

Kmenové buňky a jejich vazba na CNS

Pavla Jendelová

Ústav neurověd UK 2.LF

Ústav experimentální medicíny AV ČR

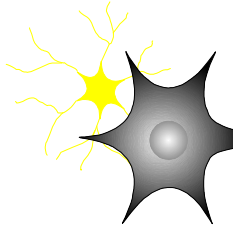
- **Kmenová buňka** je buňka schopná sebeobnovy a zároveň produkce diferencovaných dceřiných buněk
- **Sebeobnova**
 - Nejméně jedna ze dvou dceřiných buněk si zachová charakteristiky buňky původní
- **Diferenciační potenciál**
 - Schopnost tvořit jeden či více buněčných typů, jiných, než je mateřská buňka
- **Determinace**
 - Proces ztráty potenciálu a získávání specializované funkce

Řešené otázky

- Mechanismus a kontrola proliferace v nediferencovaném stavu
- Existuje univerzální kmenová buňka ?
- Jsou kmenové buňky předem geneticky naprogramované?
- Mechanismy řízení diferenciace
- Plasticita somatických kmenových buněk
- Migrace na místo určení
- Vliv niche
- Kdy, kde a kolik vzniká somatických kmenových buněk

Užití kmenových buněk

- Reparace a regenerace tkání
- Nosiče genové terapie
- Testování léků (terapeutické klonování)
- Nové poznatky o mechanismech rané embryogeneze



EMBRYO X FETUS X DOSPĚLÝ JEDINEC

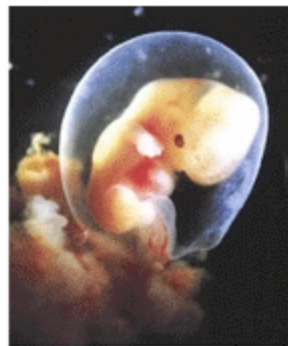
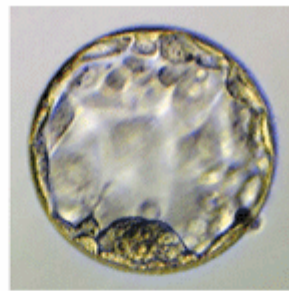
Embryonální kmenové buňky (*největší potenciál, zdroj embrya z in vitro fertilizace nebo přenos jader, etický problém*)

Fetální neurální kmenové buňky (*používají se, zdroj potraty, etický problém, nedostatečné množství, nově immortalizované linie*)

Z dospělých jedinců:

Kmenové buňky kostní dřeně, čichové buňky (*používají se, zatím ale omezeně, zdroj pacient sám, podpůrná funkce*)

Kmenové buňky pupečnickové krve (*malé možnosti použití, omezeně např. u některých sourozenců*)



Zygota
Totipotentní

Blastocysta

Embryo, 6 týdnů

Dítě

Dospělý

Embryonální zárodečné
buňky (EG)
(primordiální zárodečné buňky)
Pluripotentní

Pupečnickové
kmenové buňky
**Pluri- nebo
Multipotentní**

Buňky embryonálních
karcinomů (EC)
Pluripotentní

Embryonální kmenové
buňky (ES)
Pluripotentní

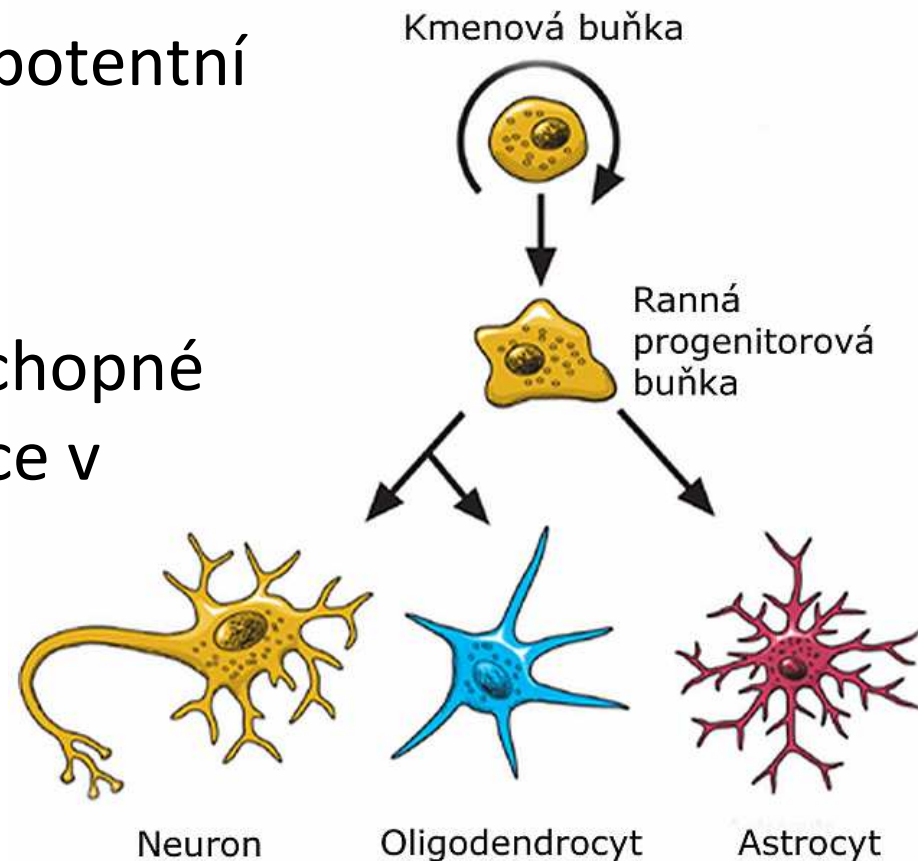
Fetální tkáňově specifické
kmenové buňky
**Pluri- nebo
Multipotentní**

Dospělé tkáňově specifické
kmenové buňky
**Pluri- nebo
Multipotentní**

Neurální kmenové buňky (NKB)

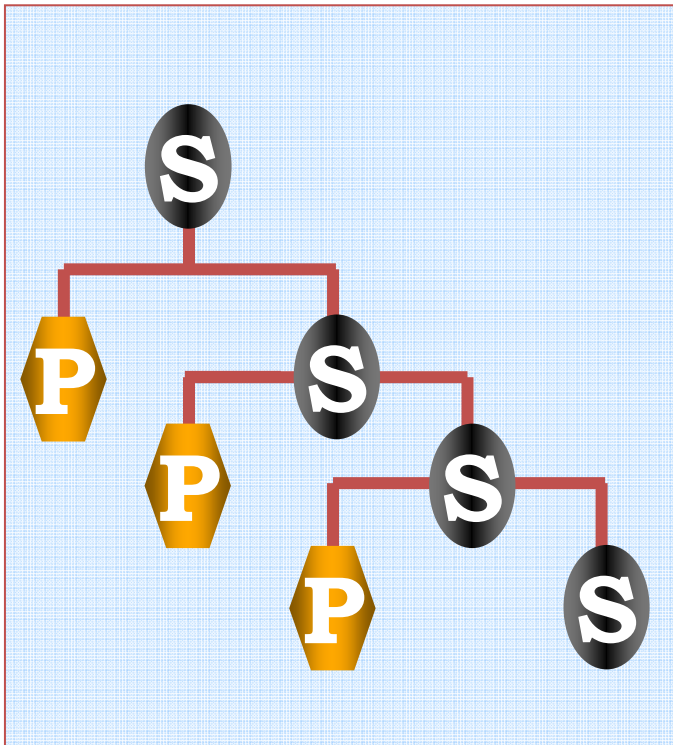
Neurální kmenové buňky

- Tkáňově specifické multipotentní buňky
- Fetální a dospělý CNS
- Definovány jako buňky schopné sebeobnovy a diferenciace v neurony, astrocyty a oligodendrocyty

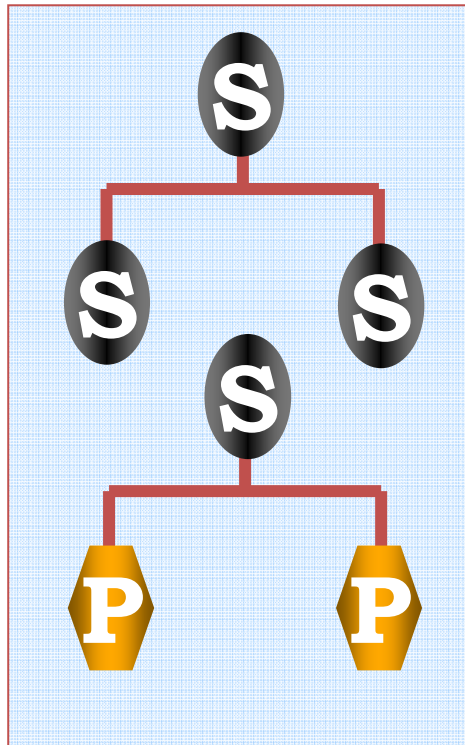


Dělení kmenových buněk

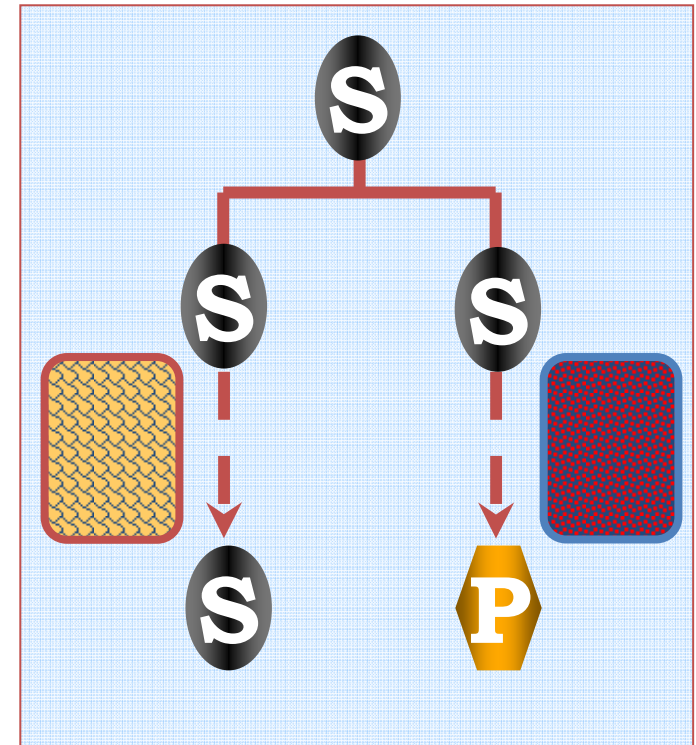
Asymetrické



Symetrické

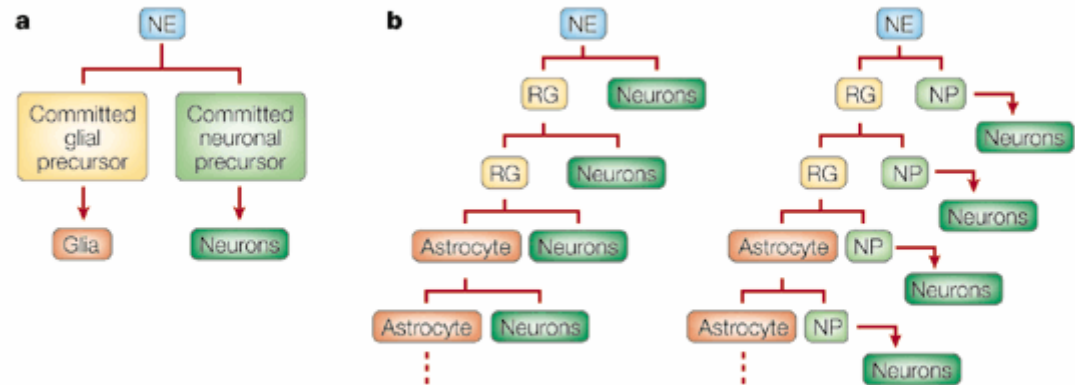


Typ dělení a diferenciace jsou ovlivněny okolním prostředím

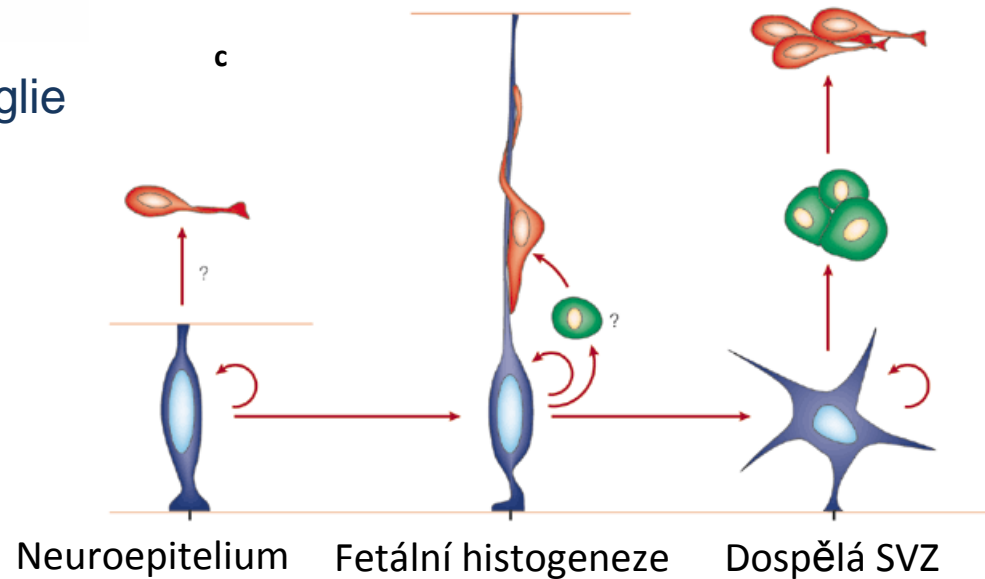


Neurální kmenové buňky během fetálního vývoje

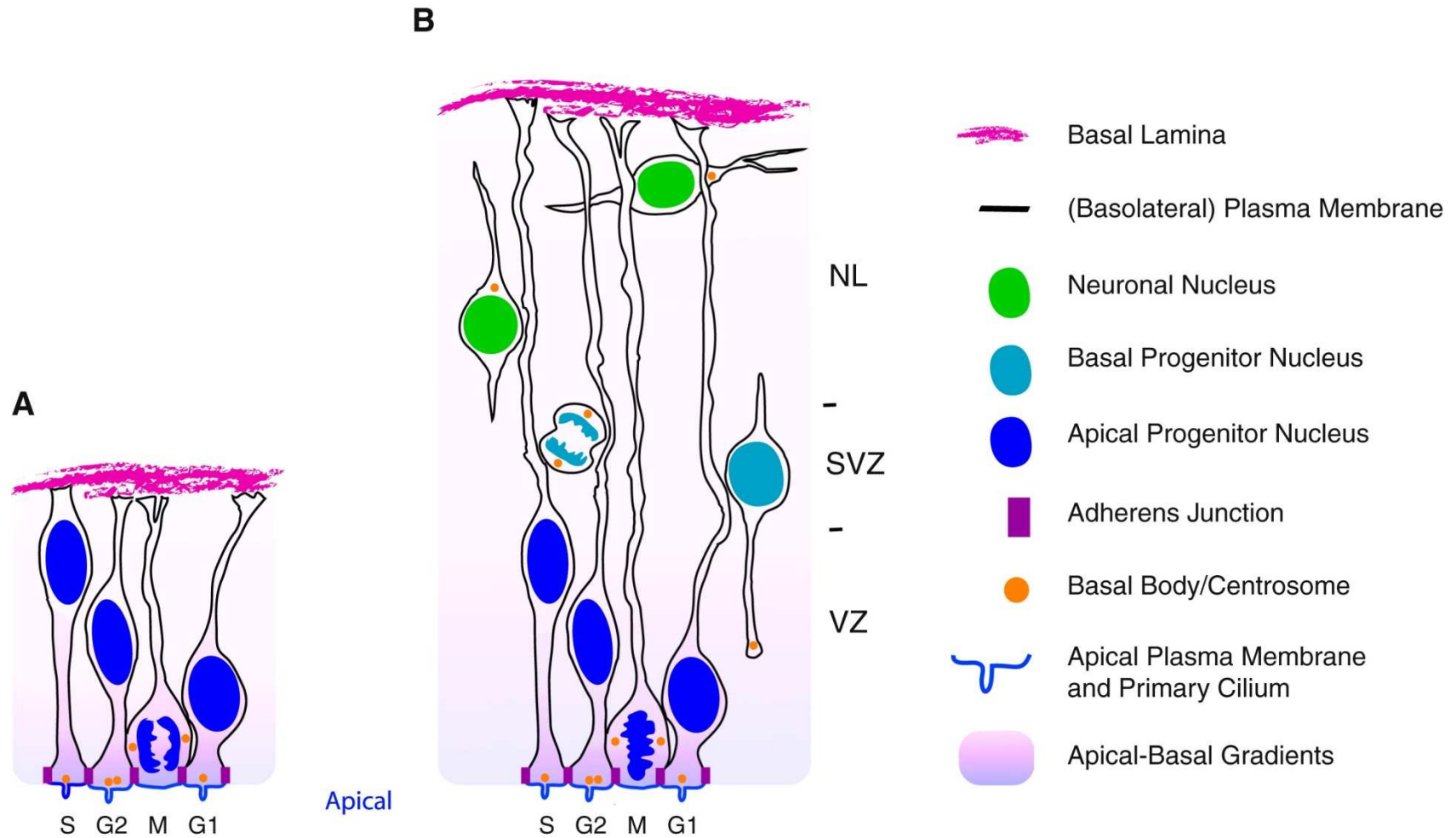
NE neuroepiteliální buňka
 RG radiální glie
 NP neuronální progenitor



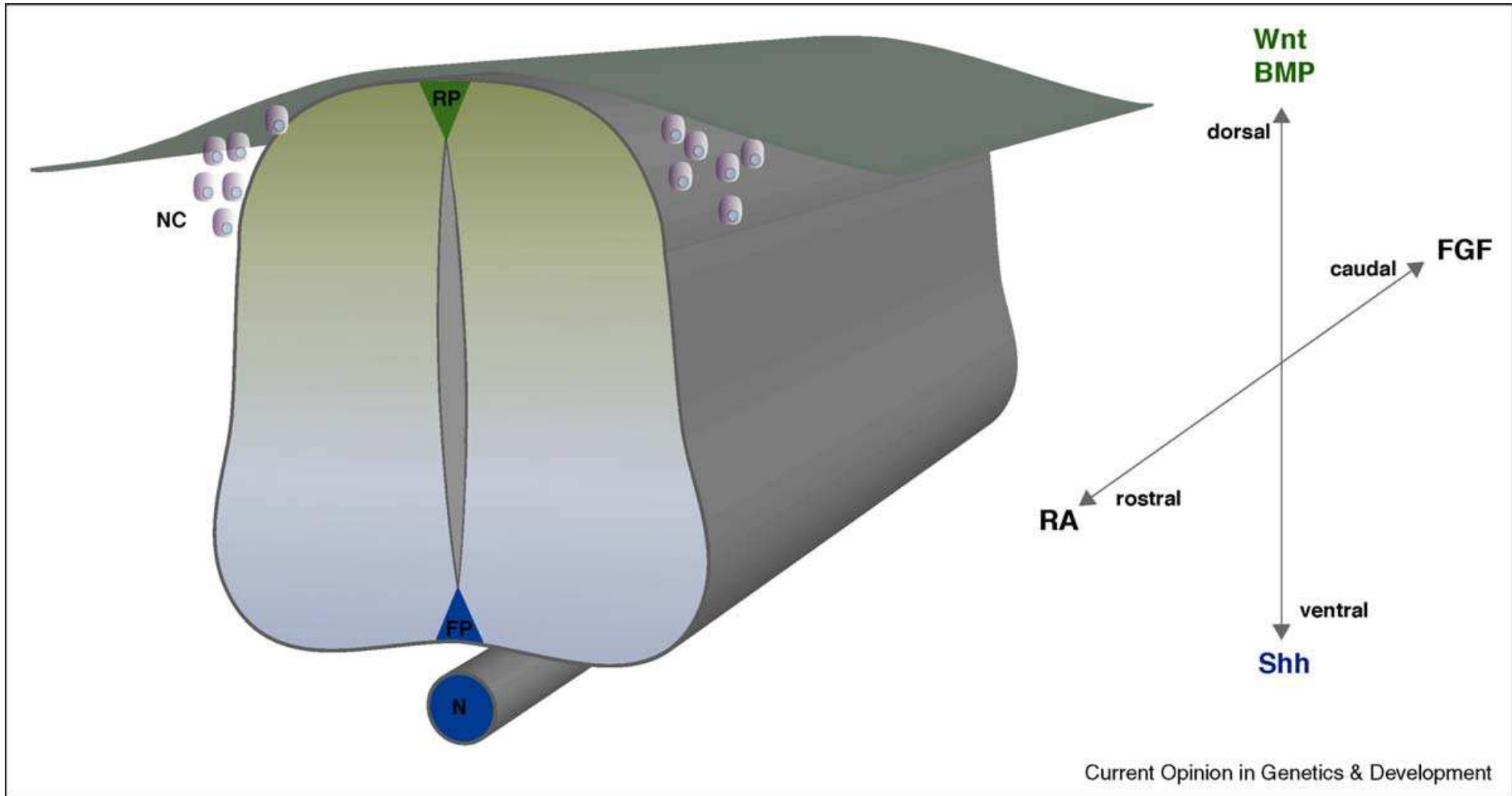
Neuroepiteliální buňka > Radiální glie
 Neuroblast
 Neuronální progenitor



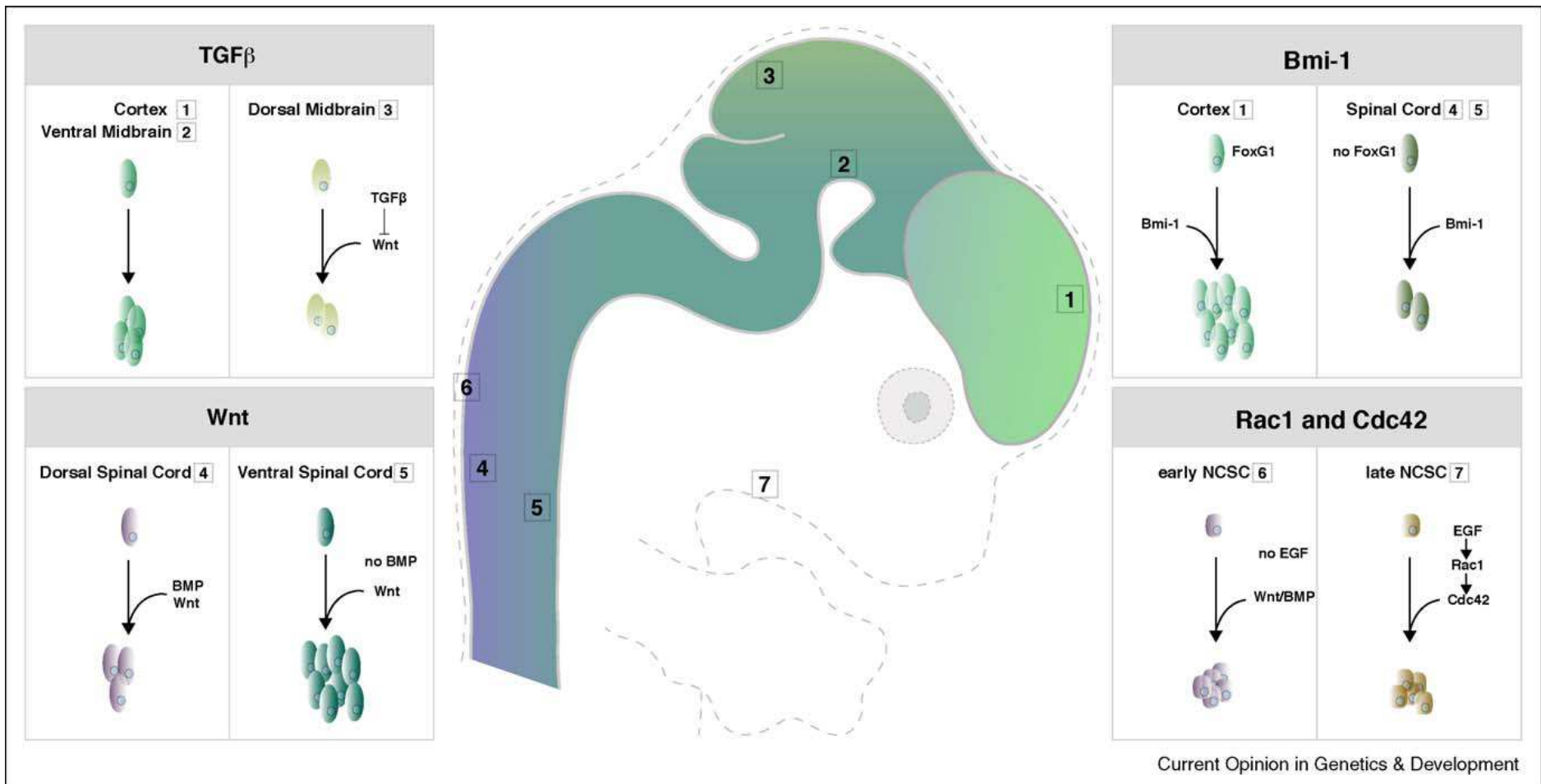
Interkinetická jaderná migrace v RG



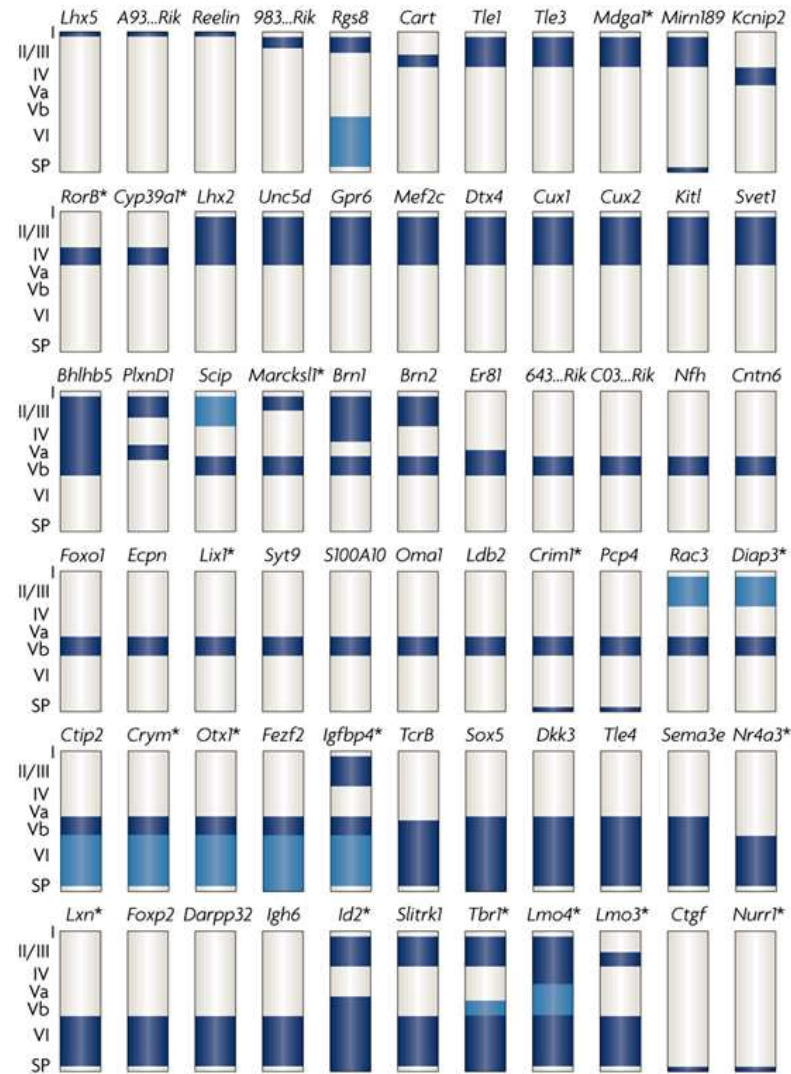
Diferenciace neurální trubice



Signální dráhy řídicí prostorovou a časovou specifikací kmenových buněk

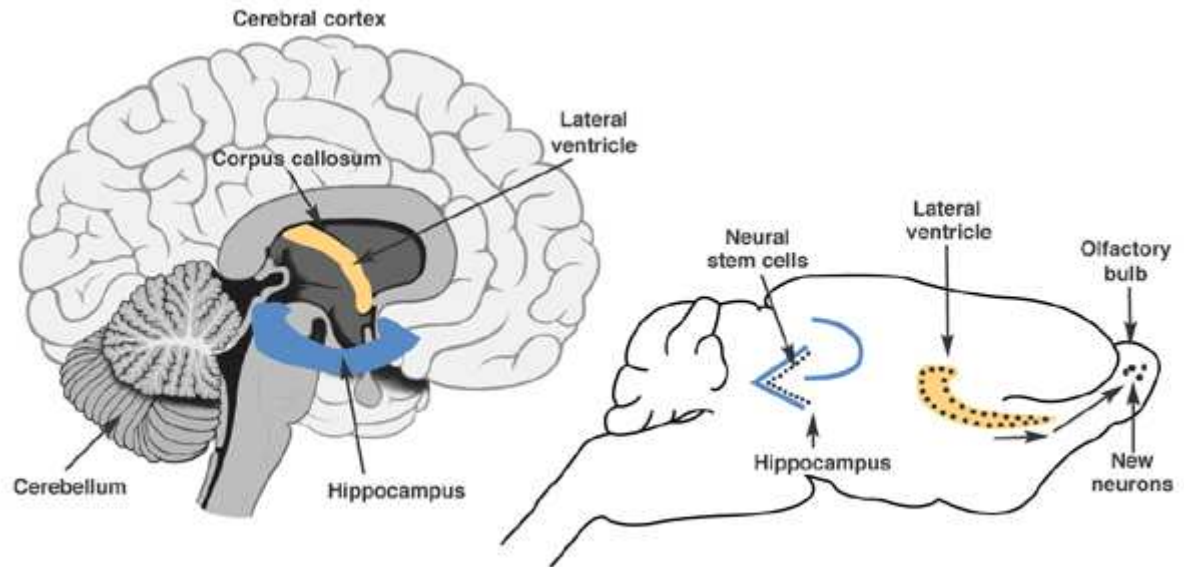


Laminárně a subtypově specifické geny myšího neokortexu



Neurální kmenové buňky v dospělém mozku

V subventrikulární zóně (SVZ)
kolem laterálních ventrikulů
V gyru dentatu hipokampu



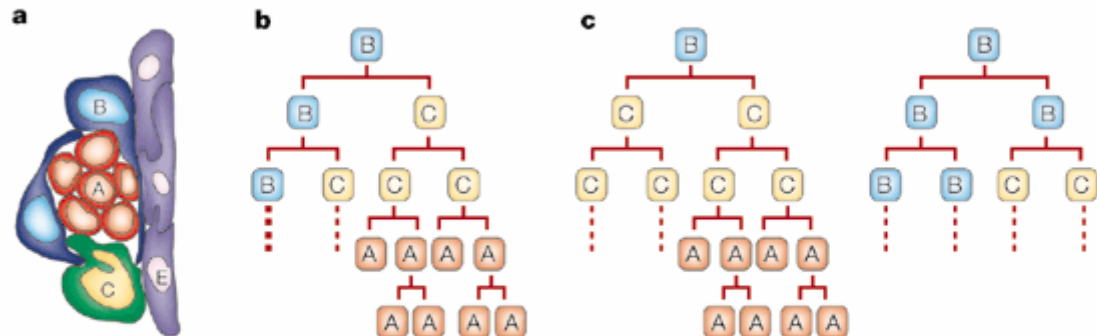
Dělení buněk v SVZ

A) Neuroblasty

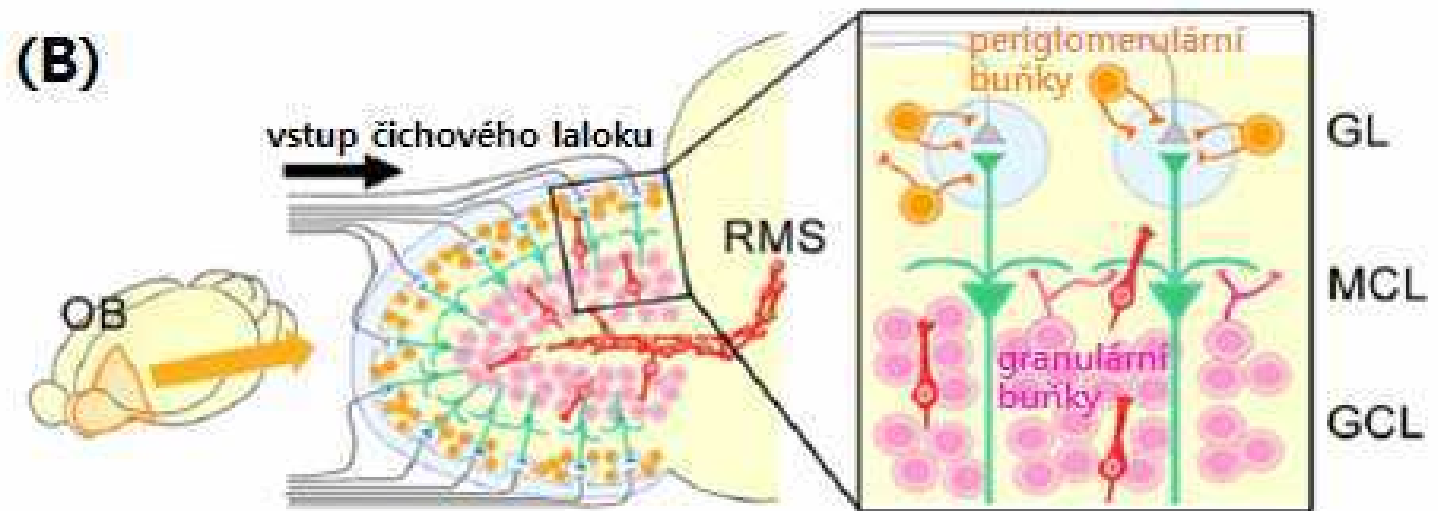
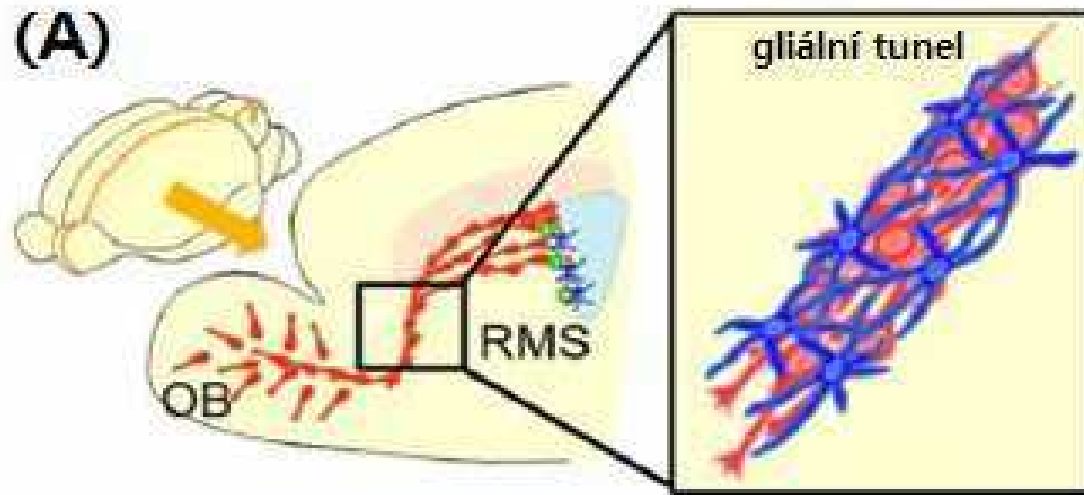
B) Astrocyty SVZ (kmenové b.)

C) Neuronální progenitory

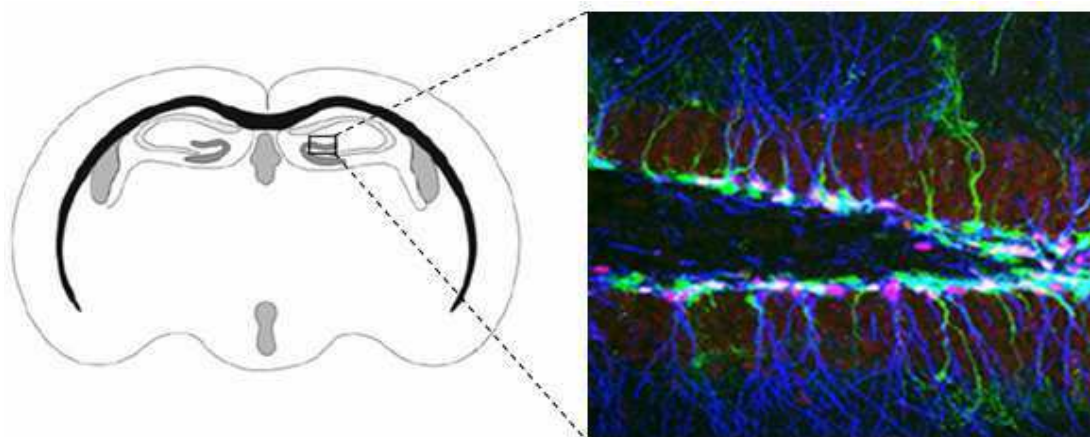
E) Ependymové buňky



Migrace ze SVZ do OB



Neurogeneze v hipokampu



Doublecortin (DCX) je marker nově generovaných neuronů (D buněk).

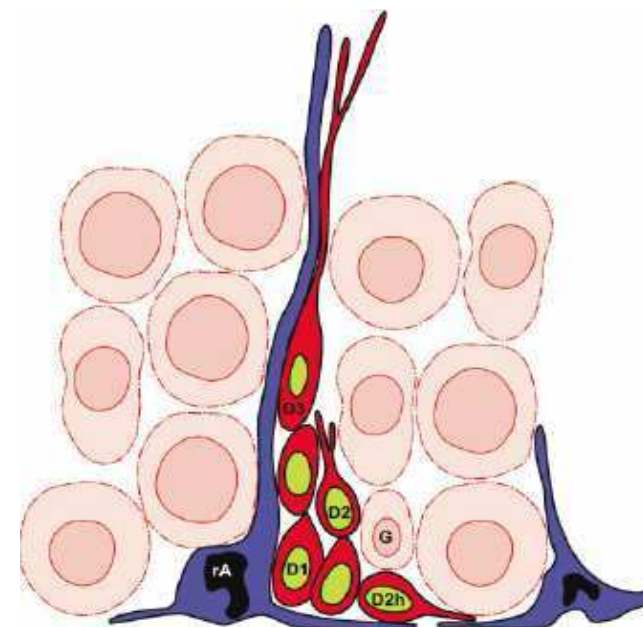
Uspořádání subgranulární zóny v koronární rovině.

Radiální Astrocyty s tangenciálními výběžky

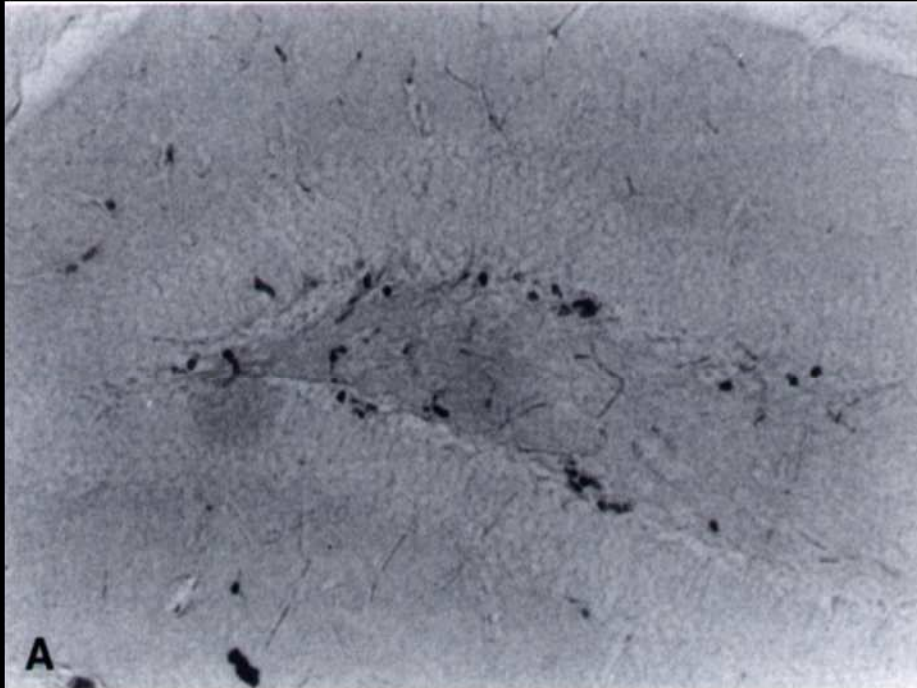
D buňky vytvářejí shluky,

které jsou umístěny v hnízdě tvořeném výběžky astrocytů. D1 buňky v něm dozrávají v D2 a D3 buňky, které se usadí v GCL poblíž starších granulárních neuronů.

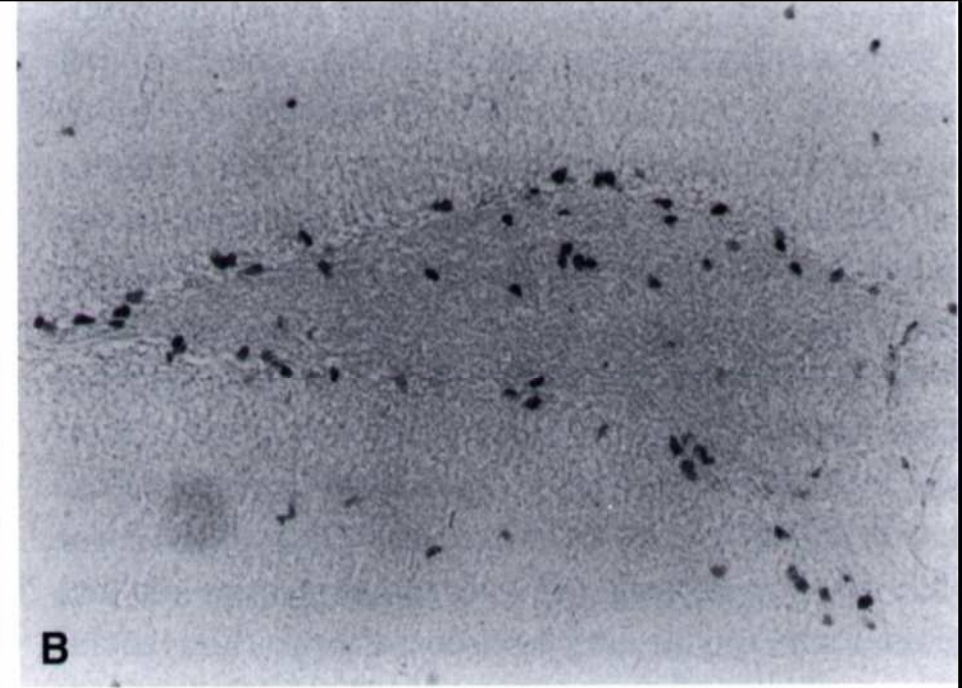
(Seri et al., 2004).



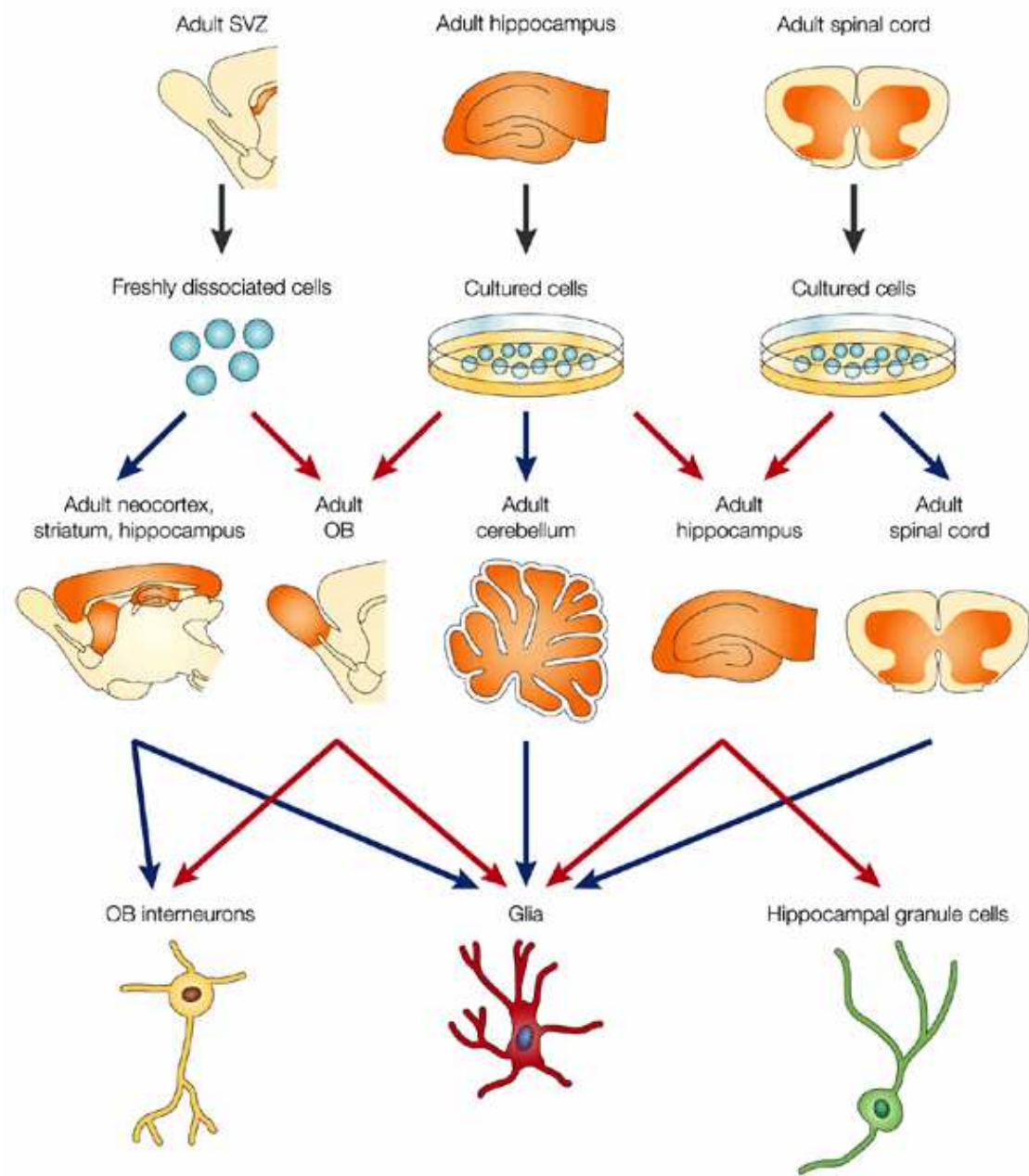
Aktivaci kmenových buněk v dospělém mozku vyvolá ischemie, poranění CNS, obohacené prostředí, cvičení atp.



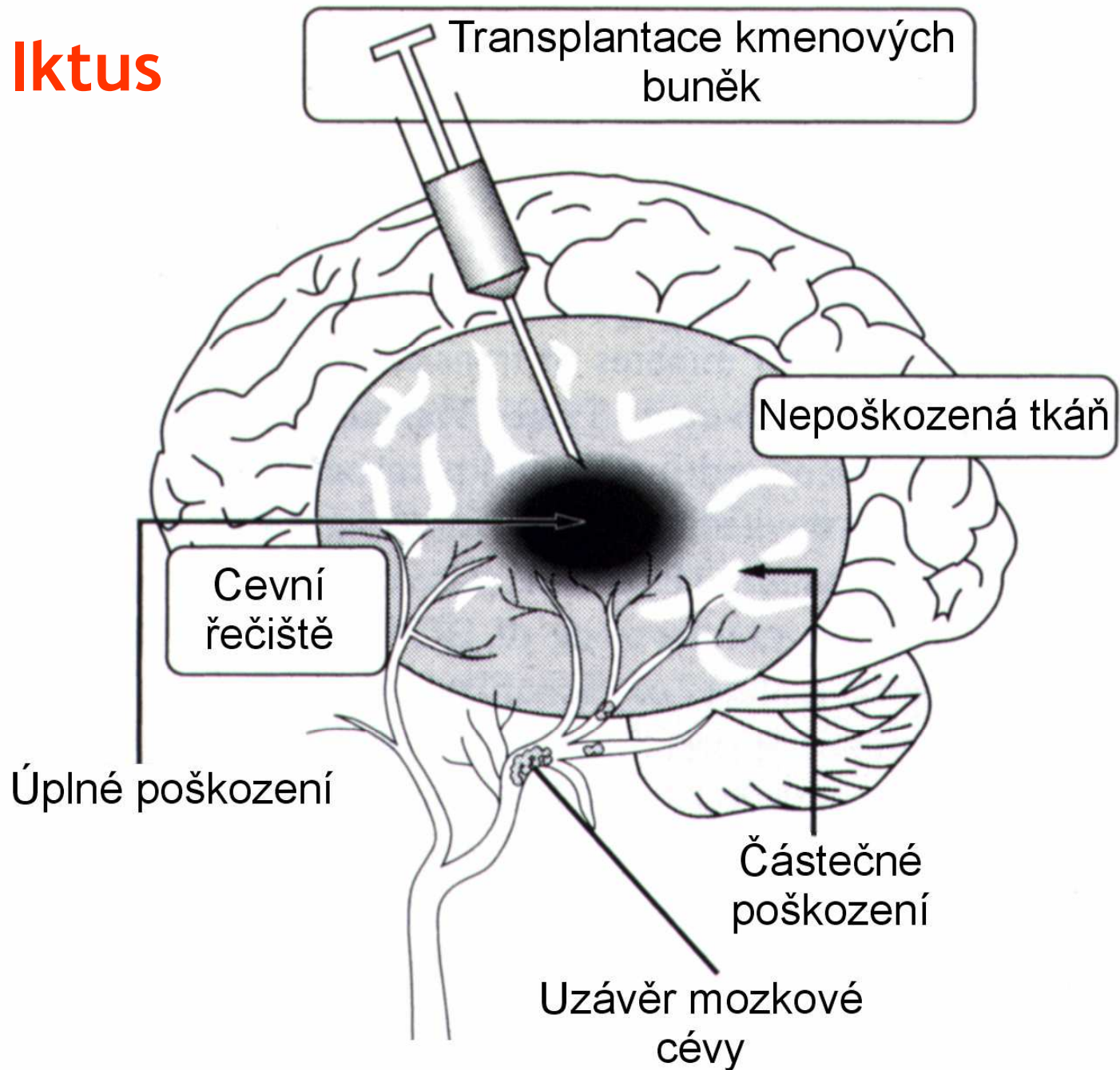
Kontrola

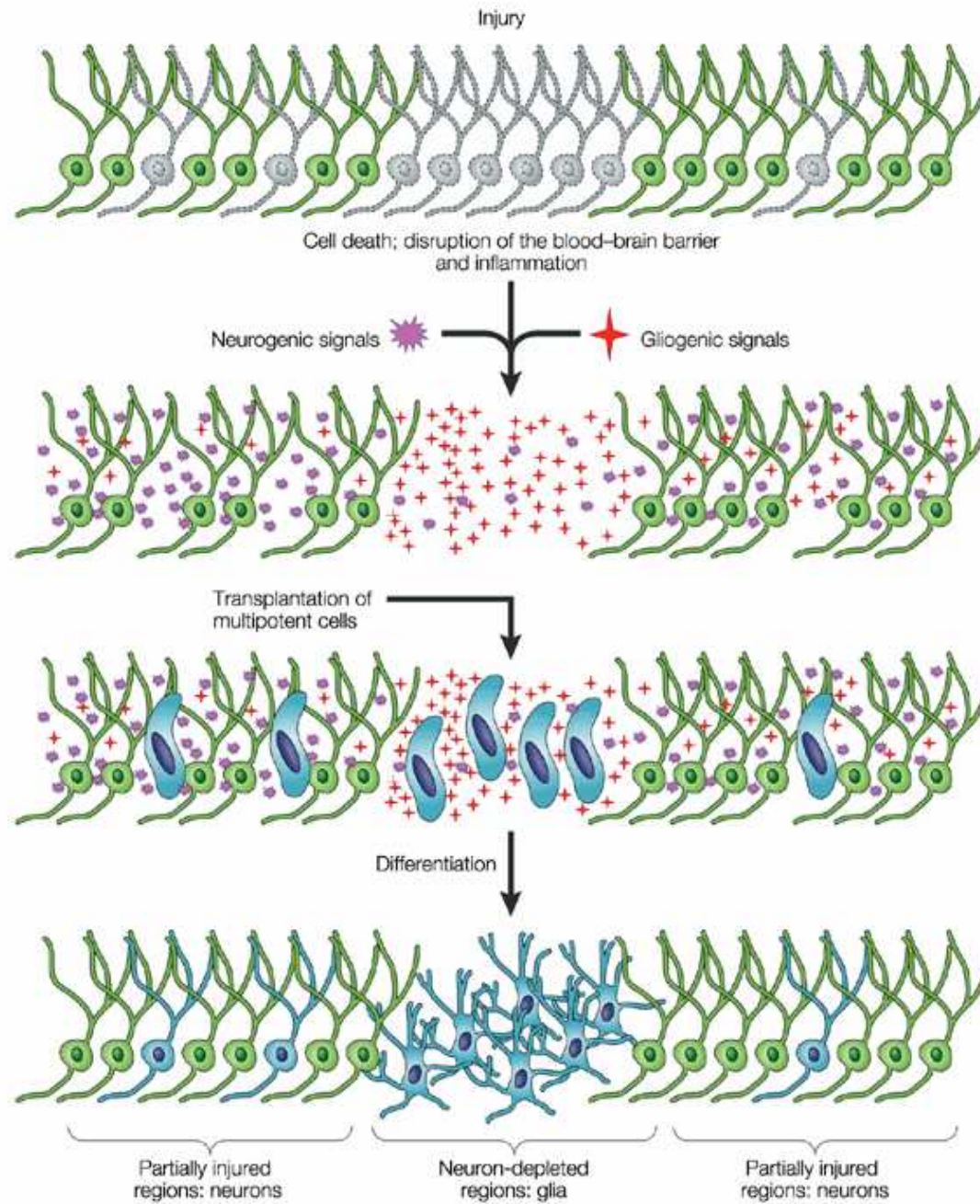


Ischemie



Iktus



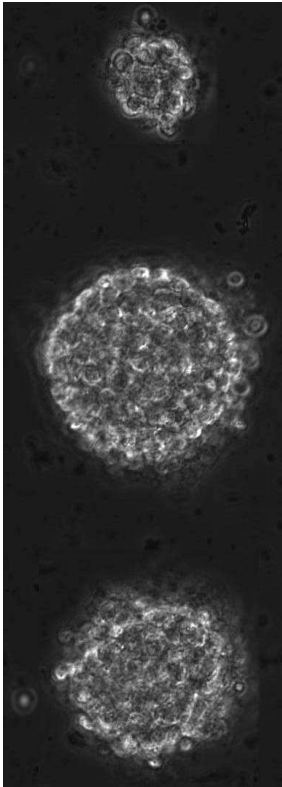


Identifikace, izolace a kultivace neurálních kmenových buněk

- Na rozdíl od např. hematopoietických kmenových buněk neexistují spolehlivé povrchové znaky => **nemožnost jednoznačné prospektivní identifikace**
- Z odebrané fetální nebo dospělé nervové tkáň je mechanicky nebo enzymaticky připravena **suspenze jednotlivých buněk**
- Přítomnost NKB v suspenzi je prokazována následně na základě jejich schopnosti **proliferovat** v kultuře a po indukci **diferencovat v neurony a glie**

Kultivace NKB

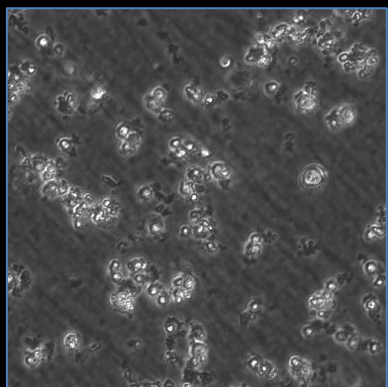
- Kultivace ve formě neurosfér



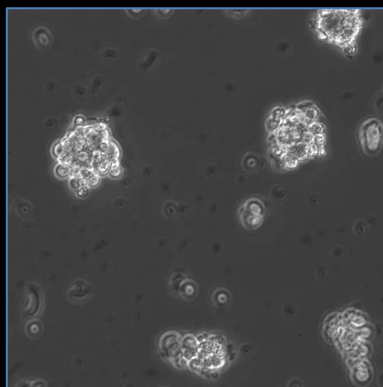
- připravená suspenze jednotlivých buněk je kultivována v bezsérovém médiu za přítomnosti růstových faktorů, které stimulují proliferaci NKB
- bazický fibroblastový růstový faktor (bFGF)
- epidermální růstový faktor (EGF)
- pro lidské NKB navíc leukocytární inhibiční faktor (LIF)
- terminálně diferencované buňky za těchto podmínek nepřežívají, NKB a progenitory se dělí za vzniku sférických volně plovoucích útvarů složených z mnoha buněk = **NEUROSFÉR**
- Rozlišení **NKB** a **progenitorů**: připravení suspenze jednotlivých buněk z primárních neurosfér => nová kultivace buňky které vytvoří **sekundární neurosféry** jsou NKB

Průkaz pluripotence NKB

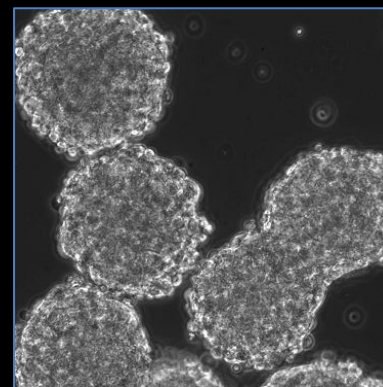
- V podmínkách *in vitro*
 - indukovaná diferenciací NKB
 - neurosféry jsou vysazeny na adhezivní povrch (kultivační miska potažená molekulami extracelulární matrix, např. lamininem, fibronectinem)
 - indukce diferenciací
 - a) odebráním růstových faktorů
 - b) přidáním fetálního séra
 - c) přidáním kyseliny all-trans retinové
 - po několika dnech NKB diferencují ve směs terminálně diferencovaných buněk, neuronů a glií
- V podmínkách *in vivo*
 - transplantace označených NKB a sledování jejich diferenciací v prostředí zdravého nebo poškozeného CNS



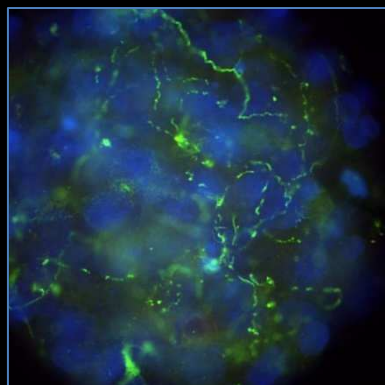
buňky po
izolaci



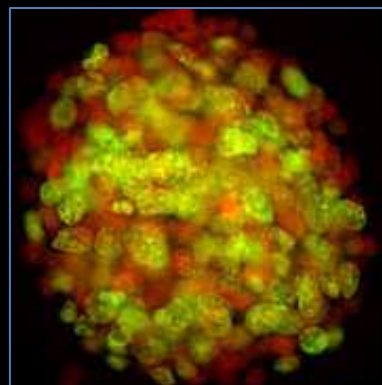
5 dní in vitro



14 dní in
vitro

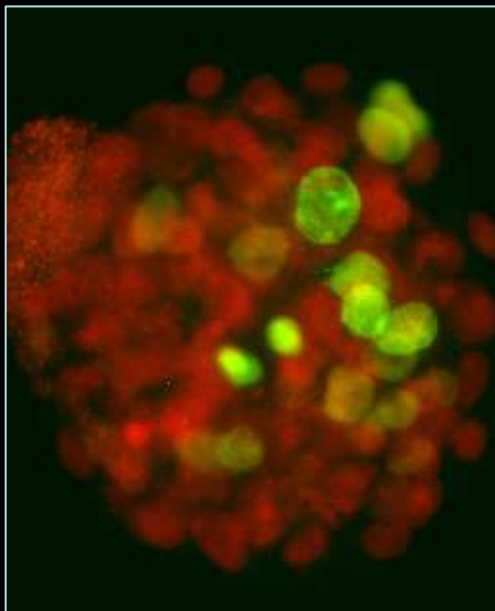


β III tubulin
DAPI

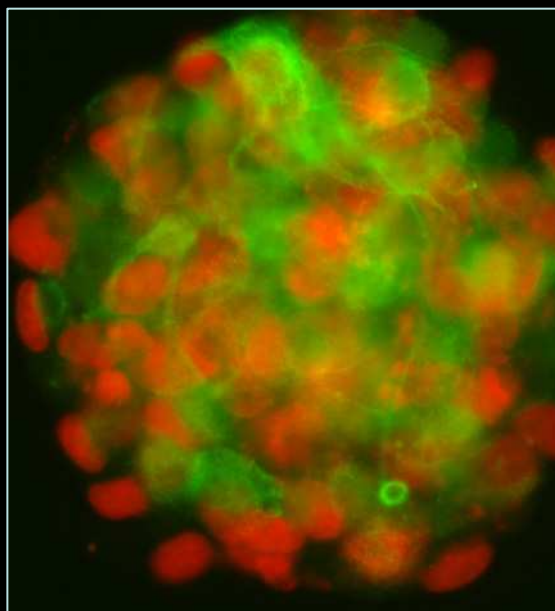


Ki67
PI

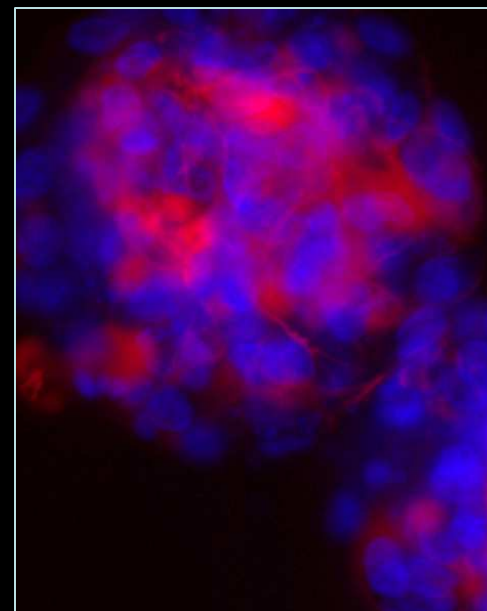
80 dní in vitro (pasáž 6)



Ki67
PI



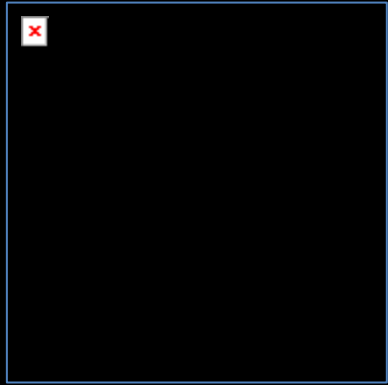
β-III tubulin
PI



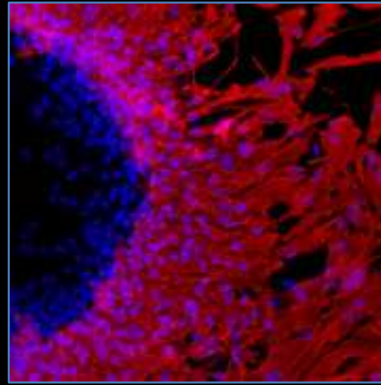
GFAP
Hoechst 33342

5 dní *in vitro* diferenciace

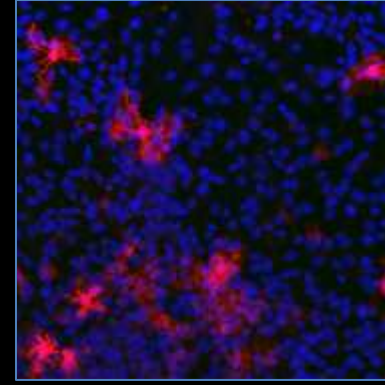
- Kultivace na povrchu potaženém lamininem a fibronektinem
- Indukce diferenciace pomocí 1 μ M ATRA nebo 1% FBS



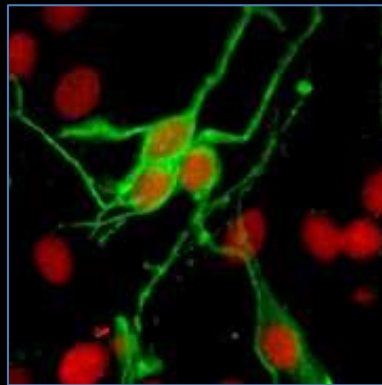
Fázový kontrast



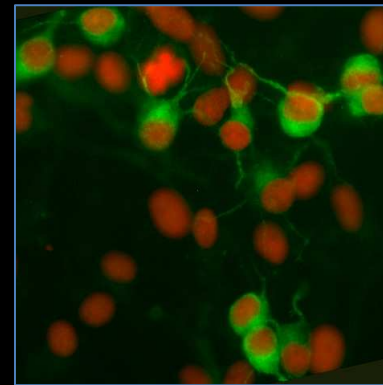
GFAP + DAPI



CNPase + DAPI



β III tubulin
PI



MAP2
PI

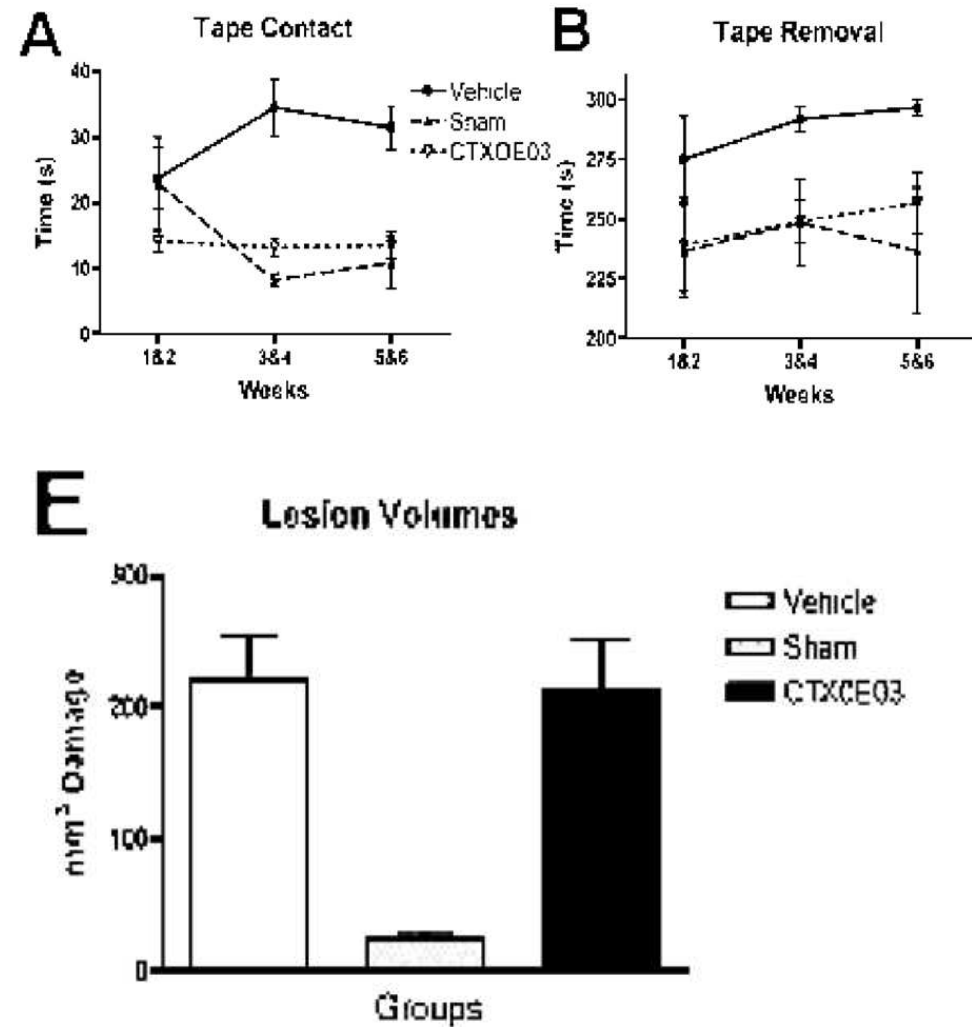
Využití NKB pro experimentální terapie poškození CNS

- Transplantace NKB byla úspěšně využita jako experimentální terapie na mnoha zvířecích modelech poškození CNS, včetně:
 - Parkinsonovy choroby
 - Huntingtonovy choroby
 - Míšního poranění
- Experimentální transplantace lidské fetální nervové tkáně pacientům s Parkinsonovou a Huntingtonovou chorobou
 - *eticky kontroverzní, použití fétů z interrupcí*
- Alternativní zdroj buněk:
 - Immortalizované buněčné linie
 - Nervové buňky diferencované z ESC

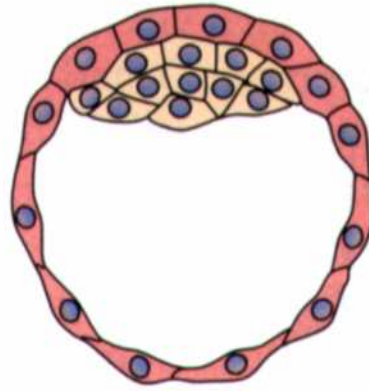
ReNeuron

Studie PISCES (Pilot Investigation of Stem Cells in Stroke)

12 pacientů, jedna dávka produktu ReN001 (CTX) izolované z buněk kortexu 1. Trimestru a immortalizované virálním vektorem nesoucím gen $\text{cmycER}^{\text{TAM}}$



blastocyst



inner-cell-mass cell



ectoderm

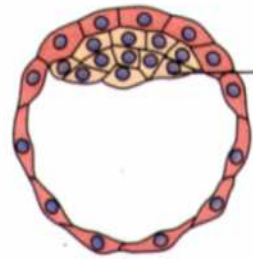
skin
nerves
eyes

mesoderm

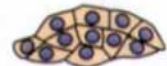
bones
muscles
blood

endoderm

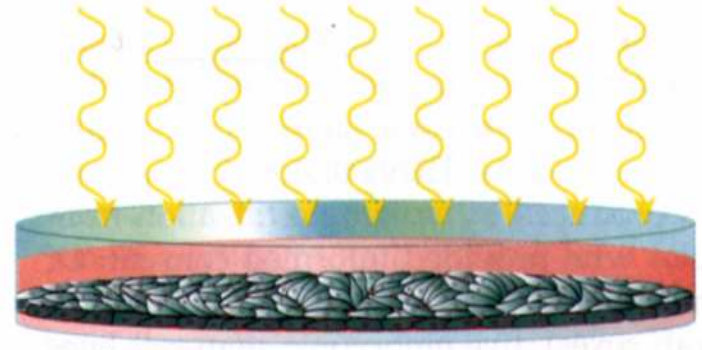
lungs
lining of gut
liver



blastocyst



inner cell mass



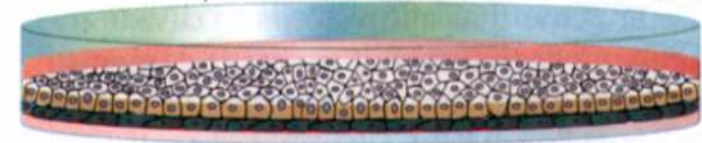
irradiated mouse fibroblasts



embryonic stem cells on feeder-cell layer

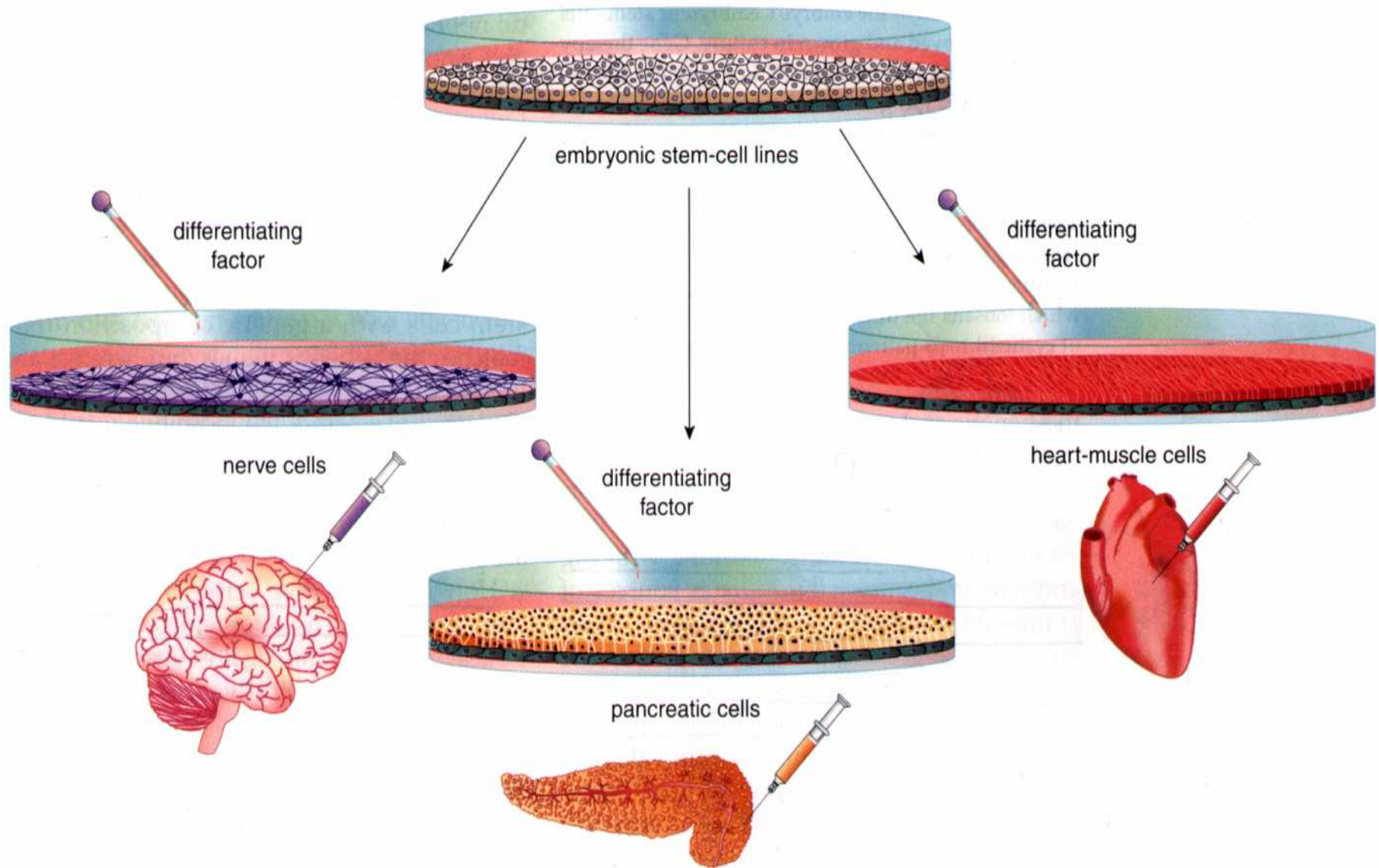


embryonic stem-cell lines

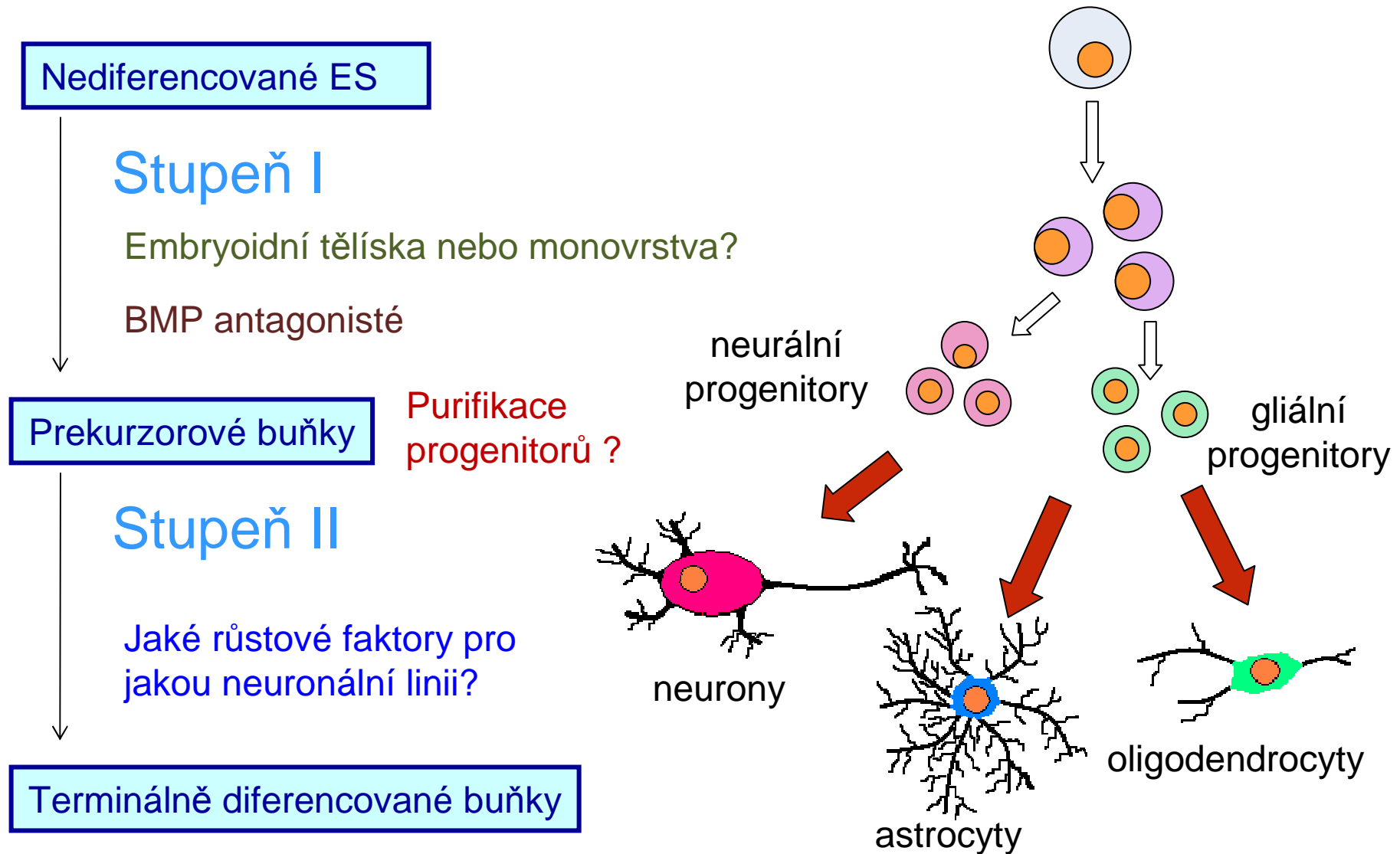


embryonic stem-cell lines

Diferenciace in vitro



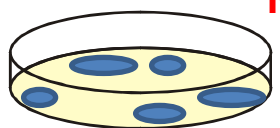
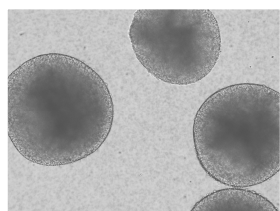
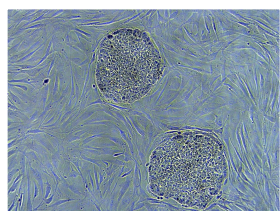
Neurální diferenciace: 2 hlavní stupně



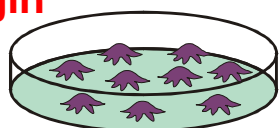
Neurální diferenciace: dvě hlavní stadia

Stupeň I

Stupeň II



Noggin



poly-D-lyzinem a lamininem potažené misky
(poly-D-lyzinem a fibronektinem pro gliální
fenotyp)

neurony

FGF2, Shh, AA
50-70%

motoneurony

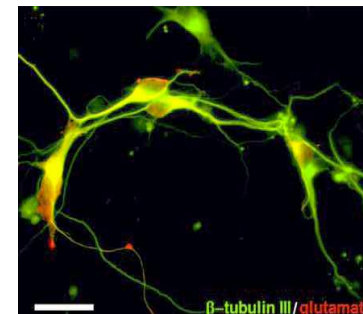
RA (2 μ M/ml),
Shh (300 nM/ml)

oligodendrocyty

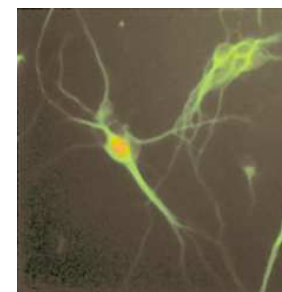
20 ng/ml EGF
a 10M/ml all-
trans-RA v
DMSO na 7 dní

astrocyty

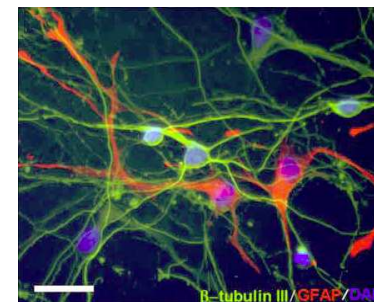
PGDF-AA (20
ng/ml), bFGF
(20 ng/ml),
EGF (20ng/ml)



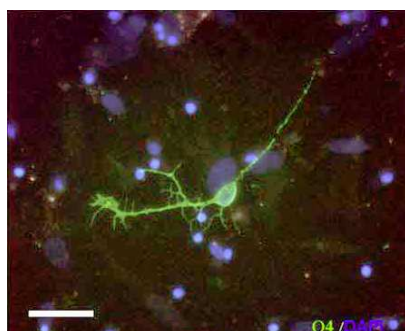
Itsykson P. et al., 2005, Mol Cell Neurosci



Wichterle H. et al., 2002, Cell

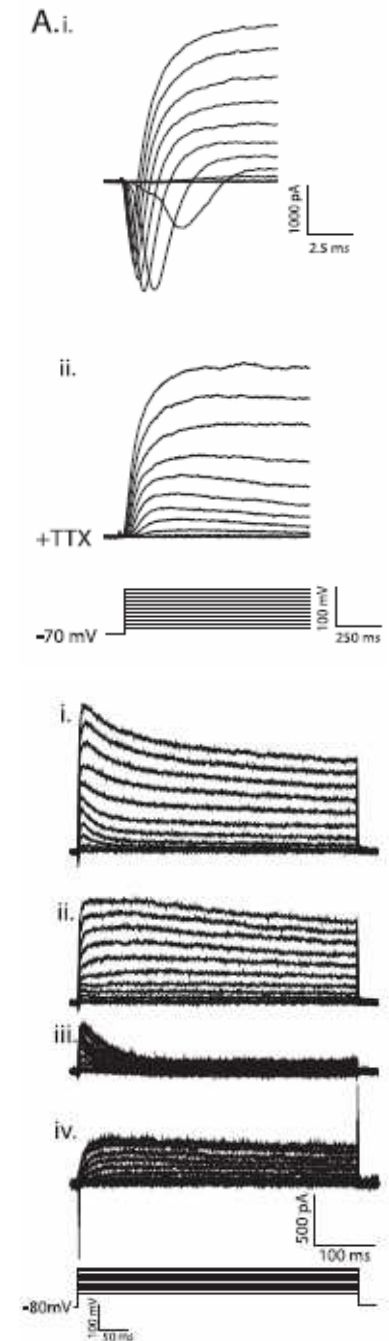
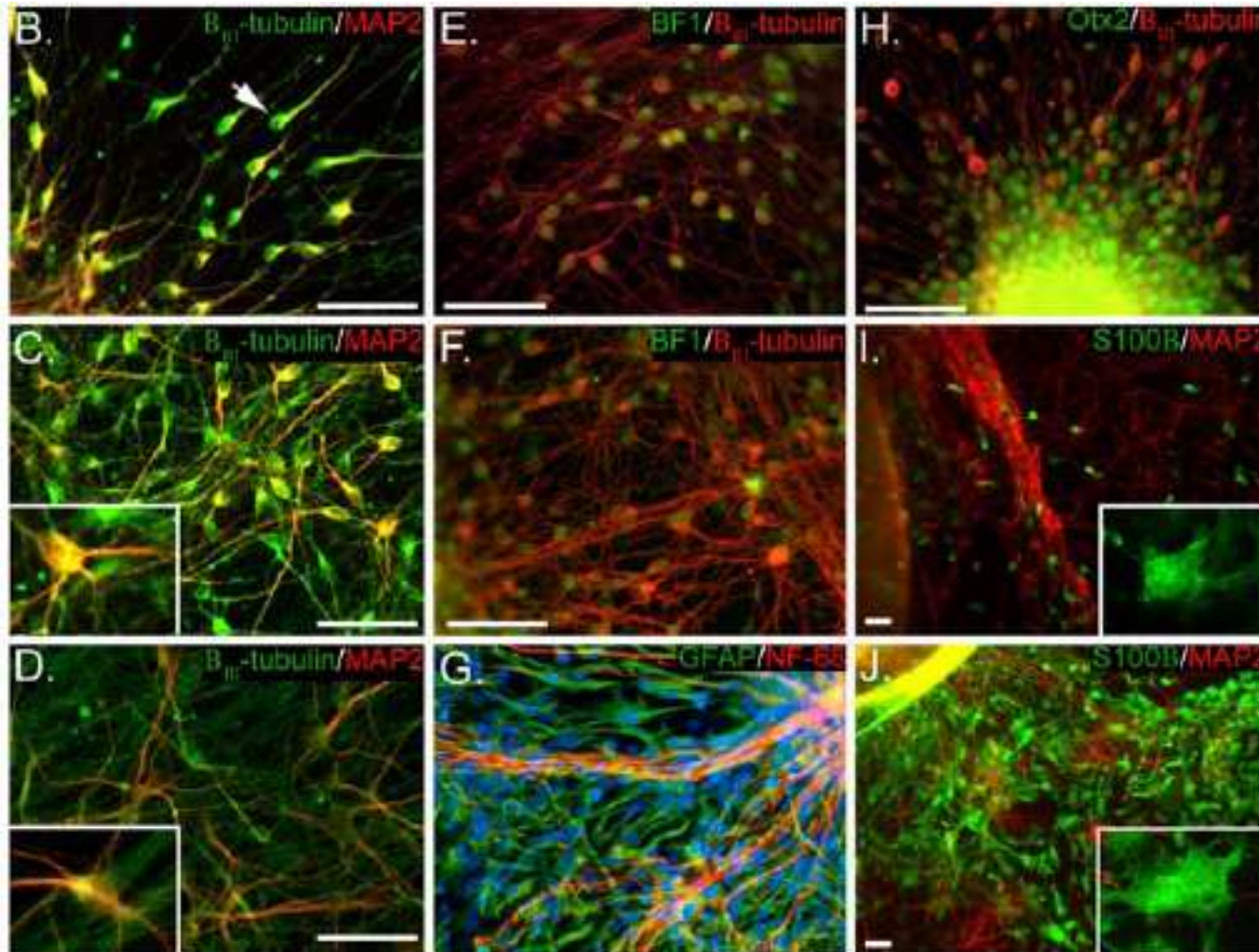


Itsykson P. et al., 2005, Mol Cell Neurosci



Itsykson P. et al., 2005, Mol Cell Neurosci

Průkaz zralosti a funkce



Johnson A.M. et al., 2007, *J Neurosci*

Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors

Kazutoshi Takahashi,¹ Koji Tanabe,¹ Mari Ohnuki,¹ Megumi Narita,^{1,2} Tomoko Ichisaka,^{1,2} Kiichiro Tomoda,³ and Shinya Yamanaka^{1,2,3,4,*}

¹Department of Stem Cell Biology, Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

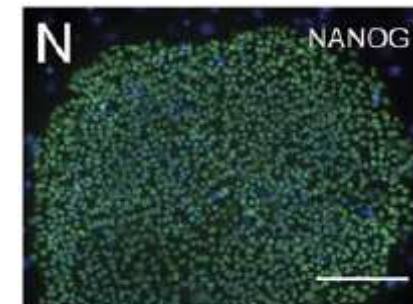
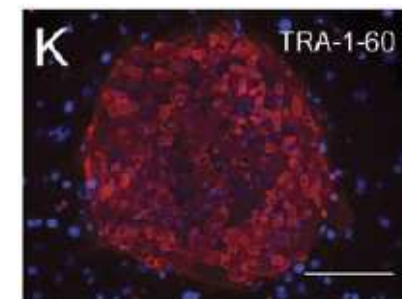
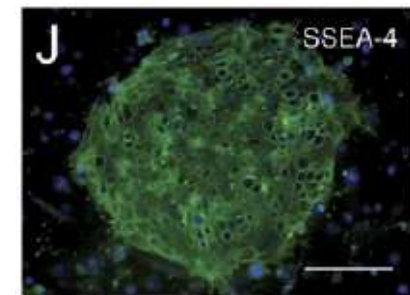
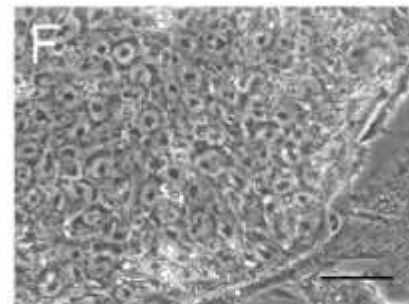
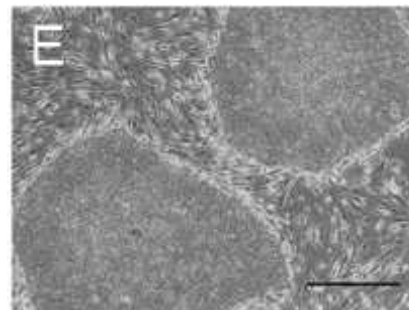
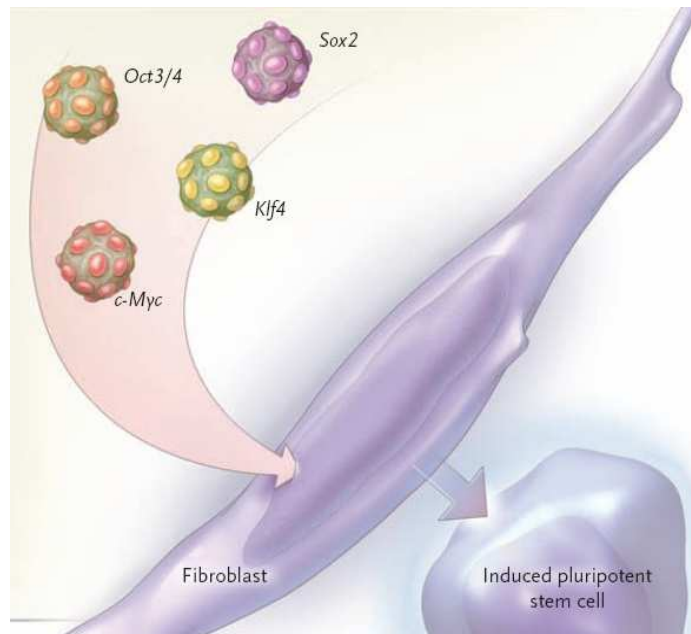
²CREST, Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi 332-0012, Japan

³Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, San Francisco, CA 94158, USA

⁴Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8507, Japan

*Correspondence: yamanaka@frontier.kyoto-u.ac.jp

DOI 10.1016/j.cell.2007.11.019



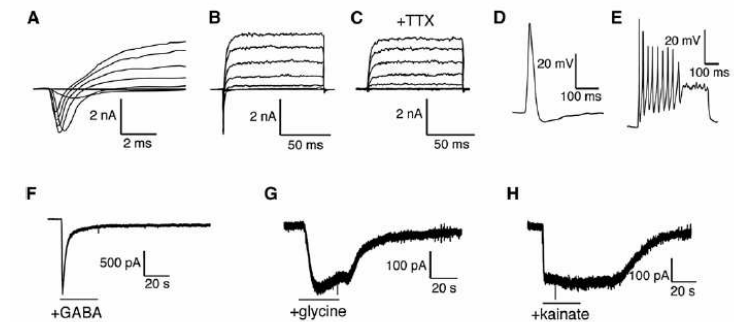
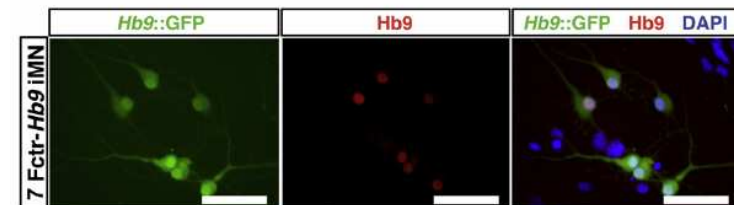
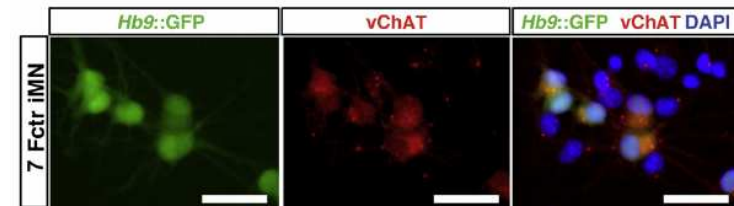
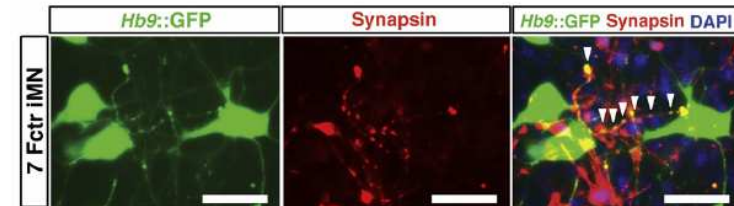
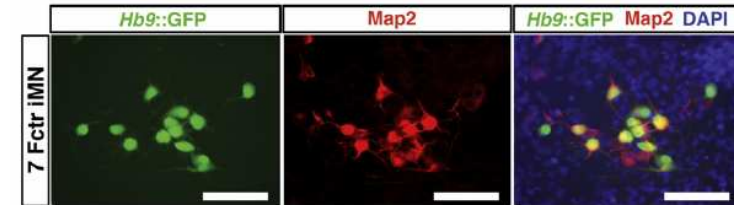
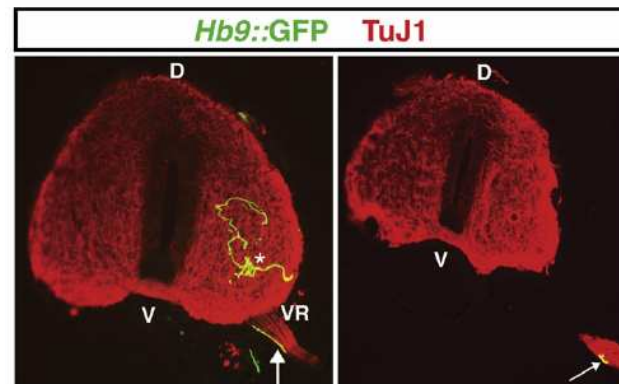
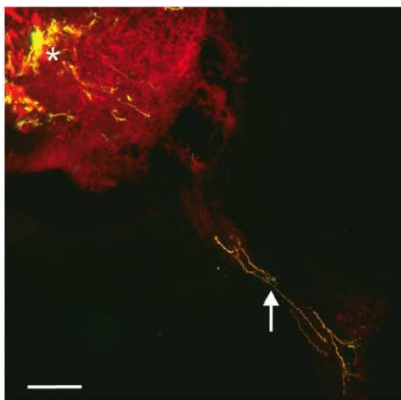
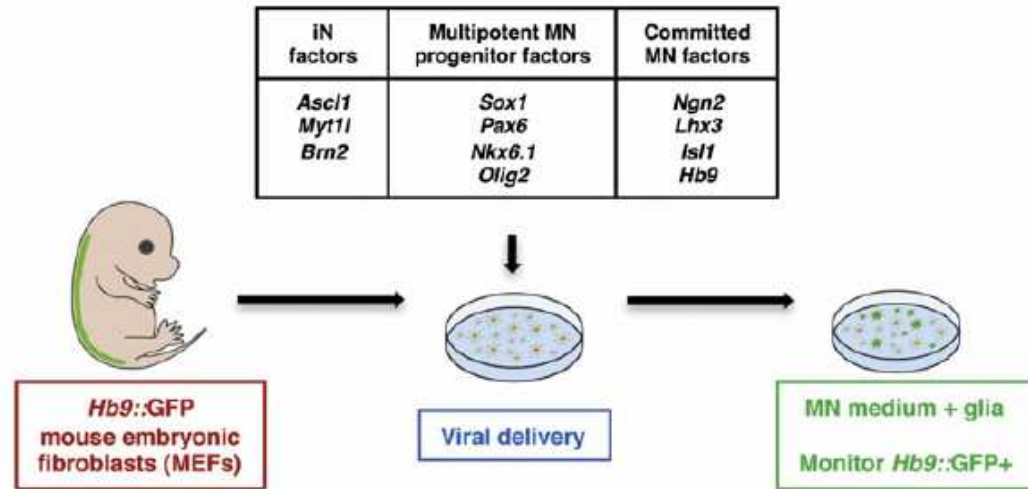
Současný stav poznání

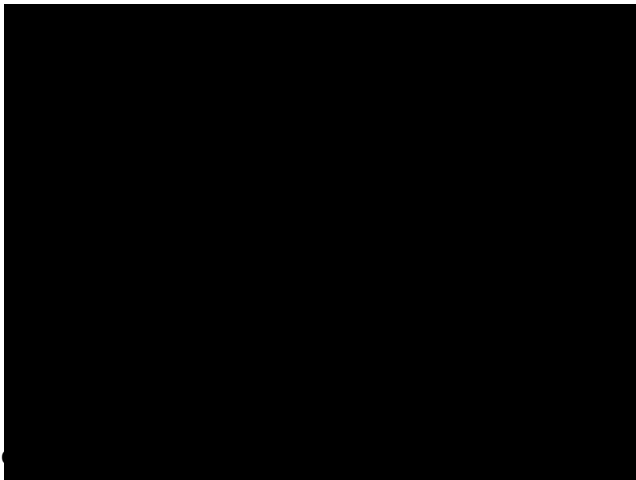
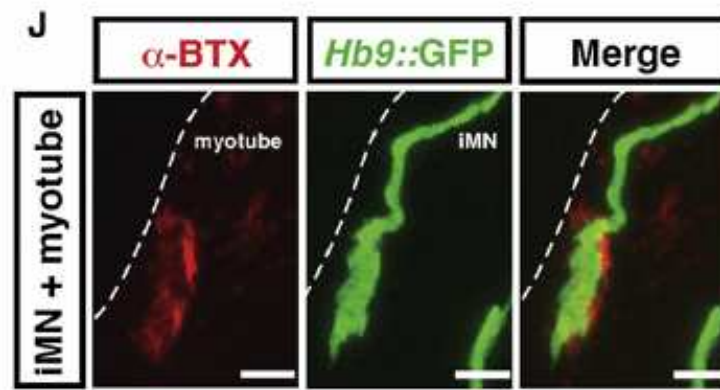
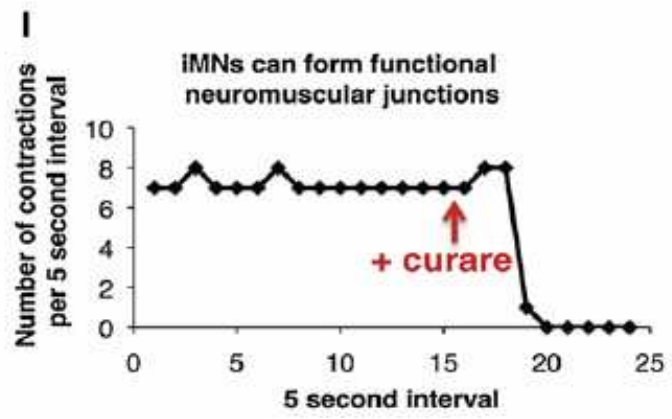
Cell Stem Cell
Article



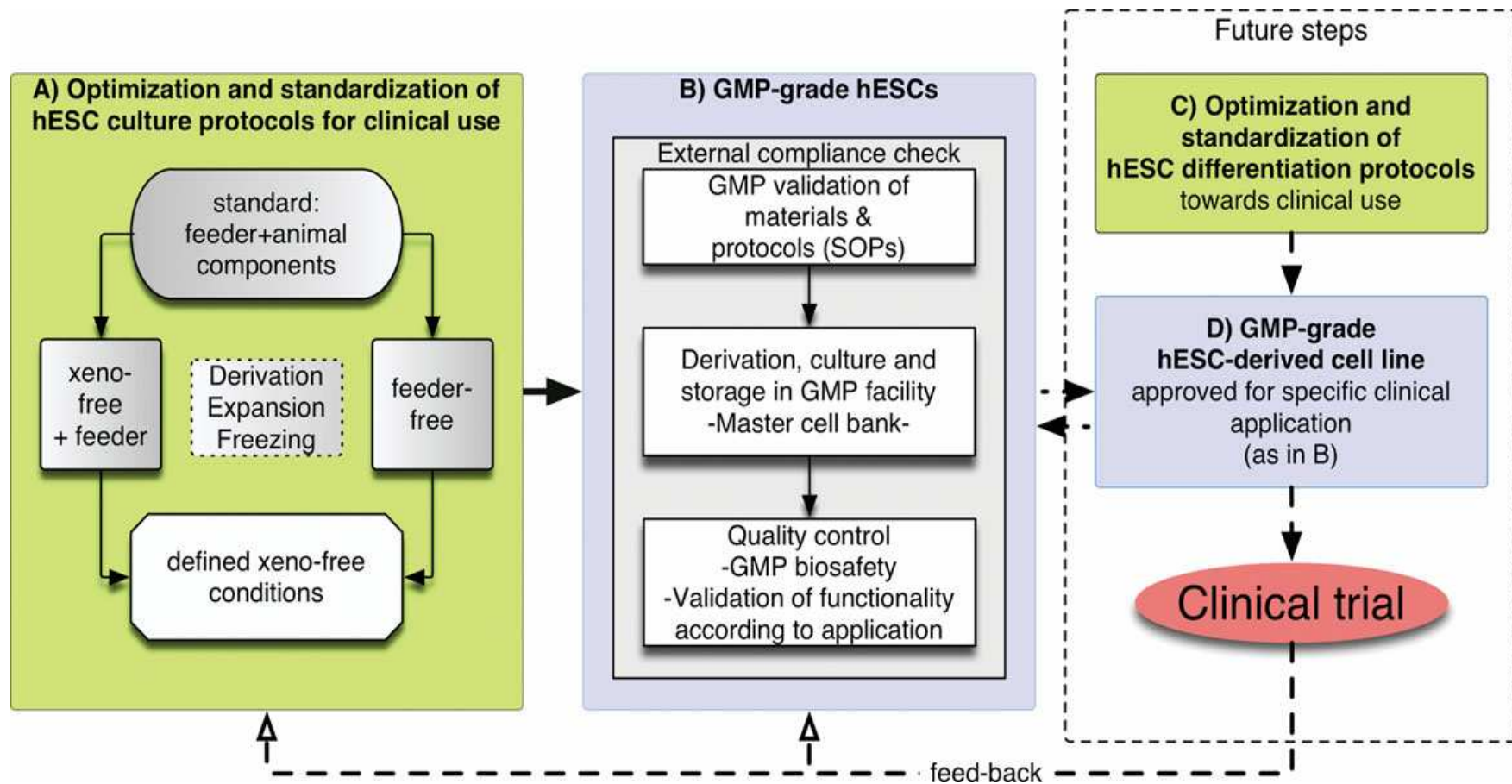
Conversion of Mouse and Human Fibroblasts into Functional Spinal Motor Neurons

Esther Y. Son,^{1,2,3,8} Justin K. Ichida,^{1,2,8} Brian J. Wainger,^{4,5} Jeremy S. Toma,⁷ Victor F. Rafuse,⁷ Clifford J. Woolf,^{4,6} and Kevin Eggen^{1,2,3,*}





Správná výrobní praxe a hES linie použitelné v klinické medicíně



Geron – lidské ESC pro léčbu SCI

- GRNOPC1 (progenitorové buňky oligodendrocytů) připravené z lidských ESC
- Použití pro léčbu míšního poškození
 - Zatím pouze u pacientů s poškozením **třídy A** injury (ASIA score)
 - Transplantace **7-14** dní po poranění
- Klinický test I. fáze = pouze ověření bezpečnosti

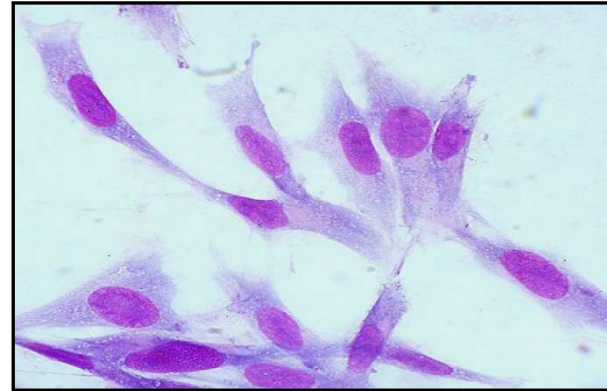
Budoucnost využití NKB v terapiích CNS

- NKB budou sloužit hlavně jako model vývoje nervového systému a buněčné diferenciaci
- Získané poznatky budou využity k produkci autologních buněk pro vlastní terapeutické použití

Definice multipotentních mesenchymových stromálních buněk (MSC)

Adherentní (CFU-F)

Připomínají fibroblasty



Pozitivní na adhezní molekuly CD73, CD 90, CD105

Negativní na hematopoietické markery CD14 nebo
11a, CD 34 and CD 45, CD 19, HLA- II

Schopnost diferenciacie do osteo, adipo and
chondrogeního fenotypu

(Dominici et al ,Cytotherapy, 2006)

MSC

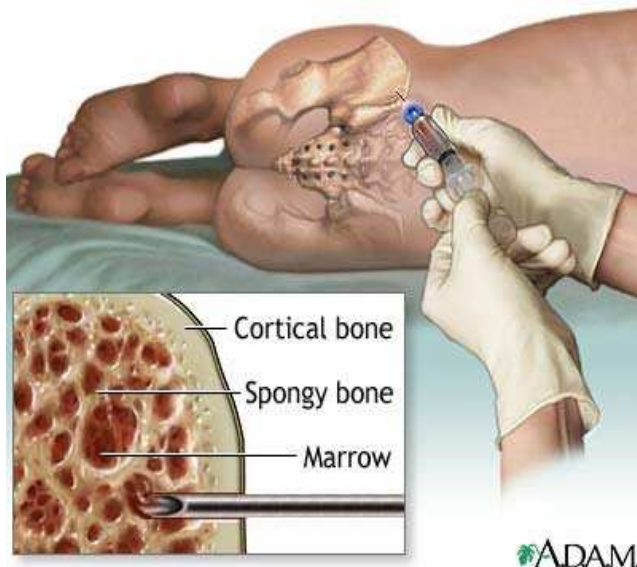
Výhody

- Dostupnost
- Autologní použití
- Snadná kultivace
- Geneticky modifikovatelné
- Nedělají tumory
- Podání i.v.

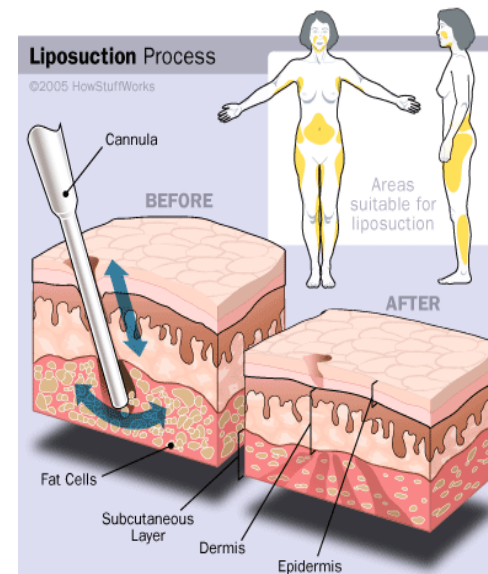
Nevýhody

- limitované možnosti diference
- fúze

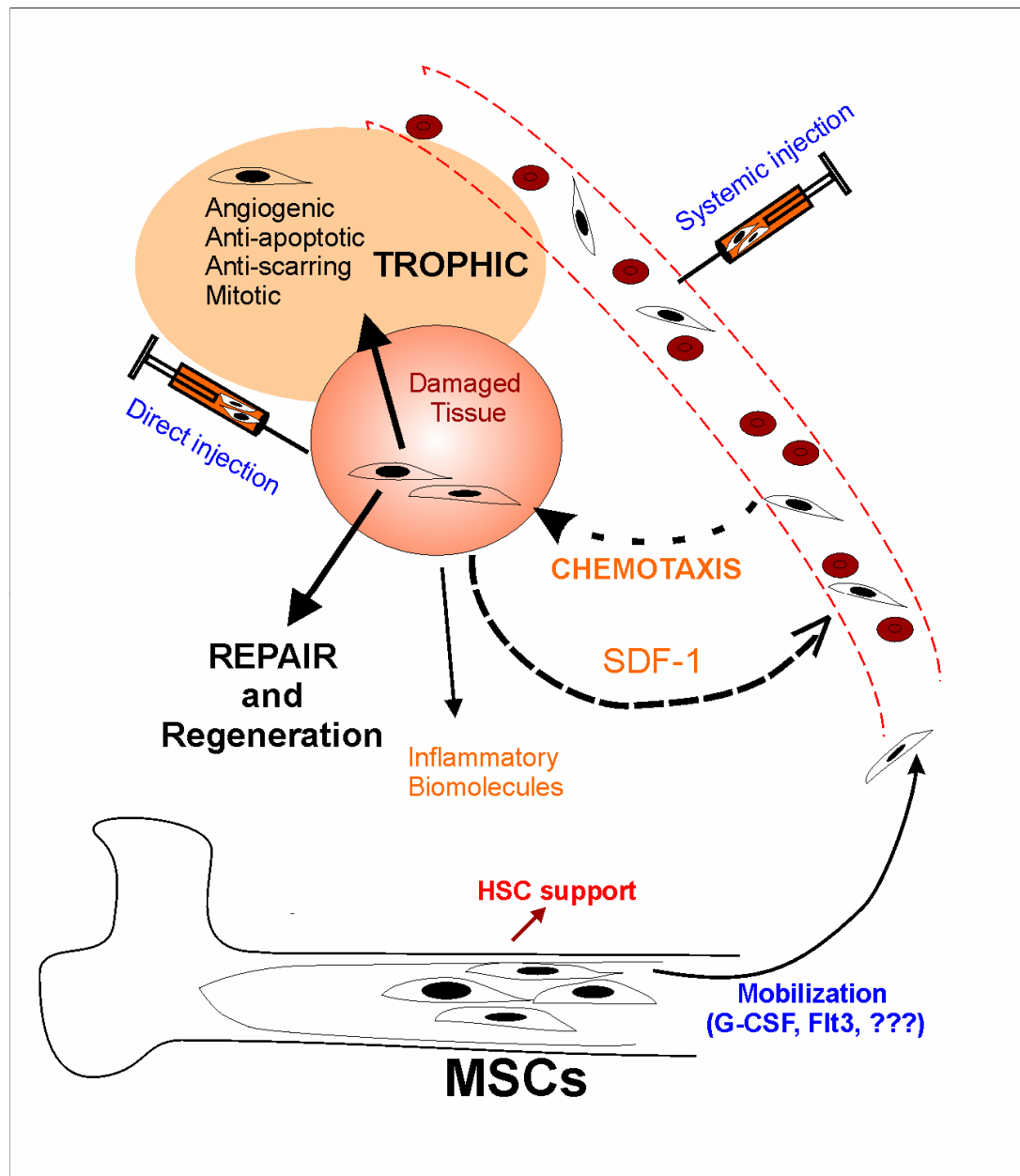
Zdroje



- Kostní dřeň
- Tuková tkáň
- Zubní pulpa
- Pupečník
- Placenta



Migrace a funkce MSC v těle příjemce



- Stromal derived factor-1 (SDF-1, CXCL12) v kostní dřeni a ischemická tkáň + CXCR4 na MSC. (Wynn, Blood 2004)
- MSC se usazují v tumorech díky monocyte chemotactic protein -1 (MCP-1), uvolňovanému tumory (Dwyer, Clin Cancer Res 2007)

Table I. Cytokine and growth factor expression by cultured mesenchymal stem cells.

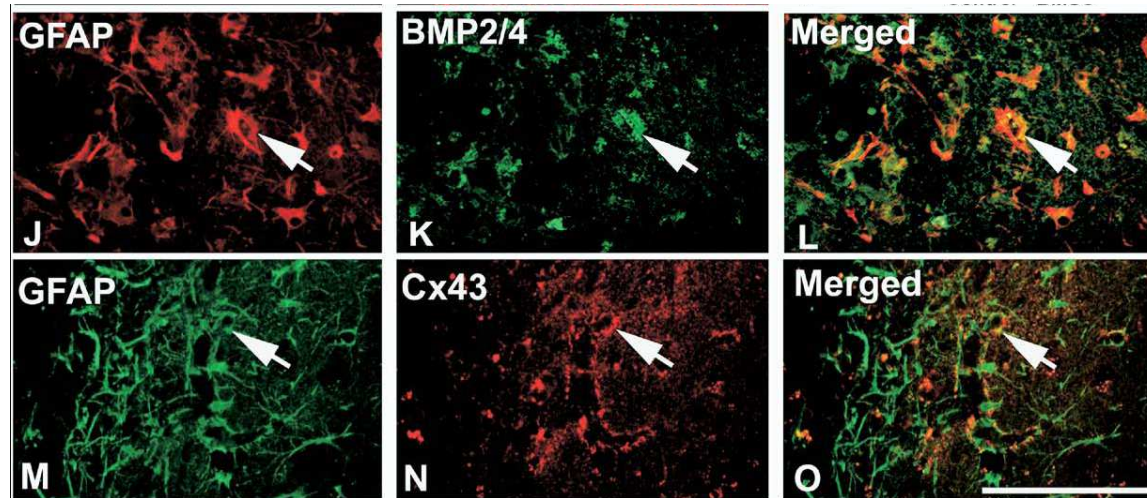
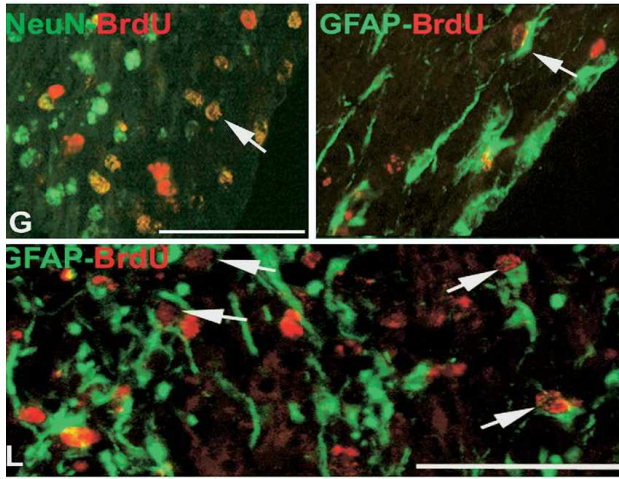
Expressed
IL-6
IL-7
IL-8
IL-11
IL-12
IL-14
IL-15
SCF
LIF
SDF-1
Flt-3 ligand
MCSF
TGF- β
BMP-4
OSM
Induced in response to stimulation (e.g by IL-1)
IL-1 α
IL-1 β
Tpo
GMCSF
GCSF

Příklady pozitivního účinku MSC in vivo

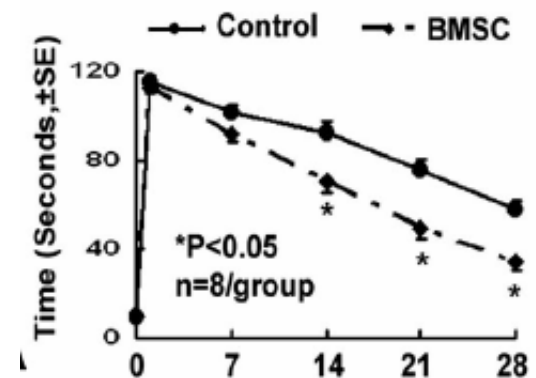
Různé experimentální modely

Podpůrná funkce

Podání MSC i.a. potkanům s MCAO ↑ proliferaci v SVZ a v ischemické oblasti ↑ expresi BMP a Cx43



Adhesive-removal test



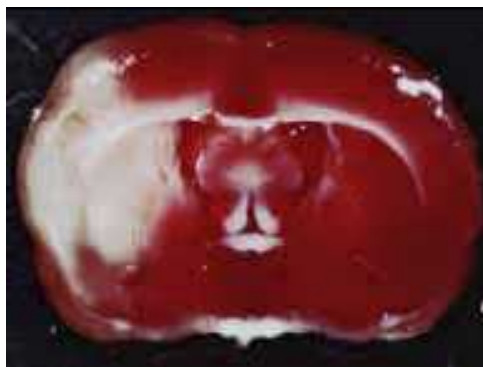
MSC lze geneticky modifikovat



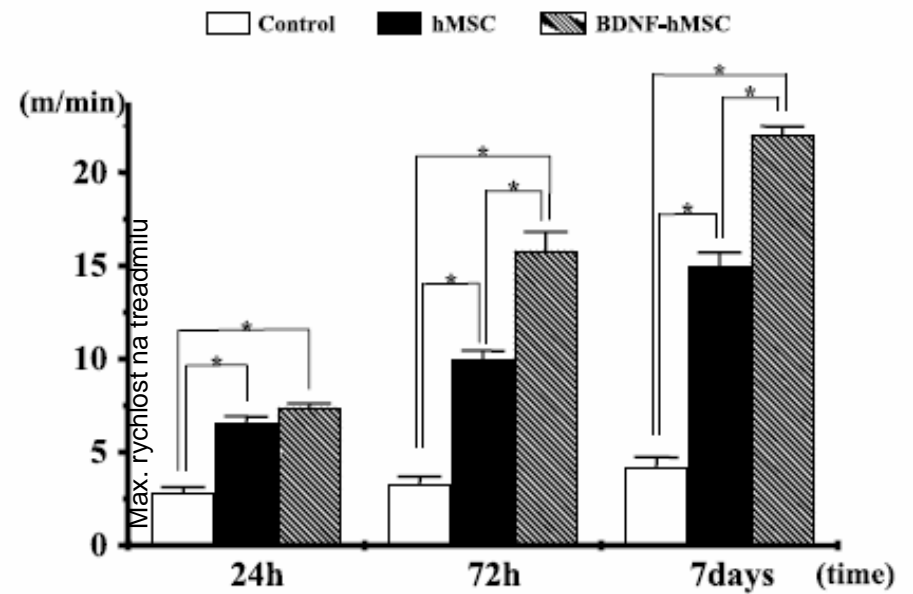
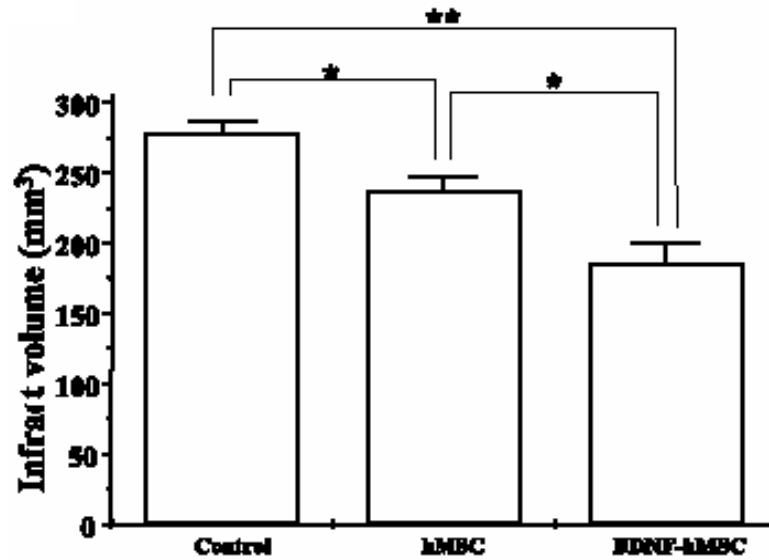
Kontrola



hMSC



hMSC + BDNF

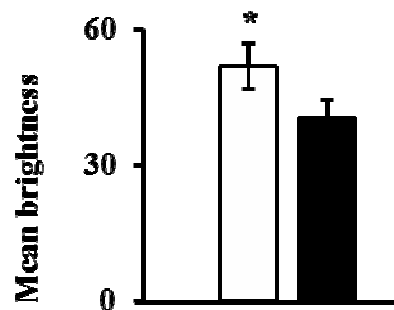
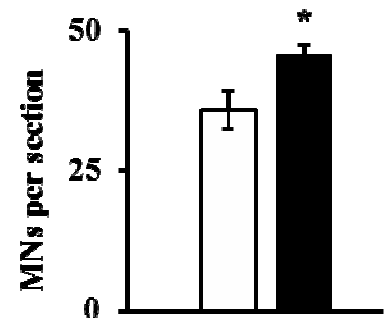
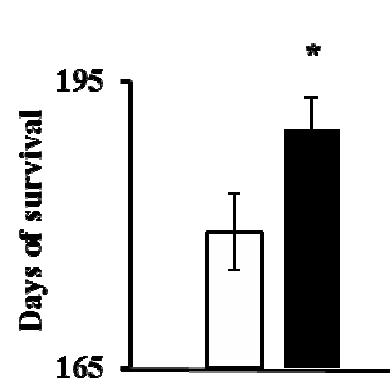


Model ischemie

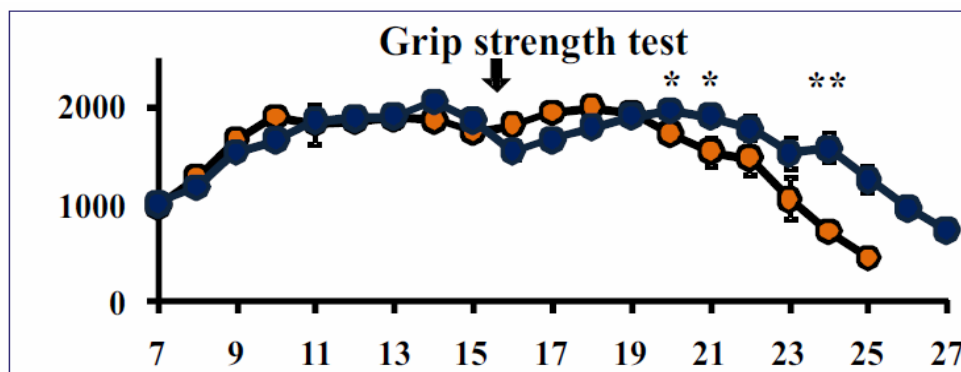
- Lidské MSC - injekce 1den po přechodné celkové ischemii myšního hipokampu.
- Zlepšená funkce a snížený počet mrtvých neuronů.
- Přežívaly < 7 dní (i v SCID zvířatech).
- Neproliferovaly.
- Ischemie upregulovala 586 myších genů.
- hMSC downregulovaly > 10% ze zvýšených (zánětlivé/imunitní odpověď).
- V myších mikroglích/makrofágách, zvýšily expresi neuroprotektivního cytokinu Ym1, IGF-1 (podporuje buněčné přežívání), galektinu-3, MHC II, Th2 cytokinů

(Ohtaki H et al PNAS 2008)

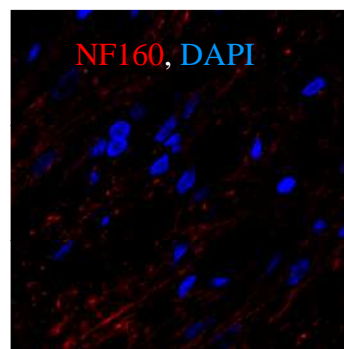
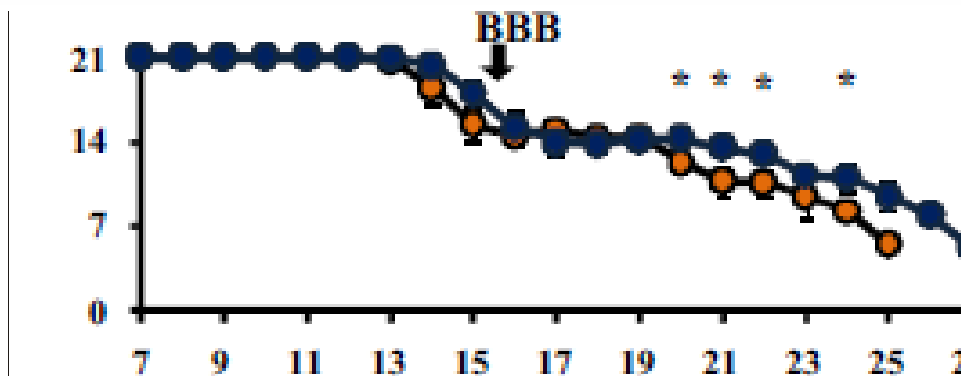
MSC v léčbě ALS



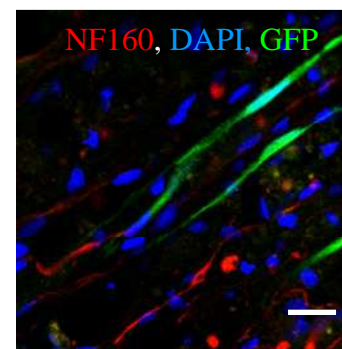
□ Kontrola ■ MSC



● Kontrola
● MSC



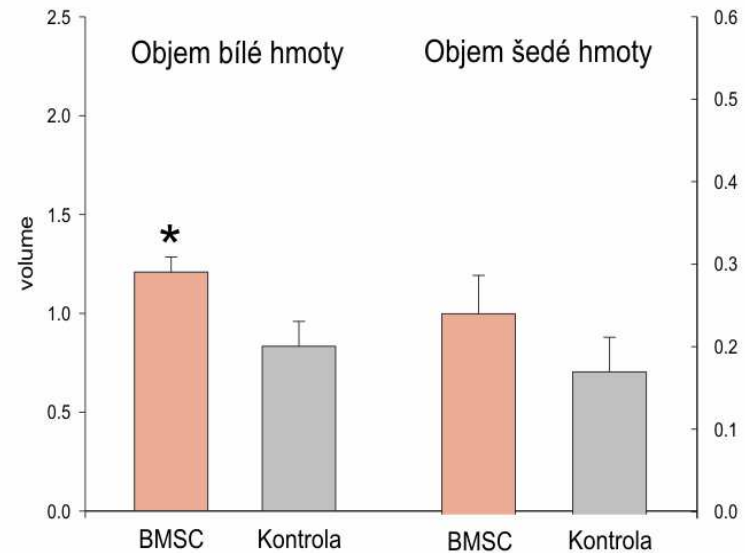
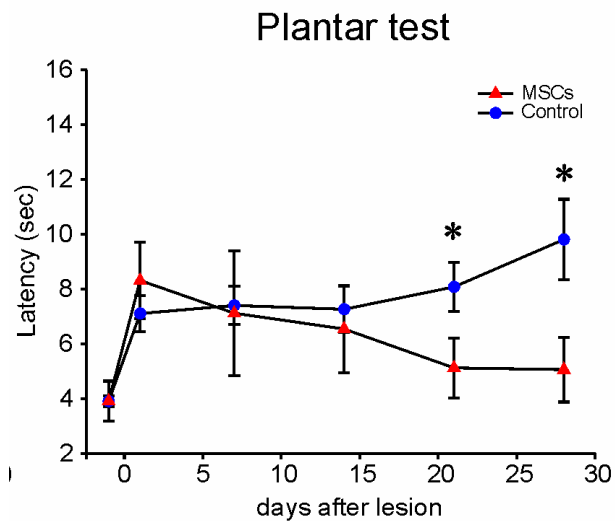
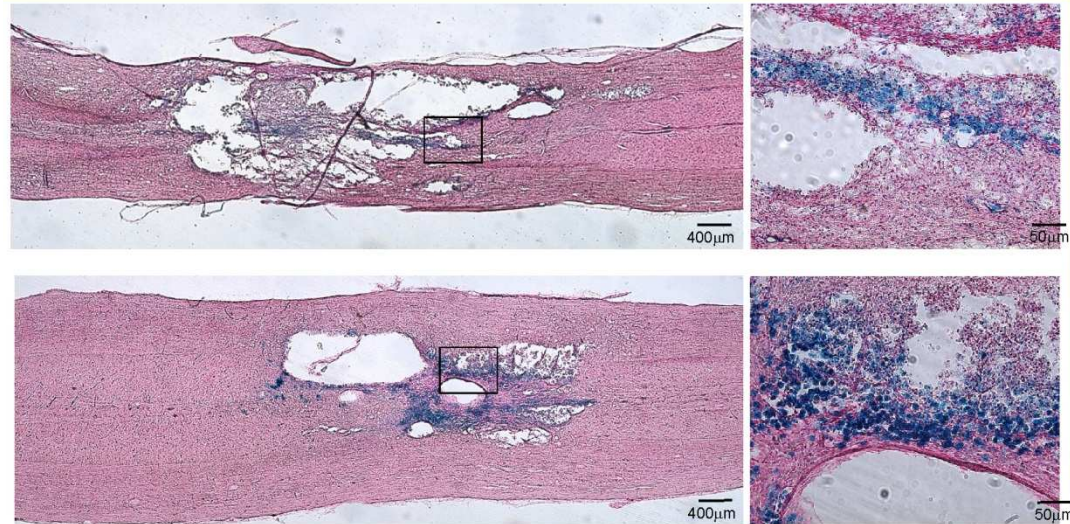
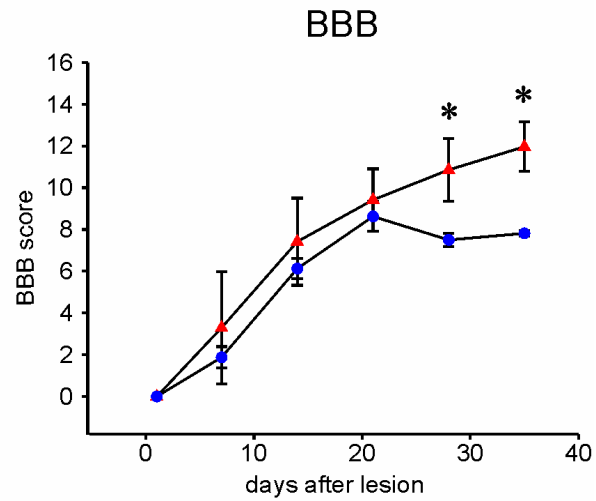
kontrola



MSC

Forostyak et al, 2011

Úplná míšňí léze u laboratorního potkana a výsledek léčby pomocí kmenových buněk kostní dřeni



Míšní poranění (po sedmi týdnech)



Míšní poranění (po transplantaci MSC)



Náhrada buněk?

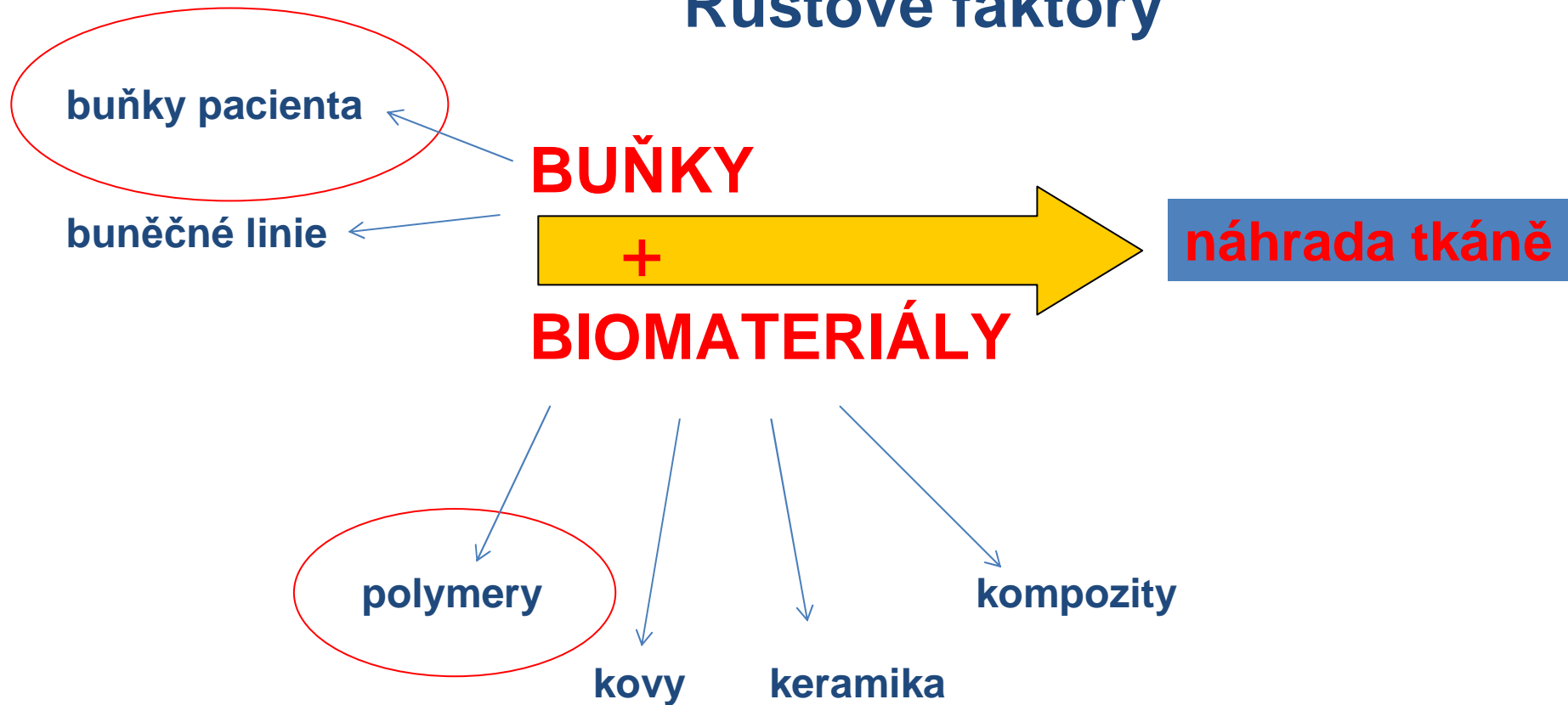
Neuroprotektivní, neurotrofický nebo protizánětlivý účinek?

Table. Beneficial Action of Transplanted Neural Stem Cells and Potential Use in Central Nervous System Disorders

Disorder	Cell Replacement	Anti-inflammatory Effect	Neuroprotective Effect	Neurotrophic Effect
Parkinson disease	Yes	No	Yes	No
Huntington disease	Yes	No	Yes	No
Amyotrophic lateral sclerosis	Unknown	No	Yes	No
Alzheimer disease	No	No	Yes	No
Stroke	No	Yes	No	Unknown
Spinal cord injury	No	Yes	No	Yes
Genetic dysmyelinating diseases	Yes	No	No	No
Multiple sclerosis	Yes	Yes	Unknown	Unknown
Age-related macular degeneration and other degenerative retinal diseases	Unknown	No	Yes	No

Tkáňové inženýrství

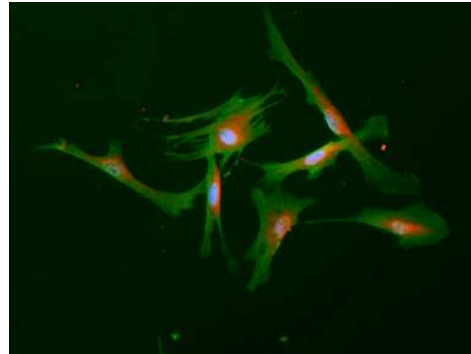
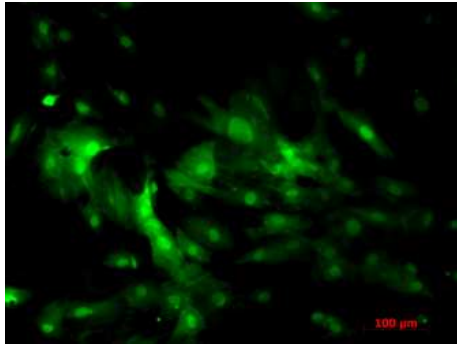
Růstové faktory



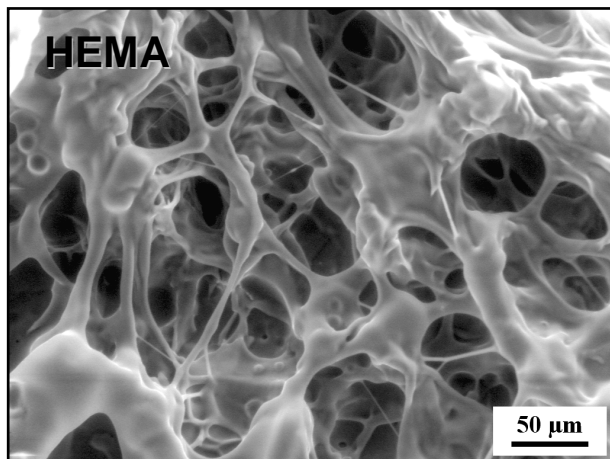
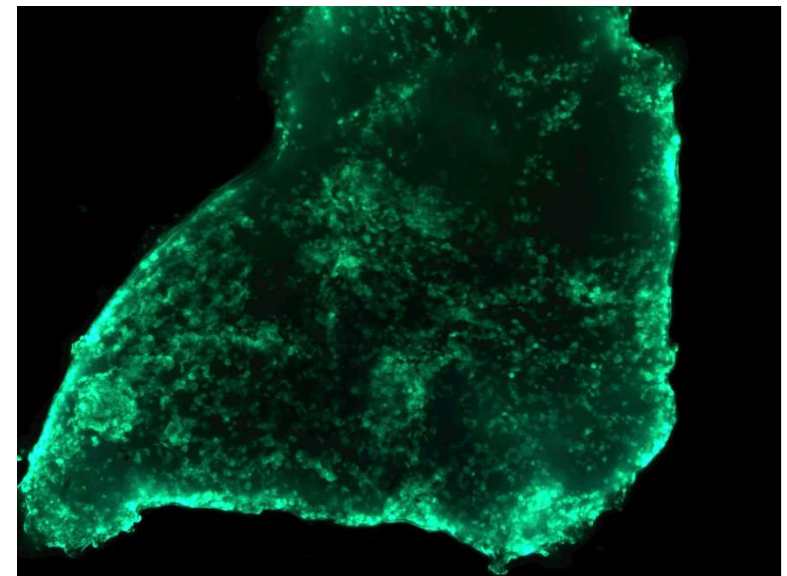
Požadované vlastnosti implantovatelných materiálů

- *Biokompatibilita*
- *Optimální fyzikální vlastnosti (měkkost, obsah vody)*
- *Optimální porosita: velikost a propojení pórů*
- *Pokrytí povrchů atraktivními látkami pro vrůstání axonů a buněk*
- *Resorbovatelnost*
- *Možnost injekční aplikace*

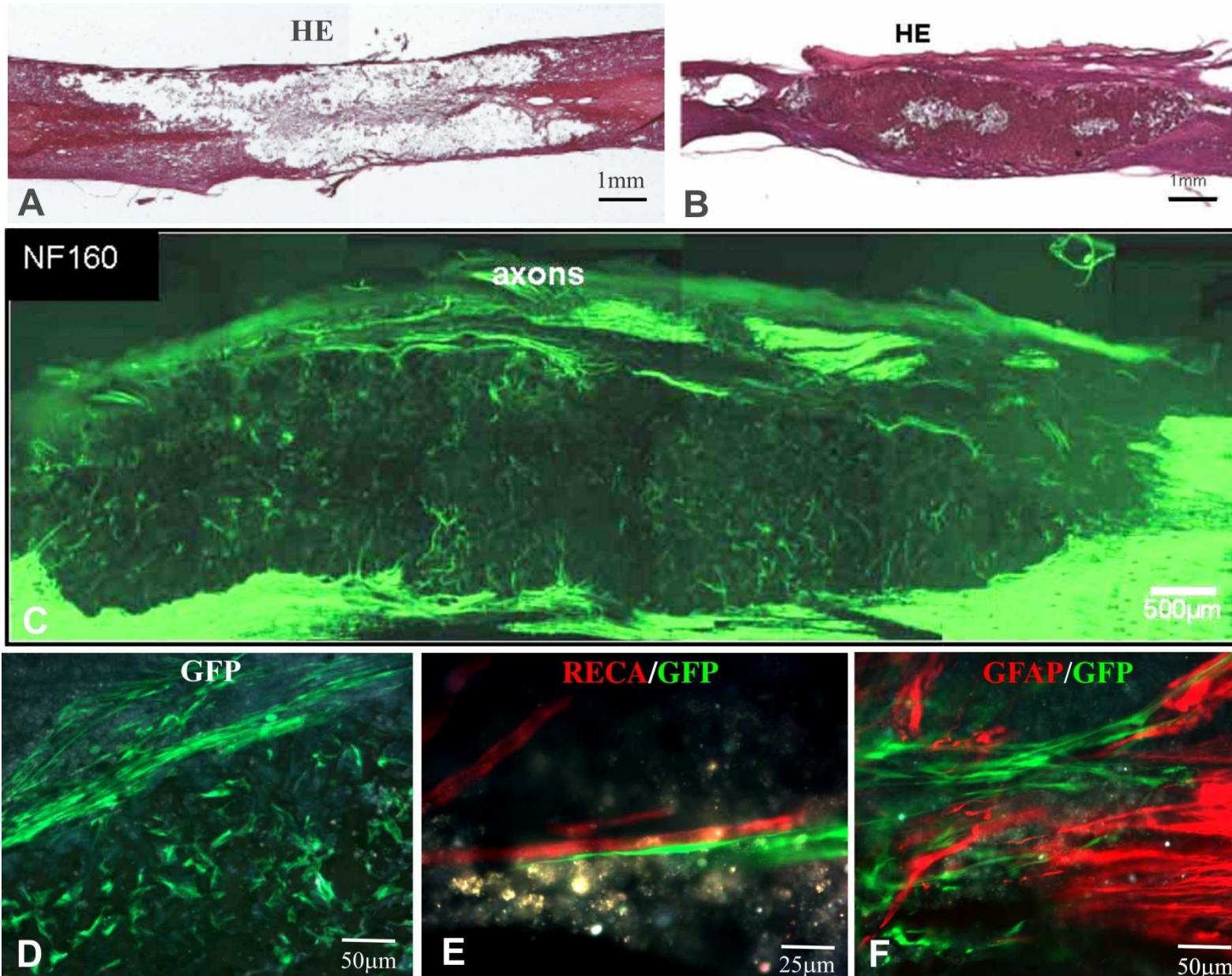
Biomateriály jako nosiče buněk



Buňky
+
Biomateriály

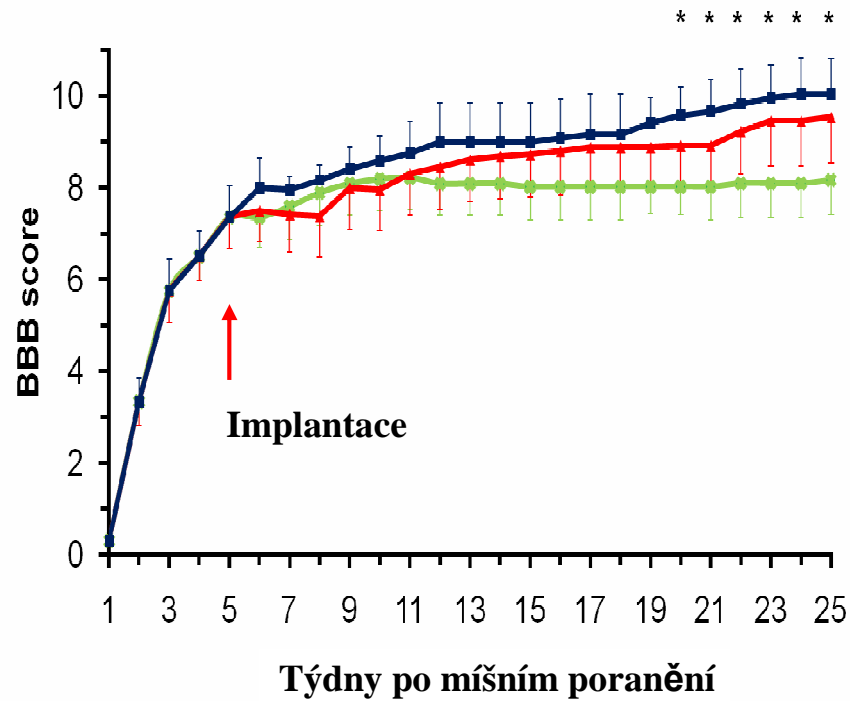


HPMA-RGD hydrogel v míšním poranění - 6 měsíců po Tx

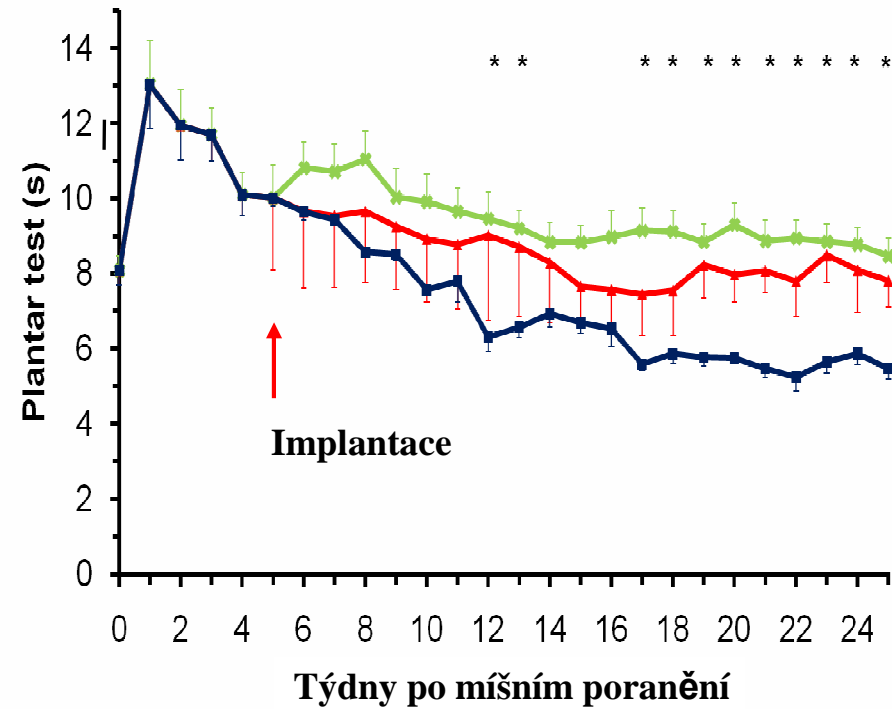


Funkční testy na modelu chronické léze

Motorický test



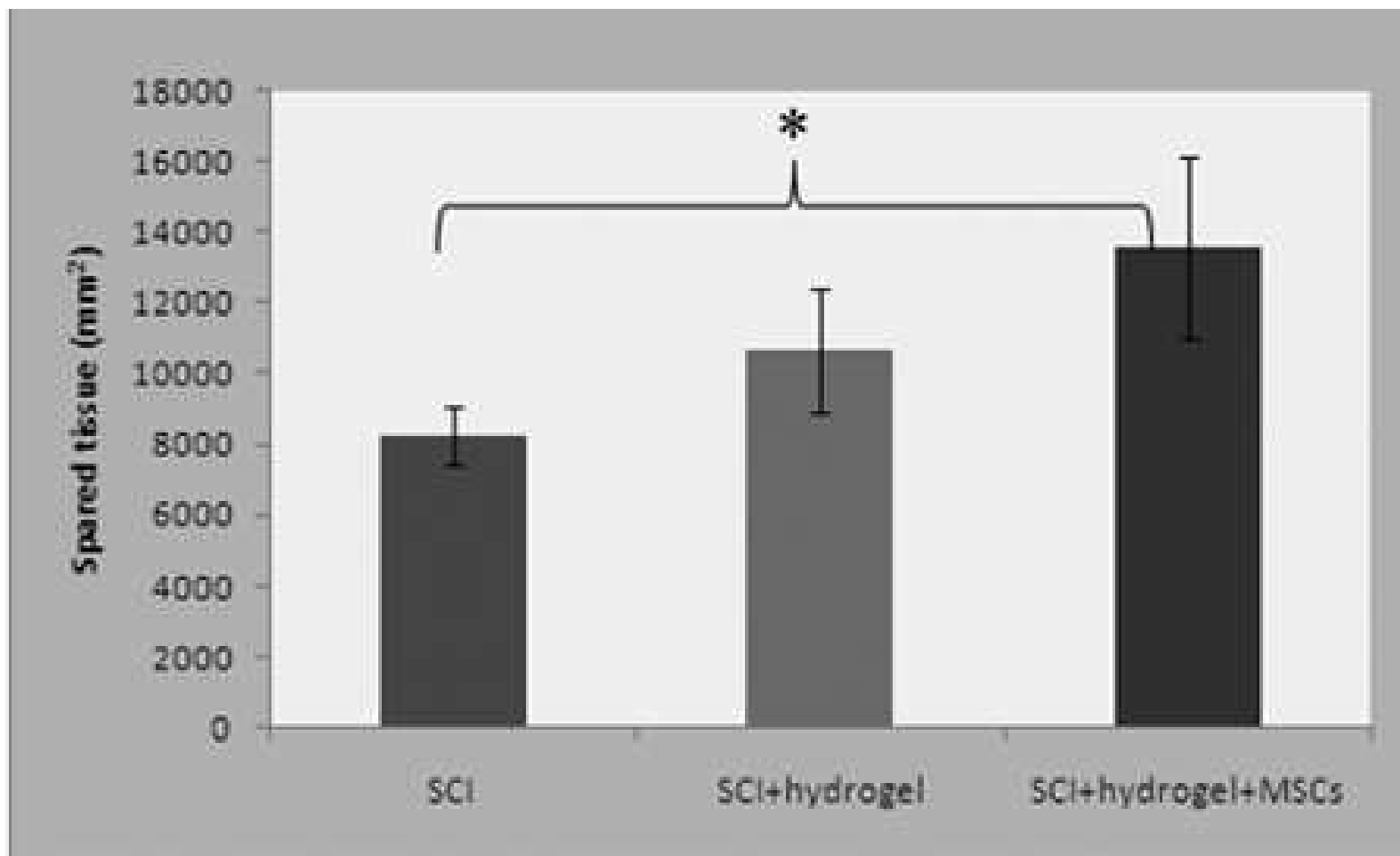
Test senzitivity



- Poranění + Hydrogel + MSCs
- ▲ Poranění + Hydrogel
- ✖ Pouze poranění

p<0.05

Morfometrie zachovalé tkáně



Budoucnost

- Musíme vypěstovat vhodné buňky pro klinické užití a v dostatečném množství.
- Takové buňky musí zůstat tak stabilní, aby stále generovaly dostatečné množství neuronů a gliových buněk, nebo aby produkovaly faktory podporující regeneraci, diferenciaci nebo neurogenesi.
- Buňky po přenosu nesmějí vytvářet nádory, nebo vést k přenosu jiných onemocnění.
- Tyto buňky musí mít i u člověka potenciál napravit anatomické a funkční defekty.
- Umělé biomateriály budou sloužit jako nosiče a mosty