

腎臓と再生医療

Kidney and regenerative medicine

福井 亮 横尾 隆

Akira FUKUI and Takashi YOKOO

はじめに

人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cells : iPS 細胞)が世界で初めて日本で、ヒトの疾患の治療研究に使用されること決定した。2013年2月に理化学研究所のチームが国の審査委員会に申請した、失明の原因ともなりうる加齢黄斑変性症の臨床研究計画についての審査が6月に終了し、2014年夏にも移植手術が行われることとなった。患者の皮膚細胞からiPS細胞を作製し、網膜色素上皮細胞に分化増殖させてシート状にした網膜移植片を網膜下に注入する。胚性幹細胞(embryonic stem cells, ES細胞)を用いた同様の治療はすでに2012年1月に米国で施行され、視力の回復に成功しているが、iPS細胞を用いた治療としては世界初である。iPS細胞を用いた再生医療研究は、2007年のヒトでの作製発表¹⁾からわずか6年で、応用に向けて大きく動き出した。

腎臓は他の臓器に比して、解剖学的にも発生メカニズムが複雑であり、再生は困難とされている。立体構造の再構築だけでも容易ではないが、さらに人体の恒常性維持を司る腎臓は、血液の濾過、分泌、再吸収を経た尿の産生だけでなく、エリスロポエチンやビタミンDを介した内分泌的調整も担っている。このように、多様な機能を有するゆえに再現が非常に難しく、すべての腎構成細胞の再生はこれまで不可能と考えられてきたが、新たな再生手法の開発やiPS細胞など幹細胞研究の進展で、機能的腎臓の再生が少しずつではあるが現実味を帯びてきた。

本稿では、腎臓を中心とした再生医療のこの1年の進歩を概説するとともに、限界や問題点についても言及する。

足場(scaffold)を用いた再生

1. 脱細胞化臓器を足場とした再生

2008年にOttらは、ラットの死体心臓の冠動脈を通じて界面活性剤を灌流することにより、細胞成分のみを除去し、脱細胞化した細胞外マトリックスを得た。これを足場として用いて、ラット胚由来の心臓細胞および内皮細胞を灌流して再び細胞化させることで、成体心臓の約2%に相当するポンプ機能を持った心臓の再生に成功した²⁾。脱細胞化した細胞外マトリックスには、臓器固有の構造が保たれるだけでなく、生理活性物質も保存されるため、また、複雑な構造を有する臓器の再生に有効であると考えられるが、2010年にPetersenらが肺³⁾、Uygunらが肝臓⁴⁾でも、同様の手法で機能的臓器の再生に成功したことを報告した。

2013年5月にSongらにより、ついに腎臓への応用が報告された⁵⁾。同様の方法で脱細胞化したラットの死体腎を足場として、特殊容器内で腎臓全体に陰圧をかけ、腎動脈側から内皮細胞(human umbilical venous endothelial cells : HUVECs)を、尿管側からラットの上皮細胞として neonatal kidney cells : NKC を灌流させた。NKC は、ラット胚の腎臓を酵素処理して単一細胞化した雑多な上皮細胞集団である。上皮細胞は脱細胞化された糸球体の約半数以上に定着を認め、それぞれの細胞はさらにポドサイトなどへと成熟分化し、腎組織として再構築を成し遂げた。この腎臓はアルブミン保持能やブドウ糖・電解質の再吸収能などの機能を持つことが示され、さらに、ラットの同所的部位に移植したところ、レシピエントの循環系によって灌流され、尿管を介して *in vivo* で尿を産生した。高度に分化したHUVECsが、足場と若干の陰圧だけでそれぞれの腎臓構成細胞に分化したとする結果は十分な追試が必要と考えられるが、再生に胚を使用しないため倫理的問題は少なく、独

創的な新たな手法として今後の展開が期待される。

2. 3D プリンターによる足場の作製

3D プリンターとは、コンピュータ上で作った 3D データを設計図として、断面形状を積層していくことで、自動車部品やフィギュアなど多様な立体物を短時間で造形できる装置である。工業だけでなく、手術法の検討や患者への説明など医療分野での活用も進んでいる。

2013 年秋、京都大学 iPS 細胞研究所と東京大学のチームにより、iPS 細胞と 3D プリンターという両最先端技術を活用した世界初の再生医療研究が、小耳症の患者を対象として開始された。人体で最も複雑な形状とされる耳軟骨の再現は困難であったが、正常な片耳を CT で撮影し、耳軟骨のデータを 3D プリンターに取り込み、合成素材(ポリ乳酸ポリマー)を材料に作製した耳軟骨の型を足場として、iPS 細胞から分化させた軟骨細胞を流し込んで耳の再生を試みる。

Faulkner-Jones らは、培養したヒト ES 細胞を含む「バイオインク」を使い、特別に改良したインクジェット式の 3D プリンターを使って、繊細なヒト ES 細胞を 3D 印刷して立体的に積み重ねることに成功し、さらにその ES 細胞は増殖や分化を継続できた⁶⁾。また、サイズは小さいものの、肝臓、腎臓などの臓器を 3D 印刷する研究も進んでいる。

前述した脱細胞化臓器を足場とした再生では、脱細胞化に用いられる臓器は同種由来であるため、残留成分による拒絶反応が問題となりうるが、本法では回避できる。しかし本法では、移植細胞の種々の臓器構成細胞への分化は限定的であると考えられるため、複雑な臓器の再生には更なる研究の進展が必要であろう。

胚盤胞補完法を用いた再生

次に、多能性幹細胞の持つキメラ形成能を利用した胚盤胞補完法 (blastocyst complementation) を用いた研究を紹介する。胚盤胞補完の原理は、特定の細胞系譜が欠損した胚盤胞(受精後の初期胚)に正常な多能性幹細胞を注入して仮親の子宮へ移植し、キメラが成立すると、欠損した細胞が完全に多能性幹細胞由来になるというものである。1993 年に Chen らは、この現象を用いてリンパ球欠損マウスの胚盤胞に正常なマウスの ES 細胞を注入することで、リンパ球はすべて ES 細胞由来となるキメラマウスを作製し、リンパ球の再生に成功した⁷⁾。

東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センターの Nakauchi らは、この手法を用いて遺伝的に特定の臓器を欠

損させた動物の胚盤胞に多能性幹細胞を注入することで、多能性幹細胞に由来する臓器を丸ごと作ることを着想した。2010 年には、膵臓欠損を示す *Pdx1* ノックアウトマウスの胚盤胞に正常なマウスの ES 細胞を注入することで、ES 細胞由来の膵臓再生に成功し⁸⁾、注入する正常多能性幹細胞として iPS 細胞が利用可能であることも示した。また、マウスおよびラットの異種間でもキメラが成立し、ラットの膵臓を持つマウスが誕生した。同様の手法を用いて iPS 細胞由来の肝臓再生にも成功し⁹⁾、さらに 2013 年には、ブタを用いた再生膵臓の大型化にも成功している¹⁰⁾。

腎臓領域では 2012 年に、腎臓欠損動物モデルとして *Sall1* ノックアウトマウスを用いてマウス iPS 細胞由来のネフロン再生に成功している¹¹⁾。しかし、*Sall1* の発現が見られない尿管芽由来の組織(尿管や集合管)や血管系および神経系はホスト(代理母)由来であるため、移植による臨床応用を目指すには拒絶反応が問題となる。すべての細胞をドナー(移植した多能性幹細胞)由来とするには、これらの系譜の細胞群を含めたすべてが欠損した動物を作製する必要がある。さらに、膵臓の場合と異なり、現時点では異種間での腎臓再生には成功していない点も問題である。しかし、これらの結果を応用すれば、ヒトの臓器形成のメカニズムを異種動物の体内で解析することが可能となり、将来的に異種動物個体内でヒト iPS 細胞由来の臓器を再生するといった、新規の再生医療技術の開発に貢献すると期待される。

また本法は、キメラ動物を実際に誕生させることから、生命操作の度合いが高く、倫理的な課題の克服が必要と考えられる。これまで、クローン技術規制法や文部科学省の指針でも、動物胚にヒトの iPS 細胞などを移植した「動物性集合胚」を作製すること自体は、目的を限定したうえで認められていたが、動物の子宮に入れて育てることは禁止されていた。しかし 2013 年 6 月、政府の総合科学技術会議の生命倫理専門調査会は、これまで世界的に禁止されていた、動物性集合胚を動物の子宮に着床させて個体を産ませ、ヒトの臓器を作製する基礎研究を大筋で容認した。動物性集合胚が、疾患メカニズムの解明や新薬開発、幹細胞の性質を調べるなど幅広く役立つ可能性があるとして、研究目的も拡大する方向である。今回の決定により本法の一層の飛躍が期待されるが、本研究を根拠に、少数の専門家の判断で動物性集合胚を受容した政府の突然の決定には懸念を抱かざるをえない。もっと国民的な議論を経る必要があり、何より研究者には高い倫理感が求められるであろう。

足場(scaffold)なしで自己組織化能を利用した再生

1. 腎オルガノイド(腎臓様組織)を用いた腎臓再生

2011年にEirakuらは、マウスES細胞の凝集塊の三次元培養で、眼杯(網膜原基)様構造が活発かつ自立的に形成されたことを報告した¹²⁾。この結果は、単純な細胞培養における眼杯の形態形成が、内在性の自己組織化プログラムによって起こることを示すと考えられる。2012年にSpenceらは、*in vitro*で一連の増殖因子を時間的に操作して胚での腸発生を模倣し、ヒト多能性幹細胞を、機能的な腸細胞、杯細胞、パネート細胞、腸内分泌細胞を含む、三次元の腸オルガノイドに分化させることに成功した¹³⁾。2013年にLancasterらは、ヒト多能性幹細胞に由来し、大脳皮質様組織を含む三次元脳オルガノイド培養系を開発した¹⁴⁾。さらにTakebeらは、発生初期のプログラムを再現することにより、ヒトiPS細胞由来の三次元的な肝原基の誘導に成功し、肝不全モデルマウスへの移植による治療効果も示した¹⁵⁾。

これらの脳など複雑な臓器での研究結果から、多能性幹細胞は強い自己組織化能を持つことが示唆され、腎臓への応用も期待される。

2010年にUnbekandtらは、マウス胚の後腎を酵素処理して単一細胞化したのちに、遠心処理で再凝集させ、Rho kinase inhibitorを添加し培養することで、尿管芽マーカーや基底膜マーカーを発現する細胞集団の誘導を*in vitro*で成功させた¹⁶⁾。胎生期の後腎には腎前駆細胞となる細胞が集まっており、それらに特定の誘導因子を外因性に添加することで、未熟ではあるが腎臓様組織へ分化しうることが示された。

またこの手法を応用し、2012年にXinarisらは、マウス胚の後腎由来細胞に増殖因子を添加し、成体ラットの腎皮膜下に移植することで、糸球体機能と尿細管機能を持ったマウスの腎臓様組織を再生することに成功した¹⁷⁾。この腎臓様組織は、異種の免疫不全ラットの腎被膜下にvascular endothelial growth factor: VEGFとともに移植されることで、ホストの血管系と統合し、腎臓系譜への分化が促進することも示されている。これは、腎臓への分化能を持つ細胞群を、外因性のオーガナイザーとともに成体腎に移植することで、腎組織の再生が可能であることを*in vivo*で示した初の報告である。この手法では、3週間以上経過すると腎臓様組織由来の組織が退縮するなどの問題点はあるものの、細胞移植による局所的な腎臓再生法として今後の応用

が期待される。

2. iPS/ES細胞を腎臓系譜に分化誘導させることによる再生

多能性幹細胞には胚性幹細胞(ES細胞)¹⁸⁾や人工多能性幹細胞(iPS細胞)¹⁹⁾などがある。2007年にYamanakaらがヒトでの作製に成功したiPS細胞が注目されるなか¹⁾、2013年にTachibanaらは、健康な女性が提供した卵子から核を取り除き、別人の皮膚細胞の核を移植するクローン技術を用いて、体細胞由来ヒトES細胞の作製に世界で初めて成功した²⁰⁾。これまでのヒトES細胞は²¹⁾、材料となった受精卵に由来するため、心筋や神経などの細胞に分化させて患者に移植する場合に生じる拒絶反応が問題であった。また、作製の成功率が低いため多量の卵を必要とすること、さらにクローン胚を母体の子宮に戻せばクローン人間が生まれる可能性があることなど倫理的問題はあるものの、患者由来のES細胞を作製すれば拒絶反応がなく、iPS細胞と同様に再生医療への応用が可能となる。さらに、今回の体細胞由来ES細胞とiPS細胞との比較研究が進めば、初期化の機序の解明や、iPS細胞作製技術の改良につながることも期待される。

iPS細胞は患者自身の体細胞から樹立できるため倫理的問題が少なく、また自己のiPS細胞だけで再生された臓器は理論的には移植に際し拒絶反応がない。まだiPS細胞のみで構成された機能的腎臓を再構築することはできないが、腎の発生メカニズムを辿ることで、腎臓を再生しようとする研究が盛んに行われている。

すべての腎組織は中間中胚葉から発生するため、ヒト由来の中間中胚葉が作製できれば、腎臓再生へ向けた大きな一歩となりうる。2013年にOsafuneらは、さまざまな成長因子のうち、BMP7(bone morphogenetic protein 7)、activin AおよびWnt3aをヒトiPS細胞に作用させ、さらに低分子化合物を用いて分化効率を高めることにより、iPS細胞を90%以上の高効率で中間中胚葉へと分化誘導することに成功した²²⁾。また、すでにOsafuneらは、マウス胎生期の後腎内にネフロン前駆細胞を見出し²³⁾、この細胞を再凝集させ特殊培養することで、三次元構造を持った糸球体や尿細管へ分化することも報告している。したがって、適切な誘導因子や化合物が同定され、中間中胚葉からネフロン前駆細胞への分化が可能となれば、ヒトiPS細胞→中間中胚葉→ネフロン前駆細胞→分化腎細胞という分化誘導が、胚や異種動物を利用せずに*in vitro*で行えることになる。また本法は、腎臓発生メカニズムを解明する新たなツールとなることも期待される。

異種動物胚のプログラムを利用した再生

われわれは 2005 年に、異種動物胚とヒト間葉系幹細胞を用いて尿を濾過し、エリスロポエチンを産生する機能的腎臓の再生に成功している^{24~26}。動物は子宮内で受精卵という単細胞から、いくつもの細胞種で構成された複雑な臓器および個体へと構築させるメカニズムを持っている。遺伝子に刻み込まれた設計図から、空間的、時間的に間違ふことなく個体発生がなされるのである。分化に必須な遺伝子が同定され、一部の細胞などへの分化は可能となりつつあるが、すべての発生過程を人工的に模倣することは現在の技術では不可能である。そこでわれわれは、発生のプログラムのすべてを兼ね備えた異種動物胚を、目的の臓器(ここでは腎不全患者の腎臓)を再生させる「臓器工場」として利用することを着想した。またわれわれは、腎臓再生の幹細胞ソースとして、全身の至るところに存在し、分離が容易な組織幹細胞の一つである間葉系幹細胞に着目した。間葉系幹細胞は間葉系の系譜をもった幹細胞であるが、外胚葉や内胚葉由来の組織への分化能も有する興味深い幹細胞である^{27,28}。また、間葉系細胞は間葉系幹細胞から分泌されるさまざまな液性因子によって組織修復や保護、免疫調整能などの多面的効果を有することから、細胞治療にも利用され注目を浴びている。われわれはこの間葉系幹細胞を用い、異種動物胚のプログラムを借りた腎臓再生を試みた。

羊膜類(鳥類, 爬虫類, 哺乳類)では、成体の腎臓は後腎である。その発生は、胚の頸胸部から尾部の総排泄腔へとウォルフ管が伸長し、その尾端近くで尿管芽を発芽することから始まる。続いて、尿管芽とその周囲の後腎間葉とが相互作用することにより、ネフロンが形成される。この時期の後腎間葉に発現し、尿管芽との相互作用に必須な遺伝子として知られるのが、グリア細胞由来神経成長因子(Glial cell-derived neurotrophic factor : GDNF)である。われわれの手法では、この GDNF を強制発現させたヒト間葉系幹細胞を異種動物胚内の後腎間葉領域に移植して尿管芽と相互作用させることで、キメラネフロンへの分化誘導に成功したのである。

具体的には、胎生 11.5 日のラット胚の後腎間葉領域に、GDNF を強制発現させたヒト間葉系幹細胞をマウス胚で移植した。続いて、その胚の発生を全胚培養器で 48 時間継続した後、後腎を摘出して 24 時間器官培養することにより、ヒト間葉系幹細胞由来のポドサイト、尿管管上皮、間質細胞を含む未熟後腎組織へと分化した。ラット胚の血管系がまだ侵入していないこの時点で、その未熟後

腎組織を成体ラットの大網に移植すると²⁹、ホスト(レシピエント)の血管系が侵入し統合されて成熟した後腎組織(neokidney)となり、ホストの血液を濾過し、尿を産生することも確認した²⁵。つまり本法により、外来性のヒト間葉系幹細胞を異種動物の大網内で neokidney にまで分化させることに成功したのである。またこの neokidney は、ホストが貧血に陥った場合に、応答性にエリスロポエチンを分泌することも確認している²⁶。

さらにわれわれは、ホストに移植されたラット後腎は、ホストに潜在する骨髄由来間葉系幹細胞を引きつけて niche を供給し、ホスト由来のエリスロポエチンを産生することを確認した³⁰。ラット後腎をマウスへ移植、もしくは、ブタ後腎をネコへ移植するといった異種移植の場合にも、移植された後腎が、ホスト由来のエリスロポエチンを産生することを種特異的 PCR で確認している。これに加え、自殺遺伝子を導入したトランスジェニック ER-E2F1 マウスを使うことにより、異物となるマウスの後腎組織をアポトーシスで排除し、再生組織だけを残存させるシステムの開発にも成功した³⁰。これらの結果は、腎性貧血患者由来の neokidney を患者自身に移植すると、neokidney が患者由来のエリスロポエチンを産生すること、また、臓器工場として用いた異種動物由来の細胞を排除しうることを示唆している。

しかし本法では、後腎間葉由来の糸球体および尿管は移植した間葉系幹細胞由来となるが、尿管芽細胞の運命はすでに決定しているため、尿管芽由来である集合管および尿管は異種動物由来になるという問題が残る。これに対しわれわれは、尿管芽さらには尿管および集合管もヒト由来にするための研究を進めている。尿管芽の発生時期は、後腎間葉の発生時期よりもさらに早く、哺乳類胚を用いた細胞移植実験はきわめて困難である。そこで、胚が比較的大きく、また胎生でないため哺乳類胚に比して移植実験が容易であり、しかも腎臓発生に必須な遺伝子の発現パターンは哺乳類とほぼ共通であるニワトリ胚を用いることに着想した。その結果、Pax2 などの転写因子を導入したヒト間葉系幹細胞は、ニワトリ胚内の適切な環境に移植されると、ウォルフ管に分化しうることを確認した³¹。このことから、導入遺伝子や移植時期、移植場所を最適化することにより、尿管芽、さらには尿管や集合管もヒト細胞由来にできると考えている。

尿管および集合管が異種動物由来となる現在の方法では、移植後の後腎の排泄路の確立が課題であるが、大型動物としてブタを用いることで、スケールアップを図り、諸

般の問題を乗り越えようと挑戦を続けている。

再生医療関連法案改正などの動きについて

2013年2月、Nature誌のeditorialで指摘されているように、わが国の幹細胞治療に対する規則は、海外に比べて整備が遅れており、まさに「途上治療のパラダイス」であった。その結果、有効性の証明されていない実験的な「幹細胞治療ビジネス」も数多く行われており、海外からも多くの人々が「幹細胞ツーリズム」にやってくるという報道もなされた。

これまでわが国の行政は、再生医療の実用化に向けて、多額の予算を投下し、研究・開発を支援してきた。しかし、国際的にみても、患者に届いている再生医療という視点では遅れをとっているという事実もある。

このような状況のなか、2014年春の施行に向けて準備が進む再生医療関連三法について紹介する。これらの法案成立により、再生医療を安全かつ迅速に患者に提供できるようになることが期待される。

1. 再生医療推進法

国会議員の発議により成立した法律(議員立法)であり、2013年4月26日に成立した。いわゆる理念法であり、再生医療を国民が迅速かつ安全に受けるため、その研究開発から実用化まで国が支援する責務が明記されている。

2. 再生医療等安全性確保法

再生医療・細胞治療の実施機関に対して、公的審査機関による審査と国の了承を義務づけている。狭義の再生医療だけでなく、いわゆる自由診療下で行われている癌免疫抑制療法や、美容目的の細胞・組織移植を含む広義の再生医療の実態も含めて厚生労働省が把握することにより、「未承認再生医療」は排除しながら、正しい再生医療を適正かつ確実に患者のもとに届かせることを目的としている。また、細胞培養加工の外部委託が認められたため、安全性と再現性の高い再生医療の裾野の拡大に結びつくことが期待される。

3. 薬事法等改正法

再生医療の実用化に対応できるよう、幹細胞などを含む製品を医薬品とは別に「再生医療製品」と定義している。幹細胞治療では、ヒトの細胞を用いるという特性から個人差が反映され、有効性の確認に長時間を要するという課題があったが、本法案では迅速承認を導入している。安全性の確認を優先し、治験で安全性が確認できれば条件つきで早期に販売を承認し、有効性は市販後に審査する仕組みを設けている。これにより、早期の実用化と承認数の増加も見

込まれる。迅速承認に対しては、かなり否定的な記事が2013年5月のNature Medicine誌に掲載されたが、このような大胆な改革が、再生医療のみならず日本の医療全体を変革するきっかけとなることを期待したい。

おわりに

2013年5月に閣議決定されていた再生医療等安全性確保法と薬事法等改正法が、本原稿執筆中の2013年11月5日に衆議院で可決された。参議院では厚生労働委員会で審議され、今国会中に可決、成立することが確実となっている。再生医療関連三法の成立により、わが国の再生医療実用化は間違いなく加速するであろう。また、政府による動物性集合胚使用の容認も、当該分野の発展に大きく寄与することだろう。

これまで述べたように、幹細胞、再生研究は国内外で多角的に進められており、世界的な競争は日々激しさを増している。ノーベル賞を受賞した山中教授が強調されているように、「日本が勝ち残るには、オールジャパン体制作りが重要」だが、政府の予算配分については「iPS細胞研究に偏りすぎ」との見方もある。ES細胞、iPS細胞、組織幹細胞をバランスよくカバーしたオールジャパン体制が整うことを期待したい。

また、解剖学的・発生的な複雑性から、最も再生しにくい臓器の一つと考えられてきた腎臓だが、新たな再生手法の開発やiPS細胞など幹細胞研究の進展で、機能的腎臓の再生が少しずつではあるが現実味を帯びてきた。現状では、どの手法を用いても、臨床応用への課題はまだ大きいと言えるが、他臓器とは異なり、透析という代替療法がすでに確立されている腎臓領域では、臨床応用を含めた再生医療研究が行いやすい環境にあるとも言える。例えば、成体腎臓の機能を100%再生できなくても、10%程度の腎機能が回復するだけでも、末期腎不全患者の透析からの離脱が望め、QOLの向上や医療費の削減に大いに貢献できると考えられる。そのためには、関連領域との連携をより深め、更なる研究の発展が必要なのはもちろんであるが、倫理面の課題を克服し、また、再生医療に対する国民の理解やコンセンサスを得ることが重要になると考えられる。腎再生医療が一日も早く臨床応用されることを期待したい。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

1. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007 ; 131(5) : 861-872.
2. Ott HC, Matthiesen TS, Goh SK, et al. Perfusion-decellularized matrix : using nature's platform to engineer a bioartificial heart. *Nat Med* 2008 ; 14 : 213-221.
3. Petersen TH, Calle EA, Zhao L, et al. Tissue-engineered lungs for *in vivo* implantation. *Science* 2010 ; 329 : 538-541.
4. Uygun BE, Soto-Gutierrez A, Yagi H, et al. Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat Med* 2010 ; 16 : 814-820.
5. Song JJ, Guyette JP, Gilpin SE, et al. Regeneration and experimental orthotopic transplantation of a bioengineered kidney. *Nat Med* 2013 ; 19 : 646-651.
6. Faulkner-Jones A, Greenhough S, King JA, et al. Development of a valve-based cell printer for the formation of human embryonic stem cell spheroid aggregates. *Biofabrication* 2013 ; 5(1) : 015013.
7. Chen J, Lansford R, Stewart V, et al. RAG-2-deficient blastocyst complementation : an assay of gene function in lymphocyte development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 4528-4532.
8. Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, et al. Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell* 2010 ; 142 : 787-799.
9. Espejel S, Roll GR, McLaughlin KJ, et al. Induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes have the functional and proliferative capabilities needed for liver regeneration in mice. *J Clin Invest* 2010 ; 120 : 3120-3126.
10. Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, et al. Blastocyst complementation generates exogenic pancreas *in vivo* in pancreatic cloned pigs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013 ; 110 : 4557-4562.
11. Usui J, Kobayashi T, Yamaguchi T, et al. Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation. *Am J Pathol* 2012 ; 180 : 2417-2426.
12. Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al. Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 2011 ; 472(7341) : 51-56.
13. Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro*. *Nature* 2011 ; 470(7332) : 105-109.
14. Lancaster MA, Renner M, Martin CA, et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* 2013 ; 501(7467) : 373-379.
15. Takebe T, Sekine K, Enomura M, et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 2013 ; 499(7459) : 481-484.
16. Unbekandt M, Davies JA. Dissociation of embryonic kidneys followed by reaggregation allows the formation of renal tissues. *Kidney Int* 2009 ; 77 : 407-416.
17. Xinaris C, Benedetti V, Rizzo P, et al. *In vivo* maturation of functional renal organoids formed from embryonic cell suspensions. *J Am Soc Nephrol* 2012 ; 23 : 1857-1868.
18. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981 ; 292 : 154-156.
19. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006 ; 126 : 663-676.
20. Tachibana M, Amato P, Sparman M, et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 2013 ; 153(6) : 1228-1238.
21. Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, et al. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 2006 ; 444(7118) : 481-485.
22. Mae S, Shono A, Shiota F, et al. Monitoring and robust induction of nephrogenic intermediate mesoderm from human pluripotent stem cells. *Nat Commun* 2013 ; 4 : 1367.
23. Osafune K, Takasato M, Kispert A, et al. Identical of multipotent progenitors in the embryonic mouse kidney by a novel colony-forming assay. *Development* 2006 ; 133 : 151-161.
24. Yokoo T, Ohashi T, Shen JS, et al. Human mesenchymal stem cells in rodent whole-embryo culture are reprogrammed to contribute to kidney tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 3296-3300.
25. Yokoo T, Fukui A, Ohashi T, et al. Xenobiotic kidney organogenesis from human mesenchymal stem cells using a growing rodent embryo. *J Am Soc Nephrol* 2006 ; 17 : 1026-1034.
26. Yokoo T, Fukui A, Matsumoto K, et al. Generation of a transplantable erythropoietin-producer derived from human mesenchymal stem cells. *Transplant* 2008 ; 85 : 1654-1658.
27. Dezawa M, Kanno H, Hoshino M, et al. Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 2004 ; 113 : 1701-1710.
28. Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000 ; 32 : 11-16.
29. Rogers SA, Lowell JA, Hammerman NA, et al. Transplantation of developing metanephroi into adult rats. *Kidney Int* 1998 ; 54 : 27-37.
30. Matsumoto K, Yokoo T, Matsunari H, et al. Xenotransplanted embryonic kidney provides a niche for endogenous mesenchymal stem cell differentiation into erythropoietin-producing tissue. *Stem Cells* 2012 ; 30 : 1228-1235.
31. Fukui A, Yokoo T, Matsumoto K, et al. Integration of human mesenchymal stem cells into the Wolffian duct in chicken embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 ; 385 : 330-335.