

배아기간세포(ES cell)의 체외에서의 분화능 ; embryoid body형성과 실제 적용

**Differentiative potential of embryonic stem (ES) cells *in vitro*;
formation of embryoid body and its practical application**

박종임

서울대학교 수의과대학 산과학 교실

서 론

배아기간세포(embryonic stem cell, ES cell)는 착상 전 배반포의 내부세포괴(inner cell mass, ICM)를 분리하여 미분화상태에서 배양 후 수립된 세포주이다. ES cell은 체외에서 계대배양이 가능하고, 착상 전 수정란에 주입되면 생식기계를 비롯한 거의 모든 종류의 조직과 세포로 분화하여 chimera 동물을 구성하며 ES cell 유래의 산자를 생산하기도 하는 등 분화의 다능성(pluripotency)을 지니고 있다. ES cell은 마우스에서 처음 수립되었으며(Martin, 1981) 최근 원숭이(Thompson et. al., 1995)와 인간(Thomson et. al., 1998)에서도 마우스와 비슷한 방법으로 수립된 ES cell에 관해 보고 되었다. 또한 마우스 원생식세포(primordial germ cell, PGC)에서도 다능성을 지닌 세포주가 수립되었으며(Matsui et al., 1992), 인간에서도 생식세포계 다능성 세포의 수립이 시도되고 있다. ES cell은 체내·외에서 광범위한 분화능을 나타내는데, 누드 마우스에 주입시 기형종(teratocarcinoma)을 형성하거나, 배양접시 위에서 박동하는 심근, 신경계 세포 및 embryoid body로 분화하여 발생초기의 배아와 유사한 구조를 형성하게 된다(Beddington & Robertson, 1989; Bradley, 1990). 본 강연에서는 embryoid body 형성을 중심으로 한 ES cell의 체외에서의 분화능과 이의 이용 가능성에 대해서 소개하였다.

ES cell의 분화능

Embryoid Body의 형성

ES cell을 부유 배양하면 세포들은 서로 응집하며 부유 배양 개시 12시간 이내로 embryoid body라고 하는 구상의 세포 덩어리를 형성하게 된다. Embryoid body는 embryo의 발생과 유사한 분화 양상을 나타내는데, embryoid body의 외부에 위치한 cell은 원시 내배엽(primitive endoderm)으로 분화되며, 배양 시스템에 따라 차이는 있으나 5일 정도 배양하게 되면 장측 및 벽측 내배엽(visceral and parietal endoderm)으로 분화된다. 이는 배반포의 ICM 외부에 위치한 세포가 정상적으로 분화하는 경로이기도 하다. 또한 primitive endoderm내측의 embryoid body중심부에 위치한 pluripotent cell은 초기 embryo의 원시 외배엽(primitive ectoderm)과 같은 조직으로 분화되는데, 이들 세포들은 후에 embryoid body내측에 출현하는 embryo의 전양막강(proamniotic cavity)과 유사한 cavity 주위에 상피층을 형성하게 된다. Primitive ectoderm은 분화의 가능성을 보유하고 있으며, 체내 embryo 발생과정 중 후에 embryo 및 성체를 구성하는 근간이 되는 외배엽, 내배엽, 중배엽의 세 배엽이 모두 여기서 출현하게 된다(Doetschman et al., 1985). Embryoid body 형성과정이 Fig. 1에 요약되어 있다.

Embryoid body 는 embryo에 비하면 구조적으로 치밀하지 않으며 포유류의 전체 발생과정을 완벽하게 반영한다고 할 수 없으나 이제까지 접근하기가 어려웠던 초기발생과정을 체외에서 쉽게 재현하고 관찰할 수 있다는 점에서 획기적인 연구재료로 각광을 받고 있다. 또한 발생과정 초기에 발현하는 일부 유전자 및 분화 세포는 embryo와 embryoid body 양 쪽에서 공통으로 검출되기도 한다 (Pedersen, 1994; Rathjen, et al, 1998). 이들 embryoid body는 초기 배아와 유사 구조를 지니는 분화능 외에도 생체 내 이식 시 기형종(teratocarcinoma) 형성 능력이 탁월하고 성체를 구성하는 세 배엽 유래의 모든 조직으로 광범위하게 분화하는 양상을 나타낸다. 또한 배양 접시상에서의 접착 배양시에도 활발한 분화상을 관찰할 수 있다(Keller, 1995). 이러한 embryoid body와 embryo의 발생상의 연관성은, ES cell 유래 embryoid body

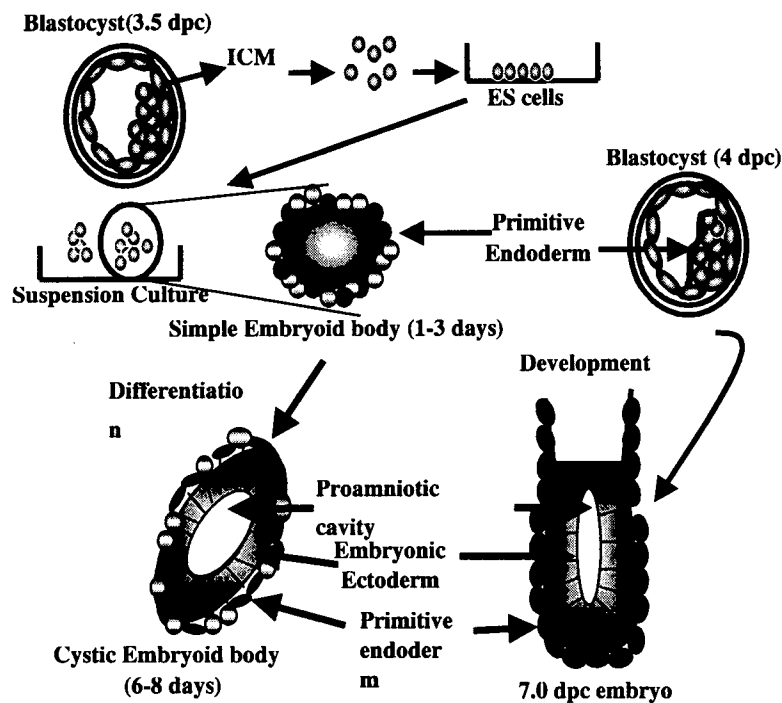


Fig. 1. Diagrammatic representation of ES cell embryoid body formation related to mouse embryogenesis (dpc; days post coitum)

에서 embryo 및 성체에서 발견되는 다분화능을 지닌 세포를 분화유도할 수 있는 점과 함께 ES cell이 embryo와 같은 분화능을 지니고 있음을 시사하고 있다. Embryoid body 내의 불규칙적인 세포구성 및 배열이 주요한 세포간 상호작용 및 분화 과정에 영향을 미쳐 특정 조직 세포에의 분화를 제한하는지의 여부는 아직 밝혀지지 않고 있다.

ES cell 유래 embryoid body의 실제 적용

ES cell과 그 분화능의 연구에 있어 최종 목적은 포유류의 발생을 결정하는 주요 분자생물학적 연관성을 밝히는 데 있다고 할 것이다. 체외에서의 ES cell의 분화를 이용한 실험은 세포의 분화와 형태형성과 같은 기초 발생 과정의 연구에 유용하게 쓰여지고 있다. 또한 이러한 연구 결과를 바탕으로 형질변환 기법과 접목하여 최근 주목을 받고 있는 난치병의 세포이식 치료 등에 실제

적용할 수 있을 것이다(Rathjen, et al, 1998). Embryoid body를 통해 얻어진 ES cell유래 분화 세포가 Fig. 2에 요약되어 있다.

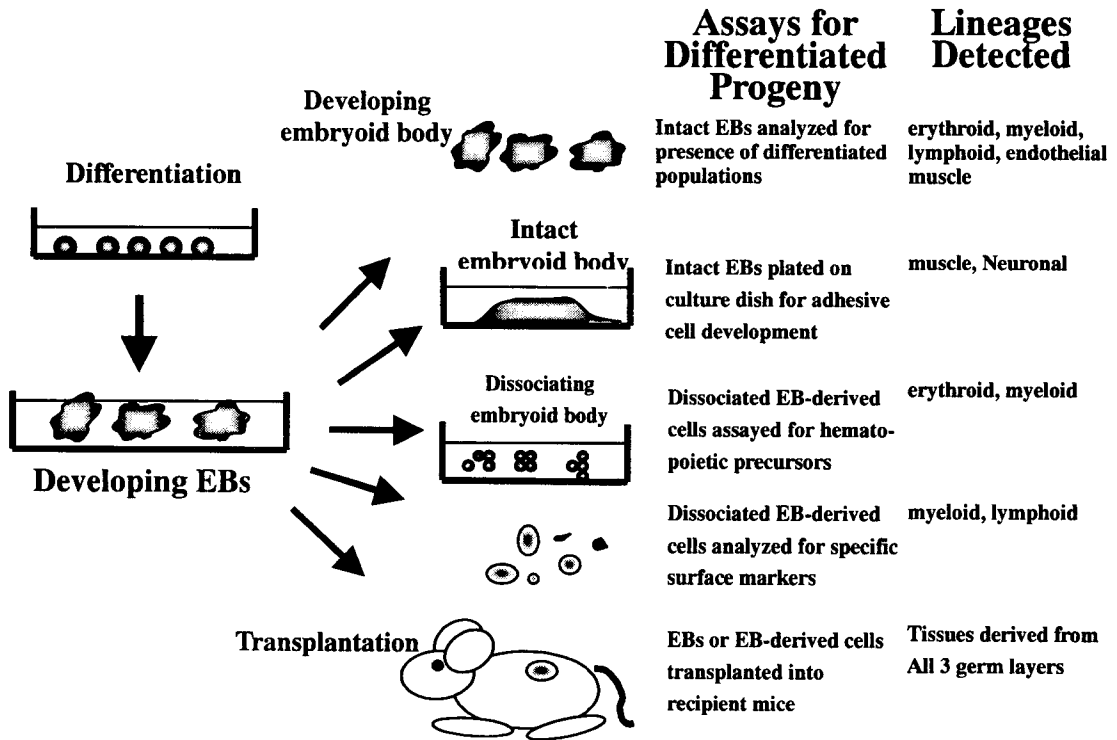


Fig. 2. The useful cell lineage derived from embryoid body

기초 생물학 연구에의 이용

1) 분화기구와 관련된 cytokine 및 기타 수용성 전달 물질의 연구

체외에서의 ES cell 분화능에 영향을 미치는 cytokine 및 기타 수용성 전달 물질은, 이미 알려진 분자 조절기구와 함께 생물학적 기능 탐색을 위한 새로운 전달물질과 그 기능의 연구에 유용하게 쓰일 것이다. 이러한 예로서 ES cell의 분화억제제인 LIF(leukemia inhibitory factor)가 있다(Smith & Hooper, 1987).

2) 세포간 상호작용 및 발생, 분화 과정 관련 유전자에 관한 연구

다분화능을 지닌 세포간의, 서로 유사하거나 상이하게 연관된 분화능은 이제까지 기술적으로 어려운 이식 실험에 의해 생체내의 복잡한 환경에서 연구되어 왔으나, embryoid body 내의 다능성 세포의 분화상의 추이를 관찰하여 분화조절인자와 세포간 상호작용의 파악에 이용할 수 있다(Keller, 1995, Wartenberg, et. al., 1998). 이와 함께 개체 발생, 분화과정 중 발현되는 유전자에 대해서도 관련 유전자의 조작 과정을 거친 ES cell의 embryoid body 형성 등 체외 분화과정 중의 발현상을 추적하여 연구할 수 있다. 또한 이들 결과를 바탕으로 체내 기관 형성에 관한 기전이 밝혀지고 있다.

Bio-medicine에의 응용

1) Human ES cell line의 수립

계대배양한 ES cell등의 생식기계 전파(germline transmission)는 인간에 있어 엄격히 제한되어 있지만 체외에서 ES cell 자체를 이용한 연구는 윤리적으로도 적용 가능한 기술이며, 앞으로 유전자 조작도 실현할 수 있을 것이다. Human ES cell은 mouse ES cell과 비슷한 성질을 지녔으며, 윤리상 인간의 *in vivo* 에서는 다룰 수 없는 발생학적인 연구에 이용되어질 수 있다(Thomson, et al., 1998). 체외에서의 분화방법은 마우스의 ES cell과 유사하며, 마찬가지로 세포 분화에 관한 조절인자, 형태형성, 타 동물과의 유전학적인 관련성 등에 관한 정보를 얻을 수 있을 것이다. 유전자조작기법과 연계한 인간 gene function에 관한 연구도 현재 진행되고 있다.

2) Human ES cell 유래 embryoid body의 응용

ES cell이 성체 분화세포의 전구세포(progenitor cell)로 분화할 수 있는 능력이 확인됨에 따라 체외에서 특정 조직의 구성 세포로 분화를 유도 시킨 후, 대상 질병의 환자에게 치료 목적에 맞는 세포를 이식하여 치료할 수 있는 세포이식 치료법이 실현 가능하게 되었다. 종래의 성체 분화세포를 이용한 치료법은 정상적인 donor의 세포 또는 면역적으로 문제가 없는 환자 자신의 세포

를 채취하여, 체외에서 유전자 조작 후 다시 체내에 환원시키는 방법등에 크게 의존하여 왔다. 그러나 대상 세포의 채취와 체외에서의 유지 및 조작의 어려움으로 인해 광범위한 적용에는 한계가 있는 실정이다. Fig. 3에 나와 있는 것처럼 ES cell 유래의 embryoid body를 이용하면 종래의 방법보다 특화된 분화세포를 분리할 수 있는 장점이 있다. 또한 체세포 복제기법을 이용, 환자 자신의 체세포를 공여핵으로 하여 핵이식 후 발생한 배반포에서 ES cell을 수립하여embryoid body 등에서 원하는 특정 세포를 얻을 수 있다면 면역반응에 의한 치료상의 문제도 해결할 수 있다(Trounsn & Pera, 1998). 앞으로 세포 이식 치료의 적용범위가 점점 확대되는 점을 생각한다면 상기의 방법과 함께 유전자 조작 기법과 연계한 새로운 분화세포의 분리방법 개발이 이루어져야 할 것이다.

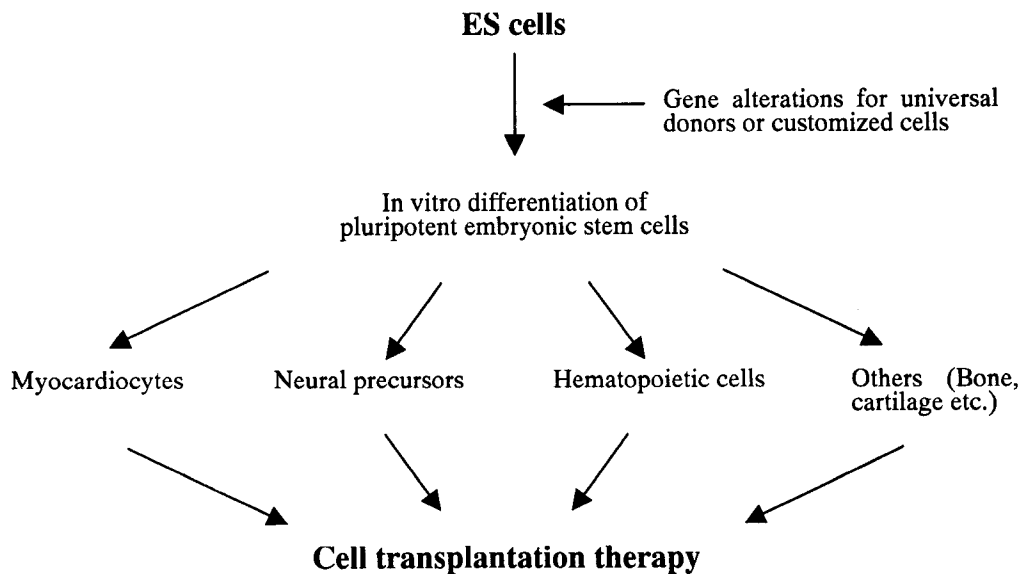


Fig. 3. Embryonic stem cell differentiation ; Possible application of ES cells to cell transplantation therapy (Gearhart, J. 1998, Science, 282; 1061-1062)

타 동물에서의 ES cell 수립

근년 마우스에서 확립된 ES cell 수립기술과 분화유도에 관한 성과를 바탕으로 마우스 외의 동물에서 ES cell의 수립 및 그 분화능에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다. Table 1에 나온 것처럼 현재 다양한 동물 중에서 ES 혹은 ES-like cell의 수립이 보고되었으며, embryoid body 및 기형종 형성 등, chimera체내에서의 광범위한 분화능이 확인되었다. 그러나 특히 유전자조작 기법과 연계한 형질변환 동물의 생산과 유전자 및 세포이식 치료를 목적으로 하는 세포분화 유도시, 이들 ES cell이 장기간에 걸친 배양과 유전자 조작 후 세포선발 과정 중 분화의 가능성을 유지할 수 있는지에 대해서는 아직 증명된 바 없으며, 이들 중 극소수의 세포만이 이용 가능성을 타진 받고 있는 실정이다.

Table 1. ES cells in other species

Cell lines	Description	References
Bovine ES-like cells	Embryoid body, teratocarcinoma formation	Stice, et al.(1996)
Hamster ES cells	Derivation and culture	Doetschman, et al. (1988)
Mink ES cells	Embryoid body, Chimera formation	Sukoyan, et al.(1993)
Pig ES cells	Derivation and culture, Chimera formation	Wheeler(1994); Shim et.al.(1997)
Rabbit ES cells	Derivation and culture	Graves and Moreadith (1993)
Sheep ES cells	Derivation and culture	Notarianni, et al.(1991)
Chicken	Embryoid body, Chimera formation	Pain et al.(1996)
Rat ES-like cells	Chimera formation	Iannaccone et al.(1994)
Monkey ES cells	Embryoid body, teratocarcinoma formation	Thomson, et al.(1995)
Human ES cells	Embryoid body, teratocarcinoma formation	Thomson, et al.(1998)

요 약

ES cell의 수립으로 특히 mouse를 중심으로한 발생학, 유전학 연구의 획기적 발전과 형질변환 동물의 생산 및 동물 체내에서 유전자 기능의 탐구에 매우 큰 변혁을 가져오게 되었다. 또한 ES cell과 embryoid body는 체외 분화능의 연구에 있어 새로운 cytokine의 발견 및 세포 수준에서의 유전자 기능 해석의 강력한 연구수단으로서 폭 넓게 이용되어 질 수 있는 가능성을 시사하고 있다. 이는 ES cell line이 지닌 두 가지 장점, 즉, 유전자 조작의 용이함과, 거의 모든 종류의 성체 구성세포로 분화할 수 있는 성질 때문이다. 이러한 ES cell technology를 실제로 제반 학문과 특히, 인간에게 적용하기 위해서는 반드시 해결해야 할 중요한 문제점이 있다. 첫째로, ES cell을 대상으로 하는 형질변환 방법의 편의성 및 효율개선이 이루어 져야 하며, 두 번째로 인간의 유전자 및 세포 이식 치료 등을 비롯한 제반 연구에 직접 적용 가능한 ES cell line의 수립과 체외에서 목적으로 하는 분화 세포를 얻기 위한 배양조건이 확립되어야 한다. 이러한 목표를 달성하기 위해 ES cell의 발생, 분화과정에 있어서의 분자조절기구, 세포 특이적 promotor, 유도 signal등에 대한 연구가 활발히 진행되어야 할 것이다.

References

- Beddington, R.S.P., and Robertson, E.J. 1989. An Assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development*, 105; 733-737.
- Bradley, A. 1990. Embryonic stem cells; proliferation and differentiation *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2; 1013-1017.
- Doetschman, T.C., Eistetter, H., Katz, M. et al. 1985. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines; formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 87; 27-45.
- Doetschman, T.C., Williams, p., and Maeda, N. 1988. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem(ES) cells. *Dev. Biol.*, 127; 224-227

- Gearhart, J. 1998. New potential for human embryonic stem cells. *Science*, 282; 1061-1062.
- Graves, K.H., and Moreadith, R.W. 1993. Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol. Reprod. Dev.*, 36; 424-433.
- Iannaccone, P.M., Taborn, G.U., Ray, L., et al. 1994. Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev. Biol.*, 163; 288-292.
- Keller, G.M. 1995. In vitro Differentiation of embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7; 862-869
- Matsui, Y.D., Zsebo, K., and Hogan, B.L.M. 1992. Derivation of pluripotent embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 70; 841-847.
- Martin, G.R. 1981. Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78; 7634-7638.
- Pain, B., Clark, M.E., Shen, M., et al. 1996. Long-term in vitro culture and characterization of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development*, 122; 2339-2348.
- Pedersen, R.A. 1994. Studies of in vitro differentiation with embryonic stem cells. *Reprod. Fertil. Dev.*, 6; 543-552.
- Piedrahita, J. A., Anderson, G.B., and Bondurant, R.H. 1990. On the isolation of embryonic stem cells; comparative behavior of murine, porcine and ovine embryos. *Theriogenology*, 34; 879-891.
- Rathjen, P.D., Lake, J., Whyatt, L.M., et al. 1998. Properties and uses of embryonic stem cells; prospects for application to human biology and gene therapy. *Reprod. Fertil. Dev.*, 10; 31-47
- Robertson, E.J. 1987. Embryo-derived stem cell line. In *Teratocarcinomas and embryonic stem cells ; a practical approach* (Ed. E.J. Robertson) pp. 71-112. IRL Press, Oxford.
- Shim, H., Gutierrez-Adam, A., Chen, L.R., et al. 1997. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. *Biol. Reprod.*, 57; 1089-1095.
- Smith, A.G., and Hooper, M.L. 1987. Buffalo rat river cells produce a diffusible activity which inhibits the differentiation of murine embryonal carcinoma and embryonic stem cells. *Dev. Biol.*, 121; 1-9

- Stice, S.L., Strelchenko, N.S., Keefer, C.L. et al. 1996. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 54; 100-110.
- Sukoyan, M., Vatolin, S., Golubitsa, A., et al. 1993. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink; comparisons of their pluripotencies. *Mol. Reprod. Dev.*, 36; 148-158.
- Thomson, J. A., Kalishman, K., Golos, T.G., Durning, M., et al., 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92; 7844-7848.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Elder, J., Shapiro, S.S., et al. 1998 Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282; 1145-1147.
- Trounson. A. and Pera. M. 1998. Potential benefits of cell cloning for human medicine. *Reprod. Fertil. Dev.*, 10; 121-125.
- Wartenberg, M., Gunther, J., Hescheler, J., et al., 1998. The embryoid body as a novel in vitro assay system for antiangiogenic agents. *Lab. Invest.*, 78; 1301-1314.
- Wheeler, M.B. 1994. Development and validation of swine embryonic stem cells; a review. *Reprod. Fertil. Dev.*, 6; 563-8.