

热点评析

诱导多能干细胞(iPSCs): 过去、现在和未来

Shinya Yamanaka著 朱丽华 译 郭礼和 校

诱导多能干细胞技术诞生至今已有6年多历史了,许多人认为这是生命科学和再生医学研究领域的一场革命,也是细胞生物学发展的里程碑,很多人预言这项技术迟早会获得诺贝尔生理学奖。但是,对这项技术诞生的历史背景、发展历程、研究现状以及未来前景,能够真正了解的并不多。为此,我们将此项技术发明人日本京都大学iPS细胞研究和应用中心山中伸弥(Shinya Yamanaka)最近发表的评述(Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: Past, present, and future. Cell Stem Cell 2012; 10(6): 678-84)翻译成中文以飨读者。

概述

2006年,我们发现将四种因子的基因同时引入小鼠成纤维细胞,可以产生与胚胎干细胞(ESCs)具有相似特性的干细胞^[1],我们称之为iPSCs。2007年,我们报道了上述方法也适用于人的成纤维细胞,通过引入上述几个因子可以产生人的iPSCs^[2]。同一天,詹姆斯·汤姆森(James Thomson)研究小组也报道了使用不同组合的因子产生iPSCs^[3]。

三股研究潮流的融合,导致了iPSCs技术的诞生

与其他科学进步相似,iPSCs技术建立在相关研究领域过去和现在大量研究发现的基础上。有三股研究主流引导我们建立了iPSCs的技术(图1)。第一股潮流是对核移植的重编程研究。1962年,John Gurdon报道了他的实验室研究成果:将未受精的卵转入成年蛙的小肠细胞核可以发育成蝌蚪^[4]。三十多年后,Ian Wilmut及其同事报告了多莉羊的诞生,这是通过哺乳类上皮细胞的体细胞克隆产生的首个哺乳类动物^[5]。这些体细胞克隆的成功证明了:即使已经分化的细胞也含有整个生物体发育所需要的遗传信息,卵母细胞含有可以重编程体细胞核的因子。2001年,Takashi Tada研究小组发现,胚胎干细胞(ESCs)也含有重编程体细胞的因子^[6]。

第二股研究潮流是发现“主控的”转录因子。1987年,科学家证明果蝇转录因子——触角腿基因(Antennapedia)异位表达时会诱导腿而非触角的形成^[7]。同年,证明哺乳动物转录因子MyoD能将成纤

维细胞转换为肌细胞^[8]。这些结果形成了“主控的调节因子”概念,该转录因子决定并诱导细胞谱系的命运。许多研究人员开始寻找各谱系起主导作用的单个调节因子。这些尝试除了少数获得成功之外^[9],大多都以失败告终。

第三股研究潮流涉及ESCs,具有以上同样的重要性。自1981年第一代小鼠ESCs^[10]建系之后,Austin Smith等确立了能够长期维持干细胞多能性的体外培养条件^[11]。维持小鼠ESCs的一个关键因子是白血病抑制因子(LIF)。同样地,自第一代人类ESCs^[12]建系以来,含有碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的最佳培养条件也被确立。

结合前两个研究潮流,我们提出这样一种假设:卵母细胞或ESCs中存在一种多个因子的组合,这种组合可以将体细胞重编程回到胚胎状态,于是我们设计实验来确定这种组合。根据培养多能干细胞所需条件的信息,我们鉴定出四个因子可以产生iPSCs。

iPSCs技术的成熟和理解

成功建立小鼠iPSCs的首个结果报道后不久,其他团队对小鼠^[13-14]和人^[15-16]的以转录因子为基础的重编程机制进行了重演。iPSCs技术的优点之一就是它的简单性和重复性。许多实验室开始探索相关机制及改良方法。

虽然iPSCs建系可重复,但效率很低:通常转染的成纤维细胞不到1%转变成iPSCs。这种低效率最初认为可能是:iPSCs是来自与成纤维细胞培养共存

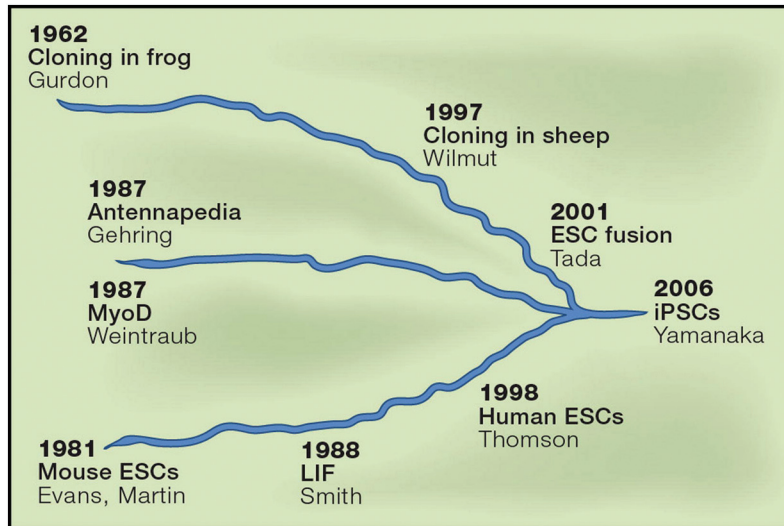


图1 引导iPSCs发展的三股研究潮流

Fig.1 Three scientific streams that led to the development of iPSCs

的稀少干细胞或是未分化细胞^[17]。然而, 随后的研究表明, iPSCs可来源于终末分化的淋巴细胞^[18]或有丝分裂后的神经元^[19]。因此, 大多数种类(如果不是全部的话)体细胞具有转变成iPSCs的潜能, 尽管效率有差异。

那么仅仅几个因子共转染是如何诱导体细胞重编程的呢? 对这个问题的讨论超出了本文的范围, 好在许多研究已经解决了这个重要的问题。从我的角度来看, 许多科学家的共识似乎是: 重编程因子启动了超过1%的转染细胞的重编程过程, 但大多数细胞未能完成这一全过程, 而是半途而废。可能存在某些随机事件——目前知之甚少——似乎对于完成重编程的全过程是必需的^[17,20]。正如我在下面讨论的那样, 培养条件似乎可作为一种驱动力, 它可促进完成重编程的全过程。

最初使用反转录病毒或慢病毒产生iPSCs, 这可能会导致插入突变, 给临床转化应用带来风险甚至会导致不良后果, 就如在基因治疗中遇到的那种情况^[21]。反转录病毒转染的iPSCs移植到小鼠, 只要*c-Myc*基因表达受到抑制, 小鼠生长看起来就很正常^[22-23]。然而, 单是小鼠的研究并不能保证人类iPSCs临床应用的长期安全性, 至少反转录病毒可以引起iPSCs产生免疫原性, 使人担忧^[24]。因此, 以细胞移植治疗为目的, 需要建立新的诱导方法, 避免载体整合到宿主基因组。

已有报道许多方法能够产生非整合的iPSCs。

这些方法包括质粒^[25-26]、仙台病毒^[27]、腺病毒^[28]、合成RNA^[29]和蛋白质^[30]。此外, 也已经尝试由小分子诱导重编程。其中, 采用质粒和仙台病毒作为载体已为许多实验室作为常规技术方法。京都大学iPSCs研究与应用中心, 在再生医学方面研究偏爱采用非整合的质粒(episomal plasmids), 而体外研究则采用反转录病毒或非整合质粒。选用这些方法是考虑其简单性和可重复性。现在科学家们已将工作重点从技术开发转向应用。

iPSCs技术出现新的研究潮流

科学的发展潮流永无止境(图2)。在Rudolf Jaenisch实验室, 小鼠方面的开创性工作(用镰刀型贫血病小鼠自身皮肤来源的iPSCs治疗该疾病——译者注)^[31]之后, 科学家们使用iPSCs在再生医学领域中已取得不断的进展, 例如治疗帕金森氏病^[32]、血小板缺乏症^[33]、脊髓损伤^[34-35]、黄斑变性^[36]。患者来源的iPSCs已被证明可以用于疾病建模和筛选候选药物库。George Daley^[37](建立特定疾病的iPSCs——译者注)和Kevin Eggan^[38](ALS病人来源的iPSCs能够分化成运动神经元——译者注)领导的团队在建立特定疾病iPSCs的开创性研究之后, 过去三年中已经发表了100多份使用特定疾病的iPSCs报告。使我惊讶的是: 使用特定病人的iPSCs既可重演单基因遗传性疾病表型也可重演迟发性多基因遗传性疾病的表型, 如帕金森氏病^[39]、阿尔茨海默氏

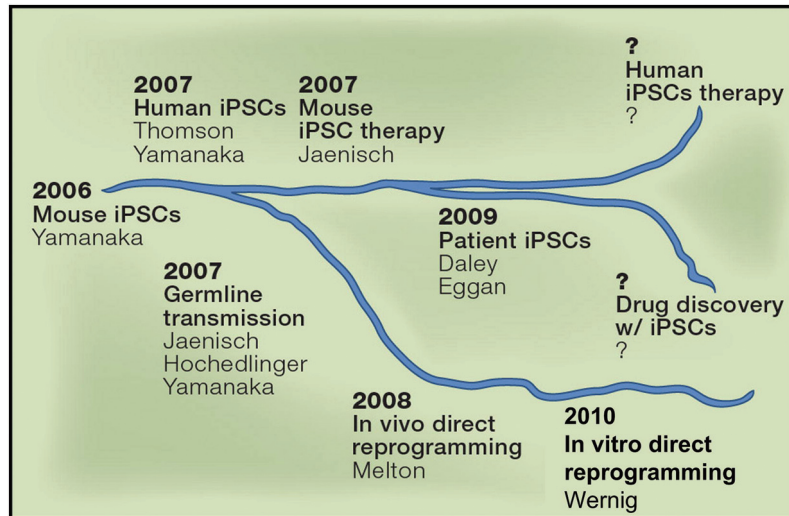


图2 iPSCs技术出现新的研究潮流

Fig.2 New scientific streams that emerged from the development of iPSCs

病^[40-42]和精神分裂症^[43]。用这些细胞来分析疾病机制和研究潜在的新治疗方法,环绕这些方面的潜在应用,已经成为研究的兴奋点。来自iPSCs的体细胞,特别是心肌细胞和肝细胞,可以替代现有的方法用于毒理学试验^[44]。

除了这些医疗应用, iPSCs可用于动物生物技术。猴^[45]、猪^[46]和狗^[47]的iPSCs可用于这些动物的基因工程研究,从而产生疾病模型,利用更大的动物生产有用的物质,如遗传病患者缺乏的酶。该技术有可能在未来用于保护濒危动物^[48],但还需克服许多挑战。其中最引人注目的iPSCs应用来自Nakauchi及其同事们的报道,他们将大鼠的iPSCs通过显微注射,移植到因缺乏一个重要基因而胰腺不能发育的小鼠囊胚后,小鼠胚胎发育后产生了大鼠胰腺^[49]。将来,使用类似的策略可能实现生产器官来供给人体移植。

iPSCs技术出现另一种研究潮流是将一种体细胞“直接重编程”为另一种细胞。正如上面提到的,对于大多数体细胞,还没能找出一个单一“主控的”转录因子。然而,根据iPSCs重编程的成功经验,科学家们转而寻找因子的组合。Melton及其同事报道了使用含有3种转录因子的组合将小鼠胰腺内分泌细胞转化为外分泌细胞^[50]。在他们开创性的工作之后,有许多报道是将成纤维细胞在体外转换为各种其他体细胞的例子,如神经细胞^[51]、肝细胞^[52]、心肌细胞^[53]和造血祖细胞^[54]。直接重编程简单、快速。剩下的

障碍是如何获得足够量的靶细胞用于下游的应用。这种新技术的最佳用法可能是原位直接重编程^[55]。

重要的问题: iPSCs与ESC有差异吗?

iPSCs最重要的问题之一是其与ESC有差异吗?如果有的话,它们在功能上是否确实存在差异。在我们研究iPSCs的最初几年,使我们惊讶的是它们与ESC有惊人的相似。然而,从2009年开始,科学家们开始报道iPSCs与ESC之间存在差异。例如,Chin等2009年通过表达式微阵列芯片比较了3株人类ESC和5株iPSCs,发现有数百个基因的表达存在着差异^[56]。他们得出结论,iPSCs应被视为多能干细胞的一种独特亚型。另外两项研究也比较了ESC和iPSCs的全基因表达谱,确定了iPSCs中存在持久的供体细胞基因表达^[57-58]。

Deng等对3个人类ESC克隆株和4个iPSCs株进行了靶定区的重亚硫酸盐测序后,首次报道了这两种类型的多能干细胞系DNA甲基化之间存在差异^[59]。Doi等2009年报道了ESC和iPSCs的同一基因,例如骨形成蛋白(BMP3),它们的甲基化有差异^[60]。随后,3个研究报道了人的iPSCs内存在供体细胞的表现遗传记忆^[61-63]。

然而,其他研究得出的结论却是单凭基因表达或DNA甲基化很难区分iPSCs和ESC。两份报告证明iPSCs克隆和ESC克隆有重叠的基因表达差异,因此,通过这些分析能将这两种多能干细胞共同归

为一族^[64-65]。他们认为, 这些差异至少部分是由于每个实验室使用不同的诱导和培养条件所造成的。Bock等2011年证明iPSCs和ESC在基因表达和DNA甲基化方面非常相似, 一些iPSCs克隆无法与ESC区分^[66]。通过检查iPSCs和ESC克隆数量的比较, 我

们观察到一个明显的趋势(表1)。认为在基因表达或DNA甲基化有差异的研究报告, 所比较的克隆数量相对较少(每组一般少于10), 而那些发现很难区分ESC和iPSCs的差的报告则用了较多的克隆进行比较, 而且克隆来自于多个实验室。

表1 已公开研究中分析的ESC和iPSCs克隆数量
Table 1 Number of ESC and iPSCs clones analyzed in published studies

ESCs与iPSCs关系的结论 Conclusion about the relationship between ESCs and iPSCs	第一作者 First author	年份 Year	克隆数 Clone numbers	
			ESCs	iPSCs
It is difficult to distinguish between them	A.M. Newman	2010	23	68
	M.G. Guenther	2010	36	54
	C. Bock	2011	20	12
There are notable differences	M. Chin	2009	3	5
	C.M. Marchetto	2009	2	2
	J. Deng	2009	3	4
	Z. Ghosh	2010	6	4
	A. Doi	2011	3	9
	Y. Ohi	2011	3	9
	K. Kim	2011	6	12
R. Lister	2011	2	5	

另一争论要点是细胞的分化能力, 也就是iPSCs在功能分化方面是否与ESC有差别。Hu等2010年对5个人ESC克隆和12个iPSCs克隆进行了体外神经定向分化试验。他们发现, 所有的ESC克隆分化成Pax6⁺细胞, 效率超过90%, 但iPSCs克隆分化程度差, 只有10%~50%的效率^[67]。然而, Boulting等2011年研究了16个人iPSCs克隆分化成运动神经元的能力, 发现其中13个iPSCs克隆分化效率相当于ESC^[68]。所以, 关于iPSCs与ESC之间的相似性, 再一次得出相互矛盾的结论。

总的说来, 这些研究表明iPSCs克隆和ESC克隆具有重叠的差异(图3)。应当指出, ESC克隆之间的差异已经有充分的记录^[69-70]。iPSCs克隆本身很可能表现出更大的差异, 一些克隆的基因表达, DNA甲基化或分化能力不同于ESC^[71], 但至少有一些iPSCs克隆与ESC克隆是无法区分的。

从造成iPSCs克隆差异的因子角度来考虑, 是非常有趣的。两个相关的小鼠iPSCs报道^[72-73]为我们提供一个重要的教训。这两项研究是在Hochedlinger实验室和Jaenisch实验室分别进行的, 他们使用了非常相似的二次诱导系统来产生小鼠iPSCs。然而,

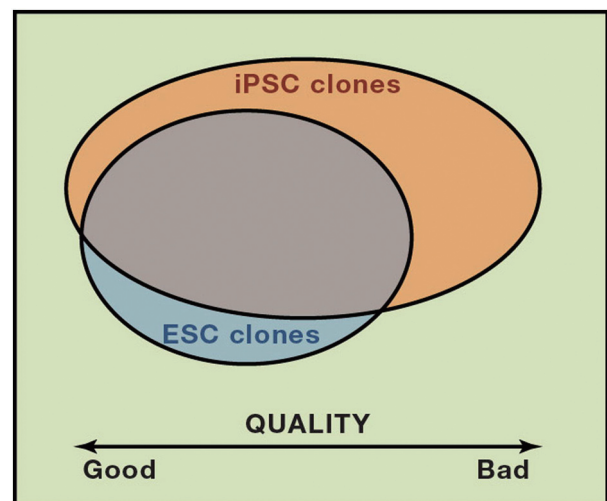


图3 iPSC和ESC克隆的差异重叠

Fig.3 Overlapping variations present in iPSC and ESC clones

两个实验室得到的iPSCs克隆在性能上非常不同。Hochedlinger实验室产生的绝大多数iPSCs克隆, 不能通过显微注射产生能够传代的嵌合体小鼠, 或通过四倍体互补技术产生完全来自iPSCs的小鼠(all-iPSCs小鼠, 子代小鼠身上的所有细胞都是由iPSCs

来的——译者注), 这是评价多能性最严格的标准。他们发现, DIK1-Dio3基因簇的印记丢失, 预示iPSCs多能性差。形成鲜明对比的是, Jaenisch实验室中产生的大多数iPSCs克隆有正常的DIK1-Dio3基因簇印记, 能够产生高质量的嵌合体小鼠和能存活的所有iPSCs小鼠。

两个实验室采用的方法唯一显著区别, 就是重编程因子在表达载体上(cassette)的顺序不同, 这使得Jaenisch实验室的iPSCs能高表达Oct4和Klf4。通过提高Oct4和Klf4的表达^[72], 或通过补充抗坏血酸^[74], 采用非常类似的诱导方法就能提高iPSCs质量。因此, iPSCs诱导产生过程中, 重编程因子的浓度和化学计量以及培养条件, 对于产生的iPSCs表观遗传状态和多能性潜力的差异有着重要影响。

这些数据表明, 不完整或不完整重编程对iPSCs不是根本性的问题。相反, iPSCs克隆的质量差异在很大程度上似乎是由于技术差异造成的, 例如: 因子的组合、基因传递方法和培养条件等。此外, 一些iPSCs克隆之间的差异可归因于重编程过程中不受控制的随机事件。因此, 对于鉴别是否适合临床应用的iPSCs克隆, 评估和选择至关重要。

诱导多能性有“阴暗面”么?

一些报告认为, 除了基因表达变异、DNA甲基化和多能性的潜力外, iPSCs还有其他的潜在异常, 包括体细胞突变^[75]、拷贝数变异^[76]和免疫原性^[24]。在这些报告中, 在我看来, iPSCs的负面影响被夸大了。媒体反应过度, 随之而来的科学评论标题耸人听闻, 如“黑暗的一面”、“受到攻击”、“漏洞”、“麻烦”和“成长中的烦恼”等^[77-80]。

然而, 尽管有这些负面新闻, 随后的分析表明, 许多iPSCs内发现的遗传差异似乎早已存在于原始的体细胞中, 因此, 与重编程过程本身无关^[81-82]。重编程形成的iPSCs是一种内在的无性增殖克隆, 因此起始细胞群如果存在低频率差异, 由此衍生的单个克隆就会将此种差异放大, 若将这一克隆与起始细胞群作为一个整体的亲本细胞来比较, 此种差异就会愈加明显了(也就是吹毛求疵——译者注)。

另一项研究显示, 一组能够产生all-iPSCs小鼠的iPSCs克隆, 相对于它们的亲本细胞来说其遗传改变极小^[83]。没有转*Myc*基因的iPSCs所产生的嵌合体小鼠及其后代显示生理正常, 表明这些iPSCs不含有

对功能有负面影响的有害遗传改变^[23,83]。关于免疫原性, 有报道说非转基因的iPSCs具有弱免疫反应, 这个问题是否重要^[84]目前尚不清楚, 因为最突出的研究报道了被检查的未分化iPSCs具有免疫原性^[24], 当然这种细胞绝不会被用于细胞移植治疗。我们必须了解所有这些结果, 并综合考虑全面认识iPSCs。

为什么ESCs和iPSCs非常类似?

虽然iPSCs与ESCs之间可能会有一些差异, 但它们仍然非常相似。如果有的话, 我们希望了解iPSCs与ESCs为什么如此相似, 尽管它们的起源和生成方法不同。人造细胞和天然存在的细胞之间存在如此相似性, 绝无仅有。如神经细胞和心肌细胞这些体细胞已经可从ESCs/iPSCs产生, 或直接从成纤维细胞产生。这些人造体细胞与正常存在于体内的天然细胞有一些共同的特点, 但它们与天然神经细胞和心肌细胞差异很大。因此, ESCs和iPSCs之间的相似性, 在许多方面是特殊的。

一个可能的解释是ESCs其实也是人造的。生理条件下的ESCs很可能并不存在, 而是在特定的条件下通过培养内细胞团(ICM)来选择和建立。ESCs与ICM的大多数细胞在许多方面有着不同。例如, 虽然ICM细胞全DNA甲基化程度很低^[85], 但ESCs甲基化水平较高^[86]。小鼠ESCs高表达*Ras*基因家族中的*ERas*, 但胚胎不表达^[87]。ESCs的端粒比胚胎的长^[88]。因此, 我们可以说是在讨论两种人造细胞之间的关系, 而不是讨论人造细胞和天然存在的细胞之间的关系。

通过许多研究人员的努力, 该领域已经确立了培养条件, 能够产生和长期维持小鼠和人的ESCs。很可能是这些培养条件选择了具有某种特性的细胞, 而这种选择有助于促使ESCs和iPSCs出现类似的特征。

总结

如果我们认可ESCs和iPSCs都是实验室产生的人造细胞类型, 转而我们可以考虑另一个重要的问题: ESCs真是iPSCs的最终对照和黄金标准吗? 我认为答案很可能是否定的。相反, 未来的研究应该关注iPSCs本身形成新的组织、器官和模型生物的能力, 与ESCs研究一起作为同一研究主干河流的两条分支潮流。

我相信, iPSCs技术对于许多应用(包括干细胞疗法)已准备就绪。每种诱导方法会产生多个质量不同的iPSCs克隆(图3)。因此,临床应用时必须优选克隆。我们也许可以根据标记基因的表达,缩小优选克隆的范围。但是,我们必须确认其体外分化倾向、基因组及表观基因组的完整性。为了广泛应用,有必要提前建立一个储备库,挑选来自健康志愿者或脐带血库的质量合格的iPSCs克隆。HLA纯合子捐助者产生的iPSCs能显著降低免疫排斥^[25]。

iPSCs技术不仅对科学,对商业和政治也可能会产生实质性的影响。应基于科学数据来严格评价iPSCs,相关的潜在临床应用要充分考虑所有这些数据。科学家应该专注于研究,政府官员和商人应该根据科学研究的确凿证据而不是对这个领域的一知半解,来告知未来的发展方向。

参考文献 (References)

- 1 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126(4): 663-76.
- 2 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- 3 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
- 4 Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 1962; 10: 622-40.
- 5 Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 381(5): 810-3.
- 6 Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by *in vitro* hybridization with ES cells. *Curr Biol* 2001; 11(19): 1553-8.
- 7 Schneuwly S, Klemenz R, Gehring WJ. Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homoeotic gene Antennapedia. *Nature* 1987; 325(6107): 816-8.
- 8 Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; 51(6): 987-1000.
- 9 Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 2010; 465(7299): 704-12.
- 10 Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292(5819): 154-6.
- 11 Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, *et al.* Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988; 336(6200): 688-90.
- 12 Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282(5391): 1145-7.
- 13 Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, *et al.* Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007; 1(1): 55-70.
- 14 Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Bernstein BE, *et al.* *In vitro* reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 2007; 448(7151): 318-24.
- 15 Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(8): 2883-8.
- 16 Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince H, *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; 451(7175): 141-6.
- 17 Yamanaka S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 2009; 460(7251): 49-52.
- 18 Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 2009; 113(22): 5476-9.
- 19 Kim J, Lengner CJ, Kirak O, Hanna J, Cassady JP, Lodato MA, *et al.* Reprogramming of postnatal neurons into induced pluripotent stem cells by defined factors. *Stem Cells* 2011; 29(6): 992-1000.
- 20 Hanna J, Saha K, Pando B, van Zon J, Lengner CJ, Creighton MP, *et al.* Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 2009; 462(7273): 595-601.
- 21 Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, *et al.* LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 2003; 302(5644): 415-9.
- 22 Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 2008; 321(5889): 699-702.
- 23 Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008; 26(1): 101-6.
- 24 Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 474(7350): 212-5.
- 25 Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, *et al.* A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 2011; 8(5): 409-12.
- 26 Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008; 322(5903): 949-53.
- 27 Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2009; 85(8): 348-62.
- 28 Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008; 322(5903): 945-9.
- 29 Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, *et al.* Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed dif-

- ferentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010; 7(5): 618-30.
- 30 Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, *et al.* Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4(6): 472-6.
- 31 Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Casadasy JP, *et al.* Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007; 318(5858): 1920-3.
- 32 Kriks S, Shim JW, Piao J, Ganat YM, Wakeman DR, Xie Z, *et al.* Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* 2011; 480(7378): 547-51.
- 33 Takayama N, Nishimura S, Nakamura S, Shimizu T, Ohnishi R, Endo H, *et al.* Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med* 2010; 207(13): 2817-30.
- 34 Nori S, Okada Y, Yasuda A, Tsuji O, Takahashi Y, Kobayashi Y, *et al.* Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(40): 16825-30.
- 35 Tsuji O, Miura K, Okada Y, Fujiyoshi K, Mukaino M, Nagoshi N, *et al.* Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(28): 12704-9.
- 36 Okamoto S, Takahashi M. Induction of retinal pigment epithelial cells from monkey iPS cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011; 52(12): 8785-90.
- 37 Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, *et al.* Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008; 134(5): 877-86.
- 38 Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, *et al.* Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008; 321(5893): 1218-21.
- 39 Devine MJ, Ryten M, Vodicka P, Thomson AJ, Burdon T, Houlden H, *et al.* Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the α -synuclein locus. *Nat Commun* 2011; 2: 440.
- 40 Israel MA, Yuan SH, Bardy C, Reyna SM, Mu Y, Herrera C, *et al.* Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* 2012; 482(7384): 216-20.
- 41 Yagi T, Ito D, Okada Y, Akamatsu W, Nihei Y, Yoshizaki T, *et al.* Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* 2011; 20(23): 4530-9.
- 42 Yahata N, Asai M, Kitaoka S, Takahashi K, Asaka I, Hioki H, *et al.* Anti-A β drug screening platform using human iPS cell-derived neurons for the treatment of Alzheimer's disease. *PLoS One* 2011; 6(9): e25788.
- 43 Brennand KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhardt C, Tran N, Sangar S, *et al.* Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 473(7346): 221-5.
- 44 Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell* 2009; 137(1): 13-7.
- 45 Liu H, Zhu F, Yong J, Zhang P, Hou P, Li H, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2008; 3(6): 587-90.
- 46 West FD, Terlouw SL, Kwon DJ, Mumaw JL, Dhara SK, Hasneen K, *et al.* Porcine induced pluripotent stem cells produce chimeric offspring. *Stem Cells Dev* 2010; 19(8): 1211-20.
- 47 Shimada H, Nakada A, Hashimoto Y, Shigeno K, Shionoya Y, Nakamura T. Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. *Mol Reprod Dev* 2010; 77(1): 2.
- 48 Ben-Nun IF, Montague SC, Houck ML, Tran HT, Garitaonandia I, Leonardo R, *et al.* Induced pluripotent stem cells from highly endangered species. *Nat Methods* 2011; 8(10): 829-31.
- 49 Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Ibata M, *et al.* Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* 2010; 142(5): 787-99.
- 50 Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. *In vivo* reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008; 455(7213): 627-32.
- 51 Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010; 463(7284): 1035-41.
- 52 Huang P, He Z, Ji S, Sun H, Xiang D, Liu C, *et al.* Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* 2011; 475(7356): 386-9.
- 53 Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, *et al.* Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142(3): 375-86.
- 54 Szabo E, Rampalli S, Risueño RM, Schnerch A, Mitchell R, Fiebig-Comyn A, *et al.* Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* 2010; 468(7323): 521-6.
- 55 Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, *et al.* *In vivo* reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 2012; 485(7400): 593-8.
- 56 Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, *et al.* Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 2009; 5(1): 111-23.
- 57 Ghosh Z, Wilson KD, Wu Y, Hu S, Quertermous T, Wu JC. Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells. *PLoS One* 2010; 5(2): e8975.
- 58 Marchetto MC, Yeo GW, Kainohana O, Marsala M, Gage FH, Muotri AR. Transcriptional signature and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2009; 4(9): e7076.
- 59 Deng J, Shoemaker R, Xie B, Gore A, LeProust EM, Antosiewicz-Bourget J, *et al.* Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat Biotechnol* 2009; 27(4): 353-60.
- 60 Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, *et al.* Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet* 2009; 41(12): 1350-3.
- 61 Kim K, Zhao R, Doi A, Ng K, Unternaehrer J, Cahan P, *et al.* Donor cell type can influence the epigenome and differentiation

- potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2011; 29(12): 1117-9.
- 62 Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, *et al.* Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 471(7336): 68-73.
- 63 Ohi Y, Qin H, Hong C, Blouin L, Polo JM, Guo T, *et al.* Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nat Cell Biol* 2011; 13(5): 541-9.
- 64 Guenther MG, Frampton GM, Soldner F, Hockemeyer D, Mitalipova M, Jaenisch R, *et al.* Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 7(2): 249-57.
- 65 Newman AM, Cooper JB. Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 7(2): 258-62.
- 66 Bock C, Kiskinis E, Verstappen G, Gu H, Boulting G, Smith ZD, *et al.* Reference maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* 2011; 144(3): 439-52.
- 67 Hu BY, Weick JP, Yu J, Ma LX, Zhang XQ, Thomson JA, *et al.* Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(9): 4335-40.
- 68 Boulting GL, Kiskinis E, Croft GF, Amoroso MW, Oakley DH, Wainger BJ, *et al.* A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2011; 29(3): 279-86.
- 69 Osafune K, Caron L, Borowiak M, Martinez RJ, Fitz-Gerald CS, Sato Y, *et al.* Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol* 2008; 26(3): 313-5.
- 70 Ward CM, Barrow KM, Stern PL. Significant variations in differentiation properties between independent mouse ES cell lines cultured under defined conditions. *Exp Cell Res* 2004; 293(2): 229-38.
- 71 Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, *et al.* Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 2009; 27(8): 743-5.
- 72 Carey BW, Markoulaki S, Hanna JH, Faddah DA, Buganim Y, Kim J, *et al.* Reprogramming factor stoichiometry influences the epigenetic state and biological properties of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2011; 9(6): 588-98.
- 73 Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natanson S, *et al.* Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* 2010; 465(7295): 175-81.
- 74 Stadtfeld M, Apostolou E, Ferrari F, Choi J, Walsh RM, Chen T. Ascorbic acid prevents loss of Dlk1-Dio3 imprinting and facilitates generation of all-iPS cell mice from terminally differentiated B cells. *Nat Genet* 2012; 44(4): 398-405, S1-2.
- 75 Gore A, Li Z, Fung HL, Young JE, Agarwal S, Antosiewicz-Bourget J, *et al.* Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 471(7336): 63-7.
- 76 Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, Ching RW, Autio R, Närvä E, *et al.* Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 2011; 471(7336): 58-62.
- 77 Apostolou E, Hochedlinger K. Stem cells: iPS cells under attack. *Nature* 2011; 474(7350): 165-6.
- 78 Dolgin E. Flaw in induced-stem-cell model. *Nature* 2011; 470(7332): 13.
- 79 Hayden EC. Stem cells: the growing pains of pluripotency. *Nature* 2011; 473(7347): 272-4.
- 80 Pera MF. Stem cells: the dark side of induced pluripotency. *Nature* 2011; 471(7336): 46-7.
- 81 Cheng L, Hansen NF, Zhao L, Du Y, Zou C, Donovan FX, *et al.* Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression. *Cell Stem Cell* 2012; 10(3): 337-44.
- 82 Young MA, Larson DE, Sun CW, George DR, Ding L, Miller CA, *et al.* Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2012; 10(5): 570-82.
- 83 Nakagawa M, Takizawa N, Narita M, Ichisaka T, Yamanaka S. Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(32): 14152-7.
- 84 Okita K, Nagata N, Yamanaka S. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 2011; 109(7): 720-1.
- 85 Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; 293(5532): 1089-93.
- 86 Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 1992; 69(6): 915-26.
- 87 Takahashi K, Mitsui K, Yamanaka S. Role of ERAs in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature* 2003; 423(6939): 541-5.
- 88 Varela E, Schneider RP, Ortega S, Blasco MA. Different telomere-length dynamics at the inner cell mass versus established embryonic stem (ES) cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(37): 15207-12.