

인간배아줄기세포 (SNUhES3)의 자발적 분화에 따른 내배엽세포 유전자의 발현

박용빈^{1,3} · 설혜원¹ · 김희선^{1,2} · 오선경^{1,2} · 정순간³ · 문신용^{1,2}

서울대학교 의과대학 의학연구원 인구의학연구소¹, 산부인과학교실²,
(주)삼진제약 중앙연구소³

Background & Objectives: 인간배아줄기세포는 미분화 상태로 무한히 증식할 수 있으며, 특정 분화 조건에서 다양한 세포로 분화가 이루어질 수 있는 특성을 가지고 있다. 일반적으로 배아줄기세포로부터 배양체 (embryoid body, EB)를 형성하여 일정 기간 부유 배양한 다음 이를 culture dish에 부착시켜 배양함으로써 특정 세포로 분화를 유도할 수 있다. 대부분의 분화 연구는 삼배엽성 세포종에서 외배엽 (신경세포 등) 및 중배엽세포 (심근세포, 혈액세포 등)의 분화 유도에 대해 많이 이루어져 있으나, 내배엽세포로의 분화 유도에 대한 연구는 미비한 편이다. 따라서 본 연구에서는 내배엽세포로의 분화 유도 과정을 밝히기 위한 연구의 일환으로 자발적 분화시 배양 기간에 따라 내배엽세포의 표지 유전자라고 알려진 몇몇 유전자들의 발현 양상을 조사하였다.

Method: 본 연구는 본 연구소에서 확립한 인간배아줄기세포 (SNUhES3, Passage 70)를 이용하여 EB 배양기간에 따른 cystic EB의 형성 유무를 관찰하고, EB 배양 기간 및 EB를 culture dish에 부착시킨 후 배양 기간에 따라 미분화 세포의 표지 유전자인 Oct-4, Nanog, 내배엽세포의 표지 유전자인 α -fetoprotein (AFP), Albumin, Amylase, Pdx-1의 발현 양상을 RT-PCR 방법을 이용하여 관찰하였고, 초기 내배엽세포의 표지자로 알려진 HNF3 β 의 발현을 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다.

Results: 미분화 인간배아줄기세포로부터 EB를 만들어 6주까지 부유 배양한 EB를 배양 기간에 따른 내배엽세포의 표지 유전자 발현을 확인한 결과 EB 배양 2주경부터 AFP와 pdx-1이 발현되기 시작하였으며, albumin은 모든 기간에서 발현되지 않았다. Amylase는 모든 시기에 발현이 되었으나 특히 배양 2, 3, 4주된 EB에서 발현이 증가하였다. 반면 미분화 유전자인 Oct-4와 nanog의 발현은 EB 배양 기간이 길어짐에 따라 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. 이 시기 EB의 형태적인 변화로는 EB 배양 2주경부터 simple EB에서 cystic EB의 형성이 되기 시작하였다. 따라서 내배엽세포 유전자가 많이 발현되는 배양 3주된 EB를 simple EB와 cystic EB로 나누고, simple EB를 culture dish에 부착하여 2주간 배양하여 내배엽세포 유전자 발현을 조사해 본 결과 cystic EB에서는 simple EB에서와 달리 내배엽세포 유전자가 많이 발현되었으며, simple EB의 경우 부착 배양 기간에 따라 AFP, albumin, pdx-1, amylase의 발현이 증가하는 양상을 관찰할 수 있었다. 특히 부유 배양한 EB에서는 발현이 되지 않았던 albumin이 부착 배양 7일부터 발현됨을 관찰하였다. 이들을 5주간 부착 배양한 후 초기 내배엽세포의 표지자로 알려진 HNF3 β 의 발현을 면역조직화학적 방법으로 확인한 결과 HNF3 β 가 발현된 세포군을 관찰할 수 있었다.

Conclusions: 이상의 연구 결과로 보아 본 연구실에서 확립한 인간배아줄기세포인 SNUhES3는 in vitro에서 내배엽세포로 자발적 분화가 이루어짐을 확인할 수 있었으며, 특히 내배엽세포는 simple EB 보다는 cystic EB에서 더 많이 형성되는 것으로 생각된다. 또한 simple EB의 경우는 부착 2주부터 내배엽 유전자가 많이 발현되는 것으로 보아, 내배엽 세포로의 분화유도 연구에는 cystic EB를 사용하는 것이 더 나은 것으로 사료되며, 배양 기간은 EB 배양 3주, 부착 배양 2주가 적당한 것으로 생각된다.

위 연구는 과학기술부 21세기프론티어 연구개발사업단인 세포응용연구사업단의 연구비 지원 (과제관리번호 SC11011)에 의해 수행되었습니다.

P-38 동결보존액의 조성에 따른 인간배아줄기세포의 대량 동결보존에 관한 연구

하성윤¹ · 오선경^{1,2} · 김희선^{1,2} · 구승엽^{1,2} · 지병철³ · 서창석^{1,2,3}
김석현^{1,2} · 최영민^{1,2} · 김정구² · 문신용^{1,2}

서울대학교 의과대학 의학연구원 인구의학연구소¹, 산부인과학교실²,
분당서울대학교병원 산부인과³

Background & Objectives: 인간배아줄기세포가 많은 연구실에서 효율적으로 연구되기 위해서는 대량으로 간편하게 동결할 수 있는 방법에 대한 연구가 필수적이다. 기존의 인간배아줄기세포의 동결 방법은 주로 배아의 동결보존에 사용된 방법과 같은 초자화동결법을 이용하여 왔다. 그러나 이 방법은 극히 소량의 세포만을 동결할 수 있고 액체 질소에 직접적으로 노출됨으로써 세포 오염의 가능성을 배제할 수 없다. 따라서 본 연구에서는 대량의 인간배아줄기세포를 간단하고 안전하게 동결 보존할 수 있는 방법에 대해 연구하고자 하였다.

Method: 인간배아줄기세포는 서울대 인구의학연구소에서 확립된 SNUhES3를 사용하였다. 세포군은 계대 후 5일에 가늘게 뽑은 유리 피펫을 이용해 약 200~300개 정도의 세포로 구성된 작은 세포덩어리로 잘랐다. 세포덩어리는 튜브에 모아서 가라 앉힌 후에 상층액을 제거하였다. 동결 보존액의 조성에 따른 차이를 비교하고자 동결보존액은 i) DF; 10% DMSO, 90% FBS, ii) DC; 10% DMSO, 90% 세포배양액 (20% serum replacement, 80% DMEM-F12, basic FGF 제외) iii) DEF; 5% DMSO, 10% ethylene glycol (EG), 50% FBS, 35% DMEM-F12의 세 가지 조성으로 준비하였다. 각각의 동결보존액을 모아진 세포에 처리하여 cryovial로 옮기고, freezing container (Nalgene)에서 분당 1°C씩 떨어져 -70°C가 되도록 한 후 액체질소에 보관하였다. 급속용해는 37°C 수조에서 빠르게 녹인 후 배양액으로 동결액을 희석하고 새 영양세포층 위에서 배양하였다. 용해 후 생존율을 비교하였고, 인간배아줄기세포의 특성을 유지하고 있는지 확인하기 위해 alkaline phosphatase (AP) 및 SSEA-1, 4의 발현 여부를 조사하였으며 배아체의 형성을 조사하였다.

Results: 위의 세포를 용해한 후, 10일 후의 세포군 생성률은 DEF군에서 약 14.0%로 DF (3.0%)군, DC (3.0%) 군보다 뚜렷하게 높은 것을 확인할 수 있었다. 세 번 이상의 반복실험 결과 DEF군에서 SNUhES3의 생존율은 지속적으로 12~19%를 유지하였다. 급속용해 후 세포군은 약 3~4일이 지난 후에 관찰할 수 있었으며, 10일 후에 동결하지 않은 세포군의 7일째와 비슷한 크기를 보였다. 동결보존 후의 세포는 배양 중에도 안정된 인간배아줄기세포의 형태를 가지고 있었고, 90% 이상의 계대 안정성을 보였다. 2계대 후에 AP와 SSEA-4 염색 결과 양성 반응이 나타났고, SSEA-1에 대해서는 음성 반응을 나타내어 정상적인 인간배아줄기세포의 특성을 지니고 있는 것을 확인하였다. 배아체 역시 동결보존하지 않았던 세포와 유사하게 형성되었다.

Conclusions: 인간배아줄기세포를 간편하게 대량 동결보존하기 위해서 동결방지제를 적절히 배합하여 사용해 본 결과, 안정된 생존률을 확인할 수 있었고 고유의 특성도 유지하고 있음을 알 수 있었다.