

诱导多能干细胞治疗年龄相关性黄斑变性的研究进展

卢怡洁^{1,2}, 秦珊^{1,2}, 秦波²

引用: 卢怡洁, 秦珊, 秦波. 诱导多能干细胞治疗年龄相关性黄斑变性的研究进展. 国际眼科杂志 2019; 19(10): 1692-1695

基金项目: 广东省省级科技计划项目 (No.2017A020211028); 广东省中医药局科研课题 (No.20151088)

作者单位:¹(510632) 中国广东省广州市, 暨南大学;²(518040) 中国广东省深圳市蛇口人民医院 中南大学湘雅二院深圳医院 深圳市眼外伤治疗与干细胞定向分化公共服务平台 暨南大学附属第二临床医学院 深圳大学眼视光学院

作者简介: 卢怡洁, 硕士, 研究方向: 眼外伤, 眼底病。

通讯作者: 秦波, 毕业于中南大学, 博士, 主任医师, 研究方向: 眼外伤, 眼底病. qinbozf@163.com

收稿日期: 2019-02-25 修回日期: 2019-09-05

摘要

年龄相关性黄斑变性是造成中老年人失明的主要原因, 严重影响了患者的生活质量, 但目前尚无有效疗法。随着病情的进展, 视网膜色素上皮细胞逐渐退化, 并最终引起视力的不可逆性损害。诱导多能干细胞的出现提供了可供移植的视网膜色素上皮细胞来源, 避免了免疫及伦理等问题, 但仍然需要克服许多障碍和困难。

关键词: 诱导多能干细胞; 年龄相关性黄斑变性; 视网膜色素上皮细胞

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2019.10.13

Advances in the treatment of age-related macular degeneration with induced pluripotent stem cells

Yi-Jie Lu^{1,2}, Shan Qin^{1,2}, Bo Qin²

Foundation items: Guangdong Provincial Science and Technology Plan Project (No.2017A020211028); Project of Traditional Chinese Medicine Bureau of Guangdong Province (No.20151088)

¹Jinan University, Guangzhou 510632, Guangdong Province, China; ²Shenzhen Shekou People's Hospital, the Second Xiangya Hospital of Central South University Shenzhen Hospital, Shenzhen City Public Service Platform of Ocular Trauma Treatment and Stem Cell Differentiation, Second Clinical Medical College Affiliated to Jinan University, College of Optometry, Shenzhen University, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China

Correspondence to: Bo Qin. Shenzhen Shekou People's Hospital, the Second Xiangya Hospital of Central South University Shenzhen Hospital, Shenzhen City Public Service Platform of Ocular Trauma Treatment and Stem Cell Differentiation, Second Clinical Medical College Affiliated to Jinan University, College of Optometry, Shenzhen University, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China. qinbozf@163.com

Received: 2019-02-25 Accepted: 2019-09-05

Abstract

• Age-related macular degeneration is the main cause of blindness in middle-aged and elderly people, seriously affects the quality of life of patients, but there is no effective therapy. As the disease progresses, the retinal pigment epithelial cells gradually degenerate and eventually cause irreversible damage to vision. The emergence of induced pluripotent stem cells provides a source of transplantable retinal pigment epithelial cells, avoiding immune and ethical issues, but still needs to overcome many obstacles and difficulties.

• **KEYWORDS:** induced pluripotent stem cells; age-related macular degeneration; retinal pigment epithelium

Citation: Lu YJ, Qin S, Qin B. Advances in the treatment of age-related macular degeneration with induced pluripotent stem cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2019; 19(10): 1692-1695

0 引言

年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, ARMD) 是在全球范围内造成失明的主要原因之一, 预计到 2020 年, 将会有 1.96 亿的患者罹患 ARMD, 而其中 1 100 万患者将会有严重的视力丧失, 这对患者的生活质量有着巨大的影响^[1]。ARMD 主要分为两类, 萎缩性和渗出性, 其中渗出性 ARMD 约占总 ARMD 患者的 10%。目前对于萎缩性 ARMD 缺乏有效的治疗方法。而对于渗出性 ARMD, 眼内注射抗血管内皮生长因子 (anti-vascular endothelial growth factor, anti-VEGF) 已成为常用的治疗方法。但是抗 VEGF 治疗所针对的患者类型十分有限, 且该治疗也有其局限性^[2-3]。RPE 细胞为有色素的六角形极化单层细胞, 在视网膜稳态中发挥着关键作用^[4]。在萎缩性 ARMD 的晚期, 视力丧失主要是由于 RPE 以及光感受器细胞萎缩导致的脉络膜毛细血管继发性丧失引起的。这提示我们需要引入替代细胞和/或营养因子来重建视网膜解剖结构。近几年来, 随着再生医学领域的不断发展, 使得干细胞移植成为了最具潜力的有望治疗 ARMD 的方法。目前的干细胞来源主要为两类, 胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ESC) 和诱导多能干细胞 (induced pluripotent stem cell, iPSC)。目前 ESC 来源的视网膜色素上皮细胞 (retinal pigment epithelium, RPE) 已被证实可以在视网膜退行性病变的动物模型中移植并且发挥功能^[5], 然而 ESC 来源的干细胞难以回避道德和伦理问题, 并且存在免疫排斥和来源不足的问题。iPSC 的出现为干细胞生物学领域带来了新的转变, 提供了多能细胞的替代来源。本综述将在 ARMD 的背景下论述关于 iPSC 细胞的相关研究以及持续存在的挑战。

1 诱导多能干细胞及其衍生的视网膜色素上皮细胞

最初, iPSC 是由 Yamanaka 等将 4 种转录因子 Oct4、

Sox2, Klf4 和 c-myc 通过逆转录病毒转入小鼠皮肤成纤维细胞所得^[6]。这些“重编程”的细胞具有分化为体内任何细胞的能力,同时避免了道德和伦理方面的相关问题,引入了使用自体细胞对患者进行特异性疗法的可能性。因为移植细胞来自于患者自身,原则上不引起免疫反应,因此消除或减少了免疫抑制治疗的需要。自从 2006 年以来,该技术已经被用于重编程来自不同物种的体细胞,其中包括大鼠、狗、恒河猴以及人类^[7-10]。眼球作为理想的干细胞移植器官,其相对于身体的其他器官处于天然的免疫豁免状态,而且与其他器官相比,眼球的大小决定了其只需较少的细胞数量即可完成移植。iPSC-RPE 细胞已经被证实体内与体外都具有 RPE 细胞的形态和功能特征,例如表达 RPE 特异性标记,如闭合小带蛋白-1(ZO-1),而且具有执行关键功能的潜力,如与天然 RPE 类似的处理维生素 A 的能力^[11],并且可以分泌抑制免疫反应的可溶性抑制因子,如 TGF- β 2、血小板反应蛋白-1(TSP-1)等^[12]。这些结果均表明,iPSC 已经能够成功衍生出与天然 RPE 相似的 RPE 细胞,为 ARMD 的干细胞治疗提供了基础。

2 诱导多能干细胞衍生的 RPE 细胞治疗 ARMD 的临床前研究

为了测试 iPSC-RPE 细胞疗法的功效,许多研究者利用动物模型进行验证研究。皇家外科医学院(royal college of surgeons, RCS)大鼠为最常用于检测 ARMD 细胞疗法的动物模型,这种视网膜退化性动物模型患有原癌基因酪氨酸激酶(MERTK)的基因突变,将会导致 RPE 和视网膜变性,从而破坏外节段吞噬作用^[13]。研究证明,视网膜下腔移植来自非营养不良大鼠、胎儿、新生儿和成人作为供体所衍生的 iPSC-RPE 细胞可不同程度地延迟 RCS 大鼠的疾病发作,并且可以预防或逆转 RPE 的退化^[14-17]。Li 等^[18]将 iPSC-RPE 细胞注射到出生后第 2d 的视网膜变性小鼠模型(Rpe65rd12/Rpe65rd12)的一只眼的视网膜下空间,使用对侧眼作为对照,研究显示移植后长期存活的小鼠中均未检测到畸胎瘤,表明了 iPSC-RPE 的安全性和有效性。Sun 等^[19]则将 iPSC-RPE 细胞注射到免疫抑制的视网膜色素变性模型 rd1 小鼠的视网膜下空间,发现人 iPSC-RPE 细胞在术后第 14d 和第 21d 明显减轻了小鼠的光感受器变性,延迟了光感受器退化。Kamao 等^[20]将来自于非人灵长类食蟹猴自体诱导的多能干细胞进行自体移植,证实移植后 iPSC-RPE 细胞片没有出现免疫排斥或肿瘤形成,表明了 iPSC-RPE 细胞片可作为一种有效的移植形式用于组织替代治疗 ARMD。当然,这种视力挽救是由于替换的 RPE 细胞还是由于植入的 RPE 细胞所分泌的生长因子所起的旁分泌作用仍有待确定,但是小型、大型的动物模型的诸多实验结果为 iPSC 细胞进入人体试验研究铺平了道路。

3 基于 iPSC 的视网膜色素上皮细胞移植的临床研究

目前使用 iPSC 衍生的 RPE 细胞片进行临床试验的研究非常有限。日本 Riken 发育生物学中心报道了第 1 个也是唯一一个接受 iPSC-RPE 细胞片视网膜下移植患

者的临床报告。2014-09,1 例患有渗出性黄斑变性(息肉状脉络膜血管病变)的日本女性患者在视网膜下腔植入了由自身成纤维细胞产生的 iPSC 衍生的 RPE 细胞片。患者未接受免疫抑制治疗,在移植后 1a 的时间点没有出现不良反应,且移植的细胞保持完整,视力未再出现下降,光学相干断层扫描(OCT)显示移植部位出现高密度区域,提示感光细胞内部以及外部区段的恢复可能。但在 2015-03 该试验被用于第 2 例患者时,由于发现了 iPSC 中的遗传突变,该试验被迫搁置^[21-23]。虽然尚不清楚这些遗传突变是来自于重编程中的诱导还是来源于患者的体细胞,但是这也提示我们在进入人体试验之前必须评估基因组的稳定性。为了避免来自于个体的基因组异常的可能性,Sugita 等使用来自部分匹配供体的 iPSC,这些细胞不仅可以验证基因组的稳定性,同时还可以加速细胞生产过程。他们的研究成果证明,来自主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)纯合子供体的细胞可以用于组织相容性受体视网膜疾病的治疗。在该研究中,研究人员将来自于 MHC 纯合动物的 iPSC 衍生的 RPE 细胞移植到没有免疫抑制的 MHC 匹配的动物模型中,发现 iPSC 衍生的 RPE 同种异体移植未出现免疫应答或排斥。这些研究表明,如果供体是 MHC 或者 HLA 匹配,iPSC 衍生的 RPE 细胞同种异体移植可能是成功的,且几乎没有免疫抑制^[24-25]。Sugita 等所提出的同种异体 HLA 匹配的干细胞治疗方法为自体 iPSC 提供了替代方案,也更丰富了 ARMD 相关的细胞治疗思路。

4 基于 iPSC 的视网膜色素上皮细胞移植所面临的挑战

基于 iPSC 治疗的首先需要面对的问题就是其耗费时间长和昂贵的费用,特别是对于自体来源细胞的移植治疗。据估计,自体来源细胞治疗的制备需要 3mo 才能完成,从采集到眼内植入大约需要花费 100 万美元^[26]。同种异体 HLA 匹配细胞的使用可能更为有效、经济,同时也适合大批量生产使用。

其次就是移植后的致瘤性和安全性方面的考虑,iPSCs 的发育需要重编程体细胞,方法包括通过病毒转染或者化学诱导等将外源转录因子传递到细胞中^[27],病毒载体可以是整合或者非整合的,因此具有突变或者免疫原性的可能^[28]。虽然 Kanemura 等^[29]研究证明,在啮齿动物模型中 iPSC 衍生的 RPE 细胞的致瘤性是可以忽略不计的,但是还需要更多的体内研究来进一步佐证。而在遗传性视网膜疾病中,引起疾病的突变仍有可能存在于 iPSC 衍生的细胞中,因此如何利用基因编辑技术修复存在的遗传缺陷并制造健康的细胞也是面临的问题之一。此外 iPSCs 移植的长期安全性也未可知,迄今的动物研究最长观察时间为 6~9mo,因此尚不清楚其长期的致瘤性。另一亟待解决的安全性挑战便是自体来源和异体来源干细胞衍生的 RPE 细胞的免疫反应。

所有基于细胞治疗干预措施的主要挑战为确保细胞能够整合到宿主视网膜中,即移植的细胞必须整合到现有的神经回路中发挥正常功能。Zhong 等^[30]发现培养的人类 iPSCs 再现了体内视网膜发育的主要过程,形成了包含主要视网膜细胞类型的 3D 视网膜杯,并显示出视网膜外节盘的形成和光敏性。Lamba 等^[31]同样观察到来源于 iPSCs 的光感受器细胞移植入视网膜下腔空间后不仅能够存活,并且在视网膜外核层发现了移植细胞,这表明 iPSCs 具有迁移并整合于视网膜的能力。尽管在动物模

型中取得了成功,但是如何增加移植细胞与宿主视网膜整合能力又是一个新的挑战。干细胞移植方法的选择与生物材料的改进,决定了移植细胞能否长期存活以及是否发挥作用。目前,将细胞递送到视网膜下空间主要有两种方法,一种为将干细胞衍生的 RPE 悬浮液注射到视网膜下空间;另一种则是将干细胞衍生的 RPE 细胞接种于支持膜(可生物降解和/或具有生物相容性的支架或生物膜)上形成单层的 RPE 细胞片进行移植。鉴于晚期 ARMD 患者 Bruch 膜的异常程度,与单个 RPE 细胞悬液视网膜下注射相比,具有支撑层的 RPE 细胞移植片被认为更有效。目前研究人员已经集中开发不同材质的生物材料聚合物支架,如胶原凝胶、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)支架、聚酰亚胺膜、血浆聚合物、聚对二甲苯-C膜、聚酯膜、聚酰胺纳米支架^[20, 32-37]等,这些聚合物与 Bruch 膜作用相似,可以为 RPE 提供支持与营养,同时可以设计具有特定的特性,例如特定的降解速率^[38]。

iPSC 衍生的 RPE 细胞理论上是可以替代在 ARMD 中受损的 RPE 细胞,但是实际移植的 RPE 细胞能够发挥多少功能,能否替代原来的 RPE 细胞所必须的基本功能以减缓甚至逆转疾病的进展还有待观察。而且即使移植的 RPE 细胞能发挥正常的生理功能,其在 ARMD 病理环境中能否成功移植以及长期存活都需要进一步的研究来探讨。

5 展望

iPSC 在治疗 ARMD 中有巨大的潜力,但仍存在必须要跨越的障碍。通过 iPSCs 的培养和疾病建模,让我们对视网膜变性疾病领域有了更新的理解。而在未来的应用中,更重要的是优化重编程方法,开发高效的分离、分化方法,改进干细胞来源的细胞注入患者的方法,例如使用支架或者生物膜等支持材料,同时测试安全性和完整性,并能监测移植后细胞的长期存活情况。

参考文献

- 1 Wong WL, Su X, Li X, *et al.* Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040; a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2014;2(2):e106-e116
- 2 Pennington BO, Clegg DO, Melkounian ZK, *et al.* Defined Culture of Human Embryonic Stem Cells and Xeno-Free Derivation of Retinal Pigmented Epithelial Cells on a Novel, Synthetic Substrate. *Stem Cells Transl Med* 2015;4(2):165-177
- 3 Nazari H, Zhang L, Zhu D, *et al.* Stem cell based therapies for age-related macular degeneration: The promises and the challenges. *Prog Retin Eye Res* 2015;48:1-39
- 4 Ramsden CM, Powner MB, Carr AJ, *et al.* Stem cells in retinal regeneration: past, present and future. *Development* 2013;140(12):2576-2585
- 5 Garg A, Yang J, Lee W, *et al.* Stem Cell Therapies in Retinal Disorders. *Cells* 2017;6(1):4
- 6 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
- 7 Vojnits K, Yang L, Zhan M, *et al.* Very small embryonic-like cells in the mirror of regenerative medicine. *J Stem Cells* 2014;9(1):1-16
- 8 Shimada H, Nakada A, Hashimoto Y, *et al.* Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. *Mol Reprod Dev* 2010;77(1):2
- 9 Liu H, Zhu F, Yong J, *et al.* Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Adult Rhesus Monkey Fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2009;3(6):

587-590

- 10 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells From Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Obstet Gynecol Surv* 2008;63(3):153
- 11 Fields MA, Bowrey HE, Gong J, *et al.* Retinoid Processing in Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Cultures. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2015;134:477-490
- 12 Sugita S, Kamao H, Iwasaki Y, *et al.* Inhibition of T-cell activation by retinal pigment epithelial cells derived from induced pluripotent stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(2):1051-1062
- 13 Parinot C, Nandrot EF. A Comprehensive Review of Mutations in the MERTK Proto-Oncogene. *Adv Exp Med Biol* 2016;854:259-265
- 14 Palomo ABA, Mclenachan S, Chen FK, *et al.* Prospects for clinical use of reprogrammed cells for autologous treatment of macular degeneration. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2015;8:9
- 15 Hazim RA, Karumbayaram S, Jiang M, *et al.* Differentiation of RPE cells from integration-free iPSCs and their cell biological characterization. *Stem Cell Res Ther* 2017;8(1):217
- 16 Lorach H, Kang S, Dalal R, *et al.* Long-term Rescue of Photoreceptors in a Rodent Model of Retinitis Pigmentosa Associated with MERTK Mutation. *Sci Rep* 2018;8(1):11312
- 17 Thomas BB, Danhong Z, Li Z, *et al.* Survival and Functionality of hESC-Derived Retinal Pigment Epithelium Cells Cultured as a Monolayer on Polymer Substrates Transplanted in RCS Rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57(6):2877
- 18 Li Y, Tsai YT, Hsu CW, *et al.* Long-term Safety and Efficacy of Human-Induced Pluripotent Stem Cell (iPS) Grafts in a Preclinical Model of Retinitis Pigmentosa. *Mol Med* 2012;18:1312-1319
- 19 Sun J, Mandai M, Kamao H, *et al.* Protective Effects of Human iPSC-Derived Retinal Pigmented Epithelial Cells in Comparison with Human Mesenchymal Stromal Cells and Human Neural Stem Cells on the Degenerating Retina in rd1 mice. *Stem Cells* 2015;33(5):1543-1553
- 20 Kamao H, Mandai M, Okamoto S, *et al.* Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Reports* 2014;2(2):205-218
- 21 Yoshihara M, Hayashizaki Y, Murakawa Y. Genomic Instability of iPSCs: Challenges Towards Their Clinical Applications. *Stem Cell Rev Rep* 2017;13(1):7-16
- 22 Chakradhar S. An eye to the future: Researchers debate best path for stem cell-derived therapies. *Nat Med* 2016;22(2):116-119
- 23 Garber K. RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2015;33(9):890-891
- 24 Sugita S, Iwasaki Y, Makabe K, *et al.* Successful Transplantation of Retinal Pigment Epithelial Cells from MHC Homozygote iPSCs in MHC-Matched Models. *Stem Cell Reports* 2016;7(4):635-648
- 25 Sugita S, Iwasaki Y, Makabe K, *et al.* Lack of T Cell Response to iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelial Cells from HLA Homozygous Donors. *Stem Cell Reports* 2016;7(4):619-634
- 26 Chakradhar S. An eye to the future: researchers debate best path for stem cell-derived therapies. *Nat Med* 2016;22(2):116-119
- 27 Tian Z, Guo F, Sangita B, *et al.* Rationale and Methodology of Reprogramming for Generation of Induced Pluripotent Stem Cells and Induced Neural Progenitor Cells. *Int J Mol Sci* 2016;17(4):594
- 28 Luo M, Chen Y. Application of stem cell-derived retinal pigmented epithelium in retinal degenerative diseases: present and future. *Int J Ophthalmol* 2018;11(1):150
- 29 Kanemura H, Go MJ, Shikamura M, *et al.* Tumorigenicity Studies of Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Retinal Pigment Epithelium (RPE) for the Treatment of Age-Related Macular Degeneration. *PLoS One* 2014;9(1):e85336
- 30 Zhong X, Gutierrez C, Xue T, *et al.* Generation of three-dimensional

retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nat Commun* 2014;5:4047

31 Lamba DA, Mcusic A, Hirata RK, *et al.* Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2010;5(1):e8763

32 Tao S, Young C, Redenti S, *et al.* Survival, migration and differentiation of retinal progenitor cells transplanted on micro-machined poly(methyl methacrylate) scaffolds to the subretinal space. *Lab Chip* 2007;7(6):695-701

33 Subrizi A, Hiidenmaa H, Ilmarinen T, *et al.* Generation of hESC-derived retinal pigment epithelium on biopolymer coated polyimide membranes. *Biomaterials* 2012;33(32):8047-8054

34 Kearns V, Mistry A, Mason S, *et al.* Plasma polymer coatings to aid retinal pigment epithelial growth for transplantation in the treatment of age related macular degeneration. *J Mater Sci Mater Med* 2012; 23 (8) :

2013-2021

35 Diniz B, Thomas P, Thomas B, *et al.* Subretinal Implantation of Retinal Pigment Epithelial Cells Derived From Human Embryonic Stem Cells: Improved Survival When Implanted as a Monolayer. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54(7):5087-5096

36 Stanzel BV, Liu Z, Brinken R, *et al.* Subretinal delivery of ultrathin rigid - elastic cell carriers using a metallic shooter instrument and biodegradable hydrogel encapsulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012;53(1):490

37 Carr AJ, Smart MJ, Ramsden CM, *et al.* Development of human embryonic stem cell therapies for age - related macular degeneration. *Trends Neurosci* 2013;36(7):385-395

38 Rowland TJ, Buchholz DE, Clegg DO. Pluripotent human stem cells for the treatment of retinal disease. *J Cell Physiol* 2012; 227 (2) : 457-466

国际眼科杂志中文版 (IES) 近 5 年影响因子趋势图

