

Szatmári István

Áttörések és kihívások az őssejt-kutatásban

A probléma felvetése

Az első humán embrionális őssejt vonalakat 1998-ban állították elő mesterséges megtermékenyítés útján létrehozott embriókezdeményből. Ezek a korlátlan osztódási és differenciálódási képességgel rendelkező, úgynevezett pluripotens sejtek, melyek a napjainkban egyre nagyobb szereppel bíró sejterápia új eszközüvé válhatnak. Felfedezésük óta ugyanakkor folyamatosan napirenden vannak az embrionális őssejtek felhasználásával, kutatásával kapcsolatos jogi és etikai aggályok. Az elmúlt évtizedben azonban olyan forradalmi technológia született, ami lehetővé teszi szinte bármilyen testi sejt visszaprogramozását pluripotens állapotba embriók felhasználása nélkül. Az így létrehozott sejteket nevezzük indukált pluripotens őssejteknek. Ennek a tanulmánynak a célja áttekinteni a pluripotens őssejtek előállításának módozatait, továbbá felvázolni e mindentudó sejtek jelen és jövőbeli szerepét a kutatásban és a sejterápiában.

Bevezetés

Napjainkra egyre ismertebbé válnak a különféle szerveket, szöveteket felépítő sejttypusok. Arról is egyre több információnk van, hogy egy adott sejttypus milyen elő-alakokból (progenitorokból) és milyen kezdeményező jelzések hatására jön létre az embrionális és posztembrionális fejlődés során. Ha ismerjük a szervezetünket működtető sejtek fejlődésének belső szabályzóit, akkor megvan a remény arra, hogy mesterséges körülmények között is létre tudjunk hozni ilyen sejtfeleségeket. Ezeket visszajutatta a beteg szervezetébe lehetségessé válik a hibás szerv regenerálása, funkciójának helyreállítása. A jövő orvoslásának egyik ígéretes fókuszterülete a regeneratív medicina (helyreállító gyógyászat), mely a károsodott szervek helyreállítását/regenerálását célozza. A regeneratív medicinán alapuló sejterápiás eljárásokhoz legígéretesebbnek jelenleg az őssejtek, vagy a belőlük irányítottan létrehozott érett sejtek tűnnek.

Az őssejtek olyan differenciálatlan sejttypusok, melyek képesek adott szövet vagy szerv, sőt az embriógenézis során akár az egész szervezet létrehozására,

illetve regenerálására. Az őssejtek két legfontosabb típusa a pluripotens és a szöveti őssejtek csoportja. A szöveti őssejtek a kifejlett élőlény szerveiben is fellelhetők. Ez az őssejt-típus behatároltabb fejlődési potenciállal rendelkezik (multipotens vagy unipotens), tehát csak az adott szövet vagy szerv létrehozására, regenerálására képes. Például az izom őssejtek a vázizmot hozzák létre vagy pótolják; a vérképző őssejtek a vér alakos elemeit termelik; a bőrhám őssejtjei a hámréteg sejtjeit regenerálják. A másik csoportba a szélesebb fejlődési képességgel rendelkező, pluripotens őssejtek tartoznak, ezek legismertebb típuscsoportját az embrionális őssejtek alkotják. A pluripotens jelleg azt jelenti, hogy ezekből a kiinduló sejtekből a szervezet szinte minden sejt- és szövettípusa létrejöhet, így belőlük idegsejtek, izomsejtek, vagy akár májsejtek is kifejlődhetnek. Ebben a közleményben elsősorban a pluripotens őssejtek lehetséges szerepét mutatjuk be a sejterápiában, illetve az orvos-biológiai kutatásokban. Ismertetjük azokat a felfedezéseket is, melyek lehetővé tették az ilyen sejtek hatékony létrehozását.

Az embrionális őssejtek felfedezése

Az embrionális őssejteket angolul „embryonic stem” sejteknek, röviden ES sejteknek nevezik. Egér ES sejteket elsőként Martin Evans és Matthew Kaufman, illetve ezzel párhuzamosan Gail Martin állított elő több mint 30 évvel ezelőtt.^{1,2} Egér embrionális őssejteket beágyazódás előtti (pre-implantációs) embriókezdeményből lehet létrehozni, a fejlődésnek ezt a stádiumát blasztociszta (hólyagcsira) állapotnak nevezzük. A blasztociszta külső sejtrétegét trofektodermának nevezzük, e sejtek nem vesznek részt a későbbi magzat kialakításában, viszont ebből fejlődik ki a méhlepény nem anyai eredetű rétege. A blasztociszta belsejében található, belső sejttömeget embriócsomónak nevezik. A későbbi magzat az embriócsomó pluripotens sejtjeiből fejlődik ki, de ugyanezekből hozhatók létre az ES sejtek is.

Az egér őssejtek létrehozását követően emberi embrionális őssejteket csak több mint egy évtizeddel később, 1998-ban sikerült előállítani James Thomson munkacsoportjának. A humán ES sejtek létrehozása során a blasztocisztából izolálták az embriócsomót, és ezeket növesztették tovább sejtenyészetben. A humán embrionális őssejtek létrehozása hatalmas publicitást kapott. Sokan mérőföldkőnek tekintették ezt a felfedezést mivel itt már nem „egyszerű” egér sejtekről volt szó, hanem humán pluripotens sejtekről, ami új lehetőséget nyitott a regeneratív medicina területén.

Humán embrionális őssejtek létrehozása sejtmag transzferrel

A humán ES sejtek felfedezését követően azonnal felmerült e pluripotens sejtek terápiás hasznosításának lehetősége. Gyógyító célú felhasználásukkal kapcsolat-

ban ugyanakkor több probléma is felmerült. Kiemelkedő ezek közül annak kérdése, hogy kinek a sejtjét használják fel. Természetesen olyan őssejteket lenne legcélszerűbb létrehozni, melyek a beteg genetikai tulajdonságait hordozzák. Ennek az az előnye, hogy az ilyen őssejtekből származó differenciált sejtekkel autológ transzplantációt lehet végrehajtani, s közben nem kellene tartani a sejtek kilökődésétől/gyors eliminálásától a genetikai különbözőség miatt. Jól ismert, hogy adott élő szervezetben a genetikai információ, néhány kivételtől eltekintve, minden sejtben azonos. A sejtek közötti különbség nem genetikai hanem epigenetikai különbségekre vezethető vissza, ami leegyszerűsítve azt jelenti, hogy a különféle sejtekben más-más gének illetve DNS szakaszok vannak aktív állapotban. A pluripotens őssejtekre is jellemző egy sajátos epigenetikai állapot; a kérdés sokáig az volt, hogy a differenciált sejteket vissza lehet-e programozni ebbe az alapállapotba.

Már az ötvenes-hatvanas években vizsgálni kezdték, mi történik akkor, ha testi sejtek magját visszajuttatják a fejlődés kiindulási pontját jelentő petesejtbe, amiből ráadásul előzetesen eltávolították a saját sejtmagját (enukleált pete). John Gurdon brit tudós megfigyelte, hogy *Xenopus laevis* békafajban ebihalak bélhám sejtjeit visszajuttatva a megfelelő fejlődési fázisban lévő enukleált petébe azok életképes békává fejlődtek. Ez az eredmény arra utalt, hogy már viszonylag differenciált (érett) sejtek is képesek visszaprogramozódni őssejt állapotba.³ E felismerés fontosságát jelzi, hogy 2012-ben John Gurdon-t, Shinya Yamanaka-val közösen (lásd később) orvosi Nobel-díjjal jutalmazták a sejtek visszaprogramozásának felfedezéséért. A kétélűeken végrehajtott sikeres sejtmag-transzferek alapján szerzett ismeretek régóta részét képezik a fejlődésbiológiai tankönyveknek, ugyanakkor a kutatók túlnyomó többsége szkeptikus volt a tekintetben, hogy a sejtmag-visszaprogramozás megvalósítható-e emlős sejtekben. A tudományos világnak 1997-ig kellett várni, amikor is Ian Wilmut és munkatársai létrehozták az első klónozott emlőst, a Dolly bórányt.⁴ A juhokon végzett sikeres sejtmagtranszfert követően más emlős fajoknál – például teheneken, kecskéken, sertéseken és egereken is – sikerült alkalmazni ezt az eljárást és megszülettek a különféle klónozott állatok.⁵ A klónozott emlősállatok előállításával párhuzamosan természetesen felmerült az emberi klónozás lehetősége is. Lényeges hangsúlyozni, hogy mind a kutató közösség, mind a társadalom túlnyomó része ellenzi a humán reprodukív klónozást. Az emberi reprodukív klónozás helyett ugyanakkor felmerül egy másik lehetőség, amit terápiás klónozásnak neveznek. Itt a cél implantáció előtti embriókezdemény létrehozása sejtmagtranszferrel, majd ebből pluripotens embrionális sejtek kinyerése és esetleges terápiás felhasználása. Emberi sejtekkel sokáig sikertelen volt a sejtmagtranszfer megvalósítása. A legújabb eredmények szerint viszont valóban lehetséges a petesejt saját sejtmagjának az eltávolítása mellett, más testi sejtől létrehozni életképes blasztocisztát és ebből humán ES sejt vonalakat.⁶ Ezek a sikeres kísérletek még megerősítésre

várnak, mindenesetre az eredmények arra utalnak, hogy a biotechnológia előbb-utóbb képes lesz pluripotens ES vonalak előállítására humán sejtmagtranszferrel.

Ha eltekintünk ennek az eljárásnak az etikai vonatkozásaitól (a létrehozott blasztocisztákat fel kell áldozni), akkor is van egy komoly praktikus akadály, ami korlátozza a petesejt alapú technológiák elterjedését. Kísérleti állatokból viszonylag egyszerű tetszőleges számú és megfelelő fázisban lévő petesejtet kinyerni, ugyanakkor emberek esetében ennek korlátai vannak. Az Egyesült Államokban nemrégiben önkénteseket próbáltak toborozni petesejt gyűjtéshez, 79 megfelelő jelentkező közül végül csak egy hölgy vállalkozott kutatási célú petesejt adományozásra.⁷ A sejtmagtranszferen alapuló technológia megkerülhetetlen kérdése a humán petesejt limitált mennyisége és hozzáférhetősége. Mindezek miatt a sejtmagtranszferen alapuló sejtprogramozás csak korlátozottan alkalmas emberi pluripotens őssejtek előállítására.

Szomatikus sejtek visszaprogramozása pluripotens őssejteké transzkripciós faktorokkal

A kétezres évek közepén viszont valóban kifejlesztésre került egy olyan technológia, ami forradalmasította a humán pluripotens sejtek előállítását. Shinya Yamanaka japán kutatónak támadt az az ötlete, hogy a differenciált testi sejtek talán nem csak petesejttel, hanem ES sejt specifikus génjeivel is visszaprogramozhatók embrionális állapotba. Takahashi és Yamanaka 2006-ban publikált kísérletük során 24 embrionális őssejtre jellemző genetikai tényezőt vizsgáltak meg egér kötőszöveti sejtekben. Szisztematikus analízissel feltárták, hogy a differenciált kötőszöveti sejtekben az őssejtszerű állapot eléréséhez a kiválasztott 24 közül elegendő 4 transzkripciós faktor (Oct4, Sox2, Klf4 és a c-Myc) egyidejű bekapcsolása.⁸ Ma már ezeket a szabályozó fehérjéket Yamanaka-faktorokként emlegeti a tudomány. E négy faktorial létrehozott sejteket indukált pluripotens őssejteknek nevezték el, az angol elnevezés rövidítése alapján iPS („induced pluripotent stem”) sejteknek hívjuk őket. A későbbiekben igazolást nyert, hogy nemcsak egér, hanem humán sejtek is visszaprogramozhatóak, továbbá a kötőszöveti sejteken kívül a legtöbb osztódásra képes testi sejt is visszaalakítható a négy Yamanaka-faktorral. Vitathatatlan, hogy a biológiai tudományok terén az elmúlt években ez a felfedezés kapta a legnagyobb publicitást. A téma fontosságát jelzi, hogy 2012-ben John Gurdonnal megosztva Shinya Yamanaka kapta az orvosi-életteni Nobel-díjat.

A transzkripciós faktorok segítségével létrehozott átprogramozás lehetővé teszi pluripotens sejtek generálását humán embriók elpusztítása nélkül, s ehhez elegendő akár egy bőrdarabból származó, néhány életképes sejt. Az iPS technológia lehetőséget teremt pluripotens sejtek hatékony létrehozására betegből származó sejtekből is. Az indukált pluripotens őssejtek felfedezését követően azonnal elindult a találgatás, hogy ezek a sejtek mennyire hasonlítanak az emb-

rionális őssejtekre, illetve mennyiben egyenértékűek azokkal. Az ES-iPS azonosság napjainkban is erőteljesen vitatott kérdéskör, s valószínűleg a jövőben is lesznek *pro* és *kontra* érvek. George Daley az embrionális őssejt kutatás egyik legismertebb képviselője úgy véli, hogy az ES és az iPS sejtek között nincsenek jelentős különbségek. Valójában önmagukban az ES, illetve az iPS sejtek sem tekinthetők homogénnek, hiszen ezek között a sejtvonalak között is lehetnek eltérések, tehát e kétféle pluripotens sejtípus egy kontinuumnak is felfogható.⁹

Pluripotens sejtek felhasználása a sejterápiában

A pluripotens őssejtek előállítását tehát forradalmi átalakuláson ment keresztül az elmúlt években. Adódik a kérdés, hogy e sok kutatási eredményből mi hasznosult eddig a klinikai sejterápiás kezeléseknél. A humán embrionális őssejtek terápiás alkalmazásának kiaknázásában úttörő szerepet játszott a Geron Corporation nevű amerikai biotechnológiai vállalat. A humán ES sejtek felfedezését követően e cég számtalan protokollt dolgozott ki különféle funkcionális sejtek létrehozására ES sejtekből. Többek között sikerült előállítaniuk oligodendrocita progenitorokat (GRNOPC1), melyek terápiás célra is bevezetésre kerültek. Ezeknek a sejteknek fontos szerepük van a károsodott idegrostok regenerálásában. Gerinc sérült patkányokon végzett kísérletek tanulsága szerint helyileg beinjektált humán ES eredetű oligodendrocita-progenitor sejtek jelentősen javították az állatok motoros funkcióit.¹⁰ Több független pozitív preklinikai vizsgálatot követően 2010-ben a Geron engedélyt kapott humán embrionális őssejt alapú sejterápiára. 2011-ben a cég már előzetes eredményekről is beszámolt, két gerinc sérült beteg adatait felhasználva kiderült, hogy a sejt kezelésnek mellékhatásai nem jelentkeztek. Ezt követően sokkolóan érte a tudományos közösséget, hogy a Geron 2011-ben felfüggesztette az ES alapú sejterápiát. Az indok szerint a biotechnológiai vállalat túl drágának találta a sejterápiás kezeléseket, ezért úgy döntött, inkább más gyógyszerfejlesztésekre csoportosítja át forrásait.¹¹

A gerinc sérülések mellett a másik ES sejt alapú klinikai gyógyászati technika a szemideghártya, a retina degenerálódását okozó betegségeket próbálja gyógyítani embrionális őssejt eredetű produktumokkal. Ezekhez a vizsgálatokhoz humán ES sejtekből létrehozott pigment epithel sejteket (*retinal pigment epithelium, RPE*) használtak. Ha az RPE sejtek degenerálódnak, akkor az adott szemfenéki területen a retina elhalása is bekövetkezik, mivel ezek táplálják az ideghártyát. Eddig két betegnél történtek publikált vizsgálatok: négy hónappal a kezelés után mindkét személynél a látás javulását figyelték meg, sőt az egyik betegnél egyértelműen bizonyítást nyert, hogy az őssejt eredetű RPE sejtek kimutathatóak a szemfenéken.¹² Ezek a megfigyelések biztatóak, de lényegesen hosszabb időperiódust felölelő és nagyobb számú vizsgálatra lesz szükség annak eldöntésére, hogy valóban biztonságosak és hatékonyak-e az ilyen típusú kezeléseik.

Milyen következtetéseket lehet levonni e korlátozott számú klinikai vizsgálatból? Fontos kiemelni, hogy az ES sejt alapú sejterápia még kísérleti fázisban van, mivel nehéz teljesen tiszta sejtpopulációt megfelelő minőségben és reprodukálható módon létrehozni humán pluripotens őssejtekből. Figyelembe kell venni az ilyen vizsgálatok horribilis költségeit is. Humán vizsgálatok céljára sejteket nem lehet szokványos sejtenyésztő laboratóriumban létrehozni, hanem ehhez úgynevezett GLP (*good laboratory practice*) körülményeket kell biztosítani. Mégis a legfontosabb korlátja a pluripotens sejtek alkalmazásának a félelem a nem várt sejtburjánzás, daganatképződés miatt. Ismert tény, hogy ha differenciálatlan ES/iPS sejteket visszainjektálunk kísérleti állatokba, az őssejtekből daganatok, úgynevezett teratómák fejlődnek ki. Ezzel szemben, ha a pluripotens őssejteket valamilyen fejlődési irányba átalakítjuk, elvesztik tumorképző sajátosságukat. A legtöbb vizsgálat eredménye szerint az ES sejtek differenciálódásának hosszától és hatékonyságától függ, hogy megmarad-e vagy sem a sejtek daganatképző sajátossága. Ugyanakkor nagyon nehéz eldönteni, hogy a terápiás célból használni kívánt ES eredetű sejtek 100%-a átalakult-e, nem tartalmaznak-e daganatképző formákat. Mindezek a kétségek jelentősen hozzájárultak ahhoz, hogy mindeddig csak korlátozottan indultak el pluripotens őssejtek felhasználásán alapuló sejterápiás kezelések. A jelenleg futó több mint száz sejterápiás klinikai vizsgálat közül csak háromnál alkalmaznak ES eredetű sejteket. A vizsgálatok döntő részéhez a biztonságosabbnak tekintett, bár korlátozottabb fejlődési képességű szöveti őssejteket használják.¹³

Pluripotens őssejtek mint kutatási eszközök

A pluripotens sejtek klinikai kipróbálása tehát jelenleg csak néhány vizsgálatra korlátozódik, s valószínűleg az elkövetkező években sem lesznek tömeges ES/iPS alapú sejterápiák. A klinikai kezelésekkal ellentétben, a kutatásban viszont valóban gyökeret vert ezeknek a sejteknek a használata. Napjainkban már nem csak az őssejt-kutatók, hanem szinte minden sejtbiológiával foglalkozó laboratórium tenyészt pluripotens őssejteket. Ezek a sejtek fontos eszközök a korai embriógenézis megértéséhez; segítségükkel nyomon lehet követni a fejlődő sejtek átalakulását. A fejlődésbiológiai vizsgálatokon túlmenően az egér ES sejteknek a transzgenézisben betöltött szerepe jelenti a másik területet, ahol e sejtek széles körben hasznosításra kerülnek. A transzgenézis lehetővé tette a kísérleti állatok – főleg egerek, de ma már patkányok – genetikai átalakítását is, ami megnyitotta az utat génhiányos állatmodellek létrehozására. Ezzel lehetővé vált számtalan emberi betegségmodell létrehozása kísérleti állatokban.

Az iPS sejtek bevezetésével viszont a humán pluripotens sejtek felhasználása is mind szélesebb körben terjedt el. Az utóbbi években mind több és több laboratóriumban hoznak létre iPS sejteket a legkülönbözőbb betegségekben szenvedő betegek sejtjeiből. Feltételezhető, hogy az így létrehozott iPS sejtek túlnyomó

része nem kerül sejterápiás bevezetésre, de a betegspecifikus őssejtek olyan lehetőséget biztosítanak, amiről korábban a kutatók álmodni sem mertek. Mivel az indukált pluripotens őssejtek minden irányba átalakíthatók, így mindenki létre tudja hozni az általa vizsgálni kívánt sejtípust iPS sejtekből, és lehetővé válik az adott betegségben érintett sejtfeleségek tüzetes tanulmányozása. Például szívbetegségeknél szívizomsejteket, az idegrendszeret érintő betegségeknél neuronokat, izomsorvadásban szenvedő betegeknek pedig izomsejteket lehetett létrehozni olyan iPS sejtekből, melyek genetikailag azonosak az adott beteg sejtjeivel. Az így előállított betegség- modellek lehetővé teszik különféle gyógyszerek tesztelését, illetve az adott betegség pathomechanizmusának jobb megértését. Mindez új távlatokat jelent a betegségek megismerésében, illetve a gyógyszerek tesztelésében.

Összegzésként elmondható, hogy a pluripotens őssejtek szinte már nélkülözhetetlenek a modern molekuláris sejtbiológiai kutatásokban, illetve egyre kiterjedtebben használhatók betegségmodellek kialakítása során. Ugyanakkor további ismeretekre kell szert tennünk, hogy kellően ellenőrizni tudjuk e sejtek átalakításának a folyamatát, ami majd lehetővé teszi a különféle altípusú és aktivitású, differenciált sejtek előállítását ezen őssejtekből. Az őssejt-kutatók reményei szerint a jövőben az így létrehozott sejtek sejterápiás célból is egyre inkább bevezetésre kerülhetnek.

Jegyzetek

1. EVANS MJ, KAUFMAN MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-156.
2. MARTIN GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(12):7634-7638.
3. GURDON JB, UEHLINGER V. "Fertile" intestine nuclei. *Nature*. 1966;210(5042):1240-1241.
4. WILMUT I, SCHNIEKE AE, McWHIR J, KIND AJ, CAMPBELL KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997;385(6619):810-813.
5. TSUNODA Y, KATO Y. Recent progress and problems in animal cloning. *Differentiation*. 2002;69(4-5):158-161.
6. TACHIBANA M, AMATO P, SPARMAN M, ET AL. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*. 2013;153(6):1228-1238.
7. EGLI D, CHEN AE, SAPHIER G, ET AL. Impracticality of egg donor recruitment in the absence of compensation. *Cell Stem Cell*. 2011;9(4):293-294.
8. TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676.
9. ROBINSON DA, DALEY GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*. 2012;481(7381):295-305.

10. KEIRSTEAD HS, NISTOR G, BERNAL G, ET AL. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci.* 2005;25(19):4694-4705.
11. FRANTZ S. Embryonic stem cell pioneer Geron exits field, cuts losses. *Nat Biotechnol.* 2012;30(1):12-13.
12. SCHWARTZ SD, HUBSCHMAN JP, HEILWELL G, ET AL. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet.* 2012;379(9817):713-720.
13. DALEY GQ. The promise and perils of stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell.* 2012;10(6):740-749.