

诱导多能干细胞在眼科疾病的研究进展

吴佳慧, 崔红平

作者单位: (200120) 中国上海市, 同济大学附属东方医院眼科
作者简介: 吴佳慧, 女, 硕士, 研究方向: 青光眼、眼表疾病。
通讯作者: 崔红平, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向:
青光眼、眼表疾病. hpcui@yahoo.com
收稿日期: 2012-10-14 修回日期: 2013-01-06

关键词: 诱导多能干细胞; 干细胞; 视网膜; 角膜; 细胞治疗
DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.02.21

引用: 吴佳慧, 崔红平. 诱导多能干细胞在眼科疾病的研究进展. 国际眼科杂志 2013; 13(2): 295-298

Progress of induced pluripotent stem cells in ophthalmic diseases

Jia-Hui Wu, Hong-Ping Cui

Ophthalmology of Shanghai East Hospital, Shanghai 200120, China
Correspondence to: Hong-Ping Cui. Ophthalmology of Shanghai East Hospital, Shanghai 200120, China. hpcui@yahoo.com
Received: 2012-10-14 Accepted: 2013-01-06

Abstract

• Induced pluripotent stem cells (iPSCs) are reprogrammed through transduction of exogenous transcription factors, into somatic cells, reprogramming the somatic cells to embryonic stem cells-like cells with potencies of unlimited proliferation and pluripotent differentiation. This technology is a milestone in the field of regenerative medicine, and many related studies have been made these years. In the development of iPSCs technology, we have achieved a lot of progress; these will lay a foundation of cell therapy. Meanwhile, the successfully reprogrammed human somatic stem cells and good results in the study of animal models have been achieved. This article aims to emphasize the development of iPSCs in Ophthalmology.

• **KEYWORDS:** induced pluripotent stem cells; stem cell; retina; corneal; cell therapy

Citation: Wu JH, Cui HP. Progress of induced pluripotent stem cells in ophthalmic diseases. *Guoji Yanke Zazhi(Int Eye Sci)* 2013; 13(2):295-298

摘要

可诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)是由体细胞或成体细胞重编程转化而来, 这项技术引起了学术界空前的关注, 越来越多的相关研究随之开展。它是通过人工方法将适当的外源性转录因子导入体细胞或成体干细胞, 使之转化为具有无限增殖潜能和定向分化能力、类似于胚胎干细胞的一类干细胞。在不断探索发展多能干细胞培养转化技术的过程中, 已经取得不少突破性的进展, 这为将来细胞移植成为临床治疗方法奠定了基础。同时各种研究成功诱导出类似人体细胞的干细胞, 并在动物实验中得到乐观的结果。我们主要探讨 iPSC 在眼科疾病方面的研究进展。

0 引言

1998 年 Thomson 等^[1]从人类胚胎中分离并分化出胚胎干细胞(embryonic stem cell, ESCs)引起了广泛的关注, 这项发现预示着细胞分化为机体各个部分的各种潜能, 对于细胞或组织的替换疗法提出了可能的基础, 意味着人类对于由疾病和创伤所造成的功能丧失和机体功能退化性改变将有可能给予治疗, 但是 ESCs 的研究却因为伦理方面的顾虑以及移植后出现的组织免疫排斥^[2]而受到阻碍。幸运的是, 这一现象因 Yamanaka 及其团队的重要发现而出现了转机, 他们成功地将机体细胞通过特定的转录因子(Oct4, Sox2, Klf4 和 c-Myc), 经病毒诱导将鼠成纤维细胞转化成了多能细胞^[3-5], 这一突破性发现将干细胞研究带入了一个新领域。我们就可诱导多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSC)在眼科方面的研究进展进行综述。

1 诱导多能干细胞的探索过程

2007 年, Yamanaka 的团队和 Thomson 的团队成功利用 Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4 和 Oct4, Sox2, Nanog, Lin28 先后将人的体细胞重编程为多能细胞^[6-8]。这些 iPSCs 在形态、多能性、基因表达和基因形态方面都与 ESCs 相似, 对临床和实验室疾病模型的建立提供了新的可能性。

iPSCs 重编程转化过程的各个环节, 包括转录因子、载体、靶细胞、细胞培养诱导等所有环节都在不断研究和优化, 从最初 4 个经典的转录因子(Oct4, Sox2, Klf4 和 c-Myc), 到后来发现在一定情况下其中的某些转录因子可以被调整或替代, 如在大鼠成纤维细胞转录过程中, 可以用 Sox1 或 Sox3 替代 Sox2, 还可以用 Klf2 替换 Klf4 等^[9]。又如在人成纤维细胞转化为 iPSCs 过程中, 若没有 c-Myc 转录因子参与, 也能获得成功, 说明 c-Myc 不是人成纤维细胞转录过程中的必需转录因子^[10]。再者, 一些小分子物质, 如丙戊酸及具有组蛋白甲基转移酶抑制作用的 BIX01294 可明显增加 4 种转录因子的转录成功率^[9]; 天然小分子脂肪酸——丁酸盐可以激发内源性多潜能的相关基因表达, 使人成纤维细胞重编程转化效率提高百倍^[11]。这些发现提示可以用小分子物质替代 4 种转录因子以诱导细胞的的重编程, 但现在还不能定论。

转录因子载体的选择同样也不断涌现新发现, 从最初使用反转录病毒载体, 到后来使用慢病毒载体 Lentivirus 和腺相关病毒载体等, 这些载体都能确保细胞重编程转化过程所需的足够时间内高效表达转录因子。但是, 这些病毒载体可能改变细胞分化潜能, 甚至增加癌变的风险。因此, 科学家们不断尝试, 试图改进这方面技术, 如采用重组

腺病毒载体、质粒等^[12,13]。但是这些非整合病毒和非病毒载体也存在不少弊端,如重编转录率低、有的残留载体序列或不能在人体细胞中使用。

除了转录因子和载体,靶细胞的选择和细胞培养环境等因素在整个 iPSCs 转化过程中同样非常重要。研究发现除了成纤维细胞外,还发现多种体细胞,如造血细胞、骨髓间质细胞、神经前体细胞等,均可被重编程转化为 iPSC^[9]。总之,目前为止对整个 iPSCs 的诱导转录过程还在不断探索中,仍有许多疑问有待解答。

2 诱导多能干细胞在治疗疾病方面的发展潜能

2009年先后三个实验团队在 iPSCs 的培育技术方面得到突破性进展,成功通过鼠 iPSCs 诱导培育出成年鼠^[14-16]。其中,我国周琪和他的研究团队是最早发表这项研究成果的,在周的研究中,他们从鼠成纤维胚胎中提取出 37 个鼠 iPSC 链,这些链中大多可以培育发展为可以种系遗传的鼠,并且有 3 条链可以培育出存活的后代小鼠。这项研究最大的发现之一就是,对于从鼠 iPSC 链中培育出鼠胚胎的技术给予了巨大发展。许多动物实验在小鼠模型上证明,一些人类疾病可以通过 iPSCs 的移植治疗方法获得乐观的效果^[17,18]。并且,越来越多的人类疾病多能干细胞已经被培育出来^[19-21],这些疾病模型的建立无疑对于许多疾病的研究提供更广阔的平台,对新疗法的研究探索也有着积极作用,为最终移植 iPSCs 技术从实验室走向临床打下坚实基础。现在,人 iPSC 已经被培育出来,虽然培育率比较低^[22,23],但是这依然是一个鼓舞人心的进展。不少致力于 iPSCs 技术发展的研究在不断开展,并取得了许多新发现,比如发现含氧量低的环境可以明显提高非病毒诱导 iPSC 的培养效率^[24],同时也使端粒酶的活性增加^[25];维生素 C 可以增强人或鼠的体细胞诱导效率^[26]等。

上述研究结果提示,iPSCs 具有多能性和巨大的发展潜能,又没有伦理道德问题和异体移植免疫排斥的现象,这对于研究从 iPSC 培育而来的细胞和组织的功能、基因遗传稳定性的研究和治疗人类疾病提供了新的信息。

3 诱导多能干细胞在眼科方面的研究

3.1 在视网膜中的研究

在眼科疾病中,年龄相关性退化、糖尿病、基因遗传所致的视网膜退化可造成大于 50% 的致盲率^[27]。视网膜功能退化会造成视力丧失,其原因在于神经传导通路上的神经细胞死亡,即光感受器死亡。光感受器受光子的激发,而不依赖传入神经元突触的传导激发,所以细胞替换技术只需提供一条传出通路和临近的视网膜二级神经元连接,就可以理论上重建视路。而其他的中枢神经系统中(CNS)疾病,都需要建立传入和传出两条神经通路才得以达到效果,所以说神经干细胞替换移植非常适用于光感受器的修复。

活体外,iPSCs 已经成功分化成视网膜细胞^[28,29],与人类光感受器细胞功能相似的细胞也已经可以从 iPSCs 分化得到^[30,31]。在视网膜退化疾病中,从患者自身提取的 iPSCs 可以作为替换治疗的手段,纠正基因缺陷并且阻止视网膜细胞的进一步退化。由 iPSC 诱导转换而来的 RPE 在营养不良小鼠实验中发现有保护作用^[32]。2010 年美国公司 Advanced Cell Technology (ACT) 宣称,他们得到了 I/II 期临床医疗准许,在 Stargardt 患者身上用 ESCs 替换视网膜色素上皮(RPE)。在这个治疗过程中,主要是把 RPE 替换掉,重建光感受器功能或者是阻止光感受器的

进一步损失。然而,一旦光感受器已经退化,治疗时就必须再包括重诱导感光细胞,这对于视网膜干细胞移植疗法在光感受器细胞大量退化的情况下,是一个巨大的挑战。

在最理想的发展理念中,移植治疗过程需避免恶性分化的倾向以及免疫方面的问题。就这两点而言,iPSCs 在多能性和低分化方面与 ESCs 存在差别,同时表现出巨大的神经元分化能力^[33]。因为,iPSCs 来源于患者,会把潜在的致癌基因剔除,这样避免使用基因和转染媒介也就避免了不可控制的分化^[34],肿瘤的形成几率也就减少了。美国的一个实验组在体外实验再次验证了这一观点^[35],他们提取一位视网膜回旋型萎缩患者的 iPSCs,随后通过药理学作用和修复目标基因两种方法,分别在体外成功使这位患者功能受损的 RPE 得到修复。除此之外,对于治疗方法来说,iPSC 自体同源的细胞来源丰富,不需要依靠动物器官等辅助治疗,低分子复合物就可以使 iPSCs 诱导成为 RPE 和光感受器细胞^[36]。

虽然 iPSCs 有许多优势,但某些问题和困难也摆在我们面前。人 iPSCs 可以转化适用于眼和视网膜各主要阶段的特征要求^[37],但是这都必须遵循视网膜发展的时间规律^[38]。若是在不清楚细胞发展趋势的情况下,将会对诱导未成熟细胞进入视网膜组织产生困难。因此,必须了解各个细胞周期转化的规律,明确转化关键点,这对于将来预知植入时间点非常重要。熟知 iPSCs 分化为视网膜的过程和时间段,也有助于临床药物研究和重建视网膜的相关研究,并让我们更了解人视网膜的发展过程。因为有研究显示,在小鼠视网膜发育的一个特定阶段得到的细胞,可以转化为成年鼠的视网膜组织^[39]。除此之外,人 iPSCs 各链在调节基因 Pax6 表达的早期各不相同^[40],Pax6 的表达对视网膜的发展起到重要作用,所以其高度表达将会增加视网膜细胞的数量,但是其它研究关于 iPSCs 链的表达却发现视网膜细胞和视神经细胞的生成数量有所减少^[32],这说明现有技术还不成熟,所获得的结果存在偏差。

3.2 在角膜中的研究

角膜对于视力至关重要,角膜缘上皮干细胞不断提供角膜上皮细胞,以维持角膜的功能和状态,角膜上皮干细胞的异常会引起角膜的许多疾病,并最终导致患者视力受损甚至丧失。现有的角膜移植手术,由于角膜来源匮乏而无法大规模开展,只有极少数患者可以接受治疗。在发现 ESCs 后,许多实验均成功将鼠 ESCs 诱导转化成角膜上皮细胞,但是由于伦理问题,进一步研究受到阻碍,现在 iPSCs 的问世打破了这个僵局。如果 iPSCs 诱导而来的人角膜上皮干细胞顺利移植到受损的人角膜上,那将给全世界许多因角膜病致盲的人带来光明。

不少研究员致力于研究 iPSCs 转化为角膜上皮细胞,并获得了成功^[8]。从人的头发组织中提取培养出 iPSCs,并最终分化成类似角膜上皮的成熟细胞,85% 的角膜 miR-450b-5p 和 miR-184 在分化期都明显增多了,说明 iPSCs 培养分化而来的角膜上皮细胞和成人角膜细胞存在高度相似性^[41]。最近有实验将人羊膜基底膜成分提取,并诱导转化为多能干细胞,说明人 iPSCs 可以诱导转化为眼部组织,包括角膜上皮^[42]。同时还有实验从多方面验证了 iPSC 在角膜病方面存在的巨大潜能,将 iPSCs 诱导转化而来的上皮细胞移植到小鼠角膜上,观察其各层变化,经过培养和密切观察,发现细胞早期外胚层的阳性标记物 K18 和 K14,基底层内发现了高度表达的 p63 和 K15,这些分

层的角膜上皮各层观察结果证明此方法可以获得极化的分层细胞层^[43]。但是,不同的人角膜缘上皮干细胞有不同的表型,比如在细胞大小和长度上有区别,因此这方面的问题需进一步研究。

3.3 在晶状体中的研究 白内障作为全世界主要的致盲原因之一,由于缺乏合适的动物模型和人晶状体的培植技术,相关研究受到巨大限制。然而,近年来的人 ESCs 和 iPSCs 的研究在晶状体研究领域提供了新的研究方向。已有研究成功从人 ESCs 中分化出大量的晶状体祖细胞,并由此再分化出晶状体小体^[44]。其次,在体外研究晶状体小体过程中,许多信号通路和影响因子被确定出^[45],这些研究都预示着从人 ESCs 提出的晶状体细胞的过程,可以尝试用于从白内障患者的细胞中提取 iPSCs,并用于晶状体分化和白内障病理机制的研究^[46]。如果这一研究得以进一步深化,那么将会给我们提供源源不断的晶状体细胞,用于研究晶状体相关的分子机制和相关疾病的病理研究,最终会给人类带来福音。

4 诱导多能干细胞技术发展面临的困难

虽然,经过许多科学家的共同努力,我们已经在 iPSC 领域取得了许多成就,但仍有更多的问题摆在我们面前。iPSC 目前面临的最大困难在于技术上的不成熟,早前不少相关研究就遇到这样一个问题,无法从 iPSC 中培育出能独立生存的后代^[47]。进一步的研究发现,iPSCs 与 ESCs 之间还是存在一定差别的^[48],这说明细胞直接转录对于诱导分化细胞转录为多能细胞是不合适的。除此之外,人与鼠的 iPSCs 之间很可能也存在差别,比如鼠 iPSCs 形成胎骶尾部畸胎瘤的可能性要远高于人 iPSCs。虽然通过四倍体补偿技术培育小鼠,让一些 iPSCs 成为多能性干细胞的可行性提供了确切的证明,但在机体细胞核转化领域中^[49],为什么仅有一小部分分化型机体细胞可以被转录为多能细胞,这仍是未来需要探索的问题。目前看来,这个问题存在两方面可能性,一方面可能与诱导内生多能细胞转化网络的适应性及空间反应有关;另一方面,也可能与各种外源限制有关,这种外源限制对于来源机体细胞的染色体标记非常重要。这些疑问和可能性,都有待于将来更加深入的研究。

5 结语

iPSCs 技术在人类再生医学方面起到了革命性转折的标志作用,他提供了许多有价值的人类再生细胞模型,这在研究人类基因工程领域有重大意义。同时,iPSCs 避免了移植后的免疫排斥问题,这是 ESCs 面临的、目前为止无法攻克的障碍。所以,iPSCs 对于一些目前不明原因的机体组织退化疾病,预示着一种可能的全新治疗方法。

但是,目前还没有可靠信息证明在移植后 ESCs 和 iPSCs 的潜能以及他们的分化后发展情况。除此之外,他们的特定组织分化能力和功能细胞的最佳应用在人类 ESC 分化的研究还没有得到证明。在动物实验中获得的结果是否同样能体现在人体身上,因为动物与人无论在解剖结构、生理、对于疾病和创伤的反应以及临床反应,都存在明显差别,这些差别限制了小鼠实验对于人类可能反应的效果评估。大型哺乳动物模型在解剖、生理和病理方面都与人类相对接近,现在已经有陆续有关狒狒和恒河猴 iPSC 的研究已经开展,但是这仅仅只是开始,在移植替换细胞或组织成为临床治疗手段之前,需要探索的道路还很漫长。

参考文献

- 1 Thomson JA,Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282: 1145-1147
- 2 Baker M. FDA to vet embryonic stem cells' safety. *Nature* 2008; 452: 670
- 3 Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126: 663-676
- 4 Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007;448: 313-317
- 5 Park IH,Zhao R, West JA, et al. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2008;451:141-146
- 6 Kanemura Y. Development of cell-processing systems for human stem cells (neural stem cells, mesenchymal stem cells, and iPSCs) for regenerative medicine. *Keio J Med* 2010; 59(2): 35-45
- 7 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131(5): 861-872
- 8 Yu J,Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318: 1917-1920
- 9 Maherali N, Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008;3(6): 595-605
- 10 Nakagawa M,Koyanagi M, Tanabe K, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008;26(1): 101-106
- 11 Mali P,Chou BK, Yen J, et al. Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes. *Stem Cells* 2010;28(4):713-720
- 12 Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, et al. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 2008;322(5903):945-954
- 13 Okita K, Hong H, Takahashi K, et al. Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protoc* 2010;5(3): 418-428
- 14 Boland MJ, Hazen JL,Nazor KL, et al. Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009;461: 91-94
- 15 Kang L, Wang J, Zhang Y, et al. iPSCs can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell* 2009;5: 135-138
- 16 Zhao XY, Li W, Lv Z, et al. iPSCs produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 2009;461: 86-90
- 17 Hanna J,Wernig M, Markoulaki, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007;318: 1920-1923
- 18 Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, 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;105:5856-5861
- 19 Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009;457:277-280
- 20 Lee G,Papapetrou EP, Kim H, et al. Modeling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 2009;461:402-406
- 21 Ye L, Chang JC, Lin C, et al. Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 9826-9830
- 22 Kim D, Kim CH, Moon JI, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009;4:472-476
- 23 Zhou W, Freed CR. Adenoviral gene delivery can reprogram human

- fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 2009;27: 2667-2674
- 24 Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, *et al.* Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2009;5: 237-241
- 25 Betts DH, Perrault SD, King WA. Low oxygen delays fibroblast senescence despite shorter telomeres. *Biogerontology* 2008;9: 19-31
- 26 Esteban MA, Wang T, Qin BM, *et al.* Vitamin C enhances the generation of mouse and human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010;6: 1-9
- 27 The Eye Diseases Prevalence Research Group. Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004;122: 477-485
- 28 Meyer JS, Shearler RL, Capowski EE, *et al.* Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:16698-16703
- 29 Osakada F, Ikeda H, Sasai Y, *et al.* Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into retinal cells. *Nat Protoc* 2009;4:811-824
- 30 Parameswaran S, Balasubramanian S, Babai N, *et al.* Induced pluripotent stem cells generate both retinal ganglion cells and photoreceptors: therapeutic implications in degenerative changes in glaucoma and age-related macular degeneration. *Stem Cells* 2010;28: 695-703
- 31 Hiram Y, Osakada F, Takahashi K, *et al.* Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett* 2009;458: 126-131
- 32 Carr AJ. Protective effects of humaniPS - derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat. *PLoS ONE* 2009;4: e8152
- 33 Hu BY, Weick JP, Yu J, *et al.* Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107:4335-4340
- 34 Junying M, Kejin H, Kim SO, *et al.* Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 2009;324:797-801
- 35 Meyer JS, Howden SE, Wallace KA, *et al.* . Optic vesicle - like structures derived from human pluripotent stem cells facilitate a customized approach to retinal disease treatment. *Stem Cells* 2011;29: 1206-1218
- 36 Osakada F, Jin ZB, Hiram Y, *et al.* *In vitro* differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small - molecule induction. *Cell* 2009;122:3169-3179
- 37 Jason SM, Rebecca LS, Elizabeth EC, *et al.* Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. *PNAS* 2009;106(39) : 16698-16703
- 38 Finlay BL. The developing and evolving retina: Using time to organize form. *Brain Res* 2008; 1192: 5-16
- 39 MacLaren RE, Pearson RA, MacNeil A, *et al.* Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* 2006;444:203-207
- 40 Yoshida S, Shimmura S, Okano H, *et al.* Differentiation of Induced pluripotent stem cells into corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:356
- 41 Ruby SF, Stephanie DL, Isabelle P, *et al.* Pluripotent stem cells as a model for corneal development, physiopathology and therapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52: 1219
- 42 Morio U, Yoshinori N, Michiru M, *et al.* Induction of Ocular tissues from human - induced pluripotent stem cells on the amniotic membrane matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52: E-Abstract 3419
- 43 Satoru Y, Miyuki Y, Hideyuki M, *et al.* Generation of stratified squamous epithelial cells from induced pluripotent stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52: 5138
- 44 Qiu X, Yang J, Liu T, *et al.* Efficient generation of lens progenitor cells from cataract patient - specific induced pluripotent stem cells. *PLoS ONE* 2012;7(3) : e32612
- 45 Zhao H, Yang T, Madakashira BP, *et al.* Fibroblast growth actor receptor signaling is essential for lens fiber cell differentiation. *Dev Biol* 2008;318:276-288
- 46 Yang C, Yang Y, Brennan L, *et al.* Efficient generation of lens progenitor cells and lentoid bodies from human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *FASEB J* 2010; 24:3274-3283
- 47 Kim JB, Zaehres H, Wu G, *et al.* Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 2008; 454:646-650
- 48 Chin MH, Mason MJ, Xie W, *et al.* Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 2009;5:111-123
- 49 Niemann H, Tian XC, King WA, *et al.* Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reproduction* 2008;135: 151-163