

治疗致盲性眼病的干细胞来源及应用

何翔宇¹ 龚宇² 卞白士姣² 付琰² 阴正勤^{1,2*}

(¹中国人民解放军总医院眼科, 北京 100853; ²第三军医大学西南眼科医院, 重庆 400038)

摘要 除了人胚胎、胎儿脐带血中已经发现的多种干细胞, 在成体哺乳动物组织器官特异性的干细胞龕位(生态位)中, 包括骨髓、脑、皮肤、心脏、眼、肾、肺、胃肠道、胰腺、肝、乳房、卵巢以及睾丸中也发现了相当种类的成体干细胞群。以上干细胞均处于相对未分化状态, 并保留了自我更新及向特定组织分化的潜能, 这让干细胞具备了维持组织稳态和修复创伤后组织的能力。近年来, 再生医学领域不乏运用干细胞直接进行或诱导成为视觉相关细胞后再进行眼病治疗的研究, 体现了干细胞治疗极其广阔的应用前景。该文将综述用于致盲性眼病治疗的干细胞潜在来源以及相关研究进展。

关键词 致盲性眼病; 干细胞; 成体干细胞; 诱导多能干细胞; 胚胎干细胞; 视网膜祖细胞

Stem Cells in Treatment of Blinding Eye Disease: Origination and Application

He Xiangyu¹, Gong Yu², Bian Baishijiao², Fu Yan², Yin Zhengqin^{1,2*}

(¹Department of Ophthalmology, General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100853, China;

²Southwest Eye Hospital, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Besides stem cells established from embryos, fetal tissues as well as umbilical cord blood, various stem cell lineages have been identified in specific tissue niches throughout the adult mammals body such as bone marrow, brain, skin, heart, eyes, kidney, lung, gastrointestinal tract, pancreas, liver, breast, ovary, and prostate. All stem cells are undifferentiated biological cells that can generate any germ-layer types of progenitor populations or terminal somatic cells and exhibit self-renewal through symmetric or asymmetric cell division. Thus, stem cells could potentially contribute to tissue homeostasis or to tissue regeneration by signaling factors paracrine or cells replenishing after lesions occur. In recent years, the remarkable progress made in regenerative medicine by using stem cell or stem cell induced cellula visualis indicates promise for the treatment of ocular diseases. This paper reviewed the research progress and potential source of stem cell for the treatment of blinding ocular diseases.

Keywords blinding eye disease; stem cell; adult stem cell; induced pluripotent stem cell; embryonic stem cell; retinal progenitor cell

干细胞治疗是指运用干细胞预防和治疗疾病, 此概念存在已久。在广岛长崎核爆之后, 研究者将健康同种动物的骨髓移植进入受辐射的动物体内,

发现此法可以恢复受试动物的造血功能^[1]。1961年, Till等^[2]通过著名的脾集落形成实验证实了造血干细胞的存在。至此, 开始了对干细胞移植治疗领域

收稿日期: 2016-12-23 接受日期: 2017-03-31

国家自然科学基金(批准号: 81130017)和国家重点基础研究发展计划(973计划)(批准号: 2013cb967002)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68754803, E-mail: qinzyin@aliyun.com

Received: December 23, 2016 Accepted: March 31, 2017

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81130017) and the National Basic Research Program of China (973 Program) (Grant No.2013CB967002)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68754803, E-mail: qinzyin@aliyun.com

网络出版时间: 2017-05-19 18:28:25 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170519.1828.020.html>

的探索。按来源,干细胞可分为异种来源、同种异体来源和自体来源三类。目前,用于视网膜修复和再生治疗的干细胞主要包括同种异体来源的胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESC)、自体来源的成体干细胞(如骨髓间充质干细胞)以及诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cell, iPSC)^[3]。每种细胞都各有优势,如胚胎干细胞拥有无限自我更新和向任意胚层分化的能力,可大规模标准化量产针对全身各器官疾病的治疗细胞。诱导多能干细胞是由患者自体终末细胞在体外诱导获得,同样具备自我更新和向任意胚层分化的能力。成体干细胞可直接从患者身体获取并用于针对疾病的治疗而不会违背医学伦理。值得注意的是,最早应用于临床转化研究的也是成体干细胞(如造血干细胞),其在临床治疗上的安全性和有效性都已得到证实。尽管已经获得上述研究突破,大部分干细胞在做到临床转化之前,各自的主要优势和缺陷仍需进一步明确。

1 致盲性眼病及其干细胞治疗方式简介

致盲性眼病严重影响患者的生存质量。我国现有约700万盲人,且以每年约45万人失明的速度递增,目前和未来都应该是全世界盲人最多的国家。目前最为常见的致盲性眼病包括角膜病、白内障、视网膜疾病(表1),而视网膜疾病中又包括了青光眼以及视网膜变性疾病。白内障患者比例占以上致盲疾病患者首位(60%),该病患者已经可以通过日趋完善的白内障摘除后人工晶体植入手术获得复明;青光眼患者的病情也可通过早期预防以及晚期予以手术、药物得到控制,以此保障患者的生存质量。虽然理论上,角膜病患者可以通过角膜移植获得复明,但解决角膜供体来源缺乏问题才是广大角膜病患者复明的关键。视网膜变性疾病包括老年性黄斑变性、视网膜色素变性和糖尿病视网膜病变等,是发

达国家致盲的首要病因,我国因此类疾病失明的人数每年约有20万。目前国际上对此类严重的致盲性疾病尚无有效治疗手段。因此,探讨角膜病和视网膜变性疾病的有效治疗方法是减少致盲发生的关键所在。

角膜病和视网膜变性疾病的共同病理过程是不可逆的视觉相关细胞(角膜上皮细胞、感光细胞、视网膜色素上皮细胞等)的变性、坏死,而角膜和视网膜的再生修复能力有限,无法完成视觉相关细胞的自我补充和功能修复。因此,外源性角膜上皮细胞、感光细胞和视网膜色素上皮细胞替代治疗是重建患者视觉功能的关键^[4]。

干细胞保留自我更新以及特定组织多向分化的潜能使其具备了维持组织稳态和修复创伤后组织的能力。近年来,再生医学领域不乏运用干细胞直接进行或诱导成为视觉相关细胞后再进行眼病治疗的研究成果。干细胞替代治疗策略已经成为了治疗严重致盲性眼病最有希望的新方向^[5]。干细胞治疗的方式主要包括以组织片的形式移植至角膜表面或视网膜下腔,或以细胞悬液移植至角膜表面或注射进入玻璃体腔、视网膜下腔进行治疗。

细胞移植治疗的作用机制主要包括两个方面:(1)早期效应来自于植入细胞的神经营养效应及保护作用,即所谓的By-stander效应;(2)长期效应可能来自于植入细胞对变性或丢失细胞的替代(cell replacement)效应。在2010年和2011年,美国ACT(Advanced Cell Technology)公司先后两次获得食品及药物管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准,进行人胚胎干细胞治疗Stargardt病和干性老年性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)的I/II期临床实验。

此外,免疫排斥反应是移植治疗必须解决的重要课题。虽然,眼球是免疫豁免器官,但病变过程

表1 视网膜疾病以及相关受累细胞

Table 1 Retinal diseases and infected cell types

视网膜疾病	受累细胞类型
Retinal diseases	Infected cell types
Glaucoma	Retinal ganglion cells
Age-related macular degeneration	Photoreceptors and RPE cells
Retinitis pigmentosa	Photoreceptors
Diabetic retinopathy	NR cells

RPE: 视网膜色素上皮; NR: 视网膜神经上皮。

RPE: retinal pigment epithelium; NR: neural retina.

中角膜新生血管、血-视网膜屏障破坏、单核细胞趋化蛋白等炎性因子释放以及小胶质细胞迁入等微环境的改变,导致细胞移植治疗后仍可能出现免疫排斥反应^[6-7]。因为有风险存在,目前移植治疗研究所选择细胞类型都或多或少地保有一定的免疫豁免能力。视网膜色素上皮细胞通过释放转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、血小板反应蛋白-1(thrombospondin-1, TSP-1)和生长激素抑制剂SOM(somatostatin)抑制T细胞增殖,通过释放 γ -干扰素(interferon- γ , IFN- γ)保持视网膜下腔的免疫豁免特性^[8]。间充质干细胞主要通过释放白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)诱导产生多种免疫调节细胞,从而介导宿主免疫耐受^[9]。Lui等^[10]、Robertson等^[11]、Wu等^[12]和Li等^[13]发现,胚胎干细胞则能够通过调节CD4⁺FoxP3⁺T细胞活性介导宿主免疫耐受。Hori等^[14]证明,神经干细胞移植至肾被膜下可长期存活并且不引起宿主免疫排斥反应,实验中检测不到细胞主要组织相容性复合物I/II(major histocompatibility complex I/II, MHC I/II)的表达。以上结果表明,尽管疾病可能会破坏眼内免疫豁免环境,但选择适当的细胞进行单独或多种细胞联合移植可诱导机体产生免疫耐受,进而创造适合移植细胞存活的免疫豁免条件^[15-16]。

2 干细胞治疗致盲性眼病细胞来源

2.1 成体干细胞

成体干细胞是分布于成熟动物躯体中并处于相对未分化状态、保留了自我更新以及多向分化的潜能的干细胞群。成体干细胞在正常组织的干细胞生态位中保持静息状态,发生应激或创伤后可动员迁移,并定植于受损组织,通过增殖分化参与维持组织稳态和修复创伤后组织。

脊椎动物成体神经干细胞(neural stem cell, NSC)主要存在于中枢神经系统室管膜下区以及海马齿状回^[17]。此类细胞可向神经元和胶质细胞分化,但是还没被证明有能力向视网膜神经上皮细胞及色素上皮细胞分化。神经干细胞可分化成替代视网膜组织主要功能的细胞成分,包括神经元、星型胶质细胞和少突胶质细胞等,并可以产生特定的营养因子发挥治疗效果^[18]。

视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium, RPE)干细胞来源于成人视网膜色素上皮^[19],可在体

外组织培养环境中大量扩增RPE细胞,并且可以在特定条件下再分化为神经或者间充质细胞。

角膜缘干细胞(limbal stem cell, LSC)是最早应用于眼临床试验的干细胞之一,其分化得到的角膜上皮细胞是维持角膜稳态的重要细胞类型^[20]。

嗅鞘细胞(olfactory ensheathing cell, OEC)是存在于嗅黏膜和嗅球中的胶质细胞,主要作用是引导和包裹嗅神经轴突。目前已开展将OEC应用于神经退行性疾病治疗的研究^[21]。

间充质干细胞(mesenchymal stem cell, MSC)主要来源于脐带组织和骨髓组织^[22],其中骨髓来源的干细胞可通过药物(普乐沙福)作用将其动员进入外周血液直接收集。间充质干细胞目前主要应用于治疗糖尿病性视网膜病变。移植间充质干细胞可加速视网膜血运,维持外层视网膜存活,延缓视网膜变性。虽然间充质干细胞诱导为视细胞的分化率较低^[23],但其分泌的营养因子可延缓变性疾病进展。此外,冻存的脐血干细胞还为患者治疗提供了额外的配型机会。

2.2 诱导多能干细胞

iPSC是指通过转录因子重编程由成体细胞诱导而来的多能干细胞。2006年, Takahashi等^[24]通过转录因子重编程外周纤维原细胞和淋巴母细胞使其转变为iPSC。iPSC拥有与ESC相似的自我更新和多向分化能力,可以诱导其分化得到视网膜组织细胞^[25-27], iPSC为干细胞临床转化治疗提供了新的研究方向。

应用遗传性视网膜疾病(inherited retinal degeneration, IRD)患者的iPSC分化得到视网膜组织可进行体外试验,在临床前对药物或基因治疗进行药理毒理测试。伴随基因治疗技术的发展,应用CRISPR/Cas9编辑系统除去iPSC内的突变致病基因^[28],然后进行诱导向视细胞分化,让iPSC成为了视网膜细胞替代治疗新的自体移植细胞来源。目前,已经有一部分文章综述了iPSC在AMD和IRD领域与治疗模型建立和细胞治疗策略筛选相关的研究成果^[29-30]。

值得注意的是, iPSC可以从病人自身的体细胞诱导而成,避免了伦理学风险。近年来,采用的小分子组合、miRNA调控等方式极大地提高了iPSC的诱导效率,同时,避免病毒载体和原癌基因的导入。但仍有报道显示, iPSC植入供体自身会产生免疫

排斥反应^[31],可见iPSC离临床转化应用仍有距离。

2.3 胚胎干细胞

人类胚胎干细胞(human embryonic stem cell, hESC)来自于受精卵发育得到的囊胚内细胞团,具有向任意胚层分化的潜能,有稳定的细胞系,可在体外大量增殖,易于基因操作,且基因操作后仍具有向各种细胞分化的潜能。直接将ESC移植进入体内存在形成畸胎瘤的风险。因此,目前ESC移植治疗致盲性眼病的策略一般都是经体外诱导为高纯度、眼特异性的治疗细胞,然后再进行眼内移植。治疗致盲性眼病常用的ESC来源的治疗细胞有视网膜或感光前体细胞^[32-33]以及包括角膜上皮细胞、视网膜色素上皮细胞和感光细胞等在内的终末分化细胞^[34-35]。

近来,日本发育生物学家笹井芳树(Yoshiki Sasai)等^[36]利用一种三维细胞培养系统诱导hESC自发形成了复杂的视网膜结构,再次证明ESC的分化潜能,同时也为在体外培育出治疗致盲性眼病的各类细胞带来希望^[37-38]。

目前,国际上批准进行致盲性眼病治疗的干细胞项目均采用hESC。2009年,美国瑞辉公司(Pfizer)与英国伦敦大学Pete Coffey实验室用hESC诱导分化为RPE细胞薄片,并已得到将该细胞片移植进入动物病变模型后的实验结果,目前正在申请进行临床实验^[39]。2012年,美国ACT公司联合美国加州大学洛杉矶分校在《Lancet》杂志上发表了用hESC治疗Stargardt病和干性AMD的I/II期临床实验的结果^[40]。该实验发现,hESC可在体外分化为纯度达99%以上的RPE细胞后,将此细胞移植到一例Stargardt病和一例干性AMD病人的视网膜,并进行时长四个月的安全性和有效性随访。研究结果并未发生移植细胞异常增殖或免疫排斥反应,并且在实验期间两位患者都获得了不同程度的视力提升^[40]。

尽管ESC来源的终末分化细胞移植到眼内可以延缓病程进展,但这些细胞已失去自我更新潜能,加之受体的整合能力有限,这可能也是细胞移植后疗效不能持久的原因之一。下文将提到应用视网膜祖细胞进行治疗是解决该问题的可能方案。

2.4 视网膜祖细胞

相对于干细胞多向分化,祖细胞倾向于定向分化为某一特定的细胞类型。干细胞与祖细胞之间最主要的区别在于干细胞可以无限的自我更新,而祖细胞仅具有有限的分裂次数。关于干细胞与祖细胞

的概念目前仍存在争论。

视网膜祖细胞(retinal progenitor cell, RPC)移植也可称为胎儿视网膜活性细胞成分移植。将转基因胎鼠视网膜中纯化得到的视网膜祖细胞移植进入成体小鼠视网膜变性模型,移植的部分祖细胞在受体视网膜内发育成为视网膜神经元,其中包括表达多种视色素蛋白的类感光细胞。移植细胞不但与受体视网膜各层产生了广泛整合,还参与挽救了受体视网膜外核层感光细胞。与对照组比较,实验组小鼠对光行为学功能得到改善^[41]。

在成体动物(如两栖动物)身上,视网膜创伤后可激活神经上皮和色素上皮中的祖细胞,共同发挥创伤后修复功能。虽然自我更新能力并未得到肯定,但研究者已经从成年哺乳动物视网膜周边睫状缘区域分离出了带有未分化标记的视网膜祖细胞^[42-43]。

在众多报道过的视网膜祖细胞类型中,视网膜Müller胶质细胞是研究得最为深入的晚期祖细胞。研究发现,Müller仍然保留了向感光细胞等神经元转分化的能力^[43-44]。在低等动物发生视网膜损伤后,Müller细胞可以被激活并参与视网膜修复,同样在小鼠视网膜内可通过生长因子的帮助模拟相似的激活过程^[45-46]。

研究证明,视网膜的神经细胞均来源于视网膜祖细胞,此类细胞通过精确的调控表达,控制着感光细胞发育和表型分化。感光细胞的发育由一系列以Crx(cone-rod homeobox gene)为中心的调控因子来调控,Crx是类似Otx2(orthodenticle homeobox 2 gene)同源结构域的转录因子^[47],Otx2是视网膜祖细胞有丝分裂后的感光前体细胞转录因子^[48],Otx2同时对RPE的发育也起重要作用。除表达以上转录因子的视网膜祖细胞外,从器官(如心脏)来源的c-kit(tyrosine-protein kinase kit or CD117,细胞膜表面抗原)阳性细胞具有自我更新、形成克隆和一定的分化潜能。研究发现,视网膜神经上皮层存在有大量c-kit阳性细胞^[49-50]。目前已有研究者证明,c-kit阳性视网膜祖细胞可延缓视网膜变性小鼠模型病情进展^[51]。

此外,视网膜变性疾病往往同时影响到RPE和感光细胞,单一种类细胞移植不能解决多种细胞丢失的关键问题。因此,移植具有多潜能的、限定分化为各类眼细胞且成瘤风险低的视网膜祖细胞,将是更具潜力的临床治疗策略。在眼内微环境的诱导

下, 视杯特异的祖细胞可以分化为病变组织所需要的修复细胞, 使移植细胞在体内的长期生存成为可能。

视网膜祖细胞从成体视网膜组织中以及iPSC和ESC诱导分化的视网膜组织中均可获得, 其成瘤风险较低, 又具有多分化潜能和可塑性。视网膜祖细胞同样适合进行临床转化研究。

3 结论

干细胞移植推广至临床治疗之前, 必须全面分析干细胞移植实验结果, 包括鉴别不同干细胞类别、不同干细胞数量以及不同注射方式等因素对受试者视功能产生的影响, 从而不断优化完善干细胞治疗致盲性眼病的方案。移植治疗干细胞来源的规范化、标准化和规模化问题仍需要进行更加深入的研究。干细胞移植治疗致盲性眼病的长期安全性、有效性等问题仍有待临床研究来解决。

参考文献 (References)

- Lorenz E, Congdon C, Uphoff D. Modification of acute irradiation injury in mice and guinea-pigs by bone marrow injections. *Radiol* 1952; 58(6): 863-77.
- Till JE, Mc CE. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961; 14: 213-22.
- Shevde N. Stem cells: Flexible friends. *Nature* 2012; 483(7387): S22-6.
- Pearson RA, Barber AC, Rizzi M, Hippert C, Xue T, West EL, *et al.* Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. *Nature* 2012; 485(7396): 99-103.
- West EL, Pearson RA, MacLaren RE, Sowden JC, Ali RR. Cell transplantation strategies for retinal repair. *Prog Brain Res* 2009; 175: 3-21.
- Yoshida N, Ikeda Y, Notomi S, Ishikawa K, Murakami Y, Hisatomi T, *et al.* Laboratory evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 2013; 120(1): e5-12.
- Yoshida N, Ikeda Y, Notomi S, Ishikawa K, Murakami Y, Hisatomi T, *et al.* Clinical evidence of sustained chronic inflammatory reaction in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* 2013; 120(1): 100-5.
- Zamiri P, Masli S, Kitaichi N, Taylor AW, Streilein JW. Thrombospondin plays a vital role in the immune privilege of the eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46(3): 908-19.
- Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy* 2016; 18(2): 160-71.
- Lui KO, Boyd AS, Cobbold SP, Waldmann H, Fairchild PJ. A role for regulatory T cells in acceptance of ESC-derived tissues transplanted across an major histocompatibility complex barrier. *Stem Cells* 2010; 28(10): 1905-14.
- Robertson NJ, Brook FA, Gardner RL, Cobbold SP, Waldmann H, Fairchild PJ. Embryonic stem cell-derived tissues are immunogenic but their inherent immune privilege promotes the induction of tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(52): 20920-5.
- Wu DC, Boyd AS, Wood KJ. Embryonic stem cells and their differentiated derivatives have a fragile immune privilege but still represent novel targets of immune attack. *Stem Cells* 2008; 26(8): 1939-50.
- Li L, Baroja ML, Majumdar A, Chadwick K, Rouleau A, Gallacher L, *et al.* Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties. *Stem Cells* 2004; 22(4): 448-56.
- Hori J, Ng TF, Shatos M, Klassen H, Streilein JW, Young MJ. Neural progenitor cells lack immunogenicity and resist destruction as allografts. *Stem Cells* 2003; 21(4): 405-16.
- Ng TF, Klassen HJ, Hori J, Young MJ. Retinal transplantation. *Chem Immunol Allergy* 2007; 92: 300-16.
- Zamiri P, Sugita S, Streilein JW. Immunosuppressive properties of the pigmented epithelial cells and the subretinal space. *Chem Immunol Allergy* 2007; 92: 86-93.
- Paspala SA, Murthy TV, Mahaboob VS, Habeeb MA. Pluripotent stem cells—a review of the current status in neural regeneration. *Neurol India* 2011; 59(4): 558-65.
- Aboudy K, Capela A, Niazi N, Stern JH, Temple S. Translating stem cell studies to the clinic for CNS repair: Current state of the art and the need for a Rosetta stone. *Neuron* 2011; 70(4): 597-613.
- Salero E, Blenkinsop TA, Corneo B, Harris A, Rabin D, Stern JH, *et al.* Adult human RPE can be activated into a multipotent stem cell that produces mesenchymal derivatives. *Cell Stem Cell* 2012; 10(1): 88-95.
- O'Callaghan AR, Daniels JT. Concise review: Limbal epithelial stem cell therapy: Controversies and challenges. *Stem Cells* 2011; 29(12): 1923-32.
- Chiu SC, Hung HS, Lin SZ, Chiang E, Liu DD. Therapeutic potential of olfactory ensheathing cells in neurodegenerative diseases. *J Mol Med (Berl)* 2009; 87(12): 1179-89.
- Friedlander M, Dorrell MI, Ritter MR, Marchetti V, Moreno SK, El-Kalay M, *et al.* Progenitor cells and retinal angiogenesis. *Angiogenesis* 2007; 10(2): 89-101.
- Huang C, Zhang J, Ao M, Li Y, Zhang C, Xu Y, *et al.* Combination of retinal pigment epithelium cell-conditioned medium and photoreceptor outer segments stimulate mesenchymal stem cell differentiation toward a functional retinal pigment epithelium cell phenotype. *J Cell Biochem* 2012; 113(2): 590-8.
- 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.
- Zhong X, Gutierrez C, Xue T, Hampton C, Vergara MN, Cao LH, *et al.* Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nat Commun* 2014; 5: 4047.
- Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ, Friedrich AM, Hinman CR, Johnson LV, *et al.* Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009; 27(10): 2427-34.

- 27 Borooh S, Phillips MJ, Bilican B, Wright AF, Wilmot I, Chandran S, *et al.* Using human induced pluripotent stem cells to treat retinal disease. *Prog Retin Eye Res* 2013; 37: 163-81.
- 28 Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013; 339(6121): 823-6.
- 29 Wright LS, Phillips MJ, Pinilla I, Hei D, Gamm DM. Induced pluripotent stem cells as custom therapeutics for retinal repair: Progress and rationale. *Exp Eye Res* 2014; 123: 161-72.
- 30 Al-Shamekh S, Goldberg JL. Retinal repair with induced pluripotent stem cells. *Transl Res* 2014; 163(4): 377-86.
- 31 Boyd AS, Rodrigues NP, Lui KO, Fu X, Xu Y. Concise review: Immune recognition of induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2012; 30(5): 797-803.
- 32 Katoh K, Omori Y, Onishi A, Sato S, Kondo M, Furukawa T. Blimp1 suppresses Chx10 expression in differentiating retinal photoreceptor precursors to ensure proper photoreceptor development. *J Neurosci* 2010; 30(19): 6515-26.
- 33 Osakada F, Ikeda H, Mandai M, Wataya T, Watanabe K, Yoshimura N, *et al.* Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2008; 26(2): 215-24.
- 34 Lamba DA, Gust J, Reh TA. Transplantation of human embryonic stem cell-derived photoreceptors restores some visual function in Crx-deficient mice. *Cell Stem Cell* 2009; 4(1): 73-9.
- 35 Idelson M, Alper R, Obolensky A, Ben-Shushan E, Hemo I, Yachimovich-Cohen N, *et al.* Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. *Cell Stem Cell* 2009; 5(4): 396-408.
- 36 Sasai Y. Next-generation regenerative medicine: Organogenesis from stem cells in 3D culture. *Cell Stem Cell* 2013; 12(5): 520-30.
- 37 Gonzalez-Cordero A, West EL, Pearson RA, Duran Y, Carvalho LS, Chu CJ, *et al.* Photoreceptor precursors derived from three-dimensional embryonic stem cell cultures integrate and mature within adult degenerate retina. *Nat Biotechnol* 2013; 31(8): 741-7.
- 38 Assawachananont J, Mandai M, Okamoto S, Yamada C, Eiraku M, Yonemura S, *et al.* Transplantation of embryonic and induced pluripotent stem cell-derived 3D retinal sheets into retinal degenerative mice. *Stem Cell Reports* 2014; 2(5): 662-74.
- 39 Coffey P. Interview: Stemming vision loss with stem cells: Seeing is believing. *Regen Med* 2009; 4(4): 505-7.
- 40 Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, *et al.* Embryonic stem cell trials for macular degeneration: A preliminary report. *Lancet* 2012; 379(9817): 713-20.
- 41 Klassen HJ, Ng TF, Kurimoto Y, Kirov I, Shatos M, Coffey P, *et al.* Multipotent retinal progenitors express developmental markers, differentiate into retinal neurons, and preserve light-mediated behavior. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45(11): 4167-73.
- 42 Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, Horsford DJ, Elia AJ, McInnes RR, *et al.* Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 2000; 287(5460): 2032-6.
- 43 Ahmad I, Tang L, Pham H. Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270(2): 517-21.
- 44 Lenkowski JR, Raymond PA. Muller glia: Stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish. *Prog Retin Eye Res* 2014; 40: 94-123.
- 45 Das AV, Mallya KB, Zhao X, Ahmad F, Bhattacharya S, Thoreson WB, *et al.* Neural stem cell properties of Muller glia in the mammalian retina: regulation by Notch and Wnt signaling. *Dev Biol* 2006; 299(1): 283-302.
- 46 Pollak J, Wilken MS, Ueki Y, Cox KE, Sullivan JM, Taylor RJ, *et al.* ASCL1 reprograms mouse Muller glia into neurogenic retinal progenitors. *Development* 2013; 140(12): 2619-31.
- 47 Peng GH, Chen S. Crx activates opsin transcription by recruiting HAT-containing co-activators and promoting histone acetylation. *Hum Mol Genet* 2007; 16(20): 2433-52.
- 48 Baas D, Bumsted KM, Martinez JA, Vaccarino FM, Wikler KC, Barnstable CJ. The subcellular localization of Otx2 is cell-type specific and developmentally regulated in the mouse retina. *Brain Res Mol Brain Res* 2000; 78(1/2): 26-37.
- 49 Koso H, Satoh S, Watanabe S. c-kit marks late retinal progenitor cells and regulates their differentiation in developing mouse retina. *Dev Biol* 2007; 301(1): 141-54.
- 50 Zhou PY, Peng GH, Xu H, Yin ZQ. c-Kit(+) cells isolated from human fetal retinas represent a new population of retinal progenitor cells. *J Cell Sci* 2015; 128(11): 2169-78.
- 51 Chen X, Chen Z, Li Z, Zhao C, Zeng Y, Zou T, *et al.* Grafted c-kit⁺/SSEA1-eye-wall progenitor cells delay retinal degeneration in mice by regulating neural plasticity and forming new graft-to-host synapses. *Stem Cell Res Ther* 2016; 7(1): 191.