

인간배아줄기세포로부터 간세포로의 유도 분화를 이용한 간질환 세포 치료의 최근 연구 동향

고려대학교 생명과학대학 생명공학부

우 동 훈 · 김 종 훈*

Directed Differentiation of Human Embryonic Stem cells into Transplantable Hepatocytes: Recent Progress and Future Directions

Dong-Hun Woo, Jong-Hoon Kim*

Division of Biotechnology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul, Korea

[Korean. J. Reprod. Med. 2009; 36(3): 143-150.]

서 론

만성 간질환 환자는 전 세계적으로 약 8억 명에 이르고, 미국의 경우 매년 30만 명의 환자가 발생하며, 이 중 10%가 사망에 이른다. 국내의 경우에도, 간질환으로 인한 사망은 암을 제외한 사망요인의 4위에 해당하는 난치성 질환이다. 이러한 중증 간질환 치료의 가장 효과적인 방법은 간 이식(whole liver transplantation)인데 반하여, 간 공여자의 희소성, 높은 수술 비용 등의 문제점으로 인하여, 그 수혜자는 극히 제한적인 실정이다. 최근 이러한 문제점을 극복하기 위하여, 간 이식의 대체물(alternative source)로 기대되는 것이 높은 증식능력을 보유한 줄기세포로부터 분화시킨 간세포(hepatocytes)의 이식이다.

배아줄기세포(embryonic stem cells, ESCs)의 경우, 무한 증식 능력과 전 분화 능을 보유하고 있기에 그 분화 기작이 면밀히 규명된다면, 세포 대체 치

료법(cell replacement therapy)에 필요한 각종 체세포들의 무한 공급원이 될 것으로 전망된다. 따라서 인간배아줄기세포(human embryonic stem cells, hESCs)로부터 간질환 세포 치료제로의 사용 목적인 간세포 분화 유도에 관한 많은 연구가 전 세계적으로 활발히 수행되고 있다.^{1~11} 그러나, 인간배아줄기세포로부터 간세포를 생산하는 분화기법에 관한 초기의 연구 보고들은, 그 분화효율이 낮으며(10~20%, Table 1 참조), 배발생 과정에서 보이는 정상적인 간세포의 분화과정을 대변하지 못한다는 문제점이 있었다. 이에 대한 원인으로서는 다양한 인자가 복합적 혹은 단독적, 그리고 순차적으로 작용하는 간의 발생 과정의 복잡성을 간과함에서 기인된 것으로 판단되어 왔다. 이러한 이유로, 최근에는 간세포의 정상 발생과정을 배양접시 내에서 가능한 유사하게 재현하기 위한 많은 시도가 이루어지고 있는 실정이다. 이러한 목적의 일환으로서, 우선 인간배아줄기세포를 간세포의 기원세포인 진정내배엽(definitive endoderm)으로 분화를 선행한 후, 확보된 내배엽성 세포로부터 간세포 분화를 순차적으로 유도하여, 높은 수율(50% 이상, Table 1 참조)의 간세포 분화를 성공시킨 연구 성과들이 보

주관책임자: 김종훈, 우) 136-713 서울특별시 성북구 안암동 5가 1, 고려대학교 생명과학대학 생명공학부
Tel: (02) 3290-3007, Fax: (02) 3290-3507
e-mail: jhkim@korea.ac.kr

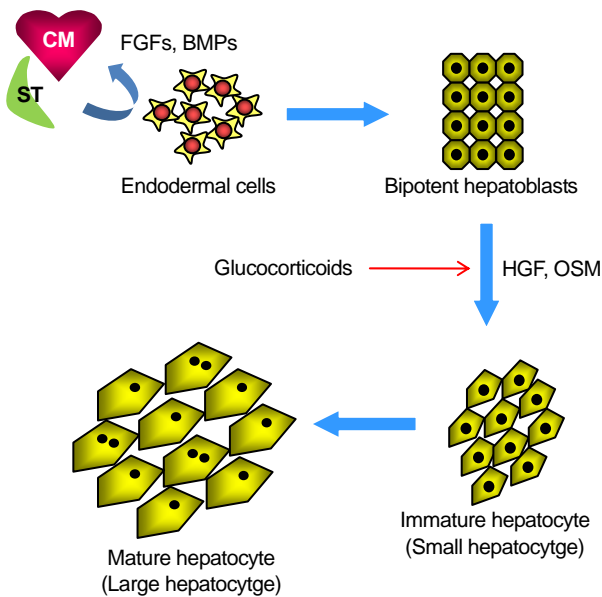


Figure 1. Hepatocyte development during embryogenesis

Dong-Hun Woo. Directed Differentiation of Human Embryonic Stem cells into Transplantable Hepatocytes: Recent Progress and Future Directions. Korean J Reprod Med 2009.

고되었다.^{6,8,9,11}

또한, 인간배아줄기세포로부터 유래된 간세포를 간질환 치료제로서 사용하기 위해서는, 분화된 인간배아줄기세포 집단으로부터 간세포들만을 선별적으로 분리 정제할 수 있는 기술이 필요하다. 선행 보고들에 의하면, 간세포만 특이적으로 발현하는 유전자의 프로모터에 리포터 유전자 (reporter gene) 을 조합하여 인간배아줄기세포에 도입 (transduction) 한 후, 분화과정에서 나타나는 리포터 유전자의 발현 유무에 기초하여 간세포를 순수 분리 정제에 성공하였으나,^{3,7} 이러한 방법은 줄기세포가 보유하는 유전자의 변형 (genetic modification)을 초래하기 때문에, 임상적 활용을 위한 세포 치료에 적용하기에는 한계가 있을 것으로 예상된다. 보다 최근에 보고된 연구에서는 유전자의 조작과정 없이 간세포에 특이적으로 발현하는 표지 인자 (cell surface marker)를 이용하여 인간배아줄기세포로부터 분화된 간세포를 분리 정제가 가능함을 보고하였다.¹¹ 이러한 방법은 앞선 방법에 비하여, 유전자 조작을 거치지 않는다는 장점이 있으나, 분화된 인간배아

줄기세포 집단 내의 간세포들 중 일부의 소수 간세포 집단만을 분리할 수 있기에 정제 후의 순도는 높으나 효율이 매우 낮다는 문제점이 있다. 이외에도, 인간배아줄기세포 유래 간세포를 간질환 치료 목적으로 사용하기 위해서는, 이식 후 잔여 미분화 세포로 말미암아 발생할 수 있는 기형종 (teratoma) 형성 및 면역거부반응 등 극복해야 할 여러 문제점들이 남아있다.

따라서, 본 중설에서는 최근까지 인간배아줄기세포로부터 기능성 간세포로의 능동적 분화에 관련된 연구방법들을 소개하고, 인간배아줄기세포 유래 간세포를 간질환 치료에 적용하기 위한 최근 연구동향 및 문제점을 고찰하여, 이들의 극복 방안들을 제시하고자 한다.

인간배아줄기세포로부터 기능성 간세포로의 능동적 분화 유도

간세포는 초기 배아발생과정 중 진정 내배엽으로부터 다양한 인자들의 복합적 그리고 순차적인 작용에 의해 분화된다.¹² 배 측 전장 (ventral foregut)에 위치한 내배엽은 인접한 Cardiac mesoderm (CM) 과 Septum transversum (ST) mesenchyme으로부터 Fibroblast growth factor (FGF) 및 Bone morphogenic protein (BMP) 신호의 영향을 받아, 간배아 (liver buds)를 형성한 후, 간세포 분화 및 성숙에 영향을 주는 Hepatocyte growth factor (HGF), Oncostatin M (OSM) 및 glucocorticoids의 영향을 받아, 간세포로 분화한다 (Figure 1). 따라서, 인간배아줄기세포로부터 효과적인 간세포 분화 유도를 위해서는, 간세포의 최종 성숙 단계에 앞서, 진정 내배엽으로의 분화를 촉진시키는 것이 필수적으로 선행되어야 한다. 그러나, 인간배아줄기세포를 이용한 간세포 분화의 초기 기술들은 간세포 분화 및 성숙에 관여하는 일련의 인자들을 미분화 인간배아줄기세포에 직접적으로 처리함으로써 간세포 분화를 시도하였다. 그 결과, 정상 간세포의 몇몇 형태적 그리고 기능적 특징을 가지는 세포의 분화에는 성공하

였으나, 아주 낮은 수준의 간세포 분화 수율을 획득하였을 뿐만 아니라 (Table 1), 분화 유도된 세포가 내배엽에서 기원한 진정한 기능성 간세포인지, 단지 몇몇 간세포의 특징을 가지는 간세포-유사 세포인지에 관한 논란의 여지가 지속되고 있는 실정이다.

D'amour 등 (2005)은 일반적으로 사용되는 배아체 (embryoid body)를 매개로 한 배아줄기세포의 분화 방법 대신에, 분화 중인 세포들 간의 상호작용을 최소화 하고, 처리한 분화 유도 인자들의 효과를 극대화할 수 있는 단층 배양법 (monolayer culture)을 이용할 경우, 저 농도의 혈청과 고 농도의 activin A를 처리하여 높은 수율의 진정 내배엽성 세포를 분화 유도할 수 있음을 확인하였다.¹³ 이후, D'amour 등의 연구 결과는 다른 후속 간세포 분화 연구들에도 영향을 미쳐, 인간배아줄기세포 유래 진정 내배엽 분화를 선행한 후, 간세포 분화 관련 인자들을 처리하여 간세포 분화를 유도한 결과, 높은 분화 수율의 간세포 분화를 도모할 수 있음이 보고되었다. 현재까지 인간배아줄기세포를 이용한 간세포 분화 방법 및 연구 결과들은 Table 1에 요약하였다.

인간배아줄기세포 유래 간세포의 순수 분리 정제

최근의 괄목할 만한 연구 성과들로부터 높은 수율의 간세포 유도 분화 방법들이 개발되고 있으나, 인간배아줄기세포로부터 유래된 간세포를 간질환 치료에 사용하기 위해서는, 분화 종료 후 잔존하는 미분화 세포에 의한 기형종 형성^{11,14,15} 및 간세포 이외의 다른 세포의 이식에 따른 부작용 등을 배제하기 위한 간세포의 순수 분리 정제기법의 개발이 필수적이다. 현재 배아줄기세포에서 분화된 기능성 세포를 정제하는 방법으로서 가장 보편적으로 이용되고 있는 방법은 기능성 세포에 특이적 유전자의 promoter에 리포터 유전자를 조합하여 배아줄기세포에 도입 후, 유도 분화과정 중 리포터

유전자를 발현하는 세포만을 선별적으로 분리 정제하는 방법이다. 간세포 분화에 있어서도, 몇몇 연구자들이 간세포에 특이적 발현을 나타내는 유전자인 albumin³ 혹은 alpha-1-antitrypsin⁷의 promoter에 GFP를 조합하여 인간배아줄기세포에 도입 후, 유도 분화과정 중, 이들 리포터 유전자를 발현하는 간세포를 선별적으로 분리 정제 가능함을 확인하였다. 그러나, 이러한 방법은, 인간배아줄기세포 자체에 유전적 변형을 초래한다는 이유로, 간질환 치료 목적의 세포 치료제로 사용하기에는 안전성이 보장되지 않는다는 단점이 있다. 이보다 안전한 방법으로는 간세포가 특이적으로 세포표면에 보유하는 표지 인자 (cell surface marker)에 대한 항체를 이용하여, 이들 표지 인자를 발현하는 세포만을 순수 분리 정제하는 방법이 있으나, 현재까지 절대적인 간세포 단독 표지 인자의 부재로 인해, 다양한 세포 집단으로 구성된 분화된 인간배아줄기세포 집단으로부터 간세포만을 효과적으로 순도 높게 분리해내는데 어려움이 따른다. 이러한 문제점의 하나의 해결책으로써, 최근 Basma 등 (2008)은 albumin을 포함한 혈청 단백질의 endocytosis에 관여하는 asialoglycoprotein receptor (ASGPR)을 이용하여, 분화된 인간배아줄기세포 집단에서 간세포만을 특이적으로 분리하는데 성공하였다.¹¹ ASGPR을 매개로 하여 분리된 세포 집단은 분리 정제 전의 세포 집단보다 간세포에 대한 순도가 현저하게 증가되었으나, 정제효율이 매우 낮아 분화된 기능성 간세포들 중 일부 간세포만이 이 방법을 통하여 정제되는 것으로 사료된다. 따라서 이러한 방법으로는 임상적 적용을 위하여 대량으로 분화된 세포들로부터 간세포를 효과적으로 정제하기에 어려움이 따를 것으로 보여지며, 순도 높고 효과적인 간세포 정제를 위한 새로운 표지 인자의 발굴이 절실히 요구되어 지고 있다.

비록, 현재까지의 연구 결과들로는 효율적인 인간배아줄기세포 유래 간세포의 순수 분리 정제에 어려움이 있다고는 하나, 이에 대한 차선책으로서, 적은 수이지만 분리 정제된 인간배아줄기세포 유

Table 1. Currents reports of hESC-derived hepatocyte differentiation

Factors for differentiation	Protein markers	Functional assays	Differentiation efficiency	In vivo assay	References
Sodium Butyrate & DMSO (EBs/monolayer + HCM)	ALB, AAT, CK8, CK18, CK19	ALB synthesis, CYP1A2 activity, PAS	N/D	No	Rambhatla et al. (2003)
Insulin, Dexamethasone, collagen type I (through EBs)	ALB	Urea synthesis	N/D	No	Shirahashi et al. (2004)
Spontaneous (through EBs)	ALB, AFP	N/D	ALB ⁺ cells: <10%	No	Lavon et al. (2004)
aFGF, HGF, OSM, Dexamethasone	ALB, CK18, Hepar1	PAS, ICG, E.M. Urea synthesis AFP, ALB synthesis	N/D	No	Baharvand et al. (2006)
DMSO, HGF, OSM	ALB, HNF4 α , AFP, Hepar1	ICG, PAS, ALB secretion, CYP450 activity	ALB ⁺ cells: about 15%	No	Hay et al. (2007)
Activin A, FGF4, BMP2, HGF, OSM	AFP, ALB, AAT, CK8, CK18, CK7, CK19	ALB secretion, PAS, HCV infection	ALB⁺ cells: about 70%	Yes: human nuclei, AAT staining	Cai et al. (2007)
Spontaneous (through EBs)	AFP, ALB, AAT, CK18	PAS, ICG, EROD assay, ALB secretion	ALB ⁺ cells: about 12%	Yes: Luminescence imaging, Incorporation: ALB staining, ALB secretion	Duan et al. (2007)
aFGF, FGF4, HGF, OSM, Dexamethasone	ALB, CK18, Hepar1	PAS, ICG, E.M. Urea synthesis AFP, ALB synthesis	N/D	No	Baharvand et al. (2008)
Activin A, Sodium butyrate, DMSO, HGF, OSM	AFP, ALB, Hepar1, CK18, CK19, CD13, CPR, CYP3A	Fibrinogen, Fibronectin synthesis, A2M synthesis, PAS	ALB⁺ cells: about 70%	No	Hay et al. (2008)
Activin A, Wnt3a, DMSO, HGF, OSM	ALB	Ureagenesis, Glucogenesis, AFP, Fibrinogen, Fibronectin, TBPA, Heptoglobin, ALB synthesis	ALB⁺ cells: about 90%	Yes: FISH for human probe, CK18, CK19 staining, ALB secretion	Hay et al. (2008)
Activin A, FGF2, DMSO, FBS or KSR, Dexamethasone, HGF	AFP, ALB	TEM, ALB, Urea, AAT secretion, EROD assay, Coagulation factor VII release	ALB⁺ cells: about 55%	Yes: Luminescence imaging, ALB, AAT secretion, ALB, CK18 staining	Basma et al. (2008)

Dong-Hun Woo. Directed Differentiation of Human Embryonic Stem cells into Transplantable Hepatocytes: Recent Progress and Future Directions. Korean J Reprod Med 2009.

Table 2. Preclinical trials for hESC-derived hepatocytes in animal disease models

Animal model	Delivery	Survival time of grafted cells	Improvement of liver functions	References
CCl4-intoxicated SCID mice	Intrasplenic injection	8 weeks	No	Cai et al. (2007)
NOD-SCID mice	Directly liver	3 weeks	No	Duan et al. (2007)
NOD.CB17-Prkdc ^{scid} /J mice	Intrasplenic injection	3 days	No	Hay et al. (2008)
NOD-SCID mice (retrorsine/hepatectomy) Nagase Rat (retrorsine/hepatectomy) uPA mice	Intrasplenic injection	NOD-SCID mice: 21 days Nagase Rat: 74 days uPA mice: 60 days	No	Basma et al. (2008)

Dong-Hun Woo. Directed Differentiation of Human Embryonic Stem cells into Transplantable Hepatocytes: Recent Progress and Future Directions. *Korean J Reprod Med* 2009.

래 간세포를 증식시켜, 간세포 이외의 세포 및 잔여 미분화 세포의 이식으로 인한 부작용을 배제하고, 간질환 치료의 세포 치료제로 이용 가능한 다량의 간세포를 확보하는 방법이 소개된 바 있다. 최근 Zhao 등 (2009)은 인간배아줄기세포로부터 간세포의 유도 분화과정 중, N-cadherin을 이용하여 간세포의 전구세포 (hepatic progenitor)를 분리 정제한 뒤, 이들을 증식시키는데 성공함으로써, 세포 치료 목적의 인간배아줄기세포 유래 간세포를 다량 확보할 수 있는 방법을 제시하였다.¹⁶

인간배아줄기세포 유래 간세포의 이식 후 생체 내 기능성 조사

간세포이식을 통한 간질환 치료의 효과적인 임상적 이용 목적은 세 가지 방법으로 분류된다. 첫 번째는, "가교 치료 (bridging therapy)"로써, 이는 간질환 환자에 이식된 공여세포가 비록 짧은 기간 생존한다 하더라도, 간 이식 전까지 환자의 생명을 연장시키거나 간질환을 완화시키는 역할을 의미하고,^{17,18} 두 번째는, 선천성 대사 질환을 가진 환자에 정상 간세포를 이식하여 대사과정에 필요한 정상 효소들을 분비하게끔 함으로서 유전적 결함을 보완하는 것을 의미한다.^{19~24} 마지막 세 번째는, 간

조직 재생이 불가능한 환자에 새로운 간세포를 이식함으로써 손상된 간세포를 정상 간세포로 교체하는 것을 의미한다.^{25,26} 간세포를 이용한 가장 효과적인 세포 치료의 조건은 충분한 양의 정상 인간 간세포를 확보하고, 이식된 간세포의 생착율을 높임과 동시에, 세포이식에 따르는 부작용을 최소화 함으로서 손상된 간 조직을 개선하는 것으로 함축할 수 있다.

이러한 의미에서 인간배아줄기세포를 이용한 치료용 간세포의 대량 확보는 간질환 치료에 있어 매우 효과적인 방법이 될 수 있을 것으로 기대된다. 따라서, 많은 연구자들이 인간배아줄기세포로부터 효과적인 간세포 유도 분화 방법을 개발하였고, 그 결과, 높은 수율의 간세포를 확보할 수 있게 되었다. 그러나, 현재까지 소수의 연구 결과들만이 인간배아줄기세포로부터 분화된 간세포가 간질환 실험동물에 이식된 뒤 간 조직 내에 생착할 수 있다는 가능성만을 제시해 주었을 뿐, 근본적인 간 기능의 개선에 대한 가능성은 보여주지 못하고 있는 실정이다 (Table 2).

또한, 최근 Haridass 등 (2009)에 따르면, 인간배아줄기세포 유래 간세포는 정상 태아 간세포 및 정상 성인 간세포에 비하여, 간질환 실험동물 모델에 이식되었을 때, 간 조직 내에서의 생착율

(repopulation)이 매우 낮다고 보고하였으며, 이러한 이유는 현재까지 보고된 간세포 분화 방법들이 정상 간세포로의 분화 유도를 완벽하게 이루어내지 못하는데 기인하므로, 보다 완벽한 분화 유도 방법 개발의 필요성을 제시하고 있다.²⁷

결론 및 고찰

간 이식은 간경변을 유발하는 C형 간염 (hepatitis C), 선천성 대사 이상 질환 (inherited metabolic diseases), 담관 질환 (bile duct disease), 간암 (primary liver cancer), 및 간경변을 유발하는 알코올성 질환 등 다양한 간질환에 대하여 행해지고 있다. 본 종설의 서두에서 언급 하였듯이, 점차 그 요구가 증가하는 간 이식에 반하는 장기 공여자의 부족 문제를 해결하기 위하여, 인간배아줄기세포를 포함한 각종 줄기세포를 이용한 세포 대체 치료 (cell replacement therapy)가 대안으로서 제시되고 있으나, 임상적 적용을 위해서는 극복해야 할 문제점이 많은 실정이다. 앞서 서술한 바와 같이 간의 정상 발생과정을 배양접시 내에서 가장 유사하게 재현할 수 있는 효과적인 배양 조건의 개발이 가장 시급하고 중요한 문제이다. 비록 간세포로의 분화효율이 높은 여러 프로토콜들이 소개되고 있으나, 일반적으로 줄기세포에서 분화된 체세포들은 정상 체세포보다 그 기능성이 다소 낮다는 것이 관련 분야를 연구하는 연구자들의 의견이다. 따라서 이러한 사실은 현재까지 보고된 분화 유도 조건 하에서는 간세포로서의 완벽한 기능에 필수적인 몇몇 발생학적 경로 (developmental pathway)가 세포 내에서 작동되지 않거나 결여되어 있을 가능성을 시사한다. 그러므로 몇몇 표지 인자 및 기능성 검사가 기준이 되어 산출되는 분화수율을 높이기 위한 연구보다는 인체 내에서 다양한 기능을 수행하고 있는 정상 간세포와 가장 유사한 간세포를 만들어내기 위한 배양 조건의 개발이 우선이며, 이는 세포이식 치료의 성패를 좌우하는 분화된 간세포의 기능성 및 이식 후 성공적인 간 기능 개선에 가장 핵심이

되는 기반 기술이라 할 수 있다.

이와 함께 줄기세포를 이용한 세포이식의 임상 적용 시 고려해야 할 또 다른 이슈는 이식을 통한 직접적인 세포 대체효과와 더불어, 이식된 세포들이 분비하는 여러 인자들에 의한 간접적인 조직 재생 효과이다. 최근 다양한 성체줄기세포를 간질환 실험동물에 이식하였을 경우, 이식된 성체줄기세포 혹은 그로부터 분화된 세포들이 분비하는 많은 인자들에 의해 실험동물의 간질환이 효과적으로 개선됨이 보고된 바 있다.^{28~31} 초기 배아의 기관 형성 (organogenesis) 과정에 있는 여러 종류의 세포들은 각종 인자들을 분비함으로써, 기관 및 조직을 구성하는 세포들의 증식 및 이들 세포의 생존을 위해 요구되는 신생혈관의 형성을 촉진시킨다.³² 따라서 인간배아줄기세포로부터 분화된 간세포의 경우 발생과정상 초기 간세포로 간주될 수 있으며, 이식 후 주변 세포의 증식 및 분화에 영향을 주는 여러 성장인자 및 세포외 기질 등을 분비할 것으로 유추된다. 이러한 점을 고려할 때 줄기세포로부터 분화된 간세포들에서 합성되어 분비되는 물질들 (secretome)을 단백질학적 방법 등으로 분석하여, 간 조직의 재생을 촉진시킬 수 있는 후보 물질을 발굴하는 것도 줄기세포를 이용한 간질환의 세포 대체 치료와 함께 연구될 수 있는 흥미로운 분야라 할 수 있다.

참 고 문 헌

1. Shirahashi H, Wu J, Yamamoto N, Catana A, Wege H, Wager B, et al. Differentiation of human and mouse embryonic stem cells along a hepatocyte lineage. *Cell Transplant* 2004; 13: 197-211.
2. Rambhatla L, Chiu C, Kundu P, Peng Y, Carpenter MK. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant* 2003; 12: 1-11.
3. Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N. Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. *Differentiation* 2004; 72: 230-8.
4. Baharvand H, Piryaei A, Rohani R, Taei A, Heidari MH,

- Hosseini A, et al. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. *Int J Dev Biol* 2006; 50: 645-52.
5. Hay DC, Zhao D, Ross A, Mandalam R, Lebkowski J, Cui W. Direct differentiation of human embryonic stem cells to hepatocyte-like cells exhibiting functional activities. *Cloning Stem Cells* 2007; 9: 51-62.
 6. Cai J, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, Meng S, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology* 2007; 45: 1229-39.
 7. Duan Y, Catana A, Meng Y, Yamamoto N, He S, Gupta S, et al. Differentiation and enrichment of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cells* 2007; 25: 3058-68.
 8. Hay DC, Zhao D, Fletcher J, Hewitt ZA, McLean D, Urruticochea-Uriguen A, et al. Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo. *Stem Cells* 2008; 26: 894-902.
 9. Hay DC, Fletcher J, Payne C, Terrace JD, Gallagher RC, Snoeys J, et al. Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 12301-6.
 10. Baharvand H, Hashemi SM, Shahsavani M. Differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatocyte-like cells in a serum-free adherent culture condition. *Differentiation* 2008; 76: 465-77.
 11. Basma H, Soto-Gutierrez A, Yannam GR, Ito R, Yamamoto T, Ellis E, et al. Differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived hepatocytes. *Gastroenterology* 2009; 136: 990-9.
 12. Zaret KS. Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 499-512.
 13. D'Amour KA, Agulnic AD, Eliazer S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1534-41.
 14. Blyszczuk P, Czyz J, Kania G, Wagner M, Roll U, St-Onge L, et al. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 998-1003.
 15. Fukuda H, Takahashi J, Watanabe K, Hayashi H, Morizane A, Koyanagi M, et al. Fluorescence-activated cell sorting-based purification of embryonic stem cell-derived neural precursors averts tumor formation after transplantation. *Stem Cells* 2006; 24: 763-71.
 16. Zhao D, Chen S, Cai J, Guo Y, Song Z, et al. Derivation and characterization of hepatic progenitor cells from human embryonic stem cells. *PLoS One* 2009; 4: e6468.
 17. Habibullah CM, Syed IH, Qamar A, Taher-Uz Z. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure. *Transplantation* 1994; 58: 951-2.
 18. Strom SC, Fisher RA, Thompson MT, Sanyal AJ, Cole PE, Ham JM, Posner MP. Hepatocyte transplantation as a bridge to orthotopic liver transplantation in terminal liver failure. *Transplantation* 1997; 63: 559-69.
 19. Wilson JM, Chowdhury NR, Grossman M, Wajsman R, Epstein A, Mulligan RC. Temporary amelioration of hyperlipidemia in low density lipoprotein receptor-deficient rabbits transplanted with genetically modified hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 8437-41.
 20. Chowdhury JR, Grossman M, Gupta S, Chowdhury NR, Baker JR, Wilson JM. Long-term improvement of hypercholesterolemia after ex vivo gene therapy in LDLR-deficient rabbits. *Science* 1991; 254: 1802-5.
 21. Gonsalus JR, Brady DA, Coulter SM, Gray BM, Edge AS. Reduction of serum cholesterol in Watanabe rabbits by xenogeneic hepatocellular transplantation. *Nat Med* 1997; 3: 48-53.
 22. Grossman M, Raper SE, Kozarsky K, Stein EA, Engelhardt JF, Muller D, et al. Successful ex vivo gene therapy directed to liver in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Nat Genet* 1994; 6: 335-41.
 23. Fox II, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI, et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type I with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998; 338: 1422-6.
 24. Lake JR. Hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998; 338: 1463-5.
 25. Lee WM. Acute liver failure. *Am J Med* 1994; 96: 3S-9S.
 26. Lee WM. Drug-induced hepatotoxicity. *N Engl J Med* 1995; 333: 1118-27.
 27. Haridass D, Yuan Q, Becker PD, Cantz T, Iken M, Rothe M, et al. Repopulation Efficiencies of Adult Hepatocytes, Fetal Liver Progenitor Cells, and Embryonic Stem Cell-Derived

- Hepatic Cells in Albumin-Promoter-Enhancer UrokinaseType Plasminogen Activator Mice. *Am J Pathol* 2009. Aug 28. [Epub ahead of print].
28. Cho SW, Moon SH, Lee SH, Kang SW, Kim J, Lim JM, et al. Improvement of postnatal neovascularization by human embryonic stem cell derived endothelial-like cell transplantation in a mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation* 2007; 116: 2409-19.
29. Lu P, Jones LL, Snyder EY, Tuszynski MH. Neural stem cells constitutively secrete neurotrophic factors and promote extensive host axonal growth after spinal cord injury. *Exp Neurol* 2003; 181: 115-29.
30. Uemura R, Xu M, Ahmad N, Ashraf M. Bone marrow stem cells prevent left ventricular remodeling of ischemic heart through paracrine signaling. *Circ Res* 2006; 98: 1414-21.
31. Formigli L, Perna AM, Meacci E, Cinci L, Margheri M, Nistri S. Paracrine effects of transplanted myoblasts and relaxin on post-infarction heart remodelling. *J Cell Mol Med* 2007; 11: 1087-100.
32. Fraser SE, Harland RM. The molecular metamorphosis of experimental embryology. *Cell* 2000; 100: 41-55.
-