

Activin A를 이용한 지방 유래 간엽줄기세포의 내배엽 분화 유도 증진

Mesenchymal Stem Cells: The Promotion of Endoderm-Induction Using Activin A

Purpose: The most important consideration for therapy using MSCs is the differentiation of the target organ's cell type. For in-vitro hepatogenic differentiation of MSCs, the main focus is efficient induction of the MSCs into the endoderm stage. Activin A, which is a signaling molecule that is similar to Nodal, promotes the induction of definitive endoderm from both ESs and MSCs. The protocols for induction into definitive endoderm have shown different efficiency and reproducibility depending on the researchers or the sources of the MSCs. Thus, a study on the various conditions of Activin A is needed to efficiently differentiate MSCs into the definitive endoderm lineage of MSCs.

Methods: MSCs were isolated from human adipose tissues and these were cultured in MCM (MSCs Culture Medium) on a human fibronectin coated plate. At 70~80% confluence, the MSCs were harvested and cultured in MCM supplemented with Activin A, at a 50 ng/mL concentration, and FGF4. The expression of the genes related with MSCs or primitive endoderm were analyzed by RT-PCR. The changes of cell morphology for differentiation were also observed by a light microscope & a SEM.

Results: The expression of genes related with primitive foregut endoderm was seen in the groups that were treated with a higher concentration of Activin A. The morphology of the cells that differentiated into definitive endoderm were not different from those of the undifferentiated MSCs. The expression of genes related with functional primitive hepatocytes was seen in the early phase during hepatic differentiation. The cell morphology was changed to a similar cuboidal form in a time-dependent manner.

Conclusion: Activin A promotes a more rapid induction of definitive endoderm. It also makes an efficient condition for the differentiation into primitive foregut endoderm at a higher concentration.

Key Words : Mesenchymal stem cell, Activin A, Endoderm induction, Hepatocyte, Differentiation
중심단어 : 간엽 줄기세포, Activin A, 내배엽 발생, 간세포, 분화

이상우^{1,2}, 민선옥¹, 김신영^{3,5}, 최세별⁴
김현옥^{3,5}, 김경식^{1,5}

¹연세대학교 의과대학 외과학교실, ²연세대학교 대학원 나노과학 기술 협동과정, ³연세대학교 의과대학 진단검사의학교실, ⁴고려대학교 의과대학 외과학교실, ⁵세브란스 병원 세포치료센터

Sang Woo Lee, B.S.^{1,2}, Seon Ok Min, B.S.¹, Shin Young Kim, M.D., Ph.D.^{3,5}, Sae Byeol Choi, M.D., Ph.D.⁴, Hyun Ok Kim, M.D., Ph.D.^{3,5}, Kyung Sik Kim, M.D., Ph.D.^{1,5}

¹Department of Surgery, Yonsei University College of Medicine, ²Graduate Program of Nano Science and Technology, Graduate School of Yonsei University, ³Department of Laboratory Medicine, Yonsei University College of Medicine, ⁴Department of surgery Korea University College of Medicine, ⁵Cell Therapy Center, Severance Hospital

책임저자

김 경 식
서울시 서대문구 성산로 250번지
연세대학교 의과대학 외과학교실
우편번호 120-752
Tel: 02-2228-2125, 2100
Fax: 02-313-8289
E-mail: kskim88@yuhs.ac

*본 논문의 요지는 2009년 61차 대한 외과학회 추계 학술대회에서 발표되었음.

Received: 2009. 9. 2
Accepted: 2009. 12. 9

서 론

최근 몇 년 동안 환자의 치료를 목적으로 하는 줄기세포 연구가 빠른 속도로 발전해 왔다.^{1,2} 체외수정 후 잉여 배아를 이용한 줄기세포 연구는 분화 방법에서 발생학적인 접근으로 가장 많은 발전을 이루었다. 하지만 체외수정 후 잉여 배아를 이용한 배아 줄기세포 연구는 환자 맞춤형 치료에 어려움이 있으며 윤리적인 문제를 갖고 있다.³ 최근에 연구되고 있는 유도 만능 줄기세포(Induced Pluripotent Stem Cells, iPS)의 연구 성과는 윤리적인 문제를 해결하기에 충분한 획기적인 발견이라 할 수 있다.^{4,5} 역분화를 이용한 전분화성(Pluripotent)의 줄기 세포 역시 특성상으로도 배아 줄기세포와 다를 바 없으며 그 분화 능력 또한 거의 흡사하다. 그러나 이 연구 역시 아직 초기단계이며 사용되는 유전자에 따라 기형종(teratoma)이 형성될 수 있어 안전성에 아직 문제가 있으므로 더 많은 연구가 필요하다.⁵

중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells, 이하 MSCs)는 다양한 성체 조직에서 얻을 수 있으며 다분화성(multipotent)의 성격을 갖고 있고 그 분화 능력은 다양한 세포로의 변화가 가능하여 줄기세포 연구의 초창기부터 많은 연구가 진행되어 왔다. MSCs는 배아줄기세포에서 가장 문제시 되고 있는 윤리적인 문제를 최소화할 수 있다는 큰 장점이 있어 최근 연골 질환(cartilage disease) 환자에서 치료를 위한 간엽 줄기세포가 상품화가 되었을 정도로 활발히 이루어지고 있다.⁶ 하지만, 최근까지 면역 거부반응이 일어나는 조직에 대한 치료용 MSCs의 개발은 미비한 것이 사실이다. 특히 간질환 같은 내배엽성 장기를 목표로 하는 MSCs의 연구는 초기 단계이다.

간부전은 난치성 간질환으로 이에 대한 치료는 간이식이 가장 좋은 치료법으로 알려져 있다. 그러나 현재 수여자에 대한 공여 장기의 부족으로 인해 제약이 많다.⁷ 난치성 간질환을 위한 치료로 세포를 기반으로 하는 방법들이 쟁점화되어 논의되고 있다. 환자 맞춤형 줄기세포의 확립은 가장 필수적이고 안정적으로 알려져 있고 공여자와 수여자의 동일함은 면역억제의 문제를 가장 최소화할 수 있는 좋은 예이다. 그러므로 환자 자신의 조직을 공급원(source)으로 하는 줄기세포의 확립과 더불어 치료 장기(target organ)의 세포로 빠르고 완벽한 분화가 필요하다. 많은 연구자들이 MSCs를 이용하여 간세포 분화를 성공하였지만^{8,9} 오랜 분화 시간과 기능적인 효율이 성

체 세포에 미치지 못하였다.

최근들어 배아줄기세포를 이용하여 간세포 및 islet-producing cells같은 내배엽성 세포로의 빠른 분화를 위하여 Activin A를 이용한 연구가 활발하게 이루어졌다.^{10,11} Activin A는 TGF- β superfamily의 하나로서 TGF- β signaling (Smad signaling) 중에서 Nodal signaling과 유사한 기전을 갖는다. 척추동물에서의 경우에 Activin A의 고농도에서 내배엽성 유도를 촉진한다는 보고가 있다.¹² 이를 바탕으로 많은 연구자들은 보다 빠른 내배엽성 유도를 이루었으며 그에 따른 분화시간을 단축하고 경제적인 이점도 얻을 수 있었다.¹³ 하지만 간세포로의 분화 유도를 위한 프로토콜이 연구자마다 다르고 공급원에 따라 분리된 줄기세포에 따라 분화 유도의 효율성과 재현성이 서로 달라 이에 대한 비교 연구가 필요한 실정이다. 또한 빠른 유도 방법에 사용되는 cytokines의 발생학적인 측면에서의 필요성을 이해하는데 반해 mechanism이 정확히 이해되고 있지 않고 있다. TGF- β signaling에 의한 발생학적 기전은 RTK signaling 등 여러 signaling과 network를 형성하고 있으며 이 기전들은 순차적이지 동시적으로 이루어진다고 알려져 있다. 특히 Wnt/ β -catenin, FGF signaling과 많은 관련이 있다고 embryonic stem cell을 이용한 연구에 의해 보고되었다.¹⁴ 그리고 MSCs에서의 세포 내 signaling의 network에 대해서도 최근에 보고되었다.¹⁵

간엽 줄기세포를 이용한 간세포(hepatocyte)로의 분화는 내배엽성 유도기(Conditioning stage), 간세포분화기(Stage 1), 정상유지기(Stage 2)의 총 세 단계로 이루어진다. 배아줄기세포 및 간엽 줄기세포를 이용하여 내배엽성 유도를 효율적으로 이루기 위해서 Activin A를 사용한 연구는 많이 보고되었으나 정확한 사용 농도에 대해서는 아직 정립된 바가 없다. 그러므로 본 연구자는 다양한 농도에서 내배엽성 유도를 시도하기 위해 다양한 농도의 Activin A (20, 50, 100 ng/mL)을 사용하여 분화를 유도하고 초기 내배엽성 발현 유전자 및 세포 성상의 변화를 관찰하여 간세포 분화를 위한 내배엽성의 유도시 Activin A가 MSCs에서 작용하는 기전을 밝혀 간세포로의 효율적인 분화를 위한 증거를 확립하고자 하였다.

방 법

1. Isolation and Culturing of MSCs

복부 지방조직은 PBS에 세척한 뒤 잘게 잘라 0.075% col-

lagenase type I (Roche, Penzberg, Germany)을 첨가하여 37°C에서 30분간 shaking incubation한다. 효소활성은 10% FBS가 함유된 α -MEM로 불활성하고 4°C 1,200 G에서 10분간 원심 분리한다. 상층 지방을 버리고 RBC를 제거하기 위하여 적혈구 용해용액(RBC lysis buffer) (54 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA)¹⁶을 넣고 5분 동안 반응시킨 후 원심 분리하여 α -MEM에서 배양한다.¹⁷ 세포는 1,000 cells/cm²의 밀도로 2차 배양되고 분리된 세포의 증식을 위해 다음과 같은 배지 60% DMEM-LG (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA), 40% MCDB-201 (Sigma), 1X insulin transferrin-selenium (ITS) (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA), 10⁻⁹M dexamethasone (Sigma), 10⁻⁴M ascorbic acid 2-phosphate (Sigma), 10 ng/mL rhEGF (Daewoong Pharmaceuticals, Korea), antibiotic/antimycotic fibronectin (GibcoBRL, Grand Island, NY, USA) 및 10% FBS (WelGENE, Daegu, Korea)를 사용하여 1~3세대 계대배양 하였으며 1주에 두 번씩 증식배지를 교환하였다.

2. Isolation of Purified MSCs by FACS

전임상 연구 및 임상 치료의 발전에 보다 많은 기회를 제공하기 위해 2006년 ISCT에서 제안된 중간엽 줄기세포의 정의 (reference)에 따라¹⁸ 세포 표지자 CD105, CD73, CD90, CD45, CD34를 FACS analysis를 이용하여 다음과 같은 방법에 의해 측정하였다. 2~3세대 계대배양 한 후 유세포 분석은 FACScan argon laser cytometer (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, USA)로 실시하였다. 일차 배양한 미분화 간엽 줄기 세포의 배양액을 제거, PBS로 세척하고 0.25% trypsin/EDTA로 분리한 후 2,000 rpm에서 5분간 원심분리 하고 0.2% BSA가 첨가

된 PBS (FC Buffer)로 세척하고 4×10⁵개로 정량 된 세포를 사용하여 각각의 항체 즉 골수 유래 간엽줄기/전구세포 관련 항원(CD73, CD105), 조혈 모세포의 항원인(CD34, CD45), integrin 수용체 관련항원(CD29), 기타 항원(CD90)에 대한 항체를 FC buffer에서 반응시킨 후 분석하였다. 분석의 효율성을 높이기 위하여 positive, negative 항체를 staining을 하였다. FACS에 사용된 모든 항체들은 Santacruz에서 구매하였다.

3. Rapid Endodermal-Induction and Differentiation into Primitive Hepatocyte

내배엽성 유도와 초기 간세포(primitive hepatocyte) 분화는 Conditioning stage (내배엽성 유도)와 Stage 1 (간세포 분화), Stage 2 (성상 유지)의 세 단계를 걸쳐서 이루어졌다(Fig. 1).

1) Endodermal-Induction using Activin A

Conditioning stage (내배엽성 유도)에서 MSC는 FBS free culture medium에 10 ng/mL FGF4가 포함된 Medium에 실험군에 따라서 20, 50, 100 ng/mL Activin A (R&D systems, inc. MN, USA)를 각각 첨가하여 계대배양 한 2세대 MSCs를 2.5~3.0×10⁴/cm²의 세포밀도(cell density)로 human fibronectin (BD science, Bedford, England), coated culture dish (6 well)에 분주(seeding)한 후 최대 3일 동안 내배엽성 유도를 하였다. 실험군은 농도와 시간 별 내배엽성 유도를 확인하기 위해 농도 별 배양된 세포를 3일에 medium을 제거하고 PBS를 사용하여 washing한 후 세포를 6 well 중 하나의 well에서 1XTypsin-EDTA를 이용하여 박리하였다.

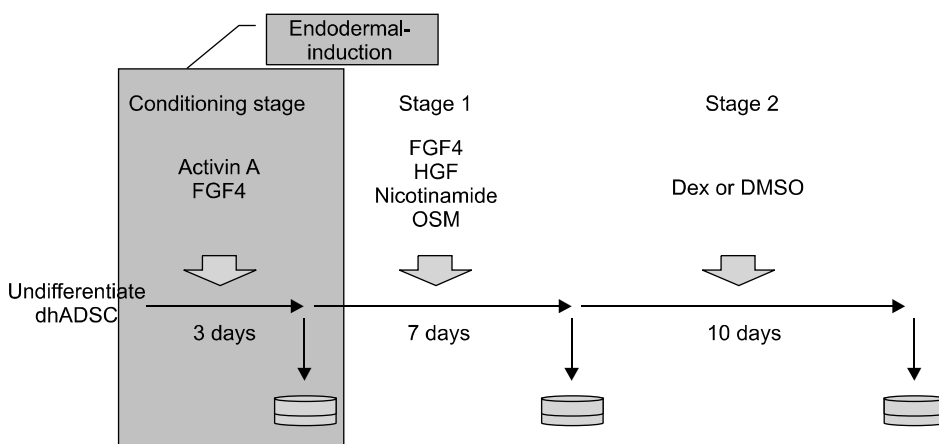


Fig. 1. Scheme of endodermal induction and hepatogenic differentiation. The endodermal induction was promoted with Activin A and FGF4 for 3 days. The differentiation into hepatocytes was induced with FGF4, HGF, nicotinamide and OSM for 7 days after endodermal induction. After that, the differentiated cells were maintained with dexamethasone and OSM for 10 days.

2) Differentiation into primitive hepatocyte of induced-endodermal cells

Conditioning stage (내배엽성 유도)에서 다양한 농도의 Activin A를 이용하여 내배엽성으로 유도된 세포는 Stage 1 (간세포 분화)에서 FBS free culture medium에 20 ng/mL HGF (R&D systems, inc. MN, USA), 30 ng/mL FGF4 (R&D systems, inc. MN, USA), 20 ng/mL OSM (oncostatin M (R&D systems, inc. MN, USA)), 4.9 mmol Dexamethasone (Sigma life Science, St Louis, USA)이 포함된 분화배지에서 배양되었다. 실험군에 따라서 Activin A의 농도는 20, 50, 100 ng/mL로 나누었으며 Stage 1의 3일까지 분화되었다. 또한, 50 ng/mL의 Activin A에 의해 내배엽성으로 유도된 세포는 50 ng/mL의 HGF로 Stage 1의 10일 동안 분화가 이루어졌다. Stage 1, 3, 7, 10일에 현미경에 의한 세포의 성장 관찰과 유전자 발현을 위한 세포는 농도와 시간 별 간세포 분화 정도를 확인하기 위해 농도별 배양된 세포를 배지 제거후 PBS를 사용하여 세척한 뒤 세포를 6 well 중 하나의 well에서 1X-Typsin-EDTA를 이용하여 박리하였다.

4. RNA Extraction and RT-PCR

각 실험군에서 RNA extraction을 하여 TRIZOL (invitrogen, Seoul, Korea) method에 의하여 RT-PCR을 시행하였다. cDNA

는 한번의 manual preparation 과정을 거쳐 ratio를 높였으며, ratio가 높아진 cDNA는 NanoDrop Spectrophotometer (Daemyung Science, Korea)를 이용하여 정량 한 후 PCR을 시행하였다. Primer는 bioneer에서 제작되었으며 각 sequence는 Table 1과 같다.

5. Scanning Electro Microscope (SEM)

세포는 4 well chamber slide에서 배양되었으며 배양 후 2 일째에 SEM으로 ×2.0 K, ×2.5 K의 배율로 MSC의 morphology를 확인하였다.

결 과

1. 지방유래 성체 줄기세포의 배양 및 성장 확인

환자의 지방에서 획득한 간엽 줄기세포의 성장은 방추형으로서(Fig. 2) 자가번식 능력(self-renewal)이 뛰어나며 다음 세대로의 계대배양 기간이 짧다. 주사전자현미경(Scanning Electro Microscope, SEM)에 의한 고배율 관찰의 결과를 보면 배양 후 2일경에는 세포의 표면에 많은 pili 같은 것이 나와서 adhesion과 cell to cell junction을 이루고 있다(Fig. 3).

Table 1. Primer sequence for PCR analysis

Gene name	Primer sequence	Accession no.	Size	A.T.	Cylce
Oct4	S 5'-CGT GAA GCT GGA GAA GGA GAA GCT G-3'	AF268617	449	57	34
	A 5'-CAA GGG CCG CAG CTC ACA CAT GTT C-3'				
Nanog	S 5'-CAA AGG CAA ACA ACC CAC TT-3'	NM_024865	394	60	34
	A 5'-ATT GTT CCA GGT CTG GTT GC-3'				
GATA4	S 5'-TTC CTC TTC CCT CCT CAA AT-3'	NM_002052	194	60	34
	A 5'-TCA GCG TGT AAA GGC ATC TG-3'				
HLA-DR	S 5'-CTG ATG AGC GCT CAG GAA TCA TGG-3'	X06079	220	60	34
	A 5'-GAC TTA CTT CAG TTT GTG GTG AGG GAA G-3'				
AFP	S 5'-CTC GTT GCT TAC ACA AAG AAA G-3'	V01514	310	58	34
	A 5'-ATG GAA AAT GAA CTT GTC ATC A-3'				
ALB	S 5'-GAC CAT GCT TTT CAG CTC-3'	BC039235	462	58	34
	A 5'-CAC AGA GAA AAG AGG CAA-3'				
HNF-4 α	S 5'-GAG CAG GAA TGG GAA GGA TG-3'	NM_178849	205	62	34
	A 5'-GGC TGT CCT TTG GGA TGA AG-3'				
GAPDH	S 5'-TCC ATG ACA ACT TTG GTA TC-3'	NM_002046	452	55	34
	A 5'-TGT AGC CAA ATT CGT TGT TA-3'				

A.T.=annealing temp.

2. 유세포 분석에 의한 간엽 줄기세포의 증명

지방으로부터 분리한 세포가 간엽 줄기세포 인지를 확인하기 위하여 간엽 줄기세포에 양성과 음성을 보이는 항체들을 이용하여 유세포분석(FACS)을 시행하였다. 지방 조직에서 분리한 세포에서 간엽 줄기세포의 표지자로 알려진 CD73, CD105, CD29, CD90에서는 평균 89% 이상 염색이 되었다, 그리고 음성 표지자로 알려진 CD34, CD45, CD14에서는 염색이 되지 않아서 간엽 줄기세포임을 확인하였다(Fig. 4).

3. Activin A를 이용한 내배엽성 세포 유도 및 초기 간세포 분화

1) 내배엽성 유도와 간세포 분화 초기의 세포 성상의 변화

Activin A의 농도가 증가할수록 conditioning stage에서의 세포 성상의 변화는 보이지 않았다. 그러나 Stage 1에서 20

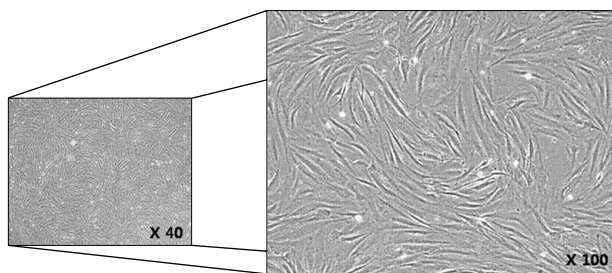


Fig. 2. Morphology of MSCs by Microscope ($\times 40$, $\times 100$) at passage 2 (confluency; 100%). The morphology of hADSCs was similar to that of fibroblast.

ng/mL의 농도로 간세포 성장인자(Hepatocyte Growth Factor, HGF)를 처리한 후 3일째에 세 그룹에서 변화가 나타남을 볼 수 있었다. 농도가 높아짐에 따라서 세포들은 단층을 유지하지 못하며 다층으로 변화하려는 형태를 보이는 것을 볼 수 있다(Fig. 5).

2) Activin A의 농도에 따른 유전자의 발현

Conditioning stage에서의 PCR에 따른 유전자 분석결과 줄기세포의 전분화성(pluripotent)을 보여주는 유전자로 알려진 *OCT-4*, *Nanog*의 발현이 유지되는 것을 볼 수 있다. *Nanog*의 경우는 Activin A의 농도가 증가함에 따라서 발현 정도가 더 강하게 나타났다.¹⁹ MHC class II (*HLA-DR*) 면역 유전자의 경우 20 ng/mL의 경우에서는 발현되지 않았으나 나머지 두 실험군에서는 나타나는 것을 볼 수 있었다. 이것은 20 ng/mL의 실험군은 줄기세포의 성격을 유지하고 있다는 것으로 해석할 수 있다. 내배엽성 초기에 발현되는 유전자인 *GATA4*의 발현은 모든 실험군에서 비슷한 발현을 나타냈다. 또한 내배엽성 대표 유전자인 α -태아 단백질(*alpha-fetoprotein*, *AFP*)도 모든 실험군에서 발현되었다. 그러나 알부민(*albumin*, *ALB*)의 발현은 어떠한 실험군에서도 나타나지 않았다(Fig. 6).

3) Hepatocyte Growth Factor에 따른 초기 간세포로의 분화 및 유전자의 발현

50 ng/mL의 Activin A에서 내배엽성으로 분화 유도된 세포를 50 ng/mL의 HGF로 간세포 분화를 시킨 경우 Stage 1의 3일째부터 조금씩 입방형의 간세포적인 형태로 세포의 성상이 변

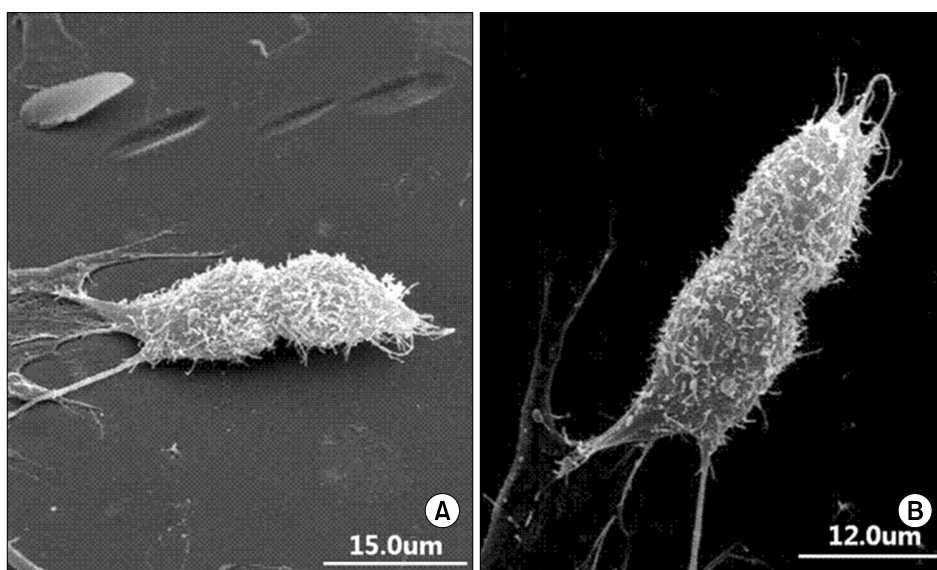


Fig. 3. Morphology of MSCs on non-coated culture plate at 2 days after seeding by Scanning Electron Microscope (SEM) (A: $\times 2.0$ K, B: $\times 2.5$ K). The cell to cell or cell to matrix adhesion was occurred by pili on cell surface.

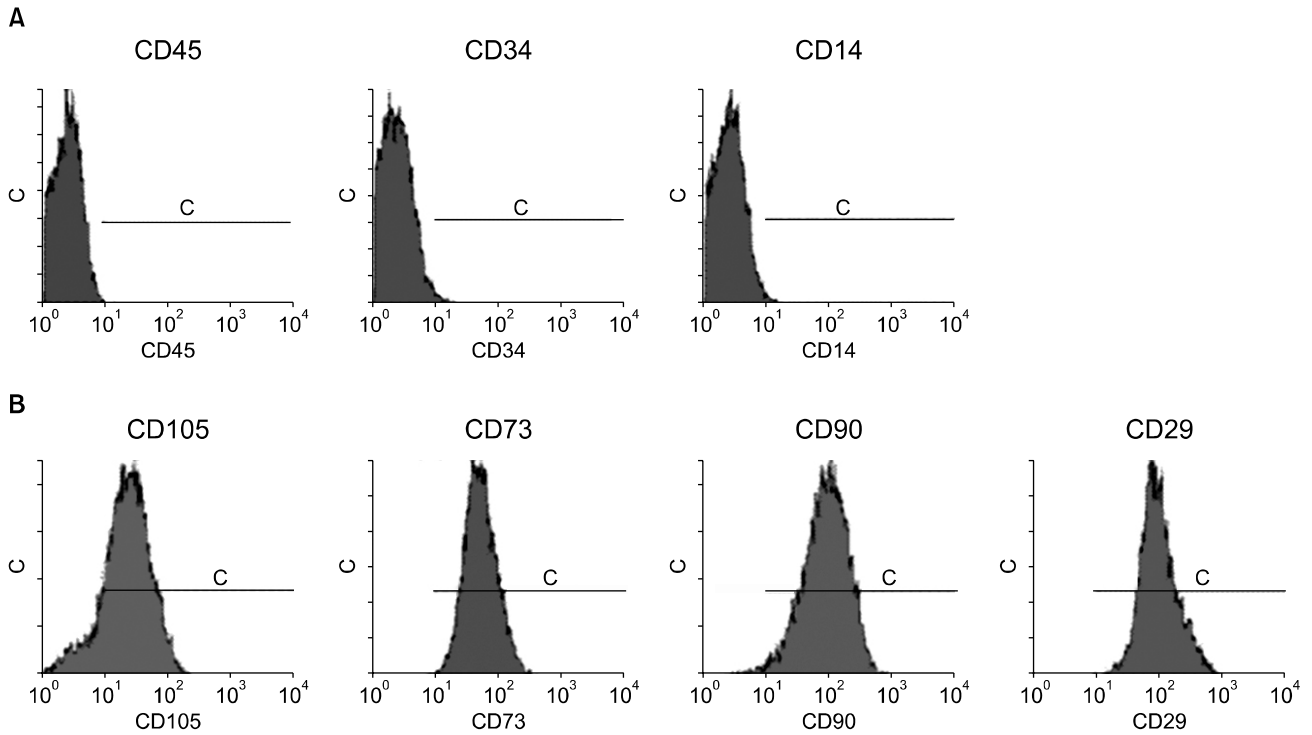


Fig. 4. Characterization of hADSCs as MSCs by FACS analysis. (A) negative surface markers (B) positive surface markers. The mesenchymal stem cell markers (CD105, CD73, CD90 and CD29) were expressed on the hADSCs.

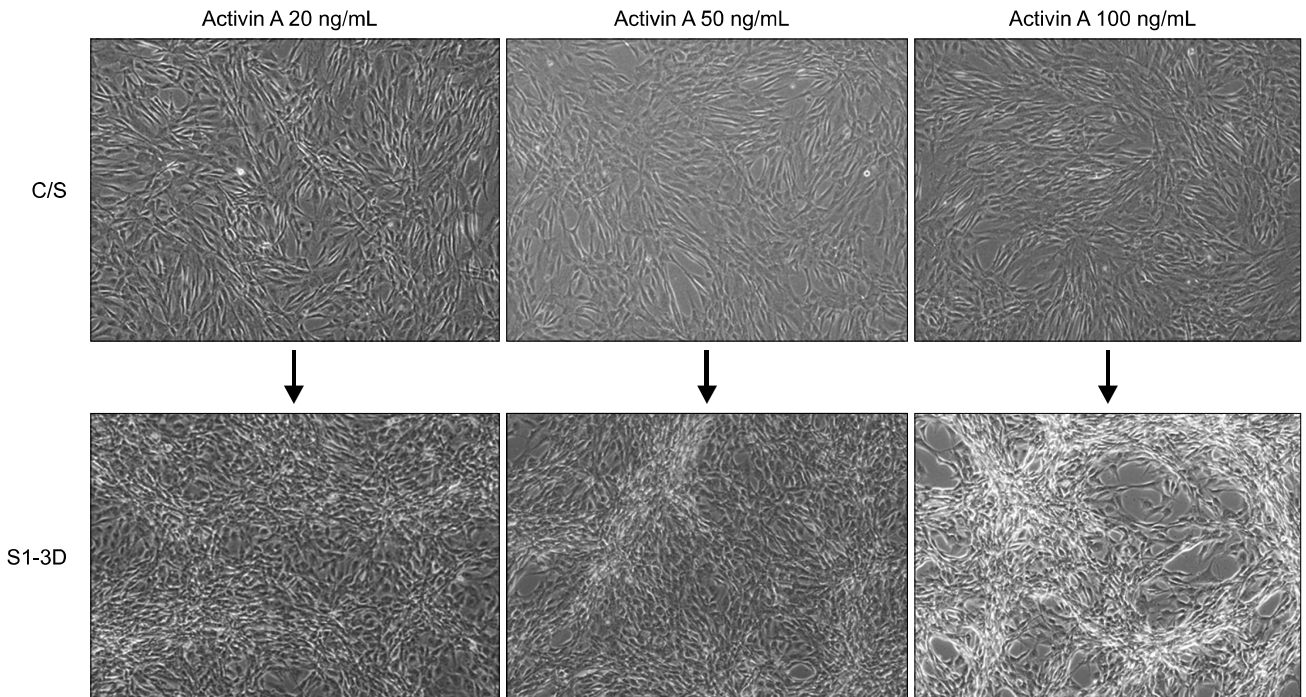


Fig. 5. Rapid endodermal induction of hADSCs with various Activin A concentrations. Differentiation into primitive hepatocyte was based on 20 ng/ml of HGF. During the endodermal induction, there was no differentiation according to the concentrations of Activin A. But after the HGF was treated, the cell growth pattern had been changed into multilayer in higher concentration of Activin A.

하는 시작하는 것을 볼 수 있었으며 Stage 1의 10일경에는 더 많은 세포의 성상이 많이 변화하였다(Fig. 7). RT-PCR에 의한 유전자의 발현을 조사한 결과 전분화성(pluripotent) 표지자인 *OCT-4*와 *Nanog*의 발현은 Stage 1의 10일째까지 유지되었으며, 내배엽성 초기 발현 유전자인 *GATA4*의 경우에도 3일째부터 10일째까지 거의 일정하게 발현이 유지되었다. *HNF-4 α* 의 발현과 내배엽성 대표 유전자인 α -태아 단백질과 알부민

의 발현도 3일째부터 나타나기 시작하여 10일째까지 일정하게 유지되었다(Fig. 8).

고 찰

간엽 줄기세포(이하 MSC)는 배아 줄기세포(Embryonic Stem Cells, ES)와는 달리 여러 기관의 세포로 분화능력에 한

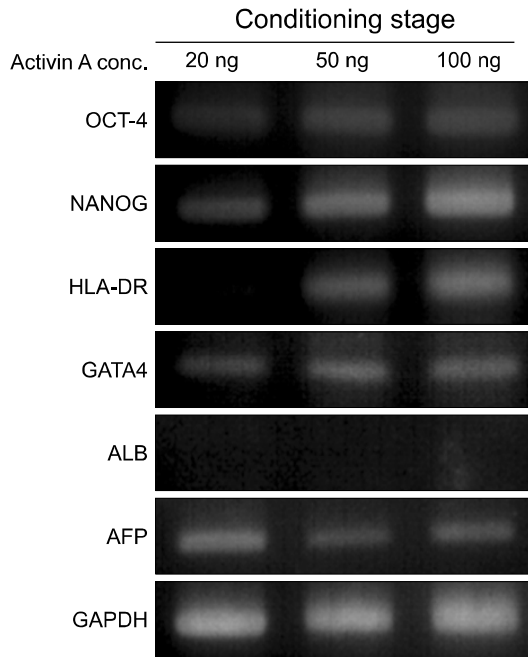


Fig. 6. Gene expressions of endodermal lineage by PCR. The expressions for OCT-4, Nanog were maintained in various concentrations of Activin A. In Nanog, the expression was stronger in higher concentration of Activin A.

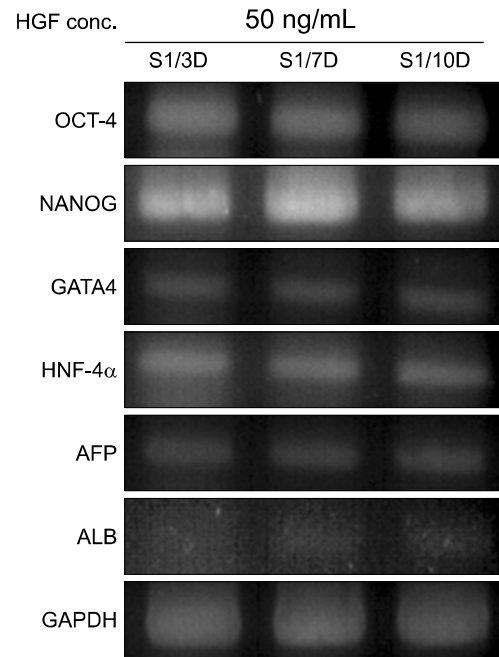


Fig. 8. Gene expressions of hepatic lineage by PCR. During the transdifferentiation into hepatocytes, the expressions of early genes for endoderm were maintained. The gene for albumin was detected after 7 days on stage 1.

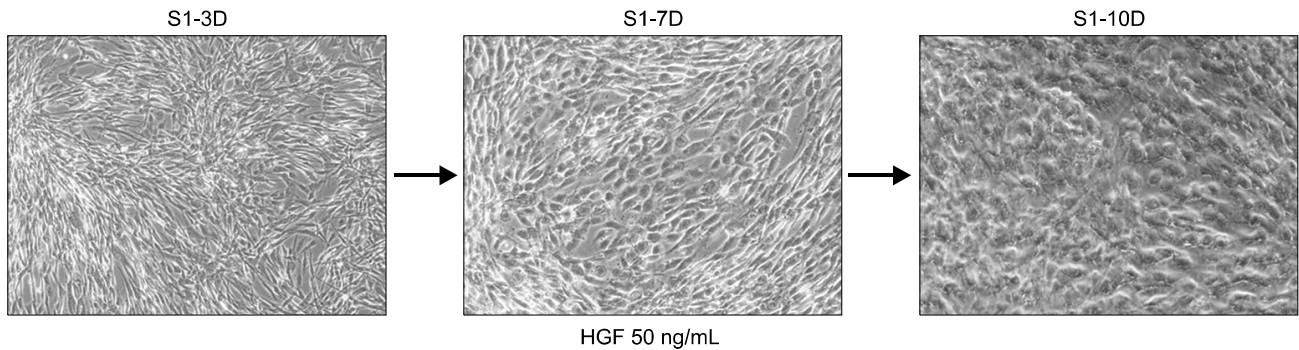


Fig. 7. Rapid formation of hADSCs into primitive hepatocytes based on high concentration of Activin A. Differentiation into primitive hepatocyte was based on 50 ng/mlf of HGF. The cell morphology had been changed into the hepatocyte like cells with single cell layer.

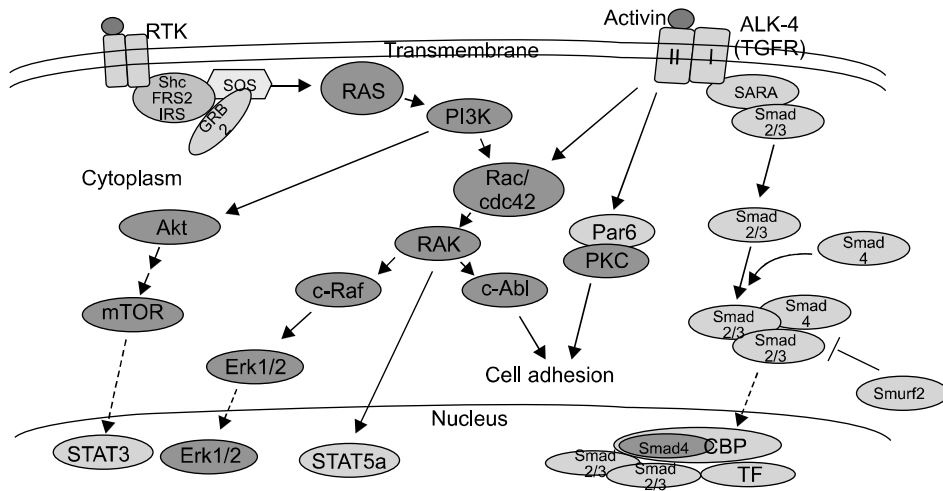


Fig. 9. Cross-talk between RTK and TGF-beta signaling to endodermal-induction.

계가 있지만 윤리적인 문제가 없으며 이식 후에도 자가증식 (self-renewal)에 따른 기형종(teratoma)형성에 있어서 안전하다. 또한 세포의 획득 및 보관이 용이하며 동결 후 세포배양의 경우에도 활력도(viability)가 높다. 이러한 이점으로 MSCs는 향후 세포 기반 치료방법에 있어서 가장 안전한 세포원으로 사용될 것이며 현재 임상 치료용으로 일부 분야에서는 사용되고 있다. MSC는 골수, 제대혈, 태반 그리고 본 연구에서 사용한 지방 등 다양한 기관 및 조직에서 획득할 수 있다. 그 중에서 지방을 이용한 MSC의 획득은 다른 조직에서보다 공여자의 부담을 덜 수 있으며 세포 배양이 어렵지 않고 증식 또한 짧은 기간에 이루어진다는 장점이 있어서 지방유래 줄기세포의 사용은 앞으로 간엽 줄기세포의 주요 공급원으로서 이용할 수 있을 것으로 보인다.²⁰

간 질환 환자의 수는 매년 급증하고 있으나 간이식을 받아야 하는 환자에 대한 공여자의 수는 환자 증가에 비해 현저히 낮은 추세이다. 공여 장기의 부족을 대체할 수 있는 치료 방법으로 세포 기반 치료가 주목 받고 있다.⁷ 특히 MSC를 이용한 치료로 시술 후 부작용에 대한 문제를 줄일 수 있는 ‘Stem Cell Therapy for Tissue Engineering’이 많은 연구자에 의해서 동물실험으로 가능성을 보여주고 있다. 그러나 아직 MSC의 다분화 가능성에 대해서만 연구가 많이 진행되었으며 완벽한 기능적 세포로의 분화는 이루지 못하고 있다. 이는 특정 조직의 세포로 분화 시 MSC의 분자적 기전(signaling)에 대하여 완벽하게 정리되어 있지 못한 이유라 볼 수 있다. 그리고 효율적인 분화를 위하여 사용되는 여러 사이토카인(cytokine)의 농도의 확립이 이루어지지 못하여 후에 임상 적용에 있어

서 환자의 경제적 부담을 안겨 줄 수 있다. 그리하여 본 연구팀은 효율적인 간세포로의 분화에 있어서 사이토카인과 growth factor의 농도 별 실험으로 가장 알맞은 조건을 확립하고자 하였다.

Activin A는 TGF- β superfamily의 하나로서 Nodal과 유사한 기전(signaling)을 갖는 사이토카인이다. Activin A를 사용하여 MSC와 ES에서 내배엽성 유도를 촉진시킨 연구는 많이 보고되었다.^{10,11} 고농도의 Activin A는 ES를 이용한 분화에서 내배엽성 유도를 촉진한다고 하였다.^{12,21} 그리고 최근에 고농도(100 ng/mL)의 사용으로 내배엽성 유도를 이루었다는 연구가 많이 보고되었다.²²⁻²⁴ Activin A는 TGF- β 의 receptor중 7가지 type I receptor의 하나인 ALK4를 receptor로 한다. 이 receptor는 발생학적 기전에서 foregut organogenesis에 관여를 한다고 한다.²⁵ 그 기전(signaling)은 Nodal과 유사하게 Smad2/3를 하위 분자로 하며 간세포 분화를 조절한다.²⁶ 이 Smad2/3는 세포 분화와 자가증식(self-renewal)에 관여하는 분자로서 작용한다. 본 연구에서 Conditioning stage에서 10 ng/mL FGF4를 기초로 하고 20, 50, 100 ng/mL의 Activin A 농도를 이용한 내배엽성 유도 결과를 비추어 볼 때 고농도의 범위에 있는 모든 실험군은 안정적으로 초기 내배엽 발현 유전자인 *GATA4*와 내배엽 특이 유전자인 AFP의 발현을 이루었다. 이것은 ES를 이용한 실험 보고와 같은 기전이 MSC에서도 일어나는 것을 보여준다.

Activin A는 또한 여러 signaling과 cross-talk하여 다른 기전(signaling)의 조절자(regulator)로서 역할을 하며 세포 분화 및 증식에 영향을 준다(Fig. 9).^{21,27} ES에서 Activin A는 FGF

기전(signaling)과 cross-talk하여 전분화능(pluripotency)를 유지한다고 한다.²⁸ 실험 결과에서 *OCT-4*, *Nanog*의 발현이 유지되는 것을 보여주는 증거이다. 특히 *Nanog*는 Smad 기전의 직접적인 표적으로 TGF 기전이 발현 정도에 의존한다.¹⁹ 결과에서 *Nanog*의 Activin A의 농도 증가에 따른 유전자 발현의 증가를 볼 수 있다. 그러나 *ALB*의 발현은 일어나지 않았으며 MHC class II (*HLA-DR*)의 발현은 20 ng/mL의 경우에는 나타나지 않았다(Fig. 6). 이것은 미분화 단계에 있다고 추측할 수 있다. 세포의 성상을 관찰한 결과에서도 내배엽성 유도 단계에서는 성상의 차이가 없었으나 20 ng/mL HGF를 이용한 초기 간세포 분화에서 3일째에 100 ng/mL Activin A의 실험군에서 다층의 세포 형성이 이루어짐을 관찰할 수 있었다(Fig. 5). 3차원적 세포배양에 있어서는 이상적인 형태일 수 있으나 2차원적 세포배양에 있어서는 적당하지 않다고 보여진다. 이와 같은 결과를 비추어 볼 때 50 ng/mL의 Activin A의 농도가 내배엽성 유도를 위해 가장 적당하다고 보여진다.

이를 바탕으로 내배엽성 유도된 세포를 이용하여 간세포 분화를 시행하였다. 간세포 성장인자(hepatocyte growth factor, HGF)의 사용은 간세포 분화에 필요한 성장요소이다. 그러나 이 또한 연구자마다 사용되는 농도가 다르다. 150 ng/mL의 고농도 HGF를 이용하여 간세포 분화를 이룬 보고¹³에서부터 10 ng/mL의 저농도를 이용한 보고²⁹까지 다양한 농도에서 간세포분화가 이루어지고 있어 본 연구자들은 초기 내배엽 유도를 위한 Activin A의 농도가 간세포 분화에 어떤 영향을 주었나를 알아보기 위해서 HGF의 농도를 50 ng/mL로 일정하게 하고 실험을 진행하였다. 간세포 분화에 따른 유전적 표현에서 *OCT-4*, *Nanog*의 발현은 유지되었다. 전분화능(pluripotency) 유전자의 발현이 계속적으로 나타나는 것은 FGF4의 기전(signaling)에 의한 것으로 보인다. 또한 내배엽 초기 발현 유전자 *GATA4*도 모든 시기에서 유지되는 것을 볼 수 있었다. 그리고 초기 기능적 간세포 발현 유전자로서의 *HNF-4α* (*hepatocyte nuclear factor-4 alpha*)의 발현³⁰도 Stage 1의 모든 시기에서 발현되었다. *AFP*와 *ALB*의 발현은 50 ng/mL HGF를 처리한 후 3일째부터 조금 발현되는 것을 보였으며 10일째까지 그 발현정도가 유지되는 것을 보였다(Fig. 8). 세포의 성상 및 유전자의 발현을 종합하여 볼 때 HGF의 농도가 50 ng/mL에서 초기 간세포(primitive hepatocyte)적인 형태를 보이는 것을 알 수 있다.

결과적으로 50 ng/mL의 Activin A의 사용으로 내배엽성 세

포로의 유도가 효과적으로 이루어지는 것을 확인하였으며 이렇게 유도된 세포에 HGF를 사용함이 초기 간세포로의 분화에 효율적임을 알 수 있었다. 그러나 이 초기 간세포(primitive hepatocyte)는 완벽한 성체 간세포로의 기능을 수행하지 못한다. 해독작용과 당 대사 등의 역할을 할 수 있는 성체 간세포로의 분화를 위해서는 앞으로 보다 많은 연구가 진행되어야 할 것이다.

Activin A를 이용한 내배엽성 유도의 촉진과 HGF의 적정 농도의 사용에 의한 간세포로의 분화는 기존의 분화 기간을 단축시키는 역할을 할 수 있을 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 보건복지가족부 보건의료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(A084120).

참고 문헌

1. Barry FP, Murphy JM. *Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization*. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:568-584.
2. Kume S. *Stem-cell-based approaches for regenerative medicine*. *Dev Growth Differ* 2005;47:393-402.
3. Denker HW. *Potentiality of embryonic stem cells: an ethical problem even with alternative stem cell sources*. *J Med Ethics* 2006;32:665-871.
4. Takahashi K, Yamanaka S. *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. *Cell* 2006;126:663-676.
5. Miura K, Okada Y, Aoi T, et al. *Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines*. *Nat Biotechnol* 2009;27:743-745.
6. Centeno CJ, Busse D, Kisiday J, Keohan C, Freeman M, Karli D. *Increased knee cartilage volume in degenerative joint disease using percutaneously implanted, autologous mesenchymal stem cells*. *Pain Physician* 2008;11:343-353.
7. Sakaida I. *Clinical application of bone marrow cell transplantation for liver diseases*. *J Gastroenterol* 2006;41:93-94.
8. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, Jung JS. *Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;328:258-264.
9. Taléns-Visconti R, Bonora A, Jover R, et al. *Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells*. *World J Gastroenterol* 2006;12:5834-5845.
10. Parashurama N, Nahmias Y, Cho CH, et al. *Activin alters the*

- kinetics of endoderm induction in embryonic stem cells cultured on collagen gels. Stem Cells 2008;26:474-484.*
11. Hay DC, Zhao D, Fletcher J, et al. *Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo. Stem Cells 2008;26:894-902.*
 12. Zorn AM, Wells JM. *Molecular basis of vertebrate endoderm development. Int Rev Cytol 2007;259:49-111.*
 13. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, et al. *Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. J Gastroenterol Hepatol 2009;24:70-77.*
 14. Böttcher RT, Niehrs C. *Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. Endocr Rev 2005;26:63-77.*
 15. Pevsner-Fisher M, Zipori D. *Environmental signals regulating mesenchymal progenitor cell growth and differentiation. In : Rajasekhar VK, Vemuri MC, editors. Regulatory networks in stem cells. Humana Press 2009;175-184.*
 16. Gerson SL. *Mesenchymal stem cells: no longer second class marrow citizens. Nat Med 1999;5:262-264.*
 17. Choi FJ, Kwon JY, Kim Ho, Kim SH, Choi YJ, Cho JA, et al. *The characterization of the mesenchymal stem cells derived from fat, cord blood, placenta tissues. Korean HBP Surg 2006;10:1-6.*
 18. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, et al. *Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. Keio J Med 2005;54:132-141.*
 19. Xu RH, Sampsel-Barron TL, Gu F, et al. *NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. Cell Stem Cell 2008;3:196-206.*
 20. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, et al. *Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. Hepatology 2007;46:219-228.*
 21. Watabe T, Miyazono K. *Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. Cell Res 2009;19:103-115.*
 22. McLean AB, D'Amour KA, Jones KL, et al. *Activin a efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. Stem Cells 2007;25:29-38.*
 23. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, et al. *Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. Nat Biotechnol 2008;26:443-452.*
 24. D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, et al. *Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2006;24:1392-1401.*
 25. Kim SK, Hebrok M, Li E, et al. *Activin receptor patterning of foregut organogenesis. Genes Dev 2000;14:1866-1871.*
 26. Clotman F, Lemaigre FP. *Control of hepatic differentiation by activin/TGFbeta signaling. Cell Cycle 2006;5:168-171.*
 27. Guo X, Wang XF. *Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. Cell Res 2009;19:71-88.*
 28. Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. *Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. J Cell Sci 2005;118:4495-4509.*
 29. Shiraki N, Umeda K, Sakashita N, Takeya M, Kume K, Kume S. *Differentiation of mouse and human embryonic stem cells into hepatic lineages. Genes Cells 2008;13:731-746.*
 30. Watt AJ, Garrison WD, Duncan SA. *HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function. Hepatology 2003;37:1249-1253.*