

인간태반양막유래 상피줄기세포의 임상적용을 위한 새로운 세포분리 및 배양 기술

우상규 · 조정윤 · 신일섭 · 강성근[†] · 라정찬

(주)알앤엘바이오 중앙연구소

New Isolation Technique and Culture System for Clinical Applications of Human Amniotic Epithelial Stem Cells

Sang Kyu Woo, Jung Yoon Jo, Il Seob Shin, Sung Keun Kang[†] and Jeong Chan Ra

Central Research Institute, RNL BIO Co. Ltd. Seoul 153-768, Korea

ABSTRACT : Human placenta is abundant source of adult stem cells. Especially, amniotic epithelial cells have stem cell characteristics, expressing surface markers normally present on embryonic stem cells and germ cells. However, culturing and expanding amniotic epithelial cells *in vitro* without feeder cells are difficult due to endogenous characteristics of epithelial cells. In the present study, amniotic epithelial cells are isolated and proliferated in several passages by applying dithiothreitol and a Rho-associated kinase inhibitor in culture media. The cultured amniotic epithelial cells showed the epithelial and stem cell characteristics. In conclusion, human placenta-derived amniotic epithelial stem cells can be a major source of stem cells for medical treatment of various diseases without any controversial issues.

Key words : Amniotic epithelial stem cells, Regenerative medicine, DTT, ROCK inhibitor, Stem cell therapy.

요 약 : 태반은 성체줄기세포의 보고이다. 특히 양막상피세포는 배아줄기세포의 줄기세포 능력을 나타내는 세포 표면 표시자들을 그대로 발현하는 줄기세포로 알려져 있다. 하지만 상피세포를 실험실에서 지지세포 없이 대량 증식 배양하는 것은 상피세포가 가지고 있는 내인성 성격으로 인해 어렵다. 본 연구에서는 디티오프레이톨(Dithiothreitol; DTT)과 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)를 이용하여 양막상피세포를 분리하고 배양하는데 있어서 임상적용이 가능한 수준의 세포를 얻었고, 최적의 세포상태를 유지하였다. 본 연구에서 분리배양된 양막상피세포는 상피세포의 특성과 줄기세포의 특성을 발현하였다. 결론적으로 줄기세포 치료를 이용한 재생의학의 관점에서 인간태반 유래 양막상피줄기세포는 아무런 윤리적인 논란을 일으키지 않는 주요한 줄기세포 치료제의 재료로서 여러 가지 질병 치료에 사용될 수 있을 것이다.

서 론

태반 유래 양막상피세포는 배아줄기세포에 버금가는 능력을 가진 것으로 알려져 있지만, 질병을 치료할 수 있는 임상에 적용이 가능한 수준으로의 증식 배양하는 것이 어려워 세포 치료에 있어서 난관에 부딪혀 있다(Miki et al., 2005). 이에 태반 양막으로부터 상피세포를 얻기 위하여 전처리하는 과정과 이후의 세포를 분리하여 배양에 이르기까지의 과정

을 연구하여 세포를 안정적으로 증식 배양하는 방법이 요구된다.

성체줄기세포는 골수에서 최초로 분리되었고(Jiang et al., 2002a), 그 후 다른 여러 성체 조직에서도 확인되었다(Verfaillie, 2002). 다시 말해, 골수는 가장 널리 알려진 줄기세포의 공급원이지만, 이러한 다분화능 줄기세포는 피부, 혈관, 근육, 뇌, 지방 및 태반으로부터도 확인되었다(Toma et al., 2001; Jiang et al., 2002b; Sampaolesi et al., 2003; Gimble & Guilak, 2003; Portmann-Lanz et al., 2006; Alviano et al., 2007). 그러나 골수와 같은 성체 조직 내의 줄기세포는 매우 드물게 존재하고, 이러한 세포들을 미분화상태를 유지하며 배양하

[†] 교신저자: 서울특별시 금천구 가산동 550-1번지 롯데 IT캐슬 2동 305호. (우) 153-768, (전) 02-858-8021, (팩) 02-858-8140, E-mail: kangsk@rnl.co.kr

기 어렵다. 즉, 이러한 줄기세포를 체외에서 분리 배양하려면 특이적으로 선별된 배지와 배양 기술이 필요하다.

골수유래줄기세포와 마찬가지로 뛰어난 분화능력과 안전성으로 각광을 받는 태반 줄기세포(Portmann-Lanz et al., 2006; Alviano et al., 2007)는 제대혈에 비해 100배 더 많은 양의 중간엽줄기세포를 추출할 수 있을 뿐만 아니라, 사용 가능 회수에서도 제대혈이 1회에 한정하고 15세 이상이 되면 타인의 제대혈을 보충해야 하지만, 태반 줄기세포는 여러 번 사용할 수 있어 성인이 되어서도 사용 가능한 것으로 알려졌다. 또한, 태반 줄기세포는 보다 다양한 질환에 이용될 수 있다. 제대혈의 조혈모세포는 주로 혈액 질환에 사용되나, 태반 줄기세포는 세포 손상 질환에 사용에 유리하여 향후 심장마비, 뇌졸중, 당뇨병, 골다공증, 퇴행성 관절염 등 많은 질병에 이용할 수 있다. 그러나, 성체줄기세포의 공급원으로 태반을 이용하는데 있어서, 분만 직후의 태반 조직을 필요한 순간마다 바로 제공받기는 어려운 실정이며, 실제로 태반 조직의 산업적 이용(태반 주사, 태반 화장품류)은 분만 후의 태반 조직을 냉장 보관하였다가 사용하고 있다. 미분화 상태로 존재하는 태반 유래 줄기세포는 분만 직후의 태반으로부터만 많은 양으로 수득할 수 있을 뿐, 분만 후 몇 시간이 경과되거나 특히, 오랜 시간 동안 냉장 보관되어 있던 태반 조직으로부터는 다량의 성체줄기세포를 수득하는 것이 매우 어렵다. 그렇기 때문에 현시점에서 태반 유래 성체줄기세포를 산업적으로 이용할 수 있기 위해서는 무엇보다도 냉장 보관되어 있는 태반 조직 등으로부터 대량으로 성체줄기세포를 제조할 수 있는 방법이 절실히 요구되고 있다.

최근에 배아줄기세포의 특성과 가장 유사한 특성을 보유했다(Miki et al., 2005). 양막상피세포는 태반을 구성하는 양막상피조직 중 배 형성 이전 또는 수정 후 8일된 외배엽으로부터 발달한 것으로 배 형성 전 배아세포의 유연성을 유지하고 있는 것을 특징으로 하고 있다. 따라서 상기 양막상피세포의 표면 표시자는 배아에서 발현되는 것과 동일한 것으로 확인되었고, 면역조직화학적 분석 및 유전학적 분석에 의하여 양막상피세포 유래 성체줄기세포가 내배엽, 중배엽, 외배엽 유래 세포로 모두 분화 가능한 능력을 가지고 있으며, 체

내에서 암 발생을 일으키지 않는 것으로 확인되었다(Miki et al., 2005). 그러나 이러한 양막상피줄기세포는 다른 태반 조직 유래 성체줄기세포(중간엽줄기세포)와 달리 초기 세포 배양 및 계대 배양 시 세포 사멸 과정으로 진행되기 쉬워 기존의 배양 방법으로는 미분화 상태의 양막상피세포 유래 성체 줄기세포를 대량으로 증식하는 것이 곤란하였다. 즉, 미분화 상태로 존재하는 양막상피세포 유래 줄기세포는 오직 분만 직후의 태반으로부터 많은 양으로 수득할 수 있을 뿐, 분만 후 몇 시간이 경과되거나 특히, 오랜 시간 동안 냉장 보관되어 있던 태반 조직으로부터는 다량의 성체줄기세포를 수득하는 것이 매우 어렵다. 통상적으로 태반에서 분리된 양막은 혈액과 점액질 등으로 표면이 둘러싸이게 된다. 이러한 점액질 등은 양막으로부터 단일 세포를 분리하는 데 장애가 되는 요소로서 종래 트립신 처리에 따른 효과를 감소시키는 역할을 해왔다. 이에 트립신 처리 전에 점액질 등의 불순물을 제거하여 단일세포의 분리에 사용되는 트립신의 효과를 극대화시킬 수 있는 환경 조성의 필요성 역시 요구되고 있다. 또한 상피세포를 실험실에서 지지세포 없이 배양하면 세포 사멸로 진행되기 때문에 대량 증식 배양에 어려움이 있으므로 분리된 세포의 배양 시 세포 사멸로의 진행을 억제시킬 필요성이 존재한다.

본 연구는 양막상피세포를 수득하는 과정에 있어서 트립신 처리 전에 디티오프레이톨(Grossmann et al., 1998)을 처리하는 방법을 사용함으로써 양막상피세포를 초기에 대량으로 수득하며, 분리된 세포의 세포 사멸을 억제하여 대량으로 배양시킬 수 있도록 배양 배지에 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)를 첨가하여 배양함으로써 양막상피세포를 임상에 적용이 가능한 수준의 세포수까지 증식시킬 수 있음을 확인하였다. 또한 이렇게 분리배양된 양막상피세포에 대해 줄기세포 전능성 표시자와 상피세포 표시자의 발현을 확인함으로써 상피유래줄기세포임을 확인하였다.

재료 및 방법

1. 태반의 수집 및 전처리

사람 태반은 고려대학교 임상실험윤리위원회의 지침서에 따라 고려대학교 부속 구로병원에서 정상분만과 제왕절개를 통한 분만 후에 얻어진 태반을 수집하여 실험에 사용하였다. 실험에 필요한 양막조직은 태반으로부터 벗겨내어 분리하였으며(Miki et al., 2005), 분리된 양막은 항생제가 포함된 생

리식염수 혹은 DMEM 배지에 넣어 연구실까지 옮겼다.

2. 양막상피세포의 분리

1) 디티오프레이톨 및 Trypsin-EDTA 처리에 의한 양막상피세포의 분리

태반을 연구실로 옮겨온 후 태반으로부터 양막을 벗겨 내고, HBSS(Gibco, USA)에 넣어 수 차례 세척하여 혈액을 제거하였다. 양막조직을 5 g 정량하여 잘라내고 10 mM 디티오프레이톨(Gibco, USA)을 첨가한 HBSS에 넣어 30분간 상온에서 반응시켰다(Grossmann et al., 1998). 반응이 끝난 양막 조직을 다시 HBSS를 이용하여 수 차례 세척하고 양막에 붙은 점액질이 충분히 제거되었는지 육안으로 확인하였다.

점액질이 제거된 양막조직을 수술용 가위를 이용하여 잘게 잘라내고 0.05% trypsin-EDTA를 함유한 DMEM(Gibco, USA) 배지를 이용하여 37°C 인큐베이터에서 40~60분간 교반하며 반응시켰다. 화학적으로 분해된 조직을 1분간 vortexing 한 후 1 mm mesh에 1차로 걸러주어 남은 조직을 제거하였다. 이후에 1차 걸러진 용액을 다시 100 μ m cell strainer(BD Falcon, USA)를 이용하여 남은 조직과 찌꺼기를 제거하였다. 걸러진 용액을 원심분리하여 세포를 얻은 다음 Hemocytometer를 이용하여 Trypan Blue Dye법으로 현미경상에서 육안으로 관찰되는 살아있는 세포들을 계수하였다.

2) Trypsin-EDTA 처리에 의한 양막상피세포의 분리

5 g 정량하여 잘라낸 양막조직을 0.05% trypsin-EDTA를 첨가한 DMEM에 넣어 10분간 37°C에서 반응시켰다. 반응이 끝난 양막 조직을 다시 HBSS를 이용하여 수 차례 세척하고 양막 조직을 수술용 가위를 이용하여 잘게 잘라내었다. 잘게 잘라진 양막 조직을 새로운 0.05% trypsin-EDTA를 함유한 DMEM(Gibco, USA) 배지를 이용하여 37°C 인큐베이터에서 40~60분간 교반하며 반응시켰다. 화학적으로 분해된 조직을 1분간 vortexing 한 후 1 mm mesh에 1차로 걸러주어 남은 조직을 제거하였다. 이후에 1차 걸러진 용액을 다시 100 μ m cell strainer(BD Falcon, USA)를 이용하여 남은 조직과 찌꺼기를 제거하였다. 걸러진 용액을 원심분리하여 세포를 얻은 다음 Hemocytometer를 이용하여 Trypan Blue Dye법으로 현미경상에서 육안으로 관찰되는 살아있는 세포들을 계수하였다.

3. 양막상피세포의 배양

디티오프레이톨과 trypsin-EDTA를 처리하여 얻어진 세포는 우태아 혈청을 함유한 RAEM(RNL BIO, Korea) 배지를 이용하여 T75-플라스크에서 배양을 시작하였고, 다음날 세포가 붙은 정도를 현미경으로 확인 후, DPBS(Welgene, Korea)를 이용하여 부착되지 않은 세포와 찌꺼기를 제거하고 RAEM을 새로 공급하였다. 세포가 배양 플라스크(Nunc, Denmark)에 100% 자랄 때까지 매일 배지를 교환하였다.

4. ROCK 저해제 존재하에서의 세포배양

디티오프레이톨과 trypsin-EDTA를 처리하여 얻어진 양막상피세포를 T75-flask에 4×10^6 세포수로 넣고 ROCK 저해제를 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지로 배양을 하면서 세포의 배양상태를 관찰하였다.

5. ROCK Inhibitor 농도별 양막상피세포 증식 비교

디티오프레이톨과 trypsin-EDTA로 처리하여 얻어진 양막상피세포의 배양에 있어서 ROCK inhibitor의 농도에 따른 양막상피세포의 증식능을 확인하기 위하여 동일한 기본 배지에 ROCK inhibitor 농도를 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 100 nM 또는 10 nM로 첨가하여 배양하며 관찰하였다.

6. FACS 분석

배양한 양막상피세포를 TrypLE-ExpressTM(Gibco, USA)을 이용하여 수거하여 FACS 분석을 위한 프로토콜에 따라 세포를 5% serum(2.5% NGS, 2.5% NHS, 각 Vector, USA)과 1% paraformaldehyde(Junsei, Japan)가 들어간 DPBS에 넣어 4°C에서 90분간 blocking 및 고정하였다. 세포를 분석하고자 하는 항체 개수만큼 일정하게 나누고 각각에 형광물질이 붙은 1차 항체인 CD9, CD29, CD49f, CD73, CD90, CD105, CD31, CD34, CD45, CD133 또는 HLA-DR 항체(BD Pharmingen, USA)를 넣어주고 4°C에서 60분간 반응하였다. 비특이적 항체 반응을 방지하고 잔존할 항체를 제거하기 위해 DPBS를 이용하여 3회 세척과정을 거친 후 유세포 분석기인 FACSCaliburTM(BD, USA)와 CellQuestTM 분석 프로그램을 이용하여 각 항체들에 대한 세포분석을 실시하였다.

7. Immunocytochemistry

4-well chamber slide(Nunc, Denmark)에서 배양한 양막

상피세포의 배지를 제거하고, DPBS로 1회당 3분간 3회 세척하였다. 4% paraformaldehyde가 들어간 DPBS를 넣어주고 4°C에서 60분간 고정하였다. DPBS로 1회당 3분씩 3회 세척한 후 0.1% Triton-X100을 함유한 DPBS로 실온에서 10분간 반응하며 permeabilization시켰다. DPBS로 동일한 세척과정을 거치고 5% serum을 함유한 DPBS로 4°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응 후 DPBS로 세척한 후 1차 항체를 함유한 DPBS를 각각 넣어주고 4°C에서 밤새도록 반응시켰다. DPBS를 이용하여 1회당 3분씩 3회 세척 후 2차 항체를 넣어 4°C에서 60분간 반응시켰다. DPBS 세척 후 DAPI를 넣고 2분간 실온에서 반응시키고 DPBS로 세척 후 mounting 하였다. 1차 항체는 Oct-4, SSEA 4, Tra-1-60, Tra-1-81 및 Cytokeratin(Pan-CK)(Invitrogen, USA; BD Pharmingen, USA; R&D system, USA)을 사용하여 줄기세포 표지자 및 상피세포 표지자를 확인하였다. Oct-4, Tra-1-60, Tra-1-81의 확인은 공초점 형광현미경(Olympus, Japan)을 사용하였고, Pan-CK은 일반 광학 형광현미경(Zeiss, Germany)을 사용하였다.

8. 분화 연구

양막상피세포를 지방세포분화유도배지(AipoDiff™, Miltenyi, Germany), 골형성유도배지(OsteoDiff™, Miltenyi, Germany), 근육세포분화배지(Skeletal Muscle cell medium, LONZA, USA), 신경세포분화유도배지(Neural Progenitor media systems, LONZA, USA)를 사용하여 각각의 회사에서 제공하는 프로토콜에 따라 분화를 유도하였다. 지방세포분화는 3주간의 분화유도 후에 Oil red O 염색법을, 골형성유도는 2주간의 분화유도 후에 Alizarin red S 염색법을 이용하여 각각 분화여부를 확인하였다. 근육세포분화는 3주간의 유도, 신경세포분화는 2주간의 분화유도 후에 면역염색법을 이용하여 각각에 맞는 항체를 선택하여 분화 여부를 확인하였다.

결 과

1. 디티오트레이톨과 Trypsin-EDTA를 이용한 양막상피세포 분리 수득률 비교

태반으로부터 분리해낸 양막조직 5 g을 정량하여 세척 후 디티오트레이톨 처리군과 처리하지 않는 군으로 나누어 각각 세포를 분리하였다. 10 mM 디티오트레이톨을 30분간 상

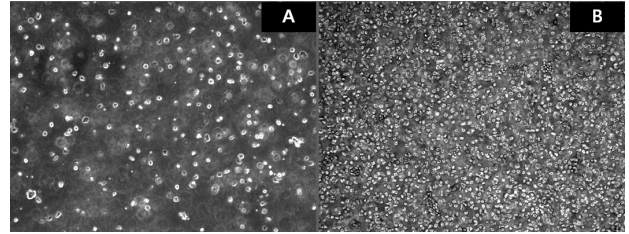


Fig. 1. Comparison of yields in cell isolation with or without DTT treatment. When 10 mM DTT was used, cells were obtained about 40 times more than non-DTT treated condition. (A) Non treated control. ($\times 100$). Counted cell numbers was 9.25×10^5 . (B) 10 mM DTT-treated sample ($\times 100$). Counted cell numbers was 3.72×10^7 .

온에서 처리한 후 조직을 잘게 자르고 0.05% trypsin-EDTA DMEM 용액에서 교반하며 세포를 분리하고 Hemocytometer를 이용하여 Trypan Blue Dye 염색법으로 세포수를 계수한 결과 3.7×10^7 개의 세포를 얻을 수 있었다. 반면, 디티오트레이톨을 처리하지 않고 0.05% trypsin-EDTA 10분 반응 후 조직을 잘게 자르고 0.05% trypsin-EDTA DMEM 용액에서 교반하며 세포를 분리하고 Hemocytometer를 이용하여 Trypan Blue Dye 염색법으로 확인한 결과 세포수는 9.3×10^5 개 밖에 되지 않았다(Fig. 1).

2. ROCK 저해제 첨가 유무에 의한 양막상피세포 증식 촉진 효과

디티오트레이톨과 trypsin-EDTA를 이용하여 조직으로부터 분리해 낸 양막상피세포를 4×10^6 개 세포씩 두 개의 T75-flask에 넣고 10 μ M ROCK 저해제를 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지를 각각 넣어 배양하였다. 배양 1일차, 2일차, 3일차 모두 현미경을 통하여 육안으로 세포의 상태를 확인하였다. Fig. 2A에서와 같이 ROCK 저해제를 넣어 배양한 양막상피세포는 세포의 노화와 사멸이 억제되면서 증식율이 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었고, ROCK 저해제를 첨가하지 않은 군에서는 세포의 노화와 사멸과정이 진행되며, 세포의 증식이 상당히 억제되어 잘 자라지 않는 것을 확인할 수 있었다.

3. ROCK 저해제 농도별 양막상피세포 증식능 비교

ROCK 저해제의 농도에 따른 양막상피세포의 증식능을 확인하기 위하여 디티오트레이톨과 trypsin-EDTA를 이용하여 조직에서 얻어진 양막상피세포의 배양에 있어서 동일

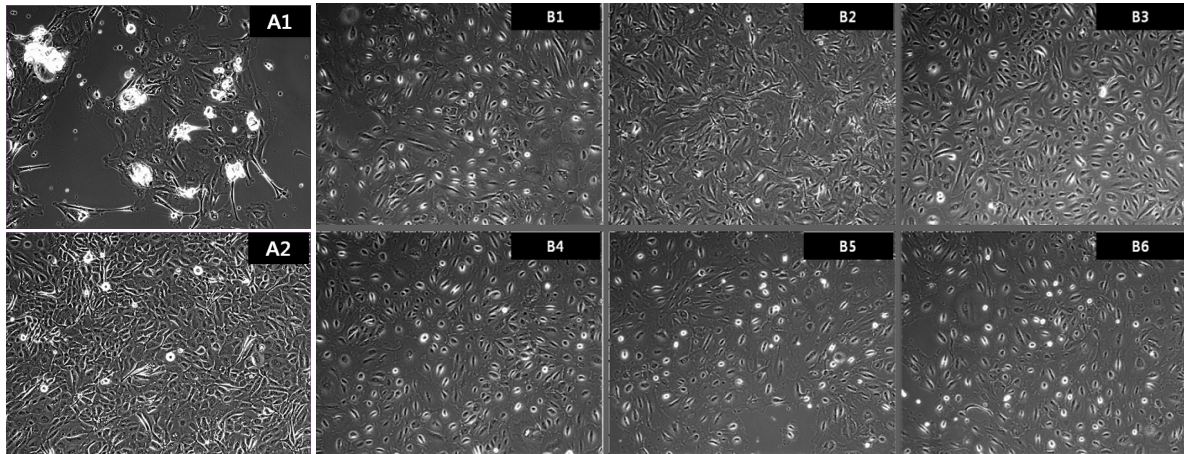


Fig. 2. The effects of a ROCK inhibitor on growth of amniotic epithelial cells. (A1) The control cells at passage 2 were cultured for 3 days without a ROCK inhibitor ($\times 100$). (A2) The cells at passage 2 were cultured for 3 days in media supplemented with $10 \mu\text{M}$ ROCK inhibitor ($\times 100$). Another set of cells at passage 2 were cultured for 4 days in media supplemented with 0 (B1), $100 \mu\text{M}$ (B2), $10 \mu\text{M}$ (B3), $1 \mu\text{M}$ (B4), 100 nM (B5), or 10 nM (B6). The magnification of B1 to B6 was $\times 100$.

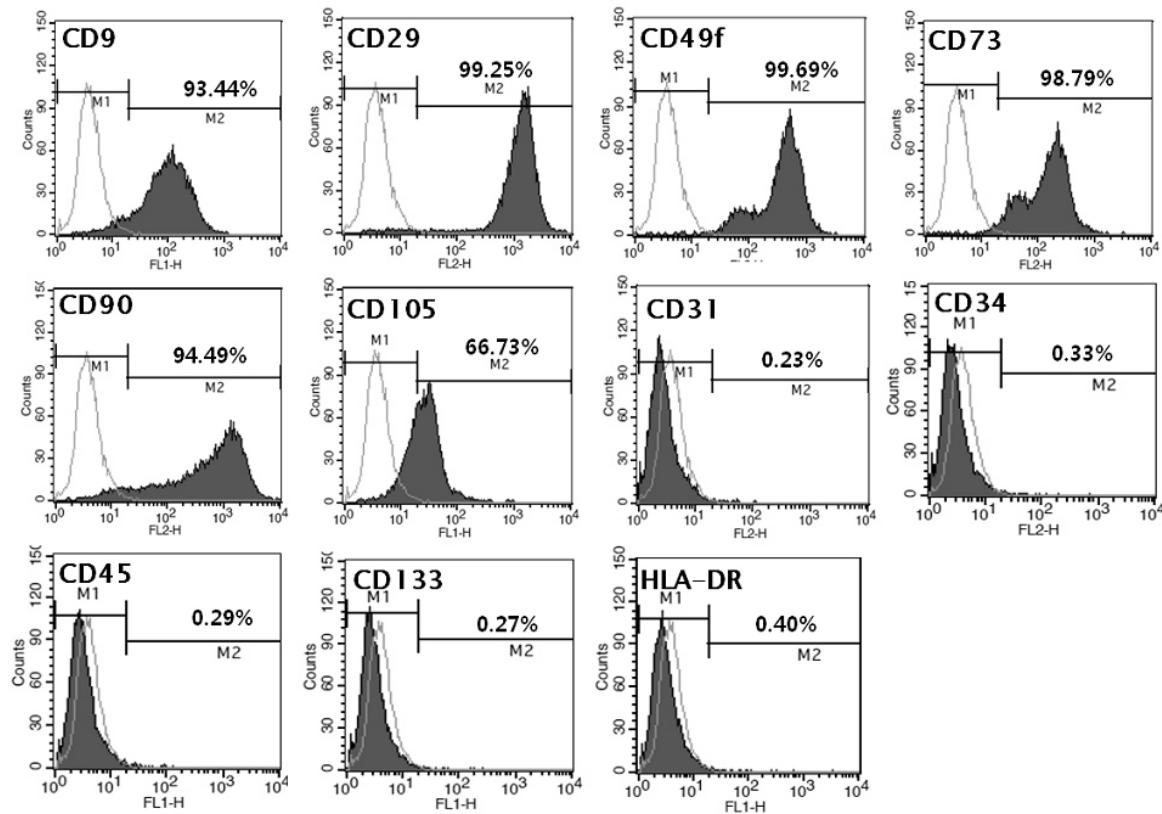


Fig. 3. Analysis of cell surface marker expression by flow cytometry. The cultured cells were trypsinized, fixed and incubated with antibodies of cell surface markers. The expression of surface protein was analyzed by FACS assay. FACS histogram for surface markers demonstrated that CD9, CD29, CD49f, CD73, CD90, or CD105 were positively expressed, and CD31, CD34, CD45, CD133, or HLA-DR were negatively expressed.

한 기본 배지에 ROCK 저해제 농도를 100 μM , 10 μM , 1 μM , 100 nM 또는 10 nM로 첨가하여 배양하며 관찰하였다. Fig. 2B에서 보는 바와 같이 10 nM 농도 이하의 ROCK 저해제를 처리한 경우는 처리하지 않은 대조군과 차이가 거의 보이지 않았고, 100 μM 농도에서는 세포의 증식이 현저하게 향상되는 것은 확인되지만, 세포의 변형이 일어나는 것을 확인할 수 있었다. 가장 세포의 상태를 좋게 유지시키면서 증식률이 유지되는 농도는 10 μM 임을 확인할 수 있었다.

4. FACS를 이용한 세포표면 항체 표시자 확인

Fig. 3에서 보는 바와 같이 11가지의 항체를 이용하여 양막상피세포의 표면 양성, 음성 표시자를 확인하였다. CD9, CD29, CD49f, CD73, CD90, CD105에서 양성반응을 보였으며,

CD31, CD34, CD45, CD133, HLA-DR에서 음성반응을 보였다.

5. Immunocytochemistry

면역형광염색을 통하여 세포 내에 발현하여 줄기세포를 미분화상태로 유지하며 자가증식능력에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Oct-4의 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 그리고 배아줄기세포의 전능성 표시자로 알려진 Tra-1-60, Tra-1-81, SSEA 4 등의 발현도 확인하였다. 배아줄기세포 표시자와 함께 양막상피세포는 상피세포임을 확인할 수 있는 Cytokeratin(Pan-CK; CAM5.2)도 강하게 발현하였다.

6. 분화 연구

양막상피세포를 지방세포, 골세포, 근육세포, 신경세포로

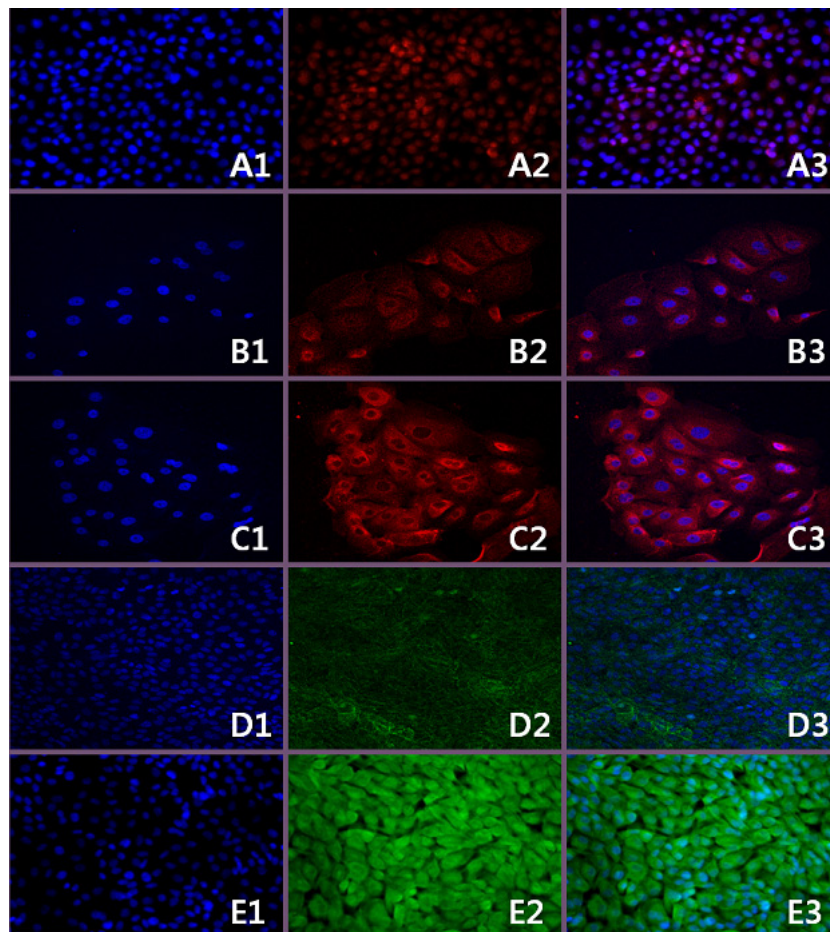


Fig. 4. Immunocytochemical analysis of pluripotent stem and epithelial cell markers in amniotic epithelial cells. (A) Oct-4; A1: DAPI, A2: Oct-4. A3: merged. ($\times 100$) (B) Tra-1-60; B1: DAPI, B2: Tra-1-60, B3: merged. ($\times 200$) (C) Tra-1-81; C1: DAPI, C2: Tra-1-81. C3: merged. ($\times 200$) (D) SSEA 4; D1: DAPI, D2: SSEA 4, D3: merged. ($\times 100$) (E) Pan-CK; E1: DAPI, E2: pan-CK, E3: merged. ($\times 200$)

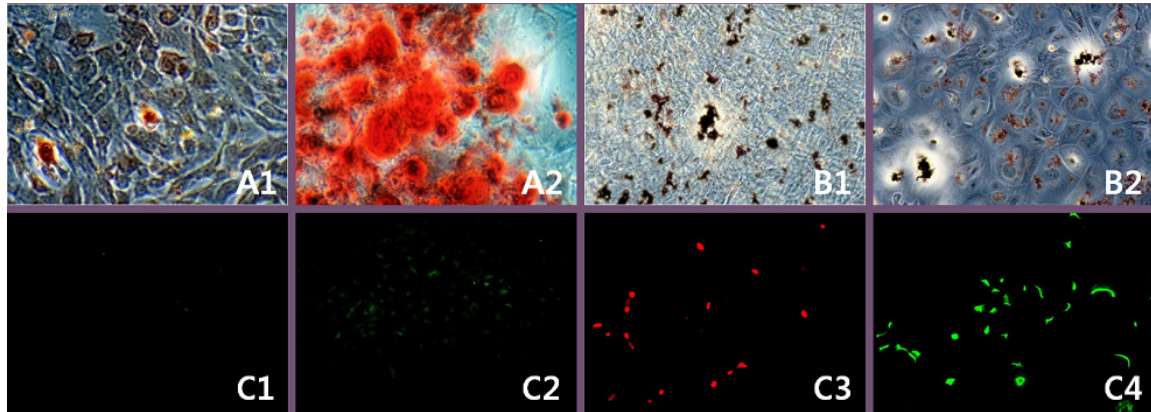


Fig. 5. Differentiation potentials of amniotic epithelial cells. The amniotic cells were differentiated into bone, adipocytes, muscle or neurons. The cells cultured in osteogenic or adipogenic induction condition showed positive staining for Alizarin red S or oil red staining, respectively. (A1) negative control of osteogenic induction ($\times 200$). (A2) osteogenic induction showing Alizarin red S staining ($\times 200$). (B1) negative control of adipogenic induction ($\times 100$). (B2) adipogenic induction showing Oil red O staining ($\times 100$). The cells were also differentiated into muscle cells and neuronal cells as positively stained with antibodies for myosin, GFAP or OI. (C1) negative control of immunostaining for myosin, GFAP and OI antibody ($\times 100$). (C2) positive expression of FITC(green) for myosin ($\times 100$). (C3) positive expression of alexa fluor 568(red) for GFAP. ($\times 100$). (C4) positive expression of alexa fluor 488 for OI ($\times 100$).

분화하기 위해 각각의 분화용 배지를 사용하여 분화를 유도하고, 각 분화결과에 대한 확인과 분석은 지방세포분화의 경우, 3주간의 분화유도 후에 Oil red O 염색법을, 골형성유도는 2주간의 분화유도 후에 Alizarin red S 염색법을, 근육세포분화는 3주간의 유도, 신경세포분화는 2주간의 분화유도 후에 면역염색법을 이용하여 실시하였다. 중배엽 유래의 골세포 및 지방세포, 근육세포로의 분화능을 확인하였고, 외배엽유래의 신경세포로의 분화능 역시 확인하였다.

고찰

양막상피세포는 해부/조직학적으로 자연계에 존재하기 시작한지 10개월 이내의 태아를 위해 특화된 상피세포라 말할 수 있다. 다시 말하자면, 발생과정 중에서 어느 배엽으로든 분화하거나 삼배엽에 속한 세포들에게 도움을 줄 수 있는 생물학적 ‘유연성’을 가지고 있으며, 최근에 배아줄기세포와 같은 능력을 지닌 줄기세포로 알려졌다(Miki et al., 2005). 이번 실험에서 이러한 양막상피세포 줄기세포를 임상적용하기 위해 양막으로부터 상피세포를 분리한 후 배양하는데 성공하였고, 임상적용이 가능한 세포수를 얻기 위해 증식 배양법을 확립하였으며, 이러한 세포가 줄기세포의 특성과 상피

세포의 특성을 가지고 있는 것을 확인하였다.

양막상피세포를 임상적으로 사용 가능한 수로 증식 배양하는 방법을 찾고자 본 연구자들은 기존에 보고된 장관상피세포의 사멸을 억제하는 방법(Grossmann et al., 1998)을 본 실험에 적용하였다. 통상적으로 태반에서 분리된 양막은 혈액과 점액질 등으로 표면이 둘러싸이게 된다. 본 연구자들이 90개 이상의 태반으로부터 실험한 결과에 따르면, 초기에 태반으로부터 분리해낸 양막으로부터 양막상피세포를 분리 및 배양할 때, 트립신에 의해 조직으로부터 상피세포가 분리되지 못하도록 방해하는 주된 물질이 점액질이라는 것을 알 수 있었다. 특히 냉장보관이 오래된 태반의 경우 이러한 점액질이 더 많이 존재해 양막상피세포를 분리배양하는데 어려움이 있었다. 기존에는 보고된 Miki et al.(2005)는 분만 직후에 얻어진 양막을 이용하여 트립신 처리를 여러 단계로 나누어서 실시함으로써 양막상피세포를 분리배양하였다. 하지만 분만 직후에 얻어진 양막과 달리 본 연구에 사용된 냉장보관된 양막에서는 트립신만을 사용한 결과, 양막에 점액질이 많아 양막상피세포의 수득율이 현저히 낮았다. 이러한 문제점을 해결하고자 본 연구에서 디티오프레이톨을 사용하여 점액질을 효과적으로 제거하여 초기배양에서 양막상피세포의 수득율을 높이고 생존율을 높였다.

디티오프레이톨을 처리함에 있어서 디티오프레이톨의 사용 농도는 5 mM 정도의 낮은 농도에서는 점액질의 분해가 잘 일어나지 않아 세포의 수득율이 향상되지 않았고, 50 mM 정도의 높은 농도에서는 조직이 오히려 단백질의 분해가 촉진되어 세포의 수득율이 떨어졌다. 본 연구자들은 장관상피세포에서의 세포 사멸을 연구한 논문(Grossmann et al., 1998)에서 사용한 것처럼 일반적인 사용 농도인 10 mM을 사용하여 세포의 사멸을 방지하고, 수득율을 높일 수 있었다. 또한 디티오프레이톨 및 트립신을 이용한 화학적인 절차뿐만 아니라, 추가로 vortex mixer를 이용하여 물리적인 힘을 더하여 줌으로써 기저막으로부터 화학적인 반응에 의해 미쳐 떨어져 나오지 못한 상피세포들이 떨어질 수 있도록 하였다. 기존의 보고에 따르면, 양막 전체를 사용하여 평균 약 1억 개의 세포를 초기에 분리해 낼 수 있다고 하였는데(Miki et al., 2005), 본 실험에서는 양막 전체의 약 10분의 1 정도인 5 g 정도만을 이용하여 3천 7백만 개의 세포를 얻을 수 있었다. 이를 조직 전체를 사용한 것으로 환산하면, 초기배양에서 약 3억 개 정도의 세포를 얻을 수 있고, 계대배양을 통해서 여기에는 몇 배를 더 얻을 수 있게 된다.

상피세포와 더불어 태반양막에 존재하는 중간엽줄기세포는 세포모양의 변형이 일어나지 않고 15계대까지 쉽게 배양이 된다는 보고가 있다(Alviano et al., 2007). 하지만 양막중간엽줄기세포와 달리, 양막상피세포가 가지는 가장 큰 취약점은 다른 상피유래세포와 마찬가지로 배양과정에서 세포의 노화에 따른 변형과 사멸과정이 빠르게 진행되어 계대배양을 통한 증식이 어렵다는 점을 꼽을 수 있다. 이러한 원인에 대해서는 ECM으로부터의 분리(Wang et al., 1995)와 세포와 세포간의 접촉이 끊어진 상태가 장관상피세포의 세포사멸과정을 유도하고 촉진한다는 보고(Bates et al., 1994; Hermiston & Gordon, 1995)에서와 같이 상피세포의 일종인 양막상피세포 역시 세포 사멸에 있어서 비슷한 메커니즘을 거칠 것이라는 예상을 할 수 있다. 따라서, 임상 적용 가능한 수준의 양막상피세포를 얻으려면 초기 양막으로부터 상피세포를 많이 얻은 디티오프레이톨 처리 방법과 함께 양막상피세포를 미분화 상태로 유지하며 세포의 노화를 방지하고 세포 사멸 과정으로 진행하는 것을 막아 세포를 증식시킬 수 있는 배양 방법이 필요할 것이다. 이에 양막상피세포를 세포 사멸을 억제하면서 대량으로 증식 배양할 수 있는 방법을 찾고자 하였다. 2007년 Kiichi Watanabe 등은 ROCK

저해제가 단일세포로 분리된 사람유래 배아줄기세포의 세포사멸을 억제하고 세포의 생존율을 높여주며 분화진행으로부터 보호한다고 보고하였다. 양막상피세포 역시 배아줄기세포에 견줄 수 있는 줄기세포로서의 특성을 갖고 있으며, 단일세포로 분리 후에는 세포 사멸 과정이 급격히 진행되는 특성을 갖고 있기 때문에, 본 연구자들은 양막상피세포의 증식 및 미분화상태의 유지를 위해 배아줄기세포 배양에 이용된 ROCK 저해제를 디티오프레이톨을 처리하여 분리된 양막상피세포의 증식 배양 연구에 적용하였다. ROCK 저해제는 세포 사멸을 억제하는 기능을 하는 물질로서, 신경돌기의 재생, 미오신 인산화 및 평활근 수축에 있어 작용-유도성 Ca^{2+} 증감 (agonist-induced Ca^{2+} sensitization)의 억제 등의 기능을 하고 (Sward et al., 2000), 고혈압과 천식을 일으키는 근육세포의 비정상적 구조를 경감시키는 기능을 하기도 한다. 또한 시신경유두의 혈액 흐름을 증가시키고 안압을 지속적으로 감소시키는 기능이 있는 것으로도 알려져 있으며, 의약품으로서의 활용 가치에 대한 연구들이 수행되어 왔다(Ishizaki et al., 2000). 본 연구에서도 세포 사멸을 억제하는 기능을 가진 ROCK 저해제를 양막상피세포 배양에 적용한 결과 양막상피세포가 ROCK 저해제가 존재하는 환경에서 배양했을 때와 그렇지 않았을 때의 세포배양 상태의 차이는 확연히 드러났다. 세포모양의 유지와 세포수의 증식에 있어서 계대배양을 진행하면서도 세포의 기본형태가 급격히 변형되는 현상이 현저하게 줄어드는 것을 볼 수 있었다. ROCK 저해제를 첨가하는 농도는 1 nM~100 μ M 단위까지 살펴보았는데 1~100 nM에서는 ROCK 저해제의 효능이 잘 드러나지 않았으며, 100 μ M에서는 Sagawa et al.(2007)에서 보고된 바와 같은 현상인 neurite, glial fiber 형태의 filament들이 양막세포 배양에서도 관찰되었다. 10 μ M 농도에서 양막상피세포의 형태 유지와 증식에 도움을 주었다.

본 연구에서 분리 배양한 세포가 줄기세포의 특징을 가지고 있는지에 대해 알아보았다. 첫 번째로 세포 표면 표시자들의 발현을 살펴본 결과, 중간엽줄기세포에서 발현되는 CD29, CD73, CD90, CD105(Cellerix Patent US20060073124)와 상피세포에서 발현되는 CD9와 CD49f가 발현되었으며, 조혈모줄기세포 표시자인 CD31, CD34, CD45, CD133가 발현되지 않음을 확인하였다. HLA-DR이 발현되지 않음이 확인되었는데, 이러한 점은 다른 줄기세포와 마찬가지로 양막상피세포도 면역거부 반응이 덜 일어날 수 있는 가능성을 말해

주고 있다. 두 번째로, 줄기세포의 가장 특징적인 분화능력을 살펴본 결과, 본 연구에서 배양된 양막상피세포가 외배엽 유래의 신경세포와 중배엽 유래의 근육세포, 지방세포 및 골세포로 분화되었다. 마지막으로 본 실험에서 얻어진 세포의 경우 상피세포의 표지자인 cytokeratin(Pan-CK)의 발현을 조사한 결과, 상피세포 특이 표지자가 발현됨을 확인되어 결론적으로 상피세포 유래 줄기세포의 특성을 가짐을 입증하였다.

이번 연구에는 결과가 제시되어 있지 않지만, 선행된 실험에서 본 연구자들은 창상을 유발한 누드마우스에서 상처치료뿐만 아니라 피하 소 조직의 재생효과를 확인한 바 있다(논문 투고 준비 중). 본 연구와 마찬가지로 태반양막상피세포를 이용한 미래 세포치료제로서의 가능성은 여러 세포 손상 질환들에 대해 열려 있음이 보고되었다(Yeager et al., 1985; Kakishita et al., 2000; Sakuragawa et al., 2000; Wei et al., 2003). 이러한 선행결과들은 결론적으로 본 연구를 통해 확립된 내장보관된 태반으로부터 양막상피세포의 대량생산방법이 양막상피세포의 임상적용을 앞당길 수 있는 확실한 가능성을 뒷받침하고 있다. 앞으로 지속적인 동물실험 등을 통하여 더 많은 적응증들에 대한 효과를 확인하고, 세포치료제로서 생산기준 및 평가기준 등을 충족할 수 있도록 한다면, 양막상피줄기세포를 통한 재생의학의 진보가 앞당겨질 것이다.

인용문헌

- Alviano F, Fossati V, Marchionni C, Arpinati M, Bonsi L, Franchina M, Lanzoni G, Cantoni S, Cavallini C, Bianchi F, Tazzari PL, Pasquinelli G, Foroni L, Ventura C, Grossi A, Bagnara GP (2007) Term amniotic membrane is a high throughput source for multipotent mesenchymal stem cells with the ability to differentiate into endothelial cells *in vitro*. BMC Dev Biol 7:11.
- Bates RC, Buret A, van Helden DF, Horton MA, Burns GF (1994) Apoptosis induced by inhibition of intracellular contact. J Cell Biol 125:403-415.
- Gimble J, Guilak F (2003) Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. Cytotherapy 5:362-369.
- Grossmann J, Maxson JM, Whitacre CM, Orosz DE, Berger NA, Fiocchi C, Levine AD (1998) New isolation technique to study apoptosis in human intestinal epithelial cells. Am J Pathol 153:53-62.
- Hermiston ML, Gordon JI (1995) *In vivo* analysis of cadherin function in the mouse intestinal epithelium: essential roles in adhesion, maintenance of differentiation, and regulation of programmed cell death. J Cell Biol 129:489-506.
- Ishizaki T, Uehata M, Tamechika I, Keel J, Nonomura K, Maekawa M, Narumiya S (2000) Pharmacological properties of Y-27632, a specific inhibitor of Rho-associated kinases. Mol Pharmacol 57:976-983.
- Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002a) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. Nature 418:41-49.
- Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM (2002b) Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. Exp Hematol 30:896-904.
- Kakishita K, Elwan MA, Nakao N, Itakura T, Sakuragawa N (2000) Human amniotic epithelial cells produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat model of Parkinson's disease: a potential source of donor for transplantation therapy. Exp Neurol 165:27-34.
- Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC (2005) Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. Stem Cells 23:1549-1559.
- Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W, Surbek DV (2006) Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. Am J Obstet Gynecol 194:664-673.
- Sagawa H, Terasaki H, Nakamura M, Ichikawa M, Yata T, Tokita Y, Watanabe M (2007) A novel ROCK inhibitor, Y-39983, promotes regeneration of crushed axons of

- retinal ganglion cells into the optic nerve of adult cats. *Exp Neurol* 205:230-240.
- Sakuragawa N, Enosawa S, Ishii T, Thangavel R, Tashiro T, Okuyama T, Suzuki S (2000) Human amniotic epithelial cells are promising transgene carriers for allogeneic cell transplantation into liver. *J Hum Genet* 45:171-176.
- Sampaolesi M, Torrente Y, Innocenzi A, Tonlorenzi R, D'Antona G, Pellegrino MA, Barresi R, Bresolin N, De Angelis MG, Campbell KP, Bottinelli R, Cossu G (2003) Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dystrophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. *Science* 301:487-492.
- Swärd K, Dreja K, Susnjar M, Hellstrand P, Hartshorne DJ, Walsh MP (2000) Inhibition of Rho-associated kinase blocks agonist-induced Ca^{2+} sensitization of myosin phosphorylation and force in guinea-pig ileum. *J Physiol* 522:33-49.
- Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabé-Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD (2001) Isolation of multipotent adult stem cells from dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol* 3:778-784.
- Verfaillie CM (2002) Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* 12: 502-508.
- Wang CY, Eshleman JR, Willson JK, Markowitz S (1995) Both transforming growth factor-beta and substrate release are inducers of apoptosis in a human colon adenoma cell line. *Cancer Res* 55:5101-5105.
- Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi JB, Nishikawa S, Nishikawa S, Muguruma K, Sasai Y (2007) A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 25:681-686.
- Wei JP, Zhang TS, Kawa S, Aizawa T, Ota M, Akaike T, Kato K, Konishi I, Nikaido T (2003) Human amnion-isolated cells normalize blood glucose in streptozotocin-induced diabetic mice. *Cell Transplant* 12:545-552.
- Yeager AM, Singer HS, Buck JR, Matalon R, Brennan S, O'Toole SO, Moser HW (1985) A therapeutic trial of amniotic epithelial cell implantation in patients with lysosomal storage diseases. *Am J Med Genet* 22:347-355.
-
- (received 9 October 2009, received in revised form 14 November 2009, accepted 18 November 2009)