



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Immunogenicity and tumorigenicity of pluripotent stem cells

Kooreman, N.G.

Citation

Kooreman, N. G. (2020, February 13). *Immunogenicity and tumorigenicity of pluripotent stem cells*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/85322>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/85322>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/85322> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Kooreman, N.G.

Title: Immunogenicity and tumorigenicity of pluripotent stem cells

Issue Date: 2020-02-13

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Zoals besproken in de introductie, zal de toename in de levensverwachting van de mens waarschijnlijk leiden tot een toename van chronische ziekten (Union 2012). Met name de weefsels van organen met weinig herstellend vermogen, zoals het brein en het hart, zullen bijdragen aan de verhoogde ziektelast. Om dit te bestrijden, zoeken onderzoekers al jaren naar verschillende manieren om weefsels te regenereren; zoals bijvoorbeeld gen- of celtherapie. Deze methoden worden in detail besproken in **Hoofdstuk 2**, waarbij dit proefschrift zich met name richt op de regeneratieve behandelingen voor aandoeningen van het vaatstelsel.

REGENERATIEVE THERAPIEËN

De afgelopen twee decennia bestonden celtherapieën uit het gebruik van progenitorcellen of volwassen stamcellen (Prockop 1997, Pittenger et al. 1999, Amado et al. 2005, Dezawa et al. 2005). De preklinische studies hadden veelbelovende resultaten, waardoor deze celtypen nu worden getest in diverse klinische studies (Boncoraglio et al. 2010, Fisher et al. 2016). Gedacht wordt dat het werkingsmechanisme van deze cellen lijkt te bestaan uit, 1) paracrine effecten die worden losgelaten door deze cellen in het beschadigde weefsel, of 2) transdifferentiatie en integratie van de volwassen stamcellen in het celtype wat beschadigd is geraakt. Dit laatste mechanisme is echter controversieel en lijkt maar in mindere mate daadwerkelijk voor te komen (van Berlo et al. 2014). Op dit moment worden volwassen stamcellen met name gezien als multipotent en kiemlaag-specifiek.

Sinds de eerste isolatie van menselijke embryonale stamcellen (hESCs) in 1998, hebben onderzoekers gekeken naar de diverse doeleinden waarvoor deze cellen gebruikt kunnen worden (Trounson and McDonald 2015). Alhoewel vele celtypen sindsdien zijn ontwikkeld uit deze hESCs, blijven de ethische bezwaren met betrekking tot het gebruik van embryo-naal weefsel voor regeneratieve therapieën bestaan. Hierdoor zullen hESCs waarschijnlijk nooit hun volledige potentie bereiken.

In 2006 heeft Shinya Yamanaka ontdekt dat volwassen cellen konden worden geprogrammeerd naar een pluripotente staat, vanwaaruit, vergelijkbaar met ESCs, diverse typen cellen kunnen worden ontwikkeld (Takahashi and Yamanaka 2006). Deze ontdekking kwam tot stand door goed te kijken naar het genexpressie profiel van ESCs en die genen te vinden die verantwoordelijk zijn voor het behoud van pluripotentie. Door deze genen (Oct4, cMyc, KLF4 en Sox2) te verpakken als virale deeltjes en een volwassen cel daarmee te infecteren, was zijn groep in staat om deze volwassen cellen pluripotent te maken. Deze geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSCs) zijn vergelijkbaar met ESCs in morfologie, eigenschappen en potentie om alle cellen te vormen van de drie kiemlagen. Een jaar later liet dezelfde groep

zien dat het creëren van iPSCs ook mogelijk was voor menselijke cellen (Takahashi et al. 2007). Hiermee werd een compleet nieuw onderzoeksgebied geopend voor regeneratieve therapieën. Samen worden ESCs en iPSCs gezien als pluripotente stamcellen.

In **Hoofdstuk 3** beschrijven we twee genvectoren die gebruikt kunnen worden voor gentherapie en voor het reprogrammeren van somatische cellen tot iPSCs. Allereerst beschrijven we een nieuwe methode die het relatief complexe en tijdrovende reprogrammeren van somatische cellen vereenvoudigt door het reprogrammeren met een gebruiksvriendelijk plasmide; het codon-geoptimaliseerde mini-intronic plasmide (CoMiP). Door de vier reprogrammeringsgenen in een MIP te plaatsen (4-in-1 CoMiP), hebben we bona fide iPSCs weten te creëren van verschillende donor cellen, waaronder PBMCs (bloedcellen). In vergelijking met andere DNA-gebaseerde reprogrammeringsmethoden, zoals minicircle of de Yamanaka individuele plasmiden, is de CoMiP methode sneller en goedkoper in het creëren van pluripotente cellen van somatische cellen. Daarnaast, als appendix van hoofdstuk 3, wordt het gebruik van een codon-geoptimaliseerde 4-in-1 minicircle (CoMiC) beschreven voor het reprogrammeren van somatische cellen. In vergelijking met conventionele plasmiden, bestaan de non-virale minicircles (MC) uit dicht opgewonden DNA-moleculen die kleiner zijn dan een normaal plasmide en geen bacteriële replicatie cassette meer hebben. Deze eigenschappen maken MCs uitermate geschikt voor gentherapie omdat ze, 1) door hun kleine formaat een hogere transfectie efficiëntie hebben en, 2) zonder bacterieel DNA verminderd immunogeen zijn.

Ten behoeve van gentherapie, hebben we in **Hoofdstuk 4** een MC gebruikt voor de systemische overexpressie van IL-10 in het angiotensine II-infusie-ApoE^{-/-} AAA muismodel van aortale aneurysma's. Infusie van MC IL-10 leidde tot significante reductie van de aorta diameter op dag 28 en verhoogde de dissectie-vrije overleving van 21.5% in controle muizen naar 62.3% in MC IL-10 behandelde muizen.

Naast gentherapie is er een extra gebied dat veel aandacht heeft gekregen in de laatste twee decennia: PSC therapie. In **Hoofdstuk 5** richtten we ons op het gebruik van iPSCs in een model van perifeer vaatlijden in patiënten met diabetes. Een belangrijke vraag die we hebben behandeld in dit hoofdstuk is of de bron van iPSCs belangrijk is voor de uiteindelijke effectiviteit van het celproduct. Om deze vraag te beantwoorden, zijn iPSCs van diabetische en niet-diabetische muizen gecreëerd en gedifferentieerd tot endotheelcellen (ECs) om het regeneratieve potentieel te bepalen in een achterpoot ischemie model. De bevindingen van deze studie lieten zien dat iPSC-ECs van diabetische donor cellen een verminderde regeneratieve capaciteit hadden in vergelijking met de iPSC-ECs van gezonde donoren. Deze resultaten zijn erg belangrijk voor het gebruik van gedifferentieerde cellen van iPSCs in de toekomst, omdat ze ons laten zien dat we deze cellen moeten creëren van gezonde donoren

voor het beste klinische resultaat. In de praktijk zal het gebruik van patiënt-specifieke iPSCs niet alleen gelimiteerd worden door de hoge kosten and “good manufacturing practices” (Turner et al. 2013), maar ook door het feit dat deze patiënt-specifieke iPSCs dus niet altijd zullen resulteren in de beste klinische resultaten.

Over het algemeen wordt het duidelijk dat regeneratieve therapieën met stamcellen grote potentie heeft. De therapeutische en regeneratieve mogelijkheden van deze cellen worden nu onderzocht in preklinische, maar ook klinische studies (Trounson and McDonald 2015, Mandai et al. 2017). Echter, de intrinsieke eigenschappen van deze cellen, alsmede de methode waarmee deze cellen worden gecreëerd, hebben gezorgd voor twijfel over de veiligheid van het gebruik van deze cellen. Deze worden geadresseerd in dit proefschrift.

KLINISCHE OBSTAKELS VOOR REGENERATIEVE THERAPIEËN

Tumorigeniciteit

Het gebruik van gen- en celtherapie voor regeneratieve therapieën is niet van de laatste tijd en de eerste onderzoeken dateren al van enkele decennia geleden. Hoewel deze therapieën al een tijd bestaan, heeft het gebruik hiervan ons over de tijd wel een aantal belangrijke lessen geleerd. Een voorbeeld hiervan is een rapport over het ontstaan van leukemie na behandeling met genterapie (Kohn et al. 2003). Deze nadelige effecten hebben geleid tot een toename in de voorzichtigheid met betrekking tot gen- en celtherapie en diepgaander onderzoek in de effecten van beide therapieën. Echter, zelfs met de hieruit voortgevloeide regels en kennis over gen- en celtherapie, komen tegenslagen tot op de dag van vandaag voor. Een goed voorbeeld hiervan is de gestarte klinische trial in Riken, Japan voor het gebruik van retina pigmentcellen (gecreëerd vanuit iPSCs) in de behandeling van maculadegeneratie. Deze was kortdurend gestaakt in verband met mutagenese van de getransplanteerde cellen (Garber 2015).

Zoals beschreven in **Hoofdstuk 6**, is een risicofactor voor genterapie en de ontwikkeling van iPSCs dat we nog onvoldoende weten wat de incorporatie van (gecorrigeerde) genen doen met de functionaliteit van het genoom. Zeker in de gevallen waar een vector integreert in het genoom kan de plaats waar integratie plaatsvindt leiden tot activatie van pro-oncogenen. Dit geldt voor genterapie, maar ook voor de generatie van iPSCs, waarbij de eerste generatie iPSCs te maken hadden met reactivatie van het cMyc gen dat leidde tot tumorigenese (Okita et al. 2007). Maar ook de intrinsieke eigenschappen van pluripotente cellen eisen voorzichtigheid in hun gebruik voor regeneratieve therapieën. Want hoewel preklinische onderzoeken ons al hebben geleerd dat ongedifferentieerde PSCs teratomen vormen na transplantatie, hebben meer recente onderzoeken uitgewezen dat zelfs >90% pure gedifferentieerde grafts kunnen leiden tot tumor formatie (Riegler et al. 2015). En deze

bevindingen baren onderzoekers zorgen als er gekeken wordt naar verdere implementatie van deze therapieën voor de behandeling van patiënten.

Immunogeniciteit

Een van de grootste limitaties van gen- en celtherapie is de immunorespons tegen vectoren en celtypen. Zoals beschreven in dit proefschrift, kan de immunogeniciteit van genvectoren zeer nadelige effecten hebben. Een voorbeeld hiervan is het overlijden van een patiënt aan een cytokinestorm, nadat deze met een retrovirale vector werd behandeld voor een neurodegeneratieve aandoening (Marshall 1999). Immunogeniciteit is niet alleen een nadelig effect van gentherapie, maar ook van celtherapie. De meeste allogene stamceltherapieën worden ondersteund door immuunsuppressie (Kim et al. 2003, Schwartz et al. 2012, Selden et al. 2013) en alhoewel goede resultaten zijn behaald in preklinische diermodellen (Swijnenburg et al. 2008, Pearl et al. 2011), is nog maar weinig bekend over de optimale immuunsuppressie om langdurige celoverleving te bevorderen in mensen. Tot dusver hebben preklinische onderzoeken in grotere diermodellen voordeel laten zien in het gebruik van T-cel co-stimulatoire blockade medicatie ter bevordering van de overleving van PSC-grafts (Chong et al. 2014). Deze resultaten laten zien dat er een belangrijke rol is voor het immuunsysteem in de overleving van getransplanteerde PSC-gerelateerde cellen.

De belofte van PSC-therapieën was dat de cellen konden worden gebruikt zonder, of met minimale immuunsuppressiva. Voor ESCs komt dit door de lage expressie van MHC moleculen op de ESCs. Echter, na differentiatie vindt er een upregulatie plaats van de MHC klasse I moleculen (Drukker et al. 2002). Na de ontdekking van iPSCs, hadden onderzoekers het idee dat ze een manier hadden gevonden om autologe cellen te gebruiken waardoor er helemaal geen noodzaak zou zijn voor immuunsuppressiva. Zoals in **Hoofdstuk 7** duidelijk is geworden, hebben we deze voorspelling enigszins moeten herzien. In dit hoofdstuk beschrijven we namelijk dat iPSCs worden afgestoten door het immuunsysteem, zelfs als deze autoloog worden getransplanteerd. Na differentiatie van iPSCs naar endotheelcellen (iPSC-ECs) verliezen deze cellen echter weer hun immunogeniciteit en werden geaccepteerd door het immuunsysteem op eenzelfde manier als somatische cellen door middel van upregulatie van het immuunsuppressieve cytokine IL-10.

In **Hoofdstuk 8** proberen we vervolgens de immunogeniciteit van PSCs in de setting van een menselijk immuunsysteem te modelleren. Hiervoor gebruiken we een gehumaniseerde BLT muis. In dit model worden NOD-SCID IL2R/g knockout bestraald en getransplanteerd met foetaal menselijk beenmerg, lever en thymus (BLT). Humanisatie van het immuunsysteem van deze muizen is superieur aan eerdere beschreven muismodellen (Lan et al. 2006, Melkus et al. 2006). Vervolgens is met dit model al aangetoond dat er een robuuste immunorespons kan worden opgewekt tegen HIV infecties en andere infectieuze ziekten (Brehm et al. 2014), alsmede in studies naar de afstoting van menselijke huid en pancreas eilandjes (Xiao et

al. 2014). Voor stamceltransplantatie studies is dit model echter nog niet uitvoerig getest. Een recente studie heeft infiltratie van immuuncellen in getransplanteerde menselijke grafts laten zien, maar graft overleving werd niet op een juiste manier geanalyseerd doordat T-cel infiltratie binnen de grafts niet automatisch betekent dat een graft wordt afgestoten. Ook “uitgeputte” of geïnactiveerde T-cellen kunnen aanwezig zijn binnen een graft, zoals bijvoorbeeld ook wordt gezien binnen kankerweefsel (Zou 2005).

Binnen onze BLT muizen werd het menselijk immuunsysteem echter wel geactiveerd, maar viel het hierbij het eigen weefsel van de muis aan wat resulteerde in een auto-immuunrespons. Deze langdurige activatie van het menselijk immuunsysteem tegen muis antigenen verhinderde hierdoor op een later moment een immuunrespons tegen de stamcel grafts. Binnen deze grafts waren T-cellen wel aanwezig, maar single-cell PCR analyse liet vermoeide en geïnactiveerde T-cellen zien. Met deze resultaten werd wederom aangetoond dat T-cellen binnen grafts aanwezig kunnen zijn zonder dat dat leidt tot afstoting.

PSC TUMORGENICITEIT EN IMMUNOGENICITEIT: NIET ALLEEN MAAR NADELEN...

Alhoewel er nog grote vooruitgangen moeten worden geboekt in ons begrip over de eigenschappen van PSCs om ze volledig veilig te maken voor transplantatie, kunnen ze nu al wel bruikbaar zijn voor bepaalde behandelingen. Al ruim een eeuw bestaan beschrijvingen over het gebruik van embryonaal weefsel om het immuunsysteem te activeren tegen kanker. Hiervan zijn een aantal met veelbelovende resultaten (Li et al. 2009, Yaddanapudi et al. 2012). Echter, vergelijkbaar met regeneratieve therapieën, zal het gebruik van embryonaal weefsel ook voor deze vorm van therapie niet snel voorbij de pre-klinische fase komen. Zoals wordt beschreven in **Hoofdstuk 9** hebben iPSCs ook een grote overlap in tumor-geassocieerde en tumor-specifieke antigenen met diverse typen kanker. De combinatie van het vergelijkbare epitopen profiel en de immunogeniciteit van iPSCs maken dat dit celtype als surrogaat kan worden gebruikt om het immuunsysteem te activeren tegen diverse kankertypen. In dit hoofdstuk laten we inderdaad zien dat dit het geval is voor borstkanker, melanoom en voor mesothelioom. Muizen vaccineren met iPSCs in combinatie met het adjuvant CpG resulteerde in verhoogde antigeen presentatie in de drainerende lymfeklieren waarop verhoging van het aantal effector/geheugen helper en cytotoxische T-cellen plaatsvond. Met dit immuunprofiel waren muizen in staat om de tumorgroei volledig of partieel te inhiberen. Met behulp van CyTOF analyses en het citrus algoritme hebben we vervolgens de immuuncellen geïdentificeerd die verantwoordelijk waren voor deze kanker immuniteit. Hierna gingen we nog een stap verder door aan te tonen dat het iPSC vaccin gebruikt kon worden om het immuunsysteem te reactiveren tegen al bestaande kanker. De muizen in deze studie werden behandeld met het vaccin na resectie van de primaire tumor en hadden

minder terugkeer van kanker in het resectiegebied en verminderde tumor aanwezigheid in de drainerende lymfeklieren.

De resultaten van dit proefschrift beschrijven de potentie van gen- en celtherapie voor verschillende vaataandoeningen, maar geven ook een gedetailleerde beschrijving van de immunogeniciteit en tumorigeniciteit die hiermee geassocieerd zijn. Voor de verdere implementatie van deze therapieën zal hier rekening mee moeten worden gehouden door bijvoorbeeld de inbouw van “zelfmoord genen” in de getransplanteerde cellen, die voor celdood zorgen als er ongewenste groei of mutatie van het transplantaat plaatsvindt (Cao et al. 2007, Jones et al. 2014). Daarnaast zullen de nieuwe ontwikkelingen in het creëren van universele donorcellen, die het immuunsysteem niet activeren, waarschijnlijk een belangrijke rol gaan spelen (Lu et al. 2013, Chen et al. 2015, Wang et al. 2015, Bix et al. 1991, Liao et al. 1991, Gornalusse et al. 2017). Tot slot beschrijft dit proefschrift dat de immunogene en tumorigene eigenschappen van iPSCs ook gebruikt kunnen worden als vaccin tegen kanker. De overlap in tumor-specifieke en tumor-geassocieerde eiwitten maakt dit celttype een goede surrogaat om immuun activiteit tegen kankercellen te creëren.

REFERENCES

- Amado, L. C., A. P. Saliaris, K. H. Schuleri, M. St John, J. S. Xie, S. Cattaneo, . . . J. M. Hare (2005). "Cardiac repair with intramyocardial injection of allogeneic mesenchymal stem cells after myocardial infarction." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(32): 11474-11479.
- Bix, M., N. S. Liao, M. Zijlstra, J. Loring, R. Jaenisch and D. Raulat (1991). "Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice." *Nature* 349(6307): 329-331.
- Boncoraglio, G. B., A. Bersano, L. Candelise, B. A. Reynolds and E. A. Parati (2010). "Stem cell transplantation for ischemic stroke." *Cochrane Database Syst Rev*(9): CD007231.
- Brehm, M. A., M. V. Wiles, D. L. Greiner and L. D. Shultz (2014). "Generation of improved humanized mouse models for human infectious diseases." *J Immunol Methods* 410: 3-17.
- Cao, F., M. Drukker, S. Lin, A. Y. Sheikh, X. Xie, Z. Li, . . . J. C. Wu (2007). "Molecular imaging of embryonic stem cell misbehavior and suicide gene ablation." *Cloning Stem Cells* 9(1): 107-117.
- Chen, H., Y. Li, X. Lin, D. Cui, C. Cui, H. Li and L. Xiao (2015). "Functional disruption of human leukocyte antigen II in human embryonic stem cell." *Biol Res* 48: 59.
- Chong, J. J., X. Yang, C. W. Don, E. Minami, Y. W. Liu, J. J. Weyers, . . . C. E. Murry (2014). "Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts." *Nature* 510(7504): 273-277.
- Dezawa, M., H. Ishikawa, Y. Itokazu, T. Yoshihara, M. Hoshino, S. Takeda, . . . Y. Nabeshima (2005). "Bone marrow stromal cells generate muscle cells and repair muscle degeneration." *Science* 309(5732): 314-317.
- Drukker, M., G. Katz, A. Urbach, M. Schuldiner, G. Markel, J. Itskovitz-Eldor, . . . N. Benvenisty (2002). "Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(15): 9864-9869.
- Fisher, S. A., C. Doree, A. Mathur, D. P. Taggart and E. Martin-Rendon (2016). "Stem cell therapy for chronic ischaemic heart disease and congestive heart failure." *Cochrane Database Syst Rev* 12: CD007888.
- Garber, K. (2015). "RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells." *Nat Biotechnol* 33(9): 890-891.
- Gornalusse, G. G., R. K. Hirata, S. E. Funk, L. Riobos, V. S. Lopes, G. Manske, . . . D. W. Russell (2017). "HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells." *Nat Biotechnol* 35(8): 765-772.
- Inoue, H., Watanabe, A., Sakamoto, C., Narusawa, M., Hiramoto, T., Miyamoto, S., Inoue, M., Takayama, K., Hasegawa, M., and Nakanishi, Y. (2013). "Vaccination With Irradiated Induced Pluripotent Stem Cells Genetically Engineered To Produce GM-CSF Confers Potent T Cells-Mediated Antitumor Immunity." *Blood* 122: 4492.
- Jones, B. S., L. S. Lamb, F. Goldman and A. Di Stasi (2014). "Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer." *Front Pharmacol* 5: 254.
- Kim, H. J., C. Y. Park, Y. H. Park, Y. J. Kim, D. W. Kim, W. S. Min and C. C. Kim (2003). "Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using triple agent immunosuppression in severe aplastic anemia patients." *Bone Marrow Transplant* 31(2): 79-86.
- Kohn, D. B., M. Sadelain and J. C. Glorioso (2003). "Occurrence of leukaemia following gene therapy of X-linked SCID." *Nat Rev Cancer* 3(7): 477-488.

- Lan, P., N. Tonomura, A. Shimizu, S. Wang and Y. G. Yang (2006). "Reconstitution of a functional human immune system in immunodeficient mice through combined human fetal thymus/liver and CD34+ cell transplantation." *Blood* 108(2): 487-492.
- Li, Y., H. Zeng, R. H. Xu, B. Liu and Z. Li (2009). "Vaccination with human pluripotent stem cells generates a broad spectrum of immunological and clinical responses against colon cancer." *Stem Cells* 27(12): 3103-3111.
- Liao, N. S., M. Bix, M. Zijlstra, R. Jaenisch and D. Raulet (1991). "MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity." *Science* 253(5016): 199-202.
- Lu, P., J. Chen, L. He, J. Ren, H. Chen, L. Rao, . . . L. Xiao (2013). "Generating hypoinmunogenic human embryonic stem cells by the disruption of beta 2-microglobulin." *Stem Cell Rev* 9(6): 806-813
- Mandai, M., Y. Kurimoto and M. Takahashi (2017). "Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration." *N Engl J Med* 377(8): 792-793.
- Marshall, E. (1999). "Gene therapy death prompts review of adenovirus vector." *Science* 286(5448): 2244-2245.
- Melkus, M. W., J. D. Estes, A. Padgett-Thomas, J. Gatlin, P. W. Denton, F. A. Othieno, . . . J. V. Garcia (2006). "Humanized mice mount specific adaptive and innate immune responses to EBV and TSST-1." *Nat Med* 12(11): 1316-1322.
- Okita, K., T. Ichisaka and S. Yamanaka (2007). "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells." *Nature* 448(7151): 313-317.
- Pearl, J. I., A. S. Lee, D. B. Leveson-Gower, N. Sun, Z. Ghosh, F. Lan, . . . J. C. Wu (2011). "Short-term immunosuppression promotes engraftment of embryonic and induced pluripotent stem cells." *Cell Stem Cell* 8(3): 309-317.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, . . . D. R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." *Science* 284(5411): 143-147.
- Prockop, D. J. (1997). "Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues." *Science* 276(5309): 71-74.
- Riegler, J., M. Tiburcy, A. Ebert, E. Tzatzalos, U. Raaz, O. J. Abilez, . . . J. C. Wu (2015). "Human Engineered Heart Muscles Engraft and Survive Long Term in a Rodent Myocardial Infarction Model." *Circ Res* 117(8): 720-730.
- Schwartz, S. D., J. P. Hubschman, G. Heilwell, V. Franco-Cardenas, C. K. Pan, R. M. Ostrick, . . . R. Lanza (2012). "Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report." *Lancet* 379(9817): 713-720.
- Selden, N. R., A. Al-Uzri, S. L. Huhn, T. K. Koch, D. M. Sikora, M. D. Nguyen-Driver, . . . R. D. Steiner (2013). "Central nervous system stem cell transplantation for children with neuronal ceroid lipofuscinosis." *J Neurosurg Pediatr* 11(6): 643-652.
- Swijnenburg, R. J., S. Schrepfer, J. A. Govaert, F. Cao, K. Ransohoff, A. Y. Sheikh, . . . J. C. Wu (2008). "Immunosuppressive therapy mitigates immunological rejection of human embryonic stem cell xenografts." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(35): 12991-12996.
- Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda and S. Yamanaka (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." *Cell* 131(5): 861-872.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *Cell* 126(4): 663-676.

- Trounson, A. and C. McDonald (2015). "Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges." Cell Stem Cell 17(1): 11-22.
- Turner, M., S. Leslie, N. G. Martin, M. Peschanski, M. Rao, C. J. Taylor, . . . I. Wilmot (2013). "Toward the development of a global induced pluripotent stem cell library." Cell Stem Cell 13(4): 382-384.
- Union, E. (2012). "The 2012 Ageing Report." European Economy.
- van Berlo, J. H., O. Kanisicak, M. Maillet, R. J. Vagnozzi, J. Karch, S. C. Lin, . . . J. D. Molkentin (2014). "c-kit+ cells minimally contribute cardiomyocytes to the heart." Nature 509(7500): 337-341.
- Wang, D., Y. Quan, Q. Yan, J. E. Morales and R. A. Wetsel (2015). "Targeted Disruption of the beta2-Microglobulin Gene Minimizes the Immunogenicity of Human Embryonic Stem Cells." Stem Cells Transl Med 4(10): 1234-1245.
- Xiao, F., L. Ma, M. Zhao, G. Huang, V. Mirenda, A. Dorling, . . . G. Lombardi (2014). "Ex vivo expanded human regulatory T cells delay islet allograft rejection via inhibiting islet-derived monocyte chemoattractant protein-1 production in CD34+ stem cells-reconstituted NOD-scid IL2rgammanull mice." PLoS One 9(3): e90387.
- Yaddanapudi, K., R. A. Mitchell, K. Putty, S. Willer, R. K. Sharma, J. Yan, . . . J. W. Eaton (2012). "Vaccination with embryonic stem cells protects against lung cancer: is a broad-spectrum prophylactic vaccine against cancer possible?" PLoS One 7(7): e42289.
- Zou, W. (2005). "Immunosuppressive networks in the tumor environment and their therapeutic relevance." Nat Rev Cancer 5(4): 263-274.