

# 诱导性多能干细胞治疗：移植排斥与安全性问题

吴鹏飞, 周光纪(广东医学院, 广东省东莞市 523808)

## 文章亮点:

- 1 此问题的已知信息: 将成熟体细胞“重编程”为诱导性多能干细胞后, 可获得与胚胎干细胞类似的多能性。因诱导性多能干细胞可来源于自体, 被认为可以实现“同基因移植”, 具有广阔的临床运用前景, 但来源于诱导性多能干细胞的衍生组织用于移植治疗的安全性问题, 还未受到应有的重视。
- 2 文章增加新的信息: 综述了目前移植研究中诱导性多能干细胞的免疫原性问题、致瘤性问题及遗传安全性问题, 对比分析了传统基因操作诱导方法与新的“无插入式”诱导方法获得的诱导性多能干细胞在移植中的安全性。各项实验采用不同细胞系进行研究, 结果也具有差异性。由于诱导性多能干细胞的重编程机制尚未完全阐明, 不同的细胞来源也会对诱导性多能干细胞安全性产生影响。与胚胎干细胞相比, 诱导性多能干细胞的遗传学特征均存在不同程度异常, 存在实际运用的安全隐患。
- 3 临床应用的意义: 进一步研究细胞重编程机制, 继续开发更加安全的诱导性多能干细胞诱导技术, 最终形成统一、安全、适用于临床的诱导性多能干细胞质量控制标准。

## 关键词:

干细胞; 移植; 诱导性多能干细胞; 免疫原性; 安全性; 胚胎干细胞; 重编程; 诱导方法; 移植排斥; 国家自然科学基金

## 主题词:

干细胞; 诱导多功能干细胞; 移植; 安全

## 基金资助:

国家自然科学基金(30772769)

吴鹏飞, 男, 1988年生, 湖北省荆门市人, 汉族, 广东医学院生理学专业在读硕士, 主要从事干细胞免疫原性研究。

通讯作者: 周光纪, 博士, 教授, 广东医学院, 广东省东莞市 523808

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2015)10-01619-05

稿件接受: 2015-02-11

http://www.crter.org

## 摘要

**背景:** 诱导性多能干细胞自发现以来一直是再生医学的研究热点, 但人们过多地关注了它的运用性却忽略了安全性。

**目的:** 通过综述目前诱导性多能干细胞在动物移植研究中的表现, 分析诱导性多能干干细胞的安全性问题及可能原因, 为今后的诱导性多能干细胞研究及临床运用提供参考。

**方法:** 以英文检索词为“induced pluripotent stem cells, safety, immune, immunogenicity, tumorigenicity, cancer, epigenomic, transplantation, Generation, Reprogramming, genomic, mutation”由第一作者检索 2006 至 2014 年 PubMed 数据库, 查阅近年来与诱导性多能干细胞安全性相关的文献, 进一步从 Cell Press 数据库和 Nature 数据库中获得文献全文阅读, 最终保留发表时间较近的 28 篇文献。

**结果与结论:** 诱导性多能干干细胞的安全性问题正引起越来越多人的重视, 免疫原性、潜在的致瘤性与表观遗传学变异问题是其临床应用的主要隐患。诱导性多能干干细胞的安全性问题主要来自于重编程过程, “插入式基因操作”比非插入式操作具有更大的致瘤风险。体细胞重编程后不同程度的发生了表观遗传学变异, 这些变异多与被重编程细胞的“遗传记忆”有关。

吴鹏飞, 周光纪. 诱导性多能干细胞治疗: 移植排斥与安全性问题[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(10): 1619-1623.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.10.026

## Induced pluripotent stem cell therapy: transplant rejection and safety

Wu Peng-fei, Zhou Guang-ji (Guangdong Medical College, Dongguan 523808, Guangdong Province, China)

## Abstract

**BACKGROUND:** Induced pluripotent stem cells have been a hotspot in regenerative medicine research since it was discovered. The clinical application of induced pluripotent stem cells is excessively focused on, but the safety issue is almost ignored.

**OBJECTIVE:** By summarizing the application of induced pluripotent stem cells in animal experiments to analyze the safety problems of induced pluripotent stem cells and their possible reasons in order to lay a foundation for further study and clinical application of induced pluripotent stem cells.

**METHODS:** PubMed database was retrieved by the first author for articles related to the safety of induced pluripotent stem cells published from 2006 to 2014 using the keywords of “induced pluripotent stem cells, safety, immune, immunogenicity, tumorigenicity, cancer, epigenomic, transplantation, generation, reprogramming,

Wu Peng-fei, Studying for master's degree, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, Guangdong Province, China

Corresponding author: Zhou Guang-ji, M.D., Professor, Guangdong Medical College, Dongguan 523808, Guangdong Province, China

Accepted: 2015-02-11

genomic, mutation” in English. Related full texts were got from Cell Press and Nature Databases. Finally, 28 articles were chosen in result analysis.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Safety problems of induced pluripotent stem cells are attracting more and more attentions. Immunogenicity, potential tumorigenicity and epigenetic variation are major risks for the clinical applications of induced pluripotent stem cells. Safety issues of induced pluripotent stem cells mainly come from the reprogramming process. The “integrating genetic manipulation” may lead to a greater risk of tumorigenicity than non-integrating operations. Epigenetic variations emerge in the reprogramming, which are mostly relative to “epigenetic memory” of reprogrammed cells.

**Subject headings:** Stem Cells; Induced Pluripotent Stem Cells; Transplantation; Safety

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 30772769

Wu PF, Zhou GJ. Induced pluripotent stem cell therapy: transplant rejection and safety. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(10):1619-1623.

## 0 引言 Introduction

诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)最初由Takahashi和Yamanaka及其团队发现, 通过向体细胞转入诱导因子使其逆向分化为多能干细胞, 具有多向分化潜能和自我更新能力, 自发现以来一直在生物医学上被寄予厚望, 人类诱导性多能干细胞的建立有望为生物医学提供更多的供体来源。由于诱导性多能干细胞可源自自体, 用于移植时相当于“自体移植”, 在理论上不会引起免疫排斥, 但因诱导性多能干细胞源自转基因技术, 外源基因的随机插入以及由此带来的细胞表观遗传学改变, 使经过遗传修饰的诱导性多能干细胞与其亲本细胞有了很大不同, 有可能存在潜在的致畸、致癌以及免疫原性改变。这些问题在近年来逐步受到重视, 也取得了一些新进展。

## 1 资料和方法 Data and methods

**1.1 资料来源** 由第一作者检索2006至2014年PubMed数据库, 查阅近年来与诱导性多能干细胞安全性相关的文献。英文检索词为“induced pluripotent stem cells, safety, immune, immunogenicity, tumorigenicity, cancer, epigenomic, transplantation, generation, reprogramming, genomic, mutation”

### 1.2 检索方法

**纳入标准:** ①内容相关度高。②具有原创性, 且观点明确, 论据可靠的文献。③内容相近的选择近期或在权威杂志发表的文献。

**排除标准:** ①内容相关性差或重复文献。②逻辑不严谨, 可信度差的文献。

**1.3 质量评估** 由全体作者共同对检索所得文献的质量进行评估, 应用关键词“induced pluripotent stem cells, iPSCs”初筛, 在结果中使用关键词“immunogenicity, tumorigenicity, safety, transplantation, genomic mutation, epigenomic, generation, reprogramming”再次筛选, 共纳入28篇文献进行综述。

## 2 结果 Results

**2.1 诱导性多能干细胞的免疫原性问题** 从基因组学角度来说, 由于诱导性多能干细胞具有与供体完全相同的基因而被认为能够避免免疫排斥。然而, 最近的研究却有不同发现, Zhao等<sup>[1]</sup>将B6小鼠胚胎成纤维细胞重编程诱导为诱导性多能干细胞后, 再移植到同品系的B6小鼠体内, 在诱导性多能干细胞形成的畸胎瘤组织中观察到了免疫排斥反应。研究人员进一步分析了上述实验中诱导性多能干细胞形成的畸胎瘤细胞的基因表达图谱, 发现有Hormad1、Zg16等9个基因的表达异常增高, 并证明这些基因异常表达导致了免疫排斥。这些基因的表达异常可能由细胞的重编程过程引起, 在重编程过程中伴随着外源基因的插入和大量表观遗传修饰变化<sup>[2]</sup>, 这些改变有可能导致诱导性多能干细胞的免疫原性发生变化<sup>[3-4]</sup>。

上述研究观察到了畸胎瘤组织整体的免疫原性, 然而畸胎瘤包含不同种类的分化细胞, 是否所有种类的细胞都具有免疫原性, 不同种类分化细胞的免疫原性是否具有差别需要进一步探究。最近有研究者将小鼠胚胎干细胞和诱导性多能干细胞分别在体外诱导为成熟的内皮细胞、肝细胞和神经元细胞后, 与同源淋巴细胞进行体外共培养和体内移植实验检测其免疫原性, 在胚胎干细胞和诱导性多能干细胞来源的成熟细胞实验中都得到了相同结果, 在体外共培养的淋巴细胞未出现增殖反应, 所有移植入同源宿主的分化细胞都未发生明显免疫排斥, 表明诱导性多能干细胞与胚胎干细胞一样, 在同基因移植时其免疫原性是“缺失”的<sup>[5]</sup>。该研究中诱导性多能干细胞和胚胎干细胞也同时被移植入同源小鼠中并都形成了畸胎瘤, 在诱导性多能干细胞和胚胎干细胞形成的畸胎瘤组织中Hormad、Zg16和Retn genes的表达也无差异<sup>[5]</sup>。然而, 值得注意的是, 在体外定向分化诱导培养时, 两种细胞来源的内皮细胞的存活率差异无显著性意义, 但在体内移植实验时, 诱导性多能干细胞来源的内皮细胞的死亡率比胚胎干细胞来源的内皮细胞的死亡率高, 提示相比于“正常细胞”胚胎干细胞, 诱导性多能干细胞及其衍生细胞在某些生物学特

性方面仍然存在差异。在另一项研究中, 研究人员使用了诱导性多能干细胞或胚胎干细胞嵌合鼠的皮肤组织和骨髓造血细胞以评估诱导性多能干细胞在体内自发分化时分化细胞的免疫原性, 结果发现, 这两种细胞衍生的分化细胞的免疫原性“可以忽略”<sup>[6]</sup>。在体外实验中, 研究人员发现从诱导性多能干细胞诱导得到的心肌细胞有较高免疫原性, 提示由诱导性多能干细胞衍生的不同种类细胞其免疫原性也不相同, 这可能是不同组织的免疫原性本身不同, 或者与组织来源无关。

在畸胎瘤实验中, 由于诱导性多能干细胞移植后形成的畸胎瘤中包含有3个胚层的各种细胞, 不同胚层细胞基因表达的取向与程度具有很大差异, 使得分化后的细胞表现出不同的免疫原性(心肌细胞和脂肪细胞免疫原性就大不相同), 因而在临床应用之前, 需要先检测移植组织细胞的免疫原性, 才能预知是否适合用于移植。

最近有一项使用灵长类动物模型的移植实验, 即将帕金森病绒猴模型的口腔黏膜细胞和外周血单核细胞重编程为诱导性多能干细胞再在体外诱导成多巴胺能神经元, 在这些细胞上检测到了较低的MHC-I类分子表达。将这些神经元移植到同基因或MHC不匹配的绒猴大脑组织后, 虽然细胞均能存活, 但异基因诱导性多能干细胞源性神经元移植引起了移植宿主的神经小胶质细胞增生和MHC-II分子表达明显增加, 而同基因移植反应很轻微<sup>[7]</sup>。

上述研究结果的差异, 可能是诱导性多能干细胞重编程的细胞及重编程方法都不同所致。重编程细胞的组织来源、重编程过程中插入外源基因方法和种类都不同, 得到的实验结果都有可能不同, 因此, 要确定诱导性多能干细胞安全性, 还需要系统、深入研究, 以建立相对安全的重编程流程, 并通过移植确认各种分化细胞的免疫原性。

## 2.2 诱导性多能干细胞的致瘤性问题

**2.2.1 外源基因插入与诱导性多能干细胞的致瘤性**  
诱导性多能干细胞的成瘤性表现为不受宿主控制的过度增殖和成熟分化缺失, 这种类似肿瘤细胞的特性可能与诱导性多能干细胞高表达某些肿瘤相关基因有关。最初的诱导性多能干细胞是用反转录病毒或慢病毒导入特定的转录因子(Oct4、Sox2、Klf4、c-Myc)获得的。这些转录因子在正常干细胞中有表达, 但也高表达于肿瘤细胞中, 它们既是体细胞进入重编程的“临界作用”所必需的, 也是肿瘤细胞必需的, 过表达这些因子的诱导性多能干细胞具有基因源性成瘤风险<sup>[8]</sup>。用四倍体胚胎互补技术(tetraploid complementation)引入诱导性多能干细胞得到的嵌合小鼠有较高肿瘤发生倾向, 这种倾向还能遗传给子代小鼠<sup>[9]</sup>。研究发现,

常用于“诱导”多能干细胞的转录因子(SOX2, OCT4, NANOG等)在肿瘤细胞中普遍高表达<sup>[10]</sup>。最近一项研究向人皮肤纤维细胞转入OCT4, SOX2和KLF4建立一株诱导多能性干细胞, 随后在体外诱导为神经干细胞, 用于移植治疗脊髓损伤模型小鼠。实验人员认为由于未转入c-Myc因子, 使该株细胞的致癌风险相对降低。在预设的47 d观察期内, 移植的神经干细胞促进了小鼠运动功能恢复。但在继续进行的移植远期观察中, 小鼠在移植后103 d运动机能突然恶化伴随肿瘤发生。该肿瘤由Nestin<sup>+</sup>未分化神经样细胞组成, OCT4基因表达相较于未移植的神经干细胞显著增强, 提示肿瘤发生可能与OCT4基因表达增强相关。对肿瘤组织进行转录分析显示增强的上皮间质转化可能促进了移植细胞的肿瘤发生<sup>[11]</sup>。还有研究发现, 小鼠诱导性多能干细胞分泌的细胞因子有助于形成肿瘤细胞的局部诱导微环境, 能诱导lewis肺癌细胞发生上皮间质转化<sup>[12]</sup>, 这种转化能促进肿瘤的发生、增殖和迁移。因此, 除了诱导性多能干细胞自身的成瘤性外, 诱导性多能干细胞移植后形成的局部诱导微环境也有可能引起移植部位宿主细胞的“癌性转化”, 这是在诱导性多能干细胞移植时需要高度关注的问题。

**2.2.2 基因异常与诱导性多能干细胞致瘤性** 研究人员将OCT3/4、SOX2、KLF4和c-MYC通过慢病毒导入灵长类动物猴的成纤维细胞后得到诱导性多能干细胞, 经检测这些细胞在表达胚胎干细胞标记(TRA1-60, SALL1, LIN28, DPPA4)的同时, 也表现出核型异常, 4q染色体发生了部分删除, 同时还出现了异常标记染色体mar。将这些诱导性多能干细胞移植入18只免疫缺陷小鼠体内6周后, 有11只小鼠发生了类似人的无性细胞瘤, 成瘤率高达61%, 而3只移植猴成纤维细胞的对照组小鼠无肿瘤形成, 提示诱导性多能干细胞具有成瘤倾向<sup>[13]</sup>。

由于不同组织细胞的基因修饰与表达谱各不相同, 因而将其诱导至可进行重编程的“临界状态”的难度也不相同, 不同组织细胞诱导成诱导性多能干细胞难易程度及所需要的转录因子的量也有很大差异, 诱导小鼠成纤维细胞所需要的转录因子量是肝细胞的100-200倍<sup>[14]</sup>。研究发现, 随着外源性c-Myc基因转入量的增加, 诱导性多能干细胞的基因异常也相应增多<sup>[13]</sup>, 提示增加转录因子的使用量可能导致出现更多的基因异常, 增加肿瘤发生的风险。

**2.2.3 “非基因插入式诱导性多能干细胞”的致瘤性问题** 由于外源性转录因子基因的插入以及与病毒载体基因的整合使得诱导性多能干细胞具有致瘤性等安全性隐患, 因此, 近年来无基因插入的诱导性多能干细胞诱导方法受到重视。腺病毒、质粒或游离型载体转染等“非插入式载体”重编程方法已成功应用于诱导性多能

干细胞的诱导<sup>[15-16]</sup>。还有通过将几种 miRNA (miRNAs-200c, -302s, -369s) 瞬时转染入小鼠和人的脂肪基质细胞后成功得到诱导性多能干细胞的报道, 这种技术通过 miRNA 激活内源的多能性基因, 从而完全避免了外源 DNA 物质的导入。研究人员将用非基因插入方法得到的诱导性多能干细胞移植入小鼠皮下, 形成的畸胎瘤中包含各种分化组织, 未观察到肿瘤发生。在最新的一项研究中, 研究人员构建了一套“人工染色体表达系统”, 这套系统包含带有 N 端标记蛋白 (Flag-tag) 和 C 端多聚精氨酸尾的 Oct4, Sox2 和 Klf4 因子, 能在组织细胞中高效表达重组蛋白并进行翻译后修饰, 这种“人工染色体”能通过蛋白转导的方式高效诱导胚胎成纤维细胞重排为诱导性多能干细胞<sup>[17]</sup>。非插入性重排技术使诱导性多能干细胞避免了肿瘤基因整合入宿主细胞基因组带来的风险, 目前尚无成瘤性报道, 有可能是一种更安全的方法, 目前非基因插入的诱导多能干细胞安全性还在评估中。但要注意的是, 非基因插入的诱导性多能干细胞虽然避免了外源基因整合, 但却无法克服重编程所致的表观遗传学修饰, 其安全性仍需进一步确认。

**2.3 诱导性多能干细胞的遗传安全性** 诱导性多能干细胞及其衍生细胞必须具有正常的遗传(包括表观遗传)特性, 并能稳定地传递给子代细胞, 才能应用于临床。近年来, 越来越多的诱导性多能干细胞遗传学异常被发现。研究人员在最近一项研究中使用 G-带分析、荧光原位杂交与光谱核型分析技术对 9 个来源于小鼠胚胎成纤维细胞或神经前体细胞的诱导性多能干细胞系进行了分析, 发现其中有 6 个细胞系的 14 号染色体出现“三体”或发生罗氏易位 (Robertsonian translocation, RB) 情况<sup>[18]</sup>, 这种异常随着外源性 c-Myc 基因转入量的增加而增多, 用于诱导性多能干细胞的细胞的核型是正常的, 说明其染色体异常发生在诱导性多能干细胞的诱导过程中。

使用特定的转录因子进行重编程有可能引起染色体异常, 那么有没有更安全重编程方法呢? “非插入式”小分子重编程也许是个不错的选择。有研究人员对 22 种人诱导性多能干细胞的基因组进行分析, 这些诱导性多能干细胞由 7 个不同实验室采用 5 种不同方法重编程人成纤维细胞得来, 包括 4 种转录因子、反转录病毒载体, 4 种转录因子、慢病毒载体, 3 种因子、慢病毒载体 3 种传统方法和 2 种非插入式方法 (游离载体和 miRNA 诱导法)。研究人员对这 22 种诱导性多能干细胞的基因进行测序比对后发现了 124 个突变, 而且不管是否采用基因整合诱导方法, 所得细胞均存在突变。经分析, 这些突变有半数可能影响蛋白质的功能, 部分变异与肿瘤发生有关<sup>[19]</sup>。利用单核苷酸多态性分析技术 (SNP) 比较大量人胚胎干细胞、人诱导性多能干细

胞及重编程来源成纤维细胞系之间的基因变异 (CNV) 后发现, 不管是否采用了无外源基因整合的诱导方法, 诱导性多能干细胞均比胚胎干细胞有更多的拷贝数变异, 但随着这些诱导性多能干细胞传代次数的增加, 变异逐渐减少至接近胚胎干细胞水平。研究人员据此推测体外培养过程中可能发生了自然筛选, 淘汰了具有严重变异的诱导性多能干细胞<sup>[20]</sup>。在经过几个代次的传代培养使诱导性多能干细胞的变异细胞接近正常胚胎干细胞后再继续传代, 高传代次数的诱导性多能干细胞发生基因组异常的情况比传代早期的诱导性多能干细胞高出将近一倍<sup>[19]</sup>, 说明传代培养具有两面性, 一定代次的体外传代培养有利于消除过度变异的细胞, 但长期传代的诱导性多能干细胞系的基因变异概率显著增加, 可能已经不再适合用于临床治疗, 这对诱导性多能干细胞的临床运用有重大价值, 究竟什么状态下的诱导性多能干细胞才是既安全又有效的, 还需要更多的研究才能得出结论。

### 3 问题与展望 Problems and prospects

从发育学角度来说, 胚胎干细胞可在适宜的条件下诱导分化为机体各种组织细胞用于病损组织、器官的修复或再生治疗, 是一种安全的“万能种子细胞”。但胚胎干细胞不能来源于自体, 免疫排斥问题就成为难于跨越的鸿沟。将自体细胞重编程为诱导性多能干细胞后, 成熟体细胞“返老还童”, 重新获得了发育分化的多能性, 可以像胚胎干细胞一样定向分化为各种组织细胞用于临床。更重要的是, 诱导性多能干细胞可来自自体, 似乎可以克服移植排斥这个器官移植最大的难题。但由于诱导性多能干细胞的重编程过程伴随有外源基因的插入以及表观遗传学改变, 这些改变本身隐含着潜在的不安全性, 在进入临床运用之前必须搞清楚<sup>[21-28]</sup>。从目前资料看, 外源基因插入式重编程存在的安全问题较多, 今后应该更多地研究“非插入式”重编程技术, 以便获得更高的安全性。另外, 由于不同来源细胞重编程的难易程度不同, 引起的表观遗传学改变及安全性也不同。因此, 深入研究重编程机制, 优选出适合实际运用的安全、高效重编程方法, 并据此制定统一的移植标准, 对保证诱导性多能干细胞的实际运用有重要意义。

**作者贡献:** 吴鹏飞进行文章构思、资料收集、分析并解析数据, 周光纪审校, 吴鹏飞对文章负责。

**利益冲突:** 文章及内容不涉及相关利益冲突。

**伦理要求:** 未涉及伦理冲突的内容。

**学术术语:** 诱导性多功能干细胞 (induced pluripotent stem cells, iPSCs) - 通过导入特定基因或是特定基因产物 (蛋白质) 等进入体细胞 (如皮肤细胞或是肝脏细胞) 中, 使该体细胞



变成具备如同胚胎干细胞一样分化成各式细胞的多功能分化能力, 并且可以持续增生分裂的细胞。2006 年日本京都大学山中伸弥教授团队首次成功将鼠成纤维细胞诱导成为诱导性多功能干细胞。

**作者声明:** 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

#### 4 参考文献 References

- [1] Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, et al. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;474(7350):212-215.
- [2] Lister R, Pelizzola M, Kida YS, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;471(7336):68-73.
- [3] 赵然,周光纪. 诱导性多能干细胞的表观遗传学调控差异及其与诱导移植排斥的关系[J].细胞与分子免疫学杂志,2013,29(10):1102-1105.
- [4] Tan Y, Ooi S, Wang L. Immunogenicity and tumorigenicity of pluripotent stem cells and their derivatives: genetic and epigenetic perspectives. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2014;9(1):63-72.
- [5] Guha P, Morgan JW, Mostoslavsky G, et al. Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2013;12(4):407-412.
- [6] Araki R, Uda M, Hoki Y, et al. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature*. 2013;494(7435):100-104.
- [7] Morizane A, Doi D, Kikuchi T, et al. Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of iPSC-derived neural cells in the brain of a non-human primate. *Stem Cell Reports*. 2013;1(4):283-292.
- [8] Luo W, Li S, Peng B, et al. Embryonic stem cells markers SOX2, OCT4 and Nanog expression and their correlations with epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One*. 2013;8(2):e56324.
- [9] Lowry WE, Richter L, Yachechko R, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(8):2883-2888.
- [10] Herreros-Villanueva M, Bujanda L, Billadeau DD, et al. Embryonic stem cell factors and pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*. 2014;20(9):2247-2254.
- [11] Nori S, Okada Y, Nishimura S, et al. Long-Term Safety Issues of iPSC-Based Cell Therapy in a Spinal Cord Injury Model: Oncogenic Transformation with Epithelial-Mesenchymal Transition. *Stem Cell Reports*. 2015;4(3):360-373.
- [12] Chen L, Mizutani A, Kasai T, et al. Mouse induced pluripotent stem cell microenvironment generates epithelial-mesenchymal transition in mouse Lewis lung cancer cells. *Am J Cancer Res*. 2014;4(1):80-88.
- [13] Yamaguchi S, Marumoto T, Nii T, et al. Characterization of common marmoset dysgerminoma-like tumor induced by the lentiviral expression of reprogramming factors. *Cancer Sci*. 2014;105(4):402-408.
- [14] Maherali N, Hochedlinger K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;3(6):595-605.
- [15] Eggenschwiler R, Cantz T. Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Hepatology*. 2009;49(3):1048-1049.
- [16] Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, et al. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*. 2008;322(5903):949-953.
- [17] Tóth A, Fodor K, Blazsó P, et al. Generation of induced pluripotent stem cells by using a mammalian artificial chromosome expression system. *Acta Biol Hung*. 2014;65(3):331-345.
- [18] Chen Q, Shi X, Rudolph C, et al. Recurrent trisomy and Robertsonian translocation of chromosome 14 in murine iPSC cell lines. *Chromosome Res*. 2011;19(7):857-868.
- [19] Gore A, Li Z, Fung HL, et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;471(7336):63-67.
- [20] Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature*. 2011;471(7336):58-62.
- [21] Lu X, Zhao T. Clinical therapy using iPSCs: hopes and challenges. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2013;11(5):294-298.
- [22] Fu X. The immunogenicity of cells derived from induced pluripotent stem cells. *Cell Mol Immunol*. 2014;11(1):14-16.
- [23] Okano H, Nakamura M, Yoshida K, et al. Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. *Circ Res*. 2013;112(3):523-533.
- [24] 陈倩,史庆华. iPSC 细胞的遗传安全性[J].遗传,2012,34(3):260-268.
- [25] Harding J, Mirochnitchenko O. Preclinical studies for induced pluripotent stem cell-based therapeutics. *J Biol Chem*. 2014;289(8):4585-4593.
- [26] Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, et al. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011;474(7350):212-215.
- [27] Cao J, Li X, Lu X, et al. Cells derived from iPSC can be immunogenic - yes or no. *Protein Cell*. 2014;5(1):1-3.
- [28] Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, et al. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell*. 2011;8(6):633-638.