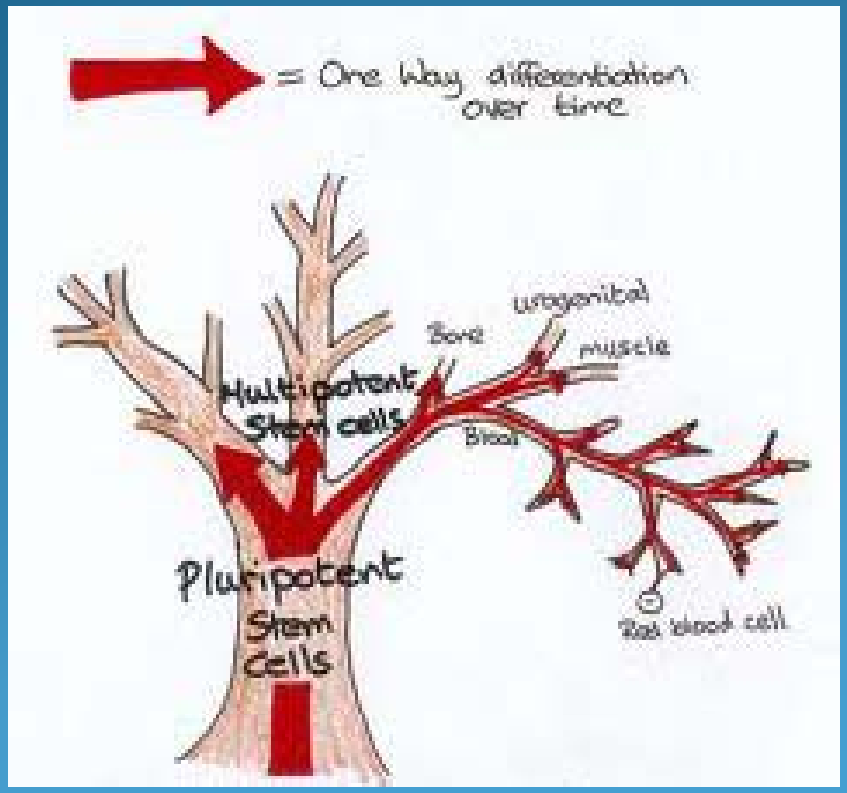
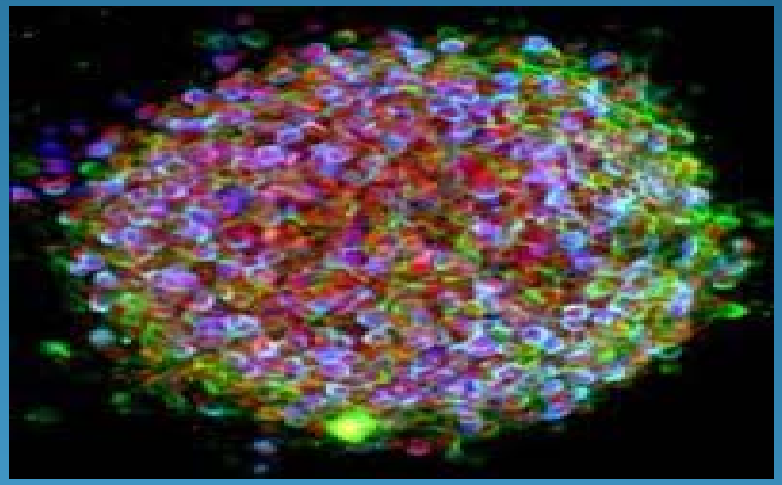
Induced pluripotent stem cells (iPS cells)





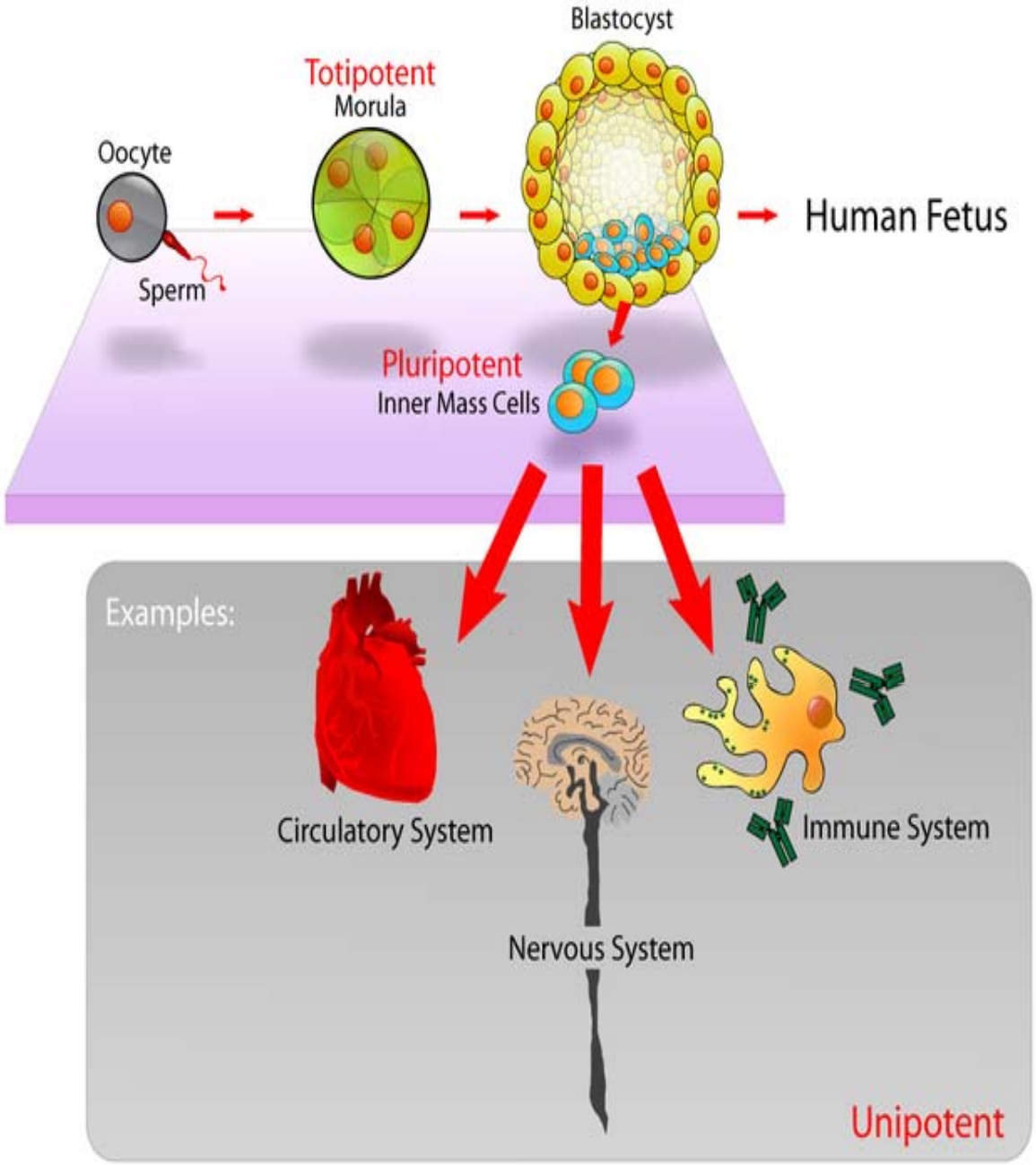
By Phinidda Cha-umphol, D.V.M., M.Sc.

Veterinary Medicine

Mahanakorn University of Technology

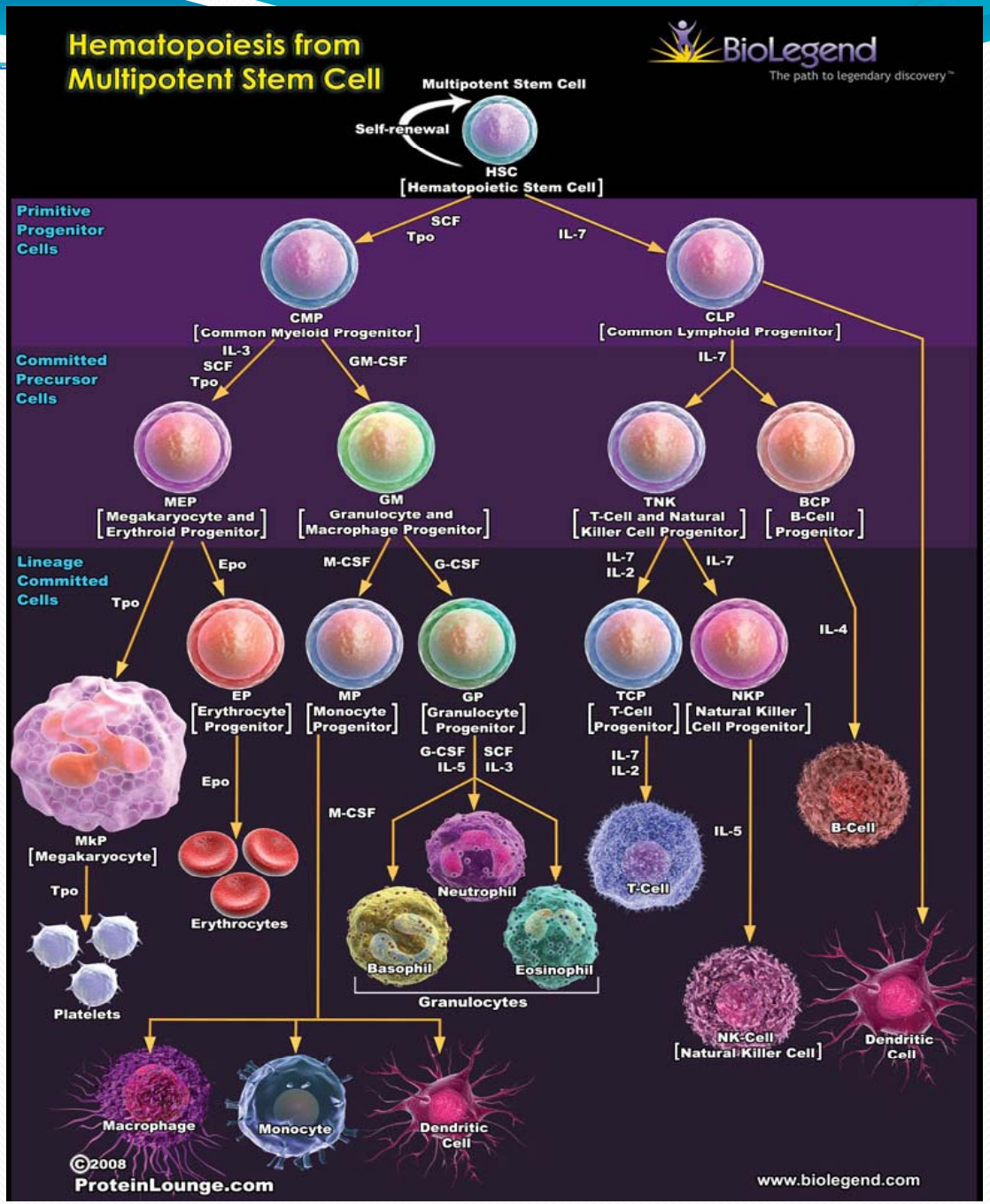
Cell Potency

- **Totipotency**
  เซลล์พัฒนาแบบไม่จำกัด
- **Pluripotency**
  เซลล์พัฒนาได้หลากหลายชนิดของเนื้อเยื่อ
- **Unipotency**
  เซลล์พัฒนาไปเป็นเซลล์จำเพาะ
- **Multipotency**
- **Oligopotency**



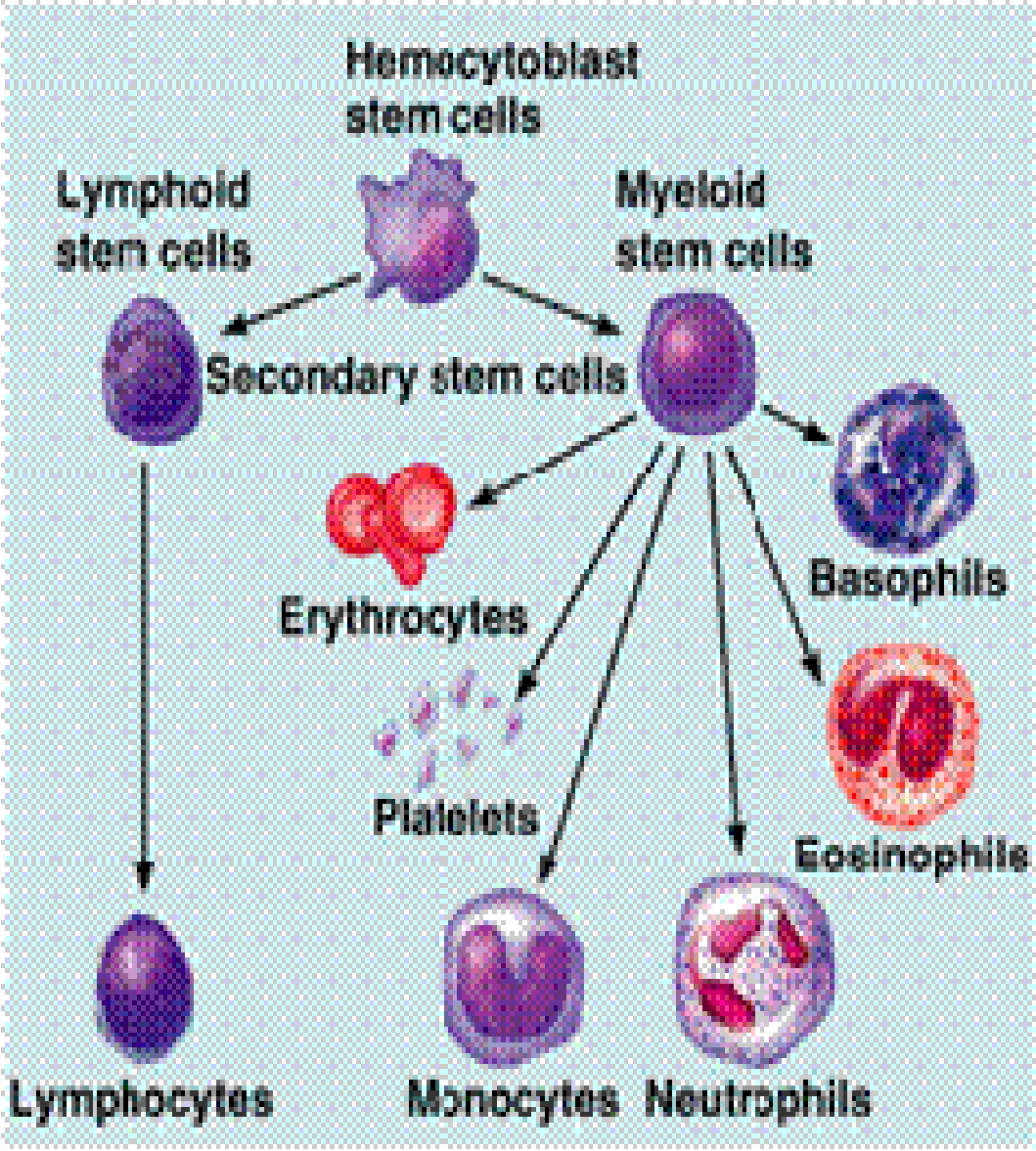
Multipotent stem cell

เป็น **progeniter cell** ที่สามารถให้เซลล์ได้หลากหลายชนิดแต่ยังคงอยู่ในสายงานจำกัด เช่น **Hematopoietic cell**

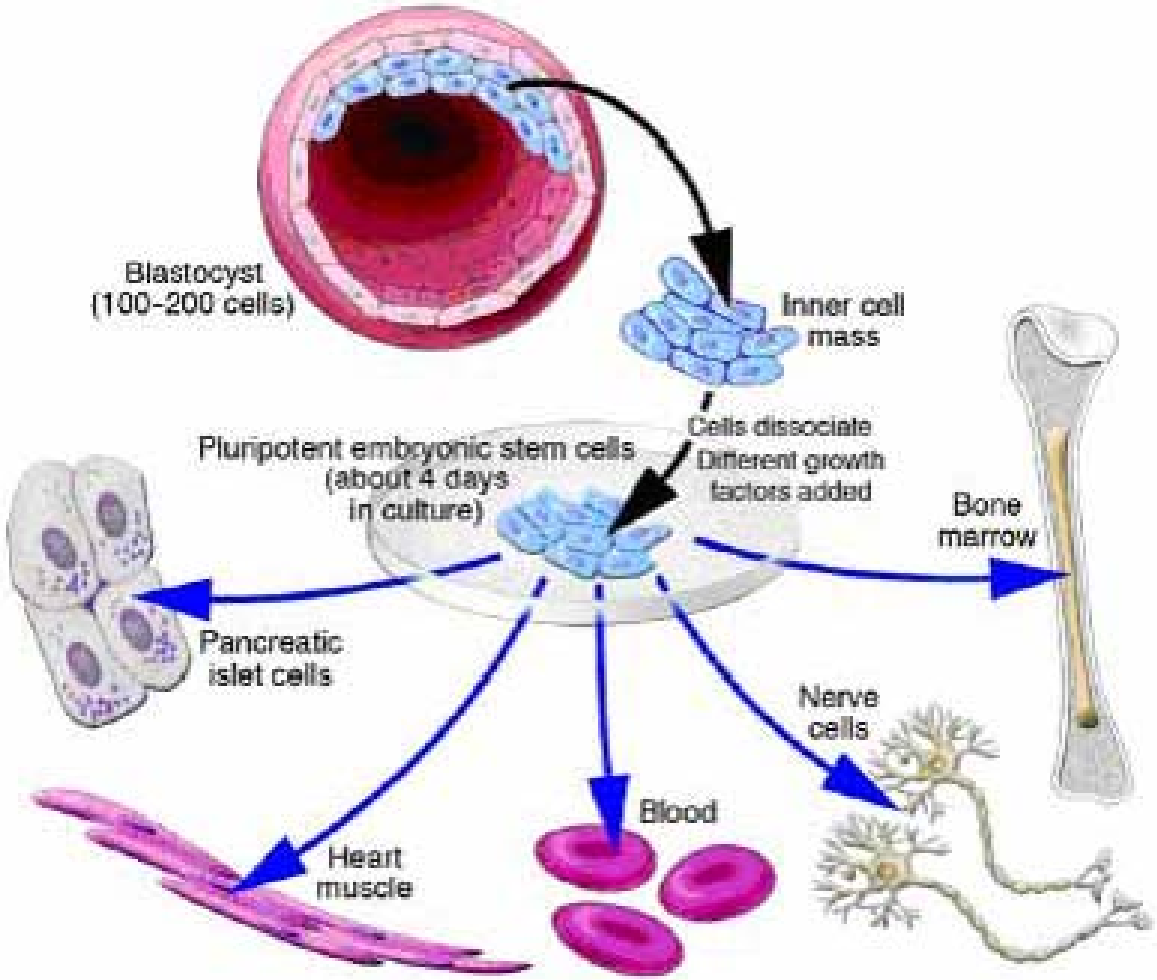


Oligopotent stem cell

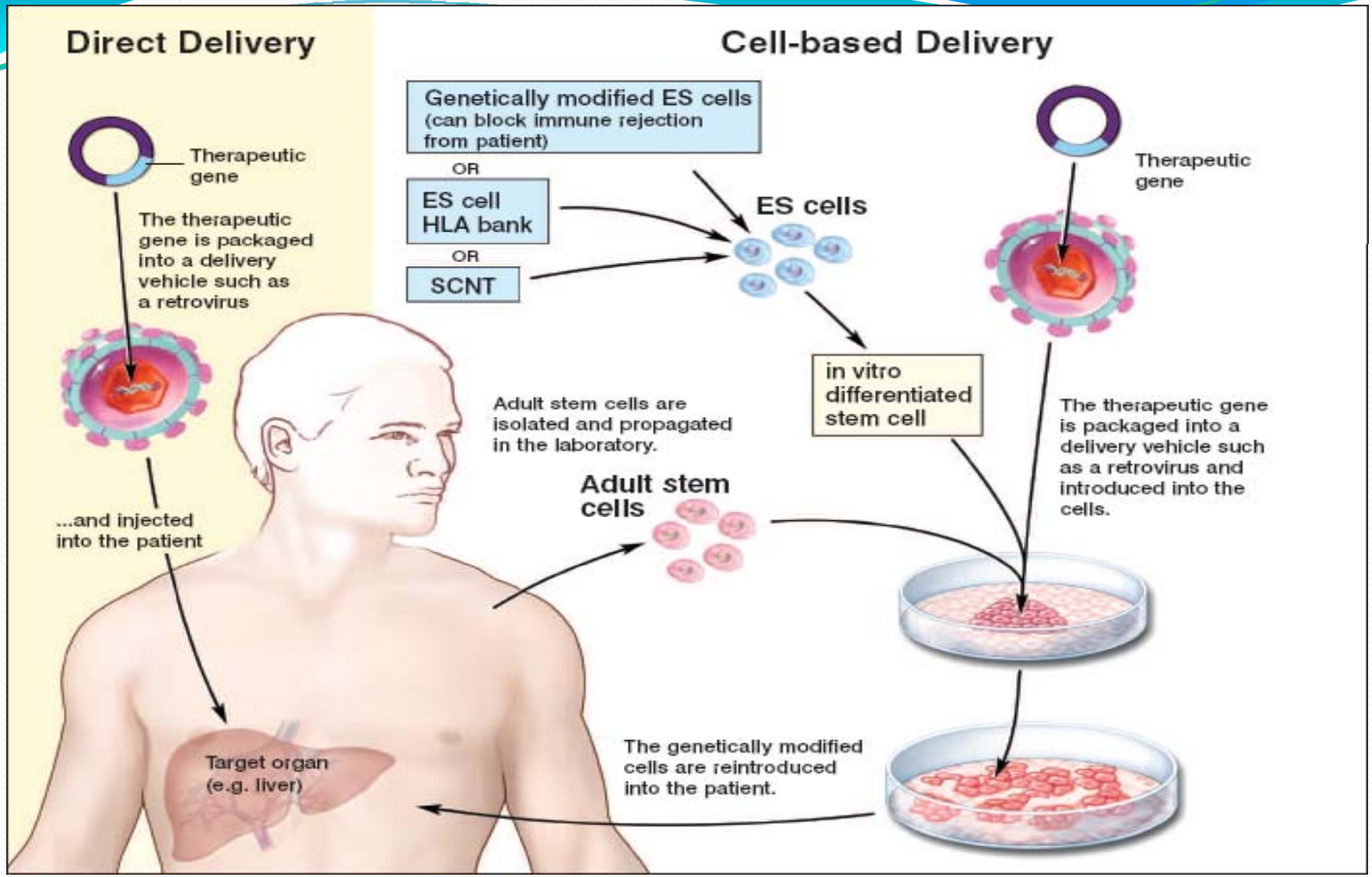
เป็น progenitor cell แต่ให้แค่ชนิดน้อย ๆ เช่น lymphoid cell, Myeloid cell



Pluripotent stem cell (Embryonic stem cell = ES cells)



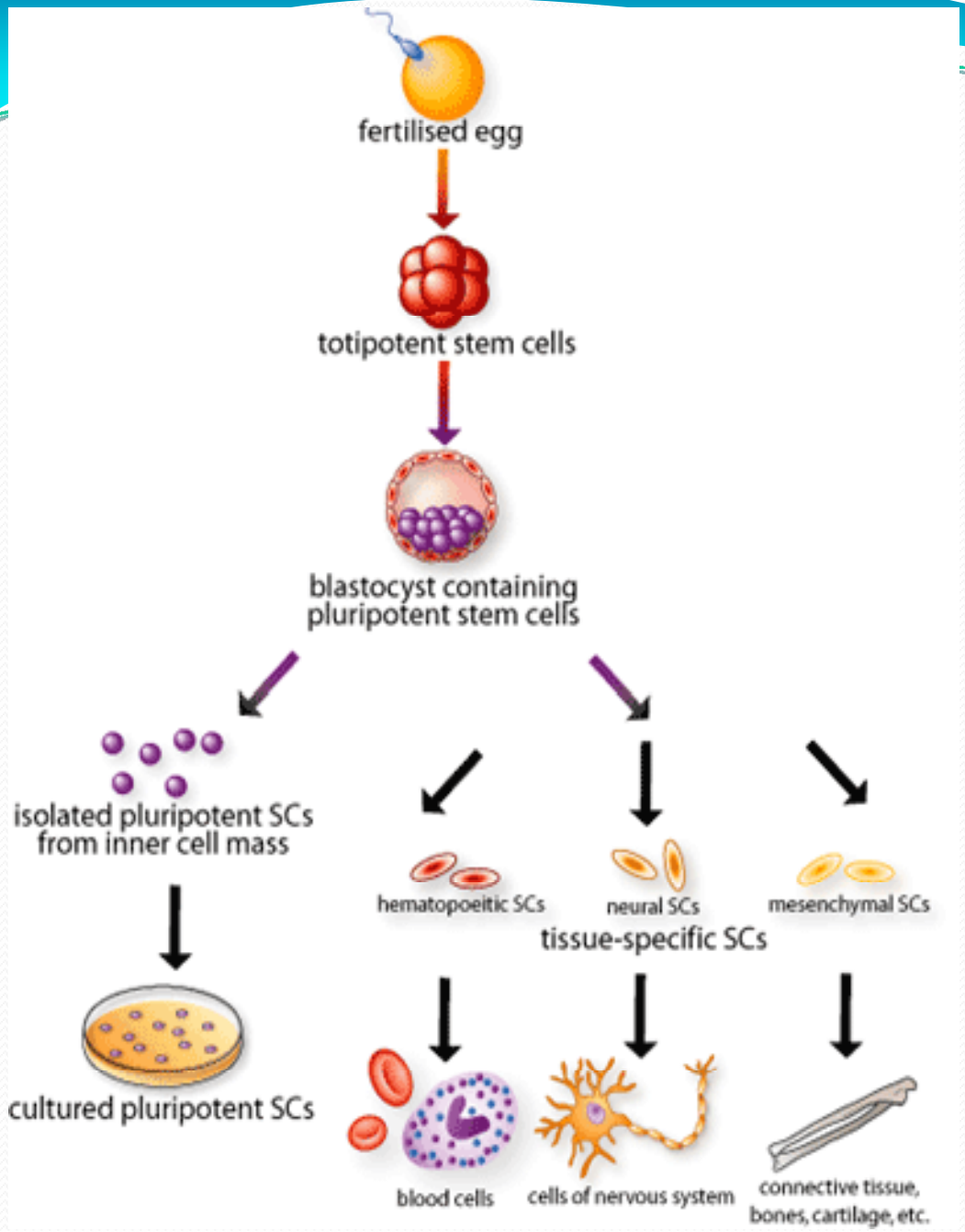
Pluripotent stem cells and tissue replacement therapy



diabetes (lost of b-islet cells), immunodeficiency (loss of cell mediated immune response), Parkinson's disease (lost of dopaminergic neuron).

การใช้ ES cells มารักษาโรค

- The first ACT trial is testing the safety of hESC-derived retinal cells to treat patients with an eye disease called Stargardt's Macular Dystrophy (SMD).
- The second ACT trial is testing the safety of hESC-derived retinal cells to treat patients with age-related macular degeneration. On July 14, 2011, ACT announced that doctors at UCLA had treated one patient in each of its clinical trials.

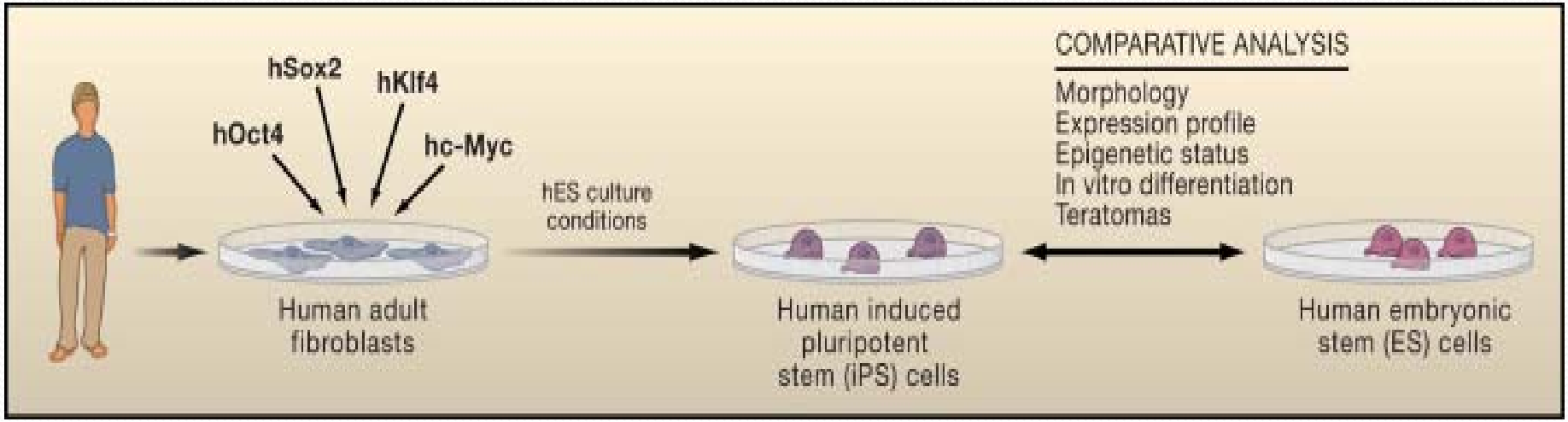


ไม่ได้รับการยอมรับ ในแง่จริยธรรม

งานวิจัย...เพื่อหาอะไรมารองรับที่ลักษณะเหมือนหรือคล้ายกันมากที่สุด

.... **Induced PS Cells**

Pluripotency induction: cell fate change by expression of transcription factors



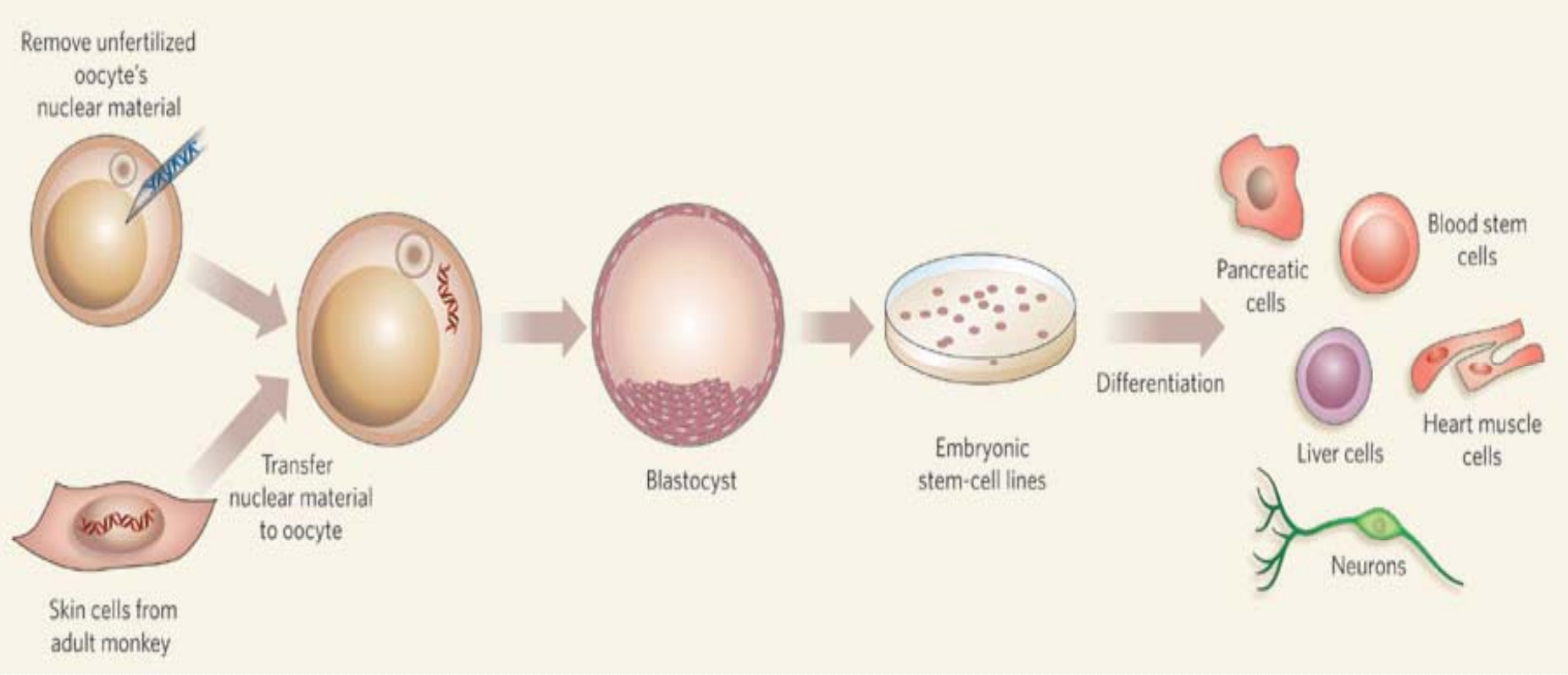
iPS Cells = iPSCs

ดูวิดีโอเพิ่มเติม

Research

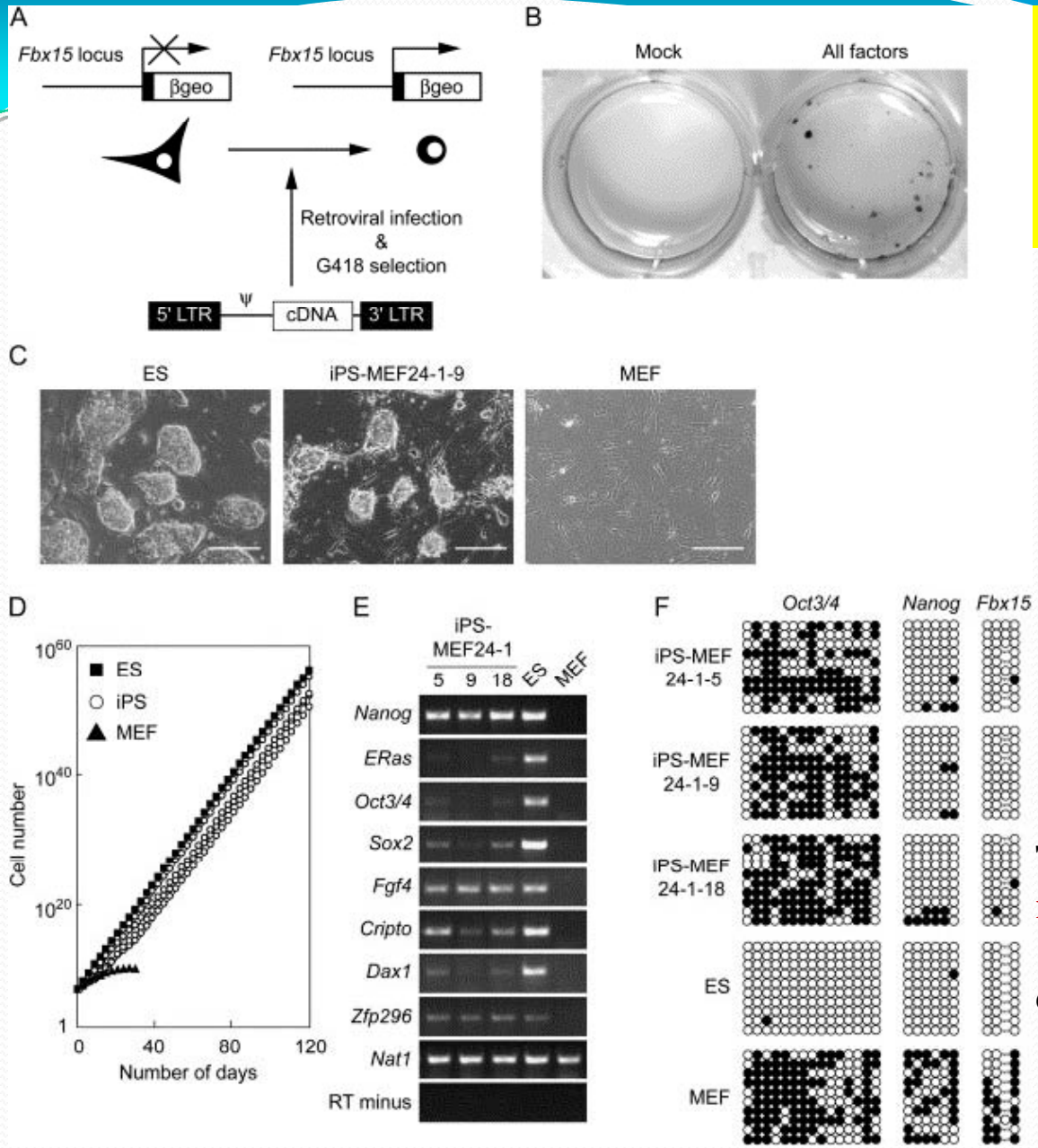
- Ectopic expression of transcription factors can reprogram cells into another lineage: Gata1 convert lymphoid/myeloid cells into Mega/Erythroid cells (Iwasaki and Akashi, Immunity 2003)
- Takahashi and Yamanaka reported that pluripotent stem cells can be established by 4 transcription factors selected from a list of 24 mouse ES enriched genes: Oct4, Sox2, Klf4 and Myc. (Takahashi and Yamanaka, cell, 2006)
- Reports from the laboratories of Thomson (Yu and Thomson, Science 2007), Yamanaka (Takahashi and Yamanaka, Cell 2007), Daley (Park, Nature 2008) and Plath (Lawry and Plath, 2008) reproduced the iPS phenomenon in human dermal fibroblasts by ectopic expression of four embryonic stem cell specific transcription factors.

Embryonic stem cell, SCNT-embryonic stem cells and other reprogramming



somatic cell nuclear transfer =SCNT

Takahashi and Yamanaka paper, Cell, 2006



24 candidate factors:
Ecat1, Dpp5(Esg1), Fbx015, Nanog, ERas,
Dnmt3l, Ecat8, Gdf3, Sox15, Dppa4, Dppa2,
Fthl17, Sall4, Oct4, Sox2, Rex1, Utf1, Tcl1,
Dppa3, Klf4, b-cat, cMyc, Stat3, Grb2

Transcription factors are delivered by retroviral vectors and the colonies became visible by day 16

History about iPS Cells

Year	Group	Strategy	Contribution
2006	Yamanaka et al.	First to demonstrate	iPS cells were first generated using retroviruses and the four key pluripotency genes; failed to produce viable chimera.
2007	Yamanaka et al.	Different Selection Method	iPS cells were generated again using retroviruses, but this time produced viable chimera (they used different selection methods).
2007	Thomson et al.	Vector	iPS cells were generated again using lentiviruses, and again produced viable chimera.
2008	Melton et al.	Small Compound Mimicking	Using HDAC inhibitor valproic acid compensates for C-Myc.
2008	Ding et al.	Small Compound Mimicking	Inhibit HMT with BIX-01294 mimics the effects of Sox2, significantly increases reprogramming efficiency.
2008	Hochedlinger et al.	Vector	The group used an adenovirus to avoid the danger of creating tumors; however, this led to lower efficiency.
2008	Yamakana et al.	Vector	The group demonstrated reprogramming with no virus (they instead used a plasmid)
2009	Ding et al.	Proteins	Used recombinant proteins ; proteins added to cells via arginine anchors was sufficient to induce pluripotency.
2009	Freed et al.	Vector	Adenoviral gene delivery reprogrammed human fibroblasts to iPS cells.
2009	Bleiloch et al.	RNA	Embryonic stem-cell specific microRNAs promted iPS reprogramming.
2011	Morrisey at al.	RNA	Demonstrated another method using microRNA that improved the efficiency of reprogramming to a rate similar to that demonstrated by Ding.

iPS cells generation in patient fibroblasts

- Parkinson's disease (Wernig and Jaenisch, 2008, Maehr and Melton PNAS 2009).
- Amyopathic Lateral Sclerosis, (Dimos and Eggan Science 2008)
- Type I diabetes (Maehr and Melton PNAS 2009)
- ADA-SCID, SBDS, Gaucher disease, Duchenne and Becker Muscular dystrophin, Parkinson's disease, Huntington disease, JDM, Down syndrome, Lesch-Nyhan syndrome. (Park and Daley Cell 2008).

iPS cells generation from other cell types

- Blood cells (Loh and Daley 2009). B-cells (Hanna and Jaenisch Cell 2008)
- Blood stem cells (Emiinli and Hochedlinger Nat Genet 2009)
- Pancreatic β-cells (Stadtfeld and Hochedlinger Cell Stem Cell2008)
- Hepatic and gastric endoderm (Aoi and Yamanaka Science 2008)
- Neural stem cells (Kim and Scholar, Nature 2008)

Developments toward the "safer" iPS generation

Reduced number of transcription factor use:

- No myc: Nakagawa and Yamanaka, Nat Biotechnol 2008, Wernig and Jaenisch, Cell Stem Cell 2009
- No Sox2: by adding GSK-3 inhibitor, Zhou and Ding, Stem cell 2009, in neural stem cell, Kim and Scholer Nature 2008
- No Klf4/myc, by addition of Valproic acid : Huangfu and Melton, Nat Biotech 2008
- No Myc and Sox2, by addition of BIX01294 and PD0325901 (Zhou and Ding, Cell Stem Cell 2008).
- Klf4 only by adding Kenpaullone (Lyssiotis and Jaenisch, PNAS 2009)

Specific pathways:

- TGFb inhibitor replace Sox2 and cMyc and induce Nanog (Maherali and Hochedlinger, Curr Biol 2009, Ichida and Eggan 2009)
- p53 inhibition augments iPS efficiency (Hong and Yamanaka, Nature 2009,Utikal and Hochedlinger Nature 2009, Marion and Blastco Nature 2009, Li and Serrano Nature 2009, Kawamura and Belmonte 2009)
- Hypoxia – Yoshida and Yamanaka Cell Stem Cell 2009
- WNT signaling stimulates reprogramming efficiency (Marsonm, Jaenisch Cell Stem Cell 2008)

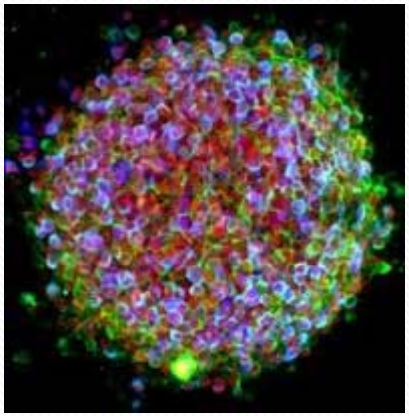
Better vectors:

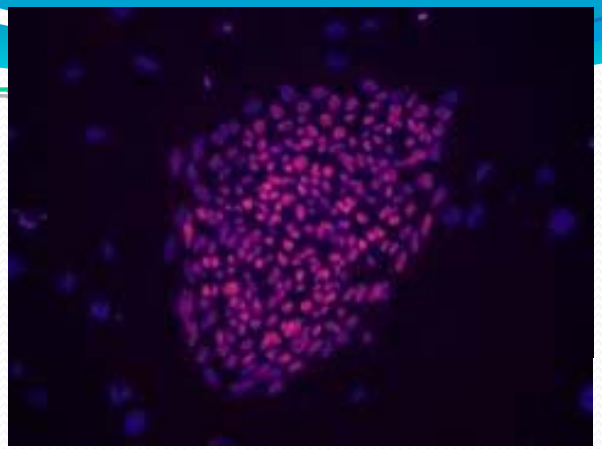
- Drug Inducible vectors: Wernig and Jaenisch, Nat Biotechnol 2008, Hockemeyer and Jaenisch, Cell Stem Cell 2008
- Non-integrating vectors : adenovirus in hepatocyte (Stadtfeld and Hochedlinger Science 2008)
- Self-inactivating vectors: Piggy Bac (Yusa and Bradley, Nat Methods 2009)
- multi-cistronic vectors: single lentiviral cassette (Carey and Jaenisch, PNAS 2009, Sommer and Mostoslavsky, Stem Cell 2009)
- Vector free (episome Yu and Thomson, Science 2009; direct transfection Okita and Yamanaka Science 2008)
- Direct protein induction: poly arginine modification of recombinant protein (Zhou and Ding, Cell Stem Cell 2009),

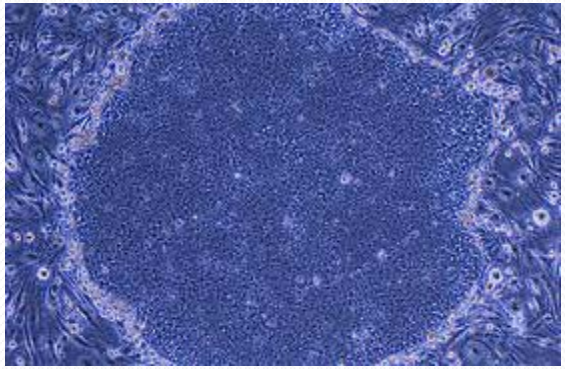
ความสำเร็จของการค้นพบอินดิวซ์พลูริโพเทนท์สเต็มเซลล์ (Induced Pluripotent Stem Cells)

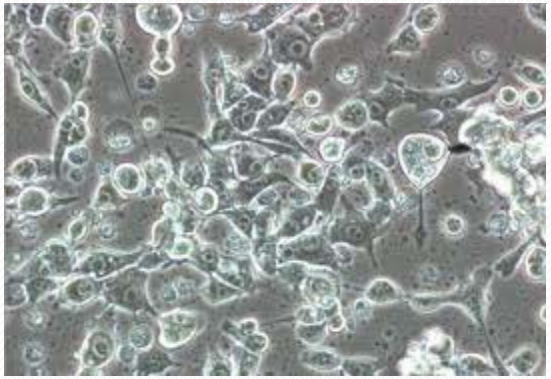
- ความสำเร็จของการค้นพบอินดิวซ์พลูริโพเทนท์สเต็มเซลล์ (Induced Pluripotent Stem Cells) ซึ่งเป็นเซลล์ต้นตอชนิดใหม่ที่กำลังเป็นที่จับตามองในการนำมาใช้ทดแทนเซลล์ต้นตอจากตัวอ่อนมนุษย์ อินดิวซ์พลูริโพเทนท์สเต็มเซลล์ หรือไอพีเอสเซลล์ (Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells) คือการนำเซลล์ต้นตอจากเซลล์ที่เจริญวัยเต็มที่แล้วมาเปลี่ยน (Reprogramming) ให้มีคุณสมบัติเหมือนกับเซลล์ต้นตอจากตัวอ่อนมนุษย์ ไอพีเอสเซลล์มีข้อได้เปรียบเซลล์ต้นตอจากตัวอ่อนมนุษย์อยู่หลายประการ เป็นต้นว่านักวิทยาศาสตร์สามารถใช้ไอพีเอสเซลล์ที่ได้รับมาจากผู้ป่วยด้วยโรคที่เกี่ยวกับการทำลายของเซลล์ประสาทในสมอง (Neurodegenerative Diseases) มาทดลองเพิ่มจำนวนเป็นเซลล์ประสาทในห้องทดลองเพื่อศึกษาหาต้นเหตุของอาการป่วยนั้นได้
- นักวิทยาศาสตร์สามารถใช้เทคโนโลยีไอพีเอสในการสร้างเซลล์ต้นตอจากผู้ป่วยที่ป่วยจากโรคบางชนิด ในขณะที่เทคโนโลยีเซลล์ต้นตอจากตัวอ่อนมนุษย์ไม่สามารถทำได้หรือทำได้ยาก เนื่องจากนักวิทยาศาสตร์ไม่สามารถระบุได้ถึงสถานภาพสุขภาพหรือร่างกายของตัวอ่อนในขณะที่ยังไม่เกิดได้ ดังนั้นไอพีเอสเทคโนโลยีจึงเป็นเครื่องมือของงานวิจัยที่มีประสิทธิภาพอย่างยิ่ง ในการช่วยให้นักวิจัยศึกษาหาสาเหตุและกระบวนการการเกิดโรคที่ในอดีตไม่สามารถศึกษาได้
- เมื่อเร็วนี้ ๆ บริษัทเซลลูลาร์ไดนามิคส์อินเตอร์เนชั่นแนล หรือซีดีไอ (Cellular Dynamics International (CDI)) ซึ่งอยู่ในเมดิสัน ได้ผลิตเซลล์ต้นตอเพื่อจำหน่ายเป็นแห่งแรกของโลก เซลล์ที่จำหน่ายนี้เป็นเซลล์ต้นตอจากตัวอ่อนที่จะเปลี่ยนไปเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ โดยซีดีไอได้จำหน่ายเซลล์ต้นตอนี้ให้กับบริษัทผู้ผลิตยาเพื่อนำไปใช้ในการทดสอบคุณสมบัติและความเป็นพิษของยา อย่างไรก็ตามทางซีซีโอ (Chief Commercial Officer (CCO)) ของบริษัทซีดีไอ นายคริส เคนดริค ปาร์คเกอร์ เชื่อว่าในระยะเวลาอันใกล้นี้บริษัทจะเปลี่ยนมาผลิตไอพีเอสเซลล์เพื่อจำหน่ายให้กับบริษัทผลิตยาและนักวิจัยแทน

iPS Cells









Cardiomyocyte จาก VDO

ข้อจำกัดของ iPS Cells

- *Science 21 December 2007:*
  Vol. 318 no. 5858 pp. 1920-1923
  DOI: 10.1126/science.1152092
- Report
- **Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin**
- Jacob Hanna1, Marius Wernig1, Styliani Markoulaki1, Chiao-Wang Sun2, Alexander Meissner1, John P. Cassady1,3, Caroline Beard1, Tobias Brambrink1, Li-Chen Wu2, Tim M. Townes2,* and Rudolf Jaenisch1,3,*

- It has recently been demonstrated that mouse and human fibroblasts can be reprogrammed into an embryonic stem cell–like state by introducing combinations of four transcription factors. However, the therapeutic potential of such induced pluripotent stem (iPS) cells remained undefined. By using a humanized sickle cell anemia mouse model, we show that mice can be rescued after transplantation with hematopoietic progenitors obtained in vitro from autologous iPS cells. This was achieved after correction of the human sickle hemoglobin allele by gene-specific targeting. Our results provide proof of principle for using transcription factor–induced reprogramming combined with gene and cell therapy for disease treatment in mice. The problems associated with using retroviruses and oncogenes for reprogramming need to be resolved before iPS cells can be considered for human therapy.

Summary

- Reprogramming patient cells into a pluripotent state provides the best matching and the most abundant source for tissue regeneration.
- Among all different methods, the most achievable is direct reprogramming, by introducing pluripotency associated transcription factors into primary tissue culture.
- Direct reprogramming generates induced pluripotent stem cells that are functionally and phenotypically identical to embryonic stem cells.
- "Safer" protocol in generating less tumorigenic induced pluripotent stem cells are rapidly evolving.
- More works are needed in order to employ iPS cells for tissue replacement therapeutics.