

干细胞来源的 RPE 细胞移植治疗视网膜退行性疾病的研究进展

曹天玥, 江双红, 晏晨, 艾明

作者单位: (430060) 中国湖北省武汉市, 武汉大学人民医院眼科
作者简介: 曹天玥, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向: 玻璃体视网膜外科。

通讯作者: 艾明, 主任医师, 研究方向: 眼底病、玻璃体视网膜外科。aiminghbwh@163.com

收稿日期: 2017-07-02 修回日期: 2017-10-25

Research progress of stem cell - derived RPE cell transplantation therapy for retinal degenerative diseases

Tian - Yue Cao, Shuang - Hong Jiang, Chen Yan, Ming Ai

Department of Ophthalmology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China

Correspondence to: Ming Ai. Department of Ophthalmology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei Province, China. aiminghbwh@163.com

Received: 2017-07-02 Accepted: 2017-10-25

Abstract

• Age - related macular degeneration (ARMD) and Stargardt's macular dystrophy (SMD) are two kinds of degenerative retinal diseases that respectively lead to irreversible vision loss of the elderly and juvenile population. However, the severe visual impairment in dry ARMD and SMD remains untreatable. In recent years, with the advancement of stem cell technology, stem cell-derived RPE cell transplantation therapy of retinal degeneration has become new research hotspot and direction. This article reviewed the progress of stem cell based approaches for treating retinal degenerative diseases and discussed the prospect and challenges in this field.

• KEYWORDS: degenerative retinal diseases; age-related macular degeneration; stem cell-based therapy; retinal pigment epithelium

Citation: Cao TY, Jiang SH, Yan C, et al. Research progress of stem cell - derived RPE cell transplantation therapy for retinal degenerative diseases. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017; 17 (12): 2260-2262

摘要

在视网膜退行性疾病中, 年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, ARMD) 和 Stargardt 黄斑营养

不良 (SMD) 分别是威胁老年人和青少年人群视力最常见的疾病。目前仍缺乏可改善干性 ARMD 和 Stargardt 黄斑营养不良患者视力的确切疗法。近年来, 干细胞 (stem cells) 技术不断发展, 干细胞来源的 RPE 细胞移植疗法成为视网膜退行性疾病治疗的热点及新方向, 本文将对该研究领域的最新研究进展作一综述。

关键词: 视网膜退行性疾病; 年龄相关性黄斑变性; 干细胞疗法; 视网膜色素上皮

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2017.12.17

引用: 曹天玥, 江双红, 晏晨, 等. 干细胞来源的 RPE 细胞移植治疗视网膜退行性疾病的研究进展. *国际眼科杂志* 2017; 17 (12): 2260-2262

0 引言

视网膜退行性疾病是可导致患者视力不可逆性损伤的一类疾病, 该疾病以视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞及光感细胞进行性破坏及缺失为主要特点, 主要包括年龄相关性黄斑变性 (age-related macular degeneration, ARMD)、视网膜色素变性 (retinitis pigmentosa, RP) 及 Stargardt 黄斑营养不良 (SMD), 其中 ARMD 是老年人中主要的致盲疾病, 而 SMD 好发于青少年。虽然抗血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 类药物的临床应用为湿性 ARMD 患者带来了新的契机, 但对于干性 ARMD 和 SMD 仍缺乏切实有效的治疗方案^[1-4]。视网膜退行性疾病的发病机制决定了细胞替代疗法可能是一种可以从病因上控制和治疗该类疾病的方法^[5]。因眼球拥有血眼屏障, 使得玻璃体腔及视网膜下腔具有相对免疫豁免而成为移植的理想环境^[6]。本文将就干细胞来源的 RPE 细胞移植在治疗视网膜退行性疾病中应用的研究进展作一综述。

1 干细胞来源

研究发现, RPE 细胞可来源于胚胎干细胞 (embryonic stem cells, ESCs)、间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs)、骨髓来源的间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 及成体细胞诱导的多能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs)^[7], 目前研究比较多的是 ESCs 和 iPSCs。

1.1 胚胎干细胞 ESCs 是一类具有无限增殖、自我更新和多向分化潜能的细胞, 该细胞由哺乳动物着床前胚胎内的细胞团中分离出, 其中人源的胚胎干细胞 (human ESCs, hESCs) 在生长过程中具有稳定的染色体组型^[8]和较长的寿命以及向 3 个胚胎层分化的潜能^[9], 是较理想的 RPE 细胞来源。但将 hESCs 用于治疗疾病时无法避免形成畸胎瘤的风险^[10]。目前, 实验过程中培养 hESCs 的环境为

非人体组织环境,这是否会影响到试验结果尚无定论。其次,同其它同种异体移植术一样,hESCs 移植术后需服用免疫抑制剂^[10]。

1.2 成体细胞诱导的多能干细胞 iPSCs 是由体外终端分化的体细胞经逆转录病毒转导 Oct3/4、Klf4、c-Myc 和 Sox2 四个基因进而重新编码得到的 ESCs 样多能干细胞^[11-13]。iPSCs 最初来源于人表皮成纤维细胞,具有与 ESCs 类似的分化潜能,2009 年体内外实验表明由 iPSCs 分化的 RPE 细胞在形态及功能上具有正常 RPE 细胞的典型特征^[14]。由于 iPSCs 可由患者自体获得,因此可以避免术后发生种属或个体间的排斥反应^[15]。体外试验证实,由 iPSCs 分化的 RPE 细胞具备与自身 RPE 细胞相似的功能、形态、免疫染色及显微结构特性,且能够抑制 T 细胞活化产生可溶性因子 TGF- β 的能力,从而进一步降低移植后排斥反应发生的可能性^[16-17]。相比于 hESCs 而言,iPSCs 来源的细胞移植具有两大优势:(1)避免因使用人类胚胎组织带来的一系列伦理问题;(2)拥有更多细胞来源的选择性,如成人角膜缘上皮细胞、表皮成纤维细胞等^[6,18]。但缺点是体外操作较多,可能携带致病基因,且费用较高,阻碍该疗法在临床的推广和应用^[6]。

2 干细胞的诱导分化

研究表明,hESCs 及 iPSCs 细胞在人工培养过程中均可自发分化成 RPE 细胞,该类细胞不仅具有与自身 RPE 细胞相似的细胞形态及功能表型,而且与基因谱精确契合,拥有单层细胞的极性及杆外段的吞噬能力^[19-20],但此种方法获得 RPE 细胞的概率较低(在 1~2mo 的细胞培养周期中获得率约为 1%)^[21]。而大量研究发现,在加入了碱性成纤维细胞生长因子、维生素 A、烟酰胺等细胞信号因子进行定向诱导分化后,RPE 细胞获得率可提高至 60%~80%^[17,21-24]。最近报道,运用操纵分子信号通路技术活化 Wnt/ β -蛋白的传导通路诱导 hESCs 分化形成 RPE 细胞的效率高达 97%^[25-27]。但自发分化和定向分化两种方法获得的 PRE 细胞,哪种细胞功能更加完善,目前尚不明确,需要进一步研究。

3 RPE 细胞移植的组织工程学

目前,将分化的 RPE 细胞移植到目标区域主要有两种方式:(1)细胞悬液移植;(2)通过支架上构建细胞片层后移植。研究表明,支架不仅能够为移植细胞提供物理支撑,其所携带的生长因子能够提供营养并促进细胞分化,从而提高细胞生存率^[28]。另有实验证实,移植细胞与支架黏附可降低细胞凋亡率,且离体细胞存活率与细胞附着率呈正相关。移植的 RPE 细胞需长期存活才能发挥作用,故虽然细胞片层移植需要较高的技术要求但仍具有相对优越性^[29]。一项关于 14 例 ARMD 患者的随机临床研究发现,自体 RPE-脉络膜组织移植和自体 RPE 细胞悬液移植疗法均可使患者视力得到有效维持并无复发 ARMD,但两组之间并无明显差异^[30]。在以往的研究中,研究者们尝试使用细胞化的基质作为天然支架,如角膜后弹力层组织、晶状体囊膜、羊膜、内界膜等,也尝试使用可降解或不可降解的人工合成聚合物支架,但基于对材料厚度、硬度和卷曲性及使用寿命等方面的综合考虑,多数学者倾向于选择聚合物支架^[31]。该移植方式存在以下问题:(1)植入支架的厚度较高,约为 5~9 μ m,支架制备存在一定技术

难度;(2)植入支架有引起炎性反应的潜在风险^[32]。目前关于 RPE 细胞附着于支架制成细胞片层后移植的研究报道较少,因此采用该技术进行 RPE 细胞移植的安全性和有效性仍有待进一步评价。

4 RPE 细胞移植的动物实验

通过大量关于视网膜退行性疾病的动物模型对干细胞治疗该类疾病的疗效和安全性进行了评估。有研究分别在视网膜色素变性的大鼠模型皇家外科医师学院大鼠(royal college of surgeons rat,RCS)和 SMD 小鼠模型 Elov14 的视网膜下植入 hESCs 来源的 RPE 细胞,结果提示视功能的改善和视网膜正常结构的维持情况与植入的 RPE 细胞悬液呈剂量相关性^[33-34]。此外,研究结果表明将由人类 iPSCs 细胞直接分化而来的 RPE 细胞植入缺乏 RPE65 基因的小鼠模型的眼睛后获得了较好的功能学和形态学的恢复^[35]。另有研究证实,向 RCS 大鼠模型视网膜下植入由人类 iPSCs 细胞分化而来的 RPE 细胞并未发现有肿瘤形成^[36],从另一层面提示了 RPE 细胞移植的安全性。

5 RPE 细胞移植临床试验

经过大量的基础实验和临床前期研究,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration,FDA)于 2009 年首次批准将 hESCs 用于脊髓损伤和 ARMD 的临床治疗。Schwartz 等^[37]通过采用 hESCs 来源的细胞治疗 ARMD 的临床试验(Ocata 疗法),获得了 hESCs 来源的细胞用于治疗人类疾病安全性反馈的第一手资料。该临床试验初期研究发现,由 hESCs 定向分化而来的 RPE 细胞纯度高达 99%及以上^[37-38]。这项规模较大的前瞻性研究还发现在移植后的 37mo 内 RPE 细胞均可维持正常形态,且并无畸胎瘤形成及免疫排斥反应出现^[38],第一次权威证明了该技术在临床应用中的安全性。

6 展望

干细胞来源的 RPE 细胞移植的成功实施可能解决数百万患者的失明问题,目前亟需解决的问题有:(1)在安全性被证实的基础上,需要更多的研究来评价疗效;(2)在视网膜退行性疾病进程中,植入 RPE 细胞的最佳时机也是亟需解决的问题;(3)在现有的治疗方案中,移植后需常规使用全身免疫抑制剂,但应排除合并一些特定疾病的患者,其中可能包括 ARMD 患者;(4)即使植入的健康 RPE 细胞发挥其最大的潜能进而达到复明的效果,但植入的 RPE 细胞仍会受到造成原始 RPE 损伤的外在因素的影响^[39]。综合以往的研究结果,干细胞来源的 RPE 细胞移植治疗基本符合预期效果,相信随着对 RPE 细胞功能的深入研究,干细胞诱导提纯方法的完善及移植手术方案的不断改善,视网膜退行性疾病的临床疗效将会有飞跃性的提高。

参考文献

- 1 Yehoshua Z, de Amorim Garcia Filho CA, Nunes RP, et al. Systemic complement inhibition with eculizumab for geographic atrophy in age-related macular degeneration: the COMPLETE study. *Ophthalmology* 2014;121(3):693-701
- 2 Volz C, Pauly D. Antibody therapies and their challenges in the treatment of age-related macular degeneration. *Eur J Pharm Biopharm* 2015;95(Pt B):158-172
- 3 Auricchio A, Trapani I, Allikmets R. Gene Therapy of ABCA4-Associated Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5(5):a017301

- 4 Lu LJ, Liu J, Adelman RA. Novel therapeutics for Stargardt disease. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2017;255(6):1057-1062
- 5 Nommiste B, Fynes K, Tovell VE, et al. Stem cell-derived retinal pigment epithelium transplantation for treatment of retinal disease. *Prog Brain Res* 2017;231:225-244
- 6 Bharti K, Rao M, Hull SC, et al. Developing cellular therapies for retinal degenerative diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55(2):1191-1202
- 7 Higuchi A, Kumar SS, Benelli G, et al. Stem Cell Therapies for Reversing Vision Loss. *Trends Biotechnol* 2017[Epub ahead of print]
- 8 Desai N, Rambhia P, Gishto A. Human embryonic stem cell cultivation; historical perspective and evolution of xeno-free culture systems. *Reprod Bio Endocrinol* 2015;13:9
- 9 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282(5391):1145-1147
- 10 Garg A, Yang J, Lee W, et al. Stem Cell Therapies in Retinal Disorders. *Cells* 2017;6(1):4
- 11 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131(5):861-872
- 12 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318(5858):1917-1920
- 13 Park IH, Zhao R, West JA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008;451(7175):141-146
- 14 Songstad AE, Worthington KS, Chirco KR, et al. Connective Tissue Growth Factor Promotes Efficient Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Choroidal Endothelium. *Stem Cells Transl Med* 2017;6(6):1533-1546
- 15 Saint-Geniez M, Rosales MAB. Eyeing the Fountain of Youth. *Cell Stem Cell* 2017;20(5):583-584
- 16 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
- 17 Bracha P, Moore NA, Ciulla TA. Induced pluripotent stem cell-based therapy for age-related macular degeneration. *Expert Opin Biol Ther* 2017;17(9):1113-1126
- 18 Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med* 2017;376(11):1038-1046
- 19 Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ, et al. Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009;27(10):2427-2434
- 20 Haruta M, Sasai Y, Kawasaki H, et al. *In vitro* and *in vivo* characterization of pigment epithelial cells differentiated from primate embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(3):1020-1025
- 21 Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, et al. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem Cells Transl Med* 2013;2(5):384-393
- 22 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
- 23 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
- 24 Zahabi A, Shahbazi E, Ahmadi H, et al. A new efficient protocol for directed differentiation of retinal pigmented epithelial cells from normal and retinal disease induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 2012;21(12):2262-2272
- 25 Leach LL, Buchholz DE, Nadar VP, et al. Canonical/ β -catenin Wnt pathway activation improves retinal pigmented epithelium derivation from human embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56(2):1002-1013
- 26 Croze RH, Buchholz DE, Radeke MJ, et al. ROCK Inhibition Extends Passage of Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigmented Epithelium. *Stem Cells Transl Med* 2014;3(9):1066-1078
- 27 Hongisto H, Jylha A, Nattinen J, et al. Comparative proteomic analysis of human embryonic stem cell-derived and primary human retinal pigment epithelium. *Sci Rep* 2017;7(1):6016
- 28 Stanzel BV, Liu Z, Sombhoonthanakij S, et al. Human RPE stem cells grown into polarized RPE monolayers on a polyester matrix are maintained after grafting into rabbit subretinal space. *Stem Cell Reports* 2014;2(1):64-77
- 29 Tezel TH, Del Priore LV, Kaplan HJ. Reengineering of aged Bruch's membrane to enhance retinal pigment epithelium repopulation. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(9):3337-3348
- 30 Falkner-Radler CI, Krebs I, Glittenberg C, et al. Human retinal pigment epithelium (RPE) transplantation; outcome after autologous RPE-choroid sheet and RPE cell-suspension in a randomised clinical study. *Br J Ophthalmol* 2011;95(3):370-375
- 31 Calejo MT, Ilmarinen T, Vuorimaa-Laukkanen E, et al. Langmuir-Schaefer film deposition onto honeycomb porous films for retinal tissue engineering. *Acta Biomater* 2017;54:138-149
- 32 Hynes SR, Lavik EB. A tissue-engineered approach towards retinal repair; scaffolds for cell transplantation to the subretinal space. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2010;248(6):763-778
- 33 Lu B, Malcuit C, Wang S, et al. Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* 2009;27(9):2126-2135
- 34 Lund RD, Wang S, Klimanskaya I, et al. Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats. *Cloning Stem Cells* 2006;8(3):189-199
- 35 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
- 36 Carr AJ, Vugler AA, Hikita ST, et al. Protective effects of human iPS-derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat. *PLoS One* 2009;4(12):e8152
- 37 Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 2012;379(9817):713-720
- 38 Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* 2015;385(9967):509-516
- 39 Cahill MT, Mruthunjaya P, Bowes Rickman C, et al. Recurrence of retinal pigment epithelial changes after macular translocation with 360 degrees peripheral retinectomy for geographic atrophy. *Arch Ophthalmol* 2005;123(7):935-938