



## 개 지방세포 유래의 중간엽 줄기세포의 종양형성시험

이은선<sup>1</sup> · 권은아<sup>2</sup> · 박정란<sup>3</sup> · 강병철<sup>2</sup> · 강경선<sup>3</sup> · 조명행<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>서울대학교 수의과대학 독성학교실, <sup>2</sup>서울대병원 임상의학연구소, <sup>3</sup>서울대학교 수의과대학 공중보건학교실,  
<sup>4</sup>국가핵심연구센터-나노시스템연구소

### Tumorigenesis Study of Canine Adipose Derived-mesenchymal Stem Cell

Eun-Sun Lee<sup>1</sup>, Euna Kwon<sup>2</sup>, Jeong Ran Park<sup>3</sup>, Byung-Chul Kang<sup>2</sup>,  
Kyung-Sun Kang<sup>3</sup> and Myung-Haing Cho<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Toxicology, College of Veterinary Medicine,

<sup>4</sup>Nano Systems Institute-National Core Research Center Seoul National University, Seoul 151-742

<sup>2</sup>Clinical Research Institute and College of Medicine, Seoul National University, Seoul 110-744

<sup>3</sup>Laboratory of Stem Cell and Tumor Biology, Department of Veterinary Public Health,  
College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Received August 27, 2007; Accepted September 21, 2007

Several recent studies demonstrated the potential of bioengineering using stem cells in regenerative medicine. Adult mesenchymal stem cells (MSCs) have the pluripotency to differentiate into cells of mesodermal origin, *i.e.*, bone, cartilage, adipose, and muscle cells; they, therefore, have many potential clinical applications. On the other hand, stem cells possess a self-renewal capability similar to cancer cells. For safety evaluation of MSCs, in this study, we tested tumorigenicity of canine adipose derived mesenchymal stem cells (cAD-MSCs) using Balb/c-nu mice. In this study, there were no changes in mortality, clinical signs, body weights and biochemical parameters of all animals treated. In addition, there were no significant changes between control and treated groups in autopsy findings. These results indicate that cAD-MSC has no tumorigenic potential under the condition in this study.

**Key words:** Canine adipose derived mesenchymal stem cells, BALB/c nu mice, Tumorigenicity.

### 서 론

여러 질병 등에 의한 조직이나 장기의 기능손실에 대해 조직재생이나 기능수복을 목표로 한 재생치료가 주목받고 있다. 이런 수단으로서 줄기세포나 인공소재를 사용한 의료기기나 세포수준에서의 치료의 연구가 진행되고 있다. 배아줄기세포(Embryonic mesenchymal stem cells;

ESC)는 전능성을 가지고 있어 모든 조직으로 분화될 수 있으며 이에 따라, 모든 장거나 조직의 질병에 대해서도 치료효과를 기대할 수 있지만 수정란을 사용하기 때문에 윤리적인 문제가 크게 작용한다는 문제가 있다. 반면 성체 줄기세포(Adult stem cells; ASC)는 배아줄기세포에 비해서는 분화능력이 떨어지지만 윤리적 문제가 없다는 점에서 현재 가장 주목받고 있는 연구 주제 중 하나이다 (Sawada *et al.*, 2007).

성체 줄기세포 중 성체 중간엽줄기세포(Adult mesenchymal stem cells; MSC)는 골수나 제대혈, 지방세포에서 유래되며 다분화능을 가진 것이 특징이다. 이러한 중간엽줄기세포는 뼈나 연골, 근육, 힘줄, 지방이나 다른 연결조직으로의 분화가 가능한데 (Jackson *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2004), 이 중에서 골수에서 유래하는 줄기세포

Correspondence to: Myung-Haing Cho, Laboratory of Toxicology, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

E-mail: [mchotox@snu.ac.kr](mailto:mchotox@snu.ac.kr)

or

Kyung-Sun Kang, Laboratory of Stem Cell and Tumor Biology, Department of Veterinary Public Health, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

E-mail: [kangpub@snu.ac.kr](mailto:kangpub@snu.ac.kr)

포(Bone marrow derived mesenchymal stem cells; BM-MSCs)는 얻을 수 있는 세포 수가 적다는 점과 시술에 의한 통증 및 윤리적인 관점에서의 문제를 가지고 있다. 이와 다르게 지방세포에서 유래하는 중간엽줄기세포(Adipose derived-mesenchymal stem cells; AD-MSCs)는 비교적 최근 대안적인 방안으로 알려진 것으로 지방세포자체가 체내에 굉장히 많은 수를 차지하고 있다는 점에서 줄기세포 유래원으로 부각되고 있다(Pansky *et al.*, 2007). 현재 성체 중간엽줄기세포는 심장질환(Ohnishi *et al.*, 2007), 연골계 질환(Vilquin and Rosset, 2006), 신경계 질환에 대한 치료제로서의 연구가 진행중이며 지방세포 유래 중간엽줄기세포에 대한 연구는 아직까지 그렇게 많지 않은 상황이다. 이러한 지방세포 유래 중간엽줄기세포의 세포치료제로서의 응용을 위해 세포수준에서의 세포의 분화능력 및 특이성의 연구와 더불어, 치료제로서의 세포자체의 안전성을 확보하기 위하여 발암성 시험을 할 필요성이 제시되었다.

이에 따라 본 연구는 지방세포 유래 중간엽줄기세포의 세포치료제로서의 이용시의 종양형성 여부를 평가하고자 마우스에서의 6개월 동안의 종양형성 관찰 실험을 진행하였다.

## 재료 및 방법

**세포 배양.** 본 연구에서 사용된 개의 지방세포 유래 중간엽줄기세포(canine adipose derived mesenchymal stem cells; cAD-MSCs)는 서울대학교 공중보건학교실에서 분리한 세포라인으로 개의 피하 지방 조직에서 유래된다. 개의 지방세포 유래 중간엽줄기세포의 일차 배양을 위해서, 개의 피하 지방조직을 같은 양의 phosphate-buffered saline(PBS)에 세척 후, collagenase type I (1 mg/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 2시간 동안 37°C에서 세포간의 유착을 떼어준다. 다시 PBS로 세척 후 1000 rpm(192 g)으로 5분간 원심분리하여 펠렛을 회수한다. 이후, 100 $\mu$ m의 나일론 메쉬로 걸러주어 세포 잔해물을 제거하고, 10%의 fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)를 추가한 DMEM 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub> 하의 37°C 인큐베이터에서 배양한다. 24시간 후, 붙지않은 세포와 잔여 적혈구들을 PBS로 세척하여 제거한 후, 배지를 교환한다. 일차 배양 이후 세포를 배양하기 위한 배지는 modified MCDB 153 medium(Keratinocyte-SFM, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)으로 recombinant epidermal growth factor(rEGF, 5 ng/ml)와 bovine pituitary extract(BPE, 50  $\mu$ g/ml)가 추가적으로 요구된다. 이외에 추가된 성장요

소와 호르몬은 insulin(5  $\mu$ g/ml), hydrocortisone(74 ng/ml), 0.2 mM  $\beta$ -ascorbic acid 2-phosphate(Asc 2P, Sigma-Aldrich), 2 mM N-acetyl-L-cysteine(NAC, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이며, 10%의 FBS 또한 첨가되었다(Lin *et al.*, 2005). 이번 연구에서는 줄기세포성(stemness)이 유지되는 계대수 5의 세포를 사용하였다.

**실험동물 및 사육환경.** 세포치료제로서의 사용시의 최고 농도로 예상하는 10<sup>6</sup> cell에 비하여 체중 대비 3000배(평균 60 kg: 20 g)의 차이가 나는 마우스에서 동량을 취함으로써 인체 대비시 3  $\times$  10<sup>9</sup> cell 농도가 되는 10<sup>6</sup> cell/mouse를 개의 지방세포 유래 중간엽줄기세포투여 최고 용량군으로 책정하고, 공비를 10으로 하여 10<sup>5</sup> cell/mouse 군과 10<sup>4</sup> cell/mouse 군을 설정, 총 3군을 설정하였다. 6주령의 암컷 BALB/c-nu 마우스가 이번 연구에서 사용되었으며, 구입 후 서울대학교병원의 실험동물사육시설에서 1주일간 순화하여 시험에 사용하였다. 시험군은 50마리의 동물을 3개의 용량군과 양성대조군, 음성 대조군의 2개의 대조군으로 하여 군간 체중이 고르게 10마리씩 배치하였다. 실험 기간중의 사육실 환경 조건은 실내온도 22  $\pm$  2°C, 상대습도 50  $\pm$  10%, 환기 횟수 12~18회/hr, 명암 조건은 12 h/day를 유지하였으며 조도는 150~300 Lux였다. 모든 실험 동물은 실험용 동물 사료와 물을 자유섭식하였다.

투여경로는 중간엽 줄기세포를 세포치료제로 사용시의 인체 적용경로로 선택된 피하주사경로를 따랐으며, 실험 개시 첫날 PBS 100  $\mu$ l에 세포를 부유시킨 후 쥐의 등쪽 피부에 피하주사하였다. 음성대조군은 PBS를, 양성대조군은 피부 암 세포주인 A431을 최고용량인 10<sup>6</sup> cell/mouse를 처리하였으며, 앞에서 언급된 것과 같이 시험군은 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> cell/mouse의 3군을 처리하였다. 최종 시험기간은 6개월간이며, 실험 종료 이전이더라도 종양발생에 따라 실험동물의 생존에 영향을 줄 수 있을 것이라 사료되는 경우 윤리적인 차원에서의 안락사를 행하도록 하였다(SNUH 0602701).

## 관찰 및 검사항목

**일반증상 및 종양 크기 측정.** 6개월간의 시험기간 중 모든 동물에 대해서 주 2회 일반 임상 증상 및 종양 발생 시 종양의 크기 측정을 시행하였다.

**체중변화.** 6개월간의 시험기간 중 모든 동물에 대해서 주 1회 체중을 측정하였다.

**Table 1.** Summary of body weight values of female BALB/c-nu mice subcutaneously inoculated with cAD-MSC in tumorigenic study

Dosage in (cells/0.1 ml/mouse)	Group summary of body weight (Unit : g)															
	0 (Control)				1 × 10 <sup>5</sup>				1 × 10 <sup>6</sup>				1 × 10 <sup>6</sup> (A431) <sup>a</sup>			
	Mean	S.D.	N		Mean	S.D.	N		Mean	S.D.	N		Mean	S.D.	N	
0	22.16 ± 1.217	10	22.12 ± 1.167	10	22.11 ± 1.201	10	22.12 ± 1.125	10	21.94 ± 0.992	10						
7	21.16 ± 1.237	10	21.18 ± 1.178	10	21.18 ± 1.233	10	21.35 ± 0.855	10	21.58 ± 0.906	10						
14	21.67 ± 1.022	10	21.52 ± 1.431	10	21.76 ± 1.416	10	21.76 ± 1.425	10	22.11 ± 1.046	10						
21	21.63 ± 1.162	10	22.06 ± 1.445	10	22.12 ± 1.000	10	21.71 ± 1.514	10	23.2* ± 0.920	10						
28	22.39 ± 0.914	10	22.94 ± 1.306	10	22.75 ± 1.344	10	22.65 ± 1.786	10	24.13* ± 1.096	10						
35	22.72 ± 1.158	10	24.05 ± 4.019	10	22.75 ± 1.446	10	22.84 ± 2.036	10	24.71 ± 1.283	10						
42	23.09 ± 1.382	10	23.62 ± 1.421	10	23.64 ± 1.440	10	23.37 ± 1.734	10	24.83 ± 0.986	10						
49	23.99 ± 1.179	10	24.17 ± 1.759	10	23.98 ± 1.267	10	23.83 ± 1.785	10	-	-						
56	24.97 ± 1.293	10	24.79 ± 2.037	10	24.10 ± 1.067	10	24.23 ± 1.886	10	-	-						
63	24.76 ± 0.938	10	24.98 ± 1.359	10	25.49 ± 1.367	10	24.59 ± 1.798	10	-	-						
70	25.22 ± 1.341	10	25.21 ± 1.305	10	24.86 ± 1.164	10	24.81 ± 1.959	10	-	-						
77	25.90 ± 1.247	10	26.14 ± 1.862	10	25.67 ± 1.060	10	25.97 ± 2.372	10	-	-						
84	25.39 ± 1.289	10	25.51 ± 1.370	10	24.73 ± 1.138	10	24.96 ± 1.940	10	-	-						
91	25.27 ± 1.487	10	25.39 ± 1.531	10	25.36 ± 1.327	10	25.23 ± 1.824	10	-	-						
98	25.80 ± 1.489	10	25.69 ± 1.637	10	25.54 ± 1.428	10	25.47 ± 1.833	10	-	-						
105	26.82 ± 1.452	10	26.83 ± 1.817	10	26.42 ± 1.671	10	26.50 ± 1.934	10	-	-						
112	26.44 ± 1.371	9	26.21 ± 1.563	10	26.28 ± 1.757	10	25.90 ± 1.965	10	-	-						
119	26.38 ± 1.499	9	26.59 ± 1.691	10	25.77 ± 1.769	10	25.89 ± 1.924	10	-	-						
126	26.88 ± 1.369	9	26.71 ± 1.238	10	27.22 ± 1.764	10	26.30 ± 1.736	10	-	-						
133	26.85 ± 1.468	9	26.68 ± 2.048	10	26.89 ± 1.771	10	26.11 ± 1.434	10	-	-						
140	26.97 ± 1.577	9	26.82 ± 1.717	10	26.79 ± 2.084	10	26.35 ± 2.323	10	-	-						
147	26.70 ± 1.221	9	26.75 ± 1.739	10	27.28 ± 2.431	10	26.27 ± 2.044	10	-	-						
154	27.83 ± 1.649	9	27.26 ± 2.170	10	27.52 ± 2.232	10	26.62 ± 1.677	10	-	-						
161	27.01 ± 1.788	9	26.89 ± 1.642	10	27.66 ± 2.145	10	26.25 ± 1.339	10	-	-						
168	26.88 ± 1.562	9	26.88 ± 1.875	10	27.14 ± 2.524	10	26.33 ± 1.159	10	-	-						
176	26.45 ± 2.428	9	26.84 ± 1.967	10	27.31 ± 2.387	10	26.37 ± 1.496	10	-	-						
181	26.71 ± 3.177	9	27.04 ± 1.874	10	27.58 ± 2.618	10	26.60 ± 1.717	10	-	-						
Body weight gain																
0~18	4.77 ± 2.578	9	4.92 ± 1.677	10	5.47 ± 2.739	10	4.48 ± 1.322	10	-	-						

S.D., Standard Devia N, Number of Anima\*, Significantly different from the control group; p < 0.05.

<sup>a</sup>Animals were inoculated with A431 cell line at 4th days after inoculation CADMSC and sacrificed at 42th day.

**혈액생화학적 검사.** 모든 실험 동물은 시험 종료 후 isoflurane으로 마취하에서 채혈하여 얻은 혈액을 30분간 방치, 응고 시킨 후 원심분리하여 얻은 혈청에 대하여 alanine transaminase(ALT), aspartate transaminase (AST), phosphorus, triglyceride(TG), cholesterol, glucose, total protein(TP), albumine, blood urea bilirubin(TBIL), lactate dehydrogenase(LDH), calcium, creatinine phosphokinase(CPK) 치를 PRIME automatic photometer(BPC+ Bio sad)를 이용하여 측정하였다.

**부검 및 장기 무게.** 시험종료 후 모든 동물에 대하여 isoflurane으로 마취하에 방혈 및 치사시켰으며 육안적으로 장기를 검사하였다. 모든 실험 동물에 대하여 비장, 신장(좌, 우), 간, 심장, 폐의 무게를 측정하였다.

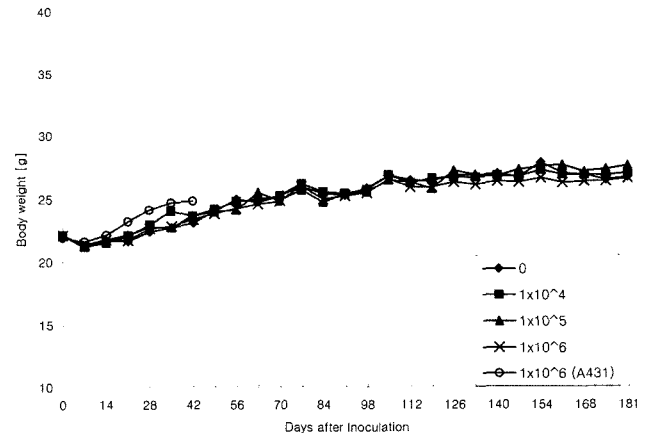
**병리 조직학적 검사.** 부검 후 무게를 측정한 장기와 췌장, 림프절, 위, 난소, 자궁, 방광, 뇌 등의 장기와 피하 주사를 한 등 부분의 피부, 근육과 척추 및 대퇴골을 10% 중성 포르말린용액에 고정하였다. 충분한 고정을 거친 모든 장기조직을 파라핀 포매기에서 포매하여 조직절편으로 만들어 Hematoxylin & Eosin 염색을 하여 광학 현미경으로 검사하였다.

**통계학적 분석.** 얻은 자료는 컴퓨터 소프트웨어프로그램을 사용하여 평균값과 표준편차로 표기하였으며, 일원 배치분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA) 방식으로 세포의 농도와 군별 통계학적 유의성을 검사하였다. 통계학적 유의수준은 5%에서 검정하였다.

## 결 과

**일반증상 및 사망률.** 음성대조군에서 시험 시작 42일에 폐사된 한마리가 발견되었으나 대조군이라는 점과 특이적인 증상이 관찰되지 않은 점을 통해 본 실험물질과는 관계가 없는 것으로 판단되었다. 양성 대조군에서의 종양 발생 이외에 실험 중 음성대조군과 실험군에서는 어떠한 특이한 임상증상도 관찰되지 않았다.

**체중 변화.** 실험 전 기간 중 실험군에서는 음성대조군과 비교하여 어떠한 특이적인 체중 변화도 관찰되지 않았다. 실험 시작 후 21, 28일에 양성대조군에서 유의성있는 ( $p < 0.05$ ) 체중증가가 관찰되었으나 이후의 결과에서 유의성을 상실한 것을 볼 때 일시적인 증가인 것으로 생각된다(Table 1, Fig. 1).



**Fig. 1.** Body weight changes of female BALB/c-nu mice subcutaneously inoculated with cAD-MSC in tumorigenic study.

**종양발생.** 실험 기간 중 양성 대조군을 제외한 모든 군에서 종양발생이 확인되지 않았다. 양성 대조군에서의 종양발생은 실험 시작 후 7일부터 관찰되었으며(Table 2, Fig. 2), 종양발생율은 100%였다. 양성 대조군은 종양의 성장에 따른 마우스의 고통경감을 위하여 종양발생 5주 후 윤리적 차원에서 안락사가 이루어졌다. 그러나 음성 대조군 및 실험군에서는 종양이 발견되지 않았다(Table 3).

**육안적인 부검소견 및 혈액생화학적 검사소견.** 모든 대조군 및 실험군에서 육안적인 임상증상은 관찰되지 않았다. 양성대조군에서의 종양발생은 주사한 피부부위에서만 발생한 것으로 관찰되었다.

혈액생화학적 검사에서도 모든 대조군 및 실험군에서 유의적인 변화는 관찰되지 않았다(데이터는 표시하지 않음).

**장기 무게의 변화.** 무게를 측정한 다섯 장기에서 음성 대조군과 비교하여, 절대 무게와 상대적인 장기 무게 모두 실험군에서는 어떠한 유의적인 변화도 관찰되지 않았다. 양성 대조군은 심장의 절대 무게와 상대적 무게에서 유의적 증가( $p < 0.05$ )를, 폐의 상대적 무게에서 유의적인 감소를 보였다(Tables 4, 5).

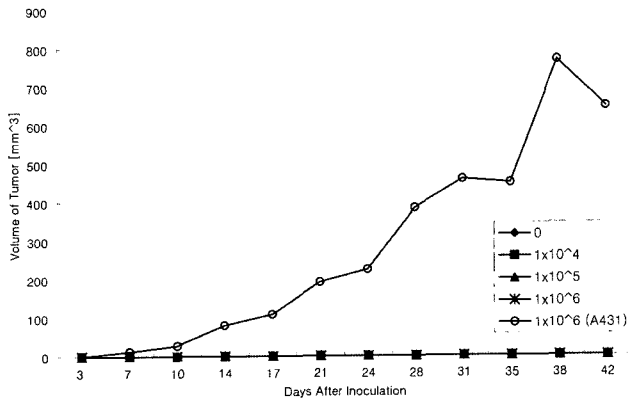
**병리조직학적 소견.** 음성대조군에 비교하여 양성대조군 및 실험군에서 어떠한 특이적인 조직학적 소견도 발견되지 않았다. 양성대조군에서는 피부암 세포주인 A431을 피하주사한 피부부위에서 종양발생이 확인되었으며 다른 조직 및 장기에서는 종양발생이 관찰되지 않아 타 장기로의 전이가 이루어지지 않았음을 확인할 수 있었다.

**Table 2.** Summary of tumor volume values of female BALB/c-nu mice subcutaneously inoculated with cAD-MSC in tumorigenic study

Dosage in (cells/0.1 ml/mouse)	Group summary of tumor volume (Unit : mm <sup>3</sup> )														
	0 (Control)			1 × 10 <sup>4</sup>			1 × 10 <sup>5</sup>			1 × 10 <sup>6</sup>			1 × 10 <sup>6</sup> (A431) <sup>a</sup>		
	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N
3	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	0.00 ±	0.00	10
7	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	12.95 ±	8.46	10
10	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	28.12 ±	20.05	10
14	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	80.08 ±	55.35	10
17	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	109.03 ±	68.00	10
21	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	192.74 ±	114.90	10
24	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	225.43 ±	143.15	10
28	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	384.61 ±	319.81	10
31	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	458.94 ±	360.47	10
35	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	449.90 ±	421.93	10
38	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	770.31 ±	980.70	10
42	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	648.40 ±	571.38	10
45	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
49	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
52	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
56	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
60	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
63	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
67	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
70	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
74	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
77	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
81	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
84	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
88	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
91	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
95	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
98	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
102	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
105	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
109	ND		10	ND		10	ND		10	ND		10	-		
112	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
116	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
119	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
123	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
126	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
130	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
133	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
137	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
140	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
144	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
148	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
151	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
155	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
158	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
162	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
165	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
169	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
172	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
176	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
179	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		
181	ND		9	ND		10	ND		10	ND		10	-		

S.D., Standard Deviation; N, Number of Animals; ND, Not Detected.

<sup>a</sup>Animals were inoculated with A431 cell line at 4th days after inoculation cAD-MSC and sacrificed at 42th day.



**Fig. 2.** Tumor volume changes of female BALB/c-nu mice subcutaneously inoculated with cAD-MSC in tumorigenic study.

**고찰 및 결론**

줄기세포란 자기분화능력을 가지고 있으며, 많은 수의 미분화 세포로 증식하고, 조직을 수복하는 능력을 가진 미분화세포이다. 일반적으로 배아줄기세포(embryonic stem cells; ESCs)만이 전능성을 가지고 있다고 알려져 있으며, 생체내 시험(*in vivo*)와 생체외시험(*in vitro*)으로 이루어진 많은 연구에서 그를 뒷받침하는 결과들이 발표되어졌다. 반대로, 성체에서 얻은 줄기세포는 분화되고 재

생될 수 있는 조직이 제한적이라고 생각되며, 이러한 제한적인 분화능력을 가진 줄기세포가 골수뿐만이 아니라 근육이나 혈관내피, 심장이나 간에도 분포하는 것이 발견되어 각 조직의 줄기세포를 분리해내는 연구가 진행되고 있다(Blau et al., 2001).

많은 동물에의 이식 연구에서 중간엽줄기세포는 조직으로 분화되어 손상된 조직을 수복하거나 부분적으로 정상 기능을 되찾게 하였다. 중간엽 줄기세포는 중간엽유래의 조직인 추간판(Crevensten et al., 2004)이나 뼈(Arinzeh et al., 2003; Chamberlain et al., 2004), 심근(Grinemo et al., 2004), 무릎 연골(Barry, 2003) 뿐만 아니라 신경(Sugaya, 2003)이나 피부조직, 폐나 간, 신장, 비장(Chapel et al., 2003; Ortiz et al., 2003) 등으로도 분화하는 양상을 보였다. 이러한 결과들은 성체 줄기세포의 세포 치료제로서의 다양한 조직의 수복이나 재생의 유용성과 가용성을 증명한다고 할 수 있을 것이다(Baksh et al., 2004).

이 중, 중간엽줄기세포(Mesenchymal stem cells; MSCs)는 개체의 발생과정 중 다양한 조직에서 발견되며, 성체에서는 골수에 존재하는 것으로 알려져왔다. 이후 여러가지 세포조직에서의 중간엽 줄기세포 분리연구가 행해졌으며, 현재 골수뿐만이 아니라 제대혈, 지방세포에서의 중간엽줄기세포의 분리가 확인되어 있다. 이러한 중간엽 줄기세포는 다양한 결합조직으로의 분화가 확인되었으며,

**Table 3.** Tumor incidence rate of female BALB/c-nu mice subcutaneously inoculated with cAD-MSC in tumorigenic study

Test item	Dosage in (cells/0.1 ml/mouse)	No. of animals	No. of tumor bearing mice	Tumor incidence rate (%)
PBS	0	10	0/10	0
cAD-MSC	1 × 10 <sup>4</sup>	10	0/10	0
cAD-MSC	1 × 10 <sup>5</sup>	10	0/10	0
cAD-MSC	1 × 10 <sup>6</sup>	10	0/10	0
A431	1 × 10 <sup>6</sup>	10	10/10	100

**Table 4.** Summary of absolute organ weight values of female BALB/c-nu mice subcutaneously inoculated with cAD-MSC in tumorigenic study

Dosage in (cells/0.1 ml/mouse) items	Group summary organ weight (Unit : g)														
	0 (Control)			1 × 10 <sup>4</sup>			1 × 10 <sup>5</sup>			1 × 10 <sup>6</sup>			1 × 10 <sup>6</sup> (A431)		
	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N
Necropsy	26.03 ± 3.03		10	26.28 ± 1.84		10	26.57 ± 2.52		10	25.70 ± 1.76		10	26.64 ± 3.13		10
Spleen	0.1216 ± 0.0257		10	0.1437 ± 0.0362		10	0.2157 ± 0.2587		10	0.1221 ± 0.0304		10	0.1424 ± 0.0414		10
Liver	1.2214 ± 0.4315		10	1.0702 ± 0.4529		10	1.3227 ± 0.5083		10	1.1365 ± 0.1989		10	1.2814 ± 0.4687		10
Kidney (L)	0.1838 ± 0.0401		10	0.1763 ± 0.0138		10	0.1768 ± 0.0323		10	0.1601 ± 0.0168		10	0.1715 ± 0.0158		10
Kidney (R)	0.1741 ± 0.0388		10	0.1752 ± 0.0155		10	0.1808 ± 0.0286		10	0.1644 ± 0.0152		10	0.1768 ± 0.0233		10
Heart	0.1307 ± 0.0161		10	0.1291 ± 0.0119		10	0.1307 ± 0.0129		10	0.1251 ± 0.0092		10	0.1468 <sup>a</sup> ± 0.0168		10
Lung	0.1719 ± 0.0134		10	0.1658 ± 0.0137		10	0.1753 ± 0.0266		10	0.1627 ± 0.0268		10	0.1522 ± 0.0241		10

S.D., Standard Deviation; N, Number of Animals.  
<sup>a</sup>, Significantly different from the control group; p < 0.05.

**Table 5.** Summary of relative organ weight values of female BALB/c-nu mice subcutaneously inoculated with cAD-MSC in tumorigenic study

Dosage in (cells/0.1 ml/mouse) items	Group summary organ weight (% body weight)														
	0 (Control)			1 × 10 <sup>4</sup>			1 × 10 <sup>5</sup>			1 × 10 <sup>6</sup>			1 × 10 <sup>6</sup> (A431)		
	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N	Mean	S.D.	N
Necropsy	26.03 ± 3.03		10	26.28 ± 1.84		10	26.57 ± 2.52		10	25.70 ± 1.76		10	26.64 ± 3.13		10
Spleen	0.5318 ± 0.2425		10	0.5434 ± 0.1091		10	0.7638 ± 0.7809		10	0.4731 ± 0.1034		10	0.4821 ± 0.1633		10
Liver	4.6510 ± 1.5267		10	4.0829 ± 1.7271		10	4.8885 ± 1.3086		10	4.3983 ± 0.5027		10	4.4199 ± 1.8961		10
Kidney (L)	0.7059 ± 0.1173		10	0.6724 ± 0.0508		10	0.6643 ± 0.0862		10	0.6229 ± 0.0528		10	0.6075 ± 0.1689		10
Kidney (R)	0.6730 ± 0.1382		10	0.6668 ± 0.0384		10	0.6797 ± 0.0744		10	0.6399 ± 0.0444		10	0.6198 ± 0.1702		10
Heart	0.5036 ± 0.0468		10	0.4915 ± 0.0299		10	0.4927 ± 0.0332		10	0.4873 ± 0.0263		10	0.5539 <sup>a</sup> ± 0.0526		10
Lung	0.6675 ± 0.0852		10	0.6323 ± 0.0519		10	0.6597 ± 0.0695		10	0.6311 ± 0.0800		10	0.5733 <sup>a</sup> ± 0.0725		10

S.D., Standard Deviation; <sup>a</sup>, Significantly different from the control group; p < 0.05. N, Number of Animals.

배양을 통해 다량을 얻을 수 있는 이점이 있어 생체내 실험에서의 줄기세포 자체의 연구뿐만 아니라 줄기세포를 이용한 조직공학적인 구조체의 연구도 이루어지고 있다. 이러한 연구는 조직이 재생 혹은 수복되지 않아 발생하는 질병의 치료에 새로운 돌파구로 제시되고 있다(Caplan and Bruder, 2001).

본 연구에서 이용된 지방세포 유래의 중간엽줄기세포는 개체에서 많은 부분을 차지하는 지방세포에서 줄기세포를 분리해 냄으로써 유래세포에 대한 윤리적 문제를 피할 수 있다는 장점과 유래세포의 풍부함으로 인해 최근 주목받기 시작한 성체 중간엽줄기세포이다.

지방세포 유래 성체 중간엽줄기세포를 이용하여 성체 중간엽줄기세포의 세포치료제로서의 임상도입 전에 실험 동물에서의 이 세포의 종양형성 여부를 확인함으로써 안전성을 확보하고, 제대혈이나 골수 유래의 성체 중간엽줄기세포의 발암성 시험을 위한 실험 과정을 설계, 수립하는 것이 이번 실험의 의의였다.

여기에서는 6주령의 암컷 BALB/c-nu 마우스에서 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup> cell/mouse의 농도로 개의 지방세포유래 중간엽 줄기세포를 피하주사하여 6개월간 종양형성 여부를 확인한 결과를 보고하였다. 실험한 모든 세포 농도군에서 육안적으로 종양발생이 일어나지 않음을 확인하였으며, 혈액생화학적 검사에서도 음성대조군에 비하여 특이적인 차이는 관찰되지 않았다. 또한 본 세포가 분화할 수 있다고 알려진 모든 세포 조직 및 장기에 대한 병리조직학적 소견에서도 종양의 발생이나 종양의 초기 증상등은 발견되지 않았다.

이상의 결과를 종합할때 시험물질인 개의 지방세포 유래 중간엽줄기세포는 본 실험조건하에서 육안적, 조직학적 소견 및 혈액생화학적 분석결과를 종합하여 볼 때 종양발생 및 그에 수반되는 특이한 임상소견 및 변화를 나타내지 않아 세포치료제로서의 종양 형성여부에 관하여

안전성을 확인했다고 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 서울시 산학연 협력사업 중 제대혈줄기세포 응용사업단 사업(10548)과 BK21 수의인력양성사업의 일환으로 수행되었다.

### 참고문헌

Arinzech, T.L., Peter, S.J., Archambault, M.P., van den, B.C., Gordon, S., Kraus, K., Smith, A. and Kadiyala, S. (2003). Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J. Bone Joint Surg. Am.*, **85**, 1927-1935.

Baksh, D., Song, L. and Tuan, R.S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.*, **8**, 301-316.

Barry, F.P. (2003). Mesenchymal stem cell therapy in joint disease. *Novartis Found. Symp.*, **249**, 86-96.

Blau, H.M., Brazelton, T.R. and Weimann, J.M. (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell.*, **105**, 829-841.

Caplan, A.I. and Bruder, S.P. (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol. Med.*, **7**, 259-264.

Chamberlain, J.R., Schwarze, U., Wang, P.R., Hirata, R.K., Hankenson, K.D., Pace, J.M., Underwood, R.A., Song, K.M., Sussman, M., Byers, P.H. and Russell, D.W. (2004). Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta. *Science*, **303**, 1198-1201.

Chapel, A., Bertho, J.M., Bensidhoum, M., Fouillard, L., Young, R.G., Frick, J., Demarquay, C., Cuvelier, F., Mathieu, E., Trompier, F., Dudoignon, N., Germain, C., Mazurier, C., Aigueperse, J., Borneman, J., Gorin, N.C., Gourmelon, P. and Thierry, D. (2003). Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-

- organ failure syndrome. *J. Gene Med.*, **5**, 1028-1038.
- Crevensten, G., Walsh, A.J., Ananthakrishnan, D., Page, P., Wahba, G.M., Lotz, J.C. and Berven, S. (2004). Intervertebral disc cell therapy for regeneration: mesenchymal stem cell implantation in rat intervertebral discs. *Ann. Biomed. Eng.*, **32**, 430-434.
- Grinnemo, K.H., Mansson, A., Dellgren, G., Klingberg, D., Wardell, E., Drvota, V., Tammik, C., Holgersson, J., Ringden, O., Sylven, C. and Le Blanc, K. (2004). Xenoreactivity and engraftment of human mesenchymal stem cells transplanted into infarcted rat myocardium. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **127**, 1293-1300.
- Jackson, L., Jones, DR., Scotting, P. and Sottile, V. (2007). Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J. Postgrad Med.*, **532**, 121-127.
- Lee, R.H., Kim, B., Choi, I., Kim, H., Choi, H.S., Suh, K., Bae, Y.C. and Jung, J.S. (2004). Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell. Physiol. Biochem.*, **14**, 311-324.
- Lin, T.M., Tsai, J.L., Lin, S.D., Lai, C.S. and Chang, C.C. (2005). Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev.*, **14**, 92-102.
- Ohnishi, S., Yanagawa, B., Tanaka, K., Miyahara, Y., Obata, H., Kataoka, M., Kodama, M., Ishibashi-Ueda, H., Kangawa, K., Kitamura, S. and Nagaya, N. (2007). Transplantation of mesenchymal stem cells attenuates myocardial injury and dysfunction in a rat model of acute myocarditis. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **42**, 88-97.
- Ortiz, L.A., Gambelli, F., McBride, C., Gaupp, D., Baddoo, M., Kaminski, N. and Phinney, D.G. (2003). Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 8407-8411.
- Pansky, A., Roitzheim, B. and Tobiasch, E. (2007). Differentiation potential of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Lab.*, **53**, 81-84.
- Sawada, R., Ito, T. and Tsuchiya, T. (2007). Safety evaluation of tissue engineered medical devices using normal human mesenchymal stem cells. *Yakugaku Zasshi*, **127**, 851-856.
- Sugaya, K. (2003). Potential use of stem cells in neuroreplacement therapies for neurodegenerative diseases. *Int. Rev. Cytol.*, **228**, 1-30.
- Vilquin, J.T. and Rosset, P. (2006). Mesenchymal stem cells in bone and cartilage repair: current status. *Regen Med.*, **1**, 589-604.