

ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

Ανασκόπηση των εφαρμογών των iPSCs και ο ρόλος τους στον καρκίνο

Γενικά, ο καρκίνος συνιστά μια ετερογενή ομάδα ασθενειών με κύριο χαρακτηριστικό την ανεξέλεγκτη κυτταρική ανάπτυξη. Παρά τη μεγαλύτερη κατανόηση των βιολογικών μηχανισμών του υπέρμετρου πολλαπλασιασμού, της εισβολής και της μετάστασης των καρκινικών κυττάρων, που υπάρχει σήμερα, ο καρκίνος εξακολουθεί να αποτελεί μια διαδικασία πολλαπλών σταδίων ανάπτυξης και εξέλιξης, η οποία δεν είναι πλήρως κατανοητή. Για τον λόγο αυτόν καθίσταται επιτακτική ανάγκη η χρήση νέων μεθόδων τόσο για τη μελέτη του, όσο και για την εύρεση καινοτόμων δοκιμασιών, με σκοπό την καλύτερη διάγνωση και θεραπεία του. Τη λύση στην παραπάνω πρόκληση φαίνεται να δίνουν τα επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (induced pluripotent stem cells, iPSCs), τα οποία σε συνδυασμό με τις πρόσφατες εξελίξεις στη βιο-μηχανική, στην επεξεργασία και καλλιέργεια ιστών και στην επεξεργασία του γονιδιώματος, αποτελούν μια νέα ευκαιρία για τη μελέτη του καρκίνου. Τα iPSCs αναδεικνύονται από τα πλέον εύχρηστα εργαλεία στη βιοϊατρική έρευνα και στις φαρμακολογικές μελέτες. Ο ογκογονικός μετασχηματισμός και ο επαναπρογραμματισμός σωματικών κυττάρων είναι διεργασίες πολλαπλών σταδίων που μοιράζονται ορισμένα κοινά χαρακτηριστικά και ως εκ τούτου τα iPSCs τα οποία παράγονται από καρκινικά κύτταρα μπορούν να μας βοηθήσουν να κατανοήσουμε καλύτερα τους μοριακούς μηχανισμούς που διέπουν την έναρξη και την εξέλιξη των καρκίνων του ανθρώπου. Οι άμεσες εφαρμογές των iPSCs περιλαμβάνουν τη διαλογή φαρμάκων, τις τοξικολογικές δοκιμές, την ταυτοποίηση βιοδεικτών και τη βιο-μηχανική αντικατάσταση ιστών. Πρόσφατα μάλιστα, η ανάπτυξη εμβολίων που βασίζονται σε ογκοεμβρυϊκά αντιγόνα με χρήση αυτόλογων επαγόμενων βλαστικών κυττάρων παρουσίασε σημαντικό θεραπευτικό δυναμικό. Σκοπός λοιπόν της παρούσας ανασκόπησης είναι η εξέταση των δυνατοτήτων που προσφέρουν τα iPSCs στην έρευνα για τον καρκίνο, στους περιορισμούς, καθώς και στις νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις στις οποίες μπορούν να συμβάλλουν.

1. iPSCs, ESCs ΚΑΙ ΟΜΟΙΟΤΗΤΕΣ ΜΕ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ

Ο επαναπρογραμματισμός των σωματικών κυττάρων σε επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (induced pluripotent stem cells, iPSCs), δηλαδή σε κύτταρα που μπορούν να παραμείνουν σε μια αυτοτροφοδοτούμενη πολυδύναμη κατάσταση όπως και τα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα (embryonic stem cells, ESCs), αποτελεί μια από τις πλέον καινοτόμες μεθόδους στη βιοϊατρική έρευνα.¹ Μπορεί τα ανθρώπινα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα να αποτελούν ακόμη μία από τις πλέον υποσχόμενες μεθόδους, παρ' όλα αυτά η χρήση τους ενέχει ηθικά διλήμματα, καθιστώντας έτσι τα iPSCs μια πιο ρεαλιστική εναλλακτική λύση.² Τα iPSCs παράγονται συνήθως από ιστούς που λαμβάνονται από υγιείς δότες και ασθενείς, καθώς και από κυτταρικούς

τύπους σε διαφορετικά στάδια οντογένεσης και ανάπτυξης.³ Δημιουργούνται χάρη στην τροποποίηση των σωματικών κυττάρων μέσω της παροδικής εξωγενούς έκφρασης ενός συνόλου παραγόντων μεταγραφής (transcription factors, TFs) και της επιγενετικής επανενεργοποίησης των ενδογενών γονιδίων πολλαπλής ισχύος.^{1,2} Επί πλέον, τα εν λόγω κύτταρα φέρουν δύο μοναδικές ιδιότητες: όχι μόνο έχουν την ικανότητα να διατηρούνται επ' αόριστον σε καλλιέργεια σε μια μη διαφοροποιημένη πολυδύναμη κατάσταση αλλά και να κατευθυνθούν προς διαφοροποίηση σε οποιονδήποτε τύπο κυττάρου του ανθρώπινου σώματος.¹

Τα καρκινικά κύτταρα, από την άλλη, μοιράζονται πολλά κυτταρικά και μοριακά χαρακτηριστικά με τα ESCs. Μερικά από τα χαρακτηριστικά αυτά είναι ο ταχύς ρυθμός πολ-

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2021, 38(4):459-470
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2021, 38(4):459-470

Μ.Δ. Κότσαρη,
Σ. Παπακωστοπούλου,
Ε.Π. Κοκκινογένης,
Μ. Δελή,
Π. Ζουμπουρλής,
Μ. Γουλιελμάκη,
Β. Ζουμπουρλής

Μονάδα Βιοϊατρικών Εφαρμογών,
Ινστιτούτο Χημικής Βιολογίας,
Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα

Review of the applications of iPSCs
and their role in cancer

Abstract at the end of the article

Λέξεις ευρετηρίου

Επαγόμενα πολυδύναμα βλαστικά
κύτταρα
Κυτταρικός επαναπρογραμματισμός
Μετασχηματισμός
Μοντελοποίηση ασθενειών
Ογκογένεση

Υποβλήθηκε 17.11.2020
Εγκρίθηκε 14.12.2020

λαπλασιασμού, η αυξημένη δραστηριότητα της τελομεράσης, τα αυξημένα επίπεδα ογκογονιδίων όπως το *c-myc*, οι υπογραφές microRNAs και η επιγενετική κατάσταση. Επίσης, μετά από μακροχρόνια καλλιέργεια, οι κυτταρικές σειρές ESCs θα συνεχίσουν να πολλαπλασιάζονται και να εκφράζουν υψηλά επίπεδα δραστηριότητας τελομεράσης, επιτρέποντάς τους έτσι να διατηρήσουν το μήκος των τελομερών τους και κατά συνέπεια να εξασφαλίσουν την κυτταρική αθανασία. Αυτά τα χαρακτηριστικά των ESCs ομοιάζουν με τα χαρακτηριστικά των καρκινικών κυττάρων που διαθέτουν «διαρκή πολλαπλασιαστική σηματοδότηση» και «αντιγραφική αθανασία».⁴

Το 2006 χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά τα γονίδια *oct4*, *sox2*, *klf4* και *c-myc* (OSKM), με σκοπό τον επαναπρογραμματισμό ινοβλαστών ποντικού στρώνοντας έτσι τον δρόμο για τον επαναπρογραμματισμό ανθρώπινων σωματικών κυττάρων.² Τα iPSCs που επαναπρογραμματίζονται από τους σωματικούς ιστούς ενός ασθενούς μοιράζονται σχεδόν τα ίδια προφίλ γονιδιακής έκφρασης με τα ESCs του ασθενούς και επί πλέον, όπως και τα ESCs, μοιράζονται κοινές γενετικές και μεταγραφικές υπογραφές με τα καρκινικά κύτταρα. Το *c-myc* είναι ένα πολύ γνωστό ογκογονίδιο και οι άλλοι τρεις παράγοντες είναι επίσης γνωστό ότι υπόκεινται σε ρύθμιση σε πολλαπλούς τύπους καρκίνου. Πράγματι, μια μελέτη έδειξε σημαντική υπερέκφραση τουλάχιστον ενός από αυτούς τους παράγοντες σε 18 από τους 40 τύπους καρκίνου που αξιολογήθηκαν. Επίσης, τα εν λόγω γονίδια σχετίζονται με την καρκινική εξέλιξη, καθώς και με κακή πρόγνωση σε ορισμένους τύπους καρκίνου, υποδηλώνοντας ότι η στόχευση αυτών των γονιδίων μπορεί να έχει θεραπευτικά οφέλη.⁴

2. iPSCs ΚΑΙ ΜΟΝΤΕΛΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

2.1. Τρέχοντα μοντέλα iPSCs

Η έρευνα σχετικά με τα iPSCs έχει αυξηθεί εκθετικά τα τελευταία έτη, μαζί με την τεχνολογική πρόοδο στις μεθοδολογίες επαναπρογραμματισμού, εφαρμόζοντας μια ποικιλία παραγόντων επαναπρογραμματισμού και ενισχυτών. Πολλές ερευνητικές ομάδες κατάφεραν να αποφύγουν τη χρήση του πρωτο-ογκογονιδίου *c-myc*, αντικαθιστώντας αυτό με λιγότερο επικίνδυνα γονίδια όπως το *L-myc*⁵ ή το *glis1*.⁶ Γενικά, έχουν αναπτυχθεί πολυάριθμες στρατηγικές για την αύξηση της ασφάλειας και της αποτελεσματικότητας της παραγωγής των iPSCs, μέσω της χρήσης συστημάτων όπως ο ιός Sendai, επισωματικοί φορείς, και mRNAs.⁷

Μελέτες που χρησιμοποιούν μεταμόσχευση πυρήνων από καρκινικά κύτταρα ποντικού έδειξαν ότι τα καρκινικά γονιδιώματα μπορούν να επαναπρογραμματιστούν προς

πολυδύναμα. Επίσης, iPSCs και κύτταρα που προσομοιάζουν τα iPSCs έχουν δημιουργηθεί από αθανатоποιημένες ανθρώπινες κυτταρικές σειρές. Παρ' όλο που τέτοιες μελέτες μπορούν να αντιμετωπίσουν ερωτήματα τα οποία σχετίζονται με την αναστρεψιμότητα του καρκινικού φαινότυπου και των επιγενετικών καθοριστικών παραγόντων του, διαγράφοντας το μεγαλύτερο μέρος του τελευταίου μέσω της διαδικασίας επαναπρογραμματισμού, η πλέον συναρπαστική εφαρμογή της επαγόμενης πολυδυναμίας είναι ίσως ο επαναπρογραμματισμός των πρωτογενών κυττάρων που απομονώνονται απ' ευθείας από ασθενείς.¹

Ωστόσο, λίγες μόνο μελέτες έχουν καταφέρει να δημιουργήσουν iPSCs από πρωτογενή κακοήγη ή προ-κακοήγη κύτταρα. Αυτά περιορίζονται σε μυελοειδείς κακοήθειες, όπως μυελοπολλαπλασιαστικά νεοπλάσματα (myeloproliferative neoplasms, MPNs) –περιλαμβανομένης της χρόνιας μυελοειδούς λευχαιμίας, της αληθούς πολυκυτταραιμίας και της πρωτογενούς μυελοϊνώσης– μυελοδυσπλαστικά σύνδρομα (myelodysplastic syndromes, MDSs) και το σύνδρομο επικάλυψης MDS-MPN, νεανική μυελονοκυτταρική λευχαιμία. Τα iPSCs από ασθενείς με τις εν λόγω διαταραχές έχουν δείξει κυτταρικούς και μοριακούς φαινότυπους χαρακτηριστικούς των υποκείμενων διαταραχών, όπως μεταβαλλόμενο δυναμικό διαφοροποίησης, σχηματισμό αιμοποιητικών κυττάρων, πολλαπλασιασμό και βιωσιμότητα κυττάρων, αλλαγές γονιδιακής έκφρασης, αλλαγές σηματοδότησης και ευαισθησία σε φάρμακα.¹ Μη πλήρως προγραμματισμένα κύτταρα «τύπου iPSCs», δηλαδή κύτταρα που δεν έχουν αποκτήσει ανεξαρτησία από την εξωγενή έκφραση επαναπρογραμματισμού TFs, έχουν δημιουργηθεί από ασθενείς με παγκρεατικό αδενοκαρκίνωμα.⁸ iPSCs έχουν επίσης δημιουργηθεί από ασθενείς με σύνδρομο οικογενειακής προδιάθεσης καρκίνου που προκύπτουν από μεταλλάξεις της γαμետικής σειράς, όπως το σύνδρομο Li-Fraumeni (μετάλλαξη *p53*),⁹ η αναιμία Fanconi (*FANCA* και *FANCC* μεταλλάξεις),¹⁰ η οικογενής διαταραχή αιμοπεταλίων (familial platelet disorder, FPD) με προδιάθεση για οξεία μυελογενή λευχαιμία (acute myeloid leukemia, AML) (FPD/AML, μετάλλαξη *RUNX1*)¹¹ και η προδιάθεση για καρκίνο του μαστού (μετάλλαξη *BRCA1*).¹² Μάλιστα, iPSCs από ασθενείς με το σύνδρομο Li-Fraumeni έδειξαν ελαττωματική οστεοβλαστική διαφοροποίηση και ογκογονικό δυναμικό και παρουσίασαν γονιδιακές υπογραφές πρωτογενών οστεοσάρκωμάτων, έναν τύπο όγκου που αναπτύσσεται συνήθως σε αυτούς τους ασθενείς.⁹

2.2. Αρχές μοντελοποίησης με iPSCs

Η παραγωγή των iPSCs από καρκινικά κύτταρα αρχίζει με την απομόνωση και την καλλιέργεια κακοήθων κυττά-

ρων από ένα πρωτογενές ή μεταστατικό δείγμα όγκου που λαμβάνεται χειρουργικά μέσω βιοψίας ή στην περίπτωση αιματολογικών κακοηθειών από δείγμα μυελού των οστών ή αίματος. Τα φυσιολογικά iPSCs μπορούν να προέλθουν από τους ίδιους τους ασθενείς με καρκίνο, με σκοπό τη δημιουργία ζευγών όγκων και φυσιολογικών iPSCs τα οποία μοιράζονται το ίδιο γενετικό υπόβαθρο. Αυτά μπορούν να προκύψουν παράλληλα, μέσω του ίδιου πειράματος επαναπρογραμματισμού από φυσιολογικά κύτταρα τα οποία συχνά «μολύνουν» ένα δείγμα όγκου και αναγνωρίζονται αναδρομικά μέσω γενετικών αναλύσεων.^{13,14} Εναλλακτικά, τα φυσιολογικά iPSCs μπορούν να προκύψουν σε ανεξάρτητα πειράματα επαναπρογραμματισμού από φυσιολογικό ιστό που λαμβάνεται ξεχωριστά από μια περιοχή δίπλα στον όγκο, με βιοψία δέρματος ή δείγμα αίματος στην περίπτωση μη αιματολογικών κακοηθειών.

Στον επαναπρογραμματισμό των κυττάρων χρησιμοποιούνται τα τέσσερα γονίδια που αναφέρθηκαν παραπάνω, γνωστά και ως παράγοντες Yamanaka, ή, εναλλακτικά, χορηγούνται συνδυασμοί παραγόντων μέσω ιικής διαμόλυνσης με τη χρήση ρετροϊών, λεντοϊών, επισωμάτων ή του ιού Sendai. Η εξωγενής έκφραση αυτών των TFs προκαλεί τεράστια επιγενετική αναδιαμόρφωση μέσω διεργασιών που δεν είναι κατανοητές σε μοριακό επίπεδο, και κατ'επέκταση οδηγεί στην ενεργοποίηση ενός ενδογενούς δικτύου πολυδύναμων ρυθμιστών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός αυτοτροφοδοτούμενου κυκλώματος αυτορρυθμιστικών βρόχων, που στη συνέχεια διατηρούν μια σταθερή κατάσταση κυττάρων η οποία δεν απαιτεί πλέον την έκφραση των εξωγενών TFs.

Η ανεξαρτησία από τους TFs αποδεικνύεται, είτε από την απώλεια των διαγονιδίων TFs από τα κύτταρα (εάν χρησιμοποιούνται μέθοδοι μη ενσωμάτωσης), είτε από την πλήρη σίγασή τους (στην περίπτωση φορέων ενσωμάτωσης), το οποίο συνιστά καθοριστικό χαρακτηριστικό των πλήρως επαναπρογραμματισμένων iPSCs. Οι καθιερωμένες σειρές iPSCs μπορούν κατ'αρχάς να διατηρηθούν στην καλλιέργεια επ' αόριστον, να επεκταθούν και να κρυοσυντηρηθούν χωρίς απώλεια των γενετικών, των επιγενετικών ή των φαινοτυπικών ιδιοτήτων τους.⁷

Για τις περισσότερες πειραματικές εφαρμογές, τα iPSCs πρέπει να διαφοροποιηθούν στον τύπο κυττάρου ο οποίος αντιστοιχεί στον καρκίνο που μας ενδιαφέρει. Πρέπει επομένως να υπάρχουν όλες οι απαραίτητες πληροφορίες για τα κύτταρα προέλευσης ενός δεδομένου όγκου και, δεύτερον, ικανότητα διαφοροποίησης των iPSCs στον συγκεκριμένο τύπο κυττάρου. Η εκτίμηση της επιτυχούς παραγωγής του επιθυμητού τύπου κυττάρου βασίζεται στην έκφραση επιφανειακών δεικτών ή γονιδίων ή σε

άλλες καθοριστικές ιδιότητες του ιστού. Οι κυτταρικές και οι μοριακές αναλύσεις εξαρτώνται από συγκρίσεις με φυσιολογικά κύτταρα, που διαφοροποιούνται από τις κανονικές σειρές iPSCs με τον ίδιο τρόπο, όπως οι σειρές οι οποίες προέρχονται από τον καρκίνο, που, ιδανικά, θα πρέπει να είναι ισογενείς ή σχεδόν ισογενείς, δηλαδή να προέρχονται, αντίστοιχα, μέσω επεξεργασίας γονιδιώματος ή από διαφορετικό τύπο κυττάρου του ίδιου ατόμου, έτσι ώστε να μοιράζονται όλες τις γενετικές, αλλά όχι τις σωματικές παραλλαγές. Εάν κανένας από αυτούς τους ελέγχους δεν είναι διαθέσιμος, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πολλαπλές μη σχετιζόμενες φυσιολογικές σειρές για να ληφθούν υπ' όψιν οι φαινοτυπικές διαφορές που προκύπτουν από το γενετικό υπόβαθρο.¹⁵

3. ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ: ΠΡΟΚΛΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΙ

3.1. Τεχνικοί περιορισμοί

Παρά την επιτυχία του επαναπρογραμματισμού ορισμένων καρκινικών κυττάρων σε πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα, αυτά αντιπροσωπεύουν ένα πολύ μικρό ποσοστό και οι περιορισμοί της μεθόδου δεν έχουν ακόμη καθοριστεί με ακρίβεια. Οι δύο πιο σημαντικές προκλήσεις στη δημιουργία των iPSCs είναι αρχικά η αποτελεσματικότητα του επαναπρογραμματισμού των κακοήθων κυττάρων και κατά δεύτερον η ικανότητα διαφοροποίησης των iPSCs στον ζητούμενο κυτταρικό τύπο. Μερικές μελέτες υποδηλώνουν ότι τα καρκινικά κύτταρα είναι γενικά περισσότερο ανθεκτικά στον επαναπρογραμματισμό από τα φυσιολογικά κύτταρα. Πιο συγκεκριμένα, όταν πυρήνες από κύτταρα μελανώματος, λευχαιμίας, λεμφώματος και καρκίνου του μαστού μεταμοσχεύτηκαν σε ωκύτταρα, η δραστηριότητα επαναπρογραμματισμού του κυτταροπλάσματος ήταν αποτελεσματική μόνο για το γονιδίωμα των κυττάρων μελανώματος. Έτσι, είναι εμφανές ότι δεν μπορούν να επαναπρογραμματιστούν επιγενετικά όλα τα καρκινικά γονιδιώματα σε πολυδύναμα και ότι το ποσοστό επιτυχίας της μεθόδου ίσως εξαρτάται και από τον τύπο του καρκίνου.^{1,3}

Αν και οι σχετικές με τον καρκίνο μεταλλάξεις ή γενετικές αλλοιώσεις μπορεί να φαίνεται ότι αποτελούν εμπόδιο στη διαδικασία του επαναπρογραμματισμού, όπως στην περίπτωση μεταλλάξεων στα γονίδια που εμπλέκονται στην αναιμία Fanconi, υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι οι γενετικές βλάβες από μόνες τους ενδέχεται να μην εμποδίζουν τον επαναπρογραμματισμό. Πρώτον, έχουν επαναπρογραμματιστεί λευχαιμικές κυτταρικές σειρές που φέρουν ογκογονίδια σύντηξης, παρουσιάζοντας μια

απόδειξη ότι κύτταρα τα οποία φέρουν χρωμοσωμικές μετατοπίσεις μπορούν να επαναπρογραμματιστούν. Δεύτερον, ο περιορισμός της καταστολής του όγκου πιθανόν να είναι σημαντικός για τη ρύθμιση της διαδικασίας επαναπρογραμματισμού. Πράγματι, η μειωμένη έκφραση των *p53*, *p16^{INK4a}/Rb*, *p19^{ARF}* ή *p21^{CIP1}* οδηγεί σε πιο αποτελεσματικό και ταχύτερο κυτταρικό επαναπρογραμματισμό.¹⁶ Ωστόσο, iPSCs που δημιουργήθηκαν από πρωτογενή καρκινικά κύτταρα με απενεργοποίηση του *p53* ή και του *p16^{INK4a}/Rb* δεν έχουν αναφερθεί ακόμη. Τρίτον, τα iPSCs έχουν δημιουργηθεί από ασθενείς με ποικιλία γενετικών ασθενειών, υποδεικνύοντας περαιτέρω ότι οι ίδιες οι κληρονομικές γενετικές αλλοιώσεις δεν επιβάλλουν ανυπέρβλητο εμπόδιο για τον επαναπρογραμματισμό.

Είναι επίσης πιθανό ότι ο τύπος των καρκινικών κυττάρων μπορεί να επηρεάσει την αποτελεσματικότητα του επαναπρογραμματισμού εξ αιτίας περιορισμών που σχετίζονται με τη βιολογία του κυττάρου –επιγενετικές αλλαγές, μειωμένη απόκριση στη βλάβη του DNA, συσσωρευμένη βλάβη DNA, γενετική αστάθεια ή γήρανση που προκαλείται από ογκογονίδια– ή λόγω τεχνικών εμποδίων τα οποία σχετίζονται με την αδυναμία διαχωρισμού ή επαγωγής της ανάπτυξης βιώσιμων καρκινικών κυττάρων από ένα δείγμα όγκου. Δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι τα πρώτα μοντέλα καρκίνου με βάση τα iPSCs προήλθαν από αιματολογικές κακοήθειες και προ-κακοήθειες, στις οποίες τα καρκινικά κύτταρα μπορούν εύκολα να ληφθούν από το αίμα ή από τον μυελό των οστών ως μεμονωμένα κύτταρα σε εναιώρημα.

Τα κυκλοφορούντα καρκινικά κύτταρα (circulating tumor cells, CTCs), δηλαδή τα κύτταρα που διοχετεύονται στην κυκλοφορία του αίματος από συμπαγείς όγκους, θα μπορούσαν επίσης να παρέχουν μια εναλλακτική, περισσότερο προσιτή πηγή κυττάρων για επαναπρογραμματισμό, αν και αυτά θα μπορούσαν να δώσουν μόνο πιο εξελιγμένους κλώνους, επειδή τα CTCs συχνά αντιπροσωπεύουν τα καρκινικά κύτταρα που προκαλούν μεταστάσεις.¹³

Τα προγράμματα απόκρισης στις βλάβες του DNA (DNA damage response, DDR) διατηρούν την ακεραιότητα του γονιδιώματος και καταστέλλουν τον κακοήγη μετασχηματισμό. Έτσι, θα μπορούσε να υποθεθεί ότι τα κύτταρα με ανεπαρκή DDR πιθανόν να είναι ανθεκτικά στον επαναπρογραμματισμό. Ωστόσο, κάποιες μορφές βλάβης εξακολουθούν να είναι συμβατές με τον επαναπρογραμματισμό, όπως η μετάλλαξη του γονιδίου της αταξίας τηλαγγειεκτασίας (ataxia telangiectasia mutated, ATM) και το σύνδρομο Hutchinson-Gilford προγηρία (Hutchinson-Gilford progeria syndrome, HGPS), ένα θανατηφόρο σύνδρομο πρόωρης γήρανσης που χαρακτηρίζεται από γονιδιωματική αστάθεια και βλάβες στους μηχανισμούς του DDR, και έχουν πρό-

σφατα δώσει iPSCs. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι η συσσώρευση των βλαβών στο DNA δεν φαίνεται να αποτελεί ανυπέρβλητο «εμπόδιο επαναπρογραμματισμού».¹⁶

Το δεύτερο περιοριστικό βήμα είναι η παραγωγή κυττάρων καθορισμένου κυτταρικού τύπου από τα iPSCs, η οποία περιλαμβάνει την κατευθυνόμενη διαφοροποίησή τους. Δεδομένου ότι οι περισσότεροι, αν όχι όλοι, οι καρκίνοι προκύπτουν από εξειδικευμένα βλαστικά και προγονικά κύτταρα, η μοντελοποίηση του καρκίνου απαιτεί ως επί το πλείστον την «ευκολότερη και ταχύτερη» παραγωγή αυτών και όχι των τελικώς διαφοροποιημένων τύπων λειτουργικών κυττάρων που συχνά απαιτούνται σε εφαρμογές μοντελοποίησης μη κακοήθους νόσου.^{16,17} Από την άλλη πλευρά, η αξιολόγηση της επιτυχούς διαφοροποίησης μπορεί να είναι περίπλοκη από το γεγονός ότι οι καρκίνοι συχνά εμφανίζουν παρεκκλίνουσα έκφραση των δεικτών γενεαλογίας. Απαιτούνται ακόμη βελτιωμένα πρωτόκολλα διαφοροποίησης που παρέχουν υψηλή απόδοση, επεκτασιμότητα, χρήση πλήρως καθορισμένων αντιδραστηρίων και, ιδανικά, επιδέχονται αυτοματοποίηση.

Επειδή τα πρωτόκολλα διαφοροποίησης των iPSCs μιμούνται τις αναπτυξιακές διαδικασίες, μια γενική πρόκληση της μοντελοποίησης της νόσου μέσω των iPSCs είναι η διάκριση των φαινοτύπων της νόσου από τους φαινότυπους των προηγούμενων σταδίων ανάπτυξης. Αυτό το ζήτημα θα μπορούσε, τουλάχιστον εν μέρει, να αντιμετωπιστεί με τη χρήση αλληλόμορφων που επιτρέπουν την εισαγωγή μιας συγκεκριμένης γενετικής τροποποίησης σε ένα μεταγενέστερο στάδιο διαφοροποίησης.¹⁸

3.2. Επιγενετική αστάθεια

Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι ο επαναπρογραμματισμός των καρκινικών κυτταρικών σειρών ή πρωτογενών κυττάρων μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μερικών επαναπρογραμματισμένων κυττάρων «τύπου iPSCs», τα οποία χαρακτηρίζονται από συνεχή εξάρτηση του εξωγενούς μεταγραφικού παράγοντα (TF).¹⁹ Επειδή τα μερικών επαναπρογραμματισμένα κύτταρα εμφανίζουν ποικιλία λειτουργικών και επιγενετικών ιδιοτήτων, θα πρέπει να αναγνωρίζονται σαφώς ως τέτοια και τα αποτελέσματα που λαμβάνονται με τη χρήση τους πρέπει να ερμηνεύονται με προσοχή. Πλήρως επαναπρογραμματισμένα, υψηλής ποιότητας iPSCs θα πρέπει να επιλέγονται μετά από αυστηρό χαρακτηρισμό, σύμφωνα με καθιερωμένα κριτήρια πολυδυναμίας και με την απόδειξη ανεξαρτησίας από τον μεταγραφικό παράγοντα (TF). Αυτά τα κριτήρια έχουν μέχρι στιγμής βρεθεί μόνο σε iPSCs που προέρχονται από αιματολογικές κακοήθειες.¹³ Ατελής επαναπρογραμματισμός μπορεί επίσης να παρατηρηθεί σε πρώιμα στάδια των iPSCs και εκδηλώνεται μεταγραφικά, επιγενετικά και στη

χωροδιάταξη της χρωματίνης ως «μήμη» του κυτταρικού τύπου του δότη, αλλάζοντας τη ροπή διαφοροποίησης.²⁰

Επί πλέον, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι τα iPSCs δεν παρουσιάζουν μεγαλύτερη φαινοτυπική ή μεταγραφική διακύμανση από γραμμή σε γραμμή από εκείνη των ανθρώπινων εμβρυϊκών βλαστικών κυττάρων (ESCs) και επομένως δεν είναι εγγενώς επιγενετικά ασταθή. Στην πραγματικότητα, η συσσώρευση στοιχείων δείχνει ότι ο κύριος καθοριστικός παράγοντας των μεταγραφικών, των επιγενετικών και των λειτουργικών ιδιοτήτων (προτίμηση διαφοροποίησης) των iPSCs είναι η γενετική τους σύνθεση, επικυρώνοντάς τα ως μοντέλα για μελέτες της γενετικής του καρκίνου γονότυπου προς φαινότυπο.¹³

Αντίθετα, η αξία τους ως μοντέλα επιγενετικής του καρκίνου είναι λιγότερο σίγουρη, επειδή οι επιγενετικές εκτροπές του αρχικού καρκινικού κυττάρου είναι πιθανόν να έχουν επαναρυθμιστεί ή διαγραφεί κατά τον επαναπρογραμματισμό. Ωστόσο, οι επιγενετικές μεταβολές που καθορίζονται γενετικά (για παράδειγμα, λόγω της μετάλλαξης ενός επιγενετικού ρυθμιστή) ενδέχεται να παραμείνουν ή να αποκατασταθούν μετά τη διαφοροποίηση. Μελέτες οι οποίες χαρακτηρίζουν το επιγενετικό τοπίο των κυττάρων που προέρχονται από τα iPSCs, σε σύγκριση με εκείνο των αρχικών πρωτογενών κυττάρων όγκου, θα μπορούσαν να συνδράμουν στην κατανόηση των περιορισμών αυτών των μοντέλων και στη διάκριση της σχέσης μεταξύ γενετικών και επιγενετικών βλαβών σε συγκεκριμένους καρκίνους.

4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ iPSCs

4.1. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα

Ο επαναπρογραμματισμός των ανθρώπινων πρωτογενών καρκινικών κυττάρων είναι μια μέθοδος που έχει πολλές πιθανές βιοϊατρικές εφαρμογές. Τα μοντέλα των iPSCs συνιστούν ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη των καρκίνων του ανθρώπου οι οποίοι προέρχονται είτε από ιστούς και τύπους κυττάρων που έχουν περιορισμένη διάρκεια ζωής στην καλλιέργεια, είτε που δεν μπορούν εύκολα να ληφθούν από ζώντες ασθενείς. Επιπροσθέτως, τα iPSCs μπορεί να αποτελέσουν μοντέλο για όγκους όπου τα ανθρώπινα γονίδια τα οποία σχετίζονται με τον όγκο δεν υπάρχουν σε πλήρη αντιστοιχία στα ποντίκια ή έχουν μεταλλάξεις που είναι πολύ πολύπλοκες για να ενταχθούν στο γονιδίωμα ποντικού. Επί πλέον, τα iPSCs τα οποία προέρχονται από καρκινικά κύτταρα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διατήρηση αυτών των μοναδικών γονοτύπων σε τράπεζες κυττάρων που ενδέχεται να διαφοροποιηθούν αργότερα σε διάφορους τύπους για μεταγενέστερη μελέτη. Πιο συγκεκριμένα, η παραγωγή iPSCs από αίμα ομφάλιου λώρου που

διατηρείται σε τράπεζες από νεογέννητα με πιθανότητες ανάπτυξης καρκίνου αργότερα θα προσφέρει επίσης μια μοναδική ευκαιρία για την κατανόηση των αναπτυξιακών και των μοριακών μηχανισμών οι οποίοι διέπουν τη διαδοχική εξέλιξη ενός κυττάρου από μια προ-καρκινική σε μια καρκινική κατάσταση.²¹

Η χρήση των iPSCs παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα σε σύγκριση με τις παραδοσιακές προσεγγίσεις, όπως η χρήση καρκινικών κυτταρικών σειρών και ζωικών μοντέλων. Πρώτον, τα iPSCs παρουσιάζουν ειδικότητα και ως προς το είδος αλλά και ως προς το άτομο, με αποτέλεσμα οι μεταλλάξεις που προκαλούν καρκίνο να μπορούν να μελετηθούν στο γονιδιωματικό πλαίσιο του καρκινοπαθούς. Ωστόσο, λόγω της στοχαστικής φύσης του επαναπρογραμματισμού και της προκύπτουσας επιγενετικής μεταβλητότητας, η διάκριση ενός φαινότυπου που προέρχεται από ατομική κλωνική ποικιλότητα από κάποιον ο οποίος πηγάζει από τον γενικό παθολογικό μηχανισμό μπορεί να είναι δύσκολη.

Δεύτερον, τα iPSCs που προέρχονται από καρκινικά κύτταρα ενδέχεται να διαφοροποιηθούν εκ νέου προς ευαίσθητες και ανθεκτικές γενεαλογίες, επιτρέποντάς μας να μελετήσουμε πώς συγκεκριμένες ογκογόνες μεταλλάξεις καθορίζουν τον καρκινικό φαινότυπο σε μια συγκεκριμένη κυτταρική γραμμή ή και αναπτυξιακή κατάσταση. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης συγκεκριμένων ογκογόνων μεταλλάξεων με διαφορετικούς τύπους κυττάρων και της σύνδεσής τους με συγκεκριμένες αναπτυξιακές καταστάσεις. Το μειονέκτημα είναι ότι οι οδοί σηματοδότησης για την εκ νέου δημιουργία αναπτυξιακών διαδικασιών και πλήρως διαφοροποιημένων τύπων κυττάρων δεν είναι ακόμη καλά κατανοητές. Επίσης, οι συστηματικές διεργασίες δεν μπορούν να μοντελοποιηθούν πλήρως *in vitro*.

Τρίτον, τα iPSCs είναι ανανεώσιμα και επεκτάσιμα συστήματα που επιτρέπουν τον έλεγχο υψηλής απόδοσης, καθιστώντας αυτά ιδιαίτερα επιθυμητά μέσα για τον θεραπευτικό έλεγχο των φαρμάκων και για τοξικολογικές μελέτες. Η πολυδυναμία τους, τους επιτρέπει να διαφοροποιούνται σε διάφορους τύπους κυττάρων. Αν και γενετικά είναι αρκετά σταθερά, ωστόσο τα iPSCs εξακολουθούν να συνιστούν κυτταρικές σειρές και κατά συνέπεια να συσσωρεύουν ανεπιθύμητες μεταλλάξεις σε περιπτώσεις παρατεταμένης καλλιέργειας, γεγονός που ενδεχομένως υπονομεύει το πλήρες δυναμικό τους για θεραπείες με βάση τα κύτταρα.²

4.2. Έρευνα για τον καρκίνο

Τα χαρακτηριστικά των iPSCs που τα καθιστούν ιδανικά

ως καρκινικά μοντέλα συνδέονται στενά με τις ιδιότητές τους ως πολυδύναμα κύτταρα. Αρχικά, η απεριόριστη αυτοανανέωσή τους τα καθιστά ικανά να αιχμαλωτίσουν ολόκληρο το άθικτο γονιδίωμα ενός μεμονωμένου καρκινικού κυττάρου και να το ενισχύσουν σε απεριόριστο αριθμό αντιγράφων. Η απεριόριστη ανάπτυξή τους μπορεί, τουλάχιστον θεωρητικά, να επιτευχθεί χωρίς φαινοτυπικές μετατοπίσεις (συχνά παρατηρούνται σε οργανοειδή ή προερχόμενα από ασθενείς ξеноμοσχεύματα), επειδή η πολυδυναμία τους είναι ενιαία, σταθερή και αυτοσυντηρούμενη *in vitro*.^{22,23} Δεύτερον, το ευρύ αναπτυξιακό δυναμικό τους προσφέρει την ευκαιρία εξέτασης των επιδράσεων ενός συγκεκριμένου γονότυπου καρκίνου ή μιας συγκεκριμένης μετάλλαξης-οδηγού, μιας μετάλλαξης που πιστεύεται ότι οδηγεί στην ογκογένεση, σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων και στάδια ανάπτυξης. Με αυτόν τον τρόπο παρέχεται ένα μοναδικό σύστημα μέσω του οποίου μπορούν να απαντηθούν ερωτήματα όπως εάν απαιτείται ένα ειδικό, περιορισμένο στους ιστούς επιγενετικό περιβάλλον για να ασκήσει ένα ογκογονίδιο το ογκογονικό του δυναμικό, και εάν κοινές ή ξεχωριστές οδοί λειτουργούν κατάντη ενός κοινού ογκογονιδίου σε διαφορετικούς ιστούς.

Μπορούν επίσης να ενισχύσουν μελέτες σχετικά με την προέλευση των καρκινικών κυττάρων, δηλαδή τον κανονικό τύπο κυττάρου στον οποίο άρχισε η διαδικασία μετασηματισμού με την απόκτηση της πρώτης μετάλλαξης που προάγει τον καρκίνο, και να βοηθήσουν στον εντοπισμό των ομοιοτήτων μεταξύ διαφορετικών τύπων καρκίνου οι οποίοι προκαλούνται από ένα κοινό ογκογονίδιο, με σκοπό την αναζήτηση ευρύτερων θεραπευτικών στόχων.²⁴

Τα iPSCs είναι ιδιαίτερα κατάλληλα για μηχανιστικές μελέτες σε βάθος, επειδή παρέχουν μια επεκτάσιμη πηγή ομοιογενούς κυτταρικού υλικού που επιτρέπει καλά ελεγχόμενα πειράματα. Ακόμη, λόγω της ευκολίας της μονοκλωνικής υποκλωνοποίησης, τα iPSCs είναι ιδιαίτερα δεκτικά στην εισαγωγή γενετικών τροποποιήσεων από το σύστημα CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas9 ή άλλα εργαλεία επεξεργασίας γονιδιωμάτων, όπως οι νουκλεάσες δακτυλίου-ψευδαργύρου και οι TALENs (transcription activator-like effector nucleases).^{1,2}

Μπορεί κάποιος να ελέγξει τις επιδράσεις των γονιδίων στα iPSCs εισάγοντας σκόπιμα μεταλλάξεις σε ένα ισογενές υπόβαθρο για να δημιουργήσει μια συγκεκριμένη γενετική δυσλειτουργία ή να διορθώσει ένα συγκεκριμένο γενετικό ελάττωμα στο πλαίσιο του γονιδιωματος του ασθενούς. Τα γενετικά ελαττωματικά κύτταρα θα μπορούσαν να διορθωθούν *in vitro* και να επανεισαχθούν σε ασθενείς, δηλαδή μια αυτόλογη προσέγγιση μεταμόσχευσης που αποδείχθηκε ότι λειτουργεί χρησιμοποιώντας ένα εξανθρωπισμένο μοντέλο

ποντικού δρεπανοκυτταρικής αναιμίας. Τα ανθρώπινα iPSCs είναι μια πιθανή πηγή κυττάρων για την ανασυγκρότηση των ιστών μακροπρόθεσμα. Για παράδειγμα, τα μεταμοσχεύσιμα αιμοποιητικά πρόδρομα κύτταρα μπορούν να παραχθούν από iPSCs, προσφέροντας δυνητικά νέες κυτταρικές πηγές για την ανασύσταση κυττάρων σε ασθενείς με αιματολογικό καρκίνο μετά τη θεραπεία.²⁵

Οι δύο πιο συνηθισμένοι τύποι μεταλλάξεων που μπορούν να κατασκευαστούν με χρήση CRISPR-Cas9 είναι η διακοπή ενός γονιδίου μέσω της εισαγωγής ένθετων αλλαγής πλαισίου, με τη μεσολάβηση της μη ομόλογης τελικής σύνδεσης (non-homologous end-joining, NHEJ) σε μια περιοχή κωδικοποίησης γονιδίων, και οι μεταλλάξεις σημείου μέσω ομόλογης κατευθυνόμενης επιδιόρθωσης (homology-directed repair, HDR). Έτσι, τα παραπάνω μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε για την αδρανοποίηση γονιδίων καταστολής όγκων, είτε για τη μοντελοποίηση σημειακών μεταλλάξεων που προάγουν τον καρκίνο, αντίστοιχα. Το σύστημα CRISPR-Cas9 επιτρέπει έτσι τη μοντελοποίηση των δύο κύριων κατηγοριών μεταλλάξεων του καρκίνου στο φυσικό τους γονιδιωματικό πλαίσιο. Το σύστημα CRISPR-Cas9 μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την εισαγωγή γενετικών αλλοιώσεων μεγάλης κλίμακας που συχνά εντοπίζονται σε καρκίνους, περιλαμβανομένων χρωμοσωμικών απαλείψεων, αναστροφών και μετατοπίσεων.¹³

Τα ανθρώπινα iPSCs θα μπορούσαν επίσης να χρησιμεύσουν ως μια νέα πηγή αιμοποιητικών κυττάρων για την ανάπτυξη ανοσοθεραπειών που στοχεύουν σε καρκίνους. Για να χρησιμοποιηθούν τα ανθρώπινα iPSCs στην εφαρμογή τέτοιων θεραπειών καρκίνου, η ασφάλειά τους είναι ύψιστης σημασίας. Η χρήση μη ολοκληρωμένων στρατηγικών επαναπρογραμματισμού εγείρει προβληματισμούς σχετικά με τη χρήση των πρωτο-ογκογονιδίων στον επαναπρογραμματισμό. Ωστόσο, η μεταμόσχευση iPSCs σε ασθενείς ενέχει εγγενείς κινδύνους λόγω της ανάγκης πολλαπλασιασμού *in vitro* και της τάσης τους να σχηματίσουν όγκους. Η HSV (herpes simplex virus)-θυμιδινική κινάση, η απαμινάση της κυτοσίνης της ζύμης και οι επαγώγιμοι μηχανισμοί αυτοκτονίας Caspase-9 έχουν κατασκευαστεί για την εξάλειψη πιθανώς ογκογόνων ή δυσλειτουργικών iPSCs που παράγονται *in vivo*.²⁶

4.3. Ανάπτυξη φαρμάκων

Η μοντελοποίηση του καρκίνου με βάση τα iPSCs θα μπορούσε επίσης να συνδράμει σε πολλούς τομείς της μεταφραστικής έρευνας, όπως ο εντοπισμός και η επαλήθευση θεραπευτικών στόχων, οι προκλινικές μελέτες αποτελεσματικότητας και ασφάλειας και ο σύνθετος έλεγχος για την ανακάλυψη φαρμάκων. Οι τύποι κυττάρων

που προέρχονται από τα iPSCs μπορούν να παρέχουν ένα περισσότερο σχετικό υπόβαθρο για τον έλεγχο φαρμάκων υψηλής απόδοσης σε σύγκριση με αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές, ινοβλάστες ή λεμφοβλαστοειδή κύτταρα.

Μέσω κυτταρικών διαδικασιών μπορεί να επιτευχθεί διαλογή φαρμάκων μεγάλης απόδοσης, μετατρέποντας τα ειδικά για καρκινικά κύτταρα iPSCs στους επιθυμητούς τύπους κυττάρων. Εάν η κατευθυνόμενη διαφοροποίηση μπορεί να αναπαράγει τον σχηματισμό όγκων *in vitro*, είναι δυνατόν να δημιουργηθούν φάρμακα που μπορούν επιλεκτικά να εξαλείψουν τα καρκινικά κύτταρα και επίσης να δοκιμαστούν σε μια σειρά άλλων τύπων κυττάρων. Η χημειοθεραπεία έχει τεράστιο αντίκτυπο στους ασθενείς λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών. Επομένως, μια διαφορετική διαλογή κυτταροτοξικότητας θα μπορούσε να αναπτύξει φάρμακα που είναι πιο ειδικά για τα κύτταρα-στόχους τους.

Μια ιδιαίτερα ελκυστική χρήση της τεχνολογίας των iPSCs στην ανάπτυξη φαρμάκων είναι ο τοξικολογικός έλεγχος, δεδομένου ότι είναι δυνατόν να δημιουργηθεί μια ποικιλία υγιών κυττάρων από φυσιολογικά iPSCs. Σε αυτά περιλαμβάνονται ηπατοκύτταρα, καρδιομυοκύτταρα και αιμοποιητικά κύτταρα, καθώς και οργανοειδή και όργανα σε chip που προέρχονται από αυτά, αποτελούμενα από ιστούς όπως νεφροί, πνεύμονες, έντερο, ήπαρ ή χολαγγειοκύτταρα.

Καρδιομυοκύτταρα που προέρχονται από iPSCs ασθενών με καρκίνο του μαστού φάνηκε πρόσφατα να μοντελοποιούν σε κυτταρικό επίπεδο την καρδιοτοξικότητα η οποία προκαλείται από τη δοξορουβικίνη που εκδηλώθηκε στους ασθενείς.²⁷ Τέτοια μοντέλα συγκεκριμένης τοξικότητας προκαλούμενης από φάρμακα μπορούν να βοηθήσουν στην κατανόηση της γενετικής βάσης και των μοριακών μηχανισμών των εν λόγω ανεπιθύμητων ενεργειών. Η μοντελοποίηση μέσω iPSCs παρουσιάζει επίσης μια ευκαιρία για την ανακάλυψη φαρμάκων με βάση τον φαινότυπο. Η δοκιμή φαρμάκων με βάση τον φαινότυπο ενδέχεται να είναι ιδιαίτερα ελκυστική σε καρκίνους χωρίς καθορισμένους στόχους και βασίζεται στην αναγνώριση κυτταρικών φαινοτύπων ή άλλων λειτουργικών δοκιμασιών, όπως για παράδειγμα του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της ενεργοποίησης συγκεκριμένης οδού σηματοδότησης ή αλλαγών στον μεταβολισμό, που σχετίζονται με την ανταπόκριση του ασθενούς και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως προγνωστικές διαδικασίες θεραπευτικής απόκρισης.²⁸

4.4. Ανάπτυξη εμβολίων

Με βάση τις ομοιότητες μεταξύ καρκινικών κυττάρων, ESCs και iPSCs, οι Li et al αξιολόγησαν μια ανθρώπινη σειρά iPSCs, την TZ1, ως αντικαρκινικό εμβόλιο σε ένα μοντέλο μεταμόσχευσης καρκίνου του παχέος εντέρου ποντικού.

Διαπίστωσαν ότι παρ' όλο που αυτά τα iPSCs επάγουν την παραγωγή σημαντικού αριθμού σπληνοκυττάρων τα οποία παράγουν IFN- γ και IL-4 ενάντια στα καρκινικά κύτταρα του παχέος εντέρου ποντικού, δεν παρατηρήθηκαν ενδείξεις απόρριψης του όγκου, ενδεχομένως λόγω της συσσώρευσης κυττάρων καταστολής που προέρχονται από μυελοειδή σε ανοσοποιημένες ομάδες TZ1.²⁹ Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ότι απαιτούνται τροποποιήσεις του εμβολίου κατά του καρκίνου με βάση τα iPSCs για την αύξηση της ανοσιακής απόκρισης κατά των όγκων. Για παράδειγμα, τα αυτόλογα iPSCs μπορεί να περιέχουν μια πιο αντιπροσωπευτική και ακριβή ομάδα αντιγόνων όγκου από τα ετερόλογα iPSCs και ως εκ τούτου τα αυτόλογα iPSCs ενδέχεται να είναι αποτελεσματικότερα ως αντικαρκινικά εμβόλια.

Επίσης, τα ESCs συχνά προέρχονται από μη συγγενικούς δότες και μπορεί να εκφράζουν μη συμβατό MHC (major histocompatibility complex), γεγονός που θα μπορούσε να προκαλέσει ανοσοαπόκριση. Για να μελετηθεί η ανοσογονικότητα των ογκοεμβρυϊκών πρωτεϊνών, επομένως, θα πρέπει να εξαλειφθεί η αλλο-ανοσία που διεγείρεται από αναντιστοιχίες των MHC. Η ογκογονικότητα που σχετίζεται με τα ESCs υπήρξε ένα από τα σημαντικότερα εμπόδια στη χρήση των ESCs ως καρκινικών εμβολίων για κλινικές εφαρμογές. Πρόσφατα, μια μελέτη αντιμετώπισε αυτά τα ζητήματα χρησιμοποιώντας ένα ακτινοβολημένο αυτόλογο εμβόλιο καρκίνου με βάση τα iPSCs. Μέσα από αυτή τη μελέτη, για πρώτη φορά δείχθηκε ότι τα iPSCs ανθρώπου και ποντικού εκφράζουν μια λίστα αντιγόνων που σχετίζονται και είναι ειδικά για τον όγκο, συγκρίνοντας τα προφίλ έκφρασης 11 διαφορετικών ανθρώπινων κλώνων iPSCs με ανθρώπινα ESCs, καρκινικούς ιστούς και υγιείς ιστούς χρησιμοποιώντας προσδιορισμό αλληλουχίας RNA.³⁰

Τα εμβόλια κατά του καρκίνου με βάση τα ογκοεμβρυϊκά αντιγόνα έχουν δείξει θεραπευτικό δυναμικό σε προκλινικές αλλά και σε ορισμένες κλινικές μελέτες. Διάφορες στρατηγικές εμβολίων με βάση τα ογκοεμβρυϊκά αντιγόνα, ιδιαίτερα προσεγγίσεις που συνδυάζουν αυτόλογα εμβόλια iPSCs με κάποιο ανοσοενισχυτικό, παρουσιάζουν ισχυρές αντικαρκινικές αντιδράσεις και είναι πολλά υποσχόμενα για τη θεραπεία του καρκίνου. Ωστόσο, οι προκλήσεις παραμένουν. Για παράδειγμα, πολλές πρώιμες κλινικές μελέτες που χρησιμοποιούν εμβόλια τα οποία βασίζονται σε ογκοεμβρυϊκά αντιγόνα επικεντρώθηκαν σε μεμονωμένα αντιγόνα με ή χωρίς ανοσοενισχυτικά, περιορίζοντας το επίπεδο και τη διάρκεια της επαγόμενης αντικαρκινικής ανοσοαπόκρισης λόγω της ετερογένειας των όγκων και της ταχείας προσαρμογής των καρκινικών κυττάρων. Από την άλλη πλευρά, τα εμβόλια ολόκληρων κυττάρων είναι καθολικά εφαρμόσιμα σε όλους τους ασθενείς χωρίς ανησυχίες για αναντιστοιχίες τύπου HLA (human leukocyte

antigen). Επομένως, τα εμβόλια με βάση ολόκληρα κύτταρα, με την ετερογένεια των επιτόπων όλων των ESCs και iPSCs, μπορεί να αποδειχθούν περισσότερο ισχυρά, ανθεκτικά και ευκολότερα στην εφαρμογή από τα εμβόλια που στοχεύουν σε ένα αντιγόνο.

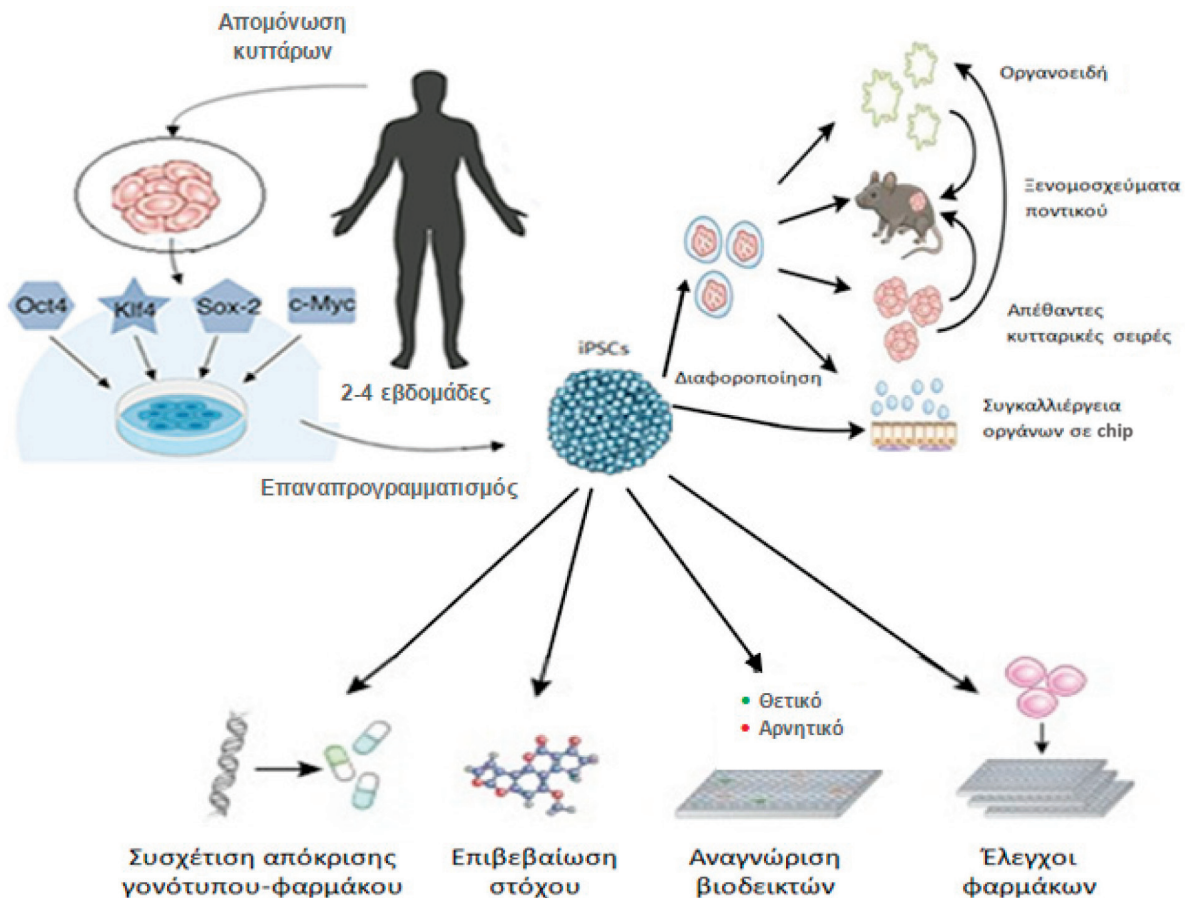
Τέλος, επειδή τα αυτόλογα εμβόλια με βάση τα iPSCs είναι σχετικά εύκολο να δημιουργηθούν, μπορούν να είναι άμεσα διαθέσιμα μετά τη διάγνωση, έτοιμα να χορηγηθούν αμέσως μετά τη χειρουργική επέμβαση, τη χημειοθεραπεία ή την ακτινοθεραπεία, όταν τα καρκινικά κύτταρα είναι περισσότερο ευάλωτα. Ο εμβολιασμός με iPSCs σε αυτή τη φάση θα μπορούσε να προκαλέσει το ανοσοποιητικό σύστημα να στοχεύσει ένα ευρύ φάσμα ειδικών για τον καρκίνο αντιγόνων, με στόχο την πρόληψη της επανεμ-

φάνισής του, μιας και οι υποτροπιάζοντες και μεταστατικοί όγκοι παρουσιάζουν φαινότυπους με μεγαλύτερη βλαστική ικανότητα.³¹ Στην εικόνα 1 παρουσιάζεται μια περίληψη των βασικών βημάτων για τη δημιουργία των iPSCs, καθώς και των σχετικών εφαρμογών τους στο πλαίσιο της μελέτης της βιολογίας του καρκίνου.

5. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΤΩΝ IPSCS ΜΕ ΑΛΛΑ ΜΟΝΤΕΛΑ

5.1. iPSCs και αθανατοποιημένες κυτταρικές σειρές

Οι συμβατικές κυτταρικές σειρές αποτελούνται από πλήρως μετασχηματισμένα και ως επί το πλείστον επιθετικά κύτταρα καρκίνου προχωρημένου σταδίου, που προέρχονται είτε αυθόρμητα μέσω επιλογής για ταχεία



Εικόνα 1. Ανάπτυξη iPSCs και εφαρμογές τους. Απομονώνονται κύτταρα όγκου και πραγματοποιείται μεταφορά γονιδίων των τεσσάρων μεταγραφικών παραγόντων (TFs), δηλαδή των *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* και *c-Myc* (επίσης γνωστών ως παράγοντες Yamanaka), χρησιμοποιώντας διάφορες μεθόδους, όπως ρετροϊούς, λεντοϊούς, επισώματα ή τον ιό Sendai. Μετά από μια περίοδο 2–4 εβδομάδων εμφανίζονται αποικίες με τη χαρακτηριστική μορφολογία των πολυδύναμων κυττάρων οι οποίες πολλαπλασιάζονται, με σκοπό τη δημιουργία κυτταρικών σειρών. Στη συνέχεια διαφοροποιούνται στον κυτταρικό τύπο προέλευσης του αρχικού όγκου. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα που προέρχονται από τα iPSCs μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή οργανοειδών, απέθαντων κυτταρικών σειρών, ξενομοσχευμάτων, και για συν-καλλιέργεια οργάνων σε chip. Οι συν-καλλιέργειες οργάνων σε chip μπορούν επίσης να ενσωματώσουν άλλους τύπους κυττάρων που ενδέχεται να προέλθουν από iPSCs. Οι «δευτερεύουσες» προερχόμενες από iPSCs κυτταρικές σειρές θα μπορούσαν θεωρητικά να προέρχονται από καρκινικά iPSCs και, με τη σειρά τους, να χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία καλλιιεργειών οργανοειδών. Καθένα από αυτά θα μπορούσε στη συνέχεια να μεταμοσχευτεί σε μοντέλα ξενομοσχεύματος. Επίσης, τα επαναπρογραμματισμένα iPSCs θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για πληθώρα εφαρμογών, όπως η συσχέτιση απόκρισης γονότυπου-φαρμάκου, η αναγνώριση βιοδεικτών, η επιβεβαίωση των στόχων και ο έλεγχος φαρμάκων.¹⁴

ανάπτυξη σε καλλιέργεια ή μέσω εξωγενούς έκφρασης ικτών ή ογκογονιδίων θηλαστικών. Αντίθετα, η αθανατοποίηση των iPSCs δεν οφείλεται στον μετασχηματισμό αλλά στην επαγωγή της πολυδυναμίας. Αν και η πολυδυναμία μοιράζεται μερικές κυτταρικές ιδιότητες και μοριακές οδούς με τον κυτταρικό μετασχηματισμό, η πολυδυναμία και ο μετασχηματισμός είναι δύο σαφώς διακριτές διαδικασίες.²³ Αυτό καθιστά εφικτή την παραγωγή iPSCs από κύτταρα που δεν είναι πλήρως μετασχηματισμένα και ως εκ τούτου δεν μπορούν να προκύψουν συμβατικές κυτταρικές σειρές, επιτρέποντας έτσι τη σύλληψη προ-κακοήθων κυττάρων, δηλαδή κυττάρων σε πρώιμα στάδια της κακοήθους διαδικασίας και κυττάρων με μεταλλάξεις προδιάθεσης για καρκίνο που δεν έχουν ακόμη αρχίσει τη διαδικασία του μετασχηματισμού.

Τα iPSCs είναι ανεξάρτητα από εξωγενή γονίδια, ενώ οι περισσότερες κυτταρικές σειρές καρκίνου βασίζονται στη συνεχή έκφραση ισχυρών εξωγενών ογκογονιδίων, τα οποία ενδέχεται να αλλάξουν την κυτταρική τους συμπεριφορά και τη γονιδιακή τους έκφραση με μη φυσιολογικούς τρόπους. Ο επαναπρογραμματισμός στην πολυδυναμία έχει αποδειχθεί ότι είναι μια καθολική ιδιότητα που μοιράζονται όλα τα κύτταρα ανεξάρτητα από τον κυτταρικό τύπο, το αναπτυξιακό στάδιο, το είδος ή τη γονιδιακή έκφραση.³² Έτσι, αν και αυτό απομένει να αποδειχθεί, τα iPSCs μπορούν δυνητικά να προέρχονται από ένα ευρύ φάσμα γονότυπων και κυτταρικών τύπων, περιλαμβανομένων εκείνων για τους οποίους υπάρχουν πολύ λίγες ή καθόλου καρκινικές κυτταρικές σειρές.

5.2. Συσχέτιση με υπό όρους επαναπρογραμματισμό

Μια μέθοδος για την καθιέρωση 2D καλλιιεργειών καρκινικών κυττάρων που προέρχονται από την ασθενή παρουσία αναστολέων Rho κινάσης (Rock) και τροφοδοτικών κυττάρων αναπτύχθηκε εμπειρικά από τους Schlegel et al και αναφέρεται ως CR (conditionally reprogrammed). Στη μέθοδο αυτή δημιουργούνται καλλιέργειες επεκτάσιμων κυττάρων που πιστεύεται ότι αποκτούν ορισμένα χαρακτηριστικά των ενήλικων βλαστικών κυττάρων. Το CR είναι τεχνικά πιο απλό από τον επαναπρογραμματισμό στην πολυδυναμία, αλλά περιορίζεται σε επιθηλιακούς όγκους και δημιουργεί πολυκλωνικούς πληθυσμούς. Η κατάσταση των κυττάρων που δημιουργούνται με CR και οι ιδιότητές τους δεν είναι καλά καθορισμένες. Αρκετές σημαντικές πτυχές του εν λόγω μοντέλου, όπως η ικανότητα επέκτασης των κυττάρων, ο βαθμός της γενετικής και της φαινοτυπικής μετατόπισης σε κάθε στάδιο και η δεκτικότητα του στην κλωνική ανάπτυξη και στον γενετικό χειρισμό, δεν έχουν διερευνηθεί ακόμη. Σε αντίθεση με το CR, ο επαναπρο-

γραμματισμός στην πολυδυναμία μπορεί να εκτελείται σε συνθήκες που διατηρούν την κλωνικότητα –κατά την οποία μεμονωμένες σειρές iPSCs προέρχονται από ένα μόνο αρχικό κύτταρο– και έτσι δημιουργούνται γενετικά ομοιογενείς σειρές.^{33,34}

5.3. Παράθεση με οργανοειδή, όργανα σε chip και τεχνολογίες ξενομοσχευμάτων

Τα iPSCs μπορούν επίσης να προσφέρουν δυνατότητες για καλύτερη μοντελοποίηση, όταν συνδυάζονται με τρισδιάστατες καλλιέργειες οργανοειδών ή ξενομεταμόσχευση. Οι καλλιέργειες οργανοειδών αποτελούνται από τρισδιάστατες δομές που προσομοιάζουν την αρχιτεκτονική του ιστού από τον οποίο προήλθαν και μπορούν να αρχίσουν χρησιμοποιώντας διαφοροποιημένα κύτταρα, ειδικά για ιστούς ή ενήλικα βλαστικά και προγονικά κύτταρα ή ανθρώπινα πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (hPSCs, περιλαμβανομένων των ESCs και iPSCs). Τα οργανοειδή προέρχονται κυρίως από πρωτογενείς όγκους που αφαιρέθηκαν χειρουργικά ή από βιοψίες. Από την άλλη, τα iPSCs μπορούν να διαφοροποιηθούν και στη συνέχεια να ενσωματωθούν σε εξωκυτταρική μήτρα (extracellular matrix, ECM) για την έναρξη οργανοειδών καλλιιεργειών με μέσα κατάλληλα για τον αντίστοιχο ιστό. Οργανοειδή τα οποία προέρχονται από κανονικά iPSCs προσφέρουν πλεονεκτήματα έναντι των οργανοειδών που προέρχονται από βλαστικά κύτταρα, ειδικά για ιστούς, επειδή περιέχουν πολλαπλούς κυτταρικούς τύπους του ιστού, περιλαμβανομένων του στρώματος και του ενδοθηλίου, ενώ τα τελευταία συνήθως περιέχουν μόνο τα επιθηλιακά συστατικά.³⁵

Τα όργανα σε chip είναι μικρορευστοποιημένες συσκευές που αποτελούνται από θαλάμους και κανάλια καλλιιεργειας κυττάρων τα οποία επιτρέπουν τη συνεχή διάχυση. Κατασκευάζονται από πρωτογενή κύτταρα ή μετασχηματισμένες κυτταρικές σειρές και, πρόσφατα, από ανθρώπινα ESCs και iPSCs.³⁶ Η μεταμόσχευση κυττάρων από iPSCs σε ποντίκια μπορεί να επεκτείνει περαιτέρω τις πειραματικές δυνατότητές τους *in vivo*. Τέτοια δευτερεύοντα μοντέλα προερχόμενων από ασθενή ξενομοσχευμάτων (patient derived xenografts, PDX), που προκύπτουν από ένα ενδιάμεσο στάδιο iPSCs, θα μπορούσαν να είναι χρήσιμα στο ένα τρίτο περίπου των ασθενών με καρκίνο από τους οποίους τα PDX δεν μπορούν να προέρχονται απ' ευθείας από πρωτογενή κύτταρα. Ένα ενδιάμεσο στάδιο iPSCs θα επέτρεπε επίσης τον γενετικό χειρισμό των κυττάρων πριν από τη μεταμόσχευση και την παραγωγή ξενομοσχευμάτων, για παράδειγμα, τα οποία εκφράζουν λουσιφεράση ή μια άλλη φθορίζουσα πρωτεΐνη ή φέρουν συγκεκριμένες γενετικές τροποποιήσεις έτσι ώστε να διευκολυνθεί η

παρακολούθηση και η μελέτη των αποτελεσμάτων που επιφέρουν στην ανάπτυξη των όγκων *in vivo*.⁸

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Είναι προφανές ότι η χρήση των επαγόμενων πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων έχει πολλά να προσφέρει τόσο στην έρευνα για τον καρκίνο όσο και σε πιο απτές βιοϊατρικές εφαρμογές. Βαδίζουμε σε μια νέα εποχή καινοτόμων τεχνολογιών όπου στο επίκεντρο βρίσκεται ο άνθρωπος και τα κύτταρα τα οποία προέρχονται από ασθενείς καταλαμβάνουν όλο και μεγαλύτερο πεδίο στην ανακάλυψη νέων θεραπειών. Σε αυτό ακριβώς βασίζονται τα μοντέλα των iPSCs τα οποία προσφέρουν πληθώρα εφαρμογών, όπως η μοντελοποίηση του καρκίνου, η ανάπτυξη φαρμάκων, η κυτταρική θεραπεία και η ογκολογία ακριβείας.

Παρά όλα αυτά, το γεγονός ότι ο επαναπρογραμματισμός, η πολυδυναμία και ο ογκογονικός μετασχηματισμός είναι συνδεδεμένες διαδικασίες που μοιράζονται πολλές ομοιότητες προβάλλουν ένα αμφιλεγόμενο ζήτημα. Ειδικότερα, η διαπίστωση ότι οι ίδιες αλλαγές που προκαλούν την ογκογένεση επηρεάζουν έντονα τον επαναπρογραμματισμό μη καρκινικών κυττάρων εγείρει ανησυχίες ασφάλειας

για μελλοντικές εφαρμογές της κυτταρικής θεραπείας με iPSCs, ενώ ταυτόχρονα λειτουργεί ενθαρρυντικά για νέες μελέτες με στόχο την ανάλυση τόσο των μηχανισμών και των εμποδίων που διέπουν τον άμεσο επαναπρογραμματισμό των καρκινικών κυττάρων, όσο και των σχέσεων μεταξύ επαναπρογραμματισμού και κυτταρικού μετασχηματισμού.

Μόλις ξεπεραστούν πλήρως οι τρέχουσες τεχνολογικές και βιολογικές προκλήσεις, τα iPSCs μπορούν να βελτιώσουν την κατανόησή μας για την ογκογένεση, τη σχέση μεταξύ των όγκων και του περιβάλλοντος ιστού και πώς τα επιγενετικά συμβάντα συμβάλλουν σε διάφορους καρκίνους. Η εν λόγω γνώση θα επιτρέψει με τη σειρά της την ανάπτυξη καλύτερων μέσων διαλογής φαρμάκων, περισσότερο στοχευμένων και λιγότερο τοξικών θεραπειών και αποτελεσματικής ανασύστασης ιστών. Η αξιοποίηση των iPSCs για τη μοντελοποίηση της ανθρώπινης νόσου και για τον έλεγχο αποτελεσματικών θεραπευτικών φαρμάκων θα επιταχύνουν αναμφίβολα την εύρεση νέων ανακαλύψεων στην έρευνα για τον καρκίνο. Το μόνο που απομένει λοιπόν είναι η περαιτέρω έρευνα για τη βελτιστοποίηση των iPSCs, έτσι ώστε να ξεπεραστούν τα έως τώρα εμπόδια και να δημιουργηθεί πρόσφορο έδαφος για τη θεραπεία του καρκίνου.

ABSTRACT

Review of the applications of iPSCs and their role in cancer

M.D. KOTSARI, S. PAPAKOSTOPOULOU, E.P. KOKKINOGENIS, M. DELI,
P. ZOUMPOURLIS, M. GOULIELMAKI, V. ZOUMPOURLIS

Unit of Biomedical Applications, Institute of Chemical Biology,
National Hellenic Research Foundation, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2021, 38(4):459–470

In general, cancer is a heterogeneous group of diseases mainly characterized by uncontrolled cell growth. Despite greater understanding of the biological mechanisms and the excessive proliferation, invasion and metastasis of cancer cells, cancer remains a multi-stage process of development and evolution that has not been fully elucidated. For this reason, it is imperative to use new methods for its study, and to find innovative assays for the improvement of its diagnosis and treatment. It appears that a solution to the above challenges comes from the induced pluripotent stem cells (iPSCs), which, in combination with recent developments in bioengineering, tissue processing and culture and genome editing, represent a new opportunity in the field of cancer management. iPSCs are emerging as the most versatile tool in biomedical research and pharmacological studies on cancer. Oncogenic transformation and somatic cell reprogramming are multi-stage processes that share certain common characteristics, and therefore study of iPSCs derived from cancer cells can promote better understanding of the molecular mechanisms that govern the onset and progression of human cancers. Direct applications of iPSCs include drug screening, toxicology testing, biomarker identification and bio-mechanical tissue replacement. Recently, the development of vaccines based on oncofetal antigens, using self-induced stem cells, has shown significant therapeutic potential. This review examines the possibilities currently offered by iPSCs in cancer research, their limitations and their contribution to new therapeutic approaches.

Key words: Cell reprogramming, Disease modeling, Induced pluripotent stem cells, Oncogenesis, Transformation

Βιβλιογραφία

- PAPAPETROU EP. Patient-derived induced pluripotent stem cells in cancer research and precision oncology. *Nat Med* 2016, 22:1392–1401
- KIM JJ. Applications of iPSCs in cancer research. *Biomark Insights* 2015, 10:125–131
- RAMOS-MEJIA V, FRAGA MF, MENENDEZ P. iPSCs from cancer cells: Challenges and opportunities. *Trends Mol Med* 2012, 18:245–247
- OUYANG X, TELLI ML, WU JC. Induced pluripotent stem cell-based cancer vaccines. *Front Immunol* 2019, 10:1510
- NAKAGAWA M, TAKIZAWA N, NARITA M, ICHISAKA T, YAMANAKA S. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient *Myc*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, 107:14152–14157
- MAEKAWA M, YAMAGUCHI K, NAKAMURA T, SHIBUKAWA R, KODANAKA I, ICHISAKA T ET AL. Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor *Glis1*. *Nature* 2011, 474:225–229
- SCHLAEGER TM, DAHERON L, BRICKLER TR, ENTWISLE S, CHAN K, CIANCI A ET AL. A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat Biotechnol* 2015, 33:58–63
- KIM J, HOFFMAN JP, ALPAUGH RK, RHIM AD, REICHERT M, STANGER BZ ET AL. An iPSC line from human pancreatic ductal adenocarcinoma undergoes early to invasive stages of pancreatic cancer progression. *Cell Rep* 2013, 3:2088–2099
- LEE DF, SU J, KIM HS, CHANG B, PAPATSENKO D, ZHAO R ET AL. Modeling familial cancer with induced pluripotent stem cells. *Cell* 2015, 161:240–254
- MÜLLER LUW, MILSOM MD, HARRIS CE, VYAS R, BRUMME KM, PARMAR K ET AL. Overcoming reprogramming resistance of Fanconi anemia cells. *Blood* 2012, 119:5449–5457
- ANTONY-DEBRÉ I, MANCHEV VT, BALAYN N, BLUTEAU D, TOMOWIAK C, LEGRAND C ET AL. Level of *RUNX1* activity is critical for leukemic predisposition but not for thrombocytopenia. *Blood* 2015, 125:930–940
- SOYOMBO AA, WU Y, KOLSKI L, RIOS JJ, RAKHEJA D, CHEN A ET AL. Analysis of induced pluripotent stem cells from a *BRCA1* mutant family. *Stem Cell Reports* 2013, 1:336–349
- KOTINI AG, CHANG CJ, BOUSSAAD I, DELROW JJ, DOLEZAL EK, NAGULAPALLY AB ET AL. Functional analysis of a chromosomal deletion associated with myelodysplastic syndromes using isogenic human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2015, 33:646–655
- YE Z, LIU CF, LANIKOVA L, DOWEY SN, HE C, HUANG X ET AL. Differential sensitivity to JAK inhibitory drugs by isogenic human erythroblasts and hematopoietic progenitors generated from patient-specific induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2014, 32:269–278
- ROUHANI F, KUMASAKA N, DE BRITO MC, BRADLEY A, VALLIER L, GAFFNEY D. Genetic background drives transcriptional variation in human induced pluripotent stem cells. *PLoS Genet* 2014, 10:e1004432
- BANITO A, GIL J. Induced pluripotent stem cells and senescence: Learning the biology to improve the technology. *EMBO Rep* 2010, 11:353–359
- ZELTNER N, STUDER L. Pluripotent stem cell-based disease modeling: Current hurdles and future promise. *Curr Opin Cell Biol* 2015, 37:102–110
- CHEN Y, CAO J, XIONG M, PETERSEN AJ, DONG Y, TAO Y ET AL. Engineering human stem cell lines with inducible gene knockout using CRISPR/Cas9. *Cell Stem Cell* 2015, 17:233–244
- MIYOSHI N, ISHII H, NAGAI KI, HOSHINO H, MIMORI K, TANAKA F ET AL. Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, 107:40–45
- KRIJGER PHL, DI STEFANO B, DE WIT E, LIMONE F, VAN OEVELEN C, DE LAAT W ET AL. Cell-of-origin-specific 3D genome structure acquired during somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 2016, 18:597–610
- BROXMEYER HE. Will iPSC cells enhance therapeutic applicability of cord blood cells and banking? *Cell Stem Cell* 2010, 6:21–24
- JAENISCH R, YOUNG R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 2008, 132:567–582
- DE LOS ANGELES A, FERRARI F, XI R, FUJIWARA Y, BENVENISTY N, DENG H ET AL. Hallmarks of pluripotency. *Nature* 2015, 525:469–478
- VISVADER JE. Cells of origin in cancer. *Nature* 2011, 469:314–322
- HANNA J, WERNIG M, MARKOULAKI S, SUN CW, MEISSNER A, CASADY JP ET AL. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPSCs generated from autologous skin. *Science* 2007, 318:1920–1923
- WU C, HONG SG, WINKLER T, SPENCER DM, JARES A, ICHWAN B ET AL. Development of an inducible caspase-9 safety switch for pluripotent stem cell-based therapies. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2014, 1:14053
- BURRIDGE PW, LI YF, MATSA E, WU H, ONG SG, SHARMA A ET AL. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes recapitulate the predilection of breast cancer patients to doxorubicin-induced cardiotoxicity. *Nat Med* 2016, 22:547–556
- FRIEDMAN AA, LETAI A, FISHER DE, FLAHERTY KT. Precision medicine for cancer with next-generation functional diagnostics. *Nat Rev Cancer* 2015, 15:747–756
- LI Y, ZENG H, XU RH, LIU B, LI Z. Vaccination with human pluripotent stem cells generates a broad spectrum of immunological and clinical responses against colon cancer. *Stem Cells* 2009, 27:3103–3111
- KOOREMAN NG, KIM Y, DE ALMEIDA PE, TERMGLINCHAN V, DIECKE S, SHAO NY ET AL. Autologous iPSC-based vaccines elicit anti-tumor responses *in vivo*. *Cell Stem Cell* 2018, 22:501–513.e7
- MALTA TM, SOKOLOV A, GENTLES AJ, BURZYKOWSKI T, POISSON L, WEINSTEIN JN ET AL. Machine learning identifies stemness features associated with oncogenic dedifferentiation. *Cell* 2018, 173:338–354.e15
- MAHERALI N, HOCHEDLINGER K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008, 3:595–605
- LIU X, ORY V, CHAPMAN S, YUAN H, ALBANESE C, KALLAKURY B ET AL. ROCK inhibitor and feeder cells induce the conditional reprogramming of epithelial cells. *Am J Pathol* 2012, 180:599–607
- CRYSTAL AS, SHAW AT, SEQUIST LV, FRIBOULET L, NIEDERST MJ, LOCKERMAN EL ET AL. Patient-derived models of acquired resistance

- can identify effective drug combinations for cancer. *Science* 2014, 346:1480–1486
35. PASSIER R, ORLOVA V, MUMMERY C. Complex tissue and disease modeling using hiPSCs. *Cell Stem Cell* 2016, 18:309–321
36. GIOBBE GG, MICHELIN F, LUNI C, GIULITTIS, MARTEWICZ S, DUPONT S ET AL. Functional differentiation of human pluripotent stem cells on a chip. *Nat Methods* 2015, 12:637–640

Corresponding author:

V. Zoumpourlis, Institute of Chemical Biology, National Hellenic Research Foundation, 48 Vassileos Constantinou Ave., 116 35 Athens, Greece
e-mail: vzub@eie.gr