

양막 및 제대에서 유래된
줄기세포로부터 간세포로의 분화

연세대학교 대학원

의 학 과

이 윤 정

양막 및 제대에서 유래된
줄기세포로부터 간세포로의 분화

지도교수 조 동 제

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2007년 12월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

이 윤 정

이윤정의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2007년 12월 일

감사의 글

이 논문을 완성하는 데 많은 조언과 지도를 해주신 조동제 교수님, 서울여대 김해권 교수님, 여러 자문 교수님들께 진심으로 감사드립니다.

전문의를 따고 외부에서 진료를 보며 틈틈이 공부하고 학업을 계속 유지할 수 있었던 것은 교수님들의 절대적 지지와 부모님과 남편의 아낌없는 사랑과 조언이 큰 힘이 되었습니다.

여러모로 도움을 준 서울여대 발생학 실험실 김지영 선생님과 다른 조원분들, 바쁘신 데 저의 실험에 신경써주셔서 너무 감사했습니다.

제가 대학원 실험과 공부에 힘을 쏟도록 배려를 해주신 수원제일산부인과 이상복, 이승, 이재승 원장님께도 감사의 말씀 전하고 싶습니다.

박사 연구 과정을 통해 한 층 더 성숙된 저의 생각과 자아를 느낄 수 있어 그동안 너무 행복했습니다. 이런 계기와 과정을 진행시키도록 도와주신 모든 분들께 다시 한번 인사드립니다. 앞으로 더 나은 모습으로 살도록 항상 노력하겠습니다. 끝으로 사랑하는 서지혁, 서지민 건강하고 행복하게 자라기를 기원합니다.

감사합니다.

저자 씀

<차례>

국문요약	1
I. 서론	4
II. 재료 및 방법	7
1. 양막과 제대 채취와 줄기세포 분리	7
가. 양막유래 줄기세포 분리 및 배양	7
나. 제대유래 줄기세포 분리 및 배양	8
2. 줄기세포 분화 능력 분석	8
3. 간세포로의 분화 유도	9
4. RNA 분리 및 RT-PCR	10
5. 세포면역화학 분석	13
6. 간세포로의 분화 확인	13
가. Immunoblotting을 이용한 간세포 배양액에서 알부민 확인 방법	13
나. ELISA 방법을 이용한 알부민 분비 측정	14
다. Periodic Acid-Schiff (PAS) Stain	14
라. 요소 합성 측정	15
7. 실험에 사용한 항체와 시약	15
8. 통계적 분석	15
III. 결과	16
1. 양막유래 줄기세포 및 제대유래 줄기세포 배양	16
2. 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포 분화능력 분석	18
3. 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포의 유전자 발현 분석	19
4. 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포의 면역화학적 분석	21

5. 간세포로의 분화 유도 조건에 따른 알부민과 요소 합성 결과	23
6. 제대유래 줄기세포의 간세포로의 분화 시 최적의 분화 방법	26
7. 제대유래 줄기세포로부터 분화된 간세포에서의 유전자 발현	30
8. 간세포 분화 유도 조건에 따른 알부민 분비 결과	32
9. 제대유래 줄기세포에서 분화된 간세포에서의 알부민 단백질 발현	34
10. 분화를 유도한 제대유래 줄기세포의 글리코겐 축적 능력 측정	35
IV. 고찰	36
V. 결론	44
참고문헌	46
영문요약	56

그림 차례

Figure 1. Morphology of human umbilical cord-derived stem cells(HUC) and human amnion-derived stem cells (HAM) during <i>ex vivo</i> expansion	16
Figure 2. Growth curve and cumulative doubling number of HUC	17
Figure 3. Growth curve and cumulative doubling number of HAM	18
Figure 4. Differentiation potential of HUC and HAM	19
Figure 5. Secretion of albumin and urea by HUC and HAM after differentiation for 3 weeks in vitro	24
Figure 6. Secretion of albumin and urea by HUC and HAM after differentiation for 3 weeks in vitro	25
Figure 7. Secretion of albumin and urea by HUC and HAM after differentiation for 3 weeks in vitro	26
Figure 8. Morphology of HUC cultivated for 21 days in vitro	28
Figure 9. Secretion of albumin and urea by HUC after differentiation for 3 weeks	

	in vitro	29
Figure 10.	Hepatocyte-related specific gene expression by HUC after differentiation for 3 weeks in vitro	31
Figure 11.	Comassie staining and immunoblotting of conditioned medium obtained from HUC after differentiation for 3 weeks in vitro	33
Figure 12.	Immunocytochemical analysis of the HUC at the 4th passage after differentiation for 3 weeks in vitro	34
Figure 13.	PAS staining of the HUC at the 4th passage after differentiation for 3 weeks in vitro	35

표 차례

Table 1. cDNA primer pairs for stem cell markers ..	11
Table 2. cDNA primer pairs for hepatocyte-related gene markers	12
Table 3. Gene expression profiles by HUC and HAM	20
Table 4. Immunocytochemical analysis of proteins expressed by HUC and HAM	21
Table 5. Hepatocyte-related specific gene expression profiles by HUC and HAM ..	22

국문요약

양막 및 제대에서 유래된 줄기세포로부터 간세포로의 분화

성체줄기세포 중 골수에서 분리된 중간엽 줄기세포는 조혈작용을 지지하고 연골, 뼈, 지방조직 등의 다양한 조직으로 분화될 수 있어 세포 기초 치료와 조직 생성 촉진의 중요한 세포원으로 인식되어져 왔다. 최근에는 골수 이외에도 다른 조직으로부터 중간엽 줄기세포를 분리할 수 있다는 것이 보고되고 있다. 양막이나 제대는 분만 시 쉽게 채취할 수 있고 배아줄기세포에서만 발견되는 여러 유전자가 발현될 뿐 아니라 골수보다 분화력이 뛰어나며 냉동보관이 가능하고 비교적 쉽게 중간엽 줄기세포를 분리할 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 양막 및 제대 조직에서 분리, 배양한 줄기세포의 특성을 조사하고 간세포 분화 유도 배양조건을 확립하여 양막 유래 줄기세포(human amnion-derived stem cells, HAM)와 제대 유래 줄기세포(human umbilical cord-derived stem cells, HUC)의 간세포로의 분화가능성을 비교하였다.

연구에 사용된 양막 및 제대는 산모의 동의아래 만삭 정상 산모로부터 제왕절개 또는 질식 분만 후 채취하여 실험에 사용하였다. 양막과 제대에서 줄기세포를 분리, 배양 후 역전사 중합 효소 연쇄 반응(RT-PCR), 세포면역화학 분석 및 중배엽성 세포로의 분화능 실험을 시행하였다. 또한 양막과 제대에서 유래한 줄기세포를 간세포로 분화 유도 후 간세포 특이 유전자 발현, 알부민 분비 측정, 요소 합성 측정, 인간 알부민에 대한 면역블로팅과 세포면역화학염색법 그리고 PAS 염색을 시행하였다.

1. 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포에서 Oct-4, SCF,

FGF-5, NCAM, nestin, vimentin, CK18, GATA-4, BMP-4, HNF-4 α , HLA ABC, HLA DR의 유전자가 발현되는 것을 RT-PCR 방법으로 확인하였다. 간세포로의 분화유도 전에 제대유래 줄기세포는 CK18, BMP-4, HNF-4 α , CYP3A4, α 1-AT, HNF-1 α , PEPCK, CX32 그리고 transferrin 유전자가 발현되었고 양막유래 줄기세포는 CK18, BMP-4, HNF-4 α , CYP3A4 그리고 α 1-AT 유전자가 발현되었다.

2. 세포 면역화학적 분석 결과 양막유래 줄기세포는 collagen I, II, III, IV, XII, fibronectin, CD44, CD54, α -SMA, vimentin, desmin, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 그리고 HLA ABC 단백질이 발현되었다. 제대유래 줄기세포는 collagen I, II, III, IV, XII, fibronectin, CD44, CD54, α -SMA, vimentin, desmin, SSEA-3, SSEA-4, vWF 그리고 HLA ABC의 단백질이 발현되었다.
3. 양막 및 제대유래 줄기세포로부터 지방세포, 골아세포, 연골세포로 분화되는 것을 관찰함으로써 줄기세포로서의 조직 다분화능을 확인하였다.
4. 간세포로의 분화 유도 시 알부민 합성 분비와 요소 합성의 농도가 제대유래 줄기세포에서 양막유래 줄기세포보다 높게 측정되었다. 제대유래 줄기세포는 분화 배양조건 중에서 DM4 배양액에서 간세포로 가장 잘 분화하였다.
5. SDS-전기영동, 면역 블로팅 결과 간 분화 유도 전 제대유래 줄기세포에서는 알부민이 분비되지 않았으나, 분화 유도한 세포에서는 알부민이 분비되었다.
6. 세포면역화학염색 방법을 이용하여 간세포로 분화한 제대유래 줄기세포내에 인간 알부민이 존재함을 직접 검증하였다.

7. PAS 염색을 하여 분화 유도 전 제대유래 줄기세포에서는 글리코겐의 축적이 관찰되지 않았으며, DM4에서 분화를 유도한 세포는 글리코겐이 축적되는 것을 관찰 할 수 있었다.

이상의 결과로부터 본 연구에서는 제대나 양막에서 얻은 줄기세포로부터 간세포로의 분화를 유도하였으며, 두 줄기세포 중 제대에서 얻은 줄기세포가 양막에서 얻은 줄기세포보다 간세포로의 분화 유도가 더 잘됨을 확인하였다. 또한 여러 분화 배양조건으로 간세포 분화를 유도하였을 때 간세포로의 분화 유도가 가장 잘되는 배양조건도 제시할 수 있었다.

결론적으로 줄기세포로부터 분화유도 된 간세포를 골수 유래 중간엽 줄기세포가 아닌 제대나 양막으로부터 얻을 수 있게 됨으로서 본 연구가 항 후 간 질환 환자에게 줄기세포 치료에 도움이 되고, 제대나 양막 등으로 줄기세포원을 확대함으로써 간세포 획득 방법에 좋은 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

핵심되는 말 : 양막유래 줄기세포, 제대유래 줄기세포, 간세포, 분화유도, 알부민

양막 및 제대에서 유래된 줄기세포로부터 간세포로의 분화

< 지도교수 조동제 >

연세대학교 대학원 의학과

이 윤 정

I. 서 론

간은 인간 체중의 3% 정도를 차지하며, 중요한 기능을 수행하는 장기로서 간을 이루는 핵심세포인 간세포는 글리코겐, 단백질, 지질, 핵산, 비타민류 등의 생합성 및 분해의 기능과 독성이 있는 물질을 해독하는 기능을 갖고 있다. 그러나 이런 정상적인 역할을 갖지 못하는 간질환 환자의 대부분은 간 조직 손상으로 인해 간세포의 재생 능력이 감소되어 있다.¹ 간에서 간세포 소실은 불가역적이고 간 기능의 감소를 자주 초래하기 때문에 배양에서 간세포를 생성하는 능력은 중요하다. 간질환에서 기능적 간세포의 수를 증가시키는 능력은 치료의 가능성을 증가시킨다. 최근 연구들에 의하면 간질환에서 간세포 이식이 간질환을 치료하는데 있어 혁신적인 방법으로 대두되고 있으나, 여전히 많은 문제점과 의문이 제기되고 있다.²⁻⁵

줄기세포에 대한 연구가 활발해 지면서, 줄기세포를 이용한 세포치료 또한 많은 연구가 이루어지고 있는 실정이다. 줄기세포란 아직 운명이 결정되지 않은 미숙한 세포로서 인체를 구성하는 신경, 간, 췌장이나, 혈관 등 각종 장기를 이루는 세포로 분화할 수 있어 만능세포라고 불리며 발생초기 포배내막에서 유래한 배아줄기세포 (embryonic stem cell)와 성숙한 조직과 기관 내에 존재하는 다기능 성체줄기세포 (multipotent adult stem cell)가 있다

그러나 배아줄기세포는 사람으로 성장할 수 있는 배아로부터 얻을 수 있다는 점에서 생명윤리와 직결되어 수많은 논쟁을 야기하고 있는 반면 성체줄기세포는 줄기세포의 성질을 쉽게 상실한다는 단점은 있지만 생명윤리 논쟁을 피할 수 있어 줄기세포를 이용한 새로운 치료법에 있어 최선의 대안으로 부각되고 있다.

성체줄기세포 중 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell, MSC)는 세포 표면분자들에서 독특한 표현 양식을 나타내는 높은 증식력을 가진 밀착성이 있는 섬유아세포들로 언급되며⁶ 뼈, 연골, 근육, 인대, 지방, 기질 같은 중간엽 조직들을 재생하고 골수의 미세 환경내 원초적 조혈세포 (primitive hemopoietic cell)의 분화와 성장을 지지하는 데 필수적이다.^{7,8} 1966년 Friedenstein과 Petrakova⁹가 쥐의 골수 세포에서 섬유아세포와 유사한 형태로 뼈, 연골 등을 형성하는 전구세포로 분화 가능한 세포를 분리하면서 MSC가 처음 언급되었다. MSC는 조혈작용을 지지하고 적절한 실험조건하에서 연골, 뼈, 지방세포 등의 다양한 조직으로 분화될 수 있다.^{10,11} 이러한 특성으로 인해 여러 질병들의 세포 기초 치료와 조직 생성 촉진의 개념에서 매력적인 도구로 인식되어져왔다. 현재 골수는 실험적, 임상적 연구들에서 MSC의 주요 공급원으로 알려져 있다. 하지만 골수의 MSC의 수와 증식분화능력이 나이가 많아질수록 현저히 감소하며 바이러스 감염의 높은 빈도를 나타내 항상 유용하게 사용할 수 없는 것이 사실이었다.¹²

따라서 자가적 (autogenic), 동종적 (allogenic)으로 사용할 수 있으면서, 골수보다 좀 더 높은 세포증식력과 분화능력을 가지면서 바이러스 감염율이 낮은 다른 성체줄기세포 공급원의 개발이 필요하다. 최근 MSC를 성체와 태아의 말초 혈액, 태아 간, 태아 비장, 태반, 제대, 제대혈, 양수, 양막 그리고 성체의 지방조직 등에서 분리할 수 있다는 보고들이 발표되었다.¹³⁻¹⁶ 이들 중 제대혈은 말초혈액 또는 골수에 비하여 증식력이 뛰어난 조혈줄기세포 (hematopoietic stem cell, HSC)가 많이 포함되어 있는 것으로 확인되었고 다양한 조직으로의 분화가 가능성이 증명되면서 성체줄기

세포의 새로운 공급원으로 각광을 받고 있다.^{17,18} 또한 제대혈에서 분리, 배양한 MSC가 골수에서 분리한 MSC와 유사한 분화 특성을 보이며 중배엽성 세포로의 분화뿐만 아니라 간세포, 신경세포로도 분화가 가능함이 보고되었다.¹ 그러나 제대혈 내 MSC의 존재에 대하여는 연구자마다 다르게 보고하고 있는데, Mareschi 등¹⁹과 Wexler 등²⁰은 제대혈 내 MSC의 존재를 부인하였으나, Erices 등²¹, Goodwin 등²², Rosada 등²³, 그리고 Lee 등²⁴은 제대혈 내에도 골아세포, 지방세포, 신경세포 등으로 분화할 수 있는 중간엽 줄기세포를 분리하였다고 보고하였다. 한편으로는 임신 말기 제대혈 내에서는 MSC를 성공적으로 배양하거나 분리할 수 없었다는 보고도 있다.¹⁹ 이처럼 그 존재에 대하여 의견이 다른 것은 제대혈 내의 MSC 수가 적어서 분리 자체가 어렵고 분화기술의 보완이 아직 미흡하기 때문이다. 임신 중기 양수에서도 MSC를 분리하였다는 보고²⁵가 있으나 아직 연구보고가 미비하며 특히 임신 말기의 양수에서는 MSC를 분리하기 어렵다는 단점이 있다. 제대혈과 마찬가지로 분만 시 쉽게 채취할 수 있는 양막이나 제대는 배아줄기세포 표지인자인 Oct-4 유전자가 발현되고 골수보다 분화력이 뛰어나며²⁶ 냉동보관이 가능하고 제대혈에 비해 비교적 쉽게 MSC를 분리할 수 있는 장점이 있다.

인간배아줄기세포를 간세포로 분화시켰다는 보고²⁷가 나오고 있지만, 이 경우 인간배아줄기세포를 재료로 삼았기 때문에 윤리적 문제와 발암, 면역거부반응의 가능성을 피할 수 없다. 지금까지 양막에서 분리한 세포에서 간세포로의 분화를 보고한 논문은 있으나 그 수가 미비하며,^{28,29} 제대유래 줄기세포 (human umbilical cord-derived stem cells HUC)와 양막유래 줄기세포 (human amnion-derived stem cells, HAM)를 비교한 논문이나 제대 줄기세포에서 간세포로 분화를 보고한 논문은 없었다.

이에 따라 본 연구에서는 성체줄기세포의 다양한 재료 중에서도 양막 및 제대에서 분리한 줄기세포의 특성을 증명하고, 이들 세포가 배양조건에 따라 지방세포, 골아세포, 연골세포로 분화되는지를 알아보았다. 또한 여러 가지 간세포 분화 유도 배양조건을 확립하여 양막유래 줄기세포와 제

대유래 줄기세포의 간세포로의 분화가능성을 비교하였다. 결과적으로 간세포로의 최적의 분화방법을 확립하여 제대와 양막에서 유래한 줄기세포를 간질환 치료를 위한 재료로의 사용 가능성을 연구하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 양막과 제대 채취와 줄기세포 분리

본 연구에 사용된 양막 및 제대는 만삭 정상 산모에서 제왕절개 또는 질식 분만 후 산모의 동의 아래 채취하였다. 채취한 후 4시간 내에 실험을 진행하였다. 본 연구는 기관생명윤리심의위원회 (IRB)를 통과하였다.

가. 양막유래 줄기세포 분리 및 배양

양막 조직을 융모막으로부터 분리한 후 Ca^{2+} , Mg^{2+} -free Dubecco's phosphate-buffered saline (DPBS, Gibco, Grand Island, NY)로 세척하였다. 조직을 잘게 자른 후 0.25% trypsin (Gibco)이 함유된 low-glucose Dubecco's Modified Eagle Medium (DMEM-LG, Gibco)에 넣어 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이를 원심분리한 후에 침전물을 얻어 잘게 자른 후 위의 과정을 한 번 더 반복하였다. 얻어진 침전물에 2mg/mL collagenase A (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland)와 0.05mg/mL DNase (Roche Diagnostics)가 포함된 DPBS에 넣어 37°C에서 2시간동안 두었다. 이를 500 xg로 3번 세척 후, 세포를 100U/mL penicillin (Gibco), 0.1µg/mL streptomycin (Gibco), 3.7mg/mL sodium bicarbonate, 그리고 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone, South Logan, UT) 이 포함된 DMEM-LG 에 37°C, 5% CO₂가 공급되는 배양기 내에서 배양하였다. 배양 3일 후 배양용기의 바닥에 붙지 않은 세포를 제거하였고, 1주에 2번 배양액을 교체하였다. 배양용기의 70~80% 정도로 세포가 자라면 0.125% trypsin 과 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 가 함유된 Hanks Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco)을 3분간 처리하여 세포를

떼어낸 후, $4 \times 10^3/\text{cm}^2$ 의 농도로 세포를 넣어주어 배양하였다.

나. 제대유래 줄기세포 분리 및 배양

채취된 제대를 100U/mL 의 penicillin 과 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 streptomycin 이 첨가된 Ca^{2+} , Mg^{2+} -free DPBS 로 탯줄 외부의 혈액을 제거하였다. 혈액이 제거된 탯줄의 외부 양막을 벗기고 동맥 2개를 제거하였다. 남은 조직을 1mm³ 크기로 자른 후, 같은 부피의 0.5% crude type collagenase (Gibco)를 첨가하여 37°C에서 20시간동안 처리하였다. 얻어진 collagenase 용액에 DPBS를 40배 첨가하여 실온에서 600 xg 로 10분간 원심분리 하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 DMEM-LG 로 2번 세척하였다. 분리된 세포를 100U/mL penicillin, 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin, 3.7mg/mL sodium bicarbonate, 그리고 10% FBS 가 포함된 DMEM-LG 에 37°C, 5% CO₂가 공급되는 배양기 내에서 배양하였다. 배양 3일 후 배양용기의 바닥에 붙지 않은 세포를 제거하였고, 1주에 2번 배양액을 교체하였다. 배양용기의 70~80% 정도로 세포가 자라면 0.125% trypsin 과 1mM EDTA 가 첨가된 HBSS 로 3분간 처리하여 세포를 떼어낸 후, $2 \times 10^3/\text{cm}^2$ 의 농도의 세포를 넣어주어 배양하였다.

2. 줄기세포 분화 능력 분석

세포들의 분화능력을 검증하기 위하여 네 번째 계대의 세포들을 분화 유도 배양액에서 배양하였다. 배양액은 1주일에 2번 교체하였다.

지방세포 생성은 DMEM-LG에 10% FBS, 1 μM dexamethasone, 0.5 μM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 0.05mg/L human insulin과 200 μM indomethacin이 첨가된 배양액을 이용하였다. 2주 배양 후, oil red O 염색을 시행하여 지질이 축적된 지방세포의 존재 여부를 확인하였다.

골세포 생성은 DMEM-LG 에 10% FBS, 0.1 μM Dex, 100mM β -glycerol phosphate, 50 μM ascorbic acid-2-phosphate 가 첨가된 배양액을 이용하였다. 2주 배양 후, von Kossa 염색을 시행하여 칼슘이 침착된

세포를 확인하였다.

연골세포 생성은 high-glucose DMEM 배지에 0.1 μ M Dex, 50 μ g/mL ascorbic acid-2-phosphate (Asc), 100 μ g/mL sodium pyruvate, 40 μ g/mL proline, 10ng/mL transforming growth factor- β 3 (TGF- β 3, R&D Systems, Minneapolis, MN), 50mg/mL ITS premix (insulin, transferrin and selenous acid at 6.25 μ g/mL each, 1.35mg/mL BSA 및 5.35mg/mL linoleic acid; Becton Dickinson, CA)가 첨가된 배양액을 이용하였다. 3주 배양 후, alcian blue 염색을 시행하여 분화 여부를 확인하였다.

3. 간세포로의 분화 유도

간세포로 분화 유도 시 모든 배양접시는 10 μ g/mL human fibronectin solution으로 37°C에서 12시간 도포하여 사용하였다. Fibronectin이 도포된 24-well culture plates (Nunc, Roester, MN)에 양막 및 체대 유래 줄기세포를 1 x 10³/cm² 의 농도의 세포를 넣어준 후 3일 후에 다음의 4가지 분화 배양액을 처리하였다.

분화 방법 1 : DMEM-LG에 10% FBS, 1X ITS, 10⁻⁴M Asc, 40ng/mL Hepatocyte growth factor (HGF, Pepprotech, Rocky Hill, NJ), 20ng/mL Oncostatin M (OSM), 1 μ M Dex, 10ng/ml epidermal growth factor (EGF, Pepprotech) 가 첨가된 배양액에 7일간 배양 후, 동일 배지에 1% dimethyl sulfoxide (DMSO), 20ng/mL fibroblast growth factor-4 (FGF4, Pepprotech) 또는 20ng/mL fibroblast growth factor-2 (FGF2, Pepprotech)를 첨가하여 14일 동안 더 배양하였다.

분화 방법 2 : DMEM-LG 에 10% FBS, 10⁻⁴M Asc, 40ng/mL HGF, 1X ITS, 20ng/mL FGF4 가 첨가된 배양액에 7일간 배양 후, 동일 배지에 1% DMSO, 20ng/mL OSM을 넣고 20ng/mL FGF4 를 첨가하거나 첨가하지 않고 14일 동안 더 배양하였다.

분화 방법 3 : DMEM-LG 에 10% FBS, 40ng/mL HGF, 20ng/mL OSM, 1 μ M Dex, 1X ITS 가 첨가된 배양액에 7일간 배양 후, 동일 배지

에 1% DMSO, 20ng/mL FGF4 또는 20ng/mL FGF2 를 첨가하여 14일 동안 더 배양하였다.

분화 방법 4 : DMEM-LG에 10% FBS, 1X ITS, 10^{-4} M Asc가 첨가된 배양액을 기본 배양액 (BM)으로 하여 기본배양액에 10ng/mL EGF와 10ng/mL FGF4를 첨가한 배양액에 2-3일간 배양하였다. 이 후 기본배양액에 20ng/mL HGF, 20ng/mL FGF4와 0.1% 또는 1% DMSO가 첨가된 배양액에 7일간 더 배양한 후 다시 기본배양액에 20ng/mL OSM, 1uM Dex 넣고, 20ng/mL HGF를 첨가하거나 첨가하지 않고 14일 동안 더 배양하였다.

4. RNA 분리 및 RT-PCR

Cell pellet은 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} -free DPBS를 이용하여 세척하고 500 μ L의 Tri-reagent를 첨가한 다음 manufacturer' instruction에 따라 total RNA를 분리하였다. 5 μ g 의 RNA는 reaction buffer, 1mM dNTP mixture, 0.5 μ g/ μ L oligo d(T)¹⁵, 20U RNase inhibitor (Takara, Japan), 20 U M-MuLV reverse transcriptase (Fermentas, Burlington, Canada)가 혼합된 20 μ L 반응 용액에서 역전사 (reverse-transcription)시켰다. 반응은 42°C에서 60분간 진행되었다. 얻어진 RT products (cDNAs)는 2 mM MgCl_2 , 1x *Taq* buffer, 0.25U *Taq* polymerase (Fermentas), 10pM의 sense 와 antisense gene-specific primers 가 혼합된 10 μ L 반응 용액으로 PCR을 수행하였다(표 1, 표 2). Amplification은 총 35 회 수행하였으며, 각 cycle은 94 °C에서 30초간의 denaturation, 30초간의 annealing, 72°C에서 30초간의 extension 과정으로 구성되었다. Annealing 과정의 온도는 사용되어진 primers에 따라 다르게 설정하였으며 (Table 1, Table2) 반응 종결 후, PCR 생성물들은 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 40% sucrose 가 포함된 6 x loading buffer 에 혼합한 다음 2% agarose gel 을 이용하여 전기영동 하였다. 전기영동 후 ethidium bromide로 염색하고 ultraviolet light를 이용하여 DNA의 영상을 얻었다.

Table 1. cDNA primer pairs for stem cell markers

Gene	Primer sequence	Accession number	Size (bp)	Annealing temp.(°C)
GAPDH	5'-acaacttggatcgtggaa-3' 5'-aaattcgtgtcataccagg-3'	NM_002046	456	53
Oct-4	5'-cgtgaagctggagaaggagaagctg-3' 5'-caagggccgcagctcacacatgtt c-3'	AF268617	245	55
Rex-1	5'-atggctatgtgtctatgagc-3' 5'-cctcaactctagtcatcc-3'	NM_174900	449	57
SCF	5'-ccattgatgccttcaaggac-3' 5'-ctccagtataaggctccaa-3'	M59964	275	55
FGF-5	5'-gctgtgtctcagggattgtaggaata-3' 5'-tatccaaagcgaacttgagtctgta-3'	NM_004464	434	55
PAX-6	5'-agattcagatgaggctcaaa-3' 5'-aattggttgtagactgg-3'	AY707088	313	57
NCAM	5'-gagggggaagatgccgtgatgtg-3' 5'-atattctgcctggcccggatggtag-3'	NM_000615	269	60
Nestin	5'-ccagaaactcaagcaccac-3' 5'-tttccactccagccatcc-3'	X65964	398	54
BMP-4	5'-agccatgctagtttgatacc-3' 5'-tcagggatgctgctgaggtt-3'	D30751	383	55
Brachyury	5'-gagctcaccaatgagatgat-3' 5'-ggctcacttatgcaagga-3'	NM_002052	335	57
αFP	5'-ttttggaccgaaactttcc-3' 5'-ctcctgtatccttagcaactct-3'	NM_001134	450	57
GATA-4	5'-ttcctctcctcctcaaat-3' 5'-tcagcgtgtaaaggcatctg-3'	NM_002052	194	60
HNF-4α	5'-ggaacatatgggaaccaacg-3' 5'-aacttctgcttggatgg-3'	NM_000457	205	55
Vimentin	5'-ccttcgtgaataccacgacctgc-3' 5'-taatatatcgctgccactgag-3'	Z19554	321	56
BMP-2	5'-ttgaggctgctcagcatgtt-3' 5'-ttgcgagaacagatgcaagatg-3'	BC069214	315	55
CK18	5'-gagatcgaggctctcaagga-3' 5'-caagctggccttcagatttc-3'	NM_00024	357	57
HLA ABC	5'-gtatttctcacatccgtgtccc-3' 5'-gtccgccggtccaagagcgcag-3'	L18898	394	70
HLA DR	5'-ctgatgagcgtcaggaatcatgg-3' 5'-gacttactcagttgtggtgagggag-3'	X06079	220	60

GAPDH, glyceraldehyde-phosphate-dehydrogenase; Oct-4, octamer-binding

protein 3/4; SCF, stem cell factor; FGF-5, fibroblast growth factor; PAX-6, paired box gene 6; NCAM, neuronal cell adhesion molecule; BMP-4, bone morphologic protein 4; GATA-4, GATA binding protein 4; HNF-4 α , hepatic nuclear factor-4 α ; CK18, cytokeratin 18.

Table 2. cDNA primer pairs for hepatocyte-specific gene markers

Gene	Primer sequence	Accession number	Size (bp)	Annealing temp.(°C)
Albumin	5'-tgggagaagaaaatttcaa-3' 5'-tataccttttagcaaagaaaagga-3'	NM_001875	49	445
α 1-AT	5'-actgtcaactcggggacac-3' 5'-ccccattgctgaagacctta-3'	NM_000295	62	517
TTR	5'-aaccagtgagctctgagagc-3' 5-tgcctggacttctaacatagc-3	NM_000371	55	358
GS	5'-gtcaagattgcggggactaa-3' 5'-tacgattggctacaccacca-3'	BC_031964	55	397
CPS-1	5'-caagattccttggtgtggc-3' 5'-tctgatggaagagaggctgg-3'	NM_001875	57	158
PEPCK	5'-aacgcatggctacaatcc-3' 5'-aggtagctccgaatgacag-3'	NM_004563	60	752
TDO	5'-aggccaatgatagcatctgcc-3' 5'-tgtcatcgtctccagaatgg-3'	NM_005651	53	471
CYP3A4	5'-tgtatgaactggcactcacc-3' 5'-tagcttgaatcatcaccacc-3'	NM_017460	56	244
HNF-1 α	5'-cagtccttctactggaactgaa-3' 5'-cttgggaacaatacaggaa-3'	NM_000545	54	444
c-MET	5-caatgtgagatgtctccagc-3' 5-cctttagattgcaggcaga-3'	NM_000245	55	560
CK19	5-cgaaccaagtttgagacggaac-3 5-cgctgttactcctgattctgc-3	NM_002276	62	601
CX32	5'-ggcgtgaaccggcattctac-3' 5'-acaacagccggaacaccacg-3'	NM_000166	61	400
Transferrin	5'-gtggcctttgtcaagca-3' 5'-ctccatccaagctcatg-3'	NM_001013	52	577

α 1-AT, α 1-antitrypsin; TTR, transthyretin; GS, glutamine synthase; CPS-1, carbomoyl phosphate synthetase-1; PEPCK, phosphoenol pyruvate; TDO, tryptophan 2,3-dioxygenase; CYP3A4, cytochrome P450 3A4; HNF-1 α , hepatic nuclear factor-1 α , c-MET, hepatocyte growth factor receptor; CK19, cytokeratin 19; CX32, connexin 32.

5. 세포면역화학 분석

양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포를 8-well slide chamber (Nunc)에서 배양한 후 2% paraformaldehyde가 함유된 DPBS용액을 이용하여 4°C에서 2시간 동안 고정하였다. 고정 후 DPBS로 5분간 3번 세척하였다. 그리고 실온에서 10분 동안 0.5% Triton X-100가 함유된 DPBS를 처리 후 세척한 다음 endogenous peroxidase activities를 제거하기 위하여 3% hydrogen peroxide (Dako, Carpinteria, CA)로 15분간 반응시킨 후 세척하였다. 2% bovine serum albumin (BSA)을 함유한 DPBS에서 실온으로 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 인간의 단백질에 대한 mouse monoclonal antibodies (1:100)를 4°C에서 17시간 동안 처리 후, 세척하였다. 이 후 biotinylated goat anti-mouse IgG와 anti-rabbit IgG를 실온에서 20분간 처리하였다. 3번 세척한 다음, horseradish peroxidase-conjugated streptavidin (Dako)을 20분간 처리하였다. 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Dako) 용액으로 발색하였다. 발색이 된 세포는 DPBS로 세척하고 Mayer's Haematoxylin으로 대조 염색한 후 광학 현미경 (LSM410; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)하에서 관찰하였다.

6. 간세포로의 분화 확인

가. Immunoblotting을 이용한 간세포 배양액에서 알부민 확인 방법

3주간 분화유도 후, serum-free DMEM-LG로 20시간동안 처리한 배양액을 얻었다. 이 배양액에 0.125M Tris-HCl (pH 6.8), 4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol 그리고 0.004% bromophenol blue가 혼합된 동량의 sample buffer를 섞어주고, 5분간 95°C에서 끓였다. 위와 같은 방법으로 준비한 시료는 8% SDS-polyacrylamide gel에서 pre-stained protein molecular marker와 함께 전기 영동법으로 분리하였다. 전기영동 후 gel은 25mM Tris (pH 8.4), 192mM glycine, 10% methanol이 포함된 transfer buffer에서 30분간 전

처리 하였다. Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P, Millipore, USA)은 absolute methanol에서 15분, distilled water (D.W.)에서 2분, 그리고 5분간 transfer buffer에서 equilibration시켰다. Gel상의 단백질들은 4°C에서 60분 동안 100 V의 전류를 주어 PVDF membrane 으로 electrotransfer시켰다. Non-specific binding sites를 saturation시키기 위하여 membrane 을 5% BSA가 첨가 된 washing buffer (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.14% Na₂HPO₄·2H₂O, 0.02% KH₂PO₄, 0.2% Tween 20, 0.1% BSA 그리고 10mM sodium azide)에서 37°C에서 1시간 동안 처리 하였다. 이 후 1% normal goat serum과 1µg/mL mouse monoclonal anti-human albumin antibody가 포함된 washing buffer에서 1시간 동안 배양하였다. 다시 washing buffer로 여러 번 세척한 다음, 1:100으로 희석 된 gold-labeled goat anti-rabbit IgG가 첨가된 washing buffer에 1시간 동안 반응시켰다. 인간의 알부민은 IntenSE BL kit (Amersham, Buckinghamshire, England)를 이용하여 확인하였다.

나. ELISA 방법을 이용한 알부민 분비 측정

3주간 분화 유도 후, serum-free DMEM-LG 로 20시간동안 처리한 배양액을 얻었다. 배양액 내로 분비된 인간의 알부민 단백질을 ELISA kit (Philadelphia, PA)를 이용하여 확인하였다.

다. Periodic Acid-Schiff (PAS) Stain

양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포를 slide chamber에 3주간 분화, 배양한 후 2% paraformaldehyde 가 함유된 DPBS 용액을 이용하여 4°C에서 2시간 동안 고정하였다. 0.1% Triton X-100 을 함유한 DPBS를 10분간 처리하고 여러 번 세척한 후 1% periodic acid 으로 실온에서 10분간 산화시키고, D.W.로 3번 세척하였다. 실온에서 30분간 schiff's reagent 로 처리한 다음, 0.05N HCl 에 10분간 반응시키고 0.5% sodium bisulfite 를 이용하여 2번 세척 후 Mayer's Haematoxylin로 대조 염색하였다. 염

색 상태를 광학 현미경 시야에서 확인 하였다.

라. 요소 합성 측정

3주간 분화유도 후, 5mM NH_4Cl 가 첨가된 serum-free DMEM-LG 로 20시간동안 처리한 배양액을 얻었다. 이 배양액에 존재하는 요소의 농도는 colorimetric assay kit (Hayward, CA)를 이용하여 측정하였다.

7. 실험에 사용한 항체와 시약

실험에 사용한 인간의 단백질에 특이적인 mouse monoclonal antibodies 는 Dako에서 CD31, 그리고 desmin을, Chemicon에서 TRA-1-60과 SSEA-4를 Abcam (Cambridge, UK)에서 FSP를, Novo Castra (Newcastle, UK)에서 CD44, CD106, CD54, collagen type II, collagen type IV, vimentin, fibronectin, vWF, α -SMA (alpha-smooth muscle actin), HLA ABC 그리고 HLA DR을, Acris Antibodies (Hiddenhausen, Germany)에서 collagen type I을 Kamiya (Seattle, WA)에서 collagen type XII을 R&D Systems에서 SSEA-3를 구입하였다. Rabbit polyclonal anti-human collagen type III antibody는 Abcam에 구입하였고, 재료 및 방법에서 언급하지 않은 시약들은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)에서 구입하였다.

8. 통계적 분석

알부민과 요소 합성 결과는 SEM 방법을 사용하여 통계처리 하였으며, 첫 번째, 두 번째, 세 번째 분화방법은 2번의 독립적인 실험을 수행하였으며, 네 번째 분화방법은 3번의 독립적인 실험을 수행하였다.

III. 결 과

1. 양막유래 줄기세포 및 제대유래 줄기세포 배양

배양 후 1주일 후에 수많은 섬유아세포들이 관찰되었다. 연이어 군집을 형성하고 확장되어 3주째 섬유아세포와 형태가 유사한 (MSC-like) 세포들이 플라스크 전체를 차지하였다 (Figure 1). 제대유래 줄기세포는 10회 정도의 계대배양이 가능하였으며 그 이후 성장을 멈추면서 군집을 이룬 세포들이 커지고 편평해졌다(Figure 2). 양막유래 줄기세포는 13회 정도의 계대배양이 가능하였고 세포 성장과 증식 능력은 제대 유래 줄기세포 보다 양막 유래 줄기세포가 뚜렷하게 증가된 소견으로 나타났다 (Figure 3).

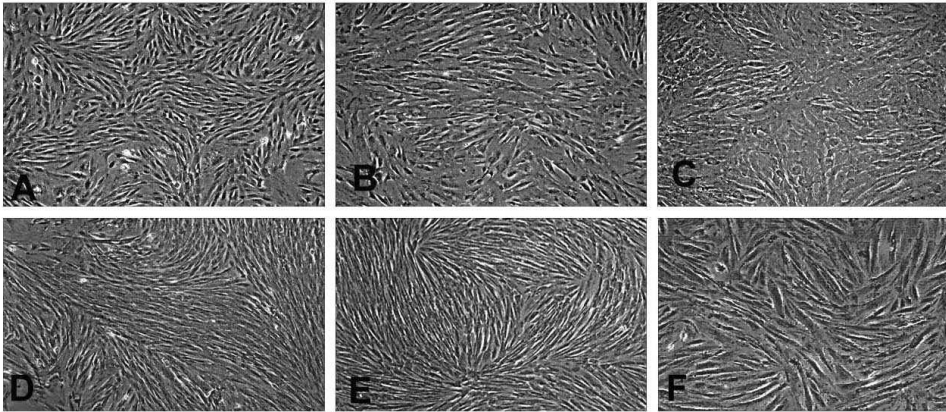


Figure 1. Morphology of HUC and HAM during *ex vivo* expansion (A) 25 days after initiation of the culture for HUC (1st passage) (B) 40 days from the culture for HUC (4th passage); (C) 87 days from the culture for HUC (10th passage) (D) 32 days after initiation of the culture for HAM (1st passage) (E) 53 days from the culture for HAM (4th passage) (F) 109 days from the culture for HAM (10th passage). Magnification, x40.

abbreviation: HUC;human umbilical cord derived stem cells

HAM;human amnion-derived stem cells

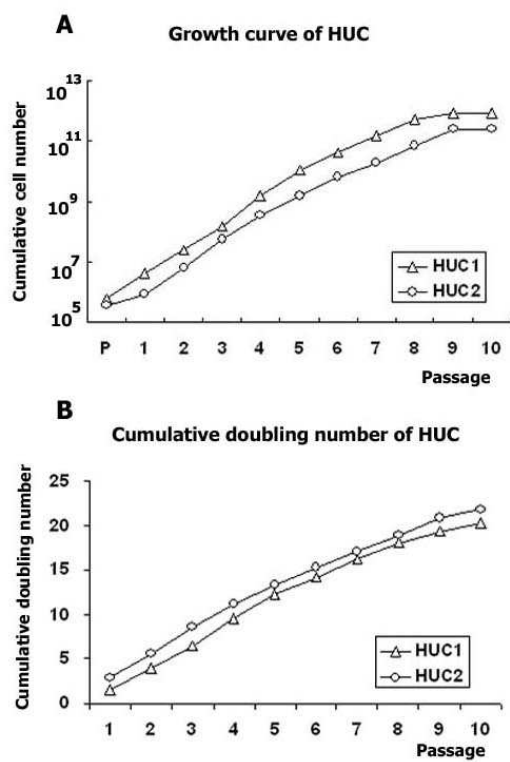


Figure 2. Growth curve and cumulative doubling number of HUC.

A, growth curve of HUC; B, cumulative doubling number of HUC.

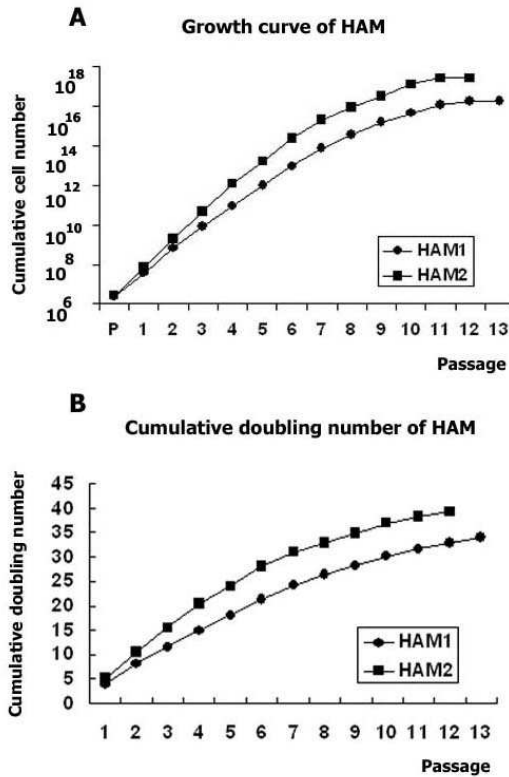


Figure 3. Growth curve and cumulative doubling number of HAM. A, growth curve of HAM; B, cumulative doubling number of HAM.

2. 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포 분화능력 분석

양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포로부터 중배엽계 세포 (지방세포, 골아세포 그리고 연골세포)로 분화되는 것을 관찰하였다. 4번 계대배양한 줄기세포를 지방생성 분화배양액에서 2주간 배양 후, oil red O 염색을 시행하여 지질이 축적된 지방세포의 존재 여부를 확인하였고, 2주간 골 생성 분화배양액에 배양 후 von Kossa 염색을 시행하여 칼슘이 침착된 골아세포로의 분화를 확인하였다. 3주간 연골 형성 분화 배양액으로 배양 후 Alcian blue 염색을 이용하여 연골생성 분화의 정도를 확인하였다 (Figure 4).

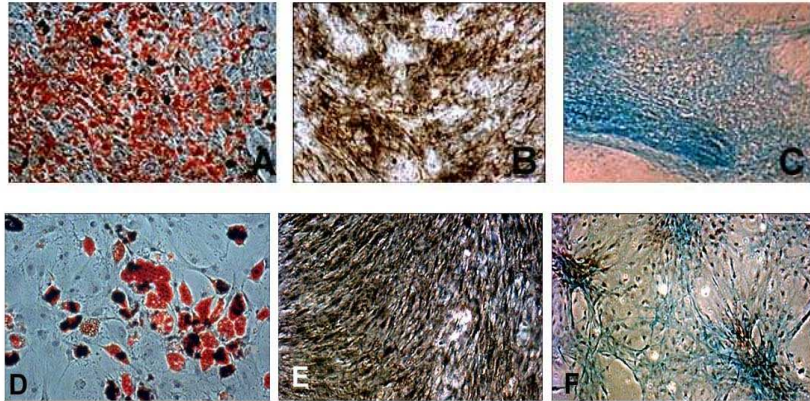


Figure 4. Differentiation potential of HUC and HAM

After a culture of HUC (A, B and C) and HAM (D, E and F) at the 4th passage was incubated in adipogenic (A, C), osteogenic (B, E) or chondrogenic (C, F) medium for 2-3 weeks, each group of HUC and HAM was examined for their specific differentiating capability using tissue-specific staining and Mayor's haematoxylin counterstaining. Magnification, x40.

3. 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포의 유전자 발현 분석

RT-PCR의 결과 3번 계대 배양한 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포는 Oct-4, SCF, FGF-5, NCAM, nestin, vimentin, CK18, GATA-4, BMP-4, HNF-4 α , HLA ABC, HLA DR의 유전자를 발현하였다. 배아 줄기세포 표지자인 Rex-1은 양막유래 줄기세포에서만 발현하였고 Pax-6는 HUC에서만 발현하였다. Brachyury와 BMP-2 유전자는 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포 모두에서 발현되지 않았다 (Table 3).

간세포로의 분화유도 전에 3번 계대 배양한 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포에서 간세포 특이 유전자 발현을 분석한 결과 제대유래 줄기세포에서는 CK18, 19, BMP-4, HNF-4 α , CYP3A4, α 1-AT, HNF-1 α , PEPCK, CX32 그리고 transferrin 유전자가 발현되는 것으로 나타났으며

양막유래 줄기세포에서는 CK18, 19, BMP-4, HNF-4 α , CYP3A4 그리고 α 1-AT 유전자가 발현하여 간세포 분화유도 전 시기에도 제대유래 줄기세포가 양막유래 줄기세포보다 간세포로의 분화 가능성이 더 크다는 것을 알 수 있다. CPS-1, TDO, TTR, GS, α FP, albumin 유전자는 간세포 분화전의 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포에서 모두 발현되지 않았다(Table 4).

Table 3. Gene expression profiles by HUC and HAM

Genes	HUC 3rd	HAM 3rd
Oct-4	+	+
SCF	+	+
FGF-5	+	+
NCAM	+	+
Nestin	+	+
Vimentin	+	+
CK18	+	+
GATA-4	+	+
BMP-4	+	+
HNF-4 α	+	+
HLA ABC	+	+
HLA DR	+	+
Rex-1	-	+
Pax-6	+	-
α FP	-	-
Brachyury	-	-
BMP-2	-	-

Table 4. Hepatocyte-related specific gene expression profiles by HUC and HAM

Genes	HUC 3rd	HAM 3rd
CK19	+	+
HNF-4 α	+	+
CYP3A4	+	+
α 1-AT	+	+
HNF-1 α	+	-
PEPCK	+	-
c-MET	+	-
Tranferrin	+	-
GS	+	-
CPS-1	-	-
TDO	-	-
TTR	-	-
CX32	-	-
α FP	-	-
Albumin	-	-

4. 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포의 면역화학적 분석

3번 계대 배양한 제대유래 줄기세포에서는 collagen I, II, III, IV, XII, fibronectin, CD44 (homing cell adhesion molecule, HCAM), CD54 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1), α -SMA, vimentin, desmin, SSEA-3, SSEA-4, vWF 그리고 HLA ABC의 단백질이 발현되었다. 특히 SSEA-3, collagen I, III, fibronectin, α -SMA, vimentin, CD44 그리고 HLA ABC 단백질이 강하게 발현되었다. TRA-1-60, CD106 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1), CD31(platelet/endothelial adhesion molecule-1, PECAM-1), HLA DR 단백질은 발현되지 않았다. (Table 5).

4번 계대 배양한 양막유래 줄기세포에서는 collagen I, II, III, IV, XII,

fibronectin, CD44, CD54, α -SMA, vimentin, desmin, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 그리고 HLA ABC 단백질이 발현되었는데, collagen I, α -SMA, FSP 그리고 HLA ABC 단백질이 특히 강하게 발현되었고 CD106, CD31, vWF 그리고 HLA DR 단백질은 발현되지 않았다 (Table 5).

Table 5. Immunocytochemical analysis of proteins expressed by HUC and HAM

Proteins		HUC 3rd	HAM 4th
Embryonic stem Cell markers	TRA-1-60	-	+
	SSEA-3	++	+
	SSEA-4	+	+
Mesenchymal stem Cell marker	Thy-1	+	+
Extracellular matrix molecules	Collagen I	++	++
	Collagen II	+	+
	Collagen III	++	+
	Collagen IV	+	+
	Collagen XII	+	+
	Fibronectin	++	+
Cytoskeletal markers	α -SMA	++	++
	Vimentin	++	+
	Desmin	+	+
Surface antigens	CD44	++	+
	CD54	+	+
	CD106	-	-
	FSP	+	++
Endothelial cell markers	vWF	+	-
	CD31	-	-
HLA	HLA ABC	++	++
	HLA DR	-	-

SSEA-3, stage-specific embryonic antigen 3; α -SMA, alpha-smooth muscle actin; FSP, fibroblast surface protein; vWF, von Willebrand

factor.

5. 간세포로의 분화 유도 조건에 따른 알부민과 요소 합성 결과

분화 방법 1, 2 그리고 3 조건에서 제대유래 줄기세포가 양막유래 줄기세포보다 알부민 단백질 합성 분비와 요소 합성의 농도가 높게 측정되었다. 제대유래 줄기세포와 양막유래 줄기세포는 세 가지 분화 방법에서 3주 동안 배양한 후 배양액을 얻었다.

분화 방법 1의 경우, 제대유래 줄기세포는 알부민 단백질을 BMDF4 분화 조건에서는 $0.29 \pm 0.02\mu\text{g}/\text{mL}$ 배양액내로 합성 분비하였고 동일 조건에서 양막유래 줄기세포는 $0.14 \pm 0.03 \mu\text{g}/\text{mL}$ 합성 분비하였다 (Figure 5). 또한 요소 합성을 측정한 결과, BMDF4 분화 조건에서 제대유래 줄기세포는 $6.7 \pm 0.5\text{mg}/\text{dL}$, 양막유래 줄기세포는 $4.7 \pm 0.35\text{mg}/\text{dL}$ 로 합성, 분비 되었다 (Figure 5).

분화 방법 2의 경우, HIAF4OD 분화 조건에서 각각 제대유래 줄기세포는 $0.35 \pm 0.02\mu\text{g}/\text{mL}$, 양막유래 줄기세포는 $0.16 \pm 0.008\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 알부민 단백질을 합성 분비 하였으며 요소 합성은 각각 제대유래 줄기세포는 $8.4 \pm 0.1\text{mg}/\text{dL}$, 양막유래 줄기세포는 $4.8 \pm 0.04\text{mg}/\text{dL}$ 의 농도로 합성 분비하였다 (Figure 6).

분화 방법 3의 경우, BMDF4 분화 조건에서 제대유래 줄기세포는 $0.66 \pm 0.03\mu\text{g}/\text{mL}$, 양막유래 줄기세포는 $0.22 \pm 0.02\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 알부민을 배양액내로 합성 분비 하였으며, 요소 합성은 제대유래 줄기세포는 $9.7 \pm 1.9\text{mg}/\text{dL}$, 양막유래 줄기세포는 $5.1 \pm 0.6\text{mg}/\text{dL}$ 의 농도로 배양액 내에서 측정되었다 (Figure 7).

분화 방법 1, 2 그리고 3의 모든 동일 조건에서 제대유래 줄기세포가 양막유래 줄기세포보다 알부민과 요소를 더 많이 합성, 배양액내로 분비하였다. 이러한 결과로 미루어 간세포로의 분화능력에 있어 양막유래 줄기세포보다 제대유래 줄기세포가 더 뛰어난을 관찰할 수 있었다.

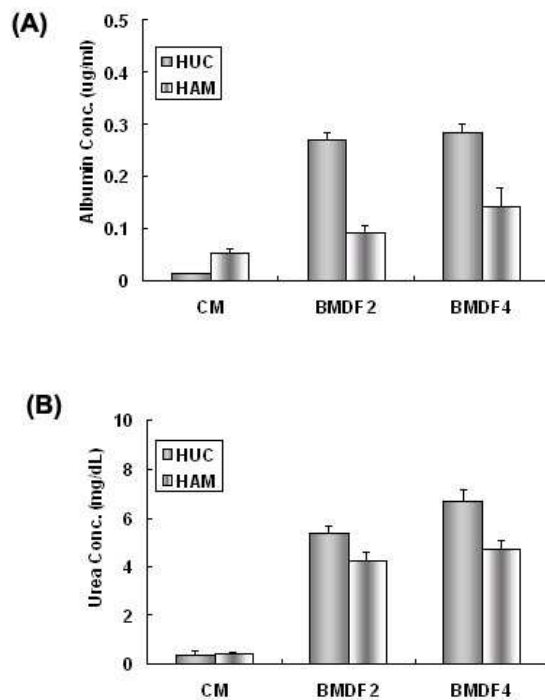


Figure 5. Secretion of albumin and urea by HUC and HAM after differentiation for 3 weeks in vitro.

HUC and HAM were cultured in differentiation medium containing DMSO in the presence of FGF-2 (BMDF2) or FGF-4 (BMDF4). As a control, HUC and HAM were cultured in DMEM-LG containing 10% FBS alone (CM). (A), After culture for 3 weeks, every group of HUC and HAM was starved for 20 h in serum free DMEM-LG. The conditioned medium was used for human albumin ELISA. (B), After culture for 3 weeks, every group of HUC and HAM was stimulated overnight in DMEM-LG with 5mM NH_4Cl . The conditioned medium was used for urea secretion assay. Data are means \pm SEM of two independent experiments.

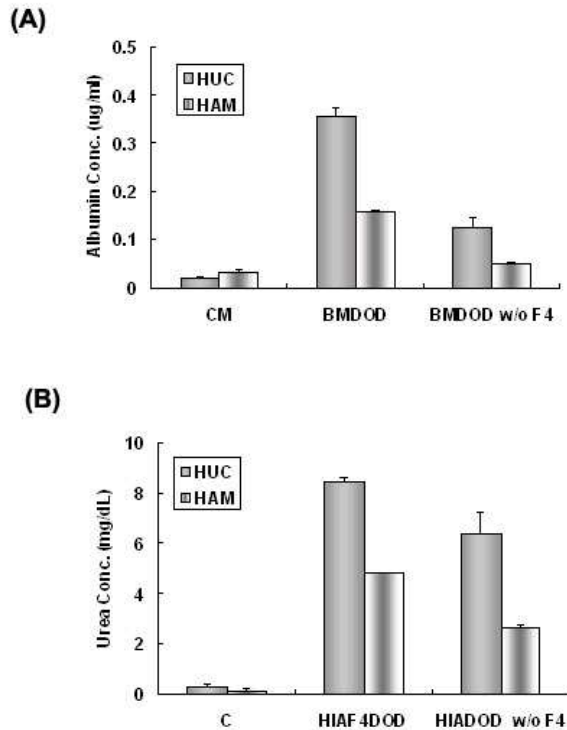


Figure 6. Secretion of albumin and urea by HUC and HAM after differentiation for 3 weeks in vitro.

HUC and HAM were cultured in differentiation medium containing DMSO in the presence of OSM, DEX and FGF-4 (BMDOD). As a control, HUC and HAM were cultured in DMEM-LG containing 10% FBS alone (CM). (A), After culture for 3 weeks, every group of HUC and HAM was starved for 20 h in serum free DMEM-LG. The conditioned medium was used for human albumin ELISA. (B), After culture for 3 weeks, every group of HUC and HAM was stimulated overnight in DMEM-LG with 5mM NH_4Cl . The conditioned medium was used for urea secretion assay. Data are means \pm SEM of two independent experiments.

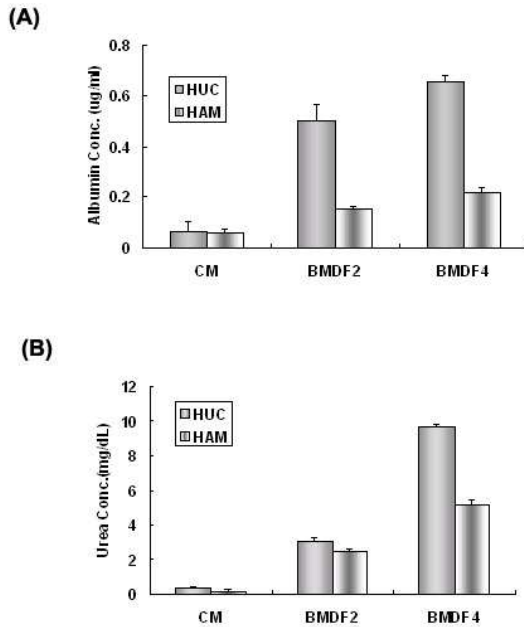


Figure 7. Secretion of albumin and urea by HUC and HAM after differentiation for 3 weeks in vitro.

HUC and HAM were cultured in differentiation medium containing DMSO in the presence of FGF-2 (BMDF2) or FGF-4 (BMDF4). As a control, HUC and HAM were cultured in DMEM-LG containing 10% FBS alone (CM). (A), After culture for 3 weeks, every group of HUC and HAM was starved for 20 h in serum free DMEM-LG. The conditioned medium was used for human albumin ELISA. (B), After culture for 3 weeks, every group of HUC and HAM was stimulated overnight in DMEM-LG with 5mM NH_4Cl . The conditioned medium was used for urea secretion assay. Data are means \pm SEM of two independent experiments.

6. 제대유래 줄기세포의 간세포로의 분화 시 최적의 분화방법

제대유래 줄기세포를 알부민 분비세포, 즉 간세포 (혹은 간세포-유사세

포, hepatocyte-like cells)로 분화하는데 있어 더 많은 알부민을 합성 분비할 수 있는 최적의 분화 조건을 찾기 위하여 분화 방법 4를 시행하였다.

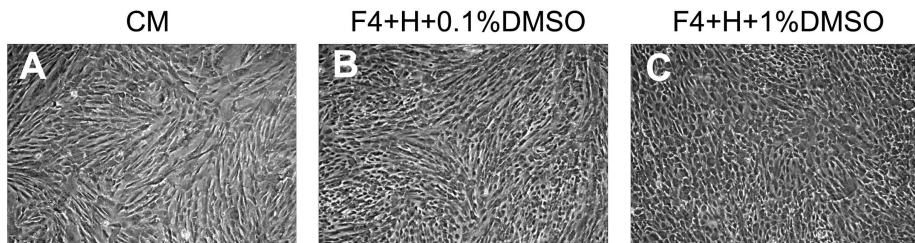
분화 방법 4는 네 가지 분화조건으로, DMEM-LG에 10% FBS, 1X ITS, 10^{-4} M Asc가 첨가된 배양액을 기본 배양액 (BM)으로 하여 기본배양액에 첫 번째 단계로 10ng/mL EGF와 10ng/mL FGF4를 첨가한 배양액에 2-3일간 배양하였다. 이 후 두 번째 단계로 기본배양액에 20ng/mL HGF, 20ng/mL FGF4와 0.1% DMSO 가 첨가된 배양액에 7일간 더 배양한 후 다시 세 번째 단계로 기본배양액에 20ng/mL OSM, 1uM Dex 넣고, 20ng/mL HGF를 첨가하거나 (DM1) 첨가하지 않고 (DM2) 14일 동안 더 배양하였다. 또한 위 배양액 조건에서 두 번째 단계에서 1% DMSO를 첨가하고, 세 번째 단계로 기본배양액에 20ng/mL OSM, 1uM Dex 넣고, 20ng/mL HGF를 첨가하거나 (DM3) 첨가하지 않고 (DM4) 14일 동안 더 배양하였다. 대조군은 10% FBS가 첨가된 DMEM-LG에서 같은 기간 배양하였다. 제대유래 줄기세포를 간세포로 3주 동안 분화 유도하는 동안 대조군으로는 DMEM-LG에 10% FBS만은 첨가하였다.

분화 10일째 각 세포를 관찰한 결과 대조군에서는 섬유세포 (fibroblastic type)와 같은 모양을 유지하고 있었다 (Figure 8A). 그러나 같은 시기에 DMSO를 첨가하여 배양한 세포는 다각형 (polygonal type) 혹은 둥근형 (round type)으로 모양이 변하였다. 특히 0.1% DMSO 보다 1% DMSO를 첨가한 실험군의 모양이 더 둥글둥글하게 바뀐 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 8B, C). 분화 21일째에 세포의 모양을 관찰한 결과 대조군에서는 여전히 모양의 변화를 관찰 할 수 없었다 (Figure 8D). 실험군 DM1, 2, 3 그리고 4에서는 3주 동안 세포의 분열로 인하여 세포수가 크게 증가함을 관찰 할 수 있었고 세포의 형태는 대부분 다각형 모양이나 둥근 모양으로 변화된 것을 관찰 할 수 있었으나 각 실험군 사이의 차이점은 없었다 (Figure 8E, F, G, H).

Figure 9에서와 같이 제대유래 줄기세포는 네 가지 분화 조건 중에서

DM4 배양액에서 간세포로 가장 잘 분화함을 관찰할 수 있었다. 제대유래 줄기세포를 간세포로 3주 동안 분화 후, DM4 배양액에서 알부민 ELISA와 요소 합성을 측정된 결과, 알부민 단백질은 $1.2 \pm 0.8\mu\text{g/mL}$ 그리고 요소는 $8.9 \pm 1.2\text{mg/dL}$ 의 농도로 측정되었다 (Figure 9).

Day 10



Day 21

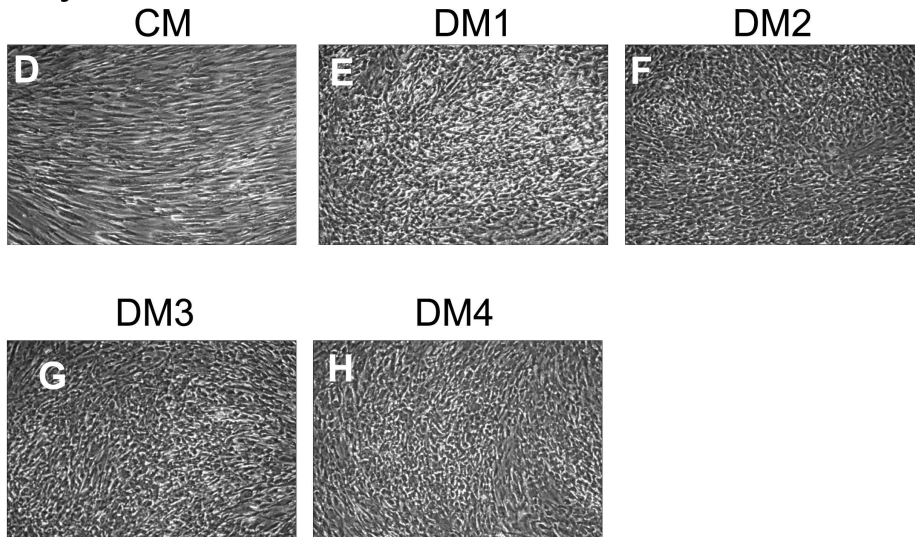


Figure 8. Morphology of HUC cultivated for 21 days in vitro.

The 1st step, HUC were cultured in BM (DMEM-LG + 10% FBS + Asc + ITS) supplemented with EGF and FGF4 for 3 days. The 2nd step, HUC were cultured again in BM supplemented with FGF4, HGF

and 0.1% DMSO for another 7 days. The 3rd step, HUC were cultured in BM supplemented with OSM, DEX and HGF (DM1) and supplemented with OSM and DEX (DM2) for more 14 days. HUC were cultured again following the above the two steps with 1% DMSO instead of 0.1% DMSO. The 3rd step, HUC were cultured in BM supplemented with OSM, DEX and HGF (DM3) and supplemented with OSM and DEX (DM4) for more 14 days.

A, B, C, Morphology of HUC at day 10 from the culture. D, E, F, G, H, Morphology of HUC at day 21 from the culture. CM, control medium (DMEM-LG + 10% FBS). Maginification, x40.

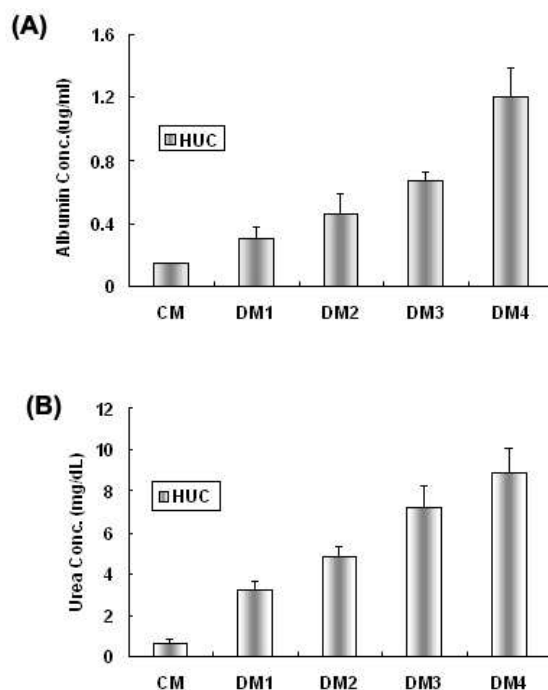


Figure 9. Secretion of albumin and urea by HUC after differentiation for 3 weeks in vitro.

The 1st step, HUC were cultured in BM (DMEM-LG + 10% FBS + Asc + ITS) supplemented with EGF and FGF4 for 3 days. The 2nd

step, HUC were cultured again in BM supplemented with FGF4, HGF and 0.1% DMSO for another 7 days. The 3rd step, HUC were cultured in BM supplemented with OSM, DEX and HGF (DM1) and supplemented with OSM and DEX (DM2) for more 14 days.

HUC were cultured again following the above the two steps with 1% DMSO instead of 0.1% DMSO. The 3rd step, HUC were cultured in BM supplemented with OSM, DEX and HGF (DM3) and supplemented with OSM and DEX (DM4) for more 14 days.

(A), After culture for 3 weeks, every group of HUC was starved for 20 h in serum free DMEM-LG. The conditioned medium was used for human albumin ELISA. (B), After culture for 3 weeks, every group of HUC was stimulated overnight in DMEM-LG with 5mM NH₄Cl. The conditioned medium was used for urea secretion assay. Data are means ± SEM of three independent experiments.

7. 제대유래 줄기세포로부터 분화된 간세포에서의 유전자 발현

위 분화조건에서 배양한 세포를 이용하여 간세포 특이 유전자의 발현 양상을 살펴본 결과, CK19, GS, α1-AT, HNF-4α, HNF-1α, PEPCK, CYP3A4, transferrin, c-MET은 분화를 유도하지 않은 세포와 분화를 유도한 세포에서 모두 발현하였다. 이들 중 HNF-1α, PEPCK, CYP3A4, transferrin, c-MET은 분화를 유도하였을 때 발현양이 증가하였으며, 특히 transferrin, c-MET의 경우 DM4 조건에서 발현양이 현저히 증가하였다. TDO, CPS-1, TTR, αFP의 경우는 분화를 유도하지 않은 세포에서는 발현되지 않았으나, 분화를 유도한 세포에서는 발현되었다. TDO와 CPS-1은 분화조건에 상관없이 발현양이 비슷하게 증가하였으나, TTR의 경우는 특히 DM3 조건에서 분화를 유도한 세포에서 발현양이 현저히 증가하였고, αFP의 발현은 다른 분화조건보다 DM3, DM4에서 증가하였다. 알부민의 경우 DM3에서 약하게 발현되고 DM4에서 강하게 발현되었으

며, CX32는 모두 조건에서 발현되지 않았다 (Figure 10).

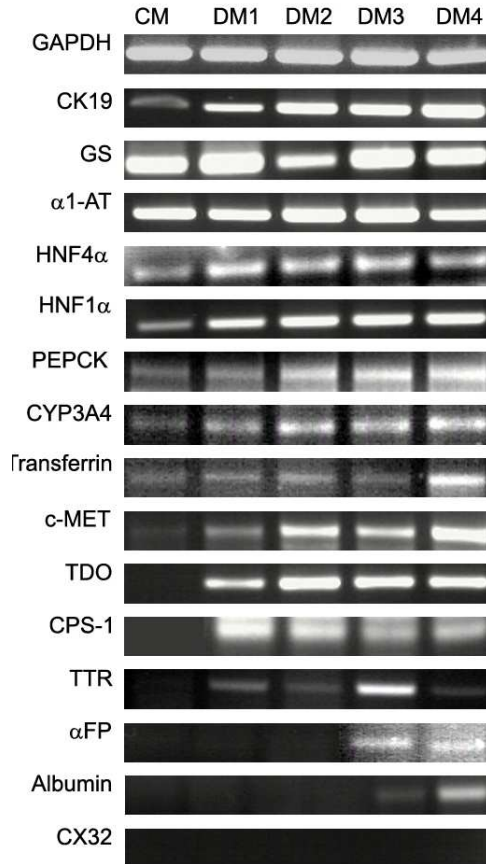


Figure 10. Hepatocyte-related specific gene expression by HUC after differentiation for 3 weeks in vitro

The 1st step, HUC were cultured in BM (DMEM-LG + 10% FBS + Asc + ITS) supplemented with EGF and FGF4 for 3 days. The 2nd step, HUC were cultured again in BM supplemented with FGF4, HGF and 0.1% DMSO for another 7 days. The 3rd step, HUC were cultured in BM supplemented with OSM, DEX and HGF (DM1) and supplemented with OSM and DEX (DM2) for more 14 days.

HUC were cultured again following the above the two steps with 1% DMSO instead of 0.1% DMSO. The 3rd step, HUC were cultured in BM supplemented with OSM, DEX and HGF (DM3) and supplemented with OSM and DEX (DM4) for more 14 days. These results were confirmed with two independent experiments.

8. 간세포로의 분화 유도 조건에 따른 알부민 분비

분화를 유도한 세포가 실제로 알부민을 합성하고 분비하는지를 알아보기 위해, 20시간동안 DMEM-LG를 처리하여 알부민 분비를 유도한 배양액을 얻어 SDS-전기영동과 면역 블로팅을 이용하여 알부민 분비정도를 살펴보았다. SDS-전기영동으로 살펴본 결과, 분화를 유도하지 않은 세포에서는 알부민이 분비되지 않았으나, 분화를 유도한 세포에서는 66kDa의 알부민이 분비되었으며, 특히 DM3, DM4 조건에서 분화를 유도한 경우 알부민의 분비량이 증가하였으며, 특히 DM4에서 현저하게 증가하였다 (Figure 11A). 면역 블로팅의 결과 역시 SDS-전기영동과 동일하게 DM3, DM4에서 인간 알부민의 분비량이 크게 증가하였다 (Figure 11B). 이러한 결과로 미루어 보아, DM4 조건이 제대유래 줄기세포를 알부민을 분비하는 간세포로 분화를 유도할 때 가장 효과적인 방법으로 생각된다.

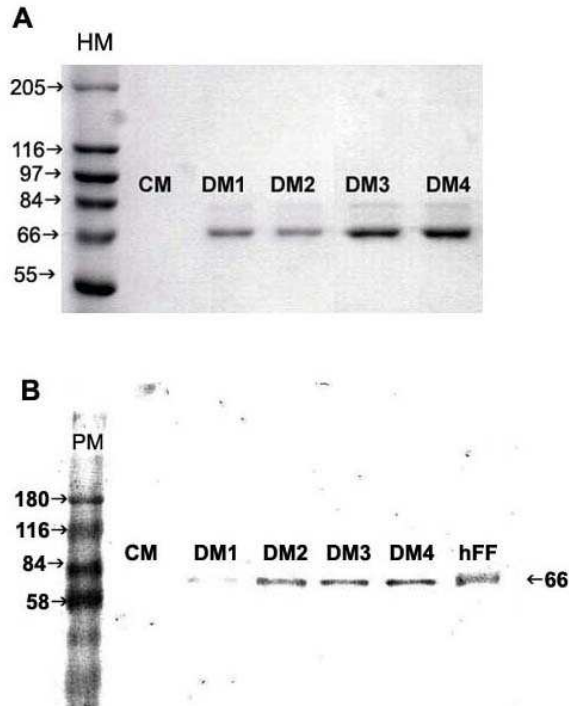


Figure 11. Comassie staining and immunoblotting of conditioned medium obtained from HUC after differentiation for 3 weeks in vitro. The 1st step, HUC were cultured in BM (DMEM-LG + 10% FBS + Asc + ITS) supplemented with EGF and FGF4 for 3 days. The 2nd step, HUC were cultured again in BM supplemented with FGF4, HGF and 0.1% DMSO for another 7 days. The 3rd step, HUC were cultured in BM supplemented with OSM, DEX and HGF (DM1) and supplemented with OSM and DEX (DM2) for more 14 days. HUC were cultured again following the above the two steps with 1% DMSO instead of 0.1% DMSO. The 3rd step, HUC were cultured in BM supplemented with OSM, DEX and HGF (DM3) and supplemented with OSM and DEX (DM4) for more 14 days.

A, Commasie staining; B, immunoblotting result using mouse monoclonal anti-human albumin antibodies. HM, high molecular markers; PM, prestained markers; CM, control medium. These results were confirmed with two independent experiments.

9. 제대유래 줄기세포에서 분화된 간세포에서의 알부민 단백질 발현

알부민 분비에 가장 효과적으로 보이는 DM4 조건에서 분화를 유도한 세포를 이용하여 세포면역화학염색방법을 이용하여 세포 내에 존재하는 인간 알부민 단백질을 염색해 본 결과, 분화를 유도하지 않은 세포에서는 알부민이 약하게 염색되었지만, DM4에서 분화를 유도한 세포의 경우 알부민이 강하게 염색되는 것을 관찰하였다 (Figure 12). 위 결과로 미루어 보아, DM4 조건에서 분화를 유도한 경우 세포 내 알부민 단백질의 발현이 현저하게 증가하는 것으로 보인다.

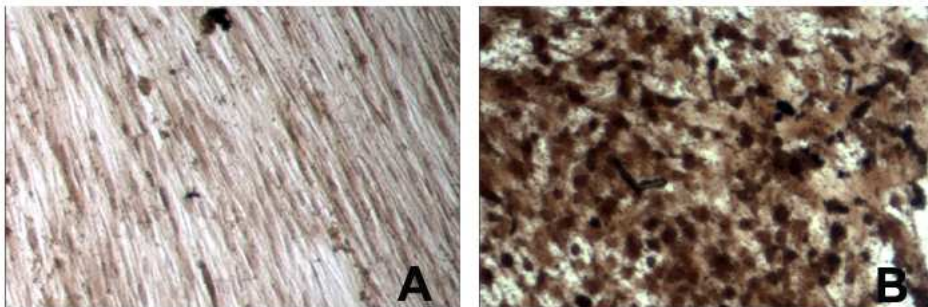


Figure 12. Immunocytochemical analysis of the HUC at the 4th passage after differentiation for 3 weeks in vitro. Immunoreactivities of HUC against the anti-human albumin were assessed.

The 1st step, HUC were cultured in BM (DMEM-LG + 10% FBS + Asc + ITS) supplemented with EGF and FGF4 for 3 days. The 2nd step, HUC were cultured again in BM supplemented with FGF4, HGF and 1% DMSO for another 7 days. The 3rd step, HUC were cultured

in BM supplemented with OSM and DEX for more 14 days.

A, HUC cultured in DMEM-LG + 10% FBS for 3 weeks; B, HUC cultured in differentiation medium for 3 weeks. Magnification, x40.

10. 분화를 유도한 제대유래 줄기세포의 글리코겐 축적능력 측정

세포 내 글리코겐을 저장할 수 있는지를 확인하기 위해 DM4에서 분화를 유도한 세포를 이용하여 PAS 염색을 하였다. 분화를 유도하지 않은 세포에서는 글리코겐의 축적이 관찰되지 않았으며, DM4에서 분화를 유도한 세포의 경우 글리코겐이 축적되어 PAS염색에서 보라색으로 염색되는 것을 관찰하였다 (Figure 13). 위 결과로 미루어 보아, DM4로 분화를 유도했을 경우, 실제 간세포와 같이 분화가 유도된 제대유래 줄기세포도 글리코겐을 저장, 축적할 수 있는 것을 관찰할 수 있었다.

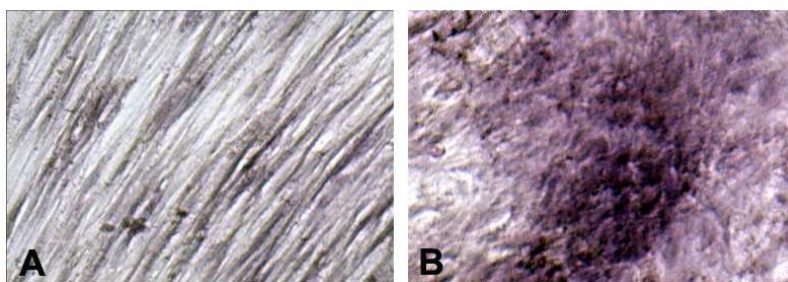


Figure 13. PAS staining of the HUC at the 4th passage after differentiation for 3 weeks in vitro. Glycogen storage of the HUC is stained purple. Nuclei was stained with Haematoxyline.

The 1st step, HUC were cultured in BM (DMEM-LG + 10% FBS + Asc + ITS) supplemented with EGF and FGF4 for 3 days. The 2nd step, HUC were cultured again in BM supplemented with FGF4, HGF and 1% DMSO for another 7 days. The 3rd step, HUC were cultured in BM supplemented with OSM and DEX for more 14 days.

A, HUC cultured in DMEM-LG + 10% FBS for 3 weeks; B, HUC cultured in differentiation medium for 3 weeks. Magnification, x40.

IV. 고 찰

줄기세포는 재생의학과 조직, 기관 대체 면에서 임상적으로 대단한 가능성이 있는 분야로서, 줄기세포를 활용하는 장기 복원 기술은 21세기 제 3의 치료기술이라 일컬어지는 재생의학의 핵심 기술로서 앞으로 기존 장기 이식의 제한점을 극복할 수 있을 것으로 전망된다. 줄기세포 중 중간엽 줄기세포는 각광을 받을 만한 재료로서 그 장점들을 나열해 보면 첫째 쉽게 분리할 수 있고 임상적 적용을 위해 비교적 쉽게 양을 늘릴 수 있다. 둘째 자가적인 중간엽 줄기세포를 사용할 수 있기 때문에 거부 반응의 위험이 없다. 셋째 줄기 세포의 성질이 보존하면서 오랜 시간 냉동 보관이 가능하다. 넷째 광범위한 가능성을 가지고 있어 골아세포, 지방세포, 연골세포의 증배엽계 세포 그리고 신경계 세포로의 분화가 가능한 다 능력 성인 줄기세포 (multipotent adult stem cell)이다.³⁰⁻³³

양막 유래 줄기세포와 제대 유래 줄기세포는 골수유래 중간엽줄기세포에서 발현되지 않는 BMP-4, GATA-4, HNF-4a, 그리고 NCAM 유전자가 발현된다. BMP-4는 연골 형성, 관절 복구, 뼈 형성에 관여하는 것으로 알려져 있다.³⁴ GATA-4는 심장 유전자 발현의 중요한 조절 기능을 가지며 배아 발달과 심근세포로의 분화를 조절한다.^{35,36} Nestin은 신경 줄기 세포의 특이 표지자로서 근육, 심근세포들에서도 발현되어진다.³⁷ Collagen type II는 연골 조직의 표지자이다.³⁸ 본 연구에서도 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포는 골수에서는 발현되지 않는 collagen II, TRA-1-60, SSEA-3, SSEA-4, BMP-4, FGF-5, HNF-4a, Rex-1이 발현되었다. Prusa 등²⁶에 의하면 Oct-4 배아 줄기세포 표지자가 발현된 경우 지방세포, 골아세포, 신경세포로의 분화를 보인다고 보고되어지고 있다. D'Ippolito 등³⁹ 역시 양막유래 줄기세포들이 SSEA-3 and -4, Oct-4와 Rex-1 유전자를 발현하였다고 보고하였다. TRA-1-60, SSEA-3, SSEA-4항원은 배아암세포와 배아줄기세포의 전형적인 표지자이다. Oct-4, Rex-1 발현 또한 배아줄기세포의 표지자로서 이러한 결과는 Kim

J 등⁴⁰의 임신 중기 양수에서 추출한 줄기세포의 유전자발현과 비슷한 결과로서 제대 및 양막유래 줄기세포가 골수유래 줄기세포보다 덜 분화된 세포로서 전 분화능 (pluripotency)을 가진 배아줄기세포와 좀 더 밀접한 연관성이 있는 것으로 보인다. 결과적으로 이들 유전자와 단백질의 자발적인 발현은 제대 및 양막유래 줄기세포가 신경세포, 연골세포, 골아세포, 심장근육세포로 쉽게 분화할 수 있는 가능성을 가진 것을 제시한다.

양막은 기원이 배아로서 초기 수정 후 8일 내 상배엽 (epiblast)에서 유래되어 많은 다양성을 가진 미성숙 된 줄기세포 양상을 보이며 내배엽, 중배엽, 외배엽 세포로의 분화 가능성을 보고되었다.^{28,41} 또한 기존 논문에서 양막 세포가 성숙한 신경세포로 분화되고 acetylcholine, norepinephrine과 dopamine같은 신경전달물질을 분비한다고 보고하였다.^{42,43} Zhao 등⁴⁴도 양막 세포가 심장근육세포, 연골, 뼈 같은 중배엽 세포로 쉽게 분화 가능하다고 보고하였다.

Romanov 등¹⁵에 의하면 제대 정맥 내피세포를 추출하여 많은 중간엽 유사 줄기세포를 배양하였으며 이 세포내에는 endothelium이나 leukocyte specific antigen이 없고 α -SMA와 여러 중간엽 세포 표지자들이 발현되었다고 보고하였다. Wang 등⁴⁵에 의하면 제대의 혈관들을 둘러싸는 결합 조직 기질인 Wharton's jelly를 배양하여 심근세포, 골아세포, 연골세포, 지방세포로 분화하는 중간엽 줄기세포를 획득하였다고 보고하였다. Sarugaser 등⁴⁶ 역시 사람의 제대 혈관 주위 세포를 분리하고 배양한 후 골아세포로의 분화를 유도하였다고 보고하였다. 본 연구에서도 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포에서 중배엽계인 지방세포, 골아세포 그리고 연골세포로 분화되는 것을 관찰하여 기존 논문들에서 나온 결과대로 줄기세포로서의 분화 가능성을 확인하였다.

Karahuseyinoglu 등⁴⁷은 배양된 제대의 기질 세포 증식이 3회 계대배양에서 7회 계대 배양까지 지속적으로 증가하고 10회에서 증식을 멈추며 FBS 농도가 증가할수록 세포 증식이 의미 있게 증가하였다고 보고하였다. 또한 고정 지지 (anchorage dependence)면에서 비고정된 세포에서는

고정된 세포보다 살아있는 세포의 수가 의미 있게 감소하였고 세포들 간의 접촉 억제에 모든 계대배양시기에서 관찰되어 이러한 복합적인 요소들이 제대줄기세포의 성장 억제에 관여하는 것으로 생각된다고 기술하였다.

본 연구의 결과에서 양막유래 줄기세포가 제대유래 줄기세포보다 성장속도가 빠르고 life time이 긴 것으로 나타났다. 기존 논문에서 제시한 성장 억제 요소들로 인해 제대유래 줄기세포의 성장이 제한되어 나타나는 것으로 사료되어진다.

세계적으로 수백만 명의 사람들이 간 질환에 걸린다. 미국에서는, 매년 간 질환으로 300,000명이 입원하고 약 4500개의 제공자 간만이 이식용으로 사용 가능하여 30,000명이 사망하는 것으로 추산된다.⁴⁸ 간 경화로 인한 간 부전의 가장 좋은 치료 방법은 공여자가 있는 경우 동종 간 이식이지만 우리나라의 현실상 간을 주겠다는 공여자가 절대적으로 부족한 실정이다. 간세포의 이식은 말기 간 기능 장애를 가진 환자를 치료하는 데 있어서 간 이식보다 훨씬 안전하고 유용하며 쉽다. 줄기세포에서 유도된 간세포 생성은 앞으로 상당한 임상적 적용을 기대할 수 있는 상황이다.⁴⁹

HNF-4 α 은 간 발달에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 CK18은 내배엽 계열 특이유전자중 하나로 간 분화의 표지자이다. later passage에 α FP과 HNF-4 α 의 발현은 쉽게 간세포 유사 세포로 분화할 수 있다고 보고하였다.⁵⁰

본 연구에서 간세포 관련 유전자의 발현이 양막유래 줄기세포보다 제대유래 줄기세포에서 증가되어 있어 간세포 분화 유도 전 시기에도 제대유래 줄기세포가 양막유래 줄기세포보다 간세포로의 분화 가능성이 더 크다는 것을 알 수 있었다.

Xu 등⁵¹에 의하면 양막유래 줄기세포 면역 염색 결과 배아 줄기 세포 표지자인 SSEA-3, SSEA-4, Rex-1, Oct-4 유전자가 발현되었다고 보고하였다. Miki 등⁴⁰역시 양막유래 줄기세포는 면역형광염색과 유세포 분석시 줄기세포 표지자인 TRA-1-60, SSEA-3, SSEA-4와 Thy-1을 발현하였고 조혈 줄기세포 표지자인 CD 34는 발현되지 않았다고 보고하였다. 양

막유래 줄기세포는 골수유래 중간엽 줄기세포의 세포 성장과 많은 유사성을 가진다. 골수와 마찬가지로 양막유래 줄기세포는 α -SMA, HCAM-1, ICAM-1^{7,52} collagen type-I, -III and -IV, fibronectin⁵³, desmin⁵⁴ 과 vimentin¹³이 발현된다. 또한 양막유래 줄기세포는 SCF⁵⁵ 과 nestin⁵⁶이 골수 MSC와 마찬가지로 발현되어진다고 보고되었다. 양막유래 줄기세포 세포들은 골수-MSC와는 달리 SSEA-3, -4, collagen type-II, -XII, 그리고 FSP 항원에 면역 발현되고 vWF 또는 VCAM-1 항원에 발현되지 않는다고 보고하였다.⁵²

Covas 등⁵⁷은 제대정맥의 내피와 내피하세포 유래 중간엽 줄기세포를 세포면역화학 염색을 시행하여 CD29, CD13, CD44, CD49e, CD54, CD90과 HLA-class I이 발현되었고 CD45, CD14, glycophorinA, HLA-DR, CD51/61, CD106과 CD49d는 발현되지 않았다고 보고하였다. 이는 골수유래 중간엽 줄기세포의 염색 발현과 일치하는 결과로 제대유래 줄기세포가 골수를 대체하여 세포치료에 사용될 수 있을 것으로 기대되어진다고 보고하였다. Karahuseyinoglu 등⁴⁷역시 flow cytometry를 통해 분석된 제대유래 줄기세포가 CD105, CD73, CD44가 발현되었고 CD45, CD34, CD14와 HLA-DR은 발현되지 않았다고 하였다. 본 연구의 세포 면역 화학적 분석 결과 기존의 논문의 결과와 일치하는 소견으로 양막유래 줄기세포, 제대유래 줄기세포 세포들은 골수 제대혈 유래 중간엽 줄기세포와 면역 표현형에 있어서 많은 유사성이 있었다. 우선 골수와 제대 중간엽 줄기세포에서도 발현되는 세포외 기질 분자들 (extracellular matrix molecules, ECM)인 collagen I, collagen III, fibronectin이 발현되었고, 세포 골격 표지자인 α -SMA, vimentin, CK18 기질 수용체인 CD44, CD54, FSP가 각각 발현되었다. HLA ABC역시 골수, 제대혈과 마찬가지로 강하게 발현 되었는데 골수에서는 발현되는 HLA DR은 제대와 양막유래 줄기세포에서는 발현 되지 않아 기존 논문 결과와 동일한 소견을 보였다. 본 연구에서도 골수에서는 발현되지 않는 배아 줄기세포 표지자인 TRA-1-60, SSEA-3, SSEA-4 그리고 중배엽 줄기세포 표지자인 Thy-1

(CD90)이 발현 되었는데 이 결과는 제대유래 줄기세포, 이 배아줄기세포와 좀 더 밀접한 연관성을 가지고 있다는 것을 알 수 있는 소견으로 사료된다.

아직까지 줄기세포 분화 기전은 잘 알려져 있지 않다. 체외에서 줄기세포의 분화가 유전자 재조합에 의한 것인지, 적절한 배양과 기질로 인한 자극으로 유도되는 것인지는 정확하지 않다.^{58, 59} 그러나 간세포로의 분화는 성장인자와 사이토카인이 관여된 여러 뚜렷한 단계들을 통해 진행되는 것으로 알려져 있다.⁶⁰ 배아의 간 분화에 영향을 미치는 인자들 중에 심장 중배엽 세포들에 의해 생성된 FGF가 초기 간 생성을 유도하는 내배엽에 관여한다고 알려져 있다.^{61,62} Dex는 합성 glucocorticoid로서 간세포 배양에 첨가 시 알부민 분비 수치를 안정화시키는 것을 촉진하고 2달까지 tyrosine aminotransferase 분비를 유도하고 간성숙의 필수적인 촉매제로 알려져 있다.⁶³ Oncostatin M은 조혈모세포에 의해 생성된 interleukin 6 계열의 cytokine중 하나로 태아중기부터 신생아시기까지 요구되며 태아의 조혈작용과 간 분화에 관여한다고 밝혀져 있다. 1차배양시 oncostatin M의 자극이 간세포의 크기를 증가시키고 성숙을 유도한다고 한다. 특히 glucocorticoid인 dexamethason과 함께 작용하여 간세포 분화 유도 시 세포 분화를 증진시킨다고 한다.^{64,65} Insulin은 쥐의 간세포에서 알부민의 분비와 세포분열을 자극한다고 밝혀져 있다.⁶⁶ Asc는 다양한 생물학적 분자들의 합성을 돕는 효소보조인자로서 강력한 항산화제로 알려져 있다.⁶⁷ 이러한 첨가물들로 배양을 해도 일차 간세포로의 최종적 분화를 이루기 위해서는 부가적인 신호들이 필요하다. 간세포로의 분화에 영향을 미치는 신호 중의 하나는 ECM으로 유도된 신호이다.⁶⁸ ECM 단백질 (collagen I, fibronectin 또는 entacin-collagen IV-laminin)가 존재하는 상태에서 세포 배양 시 다른 물질과 배양했을 때보다 ALB, AFP 같은 간 특이 유전자와 HNF-4 α 의 표현이 증가한다고 알려져 있다.⁶⁹ EGF, HGF, oncostatin M, FGF, glucocorticoid와 insulin을 포함한 여러 세포 외 신호들이 간 특이 유전자 표현들을 증가시키는 것을 초래하는 후기 간 성숙

시기에 관여되어진다.⁵

본 연구에서는 우선 제대 및 양막으로부터 줄기세포를 분리한 후 간 분화를 효과적으로 유도하기 위하여 기본배지 (DMEM-LG, ITS, Asc, OSM, Dex 에 EGF를 첨가하거나 첨가하지 않고)에서 7일정도 1차 배양 후 1% 또는 0.1% DMSO를 첨가한 후 HGF, FGF2, FGF4를 각각 달리하여 2차 배양을 2주간 하였다.

HGF는 EGF보다 배양에서 인간 간세포를 증식시키는 훨씬 더 강력한 인자로서 간 발달과 재생에 중요한 역할을 한다.⁷⁰⁻⁷² 골수 유래 줄기세포가 HGF에 의해 *in vitro*에서 간세포로 분화가 유도되었다고 보고한 논문들도 있다.^{72,73} Schwartz 등⁷⁴은 골수유래 줄기세포가 FGF4에 의해 간세포로 유도된 것을 보고하면서 간세포로의 분화정도가 HGF로 처리한 세포들보다 훨씬 더 증가되어 나타났다고 하였다. HGF는 간세포 분화를 유도하지만 간세포 증식에 활동적으로 작용하는 것은 아니라고 알려져 있다.⁷¹

간 생성 유도 조건에서 양막 및 제대 유래 줄기세포의 섬유아세포의 형태가 점차 시간이 지남에 따라 polygonal 간세포의 모양으로 진행되었고 유도 4주 후에 간세포로의 분명한 모습이 나타나게 되었다. Seo 등⁷⁵은 유도 첫날에 분화배지에 DMSO 첨가가 배양접시에 세포 분리를 증진시킨다고 하였고 분화 유도 후 7일째에 DMSO 첨가는 세포 분리를 일으키지 않는다고 보고하였다. 기본 배지에 DMSO 첨가는 분화된 간 유사세포에 의해 생성된 알부민과 글리코젠의 함량을 증가시킨다고 하였다. DMSO는 *in vitro*에서 성인 간세포의 기능을 유지하는 것으로 알려져 있다.⁷⁶ nicotinamide와 DMSO가 뚜렷하게 작은 간세포의 생성을 증가시키며 OSM 병용 시 작은 간세포의 선택적 성장을 상승적으로 증가시키고, 혈액세포집단의 성장을 억제한다.⁷⁷ Oncostatin M 단독은 간 기능에 매우 약한 영향을 끼치나 nicotinamide나 DMSO 병용 시 알부민의 분비와 cytochrome P450 능력이 크게 증가하였다. 기존의 연구에서 지방유래 줄기세포가 간세포로 분화 시 DMSO 존재 하에서 FGF2보다 FGF4 첨가

시 간세포 특이 유전자의 발현, 알부민 ELISA, 요소 측정 면에서 뚜렷하게 간유사세포로의 분화가 증가하였다고 보고하였다.⁶¹ 그러나 Schwartz 등⁷⁴에 의하면 이런 cytokine들이 in vitro에서 human multipotent adult progenitor 세포들의 간 분화를 유도하는 데 실패하였다고도 보고하였다. FGF4는 초기에 내배엽을 형성하고 설계하는 데 중요한 역할을 담당하고, FGF4 단독 또는 HGF와 함께 사용 시 체외에서 human multipotent adult progenitor 세포들의 간 분화를 유도하는 것으로 보여진다.^{74,78} 본 연구에서는 배양 분화조건 1, 2, 3에서 DMSO 존재 하에서 FGF2보다 FGF4 첨가 후 간세포 유도 분화 시 알부민 합성과 요소 분비가 증가된 양상으로 나타났다.

본 연구에서 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포의 간 분화 유도를 각각 비교 관찰하였다. 그 결과 제대유래 줄기세포에서 간세포유사세포로의 분화 시 알부민과 요소 합성이 양막유래 줄기세포에 비해 증가된 소견으로 나타났다. 알부민은 간세포에 의해 합성되는 주요 단백질이다. 간세포의 중요한 대사 기능의 하나로, 간에서 분비되는 단백질의 40% 이상을 차지하는 알부민의 합성과 분비를 들 수 있다. 특히 알부민 분비는 in vitro 배양에서 그 기능을 쉽게 잃게 되며 배양액 내에 첨가된 성장인자(EGF)와 호르몬 등에 의해 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 간 분화 초기에 알부민의 생성이 시작하여 성인 간에서 최대수치에 도달하게 된다.⁷⁹ 간세포가 혈류로 일정하게 알부민을 분비함에 따라 배양배지에서 표적세포의 간 분화를 증명하기 위해 알부민을 검사하는 것은 중요하다. 간세포 분화의 대부분의 연구들이 세포 면역화학적 분석, immunoblotting analysis, ELISA에 의해 알부민 합성과 분비를 측정하였다. 간세포 분화 시 알부민, 요소 합성이 증가하였고 분화되지 않은 세포에서는 알부민, 요소 합성이 발현되지 않았다고 보고하였다.^{49,50,74,79} 본 연구에서도 알부민 immunoblotting analysis, 알부민 ELISA 측정으로 알부민 분비와 합성을 측정하였다. 최적의 배양조건으로 알부민과 요소 합성을 최대화시키기 위해 제대유래 줄기세포에 각각의 분화조건을 달리하여 간세포 분화를 유도

하였다. 1% DMSO, 20ng/mL OSM, 1uM Dex, 20ng/mL HGF를 첨가하거나 (DM3) 20ng/mL HGF첨가하지 않았을(DM4) 경우 DM4에서 가장 알부민과 요소 분비가 증가된 소견을 보였는데 이것은 후기 간세포 유도 단계에서는 HGF를 첨가하지 않은 상태에서 OSM, Dex만 첨가한 상태가 HGF를 첨가한 상태보다 훨씬 더 간세포의 성장과 성숙을 증가시키는 것으로 사료된다.

RT-PCR을 통해 간세포로 유도 분화된 세포의 간세포 기능 관련 유전자의 표현을 조사하였다. 본 연구에서는 HNF-1 α , PEPCK, CYP3A4, Transferrin, c-MET은 분화를 유도하였을 때 발현양이 더 증가하였으며 알부민 분비가 가장 높게 측정되는 DM4에서 알부민이 가장 높게 발현되었다. TDO, CPS-1, TTR, α FP의 경우는 분화를 유도하지 않은 세포에서는 발현되지 않았으나, 분화를 유도한 세포에서는 발현되었다. Chien 등⁸⁰은 태반 유래 줄기세포에서 간세포 분화 유도 시 간 분화가 진행된 세포는 CK18과 성숙한 간세포 표지자인 TAT의 발현이 증가했다고 보고하였다. Talens-Visconti 등⁸¹에 의하면 지방세포 유래 줄기세포에서 알부민은 간세포의 분화가 진행될수록 발현이 증가하였고 CYP 계열역시 분화한 간세포에서 분화 전 세포에 비해 의미있게 발현이 증가하였다고 보고하였다 또한 간으로 인해 분비가 증가되는 전이인자들 HNF1 α , HNF3 α , HNF3 β , HNF4 α , GATA4, GATA6가 간세포로 분화하는 동안 발현이 더 증가한다고 하였다. Banas 등⁴⁹은 지방세포 유래 줄기세포에서 α FP은 초기 내배엽 분화 표지자로서 보통 간 분화 초기에 주로 발현되었다가 간 성숙이 진행됨에 따라 감소하며 성숙한 간세포의 표지자인 ALB, TDO, CYP7A는 분화가 진행됨에 따라 발현되어 계속 발현을 유지한다고 하였다. 그러나 본 연구에서는 알부민과 요소 분비가 증가되는 DM3,DM4에서 α FP의 발현이 더 증가된 양상을 보였다. 이렇게 연구자마다 면역표현형, 조직 생화학적 표현형의 결과가 다른 것은 분리방법, 사용된 배양액, 사용된 혈청, 유래된 세포의 종류 및 자체 분화상태의 차이 때문이라고 사료된다.

글리코겐의 생성과 저장은 간세포의 특징 중 하나이다. Chien 등⁸⁰은 간세포로 분화된 태반유래줄기세포를 PAS염색에서 발견되었으나 간세포 분화되지 않은 태반 유래 줄기세포는 발견되지 않았다고 보고하였다. Tamagawa 등²⁹은 간세포로 분화된 양막 유래 줄기세포를 PAS 염색으로 글리코겐 축적을 확인하였고 간세포 분화되지 않은 세포에서는 PAS 염색 상 발견되지 않았다고 보고하였다. 본 논문에서도 간세포로 분화된 제대유래 줄기세포가 PAS 염색 상 발견되는 것을 관찰하여 간세포로 분화 가능성이 높음을 확인하였다.

인간 양막, 제대는 쉽게 사용할 수 있으나 사용하지 않을 경우 흔히 폐기 처리되는 분만 후 물질이다. 기본 연구에서는 산모의 동의하에 양막, 제대를 얻어 줄기세포를 배양하고 이들 줄기세포가 다양한 분화 가능성이 있는 것을 확인하였다. 특히 양막유래 줄기세포에 비해 제대유래 줄기세포가 간세포로의 분화 가능성이 증가되어 있는 것을 간세포 분화 실험을 통해 알 수 있었다. 본 논문에서는 여러 분화조건을 달리하여 간 분화를 유도하였고 제대유래 줄기세포에서 가장 간세포 분화 유도가 잘되는 배양 조건을 제시할 수 있었다.

앞으로 양막, 제대에서 줄기세포를 확립하고 양막유래 줄기세포, 제대유래 줄기세포에서 최적의 간세포 분화 조건을 확립하기 위해서는 더 많은 연구가 필요하며 이러한 연구가 줄기세포 치료에 도움이 되고 향후 간 질환 환자의 간세포 이식 치료를 향상시킬 수 있으리라 생각된다.

V. 결 론

양막과 제대에서 줄기세포 배양 후 RT-PCR, 세포면역화학 분석 및 중배엽성 세포로의 분화능 실험을 시행하였다. 또한 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포를 간세포로 분화 유도 후 간세포 특이 유전자 발현, 알부민 분비 측정, 요소 합성 측정, 인간 알부민에 대한 면역블로팅과 세포면역화학염색방법 그리고 PAS 염색을 시행하였다.

양막유래 줄기세포, 제대유래 줄기세포에서 각각 다음과 같은 결과들을 얻었다.

1. 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포에서 배아 줄기세포 표지 유전자 및 외배엽, 중배엽, 내배엽 관련 유전자가 발현하였다.
2. 양막유래 줄기세포와 제대유래 줄기세포가 지방세포, 골아세포, 연골세포로 분화되는 것을 관찰하였다.
3. 간세포 분화 유도 전 양막유래 줄기세포보다 제대유래 줄기세포에서 더 많은 간세포 특이 유전자의 수가 발현 되었다.
4. 간세포 분화 유도 후 모든 분화 배양조건에서 제대유래 줄기세포가 양막유래 줄기세포보다 알부민과 요소의 합성, 분비 농도가 높게 측정되었다.
5. 간세포로의 분화 유도 시 제대유래 줄기세포는 DM4 분화 배양액에서 간세포로 가장 잘 분화하였다.
6. 분화 배양조건 DM4 배양액에서 간세포로 유도된 제대유래 줄기세포에서 알부민과 요소를 합성, 분비하는 것을 관찰 할 수 있었다. 또한 면역블로팅 방법으로 배양액 내에 분비된 인간 알부민을 검증하였고, 세포면역화학염색 방법을 이용하여 간세포로 분화 한 세포 내에 인간 알부민이 존재함을 직접 검증하였다.
7. 간 분화 유도 전 제대유래 줄기세포에서는 PAS 염색방법으로 글리코젠 축적이 관찰되지 않았으나 분화를 유도한 세포에서는 글리코젠이 세포 내에 축적되는 것을 관찰 할 수 있었다.

이상의 결과에서, 본 연구에서는 간세포 분화 유도 시 양막유래 줄기세포에 비해 제대유래 줄기세포가 간세포로의 분화 가능성이 높다는 것을 알 수 있었다. 또한 여러 가지 분화 배양액으로 간세포로의 분화를 유도하여 제대유래 줄기세포에서의 최적의 간세포 분화조건을 제시할 수 있었다.

결론적으로 줄기세포로부터 분화유도 된 간세포를 골수 유래 중간엽 줄기세포가 아닌 제대나 양막으로부터 얻을 수 있게 됨으로서 본 연구가 향

후 간 질환 환자에게 줄기세포 치료에 도움이되고, 제대나 양막 등으로 줄기세포원을 확대함으로써 간세포 획득 방법에 좋은 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Hong SH, Gang EJ, Jeong JA, Ahn C, Hwang SH, Yang IH, et al. In vitro differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330:1153-61.
2. Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N. Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. *Differentiation* 2004;72:230-8.
3. Strom, S. and Fisher, R. Hepatocyte transplantation: new possibilities for therapy. *Gastroenterology* 2003;124:568-71.
4. Yamamoto H, Quinn G, Asari A, Yamanokuchi H, Teratani T, Terada M, et al. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application. *Hepatology* 2003;37:983-93.
5. Hamazaki T, Iiboshi Y, Oka M, Papst PJ, Meacham AM, Zon LI, Terada N. Hepatic maturation in differentiating embryonic stem cell in vitro. *FEBS Lett* 2001;497:15-9.
6. Tocci A, Forte L. Mesenchymal stem cells: use and perspectives. *Hematol J* 2003;4:92-6.
7. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*

1999;284:143-7.

8. Devine SM, Hoffman R. Role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Opin Hematol* 2000;7:358-63.

9. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 1966;16:381-90.

10. Deans RJ, Moseley AB. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000;28:875-84.

11. Minguell JJ, Conget P, Erices A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. *Braz J Med Biol Res* 2000;33:881-7.

12. Rao MS, Mattson MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev* 2001;122:713-34.

13. Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 2001;98:2396-402.

14. Hu Y, Liao L, Wang Q, Ma L, Ma G, Jiang X, Zhao RC. Isolation and identification of mesenchymal stem cells from human fetal pancreas. *J Lab Clin Med* 2003;141:342-9.

15. Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells* 2003;21:105-10.

16. Bilic G, Ochsenein-Kölble N, Hall H, Huch R, Zimmermann R. In vitro lesion repair by human amnion epithelial and mesenchymal cells. *Am J Obstet Gynecol* 2004;190:87-92.

17. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English

D, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:3828-32.

18. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004;103:1669-75.

19. Mareschi K, Biasin E, Piacibello W, Aglietta M, Madon E, Fagioli F. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood. *Haematologica* 2001;86:1099-100.

20. Wexler SA, Donaldson C, Denning-Kendall P, Rice C, Bradley B, Hows JM. Adult bone marrow is a rich source of human mesenchymal stem' cells but umbilical cord and mobilized adult blood are not. *Br J Haematol* 2003;12:368-74.

21. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109:235-42.

22. Goodwin HS, Bicknese AR, Chien SN, Bogucki BD, Quinn CO, Wall DA. Multilineage differentiation activity by cells isolated from umbilical cord blood: expression of bone, fat, and neural markers. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7:581-8.

23. Rosada C, Justesen J, Melsvik D, Ebbesen P, Kassem M. The human umbilical cord blood: a potential source for osteoblast progenitor cells. *Calcif Tissue Int* 2003;72:135-42.

24. Lee OK, Kuo TK, Chen WM, Lee KD, Hsieh SL, Chen TH. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* 2004;103:1669-75.

25. Tsai MS, Lee JL, Chang YJ, Hwang SM. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Hum Reprod*

2004;19:1450-6.

26. 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;18:1489-93.

27. Lavon N, Benvenisty N. Study of hepatocyte differentiation using embryonic stem cells. *J Cell Biochem* 2005;96:1193-202.

28. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem cells* 2005;23:1549-59.

29. Tamagawa T, Oi S, Ishiwata I, Ishikawa H, Nakamura Y. Differentiation of mesenchymal cells derived from human amniotic membranes into hepatocyte-like cells in vitro. *Human cell* 2007;20:77-84.

30. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279-95.

31. Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM, Lee MH, et al. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. *Ann Hematol* 2004;83:733-8.

32. Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 2001;98(9):2615-25.

33. Zhao LR, Duan WM, Reyes M, Keene CD, Verfaillie CM, Low WC. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischemic brain of rats. *Exp Neurol* 2002;174:11-20.

34. Kuroda R, Usas A, Kubo S, Corsi K, Peng H, Rose T et al. Cartilage repair using bone morphogenetic protein 4 and muscle-derived stem cells. *Arthritis. Rheum* 2006;54:433-42.

35. Kuo CT, Morrissey EE, Anandappa R, Sigrist K, Lu MM, Parmacek

- MS, et al. GATA4 transcription factor is required for ventral morphogenesis and heart tube formation. *Genes Dev* 1997;11:1048-60.
36. Molkenin JD, Lin Q, Duncan SA, Olson EN. Requirement of the transcription factor GATA4 for heart tube formation and ventral morphogenesis. *Genes Dev* 1997;11:1061-72.
37. Sjoberg G, Jiang WQ, Ringertz NR, Lendahl U, Sejersen T. Colocalization of nestin and vimentin/desmin in skeletal muscle cells demonstrated by three-dimensional fluorescence digital imaging microscopy. *Exp. Cell Res* 1994;214:447-58.
38. Aigner T, Stoss H, Weseloh G, Zeiler G, von der Mark K. Activation of collagen type II expression in osteoarthritic and rheumatoid cartilage. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 1992;62:337-45.
39. D'Ippolito G, Howard GA, Roos BA, Schiller PC. Isolation and characterization of marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells. *Exp Hematol* 2006;34:1608-10.
40. Kim J, Kim LH, Hwang KJ, Kwon HC, Kim SK, Cho DJ, et al. Human amniotic fluid-derived stem cells have characteristics of multipotent stem cells. *Cell prolifer* 2007;40:75-90.
41. Miki T, Mitamura K, Ross MA, Stolz DB, Strom SC. Identification of stem cell marker-positive cells by immunofluorescence in term human amnion. *J Reprod Immunol* 2007;75:91-6.
42. Elwan MA, Sakuragawa N. Evidence for synthesis and release of catecholamines by human amniotic epithelial cells. *Neuroreport* 1997;8:3435-8.
43. Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, Itakura T, Sakuragawa N. Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a

potential source of donor for transplantation therapy. *Exp Neurol* 2000;65:27-34.

44. Zhao P, Ise H, Hongo M, Ota M, Konishi I, Nikaido T. Human amniotic mesenchymal cells have some characteristics of cardiomyocytes. *Transplantation* 2005;79:528-35.

45. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. Mesenchymal stem cells in the wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem cells* 2004;22:1330-37.

46. Saraugaser R, Lickorish D, Baksh D. Human umbilical cord perivascular(HUCPV) cells: A source of mesenchymal progenitors. *Stem cells* 2005;23:220-29.

47. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem cells* 2007;25:319-31.

48. Demetriou AA, Watanabe F, Rozga J. Artificial hepatic support systems. *Prog Liver Dis* 1995;13:331-48.

49. Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Quinn G, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology* 2007;46:219-28.

50. Ong SY, Dai H, Leong KW. Inducing hepatic differentiation of human mesenchymal stem cells in pellet culture. *Biomaterials* 2006;27:4087-97

51. 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.

52. Conget PA, and Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell Physiol* 1999;81:67-73.

53. Chichester CO, Fernandez M, Minguell JJ. Extracellular matrix gene expression by human bone marrow stroma and by marrow fibroblasts. *Cell Adhes Commun* 1993;1:93-9.
54. Bossolasco P, Corti S, Strazzer S, Borsotti C, Del Bo R, Fortunato F, et al. Skeletal muscle differentiation potential of human adult bone marrow cells. *Exp Cell Res* 2004;295:66-78.
55. Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci* 2003;10:228-41.
56. Vogel W, Grünebach F, Messam CA, Kanz L, Brugger W, Bohring HJ. Heterogeneity among human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and neural progenitor cells. *Haematologica* 2003;88:126-33.
57. Covas DT, Siufi JL, Silva AR, Orellana. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Brazilian J of Med Biological Research* 2003;36:1179-83.
58. Baksh D, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 2004;8:301-16.
59. Tosh D, Strain A. Liver stem cells-prospects for clinical use. *J Hepatol* 2005;42 Suppl 1:75-84.
60. Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000; 32:19-31.
61. Jung J, Zheng M, Goldfarb M, Zaret KS. Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors. *Science* 1999;284:1998-2003.
62. Wells JM, Melton DA. Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers. *Development* 2000;127:1563-72.

63. Tong JZ, Bernard O, Alvarez F. Long-term culture of rat liver cell spheroids in hormonally defined media. *Exp Cell Res* 1999;189:87-92.
64. Miyajima A, Kinoshita T, Tanaka M, Kamiya A, Mukoyama Y, Hara T. Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11:177-83.
65. Kamiya A, Kinoshita T, Ito Y, Matsui T. Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer. *EMBO J* 1999;18:2127-36.
66. Kaufmann PM, Fiegel HC, Kneser U, Pollok JM, Kluth D, Rogiers X. Influence of pancreatic islets on growth and differentiation of hepatocytes in co-culture. *Tissue Eng* 1999;5:583-96.
67. Chan TS, Shangari N, Wilson JX, Chan H, Butterworth RF, O'Brien PJ. The biosynthesis of ascorbate protects isolated rat hepatocytes from cumene hydroperoxide-mediated oxidative stress. *Free Rad Bio Med* 2005;38:867-73.
68. Kinoshita T, Miyajima A. Cytokine regulation of liver development. *Biochim Biophys Acta* 2002;1592:303-12.
69. Sanchez A, Alvarez AM, Pagan R, Roncero C, Vilaro S, Benito M, et al. Fibronectin regulates morphology, cell organization and gene expression of rat fetal hepatocytes in primary culture. *J Hepatol*. 2000;32:242-50.
70. Strain AJ, Ismail T, Tsubouchi H, Arakaki N, Hishida T, Kitamura N, et al. Native and recombinant human hepatocyte growth factors are highly potent promoters of DNA synthesis in both human and rat hepatocytes. *J Clin Invest* 199;87:1853-7.
71. Gomez-Lechon MJ, Castelli J, Guillen I, O'Connor E, Nakamura T, Fabra R, et al. Effects of hepatocyte growth factor on the growth and metabolism of human hepatocytes in primary culture. *Hepatology*

1995;21:1248-54.

72. Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, et al. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;279:500-4.

73. Wang PP, Wang JH, Yan ZP, Hu MY, Lau GK, Fan ST, et al. Expression of hepatocyte-like phenotypes in bone marrow stromal cells after HGF induction. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;320:712-16.

74. Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002;109:1291-302.

75. 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;328:258-64

76. Kamiya A, Kojima N, Kinoshita T, Sakai Y, Miyajima A. Maturation of fetal hepatocytes in vitro by extracellular matrices and oncostatin M: induction of tryptophan oxygenases. *Hepatology* 2002;35:1351-9.

77. Sakai Y, Jiang J, Kojima N, Kinoshita T, Miyajima A. Enhanced in vitro maturation of fetal mouse liver cells with oncostatin M, nicotinamide, and dimethyl sulfoxide. *Cell Transplant* 2002;11:435-41.

78. Shi XL, Qiu YD, Li Q, Xie T, Zhu ZH, Chen LL, et al. Hepatocyte-like cells from directed differentiation of mouse bone marrow cells in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 2005;26:469-76

79. Kamiya A, Kinoshita T, Miyajima A. Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways. *FEBS Lett* 2001;492:490-4.

80. Chien CC, Yen BL, Lee FK, Lai TH, Chen YC, Chan SH, et al. In

vitro differentiation of human placenta-derived multipotent cells into hepatocyte-like cells. *Stem cells* 2006;24:1759-68

81. Talens-Visconti R, Bonora A, Jover R, Mirabet V, Carbonell F, Castell JV, et al. Hepatogenic differentiation of human mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *World J Gastroenterol* 2006;12:5834-45.

Abstract

The differentiation of stem cells derived from human amnion and umbilical cord into hepatocyte-like cells in vitro

Yoon Jung Lee

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Dong Jae Cho)

Among adult stem cells, mesenchymal stem cells isolated from bone marrow have been considered an attractive means of cell-based treatment and tissue formation because they support hematopoiesis and can be differentiated into various tissues including cartilage, bone and fat tissue. Recently it has been found that mesenchymal stem cells can be isolated from tissues other than bone marrow. Amnion and umbilical cord are easily obtainable and they express various genes known to be expressed only in embryonic stem cells. In addition, they show higher differentiation ability than bone marrow and can be stored frozen conveniently, and it is relatively easy to isolate mesenchymal stem cells from them. The present study investigated the characteristics of stem cells isolated from

the tissues of amnion and umbilical cord and cultured, established culture conditions for inducing their differentiation into hepatocyte-like cells(HLC), and compared the possibility of the differentiation of stem cells derived from human amnion and umbilical cord into HLC. Amnions and umbilical cords used in the research were collected from Caesarean section or vaginal delivery of normal term women under their consent, and were used in the experiment. After stem cells were isolated from the amnions and umbilical cords and cultured, we performed RT-PCR, immunocytochemical analysis, and experiment on differentiation into mesodermal cells. After inducing the differentiation of human amnion-derived stem cells (HAM) and human umbilical cord-derived stem cells (HUC) into HLC, we examined the expression of hepatocyte specific genes, measured albumin secretion and urea synthesis, and conducted immunoblotting, immunocytochemical staining and PAS staining.

1. According to the results of RT-PCR, HAM and HUC were found to express genes such as Oct-4, SCF, FGF-5, NCAM, nestin, vimentin, CK18, GATA-4, BMP-4, HNF-4 α , HLA ABC and HLA DR. In HUC before induction of differentiation into HLC were expressed CK18, BMP-4, HNF-4 α , CYP3A4, α 1-AT, HNF-1 α , PEPCK, CX32 and transferrin gene, and in HAM were expressed CK18, BMP-4, HNF-4 α , CYP3A4 and α 1-AT gene.

2. According to the results of immunocytochemical analysis, in HAM were expressed collagen I, II, III, IV, XII, fibronectin, CD44, CD54, α -SMA, vimentin, desmin, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 and HLA ABC protein. In HUC were expressed collagen I, II, III, IV, XII, fibronectin, CD44, CD54, α -SMA, vimentin, desmin, SSEA-3, SSEA-4, vWF and HLA ABC protein.
3. It was observed that HAM and HUC differentiated into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes.
4. In differentiation into HLC, HUC showed higher secretion of albumin protein synthetic and higher concentration of urea synthetic than HAM. HUC differentiated into HLC most efficiently in DM4 medium among differentiation culture conditions.
5. According to the result of SDS-electrophoresis and immunoblotting, HUC before the induction of differentiation into HLC did not secrete albumin but those after the induction of differentiation secreted albumin.
6. Using immunocytochemical staining, we proved that human albumin exists in cells differentiated into HLC.
7. Through PAS staining, we observed that glycogen was not accumulated in HUC before the induction of differentiation but it was accumulated in cells after the induction of differentiation in DM4.

Through the results of this study presented above, HUC

are more likely to differentiate into HLC than HAM. In addition, we induced differentiation into HLC under several differentiation culture conditions in order to find the culture condition most efficient for inducing HUC to differentiate into HLC. Further research is required to establish the optimal condition for differentiating HAM and HUC into HLC, and such a study is considered to contribute to stem cell treatment and improve the effect of HLC transplantation for liver disease patients.

Key Words : hepatocyte-like cells, human amnion-derived stem cells, human umbilical-cord-derived stem cells, differentiation, albumin