

장지호¹ · 김정은¹ · 김은희¹ · 오선경^{1,2} · 구승엽^{1,2}
김석현^{1,2} · 최영민^{1,2} · 문신용^{1,2}

¹서울대학교 의학연구원 인구의학연구소, ²의과대학 산부인과학교실

Background & Objectives: 생쥐의 조혈모세포에서는 Wnt 신호가 자가복제능과 다분화능에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며 Notch1의 발현을 증가시켜서 그 기능을 수행한다는 보고가 있었다. 최근에는 오히려 Notch 신호가 Wnt 신호보다 조혈모세포의 미분화상태를 유지하고 분화를 억제하는데 더 필수적이라는 보고가 있었다. 인간배아줄기세포에서도 Wnt와 TGFbeta 신호가 미분화유지에 중요한 역할을 한다고 최근에 알려졌다. 이러한 사실들은 생쥐에서와 마찬가지로 Notch 신호전달체계가 인간배아줄기세포에서도 분화를 억제하고 자가복제능에 기여할 가능성이 높음을 암시하는 것이다. 따라서, 본 연구는 Notch 신호전달체계가 인간배아줄기세포에서도 분화를 억제하고 자가복제능에 기여하는지를 조사하였다.

Method: Cell lines and Culture condition 배아줄기세포는 SNUhES3을 실험에 이용하였으며, mitomycin C (Sigma)가 처리되어 세포분열이 억제된 STO (ATCC, CRL-1530)인 영양 세포층 위에서 미분화상태를 유지하며 배양되었다. 20% knockout serum replacement, 2 mM L-glutamin, 1% nonessential amino acid, 0.1 mM b-mercaptoethanol (Sigma), penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM/F12에, 0.4 ng/ml의 bFGF (invitrogen)를 첨가하였다. ATCC (CRL-1973)에서 구입한 embryonic carcinoma cells (EC)은 10% FBS가 포함된 DMEM에서 배양하였다. Embryoid body (EB)는 미분화상태의 배아줄기세포를 Dispase (Gibco)로 30분간 37℃에서 처리한 후에 영양 세포층으로부터 각각의 colony들을 분리한 후에 bFGF가 제외된 배아줄기세포 배양액이 들어있는 bacterial dish에서 suspension culture를 하였다. RT-PCR 및 quantitative realtime-PCR SNUhE3 cells, EBs와 attached EBs에서 TRIzol reagent (Invitrogen)을 이용해서 RNA를 추출한 후에 Superscript III cDNA synthesis kit (Invitrogen)을 이용하여 각각 cDNA를 만든 후에 RT-PCR을 수행하였으며, 같은 template을 이용하여 QuantitTect SYBER Green PCR kit (QIAGEN)을 이용하여 rotor-gene 3000 realtime-PCR cycler (Corbett)로 정량적인 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 95℃에서 30초, 58℃에서 45초, 72에서 45초의 조건으로 30 cycles로 증폭하였으며 realtime-PCR은 GAPDH로 보정하였으며 95℃에서 20초, 60℃에서 20초, 72℃에서 20초의 조건으로 50 cycles을 수행하였다. Immunocytochemistry SNUhES3 cells을 3번 PBS로 washing 후에 4% paraformaldehyde in PBS으로 상온에서 30분 동안 fixation하고 다시 PBS에 0.2% bovine serum albumin (BSA)를 넣은 용액으로 5분간 3번 washing한 후에 0.05% Triton X-100 in PBS/BSA로 20분에서 1시간 동안 permeabilization한 후에 3% BSA/PBS로 1시간 동안 상온에서 blocking하였다. Goat anti-Notch1 (Santa Cruz; 200:1), rabbit anti-Oct-4 (200:1), rabbit anti-SSEA-4 (500:1)로 4℃에서 overnight incubation하고 washing한 후에 AlexaFluor488-, or AlexaFluor594-로 conjugation된 donkey anti-goat/anti-rabbit secondary 항체로 2시간 동안 상온에서 incubation하였다. 다시 washing한 후에 DAPI로 10분간 염색한 후에 confocal microscopy로 관찰하였다.

Results: 전사수준에서 Notch와 그 리간드 그리고 하위단계에 있는 유전자들의 mRNA들의 발현이 활발하게 이루어진다는 것을 RT-PCR 및 realtime-PCR로 관찰하였다. 게다가 Notch 신호가 리간드와

상호작용에 의해서 processing되고 있다고 보여지는 Notch1의 활성화된 형태인 NotchIC가 핵에서도 관찰된 점으로 보아 인간배아줄기세포에서도 미분화 상태 유지에 관계할 가능성을 확인하였다. 이런 결과를 뒷받침하는 것은 인간배아줄기세포를 배양할 때에 한 colony에서 자연 분화된 부분과 미분화 상태가 공존하는 경우가 종종 관찰되는데 이런 colony에서 Notch1의 발현이 미분화 표지인 Oct-4와 SSEA-4와 같은 패턴으로 분화되지 않은 곳에서는 발현되지만 자연 분화된 부분에서는 줄어든다는 점이다.

Conclusions: 본 연구에서는 Notch 신호가 인간배아줄기세포에서 자가복제능을 유지하는데 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 분화 억제 및 lineage commitment에도 관여할 가능성에 대해서 알아본 것이다. 우리의 결과들은 생쥐 모델에서 Notch 신호가 분화를 억제하여 미분화상태 유지에 관여한다는 기존의 보고와 일치한다. 또한 siRNA나 lentivirus 등을 이용하여 Notch 발현을 억제하거나 그 하위단계 유전자들의 발현을 억제하여 분화가 가속화되는지를 확인하는 실험을 수행하여 본다면 미분화상태가 유지되는데 중요한 하위단계의 pathway를 찾을 수 있을 것으로 기대된다. 이러한 결과들은 인간배아줄기세포의 미분화 특성을 한층 더 깊이 이해하는 초석이 될 것이라 사료된다.

O-16(기초) Changes in Mitochondria and Oxidative Metabolism During the Early Differentiation of Human Embryonic Stem Cells

Dae Hoon Yoo, Hae Seon Kang, Byoung Yong Ahn,
Kyong Soo Park, Hong Kyu Lee, Young Min Cho

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

Background & Objectives: Prior to vascularization in vivo, embryonic cells and many of their differentiated progeny exist in an environment with an oxygen partial pressure that is often far less than 40 mmHg. Therefore, they must rely on anaerobic metabolism to produce ATP. Once oxygenated blood comes into the embryonic tissues after implantation, mitochondrial oxidative phosphorylation system will be activated. We aimed to examine the changes in mitochondrial content in undifferentiated human embryonic stem (hES) cells, which have been derived from inner cell mass of blastocyst, and their early differentiation stage in vitro.

Method: We removed feeder cells (STO), bFGF, and SR from undifferentiated hES cells (SNU hES3) for 1 and 2 weeks to induce spontaneous differentiation. The presence of Oct4 and nanog mRNA expression were used as markers for stemness. Mitochondria were stained with Mitotracker and also were observed with electron microscope. Intracellular ATP content, intracellular amount of reactive oxygen species, and antioxidant system were measured.

Results: Undifferentiated hES cells have scanty amount of mitochondria compared to the differentiated cells. Interestingly, the margin of hES cell colony in the very early differentiation stage have lots of mitochondria compared to the undifferentiated cells inside of the colony. Therefore, Mitotracker staining can be used for one of the differentiation markers. Electron microscope showed that the hES cells have few