

DOI: 10.13376/j.cblls/2016117

文章编号: 1004-0374(2016)08-0877-06



裴端卿, 现任中国科学院广州生物医药与健康研究院院长, 研究员。国家杰出青年基金获得者, 国家自然科学基金委“干细胞多能性与体细胞重编程”创新研究群体带头人, 曾任“干细胞研究”国家重大科学研究计划专家组召集人之一, 人类基因编辑研究小组 (Human Gene Editing Study Committee) 成员。主要研究方向为干细胞多能性与体细胞重编程。研究组近年来主要研究工作包括: (1) 率先在我国建立诱导多能干细胞 (iPS) 系, 并全力推动我国 iPS 研究; (2) 首次发现维生素 C 具有解决诱导效率低这个影响 iPS 应用的瓶颈问题的能力, 并阐明其促进诱导多能干细胞形成机理; (3) 发现 iPSC 过程中细胞在间质样状态和上皮样状态相互转换现象 (EMT-MET), 阐明了 EMT-MET 偶联发生对 iPSC 形成的作用和机制; (4) 将人体尿液上皮细胞直接转换为不含外源基因并可移植用神经干细胞, 有望用于神经损伤与退行性疾病治疗。科研成果先后获得国家自然科学奖二等奖和广东省科学技术奖一等奖两项。

功能性细胞获得的研究进展及应用前景

裴端卿

(中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州 510530)

摘要: 细胞移植可以修复和治疗人体损伤及功能性障碍的组织器官, 但体内分离获得可以用于治疗相应疾病的功能性细胞在来源和数量上受到极大限制。因此, 如何在体外获得合适的功能性细胞成为重要的科学问题。目前, 体外功能性细胞的获得取得了突破性进展。现主要对体外通过胚胎干细胞/诱导多能干细胞分化或体细胞间转分化获取的功能性细胞的研究进展及应用前景进行综述, 以期进一步推动我国在功能性细胞获得的基础研究及临床转化。

关键词: 干细胞; 功能性细胞; 分化; 转分化; 转化医学

中图分类号: Q813 **文献标志码:** A

Progress and prospect on obtaining functional cells

PEI Duan-Qing

(Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China)

Abstract: Damage and functional disorder in human tissues/organs could be treated by cell transplantation. However, the functional cells for transplantation isolated *in vivo* are limited by the source and amount. How to obtain the suitable functional cells *in vitro* for treatment became the key question here. Currently, lots of important progresses have been achieved in producing the functional cells *in vitro*. The review mainly focuses on the progress and prospect of the functional cells differentiated from embryonic stem cells/induced pluripotent stem cells or transdifferentiated from other somatic cells, which may promote the further study and clinical transformation.

Key words: stem cells; functional cells; differentiation; transdifferentiation; translational medicine

收稿日期: 2016-04-05

基金项目: 中国科学院“干细胞与再生医学研究”战略性先导科技专项(XDA01020401)

通信作者: E-mail: pei_duanqing@gibh.ac.cn

机体细胞、组织和器官的损伤或功能衰竭是人类健康面临的一大难题。同种或者异种的细胞/组织/器官移植、外科修复、人工假肢、机械装置及极少数的可选药物治疗是目前的主要治疗手段。其中,细胞/组织/器官移植可谓是最理想的治疗手段。尤其是功能性细胞作为细胞移植的主体,同时也是进一步组装获得可移植的组织/器官的基本单位,功能性细胞的获得是解决细胞/组织/器官移植的最根本问题。用于细胞移植的细胞种类主要有普通体细胞(如肝细胞、胰岛细胞)、免疫细胞(如树突状细胞、杀伤细胞)及干细胞(如胚胎干细胞、多能干细胞、造血干细胞、骨髓间充质干细胞、神经干细胞、脂肪干细胞)等等。但是,上述几类细胞除了胚胎干细胞和诱导多能干细胞不存在数量有限的问题之外,其他的细胞来源均受到供体不足的制约,是移植治疗方案中首要的瓶颈问题。因此,本文将胚胎干细胞/诱导多能干细胞定向诱导分化和体细胞转分化获得的功能性细胞两方面内容为主,对功能性细胞的获得进展及应用进行综述,旨在为我国学者进一步开展功能性细胞获得、评价、临床转化等相关工作提供良好的基础和进一步合作的契机。

1 功能性细胞获得的研究进展

胚胎干细胞是早期胚胎(原肠胚期之前)或原始性腺中分离出来的一类细胞,它具有体外培养无限增殖、自我更新和多向分化的特性。自1998年,汤姆森首次成功分离培养人类胚胎干细胞以来,干细胞相关的基础研究在近20年取得了飞速发展。2006年,Takahashi和Yamanaka^[1]通过向小鼠皮肤成纤维细胞导入4个多能性因子所获得的具有了与胚胎干细胞类似特性的细胞,被称为诱导多能干细胞(简称iPS细胞)。目前胚胎干细胞/诱导多能干细胞向各类具有修复和治疗机体疾病的功能性细胞的诱导分化探索也取得了重要的突破性成果,本文着重综述了几类代表性细胞,包括神经细胞、肝脏细胞、肾细胞、软骨细胞。

1.1 神经谱系功能性细胞的获得

随着人口老龄化的加速,神经损伤及神经退行性疾病,如脊髓损伤、帕金森病、阿尔兹海默病、亨廷顿舞蹈症等的发病率直线上升。这些神经性疾病,由于神经细胞的再生能力差,因而目前尚无有效的治疗方法。通过获得患者功能性的神经细胞,移植后可以替代已经损伤丧失功能的细胞,从而有

望治愈这类疾病。功能性神经细胞的研究主要集中在神经前体细胞、神经元及胶质细胞方面,特别是在功能性神经前体细胞方面的研究较多,方法也日趋成熟,近年来相继建立了EB诱导法、共培养诱导法及单层诱导法技术模式,一些新的技术方法也陆续应用到该领域中。Zhang等^[2]针对从iPS到神经前体细胞(NPCs)的分化过程,采用高通量测序的方法进行了分析,从而明确在神经分化过程中的关键基因,通过比较正常人与神经系统疾病患者的iPS在分化过程中的区别,将为该类神经系统疾病的治疗提供新的思路。Sanges等^[3]的研究表明,不通过体外诱导,在体内环境下,通过造血干细胞的融合诱导,可以使已分化成熟的视网膜神经元细胞转分化为NPCs,这一过程中Wnt/ β -catenin信号通路的激活发挥了重要作用,而且分化获得的NPCs可在体内通过增殖和分化实现视网膜神经元损伤的修复,从而为这类疾病的治疗开发了新的技术方法。Zeng等^[4]采用基因过表达的方法构建TrkC过表达的骨髓间充质干细胞(BMSCs-TrkC),利用明胶海绵构建三维培养环境,并将BMSCs-TrkC与过表达NT-3的施旺细胞共培养,结果可将BMSCs诱导为功能性神经元,并通过共培养3D体系的体内移植,实现了对脊髓损伤的修复。NT-3的重要作用在其他课题组的研究中也有报道。Yang等^[5]研究发现,将NT-3壳聚糖生物复合材料移植到脊髓损伤部位,可以促进机体内部NPC的动员,不需要外源性NPC的植入,也可以实现脊髓损伤的修复。在脊髓损伤类疾病中,很大一部分是由轴突髓鞘缺损造成,而常规的NPCs移植主要再生大量的神经元,修复效果有限。针对这一问题,Kawabata等^[6]建立了稳定的技术方法将iPS细胞诱导为少突胶质细胞的前体细胞,并将该细胞进行体内移植,结果显示,这种治疗模式可以实现髓鞘再生,有效修复轴突髓鞘缺损造成脊髓损伤。此外,我们团队通过非整合的技术将一些干细胞因子导入从患者尿液中分离的细胞中,成功地将患者的体细胞诱导转变为具有功能的神经干细胞^[7]。这些细胞能够在体外扩增,并可以分化成为神经元和胶质细胞。在进一步的动物模型移植实验中,能够很好地存活并融入宿主的脑环境中。这一发现为获得患者特异性的神经干细胞并用于移植治疗提供了具有极强实用性的技术手段和途径,有望在将来的临床应用中发挥重要作用。这一成果发表后,引起国际干细胞界的巨大反响。Nature杂志社在其新闻栏目以“Brain cells made from

urine”为题做了点评。同期 *Nature Methods* 杂志配发斯坦福大学医学院干细胞生物学和再生医学研究所 Marius Wernig 教授的专题评论：重编程领域持续令人兴奋，特定功能性细胞的诱导方法不断发展。

1.2 功能性肝细胞的获得

肝脏是人体的重要器官之一。据估计，我国因为供体缺乏无法进行肝脏移植的患者数量达数十万。通过干细胞技术获得肝脏/肝脏细胞将为解决这一关键问题带来曙光。近年来，研究人员陆续开发了利用干细胞分化或体细胞转分化技术获取功能性肝细胞的技术方法。2013年，Takebe等^[8]通过将iPS衍生的功能性肝细胞、血管内皮细胞、间充质细胞等混合，通过体外培养和体内移植，实现了血管化三维肝脏组织的再生，并在肝损伤的实验动物中发挥了较好的治疗效果，为后续三维肝脏类器官的构建奠定了重要基础。2016年，Ma等^[9]将3D打印技术用于肝脏再生中，他们将iPS衍生的肝前体细胞、血管内皮细胞等通过水凝胶混合在一起，再利用3D打印技术直接打印出肝脏类器官。通过体外的长期培养和体内移植分析，3D打印的肝脏不仅具有类似于正常肝脏的组织结构、细胞表型，也具有相似的功能，为3D功能性肝脏再生开发了新的途径。近年来，转分化技术在功能性肝细胞获得方面有着重要的应用，早在2011年，Huang等^[10]通过Gata4、Hnf1 α 、Foxa3和ARF的诱导，直接将小鼠成纤维细胞转分化为功能性肝样细胞。继此以后，功能性肝细胞的转分化技术在很多方面得到了进一步的发展。2014年，Huang等^[11]在前期工作基础上，采用相似的方法，成功地将人源成纤维细胞转分化为功能性肝样细胞(hiHep细胞)，为转分化技术在人类肝病方面的应用提供了重要依据。2015年，Kim等^[12]采用episome诱导的方法，建立非整合的转分化技术，进一步保证了转分化获得功能性肝细胞基因组的稳定性，促进了该技术的临床化发展。此外，除成纤维细胞，其他种类的体细胞也被证实具有转分化为肝细胞的潜能。Chen等^[13]的研究表明，精原细胞可以转分化为功能性肝细胞，并发挥治疗作用；肝脏肌成纤维细胞增殖是肝纤维化的重要原因，2016年，Song等^[14]通过FOXA3、GATA4、HNF1A和HNF4A的诱导，成功地将肝脏肌成纤维细胞转分化为功能性肝细胞，这一研究为逆转肝纤维化提供了新的治疗模式。为了使功能性肝细胞能够发挥治疗作用，研究人员陆续建立能够在体外长期培养肝细胞的技术体系：

Shan等^[15]通过高通量筛选的方法，采用小分子化合物维持功能性肝细胞的生物活性，相继建立了适合成熟功能性肝细胞增殖和未成熟功能性肝细胞分化的技术体系，为肝组织工程种子细胞的培养扩增奠定了重要基础；2015年，Huch等^[16]建立可长期培养人肝前体细胞的培养体系，该技术模式可长期稳定地维持肝前体细胞的基因组稳定性和细胞的功能活性，肝前体细胞在体外扩增培养3个月后，仍然可以在体内外环境下分化为功能性肝细胞，并发挥治疗作用，在体外肝疾病模型的构建、药物筛选、组织工程肝脏等方面均有着重要意义。

1.3 功能性肾细胞

与功能性神经细胞、功能性肝细胞相比，功能性肾细胞的研究相对较晚，直到2013年，此类功能性细胞的获取才取得了一些重要突破。2013年，Narayanan等^[17]率先建立了ES细胞向功能性肾细胞分化的技术方法，他们通过一系列细胞因子的诱导，从分化细胞中分选出AQP-1阳性的细胞群，这群细胞具有肾源性细胞的表型，同时，在体外环境和体内环境下，均具有分化为近端肾小管细胞的能力，并形成典型的管样结构；此外，该细胞也可以通过生物反应器进行培养，这项研究为生物人工肾的构架及肾脏再生奠定了重要的技术基础。紧随其后，Xia等^[18]建立了另一种技术方法，通过不同细胞因子的组合诱导，仅用4d时间即可将人的iPS细胞诱导为肾脏前体细胞，通过进一步的三维培养和分化诱导，iPS衍生的肾脏前体细胞形成了类似输尿管的结构，这为肾脏系统疾病，特别是输尿管疾病的治疗提供了新的思路和技术方法。Imberti等^[19]将iPS细胞诱导为肾脏前体细胞后，直接通过静脉途径对肾脏损伤的小鼠进行了体内移植，治疗结果显示：受损伤的肾脏组织有显著的恢复，且肾功能也得到了一定的改善，特别是移植的iPS衍生肾脏前体细胞可参与到肾脏组织中，实现组织修复，这表明iPS再生的肾脏细胞具有直接用于体内治疗的前景。除ES或iPS来源外，部分成体干细胞也具有再生功能性肾脏细胞的潜能，Papadimou等^[20]采用肾源性细胞提取物诱导人源骨髓间充质细胞分化为肾小管上皮样细胞，分化后的细胞可以在体外环境下形成管样结构，体内移植到肾脏组织后，该细胞于肾脏组织中也形成肾小管结构，与iPS衍生的肾源性细胞相似，这种成体干细胞分化而来的肾源性细胞对肾脏组织的损伤也有一定的治疗作用，并且显著改善肾脏功能。基于肾脏结构的复杂性，

单一再生一种细胞或结构很难实现完整的功能性肾脏再生,而肾单位是肾脏的最为基本的功能单元,所以,再生肾单位是实现功能性肾脏再生的必要途径。2014年,Taguchi等^[21]在上述研究的基础上,通过Wnt信号的刺激和其他细胞因子的调控,将iPS细胞分化为后肾间质前体细胞,后肾间质具有再生肾单位的功能,将iPS衍生的后肾间质前体细胞于3D环境下进行分化培养,可再生出肾小管、肾小球等多种肾结构,通过体内移植,肾小球可以与体内环境建立血管循环,并发挥一定的滤过功能。Takebe等^[22]基于他们在肝脏再生的技术方法,结合血管上皮细胞和间充质细胞,也建立了利于肾脏血管化的三维培养模型,该环境再生的肾组织具有初步类似的肾脏结构,同时血管化程度较为丰富,但在功能特性方面尚不明确。2015年,在利用干细胞技术再生肾脏方面取得了重要突破:Takasato等^[23]采用先诱导集合管,再诱导后肾间质的研究方法,构建了含有集合管的完整肾单位(包含典型的肾小管、肾小球结构),这种肾单位的结构特征与正常人3个月的胎肾结构极为相似,并且可在体内环境下建立良好的血液循环系统,发挥肾脏功能。这一研究进一步提升了利用干细胞技术再生完整功能性肾脏的可行性,为肾脏疾病模型的构建和治疗开发了新的技术途径。

1.4 功能性软骨细胞的获得

透明软骨覆盖在骨骼的关节表面提供缓冲作用。然而,由于软骨有限的再生能力,而由年龄和运动引起的软骨损伤可能会导致软骨组织退行性关节炎,通过移植软骨细胞或置换软骨组织为治疗退行性关节炎提供一个潜在的新途径。2011年,Kobayashi等^[24]从人耳软骨膜细胞中分离出CD44⁺CD90⁺阳性软骨干细胞亚群,分离获得的软骨细胞群可用于弹性软骨的修复。但分离的软骨祖细胞有限,且不适合在体外的长期增殖培养。2014年,Mizuno等^[25]也成功地从人耳的软骨中分离出软骨祖细胞。分离获得的人软骨祖细胞具有高增殖潜能,能形成长期保持的弹性软骨组织,可用于弹性软骨的修复。Bhumiratana等^[26]利用离心力凝聚人的间充质干细胞,在软骨诱导培养液中诱导软骨球体的形成,再结合材料融合获得的软骨小球,能形成与正常人软骨组织相应大小的生理结构和力学性能相似软骨组织。2012年,Johnson等^[27]的研究应用Kartogenin(KGN)能促使有多潜能的间充质干细胞向软骨细胞分化,联合间充质干细胞可用于关节软骨的修复。

2013年,Outani等^[28]的研究通过慢病毒载体转入重编程转录因子(c-Myc和Klf4)和转录因子Sox9诱导皮肤成纤维细胞不经过多能性阶段而转化为软骨细胞,获得的软骨细胞移植到裸鼠皮下能形成软骨组织,约需要18d。2014年,Olee等^[29]用Lonza公司的无血清培养液联合细胞因子TGFβ₃,经过3周诱导人的胚胎干细胞(H9)分化为间充质样软骨祖细胞,这些细胞形成的软骨组织能在软骨损伤部位产生软骨特异性基质蛋白,但在体外难获得成熟的功能性软骨。2015年,Craft等^[30]通过逐步添加细胞因子经过25d诱导多能性干细胞向软骨细胞分化,并在组合细胞因子培养液中扩增软骨祖细胞,约为4~12周,阐述了TGF-β信号通路能促进hPSC分化成软骨祖细胞的效率,能在体外和体内形成稳定关节软骨组织。与此相反,活化BMP4信号通路信号显示引起软骨组织肥大。Nejadnik等^[31]的研究通过诱导人的多能性干细胞(hiPSC)分化为间充质干细胞,再用软骨培养液诱导MSC分化为软骨细胞,在28d时获得软骨小球,在49d时得到成熟软骨。这个过程避免了EB形成的复杂低效的诱导过程,该方法获得的软骨细胞移植大鼠关节炎模型,能产生透明软骨特异性基质蛋白。然而,目前体外培养成熟的软骨细胞增殖率比较低,软骨细胞表型缺失,基质的合成较低,且与宿主组织整合能力差,因此,仍然不能达到从机体直接分离获得的软骨细胞的疗效。

2 功能性细胞的应用研究

在获得功能性细胞后,科学家在疾病动物模型、发病机制、细胞库与药物筛选、细胞移植等不同层面开展了卓越有成效的应用研究,在创造了很多原创性成果基础上,开展了规范的、有重要的技术和产品支撑的干细胞临床转化研究。

2.1 动物模型

在转化应用方面,中国科学院动物研究所利用CRISPR-Cas系统实现大鼠的Tet1/Tet2/Tet3基因敲除^[32],实现了效率高达100%的双等位基因纯合突变的单基因敲除,和接近60%高效率的三基因同时敲除,并且证明CRISPR-Cas系统引入的基因修饰可以通过生殖细胞传递到下一代。首次利用直接原核注射CRISPR/Cas一步直接产生vWF基因敲除猪模型,建立了p53双等位基因突变猴等动物模型。中国科学院广州生物医药与健康研究院赖良学团队利用TALEN技术获得免疫缺陷兔,并已经获得30

多种疾病模型猪^[33]。这些工作为研究人类重大疾病的发生机制和药物筛选提供了重要模型。

2.2 疾病发病机制

中国科学院上海生命科学研究院神经科学研究所熊志奇团队发现，神经调节素 1(Neuregulin-1, NRG1) 在癫痫发生过程中行使负反馈的调控机制，为预防和治疗癫痫提供了可能的新靶标^[34]。中国科学院生物物理研究所刘光慧团队与其合作者通过研究成年早衰症——Werner 综合征发现，异染色质的高级结构失序是人类干细胞衰老的驱动力之一^[35]，为延缓衰老及研究和防治衰老相关疾病提供了新的潜在靶点和思路。针对衰老的基础和转化医学研究是干细胞领域的重大科学问题。成年早衰症患者自青春期开始提前启动衰老程序，加速呈现出自然衰老的表征并伴发多种老年性疾病。因此，研究成年早衰症对于揭示人类自然衰老的奥秘以及实现防治衰老相关疾病具有重要的科学意义。迄今，该团队已先后利用干细胞技术建立了帕金森氏症^[36]、镰刀形细胞贫血症^[37]等一系列人类衰老性疾病和罕见病的研究平台，并开展了出色的疾病模型和基因矫正的研究工作。

2.3 细胞库与药物筛选

中国科学院动物研究所、中国科学院上海生命科学研究院、广州生物医药与健康研究院等承担了干细胞库的建设任务。目前干细胞库有包括人胚胎干细胞和小鼠胚胎干细胞在内的多种干细胞资源，并获得了我国首批通过国家认证的、无异源成分的人类临床级胚胎干细胞系与成体干细胞系，具有重要的基础研究与临床应用价值。已经建立临床级别人胚胎干细胞定向分化的技术平台，获得临床级别的神经细胞、心肌细胞、视网膜色素上皮细胞等多种不同功能性细胞，并联合医院逐步开展了规范的临床研究。同时，也向国内外干细胞研究同行共享了相关细胞资源和技术。

2.4 细胞移植

由于我国的器官捐献体系不够健全，供体器官来源问题凸显。干细胞来源的细胞或者器官有望解决这一困境。中科院上海生命科学研究院惠利健研究团队与南京大学附属鼓楼医院丁义涛团队等合作成功设计出全新的基于“hiHep 细胞”的生物人工肝系统，可显着提升肝衰竭猪的存活率^[38]。这项成果发表在 *Cell Research* 杂志。该项研究采用基于 hiHep 细胞的生物人工肝系统救治急性肝衰竭猪，显著提升了肝衰竭猪的存活率，实验结果表明，未

治疗的急性肝衰竭猪一般会在 3 d 左右死亡，而采用“hiHep 细胞”生物人工肝救治的急性肝衰竭小猪的存活率达到 80%，这通过大动物实验证明了 hiHep 细胞临床应用的可行性。该团队已经展开基于“hiHep 细胞”的生物人工肝系统的第一次临床治疗试验，试验志愿者是一位肝衰竭患者。患者前期接受各种内科治疗无明显好转，在 hiHep 生物人工肝治疗后，患者各项肝功能指标恢复，度过了危险期。这一临床病例是 hiHep 生物人工肝在临床应用中迈出的坚实有力的一步。2016 年，该团队将在上海及其周边地区进一步开展相关临床研究。同时，我们团队也在逐步推进基于神经干细胞用于治疗脊髓损伤、亨廷顿舞蹈症等神经系统疾病的临床前研究。

3 结语

尽管功能性细胞的获得在基础研究中取得了不少突破性进展，但是仍然存在着诸多向临床转化亟待解决的问题，包括如何使其功能性具有真正的治疗效果、如何对其安全性进行恰当的评估及干预、如何在体外长期维持其功能特性的稳定等等。因此，在深入基础研究的同时，以转化医学为出发点和落脚点，利用现有的成果，结合日新月异的技术，实现基础研究到临床应用的转化是功能性细胞的获得现阶段的重要策略。

[参 考 文 献]

- [1] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 2006, 126: 663-76
- [2] Zhang Y, Schulz VP, Reed BD, et al. Functional genomic screen of human stem cell differentiation reveals pathways involved in neurodevelopment and neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 12361-6
- [3] Sanges D, Romo N, Simonte G, et al. Wnt/ β -catenin signaling triggers neuron reprogramming and regeneration in the mouse retina. *Cell Rep*, 2013, 4: 271-86
- [4] Zeng X, Qiu XC, Ma YH, et al. Integration of donor mesenchymal stem cell-derived neuron-like cells into host neural network after rat spinal cord transection. *Biomaterials*, 2015, 53: 184-201
- [5] Yang Z, Zhang A, Duan H, et al. NT3-chitosan elicits robust endogenous neurogenesis to enable functional recovery after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 13354-9
- [6] Kawabata S, Takano M, Numasawa-Kuroiwa Y, et al. Grafted human iPS cell-derived oligodendrocyte precursor cells contribute to robust remyelination of demyelinated axons after spinal cord injury. *Stem Cell Rep*, 2016, 6: 1-8

- [7] Wang L, Wang L, Huang W, et al. Generation of integration-free neural progenitor cells from cells in human urine. *Nat Methods*, 2013, 10: 84-9
- [8] Takebe T, Sekine K, Enomura M, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*, 2013, 499: 481-4
- [9] Ma X, Qu X, Zhu W, et al. Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 2206-11
- [10] Huang P, He Z, Ji S, et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature*, 2011, 475: 386-9
- [11] Huang P, Zhang L, Gao Y, et al. Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 370-84
- [12] Kim J, Kim KP, Lim KT, et al. Generation of integration-free induced hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts. *Sci Rep*, 2015, 5: 15706
- [13] Chen Z, Sun M, Yuan Q, et al. Generation of functional hepatocytes from human spermatogonial stem cells. *Oncotarget*, 2016, 7: 879-95
- [14] Song G, Pacher M, Balakrishnan A, et al. Direct reprogramming of hepatic myofibroblasts into hepatocytes *in vivo* attenuates liver fibrosis. *Cell Stem Cell*, 2016, [Epub ahead of print]
- [15] Shan J, Schwartz RE, Ross NT, et al. Identification of small molecules for human hepatocyte expansion and iPSC differentiation. *Nat Chem Biol*, 2013, 9: 514-20
- [16] Huch M, Gehart H, van Boxtel R, et al. Long-term culture of genome-stable bipotent stem cells from adult human liver. *Cell*, 2015, 160: 299-312
- [17] Narayanan K, Schumacher KM, Tasnim F, et al. Human embryonic stem cells differentiate into functional renal proximal tubular-like cells. *Kidney Int*, 2013, 83: 593-603
- [18] Xia Y, Nivet E, Sancho-Martinez I, et al. Directed differentiation of human pluripotent cells to ureteric bud kidney progenitor-like cells. *Nat Cell Biol*, 2013, 15: 1507-15
- [19] Imberti B, Tomasoni S, Ciampi O, et al. Renal progenitors derived from human iPSCs engraft and restore function in a mouse model of acute kidney injury. *Sci Rep*, 2015, 5: 8826
- [20] Papadimou E, Morigi M, Iatropoulos P, et al. Direct reprogramming of human bone marrow stromal cells into functional renal cells using cell-free extracts. *Stem Cell Rep*, 2015, 4: 685-98
- [21] Taguchi A, Kaku Y, Ohmori T, et al. Redefining the *in vivo* origin of metanephric nephron progenitors enables generation of complex kidney structures from pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 2014, 14: 53-67
- [22] Takebe T, Enomura M, Yoshizawa E, et al. Vascularized and complex organ buds from diverse tissues via mesenchymal cell-driven condensation. *Cell Stem Cell*, 2015, 16: 556-65
- [23] Takasato M, Er PX, Chiu HS, et al. Kidney organoids from human iPSCs contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature*, 2015, 526: 564-8
- [24] Kobayashi S, Takebe T, Inui M, et al. Reconstruction of human elastic cartilage by a CD44⁺ CD90⁺ stem cell in the ear perichondrium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 14479-84
- [25] Mizuno M, Kobayashi S, Takebe T, et al. Reconstruction of joint hyaline cartilage by autologous progenitor cells derived from ear elastic cartilage. *Stem Cells*, 2014, 32: 816-21
- [26] Bhumiratana S, Eton RE, Oungoulian SR, et al. Large, stratified, and mechanically functional human cartilage grown *in vitro* by mesenchymal condensation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 6940-5
- [27] Johnson K, Zhu S, Tremblay MS, et al. A stem cell-based approach to cartilage repair. *Science*, 2012, 336: 717-21
- [28] Outani H, Okada M, Yamashita A, et al. Direct induction of chondrogenic cells from human dermal fibroblast culture by defined factors. *PLoS One*, 2013, 8: e77365
- [29] Olee T, Grogan SP, Lotz MK, et al. Repair of cartilage defects in arthritic tissue with differentiated human embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A*, 2014, 20: 683-92
- [30] Craft AM, Rockel JS, Nartiss Y, et al. Generation of articular chondrocytes from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 638-45
- [31] Nejadnik H, Diecke S, Lenkov OD, et al. Improved approach for chondrogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev*, 2015, 11: 242-53
- [32] Li W, Teng F, Li T, et al. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems. *Nat Biotechnol*, 2013, 31: 684-6
- [33] Song J, Zhong J, Guo X, et al. Generation of RAG 1- and 2-deficient rabbits by embryo microinjection of TALENs. *Cell Res*, 2013, 23: 1059-62
- [34] Tan GH, Liu YY, Hu XL, et al. Neuregulin 1 represses limbic epileptogenesis through ErbB4 in parvalbumin-expressing interneurons. *Nat Neurosci*, 2011, 15: 258-66
- [35] Zhang W, Li J, Suzuki K, et al. A Werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging. *Science*, 2015, 348: 1160-3
- [36] Liu GH, Qu J, Suzuki K, et al. Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2. *Nature*, 2012, 491: 603-7
- [37] Suzuki K, Yu C, Qu J, et al. Targeted gene correction minimally impacts whole-genome mutational load in human-disease-specific induced pluripotent stem cell clones. *Cell Stem Cell*, 2014, 15: 31-6
- [38] Shi XL, Gao Y, Yan Y, et al. Improved survival of porcine acute liver failure by a bioartificial liver device implanted with induced human functional hepatocytes. *Cell Res*, 2016, 26: 206-16