

역분화줄기세포의 류마티스내과 영역에서의 응용

정승민 · 주지현

가톨릭대학교 서울성모병원 류마티스내과

Application of Induced Pluripotent Stem Cells in Rheumatology

Seung Min Jung, Ji Hyeon Ju

*Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine,
Seoul St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea*

Since induced pluripotent stem cell (iPSC) was first introduced by Yamanaka in 2006, it took only six years to win a Nobel Prize for his pioneering work. It is unusual to win a Nobel Prize for such recent research with a short history. Many scientists and clinicians are interested in iPSC for its potential application. Significant progression in this field has been made, while there remain many hurdles to overcome for application of iPSC technique in real clinics. In this review, the concept of reprogramming and the basic techniques of iPSC generation will be discussed for the reader's

convenience, followed by discussion of recent progress, followed by the topics of "disease modeling" and "cell therapy" with iPSC in the second half of this article. Several examples of rheumatologic application of iPSC will be provided in the main text. If rheumatologists could understand the merits and potentials of iPSC, opportunities for innovative research and therapy can be expanded.

Key Words. Induced pluripotent stem cell, Rheumatoid arthritis, Osteoarthritis, Fibroblast like synoviocyte, Lentivirus, Reprogramming

서 론

줄기세포란, 다양한 세포로 분화할 수 있는 미분화된 세포로서, 무한한 증식능력과 자신을 새롭게 재생산하는 능력(self-renewal), 그리고 다양한 세포와 조직으로의 분화능력(pluripotency)을 가지고 있는 세포를 말한다 (1). 이는 1960년에 발견된 이후 인체의 생명유지와 조직의 재생에서 필수적인 최상위 핵심세포로써 연구 되어 왔다. 줄기세포의 발견 초기에는 세포분화와 조직 및 기관 형성에 관련된 인자를 밝히는 데에 노력을 쏟았으나, 최근에는 세포치료제와 줄기세포의 재생능력을 이용한 재생의학 분야로

그 관심이 옮겨지고 있다 (2,3). 급증하는 퇴행성 질환과 만성질환에 대한 치료법에 만족하지 못하고 있는 의료현실 속에서 줄기세포의 응용은 기존의 의학을 보완·대체하는 수단으로 평가되고 있다. 특별한 유전이상을 동반하는 유전질환에서 줄기세포의 치료가 실제로 적용 가능한 것으로 보고되었고 (4), 각 분야의 연구자들이 만성질환과 퇴행성 질환에도 줄기세포를 적용하기 위해서 치열하게 노력하고 있다.

줄기세포는 크게 배아줄기세포, 성체줄기세포, 그리고 이 글에서 주로 다루게 될 역분화줄기세포로 분류된다. 배아

<Received : September 23, 2013, Revised : October 16, 2013, Accepted : October 16, 2013>

Corresponding to : Ji Hyeon Ju, Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, Seoul St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea, #8104, Annex Building, 505, Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea. E-mail : juji@catholic.ac.kr

pISSN: 2093-940X, eISSN: 2233-4718

Copyright © 2013 by The Korean College of Rheumatology

This is a Free Access article, which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

줄기세포는 수정란을 발생시켜 얻은 배반포 내부의 세포 덩어리로부터 얻을 수 있다. 세포의 특성상 자가재생능력이 뛰어난 것이 장점이지만 배아의 파괴에 따른 윤리적인 문제가 연구의 대중화와 임상의 실용화에 걸림돌이 된다 (5). 성체줄기세포는 이미 발생이 끝난 성체로부터 얻어내는 것으로서 지방, 혈액, 골수, 제대혈 등의 다양한 부위에서 얻을 수 있다. 성체줄기세포는 배아를 파괴하지 않아도 되기 때문에 생명윤리적인 문제에서 자유로운 편이지만, 배아줄기세포에 비해 분화능력이 떨어지고 추출 가능한 세포의 수도 한정적이어서 세포치료제로서의 응용에 제한을 받기도 한다 (4,6).

성체줄기세포를 연구하는 임상연구자들은 조직적합성을 고려해 면역거부반응을 최소화하거나 소량의 성체줄기세포를 채취한 체외증식 방법을 사용하는 등 약점을 보완하여 임상에 응용하려는 시도를 하고 있다 (5).

역분화줄기세포는 2006년 일본 교토 대학의 Yamanaka 교수팀이 체세포에 Oct4, Klf4, Sox2 그리고 C-myc의 4가지 인자를 처리하여 인위적으로 리프로그래밍을 시행한 이후 전 세계에서 많은 연구자들이 관심을 보이며 빠르게 발전하고 있는 분야이다 (7-11). 수정란을 파괴해 얻어야 하는 배아줄기세포 방법에 비해 윤리적인 문제에서 비교적 자유롭고, 환자의 체세포를 직접 리프로그래밍 함으로써 환자 특이적인 줄기세포를 만들 수 있다는 점으로 인해 줄기세포의 연구 분야에서 중요하게 다루어지고 있다. 앞에서 언급한 배아줄기세포, 성체줄기세포, 역분화줄기세포 등 각 줄기세포들 사이에 장점과 단점이 혼재되어 있어 우열을 가리기는 사실상 쉽지 않다. 환자에서 얻은 환자 특이 역분화줄기세포는 만성질환, 난치성질환, 유전질환의 질환기전연구, 분자진단과 맞춤치료 등에 응용할 수 있는 대안으로서 각광을 받고 있다.

종설에서는 현재까지 보고된 다양한 연구결과를 종합하고, 최근 류마티스 분야의 연구자들이 얻은 역분화줄기세포에 대한 실험결과를 보충하여 역분화줄기세포의 일반적인 기법, 류마티스질환에의 적용 가능성, 미래의 응용가능성에 대해서 기술하고자 한다.

본 론

리프로그래밍(reprogramming)이란?

탈분화 혹은 역분화(Dedifferentiation) 현상은 염증이나 외부 자극에 의해 조직이 손상된 경우, 분화가 끝난 세포들이 시간을 거슬러 초기의 미분화 상태로 되돌아갔다가 다시 환경에 맞는 세포나 조직으로 분화하는 현상이다. 플라나리아, 원생동물, 도마뱀과 같이 손상에 대하여 활발한 재생 능력을 보이는 하등 생물에서는 쉽게 관찰되며, 포유류와 같은 고등동물에서는 발생과정 중 DNA methylation과 같은 후생유전적인 흔적을 지우고 다시 리모델링하는 과정에서 관찰된다. 정자와 난자의 수정과정을 통해 생겨난 배아 내의 일부 세포들은 부모에게서 전해 받은 게놈

(Genome)의 정보들을 다시 초기화(Reset)하여 유전정보만 갖는 새로운 세포로 리프로그래밍 된다. 이는 생명현상의 보존과 종족의 유지를 위한 필수적인 과정으로, 1990년대 영국의 연구팀이 포유류에서 처음으로 시행했던 연구인, 핵이 제거된 난자에 체세포의 핵을 전달하는 방법에서부터 인위적인 리프로그래밍 개념이 발전하였다. 이 방법으로 클론된 포유류가 바로 ‘복제양 돌리’이다 (12). ‘체세포 핵치환’ 기술에 의해 난자 내로 체세포의 핵이 전달되면, 난자의 세포질에 이미 존재하고 있던 미상의 인자들에 의해 체세포의 핵이 시간을 되돌리며 줄기세포 상태로 리프로그래밍 되는 것으로 추정되었다 (12-15). 그 후 난자뿐만 아니라 배아 줄기세포 내에도 리프로그래밍을 유도할 수 있는 인자들이 존재한다는 연구결과들이 보고되었다 (16,17).

2006년 Yamanaka 등에 의해 Oct4, Klf4, Sox2 그리고 C-myc의 4가지 인자(Yamanaka factors)에 의해 섬유아세포(Fibroblast)가 줄기세포로 역분화되는 과정이 최초로 보고되었다 (8). 이 연구를 통해 그 동안 많은 연구자들이 궁금해 했던 미상의 인자에 대한 실체가 확인되었다. ‘리프로그래밍 과정’은 다양한 생명현상에서 이미 인지된 내용이었으나, 분화된 체세포의 시계를 인위적으로 되돌려 줄기세포 상태로 역분화시키는 과정에 응용됨으로 인해 2012년 Yamanaka 박사가 노벨상을 받는데 기여하게 되었다.

정상 마우스세포와 인간세포의 역분화 줄기세포 수립과정

바로 앞에서 기술 한 것처럼 Yamanaka 등은 인위적으로 주입한 Oct4, Klf4, Sox2 그리고 c-Myc에 의해 체세포가 리프로그래밍되어 줄기세포로 유도된다는 논문을 발표 하였다 (8). 이 연구팀은 원래 배아줄기세포의 특성을 분석했던 그룹으로서, 줄기세포의 특성을 유지하는데 관여하는 수 백 개의 유전자를 목록화 하여 여기에서 선택한 24개의 유전자 조합이 리프로그래밍과 역분화 유도에 어떤 역할을 하는지를 연구해왔다. 우선 배아줄기세포에서 특이적으로 발현하는 Fbx15 유전자를 선택하여 리포터 세포주를 수립하였다. 그리고 Fbx15 유전자의 전사영역 프로모터 뒤에 항생제 내성 유전자를 인공적으로 삽입시킨 유전자재조합 마우스로부터 배아를 얻었다. 여기에서 배아 섬유아세포(Embryonic fibroblast)를 채취하고 배양하여 리프로그래밍을 할 대상 세포로 삼았다. 그런 다음 Fbx15유전자 발현 리포터를 가진 배아 섬유아세포를 대상으로 24개의 후보 유전자들을 다양한 조합으로 구성하여 세포 내에 전달하였다. 유전자를 세포 내에 전달하는 방법은 효율이 높은 레트로바이러스(Retrovirus)를 이용하였다.

Oct4, Klf4, Sox2 그리고 c-Myc의 유전자 조합을 배아 섬유아세포에 전달하였을 때, Fbx15이 활성화되어 항생제 내성을 가진 콜로니(Colony)를 획득하게 되었다. 이 콜로니로부터 얻은 세포들을 분석하였을 때 배아 줄기세포와 같은 유도만능 유전자가 발현되었고, 시험관 내 배양에서 배아체(Embryoid body)를 생성하고, 생체 내에 투여하였을

때 기형종(Teratoma)을 형성하는 등의 만능분화능력이 관찰되었다. 비록 인위적으로 유도한 세포이지만 배아줄기 세포와 매우 유사한 특징들을 나타냈기 때문에 연구자들은 이를 ‘유도만능줄기세포(Induced pluripotent stem cell, iPS cell)’라고 명명하였다. 또한 ‘체세포로부터 분화의 시계를 거꾸로 돌렸다’하여 ‘역분화줄기세포’란 이름도 같이 사용하고 있다. 초기에 Yamanaka에 의해 시도된 역분화줄기세포 실험이 배아줄기세포와 마찬가지로 ‘획득된 유전형질이 성선세포까지 형성하여 후손에게도 전달이 가능한 완전한 리프로그래밍가’는 아직까지 논란의 여지 (18)가 있지만, 이는 인위적인 줄기세포의 최초 수립이라는 측면에서 전 세계 연구자들의 흥분과 열광을 일으킨 기념비적인 연구업은 분명하다.

기존의 연구결과에 따르면 쥐와 인간 줄기세포가 줄기세포의 성격을 유지하기 위해 사용하는 기전과 전사인자에서 상당한 차이를 보이고 있어 쥐에서 성공한 역분화줄기세포 기술을 인간세포에 적용하는 것은 그 당시에는 쉽지 않을 것으로 예측하였다. 그러나 2006년의 획기적인 연구결과가 발표된 지 1년도 안 된 시점에서 일본(Yamanaka 등)과 미국(Thompson 등)에서 동시에 인간세포에서 역분화줄기세포 주 수립을 발표하였다 (7,19). 인간세포를 이용하여 역분화줄기세포를 만든 것은 환자의 유전자를 가진 줄기세포를 수립하고 이것을 시험관내에서 배양하여 환자특이 줄기세포를 대량으로 생산할 수 있음을 시사하는 결과이다.

다음해인 2007년, MIT와 Harvard 대학의 연구팀에서도 Yamanaka의 연구결과와 같은 연구결과들을 발표함으로써 체세포 리프로그래밍, 역분화줄기세포 수립에 대한 개념과 재현성을 객관적으로 확인 받게 되었다.

역분화줄기세포를 유도할 때 사용된 인자는 Oct-4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog 그리고 Lin28 등이다. 연구자들에 따라

Oct-4, Sox2, Klf4, C-myc (8) 이나 Oct-4, Sox2, Nanog, Lin28 (19) 등의 조합으로 사용하였다. Oct-4는 배아줄기세포에서만 발현되고 줄기세포의 만능성을 유지하는데 필수적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (20,21). Oct-4 발현이 정상인 경우 배아줄기세포의 줄기세포성이 유지되지만, 발현 정도가 감소하면 세포분화가 시작된다 (22). Oct-4는 Sox2와 같이 상승작용을 하여 줄기세포 특이 유전자 발현을 증가시키는 것에 상승효과를 유발한다 (23-25). Sox2 유전자는 Oct-4와 유사하게 줄기세포 기능유지에 필수적인 역할을 한다 (26). Sox2의 발현을 저해하면 줄기세포로서의 성격을 잃고 체세포로 분화가 시작된다 (27). c-Myc과 Klf4는 비슷한 성격을 가지고 있는 발암 유전자들이다 (28). c-Myc은 세포 성장, 분화, 증식, 세포사멸 및 암세포로의 형질 전환 등 다양한 세포 내 기능을 수행하는 발암 유전자로서 유전자의 Myc 인식부위에 결합하는 것뿐만 아니라, 염색체의 구조를 변화시켜 Oct-4와 Sox2가 표적 유전자에 잘 결합할 수 있도록 도와주는 기능을 수행한다 (29). Klf4는 성장 억제에 관여하여 세포 주기를 조절하는 역할을 한다. 최근 연구에 따르면 Klf4는 c-Myc 과 유사하게 배아줄기세포의 Jak-STAT3의 신호전달체계에서 하위 유전자로 작용하며, 과발현 시 Oct-4발현을 유지시켜 배아줄기세포의 분화를 억제 한다 (30). 그러나 Oct4와 Sox2와는 달리 c-Myc 과 Klf4는 분화 줄기세포를 제작하는데 반드시 필요한 유전자가 아니라는 것이 여러 연구자들의 의견이다. Nanog는 배아에서 발현하는 특이 유전인으로 Oct-4나 Sox2와 유사하게 배아줄기세포의 줄기세포성을 유지하고 만능분화성을 보유하고 있는데 필요한 유전자이다. Nanog가 역분화줄기세포 유도에 필수 인자인지는 연구팀에 따라 의견이 다르다. LIN28은 mRNA 결합 단백질로서 배아줄기세포와 배아줄기세포에서 발현되며 분화와 증식에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다 (19). 2006년 이후부터 현재까지 연구자들은 ‘얼마나 더 효율적으로 역분화줄기세포를 만들 수 있는가’, ‘생체 사용이 가능한 안전한 줄기세포로 만들 수 있는가’, ‘리프로그래밍

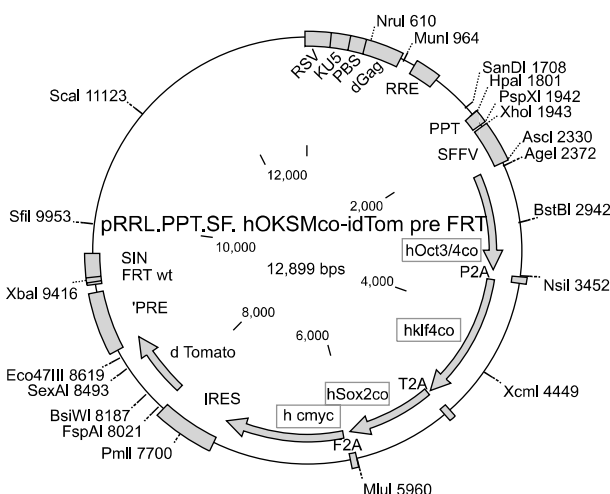


Figure 1. Vector structure of 4-in-1 lentivirus. 4-in-1 lentiviral vector contains 4 Yamanaka factors of Oct4, Klf4, Sox2, and c-Myc.

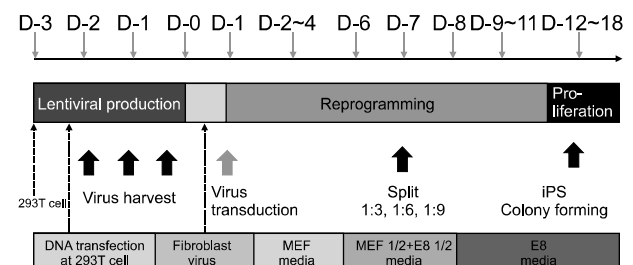


Figure 2. Overall process of reprogramming. 293 T cells are used for production of 4-in-1 lentivirus. Lentivirus is transduced into dermal fibroblasts. After 1~2 weeks, cells are transformed into stem cell like morphology. After 2~3 weeks, stem cell colonies are formed and then picked up for cultivating stem cell lines.

을 할 대상 체세포를 어떻게 하면 비 침습적으로 효율적인 대상으로 선택할까' 등의 응용에 관련한 연구들이 지속되고 있다. Yamanaka에 의해 밝혀진 4가지 인자들도 절대적은 아닌 것으로 증명 되었고, 새로운 인자들의 조합과 역분화 방법들이 계속 보고되고 있는 중이며, 현재까지의 연구결과로 예상해 보면 아직 밝혀지지 않은 역분화 유도인자들도 상당수 있을 것으로 생각된다. 방법적인 측면에서도 처음 시도되었던 바이러스를 이용한 역분화 유도 방법뿐만 아니라, mRNA, 에피솜 벡터(Episomal vector), 단백질, minicircle 벡터, microRNA 등의 다양한 방법이 활발하게 시도되었고 (31-35), 최근 저분자 화학물질로도 역분화유도가 가능하다는 결과도 보고되었다. 앞으로 재생의학분야에서의 역분화줄기세포 응용을 위해서는 효율적이면서도 안전한 역분화줄기세포를 얻는 것이 필수적이라 할 수 있겠다.

렌티바 이러스 4-in-1 벡터를 이용하여 역분화 줄기세포를 수립하는 방법

역분화줄기세포를 만드는 방법은 바이러스, 단백질, mRNA, 에피솜 벡터 등의 다양한 방법이 있고 연구자의 상황에 맞게 벡터를 구하여 실험을 하게 된다 (31-35). 이 논문에서 저자는 Oct4, Klf4, Sox2 그리고 c-Myc의 인자들이 1개의 벡터 카세트 내에 같이 들어있는 '4-in-1 벡터'를 이용한 역분화줄기세포 유도방법을 소개하였다(Figure 1). 4-in-1 유전자가 삽입되어 있는 플라스미드를 293T세포에 transfection시킨 후 3일간 배양하여 4-in-1 렌티바이러스 벡터(Lentiviral vectors)를 생산시키고, 생산된 바이러스를 모아 체세포의 리프로그래밍에 사용한다. 그 후 3일간의 바이러스 수집에 의해 생산된 4-in-1 렌티바이러스를 섬유아세포에 transduction 시킨다. Transduction의 효율을 높이기 위해 신선한 바이러스를 사용하는 것이 좋지만 미리 만들어진 바이러스를 사용할 수도 있다. 섬유아세포는 붙어서 자

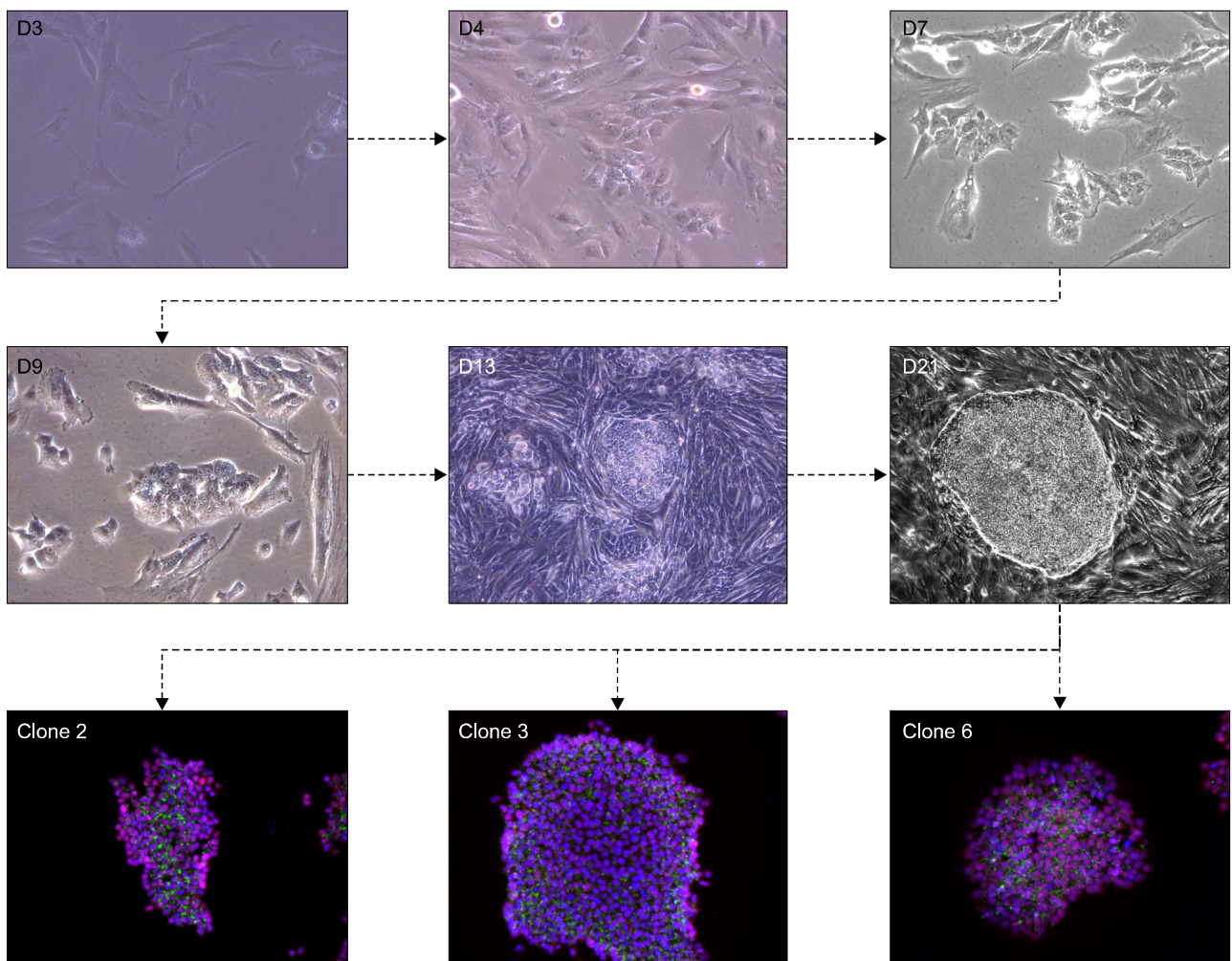


Figure 3. Summarized images during the process of iPSC reprogramming. Fibroblast begins to be changed into the shapes of self-proliferating and colony-like feature. Background fibroblasts are not reprogrammed so they remain spindle shapes. Generated three colonies are positive for pluripotency markers.

라는 특징이 있기 때문에 원심침전의 방법을 통해 중력의 힘을 이용하여 transduction의 효율을 높이기도 한다. 섬유아세포를 키울 때 사용하는 세포배양액으로 세포를 배양한지 7~8일이 경과하면 세포의 모양이 변하기 시작한다. 이 경우 줄기세포의 모양으로 변화하는 리프로그래밍 줄기세포들과 그렇지 않은 섬유아세포들이 한 데 섞여있는데, 이 때부터 섬유아세포 세포 배양액과 줄기세포배양액을 섞어서 주거나 줄기세포 배양액으로 교환을 해 주어야 줄기세포들을 효과적으로 증식시킬 수 있다. 혼합상태의 세포들을 분리 배양하여 줄기세포가 자랄 수 있는 매트릭셀(Matrigel)이 깔린 6 well 플레이트에서 키우고, 배양한지 약 2주(transduction 후 3주)가 지나면 줄기세포의 콜로니들이 관찰된다. 콜로니들이 적당하게 자라면 현미경하에서 콜로니를 채취하여 새로운 플레이트에서 키우면 역분화줄기세포주를 얻을 수 있다(Figure 2, 3). 이후 다른 줄기세포 배양과 마찬가지로 시험관내에서 배양과 분리 과정을 반복하

는데, 계대 배양(Subculture)이 진행 될수록 줄기세포의 순도는 증가하게 된다. 15~20회 정도 계대 배양을 하면 비교적 안정되게 수립된 역분화줄기세포를 얻을 수 있으며, Nanog, SSEA4, Sox2, Oct4, Tra-1-81, Tra-1-60 등의 마커로 면역형광염색을 시행하여 역분화시킨 세포들의 만능분화능력을 확인한다(Figure 4). 이는 액화질소탱크에 보관하였다가 나중에 사용할 수도 있다.

류마티스관절염 vs 골관절염의 활막세포에서 역분화줄기세포 배양

일반적인 피부 섬유아세포(Skin fibroblast)에서 역분화줄기세포를 유도했던 방법을 적용하여 류마티스관절염(Rheumatoid arthritis)의 활막세포(Synovial cells)와 골관절염(Osteoarthritis)의 활막세포에서도 역분화줄기세포를 유도하는 것이 가능하다. 흥미롭게도 환자에서 유래한 활막세포에서는 정상 피부의 섬유아세포보다 좀 더 빨리, 그리고 더 많은

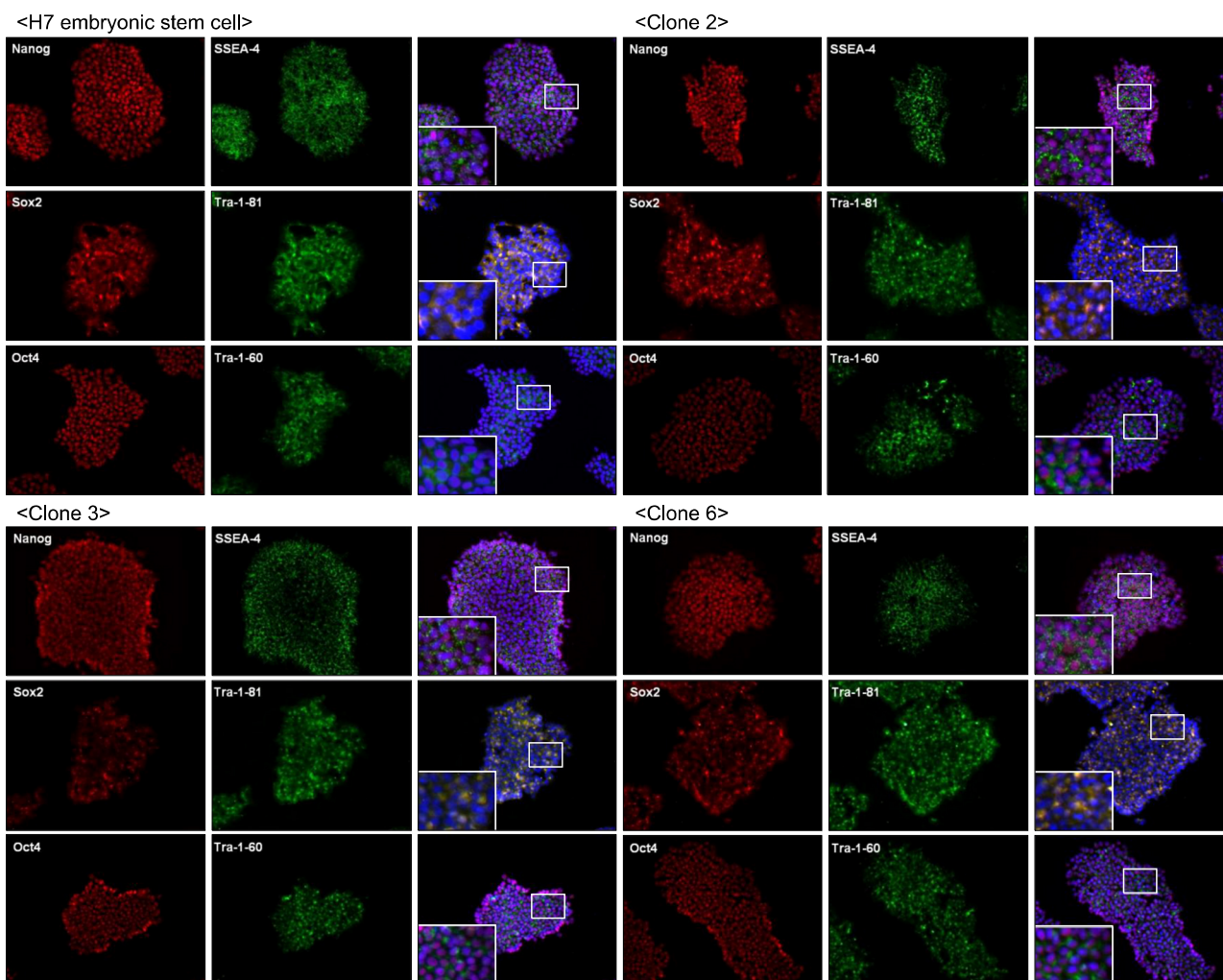


Figure 4. Pluripotency markers are positive at generated clones. Immunofluorescence staining shows positive pluripotency markers such as Nanog, SSEA4, Sox2, Tra-1-81, Oct4, Tra-1-60. Embryonic stem cells and iPSC are alike in positivity of immunofluorescence study.

컬로니가 얻어지는데, 이는 질환의 내재적인 병리기전과 줄기세포의 리프로그래밍 과정과의 연관성을 시사하는 것이다. 이런 방법을 통해 얻은 환자 특이 역분화줄기세포에 기존

에 알려져 있는 골세포 분화인자를 처리했을 때 뼈조직으로 분화가 가능함 역시 확인되었다. 환자의 체세포를 역분화줄기세포로 만들고 다시 병인세포로 분화 시킨다면 시험

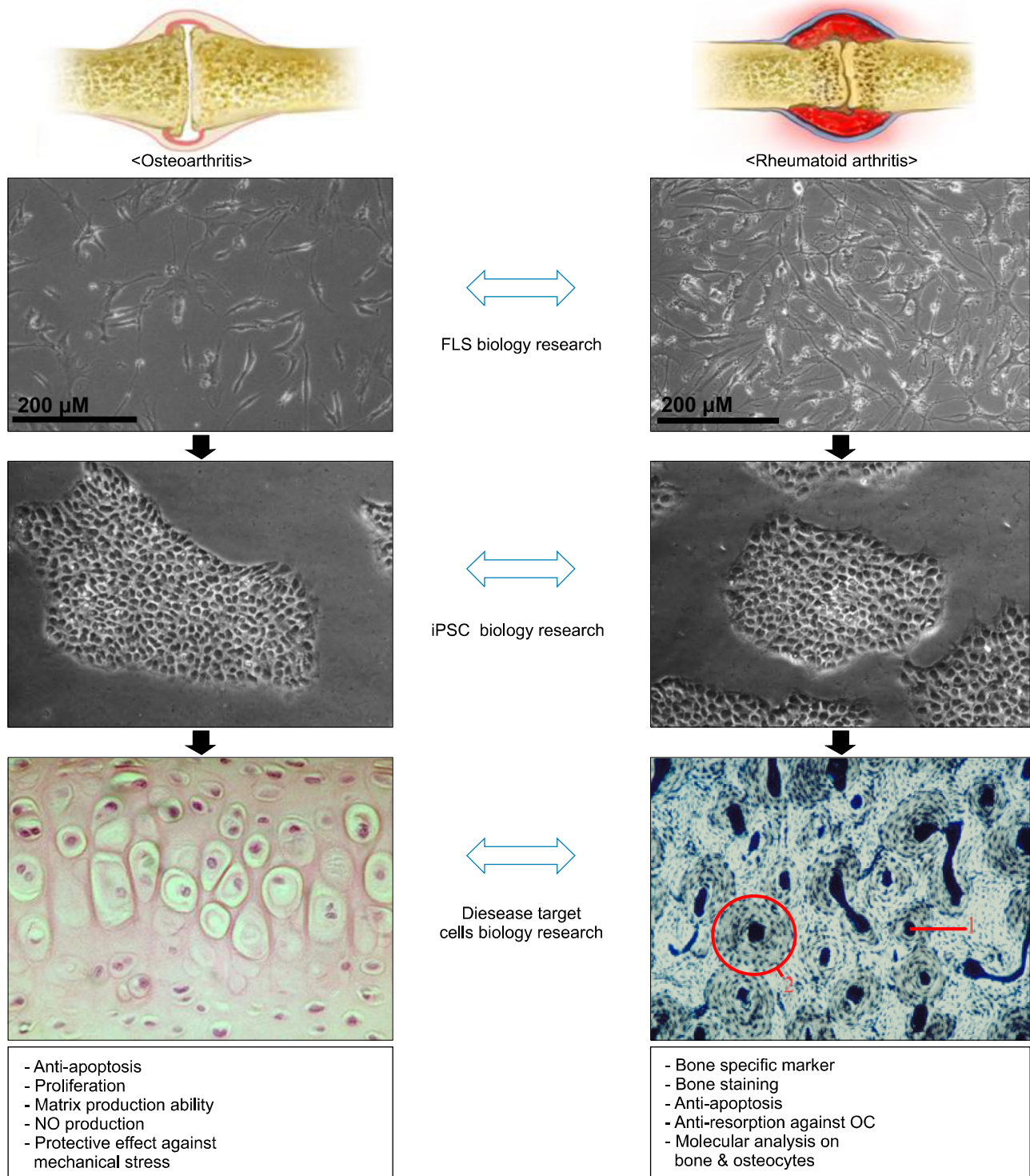


Figure 5. Various levels of studies with disease-specific iPSC. OA FLS and RA FLS are compared with each other at fibroblast level. They are also studied when they are reprogrammed into iPSC clones. They can be differentiated into target disease cells such as chondrocytes and osteocytes. If we could find any differences in OA& RA iPSC-differentiated chondrocytes, it would be a promising methodology for exploring disease mechanism.

관 내에서의 환자 맞춤형 분자진단이 가능해 질 것으로 예측되며, 환자에게 적용 가능한 약제를 선택하거나 치료법을 시뮬레이션 해볼 수 있을 것으로 판단된다(Figure 5).

환자 특이 역분화줄기세포의 응용

1) 현재 적용 가능한 분야로서 질환모델링: 연구가 빠른 속도로 진행되고 있어 조만간 연구와 임상에 적용 가능한 분야로서 ‘질환모델링’을 꼽을 수 있을 것이다 (36,37). ‘질환모델링’이란 환자의 세포를 역분화줄기세포로 리프로그래밍하고, 시험관내에서 질환의 핵심병인세포로 분화를 시킨 뒤, 시험관내에서 환자의 질환환경을 모사하는 기법이다 (3). 인간 역분화줄기세포는 대부분의 환자 세포로부터 유도가 가능하고, 또한 여러 세포로 분화시킬 수도 있기 때문에 질환모델링이 가능할 것으로 생각된다. 특히 역분화줄기세포 기술은 유전적으로 문제가 되는 질환에서 질환 유발 계통을 가진 세포주를 생산하는데 유용하다 (38,39). 질환모델링을 유전자-약제간의 상호작용을 연구하는 플랫폼으로 사용하고, 환자에게 특이적으로 효과적인 약제의 선별에 응용할 수 있다(Figure 6).

이 플랫폼을 이용하여 과거에 안전성 문제로 개발이 중단되었던 신약 후보물질이 새로운 치료제로 다시 개발될 수 있음을 확인한 연구결과들도 보고되었다. 환자유래 역분화줄기세포는 질환모델링 분야에서 다른 줄기세포들에 비해 우월하다. 배아줄기세포는 환자에서 얻어질 수 없는 세포이기 때문에 이런 질환모델링 용도로는 사용이 불가능하기 때문이다. 성체줄기세포를 통해서도 질환모델링을 적용해 보려는 시도가 있으나, 성체줄기세포의 제한된 분화능력과 줄기세포를 채취에 관한 문제로 인해 임상 적용이 활발하지 않은 편이다. 시험관내에서 구현된 환자 특이적인 질환환경은 맞춤의학적인 관점에서 앞으로 응용가능성이 클 것으로 예상된다 (40).

앞으로 유전적인 질환뿐만 아니라 퇴행성 질환의 연구(신경퇴행성질환, 연골퇴행성질환 등)에도 역분화줄기세포를 이용한 질환모델링이 응용될 것으로 전망된다. 만성 퇴행성질환은 신경이나 연골 같은 손상된 병리조직을 채취하기 어렵고, 조직을 얻더라도 병인 세포의 지속적인 배양이 쉽지 않기 때문에 시험관내 연구에 걸림돌이되었다. 환자 특이 역분화줄기세포는 체외배양을 통해 지속적인

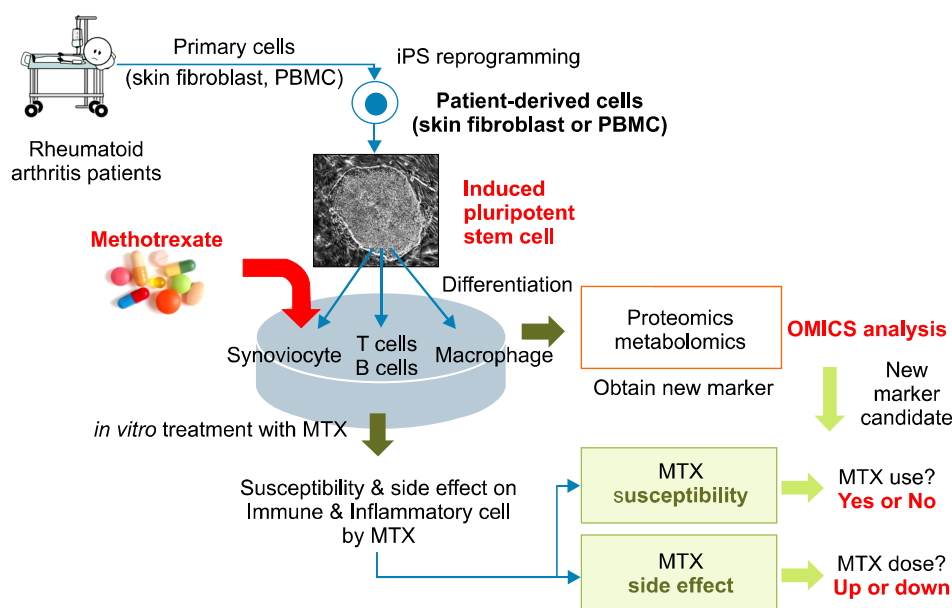


Figure 6. An example of application of iPSC in disease modeling in future. iPSC from patients are differentiated into synovocytes, T cells, B cells and so on. After methotrexate is added in culture dishes, and then the effects of MTX on target cells could be studied.

Table 1. Application of iPSC technique in disease modelling

Diseases studied with iPSC	Differentiated cells from iPSC in vitro	Disease phenotype	Drug screening or functional test in vitro
Amyotrophic lateral sclerosis	Motor neurons and glial cells	ND	No
Spinal muscular dystrophy	Neurons, astrocytes	Yes	Yes
Parkinson's disease	Dopaminergic neurons	No	Yes
Down's syndrome	Teratoma tissue	Yes	No
Sickle cell anemia	None	NA	No
Type 1 diabetes	Beta cell like cells	ND	No
Familial dysautonomia	Central nervous system cells	Yes	Yes

iPSC: induced pluripotent stem cell, ND: not detected, NA: not accessible.

증식이 가능하고 분화조건을 처리하여 원하는 세포를 대량으로 얻을 수 있으므로 환자 맞춤형 질병연구와 약제개발연구에 있어 큰 장점이 될 것으로 예측된다.

예를 들어, 유전적인 소인이 결합된 신경퇴행성 질환을 가진 환자의 역분화줄기세포를 만들어 신경세포로 분화시킨 후 환자의 신경세포의 퇴행과정을 늦추거나 막는 치료제를 개발하는 방법으로 응용될 수 있다. 그 외에도 제1형 당뇨병(Insulin dependent diabetes mellitus), 다운증후군(Down syndrome), 가족성자율신경실조증(Family dysautonomia) (41), 파킨슨병(Parkinson's disease) (42), 근위축성 측삭경화증(Amyotrophic lateral sclerosis) (43), 글리코겐축적병(Glycogen storage disease), long QT 증후군(Long QT syndrome) (44), 비후성심근병(Hypertrophic cardiomyopathy), 정신질환, 혈액질환, 간질환 등 많은 질환에서 역분화줄기세포를 이용한 질환모델링을 시도되었고, 시험관내 실험적인 약물치료가 활발하게 연구되었다(Table 1).

실험적인 약물치료를 통해 호전을 보인 일부 질환모델링 연구에서는 연구 결과를 환자에게 적용하여 난치질환의 경과를 호전시키려는 시도가 진행되고 있다 (41,45,46). 질환모델링 대부분의 대상 질환들은 지금까지 알려진 치료방법이 없었기 때문에 실질적으로 환자의 삶의 질 향상과 치료에 큰 도움을 줄 것으로 기대된다. 앞으로 환자 특이 역분화줄기세포를 이용한 질환모델링이, 치료제가 없는 유전병이나 만성병 등에 있어, 신약개발을 위한 플랫폼으로써 도움이 될 수 있을 것이다.

2) 미래 적용 가능한 분야로서의 세포치료제와 재생의학적 접근: 질환모델링보다는 늦어지고 있지만 역분화줄기세포를 미래 응용에 대해 임상연구자들의 관심을 모으는 분야가 '세포치료를 응용한 재생의학'이다 (10,47). 세포치료란 여러 가지 원인에 의해 결핍된 세포와 파괴된 조직을 복원하기 위해 체외에서 세포를 선별하고 증식시켜 다시 체내로 이식하여 질병을 완화시키거나 치료하는 방법이다. 환자에게서 채취한 체세포를 이용하여 리프로그래밍 과정을 거쳐 탄생한 역분화줄기세포로 시행하는 '자가세포치료'는 현대의학에서 난치성, 비가역적 질환에 대한 새로운 치료 대안으로 각광을 받고 있다 (48). 환자에서 채취 가능한 섬유아세포, 말초혈액세포, 잉여세포 등으로 역분화줄기세포를 만들어 세포치료의 재료로 분화시키는 방법은 '동종 간 세포이식'에서 흔하게 생기는 면역 거부반응을 최소화시킬 수 있다. 세포치료를 필요한 충분한 세포치료제를 확보한다는 차원에서 역분화줄기세포의 자가 재생산능과 지속 분화능이 매우 유리한 장점으로 적용될 것으로 생각된다. 때문에 역분화줄기세포를 이용한 세포치료 방법들이 많은 연구자들에게서 지속적으로 발표되고 있다 (49,50).

위에서 기술한 역분화줄기세포의 세포치료제로서의 단순한 역할 뿐만 아니라 체외 유전자치료의 플랫폼으로써의 기능이 가능해진다면 맞춤형 유전자치료의 중요한 수단이 될 것으로 전망된다. 환자의 체세포로 역분화줄기세포를 만든 후 최신 유전자치료기법을 통해 결함이 있는 유전자를 교정하게 되는 것이다. 교정된 유전자가 역분화줄기세포를 정상세포로 분화시킬 수 있도록 체외에서 유도한 뒤 환자에게 투여하는 식의 '세포치료 방법'으로서 가능성을 제시한 것이다. 최근 각광을 받은 연구 일례를 소개하면, 인간 겸상적혈구 빈혈(Human sickle-cell anemia)의 유전형인 hbS/hbS을 가진 생쥐 모델로부터 역분화줄기세포를 얻은 뒤, 상동성 재조합방법을 이용하여 hbA/hbS의 정상표현형 발현 유전자로 변형시켰다. 그리고 변형된 역분화줄기세포를 조혈모세포로 분화시켜 겸상적혈구 생쥐 모델의 골수에 이식하여 정상적인 적혈구를 생산하도록 하는데 성공하였다 (50). 이 결과는 자신의 세포를 이용하여 역분화줄기세포를 만들고 유전자를 교정한 후 분화시켜 재 이식함으로써 면역 거부 반응 없이 유전 질환을 치료할 수 있다는 가능성을 처음 보여주었다는 점에서 그 의미를 찾을 수 있다.

3) 역분화줄기세포의 문제점과 극복방안: 지금까지 동물실험들에서 긍정적인 결과들이 나왔음에도 불구하고 역분화줄기세포를 환자에 직접 적용하기에는 아직 극복해야 할 문제가 많다. 동물실험과는 달리 환자에게 사용하기 어려운 이유는, 중요한 문제인, 안전성에 대한 우려를 극복해야 하기 때문이다. 역분화줄기세포를 이용한 세포치료는 줄기세포의 특성상 기형종 및 종양 발생에 대한 위험도를 최소화 시켜야 한다(Yamanaka 박사 연구팀의 보고에서 역분화줄기세포를 이용해 배아를 얻어 새끼 쥐들을 탄생시키자 20% 정도에서 종양 발생이 관찰되었다).

종양발생에 대한 첫 번째 가능한 설명으로 리프로그래밍 인자 중 c-Myc과 Klf4와 같은 유전자는 이미 알려진 종양 관련 유전자들로서 역분화줄기세포 치료 시 암을 일으키는 현상과 관련이 있을 수 있다는 보고들이 있었다. 이 유전자들이 역분화 줄기세포나 분화된 세포에 남아있다가 암을 발생시킬 가능성이 있는 것이다. 두 번째 설명으로, 세포의 리프로그래밍에 사용되는 레트로바이러스 벡터가 염색체에 삽입되면서 암 억제 유전자의 기능이 상실되거나 DNA손상 회복기전이 방해받으면서 종양이 발생한다는 설명도 설득력이 있다.

질병모델링 또한 극복해야 하는 문제를 가지고 있다. 단일 유전자에 의해 질병이 발생하는 경우 역분화줄기세포를 질병모델링에 적용하였을 때 좋은 결과가 나오는 경우가 많다. 그러나 다양한 유전자가 함께 작용하거나 여러 환경인자들이 발병에 관여하는 경우 '질병모델링이 얼마만큼 질환을 잘 대변할 것인가'에는 논란의 여지가 많다 (3,37). 복합질환에 대해 시험관내에서 질병모델링을 시행하거나 미묘한 환경인자, 시간인자 등을 시험관내에 제공하는 일은 매우 섬세하고 어려운 작업이다. 생체 내에서 실제로 일어나는 복잡한 변수와 상호작용 때문에, 질병과 관련된 세포들 사이의 상호작용을 시뮬레이션으로 확인하는 것 역시 쉽지 않은 일이다. 만약 시험관내에서 인간의 몸에서 일어

나는 현상을 모두 제어할 수 있고 실시간으로 재현할 수도 있다면 가능한 이야기겠지만 현재의 의학기술로는 아직 넘어야 할 산이 많은 게 현 시점의 상황이다. 제기되고 있는 상기의 문제점들을 해결하기 위해 현재, 세포에 투여하는 역분화유전자의 수를 감소시키거나 (31,32,51), 바이러스를 배제한 역분화유도 방법의 도입 (52,53), 역분화줄기세포를 거치지 않는 직접적인 세포변환법 (54-57,64), 리프로그래밍 효율성의 증가를 위한 신물질 발굴 (58-60,65) 등 다양한 방법을 이용하여 역분화줄기세포를 안전하고 효율적으로 만들려는 시도들이 활발하게 진행 중이다 (3,61,62,66).

결 론

역분화줄기세포의 연구는 비교적 짧은 역사에도 불구하고 발전하는 속도가 무척 빠르다. 2006년에 처음으로 Kyoto대학의 Yamanaka 교수팀으로부터 역분화줄기세포의 수립이 보고되었고, 이 후 6년 만인 2012년에 Yamanaka 교수에게 노벨생리의학상이 수여되었다. 6년간의 연구성과로 노벨상을 수상하는 것이 매우 이례적 일인 만큼 여러 분야와 각계각층의 관심이 집중되어 있다고 할 수 있겠다. 기대와 호응이 큰 만큼 여러 곳에서 장밋빛 청사진들과 임상 적용가능성에 대한 연구결과들이 제시되고 있지만, 아직까지 임상에 실제 적용되기까지는 넘어야 할 장애물이 적지 않은 상황이다. 비교적 가까운 미래에 임상 적용이 가능한 역분화줄기세포의 응용분야에서 환자 특이적인 세포를 얻어서 환자의 질병모델링을 하게 될 가능성이 높다. 환자에게 직접적인 위해가 가지 않기 때문에 비교적 자유로운 임상적용과 연구영역이 될 것으로 예측되고, 이미 많은 연구자들이 ‘시험관 환자/질환(Patient/Disease in a dish)’의 개념을 정립하고 임상에 적용하기 위한 경쟁이 시작되었다.

류마티스내과는 질환의 발병기전이 아직 명확하게 밝혀지지 않은 난치성 질환이 많은 분야로 역분화줄기세포를 이용한 질환기전 연구가 활발해 질 가능성이 높은 영역이라고 할 수 있겠다.

류마티스관절염(Rheumatoid arthritis), 강직성척추염(Ankylosing spondylitis), 전신홍반루푸스(Systemic Lupus Erythematosus), 전신경화증(Systemic sclerosis), 각종 혈관염(Vasculitis) 등에서 환자 특이 역분화줄기세포를 이용한 질환기전연구가 맞춤형학적인 분자진단과 치료로의 다리역할이 될 것을 기대해 본다.

역분화줄기세포를 이용한 세포치료 전략은 질환 모델링보다는 늦게 임상에 적용될 것으로 예측된다. 그 이유는 환자에게 투여되는 세포치료제이기 때문에 줄기세포치료제 생산에 맞는 임상등급의 GMP (Good Manufacturing Practice)기준을 따라야 하고, 국가에서 지정한 표준처리 가이드라인(SOP, Standing operating procedure)을 연구단체에서부터 고려해야 한다. 줄기세포 배양 인프라, 배양 소모품, 처리 공정 등을 임상기준에 맞추는 데에는 여러 가지

제약이 따르고 상상 이상의 투자도 필요로 한다 (63). 시간적인 제약 역시 역분화줄기세포를 이용한 세포치료제 개발의 장애물이다. 환자 특이 역분화줄기세포를 제조하는데에는 최소 1~2개월 이상의 시간이 필요하므로 긴급을 요하는 치료에 있어서는 환자특이 역분화줄기세포를 사용하는데 적절하지 않은 게 사실이다. 이에 대한 극복방안으로써 국가에서는 전국민의 빈발 HLA (Human leukocyte antigen) 에 대응할 수 있는 국가차원의 역분화줄기세포주 은행의 운영을 계획하고 있다. 이런 은행이 성공적으로 수립된다면 환자의 HLA 타입에 맞는 줄기세포를 공여 받아 치료에 사용할 수 있을 것이다. 이 분야의 선두 그룹들은 이미 발 빠른 행보를 보이고 있다. 2013년 역분화줄기세포 연구를 국책사업으로 추진하고 있는 일본에서는 Yamanka 연구그룹에 의해 퇴행성 망막질환에 대한 역분화줄기세포치료 임상연구가 세계최초로 시작되었다. 침체된 일본경제의 새로운 성장동력이 될 것이라는 예측 하에서, 국가차원의 투자와 일본인 특유의 꼼꼼함이 줄기세포치료의 분야에서 새로운 시도를 시작할 수 있게 한 것이다. 세포치료나 만성신경질환에서의 역분화줄기세포의 발전에 비하면 류마티스내과 분야는 아직 연구가 활성화되어 있지 않은 편이므로 잠재적으로 볼 때 많은 기회가 있다고 생각한다. 류마티스내과 의사가 장점과 단점을 잘 파악하여 이 기술에 전략적으로 접근한다면 역분화줄기세포를 이용한 자가면역질환의 진단과 치료의 분야에 있어서 환자에게 큰 도움이 되는 창의적인 연구를 하게 될 것이다.

감사의 글

This work was supported by a grant from the Korea Healthcare Technology R&D Project, Ministry for Health, Welfare & Family Affairs, Republic of Korea (A092258) and by Advanced Production Technology Development Program, Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries (312037-05).

References

1. Somorjai IM, Lohmann JU, Holstein TW, Zhao Z. Stem cells: a view from the roots. *Biotechnol J* 2012;7:704-22.
2. Schugar RC, Robbins PD, Deasy BM. Small molecules in stem cell self-renewal and differentiation. *Gene Ther* 2008;15:126-35.
3. Grskovic M, Javaherian A, Strulovici B, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells--opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2011;10:915-29.
4. Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 2008;132:661-80.
5. Ambasudhan R, Talantova M, Coleman R, Yuan X, Zhu S, Lipton SA, et al. Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell* 2011;9:113-8.
6. Zaehres H, Schöler HR. Induction of pluripotency: from

- mouse to human. *Cell* 2007;131:834-5.
7. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861-72.
8. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-76.
9. Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:2883-8.
10. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev* 2010;24:2239-63.
11. Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 2007;1:55-70.
12. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810-3.
13. Wakayama T, Hayashi Y, Ogura A. Participation of the female pronucleus derived from the second polar body in full embryonic development of mice. *J Reprod Fertil* 1997;110:263-6.
14. Freberg CT, Dahl JA, Timoskainen S, Collas P. Epigenetic reprogramming of OCT4 and NANOG regulatory regions by embryonal carcinoma cell extract. *Mol Biol Cell* 2007;18:1543-53.
15. Taranger CK, Noer A, Sørensen AL, Håkelién AM, Boquest AC, Collas P. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 2005;16:5719-35.
16. Tada M, Morizane A, Kimura H, Kawasaki H, Ainscough JF, Sasai Y, et al. Pluripotency of reprogrammed somatic genomes in embryonic stem hybrid cells. *Dev Dyn* 2003;227:504-10.
17. Yu J, Vodyanik MA, He P, Slukvin II, Thomson JA. Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell fusion. *Stem Cells* 2006;24:168-76.
18. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germ-line-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007;448:313-7.
19. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318:1917-20.
20. Lenardo MJ, Staudt L, Robbins P, Kuang A, Mulligan RC, Baltimore D. Repression of the IgH enhancer in teratocarcinoma cells associated with a novel octamer factor. *Science* 1989;243:544-6.
21. Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, Sakai M, Muramatsu M, Hamada H. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 1990;60:461-72.
22. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000;24:372-6.
23. Wu da Y, Yao Z. Isolation and characterization of the murine Nanog gene promoter. *Cell Res* 2005;15:317-24.
24. Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L. Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev* 1995;9:2635-45.
25. Tomioka M, Nishimoto M, Miyagi S, Katayanagi T, Fukui N, Niwa H, et al. Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res* 2002;30:3202-13.
26. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 2003;17:126-40.
27. Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, et al. Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* 2006;442:533-8.
28. Seoane J, Le HV, Massagué J. Myc suppression of the p21(Cip1) Cdk inhibitor influences the outcome of the p53 response to DNA damage. *Nature* 2002;419:729-34.
29. Lewitzky M, Yamanaka S. Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18:467-73.
30. Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* 2005;105:635-7.
31. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 2008;26:101-6.
32. Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Araújo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, et al. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 2009;136:411-9.
33. Si-Tayeb K, Noto FK, Sepac A, Sedlic F, Bosnjak ZJ, Lough JW, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *BMC Dev Biol* 2010;10:81.
34. Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D, Gupta M, Cui Z, Tian Y, et al. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2011;8:376-88.
35. Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 2009;4:472-6.
36. Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008;134:877-86.
37. Tiscornia G, Vivas EL, Izpisua Belmonte JC. Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells. *Nat Med* 2011;17:1570-6.

38. Moser HW. Adrenoleukodystrophy: phenotype, genetics, pathogenesis and therapy. *Brain* 1997;120:1485-508.
39. Urbach A, Bar-Nur O, Daley GQ, Benvenisty N. Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010;6:407-11.
40. Saha K, Jaenisch R. Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell* 2009;5:584-95.
41. Lee G, Papapetrou EP, Kim H, Chambers SM, Tomishima MJ, Fasano CA, et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 2009;461:402-6.
42. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 2009;136:964-77.
43. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, et al. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 2008;321:1218-21.
44. Itzhaki I, Maizels L, Huber I, Zwi-Dantsis L, Caspi O, Winterstern A, et al. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011;471:225-9.
45. Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, et al. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009;457:277-80.
46. Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL, Ang YS, Schaniel C, Lee DF, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* 2010;465:808-12.
47. Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature* 2012;481:295-305.
48. Raya A, Rodríguez-Pizà I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009;460:53-9.
49. Wernig M, Zhao JP, Pruszak J, Hedlund E, Fu D, Soldner F, et al. Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:5856-61.
50. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007;318:1920-3.
51. Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 2008;26:1269-75.
52. Lyssiotis CA, Foreman RK, Staerk J, Garcia M, Mathur D, Markoulaki S, et al. Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:8912-7.
53. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 2008;322:949-53.
54. Lujan E, Chanda S, Ahlenius H, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:2527-32.
55. Han DW, Tapia N, Hermann A, Hemmer K, Höing S, Araúzo-Bravo MJ, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into neural stem cells by defined factors. *Cell Stem Cell* 2012;10:465-72.
56. Szabo E, Rampalli S, Risueño RM, Schnerch A, Mitchell R, Fiebig-Comyn A, et al. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* 2010;468:521-6.
57. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010;463:1035-41.
58. Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 2008;26:795-7.
59. Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, et al. A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell* 2009;5:491-503.
60. Zhu S, Li W, Zhou H, Wei W, Ambasudhan R, Lin T, et al. Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell* 2010;7:651-5.
61. Hockemeyer D, Soldner F, Beard C, Gao Q, Mitalipova M, DeKaveler RC, et al. Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol* 2009;27:851-7.
62. Mali P, Ye Z, Hommond HH, Yu X, Lin J, Chen G, et al. Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells* 2008;26:1998-2005.
63. Sun N, Panetta NJ, Gupta DM, Wilson KD, Lee A, Jia F, et al. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:15720-5.
64. Lin C, Yu C, Ding S. Toward directed reprogramming through exogenous factors. *Curr Opin Genet Dev* 2013;23:519-25.
65. Yoshioka N, Gros E, Li HR, Kumar S, Deacon DC, Maron C, et al. Efficient generation of human iPSCs by a synthetic self-replicative RNA. *Cell Stem Cell* 2013;13:246-54.
66. Lee MO, Moon SH, Jeong HC, Yi JY, Lee TH, Shim SH, et al. Inhibition of pluripotent stem cell-derived teratoma formation by small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:E3281-90.