

배아줄기세포의 구조적 특징 및 질병 모델에 이식을 위한 분화 전략

김동욱
연세의대 생리학교실

연락처: 120-752 서울시 서대문구 신촌동 134
Tel: 02-361-5208
Fax: 02-393-0203
E-mail: dwkim2@yumc.yonsei.ac.kr
Running title: Fine structure and differentiation of
embryonic stem cells

Abstract

This article describes unique characteristics the cell structure of embryonic stem (ES) cells, strategies for efficient production of certain phenotypes from ES cells, analyses of differentiated cells and the evaluation of condition for transplantation.

Key words: ES cell structure, Efficient differentiation, Transplantation

1. 서론

배아줄기세포란 수정란으로부터 만들어진 배반포 (blastocyst)의 내세포괴(inner cell mass)에서 유래된 전분화능 세포를 일컫는다. 이러한 세포는 실험실에서 미분화 상태를 유지하면서 무한 증식이 가능하고, 적절한 배양 조건 하에서 몸을 구성하는 다양한 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다. 이러한 배아줄기세포의 특성으로 말미암아 이 세포는 재생의학, 발생학, 약/독성물질의 탐색 분야 등에서 폭 넓은 활용도를 가지고 있다.

20여년 전 Evans와 Kaufman¹이 처음으로 생쥐의 배아에서 배아줄기세포의 분리, 배양에 성공한 이후로 1995년 미국 Winsconsin 대학의 Thomson등은 영장류인 rhesus monkey의 배아에서 배아줄기세포를 분리 배양하였고², 마침내 1998년 인간의 배아로부터 배아줄기세포를 분리, 배양하는 데 성공하였다³. 특히, 최근 한국을 비롯 전세계 몇몇 연구실에서 인간 배아줄기세포의 확립 및 배양이 성공적으로 이루어짐으로써³⁻⁹, 과학자들은 이러한 인간 배아줄기세포가 직접적으로 불치의 병을 치유하기 위한 세포 공급원이 될 수 있으리라는 가

능성 때문에, 세포치료를 위한 배아줄기세포의 역할에 많은 관심을 기울이고 있다.

2. 배아줄기세포의 구조적 특징

배아줄기세포들은 몇 가지 공통의 특징을 갖고 있다. 이러한 세포들은 alkaline phosphatase, 세포표식인자 (인간 배아줄기세포: SSEA-3, SSEA-4, TRA1-60, TRA-1-81; 생쥐 배아줄기세포: SSEA-1등), 전사인자 Oct4, telomerase등에 있어서 높은 발현을 보이고 있다. 또한 이러한 세포는 실험실에서 오랜기간 배양 후에도 분화능을 유지하는 탁월한 능력을 가진 것으로 밝혀져 있다. 이러한 배아줄기세포의 세포 구조를 살펴보면 재미있는 특징을 발견하게 된다. 고배율의 현미경으로 배아줄기세포의 구조를 관찰해 보면 세포질에 비해 핵이 차지하는 비율이 무척 높은 것을 알 수 있다³. 이는 전자현미경을 통해 더욱 확연히 관찰된다⁹. 이러한 특징 이외에 핵 속에는 핵 인이 뚜렷이 관찰되며 세포질막이 뚜렷하지 않다. 또 하나의 큰 특징은 분화된 체세포에 존재하는 세포 내 소기관들의 부재이다. 보통의 분화된 세포에는 소포체, 골지체, 미토콘드리아 등이 존재해 세포 내외의 활동에 관여한다. 그러나 미분화 상태의 배아줄기세포에는 이러한 세포 내 기관의 발달이 잘 보이지 않으며 미성숙된 미토콘드리아, 흩어져있는 리보솜 등이 관찰 될 뿐이다. 이러한 구조적 특징은 미성숙 세포에서 관찰되는 특성으로 세포가 오직 증식을 위한 원시적 상태를 갖고 있다고 볼 수 있다.

3. 배아줄기세포의 분화 전략

이러한 배아줄기세포를 재생 의학 등의 연구에 응용하기 위해서는 원하는 세포로의 분화가 필수적이다. 배아줄기세포는 전분화능적 성질을 갖고 있으므로 이론적으로는 원하는 어떤 체세포라도 만들 수 있는 잠재성을 갖고 있다. 그러나 배아줄기세포로부터 원하는 세포를 고수율로 얻는다는 것은 그리 쉬운 일이 아니다. 자연적인 분화 과정(spontaneous differentiation)을 통해 얻는 세포의 수율은 매우 낮은 편이므로 인위적으로 분화를 유도함(directed differentiation)이 바람직하다. 이러한 분화 유도에 있어서는 흔히 두 가지 방법이 적용될 수 있다¹⁰. 하나는 각종 signaling molecule을 사용해 분화 조건의 조절을 통한 분화 유도이고, 다른 하나는 관련 유전자의 도입을 통한 분화 유도이다. 분화 과정의 조절

을 통한 유도란 동물이나 인간의 발생 과정에서 관찰되는 신호전달에 의한 배아줄기세포의 분화에 그대로 적용해 분화 프로토콜을 만드는 것을 의미한다. 예를 들어 배아줄기세포로부터 신경세포로의 분화를 유도 시 흔히 Lee 등¹¹이 개발한 5단계 분화 방법을 사용하거나 일본의 Kawasaki 등¹²이 개발한 co-culture 방법을 사용한다. 5단계 분화 방법에서는 미분화 세포로부터 배아체(embryoid body)를 만들고 그 후 무혈청 배지(serum-free medium)에서 신경 전구체(neural precursors)를 선별한다. 이러한 신경 전구체를 bFGF 존재 하에서 증식시키고, 마지막으로 bFGF 제거를 통해 분화를 유도한다. 이런 기본적인 프로토콜에서 쥐 배아줄기세포주인 D3 를 사용할 경우 약 4%의 도파민 신경세포를 얻을 수 있는데, 도파민 신경세포의 분화와 관련된 FGF8, SHH같은 signaling molecule을 신경 전구체 증식 단계에서 처리해 주고 분화 단계에서 ascorbic acid를 처리해 주면 약 11%까지 도파민 신경세포의 분화를 유도할 수 있다¹³. 반면에, co-culture의 하나인 SDIA방법에서는 쥐 skull bone marrow에서 유래된 stromal cell인 PA6를 feeder cell로 사용하고 있다(MS5 cell을 co-culture에 사용하기도 함). 이 세포는 기본적으로 배아줄기세포에서 신경세포로의 분화에 관련되는 신호 물질을 발현하여 SDIA(Stromal Cell-Derived Inducing Activity)라는 활성을 갖고 있으며 배아줄기세포의 분화를 유도한다. 이 방법에서는 특별히 분화 단계를 구분짓지 않고 미분화 배아줄기세포를 PA6 feeder layer위에 얹은 후 분화 배지만 바꿔주며 분화를 유도하게 한다. 쥐¹², 원숭이¹⁴, 인간¹⁵ 배아줄기세포 모두 이 방법에 의해 효과적으로 신경세포(특히 도파민 신경세포)로의 분화가 이루어졌다. 이 두 가지 방법의 사이에는 분명 장단점이 존재한다. 5단계 방법은 분화 과정이 길고, 덜 효과적이나 이식 시 feeder cell을 분리해 낼 필요는 없다. PA6 등을 이용한 co-culture 방법은 분화 과정이 단순하고 짧으며 분화 효율이 매우 높으나, 이식 시 feeder layer를 분리해 내야 되는 번거로움이 존재한다.

이러한 signaling molecule과 관련된 분화 조건의 조절을 통한 분화 말고도 관련 유전자의 도입에 의해 원하는 세포로의 분화를 유도할 수 있다. 예를 들어 도파민 신경세포로의 분화를 유도 시 도파민 신경세포의 발생과 관련되어 있는 전사 인자인 Nurr1 등을 도입함으로써 도파민 신경세포로의 분화를 촉진 시킬 수 있다. 그러나 이때 주의해야 할 것은 이러한 유전자의 도입시 어떤 프로모터를 이용하느냐이다. 일반 세포주와는 다르게 줄기세포는 그 기원에 따라, 분화단계에 따라 프로모터의 활성도가 다르다¹⁶. 따라서 유전자의 도입 시 그에 맞는 적절한 프로모터를 사용하고 유전자를 도입하여야 한다. 예를 들어 생쥐 배아줄기세포에서는 EF, CBA, CAG 프로모터, 원숭이 유래 배아줄기세포에서는 SV40, CAG 프로모터, 인간 배아줄기세포에서는 EF, CAG 프로모터 등의 활성이 우수하다. 이러한 프로모터 아래 원하는 유전자를 넣고, 경우에 따라 약물 내성이 있는 유

전자도 같이 넣어 카세트를 만든 후, 이를 배아줄기세포에 도입해 일시적 또는 영구적인 유전자 도입 세포주를 얻을 수 있다. 생쥐 배아줄기세포주의 경우 Nurr1유전자를 도입해 5단계 방법으로 분화 시키면 signaling molecule처리시 도파민성 신경세포를 최고 약 62-78%까지 얻을 수 있다^{13,17}. 이러한 유전자가 도입된 세포주를 PA6위에서 분화시키면 이 둘의 상승 효과로 오단계보다 더 높은 수율의 도파민 신경세포를 얻을 수 있다(미 발표자료). 따라서 각종 분화관련 signal의 조절에 의해 최적의 분화 프로토콜을 만들고 여기에 유전자가 도입된 세포주를 사용하면 상승 작용에 의해 더 좋은 분화 결과를 얻을 수 있다고 본다.

4. 분화된 줄기세포의 분석

분화된 줄기세포는 이식 실험 이전에 원하는 세포로 분화 되었는지에 대하여 marker들의 발현 확인과 기능적인 분석들이 행해져야 한다. 예를 들어 파킨슨 질환 치료에 적용을 위해 배아줄기세포로부터 도파민 신경세포로 분화를 유도하였을 때, 첫째, 이러한 분화 세포들에 관하여 도파민 세포 특이적인 marker들(예: TH 등)에 대한 분석이 immunocytochemistry 등의 분석 수단을 통해 확인되어야 한다. 그 다음에는 이것이 중뇌 세포 특이적인 다른 marker들(예: DAT, AHD2, Ptx3 등)을 발현하고 있는지 확인되어야 한다. 왜냐하면 뇌의 여러 부분에 도파민성 신경세포가 존재하므로 파킨슨 질환에 사용을 위해서는 중뇌 특이적인 세포를 얻는 것이 바람직하기 때문이다. 그 다음에 이 분화 세포가 얼마나 도파민성 신경세포의 특성을 잘 갖고 있는나에 대한 기능적 분석이 이루어져야 된다. 이러한 기능적 분석은 *in vitro* 수준에서 볼 때 전기생리학적 분석, HPLC에 의한 도파민의 생성 및 분비 등의 분석을 포함한다. 분화 연구에서 주의 해야 될 것은 분화된 세포가 비록 몇몇 원하는 marker들을 발현한다 할지라도 그것이 우리가 원하는 기능성을 갖춘 세포가 아닐 수 있다는 점이다. 따라서, 기능성에 대한 테스트 없이 marker들만의 분석으로 원하는 세포를 얻었다고 판단하는 것은 잘못된 결과를 초래할 수 있다. *In vitro* 수준에서 충분한 기능 분석이 이루어지고 나면 실험실 수준에서 얻은 결과들을 이식 실험을 통해 *in vivo*에서 그 효과를 확인해 볼 수 있다.

5. 분화된 줄기세포의 이식 실험

In vitro 수준에서 만족할만한 좋은 결과를 얻으면 그 결과를 *in vivo* 에서 확인하기 위해 이식 실험을 수행해야 한다. *In vivo* 에서 *in vitro* 결과를 확인하기 위해서는 분화된 세포들을 동물 모델에 이식하여 그 효과를 테스트하고, 더 나아가 전임상, 임상 단계로 나아가는 과

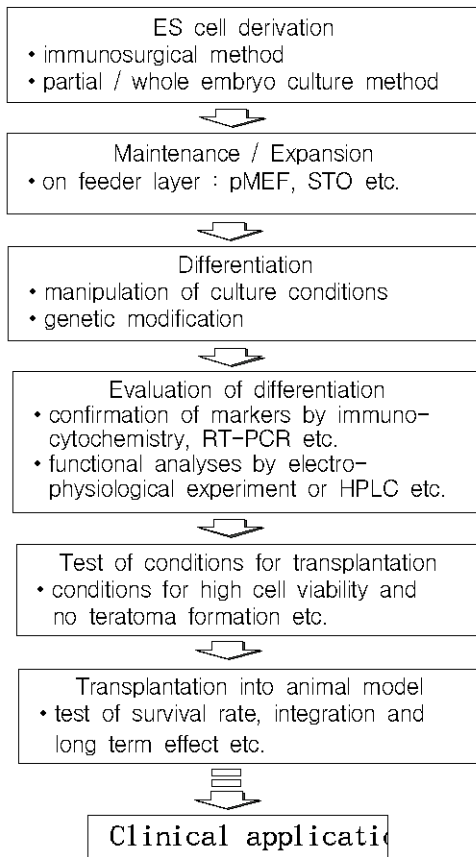


Figure 1. From derivation of embryonic stem cells to their clinical applications

정을 밟아야 한다. 초기 단계인 동물 모델에 이식하는 경우를 생각해 보면 첫째, 분화의 어느 단계에서 이식을 해야 효과가 좋을 것인가를 생각하고, 그 이식 조건을 검토하여야 한다. 일반적으로 분화가 덜된 상태에서 이식을 하면 이식된 동물 모델에서 세포의 증식이 계속 일어나 teratoma를 형성할 수 있다. 그러나 너무 분화된 세포를 이식하면 세포의 생존률이(viability) 낮아져 생체 내에서 대부분의 이식 세포가 사멸하게 된다. 신경세포로 분화 후 이식을 행할 경우에도 이러한 고려가 이루어져야 하는데 더 이상 세포 분열이 일어나지 않는 상태(post-mitotic phase; 이식 후 teratoma 형성을 막기 위함)이면서 동시에 axon등이 가장 적게 만들어진 상태(culture dish로부터 세포 분리 시 세포 손상을 줄이기 위함)가 분화 과정 중 언제인지 체크해 이러한 조건에서 이식을 행하여야 좋은 이식 결과를 얻을 수 있다. 이러한 상태는 대개 실험실에서 분화 시 신경세포 생성초기 단계에 해당된다고 볼 수 있다. 또 하나 이식 시 중요한 요소는 얼마만큼의 세포를 이식하여야 원하는 효과를 얻을 수 있는가를 검토해 보아야 한다. 이것은 이식 후 생존하는 세포의 수, 이식 효과를 보기 위한 생체 내 최소량의 세포 수 등에 대한 예비 검토를 기초로 해서 결

정되어야 한다. 아울러 이식 시 일어나는 면역 거부 반응 등에 대한 검토가 이루어져야 한다.

6. 맺는 말

지금까지 언급한 내용을 포함해 배아 줄기세포의 분리로부터 임상예의 적용에 이르기까지 일련의 과정을 요약해 모식도로 나타내면 그림 1과 같다. 줄기세포에 대한 연구가 많은 환자에게 희망을 줄 수 있는 분야인 것은 확실하다. 그러나 아직 줄기세포 연구 및 임상예에 대한 적용 등은 그 초기 단계에 머물러 있는 수준이다. 동물 모델을 비롯 생체 내에서 이식 효과를 보았다 할지라도 이식 효과와 이식 줄기세포에 대한 관계(correlation)가 과학적으로 명확히 규명되어지지 않으면 안 된다. 그것이 세포 대체에 의한 직접적 효과인지, 아니면 다른 인자에 의한 간접 효과인지 등을 포함 해 철저한 분석이 이루어져야 되는 것이다. 그리고 적어도 그것이 논문을 통해 다른 과학자들로부터 검증을 받아야 된다. 아직 초보 단계에 있는 줄기세포 이식에 대한 연구가 환자에게 보편적인 의술로 행해지기 위해서는 해결해야 될 문제들이 많이 있다. 이러한 것들 속에는 면역 거부 문제, 안정성 문제(teratoma 생성 등), 동물 유래 feeder layer의 사용에 의한 xenograft 및 바이러스 오염 문제, 염색체의 비정상화, 이식을 위한 표준화된 프로토콜의 부재, 이식 세포의 순도 문제, host와의 기능적 integration 및 지속적인 이식 효과 등에 대한 연구 등이 포함된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부 21세기프론티어 연구개발사업 세포융용연구사업단의 지원하에 진행되었음(과제번호: SC12060).

참고문헌

1. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 1981; 292: 154-6.
2. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 7844-8.
3. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282: 1145-7.
4. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. Nat Biotechnol 2000; 18:

- 399–404.
5. Park JH, Kim SJ, Oh EJ, *et al.* Establishment and maintenance of human embryonic stem cells on STO, a permanently growing cell line. *Biol Reprod* 2003; 69: 2007–14.
 6. Stojkovic M, Lako M, Stojkovic P, *et al.* Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture. *Stem Cells* 2004; 22: 790–7.
 7. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, *et al.* Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 2004; 350: 1353–6.
 8. Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, *et al.* Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 2004; 303: 1669–74.
 9. Oh SK, Kim HS, Ahn HJ, *et al.* Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines, SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3. *Stem Cells* 2005 (in press).
 10. Kim DW. Efficient Induction of Dopaminergic Neurons from Embryonic Stem Cells for Application to Parkinson's Disease. *YMJ* 2004; 45: 23–7.
 11. Lee SH, Lumelsky N, Studer L, *et al.* Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 675–9.
 12. Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, *et al.* Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 2000; 28: 31–40.
 13. Chung S, Sonntag KC, Andersson T, *et al.* Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by Nurr1 enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons. *Eur J Neurosci* 2002; 16: 1829–38.
 14. Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, *et al.* Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 1580–5.
 15. Buytaert-hoffen K, Alvarez E, Freed C. Generation of Tyrosine Hydroxylase Positive Neurons from Human Embryonic Stem Cells after Coculture with Cellular Substrates and Exposure to GDNF. *Stem Cells* 2004; 22: 669–74.
 16. Chung S, Andersson T, Sonntag KC, Bjorklund L, Isacson O, Kim KS. Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2002; 20: 139–45.
 17. Kim JH, Auerbach JM, Rodriguez-Gomez JA, *et al.* Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002; 418: 50–6.