

## 포배기 배아의 내세포괴 분리방법에 따른 인간배아줄기세포의 확립

김희선<sup>1,2</sup> · 안희진<sup>2</sup> · 김석현<sup>2</sup> · 김수진<sup>2</sup> · 성기청<sup>1</sup> · 강문주<sup>1</sup> · 오선경<sup>1,2</sup>  
구승엽<sup>1,2</sup> · 김석현<sup>1,2</sup> · 최영민<sup>1,2</sup> · 김정구<sup>1</sup> · 문신용<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 의과대학 산부인과학교실, <sup>2</sup>의학연구원 인구의학연구소

**Background & Objectives:** 인간배아줄기세포는 착상 전 포배기배아의 내세포괴 (inner cell mass)로 부터 유래된 세포로써 미분화상태로 무한히 증식가능하고 배양조건을 변화시킴으로써 삼배엽으로 파생되는 세포를 만들 수 있는 능력때문에 세포치료등의 목적을 위해 많은 관심이 집중되고 있다. 본 연구는 포배기배아의 상태에 따른 내세포괴 분리방법에 있어서 두 가지 방법의 효과를 보고자 하였다.

**Method:** 배아는 서울대학병원 산부인과 불임클리닉에서 시험관아기기술 후 냉동보존 되어있던 전 핵시기의 잉여배아를 용해하여 포배기까지 배양하였다. 배양 5~7일에 포배기로 도달된 배아의 상태를 기록하고 내세포괴의 분리를 시행하였다. 배아의 상태는 포배강의 팽윤정도에 따라 1~3까지 등급을 매겼고 내세포괴의 크기와 상태에 A~D까지 네 가지 등급을 주었다. 또한 영양세포층 (trophectoderm)의 세포모양과 상태에 따라 네 가지 등급을 주어 3AA의 경우를 가장 건강한 포배로 판단하였다. 많은 연구자들이 이용하는 immunosurgery의 방법과 포배중 내세포괴를 포함한 영양세포층의 일부만을 가늘게 뽑은 유리피펫으로 절개하는 방법으로 내세포괴를 분리 (이하 부분분리법)하였고 이들을 STO 영양세포층에서 배양하였다. 계대배양을 통하여 인간배아줄기세포의 형태를 나타내는 세포주는 특성 분석과 핵형분석을 시행하였다.

**Results:** 총 8개의 포배 (3AA x2, 3AB x3, 2BC x3)를 immunosurgery를 통해 내세포괴를 분리하였고 이들 중 4개에서 세포주가 확립되었다. 3AA에서 1개가 3AB에서 2개가 확립되었고 2BC에서 1개가 확립되었다. 부분분리법에는 총 7개의 포배 (3AA x2, 3AC x1, 3BBx1, 3CB x1, 2AC x1, 2CC x1)를 이용하였고 이들 중 3AC에서 1개, 3BB에서 1개와 2CC에서 1개가 확립되었다. 이들 중 각각의 분리방법에서 유래된 한 세포주 씩 계대유지가 진행됨에 있어 분화가 심한 현상을 보여 특성분석을 진행하지 못하고 있다. 나머지 5개의 확립된 세포주는 미분화 인간배아줄기세포주임을 확인하기 위한 특성분석을 진행한 결과 alkaline phosphatase염색에서 양성을 보였고 Oct-4, SSEA-4, TRA-1-60과 TRA-1-81에서 양성을 보였다. 분화가 심한 두 세포주를 제외한 나머지 세포주는 핵형분석결과 한 개 세포주에서 46, XX를 보였고 4개 세포주는 46, XY를 나타냈다. 5개 세포주를 DNA finger printing을 한 결과 각각 다른 배아에서 유래되었음을 확인할 수 있었다.

**Conclusions:** 현재 인간배아줄기세포를 다른 종으로부터의 감염을 막기위해 인간으로부터 유래되는 영양세포층을 이용하는 세포주 확립을 많은 연구자들이 시행하고 있다. 본 연구는 immunosurgery에 이용되는 antibody와 complement가 인간에서 유래된 것이 아니기에 이를 대체 할 수 있는 내세포괴 분리방법을 찾고자 부분분리법을 도입하였다. Immunosurgery와 부분분리방법이 포배기 배아의 상태에 따라 큰 차이점을 보이지 않았다. 향후 새로운 인간배아줄기세포확립에 있어서 부분분리법과 함께 인간에서 유래하는 영양세포층의 적용이 다른 종으로부터의 감염을 피할 수 있는 방법이 될 것으로 사료된다.

**Acknowledgement:** 본 연구는 21세기 프론티어 연구개발 사업단인 세포응용연구사업단의 연구비 지원 (SC11011)으로 수행되었습니다.