단위발생유래 생쥐 배아줄기세포로부터 체외 분화된 기능성 심근세포

신현아[1*] · 김은영[1*] · 이금실[1] · 조황윤[1] · 이원돈[2] · 박세필[1,†] · 임진호[2]
[1]마리아기초의학연구소/마리아생명공학연구소, [2]마리아불임병원

In Vitro Differentiated Functional Cardiomyocytes from Parthenogenetic Mouse Embryonic Stem Cells

Hyun Ah Shin[1*], Eun Young Kim[1*], Keum Sil Lee[1], Hwang Yun Cho[1], Won Don Lee[2], Se Pill Park[1,†] and Jin Ho Lim[2]
[1]*Maria Infertility Hospital Medical Institute/Maria Biotech, Seoul 130-812, Korea*
[2]*Maria Infertility Hospital, Seoul 130-812, Korea*

ABSTRACT

This study was conducted to examine whether the parthenogenetic mouse embryonic stem (P-mES) cells can differentiate into functional cardiomyocytes *in vitro* similar to (mES) cells. P-mES04 and IVF-derived mES03 cells were cultured by suspension culture for 4 days. The formed embryoid bodies (EBs) were treated with 0.75% dimethylsulfoxide (DMSO) for further 4 days (4-/4+), and then plated onto gelatin coated culture dish. The appearance of contracting cardiomyocytes from the P-mES04 and mES03 cells was examined for 30 days. The highest cumulative frequency was detected at days 13 (69.83%) and 22 (61.3%), respectively. By immunocytochemistry, beating P-mES04 cells were positively stained with muscle specific anti-sarcomeric α-actinin Ab and cardiac specific anti-cardiac troponin I Ab similar to contracted mES03 cells. When the expression of cardiac muscle-specific genes was analyzed by RT-PCR, beating P-mES04 cells were expressed cardiac specific L-type calcium channel, α1C, cardiac myosin heavy chain α, cardiac muscle heavy polypeptide 7β, GATA binding protein 4 and atrial natriuretic factor, but not expressed skeletal muscle specific L-type calcium channel, α1S, which was similar to male adult heart cells and mES03-derived beating cardiomyocytes. The result demonstrates that the P-mES cells can be used as an alternative for the study on the characteristic analysis of *in vitro* cardiomyocyte differentiation from the ES cells.

(Key words : Parthenogentic mouse embryonic stem cell, Cardiomyocyte, Gene expression)

요 약

본 연구는 단위발생유래 생쥐 배아줄기세포(P-mES)가 체외수정유래 생쥐 배아줄기세포 (mES)와 마찬가지로 기능성 심근세포로 체외 분화되는지를 조사하였다. 각 세포주 P-mES04와 MES03를 4일간 부유 배양하여 배아체 (EB)를 형성한 다음 4일간 DMSO를 추가적으로 처리한 뒤 젤라틴이 코팅된 배양접시에 부착시켰다(4-/4+). P-mES04와 mES03으로부터 수축성 심근세포 생성 여부를 30일간 관찰한 결과, 각각 13일(69.83%)과 22일 (61.3%)에 누적 형성율이 가장 높았다. 면역세포화학염색 결과, 수축성을 나타내는 P-mES04 세포는 수축성 mES03 세포에서와 같이 근육 특이적인 anti-sarcomeric α-actinin 항체와 심근 특이적인 anti-cardiac troponin I 항체에 염색되는 것을 확인하였다. 또한 RT-PCR 결과, 수축성을 나타내는 P-mES04 세포는 심근특이적인 L-type calcium channel, α1C, cardiac myosin heavy chain α, cardiac muscle heavy polypeptide 7β, GATA binding protein 4와 atrial natriuretic factor는 발현하나, 골격근 특이적인 L-type calcium channel, α1S는 발현하지 않아 웅성 성체의 심장세포와 유사한 양상을 보였다. 본 연구의 결과는 단위발생 유래 생쥐 배아줄기세포를 배아줄기세포의 연구의 대체제로 이용할 수 있음을 보여준다.

서 론

배아줄기세포(embryonic stem cell)는 착상전 배반포기

* 본 연구는 보건복지부 바이오보건기술개발사업 우수 핵심사업연구비(01-PJ10-PG8-01EC01-0010)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

* These two authors contributed equally to this work.
† Corresponding author : Phone: +82-2-2250-5653, E-mail: sppark@mail.mariababy.com

배의 내부 세포괴(inner cell mass)를 분리해내어 체외에서 배양한 것으로 개체를 구성하는 모든 조직으로 분화할 수 있는 다능성 (pluripotency)을 보유한 만능세포이다. 1981년 Martin에 의하여 처음 생쥐의 초기 배아에서 배아줄기세포 (mouse embryonic stem cell, mES cell)를 분리하는데 성공하였고, Evans와 Kaufman 등 (1981)에 의하여 최초로 생쥐 배아 줄기 세포를 확립하는데 성공한 이래, 최근에는 확립된 생쥐 배아줄기세포를 이용하여 심근세포, 혈액세포, 혈관세포와 신경세포로의 분화 연구가 진행되고 있다 (Doetschman 등, 1985; Heinrich 등, 2001; Andressen 등, 2001). 한편, 단위발생유래 배아줄기세포 (parthenogenetic mouse embryonic stem cell, P-mES)는 체외수정유래 배아줄기세포와는 달리 정자 없이 단위발생으로 생산된 배반포기배를 이용하여 확립된 것이다 (Allen 등, 1994). 단위 발생으로 확립된 배아줄기세포에 대한 연구는 1998년 Park 등 (1998)에 의해 생쥐 배아줄기세포로부터 embryoid body 형성 가능성으로 분화능력이 있을 것으로 보고되었고, Cibelli 등 (2002)에 의해 영장류에서 단위발생 유래 배아줄기세포를 확립하여 체외에서 신경세포로의 분화와 면역결핍성 쥐에 이식하였을 때 teratoma가 형성되어 내배엽 (내장과 호흡상피세포), 외배엽 (신경, melanocytes, 표피, 모세포), 중배엽 (연골, 근육, 뼈세포)로 체내에서 분화가 이루어짐이 확인되었다. 특히 단위발생란에서 확립된 배아줄기세포는 체외수정란에서 확립된 배아줄기세포의 장점을 모두 가지고 있으면서, 향후 난치병 치료에 이용 시 필요한 배아줄기세포의 제작에서 문제가 될 수 있는 윤리적 문제를 최소화시킬 수 있는 대체연구로서의 가능성을 시사하고 있다 (Park 등, 2002). 체외에서 심근 세포로의 분화는 배아줄기세포를 이용하여 배아체 (embryoid body, EB)를 형성시킨 후, 심근세포 유도 물질을 처리하여 자발적이며 규칙적인 수축성(contraction)을 가진 근세포 (myocytes)로 발현시키는 것이다. 기능성 심근세포의 확인은 심근의 형태학적, 면역세포학적인 방법을 이용하고 있으며, 심근에서 특이하게 발현하는 유전자를 확인하는 방법도 사용되고 있다 (Kehat 등, 2001; Park 등, 2002; Boon 등, 2004). 현재 배아줄기세포를 이용한 심근에 관한 연구 결과를 보면 배아 상태에서 발견되는 몇몇 유전자의 발현이 심근 형성에 영향을 준다고 보고되어 있다.

따라서, 본 연구는 단위발생유래 생쥐 배아줄기세포로부터 자발적 근 수축을 나타내는 심근세포를 획득한 뒤 면역세포화학염색을 실시하고 심근 형성과 관련된 초기 유전자 발현을 조사함으로써 기능성 심근세포 형성이 제대로 이루어졌는지를 조사하고, 이 결과가 체외수정유래 생쥐 배아줄기세포로부터 분화된 심근세포의 분화 특성과 동일한지 여부를 조사하고자 실시하였다.

재료 및 방법

배아줄기세포의 준비

본 실험에 사용된 생쥐 배아줄기세포는 마리아생명공학연구소에서 보유하고 있는 체외 수정란으로부터 확립된 mES 세포 (mES03)와 단위발생란으로부터 확립된 P-mES 세포 (P-mES04)를 사용하였다. 실험에 사용된 두 종류의 배아줄기세포는 미분화 특성으로 인지되고 있는 alkaline phosphatase (Sigma), SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen, Chemicon) 및 transcription factor Oct-4 (Chemicon) 발현과, GTG-banding 염색체 분석을 확인하였다.

생쥐 배아줄기세포로부터 심근세포로의 분화

mES03와 P-mES04 배아줄기세포는 0.1%의 gelatin이 피복된 배양접시에서 배양하였으며, 배양액으로는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; no-pyruvate, high-glucose formulation, Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)을 기본 배양액으로 하여, 20% FBS (Hyclone, South Logan, Utah, USA), 1 mM L-glutamine (Gibco-BRL), 1% nonessential amino acid stock (Sigma, St Louis, MO, USA), 0.1 mM β-mercaptoethanol (Sigma), mouse LIF 10^3 units/ml (Chemicon, Temecula, CA, USA)을 첨가하여 사용하였다. 분화 초기 EB 형성을 위해, mES03과 P-mES04 배아줄기세포는 0.25% trypsin-EDTA (Gibco-BRL)를 이용하여 단일세포로 분산시킨 후 4×10^6의 세포를 각각 58-mm bacteriological Petri dish (#1007, Falcon, Franklin lakes, NJ, USA)에 부유 배양하였다. 배양액으로는 mouse LIF가 첨가되지 않은 DMEM/F12를 기본 배양액으로 10% FBS (Hyclone)를 첨가하여 사용하였다. 심근세포로의 분화 유도를 위해 이미 4일 동안 부유 배양된 mES03와 P-mES04의 EBs에 0.75%의 DMSO를 첨가하여 4일간 추가 부유 배양하여 분화 유도를 실시하였다 (4-/4+ 방법). 8일 후 mES03와 P-mES04 배아줄기세포의 EBs는 0.1% gelatin이 피복된 배양접시에 1.91 cm^2 당 1~5개의 밀도로 plating하였다. 그 후 수축 (contraction)이 일어나는지 현미경 하에서 매일 관찰하였다. 심근세포로의 분화유도는 3회 반복을 실시하였다.

심근 세포의 확인

1) 형태학적 관찰

mES03와 P-mES04 배아줄기세포의 심근세포로의 분화 양상은 현미경 하에서 plating 후 30일까지 매일 관찰하였다.

2) 면역 세포화학적 염색 방법

mES03과 P-mES04 배아줄기세포로부터 유래된 EB에서 심근세포로 분화된 세포는 그 구조적인 특성을 확인하기 위해서 면역세포화학염색방법을 이용하였다. 외형상 수축이 보이는 부분의 세포 덩어리는 micropiptte를 이용하여 물리적으로 분리한 후 효소적 방법 (0.25% trypsin-EDTA, 37℃에서 5분간 처리)을 이용하여 분산시켰다. 분산시킨 세포는 개개의 세포를 확인할 수 있는 낮은 농도로 (4×10^4 cells/ml) coverslip에 plating 하여 48시간 배양하였다. 배양 후 세포는 염색을 위해서 4% paraformaldehyde로 고정한 후 0.5% Triton X-100 (Sigma)로 침투시키고 10% BSA로 1시간 blocking 하였다. 심근 세포를 확인하기 위한 일차 항체로는 muscle actin에 대한 특이성이 있는 anti-sarcomeric α-actinin mono-

clonal antibody (1: 100, Sigma)와 cardiac muscle에 대한 특이성이 있는 anti-cardiac trophonin I monoclonal antibody (cTnI, 1:2000, Chemicon)을 이용하여 4℃에서 overnight 하였다. 일차 항체에 대한 반응 정도는 Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG (1:50, Jackson, West Grove, PA, USA)와 Rhodamine (TRITC)-conjugated goat anti-mouse IgM (1:200, Jackson)을 각각 이용하여 실온에서 30분간 반응시켜 형광 현미경 하에서 관찰하였다.

3) RT-PCR을 통한 심근 특이 유전자의 발현 확인

대조군으로는 10주령의 성체 수컷 생쥐의 심장을 이용하였다. 성체 생쥐의 심장과 mES03와 P-mES04 배아줄기세포에서 유래된 심근세포의 RNA는 TRI reagent kit (Sigma)을 이용하여 추출하였다. 추출된 RNA는 Super-Script II reverse transcriptase (Life Technologies Inc.)을 이용하여 cDNA로 만들어 심근 특이 유전자를 증폭시켰다. PCR은 94℃에서 1분, 55~62℃에서 1분 그리고 72℃에서 1분간씩 40회를 실시하였고, 증폭된 산물은 1.2% agarose gel에서 ethidium bromide 염색으로 확인하였으며 image analyzer (Biorad)에서 조사하였다. 본 실험에 이용된 primer는 Mouse L-type calcium channel, α1S (5' CCAGGCCCTGCCGTACGTCCGTTT 3'와 5' TTGTAGACAGGGCCGGTGTCCTCC 3', 674 bp), Mouse L-type calcium channel, α1C (5' CAGGCAGCATGGAAGCTCAGC 3'와 5' GTTGAGTTTCTCGCTGGACTCTGCC 3', 536bp), Mouse GATA binding protein 4 (5' GGACGGGCCAACCCTGGAAGACA 3'와 5' GGCCTGCGATGTCTGAGTGACAGG 3', 674 bp), Atrial natriuretic factor (5' TGGGCTTCTTCCTCTTGGCC 3'와 5' CCTAGTCCACTCTGGGCTCCAATCCT 3', 407 bp), Mouse cardiac myosin heavy chain α (5' GGAGAAGGCCAAGAAGGCCATCAC 3'와 5' GCTCTTGGCCCGCAGCTTGTTG 3', 537bp)과 Mouse cardiac muscle heavy polypeptide 7 β (5' GTAGAGGAGGCAGTGCAGGAGTG 3'와 5' GGAACTTGGACAGGTTGGTGTC 3', 468 bp)를 이용하였다.

결 과

본 실험에 이용된 체외수정유래 생쥐 배아줄기세포 (mES03)와 단위발생유래 생쥐 배아줄기세포 (P-mES04) 는 Fig. 1에서 보여주는 바와 같이 면역 세포화학적으로 AP, SSEA-1 그리고 oct4에 강하게 염색이 되어 생쥐 배아줄기세포임을 확인 할 수 있었다 (Fig. 1 A-B, C-D, E-F). 또한 두 종류의 줄기세포를 GTG-banding으로 염색체분석을 실시한 결과 모두 정상인 40개의 염색체를 갖고 있는 것을 확인하였다 (Fig. 1 G-H). 단위발생유래 생쥐 배아줄기세포로부터 심근세포로의 체외분화는 체외수정유래 생쥐 배아줄기세포와 차이 없이 EB로부터 자발적 근 수축성을 나타내는 조직으로의 발달까지 원활하게 이루어질 수 있음이 확인되었다 (Fig. 2A~D). 체외수정유래 생쥐 배아줄기세포 (mES03)와 단위발생유래 생쥐 배아줄기세포 (P-mES04)로부터의 심근 분화 정도를 조사하였을 때, 평균적으로 mES03의 경우 근 수축 개시일은 plating 후 9일째이고 P-mES04의 경우 11일째로 조금 늦게 나타난 반면, 누적 비율이 가장 높은 날은 mES03의 경우 plating 후 22일째 (61.3%)인 반면 P-mES04의 경우는 plating 후 13일째 (69.83%)로 좀 더 빠르게 나타났다 (미제시). 또한 근 수축을 나타내는 P-mES04의 조직을 기계적으로 떼어내어 세포면역세포학적 염색을 실시하였던 바 Fig. 2E, 2F에 나타낸 바와 같이 cardiac muscle과 muscle actin이 확인되어 분화된 세포의 구조적 특성이 수축성 심근세포임을 확인할 수 있었다. 한편, 근 수축을 나타내는 세포조직에서의 심근 특이 유전자의 발현을 RT-PCR 분석으로 확인하였을 때, Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 골격근에서 나타나는 칼슘 채널인 mouse L-type calcium channel α 1S는 대조군인 성체의 심근과 더불어 실험군 P-mES04와 mES03에서 유도된 심근에서 모두 관찰되지 않았다. 그러나 반대로 심근에서 나타나는 mouse L-type calcium channel α1C는 모두 관찰되었다. 또한 중배엽성 특성을 나타내는 GATA binding protein 4 (GATA4)도 대조군과 실험군 모두에서 확인되었다. 기능성 심근의 특징을 가장 잘 나타내는 beating과 관련된 유전자 atrial natriuretic

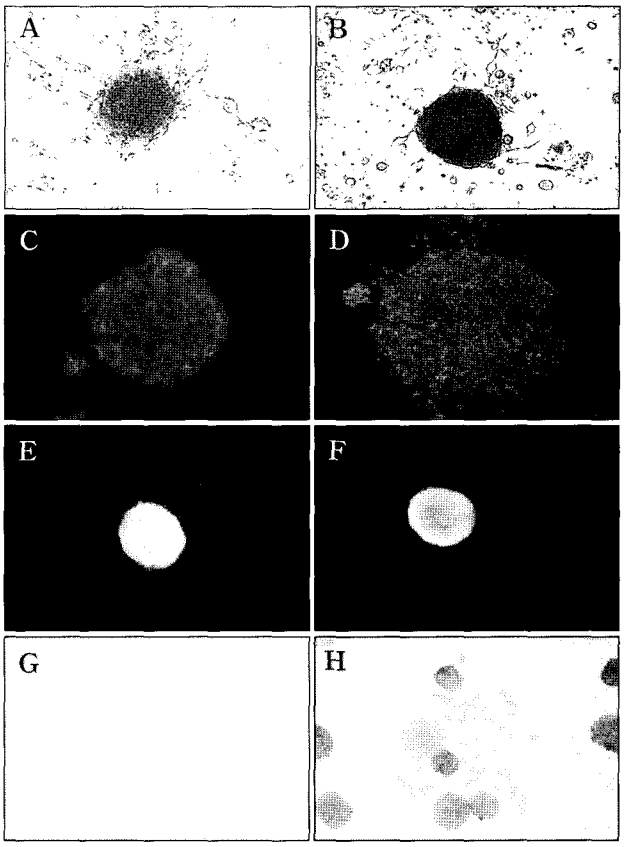

Fig. 1. Characterization of mouse embryonic stem (mES, A, C, E, G) cells and parthenogenetic mouse embryonic stem (P-mES, B, D, F, G) cells. Undifferentiated ES colonies were stained uniformly by alkaline phosphatase solution (A and B), stage-specific embryonic antigen (SSEA) 1 (C and D) and Oct4 antibody (E and F). G and H indicated normal chromosome number (2n=40) by GTG banding.

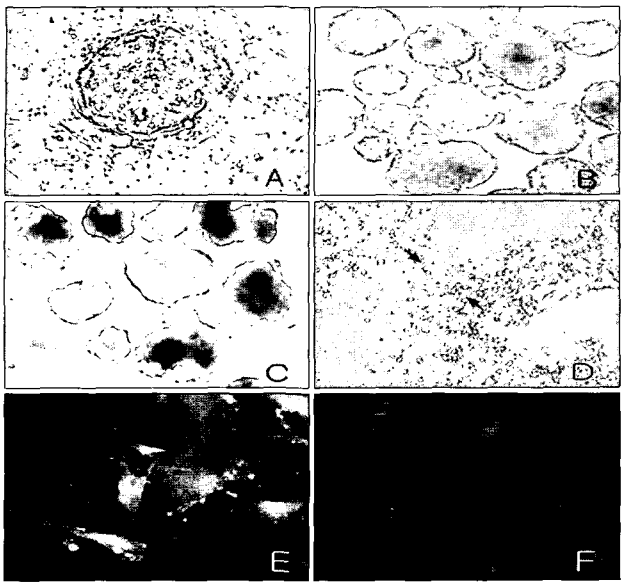

Fig. 2. *In vitro* cardiogenetic differentiation from P-mES04 cells. ES colonies were growing on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblast feeder layer (A). They were dissociated and cultured in suspension environment for 4 days and then formed embryoid bodies (EBs) (B). During further culture for 4 days, DMSO treated EBs were enlarged and cavitated similar to embryos before being plated onto gelatin-coated tissue cultures dishes (C). Arrows indicate beating area section of *in vitro* differentiated beating cardiomyocytes after plating (D). Beating cells were dissociated, plated onto coverslip and then immuno-stained with anti-cardiac troponin I antibody as a cardiac muscle marker (E) and anti-sarcomeric α -actinin antibody (F) as a muscle actin marker.

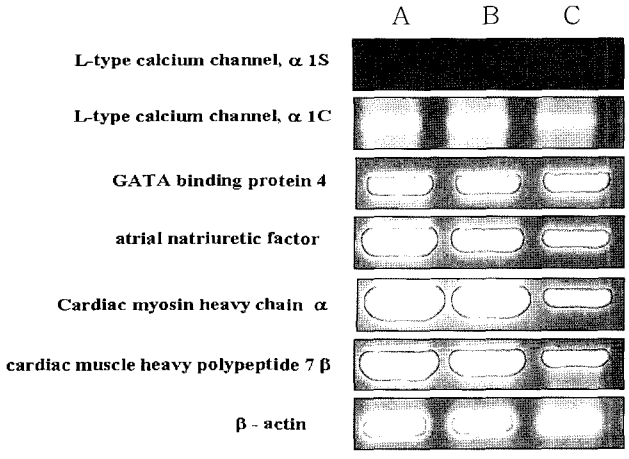

Fig. 3. RT-PCR analysis of cardiac-specific gene expression from *in vitro* differentiated day 10 P-mES cells (B) and mES cells (C). A represented male adult heart as a control cells; each row shows ethidum bromide-stained agarose gels of the PCR amplification of the indicated transcripts. Examined cardiac-specific markers were as follows; mouse L-type calcium channel α1S as a negative control (skeletal muscle cell marker), mouse L-type calcium channel α1C as a cardiac cell marker, mouse GATA binding protein 4 as a mesoderm cell marker, atrial natriuretic factor as a beating cell marker, mouse cardiac myosin heavy chain α and mouse cardiac muscle heavy polypeptide 7β as common cardiac muscle cell markers.

factor도 심근과 P-mES04와 mES03에서 유도된 심근에서 모두 관찰되었다. 심장의 근육에서 나타나는 cardiac myosin heavy chain α와 mouse cardiac muscle heavy polypeptide 7β도 대조군의 심근과 P-mES04와 mES03에의 유도된 심근에서 관찰되는 것이 확인되었다.

고 찰

본 연구는 단위발생 유래 생쥐 배아줄기세포로부터 형성된 기능성 심근세포의 유전자 발현을 조사하였을 때 체외수정 유래 생쥐 배아줄기세포로부터 유도된 심근세포와 동일한 결과를 얻었던 바, 단위 발생 유래 배아줄기세포가 대체 연구 재료로 이용 가능함을 나타낸다 (Cibelli 등, 2002).

본 실험에서 나타낸 바와 같이 단위발생 난에서 확립된 배아줄기세포도 체외수정 난에서 확립된 배아줄기세포와 마찬가지로 형태학적으로 미분화 상태를 유지하는 특성을 가지며, 일단 분화 자극이 가해지면 특정세포로 분화할 수 있는 다능성을 가지고 있다. 포유동물에 있어 심근세포의 특징은 출생 후 증식을 할 수 없는 영구세포 (permanent cell)로 알려져 있으며, 신경세포, 골격근 등도 여기에 속한다. 또한 재생능력이 아주 제한되어 있어 심장에서 일어나는 큰 손상은 결합조직에 의한 반흔 조직으로 대치된다. 그러므로 심근세포의 손상은 심장의 정상적인 기능을 수행할 수 없게 되며 심근세포의 이식만이 궁극적인 치료 방법이 될 수 있다 (Klug 등, 1996; Muller 등, 2000). 그러나 현재 공여 세포로서 심근세포 이식을 위한 충분한 수를 얻기에는 많은 문제점이 있으며, 이식과정에서 나타나는 문제를 선결해야 하는 문제가 남아 있다. 그러므로 체외에서 생쥐 배아줄기세포로부터의 심근세포로의 분화 연구는 향후 인간의 질병치료를 위한 세포대체요법 분야에서는 중요한 정보를 제공할 수 있는 장점을 가지고 있다 (Hescheler 등, 1997). 또한 포유동물에 있어서 발달 초기에 나타나는 심근 세포의 excitability에 대한 정보를 얻을 수 있는 중요한 모델로 이용할 수 있다. 즉 초기 단계의 심근 세포는 체내에서 얻을 수 없으나 (E8.5~E10.5), 배아체에서 분화된 심근세포는 이 시기의 심근 세포에 대한 특성을 관찰할 수 있는 좋은 모델이 되며, 유전자의 발현, 근섬유의 생성 (myofibrillogenesis), 이온 경로의 발달과 기능, 수용체의 발달 그리고 칼슘 handling에도 중요한 정보를 제공한다 (Gryshchenko 등, 1999; Hiromi 등, 2004).

미분화 상태의 단위발생 유래 생쥐 배아줄기세포와 체외수정 유래 배아줄기세포를 이용하여 기능성 심근세포로 분화시키는 factor로는 DMSO 외에 다양한 cytokine, growth factor, synthetic chemicals이 이용된다. 예를 들면, transforming growth factor (TGF)-1 family, fibroblast growth factor (FGF), oxytocin, retinoic acid, dynorphin B 등이 알려져 있다(Boon 등, 2004). 또한 bone morphogenetic protein (BMPs)도 심근 형성에 중요한 역할을 한다고 보고되었다 (Delot, 2003). 최근에는 BMPs와 FGFs가 *Wnt* 11과 관련된 signals이 심근 유도에 중요한 역할을 한다고 보고되었다 (Hiromi 등, 2004). 현재 배아줄기세포를 이용한 심근에 관한 연구 결과를 보면 배아

상태에서 발견되는 몇몇 유전자의 발현이 심근 형성에 영향을 준다고 보고되고 있다. GATA-4 유전자가 억제된 배아 줄기세포는 DMSO를 처리하더라도 심근 형성이 억제된다는 보고가 있는 반면(Narita 등, 1997), Nkx-2.5 유전자를 transfection시킨 배아 줄기 세포는 DMSO를 처리하지 않더라도 심근 형성이 된다는 보고가 있었다(Hiromi 등, 2004). 또한 opioid peptide gene 발현이 배아줄기세포에서 DMSO를 첨가하였을 때 기능성 심근으로 분화된다는 것이 보고되었다 (Carlo 등, 2000).

단위발생 유래 생쥐 배아줄기세포와 체외수정 유래 배아줄기세포부터 기능성 심근세포를 확인하는 방법에는 수축 현상을 확인하는 형태학적 관찰이 있으며, 그 외 심근 세포를 인지하는 항체를 이용한 면역세포화학적 염색방법, transmission electron microscopy를 이용한 구조분석법, Ca^{2+} transients의 측정 그리고 심근 세포에 대한 특이 유전자의 발현 연구 방법 등이 있다 (Hescheler 등, 1997; Gryshchenko 등, 1999). 본 연구에서는 심근세포를 확인하는 여러 방법 중 형태학적 관찰, 면역세포화학적 염색방법 그리고 심근세포에 대한 특이 유전자의 발현을 확인하였다. 형태학적으로 체외수정유래 배아 줄기세포와 단위발생유래 배아 줄기세포 모두 분화된 심근세포에서 수축현상을 확인할 수 있었다. 그리고 면역세포화학적 염색방법을 이용하여 muscle actin과 cardiac muscle이 발현되는 것이 확인되어 체외수정유래 배아 줄기세포와 단위발생유래 배아 줄기세포에서 분화된 세포의 특성이 수축성 심근세포 (contracting myocytes) 임을 재차 확인할 수 있었다. 또한 심근 세포의 특이 유전자의 발현을 확인한 결과, mouse L-type calcium channel α1C는 성체 생쥐의 심근과 P-mES04와 mES03에서 유도된 심근에서 모두 관찰되었다. 또한 중배엽성 특성을 나타내는 GATA binding protein 4 (GATA4)도 P-mES04와 mES03에서 유도된 심근에서 모두 관찰되었다. 심장의 근육에서 나타나는 cardiac myosin heavy chain α와 mouse cardiac muscle heavy polypeptide 7β도 성체 생쥐의 심근과 P-mES04와 mES03에서 유도된 심근에서 관찰되는 것이 확인되었다. 특히, 기능성 심근의 특징을 가장 잘 나타내는 beating 과 관련된 유전자 atrial natriuretic factor 또한 성체 생쥐의 심근과 P-mES04와 mES03에서 유도된 심근에서 모두 관찰되었다. 이러한 결과는 단위발생 유래 배아줄기세포도 체외수정 유래 배아줄기세포와 동일하게 기능성 심근세포로 분화가 가능하다는 것을 나타낸다. 한편, 기능성 심근의 특징을 나타내는 beating은 수많은 신호전달기전이 작용을 하는데, 이 기전에 대한 실험은 아직 미흡한 상태이다 (Carlo 등, 2000; Xuan 등, 2003). 그 외에 배양 조건, extracellular matrix의 이용, 다른 세포와의 공동배양, reactive oxygen species, free radical 등이 배아 줄기세포를 기능성 심근세포로 유도하는데 영향을 줄 수 있다고 보고되어 있다 (Boon 등, 2004).

따라서, 본 실험은 단위발생 유래 생쥐 배아줄기세포의 특성이 체외발생 유래 생쥐 배아 줄기세포와 유사하며, 기능성 심근세포로의 분화가 동일하게 가능하다는 것을 나타낸다. 이러한 의미는 단위발생 유래 생쥐 배아 줄기세포가 윤리적 문제가 해결되는 새로운 공급원이 될 수 있음을 의미하고, 이러한 기술이 인간 배아 줄기세포에 적용되었을 때 향후 인간의 심장 질환 치료를 위한 유전자 치료법, 약물 실험, 조직 공학 기술, 세포 대체 요법 분야에 기초적인 자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Allen ND, Barton SC, Kathy Hilton, Norris ML, Surani MA (1994): A functional analysis of imprinting in parthenogenetic embryonic stem cells. Development 120:1473-1482.
2. Andressen C, Stocker E, Klinz FJ, Lenka N, Hescheler J, Fleischmann B, Arnhold S, Addicks K (2001): Nestin-specific green fluorescent protein expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells used for transplantation. Stem Cells 19: 419-424.
3. Boon CH, Husnain KH, Eugene KWS, Tong C, Soon CN (2004): Strategies for directing the differentiation of stem cells into th cardiomyogenic lineage *in vitro*. Cardiovasc Reserch 62:34-42.
4. Carlo V, Margherita M (2000): Opioid peptide gene expression primes cardiogenesis in embryonal pluripotent stem cells. Circ Res 87:89-94.
5. Cibelli JB, Grant KA, Chapman KB, Cunniff K, Worst T, Green HL, Walker SJ, Gutin PH, Vilner L, Tabar V, Dominko T, Kane J, Wettstein PJ, Lanza RP, Studer L, Vrana KE, West MD (2002): Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. Science 295:819-820.
6. Delot EC (2003): Control of endocardial cushion and cardiac valve maturation by BMP signaling pathways. Mol Genet Metab 80:27-35.
7. Doetschman TC, Eistetter H, Kata M, Schmidt W, Kemler R (1985): The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. J Embryol Exp Morphol 87:27-45.
8. Evans MJ, Kaufman MH (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from moues embryos. Nature 292:154-156.
9. Gryshchenko O, Fischer IR, Dittrich M, Viatchenko-Karpinski S, Soest J, Bohm-Pinger M, Igelmund P, Fleischmann BK, Hescheler J (1999): Role of ATP-dependent K^+ channels in the electrical excitability of early embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. J Cell Sci 112:2903-2912.
10. Heinrich S, Theben T, Hescheler J, Lindner M, Brandt MC, Wartenberg M (2001): Characteristics of calcium sparks in cardiomyocytes derived from embryonic stem cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 281:H411-H421.
11. Hescheler J, Fleischmann BK, Lentini S, Maltsev VA, Rohwedel J, Wobus AM (1997): Addicks K. embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. Car-

diovasc Res 36:408-428.
12. Hiromi T, Kyoko H, Taksshi K, Akio I, Taksyuki M (2004): Wnt 11 facilitates embryonic stem cell differentiation to Nkx2.5-positive cardiomyocytes. Biochem Biophys Res Commun 325:968-975.
13. Kehat I, Kenyagin-Karsenti D, Snir M, Segev H, Amit M, Gepstein A, Livne E, Binah O, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L (2001): Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. J Clin Invest 108:407-414.
14. Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ (1996): Genetically selected cardiomyocytes from differentiation embryonic stem cells from stable intracardic grafts. J Clin Invest 98:216-224.
15. Martin GR (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.
16. Muller M, Flechmann BK, Selnert S, Ji GJ, Endl E, Middeler G, Muller OJ, Schlenke P, Frese S, Wobus AM, Hescheler J, Katus HA, Franz WM (2000): Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells *in vitro*. FASEB 14:2540-2548.
17. Narita N, Bielinska M, Wilson DB (1997): Cardiomyocyte differentiation by GATA-4-deficient embryonic stem cells. Development 124:3755-3764.
18. Park JI, Yoshida I, Tada T, Takagi N, Takahashi Y, Kanagawa H (1998): Differentiative potential of a mouse parthenogenetic embryonic stem cell line revealed by embryoid body formation *in vitro*. Jpn J Vet Res 46:19-28.
19. Park SP, Kim EY, Lee KS, Lee YJ, Shin HA, Min HJ, Lee HT, Chung KS, Lim JH (2002): Parthenogenetic mouse embryonic stem cells have similar characteristics to *in vitro* Fertilization mES cells. Korean J Fertil Steril 29:129-138.
20. Xuan Z, Emily Q, Gallicano GI (2003): Differentiation of nonbeating stem cells into beating cardiomyocytes is dependent on downregulation of PKC and in concert with upregulation of PKC. Dev Biolo 255:407-422.

(접수일자: 2005. 2. 10 / 채택일자: 2006. 3. 13)