

조류의 다능성 생식세포주 확립 및 분화 특성에 관한 연구

박 태 섭*, 한 재 용
서울대학교, 농생명공학부

Abstract

The use of pluripotent stem cells has tremendous advantages for various purposes but these cell lines with proven germ-line transmission have been completely established only in the mouse. Embryonic germ (EG) cell lines are also pluripotent and undifferentiated stem cells established from primordial germ cells (PGCs). This study was conducted to establish and characterize the chicken EG cells derived from gonadal primordial germ cells. We isolated gonadal PGCs from 5.5-day-old (stage 28) White Leghorn (WL) embryos and established chicken EG cell lines with EG culture medium supplemented with human stem cell factor (hSCF), murine leukemia inhibitory factor (mLIF), bovine basic fibroblast growth factor (bFGF), human interleukin-11 (hIL-11), and human insulin-like growth factor-I (hIGF-I). These cells grew continuously for 4 months (10 passages) on a feeder layer of mitotically active chicken embryonic fibroblasts. These cells were characterized by screening with the Periodic acid-Shiff's reaction, anti-SSEA-1 antibody, and a proliferation assay after several passages. As the results, the chicken EG cells maintained characteristics of undifferentiated stem cells as well as that of gonadal PGCs. When cultured in suspension, the chicken EG cells successfully formed an embryoid body and differentiated into a variety of cell types when re-seeded onto culture dish. The chicken EG cells were injected into blastodermal layer at stage X and dorsal aorta of recipient embryo at stage 14 (incubation of 53hrs) and produced chimeric chickens with various differentiated tissues derived from the EG cells. The germline chimeras were also successfully induced by using EG cells. Thus, Chicken EG cells will be useful for the production of transgenic chickens and for studies of germ cell differentiation and genomic imprinting.

key words; chicken, primordial germ cells, embryonic (EG) cells, in vitro culture, pluripotency

서 론

현재 전세계적으로 다능성 줄기 세포(pluripotent embryonic stem cells; ES cells)에 대한 수많은 연구가 진행 중에 있다. 이는 앞으로 무한한 가능성과 이용성으로 기초 학문 분야인 발생학 연구, 배발달 기작 연구에 활용될 수 있으며, 응용 분야로서 농업, 약학, 의학 등 여러 분야에서 응용될 것으로 예상된다. 다능성 줄기 세포는 마우스 (Evans 과 Kaufman, 1981)를 포함해서 소 (First 등, 1994), 돼지 (Wheeler 등, 1994), 토끼 (Giles 등, 1993) 등에서 체외 배양을 통하여 확립되었으며, 최근에는 인간 줄기 세포 확립까지 보고된 상황이다 (Thomson 등, 1998; Shambloott 등, 1998). 그러나 성공적인 생식선 카이메라 (germline chimera) 생산에 의한 후대 자손 생산은 유일하게 마우스에서만 보고되었다. 최근에는 다능성 줄기 세포 확립을 위하여 원시생식세포 (primordial germ cells)에 관한 연구가 활발하게 진행 중에 있다. 원시생식세포는 성성숙후 정자나 난자로 발달하는 전구 세포로서 조류의 경우 포유류와 달리, 내배엽 (epiblast)에서 유래하여 외배엽 (hypoblast)으로 이동한 후 생식선 반월 (germinal crescent)에 모이게 된다. 이후 혈관계가 형성되면 혈관을 통하여 순환하면서 최종적으로 원시생식기 (embryonic gonads)내로 정착되어 분열·분화하게 된다. Resnick 등 (1992)은 원시생식세포를 이용한 다능성 세포주 (embryonic germ cells; EG cells)를 마우스에서 보고하였으며, Labosky 등 (1994)은 이를 이용한 생식선 카이메라의 성공을 보고하였다. 그러나 생식세포주 역시 마우스에서만 생식선 카이메라가 보고되었을 뿐 타종에서의 생식선 카이메라의 생산은 보고되어 있지 않다. 가축에서의 원시생식세포를 이용한 생식세포주 확립은 소 (Cherny 등, 1994), 돼지 (Piedrahita 등, 1997, Shim 등 1997)에서 보고되었으며, 체외 배양 후 형태학적 특징 및 체외 분화 능력 등을 검증하였다.

조류의 다능성 줄기 세포에 관한 연구 결과 보고는 매우 한정되었다. Pain 등 (1996)은 최초로 닭의 배반엽 세포 (blastodermal cells)를 이용한 체외 배양을 통한 다능성 세포주를 확립하였다. 배반엽 세포로부터 유래된 줄기 세포는 체외 배양을 통하여 성공하였으며, 체외 분화 능력 검증을 통하여 다양한 조직으로 분화됨을 증명하였다. 그러나 확립된 장기 배양된 닭 줄기 세포를 이용한 생식선 카이메라는 생산하지 못했으며, 7일 단기 배양에 의해서만 생식선 카이메라를 성공하였다. 따라서, 본 연구는 원시생식기내 원시생식세포를 이용하여 장기 체외 배양을 통한 닭의 다능성 생식세포주를 확립하고자 하였으며, 확립된 생식세포주는 특성 분석 및 체외·체내 분화 능력을 검증함으로써 체세포로의 분화뿐만 아니라, 성공적인 후대 생산에 의한 생식선 카이메라를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험축

본 실험에 사용된 실험축은 생식세포주 확립을 위하여 화이트 레그혼을 이용하였으며, 체내 분화 능력 검증을 위한 수용체 배자로는 한국 재래계인 오골계를 이용하였다.

원시생식기내 원시생식세포 분리

5.5일령 (stage 28, Hamburger와 Hamilton, 1951) 화이트 레그혼 배자의 원시생식기를 적출하여 0.25% trypsin-0.05% EDTA를 5분간 처리하여 단일 세포로 분리한 후 10% 우태아혈청

이 포함된 DMEM으로 불활성화하였다.

닭 생식세포주 체외 배양

분리된 원시생식기내 원시생식세포는 24-well plate에서 800 μ l 배양액을 이용하여 배양하였다. 배양액에는 10% 우태아혈청, 2% 닭 혈청, 1mM sodium pyruvate, 2mM L-glutamine, 5.5 $\times 10^{-5}$ M 2-mercaptoethanol, 100 μ g/ml streptomycin, 100units/ml penicillin, 5ng/ml human stem cell factor (hSCF), 10units/ml murine leukemia inhibitory factor (mLIF), 10ng/ml bovine basic fibroblast growth factor (bFGF), 0.04ng/ml human interleukin-11 (h-IL-11), 10 ng/ml human insulin-like growth factor-I (IGF-I)을 혼합하여 사용하였다. 배양기는 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건으로 하였으며, 배양 7~10일에 콜로니 형성이 시작하였다. 형성된 콜로니는 파이펫에 의하여 수거하여 200 \times g에서 5분간 원심분리한 후, 24-well plate에 계대배양을 하였다. 계대배양시에는 기저 세포로 불활성화하지 않은 닭 배자 섬유아세포(chicken embryonic fibroblast; CEFs)를 사용하였다.

PAS 염색법

닭 생식세포주를 계대배양후 1% glutaraldehyde로 5분간 처리하여 고정한 후 PBS로 2회 세척하였다. Periodic Acid Solution (Sigma, USA)에 5분간 실온에서 처리 후 PBS로 세척하였으며, Schiff's Solution (Sigma, USA)에 15분간 처리하고, 2회 PBS로 세척함으로써 반응을 종료하였다.

Anti-SSEA-1 항체를 이용한 면역조직학적 검증

Anti-SSEA-1 단일 클론 항체 (MC-480) (Solter와 Knowles, 1978)를 PBS에 1,000배 희석하여 일차 항체로 이용하였다. 면역 반응은 avidin/biotin-conjugated alkaline phosphatase와 BCIP/NBT alkaline phosphatase substrate 키트를 이용하여 발색 반응을 확인하였다.

BrdU를 이용한 분열 양상 검증

분열 양상 검증을 위하여 thymidine analog bromodeoxyuridine (BrdU)를 이용하였다. BrdU는 분열 중에 있는 세포 (S-phase)의 핵에 유입되어 발색 반응을 통하여 검증하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 한 시간 처리 후 anti-BrdU 단일 클론 항체와 peroxidase/DAB system (Amersham)을 이용하여 발색 반응을 유도하였다.

체외 배양을 통한 분화 유도

닭 생식세포주의 체외 분화 능력을 검증하기 위하여 부유 배양 기법을 통한 embryoid body (EB)를 형성하였다. 형성 EB는 96 well plate에 재배양하여 다양한 조직으로의 자발적 분화를 유도하였다. 분화한 세포들은 근육 특이 항체 (actin), 내배엽 특이 항체 (endoderm, alpha-1-fetoprotein), 외배엽 특이 항체 (ectoderm, S100)를 이용하여 분화 특징을 분석하였다.

체세포 및 생식선 카이메라 생산

수용체 배자는 stage X (Eyal-Giladi와 Kochav, 1976)와 부화 53시간 (stage 14)의 한국 재래 오골계를 사용하였다. 난각에 0.5cm정도의 구멍을 낸 후 화이트 레그혼 유래 생식세포주 세포를 subgerminal cavity (stage X) 또는 혈관 (stage 14)에 미세 주입한 후, 파라필름으로 2회 밀봉하여 부화시켰다.

연구 결과

닭 생식세포주 체외 배양

닭의 원시생식기내 원시생식세포는 24-well plate에서 배양 7~10일에 콜로니 형성이 시작하였다. 형성된 콜로니는 체외 배양을 통하여 10회 계대 배양 (4개월)을 하였다. 마우스의 배아 줄기 세포와 달리, 형태학적으로 볼 때 세포간의 결합이 강하지 않았으며, 기저 세포인 닭 배아 섬유아세포와도 강한 결합을 하고 있지 않았다. 또한 콜로니의 형태도 대체로 원형을 나타내었다. 그러나 마우스의 배아 줄기 세포와 유사하게 세포의 핵이 크며, 세포가 여러 층을 형성하며 분열하였다.

PAS 염색법 및 anti-SSEA-1 항체를 이용한 면역조직학적 검증

계대 배양된 닭 생식세포주는 PAS 염색에 의해 약한 반응을 나타냈어 원시생식세포의 특성을 어느정도 유지하고 있음을 알 수 있었다. 또한, anti-SSEA-1 단일 클론 항체 (MC-480)에 의한 면역조직학적 검증은 확립한 닭 생식세포주가 계대 배양을 한 후에도 줄기 세포의 특징인 SSEA-1 epitope를 계속하여 발현하고 있음을 알 수 있었다.

BrdU를 이용한 분열 양상 검증 및 체외 분화능 검증

thymidine analog bromodeoxyuridine (BrdU)를 이용한 분열 양상 검증에는 8회 계대배양한 닭 생식세포주를 이용하였으며, 검색 결과 계대 배양 후에도 계속적으로 분열하고 있음을 알 수 있었다. 체외 분화 능력 검증은 성공적으로 부유 배양시 embryoid body를 형성하였으며, 재분화 유도 후, 각각 근육 특이 항체(actin), 내배엽 특이 항체(endoderm, alpha-1-lectoprotein), 외배엽 특이 항체(ectoderm, S100)를 이용하여 다양한 조직으로 분화하였음을 확인하였다. 이는 생식세포주가 모든 세포 계통으로 분화할 수 있음을 제시하고 있다.

체세포 및 생식선 카이메라 생산

stage X의 오골계 수용체 배자의 subgerminal cavity에 화이트 레그혼의 생식세포주를 주입하여 태어난 개체에서 체세포 카이메라가 확인되었다. 체세포 카이메라는 배, 머리 및 등에서 체세포 카이메라 양상을 보였으며, 특히 목 주변으로 하여 분포가 높았다. 이는 생식세포주가 정상적으로 배발달 과정을 통하여 체세포와 융합되어 분화되었음을 제시하고 있다. 또한 후대 검정을 통하여 주입한 생식세포주가 후대로 전달되는 생식선 카이메라도 성공적으로 생산되었다. 따라서, 본 연구는 닭의 다능성 생식세포주를 확립하였을 뿐만 아니라, 마우스이외의 동물에서 다능성 줄기 세포를 이용한 생식선 카이메라 생산에 관한 최초의 보고이다.

적 요

다능성 세포주의 확립은 현재 전세계적으로 가장 활발히 진행되고 있는 연구분야로 무한한 잠재적 가능성과 이용성이 있다. 그러나 생식선 카이메라를 포함한 완전한 다능성 세포주 확립은 마우스에서만 보고되었다. 따라서, 본 연구는 조류, 특히 닭에 있어서의 원시생식기내 원시생식세포를 이용한 다능성 및 미분화된 생식세포주를 확립하고자 하였다. 닭의 원시생식세포는 발생후 5.5일령 화이트 레그혼 배자의 원시생식기로부터 분리하였으며, 배양액으로는 DMEM을 사용하고, 성장인자로 human stem cell factor (hSCF), murine leukemia inhibitory factor (mLIF), bovine basic fibroblast growth factor (bFGF), human interleukin-11 (hIL-11), and human insulin-like growth factor-I (hIGF-I)를 사용하여 배양하였다. 닭의 생식세포주는 4개월 (계대배양 10회) 동안 불활성화하지 않은 닭 배자 섬유아세포를 기저 세포로 이용하여 배양을 할 수 있었다. 배양된 닭 생식세포주는 Periodic acid-Shiff's 반응, anti-SSEA-1 항체를 이용한 면역조직화학적 방법 및 분열 양상 등을 검증하였다. 이상의 결과로 볼 때, 배양된 닭의 생식세포주는 다능성 세포주의 특성과 원시생식세포의 특성을 가지고 있음을 알 수 있었다. 또한, 체외 분화 유도를 통하여 분화 능력을 가지고 있음을 확인하였으며, 확립된 생식세포주는 stage X의 수용체 배자 배반엽 세포층 및 혈관내 주입을 통하여 체내에서의 분화 능력을 검증하였다. 검증 결과 다양한 체세포로 분화함을 확인하였으며, 특히 성공적으로 생식선 카이메라를 최초로 생산하여, 본 연구를 통하여 확립한 닭 생식세포주가 다음 세대로의 안정적인 전달이 가능함을 제시하고 있다. 이상과 같이, 확립된 생식세포주는 앞으로 형질전환 닭 생산 및 기초 학문 연구로서 생식세포의 분화 및 기작 연구에 매우 유용하게 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고 문헌

- Allioli N, Thomas J, Chebloune Y, Nigon V, Verdier G, Legras C. 1994. Use of retroviral vectors to introduce and express the β -galactosidase marker gene in cultured chicken primordial germ cells. *Dev Biol* 165:30-37.
- Ando Y, Fujimoto T. 1983. Ultrastructural evidence that chick primordial germ cells leave the blood-vascular system prior to migration to the gonadal anlagen. *Dev Growth Differ* 25:345-352.
- Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. 1984. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309:255-256.
- Chang I, Tajima A, Chikamune T, Ohno T. 1995a. Proliferation of chick primordial germ cells cultured on stroma cells from the germinal ridge. *Cell Biol Int* 19:143-149.
- Chang I, Yoshiki A, Kusakabe M, Tajima A, Chikamune T, Naito M, Ohno T. 1995b. Germ line chimera produced by transfer of cultured chick primordial germ cells. *Cell Biol Int* 19:569-676.
- Chang I, Jeong DK, Hong YH, Park TS, Moon YK, Ohno T, Han JY. 1997. Production of germline chimeric chicken by transfer of cultured chick primordial germ cells. *Cell Biol Int* 21:495-499.

- Cherny RA, Stokes TM, Merei J, Lom L, Brandon MR, Williams RL. 1994. Strategies for the isolation and characterization of bovine embryonic stem cells. *Reprod Fertil Dev* 6:569-575.
- Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. 1985. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: Formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87:27-45.
- Doetschman TC, Williams P, Maeda N. 1988. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev Biol* 127:224-227.
- Dolci S, Williams DE, Ernst MK, Resnick JL, Brannan CI, Lock LF, Lyman SD, Boswell HS, Donovan PJ. 1991. Requirement for mast cell growth factor for primordial germ cell survival in culture. *Nature* 352:809-811.
- Donovan PJ. 1994. Growth factor regulation of mouse primordial germ cell development. *Curr Top Dev Biol* 29:189-225.
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
- Eyal-Giladi H, Kochav S. 1976. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look to the first stage of the development of the chick. I. General Morphology. *Dev Biol* 49:321-337.
- First NL, Sims MM, Park SP, Kent-First MJ. 1994. Systems for production of calves from cultured bovine embryonic cells. *Reprod Fertil Dev* 6:553-562.
- Giles JR, Yang X, Mark W, Foote RH. 1993. Pluripotency of cultured rabbit inner cell mass cells detected by isozyme analysis and eye pigmentation of fetuses following injection into blastocyst or morulae. *Mol Reprod Dev* 36:130-138.
- Godin I, Deed R, Cooke J, Zsebo K, Dexter M, Wylie CC. 1991. Effects of the steel gene product on mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 352:807-809.
- Hamburger V, Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 88:49-92.
- Koshimizu U, Taga T, Watanabe M, Saito M, Shirayoshi Y, Kishimoto T, Nakatsuji N. 1996. Functional requirement of gp130-mediated signaling for growth and survival of mouse primordial germ cells *in vitro* and derivation of embryonic germ (EG) cells. *Development* 122:1235-1242.
- Labosky PA, Barlow DP, Hogan BLM. 1994. Mouse embryonic germ (EG) cell lines: Transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell line. *Development* 120:3197-3204.
- Matsui Y, Toksoz D, Nishikawa S, Nishikawa S-I, Williams D, Zsebo K, Hogan BLM. 1991. Effect of steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature* 353:750-752.

- Matsui Y, Zsebo K, Hogan, BL. 1992. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70:841-847
- Meyer DB. 1964. The migration of primordial germ cells in the chick embryo. *Dev Biol* 10:154-190.
- Nieuwkoop PD, Sutasurya LA. 1979. The migration of the primordial germ cells. In *Primordial Germ Cells in the Chordates*. London: Cambridge University Press. pp. 113-127.
- Pain B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Sakurai M, Samarut J, Etches RJ. 1996. Long-term *in vitro* culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122:2339-2348.
- Piedrahita JA, Moore K, Lee C, Oetama B, Weeks R, Ramsoondar J, Thomson J, Vasquez J. 1997. Advances in the generation of transgenic pigs via embryo-derived and primordial germ cell-derived cells. *J Reprod Fertil (suppl)* 52:245-254.
- Piedrahita JA, Moore K, Oetama B, Lee C, Scales N, Ramsoondar J, Bazer FW, Ott T. 1998. Generation of transgenic porcine chimeras using primordial germ cell-derived colonies. *Biol Reprod* 58:1321-1329.
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. 1992. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359:550-551.
- Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci* 95:13726-13731
- Shim H, Gutierrez-Adan A, Chen L, BonDurant RH, Behboodi E, Anderson GB. 1997. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. *Biol Reprod* 57:1089-1095.
- Solter D, Knowles BB. 1978. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci* 75:5565-5569.
- Swartz WJ. 1982. Acid and alkaline phosphatase activity in migrating primordial germ cells of the early chick embryo. *Anat Rec* 202:379-385.
- Swift CH. 1914. Origin and early history of the primordial germ cells in the chick. *Am J Anat* 15:483-516.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147
- Wheeler MB. 1994. Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reprod Fertil Dev* 6:563-568.
- Wobus AM, Holzhausen H, Jakel P, Schoneich J. 1984. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 152:212-219.