БИОХИМИЯ, 2024, том 89, вып. 5, с. 772 – 793

УДК 577.12

НАРУШЕНИЯ ТОЛЕРАНТНОСТИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В ОТНОШЕНИИ АУТОЛОГИЧНЫХ ИПСК И ИХ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ ПРОИЗВОДНЫХ

Обзор

© 2024 М.Е. Богомякова[1,2]*, А.Н. Богомазова[1,2], М.А. Лагарькова[1,3]

[1] *ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России, 119435 Москва, Россия; электронная почта: margbog@rcpcm.ru*

[2] *ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России, Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, 119435 Москва, Россия*

[3] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва, Россия*

Поступила в редакцию 12.10.2023
После доработки 21.12.2023
Принята к публикации 13.02.2024

Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) благодаря своей способности к дифференцировке в любой тип соматических клеток являются многообещающим инструментом для решения проблем трансплантационной медицины. Более того, технология репрограммирования делает возможным получение персонализированного, то есть пациент-специфического, клеточного продукта, при трансплантации которого не должны возникать проблемы, связанные с гистосовместимостью пересаженных тканей и органов. В то же время противоречивые сведения о главном преимуществе производных ИПСК аутологичного происхождения – отсутствию иммуногенности – все же ставят под сомнение применение таких клеток вне протоколов иммуносупрессивной терапии. Этот обзор посвящен иммуногенным свойствам сингенных и аутологичных ИПСК и их производных, а также рассмотрению возможных причин нарушения их иммунологической толерантности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, иммунный ответ, иммуногенность, иммунотолератность, Т-клетки, NK-клетки, дифференцировка.

DOI: 10.31857/S0320972524050036 **EDN:** YPENAB

ВВЕДЕНИЕ

Плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) человека, к которым относятся эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК), обладают способностью к неограниченной пролиферации и дифференцировке практически в любой тип соматических клеток [1, 2]. Эти уникальные свойства делают их привлекательным и многообещающим инструментом для моделирования различных заболеваний и разработки лекарственных препаратов [3, 4]. Особая надежда возлагается на дифференцированные производные ПСК как на источник материала для клеточной терапии, что должно решить проблему нехватки донорских органов и тканей [5].

Сегодня о повсеместном внедрении технологии ПСК в клиническую практику говорить еще рано. С момента открытия ЭСК человека в 1998 г.

Принятые сокращения: B2M – бета-2-микроглобулин; ГМК – гладкомышечные клетки; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; ПСК – плюрипотентные стволовые клетки; ПЭС – пигментный эпителий сетчатки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; HLA – человеческий лейкоцитарный антиген; KIR – иммуноглобулин-подобные рецепторы киллерных клеток; NK – натуральные киллеры.

* Адресат для корреспонденции.

прошло всего 26 лет [1], и на текущий момент продолжаются активные работы по совершенствованию протоколов дифференцировки ПСК в специализированные клетки и получению трехмерных структурированных тканей *in vitro* [4]. Высокая стоимость технологии – еще один камень преткновения на пути к масштабной клеточной терапии. По сравнительно недавним оценкам, получение одной линии ИПСК в условиях надлежащей производственной практики (good manufacturing practice, GMP), согласно требуемым стандартам качества, обходится примерно в 800 000 долларов США [4]. Еще одним тормозящим фактором является длительное время, необходимое для получения новой линии ИПСК, а также для ее последующей дифференцировки в желаемый тип клеток [6]. Кроме того, пока четко не определены параметры клинической стандартизации, которые должны применяться как к ПСК [7], так и к их дифференцированным производным [8]. В связи с этим терапия на основе пациент-специфических ИПСК вряд ли найдет широкое распространение по крайней мере в ближайшие годы. Интересно отметить, что клеточные продукты, полученные всего из пяти линий ЭСК, были использованы почти в половине клинических исследований производных ПСК, тем не менее число исследований клеток, полученных из ИПСК, значительно увеличилось за последние несколько лет [9]. В России, согласно Федеральному закону № 180, запрещено использование ЭСК для разработки, производства и применения биомедицинских клеточных продуктов, поэтому в клинической практике возможно применение только производных ИПСК.

Несмотря на очевидные экономические преимущества, связанные с производством клеточных продуктов на основе аллогенных производных ПСК, проблема гистосовместимости донора и реципиента, связанная с высоким полиморфизмом генов главного комплекса гистосовместимости (MHC/HLA), остается нерешенной. Для предотвращения иммунного отторжения при трансплантации аллогенных тканей и органов обязательно пожизненное применение иммуносупрессивной терапии, которая часто сопряжена с побочными эффектами или может быть неэффективна [10]. Изначально считалось, что персонализированная терапия на основе аутологичных производных ИПСК сможет обойти проблему гистосовместимости [11]. Однако некоторые группы исследователей сообщают, что иммунный ответ против сингенных и аутологичных ИПСК все-таки возможен, таким образом, подвергая сомнению главное преимущество аутологичных ИПСК – отсутствие иммуногенности [12–15]. Впрочем, причины данного феномена до сих пор тщательно не изучены. В данном обзоре мы постарались пролить свет на механизмы нарушения толерантности иммунной системы по отношению к аутологичным ИПСК. Стоит подчеркнуть, что, несмотря на неизбежность, понимание реакции основных эффекторных клеток трансплантационного иммунитета – Т-клеток и NK-клеток (натуральных киллеров) – на различные типы клеток, а в будущем и тканей, полученных из ИПСК, поможет найти подходы к их подавлению и будет иметь большое значение для успешного развития трансляционной медицины.

ИММУНОГЕННОСТЬ СИНГЕННЫХ И АУТОЛОГИЧНЫХ ИПСК И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ ПО ОТНОШЕНИЮ К Т-КЛЕТКАМ

Сама возможность, что клетки, дифференцированные из аутологичных ИПСК, могут спровоцировать возникновение иммунного ответа, широко не рассматривалась до публикации Zhao et al. [12]. В этом исследовании авторы показали, что подкожное введение ИПСК сингенным, т.е. линейным, мышам приводило к образованию тератом, в которых выявлялись зоны инфильтрации Т-клетками, что сопровождалось последующим некрозом и регрессом сформированных тератом. При этом тератомы, образованные после введения сингенных ЭСК с тем же генетическим фоном, значительно реже вызывали иммунный ответ. Авторы отметили, что частота отторжения тератом из ИПСК значительно снижалась при использовании эписомных векторов для репрограммирования исходных соматических клеток, хотя в последнем случае сформированные тератомы все равно отторгались с частотой 10–20%, и большинство из них были также инфильтрированы Т-клетками. Тем не менее данные результаты были встречены в научном сообществе с некоторым скептицизмом во многом в связи с тем, что недифференцированные ИПСК не рассматриваются в качестве источника клеток для клинического применения [11].

Более поздние работы оказались достаточно противоречивыми, хотя большая часть все-таки свидетельствовала об отсутствии иммуногенности сингенных производных ИПСК. Об обратном сообщалось лишь в единичных исследованиях. Так, дополнительные доказательства иммуногенности клеток, полученных из сингенных ИПСК, представили в 2013 г. Araki et al. [16]. Авторы обнаружили аналогичную частоту отторжения тератом, сформированных как сингенными ИПСК, так и ЭСК. Было высказано предположение, что иммунный ответ на тератомы потенциально связан с экспрессией генов, регулирующих плюрипотентность. В частности, авторы опирались на ранее полученные данные, что транскрипционный фактор Oct4

может иметь иммуногенные свойства [17]. Кроме того, Araki et al. [16] впервые обнаружили признаки иммунного ответа на терминально дифференцированные производные сингенных ИПСК. При трансплантации кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, авторы наблюдали у сингенных мышей значительный уровень инфильтрации Т-клетками трансплантата.

Еще в одной работе сообщали о полной выживаемости тератом, сформированных сингенными ПСК, хотя в некоторых тератомах все-таки наблюдали зоны инфильтрации Т-клетками [18]. Далее, авторы сравнили иммуногенность эндотелиальных клеток, гепатоцитов и нейрональных предшественников, дифференцированных из сингенных ЭСК и ИПСК. Дифференцированные производные ИПСК не вызвали признаков специфического Т-клеточного ответа ни в *in vitro* модели, ни при трансплантации сингенным мышам. Таким образом, Guha et al. [18] показали, что степень иммуногенности ПСК может снижаться при дифференцировке. К такому же выводу пришли авторы другой работы [19]. Анализ функционального состояния иммунных клеток, обнаруженных в зоне трансплантации, показал, что тератомы преимущественно инфильтрированы цитотоксическими Т-клетками, в то время как эндотелиальные клетки, дифференцированные из ИПСК, – регуляторными Т-клетками и макрофагами [19].

В 2013 г. было опубликовано исследование, в котором сравнивали иммунный ответ на аутологичную и аллогенную трансплантацию дофаминергических нейронов среднего мозга, дифференцированных из ИПСК, в мозг приматов [20]. Авторы обнаружили, что значительное количество микроглии и Т-клеток инфильтрировало аллотрансплантаты, в то время как аутологичные нейроны вызвали минимальную реакцию иммунных клеток. Похожая работа была проведена на нейрональных предшественниках ИПСК, где также не наблюдали существенной инфильтрации в зонах трансплантации аутологичных клеток [21, 22]. Интересно отметить, что Morizane et al. [20] в некоторых случаях все-таки детектировали ограниченный Т-клеточный ответ на аутологичные дофаминергические нейроны, если те были дифференцированы из ИПСК, полученных с помощью ретровирусной трансфекции. Если ИПСК были получены репрограммированием с помощью эписомных векторов, то их производные не приводили к иммунному ответу аутологичных Т-клеток. Эти данные могут свидетельствовать о том, что вирусная интеграция факторов плюрипотентности при получении ИПСК может влиять на иммуногенность клеточных продуктов.

Стоит отметить некоторые ограничения работы Morizane et al. [20]. Во-первых, провести анализ иммунного ответа авторы смогли только после эвтаназии животных примерно через 3–4 месяца после трансплантации. Были предприняты попытки отследить иммунные реакции в динамике с помощью позитронно-эмиссионной томографии, а также путем измерения цитокинов в крови и спинномозговой жидкости, однако полученные результаты обладали высокой вариабельностью и слабо коррелировали с постмортальными гистологическими данными. Возможно, дополнительные временные точки могли бы точнее определить вероятность иммунного ответа на трансплантацию аутологичных производных ИПСК. Во-вторых, хотя авторы и продемонстрировали, что степень иммунного ответа была выше при трансплантации аллогенных дофаминергических нейронов, однако их отторжения не наблюдали даже при отсутствии иммуносупрессивной терапии. Данный феномен можно объяснить тем, что мозг является иммунопривилегированным органом. Более того, эти данные согласуются с клиническими наблюдениями за длительной выживаемостью аллогенных дофаминергических нейронов, полученных из фетального материала, у пациентов с болезнью Паркинсона, которые получали только кратковременную иммуносупрессию или вообще ее не получали [23, 24].

Все предыдущие работы описывали иммуногенность ИПСК животных – мышей и приматов. Однако для клинического применения очень важно изучение иммуногенности аутологичных производных ИПСК человека. В 2015 г. Zhao et al. [13] изучили этот вопрос, используя гуманизированную мышиную модель с реконструированной иммунной системой человека. Они обнаружили зоны Т-клеточной инфильтрации и некроз тканей в большинстве тератом, сформированных из ИПСК. Тем не менее степень иммунного ответа на аутологичные ИПСК оказалась слабее, чем на аллогенные ЭСК. В связи с этим авторы предположили, что только некоторые типы производных ИПСК могут вызвать отторжение. Кроме того, глубокое секвенирование репертуара Т-клеточных рецепторов (TCR) инфильтрующих лимфоцитов выявило их олигоклональный характер, что свидетельствовало об антиген-специфичном ответе Т-лимфоцитов на аутологичные ИПСК. В случае аллогенных ЭСК был выявлен поликлональный репертуар TCR.

Для выявления потенциально иммуногенных тканей были проанализированы гистологические срезы тератом, инфильтрированных Т-клетками. Zhao et al. [13] обнаружили, что десмин-положительные гладкомышечные клетки (ГМК) значительно чаще окружены инфильтрующими Т-лимфоцитами, в то время как клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС) практически не были инфильтрированы Т-лимфоцитами. Далее, авторы

провели сравнительный анализ иммуногенности двух типов клеток – ГМК и ПЭС. Оказалось, что аутологичные ГМК были более иммуногенными в связи с дерегулированной экспрессией опухоле-ассоциированных генов, в частности, *HORMAD1* и *ZG16*. Эктопическая экспрессия *ZG16* в клетках ПЭС приводила к значимому Т-клеточному ответу в аутологичных реципиентах.

Таким образом, данные об иммуногенности сингенных и аутологичных производных ИПСК по отношению к Т-клеткам достаточно противоречивы. Тем не менее большинство из них все-таки обнадеживают, как, например, сравнительно недавние работы, проведенные на моделях свиней [25], обезьян [26], гуманизированных мышей [27], а также *in vitro* [15, 28], в которых продемонстрирована толерантность иммунной системы в отношении клеточных продуктов, полученных из ИПСК.

ИММУНОГЕННОСТЬ СИНГЕННЫХ И АУТОЛОГИЧНЫХ ИПСК И ИХ ПРОИЗВОДНЫХ ПО ОТНОШЕНИЮ К NK-КЛЕТКАМ

В то время как основная функция Т-лимфоцитов – распознавание чужеродных молекул, в том числе неоэпитопов, NK-клетки имеют другой принцип иммунологического распознавания. Классическая гипотеза распознавания «отсутствие своего» предполагает, что NK-клетки распознают и уничтожают все клетки, в которых отсутствуют молекулы HLA (человеческий лейкоцитарный антиген) I класса [29]. Современное представление является более сложным: считается, что активация NK-клеток определяется взаимодействием сигналов, поступающих от двух типов рецепторов на их поверхности: активирующих и ингибирующих [30]. Превалирование ингибирующих сигналов при взаимодействии с клеткой-мишенью не нарушает анергию NK-клеток, в то время как превалирование активирующих – запускает их цитотоксическую программу. В свою очередь, превалирование активирующих сигналов может быть обусловлено как повышением количества (уровня) лигандов активирующих рецепторов NK-клеток в клетках-мишенях, так и снижением ингибирующих лигандов, главным образом молекул HLA I класса. Подобная разбалансировка в физиологических условиях определяется различными патологическими процессами, в том числе процессами онкогенеза, вирусными и бактериальными инфекциями, а также при стрессе [31].

Активность NK-клеток против недифференцированных ИПСК, в том числе сингенных и аутологичных, ранее освещалась в ряде исследований, выполненных *in vitro* [32, 33]. В целом, низкая экспрессия молекул HLA I класса является характерным признаком ПСК [34], поэтому высокая активность NK-клеток обусловлена в первую очередь нехваткой ингибирующих сигналов. Однако в некоторых работах также косвенно отмечают вклад активирующих лигандов. Так, Frenzel et al. [35] обнаружили, что предварительное блокирование активирующего рецептора NKG2D существенно снижает цитотоксичность NK-клеток при сокультивировании с сингенными ЭСК мыши. В другой работе было показано, что NK-клетки с нокаутом гена *Klrk1*$^{-/-}$, кодирующего рецептор NKG2D, лизировали значительно меньший процент ПСК, чем NK-клетки дикого типа [36]. Интересно, что для ПСК человека в экспериментах с блокирующими антителами была показана роль другого активирующего рецептора – DNAM-1 [33]. По-видимому, высокая чувствительность ПСК к действию NK-клеток обусловлена одновременно двумя факторами: низкой экспрессией молекул HLA-I и повышенной экспрессией активирующих лигандов.

Что касается иммунного ответа *in vivo*, то известно, что NK-клетки ограничивают формирование тератом после подкожной инъекции как сингенных [37], так и аутологичных ИПСК [38]. В целом, полученные данные могут свидетельствовать о том, что остаточные ПСК, которые потенциально могли остаться в трансплантате среди дифференцированных клеток, не смогут сформировать тератомы и будут отторгнуты NK-клетками. Сообщается даже, что NK-клетки могут выступать в качестве внутреннего барьера в случае репрограммирования как *in vitro*, так и *in vivo* [39]. Было показано, что NK-клетки способны распознавать и элиминировать частично репрограммированные клетки, которые, как оказалось, экспрессируют лиганды активирующих рецепторов NKG2D и DNAM-1. Далее, используя трансгенную линию мышей [40], экспрессирующую под воздействием доксициклина четыре репрограммирующих фактора коктейля Яманаки (OSKM), авторы показали, что частичное *in vivo* репрограммирование идет эффективнее при деплеции NK-клеток и, наоборот, существенно понижается при их адоптивном переносе [39].

Ответ сингенных и аутологичных NK-клеток на дифференцированные производные ИПСК изучен достаточно слабо. Так, сообщалось о повышенной чувствительности гепатоцито-подобных клеток, дифференцированных из мышиных ИПСК (iPS-HLC), к действию сингенных NK-клеток *in vitro* [41]. При этом сингенные соматические клетки – гепатоциты – практически не вызывали проявления эффекторных функций со стороны NK-клеток. Интересно отметить, что в этой работе также был определен иммунный ответ NK-клеток на гепатоцито-подобные клетки, полученные

из ЭСК (ES-HLC). Авторы обнаружили, что процент лизированных ES-HLC был практически в 2 раза выше, чем лизированных iPS-HLC. Оказалось, что ES-HLC, но не iPS-HLC, экспрессируют лиганды активирующего рецептора NKG2D. Кроме того, нокаут гена, кодирующего рецептор NKG2D в NK-клетках, достоверно снижал процент лизированных ES-HLC, но не iPS-HLC. Таким образом, эта работа еще раз подтвердила более ранние данные о том, что элиминация ПСК мыши и их дифференцированных производных преимущественно реализуется через взаимодействие рецептора NKG2D с его лигандами [35, 36, 42].

В другой работе на мышиной модели изучали ответ NK-клеток на трансплантацию кардиомиоцитов, дифференцированных из сингенных ИПСК (miPSC-CMs) [14]. Было показано, что выживаемость трансплантированных подкожно miPSC-CMs значительно выше в мышах с деплецией NK-клеток. В контрольных мышах, помимо инфильтрации NK-клетками областей трансплантата, были выявлены признаки дегрануляции NK-клеток, а также отторжения miPSC-CMs. Анализ экспрессии NK-клеточных лигандов показал, что miPSC-CMs слабо экспрессируют молекулы MHC I класса, а также окрашиваются антителами к лигандам рецепторов NKG2D и DNAM-1. Блокирование рецепторов NKG2D и DNAM-1 или увеличение экспрессии MHC-I путем предварительной обработки IFNγ снижало цитотоксические свойства NK-клеток *in vitro*, а также уменьшало инфильтрацию NK-клеток в трансплантированные области и некроз miPSC-CMs *in vivo*.

В то же время иммуногенность производных ИПСК человека по отношению к NK-клеткам изучалась достаточно мало. Преимущественно работы были связаны с созданием низкоиммуногенных, или «универсальных», линий ИПСК. Полагают, что этот подход может стать альтернативой привычной иммуносупрессивной терапии, поскольку производные таких клеток будут подходить любому реципиенту [43, 44]. Для создания гипоиммуногенных клеток наиболее часто применяется стратегия полного «выключения» экспрессии молекул HLA как I, так и II классов. Для подавления экспрессии HLA I класса обычно нокаутируют ген бета-2-микроглобулина (*B2M*), кодирующий легкую субъединицу, необходимую для стабильного формирования гетеродимера [45–47]. Для подавления экспрессии HLA II класса нокаутируют ген *CIITA*, кодирующий транскрипционный фактор, необходимый для экспрессии HLA-II [48–50]. Клетки, лишенные молекул HLA, должны стать полностью невидимыми для Т-клеток реципиента (как $CD8^+$, так и $CD4^+$) [51]. С другой стороны, элиминация молекул HLA I класса приводит к тому, что производные ПСК становятся чувствительными к цитотоксическим свойствам NK-клеток [46, 52, 53]. Поэтому получение линий ПСК с пониженной иммуногенностью обычно состоит из двух шагов: сначала должна быть подавлена экспрессия HLA, а затем добавлены дополнительные факторы, которые позволят избежать NK-клеточного ответа [53–57].

A priori исследования низкоиммуногенных производных ИПСК проводили на аллогенной модели. В целом, поскольку NK-клетки не способны распознавать чужеродные молекулы, оценку толерантности производных ИПСК по отношению к иммунной системе можно проводить с использованием NK-клеток аллогенного происхождения, однако с одним условием. Известно, что аллореактивность со стороны NK-клеток теоретически может быть вызвана несовпадением лигандов семейства KIR (иммуноглобулин-подобные рецепторы киллерных клеток) по механизму распознавания «отсутствие своего». Все аллели HLA-C делятся на две группы – HLA-C1 и HLA-C2 – в зависимости от последовательности аминокислот в позициях 77 и 80 альфа-цепи, что определяет их способность связываться с рецепторами NK-клеток KIR2DL3 и KIR2DL1 соответственно [58]. По этому принципу все доноры и реципиенты могут быть поделены на следующие группы: HLA-C1/C1, HLA-C1/C2 и HLA-C2/C2. NK-Клетки в процессе лицензирования, или «обучения» в процессе созревания, обретают толерантность к определенному набору аллелей HLA-C на собственных клетках. Условия ответа NK-клеток на несовпадение аллелей HLA-C при взаимодействии с KIR2DL-рецепторами представлено на рис. 1. Поэтому в случае использования в качестве клеток-мишеней производных, дифференцированных из HLA-гомозиготных линий ИПСК, гетерозиготные HLA-C1/C2 NK-клетки будут отвечать на отсутствие любого из KIR-лигандов, что было подтверждено в работе Ichise et al. [59]. Авторы показали, что HLA-C1/C2 NK-клетки, выделенные из крови здоровых доноров, лизируют Т-клетки и эндотелиальные клетки, дифференцированные из HLA-C1/C1 ИПСК [59]. В свою очередь, эктопическая экспрессия HLA-C2 в дифференцированных производных HLA-C1/C1 приводила к снижению NK-клеточного ответа. Помимо аллореактивности на несовпадение лигандов к KIR2DL-рецепторам, еще сообщается о реакции NK-клеток на отсутствие лигандов к рецепторам KIR3DL1 (эпитоп Bw4) и KIR3DL2 (аллели HLA-A3, A11) [60]. Таким образом, аллогенная модель может быть использована для оценки иммуногенности производных ИПСК по отношению к NK-клеткам, однако при условии типирования доноров, принимающих участие в исследовании.

Интересно, что в некоторых работах с гипоиммуногенными производными ПСК не отмечалось существенной разницы в ответе NK-клеток

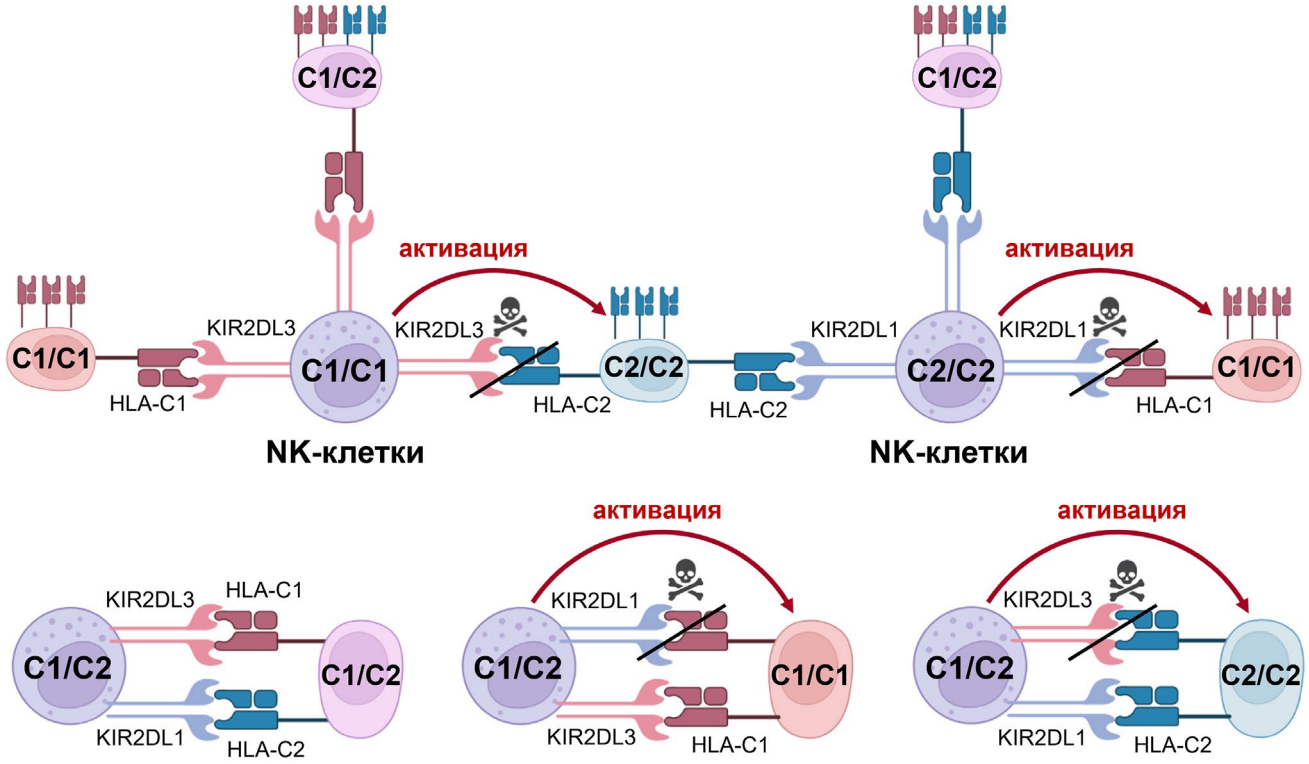

Рис. 1. Механизм аллореактивности NK-клетками на примере несоответствия лигандов для KIR2DL-рецепторов. HLA-C1/C1 NK-клетки активируются при взаимодействии с HLA-C2/C2 клетками-мишенями (нет ингибирующего сигнала через KIR2DL3-рецептор). HLA-C2/C2 NK-клетки активируются при взаимодействии с HLA-C1/C1 клетками-мишенями (нет ингибирующего сигнала через KIR2DL1-рецептор). HLA-C1/C2 NK-клетки активируются при взаимодействии с HLA-C1/C1 клетками-мишенями (нет ингибирующего сигнала через KIR2DL1-рецептор) и при взаимодействии с HLA-C2/C2 клетками-мишенями (нет ингибирующего сигнала через KIR2DL3-рецептор)

на нокаутные производные ПСК и производные ПСК дикого типа. Правда, стоит отметить, что типирование исходных клеток, а также доноров, принимающих участие в исследовании, во всех этих работах проведено не было. Так, различия в цитотоксичности и количестве $CD107a^+$ (т.е. дегранулировавших NK-клеток) были статистически незначимыми при сокультивировании с ГМК дикого типа и ГМК, не экспрессирующими HLA I класса [55]. В свою очередь, клетки ПЭС дикого типа провоцировали крайне высокую NK-клеточную цитотоксичность, которая была сравнима с нокаутными производными ПСК [50]. При этом процент дегранулировавших NK-клеток также не различался между исходными и нокаутными клетками ПЭС, хотя и сильно варьировал в зависимости от донора. Высокую цитотоксичность NK-клеток наблюдали и для кардиомиоцитов, дифференцированных из ЭСК [57]. Эндотелиальные клетки вызвали одинаковый уровень дегрануляции NK-клеток вне зависимости от экспрессии HLA I класса, хотя цитотоксичность NK-клеток была выше против производных ИПСК с нокаутом гена *B2M* [61]. Стоит отметить, что в вышеупомянутых исследованиях авторы не фокусировались на ответе NK-клеток против производных дикого типа, а, скорее, описали отсутствие гиперчувствительности к NK-клеткам для HLA-негативных клеток.

В своей недавней работе мы также обнаружили, что фибробластоподобные производные ИПСК с нокаутом гена *B2M* (ΔiPS-fibro) демонстрируют ту же степень чувствительности к действию аллогенных и аутологичных NK-клеток, что и фибробластоподобные клетки дикого типа – iPS-fibro [15]. Однако, в отличие от других авторов, были использованы исходные изогенные фибробласты в качестве отрицательного контроля реакции NK-клеток. Это сравнение позволило обнаружить отсутствие полной иммунологической толерантности дифференцированных производных ИПСК к аутологичным NK-клеткам. С помощью транскриптомного анализа был выявлен значительный дисбаланс NK-клеточных лигандов в iPS-fibro. По сравнению с исходными фибробластами, в iPS-fibro одновременно наблюдалось значительное снижение экспрессии молекул HLA-I и повышение экспрессии лигандов к семейству активирующих рецепторов DNAM-1 и NKG2D. Далее, в работе было показано, что баланс NK-клеточных лигандов в дифферен-

цированных производных ИПСК может быть возвращен в равновесное состояние за счет предварительной обработки клеточных культур IFNγ [15].

В еще одной работе отмечалась чувствительность почечных производных ИПСК к действию аутологичных NK-клеток [28]. Авторы обнаружили, что процент активированных NK-клеток был ниже при сокультивировании с предшественниками проксимальных эпителиальных клеток, чем с более «зрелыми» производными ИПСК. Однако эти различия подробно в работе не обсуждаются. Судя по данным РНК-секвенирования, в ходе длительного культивирования в проксимальных эпителиальных клетках растет уровень транскриптов HLA I класса, что согласуется с данными, полученными на iPS-fibro [15], а также некоторых активирующих NK-клеточных лигандов, в частности, *MICA* и *NECTIN2*. По-видимому, это обусловливает превалирование активирующих сигналов и реализации цитотоксической программы в NK-клетках. Также интересно отметить, что, в отличие от более ранней работы Kruse et al. [33], высокая активность NK-клеток против недифференцированных ИПСК человека в работе Rossbach et al. [28] не наблюдалась.

Надо отметить, что роль NK-клеток при трансплантации солидных органов оценивается довольно противоречиво [60, 62]. Существуют свидетельства того, что некоторые субпопуляции NK-клеток могут играть роль в регуляции толерантности к аллотрансплантату, однако чаще NK-клетки участвуют в отторжении аллотрансплантата при посредстве Т-клеток и антител [63]. При отсутствии иммуносупрессивной терапии, которая снижает цитотоксическую активность и регулирует свойства дегрануляции, активированные NK-клетки продуцируют IFNγ, что может способствовать развитию хронического воспаления и усилению иммунного ответа, опосредованного в первую очередь Т-клетками [64]. Таким образом, иммуногенность производных ИПСК по отношению к NK-клеткам также учитывается при использовании клеточного продукта, дифференцированного из ИПСК, в целях регенеративной медицины.

ВОЗМОЖНЫЕ ПРИЧИНЫ ИММУННОГО ОТВЕТА НА АУТОЛОГИЧНЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ИПСК

До сих пор нет четкого понимания, что является ключевым фактором иногда наблюдавшейся иммуногенности производных ИПСК аутологичного происхождения. В целом, ответ со стороны Т-клеток может быть объяснен формированием неоантигенов и аберрантной экспрессией генов (рис. 2, *а*), а ответ со стороны NK-клеток – нарушением баланса активирующих и ингибирующих лигандов в клетках-мишенях (рис. 2, *б*).

Одним из первых высказанных предположений о причинах иммуногенности ИПСК было использование разных репрограммирующих векторов. Еще в первой работе было показано, что тератомы, сформированные сингенными ИПСК, отторгались чаще при использовании ретровирусных векторов в качества метода репрограммирования [12]. В свою очередь, использование эписомных конструкций сильно снижало процент отторгнутых тератом. Похожие результаты были получены при трансплантации дофаминергических нейронов в мозг приматов [20]. Ретровирусные и лентивирусные конструкты преимущественно интегрируют в транскрипционно активные сайты, что может вызывать мутации, геномную нестабильность и хромосомные аберрации. Кроме того, есть сведения о том, что последующая активация трансгенов коррелирует с аберрантной продукцией иммуногенного белка Oct4 [17].

В целом, предполагается, что иммуногенность линий, полученных «неинтеграционным» способом, должна быть ниже в сравнении с линиями, полученными с помощью ретро- и лентивирусной трансфекции, однако подробных исследований на этот счет никто не проводил. Данные, посвященные сравнению геномной нестабильности в линиях ИПСК, полученных разными способами репрограммирования, достаточно противоречивы. Так, одни исследователи сообщают о схожем количестве точечных мутаций [65], а также вариаций числа копий генов CNVs (copy number variations) [66], а другие – наоборот, показывали вдвое меньшее число мутаций в безынтеграционных ИПСК [67, 68], а значит, и меньший шанс формирования потенциальных неоэпитопов. Частота генетических вариаций также была низкой в ИПСК человека, полученных с помощью эписомных конструкций [69]. Стоит отметить, что в последние годы появились и другие способы безынтеграционного репрограммирования, в частности, путем индукции эндогенных плюрипотентных генов с помощью системы CRISPR/Cas9 [70], однако дополнительных сведений об их геномной нестабильности, насколько нам известно, представлено не было. Так или иначе, именно безынтеграционные способы репрограммирования в настоящее время являются наиболее безопасными и эффективными для дальнейшего клинического применения [4].

Наиболее часто различия в иммуногенности объясняют мутациями и, следовательно, формированием неоэпитопов [71]. Во-первых, это могут быть мутации, которые существовали в исходных соматических клетках. Так, фибробласты – один из наиболее часто используемых источников клеток для репрограммирования [72]. Сообщается, что му-

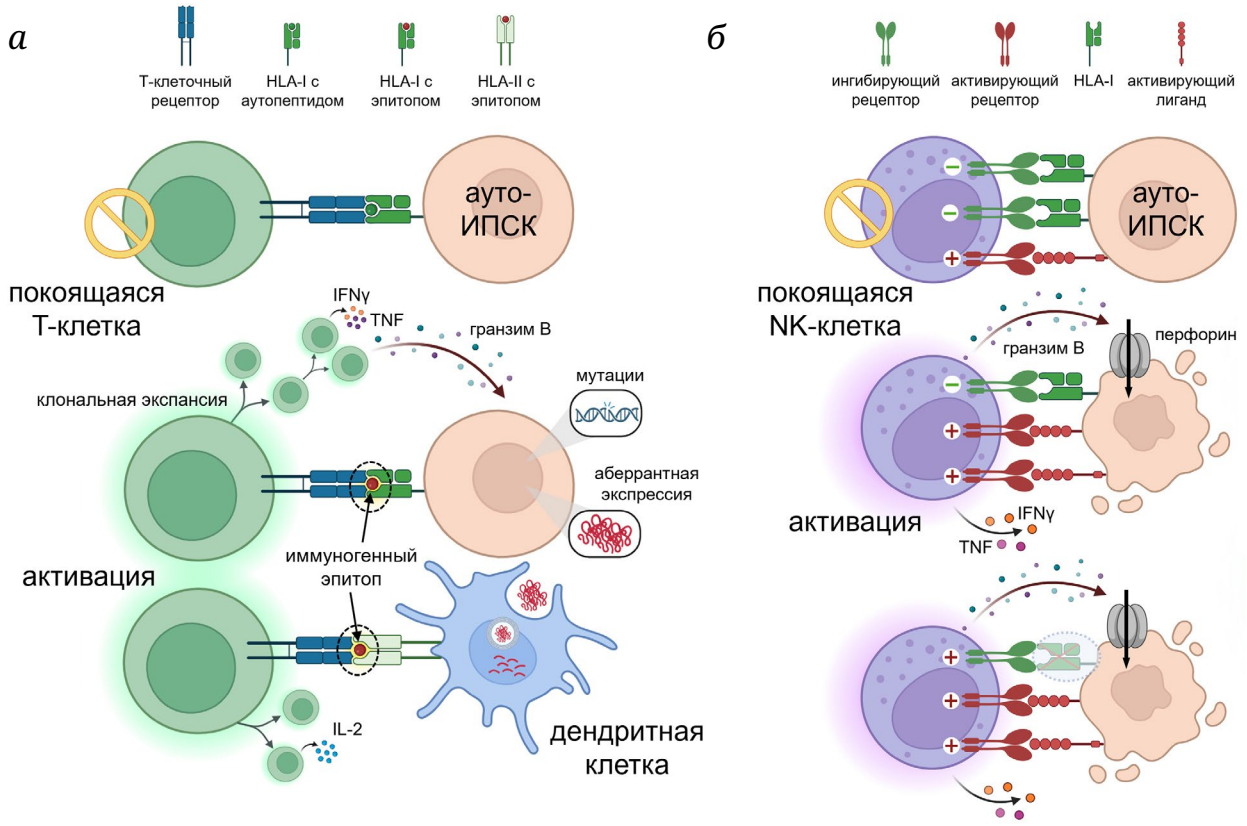

Рис. 2. Иммуногенность аутологичных ИПСК и их производных. *а* – Ответ Т-клеток на аутологичные ИПСК и их дифференцированные производные может быть обусловлен распознаванием иммуногенных неоэпитопов, сформированных в результате возникновения мутаций или аберрантной экспрессии иммуногенных генов. *б* – Ответ NK-клеток на аутологичные ИПСК и их дифференцированные производные может быть обусловлен дисбалансом NK-клеточных лигандов в клетках-мишенях. Превалирование активирующих сигналов приводит к запуску цитотоксической программы NK-клеток

тации, приобретенные вследствие УФ-индуцированного мутагенеза, присутствуют в ~50% ИПСК человека, репрограммированных из фибробластов кожи [73]. Такие мутации характеризуются заменами C-to-T или CC-to-TT и часто наблюдаются в меланомах [74]. В качестве альтернативы фибробластам могут выступать и другие соматические клетки. Например, сообщается, что ИПСК, полученные из гемопоэтических стволовых клеток, содержат значительно меньше точечных мутаций, инсерций и делеций, чем ИПСК, полученные из фибробластов кожи [75]. Также в качестве источника клеток для репрограммирования очень часто используют клетки периферической крови. Rouhani et al. [76] показали, что ИПСК, полученные из клеток крови, значительно реже содержат мутации, чем ИПСК, полученные из фибробластов. В то же время есть данные о том, что мутации в клетках крови также накапливаются с возрастом [77]. Так, работа с использованием 16 линий ИПСК, полученных из клеток крови доноров в возрасте 21–100 лет, продемонстрировала, что частота мутаций в ИПСК линейно увеличивается с возрастом доноров [78]. Помимо этого, частота мутаций митохондриальной ДНК в ИПСК человека также увеличивается с возрастом донора, и это может привести к метаболическим дефектам в ИПСК [79]. И хотя *de novo* мутации в митохондриальной ДНК – в целом редкое явление для ИПСК [80, 81], они могут приводить к образованию иммуногенных неоэпитопов и провоцировать иммунный ответ даже при аутологичной трансплантации, как было показано в одной из недавних работ [82].

Таким образом, соматические клетки молодых доноров могут иметь сравнительное преимущество при создании ИПСК. Это также подтверждает и недавняя работа, в которой из эритробластов пуповинной крови были получены ИПСК, не содержащие мутаций в белок-кодирующих участках генома [83]. Кроме того, возраст доноров может сказываться на культуральных свойствах ИПСК. Так, показано, что ИПСК, полученные из более старых мышей, пролиферировали хуже, чем ИПСК, полученные из более молодых мышей [84].

Мутации в ИПСК могут также возникать в процессе репрограммирования. Такие мутации обычно схожи с мутациями, вызванными окислительным стрессом (замены C-to-A), и преимущественно

обнаруживаются в конденсированных ламина-ассоциированных хромосомных доменах, расположенных на периферии ядра [85]. Более ранние работы свидетельствуют о том, что до 75% точечных мутаций в ИПСК возникают во время репрограммирования [86, 87]. При этом наличие разных мутаций для изогенных клонов ИПСК, а также меньшая частота точечных мутаций в изогенных ЭСК, предположительно, указывают на то, что такие мутации не были получены от исходных соматических клеток [67]. Дополнительные сведения о мутациях, возникающих в ходе репрограммирования, были представлены в работе Rouhani et al. [88]. Авторы идентифицировали уникальные мутации в изогенных линиях ИПСК, которые были получены из эндотелиальных предшественников моноклонального происхождения.

Полагают, что мутации возникают на самых ранних стадиях репрограммирования перед первым делением клетки после внесения репрограммирующих факторов или сразу же после первого или второго деления [67, 83]. Авторам последней работы также удалось обнаружить, что временный дефицит компонентов чекпоинта клеточного цикла G1/S на начальной стадии процесса репрограммирования приводит к накоплению мутаций [83]. В то же время данные о мутациях, возникающих в ходе репрограммирования, достаточно неоднозначны. В более поздних работах было показано, что до 90% различных SNP и инделов в ИПСК происходят от соматических клеток [73, 89]. Более того, Kosanke et al. [90] показали, что только 2% мутаций, выявленных в ИПСК, не были обнаружены в исходных эндотелиальных клетках, использованных для репрограммирования.

Третья причина возникновения мутаций в ИПСК – длительное культивирование. Такие мутации образуются стохастически, и поэтому являются значительно более редкими, чем предсуществующие соматические мутации или мутации, возникшие в результате репрограммирования. Полагают, что мутации, вызванные длительным культивированием, могут обеспечивать пролиферативные преимущества [91, 92]. Так, в одной линии ИПСК на поздних пассажах было обнаружено возникновение четырех дополнительных точечных мутаций по сравнению с клетками ранних пассажей [86]. Тем не менее, по последним данным, частота и спектр мутаций, возникающих в ИПСК в ходе культивирования, не отличается от мутаций, возникающих в ходе прегаструляционной стадии эмбриогенеза [93]. В другой работе было показано, что при длительном культивировании *in vitro* скорость накопления мутаций ниже в ИПСК, чем в стволовых клетках кишечника и печени [94]. Авторы обнаружили, что более чем треть мутаций вызвана заменами C-to-A, которые ассоциированы с окислительным стрессом. Культивирование клеток в условиях гипоксии (3% кислорода) в течение трех месяцев значительно снижало количество однонуклеотидных замен. Похожие результаты были получены и при культивировании ЭСК: авторы наблюдали более чем 2-кратное снижение частоты мутаций в условиях гипоксии [95]. Полученные данные могут быть использованы для оптимизации условий культивирования ИПСК.

Для клинического применения крайне важно понимать, как мутации могут влиять на фенотип ИПСК, в том числе – могут ли они приводить к процессам канцерогенеза. Есть работы, свидетельствующие о том, что точечные мутации преимущественно обнаруживают в генах, ассоциированных с раком [86]. Повторяющиеся мутации в гене опухолевого супрессора *TP53* были обнаружены как при полноэкзомном секвенировании ЭСК, так и при анализе общедоступных данных РНК-секвенирования 120 линий ПСК [92]. Помимо мутаций в *TP53*, повторяющиеся мутации обнаруживают и в других опухолеассоциированных генах, например, в *CDK12*, *EGFR* и *PATZ1* [96, 97]. Недавнее исследование выявило мутации в гене *BCOR*, которые часто обнаруживают при гематологических заболеваниях (более чем в 25% проанализированных линий ИПСК) [76]. Напротив, в других исследованиях связь с опухолеассоциированными генами не была обнаружена [65, 69, 73, 94]. В целом, большинство точечных мутаций обнаруживают в областях неактивного хроматина, поэтому маловероятно, что они смогут вызвать нежелательные эффекты. Однако уникальные мутации, которые обнаруживают в разных изогенных клонах ИПСК, обычно встречаются в активных промоторах и могут изменять экспрессию генов [73]. Это, в свою очередь, может приводить к формированию иммуногенных детерминант или влиять на эффективность дифференцировки в желаемый клеточный тип [98], что также имеет большое значение для регенеративной медицины.

Помимо мутаций, которые потенциально могут возникнуть в процессе репрограммирования и культивирования, также следует учитывать и эпигенетические изменения, которые могут регулировать экспрессию разных белков. В первую очередь это касается нарушения метилирования ДНК в линиях ПСК. Так, в некоторых работах отмечается, что паттерн аберрантного метилирования в ИПСК может быть схож с опухолевыми клетками [99–101]. Более того, было показано, что нарушения метилирования могут сохраняться и в дифференцированных клетках [102]. Однако стоит отметить, что метилирование ДНК в ПСК может иметь динамичный характер, реагировать на условия культивирования и варьировать в зависимости от клеточной линии [95].

Также существует мнение, что некоторые клетки не до конца проходят процесс репрограммирования, и ИПСК в значительной мере способны сохранять транскрипционную и эпигенетическую память о своем происхождении [103]. Тем не менее работы в этой области достаточно противоречивы и, согласно современным представлениям, молекулярные и функциональные различия в разных линиях ИПСК теряются в процессе продолжительного пассирования [104]. В то же время недавняя работа показала, что репрограммирование через стадию наивных ИПСК (TNT-репрограммирование) полностью обнуляет эпигенетическую память, а также корректирует возникшие эпигенетические аберрации [105]. Такие TNT-ИПСК оказались молекулярно и функционально более схожими с ЭСК, чем ИПСК, полученные стандартной методикой.

Так или иначе, эпигенетические особенности могли бы объяснить аномальную экспрессию иммуногенных белков. Так, по крайней мере в двух работах было продемонстрировано, что феномен «соматической памяти» может влиять на дальнейшую иммуногенность полученных линий ИПСК [106, 107]. ИПСК, полученные из клеток Сертоли семенников мыши, являющихся анатомически иммунопривилегированной областью, с большей эффективностью формировали тератомы, чем ИПСК, полученные из эмбриональных фибробластов мыши [106]. Более того, дифференцированные производные сингенных ЭСК продемонстрировали сниженный потенциал к активации аллогенных Т-клеток *in vitro* по сравнению с ИПСК, полученными из эмбриональных фибробластов мыши. Однако стоит отметить, что на более поздних пассажах авторы не увидели отличий в иммуногенности ИПСК, полученных из разных соматических клеток, что потенциально еще раз подтверждает, что некая «соматическая память» в ИПСК может присутствовать только на ранних пассажах [106]. В другой работе было показано, что мезенхимальные клетки пуповины являются менее иммуногенным источником клеток для репрограммирования, чем фибробласты кожи [107].

Нарушение экспрессии генов, связанных с NK-клеточным ответом, является еще одной причиной иммуногенности ИПСК и их производных [15]. К запуску цитотоксической программы NK-клеток может привести как повышение сигналов, идущих от активирующих рецепторов, так и снижение сигналов, поступающих от ингибирующих рецепторов. Иными словами, правильный баланс между ингибирующими и активирующими лигандами может сделать клетку-мишень невидимой для NK-клеток [108], тогда как нарушенный баланс лигандов NK-клеток в производных может быть причиной чрезмерной активации NK-клеток. Таким образом, на степень иммунного ответа будут влиять интенсивность экспрессии молекул HLA I класса, активирующих лигандов и молекул адгезии. Мы ранее показали, что все эти факторы могут являться причиной повышенного NK-клеточного ответа на производные [15]. Во-первых, в фибробластоподобных производных ИПСК (iPS-fibro) наблюдалась относительно низкая экспрессия генов молекул HLA-I, основных ингибирующих лигандов. Во-вторых, в них была обнаружена повышенная экспрессия генов лигандов основных активирующих рецепторов NK-клеток. Так, по сравнению с исходными фибробластами, экспрессия стресс-индуцированного гена *MICA* (лиганд NKG2D) была более чем в 1,5 раза выше. Лиганды DNAM-1, *NECTIN2* (CD112) и *PVR* (CD155), а также лиганд NKp30, *NCR3LG1* (B7-H6), были повышены более, чем в 3 раза в iPS-fibro. В-третьих, наблюдалась повышенная экспрессия некоторых молекул адгезии. Взаимодействие молекул адгезии с соответствующими рецепторами на поверхности NK-клеток способствует образованию плотных клеточных контактов между NK-клеткой и клеткой-мишенью, что приводит к формированию иммунологических синапсов, которые необходимы для проявления цитотоксических функций NK-клеток [109]. Гены *ICAM-1* (лиганд LFA-1) и *VCAM-1* (лиганд VLA-4, или интегрина α4β1) были повышены в производных ИПСК. Тем самым дисбаланс лигандов в производных ИПСК был обусловлен одновременно низкой интенсивностью ингибирующих сигналов и повышенной интенсивностью активирующих сигналов [15].

Уязвимость к действию NK-клеток можно объяснить недостаточной зрелостью дифференцированных производных и низким уровнем молекул HLA I класса по сравнению со взрослыми соматическими клетками. Так, по крайней мере для клеток ПЭС [50], проксимальных эпителиальных клеток почки [28] и iPS-fibro [15] был показан рост экспрессии HLA-I по мере длительного культивирования или пассирования. Еще один риск незрелого фенотипа – экспрессия эмбриональных или фетальных белков, которые также характерны для некоторых раковых опухолей (например, альфафета протеин) [110]. Несмотря на активное развитие протоколов дифференцировки, существует ряд типов клеток, которые в условиях *in vitro* могут быть дифференцированы только до незрелого фенотипа, в частности, кардиомиоциты [111], гепатоциты [112], β-клетки поджелудочной железы [113].

Отдельно стоит отметить повышенную экспрессию активирующих NK-клеточных лигандов. Анализ общедоступных данных РНК-секвенирования [114–116] показал, что экспрессия генов *NECTIN2*, *PVR*, *CADM1* и *CD70* была повышена в независимо полученных фибробластоподобных клетках по сравнению с изогенными фибробластами,

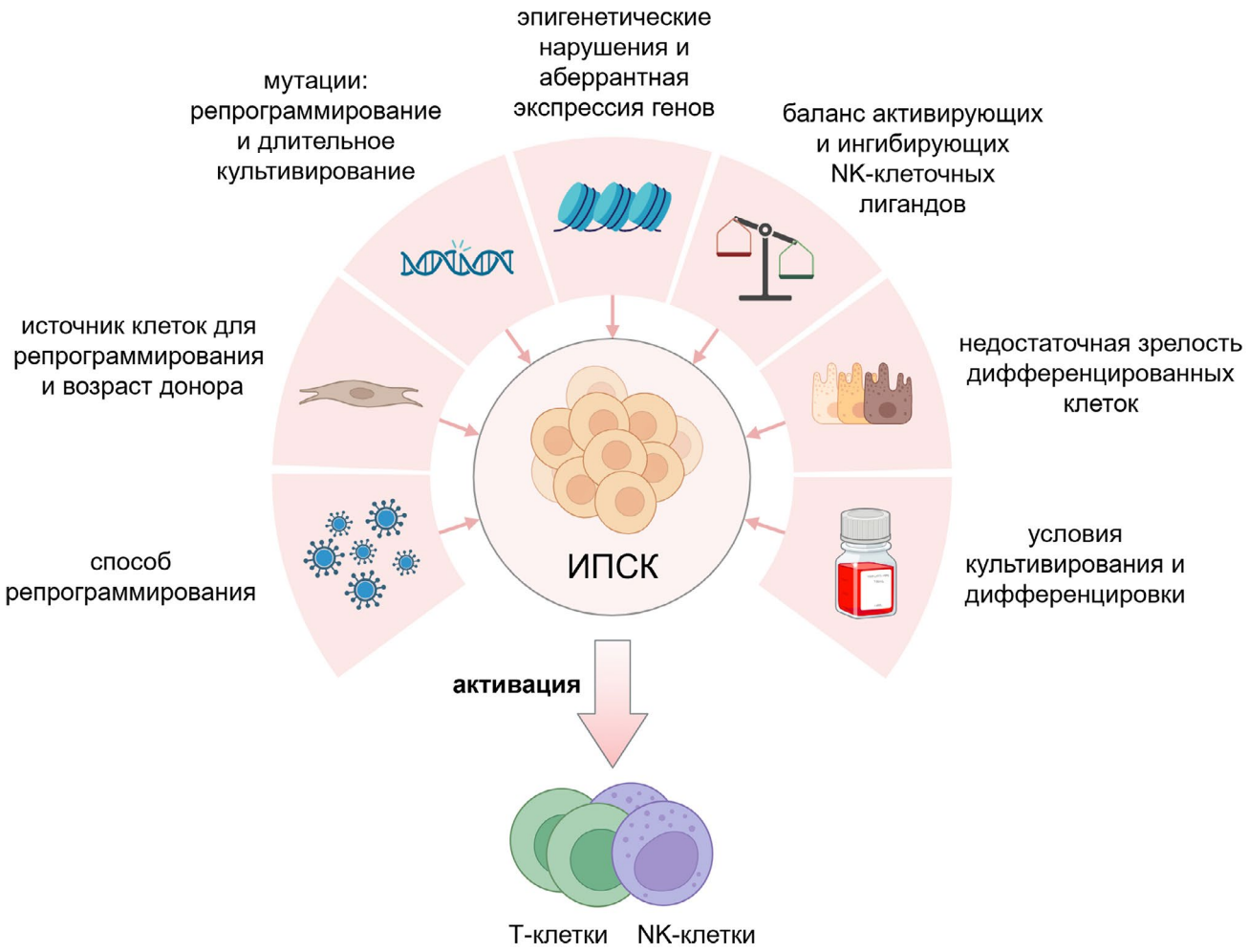

Рис. 3. Потенциальные причины нарушения толерантности иммунной системы в отношении аутологичных ИПСК и их дифференцированных производных

использованными для репрограммирования [15]. Вероятно, несовершенное микроокружение во время *in vitro* дифференцировки может влиять на правильный баланс NK-клеточных лигандов в данном типе производных ИПСК. Помимо этого, высокий уровень экспрессии *MICA* и *NECTIN2* был отмечен в проксимальных эпителиальных клетках почки [28]. Поскольку каждый тип клеток экспрессирует свой собственный набор белков, для применения в клинической практике необходимо будет определять паттерн экспрессии лигандов рецепторов NK-клеток. Стоит отметить, что некоторые типы клеток, которые относятся к иммунопривилегированным тканям, могут обладать иммуномодулирующими функциями для подавления иммунного ответа. Было показано, что некоторые типы дифференцированных производных ПСК, в частности клетки ПЭС [117, 118], ганглиозные клетки сетчатки [119], нейрональные предшественники [120–122], клетки нервного гребня [123, 124] и хондроциты [125] демонстрируют сниженную иммунногенность даже по отношению к аллогенным лимфоцитам.

Различные условия культивирования могут влиять на иммуногенность ИПСК и их производных. Как уже упоминалось ранее, длительное культивирование может приводить к накоплению мутаций в клетках на более поздних пассажах [86, 94]. Метод криопаузы, т.е. хранение ИПСК в виде готовых к использованию аликвот на одном пассаже, может снизить частоту геномных аберраций, вызванных пассированием и длительным культивированием ИПСК [126]. Поскольку окислительный стресс в ходе репрограммирования и длительного культивирования может приводить к заменам C-to-A [85, 88, 94], использование антиоксидантов может уменьшить мутагенную нагрузку в ИПСК. В частности, сообщалось, что антиоксиданты снижают CNV в ИПСК [127]. В недавнем исследовании также было показано, что введение трансгенов антиоксидантов, в частности супероксиддисмутазы 1 (*SOD1*) и 2 (*SOD2*), глутатионпероксидазы 1 (*GPX1*) и N-ацетилцистеина (*NAC*), приводило к меньшему количеству трансверсионных замен в ИПСК [83].

Выбор реактивов для культивирования и дифференцировки может оказывать влияние на иммуногенные свойства ИПСК и их производных. Так, применение ксеногенных материалов для культивирования ПСК потенциально может осложнить дальнейшее клиническое использование производных ПСК. Например, ЭСК и эмбриоидные тельца способны поглощать N-гликолилнейраминовую кислоту (Neu5Gc) из фидерных слоев эмбриональных фибробластов, а также из питательных сред, содержащих сыворотку животных [128]. Это представляет большой риск, поскольку в крови человека циркулируют антитела к Neu5Gc [129]. В настоящее время ПСК обычно культивируют в бесфидерных условиях, кроме того, были разработаны протоколы репрограммирования и дифференцировки без применения компонентов животного происхождения (xeno-free), в которых снижен или полностью отсутствует Neu5Gc, однако эти методы признаны более дорогостоящими [130, 131]. С другой стороны, коммерческие среды xeno-free могут содержать повышенный уровень аскорбата, который может влиять на метилирование промотора CD30 – маркера злокачественных новообразований [132]. Хотя стоит отметить, что CD30, скорее, является маркером недифференцированных клеток, нежели маркером трансформированных клеток [133]. Так или иначе, риск не ограничивается продуктами животного происхождения, и для новых составов сред в обязательном порядке должно быть определено их биологическое воздействие на культивируемые клетки, в том числе на баланс NK-клеточных лигандов.

Таким образом, сразу несколько факторов потенциально могут влиять на иммуногенность финального клеточного продукта, получаемого из ПСК (рис. 3). Общая систематизация перечисленных выше причин должна способствовать разработке критериев качества для обеспечения безопасности клинического применения производных ПСК. Так как каждый тип дифференцированных клеток экспрессирует разные наборы генов и белков, остается актуальным предположение, что для последующего клинического применения необходимо будет скринировать каждый тип клеток на иммуногенность [134].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Накапливающиеся сведения об отсутствии полной толерантности иммунной системы по отношению к производным аутологичных ИПСК [13–15] вызывают опасения в отношении их трансплантации без применения иммуносупрессии. Тем не менее наиболее красноречивым ответом на эти опасения могут считаться результаты текущих клинических исследований с применением аутологичных производных ИПСК. Согласно clinicaltrials.gov, стадию клинических испытаний проходят около 20 клеточных продуктов на основе аутологичных ИПСК. К настоящему моменту опубликованы первичные результаты трех из них [135–137]. В первых двух были трансплантированы клетки ПЭС для лечения возрастной макулярной дегенерации, а в третьем – дофаминергические клетки-предшественники для лечения болезни Паркинсона. Ни при одной трансплантации не применялась иммуносупрессивная терапия, но и не сообщалось о побочных эффектах. Следует отметить, что во всех случаях трансплантацию гомогенных культур производных ИПСК проводили в иммунопривилегированные органы – глаз и мозг. Возникнут ли нежелательные иммунные реакции в ходе трансплантаций производных аутологичных ИПСК, в том числе сложнокомпонентных клеточных продуктов, в органы и ткани, лишенные иммунопривилегированного статуса, еще предстоит изучить. Совсем недавно сообщалось об отсутствии побочных эффектов при трансфузии тромбоцитов, дифференцированных из аутологичных ИПСК [138].

Так или иначе, возможное отсутствие толерантности иммунной системы вкупе с высокой стоимостью и длительностью производства новых линий ИПСК на сегодняшний день не позволяют рассматривать персонализированную терапию на их основе перспективной для широкой медицинской практики. В связи с этим аллогенные производные ПСК на данный момент являются более предпочтительным источником для регенеративной медицины. В последние годы широко распространяется гипотеза, что решить проблему гистосовместимости и предотвратить иммунное отторжение можно путем создания «универсальных» линий ПСК, производные которых будут подходить любому реципиенту [43, 44, 51]. Как уже упоминалось ранее, для получения таких ИПСК применяются различные стратегии «иммунной маскировки»: от элиминации молекул HLA для ингибирования Т-лимфоцитов [45–50] до включения иммуномодулирующих факторов для ускользания от надзора со стороны NK-клеток [53–57]. Было показано, что дифференцированные производные таких модифицированных ИПСК с пониженной иммуногенностью демонстрируют долговременную выживаемость в полностью иммунокомпетентных животных: 50 дней в мышиной модели [56] и 40 недель на макаках-резус [139]. В обеих работах «ослепление» аллогенной иммунной системы было достигнуто благодаря блокированию экспрессии HLA I и II классов через нокаут генов *B2M* и *CIITA* и введению иммунного чекпоинта NK-клеток *CD47* [140]. В недавней работе одновременное введение в ЭСК мыши восьми иммуномодулирующих

факторов (Pdl1, Cd200, Cd47, H2-M3, Fasl, Serpinb9, Ccl21 и Mfge8) обеспечивало в аллогенной модели долговременное выживание тератом [141]. В некоторых группах животных срок наблюдения составлял 9 месяцев. Кроме того, в феврале 2022 г. компании «ViaCyte» и «CRISPR Therapeutics» объявили о начале первой фазы клинических испытаний VCTX210 – основанной на ЭСК терапии сахарного диабета 1-го типа без необходимости иммуносупрессии. Используемая линия CyT49 имеет нокаут гена *B2M* и экспрессирует трансген *CD274*, кодирующий иммунологический чекпоинт PD-L1 для дополнительной защиты от атаки Т-клеток [142].

Несмотря на привлекательность «универсального» подхода, стоит отметить вопросы, связанные с безопасностью такой терапии [43, 143, 144]. В первую очередь они касаются иммунной эвазии, которая может увеличить риски онкогенной трансформации клеток. Само по себе отсутствие молекул MHC/HLA не должно способствовать онкогенезу [145], поэтому вероятность злокачественного перерождения вряд ли будет превышать таковую у взрослого человека, однако очевидно, что в HLA-негативных клетках устранить ее будет труднее с помощью обычных иммунных механизмов. Решить эту проблему предлагается через вставку «суицидальных кассет», которые будут активированы в случае злокачественной трансформации или вирусного инфицирования трансплантата [43, 51]. Например, может быть использовано введение тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-TK) как под промотор плюрипотентных генов [146], так и под промоторы генов, играющих ключевую роль в регуляции клеточного цикла, например *CDK1* [147]. К слову, последний подход совсем недавно был применен и в иммуномодифицированных ЭСК человека [141]. Другой суицидальной системой может стать индуцируемая каспаза-9 (iCas9) [148]. В этом вопросе текущее клиническое испытание «ViaCyte» представляется более безопасным, поскольку β-клетки инкапсулированы полупроницаемой мембраной и не смогут выйти из капсулы в случае перерождения [149]. Так или иначе, очевиден факт, что в целях безопасности необходимо тщательно исследовать универсальные линии на наличие потенциальных онкогенных мутаций и активацию протоонкогенов [51]. И все же, несмотря на сохраняющиеся проблемы, разработка генетически модифицированных плюрипотентных стволовых клеток может способствовать крупномасштабному производству «готовых» (off-the-shelf) клеточных продуктов и решить проблему нехватки донорских органов и тканей.

Вклад авторов. М.Е.Б. – поиск литературы, написание текста, оформление рисунков; А.Н.Б. – написание и редактирование текста, М.А.Л. – общая концепция рукописи и финальное редактирование текста.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания № 123032900030-7.

Благодарности. М.А.Л. – участник Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, **282**, 1145-1147, https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145.
2. 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, https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024.
3. Лебедева О. С., Лагарькова М. А. (2018) Плюрипотентные стволовые клетки для моделирования и клеточной терапии болезни Паркинсона, *Биохимия*, **83**, 1318-1330, https://doi.org/10.1134/S0006297918090067.
4. Doss, M. X., and Sachinidis, A. (2019) Current challenges of iPSC-based disease modeling and therapeutic implications, *Cells*, **8**, 403, https://doi.org/10.3390/cells8050403.
5. Богомазова А. Н., Васина Е. М., Киселев С. Л., Лагарькова М. А., Лебедева О. С., Некрасов Е. Д., Панова А. В., Филоненко Е. С., Хомякова Е. А., Цховребова Л. В., Честков И. В., Шутова М. В. (2015) Генетическое репрограммирование клеток: новая технология для фундаментальных исследований и практического использования, *Генетика*, **51**, 466-478, https://doi.org/10.7868/S0016675815040025.
6. Huang, C. Y., Liu, C. L., Ting, C. Y., Chiu, Y. T., Cheng, Y. C., Nicholson, M. W., and Hsieh, P. C. H. (2019) Human iPSC banking: barriers and opportunities, *J. Biomed. Sci.*, **26**, 87, https://doi.org/10.1186/s12929-019-0578-x.
7. Rehakova, D., Souralova, T., and Koutna, I. (2020) Clinical-grade human pluripotent stem cells for cell therapy: characterization strategy, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2435, https://doi.org/10.3390/ijms21072435.

8. Sullivan, S., Stacey, G. N., Akazawa, C., Aoyama, N., Baptista, R., Bedford, P., Bennaceur Griscelli, A., Chandra, A., Elwood, N., Girard, M., Kawamata, S., Hanatani, T., Latsis, T., Lin, S., Ludwig, T. E., Malygina, T., Mack, A., Mountford, J. C., Noggle, S., Pereira, L. V., Price, J., Sheldon, M., Srivastava, A., Stachelscheid, H., Velayudhan, S. R., Ward, N. J., Turner, M. L., Barry, J., and Song, J. (2018) Quality control guidelines for clinical-grade human induced pluripotent stem cell lines, *Regen. Med*., **13**, 859-866, https://doi.org/10.2217/rme-2018-0095.
9. Kobold, S., Guhr, A., Mah, N., Bultjer, N., Seltmann, S., Seiler Wulczyn, A. E. M., Stacey, G., Jie, H., Liu, W., Löser, P., and Kurtz, A. (2020) A manually curated database on clinical studies involving cell products derived from human pluripotent stem cells, *Stem Cell Rep*., **15**, 546-555, https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.06.014.
10. Bolton, E. M., and Bradley, J. A. (2015) Avoiding immunological rejection in regenerative medicine, *Regen. Med*., **10**, 287-304, https://doi.org/10.2217/rme.15.11.
11. Barrilleaux, B., and Knoepfler, P. S. (2011) Inducing iPSCs to escape the dish, *Cell Stem Cell*, **9**, 103-111, https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.07.006.
12. Zhao, T., Zhang, Z. N., Rong, Z., and Xu, Y. (2011) Immunogenicity of induced pluripotent stem cells, *Nature*, **474**, 212-215, https://doi.org/10.1038/nature10135.
13. Zhao, T., Zhang, Z. N., Westenskow, P. D., Todorova, D., Hu, Z., Lin, T., Rong, Z., Kim, J., He, J., Wang, M., Clegg, D. O., Yang, Y. G., Zhang, K., Friedlander, M., and Xu, Y. (2015) Humanized mice reveal differential immunogenicity of cells derived from autologous induced pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, **17**, 353-359, https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.021.
14. Nakamura, Y., Miyagawa, S., Yoshida, S., Sasawatari, S., Toyofuku, T., Toda, K., and Sawa, Y. (2019) Natural killer cells impede the engraftment of cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells in syngeneic mouse model, *Sci. Rep*., **9**, 10840, https://doi.org/10.1038/s41598-019-47134-3.
15. Bogomiakova, M. E., Sekretova, E. K., Anufrieva, K. S., Khabarova, P. O., Kazakova, A. N., Bobrovsky, P. A., Grigoryeva, T. V., Eremeev, A. V., Lebedeva, O. S., Bogomazova, A. N., and Lagarkova, M. A. (2023) iPSC-derived cells lack immune tolerance to autologous NK-cells due to imbalance in ligands for activating and inhibitory NK-cell receptors, *Stem Cell Res. Ther*., **14**, 77, https://doi.org/10.1186/s13287-023-03308-5.
16. Araki, R., Uda, M., Hoki, Y., Sunayama, M., Nakamura, M., Ando, S., Sugiura, M., Ideno, H., Shimada, A., Nifuji, A., and Abe, M. (2013) Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells, *Nature*, **494**, 100-104, https://doi.org/10.1038/nature11807.
17. 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. USA*, **107**, 8718-8723, https://doi.org/10.1073/pnas.0915086107.
18. 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, https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.01.006.
19. de Almeida, P. E., Meyer, E. H., Kooreman, N. G., Diecke, S., Dey, D., Sanchez-Freire, V., Hu, S., Ebert, A., Odegaard, J., Mordwinkin, N. M., Brouwer, T. P., Lo, D., Montoro, D. T., Longaker, M. T., Negrin, R. S., and Wu, J. C. (2014) Transplanted terminally differentiated induced pluripotent stem cells are accepted by immune mechanisms similar to self-tolerance, *Nat. Commun*., **5**, 3903, https://doi.org/10.1038/ncomms4903.
20. Morizane, A., Doi, D., Kikuchi, T., Okita, K., Hotta, A., Kawasaki, T., Hayashi, T., Onoe, H., Shiina, T., Yamanaka, S., and Takahashi, J. (2013) Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of iPSC-derived neural cells in the brain of a non-human primate, *Stem Cell Rep*., **1**, 283-292, https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.08.007.
21. Emborg, M. E., Liu, Y., Xi, J., Zhang, X., Yin, Y., Lu, J., Joers, V., Swanson, C., Holden, J. E., and Zhang, S. C. (2013) Induced pluripotent stem cell-derived neural cells survive and mature in the nonhuman primate brain, *Cell Rep*., **3**, 646-650, https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.02.016.
22. Hallett, P. J., Deleidi, M., Astradsson, A., Smith, G. A., Cooper, O., Osborn, T. M., Sundberg, M., Moore, M. A., Perez-Torres, E., Brownell, A. L., Schumacher, J. M., Spealman, R. D., and Isacson, O. (2015) Successful function of autologous iPSC-derived dopamine neurons following transplantation in a non-human primate model of Parkinson's disease, *Cell Stem Cell*, **16**, 269-274, https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.01.018.
23. Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B., and Olanow, C. W. (2008) Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease, *Nat. Med*., **14**, 504-506, https://doi.org/10.1038/nm1747.
24. Mendez, I., Viñuela, A., Astradsson, A., Mukhida, K., Hallett, P., Robertson, H., Tierney, T., Holness, R., Dagher, A., Trojanowski, J. Q., and Isacson, O. (2008) Dopamine neurons implanted into people with Parkinson's disease survive without pathology for 14 years, *Nat. Med*., **14**, 507-509, https://doi.org/10.1038/nm1752.
25. Strnadel, J., Carromeu, C., Bardy, C., Navarro, M., Platoshyn, O., Glud, A. N., Marsala, S., Kafka, J., Miyanohara, A., Kato, T., Jr, Tadokoro, T., Hefferan, M. P., Kamizato, K., Yoshizumi, T., Juhas, S., Juhasova, J., Ho, C. S., Kheradmand, T., Chen, P., Bohaciakova, D., Hruska-Plochan, M., Todd, A. J., Driscoll, S. P., Glenn, T. D., Pfaff, S. L., Klima, J., Ciacci, J., Curtis, E., Gage, F. H., Bui, J., Yamada, K., Muotri, A. R., and Marsala, M. (2018) Survival of syngeneic and

allogeneic iPSC-derived neural precursors after spinal grafting in minipigs, *Sci. Transl. Med.*, **10**, eaam6651, https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aam6651.
26. Lu, M., Peng, L., Ming, X., Wang, X., Cui, A., Li, Y., Wang, X., Meng, D., Sun, N., Xiang, M., and Chen, S. (2019) Enhanced wound healing promotion by immune response-free monkey autologous iPSCs and exosomes vs. their allogeneic counterparts, *EBioMedicine*, **42**, 443-457, https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.011.
27. Benabdallah, B., Désaulniers-Langevin, C., Goyer, M. L., Colas, C., Maltais, C., Li, Y., Guimond, J. V., Tremblay, J. P., Haddad, E., and Beauséjour, C. (2021) Myogenic progenitor cells derived from human induced pluripotent stem cell are immune-tolerated in humanized mice, *Stem Cells Transl. Med.*, **10**, 267-277, https://doi.org/10.1002/sctm.19-0452.
28. Rossbach, B., Hariharan, K., Mah, N., Oh, S. J., Volk, H. D., Reinke, P., and Kurtz, A. (2022) Human iPSC-derived renal cells change their immunogenic properties during maturation: implications for regenerative therapies, *Cells*, **11**, 1328, https://doi.org/10.3390/cells11081328.
29. Ljunggren, H. G., and Kärre, K. (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition, *Immunol. Today*, **11**, 237-244, https://doi.org/10.1016/0167-569990097-s.
30. Lanier, L. L. (2005) NK cell recognition, *Annu. Rev. Immunol.*, **23**, 225-274, https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115526.
31. Smyth, M. J., Cretney, E., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Street, S. E., Yagita, H., Takeda, K., van Dommelen, S. L., Degli-Esposti, M. A., and Hayakawa, Y. (2005) Activation of NK cell cytotoxicity, *Mol. Immunol.*, **42**, 501-510, https://doi.org/10.1016/j.molimm.2004.07.034.
32. 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, https://doi.org/10.1096/fj.09-134957.
33. Kruse, V., Hamann, C., Monecke, S., Cyganek, L., Elsner, L., Hübscher, D., Walter, L., Streckfuss-Bömeke, K., Guan, K., and Dressel, R. (2015) Human induced pluripotent stem cells are targets for allogeneic and autologous natural Killer (NK) cells and killing is partly mediated by the activating NK receptor DNAM-1, *PLoS One*, **10**, e0125544, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125544.
34. 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. USA*, **99**, 9864-9869, https://doi.org/10.1073/pnas.142298299.
35. Frenzel, L. P., Abdullah, Z., Kriegeskorte, A. K., Dieterich, R., Lange, N., Busch, D. H., Krönke, M., Utermöhlen, O., Hescheler, J., and Sarić, T. (2009) Role of natural-killer group 2 member D ligands and intercellular adhesion molecule 1 in natural killer cell-mediated lysis of murine embryonic stem cells and embryonic stem cell-derived cardiomyocytes, *Stem Cells*, **27**, 307-316, https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0528.
36. Gröschel, C., Hübscher, D., Nolte, J., Monecke, S., Sasse, A., Elsner, L., Paulus, W., Trenkwalder, C., Polić, B., Mansouri, A., Guan, K., and Dressel, R. (2017) Efficient killing of murine pluripotent stem cells by natural killer (NK) cells requires activation by cytokines and partly depends on the activating NK receptor NKG2D, *Front. Immunol.*, **8**, 870, https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00870.
37. Dressel, R., Schindehütte, J., Kuhlmann, T., Elsner, L., Novota, P., Baier, P. C., Schillert, A., Bickeböller, H., Herrmann, T., Trenkwalder, C., Paulus, W., and Mansouri, A. (2008) The tumorigenicity of mouse embryonic stem cells and *in vitro* differentiated neuronal cells is controlled by the recipients' immune response, *PLoS One*, **3**, e2622, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002622.
38. Benabdallah, B., Désaulniers-Langevin, C., Colas, C., Li, Y., Rousseau, G., Guimond, J. V., Haddad, E., and Beauséjour, C. (2019) Natural killer cells prevent the formation of teratomas derived from human induced pluripotent stem cells, *Front. Immunol.*, **10**, 2580, https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02580.
39. Melendez, E., Chondronasiou, D., Mosteiro, L., Martínez de Villarreal, J., Fernández-Alfara, M., Lynch, C. J., Grimm, D., Real, F. X., Alcamí, J., Climent, N., Pietrocola, F., and Serrano, M. (2022) Natural killer cells act as an extrinsic barrier for *in vivo* reprogramming, *Development*, **149**, dev200361, https://doi.org/10.1242/dev.200361.
40. Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Cañamero, M., Rayon, T., Ors, I., Graña, O., Megías, D., Domínguez, O., Martínez, D., Manzanares, M., Ortega, S., and Serrano, M. (2013) Reprogramming *in vivo* produces teratomas and iPS cells with totipotency features, *Nature*, **502**, 340-345, https://doi.org/10.1038/nature12586.
41. Cisneros, T., Dillard, D. W., Qu, X., Arredondo-Guerrero, J., Castro, M., Schaffert, S., Martin, R., Esquivel, C. O., Krams, S. M., and Martinez, O. M. (2019) Differential role of natural killer group 2D in recognition and cytotoxicity of hepatocyte-like cells derived from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells, *Am. J. Transplant.*, **19**, 1652-1662, https://doi.org/10.1111/ajt.15217.
42. Phillips, L. K., Gould, E. A., Babu, H., Krams, S. M., Palmer, T. D., and Martinez, O. M. (2013) Natural killer cell-activating receptor NKG2D mediates innate immune targeting of allogeneic neural progenitor cell grafts, *Stem Cells*, **31**, 1829-1839, https://doi.org/10.1002/stem.1422.

43. Zheng, D., Wang, X., and Xu, R. H. (2016) Concise review: one stone for multiple birds: generating universally compatible human embryonic stem cells, *Stem Cells*, **34**, 2269-2275, https://doi.org/10.1002/stem.2407.
44. Богомякова М. Е., Еремеев А. В., Лагарькова М. А. (2019) «Свой среди чужих»: можно ли создать гипоиммуногенные линии плюрипотентных стволовых клеток? *Молекулярная биология*, **53**, 725-740, https://doi.org/10.1134/S0026898419050045.
45. Riolobos, L., Hirata, R. K., Turtle, C. J., Wang, P. R., Gornalusse, G. G., Zavajlevski, M., Riddell, S. R., and Russell, D. W. (2013) HLA engineering of human pluripotent stem cells, *Mol. Ther*., **21**, 1232-1241, https://doi.org/10.1038/mt.2013.59.
46. Wang, D., Quan, Y., Yan, Q., Morales, J. E., and Wetsel, R. A. (2015) Targeted disruption of the β2-microglobulin gene minimizes the immunogenicity of human embryonic stem cells, *Stem Cells Transl. Med*., **4**, 1234-1245, https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0049.
47. Bogomiakova, M. E., Sekretova, E. K., Eremeev, A. V., Shuvalova, L. D., Bobrovsky, P. A., Zerkalenkova, E. A., Lebedeva, O. S., and Lagarkova, M. A. (2021) Derivation of induced pluripotent stem cells line (RCPCMi007-A-1) with inactivation of the beta-2-microglobulin gene by CRISPR/Cas9 genome editing, *Stem Cell Res*., **55**, 102451, https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102451.
48. Chen, H., Li, Y., Lin, X., Cui, D., Cui, C., Li, H., and Xiao, L. (2015) Functional disruption of human leukocyte antigen II in human embryonic stem cell, *Biol. Res*., **48**, 59, https://doi.org/10.1186/s40659-015-0051-6.
49. Mattapally, S., Pawlik, K. M., Fast, V. G., Zumaquero, E., Lund, F. E., Randall, T. D., Townes, T. M., and Zhang, J. (2018) Human leukocyte antigen class I and II knockout human induced pluripotent stem cell-derived cells: universal donor for cell therapy, *J. Am Heart Assoc*., **7**, e010239, https://doi.org/10.1161/JAHA.118.010239.
50. Petrus-Reurer, S., Winblad, N., Kumar, P., Gorchs, L., Chrobok, M., Wagner, A. K., Bartuma, H., Lardner, E., Aronsson, M., Plaza Reyes, Á., André, H., Alici, E., Kaipe, H., Kvanta, A., and Lanner, F. (2020) Generation of retinal pigment epithelial cells derived from human embryonic stem cells lacking human leukocyte antigen class I and II, *Stem Cell Rep*., **14**, 648-662, https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.02.006.
51. Lanza, R., Russell, D. W., and Nagy, A. (2019) Engineering universal cells that evade immune detection, *Nat. Rev. Immunol*., **19**, 723-733, https://doi.org/10.1038/s41577-019-0200-1.
52. Kim, A., Lee, K. G., Kwon, Y., Lee, K. I., Yang, H. M., Habib, O., Kim, J., Kim, S. T., Kim, S. J., Kim, J. S., and Hwang, D. Y. (2021) Off-the-shelf, immune-compatible human embryonic stem cells generated via CRISPR-mediated genome editing, *Stem Cell Rev Rep*, **17**, 1053-1067, https://doi.org/10.1007/s12015-020-10113-7.
53. Wang, B., Iriguchi, S., Waseda, M., Ueda, N., Ueda, T., Xu, H., Minagawa, A., Ishikawa, A., Yano, H., Ishi, T., Ito, R., Goto, M., Takahashi, R., Uemura, Y., Hotta, A., and Kaneko, S. (2021) Generation of hypoimmunogenic T cells from genetically engineered allogeneic human induced pluripotent stem cells, *Nat. Biomed. Eng*., **5**, 429-440, https://doi.org/10.1038/s41551-021-00730-z.
54. Gornalusse, G. G., Hirata, R. K., Funk, S. E., Riolobos, L., Lopes, V. S., Manske, G., Prunkard, D., Colunga, A. G., Hanafi, L. A., Clegg, D. O., Turtle, C., and Russell, D. W. (2017) HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells, *Nat. Biotechnol*., **35**, 765-772, https://doi.org/10.1038/nbt.3860.
55. Han, X., Wang, M., Duan, S., Franco, P. J., Kenty, J. H., Hedrick, P., Xia, Y., Allen, A., Ferreira, L. M. R., Strominger, J. L., Melton, D. A., Meissner, T. B., and Cowan, C. A. (2019) Generation of hypoimmunogenic human pluripotent stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 10441-10446, https://doi.org/10.1073/pnas.1902566116.
56. Deuse, T., Hu, X., Gravina, A., Wang, D., Tediashvili, G., De, C., Thayer, W. O., Wahl, A., Garcia, J. V., Reichenspurner, H., Davis, M. M., Lanier, L. L., and Schrepfer, S. (2019) Hypoimmunogenic derivatives of induced pluripotent stem cells evade immune rejection in fully immunocompetent allogeneic recipients, *Nat. Biotechnol*., **37**, 252-258, https://doi.org/10.1038/s41587-019-0016-3.
57. Shi, L., Li, W., Liu, Y., Chen, Z., Hui, Y., Hao, P., Xu, X., Zhang, S., Feng, H., Zhang, B., Zhou, S., Li, N., Xiao, L., Liu, L., Ma, L., and Zhang, X. (2020) Generation of hypoimmunogenic human pluripotent stem cells via expression of membrane-bound and secreted β2m-HLA-G fusion proteins, *Stem Cells*, **38**, 1423-1437, https://doi.org/10.1002/stem.3269.
58. Moffett, A., and Colucci, F. (2015) Co-evolution of NK receptors and HLA ligands in humans is driven by reproduction, *Immunol. Rev*., **267**, 283-297, https://doi.org/10.1111/imr.12323.
59. Ichise, H., Nagano, S., Maeda, T., Miyazaki, M., Miyazaki, Y., Kojima, H., Yawata, N., Yawata, M., Tanaka, H., Saji, H., Masuda, K., and Kawamoto, H. (2017) NK cell alloreactivity against KIR-ligand-mismatched HLA-haploidentical tissue derived from HLA haplotype-homozygous iPSCs, *Stem Cell Rep*., **9**, 853-867, https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.07.020.
60. Zamir, M. R., Shahi, A., Salehi, S., and Amirzargar, A. (2022) Natural killer cells and killer cell immunoglobulin-like receptors in solid organ transplantation: Protectors or opponents? *Transplant. Rev. (Orlando)*, **36**, 100723, https://doi.org/10.1016/j.trre.2022.100723.
61. Song, C., Wang, L., Li, Q., Liao, B., Qiao, W., Li, Q., Dong, N., and Li, L. (2022) Generation of individualized immunocompatible endothelial cells from HLA-I-matched human pluripotent stem cells, *Stem Cell Res. Ther*., **13**, 48, https://doi.org/10.1186/s13287-022-02720-7.

62. Villard, J. (2011) The role of natural killer cells in human solid organ and tissue transplantation, *J. Innate Immun.*, **3**, 395-402, https://doi.org/10.1159/000324400.
63. Pontrelli, P., Rascio, F., Castellano, G., Grandaliano, G., Gesualdo, L., and Stallone, G. (2020) The role of natural killer cells in the immune response in kidney transplantation, *Front. Immunol.*, **11**, 1454, https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01454.
64. Adenugba, A. (2017) NK cells in transplantation, *Transplantation*, **101**, 2262-2264, https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001914.
65. Bhutani, K., Nazor, K. L., Williams, R., Tran, H., Dai, H., Džakula, Ž., Cho, E. H., Pang, A. W. C., Rao, M., Cao, H., Schork, N. J., and Loring, J. F. (2016) Whole-genome mutational burden analysis of three pluripotency induction methods, *Nat. Commun.*, **7**, 10536, https://doi.org/10.1038/ncomms10536.
66. Popp, B., Krumbiegel, M., Grosch, J., Sommer, A., Uebe, S., Kohl, Z., Plötz, S., Farrell, M., Trautmann, U., Kraus, C., Ekici, A. B., Asadollahi, R., Regensburger, M., Günther, K., Rauch, A., Edenhofer, F., Winkler, J., Winner, B., and Reis, A. (2018) Need for high-resolution genetic analysis in iPSC: results and lessons from the ForIPS consortium, *Sci. Rep.*, **8**, 17201, https://doi.org/10.1038/s41598-018-35506-0.
67. Sugiura, M., Kasama, Y., Araki, R., Hoki, Y., Sunayama, M., Uda, M., Nakamura, M., Ando, S., and Abe, M. (2014) Induced pluripotent stem cell generation-associated point mutations arise during the initial stages of the conversion of these cells, *Stem Cell Rep.*, **2**, 52-63, https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.11.006.
68. Kang, X., Yu, Q., Huang, Y., Song, B., Chen, Y., Gao, X., He, W., Sun, X., and Fan, Y. (2015) Effects of integrating and non-integrating reprogramming methods on copy number variation and genomic stability of human induced pluripotent stem cells, *PLoS One*, **10**, e0131128, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131128.
69. Cheng, L., Hansen, N. F., Zhao, L., Du, Y., Zou, C., Donovan, F. X., Chou, B. K., Zhou, G., Li, S., Dowey, S. N., Ye, Z., NISC Comparative Sequencing Program, Chandrasekharappa, S. C., Yang, H., Mullikin, J. C., and Liu, P. P. (2012) Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression, *Cell Stem Cell*, **10**, 337-344, https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.005.
70. Weltner, J., Balboa, D., Katayama, S., Bespalov, M., Krjutškov, K., Jouhilahti, E. M., Trokovic, R., Kere, J., and Otonkoski, T. (2018) Human pluripotent reprogramming with CRISPR activators, *Nat. Commun.*, **9**, 2643, https://doi.org/10.1038/s41467-018-05067-x.
71. Liu, X., Li, W., Fu, X., and Xu, Y. (2017) The immunogenicity and immune tolerance of pluripotent stem cell derivatives, *Front. Immunol.*, **8**, 645, https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00645.
72. Hanna, J. H., Saha, K., and Jaenisch, R. (2010) Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues, *Cell*, **143**, 508-525, https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.10.008.
73. D'Antonio, M., Benaglio, P., Jakubosky, D., Greenwald, W. W., Matsui, H., Donovan, M. K. R., Li, H., Smith, E. N., D'Antonio-Chronowska, A., and Frazer, K. A. (2018) Insights into the mutational burden of human induced pluripotent stem cells from an integrative multi-omics approach, *Cell Rep.*, **24**, 883-894, https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.091.
74. Martincorena, I., Roshan, A., Gerstung, M., Ellis, P., Van Loo, P., McLaren, S., Wedge, D. C., Fullam, A., Alexandrov, L. B., Tubio, J. M., Stebbings, L., Menzies, A., Widaa, S., Stratton, M. R., Jones, P. H., and Campbell, P. J. (2015) Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin, *Science*, **348**, 880-886, https://doi.org/10.1126/science.aaa6806.
75. Wang, K., Guzman, A. K., Yan, Z., Zhang, S., Hu, M. Y., Hamaneh, M. B., Yu, Y. K., Tolu, S., Zhang, J., Kanavy, H. E., Ye, K., Bartholdy, B., and Bouhassira, E. E. (2019) Ultra-high-frequency reprogramming of individual long-term hematopoietic stem cells yields low somatic variant induced pluripotent stem cells, *Cell Rep.*, **26**, 2580-2592.e7, https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.02.021.
76. Rouhani, F. J., Zou, X., Danecek, P., Badja, C., Amarante, T. D., Koh, G., Wu, Q., Memari, Y., Durbin, R., Martincorena, I., Bassett, A. R., Gaffney, D., and Nik-Zainal, S. (2022) Substantial somatic genomic variation and selection for BCOR mutations in human induced pluripotent stem cells, *Nat. Genet.*, **54**, 1406-1416, https://doi.org/10.1038/s41588-022-01147-3.
77. Genovese, G., Kähler, A. K., Handsaker, R. E., Lindberg, J., Rose, S. A., Bakhoum, S. F., Chambert, K., Mick, E., Neale, B. M., Fromer, M., Purcell, S. M., Svantesson, O., Landén, M., Höglund, M., Lehmann, S., Gabriel, S. B., Moran, J. L., Lander, E. S., Sullivan, P. F., Sklar, P., Grönberg, H., Hultman, C. M., and McCarroll, S. A. (2014) Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence, *N. Engl. J. Med.*, **371**, 2477-2487, https://doi.org/10.1056/NEJMoa1409405.
78. Lo Sardo, V., Ferguson, W., Erikson, G. A., Topol, E. J., Baldwin, K. K., and Torkamani, A. (2017) Influence of donor age on induced pluripotent stem cells, *Nat. Biotechnol.*, **35**, 69-74, https://doi.org/10.1038/nbt.3749.
79. Kang, E., Wang, X., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Folmes, C. D., Gutierrez, N. M., Lee, Y., Van Dyken, C., Ahmed, R., Li, Y., Koski, A., Hayama, T., Luo, S., Harding, C. O., Amato, P., Jensen, J., Battaglia, D., Lee, D., Wu, D., Terzic, A., Wolf, D. P., Huang, T., and Mitalipov, S. (2016) Age-related accumulation of somatic mitochondrial

DNA mutations in adult-derived human iPSCs, *Cell Stem Cell*, **18**, 625-636, https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.005.

80. Wei, W., Gaffney, D. J., and Chinnery, P. F. (2021) Cell reprogramming shapes the mitochondrial DNA landscape, *Nat. Commun.*, **12**, 5241, https://doi.org/10.1038/s41467-021-25482-x.
81. Kosanke, M., Davenport, C., Szepes, M., Wiehlmann, L., Kohrn, T., Dorda, M., Gruber, J., Menge, K., Sievert, M., Melchert, A., Gruh, I., Göhring, G., and Martin, U. (2021) iPSC culture expansion selects against putatively actionable mutations in the mitochondrial genome, *Stem Cell Rep.*, **16**, 2488-2502, https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.08.016.
82. Deuse, T., Hu, X., Agbor-Enoh, S., Koch, M., Spitzer, M. H., Gravina, A., Alawi, M., Marishta, A., Peters, B., Kosaloglu-Yalcin, Z., Yang, Y., Rajalingam, R., Wang, D., Nashan, B., Kiefmann, R., Reichenspurner, H., Valantine, H., Weissman, I. L., and Schrepfer, S. (2019) De novo mutations in mitochondrial DNA of iPSCs produce immunogenic neoepitopes in mice and humans, *Nat Biotechnol.*, **37**, 1137-1144. https://doi.org/10.1038/s41587-019-0227-7.
83. Araki, R., Hoki, Y., Suga, T., Obara, C., Sunayama, M., Imadome, K., Fujita, M., Kamimura, S., Nakamura, M., Wakayama, S., Nagy, A., Wakayama, T., and Abe, M. (2020) Genetic aberrations in iPSCs are introduced by a transient G1/S cell cycle checkpoint deficiency, *Nat. Commun.*, **11**, 197, https://doi.org/10.1038/s41467-019-13830-x.
84. Wang, B., Miyagoe-Suzuki, Y., Yada, E., Ito, N., Nishiyama, T., Nakamura, M., Ono, Y., Motohashi, N., Segawa, M., Masuda, S., and Takeda, S. (2011) Reprogramming efficiency and quality of induced pluripotent stem cells (iPSCs) generated from muscle-derived fibroblasts of mdx mice at different ages, *PLoS Curr.*, **3**, RRN1274, https://doi.org/10.1371/currents.RRN1274.
85. Yoshihara, M., Araki, R., Kasama, Y., Sunayama, M., Abe, M., Nishida, K., Kawaji, H., Hayashizaki, Y., and Murakawa, Y. (2017) Hotspots of *de novo* point mutations in induced pluripotent stem cells, *Cell Rep.*, **21**, 308-315, https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.060.
86. Gore, A., Li, Z., Fung, H. L., Young, J. E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M. A., Kiskinis, E., Lee, J. H., Loh, Y. H., Manos, P. D., Montserrat, N., Panopoulos, A. D., Ruiz, S., Wilbert, M. L., Yu, J., Kirkness, E. F., Izpisua Belmonte, J. C., Rossi, D. J., Thomson, J. A., Eggan, K., Daley, G. Q., Goldstein, L. S., and Zhang, K. (2011) Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells, *Nature*, **471**, 63-67, https://doi.org/10.1038/nature09805.
87. Ji, J., Ng, S. H., Sharma, V., Neculai, D., Hussein, S., Sam, M., Trinh, Q., Church, G. M., McPherson, J. D., Nagy, A., and Batada, N. N. (2012) Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells, *Stem Cells*, **30**, 435-440, https://doi.org/10.1002/stem.1011.
88. Rouhani, F. J., Nik-Zainal, S., Wuster, A., Li, Y., Conte, N., Koike-Yusa, H., Kumasaka, N., Vallier, L., Yusa, K., and Bradley, A. (2016) Mutational history of a human cell lineage from somatic to induced pluripotent stem cells, *PLoS Genet.*, **12**, e1005932, https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005932.
89. Kwon, E. M., Connelly, J. P., Hansen, N. F., Donovan, F. X., Winkler, T., Davis, B. W., Alkadi, H., Chandrasekharappa, S. C., Dunbar, C. E., Mullikin, J. C., and Liu, P. (2017) iPSCs and fibroblast subclones from the same fibroblast population contain comparable levels of sequence variations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 1964-1969, https://doi.org/10.1073/pnas.1616035114.
90. Kosanke, M., Osetek, K., Haase, A., Wiehlmann, L., Davenport, C., Schwarzer, A., Adams, F., Kleppa, M. J., Schambach, A., Merkert, S., Wunderlich, S., Menke, S., Dorda, M., and Martin, U. (2021) Reprogramming enriches for somatic cell clones with small-scale mutations in cancer-associated genes, *Mol. Ther.*, **29**, 2535-2553, https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.04.007.
91. International Stem Cell Initiative, Amps, K., Andrews, P. W., Anyfantis, G., Armstrong, L., Avery, S., Baharvand, H., Baker, J., Baker, D., Munoz, M. B., Beil, S., Benvenisty, N., Ben-Yosef, D., Biancotti, J. C., Bosman, A., Brena, R. M., Brison, D., Caisander, G., Camarasa, M. V., Chen, J., and Zhou, Q. (2011) Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage, *Nat. Biotechnol.*, **29**, 1132-1144, https://doi.org/10.1038/nbt.2051.
92. Merkle, F. T., Ghosh, S., Kamitaki, N., Mitchell, J., Avior, Y., Mello, C., Kashin, S., Mekhoubad, S., Ilic, D., Charlton, M., Saphier, G., Handsaker, R. E., Genovese, G., Bar, S., Benvenisty, N., McCarroll, S. A., and Eggan, K. (2017) Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations, *Nature*, **545**, 229-233, https://doi.org/10.1038/nature22312.
93. Hasaart, K. A. L., Manders, F., Ubels, J., Verheul, M., van Roosmalen, M. J., Groenen, N. M., Oka, R., Kuijk, E., Lopes, S. M. C. S., and Boxtel, R. V. (2022) Human induced pluripotent stem cells display a similar mutation burden as embryonic pluripotent cells *in vivo*, *iScience*, **25**, 103736, https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.103736.
94. Kuijk, E., Jager, M., van der Roest, B., Locati, M. D., Van Hoeck, A., Korzelius, J., Janssen, R., Besselink, N., Boymans, S., van Boxtel, R., and Cuppen, E. (2020) The mutational impact of culturing human pluripotent and adult stem cells, *Nat. Commun.*, **11**, 2493, https://doi.org/10.1038/s41467-020-16323-4.
95. Thompson, O., von Meyenn, F., Hewitt, Z., Alexander, J., Wood, A., Weightman, R., Gregory, S., Krueger, F., Andrews, S., Barbaric, I., Gokhale, P. J., Moore, H. D., Reik, W., Milo, M., Nik-Zainal, S., Yusa, K., and Andrews, P. W.

(2020) Low rates of mutation in clinical grade human pluripotent stem cells under different culture conditions, *Nat. Commun.*, **11**, 1528, https://doi.org/10.1038/s41467-020-15271-3.
96. Avior, Y., Lezmi, E., Eggan, K., and Benvenisty, N. (2021) Cancer-related mutations identified in primed human pluripotent stem cells, *Cell Stem Cell*, **28**, 10-11, https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.11.013.
97. Merkle, F. T., Ghosh, S., Genovese, G., Handsaker, R. E., Kashin, S., Meyer, D., Karczewski, K. J., O'Dushlaine, C., Pato, C., Pato, M., MacArthur, D. G., McCarroll, S. A., and Eggan, K. (2022) Whole-genome analysis of human embryonic stem cells enables rational line selection based on genetic variation, *Cell Stem Cell*, **29**, 472-486.e7, https://doi.org/10.1016/j.stem.2022.01.011.
98. Puigdevall, P., Jerber, J., Danecek, P., Castellano, S., and Kilpinen, H. (2023) Somatic mutations alter the differentiation outcomes of iPSC-derived neurons, *Cell Genom.*, **3**, 100280, https://doi.org/10.1016/j.xgen.2023.100280.
99. Ohm, J. E., Mali, P., Van Neste, L., Berman, D. M., Liang, L., Pandiyan, K., Briggs, K. J., Zhang, W., Argani, P., Simons, B., Yu, W., Matsui, W., Van Criekinge, W., Rassool, F. V., Zambidis, E., Schuebel, K. E., Cope, L., Yen, J., Mohammad, H. P., Cheng, L., and Baylin, S. B. (2010) Cancer-related epigenome changes associated with reprogramming to induced pluripotent stem cells, *Cancer Res.*, **70**, 7662-7673, https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1361.
100. Planello, A. C., Ji, J., Sharma, V., Singhania, R., Mbabaali, F., Müller, F., Alfaro, J. A., Bock, C., De Carvalho, D. D., and Batada, N. N. (2014) Aberrant DNA methylation reprogramming during induced pluripotent stem cell generation is dependent on the choice of reprogramming factors, *Cell Regen.*, **3**, 4, https://doi.org/10.1186/2045-9769-3-4.
101. Weissbein, U., Plotnik, O., Vershkov, D., and Benvenisty, N. (2017) Culture-induced recurrent epigenetic aberrations in human pluripotent stem cells, *PLoS Genet.*, **13**, e1006979, https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006979.
102. Ruiz, S., Diep, D., Gore, A., Panopoulos, A. D., Montserrat, N., Plongthongkum, N., Kumar, S., Fung, H. L., Giorgetti, A., Bilic, J., Batchelder, E. M., Zaehres, H., Kan, N. G., Schöler, H. R., Mercola, M., Zhang, K., and Izpisua Belmonte, J. C. (2012) Identification of a specific reprogramming-associated epigenetic signature in human induced pluripotent stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 16196-16201, https://doi.org/10.1073/pnas.1202352109.
103. Chin, M. H., Mason, M. J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiuwu, O., Richter, L., Zhang, J., Khvorostov, I., Ott, V., Grunstein, M., Lavon, N., Benvenisty, N., Croce, C. M., Clark, A. T., Baxter, T., Pyle, A. D., Teitell, M. A., Pelegrini, M., Plath, K., and Lowry, W. E. (2009) Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures, *Cell Stem Cell*, **5**, 111-123, https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.06.008.
104. Poetsch, M. S., Strano, A., and Guan, K. (2022) Human induced pluripotent stem cells: from cell origin, genomic stability, and epigenetic memory to translational medicine, *Stem Cells*, **40**, 546-555, https://doi.org/10.1093/stmcls/sxac020.
105. Buckberry, S., Liu, X., Poppe, D., Tan, J. P., Sun, G., Chen, J., Nguyen, T. V., de Mendoza, A., Pflueger, J., Frazer, T., Vargas-Landín, D. B., Paynter, J. M., Smits, N., Liu, N., Ouyang, J. F., Rossello, F. J., Chy, H. S., Rackham, O. J. L., Laslett, A. L., Breen, J., Faulkner, G. J., Nefzger, C. M., Polo, J. M., and Lister, R. (2023) Transient naive reprogramming corrects hiPS cells functionally and epigenetically, *Nature*, **620**, 863-872, https://doi.org/10.1038/s41586-023-06424-7.
106. 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, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106110.
107. Liu, P., Chen, S., Li, X., Qin, L., Huang, K., Wang, L., Huang, W., Li, S., Jia, B., Zhong, M., Pan, G., Cai, J., and Pei, D. (2013) Low immunogenicity of neural progenitor cells differentiated from induced pluripotent stem cells derived from less immunogenic somatic cells, *PLoS One*, **8**, e69617, https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069617.
108. Pegram, H. J., Andrews, D. M., Smyth, M. J., Darcy, P. K., and Kershaw, M. H. (2011) Activating and inhibitory receptors of natural killer cells, *Immunol. Cell Biol.*, **89**, 216-224, https://doi.org/10.1038/icb.2010.78.
109. Netter, P., Anft, M., and Watzl, C. (2017) Termination of the activating NK Cell immunological synapse is an active and regulated process, *J. Immunol.*, **199**, 2528-2535, https://doi.org/10.4049/jimmunol.1700394.
110. Simpson, A. J., Caballero, O. L., Jungbluth, A., Chen, Y. T., and Old, L. J. (2005) Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **5**, 615-625, https://doi.org/10.1038/nrc1669.
111. Hong, Y., Zhao, Y., Li, H., Yang, Y., Chen, M., Wang, X., Luo, M., and Wang, K. (2023) Engineering the maturation of stem cell-derived cardiomyocytes, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **11**, 1155052, https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1155052.
112. Tricot, T., Verfaillie, C. M., and Kumar, M. (2022) Current status and challenges of human induced pluripotent stem cell-derived liver models in drug discovery, *Cells*, **11**, 442, https://doi.org/10.3390/cells11030442.
113. Diane, A., Mohammed, L. I., and Al-Siddiqi, H. H. (2023) Islets in the body are never flat: transitioning from two-dimensional (2D) monolayer culture to three-dimensional (3D) spheroid for better efficiency in the generation of functional hPSC-derived pancreatic β cells *in vitro*, *Cell Commun. Signal.*, **21**, 151, https://doi.org/10.1186/s12964-023-01171-8.
114. Ma, H., Folmes, C. D., Wu, J., Morey, R., Mora-Castilla, S., Ocampo, A., Ma, L., Poulton, J., Wang, X., Ahmed, R., Kang, E., Lee, Y., Hayama, T., Li, Y., Van Dyken, C., Gutierrez, N. M., Tippner-Hedges, R., Koski, A., Mitalipov, N., Amato, P., Wolf, D. P., Huang, T., Terzic, A., Laurent, L. C., Izpisua Belmonte, J. C., and Mitalipov, S. (2015) Meta-

bolic rescue in pluripotent cells from patients with mtDNA disease, *Nature*, **524**, 234-238, https://doi.org/10.1038/nature14546.

115. Cacchiarelli, D., Trapnell, C., Ziller, M. J., Soumillon, M., Cesana, M., Karnik, R., Donaghey, J., Smith, Z. D., Ratanasirintrawoot, S., Zhang, X., Ho Sui, S. J., Wu, Z., Akopian, V., Gifford, C. A., Doench, J., Rinn, J. L., Daley, G. Q., Meissner, A., Lander, E. S., and Mikkelsen, T. S. (2015) Integrative analyses of human reprogramming reveal dynamic nature of induced pluripotency, *Cell*, **162**, 412-424, https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.06.016.
116. Choi, J., Lee, S., Mallard, W., Clement, K., Tagliazucchi, G. M., Lim, H., Choi, I. Y., Ferrari, F., Tsankov, A. M., Pop, R., Lee, G., Rinn, J. L., Meissner, A., Park, P. J., and Hochedlinger, K. (2015) A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs, *Nat. Biotechnol.*, **33**, 1173-1181, https://doi.org/10.1038/nbt.3388.
117. Idelson, M., Alper, R., Obolensky, A., Yachimovich-Cohen, N., Rachmilewitz, J., Ejzenberg, A., Beider, E., Banin, E., and Reubinoff, B. (2018) Immunological properties of human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelial cells, *Stem Cell Rep.*, **11**, 681-695, https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.07.009.
118. Yamasaki, S., Sugita, S., Horiuchi, M., Masuda, T., Fujii, S., Makabe, K., Kawasaki, A., Hayashi, T., Kuwahara, A., Kishino, A., Kimura, T., Takahashi, M., and Mandai, M. (2021) Low immunogenicity and immunosuppressive properties of human ESC- and iPSC-derived retinas, *Stem Cell Rep.*, **16**, 851-867, https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2021.02.021.
119. Edo, A., Sugita, S., Futatsugi, Y., Sho, J., Onishi, A., Kiuchi, Y., and Takahashi, M. (2020) Capacity of retinal ganglion cells derived from human induced pluripotent stem cells to suppress T-cells, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7831, https://doi.org/10.3390/ijms21217831.
120. Liu, J., Götherström, C., Forsberg, M., Samuelsson, E. B., Wu, J., Calzarossa, C., Hovatta, O., Sundström, E., and Åkesson, E. (2013) Human neural stem/progenitor cells derived from embryonic stem cells and fetal nervous system present differences in immunogenicity and immunomodulatory potentials *in vitro*, *Stem Cell Res.*, **10**, 325-337, https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.01.001.
121. Itakura, G., Ozaki, M., Nagoshi, N., Kawabata, S., Nishiyama, Y., Sugai, K., Iida, T., Kashiwagi, R., Ookubo, T., Yastake, K., Matsubayashi, K., Kohyama, J., Iwanami, A., Matsumoto, M., Nakamura, M., and Okano, H. (2017) Low immunogenicity of mouse induced pluripotent stem cell-derived neural stem/progenitor cells, *Sci. Rep.*, **7**, 12996, https://doi.org/10.1038/s41598-017-13522-w.
122. Ozaki, M., Iwanami, A., Nagoshi, N., Kohyama, J., Itakura, G., Iwai, H., Nishimura, S., Nishiyama, Y., Kawabata, S., Sugai, K., Iida, T., Matsubayashi, K., Isoda, M., Kashiwagi, R., Toyama, Y., Matsumoto, M., Okano, H., and Nakamura, M. (2017) Evaluation of the immunogenicity of human iPS cell-derived neural stem/progenitor cells *in vitro*, *Stem Cell Res.*, **19**, 128-138, https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.01.007.
123. Fujii, S., Yoshida, S., Inagaki, E., Hatou, S., Tsubota, K., Takahashi, M., Shimmura, S., and Sugita, S. (2019) Immunological properties of neural crest cells derived from human induced pluripotent stem cells, *Stem Cells Dev.*, **28**, 28-43, https://doi.org/10.1089/scd.2018.0058.
124. Mehler, V. J., Burns, C. J., Stauss, H., Francis, R. J., and Moore, M. L. (2020) Human iPSC-derived neural crest stem cells exhibit low immunogenicity, *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, **16**, 161-171, https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.12.015.
125. Kimura, T., Yamashita, A., Ozono, K., and Tsumaki, N. (2016) Limited immunogenicity of human induced pluripotent stem cell-derived cartilages, *Tissue Eng. Part A*, **22**, 1367-1375, https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2016.0189.
126. Wong, K. G., Ryan, S. D., Ramnarine, K., Rosen, S. A., Mann, S. E., Kulick, A., De Stanchina, E., Müller, F. J., Kacmarczyk, T. J., Zhang, C., Betel, D., and Tomishima, M. J. (2017) CryoPause: a new method to immediately initiate experiments after cryopreservation of pluripotent stem cells, *Stem Cell Rep.*, **9**, 355-365, https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.05.010.
127. Ji, J., Sharma, V., Qi, S., Guarch, M. E., Zhao, P., Luo, Z., Fan, W., Wang, Y., Mbabaali, F., Neculai, D., Esteban, M. A., McPherson, J. D., and Batada, N. N. (2014) Antioxidant supplementation reduces genomic aberrations in human induced pluripotent stem cells, *Stem Cell Rep.*, **2**, 44-51, https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2013.11.004.
128. Martin, M. J., Muotri, A., Gage, F., and Varki, A. (2005) Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid, *Nat. Med.*, **11**, 228-232, https://doi.org/10.1038/nm1181.
129. Tangvoranuntakul, P., Gagneux, P., Diaz, S., Bardor, M., Varki, N., Varki, A., and Muchmore, E. (2003) Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12045-12050, https://doi.org/10.1073/pnas.2131556100.
130. Rodríguez-Pizà, I., Richaud-Patin, Y., Vassena, R., González, F., Barrero, M. J., Veiga, A., Raya, A., and Izpisúa Belmonte, J. C. (2010) Reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells under xeno-free conditions, *Stem Cells*, **28**, 36-44, https://doi.org/10.1002/stem.248.
131. Swistowski, A., Peng, J., Liu, Q., Mali, P., Rao, M. S., Cheng, L., and Zeng, X. (2010) Efficient generation of functional dopaminergic neurons from human induced pluripotent stem cells under defined conditions, *Stem Cells*, **28**, 1893-1904, https://doi.org/10.1002/stem.499.

132. Chung, T. L., Turner, J. P., Thaker, N. Y., Kolle, G., Cooper-White, J. J., Grimmond, S. M., Pera, M. F., and Wolvetang, E. J. (2010) Ascorbate promotes epigenetic activation of CD30 in human embryonic stem cells, *Stem Cells*, **28**, 1782-1793, https://doi.org/10.1002/stem.500.
133. Lagarkova, M. A., Volchkov, P. Y., Philonenko, E. S., Pfannkuche, K., Prokhorovich, M. A., Zabotina, T., Hescheler, J., and Kiselev, S. L. (2008) CD 30 is a marker of undifferentiated human embryonic stem cells rather than a biomarker of transformed hESCs, *Cell Cycle*, **7**, 3610-3612, https://doi.org/10.4161/cc.7.22.6981.
134. Kaneko, S., and Yamanaka, S. (2013) To be immunogenic, or not to be: that's the iPSC question, *Cell Stem Cell*, **12**, 385-386, https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.03.008.
135. Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hirami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., Terada, M., Nomiya, Y., Tanishima, S., Nakamura, M., Kamao, H., Sugita, S., Onishi, A., Ito, T., Fujita, K., Kawamata, S., and Takahashi, M. (2017) Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration, *N. Engl. J. Med.*, **376**, 1038-1046, https://doi.org/10.1056/NEJMoa1608368.
136. Takagi, S., Mandai, M., Gocho, K., Hirami, Y., Yamamoto, M., Fujihara, M., Sugita, S., Kurimoto, Y., and Takahashi, M. (2019) Evaluation of transplanted autologous induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium in exudative age-related macular degeneration, *Ophthalmol. Retina*, **3**, 850-859, https://doi.org/10.1016/j.oret.2019.04.021.
137. Schweitzer, J. S., Song, B., Herrington, T. M., Park, T. Y., Lee, N., Ko, S., Jeon, J., Cha, Y., Kim, K., Li, Q., Henchcliffe, C., Kaplitt, M., Neff, C., Rapalino, O., Seo, H., Lee, I. H., Kim, J., Kim, T., Petsko, G. A., Ritz, J., Cohen, B. M., Kong, S. W., Leblanc, P., Carter, B. S., and Kim, K. S. (2020) Personalized iPSC-derived dopamine progenitor cells for Parkinson's disease, *N. Engl. J. Med.*, **382**, 1926-1932, https://doi.org/10.1056/NEJMoa1915872.
138. Sugimoto, N., Kanda, J., Nakamura, S., Kitano, T., Hishizawa, M., Kondo, T., Shimizu, S., Shigemasa, A., Hirai, H., Arai, Y., Minami, M., Tada, H., Momose, D., Koh, K. R., Nogawa, M., Watanabe, N., Okamoto, S., Handa, M., Sawaguchi, A., Matsuyama, N., and Eto, K. (2022) iPLAT1: the first-in-human clinical trial of iPSC-derived platelets as a phase 1 autologous transfusion study, *Blood*, **140**, 2398-2402, https://doi.org/10.1182/blood.2022017296.
139. Hu, X., White, K., Olroyd, A. G., DeJesus, R., Dominguez, A. A., Dowdle, W. E., Friera, A. M., Young, C., Wells, F., Chu, E. Y., Ito, C. E., Krishnapura, H., Jain, S., Ankala, R., McGill, T. J., Lin, A., Egenberger, K., Gagnon, A., Michael Rukstalis, J., Hogrebe, N. J., and Schrepfer, S. (2024) Hypoimmune induced pluripotent stem cells survive long term in fully immunocompetent, allogeneic rhesus macaques, *Nat. Biotechnol.*, **42**, 413-423, https://doi.org/10.1038/s41587-023-01784-x.
140. Deuse, T., Hu, X., Agbor-Enoh, S., Jang, M. K., Alawi, M., Saygi, C., Gravina, A., Tediashvili, G., Nguyen, V. Q., Liu, Y., Valantine, H., Lanier, L. L., and Schrepfer, S. (2021) The SIRPα-CD47 immune checkpoint in NK cells, *J. Exp. Med.*, **218**, e20200839, https://doi.org/10.1084/jem.20200839.
141. Harding, J., Vintersten-Nagy, K., Yang, H., Tang, J. K., Shutova, M., Jong, E. D., Lee, J. H., Massumi, M., Oussenko, T., Izadifar, Z., Zhang, P., Rogers, I. M., Wheeler, M. B., Lye, S. J., Sung, H. K., Li, C., Izadifar, M., and Nagy, A. (2023) Immune-privileged tissues formed from immunologically cloaked mouse embryonic stem cells survive long term in allogeneic hosts, *Nat. Biomed. Eng.*, https://doi.org/10.1038/s41551-023-01133-y.
142. Viacyte. CRISPR Therapeutics and ViaCyte, Inc. announce first patient dosed in phase 1 clinical trial of novel gene-edited cell replacement therapy for treatment of type 1 diabetes (T1D). February 2, 2022, URL: https://crisprtx.com/about-us/press-releases-and-presentations/crispr-therapeutics-and-viacyte-inc-announce-first-patient-dosed-in-phase-1-clinical-trial-of-novel-gene-edited-cell-replacement-therapy-for-treatment-of-type-1-diabetes-t1d.
143. González, B. J., Creusot, R. J., Sykes, M., and Egli, D. (2020) How safe are universal pluripotent stem cells? *Cell Stem Cell*, **26**, 307-308, https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.02.006.
144. Harding, J., Vintersten-Nagy, K., and Nagy, A. (2020) Universal stem cells: making the unsafe safe, *Cell Stem Cell*, **27**, 198-199, https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.07.004.
145. Zimmer, J., Andrès, E., Donato, L., Hanau, D., Hentges, F., and de la Salle, H. (2005) Clinical and immunological aspects of HLA class I deficiency, *QJM*, **98**, 719-727, https://doi.org/10.1093/qjmed/hci112.
146. Hara, A., Aoki, H., Taguchi, A., Niwa, M., Yamada, Y., Kunisada, T., and Mori, H. (2008) Neuron-like differentiation and selective ablation of undifferentiated embryonic stem cells containing suicide gene with Oct-4 promoter, *Stem Cells Dev.*, **17**, 619-627, https://doi.org/10.1089/scd.2007.0235.
147. Liang, Q., Monetti, C., Shutova, M. V., Neely, E. J., Hacibekiroglu, S., Yang, H., Kim, C., Zhang, P., Li, C., Nagy, K., Mileikovsky, M., Gyongy, I., Sung, H. K., and Nagy, A. (2018) Linking a cell-division gene and a suicide gene to define and improve cell therapy safety, *Nature*, **563**, 701-704, https://doi.org/10.1038/s41586-018-0733-7.
148. Wu, Y., Chang, T., Long, Y., Huang, H., Kandeel, F., and Yee, J. K. (2019) Using gene editing to establish a safeguard system for pluripotent stem-cell-based therapies, *iScience*, **22**, 409-422, https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.11.038.
149. Viacyte. CRISPR Therapeutics and ViaCyte present positive *in vitro* data towards a potential immune-evasive cell replacement therapy for diabetes at EASD 2019. September 17, 2019, URL: https://crisprtx.com/about-us/press-releases-and-presentations/crispr-therapeutics-and-via-cyte-present-positive-in-vitro-data-towards-a-potential-immune-evasive-cell-replacement-therapy-for-diabetes-at-easd-2019.

DYSREGULATION OF IMMUNE TOLERANCE TO AUTOLOGOUS iPSCs AND THEIR DIFFERENTIATED DERIVATIVES

Review

M. E. Bogomiakova[1,2]*, A. N. Bogomazova[1,2], and M. A. Lagarkova[1,3]

[1] *Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, 119435 Moscow, Russia; e-mail: margbog@rcpcm.ru*

[2] *Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, 119435 Moscow, Russia*

[3] *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) due to their ability to differentiate into the desired cell type are a promising tool for solving the problems of transplantation medicine. In addition, the reprogramming technology makes it possible to obtain a personalized, i.e., patient-specific, cell product whose transplantation should not cause problems related to histocompatibility of transplanted tissues and organs. At the same time, inconsistent information about the main advantage of autologous iPSC derivatives – lack of immunogenecity – still casts doubt on the possibility of using such cells beyond immunosuppressive therapy protocols. This review is devoted to the immunogenic properties of syngeneic and autologous iPSCs and their derivatives, as well as to discussion of the reasons of dysregulation of their immune tolerance.

Keywords: induced pluripotent stem cells, immune response, immunogenicity, immunotolerance, T-cells, NK-cells, differentiation