



李劲松研究员, 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所研究组长、细胞生物学国家重点实验室主任。主要从事细胞重编程与胚胎发育研究, 已发表论文70余篇, 其中作为通讯或共同通讯作者在*Cell*、*Nature*、*Cell Stem Cell*、*Cell Research*等杂志上发表22篇研究论文, 论文多次被*Nature*、*Cell*、*Nat Rev Genet*、*Cell Stem Cell*等作为研究亮点点评。实验室围绕细胞重编程与胚胎发育开展系统研究, 建立了小鼠孤雄单倍体胚胎干细胞(即“人造精子”), 证明其能代替精子使卵母细胞受精产生健康小鼠(即“半克隆技术”), 并利用“人造精子”携带CRISPR-Cas9文库实现了小鼠个体水平的遗传筛选; 证明CRISPR-Cas9技术在遗传疾病治疗中具有重要作用。研究成果先后入选2011年和2012年“中国科学十大进展”, 以“人造精子”为代表的细胞重编程的相关系统性研究荣获2017年上海市自然科学奖一等奖, 并为中国科学家主导开展的小鼠基因组标签计划(Genomic Tagging Project)奠定了理论与技术基础。

<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=65>

诱导多能干细胞的临床应用研究

瞿超 李劲松*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所/分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200031)

摘要 2006年与2007年, 小鼠和人诱导多能干细胞的依次建立实现了干细胞领域的重大突破。通过过表达四个多能性转录因子, 可以使体细胞重编程为诱导多能干细胞。与胚胎干细胞类似, 诱导多能干细胞同样具有自我更新与分化为三胚层的能力, 而且由于诱导多能干细胞来源于体细胞, 不需要以损坏胚胎为代价获得, 因此没有胚胎干细胞在来源上存在的伦理问题。此外, 用于治疗的细胞可以来源于患者本身, 一定程度降低了免疫排斥的风险。因此, 人诱导多能干细胞被广泛应用于临床研究。一些患者特异的疾病模型被建立, 新的药物被开发, 并且第一项基于诱导多能干细胞的细胞治疗的临床试验于2014年在日本开展。近年来, 基因编辑技术、三维类器官培养系统与诱导多能干细胞技术的结合, 进一步增强了诱导多能干细胞的临床应用。该文旨在综述诱导多能干细胞在临床应用, 尤其是疾病建模、药物开发与再生医学中的进展与仍然存在的挑战。

关键词 诱导多能干细胞; 临床应用; 疾病模型; 药物开发; 再生医学

Clinical Applications of Induced Pluripotent Stem Cells

Qu Chao, Li Jinsong*

(CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

国家自然科学基金(批准号: 31730062、81672117、31530048)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54921422, E-mail: jsli@sibcb.ac.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31730062, 81672117, 31530048)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921422, E-mail: jsli@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2019-01-17 16:41:30

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190117.1641.012.html>

Abstract In the year of 2006 and 2007, mouse and human induced pluripotent stem cells were established successively, which was seen as a great breakthrough in the stem cell field. Somatic cells can be reprogrammed to induced pluripotent stem cells by overexpressing four pluripotent transcription factors. While sharing the same capacities of self-renewing and differentiating into three germ layers as embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells were derived from somatic cells without breakage of embryos so that they were free from ethical issues which embryonic stem cells were born with. Besides, cells used for cell replacement therapy could be obtained from patients, which would reduce the risk of immune rejection to some extent. Induced pluripotent stem cells were thus broadly applied in clinical researches. Some patient-specific disease models were established and new drugs were discovered. The first clinical trial of cell replacement therapy based on induced pluripotent stem cells was conducted in Japan in 2014. Recently, the combination of gene-editing technology and three-dimension culture system with induced pluripotent stem cell technology have enhanced clinical applications of induced pluripotent stem cells. In this review, we aim at discussing the progress and remaining challenges of induced pluripotent stem cells in clinical applications, especially in diseases modelling, drug discovery and regenerative medicine.

Keywords induced pluripotent stem cells; clinical applications; disease models; drug discovery; regenerative medicine

2006年, Yamanaka实验室^[1]在24个候选因子中筛选到4个转录因子OCT4、SOX2、MYC和KLF4通过逆转录病毒载体将它们在小鼠成纤维细胞中过表达, 建立了小鼠诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)。Yamanaka也因此与体细胞核移植先驱Gurdon^[2]一起获得了2012年诺贝尔生理学或医学奖。紧接着2007年, 3个实验室分别通过在人体的体细胞中过表达同样的4个因子OCT4、SOX2、MYC和KLF4^[3-4]或者OCT4、SOX2、NANOG和LIN28^[5], 建立了人iPSCs(human induced pluripotent stem cells, hiPSCs)。hiPSCs拥有与胚胎干细胞(embryonic stem cells, ESCs)同样的分化潜能, 但hiPSCs因为从人的体细胞获得, 所以不仅拥有更充足的细胞来源, 而且不存在后者在来源上的伦理问题^[6], 并且因为可以由患者自身细胞产生, 所以具有更少的免疫排斥。此外, 相较于其他重编程技术, 比如体细胞核移植或者细胞融合, iPSCs技术获取重编程细胞的方法更加简单有效。iPSCs技术从诞生至今, 在重编程因子的选择、导入重编程因子的方式以及细胞培养条件上的广泛研究, 促使其建立和培养体系更加完善。重编程因子中除了更多的多能性转录因子被研究外, 细胞周期调控因子和一些影响表观修饰的因子都被用来提高重编程效率^[7]。导入因子的方式不仅影响重编程率, 还会影响产生的细胞的临床安全性。最初, iPSCs是通过具有基因组整合风险的逆转录病毒载体或者慢病毒载体诱导重编程因子过

表达产生。现在, 很多非整合的方法被使用, 其中, 外源DNAs^[8-9]、仙台病毒^[10]和合成的mRNAs^[11]因为相对简单高效, 最为常用^[7]。另外, 化学成分明确的培养基和重组基质蛋白被用于人诱导多能干细胞的培养, 避免了使用血清和动物源产品的临床风险^[12-14]。iPSCs的重要性不仅在于理念创新、逆转细胞命运, 更在于为一些难以治疗的疾病治疗带来希望。iPSCs在一定程度上是ESCs的替代品, 也是ESCs的延伸品。hiPSC的产生推动了包括疾病模型构建(尤其是患者特异性的疾病模型构建)、药物开发以及再生医学在内的临床应用的发展, 而且这种潜力才刚刚被开发。本文对这三方面的研究进展以及仍然存在的挑战进行具体综述。

1 iPSCs用于构建疾病模型

疾病模型是研究疾病发病机制以及药物开发的强大的工具。疾病模型对于模拟人类疾病的发生发展、寻找发病机制以及具有疗效的药物有非常大的帮助。iPSCs的出现给现有的疾病模型增加了更多的可能性。疾病模拟也是iPSCs目前在临床研究中的主要应用之一^[15-17]。利用iPSCs建模过程包括取出患者的体细胞, 将其重编程为iPSCs, 然后将其分化为疾病类型的细胞, 体外重现病理状态^[17](图1)。传统的细胞水平的疾病模型是二维(two-dimensional, 2D)的, 但是近年来, 三维(three-dimensional, 3D)类器官模型由于其更能反映人体真实的复杂状

况, 逐渐发展起来(图1)。

利用iPSCs建立的疾病模型主要有如下优势。首先, iPSCs来源的疾病模型不仅具有疾病模型的通用作用, 还能建立患者特异的疾病模型。这种来自于患者细胞的模型显然对随后的治疗具有更准确的指导作用。其次, 人源模型更准确地反映疾病的真实情况。长久以来, 小鼠模型都是研究人类疾病的重要动物模型, 然而, 很多研究显示, 小鼠模型不能完全模拟人疾病的所有表型。比如, 虽然已经建立了很多阿尔兹海默症(Alzheimer's disease, AD)的小鼠模型, 但实际上没有一种完全展示了患者的全部病理表现^[18-19]。小鼠和人有80%的同源基因^[20], 但仍存在20%的不同。因此, 物种之间存在的基因差异可能是小鼠和人在某些疾病生物学上仍然存在不完全相同表型的原因。利用患者本身的细胞或组织产生的iPSCs, 可以避免出现上述的问题。再者, 某些具有病理表型的人的细胞或者组织是很难获得或者制备的, iPSCs技术对于建立这些疾病的模型有很大优势^[21]。这些疾病主要是一些退行性疾病, 比

如AD、帕金森综合征(Parkinson's disease, PD)和肌萎缩性脊髓侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)以及一些散发性型或者复杂未知遗传因素诱发的疾病, 比如自闭症谱系障碍(autism spectrum disorders, ASD)和I型糖尿病(type I diabetes, T1D)^[21]。即使可以获得一些具有表型的人原代细胞, 这些细胞分裂能力有限甚至有些无法再分裂, 细胞数目十分有限, 限制了其后续的研究和应用。使用iPSCs技术可以使得这些具有表型的细胞重新获得增殖的能力, 从而获取更多的具有疾病表型的用于研究的细胞。

目前, 利用hiPSCs建立的模型已经有很多, 囊括了神经^[22-24]、血液^[25]、心血管^[26]、胰腺^[27]以及肝脏^[28]等的相关疾病模型。早期利用hiPSCs建立模型时, 大量单基因疾病模型被建立。比如, 在神经疾病中, 脊髓性肌萎缩(spinal muscular atrophy, SMA)是一种最常见的导致婴儿死亡的遗传疾病之一。SMN1(survival of motor neuron 1, telomeric)基因的表达缺失会导致SMA, 利用来自患者的iPSCs分化成

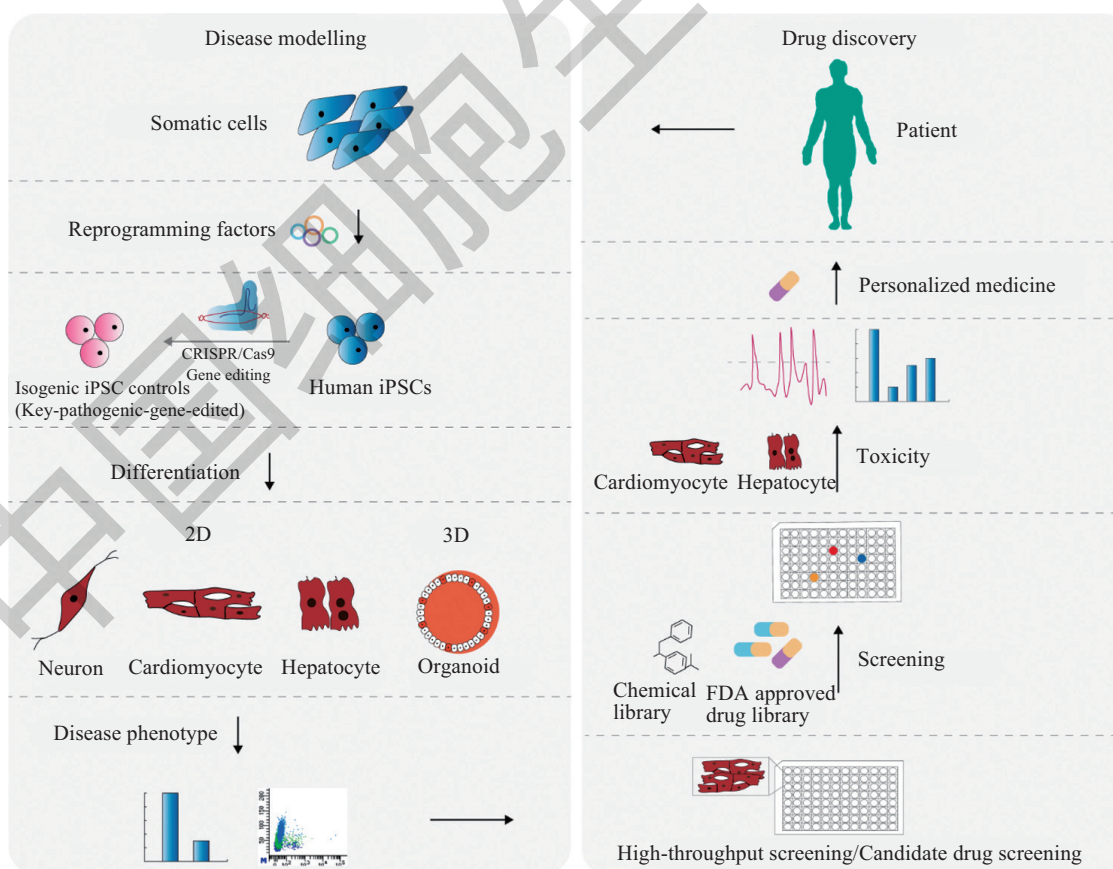


图1 基于hiPSC的疾病建模和药物开发的示意图

Fig.1 A schematic of human iPSC-based diseases modelling and drug discovery

的运动神经元表现出了相应的疾病表型, 即比正常的对照会出现更快的退化现象^[23]。神经系统相关疾病中还有一种瑞特综合征(Rett syndrome), 它是由X染色体连锁基因编码的MeCP2(methyl-CpG binding protein 2)蛋白突变导致的疾病^[29], 患者被认为也属于ASD患者。当与正常人ESCs或者iPSCs相比时, 来自瑞特综合征患者的iPSCs建立的模型模拟出了该病在结构和电生理功能上表现出的缺陷^[24]。在心血管疾病中, *KCNH2*(potassium voltage-gated channel subfamily H member 2)基因中第614位丙氨酸到缬氨酸(A614V)的错义突变会导致II型长QT综合征(long QT syndrome, LQTS)的发生。与健康对照细胞相比, II型LQTS患者iPSCs分化来的心肌细胞显示出了动作电位持续时间的显著延长以及显著的致心律失常^[26]。对于一些复杂疾病, 当存在不同的致病原因时, 单基因病因类型被研究得更多。比如, *SOD1*(superoxide dismutase 1)突变导致的ALS模型^[30]或者*PARK2*(parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase)突变导致的PD模型^[31]。尽管如此, 一些复杂基因疾病、散发性疾病的模型也被建立。AD是一种常见的神经退行性疾病, 病理表现为患者大脑中淀粉样斑块和神经元纤维缠结增加^[32]。有很多家系性AD的模型被建立, 但是也有散发性AD的模型被建立。其中一项报道显示, 2位散发性AD患者中, 仅有1位患者的iPSCs分化的神经元有类似家系性AD患者的表型^[33]。这暗示, 散发性AD的病理机制与家系性AD有一定的相关性, 同时, 也存在一些未知的遗传突变导致了散发性AD的表型的不一致。迟发型疾病PD是一种年龄依赖的神经退行性疾病, 主要症状是多巴胺神经元的进程性丢失^[34]。由于预期寿命逐渐增加, PD正在成为社会日益增长的负担, 而且大部分PD都是散发类型^[35], *LRRK2*(leucine rich repeat kinase 2)基因第2 019位甘氨酸到丝氨酸(G2019S)的突变是最常见的导致显性家系性PD以及高达2%散发性PD的原因^[36]。利用iPSCs不仅建立了家系性PD模型^[37], 也建立了散发性PD模型^[38]。

建立基于iPSCs技术的疾病模型其中一个主要的障碍是区分致病突变与遗传背景的影响^[39]。在疾病模拟过程中, 检测到的患者和健康对照iPSCs分化来的细胞之间的差异可能并不是疾病相关的表型差异, 而是不同的iPS细胞系之间的差异导致的^[40]。来自于同一个患者的不同iPSCs克隆间也可能因为

不完全重编程, 存在分化能力的差异^[41]。CRISPR/Cas9(clustered regularly interspersed short palindromic repeats/CRISPR-associated 9)技术的发展使得基因编辑变得简单高效, 因此可以通过使用CRISPR/Cas9技术对关键致病位点进行基因编辑, 获得同基因背景的对照, 从而排除机制研究中不同细胞系以及不同克隆间基因组或者表观多样性带来的研究干扰(图1)。比如近期的报道, 使用致病基因*SOD1*和*FUS*(FUS RNA binding protein)被CRISPR/Cas9系统修复后的患者特异的iPSCs作为同基因背景对照, 来研究家族性ALS^[42]。在做全基因组RNA测序后, 找到了899个异常的转录本^[42]。虽然, CRISPR/Cas9基因编辑技术仍然存在一些诸如脱靶问题的争议, 但随着该领域研究的深入, 相应的基因编辑体系一定会更加优化。然而, 上述结合CRISPR/Cas9基因编辑技术的解决方案依赖于关键致病位点的确定, 且iPSCs克隆间差异性的问题仍然反映出重编程体系的不完善, 需要更深入的研究来探索优化。

此外, 关于iPSCs的多能性和分化潜能是否与ESC相同或至少相当, 仍然存在怀疑。研究表明, 重编程后来自原始细胞的表现遗传信号仍保留在iPSCs中, 而残存的表现记忆可能影响细胞的分化能力, 这使其更倾向于分化为其来源的细胞类型^[43-45]。这也从另一方面反映出重编程体系仍然不够成熟。尽管如此, 这种表现记忆残存具有双面性。有研究提出, 这种情况可能对再生医学有利^[43], 且使用人ESCs和iPSCs建立的疾病模型展现了类似的表型, 并未因为可能的表现不同受到影响^[46]。但也有研究认为, 这样可能会使产生不同类型细胞的分化方案变得复杂^[47-48]。因此, 在使用iPSCs的过程中, 可能需要具体情况具体分析, 且重编程过程中表观事件发生的机制仍需要进一步的阐释。

目前, 大多数iPSCs疾病模型使用的是传统的2D模型, 2D的iPSCs模型已被广泛应用于研究单基因疾病以及多基因疾病中^[49]。但相对于增加了生物工程和细胞间自我组织形成的3D, 甚至由多种3D类器官组成的四维(four-dimensional, 4D)模型而言, 所有2D模型都存在的不足是不能表现生物体本身复杂性。由于不同类型细胞间相互作用也可能在疾病发生中起重要作用, 2D模型也许不能揭示疾病病理的复杂性。这也可能是缺乏3D环境的很多2D的iPSCs的衍生物不成熟更像胎儿细胞而非

成人细胞的原因^[50]。3D类器官技术正处在蓬勃发展的阶段,但是相比于传统的2D模型,它已经更加流行了^[51]。目前使用hiPSCs建立的类器官模型包括与脑^[52]、肝脏^[53]、胰腺^[54]、肠^[55]、肾^[56]、肺^[57]和视网膜^[58]等疾病相关的类器官模型。尽管如此,目前体外类器官存在缺乏血管形成的问题。缺乏血管会使类器官营养供应受限,最终影响其生长潜力以及成熟^[59]。目前已经采取多种方法来尝试解决它,比如与内皮细胞共培养,使类器官中生长出血管样的网络^[60]。此外,仍然需要对细胞与胞外基质、细胞与细胞间的相互作用有更深入的理解,从而开发出标准的类器官培养体系以及更明确的胞外基质,以保证建立更精确的、可重复的、用于临床研究的疾病模型^[61]。

2 iPSCs用于药物开发

建立人类疾病模型的最终目的是为了研究疾病的发病机制,从而帮助找到药物治疗疾病以及药物开发。新药开发的周期一般很长,同时需要巨大的经费投入。每一个上市的新药的背后都是无数次上市前失败的经验,这也是造成新药开发巨大成本的原因之一^[62]。上市新药一般会经历以下过程,首先寻找在细胞水平有效且无毒的化合物,然后依次进行临床前的优化与测试,以及进入随后的临床I期、II期和III期试验^[63]。每个阶段都有大量候选药物被淘汰,且90%的进入临床的药物未能获得批准,不仅如此,被批准的药物也可能因为后续发现药效不够好或者有毒性而被撤除^[62]。这些问题暴露出药物开发方面存在的一些问题。基于hiPSCs的疾病模型因能更准确地反映人体内的情况,以及可以提供与临床更相关的数据而备受关注,所以对其相关的研究已有很多。

iPSCs在药物开发上的应用主要集中在筛选有效化合物以及测试药物的毒性上(图1)。在有效性药物筛选上,主要有两种筛选策略。首先,小范围筛选化合物筛选。这是一种基于对该疾病有一定研究积累的筛选策略,比如,对于某一信号通路起作用或者对于有类似疾病表型的有效化合物已经被筛选到,甚至这些药物可能包括已经被美国食品药品监督管理局(Food And Drug Administration, FDA)批准的化合物。在这种筛选策略中,发掘FDA已经批准的药物的新功能,有很大的时间和金钱成本优势,

因为之前的临床前数据,比如化合物毒性、生物药效率、半衰期、药物优化以及相关测试的情况都可以直接作为当下临床前的数据参考^[64]。因此,测试的药物如果是已经在另外一个疾病上被FDA批准的药物,临床试验或许会以相对快的速度展开。*FGFR3*(fibroblast growth factor receptor 3)的突变导致骨骼发育不良[如I型致死性骨发育不全(thanatophoric dysplasia, TD1)和软骨发育不全(achondroplasia, ACH)]^[65-67]。研究者将来自TD1和ACH患者的成纤维细胞重编程为iPSCs,发现患者来源的iPSCs的软骨分化过程中会有软骨退化的形成。将这个表型作为需要修复的表型,从已报道的影响*FGFR3*的信号通路或者软骨分化的化合物中筛选能修复该表型的化合物,其中,他汀类药物由于曾经被报道对软骨的合成有影响而被囊括其中^[65]。最终,研究者发现,他汀类药物可以修复TD1和ACH患者来源的iPSCs,从而展现出软骨分化过程中的软骨降解的表型,且他汀类药物已经被大量患者服用多年,因此有大量关于其安全性的信息^[65]。由于筛选范围小,因此对小范围候选化合物筛选处理后的细胞进行比较复杂的表型分析相对于大规模筛选更现实^[46]。利用iPSCs技术实现个性化精准医疗也是基于这种策略^[46]。不同的患者对同一种药物的反应可能不同,在治疗前,可以先用患者来源的细胞对治疗该疾病的几种药物进行预测或筛选,从而找到对该患者最有效的药物,从而达到精准用药的目的^[46]。

相比之下,大规模高通量筛选则是相对盲目的筛选,通常每次会使用由成千上万的化合物组成的库进行筛选^[68]。但是进行高通量筛选需要具有易高通量判断的表型,比如荧光蛋白的表达。对于一些需要复杂检测手段(如电生理)检测处理后的细胞表型的筛选,则很有挑战^[46]。ALS是一种成年发病的复杂遗传性神经退行性疾病,患者中大约10%是家族性的,90%是散发性的,遗传病因基因不明^[69]。散发性ALS患者最常见的病因是TDP-43(TAR DNA binding protein)的异常^[30]。Burkhardt等^[30]用散发性ALS患者的成纤维细胞重编程为iPSCs,并分化为有疾病表型的神经元作为细胞模型,随后以TDP-43表达情况为标准,使用定制的机器人自动筛选系统,从1 757个活性化合物中筛选到了四类化合物:细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂(cyclin-dependent kinase

inhibitors, CDK inhibitors)、c-Jun N-末端激酶抑制剂(c-Jun N-terminal kinase inhibitors, JNK inhibitors)、雷公藤甲素(Triptolide)和强心苷(cardiac glycosides)。该研究证明了使用患者特异iPSCs进行药物有效性筛选的可能性, 同时为TDP-43异常等导致的ALS的治疗带来了希望^[30]。

许多药物临床后期失败或者上市后被撤回, 是因为其产生了未预料到的副作用。对人类细胞有特异毒性的复合物可能在动物模型中无法检测出。除了人和动物生理方面不同, 这些临床失败也可能是由于不同物种中疾病发生的机制和发展的差异引起的。利用hiPSCs来源的模型, 可以测试不同遗传背景患者的不良药物反应, 弥补了使用传统的动物模型进行药物安全性测定可能存在的缺陷。

药物诱导的肝损伤是在临床前和早期临床药物开发中有潜力的新药失败的常见原因^[70]。肝中表达的各种细胞色素P450(cytochrome P450, CYP)中, CYP2D6与很多商业化药物的代谢有关, 其遗传多态性导致个体间药物代谢能力的差异^[71]。通过建立细胞色素基因多样化的hiPSCs来源的人肝样细胞, Takayama等^[72]发现, 它们与原代人肝细胞相比, 保留了供体特异性CYP活性水平和药物反应性, 由此证明, hiPSCs衍生的肝细胞可以用于预测个体间肝脏药物代谢能力以及药物反应的差异。

心脏毒性也是药物被撤回的主要原因之一, 其造成近1/3的药物开发失败^[73]。在一项报道中, Liang等^[74]建立了各种遗传性心脏疾病患者的iPSCs, 包括: 遗传性长QT综合征(hereditary long QT syndrome,

LQT)、家族性肥厚性心肌病(familial hypertrophic cardiomyopathy, HCM)和家族性扩张型心肌病(familial dilated cardiomyopathy, DCM)。他们发现, 与正常人对照相比, 来自这些患者特异性iPSCs的心肌细胞对于心肌药物的副作用会更加敏感, 证明了iPSCs来源的模型在模拟不同遗传背景下的患者对药物代谢和毒性敏感性方面的价值^[74]。

iPSCs用于药物开发的作用依赖于疾病模型的建立, 因此只是对于一些分化条件成熟、细胞水平能重现疾病表型的模型具有药物开发的功能。然而, 正如本文上一节中, 对于iPSCs用于疾病模型中存在的障碍的讨论, 目前存在的细胞间异质性以及分化条件不完善等, 都会影响iPSCs在药物开发上的应用。iPSCs用于药物开发需要基于iPSCs的疾病模型进一步的发展。

3 iPSCs用于再生医学

再生医学这一术语于1992年首次被Kaiser^[75]在一篇医院管理的文章中使用。它是指取代或再生人类细胞、组织或器官, 以恢复或建立正常的功能^[76]。iPSCs用于再生医学主要是指获得iPSCs通过定向分化的细胞进行注射, 也称为细胞疗法(图2)。多能干细胞用于再生医学要追溯到1998年Thomson等^[77]首次建立人胚胎干细胞。多能干细胞不仅具有无限自我更新的能力, 还有分化成机体任意细胞的能力, 因此促进了再生医学的发展。iPSCs之所以继ESCs后, 在再生医学上被寄予很大希望, 其中最显著的原因是, 用于治疗的细胞可以是来源于患者自身的细胞在体外重

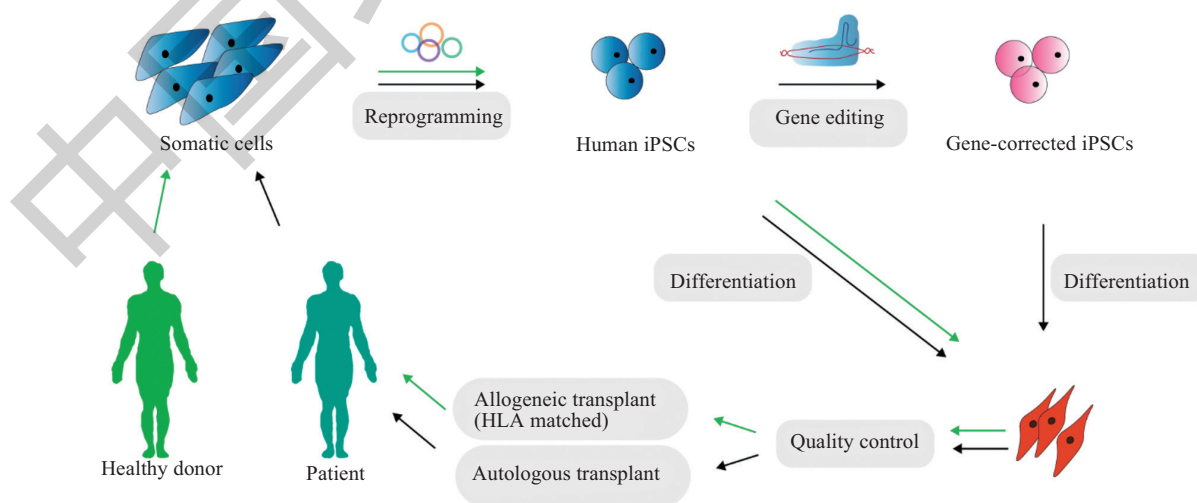


图2 基于hiPSC的细胞疗法的示意图

Fig.2 A schematic of human iPSC-based cell therapy

编程以及分化后产生的。这样可以避免异体移植产生的免疫排斥^[78],且可能可以消除对终身免疫抑制药物的需求。近年来,人类白细胞抗原(human leukocyte antigen, HLA)类型匹配的同种异体移植也被考虑到iPSCs在再生医学的应用中(图2)。自从iPSCs出现,对于其在再生医学上的应用尝试就开始了。2007年, Hanna等^[79]将进行了基因修复的人源化镰状细胞性贫血小鼠模型来源的iPSCs分化成的造血祖细胞移植回小鼠模型体内,8周后观察到,移回体内的细胞重建了镰状细胞性贫血小鼠的造血系统,并且血红蛋白功能得到了恢复。2008年,PD模型大鼠被移植入iPSCs分化来的神经前体细胞,其多巴胺功能和行为症状都得到了改善,而且几乎没有免疫排斥反应^[80]。2017年8月的一项研究中,日本科学家将hiPSCs分化来的多巴胺能祖细胞移植到灵长类食蟹猴PD模型中,成功控制其帕金森症状两年,而且没有形成任何肿瘤^[81]。啮齿类以及非人灵长类动物实验的成功显示了iPSCs在临床再生医学应用的可能。

然而,相较于iPSCs在前两方面应用的发展,其在再生医学上的应用虽很有潜力,但实际报道的临床试验并不多。正如所有研究从实验室走向常规的临床应用都要经历的一样,iPSCs也正处于这个艰难的过程之中。2014年9月,第一项hiPSCs来源的临床试验在日本进行。2位患有年龄相关的黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)的患者的皮肤细胞被取出,体外重编程后分化为视网膜色素上皮(retinal pigment epithelial, RPE)用于移植,来治疗AMD^[82]。第1位患者进行了移植手术,长达一年的研究以及第二年的评估结论是,该患者基于iPSCs的自体移植是安全可行的^[82]。另外,虽然该患者术后最佳矫正视力没有改善,但在整个期间都维持在0.1的水平,没有下降。而第2位患者的iPSCs以及重编程来的RPE细胞中观察到了X染色体上3个基因片段缺失,由于担心潜在的影响,且该患者的新生血管膜对抗血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的治疗有中度应答,因而没有对该患者进行移植手术^[82]。2014年11月,日本颁布了再生医学法,要求再生医学的临床研究计划由医疗机构提交,而不是由研究机构提交,所以该项目也停止了对患者的招募^[82]。

尽管获得了一些进展,但是在临床前仍然有些障碍需要解决。只有解决了这些问题,才能促进

iPSCs在常规临床中的应用。

首先是安全性问题。安全性问题其一是成瘤性与细胞异质性问题。整个iPSCs的产生、维持和分化过程是否有造成基因突变,细胞是否完全分化为所需的细胞类型均与成瘤性密切相关^[83]。最近的一项研究表明,细胞重编程过程不会增加遗传突变发生的概率^[84]。但临床前,对于细胞是否突变以及完全分化仍需要进行严格的筛查和测定。如果存在未分化的细胞,哪怕数量很少,都有形成畸胎瘤的风险。同时,如果重编程和分化后的细胞存在很大的异质性,治疗的成功也可能因此受到限制^[85]。目前基于细胞特异的表面标记物进行流式分选来纯化细胞,以及用动物模型测试细胞成瘤性的风险^[41]。然而,基于细胞特异性表面标记物的分选依赖于对该细胞的充分研究。目前并非所有细胞都找到了其特异的表面标记物。有报道称,合成的microRNA开关(microRNA switches)可以基于microRNA的活性,纯化别的方法难以纯化的细胞,甚至有的情况下不需要进行细胞分选^[86]。安全性问题其二是免疫排斥问题。尽管我们一直认为,自体移植不会有免疫排斥反应,然而,实际在小鼠上进行的一系列研究表明,自体移植是否存在免疫排斥是有争议的^[87]。由于可能存在的表观记忆残留以及基因组改变,iPSCs的体细胞来源以及产生方法对于产生的iPSCs及其衍生物的免疫原性都会有影响,选择合适的产生iPSCs的体细胞来源以及方法很重要^[87]。此外,鉴定hiPSCs以及其衍生物的固有免疫原性对于开发安全有效的细胞替代疗法非常必要^[87]。

再者,建立每个特定患者的临床级iPSCs的费用高、时间久^[88-89]。从建成到测试以及扩大培养,每个iPS细胞系估计要花费10 000到20 000美元,而要建立满足药品生产质量管理规范(Good Manufacturing Practice, GMP)标准的细胞系的花费甚至将近800 000美元^[88]。如果定制iPSCs的需求变得普遍,那么费用问题将成为很大的障碍。此外,产生足够数量的用于移植的细胞要花费数月,为确保安全性进行的基因组测序等又会花费额外的时间,使得iPSCs对于急性病等的细胞治疗实用性很低^[89]。建立同种异体的iPS细胞系库可能有助于解决这个问题。虽然这样看起来有悖于最初提出的个性化iPS细胞疗法,但这不失为在费用未能下降前的折中方案,而且可以因此及时获得统一质量标准的充足的细胞。其应用过

程如图2所示。HLA类型的匹配程度是决定同种异体移植的免疫排斥反应高低的重要因素, HLA匹配程度越高, 免疫排斥反应越小。通过计算估计, 将近75和140个不同的纯合HLA供体建立的iPS细胞系分别可以匹配大约80%和90%的日本人群, 而大概分别需要从64 000和160 000个人中才能找到75和140个不重复的HLA供体^[9]。2012年, 在一项iPS细胞库项目中, 日本卫生部授权Shinya Yamanaka从全国各地的胎儿脐带血样本中建立iPSCs^[90]。同年, 类似的研究估计, 从150个不同的纯合HLA供体建立的iPS细胞系可以在最小的免疫排斥反应下, 匹配93%的英国人群^[91]。最近, 韩国科学家根据本国的造血干细胞库数据, 对韩国人群中最常见的纯合HLA类型进行了分类, 并建立了13个纯合的GMP级别的iPS细胞系^[92]。第一项利用供体iPSCs获得的RPE细胞进行同种异体移植治疗AMD的临床手术于2017年3月底在日本顺利完成^[93]。1位60多岁的AMD男性患者接受了与其HLA很匹配的健康供体来源的iPSCs制成的视网膜细胞的移植^[93]。执行该临床试验的团队计划两年内至少对5名患者进行移植手术^[93]。但是2018年1月该团队称, 1位接受了同种异体视网膜细胞移植手术的患者视网膜出现了肿胀^[94]。这是首次iPSCs用于细胞治疗的严重不良反应, 发生不良反应的原因还没完全确定, 但该团队认为, 水肿是由于液体中含有iPSCs来源的视网膜细胞导致的液体逆流造成的, 并不意味着iPSCs有排斥反应或副作用, 而是在预防逆流方面还有改进的空间^[94]。

4 结语

自iPSCs产生以来, 因其有与ESC类类似的多能性特征, 但又不存在ESC的有限来源与伦理问题, 同时在免疫耐受性和个性化干预治疗方面拥有优势, 而被寄予了很大的期望。iPSCs在疾病模型、药物开发以及再生医学领域的一系列应用潜力被开发, 且这种潜力因为基因编辑技术以及3D培养技术的发展得到了更大的挖掘。然而, 到目前为止, iPSCs技术的应用潜力并未充分实现, 尤其是在再生医学领域的实际应用仍然很少。文中讨论到的iPSCs应用存在的问题的解决, 尤其是安全性问题的解决, 将会进一步促进其潜力的发挥。总体来说, iPSCs的临床应用仍然是一大热点。我们期待iPSCs在临床应用方面有更多的进展。

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 Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 1962; 10: 622-40.
- 3 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.
- 4 Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, *et al.* Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008; 451(7175): 141-6.
- 5 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: 1917-20.
- 6 de Wert G, Mummery C. Human embryonic stem cells: research, ethics and policy. *Hum Reprod* 2003; 18(5858): 672-82.
- 7 Takahashi K, Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17(4): 183-93.
- 8 Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin, II, *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009; 324(3): 797-801.
- 9 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: 409-12.
- 10 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(5): 348-62.
- 11 Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, *et al.* Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010; 7(8): 618-30.
- 12 Miyazaki T, Futaki S, Suemori H, Taniguchi Y, Yamada M, Kawasaki M, *et al.* Laminin E8 fragments support efficient adhesion and expansion of dissociated human pluripotent stem cells. *Nat Commun* 2012; 3: 1236.
- 13 Nakagawa M, Taniguchi Y, Senda S, Takizawa N, Ichisaka T, Asano K, *et al.* A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells. *Sci Rep* 2014; 4: 3594.
- 14 Chen G, Gulbranson DR, Hou Z, Bolin JM, Ruotti V, Probasco MD, *et al.* Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. *Nat Methods* 2011; 8(5): 424-9.
- 15 Grskovic M, Javaherian A, Strulovici B, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells—opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2011; 10: 915-29.
- 16 Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 2012; 481(7381): 295-305.
- 17 Tiscornia G, Vivas EL, Izpisua Belmonte JC. Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells. *Nat Med* 2011; 17(12): 1570-6.
- 18 Onos KD, Sukoff Rizzo SJ, Howell GR, Sasner M. Toward more

- predictive genetic mouse models of Alzheimer's disease. *Brain Res Bull* 2016; 122: 1-11.
- 19 Puzzo D, Gulisano W, Palmeri A, Arancio O. Rodent models for Alzheimer's disease drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* 2015; 10(7): 703-11.
 - 20 Church DM, Goodstadt L, Hillier LW, Zody MC, Goldstein S, She X, *et al.* Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol* 2009; 7(5): e1000112.
 - 21 Song M, Paul S, Lim H, Dayem AA, Cho SG. Induced pluripotent stem cell research: a revolutionary approach to face the challenges in drug screening. *Arch Pharm Res* 2012; 35(2): 245-60.
 - 22 DeRosa BA, Van Baaren JM, Dubey GK, Lee JM, Cuccaro ML, Vance JM, *et al.* Derivation of autism spectrum disorder-specific induced pluripotent stem cells from peripheral blood mononuclear cells. *Neurosci Lett* 2012; 516(1): 9-14.
 - 23 Ebert AD, Yu J, Rose FF, Jr., Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, *et al.* Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009; 457(7277): 277-80.
 - 24 Marchetto MC, Carroumeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, *et al.* A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 2010; 143(4): 527-39.
 - 25 Raya A, Rodriguez-Piza I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, *et al.* Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 460(7251): 53-9.
 - 26 Itzhaki I, Maizels L, Huber I, Zwi-Dantsis L, Caspi O, Winterstern A, *et al.* Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 471(7337): 225-9.
 - 27 Maehr R, Chen S, Snitow M, Ludwig T, Yagasaki L, Goland R, *et al.* Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(37): 15768-73.
 - 28 Rashid ST, Corbiveau S, Hannan N, Marciniak SJ, Miranda E, Alexander G, *et al.* Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 2010; 120(9): 3127-36.
 - 29 Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999; 23(2): 185-8.
 - 30 Burkhardt MF, Martinez FJ, Wright S, Ramos C, Volfson D, Mason M, *et al.* A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Mol Cell Neurosci* 2013; 56: 355-64.
 - 31 Ren Y, Jiang H, Hu Z, Fan K, Wang J, Janoschka S, *et al.* Parkinson mutations reduce the complexity of neuronal processes in iPSC-derived human neurons. *Stem Cells* 2015; 13(1): 68-78.
 - 32 Tanzi RE, Bertram L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: a genetic perspective. *Cell* 2005; 120(4): 545-55.
 - 33 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.
 - 34 Wirdefeldt K, Adami HO, Cole P, Trichopoulos D, Mandel J. Epidemiology and etiology of Parkinson's disease: a review of the evidence. *Eur J Epidemiol* 2011; 26 Suppl 1: S1-S8.
 - 35 Lesage S, Brice A. Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet* 2009; 18(R1): R48-59.
 - 36 Cookson MR. The role of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in Parkinson's disease. *Nat Rev Neurosci* 2010; 11(12): 791-7.
 - 37 Nguyen HN, Byers B, Cord B, Shcheglovitov A, Byrne J, Gujar P, *et al.* LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell* 2011; 8(3): 267-80.
 - 38 Sanchez-Danes A, Richaud-Patin Y, Carballo-Carbajal I, Jimenez-Delgado S, Caig C, Mora S, *et al.* Disease-specific phenotypes in dopamine neurons from human iPS-based models of genetic and sporadic Parkinson's disease. *EMBO Mol Med* 2012; 4(5): 380-95.
 - 39 Ben Jehuda R, Shemer Y, Binah O. Genome Editing in Induced Pluripotent Stem Cells using CRISPR/Cas9. *Stem Cell Rev* 2018; 14(3): 323-36.
 - 40 Hockemeyer D, Jaenisch R. Induced pluripotent stem cells meet genome editing. *Cell Stem Cell* 2016; 18(5): 573-86.
 - 41 Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov* 2017; 16(2): 115-30.
 - 42 Wang L, Yi F, Fu L, Yang J, Wang S, Wang Z, *et al.* CRISPR/Cas9-mediated targeted gene correction in amyotrophic lateral sclerosis patient iPSCs. *Protein Cell* 2017; 8(5): 365-78.
 - 43 Bar-Nur O, Russ HA, Efrat S, Benvenisty N. Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell* 2011; 9(1): 17-23.
 - 44 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.
 - 45 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.
 - 46 Avior Y, Sagi I, Benvenisty N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2016; 17(3): 170-82.
 - 47 Sullivan GJ, Bai Y, Fletcher J, Wilmot I. Induced pluripotent stem cells: epigenetic memories and practical implications. *Mol Hum Reprod* 2010; 16(12): 880-5.
 - 48 de Lazaro I, Yilmazer A, Kostarelos K. Induced pluripotent stem (iPS) cells: a new source for cell-based therapeutics? *J Control Release* 2014; 185: 37-44.
 - 49 Liu C, Oikonomopoulos A, Sayed N, Wu JC. Modeling human diseases with induced pluripotent stem cells: from 2D to 3D and beyond. *Development* 2018; doi: 10.1242/dev.156166.
 - 50 Wu SM, Hochedlinger K. Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Nat Cell Biol* 2011; 13(5): 497-505.
 - 51 Ho BX, Pek NMQ, Soh BS. Disease modeling using 3D organoids derived from human induced pluripotent stem cells. *Int J Mol Sci* 2018; doi: 10.3390/ijms19040936.
 - 52 Monzel AS, Smits LM, Hemmer K, Hachi S, Moreno EL, van Wuelen T, *et al.* Derivation of human midbrain-specific organoids from neuroepithelial stem cells. *Stem Cell Reports* 2017;

- 8(5): 1144-54.
- 53 Guan Y, Xu D, Garfin PM, Ehmer U, Hurwitz M, Enns G, *et al.* Human hepatic organoids for the analysis of human genetic diseases. *JCI Insight* 2017; doi: 10.1172/jci.insight.94954.
- 54 Hohwieler M, Illing A, Hermann PC, Mayer T, Stockmann M, Perkhof L, *et al.* Human pluripotent stem cell-derived acinar/ductal organoids generate human pancreas upon orthotopic transplantation and allow disease modelling. *Gut* 2017; 66(3): 473-86.
- 55 Zhang RR, Koido M, Tadokoro T, Ouchi R, Matsuno T, Ueno Y, *et al.* Human iPSC-derived posterior gut progenitors are expandable and capable of forming gut and liver organoids. *Stem Cell Reports* 2018; 10(3): 780-93.
- 56 Takasato M, Er PX, Chiu HS, Maier B, Baillie GJ, Ferguson C, *et al.* Kidney organoids from human iPSCs contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature* 2015; 526(7615): 564-8.
- 57 Chen YW, Huang SX, de Carvalho A, Ho SH, Islam MN, Volpi S, *et al.* A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nat Cell Biol* 2017; 19(5): 542-9.
- 58 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; 10(5): 4047.
- 59 Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 2014; 345(6194): 1247125.
- 60 Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, *et al.* Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 2013; 499(7459): 481-4.
- 61 Centeno EGZ, Cimarosti H, Bithell A. 2D versus 3D human induced pluripotent stem cell-derived cultures for neurodegenerative disease modelling. *Mol Neurodegener* 2018; 13(1): 27.
- 62 Rubin LL. Stem cells and drug discovery: the beginning of a new era? *Cell* 2008; 132(4): 549-52.
- 63 Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, *et al.* How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov* 2010; 9(3): 203-14.
- 64 McNeish J, Gardner JP, Wainger BJ, Woolf CJ, Eggan K. From dish to bedside: lessons learned while translating findings from a stem cell model of disease to a clinical trial. *Cell Stem Cell* 2015; 17(1): 8-10.
- 65 Yamashita A, Morioka M, Kishi H, Kimura T, Yahara Y, Okada M, *et al.* Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature* 2014; 513(7519): 507-11.
- 66 Rousseau F, Bonaventure J, Legeai-Mallet L, Pelet A, Rozet JM, Maroteaux P, *et al.* Mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor-3 in achondroplasia. *Nature* 1994; 371(6494): 252-4.
- 67 Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Church DM, Fielder TJ, Bocian M, *et al.* Mutations in the transmembrane domain of Fgfr3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia. *Cell* 1994; 78(2): 335-42.
- 68 Barmada SJ, Serio A, Arjun A, Bilican B, Daub A, Ando DM, *et al.* Autophagy induction enhances TDP43 turnover and survival in neuronal ALS models. *Nat Chem Biol* 2014; 10(8): 677-85.
- 69 Pasinelli P, Brown RH. Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 2006; 7(9): 710-23.
- 70 Williams D. Modeling hepatic drug metabolism and toxicity: where are we heading? *Drug Metab Pharmacokinet* 2018; 33(7): S3-S.
- 71 Zhou SF. Polymorphism of human cytochrome P450 2D6 and its clinical significance: Part I. *Clin Pharmacokinet* 2009; 48(11): 689-723.
- 72 Takayama K, Morisaki Y, Kuno S, Nagamoto Y, Harada K, Furukawa N, *et al.* Prediction of interindividual differences in hepatic functions and drug sensitivity by using human iPSC-derived hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(47): 16772-7.
- 73 MacDonald JS, Robertson RT. Toxicity testing in the 21st century: a view from the pharmaceutical industry. *Toxicol Sci* 2009; 110(1): 40-6.
- 74 Liang P, Lan F, Lee AS, Gong T, Sanchez-Freire V, Wang Y, *et al.* Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease-specific patterns of cardiotoxicity. *Circulation* 2013; 127(16): 1677-91.
- 75 Kaiser LR. The future of multihospital systems. *Top Health Care Financ* 1992; 18(4): 32-45.
- 76 Mason C, Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen Med* 2008; 3(1): 1-5.
- 77 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.
- 78 Lui KO, Waldmann H, Fairchild PJ. Embryonic stem cells: overcoming the immunological barriers to cell replacement therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009; 4(1): 70-80.
- 79 Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Casasady JP, *et al.* Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPSCs generated from autologous skin. *Science* 2007; 318(5858): 1920-3.
- 80 Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, *et al.* Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(15): 5856-61.
- 81 Kikuchi T, Morizane A, Doi D, Magotani H, Onoe H, Hayashi T, *et al.* Human iPSC cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson's disease model. *Nature* 2017; 548(7669): 592-6.
- 82 Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hirami Y, Morinaga C, Daimon T, *et al.* Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N Engl J Med* 2017; 376(11): 1038-46.
- 83 Lowry WE, Quan WL. Roadblocks en route to the clinical application of induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci* 2010; 123(Pt 5): 643-51.
- 84 Kwon EM, Connelly JP, Hansen NF, Donovan FX, Winkler T, Davis BW, *et al.* iPSCs and fibroblast subclones from the same fibroblast population contain comparable levels of sequence variations. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114(8): 1964-9.
- 85 Liu H, Kim Y, Sharkis S, Marchionni L, Jang YY. *In vivo* liver regeneration potential of human induced pluripotent stem cells from diverse origins. *Sci Transl Med* 2011; 3: 82ra39.

- 86 Miki K, Endo K, Takahashi S, Funakoshi S, Takei I, Katayama S, *et al.* Efficient detection and purification of Cell populations using synthetic microRNA switches. *Cell Stem Cell* 2015; 16(6): 699-711.
- 87 Chhabra A. Inherent immunogenicity or lack thereof of pluripotent stem cells: implications for cell replacement therapy. *Front Immunol* 2017; 8: 993.
- 88 Bravery CA. Do human leukocyte antigen-typed cellular therapeutics based on induced pluripotent stem cells make commercial sense? *Stem Cells Dev* 2015; 24(1): 1-10.
- 89 Sinnecker D. Cardiac regeneration using HLA-matched induced pluripotent stem cells-no monkey business, but still a long and winding road ahead. *J Thorac Dis* 2017; 9(3): 492-4.
- 90 Cyranoski D. Stem-cell pioneer banks on future therapies. *Nature* 2012; 488(7410): 139.
- 91 Taylor CJ, Peacock S, Chaudhry AN, Bradley JA, Bolton EM. Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types. *Cell Stem Cell* 2012; 11(2): 147-52.
- 92 Rim YA, Park N, Nam Y, Ham DS, Kim JW, Ha HY, *et al.* Recent progress of national banking project on homozygous HLA-typed induced pluripotent stem cells in South Korea. *J Tissue Eng Regen Med* 2018; 12(3): e1531-e6.
- 93 http://www.cdb.riken.jp/en/news/2017/topics/0404_10343.html.
- 94 <https://www.japantimes.co.jp/news/2018/01/17/national/science-health/first-serious-reaction-ips-derived-retinal-cell-transplant-reported-kobe/#.XDikWegzabg>.