

장기 배양된 마우스 정원줄기세포의 특징 및 유전자 전이 정자 생산

정 동 기

제주대학교 생명자원과학대학 생물산업학부

Characterization of Long-term Cultured Mouse Spermatogonial Stem Cells and Genetic Engineered Sperm Production

Dong-Kee Jeong

College of Applied Life Sciences, Cheju National University

I. 서 론

줄기세포는 자기복제 능력뿐만 아니라 후대세포를 생산할 수 있는 능력을 동시에 가지고 있는 경우를 말한다(Morrison 등, 1997). 그러므로, 줄기세포라는 말의 의미는 기능적 분류라고 할 수 있다. 이중 정원줄기세포는 독특한 특징을 가지고 있다. 왜냐하면 성체안에서 세포분열을 통하여 끊임 없이 생산되며 다음세대에 전달하는 유일한 줄기세포이기 때문이다. 정원줄기세포는 정소세관안에 존재하며 원시생식세포(Pimordial germ cells, PGCs)화하고 이를 prospermatogonial라 부른다(McLaren and Durcov Hills, 2001). 정소세관내에 존재하는 세포에 대한 배양 연구는 일부가 시도된 바 있다. 포유류의 세르톨리세포의 특성을 분석하기 위하여 미성숙 정소에서 분리한 세르톨리 세포에 관한 연구가 보고되었다(Jakubowiak 등, 1990). 성세포 배양은 비포유류 중에서 장기간 배양에 성공했으며 세르톨리 세포 존재하에 진행되었다(Risley, 1990). 일부 또한 성세포에 유전자 전이 연구가 보고되었으며 정원줄기세포에 대한 배양 연구가 4주간 배양 후 이식했을때 성공적인 정자 생성 메카니즘을 보여 주었다(Nagano 등, 1998; Rassoulzadegen 등, 1993). 최근에는 일부 성장인자(stem cell factor)를 첨가한 배양에서 텔로머라이즈를 이용한 영구화 A spermatogonia 세포로부터 spermatocyte와 spermatid의 생산을 보고한 바 있다(Feng 등, 2002; Cooker 등, 1993). 정원줄기세포의 이식은 현재 Brinster와 Zimmerman에 의해 시도된 이식방법을 사용하고 있다(1994). 일반적으로, 몇몇의 성장인자는 spermatogonia 세포의 생존과 증식에 직접 간여하고 있는 것으로 밝혀지고 있고 이중에는 LIF, Oncostatin M (OSM), vitamin A, 그리고 epidermal growth factor(EGF)등이 주로 이용되고 있다(De Miguel 등, 1996; De Miguel 등, 1997; Haneji 등, 1986; De Rooij 등, 1998). 그러므로 본 연구에서는 정원줄기세포의 체외 완전 배양법을 개발하고 그 특징을 규명하고 궁극적으로 유전자 전이된 줄기세포를 통하여 정자를 시험관내에서 생산하고자 수행하였다.

II. 재료 및 방법

실험동물

본 실험에 사용된 마우스는 B6, 129-TgR(ROSA26-transgenic) and B6/129로 미국의 잭슨 랩으로부터 구입하여 계대 후 사용하였다. 특히 ROSA26 마우스는 lacZ 유전자를 형질전환시킨 마우스로 본 연구에서는 공여체 줄기세포 배양을 위하여 사용되었다. ROSA26 마우스는 손쉽게 X-gal 염색을 통하여 염색이 가능하여 간단하게 공여체 마우스 세포의 분화 및 정착 여부를 판단할 수 있다. 마우스는 케이지 사육하였으며 자유급식 방식을 택하였다.

세포 분리

공여체 마우스는 4~6주령 마우스를 이용하여 정소를 채취한 후 O'Brien 방법(1993)을 통하여 효소법으로 분리하였다(Nagano 등, 1998). 간단히, 정소를 분리한 후 HBSS 용액안 담근 후 tunica를 벗겨내었다. tunica가 벗겨진 정소는 collagenase type IV, 0.25 mg/ml trypsin, 0.05 mg/ml DNase가 포함된 HBSS용액 옮긴 후 15분간 shaking water bath에서 배양하였다(온도:33℃). 배양 후 현탁액을 얼름위에 5분간 저장한 다음 상층액을 제거하였다(Mclean 등, 2002). 그리고 신선한 효소액을 첨가한 후 15분간 1회 더 배양하였다. 세포액을 500g값으로 원심분리한 후 EKRB 용액에 옮긴 후 다음 과정 실험을 진행하였다.

마우스 정원줄기세포배양

정소로부터 분리된 총 세포액을 24well plate나 6well plate를 이용하여 초기 배양을 실시하였다. 배양액의 조성은 10% FBS가 포함된 DMEM 배양액에 12ng/ml mLIF, 20ng/ml FGF, 0.04 ng/ml hIL-11, 10ng/ml human stem cell factor, 1mM sodium pyruvate, 2mM L-glutamine, 5.5x 10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol, 100 ul/ml streptomycin, 100units/ml penicillin, oncostatin M (OSM), 1ng/ml platelet derived growth factor (PDGF), 15ng/ml hIGF-1을 첨가하여 초기 배양을 시작하였다. 처음 배양은 32℃에서 줄기세포가 콜로니를 형성할 때까지 진행하였다(7~12일 정도). 초기배양에서 사용된 기저세포로는 mytomycin C를 처리한 STO 세포를 이용하였다. 사용한 STO 세포는 신선한 상태를 유지하였다. 계대배양은 7~14일 간격으로 실시하였다. 모든 실험은 3반복 실행하였으며, 콜로니 사이즈는 NIH Image 1.62 프로그램을 이용하여 배양된 부위의 염색부위를 측정하여 계산하였다.

β -Galactosidase Activity

배양중인 줄기세포는 기저세포와의 차이점을 증명하고 증식정도를 측정하고자 실시하였으며 콜로니의 특징을 판명하기 위하여 β -galactosidase activity 측정을 실시하였다.

Alkaline Phosphatase Assay and Antibody 염색

정원줄기세포 콜로니는 alkaline phosphatase (AP) activity을 측정하기 위하여 66% acetone/3% formaldehyde를 이용하여 고정 처리하였으며, naphthol/AS-MX-alkaline AP substrate를 이용하여 염색하였다. 정원줄기세포의 특이적인 antibody인 GCNA1 (germ cell nuclear antigen 1)(Enders 와 May, 1994)와 c-kit antibody를 이용한 면역염색법을 위하여 줄기세포를 PBS에 포함된 3% paraformaldehyde용액으로 고정처리한 후 antibody를 반응한 후 avidin/biotin-conjugate system을 이용하여 다음 단계를 수행하였다.

정원줄기세포의 PKH26 labeling과 분리

공여체 유래의 줄기세포의 특성을 분석하기 위하여 PKH26 형광염색 kit을 이용하여 정원줄기세포를 label 한 후 특성을 분석하였다. 간단히 방법적으로 살펴보면, 줄기세포가 포함된 정원세포 수용액을 enzyme 처리하여 단일세포로 만든 후 1ml의 diluent C 용액에 첨가한다. 그런 다음 PKH26 용액을 첨가하여 5분간 labeling을 실시한다. 반응이 끝난 다음 3번의 수세과정을 거쳤다. 관찰은 550nm의 파장대 필터를 이용하여 laser confocal microscope를 이용하여 관찰하였다.

줄기세포 Proliferation assay

정원줄기세포의 배양능 및 증식능력을 측정하는 방법으로 BrdU를 이용하여 측정하였다. 먼저, 준비된 줄기세포를 37°C에서 1시간동안 BrdU 용액에 배양한 후 1X PBS에 2번 수세하였다. 그 후 추가적인 실험과정은 BrdU proliferation assay kit의 매뉴얼에 따라 수행하였다(Zymed Lab, USA). 그리고 BrdU와 반응한 줄기세포 콜로니는 anti-BrdU monoclonal antibody를 이용하여 peroxidase/DAB system을 이용하여 수행하였다(Zymed Lab, USA).

배양된 줄기세포 transplantation

LacZ 유전자가 전이된 ROSA26 형질전환 마우스로부터 분리한 정원줄기세포는 미리 busulfan(40mg/kg) 처리한 4주령의 B6/129 마우스에 이식하였다. 이식방법을 간단히 기술하면, 마취시킨 수용체 마우스의 복부를 아래쪽을 절개한 후 정소를 노출시키고 정소 세관과 연결된 efferent duct 부위를 천공한 후 미리 준비한 미세바늘을 이용하여 줄기세포를 주입하였다. 주입여부를 검증하기 위하여 줄기세포는 소량의 trypan blue를 매뉴얼에 따라 혼합한 후 이식하여 정확한 이식 여부를 판별하였다. 총 10^7 cell/ml 세포를 미세 바늘을 이용하여 주입하였다. 주입이 끝난 정소는 원상복구한 후 수술실을 이용하여 꿰맨 후 회복시켰다. 이식한 마우스는 2개월 후 부터 희생시킨 다음 주입한 공여체 줄기세포의 분화 및 세포능을 측정하였다.

정원줄기세포의 유전자 전이 및 배양

줄기세포에 유전자를 전이시키기 위하여 retroviral vector를 이용하였다. 사용된 벡터는

pMSCV vector에 본 연구 목적에 맞게 lacZ 유전자를 클로닝하여 사용하였다. 바이러스 생산은 먼저 전기충격법을 사용하여 220V 950uF 조건으로 293T 세포에 transfection 시킨 다음 바이러스를 정량하여 본 실험 목적에 맞게 정원줄기세포에 전이시킨 후 다음 실험에 사용하였다.

시험관내 분화 및 정자 생산

장기 배양된 정원줄기세포는 일반적으로 이용되는 배아줄기세포 분화 방법인 EB 법을 약간 변형하여 적용하였다. 간단히 설명하면, 먼저 배양세포 중 콜로니만 순수하게 분리하여 기저세포가 없는 코팅되어 있지 않은 배양기에 옮긴 후 배양을 진행시키면서 suspension 상태를 계속유지하였다. 배양이 진행되면서 세포 콜로니가 EB를 형성하면 이를 여러번 배양액을 교체한 후 다시 세프틀리 세포주(Dr. grisuold lab에서 확립한 세포주)와 본 연구자가 개발한 세포주를 50:50로 섞어서 기저세포를 만든 후 이곳에 옮겨서 계속배양하였다. 배양을 시도하면서 정소내 분비되면 정자형성 호르몬을 각테일로 만들어 1주일부터 배양액에 공급하여 주었다. 그런다음 계속 1주일간 관찰하였다. 그후 콜로니가 형성되어 EB 가 만들어진 곳에서 움직이는 물체가 발견되어 촬영 후 정자임을 확인하는 추가 실험을 진행하였다.

III. 결과 및 고찰

정원줄기세포 배양

마우스의 정원줄기세포를 배양하기 위하여, 본 연구에서는 4~6주령 마우스를 실험에 사용하였다(Nagano 등, 1998). 여러 가지 성장인자가 첨가된 각테일 배양액을 제조하여 배양을 시도하였다. 배양 1주일 이 지나자, 조그마한 콜로니가 보이기 시작하더니, 시간이 경과함에 따라 콜로니의 크기는 증가하였다(Fig. 1A). 콜로니의 크기 증가는 3주일 동안(Fig. 1B) 배양하는 동안에도 증가하여 2달동안 유지되었다(Fig. 1D). 배양된 콜로니를 트립신 처리하여 계대배양을 시도하였다(Fig. 1E). 계대배양이 경과함에도 형태상의 변화 없이 8번의 계대배양에 성공할 수 있었다(Fig. 1F).

마우스 정원줄기세포가 포함된 생식세포는 또한 Mitomycin 처리한 STO 세포를 기저세포로 하여 배양을 시도하였다. 여러번의 계대배양을 거치고 나서 미분화 상태를 표시하는 AP 염색을 시도하였다. 결과적으로 모든 콜로니에서 기저세포와 확연하게 구분되는 염색 양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 1G 와 H). 배양이 진행됨에 따라 AP 염색의 콜로니가 증가하였다 (Fig. 2B에서 D, 화살표:AP 염색 상태를 나타냄). 반면에, 세포의 증식 및 콜로니 형성은 AP negative 세포에서는 나타나지 않았다. 그 결과에 더불어, AP positive 콜로니는 X-gal 염색에 진하게 염색됨을 확인할 수 있었다. 이는 콜로니가 ROSA26 형질전환 마우스 유래의 세포임을 증명하는 결과이다. 대조구 배양으로는(Fig. 2F) 일반 세포주 및 세르틀리세포주(MSC-1)는 AP에 염색되지 않음을 보여주고 있다. 각각의 콜로니들의 결합은 그리 탄탄하지 않아서 쉽게 단일 세포로 분리할 수 있었다.

본 연구에서는 AP 염색된 세포의 줄기세포 가능성을 검증하기 위하여 세포 배양중에서 6 well plate에서 배양 경과에 따라 AP 염색을 실시하였다 (Fig. 2A에서 F). 단일 세포에서

유래한 콜로니를 증명하기 위하여 약간 변형한 Ficoll 방법을 이용하여 초기 줄기세포가 포함된 세포군을 분리할 수 있었다(Chang 등, 1992). Ficoll 분리 후 세포는 PKH26 로 label하고서 그 세포를 배양에 이용하였다. 배양이 경과함에 따라 세포는 콜로니는 confocal laser microscope를 이용하여 관찰하였다(Fig. 3A에서 F). 줄기세포로 추정되는 세포는 크기에서 두드러졌으며 특징적으로 pseudopod와 큰 핵을 가지고 있다 (Fig. 3A와 B) (Kanatsu-Shinohara 등, 2003). 몇몇 세포들이 STO 세포 위에서 배양 2일째에 나타나고 있다 (Fig. 3C; 화살표). 이 세포들은 PKH labeled 된 단일 세포에서 유래한 콜로니들이다 (Fig. 3D에서 F).

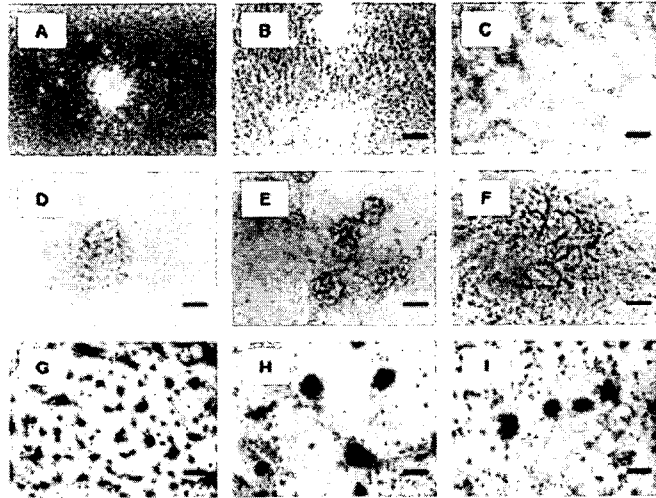


Fig. 1. Mice spermatogonial stem cell culture. Appearance of 4-week-old mice (ROSA26) testes cells cultured on the STO feeders. (A) 14-day culture. (B) 21-day culture. (C) Appearance of 1-passage cultured cells after 2-week culture (1 month total culture time). (D) 2-month culture. (E) Culture passaged 8 times, culture for 3 months total. (F) 3-month culture colony at higher magnification (400X). (G) Alkaline phosphatase (AP) activity of 1-month culture. (H) higher magnification of G. (I) AP staining of stem cell colonies passaged 3 times. Scale bar=50 um (D), 33 um (A, B, C, E, H, I), 66um (F). The experiments were repeated 3 times; each experiment comprised triplicate cultures.

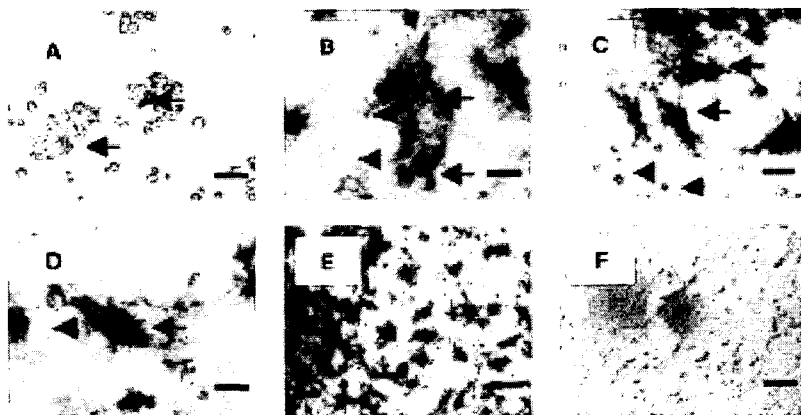


Fig. 2. Detection of stem cell proliferation using alkaline phosphatase (AP) staining method. (A) Fresh cell suspension from 4-week-old mouse testis. (B) 1-day culture. (C) 2-day culture. (D) 7-day culture. (E) X-gal staining of cell colonies (after 12 days of culture); blue color indicates cells derived from the testis of transgenic donor mice. (F) Negative control sertoli cell line, MSC-1. Arrows indicate cells with AP activity. Arrowheads indicate cells without AP activity. Scale bar= 17 um (F), 33 um (A, B, C, D, E).

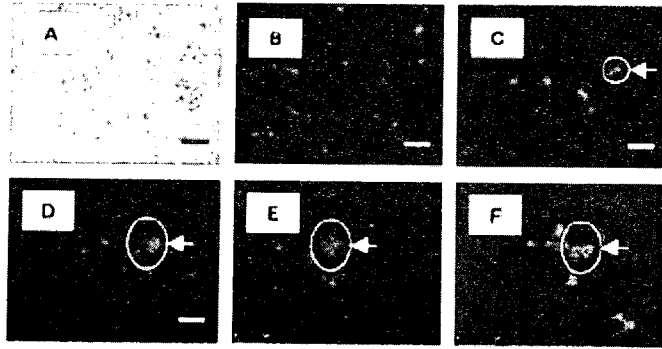


Fig. 3. Identification of spermatogonial stem cell colonies derived from single cell.

(A) Stem cells enriched by FicolI density centrifugation method after PKH26 labeling of 4-week-old murine testis cells. (B) PKH26-stained cells viewed with fluorescent light (550nm). (C) Stem cell proliferation viewed in white circle after 2-day culture period. (D) Cell colonies formed from C after 7-day culture period. (E) Proliferation of cells after 12-day culture period. (F) 21-day culture period. Scale bar= 33 μ m. The experiments were repeated 3 times; each experiment comprised triplicate cultures. Arrow indicate cells in proliferation.

정원 줄기세포의 증식에 미치는 성장인자 효과

본 연구에서 변형하여 제조한 줄기세포 배양액을 이용하여 줄기세포 배양 효과를 확인하기 위하여, 대조구로 단지 FBS만 첨가한 배양액과 비교 실험을 수행하였다. 정소로부터 분리한 세포를 각각의 배양액을 이용하여 3주간 배양한 후 X-gal 염색을 실시하였다 (Fig. 4). 콜로니의 평균 숫자는 줄기세포 배양액에서는 4주령 마우스를 이용한 실험에서는 635개였으며, 6주령 마우스에서는 113개였다. 반면에 일반 배양액을 이용한 실험에서는 4주령에서 146개와 6주령에서는 59개였다 (Fig. 3E). 줄기세포 배양액을 이용한 실험에서의 콜로니의 크기 또한 일반 배양액에 비하여 2~4배가 더 큼을 확인할 수 있었다. 그런데, 6주령 마우스에서는 줄기세포 배양액에서 조차 근소한 증가만을 보여주었다. 또한 콜로니 수에 있어서도 큰 증가를 보여주지 못했다. 본 연구에서는 또한 어떤 성장인자가 특징적으로 줄기세포의 성장에 주요하게 관여하는지를 확인하기 위하여 개별 배양을 기초 배양액에 첨가하여 수행하였다 (Fig. 5)(Ellwart 와 Dormer, 1985; Gonchoroff 등, 1986 그리고 Fukuda 등, 1990). Fig. 5A에서 보는 바와 같이 줄기세포 배양액에서는 BrdU 분석에 의한 세포가 다수 반응하는 것을 대조구에 비하여 관찰할 수 있다. 각각 성장인자에 의한 배양 결과 31%의 positive cell이 mLIF 배양액에서 관찰 되었으며, 44% positive 결과를 PDGF 배양액에서 관찰하였고 이에 반해 일반 DMEM 배양액에서는 5~7%만이 관찰되었다.

정원줄기세포의 면역생화학적 분석

본 연구에서는 정원줄기세포에 또는 줄기세포의 분화에 관련된 antibody를 이용하여 본 연구에서 배양된 콜로니를 분석하였다. 본 연구에서 사용된 antibody는 GCNA1 과 c-kit으로 GCNA1는 germ cell nuclear antigen으로 정원줄기세포 특이 마커로 사용되고 있으며 c-kit는 분화된 줄기세포에 반응하는 antibody로 널리 사용된다. 본 연구에서 Fig. 6에서처럼 두 antibody가 혼재되어 발현되는 것으로 보아서 여러 형태의 세포가 콜로니를 형성하고 있음을 알 수 있다.

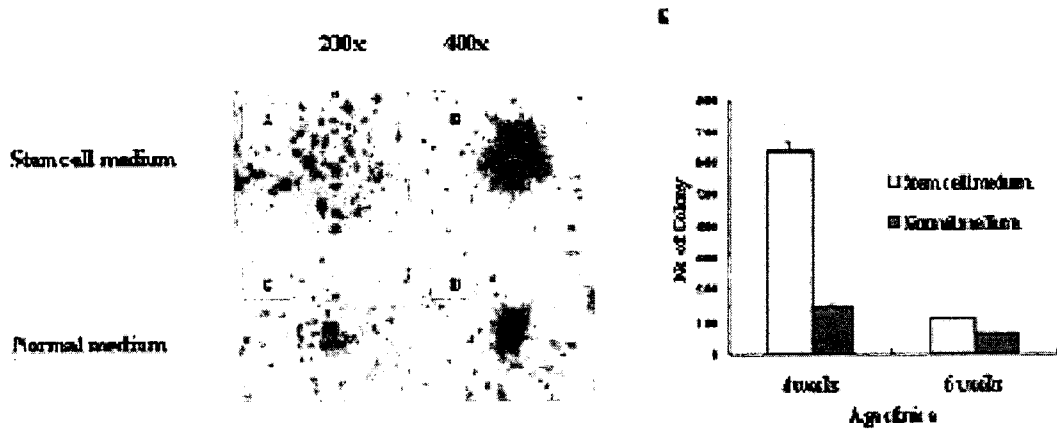


Fig. 4. Comparison of ROSA26 mice spermatogonial stem cell culture between stem cell culture medium and normal DMEM medium. (A) and (B) modified stem cell culture medium. (C) and (D) normal DMEM medium. (E) Effects of colony formation using the stem cell medium.

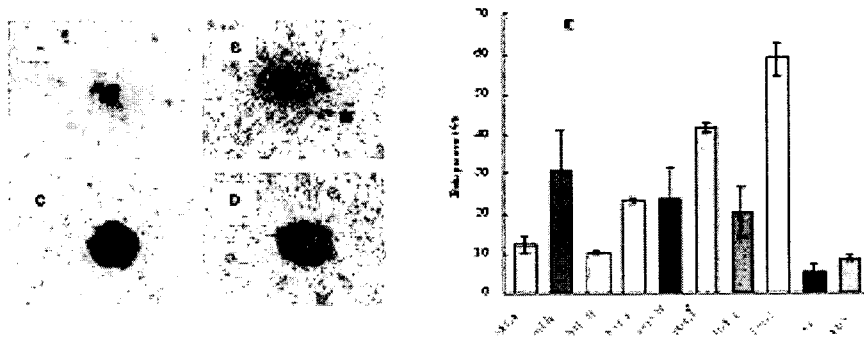


Fig. 5. Proliferation assay using BrdU. (A) Before hematoxyline staining of cell colony. (B) A few cells in the colony appear to be stained (normal medium). (C) All cell in the colony were deeply stained (total stem cell medium). (D) Outer space cell in the colony were stained. (E) Effects of several growth factors.

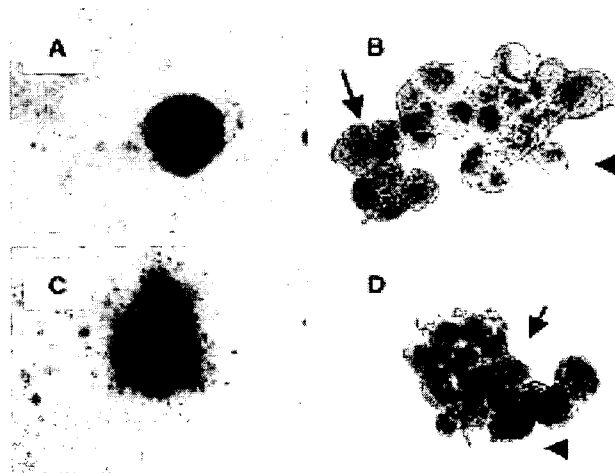


Fig. 6. Antibody staining of c-kit and GCNA1 within 4 week old mouse testis cell colonies of ROSA26. (A) c-kit. (B) GCNA1.

배양된 정원줄기세포의 이식

ROSA26형질전환 마우스로부터 분리한 정원줄기세포를 여러 가지 방법으로 배양한 후 수용체 마우스에 이식하였다. 이식 후 2주후에 바로 희생시킨 후 줄기세포의 생체내 변화를 관찰하였으며, 2달 후 공여체 배양 줄기세포가 증식하여 정자를 생산하였는지에 대한 결과를 분석하였다 (Fig. 7, Table 1)(Shinohara 등,1999, 2000, 2002). 배양된 정원줄기세포는 이식 후 2주후 희생시킨 다음 정소를 분리하여 X-gal 염색을 통하여 안정적으로 이식되어 증식되었음을 확인할 수 있었다. 또한 Table 1에서 보는 바와 같이 높은 수의 공여체 줄기세포의 생체내 콜로니 생성율을 관찰할 수 있다. 특히, 12주동안 8번의 계대배양에도 줄기세포의 특징을 잃지 않고 더 높은 콜로니 생성율을 보인 결과는 줄기세포의 안정적 증식을 증명해 주는 결과이다.

Table 1. Spermatogenesis from cultured spermatogonial stem cells after transplantation to recipient testes

Experiment	Culture period (week)	Stem cell medium	DMEM medium	STO feeder	Number of mice/testes injected	Number of Testes colonized	
						Right	Left
1	4	+	-	+	7/14	5	4
2	4	-	+	+	1/2	1	0
3	3	+	-	+	5/5	2	1
4	8	+	-	+	4/6	1	2
5	4	+	-	+	3/5	1	1
6	12	+	-	+	5/7	3	3

transplants from cryogenically preserved spermatogonial stem cells

transplants from passage cultured spermatogonial stem cells(1 passage)

transplants from passage cultured spermatogonial stem cells(8 passage for 3 months)

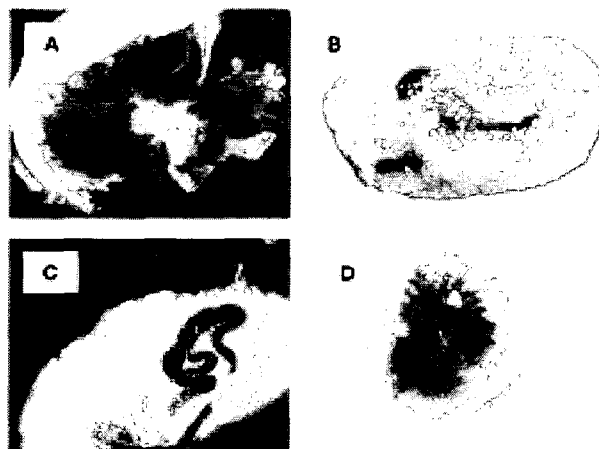


Fig. 7. Transplantation of ROSA26 spermatogonial stem cells. (A) 4 week cultured ROSA26 testis cell transplantation using stem cell culture medium (X-Gal staining after 2weeks). (B) 1 month cultured cells. (C) 2 month cultured ROSA26 spermatogonial stem cells. (D) 2 month cultured (3 times subculture) ROSA26 spermatogonial stem cells. B, C and D were stained by X-Gal staining after 2 months.

세포 배양기내에서의 유전자 전이 정자 생산

본 연구에서는 실제 수용체의 생체내에서 주입한 정원줄기세포가 분화 후 정상적인 유전자 전이 정자를 생산함을 확인할 수 있었다. 그리고 최근 또다른 연구 보고에서 시험관 내에서 일정 정도의 분화능을 확인한 실험이 보고되었다(Feng 등, 2002). 그래서 본 연구에서는 생체 정소와의 유사한 조건을 시험관 내에서 조성한 후 배양기 내에서의 정자 생성 가능성에 대하여 실험을 수행하였다. 먼저 ROSA26 마우스 유래의 정원줄기세포가 아닌 일반 마우스의 정원줄기세포를 배양한 후 본 연구에서 사용한 pMSCV β -gal 바이러스 벡터를 이용하여 생산한 바이러스를 감염시킨 후 X-gal 염색을 통하여 유전자 전이 여부를 검증하였다(Fig. 8A에서 I). Fig. 8A는 3주 배양 후 콜로니 상태를 보여 주고 있으며, 이를 단일세포로 분리한 상태의 결과(B에서 F)를 보여 주고 있으며, X-gal 염색 후 결과는 Figure D, E, G, H, I에서 보여주고 있다. 이 결과를 통하여 안정적으로 유전자가 정원줄기세포내로 도입되었음을 보여주고 있다. 이 결과를 토대로 하여 본 연구에서는 콜로니를 세포 배양용기로부터 각각 분리하여 Patridish (배양을 위한 코팅이나 처리가 안 된 dish)에 옮긴 후 Suspansion culture를 실시하였다(Polejaeva 등, 1997). 배양하는 동안 일부는 AP activity를 측정하였다(Fig. 9). Fig. 9에서 보는 바와 같이 배양이 진행됨에 따라 embryoid body (EB)와 유사한 형태로 배양이 진행됨을 알 수 있었으며, 특이적으로 AP activity가 점점 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 9 (B에서D)). 실험 초기에는 세포가 죽어가는 것으로 판단하여 trypan blue로 확인하였으나 이상을 발견할 수 없었다. 1주간 또는 그 이상 배양 후 다시 생체내 정소 조건과 유사한 상태인 세르톨리 세포주, leydig cell 그리고 그 외 정소내 생체 세포를 조합한 세포주 내로 옮긴 후 배양을 계속하였다. 주기적으로 정자 형성에 관여하는 호르몬 처리하여 배양한 결과 Fig. 10에서와 같이 일부 콜로니에서 운동성을 가지고 있는 정자를 발견할 수 있었다. 정자의 침체와 그밖 모양이 정확하게 생체 내 정자와는 일치하지 않은 것으로 판단되나 운동성을 유지하는 정자가 생성되는 것을 확인할 수 있었다. 그와 별개로 분화 직전의 줄기세포를 정소내 이식하여 수용체 정소내에서의 유전자 발현율을 측정한 결과 유전자 전이된 정원줄기세포가 안정적으로 발현되는 것을 확인할 수 있었다(Table 2).

Table 2. Retroviral mediated lacZ gene transduced spermatogonial stem cell colonization of recipient mouse testes.

Procedure	Months after transplantation	No. of testes analyzed	No. of testes with X-Cal stained seminiferous tubules
1	2	4	1
2	2	10	3
3	2	8	1
Contol	2	8	0

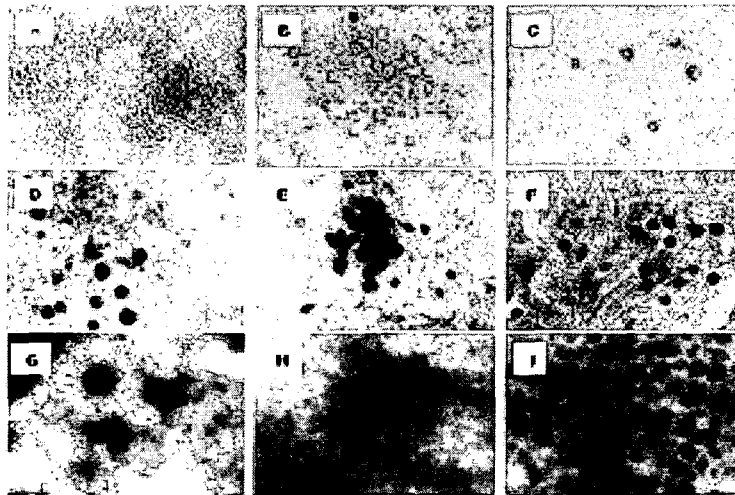


Fig. 8. Identification of spermatogonial cells after retrovirus transduction. (A) 3 week cultured cell colonies. (B) Dispersion of cell colony (Single germ cells were derived from cell colonies during long term culture). (C) Primary single cell suspension from mouse testis cells (4 week old male) by the ficoll density gradient centrifugation method. (D) Alkaline phosphatase expression of single cell suspension (fig. B). (E) X-galactosidase expression of retrovirus transduced single germ cells. (F) Alkaline phosphatase expression of retrovirus transduced single germ cells.(G) X-galactosidase expression of long-term cultured cell colony (100X). (H) Fig. G magnification (200X). (I) Fig. G magnification (400X).

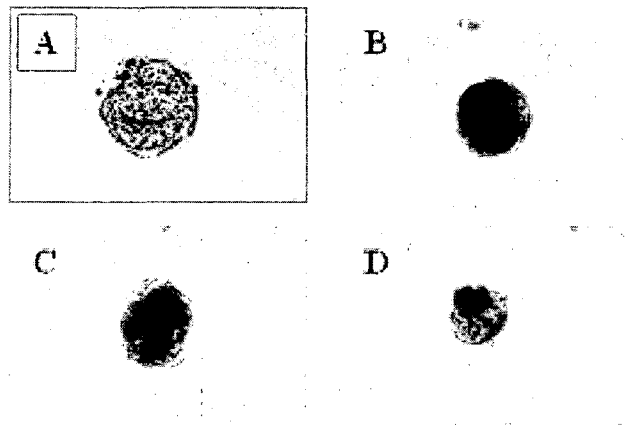


Fig. 9. Alkaline phosphatase activity was decreased during culture period. (A) Before AP treatment.(B) AP stained EB after 3 days culture. (C) After 7 days. (D) After 14 days culture.

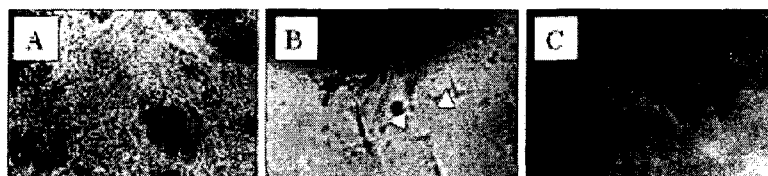


Fig. 10. Genetic modified sperm production on the culture flask using special differentiation techniques. (A) Sertoli cell line feeder culture appearance after differentiation using EB formation method. (B) appearance sperm movement (white arrow head) and sperm head (black arrow). (C) premature sperm head formation (black arrow).

IV. 참고문헌

1. Brinster RL, Zimmermann JW. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91 (24):11298-302.
2. Cooker LA, Brooke CD, Kumari M, Hofmann MC, Millan JL, Goldberg E. Genomic structure and promoter activity of the human testis lactate dehydrogenase gene. *Biol Reprod*. 1993; 48 (6): 1309-19
3. Chang IK, Tajima A, Yasuda, A, Chikamune T, Naito M and Ohno T. Simple method for isolation of primordial germ cell from chick embryos. *Cell Biol Int Rep*. 1992; 16: 853-7.
4. De Miguel MP, De Boer-Brouwer M, Paniagua R, van den Hurk R, De Rooij DG, Van Dissel-Emiliani FM. Leukemia inhibitory factor and ciliary neurotropic factor promote the survival of Sertoli cells and gonocytes in coculture system. *Endocrinology*. 1996;137:1885-1893.
5. De Miguel MP, de Boer-Brouwer M, de Rooij DG, Paniagua R, van Dissel-Emiliani FM. Ontogeny and localization of an oncostatin M like protein in the rat testis: its possible role at the start of spermatogenesis. *Cell Growth Differ*. 1997;8:611-618.
6. De Rooij DG, van Beek ME, Rutgers DH, van Duyn-Goedhart A, van Buul PP. Radioprotective effect of misoprostol on mouse spermatogonial stem cells. *Genet Res*. 1998; 72 (3): 185-189.
7. Ellwart E, Dormer P. Effect of 5-fluoro-2'-Deoxyuridine (FdUrd) on 5-bromo-2'-Deoxyuridine (BrdUrd) incorporation into DNA measured with monoclonal BrdUrd antibody and by the BrdUrd/Hoechst Quenching Effect. *Cytometry*.1985; 6: 513-520.
8. Enders, GC, May II, JJ. Developmentally regulated expression of a mouse germ cell nuclear antigen examined from embryonic day 11 to adult in male and female mice. *Development*.1994; 163: 331-340.
9. Feng Li-X, Chen Y, Dettin L, Pera RR, Herr JC, Goldberg E, Dym M. Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. *Science*.2002; 297: 392-395.
10. Fukuda K, Iwasaka T, Hachisuga T, Sugimori H, Tsugitomi H, Mutoh F. Immunocytochemical detection of S-phase cells in normal and neoplastic cervical epithelium by anti-BrdU monoclonal antibody. *Anal Quant Cytol Histol*. 1990 12 (2): 135-138.
11. Gonchoroff NJ, Katzmann JA, Currie RM, Evans EL, Houck DW, Kline BC, Greipp PR, Loken MR. S-phase detection with an antibody to bromodeoxyuridine. Role of DNase pretreatment. *J Immunol Methods*.1986; 93 (1): 97-101.
12. Haneji T, Koide SS, Nishimune Y, Oota Y. Dibutyl adenosine cyclic monophosphate regulates differentiation of type A spermatogonia with vitamin A in adult mouse cryptorchid testis in vitro. *Endocrinology*. 1986;119:2490-2496.
13. Jakubowiak A, Janecki A, Steinberger A. Kinetics of inhibin secretion in static and superfused Sertoli cell cultures in response to follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod*. 1990; 43 (6): 939-45.
14. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, Shinohara

- TLong-Term Proliferation in Culture and Germline Transmission of Mouse Male Germline Stem Cells. *Biol Reprod* 2003 [epub ahead of print].
15. McLean DJ, Russell LD, Griswold MD. Biological activity and enrichment of spermatogonial stem cells in vitamin a-deficient and hyperthermia-exposed testes from mice based on colonization following germ cell transplantation. *Biol Reprod.* 2002; 66 (5): 1374-9.
 16. Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ. Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell.*1997;88 (3): 287-98.
 17. Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue Cell.* 1998; 30 (4): 389-97.
 18. O'Brien, D. A. Isolation, separation, and short-term culture of spermatogenic cells. *Methods Tox.* 1993; 3A: 246-64.
 19. Polejaeva IA, Reed WA, Bunch TD, Ellis LC, White KL. Prolactin-induced termination of obligate diapause of mink (*Mustela vison*) blastocysts in vitro and subsequent establishment of embryonic stem-like cells. *J Reprod Fertil.* 1997; 109 (2): 229-236.
 20. Rassoulzadegan M, Paquis-Flucklinger V, Bertino B, Sage J, Jasin M, Miyagawa K, van Heyningen V, Besmer P, Cuzin F. Transmeiotic differentiation of male germ cells in culture. *Cell.* 1993; 75 (5): 997-1006.
 21. Risley MS. Support of *Xenopus laevis* spermatogenesis in vitro by different energy substrates. *Biol Reprod.* 1990; 42 (3): 511-22.
 22. Shinohara T, Inoue K, Ogonuki N, Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Nakata K, Kurome M, Nagashima H, Toyokuni S, Kogishi K, Honjo T, Ogura A. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro Microinsemination. *Hum Reprod.* 2002; 17 (12): 3039-45
 23. Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. B1- and a6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96:5504-09.
 24. Shinohara T, Orwig KE, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:8346-51.