: 31 4 2004
Kor. J. Fertil. Steril., Vol. 31, No. 4, 2004, 12

양수 세포를 이용한 인간배아줄기세포의 배양

서울대학교 의과대학 산부인과학교실[1], 의학연구원 인구의학연구소[2]

김희선[1,2] · 설혜원[2] · 안희진[2] · 오선경[1,2] · 구승엽[1]
김석현[1] · 최영민[1] · 김정구[1] · 문신용[1,2]

Human Amniotic Fluid Cells Support Expansion Culture of Human Embryonic Stem Cells

Hee Sun Kim[1,2], Hye Won Seol[2], Hee Jin Ahn[2], Sun Kyung Oh[1,2], Seung Yup Ku[1], Seok Hyun Kim[1], Young Min Choi[1], Jung Gu Kim[1], Shin Yong Moon[1,2]

[1]Department of Obstetrics and Gynecology, [2]Institute of Reproductive Medicine and Population, Medical Research Center, College of Medicine, Seoul National University, Seoul, Korea

Objective: This study was performed to evaluate the possibility of prolonged culture of human embryonic stem cells (hESC; SNUhES2) on human amniotic fluid cells (hAFC), which had been storaged after karyotyping.

Method: The hAFC was prepared for feeder layer in the presence of Chang's medium and STO medium (90% DMEM, 10% FBS) at 37℃ in a 5% CO_2 in air atmosphere. Prior to use as a feeder layer, hAFC was mitotically inactivated by mitomycin C. The hESCs on hAFC were passaged mechanically every seven days with ES culture medium (80% DMEM/F12, 20% SR, bFGF).

Results: The hAFC feeder layer support the growth of undifferentiated state of SNUhES2 for at least 59 passages thus far. SNUhES2 colonies on hAFC feeder appeared slightly angular and flatter shape as compared with circular and thicker colonies observed with STO feeder layer and showed higher level with complete undifferentiation in seven days. Like hESC cultured on STO feeders, SNUhES2 grown on hAFC expressed normal karyotype, positive for alkaline phosphatase activity, high telomerase activity, Oct-4, SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-60 and Tra-1-81 and formed embryoid bodies (EBs).

Conclusion: The hAFC supports undifferentiated growth of hESC. Therefore, these results may help to provide a clinically practicable method for expansion of hESC for cell therapies.

Key Words: Human embryonic stem cells (hESC), Human amniotic fluid cells (hAFC), Feeder layer, Undifferentiation, Expansion of hESC

인간배아줄기세포 (human embryonic stem cells, hESC)는 착상 전 포배기 배아의 내세포괴 (inner cell mass, ICM)에 존재하는 전분화능을 가지고 있는 세포에서 유래한 세포로서 체외 배양 시 무한히 증식할 수 있으며, 장기간의 체외 배양에도 불구하고 정상적인 핵형 (karyotype)을 유지할 뿐만 아니라 적절한 배양 조건을 조성하여 주면 외배엽, 중배엽, 내배엽의 삼배엽성 세포들로 분화할 수 있는 능력을

주관책임자: 문신용, 우) 110-744 서울특별시 종로구 연건동 28, 서울대학교 의과대학 산부인과학교실
Tel: (02) 2072-2384, Fax: (02) 3672-7601, e-mail: shmoon@snu.ac.kr
*위 연구는 과학기술부 21세기프로티어연구개발사업단인 세포응용연구사업단의 연구비 지원 (SC11011)에 의해 수행되었습니다.

지니고 있어 향후 세포치료 (cell therapy)에 이용될 수 있을 것으로 기대되어지는 세포이다.[1~3]

대부분의 인간배아줄기세포는 생쥐배아섬유세포 (mouse embryonic fibroblast, MEF)를 영양 세포 층 (feeder layer)으로 이용하여 배아줄기세포를 확립하였고, 미분화 상태를 유지하면서 배양하였다.[1,2] 하지만 이와 같이 생쥐배아섬유세포와 같은 동물 세포와 공배양 (coculture)하는 것은 인간배아줄기세포가 동물병원균 및 RNA 종양 바이러스 (retrovirus) 등에 감염될 가능성이 있기 때문에 세포 치료제로서 사용되는 것이 적합하지 않다.[4] 생쥐 배아줄기세포 (mouse embryonic stem cell, mESC)의 경우 미분화 상태를 유지하면서 배양하기 위해서 생쥐배아섬유세포를 필요로 하였지만 오랜 연구 결과, 생쥐배아섬유세포 없이 gelatin으로 전처리된 배양접시에 leukemia inhibitory factor (LIF)를 첨가한 배지를 이용할 경우 분화하지 않고 오랜 기간 줄기세포의 특징을 유지하는 것이 보고된 바 있다.[5] 그러나 생쥐배아줄기세포와는 다르게 인간배아줄기세포는 LIF가 생쥐 배아줄기세포 배양에서와 같은 역할을 수행하지 못하는 것으로 알려졌다.[6]

최근 Xu 등[7]은 extracellular matrix인 Matrigel과 생쥐배아섬유세포를 배양한 배양액 (conditioned media)을 이용하여 영양 세포층 없이도 미분화 상태로 인간 배아줄기세포를 배양하는데 성공하였다. 그러나 이 경우도 동물 세포를 배양한 배양액을 이용하였기 때문에 동물 세포의 영향이 완전히 배제된 것은 아니라고 생각된다. 따라서 동물 세포와의 접촉을 최대한 피하기 위해서 현재 인간에서 유래한 세포를 영양 세포층으로 이용하기 위한 연구가 많이 이루어지고 있는데, Richards 등[8]은 태아 근육 (fetal muscle) 및 태아 피부 (fetal skin) 세포와 성인 나팔관 (adult fallopian tuba) 상피 세포 (epithelial cell)와 같은 인간 세포를 영양 세포층으로 이용하여 인간 배아 줄기 세포 확립 및 미분화 배양에 성공하였고, Amit 등[4]과 Hovatta 등[9]은 인간 포피 (foreskin) 세포를, Cheng 등[10]은 인간 성체 골수 (adult bone marrow) 세포를 이용하여 미분화 상태의 인간배아줄기세포의 성공적인 배양을 보고하였다.

인간양수세포 (human amniotic fluid cells, hAFC)는 유전적 변화 (genetic alteration)에 의해 발생하는 태아의 이상 (fetal abnormalities)을 진단하는 산전 유전 진단 (prenatal genetic diagnosis)에 가장 많이 이용되어왔다.[11,12] 최근에는 양수세포에서도 줄기세포의 대표적인 미분화 표식 인자 인 octamer-binding transcription factor-4 (Oct-4)가 발현됨으로써 인간배아줄기세포 연구에 새로운 자원으로서의 가능성이 제시되었다.[13]

본 연구에서는 새로운 인간 유래의 영양 세포를 확립하기 위하여 오랜 기간 동안 인간배아줄기세포를 미분화 상태로 유지시켜주는데 필요한 영양 세포층으로서 양수세포와 양수세포 배양액의 유용성을 알아보고자 하였다.

연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

본 연구에서는 서울대학교병원 산부인과 불임 크리닉에서 체외수정시술 (IVF-ET)시 배아의 자궁 내 이식 후 남은 여분의 잉여 배아를 10년 이상 동결 보존한 후 보존 기간의 만료로 인하여 폐기 처분될 배아 중에서 환자 부부의 서면 동의를 받은 배아로부터 확립된 인간배아줄기세포 (SNUhES2)를 사용하였고, 영양 세포층으로 사용된 양수세포는 양수 검사를 통하여 염색체 분석을 수행하고 남은 정상적인 핵형을 가진 여분의 세포를 배양하여 사용하였다.

2. 연구 방법

1) 양수세포 배양

양수세포의 배양은 다음과 같은 방법으로 시행 하였다. 즉, 양수 10 ml를 원심분리 (1000 rpm, 8분)하여 얻어진 침전물에 Chang's 배지 (Irvine scientific, Santa Anna, CA, USA) 1 ml을 첨가한 후 그 부유액을 35 mm 조직 배양 접시 안에 들어있는 유리 덮개 위에 0.5 ml씩 분주하여 세포들이 유리 덮게 위에만 부착하도록 하였다. 이 상태로 37℃, 5% CO_2의 세포 배양기에서 이틀간 배양한 다음, 동일 배지 2 ml을 더 첨가해 주고 약 일주일 동안 위상차 현미경에서 세포관찰을 통해 부착된 세포군의 밀도를 확인하며 배양하였다. 4~5개의 세포군 부착이 확인되면 0.25% trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양을 하였다. 이후 유리 덮개 위에 부착된 세포군의 밀도와 세포분열중인 세포의 밀도를 확인하여 계대 배

양 및 핵형 분석을 위하여 양수세포를 획득하였고, 계대 배양 및 핵형 분석이 끝나고 남은 양수세포는 세포 상태를 확인한 다음 영양세포로 사용하기 위하여 계속 계대 배양하였으며, 인간배아줄기세포 배양시 영양 세포층으로 사용하기 위해 150분 동안 mitomycin C (0.01 mg/ml)를 처리하여 세포 분열을 억제시킨 후, 이를 영양 세포층으로 사용하였다. 초기 양수세포 배양에는 Chang's 배지가 이용되었고, 양수세포의 핵형 분석이 끝난 후부터 양수세포의 섬유세포 증식을 위해서는 10% Fetal Bovine Serum (HyClone, Utah, USA), penicillin과 streptomycin이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO) 배지가 이용되었다.

2) 인간배아줄기세포 배양

본 연구에 사용된 인간배아줄기세포는 서울대학교 의학연구원 인구의학연구소 및 서울대학교병원 산부인과에서 STO (ATCC, USA) 세포를 영양 세포층으로 하여 확립 및 71 계대까지 배양한 배아줄기세포 (SNUhES2)로서 배아줄기세포의 미분화 특성으로 알려져 있는 alkaline phosphatase (AP) 활성도, Oct-4, stage-specific embryonic antigen-3, 4 (SSEA-3, 4) 등이 모두 발현되고, 정상적인 핵형 (46,XX)을 지닌 세포이다.[14]

(1) 양수세포와 인간배아줄기세포 배양

인간배아줄기세포를 0.1% gelatin으로 전 처리한 배양접시에서 mitomycin C 처리하여 분열능을 억제시킨 양수세포와 mitomycin C를 처리하지 않은 양수세포를 영양 세포층으로 사용하여 배양하였고, 미분화된 배아줄기세포 군 (colony)을 미세한 glass knife로 100~200개의 세포가 존재하도록 작은 세포 덩어리로 분획하여 7일 간격으로 계대 배양하였다. 배양액으로는 DMEM/F12 (GIBCO)를 기본 배양액으로 하여, 20% serum replacement (SR, GIBCO), 0.4 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF, Invitrogen), 1% non-essential amnio acid, 0.1 mM β-mercaptoethanol, 0.5% penicilline/streptomycin을 첨가하여 사용하였다.

(2) 양수 배양액과 인간배아줄기세포 배양

Mitomycin C 처리된 양수세포 (2×10^6 cells)를 25 cm^2 조직 배양 flask에 양수 섬유세포 증식에 사용된 FBS가 포함된 DMEM 배지와 함께 배양한 후 세포 밀도가 70~80% 이상일 때 bFGF를 제외한 인간배아줄기세포 배양액으로 교환해 주면서 일주일 동안 매일 배양액을 모았다. 매일 모은 배양액은 0.2 μm 필터를 이용하여 정제하고 냉동 보관한 후 Matrigel로 전 처리된 35 mm 조직 배양 접시에서 영양 세포층 없이 인간배아줄기세포를 배양하기 위한 배지로 사용하였다. 세포의 계대 배양 방법은 양수세포와 인간배아줄기세포 배양에서의 방법과 동일하였다.

3) 인간배아줄기세포의 특성 분석

양수세포를 영양 세포층으로 사용하여 배양된 배아줄기세포의 특성을 규명하기 위하여 배양 중인 배아줄기세포의 핵형을 분석하였고, 미분화 배아줄기세포의 세포 표면 표식 인자 (cell surface marker)로 알려진 AP 활성도, SSEA-1, 3와 4 그리고 Tra 1-60, 1-81의 발현여부를 면역세포화학염색으로 확인하였으며, Oct-4의 발현과 telomerase 활성도를 PCR 방법으로 측정하였다. 특성분석의 자세한 방법은 Oh 등[14]의 방법대로 시행하였다.

4) 배아체 형성 및 분화 관련 유전자 발현 확인

약 500개의 배아줄기세포 덩어리로 분획하여 4~5 ml의 배아체 배지 (DMEM/F12, 20% SR, 1% non-essential amino acid, 0.1 M β-mercaptoethanol, 0.5% penicilline/streptomycin)가 들어있는 부유 배양접시로 옮겨 세포 배양기에서 배양하였다. 배양된 배아체는 삼배엽성 (three germ layer) 유도체 (derivatives)로서 자연 분화 되었는지 여부를 확인하기 위하여 내배엽 (endoderm) 표식인자로서 amylase와 albumin, 중배엽 (mesoderm) 표식인자로서 cartilage matrix protein (CMP)과 enolase 및 외배엽 (ectoderm) 표식인자로서 neurofilament heavy chain (NFH)과 keratin의 유전자 발현을 RT-PCR 방법으로 확인하였다. 사용된 primer sequences와 PCR 조건은 다음과 같다. Amylase (forward: 5'-GCTGGGCTCAGTATTCCCCAAATAC-3', reverse: 5'-GACGACAATCTCTG-3'), albumin (forward: 5'-CCTTTGGCACAATGAAGTGGGTAACC-3', reverse: 5'-GACGACAATCTCTGACCTGAGTAGC-3'), CMP (forward: 5'-ATGACTGTGAGCAGGTGTGCATCAG-3', reverse: 5'-CTGGTTGATGGTCTTGAAGTCAGCC-3'), enolase (forward: 5'-TGACTTCAGTCGCCTGATG-ATCCC-3', reverse: 5'-TGCGTCCAGCAAAGATTGC-

CTTGTC-3'), NFH (fowaard: 5'-TGAACACAGACGC-TATGCGCTCAG-3', reverse: 5'-CACCTTTATGTGA-GTGGACACAGAG-3'), keratin (forward: 5'-AGGAA-ATCATCTCAGGAGGAAGGGC-3', reverse: 5'ATCT-CAGGAGGAAGGGC-3', reverse: 5'-AAAGCACAGA-TCTTCGGGAGCTACC-3'). PCR 반응조건은 94°C에서 30초간 변성시키고, 68°C에서 30초간 primer를 결합시킨 후 72°C에서 30초 동안 확장시키는 순서로 30회 반복하도록 PCR을 수행한 후 2% agarose gel에서 전기 영동 하여 유전자 발현을 확인하였다.

결 과

인간배아줄기세포를 체외에서 배양할 때 장기간 미분화 상태를 유지하기 위해 사용된 양수세포는 9 계대까지 배양된 세포가 주로 이용되었고, 현재 12 계대까지 계속 배양 중인데, 양수세포의 성장률 및 인간배아줄기세포의 성장을 유지하는 능력의 변화는 없었다. 본 연구에서는 양수세포의 과성장 (overgrowth)을 방지하기 위해 mitomycin C로 처리한 양수 세포와 mitomycin C 처리하지 않은 양수 세포를 이용하여 인간 배아줄기세포를 배양하였다. 초기 인간배아줄기세포 배양에서는 mitomycin C 처리한 것과 처리하지 않은 양수세포를 이용했을 때 형태적으로 별다른 차이가 보이지 않았으나, 계대가 증가할수록 mitomycin C 처리한 양수세포에서 배양된 인간배아줄기세포의 세포군보다 mitomycin C 처리하지 않은 양수세포에서 배양된 세포군의 세포들 사이의 간격이 비교적 더 촘촘해서 계대 배양을 위한 세포 분획 시 세포군이 더 두꺼운 것처럼 보였다. 그러나 전체적인 세포군의 모양과 세포 증식 (proliferation)에는 차이가 없었다.

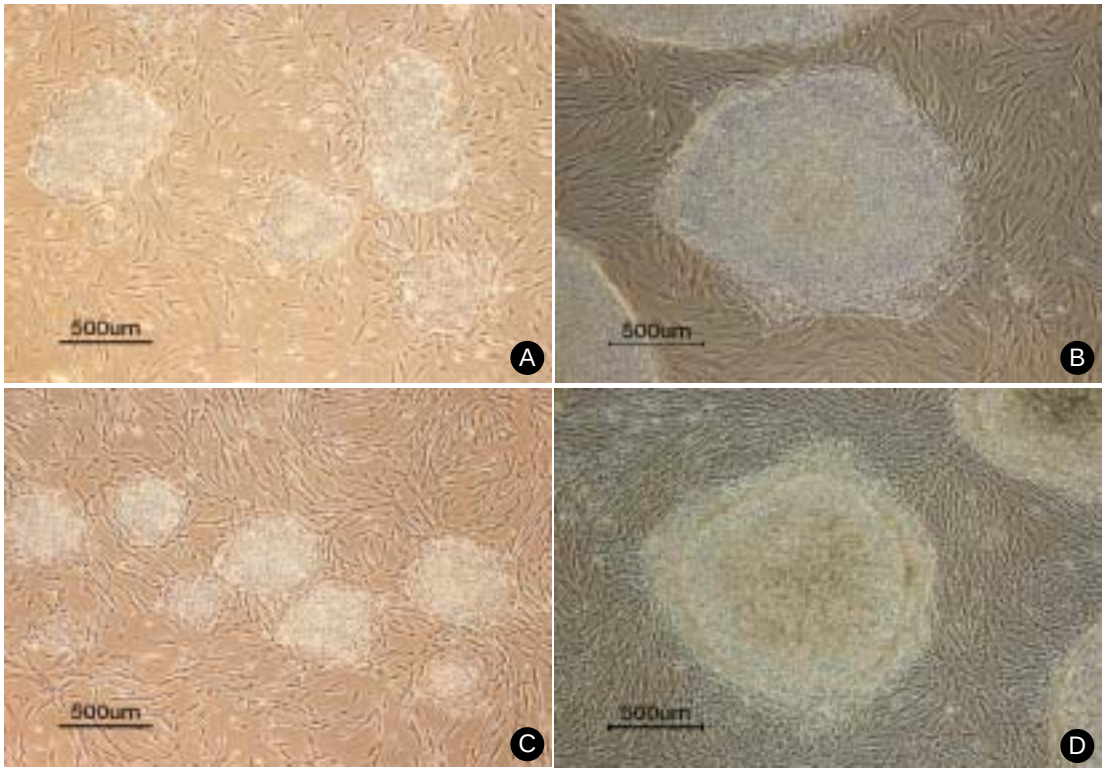

Figure 1. Morphology of SNUhES2 cell line grown on hAF feeder layer. (**A**) SNUhES2 P71-5 cell colony at day 2 on hAFC treated with mitomycin C (**B**) SNUhES2 P71-5 cell colony at day 7 on hAFC treated with mitomycin C (**C**) SNUhES2 P71-5 cell colony at day 2 on hAFC non-treated with mitomycin C (**D**) SNUhES2 P71-5 cell colony at day 7 on hAFC non-treated with mitomycin C

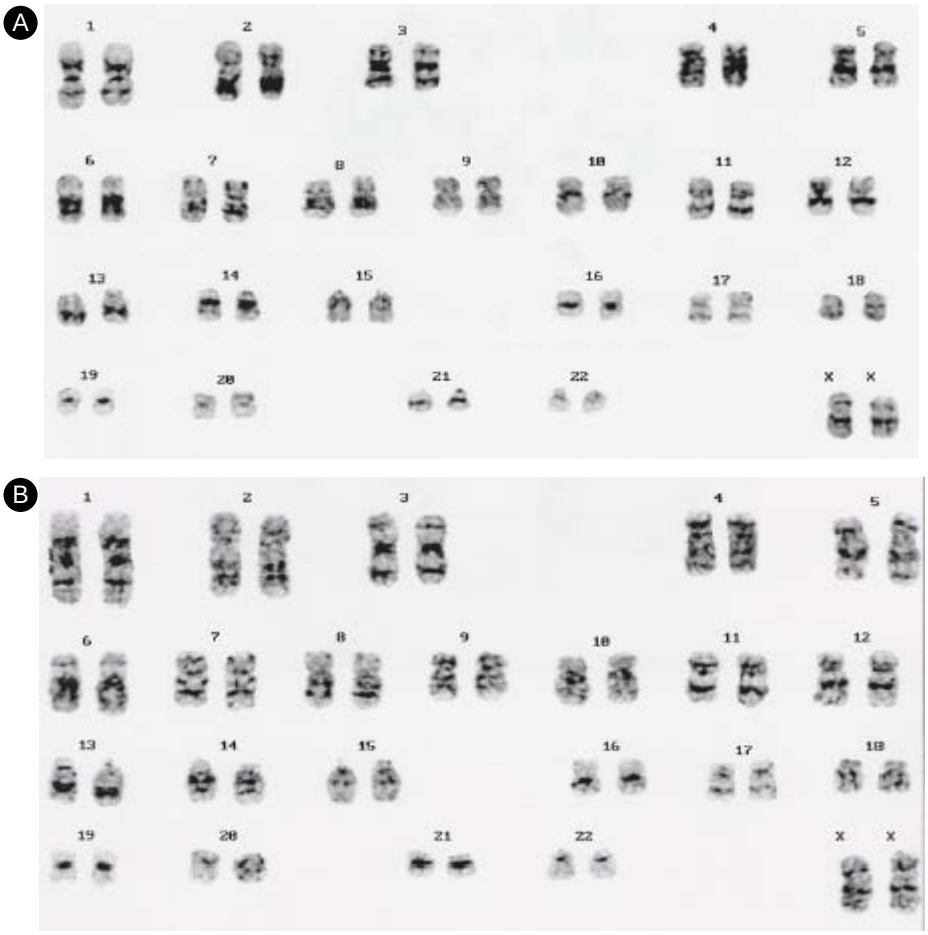

Figure 2. Results of karyotyping.(**A**) SNUhES2 P71-25 on hAFC treated with mitomycin C: 46,XX (**B**) SNUhES2 P71-25 on hAFC non-treated with mitomycin C: 46,XX

양수세포에서 배양된 인간배아줄기세포의 형태적 특징을 관찰한 결과, 기존의 영양 세포층으로 이용된 생쥐배아섬유세포와 STO 세포에서 배양된 배아줄기세포군의 형태는 그 주변부의 모양이 둥글고, 비교적 두꺼운 형태인 반면 양수세포에서 배양된 배아줄기세포군의 형태는 약간 다르게 조금 각지고 얇은 세포군의 형태를 보였다. 하지만 세포군을 구성하고 있는 각각의 배아줄기세포들의 형태는 mitomycin C 처리한 양수세포 (Figure 1A, B)와 mitomycin C 처리 하지 않은 양수세포 (Figure 1C, D)에서 차이가 없었으며 생쥐배아섬유세포에서 배양된 배아줄기세포와 같이 작고 둥근 모양이었고, 세포질 내 핵의 비율이 현저하게 높았다. Mitomycin C 처리한 것 (Figure 2A)과 처리하지 않은 양수세포 (Figure 2B)에서 배양된 배아줄기세포를 핵형 분석한 결과 모두 정상 (46,XX)이었고, 배아줄기세포의 미분화 특성으로 알려진 세포 표면 표식인자인 AP (Figure 3A, G)와 SSEA-4 (Figure 3F, L), Tra-1-60 (Figure 3B, H), Tra-1-81 (Figure 3C, I)가 양성으로 염색되었으며, SSEA-1 (Figure 3D, J)은 염색되지 않았고 SSEA-3 (Figure 3E, K)는 부분적으로 염색되었다. 또한 미분화된 세포의 특징 중 하나인 높은 telomerase 활성도 (Figure 4A)와 Oct-4 발현 (Figure 4B)이 확인되었고, 체외 자연 분화가 일어나 삼배엽성의 다양한 세포로의 분화가 가능한 배아체 (Figure 5A, B) 형성 및 배아체에서의 분화 관련 유전자의 발현 (Figure 5C)

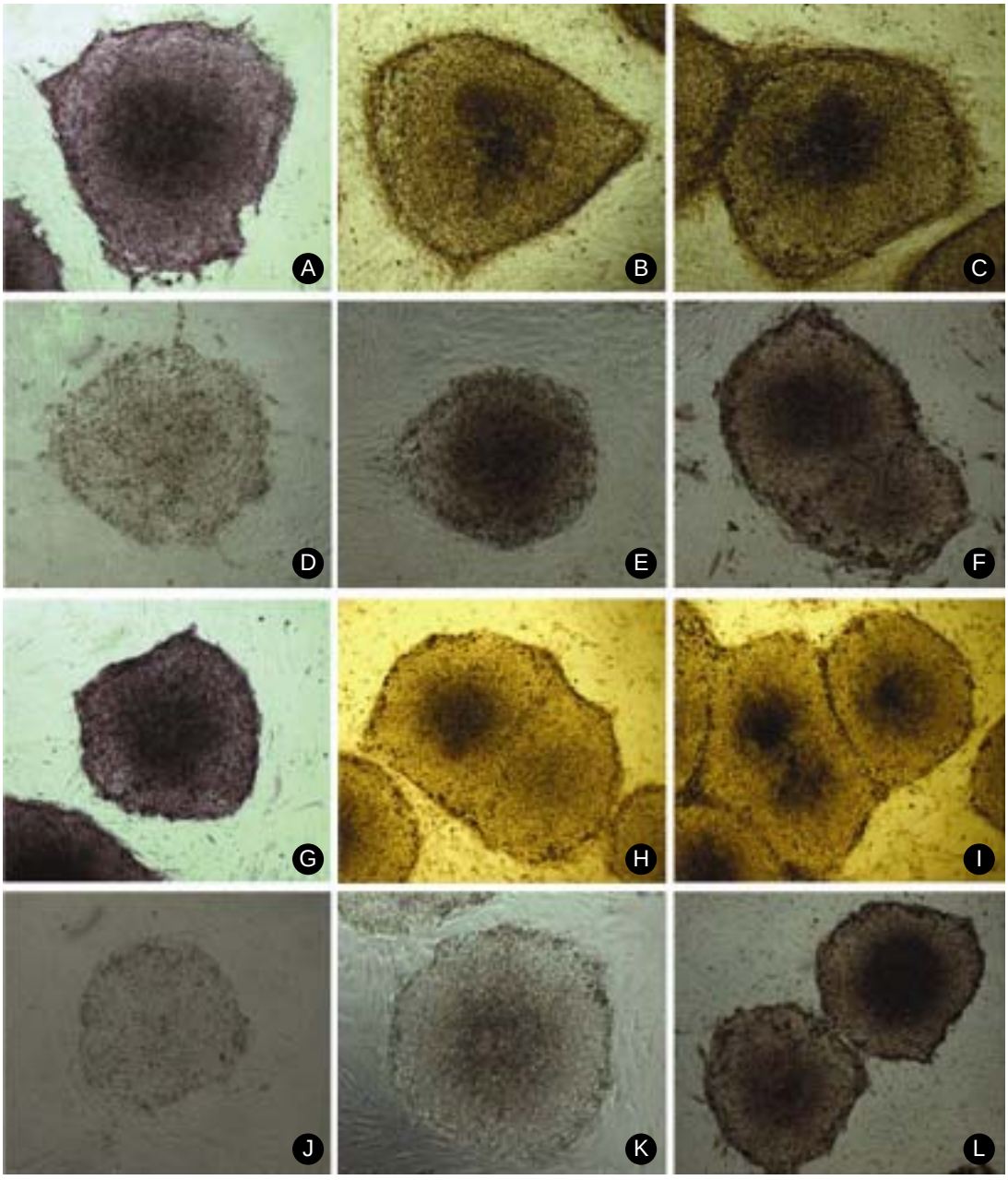

Figure 3. Immunocytochemical staining results of cell surface markers for detecting undifferentiation state of hESC grown on hAFC; (**A**)~(**F**) SNUhES2 P71-25 on hAFC treated with mitomycin C (**G**)~(**L**) SNUhES2 P71-25 on hAFC non-treated with mitomycin C (**A**, **G**) AP (+) (**B**, **H**) Tra-1-60 (+) (**C**, **I**) Tra-1-81 (+) (**D**, **J**) SSEA-1 (-) (**E**, **K**) SSEA-3 (+) (**F**, **L**) SSEA-4 (+).

을 확인하였다.

영양 세포 층 없이 mitomycin C 처리한 양수세포 배양에서 얻어진 상층 액과 Matrigel을 이용한 배아 줄기세포 배양은 영양 세포층이 있는 경우에 비해 초기 4~5 계대까지는 세포 분열이 활발하고 정상적인 미분화 세포로 유지되었다 (Figure 6). 그 이후

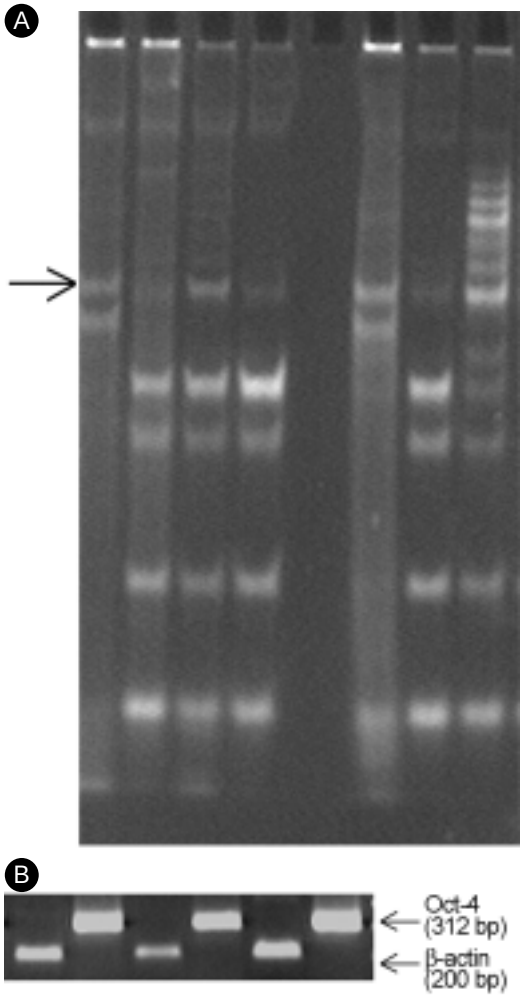

Figure 4. Detection of telomerase activity and Oct-4.
(**A**) telomerase activity.
Lane 1: SNUhES2 cells grown on hAFC treated with mitomycin C, Lane 2: Heat inactivated control of lane 1 sample, Lane 3: SNUhES2 cells on hAFC non-treated with mitomycin C, Lane 4: Heat inactivated control of lane 3 sample, Lane 6: hAFC, Lane 7: Heat inactivated control of lane 6, Lane 8: Positive control
(**B**) Oct-4 expression of SNUhES2 grown on hAFC.
Lane 1, 3, 5: beta- actin of lane 2, 4 and 6, respectively, Lane 2: SNUhES2 cells grown on hAFC treated with mitomycin C, Lane 4: SNUhES2 cells on hAFC non-

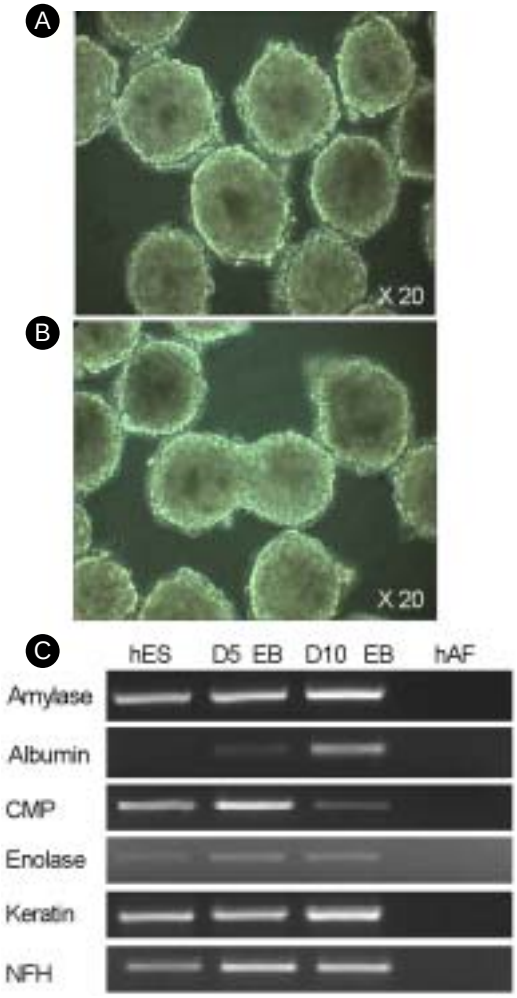

Figure 5. Morphology and gene expression in embryoid bodies. (**A**) EBs formed with SNUhES2 P71-5 cells at day 7 on hAFC treated with mitomycin C (**B**) EBs formed with SNUhES2 P71-5 cells at day 7 on hAFC non-treated with mitomycin C (**C**) RT-PCR results for detection of three germ layer markers: Endoderm (amylase and albumin), mesoderm (CMP and enolase) and ectoderm (keratin and NFH). Lane 1 is undifferentiated hESC grown on hAFC treated with mitomycin C, lane 2 is EB for day 5, lane 3 is EB for day 10 and lane 4 is hAFC as negative control.

로는 세포 부착율이 떨어지고 세포의 크기가 커지면서 세포군 가운데는 배아줄기세포의 형태를 보이나 주변부는 세포의 길이가 정상적인 세포 크기의 두 세배 정도로 커지고 길어지며 정상적인 세포군의 형태를 유지하지 못하고 세포 분화율도 비교적 높아졌다.

고 찰

지금까지 인간배아줄기세포는 소 태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)이 첨가된 영양 배지와 생쥐배아

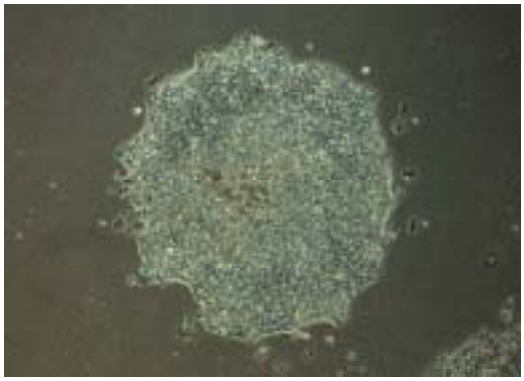

Figure 6. Morphology of colony of SNUhES2 cell on day 7 grown on feeder free condition (magnification:

섬유세포를 영양 세포층으로 이용하여 미분화 상태를 유지하면서 배양되어 왔다.[1,2] 하지만 생쥐배아섬유세포를 영양 세포층으로 사용하여 인간배아줄기세포를 배양하는 것은 생쥐 RNA종양 바이러스 감염 등의 우려가 있으므로 이러한 인간배아줄기세포를 세포 치료제로 이용하기에는 부적절하다.[4] 따라서 본 연구에서는 이러한 한계를 극복하기 위하여 인간양수세포를 영양 세포층으로 이용하여 인간배아줄기세포를 장기간 체외 배양하고, 그 세포들의 미분화 특성을 조사하였으며, 현재 59 계대까지 미분화 상태를 유지하면서 인간배아줄기세포를 성공적으로 배양하고 있다.

Mitomycin C로 처리한 양수세포에서 배양된 인간배아줄기세포는 미분화된 영장류 (primate) 배아줄기세포의 전형적인 세포 표면 인자의 발현으로서 미분화 상태를 유지하고 있었다.[16,17] 다시 말하자면, mitomycin C로 처리한 양수세포에서 배양된 인간배아줄기세포는 AP, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81이 강하게 염색되었으며, SSEA-3가 부분적으로 염색되었고, SSEA-1이 염색되지 않았다.

미분화된 배아줄기세포는 영양 세포층 없이 부유 (suspension) 배양될 때, 외배엽, 중배엽, 내배엽의 삼배엽 기원의 다양한 세포 형태로 분화할 수 있는 능력을 가진 배아체를 형성하게 되는데 mitomycin C로 처리한 양수세포에서 배양된 인간배아줄기세포도 그러한 배아체를 형성하였다.

생쥐배아섬유세포에서 배양된 인간배아줄기세포와 유사하게 양수세포에서 배양된 인간배아줄기세포를 30개 이상의 중기세포를 이용하여 핵형 분석한 결과, 장기간 체외 배양되었음에도 불구하고 정상적인 핵형을 보였다. 본 연구에서는 대략 10 계대 마다 핵형 분석을 실시하였다.

인간배아줄기세포가 미분화 특성을 유지하면서 체외에서 장기 배양되기 위해서는 생쥐배아섬유세포의 이용 이외에 또 다른 문제로 소 태아 혈청과 같은 동물 성분이 첨가된 배지를 사용하고 있다는 것이다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 소 태아 혈청을 대체할 수 있는 serum-free 조건을 개발하는 것이었고, 현재 그 대안으로 bFGF가 첨가된 serum replacement (SR)을 이용하게 되었다.[18] 본 연구에서도 소 태아 혈청 대신 SR이 첨가된 배지를 이용하였는데 인간배아줄기세포 배양에 좋은 결과를 보여주고 있다.

1998년 Thomson 등[1]이 생쥐배아섬유세포를 영양 세포층으로 이용하여 다섯 개의 인간배아줄기세포를 확립 및 유지한 보고가 있은 후로 2000년 Xu 등[7]은 일반적으로 정상적인 세포가 생존과 성장하기 위해서는 extracellular matrix와의 접촉이 필요하다는 것과, 인간배아줄기세포를 배양하기 위해서는 영양 세포로 이용된 생쥐배아섬유세포에서 알려지지 않은 용해 인자 (soluble factor)가 형성될 것이라는 것에 착안하여 영양 세포층 없이 laminin, collagenⅣ, fibronectin 및 matrigel과 같은 다양한 extracellular matrix와 영양 세포층의 배양액만을 이용하여 인간배아줄기세포가 성공적으로 배양되었음을 보고하였다. 하지만 역시 동물세포와의 접촉을 완전하게 극복하지 못했다는 점과 미분화 상태가 오랜 기간 유지되지 못했다는 한계가 있었다.

Cheng 등[10]은 성체골수세포를 직접 분리 및 배양하여 영양 세포층으로 이용하여 인간배아줄기세포의 성공적인 배양을 보고하였다. 그리고 mitomycin C 처리한 골수세포와 처리하지 않은 골수세포를 영양 세포층으로 이용하여 인간배아줄기세포를 배양하여 그 결과를 비교하였는데, mitomycin C 처리하지 않은 세포에서 배양된 인간배아줄기세포군이 더 좋은 성장률과 촘촘한 세포 간격의 형태를 보였다. 하지만 골수세포의 증식이 인간배아줄기세포보다 빨라서 인간배아줄기세포 성장에 방해 소지가 있기 때문에 mitomycin C 처리하지 않은 골수세포 이용은 중단되었다. 본 연구에서도 mitom-

ycin C 처리한 양수세포와 처리하지 않은 양 세포를 영양 세포층으로 이용하였는데 Cheng 등의 결과와 같이 형태적으로 mitomycin C 처리하지 않은 양수세포에서 배양된 인간배아줄기세포군의 모양이 더 촘촘하였으나, 세포군을 구성하는 각각의 세포들의 모양에는 mitomycin C 처리한 것과 처리하지 않은 양수세포에서 배양된 인간배아줄기세포에서 차이가 없었다. 또한 mitomycin C 는 일반적으로 세포 파괴 (cytotoxicity)가 가능한 잠재적인 발암성 물질 (carcinogen)로 알려져 있으므로, 인간배아줄기세포가 세포 치료 목적으로 이용되기 위해서는 아무리 인간 유래의 영양 세포층을 사용하더라도 mitomycin C의 이용은 적합하지 않겠다. 따라서 본 연구에서의 mitomycin C 처리하지 않은 양수세포에서의 성공적인 인간배아줄기세포의 배양은 더 큰 의의가 있겠다.

Amit 등[4]은 직접 인간포피세포를 분리 및 배양하여 세포주를 확립한 후 인간 혈청이 첨가된 배지에서 배양된 2개의 포피세포와 SR이 첨가된 배지에서 배양된 3개의 포피세포 및 소 태아 혈청이 첨가된 배지에서 배양된 3개의 포피세포 등에서 각각 3개의 인간배아줄기세포주를 배양하여 그 결과를 비교 분석하였는데 각각의 실험에서는 커다란 차이 없이 모두 성공적으로 인간배아줄기세포가 배양되었고, 결국 포피세포가 생쥐배아섬유세포를 대체할 수 있을 것으로 보고하였다. Hovatta 등[9]도 인간포피세포를 이용하였는데 전자와의 차이는 윤리적 문제 등을 고려하여 포피세포를 상업적으로 구입하였다는 것이고, 이 세포를 이용하여 새로운 인간배아줄기세포주를 확립 및 배양하는데 성공하였다.

Richards 등[19]은 지금까지 가장 다양한 11개의 인간 성체 및 태아와 신생아의 세포를 영양 세포로 이용하여, 미분화된 세포군의 정도와 계대 배양 회수 및 세포 표면 인자의 염색 정도 등을 기준으로 영양세포로서의 역할 순위를 결정하였는데 많은 세포들 중 태아 근육 세포가 50 계대 이상의 계대가 유지되었고, 평균 90%의 미분화 세포군을 유지하면서 80% 이상의 세포 표면 인자 염색으로 좋은 결과를 보였다. Carpenter 등[20]과 Rosler 등[21]은 앞서 보고된 바 있는 Xu 등[7]의 동물 세포 배양액을 이용한 배양 방법으로 Thomson 등[1]이 확립한 다섯 개의 세포주 가운데 세 개의 세포주를 영양 세포층 없이 일년 이상 배양하여 SSEA-4와 TRA-1-60 및 TRA-1-81과 같은 세포 표면 인자의 양적 차이를 flow cytometer를 통해 분석하였고, early passage와 late passage 사이의 유전자 발현 (gene expression)의 차이를 microarray를 이용하여 분석하였다. 이러한 연구 보고는 지금까지 가시적인 인간배아줄기세포의 미분화 상태 유지에만 국한하지 않고, 미분화 상태인 인간배아줄기세포 사이의 좀더 정확한 특성을 분석하였다는데 그 의의가 있겠다.

Amit 등[22]은 영양 세포층과 혈청 없이 fibronectin matirx의 이용과, SR, transforming growth factor β1 (TGFβ1), LIF와 bFGF 등의 혼합물을 적절하게 조합해서 첨가한 배지를 이용하여 인간배아줄기세포의 성공적인 배양을 보고하였다.

본 연구에서 영양 세포층으로 사용된 양수세포는 임신 중 태아 이상을 산전 진단하는데 가장 많이 이용되어 왔다. 그럼에도 불구하고 지금까지 양수세포의 기원과 그 특성에 대해서는 정확하게 알려진 것이 없다. 양수내의 세포들은 삼배엽을 기원으로 하는 세포들의 혼합물로 매우 다양하다고 알려져 있으며 배아 (embryonic) 기원 혹은 태아 (fetal) 기원의 세포들이 양수에 존재한다는 것이 보고된 바 있었으나 여전히 양수세포내의 특별한 세포들의 기원이 규명되어져야 할 것으로 보고 있다.[23,24] 양수세포는 크게 세 종류 형태의 세포로 구성되어 있는데 상피세포 (epithelioid), 양수 세포 (amniotic fluid cell)와 섬유세포 (fibroblast) 형태의 세포들이다. 양수세포를 배양하면 초기에는 상피세포 형태의 세포가 많지만, 계대 배양 할수록 섬유세포 형태의 세포가 많이 확인된다.[13] 본 연구에서도 양수세포에서 많은 섬유세포를 얻기 위해 양수세포를 여러 번 계대 배양한 후 사용하였다. 이것은 Richards 등[8]이 성인 나팔관 상피세포가 계대 배양 할수록 mesenchymal 세포로 변화 (transition) 되면서 섬유세포 형태의 세포로 적응된다고 보고한 것과 같다고 할 수 있다. 최근에는 배아줄기세포 (embryonic stem cell, ESC), 배아생식세포 (embryonic germ cell, EGC)와 배아암종세포 (embryonic carcinoma cell, ECC)에서 발현되는 다능성 줄기 세포의 표식 인자인 Oct-4가 양수세포내의 세포에서 발현되는 것이 보고되었고,[25,26] telom-

erase 활성도가 확인된 바 있어[27] 인간배아 연구에 관련한 윤리적 문제를 극복한 새로운 줄기세포의 자원으로서 인간양수세포의 가능성이 제시된 바 있다.[13] 본 연구에서 사용된 양수세포에서도 Oct-4와 telomerase 활성이 확인되었다 (Figure 4A).

지금까지 수년간 생쥐배아섬유세포가 인간배아줄기세포 배양에 이용되어졌는데도 불구하고 이 세포가 어떠한 물질 분비와 역할로 인간배아줄기세포에 영향을 주는지는 아직까지 명쾌하게 알려지지 못하고 있으며, 아마도 인간배아줄기세포와 생쥐배아섬유세포 사이의 관계는 세포막 단백질을 통해서 영양 배지나 extracellular matrix로 분비되는 어떤 인자 (factor)를 통해서 이뤄지지 않을까 하는 가능성만이 제시되었다.[6]

현재 약 2000개의 cytokine과 성장 인자 (growth factor)들이 정제 및 클론화 되어져 있다. 하지만 인간배아줄기세포에 이 성장 인자들의 체계적인 적용은 아직까지 인간배아줄기세포에 대해 알려진 바가 거의 없기 때문에 어려운 실정이다. 그럼에도 불구하고 최근 bFGF와 bone morphogenic protein 4 (BMP4)와 같은 몇몇 성장 인자들이 인간배아줄기세포를 분화 유도하는 것으로 보고 되었고, 몇몇 새로운 인자들이 배아줄기세포 성장에 관여하는 것이 알려졌는데 그들 중 일부는 아직까지 인간배아줄기세포에 직접 적용되지 못하거나, 균일하게 정제되지 못한 상황이다.[28] 따라서 앞으로 인간배아줄기세포의 미분화 상태를 유지할 수 있는 생쥐배아섬유세포나 생쥐배아섬유세포 배양액 자체 및 거기서 배양되는 인간배아줄기세포의 proteomics 분석 등을 통한 여러 가지 성장 인자들의 규명이 반드시 필요하겠다. 또한 세포 치료의 궁극적인 목적을 이루기 위해서는 미분화 상태의 인간배아줄기세포의 대량적인 양적 확보와, 원하는 세포로의 분화 조절이 가능해야 하므로 앞으로 이것에 대한 연구가 더욱더 활발하게 이뤄져야 할 것으로 기대된다.

본 연구에서는 인간양수세포를 영양 세포층으로 이용하여 생쥐배아섬유세포에서와 같이 오랜 기간 체외에서 인간배아줄기세포를 미분화 상태로 배양할 수 있었고, 그 배양액을 이용하여 인간배아줄기세포를 배양하였다. 이렇게 배양된 인간배아줄기세포는 생쥐배아섬유에서 배양 유지된 인간배아줄기세포와 같이 AP, SSEA-4, TRA-1-60와 TRA-1-81 등이 강하게 염색되었고, telomerase 활성도가 높게 보였으며 정상적인 염색체를 보유하였다. 따라서 인간양수세포와 그 배양액은 인간배아줄기세포 배양에 유용함이 확인되었다. 앞으로 체내 (in vivo) 자연분화 확인을 위하여 teratoma 형성을 계획하고 있으며, 양수세포 배양액을 이용하여 배양된 인간배아줄기세포의 특성 분석 등의 추가적인 연구가 이뤄져야 할 것이고, 더 나아가 양수세포를 영양 세포층으로 이용하여 새로운 인간배아줄기세포주를 확립하는 것도 중요한 과제라고 할 수 있겠다. 또한 양수세포 및 양수세포 배양액과 거기서 배양된 인간배아줄기세포의 proteomics 분석을 수행 후 그 결과를 생쥐배아섬유세포에서의 proteomics 결과와 비교 분석하여 미분화 상태의 인간배아줄기세포 유지에 필요한 공통 인자 (factor)들을 규명할 수 있기를 기대해 볼 수 있겠다.

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. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation in vitro. Nat Biotechnol 2000; 18: 399-404.
3. Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. J Cell Sci 2000; 13: 5-10.
4. Amit M, Margulets V, Segev H, Shariki K, Laevsky I, Coleman R, et al. Human feeder layers for human embryonic stem cells. Biol Reprod 2003; 68: 2150-6.
5. Williams R, Hilton D, Pease S, Wilson T, Stewart C, Gearing D, et al. Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. Nature 1988; 336: 684-7.
6. Lim KWE, Bodnar A. Proteome analysis of conditioned medium from mouse embryonic fibroblast feeder layers which support the growth of human embryonic stem cell. Proteomics 2002; 2: 1187-203.

7. Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, et al. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2001; 19: 971-4.
8. Richards M, Fong CY, Chan WK, Wong PC, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2002; 20: 933-6.
9. Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Stromberg AM, Inzunza J, Hreinsson J, et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. Hum Reprod 2003; 18: 1404-9.
10. Cheng L, Hammond H, Ye Z, Zhan X, Dravid G. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. Stem Cells 2003; 21: 131-42.
11. Milunsky A. Amniotic fluid cell culture. In Milunsky, A. (ed). Genetic Disorder and the fetus. Plenum Press; New York, 1979. pp. 75-84.
12. Hoehn H, Salk D. Morphological and biochemical heterogeneity of amniotic fluid cells in culture. Methods Cell Biol 1982; 26: 11-34.
13. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschlager M. Oct-4 expressing cells in human amniotic fluid: A new source for stem cell research? Hum Reprod 2003; 18: 1489-93.
14. 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 In press 2005.
15. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987; 162: 156-9.
16. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 7844-8.
17. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Hearn JP. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (Callithrix kacchus) blastocysts. Biol Reprod 1996; 55: 254-9.
18. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, et al. Clonally derived human embryonics stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. Dev Biol 2000; 227: 271-8.
19. Richards M, Tan S, Fong CY, Biswas A, Chan WK, Bongso A. Comparative evaluation of various human feeders for prolonged undifferentiated growth of human embryonic stem cells. Stem Cells 2003; 21: 546-56.
20. Carpenter MK, Rosler ES, Fisk GJ, Brandenberger R, Ares X, Miura T, et al. Properties of four human embryonic stem cell lines maintained in a feeder-free culture system. Dev Dyn 2004; 229: 243-58.
21. Rosler ES, Fisk GJ, Ares X, Irving J, Miura T, Rao MS, et al. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. Dev Dyn 2004; 229: 259-74.
22. Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J. Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. Biol Reprod 2004; 70: 837-45.
23. Gosden CM. Amniotic fluid cell types and culture. Br Med Bull 1983; 39: 348-54.
24. Prusa AR, Hengstschlager M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: A new connection. Med Sci Moni 2002; 8: 253-7.
25. Donovan PJ. High Oct-ane fuel powers the stem cell. Nature Genet 2001; 29: 246-7.
26. Pesce M, Scholer HR. Oct-4: Gatekeeper in the beginnigs of mammalian development. Stem Cells 2001; 19: 271-8.
27. Mosquera A, Fernandez JL, Campos A, Goyanes VJ, Ramiro-Diaz JR, Gosalvez J. Simultaneous decrease of telomere length and telomerase activity with ageing of human amniotic fluid cells. J Med Genet 1999; 36: 494-6.
28. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Elder J, Melton DA, Benvenisty N. Proc Natl Acad Sci USA 2000; 97: 11307-12.