

特约综述



本实验室主要研究发育多潜能细胞, 包括哺乳类动物胚胎发育早期的多能细胞和体外培养获得的胚胎干细胞及诱导性多能干细胞, 增殖和分化的信号-分子调控机制。我们利用体外建立的多能干细胞系为模型, 解析已知的调控胚胎干细胞自我更新和定向神经分化的信号通路及转录因子的作用机制, 同时发现新的重要信号通路和因子, 以期揭示建立和维持多潜能细胞特性的调控网络。此外, 利用模式动物研究重要调控因子在胚胎发育中的作用也是我们的研究兴趣之一。近年来, 我们也在利用神经系统疾病患者特异的诱导多能干细胞研究疾病的发生机制。

<http://www.shsmu.edu.cn/default.php?mod=article&do=detail&tid=329037>

## 诱导多能干细胞在神经系统遗传性疾病研究中的应用

李 春 金 颖\*

(上海交通大学医学院分子发育生物学研究室, 上海 200025)

**摘要** 神经系统遗传性疾病发病率居各系统遗传病之首。但是, 对多数这类疾病还没有十分有效的治疗方法, 其发病的分子机制也不完全清楚。近年来, 运用体细胞重编程技术建立的疾病特异性诱导多能干细胞模型有助于揭示神经系统遗传性疾病的发病机理, 并推动早期诊断及临床治疗的发展。目前, 疾病患者特异的iPS细胞已逐渐应用于神经系统遗传性疾病的发病机理和药物筛选的研究, 并有望应用于临床治疗。该文重点综述了诱导多能干细胞应用于神经系统遗传性疾病研究的最新进展, 概述了该领域目前存在的问题和面临的挑战。

**关键词** 体细胞重编程; 诱导多能干细胞; 神经系统遗传性疾病; 细胞模型

## The Application of Induced Pluripotent Stem Cells in Studying Neural Hereditary Diseases

Li Chun, Jin Ying\*

(Molecular Developmental Biology Laboratory, Shanghai JiaoTong University, School of Medicine, Shanghai 200025, China)

**Abstract** The morbidity of neural hereditary diseases ranks first over all hereditary diseases. But till now, there is no effective clinical therapy for these diseases, and their pathogenesis remains unclear. In recent years, patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from somatic cells have been gradually applied as *in vitro* models for the study of the pathogenesis of neural hereditary diseases, drug screening as well as clinical

科技部重大科学研究计划(批准号: 2010CB945200)资助的课题

\*通讯作者: Tel: 021-63852591, E-mail: yjin@sibs.ac.cn

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (Grant No.2010CB945200)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-63852591, E-mail: yjin@sibs.ac.cn

applications. Here we review the application of iPSCs in studying neural hereditary diseases according to the latest research data, and summarize the problems as well as challenges in this field. Establishing of patient-specific iPSC lines could provide promising future for understanding the underlying pathogenesis of diseases and promote the development of efficient treatment strategies in the clinical settings.

**Key words** somatic cell reprogramming; induced pluripotent stem cells (iPSCs); neural hereditary diseases; cell models

## 1 引言

神经系统遗传性疾病(neural hereditary diseases)是由于受精卵遗传物质的数量、结构或功能改变导致发育的个体出现以神经系统功能缺损为主要临床表现的高发病率疾病。大多数神经系统遗传性疾病异质性极大,病情进展缓慢,发病的分子机理尚不明确,导致无法对疾病做出准确的诊断。因此,临床诊断和治疗亟待从新的角度寻找突破。2006年, Yamanaka研究小组<sup>[1]</sup>将四种转录因子OCT4、SOX2、c-MYC和KLF4共同导入小鼠成纤维细胞,首次成功将成纤维细胞重编程为诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPS细胞)。2007年, Yamanaka小组<sup>[2]</sup>和Thomson小组<sup>[3]</sup>先后将人的体细胞重编程为iPS细胞。与胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES细胞)相似, iPS细胞具有无限自我更新能力和多向分化潜能。而且, iPS细胞克服了ES细胞建系相关的伦理学和细胞移植面临的免疫排斥等问题,为干细胞生物学和临床再生医学领域开辟了崭新的研究途径。因此, iPS技术建立后就迅速掀起了将其应用于疑难疾病分子机理和临床治疗研究的热潮,并被《Science》杂志评为2008年度十大科学进展之首<sup>[4]</sup>。2009年, Thomson和Svendson小组<sup>[5]</sup>首次将重编程技术运用于神经系统遗传性疾病的研究,建立了人脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA)iPS细胞模型,开启了应用体细胞重编程技术研究神经系统遗传性疾病的大门。本文重点综述了近年来iPS细胞在神经系统遗传性疾病中的研究进展、面临的挑战及其发展前景。

## 2 定向诱导iPS细胞分化为神经类细胞

为了实现疾病iPS细胞的应用潜能,必须将具有发育多能性的未分化的iPS细胞定向诱导分化为不同类型的、有特定功能的神经细胞。在体外将多能干细胞诱导分化为神经类细胞的研究中, ES细胞是目前研究最为深入的干细胞类型。近年来的研究表

明, ES细胞可以被定向诱导分化为不同类型的神经细胞。2001年, Zhang等<sup>[6]</sup>首次报道了一种通过体外类胚体(embryoid body, EB)悬浮培养获取神经前体细胞(neural progenitor cells, NPCs)的方法; 2004年, Perrier等<sup>[7]</sup>报道人ES细胞(human embryonic stem cells, hESCs)可以定向分化为中脑多巴胺能神经元; 2005年, Li等<sup>[8]</sup>报道hESCs可以定向分化为脊髓运动神经元; 2007年和2009年, Hu等<sup>[9]</sup>和Kang等<sup>[10]</sup>相继证实了hESCs可以向少突胶质细胞定向分化。Li等<sup>[11]</sup>发现高浓度的SHH和DKK1可以定向诱导hESC-NPCs向谷氨酸能神经元和 $\gamma$ -氨基丁酸能神经元分化。最近的研究发现, 不同的hESC系有其不同的最适神经诱导条件<sup>[12]</sup>, 科学家们仍在致力于探索细胞系特异的神经诱导方法。

基于iPS细胞与ES细胞的高相似性以及ES细胞体外定向诱导神经分化的深厚技术积淀, 科学家们开展了iPS细胞向神经分化的研究, 疾病特异的iPS细胞在神经系统疾病研究中的应用逐渐成为研究热点。2009年, Chambers等<sup>[13]</sup>报道, 通过两种SMAD通路抑制剂Noggin和SB431542的协同作用可在单层贴壁细胞培养的条件下定向高效诱导人iPS细胞(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)向神经分化, 形成运动神经元和多巴胺能神经元。同年, Soldner等<sup>[14]</sup>建立了帕金森病(Parkinson's disease, PD)特异的iPS细胞系, 并将其定向诱导分化为多巴胺能神经元。2012年, Angel等<sup>[15]</sup>同时建立了散发性和家族遗传性PD-iPS细胞系, 并将其定向诱导分化为具有明显PD疾病表型的多巴胺能神经元, 有力地证明了神经系统疾病特异性iPS细胞模型可以体外重现疾病表型, 为深入研究疾病发生机理提供了细胞模型。Zhang等<sup>[16]</sup>最近报道, C25II、CHIR99021(GSK3b抑制剂)和FGF8(成纤维细胞生长因子8)可以高效地促进hiPSCs向中脑多巴胺能神经元定向分化。Bernard等<sup>[17]</sup>首次报道了多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)来源的iPS细胞系可以体外被诱导分化为核型

正常的成熟星形胶质细胞和少突胶质细胞, 并可以在体外模拟与疾病类似的细胞电生理异常表型。和hESCs一样, 不同的hiPSC系也有不同的最适神经诱导条件<sup>[12]</sup>, 建立细胞系特异的神经诱导方法将提高诱导的效率和质量, 目前已成为重要的研究课题。

iPS细胞向神经细胞定向分化技术的建立和逐步完善有效弥补了神经干细胞来源缺乏且再生能力相对弱的缺陷及疾病特异性神经类细胞难以获得的困难, 并且克服了ES细胞建系所涉及的伦理问题。因此, iPS细胞已逐渐成为目前研究人类神经系统遗传性疾病的理想工具细胞。

### 3 利用iPS细胞模型对神经系统遗传性疾病的研

#### 3.1 建立疾病iPS细胞模型和研究疾病发生机制

疾病特异性iPS细胞携带了病人的全套遗传物质, 定向诱导其向发生病变的神经细胞分化可以用于体外研究该疾病发生过程中细胞水平和分子水平上产生的变化, 有利于探究不同发育阶段致病基因

的表达情况和其可能参与调控的信号转导通路, 为阐明神经系统遗传性疾病发病机理、筛选新型靶向药物和研究移植治疗新方法提供可靠的理论依据(图1)。目前, 已有大量文献报道了关于iPS细胞在神经系统遗传性疾病研究中的应用(表1)。本文按照神经系统遗传性疾病发生过程中产生病变细胞的不同类型对其进行分类综述, 其中多巴胺能神经元和运动神经元是发生病变的两种典型细胞类型。

3.1.1 多巴胺能神经元病变的神经系统遗传性疾病 帕金森病是由于中脑多巴胺能神经元凋亡而引起的肢体震颤、运动迟缓、肌强直和姿势步态障碍, 包括家族性和散发性两种。目前, 人们已经发现多个与PD发病相关的基因, 如: *α-synuclein(PARK1/4)*<sup>[34-35]</sup>、*Parkin(PARK2)*<sup>[36]</sup>、*UCH-L1(PARK5)*<sup>[37]</sup>、*PINK1(PARK6)*<sup>[38]</sup>、*DJ-1(PARK7)*<sup>[39]</sup>、*LRRK2(PARK8)*<sup>[27]</sup>等。关于PD-iPS细胞模型的研究, 过去主要集中于诱导方法的研究。2011年, Nguyen等<sup>[27]</sup>首次对PD-hiPSCs衍生的多巴胺能神经元的相关生物学特性进行了研究。他们发现, PD-hiPSCs衍

表1 神经系统遗传性疾病特异的iPS细胞系

Table 1 iPS cell lines from patients with neural hereditary diseases

疾病名称 Disease types	主要病变细胞 Primarily affected cells	基因(突变位点) Gene(mutations)	参考文献 References
Alzheimer's disease(AD)	Cortical neurons; Hippocampal neurons	Aβ precursor protein Apolipoprotein E Presenilin 1,2( <i>PS1, PS2</i> )	[18]
Amyotrophic lateral sclerosis(ALS)	Motor neurons	<i>SOD1</i> (L144F; G85S)	[19-20]
Angelman syndrome(AS)	Global(Hippocampal and cerebellar neurons)	Maternal deletion inherited deletion of chr. 15q11-q13	[21]
Duchenne muscular dystrophy(DMD)		<i>DMD</i> (deletion of exons 45-52)	[22-23]
Downs' syndrome	Global	Trisomy 21	[23]
Friedreich ataxia		<i>FXN</i> (GAA expansion)	[24]
Familial dysautonomia(FD)	Sensory and autonomic neurons	<i>IKBKAP</i>	[25]
Fragile X syndrome	Global	<i>FMRI</i> (CGG repeat truncation)	[26]
Gaucher disease		GBA(exon 9, G-insertion, AAC>AGC, nucleotide 84 of cDNA)	[23]
Huntington's disease(HD)	Cortical-striatal neurons	<i>HTT</i> (CAG repeats)	[23]
Parkinson's disease(PD)	DA neurons	<i>LRRK2</i> (G2019S) <i>PINK1</i> (Q456X; V170G)	[27-28]
Prader-Willi syndrome(PWS)	Hypothalamic neurons	paternal deletion of chr. 15q11-q13	[21]
Rett syndrome	Differentiated neurons	<i>MeCP2</i> (1155 del32; Q244X; Δ exon 3-4; T158M; R306C)	[29-31]
Schizophrenia		<i>DISC1</i> (4 bp deletion at the exon-intron 12 region)	[32]
Spinal muscular atrophy(SMA)	Motor neurons	<i>SMN1</i> deletion	[33]

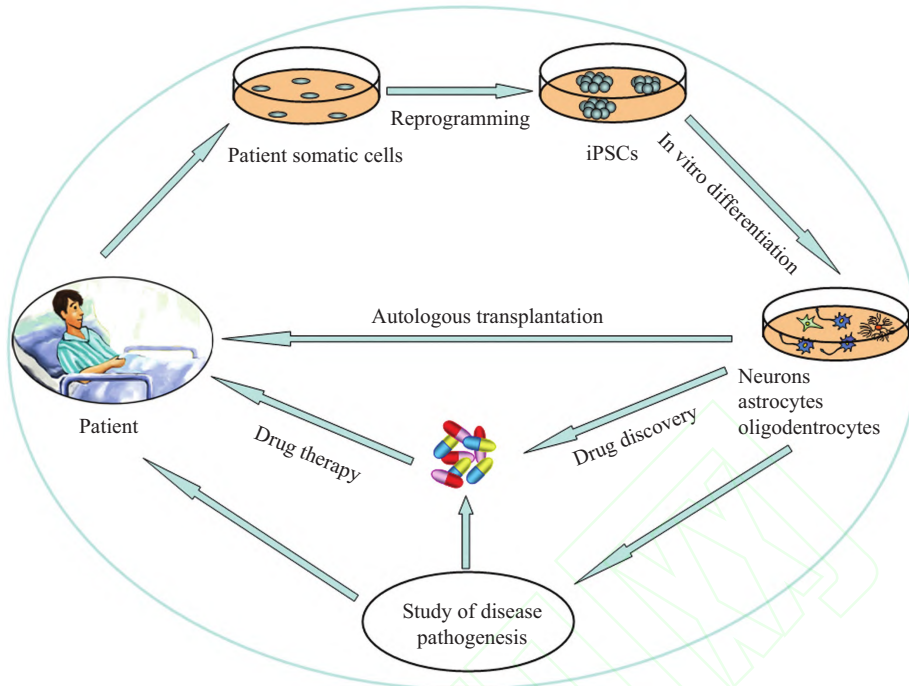


图1 疾病特异性iPS细胞在神经系统遗传性疾病中的应用

Fig.1 Application of patient-specific iPSCs in studying neural hereditary diseases

生的多巴胺能神经元的 $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -synuclein)明显升高,细胞对过氧化氢、MG-132和6-羟多巴胺的敏感性也随之变强。Byers等<sup>[35]</sup>在研究中也证实了这一现象。此外,他们还发现*LRRK2-G2019S*突变和 $\alpha$ -突触核蛋白三倍体患者来源的iPS细胞衍生的多巴胺能神经元可以更好地模拟PD的早期病变过程。最近,Liu等<sup>[40]</sup>发现,*LRRK2*基因突变会导致PD-iPS细胞衍生的NPCs细胞核结构退化。

**3.1.2 运动神经元病变的神经系统遗传性疾病** (1) 脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy, SMA): 脊髓性肌萎缩症是由于*SMN*基因的点突变或缺失突变引起运动神经元功能丧失而导致的弛缓性瘫痪和肌肉萎缩,是人类应用于构建iPS细胞模型的第一个神经系统遗传性疾病。2009年,Ebert等<sup>[33]</sup>研究发现,与正常hiPSCs相比,SMA-hiPSCs中*SMN*蛋白(人类运动神经元生存蛋白)的表达及其衍生的运动神经元的数量和体积都有明显降低。此后的研究还证实,给予丙戊酸和妥布霉素等已在SMA小鼠模型中验证可上调*SMN*表达的药物可以减少SMA-hiPSCs中*SMN*蛋白的缺失,一定程度上恢复*SMN*的表达。2013年,Corti等<sup>[41]</sup>采用特殊设计的寡核苷酸链纠正了*SMN*基因的突变位点,并发现基因修复后的SMA-hiPSCs衍生的运动神经元不再出现修复之前的疾病

特异性表型。此外,将基因修复后的SMA-hiPSCs衍生的运动神经元移植入SMA小鼠体内可以延长其寿命并减轻疾病表型,为细胞移植治疗带来新的曙光。(2)肌萎缩性脊髓侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS): 肌萎缩性脊髓侧索硬化症包括家族性和散发性两种,家族遗传性ALS主要是由于*SOD1*(超氧化物歧化酶)、*VAPB*(修复相关蛋白)以及*TDP-43*(Tar-DNA结合蛋白)基因突变引起运动神经元坏死而导致的肌肉萎缩和混合型瘫痪。Dimos等<sup>[19]</sup>建立了*SOD1*基因突变的ALS-hiPSCs模型,并诱导其分化为运动神经元,但当时未能鉴定出异常表型。此后,Mitne-Neto等<sup>[42]</sup>建立了*VAPB*基因突变的ALS-hiPSCs模型,发现其衍生的运动神经元*VAPB*蛋白表达水平显著下降,表明*VAPB*基因可能与ALS疾病的发生相关。最近,Egawa等<sup>[43]</sup>建立了*TDP-43*基因突变的ALS-hiPSCs模型,不仅发现其衍生的运动神经元表达异常高水平的突变*TDP-43*蛋白,而且筛选出一种可以减弱ALS运动神经元异常表型的组蛋白乙酰转移酶抑制剂(漆树酸)。

**3.1.3 其他神经元病变的神经系统遗传性疾病** (1) 雷特综合征(rett syndrome, RTT): 雷特综合征是由位于X染色体上编码甲基化结合蛋白2的*MECP2*基因突变引起谷氨酸能神经元突触形成能力下降而导致的

进行性智力退化和孤独症行为。Marchetto等<sup>[29]</sup>证明, RTT患者来源的iPS细胞向神经分化的过程可以模拟X染色体随机失活的生理过程, 并最终形成有功能的神经元。同时发现, RTT-hiPSCs衍生的神经元表现出某些与该患者本人一致的病变表型, 包括谷氨酸能神经元突触形成的减少, 神经元形态的改变, 功能依赖型钙信号的瞬变和电生理的异常。最近, Farra等<sup>[44]</sup>和Ananiev等<sup>[45]</sup>分别通过建立携带*MECP2*基因不同突变位点的不同患者来源的RTT-hiPSCs模型, 再次验证了其衍生神经细胞的上述异常表型。

(2)脆性X染色体综合征(fragile X syndrome, FXS): 脆性X染色体综合征是由位于X染色体上编码FMRP蛋白的*FMR1*基因上(CG<sub>n</sub>)三核苷酸重复序列的异常复制引起神经元减少和功能异常而导致的智力缺陷和发育不全。2010年, Urbach等<sup>[46]</sup>分别建立了FXS病人来源的ES细胞系和iPS细胞系。研究发现, 突变的*FMR1*基因在未分化的FXS-hESCs中有表达, 而随着分化的发生表达才会逐渐沉默。然而, 在FXS-hiPSCs中, 突变的*FMR1*基因始终保持沉默, 这表明iPS细胞和ES细胞来源的疾病模型在疾病发生机理等研究中具有差异。2012年, Wang等<sup>[47]</sup>发现FMRP蛋白的缺失会引起突触前功能障碍和神经元形成的异常。Liu等<sup>[48]</sup>再次证实了FXS-hiPSCs衍生的多种神经元亚型均有表型畸变和功能异常。

## 3.2 在神经系统遗传性疾病药物筛选和临床治疗中应用疾病iPS细胞模型

3.2.1 疾病iPS细胞应用于药物筛选 将疾病特异性iPS细胞定向诱导分化为特定的神经元或神经胶质细胞, 为高通量药物筛选提供了疾病特异的人体细胞模型。根据疾病特异性iPS细胞衍生的病变神经细胞的表型和基因表达水平的变化, 可以筛选出能够改善或恢复病变神经细胞表型和功能的药物。目前, iPS细胞在神经系统遗传性疾病药物筛选的研究中取得了一定的突破。Tropea等<sup>[49]</sup>报道胰岛素生长因子1(insulin growth factor 1, IGF1)可以在很大程度上逆转RTT小鼠的疾病表型。Marchetto等<sup>[29]</sup>再次验证了IGF1可以消除*MECP2*基因不同突变位点来源的RTT-hiPS细胞衍生神经元的异常表型, 并发现给予合适浓度(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的庆大霉素可以挽救由于*MECP2*基因无义突变(RTT-Q244X)导致的RTT疾病表型。Egawa等<sup>[43]</sup>建立了*TDP-43*基因突变的ALS-

hiPS细胞模型, 并从预测的四种化合物中最终筛选出一种可以一定程度上消除病变ALS运动神经元异常表型的漆树酸(一种组蛋白乙酰转移酶抑制剂)。最近, Kondo等<sup>[50]</sup>发现不同类型或不同患者的AD-hiPS细胞衍生的神经元对药物治疗有不同的反应, 证明疾病患者特异的iPS细胞细胞模型在疾病个体化治疗中的应用潜能。

3.2.2 疾病iPS细胞应用于疾病治疗 iPS细胞已经逐渐成为细胞移植治疗的热点研究方向。帕金森病(PD)是细胞移植治疗中研究较多的一类神经系统遗传性疾病。早期研究报道了将胎儿中脑组织移植入PD病人的壳核中, 多数病人术后两个月时可以观察到病情明显好转, 并发现在未经左旋多巴药物治疗的情况下病情可以稳定维持4-6年<sup>[51-53]</sup>。随后的研究发现, 不同来源的干细胞移植到PD啮齿类动物体内后可自发地向多巴胺能神经元分化, 术后几周内均可观察到病情缓解的现象<sup>[54-55]</sup>。近年来, Wering等<sup>[56]</sup>诱导小鼠成纤维细胞重编程为iPS细胞, 并定向诱导其分化为中脑多巴胺能神经元的各种亚型, 通过荧光激活细胞分选术(fluorescence activated cell sorter, FACS)将细胞中可能混有的未分化细胞剔除, 以避免移植大鼠体内后致癌的风险。随后, 将获得的多巴胺能神经元经手术移植入纹状体6-羟基多巴胺缺损的5只PD大鼠体内, 其中4只大鼠在术后4周内功能得到显著恢复。这些研究表明, iPS细胞衍生的神经细胞在细胞替代治疗中可以发挥重要作用, 对临床自体细胞移植治疗研究的发展具有重要意义。

## 4 iPS细胞研究和应用中存在的问题和面临的挑战

传统胚胎神经组织移植的方法存在诸多技术障碍, 如移植物组织或细胞来源和数量有限, 不能于宿主内长期存活或繁殖, 难以弥补病变神经细胞造成的功能异常, 移植后常出现免疫排斥反应等, 因而限制了其在临床上的推广应用。为了克服胚胎神经组织移植的缺陷, 近年来国内外科学家把研究焦点集中到了具有无限自我更新和多向分化潜能的iPS细胞上。但是, iPS细胞在临床上的应用也面临诸多挑战。

### 4.1 iPS细胞的遗传安全性问题

Minina等<sup>[57]</sup>针对iPS细胞的染色体稳定性进行了研究, 在所研究的两个细胞系中, 有一个细胞系发

生了染色体的重排和断片。随后, Mayshar等<sup>[58]</sup>对多种iPS细胞的染色体组成进行了系统研究, 发现在66个人源iPS细胞系中, 大多数都涉及部分或整条染色体的畸变。此后, iPS细胞遗传安全性问题迅速受到广泛关注。

目前的研究表明, 在体细胞重编程以及后期培养过程的不同阶段, 遗传物质都可能发生不同类型的变异, 主要包括染色体异常<sup>[59]</sup>、基因拷贝数变异<sup>[60]</sup>、点突变<sup>[61]</sup>和表观遗传学变异<sup>[62]</sup>等。科学家推测导致这些变异的原因可能与起始细胞来源<sup>[63]</sup>、诱导因子组合<sup>[1,64-67]</sup>, 以及诱导因子载体的选择<sup>[68-70]</sup>有关。值得注意的是, iPS细胞中出现的某些遗传损伤具有潜在的致癌性。Gore等<sup>[61]</sup>发现在iPS细胞中, 有些突变发生于肿瘤发生相关基因如*ATM*, 提示iPS细胞中的遗传损伤可能与肿瘤发生有关。Okita等<sup>[71]</sup>、Nakagawa等<sup>[72]</sup>和Nagata等<sup>[73]</sup>研究组相继报道, c-Myc参与诱导的iPS细胞所产生的嵌合体小鼠易形成肿瘤, 死亡率较高。这些结果表明, iPS细胞产生的嵌合体小鼠的肿瘤异常发生可能与iPS细胞的遗传变异有关。值得指出的是, hES细胞在体外长期培养和定向分化过程中, 也存在细胞遗传物质发生变异的问题。因此, 多能干细胞应用于疾病临床治疗之前, 必须确保其遗传完整性和安全性。

#### 4.2 iPS细胞的技术性问题

iPS细胞用于病理基础研究和疾病临床治疗之前, 必须克服目前仍存在的一些技术性问题。首先, 如何提高体细胞完全重编程为iPS细胞的效率一直是困扰科学家的难点之一。自2006年iPS细胞技术诞生以来, 全世界的科学家已经付出巨大的努力尝试各种可能用于建立iPS细胞的体细胞、安全导入重编程因子的新策略及促进重编程发生的小分子化合物。总体来说, 相对安全的策略, 如体外表达重编程因子和非基因组整合载体, 建立hiPS细胞的效率要比传统的慢(逆)转录病毒介导的策略明显低。此外, 供临床使用的细胞要求尽可能避免过多的体外操作, 而iPS细胞的建系和定向分化要经历体细胞分离、扩增、纯化, iPS细胞建系、定向分化、筛选、扩增、纯化, 以及细胞的冻存和复苏等复杂且漫长的体外制备过程, 再加上细胞体外操作过程中需使用病毒、动物血清、生长因子、抗生素、酶等多种外源因子, 因此对细胞的遗传稳定性和生物学特性均引入了极大的不确定因素。这些问题都对iPS细

胞的临床应用带来了巨大风险。因此, 建立更高效、安全、符合临床标准的iPS细胞生产和定向分化技术是理论研究和临床实践中需要解决的关键问题。

#### 4.3 iPS细胞应用于临床研究面临的其它挑战

iPS细胞应用于临床治疗尚存在很多困难, 除了上述的安全性和技术性问题之外, 还包括iPS细胞分化到什么阶段更适合体内移植, 是否可以进行遗传修饰, 移植到神经系统受损部位的细胞是否能扩增, 是否能够在受损部位长期生存, 是否会与移植部位发生组织整合, 是否能够挽救受损神经元的形态或功能损伤, 是否会影响其它组织的生理功能等问题。这些也是ES细胞应用中所面临的挑战。因此, 将多能干细胞安全有效地应用于临床治疗还面临许多挑战, 科学家仍在不断努力寻求可行的临床应对策略。

### 5 iPS细胞应用于神经系统遗传性疾病研究的前景展望

体细胞重编程技术的出现是生命科学和再生医学领域中重要的里程碑, 日本科学家Yamanaka也因首次建立该项技术获得了2012年诺贝尔生理学或医学奖。运用重编程技术获得的iPS细胞不仅具有取材方便, 可自体移植从而克服免疫排斥的优势, 同时避免了受到广泛关注的人ES细胞建系相关的伦理争议。因此, 近年来掀起了iPS细胞应用于疾病研究的热潮, 并取得了空前的突破。由于当前仍存在一些技术性和安全性问题, 所以建立更高效、更适于理论研究和临床应用的iPS细胞模型已然成为未来科研工作的重心。目前, 研究人员已经在应用疾病患者特异的iPS细胞建立的疾病模型来研究疾病的发生机制和发现新的、个体化的治疗方案。未来应用疾病患者特异的iPS细胞的衍生细胞进行细胞治疗亟待解决的问题主要包括以下几个方面: 第一, 建立高效、安全的iPS细胞制备技术; 第二, 建立和完善定向诱导iPS细胞神经分化的方法; 第三, 探索维持疾病特异性iPS细胞衍生的神经细胞移植后在病理环境中稳定生长和增殖的方法; 第四, 建立检测iPS细胞临床安全性的评估系统。此外, 建立用于个性化细胞治疗的iPS细胞库也将成为临床治疗的重要手段。由于从iPS细胞建系、定向诱导神经分化到其衍生神经细胞的筛选和纯化, 往往需要较长的时间, 受伤或发病后再开始诱导iPS细胞显然不能满足临床需要, 所以建立个体特异的iPS细胞库就显得尤

为重要。

在iPS细胞应用于神经系统遗传性疾病研究和治疗领域另外一个值得关注的方向是靶向修复疾病患者特异iPS细胞中存在的基因异常, 从而获得正常的神经细胞。这种修复的细胞除可以用于患者自身的细胞移植外, 还能作为最适合的对照细胞, 供研究人员探索病变基因特异性导致的细胞水平和分子水平变化。新近发展的TALEN基因打靶技术为实现疾病iPS细胞病变基因修复提供了方便的工具。总之, iPS细胞既能作为神经系统遗传性疾病研究和药物筛选的模型, 又能为疾病临床治疗提供自体来源的细胞, 因此无论对理论研究或临床实践都具有重要的价值。我们相信, 利用疾病iPS细胞模型, 各种神经系统遗传性疾病发病的分子机理将被不断阐明, 神经系统疾病将逐步进入个体化治疗时代。

#### 参考文献 (References)

- 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 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- 3 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
- 4 Vogel G. Breakthrough of the year. Reprogramming Cells. *Science* 2008; 322(5909): 1766-7.
- 5 Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, *et al.* Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009; 457(7227): 277-80.
- 6 Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brüstle O, Thomson JA. *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19(12): 1129-33.
- 7 Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, Topf N, *et al.* Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(34): 12543-8.
- 8 Li XJ, Du ZW, Zarnowska ED, Pankratz M, Hansen LO, Pearce RA, *et al.* Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005; 23(2): 215-21.
- 9 Hu BY, Du ZW, Zhang SC. Differentiation of human oligodendrocytes from pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 2009; 4(11): 1614-22.
- 10 Kang SM, Cho MS, Seo H, Yoon CJ, Oh SK, Choi YM, *et al.* Efficient induction of oligodendrocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2007; 25(2): 419-24.
- 11 Li XJ, Zhang X, Johnson MA, Wang ZB, Lavaute T, Zhang SC. Coordination of sonic hedgehog and Wnt signaling determines ventral and dorsal telencephalic neuron types from human embryonic stem cells. *Development* 2009; 136(23): 4055-63.
- 12 Kim H, Lee G, Ganat Y, Papapetrou EP, Lipchina I, Socci ND, *et al.* miR-371-3 expression predicts neural differentiation propensity in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2011; 8(6): 695-706.
- 13 Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sad-elain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol* 2009; 27(3): 275-80.
- 14 Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, *et al.* Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 2009; 136(5): 964-77.
- 15 Sánchez-Danés A, Richaud-Patin Y, Carballo-Carbajal I, Jiménez-Delgado S, Caig C, Mora S, *et al.* Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol Med* 2012; 4(5): 380-95.
- 16 Xi J, Liu Y, Liu H, Chen H, Emborg ME, Zhang SC. Specification of midbrain dopamine neurons from primate pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2012; 30(8): 1655-63.
- 17 Song B, Sun G, Herszfeld D, Sylvain A, Campanale NV, Hirst CE, *et al.* Neural differentiation of patient specific iPS cells as a novel approach to study the pathophysiology of multiple sclerosis. *Stem Cell Res* 2012; 8(2): 259-73.
- 18 Yagi T, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Yoshizaki T, *et al.* Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* 2011; 20(23): 4530-9.
- 19 Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008; 321(5893): 1218-21.
- 20 Boulting GL, Kiskinis E, Croft GF, Amoroso MW, Oakley DH, Wainger BJ, *et al.* A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2011; 29(3): 279-86.
- 21 Chamberlain SJ, Chen PF, Ng KY, Bourgeois-Rocha F, Lemtiri-Chlieh F, Levine ES, *et al.* Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders angelman and prader-will syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(41): 17668-73.
- 22 Tchieu J, Kuoy E, Chin MH, Trinh H, Patterson M, Sherman SP, *et al.* Female human iPSCs retain an inactive X chromosome. *Cell Stem Cell* 2010; 7(3): 329-42.
- 23 Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, *et al.* Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008; 134(5): 877-86.
- 24 Ku S, Soragni E, Campau E, Thomas EA, Altun G, Laurent LC, *et al.* Friedreich's ataxia induced pluripotent stem cells model intergenerational GAA and TTC triplet repeat instability. *Cell Stem Cell* 2010; 7(5): 631-7.
- 25 Lee G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers SM, Tomishima MJ, Fasano CA, *et al.* Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 2009; 461(7262): 402-6.
- 26 Urbach A, Bar-Nur O, Daley GQ, Benvenisty N. Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6(5): 407-11.

- 27 Nguyen HN, Byers B, Cord B, Shcheglovitov A, Byrne J, Gujar P, *et al.* LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell* 2011; 8(3): 267-80.
- 28 Seibler P, Graziotto J, Jeong H, Simunovic F, Klein C, Krainc D. Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J Neurosci* 2011; 31(16): 5970-6.
- 28 Marchetto MC, Carroumeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, *et al.* A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 2010; 143(4): 527-39.
- 30 Cheung AY, Horvath LM, Grafodatskaya D, Pasceri P, Weksberg R, Hotta A, *et al.* Isolation of MECP2-null Rett Syndrome patient hiPS cells and isogenic controls through X-chromosome inactivation. *Hum Mol Genet* 2011; 20(11): 2103-15.
- 31 Hotta A, Cheung AY, Farra N, Vijayaragavan K, Séguin CA, Draper JS, *et al.* Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. *Nat Methods* 2009; 6(5): 370-6.
- 32 Chiang CH, Su Y, Wen Z, Yoritomo N, Ross CA, Margolis RL, *et al.* Integration-free induced pluripotent stem cells derived from schizophrenia patients with a DISC1 mutation. *Mol Psychiatry* 2011; 16(4): 358-60.
- 33 Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, *et al.* Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009; 457(7227): 277-80.
- 34 Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, Ide SE, Dehejia A, Dutra A, *et al.* Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science* 1997; 276(5321): 2045-7.
- 35 Byers B, Lee H, Reijo Pera R. Modeling Parkinson's disease using induced pluripotent stem cells. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2012; 12(3): 237-42.
- 36 Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* 1998; 392(6676): 605-8.
- 37 Singleton AB, Farrer M, Johnson J, Singleton A, Hague S, Kachergus J, *et al.* Alpha-Synuclein locus triplication causes Parkinson's disease. *Science* 2003; 302(5646): 841.
- 38 Seibler P, Graziotto J, Jeong H, Simunovic F, Klein C, Krainc D. Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J Neurosci* 2011; 31(16): 5970-6.
- 39 van Duijn CM, Dekker MC, Bonifati V, Galjaard RJ, Houwing-Duistermaat JJ, Snijders PJ, *et al.* Park7, a novel locus for autosomal recessive early-onset parkinsonism, on chromosome 1p36. *Am J Hum Genet* 2001; 69(3): 629-34.
- 40 Liu GH, Qu J, Suzuki K, Nivet E, Li M, Montserrat N, *et al.* Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2. *Nature* 2012; 491(7425): 603-7.
- 41 Corti S, Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Nardini M, Ronchi D, *et al.* Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy. *Sci Transl Med* 2012; 4(165): 165ra162.
- 42 Mitne-Neto M, Machado-Costa M, Marchetto MC, Bengtson MH, Joazeiro CA, Tsuda H, *et al.* Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients. *Hum Mol Genet* 2011; 20(18): 3642-52.
- 43 Egawa N, Kitaoka S, Tsukita K, Naitoh M, Takahashi K, Yamamoto T, *et al.* Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Sci Transl Med* 2012; 4(145): 145ra104.
- 44 Farra N, Zhang WB, Pasceri P, Eubanks JH, Salter MW, Ellis J. Rett syndrome induced pluripotent stem cell-derived neurons reveal novel neurophysiological alterations. *Mol Psychiatry* 2012; 17(12): 1261-71.
- 45 Ananiev G, Williams EC, Li H, Chang Q. Isogenic pairs of wild type and mutant induced pluripotent stem cell (iPSC) lines from Rett syndrome patients as *in vitro* disease model. *PLoS One* 2011; 6(9): e25255.
- 46 Urbach A, Bar-Nur O, Daley GQ, Benvenisty N. Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6(5): 407-11.
- 47 Wang T, Bray SM, Warren ST. Perspectives on the biology of fragile X syndrome. *Curr Opin Genet Dev* 2012; 22(3): 256-63.
- 48 Liu J, Koscielska KA, Cao Z, Hulsizer S, Grace N, Mitchell G, *et al.* Signaling defects in iPSC-derived fragile X premutation neurons. *Hum Mol Genet* 2012; 21(17): 3795-805.
- 49 Tropea D, Giacometti E, Wilson NR, Beard C, McCurry C, Fu DD, *et al.* Partial reversal of Rett Syndrome-like symptoms in MeCP2 mutant mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(6): 2029-34.
- 50 Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, *et al.* Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A $\beta$  and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* 2013; 12(4): 487-96.
- 51 Sawle GV, Bloomfield PM, Björklund A, Brooks DJ, Brundin P, Leenders KL, *et al.* Transplantation of fetal dopamine neurons in Parkinson's disease: PET [18F]6-L-fluorodopa studies in two patients with putaminal implants. *Ann Neurol* 1992; 31(2): 166-73.
- 52 Wenning GK, Odin P, Morrish P, Rehncrona S, Widner H, Brundin P, *et al.* Short- and long-term survival and function of unilateral intrastriatal dopaminergic grafts in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1997; 42(1): 95-107.
- 53 Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai WY, DuMouchel W, Kao R, *et al.* Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001; 344(10): 710-9.
- 54 Ko JY, Park CH, Koh HC, Cho YH, Kyhm JH, Kim YS, *et al.* Human embryonic stem cell-derived neural precursors as a continuous, stable, and on-demand source for human dopamine neurons. *J Neurochem* 2007; 103(4): 1417-29.
- 55 Geeta R, Ramnath RL, Rao HS, Chandra V. One year survival and significant reversal of motor deficits in parkinsonian rats transplanted with hESC derived dopaminergic neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 373(2): 258-64.
- 56 Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, *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(15): 5856-61.
- 57 Minina IuM, Zhdanova NS, Shilov AG, Tolkunova EN, Liskovykh MA, Tomilin AN. Chromosomal instability of *in vitro* cultured mouse embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Tsitologiya* 2010; 52(5): 420-5.
- 58 Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, Biancotti JC, Yakir B, Clark



- AT, *et al.* Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 7(4): 521-31.
- 59 Pasi CE, Dereli-Öz A, Negrini S, Friedli M, Fragola G, Lombardo A, *et al.* Genomic instability in induced stem cells. *Cell Death Differ* 2011; 18(5): 745-53.
- 60 Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, Ching RW, Autio R, Närvä E, *et al.* Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 2011; 471(7336): 58-62.
- 61 Gore A, Li Z, Fung HL, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz-Bourget J, *et al.* Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 471(7336): 63-7.
- 62 Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, *et al.* Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 471(7336): 68-73.
- 63 Maherali N, Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 3(6): 595-605.
- 64 Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Araúzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, *et al.* Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 2009; 136(3): 411-9.
- 65 Yamanaka S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2007; 1(1): 39-49.
- 66 Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol* 2005; 7(11): 1074-82.
- 67 Pera MF, Hasegawa K. Simpler and safer cell reprogramming. *Nat Biotechnol* 2008; 26(1): 59-60.
- 68 Carey BW, Markoulaki S, Hanna J, Saha K, Gao Q, Mitalipova M, *et al.* Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(1): 157-62.
- 69 Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämläinen R, *et al.* piggyback transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 458(7239): 766-70.
- 70 Shi Y, Do JT, Desponts C, Hahm HS, Schöler HR, Ding S. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2(6): 525-8.
- 71 Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448(7151): 313-7.
- 72 Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26(1): 101-6.
- 73 Nagata S, Toyoda M, Yamaguchi S, Hirano K, Makino H, Nishino K, *et al.* Efficient reprogramming of human and mouse primary extra-embryonic cells to pluripotent stem cells. *Genes Cells* 2009; 14(12): 1395-404.