nature reviews molecular cell biology
nature protocols

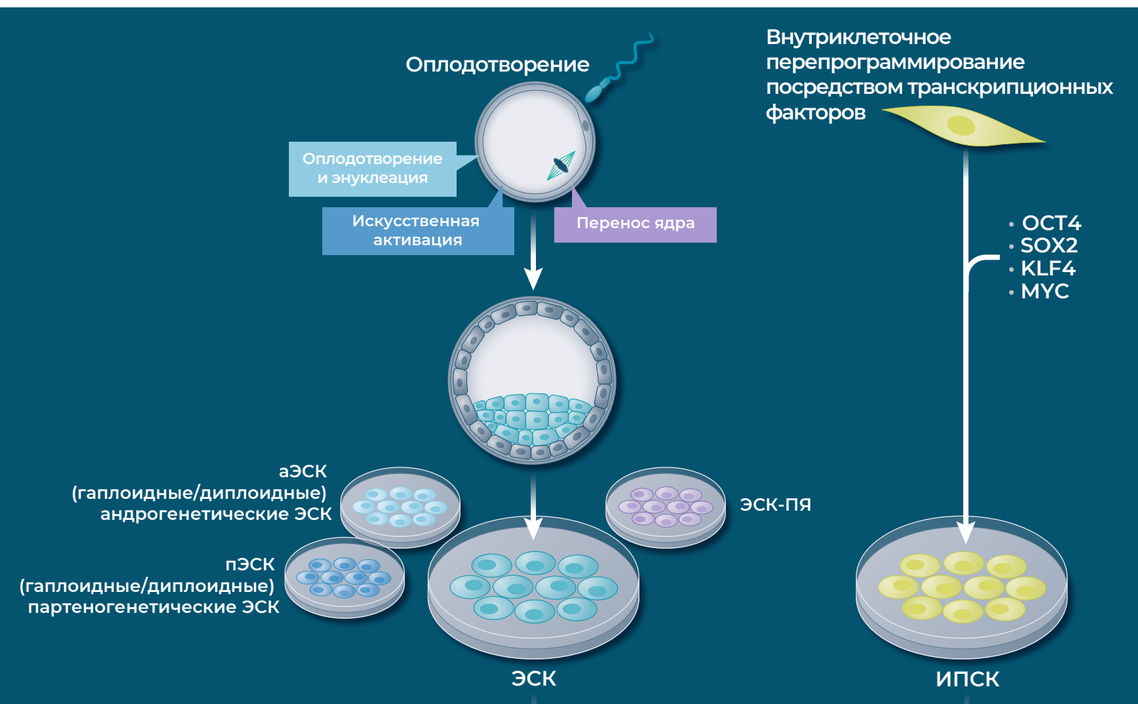
Плюрипотентные стволовые клетки человека: откуда получить и как применить?

Shiran Bar and Nissim Benvenisty

STEMCELL™ TECHNOLOGIES
Scientists Helping Scientists™ | WWW.STEMCELL.COM

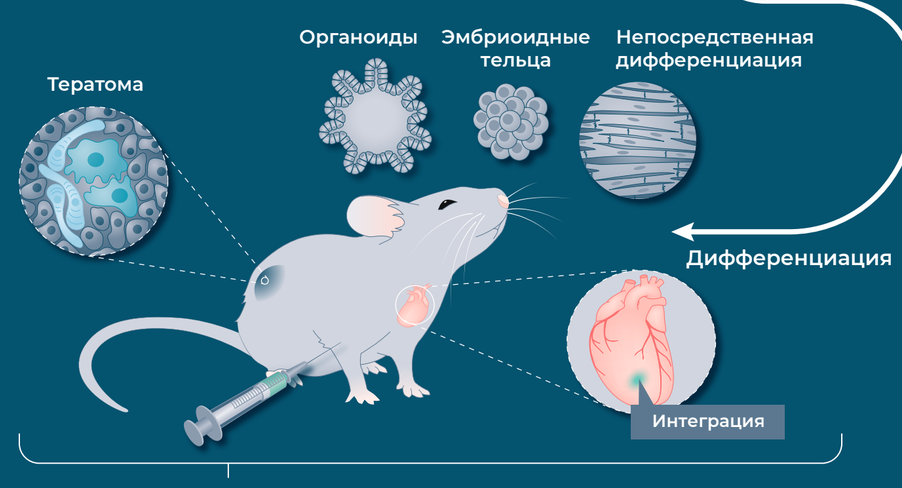
Основными типами плюрипотентных стволовых клеток человека (ПСК) являются эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК). Оба этих типа способны в условиях in vitro дифференцироваться в клетки, схожие с теми, которые происходят из любого из трех эмбриональных зародышевых листков. In vivo после трансплантации животным эти клетки способны образовывать тератомы, в состав которых входят различные клоны клеток, или же интегрироваться в качестве функциональных клеток в определенные ткани. В ПСК человека могут развиваться эпигенетические и генетические аберрации, как правило, в определенных «горячих точках» хромосом и в генах, связанных со злокачественными опухолями.

Человеческие ПСК могут применяться в широком спектре исследований, сосредоточенных на изучении ранних стадий эмбриогенеза человека, при моделировании заболеваний и в регенеративной медицине. Множество патологий человека теперь можно моделировать с использованием клеток, полученных из человеческих ПСК и выращенных в монослоях и в т. н. сфероидах или органоидах. Эти клеточные культуры используются для разработки терапевтических средств путем применения высокопроизводительного скрининга (ВПС) или изучения потенциальных лекарственных средств. Также клетки, полученные из ПСК человека, проходят клинические испытания для лечения различных заболеваний.



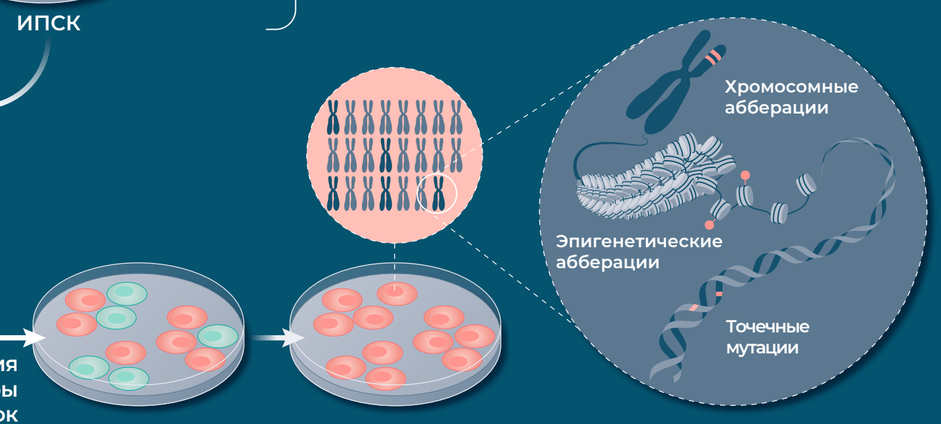
Получение человеческих ПСК

Человеческие ПСК получают из нескольких источников. ЭСК получают из бластоцист [1], тогда как ИПСК являются перепрограммированными соматическими клетками, часто посредством индукции экспрессии транскрипционных факторов OCT4, SOX2, KLF4 и MYC2. ЭСК, полученные от одной формирующейся особи, содержат только материнский (партеногенетический) или отцовский (андрогенетический) геном и развиваются из неоплодотворенных, активированных искусственным путем яйцеклеток или путем инъекции сперматозоидов в энуклеированную яйцеклетку, соответственно. Эти клетки могут служить источником гаплоидных ЭСК, имеющих один набор хромосом [3]. Соматические клетки также можно перепрограммировать посредством переноса ядра (ПЯ) в энуклеированные яйцеклетки [4].



Дифференциация человеческих PSC

Человеческие ПСК могут дифференцироваться в клетки всех трех эмбриональных зародышевых листков [5], что подтверждается экспериментально (in vitro) агрегацией в эмбриоподобные тельца. Непосредственная дифференциация в определенные типы клеток достигается за счет введения определенных факторов роста или небольших молекул. Самоорганизующиеся структуры из определенных типов клеток (клонов клеток) могут развиваться в органоиды, напоминающие функционирующие органы. Введение недифференцированных человеческих ПСК иммунодефицитным мышам приводит к развитию тератом, тогда как трансплантация незрелых, но дифференцированных клеток в соответствующие ткани животных может способствовать функциональному созреванию этих клеток в условиях in vivo.



Геномная стабильность ПСК человека

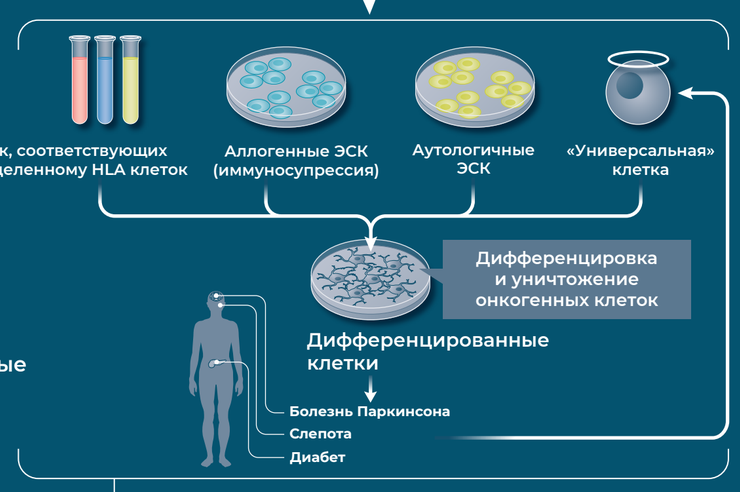
Усиленное развитие в условиях in vitro может привести к селективному экспансивному росту человеческих ПСК, обладающих набором определенных генетических аномалий [6]. Большие геномные изменения проявляются преимущественно в виде увеличения хромосомных участков 1q, 12p, 17q, 20q и X-хромосомы. Также были обнаружены точечные мутации в генах, связанных с развитием опухолевых тканей, в основном в гене-супрессоре опухолевого роста TP53. Также могут накапливаться эпигенетические аберрации, такие как изменения метилирования ДНК, что оказывает влияние на гены, связанные с импринтингом родителей в детском возрасте и развитием злокачественных опухолей. Возникающие аномалии сохраняются и после дифференциации, что влечет за собой потенциально опасные последствия в аспекте применения человеческих ПСК. Таким образом, крайне важен сбор подробных сведений о клетках, выращиваемых in vitro в течение длительных периодов времени, в том числе и с использованием кариотипирования клеток. В качестве подходов к улучшению «прогностического профиля» ПСК можно использовать альтернативные методы получения этих клеток или улучшенные условия развития.

Эмбриогенез человека

В культуре клеток дифференцировку в эктодермальные, мезодермальные и энтодермальные клетки недифференцированных ПСК можно стимулировать путем имитации эмбриональной дифференцировки во время гаструляции [7]. Дальнейшая клеточная специализация может быть достигнута шаг за шагом посредством использования малых молекул, белков или факторов транскрипции, что имитирует эмбриологическое развитие в норме, дабы стимулировать эту дифференцировку в сотни типов клеток, моделируя процесс органогенеза. Сравнение этих процессов у разных видов находит применение в изучении эволюции человека. Таким образом, ПСК представляют собой ценный материал для моделирования человеческого развития на этапах, которые в ином случае недоступны для исследований.

Моделирование патогенеза заболеваний и разработка лекарств

Основное применение ПСК человека — моделирование патогенеза заболеваний человека [8, 9], что может быть достигнуто тремя возможными путями: редактированием генов для симуляции (повторного стимулирования) мутации, ассоциированной с генетическим заболеванием; выделением ЭСК из пораженных бластоцист, идентифицированных посредством преимплантационной генетической диагностики (ПГД); или путем создания ИПСК из соматических клеток пациентов. Создание этих моделей расширяет осведомленность о молекулярной и клеточной основе конкретного заболевания и служит для определения новых методов лечения. Эти модели заболеваний также могут быть использованы для тестирования и разработки лекарственных средств, часто с помощью ВПС, что позволяет четко обозначить патологические фенотипы. Более того, патогенез инфекций удобно изучать, вводя определенные вирусы или бактерии в ПСК или в образованные из них клеточные культуры, например, органоиды.



Клеточная терапия

Человеческие ПСК уже используются в восстановительном лечении таких заболеваний, как слепота, сахарный диабет и болезнь Паркинсона [10]. Метод трансплантации дифференцированных типов клеток, полученных из ПСК, проходит испытания как в доклинических испытаниях на животных, так и в клинических испытаниях на людях. Одним из главных мер по безопасности является удаление недифференцированных онкогенных клеток перед трансплантацией. Потенциально это может быть реализовано выполнением протоколов дифференциации и сортировки, фармакологическими средствами или же введением «системы переключения», которая вызывает гибель клеток. Чтобы избежать иммунного отторжения, собственные клетки пациентов можно перепрограммировать в ИПСК, что позволяет проводить аутологичную трансплантацию. При аллогенной трансплантации необходимости лечения иммунодепрессантами можно избежать, создав банк ПСК, соответствующих определенному гаплотипу HLA (от англ. human leukocyte antigen — человеческий лейкоцитарный антиген), или создавая некие «универсальные» клетки, существование которых не будет запускать нежелательные иммунные реакции.

Словарь терминов и аббревиатур

Трансплантация аллогенных клеток
Форма клеточной терапии, при которой для трансплантации используются клетки генетически инородного донора.

Андрогенетические (а) клетки
Клетки, несущие только отцовский геном, образующиеся при введении сперматозоидов в энуклеированную яйцеклетку. Например, андрогенетические ЭСК (аЭСК)

Трансплантация аутологичных клеток
Форма клеточной терапии, при которой для трансплантации используются собственные клетки пациента.

Бластоциста
Ранняя эмбриональная структура, формирующаяся у человека через пять дней после оплодотворения; состоит из внутреннего скопления плюрипотентных клеток, внешнего слоя клеток трофоэктодермы и бластоцеля (полость, заполненная жидкостью).

Клеточная терапия
Метод лечения заболеваний человека путем трансплантации пациентам функциональных клеток.

Адаптация клеточной культуры
Изменения, возникающие в популяции клеток во время длительного роста в культуре, ведущие к повышению их приспособленности

Направленная дифференциация
Дифференциация клеток in vitro в определенных условиях, ведущая к формированию определенного типа клеток.

Моделирование заболеваний
Стратегия изучения болезней человека с использованием клеток с соответствующими патологическими особенностями

Эмбриоидные тела
Сферические агрегаты плюрипотентных стволовых клеток, способные спонтанно дифференцироваться в три эмбриональных зародышевых листка.

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК)
Плюрипотентные стволовые клетки, полученные из внутренней клеточной массы эмбрионов на стадии бластоцисты.

Гаплоидные клетки
Клетки, содержащие один набор хромосом в отличие от диплоидных клеток, которые содержат два набора хромосом.

Высокопроизводительный скрининг (ВТС)
Метод одновременной оценки биологических эффектов большого набора химических соединений или генетических изменений.

Человеческий лейкоцитарный антиген (HLA)
Главный комплекс гистосовместимости человека, являющийся частью иммунной системы. Кодирует молекулы клеточной поверхности, специализирующиеся на представлении антигенных пептидов рецепторам Т-клеток.

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК)
Плюрипотентные стволовые клетки, полученные из соматических клеток с помощью набора факторов репрограммирования, таких как OCT4, SOX2, KLF4 и MYC (вместе именуемые OSKM).

Органоиды
Трехмерные структуры, собранные из самоорганизующихся клеток, которые имитируют орган in vitro.

Партеногенетические (п) клетки
Клетки, несущие только материнский геном, развивающиеся вследствие активации неоплодотворенной яйцеклетки; например, партеногенетические ЭСК (пЭСК).

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК)
Клетки, способные к неограниченному самообновлению и дифференцировке во все три эмбриональных зародышевых листка.

Преимплантационная генетическая диагностика (ПГД)
Тест, проводимый на клетках, полученных путем биопсии, из эмбрионов на ранних стадиях развития, оплодотворенных in vitro, для определения генетических особенностей эмбриона.

Перенос ядра соматической клетки (ПЯСК)
Введение ядра соматической клетки в яйцеклетку с удаленным ядром, что ведет к индукции плюрипотентности и образованию ЭСК-ПЯ.

Тератома А
Опухоль, состоящая из клеток всех трех зародышевых листков эмбриона.

Онкогенность
Способность клетки к опухолевому росту.

Универсальные клетки
Генетически модифицированные клетки, предназначенные для ускользания от системы иммунного надзора.

STEMCELL Technologies стремится к тому, чтобы в исследованиях неизменно использовались продукты высокого качества в сочетании с беспрецедентными технологиями. Специализированные методики по культивированию клеток помогают в создании уникальных физиологичных моделей заболеваний и следующих поколений новых типов клеток с сохранением биологического качества клеточного материала.

- **mTeSR ™ Plus.** Данная стабилизированная питательная среда для поддержания жизнедеятельности ПСК человека сохраняет высокие показатели роста и качества клеток даже в отсутствие контроля со стороны исследователя. В настоящее время производится для соответствия определенным цГМФ для возможности осуществления плавного перехода от фундаментальных исследований к разработке лекарств и клеточной терапии. **www.stemcell.com/why-mtesrplus**
- **STEMdiff ™.** Оптимизация процесса дифференциации для получения высококачественных моделей тканей человека, полученных из ПСК, таких как органоиды. Позволяет надежно и эффективно создавать необходимые типы клеток из нескольких линий ПСК человека с подробными протоколами, оптимизированными составами и предварительно проверенными компонентами. **www.stemdiff.com**
- **Перепрограммирование.** Позволяет достичь превосходной морфологии колоний ИПСК даже в условиях отсутствия поступления питательных веществ извне с репрограммирующей средой ReproTeSR ™ и ReproRNA ™ - OKSGM для временной сверхэкспрессии ключевых факторов репрограммирования. **www.stemcell.com/reprogramming**
- **Матрицы.** Контроль среды культивирования чПСК с помощью определенных и незагрязненных матриц: CellAdhere ™ Laminin-521 и Vitronectin XF ™. **www.stemcell.com/matrices-and-substrates**

References

1. Thomson, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282, 1145–1147 (1998).
2. Takahashi, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 131, 861–872 (2007).
3. Sagi, I. et al. Derivation and differentiation of haploid human embryonic stem cells. Nature 532, 107–111 (2016).
4. Tachibana, M. et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. Cell 153, 1228–1238 (2013).
5. De Los Angeles, A. et al. Hallmarks of pluripotency. Nature 525, 469–478 (2015).
6. Lund, R. J., Närvä, E. & Lahesmaa, R. Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. Nat. Rev. Genet. 13, 732–744 (2012).
7. Shahbazi, M. N., Siggia, E. D. & Zernicka-Goetz, M. Self-organization of stem cells into embryos: A window on early mammalian development. Science, 364, 948–951 (2019).
8. Avior, Y., Sagi, I. & Benvenisty N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 17, 170–182 (2016).
9. Rowe, R. G. & Daley, G. Q. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. Nat. Rev. Genet. 20, 377–388 (2019).
10. Trounson, A. & DeWitt, N. D. Pluripotent stem cells progressing to the clinic. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 17, 194–200 (2016).

Affiliation

The Azrieli Center for Stem Cells and Genetic Research,
Institute of Life Sciences, The Hebrew University of Jerusalem, Israel.
E-mail: nissimb@cc.huji.ac.il | Website: http://benvenisty.huji.ac.il

Acknowledgements

The authors are grateful to Tamar Golan-Lev and Anna Bialer-Tsypin for assistance with the artwork. They thank Ido Sagi and the entire members of their laboratory for critically evaluating the poster. S.B is a Clore fellow and N.B. is the Herbert Cohn Chair in Cancer Research. This work was partially supported by the Azrieli Foundation.

Competing interests

N. B. is CSO of NewStem Ltd

The poster content is editorially independent and the sole responsibility of Springer Nature Limited. Edited by Katharine Barnes and Kim Baumann; copyedited by Carrie Hardy; designed by Vicky Summersby. Nature Reviews Molecular Cell Biology and Nature Protocols thank Florian Merkle and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this poster.

© 2020 Springer Nature Limited. All rights reserved.
https://www.nature.com/articles/s41580-020-00309-7

MEDACH.PRO