

Microengineering과 줄기세포의 분화

Microengineering approach for directing embryonic stem cell differentiation



Harvard-MIT Division of Health Sciences and Technology, Harvard Medical School, Brigham and Women's Hospital, USA.

배호재

1. 서론

무제한적 자가복제능과 인간의 몸을 구성하는 모든 장기로의 분화능의 특징을 가지는 배아줄기세포는 세포치료와 인공조직의 개발에 중요한 세포원으로 인식되어있다. 또한 induced pluripotent stem cell (iPS)의 개발은 자가세포치료의 새로운 장을 열었고 iPS세포를 이용한 수많은 연구들이 진행중이다[1]. 특히 최근에는 배아줄기세포의 분화에 대한 메커니즘이 계속 밝혀지면서 조직공학 (Tissue Engineering) 분야에서 배아줄기세포를 이용한 3차원의 인공조직 개발에 많은 연구가 이루어지고 있다. 개발된 인공조직들을 임상에 쓰려면 해결 되어야할점들이 몇가지 있는데 그 중 중요한 한 가지 요소가 바로 줄기세포의 분화를 알맞은 방향으로 통제하는 것이다[2]. 알려진 바와 같이 줄기세포는 각 조직과 기관에 해당하는 독특한 niche에 속하여 있고 (Figure 1) 이러한 niche는 고도로 정돈된 마이크로구조 내에 정확한 세포의 구분과 정렬로 이루어져 있다[3]. 따라서 줄기세포의 분화메커니즘에 지대한 영향을 미치는 마이크로 환경 (Microenvironment)을 이루는 각각 구성요소를 조절할 수 있는 기술의 획득은 줄기세포의 behavior를 통제할 수 있는 중요한 tool로 사용될 수 있다. 따라서 microfabrication과 advanced biomaterial의 적절한 융합을 통하여 효과적으로 배아줄기세포의 *in vitro* 환경을 만들어내고 세포의 분화를 조절하는 강력한 tool로서 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 장에서는 microscale engineered biomaterial이 배아줄기세포의 습성을 조절하고 3차원적인 인공조직 배양 및 개발에 대한 기술과 연구사례를 소개하고자 한다. Microscale engineering의 위 두가지의 분야에서의 적용은 재생의

학 (Regenerative Medicine)의 발전에 있어 중요한 기여를 할 것으로 기대 되어진다. 이러한 기대와 함께 이 분야의 지속적인 연구와 기술의 발전은 임상적용으로의 시간 단축으로 연결되리라 기대를 해본다.

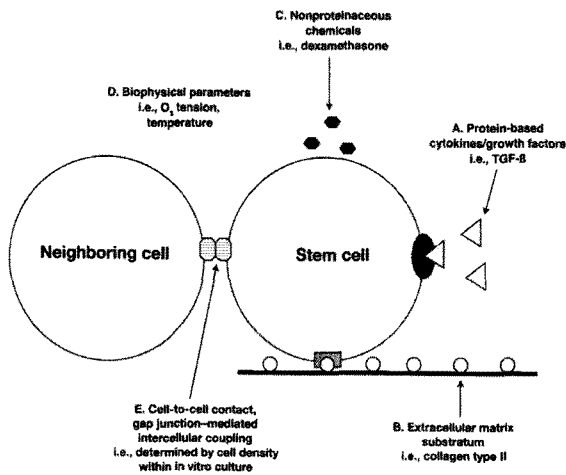


Figure 1. Microenvironmental niche 세포를 둘러싸고 있는 마이크로환경의 몇가지 다른 factor와의 상호작용을 통하여 세포의 fate와 function에 영향을 준다 [44].

2. Microengineering을 이용한 microenvironment의 제어

Microengineering의 여러 기술을 효과적으로 이용하면 세포와 microenvironment와의 상호작용을 조절할 수 있다[4]. 예를들어, 세포를 3차원적인 구조내에 제한시켜 세포의 습성을 변화시키는 간단한 방법으로[5-7] 시작하여 그밖에 microchannel[8], microwell[9], 그리고 cell-laden microgel[4, 10, 11]과 같은 마이크로 기술들을 이용한 세포의 환경을 조절하는 연구가 진행되고 있다. 최근에는 생체에 적합한 생물 고분자를 이용한 연구들이 활발하게 진행되고 있는데[4, 12, 13]. 이러한 생체재료 (biomaterials)들의 가장 큰 장점은 인공 조직을 설계하는데 있어 중요한 각종 성질의 (예를들어 degradation 속도, 기계적 물성) 조절이 용이하다는 점이다. 따라서 마이크로 기술을 이용한 생체고분자의 조작은 배아줄기세포 공학에 주목되어 세포의 습성을 조절하는 유용한 도구로서 연구되고 있다. 이러한 생체고분자는 더욱 발달한 구조의 마이크로 단위의 3차원 인

공조직이나 물질의 물성을 발전시키는데 이용되어질 수 있다. 또한 microarray 같은 기술을 이용하여 한번에 많은 가지수와 조합의 생체물질에 대한 줄기세포의 반응을 조사하여 방대한 library를 형성 할 수 있다. 이러한 줄기세포에 대한 다양한 연구들은 줄기세포의 분화 생물학부터 신약개발 연구까지 이르는 다양한 분야에 이용될 수 있다. 본 글에서는 마이크로 공학기술과 줄기세포의 분화능력을 이용하는 연구를 소개하고자 한다.

2.1 Microfluidic platforms을 이용한 cell-soluble factor의 조절

Microfluidic기술은 10-100 μm 정도의 작은 채널(channel)을 이용하여 마이크로에서 작게는 나노리터 단위의 부피의 유체를 조절하는 것을 가능하게 한다[14]. 이와 같은 microfluidic system은 미량의 샘플을 요구하기 때문에 growth factors, conditioned media, 또는 chemical formulation등을 screening하는데 유용하게 이용될 수 있다.

Microfluidic system의 발전으로 soluble factor등의 반응을 더욱 정확히 조절하고 screen하는 것이 가능하여 졌고 이는 배아줄기 세포 연구에 새로운 전성기를 가져다 주었다. 이러한 microfluidic technology는 주로 polydimethylsiloxane (PDMS)를 이용하는 데[15], 만들어진 device는 세포의 patterning, media component의 localization, high throughput drug screening, laminar flows의 영향, soluble factor gradient의 생성 등 여러분야의 연구에 적용되었다[16-19]. Kim et al (2006)은 logarithmic scale의 유속과 concentration gradient를 조절 가능한 device를 만들어 생성된 gradient에 따른 배아줄기세포의 morphology와 proliferation의 차이를 보였다[20]. 이와 같은 유속과 shear stress등의 조절능력은 배아줄기세포의 self-renewal과 proliferation, 그리고 상대적으로 빠른 유속에서 proliferation의 증가함 등을 보고하였다[21].

Microfluidic systems으로 component의 조절 말고도 세포에 기계적인 자극을 주어 분화를 조절하는 연구도 진행되었다. Park et al의 연구에서는 compressive cyclic loading이 human mesenchymal stem cells의

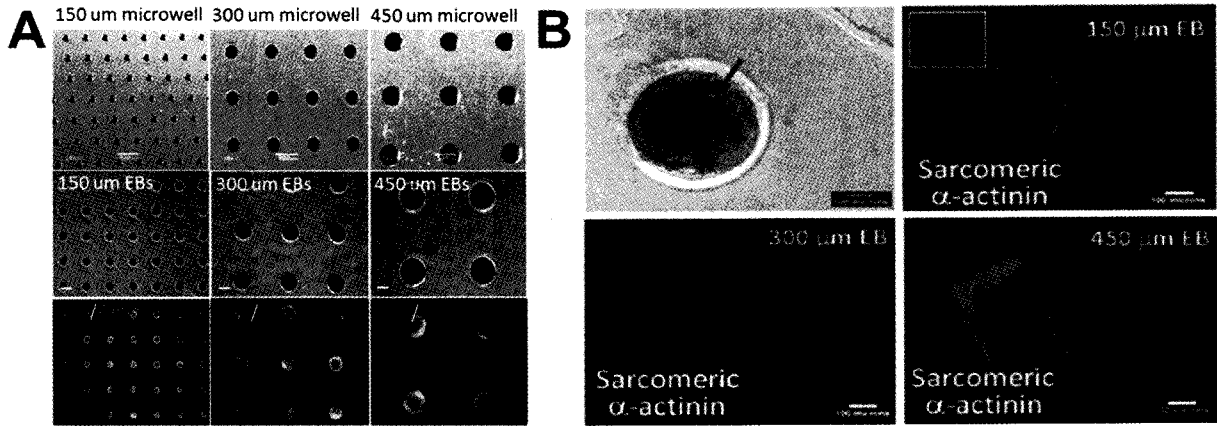


Figure 2. PEG microwell system, (A) 150 um, 300 um, 450 um의 PEG microwell system을 이용한 배양체의 생성 (Scale bar, 100 um), (B) Microwell에서 생성된 배양체의 beating하는 형태와 cardiomyogenic 분화로의 immunocytochemical characterization (Scale bar, 100 um). [34]

osteogenic differentiation을 유도하는 것을 밝혔다[22]. 또다른 연구에서는 인간 배아줄기세포로부터 분화된 endothelial 세포에 shear stress gradient를 주어 stress에 따른 다양한 gene expression을 보고 하였다[23]. 이러한 유속 또는 농도가 다양하게 조절가능한 microfluidic device는 줄기세포의 분화를 조절하는데 중요한 tool로 이용되고 있다[16, 24].

2.2. Surface micropatterning for controlling cell-cell contacts

2차원 표면에서의 마이크로 패턴을 이용하여 세포와 세포간의 contact을 조절하는 것이 가능하다[25, 26]. 배아줄기세포를 2차원 표면에 일정한 패턴으로 배치하기 위하여 microtopography[9, 27], microfabricated stencils [28], microcontact printing [29], 그리고 layer-by-layer deposition [30]과 같은 기술들이 활용 될 수 있는데 한 예로서 hydrogel microwell arrays를 들 수 있다. 이렇게 만들어진 microwell 내부에는 low shear stress region이 형성되어 배아줄기세포를 well내에 넣어 docking시키는 것이 가능케 한다. Microwell array를 활용하여 또한 co-culture도 가능한데 이와 같은 장점을 살려 feeder세포를 함께 패턴을 하여 배아줄기세포의 분화이전의 상태로의 유지도 가능하다[31]. Microwell arrays를 만들 때 쓰이는 생체 적합물질로는 대표적으로 polyethyleneglycol (PEG)로 제작한 hydrogel이 많이 연구된 상태이며 주로 균일

화된 세포의 seeding과 균일화된 크기의 배양체를 만드는데 쓰일 수 있다[32] (Figure 2A). Microwell을 이용한 배아줄기세포의 분화와 관련된 연구사례로는 공간적으로 크기가 조절된 배양체를 만들어 cardiogenic lineage로 분화를 시켜 beating을 synchronized시킨 연구가 있다[33]. 또한 배양체의 크기를 다양하게 일률적으로 조절하여 크기에 따라 일정 방향으로 분화하는 메커니즘을 연구중에 있다[29, 34] (Figure 2).

2.3. Microenvironments screening을 목적으로한 High-throughput microarrays

배아줄기세포의 분화는 세포의 마이크로 환경에 영향을 줄 수 있는 수많은 요소에 의해 끊임없이 영향을 받으며 진행이 되는데 이와 같은 방대한 가지수의 요소를 실험적으로 밝혀내기가 그리 간단하지 않고 더 나아가 각 요소들의 조합까지 고려한다면 터더욱 그렇다. 따라서 High-throughput system (HTS)을 개발하게 되었는데 주로 analysis, screening, 그리고 imaging단계로 나뉜다. 최근에는 HTS의 효율을 더욱 높이기 위하여 microarray시스템이 개발되었다. 가장 최근 개발되어 검증된 microarray방법에 의하면 하나의 glass slide (76.2 mm \times 26.4 mm)에 약 2000여개의 다른 조합의 ECM protein, soluble molecule (예: cytokine, growth factors등), 또는 생물고분자 같이 배아줄기세포의 분화에 관여할 수 있는 요소들을 단독으로 또는 조합을 이루어서 전통식 방법에 비해 더 효과적이고도 경

제적으로 screening을 할 수 있다. HTS를 이용한 배아줄기세포 연구사례로는 각기 다른 성질의 고분자들의 조합을 만들어 robotic arrayer를 이용하여 spotting을 한 다음 UV에 노출시켜 crosslink를 시킨 다음 배아줄기세포를 그 위에 배양하여 다양한 extracellular signal에 대하여 분화하는 방향을 조사하였다[35]. 슬라이드에 바로 spotting하는 방식은 때로는 region-to-region contamination을 일으키는 경우가 있어 결과를 분석하는데 어려움이 따르는 경우가 생겨 최근에는 이러한 문제점을 해결하기 위하여 sandwich HTS platform등이 개발되었다 (Figure 3). 그리고 2차원에서 세포의 반응보다는 더욱 *in vivo*와 흡사한 조건을 만들어 screening을 하기 위하여 HTS가 3D cell-based hydrogel system형식으로 발전되었다[36]. 이 연구에서는 array를 만들 때 prepolymer solution (alginate)과 세포를 혼합하여 3차원으로 array를 형성하여 세포의 3차원 환경에서 soluble factor에 대한 반응을 보았다. 현재 이와 같은 3차원 array를 이용하여 보다 더 다양한 종류의 요소에 대한 screening이 이루어지고 있다.

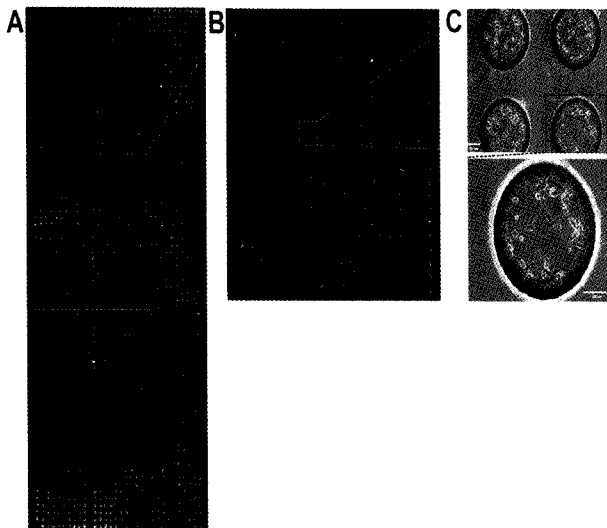


Figure 3. 세포가 loading된 high throughput screening 목적의 PEG microwellarray system (Scale bar, 100 um). (Unpublished data)

2.4. 3차원 scaffolds

배아줄기 세포의 분화에 대한 메커니즘이 밝혀져 오면서 조직공학 분야에서는 생체적합한 생분해성 고분자로 만든 scaffold를 이용하여 배아줄기세포의 성장과 분

화를 조절하는 연구가 많이 진행되었다[37]. Scaffolds는 구조적 지지대 역할을 할 수 있고 그밖에 세포의 attachment, orientation, alignment 그리고 spreading에 대한 신호를 가진다. 인공적인 3차원 조직을 만들 때 가장 기본이 되는 점은 만들어지는 생체물질 scaffold가 세포를 3차원 상에서 정렬시킬 수 있어야하고 따라서 세포가 원래 자라는 환경과 유사한 환경에서 본 기능을 할 수 있도록 유도할 수 있어야 한다. 이러한 접근방식은 세포가 사용되는 물질에 대한 예측가능한 반응을 바탕으로 *in vivo*에서 작용하는 factor들을 *in vitro*에서 사용하여 세포의 기능성을 조절한다는 점에 기반을 둔다. 여러가지의 환경적인 요인이 (예: 물리적 요인) 배아줄기세포의 분화에 관여한다고 알려져있는데 scaffold가 가질 수 있는 특징을 조절 함으로서 세포의 분화 방향을 조절하는 것이 가능하다. 이와 같은 연구 사례로는 특징이 조절된 생분해성 scaffold위에 배아줄기 세포를 배양시켜 osteogenic lineage와 bone nodule로의 분화를 증가시킨 연구가 있다[38]. 그밖에 배양체를 여러 다른 고분자 네트워크를 가지는 3차원 scaffold에 배양하여 분화를 조사하였다[39]. 3차원 scaffold의 각기 다른 구성에 따른 구조와 그에 따른 scaffold의 stiffness가 배아줄기세포의 분화방향을 결정짓는 것으로 조사되었고 이와 같은 연구결과를 바탕으로 원하는 인공조직의 배양에 있어 여러 특성이 조절 가능한 생체고분자 scaffold가 줄기세포 연구에 도움을 줄 수 있으리라 판단된다.

2.5. Microengineered building blocks : assembly를 통한 인공조직의 개발

3차원 scaffold의 생성으로 세포가 둘러싸인 마이크로 단위의 환경을 조절하는 것을 가능하게 하고 그렇게 만들어진 마이크로 크기의 scaffold block의 조합을 조절함으로써 인체내의 반복적인 조직 (예: lobule of a liver) 또는 그와 흡사한 구조를 *in vitro*에서 만들어 내는 것이 가능하다. 이와 같은 approach를 ‘Bottom-up’ approach이라고 하는데 세포를 포함하는 마이크로 hydrogel block을 만든 다음 원하는 조합으로 맞추어 더 큰 macro 스케일의 3차원 구조물을 만들어내는 방법이고 그 방식의 유사성 때문에 흔히 아이들의 block쌓기인

LEGO에 비유되기도 한다. 마이크로 block의 조합을 조절함으로써 더욱 정의된 인공조직의 구조를 만들어내는 것이 본 approach의 목표이다.

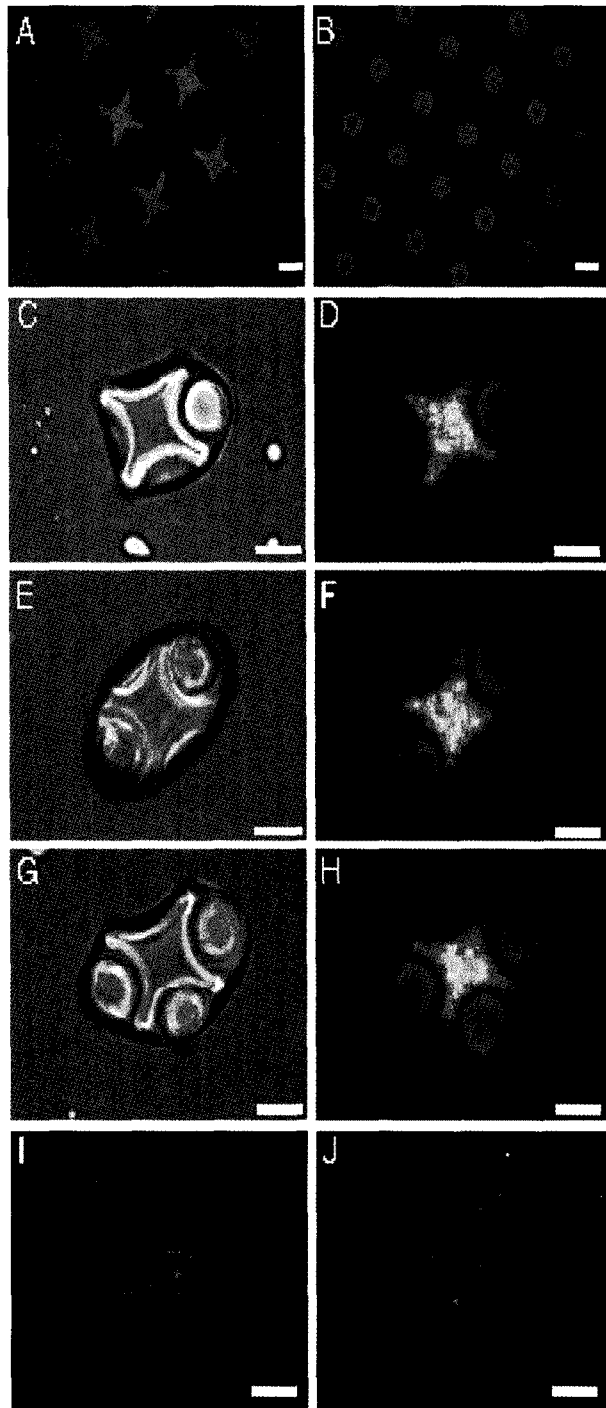


Figure 4. Directed assembly방법을 이용한 3차원 인공구조물의 생성. UV exposure와 photomask를 이용하여 Lock (A) 그리고 key (B) 모양을 한 hydrogel modules을 만든다음 미네랄오일 상에서 single (C,D), double (E,F), triple (G,H) 결합을 완성함으로써 co-culture 구조의 생성을 demonstrate 하였다 (Scale: 200um). [43].

실례로서 bottom-up의 한 방법중 layer-by-layer 테크닉은 일정한 패턴으로 정렬되어있는 세포와 ECM 또는 고분자를 순차적으로 photocrosslink하여 3차원 구조물을 만드는 방법이다[40-42]. 이 실험에서는 쥐의 간세포를 RGD로 기능화된 PEG과 혼합한다음 순차적인 photopolymerization을 거쳐 3차원의 별집모양의 구조물을 만들어 모의의 간조직을 만들어내었다. 이 방법은 인공간조직을 만들어내려는 많은 연구의 benchmark로서 많은 기여를 하였다. 현재는 만들어진 인공간조직의 간으로서의 기능을 향상시키고 임상적 실용화를 위하여 줄기세포를 이용하여 3차원 인공간조직을 만드는 연구가 진행중이다.

Bottom-up의 또다른 방법인 directed assembly 테크닉 또한 효과적으로 3차원 인공조직을 만드는데 기대가 되는 방법이다. Directed assembly의 한 예는 마이크로 크기의 세포를 포함한 hydrogel 블록을 assemble하기 위하여 친수성인 hydrogel의 표면장력을 이용하여 인공조직 구조물을 만드는 테크닉이 있다[43]. 여러 다른 aspect ratio를 가지는 세포를 포함한 hydrogel을 소수성의 mineral oil에 넣은 다음 각각의 hydrogel block의 표면 에너지를 최소화하려는 성질을 이용하여 하나의 구조물로 만들어낸다. 하나의 집합체로 assemble이 되면 곧바로 crosslinking을 거쳐 하나의 안정적인 조직으로 완성이 된다. 이 방법으로 인공조직의 형상과 크기는 각 block의 aspect ratio에 따라서 조절이 가능하며 lock-and-key와 같은 형상을 이용하여 더욱 향상된 조절능력을 가질 수 있다. 이와 같은 assembly 방법은 원하는 생체고분자물질을 이용, 여러 가지의 세포를 손쉽게 원하는 조합을 거쳐 3차원 인공구조물을 만들 수 있다는 점이 큰 장점이다. 이 방법 또한 현재 생체고분자를 줄기세포의 분화를 원하는 방향으로 조절 가능하게 기능성을 부여하여 줄기세포를 이용한 assembled 3차원 인공구조물을 만드는 연구가 활발히 이루어지고 있다.

3. 결론

이와 같이 배아줄기세포는 조직공학과 재생의학 분야에 대한 잠재적인 세포의 원천으로 간주되고 있지

만, 만들어지는 인공조직의 목적에 맞게 부여될 정확한 기능을 위하여 줄기세포의 분화를 정확히 유도하는 것이 최대의 과제로 여겨지고 있다. Biomaterials과 microengineering의 적용은 줄기세포 cell biology의 보다 정확한 이해와 더불어 줄기세포를 이용한 재생의학 분야 발전에 기여하리라 기대되고 있다.

4. 참고문헌

- [1] Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. *Cell*, 2006. **126**(4): p. 663-676.
- [2] Wobus, A.M. and K.R. Boheler, *Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy*. *Physiol Rev*, 2005. **85**(2): p. 635-78.
- [3] Murtuza, B., J.W. Nichol, and A. Khademhosseini, *Micro- and nanoscale control of the cardiac stem cell niche for tissue fabrication*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2009. **15**(4): p. 443-54.
- [4] Fukuda, J., et al., *Micromolding of photocrosslinkable chitosan hydrogel for spheroid microarray and co-cultures*. *Biomaterials*, 2006.
- [5] Tien, J. and C.S. Chen, *Patterning the cellular microenvironment*. *IEEE Eng Med Biol Mag*, 2002. **21**(1): p. 95-8.
- [6] Tien, J., C.M. Nelson, and C.S. Chen, *Fabrication of aligned microstructures with a single elastomeric stamp*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(4): p. 1758-62.
- [7] Nelson, C.M. and C.S. Chen, *VE-cadherin simultaneously stimulates and inhibits cell proliferation by altering cytoskeletal structure and tension*. *J Cell Sci*, 2003. **Sep 1**(116): p. 3571-81.
- [8] Khademhosseini, A., et al., *Molded polyethylene glycol microstructures for capturing cells within microfluidic channels*. *Lab Chip*, 2004. **4**(5): p. 425-30.
- [9] Karp, J.M., et al., *Controlling size, shape and homogeneity of embryoid bodies using poly(ethylene glycol) microwells*. *Lab on a Chip*, 2007. **7**: p. 786-94.
- [10] Khademhosseini, A., et al., *Micromolding of photocrosslinkable hyaluronic acid for cell encapsulation and entrapment*. *J Biomed Mater Res A*, 2006. **79**(3): p. 522-32.
- [11] Napolitano, A.P., et al., *Dynamics of the Self-Assembly of Complex Cellular Aggregates on Micromolded Nonadhesive Hydrogels*. *Tissue Eng Part A*, 2007. **13**(8): p. 2087-94.
- [12] Nichol, J.W. and A. Khademhosseini, *Modular tissue engineering: Engineering Biological Tissues from the Bottom Up*. *Soft Matter*, 2009. **5**: p. 1312-19.
- [13] Peppas, N.A., et al., *Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology*. *Advanced Materials*, 2006. **18**(11): p. 1345-1360.
- [14] Whitesides, G.M., *The origins and the future of microfluidics*. *Nature*, 2006. **442**(7101): p. 368-373.
- [15] McDonald, J.C., et al., *Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)*. *Electrophoresis*, 2000. **21**(1): p. 27-40.
- [16] Rhee, S.W., et al., *Patterned cell culture inside microfluidic devices*. *Lab Chip*, 2005. **5**(1): p. 102-7.
- [17] Tan, W. and T.A. Desai, *Microfluidic patterning of cells in extracellular matrix biopolymers: effects of channel size, cell type, and matrix composition on pattern integrity*. *Tissue Eng*, 2003. **9**(2): p. 255-67.
- [18] Chiu, D.T., et al., *Patterned deposition of cells and proteins onto surfaces by using three-*

- dimensional microfluidic systems*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(6): p. 2408-13.
- [19] Takayama, S., et al., *Subcellular positioning of small molecules*. Nature, 2001. **411**(6841): p. 1016.
- [20] Kim, L., et al., *Microfluidic arrays for logarithmically perfused embryonic stem cell culture*. Lab Chip, 2006. **6**(3): p. 394-406.
- [21] Meinel, L., et al., *Bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells: effects of scaffold material and medium flow*. Ann Biomed Eng, 2004. **32**(1): p. 112-22.
- [22] Park, S.H., et al., *An electromagnetic compressive force by cell exciter stimulates chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Tissue Engineering, 2006. **12**(11): p. 3107-3117.
- [23] Metallo, C.M., et al., *The response of human embryonic stem cell-derived endothelial cells to shear stress*. Biotechnology and Bioengineering, 2008. **100**(4): p. 830-837.
- [24] Tourovskaia, A., X. Figueroa-Masot, and A. Folch, *Differentiation-on-a-chip: A microfluidic platform for long-term cell culture studies*. Lab on a Chip, 2005. **5**(1): p. 14-19.
- [25] Khademhosseini, A., et al., *Microscale technologies for tissue engineering and biology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(8): p. 2480-7.
- [26] Chung BG, Kang L, and Khademhosseini A, *Micro- and nanoscale approaches for tissue engineering and drug discovery*. Expt Opin Drug Dis, 2007. **2**(12): p. 1653-1668.
- [27] Khademhosseini A, et al., *Micromolding of photocrosslinkable hyaluronic acid for cell encapsulation and entrapment*. J Biomed Mater Res A, 2006. **79**(3): p. 522-532.
- [28] Moeller, H.-C., et al., *A microwell array system for stem cell culture*. Biomaterials, 2008. **29**(6): p. 752-763.
- [29] Bauwens, C.L., et al., *Control of Human Embryonic Stem Cell Colony and Aggregate Size Heterogeneity Influences Differentiation Trajectories*. Stem Cells, 2008. **26**(9): p. 2300-2310.
- [30] Khademhosseini, A., et al., *Layer-by-layer deposition of hyaluronic acid and poly-L-lysine for patterned cell co-cultures*. Biomaterials, 2004. **25**(17): p. 3583-3592.
- [31] Mohr JC, de Pablo JJ, and Palecek SP, *3-D microwell culture of human embryonic stem cells*. Biomaterials, 2006. **27**(36): p. 6032-6042.
- [32] Kang, L., et al., *Cell confinement in patterned nanoliter droplets in a microwell array by wiping*. J Biomed Mater Res A, 2009.
- [33] Ungrin MD, et al., *Reproducible, ultra high-throughput formation of multicellular organization from single cell suspension-derived human embryonic stem cell aggregates*. PLoS ONE, 2008. **3**(2): p. e1565.
- [34] Hwang, Y.S., et al., *Microwell-mediated control of embryoid body size regulates embryonic stem cell fate via differential expression of WNT5a and WNT11*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(40): p. 16978-83.
- [35] Anderson, D.G., S. Levenberg, and R. Langer, *Nanoliter-scale synthesis of arrayed biomaterials and application to human embryonic stem cells*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(7): p. 863-6.
- [36] Fernandes, T.G., et al., *Three-dimensional cell culture microarray for high-throughput studies of stem cell fate*. Biotechnol Bioeng, 2010. **106**(1): p. 106-18.
- [37] Levenberg, S., et al., *Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds*. Proc Natl Acad Sci USA, 2003. **100**(22): p. 12741-6.

- [38] Chaudhry GR, et al., *Osteogenic cells derived from embryonic stem cells produced bone nodules in three-dimensional scaffolds*. Journal of biomedicine & biotechnology, 2004. **4**: p. 203-210.
- [39] Battista, S., et al., *The effect of matrix composition of 3D constructs on embryonic stem cell differentiation*. Biomaterials, 2005. **26**(31): p. 6194-207.
- [40] Tsang, V.L. and S.N. Bhatia, *Fabrication of three-dimensional tissues*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2007. **103**: p. 189-205.
- [41] Tsang, V.L. and S.N. Bhatia, *Three-dimensional tissue fabrication*. Adv Drug Deliv Rev, 2004. **56**(11): p. 1635-47.
- [42] Tsang, V.L., et al., *Fabrication of 3D hepatic tissues by additive photopatterning of cellular hydrogels*. Faseb J, 2007. **21**(3): p. 790-801.
- [43] Du, Y., et al., *Directed assembly of cell-laden microgels for fabrication of 3D tissue constructs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(28): p. 9522-9527.
- [44] Heng, B.C., T. Cao, and E.H. Lee, *Directing Stem Cell Differentiation into the Chondrogenic Lineage In Vitro*. Stem Cells, 2004. **22**(7): p. 1152-1167.

