

# Embryonic Stem Cell and Nuclear Transfer

임 정 목

서울대학교 농생명공학부 발생공학연구실

Lim JM

*Laboratory of Embryology and Gamete Biotechnology, School of Agricultural  
Biotechnology, Seoul National University*

## SUMMARY

Researches on manipulating pluripotent stem cells derived from blastocysts or primordial germ cells (PGCs) have a great advantages for developing innovative technologies in various fields of life science including medicine, pharmaceuticals, and biotechnology. Since the first isolation in the mouse embryos, stem cells or stem cell-like colonies have been continuously established in the mouse of different strains, cattle, pig, rabbit, and human. In the animal species, stem cell biology is important for developing transgenic technology including disease model animal and bioreactor production. ES cell can be isolated from the inner cell mass of blastocysts by either mechanical operation or immunosurgery. So, mass production of blastocyst is a prerequisite factor for successful undertaking ES cell manipulation. In the case of animal ES cell research, various protocol of gamete biotechnology can be applied for improving the efficiency of stem cell research. Somatic cell nuclear transfer technique can be applied to researches on animal ES cells, since it is powerful tool for producing clone embryos containing genes of interest. In this presentation, a brief review was made for explaining how somatic cell nuclear transfer technology could contribute to improving stem cell manipulation technology.

## 서 론

현재 전 세계적으로 전능성 배아줄기세포 (pluripotent embryonic stem cells; ES Cells)에 대한 수많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 연구는 기초 학문분야인 발생학뿐만 아니라 인공조직-대체장기생산 및 생체반응기 생산을 통한 신세대 생물활성물질, 첨단약물생산체계구축 및 난치병 의료기술개발 등 농업, 약학, 의학을 총 망라한 생명과학분야에 적극 이용될 수 있다. 동물에서의 배아줄기세포는 마우스 (Evans 과 Kaufman, 1981) 를 포함해서 소 (Saito 등, 1992; First 등, 1994), 돼지 (Piedrahita 등, 1990; Wheeler 등, 1994), 토끼 (Graves와 Moreadith, 1993; Giles 등, 1993) 등의 종에서 확립되었으며 (table 1), 최근에는 인간 배아줄기세포도 확립되었다 (Thomson 등, 1998; Shambloott 등, 1998). 그러나 생식선 카이메라 (Germline Chimera) 생산성공에 의한 후대 자손 생산은 유일하게 마우스에서만 보고되어 있어서 효율적 유전자표적 (Gene Targeting) 기술을 대입한 형질전환동물 생산적용은 아직 이루어지지 않고 있다.

### 배아줄기세포 정의 및 특성

줄기세포는 신체를 구성하는 모든 세포·조직의 근간이며, 기원되는 조직종류에 따라 성체 및 배아줄기세포로 분류된다. 성체줄기세포는 골수, 혈액, 각막, 망막, 뇌, 골격근, 치수, 간, 피부, 위장관 상피세포, 췌장 등에서 얻을 수 있지만 한정된 분화능력 (multipotency) 만을 가진다. 한편, 배아줄기세포는 성체줄기세포보다 훨씬 광범위한 분화능력, 즉 전능성을 가진다.

배아줄기세포는 전장에서 기술한대로 ES cell, EG cell, 그리고 실험적으로 생성시킨 배아암세포 (embryonic carcinoma cell) 로 대별되는데, 그 중 배아줄기세포의 경우 수정 후 최초분화가 일어나 형성된 배반포기 수정란에서 분리한다. 경제동물인 소의 경우 수정 6-7 일 후에는 100-200 개의 할구 (blastomere) 로 이루어진 배반포로 발달하게 되는데, 이러한 배반포에서 태아로 발달하게 될 내부세포괴 (inner cell mass cell) 를 기계적 또는 항체를 이

**Table 1. The isolation of pluripotent stem cells from several domestic animals**

species	publication (year)	description
cattle	Saito et al. (1992)	bovine stem cell-like cell line in vitro culture
	First et al. (1994)	bovine stem cell from the different embryonic stages
	Cherny et al. (1994)	derivation of bovine stem cell from primordial germ cells
pig	Piedrahita et al. (1990)	isolation of porcine embryonic stem cells
	Strojek et al. (1990)	cultivating embryonic stem cells from porcine blastocysts
	Notarianni et al. (1990)	cultivating embryonic stem cells from porcine blastocysts
	Talbot et al. (1993)	spontaneous differentiation of porcine stem cells
	Gerfen and Wheeler (1995)	isolation of embryonic cells from porcine blastocysts
	Piedrahita et al. (1997, 1998)	derivation of embryonic germ (EG) cells
	Shim et al. (1997)	derivation of embryonic germ (EG) cells
sheep	Handyside et al. (1987)	isolation of embryonic stem cells from ovine blastocysts
	Piedrahita et al. (1990)	isolation of ovine embryonic stem cells
	Notarianni et al. (1991)	cultivating embryonic stem cells from ovine blastocysts
rabbit	Graves and Moreadith (1993)	derivation of stem cells from preimplantation rabbit embryo
	Giles et al. (1993)	isolation of pluripotent cells from rabbit inner cell mass
mink	Sukoyan et al. (1992)	mink stem cells from the different embryonic stages
	Sukoyan et al. (1993)	characterization and differentiation of mink stem cells

용한 면역화학기법 등을 이용하여 분리한다. 이후 지지세포와의 공 배양을 통해 미분화상태에서의 증식을 유도하여, 무제한적 분열을 시킴으로 배아줄기세포주를 확립한다. 확립된 배아줄기세포주는 표식인자 및 형태적 기준을 이용하여 그 특성을 검증하게 된다.

배아줄기세포주 형성을 위하여 배반포로부터 분리된 내부세포괴는 leukemia inhibitory factor (LIF) 및 소 혈청을 포함한 각종성장인자가 함유된 배양액으

로 장기 배양한다. 이때, 감마선 또는 Mitomycin C 등으로 분열을 억제시킨 배아섬유아세포 등을 지지세포로 사용하는데, 생쥐배아줄기세포의 경우 cytokine 인 LIF 가 배양배지에 첨가될 경우 지지세포 없이도 미분화상태에서 계속 증식할 수 있다. 세포들이 분열 증식되어 일정 크기에 도달하면, 지지세포가 coating 된 새로운 배양접시에 분주하여 계대배양을 시행한다. 계대배양이 끝난 후 배아줄기세포는 미분화상태로 증식하여 다시 동일세포집단을 형성하는데, 일반적으로 40 계대 이상이 된 세포집단은 안정적으로 줄기세포의 특징적 반응을 나타낸다, 이를 배아줄기세포 주 수립이라 하며, 수립된 줄기세포 주는 다음과 같은 특성을 지닌다.

- 1) 장기간 자가재생 (self-renewal), 즉 미분화 상태로 무제한적 세포분열이 일어나야 한다
- 2) 정상 핵형을 보유하고 있어야 한다
- 3) 발달 중인 배아에 이식 시 모든조직으로 분화가 일어나야 한다
- 4) 생식선으로 전파되어 다음 세대로 고유의 형질이 이전되어야 한다
- 5) 미분화상태로 동일세포집단 (colony) 을 형성하여야 한다
- 6) 미분화 표식인자인 Oct-4 등 몇 가지 표식인자와 반응한다
- 7) 세포주기 중 G1 단계가 매우 짧거나 없어야 한다
- 8) 일반 자성체세포와 달리 두 개의 X 염색체 모두가 활성화되어 있어야 한다.

## 배아줄기세포와 핵이식

Wakayama 등에 의하면 체세포를 이용하여 핵이식하였을 경우 약 60-70%의 핵이식란이 배반포까지 발달한 반면, 배아줄기세포를 핵이식에 사용했을 경우는 10-20% 만이 배반포로 발달한다는 사실을 밝혔다. 이러한 차이는 공여체세포의 경우 G0/G1 단계인데 비하여 공여되는 배아줄기세포 대다수 (60% 이상) 가 S-Phase 이므로, 이에 따른 염색체 이상에 기인한다고 추측되고 있다. G0 혹은 G1 단계의 배아줄기세포를 선별하여 생산된 복제수정란에서 배

반포형성율이 유의적으로 증가한다는 연구결과보고는 이러한 추론을 뒷받침하고 있다 (Rideout et al, 2001). 이렇게 체세포핵이식에 관한 연구가 활발히 진행되면서, 동물복제기술을 배아줄기세포 생산에 도입하려는 시도가 구체화되고 있다. 배아줄기세포는 세포수준의 형질전환기술 적용이 가능하며 체세포핵이식의 공여핵세포로 사용할 경우 형질전환·복제동물 생산을 모색할 수 있기 때문이다. 1981년 배아줄기세포를 이용한 마우스 카이메라 마우스 생산성공은 (Martin 1981, Evans and Kaufman 1981) 배아줄기세포의 전능성을 입증한 것이며, 변형된 배아줄기세포 유전자가 후세까지 전달될 수 있는 가능성을 확인한 것으로 학문적 의의가 크다.

약 40년 전 일란성 쌍생아 간 신장이식이 성공한 이후 면역억제제 도입과 함께 장기이식연구가 활발히 진행되어 왔다. 그러나 면역억제제의 부작용과 장기의 공급 부족이라는 문제를 초래하여 이러한 첨단의료기술은 한계에 직면하게 되었다. 배아줄기세포는 성체줄기세포 및 일반 체세포에 비하여 체외에서 무제한적 증식이 가능하며, 적절한 조건에 따라 다양한 세포로 분화시킬 수 있다. 그리고 자신의 세포를 이용하여 수립된 배아줄기세포는 이식 후 면역거부반응을 유도하지 않으며, 환자 유래의 배아줄기세포가 아니더라도 공여핵세포의 면역거부유전자 제거를 통하여 면역거부반응을 억제할 수 있다. 배아줄기세포 분리 과정은 생식복제과정과 동일하다. 환자의 생검을 통해 체세포를 채취한 후 탈핵난자 내에 주입 후, 전기융합과 활성화 과정을 통해 체세포 핵이식란을 작성한다. 이후 배반포까지 체외배양 후 ICM 을 분리하여 장기배양을 통한 배아줄기세포를 구축한다. 배아줄기세포를 원하는 조직으로 효율적으로 분화시키려면 분화에 따른 다양한 기전을 명확히 파악하는 것이 필수이다. 그리고 이러한 연구와 더불어 치료복제기술의 안전성과 윤리적 문제에 대한 명확한 지침이 확고히 마련되어야 한다.

## 결 론

배아줄기세포 연구는 경제동물 활용가능성을 극대화하며 의료기술-생명공학

산업발전에 토대가 될 것으로 기대되어지고 있다. 동물 배아줄기세포연구의 경우, 아직 초보연구 단계에 머물러 있으나, 그 중요성 인식을 기반으로 급격하게 연구가 활성화되고 있다. 동물 배아줄기세포연구의 최종목표는 형질전환 동물생산에 있으며, 이러한 기술개발을 토대로, 고부가 생명활성물질, 세포·조직이식기술등 첨단 난치병치료기술, 특정약물스크리닝기술, 인공조직·장기 생산 및 질환모델동물 생산기술이 계속적으로 연구·개발될 것이다.

## 참고문헌

- Doetschman, T.C., Williams, P. and Maeda, N. 1988. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem(ES) cells. *Dev. Biol.* 127, 224-227.
- Evans, M.J. and Kaufman, M.H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. 1981. *Nature.* 292, 154-156.
- Graves, K.H. and Moreadith, R.W. 1993. Derivation and characterization of putative pluripotential embryonic stem cells from preimplantation rabbit embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 36, 424-433.
- Iannaccone, P.M., Taborn, G.U., Ray, L. et al. 1994. Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev. Biol.* 163, 288-292.
- Lai, L., Kolber-Simonds, D., Park, K.W. et al. 2002. Production of a -1,3-Galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science.* 295, 1089-1092.
- Martin, G.R. 1981. Isolation of pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78, 7634-7638.
- Matsui, Y.D., Zsebo, K. and Hogan, B.L.M. 1992. Derivation of pluripotent embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell.* 70, 841-847.
- Pain, B., Clark, M.E., Shen, M. et al. 1996. Long-term in vitro culture and characterization of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development.* 122, 2339-2348.

- Piedrahita, J.A., Anderson, G.B. and Bondurant, R.H. 1990. On the isolation of embryonic stem cells; comparative behavior of murine, porcine and ovine embryos. *Theriogenology*. 34, 879-891.
- Rideout W. M., Eggan K., Jaenisch R. Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. 2001. *Science*. 293, 1093-1098.
- Robertson, E.J. Embryo-derived stem cell line. 1987. In *Teratocarcinomas and embryonic stem cells ; a practical approach* (Ed. E.J. Robertson), IRL Press, Oxford. pp. 71-112.
- Shim, H., Gutierrez-Adam, A., Chen, L.R., et al. 1997. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. *Biol. Reprod.* 57, 1089-1095.
- Stice, S.L., Strelchenko, N.S., Keefer, C.L. et al. 1996. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol. Reprod.* 54, 100-110.
- Sukoyan, M., Vatolin, S., Golubitsa, A. et al. 1993. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink; comparisons of their pluripotencies. *Mol. Reprod. Dev.* 36, 148-158.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Elder, J., Shapiro, S.S. et al. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282, 1145-1147.
- Thomson, J. A., Kalishman, K., Golos, T.G., Durning, M. et al., 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92, 7844-7848.
- Wheeler, M.B. 1994. Development and validation of swine embryonic stem cells; a review. *Reprod. Fertil. Dev.* 6, 563-568.