

文章编号: 1004-0374(2010)03-0259-03

特定因子诱导多能干细胞

山中伸弥

(日本京都大学)

摘要: 胚胎干细胞由于具有发育上的全能性, 被认为是用于移植治疗的最佳来源。然而, 由于人的胚胎干细胞直接运用引发免疫排斥以及触及伦理矛盾, 人们一直在研发多能干细胞。2006年, 多能干干细胞的研究有了重大进展。首先, Yamanaka 实验室构建用逆转录载体将候选因子导入成纤维细胞, 而后检测多能性标志基因的表达。结果发现, 四种因子 Oct3/4、Sox2、c-Myc 以及 Klf4 的组合产生了表达多能性标志基因才有的抗药性的克隆, 意味着细胞获得了多能性。用这种方法筛选的细胞无论在形态和增殖分化能力方面均类似于干细胞, 而且表达干细胞标志基因以及在体内外能向三个胚层的细胞类型分化, 这种细胞被命名为诱导性多能干细胞(iPS 细胞)。进一步, 用更严格的筛选基因 nanog 得到的 iPS 能够嵌合到生殖系中。而后, 运用改进的方法从人的成体成纤维细胞也可以得到 iPS 细胞。然而, 这种方法得到的嵌合体小鼠存在肿瘤形成现象, 可能是由于 c-Myc 逆转录病毒整合到了基因组。通过替代的方法, 去掉 c-Myc 的 iPS 也能够获得。为了进一步降低肿瘤形成的几率, 近来发展了一种不依赖于病毒的方法, 用质粒载体作为介质。iPS 进一步的研究热点在于安全性以及从更严格的医学角度提高诱导 iPS 的效率, 其分子机理和相关的技术问题也有待解决和克服。

关键词: 干细胞; 多能性; 逆转录病毒; 诱导性多能干细胞

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A

Induction of pluripotency by defined factors

Shinya Yamanaka

(Kyoto University, Japan)

Abstract: Human ES cells have been expected as suitable resources for transplantation therapies. However, it has caused ethical controversy and immune rejection. Hence, we decided to generate an ideal pluripotent stem cell. At first, we constructed a pluripotency assay system via retrovirus vectors. The set of Oct3/4, Sox2, c-Myc, and Klf-4 gave rise to drug resistant colonies implying potential pluripotency. The survived cells resembled ES cells in terms of morphology and proliferation showed ES cell markers and formed teratoma. It was named as induced pluripotent stem cell (iPS cell). Moreover, iPS cells based on nanog-expression demonstrated germline transmission. Furthermore, we successfully generated iPS cells from human adult fibroblasts, using a modified protocol. However, tumor formation was observed in chimera mouse. We successfully established iPS cells without c-Myc. To lower the risk of tumorigenesis, we recently succeeded in developing a virus-free method. Further research results are discussed from the points of safety and induction efficiency of iPS cells for future clinical grade.

Key words: ES cells; pluripotency; retrovirus; induced pluripotent stem cell

1 胚胎干细胞的应用与现状

胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES细胞)来源于胚胎囊胚层的内细胞团, 于1981年首次从小鼠中

获得并建系。ES细胞具有与普通细胞不一样的特性: 第一, 增殖迅速; 第二, 具有多能型, 即ES细胞能够分化为各种不同的细胞类型。人的ES细胞于1998年由Thomson建系。众所周知, 由于

其多能性, ES 细胞理论上能被应用于再生医学中, 用于治疗如帕金森病、脊髓损伤、心脏病等疾病。然而, ES 细胞的应用还有很多困难: 由于还不能得到患者个体特异性的 ES 细胞, 其用于移植后机体必然产生免疫排斥; 而且, 由于要使用人类胚胎, 必然带来一系列伦理问题。因此, 必须要有新的技术来代替 ES 细胞。如果能直接从患者的体细胞获得像 ES 细胞一样具有多能性的细胞, 那么上述问题都将得到解决。

2 iPS细胞的产生

2.1 小鼠iPS细胞的产生

iPS细胞首先是由Takahashi和Yamanaka在2006年建立的。1999年底, Yamanaka在Nara科学技术研究所建立了自己的实验室。实验室成立初始, 要寻找实验室未来的方向课题, 由于对干细胞技术应用前景的潜力很有信心, 也因为目前该技术存在的一系列瓶颈, 一个大胆的想法产生了, 就是试图将体细胞用某种方法重编程, 变成干细胞样的细胞。假设体细胞如果要变成ES样细胞需要一些多能性维持所必需的因子。1999年, 两个实验室同时发现STAT3对维持小鼠干细胞的全能性很重要。随后研究结果显示, Sox2在早期胚胎发生、神经分化和晶状体发育等多种重要的发育事件中都起着关键的作用, 从而该因子引起了广泛的关注。在干细胞中, Sox2与Oct-3/4形成蛋白复合体, 共同调控FGF3、UTF1等生长因子的表达, Sox2被认为是保持Oct-3/4表达的关键因素。Oshimi Tokuzawa发现Klf4也有重要作用。至2004年, 越来越多的转录因子被发现维持在维持全能性方面有重要作用。这些因子是重编程过程中细胞获得全能性的候选因子。要筛选出这些因子, 必须有一个简单而敏感的系统来验证。Fbx15/ECAT3是由Oct4和Sox2激活的在ES细胞内特异性表达的转录因子。用gene-typing的方法获得Fbx15^{-/-}的小鼠, 将Neo插入基因组, 结果缺陷型双敲除的小鼠是健康的。Fbx15敲除的小鼠胚胎干细胞也是正常的。Fbx15-Neo的knock-in小鼠的体细胞是G418抗性敏感的, 而胚胎干细胞是G418抗性的。利用这种小鼠的这种特性, 可以将转录因子用逆转录病毒载体转入小鼠胚胎成纤维细胞, 如果获得了G418抗性的细胞, 那必然表达Fbx15。在很多候选因子中, 用一种或几种的不同组合分别尝试诱导MEF细胞, 单种的因子得不到G418抗性的细胞, 而24种因子的组合能够得到阳

性的细胞。为了进一步确定24种因子中哪些是必需的, 在实验中分别去掉其中一种, 然后用同样方法诱导, 结果发现, 只有分别去掉其中4个因子Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc, 才得不到任何阳性克隆。用这四种因子的组合能够得到类似于ES的细胞, 这种细胞被命名为诱导性多能干细胞。相关的研究于2006年在Cell杂志被发表。将此诱导性多能干细胞移植到囊胚, 能够得到嵌合体小鼠, 并可通过种系遗传到下一代。2009年, 中国两个研究组分别在Nature、Cell Stem Cell上发表文章, 首次报道了利用iPS细胞通过四倍体囊胚注射得到存活并具有繁殖能力的小鼠, 从而在世界上第一次证明了iPS细胞的全能性。

2.2 人的iPS细胞的产生

关于人的诱导性多能干细胞也有重要进展, 2007年, 日本Yamanaka研究组再度出击, Takahashi等用4个因子的逆转录病毒系统从人的成纤维细胞得到了人的诱导性多能干细胞。美国方面的进展也很迅速, 例如威斯康辛大学、哈佛大学、加州大学洛杉矶分校等也相继有报道, 分别发布利用人体皮肤细胞成功诱导生成类似胚胎干细胞样的全能干细胞的研究成果。在人类的iPS细胞研究中, 他们采用了Nanog作为分子标记, 获得的细胞全能性更接近胚胎干细胞。表观遗传学分析证明, 在DNA甲基化, H3K4、H3K27甲基化, X染色体失活等方面, 获得的细胞都接近正常的胚胎干细胞, 而且这些iPS细胞植入生殖系统后可以正常发育。这些都比2006年采用Fbx15作为筛选标记得到的鼠类iPS更为进步。

3 iPS细胞的研究与应用

2007年, 日本在东京成立了iPS细胞研究与应用中心。通过活体穿刺得到人的原代皮肤细胞, 然后用iPS的方法能够得到多能干细胞, 而用这种诱导性多能干细胞做分化, 能得到各种类型的细胞, 如心肌细胞。用来源于不同年龄的人的细胞诱导多能干细胞, 人的年龄分别从6岁至81岁不等, 结果诱导的效率竟然没有差别。iPS细胞的潜在应用价值很高, 如可以用患者的体细胞诱导获得iPS细胞之后再做定向分化, 得到神经细胞、肌细胞、肝细胞、胰岛β细胞等等, 再做移植。许多研究人员正在致力于这方面疾病模型的治疗, 比如在小鼠疾病模型中, 麻省理工大学2007年报道的治疗镰状细胞性贫血; 2008年报道的治疗帕金森氏症; 2008

年美国内华达癌症研究所报道的治疗血友病，以及2009年西班牙报道的治疗人的范尼可疾病。

用逆转录病毒介导的诱导多能干细胞的过程中，病毒会随机插入基因组，为了避免这一问题，许多替代的导入基因的方法也被陆续提出，如腺病毒(哈佛大学2008年)、质粒(日本2008年)、游离性载体(威斯康辛，2008年)、蛋白(scripps, 哈佛，2009年)，这些方法可以得到没有整合的诱导性多能干细胞。然而，这些方法的诱导效率是极低的。近来发现，在用质粒转染诱导的方法中，如果敲除P53，诱导的效率会大大提高。

从安全的角度出发，由iPS细胞分化而来的被用于治疗的那些细胞必须经过一系列如毒理学、疾病模型、筛药模型验证之后才能被用于治疗。例如，长Q-T间期综合征的发病原因有些是药物引起的，有些是个体敏感的。这种病会引起致命性心律不齐，造成死亡。研发合适的治疗药物很有必要。在iPS的临床应用方面，如果要用于治疗这种疾病，必须将患者的心电图置于密切监控之下。从患者尤其是具有个体敏感性的患者身上诱导得到的iPS细胞分化为心肌细胞，该细胞携带着患者的个体敏感性信息，用不同剂量的药物对这些细胞进行处理，密切监控心肌细胞的节律时长变化，从而更好的研发药物。再如，有很多运动神经元疾病，脊髓性肌萎缩SMA是由于SMN基因突变造成的，是早发性的，而肌萎缩性脊髓侧索硬化症(ALS)是零星的，迟发性的。运动神经元疾病既没有有效的治疗方法，也没有好的疾病模型。然而，运用iPS技术，从SMA或者ALS患者中诱导得到iPS再分化为运动神经元，可以用来进行疾病的机理研究和药物

的筛选。2008年，Nature和Science分别发表了从SMA患者和ALS患者身上诱导得到iPS的研究，前者得到的运动神经元是不正常的，而后者得到的是正常的运动神经元。疾病的机理分为遗传异常、老化和环境几个因素，从实验的结果来看，可以对它们的发病机理做出一定解释。在SMA中起主要作用的是遗传因素，而ALS的发病机理则主要与环境老化有关。

4 iPS细胞的应用前景和安全性展望

然而，iPS的应用面临着很多困难与挑战。首先，在细胞水平，如何把iPS分化成想要的细胞类型，例如把iPS细胞分化为治疗所用的各种细胞，涉及了很多基础科学的研究，尤其是病理学相关的研究，还涉及疾病模型、药物模型、药理学等等。而iPS本身的机理研究在今后很长时间内也是个热点。另外，iPS的应用面临和ES细胞一样的困难，即如何分化成想要的器官，器官如何移植，并且iPS细胞在体内可产生畸胎瘤，这本身也会带来相关的安全问题。与ES细胞不同的问题是，要得到iPS需要的重编程过程，本身也涉及了安全问题。因此要发展iPS应用，还有很长的路要走。尽管困难重重，但是，短短几年的发展，我们已经从iPS细胞上看到了它为人类疾病治疗所带来的希望和契机，我们更期待在不远的将来，这些困难会在人们的努力下逐一地被克服，最终有望真正用于造福人类健康。

(中国科学院上海生物化学和细胞生物学研究所
黄燕 编译)