

## 배아간세포의 분화

## Differentiation of Embryonic Stem Cell

국립보건원 유전질환과

오 범 석

## 1. 서 론

현재 많은 종류의 만성질환이 장기이식으로 해결되고 있으며 그 유용성은 날로 증가되는 추세에 있다. 그 중에서도 우리나라를 비롯한 아시아 권에 많은 간염, 간경화, 간암 등의 간질환 등에 대한 장기이식은 최근에 우리나라에서 활발히 진행되는 분야이며 간질환에 대한 최후의 치료법으로 각광을 받고 있다. 하지만 장기이식에 따른 이식 거부반응, 면역 억제제 합병증, 공여자의 부족 등의 여러 가지 해결해야 할 문제점들이 많기 때문에 쉽게 받을 수 있는 치료는 아니다. 이런 관점에서 배아간세포를 이용한 세포치료법은 많은 장점을 갖고 있다. 한 종류의 세포에서 여러 가지의 세포, 나아가서는 조직까지도 만들 수 있기 때문에 세포배양조건을 확립하여 원하는 세포로 분화시킬 수만 있다면 만성질환 치료에 새로운 장을 열 것이다.

하지만 아직까지는 의학적 가치가 높은 간 (liver)과 같은 내배엽 조직이나 세포로의 분화는 보고되지 않고 있다. 따라서 세포배양이나 생체이식을 통하여 간세포 (hepatocyte)의 분화를 증명하고 더 나아가 생체의 분화조건을 확립하여 원하는 세포로 분화시킬 수만 있다면 만성질환 치료를 위한 장기이식을 대체할 수 있을 것이다. 따라서 본 과제는 가까운 장래에 전개될 배아간세포를 이용한 세포치료법 및 인공장기의 제조를 가능하게 하기 위하여, 윤리적으로 허용하는 범위내에서 마우스배아간세포로부터 간과 같은 내배엽 기관세포의 분화 유도에 관한 연구를 수행하였다.

## 1. 배아간세포

배아간세포 (embryonic stem cell, ES cell)는 수정란이 자궁에 착상되기 전인 포배의 내엽세포군 (inner cell mass)에서 얻어진 다능성 (pluripotent) 세포로 마우스에서는 이를 이용하여 유전자적중 (knock-out) 마우스를 만드는데 널리 사용하고 있다. 포배의 내엽세포군은 유전자의 체계적인 발현을 통하여 배형성 (gastrulation), 신경배형성 (neurulation), 기관형성 (organogenesis)을 거쳐 새로운 개체를 형성하는 중요한 세포로 이 발생 과정 동안 세포이동, 증식, 분화를 통하여 모든 조직이나 기관을 형성하게 되므로 이론적으로 우리가 필요로 하는 모든 세포를 배아간세포를 통하여 얻을 수 있다.

배아간세포는 미분화 상태로 세포배양이 가능하므로 세포의 대량공급이 가능하며 유전자적중법 (homologous recombination)이 유일하게 가능하여 선천성 유전질환의 치료에 적합하다. 또한

핵치환기술을 이용하여 자기배아간세포의 확립이 가능하므로 세포이식에 따른 면역 거부반응의 문제점을 해결할 수 있다. 따라서 배아간세포를 이용한 세포나 조직 대체치료를 사용하고자 하는 움직임이 전세계적으로 확산되고 있으며 (Solter and Gearhart, 1999), 1998년 사람의 배아간세포가 개발된 이후 (Thomson et al., 1998) 이의 사용을 놓고 미행정부와 과학자간의 열띤 공방이 계속되다가 지난 8월 지침이 확정되어 정부의 지원을 받을 수 있게 되었다. 또한 영국에서는 간세포를 이용한 연구를 활성화 시키기 위하여 그 법안을 국회에서 통과시켰으며 미국의 The Juvenile Diabetes Foundation (JDF)는 간세포 연구를 활성화 하기 위하여 자금을 지원하겠다고 발표하였다.

## 2. 배아간세포의 분화

오래 전부터 마우스배아간세포의 연구를 통하여 조혈모세포, 심장근세포, 신경세포 등의 분화가 가능하며 (Doetschman et al., 1985), 생체에 이식한 경우 내배엽의 상피세포 (epithelial cell), 장 (gut)과 같은 조직, 중배엽의 뼈, 연골, 근육, 외배엽의 신경상피세포, 신경배세포 (neuroblast), 배아신경절세포 (gangliocyte)와 같은 조직이 나타나는 것을 알았다 (Thomson et al., 1998; Wobus et al., 1984; Martin 1981). 최근에 dopamin을 분비하는 신경세포로의 분화 및 지질세포, 조혈모세포의 분화에 성공하였으며, 또한 feeder 세포를 이용한 동시배양 (coculture)을 통하여 파골세포 (osteoclast)를 분리하는데 성공하였다 (Lee et al., 2000; Dani et al., 1997; Nakano et al., 1994). 유전자 조작을 이용하여 배아간세포의 분화를 유도한 결과 인슐린을 분비하는 췌장의 베타세포와 심장근세포의 분화에 성공하였는데, 인슐린과 myosin heavy chain 유전자의 발현조절 염기서열을 보고 유전자인  $\beta$ -galactosidase와 선택유전자인 neomycine resistance 유전자의 coding 염기서열과 결합시켜 만든 유도선택 vector를 배아간세포에 주입 (transfection)시킨 후 인슐린이나 myosin heavy chain 유전자를 발현하는 배아간세포를 선택 배양하였다 (Soria et al., 2000; Klug et al., 1996). 오스트레일리아의 Pera팀은 미국의 Thomson에 이어 두 번째 인간배아간세포를 만들어 실험실 배양조건에서 신경세포로의 분화를 성공하였으며 (Reubinoff et al., 2000), 이스라엘의 Benvenisty팀은 인간배아간세포를 이용하여 실험실에서 여러 가지 성장요소 (growth factor)를 처리한 결과 상피세포나 간엽세포 (mesenchyme)로 분화시킬 수 있다고 보고하였다 (Schuldiner et al., 2000).

배아간세포로부터 분화된 세포들의 효능을 검사하기 위하여 동물모델을 이용하여 이식한 결과 신경세포를 이용하여 척수의 손상을 치료하였고 myelin이 결핍된 쥐에 이식시켜 유전성 신경질환을 치료하였고, 유전자조합법을 이용하여 얻은 베타세포를 이용하여 당뇨모델마우스를 치료하여 배아간세포치료법의 가능성을 입증하였다 (McDonald et al., 1999; Brustle et al., 1999; Soria et al., 2000).

## II. 연구 결과

### 1. 생체이식 후 배아간세포의 분화 연구

본 실험에 사용된 배아간세포는 129/Sv계 마우스에서 확립된 세포주 (ES pro)로써 포항공대 유전학 연구실 (신희섭교수)에서 분양받아 실험에 사용하였다.  $10^6$ 개의 미분화 배아간세포를 유전적 동계 (syngenic)인 129Sv/J 마우스의 뒷다리 근육과 비장에 이식하여 3주 동안 형성된 기형종

(teratoma)을 조직학적인 검사를 한 결과 신경외배엽 (neuroectoderm) 세포가 주로 관찰되었으나 간세포 (hepatocyte)는 발견할 수 없었다. 하지만 면역성이 억제된 *nude* 마우스의 비장에 이식한 결과 기형종에서 간세포처럼 보이는 세포를 관찰할 수 있었다. 이 세포는 간세포와 같이 큰 핵과 풍성한 세포질을 가졌으며 그 조직의 모양이 동관형 (sinusoid)의 구조를 보였다. 이 *nude* 마우스 기형종에서는 또한 침샘 (salivary gland)과 유사한 세포, 원시적인 갑상선 (primitive thyroid follicular) 세포, 연골세포, 장과 유사한 세포, 췌장세포, 미숙한 지질세포 그리고 줄무늬의 근육 세포 등을 관찰할 수 있었다.

기형종에서 관찰된 간세포를 검증하기 위하여 특이단백질 항체를 이용하여 세포면역법을 시행하였다. 이중 간세포 (HER-PAR) 항체는 사람의 간세포에서 전이된 암을 검증하기 위하여 널리 사용되는 항체이며 HER-PAR 항원이 아직 안 밝혀 있으므로 마우스에서 이 항체를 검사하였다. HER-PAR 항체는 마우스의 담즙 (biliary) 세포는 인식하지 않으나 간세포는 강하게 인식하였다. 하지만 13.5일과 16.5일의 마우스태아 간세포는 인식하지 않아 분화된 간세포에 특이한 것으로 보인다. 이 항체를 배아간세포에서 만들어진 기형종에 조사한 결과 아주 특이하게 동형관구조를 갖는 세포에만 염색되었다.  $\alpha$ -fetoprotein (AFP)은 태아간에서만 분비되는 특이단백질로서 이에 대한 항체를 이용하여 기형종에 존재하는 간세포의 분화정도를 조사하였다. 그 결과 AFP 항체는 기형종의 간세포 지역의 세포를 특이하게 인식하였다. 하지만 모두는 아니고 일부분의 세포를 인식하였고 따라서 배아간세포로부터 분화된 간세포는 분화정도의 차이를 갖고 있음을 알 수 있다.

배아간세포로부터 분화된 간세포가 기능을 갖는지를 조사하기 위하여 간세포의 세포막에 존재하며 아미노산의 운반에 관여하는 N-system amino acid transporter (mNAT)의 발현을 세포면역법으로 확인하였다. 또한 periodic-acid Schiff (PAS) 염색으로 뮤코다당 (mucopolysaccharide)의 합성을 조사하였다. 적은 수이기는 하지만 두 물질의 발현을 확인할 수 있었고 따라서 배아간세포에서 분화된 간세포는 기능을 갖는 성숙한 세포로의 분화가 가능하다는 것을 시사하였다. 이 결과는 배아간세포에서 처음으로 간세포로의 분화를 보여주었으며 생체에서 분화된 간세포는 그 분화정도가 다양하다는 것을 보여준다.

## 2. 세포배양을 통한 배아간세포의 자연분화

배아간세포를 feeder 세포가 제거된 상태에서 cytokine인 LIF를 포함하지 않은 배지에서 배양하여 분화를 유도하였다. 부유배양법, 부착배양법, 부유/부착 혼합 배양법 등 세가지 방법으로 분화배양하여 배양 1주와 2주째에 간세포의 특이유전자인 AFP와 albumin (ALB)의 발현을 조사한 결과 배아간세포는 부유배양 환경에 노출되었을 때 간세포로의 전환이 가장 많이 진행되는 것으로 확인되었다.

따라서 배아간세포의 간세포로의 전환을 보다 효율적으로 하기 위해 부유배양을 선택하여 배양하였고, 간세포로의 전환에 미치는 배양기간의 영향을 알아보기 위해 총 5주 동안 배양하여, 일주일 간격으로 간 특이유전자인 AFP, ALB의 발현을 확인하였다. AFP의 경우 일주일간 배양하기 시작하면서부터 서서히 나타나기 시작하여 2주 배양 후부터는 강하게 발현되어 그 상태를 배양하는 기간 내내 계속 유지하였고, ALB의 경우 2주 배양하면서부터 발현되기 시작하여 배양을 장기간 할수록 그 양이 점점 증가하는 것으로 나타났다.

분화된 배아간세포들이 확실히 간세포로 분화되는지를 확인하기 위하여 좀더 광범위하게 간

특이유전자들의 발현을 조사하였다. Apo AI은 1주째부터 약하게 signal이 보이기 시작하면서 2주부터는 강하게 계속 발현되는 양상을 관찰할 수 있었고, Apo AII는 배양 2주째부터 발현되기 시작하여 배양기간이 연장될수록 발현량이 증가하는 것으로 관찰되었다. Dipeptidyl peptidase (DPP)는 처음 배양을 시작할 때부터 강하게 발현되어 배양기간 내내 강한 signal을 유지하였고,  $\alpha$ -1 antitrypsin과 Aldolase b는 2주부터 약하게 발현되기 시작하여 3주부터는 강하게 발현하는 양상을 보여주었고, Phenylalanine hydroxylase (PAH)는 배양 3주까지는 발현되지 않다가 4주째에 발현이 시작되는 것으로 나타났다. 이 결과들을 종합하면, EB 상태로 부유배양을 하게 되면 간세포로 분화를 효율적으로 유도할 수 있으며, 배양기간이 연장될수록 기능적으로 좀더 다양하고 성숙된 간세포로 분화되는 것을 발견할 수 있다.

### III. 결론 및 고찰

본 실험 결과 부유배양법은 간세포분화에 있어서 유의한 결과를 보여주었고 따라서 이런 세포군락에 적절한 외부자극이나 지속적인 배양조건으로 장시간 (5~6주) 배양하면 AFP에 염색되는 세포 중에서 간세포를 확인할 수 있을 것으로 기대하고 있다. 따라서 배아간세포를 부유배양법으로 1주부터 5주까지 분화를 시킨 후 EB를 조직검사와 세포면역법으로 조사하는 중이다. 또한 한국화학연구소의 화합물은행이 보관하고 있는 30,000만개의 화합합성물 중 대표화합물 3,000여종을 스크리닝하여 간세포유도체를 찾고 있는 중이다.

우리나라는 1988년에 간이식이 처음 실시된 이후에 1997년까지 120회의 간이식이 시행되었고 현재는 생체 부분 간이식을 포함하여 연간 100회 이상의 간이식이 시행되고 있다. 비록 100개 이상의 병원에서 연간 3,000회 이상의 간이식을 실시하는 미국에 비교하면 아직 미미하다고 할 수 있으나 미국에 비해서 만성 간질환이 상대적으로 많은 우리나라로서는 간이식에 대한 중요성이 크다. 만약 배아간세포에서 분화된 간세포가 만성질환 환자의 생체에서 정착되고 분열하여 고유의 세포군을 대치할 수 있다면 만성간질환의 치료에 있어서 새로운 혁명이라 생각이 되고 이러한 시도들이야 말로 간이식을 비롯한 여러 가지 치료법들이 할 수 없었던 일들을 할 수 있으리라 기대한다. 또한 장기공여자의 부족과 장기이식 거부반응과 같은 문제점을 안고 있는 현실에서 핵치환에 의한 자기 자신의 배아간세포가 가능해진다면 배아간세포의 세포치료법은 장기이식의 가장 큰 단점을 극복할 수 있을 것이다.

끝으로 배아간세포의 사용은 윤리적인 문제를 안고 있으며 따라서 그 사용에 관하여 더욱 많은 관심을 가져야 할 것이다. 사람의 배아간세포를 처음으로 만든 미국 위스콘신 (Wisconsin)대의 James Thomson은 비영리단체 (nonprofit organization)인 WiCell을 통하여 인간배아간세포를 제공하고 있으나 그 협약조건을 까다롭게 만들어 배아간세포가 잘못 이용되는 것을 막고 있다. 장기간에 걸친 미국의 간세포에 대한 청문회 결과 지난 8월 미국의 국립보건원에서 사람의 배아세포 사용에 관한 새로운 지침이 발표되었다. 그 지침을 요약하면, 연구자가 국립보건원의 연구비를 이용하여 인체배아세포의 연구를 할 수 있으나 사립재단에 의하여 확립된 세포주에 국한된다. 즉 배아간세포는 불임치료를 위하여 생산된 냉동보관된 배아에서만 얻어진 세포이어야 하며 배아제공자의 승인이 있어야 한다. 또한 연구자가 보건원 연구비를 사용하여 배아로부터 다능한 세포를 얻을 수 없으며 단순히 연구를 위하여 만들어진 배아에서 얻어낸 간 (stem) 세포는

사용할 수 없다. 핵치환기술이 적용된 간세포를 사용할 수 없으며 사람의 간세포와 동물의 배아를 섞을 수 없다. 간세포를 이용하여 배아를 만들거나 섞을 수 없다고 지침은 못 박고 있다.

### 참 고 문 헌

- Brüstle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, *et al.* Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 1999; 285: 754-6.
- Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C, *et al.* Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes *in vitro*. *J Cell Sci* 1997; 110: 1279-85.
- Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morph* 1985; 87: 27-45.
- Klug MG, Soonpaa MH, Koh GY, Field LJ. Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts. *J Clin Invest* 1996; 98: 216-24.
- Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7634-8.
- McDonald JW, Liu X, Qu Y, Liu S, Mickey SK, Turetsky D, Gottlieb DI, *et al.* Transplanted embryonic stem cells survive, differentiate and promote recovery in injured rat spinal cord. *Nat Med* 1999; 5: 1410-2.
- Nakano T, Kodama H, Honjo T. Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. *Science* 1994; 265: 1098-101.
- Lee S-H, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 2000; 18: 675-9.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nature Biotechnology* 2000; 18: 399-404.
- Schuldiner M, Yanukur O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11307-12.
- Solter D, Gearhart J. Putting stem cells to work. *Science* 1999; 283: 1468-70.
- Soria B, Roche E, Berná G, León-Quinto T, Reig JA, Martín F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000; 49: 157-62.
- 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.
- Vogel G. Researchers get green light for work on stem cells. *Science* 2000; 289: 1442-3.
- Wobus AM, Holzhausen H, Jäkel P, Schöneich J. Characterization of a pluripotent stem cell derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 1984; 152: 212-9.