

줄기세포를 이용한 세포치료법

¹손은화 · † 표석능

¹삼척국립대학교 생약자원개발학과, † 성균관대학교 약학부
(접수 : 2004. 7. 15., 게재승인 : 2004. 11. 2.)

The Use of Stem Cells as Medical Therapy

Eun-Hwa Son¹ and Suhkneung Pyo[†]

¹Dept. of Pharmacognosy Material Development, Samcheok National University, Kangwon 245-711, Korea

[†] Division of Immunopharmacology, College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

(Received : 2004. 7. 15., Accepted : 2004. 11. 2.)

Recently, there has been extremely active in the research of stem cell biology. Stem cells have excellent potential for being the ultimate source of transplantable cells for many different tissues. Researchers hope to use stem cells to repair or replace diseased or damaged organs, leading to new treatments for human disorders that are currently incurable, including diabetes, spinal cord injury and brain diseases.

There are primary sources of stem cells like embryonic stem cells and adult stem cells. Stem cells from embryos were known to give rise to every type of cell. However, embryonic stem cells still have a lot of disadvantages. First, transplanted cells sometimes grow into tumors. Second, the human embryonic stem cells that are available for research would be rejected by a patient's immune system. Tissue-matched transplants could be made by either creating a bank of stem cells from more human embryos, or by cloning a patient's DNA into existing stem cells to customize them. However, this is laborious and ethically contentious. These problems could be overcome by using adult stem cells, taken from a patient, that are treated to remove problems and then put back. Nevertheless, some researchers do not convince that adult stem cells could, like embryonic ones, make every tissue type. Human stem cell research holds enormous potential for contributing to our understanding of fundamental human biology. In this review, we discuss the recent progress in stem cell research and the future therapeutic applications.

Key Words : Stem cell, embryonic stem cell, adult stem cell, mesenchymal stem cell, medical therapy

서론

줄기세포 (stem cell)는 분화가 끝나지 않은 미성숙 세포로서 적당한 조건에서 특정 조직이나 기관으로 성장할 수 있는 능력을 갖고 있는 세포다(1). 무한히 증식할 수 있는 자가 재생산 능력과 다양한 세포로 분화되는 특성 때문에 줄기세포는 최근 장기 기능을 재생할 수 있는 획기적인 세포치료제 (cell therapy)로 인식되고 있어 장기 이식 뿐만 아니라 그 동안 치료의 한계로 생각되었던 Parkinson's disease, Alzheimer's disease (노인성 치매) 등 퇴행성 질환

이나 심장, 신장에 관련된 난치병 질환에 대한 효과적인 대안으로 부상하고 있다(2-4). 줄기세포는 시험관에서 배양하고 분화시킬 경우 환자가 필요로 하는 특정 세포로만 들어질 수 있기 때문에 손상되거나 질병이 유발된 조직의 세포에 적합한 줄기세포를 이식함으로써 그 조직의 세포 유형으로 분화하여 조직 재생을 유도하는 질병의 근원적인 치료 방법으로 이용될 수 있다.

줄기세포는 포유류 배아의 초기 발달 단계에서 만들어지는 배아줄기세포 (embryonic stem cell)와 성인의 다양한 조직에 제한적으로 존재하는 성체줄기세포 (adult stem cell)로 구분된다(Table 1). 배아줄기세포는 수정된지 5~6일 정도 되는 초기 발달단계에 있는 배아세포에서 분리되는 데, 이것은 배아, 태아, 태반 등에서도 발견되며 신체의 모든 세포 유형으로 분화될 수 있기 때문에 '전능세포 (totipotent cell; able to give rise to all embryonic and extra-embryonic cell types)' 혹은 '만능세포 (pluripotent cell;

[†] Corresponding Author : Division of Immunopharmacology, College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon 440-746, Korea

Tel : +82-31-290-7713, FAX : +82-31-292-8800

E-mail : snpyo@skku.ac.kr

able to give rise to all cell types of the embryo proper)'라고도 불린다(2). 배아줄기세포는 장기치료에 대하여 가장 우수한 효과를 나타내며 난치병을 치료할 수 있는 가장 확실한 방법으로 생각되고 있지만, 배아줄기세포의 이용은 배아의 파괴라는 생명윤리 문제를 제기하고 있어 사회적 합의 등의 신중한 접근이 요구되고 있다. 성체줄기세포는 제대혈 (umbilical cord blood, 탯줄혈액)이나 다 자란 성인의 골수 (bone marrow)와 혈액 등에서 추출해낸 것으로 뼈와 간, 혈액 등 구체적 장기의 세포로 분화되기 직전의 원시세포로서 조혈모세포 (hematopoietic stem cell)와 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell), 신경줄기세포 (neural stem cell) 등이 있다(5, 6). 성체줄기세포는 성인의 조직에 제한적으로 존재하며, 이들은 각각의 조직의 특정부위에 미분화된 상태로 존재해 있다가 조직의 손상이나 질병에 의해 활성화 되어 조직을 재생시킨다. 배아줄기세포와는 달리 성체줄기세포는 그들이 유래된 조직에 있는 세포 유형으로만 분화가 가능하다는 특징을 가진다. 그러나 최근에 성체줄기세포도 많은 종류의 세포로 분화가 가능하다는 것이 밝혀지면서 다양한 종류의 장기치료를 위한 연구가 진행되고 있다(7-11). 성체줄기세포는 인간 배아에서 추출한 배아줄기세포와는 달리 골수나 뇌세포 등 이미 성장한 신체조직에서 추출하기 때문에 윤리 논쟁을 피할 수 있고 또한 환자의 몸에서 추출할 경우 면역 거부반응 문제를 해결할 수 있는 장점이 있다. 그러나 세포 증식이 어렵고 쉽게 분화되는 성향이 강하기 때문에 임상적으로 세포치료에 이용할 만큼 다량의 미성숙 줄기세포를 분리하기 어려운 문제점을 가지고 있다.

이와 같이 배아줄기세포를 치료에 사용할 경우 면역 거부반응과 윤리 문제가 생기고, 성체 줄기세포를 이용할 경우 증식력이 낮다는 장벽을 극복해야 하기 때문에 줄기세포에 대한 연구는 이러한 문제점을 동시에 해결할 수 있는 방법으로 배아복제 (embryo cloning)에 대한 관심이 고조되었다(12, 13). 환자 자신의 체세포 핵을 인간 난자에 이식하는 동종간 핵이식 기술의 경우 복제된 배아로부터 얻어진 줄기세포가 자신의 유전물질을 거의 완벽하게 갖고 있어 환자본인에게 이식했을 때 면역 거부반응이 거의 없는 치료용 세포를 얻을 수 있는 치료법으로서 모든 과

학자들이 시도하려는 연구 분야이며, 치료용 배아복제 (therapeutic cloning)를 주장하는 것은 바로 이와 같은 엄청난 의학적, 의료적 효용성 때문이다.

줄기세포를 이용한 세포치료 기술은 초기단계로서 아직 해결해야 할 문제점들이 많다. 현재 배아줄기세포와 성체 줄기세포는 세포치료제로서 각각의 장단점을 가지고 연구 개발되고 있으며, 이에 본 논문에서는 줄기세포의 임상적 응용 및 문제점과 산업적인 전략 등을 검토하고 줄기세포의 기술개발 전망을 살펴본다.

줄기세포의 특성

배아줄기세포 (embryonic stem cell)

1998년 이전까지 과학자들은 줄기세포가 배아가 성장하는 짧은 단계에만 존재하고, 이를 몸에서 격리해서 살아있게 하는 데는 특별한 장치가 필요하기 때문에, 격리·배양이 불가능하다고 믿었다. 그렇지만 1998년 Thomson, Shambloot 등은 인간배아줄기세포를 착상전 배아의 내세포덩어리 (inner cell mass; ICM)로부터 분리하고 배양하는데 성공했다(2, 4). 수정 후 5일이 경과한 배반포 시기에 일부의 세포가 외부에서 떨어져 세포덩어리를 형성하게 되고 이 세포는 모든 형태로 분화한다. 외부의 세포들은 외배엽 (trophoectoderm)이 되어 결국에는 태반 (placenta)으로 발달하게 된다. 가운데 세포덩어리는 나중에 분화하여 성체를 만들게 되며 이 세포가 배아줄기세포이다(15). Thomson 등은 시험관 아기 기술 후 남은 배양 초기 신선 (수정 후 2~3일 된 배아) 혹은 냉동 잔여배아를 환자의 동의를 받고 사용하여 배아줄기세포를 제작하였으며, 그 배아줄기세포를 면역력이 결핍된 생쥐에 주입함으로써 외배엽 (신경과부세포), 중배엽 (근육조직, 연골조직, 뼈) 및 내배엽 (내장상피세포)으로의 분화 능력을 간접적인 분화유도 방법을 통해 확인하였다. 또한 Shambloot 등은 5~9주령의 유산된 태아의 원시생식세포에서 분화되지 않은 원시생식세포를 배양함으로써 줄기세포를 얻는데 성공하였다. 이후 2000년 Reubinoff 등은 수정 후 6일된 배반포기 배에서 얻어진 배아줄기세포가 생체내 및 생체외에서 원하는 특정 조직 세

Table 1. Source of stem cells

stem cell		contents
embryonic cell	Spare embryos	stem cells can come from leftover embryos stored at fertility clinics that were not used by couples to have children.
	Special purpose embryos	embryos are created in vitro fertilization (artificially in the lab) for the sole purpose of extracting their stem cells.
	Cloned embryos	embryos are cloned in labs using somatic nuclear transfer method in order to harvest their stem cells.
adult cell	Aborted fetuses	stem cells are taken from fetuses in early development that have been aborted.
	Umbilical cords	this after-childbirth tissue holds potential for research.
	Adult tissue or organs	stem cells are obtained from the tissue or organs of living adults during surgery.
	Cadavers	isolation and survival of neural progenitor cells from human post-mortem tissues (up to 20 hours after death) has been reported and provides an additional source of human stem cells(14)

포로의 분화가 가능함을 발표하였다. 그와 같이 생체내 배양으로는 면역력이 결핍된 생쥐에서 외배엽, 중배엽 및 내배엽으로의 분화능력을 간접적으로 확인하였고, 생체외 배양으로는 신경세포로의 분화능력을 직접적인 분화 유도 배양 방법을 통해 확인하였다(3, 16). 이와 같은 인간배아 줄기세포의 배양 및 분리기술의 성과는 초기 인간배아 연구뿐만 아니라 다양한 세포배양을 통한 신규성장인자 및 의약품 개발, 세포대체요법 (cell replacement therapy)을 통한 Parkinson's disease, Alzheimer's disease, 척추손상에 의한 사지마비, 중풍, 소아당뇨병, 심근경색, 간경화 등의 난치병 치료에 획기적으로 사용될 수 있는 21세기 가장 핵심적인 생명공학 기술 중의 하나로 주목을 받게 되었다.

재생의학에서 배아줄기세포가 중요한 이유는 배아줄기세포가 분화를 유도하는 인자에 따라 다양한 세포로 분화가 가능하기 때문이다(Table 2). 배아줄기세포는 한번 분리되면 영구적인 보관이 가능할 뿐 아니라 체외에서 2년 이상 염색체 이상 없이 배양할 수 있기 때문에 오랜 배양 증식 후에도 그 증식 및 분화 잠재력이 변형되지 않으므로 이 세포를 세포대체요법에 사용할 경우 세포 공급에 대한 문제도 해결이 가능하다(17, 18).

인간배아줄기세포의 연구 분야는 다음과 같이 특징지을 수 있다.

첫째는 인간배아줄기세포가 갖는 고유한 특성을 규명하는 것이다. 초기 배아줄기세포 연구자들은 대부분의 정보를 생쥐의 배아줄기세포로부터 얻었으나(21, 22), 실제로 인간배아줄기세포와는 많은 차이가 있었다. 예를 들면 인간과 생쥐의 배아발달단계의 유전자 발현이 서로 다르게 나타났는데(23), 장배형성시기에 태반 및 germ layer 배열을 포함하는 배아외층 형성과 egg cylinder 대신에 embryonic disc를 형성하는 등 인간 배아줄기세포는 생쥐와 다르게 나타났다(24-27). 또한 세포 표면 marker도 인간과 배아줄기세포에서 다르게 발현되는데, 인간배아줄기세포에서는 단계별 특이항원인 SSEA-3, SSEA-4, 당단백 TRA-1-60, TRA-1-81, GCTM-2가 발현되고 생쥐 배아줄기세포에서는 발견되지 않았으며(2, 3), 반면에 생쥐의 배아줄기세포에서는 SSEA-1이 발현되었으나 인간세포에서는 발견되지 않았다(2, 28). 또한 LIF (leukaemia inhibitory factor), IL-6

(interleukin 6) 등 사이토카인에 대해 반응하는 것도 다르게 나타났다(29-31).

둘째는 배아줄기세포를 이용한 다양한 분화유도법의 개발로서 초기 인간배아줄기세포가 갖는 분화능을 증명하고 생체내 이식시 기형종 (teratoma)이 형성되지 않는 세포치료제로 이용할 수 있도록 다양한 세포분화기술을 개발하는 것이다. 최근 몇 년 동안 다양한 성장인자 첨가에 따라 인간배아줄기세포가 특정세포로 변환하는 과정을 규명하는 논문들이 발표되었고(32), 인슐린을 생산하는 세포의 분화(33), 기능성 심근세포로의 분화(34), 혈액세포의 생성(35) 및 신경세포를 질환동물에 이식(36, 37) 등의 결과가 증명되었다(Table 3).

더 최근에는 Austin-Smith와 Yamanaka에 의해 배아줄기세포를 어떤 특정 세포로 분화시키는 분화조절 마스터 유전자 'Nanog'가 발견되었다(38, 39). 배아줄기세포가 특정세포로 분화되지 않고 무한하게 자기분열을 반복하도록 만드는 핵심인자로 평가되는 마스터 유전자는 줄기세포를 어떤 장기로 발전시킬 것인지를 총괄하여 조정하는 분자조절 유전자로서 일종의 사령탑 역할을 하는데 줄기세포로부터 원하는 특정 세포를 자유자재로 얻을 수 있는 수단을 획득했다는 점에서 의미가 크다. 지금까지는 줄기세포로부터 예측 불허의 다양한 세포가 얻어졌기 때문에 절반의 성공에 불과하다는 평가를 받아왔으나, 마스터 유전자의 발견으로 줄기세포에서 의사와 환자에게 필요한 세포만 골라서 배양할 수 있게 됨으로써 배아줄기세포의 분화조절 연구에 큰 영향을 줄 것으로 기대된다.

셋째는 분화 유도된 세포의 생체내 이식 시 기능회복 가능성과 이식을 위한 기반기술 개발로서 다양한 동물모델에 대한 광범위한 이식 연구이다. 신경이상 동물모델에 대한 이식(40), 당뇨병 동물모델에 대한 이식(41), 심근경색 동물에 대한 이식(42-44) 등 다양한 동물모델에 대한 이식 방법이 최근에 보고 되었다. 임상적으로 인간배아줄기세포가 세포치료제로서 활용되기 위해서는 이식 시 거부반응이 없어야 함으로 이식거부반응을 유발하는 유전자를 knockout시켜 universal stem cell로 제작하려는 연구도 진행 중이다(45).

Table 2. 배아줄기세포의 성질 및 특징

- 배아줄기세포는 외배엽 (ectoderm), 중배엽 (mesoderm), 내배엽 (endoderm)의 세개의 배엽으로 발달하며, 외배엽은 신경이나 피부로, 중배엽은 근육 뼈나 생식세포로, 그리고 내배엽은 소화관이나 체내부 장기로 분화할 수가 있는 성질을 가지고 있다.
- 일반 세포는 일정한 횟수를 분열하면 그 이상은 분열하지 않게 되는데 비해 배아줄기세포는 계속해서 분열할 수 있는 성질을 유지하고 있다.
- 배아줄기세포는 분열하면서도 염색체 수에 이상이 없이 일반 체세포와 동수인 상태를 유지하고 있다. 암세포나 다른 불사화한 세포는 분열하면서 염색체의 수가 통상의 수에서 증감하는 것이 보통이다.
- 배아줄기세포 특유의 분자생물학적인 특징을 갖고 있어 어느 특성의 효소의 활성이 높거나 낮은 경우를 공통으로 볼 수 있다; 배아줄기세포는 암세포와 비슷하게 염색체 끝부분에 붙어 있는 반복된 DNA의 이중나선이 다른 체세포보다 긴 것이 특징이다. 이들 세포에는 텔로머라아제 (telomerase) 효소의 활성이 높아 세포가 여러 차례 분열하더라도 텔로미어 (telomere)의 길이가 유지되는 것으로 알려져 있다(19, 20)
- 배아줄기세포는 모두 장기간 배양이 가능하며 pluripotent한 세포의 marker가 발견된다.
- 배아줄기세포는 반복증식이 가능하다; 배아줄기세포가 배아생식세포 (embryonic germ cell) * 보다 더 광범위한 분화능력을 갖고 있는데, 배아줄기세포는 300~400번의 반복증식이 가능하고 배아생식세포는 70~60회 정도의 분화능력이 보고 된다.

* 1981년에 생쥐의 배반포의 ICM 세포에서 모든 조직으로 분화할 수 있는 세포가 최초로 분리되었는데 이를 배아줄기 (embryonic stem, ES) 세포라 하고, 배란 후 5~10주 사이에 태아가 자라면서 고환이나 난소의 생식기관으로 발달할 세포를 배아생식 (embryonic germ, EG) 세포라 하였다. 실제로 ES세포와 EG세포는 특성이 다르지만 복제 분화를 통해 조직이나 기관으로 발달할 수 있다는 점으로 배아줄기세포에 포함시킨다.

Table 3. Examples of human ES cell differentiation culture conditions

Cell type	Growth factors	Reference
Insulin-producing	None	(33)
Cardiomyocytes	None	(46)
Cardiomyocytes	None	(47)
Cardiomyocytes	5-aza-dC	(48, 49)
Neural precursors	주)	(37)
Neural precursors	EGF, bFGF	(36)
Hematopoietic	None	(35)
Endothelial	None	(50)
Trophoblast	BMP4	(48, 49)

주) FGF-2, insulin, transferrin, progesterone, putrescine, sodium selenite, heparin.

배아줄기세포를 배양하는 방법에는 신선배아 또는 폐기 처분될 냉동잔여배아를 이용하는 법, 인간의 체세포 핵을 핵이 없는 인간 난자에 이식하는 동종(同種)간 핵이식수술법 또는 동물난자에 이식하는 이종(異種)간 핵이식기술법 등 네가지 방법이 있다. 윤리적인 측면에서 신선 혹은 냉동잔여 배아로부터 얻어진 줄기세포를 이용하는 연구가 좀 더 자유롭지만 환자에 이식시 면역거부반응이 생길 수 있다. 배아세포는 2주가 지나면 스스로 줄기세포로 급변하면서 다양한 신체장기로 분화해 가는데, 배아줄기세포가 장기이식에 비해 거부반응이 덜 일어난다고는 하지만, 이것이 배아줄기세포에서 얻은 장기이식에도 적용될지는 아직 미지수이다.

따라서 배아줄기세포를 이용한 세포치료법에서 이식거부반응을 극복하려는 연구가 활발하게 진행 중이다(51-54). 거부반응은 혈액세포에 일어나는데 혈액세포와 이식조직세포가 동일 배아줄기세포에서 유래할 경우 발생하지 않기 때문에 배아줄기세포에서 유래한 혈액줄기세포를 먼저 이식한 후 동일 배아줄기세포에서 유래한 조직세포를 이식하면 거부반응을 피할 수 있다(55, 56). 또한 줄기세포의 유전자 조작을 통해 거부반응을 없애려는 실험도 진행 중이다(57-59).

환자의 체세포 핵을 핵이 제거된 난자에 이식하는 동종간 핵이식수술에 의해 얻는 배아줄기세포의 경우, 환자에 서 유래된 조직이나 장기의 체세포를 이용하면 복제된 배아로부터 얻어진 줄기세포가 자신의 유전물질들 거의 완벽하게 갖고 있기 때문에 환자 본인에게 이식했을 때 이 론상 거부반응이 일어나지 않을 것으로 추정된다(75)(Fig. 1). 그러나 환자의 질환이 유전자 이상에 의해 발생한 것 이라면 그 비정상 유전자를 함유하고 있는 핵을 체세포핵 이식에 사용하는 것은 바람직하지 않으며, 이식된 핵과 세 포질 mitochondria내 유전물질과의 상호 작용에 대한 가능 성을 갖고 있다.

배아줄기세포를 이용한 세포치료는 이식거부반응 외에 도 종양형성, 감염, 윤리 문제 등이 해결해야할 과제로 남 아 있다. 배아줄기세포는 기본적으로 무한 증식이 가능한 세포로 이는 종양세포의 특징이기도 하다. 생쥐에 인간배 아줄기세포를 주사할 경우 기형종이 형성될 수 있다는 보 고가 있는데(62, 63) 이는 배아줄기세포가 종양세포로 전환 될 수 있다는 우려를 뒷받침한다. 또한, 인간배아줄기세포

를 배양할 때 생쥐의 배상태 섬유아세포 (embryonic fibroblast cell)가 필요한데 이 경우 정상적으로 인간에게 존재하지 않는 바이러스나 다른 감염원이 배아줄기세포를 통해 이식받는 사람을 감염시킬 수 있다. 줄기세포의 재료 인 배아는 생명체가 될 수 있는 윤리적 한계를 갖고 있어 그 자체만으로도 사회적으로 수급·제작에 많은 어려움을 갖고 있다. 현재 시도되고 있는 거의 모든 배아줄기세포도 불임치료용으로 쓰다 남은 잉여 수정란을 분화시켜 만든 것이다.

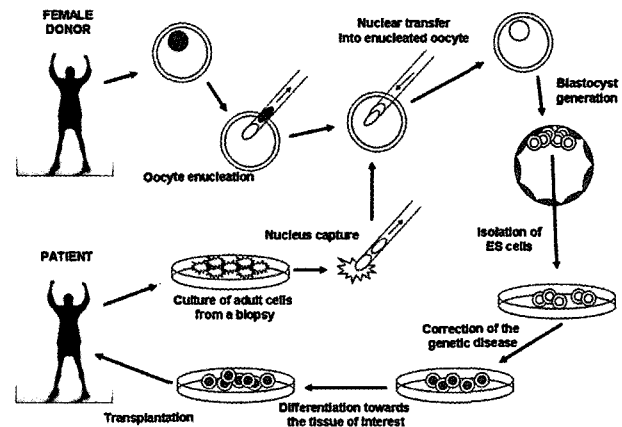


Figure 1. The embryonic stem cells generated by this procedure could be genetically corrected either by gene insertion or gene replacement strategies. In the scheme, cells from a patient biopsy are obtained and their nuclei transferred into enucleated oocytes. In a second step, embryonic stem cells are generated and expanded stem cells are subjected to genetic correction. Finally, genetically corrected cells are differentiated toward the tissue of interest and then transplanted into the patient (76).

인간배아줄기세포에 대한 연구는 전 세계적으로도 초기 단계에 머물러 있다. 배아줄기세포가 환자에 적용되기 위해서는 배아에서 추출된 줄기세포를 분화시켜 선택 분리 하고, 거부 반응을 없앤 뒤 환자에 이식해 손상부위가 살아나는지 까지 확인해야 하는 여러 단계의 실험이 필요하기 때문이다. 국내의 현재 기술은 배아에서 줄기세포를 추출하는 단계를 넘은 상태이며, 세포 배양의 어려움, 유전자 도입기술의 확보, 세포주의 분배 등의 문제 및 생체내 이식시 종양형성 등의 문제로 더 많은 연구가 필요하다. 이러한 문제점들이 있음에도 불구하고 인간배아줄기세포는 향후 난치병을 치료할 수 있는 해결책으로 예상되며 이와 같은 무한한 잠재력으로 인해 다양한 연구가 빠르게 시도되고 있다.

성체줄기세포 (Adult stem cell)

성체줄기세포는 우리 신체를 구성하는 장기조직에 극소수로 존재하면서 장기조직의 정상적 기능을 수행하고 유지해주는 근간세포이다. 배아줄기세포 연구가 이제 시작 단계인데 비해 성체줄기세포 연구는 40년 정도 되는 긴 역사를 갖고 있다. 악성빈혈이나 백혈병과 같은 혈액질환이나 면역질환의 치료를 위해 골수세포나 태아 조혈모세

포를 이용한 세포치료 기술은 이미 보편화되어 치료방법으로 적용되고 있다.

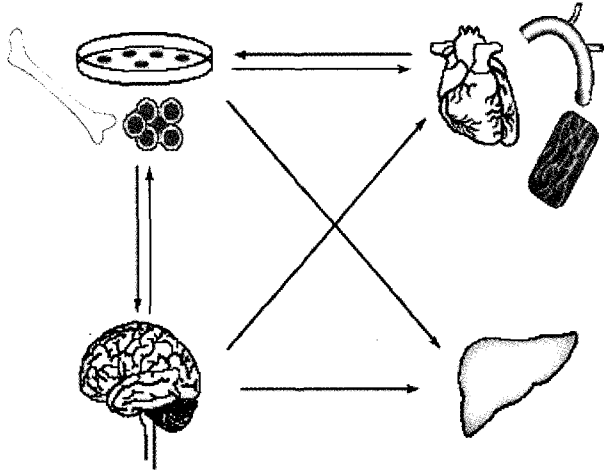


Figure 2. Adult stem cell plasticity. Adult stem cell plasticity has been described as the unexpected potential of cells from bone marrow, muscle or brain to give rise to cells of tissues other than the tissue of origin. Examples include bone-marrow-derived cells or even purified hematopoietic stem cells that can give rise to endothelium, skeletal muscle, cardiac muscle or hepatocytes (8).

최근에 성체줄기세포도 다양한 분화 능력이 입증되었는데, 1998년 Ferrari는 뼈속 줄기세포가 근육세포로 변환될 수 있다는 연구 결과를 Science지에 발표했고(64), 2000년 Lagasse는 뼈속 줄기세포가 간장세포로 분화한다는 사실을 Nature Medicine지에 발표했다(65). 단순히 골수이식에만 활용되던 뼈속 줄기세포가 배아줄기세포처럼 다양한 분화능력을 갖고 있다는 사실이 입증되기 시작하면서, 성체줄기세포는 단순히 그 장기조직으로 분화하는 것뿐만 아니라 다른 장기조직으로 분화할 수 있다는 성체줄기세포의 분화 유연성 (plasticity)이 밝혀졌다(Fig. 2, Table 4). 이에 성체줄기세포는 이식된 후 각 장기의 특성에 맞게 분화할 수 있는 특성 때문에 치료 의학에서 장기재생에 이용될 수 있는 세포치료제로써 그리고 배아줄기세포의 윤리적 문제를 해결할 수 있는 대안으로 떠오르게 되었다.

성체 줄기세포는 배아줄기세포와 같이 인체의 모든 중

류 세포로 분화되지는 않지만 추출 기원에 따라 다양한 종류의 조직세포로 분화될 수 있다. 성체줄기세포는 골수 이외의 장기 즉, 유방, 간장, 피부, 위장관, 정소, 눈, 췌장 등 자체 재생능력이 있는 장기조직에 전부 존재하기 때문에 이런 조직이나 장기가 상처를 입었을 때 정상적으로 재생될 수 있기 때문이다. 현재까지 가장 많이 연구된 성체줄기세포는 뼈속의 골수이며 혈액 및 림프구를 생산할 수 있는 조혈모세포를 비롯하여 중간엽 줄기세포 등 여러 종류의 줄기세포를 가지고 있다(79, 93, 94). 조혈모세포는 원래 여러 가지 혈액 세포로 분화되는 능력이 있으나 체외에서 골격근, 심근 상피, 간세포로도 분화될 수 있다. 그 외 신경줄기세포, 간엽줄기세포도 혈액, 골격근, 심근, 신경, 간, 혈관 등으로 분화되는 능력을 나타낸다(72-76, 95, 96). 이에 성체줄기세포는 조직 이식 거부 반응이 없는 장기생산에 이용할 수 있는데, 예를 들면 당뇨병 환자를 위하여 췌장 줄기세포를 환자의 췌장 내에 주입함으로써 인슐린 의존성 당뇨병을 치료한다든지, 연골세포나 근육에 문제가 있는 환자에게 줄기세포를 주입해 치료해줄 수 있다. 피부 화상인 경우 피부의 줄기세포를 떼어내 시험관 내에서 증식한 후 화상부위에 발라주어 화상치료에도 활용할 수 있다. 최근에는 분화에 대한 연구가 많이 진행되어 더 이상 재생이 불가능하다고 여겨진 성인의 뇌에서도 줄기세포군이 있다는 사실이 확인되었다(97, 98).

줄기세포를 얻을 수 있는 또 하나의 방법은 버려지는 제대혈로부터 추출하는 것이다. 제대혈은 태반과 탯줄 안에 있는 혈액으로서 산모의 출산시 쉽게 얻을 수 있어 채취가 용이하고 산모와 신생아에게 영향을 주지 않으며, 조혈모세포를 다량 함유하고 있으며 줄기세포의 좋은 공급원이 되고 있다. 그 밖에도 제대혈은 뼈, 연골, 골수간질세포, 지방세포, 건, 신경세포 등으로 분화할 수 있는 간엽줄기세포를 포함하고 있어 이를 이용한 조직재생용 세포치료제의 개발 가능성이 높아지고 있다(99-101). 제대혈 줄기세포를 이용한 세포치료 방법은 윤리적인 문제를 피하는 동시에 기술적으로 원하는 양만큼의 줄기세포를 얻을 수 있는 장점이 있어 매우 유리하다(Table 5).

그러나 분만시 제대혈을 보관하는 비용이 비싸고 보관 기간도 짧아 쉽게 이용되지 않는 문제점이 있다. 제대혈을 이용한 중간엽 줄기세포는 중간엽 줄기세포의 효과적인

Table 4. Adult cell plasticity

Tissue Origin	Newly formed tissue	Reference
Bone marrow	Brain(66, 67), Kidney, Skeletal muscle (64, 68)	(69)
Mesenchymal/Stromal	Brain, Bone, Fat, Heart(70, 71)	(72-76)
Hematopoietic stemcell (sorted)	Liver, Lung, Skin(77), Gastro-intestinal tract	(65, 77, 78)
MAPC (multipotent adult progenitor cells)	Brain(79-81), Retina(69), Lung, Heart, Skeletal muscle, Liver(82), Intestine, Kidney, Marrow, Blood, Skin	(83)
Brain	Heart, Skeletal muscle Kidney, Stomach, Intestine, Liver, Blood	(84-86)
Skeletal muscle	Heart	(87-89)
Liver	Bile duct	(90)
Skin	Bone, Skeletal muscle	(91)
Pancreas	Ft, Brain, Muscle, Liver	(92)

분리, 세포 특성을 유지한 상태의 대량 증식, 배양 및 증식에 소요되는 시간의 단축, 증식비용의 절감 및 효율적 관리 등의 문제가 해결된다면 세계적으로 매우 경쟁력 있는 세포치료제가 될 수 있다.

Table 5. 공급원에 따른 줄기세포의 특성 비교

줄기세포의 특성	줄기세포의 공급원		
	배아	제대혈	성체
분화능력	가장 우수함	우수함	우수함
기형종 발생 가능성	있다	없다	없다
획득의 용이성	어렵다	쉽다	어렵다
생명윤리 문제	있다	없다	없다
거부반응 해결방법	어렵다	가능하다	어렵다

성체줄기세포를 이용한 세포치료 기술의 핵심은 성체조직이나 장기에서 정확히 줄기세포만을 분리할 수 있는 기술과 이를 이용한 체외 증폭 기술개발에 있다. 성체줄기세포를 실제로 임상 적용하려면 많은 수의 줄기세포가 필요하지만 성체줄기세포는 생체 내에 존재하는 줄기세포의 양이 매우 적어 성체조직에서 줄기세포를 획득하기가 어려우며, 이를 분리할 수 있는 정확한 marker가 개발되지 못하여 순수한 줄기세포의 분리도 쉽지 않다. 체외배양을 통한 골수이식 치료에 있어서도 이식에 필요한 양의 혈액 줄기세포를 확보하기가 용이하지 않은데, 10,000개의 골수 세포 중 1개의 혈액줄기세포를 분리하는 것이 어렵기 때문에 골수 이식시 줄기세포 뿐만 아니라 다른 골수세포도 같이 이식되는 경우가 많아 심각한 부작용을 야기할 수 있다. 또한 배아줄기세포에 비해 배양이 어렵고 성체줄기세포를 체외배양으로 증폭할 수 있는 기술적 시스템이 완성되지 않았다. 성체줄기세포를 이용한 기술의 또 하나 핵심 분야는 분화의 유연성을 파악 및 활용하는데 있다. 성체줄기세포는 자신과 똑같은 세포를 만드는 자체 재생 능력과 모든 계통으로 분화할 수 있는 유연성을 가진 세포다. 따라서 어떤 조직에서 성체줄기세포를 분리하려면 세포를 분리해 시험관 내에서 자체 재생능력이 있는지, 그리고 다른 세포로 분화할 능력이 있는지를 증명하여야 한다. 그러나 시험관 내에서 이런 세포의 성질을 밝히는 것은 쉽지 않다. 또한, 성체줄기세포가 갖는 분화의 유연성인 곧 생체내의 이식 가능한 충분한 양의 세포로 분화될 수 있는지의 기술도 아직 완성되지 않았다.

성체줄기세포 연구에서 미국은 독보적인 자리를 차지하고 있다. 대표적으로 미국의 벤처기업 Osiris社は 성체줄기세포를 이용한 손상된 뼈와 심장근육을 재생시키는 실험을 임상단계에 올려놓았다(102, 103). 국내에서도 관절연골 손상 치료에 대한 임상실험을 하고 있으며, 특정 질환에 대해서 성체줄기세포를 이식하고 신체 손상부위를 회복시킨 사례도 있다. 이같은 연구 성과에도 불구하고 성체줄기세포 기술이 성공하기까지는 앞에서 기술한 바와 같이 골수 등 체내에서 성체줄기세포를 채취하는 기술, 채취한 성체줄기세포를 체외에서 증식시키는 기술, 증식된 성체줄기세포를 원하는 세포로 분화시키는 기술 및 분화시킨 성체줄기세포를 체내 이식시키는 기술 등 해결해야 할 문제가

많이 남아 있어 현재로서는 아직 갈 길이 멀다. 이에 실제로 성체줄기세포 기술이나 배아줄기세포 기술들이 척추손상 마비, 당뇨병, 심장병 난치병 등 환자에게 적용하려면 최소한 10년은 소요될 것으로 전망하고 있다.

줄기세포 기술개발을 위한 사업전략

윤리적인 문제 해결과 줄기세포의 확보

줄기세포의 연구에서 앞으로 해결해야 할 많은 문제들 중에서 가장 기본적인 문제는 적절한 줄기세포의 확보이다. 현재 가장 많이 이용되는 것이 배아줄기세포이지만 이것은 원천적인 생명윤리 문제가 야기되며, 특히 체세포 복제기술을 통한 난치병 치료 차원의 치료용 배아복제기술은 인간복제와 직결되기 때문에 종교계와 많은 시민단체가 강력히 반대하고 있다. 특히, 미국에서는 1997년 복제양 돌리의 탄생을 계기로 인간 복제에 대한 윤리성이 거론되었으며 인간배아 실험은 허용하되 자궁에 이식하는 것은 금지해왔다. 미국 하원은 아기를 얻기 위한 출산용 배아복제는 물론 연구 목적의 배아복제도 모두 금지하는 법안을 통과시켰으며 이 법안은 상원에서 통과를 늦추고 있다. 이와 같은 많은 반대는 인간복제라고 하는 악영향을 우려한 나머지 생명과학의 기술개발의 위축을 가져오게 될 수도 있다. 이에 2001년 미국대통령 부시는 특정한 경우에 한하여 사람의 배아줄기세포 연구를 지원하게 함으로써 미국국립보건원(NIH) 산하에 위원회를 구성하였고 2001년 8월 이전에 확립된 전세계 배아줄기세포의 등록을 받아 NIH Stem Cell Registry를 설립하여 총 78종류의 배아줄기세포가 확립되었음을 발표하였다(Table 6). 미국의 지원금 허용범위는 배아줄기세포 연구에 사용할 사람의 배를 얻는 공급원은 불임 치료를 위해 채취하여 쓰고 남은 것으로 국한하고, 2001년 발표하기 전에 불임 치료 이외의 채취한 배는 사용 하되 이후부터는 배아세포를 만들기 위하여 배를 파괴하지 못하도록 하였다. 그리고 배를 제공하는 경우는 반드시 충분한 설명과 이해를 확인하는 informed consent (정보에 근거한 동의)를 통해서만 이뤄지며 배를 제공하는데 대한 댓가는 없어야 한다는 점 등이었다. 현재 등록된 세포주에 대해 미국 NIH에서는 연구비를 제공하고 있고, 일부 세포주에 대해서는 연구진에게 분양이 진행되고 있다.

Table 6에서 나타나는 바와 같이 우리나라에서도 3개 기관에서 배아줄기 세포주를 등록하고 있으며, 시험관아기 시술 후 폐기될 냉동배아의 이용이 환자의 동의 하에 허용되고 있어 현재 약 15종류의 배아줄기 세포주가 확립되어 있다. 이에 국내에서는 30여개 연구기관에 분양되어 연구하고 있어 줄기세포에 대한 국내 기술수준은 세계적이며 매우 높다. 최근 보건복지부가 마련한 생명윤리법에서는 질병치료를 위한 연구 목적으로 체세포 배아복제가 일부 허용될 것으로 전망되지만 반대 목소리가 높아 국회통과는 확실치 않다. 또한, 인공 수정 후 폐기될 냉동 배아의 이용은 부분적으로 허용되고 있지만 면역 거부반응 때문에 크게 실효성이 없다.

Table 6. NIH Human Embryonic Stem Cell Registry

회사명	보유국가	배아줄기 세포주수*	현재
			이용가능한 배아줄기 세포주수**
BresaGen, Inc.	USA	4	1
CyThera, Inc.	USA	9	0
ES Cell International, Melbourne	Australia	6	4
Geron Co.	USA	7	0
Goteborg University, Goteborg,	Sweden	19	3
Karolinska Institute	Sweden	6	0
Maria Biotech Co	Korea	3	3
MizMedi Hospital	Korea	1	1
NationalCentre for Biological Sciences	India	3	0
Pochon CHA University	Korea	2	0
Reliance Life Sciences	India	7	0
Technion University	Israel	4	3
University of California, San Francisco	USA	2	0
Wisconsin Alumni Research Foundation	USA	5	1

* 2001년 8월 9일 부시 미국대통령이 줄기세포 연구자금 지원방침을 발표한 이후 NIH는 i) 2001년 8월 9일 오후 9시 이전에 생식목적으로 더 이상 이용될 수 없는 배반포 배아에서 내부세포 덩어리가 제거된 것 ii) 배아 기증동의를 받은 것 iii) 배아제공에 따른 금전적 관계가 없는 등의 조건을 충족하는 배아 줄기세포주에 한해서 등록함
 ** 미국 Science가 보도한 2002년 8월 현재 이용 가능한 배아 줄기세포 주 수

절대다수가 우려하는 인간배아복제에 관한 연구는 엄격한 정부차원의 법령 하에서 규제하고, 체세포 복제기술을 통한 난치병 치료차원의 치료용 배아복제 등의 연구 문제도 심도 있게 다루어져야 할 것이다. 특히 수정 후 2주 이내의 배아에 대해서는 의학 발전을 위한 기초적 연구와 난치병 환자를 치료하려는 목적의 연구를 위해서 국가차원의 법적, 제도적 장치가 마련되어 허용되어야 한다는 목소리가 높다. 이에 생명공학분야의 분명한 가이드라인이 설정되고 불임 센터에서 이식하고 남은 냉동 잔여배아를 이용한 배아줄기세포의 연구가 장기 기증용 복제인간 같은 생명복제와는 근본적으로 다른 세포치료제 차원의 연구로 이루어져야 할 것이다.

의약품으로써 정부의 인가

현재 새로운 치료법으로 부상하고 있는 세포치료제에 대해 의약품이 아닌 의료행위로 규정해야 한다는 주장이 제기되면서 논란이 일고 있다. 세포를 추출한 뒤 환자에게 주입해 질병을 치료하는 세포치료제에 대해 정부는 의약품이라고 규정하고 있지만 일부 전문가들은 시술이라 하여 논란이 되었다. 이러한 논란은 세포치료제가 의약품으로써 안전성에 대해 허가를 받아야 하는 문제와 민감하게 연결되어 있다. 2004년 3월 KFDA (식품의약품안전청)에 따르면 사전 승인 없이 임상시험을 실시한 벤처기업 4개가 형사 고발되었다. 전 임상 결과도 없었고 세포치료제

제조과정의 품질향상성을 보증할 수 있는 제조과정의 문서화 또는 표준화가 없이 환자에게 투여되었다. 따라서 줄기세포를 이용한 세포치료는 과학적 안전성, 유효성 및 품질관리, 제조시설 체계가 없어 위험성을 갖고 있다. 국내는 외국의 임상적용기술이 조기에 도입되어 골수 및 제대혈 이식 등과 같은 세포치료의 임상적용이 시행된 지 오래되었으며 최근에 벤처기업을 중심으로 태아 제대혈 보관이 활성화되면서 조혈모세포 및 간엽줄기세포를 이용한 임상 결과가 산발적으로 보고 되었다. 자가골수를 이용한 퇴행성관절염 치료 및 제대혈세포를 이용한 간경화치료, 뇌경색치료가 그 예이다. 그러나 이런 임상시험의 시도는 충분한 안전성을 검사하지 않고 시행한 것으로서 향후 줄기세포를 이용한 이식치료의 안전성 확보에 대한 많은 논란이 예상된다. 이에 KFDA는 세포치료에 대한 ‘의약품 임상시험계획 승인지침’을 개정하여 2004년부터 시행할 계획으로 6월에 입안 예고했다. KFDA는 승인요건을 완화하더라도 환자 사망시 연구자와 병원이 상당한 책임을 져야 하고 환자에게 진료비를 청구하지 못하게 명문화했기 때문에 돈벌이 수단으로 악용될 가능성이 적고, 안전성·유효성이 어느 정도 알려진 세포치료제가 실제로 유용한지 ‘긴박하게 생명을 위협하는 응급상황’에 한정시켰던 응급임상 적용범위를 ‘치료시기를 놓치면 치료효과를 기대하기 어렵거나 대체치료수단이 없는 상태’까지 완화함으로써 말기암 환자 등이 상업적 임상단계의 세포치료제로 치료받을 수 있는 기회를 갖게 하도록 한 것이라고 발표하였다. 이러한 정부 지침은 시판허가 전이라도 선택여지가 없는 환자에게 치료기회를 확대시키고 세포치료제에 대한 기초연구의 활성화를 꾀하여 생명공학발전을 촉진할 것으로 기대하고 있다.

줄기세포 연구지원 및 기술 경쟁력 확보

줄기세포를 제작하고 분화시켜 세포치료법에 사용하는 사업은 1998년 이후 그 가능성이 제시되어 전 세계의 많은 연구자들이 같은 실험결과를 목표로 매진하고 있으나 아직까지는 세포치료 단계에서 뚜렷한 결과가 없다. 특히, 배아줄기세포는 만능세포로의 이용 가능성 때문에 전 세계적으로 의료 및 생명공학 벤처회사에서 집중적인 투자를 하고 있다. 미국·일본 등 선진국을 중심으로 연구가 활발하게 진행되고 있는데 국가차원에서 윤리적 문제를 극복하고 기술개발을 이루려는 노력이 뚜렷하게 나타나고 있다. 최근 영국에서는 배아 연구뿐만 아니라 배아복제에 대한 연구도 의학적·의료적 효용성 때문에 윤리적 문제를 최소화하면서 정부차원에서 허용되고 있고, 2001년 미국 정부도 어쩔 수 없이 폐기될 잔여배아를 사용하는 배아줄기세포연구에 대해서 연방 정부 차원의 연구비를 적극적으로 지원하기로 하였다. 늦게나마 우리나라에서도 줄기세포 연구가 보건복지부 (바이오보건기술개발사업)와 과학기술부 (21세기 프런티어사업 중 하나로 세포융용연구사업단 선정) 등에서 줄기세포의 연구를 향후 연구하고 투자해야 할 국가기간산업 항목으로 간주하고 있으며, 정부차원에서 조혈모세포나 줄기세포를 이용해 손상된 심장근육·관절을 재생하거나 암을 치료하는 기술 개발에 대해 바이

오 벤처기업들에게 임상시험비용 등을 지원하고 상용화에 주력하고 있다. 선진국과 비교해 볼 때 우리나라는 전반적으로 생명공학분야가 경험이나 규모면에서 취약하지만 기술적 수준이 높아 배아줄기세포 제작기술의 경우도 선진국과 크게 차이 나지 않고 있다. 오히려 폐기될 냉동잔여 배반포기 배아를 이용에 대하여 효율적인 줄기세포주 생산이라는 한발 앞선 세계적 기술로 평가받고 있다.

향후 국내기술은 줄기세포 분화연구가 지속적으로 이루어져 다양한 조직으로의 분화기술 경쟁력이 확보된다면 세포대체요법에 의한 난치병 치료시장에서 선진국과 대등한 위치에 오를 것으로 예상하고 있다. 현재 국내 마리아 의학연구소에서 심근세포, 신경세포 및 근육세포로의 분화 연구에 일부 성공적인 결과를 얻고 있고, 특정 유전자가 도입된 인간 배아줄기세포를 Parkinson's disease 모델에 이식하여 행동 개선을 보고하는 등의 연구 결과가 이러한 국내 기술개발의 전망을 더욱 밝게 하고 있다.

결 론

세계적으로 차세대 바이오산업에 대한 관심과 열기가 높아지면서 국내에서도 배아줄기세포를 이용하여 당뇨병, 심장병 등의 난치병을 치료하는 산학연 합동연구가 활발히 진행되고 있다. 배아줄기세포를 이용한 세포치료제는 비교적 소수의 인원과 적은 자본을 통해 연구개발이 가능하기 때문에 자본이 취약한 국내 신약개발환경에 적합한 기술 분야로써 평가되고 있으며, 인간배아줄기세포 배양에 세계 최초로 성공하면서 더욱 기대되고 있다. 국내에서는 학계가 먼저 그 성과를 인정받았고, 이를 구체적으로 실용화 시켜야할 제약, 바이오기업들 또한 지속적인 투자를 통해 가시적인 성과로 발전시키고자 노력하고 있다. 인간배아줄기세포 배양에 성공한 일부대학에서도 국내 중견 제약 기업들과 협동연구 또는 독자연구를 통해 활발한 연구를 진행시키고 있으며 다수의 바이오벤처 기업들 또한 세포 치료제의 응용가능성을 다각도로 모색하고 있다. 학계의 연구방향이 주로 줄기세포주를 확립하는 방향으로서 세포 치료제 개발의 기초를 닦고 있는 반면 제약, 바이오기업들은 그와 연계해 세포치료법의 구체화, 즉 심장병, 당뇨병, 관절염 등의 난치성 질환치료에 대한 응용 연구에 주로 초점이 맞추어져 있다.

REFERENCES

- Weissman, I. L. (2000), Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities, *Science*, **287**, 1442-1446.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S. and J. M. Jones (1998), Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, **282**, 1145-1147.
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A. and A. Bongso (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat. Biotechnol.* **18**, 399-404.
- Shamblott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., Blumenthal, P. D., Huggins, G. R. and J. D. Gearhart (1998), Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 13726-13731.
- Spangrude, G. J., Heimfeld, S. and I. L. Weissman (1998), Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells, *Science*, **241**, 58-62.
- Bhatia, M., Wang, J. C., Kapp, U., Bonnet, D. and J. E. Dick (1997), Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5320-5325.
- Low, W. C., Largaespada, D. A. and C. M. Verfaillie (2002), Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow, *Nature*, **418**, 41-49.
- Verfaillie, C. M. (2002), Adult stem cells: Assessing the case for pluripotency, *Trends Cell Biol.* **12**, 502-508.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and D. R. Marshak (1999), Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*, **284**, 143-147.
- Woodbury, D., Reynolds, K. and I. B. Black (2002), Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal, and mesodermal genes prior to neurogenesis, *J. Neurosci. Res.* **69**, 908-917.
- Alison, M. R., Poulosom, R., Otto, W. R., Vig, P., Brittan, M., Direkze, N. C., Preston, S. L. and N. A. Wright (2003), Plastic adult stem cells: Will they graduate from the school of hard knocks? *J. Cell Sci.* **116**, 599-603.
- Eiges, R. (2001), Establishment of human embryonic stem cell transfected clones carrying a marker for undifferentiated cells, *Curr. Biol.* **11**, 514-518.
- Kawase, E. (2000), Mouse embryonic stem (ES) cell lines established from neuronal cell-derived cloned blastocysts, *Genesis*, **28**, 156-163.
- Palmer, T., Schwartz, P. H., Taupin, P., Kaspar, B., Stein, S. A. and F. H. Gage (2001), Progenitor cells from human brain after death, *Nature*, **411**, 42-43.
- Kimber, S. J. (2000), Molecular interactions at the maternal-embryonic interface during the early phase of implantation, *Semin. Reprod. Med.* **18**, 237-253.
- Itskovitz-Eldor, J. (2000), Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers, *Mol. Med.* **6**, 88-95.
- Maeshak, D. R. and Gardner, R. L. (2001), Stem Cell Biology(Monograph 40), p550, Cold Spring Harbor Lab. Press.
- Lanzendorf, S. E. (2002), Human Gametes Obtained from Anonymous Donors for the Production of Human Embryonic Stem Cell Lines, *Obst. Gynecol. Surv.* **57**, 34-35.
- Greider, C. (1998), Telomeres and senescence: the history, the experiment, the future, *Curr. Biol.* **8**, 178-181.
- Hodes, R. J. (1999), Telomere length, aging, and somatic cell turnover, *J. Exp. Med.* **190**, 153-156.
- Evans, M. J. and M. H. Kaufman (1981), Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, **292**, 154-156.
- Martin, G. R. (1981), Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 7634 - 7638.
- Braude, P., Bolton, V. and S. Moore (1988), Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development, *Nature*, **332**, 459-461.
- Kaufman, M. H. (1992), The atlas of mouse development, Academic Press. London.
- Luckett, W. P. (1975), The development of primordial and definitive amniotic cavities in early Rhesus monkey and human embryos, *J. Anat.* **144**, 149-167.

26. Luckett, W. P. (1978), Origin and differentiation of the yolk sac and extraembryonic mesoderm in presomite human and rhesus monkey embryos, *J. Anat.* **152**, 59-97.
27. O'Rahilly, R. and F. Muller (1992), Human embryology and teratology, Wiley-Liss, New York.
28. Solter, D. and B. B. Knowles (1978), Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5565-5569.
29. Starr, R., Novak, U., Willson, T. A., Inglese, M., Murphy, V., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A., Hilton, D. J. and M. Ernst (1997), Distinct roles for leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain and gp130 in cell type-specific signal transduction, *J. Biol. Chem.* **272**, 19982-19986.
30. Niwa, H. B. T., Chambers, I. and A. Smith (1998), Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3, *Gene Dev.* **12**, 2048-2060.
31. Burdon, T., Smith, A. and P. Savatier (2002), Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells, *Trend Cell Biol.* **12**, 432.
32. Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. A. and N. Benvenisty (2000), Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 11307-11312.
33. Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, K. L. and M. Tzukerman (2001), Insulin production by human embryonic stem cells, *Diabetes*, **50**, 1691-1697.
34. Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J. and L. Gepstein (2001), Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes, *J. Clin. Invest.* **108**, 407-414.
35. Kaufman, D. S., Hanson, E. T., Lewis, R. L., Auerbach, R. and J. A. Thomson (2001), Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10716-10721.
36. Reubinoff, B. E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M. F., Reinhartz, E., Itzik, A. and T. Ben-Hur (2001), Neural progenitors from human embryonic stem cells, *Nat. Biotechnol.* **19**, 1134-1140.
37. Zhang, S. C., Wernig, M., Duncan, I. D., Brustle, O. and J. A. Thomson (2001), In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells, *Nat. Biotechnol.*, **19**, 1129-1133.
38. Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S. and A. Smith (2003), Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells, *Cell*, **113**, 643-655.
39. Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. and S. Yamanaka, (2003), The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells, *Cell*, **113**, 631-642.
40. Kim, J. H., Auerbach, J. M., Rodriguez-Gomez, J. A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S. H., Nguyen, J., Sanchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K. and R. McKay (2002), Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease, *Nature*, **418**, 50-56.
41. Kodama, S., Kuhlreiber, W., Fujimura, S., Dale, E. A. and D. L. Faustman (2003), Islet regeneration during the reversal of autoimmune diabetes in NOD mice, *Science*, **302**, 1223-1227.
42. Shake, J. G. (2002), Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects, *Ann. Thorac. Surg.* **73**, 1919-1925.
43. Davani, S., Marandin, A., Mersin, N., Royer, B., Kantelip, B., Herve, P., Etievent, J. P. and J. P. Kantelip (2003), Mesenchymal progenitor cells differentiate into an endothelial phenotype, enhance vascular density, and improve heart function in a rat cellular cardiomyoplasty model, *Circulation*, **108**, 11253-11258.
44. Kobayashi, T., Hamano, K., Li, T. S., Katoh, T., Kobayashi, S., Matsuzaki, M. and K. Esato (2000), Enhancement of angiogenesis by the implantation of self bone marrow cells in a rat ischemic heart model, *J. Surg. Res.* **89**, 189-195.
45. Schmidt, M., Zickler, P., Hoffmann, G., Haas, S., Wissler, M., Muessig, A., Tisdale, J. F., Kuramoto, K., Andrews, R. G., Wu, T., Kiem, H. P., Dunbar, C. E. and C. Von Kalle (2002), Polyclonal long-term repopulating stem cell clones in a primate model, *Blood*, **100**, 2737-2743.
46. Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J. and L. Gepstein (2001), Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes, *J. Clin. Invest.* **108**, 407-414.
47. Mummery, C., Ward, D., van den Brink, C. E., Bird, S. D., Doevendans, P. A., Ophof, T., Brutel de la Riviere, A., Tertoolen, L., van der Heyden, M. and M. Pera (2002), Cardiomyocyte differentiation of mouse and human embryonic stem cells. *J. Anat.* **200**, 233-242.
48. Xu, R. H., Chen, X., Li, D. S., Li, R., Addicks, G. C., Glennon, C., Zwaka, T. P. and J. A. Thomson (2002), BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast, *Nature Biotechnol.* **20**, 1261-1264.
49. Xu, C., Police, S., Rao, N. and M. K. Carpenter (2002), Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells, *Circ. Res.* **91**, 501-508.
50. Levenberg, S., Golub, J. S., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J. and R. Langer (2002), Endothelial cells derived from human embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4391-4396.
51. Drukker, M. (2002), Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 9864-9869.
52. Draper, J. S. (2002), Surface antigens of human embryonic stem cells: changes upon differentiation in culture, *J. Anat.*, **200**, 249-258.
53. Rubinstein, P. (2001), HLA matching for bone marrow transplantation ? how much is enough? *N. Engl. J. Med.* **345**, 1842-1844.
54. Fandrich, F. (2002), Preimplantation-stage stem cells induce longterm allogeneic graft acceptance without supplementary host conditioning, *Nat. Med.* **8**, 171-178.
55. Roopenian, D. (2002), The immunogenomics of minor histocompatibility antigens, *Immunol. Rev.* **190**, 86-94.
56. Watkins, W. M. (2001), The ABO blood group system: historicalbackground, *Transfus. Med.* **11**, 243-265.
57. Tada, M. (2001), Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells, *Curr. Biol.* **11**, 1553-1558.
58. Serov, O. (2001), Embryonic hybrid cells: a powerful tool for studying pluripotency and reprogramming of the differentiated cell chromosomes, *An. Acad. Bras. Cienc.* **73**, 561-568.
59. Sykes, M. (2001), Mixed chimerism and transplant tolerance. *Immunity*, **14**, 417-424.
60. Rideout, W. M. 3rd, Hochedlinger, K., Kyba, M., Daley, G. Q. and R. Jaenisch, (2002), Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy, *Cell*, **109**, 17-27.
61. Bueren, J. A., Guenechea, G., Casado, J. A., Lamana, M. L. and J. C. Segovia (2003), Genetic modification of hematopoietic stem cells: recent advances in the gene therapy of inherited diseases, *Arch. Med. Res.* **34**, 589-599.
62. Wakitani, S., Takaoka, K., Hattori, T., Miyazawa, N., Iwanaga, T., Takeda, S., Watanabe, T. K. and A. Tanigami (2003), Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint, *Rheumatology*, **42**, 162-165.
63. Tzukerman, M., Rosenberg, T., Ravel, Y., Reiter, I., Coleman, R. and K. Skorecki (2003), An experimental platform for studying growth and invasiveness of tumor cells within teratomas derived from human embryonic stem cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*,

- 100(23), 13507-13512.
64. Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. and F. Mavilio (1998), Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors, *Science*, **279**, 1528-1530.
 65. Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold M., Weissman I. L. and M. Grompe (2000), Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo, *Nat. Med.*, **6**, 1229-1234.
 66. Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A. and S. R. McKercher (2000), Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow, *Science*, **290**, 1779-1782.
 67. Brazelton, T. R., Rossi, F. M., Keshet, G. I. and H. M. Blau (2000), From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice, *Science*, **290**, 1775-1779.
 68. Gussoni, E., Soneoka, Y., Strickland, C. D., Buzney, E. A., Khan, M. K., Flint, A. F., Kunkel, L. M. and R. C. Mulligan, (1999), Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation, *Nature*, **401**, 390-394.
 69. Grant, M. B., May, W. S., Caballero, S., Brown, G. A., Guthrie, S. M., Mames, R. N., Byrne, B. J., Vaught, T., Spoerri, P. E., Peck, A. B. and E. W. Scott, (2002), Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization, *Nat. Med.*, **8**, 607-612.
 70. Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S. M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D. M., Leri, A. and P. Anversa (2001), Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium, *Nature*, **410**, 701-705.
 71. Jackson, K. Majka, S. M., Wang, H., Pocius, J., Hartley, C. J., Majesky, M. W., Entman, M. L., Michael, L. H., Hirschi, K. K. and M. A. Goodell (2001), Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells, *J. Clin. Invest.*, **107**, 1395-1402.
 72. Fridenshtein, A. (1982), Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment, *Arkh. Patol.*, **44**, 3-11.
 73. Haynesworth, S. E. Baber, M. A. and A. I. Caplan, (1992), Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies, *Bone*, **13**, 69-80.
 74. Gronthos, S. and P. Simmons (1996), The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors, *J. Hematother.* **5**, 15-23.
 75. Prockop, D. (1997), Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues, *Science*, **276**, 71-74.
 76. Pittenger, M. F. Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and D. R. Marshak (1999), Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*, **284**, 143-147.
 77. Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S. and S. J., Sharkis (2001), Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bonemarrow-derived stem cell, *Cell*, **105**, 369-377.
 78. Petersen, B. E., Bowen, W. C., Patrene, K. D., Mars, W. M., Sullivan, A. K., Murase, N., Boggs, S. S., Greenberger, J. S. and J. P. Goff, (1999), Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells, *Science*, **284**, 1168-1170.
 79. Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A. and C. M. Verfaillie (2002), Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow, *Nature*, **418**, 41-49.
 80. Kopen, G., Prockop, D. J. and D. G. Phinney (1999), Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 10711-10716.
 81. Woodbury, D. Schwarz, E. J., Prockop, D. J. and I. B. Black (2000), Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons, *J. Neurosci. Res.*, **61**, 364 - 370.
 82. Schwartz, R. E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, T., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W. S. and C. M. Verfaillie, (2002), Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells, *J. Clin. Invest.*, **109**, 1291-1302.
 83. Reyes, M., Dudek, A., Jahagirdar, B., Koodie, L., Marker, P. H. and C. M. Verfaillie (2002), Origin of endothelial progenitors in human post-natal bone marrow, *J. Clin. Invest.*, **109**, 337-346.
 84. Bjornson, C., Rietze, R. L., Reynolds, B. A., Magli, M. C. and A. L. Vescovi (1999), Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo, *Science*, **283**, 354-357.
 85. Shih, C. C., Weng, Y., Mamelak, A., LeBon, T., Hu, M. C. and S. J. Forman (2001), Identification of a candidate human neurohematopoietic stem-cell population, *Blood*, **98**, 2412-2422.
 86. Clarke, D. L., Johansson, C. B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlstrom, H., Lendahl, U. and J. Frisen (2000), Generalized potential of adult neural stem cells, *Science* **288**, 1660-1663.
 87. Jackson, K., Mi, T. and M. A. Goodell (1999), Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 14482-14486.
 88. McKinney-Freeman, S. L., Jackson, K. A., Camargo, F. D., Ferrari, G., Mavilio, F. and M. A. Goodell (2002), Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 1341-1346.
 89. Kawada, H. and M. Ogawa (2001), Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle, *Blood*, **98**, 2008-2013.
 90. Yang, L., Li, S., Hatch, H., Ahrens, K., Cornelius, J. G., Petersen, B. E. and A. B. Peck (2002), In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8078-8083.
 91. Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K. J., Barnabe-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D. R. and F. D. Miller (2001), Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin, *Nat. Cell Biol.*, **3**, 778-784.
 92. Shen, C. N., Slack, J. M. and D. Tosh (2000), Molecular basis of transdifferentiation of pancreas to liver, *Nat. Cell Biol.*, **2**, 879-887.
 93. Larochelle, A., Vormoor, J., Hanenberg, H., Wang, J. C., Bhatia, M., Lapidot, T., Moritz, T., Murdoch, B., Xiao, X. L., Kato, I., Williams, D. A. and J. E. Dick (1996), Identification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating NOD/SCID mouse bone marrow: implications for gene therapy, *Nat. Med.*, **2**, 1329-1337.
 94. Horwitz, E. M., Prockop, D. J., Fitzpatrick, L. A., Koo, W. W., Gordon, P. L., Neel, M., Sussman, M., Orchard, P., Marx, J. C., Pyeritz, R. E. and M. K. Brenner, (1999), Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta, *Nat. Med.*, **5**, 309-313.
 95. McKay, R. (1997), Stem cells in the central nervous system, *Science*, **276**, 66-71.
 96. Gage, F. H. (2000), Mammalian neural stem cells, *Science* **287**, 1433-1438.
 97. Taupin, P. (2002), Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals, *J. Neurosci. Res.*, **69**, 745-749.
 98. Shih, C. C., Weng, Y., Mamelak, A., LeBon, T., Hu, M. C. and S. J. Forman (2001), Identification of a candidate human neurohematopoietic stem-cell population, *Blood*, **98**, 2412-2422.
 99. Erices, A., Conget, P., and J. J. Minguell (2000), Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood, *Brit. J. Haematol.* **109**, 235-242.
 100. Mollah, Z. U., Aiba, S., Manome, H., Yoshino, Y. and Tagami, H. (2002), Cord blood CD34⁺ cells differentiate into dermal dendritic

- cells in co-culture with cutaneous fibroblasts or stromal cells, *J. Invest. Dermatol.* **118**, 450-460.
101. Sanchez-Ramos, J. R. (2002), Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood, *J. Neurosci. Res.* **69**, 880-893.
102. Murphy, J. M., Fink, D. J., Hunziker, E. B. and F. P. Barry (2003), Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis, *Arthritis Rheum.* **48**, 3464-3474.
103. Barry, F. P. (2003), Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells, *Birth Defects Res. Part C Embryo Today*, **69**, 250-256.