

人多能干细胞来源可移植造血分化的研究进展

沈俊 王征宇 程涛

Generation of engraftable hematopoietic stem cells from human pluripotent stem cells Shen Jun, Wang Zhengyu, Cheng Tao

Corresponding author: Cheng Tao, State Key Laboratory of Experimental Hematology, Institute of Hematology & Blood Disease Hospital, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China. Email: chengtao@ihcams.ac.cn

血液疾病目前正威胁着世界数百万人的生命健康。多数情况下,移植健康或基因修复的、具有长期移植能力的造血干细胞(HSC)是唯一的治愈方法。然而,人体HSC数量有限,体外扩增培养困难以及移植宿主病等大大限制了HSC移植的应用。人多能干细胞(hPSC),尤其是来源广泛、不受伦理学限制的诱导型多能干细胞(iPSC)可以经体外诱导分化生成大量可以移植的自体HSC,为恶性血液疾病的治疗带来了曙光。本文着重就hPSC分化为可移植HSC的最新进展予以论述。

一、转录因子介导的可移植造血分化

基因调控网络中一些关键因子对细胞命运的改变起着决定性作用。在体内正常造血研究中发现:Runx1在内皮细胞向造血细胞的转变过程中扮演着重要角色^[1],Gata1、Pu.1能分别促进红系、髓系的发育^[2],GATA3是T细胞早期发育的关键调控因子^[3-4]。体外造血研究中C/EBP α 联合PU.1能将T细胞重编程为巨噬细胞^[5],GATA3能驱动T前体细胞逐渐转变成肥大细胞^[6]。因此,找到可以调节HSC属性的转录因子对于体外分化出有功能的HSC意义重大。

Szabo等^[7]和Pulecio等^[8]先后发现多潜能相关转录因子OCT4和SOX2能将人的成纤维细胞直接转变成具有多髓系分化能力的造血细胞。该细胞尽管能植入小鼠体内,但只能在骨髓中检测到少量的人CD45⁺细胞,外周血中却检测不到,表明这种多潜能因子介导的造血转变是不完全的。Batta等^[9]筛选出了5个与造血相关的转录因子:Erg、Gata2、Lmo2、Runx1c和Scl。这些转录因子不仅能将成纤维细胞转变成具有多髓系分化能力的造血细胞,而且在p53缺失的情

况下能分化出B细胞和T细胞,更重要的是获得了短期(2周)的红系移植能力。尽管该研究采用的是小鼠细胞,却提示我们:表达与造血相关的一些转录因子可能更容易得到功能完整的人HSC。早在2002年,Daley团队就预示了这一点^[10]。该团队在小鼠胚胎干细胞(ESC)上通过过表达与HSC自我更新相关的一个转录因子HoxB4,成功得到了具有淋系和髓系分化潜能及连续植入能力的造血细胞。然而遗憾的是在人细胞上HoxB4并没有表现出强劲效果^[11-12]。2014年,Riddell等^[13]通过转录因子的瞬时性过表达首次在体外分化得到了具有连续植入能力的小鼠HSC。他们首先筛选出了与HSC活性相关的6个因子:Hlf、Runx1t1、Pbx1、Lmo2、Prdm5和Zfp37,然后在鼠的B祖细胞及髓系祖细胞中瞬时表达这些因子,这些起始细胞被成功转变成了具有各系分化能力的造血细胞。额外添加Meis1和Mycn能提高重编程的效率。这些转变的细胞具有长期多系重建能力,而且能够进行连续移植。单细胞基因表达谱分析表明这些重编程后的细胞拥有与内源性HSC一致的功能及分子特征。这种细胞因此被定义为诱导型造血干细胞(iHSC)。Riddell等的这项工作尽管也是在小鼠细胞上完成的,却再次表明造血相关的转录因子或许能介导更好的重编程作用,并提示谱系关系越近的细胞之间表观差异可能越小,相互之间的转变越容易。

与iPSC相比,在起始细胞的选择上,上述成纤维细胞和血细胞由于不具备大规模扩增能力,因此大大限制了其在造血分化研究中的应用。尽管如此,这些研究却为人iPSC来源的造血分化研究提供了良好的借鉴作用。2013年Daley团队再次用转录因子介导的方法首次将hPSC诱导成具有植入能力的造血细胞^[14]。为了缩短重编程过程中的“表观距离”,他们将人ESC及iPSC首先分化成谱系限制的CD34⁺CD45⁻髓系前体细胞,然后在这些细胞中再联合表达转录因子HOXA9、ERG、RORA,从而使该髓系前体细胞在体外获得自我更新能力,并且能分化出T细胞。额外添加SOX4、MYB能进一步得到具有髓系及红系植入能力的造血细胞,植入的红细胞在体内逐步成熟,成体 β 血红蛋白逐渐增多。尽管该方法得到的造血细胞无法连续移植而且不具备淋系植入能力,但该研究所采用的缩短“表观距离”的方法却再次提示细胞选择的重要性。内皮细胞与造血细胞起源于共同的血液血管母细胞(hemangioblast)。在胚胎发育的AGM区,生血内皮细胞能逐渐获得造血细胞的形态与表型并进一步脱落形成HSC。鉴于这种“亲密”关系,2014年Sandler等^[15]选用人脐静脉内皮细胞(HUVEC)作为起始细胞,在这些细胞中导入转录因子FOSB、GFI1、RUNX1及SPI1后再将

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2017.03.019

基金项目:国家重点研发计划(2016ZY05002341);国家自然科学基金重大研究计划(91519315);国家自然科学基金创新研究群体(81421002)

作者单位:300020 天津,中国医学科学院、北京协和医学院血液学研究所、血液病医院;实验血液学国家重点实验室

通信作者:程涛, Email: chengtao@ihcams.ac.cn

这些细胞与HUVEC来源的内皮细胞层进行共培养从而得到了具有连续植入能力的造血细胞。尽管Sandler等使用的起始内皮细胞不具备大规模扩增能力,但该研究却再一次表明亲缘关系越近的细胞越容易相互转变。另外该研究也提示造血微环境对HSC的成熟至关重要。

二、造血微环境介导的可移植造血分化

HSC正常的生成和维持离不开骨髓造血微环境(Niche)。Niche中的各种细胞组分,如成骨细胞、内皮细胞、间充质干细胞等不仅为HSC提供了特殊的接触表面,而且能分泌HSC正常生成和维持所必需的各种生长因子。体外造血分化的一大缺陷就是脱离了这种微环境,因此一直无法得到真正意义上的具有可移植能力的HSC。模拟体内的微环境建立起一套微环境共培养体系或许有助于体外造血分化问题的解决。

2013年,Amabile等^[16]开辟蹊径,利用畸胎瘤形成的方法首次在体内建立起了一套人iPSC造血分化体系。他们将人的iPSC直接注射到免疫缺陷鼠体内,在形成的畸胎瘤里检测到了人CD34⁺CD45⁺细胞,这群细胞具有连续多系植入能力,一次植入率0.1%~1.7%,二次植入率为(0.04±0.01)%。尽管植入率相对较低,但却首次证明了人iPSC具备分化为正常功能HSC的能力。同年,Suzuki等^[17]也报道了类似的工作。他们发现注射OP9细胞的同时额外添加造血因子能够提高畸胎瘤造血生成的效率。实验发现畸胎瘤小鼠的外周血和骨髓中均有人血细胞存在,这表明人iPSC来源的HSC能够从畸胎瘤迁移到小鼠骨髓并释放到外周血中。骨髓中分选出的人血细胞具备连续移植和多系重建能力。可见畸胎瘤为iPSC来源的造血分化提供了一个良好的体内造血微环境,在该微环境下生成的造血细胞更接近于人体真正的HSC。

畸胎瘤介导的造血具有一定的随机性和不稳定性,而且通过肿瘤形成的方法也不具备良好的应用前景。考虑到造血微环境中基质细胞对造血的支持作用,能不能通过相关基质细胞的共培养在体外建立微环境系统呢?研究者们先后将人的ESC与小鼠骨髓S17细胞^[18]、OP9细胞^[19]、胎肝基质细胞^[20]进行共培养,发现这些细胞均能支持ESC的自发性造血分化,然而这种自发性造血分化的比例却极低(8~20d的培养只能产生0.1%~2.0%的CD45⁺细胞)。Narayan等^[21]将与S17细胞共培养后得到的造血细胞进行移植,发现植入率也是极低的(0.001%~0.05%)。考虑到真正的长周期HSC产自胚胎的AGM区,那么用AGM区的细胞进行共培养结果又会是怎样的呢?Krassowska等^[22]发现AGM细胞共培养能显著提高造血生成效率。Ledran等^[23]将人ESC与鼠AGM细胞共培养,得到了具有连续移植能力的造血细胞,植入率高达16%。可见不同的基质细胞对造血的支持能力是有差异的。

寻找合适的人源化基质细胞进行共培养对人的体外造血研究意义重大。近些年来越来越多的证据表明,内皮细胞在HSC的发育、维持和再生上起着重要作用^[24-26]。鉴于内皮

细胞与HSC之间的“亲密”关系,内皮细胞共培养能否促进体外造血的成熟呢?2015年,Gori等^[27]利用拟胚体(EB)分化体系通过内皮细胞共培养的方法,将人ESC及猴iPSC成功分化成具有高移植率的造血细胞。他们对EB分化得到的CD34⁺细胞进行检测发现这群细胞高表达Notch-1及Notch-2受体,他们猜测这些受体正在等待被激活。随后他们又对HUVEC进行检测发现这些细胞表达JAG-1、DLL4等Notch配体。将CD34⁺细胞与HUVEC共培养后能得到一群CD34⁺CD45⁺细胞,这群细胞表达HES1、HEY1、RUNX1及GATA2等Notch下游基因,将其打入小鼠体内,16周后这群细胞仍然具有约10%的植入率而且猴iPSC来源的造血细胞还具备二次植入能力。

三、总结与展望

hPSC体外造血分化当前存在的一个主要问题是分化得到的血细胞不够成熟,因而无法正常植入。围绕这个问题,研究者们在不同层面展开了工作。①机制研究:Gordon Keller团队提出T系分化潜能是终末造血(definitive hematopoiesis)生成的标志,并围绕这一标准在体外找到了各种区分终末造血的表面标志和信号通路^[28-30]。然而符合这一标准的终末造血细胞并不具备移植能力^[29,31]。后来有研究发现在鼠胚胎造血过程中T细胞的分化并不依赖于终末造血,T细胞可以在HSC产生之前在卵黄囊生成^[32-33]。可见单纯以T系分化能力作为终末造血的评价标准还有待商榷。②培养体系:当前的体外造血机制研究基本上都是建立在EB分化体系和共培养体系上的。这两种分化体系的诸多缺点(如成分不明确等)使机制研究不能排除相关干扰,从而造成了研究结果具有一定的局限性。将hPSC消化成单个细胞后直接种在培养板里进行造血分化的单层培养体系目前正在兴起^[31,34-35]。这种单层体系操作简便,成分相对明确,因而在将来的体外造血研究中可能会有更好的应用前景。③转录因子和微环境:近年来转录因子和微环境介导的可移植HSC的生成虽令人欣喜,但也存在许多问题。转录因子具有种属差异性,尽管鼠和人的许多转录因子具有高度同源性,但表现出的效果却截然不同。HoxB4能促进鼠ESC转变成可移植HSC,但在人细胞上却没有很好的效果^[11-12]。IKZF1在鼠的过表达能抑制B系分化增强T系分化,而在人体却对T系分化没有影响^[36]。另外,安全性也是应该考虑的问题:介导转录因子过表达的病毒载体具有致癌性,HoxB4等转录因子本身也有致癌的风险^[37]。在微环境共培养方面,共培养细胞的选取非常重要。不同细胞具有不同的造血支持能力,同一种细胞在不同状态下对造血的支持能力也有所差异^[23]。

综上所述,hPSC来源的造血细胞应用于临床还需解决以下问题:①安全性:该问题主要来自于病毒载体的使用(iPSC建系、转录因子过表达等),异源性基质细胞(鼠OP9及AGM细胞等)或同种异体基质细胞(HUVEC等)的使用,另外iPSC本身的成瘤性也不容忽视。②“质”和“量”的问题:从“质”来说,当前hPSC分化来的造血细胞只具备短期的一次植入能力,而且仅局限于髓系;不具备自我更新能力,无

法二次植入;从“量”来说,植入效率偏低,大多只能在骨髓中检测到少量植入的细胞,在外周血中基本检测不到。未来我们应该着眼于更加优秀的分化体系的建立,在此基础上强化机制的探索。寻找更合适的转录因子及微环境共培养细胞也是未来努力的方向。

参考文献

- [1] Chen MJ, Yokomizo T, Zeigler BM, et al. Runx1 is required for the endothelial to haematopoietic cell transition but not thereafter [J]. *Nature*, 2009, 457 (7231):887-891. DOI: 10.1038/nature07619.
- [2] Arinobu Y, Mizuno S, Chong Y, et al. Reciprocal activation of GATA-1 and PU.1 marks initial specification of hematopoietic stem cells into myeloerythroid and myelolymphoid lineages [J]. *Cell Stem Cell*, 2007, 1 (4):416-427. DOI: 10.1016/j.stem.2007.07.004.
- [3] Ting CN, Olson MC, Barton KP, et al. Transcription factor GATA-3 is required for development of the T-cell lineage [J]. *Nature*, 1996, 384(6608):474-478.
- [4] Hendriks RW, Nawijn MC, Engel JD, et al. Expression of the transcription factor GATA-3 is required for the development of the earliest T cell progenitors and correlates with stages of cellular proliferation in the thymus [J]. *Eur J Immunol*, 1999, 29 (6):1912-1918.
- [5] Laiosa CV, Stadtfeld M, Xie H, et al. Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors [J]. *Immunity*, 2006, 25(5):731-744. DOI:10.1016/j.immuni.2006.09.011.
- [6] Taghon T, Yui MA, Rothenberg EV. Mast cell lineage diversion of T lineage precursors by the essential T cell transcription factor GATA-3 [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8 (8):845-855. DOI: 10.1038/ni1486.
- [7] Szabo E, Rampalli S, Risueño RM, et al. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors [J]. *Nature*, 2010, 468(7323):521-526. DOI: 10.1038/nature09591.
- [8] Pulecio J, Nivet E, Sancho-Martinez I, et al. Conversion of human fibroblasts into monocyte-like progenitor cells [J]. *Stem Cells*, 2014, 32(11):2923-2938. DOI: 10.1002/stem.1800.
- [9] Batta K, Florkowska M, Kouskoff V, et al. Direct reprogramming of murine fibroblasts to hematopoietic progenitor cells [J]. *Cell Rep*, 2014, 9 (5):1871-1884. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.11.002.
- [10] Kyba M, Perlingeiro RC, Daley GQ. HoxB4 confers definitive lymphoid-myeloid engraftment potential on embryonic stem cell and yolk sac hematopoietic progenitors [J]. *Cell*, 2002, 109(1):29-37. DOI: 10.1016/S0092-8674(02)00680-3.
- [11] Wang L, Menendez P, Shojaei F, et al. Generation of hematopoietic repopulating cells from human embryonic stem cells independent of ectopic HOXB4 expression [J]. *J Exp Med*, 2005, 201(10):1603-1614. DOI: 10.1084/jem.20041888.
- [12] Bowles KM, Vallier L, Smith JR, et al. HOXB4 overexpression promotes hematopoietic development by human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2006, 24 (5):1359-1369. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0210.
- [13] Riddell J, Gazit R, Garrison BS, et al. Reprogramming committed murine blood cells to induced hematopoietic stem cells with defined factors [J]. *Cell*, 2014, 157(3):549-564. DOI: 10.1016/j.cell.2014.04.006.
- [14] Doulatov S, Vo LT, Chou SS, et al. Induction of multipotential hematopoietic progenitors from human pluripotent stem cells via respecification of lineage-restricted precursors [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(4):459-470. DOI: 10.1016/j.stem.2013.09.002.
- [15] Sandler VM, Lis R, Liu Y, et al. Reprogramming human endothelial cells to haematopoietic cells requires vascular induction [J]. *Nature*, 2014, 511(7509):312-318. DOI: 10.1038/nature13547.
- [16] Amabile G, Welner RS, Nombela-Arrieta C, et al. In vivo generation of transplantable human hematopoietic cells from induced pluripotent stem cells [J]. *Blood*, 2013, 121 (8):1255-1264. DOI: 10.1182/blood-2012-06-434407.
- [17] Suzuki N, Yamazaki S, Yamaguchi T, et al. Generation of engraftable hematopoietic stem cells from induced pluripotent stem cells by way of teratoma formation [J]. *Mol Ther*, 2013, 21 (7):1424-1431. DOI: 10.1038/mt.2013.71.
- [18] Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, et al. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98 (19):10716-10721. DOI: 10.1073/pnas.191362598.
- [19] Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, et al. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential [J]. *Blood*, 2005, 105 (2):617-626. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1649.
- [20] Qiu C, Hanson E, Olivier E, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into hematopoietic cells by coculture with human fetal liver cells recapitulates the globin switch that occurs early in development [J]. *Exp Hematol*, 2005, 33 (12):1450-1458. DOI: 10.1016/j.exphem.2005.09.003.
- [21] Narayan AD, Chase JL, Lewis RL, et al. Human embryonic stem cell-derived hematopoietic cells are capable of engrafting primary as well as secondary fetal sheep recipients [J]. *Blood*, 2006, 107(5):2180-2183. DOI: 10.1182/blood-2005-05-1922.
- [22] Krassowska A, Gordon-Keylock S, Samuel K, et al. Promotion of haematopoietic activity in embryonic stem cells by the aortagonad-mesonephros microenvironment [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(18):3595-3603. DOI: 10.1016/j.yexcr.2006.08.001.
- [23] Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L, et al. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches [J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 3(1):85-98. DOI: 10.1016/j.stem.2008.06.001.
- [24] Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, et al. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6

- (3):251-264. DOI: 10.1016/j.stem.2010.02.001.
- [25] Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, et al. Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells [J]. Nature, 2012, 481(7382):457-462. DOI: 10.1038/nature10783.
- [26] Nolan DJ, Ginsberg M, Israely E, et al. Molecular signatures of tissue-specific microvascular endothelial cell heterogeneity in organ maintenance and regeneration [J]. Dev Cell, 2013, 26(2): 204-219. DOI: 10.1016/j.devcel.2013.06.017.
- [27] Gori JL, Butler JM, Chan YY, et al. Vascular niche promotes hematopoietic multipotent progenitor formation from pluripotent stem cells [J]. J Clin Invest, 2015, 125(3):1243-1254. DOI: 10.1172/JCI79328.
- [28] Kennedy M, Awong G, Sturgeon CM, et al. T lymphocyte potential marks the emergence of definitive hematopoietic progenitors in human pluripotent stem cell differentiation cultures [J]. Cell Rep, 2012, 2(6):1722-1735. DOI: 10.1016/j.celrep.2012.11.003.
- [29] Sturgeon CM, Ditadi A, Awong G, et al. Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells [J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(6): 554-561. DOI: 10.1038/nbt.2915.
- [30] Ditadi A, Sturgeon CM, Tober J, et al. Human definitive haemogenic endothelium and arterial vascular endothelium represent distinct lineages [J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(5):580-591. DOI: 10.1038/ncb3161.
- [31] Uenishi G, Theisen D, Lee JH, et al. Tenascin C promotes haematoendothelial development and T lymphoid commitment from human pluripotent stem cells in chemically defined conditions [J]. Stem Cell Reports, 2014, 3(6):1073-1084. DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.09.014.
- [32] Yoshimoto M, Porayette P, Glosston NL, et al. Autonomous murine T-cell progenitor production in the extra-embryonic yolk sac before HSC emergence [J]. Blood, 2012, 119(24):5706-5714. DOI: 10.1182/blood-2011-12-397489.
- [33] Boiers C, Carrelha J, Lutteropp M, et al. Lymphomyeloid contribution of an immune-restricted progenitor emerging prior to definitive hematopoietic stem cells [J]. Cell Stem Cell, 2013, 13(5):535-548. DOI: 10.1016/j.stem.2013.08.012.
- [34] Wang C, Tang X, Sun X, et al. TGFbeta inhibition enhances the generation of hematopoietic progenitors from human ES cell-derived hemogenic endothelial cells using a stepwise strategy [J]. Cell Res, 2012, 22(1):194-207. DOI: 10.1038/cr.2011.138.
- [35] Niwa A, Heike T, Umeda K, et al. A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors [J]. PLoS One, 2011, 6(7):e22261. DOI: 10.1371/journal.pone.0022261.
- [36] Beer PA, Knapp DJ, Kannan N, et al. A dominant-negative isoform of IKAROS expands primitive normal human hematopoietic cells [J]. Stem Cell Reports, 2014, 3(5):841-857. DOI: 10.1016/j.stemcr.2014.09.006.
- [37] Zhang XB, Beard BC, Trobridge GD, et al. High incidence of leukemia in large animals after stem cell gene therapy with a HOXB4-expressing retroviral vector [J]. J Clin Invest, 2008, 118(4):1502-1510. DOI: 10.1172/JCI34371.

(收稿日期:2016-07-14)

(本文编辑:徐茂强)

中华医学会第十四次全国白血病·淋巴瘤 学术会议征文通知

中华医学会第十四次全国白血病·淋巴瘤学术会议将于2017年7月13-15日在哈尔滨市举办。会议由中华医学会、中华医学会血液学分会主办,哈尔滨血液病肿瘤研究所、中国医学科学院血液病医院(血液学研究所)、北京大学血液病研究所、苏州大学附属第一医院协办。会议盛邀国内外著名学者就白血病及淋巴瘤、骨髓瘤等领域相关基础及临床做专题报告;邀请美国、欧洲、日本等学者对白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、造血干细胞移植、骨髓增生异常综合征(MDS)及骨髓增殖性肿瘤(MPN)进行专题研讨,分为白血病、淋巴瘤、骨髓瘤、恶性血液病的免疫治疗、造血干细胞移植、MDS及MPN等专场进行学术论文交流,同时会前会将主办专题学术及高峰论坛。大会将提供国家级I类学分。

征文范围及要求:①范围:白血病、淋巴瘤、多发性骨髓瘤、MDS、MPN等血液肿瘤的诊断、治疗(包括造血干细胞移植)与基础及转化研究。②要求:500字左右摘要1份,中英文均可,包括目的、方法、结果、结论。③投稿方式:敬请登录大会网站www.cmacsh.org进行网上投稿。④正文截稿时间:2017年4月30日

学术联系人及联系方式:张岩(13796069359, Email: majun0322@126.com);刘冀伟(13945135458, Email: liujiwei@medmail.com.cn);赵东陆(13936254716, Email: zdl7777@163.com)。

网站技术联系人及联系方式:吕春雨(18612976547, Email: cmacsh@126.com, 10075882@qq.com)

中华医学会学术会务部