

Йошики Сасаи

Вырастить свои глаз

Биологам удалось заставить клетки сформировать сетчатку глаза вне тела человека. Фактически это шаг к выращиванию органов для трансплантации



ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ

- Научный мир не перестает удивляться и восхищаться, что из стволовых клеток можно вырастить любые органы.
- Группа японских ученых, занимающая ведущее место в этой области, вырастила человеческую и мышиную сетчатки в лабораторных условиях.
- Это позволило лучше понять механизмы развития мозга и может дать начало новым способам лечения глазных заболеваний.

ОБ АВТОРЕ

Йошики Сасаи (Yoshiki Sasai) — директор группы органогенеза и нейрогенеза в Центре биологии развития института физико-химических исследований RIKEN в Кобе, Япония. Медицинское образование и докторскую степень в области молекулярной нейробиологии Сасаи получил в Высшей школе медицины Киотского университета.



Вутробе матери шарик из одинаковых клеток дает начало различным типам тканей. Они создают сложно организованные структуры, превращающиеся затем в полноценные органы человеческого тела. Внутренняя биологическая программа направляет каждый изгиб и складку клеточной ткани таким образом, чтобы получить в точности нужную форму и размер.

Ученые, которым хорошо знаком этот прогресс, никогда не перестают рассматривать эмбриональное развитие с тихим восхищением, которому сопутствует желание воссоздать раннее развитие в лабораторных условиях, чтобы лучше понимать биологию и использовать эту информацию для восстановления и трансплантации поврежденных тканей. Возможно, пришло их время. Новейшие успехи по расшифровке хитросплетений, лежащих в основе развития, дают надежду, что пересадка органов, выращенных вне тела, станет доступна для хирургии уже в ближайшее десятилетие.

Мой оптимизм основан на проведенном в нашей лаборатории исследовании стволовых клеток, превращающихся в разные другие типы клеток. Мы показали, что даже при выращивании ткани в виде культуры они могут сформировать сетчатку, ключевую структуру глаза, которая преобразует свет из окружающего мира в электрические и химические сигналы и передает их в мозг. В другой работе мы с коллегами вырастили ткань коры мозга и часть гипофиза. Проводя эксперименты, мы использовали системы врожденных сигналов организма, чтобы заставить плоский слой разрозненных клеток в чашке Петри сформировать упорядоченную трехмерную структуру. Благодаря поданным нами химическим

сигналам стволовые клетки создавали эти структуры самостоятельно, фактически строя свою собственную сетчатку. Мы надеемся, что сформированную таким способом ткань сетчатки можно будет использовать при лечении ряда глазных заболеваний, в том числе дегенерации желтого пятна.

Плавающая культура

Когда наша лаборатория взялась за выращивание сетчатки, мы попытались ответить на основной вопрос: как она формируется? Мы знали, что сетчатка возникает из той части эмбрионального мозга, которая называется промежуточный мозг. На ранних этапах эмбрионального развития участок промежуточного мозга расширяется, образуя глазной пузырь. Затем стенка пузыря вдавливается внутрь, он принимает форму глазного бокала, и из этой ткани в дальнейшем и развивается сетчатка.

Более столетия биологи спорили о том, какой конкретно механизм лежит в основе формирования глазного бокала. Дискуссия до сих пор еще продолжается среди ученых, изучающих развитие мозга. Один из неразрешенных до последнего времени вопросов — какова при этом роль соседних структур, таких как хрусталик и роговица. Некоторые исследователи утверждали, что хрусталик физически вдавливает сетчатку внутрь, тогда как другие ученые считали, что глазной бокал формируется без помощи ткани хрусталика.

Увидеть, что происходит в живом, развивающемся животном, крайне сложно. Поэтому около десяти лет назад мы решили поместить эмбриональные стволовые клетки в пробирку и воздействовать на них веществами, участвующими в формировании глаза. Эмбриональные

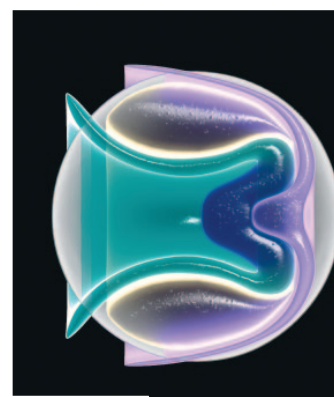
Основы

ФОРМИРОВАНИЕ ГЛАЗНОГО ЯБЛОКА

Развитие глаза из маленького комка эмбриональной ткани начинается, когда внутренний слой, нейроэпителий, выгибается наружу, и на девятый день возникает глазной пузырь. Внешние слои зародыша в то же время начинают расходиться (9,5 дней), что приводит на десятый день к формированию хрусталикового пузырька. Часть глазного пузыря изгибается, и формируется глазной бокал, из которого при взаимодействии с хрусталиковым пузырьком формируются сетчатка и зрительный нерв, а спереди образуется хрусталик (10,5 дней). Сетчатка состоит из трех отдельных слоев: палочки и колбочки; горизонтальные, биполярные и амакриновые клетки; ганглионарные клетки.



9-й день (мышь)



9,5-й день

стволовые клетки — наиболее незрелый тип стволовых клеток, и в конечном итоге они могут превращаться в любые ткани организма, от нейронов до мышц.

Методов для создания органов из культуры стволовых клеток не существовало. Пытаясь использовать эти клетки для создания нового органа, отдельные клетки сеяли на искусственную подложку в форме мочевого пузыря или пищевода. Биоинженерам не удалось получить выдающихся результатов, выращивая органы по этой технологии. Поэтому мы применили другой подход. Все началось с того, что в 2000 г. мы разработали метод, позволяющий получать из эмбриональных стволовых клеток мышцы разные типы нейронов. Мы разместили в чашке для культуры мышечные эмбриональные стволовые клетки в один слой вместе с питающими клетками, которые передавали химические сигналы, побуждающие стволовые клетки к дифференцировке во взрослое состояние. Мы понимали, что из плоского листа нам не получить трехмерный контур настоящих человеческих органов, но хотели посмотреть, достаточно ли только химических сигналов самих клеток, чтобы побудить их к созданию нейронов определенного типа на этапе раннего эмбрионального развития.

В 2005 г. мы совершили технический прорыв, выйдя за пределы ранних двумерных технологий нашей лаборатории и позволив стволовым клеткам плавать в растворе. Было несколько причин, почему мы начали использовать трехмерную культуру, которая называется плавающей. Во-первых, скопления клеток, распределенные в трехмерном пространстве, лучше формируют сложную структуру ткани, чем клетки, размещенные по подложке. Во-вторых, трехмерное распределение облегчает взаимодействие клеток друг с другом, необходимое для развития сложной структуры.

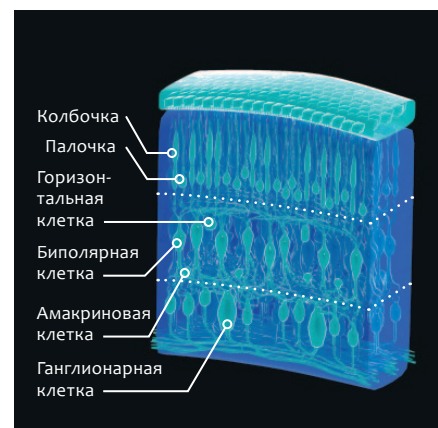
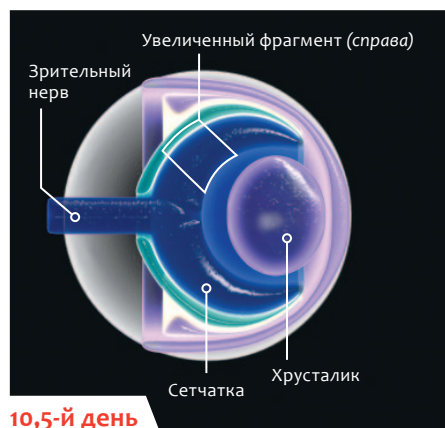
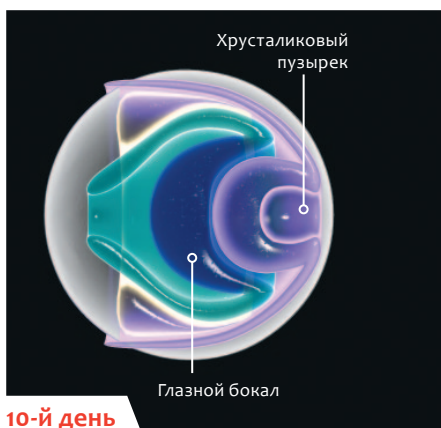
Применяя новый метод, мы поместили взвесь из отдельных клеток в небольшое количество жидкости и обнаружили, что они начали слипаться друг с другом. Из клеток, образующих эти маленькие скопления (примерно по 3 тыс. клеток каждое), можно в дальнейшем получить незрелые нервные клетки (клетки-

предшественницы), из которых позже формируются нейроны головного мозга. Потом клетки начинают подавать друг другу сигналы и через три-четыре дня спонтанно организуются в полую сферу, образованную одним слоем нейроэпителия. Мы назвали этот метод образования клеточного слоя *SFEBq*-культурой (бессывороточная плавающая культура эмбрионоподобных скоплений с быстрым слипанием).

В эмбрионе нейроэпителиальные клетки в итоге формируют конкретные мозговые структуры, после того как получают извне определенные химические сигналы. Один из таких сигналов запускает развитие промежуточного мозга, из которого формируются сетчатка и гипоталамус (отдел мозга, контролирующий пищевую мотивацию и многие другие жизненно важные процессы). Когда в лаборатории нам удалось получить сферы из клеток, мы попытались стимулировать их превращение в предшественников сетчатки, добавляя к *SFEBq*-культуре белковую смесь, содержащую вещества, выполняющие схожую функцию у эмбрионов.

После этого сферы оставались в плавающей культуре еще на несколько дней, и ткань эпителия сетчатки спонтанно изгибалась, формируя структуру, подобную главному пузырю. Более того, пузырь спонтанно менял конфигурацию: часть сферы втягивалась внутрь. Это приводило к созданию структуры, напоминающей бокал для коньяка, похожий на глазной бокал эмбриона. Как известно, у живых животных глазной бокал, сформированный из эмбриональных стволовых клеток, состоит из двух слоев: наружного эпителиального и внутреннего — собственно сетчатки.

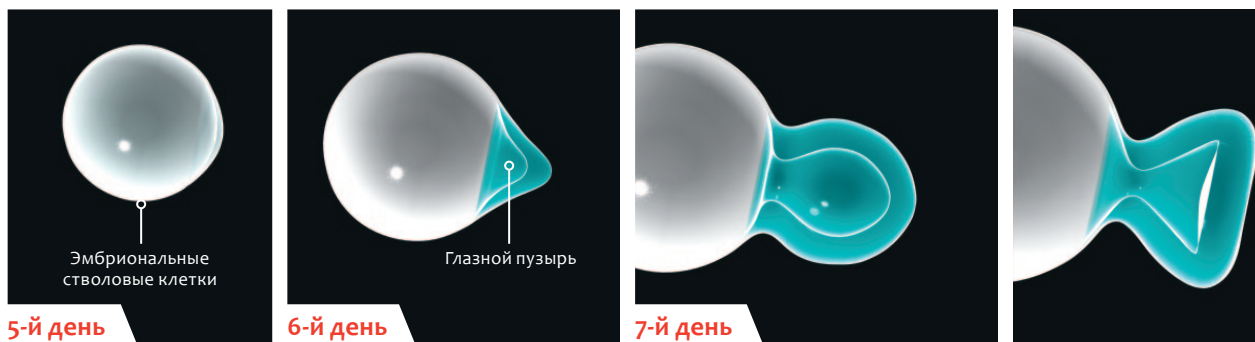
Другими словами, соединение отдельных стволовых клеток из культуры в пробирке приводит к поразительному результату — формированию упорядоченной структуры глаза. В отличие от ситуации внутри эмбриона здесь рядом с глазным бокалом не было ни хрусталика, ни роговицы. Это открытие дает однозначный ответ на давний вопрос, нуждается ли предшественник сетчатки во внешних воздействиях со стороны соседних клеток, например от клеток хрусталика. Формирование



РАЗВИТИЕ В ПРОБИРКЕ

Выращивание сетчатки из эмбриональных стволовых клеток повторяет развитие глаза зародыша в теле матери. Эта методика имеет огромную ценность для фундаментальных

исследований и поможет в создании новых методов лечения людей с нарушенным зрением. На иллюстрации показано, как эмбриональные стволовые клетки собираются



сетчатки, по крайней мере *in vitro*, — самоорганизующийся процесс, основанный на внутренней программе, которая присутствует в самих клетках.

Слои сетчатки

Нормальное развитие, которое наблюдается у эмбрионов, продолжает происходить и в пробирке. После двух дополнительных недель, проведенных в плавающей культуре, глазной бокал увеличивается до 2 мм в диаметре, и однослойный эпителий сетчатки становится, как и у эмбриона, слоистой структурой, содержащей все шесть типов клеток, присутствующих во взрослой сетчатке. Слоистая структура состоит из внешнего фоторецепторного слоя и внутреннего слоя нейронов, которые в норме соединяют глаз с мозгом. В середине, как и ожидалось, в несколько слоев располагаются вставочные нейроны. Как и предыдущие этапы, формирование этих слоев обусловлено внутренней программой, которая контролирует, какие клетки надо создавать и как организовывать их в трехмерную структуру.

Но наша работа не закончена. По-прежнему остаются вопросы, каким образом формируется глазной бокал и как шар из клеток превращается в упорядоченную структуру. Спонтанное возникновение сложной структуры из гомогенного комка материи сопровождается нарушением симметрии и происходит на протяжении всего эмбрионального развития. Если бы нарушения симметрии не было, то многочисленные клеточные деления не привели бы ни к чему, кроме недифференцированной массы клеток. Наша культура самоорганизующихся эмбриональных стволовых клеток, по-видимому, представляет собой идеальную экспериментальную модель для понимания этих механизмов эмбриогенеза млекопитающих.

Другой не до конца понятный вопрос — как эпителий сетчатки, первоначально представляющий собой просто слой клеток, программирует форму глазного бокала. В целом механические воздействия и изменение жесткости контролируют преобразования эпителиальной ткани. Изменяя направление воздействия и жесткость ткани в различных частях эпителия во время

формирования глазного бокала *in vitro*, мы обнаружили три события, приводящие к появлению определенной структуры ткани. Когда формируется глазной бокал, жесткость сетчатки уменьшается, гибкость увеличивается. В то же время клетки в местах соединения сетчатки с эпителием принимают клинообразную форму, и за счет их быстрого расширения сетчатка в итоге начинает втягиваться внутрь. Эти три шага необходимы для создания глазного бокала. Когда их смоделировали на компьютере, то получили уже знакомую нам форму глазного бокала.

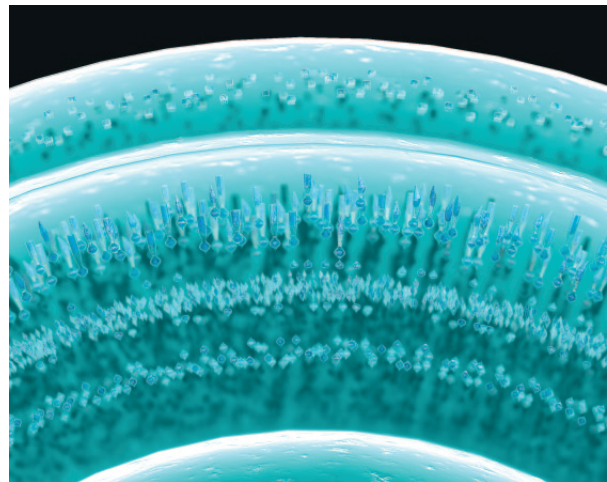
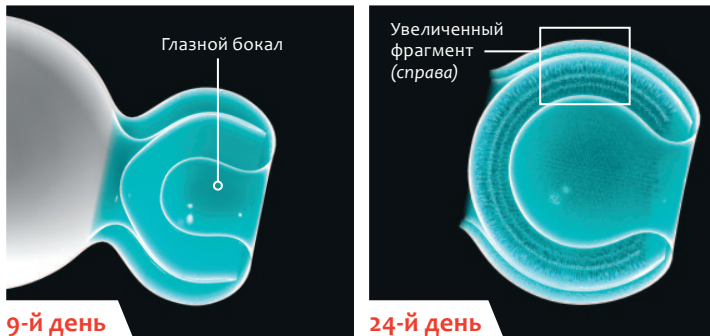
Улучшить зрение

Конечно, люди, слышавшие о наших исследованиях, интересуются, могут ли работы на мышиных эмбриональных стволовых клетках в итоге помочь людям с глазными заболеваниями. Мы достигли некоторого прогресса в этом направлении. В частности, в нашей лаборатории совсем недавно удалось создать глазной бокал и многослойную нервную ткань из человеческих эмбриональных стволовых клеток. Предполагается, что похожая методика будет применима к человеческим индуцированным плюрипотентным стволовым клеткам — «взрослым» клеткам, которые перепрограммированы таким образом, что могут быть использованы так же, как и эмбриональные стволовые клетки. Кроме того, мы изобрели улучшенный метод криоконсервации, позволяющий надежно сохранять в жидком азоте ткани человеческой сетчатки, полученные из эмбриональных клеток.

Благодаря данным исследованиям появляется перспектива медицинского применения тканей сетчатки. Например, мы сможем использовать искусственную сетчатку для изучения особенностей распространенных глазных заболеваний и создавать лекарства и генно-терапевтические методы для предотвращения разрушения сетчатки.

Наши исследования могут быть полезны при трех типах заболеваний сетчатки — макулодистрофии, пигментной дегенерации и глаукоме, от которых страдают миллионы людей во всем мире. Каждое из них вызывает

вместе, и уже через пять дней можно наблюдать ранние стадии формирования глазного пузыря.



проблемы в своем слое сетчатки. При макулодистрофии нарушается целостность пигментного эпителия, что приводит к повреждению фоторецепторов, преимущественно центральной зоны сетчатки. При пигментной дегенерации сетчатки постепенно, на протяжении многих лет, отмирают палочки (один из двух типов фоторецепторов). Первый симптом при возникновении этого заболевания — «куриная слепота» (нарушение сумеречного зрения). Позже пациент теряет большую часть зрительного поля, остается только маленькая центральная область. И, наконец, глаукома — повреждение нейронов, входящих в состав зрительных нервов и соединяющих сетчатку с центром обработки зрительной информации в затылочной зоне коры головного мозга.

Из трех перечисленных заболеваний макулодистрофия, по-видимому, наиболее проста для лечения с помощью клеточной заместительной терапии. Человеческие эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки могут относительно легко создавать пигментный эпителий сетчатки как при традиционном способе выращивания культуры клеток, так и при выращивании по нашей методике. Пилотные клинические испытания этих клеток уже начались в США, и такие же работы планируются в других странах. В этих исследованиях клетки пигментного эпителия, полученные из стволовых клеток, с помощью тонкой иглы вводятся в пространство между пигментным эпителием и фоторецепторным слоем, чтобы заменить по крайней мере часть поврежденной ткани.

В ходе проведения клеточной терапии при пигментной дегенерации сетчатки возникнут дополнительные технические сложности. Наша методика, в отличие от общепринятой, позволяет получать фоторецепторы — палочки, которые можно использовать для трансплантации. Однако чтобы трансплантация стала возможной, прежде нужно решить другую важную проблему. В отличие от такой простой ткани, как эпителий, фоторецепторы должны еще встроиться в нервную систему глаза, а именно — они должны соединиться с другим типом

чувствительных клеток, биполярными клетками, и мы до сих пор не знаем, как обеспечить создание такой связи. В случае успешного проведения трансплантации фоторецепторов поможет людям с тяжелой формой заболевания хотя бы частично вернуть зрение.

Из трех перечисленных выше заболеваний глаукома наиболее сложно поддается лечению с помощью клеточной терапии. Необходимые нейроны можно получить из эмбриональных стволовых клеток. Однако в организме после рождения прорастание зрительного нерва подавляется, и никому до сих пор не удалось понять, каким образом можно получить нужные аксоны (отростки, из которых состоит зрительный нерв и по которым сигнал идет в мозг), чтобы соединить глаз с мозгом.

Мы выяснили, что получение ткани из эмбриональных стволовых клеток дает гораздо больше возможностей, чем искусственные технологии культивирования тканей, при которых клетки помещают на субстрат в форме куска кожи или пузыря. Теперь надо набраться терпения и попытаться понять, что развивающиеся клетки могут рассказать нам об интригующих процессах, лежащих на пути превращения от одиночной клетки к такому сложному органу, как глаз.

Перевод: М.С. Багоцкая

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Self-Organizing Optic-Cup Morphogenesis in Three-Dimensional Culture. Mototsugu Eiraku et. al. in Nature, Vol. 472, pages 51–56; April 7, 2011.
- Embryonic Stem Cell Trials for Macular Degeneration: A Preliminary Report. Steven D. Schwartz et al. in Lancet, Vol. 379, No. 9817, pages 713–720; February 25, 2012.
- Self-Formation of Optic Cups and Storable Stratified Neural Retina from Human ESCs. Tokushige Nakano et al. in Cell Stem Cell, Vol. 10, No. 6, pages 771–785; June 14, 2012.
- Больше про Йошики Сасаи и работу в его лаборатории в Кубе, Япония, см. по адресу: ScientificAmerican.com/nov2012/sasai