

Komórki macierzyste: perspektywy zastosowań klinicznych

DOROTA FISZER, NATALIA ROZWADOWSKA, MACIEJ KURPISZ

Zakład Genetyki Człowieka PAN, ul. Strzeszyńska 32, 60-479 Poznań

Fiszer D., Rozwadowska N., Kurpisz M.

Stem cells from the perspective of clinical applications

Summary

Stem cells constitute a primary (undifferentiated) cell pool with the capability of self-proliferation and differentiation into three embryonic germ layers, depending on the microenvironment. These cells are presently subdivided into embryonic stem cells and tissue stem cells with pluripotential capabilities (e.g. bone marrow cells), as well as so called committed progenitor cells which may have self-renewal capability; however they are homed and pro-differentiated into specific tissues of which they constitute a natural reservoir. Depending on the microenvironment, progenitor cells may also differentiate into other cells than their original capacity would prefer, e.g. neuronal progenitor cells. Tissue stem cells can be used in the same individual to regenerate different organs; e.g. myoblasts (satellite cells of skeletal muscle) can be used for heart regeneration. Embryonal stem cells in adults could originate only by cloning, which might provoke ethical controversies (on the other hand it is postulated that small numbers of pluripotent stem cells may be also present in adult individuals). The application of stem cells for (pathological) organ regeneration seems to raise great hopes among scientists working in biomedical fields.

Keywords: stem cells, embryonal stem cells, organ regeneration.

Komórki macierzyste (stem cells) są to komórki nie-różnicowane, zdolne do proliferacji, odnawiania własnej populacji, różnicowania i tworzenia potomnych komórek o różnorodnych funkcjach. Wymienione cechy powodują, że komórki macierzyste aktywowane przez czynniki zewnętrzne mogą być zdolne do naprawy uszkodzonych tkanek, gdy zachodzi taka konieczność. Tę ich naturalną właściwość próbuje się obecnie wykorzystywać w nowo opracowywanych terapiach, w celu regeneracji narządowej.

Istnieje kilka potencjalnych źródeł komórek macierzystych, które mogą zostać użyte w terapii tkankowej. Można dokonać ogólnego podziału na macierzyste komórki pochodzenia embrionalnego i tkankowe komórki macierzyste.

Embrionalne komórki macierzyste

Embrionalne komórki macierzyste (embryonal stem cells – ES cells) pochodzą z wewnętrznej masy komórkowej blastocysty lub zarodkowych komórek płciowych (primordial germ cells) i mogą być utrzymywane w hodowli *in vitro*, jako komórki nie-różnicowane, ze zdolnością do wielokierunkowego różnicowania się (ryc. 1). Mogą one dać początek wielu różnym liniom komórkowym, pochodzącym ze wszystkich trzech listków zarodkowych. W trakcie rozwoju embrionalnego zdolność do wielokierunko-

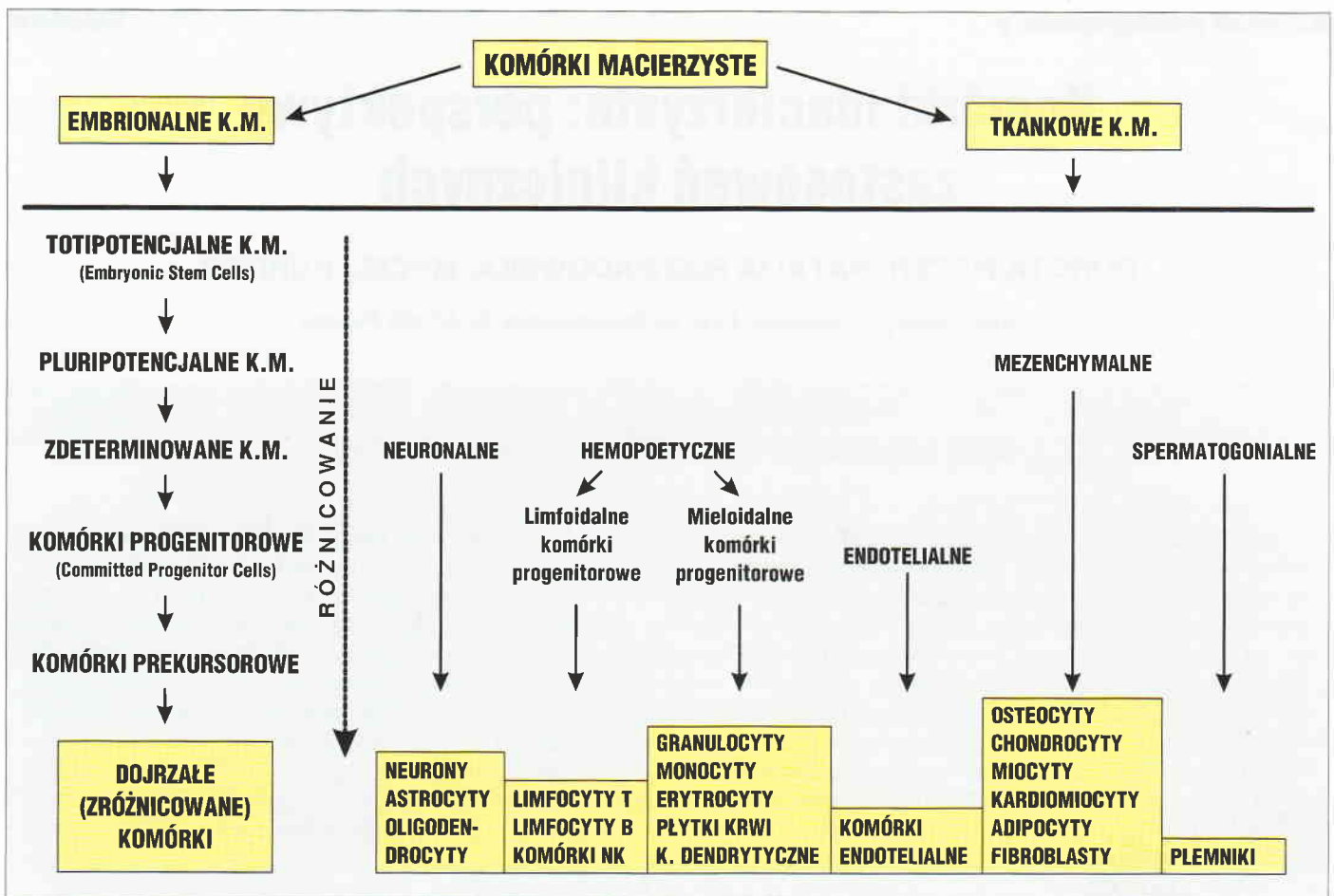
wego różnicowania powoli zanika i komórki są kierowane na określone torry różnicowania. Zdeterminowane komórki macierzyste dają początek komórkom progenitorowym (committed progenitor cells) o ograniczonej zdolności zmiany kierunku różnicowania (zmiany fenotypu).

Ludzkie embrionalne linie komórkowe są przedmiotem badań i nadziei na nowe terapie, lecz ich stosowanie budzi dylematy natury etycznej (29).

Tkankowe komórki macierzyste

Choć tkanki dorosłego organizmu zbudowane są ze zróżnicowanych komórek o zdefiniowanym fenotypie właściwym dla danego organu, to lokalnie w poszczególnych tkankach lub w krążeniu obwodowym znajdują się komórki macierzyste czy progenitorowe. Są to somatyczne (tkankowe) komórki macierzyste (w odróżnieniu od embrionalnych komórek macierzystych). *In vitro* takie komórki posiadają zdolność namnażania się i różnicowania specyficznie dla danego typu tkanki.

Komórki szpiku kostnego. Bogatym i relatywnie łatwo dostępnym źródłem autologicznych komórek macierzystych jest szpik kostny. W szpiku kostnym rezydują nie tylko hematopoetyczne komórki macierzyste (HSC – hematopoietic stem cells) i szpikowe komórki zrębowe (mezenchymalne) (MSC – mesenchymal stem cells lub SSC – stromal stem cells), ale



Ryc. 1. Kierunki różnicowania komórek macierzystych

także komórki progenitorowe dla licznych tkanek. Komórki zdolne do regeneracji naczyń krwionośnych, mięśni szkieletowych, a także mięśnia sercowego wykryto w szpiku kostnym (12, 21). Potencjalne zdolności do miogenezy i kardiogenezy przypisuje się zarówno hematopoetycznym komórkom macierzystym, jak i komórkom mezenchymalnym (7, 9, 17, 31). MSC mogą prawdopodobnie dawać początek komórkom nerwowym i komórkom gleju (2). Oczyszczone mysie HSC mogą regenerować wątrobę (14), a komórki regenerujące tkankę kostną zostały wykryte we krwi obwodowej (13). Wydaje się, że populacja komórek, znana jako hematopoetyczne komórki macierzyste (HSC), ma w rzeczywistości potencjał wielokierunkowego różnicowania podobnie jak komórki linii zarodkowej (14, 15). Niewątpliwą zaletą komórek szpiku kostnego jest łatwa ich dostępność, możliwość oczyszczania/frakcjonowania *ex vivo*, a także to, że ich użycie w badaniach i ewentualnej terapii nie wzbudza sprzeciwów natury etycznej. Dają one również możliwość zastosowania komórek autologicznych w ewentualnej terapii, co z kolei pozwala ominąć potrzebę immunosupresji u biorcy. Istnienie heterotropowych i plejotropowych komórek macierzystych w szpiku kostnym będzie miało z pewnością ogromne znaczenie i szerokie zastosowanie kliniczne, choć wiele z tych zastosowań jest na razie w początkowej fazie badawczej.

Neuronalne komórki macierzyste. Nie jest do końca wyjaśnione, czy komórki macierzyste układu nerwowego odpowiadają dokładnie kryteriom przyjętym dla określania tkankowych komórek macierzystych. Linie komórkowe wyprowadzane z neuronalnych komórek macierzystych dające początek neuronom, astrocytom i oligodendrocytom, różnią się między sobą miejscem występowania w centralnym układzie nerwowym, a także znajdują się na różnym stadium różnicowania. Komórki macierzyste znajdujące się w korze mózgowej tworzą najpierw (przejściowo) dwójki rodzaju komórki progenitorowe (NP – neuronal progenitor cells i GP – glial progenitor cells) (16), które w drugim etapie przechodzą w dojrzałe komórki układu nerwowego. Neuronalne komórki progenitorowe NP różnicują się tylko w neurony, a komórki progenitorowe gleju dają początek jedynie komórkom gleju (astrocytom i k. oligodendrytycznym). Macierzyste komórki neuronalne (neural stem cells – NSC) neuronalne komórki progenitorowe (NP) i komórki progenitorowe gleju (GP) są generalnie zlokalizowane w obszarach okołokomorowych. Te trzy typy komórek są często określane wspólnym terminem „neuronalne komórki progenitorowe” ze względu na niemożność ich prospektywnego rozróżnienia (22). Ta niemożność wynika z braku powierzchniowych markerów, umożliwiających selekcję, podobnie jak w przypadku komórek linii hematopoetycznej. Bezpośrednia

selekcja neuronalnych komórek progenitorowych stała się możliwa dzięki wprowadzeniu do komórek myślim fluorescencyjnej cząsteczki (EGFP – enhanced green fluorescent protein), której ekspresja regulowana jest przez wysoce selektywny dla NSC promotor (10, 26). Tak wyznakowane komórki CNS mogą być separowane przy użyciu sortera FACS (fluorescence-activating cell sorter). W analogiczny sposób można wprowadzić transgen przy pomocy lipofekcji lub wektorów adenowirusowych do komórek ludzkiego mózgu i następnie izolować komórki progenitorowe w celach badawczych czy terapeutycznych (11, 24, 25).

Mioblasty. Mięśnie szkieletowe posiadają zdolność do regeneracji uszkodzeń tkankowych. Tworzenie się nowych komórek mięśniowych u dorosłych osobników zostało dobrze udokumentowane. W latach sześćdziesiątych zostały odkryte komórki satelitowe mięśni szkieletowych, tzw. mioblasty (18). Mioblasty mają wyraźnie odmienną morfologię od dojrzałych miocytów. Są jednojądrzaste, znacznie mniejsze i zachowują zdolność do podziałów. Komórki te, zwykle będące w stanie „uśpienia” u osobników dorosłych, w warunkach np. uszkodzenia mięśnia szkieletowego zaczynają zachowywać się jak mioblasty embrionalne. Zaczynają migrować w kierunku uszkodzonego miejsca, rozpoczynają intensywne podziały mitotyczne, a następnie różnicują się w wielojądrzaste dojrzałe komórki mięśniowe. Pomimo że komórki satelitowe znajdują się już na określonej drodze różnicowania (committed progenitor cells) udowodniono, że mogą jednak zmieniać tor różnicowania zależnie od środowiska, w którym się znajdują. Tę ich właściwość wykorzystano w próbach regeneracji mięśnia sercowego (19, 27).

Komórki macierzyste gonady męskiej. Tkanką, w której w trakcie życia dorosłego osobnika są aktywne komórki macierzyste jest gonada męska. U ssaków zarodkowe komórki płciowe (PGC – primordial germ cells) powstające z ektodermalnego listka zarodkowego, migrują do kanalików nasiennych płodu, zaprzestają podziałów i stają się gonocytami (które w przeciwieństwie do oocytów zachowują potencjał komórek macierzystych). Po urodzeniu, gonocyty migrują w kierunku błony podstawnej kanalika plemnikotwórczego i różnicują się w spermatogonialne komórki macierzyste (SSC – spermatogonial stem cells). Jako komórki macierzyste, SSC posiadają wspólne cechy z innymi komórkami macierzystymi, a mianowicie zdolność do odnawiania własnej populacji i jednocześnie produkowania komórek różnicujących się. Transplantacja komórek gonady męskiej, po raz pierwszy przeprowadzona na myszach w 1994 r. (4, 5), pozwoliła na funkcjonalne badania spermatogonialnych komórek macierzystych. Tylko około 1% spermatogonii to komórki macierzyste, znakomita większość to te, które weszły już na drogę różnicowania. Te dwie populacje komórek trudno rozróżnić na drodze analizy morfologicznej czy biochemicznej (23).

Spermatogonialne komórki macierzyste są jedynymi komórkami, które ulegają samoodnawianiu przez całe dorosłe życie osobnika i przenoszą geny do następnych pokoleń. Dlatego są przedmiotem szczególnego zainteresowania naukowców i klinicystów. Ich przechowywanie, hodowla i transplantacja są istotne dla poznania biologii komórek macierzystych, zachowania indywidualnych genomów i modyfikacji linii germinalnych.

Transplantacja komórek macierzystych w celu regeneracji narządów i tkanek

Naprawa uszkodzonych tkanek i organów jest istotnym procesem w leczeniu wielu schorzeń. Tkanki różnią się własnym potencjałem regeneracyjnym. W konsekwencji naprawa jest zazwyczaj bardziej efektywna w tkankach, w których występuje naturalna szybka wymiana komórek. Na przykład uszkodzenia skóry czy złamania kości mogą pozostawiać długotrwałe blizny, ale odzyskanie funkcji narządu następuje w ciągu kilku tygodni. W regeneracji narządów i tkanek z zastosowaniem komórek macierzystych można używać embrionalnych komórek macierzystych bądź tkankowych komórek macierzystych, względnie też wykorzystywać odróżnicowane dojrzałe komórki. Pozyskiwanie komórek macierzystych z ludzkich zarodków do celów terapeutycznych i badawczych wzbudza wątpliwości natury etycznej. Z drugiej strony, ogromny postęp w leczeniu wielu schorzeń, który niewątpliwie gwarantują badania prowadzone na ludzkich komórkach embrionalnych, rodzi wielkie nadzieje zarówno u pacjentów, jak i u lekarzy. Klonowanie dałoby możliwość uzyskania autologicznych macierzystych komórek embionalnych ES (embryonic stem cells). Każdego roku miliony osób zapadają i umierają na poważne choroby degeneracyjne układu nerwowego, zawały serca, choroby trzustki, wątroby i innych organów. Terapia z zastosowaniem komórek macierzystych mogłaby złagodzić cierpienia lub nawet prowadzić do trwałego wyleczenia.

Mniej kontrowersyjne etycznie wydaje się stosowanie autologicznych somatycznych komórek macierzystych. Mają one dodatkową zaletę: stosując je nie ma konieczności immunologicznej selekcji dawcy i biorcy. O potencjale regeneracyjnym tkanki decyduje obecność komórek macierzystych, np. mioblastów w mięśniach szkieletowych. Jednak nie we wszystkich narządach potwierdzono obecność komórek macierzystych, np.: mięsień sercowy wydaje się mieć ograniczone zdolności regeneracyjne, wynikające jedynie ze wzrostu i regeneracji kardiomiocytów, a nie dzięki zastępowaniu zniszczonych kardiomiocytów nowymi komórkami, powstałymi na drodze różnicowania narządowych komórek macierzystych. Transplantacje komórek mogą rozwiązać problem niezdolności tkanki do samoregeneracji. Pierwszą udaną regeneracją organu z zastosowaniem komórek macierzystych była transplantacja szpiku kostnego (28).

Lista narządów, które potencjalnie mogą być podane regeneracji poprzez zastosowanie komórek macierzystych stale rośnie. Dzieje się tak między innymi z powodu postępu wiedzy na temat biologii komórek macierzystych. Obecnie prowadzi się prace badawcze z zastosowaniem komórek macierzystych dla szeregu tkanek wchodzących w skład: naczyń krwionośnych, kości, rogówki, zębiny, mięśnia sercowego, wątroby, trzustki, centralnego układu nerwowego, mięśni szkieletowych, skóry.

Do niedawna sądzono, że tkankowe komórki macierzyste mogą dawać początek tylko komórkom specyficznym dla tkanki, którą zasiedlają. Jednak pojawia się coraz więcej doniesień świadczących o znacznie większej plastyczności komórek macierzystych. Udało się, na przykład, z powodzeniem odróżnicować/przeprogramować komórki macierzyste szpiku w komórki neuronalne (3, 20), komórki hematopoetyczne w komórki wątroby (14). Natomiast zróżnicowane komórki centralnego układu nerwowego wprowadzone do blastocysty różnicowały się w różne typy komórek, inne niż komórki układu nerwowego (6).

Postuluje się, że niewielka liczba pluripotencjalnych komórek (podobnych do macierzystych komórek embrionalnych ES) egzystuje w każdym organie dojrzałego osobnika. Komórki te, w zależności od potrzeb, odpowiednio do powstałego lokalnie mikrośrodowiska mogą różnicować się w komórki tkanki, którą zasiedlają (31).

Nowe możliwości dla terapii z udziałem komórek macierzystych otwierają się dzięki rozwojowi technik transgenezy. Genetyczna modyfikacja komórek macierzystych może być z powodzeniem wykorzystana w połączeniu z terapią genową, szczególnie dobrze nadają się do tego celu macierzyste komórki hematopoetyczne (1).

Rzeczywistość techniki transplantacji spermatogonii otworzyła nowe możliwości badania podstawowych aspektów spermatogenezy, tworzenia transgenicznych zwierząt i zachowania płodności przez pacjentów poddanych chemio- i/lub radioterapii (8).

Perspektywy zastosowania komórek macierzystych w medycynie obejmują także procesy rewitalizacji oraz walki ze starzeniem organizmu. Mogą one przyczynić się do polepszenia jakości życia w niespotykanym dotąd wymiarze.

Piśmiennictwo

- Asahara T., Kalka C., Isner J. M.: Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Therapy* 2000, 7, 451-457.
- Azizi S. A., Stokes D., Augelli B. J., DiGirolamo C., Prockop D. J.: Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brain of albino rats-similarities to astrocyte grafts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1998, 95, 3908-3913.
- Brazelton T. R., Rossi F. M., Keshed G. I., Blau H. M.: From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 2000, 290, 1775-1779.
- Brinster R. L., Zimmermann J. W.: Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1994, 91, 11298-11302.
- Brinster R. L., Avarbock M. R.: Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1994, 91, 11303-11307.
- Clarke D. L., Johansson C. B., Wilbertz J., Veress B., Nilsson E., Karlstrom H., Lendahl U., Frisen J.: Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000, 288, 1660-1663.
- Gussoni E., Soneoka Y., Strickland C. D., Buzney E. A., Khan M. K., Flint A. F., Kunkel L. M., Mulligan R. C.: Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999, 401, 390-394.
- Jadyar F., Creemers L. B., van Dissel-Emiliani F. M., van Pelt A. M., de Rooij D. G.: Spermatogonial stem cell transplantation. *Mol. Cell Endocrinol.* 2000, 169, 21-26.
- Jackson K. A., Majka S. M., Wang H., Pocius J., Hartley C. J., Majesky M. W., Entman M. L., Michael L. H., Hirschi K. K., Goodell M. A.: Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J. Clin. Invest.* 2001, 107, 1395-1402.
- Kawaguchi A., Miyata T., Sawamoto K., Takashita N., Murayama A., Akamatsu W., Ogawa M., Okabe M., Tano Y., Goldman S. A., Okano H.: Nestin-EGFP transgenic mice: visualization of self-renewal of CNS stem cells. *Mol. Cell Neurosci.* 2001, 17, 259-273.
- KeYoung H. M., Roy N. S., Benraiss A., Luoissant A. Jr, Suzuki A., Hashimoto M., Rashbaum W. K., Okano H., Goldman S. A.: High-yield selection and extraction of two promoter-defined phenotypes of neural stem cells from the fetal human brain. *Nat. Biotechnol.* 2001, 19, 843-850.
- Kocher A. A., Schuster M. D., Szaboels M. J., Takuma S., Burkhoff D., Wang J., Homma S., Edwards N. M., Itescu S.: Neovascularisation of ischemic myocardium by human bone-marrow derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature Med.* 2001, 7, 430-436.
- Kuznetsov S. A., Mankani M. H., Gronthos S., Satomura K., Bianco P., Robey P. G.: Circulating skeletal stem cells. *J. Cell Biol.* 2001, 153, 1133-1140.
- Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M., Reitsma M., Dohse M., Osborne L., Wang X., Finegold M., Weissman I. L., Grompe M.: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Med.* 2000, 6, 1229-1231.
- Lagasse E., Shizera J. A., Uchida N., Tsukamoto A., Weissman I. L.: Toward regenerative medicine. *Immunity* 2001, 14, 425-436.
- Luskin M. B., Pearlman A. L., Sanes J. R.: Cell lineage in the cerebral cortex of the mouse studied in vivo and in vitro with recombinant retrovirus. *Neuron* 1988, 1, 635-647.
- Makino S., Fukuda K., Miyoshi S., Konishi F., Kodama H., Pan J., Sano M., Takahashi T., Hori S., Abe H., Hata J., Umezawa A., Ogawa S.: Cardiomycocytes can be generated from marrow stromal cell in vitro. *J. Clin. Invest.* 1999, 103, 697-705.
- Mauro A.: Satellite cells of skeletal muscle fibers. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 1961, 9, 493-495.
- Menasché P., Hugelè A. A., Scoeci M., Pouzet B., Desnos M., Diboc D., Schwartz K., Vilquin J. T., Marolleau J. P.: Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001, 375, 279-280.
- Mezey E., Chandross K. L., Harta G., Maki R. A., McKecher S. R.: Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 2000, 290, 1779-1782.
- Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S. M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D. M., Leri A., Anversa P.: Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001, 410, 701-705.
- Reynolds B. A., Weiss S.: Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992, 255, 1707-1710.
- de Rooij D. G.: Stem cells in the testis. *Int. J. Exp. Pathol.* 1998, 79, 67-80.
- Roy N. S., Benraiss A., Wang S., Fraser R. A., Goodman R., Couldwell W. T., Nedergaard M., Kawaguchi A., Okano H., Goldman S. A.: Promoter-targeted selection and isolation of neural progenitor cells from the adult human ventricular zone. *J. Neurosci. Res.* 2000, 59, 321-331.
- Roy N. S., Wang S., Jiang L., Kang J., Benraiss A., Harrison-Restelli C., Fraser R. A., Couldwell W. T., Kawaguchi A., Okano H., Nedergaard M., Goldman S. A.: In vitro neurogenesis by progenitor cells isolated from the adult human hippocampus. *Nat. Med.* 2000, 6, 271-277.
- Sawamoto K., Yamamoto A., Kawaguchi A., Yamaguchi M., Mori K., Goldman S. A., Okano H.: Direct isolation of committed neuronal progenitor cells from transgenic mice coexpressing spectrally distinct fluorescent proteins regulated by stage specific neural promoters. *J. Neurosci. Res.* 2001, 65, 220-227.
- Siminiak T., Kalawski, R., Kurpisz M.: Przeszczep mioblastów w leczeniu pozawałowym zaburzeń kurczliwości mięśnia sercowego. *Kardiol. Pol.* 2002, 56, 134-136.
- Thomas E. D.: Frontiers in bone marrow transplantation. *Blood Cells* 1991, 17, 259-267.
- Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall V. S., Jones J. M.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998, 282, 1145-1147.
- Wakitani S., Saito T., Caplan A. L.: Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995, 18, 1417-1426.
- Weissman I. L.: Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 2000, 100, 157-168.