

文章编号: 1004-0374(2009)05-0724-05

疾病特异诱导多能干细胞研究进展

王译萱, 蒋永华, 高绍荣*

(北京生命科学研究所, 北京 102206)

摘要: 通过病毒或非病毒转导体系, 在小鼠和人的体细胞中人为表达几个与细胞多能性相关的转录因子, 从而使细胞达到类似于胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)状态, 是近年来新发展起来的体细胞重编程技术。这些被重编程的细胞称为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)。这项技术为获得患者和疾病特异的多能干细胞提供了新的途径。患者和疾病特异的 iPS 细胞的获得, 不仅在避免免疫排斥的宿主特异的细胞移植治疗上有广泛前景, 并对了解疾病发生机理、药物筛选和毒性研究有着重要的意义。该文综述从 iPS 细胞技术的发明入手, 着重讨论疾病 iPS 细胞的研究进展及其在应用于治疗时亟需解决的问题。

关键词: 干细胞; iPS 细胞; 疾病 iPS 细胞; 重编程; Oct3/4; Sox2; c-Myc; Klf4

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A

Advances in generation of disease-specific induced pluripotent stem (iPS) cells

WANG Yi-xuan, JIANG Yong-hua, GAO Shao-rong*

(National Institute of Biological Sciences, Beijing 102206, China)

Abstract: A recently developed reprogramming technology can reprogram mouse and human somatic cells to an undifferentiated state similar to that of embryonic stem (ES) cells by viral or nonviral transduction of several specific transcription factors, and the reprogrammed cells are termed induced pluripotent stem (iPS) cells. This technology has opened a new avenue to generate patient- and disease-specific pluripotent stem cells, which are useful not only for customized cell transplantation therapy without immune rejection but also for disease mechanisms understanding, drug screening and toxicology study. In this review, we will discuss the overview of the development of iPS cells technology, and focus on the research progress of disease-specific iPS cells and the problems need to resolve in clinical research.

Key words: stem cell; iPS cells; disease correlated iPS cells; reprogramming; Oct3/4; Sox2; c-Myc; Klf4

1 诱导多能干细胞概述

2006年, 日本科学家Takahashi和Yamanaka^[1]运用病毒转导的方法, 将一系列转录因子转入小鼠胚胎成纤维(mouse embryonic fibroblast, MEF)细胞, 得到了类似于小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)的一种细胞, 并命名为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPS细胞)。同时, 他们运用ES标记基因Fbx15筛选系统, 得到了获得iPS细胞的关键因子: Oct3/4、Sox2、c-Myc和Klf4(图1)。

小鼠iPS细胞的获得作为重编程领域的重要里程碑, 极大的推动了该领域的发展。

2007年, Okita等^[2]和Wernig等^[3]分别运用内源

收稿日期: 2009-08-28

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)(2008AA022311; 2006AA02A101); 科技部重大科学研究计划(2009CB941100); 国家自然科学基金项目(30670302)

*通讯作者 E-mail: gaoshaorong@nibs.ac.cn

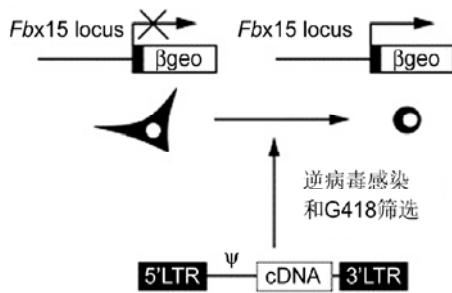


图1 运用病毒转导, 通过Fbx15筛选系统, 获得iPS细胞的方法^[1]

Oct4和Nanog的表达作为更严格的筛选系统, 得到了可以嵌入入生殖嵴的iPS细胞。随后Meissner等^[4]和Blelloch等^[5]依靠形态观察而非药物筛选, 分别获得了iPS细胞。而近期Kang等^[6]和Zhao等^[7]通过四倍体囊胚注射实验, 获得了完全由iPS细胞发育而来的成体小鼠, 从而证明了iPS细胞具有与ES细胞完全相同的多能性。

2007年, 不同国家的科学家运用相似的方法, 通过病毒转导人的成纤维细胞, 获得了人的iPS细胞。Yu等^[8]证明Oct4、Sox2、Nanog和Lin28可以将人的体细胞重编程为iPS细胞; 而Takahashi等^[9]和Park等^[10]则分别证明获得人的iPS细胞的关键因子与小鼠相同, 仍为Oct3/4、Sox2、Klf4和c-Myc。人iPS细胞的获得使人们开始将视线转移到iPS细胞的医疗应用之中, 通过将患者体细胞重编程, 获得患者特异的iPS细胞, 并进行药物筛选或基因治疗。iPS细胞与ES细胞相比, 更容易获得, 因而具有更广泛的应用前景。

2 疾病相关的iPS细胞研究进展

2007年底, Hanna等^[11]通过将人源化的镰刀型细胞贫血病的小鼠成纤维细胞诱导成iPS细胞, 采取基因打靶技术改正了突变的基因, 最后将修正的iPS细胞分化得到的造血祖细胞移植回小鼠体内, 首次建立了通过iPS细胞进行治疗的小鼠模型(图2)。在接下来的时间里, 疾病相关的iPS细胞研究进展飞速: Park等^[12]2008年首次将包括DMD、帕金森疾病、亨廷顿舞蹈症和唐氏综合征在内的10种遗传疾病的患者细胞诱导成iPS细胞, 并对这10种iPS细胞的全能性进行了鉴定; 同年, Dimos等^[13]将一位82岁的肌萎缩侧索硬化症(ALS)患者的体细胞通过病毒转导诱导得到的iPS细胞定向分化为在该疾病中被损坏的运动神经元; 而在2009年Ebert等^[14]将脊髓性肌萎缩症(SMA)患者的皮肤成纤维细胞诱导

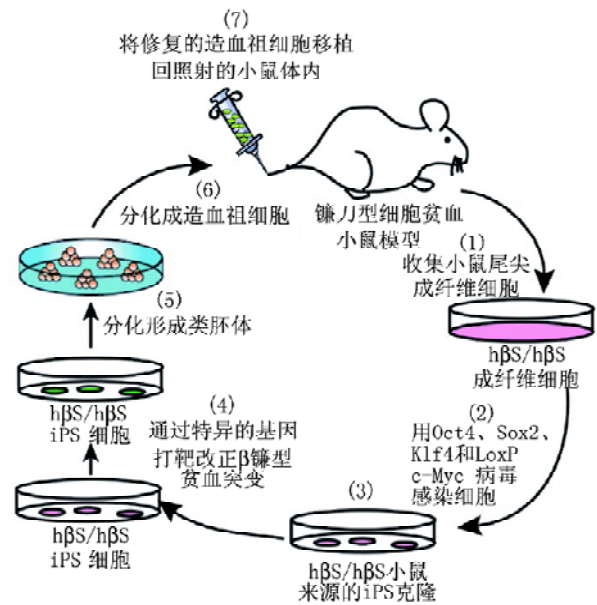


图2 运用iPS细胞技术和基因打靶技术治疗镰刀型细胞贫血病的小鼠模型^[11]

得到iPS细胞, 并将该细胞定向分化成运动神经元。尤为突出的是, 他们通过SMA疾病机理研究, 使用SMN诱导复合物刺激增加该运动神经元中的SMN蛋白水平, 从而对该疾病进行治疗。这项研究为对疾病特异的iPS细胞进行机理研究和药物筛选打下了良好的基础。

遗传性疾病可通过基因修复的方法进行治疗。Raya等^[15]运用携带FANCA蛋白的慢病毒载体感染Fanconi贫血症患者的体细胞进行基因修正, 再将修正后的体细胞诱导成iPS细胞, 该iPS细胞的FA通路功能恢复正常, 并可分化成正常的造血干细胞。这是首次通过基因修复, 运用疾病特异的iPS细胞对遗传性疾病进行治疗。

运用基因打靶技术进行定向同源重组是治疗遗传病的一个主要方向。虽然该技术在小鼠ES细胞中得到了广泛应用, 但由于人的ES细胞对胰酶尤为敏感的特性, 运用定向打靶进行疾病治疗不仅是iPS细胞领域, 也是人的ES细胞领域所面临的一个难题。Zou等^[16]运用锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)转染, 利用其可诱导靶向基因形成序列特异的双链DNA断裂, 从而在不影响其核型和多能性的前提下, 大大提高人的iPS细胞及ES细胞同源重组效率, 为疾病相关的iPS细胞通过同源重组进行疾病治疗提供了很好的模型。

3 疾病iPS细胞在应用研究中遇到的问题和需要的改进

疾病 iPS 细胞研究虽然推动了干细胞领域向实际应用的进展,但真正将疾病特异的 iPS 细胞应用于临床还有很大的距离,面临很多问题。这些问题包括:如何用其他类型的体细胞而非患者皮肤细胞获得 iPS 细胞;如何提高 iPS 细胞重编程的效率;如何解决由于病毒转导而使外源基因整合入患者基因组所带来的危险;最基本的一个问题——iPS 细胞重编程的机制是什么。解决这些问题不仅是疾病 iPS 细胞研究中的重点,也是整个 iPS 细胞和干细胞领域的重点。

3.1 用非成纤维细胞的体细胞重编程获得iPS细胞

在用成纤维细胞成功重编程获得 iPS 细胞后,人们开始试着把目标转向其他类型的体细胞。2008 年, Aoi 等^[17]首先运用病毒转导体系,将成体小鼠的肝细胞和胃上皮细胞重编程为 iPS 细胞,并证明了 iPS 细胞的形成与特定病毒整合位点无关。同年 4 月, Hanna 等^[18]运用转基因和 Dox 诱导系统,将小鼠非终末分化的 B 细胞成功重编程为 iPS 细胞,并

在四个转录因子诱导表达基础上,再过表达 C/EBP α 或特定干涉 B 细胞转录因子 Pax5, 可将终末分化的 B 淋巴细胞完全重编程。这项研究充分证明了终末分化的细胞仍可被体外重编程为多能细胞(图 3)。而 Kim 等^[19]根据小鼠神经干细胞中表达较高水平的 Sox2 和正常水平的 c-Myc 这一结果,运用 Oct3/4 和 Klf4 两个因子,将其诱导成为 iPS 细胞。同年 7 月, Stadtfeld 等^[20]将小鼠胰岛 β 细胞成功诱导为 iPS 细胞,为糖尿病的治疗提供了一个新的模型。而 Aasen 等^[21]通过四个因子逆病毒转导,将人的角细胞重编程为 iPS 细胞,并说明其重编程效率比成纤维细胞的重编程效率更高,速度更快。这些研究充分证明了非成纤维体细胞也可以通过 iPS 技术体外重编程为多能干细胞,为其医学应用提供了更广阔的供体体细胞来源。

3.2 提高iPS细胞重编程效率 运用逆转录病毒转导体细胞虽然可以使其重编程为多能干细胞,但效率极低,只有 0.1%。低效率诱导必然会造成应用上的不稳定。提高 iPS 细胞重编程效率主要有两个方面:一是尽量减少诱导所需的转录因子;二是

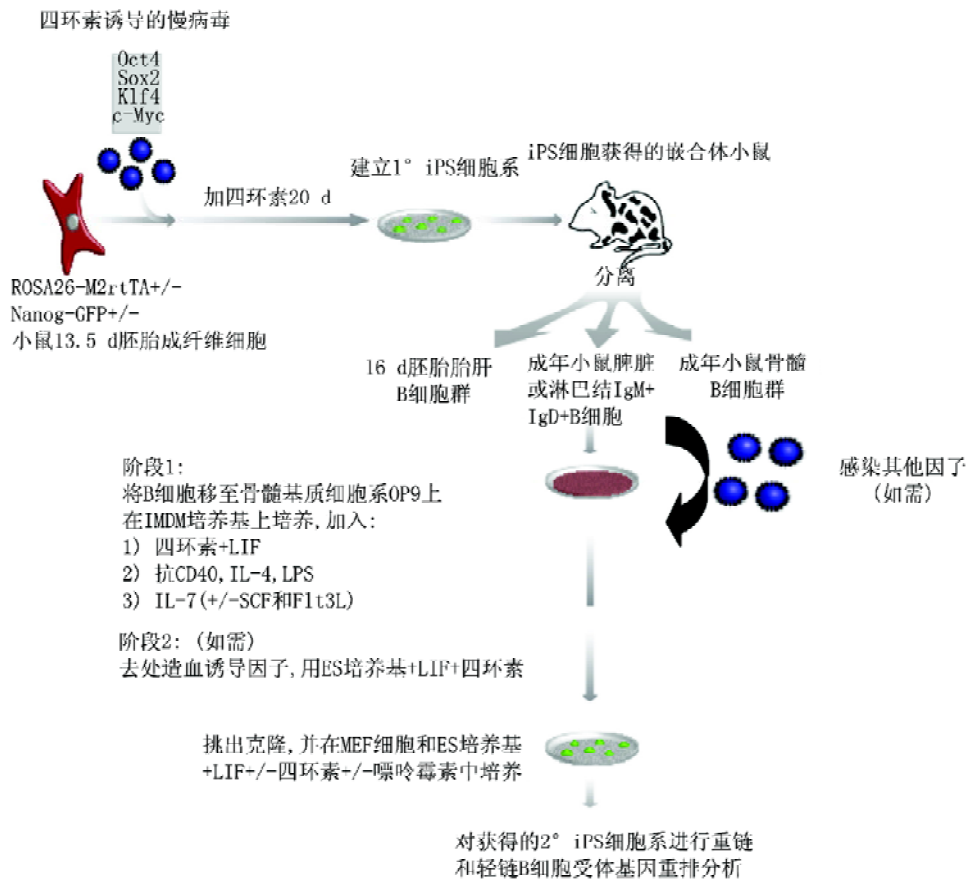


图3 B细胞体外重编程流程图^[18]

添加化学小分子, 通过影响表观遗传修饰, 提高重编程效率。这两个方面是相互联系, 相互影响的。

早在 iPS 技术建立之初, 就有文献报道小鼠和人的 iPS 细胞都可以在无 *c-Myc* 而在其他三个因子的诱导下形成^[22]。虽然这样并不能提高重编程效率, 但避免了原癌基因 *c-Myc* 整合入基因组导致肿瘤易生性的后果。Kim 等^[23]根据神经干细胞本身的特性, 在原来利用 Oct3/4 和 Klf4 两个因子的基础上进行改进, 只用一个转录因子 Oct3/4 就可以将神经干细胞重编程为 iPS 细胞。而近期有研究采用多顺反子性的病毒载体, 将 4 个转录因子通过 2A 自我剪切多肽序列顺式连接入一个单独的病毒载体, 并成功诱导获得 iPS 细胞^[24, 25]。

在添加化学小分子以提高重编程效率研究中, Huangfu 等^[26]通过比较多种 DNA 甲基化酶抑制剂和组蛋白去乙酰化酶 (HDAC) 抑制剂对小鼠 iPS 诱导效率的影响, 提出 HDAC 抑制剂 VPA 可将重编程效率提高约 100 倍。在接下来的研究中, 该实验室在添加 VPA 的条件下, 只用 Oct3/4 和 Sox2 就将人的成纤维细胞诱导重编程为 iPS 细胞, 避免了原癌基因 *c-Myc* 和 *Klf4* 整合入基因组可能会带来的负面影响^[27]。而 Shi 等^[28]和 Li 等^[29]在研究中发现小分子 BIX01294 的添加可以提高 iPS 诱导效率, 并可取代部分转录因子, 比较高效地诱导小鼠神经祖细胞 (NPC) 及人的体细胞重编程为多能干细胞。Jaenisch 实验室^[30]同样通过建立小分子筛选平台, 也筛选出了可以替代 Klf4 的小分子。将化学小分子和基因转导方法联合起来诱导 iPS 细胞, 在提高重编程效率的同时, 尽量避免患者基因组中癌基因的引入, 是疾病 iPS 细胞领域的热点和努力方向。

随着小分子 RNA (microRNA) 研究领域的发展, 小分子 RNA 作为一种易于合成、高效特异、副作用小的物质, 在疾病 iPS 细胞领域受到了广泛的关注。有研究证明胚胎干细胞特异的小分子 RNA 可以提高 iPS 细胞诱导效率^[31]。如何运用小分子 RNA 替代部分或全部转录因子诱导体细胞重编程, 也是今后疾病 iPS 细胞研究的重点和热点。

Hotta 等^[32]采用 EOS (早期转座子启动子和 Oct4 及 Sox2 增强子) 筛选系统, 通过 EGFP 和 puromycin 双重筛选, 建立了 Rett 综合征特异的小鼠及人的 iPS 细胞系, 并大大提高了重编程效率。为提高 iPS 重编程效率指出了一种新的方法。

3.3 去除病毒在 iPS 细胞重编程中可能带来的影响
在 iPS 细胞诱导过程中, 由病毒转导引入的外源

基因, 尤其是 *c-Myc* 和 *Klf4*, 在整合入基因组后可能会造成肿瘤发生或基因突变。因而, 尽量避免病毒或病毒整合的介入是疾病 iPS 研究中的一个重要方向。

无病毒的 iPS 系统首先是在小鼠模型上建立的。2008 年发表于 Science 的两篇文章分别采用转导携带四个转录因子不整合入基因组的腺病毒载体和重复多次转染携带转录因子的单个非病毒载体获得了小鼠的 iPS 细胞^[33, 34]。Kaji 等^[35]和 Yu 等^[36]采用多次重复转染携带转录因子的单个非病毒载体获得了人的 iPS 细胞, 证明了 iPS 细胞的产生并不需要外源基因整合入基因组或持续表达, 将 iPS 技术中引入的基因组修饰降至最低。而 Woltjen 等^[37]运用转座子技术, 将转录因子通过 PiggyBac (PB) 转座系统而非病毒系统导入体细胞中, 并使体细胞成功重编程。该方法不仅避免了病毒系统带来的弊端, 而且提高了无病毒 iPS 系统的重编程效率。Zhou 等^[38]运用重组蛋白直接导入小鼠体细胞, 将其重编程为 iPS 细胞。

将 Cre-LoxP 系统应用于 iPS 技术也是获得无病毒 iPS 细胞的重要途径。Soldner 等^[39]使用带有 LoxP 位点的慢病毒系统, 将 4 个转录因子导入帕金森症患者的体细胞中, 获得了 iPS 细胞; 再使用重组酶 Cre, 切除了整合入基因组的外源基因, 既保证了 iPS 细胞重编程效率, 又避免了病毒引入的基因组修饰, 在疾病 iPS 细胞的医疗应用中具有指导意义。

综上所述, iPS 重编程技术自产生以来, 受到了广泛的关注。疾病 iPS 细胞领域由于其在实际应用中前景广阔而受到了更多的重视。各种各样的患者特异的 iPS 细胞系及细胞库也在建立和鉴定过程中。但疾病 iPS 细胞系的建立与其应用之间仍存在很大的距离。如何提高重编程效率、如何避免病毒整合或外源基因引入带来的患者基因组变化以及 iPS 重编程机理的研究是今后疾病 iPS 细胞研究的热点和难点。

[参 考 文 献]

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126 (4): 663-76
- [2] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2007, 448 (7151): 313-7
- [3] Wernig M, Meissner A, Foreman R, et al. *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 2007, 448 (7151): 318-24

- [4] Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2007, 25 (10): 1177-81
- [5] Blelloch R, Venere M, Yen J, et al. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell*, 2007, 1 (3): 245-7
- [6] Kang L, Wang J, Zhang Y, et al. iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell*, 2009, 5 (2): 135-8
- [7] Zhao XY, Li W, Lü Z, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*, 2009, 461 (7260): 86-90
- [8] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 2007, 318 (5858): 1917-20
- [9] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 2007, 131 (5): 861-72
- [10] Park IH, Zhao R, West JA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature*, 2008, 451 (7175): 141-6
- [11] Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 2007, 318 (5858): 1920-3
- [12] Park IH, Arora N, Huo H, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell*, 2008, 134 (5): 877-86
- [13] Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, 2008, 321 (5893): 1218-21
- [14] Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 2009, 457 (7227): 277-80
- [15] Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 460 (7251): 53-9
- [16] Zou J, Maeder ML, Mali P, et al. Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 2009, 5 (1): 97-110
- [17] Aoi T, Yae K, Nakagawa M, et al. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*, 2008, 321 (5889): 699-702
- [18] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, 2008, 133 (2): 250-64
- [19] Kim JB, Zaehres H, Wu G, et al. Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 2008, 454 (7204): 646-50
- [20] Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic β cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol*, 2008, 18 (12): 890-4
- [21] Aasen T, Raya A, Barrero MJ, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol*, 2008, 26 (11): 1276-84
- [22] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, 2008, 26 (1): 101-6
- [23] Kim JB, Sebastiano V, Wu G, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, 2009, 136 (3): 411-9
- [24] Chang CW, Lai YS, Pawlik KM, et al. Polycistronic lentiviral vector for "hit and run" reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 2009, 27 (5): 1042-9
- [25] Gonzalez F, Barragan Monasterio M, Tiscornia G, et al. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106 (22): 8918-922
- [26] Huangfu D, Maehr R, Guo W, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*, 2008, 26 (7): 795-7
- [27] Huangfu D, Osafune K, Maehr R, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol*, 2008, 26 (11): 1269-75
- [28] Shi Y, Desponts C, Do JT, et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell*, 2008, 3 (5): 568-74
- [29] Li W, Wei W, Zhu S, et al. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell*, 2009, 4 (1): 16-9
- [30] Lyssiotis CA, Foreman RK, Staerk J, et al. Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106 (22): 8912-7
- [31] Judson RL, Babiarz JE, Venere M, et al. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol*, 2009, 27 (5): 459-61
- [32] Hotta A, Cheung AY, Farra N, et al. Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. *Nat Methods*, 2009, 6 (5): 370-6
- [33] Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 2008, 322 (5903): 945-9
- [34] Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 2008, 322 (5903): 949-53
- [35] Kaji K, Norrby K, Paca A, et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 2009, 458 (7239): 771-5
- [36] Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, 2009, 324 (5928): 797-801
- [37] Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 2009, 458 (7239): 766-70
- [38] Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, 2009, 4 (5): 381-4
- [39] Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, 2009, 136 (5): 964-77