

간부분 절제술 후 비장내 이식한 간세포화 줄기세포의 분화에 관한 형태학적 연구

박재홍 · 박중규 · 배기원 · 양영철*

인제대학교 의과대학 해부학교실

Morphological Study on Differentiation of Hepatocytic Stem Cell by Intrasplenic Transplantation after Partial Hepatectomy

Jae-Hong Park, Joong-Kyu Park, Kee-Won Bae and Young-Churl Yang*

Department of Anatomy, College of Medicine, Inje University, Pusan 614-735, Korea

Abstract

This study was performed to evaluate regenerative effects of intrasplenic stem cell transplantation after partial hepatectomy. To evaluate the regenerative effects, Sprague Dawley rats were used. *In vivo* the embryonic stem cells of blastocysts were collected from superovulated rats on day 3.5 after the vaginal plug checked. The embryonic stem cells were cocultured with hepatocytes for 8 days, they were transplanted into the spleen. After the intrasplenic transplantation of cultured stem cells, they were initially distributed near the periarterial lymphatic sheath after transplantation in the hematoxylin-eosin staining. Their number were formely increased and their size enlarged at forming small lobules. The embryonic stem cells in the culture proliferated and initially proliferated around the periarterial lymphatic sheath and later they around the trabecula with blood vessels. After the transplantation of stem cells, their cell organelles were well developed rough endoplasmic reticulum at the 20th with prominent epidermal growth factor reaction, developed smooth endoplasmic reticulum at the 30th day, well differentiated bile canaliculi with increased transforming growth factor- β and apoptosis reactions.

Key words – embryonic stem cell, intrasplenic transplantation, partial hepatectomy

서 론

간이식은 급성 간부전으로 회복할 수 없는 간질환 환자에게는 유일한 치료법이다. 그러나, 간을 쉽게 구할 수 없기 때문에 여러 가지의 위험을 감수하면서 간공여자가 생길 때까지 환자는 기다리는 수밖에 없다. 그래서, 일시적인 방편

이지만 간세포를 이식하여 급성 간부전을 치료하고자 하는 시도가 있어 왔다[1].

인체의 간(肝)세포는 인공적으로 배양하기도 힘들고 대량으로 증식시키기도 힘들었다. 그러나, 최근에 간세포를 대량으로 증식할 수 있는 기술이 개발되면서 간이식을 받지 않으면 살기 힘든 간부전(肝不全) 환자 등의 치료에 적용할 수 있게 되었다[13]. 즉 간세포에 암유전자를 주입하여 간세포를 수백만개씩 인공적으로 증식, 배양하여 간부전 환자에게 일시적으로 적용할 수 있을 것이라는 기대를 갖게 하였

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-890-6634, Fax : 051-896-6634
E-mail : anatpung@ijnc.inje.ac.kr

다[12]. 그렇지만, 간세포내에 처리된 암유전자의 작용으로 무한증식을 계속할 것이기 때문에 인공 간세포를 인체에 그대로 이식할 수는 없다. 그러므로, 적당한 크기로 자랐을 때 증식을 멈추고 암 유전자가 더 이상 기능을 하지 못하도록 '유전자 가위(gene scissor)' 역할을 하는 효소를 투입하여야 한다. 이와 같은 유전자 조작을 통해 배양한 간세포를 간의 90%를 잘라낸 쥐의 비장에 주입하여 실험대상 쥐의 60%가 간기능을 완전 회복하였다는 보고가 있다[14].

인체 간부전의 경우 바이러스나 독소 때문에 발생하는 경우가 많고, 또 새로 이식된 간세포에 암 유전자가 전달될 가능성이 있기 때문에 인체에 적용하기에는 여러 가지의 문제점을 가지고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 비장에 간세포를 이식하는 기법을 생각하게 되었으며 이미 여러 연구에서 비장이 간세포를 이식할 수 있는 최적의 장기로 알려져 있다[15].

간세포의 이식에서 태아의 간세포와 성인의 간세포는 이미 분화가 이루어진 간세포여서 세포 자체의 수명의 한계로 간이식을 기다리는 사람들에게만 일시적으로 적용을 할 수 밖에 없는 제한성이 있다. 또한, 간세포를 배양하여 간이 아닌 다른 장기인 비장내로 이식하였을 경우 간세포의 생존을 위하여 거부반응을 억제하여야 하며[8], 비장내 이식 간세포의 분리와 이식 사이에 존재하는 지연시간, 생리적 자극에 대한 반응, 증식을 자극하는 주기의 조절 등 많은 인자들을 고려되어야 한다[3].

비장내에 간세포로 직접 이식하였을 경우에 이식 효율을 유지하기 위해 간세포를 반복적으로 주입하여야 하거나 간의 부분절제 같은 재생 촉진반응 하에서 간세포의 재생율을 높일 수 있다고 하며, 이식 간세포 중에 성인줄기세포에 해당하는 타원세포(oval cell)가 많을수록 간세포의 활착이 촉진된다[5,6]. 그러나, 근본적으로 배양된 간세포는 분화가 활발하지 않기 때문에 다른 장기인 비장내에서 간세포 증식, 분화 상태를 유지하기가 어렵다. 하지만, 배자줄기세포는 모든 세포로 분화될 수 있고 간세포로도 쉽게 분화할 수 있으며 적은 수의 세포를 주입하여도 많은 세포로 증식할 수 있다는 이점이 있다[17].

최근에는 이러한 배자줄기세포의 다변성을 이용하여 간 질환으로 죽어가고 있는 환자의 간에 줄기세포를 주입하여 환자의 간을 부분 소생시킬 수 있는 것으로 밝혀졌으며, 배자줄기세포 주입이 간이식 수술을 받아야 하는 절망적인 환

자들에게 며칠의 시간적인 여유를 줄 수 있다고 보고하였다[21]. 또한, 실제 임상에서 간이식이 가능하다고 하더라도 이식에 이용할 수 있는 간보다 대기하고 있는 환자들이 훨씬 더 많기 때문에 이 같은 배자줄기세포의 이식은 매우 관심을 가질 만한 분야이다.

현재까지 다양한 동물종에서 배자줄기세포 혹은 줄기세포성 세포의 수립이 보고 되었으며, 배자체(embryoid body) 및 기형종 형성[19], 잡종(chimera)[25] 형성 등 체내에서의 광범위한 분화능이 확인되었으며 인체의 발생기전의 연구, 새로운 약물의 발견이나 이식의학에 널리 유용하게 이용할 수 있다[27].

그렇지만, 배자줄기세포를 간세포 이식에 활용하기 위하여 짧은 기간 동안 배양한 후 비장내로 이식하였을 때 간세포로의 분화가 구조적으로 어떻게 일어나는지, 실제로 장기간에 걸쳐서 간세포로 분화되어 기능적인 구조를 유지할 수 있는지에 대하여 아직 증명된 바가 없다. 이러한 점에 착안하여 본 연구에서는 간세포와 공동배양하여 분화시킨 배자줄기세포를 간부분 절제술을 시행한 흰쥐의 비장내 이식함으로써 줄기세포가 비장내에서 간세포로 분화되는지, 또 장기간에 걸쳐서 그 구조를 유지할 수 있는지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 흰쥐(Sprague-Dawley계, 생후 14주, 효창사이언스, 한국) 60마리를 암수 구별 없이 사용하였다. 구입 후 14일 동안 실험실 환경(온도 22~25°C, 습도 60-80%)에서 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물사료(삼양유지제품)와 물은 자유롭게 먹게 하였고 자연채광 하에서 사육하였다.

배자줄기세포를 얻기 위하여 동복임신 기법을 이용하였다. 동복임신을 위하여 50 units의 난포자극호르몬(follicular stimulating hormone, Sigma, USA)을 10 ml의 주사용 생리식염수에 희석하고 1 ml씩 복강 내 주사하고, 50시간 후 황체자극호르몬(luteinizing hormone 37000 units, Sigma, USA)을 740 ml의 주사용 생리식염수에 희석하여 0.1 ml씩 복강내로 주사하였다. 주사 후 암컷 2마리에 수컷 1마리의 비율로 합사시키고 질전(vaginal plug)을 확인한 날을 임신

0일로 하여 4일째 포배를 채취하였다.

실험방법

포배의 채취

포배의 채취는 임신 3.5일된 흰쥐의 복강을 열어 자궁과 난관에 붙어 있는 조직을 충분히 제거한 후 자궁과 난관을 떼어내었다. 배자줄기세포 배양액내에서 난관을 겹자로 잡고 22 G 주사 바늘로 난관을 뚫어 포배를 난관으로부터 배지내로 빠져나오게 하였다. 각 포배를 매우 조심스럽게 검사하여 수확한 후 포배는 준비해 둔 5 μ l의 줄기세포 배지방울에 두고, 다시 포배 주위에 붙어 있는 방사관 세포를 제거하기 위하여 5-6개의 줄기세포 배지방울을 지나면서 세척하였다.[20].

배자줄기세포의 분리와 배양액의 제조

포배를 37°C에서 교반시키면서 1% dispase 용액 2 ml를 가하여 15분간 처리하여 투명대가 녹는 것을 확인하면서 떨어지도록 하였다. 효소희석용액 2 ml를 가하여 원심분리하여 다른 영양막세포들을 제거한 후 속세포덩어만을 분리하였다. 속세포덩어리를 37°C에서 교반시키면서 1 mg/ml type IV collagenase 용액에 1시간 두었다가 줄기세포 배양액 내에서 하룻밤 두어 배자체를 형성시킨 후 다시 type IV collagenase 용액 내에서 1시간 동안 처리하여 각각 세포들을 분리하여 배양하였다.

줄기세포 배양액은 20% fetal calf serum(GI 16000-036) 100 ml, glutamine(1 mM), β -mercaptoethanol(0.1 mM, Sigma), nonessential amino acid stock(0.1%, Gibco), penicillin (100 U/ml)-streptomycin(100 μ g/ml, GI 15140-122), fungizone(1.25 μ g/ml, GI 15290-018), gentamycin(50 ng/ml, GI 15710-015), kanamycin(100 ng/ml, GI 15160-054)을 혼합한 후 Dulbecco's modified eagle medium(GI 11965-092)으로 500 ml이 되도록 채워서 만들었다.

분리된 줄기세포들은 배양액 속에서 미리 배양 해둔 feeder cell인 섬유모세포 위에 접종한 후 배양하였다. 섬유모세포는 생후 3일된 흰쥐의 피부를 벗겨내어 그 아래에서 긁어낸 진피조직을 모아서 1 mg/ml type IV collagenase 용액을 가하여 37°C에서 1시간 동안 교반시키고 cell strainer (40 μ m nylon, Falcon 2340, USA)에 여과시켜 얻었다.

줄기세포는 6일 동안 배양한 후 37°C에서 교반시키면서 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA 용액내로 15분간 처리하여 바닥에 부착한 세포가 배양용기 표면에서 떨어지도록 처리하여 미리 준비된 3일간 배양한 간세포 배지에서 8일 동안 합동배양한 후 이식에 사용하였다.

합동배양을 위한 간세포는 관류법에 의하여 얻었으며, 간세포 배양을 위한 배양액은 DMEM 444.5 ml, FCS 50 ml, penicillin-streptomycin 용액 5 ml, fungizone 2.5 ml, insulin 0.2 ml, dexamethasone 0.3 ml을 넣어 만들었다. 배양액은 제조 후 4°C에서 저장하고 사용하기 전 37°C로 맞추어 사용하였다.

멸균된 10 ml 피펫으로 간세포가 혼합된 용액을 되도록 천천히 흡입, 배출을 반복하여 고르게 세포가 분산되도록 한 다음 cell strainer를 이용하여 여과하였다. Trypan blue를 이용하여 1×10^5 세포/0.2 ml \cdot cm²의 밀도가 되도록 60 mm dish 위에 5 ml씩 분주하여 배양하였다.

간부분 절제술

흰쥐의 복강내로 동물용 sedaject(10 mg/ml, 삼우화학, 한국) 0.1 ml를 투여하여 전마취시킨 후 다시 ketala(50 mg/ml, 유한양행, 한국) 0.1 ml를 투여하여 마취시켰다. 횡격막을 연결하고 있는 겸상인대를 절개한 후 중간엽과 좌외측엽을 잡아 수직으로 들어 올려서 기저부 주위의 혈관을 이중으로 묶었다.

혈액이 어느 정도 스며 나온 후 꺼즈로 간엽을 싸서 약간 팽팽하게 당긴 후 가능한 이중 묶음을 한 부위에 가깝도록 절단하였다. 절단 후 배개 받침을 빼고 근육과 피부를 봉합하였으며 gentamycin(50 mg/ml, 대성미생물연구소, 한국) 0.1 ml를 근육주사 하였다. 전체 간의 30%만 남겨두는 간부분 절제술을 실시한 10일 후 배양세포를 비장내에 이식하였다.

간세포화 줄기세포의 비장내 이식

8일 동안 간세포와 합동배양한 후 0.05% trypsin-0.53mM EDTA(GI 25300-054)로 처리하여 줄기세포를 배양용기에서 분리한 후 800 g, 15분간 원심분리하여 trypsin-EDTA 용액을 제거하고 5×10^3 개 세포/ml를 26 G의 바늘을 끼운 3 ml 주사기에 준비하였다.

배양세포의 비장이식은 간부분 절제술을 시행한 흰쥐의

좌측 늑연골 하부를 소독한 후 개방하여 흰쥐의 비장을 완전히 꺼내어 위장으로 가는 상부의 두 개의 혈관은 결찰하고 다른 혈관은 수술실을 넣어 당겨서 혈류의 흐름이 없도록 하였다. 혈류를 차단한 상태에서 비장의 꼬리부분에서 26 G의 주사기를 통하여 배양세포들을 서서히 주입하였으며 주사기를 빼고난 부위에는 피가 흐르지 않도록 수술용 보비를 이용하여 지혈시켰다. 비장은 원래의 위치로 넣고 복막과 복부근육 및 피부의 순으로 봉합하고 gentamycin(50 mg/ml) 0.1 ml를 근육주사 하였다.

광학현미경용 조직표본의 제작

배양세포를 비장내 이식한 후 시간경과에 따라서 흰쥐를 희생시키고 비장을 채취하였다. 채취한 조직은 neutral buffered formalin(pH 7.4)으로 고정하고 탈수와 청명과정을 거친 후 파라핀으로 포매하여 6 µm의 조직절편을 얻어 탈파라핀 하여 합수시켰다. 일반적인 조직학적 소견은 hematoxylin & eosin(H-E) 염색을 시행하고, 면역조직화학적인 transforming growth factor-β(TGF)와 epidermal growth factor(EGF)에 대한 염색은 LSAB Kit(DAKO, USA)를 이용하였으며, 세포자멸(apoptosis)에 대한 염색은 ApopTag peroxidase in situ apoptosis detection kit(Intergen S7100, USA)를 사용하였다.

면역조직화학을 위한 절편은 탈파라핀 후 3% hydrogen peroxide에 5분간 반응시킨 뒤 증류수로 수세하고 신선한 Tris 완충액에 5분간 둔 다음 생리식염 인산염 완충액으로 5분 동안 반응시켰다. TGF는 TGF(Santa Cruz Co., USA) 항체로 1시간 반응시킨 후 Tris 완충액 bath에 5분간 두었다. EGF에 대한 반응을 위하여 미리 준비한 면역조직화학 절편에 EGF(Santa Cruz Co., USA) 항체를 1시간 동안 반응시킨 후 Tris 완충액 용기에 5분간 두었다.

반응시킨 TGF와 EGF 절편은 생리식염 인산염 완충액으로 만든 biotinylated anti-rabbit와 anti-mouse immunoglobulins로 10분간 반응시킨 후 Tris 완충액으로 수세하고 0.05 M Tris 완충액(pH 7.6)으로 제조한 streptavidin peroxidase 내에서 10분간 둔 다음 다시 Tris 완충액으로 수세 후 Tris bath에 5분간 두었다. 발색반응은 2 ml의 기질 완충액을 눈금 있는 시험관에 넣고 각 완충액 2 ml 마다 AEC chromogen액을 1방울씩 첨가하고 즉시 혼합한 다음 완충액 2 ml 마다 기질-hydrogen peroxide 용액 1방울씩 첨가하

고 즉시 혼합하여 제조한 기질-chromogen 용액으로 10분간 반응시켰다.

세포자멸 염색을 위한 조직은 탈파라핀 후 수화시키고 염색용기에 넣어서 0.05 M 생리식염 인산염 완충액으로 제조한 2% H₂O₂로 5분간 담구었다. 세척 후 절편 위에 평형완충액 2방울을 표본에 직접 적용시킨 후 working strength TdT enzyme 54 µl를 절편 위에 적용시키고 커버슬립을 다시 덮어 습윤상자 내에서 37°C로 1시간 두었다. 효소를 적용한 절편은 working strength stop/wash 완충액(1.5 cc : 51 cc)이 들어 있는 coplin jar에 넣고 15초간 진탕시켜서 실온에서 10분간 항온시키고 생리식염 인산염 완충액으로 5분간 3회 세척한 다음 anti-digoxigenin-peroxidase를 2방울 떨어뜨린 후 습윤상자에 실온 상태에서 30분간 반응시켜 생리식염 인산염 완충액으로 5분간 3회 세척하였다. 절편을 발색시키기 위하여 H₂O₂를 여과된 DAB를 표본이 완전히 덮이도록 충분히 첨가하고 3-6분간 실온에 두었다가 증류수로 수세 후 methyl green으로 10분간 대조염색 하였다.

광학현미경 하에서 배자줄기세포가 간세포로 분화되는 것을 좀 더 자세하게 관찰하기 위하여 toluidine blue염색을 시행하였다. 염색은 전자현미경 조직 처리 후 표본의 투명화와 수지침투과정은 실온에서 propylene oxide를 이용하여 3회 각 10분간 실시하고 polyresin을 이용하여 포매한 후 3일간 중합하였다. 중합시킨 조직은 초박절편기(LKB, NOVA)로 준초박절편(0.5 µm)하고, toluidine blue 염색을 시행하여 400배에서 광학현미경으로 관찰하였다.

전자현미경용 조직표본의 제작

이식 비장을 채취하여 4°C 생리식염수(중외제약, 한국)에 5분간 담구어 혈액을 완전히 제거한 후 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)로 수세한 다음 4°C의 2% glutaraldehyde-phosphate buffer (pH 7.4)에 2시간 동안 담구었다. 고정 후 다시 두께가 0.5 mm 이내가 되도록 잘게 썰어 바이알에 넣는다. 전고정으로 4°C의 2% glutaraldehyde-phosphate buffer에서 1시간 동안 처리하고 0.1 M phosphate buffer로 10분간 3회 수세한 다음 4°C의 0.1 M phosphate buffer내에서 하룻밤 두었다. 후고정은 0.1 M phosphate buffer로 실온에서 5분간 수세한 다음 1% osmium tetroxide-phosphate buffer로 1시간 동안 deep black이 될 때까지 고정하고 0.1 M phosphate buffer로 각각 10분씩 3회, 2~3차 증류수로

10분간 수세하였다.

탈수는 30%에서 100%까지 순차적으로 ethyl alcohol을 이용하여 각각 5분간씩 3회 실시하고 마지막은 10분간 3회 실시하였다. 청명과 수지침투과정은 실온에서 propylene oxide를 이용하여 3회 각 10분간 실시하여 polyresin을 이용하여 beem capsule에 포매하고 드라이오븐에서 35-37°C에서 8-18시간, 45~50°C에서 하룻밤, 55-60°C에서 1일, 실온에서 하룻동안 두는 방법으로 중합시켜 블럭을 만들었다. 전자현미경 관찰을 위하여 초박절편기를 이용하여 금색이나 회색을 띠는 절편을 200 mesh의 구리 그리드에 얹어 uranyl acetate-lead citrate 이중 전자염색을 시행하였다. 전자염색한 그리드는 100 kV, 61 μ A 상태의 투과 전자현미경(JEOL 1200EX II, Japan)으로 5000배에서 주로 관찰하였다.

결 과

본 실험에서는 간세포와 합동 배양하여 간세포로 분화시킨 줄기세포를 간부분 절제술한 흰쥐의 비장내 주입하여 이들 이식세포의 구조를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

배자줄기세포의 분리와 배양

포배는 투명대에 둘러싸여 있었으며 내부에는 분열하고 있는 오디배를 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이러한 포배들을 가는 유리관으로 흡입하여 채취한 후 1% dispase 용액으로 처리하면 투명대가 소실되고 속세포덩이만 남았다. 이를 다시 collagenase로 처리하여 각각의 세포들로 분리한 다음 하룻밤이 지나면 속세포덩이의 세포들이 배자체로 형성하게 하였다. 이 세포들을 미리 준비한 feeder cell인 섬유모세포 배지 위에 분주하였다.

배양 1일 후 배자줄기세포들은 분열하여 수가 증가하면서 원형이나 다각형에 가까운 세포들이 돌기를 내면서 바닥에 부착하여 자라고 있었다. 배양 3일 후에는 원형이나 긴 사각형의 세포들이 띠모양으로 배열하여 증식하고 있었으며(Fig. 2), 배양 6일 후에는 줄기세포들은 덩어리로 뭉쳐져서 자라고 있었다.

3일간 배양한 간세포 위에 접종시 배자줄기세포는 간세포의 가장자리에 부착하였으며, 합동배양 6일 후 많은 줄기세포들이 간세포로 분화하여 다각형에서 타원형에 이르는 형태를 하고 있었으며, 일부 줄기세포는 분화하지 않고 원

형을 유지하고 있었다. 합동배양 8일 후에는 대부분의 줄기세포들이 간세포로 분화되어 있었으며 약간의 분화되지 않고 원형으로 보이는 줄기세포들도 세포들 사이에 부착되어 있었다(Fig. 3).

비장내 이식 후 광학현미경적 소견

1) H & E 소견

배양한 줄기세포를 이식한 후 10일째에 비적수의 부분은 더욱 많은 적혈구와 함께 수많은 림프구들이 분포하고 있었다. 비백수의 동맥주위림프초(periarterial lymphatic sheath : PALS) 근처에도 주로 이식한 세포들이 모여서 분포하였으며 많은 짙게 염색된 작은 핵을 가진 림프구의 침윤과 적혈구들이 많이 관찰되었다. 분화한 간세포들은 다른 세포보다는 엷게 염색된 큰 핵을 가지고 있었으며 서로 연결되어 모여 있었다

이식 20일군의 분화한 간세포들 주위에는 여전히 림프구의 침윤이 있으나 10일군보다는 줄어들어 핵이 쉽게 관찰되었다. 간세포들은 적혈구의 수가 적은 동맥주위림프초 부근에서 2-3개의 세포들로 모여 있거나 타원형으로 소엽을 이루는 것이 관찰되었으며 세망세포와는 달리 세포의 핵이 크고 밝게 염색되었다(Fig. 4).

이식 30일군에서는 혈관이 있는 육주 근처에서 다각형의 큰 핵을 가진 세포들이 세포들 사이의 경계를 유지하면서 소엽상으로 모여 있는 것을 자주 관찰할 수 있었으며, 소엽 주위에는 작고 짙은 염색된 핵을 가진 림프구들이 둘러싸고 있었다.

40일째에는 동맥주위림프초 근처에 다각형으로 엷게 염색된 큰 핵을 가진 세포들과 약간 짙게 염색된 둥근 핵을 가진 세포들이 작은 간격을 두고 작은 소엽을 이루며 군데군데 모여 있었으며, 그 사이에는 섬유모세포들도 관찰되었으며 각 소엽의 주위는 림프구들이 분포하고 있었다(Fig. 5).

80일째에는 세포들의 크기가 커지고 타원형의 핵을 가진 간세포들이 현저하게 많아 졌으며 세포들간의 간격이 약간 넓어진 상태로 혈관이 분포한 육주의 분지로 둘러싸인 소엽을 구성하고 있었다(Fig. 6).

2) Toluidine blue 소견

배양한 줄기세포를 이식한 후 10일째에 밝고 큰 핵을 가진 분화한 간세포들은 비장의 림프구 사이에서 돌기를 내어

부착하고 있었으며(Fig. 7), 이들 세포들은 20일 후에는 그 수가 증가하였으며, 이식 30일군에서는 핵이나 세포질의 크기가 증가하였으며(Fig. 8), 40일째에는 더 많은 수의 분화된 간세포들에서 세포질이 증가하였고, 80일째에는 대부분의 세포들이 세포질이 증가한 간세포들로 이루어져 있었다(Fig. 9).

3) 비장내 이식 후 전자현미경적 소견

이식 전 간세포와 함께 6일간 합동배양한 배자줄기세포는 한쪽이 불규칙한 타원형으로 분명한 핵소체와 분절된 과립세포질세망, 소수의 사립체를 관찰할 수 있었다(Fig. 10). 이식 전 간세포와 함께 8일간 합동배양한 줄기세포는 둥근 타원형의 핵을 가지며 분절된 과립세포질세망이나 사립체의 수가 증가되고 세포막면에는 소수이지만 작은 미세음모들이 발달하고 있어서 좀 더 분화된 것으로 나타났다(Fig. 11).

비장이식 후 줄기세포는 분화하여 이식 10일 후 전체적으로 이웃하는 세포들과 넓게 접촉하고 있었다. 세포핵은 진정한 염색질과 뚜렷한 핵소체를 가지고 있었다. 세포질내에는 불규칙한 모양의 공포들과 함께 이식 전보다 더 커진 소수의 사립체와 분절된 과립세포질세망과 수많은 리보솜들이 세포질내 산재하고 있어 초기 간세포의 양상을 나타내었다(Fig. 12).

이식 20일째에 이식한 줄기세포는 더욱 분화하여 세포소기관들이 잘 발달하고 있었으며 주위의 세포들과 다각형으로 접하고 있었다. 아주 큰 타원형의 핵을 가지고 있으며 매우 잘 발달된 과립세포질세망들과 많은 리보솜들과 원형의 사립체나 작은 분비과립이 발달하고 있는 것으로 관찰되어 간세포로의 기능적인 구조를 나타내기 시작하였다(Fig. 13).

이식 30일째 분화된 세포들은 작아진 핵내 분명한 핵소체를 볼 수 있으며, 세포질내 소기관은 더욱 발달하여 큰 타원형의 사립체들과 소수의 소포들과 풍부한 리보솜들이 세포질 전체에 고르게 분포하였으며 간세포에서 관찰되는 무과립세포질세망까지 나타났(Fig. 14).

이식 40일째의 분화 간세포는 뚜렷한 핵소체와 작은 원형의 핵이 관찰되었다. 세포질내에는 잘 발달된 2-3줄의 선상을 이룬 과립세포질세망과 함께 발달된 크고 작은 둥근 사립체들이 현저하게 나타났으며 간세포와 같이 과산화소체들과 다른 세포와의 접촉부에 부위에는 많은 분비과립이나 소포들을 관찰할 수 있었다(Fig. 15).

이식 80일째에는 뚜렷한 핵소체와 불규칙한 형태의 핵이 관찰되었다. 세포질내에는 크고 작은 과산화소체들과 함께 매우 큰 multivesicular bodies, 소수의 둥근 사립체와 과립세포질세망 분비과립을 볼 수 있으며 세포막에는 용모상의 돌기들이 담세관(bile canaliculus)을 형성하고 있는 것이 관찰되어 거의 기능적인 간조직의 구조인 것을 관찰하였다(Fig. 16).

면역조직화학적 소견

1) TGF 면역반응 소견

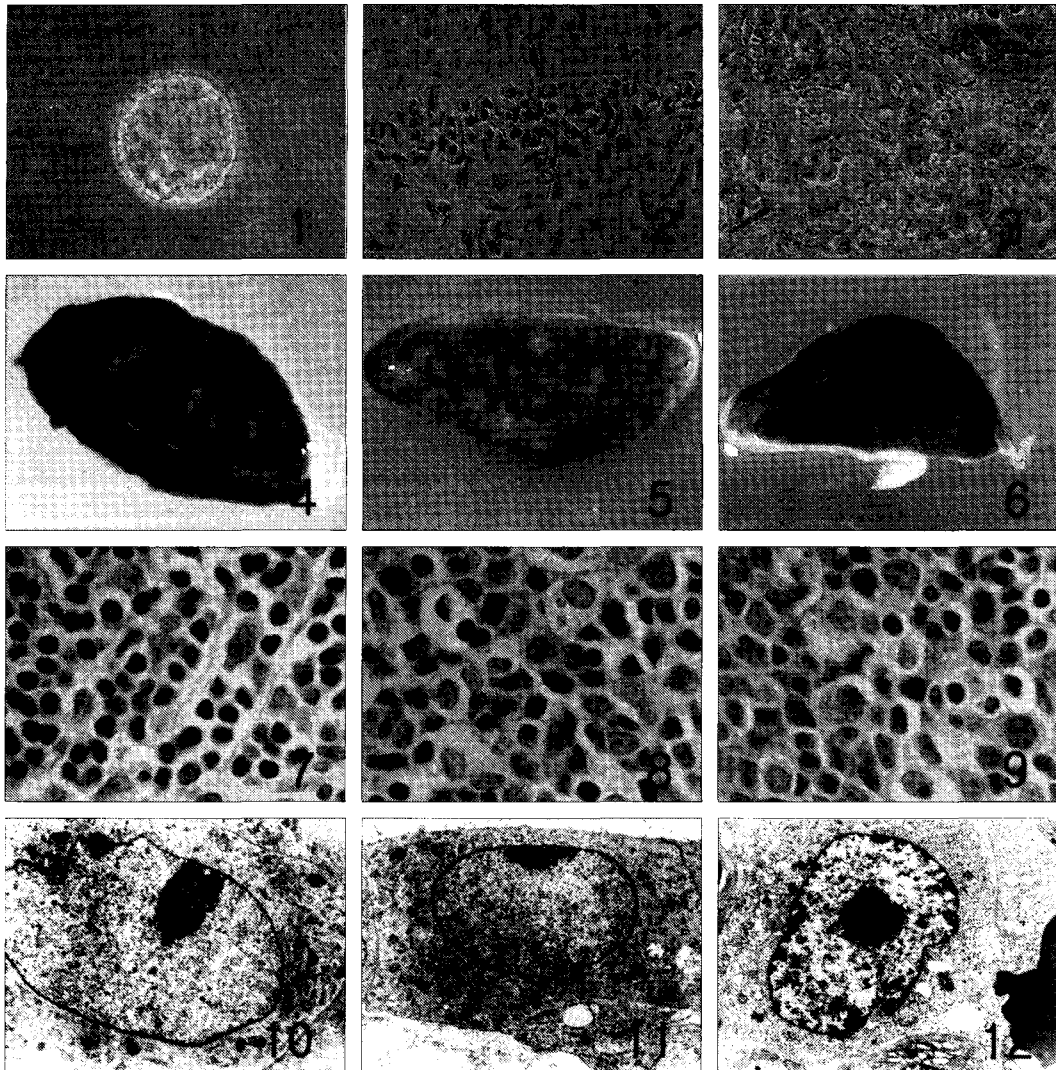
비장내 이식 후 분화된 세포의 TGF 반응은 10일째에 혈관 근처에 산재하는 세포들의 세포질내 엷은 갈색의 미약한 양성반응 보이는 세포들이, 이식 후 20일째에는 뚜렷한 TGF 반응을 보이는 세포들이 소수 출현하였다(Fig. 17). 30일째에는 세포질내 짙은 갈색의 TGF 반응을 보이는 세포들이 다수 출현하였으며, 이식 40일 후에는 전체 소엽에서 세포질내 TGF 반응을 보이는 세포들의 수가 현저하게 증가하였으며(Fig. 18), 이식 80일째에는 40일과 비슷한 양상을 보이지만 세포질내 엷은 갈색 반응을 보이는 세포들이 증가하였다.

2) EGF 면역반응 소견

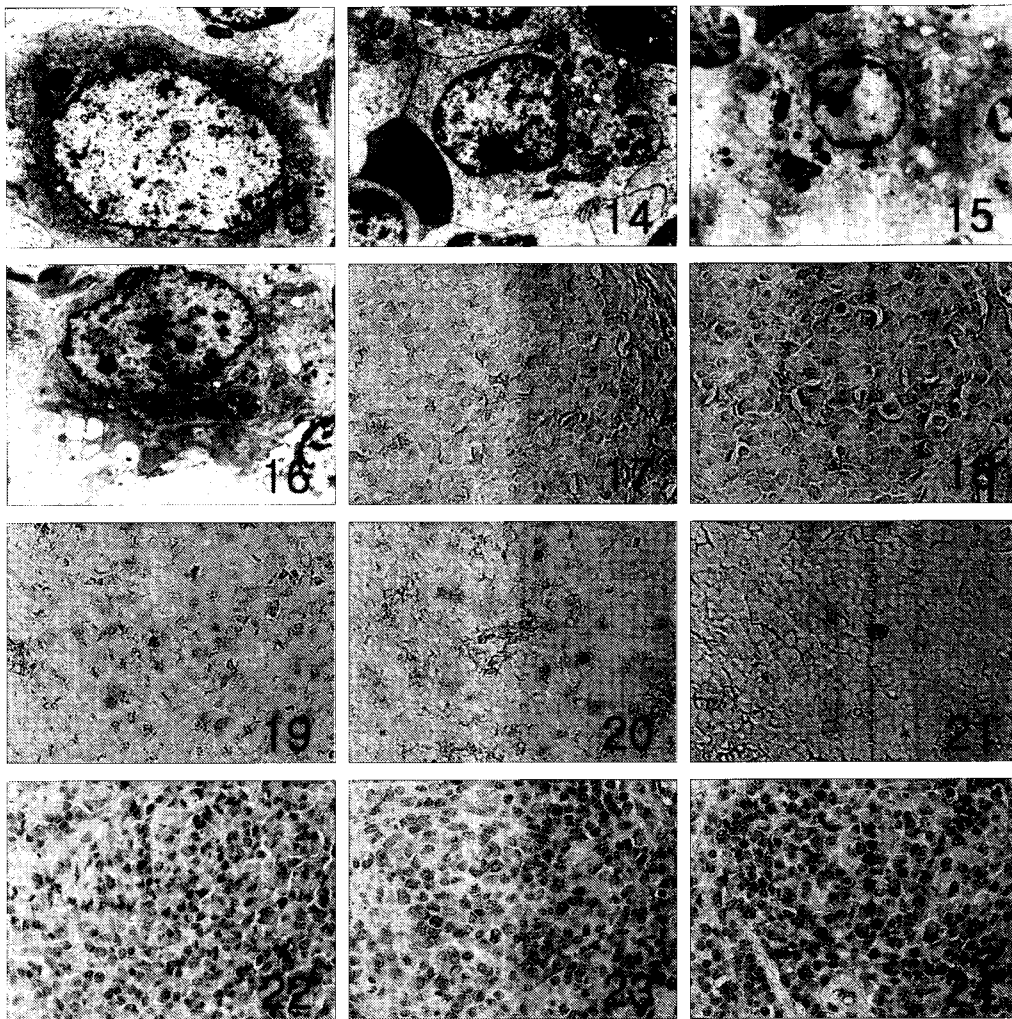
비장내 이식 후 분화된 세포의 EGF 반응은 10일째에는 세포질내 엷은 황색으로 보이는 약한 양성반응의 세포들이, 이식 20일 후 세포질내 좀 더 짙은 강한 양성반응 보이는 세포들이 다수 관찰되었으며(Fig. 19), 30일째에도 20일째와 비슷한 소견을 나타내었다(Fig. 20). 이식 40일째에는 약한 양성반응을 나타내는 세포가 감소되어 나타났으며, 80일째에는 EGF 반응을 나타내는 두서너개의 세포만이 있었을 뿐 대부분의 세포에서는 반응이 나타나지 않았다(Fig. 21).

3) Apoptosis 면역반응 소견

비장내서 세포자멸 반응 과립은 림프구의 핵내에는 짙게 나타났고 비장내 이식한 분화세포에서는 핵내 엷은 황색 또는 갈색으로 염색되어 나타났다. 이식 10일째 세포자멸 반응 과립은 림프구의 핵내에서는 아주 뚜렷하게 나타났으나 분화된 세포 핵내에는 소수의 엷은 반응을 나타낸 세포를 제외하면 전체적으로 거의 반응이 나타나지 않았다. 20일째에도 림프구에는 분명한 반응을 보였으나 분화 간세포에는 소수의 핵에서 반응 과립이 관찰되었다(Fig. 22). 30일째에



- Fig. 1. Photograph of collected blastocyst.
- Fig. 2. Photograph of culture 3 day embryonic stem cells.
- Fig. 3. Photograph of coculture 8 day embryonic stem cells with cultured hepatocytes.
- Fig. 4. Stereomicroscopic photograph of splenic cross-sections of the 20th day after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 100.
- Fig. 5. Stereomicroscopic photograph of splenic cross-sections of the 40th day after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 100.
- Fig. 6. Stereomicroscopic photograph of splenic cross-sections of the 80th day after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 100.
- Fig. 7. Toluidine blue staining of the 10th day after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 400.
- Fig. 8. Toluidine blue staining of the 30th day after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 400.
- Fig. 9. Toluidine blue staining of the 80th day after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 400.
- Fig. 10. Electron microscopic photograph of the 6th day hepatic stem cells by hepatocyte coculture. X 5000.
- Fig. 11. Electron microscopic photograph of the 8th day hepatic stem cells by hepatocyte coculture. X 5000.
- Fig. 12. Electron microscopic photograph of the 10th day hepatic stem cells after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 5000.



- Fig. 13. Electron microscopic photograph of the 20th day hepatic stem cells after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 5000.
- Fig. 14. Electron microscopic photograph of the 30th day hepatic stem cells after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 5000.
- Fig. 15. Electron microscopic photograph of the 40th day hepatic stem cells after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 5000.
- Fig. 16. Electron microscopic photograph of the 80th day hepatic stem cells after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 5000.
- Fig. 17. Immunohistochemical staining of the TGF of the 20th day after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 400.
- Fig. 18. Immunohistochemical staining of the TGF of the 40th day after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 400.
- Fig. 19. Immunohistochemical staining of the EGF of the 20th day after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 400.
- Fig. 20. Immunohistochemical staining of the EGF of the 30th day after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 400.
- Fig. 21. Immunohistochemical staining of the EGF of the 80th day after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 400.
- Fig. 22. Immunohistochemical staining of the apoptosis of the 20th day after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 400.
- Fig. 23. Immunohistochemical staining of the apoptosis of the 40th day after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 400.
- Fig. 24. Immunohistochemical staining of the apoptosis of the 80th day after intrasplenic transplantation by partial hepatectomy rat. X 400.

는 주위에 있는 림프구보다는 약한 반응이지만 간세포의 타원형 핵내에 뚜렷한 양성반응을 나타낸 세포들이 출현하기 시작하여, 이식 40일 후에는 분화 간세포의 핵내 양성반응과립을 나타낸 세포들의 수가 다소 증가하였으며 상대적으로 림프구의 반응은 감소되어 나타났다(Fig. 23). 이식 80일째에는 40일군과 비슷한 양상을 보이지만 간세포의 증식과 분화로 인하여 주위의 림프구 반응이 드물게 관찰되었고 소엽내 세포의 핵내 반응이 뚜렷하였다(Fig. 24).

고 찰

배자줄기세포는 포배의 속세포덩이로부터 분리하며 체외에서 계대배양이 가능하고 거의 모든 종류의 조직과 세포로 분화하는 다능성(pluripotency)을 지니고 있다[16]. 이미 여러 동물에서 배자줄기세포를 활용한 다양한 업적이 보고되고 있고 최근에는 사람에게 적용하는 문제로 많은 논란이 빚어지고 있다[16,18,28].

줄기세포의 초기 배양과정에서 볼 수 있는 배자체의 형성은 줄기세포의 다능성의 좋은 예이며, 지금까지 접근이 어려웠던 초기 발생과정을 체외에서 관찰할 수 있다는 점에서 획기적인 연구재료로 활용되고 있다[20]. 즉, 이들 배자체는 초기 배자와 거의 유사한 구조와 분화능이 있어서 생체 구성의 세배엽 유래의 모든 조직으로 광범위하게 분화할 수 있다[22]. 또한, 시험관 배양에서도 활발한 분화상을 관찰할 수 있다고 한다[18].

본 실험에서는 초기 단계의 줄기세포를 얻고자 포배의 속세포덩이를 분리한 후 6일간 배양하면서 배자체 형성과정을 보였으나 각 세포의 독립적 분화능을 유지하기 위해 다시 분리 배양하였다. 초기 배자세포의 이러한 집단화 현상을 조밀(compact)이라 하는데, 특히 분화초기의 배자줄기세포에서 뚜렷하다고 한다. 이와 관련하여 세포막 표면에 있는 TGF를 위한 수용체에서 TGF $\alpha 6A$ integrin subunit의 표현에 의해 세포가 뭉쳐진다고 알려져 있다[29]. 그러나, 본 실험에서는 각 줄기세포분화의 다능성이 유지된 상태를 지속시키기 위하여 배자체 형성을 못하게 하는 단백질 분해 효소인 collagenase를 처리하여 각 세포를 분리 배양하였다. 그 후 실험에 필요한 간세포화의 계통적 분화를 자극하기 위하여 따로 배양한 간세포와 합동배양하였다.

이미 분화가 끝난 간세포를 비장내에 이식한 연구에서

간을 부분 절제한 후 3H - thymidine을 병합시킨 간세포를 비장내로 이식하였던 바 간세포는 1주일내에 현저히 감소되고 세포증식이 일어나지 않았다고 하였다. 또한, 이식한 간세포의 m-albumin-RNA도 급격히 감소되었다. 즉, 비장내 간세포 이식시 초기에 간세포의 괴사가 일어나 충분한 대사성 유지를 위해서는 효과가 없는 방법이라고 보고하고 있다[4,9].

배자줄기세포의 이식에 대한 연구에서 이식에 필요한 배자줄기세포와 이식할 수 있는 적합한 부위가 확보되면 이식을 성공적으로 실행하기 위해서는 세포를 분열시켜 증식시키면서 목적하는 계통세포로 분화되어야 한다[7]. 배자줄기세포의 계대성 분화를 억제하는 것은 '세포 증식인자'이며, 계대성 분화를 촉진하는 것을 '세포 분화인자'이다. 세포 증식인자와 분화인자를 단순히 첨가하는 것만으로는 원하는 계대증식이 빠르게 일어나지 않으므로 필요한 여러 자극인자를 첨가하는 것이 필요하다고 알려져 있다[2].

본 실험에서는 간세포로의 분화 자극인자로 줄기세포를 일정 동안 간세포와 합동배양하였으며, 이식 후 분화를 촉진하기 위하여 간부분 절제술을 시행하였다. 실험의 결과에서 관찰된 전자현미경적 소견으로 비장이식 후 20일부터 간세포화된 분화를 확인하였고 30일에는 간세포의 기능을 할 수 있을 정도로 분화되었다. 나아가 40일에는 간세포 집단 사이에 담세관과 같은 관이 형성되었다. 80일에는 세포소기관 중 사립체, 형질내세망의 발달이 현저하였다. 그러나, 그 외 어떤 자극인자를 더 추가하여야 간세포의 분화가 촉진되는지는 여러 가지 신호전달인자를 연구함으로써 차츰 밝혀가야 할 것이다.

또한, 본 실험에서 이식한 분화세포의 조직 적응성을 관찰하였던 바 분화중인 이식세포들이 비장 혈관이 있는 육주 주위에 소엽을 형성하며 증식하였으며 이식 후 80일까지 활동적이었다.

배아줄기세포의 분화능에 영향을 주는 cytokine 및 기타 수용성 전달물질은 분화억제제인 LIF(leukemia inhibitory factor)가 있으며[24], TGF도 분화억제 능력이 있는 것으로 알려져 있다[26]. 또한, 미분화된 줄기세포가 표현형을 지속적으로 유지하기 위해서는 세포핵내 전사 활성인자인 STAT3의 임계적인 양이 필수적인 역할을 하는 것으로 보고되어 있다[23]. 그러나, 다분화능을 지닌 세포가 어떻게 분화되어 가는지에 대한 확신은 이식 실험에 의해 생체내의 복잡한

환경에서 연구되어 분화상의 추이를 관찰하여만 분화 조절 인자와 세포 상호작용의 파악에 활용할 수 있다.

간세포의 비장이식은 실험적으로 유발시킨 간질환에 일시적인 효과가 있다는 것으로 검증되어 있지만 비장내에서 간세포로 지속적으로 빠른 증식을 촉진하는 방법은 여전히 한계에 부딪혀 있다. 간세포의 빠른 재생을 위하여 간경화를 일으킨 흰쥐의 비장에 이식된 간세포는 간세포 자극물질 (hepatic stimulatory substances, HSS)을 투여하여 증식을 유도되었으며, 그 결과 간경화의 정도에 따라 HSS의 자극효과가 촉진되는 것을 밝혔다[10]. 그러나, 간세포의 빠른 증식을 위해서는 자극하는 여러 인자의 복합적인 세포사이의 상호작용이 관여하기 때문에 본 실험에서는 배양과정에 간세포와 줄기세포의 합동배양을 시행하고, 이식한 흰쥐에는 간부분 절제술을 시행하여 줄기세포의 분화를 유도하였다.

본 실험의 합동배양 결과 8일 후에 간세포화 분화가 진행되는 것을 전자현미경 표본에서 확인할 수 있었다. 간부분 절제술 시행 후 비장내에 이식된 배양 줄기세포의 관찰에서도 분화와 증식은 지속되어 소엽성 간세포의 집단 형성 등 기능성 간조직화를 관찰할 수 있었다. 비장내 이식 초기에 간세포화 줄기세포는 빠르게 증식하였으며, 그 후에 세포의 크기가 커지며 혈관이 있는 육주 근처에서 소엽을 형성하였다. 이들 변화는 비장의 배중심에 분화된 세포보다 더욱 미분화된 세포가 들어감으로써 지속적으로 이식된 줄기세포의 증식이 촉진된 것으로 추론할 수 있으며, 이는 TGF 및 EGF 반응의 변화에서 관찰할 수 있었다.

이식 후 분화세포의 조직화의 지침이 되는 TGF 반응은 이식 초기에는 미약한 반응을 나타내었으나 분화가 활발한 이식 40일 후에는 뚜렷한 TGF 반응의 증가를 나타내었으며 80일까지 지속되지는 않았다. 이는 분화중인 줄기세포의 세포막 표면에는 TGF를 위한 수용체가 있으나 이의 발현이 증가하기 위해서는 분화, 증식하는 다른 세포가 증가하면서 세포 상호간의 작용으로 TGF 면역반응이 증가한 것으로 생각된다. 그러나, 80일 이후에는 분화된 줄기세포의 조직화가 어느 정도 소강상태를 유지한 때문인 것으로 생각된다.

EGF는 개체발생 및 기관형성 시기의 가장 기본적인 활성화 인자로 분화와 증식의 기준이 될 수 있다. 이식 후 EGF 반응은 비교적 이식 초기인 20일과 30일 군에서 양성반응을 보이는 세포가 다수 출현하였으며 40일째에는 양성반응 세포가 감소하여 80일째는 대부분의 세포에서 반응이 나타나

지 않았다. 이는 이식 줄기세포의 분화와 증식이 이식 초기인 20일과 30일군에서 더욱 왕성하여 이 시기에 활성이 증가되었으나 40일 이후 간세포로의 분화가 안정기에 접어들며 활성이 감소한 것으로 추론할 수 있겠다.

이상의 실험 결과는 윤리상 인간 생체에서 다룰 수 없는 여러 발생학적인 연구에 응용될 수 있으며[10] 이런 연구를 바탕으로 형질변환기법과 접목하여 최근 주목받고 있는 난치병의 세포이식 치료 등에도 적용할 수 있는 기초를 마련하게 될 것이다.

본 실험에서 배자줄기세포 등 간세포와 함께 배지에 합동배양하여 간세포로 분화할 수 있는 능력을 확인함에 따라 다른 세포의 이식시에도 같은 방법을 적용하여 줄기세포를 목적하는 세포로 분화 유도시킨 후 세포이식 치료에 활용할 수 있으리라는 기대를 갖게 되었다. 특히 배자줄기세포는 무한 증식이 가능하기 때문에 특정 세포로의 분화법을 개발하면 그 세포의 결핍으로 인해 초래되는 질환의 이식을 위한 세포 공급의 문제점이 해결될 수 있게 된다. 이러한 활용을 위하여 배자줄기세포의 발생, 분화과정에 있어서의 분자 조절, 세포 특이성의 진행, 신호전달의 유도 등에 대한 연구가 앞으로 활발히 이루어져야 할 것이다.

요 약

흰쥐에서 간부분 절제술 후 비장내 배자줄기세포를 이식하여 배자줄기세포가 간세포로 분화하여 장기간에 걸쳐서 비장내에서 간세포의 기능적인 구조를 유지하는지를 조사하였으며 간세포로의 재생 효과에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 비장내 세포이식에서 배자줄기세포를 이식하면 처음에는 동맥주위림프초 근처에 위치하여 그 수가 먼저 증가하면 육주 주위에 소엽상으로 모여서 세포의 크기가 커졌다. 세포내 소기관의 발달은 이식 후 20일에 가장 현저한 발달을 보이며 이때 EGF의 반응도 가장 현저하였다. 이식 후 40일이 되면 세포질내 소기관의 발달이 간세포의 기능이 가능할 정도로 분화되었으며 TGF 반응이나 apoptosis 반응은 증가하였다.

참 고 문 헌

1. Bilir, B. M., D. Guinette, F. Karrer, D. A. Kumpe, J.

- Krysl and J. Stephens. 2000. Hepatocyte transplantation in acute liver failure. *Liver Transpl.* **6(1)**, 32-40.
2. Borel-Rinkes, I. H., A. Bijma, G. Kazemier, M. Sinaasappel, D. Valerio and O. T. Terpstra. 1994. Proliferative response of hepatocytes transplanted into spleen or solid support. *J. Surg. Res.* **56(5)**, 417-423.
 3. Calise, F., E. Di-Florio, A. Mancini, E. Mezza, R. Di-Minno and A. Ceriello. 1997. Intrasplenic hepatocyte transplantation in the pig: new technical aspects. *Transplant. Proc.* **29(4)**, 1999-2001.
 4. Chen, L., G. J. Davis, D. W. Crabb and L. Lumeng. 1994. Intrasplenic transplantation of isolated periportal and perivenous hepatocytes as a long-term system for study of liver-specific gene expression. *Hepatology* **19(4)**, 989-998.
 5. David, P., E. Alexandre, M. Audet, M. P. Chenard-Neu, P. Wolf and D. Jaeck. 2001. Engraftment and albumin production of intrasplenically transplanted rat hepatocytes (Sprague-Dawley), freshly isolated versus cryopreserved, into Nagase analbuminemic rats(NAR). *Cell Transplant.* **10(1)**, 67-80.
 6. Dunn, T. B., N. H. Kumins, V. Raofi, D. M. Holman, M. Mihalov and J. Blanchard. 2000. Multiple intrasplenic hepatocyte transplantations in the dalmatian dog. *Surgery* **127(2)**, 193-199.
 7. Gearhart, J. 1998. New potential for human embryonic stem cells. *Science* **282**, 1061-1062.
 8. Gupta, S., P. R. Yerneni, R. P. Vemuru, C. D. Lee, E. L. Yellin and K. K. Bhargava. 1993. Studies on the safety of intrasplenic hepatocyte transplantation: relevance to ex vivo gene therapy and liver repopulation in acute hepatic failure. *Hum. Gene Ther.* **3**, 249-257.
 9. Henne-Bruns, D., F. O. Ambrass, P. Schmiegelow, M. Hohne, D. Paul and B. Kremer. 1989. Intrasplenic hepatocyte transplantation: evaluation of DNA synthesis and proliferation in auxiliary transplanted cells. *Res. Exp. Med.(Berl)* **189(4)**, 295-302.
 10. Jiang, B., S. Kasai, M. Sawa, S. Hirai, T. Yamamoto and H. Ebata. 1993. Beneficial effect of hepatic stimulatory substances on the survival of intrasplenically transplanted hepatocytes. *Cell Transplant.* **2(4)**, 325-329.
 11. Keller, G. M. 1995. In vitro Differentiation of embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 862-869.
 12. Kobayashi, N., T. Fujiwara, K. A. Westerman, Y. Inoue, M. Sakaguchi and H. Noguchi. 2000. Prevention of acute liver failure in rats with reversibly immortalized human hepatocytes. *Science* **287**, 1258-1262.
 13. Kobayashi, N., M. Miyazaki, K. Fukaya, Y. Inoue, M. Sakaguchi and H. Noguchi H. 2000. Treatment of surgically induced acute liver failure with transplantation of highly differentiated immortalized human hepatocytes. *Cell Transplant.* **9(5)**, 733-735.
 14. Kobayashi, N., M. Miyazaki, K. Fukaya, Y. Inoue, M. Sakaguchi and T. Uemura. 2000. Transplantation of highly differentiated immortalized human hepatocytes to treat acute liver failure. *Transplantation* **69(2)**, 202-207.
 15. Kokudo, N., I. Otsu, T. Okazaki, S. Takahashi, K. Sanjo and Y. Adachi. 1995. Long-term effects of intrasplenically transplanted adult hepatocytes and fetal liver in hyperbilirubinemic Gunn rats. *Transpl. Int.* **8(4)**, 262-267.
 16. 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.
 17. Matsusaka, S., A. Toyosaka, K. Nakasho, T. Tsujimura, A. Sugihara and T. Takanashi. 2000. The role of oval cells in rat hepatocyte transplantation. *Transplantation* **70(3)**, 441-446.
 18. McDonald, J. W., X. Z. Liu, Y. Qu, S. Liu, S. K. Mickey and D. Turetsky. 1999. Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat. Med.* **5(12)**, 1410-1412.
 19. O'shea, K. S. 1999. Embryonic stem cell models of development. *Anat. Rec.* **257**, 32-41.
 20. Pedersen, R. A. 1994. Studies of in vitro differentiation with embryonic stem cells. *Reprod. Fertil. Dev.* **6**, 543-552.
 21. Perentesis, J., T. E. DeFor, J. P. Neglia, E. Katsanis and N. K. Ramsay. 1999. Successful autologous stem cell transplantation for high-risk pediatric solid tumors. *ASCO Proceedings* **18**, 159.
 22. Rathjen, P. D., J. Lake and L. M. Whyatt. 1998. Properties and uses of embryonic stem cells; prospects for application to human biology and gene therapy. *Reprod. Fertil. Dev.* **10**, 31-47.
 23. Raz, R., C. K. Lee, L. A. Cannizzaro, P. d'Eustachio and D. E. Levy. 1999. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96(6)**, 2846-2851.
 24. Shim, H., A. Gutierrez-Adam and L. R. Chen. 1997. Isolation of pluripotent stem cells from cultured

- porcine primordial germ cells. *Biol. Reprod.* **57**, 1089-1095.
25. Solter, D and J. Gearhart. Putting stem cells to work. *Science* **283**, 1468-1470.
26. Sparks, R. L. and R. E. Scott. 1986. Transforming growth factor type beta is a specific inhibitor of 3T3 T mesenchymal stem cell differentiation. *Exp. Cell Res.* **165(2)**, 345-352.
27. Thomson, J. A., J. Itskovitz-Elder, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel and V. S. Marshall. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147.
28. Thomson, J. A., K. Kalishman, T. G. Golos, M. Durning, C. P. Harris and R. A. Becker. 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 7844-7848.
29. Thorsteinsdottir, S., B. A. Roelen, M. J. Goumans, D. W. Oostwaard, A. C. Gaspar and C. L. Mummery. 1999. Expression of the $\alpha 6 A$ integrin splice variant in developing mouse embryonic stem cell aggregates and correlation with cardiac muscle differentiation. *Differentiation* **64**, 173-184.

(Received April 18, 2002; Accepted May 29, 2002)