

유전성 대사 질환 동물 모델에서의 줄기 세포 치료

최동호¹, 이동환², 정성철³

순천향대학교 의과대학 외과학교실¹, 소아과학교실², 이화여자대학교 의과대학 생화학교실³

≡ Abstract ≡

Stem cell therapy in animal models of inherited metabolic diseases

Dongho Choi¹, M.D., Dong Hwan Lee², M.D., and Sung-Chul Jung³, M.D.

Department of ¹Surgery, ²Pediatrics, College of Medicine, Soonchunhyang University, ³Department of Biochemistry, College of Medicine, Ewha Womens University. Seoul, Korea

Orthotopic liver transplantation is the treatment of choice for inherited metabolic diseases. However, the supply of donor organs is limiting and therefore many patients cannot benefit from this therapy. In contrast, hepatocytes can be isolated from a single donor liver. They can be transplanted into several recipients, and this procedure may help overcome the shortage of donor livers.

A great deal of work with animal models indicates that hepatocytes transplanted into the liver or spleen can survive, function, and participate in the normal regenerative process. Recent clinical studies suggest that hepatocyte transplantation may be useful for bridging patients to whole organ transplantation and for providing metabolic support during liver failure and for replacing whole organ transplantation in certain inherited metabolic diseases. Nowadays, hepatocytes from various stem cells have been regarded as another cell source for treatment of inherited metabolic diseases. Although cell therapy using stem cells for inherited metabolic disease patient has been accepted only as an experimental trial yet, hepatocytes from stem cells can solve a lot of obstacles in the treatment of inherited metabolic diseases.

Key Words: Stem cell, hepatocyte transplantation, inherited metabolic diseases

서론

유전성 대사 질환 중 일부의 경우에는 식이요법이나 대중적인 치료로서 유지가 되는 것으로 알려져 있지만 완치를 기대할 수 있는 유일한 치료법은 현재로서는 생체나 뇌사자에서 얻은 간을 이용한 간이식이다. 하지만 간이식은 공여간의 부족, 장기간의 면역 억제제의 복용, 심한 수술 합병증으로 인해서 유전성 대사 질환 환자에서 상당히 제한적으로 시행되고 있다. 최근에는 생체 간이식 및 분할 간이식 등의 술기가 개발이 되어 공여자의 부족 문제를 상당히 많이 해소를 하였으나 간이식을 받기 위해서 기다리는 환자들의 수와 공여자의 수 간의 차이를 줄이지 못하고 있는 실정이고 수술 술기의 발전으로 수술 후의 사망률이나 합병증의 빈도가 현저히 감소하였음에도 아직도 광범위한 환자에서 쉽게 시행할 수 있는 술기는 아닌 것으로 받아들여지고 있다. 유전성 대사 질환의 치료에 있어서 간이식을 보완내지는 대체할 수 있는 방법들이 연구되고 있는데 간세포 이식 및 유전자 치료가 현재 연구되어지는 대표적인 방법이다. 저자들은 유전성 대사 질환에서의 간세포 이식의 현황에 대해서 알아보고 최근에 관심의 대상이 되고 있는 줄기 세포를 이용한 유전성 대사 질환 치료의 가능성에 대해서 알아보하고자 하였다.

유전성 대사 질환에서의 간세포 이식

간에는 여러 종류의 세포가 존재하는 데 간실질 세포라고 할 수 있는 간세포(hepatocytes), 담관 세포(bile duct cells), 그 외에 혈관 내피 세포(endothelial cells), stellate cells, Kupffer

cells 등이 존재하고 있다. 이중에 간세포가 차지하고 있는 비율은 60%정도로 이론적으로는 이러한 간실질 세포만을 이식하면 간 전체를 이식하는 것에 비해서 여러 가지 장점이 있을 것으로 생각되어졌다. 일단 간세포 이식은 몇 가지 단점도 있지만 쉽고 큰 수술을 시행하지 않고 도관을 간문맥 등에 삽입하여 간세포를 주입할 수 있고 기존의 간을 제거하지 않고 이식을 하기 때문에 좀 더 안전하게 시술할 수 있고 여러 번 시행을 할 수 있는 장점이 있기 때문에 유전성 대사 질환에서 가능한 치료법으로 인식되어져 왔다.

간세포 이식의 시작은 1969년 Berry와 Friend에 의해서 간세포의 분리가 가능해지면서부터이다¹⁾. Rugstad는 1970년에 선천적으로 uridine diphosphate glucuronyl-transferase가 없어서 혈청 내에 빌리루빈치가 높은 백서에서 간암세포를 피하에 이식하여 증상의 호전을 보았다는 결과를 보고하였다²⁾. 또 한편으로는 1982년에 Kusano와 Mito가³⁾ 간세포를 비장에 이식하여 이식된 간세포가 비장 조직 내에서 16개월 이상 생존하고 증식하면서 기능을 가진 간 조직과 유사한 구조를 만드는 것을 확인한 후부터 많은 연구자들이 간세포 이식에 대한 관심이 많아지고 간기능 부전을 이러한 간세포 이식으로 치유하고자 하는 노력들을 하고 있다.

간세포 이식의 유전성 대사 질환에서의 동물 실험 및 임상 적용

유전성 대사 질환에 대한 간세포 이식의 역할은 유전적으로 조작된 다양한 인공 동물 모델들을 통해서 확인되었다. 즉, 저밀도지방단백질 수용체(LDLR)의 결핍으로 인해 고지혈증이 발생

하는 Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit (WHHR),⁴⁾ uridine diphosphate glucuronyl transferase⁵⁾가 없어서 혈청 내 빌리루빈치가 높은 Gunn rat, 알부민을 생성 못하는 Nagase analbuminemic rat⁶⁾, Wilson 병과 유사한 구리 독성을 나타내는 Long-Evans cinnamon (LEC) rat⁷⁾이 선천성 대사 이상의 동물 모델로 유용하게 이용되었다.

현재까지 유전성 대사 질환에 대한 간세포 이식은 대부분의 유전성 대사 질환에서 시도가 될 수가 있으나(Table 1) 실제 임상에서 간세포 이식을 시행하여 발표한 예(Table 2)는 5예 밖에 되질 않는데, ornithine transcarbamoylase(OTC) 결핍증⁸⁾, alpha-1 antitrypsin(AAT)결핍증⁹⁻¹⁰⁾, Crigler-Najjar 증후군 제 1형¹¹⁾, glycogen storage disease Ia¹²⁾, Refsum disease¹³⁾으로 이중 OTC 결핍증 환자는 임상적 호전을 보였으나 이식 42일 만에 폐렴으로 사망하였다. AAT 결핍증 환자의 경우에는 간세포 이식 4일 만에 간 이식을 받아서 그 효과를 파악하기가 곤란하였다. 1998년 Fox 등¹¹⁾이 보고한 Crigler-Najjar 증후군 환자가 현재까지 시도된 간세포 이식 중

가장 좋은 성적 중에 하나인데 7.5x10⁹개의 사람 간세포를 간문맥을 통해서 주입하여 혈중 빌리루빈 수치의 감소, 담즙내 포함빌리루빈의 증가와 함께 18개월 이상의 장기 생존을 보고하였다.

유전성대사질환에서의 간세포이식의 문제점

첫째 이식할 간세포의 확보가 어렵다. 이중 간세포를 이용한 간세포 이식은 심한 거부 반응으로 인해서 이용이 곤란하고 사람의 간세포는 공여 간으로서 확보에 어려움이 있다.

둘째 이식된 간세포가 완전히 분화된 세포이기 때문에 장기간 세포 생존이 불가하여 지속적인 간기능의 유지가 어려운 점이 있다.

간세포 이식의 미래

이러한 문제점에도 불구하고 간세포 이식에 대한 연구가 지속되는 것은 무한한 가능성 때문이다. 만약에 인간의 간세포가 손쉽게 냉동 저장이 가능하게 된다면 간세포 이식 시에 한사람의 공여자로부터 여러 사람이 시간 간격을 두고 시술

Table 1. 유전성 대사질환에서 간세포이식의 적응증

급성 간질환	간실질 보존질환
alpha 1-antitrypsin deficiency	Crigler-Najjar syndrome type 1
Erythropoietic protoporphyria	Familial hypercholesterolemia
Lipidoses	Urea cycle disorders
Gaucher disease	Glycogen storage diseases
Niemann-Pick disease	Peroxisomal biogenesis disorder
Tyrosinemia type 1	Coagulation defects(Factor VIII or IX deficiency)
Wilson disease	Progressive familial intrahepatic cholestasis(I, II, III)
	Bile acid synthesis disorders
	Hemochromatosis
	Oxalosis

Table 2. 유전성 대사질환에서의 간세포이식의 현황
 AT, antitrypsin deficiency, BAEP, brainstem auditory evoked potential
 VEP, visual evoked potential

	Strom et al.(1997)	Strom et al.(1997)	Fox et al.(1998)	Strom et al.(1999)	Horslen et al.(2003)	Muraca et al.(2002)	Sokal et al.(2003)
질환	α 1-AT	α 1-AT	Crigler-Najjar I	OTC	OTC	GSD Ia	Refsum disease
성별	여성	남성	남성	남성	남성	여성	여성
수혜자 수	52	18	10	5	10	46	4
나이							1.1x10 ⁹
이식 세포수	2.2x10 ⁶ (냉동)	알수없음	7.5x10 ⁶ (신선)	0.7x10 ⁹ -1x10 ⁹ (냉동)	1.5-4.5x10 ⁹ (신선, 냉동)	2x10 ⁹ (신선)	(신선) 0.9-1.96x10 ⁹ (냉동)
이식 방법	간문맥	간문맥	간문맥	간문맥	간문맥	간문맥	간문맥
면역 억제제	알수없음	알수없음	methyl-prednisolone Tacrolimus	알수없음	methyl-prednisolone Tacrolimus Steroids	methyl-prednisolone Tacrolimus Mycophenolate Mofetil	Basiliximab Tacrolimus
결과	3일후 간이식	4일후 간이식	3.5년 후에 간이식	43일후에 사망	6개월후에 간이식	3년까지 건강함	1년까지 건강함
비고	간세포이식시에 간경화상태	간세포이식시에 간경화상태		간세포이식후에 48시간내에 암모니아수치 정상화됨	간세포이식후에 정상적인 단백질섭취	7시간의 금식에도 이상이 없었음	BAEP나 VEP상의 호전은 없었음

을 받을 수 있다¹⁴⁻¹⁶). 또 간세포는 현재에는 사람의 간세포만을 이용하여야만 하였는데 최근에 여러 가지 다른 세포에서 간세포가 분화되고 만들어질 수 있음이 확인이 되었다. 기존의 간내의 줄기 세포외에도 골수 세포¹⁷⁻¹⁹), 배아간세포 등²⁰⁻²³) 이 간세포로 분화할 수 있음이 알려지고 이러한 세포들을 이용하여 간세포 이식을 하면 공여간의 부족을 어느 정도 해소할 것으로 기대되고 있다.

또 하나의 관점은 간세포 이식 시에 공여된 간세포가 수혜 간에서 좀 더 잘 정착되고 잘 증식

할 수 있는 조건을 마련해주는 것인데 비록 동물 실험이긴 하지만 여러 가지 약제나 유전자 조작을 이용하여 수혜 간세포의 증식만 선택적으로 억제하는 방법인 therapeutic liver repopulation의 개념이 대두되고 있다²⁴).

이러한 therapeutic liver repopulation이 가능하게 하려면 두 가지 조건을 만족하여야 하는 데 이식된 간세포가 기존의 수혜 간세포보다 증식이 더 잘되어야 하고 기존의 수혜 간세포가 급성 혹은 만성으로 제거가 되어서 이식된 간세포가 정착할 수 있는 자리를 만들어 주어야 한다.

Tyrosinemia type 1, Wilson's disease 와 albumin-urokinase transgenic mice에서 수혜 간세포가 유전적인 결함에 의해 크기가 줄어들어서 공여 간세포가 증식해갈수 있는 자리가 만들어 지는 경우이고²⁴⁾ Laconi 등²⁵⁾ 이 발표한 pyrrolizidine alkaloid 인 lasiocarpine 과 또 다른 alkaloid 인 retrosine 등²⁶⁾은 투여하였을 때 간세포를 G2/M 기에서 더 증식할 수 없게 만들어서 이러한 약물을 투여하고 간절제술을 시행한 후에 간세포를 이식하면 간 절제술에 의한 간세포에 대한 자극이 이식된 간세포에만 작용하게 되어서 상대적으로 수혜 간세포는 증식을 하지 않고 공여 간세포만 증식하게 된다. 이러한 결과를 아직 사람에게 적용하기는 이르지만 기존의 간세포 이식의 문제점을 극복할 수 있는 대안으로 받아들여지고 있고 치료 가능한 간질환도 많다.

유전성 대사 질환에서의 줄기 세포 치료

현재 유전성 대사 질환에서의 줄기 세포 치료는 간세포 이식이 가지는 한계를 극복할 수 있다는 기대로 인해 광범위하게 연구가 진행되고 있지만 아직은 임상에 적용 단계가 아닌 동물 실험에 국한되고 있다. 기본적으로 크게 보면 성체 줄기 세포(adult stem cells)와 배아 줄기 세포(embryonic stem cells)를 이용한 두 가지 종류의 줄기 세포를 이용하여 연구가 발전되고 있다.

줄기 세포는 Potten 과 Loeffler의 고전적인 정의²⁷⁾에 의하면 분화되지 않은 상태에서 증식이 가능하여야 하고 self maintenance가 가능하고 분화된 많은 수의 progeny를 생산할 수 있어서 조직 손상 후에 재생과 flexibility가 있는 세포를

말한다. 줄기 세포의 개념은 생체 내에서 분화되는 세포의 수에 따라서 여러 가지가 존재할 수 있다. 수정된 수정란은 확연히 totipotential하여 개체를 만들 수 있고 분화를 거듭하면서 줄기 세포 자신과 같은 세포만 만드는 unipotential stem cell, 혹은 Potten과 Loeffler의 정의에 의한 committed stem cells이 될 수도 있다²⁸⁾. 성체에서의 줄기 세포는 왕성하게 분열하는 세포가 있는 조직인 피부 진피층, 위장관 점막, 골수 등에서 발견이 되고 내분비 기관 같이 조건적으로 새로운 세포가 필요한 경우에도 줄기 세포가 존재하고 있다. 간은 조건적으로 새로운 세포가 필요한 기관이고 정상적으로는 0.3-0.5%정도의 세포를 제외한 거의 모든 세포가 분열을 하지 않는 세포이다²⁹⁾. 그러나 간세포의 증식이 필요한 시점이 되면 휴지기의 간세포는 unipotential stem cell과 같은 역할을 하여 세포 주기로 들어가 분열을 하게 된다³⁰⁾. 최근의 세포 이식 실험에 의하면 간세포는 적어도 12번에서 16번의 세포분열을 할 수 있는 것으로 되어 있다³¹⁾. 그러나 간줄기 세포는 간세포 자체는 아니고 아직까지는 정상 간에서 발견을 할 수 없고 간의 심한 손상과 간세포의 증식이 억제되는 조건에서만 발견되는 것으로 되어있다.

현재까지 알려진 결과를 종합해 보면 간줄기 세포 중에 가장 연구가 많이 된 oval cell의 경우에 bile ductule 과 간세포의 연결부위에 존재하는 Canal of Hering에 존재하는 것으로 알려져 있다³²⁻³⁸⁾.

성체 줄기 세포를 이용한 연구

1. Oval cells

간의 심한 손상이 심하여서 간세포가 광범위하

게 괴사하거나 간 독소나 발암 물질에 의해서 간의 증식이 억제되었을 때에 oval cell이라고 불리는 liver progenitor cells 이 liver lobule에 periportal area 에 나타나기 시작한다. oval cell 은 ovoid nuclei를 가지고 세포질이 적은 작은 미성숙 상피 세포로 clonogenetically하게 증식하고 간세포와 담도 세포로 분화할 수 있는 bipotential capacity를 가지는 것으로 알려져 있다³⁹⁾. Farber³⁹⁾에 의해서 처음으로 기술된 oval cell은 주로 백서에서 2-acetylaminofluorene(2-AAF) 처리와 간의 2/3을 절제하는 간 절제술을 하여서 만들 수 있는데 그 기전은 적은 용량의 2-AAF를 지속적으로 처리하여 간세포의 증식을 억제하면서 처리의 중간(주로 7일 이나 10일)에 광범위 간세포 손상을 일으킬 수 있는 간 절제술을 하게 되면 기존의 간세포는 증식에 대한 여러 가지 자극을 받을 수가 없고 반면에 oval cell이 증식이 되게 된다. oval cell 은 초기에는 biliary ductule 주위에 존재하다가 간 실질로 자라나게 된다. 그밖에도 oval cell을 발견할 수 있는 모델은 마우스에서 Dipin을 처리한 경우⁴⁰⁾, 백서에서 azodyes를 투여한 경우⁴¹⁾, ethionine 의 유무에 관계없고 choline이 부족한 diet로 feeding한 경우^{42,43)}, D-galactosamine을 투여한 경우⁴⁴⁾ 등에서 발견할 수 있다. oval cell 의 기원에 대해서는 아직도 논란의 여지가 많지만 많은 연구자들은 가장 작은 terminal bile duct를 싸고 있는 담관 세포와 periportal 간세포 사이의 transitional zone 에 존재하는 canals of Hering으로부터 기원하는 것으로 믿고 있다. 최근에는 oval cell 이 골수 세포에서도 기원할 수 있는 것으로 알려졌고¹⁷⁾ oval cell 의 tracing examination은 oval cell 이 basophilic small hepatocytes로 바뀐 뒤에 성숙

된 간세포로 변환되는 것을 확인하였다. 하지만 실제로 oval cell 은 정상적인 상태에서는 존재하지 않는 줄기 세포임으로 임상에 적용하기에는 무리가 있는 줄기 세포군이라 할 수 있겠다.

2. 태아 유래 간세포(fetal hepatocytes)

성인 간세포에 비해서 태아 유래 간세포는 간세포와 담관 세포로 분화될 수 있는 성질을 가지고 있어서 근본적으로 간 줄기 세포라고 할 수 있고 최근에는 세포주가 확립되어서 태아 유래 간세포의 생체 외 배양이 가능해 졌지만 윤리적인 문제 때문에 쉽게 임상에 적용할 수는 없는 줄기 세포라 하겠다.

3. 골수 기원 간 줄기 세포

(Bone marrow-derived cells)

1999년에 Petersen 등¹⁷⁾은 처음으로 백서의 골수 세포가 oval cell로 변화할 수 있고 간세포나 담도 세포로 더 분화할 수 있음을 발표하였다. 이러한 결과를 증명하기 위해서 3가지 다른 방법으로 확인하였는데 수컷 백서의 골수 세포를 방사선이 조사된 암컷 백서에 주사하여 Y 염색체가 있는 간 줄기 세포를 암컷 백서에서 확인하였고 dipeptidyl-peptidase IV(DDPIV) 양성 수컷 백서의 골수 세포를 DDPIV 음성암컷 백서에 이식하였고 마지막으로 Brown-Norway 백서의 간을 이용하여 L21-6 항원을 발현하는 Lewis 백서에 생체 간이식을 시행하여서 공여된 간에 수혜 백서의 간세포가 repopulation 되는 것을 확인하였다. 간의 손상 없이 마우스에서 골수의 이식 실험이 비슷한 결과를 보여주었다¹⁸⁾. 인간에서도 남자 공여자에게 골수 세포를 받은 여자의 간이나 여자 공여자에게 간을 받은 남자의 간에서 Y 염색체가 있는 간세포를 확인하여서

기존의 결과를 확실하게 하였다^{45,46}. Lagasse 등¹⁹⁾은 아주 작은 양의 조혈모세포가 진행되는 간부전의 증상을 보이는 fumarylacetoacetate hydrolase(FAH)-결손 마우스(hereditary tyrosinemia type 1의 model mouse)를 치료하는 것을 확인하였고 이식 후에 간세포의 30% 이상이 공여자에서 기원한 세포임을 보여주었다. 이상의 결과를 종합하면 조혈모세포는 간세포와 담관세포로 분화할 수 있고 그 분화는 간에서만 국한이 되어있기 때문에 간의 환경이 줄기 세포의 간세포로의 분화에 중요할 것으로 생각된다. 최근에는 골수 유래 간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cells)⁴⁷⁾, MAPCs(multipotent adult progenitor cells)⁴⁸⁾, 탯줄 줄기 세포(umbilical cord blood cells) 등⁴⁹⁾에서 간세포가 분화되는 결과들이 발표가 되어 이러한 골수 유래 줄기 세포들을 이용한 유전성 대사질환 환자의 치료에 대한 기대가 높아지고 있다.

4. 배아 줄기 세포를 이용한 연구

배아 줄기 세포는 마우스에서 1981년에 Martin⁵⁰⁾에 의해서 처음 만들어 졌고 1998년 Thomson⁵¹⁾에 의해서 인간 배아 줄기 세포가 만들어진 후에 현재 광범위하게 논란이 되고 있는 세포주로서 최근 국내 연구자⁵²⁾들에 의해서 복제된 배아 줄기 세포가 확립이 되면서 인간 배아 줄기 세포를 이용한 면역 거부 반응 없이 세포 치료를 할 수 있을 것이라는 기대가 확대되고 있다.

배아 줄기 세포에서도 간세포로 분화시키는 노력들이 진행이 되고 있는데²⁰⁻²³⁾ 실제 임상에 적용하여 유전성 대사 질환 환자에 적용하기에는 해결해야 할 문제들이 아직은 많다.

결론

유전성 대사 질환의 치료에서 줄기 세포에 대한 연구는 현재는 동물 질환 모델에서 줄기 세포를 간세포로 분화시켜 실제로 분화된 간세포가 기능을 하는지 확인하는 단계이고 최근에 이루어지고 있는 연구들은 이러한 줄기 세포 이식을 실제로 임상에서 환자의 치료에 사용할 수 있게 하기 위해 노력하는 단계이다. 실제로 상당한 진척이 있어서 새로운 개념들을 이용한 줄기 세포 이식들이 멀지 않은 시기에 성공적으로 이루어지리라 사료된다.

References

- 1) Berry MN, Friend DS: High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 1969;43:506-520
- 2) Rugstad HE, Robinson SH, Yannoni C, Tashjian AH Jr. Transfer of bilirubin uridine diphosphate-glucuronyltransferase to enzyme-deficient rats. *Science* 1970;170:553-555
- 3) Kusano M, Mito M: Observations on the fine structure of long-survived isolated hepatocytes inoculated into rat spleen. *Gastroenterology* 1982;82:616-628
- 4) Grossman M, Rader DJ, Muller DW, Kolansky DM, Kozarsky K, Clark BJ 3rd, et al. A pilot study of ex vivo gene therapy for homozygous familial hypercholesterolemia *Nat Med* 1995;1:1148-1154
- 5) Guha C, Parashar B, Deb NJ, Garg M, Gorla GR, Singh A, et al. Normal hepatocytes correct serum bilirubin after repopulation of

- Gunn rat liver subjected to irradiation/partial resection. *Hepatology*. 2002 ;36:354-62.
- 6) Nagase S, Shimamune K, Shumiya S. Albumin-deficient rat mutant. *Science* 1979;205:590-591.
 - 7) Malhi H, Irani AN, Volenberg I, Schisky ML, Gupta S. Early cell transplantation in LEC rats modeling Wilson's disease eliminates hepatic copper with reversal of liver disease. *Gastroenterology* 2002;122:438-447
 - 8) Horslen SP, McCowan TC, Goertzen TC, Warkentin PI, Cai HB, Strom SC, Fox IJ. Isolated hepatocyte transplantation in an infant with a severe urea cycle disorder. *Pediatrics* 2003; 111:1262-1267.
 - 9) Strom SC, Fisher RA, Rubinstein WS, Barranger JA, Towbin RB, Charron M, et al. Transplantation of human hepatocytes. *Transplant Proc* 1997;29:2103-2106.
 - 10) Strom SC, Chowdhury JR, Fox IJ. Hepatocyte transplantation for the treatment of human disease. *Semin Liver Dis* 1999;19:39-48.
 - 11) Fox IJ, Chowdhury JR, Kaufman SS, Goertzen TC, Chowdhury NR, Warkentin PI et al. Treatment of the Crigler-Najjar syndrome type 1 with hepatocyte transplantation. *N Engl J Med* 1998;338: 1422-1426
 - 12) Muraca M, Gerunda G, Neri D, Vilei MT, Granato A, Feltracco P et al. Hepatocyte transplantation as a treatment for glycogen storage disease type 1a. *Lancet* 2002;359: 317-318.
 - 13) Sokal EM, Smets F, Bourgois A, Van Maldergem L, Buts JP, Reding R, et al. Hepatocyte transplantation in a 4-year-old girl with peroxisomal biogenesis disease: technique, safety, and metabolic follow-up. *Transplantation* 2003;76:735-738.
 - 14) Adam RM, Wang M, Crane AM, Brown B, Darlington GJ, Ledley FD. Effective cryopreservation and long-term storage of primary human hepatocytes with recovery of viability, differentiation, and replicative potential. *Cell Transplant* 1995;4:579-586
 - 15) Li AP, Gorycki PD, Hengstler JG, Kedderis GL, Koebe HG, Rahmani R, et al. Present status of the application of cryopreserved hepatocytes in the evaluation of xenobiotics: consensus of an international expert panel. *Chem Biol Interact* 1999;121:117-123
 - 16) Jamal HZ, Weglarz TC, Sandgren EP: Cryopreserved mouse hepatocytes retain regenerative capacity in vivo. *Gastroenterology* 2000;118:390-394
 - 17) Peterson BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells *Science* 1999;284:1168-1170
 - 18) Thiese ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, et al. Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation *Hepatology* 2000;31:235-240
 - 19) Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L, et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000;6:1229-1234
 - 20) Choi D, Oh HJ, Chang UJ, Koo SK, Jiang JX, Hwang SY, et al. In vivo differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes. *Cell Transplant* 2002;11:359-68

- 21) Yin Y, Lim YK, Salto-Tellez M, Ng SC, Lin CS, Lim SK. AFP(+), ESC-derived cells engraft and differentiate into hepatocytes in vivo. *Stem Cells* 2002;20:338-46
- 22) Chinzei R, Tanaka Y, Shimizu-Saito K, Hara Y, Kakinuma S, Watanabe M, et al. Embryoid-body cells derived from a mouse embryonic stem cell line show differentiation into functional hepatocytes *Hepatology* 2002 ;36:22-9
- 23) Choi D, Lee HJ, Jee S, Jin S, Koo SK, Paik SS, et al. In vitro differentiation of mouse embryonic stem cells: enrichment of endodermal cells in the embryoid body. *Stem Cells*. 2005;23:817-27.
- 24) Grompe M: Therapeutic liver repopulation for the treatment of metabolic liver diseases *Human Cell* 1999;12:171-180
- 25) Laconi E, Sarma DS, Pani P: Transplantation of normal hepatocytes modulates the development of chronic liver lesions induced by a pyrrolizidine alkaloid, lasiocarpine. *Carcinogenesis* 1995;16:139-142
- 26) Laconi E, Oren R, Mukhopadhyay DK, Hurston E, Laconi S, Pani P. et al. Long-term, near total liver replacement by transplantation of isolated hepatocytes in rats treated with retrosine *Am J Pathol* 1998;153:319-329
- 27) Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. *Development* 1990;110:1001-1020.
- 28) Marceau N. Cell lineages and differentiation programs in epidermal, urothelial and hepatic tissues and their neoplasms. *Lab Invest* 1990;63:4-20.
- 29) Wright N, Alison M *The Biology of Epithelial Populations*. Vol 2. Clarendon Press, Oxford, 1984, pp873-980.
- 30) Alison MR. Regulation of liver growth. *Physiol Rev* 1986;66:499-541.
- 31) Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* 1994;263:1149- 1152.
- 32) Sell S. Is there a liver stem cell? *Cancer Research* 1990;50:3811-3815.
- 33) Germain L, Flouin MJ, Marceau N. Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins, α -fetoprotein, albumin, and cell surface-exposed components. *Cancer Res* 1988;48: 4909-4918.
- 34) Shiojiri N, Lemire JM, Fausto N. Cell lineage and oval cell progenitors in rat liver development. *Cancer Res* 1991;51:2611-2620.
- 35) Vandersteenhoven AM, Burchette J, Michalopoulos G. Characterization of ductular hepatocytes in end-stage cirrhosis. 1990;114:403-406.
- 36) Vos R, Desmet V. Ultrastructural characteristics of novel epithelial cell types identified in human pathologic liver specimens with chronic ductular reaction. *Am J Pathol* 1992;140:1441- 1450.
- 37) Hsia CC, Evarts RP, Nakatsukasa H, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Occurrence of oval cells in hepatitis B virus associated human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 1992; 7:427-433.
- 38) Grisham JW, Porta EA. Origin and fate of

- proliferating hepatic ductal cells in the rat: Electron microscopic and autoradiographic studies. *Exp Mol Pathol* 1974;2:242-261.
- 39) Farber E. Similarities in the sequence of early histochemical changes induced in the liver of the rat by ethionine, 2-acetylaminofluorene, and 3'-methyl-4-imethylaminoazobenzene. *Cancer Res* 1956;16:142-148.
- 40) Factor VM, Radaeva SA, Thorgeirsson SS. Origin and fate of oval cells in diphenylhydantoin-induced hepatocarcinogenesis in the mouse. *Am J Pathol* 1994;145:409-422.
- 41) Inaoka Y. Significance of the so-called oval cell proliferation during azo-dye hepatocarcinogenesis. *Gann*;1967;58: 55-366.
- 42) Shinozuka H, Lombardi B, Sell S, Lammarino RM. Early histological and functional alterations of ethionine liver carcinogenesis in rats fed a choline- deficient diet. *Cancer Res* 1978;38:1092- 098.
- 43) Sell S, Leffert HL, Shinozuka H, Lombardi B, Gochman N. Rapid development of large numbers of alpha-fetoprotein-containing "oval" cells in the liver of rats fed N-2-luorenylacetamide in choline-devoid diet. *Gann* 1981;72:479-487.
- 44) Lesch R, Reutter W, Keppler D, Decker K. Liver restitution after acute galactosamine hepatitis: autoradiographic and biochemical studies in rats. *Exp Mol Pathol*. 1970;13:58-69.
- 45) Alison MR, Poulosom R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J. et al. Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 2000;406:257.
- 46) Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, et al. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000;32:11-16.
- 47) Lee KD, Kuo TK, Whang-Peng J, Chung YF, Lin CT, Chou SH, et al. In vitro hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Hepatology*. 2004 ;40:1275-1284.
- 48) R.E. Schwartz, M. Reyes, L. Koodie, Y. Jiang, M. Blackstad, T. Lund, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone differentiate into functional hepatocyte-like cells, *J. Clin. Invest.* 2002 109: 1291-1302.
- 49) Newsome PN, Johannessen I, Boyle S, Dalakas E, McAulay KA, Samuel K, et al. Human cord blood-derived cells can differentiate into hepatocytes in the mouse liver with no evidence of cellular fusion. *Gastroenterology*. 2003 124:1891-1900.
- 50) Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78:7634-7638.
- 51) Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1998 6;282:1145-1147.
- 52) Hwang WS, Roh SI, Lee BC, Kang SK, Kwon DK, Kim S, et al. Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. *Science*. 2005 17;308:1777-1783