

干细胞专题

干细胞研究进展消息

干细胞是人体及其各种组织细胞的最初来源,具有高度自我复制、高度增殖和多向分化的潜能。干细胞研究正在向现代生命科学和医学的各个领域交叉渗透,干细胞技术也从一种实验室概念逐渐转变成能够看得见的现实。干细胞研究已成为生命科学中的热点。鉴于此,本刊就干细胞的最新研究进展情况设立专栏,为广大读者提供了解干细胞研究的平台。

Cell Stem Cell: iPSC的发育潜能受重编程因子组合影响

美国Whitehead研究院和以色列希伯来大学的联合团队发现新的重编程因子组合,得到的细胞质量有极大提升,该研究成果公布在*Cell Stem Cell*杂志上。

经典的*Oct4*、*Sox2*、*klf4*和*Myc*(OSKM)能有效地进行细胞重编程,但获得的iPSC具有严重的基因畸变,不适合用于临床研究。

科研小组通过生物信息学分析,设计出包含多种重编程因子的组合,从中筛选得到一种新型的基因组合:*Sall4*、*Nanog*、*Esrrb*和*Lin28*(SNEL)。通过SNEL组合,研究人员可以将MEF(mouse embryonic fibroblasts)重编程为高质量小鼠iPSC,虽然数量不多,但这些细胞通过四倍体补偿(4n complementation)技术,能够产生健康的“all-iPSC”小鼠。而OKSM方法得到的细胞克隆虽多,但相同测试中呈现很低的发育潜能。OSK方法排除了*Myc*可获得较多高质量iPSC,说明该基因会对重编程细胞有负面作用。研究人员还发现另外一种组合OSSNE(*Oct4*、*Sox2*、*Sall4*、*Nanog*和*Esrrb*),虽然没有致癌基因*Myc*和*Lin28*,但产生最多低质量iPSC,说明重编程因子的相互作用对重编程十分关键。

比起OKSM等方法,SNEL重编程效率虽然较差,但获得细胞的致癌风险低、基因组完整性高、H2A.X deposition高。论文作者认为,SNEL重编程之所以质量更好的原因在于不依赖于潜在致癌基因*Myc*,这种基因会引起许多遗传问题;也不依赖于潜在的主调控因子*Oct4*和*Sox2*,这两个基因有时会异常激活成体细胞基因组中某些区域。全基因组转录图谱、甲基化组分析、超级增强子等检测结果并不能区分不同质量的iPSC,但OSKM或OSK方法得到

的低质量iPSC经常观察到1765基因的异常表达,8号染色体的三倍体和异常H2A.X沉积。

目前,SNEL方法还不能用于人类细胞重编程,因为人类细胞要比小鼠细胞更难操控。这项工作只是从理论上证明通过生物信息学工具,可以筛选出更好的重编程因子组合,维持iPSC的基因组完整、正确转录重置和多能性。

Buganim Y, Markoulaki S, van Wietmarschen N, Hoke H, Wu T, Ganz K, *et al*. The developmental potential of iPSCs is greatly influenced by reprogramming factor selection. *Cell Stem Cell* 2014; 15(3): 295-309.

J Neurosci: BMP2-SMAD信号通路通过YAP抑制胚胎神经干细胞的增殖

中科院生物物理研究所脑与认知科学国家重点实验室袁增强研究组关于Hippo通路效应蛋白YAP(yes-associated protein)参与BMP信号通路对胚胎神经干细胞增殖调控的研究,首次揭示了BMP信号通路与Hippo-YAP信号通路交联在胚胎神经干细胞增殖调控中的作用。该研究结果公布在*J Neurosci*上。

神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的增殖维持和分化是神经发生的重要环节。之前的研究表明,Hippo通路效应蛋白维持干细胞增殖具有重要作用。但YAP调节NSC的精确分子机制尚未清楚。

新的研究发现,BMP2(bone morphogenetic protein-2)处理后,抑制小鼠胚胎NSC增殖作用,说明YAP对于小鼠NSC增殖非常关键。但敲除YAP可以抵消BMP2处理对小鼠NSC增殖的抑制作用,说明YAP调节BMP2通路的抑制作用。此外,研究还发现BMP2处理减弱YAP的核位移,YAP-TEAD相互作用和YAP调节的反式激活。BMP2处理抑制YAP/TEAD调节的Cyclin D1(ccnd1)表达,敲除*ccnd1*抵消

BMP2调节的小鼠NSC增殖的抑制作用。机理研究发现, BMP2通路效应蛋白Smad1/4与YAP竞争, 与TAED1相互作用, 抑制YAP的共转录活性。

研究结果揭示了BMP2通路与Hippo-YAP通路在小鼠NSC增殖的交联, 或许能为衰老以及神经系统损伤和神经退行性疾病的治疗提供理论基础。

Yao M, Wang Y, Zhang P, Chen H, Xu Z, Jiao J, *et al.* BMP2-SMAD signaling represses the proliferation of embryonic neural stem cells through YAP. *J Neurosci* 2014; 34(36): 12039-48.

Cell Res: 系统标记时序发育基因研究hESC向胰腺β细胞分化过程

北京大学、军事医学科学院、华大基因和中日友好医院等地的研究人员利用人多能干细胞(human pluripotent stem cell, hPSC)到胰腺β细胞的直接分化作为模型, 通过标记各主要发育阶段的时序发育基因研究hPSC分化, 推动体外从hESCs获得成熟的β细胞的研究。该研究结果近期发表在*Cell Res*上。

hPSC在再生医学的应用的难题是如何高效地从hPSC获得成熟细胞。控制细胞分化命运的复杂性, 以及欠缺对hPSC分化机制的了解阻碍这一难题的解决。

在新的研究中, 科研人员开发了系统性策略, 借助于转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN), 系统标记胰腺发育过程中的次序基因, 覆盖了从hESC来源的胰腺β细胞的主要发育阶段。因而产生了一大组报告细胞系(reporter cell lines); 其中, 部分细胞是在NGN3-eGFP细胞系基础上建立的双报告细胞系。利用该平台, 研究人员成功地实时可视化整个分化过程的动力学, 使我们能够识别并分离每个分化阶段的中间细胞群, 用于进一步分析。

科研人员对分离得到的NGN3-eGFP⁺细胞通过RNA测序, 获得其表达谱, 并在hESC来源的胰腺细胞和发育中的人胰腺中的胰腺内分泌祖细胞和早期内分泌细胞发现一个表达丰富的表面蛋白sushi domain-containing 2(SUSD2)。

该研究实时捕捉了一系列细胞命运转折事件, 鉴别了多个细胞亚群, 揭示了其独特的基因表达谱。该平台以及此次研究发现可为体外获得成熟的β细胞铺平道路。

Liu H, Yang H, Zhu D, Sui X, Li J, Liang Z, *et al.*

Systematically labeling developmental stage-specific genes for the study of pancreatic β-cell differentiation from human embryonic stem cells. *Cell Res* 2014; 24(10): 1181-200.

Proc Natl Acad Sci USA: 基质硬度诱导hPSC分化

美国Wisconsin-Madison大学的研究团队发现, 人多能干细胞(hPSC)生长表面的硬度单独就能调节细胞分化。这项研究发表在*Proc Natl Acad Sci USA*上。

物理刺激以协同或拮抗方式调节细胞命运选择, 但不清楚能否单独指导hPSC分化为特定细胞类型。研究人员之前曾经报道硬质材料促进Yes-associated protein(YAP)转录共激活因子的核定位, 支持hPSC的长期自我更新。

在新的研究中, 为了全面探讨生长表面对干细胞的影响, 研究人员构建了不同硬度的凝胶来模拟肌肉、肝脏和脑组织。研究显示, 类似脑组织的柔软表面, 不需要任何可溶因子, 就足以诱导hPSC转化成为神经元。而较硬的表面更倾向于保持细胞的干细胞状态。

研究证明, 即使存在多能性因子, 柔软基质抑制YAP的核定位, 促进hPSC高效分化为分裂后的神经元。在没有神经性因子的情况下, 比起传统分化方法, 有效的基质能够促进快速、高效地产生神经元(2周, >75%), 基质诱导获得的神经元表达成熟细胞标志, 具有潜在功能。柔软基质表面上的hPSC分化相当于在硬质表面加F-肌动蛋白的小分子抑制剂或敲除YAP。

研究结果表明, 基质单独就可以调节hPSC向某种成熟细胞分化, 无需其他诱导因素。这些发现可以帮助科学家们优化实验条件, 引导干细胞精确分化帮助生产大量细胞用于药物开发和疾病治疗。

Musah S, Wrighton PJ, Zaltsman Y, Zhong X, Zorn S, Parlato MB, *et al.* Substratum-induced differentiation of human pluripotent stem cells reveals the coactivator YAP is a potent regulator of neuronal specification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(38): 13805-10.

Nat Biotechnol: 科学家发现可将干细胞迅速转化为胰岛素分泌细胞的新方法

加拿大英属哥伦比亚大学等地的研究人员成

功地将干细胞转化成为胰岛素分泌细胞——胰腺β细胞,为I型糖尿病的治疗研究带来希望,研究成果刊登于*Nat Biotechnol*上。

I型糖尿病的发生往往是由于机体免疫系统破坏胰腺β细胞所致,目前正在开发源自hESC的胰腺β细胞进行糖尿病治疗。

科研人员开发了一个七步的技术方案,可以高效地将hESC转化为胰腺β细胞。第七步(S7)细胞表达成熟胰腺β细胞的标志,如MAFA,并在体外静态培养中显示同人胰岛相似的葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能。用单细胞显像和动态葡萄糖刺激测试进一步鉴别发现,S7细胞与人β细胞有相似性但有显著区别。但S7细胞在小鼠体内40 d内快速逆转糖尿病症状,比胰腺前体细胞快4倍。

尽管S7细胞不等同于成熟β细胞,但具有体内葡萄糖刺激的胰岛素分泌功能,并快速逆转糖尿病,使其有希望成为糖尿病治疗的候选细胞之一。目前,实验室培养得到的细胞并不成熟,需要移植到宿主体内之后才能够转化成完整功能的细胞。下一步研究人员将继续开发新方法使新产生的β细胞不被宿主排斥。

Rezania A, Bruin JE, Arora P, Rubin A, Batushansky I, Asadi A, *et al.* Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived *in vitro* from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2014; doi: 10.1038/nbt.3033.

Nature: iPSC首次获批进行人体实验

近日,日本神户理化研究所(RIKEN)发育生物学中心的眼科专家高桥雅代培育患者特异性的iPSC,治疗与年龄相关的视网膜退化疾病(AMD),这是iPSC首次获批用于人体实验。相关报道发表在*Nature*网站上。

AMD患者眼内生成多余的血管,视网膜色素上皮细胞(RPE)变得不稳定,导致感光细胞不断减少,最终失明。高桥雅代用患者皮肤细胞重编程为iPSC,再诱导变成RPE,将其培育成能被植入受损视网膜内的纤薄层。

研究团队已经通过猴子试验证明,iPSC移植不

会诱发免疫反应,也几乎没有出现肿瘤。尽管如此,不能确认iPSC是否会在人体内导致肿瘤出现。为了消除人们的其他担忧——生成iPSC的过程可能会导致危险的变异,团队也对整个过程和生成iPSC的遗传稳定性进行了测试,结果表明一切正常。

进行中的此次iPSC临床实验将首次证明iPSC在临床方面的价值。该研究团队计划在手术后,对细胞的受体进行长达一年的跟踪观察,这项探索性研究最终会对6名实验对象进行手术。

Cyranoski D. Japanese woman is first recipient of next-generation stem cells. *Nature* 2014; <http://www.nature.com/news/japanese-woman-is-first-recipient-of-next-generation-stem-cells-1.15915>

Stem Cells: 人体皮肤细胞重编程为单核细胞祖细胞

美国Salk研究所和西班牙再生医学研究人员合作,使用重编程方法将人类皮肤细胞变成具有巨噬细胞分化潜能的造血祖细胞(hematopoietic progenitor-like cells, HPC)。研究论文公布在近期的*Stem Cells*上。

Sox2基因在小鼠造血重建过程中上调。研究人员发现在人成纤维细胞过表达Sox2可以快速诱导产生CD34⁺细胞,伴随中胚层相关标志上升。对脐血造血祖细胞图谱分析发现,miR-125b可以促进Sox2产生的CD34⁺细胞分化为具有移植潜能的未成熟造血祖细胞。进一步分化为具有细胞吞噬功能的CD14⁺细胞。Sox2/miR-125b产生的CD34⁺细胞体内移植后,进一步成熟为CD45⁺细胞和单核细胞/巨噬细胞。

小鼠研究证明,这一过程迅速且安全,绕过了细胞重编程过程中可能出现的风险。目前,研究人员正在进行临床前的概念验证等研究,希望能尽快进入临床研究。

Pulecio J, Nivet E, Sancho-Martinez I, Vitaloni M, Guenechea G, Xia Y, *et al.* Conversion of human fibroblasts into monocyte-like progenitor cells. *Stem Cells* 2014; 32(11): 2923-38.