

[Review]

Tissue engineering

Hiroshige Nakano* and Takatugu Yamada**

* Aino Gakuin College

** 1st Department of Surgery, Nara Medical University

Key words : Tissue engineering, Embryonic stem cell, Somatic stem cell, Growth factor, Matrix

再生医学

中野博重*, 山田高嗣**

キーワード：再生医療, ES 細胞, 体性幹細胞, 細胞増殖因子, マトリックス

はじめに

臓器移植が本格的に始まってから約 40 年になり、全世界では心臓移植、肝臓移植、腎臓移植、膵臓移植、肺移植、小腸移植が年間数千例行われ、移植手術は日常的な手術になりつつある。しかし臓器移植が進むにつれ、ドナー不足が大きな問題になってきており、この問題を解決するには新しいアプローチが必要になってくる。これまで non-heart beating donor での組織保存、異種移植など色々な研究がなされた。しかしこれらの選択肢にも臓器保存、異種免疫や異種動物からの病原体移入といった超えるべき大きな問題が残されている。そこで最近、新しい選択肢として再生医学という概念がクローズアップされてきた。再生医学とは人間の持つ再生治療能力を人為的な操作により自己の機能の再生修復を計り、損傷により引き起こされた形態的、機能的欠損を代償することを目的とした新しい分野である。本稿では再生医学の歴史的背景と現状を述べ、私たちが行っている ES 細胞から臓器分化誘導について述べる。

1. 歴史的背景

再生医学の始まりは、1995 年アメリカ Massachusetts Institute of Technology (MIT) の Robert

Longer 博士と Harvard 大学の Joseph P. Vacanti 博士の 2 人が細胞とその足場材料とを組み合わせ、生体組織を再生し、それをテレビで放映した。それは背中にヒトの耳をつけたネズミが元気に走りまわっている映像であった (立花 2000)。この再生技術とは、ヒトの耳の軟骨から細胞を取り出して培養し、ヒトの耳の形をした PGA (ポリグリコール酸) の上に培養した細胞をまき増殖させる。この耳の形をしたポリマーをヌードマウスに移植する。移植されたポリマーは徐々に生体に吸収され軟骨のみとなる。このようにして細胞自身の持つ自己組織能力を利用することによって耳を再生させたことになる。当時、この試みの重要性を理解していた人はほとんどなく、彼らはその啓発活動のためヒトの耳の形をした再生軟骨を持ったネズミを作製した。このことは移植医療における深刻なドナー不足と免疫の問題がこの再生医学により一挙に解決できる可能性を示唆した。その後、十数年たった現在、皮膚、硬膜、靱帯、軟骨などの再生のための臨床応用が可能になった。21 世紀になった現在、さらに積極的に幹細胞などの利用による組織、臓器の作製を行うといった再生医学の研究が盛んになった。幹細胞とは、自己複製能と分化能を持った未分化な細胞である。幹細胞には胚性幹細胞と体性幹細胞があり、これらの細胞を用いて損傷した組織や臓器の機能の再構築を目指したものが再生医学である。

このような研究分野はティッシュ・エンジニアリング

* 藍野学院短期大学

** 奈良県立医科大学第一外科学教室

グ (tissue engineering) と呼ばれ、本邦では、組織工学、再生医学と命名され、再生医療とも呼ばれるようになった。この再生医学は医学の新しい分野でなく、生体組織の再生を助けるという医用工学のひとつの技術展開で、工学 (engineering) がその基礎になっている分野である。

2. 再生医学の基礎

再生医学の発展を支える因子として、細胞の増殖を促す細胞増殖因子、組織再生の足場 (scaffold) となる材料 (matrix) など重要であるが、最も重要なのは幹細胞 (stem cell) である。

- 1) 細胞としては、イ) 胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES 細胞) と、ロ) 体性幹細胞 (somatic stem cell) がある。

イ) 胚性幹細胞

個体発生において受精卵が分裂を繰り返すと胚盤胞になる (図1)。胚盤胞と呼ばれるボール状の初期胚は2つの種類の細胞から構成され、ボールの外壁を作る栄養外胚葉と内部細胞塊からなる。栄養外胚葉は将来胎盤などに分化するのに対して、内部細胞塊は将来体を構成するすべての細胞に成長する。すなわち内部細胞塊は200種類に及ぶとされるすべての細胞に分化する能力を持った全能性をもつ細胞の集塊である。ES細胞はこの内部細胞塊から樹立された細胞であり、*in vitro* で分化全能性を有したまま未分化状態で維持

可能にしたものである。このES細胞を体外で種々の細胞に分化させ、細胞移植して臓器の機能を取り戻すことが再生医学である。ES細胞株は1981年にEvans, Kaufmanら(1981)により始めてマウス胚細胞から樹立され、さらにヒトES細胞は1998年にThomsonら(1998)により樹立された。このES細胞から神経細胞、心筋細胞、血液細胞、肝細胞、膵細胞など様々な細胞への分化が可能になれば、将来種々の疾患の治療が可能になる。しかし、ES細胞は受精卵から得られたものであり、ヒトの受精卵を研究や医療に利用することの是非に関しては様々な意見があるので、現在日本においてヒトES細胞を用いた研究を行おうとした場合、外国で樹立された細胞株を用いるしかない。

ロ) 体性幹細胞

近年、神経、肝臓、筋肉、乳腺といった寿命の長い細胞には、成人になってからも幹細胞が存在することが明らかになってきた。ついでProckop(1997)は骨髄には造血幹細胞だけでなく、脂肪組織、腱細胞、心筋細胞などの間葉系細胞に分化できる間葉系幹細胞が存在することを明らかにした。さらにBjornsonら(1999)は、造血幹細胞が心筋細胞や肝臓細胞に、神経幹細胞が血液細胞に分化することを報告した。このように、すでに分化したと考えられる幹細胞がまったく別の種類の細胞へと分化転換するという、分化の可塑性が報告されてきた。この体性幹細胞は胚性幹細胞に比して細胞、組織の採取が比較的容易であり、かつ

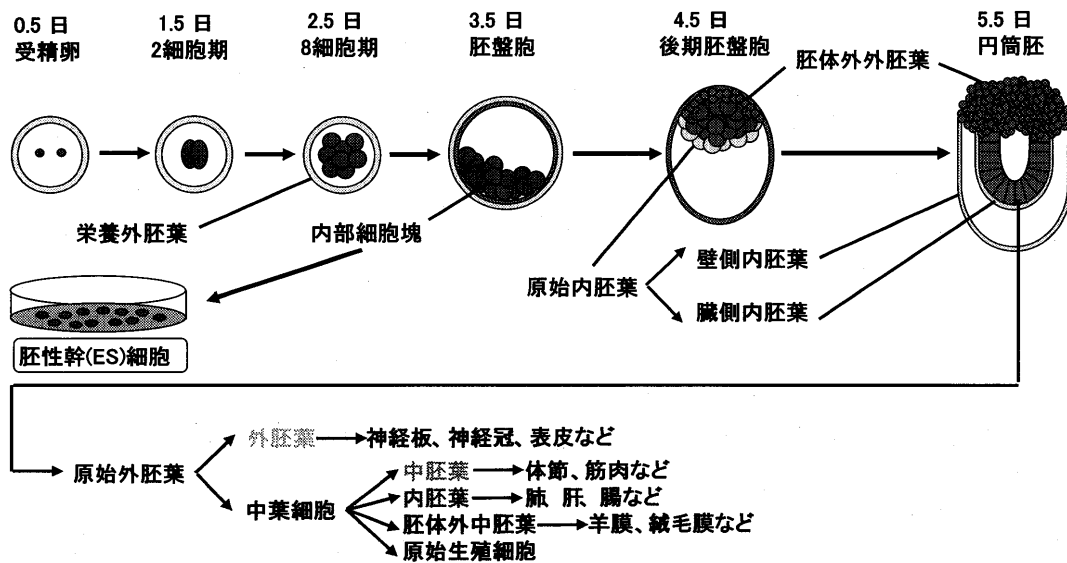


図1 マウス胚の初期発生における細胞系譜

倫理的制約を受けにくいという利点がある。反面、採取は容易であるものの、採取されたものがすべて移植に必要な細胞でないことが問題点である。

2) 細胞増殖因子

生体の再生・修復能は2つのシステムによって支えられている。1つは前述した幹細胞による再生システムである。もうひとつは肝臓、腎臓、肺、消化管、皮膚、血管系などを含む多くの組織、臓器でみられるように、すでに機能的な細胞に分化した細胞が損傷に反応して速やかに増殖することにより傷ついた組織や失われた組織が再生するシステムである。これは simple duplication システムと呼ばれ、この simple duplication システムで古くから知られているのが肝再生である。肝再生を促す液性因子として HGF (hepatocyte growth factor) が挙げられる。HGF は分子量 85 kDa の蛋白質で、標的細胞に発現して c-Met 受容体を介して生物活性を発揮する。現在 HGF は肝細胞のみならず様々な細胞に対して、細胞増殖促進、細胞運動促進、抗アポトーシス、形態形成誘導、血管新生など組織、臓器の再生と保護を担う多彩な生理活性を有することが知られている。他に VEGF (vascular endothelial growth factor) がある。

3) マトリックス (生体適合材料)

細胞が増殖し、分化するための足場になる細胞間マトリックス (extra cellular matrix) にはコラーゲンやプロテオグリカンがあり、最近接着分子が注目されてきた。これは自然の EMC に加えて、人工の EMC も必要であり、組織を再生するには、適切な人工 EMC を選択、開発することが重要である。その人工 EMC の一部はスカフォールド (scaffold) と呼ばれている。この scaffold (足場) には現在三次元構築を目指したマトリックスや、生体適合性の高いシートの開発が行われている。

3. 臓器、組織再生医学の現状

1) 肝再生

肝不全に対して肝臓移植が標準的治療法として一般的に認められているが、先にも述べたがドナー不足という問題が大きくクローズアップされてきている。このような機能不全に陥った臓器の機能をいかに補助していくかが今後の問題である。本邦ではドナー不足を

解決すべく生体部分肝移植が数多く行われている。しかし生体部分肝移植にも限界があり、肝不全に陥った患者の治療方法には人工肝臓による方法が考えられる。しかし肝臓には多くの機能が存在し、人工肝臓ですべてを補助することは不可能で、一部の機能のみしか補うことが出来ない。この人工肝臓はヒトあるいは動物の肝臓から肝細胞を分離、培養し、その肝細胞を用いて作製されているが、本格的な臨床応用には未だ至っていない。近年再生医学という分野が注目され、バイオ人工肝 (biohybrid artificial liver) に期待が寄せられている。in vivo のバイオ人工肝 (BAL) とは、tissue engineering によって肝細胞、scaffold、肝細胞を増殖させる因子を組み合わせ、in vitro で肝臓を再生させ、それを移植する、あるいは、これらの3つの要素を移植し、in vivo において肝臓を再生させるものである。肝再生医療のソースとしては、胚性幹細胞 (ES 細胞)、体性幹細胞、骨髄細胞、成熟肝細胞などがあり、ES 細胞から肝臓を構成する細胞を分化誘導し、肝再生を促す研究が最近報告されつつある (Hamazaki, T. ら, 2001)。一方で骨髄細胞が肝細胞あるいは胆管上皮細胞へ分化するという報告もあり (Petersen et al., 1999)、肝幹細胞の供給源として骨髄幹細胞も考えられる。このように再生医療としての肝再生には幹細胞から誘導したそれぞれの細胞を臓器として再構築する必要があり、tissue engineering の分野を含めた研究が待たれる。

2) 膵内分泌細胞の再生

近年 insulin 産生細胞を再生させる研究が盛んになり、ES 細胞、膵管上皮細胞、ラ島細胞からそれぞれ insulin 産生細胞の再生誘導が報告されている。ES 細胞から insulin 産生細胞が誘導可能となれば拒絶反応という大きな障害を克服できる可能性が生まれてくる。Lumelsky ら (2001) は ES 細胞から insulin 産生細胞の誘導に成功した。さらに Assady ら (2001) もヒト ES 細胞を用いて insulin 産生細胞の誘導に成功している。しかし ES 細胞は一つの個体を形成する可能性のある胚から樹立されるものであるため、倫理的問題を回避することは現在のところ困難である。体性幹細胞からの insulin 産生細胞の誘導には膵管上皮細胞が注目されている。膵内分泌細胞は膵管上皮細胞から発生することから、膵管に膵内分泌幹細胞の存在が考えられる。Bonner-Weir ら (2000) はヒトの膵管細胞を含む膵島様の細胞塊を形成することに成功した。しかしその細胞の機能は不十分であった。ラ島細

胞の再生に関しては Zulewski ら (2001) は神経組織と膵ラ島の発生上の共通点に着目し、分離ラ島から膵内分泌細胞に分化できる stem cell の分離に成功した。この分化した細胞からは insulin, glucagon などのホルモン分泌が確認されている。この事実は、分離ラ島内にもラ島再生能力を有する stem cell が存在していることが考えられ、ラ島移植の可能性を示唆している。

3) 心筋再生

ES 細胞や骨髄間葉系幹細胞を用いることによって心筋細胞の再生が可能になってきた。この再生医学には ES 細胞と体性幹細胞 (成体幹細胞) を用いる方法がある。ES 細胞を用いる利点は、万能性の多分化能を持つ幹細胞を、*in vitro* で大量に増殖させることが可能である点である。ES 細胞を心筋細胞に分化誘導させるには、LIF (leukemia inhibitory factor) 除去後に浮遊培養させ、凝集塊を形成させる。これにより一部の細胞が心筋細胞となり拍動を開始する。これが ES 細胞からの分化誘導である。一方間葉系幹細胞は骨髄中に存在するまれな細胞である。福田 (2002) はこの細胞より心筋細胞への分化誘導をさせるため、分離した骨髄間質細胞を長期培養することで不死化した細胞株を作製した。この細胞株に DNA の脱メチル化剤である 5-アザシチジンを負荷し、さらに 2 週間培養を続けると自己拍動する細胞が得られた。この自己拍動する非常に少数の細胞をクローニングシリンドで採取し、同様の操作を繰り返し行い、自己拍動する割合の高い CMG (cardiomyogenesis) 細胞株の作製法として樹立した。CMG 細胞は 5-アザシチジンにより分化誘導を行うことにより心筋細胞の表現型を獲得する。これら自己拍動能を有する心筋細胞移植は難治性心不全患者の治療につながることを期待される。

4) 小腸再生

短腸症候群という病気はクローン病、血栓症や外傷により外科的に大量に小腸を切除したあとや、先天的な機能不全により起こる小腸の吸収不良を主とする症候群である。治療法としては高カロリー輸液が中心であるが、長期間の IVH (Intra-venous hyperalimentation) カテーテルの挿入により静脈ラインの確保が困難になったり、長期高カロリー輸液のため胆汁うっ滞から不可逆的な肝臓障害を引き起こし、高カロリー輸液が続けられなくなったりする。このような場合、現在治療法としては小腸移植しかない。小腸移植は

1980 年代後半より行われ始めた。しかし他の臓器移植と比較して拒絶反応が生じやすく、いまだ成功率は十分とはいえない。そこで近年小腸再生が注目されてきた。小腸粘膜は非常に高い再生能力を持っていることは以前からよく知られていた。そこで貝原 (2002) はネズミの新生児より小腸の粘膜細胞と小腸壁全層の様々な細胞を採取し、一緒に足場組織内に接種し、同系のネズミの体内に移植したところ、移植 10 週目に粘膜、粘膜下層と平滑筋層で作られた新生小腸の形成を認めた。この小腸には神経細胞が存在し、運動能や吸収能も認められ、組織学的のみならずその機能に関しても正常小腸に似ていることが確認された。しかしこの分野の研究は今始まったばかりであり、今後の研究が期待される。

4. 著者らの行っている ES 細胞からの臓器分化誘導

1) 細胞分化から臓器分化誘導へ

再生医学研究のめざましい進歩により、これまでにマウス ES 細胞からさまざまな『細胞』(血管内皮細胞、平滑筋細胞、心筋細胞、神経細胞、インスリン産生細胞、ドーパミン産生細胞など) に分化することが報告されている。ES 細胞からある特定の『細胞』に分化誘導する場合、その細胞が個体のなかで分化するために必要な既知のサイトカイン (分化誘導因子や増殖因子) を添加して培養したり、それらの因子を導入する方法がとられてきた。一方、『臓器・器官』とは、生物体を構成する一部分で、特定の生理機能を有し、形態的に独立したもので、一種または数種の組織が一定の秩序で結合したものと定義される。個体内で作用する多種類の因子のきわめて複雑で巧妙な相互作用を忠実に実現しなくてはならないため、ES 細胞からある特定の『臓器・器官』へ分化誘導することは非常に困難であると考えられてきた。この問題を解決するために、著者らは、ES 細胞を hanging drop culture (500 個の ES 細胞を含んだ培養液をシャーレの蓋の裏に吊り下げて培養する方法) に着目した。この培養系で ES 細胞は重力にしたがって培養液滴の先端に凝集して 1 つの球状体になり、培養 5 日目で embryoid body (EB; 胚様体) に成長する。embryoid body は、個体での円筒胚に概ね相当するため、内胚葉 (肺、肝、腸などの臓器)、中胚葉 (体節、筋肉など)、外胚葉 (神経板、神経冠、皮膚など) の三胚葉系すべてに分化する能力を有する (図 1)。つまり、embryoid

body のなかで、ES 細胞は受精卵と同じ環境におかれ、個体と類似した複雑かつ巧妙な相互作用を再現できることになる。

2) ES 細胞から肝細胞分化誘導

hanging drop 培養 5 日目の embryoid body をさらに outgrowth culture (シャーレに付着させて培養) したところ、5 日目に激しく拍動 (beating) する心筋細胞の細胞塊 (cluster) の出現を認めた。outgrowth culture 後 14 日目には、この心筋細胞塊の周囲に新たに折り重なるように成長する細胞塊の出現を認めた。肝細胞特異的に取り込まれる indocyanine green (ICG) 試薬を用いて評価したところ ICG の取り込みを認めた。ICG 陽性細胞を詳細に分析したところ、免疫組織化学染色で albumin 陽性を示す三次元構築をもつ細胞群として分化することを突き止めた。さらに、RT-PCR で解析したところ、albumin, α -fetoprotein, transthyretin, α -1-antitrypsin, glucose-6-phosphatase, および内胚葉マーカーである hepatocyte nuclear factor-3 β などの肝細胞特異的マーカーの発現を認めた。電子顕微鏡を用いた形態学的解析では、細胞質内に多数の ER, Lysosomes, Golgi 装置の存在が明らかとなったほか、cell-cell contact (desmosomes) および bile canaliculus (微小胆管構造) も確認された。これらの結果から、ES 細胞から *in vitro* で肝細胞が分化誘導されることが明らかになった。さらに、この細胞群を放射線照射したマウスの門脈内に投与することにより、*in vivo* での生着能を検討した。移植した細胞群は肝臓内で 1 ヶ月にわたり長期生着を認めたのみならず、albumin 合成能も保持されていたことから、形態学的だけでなく、機能的にも肝細胞があることが示された (Yamada et al., 2002)³。

3) ES 細胞から腸管分化誘導

著者らは、この実験系を用いて ES 細胞から蠕動運動能を有する腸管の分化誘導にも成功した。ES 細胞を hanging drop で 6 日間培養すると、embryoid body の両端に beating する細胞塊 (心筋細胞群) が出現する。この時点で、outgrowth culture に移して培養を続けると、7 日間に不規則なリズムで収縮する筒状あるいはドーム状の細胞塊が多数出現した。さらに 7 日間 (14 日目) 培養すると、規則的なリズムで収縮するようになり、さらに 7 日後 (21 日目) には、規則的な自動収縮に加え、大きく波打つような搾り出す動き (蠕動運動) が観察された (図 2)。電気生理学的に解析したところ、7 日目の自動収縮時に、腸管に特異的に存在する、腸運動の pacemaker 細胞であるカハール間質細胞 (interstitial cells of Cajal, ICC) に特有の slow wave が検出された。また、21 日目にみられた大きくうねるような収縮 (蠕動運動) に同調し、神経細胞が関与すると考えられる spike を伴う活動電位を検出した。これらの結果から、この腸管様細胞には、少なくとも平滑筋細胞、ICC、神経細胞が存在していることが示唆された。さらに、電子顕微鏡を用いた形態学的解析および免疫組織化学的解析では、Goblet 細胞 (杯細胞=粘液産生)、Tuft 細胞 (圧感知細胞)、entero-endocrine 細胞 (内分泌顆粒) などの様々な腸管特異的な粘膜上皮細胞、内輪外縦の走行をもつ平滑筋細胞 (線維)、c-kit 陽性の ICC、さらに周囲には樹枝状に発達してネットワークを形成する神経細胞も存在していた。驚くべき点は、この筒状あるいはドーム状の細胞塊は個体の腸管と同様に、内側から粘膜上皮細胞、平滑筋細胞、ICC、漿膜、そしてその周囲に神経線維の順に一定の秩序で同心円状に配列していることである (図 3)。さらに、細胞塊は ICC に起因する自動運動や神経細胞に起因する蠕動運動のような腸管特異的な生理機能を有しているこ

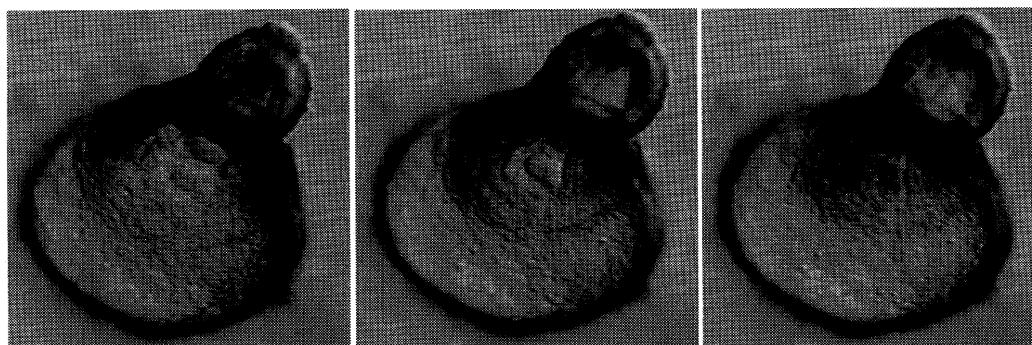


図 2 蠕動運動する ES 腸管

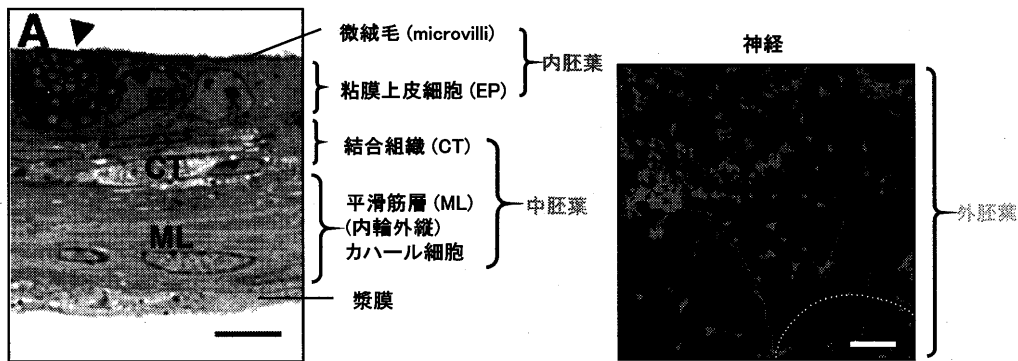


図3 ES腸管の形態学的細胞構築

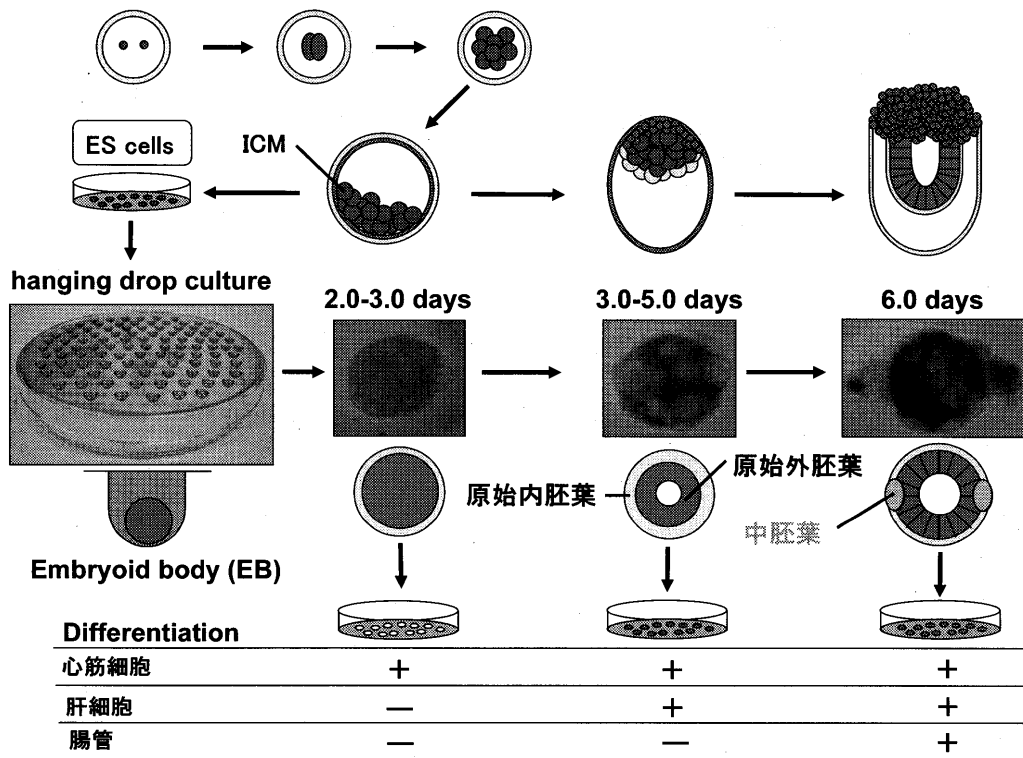


図4 胚様体培養と分化誘導のタイミング

とから、独立した『臓器・器官』としての『腸管』を分化誘導することが示された(Yamada et al., 2002)^b。

4) 臓器分化誘導のタイミング

粘膜上皮細胞が内胚葉由来、平滑筋細胞および ICC が中胚葉由来、そして神経細胞が外胚葉由来であることから考えると、構造的にも機能的にも非常に複雑で巧妙である臓器である腸管を『臓器』として分化誘導できた今回の成功は、今後 ES 細胞を用いた再生医療および人工臓器作成にとって、大変重要かつ画期的な発見であると考えられる。著者らの結果は、hanging

drop culture を用いて embryoid body を作成した場合、培養期間によって分化誘導される細胞や臓器が異なることを示唆している(図4)。つまり、hanging drop culture 後4日目までの embryoid body は、心筋細胞の分化誘導能しか持たないのに対して、hanging drop culture 後5日目の embryoid body には肝細胞に分化する能力が備わっている。肝細胞が beating する細胞(心筋)の周囲に出現することから考えると、心筋細胞から肝細胞分化に必要な因子が産生されている可能性が示唆される。実際 *in vivo* の実験系で心筋細胞を取り除いた個体からは肝臓が発生し

てこないとの報告がある。さらに, hanging drop culture 後5日目の embryoid body には腸管に分化する能力がないのに対し, 6日目の embryoid body には腸管への分化誘導能が備わっていることから, 5日から6日目の間に, embryoid body の内部でなんらかの腸管の分化誘導因子が産生されていることが示唆される。発生学的に肝臓は原腸から分化することを考えると, embryoid body のなかで心筋, 肝臓, 腸管の間でなんらかの相互作用が働いたものと考えられる。今回の著者らの結果から, ES細胞から様々な臓器を作成するうえで培養期間が非常に重要であり, embryoid body 内での細胞同士あるいは臓器同士の相互作用により, 臓器分化誘導のスイッチが順次オンになっていくであろうことが予想される。今後さらに研究を行うことにより, これらの仮説が証明されるものと期待される。

5. 再生医学の今後の展望

心臓, 肝臓, 腎臓, 膵臓などの臓器移植は20世紀の後半に目覚ましい発展を成し遂げ, 今までの医療では救命し得なかった多くの患者が救われるようになった。しかし, これらの治療法が, ドナー不足, 拒絶反応, 免疫抑制剤使用による副作用, 感染症の発症などのさまざまな問題を抱えていることも事実である。この移植の問題を解決し得る医療として再生医療が登場してきた。再生医療は機能障害や機能不全に陥った生体組織・臓器に対して, 細胞を積極的に利用することにより, その機能再生をはかる医療である。再生医学が発展し, 医療に貢献するためには, 細胞の増殖, 分化, 組織構築のメカニズムを分子レベルで徹底的に解明しようとする基礎研究分野と, 細胞増殖の足場となるマトリックスなどの生体材料工学分野とがお互いにバランスよく歩調を重ねていくことが重要である。この再生医学の臨床応用の将来像とは, ある病気になって, 細胞移植を受ければ治療できる場合, 健康な組織(皮膚など)から細胞の核を採取して卵子に移植し, 核移植後の細胞から胚性幹細胞を樹立して, 分化誘導した後移植する, といった近未来医療が描かれる。再生医学が21世紀の医学研究の柱になり, 新しい医療の展開に寄与することが大いに期待される。

参考文献

- Assady, S., Maor, G., Amit, M. et al.: Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes*. 50: 1691-1697, 2001
- Bjornson, C.R., Rietje, R.L., Reynolds, B.A. et al.: Turning brain into blood—a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 283: 534-537, 1999
- Bonner-Weir, S., Taneja, M., Weir, G.C. et al.: In vitro cultivation of human islets from expanded ductal tissue. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. 97: 7999-8004, 2000
- Hamazaki, T., Iiboshi, Y., Oka, M. et al.: Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cells in vitro. *FEBS Lett*. 497: 15-19, 2001
- Evans, M., Kaufman, M.H.: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 292: 154-156, 1981
- 福田恵一: 心筋再生——現状と展望. *外科治療*. 86: 21-26, 2002
- 貝原 聡: 小腸の再生医学. *ドクターズマガジン*. No. 31: 42-43, 2002
- Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P. et al.: Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*. 292: 1389-1394, 2001
- Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D. et al.: Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*. 284: 1168-1170, 1999
- Prockop, D.J.: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 276: 71-74, 1997
- 立花 隆: 人体再生. 中央公論社. 6-12頁, 2000
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S. et al.: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282: 1145-1147, 1998
- Yamada, T., Yoshikawa, M., Kanda, S. et al.: In vitro differentiation of stem cells into hepatocyte-like cells identified by cellular uptake of indocyanine green. *Stem Cells*. 20: 146-154, 2002
- Yamada, T., Yoshikawa, M., Takaki, M. et al.: In vitro functional gut-like organ formation from mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 20: 41-49, 2002
- Zulewski, H., Abraham, E.J., Gerlach, M.J. et al.: Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine and hepatic phenotypes. *Diabetes*. 50: 521-533, 2001