یک نگاه تازه به سلول های iPS

پتانسیل سلول‌های بنیادی پرتوان القا شده (iPS) خیلی بالاست، اما قبل از اینکه کاربردهای پزشکی و دارویی آن‌ها بتوانند کاملا تحقق یابند، موانع زیادی وجود دارد.

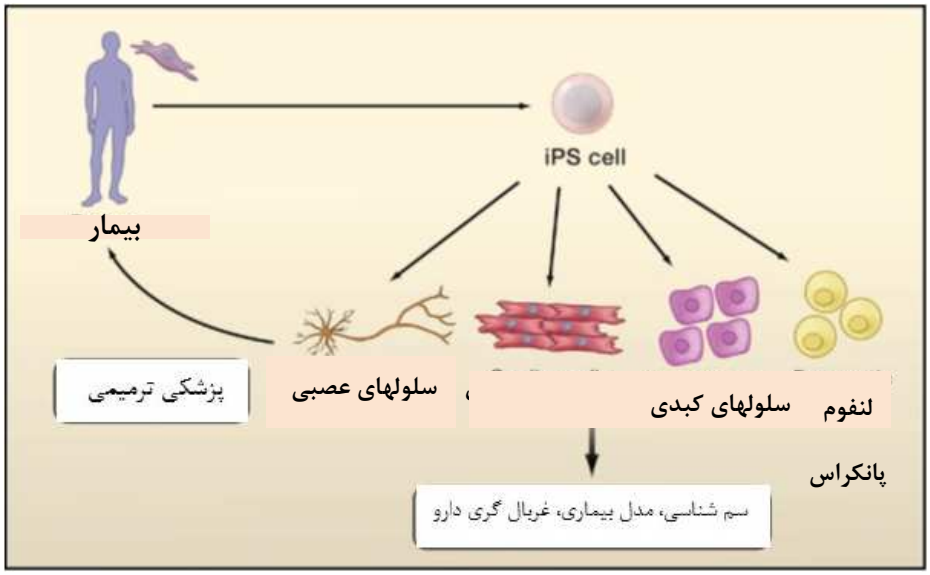
در سال ۲۰۰۶، ما نشان دادیم که بعداز وارد کردن ژن‌های کد کننده‌ی ۴ فاکتور رونویسی Oct3/4، Sox2، Kif4 و c-Myc توسط ویروس‌ها به درون فیبروبلاست‌های موشی بالغ و جنینی، آن‌ها ویژگی‌هایی را کسب می-کنند که مشابه با ویژگی‌های سلول‌های بنیادی جنینی (ES) است (تاکاشاکی و یاماناکا ۲۰۰۶). ما این سلول‌ها را سلول‌های بنیادی القا شده‌ی پرتوان نامیدیم (iPS). اولین نسل سلول‌های iPS از نظر مورفولوژی، تکثیر، بیان برخی ژن‌های مارکر سلول‌های ES و تشکیل تراتوما، مشابه با سلول‌های ES بودند. به هرحال، این سلول‌های iPS یک الگوی بیان ژن کلی متفاوتی نسبت به سلول‌های ES داشتند و در ایجاد موش کایمری بالغ شکست خورده بودند. در سال ۲۰۰۷، انتقال سلول‌های زاینده (ژرم لاین) با سلول‌های iPS موشی ممکن شد (میسنر و همکارانش ۲۰۰۷؛ اوکیتا و همکارانش ۲۰۰۷؛ ورینگ و همکارانش ۲۰۰۷) و سلول‌های iPS از فیبروبلاست‌های انسانی تولید شدند (پارک و همکارانش ۲۰۰۸b؛ تاکاشاکی و همکارانش ۲۰۰۷؛ یو و همکارانش ۲۰۰۷).

سپس ۴ گروه، سلول‌های iPS را از بیمارانی که بیماری‌های نورودژنرتیو مختلف، از جمله اسکلروز جانبی آمیوتروفیک (ALS) (دیموس و همکارانش ۲۰۰۸)، آتروفی عضلانی نخاعی (SMA) (ابرت و همکارانش ۲۰۰۹) و بیماری پارکینسون (سولدنر و همکارانش ۲۰۰۹) و یک طیفی از بیماری‌های ژنتیکی با توارث مندلی یا کمپلکس داشتند، تولید کردند (پارک و همکارانش ۲۰۰۸a). مهم‌تر اینکه، پاتولوژی SMA در نورون‌های حرکتی مشتق از سلول‌های iPS اختصاصی بیمار، طی چند نسل تکرار شده بود (ابرت و همکارانش ۲۰۰۹). بعلاوه، سلول‌های iPS از میمون (لیو و همکارانش ۲۰۰۸) و رت (لیائو و همکارانش ۲۰۰۹) نیز تولید شده‌اند. اینجا، من کاربردهای بالقوه‌ی تکنولوژی سلول‌های iPS برای انتقال دارو و پزشکی و چالش‌هایی که سر راه محقق شدن این کاربردها وجود دارند را به طور خلاصه بیان کرده‌ام (شکل ۱). من باور دارم که یکی از مهم‌ترین چالش‌هایی که وجود دارد

این است که روش‌های ساده و حساس و منطقی برای ارزیابی تاثیر و ایمنی میلیاردها کلون سلول‌های iPS و ساب کلون‌های تولید شده توسط تعداد زیاد تکنولوژی‌های مختلف وجود ندارد.

کاربردهای درازمدت و چالش‌ها

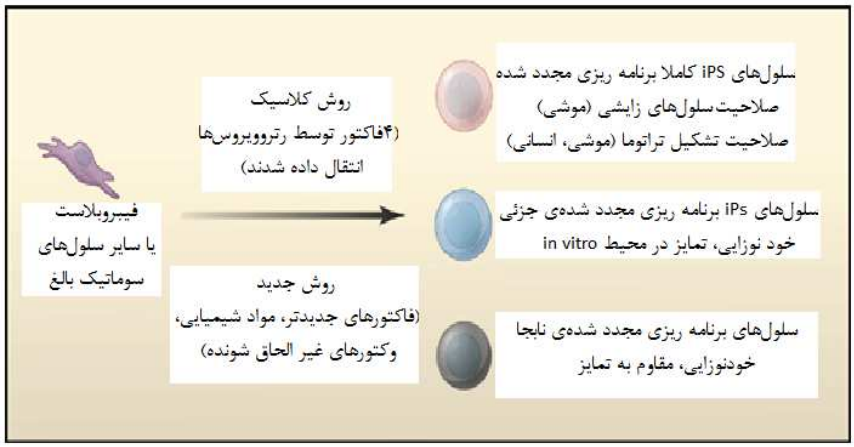
انواع مختلف سلول‌های سوماتیک مشتق از سلول‌های بنیادی پرتوان می‌توانند در پزشکی ترمیمی برای ترمیم بافت‌های آسیب دیده از طریق بیماری یا جراحت مورد استفاده قرار بگیرند. اثرات درمانی دودمان مشتق از سلول‌های ES انسانی در مدل‌های حیوانی مبتلا به آسیب دیدگی نخاعی (کیرستید و همکارانش ۲۰۰۵)، بیماری‌های شبکیه‌ای (لامبا و همکارانش ۲۰۰۹) و بیماری پارکینسون (یانگ و همکارانش ۲۰۰۸) گزارش شده‌اند. در ژانویه‌ی ۲۰۰۹، سازمان غذا و داروی US (FDA) اولین کارآزمایی بالینی برای استفاده از سلول‌های ES انسانی برای درمان بیماران مبتلا به آسیب دیدگی طناب نخاعی را تایید کرد.



شکل ۱. کاربردهای تکنولوژی سلول iPS

سلول‌های iPS مشتق از بیماران می‌توانند سلول‌های سوماتیک مختلف با اطلاعات ژنتیکی مشابه فرد بیمار را تولید کنند. این سلول‌ها می‌توانند برای ساخت مدل‌های بیماری و برای غربال گری داروهای موثر و ایمن و همچنین برای درمان بیماران از طریق پیوند سلول مورد استفاده قرار بگیرند. بانک سلول‌های iPS از انواع مختلف HLA می‌تواند برای پزشکی ترمیمی مفید باشد.

تکنولوژی سلول iPS به صورت بالقوه می‌تواند بر دو مانع مهم مرتبط با سلول‌های ES انسانی از جمله: پس زدن ایمنی بعداز پیوند و نگرانی‌های اخلاقی در مورد استفاده از جنین‌های انسانی غلبه کند. به هرحال، کاربردهای بالینی سلول‌های iPS نیز با موانع زیادی مواجه است، که برخی از آن‌ها با سلول‌های ES مشترک هستند و برخی دیگر منحصر به فرد هستند. اولین مانع مشترک، تشکیل تراتوماست (لی و همکارانش ۲۰۰۸). حتی یک تعداد کمی از سلول‌های تمایز نیافته می‌توانند منجر به تشکیل تراتوما شوند (تورمورهای سلول‌های جنینی که دارای چندین نوع سلول هستند) بنابراین یک هدف کلیدی، القا تمایز سلول‌های ES انسانی یا سلول‌های iPS به انواع سلولی مورد نیاز و در عین حال باقی گذاشتن تعداد کمی از سلول‌های تمایز نیافته است. آیا سلول‌های تمایز یافته‌ی نهایی یا سلول‌های اجدادی / بنیادی بافت مشتق از سلول‌های iPS باید مورد استفاده قرار بگیرند و آن‌ها چطور باید پیوند زده شوند؟



شکل ۲. راه‌های جدید و قدیم برای تولید سلول‌های iPS.

صرف‌نظر از روش شناسی، برنامه ریزی مجدد مستقیم می‌تواند منجر به ایجاد سلول‌های iPS، که به طور کامل برنامه ریزی مجدد شده‌اند و قابل مقایسه با سلول‌های ES هستند، همچنین می‌تواند منجر به ایجاد سلول‌های iPS که به صورت جزئی برنامه ریزی مجدد شده‌اند شود که می‌توانند خود نوزا باشند و به برخی از دودمان‌های سلولی معین تمایز پیدا کنند یا اینکه منجر به ایجاد سلول‌های برنامه ریزی شده‌ی مجدد نابجا شوند که می-توانند خودنوزا باشند اما نسبت به تمایز مقاوم هستند.

قبل از اینکه سلول‌های iPS بتوانند به صورت بالینی مورد استفاده قرار بگیرند، موانع منحصر به فردی وجود دارند که باید بر آن‌ها غلبه کرد که در وهله‌ی اول با برنامه ریزی مجدد اجباری سلول‌های سوماتیک مرتبط هستند. ما هنوز نمی‌دانیم که برای هر کلون سلول iPS آیا برنامه ریزی مجدد هسته‌ای کامل انجام شده است یا نه (شکل ۲). برنامه ریزی مجدد نابجا ممکن است منجر به ایجاد توانایی معیوب برای تمایز شود و ممکن است ریسک تشکیل تراتومای ناکامل (رشدنیافته)، بعداز تمایز جهت دار را افزایش دهد. به ویژه، بیان غیرطبیعی یک ژن منفرد (مانند Nat1, Grb2، Apc یا Nanog) به سلول‌های ES مقاومت نسبت به تمایز را اعطا می‌کند (یاماناکا و همکارانش ۲۰۰۰). بنابراین، برنامه ریزی مجدد ناکامل سلول‌های سوماتیک به سلول‌های iPS می‌تواند منجر به تمایز معیوب سلول‌های iPS به انواع سلولی موردنیاز شود.

یک موضوع کلیدی دیگر، حضور ترانس ژن‌ها در سلول‌های iPS است. بیشتر سلول‌های iPS از طریق انتقال سلول‌های سوماتیک توسط رتروویروس‌ها یا لنتی ویروس‌های حامل ترانس ژن‌ها که به درون ژنوم سلول میزبان الحاق می‌شوند، ایجاد می‌شوند. ترانس ژن‌ها به مقدار زیادی در سلول‌های iPS خاموش می‌شوند اما فعال سازی مجدد چنین ترانس ژن‌هایی (به ویژه ترانس ژن‌های کدکننده‌ی c-Myc) می‌تواند منجر به تومورزایی شود (اوکیتا و همکارانش ۲۰۰۷). بیان نشت کننده‌ی این ترانس ژن‌ها ممکن است تمایز و بلوغ کامل سلول iPS را مهار کند که منجر به ایجاد ریسک بالاتر تشکیل تراتومای ناکامل (رشدنیافته) می‌شود.

کاربردهای کوتاه مدت و چالش‌ها

یک هدف کوتاه مدت، استفاده از تکنولوژی سلول iPS برای غربال دارویی یا سم شناسی در محیط in vitro و ایجاد مدل‌های بیماری در محیط کشت می‌باشد (شکل ۱). سلول‌های کبدی (هپاتوسیت‌ها) ایجاد شده از سلول-های iPS مشتق از افرادی که آنزیم‌های مختلف سیتوکروم p450 دارند می‌تواند برای پیش گویی سمیت کبدی داروهای جدید ارزشمند باشد. اختلال سندرم QT بلند (LQTS) توسط موتاسیون در ژن‌های درگیر در ایجاد پتانسیل‌های عملکرد قلبی ایجاد می‌شود که می‌تواند موجب آریتمی‌های کشنده شوند. LQTS می‌تواند توسط برخی داروها در برخی افراد حساس نیز ایجاد شود. با ایجاد میوسیت‌های قلبی ضربان دار از سلول‌های iPS به دست آمده از این افراد حساس، داروهای کاندیدا می‌توانند در محیط in vitro تست شوند.

ایجاد مدل‌های بیماری در محیط in vitro با استفاده از تکنولوژی سلول‌های iPs نه تنها برای غربال دارو بلکه همچنین برای شفاف سازی مکانیسم‌های پاتوژنز بیماری نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند. یک بخش کوچکی از بیمارانی که شکل خانوادگی از بیماری‌های نورودژنرتیو ALS دارند و حامل موتاسیون‌هایی در ژن SOD هستند و موش ترانس ژن حامل ژن جهش یافته‌ی SOD انسانی می‌تواند برای مطالعه‌ی پاتوژنز ALS مورد استفاده قرار بگیرد. اخیرا، دیموس و همکارانش (۲۰۰۸) سلول‌های iPS را از یک بیماری که از ALS خانوادگی رنج می‌برد تولید کردند و نورون‌های حرکتی را از سلول‌های iPS به دست آوردند و یک منبع in vitro منحصربه فرد را برای توضیح اینکه چرا نورون‌های حرکتی در بیماران ALS دچار مرگ می‌شوند، ارائه کردند. پارک و همکاارنش (۲۰۰۸a) سلول‌های iPS را از بیمارانی با بیماری‌های مختلف از جمله بیماری پارکینسون و دیابت جوانان تولید کردند و ابرت و همکارانش (۲۰۰۹) کار مشابهی را برای بیماران SMA انجام دادند. یک چالش مهم این است که چطور بیماری را در سلول‌های مشتق از سلول‌های iPS اختصاصی بیمار در طی چند نسل تکرار کنیم. در بیماری‌های با توارث ژنتیکی که با درصد ژنتیکی بالا و آغاز زودهنگام به ارث می‌رسند، برخی پاتولوژی‌ها ممکن است آسان‌تر مدل سازی شوند. در واقع، نورون‌های حرکتی ایجاد شده از سلول‌های iPS مشتق از یک بیمار SMA، در مقایسه با آن‌هایی که از سلول‌های iPS مشتق از بیمارانی با مادر سالم ایجاد شده بودند، نقایص انتخابی را نشان داده بودند. اما در بسیاری از بیماری‌های نورودژنرتیو مانند ALS، سال‌ها طول می‌کشد تا علائم ایجاد شوند. ما باید راه‌هایی را برای تسهیل پاتوژنز (بیماری زایی) بیماری در سلول‌های iPS اختصاصی بیمار و برای تقلید تغییرات اپی ژنتیکی ایجاد شده توسط پیری و محیط پیدا کنیم. برخی انواع تحریک مانند تنش اکسیداتیو یا تابش UV ممکن است مورد نیاز باشد.

یک موضوع مهم دیگر این است که بسیاری از بیماری‌ها ممکن است غیراتونوم باشند، که قابل نسبت به بیشتر از یک نوع سلول هستند. برای مثال، نورون‌های حرکتی که از سلول‌های iPS اختصاصی بیماران ALS مشتق شده-اند ممکن است قادر به ایجاد مجدد پاتوژنز بیماری نباشند چون آن‌ها ممکن است نیاز به فعل و انفعال با سلول-های گلیال داشته باشند (دی جورجیو و همکارانش ۲۰۰۷). بنابراین، ممکن است لازم باشد که چندین نوع سلول از سلول‌های iPS اختصاصی بیمار تولید شوند. بعلاوه، ممکن است لازم باشد که نورون‌های حرکتی مشتق از سلول‌های iPS اختصاصی بیماران ALS به درون موش پیوند شوند تا یک مدل بیماری موثر را ایجاد کنند.

پیش گویی‌هایی برای آینده

پتانسیل تکنولوژی سلول iPS خیلی زیاد است اما این تکنولوژی هنوز در ابتدای راه است. برای درک کاربرد کامل سلول‌های iPS، بهبود روش شناسی برای تولید سلول iPS و برای ارزیابی دقیق ایمنی و اثربخشی هر کلون و ساب کلون از سلول‌های iPS ضروری خواهد بود. اینجا، من در مورد تکنولوژی‌های نوظهور برای برنامه ریزی مجدد مستقیم سلول‌های سوماتیک به سلول‌های iPS بحث می‌کنم.

از ۲۴ تا ۰؟

چند ژن برای ساخت سلول‌های iPS مورد نیاز است؟ اولین رده‌ی سلول iPS توسط انتقال همزمان با ویروس‌های بیان کننده‌ی ۲۴ عامل مختلف تولید شده بود (تاکاشاکی و یاماناکا ۲۰۰۶). آزمایش‌های بعدی، عوامل موردنیاز را به ۴ فاکتور زیر تقلیل دادند: Oct3/4، Sox2، Kif4 و c-Myc (تاکاشاکی و یاماناکا ۲۰۰۶)، تایید شده است که Oct3/4 مهم‌ترین این فاکتورهاست. بیان Oct3/4 به مقدار زیادی برای سلول‌های بنیادی پرتوان اختصاصی است، در حالی که سه فاکتور دیگر در سلول‌های دیگر نیز بیان می‌شوند (Sox2 در سلول‌های بنیادی عصبی و سلول‌های اجدادی؛ Kif4 در پوست، معده، روده و عضلات اسکلتی؛ c-Myc در همه جا بیان می‌شوند). بعلاوه، برای تولید سلول‌های iPS، Oct3/4 نمی‌تواند با سایر اعضا خانواده‌ی Oct (Oct1 یا Oct6) جایگزین شود (ناکاگاوا و همکارانش ۲۰۰۸). در مقابل، Sox2 می‌تواند با Sox1، Kif4 با Kif2 یا Kif5 و c-Myc با N-Myc یا L-Myc جایگزین شود. Oct3/4 قطعا برای حفظ پرتوانی سلول‌های ES مورد نیاز است (نیوا و همکارانش ۲۰۰۰). غیرفعال کردن Sox2 منجر به تمایز سلول‌های ES می‌شود اما بیان اجباری Oct3/4، این فنوتیپ را رها می‌سازد (ماسویی و همکارانش ۲۰۰۷). موش‌هایی که فاقد Kif4 یا c-Myc هستند تا زمان تولد زنده می‌مانند، که نشان می‌دهد که سایر فاکتورها حفظ پرتوانی را جبران می‌کنند. این یافته‌ها استدلال می‌کنند که Sox2، Kif4 و c-Myc اساسا برای تولید سلول‌های iPS ضروری نیستند.

کیم و همکارانش (۲۰۰۹)، با استفاده از Oct3/4 به تنهایی، سلول‌های iPS را از سلول‌های بنیادی عصبی موش بالغ تولید کردند. آن‌ها Oct3/4 را در سلول‌های بنیادی عصبی بیان کردند و ۳ کلون سلولی iPS را به دست آوردند که دو کلون موش کایمری بالغ، ولو با یک سهم کمی از سلول‌های iPS که توسط رنگ پوشش تشخیص

داده می‌شدند، ایجاد می‌کرد. مطالعات بیشتری برای تعیین اینکه آیا سلول‌های iPS می‌توانند از سایر سلول‌های موشی و سلول‌های انسانی با استفاده از Oct3/4 به تنهایی ایجاد شوند یا نه مورد نیاز است.

ویروس؟ پلاسمید؟ مولکول‌های کوچک؟

کدام روش برنامه ریزی مجدد، برای کاربردهای بالینی آینده مناسب‌تر از بقیه است؟ بسیاری از گروه‌ها iPS های انسانی یا موشی را با استفاده از رتروویروس‌ها و لنتی ویروس‌ها تولید کرده‌اند. سلول‌های iPS ایجاد شده دارای چندین مکان الحاق ویروس در ژنوم خودشان هستند. در طی تولید سلول iPS، پرووِیروس‌های الحاق شده خاموش می‌شوند و در واقع ژن‌های درون زاد کد کننده‌ی ۴ فاکتور فعال می‌شوند. کاربرد رتروویروس‌ها یا لنتی ویروس‌ها، مشکلات ایمنی برای سلول‌های iPS تولید شده در این مسیر را افزایش می‌دهند. الحاق ویروسی، اغلب درون ژن‌های درون زاد رخ می‌دهد و می‌تواند منجر به فعال شدن ژن شود. زمانی که بیماران دارای نقص ایمنی ترکیبی شدید پیوسته به X با استفاده از رتروویروس‌ها با ژن درمانی درمان شده بودند، فعال سازی پروتو انکوژن‌های LMO2 منجر به ایجاد لوسمی شده بود (هاسین – بی – آبینا و همکارانش ۲۰۰۳). به هرحال، در کلون‌های سلول iPS، مکان‌های الحاق ویروسی می‌توانند توسط PCR معکوس، که مستثنی کردن کلون‌های نشان دهنده‌ی الحاق رتروویروسی خطرناک را ممکن می‌سازد، تعیین شوند. هر کلون سلول iPS ممکن است تا ۴۰ مکان الحاق رتروویروسی داشته باشد اما این مکان‌ها می‌توانند به صورت موثری توسط توالی یابی کل ژنوم با روش‌های با کارایی بالا شناسایی شوند.

یک مانع احتمالی دیگر برای استفاده از رتروویروس‌ها و لنتی ویروس‌ها، فعال سازی مجدد ترنس ژن‌ها می‌باشد. در واقع، فعال سازی مجدد c-Myc که توسط یک رتروویروس انجام شده بود موجب تشکیل تومور، در حدود ۵۰٪ از موش‌های کایمری ایجاد شده از سلول‌های iPS شده بود (اوکیتا و همکارانش ۲۰۰۷). اگرچه سلول‌های iPS می‌توانند بدون c-Myc تولید شوند (ناکاگاوا و همکارانش ۲۰۰۸؛ ورنیگ و همکارانش ۲۰۰۸)، اما فعال سازی مجدد سه فاکتور برنامه ریزی مجدد دیگر نیز ممکن است موجب ایجاد تومور شود. بعلاوه، بیان پایدار ترنس ژن‌ها ممکن است تمایز سلول‌های iPS را مهار کند در نتیجه زمانی که درون بیمار پیوند زده می‌شود، منجر به ایجاد گرایش بالاتری برای تولید تراتوما می‌شود.

دو گروه نشان داده‌اند که القا سلول‌های iPS بدون الحاق ویروسی امکان پذیر است. استدفلد و همکارانش (۲۰۰۸b) سلول‌های iPS را از هپاتوسیت‌های موشی با استفاده از آدنوویروس‌هاس حمل کننده‌ی ۴ فاکتور برنامه ریزی مجدد تولید کردند. در یک مطالعه‌ی مستقل، گروه ما سلول‌های iPS را از فیبروبلاست‌های جنینی موشی با استفاده از پلاسمیدها تولید کرده است (اوکیتا و همکارانش ۲۰۰۸). ما از توالی‌های خود برش خوردنده 2A برای بیان Oct3/4، Sox2، و Kif4 در یک وکتور تک بیانی استفاده کردیم. آلودگی‌های مکرر فیبروبلاست‌های جنینی موشی با این پلاسمید و یک حامل دیگر c-Myc cDNA، تولید سلول‌های iPS را امکان پذیر می‌کند. بسیاری از این سلول‌های iPS تولید شده توسط پلاسمید، توسط PCR یا ساترن بلات هیچ الحاقی به درون ژنوم میزبان نشان ندادند. اخیرا، سلول‌های iPS توسط الحاق ژنومی ۴ فاکتور برنامه ریزی کننده‌ی مجدد با استفاده از پلاسمیدها (کاجی و همکاارنش ۲۰۰۹)، لنتی ویروس‌ها (سولدنر و همکارانش ۲۰۰۹) یا ترنسپوزون‌ها (ولتژن و همکارانش ۲۰۰۹)، تولید شدند، که این فرایند توسط حذف ترنس ژن با استفاده از برش میانجی گری شده با Cre یا بیان مجدد ترنسپوزون‌ها دنبال شد. تاثیر تولید سلول iPS با استفاده از آدنوویروس‌ها یا پلاسمیدها به شدت پایین است. یک راه دیگر برای اجتناب از الحاق ویروسی، تولید سلول‌های iPS با استفاده از مواد شیمیایی یا مولکول‌های کوچک است. چندین گروه، قبلا مواد شیمیایی که می‌توانند در طی تولید سلول iPS، جایگزین یک یا دو فاکتور برنامه ریزی مجدد کننده شوند را شناسایی کرده-اند (هونگفو و همکارانش ۲۰۰۸؛ شی و همکارانش ۲۰۰۸). با در نظر گرفتن نقش‌های اساسی Oct3/4، مواد شیمیایی که بتوانند با قدرت، ژن Oct3/4 درون زاد را فعال کنند ممکن است قادر به تولید سلول‌های iPS باشند. حتی اگر سلول‌های iPS الحاق ترنس ژن را نشان ندهند، آن‌ها ممکن است سایر تغییرات ژنتیکی مانند الحاق قطعات پلاسمیدی کوچک یا جهش‌های القا شده‌ی شیمیایی را داشته باشند. توالی یابی کل ژنوم کلون-های سلول iPS با استفاده از تکنولوژی‌های نسل آینده به منظور شناسایی این تغییرات ژنتیکی ضروری است.

فیبروبلاست‌ها؟ هپاتوسیت‌ها؟ سلول‌های خونی؟

کدام سلول‌های سوماتیک، بهترین منبع برای سلول‌های iPS انتخاب شده برای کاربردهای بالینی و دارویی هستند؟ علاوه بر فیبروبلاست‌ها، سلول‌های iPS موشی گرفته شده از سلول‌های مغز استخوان (تاکاشاکی و یاماناکا ۲۰۰۶)، هپاتوسیت‌ها و سلول‌های اپی تلیالی معدی (آئوی و همکارانش ۲۰۰۸)، سلول‌های پانکراسی

(استدفلد و همکارانش ۲۰۰۸a)، سلول‌های بنیادی عصبی (کیم و همکارانش ۲۰۰۸؛ سیلوا و همکارانش ۲۰۰۸) و لنفوسیت‌های B (هانا و همکارانش ۲۰۰۸) نیز تولید شده‌اند. سلول‌های iPS انسانی از فیبروبلاست‌های پوستی، کراتینوسایت‌ها (آسن و همکارانش ۲۰۰۸)، و سلول‌های اجدادی خونی (لوح و همکارانش ۲۰۰۹) تولید شده‌اند.

اولین مساله، گرفتن سلول‌های سوماتیک از دهنده‌ها، به روش ساده و ایمن می‌باشد. سلول‌هایی مانند لوکوسیت-ها این معیار را دارند همانند کاری که سلول‌های اپی تلیالی گرفته شده از مخاط دهان انجام می‌دهند. تولید سلول‌های iPS از سلول‌های فولیکول یک تار موی انسان نیز گزارش شده است (اسن و همکارانش ۲۰۰۸). فیبروبلاست‌های پوستی و کراتینوسایت‌ها می‌توانند با استفاده از یک بیوپسی پوستی کوچک، سلول‌های اپی تلیال معدی توسط بیوپسی اندوسکوپی و سلول‌های مغز استخوان و هپاتوسیت‌ها توسط بیوپسی با سوزن، به دست بیایند. زمانی که بیماران تحت جراحی قرار می‌گیرند بافت نیز می‌تواند به دست بیاید (گرفته شود). سایر منابع، شامل بانک‌های سلولی مانند بانک سلول خون بند ناف هستند؛ اگر سلول‌های iPS بتوانند از سلول‌های خون بند ناف تولید شوند، آن می‌تواند خیلی مفید باشد.

دومین مساله این است که سلول‌های iPS به دست آمده از منشاهای متفاوت ممکن است گرایش‌های مختلفی نسبت به تمایز داشته باشند. برخی انواع سلولی ممکن است برای برنامه ریزی مجدد کامل، بهتر باشند و ریسک کمتری برای تشکیل تراتوما داشته باشند. تولید سلول‌های بتا پانکراسی و هپاتوسیت‌های به دست آمده از سلول-های iPS مشتق از سلول‌های سوماتیک با منشا اندودرمی مانند سلول‌های اپی تلیالی معدی ممکن است آسان‌تر باشد. به طرز قابل توجهی، سلول‌های iPS مشتق از هپاتوسیت‌های موشی (اوی و همکارانش ۲۰۰۸) یا کراتینوسیت‌های انسانی (آسن و همکارانش ۲۰۰۸) مکان‌های الحاق رتروویروسی کمتری نسبت به سلول‌های iPS مشتق از فیبروبلاست‌ها دارند. این سلول‌ها ممکن است یک منبع بهتری برای تولید سلول‌های iPS باشند؛ سلول‌های iPS با استفاده از وکتورهای آدنوویروسی، از هپاتوسیت‌های موشی نیز تولید شده‌اند (استدفلد و همکارانش ۲۰۰۸b).

سلول‌های بنیادی سوماتیک القا شده / سلول‌های اجدادی؟

توانایی برای تشکیل تراتوما یک مشخصه از سلول‌های بنیادی پرتوان از جمله سلول‌های ES و سلول‌های iPS است. سلول‌های بنیادی سوماتیک مانند سلول‌های بنیادی خون ساز و سلول‌های بنیادی مزانشیمی، تراتوما ایجاد

نمی‌کنند. بنابراین، اگر ما بتوانیم سلول‌های بنیادی سوماتیک یا سلول‌های اجدادی را مستقیما از فیبروبلاست‌ها یا سایر انواع سلول‌های سوماتیک تولید کنیم، آن ممکن است لزوم به دست آوردن سلول‌های iPS را کاهش دهد و بنابراین می‌تواند ریسک تشکیل تراتوما را از بین ببرد. با توجه به اینکه فقط یک تعداد کمی از فاکتورها برای ساخت سلول‌های iPS مورد نیاز هستند، شاید یک تعداد کمی از فاکتورهای رونویسی و سایر پروتئین‌ها، همه‌ی آن چیزی باشند که برای تولید سلول‌های بنیادی سوماتیک یا سلول‌های اجدادی مورد نیاز هستند. از سوی دیگر، تمایز ترنس یک سلول سوماتیک بالغ به یک سلول دیگر ممکن است هدف نهایی باشد. زو و همکارانش (۲۰۰۸) ۳ فاکتور رونویسی (Ngn3,Pdx1, Mafa) را شناسایی کردند که سلول‌های اگزوکرینی تمایز یافته‌ی پانکراسی موش بالغ را به سلول‌هایی برنامه ریزی مجدد می‌کند که از نظر اندازه، مورفولوژی، بیان ژن و ترشح انسولین شبیه سلول‌های پانکراسی بتا هستند. این تکنولوژی‌های جدید ممکن است جایگزین تکنولوژی‌های موجود برای تولید سلول‌های iPS و سلول‌های ES برای استفاده در پزشکی ترمیمی شوند.

ارزیابی

این خیلی مهم است که معیار مشابهی در بین آزمایشگاه‌های مختلف برای ارزیابی تکنولوژی‌های تولید iPS وجود داشته باشد. معیار استاندارد برای ارزیابی سلول‌های ES موشی، توانایی آن‌ها برای تولید کایمرهای موشی بالغ دارای صلاحیت سلول‌های زاینده است. تشکیل تراتوما، حداقل چیز مورد نیاز برای ارزیابی رده‌های سلول ES انسانی در نظر گرفته می‌شود. اینکه کدام معیار مشابه باید برای ارزیابی سلول‌های iPS مورد استفاده قرار بگیرد، بحث برانگیز است (دالی و همکاارنش ۲۰۰۹؛ الیس و همکارانش ۲۰۰۹). من تمایل دارم پیشنهاد کنم که این دو گروه از تکنولوژی‌ها باید از هم متمایز شوند و با استفاده از معیارهای مجزایی ارزیابی شوند. در یک گروه، هدف، تکرار برنامه ریزی مجدد کامل اطلاعات هسته‌ای است که توسط انتقال هسته یا فیوژن با سلول‌های ES به دست می‌آید. در این مورد، سلول‌های بنیادی موشی ایجاد شده باید برای تشکیل کایمر و انتقال سلول‌های زاینده با هم رقابت کنند. سلول‌های بنیادی انسانی مانند سلول‌های ES انسانی تراتوما شکل می‌دهند. به هرحال، ما ملاحظه کردیم که تشکیل تراتوما، برنامه ریزی مجدد کامل را تضمین نمی‌کند چون بسیاری از رده‌های سلولی شبیه سلول ES، تراتوما را شکل می‌دهند اما برای تولید کایمرهای رده‌ی زاینده شکست می‌خورند. در حال حاضر، اثبات برنامه ریزی مجدد کامل در سلول‌های انسانی مشکل است.

در گروه دوم تکنولوژی‌ها، هدف، تولید سلول‌های بنیادی یا سلول‌های اجدادی مفید برای انتقال دارو، سم شناسی و پزشکی ترمیمی و ساخت مدل‌های بیماری است. در این مورد، سلول‌های ایجاد شده، تا زمانی که بتوانند خودشان را بازسازی کنند و دودمان مفیدی را تولید کنند، لازم نیست که صلاحیت سلول‌های زاینده یا حتی صلاحیت تشکیل تراتوما را داشته باشند. در واقع، سلول‌هایی که توانایی تشکیل تراتوماها را ندارند ممکن است برای پزشکی ترمیمی مفیدتر و بی خطرتر باشند.

در هر دو مورد، تکنولوژی‌های جدید باید توسط تشکیل کایمر و انتقال رده‌ی زایند (موشی) و تشکیل تراتوما (موشی و انسانی)، علاوه بر معیارهای استاندارد دیگر مانند مورفولوژی، بیان مارکر، بیان ژن و تمایز in vitro ارزیابی شوند. دانشمندان سپس باید تعیین کنند که آیا تکنولوژی جدید آن‌ها، برنامه ریزی مجدد کامل یا برنامه ریزی مجدد جزئی را به گونه‌ای فراهم می‌کند که بتواند سلول‌های بنیادی یا سلول‌های اجدادی مفیدی را ایجاد کند یا نه. انتشارات اولیه‌ای که برنامه ریزی مجدد کامل را گزارش کرده‌اند باید به منظور ارزیابی ایمنی تکنولوژی، توسط مشاهدات بلند مدت موش کایمری و دودمان آن‌ها مورد بررسی قرار بگیرند. برای برنامه ریزی مجدد ناقص (ناکامل)، بررسی انتقال سلول زاینده و تشکیل تراتوما ممکن است یک نیاز مطلق برای انتشار اولیه نباشد اما باید بعدا به عنوان یک روش علمی درست مورد بررسی قرار بگیرد و گزارش شود.

یک مزیت کلیدی از تکنولوژی سلول‌های iPS، سادگی آن است؛ سلول‌های iPS می‌توانند در هر آزمایشگاهی با استفاده از تکنیک‌ها و تجهیزات استاندارد تولید شوند. هر آزمایشی، تعداد زیادی کلون سلولی iPS تولید می‌کند (یک مزیتی که نسبت به سایر تکنولوژی‌های سلول بنیادی دارد) با این حال بهترین کلون‌های سلولی iPS باید از بین نامزدهای فراوان انتخاب شوند. در موش، سیستم‌های گزارشگر با استفاده از ژن‌های اختصاصی سلول ES مانند Oct3/4 و نانونگ، برای تشخیص کلون‌های مناسب سلول‌های زاینده مفید هستند (میسنر و همکارانش ۲۰۷؛ اوکیتا و همکارانش ۲۰۰۷؛ ورینگ و همکارانش ۲۰۰۷)؛ سیستم‌های گزارشگر مشابهی ممکن است برای سلول‌های انسانی مورد نیاز باشند. به هرحال، حتی در بین کلون‌هایی که با استفاده از سیستم‌های گزارشگر انتخاب شده بودند، ما شاهد یک تفاوت اساسی هستیم. برای درک کاربرد کامل سلول‌های iPS ما باید تکنولوژی‌هایی را گسترش دهیم که قادر به انتخاب بهترین کلون‌ها باشند.

زمان ارزیابی سلول‌ها، ما باید درک کنیم که سلول‌های iPS، حتی درون هر کلون، یکسان (یک ریخت) نیستند. بعداز الحاق رتروویروسی، قبل از اینکه برنامه ریزی مجدد کامل حاصل شود، بیشتر از ۱۰ روز طول می‌کشد. یک سلول اجدادی منفرد منتقل شده در طی این دوره‌ی آغازین، تحت چندین تقسیم سلولی قرار می‌گیرد و سلول-های دودمان آن باوجودی که منشا مشابهی دارند، ممکن است در وضعیت برنامه ریزی مجدد خودشان متفاوت باشند. حتی اگر فقط یک تعداد کمی از سلول‌ها به صورت نابجا برنامه ریزی مجدد شده باشند و نسبت به تمایز مقاومت کنند، آن سلول‌ها می‌توانند بعداز پیوند (ایمپلنت) به بیماران منجر به تشکیل تراتومای ناکامل (رشدنیافته) شوند. توسعه‌ی روش‌هایی برای تشخیص و حذف چنین جمعیت‌های سلولی که درون کلون‌های خوب، به صورت نادرستی برنامه ریزی مجدد شده‌اند ضروری خواهد بود.

نتایج

من اعتقاد دارم که چند سال بعد، ما شاهد پیشرفت‌های زیادی در درک کاربردهای in vitro تکنولوژی سلول-های iPS خواهیم بود. اما ما نمی‌توانیم خیلی دقیق بگوییم که چه زمانی می‌توان از تکنولوژی سلول‌های iPS برای پزشکی ترمیمی استفاده کرد. هر سلول iPS که توسط هر روشی از هر منبع سلولی تولید شده باشد، مجبور است که از آزمایش‌های سختی عبور کند تا ایمنی خودش را قبل از کاربرد بالینی تایید کند. دید کلی این است که هرچه فاکتورهای برنامه ریزی مجدد کمتری مورد استفاده قرار بگیرند، سلول‌های iPS بی خطرتری ایجاد خواهند شد. اما آیا این ساده است؟ ممکن است دستیابی به برنامه ریزی مجدد کامل با یک تعداد کمتری از فاکتورها مشکل باشد. در واقع، برنامه ریزی مجدد نابجا ممکن است موجب ایجاد مقاومت نسبت به تمایز در سلول‌های iPS شود و از این رو، ریسک تشکیل تراتوما بعداز تمایز جهت دار و پیوند به بیماران را افزایش دهد. حتی اگر فقط یک بخش کوچکی از سلول‌های درون هر کلون سلول iPS تمایز معیوب را نشان دهند، آن سلول-ها ممکن است برای تولید تراتومای ناکامل (رشدنیافته) کافی باشند. ما باید قبل از کاربرد بالینی، راهی را برای ارزیابی دقیق هر کلون سلول iPS و برای انتخاب مناسب ساب کلون‌ها ایجاد کنیم.

با وجود این چالش‌ها، پتانسیل این سلول‌های بنیای پرتوان جدید هنوز زیاد است. بزرگترین چالش، یعنی برنامه ریزی مجدد مستقیم توسط فاکتورهای معین، برطرف شده است (حل شده است). مابقی چالش‌ها، اساسا مسائل تکنیکال هستند که من باور دارم در آینده‌ی نزدیک حل خواهند شد. من صادقانه امیدوارم که تکنولوژی سلول

iPS بتواند منجر به درک بهتری از برنامه ریزی مجدد هسته‌ای شود و اینکه مزایای بهتری برای بیماران بیشتری فراهم کند.

تقدیر و تشکر

REFERENCES

Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., et al. (2008). Nat. Biotechnol. *26*, 1276–1284.

Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., and Yamanaka, S. (2008). Science *321*, 699–702.

Daley, G.Q., Lensch, M.W., Jaenisch, R., Meissner, A., Plath, K., and Yamanaka, S. (2009). Cell Stem Cell *4*, 200–201.

Di Giorgio, F.P., Carrasco, M.A., Siao, M.C., Maniatis, T., and Eggan, K. (2007). Nat. Neurosci. *10*, 608–614.

Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., et al. (2008). Science *321*, 1218–1221.

Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Jr., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., and Svendsen, C.N. (2009). Nature *457*, 277–280.

Ellis, J., Bruneau, G.B., Keller, G., Lemischka, I.R., Nagy, A., Rossant, J., Srivastava, D., Zandstra, P.W., and Stanford, W.L. (2009). Cell Stem Cell *4*, 198–199.

Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M.P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C.S., Pawliuk, R., Morillon, E., et al. (2003). Science *302*, 415–419.

Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B.W., Beard, C., Wernig, M., Creyghton, M.P., Steine, E.J., Cassady, J.P., Foreman, R., et al. (2008). Cell *133*, 250–264.

Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. (2008). Nat. Biotechnol. *26*, 1269–1275.

Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009). Nature Published online March 1, 2009. 10.1038/nature07864.

Keirstead, H.S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K., and Steward, O. (2005). J. Neurosci. *25*, 4694–4705.

Kim, J.B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Arauzo-Bravo, M.J., Ruau, D., Han, D.W., Zenke, M., et al. (2008). Nature *454*, 646–650.

Kim, J.B., Sebastiano, V., Wu, G., Araúzo-Bravo, M.J., Sasse, P., Gentile, L., Ko, K., Ruau, D., Ehrich, M., van den Boom, D., et al. (2009). Cell *136*, 411–419.

Lamba, D.A., Gust, J., and Reh, T.A. (2009). Cell Stem Cell *4*, 73–79.

Li, J.Y., Christophersen, N.S., Hall, V., Soulet, D., and Brundin, P. (2008). Trends Neurosci. *31*, 146–153.

Liao, J., Cui, C., Chen, S., Ren, J., Chen, J., Gao, Y., Li, H., Jia, N., Cheng, L., Xiao, H., et al. (2009). Cell Stem Cell *4*, 11–15.

Liu, H., Zhu, F., Yong, J., Zhang, P., Hou, P., Li, H., Jiang, W., Cai, J., Liu, M., Cui, K., et al. (2008). Cell Stem Cell *3*, 587–590.

Loh, Y.H., Agarwal, S., Park, I.H., Urbach, A., Huo, H., Heffner, G.C., Kim, K., Miller, J.D., Ng, K., and Daley, G.Q. (2009). Blood. Published online March 18, 2009. 10.1182/blood-2009-02-204800.

Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., et al. (2007). Nat. Cell Biol. *9*, 625–635.

Meissner, A., Wernig, M., and Jaenisch, R. (2007). Nat. Biotechnol. *25*, 1177–1181.

Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Nat. Biotechnol. *26*, 101–106.

Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Nat. Genet. *24*, 372–376.

Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Nature *448*, 313–317.

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Science *322*, 949–953.

Park, I.H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008a). Cell *134*, 877–886.

Park, I.H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W., and Daley, G.Q. (2008b). Nature *451*, 141–146.

Shi, Y., Do, J.T., Desponts, C., Hahm, H.S., Scholer, H.R., and Ding, S. (2008). Cell Stem Cell *2*, 525–528.

Silva, J., Barrandon, O., Nichols, J., Kawaguchi, J., Theunissen, T.W., and Smith, A. (2008). PLoS Biol. *6*, e253 10.1371/journal.pbio.0060253.

Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., et al. (2009). Cell *136*, 964–977.

Stadtfeld, M., Brennand, K., and Hochedlinger, K. (2008a). Curr. Biol. *18*, 890–894.

Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008b). Science *322*, 945–949.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Cell *126*, 663–676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Cell *131*, 861–872.

Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). Nature *448*, 318–324.

Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J.P., and Jaenisch, R. (2008). Cell Stem Cell *2*, 10–12.

Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hamalainen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., et al. (2009). Nature. Published online March 1, 2009. 10.1038/nature07863.

Yamanaka, S., Zhang, X.Y., Maeda, M., Miura, K., Wang, S., Farese, R.V., Jr., Iwao, H., and Innerarity, T.L. (2000). EMBO J. *19*, 5533–5541.

Yang, D., Zhang, Z.J., Oldenburg, M., Ayala, M., and Zhang, S.C. (2008). Stem Cells *26*, 55–63.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Science *318*, 1917–1920.