

인간태아 섬유아세포와 생쥐배아 섬유아세포를 기저세포로 활용한 인간 배아줄기세포의 확립

부산대학교 의과대학 산부인과학교실¹, 예일마리 산부인과², 부산대학교병원 불임클리닉³
조혜원¹ · 고경래² · 김미경³ · 이재익³ · 신수일¹ · 이동형¹ · 김기형¹ · 이규섭¹

Establishment of Human Embryonic Stem Cells using Mouse Embryonic Fibroblasts and Human Fetal Fibroblasts as Feeder Cells

Hye Won Cho¹, Kyoung Rae Ko², Mi Kyoung Kim³, Jae Ik Lee³, Su Il Sin¹,
Dong Hyung Lee¹, Ki Hyung Kim¹, Kyu Sup Lee¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Pusan National University,
²Yalemari Women's Clinic, ³Infertility Clinic, Pusan National University Hospital, Busan, Korea

Objectives: This study was carried out to establish human embryonic stem cells derived from frozen-thawed embryos using mouse embryonic fibroblasts (mEFs), human fetal skin and muscle fibroblasts as feeder cells, and to identify the characteristic of embryonic stem cells.

Methods: When primary mEFs, human fetal skin and muscle fibroblasts were prepared, passaging on 4 days from replating could have effective trypsinization and clear feeder layers. Eight of 23 frozen-thawed 4~8 cell stage embryos donated from consenting couples developed to blastocysts. Inner cell mass (ICM) was isolated by immunosurgery. ICM was co-cultured on mEFs, human fetal skin or muscle fibroblasts. The ICM colonies grown on mEFs, human fetal skin or muscle fibroblasts were tested the expression of stage specific embryonic antigen-3, -4 (SSEA-3, -4), octamer binding transcription factor-4 mRNA (Oct-4) and alkaline phosphatase surface marker.

Results: We obtained 1 ICM colony from 2 ICM co-cultured on mEFs as feeder cells and did not obtain any ICM colony from 6 ICM clumps co-cultured on human fetal skin or muscle fibroblasts. The colony formed on mEFs could be passaged 30 times every 5 days with sustaining undifferentiated colony appearance. When the colonies cultured on mEFs were grown on human fetal skin or muscle fibroblasts, the colonies could be passaged 15 times every 9 days with sustaining undifferentiated colony appearance. The colonies grown on mEFs and human fetal fibroblasts expressed SSEA-4 and alkaline phosphatase surface markers and positive for the expression of Oct-4 by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The produced embryoid body differentiated spontaneously to neural progenitor-like cells, neuron-like cells and beating cardiomyocyte-like cells, and frozen-thawed embryonic stem cells displayed normal 46,XX karyotype.

Conclusions: The human embryonic stem cells can be established by using mEFs and human fetal fibroblasts produced in laboratory as feeder cells.

Key Words: Inner cell mass (ICM), Embryonic stem cell, Fibroblast, Feeder cell

줄기세포 (stem cell)란 미분화 상태의 세포로서 분화가 억제되면서 무한히 증식할 수 있으며, 분화 유도물질에 의해 신체를 구성하는 수많은 세포나 조직으로 분화하여 기능을 수행할 수 있는 잠재력 (pluripotential)을 가진 세포를 말한다.^{1,2}

배아줄기세포 (embryonic stem cell)는 포배기 (blastocyst) 배아의 내세포괴 (inner cell mass, ICM)에서 분리한 세포로 정상핵형을 가지면서 무한히 증식시킬 수 있으며, 분화유도물질에 의해 신체의 각 조직으로 분화할 수 있는 세포이다.^{1,2}

배아줄기세포 확립 (establishment) 과정은 포배기의 ICM을 분리하여 분화억제물질인 leukemia inhibitory factor (LIF)^{3,4}를 첨가한 배양액과 LIF를 분비하는 생쥐배아 섬유아세포 (mouse embryonic fibroblasts, mEFs)와 같은 기저세포 단일층 (feeder cell monolayer)에서 미분화 상태로 계대배양 (doubling) 하여, 약 10~15회의 계대배양에서 얻어진 colony를 줄기세포의 특성규명을 위해 미분화 줄기세포 표면에 특이적으로 발현되는 alkaline phosphatase 활성도, SSEA-3, -4 혹은 Oct-4 mRNA 발현을 확인하여야 하며, 염색체 분석을 통한 정상핵형 확인과 분화유도과정을 거쳐야 한다.⁵⁻⁸

최초의 배아줄기세포에 대한 연구는 1981년 Martin⁹에 의해 생쥐의 배아에서 배아줄기세포를 분리하는데 성공하였고, 같은 해에 Evans와 Kaufman¹⁰이 생쥐 배아줄기세포 확립에 성공하였으며, 이후 hamster (1988),¹¹ rabbit (1993),¹² pig (1994)¹³ 및 cow (1998) 등¹⁴과 같은 다양한 종에서 배아줄기세포의 확립이 보고되었다.

현재 전 세계적으로 생명공학과 의학 연구기관, 이와 관련된 산업분야에서 줄기세포에 대한 많은 관심을 가지고 있는 이유는 미분화 상태의 줄기세포를 기능성 세포로 분화시켜 난치병 환자에게 이식하여 치료하는 세포대체요법 (cell replacement therapy)의 가능성과 그에 따른 경제적 파급효과가 막대하기 때문이다.¹⁵⁻¹⁹

인간 배아줄기세포에 대한 연구는 1994년 Bongso 등⁵이 체외에서 수정된 난자를 포배기까지의 발달율과 임신율을 높이기 위하여 난관상피세포를 이용한 공동배양시스템 연구에서 배아줄기세포 유사세포 (embryonic stem cell like cells)를 보고하면서부터

시작되었고, 1998년 Thomson 등⁷은 체외수정기술을 받고 남은 잉여배아를 기증받아 mEFs를 기저세포로 이용하여 배아줄기세포주 (embryonic stem cell line) 확립에 성공하였으며, 2000년에는 Reubinoff 등⁸이 Thomson 등⁷과 유사한 방법으로 배아줄기세포 확립을 보고한 이후 인간 배아줄기세포주가 계속 미국 국립보건원 (National Institutes of Health)에 등록되고 있다.

그러나, 미국 국립보건원에 등록된 인간 배아줄기세포는 거의 mEFs를 기저세포로 이용하여 확립된 세포이기 때문에 향후 세포대체요법이 임상적으로 적용될 때 세균오염과 이종간의 세포오염이 문제점으로 떠오르고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 Richards 등²⁰은 인간태아 근육세포 (fetal muscle)와 태아 표피세포 (fetal skin) 및 성인 난관상피세포 (adult fallopian tube epithelial cell)를 기저세포로 이용하여 mEFS에서 확립된 인간 배아줄기세포를 계대배양하여 줄기세포주 확립을 보고하였고, Hovatta 등²¹도 American tissue culture collection (Rockville, USA) 사에서 구입한 인간 섬유아세포 (human foreskin fibroblasts)를 기저세포로 이용하여 인간 배아줄기세포 확립을 보고하여 이종간의 세포오염 문제점을 극복함과 동시에 줄기세포 확립에 인간 섬유아세포의 효용성을 시사하였다.

본 연구는 줄기세포를 배양할 때 기저세포로 이용되는 mEFs, 인간태아 근육세포, 인간태아 표피세포를 직접 제작하여 시험관아기기술 프로그램이 종료된 환자로부터 제공된 잉여배아를 이용하여 인간 배아줄기세포를 확립하고 특성을 규명하기 위하여 실행되었다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

본 연구에 사용된 배아는 2002년 1월 1일부터 2003년 6월 30일까지 부산대학교 병원 산부인과 불임클리닉에서 시험관아기기술시 이식하고 남은 4~8 세포기의 잉여배아를 동결보존 하였다가 시험관아기 프로그램이 종료된 환자의 동의를 얻어 사용하였다.

2. 연구방법

1) 수정란의 동결과 용해

이식하고 남은 4~8 세포기 배아는 실온에서 0.5 M, 1 M, 1.5 M PROH 및 1.5 M PROH + 0.2 M sucrose 용액으로 각각 5분씩 탈수시킨 후 -7℃까지 분당 2℃, -30℃까지 분당 0.3℃로 온도를 하강시킨 후 -196℃의 액체질소에서 냉동보관 하였다.

시험관아기 프로그램이 종료된 후 동결보존 되었던 배아의 용해는 실온에서 15초, 30℃에서 1분간 용해 후 1 M PROH + 0.2 M sucrose, 0.5 M PROH + 0.2 M sucrose 및 0.2 M sucrose 용액 순으로 각 5분씩 재탈수시킨 후 G2 배양액에서 포배기까지 배양 하였다.

2) 기저세포 제작

(1) mEFs

과배란이 유도된 6주령의 ICR계 생쥐 암컷을 교미시킨 후 질전 (vaginal plug)을 확인한 날로부터 13~14일째 되는 날 경추과열법으로 임신한 생쥐를 도살하여 자궁으로부터 태아를 적출하였다. 적출된 태아의 머리와 간을 제거한 후 Iris curb scissor로 태아조직을 잘게 조각내고 다시 한쪽 면도칼로 mincing하여 0.05% trypsin/0.53 mM ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)로 조직을 풀어준 후 직경 10 cm petri dish당 3마리의 태아조직을 20% fetal bovine serum (FBS; Hyclone, Logan, UT), 2 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acid, 0.1 mM β -mercaptoethanol, 1% penicillin-streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM: 4500 mg glucose/L, no pyruvate; Life Technologies, Rockville, USA)으로 2일간 배양하였다. 3일간 매일 신선한 배양액으로 교체한 후 petri dish에 단일세포층이 균일하게 분포되면 3회 계대배양하여 10% dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma, St. Louise, MO) 동결보존액으로 $5\sim 10 \times 10^6$ cell/ml의 농도로 cryovial에 1 ml씩 분주하여 초급속동결법으로 액체질소에서 냉동보관하였다.

(2) 인간태아 표피와 근육 섬유아세포

인간태아 섬유아세포는 Richards 등²⁰의 방법에 준하여 제작하였다. 인체 면역 결핍 바이러스와 B형 간염검사에 음성반응을 나타낸 산모의 유산된

태아로부터 표피와 근육을 채취한 후 각각 한쪽 면도날로 mincing하여 2 ml의 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA를 첨가하여 세포조직을 풀어 준 후 직경 10 cm petri dish에서 20% FBS, 2 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acid, 0.1 mM β -mercaptoethanol, 1% penicillin-streptomycin, 1% insulin-transferrin-selenium G supplement (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 첨가한 DMEM 배양액으로 2일간 배양하였다. 2일 후부터는 매일 신선한 배양액으로 3일간 교체한 후 3회 계대배양 (계대배양기간: 4일)하여 10% DMSO 동결보존액으로 cryovial에 1 ml씩 분주하여 초급속동결법으로 액체질소에 보관하였다.

3) ICM을 배양하기 위한 배양액과 섬유아세포 단일층의 준비

인간과 생쥐의 섬유아세포 단일층 제작은 같은 방법으로 하였다.

(1) 배양액

DMEM에 20% FBS, 1 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acid, 0.1 mM β -mercaptoethanol, 1,000 IU/ml LIF, 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 0.2 μ l filter로 filtering한 후 5% CO₂ 37℃ 배양기에서 6시간 동안 배양시킨 후 사용하였다.

(2) 섬유아세포

사용하기 하루 전에 동결해 두었던 섬유아세포를 37℃에서 3분간 용해한 후 cryovial에 있던 1 ml의 세포부유물에 7 ml의 DMEM을 넣고 현탁하여 1,000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 버리고 20 ml의 DMEM으로 현탁액을 만들어 직경 10 cm petri dish에서 단일층을 만들기 위해 5% CO₂ 37℃ 배양기에서 overnight 시켰다. 다음날 신선한 배양액으로 교체한 후 150분간 10 μ g/ml의 mitomycin-C (Sigma, St. Louis, USA) 처리를 하였다. 10 ml phosphate-buffered salines (PBS)로 3회 세척 후 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA 처리로 세포현탁액을 만들어 사용하고자 하는 크기 (6~10 cm)의 dish에 적절한 농도로 분주하였다. 3시간 후에는 단일층이 형성되어 있어 배양액을 교체한 후 ICM을 올려 7일간 공배양 하였다.

4) ICM 분리를 위한 면역절제술 (immunosurgery)

동결용해 후 포배기로 발달한 배아를 0.5% pro-

nase에서 1분간 처리한 후 pipetting으로 투명대 (zona pellucida)를 제거하고 영양막세포 (trophoblast)를 괴사시키기 위해 Solter와 Knowles²²의 방법을 변형하여 mineral oil로 도포된 50 µl drop의 rabbit anti-human serum antibody (1:10; Sigma, St. Louis, MO)에서 30분간 배양하여 항원항체반응을 유도하고, guinea pig complement (1:5; Sigma, St. Louis, MO)를 5분간 처리하여 배양액에서 2시간 배양 후 실험현미경상에서 mouth pipette으로 ICM을 흡입하여 기저세포와 공배양 하였다.

5) 줄기세포 계대배양

7일간 배양하여 커진 ICM 덩어리를 가늘게 뽑은 유리 미세침으로 덩어리 가장자리 부분의 섬유아세포를 제거하고 새로 준비한 섬유아세포 단일층으로 옮겨 7일간 더 배양하였다. 계대배양은 5일 간격으로 하였으며, 커진 colony를 가늘게 뽑은 유리 미세침과 mouth pipette을 이용하여 채취하고 dispase (10 mg/ml; Life Technologies, Gaithersburg, USA) 처리로 colony 가장자리에 붙어 있는 섬유아세포를 제거한 후 2~4개의 조각으로 나누어 새로운 섬유아세포 단일층으로 옮겨 배양하였다.

6) 미분화 줄기세포의 특성 분석

(1) Alkaline phosphatase 활성도 측정

미분화세포 표면 표식인자 (cell surface marker)로 이용되는 alkaline phosphatase의 활성도는 alkaline phosphatase kit (Sigma, St. Louis, USA)를 사용하여 면역조직화학염색을 하였다. 섬유아세포상의 줄기세포를 4.5 mM citric acid, 2.2 mM sodium citrate, 3 mM sodium chloride를 첨가한 용액 27%, 65% methanol, 3% formaldehyde를 혼합하여 실온에서 30초간 고정시킨 후 증류수로 세척하였고, alkaline-dye mixtured solution으로 실온에서 15분간 염색시킨 후 현미경으로 관찰하였다.

(2) SSEA-4 발현 측정

SSEA-4의 염색을 위해서 0.05% trypsin/0.53 mM EDTA로 배아줄기세포 주위의 섬유아세포를 제거하고 90% acetone으로 고정한 후 PBS로 세척하여 미분화세포 표면에서 특이적으로 생성되는 일차항체 (MC-813-70; Chemicon, UK) 반응은 37°C에서 60분간 반응을 유도하고 이 항체에 결합하여 형광을 발하는 Fluorescein-Isothiocyanate conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin (Sigma, St. Louis, MO)으로 37°C에서 30분간 반응시켜 형광현미경으로 발광을 관찰하였다.

(3) Oct-4 발현의 측정

Oct-4는 미분화 배아줄기세포와 초기배아에서 강하게 발현되는 줄기세포 표식인자이다. 줄기세포 colony로부터 Quiagen RNeasy kit (Quiagen, Valencia, USA)로 RNA를 추출하여 cDNA kit (Ambion, Austin, USA)로 역전사 (reverse transcription)하였다.

중합 효소 연쇄반응 (PCR)은 94°C에서 5분간 denaturation, 55°C에서 30초간 annealing, 72°C에서 30초간 extension 과정을 35회 실시하였다.

Primer는 Richard 등²⁹의 방법에 따라서 Table 1과 같이 준비하였다.

7) 배아줄기세포의 동결과 용해

배아줄기세포의 동결과 용해는 Reubinoff 등²³의 방법에 따라 유리화 (vitrification) 방법으로 동결하였다. 20% FBS가 첨가된 hepes buffered DMEM (HM) 배양액으로 vitrification solution (VS1); 10% DMSO + 10% ethyleneglycol과 20% DMSO + 20% ethylene glycol + 0.5 M sucrose (VS2) 용액을 제조하였다. 4~5개의 줄기세포 colony를 37°C의 VS1 용액에 1분간 노출하고 VS2 용액에 30초간 노출한 후 미리 준비해둔 straw에 mouth pipette으로 loading하였다. Straw는 밀봉 (sealing)하지 않고 곧바로 -196°C 액체질소

Table 1.

Marker	Primer
Oct-4	Sense : 5'-CGRGAAGCTGGAGAAGGAGAAGCTG-3'
	antisense : 5'-GCACAGCTTCTCCTTAATGTCACGC-3'
β-actin	sense : 5'-TGGCACCACCTTCTACAATGAGC-3'
	Antisense : 5'-GCACAGCTTCTCCTTAATGTCACGC-3'

에 침지 (plunging)하여 보관하였다.

용해는 37°C의 water bath에서 30초간 용해 후 0.2 M sucrose + HM 용액에 straw 내용물을 빼낸 다음 0.1 M sucrose + HM 및 HM 용액에서 각각 5분간 처리하여 동결액을 제거하고 미리 준비한 섬유아세포 단일층으로 옮겨 배양하였다.

8) 인간 배아줄기세포의 염색체 분석

계대배양 3일째 colcemid (10 µg/ml)를 1시간 처리한 후 줄기세포 colony만을 채취하여 1,000 rpm에서 5분간 원심 분리한 후 37°C의 저장액 (hypotonic solution, 0.075M KCl) 5 ml을 넣고 부드럽게 pipetting하여 37°C에서 15분간 저장처리 하였다. 0.2 ml의 고정액 (acetic acid 1 : methanol 3)을 drop wise 방법으로 넣고 pipetting 후 1,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 상층액을 버리고 냉동보관했던 고정액 5 ml를 drop wise 방법으로 넣고 부드럽게 pipetting 한 후 1,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 4°C에서 30분간 보관하였다. 고정처리를 2회 반복한 후 slide를 제작하여 실온에서 하루 동안 건조시켰다. 0.1% trypsin으로 15초간 처리한 후 5% Giemsa 용액으로 G-banding하여 염색체 분석을 시행하였다.

9) Embryoid body 형성과 자발적 분화유도

배아줄기세포 colony를 섬유아세포로부터 분리하여 dispase (10 mg/ml) 처리로 colony 주위의 세포를 제거하였다. 미세침으로 최대한 작은 조각으로 나누고, 0.25% trypsin/0.53 mM EDTA로 colony들을 15분간 분해하여 LIF와 β-mercaptoethanol을 뺀 줄기세포 배양액이 들어 있는 직경 6 cm petri dish와 conical tube에서 5일간 배양하거나 dish 바닥에 20

µl 배양액 소적 (drop)을 만들고 여기에 분해된 줄기세포들을 넣고 뒤집어 배양하는 hanging drop 방법으로 5일간 배양하여 embryoid body 형성을 유도하였고 형성된 embryoid body를 0.1% gelatin으로 도포된 dish로 옮겨 4 ng/ml의 basic-FGF (Invitrogen, St. Louis, MO)를 첨가한 배양액으로 배양하면서 자발적 분화 형태를 관찰하였다.

결 과

1. 기저세포 제작

포배기 배아로부터 분리한 ICM을 미분화 상태로 계속 계대배양하기 위해서는 LIF를 분비하는 기저세포와의 공배양이 필수적이다. 이러한 기저세포로 이용하기 위하여 mEFs와 인간태아 표피와 근육 섬유아세포를 제작하였다.

mEFs를 제작하기 위하여 임신 13~14일된 ICR계 생쥐 3마리에서 적출한 24마리의 태아로부터 나온 조직을 10 cm petri dish당 3마리의 분량으로 나누어 배양하였고, 인간태아 표피와 근육 섬유아세포는 유산된 태아의 조직을 표피와 근육을 구분하여 작은 조각으로 처리한 후 배양한 결과 배양 4일째에 모든 dish에서 불규칙하게 퍼진 세포들을 관찰할 수 있었으며, 1회 계대배양시 조직과 debris를 제거하고, 2회 계대배양부터는 한 개의 dish에서 나온 세포를 세 개의 dish로 분주하여 배양하였다 (Figure 1). 계대배양 후 3일이 지나면 세포가 dish에 고르게 퍼져 있었으며, trypsin/EDTA 처리 후 세포현탁액이 잘 만들어졌으나, 5일 이상이 지나면 세포가

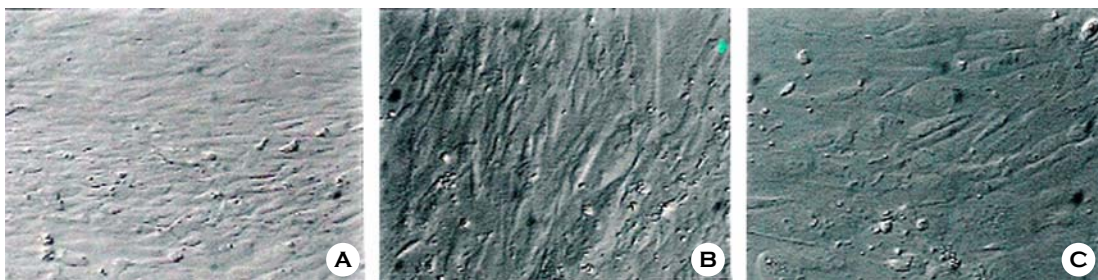


Figure 1. Morphology of feeder cells (×100).

A; Confluent mouse embryo fibroblasts, **B;** Confluent human fetal skin fibroblasts, **C;** Confluent human fetal muscle fibroblasts.



Figure 2. The ICM plated on feeder cells after immunosurgery ($\times 100$).

너무 밀집되어 dish의 가장자리부터 세포가 말리는 현상이 나타났으며, 계대배양을 위한 trypsin/EDTA 처리 시 세포현탁액이 잘 만들어지지 않고 덩어리져 있었다. 이러한 현상은 trypsin/EDTA 처리시간이 길어지므로 세포에 해를 줄 수 있고, 세포덩어리가 잘 풀어지지 않아 깨끗한 세포층을 만들기 어려우므로 계대배양은 세포의 밀도가 너무 높지 않을 때 하는 것이 좋을 것으로 사료되었다.

2. ICM 분리 및 배양

시험관아기 프로그램이 종료된 환자의 동의를 얻어 용해한 4~8 세포기 수정란 23개 중 8개가 포배기로 발달하였으며 0.5% pronase로 투명대를 제거한 후 ICM의 크기에 상관없이 면역결핍제로 영양막세포를 제거하여 mEFs 단일층에 2개, 인간태아 표피 섬유아세포와 근육 섬유아세포 단일층에 각각 3개씩 올려 공배양을 하였다.

배양 후 3일째에 mEFs 단일층에서 1개의 colony가 형성된 것을 관찰할 수 있었고, 인간태아 표피 섬유아세포와 근육 섬유아세포에서는 colony가 형성되지 않았다 (Figure 2).

3. ICM colony의 계대배양 및 형태

mEFs에서 형성된 colony는 5일째부터 갑자기 커지기 시작하였고 (Figure 3), 7일째 되는 날 가늘게 뽑은 미세침으로 커진 ICM colony를 섬유아세포층으로부터 분리하여 여러 조각으로 분획하여 5일 간격으로 30회 계대배양을 하는 동안 약 60%의 colony가 미분화 상태로 성장하였다. 또한, colony를

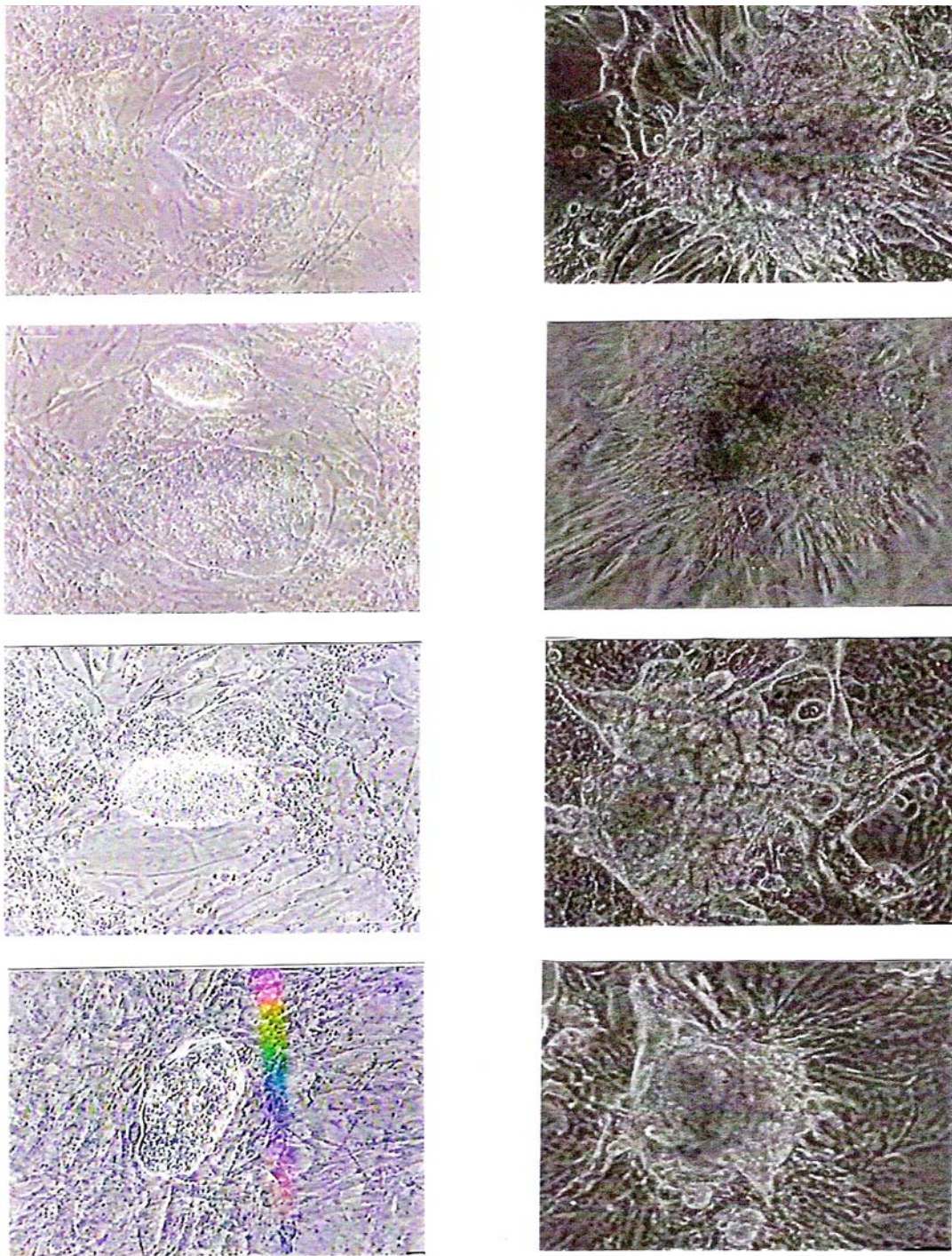


Figure 3. ICM clump grown on mouse embryo fibroblast monolayer for 5 days after plating.

여러 조각으로 나눌 때 크기가 작을수록 분화가 잘 일어나는 것을 관찰할 수 있었다. 미분화 상태의 colony는 줄기세포와 섬유아세포간의 경계가 뚜렷하며, 주로 원판모양이나 럭비공모양의 타원형을 이루었으나, 분화된 colony는 가장자리의 경계가 없고 세포가 퍼지면서 섬유아세포 모양으로 변해가는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 4). mEFs에서 15회 계대배양된 배아줄기세포 colony를 인간태아 표피 섬유아세포와 근육 섬유아세포로 옮겨 계대배양을 하였을 때, 두 세포층에서 다 colony를 형성하였으며, 근육 섬유아세포보다 표피 섬유아세포에서 미분화 상태로 성장이 잘 되었다. mEFs와 인간태아 표피 섬유아세포상에서의 배아줄기세포 성장을 비교하였을 때 mEFs에서 형성된 colony는 배양 5일째부터 뚜렷했던 colony의 가장자리 경계가 흐려지기 시작하였고, 인간태아 섬유아세포층에서 형성된 colony는 9일째부터 이러한 현상이 나타나기 시작하여 mEFs에서 형성된 colony는 5일마다 계대배양하였고 인간태아 섬유아세포층에서 형성된 colony는 9일마다 계대배양을 하였다. Colony의 분화되는 속도는 mEFs보다 인간태아 섬유아세포에서 빨리 분화되어 오는 것으로 관찰되었다 (Figure 5, 6).

4. 배아줄기세포 특성 분석

인간배아 줄기세포의 확인을 위해 줄기세포 표면 표식인자인 alkaline phosphatase 활성도를 확인한 결과 가장자리 경계가 뚜렷한 미분화 상태의 colony에서는 붉은 색으로 염색되었고, 경계가 뚜렷하지



Undifferentiated Colonies

Differentiated Colonies

Figure 4. Undifferentiated and differentiated human ESC-like cell colonies on mouse embryo fibroblast monolayer.

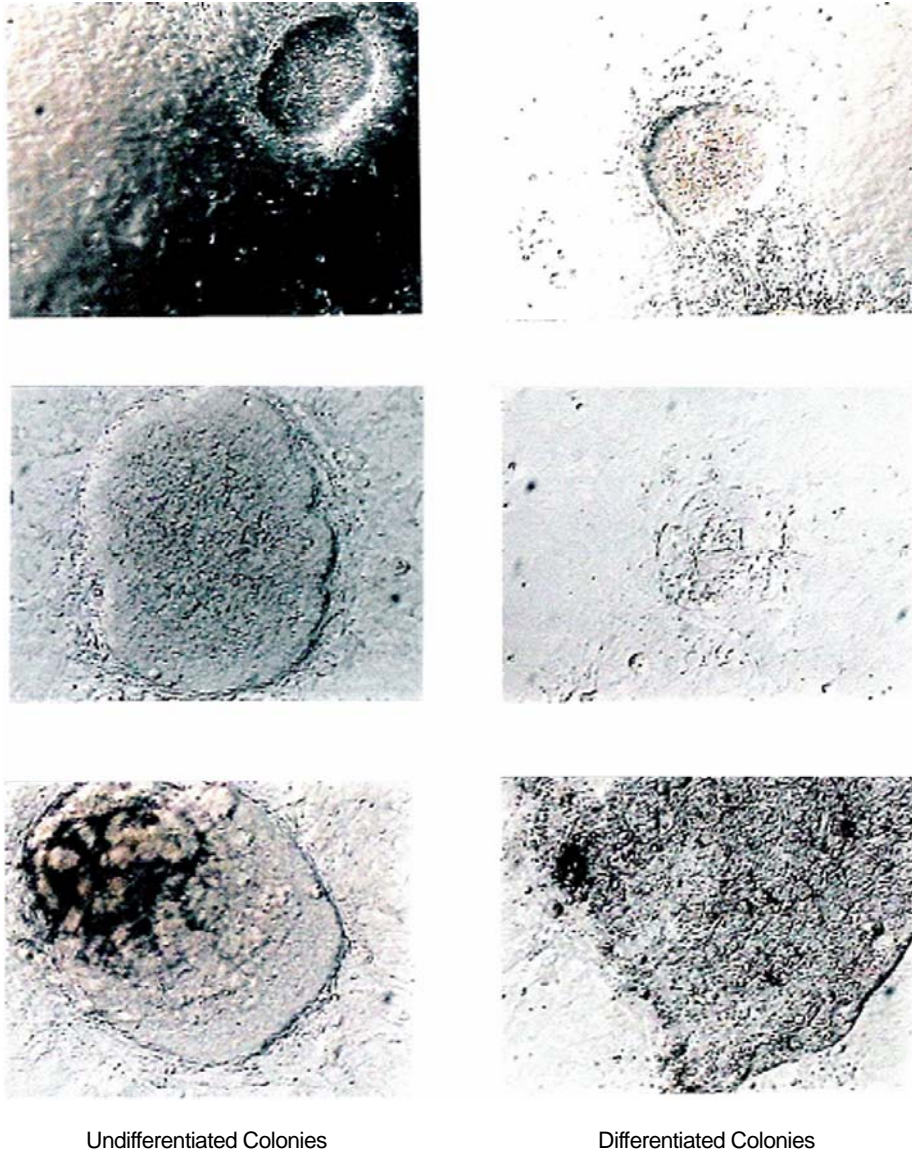


Figure 5. Undifferentiated and differentiated human ESC-like cell colonies on human fetal muscle fibroblast monolayer.

얇은 colony에서는 염색이 되지 않는 것을 확인할 수 있었으며 (Figure 7A), SSEA-4 역시 미분화 형태를 나타내는 colony에서 형광을 나타내는 것을 확인하였다 (Figure 7B).

미분화 상태의 배아줄기세포에서 발현되는 Oct-4 mRNA의 발현을 조사하기 위해 인간태아 표피 섬유아세포와 근육 섬유아세포, mEFs상에서 계대배양한 줄기배아세포 colony에서 Oct-4 mRNA 발현

을 알아보기 위해 역전사 증합 효소 연쇄반응 (RT-PCR)으로 조사한 결과 세 종류의 섬유아세포상에서 배양된 colony에서 모두 Oct-4 mRNA가 발현되는 것을 확인하였다 (Figure 7C).

mEFs와 인간태아 섬유아세포층에서 계대배양한 ICM colony의 배아줄기세포 특성의 확인을 통해 인간배아 줄기세포 확립을 위해 mEFs와 인간태아 섬유아세포 모두 기저세포로 활용될 수 있지만 이중

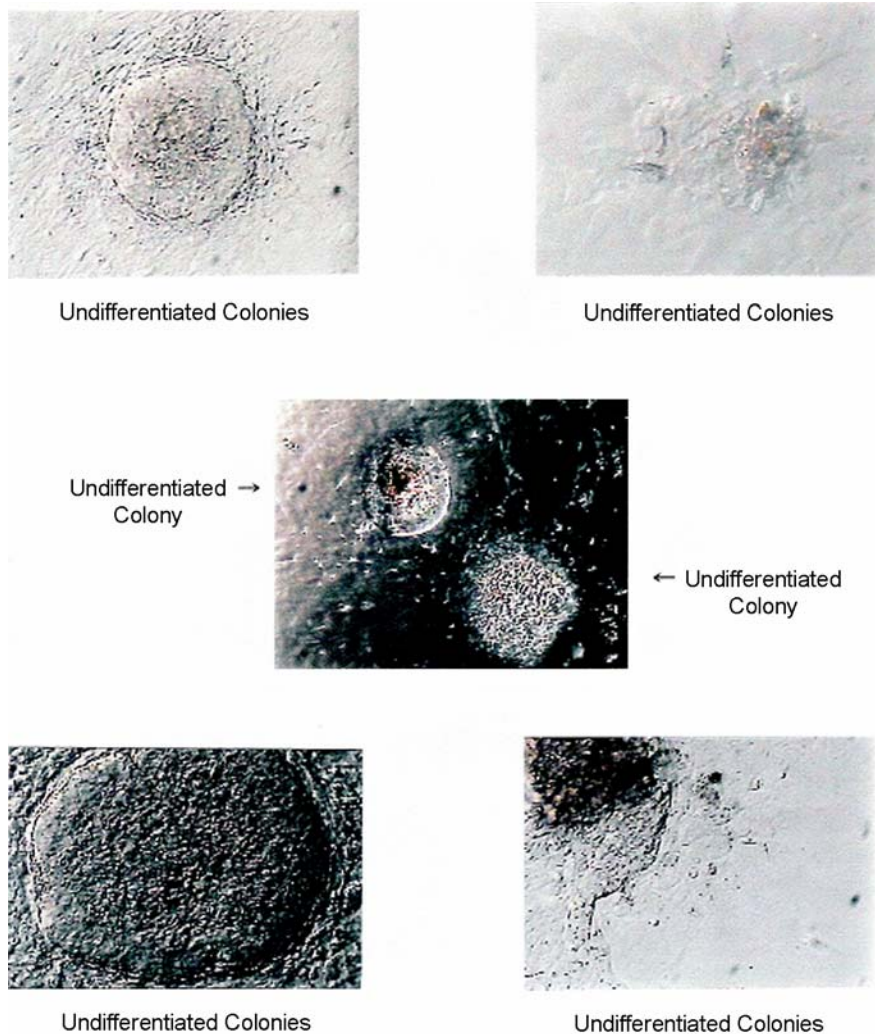


Figure 6. Undifferentiated and differentiated human ESC-like cell colonies on human fetal skin fibroblast monolayer.

간의 세포오염을 막기 위해 mEFs를 인간태아 섬유아세포로 대체할 수 있다는 결과를 얻었다.

5. 배아줄기세포의 유리화동결과 융해 후 염색체 분석

mEFs, 인간태아 표피 섬유아세포, 인간태아 근육 섬유아세포에서 계대배양된 인간배아줄기세포 colony들을 유리화 동결한 후 융해하여 기저세포별로 계대배양하여 생존율과 성장 상태를 관찰한 결과 약 50%의 colony가 단일층에 부착하여 성장하기 시작하였으며, 일부 colony의 가장자리에서 분

화된 양상을 나타내기 시작하였으나 가늘게 뽑은 유리 미세침으로 가능한 한 분화된 가장자리 부분을 제거하고 계대배양을 했을 때 분화되어 버리는 colony도 있었고, 미분화 상태로 성장하는 colony도 있었다.

인간 배아줄기세포 특성을 규명한 후 유리화동결 방법으로 냉동보관 했던 colony들을 융해하여 인간태아 섬유아세포와 생쥐 배아줄기세포 상에서 공동배양 하여 2회 계대배양한 후 G-banding 법으로 핵형 분석을 실시한 결과, 모두 46,XX의 정상핵형을 확인하였다 (Figure 8).

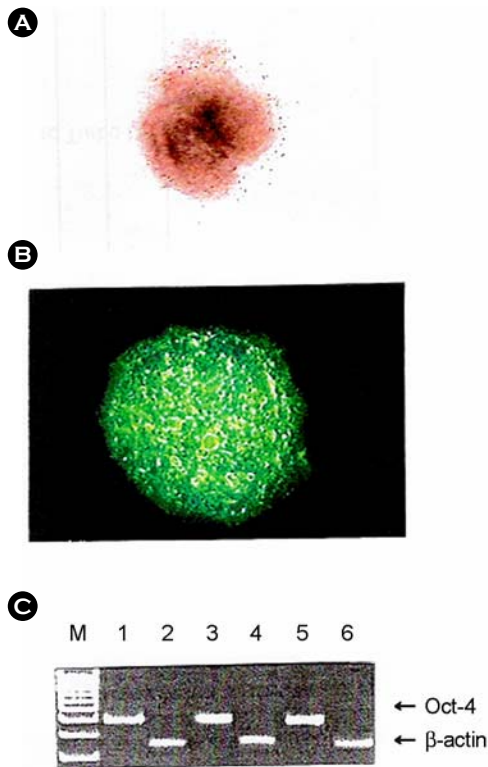


Figure 7. Characteristic assay of human ESC-like cell colonies.

A; Expression of alkaline phosphatase ($\times 100$)

B; Expression of SSEA-4 epitope ($\times 100$)

C; Expression of Oct-4 mRNA

Lane M, 100 bp DNA ladder

Lane 1, Oct-4, hESC (passage30) grown on mouse embryo fibroblasts

Lane 2, β -actin, hESC (passage30) grown on mouse embryo fibroblasts

Lane 3, Oct-4, hESC (passage15) grown on human fetal skin fibroblasts

Lane 4, β -actin, hESC (passage15) grown on human fetal skin fibroblasts

Lane 5, Oct-4, hESC (passage15) grown on human fetal muscle fibroblasts

Lane 6, β -actin, hESC (passage15) grown on human fetal muscle fibroblasts

Oct-4 band, 400 bp ; β -actin band, 241 bp

6. Embryoid body 형성과 자발적 분화유도

미분화 인간 배아줄기세포 colony를 0.25% trypsin/0.53 mM EDTA 용액에서 pipetting으로 단일세포현탁액을 만들어 petri dish, conical tube, hanging drop에서 5일간 배양하여 embryoid body 형성을 유도한

결과 conical tube에서 embryoid body가 가장 잘 형성되었으며 (Figure 9), hanging drop에서도 embryoid body가 잘 형성될 것으로 예상하였으나 세포들이 drop 표면에 고르게 퍼져 embryoid body가 잘 형성되지 않았다. 형성된 embryoid body들을 0.1% gelatin이 도포된 petri dish로 옮겨 LIF와 β -mercaptoethanol을 빼고 4 ng/ml의 basic-FGF (Invitrogen, St. Louis, MO)를 첨가한 줄기세포 배양액으로 계속해서 배양하면서 관찰한 결과 신경전구유사세포 (neural progenitor cell-like cell), 신경유사세포 (neuron-like cell), 심근유사세포 (cardiomyocyte-like cell) 등으로 분화된 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 9, 10).

고 찰

줄기세포는 크게 성체줄기세포 (adult stem cell)와 배아줄기세포로 나눌 수 있는데, 성체줄기세포는 혈액, 뇌, 췌장 등에 존재하는 세포로 건초디미에서 바늘을 찾을 정도로 그 수가 너무 적어 세포를 분리하기가 어렵고, 세포증식과 분화능력에 한계가 있다는 단점 때문에 배아줄기세포에 많은 연구가 집중되고 있다.

배아줄기세포에 대한 연구는 1981년 Evans와 Kaufman¹⁰이 생쥐 포배기 배아로부터 ICM을 분리하여 최초로 생쥐 배아줄기세포 확립에 성공한 이후 다양한 종에서 배아줄기세포 확립이 보고되었다.¹¹⁻¹⁴ 이러한 동물연구를 기초로 하여 1998년 Thomson 등⁷이 불임시술이 종료된 환자로부터 기증받은 잉여배아를 이용하여 인간 배아줄기세포 확립을 보고한 이후 기초연구에서 많은 연구가 이루어져 확립된 배아줄기세포를 이용하여 조혈세포,^{24,25} 신경세포,^{26,27} 췌장세포,^{28,29} 심근세포³⁰⁻³² 등으로의 분화에 대한 많은 연구가 보고되고 있어, 인간의 난치병 치료에 대한 줄기세포의 이용 가능성이 제시되고 있다.¹⁵⁻¹⁹

그러나, 많은 연구기관에서 줄기세포에 대한 관심과 연구가 활발히 진행되고 있지만 미국 국립보건원에 등록된 배아줄기세포는 70여종 밖에 되지 않는다. 배아줄기세포의 확립이 적은 이유는 줄기세포연구에 이용되는 인간배아를 구하기가 어렵고, ICM으로부터 작성한 배아줄기세포의 미분화 특성

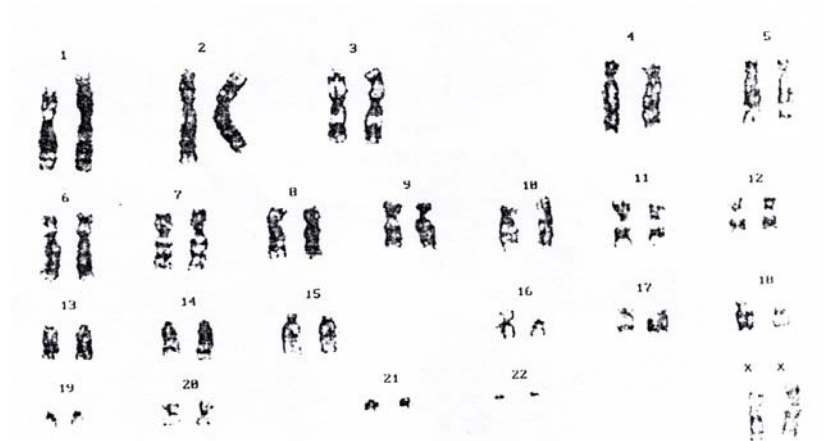


Figure 8. Karyotype of vitrified hESC colony (normal; 46,XX).

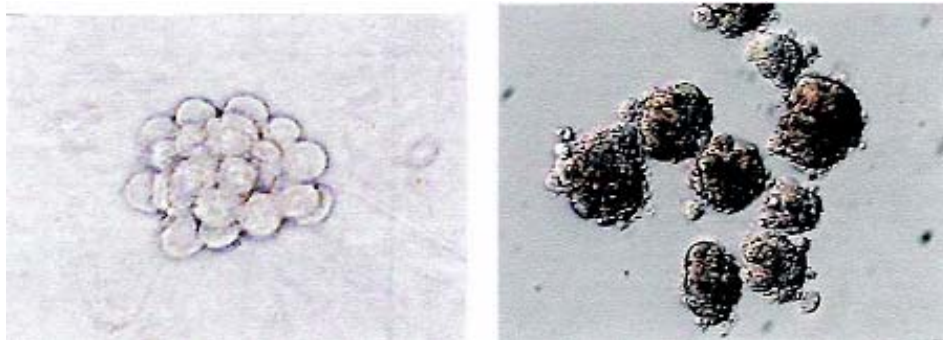


Figure 9. Embryoid bodies (A: 2 days, B: 5 days) formed from hESC.

을 규명하기 전에 분화되어 버리기 때문에 사료 된다.

줄기세포작성을 위해서는 먼저 포배기 배아로부터 분리한 ICM이 부착하게 하고, 미분화 상태로 자랄 수 있도록 미분화억제물질을 분비하는 기저세포의 이용과 LIF을 배양액에 첨가하여 배양하게 되는데,³⁴ 현재까지 보고된 인간 배아줄기세포는 거의 mEFs를 기저세포로 이용하여 작성된 줄기세포다. 그러나, 줄기세포의 특정 세포로의 분화에 대한 연구가 진행되면서 세포치료법의 가능성이 제시되자 새로운 문제점이 부각되었는데, 줄기세포와 기저세포간의 세포오염과 세균오염이다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 인간태아 섬유아세포를 이용하여 배아줄기세포를 확립하거나 extracellular 물질인 matrix나 laminin을 이용한 feeder free culture system으

로 미분화 상태를 유지하면서 줄기세포를 계대배양하는 방법이 제시되었다.³³ 또한, 세포 배양액에 첨가되는 FBS 역시 오염의 문제점을 안고 있어 줄기세포와 관련된 모든 세포배양에 FBS를 인간혈청으로 대체하거나 합성혈청대체물질 (synthetic serum substitute)을 첨가한 무혈청 배양액을 사용하는 연구가 진행되고 있다.^{29,30}

본 연구를 실행하기 위해 먼저 줄기세포 확립에 필요한 mEFs 및 유산된 태아로부터 표피 섬유아세포와 근육 섬유아세포를 제작하였다. 원시 섬유아세포 (primary fibroblast) 준비시 연구수행자로부터 야기되는 오염과 sample의 혈액을 완전히 제거하지 못해 일어나는 hemolysis를 방지하기 위해 멸균적으로 sample을 세척하여 원시 섬유아세포를 제작하고, 세포의 밀도가 너무 높지 않을 때 계대배양을

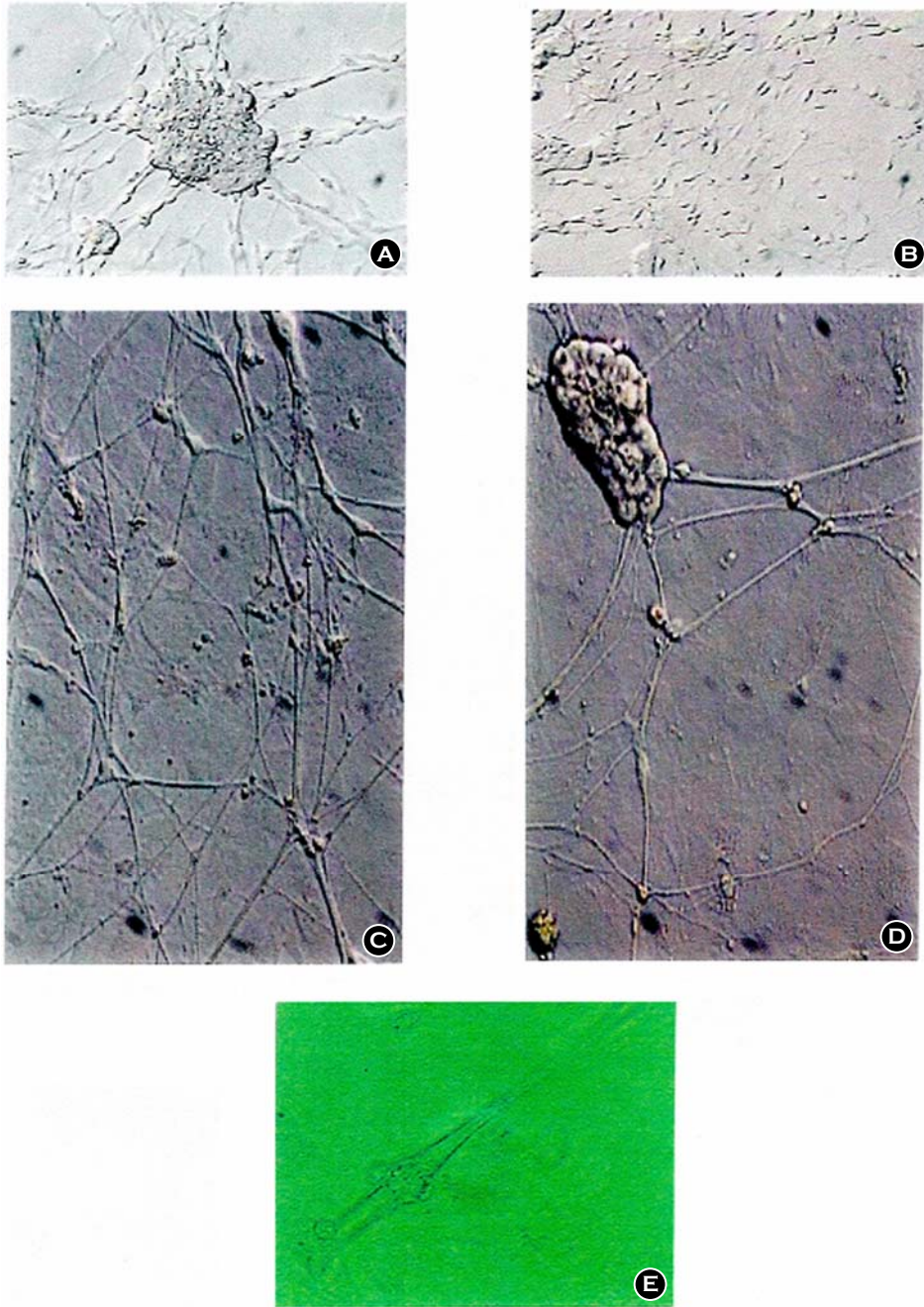


Figure 10. Morphology of spontaneous differentiation from embryoid bodies.
A, B; Neural precursor-like cell, **C, D;** Neuron-like cell, **E;** Cardiomyocyte-like cell

하면 trypsin/EDTA 처리시간을 줄이면서 깨끗한 세포층을 얻는 데 어려움이 없을 것으로 사료된다. 본 연구에서는 원시 섬유아세포를 3일 간격으로 4회

계대배양하여 냉동보관하였다가 줄기세포 연구에 사용하였다. Thomson 등⁷과 Richards 등²⁰은 4회 계대배양된 섬유아세포를 줄기세포 확립과 계대배양

에 이용하였는데, 본 연구에서 관찰한 결과 계대배양이 6회를 넘어가게 되면 해저의 수초처럼 섬유아세포 단일층으로부터 수포가 떠오르는 것을 생쥐와 인간 섬유아세포에서 관찰할 수 있었고, 배양액으로 여러 번 세척하여도 떨어지지 않았는데, 이것이 줄기세포의 미분화와 성장에 영향을 미치는 것으로 사료되어 섬유아세포를 4회 이상 계대배양하지 않았다.

직접 제작한 생쥐와 인간의 섬유아세포를 이용하여 8개의 계승된 포배기 배아로부터 면역결핍술로 영양막세포를 제거하여 채취한 ICM을 인간태아 표피와 근육 섬유아세포에 각각 3개씩, mEFs에 2개를 공배양 하였으나, mEFs상에서 1개의 ICM colony를 얻을 수 있었다. 7일간의 배양 후 미세침을 이용한 물리적인 방법으로 작은 조각으로 분획하여 계대배양을 하였다. 30회의 계대배양을 하는 동안 형태적으로 분화된 colony와 미분화된 colony를 구분할 수 있었는데, 미분화된 colony는 기저세포와의 경계선이 뚜렷하고 세포모양이 확실히 구분되었으며 돔(dome)모양의 colony를 이루었으나, 분화된 colony는 기저세포와의 경계가 뚜렷하지 않고, 세포모양 또한 시간이 지날수록 구분하기가 어려워지며, 줄기세포가 기저세포를 밀어내면서 과고들거나 퍼지는 현상을 나타내었다. 또한, 계대배양기간이 5일을 넘기면 분화현상이 나타나기 시작하여 mEFs를 기저세포로 이용한 줄기세포의 계대배양기간은 5일간으로 하였다.

mEFs에서 15회 계대배양 된 줄기세포 colony의 일부를 인간태아 표피와 근육 섬유아세포상으로 옮겨 계대배양을 시도한 결과 일부의 colony에서 분화현상을 나타내었으나 계대배양을 계속하였을 때 미분화 상태를 유지할 수 있었다. 그러나, 생쥐와 인간 섬유아세포상에서 계대배양 되어진 미분화 줄기세포의 colony 모양은 mEFs상에서는 돔(dome)모양을 나타낸 반면, 인간태아 섬유아세포상에서는 원판(plate)모양을 나타내었다. 분화된 colony의 모양은 mEFs에서와 비슷한 현상을 나타내었다. 인간태아 섬유아세포상에서 배양한 줄기세포의 계대배양기간은 9일으로써 mEFs상에서의 5일 보다 계대배양할 때까지 미분화 상태로 4일간 더 배양을 하여도 분화되지 않는 colony들을 볼 수 있어 Richard

등²⁰과 Hovatta 등²¹의 보고와 일치함을 알 수 있었다. 또한, 이들은 인간 배아줄기세포를 같은 인간태아 섬유아세포상에서 미분화 상태로 계대배양기간을 4일간 더 연장하면서 계대배양을 할 수 있다는 것은 연구에 소요되는 시간, 노력, 비용의 절감효과와 이종간의 세포와 세균오염을 막을 수 있다고 보고 함으로써 인간유래 섬유아세포의 유용성을 강조하였다.

본 연구에서 직접 제작한 생쥐배아와 인간태아 섬유아세포를 기저세포로 이용하여 ICM으로부터 약 30회 계대배양한 colony들의 줄기세포 특성을 확인하기 위하여 줄기세포 표면 표식인자인 alkaline phosphatase 활성도, SSEA-4와 Oct-4 mRNA 발현을 확인한 결과 생쥐배아와 인간태아 섬유아세포에서 배양된 colony에서 강한 반응을 나타내어 미분화된 인간 배아줄기세포임을 확인할 수 있었다. 줄기세포 특성의 반응은 colony에 따라 염색과 발광에 다소 차이가 나는 것을 관찰할 수 있었는데, 반응이 약한 colony는 분화된 줄기세포와 미분화 줄기세포가 혼재하거나 분화가 진행되고 있다는 것을 암시하고 있다. 이러한 관찰은 줄기세포 계대배양시 미분화 colony를 구별하는데 도움이 될 것으로 사료된다.

미분화된 인간 배아줄기세포 확인과정을 거친 줄기세포 colony들을 2회 더 계대배양한 후 Reubinoff 등²³의 방법에 따라 유리화 동결법으로 동결보존 하였다. 보존된 일부 colony를 용해 후 배양한 결과 60% 정도에서 colony를 형성하여 Reubinoff 등²³과 일치한 결과를 얻었고, 형성된 일부 colony들의 정상핵형 유무를 알아보기 위해 염색체 분석을 한 결과 46,XX의 정상핵형을 나타내어, 유리화 동결법이 줄기세포 동결보존에 유용함을 확인할 수 있었다. 또한, 줄기세포는 무한정으로 계대배양할 수 있기 때문에, 그 양이 기하급수적으로 늘어나 원판동결법으로는 용해 후 생존율이 낮을 뿐만 아니라 시간이 너무 많이 걸리기 때문에 유리화 동결법은 앞으로 줄기세포 동결보존에 소요되는 시간과 노력의 절감에 효과적인 방법이 되리라고 사료된다.

인간 배아줄기세포의 특성을 확인한 일부의 colony들을 trypsin 처리로 줄기세포현탁액으로 만들어 LIF 대신 4 ng/ml의 basic-FGF를 첨가한 줄기세

포 배양액으로 기저세포가 없는 dish에서 embryoid body를 형성시킨 후 매일 배양액을 교환해 주며 관찰한 결과 신경전구유사세포, 신경유사세포, 박동하는 심근유사세포 등을 확인할 수 있었다.

본 연구 결과 줄기세포 확립에 이용되는 기저세포로 직접 제작한 mEFs와 인간태아 섬유아세포에서 인간 배아줄기세포를 확립함으로써, 미분화 줄기세포 배양에 더 효과적인 기저세포 개발연구와 줄기세포를 이용한 다양한 분화연구에 기초 자료가 될 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Doetschman TC, Eistetter H, Kata M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryo Exp Morphol* 1985; 87: 27-45.
2. Peta MF, Reubinoff B, Trouson A. Human embryonic stem cell. *J Cell Sci* 2000; 13: 5-10.
3. Smith AG. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988; 336: 688-90.
4. Williams RL. Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stems. *Nature* 1988; 336: 684-7.
5. Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam SS. The growth of inner cell mass cells from human blastocysts (abstract). *Theriogenology* 1994; 41: 161.
6. Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam SS. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum. Reprod.* 1994; 9: 2110-7.
7. Thomson JA, Itskovitz Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
8. Reubinoff BE, Pera M, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnol* 2000; 18: 399-404.
9. Martin GR. Isolation of a pluripotent stem cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7634-8.
10. Evans MJ, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotential stem cell lines from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 151-6.
11. Doetschman TC, Williams P, Maeda N. Establishment of hamster blastocyst derived embryonic stem cells. *Dev Biol* 1988; 127: 224-7.
12. Graves KH, Moreadith MH. Derivation and characterization of putative pluripotential embryo stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol Reprod Dev* 1993; 36: 424-33.
13. Wheeler MB. Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6: 563-8.
14. Cibelli JB, Stice SL, et al. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell derived stem-like cells. *Nature Biotechnol* 2000; 16: 642-6.
15. Geron. 1999. <http://www.geron.com>
16. Solter D, Gearhart J. Putting stem cells to work. *Science* 1999; 283: 1468-70.
17. Fishel SB, Edwards RG, Evans CJ. Human chorionic gonadotropin secreted by preimplantation embryos cultured in vitro. *Science* 1984; 223: 816-8.
18. Edwards RG. IVF and history of stem cells. *Nature* 2001; 413: 349-51.
19. Edwards RG. Personal pathways to embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online* 2002; 4: 236-78.
20. Richards M, Fong C-Y, Chan W-K, Wong P-C, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nature Biotechnol* 2002; 20: 933-6.
21. Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Stromberg A-M, Inzunza J, Hreinsson J, Rozell B, Blennow E, Andang M and Ahrlund-Richter L. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod* 2003; 18: 1404-9.
22. Solter D, Knowles BB. Immunosurgery of mouse

- blastocyst. *Proc Natl Acad Sci USA* 1975; 72: 5099-102.
23. Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, Trounson AO. Effective cryopreservation human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Hum Reprod* 2001; 16: 2187-94.
 24. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three. 2001.
 25. Filippi MD, Porten F, prsteur FL, Schiavon V, Millot GA, Vainchenker W, de Sanvage FJ, Dubart Kupper Schmitt A, Sainteny F. Requirement for mitogen-activated protein kinase activation in the response of embryonic stem cell-derived hematopoietic cells to thrombopoietin in vitro. *Blood* 2002; 99(4): 1174-82.
 26. Andressen C, Stocker E, Klinz FJ, Lenka N, Hescheler J, Fleischmann B, Amhold S, Addicks K. Nestin-specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation. *Stem Cells* 2001; 19(5): 419-24.
 27. Arnhold S, Lenartz D, Kruttwig K, Klinz FJ, Kolossov E, Hescheler J, Sturm V, Andressen C, Addicks K. Differentiation of green fluorescent protein labeled embryonic stem cell-derived neural precursor cells into Thy-1-positive neurons and glia after transplantation into adult rat striatum. *J Neurosurg* 2000; 93: 1026-32.
 28. Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martin F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000; 49: 157-62.
 29. Assad S, Maor G, Amit M, Itskovitz-eldor J, Skorecki K, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001; 50: 1691-7.
 30. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest*. 1996; 98: 216-21.
 31. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001; 108: 407-14.
 32. Heinrich S, Thenben T, Hescheler J, Lindner M, Brandt MC, Wartenberg M. Characteristics of calcium sparks in cardiomyocytes derived from embryonic stemcells. *Am J Physiol* 2001; 281: H411-2.
 33. Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnol* 2001; 19: 971-4.