سلول‌های بنیادی پرتوان القایی از تولید تا کاربرد: *مقاله مروری*

شریف مرادی
حسین بهاروند*

پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست‌شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست‌شناسی تکوینی، تهران، ایران.

دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۱۷ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۴/۰۴ آنلاین: ۱۳۹۳/۰۸/۲۰

چکیده

سلول‌های بنیادی جنینی سلول‌های بنیادی پرتوانی هستند که علاوه بر قابلیت خودنوزایی نامحدود، دارای توانایی تمایزی بالایی به دودمان‌های سلولی مختلف هستند که به این قابلیت، پرتوانی می‌گویند. این سلول‌ها به خاطر داشتن این دو ویژگی مهم، کاربردهای بالقوه‌ی بسیاری در مطالعات و تحقیقات بنیادین و حوزه‌های درمانی دارند. اما سلول‌های مشتق از سلول‌های بنیادی جنینی با مشکل رد پیوند در هنگام پیوندزدن روبه‌رو هستند. در سال ۲۰۰۶ میلادی، پژوهشگران ژاپنی تولید نوع جدیدی از سلول‌های بنیادی پرتوان را گزارش کردند که مشکل ایمونولوژیک سلول‌های بنیادی جنینی در مورد آن‌ها مطرح نبود، زیرا از سلول‌های خود فرد دهنده تولید می‌شدند. آن‌ها این سلول‌ها را که با بیان ویروسی چهار ژن مهم پرتوانی در سلول‌های سوماتیک تولید شده بودند، سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (Induced pluripotent stem cells, iPSCs) نامیدند. این سلول‌ها تمام قابلیت‌های سلول‌های بنیادی جنینی از جمله توانایی تولید یک جاندار کامل را دارند، از این رو در ضمن نداشتن مشکل ایمونولوژیک، دارای تمامی کاربردهای «بالقوه»ی سلول‌های بنیادی جنینی شامل غربالگری داروها و مدل‌سازی بیماری‌ها هستند. همچنین با توجه به این که سلول‌های iPS «خاص بیمار» را می‌توان به راحتی تولید کرد، چشم‌انداز روشنی برای کاربرد درمانی این سلول‌ها در آینده وجود دارد. در این مقاله بنا داریم که شرح جامعی از چیستی، چرایی و چگونگی تولید سلول‌های iPS، رویکردهای گوناگون برای تهیه‌ی آن‌ها و نیز چگونگی تعیین هویت آن‌ها را ارایه دهیم. همچنین کاربردهای پزشکی این سلول‌ها را با ذکر ملاحظات و برخی از چالش‌های کاربردی پیش رو برای این سلول‌ها به بحث خواهیم گذاشت.

کلمات کلیدی: سلول‌های بنیادی جنینی، سلول‌های بنیادی پرتوان القایی، تکثیر، تمایز.

* نویسنده مسئول: تهران، بزرگراه رسالت، خیابان بنی‌هاشم، میدان بنی‌هاشم، پژوهشگاه رویان.
تلفن: ۰۲۱-۲۲۳۰۶۴۸۵
E-mail: baharvand@royaninstitute.org

مقدمه

سلول‌های بنیادی علاوه بر قابلیت خودنوزایی و تکثیر نامحدود، قادرند یک یا چند نوع سلول تمایزیافته را به وجود آورند. سلول‌های بنیادی بر اساس انواع سلول‌های تمایزیافته‌ای که می‌توانند ایجاد کنند، به سه گروه سلول‌های بنیادی تک‌توان (نظیر سلول‌های بنیادی اسپرماتوگونیال)، سلول‌های بنیادی چندتوان (نظیر سلول‌های بنیادی خونساز) و سلول‌های بنیادی پرتوان (نظیر سلول‌های بنیادی جنینی، Embryonic Stem cells, ES cells) تقسیم‌بندی می‌شوند. سلول‌های بنیادی پرتوان قادرند به مشتقات هر سه رده‌ی زایای اکتودرم، مزودرم و آندودرم متمایز شده و در کامل‌ترین تعریف، باید بتوانند یک موجود کامل را ایجاد کنند. سلول‌های بنیادی پرتوان کاربردهای بسیاری در مدل‌سازی بیماری‌ها، غربالگری و تولید داروهای جدید، مطالعه وقایع مولکولی درگیر در تولید حالت پرتوان و همچنین پتانسیل خوبی برای استفاده در درمانگاه‌های سلول‌درمانی دارند.[1] این سلول‌ها از منابع مختلفی به دست می‌آیند، به‌طوری که می‌توان آن‌ها را از انواع جنین‌های مرحله‌ی بلاستوسیست،[2و3] از جنین‌های پس از لانه‌گزینی (برای نمونه سلول‌های بنیادی اپی‌بلاستی موشی)[4] و نیز از

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]

روش کلون‌سازی درمانی (Therapeutic cloning)[۵] تهیه کرد. اما دو مشکل عمده در مورد این نوع سلول‌های پرتوان "جنینی" وجود دارد: مشکل اخلاقی دستکاری جنین‌های انسانی و مشکل ردپیوند سلول‌های مشتق از آن‌ها. البته دستکاری جنین‌های اولیه‌ی انسانی در برخی از کشورها نظیر استرالیا، ایالات متحده آمریکا و نیز کشورهای اسلامی نظیر ایران با مشکل اخلاقی روبرو نیست، اما کشورهایی چون آلمان با موانع قانونی و اخلاقی در رابطه با انجام پژوهش روی جنین‌های انسانی روبه‌رو هستند.[۶]

مشکلات ایمونولوژیک و اخلاقی سلول‌های بنیادی جنینی سبب شد دانشمندان به تهیه‌ی سلول‌هایی فکر کنند که این دو مشکل را نداشته باشند. در سال ۲۰۰۶، دانشمندان ژاپنی Yamanaka و Takahashi نشان دادند که می‌توان فیبروبلاست‌های کشت‌شده‌ی موش را تحت شرایط خاصی به سلول‌هایی با ویژگی‌های مشخصه‌ی سلول‌های ES تبدیل کرد، به‌طوری که این سلول‌ها هم قابلیت خودنوزایی نامحدود و هم پتانسیل تمایزِ چند دودمانی (خاصیت پرتوانی) را داشتند.[۷] آن‌ها این سلول‌ها را «سلول‌های بنیادی پرتوان القایی» یا سلول‌های iPS، (Induced pluripotent stem cells, iPSCs) نامیدند، زیرا خصوصیات سایر سلول‌های بنیادی پرتوان (بنیادینگی و پرتوانی) را داشتند و در عین حال سلول‌هایی مصنوعی (غیرطبیعی) بودند که تولید آن‌ها در شرایط آزمایشگاهی «القا» شده بود.

از آن جا که منشا سلول‌های iPS از جنین نبوده و در عوض از سلول‌های خود فرد دهنده‌ی سلول تهیه می‌شوند، نه مشکل اخلاقی در مورد آنها مطرح است و نه مشکل رد پیوند، از این رو چشم‌انداز امیدبخشی را در پیشِ روی درمان بیماری‌ها با سلول‌های بنیادی قرار می‌دهند. برای مثال می‌توان از فردی مبتلا به یک بیماریِ قابل‌درمان با سلول‌درمانی، فیبروبلاست‌های پوستی یا هر نوع سلول دیگری را تهیه کرد، کشت داد، به سلول‌های iPS تبدیل کرد، سلول‌های iPS حاصل را به سمت مورد نظر (به‌عنوان نمونه در جهت تولید سلول‌های عصبی) تمایز داد و سلول‌های تمایزیافته‌ی حاصل را پس از ارزیابی‌های مربوطه و کنترل کیفی، به موضع مشخص از فرد بیمار پیوند زد، بدون این که رد پیوند اتفاق بیافتد. بنابراین می‌توان سلول‌های iPS را از بیماران با بیماری‌های مختلف تولید کرد و به‌طور اختصاصی (Patient-specific) برای خود آنان مورد استفاده قرار داد.[۸و۹] در این مقاله بنا داریم که درک فعلی از سلول‌های iPS را به‌طور خلاصه مطرح کرده، روش‌های تولید آن‌ها را تشریح نموده و کاربردهای پزشکی این سلول‌ها را مورد بحث قرار دهیم. اکنون بحث خود را در این مقاله، با نگاهی به روش‌ها و مولکول‌های مورد استفاده در تولید سلول‌های iPS آغاز می‌کنیم.

رویکردهای تولید سلول‌های iPS : در اولین تجربه موفق تولید سلول‌های iPS در سال ۲۰۰۶، پژوهشگران ژاپنی فهرستی از ۲۴ ژن دخیل در حفظ پرتوانی را تهیه کردند و همزمان به سلول‌های فیبروبلاست موشی انتقال دادند. دو هفته پس از افزودن ژن‌ها، کلونی‌های معدودی با ویژگی‌های ریخت‌شناسی و رفتاری شبیه به کلونی‌های سلول‌های ES پدیدار شدند.[۷]

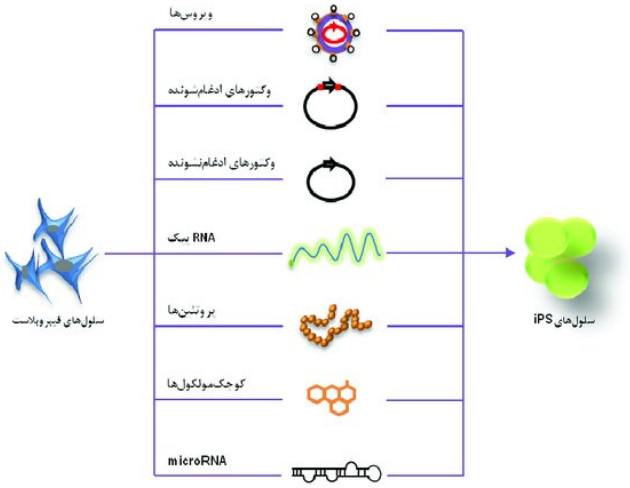
آنها برای این که تعداد فاکتورهای مورد استفاده را به حداقل برسانند، با حذف‌کردن تک‌تک ژن‌ها به‌طور جداگانه، اهمیت کارکردی هر یک از آنها را معلوم کردند و در نهایت، یک ترکیب چهار ژنی (شامل OCT4، SOX2، KLF4 و C-MYC) به دست آمد که قادر بود سلول‌های شبه ES را طی یک دوره‌ی زمانی دو هفته‌ای ایجاد کند.

سلول‌های حاصل (موسوم به سلول‌های iPS)، از لحاظ شکل کلونی، شکل سلول، نسبت هسته به سیتوپلاسم، اتصالات سلولی، قابلیت خودنوزایی و پتانسیل تمایزی و همچنین از لحاظ مولکولی، فوق‌العاده شبیه به استاندارد طلایی پرتوانی یعنی سلول‌های ES بودند. حدود ۵۰ سال پیش، Gurdon برای اولین بار نشان داده بود که می‌توان قورباغه‌ی Xenopus laevis را با استفاده از سلول‌های بالغ مشتق از روده‌ی آن شبیه‌سازی کرد.[۱۰]

یک سال بعد، یک گروه تحقیقاتی Yu و همکاران که پیشتر در سال ۱۹۹۸ اولین رده‌های سلولی ES انسانی را تهیه کرده بودند، ترکیب به نسبت متفاوتی از چهار فاکتور پروتیینی (OCT4، SOX2، NANOG و LIN28) را معرفی کرد که آنها هم قادر به القای پرتوانی در فیبروبلاست‌های کشت‌شده بودند.[۱۱] در ادامه عمومیت رویکرد در بسیاری از آزمایشگاه‌های دنیا که روی سلول‌های بنیادی پرتوان پژوهش می‌کردند، مشخص شد.[۱۲-۱۴]

ابزارهای گوناگونی برای انتقال فاکتورهای القاگر پرتوانی به داخل سلول‌ها به‌کار می‌روند (شکل ۱). ویروس‌ها به جهت این که از یک مسیر طبیعی برای انتقال ژنوم خود به درون سلول‌ها استفاده می‌کنند، از سوی زیست‌شناسان مولکولی بسیار مورد توجه بوده و در

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]



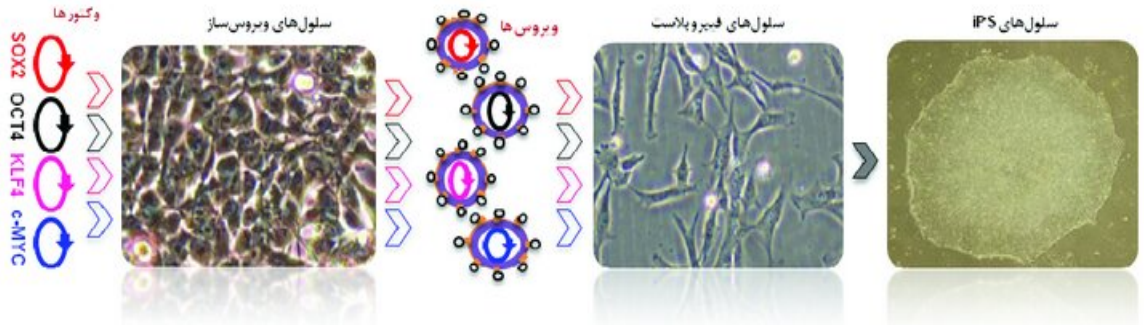
شکل ۱: رویکردهای گوناگون برای تولید سلول‌های iPS. وکتورهای ویروسی اگرچه بازده بالایی در انتقال ژن دارند، اما به‌خاطر ماهیت ویروسی بهتر است از آن‌ها اجتناب شود. وکتورهای غیرویروسی ادغام‌شونده و ادغام‌نشونده را می‌توان به‌جای ویروس‌ها مورد استفاده قرار داد. در عین حال، انتقال RNA پیک، روشی ایمن‌تر وکتورهای مذکور را برای بیان‌کردن یک ژن خاص فراهم می‌آورد، زیرا احتمال بسیار کمی وجود دارد که از طریق تبدیل‌شدن به DNA، در ژنوم سلول‌های میزبان وارد شود. روش‌های جایگزین برای تولید سلول‌های iPS عبارتند از انتقال پروتیین‌های نوترکیب، استفاده از کوچک‌مولکول‌ها و نیز بیان microRNAها. این روش‌ها و یا ترکیبی از آن‌ها به کرات توسط پژوهشگران برای تولید سلول‌های iPS به کار می‌روند

انتقال ژن به درون سلول‌های یوکاریوتی بسیار کارآمد و مطمئن هستند. شکل ۲، چگونگی تولید سلول‌های iPS را با استفاده از ویروس‌ها نشان می‌دهد. رتروویروس‌ها و لنتی‌ویروس‌ها که از خانواده‌ی رتروویریده هستند، در انتقال ژن بسیار کارآمدتر از سایر ویروس‌ها بوده و به خاطر درج‌کردن ژنوم خود و در نتیجه ژن(های) خارجی در ژنوم میزبان، بیان پیوسته‌ای از ژن(های) برونزاد را فراهم می‌آورند. مزیت اصلی‌ای که لنتی‌ویروس‌ها به رتروویروس‌ها دارند، این است که قادرند علاوه بر سلول‌های در حال تقسیم، سلول‌های بدون‌تقسیم را نیز آلوده کنند. با وجود مزایای رتروویریده برای انتقال ژن، به خاطر درج تصادفی ژنوم آن‌ها در ژنوم سلول‌های میزبان و خطر بروز جهش‌زایی درجی، ویروس‌های دیگری که خارج از کروموزوم‌های میزبان تکثیر می‌شوند نیز مورد توجه پژوهشگران هستند. آدنوویروس‌ها و سندای‌ویروس‌ها از جمله‌ی این ویروس‌ها هستند. سندای‌ویروس از این نظر که دارای ژنوم RNAای است، احتمال کمی برای درج ژنوم آن (به شکل DNA) در ژنوم میزبان وجود دارد و از این جهت، دارای مزیتی بر آدنوویروس‌ها و سایر ویروس‌های DNAدار و درج‌شونده است. اما به هر حال از لحاظ ایمنی رویکرد، ترجیح بر آن است که ویروس‌ها اساسا مورد استفاده قرار نگیرند.[۱۵]

وکتورهای ادغام‌شونده، وکتورهای ادغام‌شونده‌ی قابل‌حذف از ژنوم (به‌عنوان نمونه با سیستم Cre-loxP)، وکتورهای ادغام‌نشونده (اپی‌زومال)، وکتورهای نیم‌دایره (Minicircle) و ترانسپوزون‌هایی نظیر Sleeping beauty به‌عنوان جایگزین‌های ایمن‌تری از ویروس‌ها برای انتقال ژن‌های خارجی به درون سلول‌ها مورد استفاده قرار گرفته‌اند و موفقیت خوبی برای تولید سلول‌های iPS از خود نشان داده‌اند.[۹] ابزارهای دیگری نیز برای القای پرتوانی در سلول‌های سوماتیک استفاده شده‌اند که عبارتند از پروتیین‌های نوترکیب OCT4، SOX2، KLF4 و C-MYC، مولکول‌های RNA پیامبر رمزگردان این فاکتورها، کوچک‌مولکول‌ها و microRNAها. متاسفانه پروتیین‌های نوترکیب، کارآمدی بسیار پایینی در تولید سلول‌های iPS داشته‌اند، ضمن این که تولید و تخلیص آن‌ها چالش‌برانگیز است.[۱۶]

از طرفی RNA پیامبر موفقیت‌های بهتری به دست داده و تولید سلول‌های iPS را با کارآیی به‌نسبت خوبی میسر ساخته است.[۱۷و۱۸] کوچک‌مولکول‌ها و microRNAها نیز به کرات توسط پژوهشگران برای افزایش کارآیی تولید سلول‌های iPS مورد استفاده قرار گرفته‌اند.[۱۹و۲۰] اگرچه گزارش‌های معدودی در رابطه با القای مستقل پرتوانی در سلول‌های سوماتیک توسط کوچک‌مولکول‌ها[۲۱و۲۲] و microRNAها[۱۵و۲۳] – بدون دخالت هر گونه عامل رونویسی– وجود دارد، اما هنوز توافق کامل بر این که آیا این مولکول‌ها قادرند به تنهایی سلول‌های iPS را ایجاد کنند، حاصل نشده است.[۲۴] کوچک‌مولکول‌ها به دو شکل مصنوعی (نظیر اسید والپرویک) و طبیعی (نظیر بوتیرات و ویتامین C) وجود دارند و به خاطر مزایای متعددشان، توجه بخش مهمی از جامعه‌ی علمی را به خود معطوف کرده‌اند. این مولکول‌ها ارزان‌ترند، پایداری متابولیکی بالایی دارند، زیرا بیشتر آنزیم‌های درون و برون‌سلولی قادر نیستند آن‌ها را متابولیزه کنند، به راحتی در سلول نفوذ می‌کنند و اهداف خود را می‌یابند. اما به هر حال برخی از کوچک‌مولکول‌ها، سبب ناپایداری

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]



شکل ۲: چگونگی تولید سلول‌های iPS با استفاده از ویروس‌ها. ابتدا وکتورهای رمزگردان فاکتورهای باز برنامه‌ریزی به سلول‌های ویروس‌ساز موسوم به سلول‌های بسته‌بندی‌کننده (Packaging cells) وارد شده تا ویروس‌ها تولید شوند. بعد ویروس‌های حاصل جمع‌آوری شده و به محیط روی سلول‌های اولیه (مثلا فیبروبلاست) افزوده می‌شوند. پس از حدود دو تا سه هفته، کلونی‌های iPS به مشخصات ریخت‌شناختی و مولکولی سلول‌های ES ظاهر می‌شوند.

ژنومی و کروموزومی می‌شوند و به اصطلاح ژنوتوکسیک هستند.[۲۵] microRNAها، RNAهای کوچکی به اندازه ۲۵–۱۸ نوکلئوتید هستند که با اتصال واتسون–کریکی به رونوشت‌های هدف خود و تخریب یا مهار ترجمه‌ی آن‌ها، بیان ژن‌ها را در سطح پس از رونویسی تنظیم می‌کنند. پیش‌بینی می‌شود که هر microRNA صدها هدف بالقوه دارد و در نتیجه انتظار می‌رود که اثرات آن‌ها گسترده باشد.[۲۶] microRNAهای متعددی نظیر خوشه‌ی miR-302/367، خوشه‌ی miR-290/295، خانواده‌ی miR-17 و miR-200 شناخته شده‌اند که قادرند بازده تولید سلول‌های iPS را به‌طور قابل‌توجهی افزایش دهند.[۱۹و۲۹–۲۷]

گزارش‌هایی نیز مبنی بر قابلیت این microRNAها برای تولید سلول‌های iPS، مستقل از هر گونه عامل رونویسی وجود دارد که چشم‌انداز امیدبخشی را در مورد کاربرد این RNAهای کوچک در تغییر سرنوشت سلول‌ها مطرح می‌کند.[۱۵و۲۳و۲۴] سلول‌های iPS کاربردهای بی‌شماری در تحقیقات پایه و طب ترمیمی دارند که در ادامه مورد بحث قرار خواهند گرفت.

تعیین هویت سلول‌های iPS: رویکرد چهار فاکتوری Yamanaka، سرنوشت سلول‌های تمایزیافته موشی را طی حدود دو هفته و سلول‌های تمایزیافته انسانی را طی حدود سه هفته به سلول‌های iPS تغییر می‌دهد.[۷و۳۰] سلول‌هایی که وی برای انجام آزمایش خود انتخاب کرد، سلول‌های فیبروبلاستی بودند که سلول‌هایی مزانشیمی (غیراپی‌تلیالی) هستند. سلول‌های پرتوان (از جمله سلول‌های iPS) ویژگی‌های اپی‌تلیالی دارند و بسیاری از مارکرهای اپی‌تلیالی از جمله E-کادهرین و اکلودین را بیان می‌کنند، ضمن این که مارکرهای مزانشیمی را یا بیان نمی‌کنند یا سطح پایینی از بیان آن‌ها را نشان می‌دهند. پس لازم است که برای رسیدن از حالت مزانشیمی (فیبروبلاستی) به اپی‌تلیالی (iPSی)، یک فرایند گذار مزانشیمی به اپی‌تلیالی (MET) رخ دهد.[۳۱]

فاکتورهای پرتوانی پس از ورود به سلول‌های اولیه، به ژن‌ها و مولکول‌های هدف خود متصل شده و ضمن خاموش‌کردن ژن‌های تمایزی، به‌تدریج سبب القای بیان ژن‌های بنیادینگی و پرتوانی می‌شوند. این فرایند تنظیم بیان ژن توسط فاکتورهای القاگرِ پرتوانی، تا آنجا ادامه می‌یابد که شبکه‌ی تنظیمی ژن سلول اولیه به‌طور کامل به هم ریخته و در عوض، یک شبکه‌ی تنظیمی جدید برقرار می‌شود که مشخصه سلول‌های بنیادی پرتوان است. در این حالت، ژن‌های مربوط به سلول اولیه، قوی‌تر مهار شده و در مقابل، ژن‌های پرتوانی آسان‌تر القا می‌شوند.[۳۲]

طی هفته دوم از القای پرتوانی در سلول‌های فیبروبلاست، مشاهده می‌شود که یکسری از سلول‌ها به کنار هم می‌آیند، ظاهر اپی‌تلیالی به خود می‌گیرند، تکثیر می‌شوند و کلونی‌های اولیه‌ای (شامل سلول‌های iPS نابالغ) را تشکیل می‌دهند. بسته به گونه، کلونی‌ها به صورت سه‌بعدی، گنبدی شکل با حاشیه مشخص (برای کلونی‌های iPS جوندگان)[۳۳] یا به صورت مسطح، گرد و با حاشیه مشخص و صاف دیده می‌شوند (برای کلونی‌های iPS انسانی)[۳۰]

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]

(شکل ۳). همچنین کروماتین سلول‌ها به صورت باز درآمده و نسبت هسته به سیتوپلاسم سلول‌های در حال باز برنامه‌ریزی افزایش می‌یابد.[۱۱] به این ترتیب اولین و ساده‌ترین معیار برای تشخیص کلونی‌های در حال ظهور iPS، بر پایه ویژگی‌های ریخت‌شناسی سلول‌ها و کلونی‌های در حال تشکیل صورت می‌گیرد. مشخص شده است که کراتینوسیت‌های پوست (نوعی سلول اپی‌تلیال) استعداد بیشتری برای تبدیل‌شدن به سلول‌های iPS دارند[۳۴] که حداقل تا اندازه‌ای می‌توان این تمایل را به خاصیت اپی‌تلیالی آن‌ها نسبت داد. این که آیا سلول‌های اپی‌تلیال برای رسیدن به مرحله‌ی iPS، ابتدا از حالت اپی‌تلیالی خود خارج می‌شوند و در ادامه ماهیت اپی‌تلیالی iPSی را می‌یابند، یا این که وضعیت اپی‌تلیالی خود را طی باز برنامه‌ریزی، تا آخر حفظ می‌کنند، سوالی است که هنوز پاسخی به آن داده نشده است.

سلول‌های بنیادی پرتوان باید قدرت تکثیر بالایی داشته باشند. سرعت تکثیر سلول‌های بنیادی پرتوان از سلول‌های سرطانی کمتر و از سلول‌های فیبروبلاستی بیشتر است.[۳۳] بنابراین یکی دیگر از معیارهای تعیین هویت سلول‌های iPS، سرعت تکثیر و رشد کلونی‌های آن‌ها است. کلونی‌های iPS پس از ظهور، باید از جای خود جدا شده و به ظروف جدیدی حاوی محیط کشت سلول‌های پرتوان منتقل شوند.

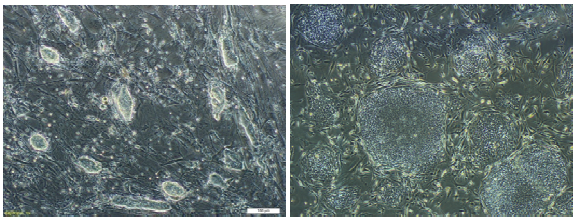
پس از آن که رشد، تکثیر و سایر ویژگی‌های ریخت‌شناسی سلول‌های iPS مورد تایید قرار گرفت، لازم است که با روش‌های جزیی‌تری ارزیابی و تعیین‌هویت شوند. سلول‌های iPS را زمانی حقیقی (Genuine) و به‌طور کامل باز برنامه‌ریزی‌شده (Fully reprogrammed) در نظر می‌گیرند، که ترانس‌ژن‌هایشان، هم توانسته باشند ژن‌های درون‌زاد پرتوانی را القا کرده و شبکه‌ی تنظیمِ ژن مرکزی پرتوانی را در سلول‌ها به راه انداخته باشند و هم پس از راه‌اندازی شبکه‌ی یادشده، خود ترانس‌ژن‌ها خاموش شوند. پس لازم است که خاموشی اگزوژن‌ها (در صورتی که برای باز برنامه‌ریزی از ترانس‌ژن‌ها استفاده شده باشد) و روشن‌شدن آندوژن‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد. همچنین، سلول‌های iPS باید شاخص‌های پرتوانی را هم در سطح mRNA و هم در سطح پروتیین بیان کنند. در بسیاری از گزارش‌ها، بیان همه ژن‌ها را در سلول‌های iPS حاصل در مقایسه با سلول‌های ES (به عنوان استاندارد پرتوانی) با روش‌های پروفایلینگ نشان می‌دهند.[۱۶] پرتوانی سلول‌های iPS در آزمایشگاه، با روش تمایز خودبه‌خودی (تشکیل اجسام شبه‌جنینی، Embryoid Body, EB) یا تمایز جهت‌دار آن‌ها به سمت دودمان خاصی سنجیده می‌شود. علاوه بر این، لازم است تمایز این سلول‌ها در بدن موجودزنده نیز با آزمون «تشکیل تراتوما» بررسی شود. این آزمون، با اطمینان‌ترین تستی است که می‌توان برای ارزیابی پرتوانیِ سلول‌های پرتوان «انسانی» در بدن موجودزنده انجام داد. در این آزمون، سلول‌های تمایزنیافته‌ی پرتوان به موضع مشخصی (به‌عنوان نمونه زیر پوست) از بدن یک موش تزریق می‌شوند که دارای دستگاه ایمنی معیوبی است (برای این که سلول‌های پیوندشده، پس‌زده نشوند). در صورتی که سلول‌های تزریق‌شده پرتوان باشند، تومورهای خوش‌خیمی به نام تراتوما پس از چند هفته در موضع پیوند شکل خواهند گرفت.

اما سلول‌های iPS موشی علاوه بر آزمون‌هایی که بیان شد، باید با آزمون تولید کایمر (Chimera formation) و گاهی اوقات با مطمئن‌ترین آزمون پرتوانیِ موشی یعنی تکمیل‌سازی تتراپلویید (Tetraploid complementation) مورد ارزیابی قرار گیرند.[۳۵] در آزمون تشکیل کایمر، تعداد معدودی سلول iPS (۱۵-۱۰ سلول) به درون بلاستوسیست تزریق می‌شوند که در صورتی که سلول‌های تزریق‌شده پرتوان باشند، موش نوزاد علاوه بر سلول‌های مشتق از توده‌ی سلولی داخلی بلاستوسیست میزبان، دارای سلول‌هایی با منشا سلول‌های iPS تزریق‌شده خواهد بود.

عموما سریع‌ترین روش تشخیص کایمر، قضاوت بر اساس رنگ پوست و موی موش حاصل است، زیرا به‌طور معمول بلاستوسیست میزبان و سلول‌های iPS تزریق‌شده از موش‌هایی با رنگ موی متفاوت تهیه می‌شوند. در دشوارترین آزمون پرتوانی یعنی تکمیل‌سازی تتراپلویید، به همان صورتی که در مورد تشکیل کایمر بیان شد، تعدادی سلول iPS به بلاستوسیستی تزریق می‌شوند که «تتراپلویید» است و در نتیجه انتظار نمی‌رود که این بلاستوسیست به تنهایی بتواند تکوین یک جنین کامل، بجز پرده‌های خارج‌جنینی، را به پیش ببرد. چنانچه موشی از چنین آزمونی متولد شود، بیانگر پرتوان‌بودن سلول‌های iPS تزریق‌شده است که توانسته‌اند کل سلول‌های بدن موش حاصل را تشکیل دهند.

به موش حاصل، موش تماما iPSی (all-iPSC mice) می‌گویند. دو آزمون تشکیل کایمر و تکمیل‌سازی تتراپلویید از آن جهت برای

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]



B A

شکل ۳: ریخت‌شناسی سلول‌های iPS انسانی در مقایسه با سلول‌های iPS موشی. قسمت A، ریخت‌شناسی سلول‌های iPS انسانی (کلونی‌های گرد، مسطح، با حاشیه مشخص و اپی‌تلیالی)، و قسمت B، ریخت‌شناسی سلول‌های iPS موشی (کلونی‌های دوکی، گنبدی‌شکل، با حاشیه مشخص) را نشان می‌دهد.

ارزیابی پرتوانی سلول‌های پرتوان انسانی قابل انجام نیستند که اخلاق زیستی اجازه نمی‌دهد از بلاستوسیست‌های «انسانی» برای انجام چنین آزمون‌هایی استفاده شود. در نظر بگیرید که نوزاد انسانی که به این ترتیب ایجاد شود (آن هم با فرض این که بدون نقص متولد شود)، بدون هویت خواهد بود و اخلاق انسانی، این را برنمی‌تابد. از طرفی، پیدا کردن زنی که مایل به حمل چنین جنینی و زایمان چنین نوزادی شود، بسیار دشوار خواهد بود.

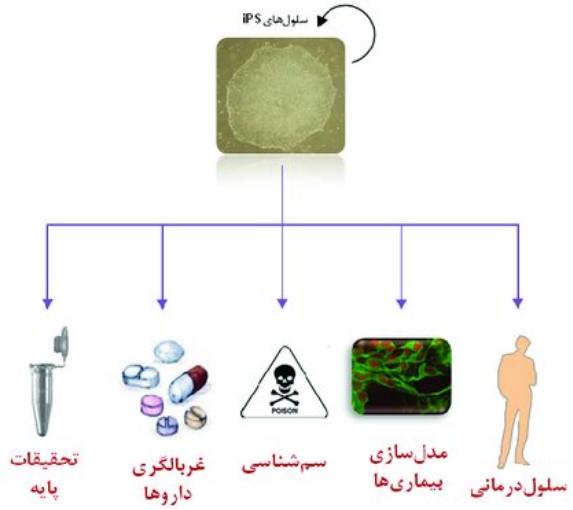
کاربردهای زیست‌پزشکی سلول‌های iPS: سلول‌های iPS به وجود آمدند تا یک منبع پرتوان سلولی را فراهم کنند که تولید و استفاده از آن نه مشکل اخلاقی داشته باشد و نه در هنگام استفاده‌ی بالقوه‌ی درمانی، مانعی چون ردپیوند را بر سر راه خود ببینند.[۷] ظهور سلول‌های iPS خبری مسرت‌بخش برای کشورهایی چون آلمان بود که در تولید سلول‌های پرتوان از جنین‌های انسانی با مانع اخلاقی روبرو بودند. از آن پس آن‌ها می‌توانستند از سلول‌های سوماتیک افراد مختلف، سلول‌های iPS انسانی را بسازند که از هر جهت بسیار مشابه سلول‌های ES انسانی بودند.

به این ترتیب مطالعه «پرتوانی» و «خودنوزاییِ پرتوانی» در انسان برای بسیاری از پژوهشگرانی که تا آن زمان از آن محروم بودند، فراهم شد. همان کاربردهایی که برای سلول‌های ES شناخته شده‌اند،[۱] با سلول‌های iPS نیز برآورده می‌شوند: علاوه بر مطالعه‌ی پرتوانی و بررسی تکوین سلول‌های پرتوان در شرایط آزمایشگاه،[۳۶] سلول‌های iPS را می‌توان برای ارزیابی (میزان) سمیت مواد مصرفی، بهداشتی، غذایی و دارویی[۳۷] و همچنین غربالگری داروهای بالقوه قبل از ورود به بازار و فرایند درمان،[۳۸] برای مدل‌سازی بیماری‌های عفونی،[۳۹] بیماری‌های تک‌ژنی و حتی چندژنی پیچیده[۴۰] مورد استفاده قرار داد. همچنین سلول‌های iPS را می‌توان به عنوان یک منبع پایان‌ناپذیر و سهل‌الوصول سلولی برای تولید سلول‌های تمایزیافته‌ی مناسب برای مقاصد درمانی در نظر گرفت.[۴۱-۴۳] شکل ۴، کاربردهای مختلف سلول‌های iPS را به اختصار به تصویر می‌کشد. اما در این مسیر موانعی وجود دارد که باید برطرف شوند، اگرچه کارآیی پایین، تا مدتی یکی از چالش‌ها به شمار می‌رفت، اما پس از گزارش جدیدی که بازده حدود ۱۰۰٪ تولید سلول‌های iPS را گزارش کرد،[۴۴] دیگر مشکلی جدی محسوب نمی‌شود. بالابودن کارآیی باز برنامه‌ریزی به معنی تولید کلونی‌های iPSای بیشتر و به همان نسبت، تولید تعداد کلونی‌های خوب و با کیفیت بیشتر است، در نتیجه پژوهشگر می‌تواند کلونی‌های بالغ، با کیفیت را از میان جمعیت ناهمگن کلونی‌های بالغ و نابالغ iPSای انتخاب کند.

لازم است که بازه‌ی زمانی بازبرنامه‌ریزی کوتاه‌تر باشد. در بیشتر آزمایشگاه‌ها و با بیشتر روش‌های کنونی برای القای پرتوانی، حدود دو هفته برای شکل‌گیری کلونی‌های iPS موشی[۷] و حدود سه هفته برای شکل‌گیری کلونی‌های iPS انسانی[۳۰] زمان لازم است. سلول‌هایی که برای باز برنامه‌ریزی انتخاب می‌شوند، از قبل دارای یکسری جهش‌های نواحی رمزگردان و غیررمزگردان تنظیمی و غیرتنظیمی در DNA خود هستند،[۴۵] این جهش‌ها به ویژه برای آن سلول‌هایی که موقعیت سطحی‌تر در بدن دارند (نظیر سلول‌های پوست) بیشترند.[۴۶] طی فرایند باز برنامه‌ریزی (و تقسیم‌هایی که طی این دوره اتفاق می‌افتند) نیز جهش‌های دیگری بر سلول‌ها تحمیل می‌شوند. همچنین طی کشت آزمایشگاهی سلول‌ها نیز یکسری رویداد ژنتیکی و اپی‌ژنتیکی ناهنجار برای سازگارشدن با شرایط کشت در کروماتین سلول‌ها روی می‌دهند.[۴۷]

پس از تشکیل کلونی‌ها نیز لازم است تعدادی از کلونی‌ها برداشته شده و تکثیر و توسعه داده شوند که باز هم بر بار جهشی سلول‌ها می‌افزاید. برای تهیه سلول‌های تمایزیافته‌ی مناسب برای پیوند سلولی، لازم است که سلول‌ها مدت زمان دیگری را در محیط آزمایشگاه (محیط کشت القاکننده‌ی تمایز)، سپری و شرایط مصنوعی آن را تحمل کنند که خود، مستلزم رویداد وقایع ناهنجار دیگری

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]



شکل ٤: کاربردهای زیست‌پزشکی سلول‌های iPS. سلول‌های iPS را می‌توان برای مطالعات پایه (مثلا مکانیسم مولکولی بنیادینگی و پرتوانی)، غربالگری داروها (با اثر دادن ترکیبات شناخته‌شده و ناشناخته بر روی سلول‌های iPS)، مطالعات توکسیکولوژیک (مثلا بررسی اثر سمیت مواد آرایشی و بهداشتی) و مدل‌سازی بیماری‌ها مورد استفاده قرار داد. در صورتی که کنترل‌های کیفی به‌خوبی اعمال شوند، سلول‌های iPS حتی پتانسیل کاربرد در سلول‌درمانی را دارند (به متن مراجعه کنید).

است. با این اوصاف هر چه زمان باز برنامه‌ریزی کوتاه‌تر باشد، جهش‌های کمتری اتفاق می‌افتند و سلول‌های حاصل سالم‌ترند. پس لازم است روش‌هایی برای القای پرتوانی انتخاب شوند که با سرعت بیشتری پرتوانی را القا می‌کنند.

در روش‌های تولید سلول‌های iPS به واسطه‌ی درج ژن‌های برون‌زاد در ژنوم سلول‌های اولیه، پدیده‌ای به نام جهش‌زایی درجی رخ می‌دهد. در زمانی که سلول‌های iPS برای کاربردهایی غیر از سلول‌درمانی در نظر گرفته شوند، مانعی ندارد که برای تولید آن‌ها از روش‌های درجی نظیر ویروس‌های درج‌شونده و وکتورهای ادغامی استفاده شود. در این مورد، رتروویروس‌ها، لنتی‌ویروس‌ها، آدنوویروس‌ها، آدنواسوشییتدویروس‌ها، سندای‌ویروس‌ها، وکتورهای‌ترانسپوزونی (نظیر Piggy-back و Sleeping beauty)، وکتورهای‌اپی‌زومال، وکتورهای نیم‌دایره و دیگر وکتورهای‌درجی و غیردرجی دیگر را می‌توان مورد استفاده قرار داد. اما زمانی که قرار است این سلول‌ها به منظور سلول‌درمانی تولید شوند، باید استراتژی مطمئنی را برای تولید آن‌ها در پیش گرفت. در وهله‌ی اول بهتر است از تمامی روش‌های ویروسی و درجی اجتناب شود. حتی ویروس‌های غیردرجی نظیر سندای‌ویروس (با وجودی که ژنوم RNAای دارد و در ژنوم درج نمی‌شود)، به خاطر ماهیت ویروسی بهتر است در تولید سلول‌های iPS بالینی کنار گذاشته شوند. روش‌های درجی به خاطر رویداد جهش‌زایی درجی می‌توانند مشکل‌آفرین باشند، اما اگر قرار است مورد استفاده قرار گیرند، بهتر است از یک ویروس یا وکتور پلی‌سیسترونیک (شامل همه‌ی ژن‌های القاگر پرتوانی) استفاده شود تا جایگاه‌های درج ژنومی به حداقل برسد، ضمن این که چنین سازه‌های ژنی ممکن است به افزایش بازده فرایند نیز کمک کنند.[۴۸]

علاوه بر این، می‌توان از سیستم سازه‌ای Cre-loxP استفاده کرد تا پس از به‌راه‌افتادن شبکه تنظیمیِ پرتوانی در سلول‌ها، اگزوژن‌ها حذف شوند و حداقلِ «ردپا» از سازه‌ی ژنی باقی بماند.[۴۹] سیستم‌های ترانسپوزونی می‌توانند حتی جایگزین مناسب‌تری باشند، زیرا پس از راه‌افتادن شبکه‌ی پرتوانی خود را به طور کامل از ژنوم میزبان جدا می‌کنند و هیچ اثری از خود در ژنوم بر جای نمی‌گذارند.[۵۰]

در هر صورت لازم است در رویکردهای درجی، پیش از کاربرد بالینی سلول‌ها، انسجام ژنومی سلول‌های iPS مورد نظر به وسیله‌ی کاریوتایپینگ و توالی‌یابی کل ژنوم مورد ارزیابی قرار گیرد تا هم تعداد جایگاه‌های درج، هم خود جایگاه‌های درج ژن‌ها (این که دقیقا در کجای ژنوم ادغام شده‌اند) و هم تعداد و نوع جهش‌های سلول‌ها بررسی شوند.[۴۶]

به هر حال، به تازگی گزارش شده است که می‌توان سلول‌های iPS انسانی را فقط با دوبار ترانسفکت‌کردن mRNAی پروتیین‌های OCT4، SOX2، KLF4، C-MYC و LIN28 به همراه مهار پروتیین MBD3 با بازده نزدیک ۱۰۰٪ تولید کرد.[۴۴] بنابراین، می‌توان با استفاده از siRNA اختصاصی علیه MBD3، از به‌کاربردن روش‌های درجی برای تولید سلول‌های iPS انسانی اجتناب کرد. هم اکنون در ژاپن، اولین کارآزمایی بالینی با استفاده از سلول‌های iPS برای درمان بالقوه‌ی یک بیماری شبکیه‌ای که به نابینایی افراد مبتلا منجر می‌شود، کلید خورده است.

از آن جا که سلول‌های پرتوان از جمله سلول‌های iPS، تمایل ذاتی بالایی برای تبدیل‌شدن کارآمد به سلول‌های عصبی (که بخش

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]

مهمی از شبکیه را تشکیل می‌دهند) از خود نشان می‌دهند، دانشمندان امیدوارند که این گام نخست، گامی مطمئن در جهت کاربردی‌کردن فناوری iPS در درمان بیماری‌های بدون درمان یا سخت درمان باشد.

دستاورد مهم دیگری که فناوری چندفاکتوری تولید سلول‌های iPS داشته است، پرورش این فکر در ذهن دانشمندان بوده است که می‌توان به جای روش تک‌فاکتوری، از رویکردهای ترکیبی برای تبدیل مستقیم یک سلول تمایزیافته (به‌عنوان نمونه فیبروبلاست) به سلول تمایزیافته‌ی دیگر (به‌عنوان نمونه هپاتوسیت کبد) استفاده کرد.[۵۱و۵۲]

در واقع پس از اولین گزارش شگفت‌انگیز تولید سلول‌های iPS بود که عرصه‌ی تبدیل سلول‌های تمایزیافته به یکدیگر (یا همان دگرتمایزی، Transdifferentiation)، به شکوفایی خود رسید و عصر جدیدی برای تولید سلول‌های تمایزیافته به وجود آمد، به طوری که در حال حاضر سلول‌های تمایزیافته‌ی مختلف، عمدتا با کمک چند فاکتور رونویسی اختصاصی می‌توانند به سرنوشت‌های تمایزی دیگری (شامل نورونی، قلبی، کبدی و پانکراسی) تبدیل شوند.[۵۳] چنانچه فرایند دگرتمایزای بتواند سلول‌هایی ایمن و دارای عملکرد را برای سلول‌درمانی تولید کند، به‌طور بالقوه می‌تواند رقیب خوبی برای سلول‌های تمایزیافته‌ای باشد که حاصل از تمایز سلول‌های iPS هستند، زیرا سلول‌های iPS استعداد تومورزایی بالاتری نسبت به سلول‌های حاصل از دگرتمایزی دارند، که خود می‌تواند کاربرد درمانی آن‌ها را با محدودیت روبرو کند.

فناوری iPS، دستاورد دیگری نیز داشته است و آن این که از آن می‌توان در بیوتکنولوژی حیوانات استفاده کرد. هم اکنون سلول‌های iPS میمونی، خوکی و سگی را می‌توان تولید کرد، برای انجام مهندسی ژنتیک در این حیوانات مورد استفاده قرار داد و به این ترتیب، مدل‌های بیماری‌های انسانی را در آن‌ها تولید کرد.[۵۴]

همچنین می‌توان به این وسیله، یکسری ترکیبات مفید نظیر آنزیم‌هایی را در این حیوانات تولید کرد که در انسان‌های مبتلا به بیماری‌های ژنتیکی وجود ندارند. علاوه بر این، رویکرد iPS ممکن است در آینده بتواند برای نجات گونه‌های جانوری در خطر انقراض به کار رود،[۵۵] هر چند که چالش‌های بسیاری در این مسیر وجود دارند.

به کمک فناوری ترکیبی تولید سلول‌های iPS و بیوتکنولوژی حیوانات (ریزتزریق سلول‌های iPS در بلاستوسیست‌ها)، یک گروه از پژوهشگران با موفقیت توانستند پانکراس rat را در بدن موش‌های فاقد Pdx1 (موش‌هایی ناتوان در تولید پانکراس) تولید کنند.[۵۶] شاید بتوان در آینده در بدن حیواناتی که به لحاظ فیزیولوژیک شبیه به انسان هستند (نظیر خوک)، با همین روند اندام‌هایی عملکردی را تولید کرد و به موضع مناسب از افراد بیمار پیوند زد.

همچنین می‌توان از بیماران ژنتیکی مختلف، سلول‌های iPS خاص‌بیمار را تهیه و به کمک روش‌های مختلف (نظیر نوترکیبی همولوگ) مشکل ژنتیکی سلول‌ها را برطرف کرد و پس از تمایز سلول‌ها در جهت موردنظر، سلول‌های تمایزیافته‌ی حاصل را به افراد بیمار پیوند زد.[۵۷]

نتیجه‌گیری نهایی: چالش‌های اخلاقی و ایمونولوژیک، سلول‌های ES بود که سبب هدایت‌شدن دانشمندان به سمت تولید سلول‌های iPS شد. این سلول‌ها با ترکیبی از صرفا چند فاکتور پروتیینی از سلول‌های سوماتیک مشتق می‌شوند و به خاطر شباهت بسیار به سلول‌های ES (به عنوان استاندارد طلایی پرتوانی) کاربردهای بالقوه‌ی بسیاری در غربالگری داروها، ارزیابی سمیت مواد مصرفی و آرایشی- بهداشتی، مدل‌سازی بیماری‌ها و حتی در سلول‌درمانی دارند. در مواردی، ممکن است پتانسیل تومورزایی سلول‌های iPS از سلول‌های ES بالاتر باشد که لازم است پیش از ورود این سلول‌ها به فرایند درمان، از این نظر سنجیده شوند.

فناوری iPS دستاوردهای متعددی داشته است که از آن جمله می‌توان به کاربردهای مدل‌سازی و درمانی این سلول‌ها، شکوفاشدن فرایند دگرتمایزی و زیست‌فناوری حیوانات اشاره کرد.

به هر حال سلول‌های iPS برای این که بتوانند با اطمینان وارد درمانگاه‌های سلول‌درمانی شوند، لازم است که به دقت ارزیابی و تایید ماهیت شده و از سلامت آن‌ها اطمینان حاصل شود. اهمیت تولید و آینده‌ی امیدبخش سلول‌های iPS به گونه‌ای بود که در سال ۲۰۱۲، «جایزه نوبل فیزیولوژی یا پزشکی» به طور مشترک به جان گوردون (به خاطر انجام اولین تجربه‌ی موفق شبیه‌سازی) و یاماناکا (به خاطر گزارش اولین تجربه‌ی موفق تولید سلول‌های iPS) اهدا گردید.

هم اکنون در ژاپن، اولین کارآزمایی بالینی با استفاده از سلول‌های iPS برای درمان یک بیماری چشمی که شبکیه و در نتیجه بینایی افراد

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]

مبتلا را از بین می بـرد، در حـال انجـام اسـت. گذشـت زمـان نـشان خواهد داد روزنه‌ی امیـدی کـه سـلول‌هـای iPS بـه روی بـسیاری از بیماری‌ها گشوده‌اند، تا چه اندازه انتظارات پژوهـشگران و بیمـاران را برآورده خواهد کرد.

References

1. Stojkovic M, Lako M, Strachan T, Murdoch A. Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells. *Reproduction* 2004;128(3):259-67.
2. Hassani SN, Totonchi M, Farrokhi A, Taei A, Larijani MR, Gourabi H, et al. Simultaneous suppression of TGF-β and ERK signaling contributes to the highly efficient and reproducible generation of mouse embryonic stem cells from previously considered refractory and non-permissive strains. *Stem Cell Rev* 2012;8(2):472-81.
3. Hassani SN, Totonchi M, Sharifi-Zarchi A, Mollamohammadi S, Pakzad M, Moradi S, et al. Inhibition of TGFβ signaling promotes ground state pluripotency. *Stem Cell Rev* 2014;10(1):16-30.
4. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 2007;448(7150):196-9.
5. Hwang WS, Roh SI, Lee BC, Kang SK, Kwon DK, Kim S, et al. Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. *Science* 2005;308(5729):1777-83.
6. Isasi RM, Knoppers BM. Governing stem cell banks and registries: emerging issues. *Stem Cell Res* 2009;3(2-3):96-105.
7. 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.
8. Baharvand H, Totonchi M, Taei A, Seifinejad A, Aghdami N, Salekdeh GH. Human-induced pluripotent stem cells: derivation, propagation, and freezing in serum- and feeder layer-free culture conditions. *Methods Mol Biol* 2010;584:425-43.
9. Seifinejad A, Tabebordbar M, Baharvand H, Boyer LA, Salekdeh GH. Progress and promise towards safe induced pluripotent stem cells for therapy. *Stem Cell Rev* 2010;6(2):297-306.
10. Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 1962;10:622-40.
11. 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.
12. Seifinejad A, Taei A, Totonchi M, Vazirinasab H, Hassani SN, Aghdami N, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from a Bombay individual: moving towards "universal-donor" red blood cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391(1):329-34.
13. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007;448(7151):313–7.
14. Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2007;25(10):1177-81.
15. Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, et al. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 2011;8(6):633-8.
16. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009;4(6):472-6.
17. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010;7(5):618-30.
18. Yoshioka N, Gros E, Li HR, Kumar S, Deacon DC, Maron C, et al. Efficient generation of human iPSCs by a synthetic self-replicative RNA. *Cell Stem Cell* 2013;13(2):246-54.
19. Li Z, Yang CS, Nakashima K, Rana TM. Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation. *EMBO J* 2011;30(5):823-34.
20. Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, et al. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell* 2009;5(5):491-503.
21. Pasha Z, Haider HKh, Ashraf M. Efficient non-viral reprogramming of myoblasts to stemness with a single small molecule to generate cardiac progenitor cells. *PLoS One* 2011;6(8):e23667.
22. Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* 2013;341(6146):651-4.
23. Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2011;8(4):376-88
24. Moradi S, Asgari S, Baharvand H. Concise review: harmonies played by microRNAs in cell fate reprogramming. *Stem Cells* 2014;32(1):3-15.
25. Hendry LB, Mahesh VB, Bransome ED Jr, Ewing DE. Small molecule intercalation with double stranded DNA: implications for normal gene regulation and for predicting the biological efficacy and genotoxicity of drugs and other chemicals. *Mutat Res* 2007;623(1-2):53-71.
26. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136(2):215-33.
27. Hu S, Wilson KD, Ghosh Z, Han L, Wang Y, Lan F, et al. MicroRNA-302 increases reprogramming efficiency via repression of NR2F2. *Stem Cells* 2013;31(2):259-68.
28. Wang G, Guo X, Hong W, Liu Q, Wei T, Lu C, et al. Critical regulation of miR-200/ZEB2 pathway in Oct4/Sox2-induced mesenchymal-to-epithelial transition and induced pluripotent stem cell generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110(8):2858-63.
29. Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Blelloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol* 2009;27(5):459-61.
30. 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.
31. Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2010;7(1):51-63.
32. Polo JM, Anderssen E, Walsh RM, Schwarz BA, Nefzger CM, Lim SM, et al. A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* 2012;151(7):1617-32.
33. Lin SL, Chang DC, Chang-Lin S, Lin CH, Wu DT, Chen DT, et al. Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA* 2008;14(10):2115-24.
34. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, et al. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 2008;26(11):1276-84.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]

35. Zhao XY, Li W, Lv Z, Liu L, Tong M, Hai T, et al. iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 2009;461(7260):86-90.
36. Cantz T, Martin U. Induced pluripotent stem cells: characteristics and perspectives. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2010;123:107-26.
37. Kang KS, Trosko JE. Stem cells in toxicology: fundamental biology and practical considerations. *Toxicol Sci* 2011;120 Suppl 1:S269-89.
38. Grskovic M, Javaherian A, Strulovici B, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells: opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10(12):915-29.
39. Schwartz RE, Trehan K, Andrus L, Sheahan TP, Ploss A, Duncan SA, et al. Modeling hepatitis C virus infection using human induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109(7):2544-8.
40. Zhu H, Lensch MW, Cahan P, Daley GQ. Investigating monogenic and complex diseases with pluripotent stem cells. *Nat Rev Genet* 2011;12(4):266-75.
41. Vosough M, Omidinia E, Kadivar M, Shokrgozar MA, Pournasr B, Aghdami N, et al. Generation of functional hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells in a scalable suspension culture. *Stem Cells Dev* 2013;22(20):2693-705.
42. Satarian L, Javan M, Kiani S, Hajikaram M, Mirnajafi-Zadeh J, Baharvand H. Engrafted human induced pluripotent stem cell-derived anterior specified neural progenitors protect the rat crushed optic nerve. *PLoS One* 2013;8(8):e71855.
43. Pouya A, Satarian L, Kiani S, Javan M, Baharvand H. Human induced pluripotent stem cells differentiation into oligodendrocyte progenitors and transplantation in a rat model of optic chiasm demyelination. *PLoS One* 2011;6(11):e27925.
44. Rais Y, Zviran A, Geula S, Gafni O, Chomsky E, Viukov S, et al. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Nature* 2013;502(7469):65-70.
45. 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.
46. Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell* 2009;137(1):13-7.
47. Amps K, Andrews PW, Anyfantis G, Armstrong L, Avery S, Baharvand H, et al; International Stem Cell Initiative. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage. *Nat Biotechnol*. 2011 Nov 27;29(12):1132-44.
48. 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 U S A* 2009;106(1):157-62. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(13):5449. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106(28):11818.
49. Papapetrou EP, Sadelain M. Generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells with an excisable single polycistronic vector. *Nat Protoc* 2011;6(9):1251-73.
50. Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 20099;458(7239):771-5.
51. 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 U S A* 2008;105(15):5856-61.
52. Ambasudhan R, Talantova M, Coleman R, Yuan X, Zhu S, Lipton SA, et al. Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell* 2011;9(2):113-8.
53. Pournasr B, Khaloughi K, Salekdeh GH, Totonchi M, Shahbazi E, Baharvand H. Concise review: alchemy of biology: generating desired cell types from abundant and accessible cells. *Stem Cells* 2011;29(12):1933-41.
54. Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H, et al. Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2008;3(6):587-90.
55. Ben-Nun IF, Montague SC, Houck ML, Tran HT, Garitaonandia I, Leonardo TR, et al. Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nat Methods* 2011;8(10):829-31.
56. Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Ibata M, et al. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* 2010;142(5):787-99.
57. Mali P, Cheng L. Concise review: Human cell engineering: cellular reprogramming and genome editing. *Stem Cells* 2012;30(1):75-81.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]

TUMJ Tehran University Medical Journal, November 2014; Vol. 72, No. 8: 497-507 Review Article

Induced pluripotent stem cells, from generation to application: *review article*

Sharif Moradi M.Sc.
Hossein Baharvand Ph.D.*

Department of Stem Cells and Developmental Biology at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, Tehran, Iran.

Abstract

Received: 08 Mar. 2014 Accepted: 25 Jun. 2014 Available online: 11 Nov. 2014

Embryonic stem cells are pluripotent stem cells which have the ability to indefinitely self-renew and differentiate into all differentiated cells of the body. Regarding their two main properties (unlimited self-renewal and multi-lineage differentiation), these cells have various biomedical applications in basic research and cell based therapy. Because the transplantation of differentiated cells that are derived from embryonic stem cells is allogenic, they face the problem of immune rejection following the transplantation of embryonic stem cell-derived cells into patients. In 2006, researchers from Japan reported the derivation of a new type of pluripotent stem cells which could overcome the problem of immune rejection that is associated with the application of embryonic stem cells. They designated these cells as induced pluripotent stem (iPS) cells, because their production was 'induced' from differentiated somatic cells using a combination of four embryonic stem cell-associated transcription factors. Importantly, these pluripotent stem cells exhibit all the key features of embryonic stem cells including unlimited self-renewal and multi-lineage differentiation potential, and can pass the most stringent test of pluripotency which is known as the tetraploid (4n) complementation. Hence, in addition to bypassing the problem of immune rejection, iPS cells have all of the potential applications of embryonic stem cells, including in developmental studies, toxicology research, drug discovery and disease modeling. Also, considering that they could be generated from patient's own cells, iPS cells hold great promise in the future of patient-specific cell replacement therapies using pluripotent stem cells. In this review article, we will present a comprehensive review on the how and why of the generation of iPS cell from somatic cells of the body and discuss how they should be characterized in terms of morphologically, pluripotent stem cell behavior, and the molecular signature. In addition, their medical applications as well as some of the considerations and future challenges in their use will be discussed.

Keywords: differentiation, embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, proliferation.

* Corresponding author: Royan Institute, Banihashem Sq., Banihashem St., Ressalat high-way, Tehran, Iran.
Tel: +98- 21- 22306485
E-mail: baharvand@royaninstitute.org

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-09-17]