

イヌにおける再生医療の現状と可能性

ヒトと比較して考える

誌名	畜産の研究 = Animal-husbandry
ISSN	00093874
著者名	中里,文昭 杉村,智史 山城,秀昭 菅原,淳史 諸白,家奈子 成田,香里 紺野,耕 吉田,宗芳 佐藤,英明
発行元	養賢堂
巻/号	60巻11号
巻号補足	
掲載ページ	p. 1172-1178
発行年月	2006年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



イヌにおける再生医療の現状と可能性

—— ヒトと比較して考える ——

中里 文昭*・杉村 智史*・山城 秀昭*・菅原 淳史*・諸白 家奈子*・
成田 香里**・紺野 耕**・吉田 宗芳**・佐藤 英明*

1. はじめに

昨今の先端科学のうち最も人々の注目を集めているもののひとつに再生医療が挙げられる。なぜなら、現行の医療技術では治療が不可能なパーキンソン病、糖尿病、脊髄損傷などの難病の治療が可能になると考えられるからである。これらの難病は、正常な状態を保つために不可欠な働きを担う特定種の細胞・組織が死滅するために引き起こされる。再生医療は失われた細胞・組織を“再生”して健康を取り戻すことを目的とする治療法である。再生医療が臨床応用されれば、これまでは薬剤投与により進行を抑えるしか対応策が無かったこれらの難病を完治できるようになると期待されている。さらに、再生医療は人工臓器・臓器移植に代わる治療法になるともいわれている。人工臓器は生体との適合性の問題や永久動力源の確保が困難であり、臓器移植は患者の数に対して臓器提供者の数が圧倒的に不足していることに加え、免疫拒絶の問題もあり、移植可能な臓器が見つかる可能性は極めて低い。これら移植医療は欠点が多く残されているのである。心臓疾患や肝疾患などでは臓器移植以外の治療法が存在しないため移植医療は現在でも行われているが、再生医療が実用化すれば、移植医療の現在抱えている問題点を克服した新しい治療法となるに違いない。

このように、再生医療は医学における治療のあり方に大きな変革をもたらす医療技術になるといわれている。国家プロジェクトが発足(文部科学省の「再生医療の実現化プロジェクト」など)していることからわかるように、再生医療は社会的・経済的に大きな期待が寄せられており、また、患者にとっての唯一の希望の光として福祉的観点

からも、一刻もはやく実用化されることが切望されている。

2. 再生医療とは

再生医療とは、病気や事故で失われた組織・器官を細胞自身が持つ再生能力を利用して形態的・機能的に回復させる治療法と定義される。古くから行われてきた皮膚移植や骨髄移植などの単純な組織移植も再生医療の一種と考えられるが、これほどまでに再生医療が注目を浴びようになったのは、自己複製能と多分化能を有し数種類の細胞に分化する能力を持つ幹細胞の存在が明らかになったからである。幹細胞は種々の組織細胞に分化増殖することで新たな組織・器官を形成する能力を持つことから、患者自身の幹細胞を用いて免疫拒絶のない組織・器官を人為的に作製できる可能性がある。実際の治療では、採取した幹細胞を体外で培養して組織を作製した後、その組織が移植される。これを細胞治療と呼ぶ。

細胞治療に用いられる幹細胞は、ES細胞(胚性幹細胞)と体性幹細胞に大別される。ES細胞は初期の受精胚の細胞から樹立される。ES細胞は万能細胞とも呼ばれるように理論的には体中のあらゆる種類の細胞に分化可能で、ほぼ無限に増殖できるという利点がある。しかしながら、樹立の際に受精胚を必要とするといった倫理的問題や、分化のコントロールが困難であることなどの欠点を持つ。一方、体性幹細胞は皮膚、骨髄、神経などの組織中に存在する、分化の過程にある細胞である。特定の細胞系列への分化が運命づけられているものの、成体から取り出すことができるため倫理的な問題はほとんどなく、患者自身の細胞を用いれば免疫拒絶が生じないという利点がある。また最近の研究で、本来分化する組織以外の細胞にも分化・成長が可能であることが明らかにされつ

* 東北大学大学院 農学研究科 動物生殖科学分野 (Fumiaki Nakazato・Satoshi Sugimura・Hideaki Yamashiro・Atsushi Sugawara・Kanako Morohaku・Eimei Sato)

** 日本動物専門学院付属イヌ科動物科学研究所
(Kaori Narita・Tsutomu Konno・Muneyoshi Yoshida)

つある。たとえば、骨髄の中に存在する間葉系幹細胞は、骨髄細胞以外に筋細胞、骨細胞、神経細胞等に分化可能であることが示された。しかしながら、体性幹細胞が発見された組織・臓器は一部に限られており、それらの組織・臓器においても少数しか存在せず、また増殖能も低いため効率的な増産が困難であるという欠点を持つ。細胞治療を臨床応用する場合、治療の対象となる動物種および再生する組織により、ES細胞と体性幹細胞の利点・欠点を比較吟味した上で、より適切な幹細胞を選択する必要がある。

しかしながら、幹細胞を患部に直接移植するだけでは不十分である。患部に移植した細胞が増殖分化し生体組織に定着して自己組織化するためには、それに適した環境を提供する必要がある。この環境の構築技術を組織工学という。組織工学において重要な要素は、①十分な数の細胞、②細胞が定着する足場、③細胞増殖因子の三つである。組織工学技術を利用することで、特定の骨組みの生体吸収材料の上で細胞を増殖させて、希望通りの形状の組織が作製可能になる。すなわち、組織工学と細胞治療の連携により再生医療は初めて実現可能になる。

再生医療研究はヒトにおいて活発に行われており、皮膚、軟骨、骨、血管、角膜において臨床応用が開始されている。これらは簡単な構造の組織であるが、再生医療の最終目標は複雑な構造を持つ臓器の作製である。そのためには、臓器の持つ3次元の立体構造を組み立て、さらに内部の血管や神経も形成させる必要があり、現時点では不可能である。この目標を達成するためには、幹細胞の分化制御機構を解明し、体性幹細胞の採取法、目的とする細胞の分離法、効率的な増殖法などを確立する必要がある、さらなる再生医療の発展に向けた今後の課題である。

上述したように、再生医療研究は現在、発達過程にあり、未解明の点が多いため、新たな領域を研究することは大変難しい。しかしながら、ヒトにおいて実用化した技術は、他の哺乳類に適用できる可能性が高い。そこで、イヌに再生医療を応用することを提案する。イヌは愛玩犬としてだけでなく、介助犬、救助犬、警察犬として社会的にも大きな役割を果たしており、ヒトとのかかわ

りが最も深い動物のひとつである。イヌの医療技術を高めることはヒトの生活をより豊かにすることにつながると考えられるのである。イヌにおいて再生医療が確立されることにより、現在の医療では治療不可能である疾病の克服が期待されるため、多くの需要が見込まれる。以上のことより、ヒトにおける研究成果をイヌに応用するという観点から、ヒトの再生医療の現状を述べるとともにイヌの再生医療研究の可能性について検討する。

3. ヒトにおける再生医療の現状

ヒトの再生医療でES細胞を使うことは現実的でない。ES細胞は、樹立過程で受精胚を必要とするため、倫理的問題からヒトの再生医療に利用することは困難である。そのため、ヒトの再生医療においては体性幹細胞を使うのが一般的である。実際、再生医療についての市民アンケート(<http://www.nch.go.jp/>)において「積極的に進めてほしい」との回答は体性幹細胞を使う場合では41%、一方、ES細胞を使う場合では24%と低かった。この結果からES細胞を研究に用いることは社会に受け入れられにくいことが示唆される。

体性幹細胞を用いたヒトの再生医療は、上述したように皮膚、骨、軟骨、角膜、末梢神経などの組織レベルにおける研究が進展している。これらの組織は構造が簡単なことに加えて、それぞれの幹細胞が入手しやすいため研究の進展が速く、臨床応用されているものが多い。こうした理由から再生医療研究は進歩している領域と停滞している領域に分かれており、今後近いうちに臨床利用可能になると期待される組織もあれば、しばらくは実現不可能といわれる組織もある。以下に比較的臨床段階に近い領域について考察する。

角膜：角膜上皮の再生医療はすでに臨床レベルで実現している。角膜は透明な組織であるが、角膜を産生する角膜上皮幹細胞がダメージを受け消失すると角膜部位が白く混濁した組織でおおわれ、視力障害になる。この疾患は角膜上皮幹細胞がないことが原因であるので、一方の眼が健康であるならそちらから幹細胞を採取し培養して増殖させてから患部に移植する治療法が有効である。両目とも角膜が混濁してしまっているケースでは、代

用として口の粘膜上皮の幹細胞を採取し培養して再生角膜シートをつくり移植する方法がとられる。口の粘膜上皮を使う理由は、角膜上皮細胞に分化マーカーが似ており、また採取が容易だからである。どちらのケースもこれまでほぼ全例において視力が回復したと報告されている。この中には視力が0.01から0.7まで回復した患者もあり、現在も経過は良好とのことである¹⁾。

歯周組織: 歯そのものを新しく再生させるには至っていないが、歯周組織の再生が臨床レベルで行われている。歯周病となり欠落してしまった歯周部位に、あごの周りに存在する骨膜を採取しシート状に培養して移植することで歯周組織が再生された²⁾。また、歯が抜けてから時間がたつと歯槽骨が萎縮し、入れ歯を使うこともできなくなってしまう。その場合は骨髄から採取した間葉系幹細胞と血小板を用いて歯槽骨を再生させている³⁾。これらは臨床レベルで優れた効果がみられている。

神経: 神経細胞の再生が可能になれば、アルツハイマー、パーキンソン病などにおいてニューロン新生による回復も可能となる。すでにその有効性は動物実験で確認されている。現在、ヒトのES細胞をドーパミン産生ニューロンに分化誘導できることが明らかとなったが⁴⁾、脳への移植はまだ行われていない。一方、ヒトにおいてはこのような細胞治療ではなく、増殖因子を投入して内部で幹細胞の増殖を起こさせる方向にむかっている。これも細胞治療とは異なる再生医療の一種である。最近、成人でもニューロン新生が起きていることが明らかになった⁵⁾ため、ニューロン新生を促進してこれらの病気を回復させようと試みられている。具体的には、上皮成長因子と線維芽細胞成長因子を投与して、もともと備わっている脳の自己修復能を促す試みがなされており、期待の持てる結果が出ているという^{6~8)}。

心臓: 心臓を構成する心筋細胞は再生能力がないため、心不全のような病では移植しか治療法がない。過去に、心筋細胞を再生させる研究として骨髄や骨格筋の幹細胞の移植が試みられたが、移植後細胞は死滅した。移植後の細胞が生育できない原因として、心筋細胞を移植できたとしてもそこに血管が新生しないことがある。血管は栄養分を

運び入れ、老廃物を排出するため心臓や肝臓など構造が複雑な臓器では血管が無いと移植組織は維持できない。もうひとつの理由として、細胞を支える構造が損傷域では失われていることがある。そこで最近考案されたのが、微小な孔が多数あいたアルギン酸塩を足場として、そこに細胞をまいて心筋パッチシートを作成し、それを移植する手法である。この移植はラットでの動物実験段階であるが、心機能の改善が確認され、さらに血管の新生も誘起された⁹⁾。このシート技術は心臓だけでなく、さまざまな臓器再生の基盤技術として利用されることが期待されている。

糖尿病: 糖尿病は膵臓で産生されるインスリンが不足することが原因の疾病である。インスリンを分泌する細胞を移植することで臨床的に治療効果が確認されている。その手法として、インスリンを分泌する膵島細胞を分離して、カテーテルを通して肝臓内に移植する治療法が臨床で確立された¹⁰⁾。肝臓に移植する理由は、インスリンがブドウ糖をグリコーゲンに変換する働きをする場所が肝臓内であるためである。この治療法は確かな効果があり、安全で再現性があるため糖尿病の治療に非常に有効である。また、腸管上皮細胞をインスリン分泌細胞に分化誘導することにも成功している。腸管由来のインスリン分泌細胞の移植は、動物実験で治療効果が確認されている¹¹⁾。

血管: 欠損した組織に細胞を注入しても、そこに血流が無ければ栄養や酸素が供給されずに細胞は死滅する。血管新生を誘起してやれば細胞は死なず、組織の修復は可能となる。つまり血管新生の誘導は再生医療の全般において非常に重要である。

それまでは、すでに血管のある部位でしか血管形成は起こらないと考えられていたが、1997年に血管内皮前駆細胞が発見されたことにより、成体内でも目的とする部位に血管新生が起こることが明らかになった¹²⁾。この事実をもとにした血管の再生医療研究が進展してきた。この血管前駆細胞から作成した心臓弁の小児への移植に成功している¹³⁾。

骨・軟骨: 軟骨の再生法として、自己細胞での治療が確立された。患者の軟骨を採取して体外培養した後に患部に移植する方法である¹⁴⁾。この治療

法は今までに100例以上行われている。また、骨や軟骨に分化する間葉系幹細胞を用いた研究も進められている。患者の間葉系幹細胞を採取し、培養し増殖させる。この培養細胞を骨・軟骨に分化させて、コラーゲンなどの生体吸収性膜に包んで移植する方法が試みられている^{15,16)}。多くの細胞種に分化可能な間葉系幹細胞を用いた効果的な治療法である。

このようにヒトの再生医療研究は予想以上に進展している。臨床応用段階にあるものも少なくない。しかしながら国による法律・ガイドラインの整備が遅れているため、再生医療が技術的には臨床段階にあるにもかかわらず実際の医療の現場に普及していないのが現状である。今後は、社会的に受け入れられる包括的な法律の制定が不可欠である。また、体性幹細胞を用いた再生医療は、採取した細胞を培養して再び移植するという過程が含まれるため、コストが高くなる。背中大の皮膚培養に数百万円かかってしまう。多くの患者が利用できるように、再生組織を低コストで供給できるシステムの整備も再生医療の普及に不可欠である。以上のように、再生医療は技術面以外の体制を整えることも重要である。

培養皮膚・培養軟骨は欧米ですでに商品化されていることから再生医療の需要は非常に高いことがわかる。今後の高齢社会において、疾患の治療以外に高齢者の身体機能の回復への利用も求められる。再生医療のよりいっそうの進歩が期待されるであろう。その期待に応えるかのように先日、再生医療にとって有望な報告がなされた。マウスの皮膚細胞から、ES細胞に近い万能細胞の作製に成功したのである¹⁷⁾。同様の細胞がヒトで作製可能になれば、倫理問題がほとんどない万能細胞が得られる。この万能細胞は再生医療を飛躍的に進歩させる可能性がある。このように、再生医療についての研究は日々進んでおり、体を構成するすべての臓器・組織で再生医療を利用できる時が来ることが期待される。

4. イヌでの現状

再生医療研究は、ヒトでようやく臨床利用が始まった領域があるという段階で、イヌの治療目的の研究はほとんど存在しない。しかしながら、昨

今ではイヌはペットとして家族の一員と考えられるようになり、病気にかった際には人間と同じレベルで治療を求める飼い主が増加している。手術をすることも決して珍しいことではない。ヒトと同様にイヌにも不治の病があり、再生医療はこのような疾病のいくつかを治すことのできる唯一の手段となり得る。再生医療がイヌにおいて実用化されれば、飼い主からの多くの需要が期待されるため、再生医療のイヌへの応用には意義がある。また、ヒトに比べて倫理的問題がほとんどないため、ES細胞を用いた研究も可能であり、研究の進展が速いと予想される。さらに、ヒトの場合と違い材料となる幹細胞の厳重な管理システムをつくる必要がなく、医療現場での規制もかなり柔軟なものになると予想できるため、技術が確立してから普及するまでにそれほど時間を必要としないと考えられる。イヌにおける再生医療の臨床応用が可能となれば、短期間のうちに全国の動物病院で治療を受けられるようになるであろう。研究が実際の医療に直結されるのである。イヌにおいての再生医療研究の進展状況を以下に示す。

角膜：ヒトでの角膜再生の成功を受け、イヌでも角膜再生は実用化している。実際に治療を請け負う動物病院もある。

歯：イヌの乳歯が萌出した直後に抜歯し、その抜歯跡に、培養した乳歯を移植しなおし、その部位での歯の形成を調べる研究が行われた。抜歯後に移植して24週後に硬組織・管状歯質・骨が再形成されていたが、エナメル組織と歯根の形成はみられなかった¹⁸⁾。この研究は一度抜き去った歯性細胞の、歯槽内での歯の形成能を調べたものであり、歯芽形成における今後の基盤となるであろう。

歯周組織の再生研究も行われており、歯周病の成犬の下顎骨から採取した骨膜を培養により増殖させて面積を拡大してから同一のイヌに移植したところ、3ヶ月で骨欠損が再生し硬組織も新しく形成され、歯周病症状の改善がみられた¹⁹⁾。

神経：末梢神経の修復が主な対象である。人工材料からつくられた接合チューブで、神経のギャップ（裂け目）を接合し神経を再生させようという試みがなされている。コラーゲンコーティングした生体分解性のポリグリコール酸チューブを用

い、チューブの中にI型コラーゲンを微細線維化したスポンジ構造を足場として充填した。このチューブをイヌの総腓骨神経の80mmギャップに接合したところ、1ヶ月で知覚電位と筋電図が現れ、神経の接合が確認できた。再生した軸索数・太さは十分正常に近くなった。3ヶ月後には正常歩行を開始した²⁰⁾。

心臓：心臓の血管再生についての実験がある。イヌの冠動脈の前下行枝を結紮して虚血モデルをつくり、1週間後にbFGF(血管新生因子)を含むゼラチンハイドロゲル(キャリア)を投与したところ、周辺に多くの血管新生がみられ心機能が回復した²¹⁾。

糖尿病：糖尿病のイヌの体内に膵島細胞を移植してインスリンを分泌させようという実験は10年以上前から始まっており、血糖値の減少効果があることが知られている。最近では、膵島細胞を高分子膜で包んだ、カプセル化膵島を皮下に移植する研究が行われている。免疫隔離膜で膵島細胞を包むことで免疫拒絶が起きないようにして、異種移植や同種移植を可能にする²²⁾。

血管：組織工学技術により作製した血管は培養に8週間かかり、臨床利用するにはこの期間を短くする必要がある。そこで、コンピュータで圧力を調節して血管内に培養液を流し続け、最初より10%膨らんだ状態にして血管の培養を続けたところ、血管は内圧に対する強度・横方向の引っ張りに対する強度が飛躍的に上昇した²³⁾。また、組織工学技術により作製した血管を移植する前後にG-CSFを皮下投与したところ、血管内皮の形成がより広範になり、また血管内皮が異常増殖することもかなり減少した²⁴⁾。つまりG-CSFを投与すれば移植片の内皮化が進み、かつ血管閉鎖が減少するということである。

骨：頭蓋骨の欠失した部位に、自己の骨髄間質細胞を移植したところ、頭蓋骨とよく似た性質の骨が形成された²⁵⁾。

また、生体内に移植すると本物の骨に置き換わる人工骨が開発された。人工骨はハイドロキシアパタイトとコラーゲンからできており、骨とほぼ同一成分から成るため、時間がたつと生体に吸収される。この人工骨をビーグル犬の脛骨の欠損部に移植したところ、移植部位の周囲に、骨を新生

する細胞が誘導され、12週後には新しく再生された骨で人工骨が完全に覆われ、イヌは自由に歩けるようになった。24週後には人工骨は生体に吸収され、骨髓腔が形成された本物の骨に置き換わった²⁶⁾。

上述したイヌにおける再生医療研究のほとんどは、ヒトに応用する目的で行われている。イヌは人工臓器が移植された最初の動物であり、臓器再生医療の主要なモデル動物としてヒトに応用する前臨床実験によく用いられている。イヌにおける研究結果はマウスから得られた研究結果よりもヒトの治療に直接還元されることが多く、イヌで成功したならばヒトにも利用できる可能性が高いと考えられるからである。これを言い換えると、ヒトで成功した技術はイヌに利用できる可能性が高いということになる。イヌの再生医療研究は、ヒトで臨床応用された組織に対して行うのであるなら、ヒトで成功しているため前臨床段階まで終了していることになる。イヌにおける再生医療はあと少しの改良を加えるだけで実現するのではないだろうか。需要があることが明らかであり、研究に着手すれば比較的短期間のうちに実用化が可能と予想されるイヌの再生医療は、この先ヒトの再生医療が進歩しその実用性が広く認知されたとき、急速に進展することになるのではないだろうか。

5. イヌES様細胞の樹立の成功

2006年2月、大阪府立大と滋賀医大の研究チームは、さまざまな臓器や組織に分化可能なES細胞とほぼ同じ能力を持つES様細胞の樹立に成功した。雌ビーグル犬から受精胚を回収し内部細胞塊を取り出し培養し、ES様細胞のコロニーが形成された後、物理的に分離させたところ二つのES様細胞系ができ、8継代まで未分化な状態の維持が可能であった。このES様細胞は*in vitro*で神経様・上皮様・メラニン様・繊維芽様・心筋様の5種の細胞に分化することが確認された。心筋様細胞は律動的な拍動が認められた²⁷⁾。未分化な状態を1ヶ月ほどしか維持できなかったため厳密にはES細胞ということではできないが、「ES細胞であることはほぼ間違いないと思う」と研究者の一人は言っている。

このように *in vitro* においてさまざまな細胞に分化する能力を示したことはイヌ ES 様細胞が再生獣医学に応用できる可能性が十分あることを示唆している。

6. 核移植技術を利用したイヌ ES 細胞樹立によるテラーメイド治療の可能性

テラーメイド治療とは、遺伝情報に応じて個人個人に適切な治療をすることである。核移植による ES 細胞というのは、患者の体細胞から採取した核を、除核した未受精卵に移植して胚盤胞まで培養した後、内部細胞塊を取り出して樹立された ES 細胞のことである。こうして樹立された ES 細胞は患者と同じ遺伝子構成であるため、移植の際に免疫拒絶がなく、患者に移植可能な細胞として再生医療での利用が期待される。ES 細胞はほぼ無制限に増殖し、理論上すべての細胞に分化できる全能性を持っているという点で体性幹細胞より優れている。しかしながら、ES 細胞は分化誘導機構が不明であり、その解明が必要となる。また、ES 細胞は移植後に奇形腫をつくることがあるという欠点を持つ。実際の医療現場では移植前に体外で十分に分化させて、異常な組織を体内で形成しないよう細心の注意を払わなければならない。

ES 細胞は個体として生まれてくるはずの生命を破壊して得られることから、ヒトでの利用は倫理的問題が大きく、当面は再生医療に用いるのは不可能であろう。一方、イヌにおいては倫理的問題が小さくなるため、ES 細胞を再生医療に利用する研究は社会的に許容される。そのため、イヌならではのヒトとは違う方向から研究を進めることが可能な領域である分、核移植により樹立したイヌ ES 細胞の再生医療への利用は有望視できるといえよう。

7. おわりに

医療技術の開発がヒトで最優先されるのは当然のことである。社会的にも経済的にも求められるのはヒトにおいての実用化である。しかしながら上述したように、再生医療を広くヒトに利用するには倫理的問題、幹細胞の管理体制についての国

のガイドラインの制定が必要となる。再生医療は医学の進歩における多大なプラスの可能性と、倫理上の大きなマイナス面を持っているため、ガイドラインの制定が遅れるのは仕方のないことである。このような事情からヒトの再生医療の普及は遅れている。一方、イヌの再生医療はヒトほど慎重になる必要がないためガイドラインの制定は可能であろう。よってイヌでの再生医療は臨床応用可能との結果ができればすぐにでも実用化されるのではないだろうか。ヒトよりもイヌのほうで先に広く普及するということになるかもしれない。さらに、イヌにおける研究で得られた知見・確立した技術をヒトで応用することも可能であり、ヒト・イヌ双方からの研究による相乗的な進展が期待できる。これからはヒトの再生医療研究の動向に注意を傾けてイヌに応用することが、時代とともに必要とされるようになると予想できる。

参考文献

- 1) Nishida, K., Yamato, M., Hayashida, Y., Watanabe, K., Yamamoto, K., Adachi, E., Nagai, S., Kikuchi, A., Maeda, N., Watanabe, H., Okano, T., Tano, Y.: Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med*, 351:1187 – 96, 2004
- 2) Mizuno, H., Hata, K., Kojima, K., Bonassar, L.J., Vacanti, C.A., Ueda, M.: A novel approach to regenerating periodontal tissue by grafting autologous cultured periosteum. *Tissue Eng*, 12:1227 – 335, 2006
- 3) Ueda, M., Yamada, Y., Ozawa, R., Okazaki, Y.: Clinical case reports of injectable tissue-engineered bone for alveolar augmentation with simultaneous implant placement. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 25:129 – 37, 2005
- 4) Yan, Y., Yang, D., Zarnowska, E.D., Du, Z., Werbel, B., Valliere, C., Pearce, R.A., Thomson, J.A., Zhang, S.C.: DIRECTED differentiation of dopaminergic neuronal subtypes from human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 23:781 – 90, 2005
- 5) Eriksson, P.S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A.M., Nordborg, C., Peterson, D.A., Gage, F.H.: Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med*, 4:1313 – 7, 1998
- 6) Tropepe, V., Sibilia, M., Ciruna, B.G., Rossant, J., Wagner, E.F., van der Kooy, D.: Distinct neural stem cells proliferate in response to EGF and FGF in the developing mouse telencephalon. *Dev Biol*, 208:166 – 88, 1999

- 7) Laskowski, A., Schmidt, W., Dinkel, K., Martinez-Sanchez, M., Reymann, K.G.: bFGF and EGF modulate trauma-induced proliferation and neurogenesis in juvenile organotypic hippocampal slice cultures. *Brain Res*, 1037:78 – 89, 2005
- 8) Baldauf, K., Reymann, K.G.: Influence of EGF/bFGF treatment on proliferation, early neurogenesis and infarct volume after transient focal ischemia. *Brain Res*, 1056:158 – 67, 2005
- 9) Leor, J., Cohen, S.: Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart. *Ann N Y Acad Sci*, 1015:312 – 9, 2004
- 10) Maleux, G., Gillard, P., Keymeulen, B., Pipeleers, D., Ling, Z., Heye, S., Thijs, M., Mathieu, C., Marchal, G.: Feasibility, safety, and efficacy of percutaneous transhepatic injection of beta-cell grafts. *J Vasc Interv Radiol*, 16:1693 – 7, 2005
- 11) Suzuki, A., Nakauchi, H., Taniguchi, H.: Glucagon-like peptide 1 (1 – 37) converts intestinal epithelial cells into insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100:5034 – 9, 2003
- 12) Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G., Isner, J.M.: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275:964 – 7, 1997
- 13) Cebotari, S., Lichtenberg, A., Tudorache, I., Hilfiker, A., Mertsching, H., Leyh, R., Breymann, T., Kallenbach, K., Maniuc, L., Batrinac, A., Repin, O., Maliga, O., Ciubotaru, A., Haverich, A.: Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation*, 114:1132 – 7, 2006
- 14) Ochi, M., Adachi, N., Nobuto, H., Yanada, S., Ito, Y., Agung, M.: Articular cartilage repair using tissue engineering technique – novel approach with minimally invasive procedure. *Artif Organs*, 28:28 – 32, 2004
- 15) Wakitani, S., Mitsuoka, T., Nakamura, N., Toritsuka, Y., Nakamura, Y., Horibe, S.: Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: two case reports. *Cell Transplant*, 13:595 – 600, 2004
- 16) Ciapetti, G., Ambrosio, L., Marletta, G., Baldini, N., Giunti, A.: Human bone marrow stromal cells: In vitro expansion and differentiation for bone engineering. *Biomaterials*, 2006
- 17) Takahashi, K., Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126:663 – 76, 2006
- 18) Honda, M.J., Ohara, T., Sumita, Y., Ogaeri, T., Kagami, H., Ueda, M.: Preliminary study of tissue-engineered odontogenesis in the canine jaw. *J Oral Maxillofac Surg*, 64:283 – 9, 2006
- 19) Mizuno, H., Hata, K., Kojima, K., Bonassar, L.J., Vacanti, C.A., Ueda, M.: A novel approach to regenerating periodontal tissue by grafting autologous cultured periosteum. *Tissue Eng*, 12:1227 – 335, 2006
- 20) Nakamura, T., Inada, Y., Fukuda, S., Yoshitani, M., Nakada, A., Itoi, S., Kanemaru, S., Endo, K., Shimizu, Y.: Experimental study on the regeneration of peripheral nerve gaps through a polyglycolic acid-collagen (PGA-collagen) tube. *Brain Res*, 1027:18 – 29, 2004
- 21) Liu, Y., Sun, L., Huan, Y., Zhao, H., Deng, J.: Effects of basic fibroblast growth factor microspheres on angiogenesis in ischemic myocardium and cardiac function: analysis with dobutamine cardiovascular magnetic resonance tagging. *Eur J Cardiothorac Surg*, 30:103 – 7, 2006
- 22) Calafiore, R., Basta, G., Luca, G., Calvitti, M., Calabrese, G., Racanicchi, L., Macchiarulo, G., Mancuso, F., Guido, L., Brunetti, P.: Grafts of microencapsulated pancreatic islet cells for the therapy of diabetes mellitus in non-immunosuppressed animals. *Biotechnol Appl Biochem*, 39:159 – 64, 2004
- 23) Xu, J., Ge, H., Zhou, X., Yang, D., Guo, T., He, J., Li, Q., Hao, Z.: Tissue-engineered vessel strengthens quickly under physiological deformation: application of a new perfusion bioreactor with machine vision. *J Vasc Res*, 42:503 – 8, 2005
- 24) Cho, S.W., Lim, J.E., Chu, H.S., Hyun, H.J., Choi, C.Y., Hwang, K.C., Yoo, K.J., Kim, D.I., Ki, B.S.: Enhancement of *in vivo* endothelialization of tissue-engineered vascular grafts by granulocyte colony-stimulating factor. *J Biomed Mater Res A*, 76:252 – 63, 2006
- 25) Mankani, M.H., Kuznetsov, S.A., Shannon, B., Nalla, R.K., Ritchie, R.O., Qin, Y., Robey, P.G.: Canine cranial reconstruction using autologous bone marrow stromal cells. *Am J Pathol*, 168:542 – 50, 2006
- 26) Itoh, S., Kikuchi, M., Koyama, Y., Matumoto, H.N., Takakuda, K., Shinomiya, K., Tanaka, J.: Development of a novel biomaterial, hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) composite for medical use. *Biomed Mater Eng*, 15:29 – 41, 2005
- 27) Hatoya, S., Torii, R., Kondo, Y., Okuno, T., Kobayashi, K., Wijewardana, V., Kawate, N., Tamada, H., Sawada, T., Kumagai, D., Sugiura, K., Inaba, T.: Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. *Mol Reprod Dev*, 73:298 – 305, 2006