

Establishment of Human Embryonic Stem Cells Derived from Frozen-Thawed Blastocysts

마리아 기초의학연구소/생명공학연구소, 마리아병원*

김은영 · 박세필 · 임진호*

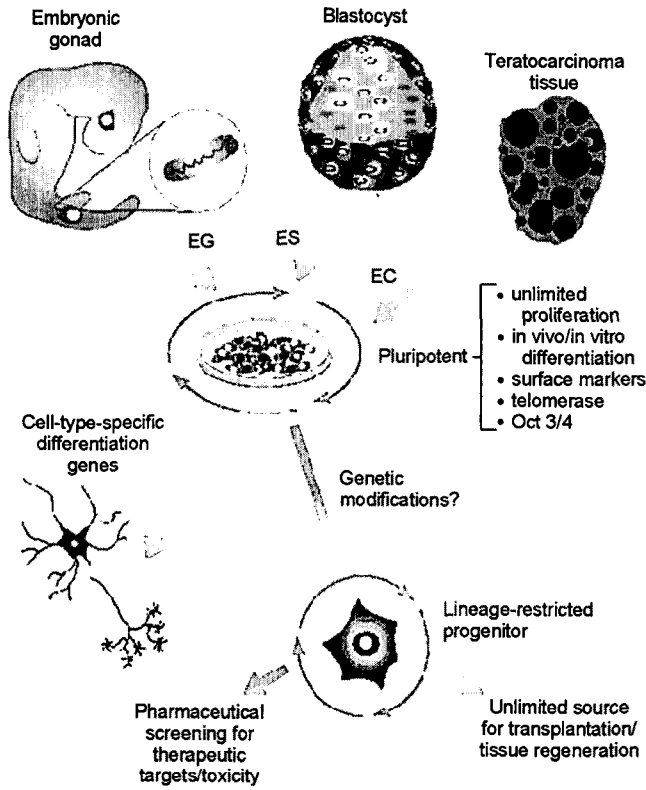
I. 서 론

인간 배아 간 (幹) 세포 (embryonic stem cell)의 배양 및 분화 기술은 21세기 가장 핵심적인 생명공학 기술 중의 하나이다. 배아 간세포는 인간의 210여 개의 장기를 구성하는 조직으로 분화할 수 있는 무한한 잠재력을 가진 만능세포로, 분화가 억제되고 증식만이 가능한 세포를 말한다 (Thomson 등, 1998). 이들은 초기 인간의 배아 연구 뿐만 아니라, 신규 성장인자 및 의약 개발, 질병 치료, 이식 치료학에 널리 이용될 수 있다는 점에서 최근 의료·생명공학 분야에서 활발하게 연구가 진행되고 있는 추세이다 (Reubinoff 등, 2000). 따라서 이 사업의 핵심 기술은 간세포를 분화되지 않은 상태로 계속 배양할 수 있는 배양 기술, 그리고 필요할 때에는 원하는 조직세포로의 분화를 유도할 수 있는 기술로 나눌 수 있다. 하지만 이 기술은 국외에서도 일부 연구자들만이 성공할 정도로 매우 어렵고 고난도의 기술을 요하는 것으로 알려져 있다.

본 연구소에서는 인간의 불임시술과정에서 사용되고 남은 잉여배아를 5년 이상 동결보존한 뒤 폐기될 처지에 놓인 냉동 잉여배아로부터 배아 간세포 제작 및 분화의 적정화를 유도하였던 바, 이에 대해 얻어진 연구 결과에 대해서 기술하고자 한다.

II. 인간 배아 간세포에 대한 연구

인간 배아 간세포에 대한 연구는 1998년 미국 위스콘신대와 존스홉킨스대 (Shamblott 등, 1998; Thomson 등, 1998)에서 각각 인간 배아 간세포의 수립을 보고함으로써, 간세포는 초기 인간 배아 연구를 포함한 의약품의 개발 및 질병 치료 그리고 이식대체요법에 획기적으로 사용될 수 있을 것으로 전망되었다 (Figure 1). 난치병으로 알려진 파킨슨씨병, 알츠하이머병, 척추손상에 의한 사지마비, 중풍, 소아당뇨병, 심근경색, 간경화 등의 질환은 각 조직을 구성하는 세포의 파괴 및 영구적 기능 장애에 의해 초래되며, 이들 질환에 파괴되어 부족한 세포를 외부로부터 이식해주는 세포대체요법 (cell replacement therapy)이 이들 질환을 치료할 수 있는 가장 근접한 방법이라 여겨지고 있다 (Geron, 1999). 성인 간세포는 골수 이식과 같은 한정된 부분에서 주로 이용되어 왔으나 인간 배아 간세포는 상기에서 기술한 바와 같이 만능세포로 모든 조직의 치료요법에 이용될 수 있다. 하지만 배아 간세포는 인간 배아를 이용해야 하기 때문에 그 수급에 어려움이 있으며 윤리적인 문제 또한 지적이 된다. 따라서, Thomson 등 (1998)은 시험관 아기 시술 후 남은 몇 안 되는 신선 잉여배아를 환자의 동의를 받고 사용하여 배아 간세포를 제작하였으며, 그 배아 간



© Bob Crimi

Figure 1. An illustration of the different human tissue sources for pluripotent cell derivation. (Nature Biotechnology 18, 381-382, 2000)

세포를 면역 결핍된 마우스에 주입함으로써 외배엽 (신경과 피부세포), 중배엽 (근육조직, 연골 조직, 뼈) 및 내배엽 (내장 상피세포)으로의 분화능력을 간접적인 분화유도 방법을 통해 확인하였다. Shambloott 등 (1998)은 5주 내지 9주령의 유산된 태아의 원시생식세포에서 분화되지 않은 원시생식세포를 배양함으로써 간세포를 얻는데 성공하였다. 이후 2000년 Reubinoff 등은 수정 후 6일된 배반포기배에서 얻어진 배아 간세포가 생체내 및 생체외에서 원하는 특정 조직세포로의 분화가 가능함을 발표하였으며, 생체내 배양으로는 면역 결핍된 마우스에서 외배엽, 중배엽 및 내배엽으로의 분화능력을 간접적으로 확인하였고, 생체외 배양으로는 신경세포로의 분화능력을 직접적인 분화유도 배양 방법을 통해 확인하였다. 이처럼 인간 배아를 이용한 배아 간세포의 개발은 상기에서 설명한 바와 같이 배아의 수급사정 및 윤리적인 문제·간세포 제작의 기술적 어려움 때문에 신선 배아만이 이용될 수 밖에 없었으나, 2000년 본 연구소에서는 불임시술 후 5년 이상 냉동 보관된 뒤 폐기될 위기에 처한 잉여배아를 이용하여 배아 간세포 제작에 성공하였으며 이를 이용하여 심근세포로의 분화를 확인하였고 최근에는 신경 및 신경보조세포 그리고 근육세포로의 분화 가능성을 확인한 바 있다.

III. 냉동 잉여배아로부터 배아 간세포 제작

1. 인간 난자

본 실험은 인간 시험관 아기 (human IVF) 프로그램으로부터 생산된 여분의 난자를 5년 이상 동결 보관해 두었던, 어쩔 수 없이 폐기될 처지에 놓여 있는 배반포기배 단계의 난자를 환자의 동의를 받고 사용하였다.

2. 인간 배반포기배의 동결과 용해

인간 배반포기배의 동결은 시험관 아기 프로그램에서 5, 6일에 생산된 난자를 20% 인간 난포액이 함유된 용액에서 10분간 노출시킨 뒤 5% glycerol과 9% glycerol, 0.2 M sucrose 동결 보호제가 함유된 용액에 각각 10분간 노출하여 straw에 넣어 slow-program 동결기에서 동결한 뒤 액체질소에 보관되었다 (Menezo, 1996). 본 실험에 사용된 난자의 용해는 난자 내에 들어있는 동해제를 제거하기 위해 용해된 배반포기배를 단계적으로 5%, 3% 그리고 1% glycerol이 함유된 용액에서 각각 5분간 처리한 뒤 0.2 M sucrose에서 2분간 처리하였으며 20% 인간 난포액에서 세척하였고, 이 과정에서 살아남은 난자는 24시간 동안 세포 배양기에서 배양하였다 (자체 개발된 용해 방법).

3. 항-인간세포 항체의 생산

본 연구를 수행하기 위해 자체 개발된 것으로, 태아로 될 내부세포피 세포 inner cell mass (ICM) cells만을 회수하기 위해 만들어진 특이 항체이다. 인간세포 유래의 항원은 면역증강제 (RIBI adjuvant, R-700 또는 Freund's adjuvant)와 혼합된 뒤 항체 생산주로서 토끼에 2주 간격으로 4회 주사하여 마지막 주사일로부터 10일 후에 토끼의 심장으로부터 회수된 항체이다.

4. 영양배엽세포로부터 내부세포피 세포를 회수하기 위한 면역절제술

배반포기배는 태아로 자랄 운명인 내부세포피와 태반으로 자리잡을 영양배엽세포로 구성되어 있다. 본 실험에서 얻고자 하는 시료는 내부세포피이다. 용해 후 살아남은 배반포기배는 일차적으로는 난자를 둘러싸고 있는 투명대 (zona pellucida)를 0.25% pronase로 제거시키고, 단백분해효소의 독성을 제거시키기 위해 충분히 배양시킨 후 1 : 20의 항인간세포 항체에 30분간 노출시킴으로써 항원 항체 반응을 유기하고, 여기에 guinea pig complement를 30초간 처리함으로써 영양배엽세포를 괴사시켰다. 이와 같이 처리된 난자에서 미세한 pipette을 이용하여 내부세포피만을 회수하였고 회수된 내부세포피는 STO 세포 위에 놓음으로써 공동배양을 실시하였다.

5. STO (mouse embryonic fibroblast) 세포의 준비

배반포기배로부터 회수된 내부세포피가 체외에서 배아 간세포로서 분화되지 않고 증식만을 하게 하기 위해서는 분화억제제와 관련된 여러 인자들을 배양시에 첨가해 주어야만 한다. STO 세포는 분화억제인자를 분비하는 세포주로서 일반적으로 배아 간세포 제작시에 많이 사용되는 세포이다. 또한 분화억제인자로서 배양액에 백혈병억제인자 (leukemia inhibitory factor; LIF)를 첨가한다. STO 세포는 ATCC (American type culture collection)로부터 구입되었으며, 배양용기에서 2일에

한번씩 계대되어지며, 내부세포괴의 배양에 사용되기 위해서는 mitomycin-C에 2시간 반 가량 처리시킨 후 회수된 세포를 소적으로 제작하여 이용되었다.

6. 내부세포괴 세포의 배양 및 계대배양

STO 세포와 공동배양된 내부세포괴 세포는 20% FBS, 1 mM L-glutamine, 1% non-essential amino acid와 0.1 mM β -mercaptoethanol이 들어있고 2000 unit의 LIF가 들어있는 DMEM (Gibco, high glucose 4.5 g/L, no pyruvate)에서 매일 신선하게 배양되었으며, 배양 후 형성된 내부세포괴 덩어리는 새로운 STO 소적으로 옮겨 주었다. 이와 같은 내부세포괴 덩어리는 여러 덩어리로 나누어 대략 7일에 한번 정도 새로운 STO 소적에서 배양하였다.

7. 배아 간세포 확인

i) 형태학적 관찰

용해된 배반포기 배아 총 6개로부터 면역절제술에 이용될 수 있는 4개의 배아를 얻는데 성공하였고, 영양배엽세포로부터 성공적으로 분리된 4개의 내부세포 덩어리로부터 2개가 자리잡아 colony를 형성하였으며, 이 2개의 colony는 여러 개로 나누어 재배양을 유도하였고, 그 중 1개의 replating된 내부세포괴 덩어리는 40회 (면역절제술 후 대략 200일) 계대되는 동안 분화되지 않고 계속 성장되었다. 이와 같은 내부세포괴 세포의 발달양상은 현미경 하에서 매일 관찰하였고, 배아 간세포로의 발달 가능성 평가 기준은 Thomson 등 (1998)과 Reubinoff 등 (2000)의 논문에 근거하였다.

ii) Alkaline phosphatase activity 측정

이 방법은 미분화된 간세포의 표식인자로 가장 많이 사용되는 것으로서, 배아 간세포로 추정되는 세포 덩어리는 4% formaldehyde에서 15분 고정시키고 멸균 증류수로 세번 정도 세정한 뒤 Fast Red TR/Naphthol AS-MX 용액 (Sigma Chemical Co.)을 이용하여 15~30분간 염색하여 그 염색 정도를 관찰하였다. 이 방법 또한 Thomson 등 (1998)과 Reubinoff 등 (2000)의 논문에 근거하였다.

iii) Oct-4 발현 유무 확인

Oct-4는 초기 배아와 생식선, 그리고 배아 간세포에서 특징적으로 강하게 발현되는 인자로 alternative splicing form으로 a와 b 형태가 존재한다. 배아 간세포 colony는 일반적인 처리 방법이

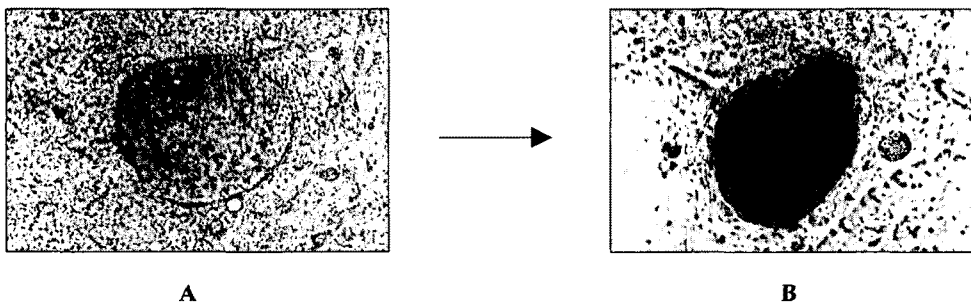


Figure 2. Alkaline phosphatase activity assay of ES colony. A: ES colony formation after ICM plating, B: Alkaline phosphatase staining of ES colony (Adapted from Maria Infertility Medical Institute, 2001).

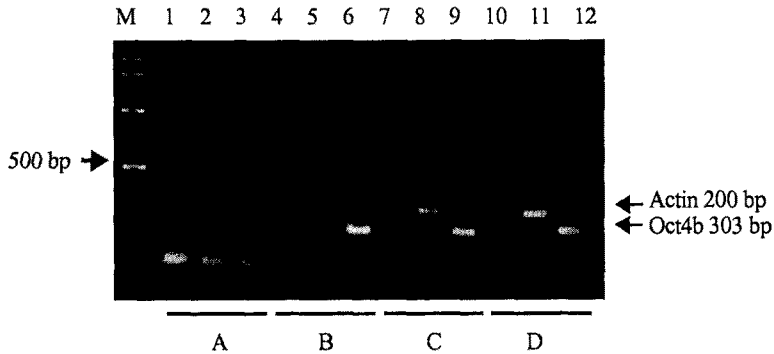


Figure 3. Comparison of expression of Oct4 in embryoid body (EB) and embryonic stem (ES) colony. A: EB, B-D: ES colony in 8, 15, 30 passage, respectively. M; DNA ladder, 1, 4, 7 & 10; Oct4a, 2, 5, 8 & 11; Oct4b, 3, 6, 9 & 12; β -actin (adapted from Maria Infertility Medical Institute, 2001).

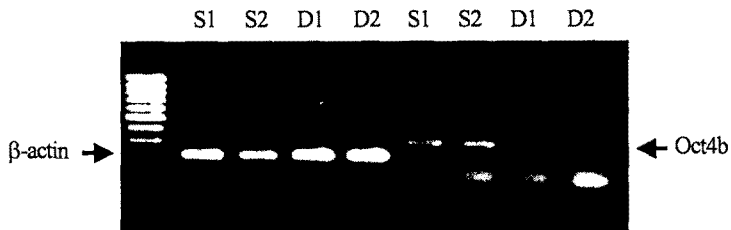


Figure 4. Comparison of expression of Oct4b in embryonic stem (S) and differentiated stem (D) colony (adapted from Maria Infertility Medical Institute, 2001).

아닌 whole cell extraction (Daniels 등, 2000) 과정을 통해서 RNA를 추출하였고, 이를 이용하여 cDNA를 준비하였다. PCR은 94°C에서 1분, 55°C에서 1분 그리고 72°C에서 1분간씩 35회를 실시하였고, 증폭된 산물은 1% agarose gel에서 ethidium bromide 염색으로 확인하였으며 image analyzer (Biorad)에서 조사하였다. Oct-4에 대한 primer는 Takeda 등 (1992)의 논문에 근거하여 다음과 같이 준비하였다 (antisense primer는 Oct-4a,b 동일, 5'-CCACATCGGCCTGTGTATAT-3', 그리고 sense primer는 각각 다름, Oct-4a: 5'-CTCCTGGAGGGCCAGGAATC-3', Oct-4b: 5'-ATGCATGAGTCAGT-GAACAG-3'). 그 결과, Oct-4는 a type 보다는 b type이 뚜렷하게 나타났으며 Oct-4b는 배아 간세포 colony는 나타나지만 embryoid body나 분화된 colony에서는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 Reubinoff 등 (2000)의 결과와 일치한다.

IV. 배아 간세포로부터 특정세포로의 분화유도

1. 분화유도 배양액

배아 간세포는 자연 발생적 분화 (spontaneous differentiation)의 특성이 강하다 (Reubinoff 등, 2000). 배아 간세포를 배양하는 과정에서 배아는 고전적인 모양의 colony, 내외장의 형태를 갖춘

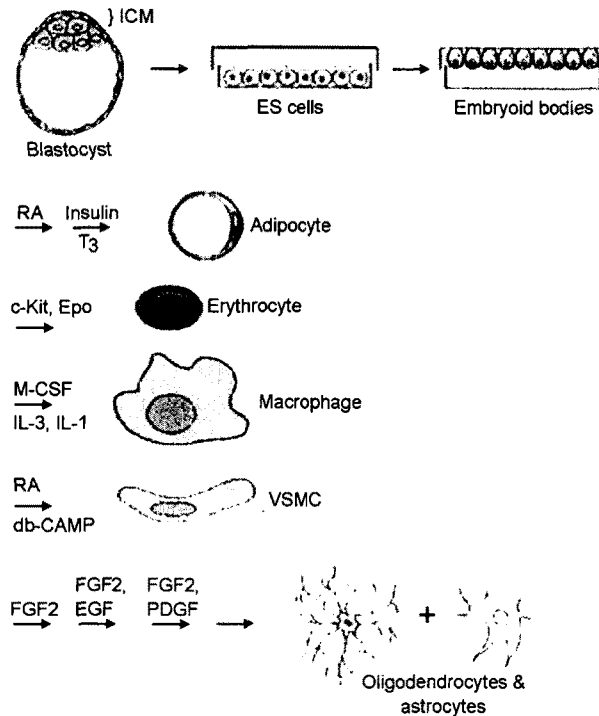


Figure 5. Differentiation Potential of Embryonic Stem (ES) Cells. ES cells are isolated from the ICM (inner cell mass) of a blastocyst, cultured, and then differentiated as embryoid bodies. Given the proper combination of growth factors, these embryoid bodies can develop into such diverse cell types as adipocytes, erythrocytes, macrophages, vascular smooth muscle cells (VSMC), oligodendrocytes, or astrocytes (see Keller et al. 1993; Dani et al. 1997; Drab et al. 1997; Brustle et al. 1999). RA, retinoic acid; T₃, triiodothyronine; Epo, erythropoietin; M-CSF, macrophage colony stimulating factor; IL, interleukin; db-CAMP, dibutyryl cyclic AMP; FGF, fibroblast growth factor; EGF, epidermal growth factor; PDGF, platelet-derived growth factor. (Cell 2000; 100: 143)

colony, 분화되는 colony 등 다양한 양상으로 나타난다. 인위적인 분화유도는 분화양상으로 가는 일부의 colony를 옮겨서 배양하거나, embryoid body를 이용한다. 일반적으로 embryoid body는 간세포를 혈청이 없는 배양액 내에서 부유배양하였을 때 형성되는 것으로 알려져 있으나 분화되는 세포군에서 과밀도 상태가 될 때 형성되기도 한다. 특정세포로의 분화유도는 STO feeder 세포가 없고 LIF가 첨가되지 않는 환경에서 내부세포피의 배양에 사용된 기본 배양액 (L-glutamine, non-essential amino acid와 20% FBS가 들어있는 DMEM)에 성장인자를 첨가하여 줌으로 유도하였다. 배아 간세포의 분화유도 연구에 있어서, 적절한 성장인자들을 조합하여 배양액 내에 첨가하면 배아 간세포는 특정세포로의 분화유도가 가능하다고 알려져 있지만 (Figure 5), 최근 Shuldiner 등 (2000)에 의해 밝혀진 바에 따르면 각각의 성장인자가 단일 세포 형태로만의 분화를 유도하지는 않으며 개별 성장인자에 의해서 분화가 유도되더라도 다양한 세포 형태가 나타난다고 보고한 바 있다. 본 실험에서도 특정세포로의 분화를 위해서 각 세포군의 발달에 맞는 성장인자를 첨가하여 비교 조사하였던 바 배양기간이 길어지고 계대배양을 할수록 특정세포로의 특성은 뚜렷해지지만 이 시기에도 여러 세포가 혼합된 형태임을 알 수 있었다.

2. 심근세포로의 분화

일부의 배아 간세포 colony는 내외강이 반복적으로 형성된다. 이와 같이 형성된 분화과정 중에 있는 colony에서 내외강만을 절제하여 1 μ M의 retinoic acid가 첨가된 배양액 내에서 배양하게 되면 일부의 세포군에서 다음과 같은 심근세포가 형성됨을 확인할 수 있었고, 이러한 세포군의 심근세포로의 검증은 형태학적 특징인 규칙적인 심박수 (heart beat, 60회/분 이상)로 확인하였다.

3. 신경세포로의 분화

Embryoid body나 상기에서 언급한 분화과정 중에 있는 colony를 1 μ M retinoic acid, 10 ng/ml basic fibroblast growth factor, 100 ng/ml nerve growth factor를 단독으로 또는 혼합하여 첨가된 배양 환경에서 배양하였을 때, 초기 분화 상태에서는 다양한 세포 형태가 혼합된 형태를 나타내지만 배양기간이 길어지고 계대배양을 할수록 신경세포로의 특성이 뚜렷해진다. 형태학적인 구분과 더불어 면역세포화학적 염색 방법을 사용하여 신경세포 고유의 특성을 나타내는 neurofilament 200 kDa protein과 microtubule associated protein 2 그리고 β -tubulin 인자가 확인되었다. 또한, glial fibrillary acidic protein (GFAP)와 galactosebroside (GalC)에 대한 polyclonal 항체를 이용하여 신경보조세포의 존재도 확인하였다. 이 방법은 Reubinoff 등 (2000)의 방법에 근거하였다.

4. 근육세포로의 분화

심근세포와 동일한 분화 배양과정 중에 있는 세포군의 일부는 근육세포의 형태를 나타내는데 이와 같은 형태의 세포도 면역세포화학적 염색 방법을 사용하여 조사하였다. Muscle actin에 특이적으로 반응성이 있는 monoclonal 항체와 이 항체에 반응성이 있으면서 FITC가 붙어 있는 2차 항체를 사용하였다. 이 방법은 Reubinoff 등 (2000)의 방법에 준하여 실시하였다.

V. 배아 간세포의 동결보존 및 융해

배아 간세포의 장기간 보존 가능성을 알아보기 위해 동결을 실시하였다. 배아 간세포의 동결을 위해서 동결액은 배아 간세포의 배양액에 10% DMSO를 첨가하여 필터한 후 사용하였고, 동결액에 대한 독성을 줄이기 위해서 배아 간세포 colony를 동결액이 들어있는 동결 튜브에 직접 넣었으며 동결은 -20 $^{\circ}$ C에서 2시간 두었다가 -70 $^{\circ}$ C에서 보관하였다. 융해시 배아 간세포가 들어있는 동결 튜브는 36 $^{\circ}$ C 수조에서 완전히 융해하였으며 동결 튜브 안에 있는 내용물은 배아 간세포 배양액에 넣어 동해제를 제거하였고, 회수된 배아 간세포 덩어리는 곧 바로 배양용기에 넣어 그 생존능을 조사하였다.

VI. 실험의 의의 및 전망

배아 간세포를 제작하고 분화시켜 세포치료요법에 사용하는 기술은 1998년 이후 그 가능성이 제시되어 전세계의 많은 연구자들이 같은 실험 결과를 목표로 매진하고 있으나 아직까지는 세포 치료요법 단계에서 뚜렷한 결과가 없는 과정 중에 있다. 선진국과 비교해 볼 때 우리나라는 생명

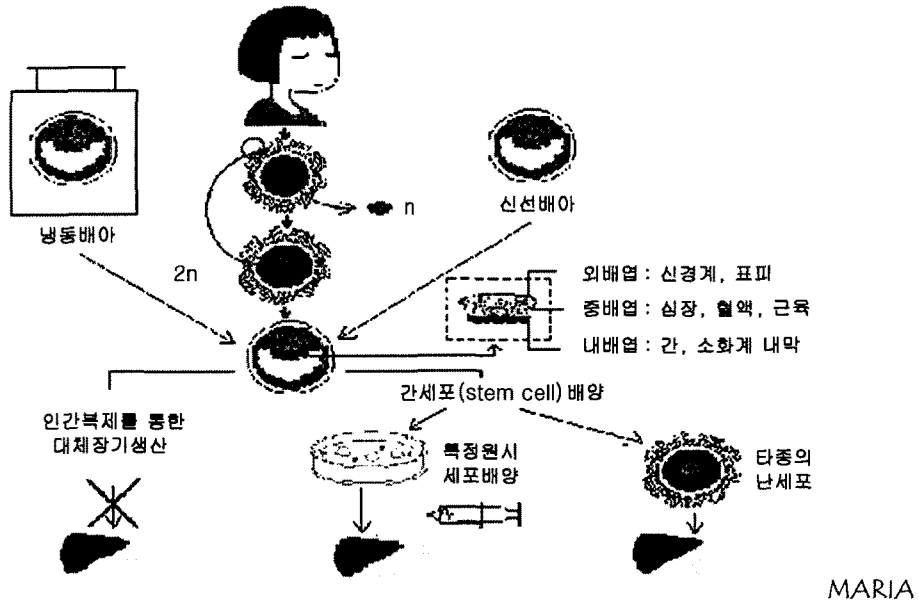


Figure 6. 배아 간세포를 이용한 난치병 치료

공학 분야가 연륜이나 규모 면에서 취약하지만 기술적 수준이 높아, 배아 간세포 제작 기술의 경우 선진국과 크게 차이가 나지는 않는다. 특히 본 실험실에서 실시한 폐기될 냉동 잉여배아를 이용하는 배아 간세포의 제작은 신선 배아를 이용하는 경우보다 윤리적인 문제를 배제할 수 있고 배아 간세포의 무한한 이용 가능성이 긍정적인 평가가 이루어져, 최근 영국에서도 배아 연구 뿐만 아니라 난치병 치료 목적의 배아 복제에 대한 연구조차도 의학적·의료적 효용성 때문에 윤리적 문제를 최소화 하면서 정부 차원에서 허용되고 있고, 2000년 미국 정부도 어쩔수 없이 폐기되어질 잉여 냉동 배아를 사용하는 배아 간세포 연구에 대해서도 연방 정부 차원의 연구 지원을 하겠다는 연구 내용이다 (Figure 6). 향후 계속된 간세포 분화 연구로 다양한 조직으로의 분화 가능성을 확인하는 기술만 확보한다면 세포대체요법에 의한 난치병 치료 시장에서 선진국과 대등한 위치를 얻을 것으로 기대된다. 상기에서 언급한 바와 같이 배아 간세포 배양 기술이 확립 되면,

- 1) 지금까지 난치병으로 간주되어 왔던 여러 질병의 치료법이 개발되어 인간의 삶의 질이 크게 향상될 것이며,
- 2) 세포 치료법, 유전자 치료법, 조직공학 기술 등 현재 개발되고 있는 다른 기술과 연계되어 의학 기술의 엄청난 시너지 효과 및 이를 통한 의료 기술의 일대 혁명을 유도할 것이다. 또한,
- 3) 간세포 배양 기술은 경제적인 가치가 크게 확대되어 엄청난 파급 효과를 가져올 것으로 예상된다. 따라서 기술 발전을 효과적으로 이루기 위해서는 산학연의 체계적이고 조직적인 협조가 요구되며, 연구 개발을 위한 관련기관 및 국가적인 차원의 집중적인 투자 및 제반 법규의 정비가 정부 차원에서 시급히 뒷받침되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Amour KD, Gage FH. New tools for human developmental biology. *Nature Biotechnology* 2000; 18: 381-2.
- Brüstle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD. 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, Ailhaud G. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* 1997; 110: 1279-85.
- Daniels R, Hall V, Trounson AO. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei. *Biology of Reproduction* 2000; 63: 1034-40.
- Drab M, Haller H, Bychkov R, Erdmann B, Lindschau C, Haase H, Morano I, Luft FC, Wobus AM. From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model. *FASEB J* 1997; 11: 905-15.
- Fuchs E, Segre JA. Stem cells: a new lease on life. *Cell* 2000; 100: 143-55.
- Geron. 1999. <http://www.geron.com>
- Keller G, Kennedy M, Papayannopoulou T, Wiles MV. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol cell Biol* 1993; 13: 473-86.
- Menezo T, Kaufmann RA, Nicolle B, et al. Efficiency of a simplified thawing protocol for human co-cultured blastocysts. Abstract ASRM 52nd Annual Meeting 1996.
- 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.
- Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg E, 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.
- Shuldiner M, Yanuka 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.
- Takeda J, Seino S, Bell GI. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosome location, and expression at low levels in adult tissues. *Nucleic Acids Research* 1992; 20: 4613-20.
- 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.