

신생 생쥐 고환에서 기인한 다분화능 생식줄기세포주의 확립 및 특성 분석

관동대학교 의과대학 제일병원 생식생물학 및 불임연구실¹, 의학과²

한상철¹ · 송행석^{1,2} · 전진현^{1,2*}

Establishment and Characterization of Multipotent Germ Line Stem Cells (MGSCs) from Neonatal Mouse Testis

Sang Chul Han¹, Haengseok Song^{1,2}, Jin Hyun Jun^{1,2*}

¹Laboratory of Reproductive Biology and Infertility and ²Department of Medicine, Cheil General Hospital & Women's Healthcare Center, Kwandong University College of Medicine, Seoul, Korea

Objective: The aim of this study was to investigate whether multipotent germline stem cells (MGSCs) can be established from neonatal mouse testis.

Methods: Various cells containing MGSCs were collected from neonatal testis of ICR mice and allocated to plates for in vitro culture. After 7 days in culture, the cells were passed to a fresh culture plate and continuously cultured. From the third or fourth passage, the presumed MGSCs were cultured and maintained on mitomycin C-inactivated STO feeder cells. The MGSCs were cultured in a condition where mouse embryonic stem cells (ESCs) are cultured. Characteristics of the MGSCs were evaluated by RT-PCR, immunocytochemistry, alkaline phosphatase activity, karyotyping, and transmission electron microscopy.

Results: Two MGSCs lines were established from 9 pooled sets of neonatal testicular cells. MGSCs colonies were morphologically undistinguishable from ESCs colonies and both MGSC lines as well as ESCs expressed undifferentiated stem cell markers, such as Thy-1, Oct-4, Nanog, Sox2 and alkaline phosphatase. Fine structure of undifferentiated MGSCs were similar to those of ESCs and 60% of MGSCs (12/20) had normal karyotype at passage 10. They were able to form embryoid bodies (EBs) and MGSC-derived EBs expressed marker genes of three germ layers.

Conclusion: We could establish the MGSCs from neonatal mouse testis and they were differentiated to multipotent lineages of three germ layers. Molecular characteristics of MGSCs were similar to those of ESCs. Our results suggest a possibility that multipotent stem cells derived from testis, the MGSCs, could replace the ESCs in biotechnology and regenerative medicine.

[Korean. J. Reprod. Med. 2008; 35(1): 39-48.]

Key Words: Multipotent germ line stem cells (MGSCs), Neonatal mouse testis, Embryonic stem cells (ESCs), Differentiation, Regenerative medicine

줄기세포 (stem cells)는 미분화 상태로 오랜 기간 동안 자가분열을 통하여 증식이 가능하며, 적절한 조건하에서 특수한 기능을 수행하는 세포로 분화

될 수 있는 능력을 가지고 있다. 이러한 줄기세포는 분리 시기에 따라 배아줄기세포 (embryonic stem cells)와 성체줄기세포 (adult stem cells)로 구분된다. 배아줄기세포는 포배기 시기의 내세포괴 (inner cell mass)로부터 유래하며 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있는 전분화능 (pluripotency)을 지니고 있다.

주관책임자: 전진현, 우) 100-380 서울특별시 중구 목정동 1-19, 관동대학교 의과대학 제일병원 생식생물학 및 불임연구실
Tel: (02) 2000-7668, Fax: (02) 2265-5621
e-mail: junjh55@hanmail.net

1981년 Evans와 Kaufman에 의하여 생쥐의 배아줄기세포주가 확립된 이후,¹ 햄스터, 양, 돼지, zebra-fish, 토끼, 원숭이, 흰쥐 등에서도 배아줄기세포의 분리가 성공적으로 이루어 졌다.^{2~8} 그리고 Thomson 등이 인간 배아줄기세포의 확립을 보고한 이후,¹⁰ 인간 배아줄기세포는 발생 및 분화에 관련된 기초 연구, 재생의학, 약물검색, 세포치료제 개발 등에 널리 이용되고 있다.^{11~14} 그러나 인간 배아줄기세포를 확립하는 과정 중에 많은 수의 배아가 파괴되는 심각한 윤리적 문제를 안고 있으며, 또한 배아줄기세포를 재생의학에 사용하기 위해서는 면역거부반응을 극복해야 하는 문제점들을 해결해야 한다.^{15,16}

성체줄기세포 (adult stem cell)는 조직 및 기관에 존재하는 자가분열이 가능한 미분화 세포로서, 손상된 조직 및 기관에 적절한 세포를 공급하여 기능적으로 항상성을 유지할 수 있게 한다. 즉, 특정 조직이 손상을 입게 되면 관련 성체줄기세포의 증식 및 손상 받은 특정 세포로의 분화를 통하여 조직의 기능을 회복하게 된다. 최근, 각 조직의 성체줄기세포가 해당 조직의 특정 세포로 분화될 뿐만 아니라 다양한 종류의 조직 혹은 기관의 세포로도 분화가 가능하다는 보고들이 발표되고 있다.^{17~21} Kim 등이 제대혈에서 분리한 중배엽성 줄기세포 (mesenchymal stem cells)와 Pittenger 등이 골수에서 분리한 중배엽성 줄기세포가 지방세포, 골세포, 연골세포 등으로 분화될 수 있다고 보고한 바 있으며,^{17,18} 이는 중배엽성 줄기세포가 다분화능 (multipotency)을 지니고 있다는 것을 의미하는 것이다.

최근에 몇몇의 연구자들에 의해 생쥐의 고환에서 분리한 줄기세포도 다분화능 특성을 나타내고 있음이 보고되고 있다.^{19~22} Shinohara 등은 신생 생쥐로부터 다분화능을 지니고 있는 줄기세포를 분리하였으며,^{19~21} Guan 등은 성체의 고환으로부터 획득한 다분화능을 지니고 있는 줄기세포가 기형종 (teratoma) 형성 과정에서 심근세포, 근세포, 신경세포, 간세포, 혈관세포, 장상피세포 등으로 분화됨을 보고하였다.²² 이와 같이 고환에서 유래한 성

체줄기세포가 다양한 세포로 분화가 가능하다는 점은 재생의학 및 다양한 기초의학 연구에서 이들이 배아줄기세포를 대체할 수 있는 가능성을 시사한다. 현재까지 배아줄기세포의 미분화 상태 유지와 분화 과정을 유도하는데 관여하는 유전자들의 발현 양상에 대한 연구는 많이 진행되었지만, 최근 보고된 고환 유래 다분화능 생식줄기세포들 (multipotent germline stem cells, MGSCs)에 대한 전반적인 연구는 미진한 상태이다.

따라서 본 연구에서는 생후 2~3일된 생쥐 고환으로부터 배아줄기세포와 유사한 특성을 보이는 다분화능 생식줄기세포 (MGSCs)를 배양하고, 확립된 MGSCs 세포주의 특성을 생쥐 배아줄기세포와 비교, 분석하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 고환에서 유래한 다분화능 생식줄기세포주의 확립

생후 2~3일된 생쥐 고환 조직을 해부기를 이용하여 조각낸 후 collagenase (1 mg/mL)와 trypsin-EDTA (0.25%/0.02%)로 처리하여 세포들을 분리하였다. 분리된 고환세포들을 조직 배양접시에서 하루 동안 배양하였고, 다음날 부유배양된 세포들만을 모아 새로운 배양접시로 옮겨 배양하였다. 이들을 7일 주기로 세 번의 계대배양을 시행한 후, mitomycin C로 비활성화된 STO 지지세포층 위에서 배양하였다. 이후 MGSCs로 생각되는 세포들을 1% FBS (Hyclone, Utah, USA)를 첨가한 생쥐 배아줄기세포주 배양조건에서 배양하였다. 기본 배양액은 DMEM에 10 ng/mL GDNF (R&D Systems, Minneapolis, USA), 10³ U/mL LIF (ESGRO, Chemicon, USA), 5 ng/mL bFGF (Invitrogen, Carlsbad, USA), 5 ng/mL EGF (Boehringer Mannheim, Germany)를 첨가하였다. 배양 과정에서 MGSCs 콜로니가 형성된 후에는 배양액의 FBS 농도를 15%로 높였다.

2. 배아체의 형성과 분화

MGSCs와 생쥐 배아줄기세포 (D3 mouse ESC, ATCC, Manassas, USA)의 배아체 (embryoid body) 형성을 위해 15% FBS를 첨가한 생쥐 배아줄기세포주 배양조건에서 4~5일 간격으로 2회에 걸쳐 지지세포 없이 계대배양하여 지지세포를 제거하였다. 배아체 형성은 지지세포 제거 후 단독배양된 MGSCs와 생쥐 배아줄기세포에 trypsin-EDTA (0.25%/0.02%)를 각각 처리하여 수확한 후, 박테리아 배양 접시에서 1.2×10^5 cells/mL의 세포를 접종한 후 5일 동안 부유배양하면서 DMEM 배양액에 15% FBS를 첨가한 배아체 배양액을 2일 간격으로 교체하였다.

3. Alkaline phosphatase (ALP) 활성의 조직화학적 관찰

계대배양 중인 MGSCs와 생쥐 배아줄기세포에서 배양액을 제거하고 PBS buffer (pH 7.4)로 수세한 후, 10% formalin으로 30초간 고정하였다. 고정액을 제거하고 PBS로 수세한 후, 200 mM Tris-HCL과 1 mM MgCl₂의 농도에 pH 9.5로 조정된 ALP buffer를 사용하여 30초간 수세하였다. Naphthol (0.2 mg)/Fast Red Violet (2 mg)을 ALP buffer에 녹인 반응 시약에 30분 동안 처리하였다. ALP buffer로 수세한 후 PBS로 채워주고 발색 반응 결과를 현미경을 이용하여 관찰하였다.

4. RNA 추출 및 RT-PCR

MGSCs와 생쥐 배아줄기세포 그리고 그로부터 형성된 배아체로부터 RNA를 추출하기 위하여 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA)를 사용하였다. 각각의 시료는 1 mL의 Trizol reagent를 넣어 분쇄한 후 200 μ L의 chloroform을 넣고 섞었다. 원심분리기를 사용하여 4°C, 12000 g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 수거하고 동량의 isopropanol을 넣어 RNA를 침전시켰다. Total RNA를 적당량의 3차 증류수에 용해시켰다. 추출한 total RNA를 MMLV, 5 \times MMLV RT buffer, RNasin, 10 mM dNTP,

10 pM oligo-dT, 3차 증류수를 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 역전사 (reverse transcription) 반응을 시켰다. 역전사 반응 후 cDNA, 10 \times PCR buffer, 5 U/ μ L Taq polymerase (Boehringer Mannheim, Germany), 2 mM dNTP (Boehringer Mannheim, Germany), 그리고 증류수에 미분화 표지인자인 Oct-4, Nanog, Sox2, Thy-1을 그리고 외배엽성 표지유전자인 FGF-5, nestin, 중배엽성 표지인자인 enolase, α -globin, 내배엽 표지유전자인 α -fetoprotein, Gata-4의 primers를 사용하여 줄기세포의 미분화 및 분화 상태에서의 유전자 발현 정도를 RT-PCR을 통하여 확인하였다. 이들 primers에 대한 정보는 Table 1에 나타내었다.

5. MGSCs의 염색체 분석

MGSCs의 염색체 분석을 실시하기 위해 15% FBS를 첨가한 생쥐 배아줄기세포주 배양조건에서 4~5일 간격으로 3회에 걸쳐 지지세포 없이 계대배양하여 지지세포를 제거하였다. MGSCs에 0.1 μ g/ μ L의 colcemid (Gibco BRL, USA)를 37°C에서 4시간, 그리고 0.075 M KCl 용액을 37°C에서 30분 동안 처리하였다. 그리고 Carnoy solution (methanol : acetic acid = 3:1)을 이용하여 20°C에서 30분간 고정하였다. 동일한 용액으로 2회 수세한 후 slide glass에 metaphase spread를 준비하여 상온에서 24시간 건조시켰다. 건조 후 125 ng/mL DAPI 용액으로 염색하여 중기 염색체 상이 명확히 관찰되는 20개의 세포에서 염색체의 수를 확인하였다.

6. 전자현미경 표본 제작

MGSCs와 생쥐 배아줄기세포의 미세구조적 형태를 관찰하기 위해 투과전자현미경 표본을 제작하였다. 지지세포를 제거한 후, 배양된 MGSCs와 생쥐 배아줄기세포의 콜로니들을 사용하였다. 전고정을 위해 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)로 보정된 4% glutaraldehyde 용액 1 mL에 10분간 처리하였으며, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)로 보정된 1% OsO₄에서 90분간 후고정 하였다. 탈수 과정은 50% 알코올에서 무수알코올 농도 순으로 실시하였으

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers and PCR conditions

Genes	Forward primer Reverse primer	Annealing Tm (°C)	Product Size (bp)
Thy-1	5'-AAGGCCTCTGCCTGTAGTGA-3'	58°C	218
	5'-GAAGAGGCAGGTTGCAAGAC-3'		
Oct-4	5'-TTGGGCTAGAGAAGGATGTG-3'	58°C	221
	5'-CCTCAGCAAAGGGACTGAG-3'		
Sox2	5'-CACAACCTCGGAGATCAGCAA-3'	62°C	190
	5'-CTCCGGAAGCGTGTACTTA-3'		
Nanog	5'-AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG-3'	58°C	341
	5'-CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG-3'		
α-Fetoprotein	5'-CGAAACCTCCAGGCAACAAC-3'	58°C	160
	5'-TCATGACTTTTTCCCATCC-3'		
Gata-4	5'-CGCCGCCTGTCCGCTTCC-3'	65°C	193
	5'-TTGGGCTTCCGTTTTCTGGTTTGA-3'		
α-Globin	5'-GCTGAAGCCCTGGAAAGGAT-3'	58°C	232
	5'-GGCTCAGGAGCTTGAAGTTG-3'		
Enolase	5'-CAGGCCTGTAACTTGCACA-3'	58°C	190
	5'-CAAGAGCCTCCTCAATCCTC-3'		
FGF-5	5'-TGTAAGCAGAGTGGGCATC-3'	58°C	205
	5'-TCATCCGTAATTTGGCACT-3'		
Nestin	5'-CCAAAGAGGTGTCCGATCAT-3'	58°C	213
	5'-TGACATCCTGGACCTTGACA-3'		
rPL7	5'-TCAATGGAGTAAGCCCAAAG-3'	60°C	246
	5'-CAAGAGACCGAGCAATCAAG-3'		

며, 치환 및 포매는 100% propylene을 두 번 처리한 후 propylene : Epon (1:1)에 12시간 동안 치환하고, Epon 812에 포매하였다. 준비된 시료를 박편절단기를 이용하여 60 nm의 두께로 절편하고, lead citrate와 uranyl acetate로 이중염색한 후 Hitachi H-7600 (Hitachi, Japan) 투과전자현미경을 사용하여 관찰하였다.

결 과

1. MGSCs의 분리와 배양

생후 2~3일된 생쥐 고환 조직에서 수획한 세포들로 실시한 9번의 배양실험에서 2개의 MGSCs 세포주를 확립하였다. 고환 유래 MGSCs 콜로니 형성은 배양 시작 후 3~4주째에 관찰할 수 있었다. 계대배양 과정에서 나타난 MGSCs 콜로니를 단일

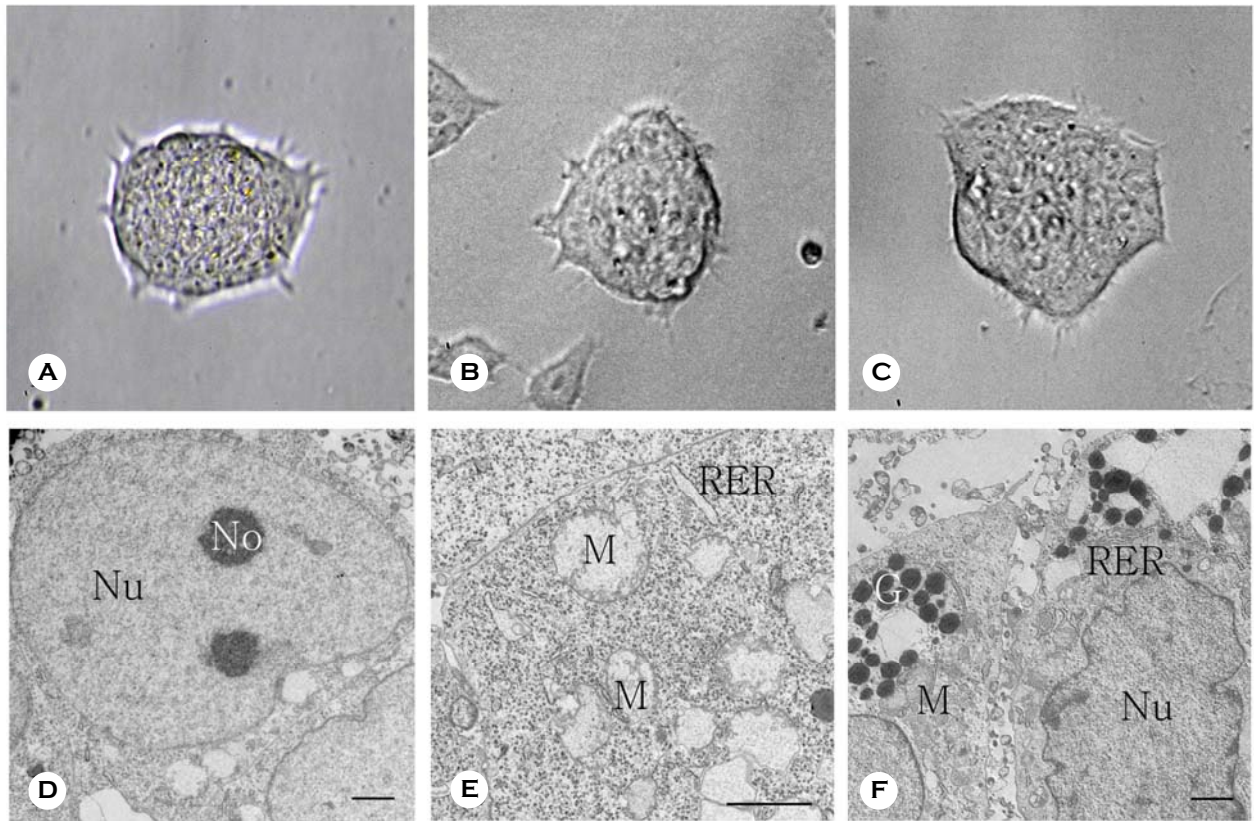


Figure 1. Morphological characteristics of multipotent germ line stem cells (MGSCs) derived from neonatal testis. Representative microphotographs of mouse embryonic stem cells (A) and MGSCs (B and C). Original magnification of A, B and C was $\times 200$. Transmission electron microscopic images of cells of inner region (D and E) and outer region in a MGSCs colony (F). Nu: Nucleus, No: Nucleolus, M: Mitochondria, RER: Rough endoplasmic reticulum, G: granules. Scale bar is $2 \mu\text{m}$ in D, E and F.

세포로 분리하여 배양하면 3~4일 후에 새로운 콜로니가 형성되고 5일이 경과되면 일부 세포들이 분화되기 시작하는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 MGSCs의 계대배양을 3~4일을 주기로 실시하였으며, 6개월 이상의 계대배양 동안 특별한 콜로니 모양의 변화가 관찰되지 않았다.

2. MGSCs의 형태학적 특징 관찰

확립한 MGSCs의 형태를 생쥐 배아줄기세포와 비교한 결과, 두 군 모두에서 성장 및 증식 형태가 단일세포에서 세포와 세포 사이가 밀착된 다층의 콜로니 형태로 증식하며, 배양 4~5일이 경과하면 콜로니 상층부에 구형의 세포와 일부 어두운 색의 세포가 표층 부위에서 관찰되었다 (Figure 1A-C).

투과전자현미경을 이용하여 MGSCs의 미세구조를 관찰한 결과, MGSCs 콜로니의 내부와 외층에 존재하는 세포들 간에 형태적 차이점을 볼 수 있었다. 콜로니 내부에 존재하는 세포들의 핵은 주로 진정염색질 (euchromatin)로 구성되어 있었으며 인이 매우 활성화되어 있음을 관찰하였다 (Figure 1D). 리보솜은 세포질 전체에 산재해 있었고, 소포체는 매우 낮은 빈도로 관찰되었다. 미토콘드리아의 cristae는 발달이 거의 진행되지 않은 미분화 상태로 관찰되었고, 핵에 비하여 세포질의 양이 매우 적은 특징을 보여주었다 (Figure 1E). 한편, 콜로니 외층에 존재하는 세포들의 핵은 이질염색질 (heterochromatin)이 많이 분포하고 있었으며, 발달한 인을 보유하고 있었다. 또한, 이들 외층에 존재하는 세포

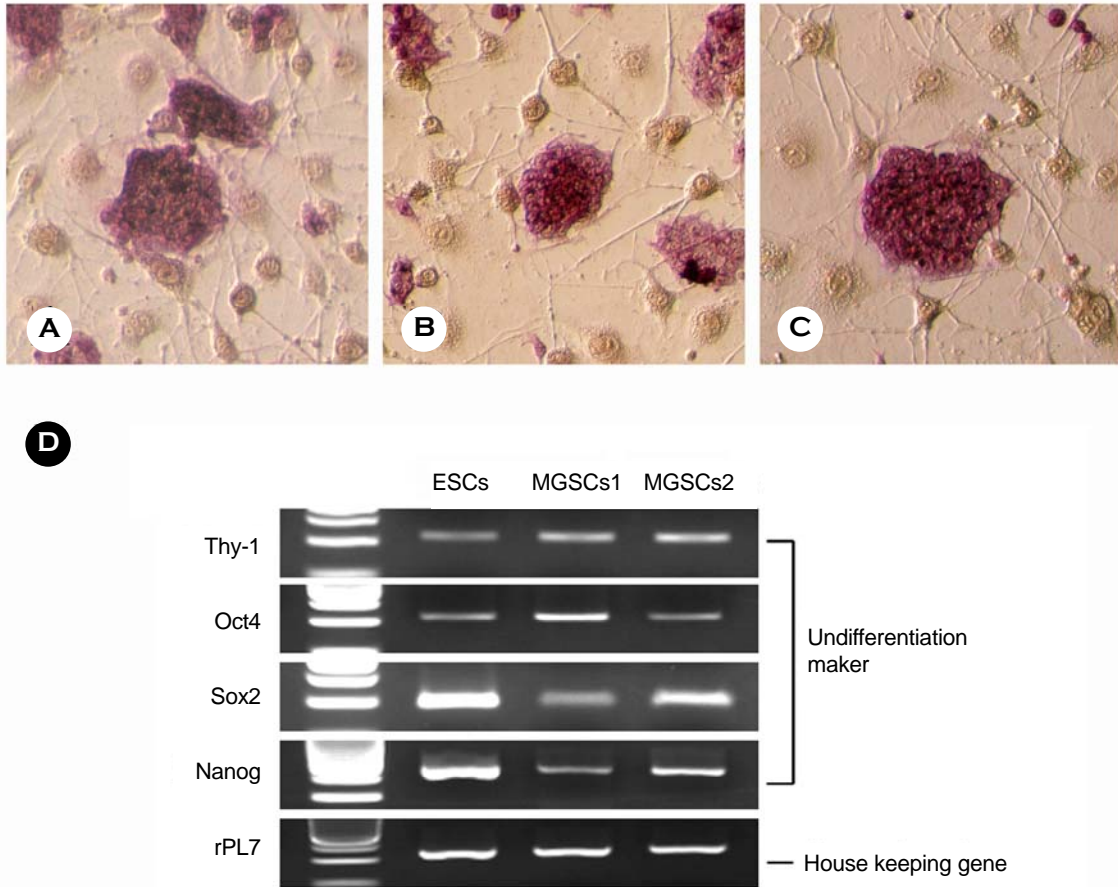


Figure 2. Activity of alkaline phosphatase in mouse embryonic stem cells (A) and multipotent germ line stem cells (B and C). Original magnification of A, B and C was $\times 200$. RT-PCR analysis for the expression of undifferentiation marker genes (D).

들은 발달한 조면소포체와 골지체를 가지고 있었으며, 미토콘드리아의 cristae도 분지를 형성하여 분화되어 있는 것을 관찰할 수 있었다 (Figure 1F).

3. MGSCs의 줄기세포 특성 확인

줄기세포에서 미분화 표지인자로 사용되는 ALP의 활성도를 확인하기 위하여 MGSCs와 생쥐 배아 줄기세포를 대상으로 Naphthol/Fast Red Violet solution을 처리하여 발색 결과를 관찰하였다. MGSCs와 생쥐 배아줄기세포 모두에서 강한 ALP 활성 반응을 관찰할 수 있었다. 그러나 지지세포에서는 ALP의 활성에 따른 발색 반응을 관찰할 수 없었다 (Figure 2A-C). 계대배양 중인 MGSCs와 생쥐 배아 줄기세포에서 모두 미분화 표지인자인 Oct-4, Sox2,

Nanog, Thy-1 유전자들 모두가 발현되는 것을 RT-PCR 방법으로 확인할 수 있었다 (Figure 2D).

계대배양 중인 MGSCs에서 염색체 분석 방법으로 20개의 중기 염색체를 관찰한 결과, 정상적인 염색체 수를 갖고 있는 세포는 12개 (60%)였다. 그 외에 중기 염색체 상에서 각각 39개 (n=1)와 41개 (n=1)의 염색체를 갖는 세포와 80개 이상의 염색체 수 (n=6)를 나타내는 세포들을 관찰할 수 있었다.

4. MGSCs의 배아체 형성과 삼배염성 표지유전자의 발현

MGSCs와 생쥐 배아줄기세포의 배아체를 형성하기 위하여 강제부유법을 사용하였으며, 형성된 배아체에서 삼배염성 표지인자의 발현 양상을 확인

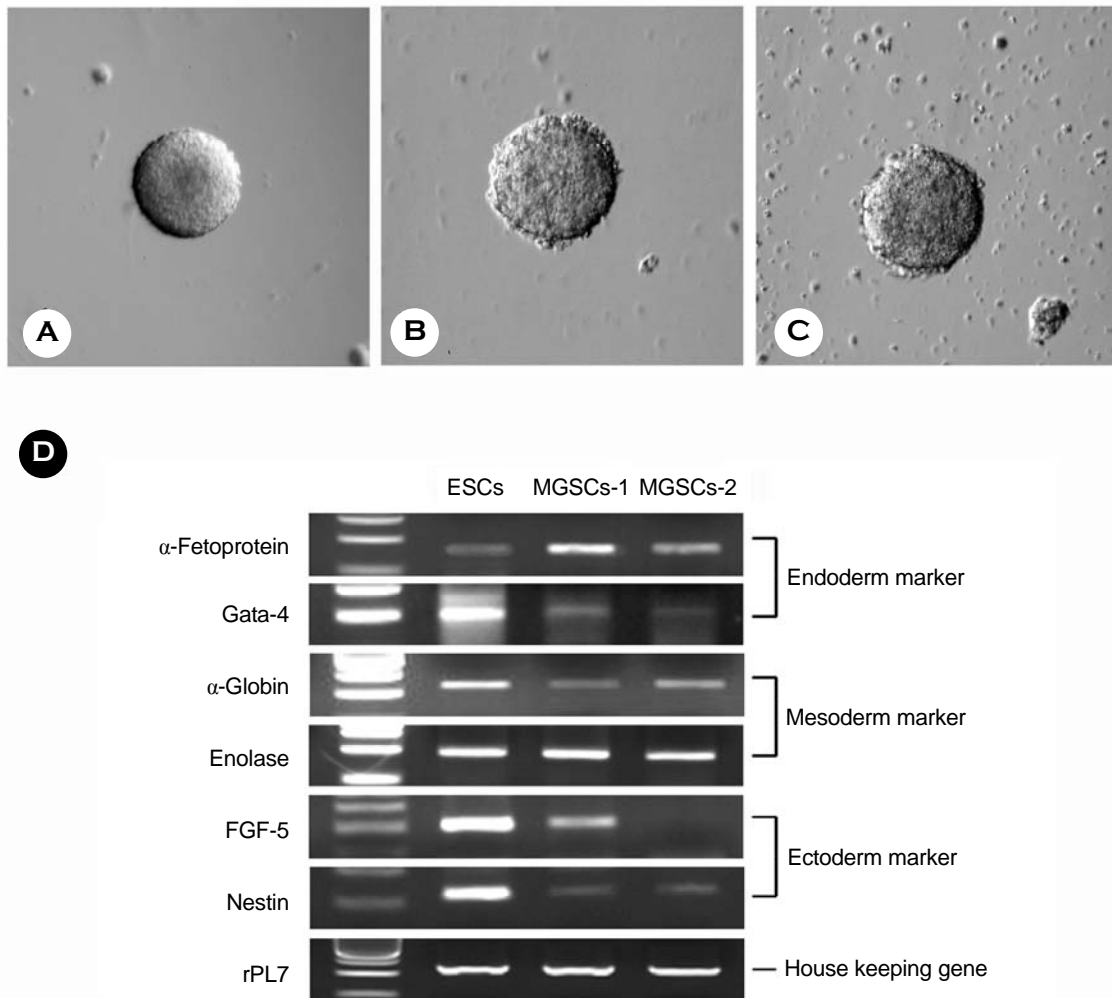


Figure 3. Microphotographs of embryoid bodies derived from mouse embryonic stem cells (ESCs, **A**) and multipotent germ line stem cells (MGSCs, **B** and **C**). Original magnification of **A**, **B** and **C** was $\times 200$. RT-PCR analysis for the expression of three germ layer marker genes in ESCs and MGSCs (**D**).

하였다. 배양 2~3일째부터 배아체가 형성되는 것을 두 가지 줄기세포에서 모두 관찰할 수 있었고 (Figure 3A-C), 배양 5일째 삼배엽성 표지인자의 발현 양상을 확인하기 위하여, 형성된 배아체에서 RT-PCR을 수행하였다. MGSCs와 생쥐 배아줄기세포의 삼배엽성 표지인자의 발현을 관찰한 결과, 두 가지 줄기세포에서 다소 상이한 발현 양상을 관찰할 수 있었지만, 외배엽성 표지유전자인 FGF-5, nestin, 중배엽성 표지인자인 enolase, α-globin, 내배엽 표지유전자인 α-fetoprotein, Gata-4 등이 모두 발현됨을 관찰할 수 있었다 (Figure 3D).

고 찰

인간과 설치류 등을 포함한 포유동물들은 평생 동안 고환에서 정자를 생성할 수 있는데 이는 고환 조직 내에 항상성을 유지할 수 있는 줄기세포가 존재하기 때문으로 생각된다. 고환 내에 존재하는 줄기세포로는 spermatogonial stem cells (SSCs), Leydig stem cells (LSCs), 그리고 MGSCs 등이 알려져 있다.^{19~26} SSCs는 자가분열 후 일부는 줄기세포의 특성을 지닌 채로 존재하고, 일부는 정자형성 과정 (spermatogenesis)을 통해 일생 동안 지속적인

로 정자를 형성하게 된다.²³⁻²⁵ LSCs는 고환 내에 Leydig 세포들의 수와 기능을 유지하는 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있다.²⁶ SSCs와 LSCs는 최종적으로 분화되는 세포가 정해져 있는 단분화성 줄기세포로 알려져 있다. 그러나, 근래에 고환 내에 배아줄기세포와 유사한 다분화능 줄기세포인 MGSCs의 분리 및 배양에 성공하였으며, 이들에 대한 연구들에서 고환 유래의 성체줄기세포를 이용한 세포치료가 가능하고 더 나아가 배아줄기세포를 효과적으로 대체할 수 있음을 보고하고 있다.¹⁹⁻²²

Oct4, Sox2, Nanog는 줄기세포의 미분화 상태를 증명하는 표지인자로 널리 사용되고 있으며, 배아 줄기세포의 미분화 상태와 전분화능을 유지하는데 중요한 전사인자로서 기능을 수행한다.^{27,28} 본 연구에서 생쥐 배아줄기세포와 동일하게 MGSCs에서 줄기세포 미분화 표지인자들인 Oct4, Sox2, Nanog가 발견되는 것을 확인하여, 이들이 생쥐 배아줄기세포와 유사한 미분화 상태를 유지하면서 전분화능을 보유하고 있을 가능성을 시사한다. 그러나 최근에 Seandel 등은 생쥐 배아줄기세포와 MGSCs 간에 미분화 표지인자의 발현 양상에 대한 연구에서, Oct4는 두 줄기세포간에 발현량의 차이가 없지만, Sox2와 Nanog는 생쥐 배아줄기세포에 비해 MGSCs에서 발현량이 적다고 보고하였다.²⁹ 이러한 결과는 생쥐 배아줄기세포와 MGSCs 간에 미분화 표지인자의 발현 양상을 포함해 근본적으로 서로 다른 특성을 지니고 있을 가능성을 제시하고 있다. 향후 이에 대한 심화 연구를 통해서 MGSCs의 특성을 보다 명확하게 확인해야 될 것으로 생각한다.

본 연구에서는 MGSCs와 생쥐 배아줄기세포를 박테리아 배양접시에서 강제 부유시켜 배아체를 형성시켰다. 이러한 배아체 형성 과정에서 부착한 상태로 성장하는 배아체의 빈도가 생쥐 배아줄기세포 유래 배아체에 비해 MGSCs 유래 배아체에서 다소 높게 관찰되었다 (data not shown). 즉, 동일한 조건하에서 분화를 유도하였지만, 실질적인 배아체 형성 결과에서 차이가 있었으며, 이에 따라 삼배엽

표지인자의 발현에서도 다소 차이가 발생할 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 두 줄기세포의 배아체를 1~2주 정도 자연분화 실험을 실시한 결과, 두 세포군 모두에서 박동하는 심근세포를 관찰할 수 있었으나, 그 빈도는 MGSCs에서 높게 관찰되었다 (data not shown). 이는 MGSCs가 정자를 형성하는 생식세포가 아닌 고환 조직 내의 중배엽성 세포에서 유래하여, 중배엽성 세포로의 분화가 우성적으로 나타날 수도 있음을 시사하고 있다.

결론적으로 본 연구에서는 국내 최초로 생쥐 고환에서 다분화능을 나타내는 MGSCs를 분리, 배양하는데 성공하였으며, 배아체 형성을 통한 분화실험에서 이들이 삼배엽성 세포들로의 분화가 진행됨을 확인하였다. 이는 MGSCs가 배아줄기세포를 확립하는 과정에서 발생하는 윤리적 문제와 면역 거부반응을 극복할 수 있는 좋은 대안이 될 수 있는 가능성을 높여준 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Evans MJ, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotent stem cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-6.
2. Doetschman TC, Williams P, Maeda N. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev Biol* 1988; 127: 224-7.
3. Notarianni E, Galli C, Laurie S, Moor RM, Evans MJ. Derivation of pluripotent, embryonic stem cell lines from the pig and sheep. *J Reprod Fertil Suppl* 1991; 43: 255-60.
4. Wheeler MB. Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6: 563-8.
5. Sun L, Bradford CS, Ghosh G, Collodi P, Bames DW. ES-like cell cultures derived from early zebrafish embryos. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1995; 4: 193-9.
6. Schoonjans L, Albricht GM, Li JL, Collen D, Moreadith RW. Pluripotent rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overt coat color chimeras following injection into blastocysts. *Mol Reprod Dev* 1996; 46: 439-43.
7. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Hearn JP. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod* 1996; 55: 254-9.

8. Vassilieva S, Guan K, Pich U, Wobus AM. Establishment of SSEA-1 and OCT-4-expressing rat embryonic stem like cell lines and effects of cytokines of the IL-6 family on clonal growth. *EXP Cell Res* 2000; 258: 361-73.
9. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
10. Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, Mckay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 675-9.
11. Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 2000; 28: 31-40.
12. Nakayama H, Lee J, Chiu L. Vascular endothelial growth factor synergistically enhances bone morphogenetic protein-4-dependent lymphohematopoietic cell generation from embryonic stem cells in vitro. *Blood* 2000; 95: 2275-83.
13. Hirashima M, Kataoka H, Nishikawa S, Matsuyoshi N, Nishikawa S. Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an in vitro model vasculogenesis. *Blood* 1999; 93: 1253-63.
14. Yamane T, Hayashi H, Mizoguchi M, Yamazaki H, Kunisada T. Derivation of melanocytes from embryonic stem cells in culture. *Dev Dyn* 1999; 216: 460-9.
15. Filip S, Mokry J, English D, Vojacek J. Stem cell plasticity and issues of stem cell therapy. *Folia Biologica* 2005; 51: 180-7.
16. Henningson CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 11: 745-53.
17. Kim JW, Kim SY, Park SY, Kim YM, Kim JM, Lee MH, et al. Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. *Ann Hematol* 2004; 83: 733-8.
18. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Doublas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-7.
19. Shinohara MK, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 2004; 119: 1001-12.
20. Shinohara MT, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Bio Rep* 2003; 69: 612-6.
21. Shinohara T, Orwig K, Avarbock M, Brinster R. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. *Proc Natl Acad Sci* 2000; 97: 8346-51.
22. Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, et al. Pluripotent of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 2006; 440: 1199-203.
23. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Culture condition and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Rep* 2004; 71: 722-31.
24. Nagano M, Avarbock MR, Leonida EB, Brinster CJ, Brinster RL. Culture of mouse spermatogonial stem cells. *Tissue and cells* 1998; 30: 389-97.
25. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 47: 16489-94.
26. Ge RS, Dong Q, Sottas CM, Chen H, Zirkin BR, Hardy MP. Gene expression in rat Leydig cells during development from the progenitor to adult stage: A cluster analysis. *Biol Reprod* 2005; 72: 1405-15.
27. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 2005; 122: 947-56.
28. Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 2006; 38: 431-40.
29. Seandel M, James D, Shmelkov SV, Falcatori I, Kim JY, Chavala S, et al. Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR1251 germline progenitors. *Nature* 2007; 449: 346-51.

= 국문초록 =

목적: 본 연구에서는 신생 생쥐 고환으로부터 다분화능 생식줄기세포주 (MGSCs)를 확립하고, 배아체 형성을 통한 삼배엽성 세포로의 분화 가능성을 확인하고자 하였다.

연구방법: 고환에서 유래한 MGSCs를 확립하기 위하여 생후 2~3일된 생쥐 고환 조직으로부터 세포들을 분리하여 1% FBS를 첨가한 생쥐 배아줄기세포주 배양조건에서 배양하였다. MGSCs 콜로니가 형성된 후에는 배양액의 FBS의 농도를 15%로 높였다. 이러한 과정으로 확립된 MGSCs의 미분화 및 분화 특성을 배아줄기세포주와 비교, 분석하였다.

결과: 신생 생쥐 고환 조직에서 수확한 세포들로 실시한 9번의 배양실험에서 2개의 MGSCs 세포주를 확립하였다. MGSCs 세포주와 생쥐 배아줄기세포 모두에서 미분화 표지인자인 Thy-1, Oct-4, Nanog, Sox2의 발현과 alkaline phosphatase 활성을 관찰할 수 있었으며, MGSCs의 미세구조 또한 생쥐 배아줄기세포와 유사하였다. MGSCs에서 형성된 배아체에서 삼배엽성 표지유전자의 발현을 확인하였다.

결론: 본 연구의 결과는 배아줄기세포의 윤리적인 문제점을 극복할 수 있는 고환 유래의 다분화능 MGSCs가 생물공학과 재생의학에서 효율적으로 이용될 수 있는 가능성을 보여준 것으로 생각된다.

중심단어: 다분화능 생식줄기세포, 신생 생쥐 고환, 배아줄기세포, 분화, 재생의학
