物	
<400>	58	
	atggtgaagc tgggcatagg	20
<210>	59	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	MSX1的正向引物	
<400>	59	
	cgagaggacc ccgtggatgc	20
<210>	60	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	MSX1的反向引物	
<400>	60	
	ggcggccatc ttcagattct	20
<210>	61	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BRACHYURY的正向引物	
<400>	61	
	gccctctccc tccccctcca c	21
<210>	62	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	BRACHYURY的反向引物	
<400>	62	
	ggcgccgttg ctcacagacc	20
<210>	63	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	Col1A2的正向引物	

[0013]

<400>	63	
ctggtgctgc	tggccgagtc	20
<210>	64	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	ColA2的反向引物	
<400>	64	
gggaccaggg	ggaccacgtt	20
<210>	65	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD49f启动子-1的正向引物	
<400>	65	
agaacaacgg	gtcattcag	20
<210>	66	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD49f启动子-1的反向引物	
<400>	66	
cgacaggtag	agcaagcaca	20
<210>	67	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD49f启动子-2的正向引物	
<400>	67	
taggaaagaa	cggcacgctc	20
<210>	68	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD49f启动子-2的反向引物	
<400>	68	
ctaggatttt	gcccaggtga	20

[0014]

<210>	69	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD49f启动子-3的正向引物	
<400>	69	
	aaccctgca ggataaggtt	20
<210>	70	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD49f启动子-3的反向引物	
<400>	70	
	agttgtgggg agaactgctg	20
<210>	71	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD49f启动子-4的正向引物	
<400>	71	
	tgatgttcac gcagcttttc	20
<210>	72	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD49f启动子-4的反向引物	
<400>	72	
	ggaatctgac atccctgcat	20
<210>	73	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	CD49f启动子-5的正向引物	
<400>	73	
	acatggggat atccaagcag	20
<210>	74	
<211>	20	
<212>	DNA	

[0015]

<213> 人工序列

<220>

<223> CD49f启动子-5的反向引物

<400> 74

tgcccttagt tcctcacagg

20

<210> 75

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD49f启动子-6的正向引物

<400> 75

ctggcctaaa cttgatggtt

20

<210> 76

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CD49f启动子-6的反向引物

<400> 76

ccatcgcaaa tggaaaactt

20

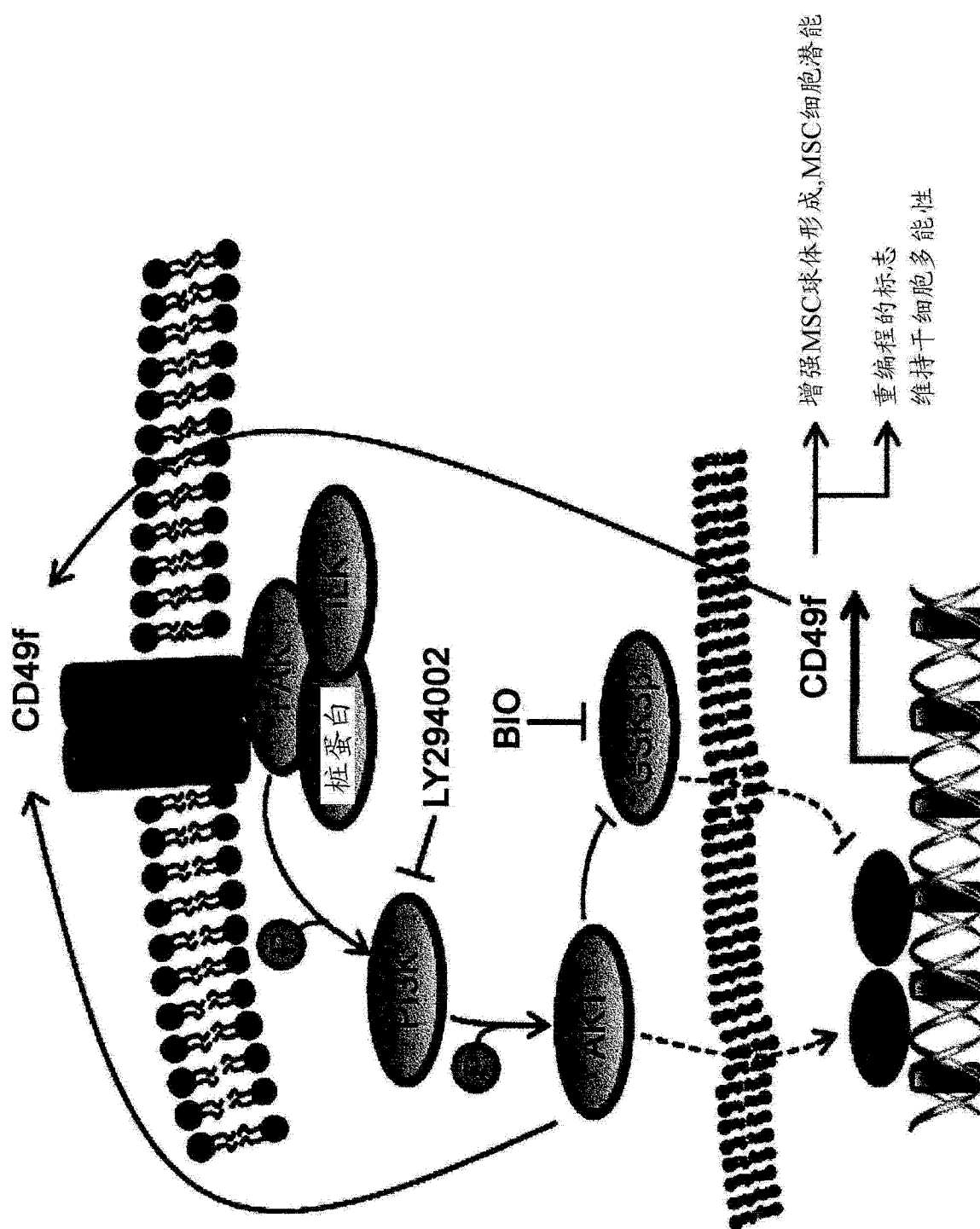
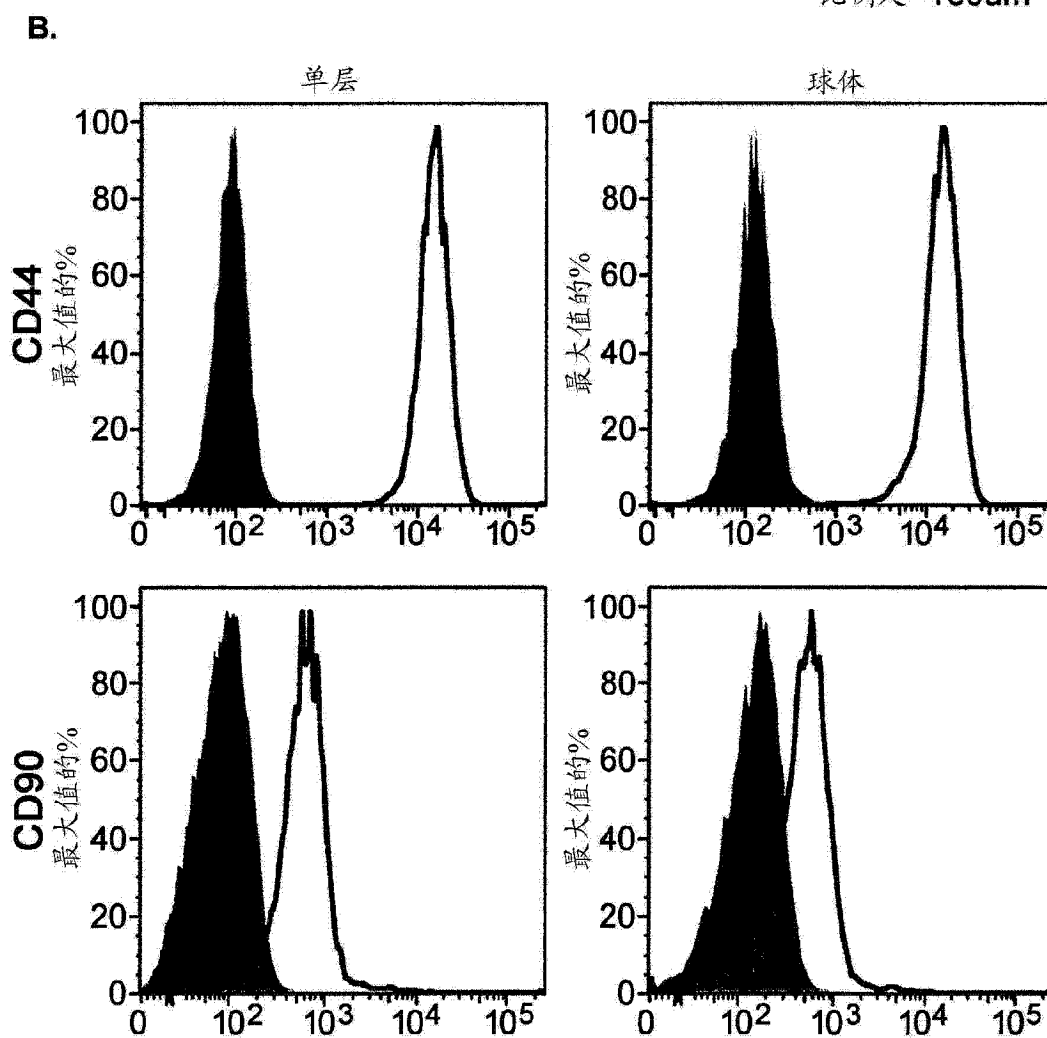
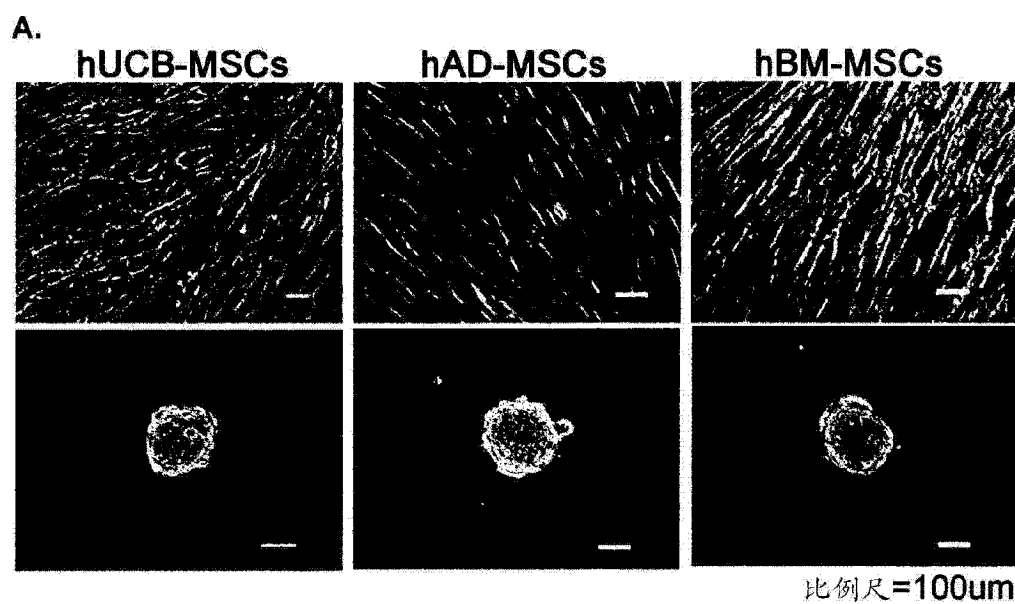


图 1



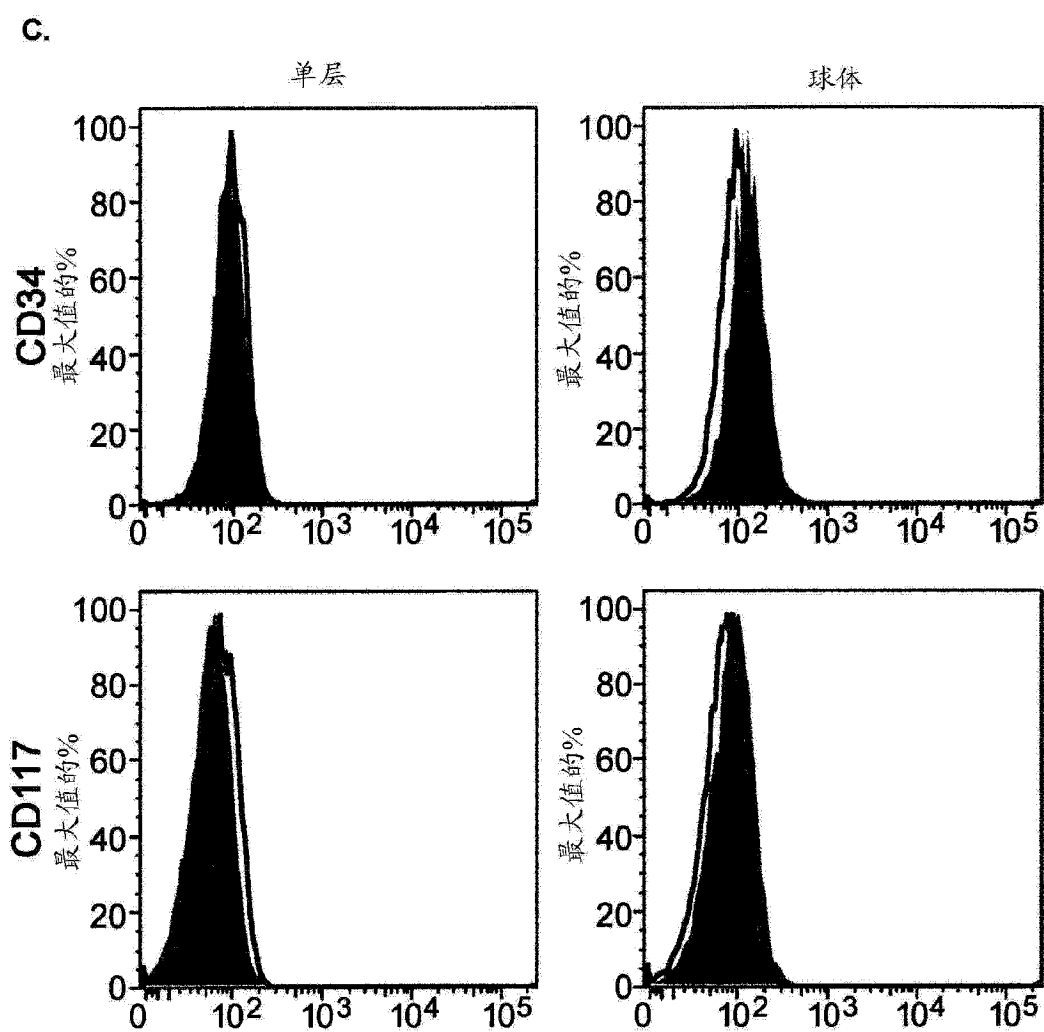
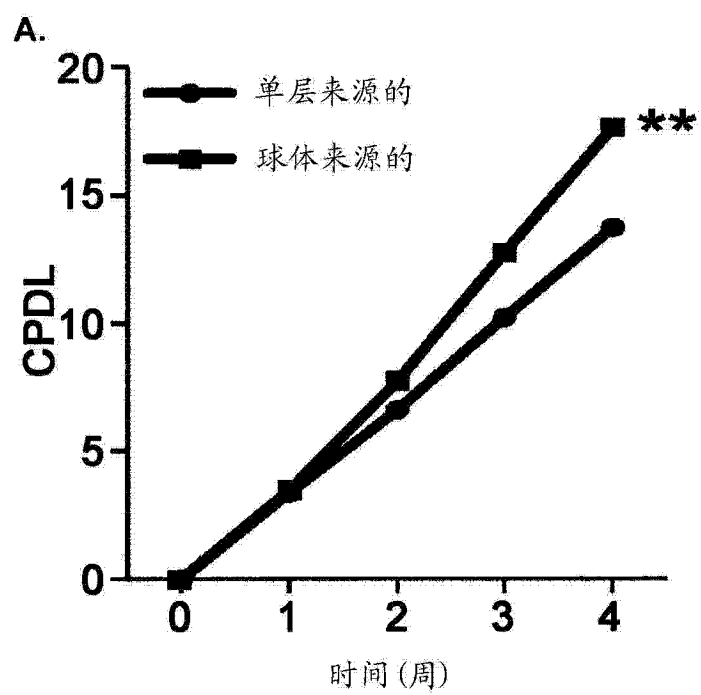


图 2



B.

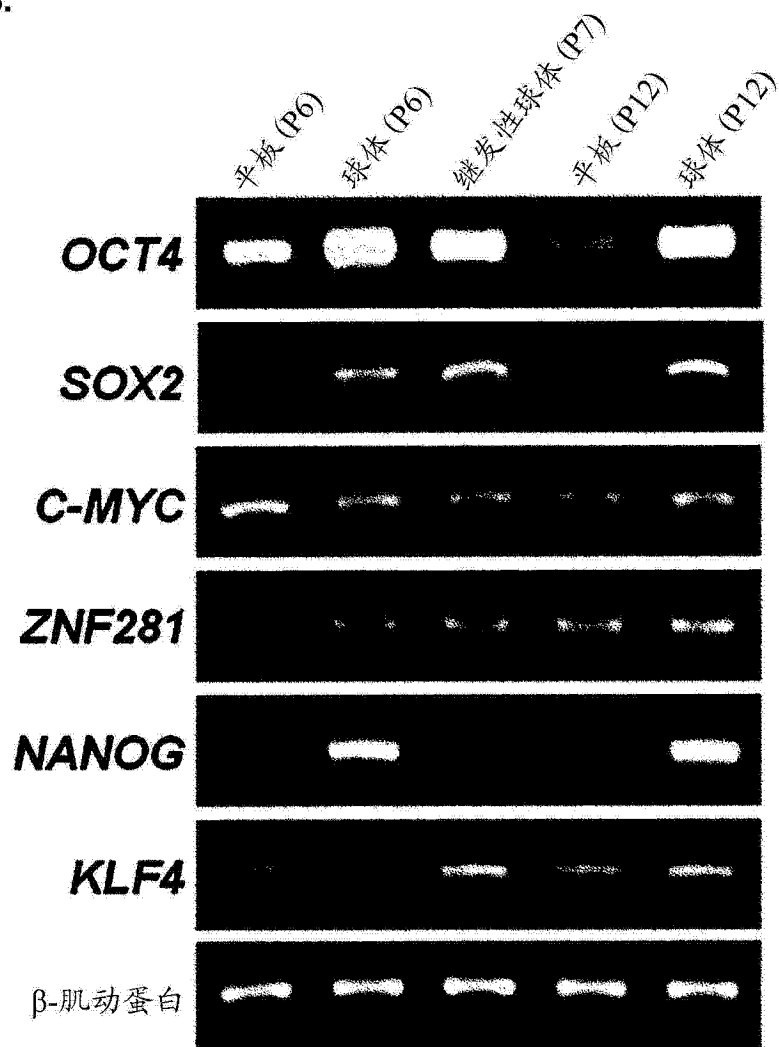
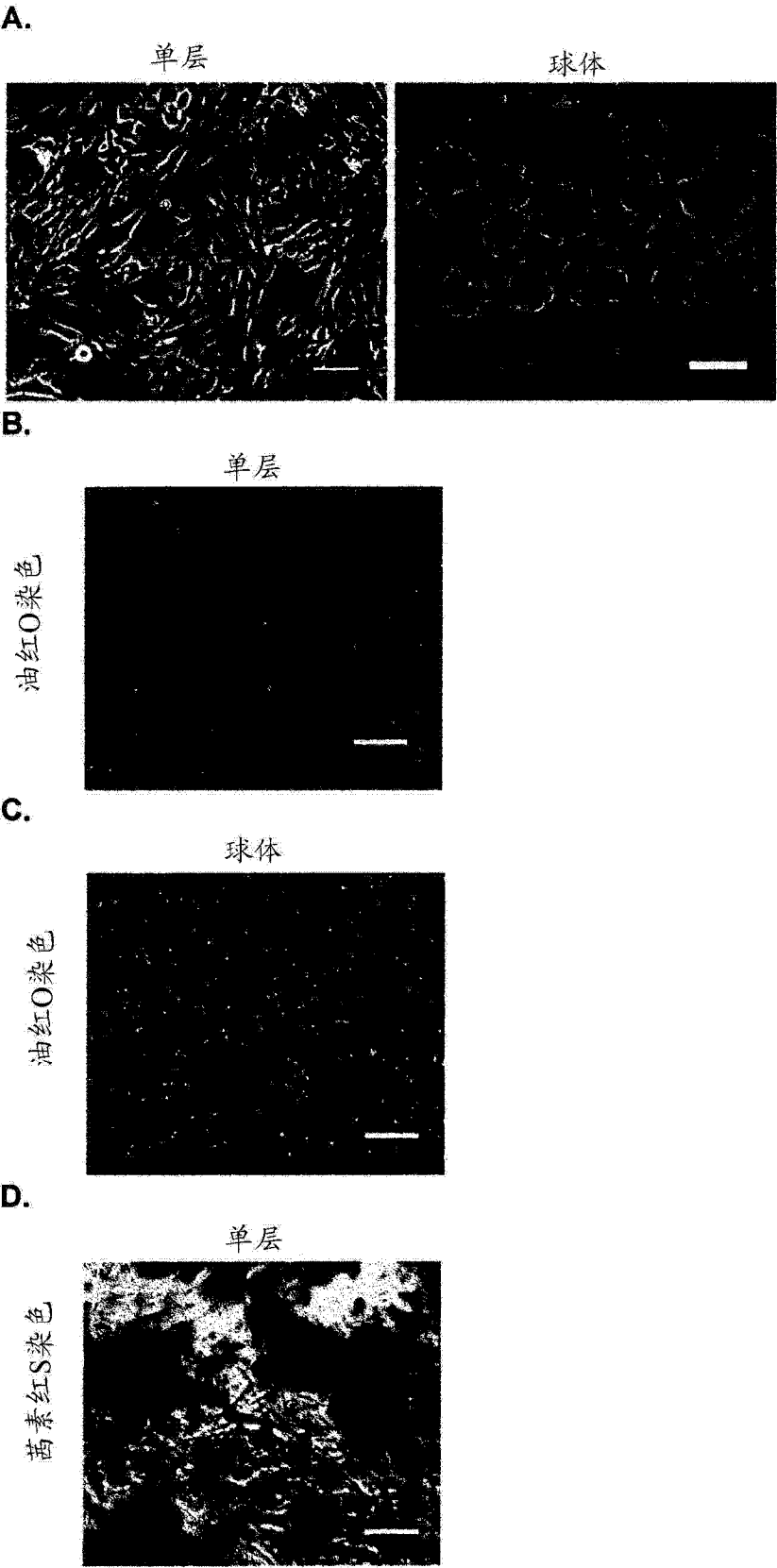
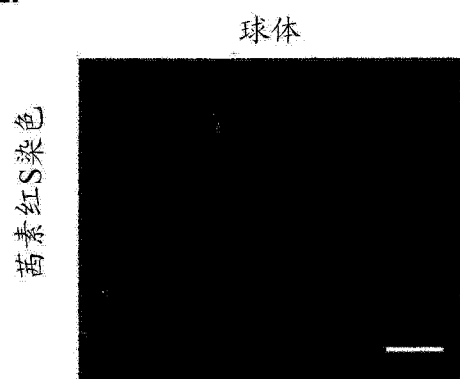


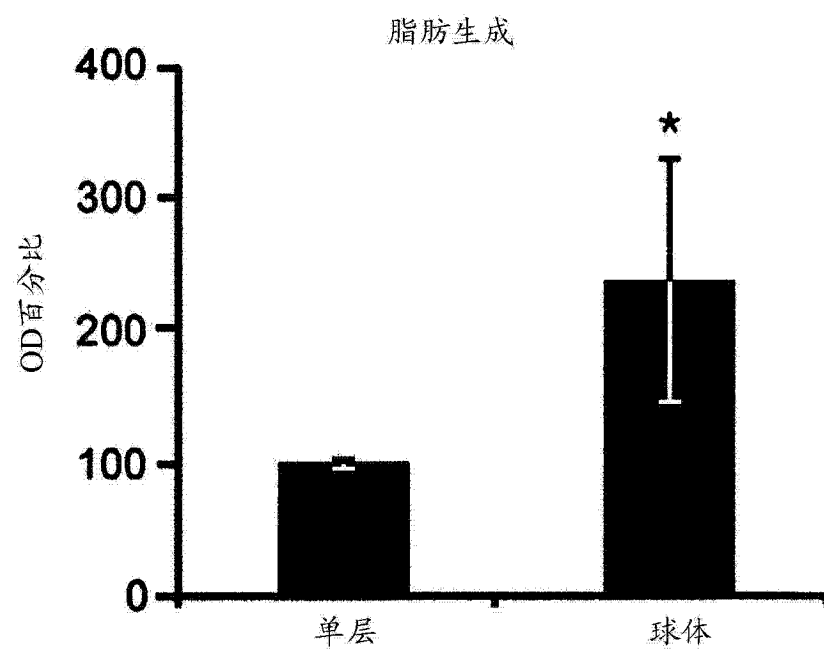
图 3

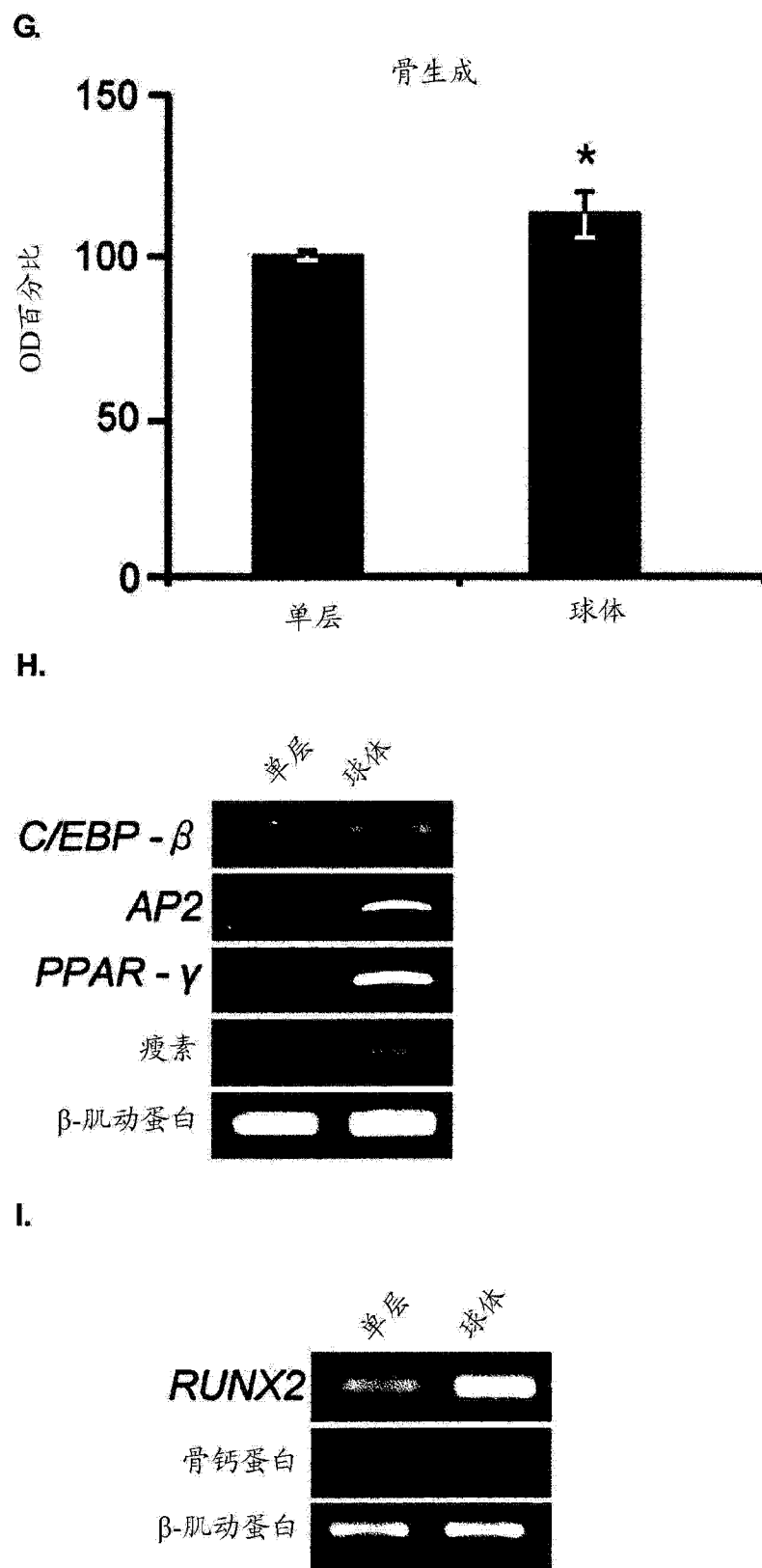


E.



F.





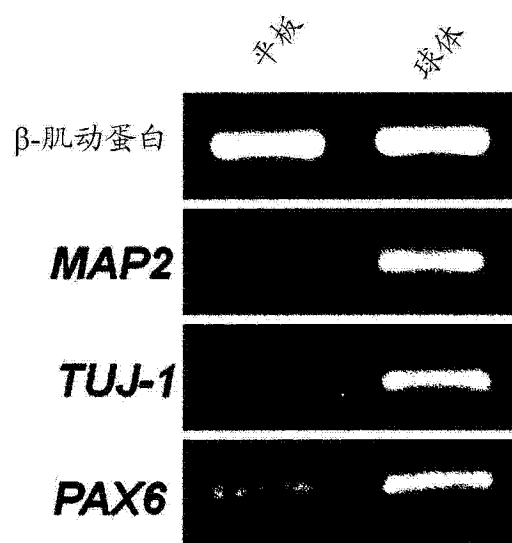
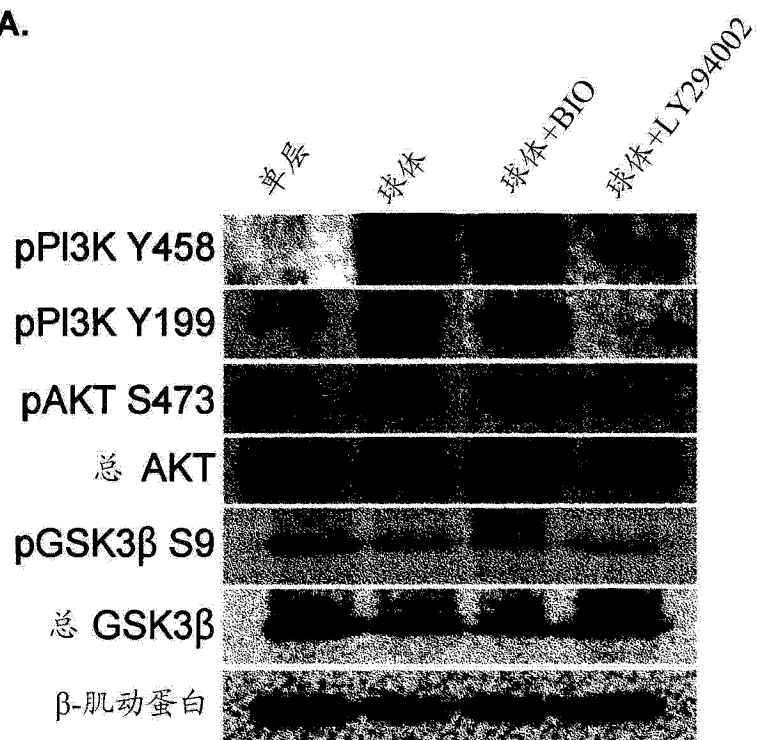
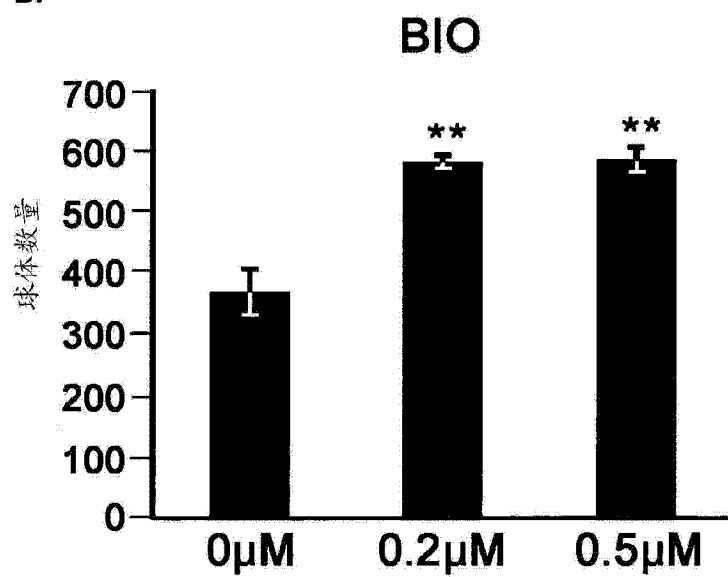


图 5

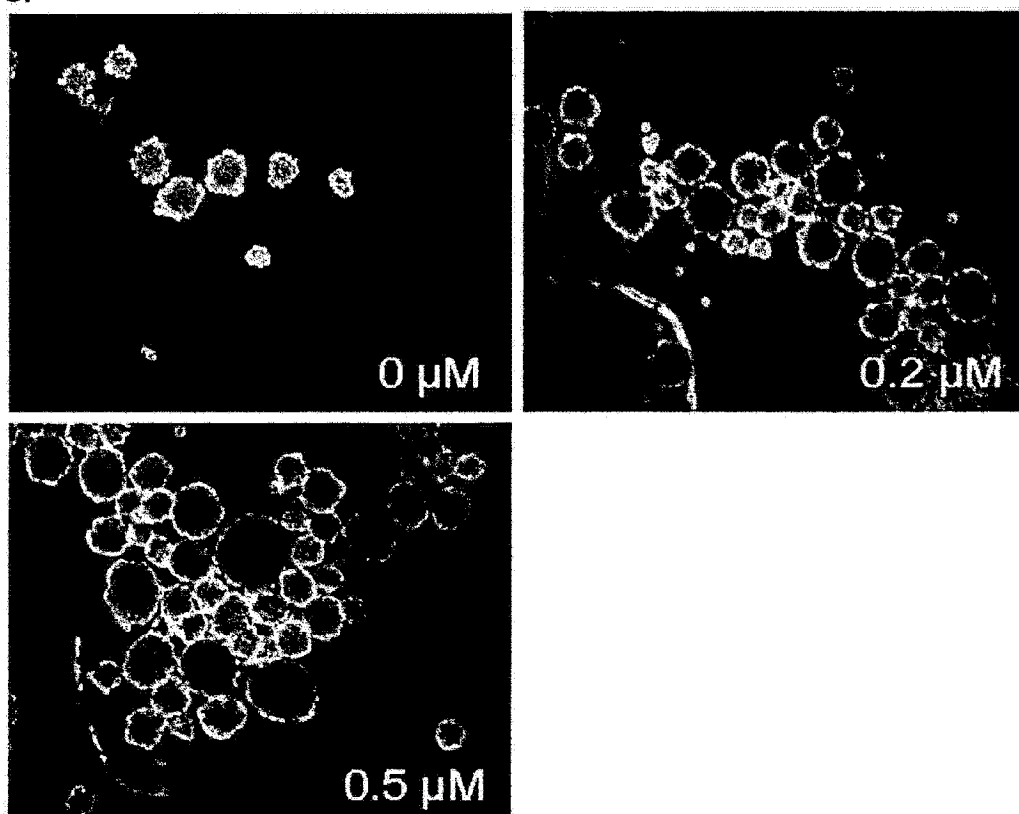
A.



B.



C.



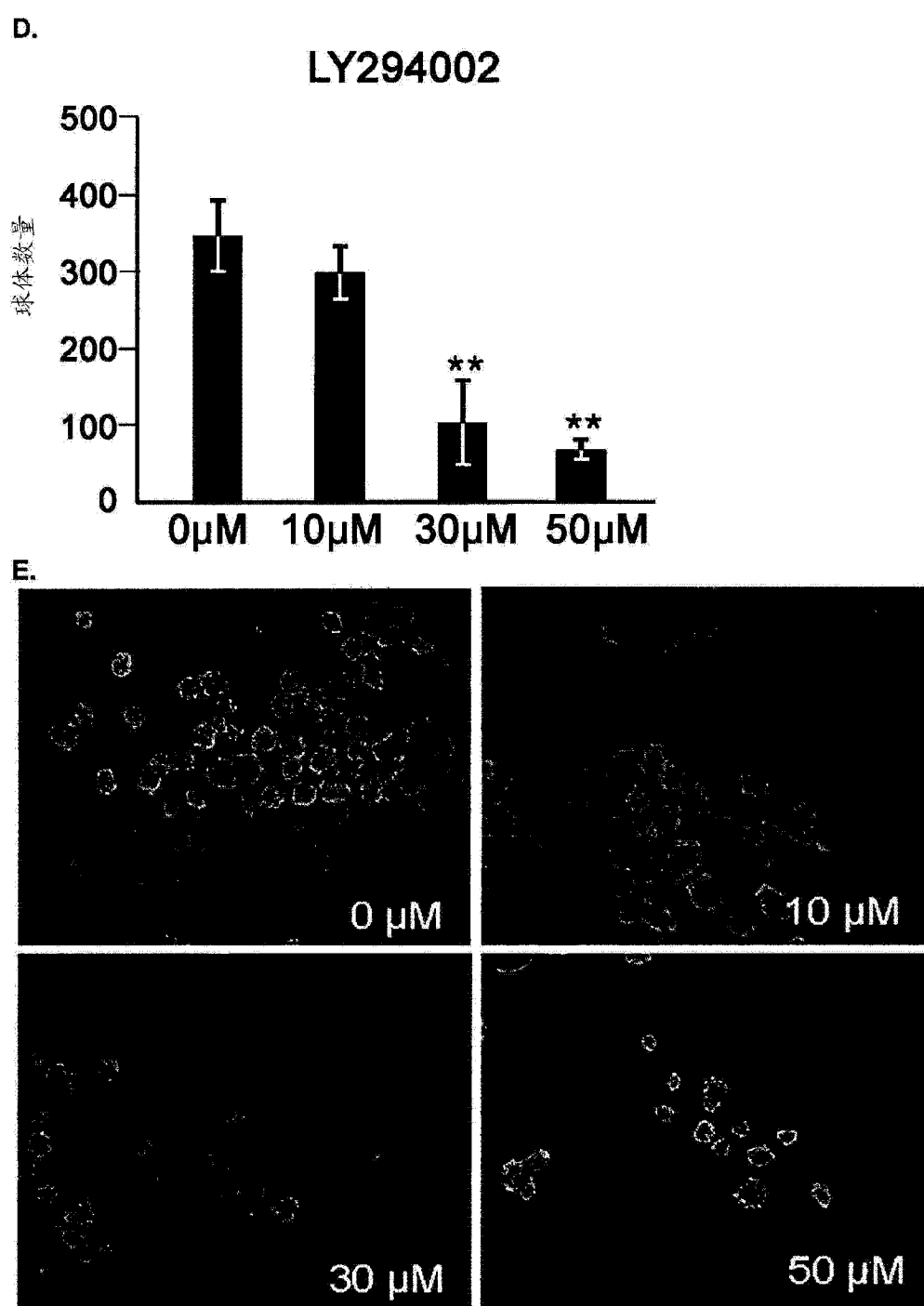
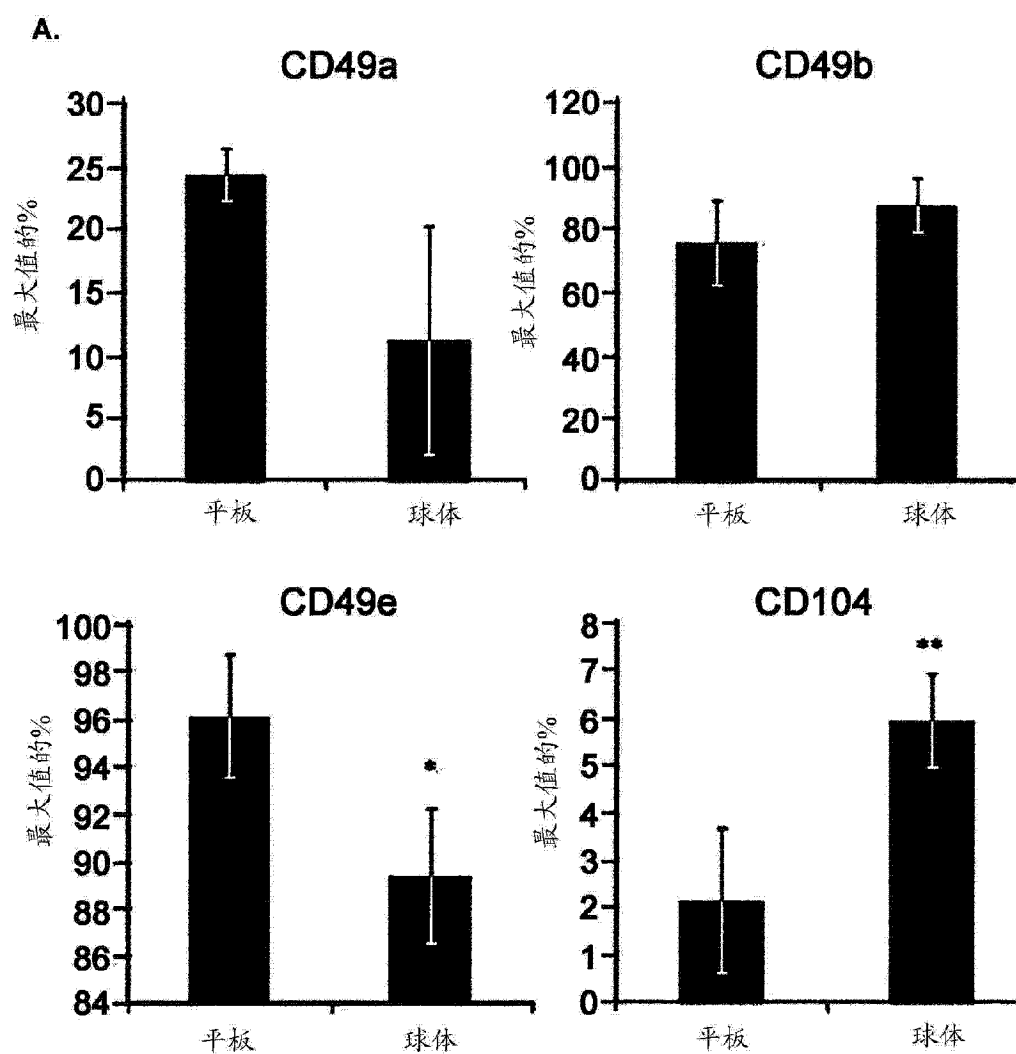


图 6



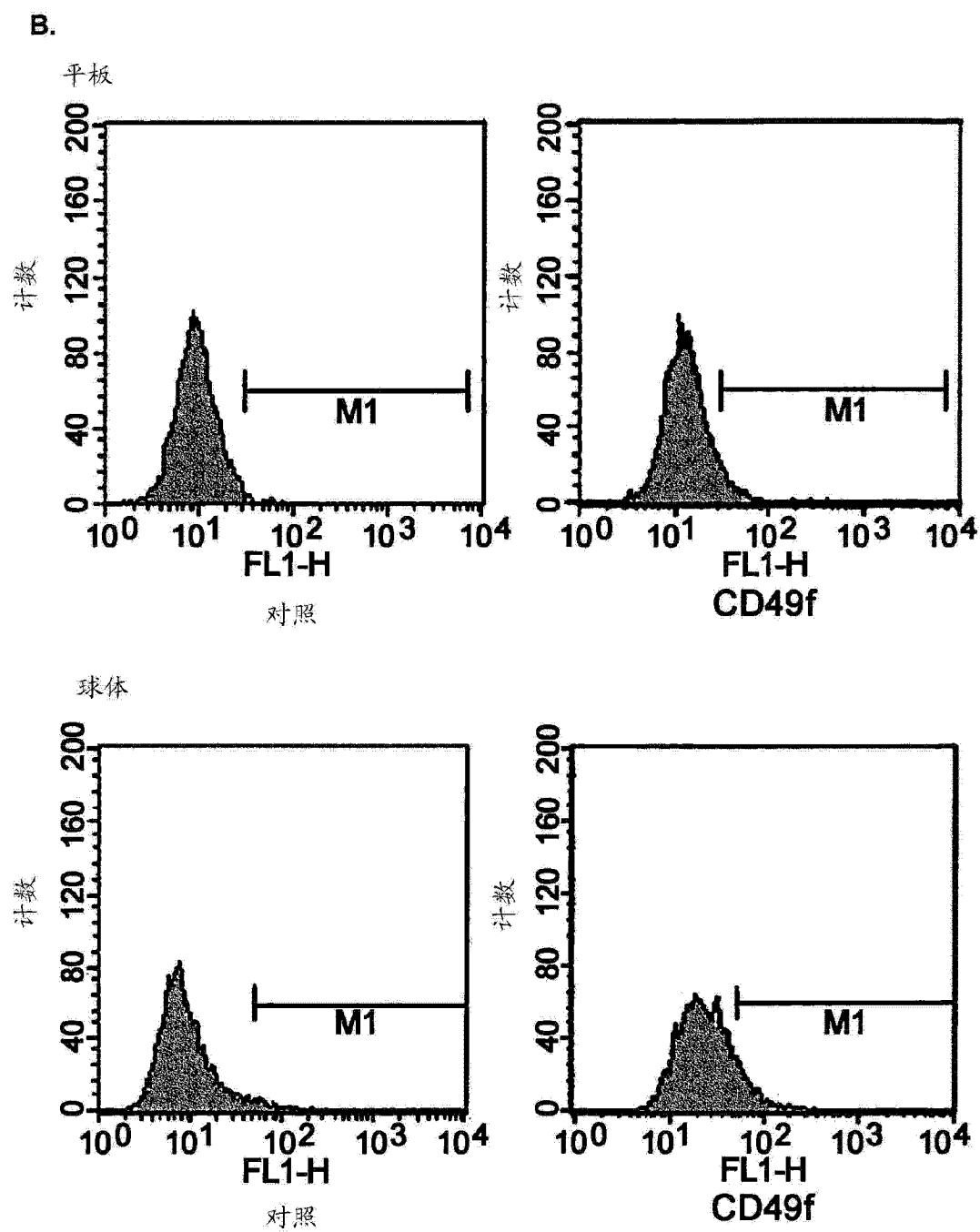
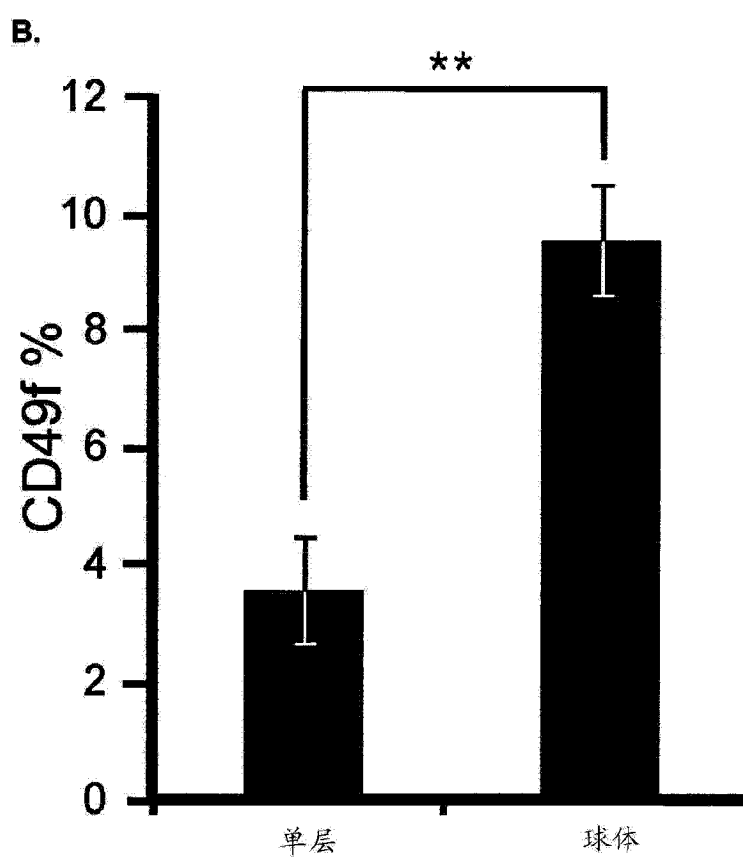
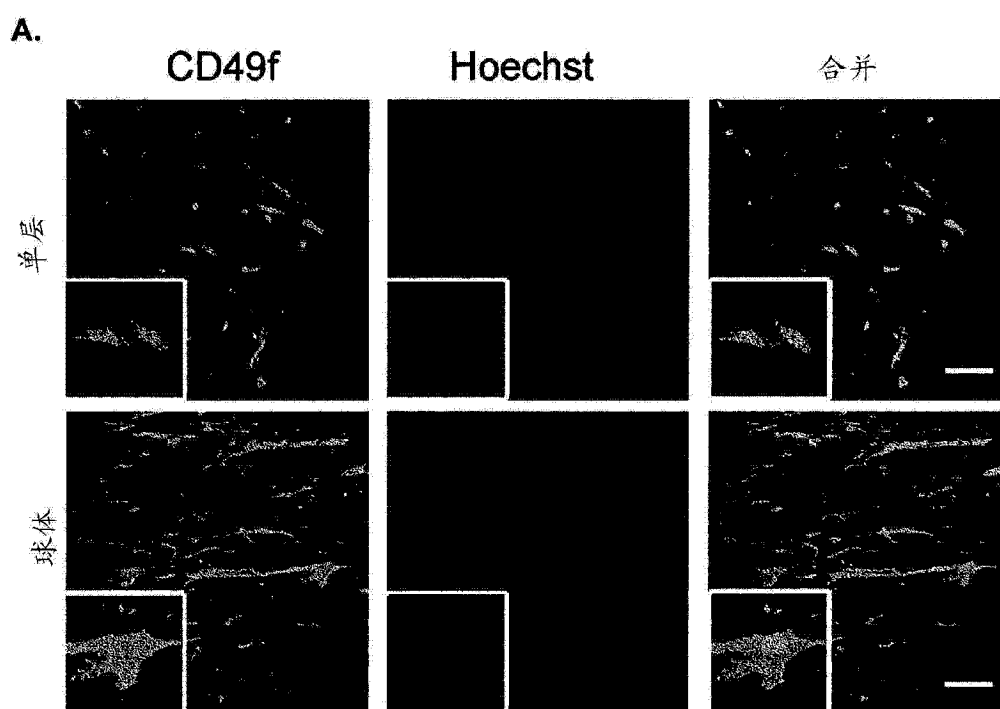
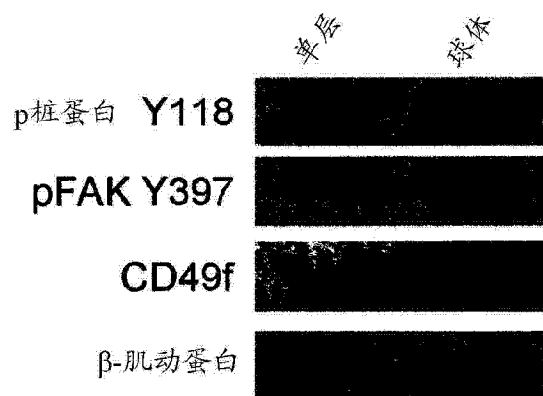


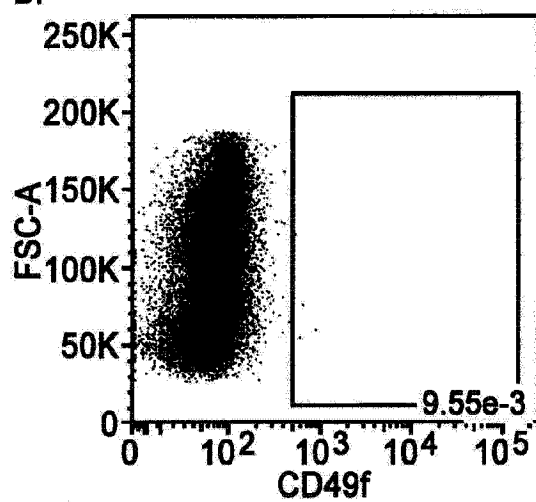
图 7



C.



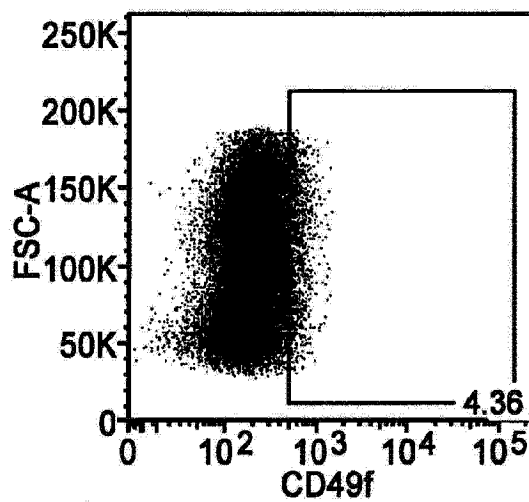
D.



细胞

MSC sorting_unstained.fcs

事件计数：41875

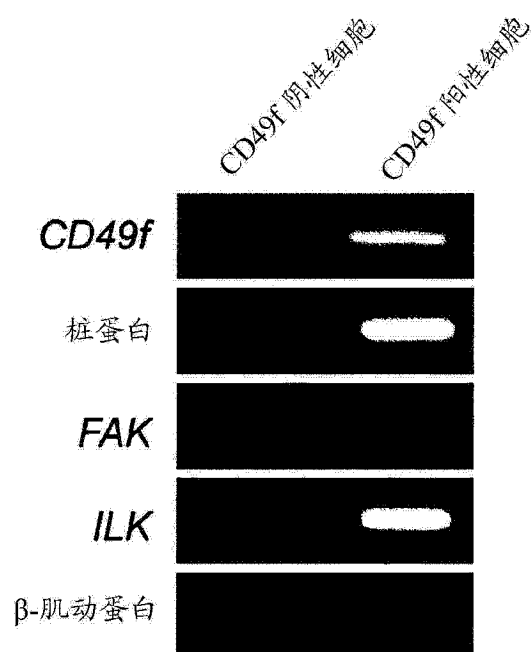


细胞

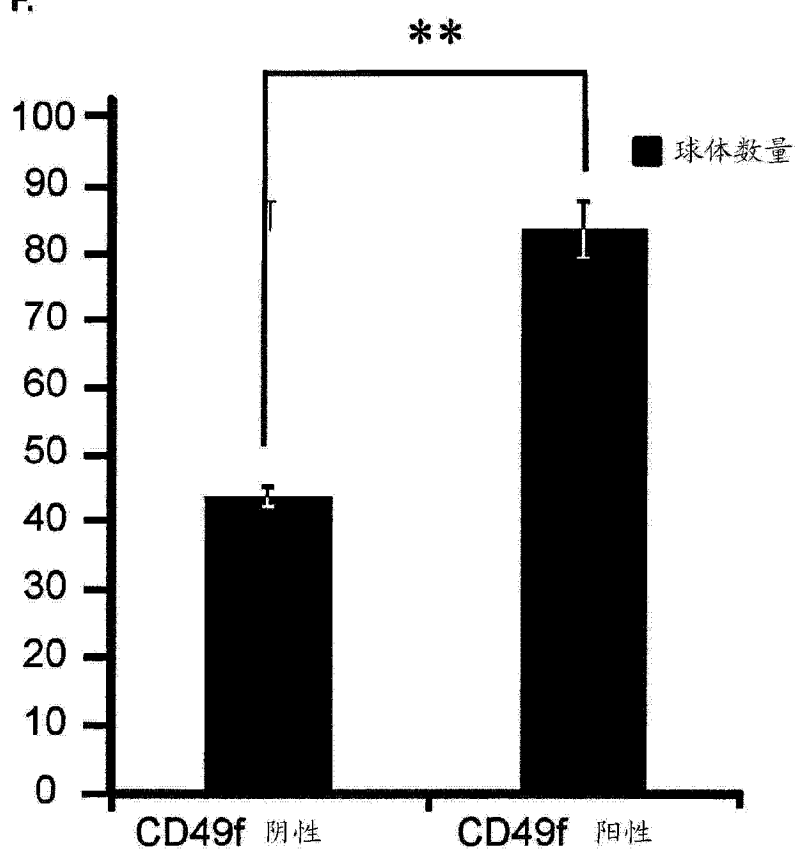
MSC sorting_CD49f.fcs

事件计数：82081

E.



F.



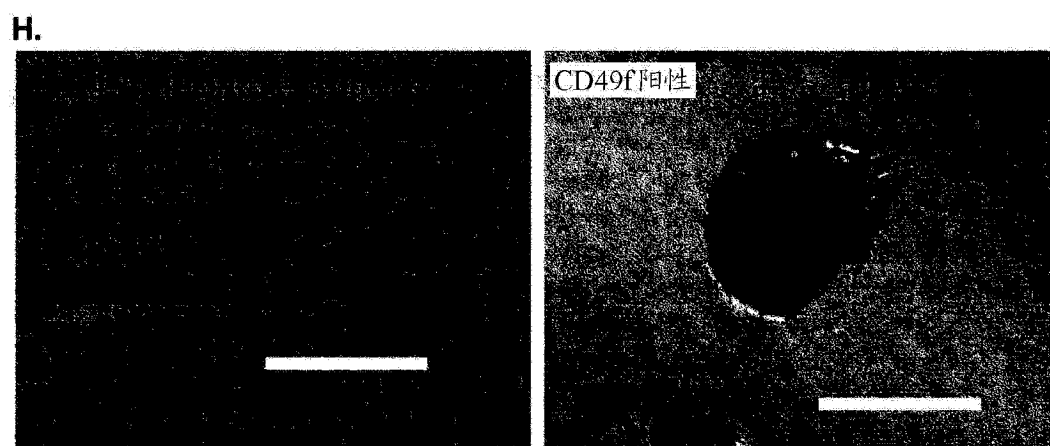
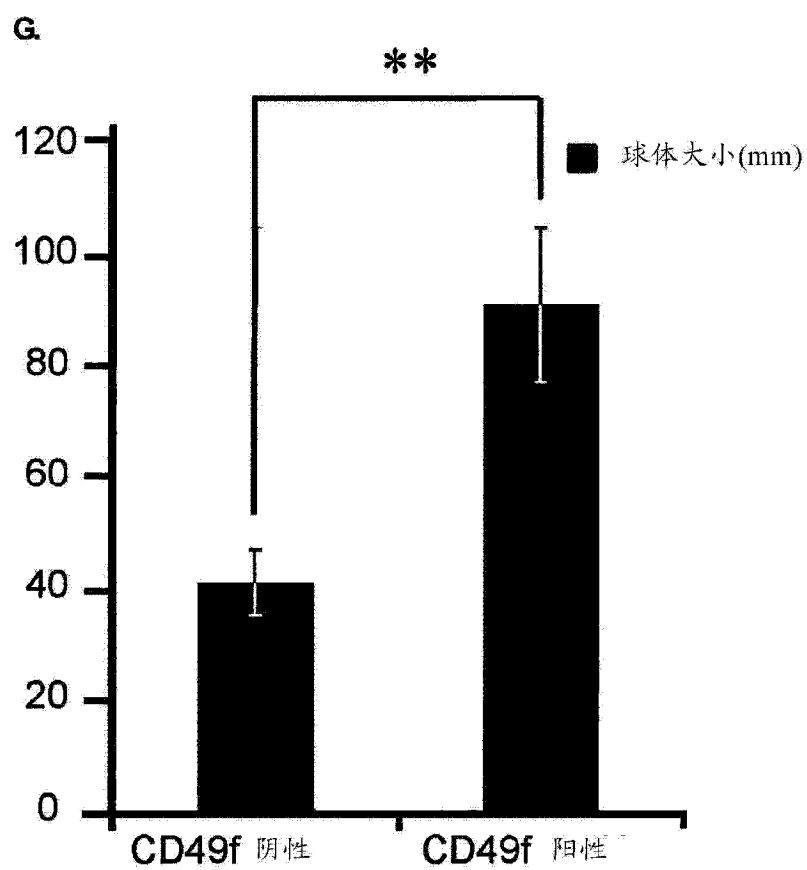
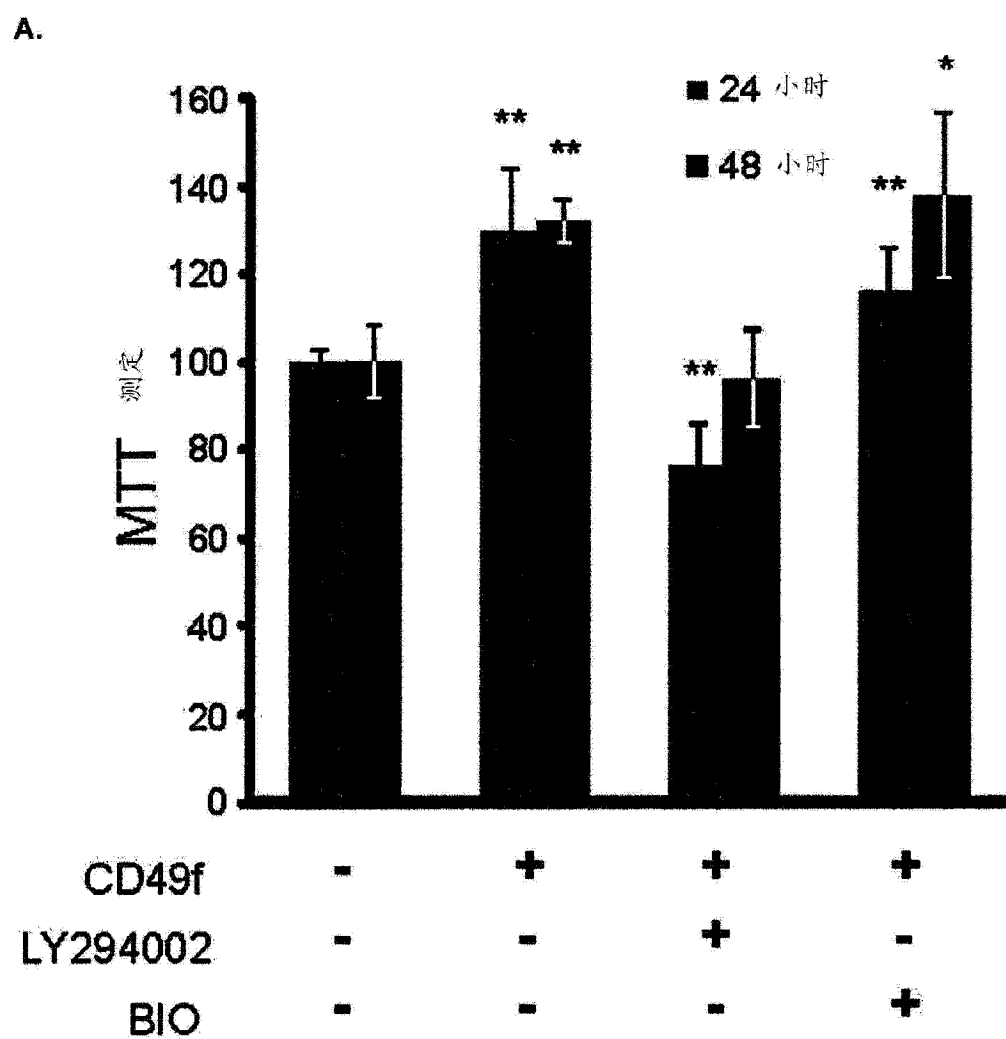
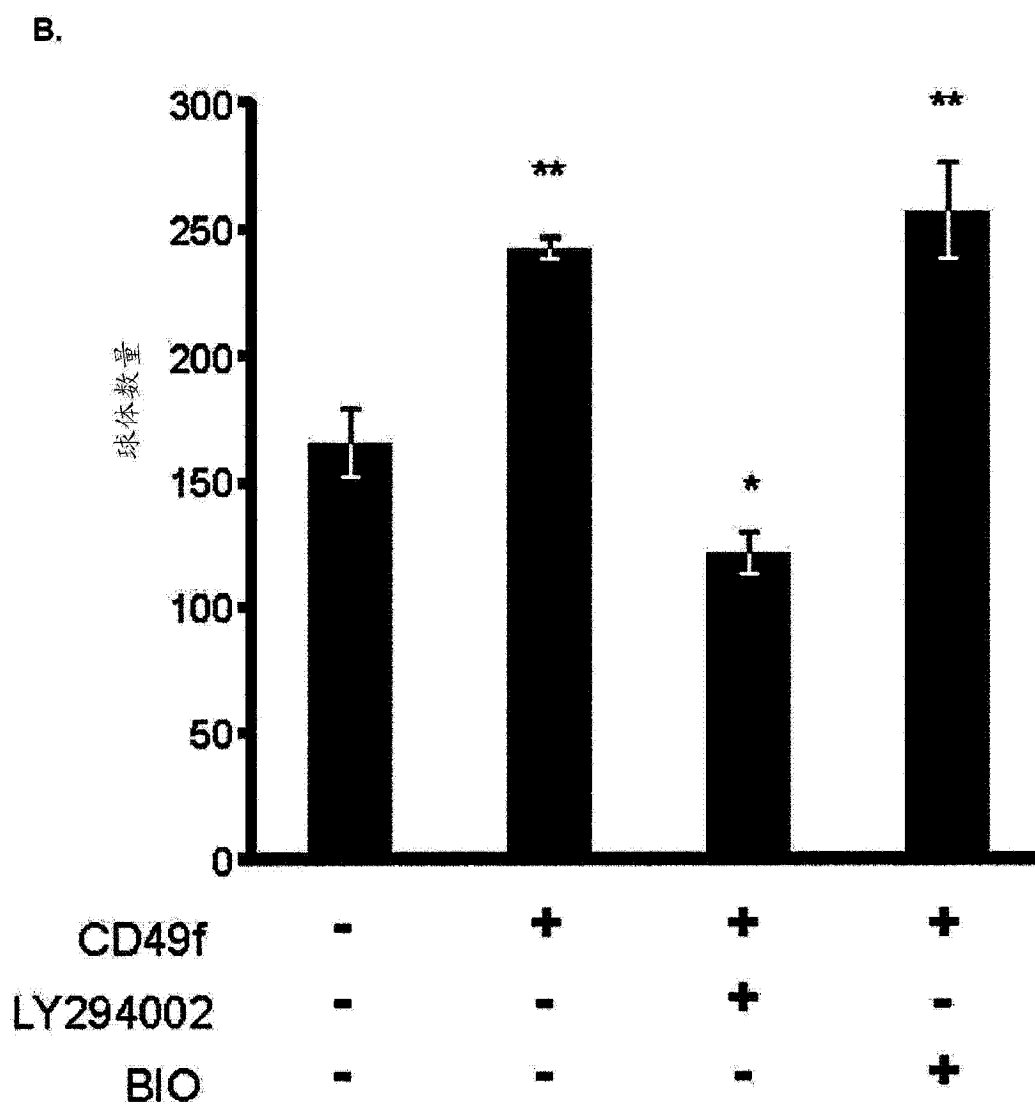


图 8





c.

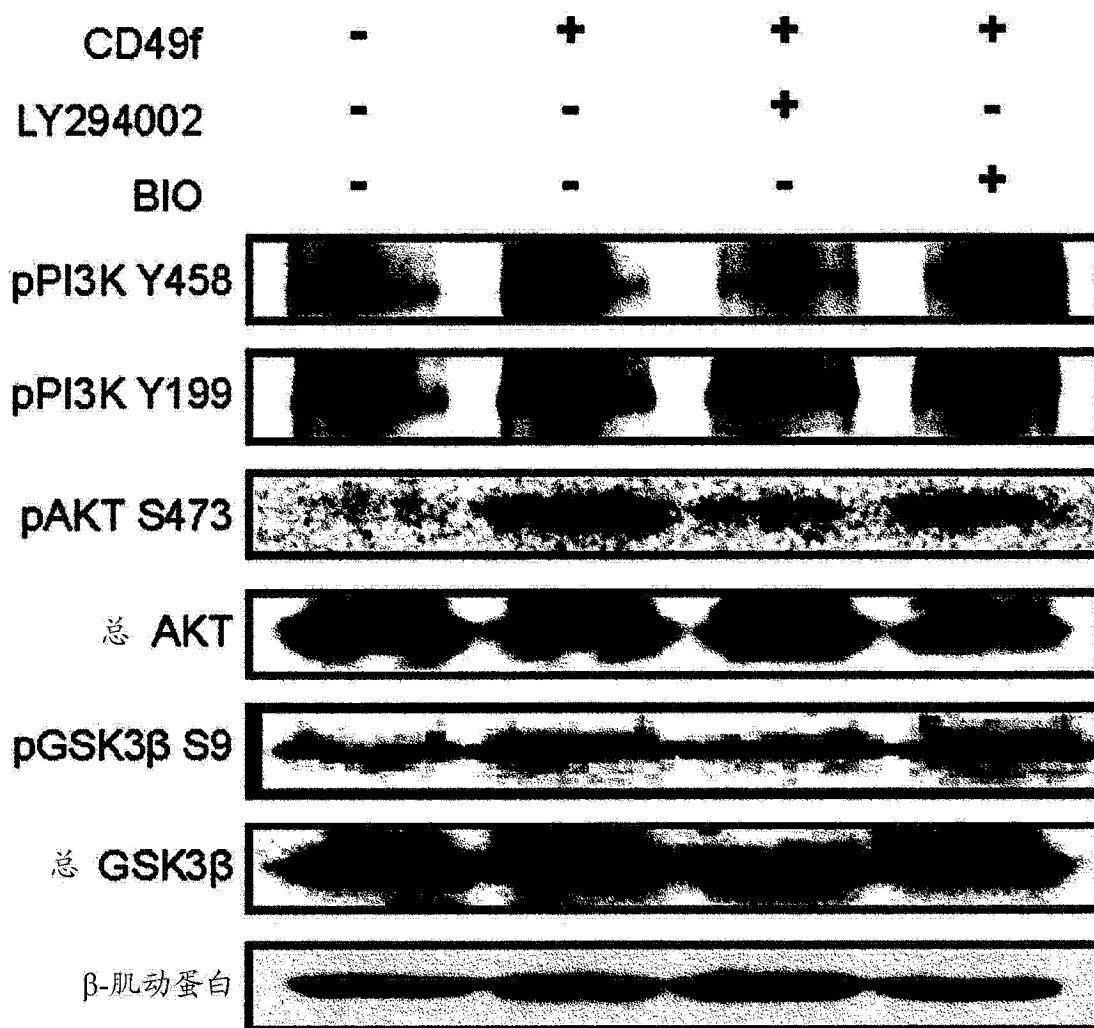
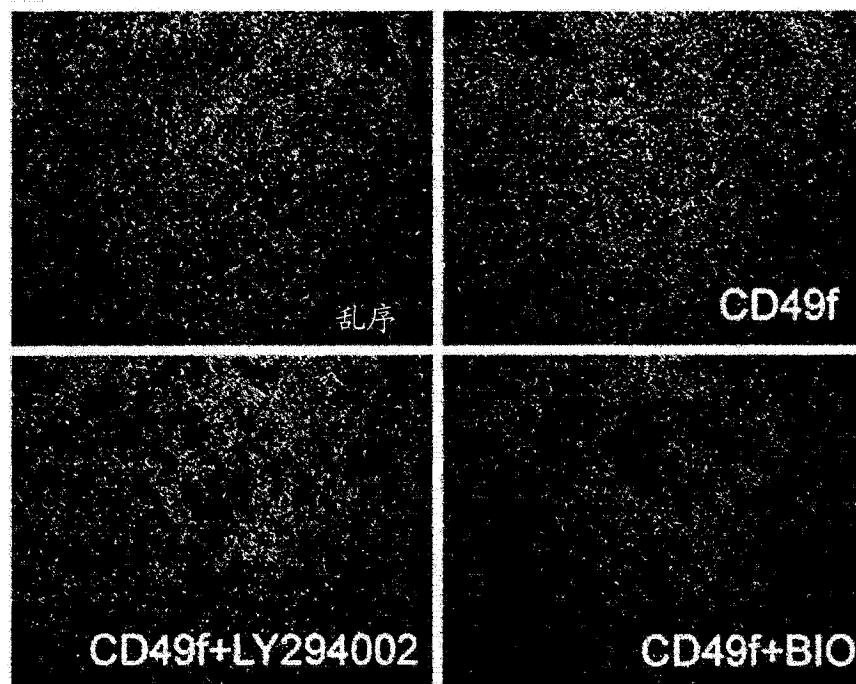
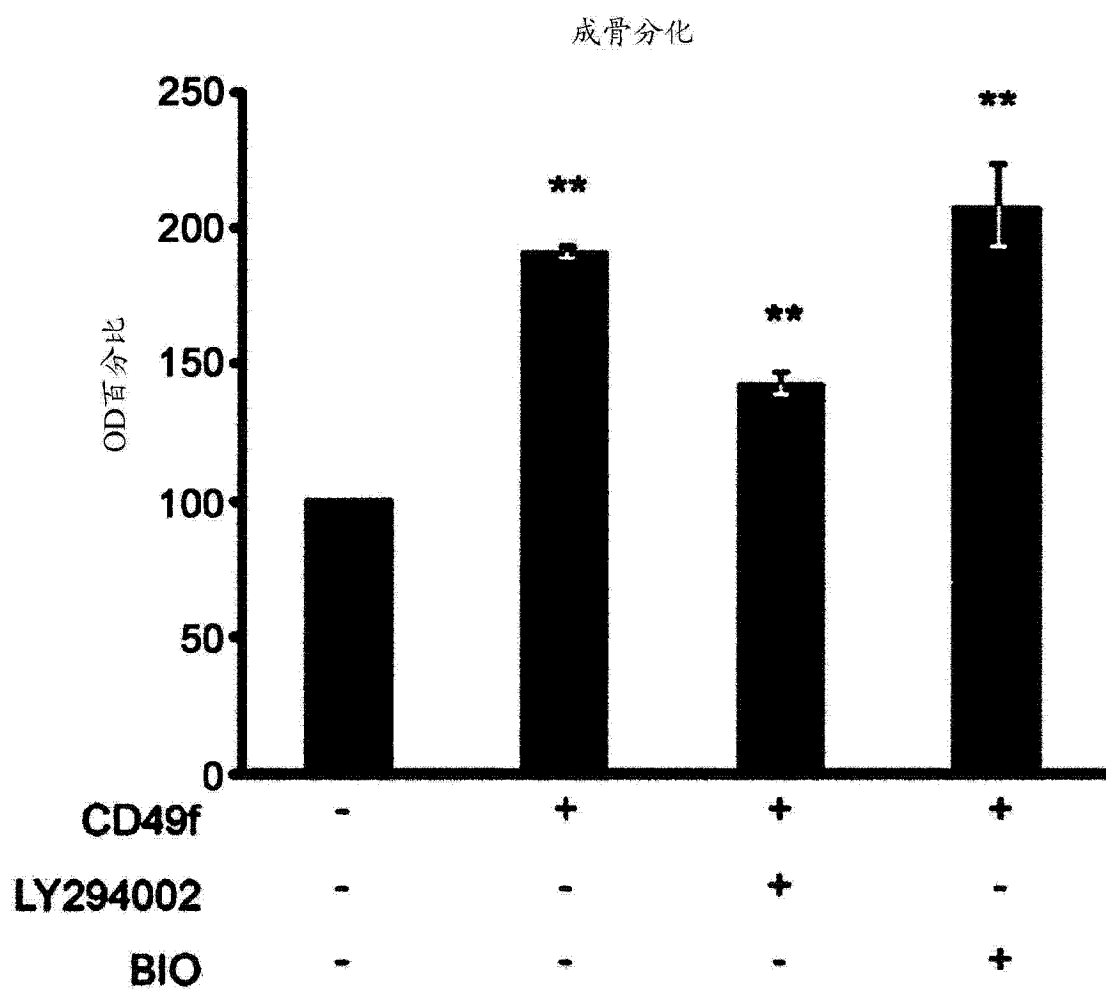


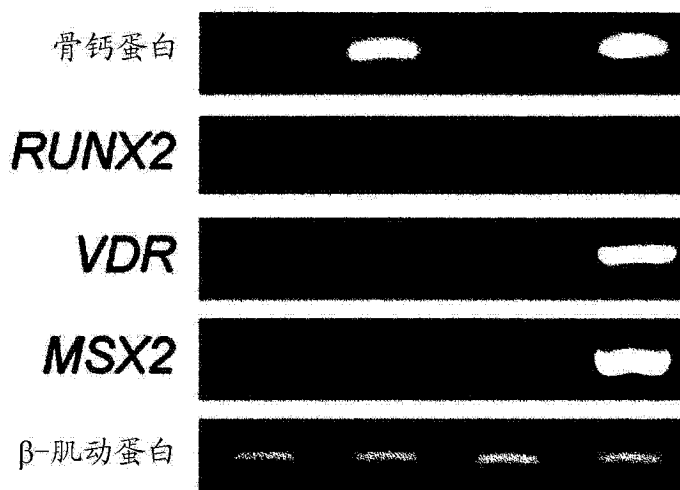
图 9

A.

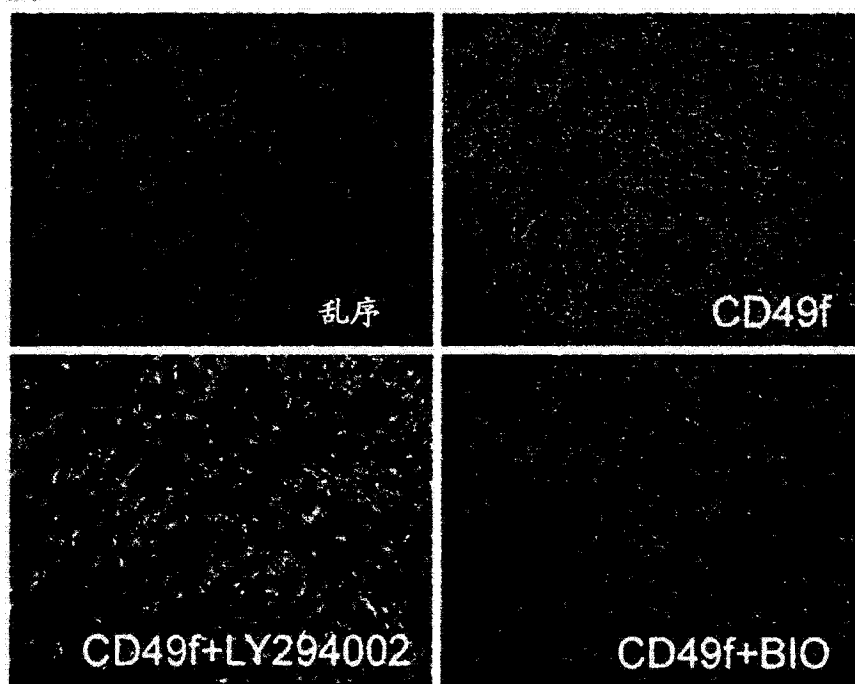
B.

C.

CD49f	-	+	+	+
LY294002	-	-	+	-
BIO	-	-	-	+

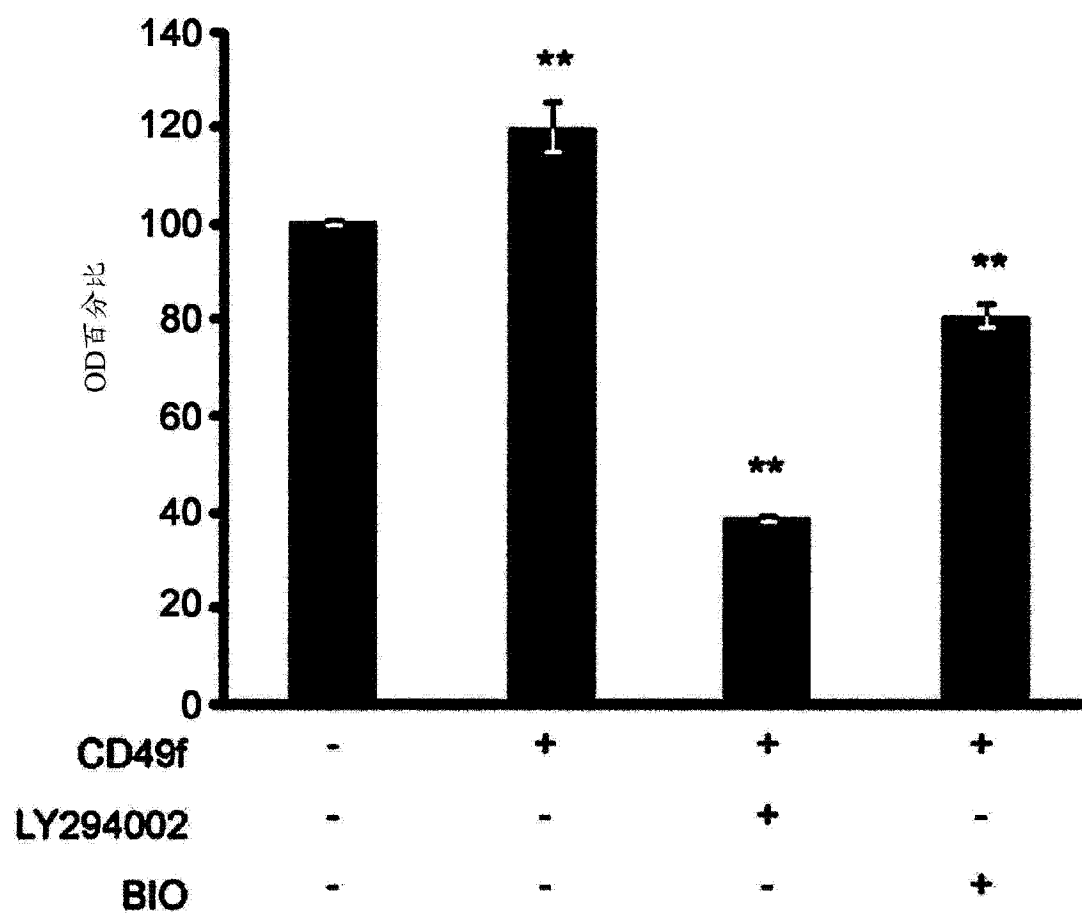


D.



E.

成脂分化



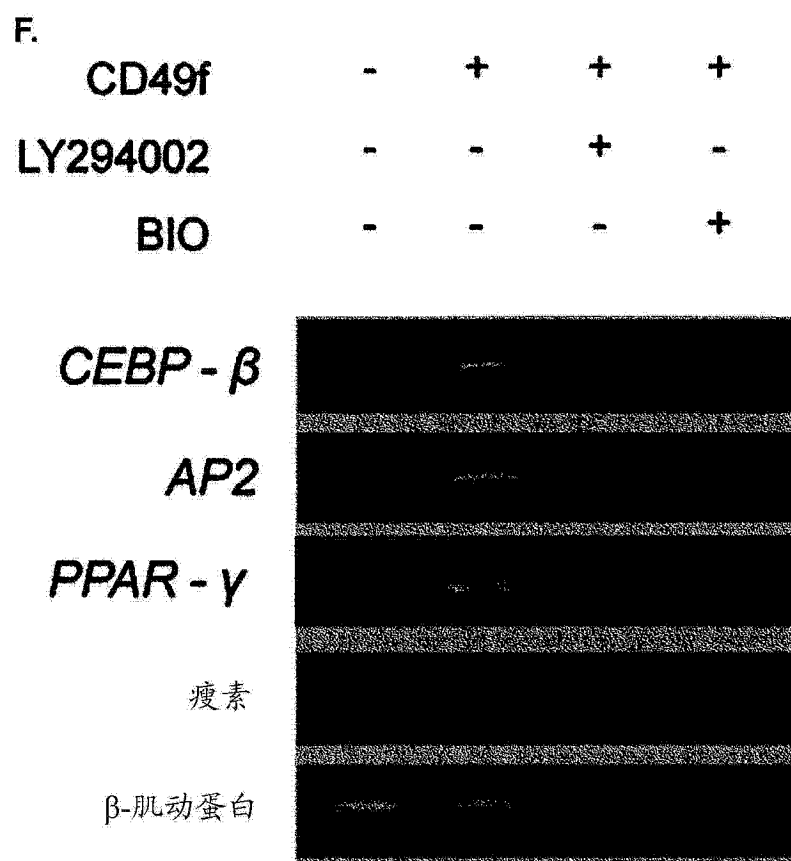
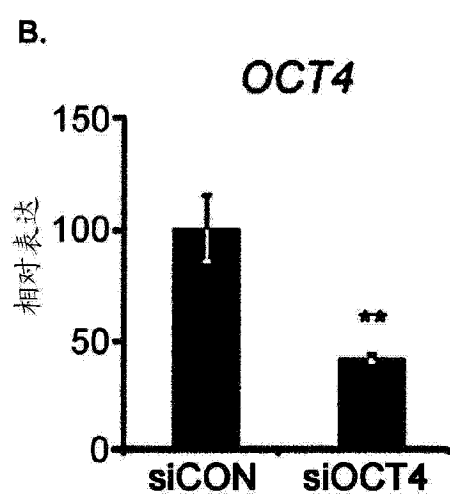
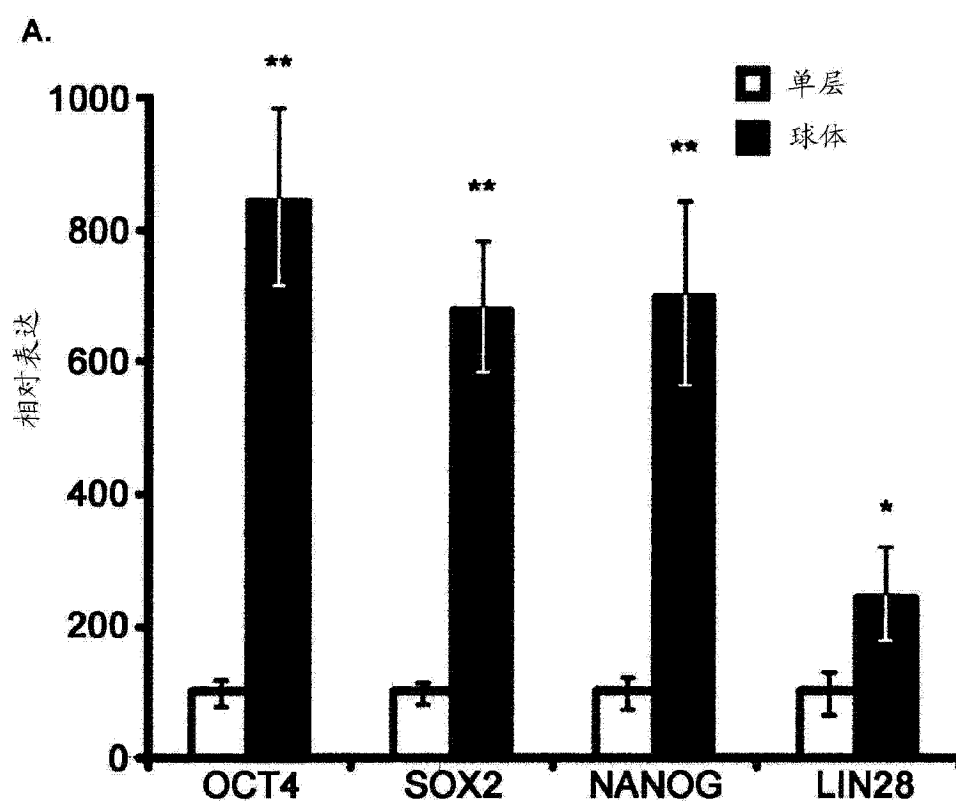
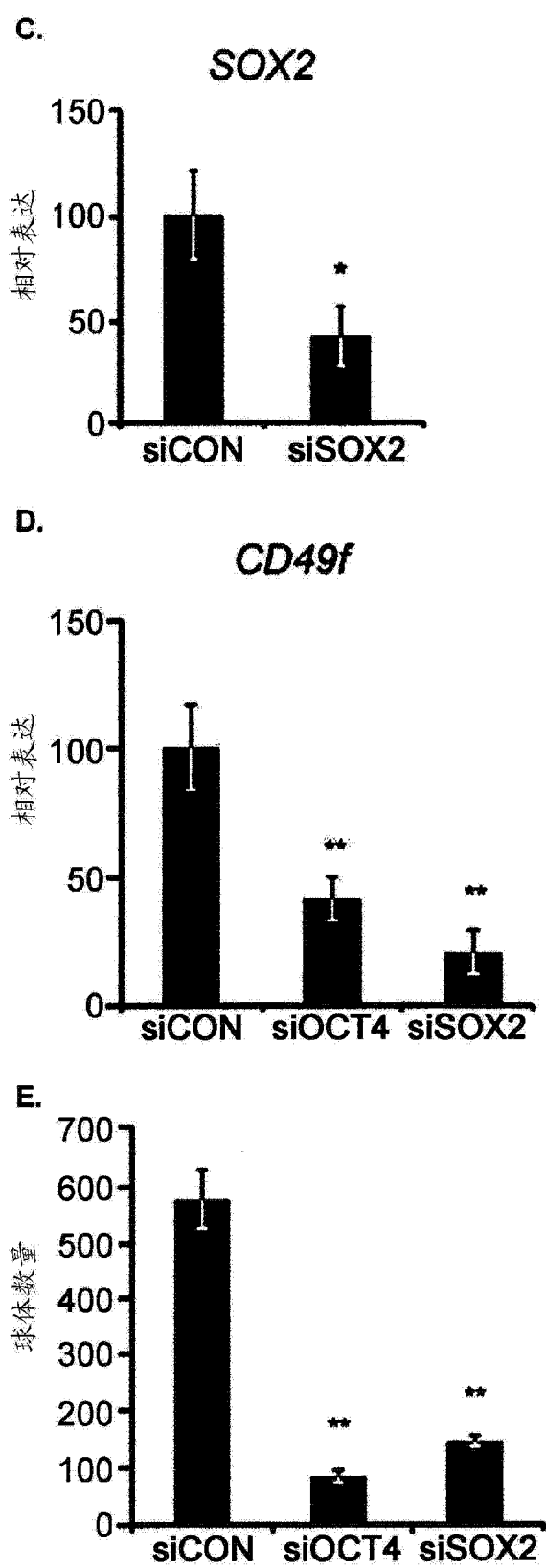
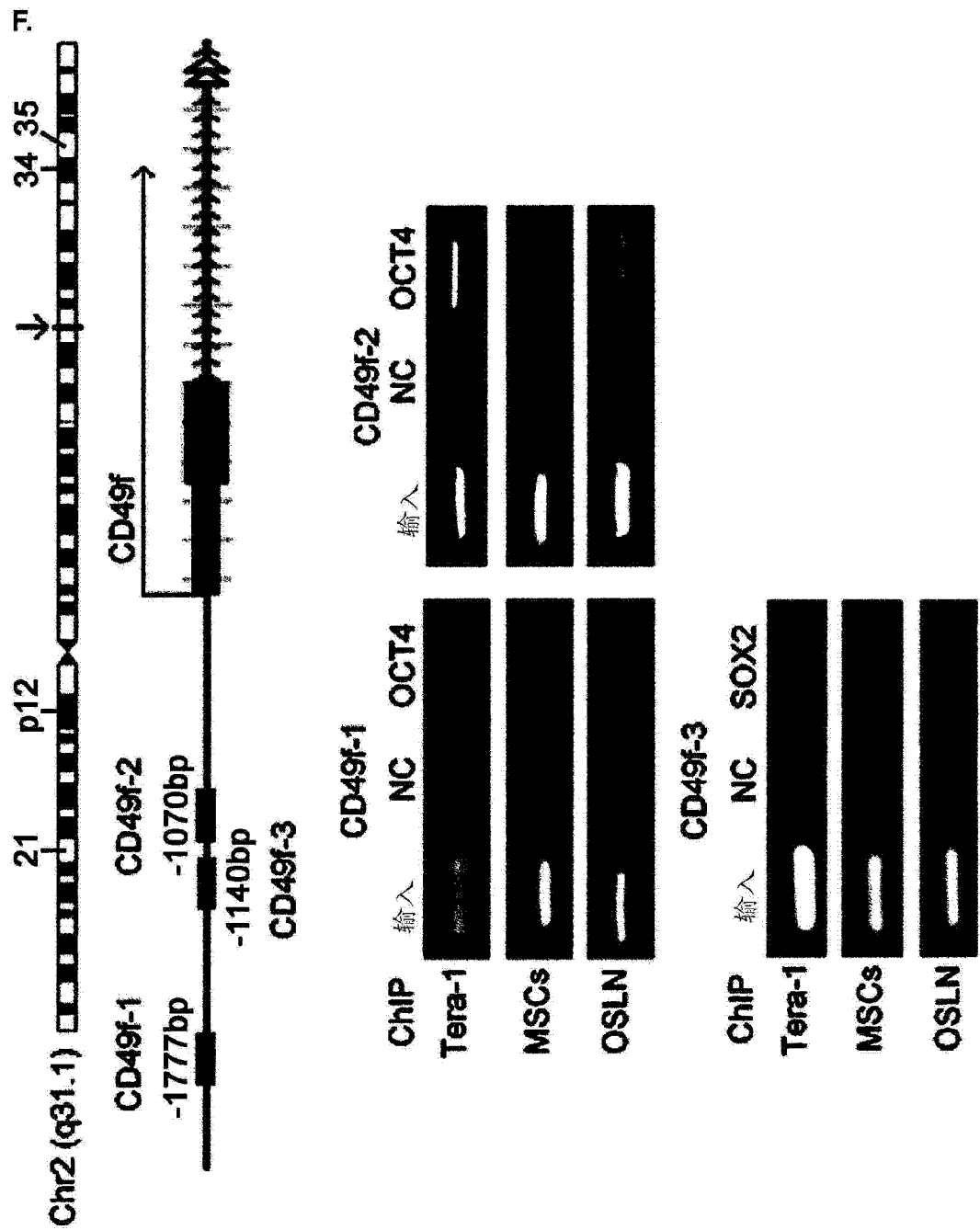
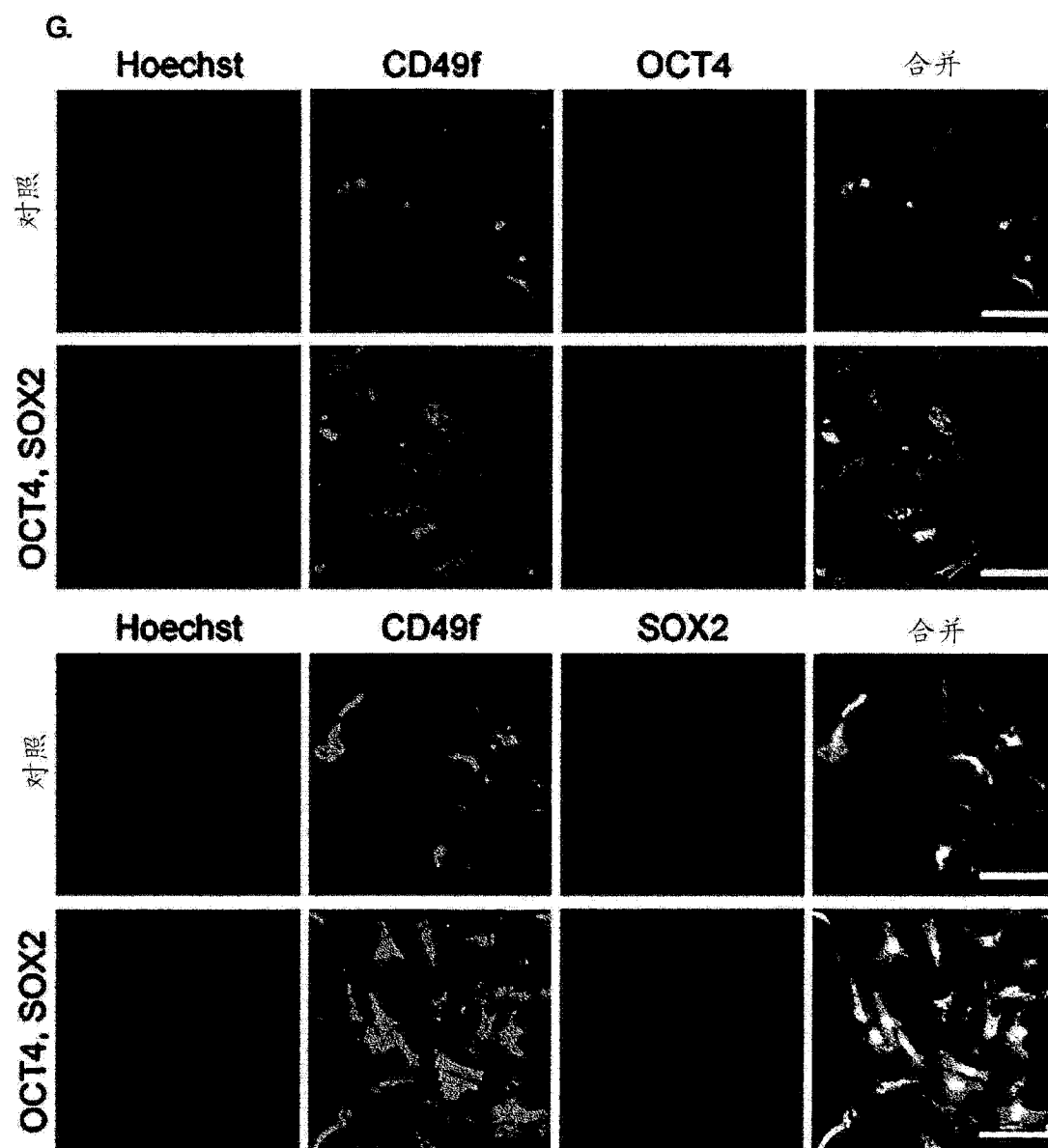


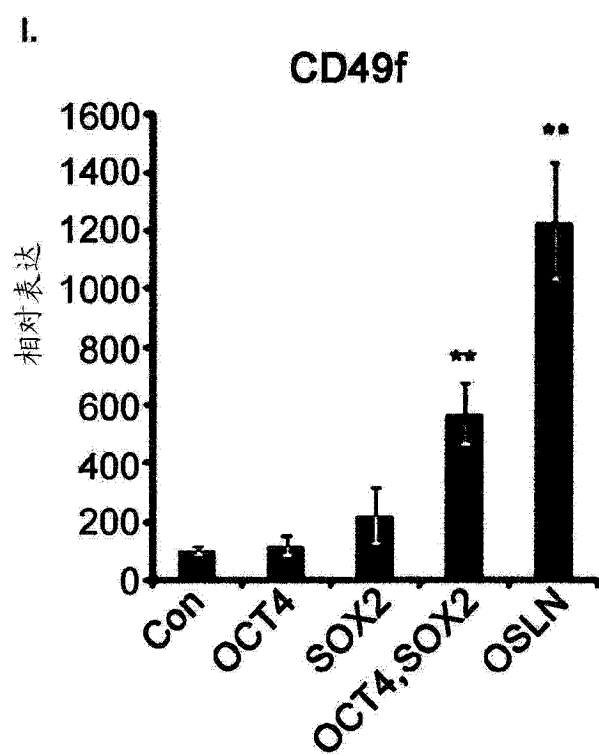
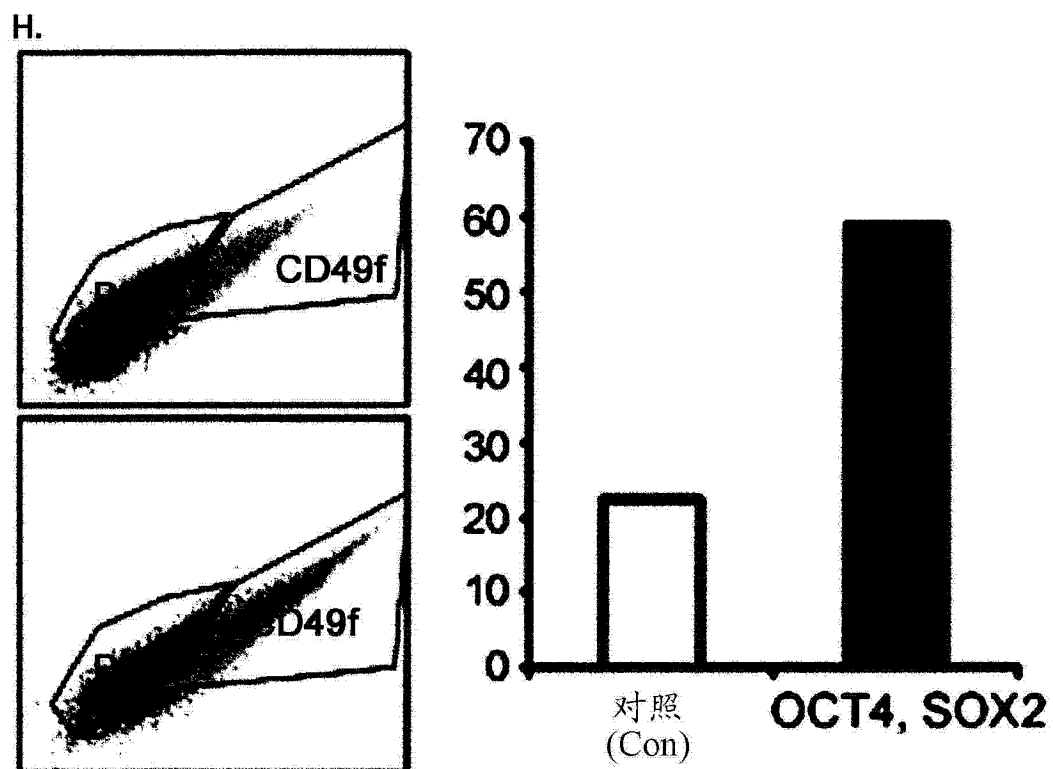
图 10











J.

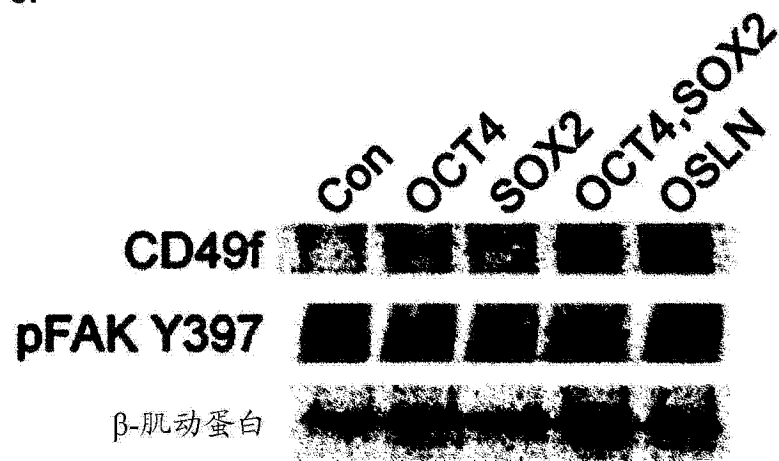


图 11

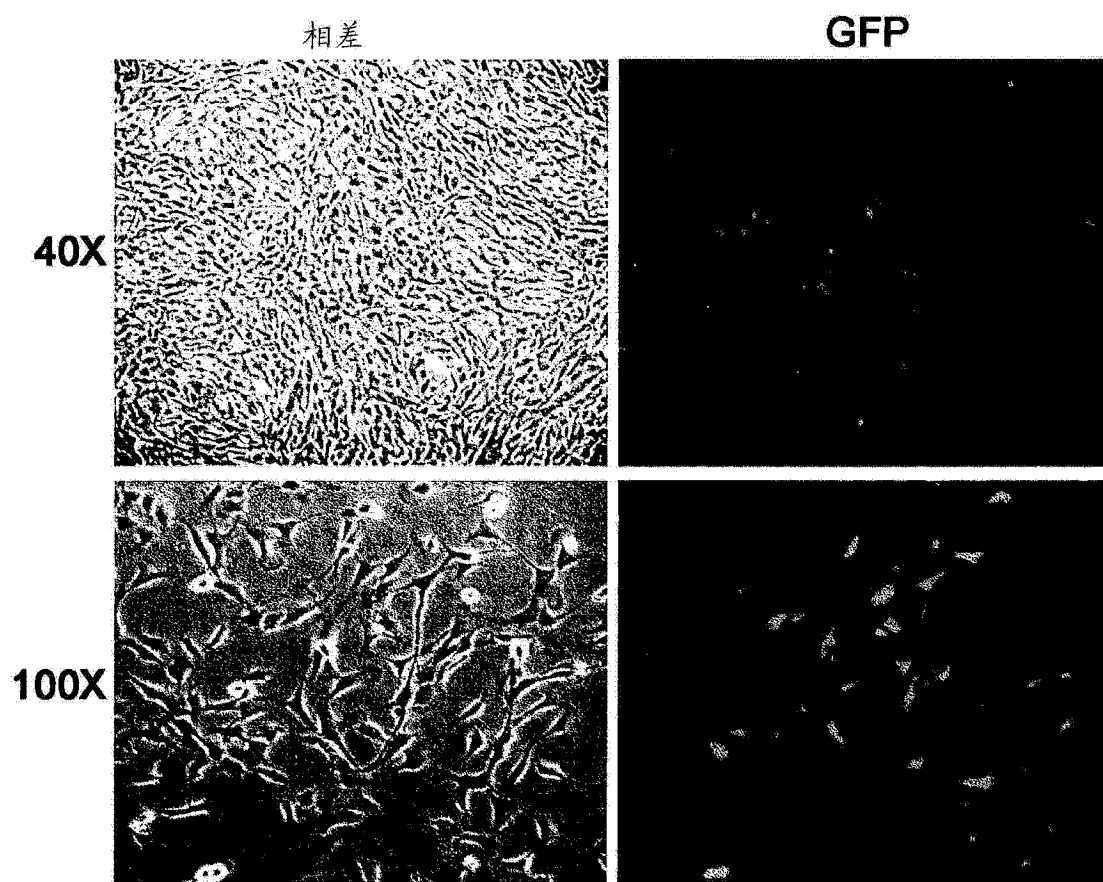
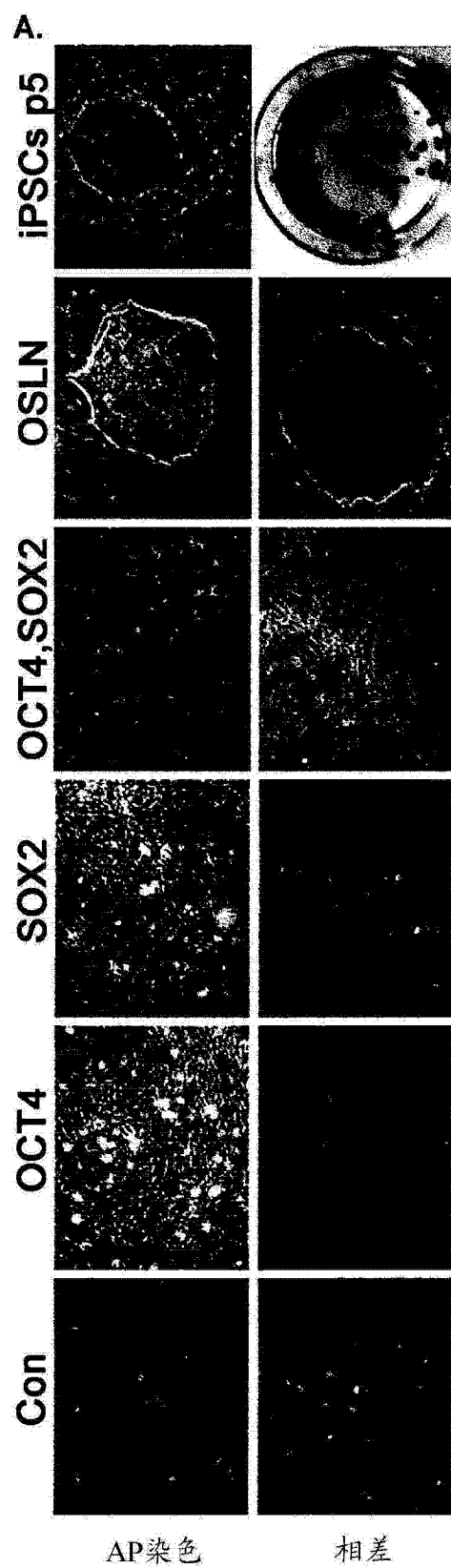
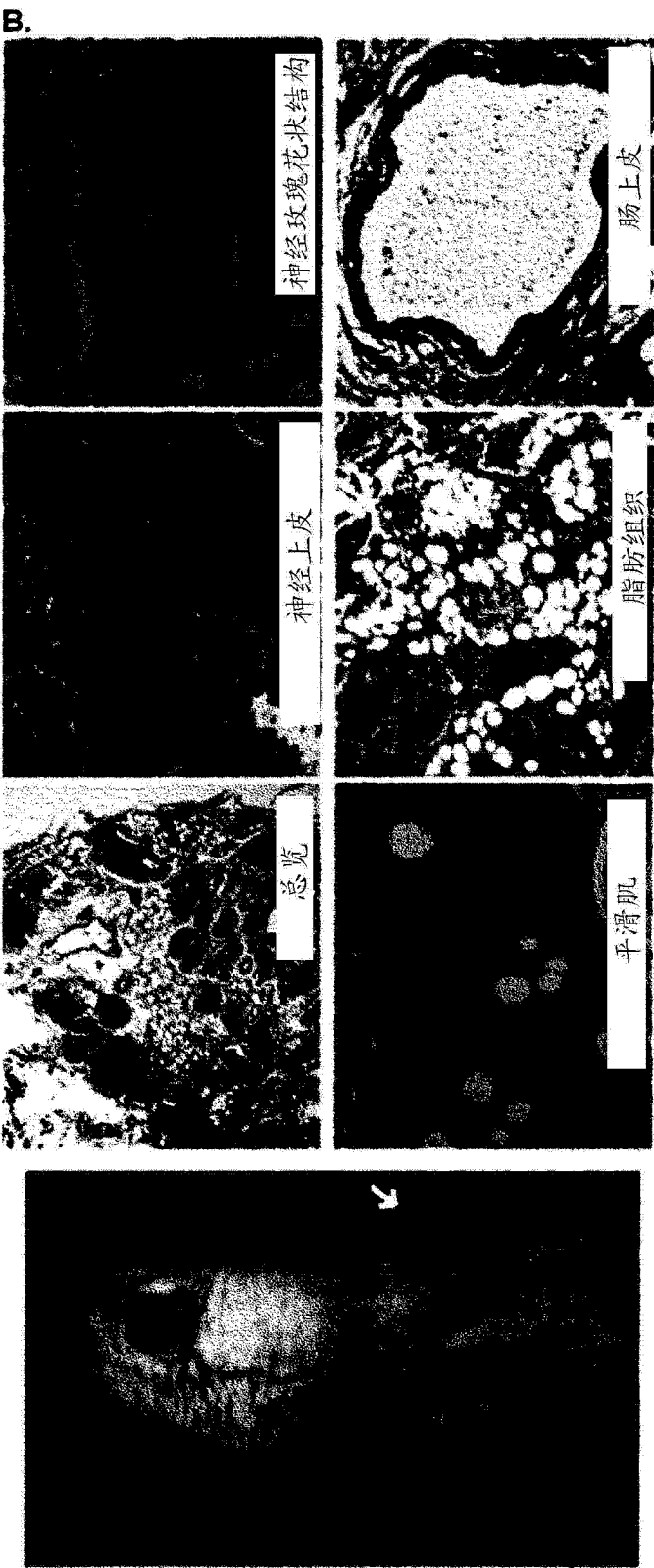
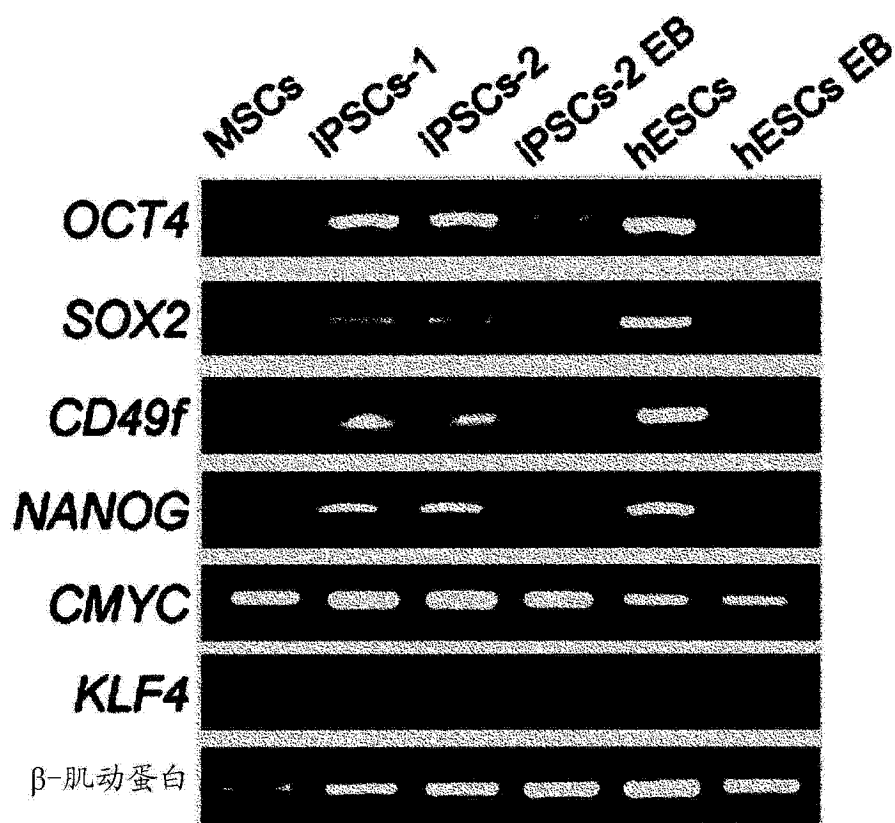


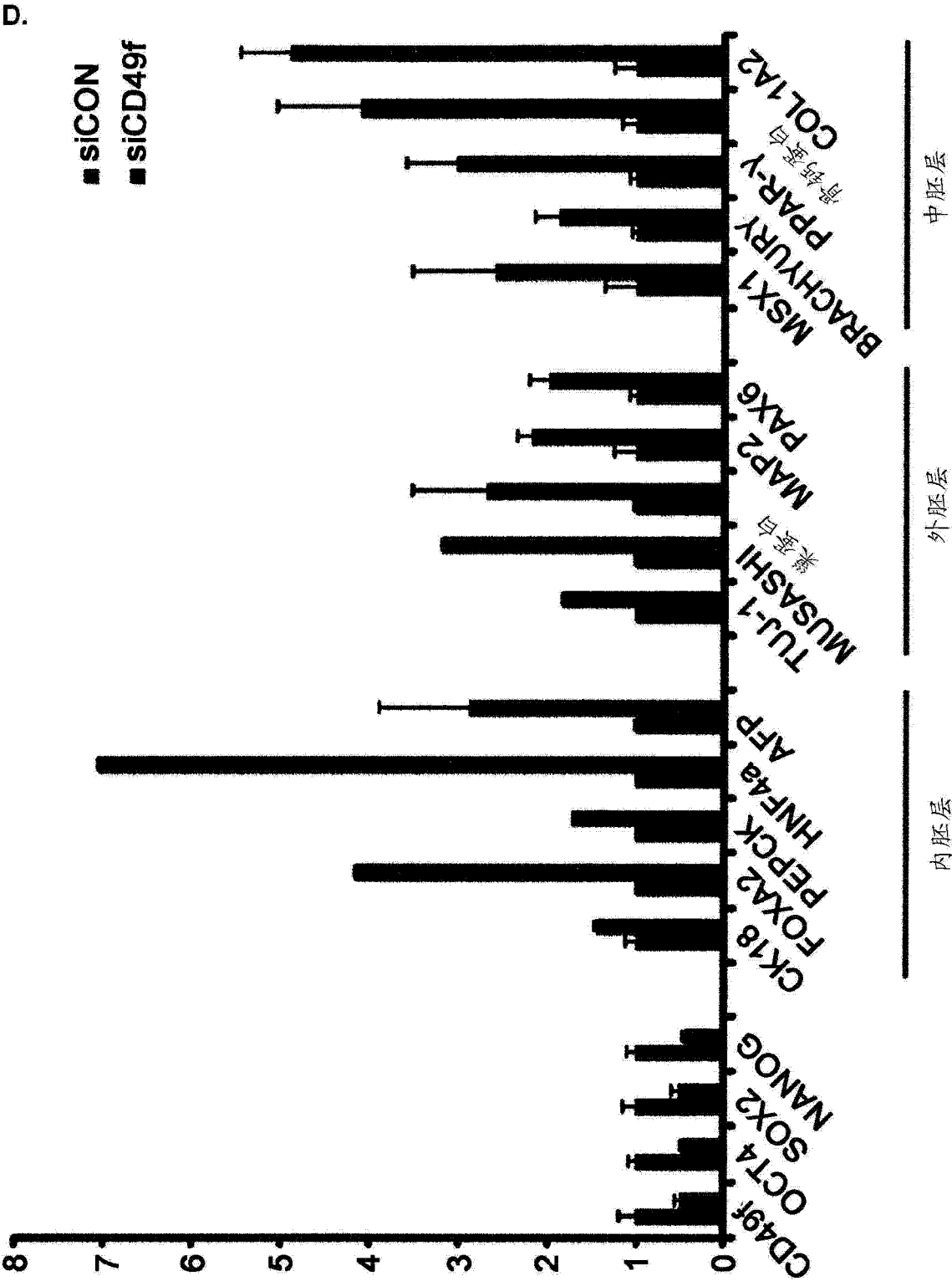
图 12



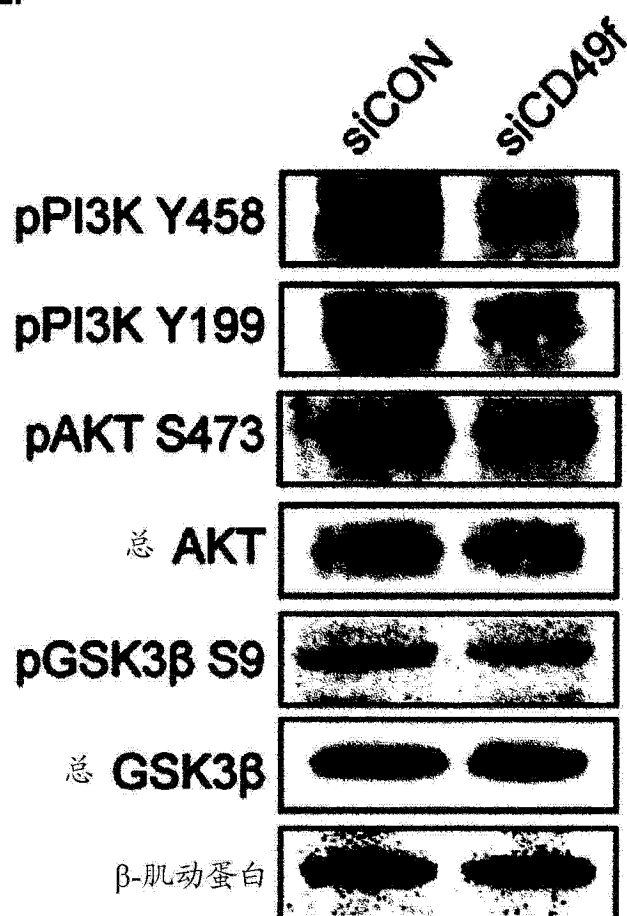


c.





E.



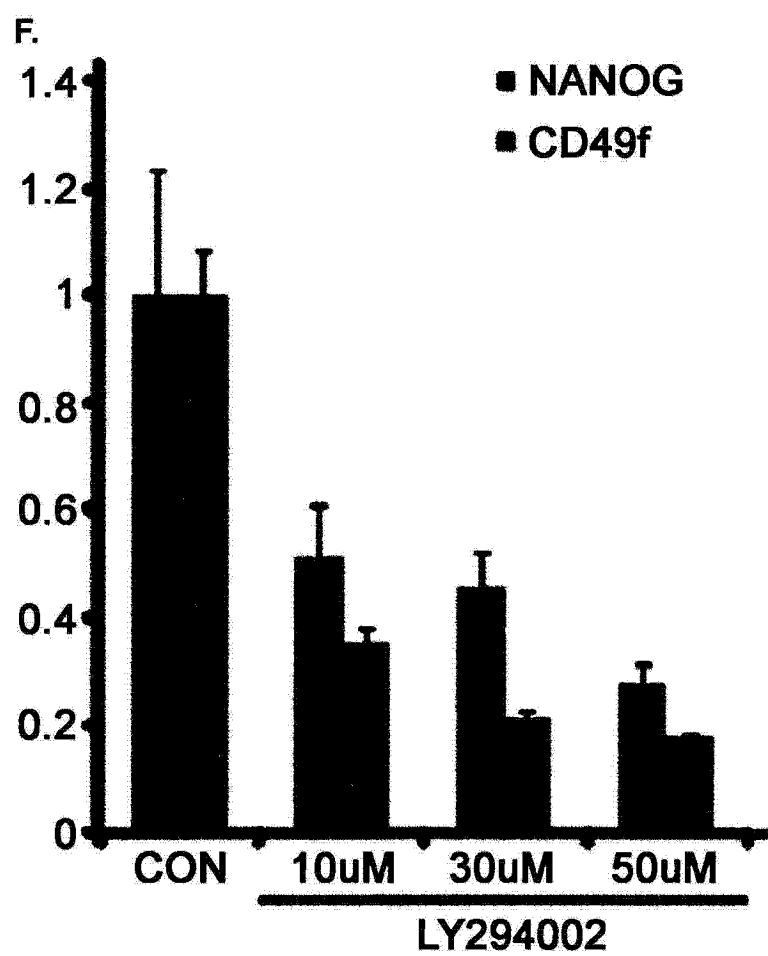


图 13

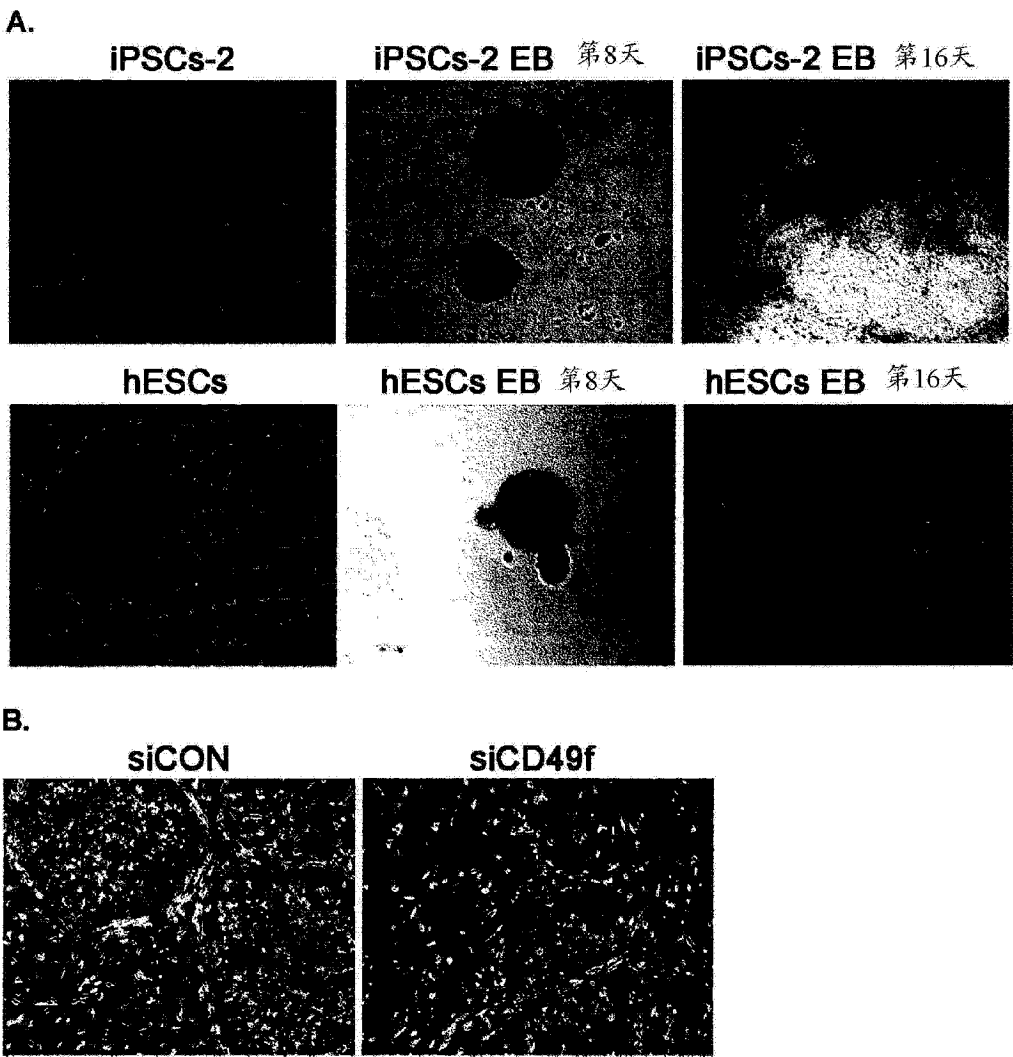


图 14

专利名称(译)	CD49F通过PI3K/AKT/GSK3途径促进成体干细胞的增殖、专能性和重编程		
公开(公告)号	CN102884177A	公开(公告)日	2013-01-16
申请号	CN201180019732.X	申请日	2011-02-18
[标]申请(专利权)人(译)	康干细胞控股有限公司		
申请(专利权)人(译)	康干细胞控股有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	康干细胞控股有限公司		
[标]发明人	康景宣 俞灵录		
发明人	康景宣 俞灵录		
IPC分类号	C12N5/074 C12Q1/24 G01N33/53 A61K35/12		
CPC分类号	C12N2501/70 C12Q1/68 C12N5/0667 G01N2333/7055 G01N33/5073 C12Q1/24 A61K2035/124 C12N5/0663 C12N5/0018 C12N5/0602 C12N5/0665 C12N15/00 A61P19/00 A61P25/00 A61K35/12 C12N5/0607 C12N5/0656 G01N33/53		
代理人(译)	洪欣		
优先权	1020100014771 2010-02-18 KR		
其他公开文献	CN102884177B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于从包含干细胞的细胞来源获得成体干细胞的方法，其中所述成体干细胞具有表面抗原CD49f，由于球体形成而优良地形成球体以及高表达OCT4和SOX2的，还涉及含有通过该方法获得的成体干细胞或从其分化的细胞作为活性成分的细胞治疗剂。根据本发明，来源于球体的成体干细胞适用于大量培养成体干细胞，因为它们与由已知的附着培养方法获得的干细胞相比生长更快速，它们具有特定的表面抗原，使得通过使用该特定的表面抗原可以同质地获得，并且由于其良好的分化而可用于利用其制备细胞治疗剂。

