



周琪博士, 中国科学院动物研究所研究员、所长, 博士生导师, 中国科学院干细胞与再生医学创新研究院(筹)院长, 中国科学院院士, 发展中国家科学院(TWAS)院士。主要从事生殖、发育、干细胞和再生医学等研究与转化工作。长期担任国家973计划、863计划、国家重大科学研究计划项目首席科学家、中国科学院干细胞领域战略先导专项首席科学家。已在*Cell*、*Nature*、*Science*等期刊上发表SCI论文170余篇, 研究成果多次入选年度中国科技十大进展。曾获国家自然科学奖二等奖、TWAS生物学奖、周光召基金会青年创新奖、何梁何利基金科学与技术进步奖等多项荣誉。

http://sourcedb.ioz.cas.cn/zw/zjrc/200907/t20090716_2088445.html

人胚胎干细胞的临床转化研究进展

吴骏^{1,2,3#} 王昱凯^{1,2,3#} 王磊^{1,2,3,4} 李仲文^{1,2,3,4} 梁灵敏^{1,2,3,4} 冯琳^{1,2,3,5} 郭保杰^{1,2,3}
于娟^{1,2,3,4} 王柳^{1,2,3,4} 郝捷^{1,2,3} 周琪^{1,2,3,4*}

(¹中国科学院动物研究所, 北京 100101; ²北京干细胞库, 北京 100190; ³中国科学院干细胞与再生医学创新研究院, 北京 100101; ⁴中国科学院大学, 北京 100049; ⁵曲阜师范大学生命科学学院, 曲阜 273100)

摘要 胚胎干细胞的基础研究和转化是再生医学领域的重要研究课题。继传统化学药品和外科手术, 具有自我更新能力和多向分化潜能的胚胎干细胞有望成为新的疾病治疗药物, 将在神经退行性疾病、特定组织或细胞缺损性疾病等难治性疾病的治疗中发挥重要作用。该文综述了国内外人胚胎干细胞的临床研究进展, 总结了其在黄斑变性、帕金森病、脊髓损伤和心血管疾病治疗中的临床研究, 最后提出了该领域存在的关键问题和面临的重大挑战, 并对人胚胎干细胞的未来临床应用进行了展望。

关键词 胚胎干细胞; 临床研究; 细胞治疗

Progress in Clinical Research of Human Embryonic Stem Cells

Wu Jun^{1,2,3#}, Wang Yukai^{1,2,3#}, Wang Lei^{1,2,3,4}, Li Zhongwen^{1,2,3,4}, Liang Lingmin^{1,2,3,4}, Feng Lin^{1,2,3,5}, Guo Baojie^{1,2,3},
Yu Juan^{1,2,3,4}, Wang Liu^{1,2,3,4}, Hao Jie^{1,2,3}, Zhou Qi^{1,2,3,4*}

(¹Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; ²Beijing Stem Cell Library, Beijing 100190, China; ³Institute for Stem Cell and Regenerative, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; ⁴University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; ⁵School of Life Sciences, Qufu Normal University, Qufu 273100, China)

Abstract The basic research and translational application of embryonic stem cells (ESCs) are important research topics in regenerative medicine. In addition to traditional medical treatments of drugs and surgical inter-

国家自然科学基金(批准号: 31621004)、国家重点研发计划(批准号: 2016YFA0101502)和北京市科学技术委员会项目(批准号: Z181100003818005)资助的课题

#共同第一作者

*通讯作者。Tel: 010-64807299, E-mail: zhouqi@ioz.ac.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31621004), the National Key Research and Development Project of China (Grant No.2016YFA010150) and the Beijing Municipal Science and Technology Commission Project (Grant No.Z181100003818005)

*These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-10-64807299, E-mail: zhouqi@ioz.ac.cn

网络出版时间: 2019-01-17 16:30:29

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190117.1630.004.html>

vention, ESCs, due to their self-renewal ability and potential of multi-directional differentiation, are hoped to be developed into a new approach of medication, and to play an important role in the treatment of some incurable diseases such as neurodegenerative disorders, and specific tissue- or cell-deficiencies. In this article, we review the current progress in clinical research of human ESCs (hESCs) in China and abroad, and summarize the clinical research of hESCs in the treatment of macular degeneration, Parkinson's disease, spinal cord injury and cardiovascular disease. Finally, key questions and enormous challenges in this field are presented, and prospects of hESCs in the future clinical application are discussed.

Keywords embryonic stem cells; clinical research; cell therapy

1 干细胞与再生医学的国家战略需求

人口、环境和资源是社会可持续发展的三要素, 其中人口是社会可持续发展的最关键要素。改革开放给我国带来高速增长的同时, 中国正面临“人口红利”枯竭、人口加速老龄化等严重社会问题。预计到2050年, 中国60岁以上老年人口将占我国总人口的35%, 全球老龄化人口也将突破20亿。随着老龄化的加剧, 我国在人口健康领域面临巨大挑战: (1)老龄化人口结构改变传统婚育模式, 导致新生儿缺陷率增高, 改变我国健康人口比例; (2)老龄化改变社会人口疾病谱, 导致我国当前公共卫生布局与实际人口健康需求脱节; (3)老龄化增加残障和伤患者数, 加重我国人口健康领域人力和财力负担。人们迫切期待医学治疗领域的革命性创新, 弥补当前化学用药、手术治疗等传统医学手段的不足, 从而满足我国未来人口健康的巨大临床需求。

干细胞研究及转化应用有望为众多常规治疗无法根治的难治性疾病, 如糖尿病、心血管病、神经退行性疾病等, 提供新的治疗方法。基于近20年来积累的大量临床前安全性和有效性研究数据, 干细胞药物产品前期研发已趋于完善, 目前已跨入后期临床研究 and 应用转化阶段。随着干细胞技术的发展, 具有自我更新和多向分化能力的干细胞将成为一类新型的疾病治疗手段。

2 人胚胎干细胞分化研究进展

人胚胎干细胞(human embryonic stem cells, hESCs)是一类从人类早期胚胎中分离的、具有自我更新和多向分化潜能的细胞。1998年, 美国威斯康星大学的Thomson等^[1]首次利用体外受精人类胚胎建立hESCs细胞系, 该细胞系随后被广泛应用于世界各国科学研究。这些研究大力推动了干细胞研究发展成为新的研究领域。随着对hESCs的深入研究, 科

学家们通过添加特定因子或小分子调控干细胞内信号通路, 将hESCs定向分化为各类型细胞, 如神经元细胞^[2]、胶质细胞^[3]、肝细胞^[4]、胰岛细胞^[5]、精卵细胞^[6-7]以及心肌细胞、血液细胞或小肠上皮细胞等其他类型的细胞^[8]。上述hESCs来源功能细胞可以直接用于患者体内移植, 也可先与细胞外基质等生物材料混合制备生物墨水, 通过生物3D打印制备具有一定外形和生物学功能的器官或组织, 然后再用于患者体内移植。目前, 生物3D打印技术可在体外构建心脏瓣膜、人耳、骨骼、肌肉、肝脏、肾脏以及视网膜等^[9-10]。近年来, 科学家通过定向诱导分化培养hESCs产生类器官。类器官拥有与对应器官类似的空间结构和生理功能, 可广泛用于体外疾病模型构建, 靶向药物筛选甚至直接用于人体内器官移植。

3 人胚胎干细胞临床应用进展

3.1 人胚胎干细胞临床应用指导原则

2008年, 国际干细胞研究学会(International Society for Stem Cell Research, ISSCR)制定《干细胞临床转化指南》, 提出干细胞临床转化研究应遵守的最基本准则^[11]。2009年, 国际干细胞组织(International Stem Cell Forum, ISCF)制定《人胚胎干细胞建库和供应指南》, 明确基础研究用人胚胎干细胞的质量控制原则^[12]。上述两份国际干细胞指南性文件从质量控制等基础规范出发, 为hESCs临床转化研究奠定基础。美国和欧洲各国最早建立较完善的干细胞制剂和应用相关指导原则。美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)、欧洲药品管理局、世界卫生组织、美国国家科学院、国际干细胞研究学会和国际干细胞组织等先后对干细胞制剂材料捐赠、采购、检测、储存以及临床前研究等进行了规范。

我国于2015年7月20日颁布《干细胞临床研究

管理办法(试行)》,规范干细胞临床治疗,明确我国干细胞治疗产品按照药物管理,干细胞临床研究实行备案制。

3.2 人胚胎干细胞衍生细胞的临床研究

2010年,美国Geron公司启动全球首例hESCs来

源功能细胞临床试验治疗脊髓损伤,此后,临床试验用hESCs来源功能细胞类型和疾病类型都有很大扩展(表1)。截至2018年10月,美国ClinicalTrials网站(<https://ClinicalTrials.gov>)注册干细胞相关临床研究6 200余项,其中美国3 534例,占全球的半数以上,中

表1 ClinicalTrials.gov注册使用hESCs分化细胞的临床研究

Table 1 Clinical studies of hESCs-derived cells registered on ClinicalTrials.gov

编号 NCT No.	适应证 Conditions	干预措施 Interventions	剂量 Doses	临床 Phase	国家 Locations	入组人数 Number enrolled	开始时间 Study start
NCT02563782	Age-related macular degeneration (AMD)	hESC-retinal pigment epithelial cells (PRE)	2×10^5	Phase 2	Japan	N/A	2015.09
NCT02122159	Myopic macular degeneration	hESC-PRE	4 doses: 5×10^4 , 1×10^5 , 1.5×10^5 , 2×10^5	Phase 1/2a	United States	N/A	2013.03
NCT02903576	Stargardt's macular dystrophy (SMD)	hESC-PRE	1×10^5	Phase 1/2a	Brazil	18	2015.08
NCT02286089	Advanced dry AMD	hESC-PRE	5×10^4 - 5×10^5	Phase 1/2a	Israel	15	2015.02
NCT01344993	Advanced dry AMD	hESC-PRE	4 doses: 5×10^4 , 1×10^5 , 1.5×10^5 , 2×10^5	Phase 1/2a	Japan	13	2011.04
NCT02463344	Dry AMD	hESC-PRE	4 doses: 5×10^4 , 1×10^5 , 1.5×10^5 , 2×10^5	Phase 1/2a	Japan	11	2012.07
NCT01674829	Advanced dry AMD	hESC-PRE	4 doses: 5×10^4 , 1×10^5 , 1.5×10^5 , 2×10^5	Phase 1/2a	Korea	12	2012.09
NCT01691261	Acute wet AMD and recent rapid vision decline	hESC-PRE	N/A	Phase 1	United Kingdom	10	2015.02
NCT02590692	Dry AMD and geographic atrophy	hESC-PRE	N/A	Phase 1/2a	United States	20	2015.10
NCT02749734	Macular degeneration/SMD	hESC-PRE	4 doses: 5×10^4 , 1×10^5 , 1.5×10^5 , 2×10^5	Phase 1	China	15	2015.05
NCT03046407	Dry AMD	hESC-PRE	1.5×10^5	Phase 1	China	10	2017.04
NCT02755428	Dry AMD	hESC-PRE	1.5×10^5	Phase 1	China	10	2017.04
NCT01345006	SMD	hESC-PRE	4 doses: 5×10^4 , 1×10^5 , 1.5×10^5 , 2×10^5	Phase 1/2a	Japan	13	2011.04
NCT01469832	SMD	hESC-PRE	4 doses: 5×10^4 , 1×10^5 , 1.5×10^5 , 2×10^5	Phase 1/2a	Japan	12	2011.11
NCT02941991	SMD	hESC-PRE	4 doses: 5×10^4 , 1×10^5 , 1.5×10^5 , 2×10^5	Phase 1/2a	Japan	11	2013.01

(续表1)

编号 NCT No.	适应证 Conditions	干预措施 Interventions	剂量 Doses	临床 Phase	国家 Locations	入组人数 Number enrolled	开始时间 Study start
NCT02445612	SMD	hESC-PRE	5×10^4 - 2×10^5	Phase 1/2a	Japan	12	2012.07
NCT02452723	Parkinson's disease (PD)	hESC-neural stem cells	One injection: 3×10^7 - 7×10^7	Phase 1	Australia	12	2016.03
NCT03119636	PD	hESC-neural precursor cells	3 doses: 1×10^6 4×10^6 4×10^7	Phase 1/2a	China	50	2017.04
NCT01217008	Spinal cord injury (SCI)	hESC-oligodendrocyte progenitor cells (hESC-OPC)	One injection: 2×10^6	Phase 1	United States	5	2010.10
NCT02302157	SCI	hESC-OPC	One injection: 2×10^6 or 1×10^7 , or 2 injections: 10×10^6	Phase 1/2a	United States	35	2015.03
NCT02057900	Ischemic heart disease	hESC-cardiac progenitor cells	N/A	Phase 1	France	6	2013.05

国大陆开展494例, 仅次于美国和欧洲各国。获批上市的干细胞治疗药物十余种, 其中大多数为条件性批准的间充质干细胞产品。2017年, 我国通过了备案制后的首批8个干细胞临床研究备案, 截至2018年10月, 我国通过了3批共计27个干细胞临床研究备案。

3.3 人胚胎干细胞来源功能细胞治疗眼部疾病

眼是人体重要的感觉器官。黄斑区位于眼睛视网膜中央, 是视网膜上厚度最薄、视觉最敏锐的一小块区域。黄斑区在光学信号识别中具有重要作用, 黄斑区的任何病变都会导致视力下降, 甚至失明。常见黄斑区病变有老年性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD, 又称年龄相关性黄斑变性)和青少年型黄斑营养不良(Stargardt's macular dystrophy, SMD)。

3.3.1 AMD AMD是当前发达国家50岁以上老年人失明的主要原因之一。我国AMD发病率逐年升高, 50岁以上人群发病率为2.9%~12.9%。AMD病因尚未确定。根据是否有脉络膜新生血管侵入视网膜, 临床上将AMD分为干性和湿性两种类型。

干性AMD无脉络膜新生血管侵入, 约占AMD的80%。目前干性AMD没有有效的治疗方法。服用一些抗氧化剂, 如维生素C、维生素E、Zn、叶黄素、玉米黄质等, 可用作干性AMD的辅助治疗。湿性AMD有脉络膜新生血管侵入, 约占AMD的20%。

抗新生血管药物VEGF抑制剂的出现使湿性AMD治疗取得了长足的进展。

视网膜色素上皮细胞(retinal pigmen epithelium, RPE)是一类生长于神经视网膜和脉络膜血管层之间Bruch's膜上的单层细胞^[14], 在维持视网膜和光感受器功能方面具有非常重要的作用, 包括血-视网膜屏障的形成、神经视网膜营养的供给、光感外节的吞噬、细胞代谢物的清除、视觉色素的重建、杂散光的过滤与吸收以及视觉感知转换的驳接等^[14]。同时, RPE分泌拮抗血管新生的因子和胞外基质, 抑制脉络膜新生血管向视网膜内侵入生长^[15-16]。因此, RPE移植理论上是治疗AMD的有效方法。截至2018年10月, 美国ClinicalTrials网站注册39项AMD细胞治疗临床研究, 其中25项使用RPE细胞。

2012年,《柳叶刀》发表临床研究论文, 首次证明hESCs来源RPE治疗AMD安全且部分有效。研究者将纯度99%以上的RPE细胞注射入AMD患者视网膜下腔, 移植后随访4个月中, 未观察到移植细胞异常增殖和移植相关免疫排斥反应。接受RPE移植的患者视力有一定程度的改善, 从21个字母提升到了28个字母^[17]。2015年,《柳叶刀》发表后续临床研究论文, 对其中9例接受视网膜下移植hESC来源RPE且年龄大于55岁的AMD患者进行临床I/II期安全性和耐受性前瞻性研究, 临床研究采用3个移植剂量

组, 分别为 5×10^4 、 1×10^5 和 1.5×10^5 个RPE细胞。移植后连续22个月定期进行全身、眼科和影像学检查随访, 没有观察到移植物不良增殖、排斥反应或严重的眼部或全身不良事件^[18]。同年, 韩国科学家将hESCs来源RPE分别注射至2例AMD和2例SMD患者眼内, 移植剂量为 4×10^4 个细胞。经过1年随访, 没有观察到严重不良事件^[19]。2018年, 英美科学家首次尝试移植hESC来源RPE细胞片层治疗湿性AMD和干性AMD, 患者视力得到了一定程度的提高^[20-21]。值得注意的是, 2018年中国科学家报告了移植hESC来源RPE治疗湿性AMD的临床研究结果, 3例患者分别接受了 1×10^6 个hESC来源RPE移植, 随访1年未观察到严重不良事件, 黄斑受损区域有新生RPE样细胞层, 视觉和眼电生理功能有一定改善^[22]。

3.3.2 SMD SMD是一类常见的遗传性视网膜病变, 由德国医生Stargardt于1909年首先报道而得名。SMD好发于6~20岁青少年, 病情随年龄增长加重, 最终导致失明。SMD临床表现为获得性中心视力受损, 黄斑与色素上皮萎缩, 常伴随后极部斑点^[23]。SMD病因是RPE细胞内脂褐质的异常沉积导致RPE功能障碍, 最终累及光感受器而发生视力衰退。RPE细胞*ABCA4*基因编码缺陷边缘蛋白, 无法正常代谢二维甲酸-吡啶乙醇胺(A2E), 导致RPE细胞变性。另外, RPE细胞*ELOVL4*基因突变影响脂肪酸合成, 影响PRE细胞正常脂肪代谢。多数SMD为常染色体隐性遗传, 少数为常染色体显性遗传或X-连锁隐性遗传, 目前缺乏有效治疗手段^[24]。截至2018年10月, 美国ClinicalTrials网站注册7项SMD细胞治疗临床研究, 其中6项使用hESCs来源RPE。

2012年,《柳叶刀》发表临床研究论文, 首次证明hESCs来源RPE治疗SMD的安全性和部分有效性。在术后随访期间, SMD患者最佳矫正视力从0个字母提升到了5个字母, 在此后长期随访中, 也未观察到严重不良事件^[18]。2015年, 韩国科学家使用hESCs来源RPE移植治疗2例SMD患者, 移植细胞剂量为 4×10^4 个细胞, 经过1年随访, 未发现不良增殖、致瘤性、异位组织形成或其他严重不良事件。2例患者视力均有所改善, 1例提升9个字母, 1例提升1个字母^[19]。

以上临床研究结果证明, hESCs来源RPE移入患者视网膜下腔后可长期存活并且是安全的, 接受移植的部分患者视力有不同程度的提升^[17-22]。干性AMD和SMD多采用RPE悬液注射移植, 湿性AMD

多采用RPE细胞片层移植, RPE悬液移植具有较高的安全性和一定的有效性, 细胞片层移植只有3例患者, 其安全性和有效性需要进一步验证。目前临床研究采用的RPE移植剂量有 4×10^4 、 5×10^4 、 1×10^5 、 1.5×10^5 和 1×10^6 个细胞, 不同剂量对患者视力均有一定的提升作用。截至2018年10月, 临床研究一共报道25例AMD或者SMD患者接受RPE移植治疗, 其中22例最佳矫正视力有不同程度提升, 剩余3例无变化。

目前细胞移植治疗AMD或SMD存在如下问题: (1)由于移植区域是一个动态环境, 植入的RPE可能因无法固定而流失; (2)由于RPE为终末分化细胞, 可能会因整合能力差导致失巢凋亡; (3)老年患者Bruch's膜状态较差, 可能难以支持新植入RPE的生长^[25]。最近研究表明, 与生物材料共移植可提高RPE细胞存活率^[26], 提示共移植为解决上述问题提供解决方案。此外, 虽然视网膜下腔一直被认为是免疫豁免区, 但因脉络膜新生血管侵入或手术导致血-视网膜屏障破坏, 从而诱发免疫排斥反应, 最终影响移植RPE存活。因此, 围RPE移植治疗期, 患者需接受免疫抑制剂治疗。考虑到免疫排斥反应与RPE移植细胞数量存在正相关关系, 建议进一步明确药效学必需的最小量RPE移植细胞数量。

3.4 人胚胎干细胞衍生细胞治疗中枢神经系统疾病进展

脑与脊髓构成的人体中枢神经系统是人类各种认知过程和心理过程的核心, 也是生命得以维持的中枢。随着中国社会老龄化的加剧, 包括神经退行性疾病、神经发育性疾病和创伤性损伤在内的中枢神经系统疾病成为影响人类健康的重要因素^[27]。目前, 我国帕金森病(Parkinson's disease, PD)患者超过250万人, 脑卒中和脊髓损伤(spinal cord injuries, SCI)也已经成为我国首要的致残和致死原因。由于中枢神经系统内源性修复能力欠缺, 而且这类疾病缺乏有效的治疗手段, 要实现结构与功能的理想修复, 尚面临巨大挑战。

对于此类疾病采取细胞治疗的方法, 干细胞能够增强细胞存活和营养因子的分泌, 取代死亡的神经元, 修复受损的神经回路。目前中国、美国、澳大利亚, 已开展了hESCs分化来源的多巴胺神经前体细胞治疗PD的临床研究。2015年, 美国开展了hESCs来源的少突胶质细胞治疗SCI的临床研究。

3.4.1 PD PD是一种常见于中老年人的中枢神经

系统退行性疾病。1817年,英国外科医生詹姆斯·帕金森在《震颤麻痹论》一书中首次对该疾病作了完整的描述。为纪念帕金森医生,遂正式命名该病为帕金森病。PD在老年人中多见,平均发病年龄为60岁。全球约有600万PD患者,我国有250~300万,占全球人数的一半。患者会出现震颤、肌强直、动作迟缓、姿势平衡障碍等运动症状和嗅觉减退、便秘、失眠和抑郁等非运动症状的临床表现,严重影响患者的生活质量,给家庭和社会造成了沉重的精神和经济负担。PD的临床症状和体征会随时间变化而恶化,目前常用Hoehn-Yahr分级表来评估患者的病情阶段^[28]。根据临床症状严重程度的不同,可以将PD的病程分为早期和中晚期,即将Hoehn-Yahr 1.0~2.5级定义为早期, Hoehn-Yahr 3.0~5.0级定义为中晚期。

PD主要的病理特征是中脑黑质多巴胺能神经元大量死亡,从而导致纹状体区多巴胺递质合成减少。多巴胺是一种控制肢体活动重要的神经递质,多巴胺经黑质——纹状体束转运至纹状体的尾状核和壳核细胞,参与信号传递和运动调控^[29]。目前,PD的具体发病机制仍不完全明确。年龄因素、遗传因素、环境因素、氧化应激等均可能参与多巴胺能神经元的死亡过程。

PD的传统治疗方法主要有药物治疗和手术治疗。药物治疗是1967年发明的口服左旋多巴法,或辅以服用多巴胺受体激动剂。口服药物可以增加脑内多巴胺水平,能有效地改善患者症状。但是,药物治疗的蜜月期一般为5年,随着病情的发展,简单的药物治疗通常无法取得良好的效果。同时,长期服药会产生一系列的副作用,如恶心、呕吐、异动症、精神症状等^[31-32]。手术方法主要包括神经损毁术和深部脑刺激(deep brain stimulation, DBS), DBS因创伤小并能有效改善运动症状而成为主要选择,但其对非运动症状没有改善,患者依然经历失眠、认知障碍、精神异常。不论口服药物,还是外科手术,虽然都有一定的效果,但并不能阻碍疾病的进展,也无法使受损的神经元再生,难以从根本上治愈PD。因此,开发能从根本上治愈PD的新疗法仍是基础研究者 and 临床工作者的重要任务。

由于PD是特定区域中特定类型细胞缺失造成的,所以,向该区域补充缺失的细胞有可能恢复或重建原有的功能。hESCs可以定向分化为多巴胺能神

经细胞^[33],可为PD患者提供充足的细胞来源。这些细胞移植到大脑后,可以存活并分泌多巴胺递质,有望缓解患者的症状。2016年3月, Cyto Therapeutics Pty Limited公司在澳大利亚率先开展了孤雌hESCs分化细胞治疗PD的I期临床研究,这是一项剂量递增、开放标签、单中心、无对照组的试验,移植细胞采用的是孤雌hESCs分化的神经干细胞(ISC-hpNSC),该研究将招募12例中重度患者进行3种不同剂量(3×10^7 、 5×10^7 、 7×10^7)的细胞注射,每例患者接受单剂量ISC-hpNSC脑内注射。移植后,研究团队对所有患者进行为期1年的随访,评估ISC-hpNSC细胞移植的安全性和初步疗效。孤雌胚胎干细胞来源于捐献的未受精的卵细胞,伦理争议小而且配型较容易^[34-36]。但国际同行对该研究所使用的细胞类型存在质疑^[37],首先,NSC具有很强的增殖能力,这类细胞植入体内可能会引起过度增殖而增加肿瘤风险^[38-39]。其次,这些细胞为PAX6阳性^[40],表明是背侧神经命运,而中脑多巴胺能神经元来源于PAX6阴性的中脑腹侧底板^[33,41],因此,它们能否产生真正的中脑多巴胺能神经元还缺少确凿的证据^[42]。这些NSC细胞在体内分化为TH⁺细胞的比例仅为1%~2%,只能靠加大注射量来保证产生足够的多巴胺神经细胞^[43]。

2017年,中国科学院动物研究所和郑州大学第一附属医院联合开展了hESCs分化细胞治疗PD的I/IIa期临床研究,研究中使用的是多巴胺神经前体细胞(dopaminergic progenitor cells),该细胞是由受精卵来源的人胚胎干细胞经历中脑腹侧底板分化而来,是真正的中脑多巴胺神经前体细胞^[44]。计划招募50例患者,并对所有患者进行为期1年的随访。

3.4.2 SCI 脊髓损伤(spinal cord injuries, SCI)是指在强烈外力作用下脊柱遭到破坏,进而导致脊髓神经及相关组织受到损伤。其并发症能加剧功能障碍,如感染,心脏病,呼吸、膀胱和肠道故障,以及一些疼痛综合征(伤害性和/或神经性)。上述并发症进一步加重SCI患者个人、家庭以及社会负担。大多数创伤后变性组织是由多因素继发性损伤引起的,包括几个相互关联的过程:血脑屏障功能障碍、局部炎症、神经元死亡、脱髓鞘和破坏神经通路^[45]。

SCI是一种压倒性的神经系统疾病,全世界共有130万患者。原因包括车辆事故、暴力、意外跌

倒和其他创伤事件^[46]。SCI导致毁灭性的神经功能缺损和损伤,引起感觉/运动能力的部分或完全丧失,导致瘫痪。

SCI主要经历两个时期。(1)原发性损伤期,即在外力作用下脊髓神经组织被压迫、挫伤甚至撕裂,造成脊髓神经组织、细胞和相关血管受到急性机械损伤^[47];大多数创伤性脊髓损伤伴随着对脊柱的损伤,包括骨折、脱位、椎间盘破裂突出、韧带撕裂和血液供应中断^[48]。主要伤害是创伤的直接后果,可能是由于压迫,导致脊髓的挫伤、剪切、过度伸展、横断和明显的出血^[49]。(2)继发性损伤期,即兴奋性神经毒性、炎症反应等导致脊髓神经细胞凋亡、轴突髓鞘丢失,另外组织坏死、胶质细胞增殖等形成瘢痕,在很大程度上阻碍受损脊髓神经再生和相关组织重建^[50]。

目前SCI治疗方法主要有以下几方面。(1)药物治疗:类固醇皮质激素,如甲基强的松龙(methylprednisolone)^[51]、红细胞生成素(erythropoietin)^[52-53];神经营养素,如神经节苷脂(ganglioside)^[54-55];谷氨酸受体拮抗剂,如利鲁唑(riluzole)^[56-57];Rho拮抗剂,如BA210^[58]、cethrin^[59];以及其他小分子药物,如二甲胺四环素(minocycline)^[60-62]、达伐吡啶(dalfampidine)^[63-64]等;(2)外科手术:解除脊髓压迫、稳定脊柱、避免二次损伤、减少脊髓神经进一步受损^[65-66];(3)康复治疗:主要有按摩、电磁刺激、针灸等^[67-69]。

基础研究中一般把治疗分为三个时期^[70]:挽救神经组织减轻继发性损伤(rescue)、重新激活残余神经环路(reactivate)和脊髓伤后重建(rewire)。挽救神经组织减轻继发性损伤阶段治疗的目标主要是防止细胞死亡、组织丢失、囊泡空穴、炎症反应和脱髓鞘反应。重新激活残余神经环路阶段治疗的目标主要是通过重新髓鞘化加强残余神经环路、训练或药物治疗及修复已经脱髓鞘的轴突的信号传导。脊髓伤后重建阶段治疗的目标主要是用新生组织桥接(bridge)或者残余组织产生新连接(relay)替代丢失组织的功能,或者用生长因子或抑制性抗体刺激产生新的轴突。

但是,上述方法都只是对症治疗,无法治愈SCI及其并发症。hESCs可分化为神经元以替代受损的神经细胞,促进受损轴突的髓鞘再生^[71]。2009年,FDA批准了Geron制药公司利用hESCs分化的少突胶质前体细胞(human embryonic stem cell-derived

oligodendrocyte progenitor cells, GRNOPC1)治疗脊髓损伤的临床I期试验申请,这是首个使用hESCs分化细胞的临床试验^[72]。2010年10月,Geron公司开始正式向脊髓损伤患者体内移植GRNOPC1细胞。在患者受伤7~14天后,椎管内注射 2×10^6 或 1×10^7 GRNOPC1细胞,或分两次注射 1×10^7 的细胞量,并进行后期的跟踪检测。数据表明,GRNOPC1是一种较为安全的治疗手段,并不会引发严重的不良反应。

2013年,Asterias公司收购了Geron公司的该临床项目。2014年8月,美国FDA批准Asterias公司开展关于AST-OPC1治疗SCI患者的临床I/IIa试验。2016年6月,Asterias公司招募了8例SCI患者,其中3例患者接受了低剂量的细胞移植处理(2×10^6)。另外5例患者接受了高剂量的细胞移植处理(1×10^7)。2016年中期,Asterias公布了此前接受Geron公司临床试验的患者在4~5年追踪观察期结束后的结果。结果显示:该疗法在长期范围内能够保证安全性,同时能够降低4/5患者脊椎恶化的趋势。目前该临床项目正在进行中,没有发生严重不良事件。

现有临床试验虽然取得了一定成果,但大多是短期观察,尚缺乏长期的、全面观察的研究数据。hESCs在细胞分化方面也存在不同批次之间的差异。而且脊髓具有一个独特而又复杂的微环境,使功能重建变得非常困难。未来会有多种细胞类型用于脊髓损伤的治疗,如神经干细胞等^[73]。

3.5 心血管疾病

心脏是人体循环系统的动力器官,推动血液在心血管系统中循环流动,从而维持机体的生命活动。心血管疾病是指与心脏和血管相关的疾病,2014年中国心血管病报告概要显示,心血管疾病是我国主要的死亡原因之一,并且发病率呈逐年上升的趋势,特别是冠状动脉性心脏病(coronary heart disease, CHD),是我国居民的头号杀手。CHD患病率目前在我国处于持续上升阶段,2014年中国心血管病报告概要显示,2013年居民冠心病死亡率为100.86/10万,与2002年的35.56/10万相比明显上升。由于心脏缺少再生能力,随着病程进展,最终发展成心功能衰竭而导致患者死亡^[74-75]。

心血管疾病,尤其是心肌梗死等缺血性疾病,是一种严重威胁人类生命健康的疾病,不仅急性期病死率高,其远期预后也很差。心肌梗死是指冠状动脉急性闭塞血流中断所引起局部心肌的缺血性坏

死, 临床表现可有持久的胸骨后疼痛、休克、心律失常和心力衰竭, 并伴有血清心肌酶升高。心肌梗死主要是冠状动脉粥样硬化引起的血管逐渐狭窄或阻塞, 或(和)因冠状动脉功能性改变(痉挛)导致心肌供血不足, 而侧支循环未充分建立, 当意外使心脏血供急剧减少或中断时, 心肌严重而持久地急性缺血缺氧, 从而发生心肌梗死。目前的治疗方法包括药物和外科手术治疗, 可以在一定程度上改善心脏功能, 但是这些方法都不能逆转已经坏死的心肌细胞^[76], 也不能阻止心肌梗死后心室重构及心功能恶化^[76]。上世纪50年代, 心脏移植手术开始在临床上广泛开展^[77]。但是, 由于供体有限和配型问题, 每年仅有少数患者接受心脏移植。随着干细胞技术的发展, 细胞治疗开始进入临床医生的视野。hESCs可以分化为心肌细胞(human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes, hESC-CMs), 有望替代受损的心肌细胞, 从而实现心脏的再生^[78-79]。细胞治疗可应用于急性心肌梗死、缺血性心肌病、心脏移植后出现的缺血再灌注损伤以及其他心血管疾病的治疗。

2013年, 法国巴黎医院的科学家Menasche开始使用hESCs来源的心肌前体细胞(cardiac progenitor cells)治疗急性心脏病的临床试验。2015年, Menasche团队^[80]报道了第1例hESCs来源的心肌前体细胞治疗急性心脏病的临床实验结果。该团队选择了1例心功能III级的糖尿病老年患者, 在对患者做冠状动脉搭桥手术后, 将细胞补片贴用心包片固定在病变区的心室壁表面。手术后3个月, 患者的心功能得到明显改善。2018年, Menasche团队^[81]报道了hESCs来源的心肌前体细胞治疗急性心脏病的临床结果。该团队选择了6例急性心脏患者, 利用组织工程, 移植包含 $2 \times 10^7 \sim 10 \times 10^7$ hESCs来源心肌前体细胞的心肌补片, 1年后通过观察成瘤、心率失常和同种异体免疫, 评价该治疗方法的安全性。患者随访18个月, 除1例患者术后不久死于与治疗无关的因素外, 其他患者都没有观察到成瘤和心率失常现象, 其中3例患者发生了同种异体免疫反应, 试验结果显示所有患者的症状得到改善。该试验结果证明, hESCs来源的心肌细胞移植可以有效地改善患者的症状, 并且是安全的。

目前, 根据临床实验可以将细胞治疗心肌梗死分为4大类: 药物刺激诱导干细胞迁移募集在心肌梗死区、刺激心脏祖细胞的增殖, 但是, 这些促进心脏

再生的疗效还需进一步验证^[82-85]; 成体干细胞移植治疗实现心脏再生^[86]; 多能干细胞源心肌细胞系移植治疗心肌梗死, 可规模化、标准化地进行细胞制备, 是理想的种子细胞来源^[19,80]; 组织工程——将心肌细胞或其他类型细胞分别与材料混合做成心肌补片, 然后将补片固定在心脏病灶区, 可将大量的细胞滞留在移植部位并有效阻止细胞死亡, 可能是目前细胞移植的最有效途径^[87-90]。

近年来, 随着细胞大规模培养技术的开发和培养体系的逐步成熟^[91-92], 心肌细胞的大规模悬浮培养体系应用也得到了发展^[93-94]。通过代谢纯化方法, 使得大规模制备均质稳定的hESC-CMs成为可能, 从而满足临床治疗心脏疾病对细胞量的需求^[95]。

4 问题与挑战

虽然近十年来干细胞研究取得了巨大进展, 并为治疗许多难治愈疾病提供了新的可能。但是干细胞的应用仍面临许多问题, 有待解决。

4.1 功能细胞的临床前评价

临床前动物实验作为临床研究的基础和前提, 其结果的可靠性非常重要。动物试验要解决诸多科学问题。(1)哪种分化阶段的细胞更适合于移植。用分化早期的前体细胞, 还是用较成熟的细胞, 未来哪种细胞能够占据主导地位, 除了最终的治疗效果外, 还受到包括专利、政策、产品制剂化等多种因素的影响。(2)细胞递送的方式。对于某些疾病或细胞类型, 可以用静脉输注的方式进行临床治疗; 而对于多数神经疾病来说, 需要通过外科手术将细胞精准递送到颅内。因此, 即使干细胞治疗的安全性和有效性得到充分的验证, 如何进一步优化细胞递送路径, 尽可能减少手术创伤, 是有效推动细胞治疗广泛应用于临床的重要前提之一。(3)局部微环境。在细胞移植时, 需要充分考虑移植体与局部微环境的相互作用。一般而言, 发病早期的体内局部环境优于晚期, 年轻患者优于年老患者。在细胞移植时, 适当引入能保护细胞存活或促生长的生物材料, 或许可以改善微环境, 提高移植细胞的存活, 增强治疗效果。

4.2 细胞制备的质控及标准问题

尽管某些病例在移植后取得了很好的效果, 但由于我国干细胞治疗缺乏相关的技术规范、质控标准、伦理等, 研究相对滞后, hESCs分化功能细胞各

批次稳定性较差,造成移植物质量参差不齐;缺乏专门从事干细胞质控和标准研究的队伍和学术机构;缺乏标准化、规模化制备的细胞产品,细胞的工程化制备、鉴定、保存、分装、存储、运输、应用等面临着许多瓶颈问题。这导致干细胞制品用于治疗的可行性大大降低。

4.3 临床研究方案设计

hESCs临床治疗的有效性和安全性除了要保证干细胞制剂的质量外,干细胞的临床方案设计是很重要的一环。试验的科学性、完整性以及数据的可信性主要取决于试验设计,但由于干细胞这种创新型药物的试验设计,国内外经验不足,团队人员专业性不强,若试验设计时对受试者的选择、对照药物的选择、剂量选择、注射方法与效率、样本量、评价的疗效指标、安全性指标等任何一个环节把握不准确,就会导致设计的试验存在缺陷,如果设计不科学合理,就会导致临床试验失败,数据不可用,从而造成人、财、物资源的浪费。

4.4 临床研究评价指标

细胞最终的治疗效果依靠于细胞移植后在体内的存活和功能(如神经细胞的环路整合、突触连接、投射等),这些指标无法在体外模拟。hESCs分化来源的功能细胞治疗属于异体移植,体内移植后可能会出现免疫排斥的现象。移植到人体后的干细胞也不能像在动物模型实验中通过各种细胞标记及示踪技术进行活细胞体内分布、致瘤性/促瘤性等临床安全性和有效性评价。对于干细胞的临床评价体系,目前在国际上还没有一个统一的规范。

4.5 干细胞的储存管理

干细胞资源库是干细胞临床和产业转化的重要支撑。我国主要有三大类干细胞库,一是由科技部从战略资源角度支持建立的干细胞资源库;二是参照血库建立的脐血干细胞库;三是企业自主建立的干细胞库。总体而言,除科技部支持的干细胞资源库提前布局了临床级多能干细胞种子库外,多数细胞库侧重成体干细胞资源存储,在干细胞药物研发方面进展有限。因此,为了推动细胞治疗产业化,需要建立管理规范、质量可靠、规模化的便于统一质控的国家级干细胞库。

此外,我国干细胞研究虽然处在前列,但是大多是复制国外研究,创新能力较差,目前为止全球已经批准了十几种干细胞产品,我国还没有任何一款

细胞治疗产品投入市场。这些都影响了我国干细胞与再生医学研究和转化应用的健康发展。

5 总结与展望

干细胞制剂对人类健康保障和经济社会发展方面具有重要意义,因此,细胞治疗研究已成为世界各国政府以及科技界和产业界高度关注和大力投入的战略必争领域,目前国际竞争空前激烈。利用hESCs分化获得功能性细胞进行移植,在技术方面已取得重大突破。但若将其作为治疗产品,制备临床前评价效果好、批次间稳定性高、满足临床需要的细胞量,实现产业升级,建立规范和标准的操作及管理程序,利用机械设备进行自动化的干细胞大规模制备极为重要。

针对hESCs分化的功能细胞临床前评价,需要对基础科研加大投入。由于细胞产品有其独特的性质,因此套用化学药物的毒理、药效评价实验来证明干细胞的安全性是缺乏科学性的。我们需要针对细胞药物的特点建立包括干细胞种类、移植方式、移植后在动物模型中的安全性、免疫排斥、再生功能等评价标准及干细胞移植后体内分布、动态变化、致瘤性等功能性指标;建立干细胞、诱导分化细胞在动物体内分布及其动态变化和致瘤性/促瘤性等关键评价技术,进而建立相关干细胞临床前安全评价技术体系和评价规范。

针对干细胞制剂的缺乏国际通用的质控标准的问题,建立治疗性细胞制品标准化评估体系,推动干细胞治疗相关产品的行业标准与国家标准的颁布与实施,推动并完善质量评价管理体系建设,以指导干细胞临床转化、产品研发和产业发展。参考ISO90001质量管理体系,建立GMP级别的干细胞细胞制剂产品质量控制体系;对干细胞制备工艺流程进行CNAS认证,建立规范、标准、责任明确、数据互认的干细胞制备工艺;最终建立一整套从细胞制备到临床随访的标准质量控制流程。

针对干细胞制剂的制备问题,国家卫生健康委员会、食品药品监督管理总局共同或分别颁布了一批法规、原则和指导意见,明确细胞制品未来将按药品评审原则进行处理,未来胚胎干细胞以及分化的相关产品制剂制备过程要遵守GMP规范,对影响干细胞质量的人、机、料、法、环五大关键要素实施严格监控,避免污染、交叉污染以及混淆、差错

等风险, 确保持续稳定地制备出符合质量标准和预定用途的、具有唯一性和可追溯性的干细胞制剂。

针对干细胞临床研究的方案设计和评价指标问题, 我们需要参考传统化学药物的临床研究方案和评价标准, 包括随机化和对照分组、通过统计学分析估算样本量、自始至终的盲法观察和分析、利益冲突声明等。除此之外, 还要建立适合不同类型干细胞的标准化评估体系; 建立评价细胞安全性、有效性的方法和指标。

针对干细胞的储存问题, 目前国际组织、国家政府或科研机构发布了一系列旨在推动干细胞研究和储存统一化、标准化的国际倡议(计划), 这些国际倡议(计划)推动许多国家建立了国家干细胞库。我国应当建设以多能干细胞为主的国家级干细胞库, 旨在整合所有的干细胞资源, 建立干细胞及其产品制备的标准。利用现有资源, 在HLA配型的基础上, 筛选通用型干细胞或超级供体干细胞等, 使干细胞产品得到更广泛的应用。除此之外, 我们还应建立干细胞临床研究信息资源平台, 通过与信息技术的结合, 更加方便快捷地整合干细胞资源以及干细胞相关临床转化的信息, 在临床方案设计及临床评价方面实现信息共享。在国家干细胞库及干细胞临床研究信息资源平台的基础上, 成立干细胞深度研发基地, 加快干细胞规模化培养技术的研发及应用、促进安全有效的干细胞制剂相关医疗产品的临床应用及产业化发展, 使其符合国内及国际标准的干细胞药物研发与生产服务, 推动整个干细胞研究领域的快速发展。

总体来说, 干细胞治疗研究仍需要攻克无数的难关, 需要大量的临床前和临床研究对细胞治疗的安全性和有效性进行全面评价。可以预见, 在不久的将来, 像PD、SCI等由特定细胞病变引起的疾病将能通过细胞替代得到有效治疗。未来的疾病治疗将是基于干细胞与再生医学概念的更简单、有效、安全的综合治疗。细胞质量将会进一步提高, 移植物将趋向于模块化, 由目的细胞与营养细胞或生物材料组成的有效功能单元, 经过严格的质控和评价并能可能产品化。移植途径将会有新的革新, 微创、介入等新的技术将使患者对细胞移植的接受度进一步提高。原位细胞激活与修复, 体内转分化等目前尚处于探索阶段的治疗途径将会得到进一步发展并可能成为临床治疗的新的途径。

参考文献 (References)

- 1 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.
- 2 Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA. *In vitro* differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19(12): 1129-33.
- 3 Hu BY, Du ZW, Li XJ, Ayala M, Zhang SC. Human oligo-dendrocytes from embryonic stem cells: conserved SHH signaling networks and divergent FGF effects. *Development* 2009; 136(9): 1443-52.
- 4 Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, *et al.* Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells *in vitro*. *FEBS Lett* 2001; 497(1): 15-9.
- 5 Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science* 2001; 292(5520): 1389-94.
- 6 Sato T, Katagiri K, Gohbara A, Inoue K, Ogonuki N, Ogura A, *et al.* *In vitro* production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. *Nature* 2011; 471(7339): 504-7.
- 7 Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, Shimamoto S, Ohta H, Saitou M. Offspring from oocytes derived from *in vitro* primordial germ cell-like cells in mice. *Science* 2012; 338(6109): 971-5.
- 8 Keller G. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* 2005; 19(10): 1129-55.
- 9 Duan B, Kapetanovic E, Hockaday LA, Butcher JT. Three-dimensional printed trileaflet valve conduits using biological hydrogels and human valve interstitial cells. *Acta Biomater* 2014; 10(5): 1836-46.
- 10 Kang HW, Lee SJ, Ko IK, Kengla C, Yoo JJ, Atala A. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nat Biotechnol* 2016; 34(3): 312-9.
- 11 ISSCR Guidelines for the clinical translation of stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2009; Appendix 1: Appendix 1B.
- 12 International Stem Cell Banking I. Consensus guidance for banking and supply of human embryonic stem cell lines for research purposes. *Stem Cell Rev* 2009; 5(4): 301-14.
- 13 Trounson A, DeWitt ND. Pluripotent stem cells progressing to the clinic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17(3): 194-200.
- 14 Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 2005; 85(3): 845-81.
- 15 Cai J, Jiang WG, Grant MB, Boulton M. Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *J Biol Chem* 2006; 281(6): 3604-13.
- 16 Zhao B, Ma A, Cai J, Boulton M. VEGF-A regulates the expression of VEGF-C in human retinal pigment epithelial cells. *Br J Ophthalmol* 2006; 90(8): 1052-9.
- 17 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.
- 18 Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, Elliott D, Rosenfeld PJ,

- Gregori NZ, *et al.* Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* 2015; 385(9967): 509-16.
- 19 Song WK, Park KM, Kim HJ, Lee JH, Choi J, Chong SY, *et al.* Treatment of macular degeneration using embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium: preliminary results in Asian patients. *Stem Cell Rep* 2015; 4(5): 860-72.
 - 20 da Cruz L, Fynes K, Georgiadis O, Kerby J, Luo YH, Ahmado A, *et al.* Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nat Biotechnol* 2018; 36(4): 328-37.
 - 21 Kashani AH, Lebkowski JS, Rahhal FM, Avery RL, Salehi-Had H, Dang W, *et al.* A bioengineered retinal pigment epithelial monolayer for advanced, dry age-related macular degeneration. *Sci Transl Med* 2018; 10(435): ea04097.
 - 22 Liu Y, Xu HW, Wang L, Li SY, Zhao CJ, Hao J, *et al.* Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium transplants as a potential treatment for wet age-related macular degeneration. *Cell Discov* 2018; 4: 50.
 - 23 Rotenstreich Y, Fishman GA, Anderson RJ. Visual acuity loss and clinical observations in a large series of patients with stargardt disease. *Ophthalmology* 2003; 110(6): 1151-8.
 - 24 Glazer LC, Dryja TP. Understanding the etiology of Stargardt's disease. *Ophthalmol Clin North Am* 2002; 15(1): 93-100, viii.
 - 25 Sun K, Cai H, Tezel TH, Paik D, Gaillard ER, Del Priore LV. Bruch's membrane aging decreases phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium. *Mol Vis* 2007; 13: 2310-9.
 - 26 Tezel TH, Del Priore LV. Reattachment to a substrate prevents apoptosis of human retinal pigment epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997; 235(1): 41-7.
 - 27 Lindvall O, Kokaia Z. Stem cells for the treatment of neurological disorders. *Nature* 2006; 441(7097): 1094-6.
 - 28 Hoehn MM, Yahr MD. Parkinsonism: onset, progression and mortality. *Neurology* 1967; 17(5): 427-42.
 - 29 Prakash N, Wurst W. Development of dopaminergic neurons in the mammalian brain. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63(2): 187-206.
 - 30 Domingo A, Klein C. Genetics of Parkinson disease. *Handb Clin Neurol* 2018; 147: 211-27.
 - 31 Morris JG. A review of some aspects of the pharmacology of levodopa. *Clin Exp Neurol* 1978; 15: 24-50.
 - 32 Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med* 1998; 339(16): 1130-43.
 - 33 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.
 - 34 Mai Q, Yu Y, Li T, Wang L, Chen MJ, Huang SZ, *et al.* Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts. *Cell Res* 2007; 17(12): 1008-19.
 - 35 Turovets N, Semechkin A, Kuzmichev L, Janus J, Agapova L, Revazova E. Derivation of human parthenogenetic stem cell lines. *Methods Mol Bio* 2011; 767: 37-54.
 - 36 Hao J, Zhu W, Sheng C, Yu Y, Zhou Q. Human parthenogenetic embryonic stem cells: one potential resource for cell therapy. *Sci China C Life Sci* 2009; 52(7): 599-602.
 - 37 Barker RA, Parmar M, Kirkeby A, Bjorklund A, Thompson L, Brundin P. Are stem cell-based therapies for Parkinson's disease ready for the clinic in 2016? *J Parkinsons Dis* 2016; 6(1): 57-63.
 - 38 Doi D, Morizane A, Kikuchi T, Onoe H, Hayashi T, Kawasaki T, *et al.* Prolonged maturation culture favors a reduction in the tumorigenicity and the dopaminergic function of human ESC-derived neural cells in a primate model of Parkinson's disease. *Stem Cells* 2012; 30(5): 935-45.
 - 39 Samata B, Doi D, Nishimura K, Kikuchi T, Watanabe A, Sakamoto Y, *et al.* Purification of functional human ES and iPSC-derived midbrain dopaminergic progenitors using LRTM1. *Nat Commun* 2016; 7: 13097.
 - 40 Gonzalez R, Garitaonandia I, Abramihina T, Wambua GK, Ostrowska A, Brock M, *et al.* Deriving dopaminergic neurons for clinical use. A practical approach. *Sci Rep* 2013; 3: 1463.
 - 41 Kirkeby A, Grealish S, Wolf DA, Nelander J, Wood J, Lundblad M, *et al.* Generation of regionally specified neural progenitors and functional neurons from human embryonic stem cells under defined conditions. *Cell Rep* 2012; 1(6): 703-14.
 - 42 Gonzalez R, Garitaonandia I, Crain A, Poustovoitov M, Abramihina T, Noskov A, *et al.* Proof of concept studies exploring the safety and functional activity of human parthenogenetic-derived neural stem cells for the treatment of Parkinson's disease. *Cell Transplant* 2015; 24(4): 681-90.
 - 43 Garitaonandia I, Gonzalez R, Sherman G, Semechkin A, Evans A, Kern R. Novel approach to stem cell therapy in Parkinson's disease. *Stem Cells Dev* 2018; 27: 951-7.
 - 44 Wang YK, Zhu WW, Wu MH, Wu YH, Liu ZX, Liang LM, *et al.* Human clinical-grade parthenogenetic ESC-derived dopaminergic neurons recover locomotive defects of nonhuman primate models of Parkinson's disease. *Stem Cell Rep* 2018; 11(1): 171-82.
 - 45 Singh A, Tetreault L, Kalsi-Ryan S, Nouri A, Fehlings MG. Global prevalence and incidence of traumatic spinal cord injury. *Clin Epidemiol* 2014; 6: 309-31.
 - 46 Silva NA, Sousa N, Reis RL, Salgado AJ. From basics to clinical: a comprehensive review on spinal cord injury. *Prog Neurobiol* 2014; 114: 25-57.
 - 47 Papa S, Caron I, Erba E, Panini N, De Paola M, Mariani A, *et al.* Early modulation of pro-inflammatory microglia by minocycline loaded nanoparticles confers long lasting protection after spinal cord injury. *Biomaterials* 2016; 75: 13-24.
 - 48 Norenberg MD, Smith J, Marcillo A. The pathology of human spinal cord injury: defining the problems. *J Neurotrauma* 2004; 21(4): 429-40.
 - 49 Sharma HS. Pathophysiology of blood-spinal cord barrier in traumatic injury and repair. *Curr Pharm Des* 2005; 11(11): 1353-89.
 - 50 Varma AK, Das A, Wallace Gt, Barry J, Vertegel AA, Ray SK, *et al.* Spinal cord injury: a review of current therapy, future treatments, and basic science frontiers. *Neurochemical Res* 2013; 38(5): 895-905.
 - 51 Gorio A, Madaschi L, Di Stefano B, Carelli S, Di Giulio AM, De Biasi S, *et al.* Methylprednisolone neutralizes the beneficial effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(45): 16379-84.

- 52 Vitellaro-Zuccarello L, Mazzetti S, Madaschi L, Bosio P, Gorio A, De Biasi S. Erythropoietin-mediated preservation of the white matter in rat spinal cord injury. *Neuroscience* 2007; 144(3): 865-77.
- 53 Costa DD, Beghi E, Carignano P, Pagliacci C, Faccioli F, Pupillo E, *et al.* Tolerability and efficacy of erythropoietin (EPO) treatment in traumatic spinal cord injury: a preliminary randomized comparative trial vs. methylprednisolone (MP). *Neurol Sci* 2015; 36(9): 1567-74.
- 54 Zhai HW, Gong ZK, Sun J, Chen W, Zhang M, Zhou JJ, *et al.* Ganglioside with nerve growth factor for the recovery of extremity function following spinal cord injury and somatosensory evoked potential. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19(12): 2282-6.
- 55 Xu D, Yang L, Li Y, Sun Y. Clinical study of ganglioside (GM) combined with methylprednisolone (MP) for early acute spinal injury. *Pak J Pharm Sci* 2015; 28(2 Suppl): 701-4.
- 56 Kitzman PH. Effectiveness of riluzole in suppressing spasticity in the spinal cord injured rat. *Neurosci Lett* 2009; 455(2): 150-3.
- 57 Fehlings MG, Wilson JR, Frankowski RF, Toupes EG, Aarabi B, Harrop JS, *et al.* Riluzole for the treatment of acute traumatic spinal cord injury: rationale for and design of the NACTN Phase I clinical trial. *J Neurosurg Spine* 2012; 17(1 Suppl): 151-6.
- 58 Lord-Fontaine S, Yang F, Diep Q, Dergham P, Munzer S, Tremblay P, *et al.* Local inhibition of Rho signaling by cell-permeable recombinant protein BA-210 prevents secondary damage and promotes functional recovery following acute spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2008; 25(11): 1309-22.
- 59 Fehlings MG, Theodore N, Harrop J, Maurais G, Kuntz C, Shaffrey CI, *et al.* A phase I/IIa clinical trial of a recombinant Rho protein antagonist in acute spinal cord injury. *J Neurotrauma* 2011; 28(5): 787-96.
- 60 Casha S, Zygun D, McGowan MD, Bains I, Yong VW, Hurlbert RJ. Results of a phase II placebo-controlled randomized trial of minocycline in acute spinal cord injury. *Brain* 2012; 135(Pt 4): 1224-36.
- 61 Festoff BW, Ameenuddin S, Arnold PM, Wong A, Santacruz KS, Citron BA. Minocycline neuroprotects, reduces microgliosis, and inhibits caspase protease expression early after spinal cord injury. *J Neurochem* 2006; 97(5): 1314-26.
- 62 Stirling DP, Khodarahmi K, Liu J, McPhail LT, McBride CB, Steeves JD, *et al.* Minocycline treatment reduces delayed oligodendrocyte death, attenuates axonal dieback, and improves functional outcome after spinal cord injury. *J Neurosci* 2004; 24(9): 2182-90.
- 63 Cardenas DD, Ditunno J, Graziani V, Jackson AB, Lammertse D, Potter P, *et al.* Phase 2 trial of sustained-release fampridine in chronic spinal cord injury. *Spinal Cord* 2007; 45(2): 158-68.
- 64 Cardenas DD, Ditunno JF, Graziani V, McLain AB, Lammertse DP, Potter PJ, *et al.* Two phase 3, multicenter, randomized, placebo-controlled clinical trials of fampridine-SR for treatment of spasticity in chronic spinal cord injury. *Spinal Cord* 2014; 52(1): 70-6.
- 65 Marco RA, Kushwaha VP. Thoracolumbar burst fractures treated with posterior decompression and pedicle screw instrumentation supplemented with balloon-assisted vertebroplasty and calcium phosphate reconstruction. *J Bone Joint Surg Am* 2009; 91(1): 20-8.
- 66 Fehlings MG, Vaccaro A, Wilson JR, Singh A, Kushwaha WC, Harrop JS, *et al.* Early versus delayed decompression for traumatic cervical spinal cord injury: results of the Surgical Timing in Acute Spinal Cord Injury Study (STASCIS). *PLoS One* 2012; 7(2): e32037.
- 67 Shields RK, Dudley-Javoroski S, Law LA. Electrically induced muscle contractions influence bone density decline after spinal cord injury. *Spine* 2006; 31(5): 548-53.
- 68 Wong AM, Leong CP, Su TY, Yu SW, Tsai WC, Chen CP. Clinical trial of acupuncture for patients with spinal cord injuries. *Am J Phys Med Rehabil* 2003; 82(1): 21-7.
- 69 Sung DH, Yoon SD, Park GD. The effect of complex rehabilitation training for 12 weeks on trunk muscle function and spine deformation of patients with SCI. *J Phys Ther Sci* 2015; 27(3): 951-4.
- 70 Ramer LM, Ramer MS, Bradbury EJ. Restoring function after spinal cord injury: towards clinical translation of experimental strategies. *Lancet Neurol* 2014; 13(12): 1241-56.
- 71 Vismara I, Papa S, Rossi F, Forloni G, Vegliani P. Current options for cell therapy in spinal cord injury. *Trends Mol Med* 2017; 23(9): 831-49.
- 72 Bretzner F, Gilbert F, Baylis F, Brownstone RM. Target populations for first-in-human embryonic stem cell research in spinal cord injury. *Cell Stem Cell* 2011; 8(5): 468-75.
- 73 Rosenzweig ES, Brock JH, Lu P, Kumamaru H, Salegio EA, Kadoya K, *et al.* Restorative effects of human neural stem cell grafts on the primate spinal cord. *Nat Med* 2018; 24(4): 484-90.
- 74 Pasumarthi KB, Field LJ. Cardiomyocyte cell cycle regulation. *Circ Res* 2002; 90(1): 1044-54.
- 75 Rubart M, Field LJ. Cardiac regeneration: repopulating the heart. *Annu Rev Physiol* 2006; 68: 29-49.
- 76 Briffa T, Hickling S, Knuiman M, Hobbs M, Hung J, Sanfilippo FM, *et al.* Long term survival after evidence based treatment of acute myocardial infarction and revascularisation: follow-up of population based Perth MONICA cohort, 1984-2005. *BMJ* 2009; 338: b36.
- 77 Kantrowitz A. America's first human heart transplantation: the concept, the planning, and the furor. *ASAIO J* 1998; 44(4): 244-52.
- 78 Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, *et al.* Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001; 108(3): 407-14.
- 79 Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 2002; 91(6): 501-8.
- 80 Menasche P, Vanneau V, Hagege A, Bel A, Cholley B, Cacciapuoti I, *et al.* Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report. *Eur Heart J* 2015; 36(30): 2011-7.
- 81 Menasche P, Vanneau V, Hagege A, Bel A, Cholley B, Parouchev A, *et al.* Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiovascular progenitors for severe ischemic left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2018; 71(4): 429.
- 82 Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, *et al.* HMG-CoA reductase inhibitors (statins)

- increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest* 2001; 108(3): 391-7.
- 83 Landmesser U, Engberding N, Bahlmann FH, Schaefer A, Wiencke A, Heineke A, *et al.* Statin-induced improvement of endothelial progenitor cell mobilization, myocardial neovascularization, left ventricular function, and survival after experimental myocardial infarction requires endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 2004; 110(14): 1933-9.
 - 84 Bahlmann FH, de Groot K, Mueller O, Hertel B, Haller H, Fliser D. Stimulation of endothelial progenitor cells: a new putative therapeutic effect of angiotensin II receptor antagonists. *Hypertension* 2005; 45(4): 526-9.
 - 85 Wang CH, Verma S, Hsieh IC, Chen YJ, Kuo LT, Yang NI, *et al.* Enalapril increases ischemia-induced endothelial progenitor cell mobilization through manipulation of the CD26 system. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 41(1): 34-43.
 - 86 Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, *et al.* Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114(6): 763-76.
 - 87 Simpson D, Liu H, Fan TH, Nerem R, Dudley SC Jr. A tissue engineering approach to progenitor cell delivery results in significant cell engraftment and improved myocardial remodeling. *Stem Cells* 2007; 25(9): 2350-7.
 - 88 Sekiya N, Matsumiya G, Miyagawa S, Saito A, Shimizu T, Okano T, *et al.* Layered implantation of myoblast sheets attenuates adverse cardiac remodeling of the infarcted heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009; 138(4): 985-93.
 - 89 Bel A, Planat-Bernard V, Saito A, Bonnevie L, Bellamy V, Sababeh L, *et al.* Composite cell sheets: a further step toward safe and effective myocardial regeneration by cardiac progenitors derived from embryonic stem cells. *Circulation* 2010; 122(11 Suppl): S118-23.
 - 90 Stevens KR, Pabon L, Muskheli V, Murry CE. Scaffold-free human cardiac tissue patch created from embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A* 2009; 15(6): 1211-22.
 - 91 Wang Y, Chou BK, Dowey S, He C, Gerecht S, Cheng L. Scalable expansion of human induced pluripotent stem cells in the defined xeno-free E8 medium under adherent and suspension culture conditions. *Stem Cell Res* 2013; 11(3): 1103-16.
 - 92 Otsuji TG, Bin J, Yoshimura A, Tomura M, Tateyama D, Minami I, *et al.* A 3D sphere culture system containing functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production. *Stem Cell Reports* 2014; 2(5): 734-45.
 - 93 Jiang B, Xiang Z, Ai Z, Wang H, Li Y, Ji W, *et al.* Generation of cardiac spheres from primate pluripotent stem cells in a small molecule-based 3D system. *Biomaterials* 2015; 65: 103-14.
 - 94 Kempf H, Kropp C, Olmer R, Martin U, Zweigerdt R. Cardiac differentiation of human pluripotent stem cells in scalable suspension culture. *Nat Protoc* 2015; 10(9): 1345-61.
 - 95 Chong JJ, Yang X, Don CW, Minami E, Liu YW, Weyers JJ, *et al.* Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 2014; 510(7504): 273-7.