

인간 배아줄기세포로의 eGFP 유전자 도입 및 특성 분석

서울대학교 의학연구원 인구의학연구소¹, 의과대학 산부인과학교실², 삼진제약 주식회사 중앙연구소³

김윤영¹ · 구승엽^{1,2} · 박용빈^{1,3} · 오선경^{1,2} · 문신용^{1,2} · 최영민^{1,2*}

Transduction of eGFP Gene to Human Embryonic Stem Cells and Their Characterization

Yoon Young Kim¹, Seung-Yup Ku^{1,2}, Yong Bin Park^{1,3}, Sun Kyung Oh^{1,2},
Shin Yong Moon^{1,2}, Young Min Choi^{1,2*}

¹Institute of Reproductive Medicine and Population, Medical Research Center, Seoul National University,

²Department of Obstetrics and Gynecology, Seoul National University College of Medicine,

³Central Research Institute, Sam Jin Pharm. Co. Ltd.

Objective: Human embryonic stem cells (hESCs) can proliferate indefinitely and differentiate into all kinds of cell types *in vitro*. Therefore, hESCs can be used as a cell source for cell-based therapy. Transduction of foreign genes to hESCs could be useful for tracing differentiation processes of hESCs and elucidation of gene function. Thus, we tried to introduce enhanced green fluorescent protein (eGFP) gene to hESCs, XX and XY cell lines in this study.

Methods: Lentivirus containing eGFP was packaged in 293T cells and applied to hESCs to transduce eGFP. Expression of transduced eGFP was evaluated under the fluorescence microscope and eGFP positive population was analyzed by FACS. Expression of undifferentiation state markers such as Oct4, Nanog, SSEA4 and Tra-1-81 was examined by RT-PCR and/or immunofluorescence in eGFP-hESCs after transduction. In addition, the ability of eGFP-hESCs to form embryoid bodies (EBs) was tested.

Results: eGFP was successfully transduced to hESCs by lentivirus. eGFP expression was stably maintained up to more than 40 passages. eGFP-hESCs retained expression patterns of undifferentiation state markers after transduction. Interestingly, disappearance of transduced eGFP was notably observed during spontaneous differentiation of eGFP-hESCs.

Conclusion: We established eGFP expressing hESC lines using lentivirus and showed the maintenance of undifferentiation characteristics of these eGFP-hESCs. This reporter-containing hESCs could be useful for tracing the processes of differentiation of hESCs and other studies.

[Korean. J. Reprod. Med. 2009; 36(4): 283-292.]

Key Words: Human embryonic stem cells, Enhanced green fluorescent protein, Lentivirus

인간 배아줄기세포 (human embryonic stem cells; hESCs)는 착상 전 포배 (blastocyst)의 내세포괴 (inner cell mass)로부터 유래되어, 체외에서 자가증식 (self-renewal)을 통해 미분화 상태 (undifferentiated

state)를 유지하며, 인체를 구성하는 모든 종류의 세포로 분화할 수 있는 전분화능 (pluripotency)을 가진 세포이다.^{1,2} 이러한 특성에 따라, 인간 배아 줄기세포로부터 특정세포로의 분화를 유도한 후, 세포치료를 위한 약물 스크리닝 및 인간 발생의 연구모델 등으로 활용될 수 있을 것으로 기대를 모으고 있다. 인간 배아줄기세포의 확립이 처음 보고된 이후, 인간 배아줄기세포에 표지 유전자

주관책임자: 최영민, 우) 110-744 서울특별시 종로구 연건동 28, 서울대학교 의과대학 산부인과학교실
Tel: (02) 2072-2385, Fax: (02) 762-3599
e-mail: ymchoi@snu.ac.kr

*본 연구의 요지는 제56차 대한생식의학회 춘계학술대회에서 우수포스터상을 수상하였습니다.

(reporter gene)를 도입하여 분화 진행 정도를 추적하거나, 세포 계열 (lineage) 특이적 유전자를 도입하여 특정세포로의 분화 효율을 높이려는 연구 등이 시도되었다.³ 그러나 인간 배아줄기세포는 기존의 다른 세포주들과 달리 단일세포 (single cell)로 자라지 않고, 군락 (colony)을 이루면서 자라는 특성 및 미분화 상태를 유지에 기여하는 지지세포 (feeder cell) 또는 지지세포를 배제하고 미분화 상태를 유지하기 위한 배양환경 (feeder-free)의 필요성 등의 고유한 배양환경적 특성에 따라 외부의 유전자 도입이 어려운 것으로 알려져 있다. 또한 생쥐 배아줄기세포 (mouse embryonic stem cells; mESCs) 등과 같은 기존의 세포주와는 달리 전기투과법 (electroporation) 등의 방법으로 외래 유전자를 도입할 경우, 생존율 등이 낮은 한계점이 있어 유전적 조작이 어려운 것으로 알려져 있다.⁴

인간 배아줄기세포로의 외부 유전자 도입에는 lipofection 방법,⁵ 전기투과법,⁴ 단백질 전달체,⁶ 아데노 바이러스⁷ 및 렌티 바이러스⁸ 등을 이용한 방법들이 시도되었다. 상기한 여러 방법 중, 가장 효율적인 것으로 알려진 방법은 레트로 바이러스의 일종인 HIV-1에서 유래되어 사용되고 있는 렌티 바이러스를 이용한 유전자 도입법이다. 렌티 바이러스는 분열중인 세포와 분열하지 않는 상태의 세포 모두에게 감염될 수 있으며, 포유류 배아줄기세포의 유전자 조작에 가장 효과적인 방법으로 알려져 있다.⁹ 인간 배아줄기세포에 렌티 바이러스를 이용하여 외래 유전자를 도입한 후에도 배아줄기세포는 미분화 상태를 유지하며, 다양한 세포로 분화하는 동안에도 발현이 지속된다는 사실이 보고되고 있다. 따라서 렌티 바이러스를 이용하여 다양한 유전자를 인간 배아줄기세포로 도입하는 연구가 활발히 진행되었다.^{3,10~13}

Gropp 등 (2003)은 렌티 바이러스를 이용하여 GFP 유전자를 인간 배아줄기세포에 도입한 후 그 발현이 38주 이상 지속됨을 확인하였으며,⁸ Xiong 등 (2005)은 렌티 바이러스를 이용하여 siRNA를 세포 내로 전달하여 목표 유전자의 발현이 억제됨을

확인함으로써, 렌티 바이러스를 이용하여 인간 배아줄기세포 내의 유전자의 기능 조절이 가능함을 제시하였다.³ 렌티 바이러스에 다양한 프로모터를 장착한 후 그 효율을 비교한 연구도 보고되었다. Kim 등 (2007)은 elongation factor-1 α (EF1 α) 또는 cytomegalovirus (CMV) 프로모터가 장착된 렌티 바이러스를 이용하여 생쥐, 원숭이 및 인간 배아줄기세포에 도입한 후 eGFP 발현 효율을 비교하여, 효과적인 프로모터를 선별하였다.¹⁴

본 연구에서는 렌티 바이러스를 이용하여 enhanced green fluorescent protein (eGFP) 유전자를 인간 배아줄기세포에 도입하여, eGFP가 도입된 인간 배아줄기세포주를 확립하고, 그 특성을 분석하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 인간 배아줄기세포의 배양

인간 배아줄기세포주 SNUhES3 (46, XY)²와 SNUhES12 (46, XX)를 실험에 이용하였으며, 배양 방법은 Oh 등 (2005)에 의해 발표된 방법을 이용하였다.¹⁵ 인간 배아줄기세포의 배양은 mitomycin C (Sigma, USA)를 처리한 STO (CRL-1503; ATCC, USA) 지지세포 위에서 매 7일마다 기계적 분리법을 이용하여 계대배양하였다. 배양액은 DMEM/F12 (Invitrogen, USA)를 기본으로 하여, 20% knockout SR (KO-SR; Invitrogen), MEM NEAA (Invitrogen), 50 units Penicillin (Invitrogen), 50 g/ml Streptomycin (Invitrogen), 2 mM β -Mercaptoethanol (Sigma) 및 4 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF; Invitrogen)를 첨가하여 사용하였다. 배아체 (embryoid body; EB) 배양 시 사용된 배양액의 조성은 인간 배아줄기세포의 배양에 사용된 배양액과 같으며, bFGF를 첨가하지 않고 사용하였다.

2. 배아체 형성

eGFP가 도입된 미분화 상태의 인간 배아줄기세포에 2 mg/ml Collagenase type IV (Invitrogen)를 첨가

Table 1. Primer sequences used for RT-PCR

Gene	Forward	Reverse	bp
GAPDH	GGCGTTCTCTTTGGAAAGGTGTTC	GTA CTCAGCGGCCAGCATCG	302
OCT4	GAGAACAATGAGAACCTTCAGGA	CTCGAACCACATCCTTCTCT	314
NANOG	GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA	TGCTATTCTTCGGCCAGTTG	385

Yoon Young Kim. Transduction of eGFP Gene to Human Embryonic Stem Cells and Their Characterization. Korean J Reprod Med 2009.

한 후, 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 후, 지지 세포와 배아줄기세포 군락의 경계부위를 부드럽게 밀어 분리하였다. 분리된 군락들을 튜브에 모은 후 1,500 rpm으로 5분간 원심분리한 후, 상층액을 제거하였다. 군락들을 배아체 배양접시에 옮겨준 후, 배아체 배양액을 첨가하여 부유배양 (suspension culture)하였다. 이를 뒤, 배아체의 형성 여부를 확인하였으며, 형성된 배아체에서의 eGFP 발현을 형광현미경 (Nikon, Japan)으로 관찰하였다.

3. 렌티 바이러스 생산 및 이를 이용한 eGFP 유전자 도입

최적의 transfection 조건을 확인하기 위하여, ExGen 500 (Fermentas, USA), Lipofectamine 2000 (Invitrogen), FuGene 6 (Roche, Germany) 등 각각의 reagent를 이용하여 DNA를 2×10^4 의 농도로 도포된 293T (CRL-11268; ATCC, USA) 세포에 transfection 시킨 후, 유세포 분석을 이용하여 효율을 비교한 후, 최적의 transfection 방법을 선별하였다.

렌티 바이러스 벡터는 일본 RIKEN 연구소의 Miyoshi 박사로부터 제공받아 사용하였으며,¹⁶ 다음의 플라스미드로 구성되었다: Packaging 플라스미드 pCAG-HIVgp (gp), Rev 단백질을 위한 발현 벡터인 pCMV-VSV-G-RSV-Rev (VSVG) 및 EGFP를 암호화 하고 있는 pCSII-EF1 α -MCS-IRES-EGFP (EG). 2×10^5 개의 293T 세포를 도포한 후, 다음날 플라스미드의 DNA를 각각 gp 10 μ g, VSVG 10 μ g, EG 20 μ g을 ExGen 500을 이용하여 transfection 시켰다. 293T 세포를 위한 배양액은 DMEM (Invitrogen)을 기본으로 하여 10%의 소 태아 혈청 (FBS; HyClone, USA)을 첨가하여 사용하였다. Transfection

후 매 24시간, 3일 동안 293T 세포로부터 상층액을 수거하였다. 수거된 상층액은 0.45 μ m 필터 (Millipore, USA)를 이용하여 여과한 후, Centricon ultra-15 (Millipore)을 이용하여 농축시킨 후, -70°C에 분주하여 보관하였다. 농축된 상층액을 농도 별로 희석하여 293T 세포에 infection 시킨 후 유세포 분석을 이용하여 바이러스의 농도 (titer)를 측정하였으며, 농축된 상층액의 농도는 $2.5 \sim 3.5 \times 10^6$ 였다.

미분화 상태의 인간 배아줄기세포를 작은 조각 (clump)으로 잘라, 바이러스 농축액이 포함된 배양액을 넣고, 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 3시간 후 원심분리를 수행하여, 상층액을 제거한 후, 배양액을 첨가하여 다시 한번 원심분리를 수행하였다. 이후 세포의 조각들을 지지세포층이 도포된 배양접시에서 2일 동안 배양하였다. 2일 후부터 배양액을 매일 교체하였으며, eGFP의 발현 여부를 형광현미경 (Nikon)을 이용하여 확인하였다 (Figure 1).

4. 역전사 중합반응 (RT-PCR)

시료로부터 Trizol (Invitrogen)을 이용하여 RNA를 추출하였다. RNA 1 μ g을 이용하여 cDNA를 합성한 후, cDNA에 각각의 primer를 첨가하여 55°C에서 결합 (annealing) 시킨 후, 35주기로 증폭하였다. 증폭에 사용된 primer의 염기서열은 Table 1과 같다. 증폭된 산물은 2% agarose 겔에서 전기영동하여 확인하였다.

5. 면역형광염색법

시료를 4% paraformaldehyde (PFA; Sigma) 용액으로 상온에서 20분간 고정하였다. PBS 용액으로 2

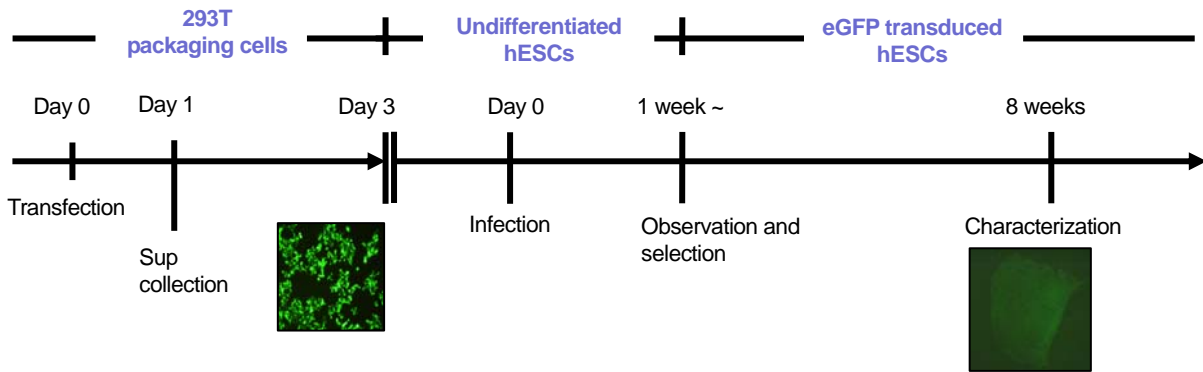


Figure 1. Experimental scheme for transduction of eGFP to hESCs using lentiviral vector. Viral DNAs were transfected to 293T cells by ExGen 500 and supernatant was collected every 24 hr for 3 days. Collected viral sup was concentrated and added to dissociated hESC clumps. The clumps were incubated for 3 hrs at 37°C for the transduction of eGFP. And then, hESCs were washed and replated onto fresh feeder layer. Expression of eGFP in hESCs was observed under fluorescence microscope. Characterization of eGFP-hESCs was performed at the 8th passage after transduction.

Yoon Young Kim. Transduction of eGFP Gene to Human Embryonic Stem Cells and Their Characterization. Korean J Reprod Med 2009.

번 세정한 후, 비특이적 반응을 억제하기 위하여 0.3% Triton X100 (Sigma)이 포함된 3% bovine serum albumin (BSA; Sigma) 용액을 첨가한 후, 4°C에서 12시간 이상 반응시킨다. 이후 일차 항체 mouse anti-human Oct4 (SantaCruz Biotechnology, USA), mouse anti-human SSEA-4 (Chemicon, USA), goat anti-human Tra-1-81 (Chemicon)을 1:100의 농도로 첨가한 후, 역시 4°C에서 밤새 반응시킨다. 다음날, 0.05% Tween 20 (Sigma)가 포함된 PBS 용액 (PBST)으로 두 번 세정한 뒤, 이차 항체 Alexa Fluor anti-mouse 594 (Molecular Probes, USA), Alexa Fluor anti-goat 594 (Molecular Probes)를 1:200의 농도로 첨가한다. 그 다음으로, 상온에서 1시간 동안 반응시킨 뒤, PBST 용액으로 2번 세정한다. 세정 후, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)가 포함되어 있는 mounting 용액 (Vector Laboratories, USA)을 첨가한 후 공초점 형광현미경 (confocal laser scanning microscope; BioRad, USA)를 이용하여 관찰하였다.

6. 유세포 분석

시료에 0.25% trypsin-EDTA (Invitrogen)를 첨가하여 단일세포로 분리하였다. 분리된 세포들을 PBS를 이용하여 세정하였다. 원심분리 후 상층액을

제거하고, 500 µl의 PBS 용액에 부유시킨 후 FACS Calibur™ (BD Biosciences, USA)를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 최적 transfection reagent의 선별

최적의 transfection reagent를 선별하기 위해 ExGen 500, Lipofectamine 2000 및 FuGene 6를 이용하여 벡터를 293T 세포에 transfection 시킨 후, eGFP의 발현을 확인하였다 (Figure 2). 3종류의 reagent를 이용하여 eGFP를 transfection 시킨 결과, ExGen 500을 이용한 경우 가장 많은 세포가 eGFP를 발현하고 있음을 형광현미경을 이용하여 확인하였다. Lipofectamine 2000를 이용한 경우도 높은 비율로 eGFP를 발현하는 세포를 확인할 수 있었으나, ExGen 500과 비교하여 그 비율은 높지 않았다. FuGene 6를 이용한 경우 eGFP를 발현하는 세포가 매우 적은 수로 관찰되었다. eGFP를 발현하는 세포의 비율을 확인하기 위해 유세포 분석을 수행한 결과, eGFP를 발현하는 세포의 비율은 ExGen 500을 이용한 경우 90%, Lipofectamine 2000를 이용한 경우 66.7%였으며, FuGene 6는 3.0%로 매우, 낮

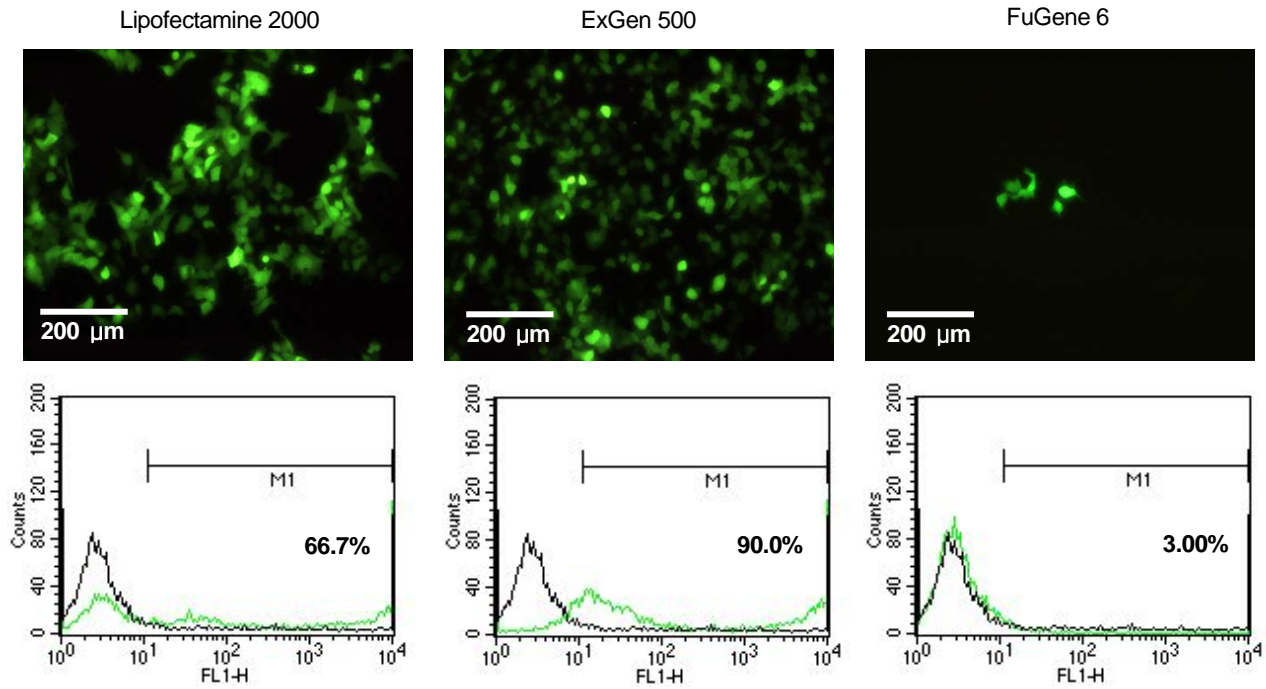


Figure 2. Transfection efficiency of lipofection reagents in 293T cells. Transfection efficiency of eGFP lentiviral vector using several lipofection reagents in 293T cells was evaluated by microscopic observation and FACS analysis.

Yoon Young Kim. Transduction of eGFP Gene to Human Embryonic Stem Cells and Their Characterization. Korean J Reprod Med 2009.

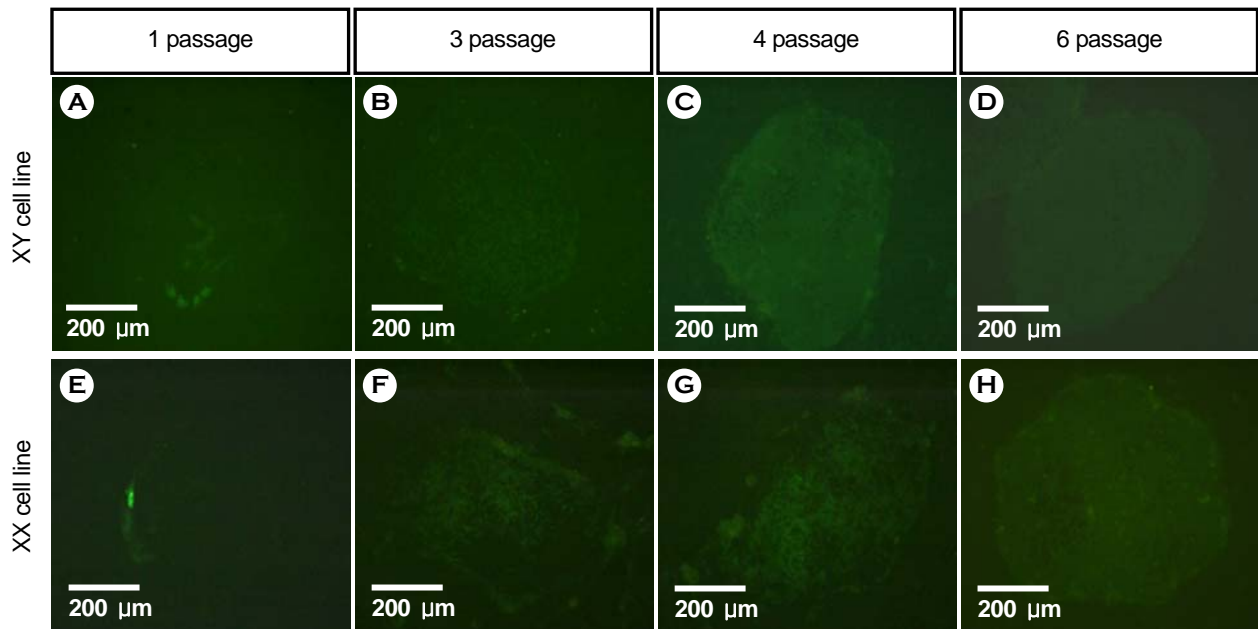


Figure 3. eGFP expression in hESC colonies after transduction. **A-D**, eGFP expression in XY hESC line at 1, 3, 4 and 6 week(s) after transduction, respectively, **E-H**, eGFP expression in XX hESC line at 1, 3, 4 and 6 week(s) after transduction, respectively.

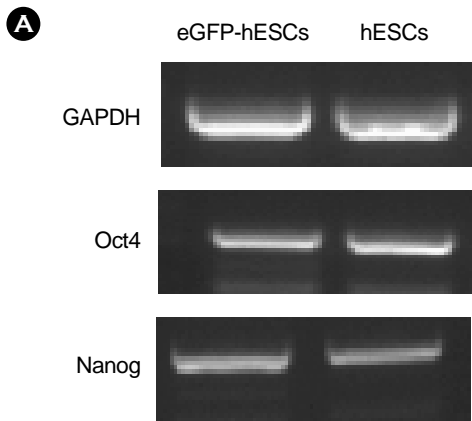
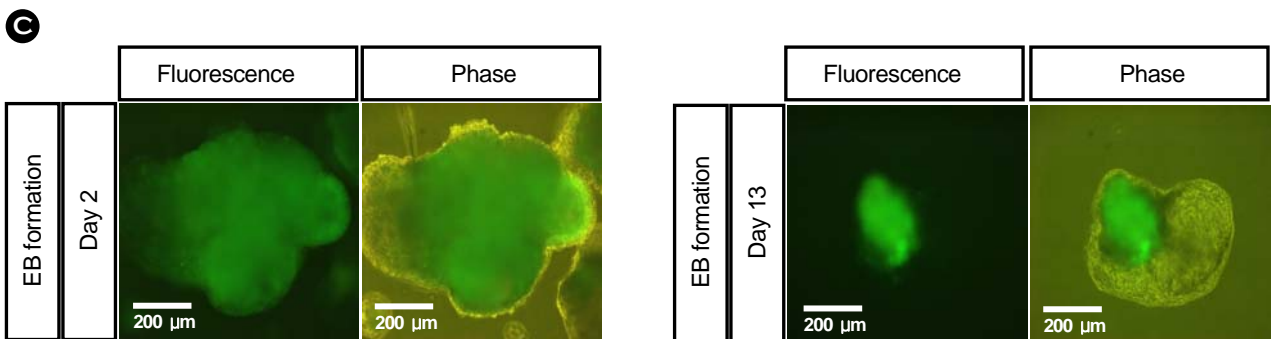
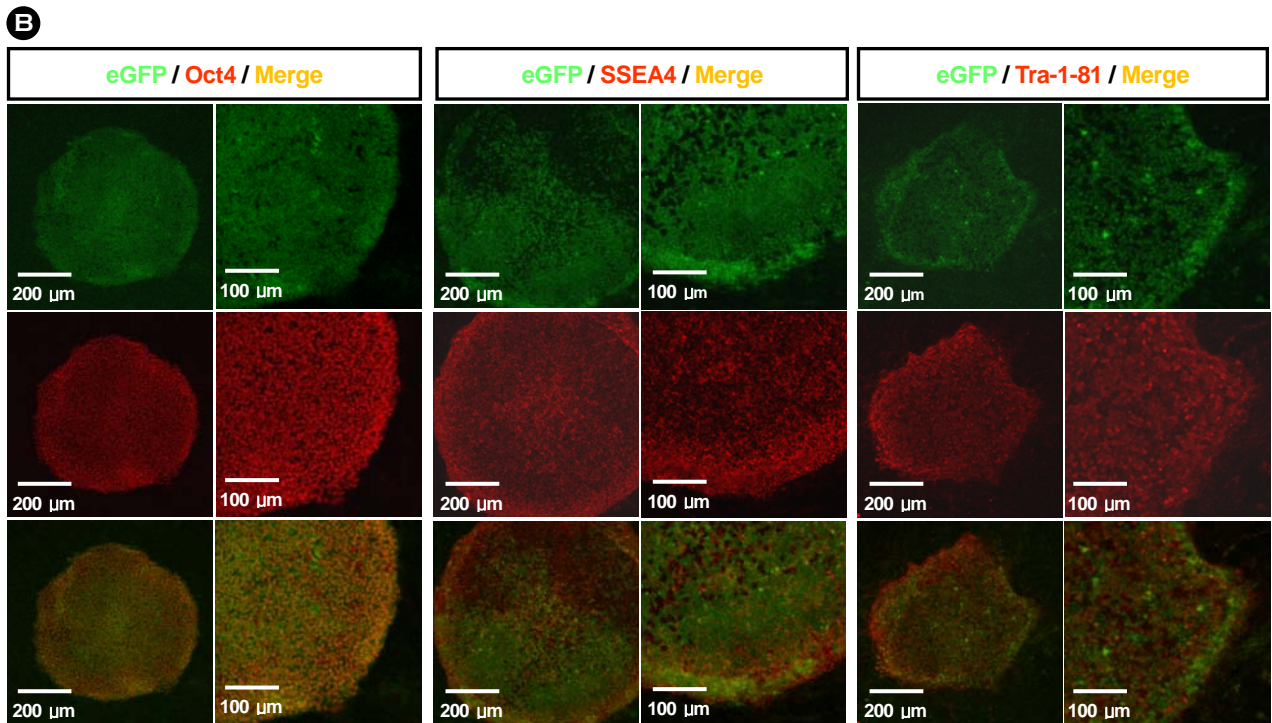


Figure 4. Evaluation of hESC characteristics in eGFP-hESCs. Characterization of eGFP-hESCs was evaluated at the 8th passage in XY hESC lines. **A**; Representative images of RT-PCR results of Oct4 and Nanog in eGFP-hESCs. **B**; Immunostaining results of undifferentiated state markers in eGFP-hESCs. Expression of specific markers such as Oct4, SSEA4 and Tra-1-81 were co-localized with eGFP expression. **C**; EB formation of eGFP-hESCs. Undifferentiated eGFP-hESCs were cultured in suspension to form EBs. At day 2, formed EBs expressed eGFP and the fluorescence was decreased as they spontaneously differentiated (day 13).

Yoon Young Kim. Transduction of eGFP Gene to Human Embryonic Stem Cells and Their Characterization. Korean J Reprod Med 2009.



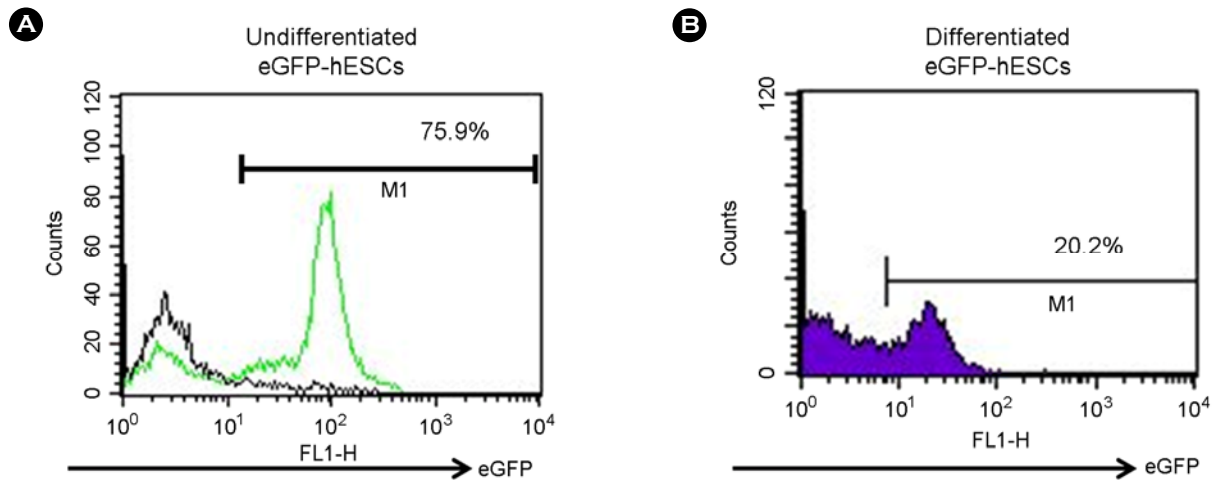


Figure 5 FACS analysis of eGFP expression in undifferentiated and differentiated hESCs. Positive population of eGFP in undifferentiated (A) and spontaneously differentiated (B) eGFP-hESCs.

Yoon Young Kim. Transduction of eGFP Gene to Human Embryonic Stem Cells and Their Characterization. Korean J Reprod Med 2009.

았다. 현미경 관찰 및 유세포 분석 결과를 종합하여, transfection reagent 중 ExGen 500이 최적의 transfection reagent임을 확인하였다.

2. 인간 배아줄기세포에서의 eGFP 발현

eGFP 유전자 도입 후에 지속적인 eGFP의 발현 여부를 관찰하였다. 도입 후 초기에는 군락 내의 일부 세포들에서 eGFP의 발현을 관찰하였으며, eGFP 도입 5 계대 (passage) 후에는 XY와 XX핵형 (karyotype)을 가진 인간 배아줄기세포주에서 eGFP를 발현하는 군락 전체가 관찰되었다 (Figure 3). eGFP 도입 후 40 계대가 지난 후에도 eGFP의 발현은 지속되었으며, 이상의 결과로 XX와 XY의 핵형을 가진 인간 배아줄기세포주에 eGFP가 성공적으로 도입되었음을 확인하였다.

3. eGFP가 도입된 인간 배아줄기세포의 특성 분석

1) 미분화 표지인자의 발현

eGFP가 도입된 인간 배아줄기세포에서 미분화 표지인자의 발현을 mRNA 및 단백질 수준에서 분석하였다. 전사인자 Oct4와 Nanog 모두 eGFP가 도입된 인간 배아줄기세포주에서 eGFP가 도입되지

않은 인간 배아줄기세포주와 비교하여 대등하게 발현함을 확인하였다 (Figure 4A). 면역형광염색 결과, eGFP를 발현하는 군락에서 Oct4, SSEA-4 및 Tra-1-81가 발현됨을 확인하였다 (Figure 4B). 이러한 결과를 통해 렌티 바이러스를 이용하여 eGFP를 도입시킨 인간 배아줄기세포에서 인간 배아줄기세포의 특성이 유지되고 있음을 확인하였다.

2) 배아체 형성 및 eGFP 발현

eGFP를 발현하는 인간 배아줄기세포주로부터 배아체를 형성시켜 자연적 분화 (spontaneous differentiation)를 유도한 후, eGFP 발현의 변화 정도를 관찰하였다. eGFP가 도입된 인간 배아줄기세포주는 성공적으로 배아체를 형성하였으며, 2일 후에 관찰한 결과 대부분의 세포에서 eGFP의 발현이 유지됨을 확인하였다. 분화기간이 지속됨에 따라, eGFP 발현 정도는 감소하였으나, 10일 이후에도 일부 세포에서 eGFP의 발현이 확인되었다 (Figure 4C). 이러한 실험 결과, eGFP가 도입된 후에도 인간 배아줄기세포는 분화능을 유지하며, 또한 eGFP의 발현은 자연적 분화의 진행에 따라 점차 발현이 감소됨을 확인하였다.

4. 미분화 및 분화된 인간 배아줄기세포에서의 eGFP 발현 양상 분석

eGFP가 도입된 인간 배아줄기세포주의 미분화 및 분화된 세포에서 eGFP를 발현하는 세포의 비율을 측정하였다. eGFP 도입 6 계대 후 유세포 분석을 수행한 결과 75.9%의 세포가 eGFP를 발현하는 것을 확인하였다 (Figure 5A). eGFP 도입 30 계대 후 미분화 상태의 세포가 자연적으로 분화되었을 경우 eGFP의 발현이 감소되는 양상을 형광현미경 하에서 관찰하여, 그 비율을 분석하였다. 자연적 분화가 일어난 경우에 eGFP의 발현은 감소되었으며, 20.2%의 세포가 eGFP를 발현하였다 (Figure 5B).

고 찰

렌티 바이러스를 이용한 배아줄기세포로의 유전자 도입은 유전자 도입 후에도 배아줄기세포의 고유한 특성인 자가증식과 전분화능이 유지된다는 사실이 알려지면서,¹⁷ 인간 배아줄기세포의 유전자 조작 (gene manipulation)에 사용되고 있다. 특정세포로의 분화 조절 및 특정 유전자의 기능 분석 및 표지 유전자의 도입 등을 위해 다양하게 이용되고 있다.

표지 유전자가 장착된 인간 배아줄기세포주는 Gropp 등 (2003)에 의해 보고된 바 있는데, 렌티 바이러스를 이용하여 도입된 eGFP가 오랜 시간의 체외배양 후에도 그 발현을 유지하며, 유전자 도입 후에도 배아줄기세포의 특성을 유지한다는 사실을 보고한 바 있다.⁸ Kim 등 (2007)은 eGFP 유전자를 도입한 후 특성 분석을 통해 미분화 표지인자의 발현 및 기형종의 형성 등의 인간 배아줄기세포의 특성을 유지하고 있음을 확인하였다.¹⁴ 표지 유전자의 도입 외에 Lavon 등 (2006)은 insulin 프로모터와 pancreatic and duodenal homeobox factor-1 (Pdx1) 프로모터에 eGFP가 장착된 벡터를 렌티 바이러스를 이용하여 인간 배아줄기세포로 도입한 후, 분화 양상을 분석하였다.¹⁸

본 실험에서는 293T 세포에 transfection을 수행하기 위하여, 여러 lipofection reagent들의 효율을 비교하였다. 비교 결과 Lipofectamine 2000과 ExGen 500을 이용한 방법은 효율이 50% 이상이었으며, ExGen 500을 이용한 경우 가장 높은 효율을 나타내었다. 이들 reagent와는 달리 FuGene 6의 경우 반복실험에서도 효율이 매우 낮았는데, 이는 기존의 보고⁵와 대조적인 결과로서 벡터와 세포주의 종류에 따른 차이일 것으로 추측된다.

렌티 바이러스 벡터에 장착된 EF-1 α 프로모터는 배아줄기세포에서 CMV 프로모터보다 강한 활성을 나타내며, 오랜 동안 안정적으로 그 활성이 유지되는 것으로 알려져 있다.¹⁴ Chung 등 (2002)은 EF-1 α 프로모터의 활성이 생쥐 배아줄기세포와 배아체에서 모두 안정적으로 발현된다고 보고하였다.¹⁹ 본 실험에서는 미분화 상태의 인간 배아줄기세포에서 자연적 분화가 일어난 경우와 배아체 형성 후 배양기간이 지남에 따라 eGFP의 발현이 감소하는 현상을 관찰되었다. 따라서, 자연적 분화가 발생한 경우 Laker 등 (1998)이 보고한 바와 같이 분화 초기에 외래 유전자가 침묵 (silencing)되는 현상이 일어난 것인지에 관한 좀 더 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.²⁰

본 연구에서는 렌티 바이러스를 이용하여 eGFP 유전자를 XX와 XY 핵형을 가진 인간 배아줄기세포주로 도입하였다. 외래 유전자의 도입에 있어 XX와 XY 인간 배아줄기세포주의 차이는 없었으며, eGFP의 발현은 안정적으로 지속되었다. eGFP가 도입된 인간 배아줄기세포를 활용하여 향후 특정세포로의 분화 양상 관찰, 이식 후 세포의 추적 등의 다양한 분야에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

위 연구는 교육과학기술부 21세기 프론티어연구개발사업인 세포응용연구사업단의 연구비 지원 (과제코드(SC1150))에 의해 수행되었습니다.

본 연구에 이용된 렌티 바이러스 벡터는 일본 RIKEN 연구소의 Miyoshi 박사로부터 제공받아 사

용되었습니다.

참 고 문 헌

1. 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; 282: 1145-7.
2. Oh SK, Kim HS, Ahn HJ, Seol HW, Kim YY, Park YB, et al. Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3. *Stem Cells* 2005; 23: 211-9.
3. Xiong C, Tang DQ, Xie CQ, Zhang L, Xu KF, Thompson WE, et al. Genetic engineering of human embryonic stem cells with lentiviral vectors. *Stem Cells Dev* 2005; 14: 367-77.
4. Zwaka TP, Thomson JA. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 319-21.
5. Eiges R, Schuldiner M, Drukker M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Benvenisty N. Establishment of human embryonic stem cell-transfected clones carrying a marker for undifferentiated cells. *Curr Biol* 2001; 11: 514-8.
6. Kwon YD, Oh SK, Kim HS, Ku SY, Kim SH, Choi YM, et al. Cellular manipulation of human embryonic stem cells by TAT-PDX1 protein transduction. *Mol Ther* 2005; 12: 28-32.
7. Smith-Arica JR, Thomson AJ, Ansell R, Chiorini J, Davidson B, McWhir J. Infection efficiency of human and mouse embryonic stem cells using adenoviral and adeno-associated viral vectors. *Cloning Stem Cells* 2003; 5: 51-62.
8. Gropp M, Itsykson P, Singer O, Ben-Hur T, Reinhartz E, Galun E, et al. Stable genetic modification of human embryonic stem cells by lentiviral vectors. *Mol Ther* 2003; 7: 281-7.
9. Asano T, Hanazono Y, Ueda Y, Muramatsu S, Kume A, Suemori H, Suzuki Y, Kondo Y, Harii K, Hasegawa M, Nakatsuji N, Ozawa K. Highly efficient gene transfer into primate embryonic stem cells with a simian lentivirus vector. *Mol Ther* 2002; 6: 162-8.
10. Ma Y, Ramezani A, Lewis R, Hawley RG, Thomson JA. High-level sustained transgene expression in human embryonic stem cells using lentiviral vectors. *Stem Cells* 2003; 21: 111-7.
11. Suter DM, Cartier L, Bettiol E, Tirefort D, Jaconi ME, Dubois-Dauphin M, Krause KH. Rapid generation of stable transgenic embryonic stem cell lines using modular lentivectors. *Stem Cells* 2006; 24: 615-23.
12. Gallo P, Grimaldi S, Latronico MV, Bonci D, Pagliuca A, Ausoni S, et al. A lentiviral vector with a short troponin-I promoter for tracking cardiomyocyte differentiation of human embryonic stem cells. *Gene Ther* 2008; 15: 161-70.
13. Niwano K, Arai M, Koitabashi N, Watanabe A, Ikeda Y, Miyoshi H, et al. Lentiviral vector-mediated SERCA2 gene transfer protects against heart failure and left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Mol Ther* 2008; 16: 1026-32.
14. Kim S, Kim GJ, Miyoshi H, Moon SH, Ahn SE, Lee JH, et al. Efficiency of the elongation factor-1alpha promoter in mammalian embryonic stem cells using lentiviral gene delivery systems. *Stem Cells Dev* 2007; 16: 537-45.
15. Oh SK, Kim HS, Park YB, Seol HW, Kim YY, Cho MS, et al. Methods for expansion of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005; 23: 605-9.
16. Hashimoto D, Nagata T, Uchijima M, Seto S, Suda T, Chida K, et al. Intratracheal administration of third-generation lentivirus vector encoding MPT51 from Mycobacterium tuberculosis induces specific CD8+ T-cell responses in the lung. *Vaccine* 2008; 26: 5095-100.
17. Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2140-5.
18. Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N. The effect of overexpression of Pdx1 and Foxa2 on the differentiation of human embryonic stem cells into pancreatic cells. *Stem Cells* 2002; 24: 1923-30.
19. Chung S, Andersson T, Sonntag KC, Bjorklund L, Isacson O, Kim KS. Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2002; 20: 139-45.
20. Laker C, Meyer J, Schopen A, Friel J, Heberlein C, Ostertag W, et al. Host cis-mediated extinction of a retrovirus permissive for expression in embryonal stem cells during differentiation. *J Virol* 1998; 72: 339-48.

= 국문초록 =

목적: 인간 배아줄기세포 (human embryonic stem cells; hESCs)는 체외에서 오랫동안 증식할 수 있으며, 모든 종류의 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포이다. 그러므로, 인간 배아줄기세포는 세포치료의 세포공급원의 역할을 할 수 있을 것으로 기대를 모으고 있다. 인간 배아줄기세포로의 외래 유전자의 도입은 분화경로 규명 및 특정 유전자의 기능 규명 등에 효과적으로 이용될 수 있다. 본 연구에서는 렌티 바이러스를 이용하여 eGFP 유전자를 XY와 XX 핵형을 가진 인간 배아줄기세포주에 도입하고자 하였다.

연구방법: 렌티 바이러스를 이용하여 eGFP 유전자를 인간 배아줄기세포에 도입하였다. 도입된 eGFP의 발현은 형광 현미경을 이용하여 확인하였으며, 유세포 분석을 통하여 eGFP 발현세포의 비율을 분석하였다. 또한, eGFP가 도입된 인간 배아줄기세포에서 표지인자인 Oct4, SSEA4 및 Tra-1-81의 발현을 확인하였으며, 배아체의 형성 여부를 확인하여 특성분석을 수행하였다.

결과: eGFP는 인간 배아줄기세포로 성공적으로 도입되었다. eGFP의 발현은 40 계대 이상 안정적으로 지속되었다. eGFP를 발현하는 인간 배아줄기세포는 eGFP 도입 후에도, 배아줄기세포의 특성을 유지하고 있음이 확인되었다. 또한, 자연적 분화 동안 발현이 감소하는 현상이 관찰되었다.

결론: 본 연구에서는 렌티 바이러스를 이용하여 eGFP가 도입된 인간 배아줄기세포주를 확립하였으며, 그 특성이 유지되고 있음을 확인하였다. 표지 유전자가 도입된 인간 배아줄기세포주는 분화 및 다른 연구에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

중심단어: 인간 배아줄기세포, eGFP, 렌티 바이러스
