

高齢者の再生医療

豊田 雅士

要約 超高齢社会において、糖尿病などの生活習慣病や種々の神経変性疾患、脳梗塞、網膜症など高齢者特有の難治性疾患に対する新しい治療法の開発は、QOL（生活の質）の向上のための最重要課題となっており、画期的な医療の実現に対する期待には極めて大きいものがある。その中で注目される再生医療研究は様々な分野で予想以上の拡がりを見せている。機能の衰えた、あるいは不全をおこした組織・臓器に対して、発生過程をたどるように再び幹細胞を通して、増殖、分化、機能というプロセスを与えるという再生医療は、これまで難しいとされた疾患に新たな治療戦略を与えると考えられている。自己の幹細胞（間葉系幹細胞、皮膚幹細胞、脂肪幹細胞、iPS細胞等）から、治療に必要な細胞を選択的に分化誘導させ、しかも、治療に必要な細胞数を確実に得る技術の確立に向けた研究の進展は著しい。再生医療が21世紀において、高齢患者の病状の改善、病気の進行の予防と治療、QOLの向上に寄与し、健康長寿に多大な貢献をなし得るようになることが期待される。ここでは、幹細胞を用いた細胞移植医療と組織工学との融合による再生医療の現状と、その実用化により今後大きな変貌を遂げていくことになる医療に対する展望について述べる。

Key words : 多能性幹細胞, 組織幹細胞, 組織工学, 細胞移植, 老年病

(日老医誌 2011; 48: 7-13)

はじめに

日本は超高齢社会にあり、日常生活の中で少しでも健康な状態を維持しながら長生きできる社会を築いていくことが重要な課題である。そのためには、高齢者特有の疾患の原因を明らかにし、その成果をいち早く予防・治療法の開発へと発展させつつ、QOLの向上を図っていくことが最も大切となる。したがって新しい画期的な医療の開発に対する期待は極めて大きい。なかでも最近注目されているのが再生医療であろう。現在、再生医療の研究は、身体のおよそ90%の組織・臓器を対象として実に幅広い精力的な展開が行われ、様々な分野で予想以上の拡がりを見せている。

再生医療とは

生体の不思議な再生機能に関しては、これまで発生学の面から基礎的研究が進められてきた。ヒトの体は約60兆個の細胞からなるが、元々は卵と精子が出会い受精した一つの受精卵に由来する。その受精卵が細胞分裂を繰り返しながら様々な細胞を生み出し、それらがお互いに

連携しながら様々な組織・臓器を形作り一つの個体を築き上げていく。この壮大な発生過程における細胞のたどる道は、全能性から分化細胞へ一方向性であると考えられてきた。そこに自己複製能（分裂することにより自身と同じ種類の細胞を作り出す能力）と多分化能（多くの種類の細胞に分化できる能力）をもつ幹細胞、とりわけ胚性幹（ES）細胞¹⁾と人工多能性幹（iPS）細胞²⁾の登場で大きな転換を迎えた（図1）。

再生医療の具体的なアプローチとしてはいろいろな方法がある。1) 従来から行われている血液疾患に対する骨髄移植（造血系骨髄幹細胞移植）や糖尿病に対する膵島細胞移植など正常な機能・再生機能を保持する細胞を注入・投与する細胞移植療法。2) 回復不可能な組織や臓器に対してその機能を補ったり、すべてを代行したりする人工臓器（人工心臓、人工血管、人工腎臓、人工骨、人工軟骨等）による治療。こうした治療法に、ヒトの組織や臓器のおおもとになる幹細胞研究の進展が加わり、新たな「再生医療」の局面が起こってきている。この新たな再生医療は、患者に対する負担が少なく侵襲が軽微であることから、高齢であるが故に治療対象外となっていた疾患や難治性疾患に対する治療への期待が大きい。また幹細胞研究は、高齢者特有の疾患の原因解明や新たな創薬・薬の作用/副作用の予測などにもつながっていく。

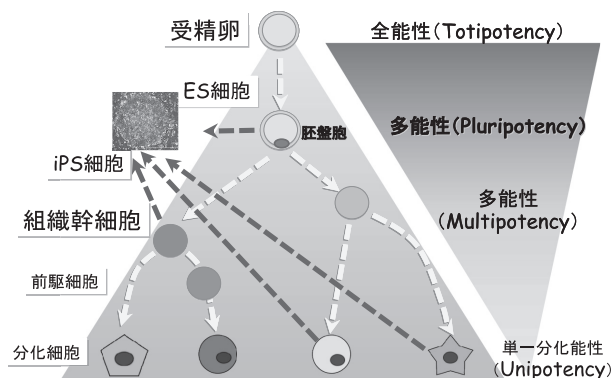


図1 細胞の階層性

受精卵は全能性を有しており、細胞分裂を繰り返しながら様々な細胞を生み出し、それらがお互いに連携しながら様々な組織・臓器を形作り一つの個体を築き上げていく。ES細胞は胚盤胞における内部細胞塊から樹立され、あらゆる細胞への分化能をもつ。iPS細胞はこれまで考えられた分化の一方向性に逆らって作製される。

幹細胞を用いた細胞移植医療

再生医療の目標は人間のあらゆる臓器、組織を再生することにあり、現在はまだそこまでには至っていない。そのため、現状の再生医療に期待されることは既存の機能低下した組織の機能を（安定的な活動と生存が可能なレベルにまで）回復させることにある。生体内の細胞や臓器の機能が弱ったり破綻したりした場合、主として臓器移植が行われているがドナー不足や術後管理（拒絶反応、感染等）の難しさといった課題があり、さらに高齢者に対してはリスクの高さから移植対象外となっている現状がある。そこで注目されているのが細胞移植医療である。幹細胞もしくは前駆細胞を含む細胞分画を、機能不全に陥った臓器・組織に何らかの方法で移植することで機能の補完・代替をし、臓器移植と比べ低侵襲で負荷が少なく優れた治療効果が得られると考えられている。こうした細胞移植医療は、生体のほとんどすべての組織・臓器の疾患がその治療対象になる。

移植に用いる幹細胞には大きく分けて、造血幹細胞や神経幹細胞、脂肪幹細胞、間葉系幹細胞など、分化する細胞の種類が限られている体性（組織）幹細胞と、人体のあらゆる細胞に成長できる能力をもつ多能性幹細胞がある。

1 体性幹細胞を用いた細胞移植医療

体性幹細胞は、造血幹細胞を用いた骨髓移植による白血病治療は臨床治療として確立しており、骨髓や末梢血などから得られる血管内皮前駆細胞を用いた閉塞性動脈硬化症の治療³⁾も先進医療としてすでに行われている。

さらには骨髓単核球や心筋幹細胞を用いた重症心不全に対する治療が臨床治験として行われ、症状の改善が報告されている^{4)~6)}。このように体性幹細胞を用いた種々の疾患に対する細胞移植医療が急速な拡がりを見せている。これは、細胞移植医療に必要な細胞源として自己の骨髓や脂肪組織以外に臍帯血、羊膜、胎盤等従来は医療廃棄物として処理される組織など様々な組織から得ることが可能となり、また当初考えられていた以上にこうした細胞が神経、心筋、骨格筋、骨、軟骨といった胚葉をこえた分化能を有していることが明らかになりつつある^{7)~25)}ためである。しかし一方でまだ多くの課題がある。まず体性幹細胞の場合ES細胞等と違い、分化能を維持したまま無限に増殖させることが確立されていないため、移植のためには十分な細胞数と質の確保が必要となる。そのためには、生体外で細胞を効率よく増殖させることが不可欠であり、さらに必要に応じて細胞の凍結保存、目的とする細胞への分化誘導や均一な細胞集団の単離が求められる。また細胞の取得から移植までの過程で、移植する細胞の分化段階や有効性・安全性を把握する必要がある（図2）。したがって移植細胞の基準を早急に設定することが求められる。その上で、分化した細胞をどのように患者に移植するのがいいのか試行錯誤段階の技術面の確立、実際の機能改善効果のメカニズムの検証を進めていくことが大事である。そうすることによって医療界と産業界が協調し、再生医療が普遍的な一般の医療になるための大きな一歩になっていくと考えられる。

2 多能性幹細胞を用いた細胞移植医療

多能性幹細胞は、その分化特性より多くの疾患、とりわけこれまで有効な治療法がない難治性疾患に対する治療への応用に期待が高い。胚性幹（ES）細胞や人工多能性幹（iPS）細胞は、その性質を維持しつつほぼ無限に増やすことができる。したがって体性幹細胞での課題であった移植に必要な細胞数の確保という問題はない。自らの細胞から作製可能なiPS細胞はこれまで世界中で報告されているが、人種、年齢、疾患等によってそれほど変わらない効率でiPS細胞を作製できている。一方で目的とする方向に効率よく分化させることが今の大きな課題である。ES/iPS細胞を様々な細胞群に分化誘導させることが日々報告されているものの、その効率性、未分化や目的外へ分化した細胞の除去法、どの分化段階で患者に移植するかを含めてまだ確立されていない。またES細胞については受精卵を壊して作製されることから倫理的問題があり、移植にあたっては拒絶反応の問題もある。iPS細胞はその点は克服できるものの、遺伝子を導入して作製されるため腫瘍化の懸念が残る。これに

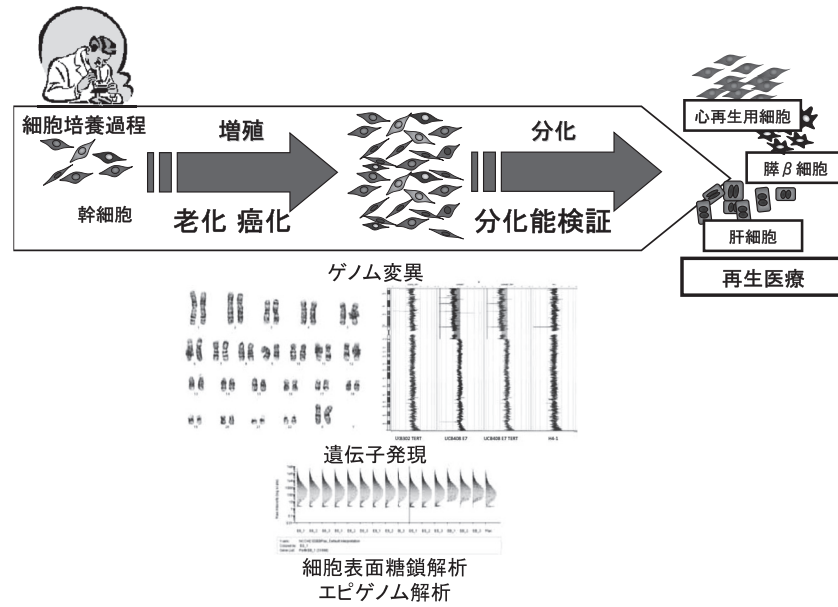


図2 細胞移植医療の安全性・有効性評価

細胞移植医療を行うためには、採取した細胞を生体外で培養して増殖させ、時には分化誘導する必要がある。その各過程でゲノム変異や腫瘍化などが起こらないか、安全性や有効性をきちんと決める必要がある。

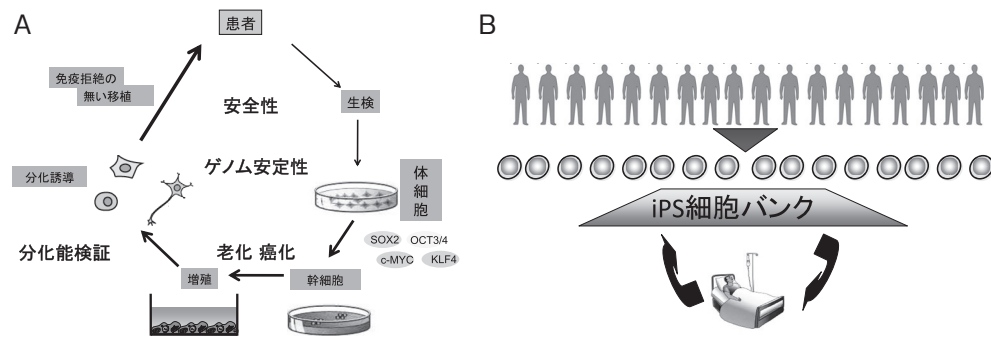


図3 多能性幹細胞による再生医療

- A. 細胞の採取から iPS 細胞の作製、目的細胞への分化という過程を経て移植が行われる。この間、安全性の確認なども含めれば少なくとも半年程度を有する。
- B. 再生医療での細胞供給に迅速に対応するための iPS 細胞バンクの確立。移植免疫拒絶を回避するため HLA (ヒト白血球抗原) を網羅した iPS 細胞を作製、保存する。

については臨床を念頭とし安全性を担保するため、低分子化合物やタンパク質、RNA など遺伝子を導入しない方法の開発が進められ報告もされて今後に大きな期待がよせられている^{26)~32)}。しかし iPS 細胞は、どの組織由来の細胞からでも作製ができるため、ES 細胞と比較して持っている分化能は多様性に富んでいるといわれている。iPS 細胞は作製まで少なくとも数カ月を有する(図3A)ことから、疾病にかかった患者に iPS 細胞を用いて再生医療を受けたいと思ったとしても自分自身の iPS 細胞を得

るまで待たなくてはいけないことを意味している。これは急性、亜急性の疾病では意味をなさないもので、前もって様々な HLA の型を有した iPS 細胞を作成しておき、バンク化しておくことが考えられる(図3B)。細胞をバンク化して共通の供給源とするという発想は、臍帯血バンクでの成功例があり、将来の興味深い課題として残されている。iPS 細胞バンクがどのように臨床に適した細胞を選択するかについての基準はなく、遺伝子発現解析やエピゲノム解析など様々な面から研究が行われてい

る。我々も最近細胞表面にある糖タンパク質糖鎖を網羅的に解析することで多能性幹細胞の未分化状態と分化状態を判定し、移植の際の細胞選別として細胞表面糖鎖解析が有効であることを示した。またES細胞やiPS細胞を用いる再生医療は、従来から行われている造血幹細胞や間葉系幹細胞による再生医療とは異なり、細胞の採取から移植まで多くの段階を経る必要がある(図3A)、今後各過程で有効性や安全性を一つ一つ考えていかなければならない。まだ研究が浅いiPS細胞であり今後の大きな課題であろう。

組織工学と再生医療

細胞移植医療では、ホストとなる組織や臓器に細胞を効率よく生着させられるかが課題の一つである。生体組織は細胞のみから構成されているわけではなく、生体での細胞の機能や恒常性を保つためには細胞周囲の環境が重要である。中でも細胞外マトリックスは、動的で機能的な役割を担っており、例えば細胞接着における足場(基底膜やファイブロンネクチン)や増殖因子等の保持・提供する役割(ヘパラン硫酸)が知られている。こうした細胞外マトリックスを操作することによって組織や細胞を制御し再生医療等へ応用する技術開発が進められている。

1993年にLangerとVacantiにより、細胞、成長因子、足場という3要素により組織が再生できると提唱された³³⁾。細胞が育つ足場材料として生分解性高分子を3次元的に成形しそこに細胞を播種・増殖させ、その後生体内に移植する。生分解性高分子は徐々に分解されていくが、播種した細胞やホスト由来の細胞外マトリックスがそれを埋めるため、成形した形状を保った組織が構築できる。こうした手法で構築した再生組織(皮膚、骨、軟骨、気管等)を用いた移植治療はすでに行われている。しかし現状は小さな骨や軟骨などの組織再生にとどまっており、より大きな再生組織をいかに作製していくかが期待される。

また新たな技術として生体の細胞を利用したハイブリット型の装置が開発されつつあり、ヤギの皮膚細胞から人工の心臓大動脈弁を作製しそれを移植して生体内で正常に機能することに成功したと最近報道された(2010年8月8日付け読売新聞)。血液の逆流を防ぐ役割をする大動脈弁に異常がある場合金属製の機械弁に置換する手術が行われるが、機械の寿命や成長にあわせた再手術の必要性など課題がある。研究ではアクリル樹脂で心臓弁の型を作りヤギの背中に埋め込むと、その回りに皮膚細胞が移動してきて、分泌物のコラーゲンが固まるなど

して約1カ月でハイブリット人工弁ができるという。これまでと違い細胞を採取して外で培養する必要がないばかりか、手術が不向きであった子供や高齢者にとって治療への道が開かれることになり今後大いに期待が持たれる。

一方でこうした足場材料を用いた手法は、肝臓や心臓、腎臓など複雑な構造と機能を持っている組織・臓器では難しいとされる。その中で足場材料を用いず細胞をシート状に回収して組織を構築する「細胞シート工学」が角膜上皮、食道、心筋組織などをはじめとした多くの組織再生に利用され、細胞を効率よくホストへ移植でき臨床研究においても良好な成績を収めている^{34)~39)}。ごく最近では大阪大学のグループが、重症の心臓病患者に足の筋肉細胞を培養してシート上にして心臓に貼付けることで機能回復をはかり、心臓移植に変わる医療として期待される成果として大きく報道もされた。今後さらに種々の組織・臓器への臨床応用が進むことによって、高齢者へのQOLを考慮した治療法としてますます増えていくことが期待される。

高齢者にとってもう一つの福音

これまで見てきたように幹細胞を用いた細胞移植医療や最新の組織工学と組み合わせた再生医療は、高齢者疾患に対して低侵襲な治療のため体への負荷も少なく大きな福音をもたらす。こうした再生医療を支えているのが幹細胞であるが、これを用いることでもう一つのメリットを高齢者にもたらす可能性がある。

一般に高齢者は複数の疾患に罹患しており、それに応じた薬を服用していることが多い。薬の開発では、成人を対象として薬効や副作用などが設定され、それも単独で服用した時の場合がほとんどである。加齢に伴い体内の代謝機能は変化し、したがって薬に対する作用も異なってくるが、老化の程度は個体差が大きく簡単に予測することは難しい。また薬の組み合わせがどのような効果をもたらすかについても膨大なデータが必要であり、次々とでる新薬に対応することはできない。こうした問題に幹細胞研究は大きな役割が果たせる可能性がある。すなわち将来的には、高齢者から細胞をもらい、iPS細胞を作製、対象となる細胞(心筋細胞、肝細胞、神経細胞等)へ分化させ、そこで薬に対する効果や副作用を調べることで適切な薬の選択、副作用の予測、また薬の組み合わせがもたらす効果について比較的短時間でかつ簡単に判定が可能となると考えられる。また細胞の機能の再生や分化誘導(必要とする細胞を再生させること)に対して高い効力を発揮する因子(薬剤、成長因子などの

物質)の開発につながり、細胞を入れる代わりにその物質を投与するだけで、働きの低下した組織や臓器の機能を再生させ、蘇らせることができ、高齢者のみならず多くの人たちに対して福音となるであろう。実際2010年10月に開催されたトランスレーショナルリサーチの国際会議において、間葉系幹細胞が分泌する因子だけで心筋梗塞に治療効果があったとする発表があり、将来的な話ではなく現実味がでてきている。

今後の再生医療

幹細胞の特性や個体発生に関する理解が急速に進んだことに加え、組織工学に関する細胞移植医療に役立つ技術開発も進んでいる。iPS細胞を作り出せるという発見は、体細胞から他の細胞への変身(分化転換)がいろいろな場合において可能であることを意味している。間葉系細胞から膵β細胞を作製することも、皮膚表皮細胞から肝細胞を作製することも可能といえる。実際基礎研究レベルではあるが、数種類の遺伝子を入れることによって、膵臓の消化液を作る細胞からインスリン分泌をもつベータ細胞に⁴⁰⁾、また皮膚細胞を神経細胞に⁴¹⁾、同じく皮膚細胞から拍動する心筋細胞に⁴²⁾⁴³⁾になったとする論文が発表され、新たな戦略として注目されている。これは、得られた細胞が増えないため腫瘍化の懸念がなく、他の細胞へ分化せず目的とする機能のみを発揮するとされているためである。一方課題は生体内で機能し続けるかどうかの長期的なフォローであろう。また細胞数の確保、その細胞集団の形態を維持しながらの生体内への移植、生体内での持続的機能についても課題であるが、組織工学との融合など今後の移植医療として用いる有効な細胞ソースとなりうる。

おわりに

再生医療の研究は予想以上の展開を見せているが、実際に原稿執筆中にも新たな展開が報告された。米国ではヒトES細胞を用いた脊髄損傷により運動機能に大きな障害が起きている患者に対する初の臨床試験が開始された。ES細胞から脳や脊髄の神経細胞を保護する役割を持つ細胞に分化誘導し損傷部に注入する臨床試験であり今後10人程度で実施して安全性を確認する。一方日本では、iPS細胞を治療に使えるための厚生労働省の臨床研究指針が作成され、2010年11月1日から施行された。iPS細胞を使って臨床を行うことをうたった指針は世界初である。この中では研究機関内部と厚生労働省の2段階の審査を受けるとともに、常に新しい技術を入れた安全性の確認や患者に対して最新の知識をつたえることな

どが規定されており、実際に動くまでにはまだ時間を要すると考えられる。しかしここでは、自家移植だけでなく他家移植についても認められており、文科省が作成したロードマップにそって臨床応用に向けた第一歩を踏み出したといえる。再生医療研究の進歩とその実用化により、今後の医療は大きな変貌を遂げていくことになるであろう。

文 献

- 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: 1145-1147. Erratum in: *Science* 1998; 282: 1827.
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al: Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-872.
- 3) Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, et al: Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427-435.
- 4) Miyagawa S, Matsumiya G, Funatsu T, Yoshitatsu M, Sekiya N, Fukui S, et al: Combined autologous cellular cardiomyoplasty using skeletal myoblasts and bone marrow cells for human ischemic cardiomyopathy with left ventricular assist system implantation: report of a case. *Surg Today* 2009; 39: 133-136.
- 5) Sawa Y: Surgical regeneration therapy using myoblast sheets for severe heart failure. *Kyobu Geka* 2007; 60: 355-361.
- 6) Gojo S, Kyo S, Nishimura S, Komiyama N, Kawai N, Bessho M, et al: Cardiac resurrection after bone-marrow-derived mononuclear cell transplantation during left ventricular assist device support. *Ann Thorac Surg* 2007; 83: 661-662.
- 7) Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
- 8) Umezawa A, Maruyama T, Segawa K, Shaddock RK, Waheed A, Hata J: Multipotent marrow stromal cell line is able to induce hematopoiesis in vivo. *J Cell Physiol* 1992; 151: 197-205.
- 9) Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP: Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem* 1997; 64: 295-312.
- 10) Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, et al: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103: 697-705.
- 11) Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 13625-13630.
- 12) Erices A, Conget P, Minguel JJ: Mesenchymal progeni-

- tor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000; 109: 235-242.
- 13) Zvaifler NJ, Marinova-Mutafchieva L, Adams G, Edwards CJ, Moss J, Burger JA, et al.: Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2000; 2: 477-488.
 - 14) Asakura A, Komaki M, Rudnicki M: Muscle satellite cells are multipotential stem cells that exhibit myogenic, osteogenic, and adipogenic differentiation. *Differentiation* 2001; 68: 245-253.
 - 15) Sekiya I, Larson BL, Vuoristo JT, Cui JG, Prockop DJ: Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma (MSCs). *J Bone Miner Res* 2004; 19: 256-264.
 - 16) Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Barhim J, et al.: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364: 149-155.
 - 17) Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hiroose I, Kitamura T, Tsuji K: Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells* 2004; 22: 649-658.
 - 18) Mori T, Kiyono T, Imabayashi H, Takeda Y, Tsuchiya K, Miyoshi S, et al.: Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 5183-5195.
 - 19) Terai M, Uyama T, Sugiki T, Li XK, Umezawa A, Kiyono T: immortalization of human fetal cells: the life span of umbilical cord blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 1491-1499.
 - 20) Cui CH, Uyama T, Miyado K, Terai M, Kyo S, Kiyono T, et al.: Menstrual blood-derived cells confer human dystrophin expression in the murine model of Duchenne muscular dystrophy via cell fusion and myogenic transdifferentiation. *Mol Biol Cell* 2007; 18: 1586-1594.
 - 21) Okamoto K, Miyoshi S, Toyoda M, Hida N, Ikegami Y, Makino H, et al.: 'Working' cardiomyocytes exhibiting plateau action potentials from human placenta-derived extraembryonic mesodermal cells. *Exp Cell Res* 2007; 313: 2550-2562.
 - 22) Nishiyama N, Miyoshi S, Hida N, Uyama T, Okamoto K, Ikegami Y, et al.: The significant cardiomyogenic potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Stem Cells* 2007; 25: 2017-2024.
 - 23) Kawamichi Y, Cui CH, Toyoda M, Makino H, Horie A, Takahashi Y, et al.: Cells of extraembryonic mesodermal origin confer human dystrophin in Mdx model of duchenne muscular dystrophy. *J Cell Physiol* 2010; 223: 695-702.
 - 24) Tsuji H, Miyoshi S, Ikegami Y, Hida N, Asada H, Togashi I, et al.: Xenografted human amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells are immunologically tolerated and transdifferentiated into cardiomyocytes. *Circ Res* 2010; 106: 1613-1623.
 - 25) Cui CH, Miyoshi S, Tsuji H, Makino H, Kanzaki S, Kami D, et al.: Dystrophin conferral using human endothelium expressing HLA-E in the nonimmunosuppressive murine model of Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* 2010, in press.
 - 26) Maherali N, Hochedlinger K: Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol* 2009; 19: 1718-1723.
 - 27) Feng B, Jiang J, Kraus P, et al.: Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 197-203.
 - 28) Heng JC, Feng B, Han J, et al.: The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell* 2010; 6: 167-174.
 - 29) Desponts C, Ding S: Using small molecules to improve generation of induced pluripotent stem cells from somatic cells. *Methods Mol Biol* 2010; 636: 207-218.
 - 30) Zhou H, Wu S, Joo JY, et al.: Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 2009; 4: 381-384.
 - 31) Judson RL, Baboarz JE, Venere M, Blleloch R: Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol* 2009; 27: 459-461.
 - 32) 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: 618-630.
 - 33) Langer R, Vacanti JP: Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920-926.
 - 34) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, et al.: Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. *Transplantation* 2004; 77: 379-385.
 - 35) Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, et al.: Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med* 2004; 16: 1187-1196.
 - 36) Ohki T, Yamato M, Murakami D, Takagi R, Yang J, Namiki H, et al.: Treatment of oesophageal ulcerations using endoscopic transplantation of tissue-engineered autologous oral mucosal epithelial cell sheets in a canine model. *Gut* 2006; 55: 1704-1710.
 - 37) Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T: Cell sheet engineering for myocardial tissue reconstruction. *Biomaterials* 2003; 24: 2309-2316.
 - 38) Haraguchi Y, Shimizu T, Yamato M, Kikuchi A, Okano T: Electrical coupling of cardiomyocyte sheets occurs rapidly via functional gap junction formation. *Biomaterials* 2006; 27: 4765-4774.
 - 39) Miyagawa S, Sawa Y, Sakakida S, Takaetani S, Kondoh H, Memon IA, et al.: Tissue cardiomyoplasty using bioengineered contractile cardiomyocyte sheets to repair damaged myocardium: their integration with recipient myocardium. *Transplantation* 2005; 80: 1586-1595.
 - 40) Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA: In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to

- beta-cells. *Nature* 2008; 455: 627–632.
- 41) Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Sudhof TC, Wernig M: Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010; 463: 1035–1041.
- 42) Takeuchi JK, Bruneau BG: Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature* 2009; 459: 708–711.
- 43) Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, et al.: Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142: 375–386.
-