

성인 중간엽 줄기세포의 계대 배양에 따른 특성 변화

연세대학교 의과대학 정형외과학교실¹, 연세대학교 BK21 의과학과²

김윤희² · 선현진² · 한승환¹ · 이진우^{1,2}

Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells during Serial Subculture

Yun Hee Kim², Hyun Jin Sun², Seung Whan Han¹, Jin Woo Lee^{1,2}

Department of Orthopaedic Surgery¹, Brain Korea 21 Project for Medical Science²,
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

성체 줄기 세포

줄기세포는 사람의 배아를 이용해 만들 수 있는 배아줄기세포 (embryonic stem cell)와 제대혈 및 성체의 골수와 혈액 등에서 추출한 성체줄기세포 (adult stem cell)로 나누어 볼 수 있다. 배아 줄기세포는 장차 인체를 이루는 모든 세포와 조직으로 분화할 수 있는 세포로 알려져 있고, 골수에 다량 존재하는 성체 줄기세포 (adult mesenchymal stem cell)는 크게 조혈모 줄기세포 (hematopoietic stem cell)와 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell)로 나눌 수 있는데, 조혈모 줄기세포는 적혈구, 면역세포, 혈소판 등의 혈구세포로, 중간엽 줄기세포는 골아세포, 연골세포, 지방세포, 근육세포, 신경세포 등으로 분화할 수 있다. 성체 줄기세포는 면역학적 문제 및 추출의 용이 등의 장점을 가지고 있으며, 자가 이식을 통한 조직 재생의 이용가치를 가지고 있으며 현재 다양한 임상 시험 평가가 진행 중이다 (Table 1). 그러나 조직 재생이나 치료에 적용할 만큼의 충분한 양의 중간엽 줄기세포를 확보해야 하는 점, 시험관 배양중의 증식 및 분화 효율 등은 앞으로 해결

해야 할 과제로 여전히 남아 있다.

중간엽 줄기세포의 특성

1. 세포의 형태

중간엽 줄기세포는 골수, 제대혈, 말초 혈액, 간 및 운혈액 등에 존재하며, 골수의 단핵 세포 중 0.001~0.1% 비율로 존재한다. 중간엽 줄기세포는 시험관에서 배양되면서 빠른 속도로 자가 증식을 하고, 크기가 좀 더 큰 세포일수록 50 계대 배양에서 증식의 감소를 보이는 것으로 보고되었으며, 분화 되지 않은 세포는 spindle-shape의 섬유아세포와 유사한 형태를 지니고 있다 (Fig. 1).

2. 표면 항원

말초혈액과 달리 중간엽 줄기세포는 여러 종류의 비 특이적 표면항원 (surface marker)을 발현하며, 아직도 대변할 수 있는 단일 표면항원이 밝혀지지 않은 상태이다 (Table 2). 일반적으로 중간엽 줄기세포는 혈구세포 (hematopoietic cell)의 특이적 항원인 CD34, CD45, CD14 또는 내피세포 (endothelial cell)의 CD34, CD31, VWF 등을 발현하지 않는다. 골수에 서 추출한 줄기세포는 시험관 배양시 CD34의 표면

책임저자: 이진우, 연세대학교 의과대학 정형외과학교실
Tel: 02)2228-2190, Fax: 02)363-1139
E-mail: ljwos@yumc.yonsei.ac.kr

* 위 연구는 21세기 프론티어 연구 개발 사업단인 세포응용 연구사업단의 연구비지원 (SC3020)에 의해 수행되었음.

Table 1. Case studies and phase I clinical trials in a variety of conditions that employed mesenchymal stem cells (Kassem M. Colning Stem Cells. 2004 논문에서 발췌)

Induction	Number of Patients	Cells used and route of decolvery	Results	Reference
Large bone defect	3	Autologuse MSC mixed with hydroxyapatite scaffold	Improved bone repair	(Quarto, et al., 2001)
Osteogenesis imperfecta	3	Mixed allogenic bone marrow transplantation	New bone formation and some clinical improvement	(Horwitz, et al., 1999)
Myocardial infarct	60	Autologous mono-nuclear bone marrow cells (mixed hematopoietic and stromal cells)	Improved global left ventricle function in	(Wollert, et al., 2004)
Peripheral ischemia in lower extremities	22	Autologous mono-nuclear bone marrow cells (mixed hematopoietic and stromal cells)	Improved clinical parameters related to vascular supply	(Tateishi-Yuyama, et al., 2002)
Metchromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome	4/6	Allogenic MSC transplntation of HLA-identical sibling	Well tolerated and some improvement in neurological functions	(Koc, et al., 2002)
Severe idiopathic aplastic anemia	1	Allogenic MSC transplantation	Improved stromal functions	(Fouillard, et al., 2003)
Bone marrow transplantation of Breast cancer patients	28	Allogenic MSC together with peripheral blood progenitor cells infusion	Well tolerated and improved haematological recovery	(Koc, et al., 2000)
Chronic non-healed skin wound	3	Autologous bone marrow (mixed hematopoietic and stromal cells) implantation	Dermal rebuilding and closure of non-healed wounds	(Badiavas, et al., 2003)

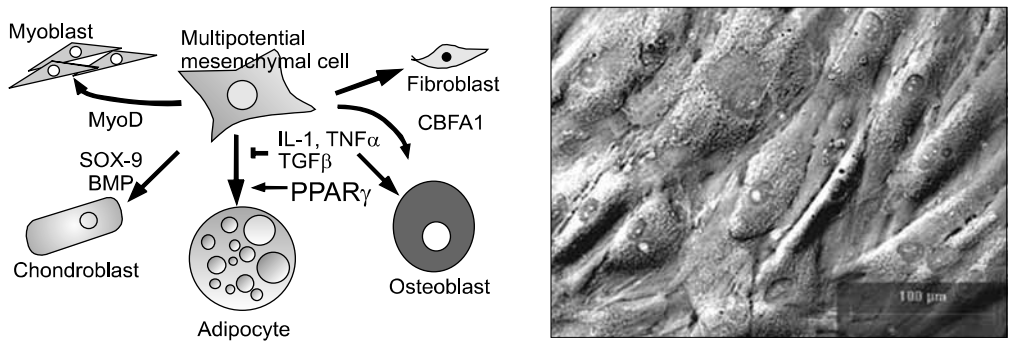


Fig. 1. Differentiation paradigm and related signals and phase contrast photomicrograph showing a confluent layer of cultured MSCs (magnification ×200).

항원은 여전히 존재하지 않으나, 간에서 추출한 줄기 세포의 경우 계대 배양 중 CD34+ / CD50-의 표면 항원을 가지며, 이러한 세포가 중간엽 줄기세포와

유사한 분화 기능을 보였다. 일반적으로, 중간엽 줄기세포는 CD44, CD29, CD90 (부착 관련 인자)과 SH-2, SH-3, SH-4, inter-

Table 2. 골수에서 분리한 중간엽 줄기세포의 표면항원

CD locus		CD locus	
Cytokine and growth factor receptors		Adhesion molecules/integrins	
IL-1R (CD121)	IL-3R (CD123)	ICAM-1 (CD54)	Endoglin (CD105)
IL-4R (CD124)	IL-6R (CD126)	ICAM-2 (CD102)	L-selection (CD62L)
IL-7R (CD127)	GCSFR (CD114)	ICAM-3 (CD50)	P-selection (CD62P)
TNF- α 1R (CD120a)	TNF- α 2R (CD120b)	VCAM (CD106)	E-selection (CD62E)
PDGFR (CD140a)	Interferon R (CD119)	NCAM (CD44)	
Extracellular matrix proteins		Others	
β 1 integrin (CD29)	VLA- α 1 (CD49a)	SH-2 (CD105)	STRO-1
β 3 integrin (CD61)	VLA- α 5 (CD49e)	SH-3 (CD73)	Thy-1 (CD90)
Fibronectin	Hyaleronan	SH-4 (CD73)	

leukin-1R, TNF- α R 등을 발현하며, 이러한 발견은 중간엽 줄기세포를 고효율적으로 분리하는 데에 이용되어지고 있으나, CD44, CD29 및 CD90은 중간엽 줄기세포에만 국한되지 않고 여러 종류의 세포에서도 발현하는 것으로 특이적 항원이라고 할 수 없다.

최근에 혈구세포에는 발현하지 않고 골수의 중간엽 줄기세포에서 관찰된 STRO-1의 경우, STRO-1에 양성인 세포들에서 CFU-F (fibroblast-colony forming units)가 10~20배 증가하였고, CD106은 골수의 중간엽 줄기세포에서는 발현하나 골아세포의 분화가 진행되면 발현하지 않는 것으로 보고되었다. 기술한 바와 같이 여러 세포군에서 중간엽 줄기세포만을 특이적으로 분리하기 위한 특이적 표면항원의 개발 연구가 요구되며, 이를 보완하고자 여러 표면항원을 복합적으로 사용하여 세포를 분리하고 있으나, 여전히 순수분리에 대한 한계를 극복하지 못하는 단점이 있다.

계대 배양에 의한 특성 변화

중간엽 줄기세포의 증식 및 분화능은 연령, 성별 및 계대 배양 정도 등의 다양한 인자에 의해 영향을 받는 것으로 알려지고 있으며, 특히 성별보다는 연령에 의해 좌우되는 경향을 보이고 있으나, 이에 대한 연구 결과도 상반된 결과를 보이고 있다. 동물의 경우 연령에 의해 성장 동역학과 골아세포로의 화능

등의 차이를 보이지만, 사람에 있어서는 연령에 의해 나타나는 결과가 상반되어 보고되고 있다.

그 중에서도 세포의 크기가 작은 세포가 증식이 빠르고, 골아세포, 지방세포 및 연골세포로의 분화 능력도 높다고 보고되었다. 중간엽 줄기세포를 고 농도로 분주할 경우 계대배양이 여러번 반복되면서 세포의 형태는 동일하나, 세포 자체의 다분화 능력이 떨어짐이 보고되었으며, 특정 세포로의 분화능에 대해서만 감소한다는 결과도 보고되고 있다. 계대 배양뿐만 아니라, 여러 요인에 의해 나타날 수 있는 중간엽 줄기세포의 제한된 증식력과 분화능을 향상시키고자 telomerase 형질 도입, 세포의 기질 및 성장인자의 처리 등 다양한 방법이 시도되고 있으나, 확실한 기전은 보고되지 않았다. 뿐만 아니라, 골수에서 분리한 중간엽 줄기세포의 경우, 다양한 종류의 세포군으로 형성되어 있기 때문에, 줄기세포 혹은 하나의 단일 줄기세포만을 분리하는 방법이 필요하며, 이러한 방법은 분화의 효율을 최대화 할 수 있을 것이다.

프로테오믹스를 이용한 계대 배양에 따른 단백질 변화

본 연구에 의해 골수에서 채취한 중간엽 줄기세포로부터 계대 배양과정중의 전체 단백질의 변화양상을 알아보려고 하였다. 세포를 7 계대까지 1:3의 비율로 배양하였으며, 배양시간이 지날수록 크

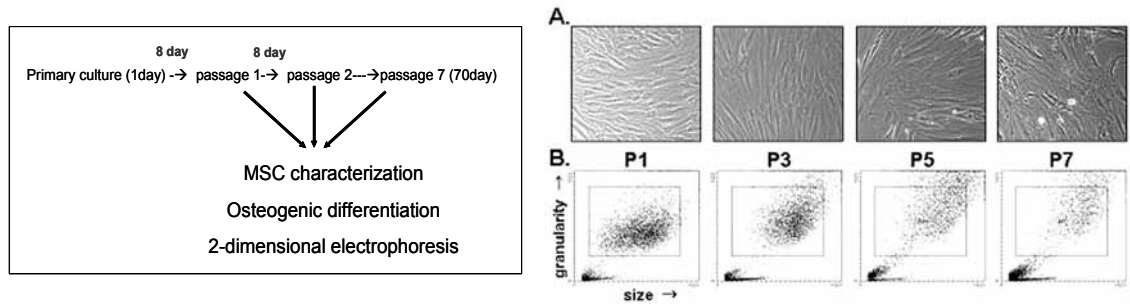


Fig. 2. 배양 모식도 및 계대배양에 따른 세포의 형태 변화 및 세포의 비대화

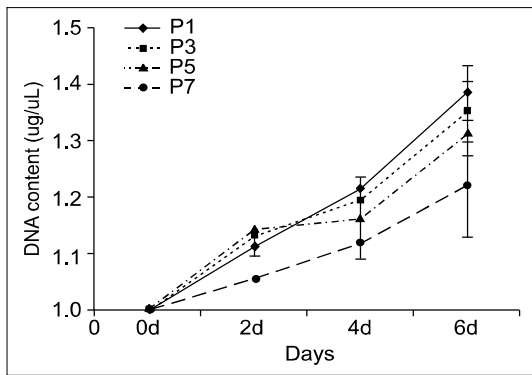


Fig. 3. 계대 배양에 따른 중간엽 줄기세포의 증식률

기가 크고 넓적하며 과립이 많은 세포의 형태로 변화하였다 (Fig. 2).

기존의 연구결과에서 계대 배양에 의한 세포의 형태 비대화가 보고되어 왔으며, 이는 계대 배양이 중간엽 줄기세포의 세포 크기, 모양 등의 특성 변화에 영향을 미치는 것으로 인식되고 있다. 세포의 모양 변화뿐만 아니라, 세포의 양성 표면항원 (CD 105 & CD29)의 변화 관찰에서 7 계대에서 급격히 감소하였고, 음성 표면항원 (CD34 & CD14)는 1.5% 이하로 변화가 없었다. 기본 배양액에서 각 계대별 중간엽 줄기세포를 6일간 배양한 후, DNA량을 측정할 결과, 계대 배양에 의해 중간엽 줄기세포의 증식이 통계적으로 유의하게 감소하였다 (Fig. 3). 뿐만 아니라, 6 계대 배양에 의해 ALP (alkaline phosphatase) 활성, Alizarin red 염색 및 칼슘 침착량이 점차 감소하였고, 제 5 및 7 계대에 통계적으로 감소를 보였다 (Fig. 4).

계대 배양에 따라 프로테오믹스를 이용한 단백질 변화는 세포 주기, 증식, 사멸 등과 관련된 단백질, annexin A1, chain B, Cathepsin D, T-complex protein (TCP) 1, α subunit, chaperonin containing TCP1 (CCT), subunit 3, 세포 구조와 관련된 capping protein (actin filament), gelsolin-like 등의 변화 단백질을 발굴하였다 (Table 3). 특히, TCP1은 계대 배양에 의해 점차 감소하였으며, 특이적 항체에 의한 단백질 발현 감소가 확인되었다. 그러나 분화 조절 인자와 관련된 단백질 변화는 관찰되지 않았다. TCP1은 cytosolic chaperonin containing T-complex polypeptide 1 CCT)의 8개 subunit 중의 하나이며, 이러한 단백질은 actin이나 tubulin 등의 cytosolic protein folding에 관여한다고 알려져 있으며, CCT 발현이 세포 증식과 세포주기 등에 밀접하게 관련된다고 알려져 있다. 또한 CCT subunit 중 일부가 분화 과정에서 감소한다고 보고되기도 하였다.

일반적으로 중간엽 줄기세포의 골아세포로의 분화 과정동안 세포의 증식률이 감소한다고 알려져 있다. 따라서, 이러한 가설을 증명하기 위해 초기 배양세포를 골아세포로 분화시킨 후, TCP1의 발현을 측정할 결과 감소하는 것이 확인되었다. 이는 계대 배양에 따른 중간엽 줄기세포의 증식 및 골아세포로의 분화능의 감소와 관련된 중요한 인자로서 TCP1의 역할 가능성을 추측할 수 있다.

종합해보면, 골수에서 채취한 중간엽 줄기세포는 계대 배양에 의해 세포의 비대화 및 과립의 증가와 함께 증식률이 점차 감소한다. 또한 골아세포의 분화능 (Alkaline phosphatase activity & 칼슘 침착)이

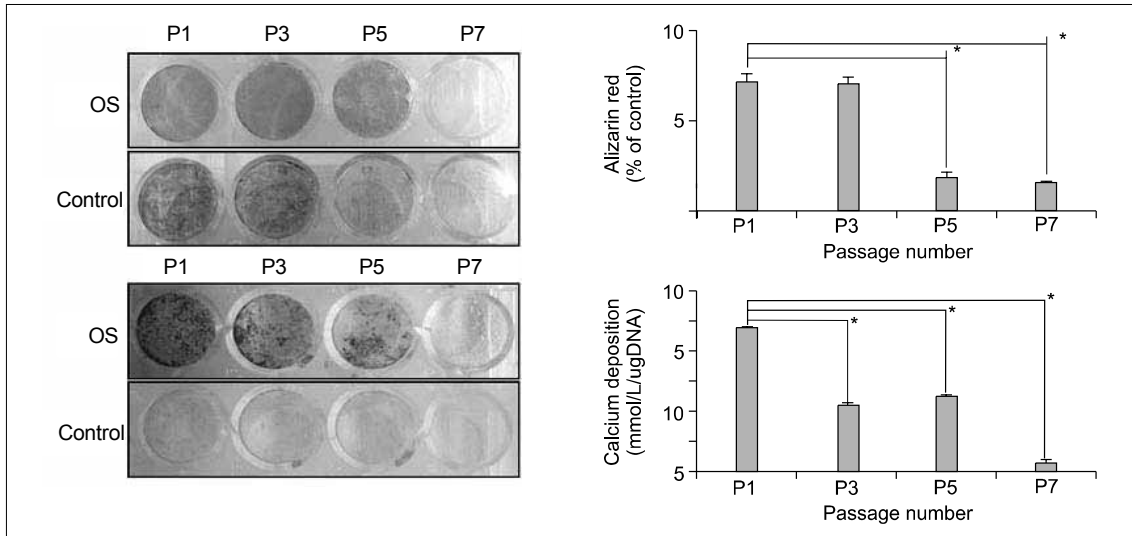


Fig. 4. 계대 배양에 따른 중간엽 줄기세포의 골아세포능 분석

Table 3. 프로테오믹스를 이용한 계대 배양 중 변화 단백질

No.	Protein identity	Accession number
Up-regulated		
1	Annexin A1	NP_000691.1
2	Pyruvate kinase (3, muscle)	S30038
3	Enolase 1: phosphopyruvate hydratase	NP_001419.1
4	Heat shock 27kD protein 1	NP_001531.1
5	Annexin A2	AAH23990.1
6	Protein disulfide isomerase-related protein	NP_005733.1
7	Proteasome 26S ATPase subunit 5	NP_002796.4
8	Chain B, Cathepsin D	ILYA
Down-regulated		
1	T-complex protein 1, alpha subunit	P17987
2	Proteasome 26S ATPase subunit 2	NP_002794.1
3	Capping protein (actin filament), gelsolin-like	NP_001783.1
4	Chaperonin containing TCP1, subunit 3	NP_005989.2

현저히 감소되며, 계대 배양에 의한 특성 변화와 관련된 단백질을 발굴하고자 프로테오믹스에서 여러 단백질이 관찰되었다. 그러나 이러한 단백질과 중간엽 줄기세포에 미치는 영향 및 기능에 대한 연구가 보고된 바가 없으며, 앞으로 더 많은 연구가 진행되어야 할 것이다. 중간엽 줄기세포의 계대 배양 중의 특성 변화 및 분화능 감소는 임상 적용을 위

한 배양 기준을 설정하는 데에 매우 중요한 기초 자료로 요구되어질 것이다.

참고 문헌

1. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential

- of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
2. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng* 1998;4:415-28.
 3. Shi S, Gronthos S, Chen S, Reddi A, Counter CM, Robey PG, et al. Bone formation by human postnatal bone marrow stromal stem cells is enhanced by telomerase expression. *Nat Biotechnol* 2002;20:587-91.
 4. Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H, Hiraoka H, Oda R, Nishimura M, et al. A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:503-8.
 5. Phinney DG, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N, Prockop DJ. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 1999;75:424-36.
 6. Burgmann H, Looareesuwan S, Viravan C, Vanijanonta S, Zedwitz-Liebenstein K, Vorbach H, et al. Serum laminin and basic fibroblast growth factor concentrations in patients with complicated *Plasmodium falciparum* malaria. *J Clin Immunol* 1996;16:278-82.
 7. Conget PA, Minguell JJ. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J Cell Physiol* 1999; 181:67-73.
 8. Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASEB J* 1990;4:3111-23.
 9. Hartl FU. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 1996;381(6583):571-9.
 10. Jia L, Young MF, Powell J, Yang L, Ho NC, Hotchkiss R, et al. Gene expression profile of human bone marrow stromal cells: high-throughput expressed sequence tag sequencing analysis. *Genomics* 2002;79:7-17.
 11. Hu Q, Piao Y, Zou F. Gene expression profiles of human bone marrow derived mesenchymal stem cells and tendon cells. *Chin Med J Engl* 2003; 16:1270-2.
 12. Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, et al. Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288:413-9.
 13. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 1998;80:985-96.
 14. Seshi B, Kumar S, Sellers D. Human bone marrow stromal cell: coexpression of markers specific for multiple mesenchymal cell lineages. *Blood Cells Mol Dis* 2000;26:234-46.
 15. Matsubara T, Tsutsumi S, Pan H, Hiraoka H, Oda R, Nishimura M, et al. A new technique to expand human mesenchymal stem cells using basement membrane extracellular matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;313:503-8.
 16. Mets T, Verdonk G. In vitro aging of human bone marrow derived stromal cells. *Mech Ageing Dev* 1981;16:81-9.