

Activin-A 처리에 의해 분화 촉진된 인간 배아 줄기세포 유래 내배엽성 세포의 효과적인 정제

김문규^{1,*} · 문성환^{2,*} · 박순정¹ · 이경일² · 신정민² · 장재우¹ · 정형민^{1,2,†}

¹차의과학대학 의생명과학대학원 줄기세포 연구실, ²차바이오펜디오스텍

Effective Isolation of Endodermal Lineage Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells Post Activin-A Treatment

Mun-Kyu Kim^{1,*}, Sung-Hwan Moon^{2,*}, Soon-Jung Park¹, Kyung-Il Lee², Jeong-Min Shin²,
Jae-Woo Jang¹ and Hyung-Min Chung^{1,2,†}

¹Graduate School of Life Science, CHA Stem Cell Institute, CHA University, College of Medicine, Seoul 135-907, Korea

²CHA Biotech & Diotech Co., Ltd., Seoul 135-907, Korea

ABSTRACT

Embryoid bodies (EBs) generated from human embryonic stem cells (hESCs) include spontaneously induced endodermal lineage cells (ELCs). Activin-A plays important roles in the endoderm differentiation of hESCs. Despite studies on the generation of ELCs from hESCs with treatment of Activin-A, it was unclear for localization and pattern of ELCs by Activin-A during differentiation of hESCs. Accordingly in this study, we knew that Activin-A increased the cystic EBs formation, including the highly enriched AFP (endoderm lineage specific marker)-expressing cells in the surface of cystic EBs. To induce the EBs formation from undifferentiated hESCs, cells were transferred onto petri-dish and cultured in suspension condition without bFGF removed hESC media (EB media) for 3 days. Next to investigate the effect of Activin-A, EBs were subsequently cultured in EB media supplement with 100 ng/ml Activin-A for 3 days. After 5~7 days of Activin-A treatment, cystic EBs began to appear which increased in numbers reaching ~60% of initially formed EBs over 5 days. Endoderm lineage marker, AFP were highly expressed and specifically localized at the surface region of cystic EBs comparison with normal EBs. We next attached the cystic EBs onto gelatin-coated plates and cultured for 5 days. In the results of real-time PCR and immunocytochemistry analysis, AFP-expressing cells migrated and localized at the outgrowth region of attached cystic EBs. To obtain the AFP-expressing cells of the outgrowth region, we manually isolated by using micro-dissection and cultured them. These cells strongly express AFP over 70% of isolated cells post re-plating. Here, we first showed an expression pattern of specifically localized ELCs by Activin-A during differentiation of hESCs. From this observation, we could highly purified ELCs from undifferentiated hESCs. Taken together, our system will provide a novel and efficient option to generate ELCs from hESCs.

(Key words : Human embryonic stem cells, EB formation, Endoderm differentiation, Activin-A, Micro-dissection)

서 론

1998년 미국 위스콘신대학의 Thomson 연구진에 의해 인간의 배아로부터 확립된 인간 배아 줄기세포(Human embryonic stem cells: hESCs)는 무한 자가 증식을 할 수 있

는 능력(self-renewality)과 신체의 각 장기와 조직을 구성하는 모든 세포로 분화 가능한 전분화능(pluripotency)을 가지고 있다(Thomson 등, 1998; Draper와 Andrews, 2002; Stojkovic 등, 2004; Lerou와 Daley, 2005; Zeng와 Rao, 2006). 인간 배아 줄기세포의 전분화능은 삼배엽의 모든 세포가 발현되는 배상체(embryoid body: EB) 형성을 통하

* 공동 1저자의 권한을 부여함.

** 본 연구는 지식경제부 산업원천기술개발사업(10033642)의 연구비의 지원으로 이루어진 것임.

† Corresponding author : Phone: +82-2-538-4104, E-mail: stemchung@gmail.com

여 분화 유도되며(Brook와 Gardner, 1997; Doi 등, 1997; Magyar 등, 2001; He 등, 2003), 삼배엽성 세포가 포함된 배상체는 다양한 분화 조건에 따라, 외배엽 유래의 신경 및 피부(Aubert 등, 2002; Ying 등, 2003) 중배엽 유래의 심장 및 혈관(Kim 등, 2007; Murry와 Keller, 2008), 내배엽 유래의 간 및 췌장(Wells와 Melton, 1999; Kimelman와 Griffin, 2000; Grapin-Botton와 Melton, 2000; Tremblay 등, 2000) 등의 세포로 분화될 수 있다. 따라서 전분화능을 가지고 있는 인간 배아 줄기세포는 오늘날 난치성 질환의 치료를 위한 중요한 세포 자원으로 인식되고 있다(Dvash 등, 2006; Klimanskaya 등, 2006; Friedrich Ben-Nun와 Benvenisty, 2006; Deb와 Sarda, 2008).

배상체 형성을 통한 분화 유도 과정 중에 사용되는 다양한 성장인자들은 특정 세포로의 분화 효율을 향상시킬 수 있으며, 각 배엽성 세포의 분화 조절에 관여하는 대표적인 성장인자는 외배엽성 분화 촉진에 사용되는 bFGF(Cox와 Hemmati-Brivanlou, 1995), 중배엽성 세포의 분화 촉진에 관여하는 BMP4(Nostro 등, 2008), 내배엽성 세포의 분화 촉진에는 Activin-A가 관여한다는 보고가 있다(D'Amour 등, 2005; McLean 등, 2007; Sulzbacher 등, 2009). 인간 배아 줄기세포 유래의 특정세포 분화 효율의 증진과 더불어, 특정세포 만을 효과적으로 정제하는 방법 또한 인간 배아 줄기세포의 활용에 중요한 연구 과제로 진행되어 왔다. 인간 배아 줄기세포 유래의 혈액 및 혈관 세포의 경우, 세포 표면 특이인자를 이용한 유세포 분석기로 정제하는 방법(Keller, 2005; Olsen 등, 2006; Cho 등, 2007)과 응-수축(contracting) 작용을 하는 심근세포의 경우, 육안으로 구분하여 물리적으로 분리하는 방법(Kehat 등, 2001)이 대표적인 분화세포를 정제하는 방법으로 사용되어 왔다. 하지만, 세포 표면 특이인자가 존재하지 않으며, 형태학적으로 구분이 어려운 내배엽성 세포의 경우에는 새로운 정제 방법의 개발이 절실히 요구된다. 따라서, 본 연구에서는 배상체 형성을 통한 인간 배아 줄기세포의 분화 과정 동안에 내배엽성 세포 분화를 촉진시키고자 성장인자 Activin-A를 처리한 후, 배상체의 형태학적 변화에 대한 분석과 대표적인 내배엽성 표지인자인 AFP 발현 세포들의 발현 패턴을 면역염색법으로 분석하여, 내배엽성 세포 만을 효과적으로 분리하고자 하였다.

재료 및 방법

인간 배아 줄기세포의 배양

미분화 상태의 인간 배아 줄기세포(H9-hESC)를 0.2% 젤라틴으로 코팅된 배양접시(Nunc, Roskilde, Denmark)에서, 세포 성장 억제 물질인 mitomycin C(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 10 μ g/ml 농도로 90분 동안 처리하여 준비된 지지세포(mouse embryonic fibroblast: MEF)와 함께 공배양하였다. 이 때, 인간 배아 줄기세포는 DMEM/F12(50:50, Gibco, Gaithersburg, MD, USA), 20% (v/v) serum replacement(Gibco), 1 mM L-glutamine(Gibco), 1% nonessential amino acids(Gibco), 100 mM beta-mercaptoethanol(Gibco), 4 ng/mL bFGF(Sigma)로 조성된 배양액을 사용하였다. 배양액은 매일 교체해 주고, 5일에서 7일 간격으로

새로운 지지세포에 계대배양하였으며, 세포 배양은 37°C, 5% CO₂, 95% 습도를 유지하면서 진행하였다(Thomson 등, 1998).

배상체 형성 및 내배엽성 세포로의 분화

분화 유도를 위한 배상체 형성은 인간 배아 줄기세포를 dispase(Gibco) 효소로 지지세포와 분리시킨 뒤, 새로운 배양접시(Falcon/BD Biosciences, San Jose, CA)로 옮겨 DMEM/F12(50:50, Gibco), 20% (v/v) serum replacement(Gibco), 1 mM L-glutamine(Gibco), 1% nonessential amino acids(Gibco), 100 mM beta-mercaptoethanol(Gibco)로 조성된 배양액에서 부유배양하였으며, 배양액은 매일 교체하였다(Kim 등, 2007; Cho 등, 2007). 배상체를 이용한 내배엽성 세포로의 분화 유도를 위해 100ng/ml 농도의 Activin-A(R&D System, Minneapolis, MN)를 배상체 형성을 통한 분화 유도하는 초기 3일간 처리한 후, 5~7일간 배양하였다(Fig. 1A).

내배엽성 세포의 정제 및 배양

내배엽성 세포를 분리하기 위하여, Activin-A에 의해 분화 유도된 cystic 배상체를 0.2% 젤라틴으로 코팅된 배양접시에 부착하여 5일 동안 배양하였다. 부착된 배상체는 부착지점으로부터 세포가 outgrowth 부위로 이동하여 cluster 부분과 monolayer 부분이 관찰되었고, monolayer 부분만을 유리 파이펫을 이용하여 물리적으로 분리하여 새로운 배양접시에 재부착하였으며, DMEM high glucose(Gibco), 10% fetal bovine serum(HyClone, Logan, Utah), 1 mM L-glutamine(Gibco), 1% nonessential amino acids(Gibco), 100 mM beta-mercaptoethanol(Gibco)로 조성된 배양액을 이용하여 배양하였다.

RNA 추출 및 실시간 중합효소 연쇄 반응 분석

Activin-A에 의해 분화 유도된 배상체에서 발현되는 내배엽성 세포 유전자를 분석하기 위하여 실시간 중합효소 연쇄 반응을 수행하였다. 실시간 중합효소 연쇄 반응을 위해 사용한 세포 시료는 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 RNA를 추출하였으며, 추출된 RNA는 Maxime RT PreMixKit(iNtRON BIOTECHNOLOGY, Sungnam, Kyungki-Do, Korea)를 사용하여 cDNA로 합성되었다. 실시간 중합효소 연쇄 반응은 Faststart DNA Masterplus SYBR Green I kit(Roche Diagnostics, Burgess Hill, U.K.)를 이용하여 Roche Lightcycler System을 통해 수행되었고, 정량화를 위하여 제조자(manufacturer)의 지침에 따라 comparative Ct 방법을 이용하여 표적 유전자를 GAPDH에 대하여 표준화 시켰다(Naito 등, 2006). Table 1은 본 실험에서 사용된 프라이머의 염기 서열을 나타낸다.

면역 염색 분석

Activin-A에 의해 분화 유도된 배상체에서 발현되는 내배엽성 세포 특이적 항체를 관찰하기 위해 면역염색법을 수행하였다. 면역염색을 위하여, 세포 시료를 4% 파라포름 알데하이드로 15분간 상온에서 고정시킨 다음, 0.03% Triton X-100(Sigma)이 포함된 PBS(Gibco)를 이용하여 세 번 세척하였다. 그리고 고정된 배상체에 5% BSA(bovine serum albumin)를 첨가하여 한 시간 동안 블로킹한 후, Oct-

Table 1. Primers used for Real-time PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer	cDNA size(bp)
GAPDH	5'CTCGCT TCGGCAGCACAA	5'AACGCT TCA CGAATTTGCGT	238
Oct3/4	5'TATGCAAAGCAGAAACCCTCGTGC	5'TTCGGGCACTGCAGGAACAAATTG	103
AFP	5'ACCCGAACCTTCCAAGCCATAAC	5'CAGACAATCCAGCACATCTCCTC	141
Brachyury	5'CCAGTGGCAGTCTCAGGTTAAG	5'GCAGGTGTGAGCAAGGGATG	116
TUBB3	5'TTCCTGCACTGGTACACGG	5'TGCGAGCAGCTTCACTTG	185

4(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), AFP (R&D System), TuJ1(Millipore, Chicago, IL)과 같은 일차 항체를 4°C에서 12시간 동안 반응시켰으며, PBS를 이용하여 세 번 세척하였다. 세척 후, Cy3(Molecular Probes Inc., Eugene, OR), FITC(Molecular Probes)와 같은 이차 항체를 상온에서 1시간 동안 처리한 후에 PBS를 이용하여 세 번 세척하였다. 면역 염색이 끝난 배상체는 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)가 함유되어 있는 glycerol-based mounting solution을 이용하여 마운팅한 뒤, LSM 510 META 공초점 현미경(Carl Zeiss Inc.; Oberkochen, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

통계처리 및 분석

대조군과 실험군에 대한 정량적인 결과는 평균값과 표준편차를 이용하여 나타내었다. 각 실험군 간의 다중 비교를 위하여 one-way analysis of variance (ANOVA)를 SPSS (SPSS 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램의 student *t*-test를 이용하여 유의성 검정하였으며, *p*값이 <0.05 일 때 통계학적으로 유의성 있는 차이가 있는 것으로 하였다.

결 과

Activin-A가 배상체 형성에 미치는 형태학적 분석

인간 배아 줄기세포 유래의 내배엽성 세포로의 분화를 촉진하는 성장인자로 알려진 Activin-A가 배상체 형성과정에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 본 연구에서는 100 ng/ml 농도의 Activin-A(D'Amour 등, 2005; Yang 등, 2008)를 배상체 형성을 통해 분화를 유도하는 초기 3일간 처리한 후, 5~7일간 배양하여(Fig. 1A) Activin-A 처리군과 비처리군의 형태학적 변화를 비교하였다. Activin-A의 비처리군에서는 다양한 크기의 배상체가 관찰되었지만, 형태학적으로 cystic을 형성한 배상체(Fig. 1B arrow head)는 전체 배상체의 10% 미만에 불과하였다(Fig. 1D). 반면, Activin-A의 처리군에서는 다양한 크기의 배상체가 형성됨과 동시에 형태학적으로 cystic 형태의 배상체(Fig. 1C arrow head)가 전체 배상체의 60% 이상에서 관찰되었다(Fig. 1D).

Activin-A에 의해 분화 유도된 배상체의 미분화와 삼배엽 유전자의 발현 패턴 분석

Activin-A의 처리군 배상체와 비처리군 배상체의 유전

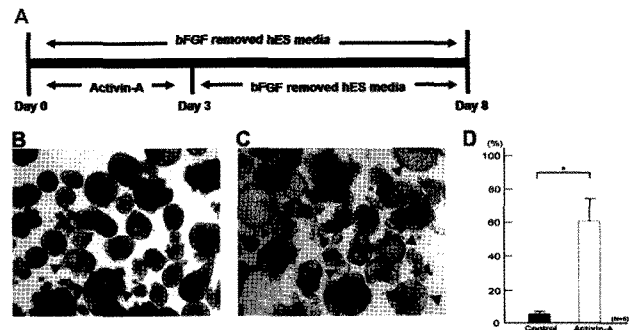


Fig. 1. Comparison of cystic EBs formation derived from hESCs between Activin-A treatment and non-treatment. (A) Overall strategy for differentiation of EBs from hESCs. (B) Morphologies of spontaneously differentiated EBs without Activin-A treatment. (C) Morphologies of differentiated EBs post Activin-A treatment. (D) Measurement of the number of formed cystic EBs with / without Activin-A treatment (* *p*<0.05).

자 발현 패턴을 조사하기 위하여, 대표적인 미분화 표지인자인 Oct4 유전자와 삼배엽성 세포의 표지인자인 AFP(내배엽), Brachyury(중배엽), Tubb3(외배엽) 유전자에 대하여 실시간 중합효소 연쇄 반응 기법으로 분석하였다. 그 결과, Oct4 유전자 발현의 경우, 미분화 인간 배아 줄기세포군에서만 강하게 발현되고, Activin-A의 비처리군과 처리군 모두에서는 Oct4 유전자의 발현이 약하고 두 군간의 발현 차이는 없었다(Fig. 2A). 각 배엽성의 대표적인 표지인자 유전자의 발현 패턴에서, 내배엽 표지인자인 AFP 유전자는 미분화 인간 배아 줄기세포군과 비처리군에 비해 처리군에서만 강하게 발현되었으며(Fig. 2B), 중배엽 표지인자인 Brachyury 유전자와 외배엽 표지인자인 Tubb3 유전자의 경우, 미분화 인간 배아 줄기세포군과 처리군에서는 약하게 발현된 반면, 비처리군에서는 강하게 발현되는 패턴을 보였다(Fig. 2C). 따라서 우리는 실시간 중합효소 연쇄 반응 분석을 통해, 배상체의 대부분이 cavity 형태인 Activin-A 비처리군의 경우(Fig. 1B), 삼배엽성 세포가 고루 분포하고 있는 것을 관찰할 수 있었으며(Fig. 2B-2D), 특히적으로 중배엽성 세포의 발현이 강한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2C) (Yang 등, 2008; Cho 등, 2007). 반면, 배상체의 대부분이 cystic 형태인 Activin-A 처리군의 경우(Fig. 1C), 비처리군에 비해 상대적으로 중배엽, 외배엽의 발현이 다운되는 것을 관찰할 수 있었으며(Fig. 2C, 2D) 특히적으로 내배엽성 세포의 발현이 강하게 증가한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B)(Conley 등, 2004; Sachlos와 Auguste, 2008). 상기 결과로부터, 배상체 분화 과정에 처리한 Activin-A는 미

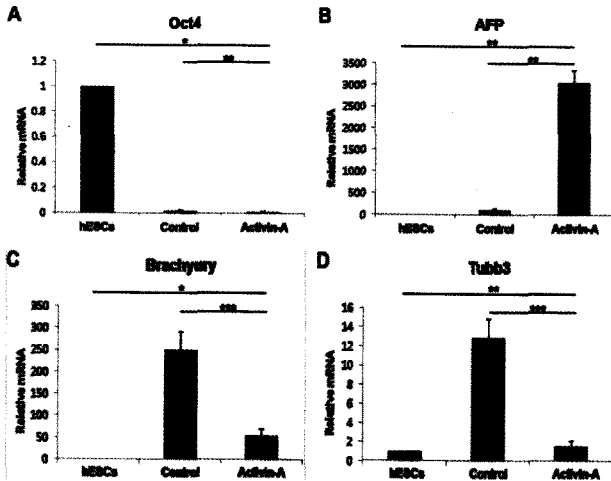


Fig. 2. Gene expression patterns of Activin-A treated groups for pluripotent and germ-layer genes as detected by real-time PCR. (A~D) Real-time PCR for pluripotent gene (*Oct4*) and three germ-layer genes such as alpha-fetoprotein (*AFP*; endoderm), *Brachyury* (mesoderm) and *Tubb3* (ectoderm) using samples obtained from the differentiated EBs by each culture condition at day 8 demonstrated that endoderm specific gene, *AFP*, was up-regulated in the Activin-A treatment group compare with the hESCs or non-treatment group as a control. Individual values were normalized to GAPDH gene. Data are presented as fold difference compare with the hESCs group (n=6 per group). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

분화 유전자의 발현 패턴에는 크게 관여하지 않으나, 삼배엽 관련 유전자 중 특히, 내배엽 관련 유전자 발현 패턴에 중요한 성장인자로 작용한다는 것을 판단할 수 있었다.

Activin-A에 의한 배상체 내에서의 내배엽성 세포의 발현 패턴 및 분포도 분석

Activin-A 처리군의 배상체에서 증가된 내배엽성 세포의 발현 패턴과 분포도를 조사하기 위하여, Activin-A 처리군과 비처리군에서의 cystic 배상체를 미분화 특이 항체인 *Oct4*, 내배엽성 세포 특이 항체인 *AFP*, 배상체의 표면에 특이적으로 발현되는 외배엽성 세포 특이 항체인 *Tuj1*을 이용하여 면역염색법으로 분석하였다. 미분화 특이 항체 *Oct4*의 경우, Activin-A 비처리군의 cystic 배상체에서 약하게 발현되는 세포가 관찰되었으며(Fig. 3A), 처리군에서는 *Oct4* 발현세포를 관찰할 수 없었다(Fig. 3C). 내배엽성 특이 항체 *AFP*의 경우, 처리군과 비처리군의 cystic 배상체 모두에서 *AFP* 발현세포가 관찰되었으며, 특히, 처리군의 cystic 배상체에서의 *AFP* 발현이 비처리군의 cystic 배상체보다 강한 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3B와 3D). 따라서, Activin-A 처리에 의해 형성된 cystic 배상체가 비처리군의 cystic 배상체보다 내배엽성 세포 분화가 촉진되었다는 것을 알 수 있었다. 외배엽 특이 항체 *Tuj1*의 경우, 처리군의 cystic 배상체에 비해 비처리군의 cystic 배상체에서 강하게 발현되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A-3D). 따라서, Activin-A 처리에 의해 내배엽성 세포가 증가한 cystic 배상체에서는 외배엽성 세포의 발현이 현저히 감소된다는 것을 알 수 있었다. 상기 결과는, 유전자 발현 패턴과 비슷한 양상(Fig. 2A-2D)을 보였으며, Activin-A는 cystic 배상체의

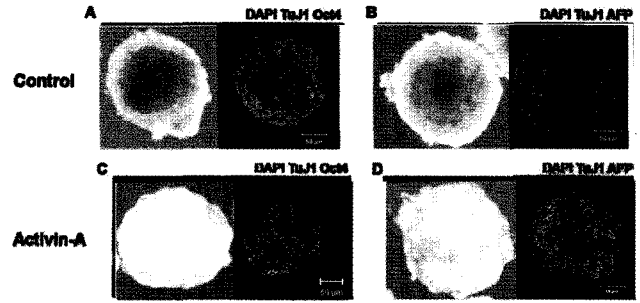


Fig. 3. Expression pattern and distribution of pluripotency and markers of the germ layers in cystic EBs of Activin-A treated and non-treated groups. (A~D) The pluripotency marker, *Oct4*, ectoderm lineage marker, *Tuj1*, and endoderm lineage marker, *AFP*, were shown to have significantly different expression and distribution between Activin-A treatment and non-treatment as a control groups according to the immunocytochemistry results. DAPI staining indicates nuclei.

형성을 증가시킴과 동시에 내배엽성 세포로의 분화를 촉진 시키는데 효과적이라는 것을 확인할 수 있었다.

부착된 배상체에서의 AFP 발현 패턴을 이용한 고순도 내배엽성 세포의 정제

내배엽성 세포가 특이적으로 강하게 발현되는 Activin-A 처리군의 배상체에서 고순도 내배엽성 세포만을 효과적으로 분리하기 위하여, Activin-A 처리군의 배상체를 형태학적으로 non-cystic과 cystic 배상체로 구분하여 젤라틴이 코팅된 배양 접시에 부착하여 *AFP* 발현세포의 양상을 면역염색법으로 분석하였다. 배양접시에 부착된 non-cystic과 cystic 배상체는 부착된 지점을 중심으로 cluster와 monolayer 부분으로 구분하여, *AFP* 발현 패턴을 면역염색법으로 분석하였다. 부착된 non-cystic 배상체의 경우, monolayer 부분에서는 다양한 세포의 형태가 관찰되었으며(Fig. 4A), 면역염색 결과에서 *AFP* 발현세포가 monolayer의 일부분에서만 존재하고 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4B). 반면, 부착된 cystic 배상체의 경우에는 monolayer 부분에서 균일한 모양의 세포가 분포하고 있는 것을 관찰할 수 있었으며(Fig. 4C), 대부분의 monolayer 부분에서 특이적으로 *AFP* 발현세포가 존재하고 있는 것을 면역염색법을 통해 알 수 있었다(Fig. 4D). 부착된 non-cystic 배상체와 cystic 배상체의 cluster와 monolayer 부분을 물리적으로 분리하여, *AFP* 유전자 발현 양상을 실시간 중합효소 연쇄반응 분석법을 이용하여 분석한 결과, 상대적으로 부착된 cystic 배상체의 monolayer에서 *AFP* 유전자의 발현이 가장 높은 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4E). 상기 결과로부터, Activin-A 처리군의 cystic 배상체를 선택적으로 구분한 후, 일정 기간 배양접시에서 배양하여 monolayer 부분의 세포군만을 물리적인 방법으로 분리하는 것이 고순도 내배엽성 세포를 효과적으로 정제할 수 있는 방법이라 판단하였고, 물리적으로 분리한 세포를 새로운 배양접시에 옮겼을 때, 균일한 형태로 세포가 배양되고 있다는 것을 알 수 있었으며(Fig. 5A), *AFP* 발현세포를 면역염색법으로 분석한 결과 전체 세포 중 70% 정도의 세포가 *AFP*가 발현되는 내배엽성 세포임을 알 수 있었다(Fig. 5B와 5C).

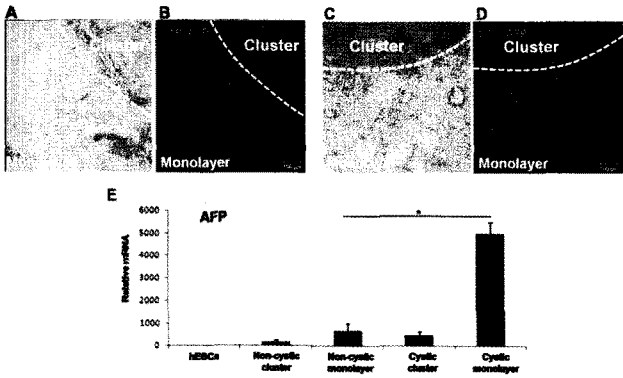


Fig. 4. Specific localization and expression pattern of the AFP-expressing cells in the attached cystic EBs. (A~D) The ectoderm lineage marker AFP was specifically localized and strongly expressed in the monolayer region of attached cystic EBs comparison with cluster region of attached cystic EBs or attached cells of non-cystic EBs. Comparison of the expression patterns of AFP genes for isolated two type cells (cluster region / monolayer region) derived from attached cystic- and non-cystic EBs using real time PCR (* $p < 0.05$).

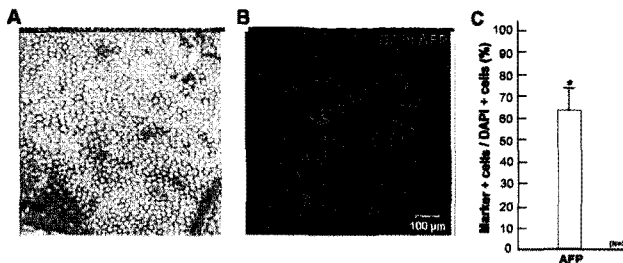


Fig. 5. Purification of AFP-expressing cell populations derived from the induced cystic EBs by Activin-A treatment. (A) Morphology of isolated monolayer region cell populations from attached cystic EBs by using micro-dissection method, and expression of (B) AFP-positive cells in immunohistochemistry result. (C) Measurement of purification efficiency as the AFP-expressing cells among DAPI-expressing cells in Fig. 5B (* $p < 0.05$).

고 찰

배상체는 형태학적으로 cavity와 cystic으로 구분되며, 일반적으로 배상체라 함은 형태학적으로 cavity 배상체를 일컫는 말로 Fig. 1B에서 관찰되는 대부분의 형태가 cavity 배상체이다. cavity 배상체는 삼배엽성의 세포가 고루 분포하고 있으며(Fig. 2B-2D), 본 연구진은 cavity 배상체의 중심부에 중배엽성 세포가 특이적으로 존재한다는 사실을 앞선 연구에서 보고하였다(Cho 등, 2007). 반면, cystic 형태의 배상체는 특이적으로 배상체 내부의 세포 사멸에 의해 수정체 형태를 나타내며(Fig. 1C, arrow head)(Sachlos와 Auguste, 2008), mesoendoderm 분화의 특징을 나타낸다는 보고가 있다(Conley 등, 2004). 본 연구진은 일반적인 cavity 배상체(Fig. 1B)를 대조군으로 이용하여, Activin-A가 cystic 배상체 형성에 미치는 영향과 미분화 인간 배아 줄기세포로부터 Activin-A 처리에 의해 배상체 내에 증가

된 내배엽성 세포의 발현 패턴을 분석하여, 고순도 내배엽성 세포만을 효과적으로 정제할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다.

최초 미분화 상태의 인간 배아 줄기세포(Fig. 6A)를 Activin-A 성장인자의 처리에 의해 내배엽성 발현세포의 분포가 많은 cystic 배상체의 분화 효율을 60% 이상 증가시켰으며(Fig. 6B), 내배엽성 발현세포의 분포가 많은 cystic 배상체만을 선택적으로 구분하여 젤라틴이 코팅된 배양접시에 부착하였다. 일정기간 배양된 세포 중, AFP 발현세포로 구성되어 있는 monolayer 부분만을 물리적인 방법으로 분리하는 과정을 통해(Fig. 6C) 70% 이상의 고순도 내배엽성 세포만을 정제할 수 있었다(Fig. 6D). 본 연구 결과로부터, Activin-A 성장인자는 내배엽성의 세포 분화에 효과적으로 이용될 수 있으며, 면역세포 분석기법을 통한 AFP 발현세포의 패턴을 조사하여 물리적으로 분리 정제하는 방법은 세포 특이 표면인자가 없어 유세포 분석기를 통해 내배엽성 세포를 정제할 수 없는 현시점에서 고순도 내배엽성 세포를 효과적으로 정제할 수 있는 대안책으로 이용할 수 있을 것으로 판단되며, 이러한 분화방법은 내배엽성 세포

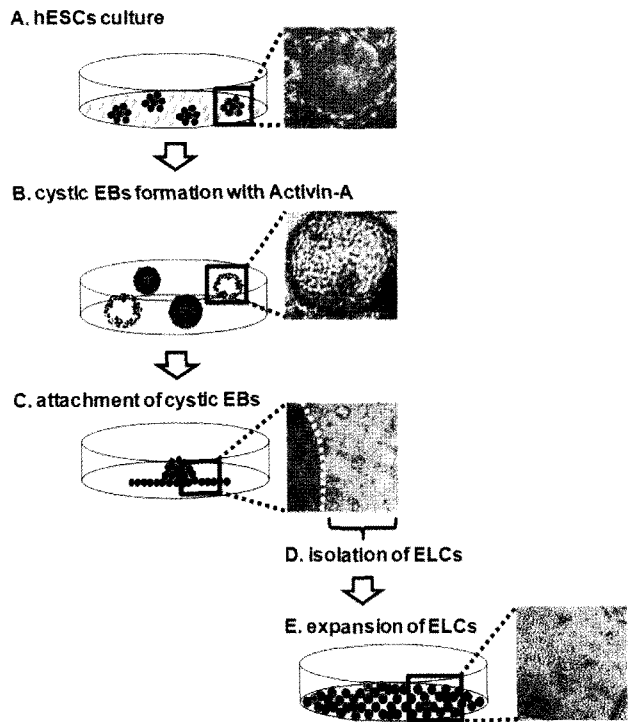


Fig. 6. Model for the highly purified AFP-expressing cells derived from hESCs by Activin-A treatment. (A) To initial induce the differentiation of undifferentiated hESCs, cells were formed EB in suspension condition. (B) And then, EBs were subsequently cultured in EB media supplement with Activin-A for 3 days. After treatment of Activin-A, cystic EBs began to appear over 60% of total EB formation. At this time, endoderm lineage marker, AFP were highly expressed and specifically localized at the surface region of cystic EBs comparison with control EBs. (C) Post-plating, these AFP-expressing cells migrated into the outgrowth region of attached EB. (D) Next to obtain the AFP-expressing cells of the outgrowth region, we manually isolated by using micro-dissection and cultured them. (E) These cells strongly expressed AFP over 90% of isolated cells post re-plating.

의 분화뿐 아니라, 인간 배아 줄기세포 유래의 분화된 다양한 세포의 분화 및 효과적인 정제 방법으로 활용될 수 있을 것이라 기대한다.

인용문헌

- Aubert J, Dunstan H, Chambers I, Smith A (2002): Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation. *Nat Biotechnol* 20:1240-1245.
- Brook FA, Gardner RL (1997): The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:5709-5712.
- Cho SW, Moon SH, Lee SH, Kang SW, Kim J, Lim JM, Kim HS, Kim BS, Chung HM (2007): Improvement of postnatal neovascularization by human embryonic stem cell derived endothelial-like cell transplantation in a mouse model of hindlimb ischemia. *Circulation* 116:2409-2419.
- Conley BJ, Trounson AO, Mollard R (2004): Human embryonic stem cells form embryoid bodies containing visceral endoderm-like derivatives. *Fetal Diagn Ther* 19:218-223.
- Cox WG, Hemmati-Brivanlou A (1995): Caudalization of neural fate by tissue recombination and bFGF. *Development* 121:4349-4358.
- D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazar S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE (2005): Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 23:1534-1541.
- Deb KD, Sarda K (2008): Human embryonic stem cells: preclinical perspectives. *J Transl Med* 6:7.
- Doi K, Itoh H, Nakagawa O, Igaki T, Yamashita J, Chun TH, Inoue M, Masatsugu K, Nakao K (1997): Expression of natriuretic peptide system during embryonic stem cell vasculogenesis. *Heart Vessels Suppl* 12:18-22.
- Draper JS, Andrews PW (2002): Embryonic stem cells: advances toward potential therapeutic use. *Curr Opin Obstet Gynecol* 14:309-315.
- Dvash T, Ben-Yosef D, Eiges R (2006): Human embryonic stem cells as a powerful tool for studying human embryogenesis. *Pediatr Res* 60:111-117.
- Friedrich Ben-Nun I, Benvenisty N (2006): Human embryonic stem cells as a cellular model for human disorders. *Mol Cell Endocrinol* 252:154-159.
- Grapin-Botton A, Melton DA (2000): Endoderm development: from patterning to organogenesis. *Trends Genet* 16:124-130.
- He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ (2003): Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* 93:32-39.
- 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.
- Keller G (2005): Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev* 19:1129-1155.
- Kim J, Moon SH, Lee SH, Lee DR, Koh GY, Chung HM (2007): Effective isolation and culture of endothelial cells in embryoid body differentiated from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 16:269-280.
- Kimelman D, Griffin KJ (2000): Vertebrate mesoderm induction and patterning. *Curr Opin Genet Dev* 10:350-356.
- Klimanskaya I, Chung Y, Becker S, Lu SJ, Lanza R (2006): Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 444:481-485.
- Lerou PH, Daley GQ (2005): Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev* 19:321-331.
- Magyar JP, Nemir M, Ehler E, Suter N, Perriard JC, Eppenberger HM (2001): Mass production of embryoid bodies in microbeads. *Ann N Y Acad Sci* 944:135-143.
- McLean AB, D'Amour KA, Jones KL, Krishnamoorthy M, Kulik MJ, Reynolds DM, Sheppard AM, Liu H, Xu Y, Baetge EE, Dalton S (2007): Activin efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed. *Stem Cells* 25:29-38.
- Murry CE, Keller G (2008): Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 132:661-680.
- Naito AT, Shiojima I, Akazawa H, Hidaka K, Morisaki T, Kikuchi A, Komuro I (2006): Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:19812-19817.
- Nostro MC, Cheng X, Keller GM, Gadue P (2008): Wnt, activin, and BMP signaling regulate distinct stages in the developmental pathway from embryonic stem cells to blood. *Cell Stem Cell* 2:60-71.
- Olsen AL, Stachura DL, Weiss MJ (2006): Designer blood: creating hematopoietic lineages from embryonic stem cells. *Blood* 107:1265-1275.
- Sachlos E, Auguste DT (2008): Embryoid body morphology influences diffusive transport of inductive biochemicals: a strategy for stem cell differentiation. *Biomaterials* 29:4471-4480.
- Stojkovic M, Lako M, Strachan T, Murdoch A (2004): Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells. *Reproduction* 128:259-267.

28. Sulzbacher S, Schroeder IS, Truong TT, Wobus AM (2009): Activin A-induced differentiation of embryonic stem cells into endoderm and pancreatic progenitors-the influence of differentiation factors and culture conditions. *Stem Cell Rev* 5:159-173.
29. 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.
30. Tremblay KD, Hoodless PA, Bikoff EK, Robertson EJ (2000): Formation of the definitive endoderm in mouse is a Smad2-dependent process. *Development* 127:3079-3090.
31. Wells JM, Melton DA (1999): Vertebrate endoderm development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:393-410.
32. Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, Henckaerts E, Bonham K, Abbott GW, Linden RM, Field LJ, Keller GM (2008): Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* 453:524-528.
33. Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A (2003): Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* 21:183-186.
34. Zeng X, Rao MS (2006): The therapeutic potential of embryonic stem cells: A focus on stem cell stability. *Curr Opin Mol Ther* 8:338-344.
(접수일자: 2010. 6. 10 / 채택일자: 2010. 8. 30)