

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální biochemické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů

Barbora Kovandová



**Savčí imunitní odpověď proti progenitorovým typům buněk
včetně indukovaných pluripotentních kmenových buněk (iPSCs)**

Immune response in mammalian species against progenitor cell types
including induced pluripotent stem cells (iPSCs)

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce:
RNDr. Karel Drbal Ph.D.

Praha, 2016

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 18. 8. 2016

.....

Poděkování

Tímto děkuji svému školiteli RNDr. Karlu Drbalovi Ph.D. za cenné rady, které mi pomohly napsat tuto práci. Děkuji i své rodině za podporu, kterou mi poskytovali po celou dobu, kdy jsem tuto práci psala.

Abstrakt

Pozornost vědců se již dlouho obrací ke kmenovým buňkám jakožto k velmi užitečnému nástroji pro regenerativní medicínu. Kmenové buňky jsou teoreticky schopné nahradit či znovu vytvořit jakoukoliv tkáň a mohly by tak opravovat nebo nahradit tkáň poškozené ať už stářím, tak nemocí či úrazem. Nejprve je však nutné se vypořádat s problémy, které jejich užití provází. Mezi tyto problémy patří hlavně jejich imunogenita, tedy schopnost vyvolat imunitní odpověď příjemce. Tato bakalářská práce popisuje právě imunogenitu embryonálních (ESC), indukovanými pluripotentních (iPSC) i dospělých tělních kmenových buněk (ASC).

Tkáň vzniklé z ESC byly *in vivo* popsány jako silně imunogenní, byť byly na základě původních *in vitro* pokusů popsány jako imunosupresivní. Také mají potenciál tvořit nádory, což je další nebezpečí jejich užití. Nemluvě o etických problémech, které jejich používání provází.

iPSC se zdají jako dobrým, eticky i imunologicky nezávadným řešením situace. Z hlediska imunogenicity tomu tak však není, bylo popsáno, že jsou imunogenní i v autologním prostředí. Hlavní problém, který v současnosti brání jejich běžnému využití, je jejich schopnost tvořit nádory. Imunogenita i tumorigenita může být následek metody, kterou jsou dediferencovány zpět na kmenový stav.

Užití ASC opět není spojeno s etickými problémy. Jako jediné kmenové buňky se dnes některé z nich běžně transplantují (transplantace kostní dřeně). Výsledky studií se však různí, některé je *in vitro* i *in vivo* popisují jako imunosupresivní a dokonce tumor-supresivní, jiné je popisují jako imunogenní a pro-tumorigenní. Jejich užití tedy také není úplně bezpečné.

V současnosti probíhá mnoho studií, které se snaží zabránit negativním efektům užití kmenových buněk. Výsledky některých z nich se zdají slibné, například genetické modifikace či změna způsobu jejich kultivace. Bez další pečlivé analýzy však nikdy nebudeme schopní kmenové buňky bezpečně používat.

Klíčová slova

přirozená a adaptivní imunitní odpověď, imunogenita, tumorigenita, sekretom, kmenová buňka, indukovaná pluripotentní kmenová buňka, buněčná diferenciac

Abstract

Stem cells may be very useful tool for regenerative medicine. They are able to repair any tissue in a human body and cure any damage caused by injury, sickness or aging. But at first, we have to deal with problems, which are connected with their usage – especially their immunogenicity. This bachelor thesis is focused on immunogenicity of embryonal (ESC), induced pluripotent (iPSC) and adult stem cells (ASC).

Tissues derived from ESC are *in vivo* described as strongly immunogenic, although they seem to be immunosuppressive *in vitro*. Another danger of their usage is their tumorigenic potential. There also exist ethical issues connected with their usage.

iPSC were supposed to be a good replacement for ESC, because no immunological nor ethical problems were expected. Surprisingly, they were described as immunogenic, too, even in autologous environment. These cells were also described as tumorigenic; this is the main reason for now why they cannot be used for the replacement therapy. Immunogenicity, so as tumorigenicity of iPSC may be a consequence of their dedifferentiation from somatic back to stem cells.

ASC are the only stem cells, which are already used for the replacement therapy (transplantation of bone marrow). Some of them are described as immunosuppressive or tumor-suppressive, other are described as immunogenic and pro-tumorigenic (both *in vitro* and *in vivo*).

Stem cells cannot be used for the replacement therapy until above stated problems are solved. There have already been suggested solutions, for example genetic modifications or changes in cultivation of them. Some of these solutions could be promising, but without additional research we will never be able to use stem cells without any danger.

Keywords

innate and adaptive immune responses, immunogenicity, tumorigenicity, secretome, stem cell, induced pluripotent stem cell, cellular differentiation

Obsah

Úvod	1
1. Kmenové buňky obecně	5
1.1. Embryonální kmenové buňky (ESC).....	5
1.2. Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC).....	5
1.3. Dospělé tělní kmenové buňky (ASC)	6
1.4. Nádorové kmenové buňky (CSC).....	7
1.5. Srovnání.....	7
2. Imunitní reakce proti kmenovým buňkám: příčiny a důsledky	8
2.1. Imunitní reakce proti ESC.....	8
2.2. Imunitní reakce proti iPSC.....	12
2.3. Imunitní reakce proti ASC.....	16
2.3.1. Mezenchymální kmenové buňky.....	16
2.3.2. Neurální kmenové buňky	17
2.3.3. Hematopoetické kmenové buňky	17
3. Tumorigenicita.....	18
3.1. Tumorigenicita ESC.....	18
3.2. Tumorigenicita iPSC.....	19
3.3. Tumorigenicita ASC	20
Závěr.....	22
Použitá literatura.....	24

Cíle práce

Cílem této práce je shrnout naše dosavadní poznatky o reakci imunitního systému na kmenové buňky a dále popsat výhody i rizika jejich možného medicínského využití a navrhnout řešení problémů, které jejich aplikace provází.

Seznam zkratek

- ASC – Adult stem cells – Dospělé tělní kmenové buňky
- APC – Antigen presenting cells – Antigen prezentující buňky
- CCL5 - Chemokine (C-C motif) ligand 5
- CNS – Centrální nervová soustava (mozek a mícha)
- CNV – Copy number variation – Variabilita počtu kopií
- CSC – Cancer stem cells – Nádorové kmenové buňky
- DAMP – Damage/danger molecular patterns
- DAPT - (N-[N-(3,5-difluorofenacetyl)-l-alanyl]-S-fenylglycin t-butyl ester) – Inhibitor Notch signální kaskády
- DC – Dendritic cells – Dendritické buňky
- DKK1 - Dickkopf-related protein 1
- ESC – Embryonal stem cells – Embryonální kmenové buňky
- GvHD – Graft vs. host disease – Reakce štěpu proti hostiteli
- GvL – Graft vs. leukemia – Reakce štěpu proti leukémii
- H2-B1 – Histon H2B protein – Myší analog lidského HLA-1
- HLA – Human leukocyte antigen
- HSC – Hematopoietic stem cells – Hematopoetické kmenové buňky
- ICAM-1 – Intercellular Adhesion Molecule 1
- IL – Interleukin
- IFN - Interferon
- iPSC – Induced pluripotent stem cells – indukované pluripotentní kmenové buňky
- KIR – Killer inhibitor receptors
- LOH – Loss of heterozygosity – Ztráta heterozygosity
- MHC – Major histocompatibility complex – Hlavní histokompatibilitní komplex
- mHC – Minor histocompatibility complex – Minoritní histokompatibilitní komplex
- MS1/2 – fenotypy MSC
- MFG-E8 – Milk fat globule-EGF factor 8 protein
- MSC – Mesenchymal stem cells – mezenchymální kmenové buňky
- NK – Natural killers
- NO – Oxid dusnatý

NSC – Neural stem cells – Neurální kmenové buňky

OSKM – Zkratka pro *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* a *c-Myc*, geny nutné k reprogramování iPSC

OSK – Zkratka pro *Oct3/4*, *Sox2* a *Klf4*

PAMP – Pathogen associated molecular patterns

PKC- θ – Proteinkináza C- θ

PRR – Pattern recognition receptor

Tc – Cytotoxický T-lymfocyt

TCR – T-cellular receptor – Receptor T-buněk

TGF – Tumor growth factor

TIMP1 - Tissue inhibitor of metalloproteinase 1

TLR – Toll like receptor

Treg – Regulační T-lymfocyt

TSG-6 – Tumor necrosis factor-inducible gene 6 protein

VCAM-1 – Vascular cell adhesion protein 1

VEGF – Vascular endothelial growth factor

Úvod

Všechny kmenové buňky sdílí schopnost sebeobnovy a diferenciaci, což je schopnost transformovat se z nesespecializovaného ve více specializovaný buněčný typ. Tyto unikátní vlastnosti kmenových buněk je činí zajímavým nástrojem pro regenerativní medicínu. Pluripotentní buňky, embryonální kmenové buňky (ESC) a indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC), mají schopnost diferencovat se do buněk ze všech tří zárodečných linií. Další typ kmenových buněk, dospělé tělní kmenové buňky (ASC), byly popsány jako multipotentní, tedy schopné se diferencovat do buněk jen jedné zárodečné linie. ASC se jako jediné z kmenových buněk přirozeně vyskytují v těle dospělého jedince v místech, kde je třeba buňky často obnovovat, typicky se jedná o kůži nebo epitel střeva. Kmenové buňky v sobě skrývají potenciál regenerovat stárím, nemocí či úrazem poškozené tkáně, případně i vytvořit celé nové orgány, zároveň je však jejich aplikace spojena s řadou problémů. Jmenovitě se jedná o jejich imunogenní a tumorigenní potenciál, jak bude diskutováno v této práci.

Imunogenicita, což je schopnost vyvolat imunitní reakci, byla popsána u všech typů kmenových buněk. Podle *self-non-self* teorie o imunitní reakci platí, že transplantujeme-li buňky z jiného jedince stejného (alologní transplantace) nebo jiného živočišného druhu (xenologní transplantace), je na místě očekávat imunitní odpověď. Naopak u transplantace autologní (dárce i příjemce je tentýž jedinec) nebo syngenní (dárce a příjemce mají stejnou genetickou informaci) by imunitní odpověď neměla nastat (Burnet, 1960).

Autologní transplantace ESC není možná, v alologním i xenologním prostředí byly ESC popsány jako imunogenní. Pokud jde o imunogenicitu iPSC, výsledky různých studií se značně liší. V některých studiích byly iPSC popsány jako neschopné vyvolat imunitní reakci, naopak v jiných studiích byly popsány jako silně imunogenní – a to i v autologním, respektive syngenním prostředí (Kaneko and Yamanaka, 2013). ASC nelze obecně označit za silně/slabě imunogenní nebo imunosupresivní. Typů ASC je několik a jejich imunogenicita se liší.

Na imunitní reakci vůči kmenovým buňkám se podílí vrozená i adaptivní imunita. Ze složek vrozené imunity se na imunitní reakci silně podílí makrofágy, dendritické buňky a NK buňky. Ostatní složky vrozené imunity hrají v tomto případě jen minoritní roli, a proto v tomto textu nejsou popisovány. Makrofágy a dendritické buňky pohlcují volný materiál vzniklý například po lyzi buňky. Makrofágy taktéž pohlcují buňky, které neexprimují „*don't eat me* signály“, mezi něž patří molekula CD47. Tyto buňky jsou zároveň i antigen

prezentujícími buňkami (APC) a hrají nezastupitelnou roli v maturaci buněk specifické imunity. Dané buňky rozeznávají „*pathogen associated molecular patterns*“ (PAMP), molekuly typické pro patogeny, jako je LPS nebo dsRNA, pomocí „*pattern recognition receptorů*“ (PRR), mezi něž patří i „*toll like receptory*“ (TLR). Stejný efekt jako PAMP mají i „*danger/damage associated molecular patterns*“ (DAMP), molekuly jako ATP nebo DNA v extracelulárním prostoru.

Aktivace různých TLR má za následek kaskádu dějů vedoucích k produkci cytokinů a zároveň prezentaci fagocytovaných peptidů pomocí MHC II glykoproteinů na povrchu makrofágů a dendritických buněk. Při setkání T-lymfocytů s maturovanými dendritickými buňkami po stimulaci PAMP a DAMP dojde rovněž k aktivaci a maturaci T-lymfocytů ve funkční Tc nebo Th lymfocyty. Naivní dendritické buňky, což jsou buňky, které nebyly stimulovány přes PRR, mají na naivní T-lymfocyty úplně jiný účinek: T-lymfocyty na ně buď nereagují, nebo se vyvinou v regulační T-lymfocyty.

NK buňky mají za úkol ničit zejména buňky napadené viry a nádorové buňky. Takové buňky mají na svém povrchu neobvykle málo MHC I glykoproteinů, což aktivuje reakci NK buněk vůči nim. Takzvané licencované NK buňky, které specificky rozeznávají tělu vlastní MHC I glykoproteiny, reagují i vůči buňkám, jež neprodukují i jen jednu alelickou formu MHC I glykoproteinů. Pokud buňka produkuje dostatek všech příslušných forem MHC I, reakci NK buněk vůči nim zabrání rozpoznání MHC I pomocí inhibičních KIR receptorů. Některé tkáně, jmenovitě tkáně plodu, mají přirozeně sníženou expresi klasických MHC I (HLA-A/B/C). NK buněčná reakce vůči takovým tkáním ovšem nenastává díky zvýšené expresi neklasických MHC I (HLA-G/E).

Adaptivní imunitní odpověď vůči kmenovým buňkám je způsobena především T-lymfocyty. Ostatní mechanismy adaptivní imunity v porovnání s nimi nehrají velkou roli, a proto nebudou dále popisovány. Maturovaných T-lymfocytů je několik typů: pomocné T-lymfocyty typu Th1 a Th2, cytotoxické T-lymfocyty (Tc) a regulační T-lymfocyty (Treg). T-lymfocyty váží peptidy navázané na MHC glykoproteinech. Naprostá většina T-lymfocytů není autoreaktivní, protože prošly centrální selekcí v thymu, proto tyto buňky rozpoznávají struktury tělu cizí. Jsou tudíž schopné rozeznat a také reagovat proti tělu cizím buňkám.

Treg lymfocyty (FOXP3⁺/CD4⁺ T-lymfocyty) se vyvíjí v přítomnosti IL-2 a TGF-β. Mají za úkol tlumit zánět v místě svého výskytu produkcí IL-10 a dalšího TGF-β.

Tc-lymfocyty ($CD8^+$ T-lymfocyty) mají za úkol ničit buňky napadené virem nebo rakovinné buňky. Pomocí koreceptoru CD8 váží své TCR receptory na MHC glykoproteiny s cizorodými či abnormálními peptidy na povrchu cílové buňky. Tato vazba způsobí vylití cytotoxických látek (perforinu, granzymů) a smrt cílové buňky. Tc lymfocyty jsou rovněž hlavní příčinou rejekce transplantovaných štěpů. Různé alelické formy MHC glykoproteinů váží různé fragmenty normálních buněčných proteinů. V případě neshody dárce s příjemcem v MHC glykoproteinech se buňky dárce imunitnímu systému příjemce jeví jako silně napadené virem, a proto je proti nim vyvinuta příslušná reakce.

Nejdůležitějším typem T-lymfocytů jsou Th lymfocyty ($CD4^+$ T-lymfocyty), které mají za úkol produkovat cytokiny a stimulovat tak reakci ostatních buněk imunitního systému. Typ Th2 produkuje IL-4, 5, 6, 13 a stimuluje B-lymfocyty, eosinofily a mastocyty. Pro imunitní reakci vůči transplantovaným tkáním jsou důležité Th1 lymfocyty, ty produkují IL-2, IL-12, IFN- γ a LT a stimulují tak makrofágy a Tc lymfocyty.

Z hlediska imunitní reakce jsou specifickými tkáněmi imunoprivilegované tkáně. Silná imunitní odpověď by mohla mít za následek vážné až fatální poškození těchto tkání a tedy až fatální následky pro celý organismus. Zánětlivá (Th1) imunitní reakce je tím pádem v těchto tkáních výrazně utlumena; jmenovitě se jedná o centrální nervový systém, oko, varlata a tkáň plodu. Tyto tkáně jsou od zbytku těla částečně fyzicky odděleny pomocí hematoencefalické / hematookulární / hematotestikulární /placentární bariéry, jejímž hlavním úkolem je chránit příslušné orgány především před virovou infekcí. Imunitní reakce je v těchto místech tlumena protizánětlivými cytokiny (TGF- β , IL-10), mají tak vliv na vývoj Treg lymfocytů. V případě varlat je produkce prozánětlivých cytokinů tlumena androgeny. Sertoliho buňky a buňky oka exprimují Fas-ligand, který indukuje apoptózu buněk s Fas-receptorem (mimo jiné mezi ně patří aktivované T-lymfocyty). Buňky oka a mozku exprimují jen málo MHC a kostimulačních molekul pro inhibici T-buněčné reaktivity, buňky plodu exprimují neklasické MHC I, HLA-G, čímž inhibují funkci NK buněk.

Z hlediska imunitní reakce jsou další abnormalitou chimérní organismy. Jako chiméra je definován organismus, jehož tělo obsahuje buňky s různou genetickou informací. Imunitní systém takového organismu nereaguje na oba typy buněk, protože během časně ontogeneze vychová svoje T i NK buňky jako tolerantní, které nebudou schopny rozvinout proti oběma typům imunitní reakci. To se v optimálním případě stane po transplantaci alo/xenologní tkáně.

Imunitní reakce proti kmenovým buňkám vzniká z několika různých důvodů. Neshoda dárce a příjemce v MHC glykoproteinech je považována za hlavní příčinu rejekce štěpů. Roli však hrají i jiné faktory. Například skutečnost, že ne všechny buňky transplantované tkáni operaci přežijí. Přítomnost mrtvých buněk může vyvolat imunitní reakci vůči buňkám v jejich okolí (Rock and Kono, 2008). Tento fakt vysvětluje alternativní *danger* teorie o vzniku imunitní reakce, podle níž nezáleží na původu buněk, nýbrž na přítomnosti DAMP. Pokud se DAMP, molekuly jako například DNA nebo ATP, nacházejí v extracelulárním prostoru, značí to přítomnost poškozených či mrtvých buněk (Pradeu and Cooper, 2012). *Danger* teorie tímto způsobem vysvětluje vznik imunitní reakce vůči autologním tkáním.

Dalším velkým problémem spojeným s transplantací kmenových buněk je jejich tumorigenicita – schopnost dávat vzniknout tumorům. Genetický materiál kmenových buněk (prokázáno u ESC) je značně nestabilní a náchylný k mutacím (Närvä et al., 2010), což může vést k jejich transformaci v nádorové buňky.

1. Kmenové buňky obecně

Vědecký zájem o všechny typy kmenových buněk je dán jejich potenciálem se dělit a diferencovat se v různé typy buněk. Kmenové buňky mají schopnost opravovat nemocemi, zraněním či stářím poškozené tkáně a dokonce vytvářet celé nové orgány, což jim dává značný význam v regenerativní medicíně.

1.1. Embryonální kmenové buňky (ESC)

Zájem se nejprve obracel k embryonálním kmenovým buňkám (ESC). Tyto buňky mají schopnost se diferencovat v kteroukoliv buňku dospělého těla, nicméně manipulace s nimi je velice složitá. V případě lidských ESC je navíc práce s nimi spojena s etickými problémy (Alvarez et al., 2012).

ESC lze rovněž připravit uměle: partenogenezí nebo přenosem jader. Metoda přenosu jader je založena na odstranění haploidního jádra oocytu a jeho nahrazením diploidním jádrem somatické buňky. Po tomto přenosu se buňka začne vyvíjet stejně, jako kdyby došlo k oplození, tudíž je možné tímto způsobem získat ESC (Deuse et al., 2015).

Partenogeneze musí být u savců vyvolána uměle, přirozeně k ní totiž nedochází. Pokud je oocyt stimulován Ca^{2+} ionty (elektroporací v médiu obsahujícím tyto ionty), nastane stejná situace, jako když dojde k oplození – haploidní oocyt se začne dělit, proto je následně možné získat ESC (Daughtry and Mitalipov, 2014).

1.2. Indukované pluripotentní kmenové buňky (iPSC)

Dalším typem kmenových buněk jsou indukované pluripotentní buňky (iPSC). Jedná se o plně diferencované tělní buňky, u kterých byl uměle obnoven kmenový stav. První úspěšný pokus na vytvoření iPSC proběhl na myších buňkách v roce 2006. Autoři zde vytipovali 24 genů, které mohou způsobovat pluripotenci. Každý z těchto genů byl retrovirovou transdukcí vložen do myších embryonálních fibroblastů a postupnou selekcí byly vybrány transkripční faktory Oct3/4, Sox2, Klf4 a onkogen c-Myc (OSKM). Když byly tyto čtyři geny retrovirovou transdukcí vloženy do embryonálních fibroblastů, došlo k jejich dediferenciaci na iPSC, bez kteréhokoliv z nich se na iPSC nezměnily (Takahashi and Yamanaka, 2006). Přestože pozdější výzkum ukázal, že toto není jediná možnost, jak vytvořit iPSC, je třeba zdůraznit, že tímto postupem se podařilo vytvořit iPSC úplně poprvé a tedy zbořit dogma, že dediferenciaci somatických buněk zpět na kmenový stav není možná. Tento

pokus se stal důležitým milníkem v buněčné biologii a Shinya Yamanaka za tento objev roku 2012 obdržel Nobelovu cenu.

1.3. Dospělé tělní kmenové buňky (ASC)

Posledním typem kmenových buněk jsou dospělé tělní kmenové buňky (ASC). Tyto buňky se přirozeně vyskytují v prakticky všech tkáních dospělého těla, typicky je to však v místech, kde musí neustále docházet k obnově buněk jako například v krvi (kostní dřeni). Velkou výhodou těchto buněk je skutečnost, že se dají poměrně snadno získat. Jejich využitelnost je však omezená, protože tyto buňky nejsou pluripotentní, jsou totiž pouze multipotentní, mohou proto dát vzniknout jen buňkám ze stejného zárodečného listu.

Typů ASC bylo popsáno několik, například mezenchymální, neurální a hematopoetické. Mezenchymální kmenové buňky (MSC) se dají získat z amniové tekutiny, endometria, zubní dřeni, kůže, tuku nebo synoviální tekutiny, poprvé však byly získány z kostní dřeni. Bylo zjištěno, že MSC jsou schopné diferencovat se nejen do tkání mezenchymálního původu (chondroblasty, osteocyty, adipocyty, myocyty), ale i například v neurony, buňky ektodermálního původu (Ma et al., 2014).

Neurální kmenové buňky (NSC) jsou prekuzory nervových buněk (například neurony či astrocyty), které se přirozeně nacházejí v CNS. Jejich transplantace je nadějí pro osoby po úrazu například páteřní míchy nebo osoby trpící neurodegenerativními chorobami, jako je Huntingtonova nebo Parkinsonova choroba (Kim et al., 2013).

Hematopoetické kmenové buňky (HSC) jsou jediné ASC, jež se v současnosti běžně transplantují. Jedná se o prekuzory všech krevních buněk, jejich transplantace je standardní procedurou pro jedince trpící například leukémií (Slavin, 2000). Transplantace HSC bývá nepřesně označována jako „transplantace kostní dřeni“.

Práce s ASC je nicméně spojena s podstatným problémem – jejich vlastnosti se s rostoucím věkem dárce mění. Při porovnání ASC získaných od osob různého věku byly nalezeny rozdíly v jejich expresních profilech. Produkce miRNA se u ASC od osob mladších 50 let liší od produkce miRNA zjištěné u ASC od osob starších 50 let. Rozdílná produkce miRNA má mimo jiné přímý vliv na expresi složek MAP a NF κ B signální kaskády (starší ASC exprimovaly více NF κ B a méně I κ B nebo ERK1/2) (Pandey et al., 2011). Zmíněné rozdíly v expresních profilech mají vliv na vlastnosti ASC. Konkrétně u MSC bylo zjištěno, že imunosupresivní vlastnosti starších MSC jsou v porovnání s imunosupresivními vlastnostmi mladších MSC zanedbatelné. Bylo tak demonstrováno na léčbě roztroušené

sklerózy. Pro úplnost lze dodat, že mladším dárčům bylo v průměru 26, starším 63 (Scruggs et al., 2013).

1.4. Nádorové kmenové buňky (CSC)

Pro úplnost je třeba zmínit existenci nádorových kmenových buněk (CSC). Jedná se o buňky, z nichž celý nádor vzniká, samotný nádor je však heterogenní skupinou buněk. CSC mají stejně jako ostatní kmenové buňky schopnost sebeobnovy a diferenciaci, mohou tím pádem vytvořit *in vivo* celý nádor. Hovoříme o buňkách postižených genetickými mutacemi nebo epigenetickými změnami, které způsobí nádorovou transformaci daných buněk. Pro příklad lze uvést, že mutace v genu pro transkripční faktor WT1 způsobuje signifikantní snížení počtu místně-specifických hydroxymethylací a zároveň snižuje množství TET2 enzymu v buňce. Předpokládá se, že tyto mutace úzce souvisejí se vznikem akutní myeloidní leukémie (Rampal et al., 2014). Rovněž byla nalezena souvislost mezi mutacemi v genech *APC* (tumor supresor) nebo *CTNBI* (transkripční faktor) současně s mutací v genu *KRAS*. Tyto mutace mají za následek zesílení WNT signální kaskády a následně obnovení kmenového stavu buňky, což bylo pozorováno u iniciace rakoviny tlustého střeva (Rolle et al., 2016).

1.5. Srovnání

Všechny kmenové buňky mají schopnost sebeobnovy a diferenciaci. ESC a iPSC jsou pluripotentní, mají tedy schopnost diferencovat v jakékoli jiné tělní buňky. ASC jsou sice popsány jako pouze multipotentní, přesto u nich byla zaznamenána schopnost diferencovat se i v buňky pocházející z jiného zárodečného listu. ASC se jako jediné kmenové buňky přirozeně vyskytují v těle dospělého organismu.

Výše specifikované tři typy kmenových buněk jsou využitelné v reparativní medicíně. Jejich kvalita (respektive nepoškozenost genetického materiálu) je pro jejich další vývoj kritická. Studie Nārva a kol. prokázala, jak je pro další vývoj ESC důležité nezměněné množství kopií daných genů (CNV) a zachování heterozygoty (LOH). Dále bylo zjištěno, jak je genom ESC *in vitro* nestabilní; více než 30 pasážování mělo značně negativní účinky. Při porovnávání buněk, které prošly méně než 30 pasážováními, s buňkami, které prošly více než 30 pasážováními, byly nalezeny rozdíly. Brzké a pozdní pasáže se lišily v 24% LOH míst a v 66% CNV. Tyto mutace ovlivnily expresní profil těchto buněk. Bylo vyzorováno, že 20,2% takto upregulovaných/downregulovaných genů ovlivňuje buněčnou transformaci, 14,3% buněčné dělení a buněčný cyklus, 44,4% těchto genů je stejně upregulovaných/downregulovaných v CSC (Nārva et al., 2010). Lee a kol. uvádí, že expresní

profily CSC a ostatních kmenových buněk značně shodují (Lee et al., 2013a). Není proto překvapivé, že nestabilita genomu kmenových buněk nezdědka vede k jejich transformaci v CSC.

2. Imunitní reakce proti kmenovým buňkám: příčiny a důsledky

Velkým problémem, který brání medicínskému využití kmenových buněk a tkání z nich derivovaných, je jejich potenciální imunogenita. Existují studie, jež popisují imunitní reakci vůči všem typům kmenových buněk. Existují však i studie, které uvádějí pravý opak.

U kmenových buněk byla popsána produkce imunosupresivních molekul jako HLA-G nebo TGF- β . Bylo také popsáno, že kmenové buňky mají sníženou expresi klasických MHC I glykoproteinů, nejsou tedy efektivně rozpoznatelné adaptivní imunitou. Snížená exprese MHC I však může způsobit NK buněčnou reakci vůči kmenovým buňkám. Dhodapkar a kol. dále popsali existenci paměťových T-lymfocytů cílících proti buňkám, které exprimují protein *Oct4* (Dhodapkar et al., 2010). Tento protein je přímo markerem pluripotence a je tedy exprimován ESC i iPSC.

Po diferenciaci kmenové buňky značně mění své vlastnosti, například se u nich masivně zvýší exprese klasických MHC I glykoproteinů a jsou tedy poté rozpoznatelné i adaptivní imunitou (Drukker et al., 2002), která na ně reaguje jako na ostatní auto/alo/xenologní buňky. Mezi další imunogenní molekuly, jejichž exprese byla u kmenových buněk popsána, patří mHC a antigeny krevních skupin (Almeida et al., 2013).

Jak je výše uvedeno, pokud jde o imunogenicitu kmenových buněk, závěry různých studií se značně liší. Rozbor příčin a důsledků rozdílných závěrů jednotlivých studií je obsahem této kapitoly.

2.1. Imunitní reakce proti ESC

U transplantací ESC lze imunitní reakci očekávat, jelikož se nejedná o autologní transplantaci. Autologní, respektive syngenní, ESC je možno u savců získat pomocí inbredních kmenů zvířat. Autologní ESC lze připravit uměle pomocí partenogeneze nebo přenosem jader. Tyto metody jsou však spojeny s dalšími komplikacemi, jak bude níže popisováno.

Nediferencované ESC byly dlouhou dobu považovány za slabě imunogenní až imunosupresivní, protože mají velmi nízkou expresi klasických MHC I molekul a zcela postrádají MHC II molekuly (Drukker et al., 2002) (Boyd and Wood, 2009) (Suárez-Álvarez

et al., 2010). U ESC byla zaznamenána produkce neklasických MHC I – Drukker a kol. zaznamenali produkci HLA-E. Produkci HLA-G Drukker a kol. však nezaznamenali (Drukker et al., 2002). Produkce HLA-G byla zaznamenána až pozdější studií Verloese a kol. (Verloes et al., 2011).

ESC produkují TGF- β (Koch et al., 2008) a MFG-E8 (Tan et al., 2015), díky čemuž mají *in vitro* imunopresivní účinky. TGF- β působí na monocyty a brání jejich maturaci v dendritické buňky, jelikož potlačuje produkci glutathionu, který je pro jejich maturaci nezbytný. Tímto způsobem TGF- β nepřímo brání i maturaci T-lymfocytů (Leshansky et al., 2014). Solubilní molekuly produkované ESC, včetně MFG-E8, mají na maturaci T-lymfocytů i přímý vliv, protože brání fosforylaci a tím pádem aktivaci proteinkinázy C- θ (PKC- θ) (Mohib et al., 2012) (Tan et al., 2015). Tato kináza je nezbytnou složkou NF κ B signální kaskády vedoucí k maturaci naivních CD4⁺ T-lymfocytů. Zmíněné solubilní faktory mají dále vliv na cytokinovou produkci Th1 lymfocytů. Th1 lymfocyty začnou místo pro ně typických cytokinů IFN- γ a IL-2 produkovat TGF- β a také FoxP3, molekuly typické pro Treg lymfocyty (Mohib et al., 2012).

In vivo se však tyto poznatky nepotvrdily, naopak tkáně derivované z ESC byly popsány jako silně imunogenní. Bylo zjištěno, že po stimulaci pomocí INF- γ se u ESC masivně zvýší exprese MHC I. Na expresi MHC II stimulace INF- γ nemá vliv (Drukker et al., 2002) (Suárez-Álvarez et al., 2010). Studie Swijnenburga a kol. ukázala, že ESC imunopresivní vlastnosti *in vivo* ztrácejí. Swijnenburg a kol. transplantovali ESC ischemického myokardu myši, tyto tkáně byly následně silně infiltrovány NK buňkami a T-lymfocyty. S postupujícím časem a tedy diferenciací ESC se infiltrace ještě zesílila, v alologním prostředí mezi 4. a 8. Týdnem pozorování veškeré transplantované buňky zmizely. Můžeme učinit závěr, že ESC v alologním prostředí nejsou imunopresivní, naopak jsou imunogenní (Swijnenburg et al., 2005). V xenologním prostředí je rejekce ESC rychlejší než v alologním prostředí. Grinnemo a kol. již tři dny po injekci lidských ESC do myšního myokardu v příslušném místě výskyt ESC nezaznamenali. V místě injekce byl detekován výskyt makrofágů a T-lymfocytů (Grinnemo et al., 2006). Pouze v syngenním je imunogenicita ESC minimální (Pearl et al., 2011).

Při transplantacích z ESC derivovaných tkání je v xeno/alologním prostředí nutné užívat alespoň krátkodobou (několikaměsíční) imunopresi, v současnosti se tak běžně děje u transplantací u lidí i zvířat. Pro příklad lze uvést, že při aplikaci imunoprese má léčba srdce pomocí ESC pozitivní výsledky: u opic (makaků) i lidského pacienta se štěp uchytil a i po

třech měsících po transplantaci byly v srdci detekovány z ESC derivované kardiomyocyty (Chong et al., 2014) (Menasché et al., 2015).

Imunitní reakci lze omezit, pokud jsou ESC a z nich derivované tkáně transplantovány do imunoprivilegovaných oblastí. Dobu, po kterou je nutno aplikovat imunosupresiva, lze zkrátit jen na několik týdnů.

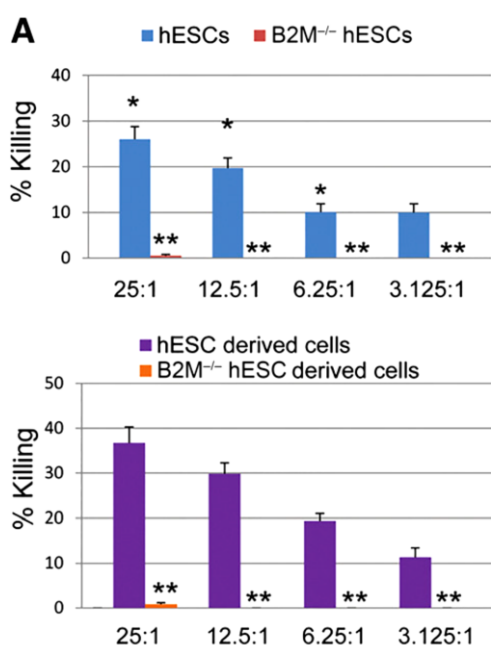
Pro příklad léčba zraku v případě Stargardtovy a atrofické věkem podmíněné makulární degenerace pomocí ESC (respektive buněk pigmentového epitelu sítnice z nich derivovaných) má, jak se zdá, dobré výsledky. Ve studii Schwartz a kol. se transplantované štěpy v oku uchytily: 13 z 18 pacientů vykazovalo zvýšenou pigmentaci v subretinální oblasti. U jednoho pacienta se zrak zhoršil, u všech ostatních zůstal stejný nebo se zlepšil. Důležité je, že po celou dobu nebyla zaznamenána rejekce transplantovaných buněk (Schwartz et al., 2015). Song a kol. provedli podobnou studii. 3 z jejich 4 pacientů se zlepšil zrak, u jednoho k žádné změně nedošlo. 3 ze 4 pacientů nevykazovali žádné známky rejekce štěpu, nicméně u jednoho pacienta se vyvinula intraretinální cysta. Vývoj této cysty má víc než jedno vysvětlení, do úvahy přichází i rejekce štěpu (Song et al., 2015).

U ESC byly popsány tři typy povrchových molekul, které jsou důvodem vzniku imunitní reakce vůči nim: MHC a mHC glykoproteiny a antigeny krevních skupin (Almeida et al., 2013).

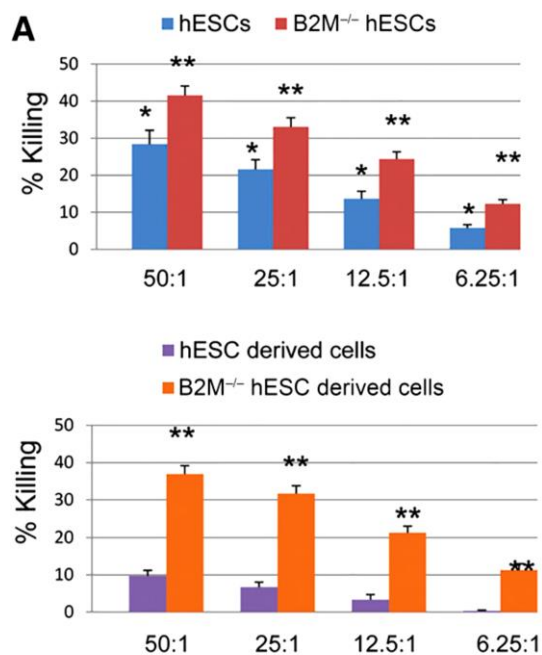
Studie Deuse a kol. potvrdila důležitost MHC ve vzniku imunitní reakce. V této studii byly ESC vytvořeny uměle metodou přenosu jader. Když byly transplantovány ESC, jejichž MHC se neshodovaly s recipientem, v 80% případů byl štěp zcela odmítnut. Pokud se dárcce a příjemce neshodovali pouze v mHC, množství odmítnutých štěpů bylo mnohem nižší, pouhých 10%. Je tedy evidentní, že role mHC v rejekci štěpu je v porovnání s MHC minoritní (Deuse et al., 2015). Bylo prokázáno, že ESC exprimují i antigeny krevních skupin (Mölne et al., 2008), nicméně jejich role v rejekci transplantátu není detailně popsána. Předejít rejekci transplantátu způsobenou právě antigeny krevních skupin je snadné, stačí totiž, když má dárcce a příjemce stejnou krevní skupinu.

Jak ukázala výše zmíněná studie Deuse a kol., na vzniku imunitní reakce vůči ESC se v alologním prostředí značnou měrou podílí molekuly MHC, respektive neshoda dárcce a příjemce v těchto glykoproteinech. Za účelem zabránění T-buněčné rejekci transplantátu způsobené neshodou dárcce a příjemce v MHC glykoproteinech Wang a kol. vytvořili kmen ESC deficientní na β 2-mikroglobulin. Popsané ESC nejsou ani po diferenciaci schopné exprimovat HLA I (= lidské MHC I) a jsou tedy rezistentní vůči cytotoxickým T-lymfocytům, zároveň jsou však náchylnější k destrukci pomocí NK buněk. Tato studie dále prokázala, že

škody způsobené cytotoxickými T-lymfocyty jsou vážnější než škody způsobené NK buňkami, viz níže uvedené grafy. Další velkou výhodou takovýchto ESC je fakt, že tyto buňky je možné používat univerzálně bez ohledu na MHC haplotyp recipienta. Nutno dodat, že čistota izolovaných T-lymfocytů byla $88\% \pm 3,3\%$ a čistota izolovaných NK buněk byla $86\% \pm 2,6\%$ (Wang et al., 2015).



Obrázek 1 Množství přeživších ESC po kultivaci s CD8⁺ T-lymfocyty (Wang et al., 2015)



Obrázek 2 Množství přeživších ESC po kultivaci s NK buňkami (Wang et al., 2015)

Dingwall a kol. se pokusili o něco podobného, genetickými úpravami ESC se snažili snížit imunogenicitu těchto buněk. Vytvořili kmen ESC, který i po diferenciaci exprimuje protein H2-B1 (myší homolog HLA-G) (Dingwall et al., 2015). Vytvořený kmen by dle *in vitro* výsledků měl být rezistentní vůči NK buňkám a současně být i méně napadán T-lymfocyty (Gal et al., 1999) (Schmitt et al., 2015). *In vivo* se však silný vliv H2-B1 na reakci Tc lymfocytů nepotvrdil, transplantované ESC nebyly schopné přežít v xenologním ani alologním prostředí. Pouhá exprese H2-B1/HLA-G tudíž k přežití transplantovaných ESC pravděpodobně nestačí (Dingwall et al., 2015).

Uměle vytvořit ESC obsahující genom recipienta je další možnost, jak se vyhnout imunitní reakci. Takové ESC je možné vytvořit po přenosu jader. Haploidní jádro oocyту je nahrazeno diploidní jádrem somatické buňky recipienta, dojde k vývoji ESC s jaderným

genomem recipienta. Jaderná DNA však není jediná, kterou savčí buňky obsahují. DNA obsahují i mitochondrie, které spolu s cytoplasmou v oocytu zůstávají, jejich DNA je pro recipienta alologní. Výše zmíněná studie Deuse a kol. prokázala, že alologní mitochondriální proteiny zcela postačují pro vznik imunitní reakce vůči specifikovaným buňkám, pouze 60% takových transplantací bylo úspěšných. Z uvedeného plyne závěr, že přenosem autologního jádra do alologního oocytu se imunitní reakci vyhnout nedá (Deuse et al., 2015).

Z oocytu je možno vytvořit ESC i partenogenezí. Veškerý genom, který takové ESC obsahují, je identický s genomem dárkyně oocytů. Z partenogenetických ESC byly úspěšně derivovány NSC, v současnosti probíhá první fáze výzkumu jejich aplikace pro léčbu Parkinsonovy choroby. Bylo zjištěno, že NSC produkují HLA-G a že z partenogenetických ESC derivované NSC produkují více HLA-G, než ty „normální“ (obsahující genom dvou rodičů). Z partenogenetických ESC derivované NSC jsou tudíž schopné tlumit NK buněčnou imunitní reakci účinněji, respektive jsou NK buňkami méně napadány, což je rozhodně pozitivní poznatek (Schmitt et al., 2015).

Na závěr této podkapitoly lze shrnout, že byť se dle *in vitro* zjištěné produkce imunopresivních molekul jeví imunogenita ESC jako minimální, jsou *in vivo* imunogenní. Po diferenciaci se vlastnosti ESC mění, například se u nich masivně zvýší exprese MHC I, z tohoto důvodu jsou neupravené ESC v alologním i xenologním prostředí cílem imunitní reakce. Genetické úpravy ESC dokáží jejich imunogenitu snížit, ne jí však úplně zabránit. Stejně tak nejsou zcela neimunogenní ani ESC vzniklé přenosem autologního jádra do alologního oocytu.

Při dočasné aplikaci imunopresiv se však ESC jsou schopné v těle příjemce přežít a nahradit poškozenou tkáň.

2.2. Imunitní reakce proti iPSC

iPSC byly vytvořeny jako umělá alternativa ESC, která by neměla u recipientů vyvolávat imunitní reakci, jelikož je možno vytvořit i autologní iPSC. Proteom iPSC a produkce mRNA se značně shodují s ESC, proto lze logicky předpokládat, že se i jejich vlastnosti budou ve velké míře ucha pouze malé množství MHC I a žádné MHC II (Park et al., 2013). iPSC exprimují malé množství MHC I a žádné MHC II (Munoz et al., 2011) (Choi et al., 2015). iPSC stejně jako ESC exprimují ve srovnání s fibroblasty množství HLA-G a na rozdíl od ESC i HLA-EE (Lu et al., 2014). Po *in vitro* stimulaci IFN- γ u iPSC vzroste produkce MHC I, včetně HLA-E, exprese MHC II a HLA G zůstává beze změny. I přes zvýšenou expresi MHC I po stimulaci

IFN- γ však iPSC *in vitro* nejsou schopny aktivovat proliferaci alologních CD4⁺ a CD8⁺ T-lymfocytů, stimulují je však k produkci IL-2 a IL-10 (Lu et al., 2014). iPSC dále exprimují i „*don't eat me* signál“ CD47 ve stejném množství jako embryonální fibroblasty, proto jsou schopny se bránit fagocytóze makrofágy (Mizukami et al., 2014). Zároveň však iPSC exprimují protein *Oct4*. Dhodapkar a kol. v lidském těle prokázali existenci paměťových T-lymfocytů cílících na buňky exprimující tento protein (Dhodapkar et al., 2010). U myších (Dressel et al., 2010) i lidských iPSC (Suárez-Álvarez et al., 2010) byla popsána i produkce ligandů pro NKG2D receptor NK buněk. Vazba tohoto receptoru na příslušný ligand spouští NK buněčnou reakci vůči takovým buňkám. Zároveň však bylo *in vitro* zjištěno, že specifikované reakce jsou schopny pouze NK buňky předem aktivované pomocí IL-2 (Dressel et al., 2010).

Sekretom iPSC dosud nebyl blíže specifikován.

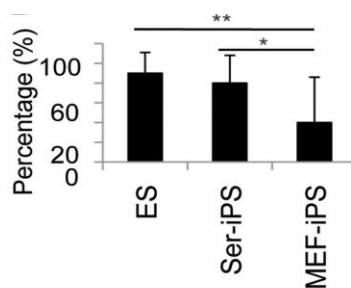
In vivo provedené studie nedospěly k jasnému závěru, zda jsou iPSC imunogenní či nikoli, protože se výsledky jednotlivých studií značně liší. Studie Zhaa a kol. provedena roku 2011 autologní iPSC označila jako silně imunogenní, mnohem silněji než syngenní ESC. Bylo zjištěno, že iPSC exprimují jiné geny než ESC a že imunitní reakce vůči iPSC je závislá na T-lymfocytech. V posuzovaném případě se jednalo o geny *Hormad1* a *Zg16*. Souvislost overexprese těchto genů s imunogenicitou příslušných buněk není náhodná, tyto geny jsou totiž overexprimovány i v rakovinných buňkách. Na základě uvedených poznatků autoři studie dospěli k závěru, že tělo vnímá iPSC jako druh rakovinných buněk (Zhao et al., 2011). Později provedené studie však došly k zcela odlišným závěrům. Studie Arakiho a kol. z roku 2013 nezjistila signifikantní rozdíl mezi imunogenicitou syngenních ESC a autologních iPSC. ESC i iPSC byly diferencovány v buňky kůže a kostní dřevě a následně transplantováno, po transplantaci přežilo 98,3% štěpů z iPSC a 92,5% štěpů z ESC. Štěpy byly jen velmi málo infiltrovány imunitními buňkami a transplantované buňky byly po několika měsících přítomny v tělech příjemců. Stejně tak nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v expresi *Hormad1* a *Zg16*, naopak byl zjištěn rozdíl v expresi těchto genů mezi různými tkáněmi obecně (zde kostní dřevě a kůže) (Araki et al., 2013). Následná studie Guhy a kol. zaznamenala dokonce 100% přeživších štěpů ze syngenních ESC a autologních iPSC (Guha et al., 2013).

Morizane a kol. prokázali, že i alologní iPSC jsou schopny v těle (mozku) příjemce – makaka, přežít bez imunosuprese. V počtu přeživších alologních a autologních štěpů nebyl signifikantní rozdíl, je však pravdou, že alologní štěpy byly více infiltrovány imunitními buňkami a vykazovaly nižší hustotu (Morizane et al., 2013). S výsledky Zhaa a kol. se rozchází i studie Aweho a kol. Závěr dané studie je, že exprese genů *Hormad1* a *Zg16*

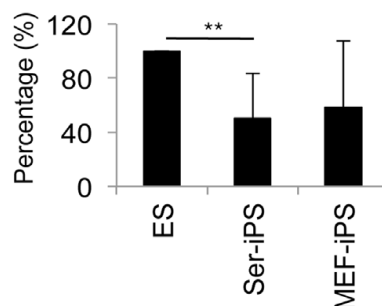
nesouvisí s imunitní reakcí vůči příslušným buňkám. Awe a kol. navíc zaznamenali, že produkce *Hromad1* je u různých kmenů iPSC extrémně nízká (Awe et al., 2015).

Vyvstává zde řada otázek, proč se závěry uvedených studií liší. Jedním z faktorů je rozdílný původ buněk reprogramovaných v iPSC. Jak bylo prokázáno Polem a kol., původ buněk ovlivňuje jejich vlastnosti i po reprogramování v iPSC – iPSC různého původu se liší v expresních i epigenetických profilech. Je však pravdou, že tyto expresní a epigenetické rozdíly se týkají pouze čerstvě reprogramovaných iPSC. V předmětné studii 16 pasážování příslušných buněk stačilo na to, aby tyto rozdíly již nebyly znatelné (Polo et al., 2010).

Uvedené rozdíly ovlivňují imunogenicitu příslušných buněk. Závěrem studie Wang a kol. je, že iPSC vytvořené z buněk imunoprivilegovaných tkání (zde Sertoliho buněk: Ser-iPSC) jsou méně imunogenní než iPSC, které pocházejí z buněk mimo tyto tkáně (zde embryonální fibroblasty: MEF-iPSC); štěpy z Ser-iPSC byly méně infiltrovány imunitními buňkami a přežily ve vyšších procentech než štěpy z MEF-iPSC. I v této studii však bylo prezentováno, že tyto rozdílné vlastnosti postupem času mizí. Po 9-15 pasážování byl prezentován rozdíl v imunogenicitě, úspěšně se uchytlo 80% Ser-iPSC a 40% MEF-iPSC; po 35-38 pasážování již o snížené imunogenicitě Ser-iPSC uvažovat nelze, uchytlo se totiž 50% Ser-iPSC a 60% MEF-iPSC (Wang et al., 2014).



Obrázek 4 Množství přeživších buněk po 9-15 pasážování (Wang et al., 2014)



Obrázek 3 Množství přeživších buněk po 35-38 pasážování (Wang et al., 2014)

Dalším možným vysvětlením, proč jsou iPSC v některých případech označovány jako imunogenní a v jiných jako neimunogenní, je rozdílná kvalita použitých buněk. iPSC použity Zhaem a kol. měly diskutabilní kvalitu, jelikož pro pokusy byly vybrány i iPSC, u kterých došlo k integraci použitého retrovirového vektoru nesoucího příslušné geny do genomu hostitelských buněk na blíže nespecifikovaná místa (Zhao et al., 2011). Araki/Guha a kol. se naopak na kvalitu použitých buněk zaměřili, a proto pro pokusy byly vybrány pouze buňky, u nichž se vektor nesoucí geny pro OSKM neintegroval do hostitelského genomu, a genová transkripce nebyla ovlivněna jiným než zamýšleným způsobem (Araki et al., 2013) (Guha et al., 2013).

Imunogenicitu iPSC rovněž ovlivňuje způsob reprogramování. Zhao a kol., stejně jako Morizane a kol., pozorovali sníženou imunogenicitu iPSC reprogramovaných neintegrujícím se epizomálním vektorem v porovnání s iPSC reprogramovanými retrovirovým vektorem (Zhao et al., 2011), což je mimo jiné způsobeno zbytkovou expresí virových genů přítomných na vektoru (Morizane et al., 2013).

Mezi potenciální faktory, proč se s výjimkou studie Guha a kol. neuchytily všechny transplantované autologní štěpy, patří i skutečnost, že transplantaci jako takovou jen zřídka přežijí všechny transplantované buňky. Přítomnost mrtvých buněk má totiž negativní vliv na přežívání buněk v jejich okolí (Rock and Kono, 2008).

V alogním prostředí může imunitní reakci způsobit i neshoda dárce a příjemce v MHC glykoproteinech, ani absolutní shoda v MHC však nezajistí bezproblémové přijetí štěpu. Svou roli zde hraje neshoda v jiných faktorech, jako jsou mHC (Mizukami et al., 2014).

Tabulka 1: Porovnání iPSC použitých v jednotlivých studiích v autologním prostředí

Autoři	Rok	Původ iPSC	Metoda reprogramování	Procento přeživších štěpů	
Zhao a kol.	2011	Myší embryonální fibroblasty	Retrovirový vektor	54% rostoucích, 17% zmenšujících se	
			Neintegrující se epizomální vektor	80% rostoucích, 9% zmenšujících se	
Araki a kol.	2013	Myší kůže	Plasmidy pCX-OXS-2A a pCXc-Myc	98,3 ± 1,3%	
		Myší kostní dřeň			
Guha a kol.	2013	Myší fibroblasty z konce ocasu	Lentivirový vektor	100%	
			Neintegrující se epizomální vektor		
Morizane a kol.	2013	Opičí fibroblasty z ústní dutiny	Retrovirový vektor	100%; obsahovaly množství CD45 ⁺ buněk	
		Opičí jednojaderné buňky periferní krve	Neintegrující se epizomální vektor	100%	
Wang a kol.	2014	Myší Sertoliho buňky	Retrovirový vektor	80% brzkých pasáží	50% pozdních pasáží
		Myší embryonální fibroblasty		40% brzkých pasáží	60% pozdních pasáží

Původ, metody reprogramování i kvalita iPSC použitých v jednotlivých studiích se liší. Tyto faktory ovlivňují jejich imunogenicitu, proto nemůžeme jednoznačně říci, zda a do jaké míry jsou iPSC imunogenní. Na druhou stranu – vzhledem k faktu, že studie, které hlídaly kvalitu iPSC (Guha/Araki a kol), nepozorovaly vznik silné imunitní reakce proti nim, se lze přiklonit k názoru, že imunogenita iPSC je v autologním prostředí minimální.

2.3. Imunitní reakce proti ASC

2.3.1. Mezenchymální kmenové buňky

MSC *in vitro* vykazují imunosupresivní účinky: byla u nich popsána exprese HLA-G (Nasef et al., 2007), FasL (Akiyama et al., 2012), prostaglandinu E₂ (Spaggiari et al., 2009), oxidu dusnatého (Ren et al., 2010), TSG-6 (Sala et al., 2015), indoylamin-2,3-dioxigenázy (Waterman et al., 2010) nebo TIMP-1 (Zanotti et al., 2016), inhibují tedy reakci dendritických buněk i T-lymfocytů. Imunosupresivní vlastnosti MSC z velké míry závisí i na IL-10. Není však úplně jisté, v jaké míře jej produkují samy tyto buňky, respektive do jaké míry k jeho produkci MSC stimulují buňky ve svém okolí (Ma et al., 2014). MSC rovněž exprimují adhezivní molekuly VCAM-1 a ICAM-1. Tyto molekuly jsou v těle důležité pro adhezi T-lymfocytů ke stěnám cév; v tomto případě však umožňují adhezi T-lymfocytů přímo k MSC. Díky této adhezi mohou na T-lymfocyty působit i molekuly jako NO, které následkem krátkého poločasu rozpadu působí jen v bezprostředním okolí buňky, která jej produkuje (Ren et al., 2010).

Autologní MSC *in vivo* imunitní reakci nevyvolávají a jsou schopné reparovat poškozené tkáně, například srdeční sval (Schuleri et al., 2009). Ne vždy však je autologní buňky možné použít, proto je nutné aplikovat alogenní MSC. V případě alogenních transplantací se výsledky, co do imunogenicity těchto buněk, značně liší. Podle některých studií jsou MSC schopny vyvolat silnou T-buněčnou imunitní reakci (Nauta et al., 2006) (Eliopoulos et al., 2005), jiné však uvádějí pravý opak (Ding et al., 2010) (Tang et al., 2016). Watermann a kol. přišli na příčinu takto rozdílných výsledků, protože prokázali existenci dvou rozdílných fenotypů MSC vznikajících po stimulaci rozdílných TLR receptorů. Po stimulaci TLR3 vzniká imunosupresivní fenotyp MS2 a po stimulaci TLR4 vznikne imunogenní fenotyp MS1.

Sekretom těchto fenotypů se liší: MS1 produkuje IL-6, IL-8 a překvapivě i TGF- β , MS2 produkuje indoylamin-2,3-dioxigenázu, IL-4 a prostaglandin E₂ (Waterman et al., 2010). Imunosupresivní MSC je možné využívat v podstatě jako lokální imunosupresivum. Přítomnost MSC pomáhá hojení poškozených tkání a oslabuje rejekci transplantátů (Ding et

al., 2010) (Lee et al., 2013b) (Tang et al., 2016). MSC dokonce pomáhají zmírňovat autoimunitní choroby. MSC overexprimující IL-10 jsou využitelné při léčbě revmatoidní artritidy (Lim et al., 2016). Opakované injekce auto/alo/xenologních MSC zmírňují systémový lupus erythematosus (Choi et al., 2016).

MSC jsou důležité i pro jiné ASC, jelikož pomáhají vytvořit imunoprivilegované prostředí pro NSC (Salgado et al., 2015) a HSC (Méndez-Ferrer et al., 2010).

2.3.2. Neurální kmenové buňky

Nediferencované NSC neexprimují MHC II a exprimují jen malé množství MHC I, to se však změní po jejich diferenciaci nebo stimulaci INF- γ ; exprese MHC I se rapidně zvýší, mírně se zvýší i po stimulaci IFN- α . Stimulace pomocí TFN- α u NSC vyvolá i slabou expresi MHC II (Ubiali et al., 2007). NSC sice dokázaly *in vivo* několik týdnů přežít i v neimunoprivilegované tkáni (ledvině), po své diferenciaci však začaly exprimovat MHC I a byly imunitním systémem zničeny. Po celou dobu pozorování se neprokázalo, že by NSC byly schopny aktivní imunosuprese (Hori et al., 2003).

2.3.3. Hematopoetické kmenové buňky

Transplantace HSC je jako jediná z transplantací kmenových buněk běžnou praxí. U této transplantace je nutná dokonalá shoda dárce a příjemce mimo jiné v MHC antigenech; HSC a z nich derivované buňky MHC exprimují. T-lymfocyty dárce jsou aktivovány pomocí DC příjemce, proto mohou začít útočit na tkáň příjemce. Tento jev se nazývá reakce štěpu proti hostiteli (GvHD), následky této reakce mohou být fatální. GvHD reakce je omezená transplantací HSC společně se MSC (Zanotti et al., 2013). Pro udržení imunoprivilegovaného prostředí pro HSC jsou nepostradatelné Treg lymfocyty (Fujisaki et al., 2011), přesto jsou HSC do jisté míry schopny se imunitnímu systému bránit i aktivně. Exprimují CD47, což znamená, že jsou schopny se bránit fagocytóze makrofágy (Jaiswal et al., 2009). Pokud se HSC v těle recipienta uchytí, stává se z něj stabilní chiméra. Imunitní systém takového jedince neútočí na buňky jemu vlastní ani na buňky transplantované. Této skutečnosti je možno využít při velkých orgánových transplantacích. Byla popsána například transplantace kostní dřeně a ledviny od jednoho dárce – transplantovaná kostní dřeň se uchytí a neútočí na tělo recipienta a pochopitelně ani na transplantovanou ledvinu (Leventhal et al., 2012).

Autologní transplantace ASC nevolává imunitní reakci vůči příslušným buňkám, vzhledem k změně jejich vlastností s postupujícím věkem jedince (viz. kapitola Kmenové buňky obecně) však není možno je aplikovat vždy. V alogním prostředí se stávají cílem

imunitní reakce. Výjimkou jsou MSC, které se vyskytují v imunogenním i imunosupresivním fenotypu. Imunosupresivní MSC mají v těle dospělého jedince nezastupitelnou roli v udržování imunoprivilegovaného prostředí pro další typy ASC. Imunosupresivní MSC mají rovněž široké medicínské využití a jejich aplikace jakožto lokálního imunosupresiva se zdá slibná jak při transplantacích, tak při léčbě autoimunitních chorob.

3. Tumorigenicita

3.1. Tumorigenicita ESC

Při léčbě pomocí ESC byla zaznamenána jejich schopnost vytvářet nádory, a to často v imunoprivilegovaném prostředí. Byť existují studie, které tvorbu nádorů po transplantaci ESC nezaznamenaly (Song et al., 2015) (Schwartz et al., 2015), byla publikována řada studií, které jejich vznik zaznamenaly, například Arnhold a kol. po transplantaci neupravených ESC pozorovali tvorbu tumorů u 50% testovaných jedinců (Arnhold et al., 2004). Lze konstatovat, že genom ESC je značně nestabilní (Närvä et al., 2010). Expresní profil ESC se podobá expresnímu profilu CSC, konkrétně byla u obou typů buněk zjištěna exprese *Sox2*, *NANOG* a *Oct4* (Herreros-Villanueva et al., 2014).

Tumorigenicitu ESC lze snížit inhibicí WNT signální kaskády. WNT signální kaskáda úzce souvisí s finální diferenciací buněk a její narušení má často za následek vznik rakovinných buněk. Ve studii Cuiho a kol. se inhibicí dané kaskády pomocí DKK1 výrazně snížilo množství ESC, které po transplantaci zapříčinily vznik tumoru (z 60,58% na 3,23%), navíc se tyto upravené buňky mnohem lépe integrovaly do hostitelské tkáně – do rohovky (integrovalo se jen 33,65% neupravených ESC, upravených se integrovalo 93,54%) (Cui et al., 2013).

Nejjednodušším způsobem, jak předejít tvorbě tumorů po transplantaci ESC, je diferencovat je v potřebné buňky *in vitro*. Berderlau a kol. *in vitro* diferencovali ESC v dopaminergní neurony po 16, 20 a 23 dní a následně je transplantovali do myší. Ukázalo se, že čím déle jsou ESC kultivovány, tím menší je pravděpodobnost vzniku tumoru. Z ESC diferencovaných po dobu 16 dní se tumory vytvořily u všech recipientů, u ESC kultivovaných 23 dní se tumor nevytvořil u žádného z recipientů. Zároveň se však ukázalo, že čím déle jsou ESC diferencovány v dopaminergní neurony, tím menší je pravděpodobnost přežití těchto neuronů po transplantaci (Berderlau et al., 2006). Doi a kol. došli ke stejným závěrům při testování výše uvedeného na opicích: delší kultivace ESC, respektive jejich *in vitro*

diferenciace v dopaminergní neurony, výrazně snižuje jejich tumorigenní potenciál (Doi et al., 2012).

ESC mají potenciál tvořit nádory. Tento jejich tumorigenní potenciál lze snížit například jejich prodlouženou *in vitro* diferenciací v příslušné buňky. Prodloužená *in vitro* diferenciaci však nesnižuje pouze tumorigenní potenciál ESC, ale bohužel i životaschopnost transplantovaných buněk.

3.2. Tumorigenicita iPSC

Laboratorní reprogramování somatických buněk na iPSC se v mnoha ohledech velmi podobá přirozenému vzniku rakovinných buněk. CSC i iPSC vznikají dediferenciací somatických buněk zpět na buňky kmenové. Geny, které jsou v iPSC uměle reaktivované, jsou rovněž aktivní i v CSC, jmenovitě jsou to geny *Myc*, *Klf4*, *Nanog*, *Sox2* a *Oct4*. Nabízí se tudíž možnost, že indukovaná pluripotence je vlastně formou nádorové transformace. Na toto téma provedená studie však tento fakt nepotvrdila. Srovnáním expresních profilů ESC, iPSC a rakovinných buněk (oncogenic foci) bylo zjištěno, že iPSC nejsou analogy ESC ani rakovinných buněk, že jejich vlastní expresní profil se dokonale neshoduje ani s jedním z nich. Ze všech testovaných genů měly však iPSC více upregulovaných / downregulovaných genů společných s ECS než s rakovinnými buňkami. Testované geny souvisely hlavně s buněčným metabolismem, nicméně byly mezi nimi i ty výše uvedené. Výsledky ukazují, že nádorová transformace není nutným následkem indukované pluripotence, tedy že iPSC nejsou druhem rakovinných buněk (Riggs et al., 2013). I přes toto zjištění má zejména autologní transplantace iPSC často za následek vznik tumoru. Allo/xenologní transplantace se s tímto problémem tolik nepotýkají, protože takové iPSC jsou imunogenní; mohou být tudíž imunitním systémem zničeny dříve, než dojde ke vzniku tumoru (Itakura et al., 2015). Jak bylo popsáno výše, autologní iPSC jsou imunogenní jen minimálně, a proto počáteční stádia vznikajícího tumoru mohou imunitnímu systému uniknout.

Dle výše uvedeného lze uvést, že iPSC reprogramované pomocí OSKM mají tumorigenní potenciál, ukázalo se však, že OSKM není jediný způsob reprogramování iPSC. Gen *c-Myc* je jakožto amplifikátor genové exprese aktivní v mnoha druzích nádorů (Ben-Porath et al., 2008), zároveň je však uměle aktivován i v iPSC. Nabízí se zde souvislost mezi jeho aktivitou a tumorigenním potenciálem iPSC. Hamanaka a kol. prokázali, že *c-Myc* není pro dediferenciaci somatických buněk na iPSC nezbytný. Reprogramování somatických buněk pouze za pomoci OSK bylo efektivní také. Touto metodou reprogramované iPSC mají

navíc podstatně nižší tumorigenní potenciál, během šestiměsíčního pozorování se nevyvinul jediný tumor (Hamanaka et al., 2011). Další možností, jak předejít nádorové transformaci kvůli aktivnímu genu *c-Myc* je jeho blokáce pomocí proteinu *Omomyc* (inhibitor *c-Myc*). Výsledky ukazují, že *Omomyc* může být použit k vyfiltrování iPSC zbylých ve štěpu a tudíž neriskovat jejich transformaci v rakovinné buňky déle, než je v těle nezbytně nutné. Takto je možné vyfiltrovat nediferencované iPSC zbylé ve štěpu dokonce i před transplantací. Taktéž je možno *Omomyc* použít jako lék na agresivní formy rakoviny (Oricchio et al., 2014).

Podle jiné metody lze vytvořit iPSC bez reaktivace *c-Myc* a současně i bez reaktivace *Klf4*. Tato metoda zahrnuje inhibici Notch signální kaskády pomocí DAPT. Notch signální kaskáda reguluje vývoj a diferenciaci kmenových buněk a raných stádií buněk z nich vzniklých. Její inhibice má na buňky stejný efekt jako reaktivace genů *Klf* a *c-Myc*, navíc ponechává v aktivní formě i p53, což je důležitý tumor supresor (následek OSKM reaktivace je jeho deaktivace). Buňky, ve kterých byly reaktivovány jen geny *Sox2* a *Oct4* a zároveň do nich byl vpraven DAPT, se začaly chovat jako iPSC, stejně jako buňky, u nichž byly reaktivovány všechny OSKM geny. Velkou výhodou tohoto postupu je, že v těchto iPSC nebyl deaktivován p53, tím pádem nehrozí, že takto upravené buňky budou za cenu obnovené pluripotence zatíženy vzrůstajícím množstvím genomových mutací, které mohou mít rovněž za následek nádorovou transformaci (Ichida et al., 2014).

První popsané iPSC, reprogramované pomocí OSKM, byly popsány jako tumorigenní a to především v autologním prostředí. Ukázalo se však, že reaktivace OSKM není jediný možný způsob dediferenciace somatických buněk zpět na kmenový stav a těmito alternativními způsoby reprogramované iPSC se jeví jako méně tumorigenní. Stejně tak je možno ovlivnit dobu, po kterou budou ve štěpu obsaženy nediferencované iPSC, takové, které exprimují gen *c-Myc*, takové iPSC je možno selektivně zahubit.

3.3. Tumorigenicita ASC

Léčba pomocí ASC má, co se vztahu k rakovině týká, velmi rozporuplné výsledky. V některých studiích totiž byly ASC popsány jako tumorigenní nebo pro-tumorigenní, v jiných jako tumor supresivní. Genetické mutace u ASC mohou mít za následek, že se z nich vyvine tumor - toto bylo popsáno u rakoviny tlustého střeva. Uvádí se, že následkem mutace v genu *Apc* dojde k reaktivaci Wnt signální kaskády a následně dojde ke vzniku adenomu (druh tumoru specifický pro žlázy) (Huels and Sansom, 2015). Co se MSC týče, bylo zjištěno, že se nacházejí přímo v tumoru, kde díky svým imunosupresivním účinkům podporují tumor

v růstu (Djouad, 2003). MSC také v tumoru podporují angiogenezi (sekretují růstový faktor VEGF) a navíc pomáhají tumoru i metastázovat, konkrétně mimo jiné díky sekreci chemokinu CCL5, který zvyšuje pohyblivost a invazivitu buněk tumoru (Karnoub et al., 2007). Taktéž však MSC popsány jako schopné růst tumoru potlačovat, jsou schopné inhibovat Wnt signální kaskádu, která je pro růst a vývoj tumoru nepostradatelná (Ramdasi et al., 2015). I tyto rozdíly lze vysvětlit odlišnými fenotypy MSC, imunogenním MS1 a imunosupresivním MS2. Jak je popsáno výše, sekretom těchto fenotypů se liší, v důsledku čehož má fenotyp MS2, stejně jako nediferencované MSC, pro-tumorigenní účinky. Naopak fenotyp MS1 má anti-tumorigenní účinky, teoreticky je tedy možné ho využít i k léčebným účelům (Waterman et al., 2012).

Některé druhy rakoviny je možno léčit i pomocí HSC. Imunitní buňky, které se diferencují z HSC, mimo jiné napadají buňky nesoucí maligní značky. Pokud uvedeného není imunitní systém pacienta schopen, může pomoci transplantace kostní dřeně, respektive HSC. V minulosti byl popsán efekt zvaný *graft vs. leukemia* (GvL). Tato reakce je založená na NK buňkách, alogenní licencované NK buňky dárce napadají buňky příjemce, které neexprimují některou alelu MHC I glykoproteinů, kterou exprimuje dárce (Nash and Storb, 1996). Reakce štěpu proti hostiteli je však i v tomto případě nezřídka následkem transplantace HSC (Radujkovic et al., 2015). Proto je nutné předejít reakci štěpu proti hostiteli nalezením vhodného dárce nebo aplikací MSC, jež oslabuje GvHD, avšak nemá vliv na reakci GvL (Auletta et al., 2015).

Závěr

Jak bylo řečeno v úvodu, kmenové buňky jsou velmi užitečným nástrojem pro reparativní medicínu. Jsou totiž použitelné i v místech, v nichž není klasická transplantace možná, jako například v CNS.

U kmenových buněk byla *in vitro* popsána je slabá exprese klasických MHC glykoproteinů a zároveň byla popsána exprese imunosupresivních molekul jako neklasické MHC I (HLA-G nebo HLA-E). Kmenové buňky dále sekretují molekuly jako TGF- β nebo IL-10, které mají rovněž imunosupresivní účinky, dále stimulují vznik Treg lymfocytů. *In vivo* však byly všechny typy kmenových buněk alespoň v minulosti popsány jako imunogenní a to i v nediferencovaném stavu. Po transplantaci se začínají kmenové buňky diferencovat a jejich vlastnosti se začnou měnit. Po diferenciaci se u kmenových buněk mimo jiné masivně zvýší exprese klasických MHC I glykoproteinů a stanou se tedy rozeznatelné i pro adaptivní imunitu, následně se v alo/xenologním prostředí stávají cílem reakce T-lymfocytů. Ke stejnému efektu dochází i v zánětlivém prostředí (přítomnosti IFN- γ). Neopomenutelnou roli v imunitní reakci vůči kmenovým buňkám mají i makrofágy a dendritické buňky, hrají velkou roli jako APC. Neshoda v MHC antigenech je považována za hlavní příčinu rejekce transplantátů, svou roli však hraje například i neshoda v mHC. U autologní/syngenní transplantace by tyto problémy neměly nastat. Syngenní ESC sice prokazatelně nevyvolávají imunitní reakci, avšak získat je pro medicínské využití je přirozenou cestou nemožné. Uměle vytvořené ESC vzniklé po přenosu autologního jádra jsou imunogenní. Určitá míra imunosuprese je u transplantace ESC zapotřebí vždy.

Vývoj iPSC měl vyřešit výše specifikovaný problém. K tomu však nedošlo, jelikož i autologní iPSC byly popsány jako imunogenní. Zatím nebylo jednoznačně určeno, na kolik jsou autologní iPSC imunogenní. Původ a metoda reprogramování iPSC ovlivňuje jejich imunogenicitu a zmíněné faktory se v jednotlivých studiích liší. Liší se však i kvalita iPSC použitých v jednotlivých studiích a studie, které pro výzkum použily iPSC vysoké kvality nezaznamenaly vznik silné imunitní reakce proti nim. Proto se lze klonit k názoru, že imunogenicita iPSC je v autologním prostředí minimální.

ASC v autologním prostředí imunogenní nejsou, použitelné jsou však jen zřídka. Jejich vlastnosti se s postupujícím věkem dárce mění. U alogních ASC byla zároveň popsána jejich schopnost vyvolat silnou imunitní reakci. Vznik silné imunitní reakce po transplantaci

HSC (reakce štěpu proti hostiteli) může mít až fatální následky. Výjimkou jsou MSC, které byly v alogenním prostředí popsány jako imunogenní i imunosupresivní zároveň, jelikož se vyskytují ve dvou fenotypech. Aplikace imunosupresivního fenotypu MS2 jakožto lokálního imunosupresiva má zatím slibné výsledky. MS2 je možné využít k podpoření hojení, léčbě autoimunitních chorob nebo oslabení rejekce transplantátu. Tímto způsobem je zároveň možné oslabit rejekci jiných kmenových buněk transplantovaných společně s nimi.

Imunogenicita kmenových buněk však není jediným problémem spojeným s jejich aplikací – u pluripotentních kmenových buněk, tedy ESC a iPSC, byl zároveň popsán i jejich tumorigenní potenciál. Bylo prokázáno, že i minimální genetické/epigenetické změny způsobují transformaci kmenových buněk v buňky rakovinné. Toto riziko je tím vyšší, čím méně diferencované dané buňky jsou, málo diferencovaná stadia těchto buněk by se raději pro transplantace vůbec používat neměla. Prodloužená *in vitro* kultivace nebo selektivní likvidace nediferencovaných buněk ve štěpu pomáhá jejich tumorigenní potenciál snížit. U ASC bylo prokázáno, že určité genové mutace mohou způsobit jejich transformaci v nádorové buňky. Zároveň byly u MSC popsány současně pro-tumorigenní a tumor-supresivní vlastnosti. Důvodem takto rozdílných závěrů jsou opět dva rozdílné fenotypy MSC, fenotyp MS2 je pro-tumorigenní, fenotyp MS1 je antitumorigenní. Fenotyp MS1 je možno využít v léčbě rakoviny, stejně jako je možno k léčbě některých typů rakoviny využít i HSC, tento efekt se nazývá reakce štěpu proti leukémii.

V současnosti se některé kmenové buňky již transplantují, nicméně je nutné užití imunosupresiv a zároveň existuje riziko vzniku tumoru. Chceme-li v budoucnu tato rizika snížit na absolutní minimum, je nezbytná lepší charakteristika epigenomu a sekretomu kmenových buněk.

Použitá literatura

- Akiyama, K., Chen, C., Wang, D., Xu, X., Qu, C., Yamaza, T., Cai, T., Chen, W., Sun, L., and Shi, S. (2012). Mesenchymal-Stem-Cell-Induced Immunoregulation Involves FAS-Ligand-/FAS-Mediated T Cell Apoptosis. *Cell Stem Cell* 10, 544–555.
- Almeida, P.E. de, Ransohoff, J.D., Nahid, A., and Wu, J.C. (2013). Immunogenicity of Pluripotent Stem Cells and Their Derivatives. *Circ. Res.* 112, 549–561.
- Alvarez, C.V., Garcia-Lavandeira, M., Garcia-Rendueles, M.E.R., Diaz-Rodriguez, E., Garcia-Rendueles, A.R., Perez-Romero, S., Vila, T.V., Rodrigues, J.S., Lear, P.V., and Bravo, S.B. (2012). Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs, and iPS cells. *J. Mol. Endocrinol.* 49, R89–R111.
- Araki, R., Uda, M., Hoki, Y., Sunayama, M., Nakamura, M., Ando, S., Sugiura, M., Ideno, H., Shimada, A., Nifuji, A., et al. (2013). Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature* 494, 100–104.
- Arnhold, S., Klein, H., Semkova, I., Addicks, K., and Schraermeyer, U. (2004). Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 4251–4255.
- Auletta, J.J., Eid, S.K., Wuttisarnwattana, P., Silva, I., Metheny, L., Keller, M.D., Guardia-Wolff, R., Liu, C., Wang, F., Bowen, T., et al. (2015). Human Mesenchymal Stromal Cells Attenuate Graft-Versus-Host Disease and Maintain Graft-Versus-Leukemia Activity Following Experimental Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *STEM CELLS* 33, 601–614.
- Awe, J., Eh, G., A, V.-C., J, V., Mh, W., B, T., Db, K., N, K., and Ja, B. (2015). Putative immunogenicity expression profiling using human pluripotent stem cells and derivatives., Putative Immunogenicity Expression Profiling Using Human Pluripotent Stem Cells and Derivatives. *Stem Cells Transl. Med.* 4, 4, 136, 136–145.
- Boyd, A.S., and Wood, K.J. (2009). Variation in MHC expression between undifferentiated mouse ES cells and ES cell derived insulin-producing cell clusters. *Transplantation* 87, 1300–1304.
- Brederlau, A., Correia, A.S., Anisimov, S.V., Elmi, M., Paul, G., Roybon, L., Morizane, A., Bergquist, F., Riebe, I., Nannmark, U., et al. (2006). Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cells to a Rat Model of Parkinson's Disease: Effect of In Vitro Differentiation on Graft Survival and Teratoma Formation. *STEM CELLS* 24, 1433–1440.
- Burnet, F.M. (1960). Immunological Recognition of Self. *Science* 133, 307–311.
- Choi, E.W., Lee, H.W., Shin, I.S., Park, J.H., Yun, T.W., Youn, H.Y., and Kim, S.-J. (2016). Comparative Efficacies of Long-Term Serial Transplantation of Syngeneic, Allogeneic, Xenogeneic, or CTLA4Ig-Overproducing Xenogeneic Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells on Murine Systemic Lupus Erythematosus. *Cell Transplant.* 25, 1193–1206.

- Choi, J., Lee, S., Mallard, W., Clement, K., Tagliazucchi, G.M., Lim, H., Choi, I.Y., Ferrari, F., Tsankov, A.M., Pop, R., et al. (2015). A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs. *Nat. Biotechnol.* 33, 1173–1181.
- Chong, J.J.H., Yang, X., Don, C.W., Minami, E., Liu, Y.-W., Weyers, J.J., Mahoney, W.M., Van Biber, B., Cook, S.M., Palpant, N.J., et al. (2014). Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Regenerate Non-Human Primate Hearts. *Nature* 510, 273–277.
- Cui, L., Guan, Y., Qu, Z., Zhang, J., Liao, B., Ma, B., Qian, J., Li, D., Li, W., Xu, G.-T., et al. (2013). WNT signaling determines tumorigenicity and function of ESC-derived retinal progenitors. *J. Clin. Invest.* 123, 1647–1661.
- Daughtry, B., and Mitalipov, S. (2014). Concise Review: Parthenote Stem Cells for Regenerative Medicine: Genetic, Epigenetic, and Developmental Features. *Stem Cells Transl. Med.* 3, 290–298.
- Deuse, T., Wang, D., Stubbendorff, M., Itagaki, R., Grabosch, A., Greaves, L.C., Alawi, M., Grünewald, A., Hu, X., Hua, X., et al. (2015). SCNT-Derived ESCs with Mismatched Mitochondria Trigger an Immune Response in Allogeneic Hosts. *Cell Stem Cell* 16, 33–38.
- Dhodapkar, K.M., Feldman, D., Matthews, P., Radfar, S., Pickering, R., Turkula, S., Zebroski, H., and Dhodapkar, M.V. (2010). Natural immunity to pluripotency antigen OCT4 in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8718–8723.
- Ding, Y., Bushell, A., and Wood, K.J. (2010). Mesenchymal Stem-Cell Immunosuppressive Capabilities: Therapeutic Implications in Islet Transplantation. *Transplantation* 89, 270–273.
- Dingwall, S., Brooks, A., Apte, S.H., Waters, M., and Wolvetang, M.F.L. and E.J. (2015). Expression of Histocompatibility 2 Blastocyst (H2-B1) in Embryonic Stem Cells Inhibits CD8+ T-Cell Activation but is not Sufficient to Facilitate Graft Tolerance. *J. Stem Cell Res. Ther.* 2015, 1000320.1- 1000320.8.
- Djouad, F. (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102, 3837–3844.
- Doi, D., Morizane, A., Kikuchi, T., Onoe, H., Hayashi, T., Kawasaki, T., Motono, M., Sasai, Y., Saiki, H., Gomi, M., et al. (2012). Prolonged Maturation Culture Favors a Reduction in the Tumorigenicity and the Dopaminergic Function of Human ESC-Derived Neural Cells in a Primate Model of Parkinson’s Disease. *STEM CELLS* 30, 935–945.
- Dressel, R., Nolte, J., Elsner, L., Novota, P., Guan, K., Streckfuss-Bömeke, K., Hasenfuss, G., Jaenisch, R., and Engel, W. (2010). Pluripotent stem cells are highly susceptible targets for syngeneic, allogeneic, and xenogeneic natural killer cells. *FASEB J.* 24, 2164–2177.
- Drukker, M., Katz, G., Urbach, A., Schuldiner, M., Markel, G., Itskovitz-Eldor, J., Reubinoff, B., Mandelboim, O., and Benvenisty, N. (2002). Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 9864–9869.
- Eliopoulos, N., Stagg, J., Lejeune, L., Pommey, S., and Galipeau, J. (2005). Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood* 106, 4057–4065.

- Fujisaki, J., Wu, J., Carlson, A.L., Silberstein, L., Putheti, P., Larocca, R., Gao, W., Saito, T.I., Celso, C.L., Tsuyuzaki, H., et al. (2011). In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature* 474, 216–219.
- Gal, F.-A.L., Riteau, B., Sedlik, C., Khalil-Daher, I., Menier, C., Dausset, J., Guillet, J.-G., Carosella, E.D., and Rouas-Freiss, N. (1999). HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.* 11, 1351–1356.
- Grinnemo, K.-H., Kumagai-Braesch, M., Månsson-Broberg, A., Skottman, H., Hao, X., Siddiqui, A., Andersson, A., Strömberg, A.-M., Lahesmaa, R., Hovatta, O., et al. (2006). Human embryonic stem cells are immunogenic in allogeneic and xenogeneic settings. *Reprod. Biomed. Online* 13, 712–724.
- Guha, P., Morgan, J.W., Mostoslavsky, G., Rodrigues, N.P., and Boyd, A.S. (2013). Lack of Immune Response to Differentiated Cells Derived from Syngeneic Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 12, 407–412.
- Hamanaka, S., Yamaguchi, T., Kobayashi, T., Kato-Itoh, M., Yamazaki, S., Sato, H., Umino, A., Wakiyama, Y., Arai, M., Sanbo, M., et al. (2011). Generation of Germline-Competent Rat Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE* 6, e22008.
- Herreros-Villanueva, M., Bujanda, L., Billadeau, D.D., and Zhang, J.-S. (2014). Embryonic stem cell factors and pancreatic cancer. *World J. Gastroenterol.* WJG 20, 2247–2254.
- Hori, J., Ng, T.F., Shatos, M., Klassen, H., Streilein, J.W., and Young, M.J. (2003). Neural Progenitor Cells Lack Immunogenicity and Resist Destruction as Allografts. *STEM CELLS* 21, 405–416.
- Huels, D.J., and Sansom, O.J. (2015). Stem vs non-stem cell origin of colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 113, 1–5.
- Ichida, J.K., TCW, J., Williams, L.A., Carter, A.C., Shi, Y., Moura, M.T., Ziller, M., Singh, S., Amabile, G., Bock, C., et al. (2014). Notch inhibition allows oncogene independent generation of iPSC cells. *Nat. Chem. Biol.* 10, 632–639.
- Itakura, G., Kobayashi, Y., Nishimura, S., Iwai, H., Takano, M., Iwanami, A., Toyama, Y., Okano, H., and Nakamura, M. (2015). Controlling Immune Rejection Is a Fail-Safe System against Potential Tumorigenicity after Human iPSC-Derived Neural Stem Cell Transplantation. *PLoS ONE* 10, e0116413.
- Jaiswal, S., Jamieson, C.H.M., Pang, W.W., Park, C.Y., Chao, M.P., Majeti, R., Traver, D., Rooijen, N. van, and Weissman, I.L. (2009). CD47 Is Upregulated on Circulating Hematopoietic Stem Cells and Leukemia Cells to Avoid Phagocytosis. *Cell* 138, 271–285.
- Kaneko, S., and Yamanaka, S. (2013). To Be Immunogenic, or Not to Be: That's the iPSC Question. *Cell Stem Cell* 12, 385–386.
- Karnoub, A.E., Dash, A.B., Vo, A.P., Sullivan, A., Brooks, M.W., Bell, G.W., Richardson, A.L., Polyak, K., Tubo, R., and Weinberg, R.A. (2007). Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449, 557–563.

- Kim, S.U., Lee, H.J., and Kim, Y.B. (2013). Neural stem cell-based treatment for neurodegenerative diseases. *Neuropathology* 33, 491–504.
- Koch, C.A., Gerald, P., and Platt, J.L. (2008). Immunosuppression by Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* 26, 89–98.
- Lee, A.S., Tang, C., Rao, M.S., Weissman, I.L., and Wu, J.C. (2013a). Tumorigenicity as a Clinical Hurdle for Pluripotent Stem Cell Therapies. *Nat. Med.* 19, 998–1004.
- Lee, J.H., Jeon, E.-J., Kim, N., Nam, Y.-S., Im, K.-I., Lim, J.-Y., Kim, E.-J., Cho, M.-L., Han, K.T., and Cho, S.-G. (2013b). The Synergistic Immunoregulatory Effects of Culture-Expanded Mesenchymal Stromal Cells and CD4 + 25 + Foxp3 + Regulatory T Cells on Skin Allograft Rejection. *PLOS ONE* 8, e70968.
- Leshansky, L., Aberdam, D., Itskovitz-Eldor, J., and Berrih-Aknin, S. (2014). Human Embryonic Stem Cells Prevent T-Cell Activation by Suppressing Dendritic Cells Function via TGF-Beta Signaling Pathway. *STEM CELLS* 32, 3137–3149.
- Leventhal, J., Abecassis, M., Miller, J., Gallon, L., Ravindra, K., Tollerud, D.J., King, B., Elliott, M.J., Herzig, G., Herzig, R., et al. (2012). Chimerism and Tolerance Without GVHD or Engraftment Syndrome in HLA-Mismatched Combined Kidney and Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Sci. Transl. Med.* 4, 124.
- Lim, J.-Y., Im, K.-I., Lee, E.-S., Kim, N., Nam, Y.-S., Jeon, Y.-W., and Cho, S.-G. (2016). Enhanced immunoregulation of mesenchymal stem cells by IL-10-producing type 1 regulatory T cells in collagen-induced arthritis. *Sci. Rep.* 6, 26851.
- Lu, Q., Yu, M., Shen, C., Chen, X., Feng, T., Yao, Y., Li, J., Li, H., and Tu, W. (2014). Negligible Immunogenicity of Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Human Skin Fibroblasts. *PLoS ONE* 9, e114949.
- Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., and Wang, Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* 21, 216–225.
- Menasché, P., Vanneau, V., Hagege, A., Bel, A., Cholley, B., Cacciapuoti, I., Parouchev, A., Benhamouda, N., Tachdjian, G., Tosca, L., et al. (2015). Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur. Heart J.* 36, 2011–2017.
- Méndez-Ferrer, S., Michurina, T.V., Ferraro, F., Mazloom, A.R., MacArthur, B.D., Lira, S.A., Scadden, D.T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G.N., and Frenette, P.S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829–834.
- Mizukami, Y., Abe, T., Shibata, H., Makimura, Y., Fujishiro, S., Yanase, K., Hishikawa, S., Kobayashi, E., and Hanazono, Y. (2014). MHC-Matched Induced Pluripotent Stem Cells Can Attenuate Cellular and Humoral Immune Responses but Are Still Susceptible to Innate Immunity in Pigs. *PLoS ONE* 9, e98319.
- Mohib, K., AlKhamees, B., Zein, H.S., Allan, D., and Wang, L. (2012). Embryonic Stem Cell-Derived Factors Inhibit T Effector Activation and Induce T Regulatory Cells by Suppressing PKC- θ Activation. *PLOS ONE* 7, e32420.

- Mölne, J., Björquist, P., Andersson, K., Diswall, M., Jeppsson, A., Strokan, V., Rydberg, L., and Breimer, M.E. (2008). Blood group ABO antigen expression in human embryonic stem cells and in differentiated hepatocyte- and cardiomyocyte-like cells. *Transplantation* 86, 1407–1413.
- Morizane, A., Doi, D., Kikuchi, T., Okita, K., Hotta, A., Kawasaki, T., Hayashi, T., Onoe, H., Shiina, T., Yamanaka, S., et al. (2013). Direct Comparison of Autologous and Allogeneic Transplantation of iPSC-Derived Neural Cells in the Brain of a Nonhuman Primate. *Stem Cell Rep.* 1, 283–292.
- Munoz, J., Low, T.Y., Kok, Y.J., Chin, A., Frese, C.K., Ding, V., Choo, A., and Heck, A.J.R. (2011). The quantitative proteomes of human-induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. *Mol. Syst. Biol.* 7, 550.
- Närvä, E., Autio, R., Rahkonen, N., Kong, L., Harrison, N., Kitsberg, D., Borghese, L., Itskovitz-Eldor, J., Rasool, O., Dvorak, P., et al. (2010). High-resolution DNA analysis of human embryonic stem cell lines reveals culture-induced copy number changes and loss of heterozygosity. *Nat. Biotechnol.* 28, 371–377.
- Nasef, A., Mathieu, N., Chapel, A., Frick, J., François, S., Mazurier, C., Boutarfa, A., Bouchet, S., Gorin, N.-C., Thierry, D., et al. (2007). Immunosuppressive Effects of Mesenchymal Stem Cells: Involvement of HLA-G. *Transplantation* 84, 231–237.
- Nash, R.A., and Storb, R. (1996). Graft-versus-host effect after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: GVHD and GVL. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 674–680.
- Nauta, A.J., Westerhuis, G., Kruisselbrink, A.B., Lurvink, E.G.A., Willemze, R., and Fibbe, W.E. (2006). Donor-derived mesenchymal stem cells are immunogenic in an allogeneic host and stimulate donor graft rejection in a nonmyeloablative setting. *Blood* 108, 2114–2120.
- Oricchio, E., Papapetrou, E.P., Lafaille, F., Ganat, Y.M., Kriks, S., Ortega-Molina, A., Mark, W.H., Teruya-Feldstein, J., Huse, J.T., Reuter, V., et al. (2014). A cell engineering strategy to enhance the safety of stem cell therapies. *Cell Rep.* 8, 1677–1685.
- Pandey, A.C., Semon, J.A., Kaushal, D., O’Sullivan, R.P., Glowacki, J., Gimble, J.M., and Bunnell, B.A. (2011). MicroRNA profiling reveals age-dependent differential expression of nuclear factor κ B and mitogen-activated protein kinase in adipose and bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 2, 49.
- Park, K.-M., Cha, S.-H., Ahn, C., and Woo, H.-M. (2013). Generation of porcine induced pluripotent stem cells and evaluation of their major histocompatibility complex protein expression in vitro. *Vet. Res. Commun.* 37, 293–301.
- Pearl, J.I., Lee, A.S., Leveson-Gower, D.B., Sun, N., Ghosh, Z., Lan, F., Ransohoff, J., Negrin, R.S., Davis, M.M., and Wu, J.C. (2011). Short-Term Immunosuppression Promotes Engraftment of Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 8, 309–317.
- Polo, J.M., Liu, S., Figueroa, M.E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., et al. (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 28, 848–855.

- Ben-Porath, I., Thomson, M.W., Carey, V.J., Ge, R., Bell, G.W., Regev, A., and Weinberg, R.A. (2008). An embryonic stem cell–like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat. Genet.* *40*, 499–507.
- Pradeu, T., and Cooper, E.L. (2012). The danger theory: 20 years later. *Front. Immunol.* *3*, 287.
- Radujkovic, A., Guglielmi, C., Bergantini, S., Iacobelli, S., Biezen, A. van, Milojkovic, D., Gratwohl, A., Schattenberg, A.V.M.B., Verdonck, L.F., Niederwieser, D.W., et al. (2015). Donor Lymphocyte Infusions for Chronic Myeloid Leukemia Relapsing after Allogeneic Stem Cell Transplantation: May We Predict Graft-versus-Leukemia Without Graft-versus-Host Disease? *Biol. Blood Marrow Transpl.* *21*, 1230–1236.
- Ramdasi, S., Sarang, S., and Viswanathan, C. (2015). Potential of Mesenchymal Stem Cell based application in Cancer. *Int. J. Hematol.-Oncol. Stem Cell Res.* *9*, 95–103.
- Rampal, R., Alkalin, A., Madzo, J., Vasanthakumar, A., Pronier, E., Patel, J., Li, Y., Ahn, J., Abdel-Wahab, O., Shih, A., et al. (2014). DNA hydroxymethylation profiling reveals that WT1 mutations result in loss of TET2 function in acute myeloid leukemia. *Cell Rep.* *9*, 1841–1855.
- Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L’Huillier, A., Ling, W., Roberts, A.I., Le, A.D., Shi, S., Shao, C., et al. (2010). Inflammatory Cytokine-Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Mesenchymal Stem Cells Are Critical for Immunosuppression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *184*, 2321–2328.
- Riggs, J.W., Barrilleaux, B.L., Varlakhanova, N., Bush, K.M., Chan, V., and Knoepfler, P.S. (2013). Induced Pluripotency and Oncogenic Transformation Are Related Processes. *Stem Cells Dev.* *22*, 37–50.
- Rock, K.L., and Kono, H. (2008). The inflammatory response to cell death. *Annu. Rev. Pathol.* *3*, 99–126.
- Rolle, A.-F.L., Chiu, T.K., Zeng, Z., Shia, J., Weiser, M.R., Paty, P.B., Chiu, V.K., Rolle, A.-F.L., Chiu, T.K., Zeng, Z., et al. (2016). Oncogenic KRAS activates an embryonic stem cell-like program in human colon cancer initiation. *Oncotarget* *7*, 2159–2174.
- Sala, E., Genua, M., Petti, L., Anselmo, A., Arena, V., Cibella, J., Zanotti, L., D’Alessio, S., Scaldaferrri, F., Luca, G., et al. (2015). Mesenchymal Stem Cells Reduce Colitis in Mice via Release of TSG6, Independently of Their Localization to the Intestine. *Gastroenterology* *149*, 163–176.
- Salgado, A.J., Sousa, J.C., Costa, B.M., Pires, A.O., Mateus-Pinheiro, A., Teixeira, F.G., Pinto, L., and Sousa, N. (2015). Mesenchymal stem cells secretome as a modulator of the neurogenic niche: basic insights and therapeutic opportunities. *Front. Cell. Neurosci.* *9*, 249.
- Schmitt, J., Eckardt, S., Schlegel, P.G., Sirén, A.-L., Bruttel, V.S., McLaughlin, K.J., Wischhusen, J., and Müller, A.M. (2015). Human Parthenogenetic Embryonic Stem Cell–Derived Neural Stem Cells Express HLA-G and Show Unique Resistance to NK Cell–Mediated Killing. *Mol. Med.* *21*, 185–196.

Schuleri, K.H., Feigenbaum, G.S., Centola, M., Weiss, E.S., Zimmet, J.M., Turney, J., Kellner, J., Zviman, M.M., Hatzistergos, K.E., Detrick, B., et al. (2009). Autologous mesenchymal stem cells produce reverse remodelling in chronic ischaemic cardiomyopathy. *Eur. Heart J.* *30*, 2722-2732.

Schwartz, S.D., Regillo, C.D., Lam, B.L., Elliott, D., Rosenfeld, P.J., Gregori, N.Z., Hubschman, J.-P., Davis, J.L., Heilwell, G., Spirn, M., et al. (2015). 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. *The Lancet* *385*, 509–516.

Scruggs, B.A., Semon, J.A., Zhang, X., Zhang, S., Bowles, A.C., Pandey, A.C., Imhof, K.M.P., Kalueff, A.V., Gimble, J.M., and Bunnell, B.A. (2013). Age of the Donor Reduces the Ability of Human Adipose-Derived Stem Cells to Alleviate Symptoms in the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Mouse Model. *Stem Cells Transl. Med.* *2*, 797–807.

Slavin, S. (2000). New strategies for bone marrow transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* *12*, 542–551.

Song, W.K., Park, K.-M., Kim, H.-J., Lee, J.H., Choi, J., Chong, S.Y., Shim, S.H., Del Priore, L.V., and Lanza, R. (2015). Treatment of Macular Degeneration Using Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium: Preliminary Results in Asian Patients. *Stem Cell Rep.* *4*, 860–872.

Spaggiari, G.M., Abdelrazik, H., Becchetti, F., and Moretta, L. (2009). MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood* *113*, 6576–6583.

Suárez-Álvarez, B., Rodríguez, R.M., Calvanese, V., Blanco-Gelaz, M.A., Suhr, S.T., Ortega, F., Otero, J., Cibelli, J.B., Moore, H., Fraga, M.F., et al. (2010). Epigenetic Mechanisms Regulate MHC and Antigen Processing Molecules in Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE* *5*, e10192.

Swijnenburg, R.-J., Tanaka, M., Vogel, H., Baker, J., Kofidis, T., Gunawan, F., Lebl, D.R., Caffarelli, A.D., Bruin, J.L. de, Fedoseyeva, E.V., et al. (2005). Embryonic Stem Cell Immunogenicity Increases Upon Differentiation After Transplantation Into Ischemic Myocardium. *Circulation* *112*, 166–172.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* *126*, 663–676.

Tan, Y., AlKhamees, B., Jia, D., Li, L., Couture, J.-F., Figeys, D., Jinushi, M., and Wang, L. (2015). MFG-E8 Is Critical for Embryonic Stem Cell-Mediated T Cell Immunomodulation. *Stem Cell Rep.* *5*, 741–752.

Tang, J., Yang, R., Lv, L., Yao, A., Pu, L., Yin, A., Li, X., Yu, Y., Nyberg, S.L., and Wang, X. (2016). Transforming growth factor- β -Expressing Mesenchymal Stem Cells Induce Local Tolerance in a Rat Liver Transplantation Model of Acute Rejection. *STEM CELLS* *10*.

Ubiali, F., Nava, S., Nessi, V., Frigerio, S., Parati, E., Bernasconi, P., Mantegazza, R., and Baggi, F. (2007). Allorecognition of human neural stem cells by peripheral blood

lymphocytes despite low expression of MHC molecules: role of TGF- β in modulating proliferation. *Int. Immunol.* 19, 1063–1074.

Verloes, A., Velde, H.V. de, LeMaout, J., Mateizel, I., Cauffman, G., Horn, P.A., Carosella, E.D., Devroey, P., Waele, M.D., Rebmann, V., et al. (2011). HLA-G Expression in Human Embryonic Stem Cells and Preimplantation Embryos. *J. Immunol.* 186, 2663–2671.

Wang, D., Quan, Y., Yan, Q., Morales, J.E., and Wetsel, R.A. (2015). Targeted Disruption of the β 2-Microglobulin Gene Minimizes the Immunogenicity of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Transl. Med.* sctm.2015–0049.

Wang, X., Qin, J., Zhao, R.C., and Zenke, M. (2014). Reduced Immunogenicity of Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Sertoli Cells. *PLoS ONE* 9, e106110.

Waterman, R.S., Tomchuck, S.L., Henkle, S.L., and Betancourt, A.M. (2010). A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. *PLoS ONE* 5, e10088.

Waterman, R.S., Henkle, S.L., and Betancourt, A.M. (2012). Mesenchymal Stem Cell 1 (MSC1)-Based Therapy Attenuates Tumor Growth Whereas MSC2-Treatment Promotes Tumor Growth and Metastasis. *PLoS ONE* 7, e45590.

Zanotti, L., Sarukhan, A., Dander, E., Castor, M., Cibella, J., Soldani, C., Trovato, A.E., Ploia, C., Luca, G., Calvitti, M., et al. (2013). Encapsulated mesenchymal stem cells for in vivo immunomodulation. *Leukemia* 27, 500–503.

Zanotti, L., Angioni, R., Cali, B., Soldani, C., Ploia, C., Moalli, F., Gargasha, M., D'Amico, G., Elliman, S., Tedeschi, G., et al. (2016). Mouse mesenchymal stem cells inhibit high endothelial cell activation and lymphocyte homing to lymph nodes by releasing TIMP-1. *Leukemia* 30, 1143–1154.

Zhao, T., Zhang, Z.-N., Rong, Z., and Xu, Y. (2011). Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 474, 212–215.