

人诱导多能干细胞的成瘤性发生机制及干预策略

刘淑平 程涛 袁卫平

Research progress in tumorigenicity of human induced pluripotent stem cells Liu Shuping, Cheng Tao, Yuan Weiping

Corresponding author: Yuan Weiping, Institute of Hematology and Blood Diseases Hospital, State Key Laboratory of Experimental Hematology, CAMS & PUMC, Tianjin 300020, China. Email: wpyuan@ihcams.ac.cn

2006年Takahashi等^[1]首次利用逆转录病毒作为载体将OCT4、SOX2、KLF4、c-Myc4个转录因子导入到小鼠的成纤维细胞内使之重编程为类似“胚胎干细胞”形态的多能干细胞,命名为“诱导多能干细胞(iPSC)”。随后他们证明了人皮肤成纤维细胞也能重编程成为iPSC^[2-3]。2013年研究发现白血病细胞也能重编程成为iPSC^[4]。iPSC的获得不需要胚胎操作,避免了胚胎干细胞的伦理问题以及法律障碍,而且利用“iPS”细胞技术可以获得患者特异性的iPSC,可以解决细胞移植治疗的免疫排斥,所以iPSC有很广阔的临床应用前景。例如,大多数血液疾病的主要治疗手段是造血干细胞(HSC)移植,但是移植前需要进行骨髓配型,骨髓配型概率很低,而且异体移植也存在骨髓排斥的问题。通过“iPS”细胞技术可以获得患者自体“iPS”细胞后利用定向诱导分化技术获得患者自体正常HSC,就可以进行自体细胞移植,避免了移植排斥,为血液疾病尤其是白血病的治疗提供了崭新的途径。

早在20世纪60年代,多个研究发现肿瘤的发生和细胞的多能性有关。在当时,研究者主要研究的是畸胎瘤,即畸胎瘤的恶性形式。畸胎瘤之所以为恶性是由于存在胚胎瘤(embryonic carcinoma, EC)细胞,该细胞具有自我更新能力和分化成各种组织的能力,单个EC细胞的移植可以导致由许多不同的组织组成的畸胎瘤。1998年人胚胎干细胞(hESC)第1次被分离出来后,发现了hESC和EC细胞具有很多相似性,比如多能性标志(SSEA3、SSEA4、TRA-1-60、TRA-1-81、端粒酶和碱性磷酸酶)的表达和畸胎瘤的形成能力。多能性细胞的成瘤性可能由于它们具有类似肿瘤的特性,例如自我更新、快速增殖、接触抑制的缺乏以及活跃的端

粒酶活性。因此,尽管iPSC技术克服了ESC的免疫排斥和伦理的障碍,但因为iPSC具有和ESC相同的特性即自我更新和多向分化潜能,iPSC走向临床同样面临着和ESC相同的问题,即成瘤性。本文我们对iPSC的致瘤性的研究近况进行总结,并分析与iPSC致瘤性相关的因素,以及解决iPSC致瘤性的可能方法。

一、重编程方法和肿瘤发生

最初的重编程方法靠病毒将重编程基因插入到受感染细胞的基因组中,从而永久地改变其基因组DNA。研究者们对这种方法有一定的疑虑,因为新插入的基因有可能会使某些正常的基因(例如抗癌基因)失活或使某些原癌基因激活,从而导致肿瘤发生。尽管后来有证据表明新插入的基因似乎在重编程结束后会自动关闭,而让细胞内源性的基因接管其功能,但插入的基因仍有可能再次激活或者对细胞产生其他未知的影响。Yamanaka等^[5]后来的研究也发现,在经过基因改造的121只实验鼠中有20%发生了肿瘤病变,这说明使用逆转录病毒插入基因容易引发肿瘤是客观存在的。为了解决这一问题,众多研究者做出了很多努力,寻找一种可行的安全载体替代不稳定的病毒载体。例如采用非整合的Sendai病毒^[6]以及非病毒方法即mRNA方法^[7],重组蛋白方法^[8],Episomal方法^[9]等。2013年Hou等^[10]使用7个小分子化合物的组合对体细胞进行处理就可以成功地逆转其“发育时钟”,实现体细胞的重编程,为诱导体细胞成为多能性干细胞提供了更加简单和安全的方法。这些非整合方法虽然能降低iPSC的成瘤性,但是相对的诱导效率会降低。所以,iPSC技术方法不断进步,其最终能降低iPSC临床应用致瘤性的风险,但是更加安全、简单、高效的方法仍然处于探索中。

二、重编程因子和肿瘤发生

诱导体细胞重编程成为iPSC使用的多能性基因在人的多种肿瘤细胞中具有表达,c-MYC和KLF4是原癌基因,SOX2、NANOG和OCT3/4参与肿瘤的形成。SOX2、NANOG和OCT4编码转录调控因子,在高度恶性的乳腺癌细胞中这些因子的靶基因过表达并且非常活跃^[11]。NANOG和OCT4的表达失调和口腔癌的不良预后相关。在前列腺癌细胞系和原发性前列腺肿瘤细胞中也有多能性基因OCT3/4、SOX2、NANOG、c-MYC和KLF4的表达。将表达多能性基因的肿瘤细胞移植给免疫缺陷小鼠体内,能够诱导小鼠形成高度恶性肿瘤^[12]。

c-MYC基因既是一种可易位基因,又是一种受因子影响的可调节基因,也是一种可使细胞无限增殖、获永生化功能、促进细胞分裂的基因。它与细胞凋亡、多种肿瘤发生发

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.03.022

基金项目:科技部干细胞重大研究计划(2010CB945204、2012CB966604、2013CB966902)

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:袁卫平,Email:wpyuan@ihcams.ac.cn

展有关。尽管c-MYC对于iPSC的多能性诱导不是必需的,但是c-MYC能够提高OCT4、SOX2和KLF4的重编程能力,具有抑制细胞的分化和促进细胞的增殖能力。Eilers和Eisenman发现MYC蛋白调控几千个基因的表达。这些基因中大多数表达上调参与细胞增殖,少数基因表达下调参与细胞周期停滞,细胞黏附和细胞间的通信。作为一种原癌基因,MyC在人类的许多恶性肿瘤中都有着不同程度的表达。Burkitt淋巴瘤是一种高度恶性的B细胞肿瘤,发现部分病例中c-Myc基因存在异位,导致c-Myc的异常表达^[13]。但是,并不是所有MyC家族成员都具有类似的特性,例如L-Myc具有降低肿瘤发生的特性,仅有少数的肿瘤发生和L-Myc的异常表达相关。研究表明L-Myc能够替代c-Myc使体细胞重编程为iPSC,并且嵌合子小鼠的肿瘤发生率明显降低^[5]。

KLF4即Krüppel-like factor 4,是具有锌指结构的转录因子,在很多组织中均有表达。在重编程过程中可能和c-Myc具有协同作用,提高重编程的效率,而且在ESC中高表达能够抑制其分化,说明KLF4也参与了多能干细胞自我更新功能的维持。KLF4具有多重作用,其中在肿瘤中既可作为抑癌基因又可作为原癌基因。这可能与KLF4所处的环境有关。在胃肠道肿瘤中,KLF4发挥肿瘤抑制作用。近来研究发现在骨髓瘤中KLF4的表达会使其预后不良。

OCT3/4是POU家族的转录因子,由pou5f1基因编码,在早期胚胎发育中起着关键作用,所表达的蛋白质是细胞全能性的重要标志,并特异地表达于全能性ESC,对调节ESC自我更新的复杂信号分子网络有重要作用^[14]。OCT4被发现在许多肿瘤细胞中都有表达,比如生殖细胞肿瘤、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌等^[15]。但是关于OCT4对于肿瘤细胞的作用了解很少。Hochedlinger等^[16]通过利用Dox诱导OCT4表达的小鼠模型研究OCT4过表达对体细胞的分化以及肿瘤发生的影响。Dox诱导5d可发现上皮组织发育不良。仅在上皮祖细胞和(或)干细胞中发现了发育不良,OCT4的过表达并不影响已分化的体细胞表型。Dox的撤退能够完全逆转肿瘤细胞的表型,再一次证明OCT4的过表达和肿瘤发生有关。2013年高绍荣等^[17]首次证明Tet1通过促进OCT4基因的去甲基化和激活而促进iPSC的诱导,并进一步证明Tet1可以取代外源OCT4实现安全高效的体细胞重编程,其Tet1、SOX2、KLF4和c-MYC(TSKM)的二次重编程体系为未来研究体细胞重编程的表观修饰机制提供了有效的研究手段,并且TSKM iPSC与ESC更接近的羟甲基化水平为降低iPSC的致癌性提供了新的转化研究方向。

SOX2是胚胎癌细胞中表达的一个SOX家族成员之一,也是胚胎发育早期多能性的标志基因。SOX2在内细胞团、外胚层和生殖细胞均有表达。在胚胎发生中,SOX基因表达呈现动态性和多样性的特点,SOX2调节干细胞的自我更新,也参与成体组织的发育包括大脑和脊椎的发育。近来研究发现,SOX2基因的过表达与鳞状细胞癌(比如肺癌和食管癌)发生有关。临床研究表明,SOX2的过表达与肿瘤的预后相关,以及能够增加肿瘤干细胞的扩增能力。

目前人的体细胞重编程为HiPSC需要外源基因的介入,而这些外源基因又与很多肿瘤的发生相关,而且外源基因的介入本身也可能会对基因组造成影响,因此,为了将来iPSC的临床应用,减少其致癌性,研究者们进行了探索,减少外源因子的介入或者使用重组蛋白质的方法,但是相应地会带来重编程效率低的问题,因此避免外源因子的介入,使人的体细胞成功重编程成为iPSC,还需要继续探索。

三、iPSC的基因稳定性和肿瘤发生

基因组不稳定性被认为在肿瘤的发生过程中起很大作用,在这个过程中,细胞不断积累突变,使其达到一个具有肿瘤特征的状态。病毒的整合和重编程因子的再激活并不是导致iPSC基因组改变的唯一因素,还有其他的一些因素可以导致iPSC基因组发生异常,比如,p53基因表达的下调,体细胞本身携带的基因突变;重编程过程中应激导致的基因突变;体外培养传代产生的适应性突变等。

p53是一种肿瘤抑制基因,可以通过阻滞细胞周期、促进细胞凋亡和维持基因组稳定性预防肿瘤形成。在体细胞重编程过程中,p53也具有十分重要的作用。研究表明,短暂的抑制p53的表达,可以提高体细胞的重编程效率^[18]。为了提高其重编程效率,敲除p53或者通过SV-40的表达减低p53的表达,结果会使部分iPSC基因组不稳定。近来研究表明,下调PUMA基因的表达也可以提高iPSC的重编程效率,而且可以减少具有异常染色体的iPSC产生,下调PUMA基因表达的作用机制是独立于p53信号通路的^[19]。

iPSC来源于体细胞,该体细胞经过多次细胞分裂,有足够时间获得基因突变。这些突变假设是随机的和稀少的,但是如果这些细胞由于突变导致具有扩增或者抗凋亡能力,在重编程过程中可能会被优先选择,且重编程效率很低的情况下,将导致具有基因突变的iPSC形成。不论使用什么重编程方法,重编程过程对于重编程的体细胞来说是一种应激,与应激有关的反应的信号通路将参与重编程过程,这是一个突变累积的过程。尽管大多数基因突变预计会被选择掉,也可能随着细胞的分裂而消失,但那些有利于细胞增殖的基因突变可能会留下。近来研究已经证实染色体异常可能来自起始的体细胞或者重编程应激^[20]。

与ESC一样,iPSC也需要在体外长时间培养,因此可能会导致染色体突变,有利于iPSC更好地适应体外培养环境。研究表明ESC的染色体异常改变并非随机的,最常见的为12号染色体(尤其是12p),17号染色体(主要是17q),20号染色体(时常是20q11.21)和X染色体的增多^[21]。有趣的是12、17和X染色体的增多是生殖细胞肿瘤和胚胎肿瘤的主要特征,并且20q11.21在多数肿瘤细胞中都有扩增^[22]。

值得注意的是在iPSC培养过程中适应性改变中并不是只有非整倍体发生。通过遗传学分析和点突变分析发现染色体一些小的片段也存在缺失或者增多。近来已有研究证明了iPSC的亚染色体增多或者缺失发生频率很高,缺失的区域时常包含肿瘤抑制基因,增多的区域时常包含原癌基因^[23]。因此这些微小区域的突变可能和iPSC的成瘤性相

关。例如,增加细胞增殖能力的点突变,会赋予该细胞抗凋亡能力和阻碍细胞的分化能力,可能会导致产生具有侵袭性的畸胎瘤。已证明抑癌基因的表达水平和畸胎瘤的生长有关^[24]。随着技术的进步,完整的基因组测序变得越来越方便,更多的异常突变会被发现,有利于确定染色体变异规律。iPSC的基因不稳定性的改变会限制其临床应用,因此为了减少基因组改变的发生率,应该对iPSC的培养进行严格控制,在临床应用前应该对其质量进行精确地检测。

四、致瘤性与临床应用

为了使iPSC的临床应用成为可能,首先需要解决的是iPSC的致瘤性问题。最近几年中研究者通过研究提出了3种策略降低其临床应用致瘤性风险:即终末端分化或者完全去除已分化细胞中残留的多能性细胞;干扰残留的多能干细胞中致肿瘤发生的基因以防止肿瘤形成;肿瘤监测和切除患者体内形成的肿瘤^[25]。

第一,据报告几百个多能干细胞就能够形成肿瘤^[26],因此iPSC最安全的临床应用的处理方法为诱导iPSC分化成目的细胞并且保证终末端分化细胞群的纯度达到100%,否则必须完全去除该细胞群体中不完全分化的细胞。为了这个目的,研究者做出了很多努力,进行了多种尝试,最具有代表性的是利用细胞毒性抗体去除未分化的多能干细胞^[27]。但是目前为止,利用此种方法并不能保证完全去除分化细胞群中的多能干细胞。

第二,基于目前产生纯度为100%的由iPSC而来的分化细胞的能力有限,另一种可选择的方法为干扰与畸胎瘤形成有关的基因,但是这种方法对于成体组织是没有作用的。据报道,Survivin是一个典型的原癌-胎儿基因,具有抗凋亡活性,广泛存在于未分化的ESC和其衍生的畸胎瘤体内。从遗传学角度和药理学角度来看,Survivin的敲除能够引起ESC的凋亡^[28]。因此如果发现更多与畸胎瘤形成相关的基因,并通过分子方法靶向处理是一个非常具有前途的方法来解决ESC和iPSC的成瘤性问题。

第三,尽管存在争议,但是针对多能性细胞的成瘤性,监测肿瘤形成并切除已形成肿瘤的处理方法已被提出。例如,将自杀基因导入到多能干细胞中,一旦形成肿瘤,即可使用特异性的药物安全移除肿瘤并且可以防止扩散^[29]。这种方法的提出虽然可以解决潜在的肿瘤,但是并不能预防肿瘤的形成,因此这些方法的提出注定是不足以成为优先选择的方法。

iPSC具有产生体细胞肿瘤的风险。因此干扰与畸胎瘤相关的基因并不能阻止体细胞肿瘤的发生。科学家们一直无法有效地将人的胚胎干细胞维持在它们的最原始干细胞状态,尽管iPSC能够分化为许多不同的细胞类型,它们还不是“始发态”干细胞。Gafni等^[30]通过研究小鼠胚胎干细胞的分化抑制机制,进而改变人的iPSC的培养条件,抑制iPSC的分化遗传信号通路,成功地获得了新的、原始的、多能状态的iPSC。这种iPSC更接近于人的受精卵状态,其基因组具有稳定性,应该会减低iPSC的致瘤性。

五、结语

近几年虽然诱导iPSC的技术取得了很大的进步,已经可以通过非整合或非病毒方法将体细胞重编程成iPSC,但目前最需要的是深入研究iPSC的重编程机制,并在这一基础上提出新的iPSC诱导方法和解决iPSC的成瘤性的方法。因为随着重编程技术逐渐成熟和接近临床应用,iPSC成瘤性的生物学研究也需要并驾齐驱以保证安全性。iPSC起始细胞来源于体细胞,与ESC相比,iPSC具有更广阔的临床应用前景。研究表明尽管iPSC功能类似于ESC,但是其致瘤性风险明显高于ESC。目前,研究者正在利用iPSC通过在体外分化获得有功能但没有致瘤性的目的细胞,并能移植到体内,这将是我們最期待的结果。尽管目前iPSC在血液疾病方面的应用还未见相关报道,但是近来日本理化研究所利用iPSC成功分化成视网膜细胞,并为6例眼部疾病患者移植了新的视网膜细胞,具体疗效目前还需观察,这是iPSC技术的首例临床应用。这也为iPSC技术走进临床提供了希望。

参考文献

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors[J]. Cell, 2006, 126(4):663-676.
- [2] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells[J]. Science, 2007, 318(5858):1917-1920.
- [3] Lewitzky M, Yamanaka S. Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors [J]. Curr Opin Biotechnol, 2007, 18(5):467-473.
- [4] Liu Y, Cheng H, Gao S, et al. Reprogramming of MLL- AF9 leukemia cells into pluripotent stem cells[J]. Leukemia, 2014, 28(5):1071-1080.
- [5] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells[J]. Nature, 2007, 448(7151):313-317.
- [6] Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, et al. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome[J]. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 2009, 85(8):348-362.
- [7] Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency[J]. Cell Stem Cell, 2011, 8(4):376-388.
- [8] Zhou H, Wu S, Joo JY, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins[J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(5):381-384.
- [9] Su RJ, Baylink DJ, Neises A, et al. Efficient generation of integration-free ips cells from human adult peripheral blood using BCL-XL together with Yamanaka factors[J]. PLoS One, 2013, 8(5):e64496.
- [10] Hou P, Li Y, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from

- mouse somatic cells by small-molecule compounds[J]. Science, 2013, 341(6146):651-654.
- [11] Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors[J]. Nat Genet, 2008, 40(5):499-507.
- [12] Chiou SH, Yu CC, Huang CY, et al. Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(13):4085-4095.
- [13] Pedersen MO, Gang AO, Poulsen TS, et al. MYC translocation partner gene determines survival of patients with large B-cell lymphoma with MYC- or double-hit MYC/BCL2 translocations[J]. Eur J Haematol, 2014, 92(1):42-48.
- [14] Jerabek S, Merino F, Scholer HR, et al. OCT4: dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1839(3):138-154.
- [15] Bernhardt M, Galach M, Novak D, et al. Mediators of induced pluripotency and their role in cancer cells - current scientific knowledge and future perspectives[J]. Biotechnol J, 2012, 7(6):810-821.
- [16] Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, et al. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues[J]. Cell, 2005, 121(3):465-477.
- [17] Gao Y, Chen J, Li K, et al. Replacement of Oct4 by Tet1 during iPSC induction reveals an important role of DNA methylation and hydroxymethylation in reprogramming[J]. Cell Stem Cell, 2013, 12(4):453-469.
- [18] Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, et al. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming[J]. Nature, 2009, 460(7259):1140-1144.
- [19] Li Y, Feng H, Gu H, et al. The p53-PUMA axis suppresses iPSC generation[J]. Nat Commun, 2013, 4:2174.
- [20] Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N, et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(4):521-531.
- [21] Spits C, Mateizel I, Geens M, et al. Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(12):1361-1363.
- [22] Lefort N, Feyeux M, Bas C, et al. Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21 [J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(12):1364-1366.
- [23] Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESC and iPSCs during reprogramming and time in culture[J]. Cell Stem Cell, 2011, 8(1):106-118.
- [24] Moriguchi H, Chung RT, Sato C. Tumorigenicity of human induced pluripotent stem cells depends on the balance of gene expression between p21 and p53 [J]. Hepatology, 2010, 51(3):1088-1089.
- [25] Blum B, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic stem cells[J]. Adv Cancer Res, 2008, 100:133-158.
- [26] Lee AS, Tang C, Cao F, et al. Effects of cell number on teratoma formation by human embryonic stem cells[J]. Cell Cycle, 2009, 8(16):2608-2612.
- [27] Tan HL, Fong WJ, Lee EH, et al. mAb 84, a cytotoxic antibody that kills undifferentiated human embryonic stem cells via oncosis[J]. Stem Cells, 2009, 27(8):1792-1801.
- [28] Blum B, Bar-Nur O, Golan-Lev T, et al. The anti-apoptotic gene survivin contributes to teratoma formation by human embryonic stem cells[J]. Nat Biotechnol, 2009, 27(3):281-287.
- [29] Korsgren O, Nilsson B. Improving islet transplantation: a road map for a widespread application for the cure of persons with type I diabetes [J]. Curr Opin Organ Transplant, 2009, 14(6):683-687.
- [30] Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, et al. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells [J]. Nature, 2013, 504(7479):282-286.

(收稿日期:2014-07-03)

(本文编辑:董文革)

·读者·作者·编者·

关于提供伦理委员会批准文件及受试对象知情同意书的通知

根据中华医学会杂志社的相关规定,当以人体为研究对象时,作者应该说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位、地区或国家)所制订的伦理学标准并提供该委员会的批准文件复印件,同时在正文中说明受试对象或其监护人是否知情同意。

本刊编辑部