

배아간세포주의 수립과 응용 (Isolation and Application of Embryonic Stem Cells)

포천중문 의과대학 생리학교실

심 호 섭

서 론 (introduction)

배아의 발달은 크게 두 가지 과정을 수반하는데 세포분열에 의해 세포의 수가 늘어나는 증식 (proliferation)과, 배아를 이루고 있는 세포들이 간, 심장 등과 같이 여러 형태의 조직으로 변화하는 분화 (differentiation)가 있다. 정자와 난자가 수정이 된 후 일정시기까지는 세포들이 분화되지 않은 상태이기 때문에 각각의 세포는 아직 전능성 (totipotency), 즉 개체를 이루는 모든 형태의 조직으로 분화할 수 있는 능력이 있다. 배아로부터 전능성을 가진 세포를 얻어 분화를 억제하면서 시험관내 배양을 계속하면 이 세포들은 전능성은 유지하되 영구히 증식하는 세포로 변하게 되는데 이를 배아간세포 (embryonic stem cell, ES cell)라고 한다. 1981년 Evans와 Kaufman 그리고 Martin에 의해 마우스의 배아간세포가 보고된 이래, 다수의 동물에서 유사한 세포주가 연구되어 왔으며 최근에는 인간의 배아간세포가 보고된 바 있다 (Shamblott 등, 1998; Thomson 등, 1998). 이 세포들은 영구적으로 시험관내 배양이 가능할 뿐 아니라 배양조건을 바꾸어 주면 분화를 재개하여 혈구, 근육, 신경세포 등 신체를 구성하고 있는 다양한 세포로 발달하게 된다.

배아간세포의 수립 (isolation of embryonic stem cells)

배아간세포는 내부세포괴 (inner cell mass, ICM) 또는 원시생식세포 (primordial germ cell, PGC)를 배양하여 세포주를 수립한다. 내부세포괴는 분화가 이루어지지 않은 상태를 유지하면서 계대배양하여 세포주를 얻는 반면, 원시생식세포는 아직 그 기전이 잘 밝혀져 있지 않은 역분화 (dedifferentiation) 과정을 거쳐 세포주가 만들어지게 된다. 세포주의 근원을 구분하기 위하여 통상 내부세포괴 유래의 미분화 세포는 embryonic stem (ES) cell, 원시생식세포 유래의 세포는 embryonic germ (EG) cell로 불린다. ES 및 EG cell은 모두 미분화 상태로 전능성 또는 다능성 (pluripotency)를 가지고 있다는 점에서 여타의 많은 세포주와 구별된다. 이 세포들은 체외에서 영구적인 계대배양이 가능하고, 배양조건을 변화시키면 체외에서 혈액, 근육, 신경세포 등 다양한 종류의 세포로 분화한다. 만약 면역기능이 결핍된 누드 (nude) 또는 SCID (severe combined immunodeficient) 마우스에 이식하면 기형종 (teratocarcinoma)을 비롯한 다양한 조직을 형성한다. 또한 배반포기 수정란에 주입한 후 대리모에 이식하면 태어나는 카이메라 (chimera)의 생식기계 (germ line)를 비롯하여 대다수의 조직으로 분화한다. 1981년 마우스에서 ES cell이 수립된 것을 시작으로 1998년 인간의 ES 및 EG cell에 이르기까지 여러 포유동물 중에서 배아

Table 1. Isolation of undifferentiated stem cells in mammals

| Classification | Species | Derivation | In vitro differentiation | Differentiation in immunodeficient mice | Production of chimera | Germ line transmission | Reference |
|----------------|---------|------------|--------------------------|---|-----------------------|------------------------|---|
| ES cell | Mouse | ● | ● | ● | ● | ● | Evans and Kaufman (1981); Martin (1981) |
| | Hamster | ● | ● | | | | Doetschman et al. (1988) |
| | Sheep | ● | | | | | Notarianni et al. (1991) |
| | Mink | ● | ● | | | | Sukoyan et al. (1993) |
| | Rabbit | ● | ● | | | | Graves and Moreadith (1993) |
| | Rat | ● | | | | ● | Iannaccone et al. (1994) |
| | Pig | ● | ● | ● | | ● | Wheeler (1994) |
| | Monkey | ● | ● | ● | | | Thomson et al. (1995) |
| | Cow | ● | | | | ● | Cibelli et al. (1998) |
| | Man | ● | | | ● | | Thomson et al. (1998) |
| EG cell | Mouse | ● | ● | ● | ● | ● | Matsui et al. (1992); Resnick et al. (1992) |
| | Cow | ● | ● | | | | sCherny et al. (1994) |
| | Pig | ● | ● | | | ● | Shim et al. (1997) |
| | Man | ● | ● | | | | Shamblott et al. (1998) |

간세포의 수립이 보고되었으며 전능성 또는 다능성에 관한 다양한 증거들이 제시되었다. 그러나 현재까지 마우스의 ES 및 EG cell에서만 배아간세포의 전능성을 궁극적으로 증명하는 생식기계전파 (germ line transmission)가 이루어졌다 (Table 1).

배아간세포의 체외분화 (in vitro differentiation of embryonic stem cells)

배아간세포는 착상 전의 미분화 수정란의 특성을 지니고 있으며 계대배양을 통하여 무한정의 세포를 얻을 수 있고 또한 배양조건을 바꾸어 줌으로서 분화를 유도할 수 있기 때문에 이를 이용하면 적은 수의 수정란으로는 실험이 어려운 DNA, RNA 또는 단백질을 여러 가지 조건에서 동정해 낼 수 있어 수정란의 발생 및 분화를 연구하는 재료로 쓰여진다. 체외배양 중에 성장인자 등 분화를 억제하는 조건을 제거하면 마우스의 ES cell은 embryoid body라고 불리는 구상의 세포괴를 이루는 과정을 거쳐 수정란의 체내 발생과정과 유사한 형태로 내배엽 (endoderm), 중배엽 (mesoderm), 외배엽 (ectoderm) 등 세 층의 생식층 (germ layer)을 형성한다. 나아가서 이로부터 신경세포 (Bain과 Gottlieb, 1998), 지방세포 (Dani 등, 1997), 근육세포 (Wu와 Adamson, 1996; Narita 등, 1997), 혈액세포 (Choi 등, 1998) 등 다양한 세포들이 만들어진다. 이는 포유류의 초기 발생과정을 체외에서 재현하는 것으로 증식 및 분화의 과정을 용이하게 관찰할 수 있고 다양한 유전자의 발현을 손쉽게 측정할 수 있는 유용한 연구 모델이 되고 있다.

유전자 적중 (gene targeting)

지난 십여 년간 ES cell이 생명과학 전반에 기여한 공로는 아무리 강조해도 지나침이 없을 것이며 이는 바로 ES cell이 유전자 적중을 가능케 하였기 때문일 것이다 (see Capecchi, 1994 for review). 즉, ES cell이 무한히 자라는 미분화 세포인 점을 이용하여 이 세포에 외래유전자를 도입하여 상동유전자 재조합 (homologous recombination)을 유도한 후 체외배양 과정을 통하여 항생제 등으로 정확히 유전자 조작이 이루어진 세포만을 선별 (screening)하고 이렇게 선별된 ES cell을 배반포기의 수정란에 주입한다. ES cell은 다능성을 가진 세포이기 때문에 이식 후 수정란의 발생에 참여하여 생식기계를 비롯한 다수의 조직으로 분화하여 chimera를 형성하게 된다. 만약 ES cell이 생식기계로 이행한다면 그로부터 만들어지는 생식세포는 선별된 ES cell에서 이루어진 것과 동일한 유전형을 보유하고 있으며, 이후 chimera를 번식시켜 순수한 형질 전환동물을 생산할 수 있다 (Figure 1).

형질전환동물의 생산을 위해 보편적으로 사용되어온 외래유전자의 전핵내 주입법 (pronucleus injection)은 유전자의 삽입이 동물의 계놈에 무작위적으로 일어나기 때문에, 외래유전자를 부가하는 것 (gain of function mutation)만이 가능하고 기존의 유전자를 삭제 (loss of function mutation)

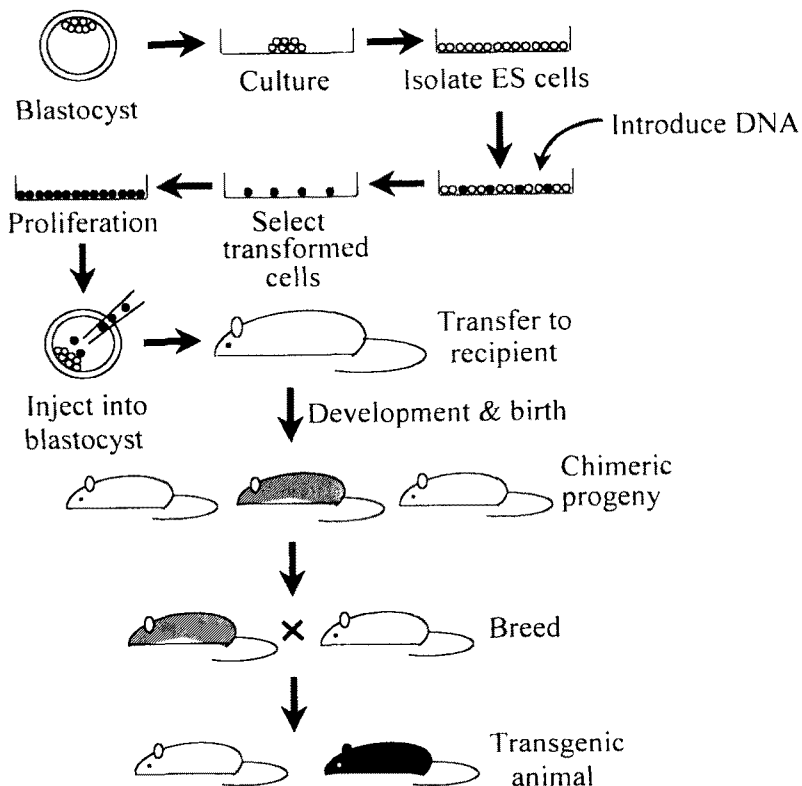


Figure 1. Site-directed mutagenesis using embryonic stem cells

또는 치환 (change of function mutation)하는 것은 불가능하였다. 또 도입된 외래유전자의 삽입 부위 (integration site) 및 수에 따라 그 발현의 정도가 달라지기 때문에 이를 조절할 수 없었다. 그러나 ES cell을 이용하면 외래유전자의 도입부위를 정확히 조절하고 그 발현을 예측해 낼 수 있기 때문에 여타의 형질전환동물 생산기술과는 대비된다. 이 기술은 유전자 적중이라고 일컬어지며 이렇게 생산된 형질전환생쥐를 통상 knockout (KO) mouse라고 한다 (Figure 1). 마우스에 있어서 유전자의 부가, 삭제 및 치환이 자유롭게 이루어짐으로 인하여 소위 디자인 마우스 (designed mouse)가 가능하게 되었고, 원하는대로 유전형질을 조작한 마우스를 생산한 후 그 표현형을 조사함으로써 많은 유전자의 생리학적 기능을 밝혀내게 되었다.

인간 배아간세포 (human embryonic stem cells)

1998년 위스콘신대와 존스홉킨스에서 각각 인간의 배아간세포를 보고함으로써 이 연구는 이제 의학분야에서 질병의 직접적인 치료에 적용할 수 있는 가능성이 논의되고 있다. Thomson 등 (1998)은 인간의 배반포기 수정란에서 유래한 ES cell을, Shamblott 등 (1998)은 원시 생식세포에서 유래한 인간 EG cell의 세포주를 수립하였는데, 인간 배아간세포의 생식기계전파 (germline transmission)는 윤리적 이유로 인하여 가능하지 않으나 이들 세포주가 계대배양이 가능하고, 다수의 미분화 세포 특이항원을 지니고 있으며, 체외 또는 면역결핍 마우스에서 분화를 재개하는 것으로 보아서 위에서 열거한 다른 포유동물종의 배아간세포와 많은 특성을 공유하고 있음을 알 수 있다. 우선 이러한 세포들은 인간 수정란에 대한 연구가 그 재료의 희귀성으로 인해 많은 제약을 받고 있는 상황에서 수정란을 대신하여 인체발생학의 연구에 귀중한 재료로 쓰일 수 있을 것이다. 그러나 무엇보다도 관심이 모으는 것은 인간의 배아간세포를 채

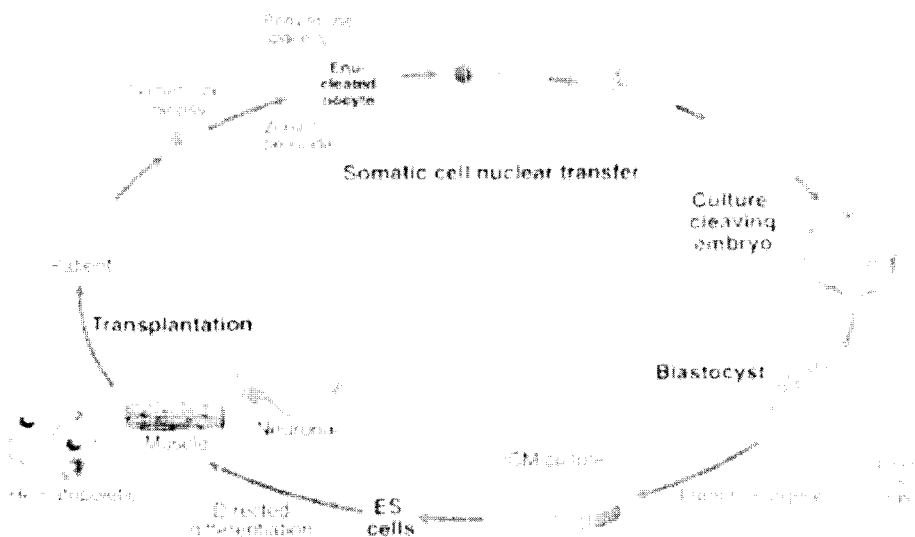


Figure 2. Procedures of stem cell therapy (Solter and Gearhart, 1999)

외분화시켜 세포나 조직의 이식이 필요한 환자에 공급할 수 있는 가능성이다. 흔히 간세포 치료 (stem cell therapy)라고 불리는 이 기술은 이제 시작 단계에 와 있으나 앞으로 급속한 발전이 예상되고 있다. 특히, 체세포 핵이식 (somatic cell nuclear transfer)이 개발되어 1997년 Wilmut 등에 의해 복제양 돌리 (Dolly)의 탄생을 필두로 하여 성체에서 얻은 체세포의 핵을 정상적인 난자의 핵과 치환하는 방법에 의해 다수의 복제동물이 탄생하였다. 이 연구는 정자와 난자의 결합에 의한 생명의 창조라는 지금까지의 개념을 뒤엎고 이미 분화된 세포를 다시 초기 발생 단계로 환원 (reprogramming)시켜 완전한 개체로의 발생이 가능하다는 것을 입증하였으며 이후 인간복제의 가능성을 놓고 지금까지도 논쟁이 계속되고 있다. Wilmut 등 다수의 연구자들은 이러한 체세포 핵이식 기술을 인간 배아간세포의 수립과 접목하여, 환자에게 이식할 때 거부반응을 일으키지 않는 조직의 생산을 시도하고 있다. Figure 2에서 보는 바와 같이 우선, 이식을 필요로 하는 환자로부터 건강한 세포를 채취한 후 이 세포의 핵을 정상적인 난자에서 핵을 제거한 자리에 이식한다. 이렇게 재조합한 난자를 시험관에서 배양하여 배아간세포를 수립한다. 그 후 배아간세포는 일정한 배양조건을 부여한 시험관내에서 혈구, 근육, 신경 등 필요한 세포들로 분화를 유도하고 이렇게 얻은 세포들을 환자의 치료하고자 하는 부위에 이식한다. 무엇보다도 이러한 세포 또는 조직은 환자 자신에서 유래한 것이기 때문에 이식하였을 때 전혀 거부반응을 일으키지 않을 것이다. 또한 만약을 대비하여 모든 사람이 자신의 배아간세포를 냉동보존 할 수도 있을 것이며 나아가서 질병치료를 도움을 주는 외래유전자를 체외분화 전후의 배아간세포에 도입할 수도 있을 것이다. 이러한 연구가 실현된다면 파킨슨씨병, 알츠하이머, 심장질환, 화상, 당뇨, 간염, 면역질환, 관절염, 각종 암에 이르기까지 세포나 조직을 이식함으로써 치료될 수 있는 모든 종류의 질병에 걸쳐 그 적용 범위는 무한하리라고 생각된다. 1999년 1월 미국 보건원 (National Institute of Health)은 인간 배아연구에 대해 연구비를 지원하지 않는다는 그 동안의 정책과는 반대로 인간 배아간세포의 연구에 정부출연 연구비의 사용을 허가하였으며, 1999년 7월에는 대통령직속 국립생명윤리자문위원회 (National Bioethics Advisory Committee)가 보건원의 결정을 지지하였다. 이에 앞서 노벨상 수상자 30여명이 백악관에 인간 배아간세포의 연구를 지지한다는 서신을 보낸 바 있다. 이는 위의 연구가 인류에게 가져다 줄 잠재적인 이익이 매우 크다는 사실을 보여준다고 하겠다. 그러나 이 연구가 비록 인간의 개체복제에까지 이르지 않는다고 그간 동물복제에 사용되었던 기술을 인간의 초기배에 적용하고 있다는 점에서 반대하는 의견도 만만치 않아 그 귀추가 주목된다.

요 약 (summary)

배아간세포의 수립은 포유동물의 분화 및 발생에 관한 연구를 획기적으로 발전시켰으며 형질전환동물에 있어서 유전자 조작의 정확도를 높임으로서 체내에서 유전자의 기능을 규명하는 데에도 크게 기여하였다. 최근에는 인간의 배아간세포가 수립되어 인간의 질병치료를 필요한 이식용 조직의 생산이 모색되고 있다. 특히 체세포 핵이식 기술과 배아간세포의 결합으로써 많은 장래에 이식시 거부반응이 없는 조직의 공급이 기대되고 있다. 그러나 그에 앞서 배아간세포 수립의 효율성을 제고하고, 목적하는 각종의 세포로 체외분화 시키는데 필요한 배양조건을 확립하여야 하며, 간세포 치료를 위한 외래유전자 도입 등에 관한 폭넓은 연구가 이루어져야 할 것이다.

REFERENCES

- Bain G, Gottlieb DI. Neural cells derived by in vitro differentiation of P19 and embryonic stem cells. *Perspect Dev Neurobiol* 1998; 5: 175-8.
- Capecchi MR. Targeted gene replacement. *Sci Am* 1994; 270: 52-9.
- Cherny RA, Stokes TM, Merein J, Lom L, Brandon MR, Williams RL. Strategies for the isolation and characterization of bovine embryonic stem cells. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6: 569-75.
- Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou JC, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998; 125: 725-32.
- Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 642-6.
- Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C, Ailhaud G. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* 1997; 110: 1279-85.
- Doetschman TC, Williams P, Maeda N. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev Biol* 1988; 127: 224-7.
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-6.
- Graves KH, Moreadith RW. Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol Reprod Dev* 1993; 36: 424-33.
- Iannaccone PM, Taborn GU, Ray L, Garton RL, Caplice MD, Brenin DR. Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev Biol* 1994; 163: 288-92.
- Matsui YD, Zsebo K, Hogan BLM. Derivation of pluripotent embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992; 70: 841-7.
- Martin GR. Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7634-8.
- Narita N, Bielinska M, Wilson DB. Cardiomyocyte differentiation by GATA-4-deficient embryonic stem cells. *Development* 1997; 124: 3755-64.
- Notarianni E, Galli C, Laurie S, Moor RM, Evans MJ. Derivation of pluripotent, embryonic cell lines from the pig and sheep. *J Reprod Fertil Suppl* 1991; 43: 255-60.
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 1992; 359: 550-1.
- Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 13726-31.
- Shim H, Gutierrez-Adan A, Chen LR, BonDurant RH, Behboodi E, Anderson GB. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. *Biol Reprod* 1997; 57: 1089-95.
- Solter D, Gearhart J. Putting stem cells to work. *Science* 1999; 283: 1468-70.

- Sukoyan M, Vatolin S, Golubitsa A. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink; comparisons of their pluripotencies. *Mol Reprod Dev* 1993; 36: 148-58.
- Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7844-8.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
- Wheeler MB. Development and validation of swine embryonic stem cells; a review. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6: 563-8.
- Wu JX, Adamson ED. Kinase-negative mutant epidermal growth factor receptor (EGFR) expression during embryonal stem cell differentiation favours EGFR-independent lineages. *Development* 1996; 122: 3331-42.
-