

인체혈청 하에서 배양한 인체지방기질줄기세포의 표면항원 및 유전자 발현

전은숙¹ · 조현화² · 주혜준² · 김희규² · 배용찬³ · 정진섭^{1,2*}

¹부산대학교 의학연구소, ²부산대학교 의학대학 생리학 교실, ³부산대학교 의과대학 성형외과

Received March 29, 2007 / Accepted May 16, 2007

Surface maker and gene expression of human adipose stromal cells growing under human serum. Eun Sook Jun¹, Hyun Hwa Cho², Hye Joon Joo², Hoe Kyu Kim², Yong Chan Bae³ and Jin Sup Jung^{1,2*}. ¹Medical Research Institute, Pusan National University Hospital, Pusan (602-739), Korea, ²Department of Physiology, College of Medicine, Pusan National University, Pusan (602-739), Korea, ³Department of Plastic Surgery, College of Medicine, Pusan National University, Pusan (602-739), Korea – Human mesenchymal stem cells (hMSC), that have been reported to be present in bone marrow, adipose tissues, dermis, muscles and peripheral blood, have the potential to differentiate along different lineages including those forming bone, cartilage, fat, muscle and neuron. Therefore, hMSC are attractive candidates for cell and gene therapy. The optimal conditions for hMSC expansion require medium supplemented with fetal bovine serum (FBS). Some forms of cell therapy will involve multiple doses, raising a concern over immunological reactions caused by medium-derived FBS proteins. Previously, we have shown that hADSC can be cultured in human serum (HS) during their isolation and expansion, and that they maintain their proliferative capacity and ability for multilineage differentiation and promote engraftment of peripheral blood-derived CD34 cells mobilized from bone marrow in NOD/SCID mice. In this study we determined whether hADSC grown in HS maintain surface markers expression similar with cells grown in FBS during culture expansion and compared gene expression profile by Affymetrix microarray. Flow cytometry analysis showed that HLA-DR, CD117, CD29 and CD44 expression in HS-cultured hADSC during culture expansion were similar with that in FBS-cultured cells. However, the gene expression profile in HS-cultured hADSC was significantly different from that in FBS-cultured cells. Therefore, these data indicated that HS-cultured hADSC should be used in vivo animal study of hADSC transplantation for direct extrapolation of preclinical data into clinical application.

Key words – human adipose stromal cells, human serum, proliferation, surface markers, gene expression profile

서 론

인간중간엽줄기세포(Human Mesenchymal stem cell, hMSC)는 성체의 골수, 근육, 지방조직 등에서 분리되어 체외에서 쉽게 증식할 수 있으며, 여러 가지 세포형태인 지방세포, 연골세포, 근육세포, 뼈세포로 분화가 가능한 세포이다 [3,5,20,21]. 또한 골수줄기세포(Bone marrow stromal cells, BMSC)는 조혈모세포 (hematopoietic stem cells, HSC)의 증식(proliferation)과 분화(differentiation)를 조절하는 것으로도 보고되어져 있다[11]. 성체줄기세포(Adult stem cells)는 각각 다른 배아층에서 유래하는 정상 배아발달 동안 조직으로 분화하는 것으로 보인다. 예를 들면, 골수 유래 중간엽줄기세포는 배아의 외배엽에서 유래된 신경조직으로 분화할 수 있다[4,17].

최근, 이들 중간엽줄기세포를 각 조직세포로 분화 후 이식

함으로써 Alzheimer's disease, Parkinson disease 등 각종 신경질환과 각종 유전질환의 치료 가능성이 부각되고 있으며, 이들 질환 세포치료 외에도 중간엽 세포에 유전자를 발현시킴으로써 유전자치료 (gene therapy)에 이용하고자 하는 연구가 최근 국내외에서 관심의 초점이 되고 있다[26]. 그러나, 세포치료 및 유전자치료에 중간엽줄기세포를 임상적으로 활용하고자 하는 시도는 우선적으로 배양, 분화기술 및 효능평가의 표준화 등의 연구가 필요하다.

인간 골수로부터 중간엽줄기세포의 분리를 위한 기법과 지방조직에서 중간엽줄기세포를 분리하는 기법은 각각 Pittenger 등[21]와 van 등[27]의 문헌에서 개시되었다. 이들에서는 세포배양을 위하여 α -MEM이나 DMEM배지 및 10-20% 소 태아 혈청을 사용하였다. 그러나 임상적용에 있어서 중간엽줄기세포를 분리 및 배양하기 위해 소 태아혈청을 함유하는 배지를 이용하는 경우, 소 태아혈청으로 배양한 세포를 소 태아혈청이 없는 용액으로 세척하더라도 상당량의 소 태아혈청이 세포 내 잔류하여 강력한 이종항원으로 작용하며 바이러스 및 박테리아 감염, Creutzfeldt-Jakob 질병을

*Corresponding author

Tel : +82-51-240-7734, Fax : +82-51-246-6001

E-mail : jsjung@pusan.ac.kr

일으키는 프리온 등 소의 질환의 인체감염가능성, 혈청의 단백질 오염으로 인한 면역 및 염증반응을 일으킬 수 있다 [8,9,14,15,22,25,28]. 이를 극복하기 위해 종래 세포배양배지에서 소 태아혈청 대신에 인체혈청을 사용한 연구가 많이 보고되고 있다 [12,19,24,29].

지방조직에는 골수기질세포 (BMSC)와 유사한 특징을 가지는 다능성 전구세포를 가지고 있으며 [1,13], 지방조직으로부터 얻어진 중간엽줄기세포가 생체 외 적절한 배양조건 하에서 지방세포, 연골세포, 근세포, 골세포로 분화함이 보고되고 있다 [2]. 최근 연구에 의하면 지방유래기질세포(ADSC)가 생체 외에서 신경세포의 발현을 유도 할 수 있다고 밝혀졌다 [16]. 그러므로, 인체 지방조직은 다능성을 가진 기질세포의 대체적인 자원으로 생각 되어진다. 최근, 자가혈청이 중간엽줄기세포의 단기 성장과 골분화를 도울 수 있다고 보고 되어졌다 [23,29]. 이전연구에서 본 연구자들은 FBS를 HS으로 대체하여 세포의 증식과 분화 능을 유지한 상태로 배양하는 것이 가능하며 이들 세포가 조혈모세포의 골수 안착에 FBS로 배양한 세포와 유사한 효능을 나타냄을 보고하였다 [10]. 그러나, 이들 세포가 모든 면에서 동일한 기능을 갖는지는 명확하지 않다. 따라서, 본 연구에서는 인체혈청을 이용하여 장기 배양하는 동안 지방유래중간엽줄기세포의 특성을 보다 명확히 밝히기 위하여 표면항원의 발현과 유전자 발현을 flow cytometry와 microarray로 측정하여 비교 분석 하였다.

재료 및 방법

지방기질줄기세포의 분리 및 배양

지방조직으로부터 지방기질줄기세포를 분리하기 위하여 성형외과에서 피하지방 제거 술을 시행한 환자로부터 동의 하에 지방조직을 얻었다. 분리한 지방조직은 HBSS로 씻어준 후 지방조직을 얇게 자른 다음 0.075% collagenase (Sigma)를 첨가한 serum이 없는 α -MEM배지로 현탁하여 37°C, 5% CO₂농도의 조건 하에서 30분간 처리하였다. 원심분리 후 pellet에 다음과 같은 2가지 조성의 배양용액을 각각 사용하여 기질 줄기세포를 배양하였다. Fibronectin (10 ng/ml)이 coating된 배양용기에 60% low-glucose DMEM (L-glutamine) (Life Technologies), 40% F-12 Nutrient Mixture (Life Technologies), 1x insulin-transferrin-selenium (Sigma), 10⁻⁸ M dexamethasone (Sigma), 100 U penicillin/1,000 U streptomycin (Sigma), 10 ng/ml EGF (Daewoong 제약), ① 10% 소태아혈청으로 이루어진 배양용액, ② 10% 인체혈청으로 이루어진 배양용액에서 배양하였다. 분리된 세포들을 dish에 plating해서 24시간 후 부착되지 않은 세포를 제거하였다. 세포가 70-80%까지 자란 후 trypsin/EDTA를 처리하여 세포를 단일세포로 분리하고 이를 2,000/cm²의 밀도로 갈아 계대배양하였다.

지방기질줄기세포의 동결시에는 먼저 세포를 떼어내서 20% human serum이나 소 태아혈청을 포함한 세포배양배지 (DMEM-low glucose/F-12배지) 900 μ l 로 현탁시킨다. Freezing vial에 DMSO 100 μ l 를 넣고 현탁된 세포를 넣어 -20°C에서 1시간 30분간 보관 후 -70°C로 옮겨 보관한다

지방기질줄기세포의 지방 및 골 세포로의 분화유도

지방기질줄기세포의 지방 및 골세포로의 분화를 유도하기 위해서 지방세포유도 분화배지 (10% 소 태아혈청 또는 인체혈청, 1 μ M dexamethasone, 0.5 mM 3-isobutyl-1-methyl-xanthine and 200 μ M indomethacin in α -MEM) 및 골세포유도 분화배지 (10% 소 태아혈청 또는 인체혈청, 0.1 μ M dexamethasone, 10 mM β -glycerophosphate, and 50 μ M ascorbic acid in α -MEM)에서 각각 배양 14일 동안 배양 하였으며, 배지는 3일에 한번씩 교환 하였다. 분화된 지방세포는 세포표면에 축적된 lipid를 Oil Red O로 염색하고, 여기에 isopropyl alcohol을 처리한 후 510 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. Oil Red O로의 염색과정은 분화배지를 제거한 후 4% formaldehyde로 15분간 실온에서 고정시키고 HBSS로 두 번 씻어준다. 2% Oil Red O로 실온에서 1시간 염색한 후 HBSS로 깨끗하게 씻어주고 현미경에서 분화정도를 관찰 하였다. 분화된 골세포는 alizarin red S로 염색한 후 Meta Morph 프로그램을 이용하여 전체 세포에서 분화된 세포의 퍼센트를 측정 수치화하여 정량하였다. Alizarin red S로의 염색과정은 분화배지를 제거한 후 70% ethanol로 15분간 실온에서 고정시키고 증류수로 두 번 씻어주었다. Alizarin red S를 실온에서 10분 염색한 후 분화정도를 현미경하에서 관찰하였다.

유세포분석

소 태아혈청 및 인체혈청에서 배양한 인체지방기질줄기세포에서 표면항원의 발현이 변화하는지를 확인하기 위하여 유세포분석을 실시하였다. 유세포분석을 위하여 세포를 72시간 배양한 후 0.25% trypsin/EDTA로 세포를 떼어낸 후 4% formaldehyde로 30분간 고정시킨다. 고정된 세포는 flow cytometry buffer (FCB; 1 x PBS, 2% FBS, 0.05% sodium azide)로 씻어주고 10⁶ 세포로 나눠 담은 뒤 CD29, CD44, CD117, HLA-DR 항체를 포함하는 flow cytometry buffer를 각각 처리하였다. 항체로 처리된 세포는 FACScan argon laser cytometer (Becton Dickson, San Jose, CA)를 이용하여 측정하였다.

증식능의 측정

인체지방기질줄기세포를 2000/cm²의 밀도로 갈아 3일 간격으로 계대배양 하면서 각 계대배양 시기마다 현미경에서 haematometer를 사용하여 세포 수를 측정하였다.

CFU (colony forming unit, CFU) 측정

세포 집락 형성(colony forming unit, CFU) 능력을 확인하기 위해서 인체지방기질줄기세포를 최종 60 cells /10 cm² plates로 세포배양기에서 10일간 배양한 후 도립현미경을 통하여 CFU를 측정하였다.

혈청분리

인체혈청분리를 위하여 채혈 후 응고된 혈액을 3000 rpm에서 10 분 동안 원심분리 하여 혈청을 회수하였다. 혈청은 0.2 µm 필터에서 여과하여 1 ml씩 분주하여 -20℃에 보관하였다. 열처리된 혈청을 얻기 위해 사용하기 전 56℃ 수조에서 30 분간 불활성화 시킨 후 실험에 사용하였다.

cDNA chip

인체혈청 및 소 태아혈청에서 배양한 인체지방기질줄기세포의 유전자 분석을 위해서 total RNA는 RNeasy mini kit (QIAGEN, Inc., Valencia, CA)로 분리하고 Affymetrix (Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA)사의 protocol에 따라 유전자 칩U133A array로 유전자 발현을 비교, 분석하였다.

통계분석

각 실험군 간의 통계학적 차이는 Student's t-test를 이용하였으며, 통계학적으로 유의성이 있는 p 수치는 0.05미만으로 하였다.

결 과

인체혈청과 소태아 혈청에서의 지방기질줄기세포의 증식

인체지방기질줄기세포를 6 well 플레이트에 2000/cm²의 밀도로 세포를 깔아 10% 소 태아혈청 또는 인체혈청을 포함하는 DMEM-LG/F-12 배지에서 3일 간격으로 계대배양 하였다. 각 계대배양 시기마다 현미경에서 haematometer를 사용하여 현미경하에서 세포 수를 측정하였다. 소 태아혈청을 10% 인체혈청으로 대체한 경우 DMEM-LG/F-12 배지에서 성장 능의 유의한 차이가 확인되지 않았으며 (Figure 1), 또한 이들 세포는 장기 계대배양 하더라도 CFU 생성 능력에 유의한 차이가 관찰되지 않았다(Table 1).

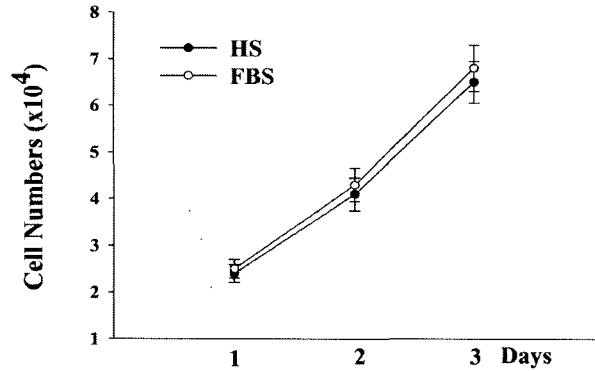


Fig. 1. Effect of proliferation hADSC growing under human serum and FBS. Proliferation of hADSC growing under human serum and FBS was determined by direct cell counting using a hemocytometer for the 3 days after plating. Data represent mean ± SEM of 4 different experiments.

세포표면항원의 발현

인체혈청 및 소 태아혈청에서 장기 배양한 인체지방기질줄기세포에서 표면항원의 발현이 변화하는지를 확인하기 위하여 이식 시 면역거부반응에 중요한 역할을 하는 MHC-class II antigen인 HLA-DR, 중간엽줄기세포의 marker인 CD44와 CD29, 조혈모세포(haemopoietic progenitors)의 marker인 CD117 (c-kit)의 발현변화를 유 세포 분석을 통하여 확인하였다. 그 결과 인체혈청으로 배양한 지방기질줄기세포에서 표면항원의 발현은 소 태아혈청 존재 하에서 배양한 지방기질줄기세포와 유의한 차이를 나타내지 않았으며 연속적인 계대배양시도 표면형의 발현이 안정적으로 유지됨을 나타내었다(Table 1).

인체혈청과 소 태아혈청에서의 지방기질줄기세포의 분화

인체혈청 및 소 태아혈청에서 배양한 인체지방기질줄기세포가 분화 능을 유지하는 지를 밝히기 위하여 각 배양조건에서 증식한 지방기질줄기세포를 골세포 및 지방세포로 분화를 유도 하였다. 분화 후 그 정도를 정량분석 한 결과 유의한 분화 능의 차이가 관찰되지 않았다(Figure 2).

인체혈청과 소 태아혈청에서의 유전자 분석

인체혈청 및 소 태아혈청에서 배양한 인체지방기질줄기세포

Table 1. Expression of surface markers in hADSC grown in human serum (HS) and FBS.

	Passage	CD117	CD29	HLADR	CD44	CFU
HS	1	5.3±1.41	94.3±9.62	0.4±0.05	98.2±9.74	24±4.52
	4	3.2±1.02	95.2±9.92	0.5±0.08	99.3±9.85	28±5.64
	8	1.2±0.98	94.3±9.66	0.3±0.04	98.5±9.78	24±4.98
FBS	1	4.3±1.52	96.3±10.07	0.4±0.04	97.5±9.68	26±4.99
	4	3.5±1.27	95.7±9.94	0.3±0.03	98.2±9.81	27±5.01
	8	0.9±0.12	94.3±9.65	0.6±0.09	97.9±9.71	24±4.58

Data represent means ± SEM (n = 6 per group).

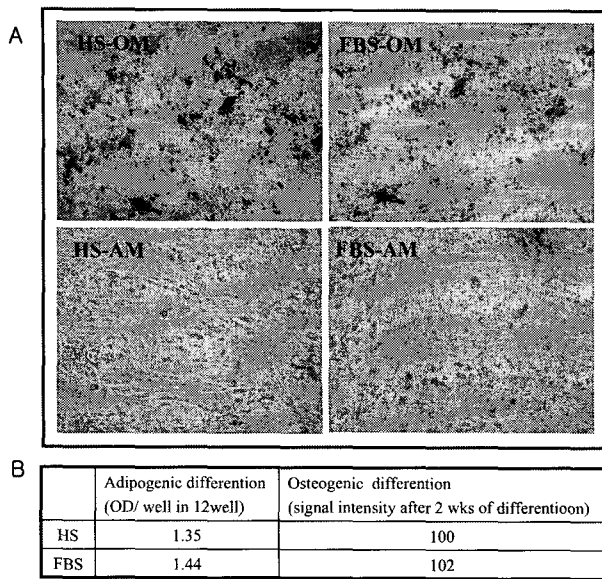


Fig. 2. Effect of adipogenic and osteogenic differentiation hADSC growing under human serum and FBS. hADSC were cultured at a confluent state before induction of differentiation, and cells were differentiated for subsequent 14 days in adipogenic medium (AM) and osteogenic medium (OM). After then, hADSC were stained with oil red O and alizarin red S. (B) Quantitation of adipogenic and osteogenic differentiation. The adipogenic induction was washed with isopropanol and OD was measured by a spectrophotometer. The osteogenic differentiation was performed by determination of density and area of alizarin red S staining with an image analysis program. Data represent mean of 5 different experiments.

포에서 발현하는 유전자 발현을 확인하기 위해서 Affymetrix사의 인간 유전자 14,500의 probe를 포함하는 chip array를 이용하여 유전자 발현들을 분석하였다. 그 결과 인체혈청 및 소 태아혈청에서 배양한 인체지방기질줄기세포 간의 유전자를 비교하였을 때 2,585개의 유전자 발현 차이를 보이고, 그 중 소 태아혈청에서 배양한 세포에 비해 인체 혈청에서 배양한 세포에서 1,604개의 유전자 발현이 증가하고 980개의 유전자 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 표2, 3에서는 2배 이상 발현이 차이 나는 유전자들을 부분적으로 나열하고, signal pathway 별로 발현이 차이 나는 유전자수를 분석하였다(Table 4, 5).

고 찰

중간엽줄기세포는 1976년 Fridenstein등에 의하여 골수에서 처음 발견되었으며 [7], 골수에서 존재하는 조혈모세포와 다른 표면항원의 발현을 나타내고 비교적 용이하게 실험실 조건에서 증식이 가능하다. 이들 세포는 자가복제 능 뿐만

아니라 증배염성조직인 골, 연골, 지방, 근육 및 내피세포로 분화가 가능하고 신경세포와 같은 외배엽성세포로도 분화가 가능한 것으로 알려져 있어 재생의학에서 이용되는 줄기세포의 중요한 공급원으로 간주되고 있다. 최근 이러한 중간엽 줄기세포는 골수 뿐만 아니라 지방, 제대혈 등에 존재하는 것으로 보고되었다[6,30]. 인체지방조직은 쉽게 접근이 가능하고 대량으로 존재하며 골수에 비하여 중간엽줄기세포의 밀도가 상대적으로 높아 대량의 세포가 필요한 세포치료제의 임상적용의 측면에서 보다 짧은 시간에 세포를 확보할 수 있는 이상적인 중간엽줄기세포의 공급원의 하나이다. 지방 유래 중간엽줄기세포는 급성 중추신경손상, 하지허혈 및 심근경색, 조혈모세포의 골수 안착, 골 및 연골재생, 창상치유 및 성형외과적 재건등에 효과를 나타내는 것으로 보고되었다[10,18]. 일반적으로 중간엽줄기세포를 이용하여 실험동물의 생체효능시험 시 소 태아혈청에서 배양한 세포를 사용한다. 그러나, 소 태아혈청으로 인간중간엽줄기세포를 배양 시에 소 태아혈청 단백질이 세포 내로 흡수 되어 간단한 세척에 의해서는 제거되지 않는다고 보고되어 있다[23]. 이처럼 상당량의 소 태아혈청이 세포 내 잔류하여 강력한 이종항원으로 작용하여 과민반응을 유도할 수 있고 바이러스 및 박테리아 감염, Creutzfeldt-Jakob질환을 일으키는 프리온 등 소의 질환의 인체감염 가능성, 혈청의 단백질 오염으로 인한 면역 및 염증반응을 일으킬 수 있기[8,9,14,15,22,25,28] 때문에 임상적용을 위해서는 이를 극복 하는 방법을 개발하는 것이 필수적이다. 본 연구에서는 소 태아혈청을 대신하여 인체혈청으로 인체 지방줄기세포를 장기적으로 배양하여 이들의 증식 능, 분화 능, 표면항원, 핵형, 유전자 발현을 비교 분석하였다. 인체혈청 및 소 태아혈청으로 배양한 인체 지방줄기세포는 증식 능, 지방 및 골 분화 능에서 유의한 차이를 보이지 않았고, 이식 시 면역거부반응에 중요한 역할을 하는 MHC-class II antigen인 HLA-DR, 중간엽줄기세포의 marker인 CD44와 CD29, 조혈모세포(haemopoietic progenitors)의 marker인 CD117 (c-kit) 표면 항원으로 발현 변화를 유세포 분석을 통하여 확인한 결과 유의한 차이를 나타내지 않았으며 연속 계대배양 시도 그 발현의 유의한 차이가 나타나지 않았다. 또한, 줄기세포의 증식 능을 반영하는 CFU의 생성 능력도 소 태아혈청에서 배양한 세포와 인체혈청에서 배양한 세포사이에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 소 태아혈청의 사용 없이도 인체혈청을 이용하여 세포치료제로 이용 가능한 중간엽줄기세포를 지방조직에서 배양하는 것이 가능함을 나타낸다.

그러나 microarray를 이용한 유전자 분석에서 인체혈청 및 소 태아혈청으로 배양한 인체 지방줄기세포 간의 유전자 발현을 비교 분석한 결과 인체혈청 하에서 배양된 인체 지방 줄기세포의 유전자 발현형태와 소 태아혈청 하에서 배양된 세포의 유전자 발현형태 간에는 상당한 차이를 보였다. 그

Table 2. Genes list up-regulated in culture of human serum than FBS.

Gene Name	Fold	Gene Name	Fold
Homo sapiens flavin containing monooxygenase 1	10.2	regulator of G-protein signalling 16	4.6
Homo sapiens CD163 antigen (CD163)	9.3	phospholipase D1	4.5
WNT1 inducible signaling pathway protein 2	8.9	interferon induced transmembrane protein 1	4.5
apolipoprotein E	8.8	cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5	4.3
prostaglandin D2 synthase	8.4	membrane metallo-endopeptidase	4.3
spondin 1, (f-spondin) extracellular matrix protein	8.2	proteoglycan 2	4.2
lipopolysaccharide binding protein (LBP)	8.1	hypoxia-inducible protein 2 (HIG2)	4.2
alpha-2A adrenergic receptor	7.9	small inducible cytokine B subfamily (Cys-X-Cysmotif), member	4.1
mitogen induced nuclear orphan receptor	7.5	secreted frizzled-related protein 4	4
intercrine-alpha (hIRH)	7.5	interleukin 18 receptor 1	3.9
matrix metalloproteinase 8	7.4	adipose differentiation-related protein	3.9
platelet-derived growth factor receptor-like	7	GTP cyclohydrolase 1	3.9
leptin (murine obesity homolog) (LEP)	6.9	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	3.9
lung type-I cell membrane-associated glycoprotein, isoform 2 precursor	6.7	prostaglandin F receptor (FP) (PTGFR)	3.8
nsulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	6.6	carbonic anhydrase XII	3.8
short form transcription factor C-MAF	6.5	vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1)	3.8
collagen, type XV, alpha 1	6.2	cyclin-dependent kinase inhibitor 1C	3.6
carboxypeptidase M (CPM)	6.2	glycerol kinase (GK)	
cytochrome P450 retinoid metabolizing protein	6.2	extracellular matrix protein 2	3.4
orphan seven-transmembrane receptor,	6.2	Kruppel-like factor 4	3.3
stromal cell-derived factor 1 (SDF1)	6	interleukin 7	3.3
tumor necrosis factor receptor 2	6	heat shock 27kD protein 2	3.2
STAT inhibitor 3	5.9	interferon-gamma receptor	3.2
prostaglandin E receptor EP3 subtype 4 isoform	5.7	angiopoietin-like 2 (ANGPTL2)	3.1
FXYD domain-containing ion transport regulator 6	5.7	peptide transporter 3	3.1
phospholipase A2, group IIA	5.6	adenylate kinase 2	3.1
suppression of tumorigenicity 16	5.6	mitogen-activated protein kinase 10	3
interleukin 1 receptor, type II (IL1R2)	5.5	CEBP-induced protein	3
toll-like receptor 2 (TLR2)	5.5	Rho GTPase activating protein 6 (ARHGAP6)	3
matrix metalloproteinase 13 (MMP13)	5.5	bone marrow stromal cell antigen 2	3
prostaglandin E synthase (PTGES)	5.4	NOD2 protein	2.9
G protein-coupled receptor 24 (GPR24)	5.4	CDC14 (cell division cycle 14)	2.6
chemokine (C-C motif) receptor 1 (CCR1)	5.4	transforming growth factor, beta 3	2.6
matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	5.4	macrophage differentiation-associated	2.6
prostaglandin D synthase	5.3	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	2.6
endothelial cell growth factor 1	5	Janus kinase 2 (a protein tyrosine kinase)	2.2
immunoglobulin superfamily, member 4	5	STAT induced STAT inhibitor 3	2.2
interleukin 15 receptor, alpha	5	histamine receptor H1 (HRH1)	2.1
insulin-like growth factor I (IGF-I)	4.9	intercellular adhesion molecule 1 (CD54)	2.1
potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J member 6	4.9	heparin-binding growth factor receptor	2
zinc finger protein 145	4.9	interferon induced transmembrane protein 2	2
spinal cord-derived growth factor-B	4.8	fibroblast growth factor 7	2
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	4.7	osteomodulin (OMD)	2

Table 3. Genes list down-regulated in culture of human serum than FBS.

Gene Name	Fold	Gene Name	Fold
desmoplakin (DPI, DPII) (DSP)	8.3	hyaluronan receptor (RHAMM)	3.4
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4	6.3	PRKC, apoptosis, WT1	3.3
TEK tyrosine kinase	5.9	regulator of cytokinesis 1 (PRC1)	3.3
cyclin A2 (CCNA2)	5.5	collagen type I receptor	3.2
regulator of G-protein signalling 5	5.3	LDL receptor-related protein 6 (LRP6)	3.2
cadherin 2, type 1, N-cadherin	5.2	cell division cycle 20	3.2
connective tissue growth factor	5.1	nuclear receptor subfamily 2	3
serinethreonine kinase 6 (STK6)	5	serinethreonine kinase 15 (STK15)	3
diphtheria toxin receptor	5	cellular retinoic acid-binding protein 2	2.8
annexin 14 (ANX14)	4.9	pituitary tumor-transforming protein 1	2.8
coagulation factor II (thrombin) receptor (F2R)	4.8	dickkopf (Xenopus laevis) homolog 1	2.7
potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M	4.7	ring finger protein 3 (RNF3)	2.6
cytokine receptor-like factor 1 (CRLF1)	4.6	renal tumor antigen	2.6
insulin-like growth factor binding protein 6	4.5	protein tyrosine phosphatase	2.5
PTPL1-associated RhoGAP 1 (PARG1)	4.4	TTK protein kinase (TTK)	2.5
kinesin family member 4A (KIF4A)	4.3	c-myc binding protein	2.5
enhancer of filamentation 1	4.3	neurogenic extracellular slit protein	2.4
PRKC, apoptosis, WT1, regulator (PAWR)	4.2	Fas-activated serinethreonine kinase	2.4
leukemia inhibitory factor	3.7	myosin regulatory light chain 2	2.4
WNT1 inducible signaling pathway protein 1	3.7	member RAS oncogene family (RAB3B)	2.1
mouse double minute 2	3.7	FE65-like protein (hFE65L)	2
asparagine synthetase (ASNS)	3.6	Melanoma associated gene	2
chloride intracellular channel 3 (CLIC3)	3.6	Melanoma associated gene	2
inhibitor of DNA binding 3	3.5	proteoglycan 1, secretory granule (PRG1)	2
tissue inhibitor of metalloproteinase 3	3.5	inhibin, beta A	2

중 소 태아혈청에서 배양한 세포에 비해 인체혈청에서 배양한 세포에서 cell proliferation, cell signaling pathway, cell growth, cell surface receptor, cell cycle, cell adhesion, cell development, cell communication, protein modification, apoptosis, Protein phosphorylation, cell motility and immune response 등에 관련한 유전자 1,604개의 유전자 발현이 증가하고 980개의 유전자 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 인체혈청 및 소 태아혈청으로 배양한 인간지방줄기세포간의 상당한 유전자 발현차이는 본 실험에서 측정된 증식 능, 분화 능, 표면항원발현에서는 유의한 차이는 보이지 않았지만, 소 태아혈청을 이용하여 배양한 세포의 생체효능이 인체혈청을 이용하여 배양한 세포와 다르게 나타날 가능성을 배제할 수 없다. 세포치료제의 개발에 있어 실험동물을 이용한 전임상 효능시험의 성적이 임상시험 전 단계의 치료제의 효능으로 인정됨에 비추어 전 임상시험단계부터 인체 혈청으로 배양한 세포를 이용하여 실험을 수행 함으로서 보다 신뢰성 있는 효능시험자료를 얻는 것이 필요함을 제시한다.

요 약

인간중간엽줄기세포는(Human mesenchymal stem cells,

hMSC) 골수, 지방, 피부, 근육, 혈액에 존재하며, 뼈, 연골, 지방, 근육, 신경세포로 분화가능성이 보고되어 손상조직의 재생을 위한 재료로서뿐만 아니라 유전자치료의 매개체로 이용될 수 있는 가능성이 제안되고 있다.

인간중간엽줄기세포의 적절한 배양조건에는 소 태아혈청 (fetal bovine serum ,FBS)이 요구되어지므로 세포치료에는 소 태아혈청이 다수 포함되어 있을 것이며 세포배양 배지 유래 소 태아혈청의 단백질에 의한 면역거부반응이 우려된다. 이미 앞선 연구에서 자가혈청 하에서 인체지방줄기세포 분리과 계속적인 세포배양을 실시하였을 때 인체지방줄기세포의 증식능력과 다 분화 능이 유지되며 면역결핍 생쥐에 골수의 말초혈액에서 유래된 CD34세포 이식 시 안착 능을 촉진함을 보였다.

본 연구에서 인체지방줄기세포가 인체혈청 하에서 배양되었을 때 소 태아혈청 하에서 배양할 때 발현하는 표면항원을 유지함을 확인했으며 microarray를 사용하여 유전자 발현을 비교했다. 유 세포 분석을 통하여 인체혈청 하에서 계속적으로 배양된 인체유래지방줄기세포에서 HLA-DR, CD117, CD29 와 CD44 의 발현이 소 태아혈청 하에서 배양했을 때와 비슷함을 밝혔다. 그러나 인체혈청 하에서 배양된 인체지방줄기세포의 유전자 발현형태와 소 태아혈청 하에서 배양된 세포의 유전자 발현형태 간에는 상당한 차이를 보였다.

Table 4. Signaling pathway classification of up-regulated genes in human serum

Pathway	Number	Pathway	Number
Cholesterol biosynthesis	2	Hypoxia response via HIF activation	3
Ubiquitin proteasome pathway	4	Parkinson disease	9
Cytoskeletal regulation by Rho GTPase	3	Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	32
Hedgehog signaling pathway	1	Adrenaline and noradrenaline biosynthesis	2
TCA cycle	1	PDGF signaling pathway	13
Plasminogen activating cascade	6	Endothelin signaling pathway	15
Metabotropic glutamate receptor group III pathway	3	Apoptosis signaling pathway	16
Ionotropic glutamate receptor pathway	3	Glycolysis	3
JAK/STAT signaling pathway	5	Notch signaling pathway	2
Interleukin signaling pathway	17	VEGF signaling pathway	12
DNA replication	1	Axon guidance mediated by Slit/Robo	2
Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade	7	Alzheimer disease-amyloid secretase pathway	8
Blood coagulation	5	General transcription regulation	2
Circadian clock system	2	Transcription regulation by bZIP transcription factor	2
Axon guidance mediated by semaphorins	4	FAS signaling pathway	4
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway	14	Metabotropic glutamate receptor group I pathway	5
p53 pathway	2	Huntington disease	6
TGF-beta signaling pathway	9	B cell activation	11
Interferon-gamma signaling pathway	4	Alpha adrenergic receptor signaling pathway	4
Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade	5	PI3 kinase pathway	8
Cadherin signaling pathway	10	T cell activation	14
Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway	5	Oxidative stress response	4
Toll receptor signaling pathway	13	EGF receptor signaling pathway	15
Alzheimer disease-presenilin pathway	22	Wnt signaling pathway	22
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathway	11	Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway	5
Integrin signalling pathway	20	FGF signaling pathway	11
Muscarinic acetylcholine receptor 2 and 4 signaling pathway	3	Angiogenesis	29

그러므로 본 연구는 인체혈청 하에서 배양된 인체지방기질 줄기세포가 임상적용을 위한 선행 데이터로써 직접적인 추정을 하기 위해서는 인체지방기질줄기세포 이식연구에 in vivo 동물실험연구가 수행되어야 함을 제시하고 있다.

감사의 글

이 연구는 부산대학교 자유과제 학술연구비(2년)에 의하여 연구 되었으며 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

- Allen, T. D., T. M. Dexter and P. J. Simmons. 1990. Marrow biology and stem cells. *Immunology* **49**, 1-38.
- Angelopoulou, M., E. Novelli, J. E. Grove, H. M. Rinder, C. Civin, L. Cheng and D. S. Krause. 2003. Cotransplantation of human mesenchymal stem cells enhances human myelopoiesis and megakaryocytopoiesis in NOD/SCID mice. *Experimental hematology* **31**, 413-420.
- Beresford, J. N., J. H. Bennett, C. Devlin, P. S. Leboy and M. E. Owen. 1992. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *Journal of cell science* **102**, 341-351.
- Brazelton, T. R., F. M. Rossi, G. I. Keshet and H. M. Blau. 2000. From marrow to brain: Expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* **290**, 1775-1779.
- Caplan, A. I. 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research* **9**, 641-650.

1. Allen, T. D., T. M. Dexter and P. J. Simmons. 1990.

Table 5. Signaling pathway classification of down-regulated genes in human serum.

Pathway	Number	Pathway	Number
T cell activation	9	Blood coagulation	5
Axon guidance mediated by Slit/Robo	3	Metabotropic glutamate receptor group II pathway	2
Insulin/IGF pathway-mitogen activated protein kinase kinase/MAP kinase cascade	8	PDGF signaling pathway	8
Glycolysis	2	Angiogenesis	21
General transcription regulation	3	Cadherin signaling pathway	10
Alzheimer disease-presenilin pathway	12	Axon guidance mediated by netrin	5
Metabotropic glutamate receptor group III pathway	2	TGF-beta signaling pathway	17
Ionotropic glutamate receptor pathway	2	JAK/STAT signaling pathway	1
Wnt signaling pathway	24	Toll receptor signaling pathway	1
Alzheimer disease-amyloid secretase pathway	4	Oxidative stress response	1
Apoptosis signaling pathway	12	VEGF signaling pathway	6
Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gi alpha and Gs alpha mediated pathway	5	Heterotrimeric G-protein signaling pathway-rod outer segment phototransduction	1
Interferon-gamma signaling pathway	3	DNA replication	4
Transcription regulation by bZIP transcription factor	6	Hedgehog signaling pathway	3
Cell cycle	5	Muscarinic acetylcholine receptor 2 and 4 signaling pathway	4
EGF receptor signaling pathway	11	TCA cycle	1
Adrenaline and noradrenaline biosynthesis	2	Nicotinic acetylcholine receptor signaling pathway	9
Hypoxia response via HIF activation	2	Cytoskeletal regulation by Rho GTPase	11
FGF signaling pathway	15	Metabotropic glutamate receptor group I pathway	1
Insulin/IGF pathway-protein kinase B signaling cascade	7	p53 pathway	6
B cell activation	10	Interleukin signaling pathway	12
Alpha adrenergic receptor signaling pathway	2	Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway	18
Notch signaling pathway	2	Endothelin signaling pathway	4
FAS signaling pathway	4	Plasminogen activating cascade	3
Integrin signalling pathway	31	Heterotrimeric G-protein signaling pathway-Gq alpha and Go alpha mediated pathway	6
Huntington disease	20	PI3 kinase pathway	10
Ubiquitin proteasome pathway	13	Muscarinic acetylcholine receptor 1 and 3 signaling pathway	4
Parkinson disease	10	Axon guidance mediated by semaphorins	3

- El-Badri, N. S., A. Hakki, S. Saporta, X. Liang, S. Madhusodanan, A. E. Willing, C. D. Sanberg and P. R. Sanberg. 2006. Cord blood mesenchymal stem cells: potential use neurological disorders. *Stem cell development* **15**(4), 495-506.
- Friedenstein, A. J., J. F. Gorskaja and N. N. Kulagina. 1976. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology* **4**, 267-274.
- Horwitz, E. M., P. L. Gordon, W. K. Koo, J. C. Marx, M. D. Neel, R. Y. McNall, L. Muul and T. Hofmann. 2002. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 8932-8937.
- Kievits, F., W. J. Boerenkamp and P. Ivanyi. 1988. H-2-dependent binding of xenogeneic beta 2-microglobulin from culture media. *Journal of Immunology* **140**, 4253-4255.
- Kim, S. J., H. H. Cho, Y. J. Kim, S. Y. Seo, H. N. Kim, J. B. Lee, J. H. Kim, J. S. Chung and J. S. Jung. 2005. Human adipose stromal cells expanded in human serum promote engraftment of human peripheral blood hematopoietic stem cells in NOD/SCID mice. *Biochemical and biophysical research communications* **329**, 25-31.
- Kincade, P.W., G. Lee, C. E. Pietrangeli, S. Hayashi and J. M. Gimble. 1988. Cells and molecules that regulate B lymphopoiesis in bone marrow. *Annual review of immunology* **7**, 111-143.
- Kuznetsov, S. A., M. H. Mankani and P. G. Robey. 2000.

- Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. *Transplantation* **70**, 1780-1787.
13. Lichtman, M. A. 1981. The ultrastructure of the hemopoietic environment of the marrow: a review. *Experimental hematology* **9**, 391-410.
 14. MacDermott, R. P. and M. J. Bragdon. 1983. Fetal calf serum augmentation during cell separation procedures accounts for the majority of human autologous mixed leukocyte reactivity. *Behring Institute Mitteilungen* **72**, 122-128.
 15. Mackensen, A., R. Drager, M. Schlesier, R. Mertelsmann and A. Lindemann. 2000. Presence of IgE antibodies to bovine serum albumin in a patient developing anaphylaxis after vaccination with human peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer immunology, immunotherapy* **49**, 152-156.
 16. Maitra, B., E. Szekely, K. Gjini, M. J. Laughlin, J. Dennis, S. E. Haynesworth and O. N. Koc. 2004. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone marrow transplantation* **33**, 597-604.
 17. Mezey, E., K. J. Chandross, G. Harta, R. A. Maki and S. R. McKercher. 2000. Turning blood into brain: Cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* **290**, 1779-1782.
 18. Moon, M. H., S. Y. Kim, Y. J. Kim, S. J. Kim, J. B. Lee, Y. C. Bae, S. M. Sung and J. S. Jung. 2006. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. *Cellular physiology and biochemistry* **17**, 279-290.
 19. Park, E. K., S. Y. Lee, T. H. Kim, P. H. Choung, G. Khang, Y. S. Son, S. K. Kim and S. Y. Kim. 2005. Effect of Heat Inactivated Autologous Serum on Proliferation and Osteoblastic Differentiation of Human Bone Marrow Stem Cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **2**, 55-61.
 20. Patricia, A. Z., Z. Min, M. Hiroshi, H. Jerry, F. J. William, J. K. Adam, B. Prosper, L. H. Peter and M. H. Hedrick. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue engineering* **7**, 211-227.
 21. Pittenger, M.F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig and D. R. Marshak. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147.
 22. Selvaggi, T. A., R. E. Walker and T. A. Fleisher. 1998. Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood* **89**, 776-779.
 23. Spees, J. L., C. A. Gregory, H. Singh, H. A. Tucker, A. Peister, P. J. Lynch, S. C. Hsu, J. Smith and D. J. Prockop. 2004. Internalized antigens must be removed to prepare hypoinmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Molecular therapy* **9**, 747-756.
 24. Stute, N., K. Holtz, M. Bubenheim, C. Lange, F. Blake and A. R. Zander. 2004. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Experimental hematology* **32**, 1212-1225.
 25. Tuschong, L., S. L. Soenen, R. M. Blaese, F. Candotti and L. M. Muul. 2002. Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. *Human gene therapy* **1**, 1605-1610.
 26. Van Damme, A., T. Vanden Driessche, D. Collen and M. K. Chuah. 2002. Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy. *Current gene therapy* **2**, 195-209.
 27. Van, R. L., C. E. Bayliss and D. A. Roncari. 1976. Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture. *The Journal of clinical investigation* **58**, 699-704.
 28. Will, R. G., J. W. Ironside, M. Zeidler, S. N. Cousens, K. Estibeiro, A. Alperovitch, S. Poser, M. Pocchiari, A. Hofman and P. G. Smith. 1996. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet* **347**, 921-925.
 29. Yamamoto, N., M. Isobe, A. Negishi, H. Yoshimasu, H. Shimokawa, K. Ohya, T. Amagasa and S. Kasugai. 2003. Effects of autologous serum on osteoblastic differentiation in human bone marrow cells. *Journal of medical and dental Sciences* **50**, 63-69.
 30. Zuk, A. J., M. Zhu, P. Ashjian, D. A. Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim and M. H. Hedrick. 2002. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cell. *Molecular biology cell* **13**, 4279-4295.