Одна из стратегий терапии на уровне гена/клетки: использование естественной способности зрелых стволовых клеток восстанавливать ткани

Darwin J. Prockop, M.D., Ph.D.,
Директор, Центр Генной Терапии, Медицинский научный центр Туланского Университета, Новый Орлеан, Луизиана, США

Как самовосстанавливается организм?

Cohnheim (1867):

-- вероятно с помощью клеток, поступающих с потоком крови

Более недавняя гипотеза

-- вероятно изначально при помощи подобных стволовым клеток, присутствующих во многих тканях

-- вероятно после их истощения

--стволовыми клетками костного мозга

Насколько хорошо работает восстановительная система?

Человек находится не на вершине эволюционного дерева:

Гидра, планария и т.д.

---восстанавливают организм из нескольких клеток.

Семейство саламандр

---восстанавливают конечности или хвосты

Мыши и крысы

---большинству их органов трудно нанести непоправимый вред.

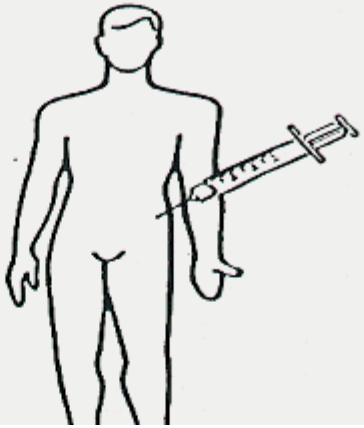
Одна из стратегий терапии на уровне гена/клетки

Применить подобные стволовым клетки костного мозга

---с целью приблизить восстановительную способность нашего организма к организму грызунов и, возможно, саламандр.

Наш подход

---большое количество собственных клеток пациента.

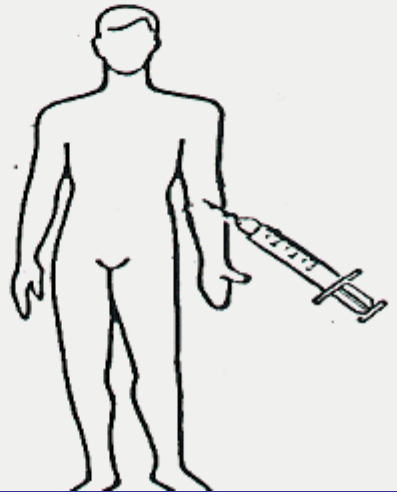


Материал костного мозга
-местная анестезия

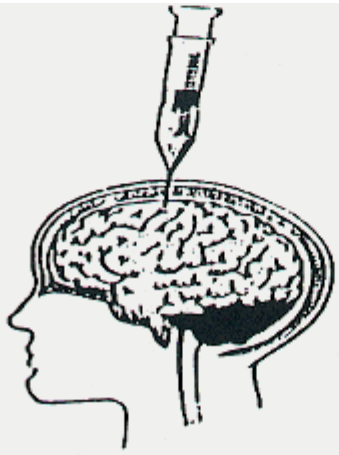
Костные стромальные клетки
-увеличенные
-генноинженерные

Лечение Некоторых Пациентов

Болезни скелета
и связанные с ними



Заболевания ЦНС



Вопросы

1. ***Уверены ли мы, что костный мозг содержит стволовые клетки для восстановления некроветворных тканей?***

2. ***Если да, какие это клетки?***

3. ***Каким образом в этом случае клетки восстанавливают ткани ?***

Вопросы

1. Уверены ли мы, что костный мозг содержит стволовые клетки для восстановления некроветворных тканей?

Сегодня мы располагаем данными

а. по дифференциации культуры клеток.

б. исследований на животных.

в. проб костного мозга пациентов и трансплантантов органов.

(see Prockop et al. PNAS 100(1): 11917- 23, 2003)

2. О каких клетках мозга идет речь?

1. Кроветворные стволовые клетки (HSC) (CD 34* or CD 133*)?
2. “Side population” клетки?
3. Мультипотентные зрелые “progenitor” cells ?
4. *Мезенхимальные стволовые/костного мозга стромальные клетки (*MSCs*)?*

ИЛИ какие-то другие до сих пор неиндифицированные клетки?

Один из кандидатов на восстановительную функцию - клетка костного мозга

Выделена с помощью

---посева костного мозга

Наиболее распространенное название:

---“стромальные клетки костного мозга”

---использовались как питательный слой для HSC клеток.

---“мезенхимиальные стволовые клетки”

---видоизменяются в большинство типов клеток.

компромис: “MSCs”.

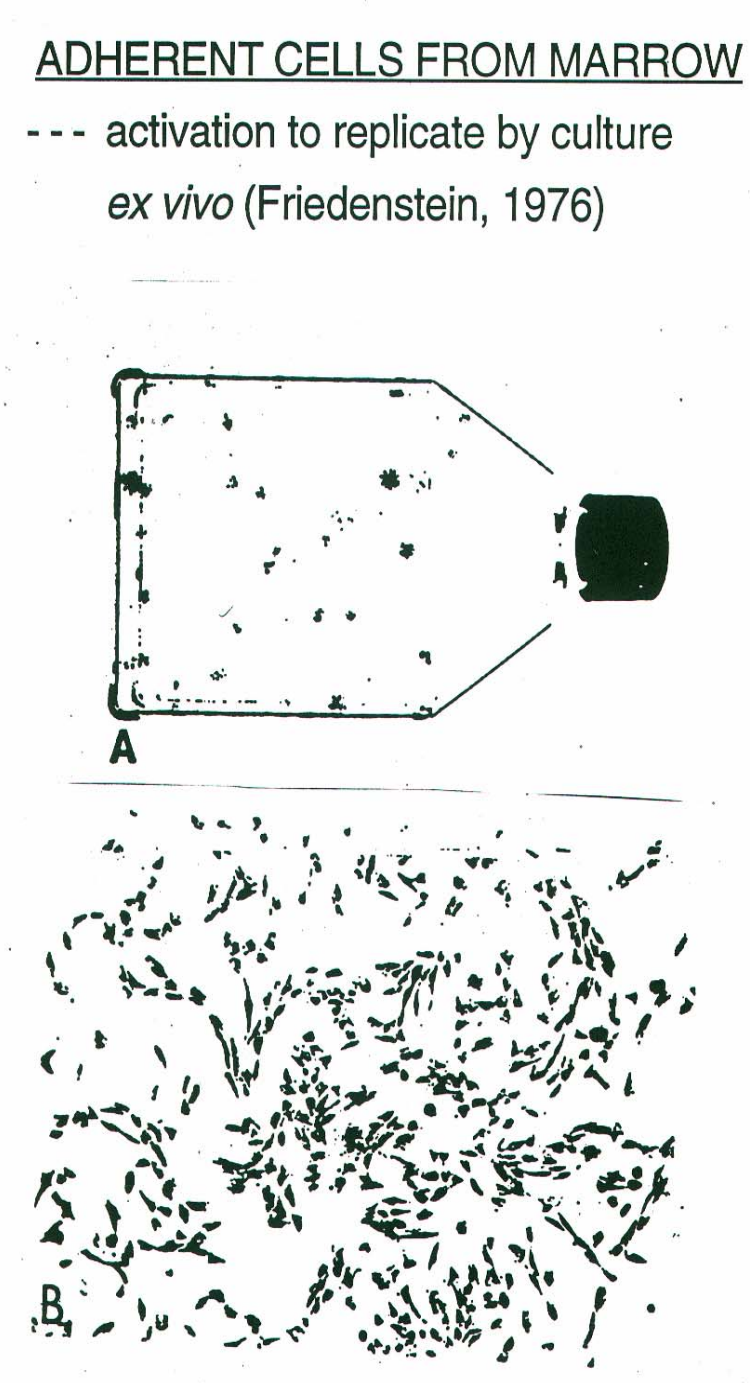
Friedenstein, 1976

Клетки костного мозга (MSCs):

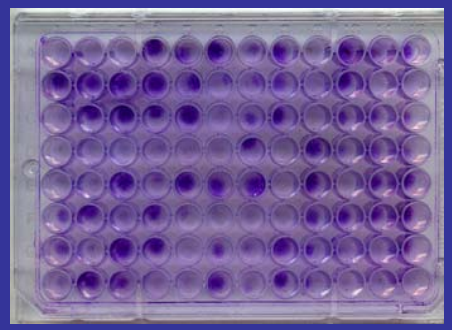
---1:10,000 до 100,000 ядросодержащих клеток.

---способны быстро расти.

---видоизменяются в костные, жировые, хрящевые *in vitro* & *in vivo*.



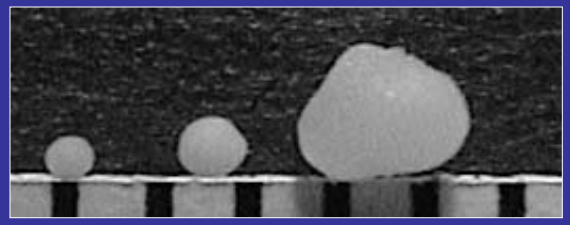
Легко клонировать & Клоны видоизменяются--- без трансфузии



+/- Мышечные трубочки

+/- Невральные предвестники

Одноклеточные клоны



Хондроциты

Адипоциты

Остеобласты

Привлекательность MSCs для терапии

1. *Их относительно легко*

---изолировать и растить.

---получать у одного и того же пациента.

2. Они мультипотентны для дифференциации
3. Не формируют опухоли.
4. Имеют тенденцию оставаться в местах поврежденных тканей и восстанавливать их.

Экспансия MSCs

Из 2 мл аспирата костного мозга

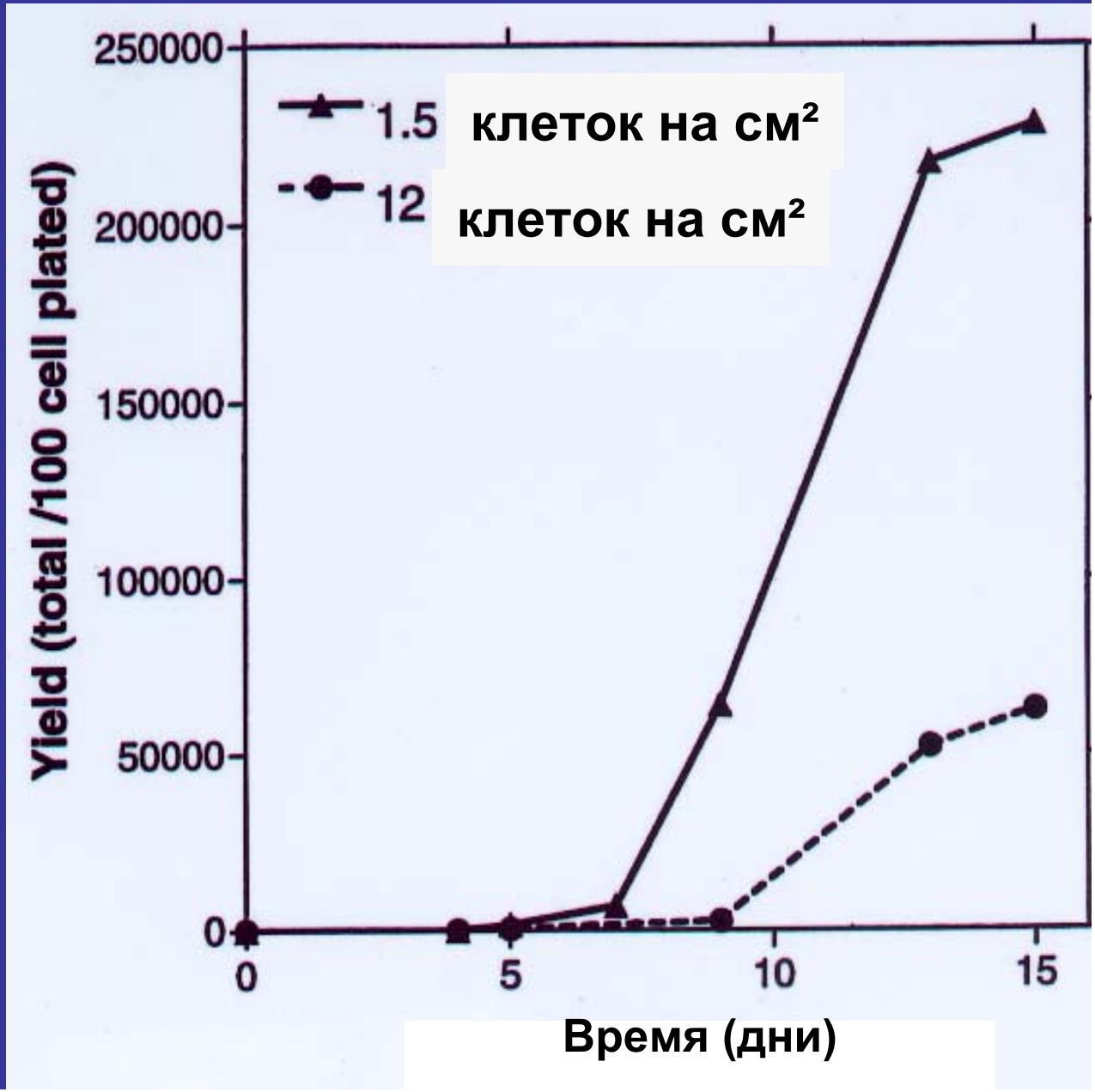
---можно получить более
0.5 миллиардов MSCs

--- за 2 недели.

Влияние плотности на экспансию

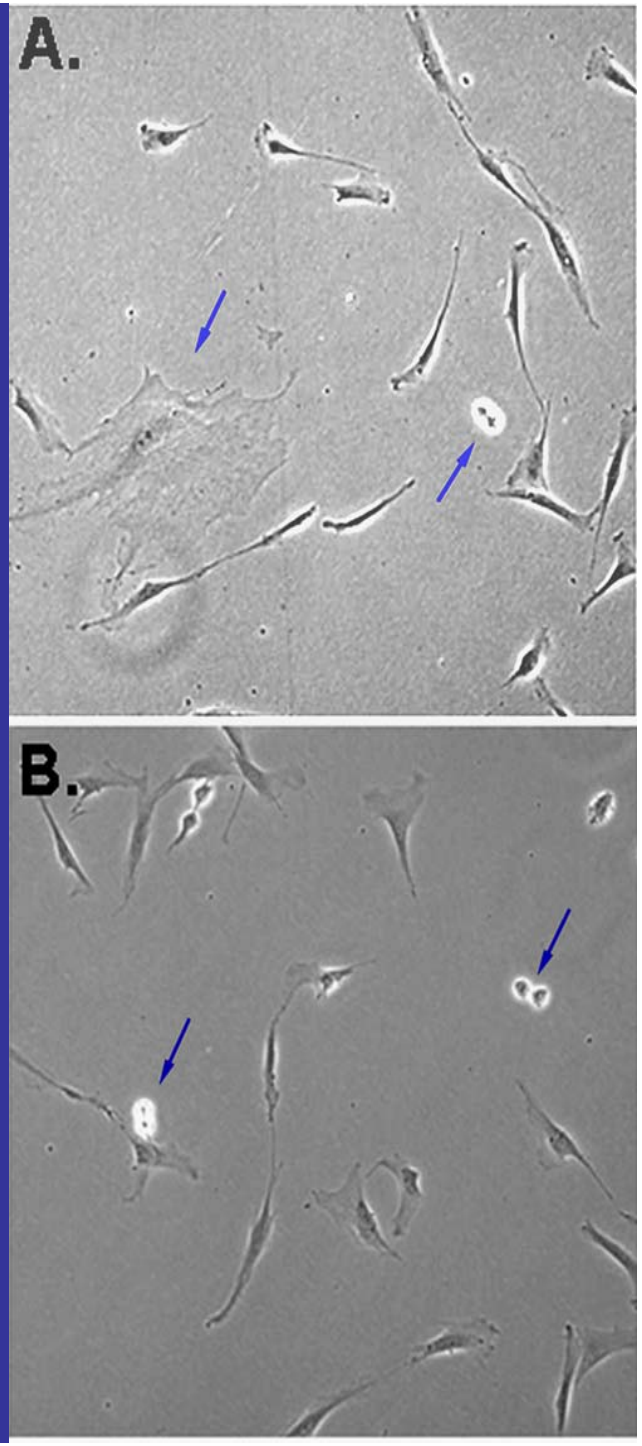
В 2,000 раз за 12 дней.

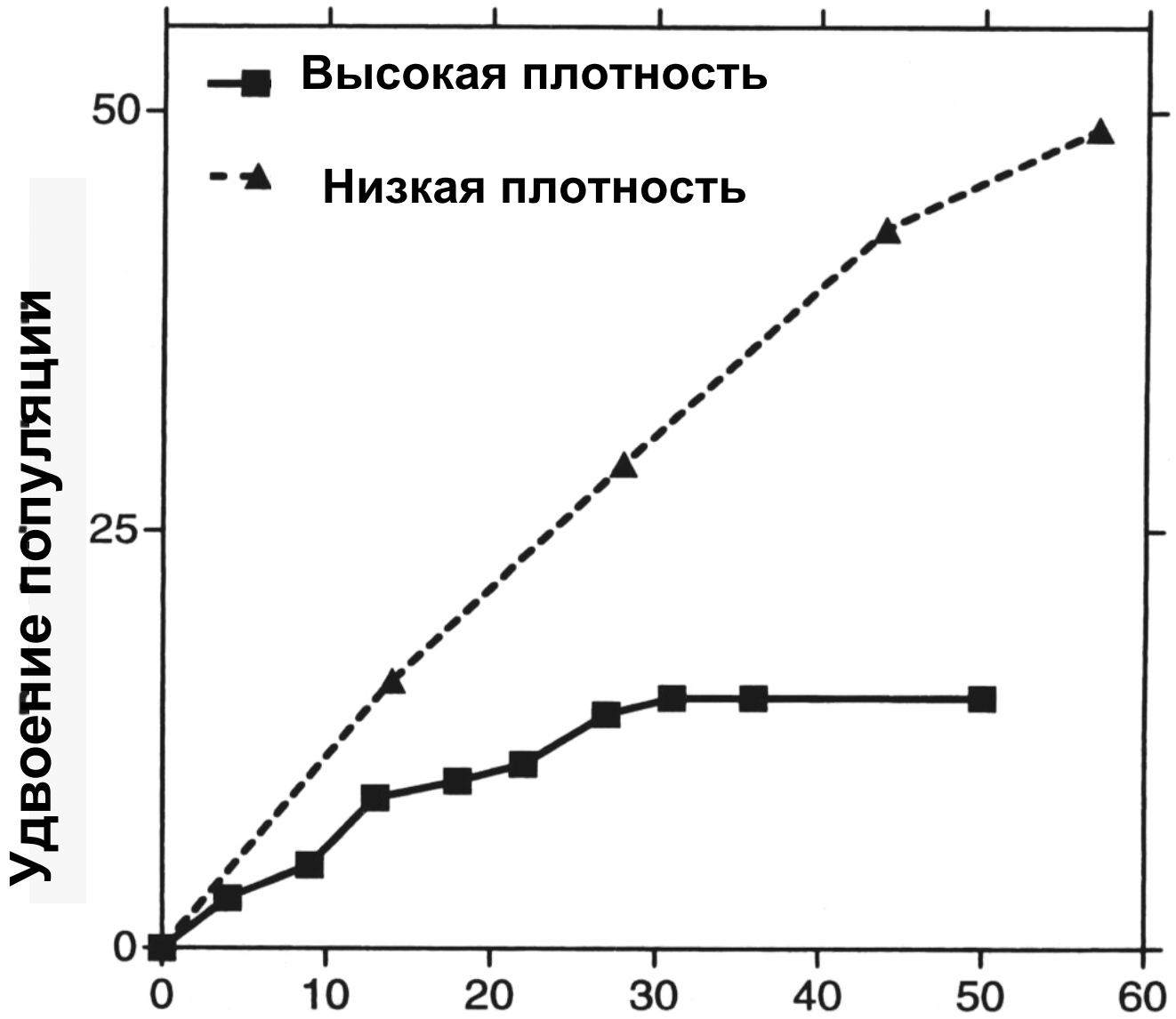
(Colter, DiGirolamo, Prockop, 2000).



Несколько видов клеток

1. В форме иглы.
2. Большие, плоские.
3. Очень маленькие круглые, “быстро самообновляющиеся” (RS клетки).





Удвоения клеточной популяции, полученной при посеве при низкой и высокой плотности

Влияние плотности на экспансию

Почему

--- латентный период?

--- сливанию культур предшествует стационарная фаза?

Гипотеза

---требует всестороннего исследования & раскрытия секрета стимулирования роста.

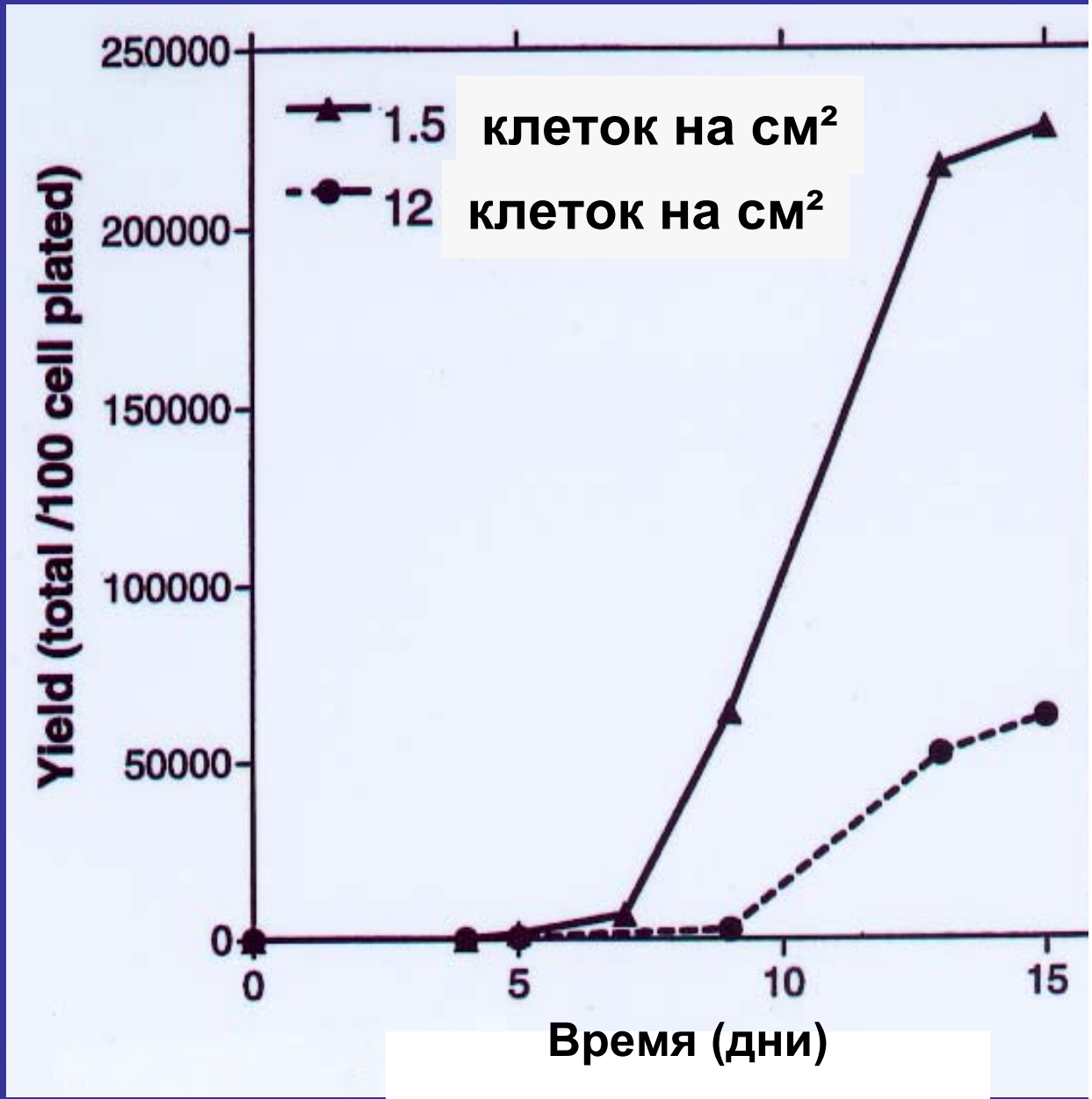
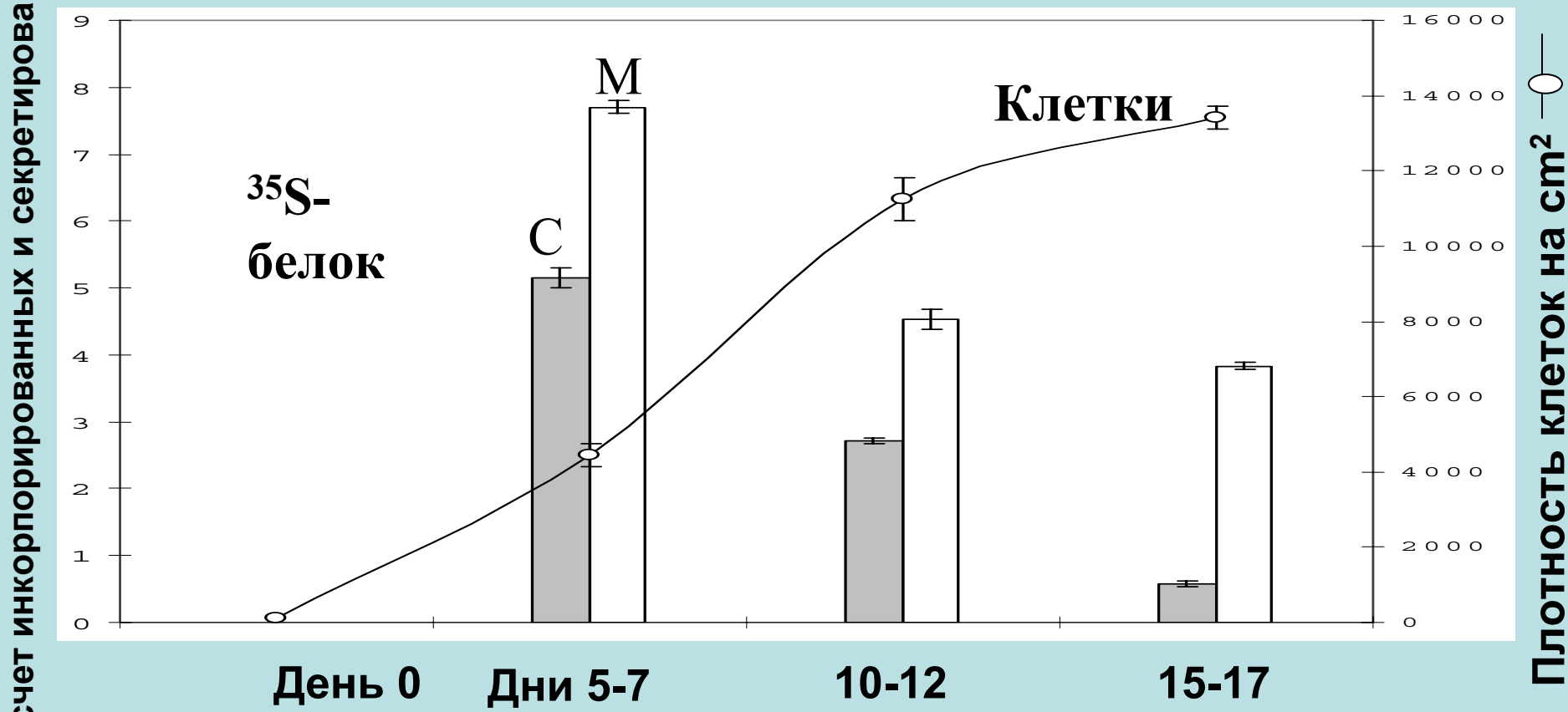
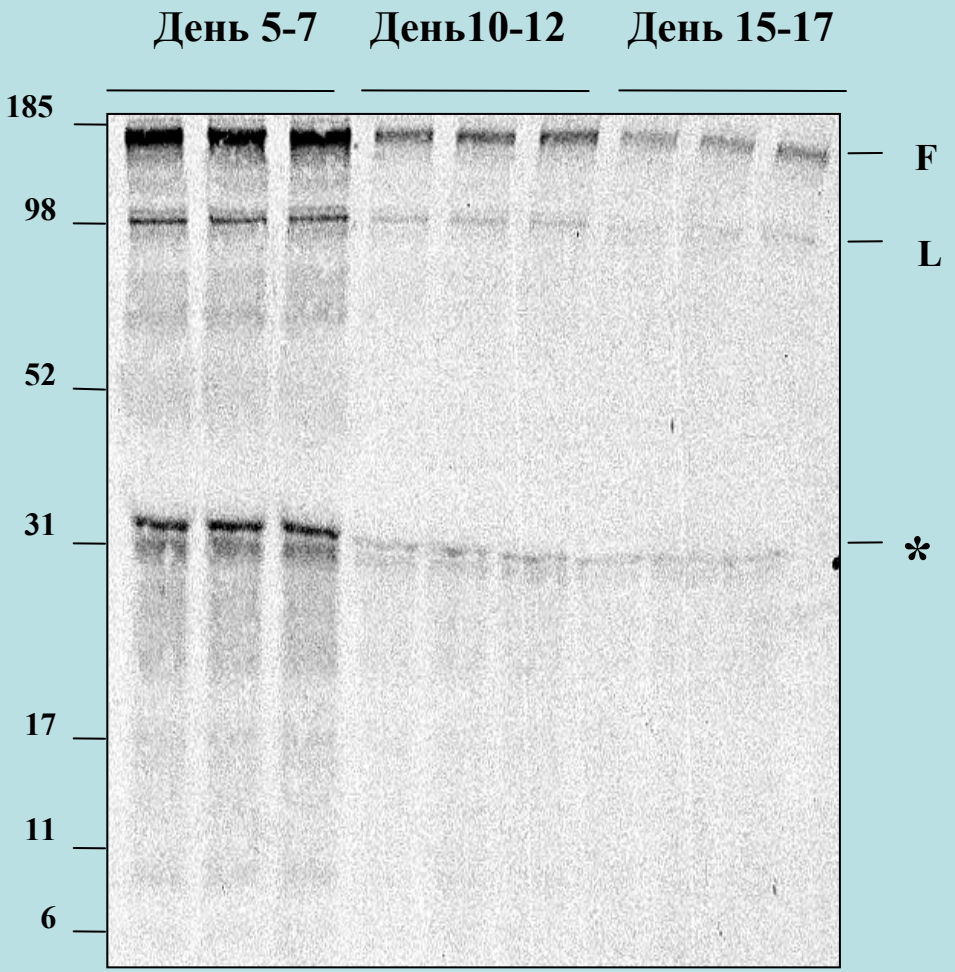


Figure 1

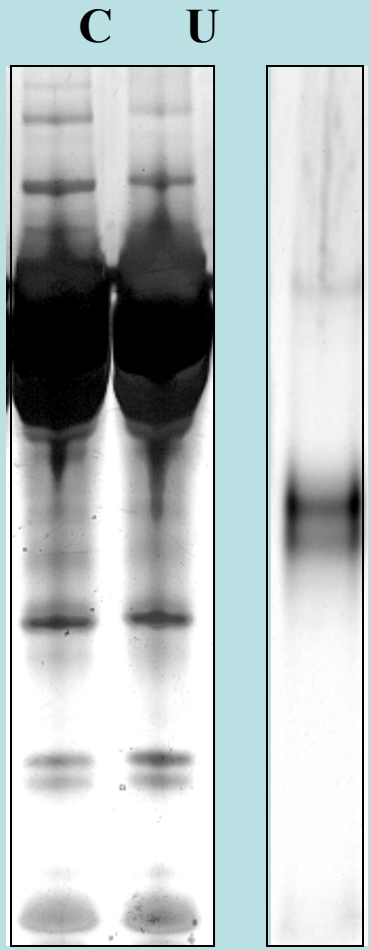


MSC культуры, маркированные ^{35}S-метионином. Столбцы указывают ^{35}S-белок в клетках (C) и между ними (M). Синтез белка снижается, когда культуры достигают стационарной фазы.

Autoradiography of conditioned media



Ауторад



Серебро

Очищенный и концентри-рованный 35 kDa экстракт

Вновь синтезированные ^{35}S-протеины секретированные клетками - это в основном фибронектин (F), ламинин (L) и неопознанный протеин (*). Этот неопознанный протеин получен путем очистки большого количества протеинов коровьих эмбрионов.

Трипсин 16 часов, SELDI TOF

Obs.	Act.	Δ mass	Position	Peptide
827.1	827.407	0.3072	260-265	LHTCQR
1143.2	1143.59	0.3905	227-236	GSHGLEIFQR
1161	1161.449	0.4486	237-246	CYCGEGLSCR
1312.4	1312.657	0.2566	172-182	TTLSSKMYHTK
1439.4	1439.57	0.168	124-134	HAMCCPGNYCK
1774.9	1774.677	-0.02226	121-134	GGDAGVQICLACRK
1390.9	1390.693	-0.2069	103-116	CMRHAMCCPGNYCK

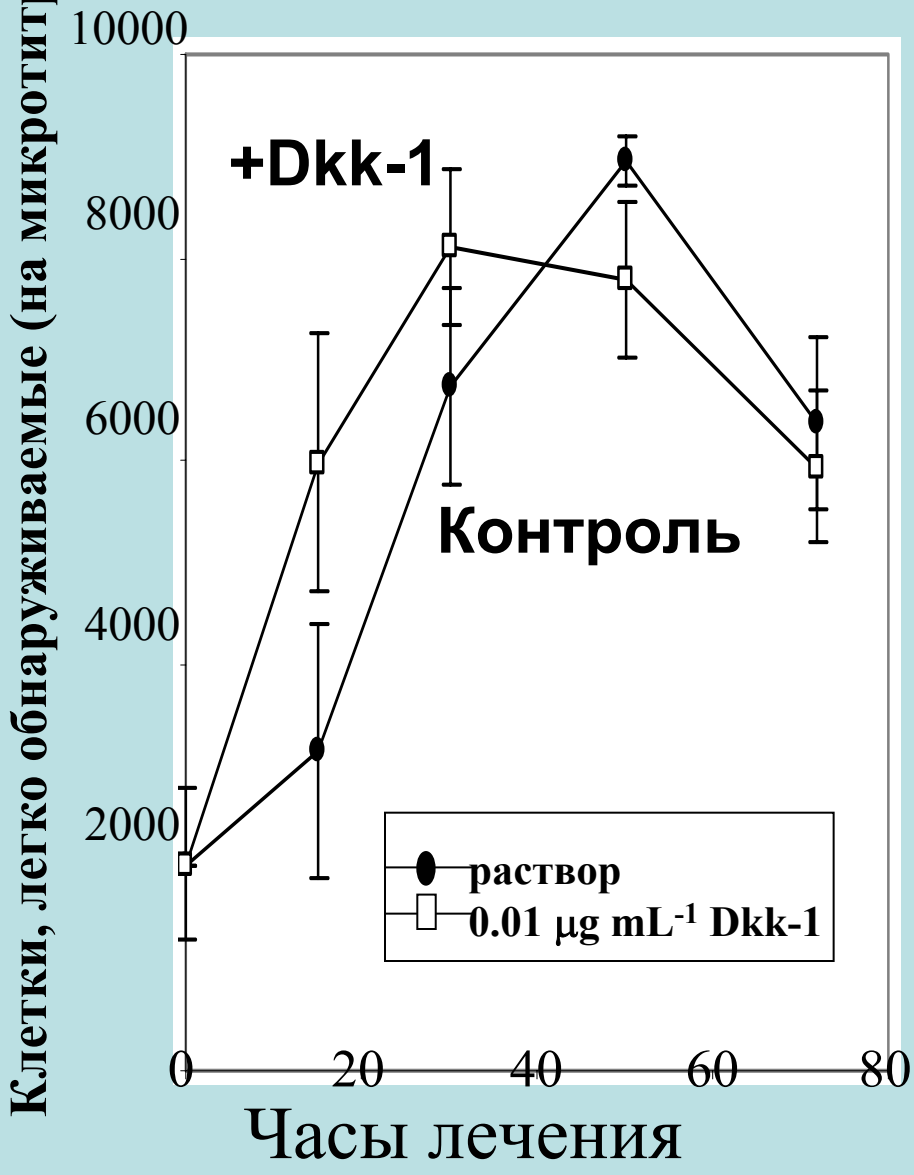
Пептидент (TREMBL, SWISSPROT)

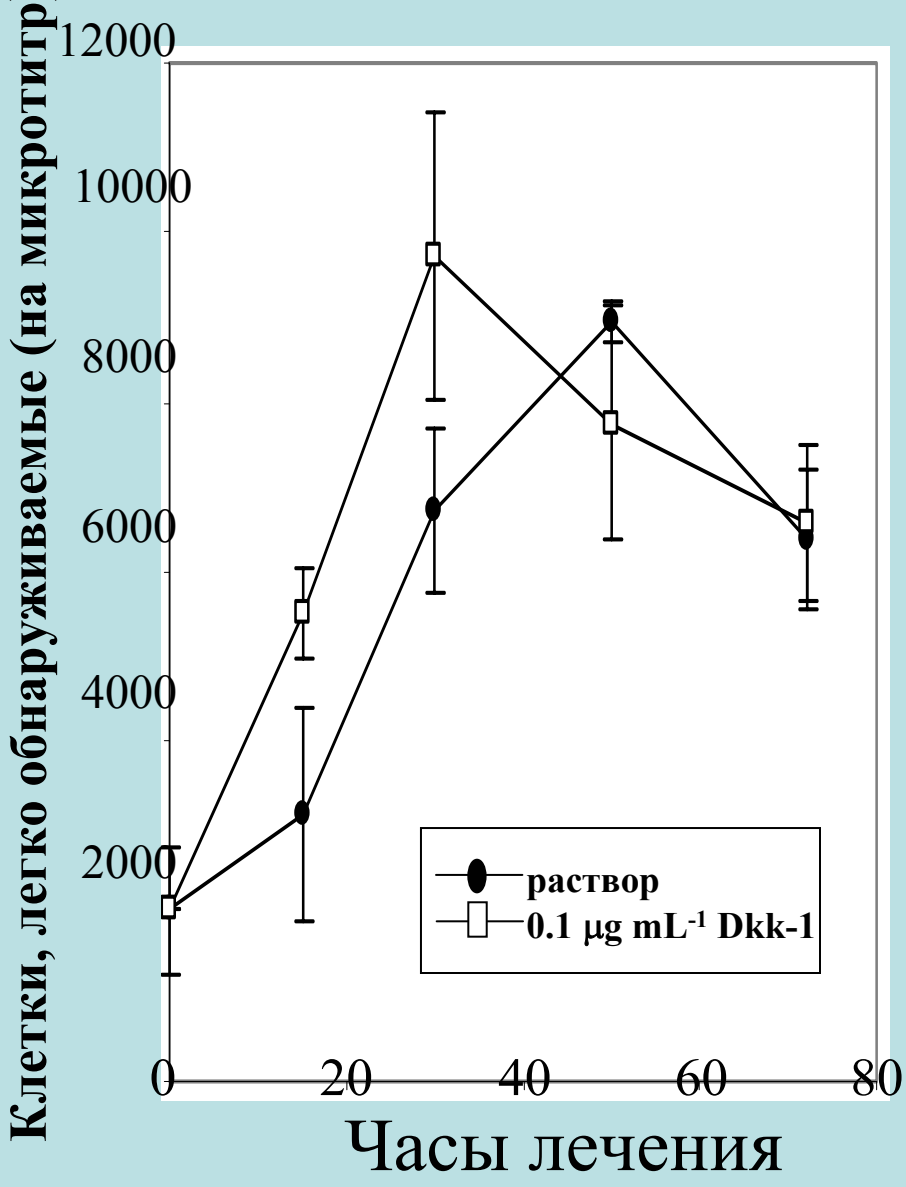
M M A L G A A G A T R V F V A M V A A A L G G H P L L G V S A T L N S V L N S N
A I K N L P P P L G G A A G H P G S A V S A A P G I L Y P G G N K Y Q T I D N Y
Q P Y P C A E D E E C G T D E Y C A S P T R **G G D A G V Q I C L A C R K** R R K R
C M R H A M C C P G N Y C K N G I C V S S D Q N H F R G E I E E T I T E S F G N
D H S T L D G Y S R R **T T L S S K M Y H T K** G Q E G S V C L R S S D C A S G L C
C A R H F W S K I C K P V L K E G Q V C T K H R R K **G S H G L E I F Q R** **C Y C G**
E G L S C R I Q K D H H Q A S N S S R **L H T C Q R** H

= Dickkopf-1, ингибитор сигнального Wnt.

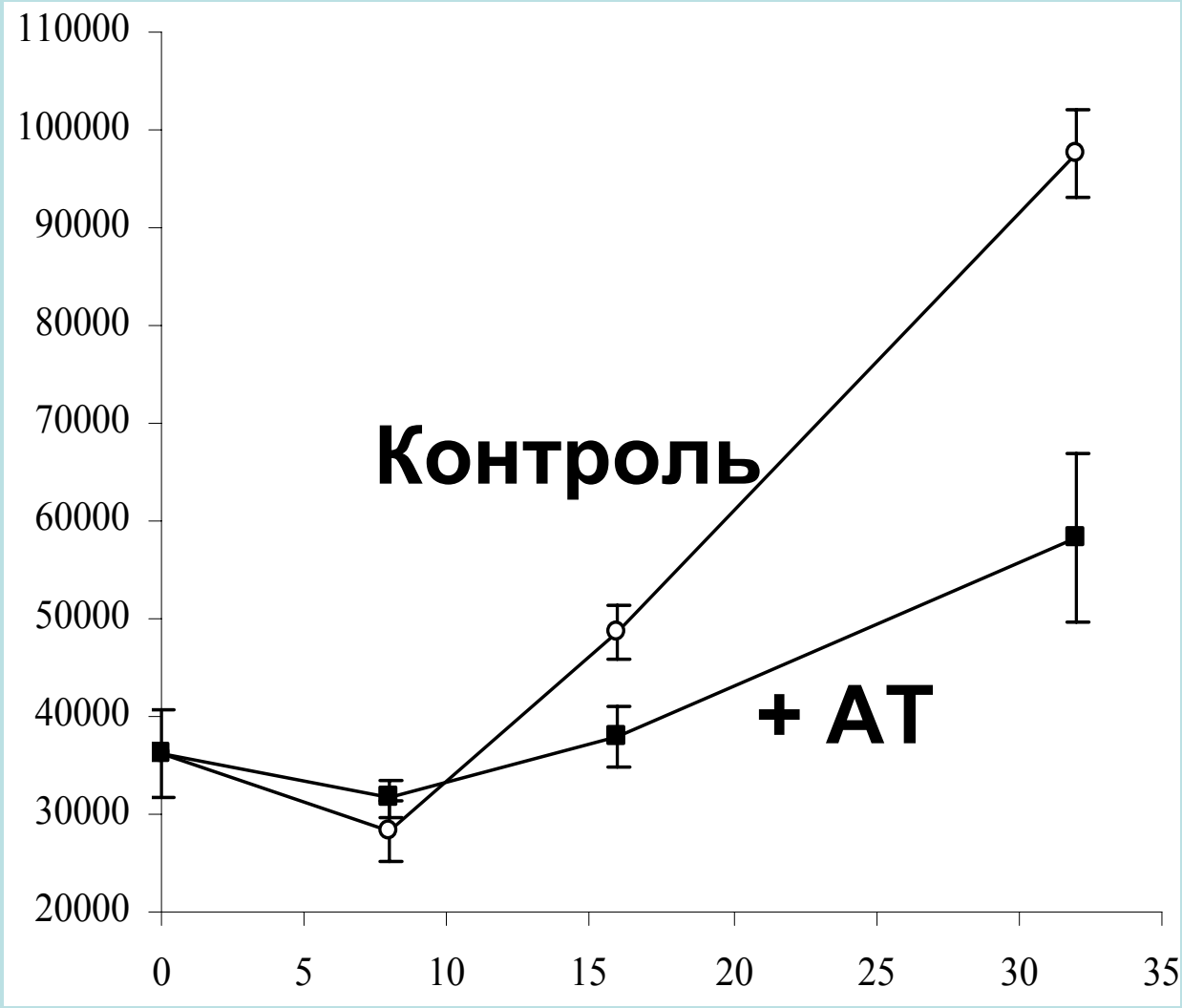
Семь триптических пептидов из 35 kDa протеина имели молекулярные массы, аналогичные семи пептидам ранее идентифицированного ингибитора сигнального Wnt.

Рекомбинтный Dkk-1 снижает латентный период в культурах MSCs (повторные исследования)



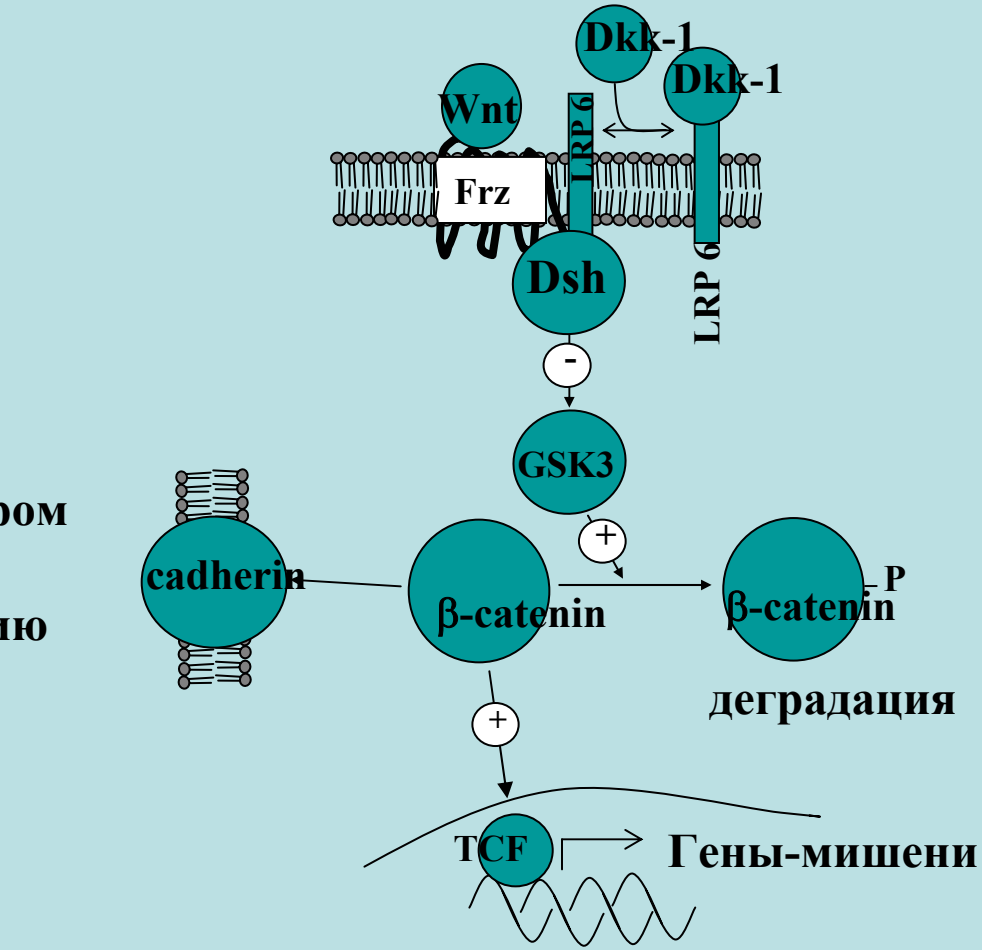


Антитело пептида Dkk-1 --- удлиняет латентный период.



Wnt ингибитор, Dkk-1 выражается в быстро растущем числе hMSCs

Dkk-1: ингибитор канонического Wnt механизма



Контакт с ингибитором ведет с склеиванию стыков

Необычный рост кинетики при культивировании MSCs:

a. Посеянные при низкой плотности клетки

остаются в латентной фазе

---до момента синтезирования и секретирования

“импульса” Dkk-1, сигнального ингибитора Wnt.

b. Они переходят в стационарную фазу

---когда синтез Dkk-1 прекращается

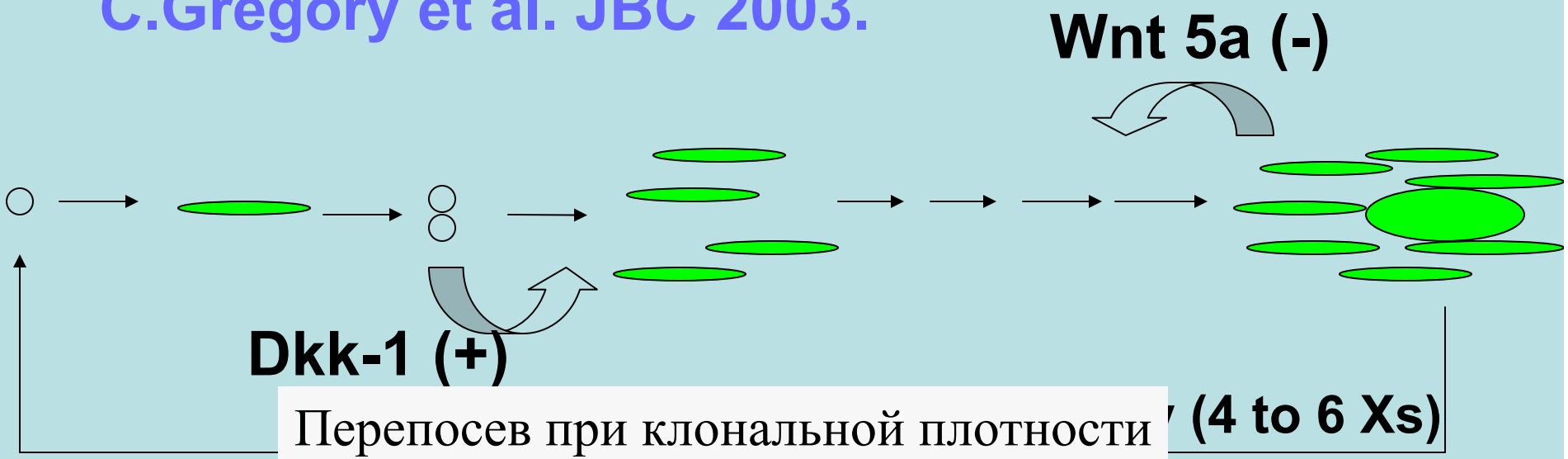
--- они отправлют Wnt-5a, связку для позитивного сигнального Wnt.

c. При перепосеве клеток процессы повторяются

---от 4 до 6 циклов и до тех пор, пока клетки не

достигнут старения.

C.Gregory et al. JBC 2003.



Перепосев при клональной плотности

Dickkopf-1 (Dkk-1)

Ингибитор канонического Wnt сигнального механизма.

В большинстве систем ингибирование Wnt прекращает рост клетки.

Одна возможность: Использование для культивирования MSCs.

Другая: Терапия при помощи Dkk-1 могла бы привести к росту количества собственных клеток MSC у пациента.

Иерархия изменений MSCs в условиях культивирования

Вопрос: Могут ли MSCs использоваться в клинических испытаниях?

- Можно производить до 0.5 миллиарда клеток в течение 2 недель из 2 мл костного мозга.
- Однако условия их культивирования являются критическими.
- Изменчивость представляет серьезную проблему в этой области исследований

  ---Центр Tulane недавно получил 4.3 миллионый($) грант Национальных Институтов Здоровья для обеспечения стандартизованной подготовки к работе других исследователей этой проблемы

Вопросы

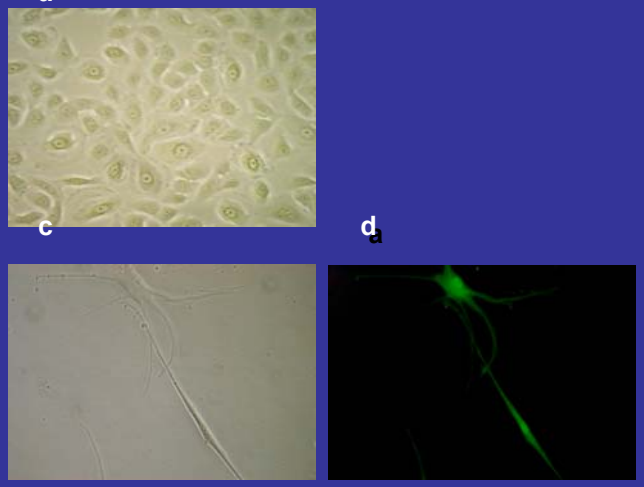
1. ***Уверены ли мы, что костный мозг содержит стволовые клетки для восстановления некроветворных тканей?***

2. ***Если да, какие это клетки?***

3. ***Каким образом в этом случае клетки восстанавливают ткани ?***

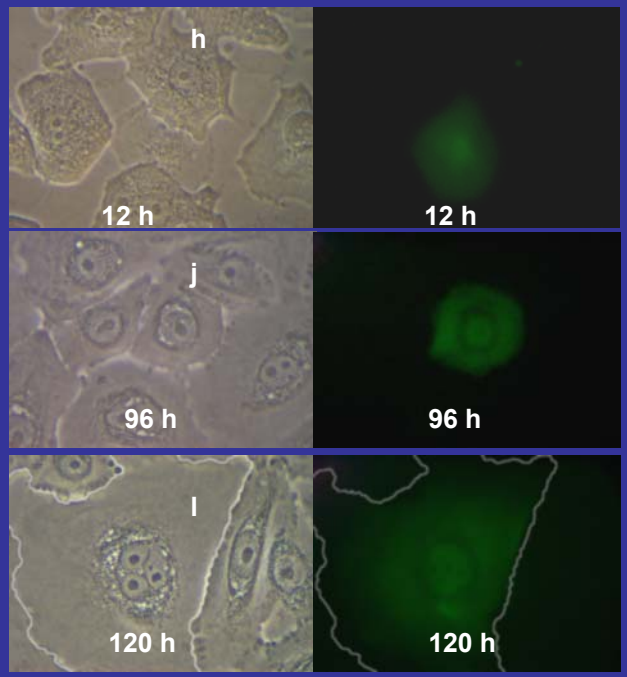
Малый эпителий дыхательных путей (SAE)

GFP+ /MSCs



(X 20)

Тепловой шок SAE + GFP+/MSCs



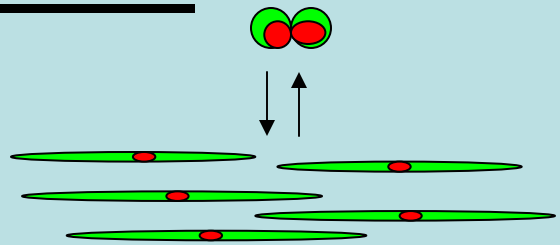
(X 40)

После повреждения однослойного клеточного эпителия тепловым шоком, GFP-маркированные MSCs восстанавливают рану, внедряясь в слой и приобретая распространенную морфологию клеток эпителия.

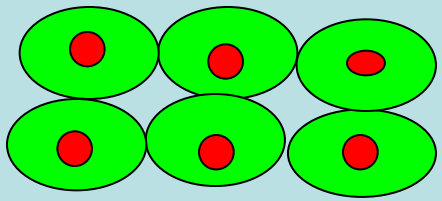
3. Как MSCs восстанавливают ткани?

Spees et al. PNAS 2003

Культивирование MSCs



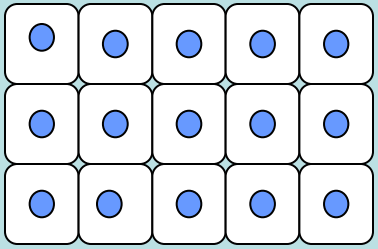
Быстро само-обновляющиеся клетки



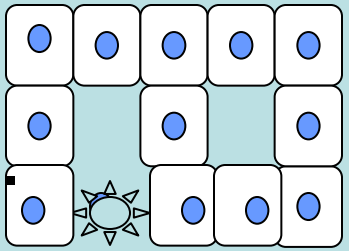
Созревшие MSCs
(конфлюентные культуры)

Пример:

Однослойный эпителий



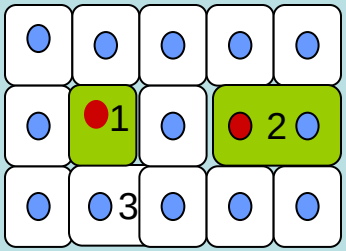
Травма



1.Дифференциация.
2. Слияние клеток (?).

3. Факторы роста

(Wnt 5a, VEGF, PDGF, BDNF, NT-3)



На какие заболевания направлена цель?

Любопытная ситуация

---в настоящий момент трудно исключить какое-либо из заболеваний

---сердца, печени, почек,

метаболические,

центральной нервной системы

Наш подход

Заболевание с

- тяжелейшими последствиями либо предвещающее смерть.

- не имеющее какой-либо подходящей терапии

- положительные данные исследований на моделях с животными.

Одна из целей: Спинномозговая травма

Более 3,000 людей в США парализованы

Медицинская помощь им обходится в $500,000 ежегодно.

Не существует эффективной терапии.

В четырех лабораториях получены обнадеживающие результаты после исследований на крысах.

Несколько клинических исследований с применением IV терапии с помощью MSCs не выявили никакой токсичности.

Спинномозговая травма - модель на крысах

MSCs улучшают

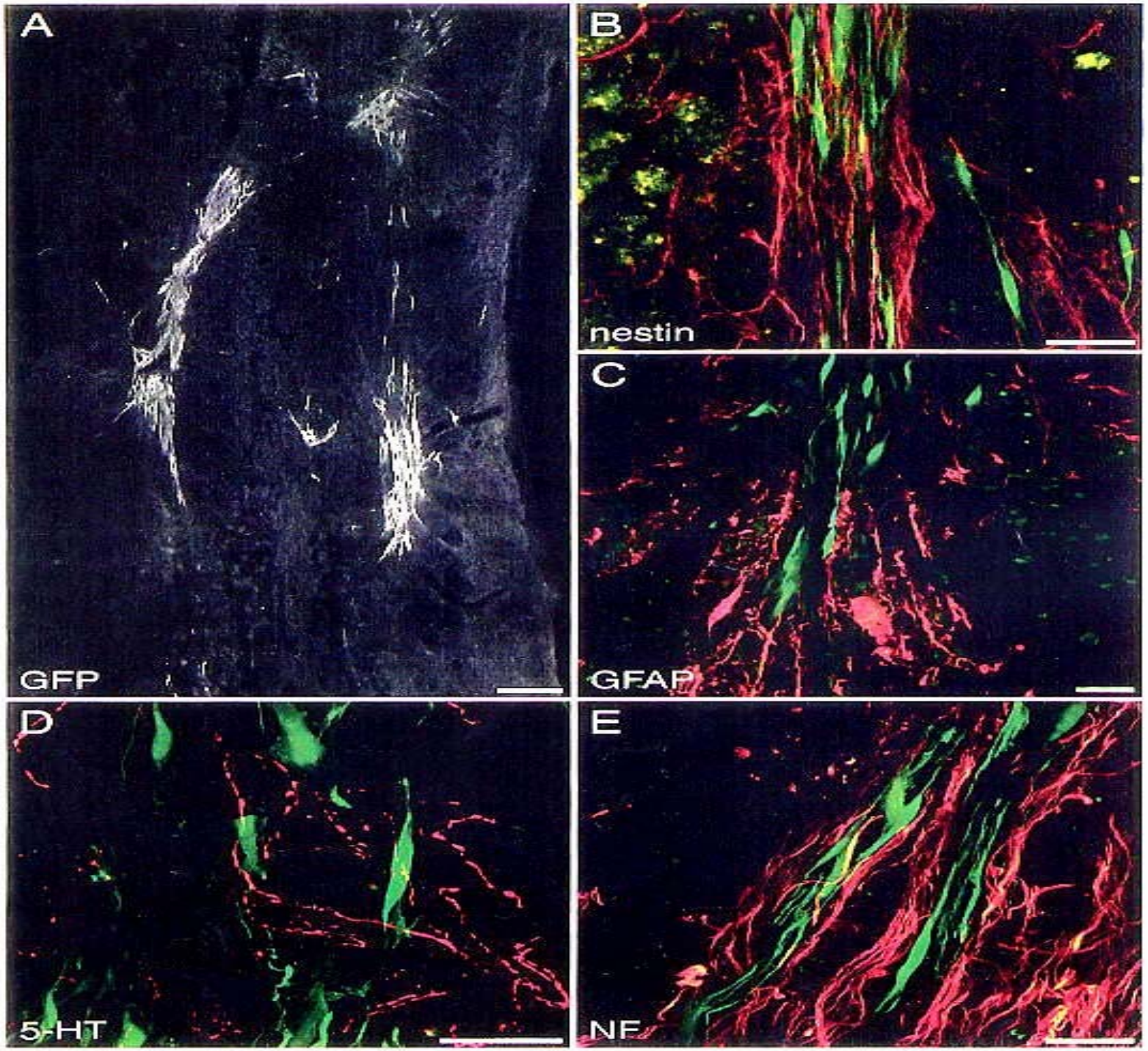
---двигательную функцию

---регенерацию аксонов

---обеспечивая среду для регенерации

---как они делают для кроветворных стволовых клеток в костном мозге.

(Hoffstetter et al. PNAS 2002)


A
GFP
B
nestin
C
GFAP
D
5-HT
E
NF

Спинномозговая травма - модель на крысах

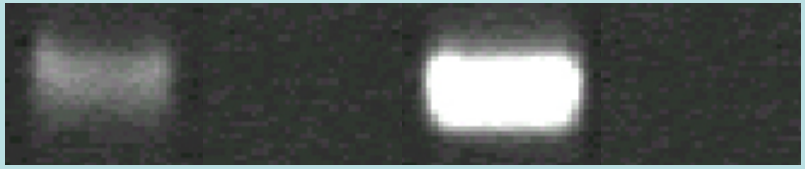
Зрелые крысы получали травму (размозжение).
Спустя 1 неделю им в мозг вливались крысиные MSCs.

	Поднимали туловище	Поведенческий тест
Контрольная группа	0/10	6.8 +/-0.4 SEM
Получив. лечение	7/12*	9.2 +/- 0.4 SEM (p=0.013)

* 2 совершали ритмичные шаги

hMSCs Экспресс Нейротрофины

BDNF (-) NGF (-) NT-3 (-) CNTF (-)



FGF-2 (-) PDGF-C (-)

Наше исследование по спинномозговой травме

Не является первым

--- но мы надеемся является лучшим

---с тщательной стандартизацией MSCs пациента, нуждающегося в лечении.

---проводилось под наблюдением интернационального комитета.

---являлось многоцентровым.

(Возможно, это полезный шаг в направлении изучения более распространенных заболеваний ЦНС?)

Используемая литература:

Prockop, D. J., C. A. Gregory and J. L. Spees. One strategy for cell and gene therapy: Harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. Proceedings of the National Academy of Sciences 100 (1): 11917-11923 (2003).