

Fra stamceller til funktionelle betaceller ved type 1-diabetes

Akademiker Nina Engberg, afdelingsleder Mattias Hansson & forskningschef Ole D. Madsen

OVERSIGTSARTIKEL

Hagedorn Forskningsinstitut, Afdeling for Stamcellebiologi

RESUME

Selv om rekonstruktion af en funktionel β -cellemasse gennem transplantation af isolerede Langerhanske øer kan genskabe euglykæmi i fravær af insulinbehandling, er anvendelsen af celleterapi til behandling af type 1-diabetes vanskeliggjort af bl.a. manglen på donormateriale. Fremskridt i målrettet differentiering af stamceller imod β -celler ved trinvis at rekapitulere fosterudviklingen tyder på, at stamceller er en egnet kilde til frembringelse af β -celler. Vi kaster her lys over nogle af de problemstillinger, som i øjeblikket forhindrer brugen af cellebaserede diabetestherapier i klinikken.

Diabetes mellitus er en familie af metaboliske lidelser, der er karakteriseret ved kronisk hyperglykæmi og forstyrret kulhydrat-, fedt- og proteinstofskifte, som er forårsaget af utilstrækkelig produktion af – eller cellulær resistens mod – peptidhormonet insulin. Type 1-diabetes mellitus (T1DM) er kendetegnet ved fuldstændig mangel på insulin, der er forårsaget af autoimmun destruktion af insulinproducerende β -celler, hvorimod type 2-diabetes mellitus (T2DM) er fremkaldt af en relativ insulinmangel og perifer insulinresistens. I 2010 har mere end 280 millioner individer diabetes på globalt niveau (prævalens på 6,6%), og dette tal forventes at stige til 438 millioner i 2030. Disse høje antal påfører verdenssamfundet enorme økonomiske byrder både i form af direkte



FAKTABOKS

Transplantation af isolerede langerhanske øer ved type 1-diabetes mellitus (T1DM) kan gøre patienterne uafhængige af insulinbehandling i op til 5-10 år. Manglen på donorvæv er en af de væsentligste begrænsninger for brugen af celleterapi i behandlingen af T1DM.

Humane pluripotente stamceller (embryonale stamceller eller inducerede pluripotente stamceller) har potentialet til at differentiere til alle celletyper i kroppen.

Der forskes i målrettet at differentiere stamceller til glukosefølsomme, insulinproducerende β -celler ved trinvis at rekapitulere den embryonale udvikling af bugspytkirtlen.

Mulige strategier til at beskytte de transplanterede celler uden livslang immunsuppressiv behandling inkluderer indkapsling af transplantatet eller induceret immuntolerance.

omkostninger til medicinsk behandling og indirekte som følge af reduceret økonomisk produktivitet.

T1DM behandles med injektioner af eksogen insulin, som afværger akutte metaboliske komplikationer, men ikke er i stand til fuldstændigt at genoprette stofskiftehomeostasen, hvilket fører til mikro- og makrovaskulære komplikationer i øjne, nyrer og hjerte. Intensiv diabetesbehandling med det mål at normalisere blodsukkerniveauet reducerer risikoen for senkomplikationer, men er også associeret med en øget risiko for hypoglykæmi. Derfor er der behov for forbedrede behandlinger, som forhindrer udviklingen af senkomplikationer uden at øge risikoen for hypoglykæmi.

Insulin bliver produceret i β -cellerne, som tilsammen med α - (glukagon), δ - (somatostatin) og (pankreatisk polypeptid (pp))-celler udgør de langerhanske øer i den endokrine pancreas. β -cellerne reagerer på forhøjede blodsukkerniveauer ved at secernere insulin til blodet via øernes kapillærsystem.

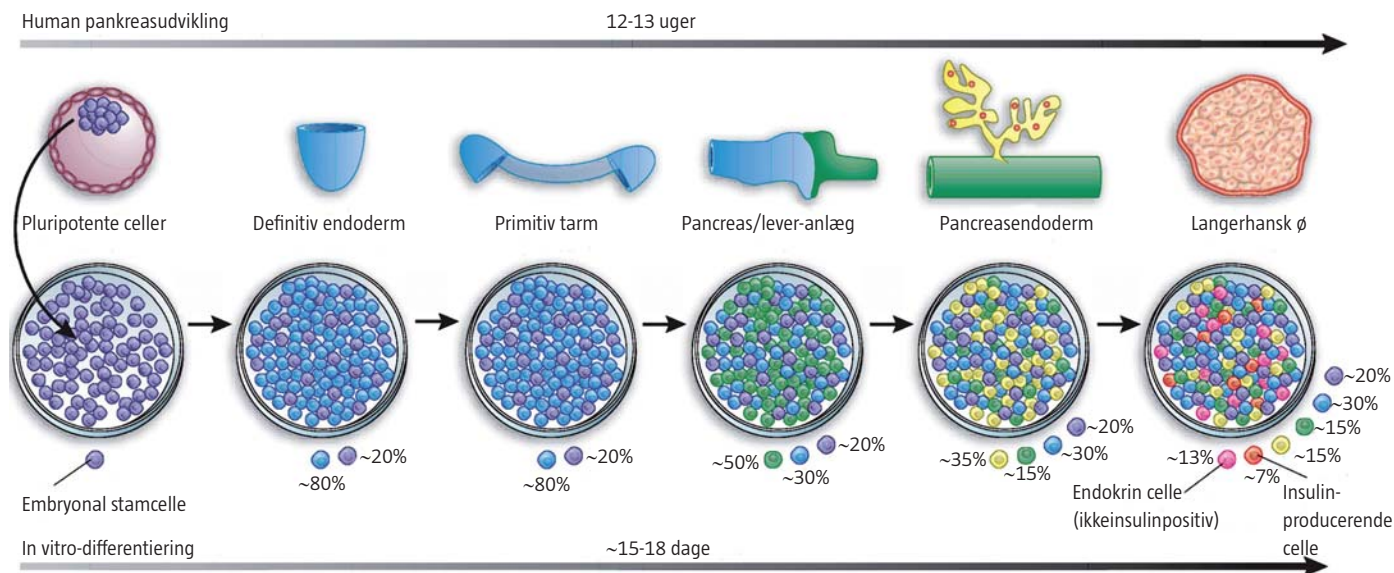
Opdagelsen og oprensningen af insulin i 1920'erne ændrede fuldstændigt udsigten for patienterne, som hidtil var blevet diagnosticeret med en dødelig sygdom [1]. Igennem injektioner med oprenset insulin fra dyr kunne diabetespatienterne nedsætte deres blodsukker og undgå livsfarlige tilfælde af ketoacidose. I 1980'erne blev det muligt at producere rekombinant human insulin, og i slutningen af 1990'erne blev hurtigtvirkende insulinanaloger introduceret efterfulgt af langtidsvirkende analoger, som tilsammen forbedrede blodsukkerreguleringen hos patienterne [2]. I det seneste årti har fremskridt i transplantation af hele øer [3, 4] samt in vitro-produktion af β -celler fra pluripotente celler [5-9] skabt grobund for engang at kunne genskabe en funktionel β -cellemasse i patienter med diabetes. Denne oversigtsartikel præsenterer nogle af de fremtidige retninger og udfordringer, der er forbundet med stamcellebaserede terapier til behandling af diabetes (se desuden [10]).

CELLETERAPI TIL BEHANDLING AF DIABETES

Tilbage i 1890'erne fik en lille dreng med fremskreden diabetes transplanteret et stykke af bugspytkirtlen fra et får, og man observerede en kortvarig forbedring i

FIGUR 1

Måltrettet differentiering af humane embryonale stamceller imod β -celler ved trinvis at efterligne fosterudviklingen af pancreas. Øverst ses vigtige stadier i den embryonale udvikling af pankreatiske endokrine celler, mens de tilsvarende trin i differentieringen af stamcellerne in vitro er vist nedenfor. (Kilde: [29]).



hans tilstand, før han døde få dage efter indgrebet. Transplantation af hele bugspytkirtlen fra en afdød donor er mest anvendt i T1DM. Dette genskaber den endokrine funktion, og 60-80% af transplantaterne består 36 måneder efter indgrebet [11].

Transplantation af hele pancreas er dog et større operativt indgreb, der er forbundet med en ikke ubetydelig perioperativ mortalitet og behov for livslang immunsuppressiv behandling, hvorfor operationen ikke længere udføres i Danmark, og en mindre invasiv procedure som transplantation af isolerede øer tilstræbes. I 1972 blev den første vellykkede transplantation af isolerede øer fra ikke-diabetiske til diabetiske rotter rapporteret, og kort efter fulgte de første meldinger om succesfulde øtransplantationer i mennesker. Generelt har succesraten for transplantation af isolerede øer dog været lav. I år 2000 publicerede Shapiro *et al* en forbedret succesrate ved infusion af friske øer fra 1-2 donorer kombineret med en glukokortikoidfri immunsuppressiv behandling, hvilket førte til fuldstændig uafhængighed af insulinbehandling umiddelbart efter indgrebet [12], men hovedparten af patienterne blev igen insulinafhængige i løbet af fem år [3].

Dog blev der observeret en positiv effekt på blod-sukkerniveauet ved femårsopfølgningen, idet cirka 80% af patienterne stadig havde tilbageværende funktion i de transplanterede øer (målt ved cirkulerende C-peptid), og frekvensen af hypoglykæmi forbundet med insulinbehandlingen forblev minimal.

Lignende resultater er rapporteret i flere internationale transplantationsstudier [4].

Selv om hovedparten af patienterne falder tilbage til insulinafhængighed med tiden, findes der bemærkelsesværdige eksempler på langtidsoverlevelse (> 10 år) og funktion af de transplanterede øer [13]. Disse data demonstrerer, at langsigtet uafhængighed fra insulinbehandling er et opnåeligt mål ved transplantation af isolerede øer. Manglen på donorvæv er en af de væsentligste begrænsninger for brugen af celleterapi i behandling af T1DM, hvilket ansporer forskere til at finde alternative kilder til β -celler, heriblandt voksne eller embryonale stamceller (ES).

METODE

Denne litteraturgennemgang er baseret på litteratursøgning (Pubmed/Google Scholar) inden for området »betaceller og diabetes/celleterapi af diabetes/betacelleudvikling/betaceller fra stamceller«. Herfra har vi udvalgt de mest relevante citationer med særligt fokus på nyere litteratur (siden år 2000) samt inkluderet relevante tidligere nøglearbejder.

β -CELLE-ONTOGENESE

– FRA DEN INDRE CELLEMASSE TIL β -CELLER

Hovedparten af de publicerede differentieringsprotokoller, der har haft til formål at lave pankreatiske endokrine celler fra ES forsøger at efterligne fosterudviklingen [5-7, 9, 14, 15] (Figur 1). Den embryonale udvikling af bugspytkirtlen og β -celleontogenesen er



ORDLISTE

Ektoderm: Ydre kimlag, som giver ophav til hud og nervesystem.

Embryonale stamceller (ES): Celletype afledt fra blastocystens indre cellemasse, som er karakteriseret ved evnen til selvfornyelse (celledeling til identisk embryonal stamcelle) og pluripotens (differentiering til celletyper fra alle kimlag).

Endoderm: Indre kimlag, som giver ophav til fordøjelseskanalen samt associerede organer (skjoldbruskkirtel, thymuskirtel, lunger, bugspytkirtel og lever).

Gastrulering: Proces, ved hvilken de uspecialiserede celler i blastocysten prolifererer og skifter beliggenhed, hvorved de tre kimlag, endo-, meso- og ektoderm dannes.

Indre cellemasse (ICM): Celleklump i blastocysten (det befrugtede æg omkring den 6. dag), som giver ophav til fosteret.

Inducerede pluripotente stamceller (iPS): Pluripotent celletype, som svarer til embryonale stamceller, men er fremkommet ved introduktion af pluripotensrelaterede gener (bl.a. Oct4, Sox2) i en somatisk celle.

MafA: β -cellespecifik transkriptionsfaktor.

Mesoderm: Midterste kimlag, som giver ophav til hjerte, milt, nyrer, knogler, skeletmuskulatur, bindevæv og bloddannende system.

Ngn3: Alle endokrine celler stammer fra Ngn3-udtrykkende celler. Mus med ødelagt funktion af dette gen udvikler ingen endokrine celler.

Nkx6.1: Udtrykkes sammen med Pdx1 i de endokrine celletyper.

Oct4, Nanog og Sox2: Netværk af transkriptionsfaktorer, som er nødvendige for at opretholde den pluripotente fænotype både i det tidlige embryo og i embryonale stamceller.

Pdx1: Transkriptionsfaktor, som er nødvendig for pancreasudviklingen og modningen af β -celler. Mus med ødelagt funktion af dette gen udvikler ingen pancreas. Såvel det eksokrine som det endokrine væv og udførselsgangene kan spores tilbage til Pdx1⁺-celler.

Pluripotens: Evnen til at differentiere til alle kroppens celletyper, men ikke til Ekstraembryonale væv.

Ptf1: Udtrykkes sammen med Pdx1 i det pankreatiske epitel. *ptf1a*^{-/-}-musemutanter udvikler ingen eksokrine celletyper og udførselsgange, hvorimod endokrine celler stadig opstår.

Trofoblast: Blastocystens ydre cellegang, som er ansvarlig for implantationen i livmodervæggen og danner fosterhinder og moderkagen.

grundigt studeret, og denne viden skaber basis for at kontrollere og overvåge målrettet differentiering af pluripotente celler.

Den tidligste opdeling af cellelinjer under fosterudviklingen er adskillelsen af den indre cellemasse (ICM) fra den omgivende trofoblast. Herved fremkommer en væskefyldt blastocyst, hvor ICM placeret i den ene ende indeholder de pluripotente celler, der skaber epiblasten og siden embryoet, mens trofoblasten giver ophav til fosterhinder og til moderkagen. De tre kimlag (endoderm, mesoderm og ektoderm) dannes fra epiblasten ved gastrulering, hvor cellerne vandrer ned gennem en kløft i epiblasten, der kaldes primitivstriben, og danner fosterets mesoderm og definitive endoderm. Alle disse dynamiske begivenheder styres af molekulære signaleringsnetværk i det embryonale og ekstraembryonale væv.

Alle gastrointestinale organer, inklusive bugspytkirtlen, stammer fra den definitive endoderm. Urtarmen dannes ved, at den forreste og bagerste del af den flade endoderm folder ned og samles på midten, mens tarmen lukkes til et rør. Bugspytkirtlen dannes fra to knopskydninger på tarmen ved overgangen mellem den senere mave og tolvfingertarm. Når tarmen roterer, mødes de to pankreatiske knopper og fusionerer til et organ, imens cellerne prolifererer og differentierer til endokrine og eksokrine celletyper. De endokrine celler løsnes fra epitelet og samles i det omgivende mesenkym som langerhanske øer.

Udviklingen af bugspytkirtlen bliver reguleret af flere transkriptionsfaktorer (for grundig gennemgang

se [16, 17]). Meget væsentlig er *pancreatic and duodenal homeobox 1* (Pdx1), som er udtrykt i den forreste del af tarmen, der senere vil udgøre bugspytkirtlen og dele af tolvfingertarmen og maven. Mus såvel som mennesker med ødelagt funktion af dette gen udvikler ingen bugspytkirtel, men kun den første knopskydning. Endnu mere specifik for de to pancreasknopper er *pancreas-specific transcription factor 1* (Ptf1). De tidligste multipotente celler i det pankreatiske epitel er altså pdx1/ptf1a-dobbeltpositive celler. Disse multipotente celler udtrykker også Nkx6.1, og den efterfølgende opdeling i pdx1/ptf1a- og pdx1/nkx6.1-udtrykkende celler repræsenterer adskillelsen af henholdsvis eksokrine og endokrine celletyper.

Udviklingen af den endokrine linje er afhængig af neurogenin 3 (Ngn3), mens modningen af β -celler til glukosefølsomme celler afhænger af MafA. Pankreatiske eksokrine celler kan omdannes til β -celler ved kombineret udtryk af Pdx1, Ngn3 og MafA.

STAMCELLER: DEFINITION, KLASSEFIKATION OG KILDER

Stamceller er defineret som celler, der både kan forny sig selv og lave nye stamceller, samtidig med at de har evnen til at differentiere til specialiserede celletyper. Stamceller klassificeres ud fra deres udviklingsmæssige potentiale, som strækker sig fra totipotent til unipotent.

Totipotente celler, som f.eks. det befrugtede æg (zygoten) og de tidlige blastomerer, har potentialet til at lave en hel organisme inklusive somatiske og ekstraembryonale celler og kønsceller. Pluripotente

celler, inklusive ES og inducerede pluripotente stamceller (iPS), kan differentiere til alle celletyper i kroppen, men kan ikke skabe en hel organisme uden støtte fra andre celletyper. Multipotente celler (f.eks. bloddannende og neurale stamceller) kan producere et begrænset antal cellelinjer, mens unipotente celler kun kan udvikle sig til en moden celletype (f.eks. de spermdannende celler). Stamceller kan desuden klassificeres ud fra deres afstamning (embryonale celler, fosterceller eller voksne celler), hvilket for det meste også reflekterer deres udviklingsmæssige potentiale [18, 19].

Multipotente stamceller i den voksne organisme er blevet identificeret i flere væv fra alle tre kimlag, hvor disse celler har stor betydning for udbedring af vævsskader. Dog er det stadig et åbent spørgsmål, om pankreatiske stamceller kan bidrage til produktionen af nye β -celler.

Pluripotente stamceller fra forskellige kilder deler mange biologiske egenskaber, blandt andet evnen til at differentiere til celletyper fra alle tre kimlag. Pluripotensen kan defineres som ekspressionen af et vigtigt regulatorisk signaleringsnetværk, der består af Oct4, Nanog og Sox2. ES er afledt af ICM i den tidlige blastocyst [19], mens iPS fremstilles fra reprogrammerede somatiske celler [20-22], men begge celletyper er afhængige af de samme transkriptionsfaktorer for at opretholde deres pluripotente tilstand. iPS frembringes netop ved at overudtrykke en række af disse fælles faktorer i somatiske celler. iPS er en attraktiv kilde til produktion af terapeutiske celler til brug i celleterapi, idet de kan produceres fra patientens egne somatiske celler, hvorved man både undgår immunsystemets afstødelse af transplanterede celler samt de etiske problemstillinger omkring afledningen af ES fra befrugtede æg.

FRA STAMCELLER TIL β -CELLER

Selv om pluripotente celler er en potentielt attraktiv kilde til β -celler, har realiseringen af deres potentiale været langsom og udfordrende. Flere grupper har rapporteret målrettet differentiering af humane ES mod β -celler ved trinvist at rekapitulere fosterudviklingen fra pluripotente celler over urtarm og pankreatisk epitel til modne hormonproducerende endokrine celler [5-7, 9, 14, 15] (Figur 1). Samme tilgang er blevet overført til differentiering af iPS [8, 9]. Selv om de producerede β -celler tydeligvis stadig afviger fra modne β -celler, er der særligt et studie fra Kroon *et al.*, som giver *proof of principle* for, at disse humane ES-afledte celler har potentialet til at modnes til glukosefølsomme β -celler efter transplantation ind i mus [5].

Screening af enorme biblioteker med små syn-

tetiske molekyler har identificeret nogle få cellepermeable stoffer, som kan anvendes i differentieringen af ES mod β -celler [23]. Kemiske forbindelser, som primer ES før differentieringen, kan måske også anvendes til at forøge produktionen af en særlig cellelinje [24].

Det vil sandsynligvis være vigtigt at finde små syntetiske molekyler til anvendelse i produktionen af specifikke celletyper til celleterapi, idet disse molekyler kan syntetiseres relativt billigt og i høj kvalitet og betydelig kvantitet. Desuden undgås problemstillingen om sikkerhed, der er associeret med brugen af animalske produkter og vækstfaktorer.

Muligheden for at producere pankreatiske β -celler fra multipotente voksne stamceller er blevet udforsket. Selv om man umiddelbart har opnået positive resultater, har man endnu ikke adresseret cellernes evne til at give ophav til fuldt funktionelle β -celler, hvilket er nødvendigt, før disse celletyper kan betragtes som et alternativ til produktionen af celler til celleterapi. Desuden er mange af disse protokoller bygget på transgen overudtryk af vigtige transkriptionsfaktorer, hvilket yderligere vil komplicere udviklingen mod klinisk anvendelse af disse protokoller.

HÅNDTERING AF IMMUNBARRIEREN VED CELLETERAPI

Immunsuppressiv behandling er toksisk for de transplanterede β -celler, hvorfor forbedrede immunsuppressive behandlingsmuligheder er nødvendige. Funktionsdygtige alternativer – som for eksempel indkapsling af transplantatet eller induceret immuntolerance – kan vise sig som nye strategier til at beskytte de transplanterede øer fra værtens immunangreb. Indkapsling har til formål at isolere øerne fra immunsystemets celler ved hjælp af en semipermeabel membran [25], som stadig giver adgang til næringsstoffer (f.eks. glukose og ilt) og tillader sekretion af et terapeutisk protein (insulin).

Teknikken indebærer unikke udfordringer, som skal løses, inklusive materialets forlidelighed med patientens væv og immunsystem, permeabilitet og strukturel udformning af kapslen, samt problemstillinger om vaskularisering, placering og funktionel ydeevne af de indkapslede celler.

Det ultimative mål i klinisk transplantation er at inducere tolerance over for transplantatet, således at værtens immunsystem accepterer donorvævet uden behov for løbende immunsuppressiv behandling, samtidig med at det kan reagere på andre antigener.

Lovende resultater på området er opnået i eksperimentelle dyremodeller ved brug af forskellige metoder, f.eks. kan en blanding af donor og modtagers dendritiske celler gøre modtageren i stand til at ac-

ceptere ikke-human leukocyt antigen (HLA)-matchet væv [26]. Sideløbende produktion af terapeutiske endokrine β -celler og dendritiske celler fra samme kilde af pluripotente stamceller kan måske give immunologisk tolerance uden brug af barsk immunsuppressiv behandling [27]. Celleterapi i T1DM støder imidlertid på en dobbelt immunologisk barriere, idet induceret tolerance ikke nødvendigvis håndterer den autoimmune destruktion af patientens endogene β -celler. Derfor kan andre strategier, som for eksempel indkapsling, vise sig at være nødvendige for at beskytte de nye øer mod destruktion.

KONKLUSION

Fremskridt i målrettet differentiering af pluripotente celler imod β -celler samt i transplantation af isolede øer har skabt *proof of concept* for, at celleterapi muligvis kan anvendes til behandling af diabetes. Dog er udviklingen af denne teknologi mod klinisk anvendelse langsom og krævende.

En robust og effektiv differentieringsprotokol til produktion af funktionelle β -celler fra pluripotente celler er endnu ikke fundet, men udviklingen af definerede cellekulturbetingelser vil kunne muliggøre en fremtidig brug af cellebaserede diabetestherapier i klinikken. Derudover er det vigtigt at vurdere den potentielle risiko for tumorudvikling fra tilbageværende ES i transplantatet. Også forbedrede metoder til at undgå immunmediert afstødelse af transplantatet er påkrævede.

Anvendelsen af sygdomsspecifikke pluripotente celler til at lave modeller for humane sygdomme giver nye muligheder i studiet af sygdommens patogenese eller til screening for nye biomarkører eller lægemiddelkandidater. I 2009 blev iPS afledt fra T1DM-patienter, hvorefter de blev differentieret til β -lignende celler [28].

Co-kultur af disse patientspecifikke celler med de respektive lymfocytter kan måske for første gang give mulighed for at studere udviklingen af autoimmunitet og β -celledestruktion *in vitro*, hvilket kan føre til forbedrede forebyggelses- og behandlingsstrategier.

KORRESPONDANCE: Ole D. Madsen, Hagedorn Forskningsinstitut, Niels Steensens Vej 6, 2820 Gentofte. E-mail: odm@hagedorn.dk

ANTAGET: 26. august 2010

INTERSEKONFLIKTER: Hagedorn Forskningsinstitut modtager støtte fra EU's 6. rammeprogram og Novo Nordisk A/S til et projekt »aiming to produce therapeutic beta-cells«. Forfattergruppen er ansat af Novo Nordisk A/S. *Mattias Hansson* og *Ole D. Madsen* har medarbejderaktier i Novo Nordisk A/S.

En fuldstændig litteraturliste kan fås ved henvendelse til forfatteren.

LITTERATUR

- Rosenfeld L. Insulin: discovery and controversy. *Clin Chem* 2002;48:2270-88.
- Hirsch IB. Insulin analogues. *N Engl J Med* 2005;352:174-83.
- Ryan EA, Paty BW, Senior PA et al. Five-year follow-up after clinical islet transplantation. *Diabetes* 2005;54:2060-9.
- Shapiro AM, Ricordi C, Hering BJ et al. International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. *N Engl J Med* 2006;355:1318-30.
- Kroon E, Martinson LA, Kadoya K et al. Pancreatic endoderm derived from

- human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2008;26:443-52.
- D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S et al. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2006;24:1392-401.
- D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazer S et al. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 2005;23:1534-41.
- Tateishi K, He J, Taranova O et al. Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 2008;283:31601-7.
- Zhang D, Jiang W, Liu M et al. Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res* 2009;19:429-38.
- Hansson M, Madsen OD. Pluripotent stem cells, a potential source of beta-cells for diabetes therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2010;11:417-25.
- White SA, Shaw JA, Sutherland DE. Pancreas transplantation. *Lancet* 2009;373:1808-17.
- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA et al. Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 2000;343:230-8.
- Berney T, Ferreri-Lacraz S, Buhler L et al. Long-term insulin-independence after allogeneic islet transplantation for type 1 diabetes: over the 10-year mark. *Am J Transplant* 2009;9:419-23.
- Jiang J, Au M, Lu K et al. Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2007;25:1940-53.
- Phillips BW, Hentze H, Rust WL et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into the pancreatic endocrine lineage. *Stem Cells Dev* 2007;16:561-78.
- Jorgensen MC, Ahnfelt-Ronne J, Hald J et al. An illustrated review of early pancreas development in the mouse. *Endocr Rev* 2007;28:685-705.
- Gittes GK. Developmental biology of the pancreas: a comprehensive review. *Dev Biol* 2009;326:4-35.
- Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:387-403.
- Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001;17:435-62.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861-72.
- Meissner A, Wernig M, Jaenisch R. Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2007;25:1177-81.
- Borowiak M, Maehr R, Chen S et al. Small molecules efficiently direct endodermal differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 2009;4:348-58.
- Zhu S, Wurdak H, Wang J et al. A small molecule primes embryonic stem cells for differentiation. *Cell Stem Cell* 2009;4:416-26.
- Beck J, Angus R, Madsen B et al. Islet encapsulation: strategies to enhance islet cell functions. *Tissue Eng* 2007;13:589-99.
- Cosimi AB, Sachs DH. Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Transplantation* 2004;77:943-6.
- Bonde S, Chan KM, Zavazava N. ES-cell derived hematopoietic cells induce transplantation tolerance. *PLoS One* 2008;3:e3212.
- Maehr R, Chen S, Snitow M et al. Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:15768-73.
- Madsen OD, Serup P. Towards cell therapy for diabetes. *Nat Biotechnol* 2006;24:1481-3.