

BMP4 처리에 의한 인간 배아줄기세포 유래 KDR 양성 중배엽성 세포군의 분화 양상 조사

김정모^{1,*} · 손은주^{1,*} · 조윤정¹ · 이재호² · 정형민^{1,2,†}

¹차의과학대학 의생명과학대학원 줄기세포 연구실, ²차바이오펜디오스텍

Identification and Characterization of a KDR-positive Mesoderm Population Derived from Human Embryonic Stem Cells Post BMP4 Treatment

Jung-Mo Kim^{1,*}, Onju Son^{1,*}, Youn-Jeong Cho¹, Jae-Ho Lee² and Hyung-Min Chung^{1,2,†}

¹Graduate School of Life Science, CHA Stem Cell Institute, CHA University, College of Medicine, 605-21 Yeoksam 1 dong, Gangnam gu, Seoul 135-907, Korea

²CHA Biotech & Diotech Co., Ltd. 606-16 Yeoksam 1 dong, Gangnam gu, Seoul 135-907, Korea

ABSTRACT

The functional cardiovascular system is comprised of distinct mesoderm-derived lineages including endothelial cells, vascular smooth muscle cells and other mesenchymal cells. Recent studies in the human embryonic stem cell differentiation model have provided evidence indicating that these cell lineages are developed from the common progenitors such as hemangioblasts and cardiovascular progenitor cells. Also, the studies have suggested that these progenitors have a common primordial progenitor, which expresses KDR (human Flk-1, also known as VEGFR2, CD309). We demonstrate here that sustained activation of BMP4 (bone morphogenetic protein 4) in hESC line, CHA15 hESC results in KDR⁺ mesoderm specific differentiation. To determine whether the KDR⁺ population derived from hESCs enhances potential to differentiate along multipotential mesodermal lineages than undifferentiated hESCs, we analyzed the development of the mesodermal cell types in human embryonic stem cell differentiation cultures. In embryoid body (EB) differentiation culture conditions, we identified an increased expression of KDR⁺ population from BMP4-stimulated hESC-derived EBs. After induction with additional growth factors, the KDR⁺ population sorted from hESCs-derived EBs displays mesenchymal, endothelial and vascular smooth muscle potential in matrix-coated monolayer culture systems. The populations plated in monolayer cultures expressed increased levels of related markers and exhibit a stable/homologous phenotype in culture terms. In conclusion, we demonstrate that the KDR⁺ population is stably isolated from CHA15 hESC-derived EBs using BMP4 and growth factors, and sorted KDR⁺ population can be utilized to generate multipotential mesodermal progenitors *in vitro*, which can be further differentiated into cardiovascular specific cells.

(Key words : Human embryonic stem cells, KDR, Mesoderm, Differentiation)

서 론

인간 배아줄기세포는 무한히 증식하는 자가재생능력 (self-renewal)과 인체를 구성하는 모든 세포로 분화할 수 있는 전분화능(pluripotent)을 가진다(Thomson 등, 1998; Okita와 Yamanaka, 2006). 삼배엽의 모든 세포가 발현되는 인간 배아줄기세포의 전분화능은 다양한 방법의 분화 연구를 통해 난치성 질환 치료를 위한 세포치료제의 중요한 공급원으로 인식되고 있다(Shannon, 2001; Draper

와 Andrews, 2002; Gerecht-Nir와 Itskovitz-Eldor, 2004; Zeng와 Rao, 2006). 심혈관 질환은 세계 사망원인 1위의 난치성 질환이다(Musunuru 등, 2010). 약물치료나 인공 조직으로의 대체치료만으로는 그 치료가 쉽지 않고 부작용도 따른다. 따라서, 이에 대한 주요 치료제로써 줄기세포로부터 유래된 심혈관 전구세포를 이용한 세포치료제 개발이 주목 받고 있다(Cho 등, 2007; Li 등, 2009; Sievking와 Ng, 2009; Rufaihah 등, 2010). 심장, 혈관과 혈액으로 구성된 심혈관계는 초기 배아 발생 과정에서 중배엽 형성에서 기인한다(Murry와 Keller, 2008). 하지만, 중

* 공동 1저자의 권한을 부여함(These authors contributed equally to this study.)

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

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

배엽성 세포의 형성 및 분화 과정의 분자적 메커니즘은 현재까지 명확히 밝혀진 바 없다.

미분화 인간 배아줄기세포는 보통 삼배엽의 모든 세포가 발현되는 배상체(Embryoid body: EB) 형성을 통하여 분화 유도되며(Levenberg 등, 2002; Kim 등, 2007), 이 배상체는 특정 분화 조건에 노출됨으로써 다양한 세포로 분화될 수 있다(Wang 등, 2004; Lu 등, 2007). 특히, BMP-4 성장인자는 배상체에서 중배엽성 세포로의 분화 효율을 높이는 것으로 알려져 있다(Goldman 등, 2009). 최근 인간 배아줄기세포 분화 모델(Murry와 Keller, 2008)에 따르면, BMP4 성장인자에 의한 중배엽성 세포로의 분화는 심근세포, 혈관 내피세포 및 평활근세포로의 분화 가능성을 지닌 심혈관 전구세포(Cardiovascular progenitor cells) (Yang 등, 2008; Bai 등, 2010; Zeevi-Levin 등, 2010)와 조혈모세포와 혈관 내피세포로 분화 가능한 혈액모세포(Hemangioblast) (Kaufman 등, 2001; Lu 등, 2007; Zhang 등, 2008; Choi 등, 2009)와 같은 심혈관 구성 세포들의 전구세포로의 분화를 유발한다. 특히, 이들 전구세포들은 KDR(human Flk-1, VEGFR2, CD309)이 발현되는 공통 원시 전구세포를 가지는 것으로 추측하고 있다(Peichev 등, 2000). BMP4 성장인자는 배아줄기세포에서 KDR의 발현을 증가시키는 주요 인자로 알려져 있다. 하지만, 인간 배아줄기세포에서 BMP4 성장인자에 의한 KDR의 발현 양상(Goldman 등, 2009)은 마우스 배아줄기세포의 발현 양상(Taha 등, 2007)에 비해 보다 복잡한 것으로 보고되고 있다.

따라서, 본 연구에서는 배상체 형성을 통한 인간 배아줄기세포의 분화 과정 동안에 중배엽성 세포 분화를 촉진시키고자 BMP4 성장인자를 처리한 후, 배상체에서의 KDR 발현 양상에 대한 분석을 유세포분석을 통해 진행하였다. 또한, BMP4 성장인자에 의해 증가된 KDR 양성 세포군집이 심혈관계 세포로의 분화에 있어 공통 전구세포로의 가능성을 타진하기 위해 유세포분리기를 이용하여 KDR 양성 세포군집을 분리하고, 성장인자 및 기질을 포함하는 추가적인 분화 조건을 적용하여 심혈관 구성 세포로의 분화를 유도하고, 세포 특이 표지인자들의 면역염색법으로 분석하여, 유도된 세포들의 특성을 확인하고, BMP4 성장인자에 의해 증가된 KDR 표지인자가 인간 배아줄기세포의 심혈관계 세포로의 분화에 있어 관문이 됨을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

인간 배아줄기세포의 배양과 배상체 형성

미분화 상태의 인간 배아줄기세포(CHA15, Lee 등, 2010)는 0.2% 젤라틴이 코팅된 배양접시에서 세포성장 억제물질인 마이토포미신 C를 처리한 MEF와 함께 공배양하였다. 이 때 배양액은 DMEM/F12(50:50, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 20%(v/v) 단백질청대체물(Invitrogen), 1 mM L-글루타민(Invitrogen), 1% 비필수 아미노산(Invitrogen), 1% 페니실린스트렙토마이신(Invitrogen), 0.1 mM 베타머캅토에탄올(Invitrogen), 4 ng/ml bFGF 성장

인자 (Sigma, St. Louis, MO)의 조성으로, 매일 교체해 주며 6일 간격으로 새로운 지지세포로 계대배양을 하였다. 배상체는 6일간 배양된 인간 배아줄기세포를 디스페이즈(Invitrogen) 효소로 지지세포와 분리시킨 후 페트리 배양 접시로 옮겨 DMEM/F12, 1 mM L-글루타민, 1% 비필수 아미노산, 0.1 mM 베타머캅토에탄올에 10%(v/v) 단백질청대체물을 첨가한 배양액으로 부유배양하였으며, 매일 배양액을 교체해 주었다.

미분화 인간 배아줄기세포 알칼라인포스파타이스(AP) 염색

Alkaline Phosphatase(86R-1kt, SIGMA, USA) 키트를 이용하여 실험에 이용된 세포가 미분화 세포임을 확인하였다. 간략히 기술하면, 4일 동안 유지배양된 인간 배아줄기세포를 시트랏트 솔루션과 아세톤, 37% 포르말데하이드를 이용하여 2분 동안 고정을 시키고, dPBS로 세척을 해준 뒤 소듐움 나트레이트와 FRL-알칼라인 솔루션을 1:1로 섞어 2분 동안 반응을 시키고, 일차중류수에 넣어 반응을 멈추게 한 다음 naphthol AS-B1 솔루션을 넣은 뒤 이 용액을 준비한 세포와 15분 동안 반응시킨다. 그 후 dPBS로 세척을 해준 뒤 위상차 현미경으로 관찰하였다.

중간엽 세포로의 분화 유도 및 분리방법

상기된 방법으로 만든 배상체를 중간엽 세포로 분화시키기 위해, 배상체를 형성시킨 첫째 날 DMEM/F12, 1 mM L-글루타민, 1% 비필수 아미노산, 0.1 mM 베타머캅토에탄올에 10%(v/v) 단백질청대체물을 첨가한 배양액에 10 ng/ml BMP4 성장인자(Peprotech Inc., Rocky Hill, NJ, USA)를 처리하였으며, 다음날부터 이틀에 한번 BMP-4 성장인자를 처리한 배양액을 교체해 주었다. 배상체가 중간엽 줄기세포로 분화되었는지 유세포분석기로 분석하기 위해 PBS(Invitrogen 1X)로 세척하고, Tryp-LE(Invitrogen)를 이용하여 단일 세포군으로 만들었으며, 2% FBS (Terracell, Webtec Inc., Charlotte, NC, USA)가 함유된 PBS로 부유시킨 후 분석을 실시하였으며, 중간엽 줄기세포 양성 마커인 KDR(PE, R&D systems, Minneapolis, MN, USA), PDGFR α (PE, R&D systems)과 CD133(APC, Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, USA)가 이용되었다. 또한, 중간엽 줄기세포를 분리하기 위해 6일 배양된 배상체를 KDR, CD133 그리고 PDGFR α 마커를 이용하여 유세포분리 (FACS Vantage flow cytometer, BD Bioscience, San Jose, CA, USA)로 분리하였다.

중간엽 계통 세포로의 분화 유도

유세포분리기로 분리한 KDR/CD133 이중 양성세포를 collagen (Stem Cell Technology, USA)으로 코팅된 배양 접시에 1×10^5 개 놓은 후 50 ng/ml VEGF 성장인자 (Peprotech), 10 μ m TGF β 억제제 SB431542(Tocris Cookson Inc., Missouri, USA)가 첨가된 EGM-2MV(Lonza Inc., Walkerville, MD, USA) 배양액으로 이틀에 한번 교체해 주었으며, 14일 동안 유사 혈관 내피세포로 분화를 유도하였다. 그리고 KDR/PDGFR α 이중 양성세포 1×10^5 개를 collagen (Stem Cell Technology, USA)으로 코팅된 배양접시에 놓은 후 50 ng/ml PDGF-BB(Peprotech) 성장 인자가 첨가된 EGM-2MV 배양액으로 이틀에 한번 교체

하여 10일 동안 유사 중간엽 줄기세포로 분화를 유도하였으며, KDR/PDGFR α 이중 양성세포를 동일한 양으로 gelatin으로 코팅된 배양접시에 5% FBS (Terracell)가 함유된 DMEM 고농도글루코오스 배양액 (Invitrogen)으로 이들에 한번 교체해 주면서 10일 동안 유사 평활근 세포로 분화를 유도하였다.

혈관 내피세포의 특성 규명

혈관 내피세포의 특성을 확인하기 위해 분화된 유사 혈관 내피세포를 Matrigel (BD Bioscience)이 코팅된 배양접시에 올려서 배양하였으며, 24시간 후 40 \times 위상차 현미경으로 모세혈관 구조를 관찰하였다. 그리고 혈관 내피세포를 vWF (BD Bioscience), PECAM (BD Bioscience)으로, 핵을 DAPI (Vector Laboratories, Inc.)로 면역형광염색을 실시한 후, LSM 510 META 공초점 현미경 (Carl Zeiss Inc.; Oberkochen, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

중간엽 줄기세포의 특성 규명

중간엽 줄기세포의 특성을 확인하기 위해 유세포 분석을 실시하였다. 유세포 분석을 위해 PBS(Invitrogen 1X)로 세척하고, TrypLE(Invitrogen)를 이용하여 단일 세포 군으로 만든 후 2% FBS(Terracell)가 함유된 PBS를 이용하여 분석을 실시하였으며, 중간엽 줄기세포의 대표적인 양성 마커인 CD105(APC, R&D systems), CD90(PE, R&D systems), CD44(PE, R&D systems)을 유세포분석기 (BD FACSCaliber, BD Bioscience, San Jose, CA, USA)로 확인하였다.

평활근 세포의 특성 규명

평활근 세포의 특성을 확인하기 위해 면역형광염색을 실시하였다. Calponin (BD Bioscience) 또는 Smooth muscle-myosin heavy chain (SM-MHC, BD Bioscience), α -Smooth muscle actin(α -SMA, BD Bioscience)으로 평활근 세포를 염색하였으며, DAPI를 처리하여 핵을 염색시킨 후, LSM 510 META 공초점 현미경 (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

면역형광염색법

BMP4 성장인자에 의해 분화 유도된 유사 중간엽 줄기세포에서 발현되는 중간엽 줄기세포 특이적 항체와 유사 평활근 세포에서 발현되는 평활근 세포 특이적 항체를 관찰하기 위해 세포를 4% 파라포름알데히드로 15분간 상온에서 고정시킨 후, 0.03% Triton X-100 (Sigma, St Louis, MO, USA)이 포함된 PBS(Invitrogen)로 세 번 세척하였다. 이어서, 5% BSA(Bovine Serum Albumin)을 첨가하여 한 시간 동안 블로킹한 후, 일차 항체를 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 처리하였으며, PBS로 세 번 세척한 후, 이차 항체를 상온에서 1시간 반응시키고 다시 PBS로 세 번 세척하였다. 세척이 끝난 세포는 4,6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)가 함유된 glycerol-based mounting solution으로 마운팅한 뒤, LSM 510 META 공초점 현미경 (Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

결 과

미분화 인간 배아줄기세포에서 중배엽성 세포로의 분화유도

인간 배아줄기세포를 통해 배상체를 형성한 후 BMP4 성장인자 처리를 통해 중배엽성 세포로 분화시키는 과정을 Fig. 1의 모식도로 나타내었다. 약 5일에서 7일 동안 배양된 배아줄기세포로부터 배상체를 형성한 후, 10 ng/ml의 BMP4 성장인자를 처리하여 6일 동안 배양한 세포를 유세포분석기를 이용하여 KDR/CD133 또는 KDR/PDGFR α 이중 마커 양성세포만을 분리하였다. 그리고 새로운 배양접시로 옮겨 단층배양한 결과, 중배엽성 계통의 세포로 분화를 유도할 수 있었다.

미분화 인간 배아줄기세포의 특성규명

6일간 배양한 인간 배아줄기세포의 미분화 상태를 확인하기 위해 40 \times 위상차 현미경 하에서 콜로니를 형성하며 자라는 세포의 형태를 관찰하였으며(Fig. 2A), CHA15 인간 배아줄기세포에서 미분화 마커인 알칼라인 포스파테이즈(AP)의 발현을 40 \times 위상차 현미경 하에서 확인하였다(Fig. 2B). 또한, 유세포분석기를 이용하여 미분화 세포의 대표적인 마커인 TRA-1-60/SSEA-4의 이중 양성 발현(99% 이상)을 확인하였고(Fig. 2C), 90% 이상의 CD133을 발현하고 있는 것에 반해 KDR의 발현은 확인할 수 없었다(Fig. 2D).

BMP4 성장인자 처리에 의해 KDR 발현 양성 변화

BMP4 성장인자에 의한 KDR 발현 양성 변화를 확인하고자, 6일간 배양한 인간 배아줄기세포에서 얻어진 배상체에 BMP4 성장인자를 10 ng/ml의 농도로 처리하여 유세포 분석을 실시하였고(Fig. 3A와 B). 그 결과 BMP4 성장인자를 처리하지 않은 실험군의 경우 KDR 발현 증감은 보여졌으나, 경향성은 보여주지 못했다. 반면, BMP4 성장 인자를 처리한 실험군의 경우, KDR 발현은 점진적

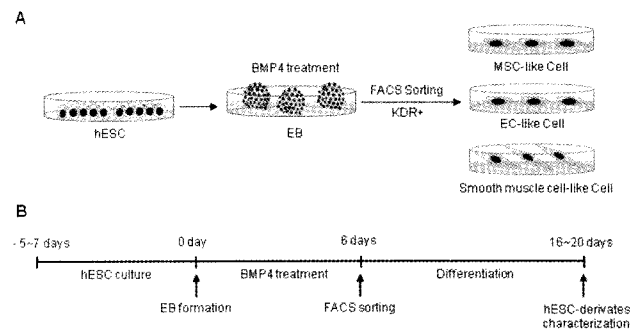


Fig. 1. Experiment scheme of mesoderm lineage cell differentiation from embryoid bodies. (A) Schematic diagram of mesoderm lineage cell differentiation from embryoid bodies induced by BMP4 treat. Sorted KDR/CD133 positive cells are continuously induced differentiation into endothelial cell-like cells. And sorted KDR/PDGFR α positive cells are induced into mesenchymal stem cell-like cells and smooth muscle cell-like cells (B) Time table of experimental scheme. Embryonic bodies treated by BMP4 during 6days. FACS sorted KDR positive cells are continuously differentiated into mesoderm lineage cells for 10~14 days.

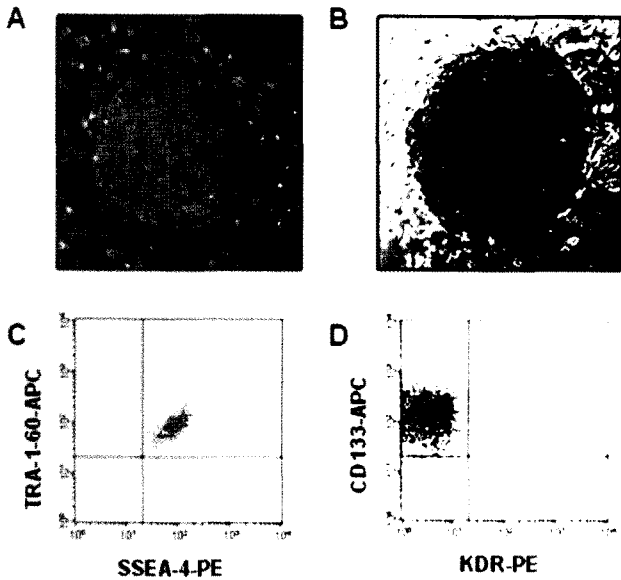


Fig. 2. Characterization of undifferentiated human embryonic stem cells. (A) Morphology of human embryonic stem cells (B) Immunocytochemistry analysis of human embryonic stem cells, stained by alkaline phosphatase. FACS analysis of undifferentiated cell markers, TRA-1-60 and SSEA-4 (C) and mesoderm cell markers, KDR and CD133 (D).

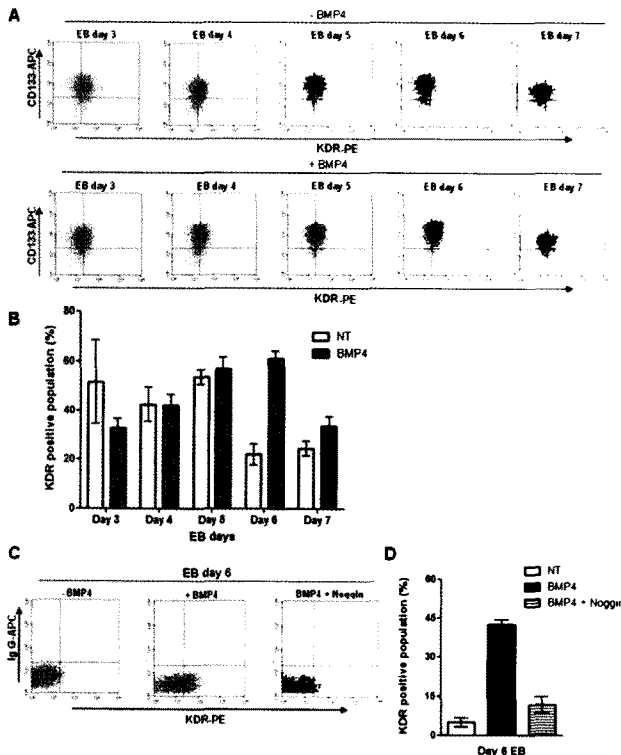


Fig. 3. KDR+ population changes induced by BMP4. (A) KDR population patterns of embryoid bodies. Cells are cultured without BMP4 (upper) or with BMP4 (lower) (B) quantitative represents comparison of KDR changes between -BMP4 and +BMP4 cells (C) KDR population inhibited by noggin treatment (D) quantitative represents of (C).

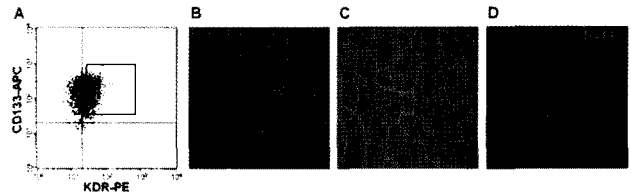


Fig. 4. Characterization of endothelial-like cells driven from BMP4 induced KDR/CD133 population. (A) KDR/CD133 positive cells are induced differentiation into EC-like cells (A) EC-like cells represented coble-stone morphology (B) Vessel formation of EC-like cells on Matrigel (C) Immunofluorescent staining of EC-like cells with vWF(green), PECAM(red) and DAPI(blue).

으로 증가하여 분화개시 6일째 최고점(60.99%±3.18)을 보였으며, 그 후 감소함(33.81%±3.65)을 볼 수 있었다. 또한, 이러한 KDR의 발현이 BMP4 성장인자의 영향에 의한 것인지 확인하기 위해 10 ng/ml 농도의 BMP4 성장인자와 함께, BMP4 성장인자의 억제제로 알려진 Noggin을 50 ng/ml의 농도로 처리한 결과, BMP4 성장인자 처리에 의해 높게 발현되는 KDR(42.71%±1.85)에 비해, 발현이 현저히 억제된 KDR(11.67%±3.11)을 확인하였다(Fig. 3C와 D).

KDR/CD133 이중 양성세포의 분리 및 유사 혈관 내피세포로의 분화

BMP4 성장인자 처리를 통한 중배엽성 세포로의 분화 유도 후 KDR의 발현이 가장 높은 것으로 나타나는 6일째의 배상체를 유세포분리기를 이용하여 KDR/CD133 이중 양성세포(61.24%±3.43중 Fig. 4A의 우상단 작은 상자 내 ~40%)만을 분리하였으며, 이후 유사 혈관 내피세포로 분화를 유도하였다. 유세포분리기를 이용하여 분리한 KDR/CD133 이중 양성세포를 유사 혈관 내피세포로 분화를 유도하여 그 특성을 규명하였다(Fig. 4B, C와 D). 위상차 현미경으로 관찰하였을 때 유사 혈관 내피세포는 조약돌 모양을 가지며(Fig. 4B), Matrigel 위에서 혈관 유사 형태

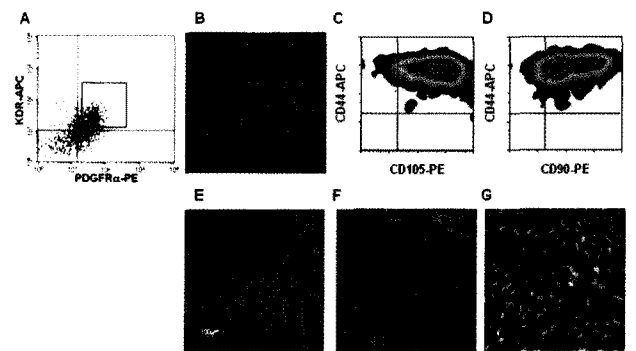


Fig. 5. Characterization of mesenchymal stem cell-like cells/smooth muscle cell-like cells driven from BMP4 induced KDR/CD133 population. (A) KDR/PDGFRα positive cells are induced differentiation into MSC-like cells and SMC-like cells (B) MSC-like cells represent MSC morphology. FACS analysis of MSC-like cells with (C) CD44/CD105 and (D) CD44/CD90 markers (E) SMC-like cells represent SMC morphology. Immunofluorescent staining of SMC-like cells with (F) calponin (green), αSMA (red), DAPI (blue) and (G) SM-MHC (green), αSMA (red), DAPI (blue).

의 연결망을 형성하였다(Fig 4C). 또한, 면역형광염색을 실시한 결과, vWF, PECAM과 DAPI가 염색되어 공초점 현미경 하에서 관찰되었다(Fig. 4D).

KDR/PDGFR α 이중 양성세포의 분리 및 유사 중간엽 줄기 세포 및 평활근 세포로의 분화

KDR/PDGFR α 이중 양성세포(57.43% \pm 2.17% Fig. 5A의 우상단 작은 상자내 ~35%)만을 분리하여, 이후 유사 중간엽 줄기세포와 유사 평활근 세포로 분화를 유도하였다. KDR/PDGFR α 이중 양성세포를 분리하여 유사 중간엽 줄기세포로 분화 유도하였다(Fig. 5B, C와 D). 이는 위상차 현미경 하에서 중간엽 줄기세포 형태와 유사하게 관찰되었으며(Fig. 5B), 유세포분석기를 이용하여 중간엽 줄기세포의 마커인 CD44, CD105, CD90의 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 5C와 D). 그리고 KDR/PDGFR α 이중 양성세포를 유사 평활근 세포로 분화를 유도하여 그 특성을 규명한 결과(Fig. 5E, F와 G), 위상차 현미경 하에서 가늘고 긴 평활근 세포와 흡사한 형태를 관찰할 수 있었으며(Fig. 5E), 면역형광염색을 실시한 결과, 평활근 세포 특이 마커인 calponin, α -Smooth muscle actin (α SMA) (Fig. 5F), smooth muscle-myosin heavy chain(SM-MHC) (Fig. 5G)의 발현을 확인할 수 있었다.

고찰

심혈관계의 경우, 조직 자체의 자가 재생력이 매우 낮으며, 특히 심혈관계 질환 환자에서 얻을 수 있는 자가 성체줄기세포의 수는 극히 소량이다. 인간 배아줄기세포는 인체를 구성하는 모든 세포로 분화할 수 있는 전분화능이 있어 세포치료제의 주요한 공급원으로 제시되고 있다. 때문에 인간 배아줄기세포로부터 분화된 중배엽성 전구세포 즉, 혈관 내피 전구세포(Rufaihah 등, 2010), 심혈관 전구세포(Hill 등, 2010), 혈액모세포(Choi 등, 2009)는 심혈관질환의 치료에 이용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 최근 연구에 따르면, 이들 전구세포들은 하나의 공통된 모전구세포를 가질 것으로 추측되며(Bai와 Wang, 2008; Yamahara와 Itoh, 2009), 그 공통 모전구세포는 KDR 양성 세포군을 포함하는 것으로 보고되고 있다(Yang 등, 2008).

이에 본 연구에서는, 미분화 인간 배아줄기세포(Fig. 2) 유래 배상체에 잠재적인 중배엽 유도물질로 알려진 BMP4 성장인자를 처리하여 KDR의 발현 양상을 조사하였다. 배아줄기세포에서 중배엽으로의 초기 분화에 있어 KDR은 두 단계의 발현 정점을 가진다(Goldman 등, 2009). 첫 번째 KDR 발현 정점은 일시적이며, 이후 두 번째 KDR 발현 정점은 계속적으로 유지되는 것으로 알려져 있다. 보고된 마우스 배아줄기세포의 Flk-1 발현 양상과는 달리, BMP4 성장인자가 없는 배상체 배양조건에서도 KDR의 발현은 증감을 보였다. 이는 인간 배아줄기세포의 중배엽으로의 분화에 BMP4 성장인자가 절대적인 요인이 아님을 보여준다(Boyd 등, 2007). 또한, KDR의 분화양상에 있어 어떤 경향성도 보여주지는 못했으며, 배상체 배양 시마다 다른 발현 경향을 보였다. 이는 미분화

배아줄기세포 및 배상체 분화에 있어 KDR의 내재 발현(endogeneous expression) (Boyd 등, 2007)과 관련있다고 보고 있다. 그에 반해 BMP4 성장인자가 포함된 배상체 배양조건에서의 KDR 발현 양상은 본 연구 조건에 있어 분화시점부터 점진적으로 증가하여 분화개시 6일째 KDR 발현의 최고점을 보였으며, 그 후 발현 감소함을 볼 수 있었다(Fig. 3). 이는 배아줄기세포의 중배엽으로의 초기 분화에 있어 KDR의 첫 번째 발현 정점과 의미를 같이 한다고 볼 수 있다(Zhang 등, 2008). 이 과정에 BMP4 성장인자는 미분화 배아줄기세포 및 배상체 분화에 있어 KDR의 내재 발현을 재정비하고, 중배엽으로의 분화를 프로그래밍하는 역할을 하는 것으로 사료된다. 또한, Noggin(Groppe 등, 2002)에 의한 배상체 내 KDR 양성 군집 감소는 분화 배지 내 포함된 BMP4 성장인자의 활성화에 대한 Noggin의 억제에 기인한 것으로 판단된다.

이어서 배상체에서 BMP4 성장인자에 의해 증가된 KDR 양성 세포가 중배엽성 전구세포로서 심혈관 세포로의 분화 가능성을 확인하였다. 이를 위해 배상체에서 BMP4 성장인자에 의해 유도된 KDR 양성 세포군을 유세포분리기를 이용하여 분리하고(Fig. 4A와 5A), VEGF, PDGF와 같은 성장인자와 collagen(Kim J 등, 2008, Sefcik 등, 2008), gelatin(Li 등, 2005; Xie 등, 2007)과 같은 기질을 이용하여 분화시켰다(Fig. 4와 5). 분리된 KDR 양성 세포군을 다양한 조건으로 분화 유도하였을 때, 중배엽성 세포인 유사 혈관 내피세포(endothelial cell-like cells, Fig. 4) (Peichev 등, 2000; Hill 등, 2010), 유사 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell-like cells, Fig. 5B, C와 D) (Riekstina 등, 2009; Kopher 등, 2010)와 유사 평활근세포(smooth muscle cell-like cells, Fig. 5E, F와 G) (Hill 등, 2010)로 분화하였으며, 그 특성을 확인할 수 있었다.

인간 배아줄기세포를 이용하여 난치병 치료를 위한 세포치료제를 만들기 위한 기본적인 배양조건과 특성세포로의 효율적인 분화유도 방법 및 분리정제 기술은 세포치료제 대량생산을 위하여 개발되어야 할 부분으로써(Liang 등, 2010; Galat 등, 2010), 보다 효율적인 분화 배양조건 확립 시 관련 기작에 대한 기본적인 정보로써의 활용도가 기대된다. 본 연구 결과를 통해, BMP4 성장인자는 인간 배아줄기세포의 분화 과정에서 KDR 발현에 일정한 경향성을 부여함으로써 중배엽성 전구세포로의 분화가 가능할 것으로 보인다. 더욱이 KDR을 표지마커로 이용하여 분리된 세포는 중배엽성 전구세포의 특성을 가지며, 다양한 분화 조건에 의해 심혈관 관련세포들로 분화될 수 있을 것으로 기대된다.

인용문헌

1. Bai H, Gao Y, Arzigian M, Wojchowski DM, Wu WS, Wang ZZ (2010): BMP4 regulates vascular progenitor development in human embryonic stem cells through a Smad-dependent pathway. *J Cell Biochem* 109:363-374.
2. Bai H, Wang ZZ (2008): Directing human embryonic stem cells to generate vascular progenitor cells. *Gene*

- Ther 15:89-95.
3. Boyd NL, Dhara SK, Rekaya R, Godbey EA, Hasneen K, Rao RR, West FD, 3rd, Gerwe BA, Stice SL (2007): BMP4 promotes formation of primitive vascular networks in human embryonic stem cell-derived embryoid bodies. *Exp Biol Med* (Maywood) 232:833-843.
 4. 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.
 5. Choi JH, Ryu YS, Kim KH, Lee YR, Cha KW, Han IS, Kwon BS (2009): *In vitro* development of a heman-gioblast from a human embryonic stem cell, SNU-hES#3. *Life Sci* 85:39-45.
 6. Draper JS, Andrews PW (2002): Embryonic stem cells: advances toward potential therapeutic use. *Curr Opin Obstet Gynecol* 14:309-315.
 7. Galat V, Ozen R, Verlinskii I, Greiss H, Krotova E, Mazepa A, Chailakhian LM, Iannaccone P (2010): [Cell engineering and genetic approaches to the development of models of human embryonic stem cells for studying genetic disorders]. *Biofizika* 55:481-485.
 8. Gerecht-Nir S, Itskovitz-Eldor J (2004): Cell therapy using human embryonic stem cells. *Transpl Immunol* 12:203-209.
 9. Goldman O, Feraud O, Boyer-Di Ponio J, Driancourt C, Clay D, Le Bousse-Kerdiles MC, Bennaceur-Gris-cellii A, Uzan G (2009): A boost of BMP4 accelerates the commitment of human embryonic stem cells to the endothelial lineage. *Stem Cells* 27:1750-1759.
 10. Groppe J, Greenwald J, Wiater E, Rodriguez-Leon J, Economides AN, Kwiatkowski W, Affolter M, Vale WW, Belmonte JC, Choe S (2002): Structural basis of BMP signalling inhibition by the cystine knot protein Noggin. *Nature* 420:636-642.
 11. Hill KL, Obrtlíkova P, Alvarez DF, King JA, Keirstead SA, Allred JR, Kaufman DS (2010): Human embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells capable of endothelial and smooth muscle cell function. *Exp Hematol* 38:246-257 e241.
 12. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA (2001): Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10716-10721.
 13. 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.
 14. Kim J, Moon SH, Lee MJ, Oh IR, Shin JM, Park SJ, Chung SH, Kim MK, Lee KI, Chung HM (2008): Optimized condition to culture of endothelial precursor cells derived from human embryonic stem cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 5:467-473.
 15. Lee JE, Kang MS, Park MH, Shim SH, Yoon TK, Chung HM, Lee DR (2010): Evaluation of 28 human stem cell lines for use as unrelated donors in stem cell therapy: implications of HLA and ABO genotypes. *Cell Transplant*.
 16. Levenberg S, Golub JS, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Langer R (2002): Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4391-4396.
 17. Li M, Cui T, Mills DK, Lvov YM, McShane MJ (2005): Comparison of selective attachment and growth of smooth muscle cells on gelatin- and fibronectin-coated micropatterns. *J Nanosci Nanotechnol* 5:1809-1815.
 18. Li Z, Han Z, Wu JC (2009): Transplantation of human embryonic stem cell-derived endothelial cells for vascular diseases. *J Cell Biochem* 106:194-199.
 19. Liang H, Matzkies M, Schunkert H, Tang M, Bonnemeier H, Hescheler J, Reppel M (2010): Human and murine embryonic stem cell-derived cardiomyocytes serve together as a valuable model for drug safety screening. *Cell Physiol Biochem* 25:459-466.
 20. Lu SJ, Feng Q, Caballero S, Chen Y, Moore MA, Grant MB, Lanza R (2007): Generation of functional heman-gioblasts from human embryonic stem cells. *Nat Methods* 4:501-509.
 21. Murry CE, Keller G (2008): Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 132:661-680.
 22. Musunuru K, Domian IJ, Chien KR (2010): Stem cell models of cardiac development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26:667-687.
 23. Okita K, Yamanaka S (2006): Intracellular signaling pathways regulating pluripotency of embryonic stem cells. *Curr Stem Cell Res Ther* 1:103-111.
 24. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S (2000): Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95: 952-958.
 25. Rufaihah AJ, Haider HK, Heng BC, Ye L, Tan RS, Toh WS, Tian XF, Sim EK, Cao T (2010): Therapeutic angiogenesis by transplantation of human embryonic stem cell-derived CD133+ endothelial progenitor cells for cardiac repair. *Regen Med* 5:231-244.
 26. Sefcik LS, Neal RA, Kaszuba SN, Parker AM, Katz AJ, Ogle RC, Botchwey EA (2008): Collagen nanofibers are a biomimetic substrate for the serum-free osteogenic differentiation of human adipose stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2:210-220.
 27. Shannon TA (2001): Human embryonic stem cell therapy. *Theol Stud* 62:811-824.
 28. Sieveking DP, Ng MK (2009): Cell therapies for thera-

- peutic angiogenesis: back to the bench. *Vasc Med* 14: 153-166.
29. Taha MF, Valoerdi MR, Mowla SJ (2007): Effect of bone morphogenetic protein-4 (BMP-4) on cardiomyocyte differentiation from mouse embryonic stem cell. *Int J Cardiol* 120:92-101.
 30. 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.
 31. Wang L, Li L, Shojaei F, Levac K, Cerdan C, Menendez P, Martin T, Rouleau A, Bhatia M (2004): Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity* 21:31-41.
 32. Xie CQ, Zhang J, Villacorta L, Cui T, Huang H, Chen YE (2007): A highly efficient method to differentiate smooth muscle cells from human embryonic stem cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27:e311-312.
 33. Yamahara K, Itoh H (2009): Potential use of endothelial progenitor cells for regeneration of the vasculature. *Ther Adv Cardiovasc Dis* 3:17-27.
 34. 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.
 35. Zeevi-Levin N, Itskovitz-Eldor J, Binah O (2010): Functional properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 20: 51-59.
 36. 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.
 37. Zhang P, Li J, Tan Z, Wang C, Liu T, Chen L, Yong J, Jiang W, Sun X, Du L, Ding M, Deng H (2008): Short-term BMP-4 treatment initiates mesoderm induction in human embryonic stem cells. *Blood* 111:1933-1941.
- (접수일자: 2010. 11. 4 / 채택일자: 2011. 1. 3)