

## 인간배아줄기세포와 기형종: 전분화능의 증거와 조직공학 리서치 툴로서의 가치

이유진 · 김한수\*

연세대학교 의과대학, 진단검사의학과 및 세포치료센터

### Human Embryonic Stem Cells (hESCs) and Teratoma: Evidence of Stemness and Research Tool for Tissue Engineering

Eugene Lee and Han-Soo Kim\*

Department of Laboratory Medicine and Cell Therapy Center, Yonsei University College of Medicine, 134 Shinchon-dong, Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea

(Received: October 13<sup>th</sup>, 2009; Accepted: November 10<sup>th</sup>, 2009)

**Abstract :** Human embryonic stem cells (hESCs) and recently introduced induced pluripotent stem cells (iPSCs) are stem cells with an indefinite self-renewal and the potential to generate any mature cell type. Because of these properties, pluripotent stem cells hold great promise for regenerative medicine. One of the critical issues, however, is the risk of teratoma formation after transplantation of derivatives of these pluripotent stem cells. Experimentally, transplantation of hESC and iPS cells into immunodeficient animal led to the formation of tumors composed of all three germ layers, i.e. teratoma. This property is considered the gold standard for demonstrating pluripotency of a given cell type. At the same time, the same type of assay hold promise as a standard for assessing safety of the therapeutic cells intended for clinical applications. This review article describes the key aspects of pluripotent stem cell-derived teratoma formation and utilization of teratoma as a research tool for human embryonic development or disease pathogenesis. The promises and limitations of current ES cell-based therapy are also discussed.

#### 1. 배아줄기세포의 전분화능과 기형종

인간 배아줄기세포(human embryonic stem cells, hESCs)는 수정란 착상 이전의 배반포(blastocyst) 단계에서 회수하는 전분화능을 갖는 내세포괴(inner cell mass)에서 유래한 세포들로 in vitro 또는 in vivo에서 미분화상태를 유지하거나 분화할 수 있는 특성을 갖는다.<sup>1</sup> 인간배아줄기세포의 자기재생 (self renewal)과 배아의 모든 조직으로의 분화 능력 (전분화능, pluripotency)이라는 두가지 특성으로 인해 파킨슨질환 (Parkinson's disease)이나 중추신경 손상, 심혈관 질환, 당뇨병등과 같은 다양한 질환의 치료에 활용될 수 있는 세포공급원으로 큰 기대를 모으고 있다.<sup>2</sup> 이러한

기대에 발맞추어, 많은 연구자들이 인간배아줄기세포를 신경세포, 심근세포, 인슐린을 분비하는 췌장의 베타세포와 같은 질병 치료용 세포로의 분화를 위한 기술 개발에 노력을 경주하고 있다.

인간배아줄기세포는 마우스 배아줄기세포와 유사하게 in vitro에서 배양조건을 달리하면 발생단계에서 관찰되는 내배엽, 중간엽, 외배엽의 3배엽 조직을 갖는 배아체 (embryoid body)로 자발적으로 분화하는 특성이 있기 때문에,<sup>3</sup> 줄기세포의 전분화능을 시험관에서 부분적으로 증명할 수 있다. 인간 배아줄기세포의 전분화능이 가장 명확하게 증명되는 경우는 면역결핍 마우스와 같은 생체에 이식했을 때 배아에서 관찰되는 여러 유형의 조직이 무질서하게 배치된 커다란 종양 (기형종, teratoma)의 형성이다.<sup>4</sup> 전분화능을 갖는 세포의 이식을 통해 실험적으로 유도한 기형종은 세포의 생장과 증식을 허용하는 이소부위에 이

\*Tel: 02-2228-78231; Fax: 02-2227-7850  
e-mail: hansk@yuhs.ac (Han-Soo Kim)

식한 유전적으로 정상인 전분화능 줄기세포로부터 형성된다. 새롭게 구축된 세포주들이 기존의 배아줄기세포와 마찬가지로 전분화능을 가졌는지를 확인하기 위해 이용하는 *in vitro* 의 다양한 기준과 방식 이외의 가장 중요한 기준이 생체에 이식했을 때 이식세포 유래의 3배엽 조직이 형성되는가의 여부이다. 이 기준은 최초의 인간 배아줄기세포가 구축된 이래<sup>1</sup> 하나의 명제가 되었으며, 인간배아줄기세포를 선천성 면역 결핍 (*scid*) 마우스에 이식할 경우 모호하고 무계획적인 구조를 갖는 3배엽 유래의 분화세포로 구성된 다양한 조직들의 형성이 특징이다.

그러나, 줄기세포의 종양 형성 능력은 한편으로 인간배아줄기세포의 임상적인 활용에 대해 가장 큰 장애이다. 아직까지는 인간배아줄기세포의 분화기술 수준이 암의 유발 가능성이 있는 미분화세포와 정체가 불분명한 미지의 세포들이 혼합되어 있는 치료용 세포를 제작하는 수준에 머물러 있기 때문에 향후 임상적인 효용성 뿐만 아니라 안전성에 중요한 장애가 된다. 이러한 제약에도 불구하고, 기형종은 배아줄기세포나 기타 줄기세포의 전분화능을 검증하는 기준이며<sup>5</sup> 동시에 초기배아 발달과 조직공학 연구에 주요한 도구로서의 가치를 지니고 있다.

인간배아줄기세포의 이식에 의한 기형종 이외에도, 생체에 자연적으로 형성되기도 하는 기형종은 *germ cell tumor* (GCT)로 분류되며, 3배엽성 조직을 대표하는 세포들과 조직으로 구성되어 있어 기형종 형성의 원인이 전분화능 줄기세포임을 증명하고 있다.<sup>6</sup> 실제로 생체의 자발적인 종양인 GCT로부터 분리한 줄기세포의 연구로부터 얻어진 정보가 배반포로부터 마우스 배아줄기세포와<sup>7</sup> 인간배아줄기세포의 구축<sup>1</sup> 및 후속 연구의 토대가 되었다. 이들은 조직학적으로 세포와 조직이 잘 형성되어 있는 고형 (*solid*) 기형종, 세포와 체액으로 구성된 낭성 (*cystic*) 기형종 또는 낭성과 고형성 조직이 혼재하는 혼재형 (*mixed*) 기형종으로 구분할 수도 있으며, 이와는 별도로 조직의 발달 정도 (분화 상태), 구성세포, 환자의 연령, 성별, 핵형, 각인과 같은 후생유전적 분석체 등을 기준으로 다양하게 분류하고 있다.<sup>8-9</sup> 유전적으로 정상인 인간배아줄기세포는 유전적인 결손을 보유하고 있는 배아종양(*Embryonic carcinoma*)과는 기형종 형성능, 자기재생, 전분화능의 공통점을 갖기 때문에,<sup>10</sup> GCT 등의 종양 형성 과정을 연구에 활용할 수 있다.

## 2. 기형종 형성의 요건

인간줄기세포의 특성규명은 분화 및 미분화 상태를 결정하는 다양한 마커들의 발현 여부, 핵형 분석, telomerase 효소 활성, 시험관에서 다양한 세포로의 분화 능력 분석과 생체에서의 기형종 형성을 통한 전분화능의 확인을 통

해 이루어진다.<sup>11-13</sup> 기형종 형성을 통해 증명하는 줄기세포의 전분화능은 인간배아줄기세포(또는 만능유도줄기세포와 같은 전분화능 줄기세포)들을 면역결핍 마우스에 이식하여 이식부위에 대략 6-10주 전후로 형성되는 손쉽게 관찰되는 종양으로 판단된다. 이러한 실험을 위해 대표적으로 *scid*, *nude*, *scid-beige* 등의 다양한 계통의 마우스들이 활용되고 있다.<sup>4</sup> 비록 이식편에 의해 형성되는 기형종의 구조가 무질서한 것으로 보이지만, 그 형성과정이나 조직으로의 분화가 임의적인 것이 아니며, 기형종의 형성은 다음의 몇 가지 인자들에 의해 영향을 받는다

### (1) Stem cells

ESC의 세포주 구축이 유전적으로 동일하지 않은 배아로부터 다양한 기술에 의해 진행되고 그 과정에서 추가적으로 배양과 유지에 이용되는 시약과 기술적인 차이로 인해, 보편적으로 활용되는 줄기세포 마커를 포함한 일부 기준들로는 차이가 없지만, 각 ESC들이 자발적인 분화능을 포함한 미묘한 특성에서 차이가 있을 것이라는 보고가 있다.<sup>14</sup> 많은 수의 ESC의 유전체 분석을 통해 hESC들이 유사한 유전자 발현 양상을 보임과 함께<sup>15</sup> 일부 유전자에서 차이가 있음도 확인되었다.<sup>16</sup> 이와 관련해서, 동일한 조건에서 ESC의 3배엽 분화 성향에서 세포주들 간에 차이가 있음이 보고되었다.<sup>17</sup> 이러한 현상의 원인 중 하나는 각 세포주들의 기원에 따른 근본적인 유전적 배경과 배양 이전 또는 배양 과정에서 가해지는 후생적 유전체 변화 (*epigenetic change*) 등으로 생각된다. 이러한 미세한 차이는 세포군집에서 발현되는 생존과 분화신호의 차이를 유도하여 생체 이식한 세포주의 생존에 의한 기형종의 형성 유무 뿐만 아니라 기형종 내의 조직들의 특정 계통 발달을 촉진시키거나 억제할 수도 있다. 최근 각광 받고 있는 사람의 iPSC<sup>18-19</sup>의 경우 세포의 증식, 분화 EB 형성 과 기형종 형성 등에서 hESC와 매우 유사한 분화, EB 형성과 가지는 것으로 확인되었다. 현재는 바이러스 이외에도, plasmid,<sup>20</sup> transposon,<sup>21</sup> chemical 및 protein transduction<sup>22</sup> 등의 다양한 방식으로 제작되고 있는 iPSC 세포주가 ESC와 같은 특성을 보유하는 여러 기준 중 하나로 기형종의 형성 유무가 가장 중요한 역할을 하고 있다.

전분화능 세포로부터 유래하는 분화세포 내에 포함되는 잔류 미분화세포의 함량에 따른 위험도의 측정을 위해 진행되는 전임상 동물실험에서 중요한 고려사항의 하나가 미분화세포의 함량(전분화능줄기세포의 수)이다. Nussbaum 등은 C57BL/6 유래 배아줄기세포를 동종의 심근에 이식할 경우  $5 \times 10^4$ 개 이하의 세포가 면역결핍 마우스의 심장에 이식되었을 때 기형종의 형성 뿐만 아니라 생존 이식편이 검출되지 않아 이식세포수에 비례하여 기형종 형성이 유도, 촉진됨을 밝혔다.<sup>23</sup> 또한, Brederlau 등은 rat에 시경세포 분화의 여러 분화 단계에 있는 hESC 유래의 세포를 파킨슨

모델의 백서에 이식하여 기형종 형성이 배양(분화)시기와 반비례함을 밝혔다.<sup>24</sup> 이러한 결과는 인간배아줄기세포를 체외에서 오래 분화시킬수록 전체 세포 중에 미분화세포의 함량이 줄어들어 기형종의 형성 가능성이 줄어든다는 것을 의미한다. Lee 등은 scid 마우스의 심근과 골격근에 이식하여 기형종을 형성하기 위한 최소 hESC 세포의 수를 각각  $10^5$ 과  $10^4$ 개로 보고하였다.<sup>25</sup> 그러나, Fujikawa 등은 마우스 배아줄기세포 유래의 췌장  $\beta$ -cell 이식에 의한 당뇨 질환개선 동물 모델에서 0.2% 만의 미분화세포 오염 만으로도 기형종이 형성됨을 확인한 바 있어,<sup>26</sup> 소수의 잔류 미분화세포만으로도 기형종 형성의 위험성이 있음을 보고하였다. 더불어, van der Bogt 등은 100개 수준의 hESC 만으로도 피하 이식에 의해 기형종의 형성이 가능함을 증명하였다.<sup>27</sup>

줄기세포의 기원에 따른 기형종 형성능력의 차이는 iPSCs 에도 동일하게 적용된다. Miura 등은 11가지 다른 방식으로 제작된 36개의 마우스 iPSCs로부터 유래한 2차 neurosphere의 기형종 형성능 비교를 통해 embryonic fibroblast 유래의 iPSC는 ESC 유래 2차 neurosphere와 유사한 기형종 형성능을 보인 반면, 다른 조직 유래의 iPSC는 상대적으로 효율이 떨어지며,<sup>28</sup> 이러한 경향은 역분화 세포의 기원, 역분화의 방법과 신경으로의 바이러스의 도입과 같이 유전적인 변화를 유발시키는 iPSC 유도 분화 방법 등의 차이에 기인한 것으로 판단된다. 이러한 측면에서 유전적 조작에 의한 iPSC의 임상적 활용은 다양한 변수를 고려하여 기형종의 형성 가능성에 대해 보다 신중하게 분석을 할 필요가 있다.

## (2) 숙주 (host)

이식편에 의한 기형종의 형성에서 가장 중요한 요소 중의 하나가 사용되는 숙주이다. 특정 종에서의 기형종 형성을 유도하는 ESC가 반드시 다른 종에서도 기형종을 형성한다는 것을 의미하지 않는다. 마우스의 배아줄기세포와 hESC에 의한 기형종 형성의 차이는 마우스 조직환경에 대한 마우스와 사람 세포의 종간 차이에도 일부 기인한다. hESC는 이식된 마우스의 조직에서 주변의 성장인자, 혈관을 비롯한 주변조직과의 상호작용과 통합을 비롯한 여러 불일치로 인해 마우스의 줄기세포에 비해 최적 상황이 아님은 자명하다. 마우스 ESC는 마우스의 손상된 뇌에서 악성 기형종을 형성하지만, Rat의 뇌에서는 이동과 생착 및 조직으로의 통합 이외에는 기형종을 형성하지 않는 것으로 확인되었다.<sup>29</sup> 이와 함께, mESC를 마우스의 손상된 뇌 부위에 이식했을 경우 기형종이 형성되지 않는다는 보고<sup>30</sup>는 다른 연구자들의 결과를 비교 분석할 때 세밀한 실험적인 차이가 기형종 형성에 영향을 줄 수도 있음을 의미한다.

인간배아줄기세포 유래의 분화세포 또는 줄기세포의 이

식을 지지해 주는 숙주의 선택은 매우 주의를 기해야 한다. 인간의 세포가 마우스의 세포성 면역 (cellular immunity)과 체액성 면역(humoral immunity)에 의한 공격의 대상이 될수 있기 때문에, 가장 이상적인 환경은 인간 세포에 대해 숙주가 면역 관용 (immune tolerance)을 발휘하는 것이다. Drukker 등은 미분화 hESC를 다양한 계통의 면역결핍 마우스들과 정상 마우스 kidney capsule에 이식하여 기형종 형성을 비교하였다.<sup>31</sup> 정상마우스에서는 기형종 형성이 전혀 관찰되지 않았고, 면역결핍 마우스들간에도 NOD/scid mice (B and T cell-deficient)는 기형종을 형성하여 T 림프구가 이식된 이종세포(hESC)의 제거에 가장 큰 역할을 수행하지만, 자연독살세포(NK 세포) 결핍마우스와 B 림프구 결핍마우스에서는 기형종을 형성하지 않아 숙주의 면역 환경에 따른 hESC의 거부반응에서의 차이가 보고되었다. 반면에, Tian 등은 hESC의 근육내 주사를 통해 T림프구와 NK 결핍이 있는 SCID 마우스에서 기형종 형성이 더욱 촉진됨을 밝혀 NK세포의 존재가 hESC의 이종세포 거부반응 (xenorejection)에 기여함을 밝혔다.<sup>32</sup>

Dressel 등은 또한 종간의 기형종 형성 차이를 분석하여 억제에서의 면역세포의 역할을 규명하기 위해 마우스의 ESC를 동종, 동종이계 (allogeneic) 및 이종 (xenogeneic) 개체에 이식한 후 기형종 형성에서 종간 차이를 분석하였다.<sup>33</sup> 배아줄기세포가 동종의 생체에서 기형종의 형성 능력이 높으며, 이는 이종 미분화세포(배아줄기세포)가 숙주의 NK세포에 의해 제거되기 때문임을 밝혔다. 다만, 면역억제 환경에서 배아줄기세포 유래의 분화세포들이 이종 이식되었을 경우 여전히 적지 않은 빈도로 기형종을 형성 하여 배아줄기세포 단계가 아닌 분화세포내의 일부 미분화세포의 추가 동정과 제거가 안전성 확보를 위해서는 필수적이라는 것이 증명되었다. 인간배아줄기세포 유래의 분화세포에서 이러한 특성을 갖는 미분화세포들이 존재하는지는 규명되어 있지 않다.

사람을 대상으로 한 hESC의 기형종 형성에 대한 실험적인 증명은 실현가능성이 없기 때문에, 그 대안으로 영장류 실험이 진행되고 있다.<sup>34</sup> 또 다른 대안으로 면역결핍 scid마우스 조직내에 인간 태아조직 (흉선, 폐 및 췌장 조직)을 이식한 다음 여기에 hESC 또는 hESC-유래의 분화세포를 이식하여 기형종의 형성을 판별하는 것으로,<sup>35</sup> 이 경우 hESC의 기형종 형성이 촉진되며 태아조직이 없는 대조군에 비해 악성 미분화 종양이 형성되는 특징을 보였다.

## (3) 이식 부위

이식 부위의 환경적인 요인과 구조적인 특성이 기형종 형성을 유도하는 세포의 증식과 분화에 매우 중요한 역할을 한다. 많은 연구들에서 정소, 신장의 subcapsular 구역이 여러 개체들간의 차이가 비교적 적으며, 동일한 환경을 제공해 주며 이식 세포들이 이식 장소에 국한되어 존재하는 가

장 확실한 조직으로 인식되어 가장 빈번하게 이용되고 있다.<sup>36</sup> 그러나, 이식 부위와 이식 방법이 기형종 형성의 효율에 미치는 영향에 대한 정보는 매우 제한적이다. Prokhorova 등은 면역결핍 마우스의 조직 위치에 따라 kidney capsule(100%)이 매우 효율적이며, 피하 (25-100%), 정소 (60%), 근육 (12.5%) 등으로 기형종 형성이 현저하게 차이를 보임을 증명하였다.<sup>37</sup> Cooke 등은 hESC를 nude마우스의 피하와 간 이식을 통해 기형종의 형태와 구성 및 형성속도에서 이식세포의 주변 미세환경에 의한 발달속도 차이와 세포에 영양분과 노폐물의 교환을 촉진하는 혈액과 같이 이식 부위 조직이 갖는 풍부한 순환계와 조직의 자생적인 성장과 재생 환경이 기형종의 발달에 매우 중요한 요소임을 증명하였다.<sup>38</sup> 특히 간과 같이 자체 재생력이 뛰어난 조직에서 분비되는 stem cell factor, hepatocyte growth factor 등과 같은 기형종 형성에 영향을 주는 생체활성 물질이 상당한 역할을 수행하는 것으로 예상된다.

신경줄기세포 또는 전구세포같이 이식부위의 주변 세포들과 동화되어 조직세포로 분화하는 세포들과는 달리, 미분화 hESC는 이식조직에 해당하는 세포로의 분화 경향이 낮다.<sup>39</sup> 그럼에도 불구하고, hESC의 생체내 분화는 여러 다른 세포들이 주변의 영향을 받아 발달하는 다클론형 (polyclonal) 이며 주변의 미세환경에 의해 영향을 받는다는 것을 조직 염색을 통해 밝혔고,<sup>40</sup> 이 사실은 기형종의 발달이 숙주의 면역체계에 의한 도태나 우월한 클론의 선발에 의한 것이 아님을 의미한다. 동일한 세포의 이식부위에 따른 기형종 형성 능력과 조직 발달 경향성은 SCID 마우스의 knee joint space와 피하 이식의 비교를 한 Wakitani 등에 의해 보고 되어 주변 미세환경의 영향이 증명된 바 있다.<sup>41</sup> 반면에, 허혈성 심근 조직에 이식한 mESC에 의해 형성된 기형종의 경우는 하지에 형성된 기형종에 비해 특별히 심근 계통의 선택적인 조직 분화 양상이 보이지 않아<sup>23</sup> 주변조직에 의해 제공되는 방향성 분화유도 물질<sup>42</sup>에 대치된다.

숙주의 발달 단계(연령)도 기형종 형성에 중요한 영향을 준다. 대부분의 연구에서는 8주령 이상의 성체 면역결핍 마우스가 사용되고 있다. 조직의 발달과 같은 분자적 신호들의 가동이 배아발생기에 활발하기 때문에, 배아 조직이 이식세포의 기형종 형성 연구의 환경을 제공할 수 있음을 예상할 수 있으나, 아직 기형종의 형성에 적합한 이식 장소와 발생시기에 대한 기준은 정리되어 있지 않다. hESC를 성체 scid 마우스의 간에 이식한 경우 피하이식한 경우에 비해 보다 악성이고 미분화 기형종이 형성되는 반면,<sup>38</sup> hESC의 자궁내 14일 마우스의 뇌 lateral brain ventricle) 이식은 세포의 조직 통합과 neuronal 및 glial 계통의 신경 분화를 가져왔으나, 기형종은 형성되지 않아<sup>43</sup> 배아가 제공하는 환경이 이식후의 hESC의 증식과 분화를 기형종

형성 없이 적절하게 조절하는 신호가 됨을 시사 한다.

이러한 결과들은 더 세밀한 기형종의 분석이 필요함을 의미한다. 특히, 어떤 이유로 특정 조직이나 세포들이 낭성 기형종을 형성하는지 규명할 필요가 있다. 간에서와 같이 주변의 숙주 조직을 구조적으로 밀어내면서 파괴하는 경우 낭포성 기형종을 형성하는 경향이 있다. 반면에 동일한 세포를 동일한 부위의 다른 개체에 이식할 경우도 서로 다른 형태의 기형종이 형성되기도 하는 것으로 보아<sup>4</sup> 이식세포의 상태, 이식되는 정확한 장소 (주변 조직)가 영향을 줌을 의미한다. 따라서, 기형종 형성에서 배아줄기세포들의 종간의 차이 뿐만 아니라, 숙주의 연령, 이식 부위, 숙주의 면역 상황이 기형종의 형성에 중요한 역할을 함을 의미한다.

#### (4) 염색체 이상과 기형종

기형종의 현실을 더 복잡하게 만드는 것이 유전적 변형을 거친 hESC의 출현이다. hESC의 장기 배양은 trisomy, 염색체 상실, microsatellite instability 등의 다양한 이상을 유도하는 것으로 보고되었으며,<sup>44</sup> 이러한 현상은 teratoma의 형성과 무관해 보이지 않는다. 장기 배양의 결과, 일부 hESC 세포주들에서 사람의 12, 17번 및 X 염색체의 획득이 빈번하며 다른 염색체의 소실이나 획득<sup>45-47</sup>과 함께 미세한 유전적 변화도 보고된 바 있다.<sup>48</sup> 특이한 점은 이러한 유전적인 변화가 사람의 GCT나 teratocarcinoma cell lines 에서 동일한 현상으로 관찰되어,<sup>9</sup> hESC의 변화로 인한 암세포화가 GCT의 발달과 연관성을 지닌다는 주장이 있다.<sup>46</sup> 정상 hESC에 비해 이들 culture-adapted hESC는 미성숙 기형종을 형성하며,<sup>36,46</sup> 유전적 변화가 있는 embryonal carcinoma와 유사하게 기형종 내에 미분화 줄기세포의 존재가 확인된다. 이러한 미분화세포의 유지는 GCT와 embryonic carcinoma 에서 과발현되는 Nanog 유전자가 존재하는 염색체 12번의 이상과 무관하지 않은 것으로 보인다.<sup>49</sup> Nanog과 함께 배아줄기세포의 미분화 상태 유지 (self renewal)에 매우 중요한 Oct4의 경우도 human GCT의 진단에 활용되며, teratocarcinoma의 내부에 발현한다는 것이 밝혀져 있다.<sup>50</sup> 그러나 EC나 teratocarcinoma에서 발현되는 이들 유전자가 이들 세포의 전분화능 때문에 검출 되는 것인지, 혹은 종양의 원동력으로서 발현되는 것인지는 명확하지 않다. 다만, 이들 유전자가 체세포를 전분화능을 갖도록 재프로그래밍하는 소수의 유전자라는 점은 시사하는 바가 크다.

염색체의 불안정성을 유도하는 원인의 하나로 만성적인 oxidative stress를 들 수 있다. Schieke 등은 마우스 배아줄기세포의 연구에서 mitochondrial oxygen consumption 높은 (mitochondrial membrane potential가 높은) 배아줄기세포들이 중간엽 세포로의 분화능이 낮고 기형종 형성능은 높음을 밝힌 바 있다.<sup>51</sup> 미토콘드리아의 기능 이상에 의해 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)이 축적되어

형성되는 만성적인 oxidative stress가 유전체 불안정성의 원인이 될 수 있음은 실험적으로 증명되었다.<sup>52</sup>

특히, 증식이 빠른 종양은 Warburg effect<sup>53</sup>로 인해 aerobic glycolysis의 비율이 높으며, hypoxia란 영양분 고갈과 같은 한계 상황에서도 종양의 성장을 유지할 정도로 종양의 증식에 이점을 제공한다, 또한 활발한 물질대사는 DNA 손상과 노화에 영향을 주는 활성 산소종 (reactive oxygen species)의 발생을 유도한다. 따라서 배아줄기세포의 물질대사 증가와 활성산소종의 발생으로 인한 돌연변이와 염색체의 손상이 유전적인 불안정성을 초래하여 기형종의 형성에 기여할 가능성도 있다. 이러한 연구는 염색체 불안정성의 원인을 규명하거나, 새로운 줄기세포의 특성 (stemness; self renewal과 pluripotency)에 핵심적인 역할을 하는 신규 유전자의 동정이나 암 억제 유전자의 동정에 기여할 것이다.

### 3. 줄기세포 연구에서 기형종 역할

hESC가 유전적 변형이 없이도 기형종을 형성하는 현상을 일부 연구자들은 종양 형성으로 보기 보다는 발생단계의 세포들이 부적합한 조직상의 위치 선정에 따른 정상 배아발생의 실패로 파악하기도 한다<sup>54</sup>. 이리 측면에서는 hESC의 종양(기형종)형성 능력이 초기 인간 배아발생 연구에 매우 효과적인 도구이다. 특히, 생체 내 초기 인간 배아 발생 연구가 원천적으로 불가능하고 인간과 마우스의 발생이 차이가 있는 상황에서 hESC는 가장 이상적인 인간 배아발생 연구의 유일한 대안이자, 다양한 발생단계-연관 질환의 모델이 될 수 있다.

#### (1) 정상 배발생 연구

초기 배발생은 세포의 증식, 분화와 이동으로 규정할 수 있다. 배아의 착상 후 진행되는 낭배기(Gastrulation) 단계에서 3배엽이 형성되며 기관 발생을 위한 세포들의 이동과 위치가 지정된다. 이러한 시기에 준하는 hESC 들은 주변의 신호에 반응하여 적절한 분화를 통한 조직 형성을 시도하는 것이 기형종으로 발달하는 것이다. 물론 생체내의 배발생은 시 공간 적으로 조율된 신호들과 신호들에 의해 발현되는 유전자들이 작용한 결과이지만, 이러한 과정을 생체에서 분석하기 어렵기 때문에, 초기 배발생을 시뮬레이션하는 모델이 필요한데, 기형종은 이런 측면에서 매우 적절한 대안이다. 비록 이식 줄기세포들은 시 공간 적으로 배발생 단계와 같은 환경에 노출되어 있지 않기 때문에 주변 조직과의 통합이 이루어 지지 않는 단점이 있으나, 초기 배발생의 모델로서의 기형종은 단계적인 조직의 발달과정과 그 과정에서 세포의 운명과 분화 양상과 같은 분자적인 기전에 대한 이해를 증진시킨다.

Gertow 등은 최초로 hESC 기원의 기형종을 다양한 표

지지를 활용하여 조직학적으로 분석하여 발생연구를 시도하였다.<sup>55</sup> 이 연구에서 저자들은 기형종의 주변 조직이 기형종이 보유하는 조직의 종류에 영향을 주는 것으로 인식하였다. 이러한 현상은 Lavon 등에 의해 심근 주변에 이식한 hESC로부터 형성된 기형종에서 간세포(hepatocyte) 유사세포의 발달로 지지를 받았고,<sup>56</sup> 이 결과들은 기형종이 정상 배아 발생에서 진행되는 과정과 비슷하게 발달됨을 시사한다.

iPS 세포의 이식후 기형종의 발달 과정에서 미분화 세포(Nanog, Oct4 발현)들이 기형종의 중심에 자리하고, 지속적으로 증식하면서 점차 바깥쪽으로 새로 증식하는 세포들에 의해 밀려가면서 종양의 신호로부터 멀어지는 농도구배가 세포/조직의 점진적 분화 정도에 영향을 주는 것으로 보인다.<sup>57</sup>

#### (2) 발생 관련 질환의 연구

Eiges 등은 최근 fragile X syndrome 을 보유한 배아로부터 hESC를 확립하여, FMR1의 silencing연구에 활용하고 있다.<sup>58</sup> 특히 이러한 연구는 마우스에서 동일 질환을 재현하는 것이 불가능한 경우 가장 이상적인 대안으로 다양한 발생단계에서의 특정 질환의 발병 연구에 활용할 수 있는 매우 소중한 자산이다. 배아줄기세포의 장기배양과정에서 물리적, 화학적 또는 생물학적인 원인으로 인해 돌연변이 또는 염색체 이상과 같은 세포의 유전적인 안정성이 훼손되는 경우들이 빈번하게 보고되고 있다. 그리고 이러한 이상을 갖는 세포들이 정상세포들에 비해 체외 환경에 더 잘 적응 하며 정상세포와 차별적인 마커들을 발현한다는 보고도 있다.

줄기세포에 염색체 이상을 유도한 다음 기형종의 발달을 통해 발생학적인 연구를 하는 것도 가능하다. 염색체 이상은 줄기세포의 분화능에 손상을 주어 3배엽의 발달 중 특정 계통의 발달에 영향을 줄 수 있음이 사람의 21번 염색체를 이식한 마우스 배아줄기세포에 의해 형성된 기형종에서 신경분화에 심각한 결함이 심각한 결함이 유도됨에 의해 밝혀진 바 있다.<sup>59</sup> 사람의 21번 염색체 trisomy에 의한 다운증후군에서 기형종 내의 신경 분화에 영향을 주며, 이러한 발달 장애가 환자의 정신지체, 뇌의 작은 크기, 적은 신경과 신경돌기의 숫자, 조기 유사 Alzheimer 신경퇴행등이 현상으로서의 발전 가능성을 제시하는 등 질환의 모델로 배아줄기세포 유래의 기형종을 활용하는 것이 가능하다. 다만, 이러한 접근은 환자의 배아에서 유래한 hESC 또는 환자의 성체 세포로부터 제작되는 iPSC를 이용하면 보다 효과적으로 분석이 가능할 것이다.

더불어, 기형종은 인간의 질병모델과 질병의 구조적인 기원을 추적하는 적절한 도구가 될 수 있고, 배발생 이상과 질병을 유도하거나 종양형성을 유도하는 다양한 독성인자들의 평가와 신약개발에 매우 유용한 도구이며,<sup>60</sup> 약제나 미세환

경에 의한 세포의 발달과 분화, 조직의 형성, 혈관 신생과 이동 등의 연구를 위한 효과적인 모델을 제공할 수 있다.

(3) 암 발생 및 치료 연구

대부분의 발암 및 치료의 연구를 위한 동물 모델은 사람의 종양세포주를 면역 결핍 마우스에 이식하는 이종간 이식을 활용하고 있다. 최근 들어 종양 주변의 기질세포들이 중요한 기여를 한다는 것이 밝혀지고 있으나, 이러한 동물 모델에서의 기질 (stroma)라고 통칭되는 혈관과 지지세포들이 종양의 성장, 이동, 전이 및 신생혈관 형성 등에 필수적인 미세환경을 제공하고 있음이 밝혀지면서 발암 연구와 종양의 치료를 위한 중요한 대상으로 부각되고 있다.<sup>61-63</sup> 그러나, 사용되는 동물모델이 제공하는 기질은 동물 유래이기 때문에, 사람의 종양과 기질간의 영향과 그에 따른 약제에 대한 저항성의 연구에 적합하지 않다. 이러한 측면에서 마우스에서 형성된 hESC 유래의 기형종을 종양의 이식 부위로 할 경우 사람의 정상 조직과 암발생의 연관성을 연구하는 도구로서 항암제와 혈관형성 억제제 등의 약제의 효과를 분석하기에 매우 유용하다. Tzukerman 등이 개발한 이러한 모델<sup>64</sup>은 발암과정에서 적절한 미세환경을 제공해 줄 뿐만 아니라, 이러한 미세환경과 종양의 상호작용, 전이와 신생혈관의 형성 기전, 약제에 대한 감수성 및 내성의 원인을 보다 인체에 가까운 상황에서 분석할 수 있다는 장점을 갖는다.

(4) 기형종과 조직공학

조직공학에서도 기형종은 매우 유용한 연구재료이다. 비록 특정 줄기세포를 in vitro에서 목표로 하는 세포로의 분화가 가능해 졌지만, 이들 세포들로 하여금 조직과 같이 다양한 세포로 구성되어 있고, 보다 고차원의 구조를 갖는 기능적 조직으로의 발달을 유도하도록 조절하기는 어렵다. 3차원 담체 (scaffold)의 개발은 종래의 2차원 배양에서는 불가능한 주위세포들과의 상호작용과 세포들간의 공간배치가 가능하도록 하여 세포 활성화에 매우 큰 영향을 주고 있다.<sup>65</sup> 기형종은 세포의 분화와 조직의 형성에 필요한 생체의 미세환경을 적절하게 모방하고 있기 때문에 이러한 구조의 연구를 진행하면 세포의 분화와 기능에 필요한 3차원 구조에 대한 정보를 확보할 수 있다. 특히 생체조직은 하나의 세포로 구성되어 있지 않고, 혈관, 기질세포 및 기능성 분화세포와 세포의 기질 단백질 등과 같은 다양한 구성요소들의 복합체이기 때문에 단일 성분으로 구성된 담체 보다는 다양한 기질과 세포들이 배치될 수 있는 환경을 가진 복합 구조의 담체 개발이 필요하다. 기형종의 연구로부터 확보되는 다양한 세포와 기질들의 구조에 대한 정보를 바탕으로 보다 생체와 가까운 기능적 조직과 구조를 통해 이식세포의 형태형성(morphogenesis)과 생착 및 기능의 개선을 달성할 수 있다.

이외에도 기형종은 배아체와 마찬가지로 분화의 특정 단

계에 있는 세포의 원천으로서의 가치가 있다. 형성된 기형종으로부터 특정 조직세포에 대한 항체를 이용하여 목표로 하는 세포의 순수 분리가 가능하며, 이러한 세포들은 체외 배양에 의해 만들어진 분화세포들 보다 더 체내에 존재하는 생리학적으로 적절하게 분화되어 있기 때문에, 세포치료제의 세포공급원으로 활용하는 것이 가능하다. 다만, 이를 위해서는 기형종의 형성 과정에서 이종세포, 단백질이 무해함과, 바이러스를 포함한 잠재적인 병원성 입자에 의한 오염의 가능성의 배제가 반드시 선결되어야 한다.

4. 전분화능 줄기세포 이용에서 기형종의 유발을 막기 위한 노력

인간배아줄기세포가 발휘하는 전분화능의 한 형태인 기형종은 양면의 칼과 같아서, hESC의 임상적인 활용에 있어서는 심각한 문제를 제기한다. hESC가 세포치료제의 좋은 세포공급원인 반면에 이식 후 기형종의 형성 위험성이 상존한다. iPSC세포의 출현에도 불구하고, 현 상황에서는 자가 hESC에 준하는 면역적합성 (immune-compatible) 세포가 없기 때문에 이식 후 면역거부반응이나 강렬한 이상 면역 반응을 유도 할 수도 있다. 그 중, 면역 적합성은 유전적으로 다양한 배아줄기세포의 구축, 핵치환 줄기세포의 제작, iPSC의 제작, 단성생식에 의한 배아줄기세포 구축 등 여러가지 방법으로 해결이 모색되고 있다.

그러나, 기형종에 대한 우려는 여전히 현 상황이다. 배아줄기세포를 미분화 상태로 실험 동물에 이식했을 때 Parkinson 질환, 당뇨병과 같은 퇴행성 질환의 개선이 확인된 바 있다.<sup>66-71</sup> 그러나, 이러한 미분화 배아줄기세포 또는 배아줄기세포를 체외에서 특정 세포로 분화시킨 단계의 이식이 이상 조직의 발생이나 기형종을 형성할 수 있음이 이미 보고된 바 있기 때문에,<sup>26,72</sup> 배아줄기세포 유래의 분화세포를 임상적으로 활용하기 위해서는 분화 세포 중에 잔존하는 미분화세포의 제거가 필수적이며 이를 위해 다양한 방식으로 질병 치료를 위해 제작한 특정 분화 세포내에 존재하는 기형종을 형성할 수 있는 미분화 줄기세포를 제거하기 위한 노력이 경주되고 있다.<sup>38,73-74</sup>

(1) 효율적 분화 유도에 의한 순수세포의 제작

가장 이상적인 방식은 효율적인 목표 세포로의 분화를 통한 미분화세포의 제거이다. 분화된 세포들은 전분화능을 상실했기 때문에 기형종을 형성할 능력도 없으며, 생체내에서도 매우 제한된 계통으로만 분화나 발달이 가능하기 때문에 안전성을 확보할 수 있다. 그러나 아직, 어떤 연구자도 100% 순수한 목표세포의 제작은 달성하지 못하고 있으며, 목표 세포로의 분화는 이식과 생착효율의 감소와 반비례한다. 즉 치료의 대상인 목표세포 (최종 분화세포) 로의 성공적인 분화가 이식세포의 정상적인 생착과 기능

을 담보하지 못한다. 이를 보완하기 위해 생착능이 좋은 전구세포로의 분화 유도과 미분화세포의 제거 방식이 개발되고 있다.

(2) 항체나 마커에 의한 미분화세포의 제거 또는 분화세포의 선별

가장 대표적으로 항체를 이용한 미분화세포의 제거 또는 분화세포의 선별이다. hESC는 globo-series의 당지질인 SSEA-3,4와 keratin sulfate 관련 항원인 TRA-1-60 and TRA-1-81을 발현하며 분화가 진행되면서 이들 항원의 발현이 크게 감소하기 때문에,<sup>75</sup> SSEA-4와 같은 세포표면 항원이 가장 이상적인 미분화세포의 제거를 위한 목표가 된다. 실제로, 원숭이 ESC에서 유래한 조혈줄기세포의 원숭이 이식 실험에서 이러한 방식이 기형종의 형성을 억제함이 보고된 바 있다.<sup>34</sup> hESC 단계에서 발현되는 PODXL에 대한 항체 (mAb84)가 미분화세포의 세포독살을 유도하여 위험성을 감소함이 보고된 바 있다.<sup>76</sup> 문제는 분화세포의 계통에 따라 일부 항원들은 미분화세포 뿐만 아니라 분화세포에도 발현되기 때문에, 대상이 되는 세포군에 의해 사용할 수 있는 항체들이 제한 될 것이다. 하나의 항체만을 이용했을 때 완전히 제거되지 못한 미분화 세포의 제거를 위해 둘 이상의 항체를 단계적으로 활용하는 방법도 개발 중에 있다. 다음으로는 미분화세포 또는 분화세포에 특정유전자를 도입하여 세포의 분리 또는 제거에 활용하는 방안이다. 대표적으로 신경세포에서 발현되는 유전자들의 promoter에 의해 표지 유전자를 발현하도록 유도하여 세포를 선별하려는 시도들이 있다.<sup>73</sup>

(3) 약제에 의한 미분화세포의 사멸 유도

Ceramide 계열의 약제인 N-oleoyl serinol (S18)은 prostate apoptosis response-4 (PAR-4)라는 미분화 ESC에 선택적인 세포독살 효과를 보이기 때문에 분화세포에 포함되어 있을 가능성이 있는 미분화세포의 제거에 효과적인 것으로 보고되었다.<sup>77</sup> 다만, 이 약제의 효능을 매개하는 단백질의 발현이 ESC에 국한 되어있는지는 확인이 필요하며, 동물 실험을 통한 미분화세포의 제거 효과 및 기형종 부정시험의 선행이 필요하다.

Mitochondria의 대사활성이 높은 경우 과발생하는 ROS가 염색체 불안정성을 높인다는 특성은 mitochondria 활성의 차이를 이용하여 미분화줄기세포 (배아줄기세포)와 암줄기세포 (cancer stem cells)를 목표로 하는 약제나 제거/선별 방식의 가능성을 제시한다. 이 이외에도 배아줄기세포에 thymidine kinase와 같이 drug-sensitive 자살 유전자를 Oct-4의 promoter에 의해 조절되도록 하여 분화 세포 중에 잔존하는 미분화 세포들을 drug으로 선택적으로 세포독살시키는 유전자 변형과 같은 시도도 진행되고 있다.<sup>78</sup> 예를 들어, GFP 유전자 TH promoter에 의해 조절되도록 하여, 도파민 신경세포 단계에서 유세포 분석으로 손쉽게 분화세포

만을 순수분리 할 수 있으나,<sup>79</sup> 현실적인 면에서 외래유전자 도입이라는 방식은 유전적인 위험성 때문에 임상적인 진전으로 연결되기는 어려울 것이다.

## 5. 동물모델에서의 기형종 부정시험이 안전성을 보장하는가?

Zhang 등은 면역억제제를 처리한 newborn 마우스에 hESC 유래의 신경전구세포의 이식을 한 경우 intracerebroventricular region 뇌에서 hESC유래 신경세포들이 마우스의 신경세포들과 구조적·생리적으로 정상적인 발달을 통해 공존하며 기형종의 형성이 되지 않았음을 보고한 바 있다.<sup>80</sup> 또한, Erdö 등은 미분화 상태의 mESC를 허혈성 뇌손상이 있는 rat의 뇌에 이식한 이종간 이식 모델에서 세포의 이동과 신경 분화 및 조직 복구에 효과를 보였으며 기형종의 형성이 거의 없음을 보고하였다.<sup>29</sup> 반면에, 동일한 mESC를 동종 마우스의 뇌에 이식한 경우 예외 없이 이식부위에 심각한 기형종이 형성되었다. 이 결과는 이종간의 이식이라는 조건이 종양의 발생을 억제하였음을 의미한다. 그렇다면, hESC 또는 hESC 유래의 세포를 이식한 면역 결핍 마우스에서 기형종이 생기지 않았다는 결과가 이 세포치료제의 안전성을 담보하는가?

hESC 유래의 세포치료제를 이식받을 사람의 조직에 비해 동물의 조직은 상대적으로 덜 우호적이며, 이식세포와 혈관 및 주변 조직세포들 간의 상호작용(interaction)도 비효율적일 것이다. 특히, 기형종을 형성할 능력이 있는 이식세포들이 호의적이지 못한 환경에서는 단순히 섬유아세포와 같은 연결조직으로 변성될 될 가능성도 배제할 수 없기 때문에, 적절한 모델을 이용한 안전성의 확인이 필수적이다. 이러한 측면에서는 Shih 등에 의해 시도된 바와 같이, 면역결핍 scid 마우스에 미리 사람의 조직을 이식한 다음 hESC 또는 hESC 유래의 분화세포를 이식하여 기형종 형성을 판별하는 것이 하나의 방법일 수 있다.<sup>35</sup>

보다 이상적인 모델은 원숭이와 같은 대형 동물에서의 자가 혹은 타가 배아줄기세포를 이용한 안전성 시험이다. 문제는 적절한 배아줄기세포의 확보 뿐만 아니라, 배아줄기세포로부터 특정 분화세포를 제작하는 조건의 탐색과, 이식에 필요한 세포의 수, 이식 후 기형종과 같은 종양 발생을 검증하기에 필요한 최소한의 기간 등과 같은 정보의 확보에 상당한 시일이 소요된다는 것이다.

## 6. 전분화능, 기형종 그리고 향후 전망

비록 최근에 미국의 FDA가 Geron사의 hESC 유래의 oligodendrocyte 전구세포를 중추신경 손상 환자를 대상으로 소규모 임상시험을 승인하였고, 동물모델에서의 안전성

문제로 인해 현재 이 실험이 일시 중단 상태에 있으나, 세포치료제로서의 hESC의 정착을 위해서는 다음의 몇가지 장애를 해결해야 한다. 그 하나가 면역 거부 반응이고 다른 하나는 기형종과 종양 형성의 위험성이다. 최근 Dighe 등이 시도하는 단성생식에 의한 줄기세포의 제작<sup>8,1</sup>과 Takahashi 등과 Yu 등에 의한 성체세포의 역분화에 의한 iPSC의 제작으로<sup>18-19</sup> 면역거부에 대해서는 문제 해결에 큰 진전을 이루었으며, 이로 인해 기형종의 형성 문제가 가장 큰 이슈가 되고 있다. 면역결핍 마우스에 전분화능 줄기세포를 이식하면 형성되는 다양한 조직으로 구성된 기형종이 줄기세포의 전분화능의 중요한 증거이기 때문에<sup>4</sup> 기형종의 조직학적인 연구는 많은 편이지만, 기형종 자체의 연구가 미진한 탓에 이식세포의 행동, 주변과의 상호작용, 발달과정의 이해와 같은 정보가 부족하다. 기형종이 갖는 발생학적, 병리학적, 조직공학적 특성은 치료용 세포들이 주변 조직에 효과적으로 통합하기 위한 필수적인 정보를 제공하기 때문에, 줄기세포를 이용한 조직공학 및 재생의학 연구에 큰 기여를 할 것이다.

화학적, 물리적, 조직손상이나 퇴행성 질환으로 인해 결함있는 조직의 세포를 대체할 적절한 자원으로 활용하는 재생의학에서 미분화세포의 이식에 의한 기형종의 형성이 취약점인 것은 분명하다. 미분화세포의 선별적 제거나 분화세포의 효율적 농축과 같은 접근이나, 기형종 형성 가능성이 없는 전분화능 세포의 활용은 재생의학의 새로운 돌파구가 될 수 있다. 이러한 측면에서 hESC와 hEGC와의 비교 분석이 이식되는 기형종을 형성할 수 있는 줄기세포의 생체내에서의 행동을 이해하고, 기형종의 발달과 제거에 대한 정보를 제공할 것으로 기대한다. 이식 후 단기간에 발생하는 기형종 외에도, 이식세포들이 장기간에 걸쳐 목표로 하는 세포나 조직이 아닌 이식 부위와 무관한 별개의 세포/조직으로의 발달 가능성도 있기 때문에 향후의 임상시험은 발생 가능한 모든 부작용에 대한 준비도 필요할 것이다. 끝으로, 현재의 모든 모델, 기술 및 정보를 활용한다 해도 사람을 대상으로 한 hESC 기반의 세포치료제에 의한 기형종에 대한 안전성을 담보하지 못한다는 것을 기억해야 한다. iPSC 세포와 연관 신기술에 의한 바이러스나 유전자 변형이 없는 환자 맞춤형 줄기세포의 등장도 현실적인 가능성으로 되고 있는 시점에서 재생의학의 진전을 위해서는 hESC에 의한 기형종의 형성 문제를 해결하기 위한 시급한 노력이 필요하다.

### 감사의 글

본 총설은 교육과학기술부 21세기프런티어 연구개발사업인 세포응용연구사업단의 연구비 지원 (SC2130)에 의해 수행되었습니다.

### References

1. JA Thomson, J Itskovitz-Eldor, SS Shapiro, *et al.*, Embryonic stem cell lines derived from human blastocyst, *Science*, **282**, 1145 (1998).
2. AG Smith, Embryo-derived stem cells: of mice and men, *Ann Rev Cell Dev Biol*, **17**, 435 (2001).
3. J Itskovitz-Eldor, M Schuldiner, D Karsenti, *et al.*, Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers, *Mol Med*, **6**, 88 (2000).
4. SA Przyborski, Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice, *Stem Cells*, **23**, 1242 (2005).
5. MW Lensch, TM Schlaeger, LI Zon, *et al.*, Teratoma formation assays with human embryonic stem cells: a rationale for one type of human-animal chimera, *Cell Stem Cell*, **1**, 253 (2007).
6. TP Zwaka, JA Thomson, A germ cell origin of embryonic stem cells?, *Development*, **132**, 227 (2005).
7. MJ Evans, MH Kaufman, Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, **292**, 154 (1981).
8. LH Looijenga, AJ Gillis, HJ Stoop, *et al.*, Chromosomes and expression in human testicular germ-cell tumors: insight into their cell of origin and pathogenesis, *Ann N Y Acad Sci*, **1120**, 187 (2007).
9. JW Oosterhuis, LH Looijenga, J van Echten, *et al.*, Chromosomal constitution and developmental potential of human germ cell tumors and teratomas, *Cancer Genet Cytogenet*, **95**, 96 (1997).
10. PW Andrews, From teratocarcinomas to embryonic stem cells, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **357**, 405 (2002).
11. SK Oh, HS Kim, HJ Ahn, *et al.*, Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3, *Stem Cells*, **23**, 211 (2005).
12. N Heins, MC Englund, C Sjöblom, *et al.*, Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells, *Stem Cells*, **22**, 367 (2004).
13. M Aleckovic, C Simón, Is teratoma formation in stem cell research a characterization tool or a window to developmental biology?, *Reprod Biomed Online*, **17**, 270 (2008).
14. M Mikkola, C Olsson, J Paldi, *et al.*, Distinct differentiation characteristics of individual human embryonic stem cell lines, *BMC Dev Biol*, **6**, 40 (2006).
15. Y Liu, S Shin, X Zeng, *et al.*, Genome wide profiling of human embryonic stem cells (hESCs), their derivatives and embryonal carcinoma cells to develop base profiles of U.S. Federal government approved hESC lines, *BMC Dev Biol*, **6**, 20 (2006).
16. O Adewumi, B Aflatoonian, L Ahrlund-Richter, *et al.*, Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative, *Nature Biotech*, **25**, 803 (2007).
17. K Osafune, L Caron, M Borowiak, *et al.*, Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines, *Nature Biotech*, **26**, 313 (2008).
18. K Takahashi, K Tanabe, M Ohnuki, *et al.*, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell*, **131**, 861 (2007).
19. J Yu, MA Vodyanik, K Smuga-Otto, *et al.*, Induced pluripotent



- stem cell lines derived from human somatic cells, *Science*, **318**, 1917 (2007).
20. K Okita, M Nakagawa, H Hyenjong, *et al.*, Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors, *Science*, **322**, 949 (2008).
  21. K Woltjen, IP Michael, P Mohseni, *et al.*, piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells, *Nature*, **458**, 766 (2009).
  22. D Kim, CH Kim, JI Moon, *et al.*, Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins, *Cell Stem Cell*, **4**, 472 (2009).
  23. J Nussbaum, E Minami, MA Laflamme, *et al.*, Transplantation of undifferentiated murine embryonic stem cells in the heart: teratoma formation and immune response, *FASEB J*, **21**, 1345 (2007).
  24. A Brederlau, AS Correia, SV Anisimov, *et al.*, Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of in vitro differentiation on graft survival and teratoma formation, *Stem Cells*, **24**, 1433 (2006).
  25. A Lee, C Tang, F Cao, *et al.*, Effects of cell number on teratoma formation by human embryonic stem cells, *Cell Cycle*, **8**, 2607 (2009).
  26. T Fujikawa, SH Oh, L Pi, *et al.*, Teratoma formation leads to failure of treatment for type I diabetes using embryonic stem cell-derived insulin-producing cells, *Am J Pathol*, **166**, 1781 (2005).
  27. KE van der Bogt, RJ Swijnenburg, F Cao, *et al.*, Molecular imaging of human embryonic stem cells: keeping an eye on differentiation, tumorigenicity and immunogenicity., *Cell Cycle*, **5**, 2748 (2006).
  28. K Miura, Y Okada, T Aoi, *et al.*, Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nature Biotech*, **27**, 743 (2009).
  29. F Erdö, C Bührle, J Blunk, *et al.*, Host-dependent tumorigenesis of embryonic stem cell transplantation in experimental stroke, *J Cereb Blood Flow Metab*, **23**, 780 (2003).
  30. AS Srivastava, S Shenouda, R Mishra, *et al.*, Transplanted embryonic stem cells successfully survive, proliferate, and migrate to damaged regions of the mouse brain, *Stem Cells*, **24**, 1689 (2006).
  31. M Drukker, H Katchman, G Katz, *et al.*, Human embryonic stem cells and their differentiated derivatives are less susceptible to immune rejection than adult cells, *Stem Cells*, **24**, 221 (2006).
  32. X Tian, PS Woll, JK Morris, *et al.*, Hematopoietic engraftment of human embryonic stem cell-derived cells is regulated by recipient innate immunity, *Stem Cells*, **24**, 1370 (2006).
  33. R Dressel, J Schindehütte, T Kuhlmann, *et al.*, The tumorigenicity of mouse embryonic stem cells and in vitro differentiated neuronal cells is controlled by the recipients' immune response, *PLoS One*, **3**, e2622 (2008).
  34. H Shibata, N Ageyama, Y Tanaka, *et al.*, Improved safety of hematopoietic transplantation with monkey embryonic stem cells in the allogeneic setting, *Stem Cells*, **24**, 1450 (2006).
  35. CC Shih, SJ Forman, P Chu, *et al.*, Human embryonic stem cells are prone to generate primitive, undifferentiated tumors in engrafted human fetal tissues in severe combined immunodeficient mice, *Sem Cells Dev*, **16**, 893 (2007).
  36. B Blum, N Benvenisty, The tumorigenicity of human embryonic stem cells, *Adv Cancer Res*, **100**, 133 (2008).
  37. TA Prokhorova, LM Harkness, U Frandsen, *et al.*, Teratoma Formation by Human Embryonic Stem Cells is site-dependent and enhanced by the presence of Matrigel, *Stem Cells Dev*, **18**, 47 (2008).
  38. MJ Cooke, M Stojkovic, SA Przyborski, Growth of teratomas derived from human pluripotent stem cells is influenced by the graft site, *Stem Cells Dev*, **15**, 254 (2006).
  39. DJ Deacon T, Costantini LC, Ratliff J, Isacson O., Blastula-stage stem cells can differentiate into dopaminergic and serotonergic neurons after transplantation, *Exp Neurol*, **149**, 28 (1998).
  40. B Blum, N Benvenisty, Clonal analysis of human embryonic stem cell differentiation into teratomas, *Stem Cells*, **25**, 1924 (2007).
  41. S Wakitani, K Takaoka, T Hattori, *et al.*, Embryonic stem cells injected into the mouse knee joint form teratomas and subsequently destroy the joint, *Rheumatol*, **42**, 162 (2003).
  42. A Tomescot, J Leschik, V Bellamy, *et al.*, Differentiation in vivo of cardiac committed human embryonic stem cells in postmyocardial infarcted rats, *Stem Cells*, **25**, 2200 (2007).
  43. AR Muotri, K Nakashima, N Toni, *et al.*, Development of functional human embryonic stem cell-derived neurons in mouse brain, *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 18644 (2005).
  44. MP Imreh, K Gertow, J Cedervall, *et al.*, In vitro culture conditions favoring selection of chromosomal abnormalities in human ES cells, *J Cell Biochem*, **99**, 508 (2006).
  45. JS Draper, K Smith, P Gokhale, *et al.*, Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells, **22**, (2004).
  46. DE Baker, NJ Harrison, E Maltby, *et al.*, Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo, *Nature Biotech*, **25**, 207 (2007).
  47. C Spits, I Mateizel, M Geens, *et al.*, Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells, *Nature Biotech*, **26**, 1361 (2008).
  48. A Maitra, DE Arking, N Shivapurkar, *et al.*, Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells, *Nature Genet*, **37**, 1099 (2005).
  49. AT Clark, RT Rodriguez, MS Bodnar, *et al.*, Human STELLAR, NANOG, and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma, *Stem Cells*, **22**, 169 (2004).
  50. TD Jones, TM Ulbright, JN Eble, *et al.*, OCT4 staining in testicular tumors: a sensitive and specific marker for seminoma and embryonal carcinoma, *Am J Surg Pathol*, **28**, 935 (2004).
  51. SM Schieke, M Ma, L Cao, *et al.*, Mitochondrial metabolism modulates differentiation and teratoma formation capacity in mouse embryonic stem cells, *J Biol Chem*, **283**, 28506 (2008).
  52. CL Limoli, E Giedzinski, Induction of chromosomal instability by chronic oxidative stress, *Neoplasia*, **5**, 339 (2003).
  53. MG Vander Heiden, LC Cantley, TC B, Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation., *Science*, **324**, 1029 (2009).
  54. MW Lensch, TA Ince, The terminology of teratocarcinomas and teratomas, *Nature Biotech*, **25**, 1211 (2007).
  55. K Gertow, S Wolbank, B Rozell, *et al.*, Organized development from human embryonic stem cells after injection into

- immunodeficient mice, *Stem Cells Dev*, **13**, 421 (2004).
56. N Lavon, O Yanuka, N Benvenisty, Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells, *Differentiation*, **72**, 230 (2004).
  57. M Wernig, A Meissner, R Foreman, *et al.*, In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state, *Nature*, **448**, 318 (2007).
  58. R Eiges, A Urbach, M Malcov, *et al.*, Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos, *Cell Stem Cell*, **1**, 568 (2007).
  59. A Mensah, C Mulligan, J Linehan, *et al.*, An additional human chromosome 21 causes suppression of neural fate of pluripotent mouse embryonic stem cells in a teratoma model, *BMC Dev Biol*, **7**, 131 (2007).
  60. P Menendez, C Bueno, L Wang, Human embryonic stem cells: A journey beyond cell replacement therapies, *Cytotherapy*, **8**, 530 (2006).
  61. ID Davis, J Desai, Clinical use of therapies targeting tumor vasculature and stroma, *Curr Cancer Drug Targets*, **8**, 498 (2008).
  62. F Ahmed, JC Steele, HJ M, *et al.*, Tumor stroma as a target in cancer, *Curr Cancer Drug Targets*, **8**, 447 (2008).
  63. H Kiaris, G Trimis, AG Papavassiliou, Regulation of tumor-stromal fibroblast interactions: implications in anticancer therapy, *Curr Med Chem*, **15**, 3062 (2008).
  64. M Tzukerman, T Rosenberg, I Reiter, *et al.*, The influence of a human embryonic stem cell-derived microenvironment on targeting of human solid tumor xenografts, *Cancer Res*, **66**, 3792 (2006).
  65. S Levenberg, NF Huang, E Lavik, *et al.*, Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds, *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**, 12741 (2003).
  66. LM Bjorklund, RC Sánchez-Pernaute, S, T Andersson, *et al.*, Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model, *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 2344 (2002).
  67. JH Kim, JM Auerbach, JA Rodríguez-Gómez, *et al.*, Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease, *Nature*, **418**, 50 (2002).
  68. T Barberi, P Klivenyi, NY Calingasan, *et al.*, Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice, *Nature Biotech*, **21**, 1200 (2003).
  69. T Ben-Hur, M Idelson, H Khaner, *et al.*, Transplantation of human embryonic stem cell-derived neural progenitors improves behavioral deficit in Parkinsonian rats, *Stem Cells*, **22**, 1246 (2004).
  70. JH Shim, SE Kim, DH Woo, *et al.*, Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate, *Diabetologia*, **50**, 1228 (2007).
  71. MS Cho, YE Lee, JY Kim, *et al.*, Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells, *Proc Natl Acad Sci USA*, **105**, 3392 (105).
  72. S Arnhold, H Klein, I Semkova, *et al.*, Neurally selected embryonic stem cells induce tumor formation after long-term survival following engraftment into the subretinal space, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **45**, 4251 (2004).
  73. S Chung, BS Shin, E Hedlund, *et al.*, Genetic selection of sox1GFP-expressing neural precursors removes residual tumorigenic pluripotent stem cells and attenuates tumor formation after transplantation., *J Neurochem*, **97**, 1467 (2006).
  74. H Hentze, R Graichen, A Colman, Cell therapy and the safety of embryonic stem cell-derived grafts, *Trends Biotech*, **25**, 24 (2007).
  75. J Pruszak, KC Sonntag, MH Aung, *et al.*, Markers and methods for cell sorting of human embryonic stem cell-derived neural cell populations, *Stem Cells*, **25**, 2257 (2007).
  76. AB Choo, HL Tan, SN Ang, *et al.*, Selection against undifferentiated human embryonic stem cells by a cytotoxic antibody recognizing podocalyxin-like protein-1, *Stem Cells*, **26**, 1454 (2008).
  77. E Bieberich, J Silva, G Wang, *et al.*, Selective apoptosis of pluripotent mouse and human stem cells by novel ceramide analogues prevents teratoma formation and enriches for neural precursors in ES cell-derived neural transplants, *J Cell Biol*, **167**, 723 (2004).
  78. A Hara, H Aoki, A Taguchi, *et al.*, Neuron-like differentiation and selective ablation of undifferentiated embryonic stem cells containing suicide gene with Oct-4 promoter, *Stem Cells Dev*, **17**, 619 (2008).
  79. E Hedlund, J Pruszak, A Ferree, *et al.*, Selection of embryonic stem cell-derived enhanced green fluorescent protein-positive dopamine neurons using the tyrosine hydroxylase promoter is confounded by reporter gene expression in immature cell populations, *Stem Cells*, **25**, 1126 (2007).
  80. SC Zhang, M Wernig, ID Duncan, *et al.*, In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells, *Nature Biotech*, **19**, 1129 (2001).
  81. V Dighe, L Clepper, D Pedersen, *et al.*, Heterozygous embryonic stem cell lines derived from nonhuman primate parthenotes, *Stem Cells*, **26**, 756 (2008).