

인간 배아줄기세포의 배양을 위한 지지세포에 관한 고찰

서울대학교 의학연구원 인구의학연구소¹, 의과대학 산부인과학교실²

김윤영¹ · 오선경^{1,2} · 최영민^{1,2*}

Feeder Cells for Culture of Human Embryonic Stem Cells

Yoon Young Kim¹, Sun Kyung Oh^{1,2}, Young Min Choi^{1,2*}

¹Institute of Reproductive Medicine and Population, Medical Research Center,

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

[Korean. J. Reprod. Med. 2007; 34(4): 219-227.]

서 론

인간 배아줄기세포 (human embryonic stem cell; hESC)는 확립된 이후,¹ 난치병을 치료하기 위한 세포 치료 (cell-based therapy)에 있어 훌륭한 세포 공급원이 될 수 있을 것으로 기대를 모아왔다. 이후 지속적인 연구를 통하여 배아줄기세포뿐 아니라 여러 조직 또는 기관 내에 존재하는 줄기세포들에 관한 사실들이 속속 밝혀지고 있다. 한정된 분화능을 가진 것으로 알려졌던 성체줄기세포 (adult stem cell)는 유래된 세포와 다른 종류의 세포로 분화할 수 있는 교차분화 (transdifferentiation) 능력이 있음이 밝혀졌으며,² 이미 분화된 체세포 (somatic cell)들도 역분화 (dedifferentiation) 기작을 통해 다시 전분화능을 가진 상태로 돌아갈 수 있다는 것이 알려졌다.³ 최근에는 양수 (amniotic fluid; AF)에 존재하는 줄기세포의 존재 또한 밝혀졌다.⁴ 이러한 줄기세포들은 줄기세포의 특성을 공통적으로 나타내며, 그 기원에 따라 각기 다른 특성을 지니고 있어, 배아줄기세포 외에 또 다른 세포 공급원의 역

할을 할 것으로 기대되고 있다.

인간 배아줄기세포는 배반포 (blastocyst)의 내세포괴 (inner cell mass)로부터 유래된 세포로 체외배양 시 미분화 상태 (undifferentiated state)를 유지하며, 자가증식 (self-renewal) 능력 및 모든 종류의 세포로 분화할 수 있는 전분화능 (pluripotency)을 가진 세포이다. 이러한 특성에 기인하여 배아줄기세포는 세포 치료에 있어 적합한 세포 공급원의 하나로 간주되고 있다.

최초로 인간 배아줄기세포가 확립된 이후,¹ 여러 인간 배아줄기세포주의 확립 및 유지가 보고되었으며,^{5,6} 배아줄기세포를 특정 세포로 분화시키기 위한 연구들이 진행되어, 삼배엽성 세포로의 분화 유도가 성공적으로 이루어지고 있다.⁷⁻⁹ 또한 배아줄기세포의 미분화 유지 기작, 전분화능을 조절하는 신호전달 체계 (cell signaling) 및 전사 인자 (transcription factor), 배양 조건 (culture condition)의 개선 등에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 그러나, 배아줄기세포로부터 특정 계열의 세포로 분화유도된 세포들을 세포 치료에 이용하기 위해서 선결되어야 할 과제들이 있는데, 미분화 상태를 유지하기 위한 이중 유래의 지지세포 (feeder cell)를 사용함으로써 유발될 수 있는 병원균의 전달

주관책임자: 최영민, 우) 110-799 서울특별시 종로구 연건동 28, 서울대학교 의과대학 산부인과학교실
Tel: (02) 2072-2385, Fax: (02) 762-3599
e-mail: ymchoi@snu.ac.kr

Table 1. Composition of media generally used for human embryonic stem cell culture

Types of Media	Media Composition
MEF culture medium	DMEM 85 / 90%, FBS or FCS 15 / 10%
STO culture medium	DMEM 85 / 90%, FBS or FCS 15 / 10%
hESC culture medium	KO DMEM or DMEM/F12 80 / 85%, KO-SR 20 / 15%, 0.4 or 4 ng/ml bFGF
Conditioned medium	KO DMEM or DMEM/F12 80 / 85%, KO-SR 20 / 15%, 8 ng/ml bFGF

MEF; mouse embryonic fibroblast, FBS; fetal bovine serum, FCS; fetal calf serum, hESC; human embryonic stem cell, KO DMEM; knockout DMEM, KO-SR; knockout serum replacement, bFGF; basic fibroblast growth factor

(transmission of unknown pathogen) 방지와, 환자에게 이식했을 경우 발생할 수 있는 기형종 (teratoma)의 형성 및 면역거부 반응 (immune rejection)의 억제 등을 꼽을 수 있다. 이러한 과제들을 개선하기 위해서는 인간 배아줄기세포의 배양 조건 중 생쥐 유래 지지세포의 대체 또는 배제, 동물 유래 물질을 배제하고 성분이 알려진 배양액 (defined media)의 개발 등이 필수적이다.

현재 가장 광범위하게 사용되고 있는 배아줄기세포 배양 방법은 생쥐 유래 지지세포와 동물 유래 성분의 knockout serum replacement (KO-SR, Invitrogen)가 포함된 배양액을 사용한다 (Table 1). 이러한 이중 유래 물질들을 포함하는 조건에서 배양된 배아줄기세포로부터 특정한 세포로 분화유도하여 세포 치료에 이용할 경우, 이중 유래의 레트로 바이러스에 대한 노출¹⁰ 또는 병원균의 전달 등의 여러 가지 문제들을 고려해야만 한다. 따라서 배아줄기세포의 배양 시 생쥐 지지세포를 대체할 수 있는 다양한 종류의 인간 지지세포의 개발, 성분이 알려진 배양액 개발 등과 같은 배아줄기세포 배양 조건 개선을 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

본 고찰에서는 본 연구실에서 개발한 인간 유래 지지세포를 이용한 인간 배아줄기세포의 배양에 관한 연구 결과를 포함하여, 최근까지 수행된 다양한 인간 지지세포를 이용한 배양, 지지세포를 배제한 조건배양액 (conditioned media; CM)을 이용한 배양 및 성분이 알려진 배양액 개발 등 인간 배아줄기세포의 배양 조건의 개선을 위한 연구들에 관하

여 살펴보고자 한다.

지지세포의 역할

지지세포는 배아줄기세포의 미분화 상태를 유지하는데 기여하는 영양 인자 (trophic factor)들을 분비하고, 세포 접촉으로 매개되는 미분화 유지 기작과 연관되어 있는 것으로 알려져 있다.¹¹ 지지세포에서 분비되는 신호전달 물질들은 상호간의 다양한 네트워크를 구성하여 배아줄기세포의 미분화 유지 또는 분화의 개시를 조절하는데 기여한다. 지지세포로부터 분비되는 물질들은 신호전달 물질인 Wnt, Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), Transforming Growth Factor (TGF) β 등과 세포외기질 (extracellular matrix) 성분이 있다.¹² Wnt 단백질은 배아 발생 및 분화에 다양한 역할을 하며,¹³ 배아줄기세포의 자가증식에도 기여하는 것으로 알려져 있다.¹⁴ BMPs는 초기 배아의 분화, 성장 및 발달에 다양한 역할을 하며,¹⁵ TGF β 군에 속하는 단백질 중의 하나인 Activin A는 지지세포가 없는 경우에도 배아줄기세포의 전분화능 유지에 기여한다는 사실이 보고되었다.¹⁶

인간 배아줄기세포의 확립에 앞서 확립·연구된 생쥐 배아줄기세포 (mouse embryonic stem cell)의 배양 시에 생쥐 섬유아세포 (mouse embryonic fibroblast; MEF)를 지지세포로 사용한 배양법이 널리 이용되어 왔다.¹⁷ 그러나 생쥐 배아줄기세포는 leukemia inhibitory factor (LIF)를 첨가하여 배양할 경우 지지세포 없이도 미분화 상태의 유지가 가능하다

는 사실이 알려져 있으나,¹⁸ 인간 배아줄기세포에서는 LIF가 미분화 유지에 기여를 하지 않는다는 것이 보고되었다.¹⁹ 최초로 인간 배아줄기세포를 확립한 Thomson 등의 연구에서는 생쥐 섬유아세포를 생쥐 배아줄기세포의 배양에서와 같이 인간 배아줄기세포의 미분화 상태 유지에 이용하였다.¹ 이후 보고된 다른 연구에서도 인간 배아줄기세포주의 확립 및 배양에 생쥐 섬유아세포가 널리 사용되고 있다. 본 연구실에서는 생쥐 유래 STO (mouse embryonic fibroblast, CRL-1503, ATCC) 세포를 지지세포로 이용하여 인간 배아줄기세포주의 확립 및 배양을 보고한 바 있다.⁶

현재 인간 배아줄기세포의 배양에 가장 널리 쓰이는 지지세포는 생쥐 섬유아세포인 MEF 또는 STO 세포이다. 적절한 밀도로 자란 지지세포들을 감마선 조사 (γ -irradiation, 30 Gy) 또는 mitomycin C (0.01 μ M, 2시간 이상) 처리 방법을 이용하여 세포 분열을 억제시켜 다시 배양접시에 간 후, 인간 배아줄기세포의 콜로니를 배양하는데 사용한다.

생쥐로부터 유래된 섬유아세포를 지지세포로 이용하는 배양법은 이종 세포와의 직접적 접촉이 이루어지고 있어, 세포 치료에 사용될 배아줄기세포의 배양법으로는 적절하지 않다. Martin 등은 이러한 배양법으로 배양된 인간 배아줄기세포는 세포막에 통해 전달되는 이종 유래의 면역반응을 유발할 수 있는 sialic acid, Neu5Gc를 포함하고 있음을 확인하였다.²⁰

위에서 언급한 문제점들을 극복하기 위하여 인간 지지세포를 이용한 배양 또는 성분이 알려진 배양액의 개발 등에 관한 연구는 필수적이라고 할 수 있다.

인간 유래 지지세포를 이용한 배아줄기세포의 배양

생쥐 섬유아세포를 대체하기 위한 다양한 인간 유래 지지세포들이 개발되어 인간 배아줄기세포의 확립 및 유지에 이용되고 있다 (Table 2). 본 연구

Table 2. Mouse- and human-derived feeder cells used for culture of human embryonic stem cells

Origin	Type of feeder cell	Reference
Mouse	Mouse embryonic fibroblast (MEF)	1, 5, 26, 46~58
	STO	6
	Adult fallopian tube epithelial cells	25
	Adult muscle	25
	Adult skin	25
Human	Adult marrow stroma	28
	Amniotic fluid fibroblast	21
	Fetal muscle	24
	Fetal skin	25
	Foreskin	10, 26, 27
	hESC-derived fibroblast	31~33
	Placenta	29, 30

hESC; human embryonic stem cell

실에서는 인간 유래 지지세포들 중 양수세포를 지지세포로 사용하여 인간 배아줄기세포를 성공적으로 배양할 수 있음을 보고하였다.²¹ 양수세포는 태아의 이상을 진단하는 산전 유전 진단에 가장 많이 이용되어 온 세포지만, 그 기원과 특성에 대해서는 정확하게 알려지지 않았다. 양수에서 유래한 세포는 태아 조직과 양막 (amnion)으로부터 유래된 세포들이 섞여 있으며,²² 줄기세포의 대표적 미분화 표식 인자인 Oct4를 발현한다는 사실이 알려짐으로써 줄기세포와 유사한 가능성을 가진 세포로 새로이 대두되고 있다.²³ 최근에 양수세포 내에 존재하는 줄기세포가 삼배엽성 세포로 성공적으로 분화될 수 있음이 확인되어 세포 치료의 새로운 공급원이 될 수 있는 가능성이 확인되었다.⁴

이러한 양수세포의 특성에 착안하여 김 등은 양수세포에서 분리한 섬유아세포를 인간 배아줄기세포의 배양에 지지세포로 이용하여, 배아줄기세포의 미분화 상태 및 전분화능이 성공적으로 유지될 수 있음을 보고하였다.²¹ 이들은 SNUhES2 세포주를

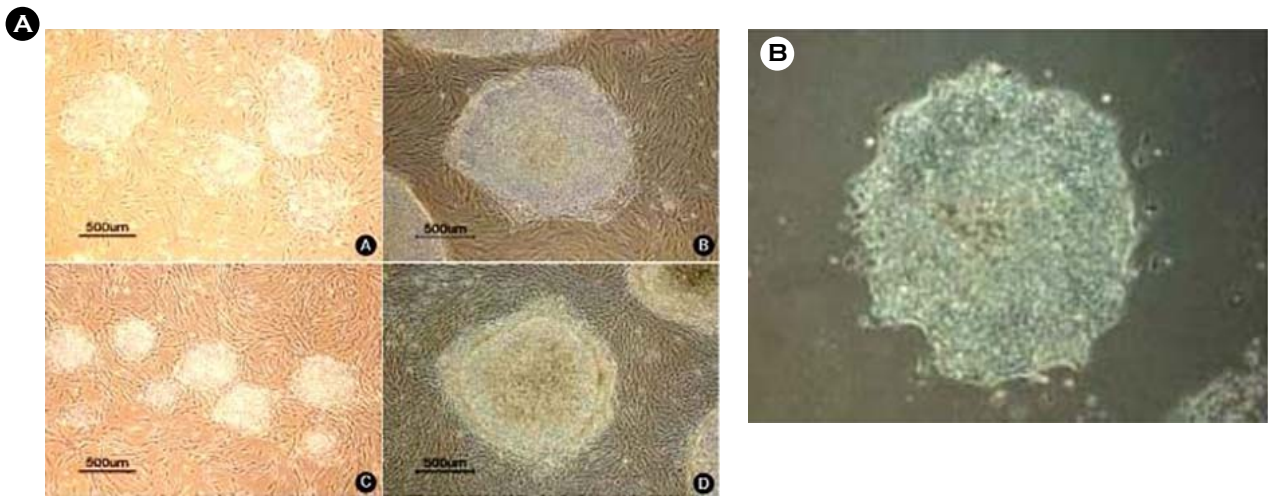


Figure 1. hAF fibroblast as feeder cells for hESC (SNUhES2) culture.²¹ **A**, Morphology of SNUhES2 cell line grown on hAF feeder layer. (A) SNUhES2 P71-5 cell colony at day 2 on hAFC treated with mitomycin C, (B) SNUhES2 P71-5 cell colony at day 7 on hAFC treated with mitomycin C, (C) SNUhES2 P71-5 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; **B**, Morphology of colony of SNUhES2 cell on day 7 grown on feeder-free condition. hAF; human amniotic fluid, hESC; human embryonic stem cell, hAFC; human amniotic fluid cell

이용하여 59계대 동안 미분화 특성을 유지할 수 있었고, 성공적으로 배아체 (embryoid body; EB)를 형성하였으며, 이 배아체에서 분화 관련 유전자들의 높은 발현을 확인하였다. 따라서 양수세포로부터 유래된 섬유아세포가 인간 배아줄기세포의 배양에 있어서 지지세포의 역할을 충분히 수행할 수 있음을 증명하였다 (Figure 1).

생쥐 섬유아세포를 대체하여 인간 세포를 지지세포로 이용한 연구는 Richards 등에 의해 최초로 연구되었다.²⁴ 이들은 태아의 근육 (fetal muscle; FM) 과 피부 (fetal skin; FS) 및 성체 나팔관 상피 (adult fallopian tube; AFT) 세포 등과 인간 혈청 (human serum)을 포함한 배양액을 이용하여 배아줄기세포의 미분화 상태를 성공적으로 유지하였다.²⁴ 이후 Richards 등은 태아 근육, 피부 및 성체 나팔관 상피, 근육 (adult muscle; AM), 피부 (adult skin; AS) 세포 등을 지지세포로 이용하여, 인간 배아줄기세포주를 30계대 이상 성공적으로 배양하였다.²⁵ 또, 인간 유래 지지세포를 배양하는데 인간 혈청을 이용하여 배양액에서 이종 물질의 함량을 감소시키고, 여러 종류의 인간 세포를 지지세포로 사용하여, 지

지세포의 종류에 따라 배아줄기세포의 미분화 상태를 유지하는 능력에 차이가 있다는 사실을 확인하였다.²⁵ 이후 여러 종류의 인간 유래 지지세포를 이용한 인간 배아줄기세포의 확립 및 유지가 보고되었다.

Hovatta 등은 상업적으로 판매되는 인간 포피 섬유아세포 (human foreskin fibroblast, CRL-2429, ATCC) 를 지지세포로 이용하여 배아줄기세포를 배양하였으며,²⁶ Amit 등은 인간 포피세포들을 분리하여 지지세포로 사용함과 더불어 인간 혈청을 포함한 배양액을 이용하여, 인간 배아줄기세포를 성공적으로 배양하였다.²⁷ Cheng 등은 성인 골수 (bone marrow) 세포를 지지세포로 이용하였으며,²⁸ 이외에도 태반에서 유래된 섬유아세포를 지지세포로 이용한 사례도 보고되었다.^{29,30}

인간 유래의 세포를 지지세포로 사용한 연구 외에도, 인간 배아줄기세포로부터 섬유아세포 (hESC-derived fibroblast)로의 분화를 유도하여 지지세포로 이용한 연구 또한 보고되었다. Xu 등은 바이러스 감염 방법을 통해 hTERT 유전자를 삽입한 섬유아세포 세포주 (HEF1-hTERT)를 만든 후,³¹ 이 세포

로부터 조건배양액을 획득하여 배아줄기세포의 배양에 이용하였다. Stojkovic 등은 배아줄기세포로부터 분화된 섬유아세포를 이용하여 배아줄기세포의 미분화 상태 유지하였고,³² Wang 등 또한 배아줄기세포로부터 얻은 섬유아세포를 이용하여 인간 배아줄기세포주의 확립 및 유지에 성공하였다.³³

그러나 인간 지지세포를 이용한 배아줄기세포의 배양 역시 지지세포의 안정적인 확보 및 배양, 수명, 획득 시기에 따른 변이 등의 요인에 의해 배아줄기세포를 다양으로 배양하는데 이용하기 어렵다는 문제점을 지니고 있다.

지지세포의 사용을 배제한 배양 (Feeder-free culture)

인간 지지세포와 함께 조건배양액과 세포외기질을 이용한 배양 또한 활발히 연구되었다. 이 방법은 지지세포와의 직접적인 접촉 없이, 지지세포와의 conditioning (세포분열이 억제된 생쥐 또는 인간 지지세포를 인간 배아줄기세포 배양액에서, 12시간 이상 배양한 후 수거하여 사용)을 통해 얻은 조건배양액과 세포외기질을 배양에 이용한다.³⁴ 지지세포를 배제한 배양에서 사용된 세포외기질로는 생쥐 육종으로부터 유래된 laminin과^{16,29,34,35} 기저층(basal lamina)의 구성 성분인 fibronectin 등이 있다.^{27,36} 지지세포를 배제한 배양에서 가장 널리 사용되는 또 다른 세포외기질인 Matrigel (BD Sciences)은 역시 생쥐 육종으로부터 유래된 것이지만 laminin, collagen IV를 비롯한 다양한 성장 인자들이 포함되어 있다.³⁴

지지세포를 배제한 배양은 2001년 처음으로 보고되었는데, Xu 등은 생쥐 섬유아세포로부터 얻어진 조건배양액과 laminin, collagen IV, fibronectin 및 matrigel 등을 이용하여 인간 배아줄기세포의 성공적인 배양에 성공하였다.³⁴ 이들은 조건배양액을 얻는 지지세포의 종류에 따라 배아줄기세포의 미분화 상태를 유지시키는 능력에 있어 차이가 있다는 사실 또한 확인하였다. Carpenter 등은 생쥐 섬유아

세포로부터 얻은 조건배양액과 세포외기질을 이용하여 4개의 배아줄기세포주를 배양하고 각각의 특성을 분석하여, 지지세포를 사용하지 않고 배양된 배아줄기세포도 그 특성을 오랜 기간 동안 유지할 수 있음을 확인하였다.³⁵ Wang 등은 지지세포에서 유래한 조건배양액을 사용하지 않고, 배아줄기세포의 미분화 유지 기작에 기여한다고 알려져 있는 BMP 신호전달 체계의 길항제 (antagonist)인 noggin과 고농도의 basic fibroblast growth factor (bFGF)를 이용하여 지지세포를 배제한 상태에서의 배아줄기세포의 미분화 상태 유지에 성공하였다.³⁷

지지세포와 함께 배양하여 얻어지는 조건배양액은 지지세포에서 배출된 다양한 종류의 성장 인자 및 미분화 유지를 위한 알려지지 않은 수용성 인자(soluble factor) 등을 포함하지만, 배양액을 얻은 시기 및 지지세포의 종류에 따른 미분화 유지 정도 차이가 존재한다. 또한, 지지세포를 배제한 배양법은 기존의 배양법과 비교하여, 생쥐 지지세포와의 직접적인 접촉이 없다는 장점이 있지만, 조건배양액과 세포외기질의 사용에 따른 동물 유래 물질들을 여전히 포함하고 있다는 점에서 세포 치료에 사용될 인간 배아줄기세포의 배양법으로는 적합하지 않다는 문제점이 있다. 또한 미분화 상태를 유지하는 기간과 정도가 기존의 생쥐 지지세포를 이용한 방법보다 길지 않고 자연적 분화가 일어나는 정도가 높은 것으로 알려져 있다.³⁴ 따라서 기존의 생쥐 지지세포를 대신하여 인간 배아줄기세포의 확립과 유지에 사용되기 보다는, 주로 유전자 전달 등의 특정한 실험에서 생쥐 유래 세포와의 섞임을 방지하기 위해 단기간 동안 사용되고 있다.

성분이 알려진 배양액 (Defined media)

배아줄기세포의 배양 시 널리 사용되고 있는 지지세포와 배아줄기세포 배양액의 조성은 동물 유래의 물질을 포함한다 (Table 1). 동물 유래 물질을 포함한 배양액에서 배양된 배아줄기세포를 이용할 경우 이종 물질에 의한 면역 거부 반응의 유발 및

병원균의 전달 가능성으로부터 자유로울 수 없다. 따라서 이러한 위험성을 감소시키고 표준화된 배양 환경을 조성하기 위해 최근에는 지지세포를 사용하지 않고 세포외기질과 함께 조성이 알려진 배양액을 이용한 연구가 활발히 연구되고 있다.

Ellerstrom 등은 이종 유래 혈청에 의한 위험성을 극복하기 위해 성인 인간 혈청이 포함된 배양액을 이용한 인간 배아줄기세포의 확립 및 배양이 시도되어 성공적으로 인간 배아줄기세포를 유지하였다.³⁸ 그러나 인간 혈청은 동물 혈청과 마찬가지로 획득된 시기에 따른 차이, 알려지지 않은 구성성분, 인간 배아줄기세포 배양에 있어 동물 혈청 사용 시보다 낮은 효율 (예: 자연분화의 증가, 낮은 부착율) 등의 문제점이 있다.³⁹

배아줄기세포 배양액에 포함된 혈청 성분은 현재 KO-SR로 대체되어 사용되고 있다. 동물 혈청을 포함한 배양액에서 확립된 배아줄기세포주들도 KO-SR이 포함된 배양액을 이용하여 성공적으로 미분화 상태를 유지하였으며,⁴⁰ KO-SR을 포함한 배양액에서 배양된 인간 배아줄기세포는 동물 혈청을 포함한 배양액에서 배양된 인간 배아줄기세포보다 증가된 성장율을 나타내었다.⁴¹ 그러나 동물 혈청을 대체한 KO-SR 또한 소의 혈청 성분으로부터 추출된 알부민을 포함하고 있어 완전히 동물 유래 물질이 배제되었다고는 볼 수 없다.²⁷

최근에는 구성 성분이 알려진 배양액의 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. Genbacev 등은 태반에서 분리된 섬유아세포를 지지세포로 사용하여 인간 배아줄기세포주를 확립하고, X-VIVO 10 (Cambrex Biosciences; 약제 등급의 인간 albumin, insulin, transferrin 등이 포함되어 있음) 배양액과 고농도의 bFGF (80 ng/ml)가 첨가된 성분이 알려진 배양액을 이용하여 배아줄기세포를 배양하였다.²⁹ Li 등도 X-VIVO 10 배양액과 고농도의 bFGF (8, 40, 80 ng/ml) 및 stem cell factor (15 ng/ml), flt3 ligand (15, 75 ng/ml) 등을 첨가하여 성분이 알려진 배양액에서 배아줄기세포를 배양하였다.⁴² 이 밖에도 Vallier 등은 인간 배아줄기세포의 전분화능이 Activin/Nodal

신호전달계를 통해 유지된다는 사실을 확인하고, 이 신호전달 물질을 bFGF와 함께 첨가하여 지지세포 없이, 성분이 알려진 배양액에서 배아줄기세포를 성공적으로 배양한 결과도 보고하였다.⁴³

Ludwig 등은 배양액에 고농도의 bFGF, lithium chloride, GABA, pipercolic acid 및 TGF β 를 첨가하여 성분이 알려진 배양액 (TeSR1)을 만들고 인간 유래 세포외기질을 사용하여 인간 배아줄기세포를 확립하고, 미분화 상태를 유지하는데 성공하였다.⁴⁴ 그러나, TeSR1 배양액은 배아줄기세포를 다량으로 배양하는데 사용하기에는 경제적인 부담이 커, 배양액의 성분 중 일부를 동물 유래 물질로 대체한 mTeSR1 배양액을 개발함으로써, 이 성분이 알려진 배양액의 상용화를 통하여 성분이 알려진 배양액의 적용 범위를 넓혔다.⁴⁵

결 론

이상에서와 같이 인간 배아줄기세포의 확립과 배양에 있어 사용된 다양한 지지세포 및 배양액에 관해 살펴보았다. 또한, 본 연구실에서 연구된 양수 세포를 지지세포로 이용한 인간 배아줄기세포 배양결과에 관해 살펴보고, 그 밖의 다양한 인간 유래 지지세포, 지지세포를 배제한 배양 (feeder-free culture) 및 성분이 알려진 배양액 (defined media)에 관하여 살펴보았다. 현재 활발히 연구되고 있는 인간 유래 지지세포, 지지세포를 배제한 배양법, 성분이 알려진 배양액의 개발 등의 연구들은 궁극적으로 세포 치료에 적합한 인간 배아줄기세포들의 확립 및 유지에 기여할 것으로 기대된다. 그러나, 상기의 방법들은 인간 지지세포의 확보 및 안정적인 배양 등이 먼저 이루어져야 하기 때문에 인간 배아줄기세포를 다량으로 배양하는데 적합하지 않다는 한계를 아직 지니고 있다. 이러한 방법들을 광범위하게 적용하기에 앞서 지지세포 종류에 따른 미분화 유지의 정도 및 기간, 전분화능의 유지 및 정상 핵형의 유지 등에 미치는 영향을 비교 분석하는 등의 후속 연구들이 좀 더 구체적으로 이루어질 필요

가 있다. 따라서 세포 치료에 적합한 수준의 인간 배아줄기세포를 확립 및 배양하기 위한 구성 성분이 알려진 배양액, 다양하고 최적화된 배양 조건의 개발을 위한 연구 등이 더 이루어져야 할 것으로 사료된다.

사사

위 연구는 과학기술부 21세기프론티어연구개발사업단인 세포응용연구사업단의 연구비 지원(SC1020)에 의해 수행되었습니다.

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. Tosh D, Slack JM. How cells change their phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 187-94.
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 1-14.
4. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, Xu T, Santos CC, Perin L, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 100-6.
5. 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.
6. 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.
7. Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki K, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001; 50: 1691-7.
8. Carpenter MK, Inokuma MS, Denham J, Mujtaba T, Chiu CP, Rao MS. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp Neurol* 2001; 172: 383-97.
9. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, et al. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* 2001; 108: 407-14.
10. 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.
11. Laslett AL, Filipczyk AA, Pera MF. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13: 295-301.
12. Prowse AB, McQuade LR, Bryant KJ, Marcal H, Gray PP. Identification of potential pluripotency determinants for human embryonic stem cells following proteomic analysis of human and mouse fibroblast conditioned media. *J Proteome Res* 2007; 10.1021/pr0702262.
13. Kawano Y, Kypta R. Secreted antagonists of the Wnt signaling pathway. *J Cell Sci* 2003; 116: 2627-34.
14. Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 2004; 10: 55-63.
15. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev* 2003; 24: 218-35.
16. Beattie GM, Lopez AD, Bucay N, Hinton A, Firpo MT, King CC, et al. Activin A maintains pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Stem Cells* 2005; 23: 489-95.
17. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-6.
18. 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.
19. 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: 1197-203.
20. Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med* 2005; 11: 1-5.
21. 김희선, 설혜원, 안희진, 오선경, 구승엽, 김석현 등. 양수세포를 이용한 인간 배아줄기세포의 배양. *대한불임학회지* 2004; 31: 261-71.
22. Prusa AR, Hengstschlager M. Amniotic fluid cells and human stem cell research: a new connection. *Med Sci Monit* 2002;

- 8(11): RA253-7.
23. Prusa AR, Marton E, Rosner M, Bernaschek G, Hengstschläger M. Oct-4-expressing cells in human amniotic fluid: a new source for stem cell research? *Hum Reprod* 2003; 18(7): 1489-93.
 24. 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.
 25. 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.
 26. 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.
 27. 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.
 28. Cheng L, Hammond H, Ye Z, Zhan X, David G. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells* 2003; 21: 131-42.
 29. Genbacev O, Krtolica A, Zdravkovic T, Brunette E, Powell S, Nath A, et al. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. *Fertil Steril* 2005; 83: 1517-29.
 30. Kim SJ, Song CH, Sung HJ, Yoo YD, Geum DH, Park SH, et al. Human placenta-derived feeders support prolonged undifferentiated propagation of a human embryonic stem cell line, SNUhES3: comparison with human bone marrow-derived feeders. *Stem Cells Dev* 2007; 16: 421-8.
 31. Xu C, Jiang J, Sottile V, McWhir J, Lebkowski J, Carpenter MK. Immortalized fibroblast-like cells derived from human embryonic stem cells support undifferentiated cell growth. *Stem Cells* 2004; 22: 972-80.
 32. Stojkovic P, Lako M, Stewart R, Przyborski S, Armstrong L, Evans J, et al. An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005; 23: 306-14.
 33. Wang Q, Fang ZF, Jin F, Lu Y, Gai H, Sheng HZ. Derivation and growing human embryonic stem cells on feeders derived from themselves. *Stem Cells* 2005; 23: 1221-7.
 34. 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.
 35. 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.
 36. Noaksson K, Zoric N, Zeng X, Rao MS, Hyllner J, Semb H, et al. Monitoring differentiation of human embryonic stem cells using real-time PCR. *Stem Cells* 2005; 23: 1460-7.
 37. Wang G, Zhang H, Zhao Y, Li J, Cai J, Wang P, et al. Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 934-42.
 38. Ellerstrom C, Strehl R, Moya K, Andersson K, Bergh C, Lundin K, et al. Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line. *Stem Cells* 2006; 24: 2170-6.
 39. Rajala K, Hakala H, Panula S, Avio S, Pihlajamaki H, Suuronen R, et al. Testing of nine different xeno-free culture media for human embryonic stem cell cultures. *Hum Reprod* 2007; 22: 1231-8.
 40. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000; 227: 271-8.
 41. Koivisto H, Hyvärinen M, Strömberg AM, Inzunza J, Mätiläinen E, Mikkola M, et al. Cultures of human embryonic stem cells: serum replacement medium or serum-containing media and the effect of basic fibroblast growth factor. *Reprod Biomed Online* 2004; 9: 330-7.
 42. Li Y, Powell S, Brunette E, Lebkowski J, Mandalam R. Expansion of human embryonic stem cells in defined serum-free medium devoid of animal-derived products. *Biotechnol Bioeng* 2005; 91: 688-98.
 43. Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 2005; 118: 4495-509.
 44. Ludwig T, Levenstein M, Jones J, Berggren W, Mitchen E, Frane JL, et al. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 185-7.
 45. Ludwig TE, Bergendahl V, Levenstein ME, Yu J, Probasco MD, Thomson JA. Feeder-independent culture of human embryonic stem cells. *Nat Met* 2006; 3: 637-46.

46. Klimanskaya I, Chung Y, Meisner L, Johnson J, West M, Lanza R. Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet* 2005; 365: 1636-41.
47. Stojkovic P, Lako M, Przyborski S, Stewart R, Armstrong L, Evans J, et al. Human-serum matrix supports undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005; 23: 895-902.
48. Lanzendorf SE, Boyd CA, Wright DL, Muasher S, Oehninger S, Hodgen GD. Use of human gametes obtained from anonymous donors for the production of human embryonic stem cell lines. *Fertil Steril* 2001; 76: 132-7.
49. Amit M, Itskovitz-Eldor J. Differentiation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *J Anat* 2002; 200: 225-32.
50. Mitalipova M, Calhoun J, Shin S, Wininger D, Schulz T, Noggle S, et al. Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos. *Stem Cells* 2003; 21: 521-6.
51. Heins N, Englund MC, Sjoblom C, Dahl U, Tonning A, Bergh C, et al. Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004; 22: 367-76.
52. Suss-Toby E, Gerecht-Nir S, Amit M, Manor D, Itskovitz-Eldor J. Derivation of a diploid human embryonic stem cell line from a mononuclear zygote. *Hum Reprod* 2004; 19: 670-5.
53. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from blastocysts. *N Engl J Med* 2004; 350: 1353-6.
54. Baharvand H, Ashtiani SK, Valojerdi MR, Shahverdi A, Tae A, Sabour D. Establishment and in vitro differentiation of a new embryonic stem cell line from human blastocyst. *Differentiation* 2004; 72: 224-9.
55. Stojkovic M, Lako M, Stojkovic P, Stewart R, Przyborski S, Armstrong L, et al. Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture. *Stem Cells* 2004; 22: 790-7.
56. Strelchenko N, Verlinsky O, Kukhareno V, Verlinsky Y. Morula-derived human embryonic stem cells. *Repro Biomed Online* 2004; 9: 623-9.
57. Li T, Zhou CQ, Mai QY, Zhuang GL. Establishment of human embryonic stem cell line from gamete donors. *Chin Med J (Engl)* 2005; 118: 116-22.
58. Inzunza J, Gertow K, Stromberg MA, Matilainen E, Blennow E, Skottman H, et al. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem Cells* 2005; 23: 544-9.