

Spermatogonial Stem Cells (SSCs) and Mutipotent Germline Stem Cells (mGSCs) from Testis

- 정소 유래의 정자형성 줄기세포와 다분화능 생식줄기세포 -

전진현 · 송행석 · 한상철

관동대학교 의과대학 제일병원 생식생물학 및 불임연구소

I. 서론

인간을 포함한 다양한 동물들에서 생식세포는 부모의 유전정보를 자손에게 전달하는 고유한 특성을 갖고 있다. 대부분의 포유동물에서 초기 발생 시기에 난황막에서 유래한 원시생식세포 (primordial germ cells, PGs)는 원시생식선으로 이동하여 생식소를 형성하고, 남성 또는 여성 생식소로 분화되면서 원시생식세포의 증식과 분화가 일어나게 된다. 남성 생식세포의 경우 출생 후에 정자형성 줄기세포 (spermatogonial stem cells, SSCs)로의 증식이 시작된다. 이러한 정자형성 줄기세포는 정자형성과정 (spermatogenesis)을 거쳐 성숙 정자로 분화되게 된다. 포유동물의 여성 생식세포인 난자는 출생 직후에 증식이 중지되지만, 정자형성 줄기세포는 생명을 유지하는 동안 증식되며 정자형성과정을 지속한다.^{1,2}

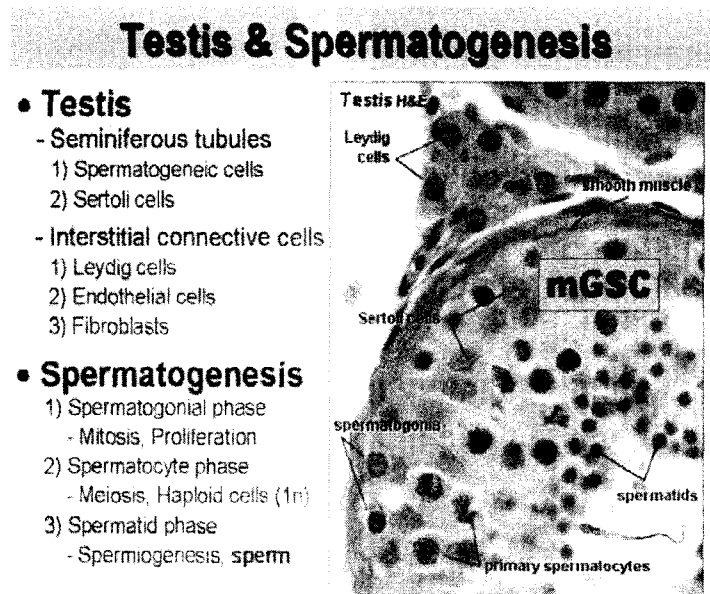


Figure 1. Histological observation of various cells in mammalian testis.

포유동물의 정소는 Figure 1에서와 같이 세정관 (seminiferous tubule)과 그 주변에 존재하는 Leydig cells, endothelial cells, fibroblasts 등으로 구성되어 있다. 세정관은 smooth muscle로 둘러싸여 있으며, 내부에 Sertoli cells와 정자형성과정에서의 다양한 생식세포들이 존재하고 있다. 이러한 생식세포들 가운데 일부의 세포들이 정자

형성 줄기세포와 다분화능 생식줄기세포로서의 역할을 수행하고 있으며, 본 연제에서는 이들의 특성과 관련 연구들에 대해 살펴보고자 한다.

II. 정자형성 줄기세포 (Spermatogonial Stem Cells, SSCs)

포유동물에서 정자형성 줄기세포에 대한 연구는 미국의 Brinster 교수팀에 의해 도입된 Figure 2에 도식화한 생식세포이식 (germ cell transplantation) 방법을 적용하여 이들의 특성 확인과 분리 및 배양법이 확립되었다.³⁻⁵ 이러한 연구 기법을 이용하여 포유동물의 정소에서 정자형성 줄기세포를 효과적으로 분리할 수 있는 표면 항원을 발굴하고, 근래에는 정자형성 줄기세포를 이용한 형질 전환 동물의 생산 가능성이 생쥐와 쥐에서 보고되었다.^{6,7}

동종과 유연종 간의 정자형성 줄기세포의 이식 연구에서 이식 후 정자형성이 성공적으로 수행됨을 확인하였으며, 면역결핍 생쥐의 피하에 이종의 정소 조직을 이식하여 정자형성이 가능함이 보고되기도 하였다.⁸⁻¹⁰ 또한, 정자형성 줄기세포에 대한 체외배양 연구도 활발하게 진행되어, 체외배양을 통한 정자형성과정의 재현과 이러한 연구들을 기반으로 한 정자형성장애에서 기인한 남성불임을 해결하기 위한 임상적인 적용 가능성이 제시되고 있다.¹¹⁻¹³ 그러나 정자형성 줄기세포의 연구들에서 이들의 정자형성 능력에 대한 연구이외에 다른 종류의 세포로의 분화에 대한 연구는 최근까지 시도되지 않았었다.

Male germline stem cells

• Spermatogonial stem cells (SSCs)

1. Self-renew and produce large number of germ cells that become spermatozoa throughout postnatal life and transmit genetic information to the next generation.
2. In vivo transplantation of SSCs → Transgenic/KO mice
3. In vitro differentiation of SSCs → Haploid germ cells

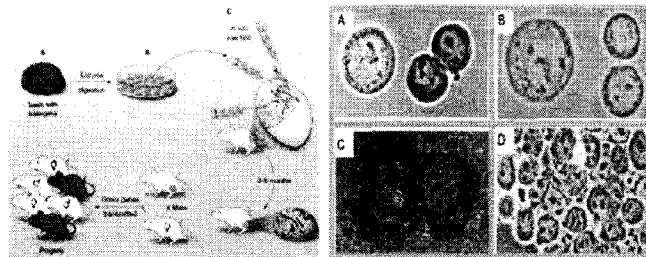


Figure 2. Transplantation and in vitro culture of spermatogonial stem cells.

III. 정소 유래의 다분화능 생식줄기세포 (multipotent germline stem cells, mGSCs)

여성의 생식세포인 난자는 일정시기에 증식이 중지되는 반면 남성의 생식세포인 정자는 지속적으로 증식되고 분화하는 특성을 가지고 있으며, 정소의 기형종 (teratoma)에서 관찰되는 다양한 종류의 조직 및 세포들은 다분화능 줄기세포가 정소에 존재할 가능성을 시사하고 있다.^{14,15} 정자형성 줄기세포에 대한 연구를 수행하던 일본의 Shinohara 교수팀이 2004년에 신생 생쥐의 정소에서 다양한 종류의 세포로 분화가 가능한 다분화능 생식줄기세포 (multipotent germline stem cells, mGSCs)의 존재를 확인하였다.¹⁶ 이들의 연구에서 다분화능 생식줄기

세포는 배아줄기세포와는 상이한 양상의 methylation pattern을 나타내지만 (Figure 3), 미분화 유전자 발현과 분화 능력은 배아줄기세포와 유사함을 보고하였다. 또한, 이들은 정소에서 기형종이 빈번하게 발생하는 p53 유전자 결손 생쥐의 성체 정소에서 다분화능 생식줄기세포의 분리 및 배양에 성공하였지만, 정상적인 성체 생쥐에서는 성공하지 못하였다.

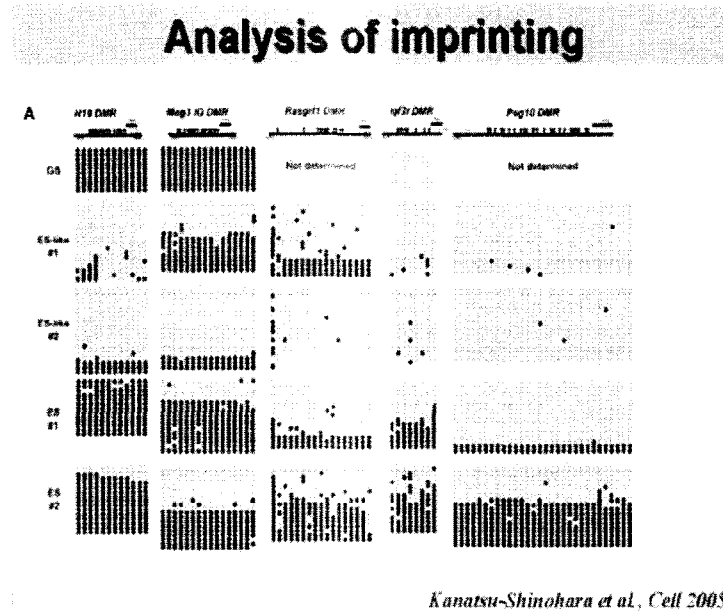


Figure 3. Methylation patterns of spermatogonial stem cells (GS), multipotent germline stem cells (ES-like) and embryonic stem cells (ES).

성체 생쥐의 정소에서 다분화능 생식줄기세포의 성공적인 분리 및 배양은 이들을 분리할 수 있는 표지인자가 동정되지 않은 상황에서는 해결하기가 쉽지 않은 문제였다. 그러나 2006년에 Guan 등은 정원세포 (spermatogonia)

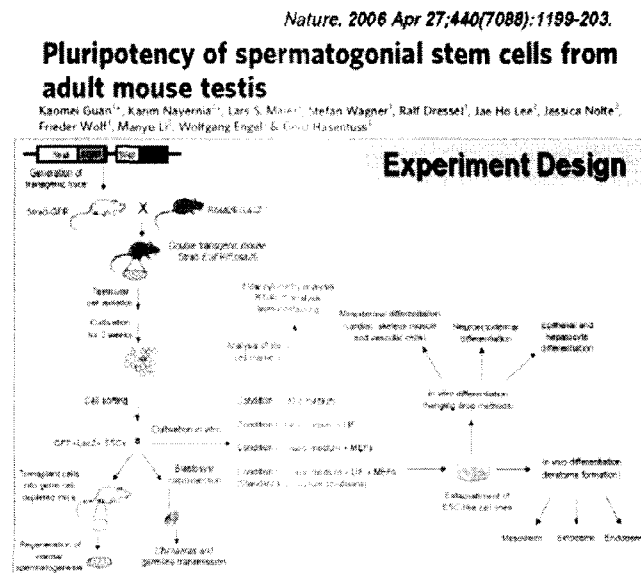
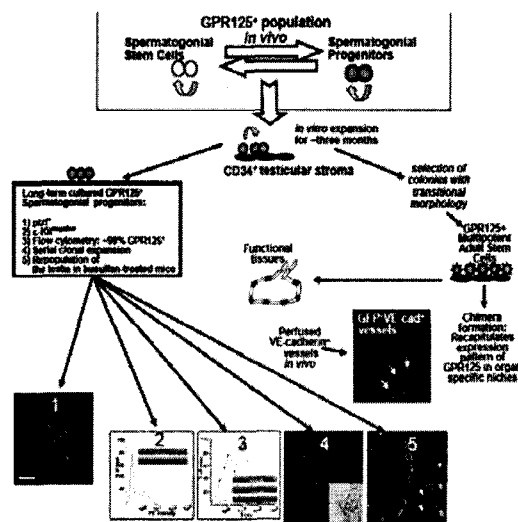


Figure 4. Schematic of protocol for isolation and culture of mGSCs.

에서 특이적으로 발현되는 *Stra8* 유전자의 promoter와 green fluorescent protein 유전자가 결합된 형질전환 성체 생쥐에서 다분화능 생식줄기세포의 분리와 배양에 성공하였다.¹⁷ 이들은 세 종류의 생쥐 strain에서 다분화능 생식줄기세포의 분리 및 배양에 성공하였다고 보고하였다 (2/11 of C57BL6, 1/7 of FVB, 1/3 of 129/Ola).

최근에 미국의 Seandel 등은 일반적으로 줄기세포의 지지세포로 사용되는 mouse embryonic fibroblasts (MEFs) 대신에 성체 정소에서 분리한 기질세포인 CD34+ putative peritubular cells (CD34+ MTS)를 사용하여 성체 생쥐의 정소에서 다분화능 생식줄기세포를 분리 및 배양하는데 성공하였다.¹⁸ 이들은 정소에 존재하는 정자형성 줄기세포를 체외에서 적절한 조건 하에서 배양하는 과정에서 일부의 세포들에서 형태적인 변화가 나타나고 이들이 다분화능 생식줄기세포의 특성을 갖는 세포들로 변화된다고 주장하였다 (Figure 5). 또한, 연구자들은 정소 세정관 기저부의 세포들에서 특이적으로 발현되는 GPR125라는 표지인자가 다분화능 생식줄기세포에서 발현될 뿐만 아니라 배아줄기세포에서도 발현됨을 보고하였으며, 이를 이용한 인간에서의 정소 유래의 줄기세포 분리 가능성을 제시하였다.



Nature, 2007 Sept 20;449:346-350

Figure 5. Schematic of protocol for derivation of mGSC, their putative origin, and functionality.

IV. 다분화능 생식줄기세포의 유도 분화

정소 유래의 다분화능 생식줄기세포를 세포치료에 효과적으로 이용하기 위해서는 이들을 원하는 특정 세포로 분화시킬 수 있는 유도 분화 기술이 확립되어야 한다. 일본의 Baba 등은 신생 생쥐 정소에서 분리한 다분화능 생식줄기세포를 중배엽성 세포들로 분화시키기 위해 OP-9세포와의 공동배양을 시도하였다.¹⁹ 그 결과 다분화능 생식줄기세포에서 Flk1+ lineage 세포들로 분화시킬 수 있었으며, 단일 세포로부터 심근, 혈관내피, 조혈 세포 등으로 분화됨을 확인하였다. 또한, 심박동을 나타내는 세포군에서 전기생리학적인 수축과 심근세포 관련 유전자들의 발현을 확인하였다 (Figure 6).

한편, 독일의 Guan 등도 성체 생쥐 정소 유래의 다분화능 생식줄기세포를 기능적인 심근세포로 유도 분화시킨 후 이를 이식하여 그 효용성을 확인한 연구를 최근에 보고하였다.²⁰ 이들의 연구에서 세 종류의 생쥐 strain (C57BL6, FVB, 129/Ola)에서 확립한 줄기세포주의 유도 분화에서 약 50% 정도의 배아체가 심박동을 나타내는 세포군을 형성하였다. 심장으로서의 생체이식 모델에서는 다분화능 생식줄기세포가 혈관상피세포와 평활근세포로 분화됨을 관찰하였으며, 이식 후 1개월이 지나서까지 종양이 형성되지 않음을 보고하였다 (Figure 7).

Generation of Cardiac and Endothelial Cells from Neonatal Mouse Testis-Derived Multipotent Germline Stem Cells
 Shiro Baba, Toshio Heike, Katsutosugu Umeda, Toru Iwasa, Shinji Kaichi, Yoshimi Hiraumi, Hiraku Doi, Momoko Yoshimoto, Mito Kanatsu-Shimohara, Takashi Shimohara and Tatsutoshi Nakahata
Stem Cells 2007;25:1375-1383; originally published online Feb 22, 2007;

Table 2. Single-cell culture: Potential of single *FR1*⁺ cells derived from ES, EG, or mGS cells to differentiate into cardiac, endothelial, and/or hematopoietic cells

Type of colony	ES	EG	mGS
C	0	0	1
C + H	2	1	1
E + H	16	16	21
C + E	2	3	2
C + E + H	1	2	3

The *FR1*⁺ cells from day-4 differentiating cultures of ES, EG, and mGS cells were sorted, and individual cells were placed in 96-well plates (n = 960 cells from each cell type) and cultured further on OP-9 stromal cell layers in differentiation medium. On day 13, the wells were examined for the presence of cardiac, endothelial, and/or hematopoietic colonies.
 Abbreviations: C, cardiac; E, endothelial; EG, embryonic germ; ES, embryonic stem; H, hematopoietic; mGS, multipotent germline stem.

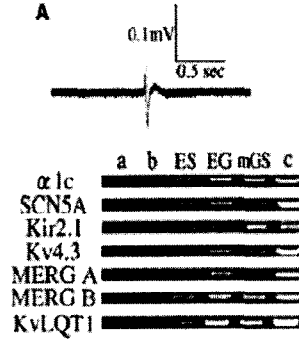


Figure 6. Differentiation potential of mGSC into cardiac, endothelial and/or hematopoietic cells, and electrical activities and gene expression in differentiated cells.

(Circ Res. 2007;100:1615-1625)
Generation of Functional Cardiomyocytes From Adult Mouse Spermatogonial Stem Cells

Kaomei Guan,^a Stefan Wagner,^b Bernhard Unsöld,^a Lars S. Maier, Diana Kaiser, Bernhard Hemmerlein, Karim Nayernia, Wolfgang Engel, Gerd Hasenfuss

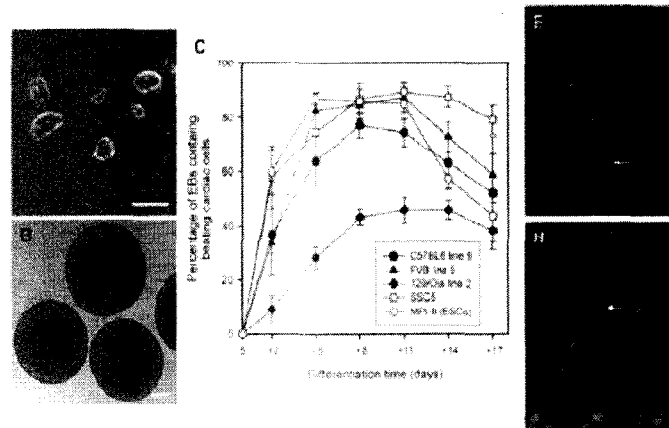


Figure 7. Percentage of EBs containing beating cardiac clusters during differentiation and the fate of graft cells following intramyocardial injection of mGSC.

V. 결론

위에서 살펴본 정소 유래 줄기세포에 대한 연구들에서 정자형성 줄기세포에 대한 연구는 현재 생쥐와 쥐뿐만 아니라 인간에서도 시도되고 있으며, 국내 연구진들에 의해서도 이에 대한 연구 결과가 보고된 바 있다.¹³ 아직까지 인간에서는 장기간의 체외배양을 통해 생성된 정자를 이용한 임신 및 출산이 보고되지는 않았지만, 멀지 않은 미래에 성공할 수 있을 것으로 기대된다.

위에서 언급한 바와 같이 정소 유래 다분화능 생식줄기세포의 분리 및 배양 그리고 유도 분화에 대한 연구들이 일본, 독일, 미국 등에서 활발하게 진행되고 있으며, 본 연구실에서도 신생 생쥐와 잠복고환 (cryptorchidism) 을 유도한 생쥐에서 다분화능 줄기세포를 분리, 배양하는데 성공하였다.²¹ 현재 이들의 분화 능력을 확인하는 단계이며, 적절한 분화 조건에서 신경세포와 심근세포로의 분화가 가능함을 확인하였다 (Figure 8). 이러한 정소 유래 다분화능 줄기세포는 세포치료 시 면역거부 반응을 극복할 수 있는 자가 줄기세포로서 이용이 가능한 장점을 가지고 있다.

결론적으로 지금까지의 연구를 통해 세포 증식과 분화를 지속적으로 수행하는 조직특이성을 가지고 있는 포유동물의 정소에는 정자를 형성하는 정자형성 줄기세포 뿐만 아니라 다양한 조직과 세포로 분화될 수 있는 다분화능 생식줄기세포가 존재하고 있음을 알 수 있다. 따라서 이를 이용한 형질전환 동물의 생산, 남성불임에 대한 새로운 치료법 개발, 생식세포의 보존 더 나아가서는 난치병을 치료할 수 있는 세포치료제 개발 등에 대한 연구들이 국내에서도 활성화되기를 기대한다.

Differentiation of mGSCs into neuronal and cardiac cells

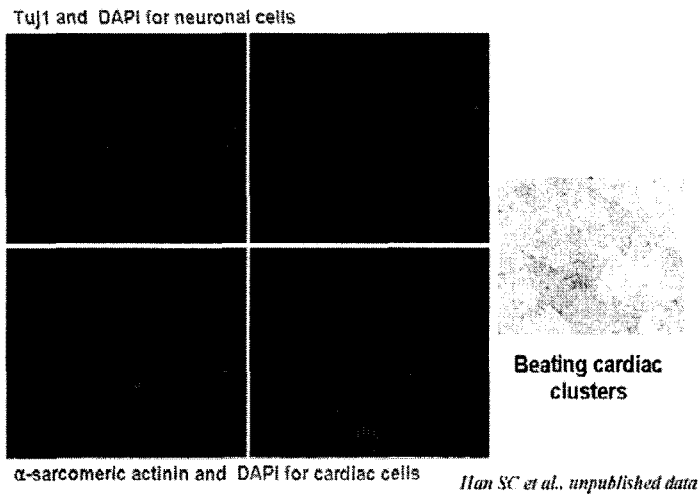


Figure 8. Differentiation of mGSC from mouse testis into neuronal, cardiac cells and beating clusters.

참 고 문 헌

1. Dym M. Spermatogonial stem cells of the testis. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 11287-9.
2. McLaren A. Germ and somatic cell lineages in the developing gonad. Mol Cell Endocrinol 2000; 163: 3-9.
3. Brinster RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. Science 2002; 296: 2174-6.
4. Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, et al. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. Biol Reprod 2003; 69: 612-6.
5. Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 16489-94.
6. Kanatsu-Shinohara M, Toyokuni S, Shinohara T. CD9 is a surface marker on mouse and rat male germline stem cells. Biol Reprod 2004; 70: 70-5.

7. Ryu BY, Orwig KE, Oatley JM, Lin CC, Chang LJ, Avarbock MR, et al. Efficient generation of transgenic rats through the male germline using lentiviral transduction and transplantation of spermatogonial stem cells. *J Androl* 2007; 28: 353-60.
8. Dobrinski I, Avarbock MR, Brinster RL. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biol Reprod* 1999; 61: 1331-9.
9. Nagano M, McCarrey JR, Brinster RL. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testis. *Biol Reprod* 2001; 64: 1409-16.
10. Honaramooz A, Snedaker A, Boiani M, Scholer H, Dobrinski I, Schlatt S. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice. *Nature* 2002; 418: 778-81.
11. Feng LX, Chen Y, Dettin L, Pera RA, Herr JC, Goldberg E, et al. Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. *Science* 2002; 297: 392-5.
12. Izadyar F, den Ouden K, Creemers LB, Posthuma G, Parvinen M, de Rooij DG. Proliferation and differentiation of bovine Type A spermatogonia during longterm culture. *Biol Reprod* 2003; 68: 272-81.
13. Lee DR, Kim KS, Yang YH, Oh HS, Lee SH, Chung TG, et al. Isolation of male germ stem cell-like cells from testis tissue of non-obstructive azoospermic patients and differentiation into haploid male germ cells in vitro. *Hum Reprod* 2006; 21: 471-6.
14. Stevens LC. 1984. Spontaneous and experimentally induced testicular teratomas in mice. *Cell Differ* 15, pp. 69-74.
15. Regenass U, Friedrich TD, Stevens LC. Experimental induction of testicular teratomas in dissociated-reaggregated chimaeric gonads. *J Embryol Exp Morphol* 1982; 72: 153-67.
16. Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, et al. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 2004; 119: 1001-12.
17. Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel Ralf, Lee JH, et al. Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 2006; 440: 1199-203.
18. Seandel M, James D, Shmelkov SV, Falcatori I, Kim J, et al. Generation of functional multipotent adult stem cells from GPR125⁺ germline progenitors. *Nature* 2007; 449: 346-50.
19. Baba S, Heike T, Umeda K, Iwasa T, Kaichi S, Hiraumi Y, et al. Generation of cardiac and endothelial cells from neonatal mouse testis-derived multipotent germline stem cells. *Stem Cells* 2007; 25: 1375-83.
20. Guan K, Wagner S, Unsold B, Maier LS, Kaise D, et al. Generation of functional cardiomyocytes from adult mouse spermatogonial stem cells. *Circ Res* 2007; 100: 1615-25.
21. 한상철, 송행석, 임천규, 조재원, 고덕성, 김슬기 등. 생쥐 고환 유래 다분화능 줄기세포의 배양 및 유도 분화. *대한생식의학회지* 2007; 34(Suppl.1): 148.