

기세포주의 분화 특성에 맞는 유도 분화에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

**Acknowledgment:** 본 연구는 21세기 프론티어 연구개발 사업단인 세포융용연구사업단의 연구비 지원 (SC12022)으로 수행되었습니다.

## P-30 인간 배아줄기 세포로부터 분화된 세포에서 MACS를 이용하여 분리한 세포주의 특성에 대한 연구

조재원 · 신현상<sup>1</sup> · 임천규<sup>1</sup> · 신미라<sup>1</sup> · 방경희<sup>1</sup>  
윤현수<sup>3</sup> · 궁미경<sup>2</sup> · 전진현<sup>1</sup>

<sup>1</sup>성균관대학교 대학 삼성제일병원 생식생물학 및 불임연구소,  
<sup>2</sup>산부인과, <sup>3</sup>미즈메디병원 의학연구소

**Background & Objectives:** 인간 배아줄기세포는 내배엽, 중배엽, 외배엽을 포함하는 삼배엽성의 배아체를 형성할 수 있으며, 이러한 삼배엽성 배아체는 growth factor나 cytokine, 유전자 발현 조절에 의해서 특정한 세포로 분화 유도될 수 있다. 본 연구에서는 분화된 인간 배아줄기세포를 magnetic cell sorting (MACS) system을 이용하여 분리한 후 RT-PCR 방법을 통하여 분리 배양된 세포의 특성을 규명하고자 하였다.

**Method:** 인간 배아줄기세포 (Miz-hESC4 cell line)는 mouse embryonic fibroblast (MEF) feeder cell 위에서 DMEM/F12 배양액을 기본 배지로 사용하여 배양하였다. 배아줄기세포의 분화를 유도하기 위하여 부유배양법을 이용하여 삼배엽성의 배아체 형성을 유도하였다. 배아체는 10% FBS가 함유된 DMEM 배양액에서 4주간 분화 유도되었으며, CD34 (hematopoietic progenitor), HEA (human epithelial antigen), fibroblast 등에 대한 항체를 이용한 MACS 방법으로 분리하였다. 분리된 세포는 각각 항체에 대한 양성 과 음성 세포로 구분하여 4주 동안 DMEM-10%FBS 배양액에서 분화를 유도하였다. 분리 배양된 세포에서 분화 특이성 유전자들에 대한 RT-PCR 분석을 통해 그들의 특성을 규명하였으며, phase contrast image를 통해 형태학적인 변화를 관찰하였다.

**Results:** 분리된 세포의 형태학적인 변화를 관찰한 결과 CD34 양성 세포는 배양 초기에는 작은 구형이었으나, 배양 후기에는 그 크기가 커지고 편평한 형태의 세포로 관찰되었다. HEA 양성 세포는 크고 넓적한 형태로 나타났으며, fibroblast 양성 세포는 길고 길쭉한 방추체 형태를 띠는 것으로 관찰되었다. 또한, RT-PCR 결과 CD34 양성 세포는 배양 초기에는  $\alpha$ -fetoprotein, flk1, enolase, renin 유전자가 발현되었으며, 배양기간이 길어짐에 따라 gata4, lmo2, flk1, enolase, renin 유전자가 발현되는 것으로 나타났다. CD34 양성 세포의 배양기간에 따른 유전자 발현 양상의 변화는 hematopoietic lineage 세포의 변화와 유사한 것으로 생각된다. Fibroblast 양성 세포는  $\alpha$ -fetoprotein, lmo2, gata2, enolase 유전자가 발현되어 이들이 내배엽 및 중배엽 유래의 세포라는 것을 간접적으로 확인하였다. HEA 양성 세포는 특이하게도 내배엽 표지 유전자인인 albumin이 발현되었으며, 외배엽 유래의 nestin, NF68kd가 발현되는 것을 확인함으로써 분리 배양된 HEA 양성 세포가 내배엽과 외배엽 유래의 세포라는 것을 확인하였다.

**Conclusions:** 본 연구의 결과를 통해, MACS system을 이용하여 분리된 세포는 각각의 분리 항체에

따라 상이한 형태학적인 변화와 분화 관련 유전자의 발현 양상을 나타냄을 알 수 있었다. 이러한 결과를 세포치료에 응용하기 위해서는 MACS system으로 분리, 배양된 세포의 특정 세포로의 유도 분화에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

---

**Acknowledgment:** 본 연구는 21세기 프론티어 연구개발 사업단인 세포응용연구사업단의 연구비 지원 (SC12022)으로 수행되었습니다.

## P-31                    Efficient Generation of Oligodendrocytes from                                   Human Embryonic Stem Cells

**Kang SM<sup>4</sup>, Cho MS<sup>1,3</sup>, Oh SK<sup>1,2</sup>, Kim DW<sup>4</sup>, Moon SY<sup>1,2</sup>**

*<sup>1</sup>Institute of Reproductive Medicine and Population, Medical Research Center,*

*<sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, College of Medicine, Seoul National University,*

*<sup>3</sup>R&D Center, Jeil Pharmaceutical CO., LTD, <sup>4</sup>Department of Physiology,*

*Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background & Objectives:** Oligodendrocytes are myelinating cells in the central nervous system (CNS) that form myelin sheaths around axons to support rapid nerve conduction. Axon demyelination can result from various CNS diseases such as stroke, spinal cord injury and multiple sclerosis. The axon demyelination often contributes to improper nerve conduction and lead to deterioration of nerve function. Human embryonic stem cells (hESC) are pluripotent and thus can serve as a valuable cell source for generation of oligodendrocytes. In this study, we attempted to make a protocol in which oligodendrocytes can be generated from hESC to treat demyelinated axon.

**Method:** hESC were grown on mitomycin-C treated STO feeder layer in Dulbecco's modified Eagle's medium F12 containing 20% serum replacement. Seven days after passage, colonies were used to form embryoid bodies (EB). Four days after EB formation, hESC were differentiated into neural progenitors through 8-day selection culture and 8-day enrichment culture. Neural progenitors were then grown in OP medium for ~10 days and then treated with MO medium for 2~3 weeks to generate oligodendrocytes.

**Results:** Most of the hESC had differentiated into neural progenitors after the selection and enrichment culture. We were able to verify this by probing with an anti-nestin antibody. These neural progenitor cells were further differentiated into oligodendrocyte precursor cells (OPC) in OP medium. The presence of OPC was confirmed by immunocytochemistry by using an antibody against A2B5. ~50% of the cells had stained positive for A2B5. Lastly, mature oligodendrocytes, which were O1-positive, were induced from OPC in MO medium.

**Conclusions:** In our study, OPC and mature oligodendrocytes were successfully induced from hESC. We are now trying to test how these cells are functional.

---

**Acknowledgement:** This research was supported by a grant (SC11011) from Stem Cell Research Center of