

두 개의 다른 마우스 배아줄기세포의 차별적인 조혈세포 분화능

김진숙¹ · 강호범¹ · 송지연² · 오구택³ · 남기환⁴ · 이영희[†]

충북대학교 자연과학대학 생화학과, ¹충남대학교 약학대학, ²한국과학기술원 생명과학과,
³이화여자대학교 생명과학부, ⁴한국생명공학연구원 질환동물모델평가연구실

Different Potential of Hematopoietic Differentiation in Two Distinct Mouse Embryonic Stem Cells

Jin-Sook Kim, Ho-Bum Kang¹, Jee-Yeon Song², Goo-Taeg Oh³, Ki-Hoan Nam⁴ and Young-Hee Lee[†]

Department of Biochemistry, Biotechnology Research Institute, Chungbuk National University,
Cheongju, Chungbuk, 361-763, Korea

¹College of Pharmacy, Chungnam National University, Yusong, Daejeon, 305-764, Korea

²Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Daejeon, 305-701, Korea

³Laboratory of Cardiovascular Genomics, Ewha Womans University, Seoul, 120-750, Korea

⁴Laboratory of Animal Model Evaluation, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology(KRIBB),
P.O. Box 115, Yusong, Daejeon, 305-600, Korea

ABSTRACT : Embryonic stem(ES) cells have tremendous potential as a cell source for cell-based therapies. Realization of that potential will depend on our ability to understand and manipulate the factors that influence cell fate decision and to develop methods for getting enough cell numbers for clinical applications. Hematopoiesis has been widely studied, and hematopoietic differentiation from ES cells is a good model to study lineage commitment. In this study, we investigated stemness and compared the efficiency of hematopoietic differentiation using two different mouse embryonic stem cell lines TC-1 and B6-1. Although the two cell lines showed known stem cell properties with minor differences, the embryoid body formation efficiency in methylcellulose was much higher in TC-1 than B6-1. When measured potentials of hematopoietic differentiation using functional(colony-forming cell) and phenotypic(specific marker expression) assays, we found that TC-1 can differentiate into hematopoietic cells in methylcellulose culture but B6-1 cannot. These results imply that we can improve the efficiency of hematopoietic cell differentiation by selection of proper cell lines and this may be also applied in the differentiation of human embryonic stem cells.

Key words : Hematopoiesis, Mouse embryonic stem cells, Stemness, Differentiation.

요 약 : 배아 줄기세포는 세포 치료 목적을 위한 재료로서 매우 큰 잠재력을 가지고 있으며, 이러한 잠재력의 실현을 위해서 세포의 운명에 결정적인 역할을 하는 요소들을 확인하고 특정 세포의 대량 생산을 위한 방법을 개발하여야 한다. 조혈과정은 폭넓게 연구되어 왔으며, 배아 줄기세포로부터 조혈세포의 분화는 lineage commitment에 관한 연구에 좋은 모델이 된다. 본 연구에서는, 두 종류의 마우스 배아 줄기세포주 TC-1과 B6-1를 이용하여 그 특성과 조혈세포 분화능을 비교하여 보았다. 두 세포주는 작은 차이는 있으나 줄기세포로서의 특성을 공통적으로 가지고 있었다. 그러나 methylcellulose 배양 system을 사용하여 embryonic body 형성능을 확인한 결과 TC-1이 B6-1에 비해 월등함을 확인하였다. 조혈세포 분화의 추적을 위해 blast colony의 형성, progenitor assay, RT-PCR을 통한 조혈세포 분화 관련 marker의 발현 분석을 수행한 결과, TC-1은 정상적으로 조혈세포를 생성해 내지만, B6-1은 제대로 분화되지 못함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들은 *in vitro* 에서 배아 줄기세포로부터 조혈세포로 분화를 유도할 때, 보다 적합한 세포주의 탐색이 요구됨을 제시하며 이는 향후 인간 배아 줄기세포주에서도 마찬가지로 적용될 수 있음을 암시한다고 사료된다.

본 연구는 과학기술부 21세기 프론티어 연구개발사업인 세포응용연구 사업단의 연구비 지원(SC2110), 2005년도 충북대학교 학술연구지원사업의 지원을 받아 수행되었음.

[†] 교신저자: 충청북도 청주시 흥덕구 개신동 12번지, 충북대학교 자연과학대학 생화학과. (우) 361-763, (전) 043-261-3387, (팩) 043-267-2306, E-mail: yhl4177@chungbuk.ac.kr

서 론

줄기세포 연구는 미래의학이라 할 수 있는 세포대체요법 (cell replacement therapy)이나 생체 친화적 인공장기 개발

을 위한 재료의 공급원으로 뿐만 아니라 인체 발생과정의 경시적 관찰과 더불어 각종 질병이나 유전질환의 원인을 해석할 수 있기 때문에, 윤리적 논란에도 불구하고 세계적으로 연구가 활발히 진행되고 있는 분야이다. 아울러 정상 염색체를 가지고 있고 노화와 관련된 telomerase activity가 매우 높아 향후 개발될 세포 치료 요법을 위한 세포 공급원으로서 유용한 재료로 이용될 수 있다.

줄기세포(stem cell)란 조직을 구성하는 각 세포로 분화되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭하며, 분화 자극(환경)에 의해 특정 세포로의 분화가 진행된다. 줄기세포는 일반 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 재생산하면서 증식될 수 있는 특성을 가지고 있다(Evans & Kaufman, 1981; Thomson *et al.*, 1995; Reubinoff *et al.*, 2000). 또한 줄기세포는 특정 세포로 분화될 때, 환경(분화 자극)에 따라 다른 세포로 분화될 수 있어 분화에 유연성을 가지고 있는 것이 특징이다(Orkin & Zon, 2002). 사람의 경우 임신 후 2주경에 포배기라고 불리는 배아 발생단계에 도달하게 되는데 이 포배기의 내부에는 세포내괴라고 하는 세포 덩어리가 있다. 이 세포내괴는 장차 태아를 형성할 부분으로서 이 세포 덩어리로부터 확립한 줄기세포가 배아 줄기세포(embryonic stem cell, ES cell)이다(Thomson *et al.*, 1998). 이 배아 줄기세포는 이론적으로 한 개체를 구성하는 모든 조직의 세포로 분화될 수 있는 잠재력을 지닌 줄기세포이다. 그 후 태아 발생과정이 진행되어 태아의 각 장기가 형성되는 과정에서는 각 장기의 조직에 특이한 줄기세포가 존재하여 그 장기를 형성하는 태아 발생과정을 주도하게 된다. 이와 같이 조직 특이 줄기세포는 일반적으로 분화할 수 있는 능력이 특정 조직을 구성하는 세포로만 한정되게 되며, 성인이 된 후에도 대부분의 장기 조직에는 각 조직에 특이한 줄기세포가 남아 있게 되어 정상적 또는 병리적으로 발생하는 세포의 손실을 보충하게 된다(NIH Report on Stem Cells, 2001).

모든 종류의 성체 혈구 세포는 골수에 존재하는 극소수의 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cell; HSC)로부터 분화하여 생성된다(Paul *et al.*, 1991). 조혈 줄기세포도 자기복제를 통해 미분화 상태로 남아있는 동시에 다양한 혈구세포, 즉 보다 제한적인 분화능력을 갖는 전구세포들을 생성하는 특징을 가진다. 이러한 조혈 줄기세포로부터 최소한 8가지 이상의 다양한 혈구세포로 분화되는 과정을 조혈이라고 한다. 배아의 발생과정에서는 포배기를 지나 세 개의 배엽 즉, 외배엽, 중배엽, 내배엽으로 분화되는데, 조혈과정은 이 중에서도 중배엽에서 일어난다(Wiles & Keller, 1991; Chen, 1992; Nakano *et al.*, 1994; Keller *et al.*, 1993). 조혈과정의

자가 재생 기작이나 특정 혈구세포로의 분화 운명 결정 과정을 밝히는 것은 배아 줄기세포로부터 조혈 세포의 분화 연구에 있어 풀어야 할 핵심적인 과제이다. 또한 배아 줄기세포의 연구에 있어 특정세포로의 분화 유도 기술의 개발은 줄기세포의 응용범위를 결정할 수 있다는 점에서 매우 중요하다. 마우스 배아 줄기세포의 경우 분화 억제 물질인 leukemia inhibitory factor(LIF) 등을 제거한 상태로 배양하게 되면 신경, 심근, 연골, 근육 및 내장 등과 같은 다양한 세포로 분화되는데 이를 자발적 분화라고 한다(Vogel *et al.*, 1975). 이때 자발적 분화의 효율은 매우 낮으므로 이를 통해 분화된 각각의 세포를 순수 분리하는 것은 매우 어려운 일이다. 따라서 특정세포로 분화를 유도하는 기술적 체계가 개발되어야 한다.

본 연구에서는 두 개의 다른 마우스 배아 줄기세포(TC-1과 B6-1)를 이용하여 줄기세포로서의 특성을 비교 분석하였으며, 조혈세포로의 분화효율을 비교하여 분화 유도의 효율을 증가시키기 위한 한 조건으로서 배아 줄기세포주의 선택이 중요함을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 마우스 배아 줄기세포 배양

마우스 배아 줄기세포는 129S6 마우스에서 유래된 세포인 TC-1과 B6-1을 이용하였다. 마우스 배아 줄기세포는 2~3일마다 한 번씩 계대 배양을 해주었다. 배양 접시에서 자라고 있는 마우스 배아 줄기세포를 1X PBS(137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4mM Na₂HPO₄, 1.5mM KH₂PO₄)로 두 번 세척한 후 0.025% trypsin-EDTA를 첨가하여 37°C, 5% CO₂, 습윤한 incubator에서 5분간 두었다. 세포가 단일 세포로 분리된 것을 확인한 다음 마우스 배아줄기세포 배양 배지(DMEM, 15% fetal bovine serum (FBS; Hyclone Inc., Logan, UT, USA), 2mM L-glutamine, 0.1mM β-mercaptoethanol, 1mM pyruvate, 100U/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin, 0.1mM non-essential amino acids)를 첨가하여 2,000rpm에서 5분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 새 배지에 재부유시켜서 irradiated mouse embryonic fibroblast(MEF) 배양 접시에 마우스 배아 줄기세포를 넣어 37°C, 5% CO₂, 습윤한 incubator에서 배양하였다.

2. Alkaline Phosphatase 염색

Alkaline phosphatase activity는 alkaline phosphatase kit(86-R; Sigma, ST. Louis, MO)을 이용하여 확인하였다.

ES cell 배양접시를 세척한 후, 66% acetone, 3% formaldehyde 용액으로 고정하고, diazonium salt/naphthol AS-BI alkaline solution을 첨가하여, 15분간 실온에서 배양하였다.

3. SSEA 1/3/4의 발현 여부 확인

SSEA 1/3/4의 발현은 항체 적용 후 vectastatin elite ABC kit(PK-6102 Mouse IgG; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA)을 이용하여 염색성을 확인하였다. ES cell 배양접시를 세척한 후, 3% paraformaldehyde를 포함한 PBS로 세포를 고정하였다. Blocking 과정으로서, normal serum을 이용하여 500 μ L/well로 적용하고, 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 이때 SSEA-1과 SSEA-3의 경우에는 2% mouse serum(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)을 사용하였고 SSEA-4의 경우에는 2% rat serum(Santa Cruz)을 사용하였다. 1차 항체 반응에 대한 negative control로서는 PBS만 처리하였고, SSEA-1은 mouse anti-SSEA1 monoclonal antibody(isotype IgM), SSEA-3은 rat anti-SSEA3 monoclonal antibody(isotype IgM), SSEA-4는 mouse anti-SSEA4 monoclonal antibody(isotype IgG3)를 최종농도가 5 μ g/mL로 하여 200 μ L/well로 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. SSEA-1 및 SSEA-4에 대한 항체는 Chemicon International(Temecula, CA, USA)에서 구입하였고 SSEA-3에 대한 항체는 Iowa University의 Developmental Studies Hybridoma Bank(Iowa City, IA, USA)에서 구입하였다. 각 well을 PBS로 2회 세척한 후, SSEA-1, SSEA-3 및 SSEA-4에 대한 2차 항체로서는 rat anti-mouse IgM biotinylated antibody(Pharmingen, San Diego, CA, USA), mouse anti-rat IgM biotinylated antibody(Pharmingen), rat anti-mouse IgG biotinylated antibody(Vector Laboratories Inc.)를 각각 1/1,000 비율로 희석하여 200 μ L/well로 적용하고, 30분간 실온에서 배양하였다. 각 well을 PBS로 2회 세척한 후, streptavidin-conjugated horseradish peroxidase와 기질 DAB를 이용하여 발색 반응시키고, 세포 관찰을 용이하게 하기 위해 hematoxylin으로 대조염색을 하였다.

4. Oct-4와 Nanog 유전자의 발현 확인

감마선을 조사한 MEF 위에서 배양하던 미분화 상태의 마우스 배아 줄기세포를 회수한 후, TRI reagent(MRC, Cincinnati, OH, USA)를 사용하여 total RNA를 분리하였고 reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR)을 이용하여 cDNA를 얻은 후 Oct-4 및 Nanog 유전자에 특

이적인 primer를 이용하여 분석하였다. PCR product를 agarose 전기영동으로 분석하여, 이들 유전자의 발현을 확인하였다. PCR에 사용된 primer는 GenoTech(Daejeon, Korea)에서 제조하였으며 그 서열은 Oct4로 5'-GAGAACAATGA GAACCTTCAGGAGA-3'(sense), 5'-TTCTGGCGCCGGT TACAGAACCA-3'(antisense); Nanog로 5'-AGGGTCTG CTACTGAGATGCTCTG-3'(sense), 5'-CAACCACTGGT TTTTCTGCCAC-3' (antisense), Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)로, 5'-ACCACAGTCCATGCCA TCAC-3'(sense), 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'(antisense)이었다.

5. Western Blot 분석

마우스 배아 줄기세포의 LIF에 대한 반응성을 확인하기 위해서 배아 줄기세포를 serum이 없는 상태에서 하룻밤(18 시간) 정도 둔 뒤, 10ng/mL human hLIF, 50ng/mL human interleukin-6(hIL-6) 및 50ng/mL mouse stem cell factor (mSCF)(Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA)를 처리하였다. 세포 lysate를 얻은 후 분리한 단백질은 정량하여 같은 양의 시료를 12% SDS-PAGE gel에 분주하고 전기영동하였다. 전기영동으로 분리한 단백질은 nitrocellulose membranes (Millipore Corp, Bedford, MA, USA)로 옮겼다. 비특이적인 단백질의 결합을 방지하기 위해 5% skim milk가 첨가된 Tris buffered saline-Tween 20(TBS-T; 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) 용액으로 1시간 동안 반응한 후 1차 phospho-specific anti-p-STAT3 antibody(Cell Signaling Technology; Beverly, MA, USA)로 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. TBS-T 용액으로 세척한 후, anti-rabbit 2차 항체(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)로 두 시간 동안 반응시켰다. West-Zol™ Plus(iNtRON Biotechnology, Seoul, Korea)를 사용하여 면역반응성을 확인하였다. 사용한 단백질의 양이 동일함을 확인하기 위하여 anti-Hsp70 antibody(Cell Signaling Technology)로 다시 반응시켜 결과를 비교하였다.

6. RNase Protection Assay

TRI reagent를 사용하여 TC-1과 B6-1 세포주에서 total RNA를 분리한 후 종전 실험에서 사용하였던 방법에 따라 RNase protection assay를 수행하였다(Lee *et al.*, 2001). Multi-probe template set mCR-2(mouse chemokine receptor 2; Pharmingen)을 주형으로 하여 *in vitro* transcription으로 ³²P-UTP로 표지된 RNA probe를 제조한 후 RNA sample과

하룻밤 동안 혼합시켰다. 혼합액에 RNAse를 처리한 후, RNase로 분해되지 않은 probe를 순수 분리하여 5% denaturing polyacrylamide gel에서 전기영동 후 autoradiography로 분석하였다. mCR-2 probe에는 interleukin 5 receptor α (IL-5R α), AIC-2A, AIC-2B, granulocyte macrophage colony stimulating factor α (GM-CSFR α), interleukin 3 receptor α (IL-3R α), interleukin 6 receptor α (IL-6R α), gp130, LIF receptor α (LIFR α), granulocyte colony stimulating factor receptor (G-CSFR)와 internal control인 L32, GAPDH가 포함되었다.

7. Embryonic Body 형성을 통한 조혈세포 분화 유도

MEF 위에서 배양하던 미분화 상태의 마우스 배아 줄기 세포를 분화 조건에서 방치하여 embryonic body(EB)를 형성 하게 함으로써 조혈세포 분화를 유도하였다. EB 형성 이틀 전에 배양 중인 마우스 배아 줄기세포를 IMDM 분화용 배지로 계대하여 cell을 미리 적응시켰다. 이틀 후 ES cell을 trypsin-EDTA를 처리하여 단일 세포로 만들고, MEF cell의 제거를 위해 마우스 배아 줄기세포를 배양접시에 30분간 둔 후, plate 바닥에 붙지 않은 배아 줄기세포를 회수하였다.

1) Methylcellulose 배양법

세포의 수를 확인하여 분화용 배지(15% FBS, 1mM sodium pyruvate, 100U/mL penicillin, 100mg/mL streptomycin, 2mM glutamine, 0.1mM non-essential amino acids, 100 μ M mono-thioglycerol(MTG), IMDM)에 1×10^5 cells/mL의 농도로 재부유시켰다. 0.8% methylcellulose가 포함된 분화용 배지에 1×10^4 cells/mL 이 포함되도록 세포를 첨가하여 3.5cm bacterial petri dish(noncoated dish; SPL Life Sciences, Kyoung-Gi, Korea)에서 배양하여 EB를 생성시켰다. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하며 매일 역상현미경을 통해 관찰하였다. Blast colony 형성을 확인하기 위해서는, EB 생성 3.5일 시점에서 EB를 회수하여 분쇄한 후 mSCF와 vesicular endothelial growth factor(VEGF)가 포함된 분화용 배지(15% FBS, 2mM L-glutamine, 50ng/mL mSCF, 5ng/mL VEGF(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), 450 μ M MTG)에 1×10^4 cells/mL이 포함되도록 세포를 첨가하여 3.5cm bacterial petri dish(noncoated dish; SPL Life Sciences, Kyoung-Gi, Korea)에서 배양하고 7일 후에 colony를 관찰하였다. 생성된 colony의 모양에 따라 secondary EB, blast-like colony, blast colony로 분류하였다.

2) Liquid Suspension Culture

세포의 수를 확인하여 분화용 배지에 8×10^3 cells/mL 되도록 희석한 후 10 cm bacterial petri dish에서 배양하였다. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하며 매일 역상현미경을 통해 관찰하였다. Blast colony 형성방법은 methylcellulose 배양법에서 사용한 방법과 동일하다.

8. Progenitor Assay(Colony Forming Assay)

마우스 배아 줄기세포를 methylcellulose에서 분화시킨 EB를 회수하여, 0.8% methylcellulose(Stem Cell Technology, Vancouver, BC, Canada), 30% FBS, 2mM L-glutamin, 0.2mM Hemin(Sigma) 및 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol(Sigma)을 함유하는 IMDM을 배지로 하여 35mm bacterial petri dish(SPL)에 1 mL의 양으로 3중복 배양하였다. 각 dish당 5×10^4 세포가 포함되도록 하여 37°C, 5% CO₂, 완전 습윤 상태의 배양기에서 7일간 배양한 후 역상현미경 하에서 일반적인 기준에 따라 colony-forming unit granulocyte, macrophage(CFU-GM), burst-forming unit-erythroid(BFU-E) 및 colony-forming unit-ganulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte(CFU-GEMM)의 수를 세었다. 실험 목적에 맞게 조혈 성장인자를 첨가하며, 표준적 분석을 하는 경우엔 c-kit ligand(KL; R&D system), interleukin-3(IL-3; R&D system) 및 erythropoietin(EPO; Amgen, Thousand Oaks, CA, USA)을 각각 20ng/mL, 50ng/mL 및 6U/mL의 농도로 첨가하였다.

9. Cytospin 분석

얻어진 colony의 특성을 재확인하기 위해 cytopsin으로 세포를 포말하여 Giemsa staining으로 세포 형태를 재확인하였다. 각 분화 단계별로 회수한 세포를 1% BSA가 포함된 배지에 10^4 에서 5×10^5 cells/mL이 되도록 부유시켰다. 준비한 세포 부유액을 cytopsin centrifuge chamber에 200 μ L를 첨가하여 200g에서 5분 동안 원심분리하였다. 슬라이드를 chamber로부터 분리하여 실온에서 건조시킨 후 메탄올에 2분 동안 세포를 고정시킨다. 다시 건조시킨 후 May-Grunwald & Giemsa(Hemacolor rapid staining kit; Merck, Darmstadt, Germany) 염색을 하고 역상현미경을 통해 관찰하였다.

10. 조혈세포 분화 관련 유전자 발현 분석

분화된 마우스 줄기세포를 분화 단계별로 회수하여 TRI reagent(MRC)를 사용하여 total RNA를 분리한 후 RT-PCR을 이용하여 분석하였다. 조혈 세포 분화과정에서 발현되는

유전자(brachyury, Scf/TAL1, β -Major, β -H1)의 primer 서열로(GenoTech) Brachyury로 5' CTAGTACTCTTTCTT GCTGG 3'(sense), 5' GGTCTCGGGAAAGCAGTGGC 3'(antisense), Scf/TAL1으로 5' ATGGAGATTTCTGATG GTCCTCAC 3'(sense), 5' AAGTGTGCTTGGGTGTTGG CTC 3'(antisense), β -Major로 5' CTGACAGATGCTCTC TTGGG 3'(sense), 5' CACAAACCCAGAAACAGACA 3' (antisense), β -H1으로 5' AGTCCCCATGGAGTCAAA GA 3'(sense), 5' CTCAAGGAGACCTTTGCTCA 3'(anti-sense)이었다.

결 과

1. 줄기세포로서의 분자적 특성 확인

배아 줄기세포는 세포-유전학적 특성 규명을 반드시 수행해야만 한다. 즉, 세포 표면에 특이적으로 발현되는 alkaline phosphatase(AP) 활성, SSEA-1, SSEA-3 및 SEA-4의 발현 여부 및 transcription factor인 Oct3/4, Nanog 등의 발현이 확인되어야 하며 아울러 염색체 분석을 통하여 정상적인 상 염색체 상을 갖는지 또한 *in vivo* 에서 삼배염성 세포로 분화하여 teratoma를 형성하는지를 관찰하여야 한다(Keller *et al.*, 1997; Thomson *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 1998; Faloon *et al.*, 2000; Lacaud *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2002; Zhu & Emerson, 2002). 본 연구에서는 일반적으로 쉽게 활용할

수 있는 assay를 중심으로 줄기세포의 생화학적 특성을 주기적으로 수행하였는데, 감마선을 조사한 MEF 위에서 미분화된 상태로 유지되던 마우스 배아 줄기세포는 alkaline phosphatase의 활성이 강하게 나타남을 붉은색으로 염색된 colony로부터 확인하였고, MEF의 경우 활성을 보이지 않았다(Fig. 1-B). Immunohistochemistry를 통하여 마우스 배아 줄기세포에서 특이적으로 보이는 것으로 알려진 SSEA-1가 발현됨을 확인할 수 있었으나 SSEA-3, SSEA-4는 발현되지 않았다. SSEA-1의 발현은 FACS 분석 결과를 통해서도 확인할 수 있었으며, 이때 TC-1이 B6-1에 비해서 SSEA-1의 발현이 더 강하게 나타났(결과 제시하지 않음). Oct3/4, Nanog의 발현은 RT-PCR로 확인하였다. MEF 위에서 여러 계대 유지되던 TC-1과 B6-1에서 이들이 모두 발현됨을 확인하였다(Fig. 2).

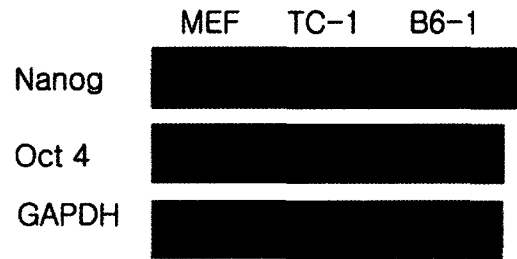


Fig. 2. Expression of Oct4 and Nanog. Total RNAs were isolated from TC-1 and B6-1 cells and the gene expression was determined by RT-PCR. The amount of GAPDH mRNA was shown as a loading control.

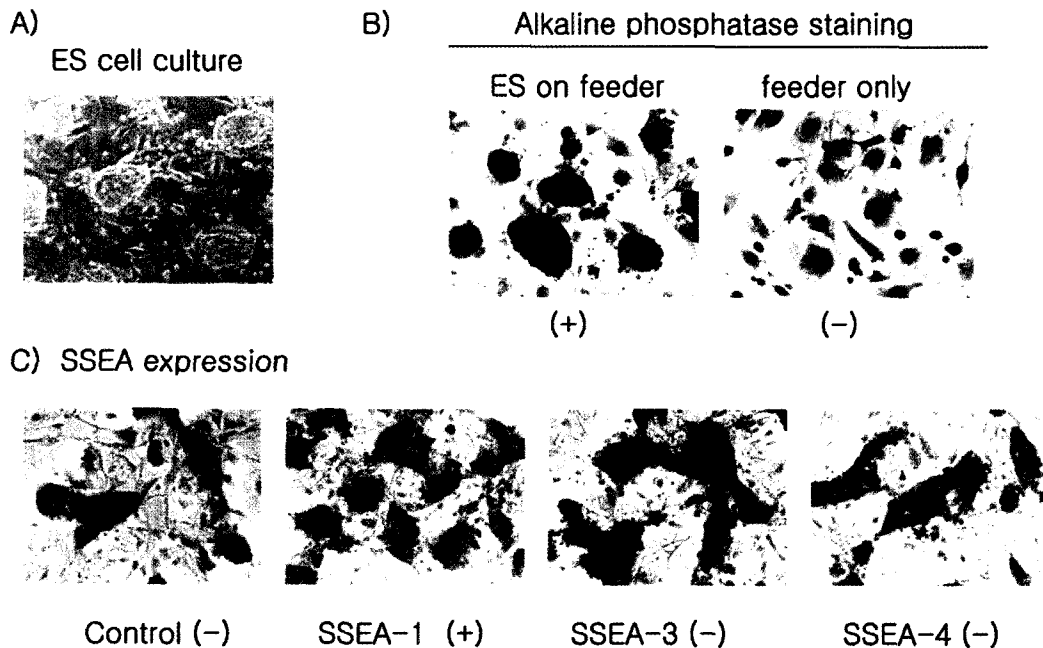


Fig. 1. Undifferentiated mouse ES cells TC-1 and B6-1 have stem cell properties. The mouse ES cells were analyzed for both their morphology and cell surface markers. (A) ES cells on feeder cells, (B) Alkaline phosphatase activity, and (C) SSEA expression was confirmed by immunostaining. After immunostaining, the samples were counterstained with hematoxylin.

마우스 배아 줄기세포의 경우에는 LIF를 첨가하면, feeder가 없는 조건에서 배아 줄기세포의 자가 재생을 유지할 수 있다. 그러나 인간 배아 줄기세포의 경우에는 LIF를 넣어주어도 자가 재생이 되지 않으며 이와 관련된 기전은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않다. 마우스 배아 줄기세포의 LIF에 의한 반응을 Western blotting을 통하여 확인한 결과, TC-1과 B6-1 모두 LIF에 의해 STAT3의 활성이 보였으며, 특히 TC-1의 반응성이 B6-1에 비해 강함을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

2. 마우스 배아 줄기세포의 표면 Cytokine 수용체 발현의 비교

LIF에 대한 반응성의 차이를 분자적 기전의 차원에서 이해하기 위한 시도로서, LIF receptor 및 LIF receptor와 함께 결합하여 LIF의 신호전달 역할을 하는 co-receptor인 gp130을 포함한 여러 cytokine 수용체의 발현을 Multi-probe RNase protection assay를 통하여 확인하여 보았다. Probe에는 cytokine LIFR, gp130 외에 AICA, AICB, GM-CSFR α , IL-3Ra, IL-6Ra와 internal control인 L32와 GAPDH이 포함되어 있었으며 성체세포와의 비교를 위해 mouse bone marrow cells(BM), murine progenitor cell line인 BaF3을 함께 분석하였다. 이들 중 gp130의 발현에 뚜렷한 차이를 볼 수 있었는데, TC-1의 경우 B6-1에 비해 발현이 높았다. LIFR의 발현은 유사한 것으로 보아, gp130의 높은 발현이 LIF에 대한 강한 반응성과 연관되는 것으로 해석된다. 특이한 점으로는 IL-6 receptor는 TC-1에서 IL-3 receptor는 B6-1에서 각각 높이 발현됨이 확인되었다(Fig. 4). 두 세포 주 모두에서 GM-CSFR α 는 매우 낮은 수준으로 발현되고 있었으며, GM-CSF, IL-3 및 IL-5 등의 cytokine receptor β subunit인 AIC-2A와 AIC-2B 등이 발현되고 있지 않았다.

3. 마우스 배아 줄기세포의 조혈세포 분화

두 개의 마우스 배아 줄기세포(TC-1과 B6-1)를 이용하여

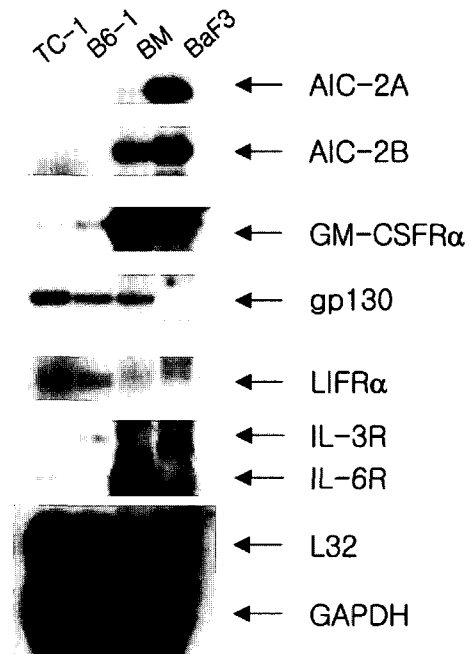


Fig. 4. The expression of cytokine receptors in TC-1 and B6-1 cells. Total RNAs isolated from mouse ES cells, mouse bone marrow, and murine progenitor cell line BaF3 were analysed by Multi-probe RNA protection assay. mRNAs for L32 and GAPDH were shown as internal loading controls.

마우스 배아 줄기세포의 조혈세포로의 분화를 유도하였다. 분화 유도는 일반적으로 수행하는 두 가지 방법 즉, liquid suspension 배양법과 methylcellulose 배양법을 채택하여, embryonic body 형성 정도를 비교 분석하였다. 또한, 형성된 EB로부터 조혈세포 분화 정도를 blast colony assay, progenitor assay, cytospin assay, RT-PCR assay 등을 통하여 확인하였다. EB 형성은 liquid suspension culture 및 methylcellulose culture 방법을 이용한 조혈세포 분화를 시도한 결과, 양쪽 방법이 모두 가능하였다. 마우스 배아 줄기세포에서 liquid suspension culture 방법으로 만들어진 EB는 만 하루가 지나면 cell aggregation을 관찰할 수 있었으며,

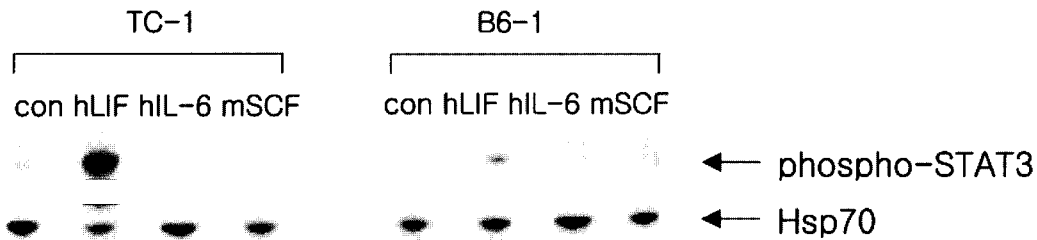


Fig. 3. The LIF-induced STAT3 activation in ES cells. Factor-starved ES cells were stimulated with hLIF(10ng/mL), hIL-6(50ng/mL), or mSCF(50ng/mL) for 30 min and the activation of STAT3 was measured by Western blotting with phospho-specific anti-p-STAT3 antibody. The amount of Hsp70 protein was shown as a loading control.

methylcellulose culture의 경우엔 만 삼일이 지나야 겨우 cell aggregation을 관찰할 수 있었다. EB 형성에 feeder cell 이 마우스 배아 줄기세포와 섞여 있으면 EB 형성에 방해가 되는 것을 관찰하였고, methylcellulose 배양법은 antibiotics 가 존재하면 분화 및 colony assay에 심각한 문제가 발생함을 확인하였다. 결론적으로 액상 배양법은 많은 양의 EB를 얻을 수 있어 실험에 용이하였으나 cell death가 많은 단점이 있었고, EB 생성부터 methylcellulose에서 수행하는 것은 시간이 너무 소요되고 회수되는 EB의 양이 적은 단점이 있으나, 실험의 반복성이 좋았다. 본 연구에서는 methylcellulose culture 방법을 주로 활용하였다.

Methylcellulose에서 EB를 형성시키면서 매일 관찰한 결과, TC-1의 경우 EB의 수와 모양이 B6-1에 비해 우월하여 최종 얻어지는 EB 수로부터 비교하였을 때 TC-1이 6배 정도 많음을 확인하였다(Fig. 5A, B). 3.5일 경과한 B6-1의 EB(Fig. 6A) 및 TC-1의 EB(Fig. 6C)를 단일세포로 만든 후, SCF와 VEGF가 포함된 methylcellulose 배지에서 7일 정도 후에 blast colony 형성을 확인하였다. Secondary EB는 매우 단단한 형태로 테두리가 명확히 구별되었으나, TC-1의 경우 EB에서 blast like colony(Fig. 6D) 및 blast colony(Fig. 6E)로 분화가 유도되면서 EB의 형태가 깨지고 테두리가 불명확하게 변화된 것을 확인하였다. 한편 B6-1의 경우에는 Fig. 6B에 보인대로 주로 secondary EB가 형성되었으며, blast colony의 형성이 미약했다. TC-1의 경우, 5일된 EB로부터 methylcellulose 배지에서 7일 정도 후에 erythroid proge-

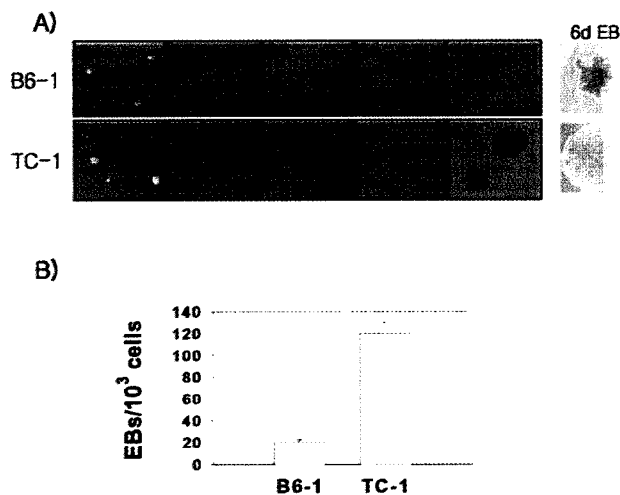


Fig. 5. A distinct capacity of embryoid body formation in methylcellulose culture in two mES cell lines. (A) EBs of B6-1 and TC-1 formed in methylcellulose culture were observed for 6 days. (B) The numbers of EB at day 5 were counted and compared.

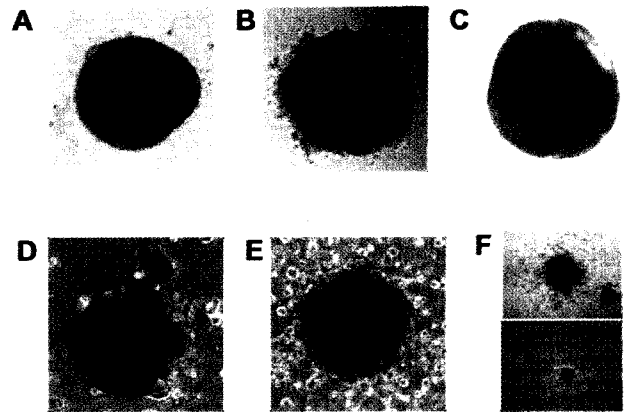


Fig. 6. Formation of blast cells and hematopoietic colonies.

The capacity of blast cell formation was estimated in methylcellulose culture including 50ng/ml of mSCF and 5ng/ml of VEGF(A-E). (A-B) B6-1 derived secondary EB(A) and blast-like cells(B). (C-E) TC-1 derived secondary EB(C), blast-like cells(D), and blast cells(E). The formation of hematopoietic colonies derived from TC-1 was analyzed by progenitor assay and two representative GEMM colonies are shown(F).

nitor들을 확인하였고 9일에서 10일된 EB로부터 methylcellulose 배지에서 7일 정도 후에 myeloid progenitor들을 확인하였다. 얻어진 colony의 특성을 재확인하기 위해 cyto-spin으로 세포를 포말하여 Giemsa staining으로 세포 형태를 재확인하였다(결과 제시하지 않음). 제대혈 및 mouse 골수세포를 이용한 대조 실험과 비교할 때, CFU-GEMM(colony-forming units-granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte) colony가 많이 발견되었다(Fig. 6F).

분화된 줄기세포는 분화 단계별로 여러 가지의 transcription factor 및 유전자가 발현된다. 본 연구에서는 배아 줄기세포의 발달에 있어서 초기 중배엽 발달의 marker인 brachyury, helix-loop-helix motif를 가지고 있으며 배아 발생동안 hematopoietic system과 vascular system 양쪽의 progenitor cell에서 나타나는 marker인 Scf/TAL1, primitive erythroid cell의 marker인 β -H1, definitive erythroid cell의 marker인 β -Major의 발현을 마우스 ES cell과 분화 중인 EB에서 RT-PCR을 이용하여 확인하였다. TC-1과 B6-1이 약간의 차이를 보였는데, methylcellulose 배양법에서 TC-1이 B6-1에 비해서 EB 형성능 및 조혈세포 생성능이 우월하였던 결과와 마찬가지로, 각 분화 단계별 유전자 발현 양상도 TC-1이 보다 이상적임을 확인할 수 있었다(Fig. 7). Brachyury는 3일부터 증가하여 6일이 지나면서 서서히 감소하였고, Scf/TAL1은 분화 3.5일부터 발현이 급증하였는데, 이 두 유전자의 발현은 TC-1의 경우에 B6-1에 비해 발현량

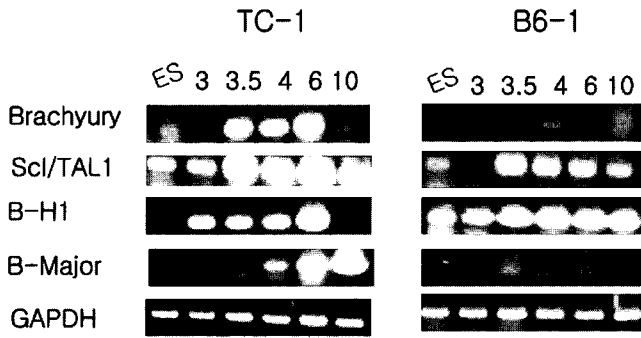


Fig. 7. Expression of hematopoietic genes during differentiation of TC-1 and B6-1 in methylcellulose. Total RNAs of ES cells and EBs were isolated and the gene expression was determined by RT-PCR. The amount of GAPDH mRNA was shown as a loading control.

이 높음을 확인하였다. 가장 뚜렷한 차이점으로서 TC-1의 경우 primitive erythroid cell의 maker인 β -H1은 3일에서 6일까지 증가하다가 사라졌으며 definitive erythroid cell의 maker인 β -Major은 4일부터 발현되어 10일까지 계속 발현되었으나, B6-1의 경우에는 β -H1의 발현은 EB가 분화하는 동안 지속적으로 유지되는 반면, β -Major의 발현은 매우 미미하였다(Fig. 7). 따라서 B6-1은 EB로부터의 조혈세포 분화에서 primitive erythroid cell까지는 분화 유도가 이루어질 수 있으나, definitive erythroid로 넘어가는 분화 유도는 거의 이루어지지 않음을 확인할 수 있었다. 한편, 줄기세포의 특징의 하나로 발현되는 Nanog는 TC-1과 B6-1에서 모두 10일이 지난 EB에서도 계속 발현됨을 확인하였는데 이는 분화되는 동안에도 미쳐 분화되지 않은 세포들이 섞여있는 것으로 추측해 볼 수 있다(결과 제시하지 않음).

고찰

배아 줄기세포의 연구에 있어 특정세포로의 분화 유도 기술의 개발은 줄기세포의 응용범위를 결정할 수 있다는 점에서 매우 중요하다. 따라서 특정세포로 분화를 유도하는 기술적 체계가 개발되어야 한다. 본 연구에서는 두 개의 마우스 배아 줄기세포인 TC-1과 B6-1을 이용하여 마우스 배아 줄기세포를 조혈세포로 분화시키는데 있어 세포주의 선택이 미치는 영향을 비교하였다. 예비실험으로서 조혈세포 분화 방법으로 알려져 있는 liquid suspension 배양법과 methylcellulose 배양법을 이용하여, EB 형성 정도를 비교 분석하였으며, 형성된 EB로부터 조혈세포 분화 정도를 blast colony assay, progenitor assay, cytopsin assay, RT-PCR assay 등으로 분석하였다. methylcellulose 배양을 통한 조혈세포 분

화 방법이 일관성 있는 결과를 얻을 수 있으며, 분화의 효율이 높아 본 연구에서는 methylcellulose 배양법을 활용하였다. 그러나 liquid suspension 배양 방법이 대량생산을 위한 규모의 증가 및 방법의 편리성에 있어 methylcellulose 배양법보다 용이하므로 궁극적으로는 liquid suspension 배양 방법의 효율을 증가시키는 연구가 수행되어야 할 것이다.

TC-1과 B6-1은 alkaline phosphatase activity를 가지며, SSEA-1을 발현하고 SSEA3와 SSEA4를 발현하지 않았으며, transcription factor인 Nanog 및 Oct4가 발현되었고, 정도의 차이는 있었으나 LIF에 의해 STAT3이 활성화됨을 확인되어 LIF/STAT3의 축에 의해 self-renewal을 유지하는 것으로 판단되며, 이는 기존의 보고와 일관된 결과이다(Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3). 이와 관련하여 LIF의 수용체인 LIFR과 signaling receptor인 gp130 유전자가 발현됨을 공통적으로 확인할 수 있었다(Fig. 4). STAT3의 활성화가 TC-1 세포주에서 더 높았던 것은 신호 전달과 관련이 있는 co-receptor인 gp130의 높은 발현과 관련이 있는 것으로 생각된다. IL-3 및 IL-6는 조혈과정에서 중요하게 작용하는 cytokine들로서 이들 receptor의 발현에서 보이는 차이는 조혈과정에도 영향을 미칠 수 있을 것이다.

줄기세포로서의 특성은 유사하였으나, 배아 줄기세포주 TC-1과 B6-1의 조혈세포 분화능은 관련하게 달랐다. methylcellulose에서 EB를 형성하는 양과 질에서도 큰 차이가 보였으며(Fig. 5), blast colony의 형성, progenitor 생성, 조혈세포 분화과정에서 발견되는 유전자 발현 양상 등에서도 확연한 차이를 보여 TC-1의 우세한 분화능을 입증하였다. Blast colony(BL-CFC = Hemagioblast)는 *in vitro*에서 EB로부터 분화되는 transient population으로써 hematopoietic precursor와 endothelial precursor 모두를 포함하고 있으며, 이 bi-potential population은 EB가 분화하는 동안 early stage에서 짧은 기간 동안 나타났다가 사라지고, 이 시점부터 primitive erythroid 세포들이 나타나는 것으로 알려져 있다(Kennedy *et al.*, 1997). Blast colony의 형성을 비교한 결과 역시 TC-1이 B6-1에 비해 훨씬 높은 활성을 보임을 알 수 있었다(Fig. 6).

조혈세포의 분화는 조혈줄기세포(hematopoietic stem cell, HSC)로부터 단계적으로 특정 조혈 세포로만 분화 능력이 제한된 progenitor를 거쳐 최종적으로 분화된 각종 조혈 세포들을 생성한다. Weissman 등의 모델에 의하면 HSC는 CLP(common lymphoid progenitor)와 CMP(common myeloid progenitor)로 분화하고, 이어 CLP는 모든 종류의 lymphoid 계 세포로 분화한다(Passegue *et al.* 2003; Terskikh *et al.*

2003). CMP는 모든 종류의 myeloid계 세포로 분화할 수 있는 granulocyte macrophage precursor(GMP)와 혈소판과 적혈구로 분화할 수 있는 megakaryocyte erythroid precursor(MEP)로 분화한다. 이러한 과정은 lineage 특이적 cytokine signal과 전사인자들에 의해 조절되는 것으로 생각되고 있다. 배아 줄기세포에서 조혈세포로의 분화 또한 성체줄기세포에서와 마찬가지로 분화의 hierarchy가 존재하며, progenitor assay를 통해 다양한 유형의 colony forming cell (CFU)이 존재함을 확인하였으며(결과 제시하지 않음), 특히 제대혈이나 성체 조혈 줄기세포의 경우와 비교해서 보다 미분화된 CFU, 즉 CFU-GEMM이 많이 존재하는 것을 확인하였다(Fig. 6). 이는 제대혈이나 성체세포보다 훨씬 미분화된 배아 줄기세포에서 유래하는 조혈세포이기 때문으로 생각된다. 제대혈의 경우 성체 조혈세포에 비해 항원성과 면역성이 낮으므로 조직 적합성의 요구도가 낮아 생장율이 높은 장점과 함께 암환자의 경우에는 잔여 암세포를 효율적으로 제거하지 못하는 단점을 가지고 있기도 하는 등 성체세포와는 다른 특성을 가진다(Lu *et al.*, 1996; Martin & Paolo, 2001). 그러므로 제대혈 유래 조혈세포의 다양한 특성을 확인하는 연구가 한창인데, 배아 줄기세포 유래의 조혈세포 또한 성체 및 제대혈 세포와는 다른 특성을 가질 수 있으며 이러한 특성이 장단점으로 작용할 수 있으므로 이들의 특성을 확인해 가는 과정이 필수적이라고 하겠다.

조혈과정과 관련된 유전자 발현 양상을 살펴보면 가장 뚜렷한 차이점은 definitive erythroid cell marker인 β -Major의 발현이 유도되지 않는다는 것이다. 즉, 적어도 methylcellulose를 이용한 *in vitro* 배양법에 의해서는 조혈세포로의 분화가 보이지 않았다. 그러나 본 연구에서 사용한 배아 줄기세포주는 모두 knockout mice 생산에 이용하고 있는 세포로서 *in vivo*에서는 pluripotency를 보여주고 있다. 이는 *in vitro*에서 유도하는 분화의 한계점 또는 차이점을 제시한다고 생각된다. 즉, TC-1의 경우에는 *in vitro*에서도 분화가 잘 유도되는 반면 B6-1은 조혈세포 분화에 결함을 보이지만 *in vivo*에서는 이 결함이 해소될 수 있는 것으로 추측된다. 이러한 예측은 mouse stromal cell line인 OP9와의 공조배양을 통해 분화를 유도했을 경우, B6-1의 조혈세포 분화가 정상적으로 일어난 결과와 일맥상통한다(보고하지 않은 결과). 그러므로 *in vivo*에서와 유사한 환경을 제공하는 공조배양 및 3차원적 배양법을 활용한 배양조건의 개선이 분화 효율을 크게 향상시킬 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구에서는 두 가지 종류의 마우스 배아 줄기세포주를 선택하여 각 세포주의 특성 및 분화효율을 관찰 비교하였다.

줄기세포로서의 특성을 공유하는 세포주라 할지라도 유전자 발현 양상 및 반응성에 차이를 보였으며, 특정세포로 분화하는 효율에도 큰 차이를 보임을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 최근 많은 연구자들이 시도하고 있는 인간 배아 줄기세포의 분화 유도에도 적용될 수 있을 것이다. 그러므로 여러 세포주의 분화 효율을 비교하고 이들 중 특정세포로의 분화 효율이 보다 높은 세포주를 선별하여 분화 효율을 더욱 증가시키는 방향의 노력이 이루어져야 할 것이다.

인용문헌

- Chen U (1992) Differentiation of mouse embryonic stem cells to lymphohematopoietic lineages *in vitro*. *Dev Immunol* 2:29-50.
- Choi K, Kennedy M, Keller G (1998) A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125:725-732.
- Chung YS, Zhang WJ, Choi K (2002) Lineage analysis of the hemangioblast as defined by FLK1 and SCL expression. *Development* 129:5611-5620.
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.
- Faloon P, Arentson E, Choi K (2000) Basic fibroblast growth factor positive regulates hematopoietic development. *Development* 127:1931-1941.
- Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, Wiles MV (1993) Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol* 13: 473-486.
- Kennedy M, Firpo M, Choi K, Keller G (1997) A common precursor for primitive erythropoiesis and definitive hematopoiesis. *Nature* 386:488-493.
- Lacaud G, Gore G, Kennedy M, Keller G (2002) Runx1 is essential for hematopoietic commitment at the hemangioblast stage of development *in vitro*. *Hematopoiesis* 100:458-466.
- Lee Y, Mantel C, Anzai N, Braun SE, Broxmeyer HE (2001) Transcriptional and ERK1/2-dependent synergistic upregulation of p21cip1/waf1 associated with steel factor synergy in MO7c. *Biochem Biophys Res Commun* 280:675-683.

- Lu L, Shen RN, Broxmeyer HE (1996) Stem cells from bone marrow, umbilical cord blood and peripheral blood for clinical application: current status and future application. *Crit Rev Oncol Hematol* 22:61-78.
- Martin K, Paolo A (2001) Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood* 98:2900-2908.
- Nakano T, Kodama H, Honjo T (1994) Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 265:1098-1101.
- NIH Report on Stem Cells (2001) The stem cell. In: *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*, NIH, pp1-4.
- Orkin SH, Zon LI (2002) Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat Immunol* 3:323-328.
- Paul SR, Yang YC, Donahue RE, Goldring S, Williams DA (1991) Stromal cell-associated hematopoiesis: immortalization and characterization of a primate bone marrow-derived stromal cell line. *Blood* 77:1723-1733.
- Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL (2003) Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA* 100(Suppl 1): 11842-11849.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotechnol* 18:399-404.
- Terskikh AV, Diatchenko L, Weissman IL (2003) Gene expression analysis of purified hematopoiesis stem cells and committed progenitors. *Hematopoiesis* 102:94-101.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP (1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:7844-7848.
- Vogel JE, Incefy GS, Good RA (1975) Differentiation of population of peripheral blood lymphocytes into cells bearing sheep erythrocyte receptors *in vitro* by human thymic extract. *Proc Natl Acad Sci USA* 72:1175-1178.
- Wiles MV, Keller G (1991) Multiple hematopoietic lineages develop from embryonic stem (ES) cells in culture. *Development* 111:259 - 267.
- Zhu J, Emerson SG (2002) Hematopoietic cytokines, transcription factors and lineage commitment. *Oncogene* 21:3295-3313.