

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки: новые возможности в нейробиологии и нейротрансплантологии

О.С. Лебедева, М.А. Лагарькова, С.Н. Иллариошкин, Л.Г. Хаспекв, И.А. Гривенников

Институт молекулярной генетики РАН;
Институт общей генетики им. Н.Н. Вавилова РАН;
Научный центр неврологии РАМН (Москва)

Открытие эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и разработка методов манипулирования с ними относятся к наиболее значимым достижениям науки XX века. Поскольку ЭСК млекопитающих представляют собой, по существу, неисчерпаемый источник недифференцированных клеток с нормальным диплоидным кариотипом, они будут оставаться важнейшим объектом для фундаментальных исследований, в т.ч. в нейробиологии, однако их применение для решения задач практической неврологии сталкивается с рядом сложностей медицинского и этического характера. Результаты последних исследований открывают совершенно новые возможности в области клеточной терапии тяжелых болезней человека. Речь идет о репрограммировании соматических клеток млекопитающих, включая человека, в плюрипотентные стволовые клетки (так называемые индуцированные плюрипотентные стволовые клетки – ИПСК), с дальнейшей их дифференцировкой в клетки различных типов. Показана практическая возможность трансформации ИПСК пациентов в дофаминергические и другие специфические нейроны ЦНС, что дает в руки врачей принципиально новую технологию получения адекватного и генетически идентичного клеточного материала для нейротрансплантации при болезнях Паркинсона, Гентингтона и других тяжелых нейродегенеративных заболеваниях.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, репрограммирование, нейродегенеративные заболевания

Одним из крупнейших достижений науки XX столетия явилось открытие *стволовых клеток*, их роли и закономерностей функционирования в нормальном онтогенезе и при различных повреждениях тканей организма. В 1999 г. журнал “Science” признал открытие стволовых клеток третьим по значимости событием в биологии после расшифровки двойной спирали ДНК и реализации программы «Геном человека». Стволовые клетки – это клетки-предшественники, из которых при необходимости образуются все другие типы клеток, составляющие различные органы и ткани. Общепринятыми критериями «стволовости» при характеристике клеток являются следующие признаки: а) способность к неограниченному делению; б) свойство клетки при делении давать начало разным видам дочерних клеток, одна из которых дифференцируется, а вторая остается стволовой, за счет чего стволовые клетки образуют самоподдерживающуюся популяцию [1, 3, 7].

Стволовые клетки имеют свою иерархию и различный репродуктивный потенциал. С этой точки зрения выделяют несколько видов стволовых клеток:

- 1) *тотипотентные* – способны дифференцироваться во все типы клеток. Тотипотентные стволовые клетки существуют в развивающемся организме очень короткое время – лишь на стадии нескольких клеточных делений зиготы;
- 2) *плюрипотентные* – способны дифференцироваться во все типы клеток, кроме экстраэмбриональных тканей.

Плюрипотентные стволовые клетки представлены в раннем эмбриогенезе на стадии бластоцисты;

- 3) *мульти- и олигопотентные* – могут дифференцироваться лишь в клетки определенных тканей (совокупности тканей). Они являются региональными (мезенхимальными, нейральными и т.п.), присутствуют во взрослом организме и являются источником ограниченной регенерации органов и тканей в ответ на повреждение.

Для репаративной медицины основной интерес представляют плюрипотентные стволовые клетки. До последнего времени их практически единственным источником была внутренняя масса бластоцисты, которую получали в лабораторных условиях через несколько дней после процедуры экстракорпорального оплодотворения. ЭСК представляют собой практически неисчерпаемый источник недифференцированных клеток с нормальным диплоидным кариотипом, которые могут быть дифференцированы в самых разных направлениях [1, 4, 58]. Безусловно, ЭСК и далее будут оставаться важнейшим объектом для исследователей, занимающихся изучением путей эмбрионального развития, формирования и функционирования отдельных типов тканей. Однако манипуляции с ЭСК сопровождаются высоким риском их злокачественной трансформации, а также значительными проблемами этического порядка в связи с необходимостью забора клеток от человеческих эмбрионов [4]. Поэтому применение ЭСК в качестве клеточной терапии до сих пор так и не стало предметом широкой клинической практики.

Неврология является той областью клинической медицины, для которой развитие исследований стволовых клеток особенно важно. В силу постмитотической природы дифференцированных нейронов, их высокой ранимости и весьма ограниченного репаративного потенциала основные надежды в восстановлении функций вещества мозга, утраченных в результате разнообразных острых катастроф либо хронических прогрессирующих заболеваний нервной системы, в последние годы связаны с заместительными клеточными технологиями. В литературе есть ряд сообщений о применении региональных мультипотентных стволовых клеток (получаемых из пуповинной крови, костного мозга, жировой и др. тканей) при инсульте [9, 22, 30], нейродегенеративных заболеваниях и их экспериментальных моделях [1, 6, 31, 33], рассеянном склерозе [10], после нейротравмы [22, 60] и т.д. В целом, однако, такое лечение сопровождалось обычно лишь минимальным и неспецифическим клиническим эффектом либо (чаще всего) давало отрицательный результат. Более того, под сомнение поставлена сама возможность дифференцировки мультипотентных стволовых клеток в нейроны [35]. Попытки нейротрансплантации с использованием некоторых новых источников клеток (например, ретикулярных пигментированных эпителиальных клеток, прогениторных клеток обонятельного эпителия и др.) также пока безуспешны [2, 19]. По существу, именно отсутствие доступного источника стволовых клеток с высоким потенциалом адресной дифференцировки в тот или иной тип специализированных нейронов стало главным тормозом на пути развития методов нейротрансплантации.

Настоящий прорыв в данной области произошел в 2006 г. Японским исследователям К. Takahashi и S. Yamanaka из Киотского университета [55] удалось осуществить репрограммирование взрослых и эмбриональных фибробластов мыши в плюрипотентные стволовые клетки путем введения в них с помощью ретровирусных векторов четырех транскрипционных факторов Oct3/4, Sox2, с-Мус и Klf4. Иными словами, клетки кожи превращались в плюрипотентные стволовые клетки в результате активации в них четырех генов, наиболее активных на этапе эмбрионального развития. Полученные в результате такой обработки ИПСК обладали сходной с ЭСК морфологией, ростовыми свойствами и экспрессией специфических клеточных маркеров. Спустя короткое время, исследователи из той же лаборатории под руководством профессора S. Yamanaka (он был номинирован на Нобелевскую премию в области физиологии и медицины) сообщили об успешной де-дифференцировке фибробластов взрослого человека и получении ИПСК с помощью идентичных пептидных факторов [39, 54]. Таким образом, была принципиально показана возможность **перепрограммировать соматические клетки**, меняя их специализацию и «стирая» клеточную память, связанную с индивидуальным развитием.

Далее будут рассмотрены способы получения ИПСК и перспективы их использования в неврологии для исследования и лечения ряда нейродегенеративных заболеваний.

Основные гены, участвующие в репрограммировании

В пионерской работе Takahashi и Yamanaka был проанализирован транскриптом ЭСК мыши и выявлены 24 гена, отвечающие за поддержание их плюрипотентного состояния [55]. После анализа этих генов было показано, что сочетание транскрипционных факторов Oct4, Sox2, Klf4 и с-Мус

при их лентивирусной трансфекции (т.е. при введении их генов в клетку в составе вирусных векторов) приводит к возвращению дифференцированной соматической клетке ее плюрипотентного состояния. Позднее для индукции плюрипотентности был применен другой набор транскрипционных факторов: Oct4, Sox2, Nanog и LIN28 [18].

Транскрипционный фактор Oct4 необходим для самообновления плюрипотентных клеток, причем любое изменение в его экспрессии приводит к потере «стволовости» [67]. Так, эмбрионы мыши, у которых отсутствует ген, кодирующий Oct4, не формируют клетки внутренней клеточной массы бластоцисты, все клетки в этом случае превращаются в трофобластодерму [45]. Oct4 может образовывать гетеродимеры с транскрипционным фактором Sox2 — пептидом, также активно участвующим в поддержании плюрипотентного состояния [12, 48]. Экспрессия обоих этих транскрипционных факторов регулируется протоонкогеном Klf4. Следует добавить, что Oct4 осуществляет регуляцию экспрессии собственного гена в составе комплекса транскрипционных факторов Sox2/Oct4/Nanog. Последний из них, Nanog, получивший свое название по имени страны вечной юности Тир Нан Ог из кельтской мифологии, функционирует в виде гомодимера и экспрессируется в недифференцированных клетках [23, 50]. В дальнейшем было показано, что с комплексом Sox2/Oct4/Nanog может взаимодействовать четвертый транскрипционный фактор с-Мус [16, 38].

Экспрессия важнейшего гена поддержания плюрипотентности Oct4 регулируется и на посттранскрипционном уровне белком LIN28, который связывается с кодирующей последовательностью мРНК Oct4 и увеличивает уровень ее белкового продукта в клетке [47]. В ЭСК мыши репрессия LIN28 приводит к ослаблению клеточного деления, а повышенная экспрессия этого белка, напротив, усиливает пролиферацию клеток [61]. Транскрипционные факторы Oct4, Sox2, Klf4, с-Мус, Nanog и LIN28 формируют сеть взаимодействий, необходимых для поддержания самообновления и плюрипотентности ИПСК. Именно эти факторы при введении их в дифференцированные соматические клетки позволяют вернуть им недифференцированное плюрипотентное состояние.

Способы получения ИПСК

Существует достаточно большое количество методов индукции плюрипотентности. Исторически первыми были вирусные системы индукции: ретровирусная [55] и лентивирусная трансфекция [65]. Но клетки, несущие в своем геноме вирусные вставки, не могут применяться для клеточной терапии из-за опасности активации трансогенов в организме пациента, что может привести к развитию злокачественных новообразований. В связи с этим стали разрабатываться безвирусные методы индукции плюрипотентности: транспозон piggyBac, несущий «сшитые» через 2A пептиды транскрипционные факторы [28], плазмидные ДНК [41], рекомбинантные транскрипционные факторы (Oct4, Sox2, с-Мус, Klf4) [70], эписомы [64]. Новейшей разработкой в данной области является индукция плюрипотентности с помощью трансфекции соматических клеток матричной РНК (мРНК), кодирующей указанные выше факторы репрограммирования [57]. Данная методика является безопасной, т.к. мРНК полностью разрушается в клетке, а ее синтез *in vitro* не связан с использованием материалов животного происхождения.

таблица 1: Эффективность репрограммирования клеток с помощью различных методов.

Способ репрограммирования	Эффективность репрограммирования (%)	Источник
Лентивирусная трансфекция	0,02–0,2	[Yu et al., 2007] [Brambrink et al., 2008]
Ретровирусная трансфекция	0,1	[Takahashi et al., 2007]
Система транспозон-транспозаза	0,1 (4 фактора*) 1,0 (6 факторов**)	[Yu et al., 2009]
Плазмидные ДНК	0,0001–0,003	[Okita K. et al., 2008]
Рекомбинантные белки	0,006	[Zhou H. et al., 2009]
мРНК	1,0	[Warren L. et al., 2010]

Примечание: * – Oct4, Sox2, Nanog, LIN28; ** – Oct4, Sox2, Nanog, LIN28, Klf4, c-Myc.

Как видно из табл. 1, процесс репрограммирования в принципе является достаточно низкоэффективным (~1%). Ингибиторы ДНК-метилтрансферазы [26], метилазы гистонов (VIX) [52] и деацетилазы гистонов (VPA) [26] повышают эффективность репрограммирования в несколько раз, т.к. репрограммирование связано с эпигенетическими перестройками в соматических клетках. Известно также, что эффективность репрограммирования эмбриональных фибробластов мыши можно повысить с помощью малой молекулы *Wu*8644, которая является антагонистом кальциевых каналов L-типа [51]. Некоторые малые молекулы способны заменять факторы репрограммирования. Так, при репрограммировании фибробластов мыши соединение *Ken*полон замещает Klf4 и обеспечивает индукцию Nanog с получением полноценных ИПСК в присутствии лишь трех транскрипционных факторов (Oct4, Sox2, c-Myc) [36]. Комбинация двух малых молекул VIX и *Wu*8644 позволяет осуществлять репрограммирование эмбриональных фибробластов мыши с помощью только двух транскрипционных факторов Oct4 и Klf4 [51]. Фибробласты человека можно вернуть в эмбриональное состояние с помощью транскрипционных факторов Oct4 и Sox2 в присутствии соединения VPA [27].

таблица 2: Типы клеток человека, из которых были получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

Тип клеток	Репрограммирующие транскрипционные факторы	Ссылка
Фибробласты	Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4	[Nakagawa et al., 2008]
Фибробласты	Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4	[Takahashi et al., 2007]
Фибробласты	Oct4, Sox2	[Huangfu et al., 2008]
Кератиноциты	Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4	[Aasen et al., 2008]
Фибробласты	Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4	[Taura et al., 2009]
Фибробласты	Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4+2A пептиды	[Kaji et al., 2009]
Кератиноциты	Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4	[Dimos et al., 2008]
Фибробласты	Oct4, Sox2, Nanog, LIN28	[Ebert et al., 2009]
Клетки крови	Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4	[Loh et al., 2009]
Эндотелиоциты	Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4	[Lagarkova et al., 2010]

В настоящее время ИПСК получены уже из различных дифференцированных соматических клеток человеческого организма (табл. 2).

Сходства и различия ИПСК и ЭСК

Недифференцированное состояние плюрипотентных клеток характеризуется различными признаками. Плюрипотентные стволовые клетки отличаются высокой активностью щелочной фосфатазы [54], экспрессией протеогликанов TRA-1-60 и TRA-1-81 [34] и гликолипида SSEA-4, в меньшей степени – гликолипида SSEA-3 [44]. ИПСК и ЭСК схожи как по набору внутриклеточных маркеров недифференцированного состояния – транскрипционных факторов плюрипотентности [11, 37, 65], так и метилированию генома [20].

Кроме белковых маркеров существуют функциональные тесты на плюрипотентность. Единственным возможным для человеческих плюрипотентных клеток тестом на плюрипотентность *in vivo* является образование тератом при введении их иммунодефицитным мышам. В этих тератомах обнаруживаются такие ткани, как: кишечный эпителий (энтодерма); хрящ, кость и гладкие мышцы (мезодерма); нейральный эпителий (эктодерма) [11, 54]. ИПСК и ЭСК, полученные из дифференцированных клеток мыши, могут включаться не только в соматические ткани химерного животного, но и образовывать клетки половой линии [37, 70].

ИПСК и ЭСК практически идентичны по морфологическим и функциональным характеристикам, однако потенциальные области применения этих типов плюрипотентных клеток значительно различаются. ЭСК имеют ряд недостатков, ограничивающих их применение в медицине и лабораторной практике (табл. 3). С точки зрения клеточной терапии, один из основных недостатков ЭСК – возможное развитие иммунного ответа на трансплантат. Поскольку существует ограниченное количество линий ЭСК, не для всех реципиентов можно подобрать подходящий по антигенам лейкоцитов человека (HLAs) трансплантат. Выходом из этого положения могут служить генетически измененные ЭСК человека с генами HLA реципиента, но такой подход сложный и трудоемкий, причем неизвестно, сколько клонов необходимо будет получить. Другой альтернативой является получение новой пациент-специфичной линии ЭСК путем переноса ядра соматической клетки в энуклеированный ооцит. Эта методика позволит избежать развития иммунного ответа у реципиента, но она сопряжена с получением человеческого эмбриона и последующим его разрушением для выделения ЭСК. Она

таблица 3: Сравнение свойств индуцированных плюрипотентных и эмбриональных стволовых клеток.

Характеристики	Эмбриональные стволовые клетки	Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки
Плюрипотентность	+	+
Источник	эмбрион (бластоциста)	взрослый организм
Этические проблемы	+	–
Возможность получения «больных» клеток	–	+
Пациентоспецифичность	–	+

объединяет в себе клонирование человека и разрушение человеческого эмбриона — два этически и политически наиболее спорных вопроса, обсуждаемых более 10 лет политиками, биоэтиками, правозащитниками и журналистами [4, 42].

Интересной областью применения плюрипотентных клеток является изучение механизмов развития различных генетически обусловленных болезней и скрининг лекарственных препаратов на культурах клеток, несущих соответствующую данной болезни мутацию. Как получить такие «больные» клетки? Самый простой выход — выделить первичные культуры клеток из пациентов, страдающих изучаемым заболеванием. Но не все клетки человеческого организма способны длительное время находиться в культуре, а некоторые типы клеток (например, нейроны) практически невозможно получать от живых доноров. Плюрипотентные же клетки способны дифференцироваться в любые типы клеток взрослого организма. При использовании ЭСК из невоплощенных при процедуре экстракорпорального оплодотворения бластоцист исследователь может узнать, несет ли данный эмбрион какую-либо мутацию, но это связано с трудоемкой процедурой анализа единичного blastomera. При получении ЭСК методом переноса ядра соматической клетки в энуклеированный ооцит вопрос о наличии мутации решен, но мы возвращаемся к другому камню преткновения — клонированию человека. Таким образом, получение ИПСК с известной мутацией от взрослого донора является в настоящее время предпочтительным (табл. 3). Такие клетки позволяют изучать механизмы развития болезни и тестировать лекарственные препараты. Более того, в сочетании с исправлением мутантных генов пациент-специфичные ИПСК могут служить потенциально неиссякаемым ресурсом для клеточной терапии генетических заболеваний человека. В настоящее время разработаны методы направленной дифференцировки ИПСК во многие типы клеток взрослого организма.

Направленная дифференцировка ИПСК

ЭСК и ИПСК имеют практически одинаковый дифференцировочный потенциал, и к ним применяют сходные методики дифференцировки. Благодаря своей плюрипотентности данные типы клеток могут дифференцироваться в производные всех трех зародышевых листков, свойственные взрослому организму. Для клеточной терапии зачастую необходимы культуры клеток, обогащенные каким-то одним (или несколькими) типом клеток.

Zhang и соавт. [68] разработан протокол высокоэффективной дифференцировки ИПСК и ЭСК в инсулин-продуцирующие панкреатические клетки. На первом этапе плюрипотентные клетки были дифференцированы в клетки энтодермы, экспрессирующие Sox17 и Foxa2, затем под воздействием ретиноевой кислоты и факторов Noggin и FGF7 были получены панкреатические клетки. После обработки таких клеток эндотелиальным фактором роста удалось получить культуру клеток, на 25% состоящую из инсулин-продуцирующих клеток, ко-экспрессирующих инсулин, С-пептид, PDX1 и NKX6-1, являющиеся маркерами зрелых β -клеток островков Лангерганса [68].

ЭСК были успешно дифференцированы в кардиомиоциты [43]. После последовательной обработки ЭСК человека активинем А и фактором BMP4 была получена культура,

содержащая 10–50% сокращающихся клеток. По результатам количественного ПЦР-анализа полученные клетки экспрессируют такие маркеры кардиомиоцитов, как тяжелые цепи β -миозина, сердечная изоформа тропонина Т и кардиоспецифичный транскрипционный фактор Nkx2.5.

Существуют также протоколы направленной дифференцировки ИПСК в производные эктодермы. Так, в 2011 г. Ohta и соавт. удалось получить из ИПСК обогащенную меланоцитами культуру клеток [40]. С точки зрения клеточной терапии особый интерес представляют подходы к направленной дифференцировке ИПСК человека по нейрональному пути. ИПСК дифференцируются в нейрональные предшественники, экспрессирующие Sox1 и Pax6, с эффективностью 15–79% в зависимости от конкретной линии клеток. Важно отметить, что эффективность нейрональной дифференцировки не зависит от набора факторов для репрограммирования и наличия или отсутствия вирусных интеграций в геном данных клеток. Показано, например, что если такие нейрональные предшественники культивировать дальше в определенных условиях в течение 6–8 недель, образуются β III-тубулин-позитивные мотонейроны, способные генерировать потенциал действия; при совместном культивировании с клетками миоцитарного ряда такие мотонейроны образуют с ними синапсы и способны проводить сигнал, вызывающий сокращение миотубулярных структур [24].

Для лечения различных заболеваний бывает необходимо получить культуру дифференцированных клеток, обогащенную конкретным типом нейронов. Так, опубликован протокол получения мотонейронов из ЭСК, который был протестирован также и на ИПСК [25]. Такая дифференцировка занимает около двух месяцев и дает выход около 50% функциональных мотонейронов. Протокол детально описывает условия дифференцировки ЭСК, что позволяет изучать сам процесс дифференцировки и использовать полученные клетки для трансплантации пациентам с повреждениями спинного мозга.

ИПСК при наследственных нейродегенеративных заболеваниях

В настоящее время в мире десятки миллионов людей страдают от таких неизлечимых заболеваний, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона и др. Медикаментозное лечение при данных формах нейродегенеративной патологии либо неэффективно, либо позволяет лишь компенсировать отдельные симптомы болезни, не влияя на течение процесса. Качественно новым шагом здесь может стать клеточная терапия, но проблема получения пригодного для трансплантации клеточного материала по-прежнему остается очень острой. Как и в случае пересадки органов, клеточный трансплантат может не прижиться, вызвать иммунный ответ в организме реципиента и, как следствие, не произвести нужного терапевтического эффекта. Представляется, что ИПСК могут служить практически идеальным источником материала для клеточной трансплантации (рис. 1).

Особенно интересным является то, что при работе с ИПСК возможно исправление генетических дефектов на уровне плюрипотентных клеток с помощью гомологичной рекомбинации (т.е. встраивания в клеточный клон нормальной копии гена посредством специальных методов генной инженерии) [66]. Кроме вопроса о замещаю-

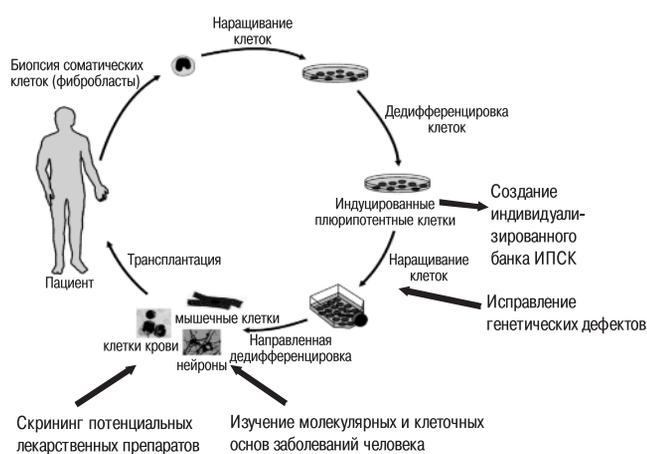


рис. 1: Получение и перспективы использования ИПСК.

шей клеточной терапии, существует проблема наличия адекватных моделей нейродегенеративных заболеваний для изучения патогенеза болезни и скрининга лекарственных препаратов. Работа с материалом пациентов ограничена только постмортальными образцами мозга. Осуществлять скрининг и тестирование новых лекарственных препаратов на животных проблематично как из-за различий метаболизма ксенобиотиков в организмах человека и мыши, так и из-за отсутствия адекватных моделей заболеваний головного мозга человека. Выходом из данной ситуации стали культуры ИПСК, дифференцированные в соответствующий специализированный тип нейронов. Остановимся на некоторых примерах использования ИПСК в нейробиологии и неврологии.

Болезнь Альцгеймера – наиболее распространенное нейродегенеративное заболевание человека, приводящее к прогрессирующим когнитивным расстройствам и деменции. На клеточном уровне заболевание проявляется накоплением в нейронах агрегатов β -амилоида и нейрофибриллярных клубков, а также формированием амилоидных бляшек в паренхиме мозга, причем β -амилоид производится в клетке из белка-предшественника с участием ферментов β - и γ -секретаз [5, 8]. В настоящее время поиск веществ, модулирующих активность β - и γ -секретаз, является одним из наиболее перспективных подходов к разработке новых методов лечения болезни Альцгеймера. В 2011 г. была получена модель для скрининга подобных соединений на основе ИПСК человека [63]. ИПСК были дифференцированы в нейроны переднего мозга, в которых экспрессировались белки с активностью β - и γ -секретаз и две формы β -амилоида (A β 40 и A β 42), что позволило считать данные клетки удачной моделью для изучения действия ингибиторов секретез. Исследовали ингибитор β -секретазы IV, ингибитор γ -секретазы XXI/вещество E и нестероидный противовоспалительный препарат сулиндак сульфид, для которого показана способность напрямую ингибировать γ -секретазу. Ингибитор β -секретазы IV и сулиндак сульфид снижали уровень экспрессии A β 40 и A β 42, причем сулиндак сульфид преимущественно ингибирал продукцию A β 42. Ингибитор γ -секретазы XXI в низких концентрациях (10^{-11} – 10^{-8} М) повышал продукцию A β 40 и A β 42, однако в более высоких дозах (10^{-7} – 10^{-6} М) – ингибирал ее [63].

Болезнь Паркинсона, которая может носить спорадический либо наследственный характер, характеризуется

гибелью дофаминергических нейронов в компактной части черной субстанции среднего мозга, что приводит к манифестации основных двигательных симптомов заболевания [5]. ИПСК, полученные от пациентов со спорадической формой болезни Паркинсона, способны дифференцироваться в дофаминергические нейроны [13, 53, 59]. При пересадке таких клеток крысам с экспериментальным паркинсонизмом наблюдалось уменьшение амфетамин-индуцированного ротационного поведения [59]. При иммуногистохимическом анализе вещества мозга животных было обнаружено, что трансплантированные в стриатум нейроны дают аксональные проекции в другие отделы мозга, причем образования телец Леви в трансплантате не наблюдалось [21]. Можно предположить, что производные ИПСК от пациентов со спорадической формой болезни не способны проявлять патологический фенотип в культуре, т.к. не имеют для этого генетических предпосылок.

Иначе обстоит ситуация в случае ИПСК, полученных от пациентов с наследственными формами болезни Паркинсона. Именно такие ИПСК, по-видимому, могут служить удобной моделью для изучения заболевания и скрининга лекарственных средств. Одним из генов, ассоциированных с болезнью Паркинсона, является ген митохондриальной киназы PINK1 – данный белок локализуется на внешней мембране митохондрий и участвует в защите клетки от окислительного стресса посредством его взаимодействия с паркином [8]. Как показано в недавней работе Seibler и соавт. [49], мутация PINK1 не влияет на репрограммирование клеток пациента и на дифференцировку полученных ИПСК в дофаминергические нейроны. В зрелых нейронах, несущих мутацию, в условиях стресса нарушается мобилизация паркина к поврежденным митохондриям, тогда как в нейронах, полученных из генетически нормальных ИПСК, подобных нарушений не наблюдалось. В мутантных нейронах патологические процессы подавлялись при повышенной экспрессии нормального белка PINK1 [49].

Еще одним значимым для изучения моногенным нейродегенеративным заболеванием ЦНС является болезнь Гентингтона, которая наследуется по аутосомно-доминантному типу. Заболевание вызывается экспансией (свыше 35–37 копий) числа тринуклеотидных повторов CAG, кодирующих аминокислоту глутамин в составе белка гентингтина [5]. Функция гентингтина на данный момент остается неизвестной, не до конца ясны также механизмы патологического воздействия мутантного белка именно на ГАМК-ергические шиповидные нейроны стриатума. К настоящему времени созданы две клеточные модели болезни Гентингтона на основе ИПСК-технологии. В первой модели ИПСК были получены из фибробластов кожи трансгенной обезьяны, экспрессирующей гентингтин с 72 копиями CAG-повторов [15]. При этом было показано, что мутация не влияет на репрограммирование и нейрональную дифференцировку клеток. Агрегаты мутантного гентингтина в плюрипотентных клетках не наблюдались и появлялись лишь в ходе дифференцировки на уровне нейрональных предшественников (нестин-позитивных клеток). По данным Вестерн-блоттинга, количество агрегатов увеличивалось при дальнейшей дифференцировке. При иммуноцитохимическом окрашивании нейронов были выявлены агрегаты мутантного гентингтина в ядрах клеток и отростках, что является одним из характерных цитологических признаков болезни Гентингтона [15]. Еще одна модель на основе человеческих клеток была создана в 2010 г. [69]. На ней показано,

что ИПСК с мутантным гентингином (72 копии CAG-повторов) успешно дифференцируются в ГАМК-ергические нейроны с выходом 10% (среди общей популяции нейронов). Дифференцированные мутантные клетки отличались от нормальных нейронов каспазной активностью, а также паттернами фосфорилирования киназ ERK1 и ERK2 в ответ на добавление фактора роста [69].

В литературе есть также сообщения об исследовании закономерностей патологического процесса и успешном опыте тестирования биологически активных соединений на ИПСК-моделях некоторых других наследственных нейродегенеративных заболеваний — спинальной амиотрофии [18], семейной дизавтономии Райли–Дея [32], SOD1-ассоциированной форме бокового амиотрофического склероза [17]. Такие работы ведутся в настоящее время во многих ведущих лабораториях мира — речь идет о создании банков ИПСК и нейрональных культур от больных с охарактеризованными моногенными заболеваниями ЦНС. В нашей стране исследования ИПСК при наследственных нейродегенеративных заболеваниях проводятся с 2010 г. в совместной работе Института молекулярной генетики РАН, Института общей генетики им. Н.Н. Вавилова РАН и Научного центра неврологии РАМН: созданы культуры ИПСК от пациентов с болезнью Гентингтона (рис. 2), а также (впервые в мире) — с PARK2 и PARK8 формами болезни Паркинсона. Предполагается дифференцировка этих ИПСК соответственно в холинергические шиповидные нейроны стриатума и дофамин-продуцирующие нейроны черной субстанции, с дальнейшим изучением молекулярного фенотипа получаемых клеток, исследованием возможностей нейропротекторных соединений и перспектив экспериментальной клеточной терапии.

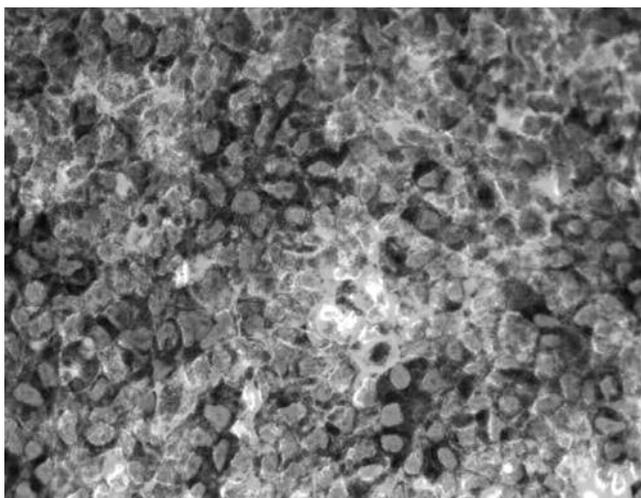


рис. 2: Иммунофлуоресцентный анализ клона ИПСК, полученного из фибробластов кожи больного хореей Гентингтона.

Примечание: цветную версию рис. см. на обложке (зеленый цвет — антитела к маркеру плюрипотентных клеток SSEA-4, красный — антитела к транскрипционному фактору Oct4. Ядра окрашены DAPI (синий цвет)).

Технологии репрограммирования соматических клеток развиваются на наших глазах невиданными темпами. В 2010 г. была опубликована первая работа, в которой фибробласты с помощью индуцированной экспрессии определенного набора факторов транскрипции были в один этап конвертированы в нейрональные клетки — даже минуя стадию плюрипотентности [56]. Еще более поразительный по клеточной специфичности результат был представлен в этом году двумя независимыми группами исследователей, которым удалось осуществить прямую конверсию фибробластов непосредственно в дофаминергические нейроны со всеми их характерными гистохимическими и функциональными свойствами [14, 46]. Интересно, что этими авторами при получении дофамин-продуцирующих нейронов были использованы различные по составу «генные коктейли». Данный факт демонстрирует, что разные молекулярные детерминанты «судьбы» клеток могут вести к одному и тому же результату через различные транскрипционные каскады. Значительным преимуществом такой прямой конверсии соматических клеток в специализированные нейроны, позволяющей избежать стадии плюрипотентности, является элиминация риска злокачественной трансформации клеток в процессе манипуляций с ними.

Таким образом, не вызывает сомнений, что перед нейробиологией открывается ясная перспектива получения неограниченного числа специализированных нервных клеток, репрограммированных из соматических клеток человека. Это знаменует прорыв не только в исследовании нейрональных патологических процессов, идентификации новых молекулярных мишеней и лекарственных препаратов направленного действия, но и в развитии нейротрансплантологии — в связи с возможностью имплантации пациенту генетически идентичных нейронов, полученных из его собственных фибробластов и других типов зрелых клеток. Одним из наиболее перспективных заболеваний для применения такой технологии является болезнь Паркинсона, поскольку методы получения дофаминергических нейронов уже достаточно хорошо разработаны и воспроизведены многими исследовательскими группами [29, 62].

На сегодняшний день в данной области пока остается ряд нерешенных проблем. Так, например, пока не для всех типов нейронов разработаны высокоэффективные протоколы дифференцировки, а способность к нейрональной дифференцировке варьирует у линий ИПСК, полученных разными способами от пациентов разного возраста и в разных лабораториях. Тем не менее, можно надеяться, что после дополнительных интенсивных исследований задача стандартизации работы с ИПСК будет решена, и они найдут еще более широкое применение в фундаментальной и клинической неврологии.

Данная работа выполнялась при поддержке Министерства образования и науки РФ (Госконтракты №№ 16.512.11.2103 и 16.512.11.2105) и Российского фонда фундаментальных исследований (№ 11-04-01337).

Список литературы

1. Биология стволовых клеток и клеточные технологии (под ред. М.А. Пальцева). В 2-х т. М.: Медицина, 2009.
2. Викторов И.В., Савченко Е.А., Ухова О.В. и др. Мультипотентные стволовые и прогениторные клетки обонятельного эпителия. Клет. технол. в биологии и медицине 2006; 4: 185–193.
3. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. Современные взгляды на проблему стволовых клеток и возможности их использования в медицине. Клет. технол. в биологии и медицине 2005; 4: 184–189.
4. Гривенников И.А. Эмбриональные стволовые клетки и проблема направленной дифференцировки. Успехи биол. химии 2008; 48: 181–188.
5. Иллариошкин С.Н. Конформационные болезни мозга. М.: Янус-К, 2003.
6. Куликов А.В., Степанова М.С., Стволинский С.Л. и др. Применение мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека для компенсации неврологического дефицита у крыс, вызванного введением 3-нитропропионовой кислоты. Клет. технол. в биологии и медицине 2008; 2: 83–89.
7. Малайцев В.В., Богданова И.М., Сухих Г.Т. Современные представления о биологии стволовой клетки. Арх. патол. 2002; 4: 7–11.
8. Нейродегенеративные заболевания: фундаментальные и прикладные аспекты (под ред. М.В. Угрюмова). М.: Наука, 2010.
9. Соколова И.Б., Федотова О.Р., Зинькова Н.Н. и др. Влияние трансплантации мезенхимальных стволовых клеток на когнитивные функции крыс после ишемического инсульта. Клет. технол. в биологии и медицине 2006; 4: 202–205.
10. Шевченко Ю.Л., Новик А.А., Кузнецов А.Н. и др. Аутологичная трансплантация кроветворных стволовых клеток при рассеянном склерозе: результаты исследования российской кооперативной группы клеточной терапии. Неврол. журн. 2008; 2: 11–18.
11. Brambrink T., Foreman R., Welstead G.G. et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. Cell Stem Cell 2008; 2: 151–159.
12. Brandenberger R., Khrebtukova I., Thies R.S. et al. MPSS profiling of human embryonic stem cells. BMC Dev. Biol. 2005; 4: 10–26.
13. Cai J., Yang M., Poremsky E. et al. Dopaminergic neurons derived from human induced pluripotent stem cells survive and integrate into 6-OHDA-lesioned rats. Stem Cells Dev. 2010; 19: 1017–1023.
14. Caiazzo M., Dell'Anno M.T., Dvoretzskaya E. et al. Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. Nature 2011; 476: 224–227.
15. Chan A.W., Cheng P.H., Neumann A., Yang J.J. Reprogramming huntington monkey skin cells into pluripotent stem cells. Cell Reprogram. 2010; 12: 509–517.
16. Chickarmane V., Troein C., Nuber U.A. et al. Transcriptional dynamics of the embryonic stem cell switch. PLOS 2006; 9: 1080–1092.
17. Dimos J.T., Rodolfa K.T., Niakan K.K. et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. Science 2008; 321: 1218–1221.
18. Ebert A.D., Yu J., Rose F.F. et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. Nature 2009; 457: 277–280.
19. Gross R.E., Watts R.L., Hauser R.A. et al. Intraatrial transplantation of microcarrier-bound human retinal pigment epithelial cells versus sham surgery in patients with advanced Parkinson's disease: a double-blind, randomised, controlled trial. Lancet Neurol. 2011; 10: 509–519.
20. Hanna J., Markoulaki S., Schorderet P. et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. Cell 2008; 133: 250–264.
21. Hargus G., Cooper O., Deleidi M. et al. Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2010; 107: 15921–15926.
22. Harris D.T. Non-haematological uses of cord blood stem cells. Br. J. Haematol. 2009; 147: 177–184.
23. Hatano S.Y., Tada M., Kimura H. et al. Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. Mech Dev. 2005; 122: 67–79.
24. Hu B.-Y., Weick J.P., Yu J. et al. Neural differentiation of hiPSC follows developmental principles but with variable potency. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2010; 107: 4335–4340.
25. Hu B.-Y., Zhang S.-C. Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. Nat. Protoc. 2009; 4: 1295–1304.
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. 2008a; 26: 795–797.
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. 2008b; 26: 1269–1275.
28. Kaji K., Norrby K., Paca A. et al. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. Nature 2009; 458: 771–775.
29. Knight A.L., Daigle J.G. Reprogramming Parkinson's disease research. Dis Model Mech. 2010; 3: 509–510.
30. Kondziolka D., Wechsler L., Goldstein S. et al. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. Neurology 2000; 55: 565–569.
31. Langston J.W. The promise of stem cells in Parkinson's disease. J. Clin. Invest. 2005; 115: 23–25.
32. Lee G., Papapetrou E.P., Kim H. et al. Modeling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient specific iPSCs. Nature 2009; 461: 402–406.
33. Lindvall O., Kokaia Z., Martinez-Serrano A. Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders – how to make it work. Nat. Med. 2004; 10 (Suppl.): S42–S50.
34. Lowry W.E., Richter L., Yachechko R. et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2008; 105: 2883–2888.
35. Lu P., Blesch A., Tuszyński M.H. Induction of bone marrow stromal cells to neurons: differentiation, transdifferentiation, or artifact? J. Neurosci. Res. 2004; 77: 174–191.
36. Lyssiotis C.A., Foreman R.K., Steark J. et al. Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2009; 106: 8912–8917.
37. Maherali N., Sridharan R., Xie W. et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. Cell Stem Cell. 2007; 1: 55–70.
38. Medeiros R.B., Papenfuss K.J., Hoiom B. et al. Novel sequential ChIP and simplified ChIP protocols for promoter co-occupancy and target gene identification in human embryonic stem cells. BMC Biotechnology 2009; 9: 59.
39. 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: 101–106.
40. Ohta S., Imaizumi Y., Okada Y. et al. Generation of human melanocytes from induced pluripotent stem cells. PLOS ONE 2011; 6: 1–10.
41. Okita K., Nakagawa M., Hyunjong H. et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. Science 2008; 322: 949–953.
42. O'Mathuna D.P. What to call human cloning: The technical terminology increasingly used in the cloning debate sidesteps the ethical questions raised. EMBO reports 2002; 3: 502–505.
43. Paige S.L., Osugi T., Afanasiev O.K. et al. Endogenous Mnt/-catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells. PLOS ONE 2010; 5: 1–8.

44. Park I.-H., Arora N., Huo H. *et al.* Disease-specific induced pluripotent stem (iPS) cells. *Cell* 2008; 134: 877–886.
45. Pesce M., Schöler H.R. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells* 2001; 19: 271–278.
46. Pfisterer U., Kirkeby A., Torper O. *et al.* Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2011; 108: 10343–10348.
47. Qiu C., Ma Y., Wang J. *et al.* Lin28-mediated post-transcriptional regulation of Oct4 expression in human embryonic stem cells. *Nucl. Acids Res.* 2010; 38: 1240–1248.
48. Remenyi A., Lins K., Nissen L.J. *et al.* Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes Dev.* 2003; 17: 2048–2059.
49. Seibler P., Grazjotto J., Jeong H. *et al.* Mitochondrial parkin recruitment in neurons derived from mutant PINK1 iPS cells. *J. Neurosci.* 2011; 31: 5970–5976.
50. Sharov A.A., Masui S., Sharova L.V. *et al.* Identification of Pou5f1, Sox2 and Nanog downstream target genes with statistical confidence by applying a novel algorithm to time course microarray and genome-wide chromatin immunoprecipitation data. *BMC Genomics.* 2008; 9: 269.
51. Shi Y., Desponts C., Do J.T. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell.* 2008; 3: 568–574.
52. Shi Y., Do J.T., Desponts C. *et al.* A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008a; 2: 525–528.
53. Swistowski A., Peng J., Liu Q. *et al.* Efficient generation of functional dopaminergic neurons from human induced pluripotent stem cells under defined conditions. *Stem Cells* 2010; 28: 1893–1904.
54. Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861–872.
55. Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663–676.
56. Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P. *et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010; 463: 1035–1041.
57. Warren L., Manos P. D., Ahfeldt T. *et al.* Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell.* 2010; 7: 1–13.
58. Weissman I.L. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units of evolution. *Cell* 2000; 100: 157–168.
59. Wernig M., Zhao J.P., Pruszak J. *et al.* Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105: 5856–5861.
60. Whittemore S.R. Neuronal replacement strategies for spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 1999; 16: 667–673.
61. Xu B., Zhang K., Huang Y. Lin28 modulates cell growth and associates with a subset of cell cycle regulator mRNAs in mouse embryonic stem cells. *RNA* 2009; 15: 357–361.
62. Xu L., Tan Y.Y., Ding J.Q., Chen S.D. The iPS technique provides hope for Parkinson's disease treatment. *Stem Cell Rev.* 2010; 6: 398–404.
63. Yahanta N., Asai M., Kitaoka S. *et al.* Anti-A drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. *PLOS ONE* 2011; 6: 1–11.
64. Yu J., Hu K., Smuga-Otto K. *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequence. *Science* 2009; 324: 797–801.
65. Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318: 1917.
66. Yusa K., Rashid S.T., Strick-Marchand H. *et al.* Targeted gene correction of 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 478: 391–394.
67. Zaehres H., Lensch M.W., Daheron L. *et al.* High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005; 23: 299–305.
68. Zhang D., Jiang W., Lu M. *et al.* Highly efficient differentiation of human ES and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res.* 2009; 19: 429–438.
69. Zhang N., An M.C., Montoro D., Ellerby L.M. Characterisation of human Huntington's disease cell model from induced pluripotent stem cells. *PLOS Curr.* 2010; 2: RRN1193.
70. Zhou H., Wu S., Joo J.Y. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell.* 2009; 4: 381–384.

Induced pluripotent stem cells: new possibilities in neurobiology and neurotransplantation

O.S. Lebedeva, M.A. Lagarkova, S.N. Illarioshkin, L.G. Khaspekov, I.A. Grivennikov

*Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences;
Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences;
Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences (Moscow)*

Key words: embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, reprogramming, neurodegenerative disorders

The discovery of embryonic stem cells (ES) and methods of ES handling belong to most significant achievements of science in the 20th century. As mammalian ES represent an essentially unlimited source of non-differentiated cells with normal diploid karyotype, they will remain to be an important object in basic research, including neurobiology, although their use for the purposes of practical neurology meets a number of medical and ethical difficulties. Results of last studies open completely new possibilities in the field of cell therapy of severe human disorders. We are talking about reprogramming of somatic cells in mam-

malians, including humans, into pluripotent stem cells (so-called induced pluripotent stem cells, iPS), with their further differentiation to cells of different types. The practical capability of patients' iPS to be transformed into dopaminergic and other specific neurons of the CNS is shown, that gives to doctors a fundamentally new technology of getting adequate and genetically identical cell material for neurotransplantation in Parkinson's disease, Huntington's disease and other severe neurodegenerative disorders.

Контактный адрес: Лебедева Ольга Сергеевна – асп. лаб. молекулярной генетики соматических клеток Института молекулярной генетики РАН. 123182, Москва, пл. акад. Курчатова, д. 2. Тел.: +7 (499) 196-02-11; e-mail: lebedevaolgasergeevna@gmail.com.

Лагарькова М.А. – зав. лаб. генетических основ клеточных технологий Института общей генетики имени Н.Н. Вавилова РАН;

Иллариошкин С.Н. – зам. дир. по научной работе, рук. отдела исследований мозга Научного центра неврологии РАМН;

Хаспеков Л.Г. – зав. лаб. экспериментальной нейробиологии отдела исследований мозга Научного центра неврологии РАМН;

Гривенников И.А. – зав. лаб. молекулярной генетики соматических клеток Института молекулярной генетики РАН.