

УДК 576.3:57.017.642:602.9

ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА*

© 2013 г. А.Г. Мензоров

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;
Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, Россия, e-mail: menzorov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 6 марта 2013 г. Принята к публикации 17 марта 2013 г.

Рассмотрены современные представления об эмбриональных стволовых клетках мыши и человека. Обсуждаются предпосылки и методы их получения, стратегия доказательства плюрипотентности, проблемы при долговременном культивировании *in vitro*. Освещены некоторые проблемы биологии эмбриональных стволовых клеток и перспективы использования для клеточной терапии.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки, плюрипотентность.

ВВЕДЕНИЕ

Клетки млекопитающих отличаются по способности к делению и дифференцировке. Тотипотентные клетки, такие, как зигота и бластомеры, способны дифференцироваться в экстраэмбриональные ткани и формировать эмбрион. На стадии бластоцисты потенциал клеток эмбриона уже ограничен, клетки трофобласта дадут экстраэмбриональные ткани, а клетки внутренней клеточной массы (ВКМ) – ткани эмбриона. Эмбриональные стволовые (ЭС) клетки получают из ВКМ бластоцисты. Как и клетки ВКМ, они обладают способностью к самообновлению и плюрипотентностью, т. е. потенциалом к дифференцировке в клетки, производные трех зародышевых листков: эктодермы, мезодермы и энтодермы, а также в клетки зародышевого пути. Долгое время считалось, что ЭС клетки не способны давать экстраэмбриональные производные, однако недавно было экспериментально показано, что в популяции ЭС клеток есть клетки, обладающие таким потенциалом (Macfarlan *et al.*, 2012). При развитии эмбриона потенциал к дифференцировке постепенно снижается. Следующий этап потери потенциала к дифференцировке после плюрипотентных ЭС

клеток – мультипотентные стволовые клетки, такие, как гемопоэтические. Гемопоэтические стволовые клетки способны дифференцироваться во все клеточные типы крови. Олигопотентные стволовые клетки, например миелоидные предшественники, могут дифференцироваться в несколько типов клеток. Унипотентные клетки, такие, как тучные клетки, – только в один. И, наконец, нуллипотентность соответствует терминальной дифференцировке.

Способность ЭС клеток мыши и человека к неограниченному делению в культуре и дифференцировке в производные трех зародышевых листков сделала их важным объектом для использования в качестве модели для изучения эмбрионального развития, генетических заболеваний и, говоря об ЭС клетках мыши, для получения трансгенных животных. ЭС клетки человека – один из перспективных источников клеточного материала для клеточной терапии различных заболеваний.

НАЧАЛО: ТЕРАТОКАРЦИНОМЫ МЫШИ

Тератокарцинома – это герминативная опухоль, состоящая из смеси дифференцированных и недифференцированных клеток. В 1954 г. было

* Работа написана на основе доклада, прочитанного в ИЦиГ СО РАН (http://www.bionet.nsc.ru/asp/?page_id=86).

показано, что из клеток эмбриональной тератоканциномы (ЭК) мышей линии 129 формируются как быстро дифференцирующиеся клетки, так и подобные им недифференцированные (Stevens, Little, 1954). Фактически это определение эмбриональных стволовых клеток, в котором отражена как способность к самообновлению, так и, частично, плюрипотентность. Клетки ЭК получают из спонтанных опухолей семенников мыши. Их основные характеристики *in vivo* – перевиваемость и способность индивидуальной клетки дать спектр дифференцированных тканей. Так как при получении клеток ЭК *in vitro* образуется мультиклональная популяция, возникает вопрос, действительно ли клетки ЭК дифференцируются в клеточные типы различных зародышевых листков, или же популяция клеток изначально гетерогенная и уже содержит различные клетки-предшественники. В 1972 г. было показано, что клоны, полученные из индивидуальных клеток ЭК, сохраняют способ-

ность к дифференцировке в разные типы клеток, т. е. дифференцировка действительно проходит *in vitro* (Evans, 1972). Следует отметить, что для сохранения плюрипотентности клеток ЭК Мартин Эванс использовал питающие (фидерные) клетки, облученные гамма-излучением фибробласты цыпленка. Оказалось, что выделяемые ими ростовые факторы необходимы для поддержания плюрипотентности.

Клетки ЭК в 1950–1970-е гг. стали уникальной системой для изучения дифференцировки плюрипотентных клеток *in vitro*. Дифференцировка клеток ЭК с образованием эмбрионных телец напоминает дифференцировку внутренней клеточной массы (ВКМ) нормального эмбриона (рис. 1, а, б). При этом в отличие от эмбриона *in vivo* их можно сравнительно легко изучать. Таким образом, можно считать, что клетки эмбриональной карциномы ведут себя в культуре, как клетки эмбриона в норме, но вне контекста (Martin, Evans, 1975).

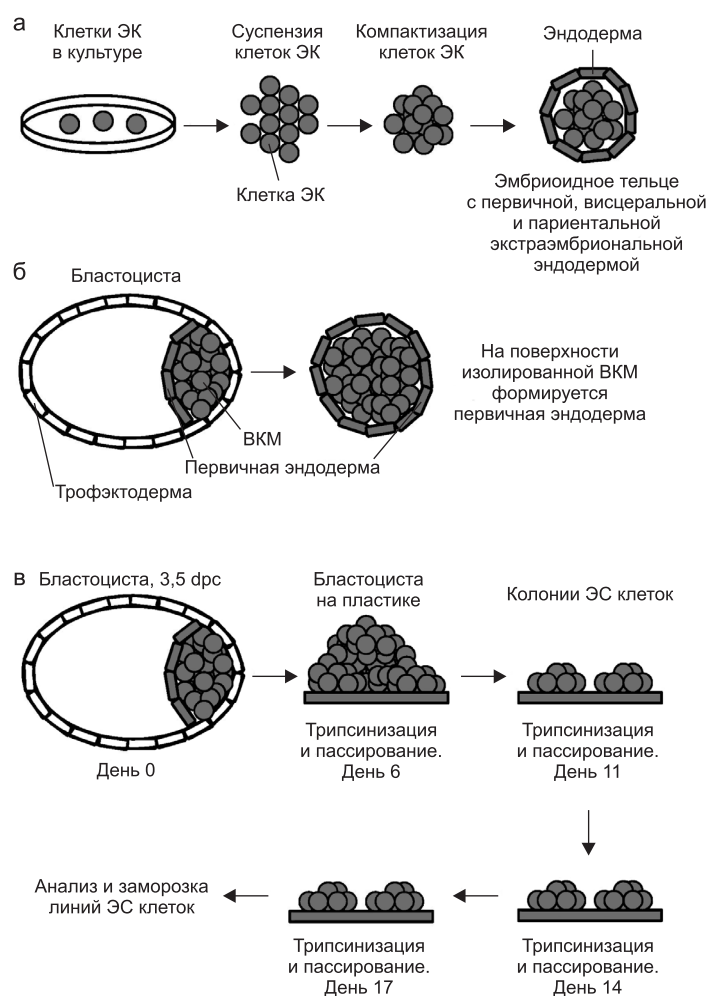


Рис. 1. Культивирование плюрипотентных клеток мыши.

а – формирование эмбрионных телец при дифференцировке клеток ЭК; б – формирование эмбрионных телец при изолировании ВКМ (Evans, 2011, с модификациями); в – схема получения линий ЭС клеток (Bruja *et al.*, 2006, с модификациями).

Помимо дифференцировки *in vitro* в клетки, производные трех зародышевых листков, плюрипотентность клеток ЭК была показана с помощью формирования химерных мышей. После введения клеток ЭК в бластоцисту были получены мыши, имеющие потомков клеток ЭК в тканях, производных экто-, мезо- и энтодермы (Mintz, Illmensee, 1975; Papaioannou *et al.*, 1975). В отличие от клеток эмбриона практически все линии клеток ЭК имеют анеуплоидию и другие генетические и эпигенетические нарушения, поэтому они не вносят вклад в зародышевый путь, т. е. не проходят гаметогенез. Лишь некоторые линии клеток ЭК с околотилоидным хромосомным составом способны формировать функциональные гаметы (Bradley *et al.*, 1984).

В 1978 г. был сделан еще один важный для характеристики клеток ЭК шаг – были получены моноклональные антитела на поверхностный антиген SSEA1 (stage-specific embryonic antigen 1, стадийноспецифичный эмбриональный антиген 1) клеток ЭК линии F9 (Solter, Knowles, 1978). Оказалось, что SSEA1 можно использовать как для специфичной окраски клеток ЭК, так и для окраски ВКМ и зародышевых клеток мыши.

ПОЛУЧЕНИЕ ЭС КЛЕТОК МЫШИ

К 1981 г. были разработаны методы культивирования клеток ЭК, в том числе с использованием питающих клеток, протоколы дифференцировки и найден поверхностный антиген SSEA1, позволяющий их идентифицировать. Кроме того, линия мышей 129 с высокой частотой образования спонтанных тератокарцином оказалась очень удачным выбором для получения ЭС клеток мыши. Так, позднее было показано, что только из трех линий мышей можно легко получить ЭС клетки: 129, C57BL и BALB (Hanna *et al.*, 2010b). С использованием этих достижений в 1981 г. две группы исследователей впервые получили эмбриональные стволовые клетки мыши. Эванс и Кауфман получили ЭС клетки путем высаживания бластоцист на слой фидерных клеток (Evans, Kaufman, 1981). Мартин Гейл в том же году опубликовала метод получения ЭС клеток с помощью иммунохирургического выделения ВКМ (Martin, 1981). Этот метод не получил распространения, а предложенный Мартин термин

«эмбриональные стволовые клетки» до сих пор используется.

Основные принципы получения ЭС клеток мыши за более чем 30 лет изменились незначительно. Кратко один из современных протоколов представлен на рис. 1, в. Бластоцисты на стадии 3,5 dpc высаживают на слой фидерных клеток, эмбриональных фибробластов мыши, инактивированных митомицином С. Среда для культивирования содержит DMEM (минимальная необходимая среда, модификация Дульбекко), 20 % KSR (нокаутный заменитель сыворотки), NEAA (дополнительные аминокислоты), L-глутамин, антибиотики и LIF (фактор ингибирования лейкемии). Через 6 дней бластоцисту дезагрегируют трипсином до единичных клеток или конгломератов из нескольких клеток и пересаживают на фидерные клетки в среду с 20 %-й эмбриональной сывороткой. На следующий день среду снова меняют на содержащую KSR и клетки культивируют до появления колоний. Затем пассирование повторяют до получения достаточного количества клеток для заморозки и анализа, например, нескольких миллионов клеток. Морфологически колонии ЭС клеток мыши многослойные, с четкими краями, границ между клетками не видно, а клетки имеют большое ядерно-цитоплазматическое соотношение.

Эмбриональная сыворотка должна быть специально тестирована на способность поддерживать рост ЭС клеток. Сыворотка содержит множество ростовых факторов, большинство лотов сыворотки стимулируют дифференцировку ЭС клеток и, соответственно, непригодны для культивирования плюрипотентных клеток. KSR в отличие от сыворотки – синтетический заменитель сыворотки, который имеет известный и полностью контролируемый состав. Кроме того, KSR не поддерживает рост трофобластных стволовых клеток, которые могут контаминировать культуру ЭС клеток. Сыворотка в вышеописанном протоколе используется для инактивации трипсина и, возможно, дает некоторые необходимые для поддержания плюрипотентности факторы. Роль LIF заключается в блокировке дифференцировки ЭС клеток, показано, что в присутствии LIF можно получать ЭС клетки без фидерных клеток (Nichols *et al.*, 1990). Считается, что физиологическая

роль этого фактора – поддержание жизнеспособности клеток ВКМ в диапаузе.

ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ ЭС КЛЕТОК МЫШИ

Плюрипотентность ЭС клеток обеспечивается ключевыми транскрипционными факторами – Oct4, Sox2 и Nanog. На рис. 2 представлена упрощенная схема сети генов, регулирующей плюрипотентность. Транскрипционный фактор Oct4 связывается с октамером 5'-ATTTGCAT-3', экспрессия этого фактора показана в плюрипотентных клетках и клетках зародышевого пути. Oct4 осуществляет регуляцию транскрипции как сам по себе, так и в комплексе с транскрипционным фактором Sox2. Транскрипционный фактор Nanog (Tír na nÓg (Тир на Ног) – в кельтской мифологии «остров юных», страна вечной молодости) экспрессируется в плюрипотентных клетках и обеспечивает самообновление ЭС клеток (Chambers *et al.*, 2003).

Транскрипционные факторы Oct4, Sox2 и Nanog представляют собой внутреннюю регуляторную сеть. Внешние сигналы, факторы LIF и BMP4 (костный морфогенный белок 4), связываются с рецепторами на поверхности клетки и активируют сигнальные пути JAK-Stat и MAPK. В результате LIF ингибирует дифференцировку в мезодерму и энтодерму, BMP4 – в нейроэктодерму, ЭС клетки остаются в недифференцированном состоянии. В целом самообновление ЭС клеток регулируют внешние и

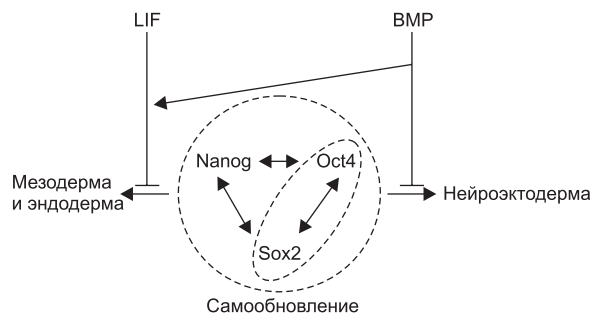


Рис. 2. Поддержание плюрипотентности в ЭС клетках мыши (Friel *et al.*, 2005, с модификациями).

внутренние факторы. Изучение роли LIF и BMP4 в поддержании плюрипотентности в 2003 г. позволило исследователям *de novo* получить плюрипотентные ЭС клетки без использования сыворотки (Ying *et al.*, 2003). Авторы использовали среду, содержащую комплексные добавки B2 и N27, вместе с LIF и BMP4.

Плюрипотентность – это способность к самообновлению и дифференцировке. Для ЭС клеток мыши существуют методы дифференцировки *in vitro* и *in vivo*. Самый простой в лабораторных условиях метод оценки плюрипотентности – дифференцировка *in vitro*. В табл. 1 приведены основные способы дифференцировки *in vitro* с описанием достоинств и недостатков. В целом спонтанная дифференцировка в эмбрионидные тельца является аналогом эмбрионального развития. Использование сокультивирования со стромальными клетками позволяет осуществлять направленную диф-

Таблица 1

Методы дифференцировки ЭС клеток *in vitro* (Nishikawa *et al.*, 2007, с модификациями)

Характеристики	Методы		
	Эмбрионидные тельца	Сокультивирование	Использование матрикса
Тип дифференцировки	Аналог эмбрионального развития	Направленная дифференцировка	Направленная дифференцировка
Подбор условий культивирования	Просто	Просто	Сложно
Технические сложности	Просто	Культивирование стромальных клеток	Просто
Морфогенез	Возможен	Сложно	Сложно
Цена	Низкая	Средняя	Высокая
Сортировка клеток	Абсолютно необходима	Необходима	Часто не требуется
Лимитирующие факторы	Сортировка клеток	Сортировка клеток	Подбор условий культивирования

ференцировку. Стромальные клетки образуют поверхность, имитирующую нормальное клеточное окружение, кроме того, они выделяют различные сигнальные молекулы, которые могут стимулировать или ингибировать различные пути дифференцировки. Использование полимерного матрикса, которым покрывают дно пластиковых чашек, в некоторых случаях позволяет эффективно направлять дифференцировку (Nishikawa *et al.*, 2007). Для дифференцировки в различные типы клеток используют такие покрытия, как фибронектин, коллаген, поли-L-орнитин, поли-L-лизин, матригель, желатин и др. На сегодняшний день ЭС клетки удалось дифференцировать во множество типов клеток, таких, как адипоциты, остеобласты, астроциты, различные типы нейронов, гемопоэтические клетки, эндотелиальные, гепатоциты, кератиноциты, мышечные и др. (Wobus, Boheler, 2005). Совсем недавно из ЭС клеток были получены функциональные сперматозоиды и даже ооциты (Hayashi *et al.*, 2011, 2012).

Дифференцировка *in vivo* включает в себя тесты на формирование тератом и получение химерных животных. Для получения тератом ЭС клетки вводят сингенным или иммунодефицитным мышам, например, подкожно в область загривка. Это приводит к образованию опухоли (тератомы) с тканями и даже органами, напоминающими нормальные производные трех зародышевых листков. Присутствие в тератомах молекулярных маркеров дифференцированных тканей и иммуногистохимический анализ позволяют делать вывод о плюрипотентности ЭС клеток в случае присутствия производных трех зародышевых листков.

Второе направление *in vivo* тестирования плюрипотентности – получение химерных животных (рис. 3). Наиболее простой способ – агрегация ЭС клеток с морулой с последующей подсадкой реципиентному животному (рис. 3, а). Можно также проводить агрегацию группы ЭС клеток с двумя морулами (метод «сэндвича»). Другой вариант – инъекция ЭС клеток в бластоцисту (рис. 3, б). Из-за удобства химеризм обычно оценивают по доле клеток донора в коже, т. е. по цвету шерсти. Линию реципиентных мышей выбирают так, чтобы окраска отличалась от линии донора. При этом химеры с незначительным вкладом клеток донора могут быть не

распознаны, а анализ на химеризм по тканям внутренних органов обычно не проводят из-за трудоемкости. Относительно недавно появился метод тетраплоидной комплементации (Nagy *et al.*, 1990, 1993). ЭС клетки агрегируют с тетраплоидными морулами или же вводят в бластоцисту тетраплоидной бластоцисты (рис. 3, в). Тетраплоидные клетки образуют экстраэмбриональные производные, а эмбрион формируется в основном из клеток донора, так как тетраплоидные клетки медленнее делятся и могут иметь ограниченный потенциал к дифференцировке. Так можно получить мышь, практически целиком состоящую из дифференцированных производных ЭС клеток. Прохождение ЭС клетками теста тетраплоидной комплементации можно считать наиболее сильным доказательством плюрипотентности.

ПОЛУЧЕНИЕ ЭС КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Через 17 лет после получения ЭС клеток мыши в разделе «Краткие сообщения» журнала «Science» была опубликована первая статья по получению ЭС клеток человека (Thomson *et al.*, 1998). Для получения ЭС клеток группа Томсона использовала 14 эмбрионов на стадии дробления, которых культивировали до стадии

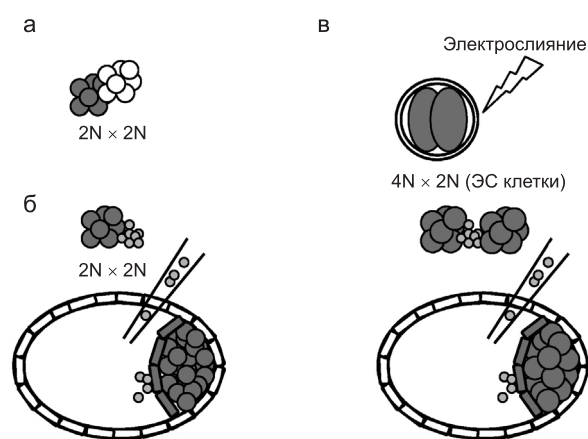


Рис. 3. Получение химерных мышей (Tam, Rossant, 2003, с модификациями).

а – агрегация двух восьмиклеточных эмбрионов; б – агрегация восьмиклеточного эмбриона с ЭС клетками или инъекция ЭС клеток в бластоцисту; в – тетраплоидная комплементация: агрегация тетраплоидного (4n) восьмиклеточного эмбриона с диплоидными (2n) ЭС клетками или инъекция диплоидных ЭС клеток в тетраплоидную бластоцисту.

бластоцисты. После иммунохирургического выделения клеток ВКМ и их дальнейшего культивирования удалось получить 5 линий ЭС клеток: H1, H13 и H14 – (46, XY), H7 и H9 – (46, XX). Интересно, что эта же группа в 1995 г. получила ЭС клетки макаки-резуса, используя тот же протокол (Thomson *et al.*, 1995). Почему получение ЭС клеток приматов потребовало столько лет? Здесь можно сделать несколько предположений. Для культивирования ЭС клеток очень важны свойства сыворотки крови телят, одного из компонентов среды для культивирования. Некоторые лоты сыворотки могут поддерживать рост ЭС клеток в недифференцированном состоянии, однако большая часть стимулирует дифференцировку. В настоящее время для культивирования ЭС клеток человека используют синтетические заменители сыворотки с известным составом. Кроме того, оказалось, что техника культивирования ЭС клеток человека отличается от таковой для мыши. Клетки мыши при пересадке трипсином разбивают до одноклеточной суспензии, так как они обладают клоногенностью. Что касается человеческих ЭС клеток, они клоногенностью практически не обладают и гибнут при отсутствии клеточных контактов, если не применять, например, ингибитор ROCK киназы Y-27632 (Watanabe *et al.*, 2007). Кроме того, для поддержания ЭС клеток человека в недифференцированном состоянии не требуется LIF, зато необходим bFGF, основной фактор роста фибробластов. Таким образом, культивирование ЭС клеток человека существенно отличается от культивирования ЭС клеток мыши. И, возможно, самая большая сложность – получение разрешения этической комиссии на работу с человеческими эмбрионами требует времени. Таким образом, различия в свойствах ЭС клеток человека и мыши и более высокая требовательность ЭС клеток человека к условиям культивирования затруднили их получение.

ПЛЮРИПОТЕНТНОСТЬ ЭС КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Колонии ЭС клеток человека плоские, с достаточно четкими границами между клетками. Среди поверхностных маркеров можно выделить SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 и TRA-1-81

(Thomson *et al.*, 1998). Интересно, что в отличие от ЭС клеток мыши SSEA1 экспрессируется на поверхности ЭС клеток человека, уже начавших дифференцировку. Как и для ЭС клеток мыши регуляция плюрипотентности осуществляется ключевыми транскрипционными факторами Oct4, Sox2 и Nanog.

ЭС клетки человека дифференцируются при отсутствии в среде для культивирования bFGF. *In vitro* дифференцировка с образованием эмбрионидных телец путем сокультивирования или культивирования на матриксе также позволяет получить множество различных типов клеток (Wobus, Boheler, 2005). *In vivo* тест на плюрипотентность для ЭС клеток человека – образование тератом при введении иммунодефицитным мышам. Например, в работе Томсона в тератомах из потомков ЭС клеток человека было показано образование эпителия желудочно-кишечного тракта (энтодерма), кости, хряща, гладкой и поперечнополосатой мускулатуры (мезодерма), нейрального эпителия, эмбриональных ганглиев и эпителиальных клеток (эктодерма) (Thomson *et al.*, 1998). По понятным причинам тест на химеризм для человека недоступен.

СРАВНЕНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА И МЫШИ

Свойства ЭС клеток человека и мыши существенно различаются. В табл. 2 представлена их сравнительная характеристика. Оба клеточных типа позитивны по экспрессии щелочной фосфатазы, хотя в настоящее время этот маркер уже не считается специфичным только для плюрипотентных клеток. Другие поверхностные маркеры ЭС клеток различаются. Основные транскрипционные факторы, регулирующие плюрипотентность, совпадают, кроме того, активность теломеразы делает возможным самообновление и тех и других ЭС клеток. Существенные отличия видны в факторах, необходимых для поддержания плюрипотентности, например, для ЭС клеток мыши это LIF, а для человека – bFGF. Морфологически ЭС клетки человека и мыши отличаются, кроме того, без применения специальных факторов ЭС клетки человека практически не обладают клоноген-

Таблица 2
Сравнительная характеристика
ЭС клеток мыши и человека
(Wobus, Boheler, 2005, с модификациями)

Характеристика	ЭС клетки мыши	ЭС клетки человека
SSEA-1	+	–
SSEA-3, SSEA-4	–	+
TRA-1-60, TRA-1-81	–	+
Щелочная фосфатаза	+	+
Oct4, Sox2, Nanog	+	+
Активность теломеразы	+	+
Факторы, необ- ходимые для самообновления	LIF, BMP4, фидер*	bFGF, фидер*
Рост <i>in vitro</i>	Многослойные колонии	Плоские колонии
Эмбрионидные тельца	Простые и сложные	Простые
Дифферен- цировка	3 зародышевых листка и зародышевый путь	3 зародышевых листка и трофобласт
Формирование тератом	+	+
Статус X-хромосом	ХаХа	ХаХа/ХаXi

* Не является необходимым.

ностью. Для ЭС клеток человека характерна спонтанная дифференцировка в клетки трофобласта, в то время как до недавнего времени считалось, что для ЭС клеток мыши такая дифференцировка нехарактерна, ее возможность была подтверждена лишь сравнительно недавно (Macfarlan *et al.*, 2012). ЭС клетки мыши могут дифференцироваться в гаметы, это было показано с помощью химерных животных и недавно – *in vitro* (Hayashi *et al.*, 2011, 2012). Для ЭС клеток человека дифференцировка в гаметы пока не получена. Еще одно отличие ЭС клеток мыши и человека – статус X-хромосом. Для ЭС клеток мыши не характерна инактивация X-хромосом, оба гомолога активны, в то время как в различных линиях ЭС клеток человека

или же среди клеток одной линии могут быть как Ха/Ха, так и Ха/Xi клетки.

Тот факт, что ЭС клетки мыши и человека имеют существенные различия, вызывает вопрос, а действительно ли ЭС клетки человека можно считать «настоящими» эмбриональными стволовыми? Следует отметить, что для мыши плюрипотентность помимо ЭС клеток показана для эпибластных стволовых клеток (эпиСК), выделяемых из эпибласта постимплантационного эмбриона, и для герминальных стволовых клеток (ГСК), получаемых из гонадного валика. Эти клеточные типы хотя и считаются плюрипотентными, но имеют ограниченный потенциал к дифференцировке. В табл. 3 приведено сравнение ЭС клеток и эпиСК. Было предложено называть ЭС клетки, полученные из ВКМ на «ранней» стадии плюрипотентности, «naïve», а более «поздние» эпиСК – «primed» (Hanna *et al.*, 2010b). ЭС клетки и эпиСК отличаются клоногенностью, по морфологии, способности давать химеры, активности ключевых транскрипционных факторов, статусу инактивации X-хромосом. Можно видеть, что

Таблица 3
Сравнительная характеристика
ЭС клеток и эпиСК
(Hanna *et al.*, 2010b, с модификациями)

Характеристика	«Naïve» ство- ловые клетки	«Primed» ство- ловые клетки
Тип клеток	ЭС клетки, ГСК	ЭпиСК
Эмбриональные тельца	+	+
Тератомы	+	+
Химеры	+	–
Клоногенность	Высокая	Низкая
Время удвоения	10–14 ч	14–16 ч
Морфология колоний	Куполо- образная	Уплощенная
SSEA-1, щелоч- ная фосфатаза	+	+
Oct4, Sox2	+	+
Nanog, Klf2, Klf4, Rex1, Stella	Высокая++	Низкая/нет +/-
Статус X-хромосом	ХаХа	ХаXi

свойства эпСК мыши и ЭС клеток человека во многом схожи. Это позволяет предположить, что ЭС клетки человека соответствуют «primed» плюрипотентности.

Говоря об ЭС клетках мыши, нужно отметить, что только от ограниченного числа линий мышей удастся получить «naïve» ЭС клетки, например из 129, C57BL и BALB. Для получения ЭС клеток из других линий мышей и других видов грызунов, например крысы, необходимо использовать дополнительные факторы, такие, как «2i», ингибиторы киназ GSK3b и ERK1/2 (Buehr *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008). Интересно, что условия культивирования позволяют манипулировать статусом плюрипотентности. Добавление 2i к эпСК мыши позволяет перевести их в «naïve» состояние. Для ЭС клеток человека также удалось перевести их из «primed» состояния в «naïve» добавлением форсколина и 2i, но только на несколько пассажей (Hanna *et al.*, 2010a).

Таким образом, ЭС клетки человека и мыши имеют достаточно существенные различия, связанные не только с различной биологией двух видов, но и со статусом плюрипотентности. С этим также связаны различия протоколов дифференцировки ЭС клеток и неприменимость многих данных, полученных на ЭС клетках мыши, для изучения человеческих ЭС клеток.

ПРОБЛЕМЫ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ЭС КЛЕТОК *IN VITRO*

Культивирование *in vitro* приводит к различным эпигенетическим и генетическим нарушениям. Методом тетраплоидной комплементации были получены мыши, практически полностью происходящие из ЭС клеток (Nagy *et al.*, 1990, 1993). Часть рожденных особей имела различные нарушения, а при использовании ЭС клеток на поздних пассажах получить живых мышей не удавалось. Было сделано предположение, что при культивировании *in vitro* нарушается статус импринтированных генов. И действительно, изучение статуса импринтинга двух генов с материнской экспрессией (*Igf2r* и *H19*) и двух — с отцовской (*Igf2*, *U2af1-rs1*) выявило нарушение импринтинга как *in vitro* в ЭС клетках, так и у родившихся мышат (Dean *et al.*, 1998). Считается, что около 1 % генов млекопитающих

имеют монородительскую экспрессию, так что в условиях *in vitro*, когда импринтинг для выживания клеток не важен, создаются предпосылки для накопления эпигенетических аномалий.

Хромосомный состав ЭС клеток мыши также изменяется при культивировании. В 2006 г. был проведен масштабный цитогенетический анализ 540 линий ЭС клеток, доступных для исследователей в Японии (Sugawara *et al.*, 2006). Оказалось, что только 66,5 % линий имели диплоидный кариотип, т. е. 40 хромосом. Среди наиболее часто встречающихся аномалий хромосомного состава были трисомии по хромосомам 8 и 11. Это подтверждает ранее полученные данные о том, что трисомия по этим хромосомам увеличивает скорость роста ЭС клеток и, соответственно, такие клетки получают преимущество в культуре (Liu *et al.*, 1997). Следует отметить, что этот анализ был выполнен на доступных, т. е. уже охарактеризованных линиях клеток, а значит, линии с грубыми нарушениями кариотипа в него не попали. В то же время в одной из работ при получении ЭС клеток среди 15 линий было только две, имеющие более 50 % диплоидных клеток и не имеющие видимых перестроек (Nichols *et al.*, 1990). По нашим unpublished данным, только 21 из 32 линий ЭС клеток на ранних пассажах культивирования имели диплоидное модальное число хромосом. Кроме изменения числа хромосом, могут также возникать небольшие делеции и транслокации (Guo *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2008).

ЭС клетки человека имеют относительно стабильный статус импринтированных генов (Rugg-Gunn *et al.*, 2007). Для ЭС клеток человека так же, как и для мышинных, характерны присутствие и накопление различных хромосомных аномалий при культивировании. Помимо грубых нарушений, таких, как тетраплоидизация и трисомия, с помощью современных методов удалось показать нарушения также и на уровне небольших участков ДНК и отдельных нуклеотидов. Так, Лаурент с соавт. (Laurent *et al.*, 2011) исследовали изменение копийности различных генов в ЭС клетках человека в процессе культивирования. Было проведено полногеномное генотипирование 1140419 одонуклеотидных полиморфизмов в 69 линиях ЭС клеток человека (130 образцов), 11 линиях соматических стволовых клеток (11 образцов),

41 линии первичных клеток (41 образец) и в 20 типах тканей (67 образцов). Оказалось, что для ЭС клеток характерны дупликации участков хромосом 12, 17 и 20. Найдено 152 региона со значимым различием числа дупликаций между стволовыми клетками и соматическими, из них 18 высоко представлены в плюрипотентных клетках. Особо следует отметить то, что две из таких дупликаций находились рядом или включали гены *NANOG* (9 из 69 ЭС клеток) и характерную для ЭС клеток ДНК-метилтрансферазу *DNMT3B* (7 из 69 ЭС клеток). Следует отметить, что мутации, затрагивающие *DNMT3B*, наблюдаются во многих опухолях, так что склонность плюрипотентных клеток *in vitro* к их накоплению вызывает некоторые опасения. Таким образом, ЭС клетки человека имеют многочисленные хромосомные нарушения, которые невозможно выявить рутинным кариотипированием.

Как могут возникать хромосомные нарушения? Один из описанных механизмов для ЭС клеток человека – нарушение числа центросом, вызывающее анеуплоидию (Holubcová *et al.*, 2010). Интересное объяснение нестабильности кариотипа было предложено в работе Мантел с соавт. (Mantel *et al.*, 2007). Они показали, что при делении дифференцированной клетки необходимо прохождение точки контроля сборки веретена деления. Если число хромосом диплоидное, деление продолжается, а если возникла анеуплоидия – клетка уходит в апоптоз. В то же время плюрипотентные клетки проходят контрольную точку и независимо от результата продолжают деление. Такое поведение характерно для ЭС клеток как мыши, так и человека. В соответствии с этим механизмом при дифференцировке в эмбриональные тельца наблюдается апоптоз клеток, имеющих нарушения хромосомного состава.

ХАРАКТЕРИСТИКА И ПРИМЕНЕНИЕ ЭС КЛЕТОК МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА

Есть два связанных направления использования ЭС клеток: трансгенез и клеточная терапия. Направленное изменение генома ЭС клеток позволяет включать и выключать выбранные гены, определять их функции и создавать модели заболеваний. Изменения, внесенные в ЭС клетки мыши, можно затем исследовать на ор-

ганизменном уровне, получив трансгенных животных. Дифференцировка ЭС клеток человека позволяет получить различные типы клеток, которые с некоторыми ограничениями могут быть использованы для клеточной терапии.

Для применения ЭС клеток необходимо их охарактеризовать. Первая стадия анализа – соответствие морфологии, затем – кариотипирование, ЭС клетки с анеуплоидным числом хромосом непригодны для большинства исследований. Следующий этап – анализ экспрессии генов. Оптимально проводить полногеномный анализ, но как более дешевый вариант можно использовать ОТ-ПЦР и иммуноцитохимический анализ на присутствие основных молекулярных маркеров ЭС клеток, таких, как Oct4, Sox2, Nanog и др. Желательно проверить статус метилирования импринтированных генов; нарушения импринтинга могут негативно сказаться на корректности последующей дифференцировки. Способность к дифференцировке проверяется *in vitro* с помощью образования эмбрионидных телец, *in vivo* – получением тератом в иммунодефицитных мышах и созданием химерных животных, в том числе тетраплоидной комплементацией. По понятным причинам для ЭС клеток человека анализ дифференцировки ограничивается эмбриональными тельцами и тератомами. Для предсказания потенциала к дифференцировке ЭС клеток человека был разработан эффективный полуколичественный подход (Bock *et al.*, 2011). После дифференцировки ЭС клеток человека в эмбрионидные тельца проводили анализ экспрессии 500 тканеспецифических генов. Сравнение с контрольными линиями ЭС клеток позволяет сделать прогноз о применимости линий плюрипотентных клеток для дифференцировки в производные экто-, эндо- и мезодермы. Таким образом, предложенный метод позволяет быстро и относительно дешево оценивать потенциал ЭС клеток человека.

Многие исследователи сталкиваются с невозможностью воспроизведения результатов экспериментов при использовании различных линий ЭС клеток. Как уже было сказано ранее, ЭС клетки только ограниченного числа линий мышей можно относительно легко получить *in vitro*. Подавляющее число исследований выполнено с использованием ЭС клеток, происходящих

от линии мышей 129, реже встречаются работы, выполненные на ЭС клетках генотипа C57BL. Для ЭС клеток человека была похожая ситуация. До недавнего времени большинство исследований проводили на трех линиях ЭС клеток, полученных Томсоном: H1, H7 и H9. Сейчас в мире создано много линий ЭС клеток, и исследователи уже не так ограничены в выборе. Фактически использование клеток только трех линий мышей или же трех линий ЭС клеток человека показывает, что большая часть сведений о биологии ЭС клеток как мыши, так и человека получена на основе анализа всего лишь трех генотипов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование ЭС клеток для клеточной терапии на модельных животных или человеке имеет ограничения. В терапии наследственных заболеваний человека это, прежде всего, иммунологическое отторжение чужеродного генетического материала. Кроме того, большинство протоколов дифференцировки в настоящее время не позволяет получить трехмерную структуру тканей и органов, ограничивая возможности применения ЭС клеток для клеточной терапии.

Недавние исследования позволили обойти проблему иммунологической несовместимости. Оказалось, что сверхэкспрессия нескольких ключевых для плюрипотентности ЭС клеток транскрипционных факторов позволяет индуцировать плюрипотентность в фибробластах мыши (Takahashi, Yamanaka, 2006). В дальнейшем были получены индуцированные плюрипотентные стволовые клетки человека и других видов (Медведев и др., 2011). То есть сейчас стало возможным получение пациент-специфичных индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, что позволяет после дифференцировки использовать для клеточной терапии клетки генотипа пациента. Недостаток этого метода – возможность сохранения недифференцированных клеток, которые могут дать опухоль, или же реактивации вирусов, использованных для получения плюрипотентных клеток с тем же результатом.

Относительная простота репрограммирования фибробластов в плюрипотентные клетки инициировала поиск подходов к прямому репро-

граммированию. В 2010 г. впервые были получены нейроны из фибробластов мышей, минуя промежуточный этап дедифференцировки в плюрипотентное состояние (Vierbuchen *et al.*, 2010). Этот метод в перспективе также позволит получать пациент-специфические клетки.

Таким образом, в настоящее время плюрипотентные стволовые клетки широко используются как для фундаментальных, так и для прикладных исследований. Данные, полученные при изучении ЭС клеток мыши и человека, создали основу для изучения и использования индуцированных плюрипотентных стволовых клеток и приблизили применение клеточной терапии человека.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 12-04-31345). Автор выражает благодарность Н.М. Матвеевой за ценные замечания к тексту статьи.

ЛИТЕРАТУРА

- Медведев С.П., Шевченко А.И., Сухих Г.Т., Закиян С.М. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки. Новосибирск: Изд-во СО РАН, 2011. 216 с.
- Bock C., Kiskinis E., Verstappen G. *et al.* Reference maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines // *Cell*. 2011. V. 144. No. 3. P. 439–452.
- Bradley A., Evans M., Kaufman M.H., Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines // *Nature*. 1984. V. 309(5965). P. 255–256.
- Bryja V., Bonilla S., Cajanek L. *et al.* An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells // *Stem Cells*. 2006. V. 24. No. 4. P. 844–849.
- Buehr M., Meek S., Blair K. *et al.* Capture of authentic embryonic stem cells from rat blastocysts // *Cell*. 2008. V. 135. No. 7. P. 1287–1298.
- Chambers I., Colby D., Robertson M. *et al.* Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells // *Cell*. 2003. V. 113. No. 5. P. 643–655.
- Dean W., Bowden L., Aitchison A. *et al.* Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes // *Development*. 1998. V. 125. No. 12. P. 2273–2282.
- Evans M.J. The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratocarcinoma cells // *J. Embryol. Exp. Morphol.* 1972. V. 28. P. 163–196.
- Evans M. Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2011. V. 12. No. 10. P. 680–686.

- Evans M.J., Kaufman M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos // *Nature*. 1981. V. 292. P. 154–156.
- Friel R., van der Sar S., Mee P.J. Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signaling // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005. V. 57. No. 13. P. 1894–1903.
- Guo J., Jauch A., Heidi H.G. *et al.* Multicolor karyotype analyses of mouse embryonic stem cells // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2005. V. 41. No. 8/9. P. 278–283.
- Hanna J., Cheng A.W., Saha K. *et al.* Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2010a. V. 107. P. 9222–9227.
- Hanna J.H., Saha K., Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues // *Cell*. 2010b. V. 143. No. 4. P. 508–525.
- Hayashi K., Ohta H., Kurimoto K. *et al.* Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells // *Cell*. 2011. V. 146. No. 4. P. 519–532.
- Hayashi K., Ogushi S., Kurimoto K. *et al.* Offspring from oocytes derived from *in vitro* primordial germ cell-like cells in mice // *Science*. 2012. [DOI:10.1126/science.1226889].
- Holubcová Z., Matula P., Sedláčková M. *et al.* Human embryonic stem cells suffer from centrosomal amplification // *Stem Cells*. 2011. V. 29. No. 1. P. 46–56.
- Laurent L.C., Ulitsky I., Slavin I. *et al.* Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture // *Cell. Stem. Cell*. 2011. V. 8. No. 1. P. 106–118.
- Li P., Tong C., Mehrian-Shai R. *et al.* Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts // *Cell*. 2008. V. 135. No. 7. P. 1299–1310.
- Liang Q., Conte N., Skarnes W.C., Bradley A. Extensive genomic copy number variation in embryonic stem cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. No. 45. P. 17453–17456.
- Liu X., Wu H., Loring J. *et al.* Trisomy eight in ES cells is a common potential problem in gene targeting and interferes with germ line transmission // *Dev. Dyn.* 1997. V. 209. No. 1. P. 85–91.
- Macfarlan T.S., Gifford W.D., Driscoll S. *et al.* Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity // *Nature*. 2012. V. 487. No. 7405. P. 57–63.
- Mantel C., Guo Y., Lee M.R. *et al.* Checkpoint-apoptosis uncoupling in human and mouse embryonic stem cells: a source of karyotypic instability // *Blood*. 2007. V. 109. No. 10. P. 4518–4527.
- Martin G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78. P. 7634–7638.
- Martin G.R., Evans M.J. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies *in vitro* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1975. V. 72. P. 1441–1445.
- Mintz B., Illmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1975. V. 72. P. 3585–3589.
- Nagy A., Gocza E., Diaz E.M. *et al.* Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse // *Development*. 1990. V. 110. No. 3. P. 815–821.
- Nagy A., Rossant J., Nagy R. *et al.* Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. No. 18. P. 8424–8428.
- Nichols J., Evans E.P., Smith A.G. Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity // *Development*. 1990. V. 110. No. 4. P. 1341–1348.
- Nishikawa S., Jakt L.M., Era T. Embryonic stem-cell culture as a tool for developmental cell biology // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 8. No. 6. P. 502–507.
- Papaioannou V.E., McBurney M.W., Gardner R.L., Evans M.J. Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos // *Nature*. 1975. V. 258. P. 70–73.
- Rugg-Gunn P.J., Ferguson-Smith A.C., Pedersen R.A. Status of genomic imprinting in human embryonic stem cells as revealed by a large cohort of independently derived and maintained lines // *Hum. Mol. Genet.* 2007. V. 16. No. 2. P. 243–251.
- Solter D., Knowles B.B. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1) // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1978. V. 75. P. 5565–5569.
- Stevens L.C., Little C.C. Spontaneous testicular teratomas in an inbred strain of mice // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1954. V. 40. P. 1080–1087.
- Sugawara A., Goto K., Sotomaru Y. *et al.* Current status of chromosomal abnormalities in mouse embryonic stem cell lines used in Japan // *Comp. Med.* 2006. V. 56. No. 1. P. 31–34.
- Takahashi K., Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors // *Cell*. 2006. V. 126. No. 4. P. 663–676.
- Tam P.P., Rossant J. Mouse embryonic chimeras: tools for studying mammalian development // *Development*. 2003. V. 130. No. 25. P. 6155–6163.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts // *Science*. 1998. V. 282. No. 5391. P. 1145–1147.
- Thomson J.A., Kalishman J., Golos T.G. *et al.* Isolation of a primate embryonic stem cell line // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. No. 17. P. 7844–7848.
- Vierbuchen T., Ostermeier A., Pang Z.P. *et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors // *Nature*. 2010. V. 463. No. 7284. P. 1035–1041.
- Watanabe K., Ueno M., Kamiya D. *et al.* A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. No. 6. P. 681–686.
- Wobus A.M., Boheler K.R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy // *Physiol. Rev.* 2005. V. 85. No. 2. P. 635–678.
- Ying Q.L., Nichols J., Chambers I., Smith A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3 // *Cell*. 2003. V. 115. No. 3. P. 281–292.

MOUSE AND HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS

A.G. Menzorov

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia;
Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia
e-mail: menzorov@bionet.nsc.ru

Summary

This mini review is focused on the current state in the field of mouse and human embryonic stem (ES) cell biology. Methods of ES cell derivation, pluripotency assessment and problems associated with long term cultivating *in vitro* are discussed. Attention is given to some unresolved questions of ES cell biology and prospects of ES cells in cell therapy.

Key words: embryonic stem cells, pluripotency.