

초기 계대 인간 배아줄기세포의 해동 후 효율적인 배양 방법

서울대학교 의학연구원 인구의학연구소¹, 삼진제약주식회사 중앙연구소²,
서울대학교 의과대학 산부인과학교실³

백진아¹ · 김희선^{1,3} · 설혜원¹ · 서진¹ · 정주원¹ · 윤보애¹ · 박용빈²
오선경^{1,3} · 구승엽^{1,3} · 김석현^{1,3} · 최영민^{1,3*} · 문신용^{1,3}

Efficient Culture Method for Early Passage hESCs after Thawing

Jin Ah Baek¹, Hee Sun Kim^{1,3}, Hye Won Seol¹, Jin Seo¹, Juwon Jung¹, Bo Ae Yoon¹, Yong Bin Park²,
Sun Kyung Oh^{1,3}, Seung-Yup Ku^{1,3}, Seok Hyun Kim^{1,3}, Young Min Choi^{1,3*}, Shin Yong Moon^{1,3}

¹Institute of Reproductive Medicine and Population, Medical Research Center, Seoul National University, 199-1, Dongsung Dong, Jongno Gu, Seoul, 110-810, Korea, ²Central Research Institute, Sam Jin Pharm. Co. Ltd., Hwasung 445-746, Korea, ³Department of Obstetrics and Gynecology, Seoul National University College of Medicine, 101 Daehang Ro, Jongno Gu, Seoul, 110-744, Korea

Objective: Human embryonic stem cells (hESCs) have the capacity to differentiate into all of the cell types and therefore hold promise for cell therapeutic applications. In order to utilize this important potential of hESCs, enhancement of currently used technologies for handling and manipulating the cells is required. The cryopreservation of hESC colonies was successfully performed using the vitrification and slow freezing-rapid thawing method. However, most of the hESC colonies were showed extremely spontaneous differentiation after freezing and thawing. In this study, we were performed to rapidly collect of early passage hESCs, which was thawed and had high rate of spontaneously differentiation of SNUhES11 cell line.

Methods: Four days after plating, partially spontaneously differentiated parts of hESC colony were cut off using finely drawn-out dissecting pipette, which is mechanical separation method.

Results: After separating of spontaneously differentiated cells, we observed that removed parts were recovered by undifferentiated cells. Furthermore, mechanical separation method was more efficient for hESCs expansion after thawing when we repeated this method. The recovery rate after removing differentiated parts of hESC colonies were 55.0%, 74.5%, and 71.1% when we have applied this method to three passages.

Conclusion: Mechanical separation method is highly effective for rapidly collecting and large volumes of undifferentiated cells after thawing of cryopreserved early passage hESCs. [Korean. J. Reprod. Med. 2009; 36(4): 311-319.]

Key Words: Human embryonic stem cells (hESCs), Cryopreservation-Thawing, Early passage, Mechanical separation method

착상 전 포배기 (blastocyst)의 내세포괴 (inner cell

주관책임자: 최영민, 우) 110-744 서울특별시 종로구 연건동 28,
서울대학교 의과대학 산부인과학교실
Tel: (02) 2072-2385, Fax: (02) 762-3599
e-mail: ymchoi@snu.ac.kr

* 위 연구는 과학기술부 21세기 프론티어연구개발사업단인 세포응
용연구사업단의 연구비 지원 (SC1150)에 의해 수행되었습니다.

mass)로부터 유래된 인간 배아줄기세포 (human embryonic stem cells; hESCs)는 미분화 상태를 유지하며 무한 증식할 수 있는 자가 증식 (self-renewal) 능력과 인체를 구성하는 모든 종류의 세포로 분화할 수 있는 전분화능 (pluripotency)의 특징을 가

진 세포로, 1998년에 Thomson 등에 의해 처음으로 확립 (derivation)된 이후 이를 이용한 여러 가지 연구가 계속되고 있다.^{1~3} 최근에는 파킨슨씨병 (Parkinson's disease)과 같은 퇴행성 질환이나 당뇨 및 심근경색 등과 같은 난치병 치료를 위하여 인간 배아줄기세포를 신경계세포 (neurons), 췌장세포 (pancreatic β cells) 또는 심근세포 (cardiomyocytes) 등의 다양한 종류의 세포로 분화를 유도하는 연구가 진행되고 있으며 이렇게 분화된 인간 배아줄기세포를 손상된 세포를 건강한 세포로 대체하고자 하는 세포치료 (cell therapy) 연구에 활용될 수 있을 것으로 기대되고 있다.^{4~6} 이와 같은 세포치료술 연구에 사용하기 위한 세포 공급원 (cell source)인 인간 배아줄기세포는 계대 배양의 기간이 길어 질수록 자가 증식 능력은 높아지지만 전분화능의 가능성은 점차 낮아지고,^{7~9} 또한 미분화 세포의 체외 장기 배양 시 부적합한 배양 환경 (sub-optimal culture condition)으로 인한 염색체 이상이 발생할 수 있기 때문에 특정 종류의 세포로 분화를 유도하는 실험을 하기 위해서는 초기 계대의 인간 배아줄기세포를 미분화 상태로 확보하여 수적 제한 없이 공급하는 것이 매우 중요하다.^{10,11}

그러나 인간 배아줄기세포는 확립된 직후의 초기 계대에는 그 세포 수가 매우 적고 한정적이기 때문에 세포주의 소실을 막기 위해서는 적절한 방법으로 보존하는 것이 매우 중요하다. 이를 위하여 일반적으로 초자화동결 (vitrification) 또는 완만동결-급속용해 (slow freezing-rapid thawing)와 같은 냉동보존 방법을 사용하여 세포를 확보한다.^{12,13} 그러나 Yang 등의 보고에 의하면 초자화동결과 같은 냉동보존 방법의 경우에는 해동 후 생존률이 88.73% 정도로 높지만 많은 양의 세포를 보관하기 힘든 단점이 있고, Reubinoff 등의 논문에서는 또 다른 냉동보존 방법인 완만동결-급속용해 방법을 사용했을 때 다량의 세포를 보관할 수 있는 장점이 있지만 냉동보관 되었던 세포를 녹여서 배양하였을 때의 생존률이 0~16% 정도로 매우 낮은 것으로 보고하고 있다.^{14,15} 또한 Richards 등의 보고

에 따르면 냉동보존 후 해동하여 배양하는 인간 배아줄기세포의 세포군 (colony) 가운데 한 세포군에서 자연 발생적 분화가 80% 이상 진행되는 정도는 79.9%로 매우 높기 때문에 해동 직후의 계대 배양 시 미분화 상태를 유지하는 인간 배아줄기세포의 양적 확보가 어려워 분화 유도 실험을 적시에 진행시키기 어렵다.¹⁶

따라서 본 연구에서는 초자화동결 또는 완만동결-급속용해와 같은 방법으로 냉동보존되어 있던 초기 계대의 인간 배아줄기세포를 해동하여 다시 배양할 때 자연 발생적 분화 부분을 절개용 유리 피펫을 사용하여 기계적인 방법으로 분리한 후 제거하여 미분화를 유지하는 인간 배아줄기세포를 빠른 시기에 보다 많은 양을 확보하기 위한 효율적인 방법에 대해 알아보하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 인간 배아줄기세포 배양

본 연구에는 서울대학교 인구의학연구소에서 확립된 인간 배아줄기세포주 SNUhES11을 사용하였다. 확립한 후 5계대 (passage 5; p5)까지 배양한 다음 초자화동결 방법으로 냉동보관하고 있던 세포 중 19개의 세포덩어리 (clumps)를 녹여, Oh 등의 방법에 따라 배양하였다.³ 배양액으로는 Dulbecco's modified eagle medium nutrient mixture F-12 (DMEM/F12; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 20% KnockOut Serum Replacement (Ko-SR; Invitrogen, San Diego, CA, USA)와 1% non-essential amino acid (NEAA; Invitrogen, San Diego, CA, USA), 0.1 mM β -mercaptoethanol (Sigma, St Louis, MO, USA), 4 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF; invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 그리고 0.5% penicillin/streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 첨가하여 사용하였고, Mitomycin C (Sigma, St Louis, MO, USA)를 처리한 생쥐 배아섬유세포 (STO, CRL-1503; ATCC, Manassas, VA, USA)를 영양세포로 사용한 배양접시에 배양하였다. 초기 계대에서 초자화동결 방법으로 동결된 인간 배아

줄기세포는 매우 소량이며, 또한 해동 직후의 인간 배아줄기세포는 최초 몇 계대를 유지할 때 자연 발생적 분화가 매우 심하기 때문에 계대를 유지하기 위해서 기계적인 방법 (mechanical transfer)으로 미분화 상태를 유지하고 있는 부분만 잘라내어 3~5일 간격으로 새로운 STO 영양세포 배양접시에 옮겨 세포주 SNUhES11이 유지될 수 있도록 하였고, 이러한 방법으로 7번 (p5+7)의 계대를 넘기며 안정화 하는 동시에, 본 실험에 사용하기 위한 최소한의 인간 배아줄기세포를 확보하였다.

2. 미분화 세포의 양적 확보를 위한 계대 방법

인간 배아줄기세포주 SNUhES11 (p5+7)의 세포군에서 미분화를 유지하고 있는 부분을 기계적인 방법을 사용하여 약 100개의 세포덩어리로 잘라내어 새로운 STO 영양세포 배양접시에 적당한 간격으로 배치하며 계대를 넘겼다 (p5+8). 계대를 넘겨 배양을 한지 2일이 되는 날부터 배양접시의 배양액을 교환하여 주고, 4일이 되었을 때 부착되어 자라난 세포군 중에서 자연 발생적 분화가 50% 이상 나타난 세포군의 분화된 부분만을 Oh 등의 방법에 따른 절개용 유리 피펫 (drawn-out dissecting pasture pipette)을 사용하여 기계적인 방법으로 제거하였다.¹⁷ 절개용 유리 피펫은 초음파 세척기를 이용하여 3번 세척한 후 습윤 멸균한 9-인치 유리 피펫에 열을 가하여 가늘게 뽑아 그 끝을 갈고리 모양으로 만들었고, 이를 이용하여 현미경 아래에서 세포군의 미분화 상태의 세포와 자연 발생적 분화가 나타난 세포의 경계 부분을 확인하며 갈고리 모양의 둥근 부분으로 잘라내었다. 이후 지속적으로 배양액을 교환해 주며 세포군의 제거된 부분을 7일째 되는 날까지 관찰하였으며, 이와 같은 방법으로 세 번의 계대를 넘기며 전체 300개의 세포군을 실험하였다.

3. 인간 배아줄기세포의 면역세포화학 염색

자연 발생적 분화 부분을 절개용 유리 피펫을 사용하여 기계적인 방법으로 분리하여 제거한 후에

배양된 세포군이 인간 배아줄기세포의 특성을 지속하는지를 확인하기 위해 항원-항체 반응을 이용한 면역세포화학 염색 방법 (immunocytochemistry)을 사용하였다. 인간 배아줄기세포의 미분화를 유지하는 세포에서 높게 발현된다고 알려진 전사인자 Oct-4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 세포표면 표식인자인 SSEA-4 (Millipore, Billerica, MA, USA), Tra-1-60 (Millipore, Billerica, MA, USA), 그리고 Tra-1-81 (Millipore, Billerica, MA, USA) 단백질을 염색하여 발현 여부를 관찰하였다. 기계적인 방법으로 자연 발생적 분화 부분을 분리하여 제거한 후 3일 동안 배양된 세포군이 정착되어 있는 슬라이드를 4% Paraformaldehyde (USB, Cleveland, OH, USA)로 상온에서 30분간 고정하고, Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 한 번 세척한 후 0.05% tween-twenty (Sigma, St Louis, MO, USA)와 3% Bovine serum albumin (BSA; Sigma, St Louis, MO, USA)을 1:1 비율로 섞어 4°C에서 12시간 이상 처리하였다. 이후 1차 항체를 4°C에서 12시간 이상 처리한 다음 D-PBS로 세 번 세척한 후, 2차 항체인 Alexa Fluor 488-labelled donkey anti-mouse IgG와 Alexa Fluor 594-labelled donkey anti-mouse IgG (Invitrogen Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA)를 상온에서 1시간 처리하였다. 2차 항체까지 처리한 슬라이드를 DAPI가 포함된 Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)로 도포한 후 형광현미경 (Eclipse 80i, Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

결 과

초자화동결 방법으로 보존되어 있던 인간 배아줄기세포주 SNUhES11 중 5계대 (p5)의 세포덩어리 (clump) 19개를 해동한 후 세포의 안정화와 동시에 실험에 사용할 수 있는 최소의 세포 수를 확보하기 위해서 기계적인 방법을 사용하여 3~5일 간격으로 7번 (p5+7)의 계대를 넘겼다. 그 이후 초

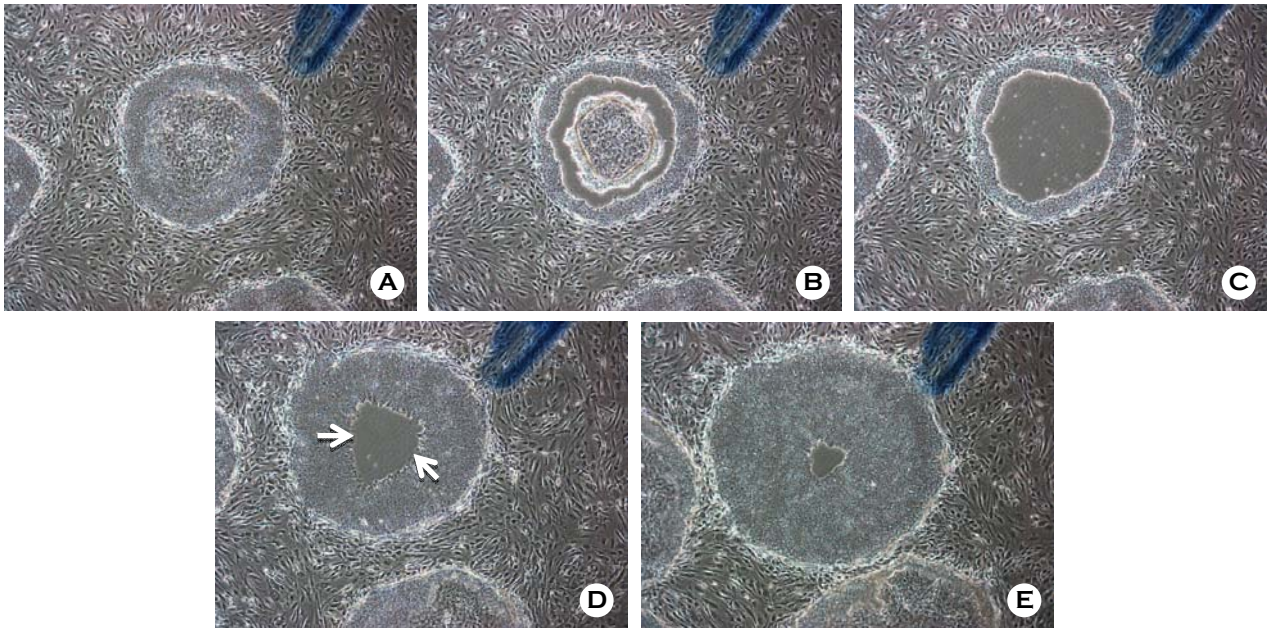


Figure 1. Mechanical separation method of partially spontaneously differentiated parts from SNUhES11 colony. The black line (in the upper right corner) is indicating marker for same colony. **(A)** Morphology of hESC colony at day 4 after plating. The center of hESC colony was spontaneously differentiated more than 50%. **(B)** Separate the spontaneously differentiated parts of hESC colony using finely drawn-out dissecting pipette from undifferentiated parts of hESC colony. **(C)** The segregated parts of colony were removed with micropipette when old medium was replaced with new medium. **(D)** The day after (day 5), the empty space of hESC colony was filled with undifferentiated cells for white arrow direction. **(E)** At day 6, The colony was almost recovered by undifferentiated hESCs ($\times 40$).

Jin Ah Baek. Efficient Culture Method for Early Passage hESCs after Thawing. Korean J Reprod Med 2009.

기 계대의 미분화 세포를 빠른 시기에 다량으로 확보하기 위해서 기계적 분리 방법을 사용하였다. Figure 1에서 보는 것과 같이 계대를 넘긴지 4일째 되는 날에 세포군에서 자연 발생적 분화가 심한 부분을 절개용 유리 피펫으로 기계적인 방법을 사용하여 분리하였다. 잘라낸 자연 발생적 분화 부분은 배양액을 교환할 때 동시에 제거하였고, 이후에는 일반적인 배양 방법과 같이 매일 배양접시의 배양액을 교환 해주며 지속적으로 배양하였다. 그 결과, 자연 발생적인 분화 부분을 기계적인 방법으로 잘라내어 경계가 뚜렷하게 보였던 빈 공간에 미분화 상태의 인간 배아줄기세포가 분열하여 미분화 세포들로 채워지는 것을 관찰하였다 (Figure 1).

세포군에서 자연 발생적 분화 부분을 제거한 세포군과 제거하지 않은 세포군을 비교 관찰했을 때 이러한 경향을 다시 한 번 확인할 수 있었다

(Figure 2). 자연 발생적 분화 부분을 제거한 후 배양한 세포군의 거의 모든 부분은 미분화 세포로 채워져 정상적인 미분화 세포군을 형성하였으나 (Figure 2, left colony), 분화 부분을 제거하지 않고 배양을 지속한 세포군은 80% 이상 되는 거의 모든 부분에서 자연 발생적 분화가 일어났으며 새로운 STO 영양세포 배양접시로 계대를 넘길만한 미분화 상태의 세포가 적어 계대 유지가 어려워진 것을 확인할 수 있었다 (Figure 2, right colony).

또한, 자연 발생적인 분화 부분을 제거한 공간에 새로이 채워진 세포가 미분화 세포의 특성을 지속적으로 유지하는 인간 배아줄기세포인지를 면역세포화학 염색 방법으로 확인한 결과 전사인자 Oct-4와 세포표면 표식인자인 SSEA-4, Tra-1-60 그리고 Tra-1-81 단백질이 모두 발현하며 인간 배아줄기세포의 미분화 특성을 지속적으로 유지하고 있는 것

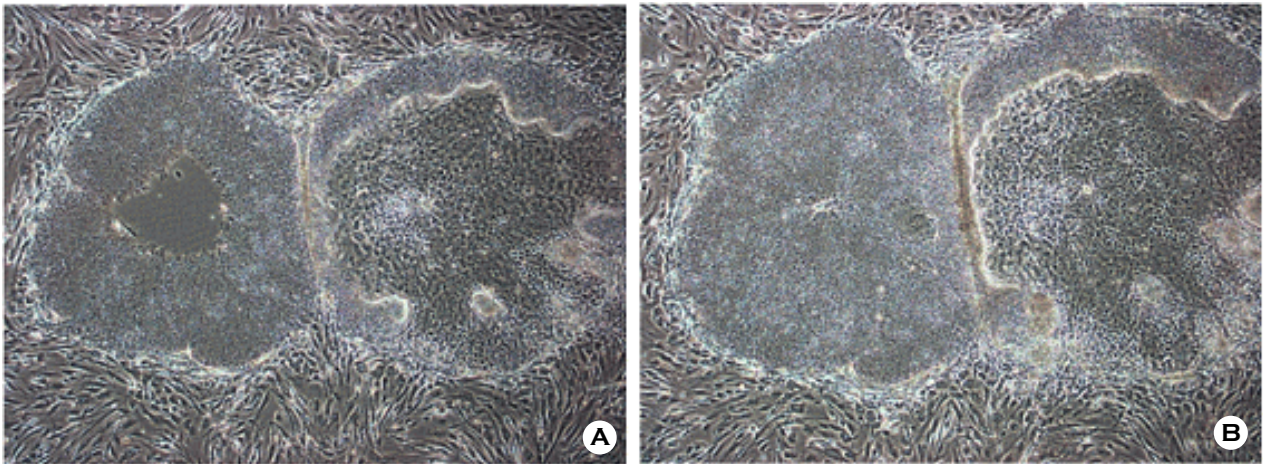


Figure 2. Colonies after removing spontaneously differentiated parts of hESCs or not. **(A)** The left colony was removed spontaneously differentiated parts of hESCs by mechanical separation method and right colony was not removed. **(B)** At day 3 after removing, the left colony was almost recovered by undifferentiated hESCs but most parts of right colony was differentiated at day 6 ($\times 40$).

Jin Ah Baek. Efficient Culture Method for Early Passage hESCs after Thawing. Korean J Reprod Med 2009.

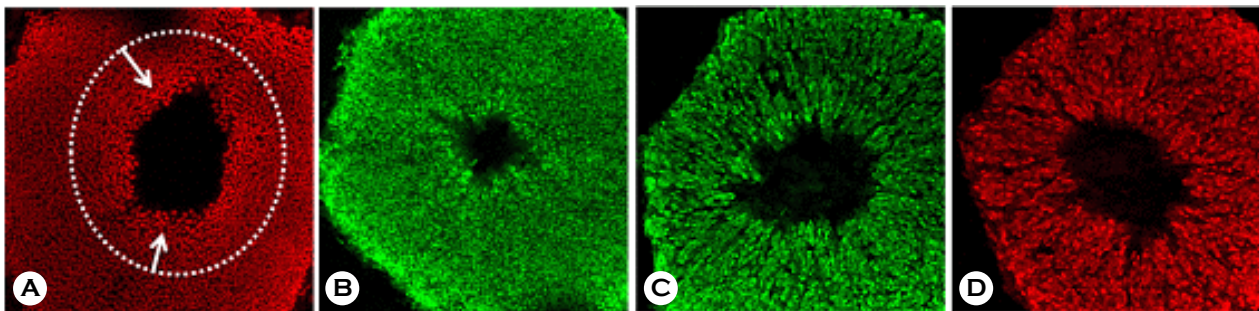


Figure 3. Expression of undifferentiated cell markers in hESCs after removing spontaneously differentiated parts by mechanical separation method. Three days after removing, the empty space of hESC colony (a dotted line) was filled with undifferentiated cells for white arrow direction. The same method was used **(A)-(D)**. hESC colonies were stained with **(A)** Oct-4, **(B)** SSEA-4, **(C)** Tra-1-60, and **(D)** Tra-1-81 antibodies ($\times 100$).

Jin Ah Baek. Efficient Culture Method for Early Passage hESCs after Thawing. Korean J Reprod Med 2009.

을 확인하였다 (Figure 3).

자연 발생적 분화 부분을 기계적 분리 방법으로 제거한 후 지속적으로 관찰한 결과 p5+8에서는 109개 세포군 중 55.0% (60/109), p5+9의 94개 세포군 중 74.5% (70/94), p5+10의 97개 세포군 중 71.1% (69/97)는 자연 발생적 분화 부분이 제거된 빈자리에 인간 배아줄기세포가 채워져 미분화 상태의 세포군을 지속적으로 유지하는 것을 확인하였다. 반면 전체의 33.7% (101/300)는 제거된 부분

에 인간 배아줄기세포가 채워진 후 다시 자연 발생적 분화가 일어나는 것을 관찰하였다. 또한 기계적인 방법으로 자연 발생적 분화 부분을 분리하여 제거하는 실험 방법을 연속적으로 적용하여 계대 배양을 지속하며 관찰했을 때, 미분화 상태를 회복하는 비율이 55.0%에서 74.5%로 높아지는 것으로 보아 확립되어 얼마 되지 않아 매우 적은 양이 있는 초기 계대의 인간 배아줄기세포를 해동한 직후 미분화 상태를 유지하는 세포를 빠른 시간 내에 다

Table 1. The recovery rate of undifferentiated colonies vs. differentiated colonies after removing differentiated parts of spontaneously differentiated hESC colonies in SNUhES11

(Unit : Colony)

Passage	# of spontaneously differentiated parts removed colony	# of recovered colony after removed (%)	# of re-differentiated colony after removed (%)
p5~8*	109	60 (55.0)	49 (45.0)
p5~9	94	70 (74.5)	24 (25.5)
p5~10	97	69 (71.1)	28 (28.9)
Total	300	199 (66.3)	101 (33.7)

* Passage number for the culture is represented as number of passages following cryopreservation at passage 5 (p5-X)

Jin Ah Baek. Efficient Culture Method for Early Passage hESCs after Thawing. Korean J Reprod Med 2009.

량으로 얻고자 할 경우 매우 유용한 방법임을 확인할 수 있었다 (Table 1).

고 찰

인간 배아줄기세포는 체외에서도 미분화 상태를 유지하며 무한 증식이 가능하고 체내의 모든 종류의 세포로 분화할 수 있는 능력을 유지하는 특징을 가지고 있으며, 이러한 특성을 활용하여 인간 배아줄기세포로부터 퇴행성 질환이나 손상된 조직을 치유하기 위한 특정세포로의 분화를 유도하는 방법에 관한 연구가 진행되고 있다.^{1~6} 이와 같이 인간 배아줄기세포는 일반적으로 무한 증식이 가능하고 다양한 세포로의 분화가 가능한 것으로 알려져 있지만, 최근 보고에 의하면 배양기간이 길어질수록 초기 계대의 인간 배아줄기세포와 비교하여 세포의 성질이 변화하는 것으로 알려졌다.^{7~11} 예를 들면, 인간 배아줄기세포는 오랜 기간 배양할수록 세포의 자가 증식률은 증가하지만 다양한 세포로의 분화 능력은 감소한다는 보고가 있으며,^{7~9} 17번 염색체의 장완 이상, 12번 염색체 이상, 그리고 X염색체와 그 밖에 다른 여러 염색체의 이상을 확인하며 이러한 염색체 이상을 가진 인간 배아줄기세포는 유전자 변화로 인한 세포의 성장률이 높아진다고 보고된 바 있다.^{10,11} 이러한 보고들을 종합해 보면, 인간 배아줄기세포를 이용한 분화 연구

에는 오랜 기간 배양해온 세포보다 초기 계대의 세포를 이용하는 것이 더욱 효율적이라는 것을 알 수 있다. 때문에 초기 계대의 인간 배아줄기세포는 초자화동결 또는 완만동결-급속용해와 같은 냉동 보존 방법으로 보관하게 되며, 인간 배아줄기세포가 연구에 필요한 경우 보관되어 있던 세포를 다시 해동, 배양하고 그 수를 증식하여 연구에 사용하게 된다.^{12,13}

인간 배아줄기세포는 일반적으로 다량의 밀착결합 (tight junction)과 간극결합 (gap junction), 그리고 부착분자 (adhesion molecule) 등에 의해 세포군을 형성하여 자라며, 세포군 형성을 이루지 못한 경우에는 생존하지 못하거나 자연 발생적 분화율이 높아진다.^{18,19} 초자화동결 또는 완만동결-급속용해와 같은 냉동보존 방법을 사용하여 보존하는 인간 배아줄기세포는 동결하는 과정 중 세포주변에 빙정 (ice crystal)이 형성되는데, 이러한 빙정은 동결 후 해동 시 세포와 세포 사이에 존재하는 밀착결합과 간극결합 그리고 부착분자 간의 결합을 어렵게 만들기 때문에 세포의 회복율이 낮아지고 자연 발생적 분화율이 높아져서 초기 계대의 세포를 다량으로 확보하는데 상당한 기간이 걸리며 그에 따르는 여러 가지 어려움을 겪고 있다.^{19,20} 그렇기 때문에 인간 배아줄기세포의 해동 직후 미분화 세포를 빠른 기간 내에 다량으로 확보하기 위한 적절한 배양 방법을 개발하는 것이 매우 중요하다.

본 논문에서는 이러한 어려움을 극복하여 해동 후 미분화 상태의 초기 계대 인간 배아줄기세포를 다량으로 확보하는 기간을 단축하기 위해 배양 시 자연 발생적 분화 부분을 기계적인 방법으로 분리하여 제거하는 방법을 시도하였다. 초기 계대에서 초자화동결 방법으로 보관되어 있던 인간 배아줄기세포는 매우 소량이었으며, 해동 직후의 인간 배아줄기세포는 최초 몇 계대를 유지할 때 자연 발생적 분화가 매우 심하기 때문에 미분화 상태를 유지하고 있는 부분만 잘라내어 3~5일 간격으로 계대 배양을 하였음에도 불구하고, 대다수의 세포군은 한 세포군의 약 80% 이상 되는 자연 발생적 분화가 이루어져 온전한 미분화 상태의 세포군을 얻기가 어려웠다. 그러나 기계적 분리 방법을 사용하여 자연 분화된 부분을 기계적으로 잘라내 제거한 다음 지속적으로 배양을 하였더니 자연 분화된 세포들을 제거한 부분에 미분화 상태의 세포가 채워져서 완전한 미분화 세포군이 되는 것을 확인할 수 있었다. 이후의 계대 배양에서 이와 같은 방법을 다시 한 번 적용한 결과 미분화 상태의 인간 배아줄기세포로 채워진 세포군들이 약 55%에서 75%로 증가하였으며, 자연 분화된 세포를 포함하고 있는 세포군은 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 방법을 두 번 연속으로 수행한 이후의 계대에 일반적인 계대 배양 방법을 적용한 결과, 자연 발생적 분화를 보이는 세포군은 상당히 감소하였으며 다량의 미분화 상태 인간 배아줄기세포를 확보할 수 있었다. 이러한 결과로 볼 때, 해동 직후 초기 배양 시 미분화 세포만을 선택하여 계대 배양할 경우 다량의 미분화 세포군을 확보하기까지 많은 시간이 필요하지만 본 논문의 방법을 이용하여 배양하는 경우에는 약 3계대 이내의 짧은 시간 안에 다량의 미분화 세포군을 확보하여 비교적 초기 계대의 인간 배아줄기세포를 분화연구에 활용할 수 있음을 보여주고 있다. 따라서 본 논문의 방법을 이용할 경우에는 해동 후의 인간 배아줄기세포가 초기 계대일 때에도 미분화를 유지하는 세포의 양적 확보가 용이하기 때문에 신

경계세포, 췌장세포 또는 심근세포 등의 분화 유도 실험을 하기 위한 적절한 세포를 수적 제한 없이 초기 계대에 공급할 수 있다는 데 의의가 있겠다.

인간 배아줄기세포의 배양접시에 교원질 분해효소 (collagenase)를 처리하여 계대 배양하는 효소적인 (enzymatic) 방법은 많은 양의 세포를 확보하기에는 좋지만 자연 분화된 세포까지 계대 배양이 될 수 있는 단점이 있고, 유리 피펫을 절개용으로 만들어서 기계적인 (mechanical) 방법으로 계대 배양을 하는 경우에는 효소적인 방법을 사용하는 것에 비해 시간이 오래 걸리는 단점이 있지만 자연 발생적 분화 부분을 정확하고 깨끗하게 잘라내어 미분화를 유지하는 세포만을 계대 배양할 수 있다.¹⁷ 또한 Mitalipova 등은 효소적인 방법으로 계대 배양을 한 경우 염색체 이상이 증가할 수 있다고 보고한 바 있다.²¹ 따라서 수가 매우 적고 자연 분화로 인한 세포소실이 우려되는 초기 계대 인간 배아줄기세포 또는 냉동보존되어 있던 세포의 해동 후 빠른 기간 내에 양적 확보를 하기 위해서는 기계적인 방법을 사용하여 계대 배양하는 것이 적합하다고 할 수 있다. 또한 인간 배아줄기세포의 세포군 내 자연 분화 부분을 유리 피펫을 사용하여 제거하는 방법으로 인간 배아줄기세포의 초기 계대 미분화 세포를 다량 확보하는 것은 인간 배아줄기세포를 체외에서 장기 배양할 때 일어날 수 있는 염색체 이상의 확률이 높아지기 전에 분화 유도 실험을 진행할 수 있기 때문에 더욱 유용한 방법이라고 사료된다.

본 연구에서는 초기 계대 인간 배아줄기세포의 해동 후 미분화 세포의 빠른 확보를 위하여 계대를 넘긴 후 4일 째 되는 날에 자연 발생적으로 분화가 된 부분을 절개용 유리 피펫을 사용하여 기계적인 방법으로 제거한 후 지속적으로 배양액을 교환하며 관찰한 결과, 그렇지 않은 실험군에 비해 미분화를 유지하는 세포군이 많은 것을 확인할 수 있었다. 또한 이러한 실험 방법을 연속적으로 적용했을 때 미분화 상태를 유지하는 인간 배아줄기세포의 비율이 55.0%에서 74.5%로 효율이 더욱 높아

지는 것을 확인하였다. 이러한 결과로 보아 동결되어 있던 초기 계대 인간 배아줄기세포의 해동 직후, 자연 발생적 분화에 의해 미분화 상태를 유지하는 세포의 수가 적어 계대 유지가 어려울 때 이와 같은 기계적인 방법으로 자연 발생적 분화 부분을 제거한 후 배양을 지속하는 것이 빠른 기간 안에 미분화 상태를 유지하는 인간 배아줄기세포의 양적 확보를 위한 효율적인 방법이라고 사료된다.

참 고 문 헌

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
2. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 399-404.
3. Oh SK, Kim HS, Ahn HJ, Seol HW, Kim YY, Park YB, et al. Derivation and characterization of new human embryonic stem cell lines: SNUhES1, SNUhES2, and SNUhES3. *Stem Cells* 2005; 23: 211-9.
4. Kang SM, Cho MS, Seo H, Yoon CJ, Oh SK, Choi YM, et al. Efficient induction of oligodendrocytes from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2007; 25: 419-24.
5. Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N. The effect of over-expression of Pdx1 and Foxa2 on the differentiation of human embryonic stem cells into pancreatic cells. *Stem Cells* 2006; 24: 1923-30.
6. Passier R, Mummery C. Cardiomyocyte differentiation from embryonic and adult stem cells. *Curr Opin Biotechnol* 2005; 16: 498-502.
7. Park YB, Kim YY, Oh SK, Chung SG, Ku SY, Kim SH, et al. Alterations of proliferative and differentiation potentials of human embryonic stem cells during long-term culture. *Exp Mol Med* 2008; 40: 98-108.
8. Rosler ES, Fisk GJ, Ares X, Irving J, Miura T, Rao MS, et al. Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Dev Dyn* 2004; 229: 259-74.
9. Ko JY, Park CH, Koh HC, Cho YH, Kyhm JH, Kim YS, et al. Human embryonic stem cell-derived neural precursors as a continuous, stable, and on-demand source of human dopamine neurons. *J Neurochem* 2007; 103: 1417-29.
10. Draper JS, Smith K, Gokhale P, Moore HD, Maltby E, Johnson J, et al. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 53-4.
11. Baker DE, Harrison NJ, Maltby E, Smith K, Moore HD, Shaw PJ, et al. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 207-15.
12. Lane M, Schoolcraft WB, Gardner DK. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertil Steril* 1999; 72: 1073-8.
13. Freshney RI. Culture of animal cells; a manual of basic technique. 5th ed. John Wiley and Sons Inc (NY): 255; 2005.
14. Li Y, Tan JC, Li LS. Comparison of three methods for cryopreservation of human embryonic stem cells. *Fertil Steril* 2008; Dec 22. [Epub ahead of print]
15. Reubinoff BE, Pera MF, Vajta G, Trounson AO. Effective cryopreservation of human embryonic stem cells by the open pulled straw vitrification method. *Hum Reprod* 2001; 16: 2187-94.
16. Richards M, Fong CY, Tan S, Chan WK, Bongso A. An efficient and safe xeno-free cryopreservation method for the storage of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2004; 22: 779-89.
17. Oh SK, Kim HS, Park YB, Seol HW, Kim YY, Cho MS, et al. Methods for expansion of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005; 23: 605-9.
18. Sathananthan H, Pera M, Trounson A. The fine structure of human embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online* 2002; 4: 56-61.
19. Richards M, Tan SP, Tan JH, Chan WK, Bongso A. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells* 2004; 22: 51-64.
20. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, Chiu CP, Harris CP, Waknitz MA, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000; 227: 271-8.
21. Mitalipova MM, Rao RR, Hoyer DM, Johnson JA, Meisner LF, Jones KL, et al. Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 19-20.

= 국문초록 =

목적: 인간 배아줄기세포 (human embryonic stem cells; hESCs)는 미분화 상태로 무한 증식할 수 있는 자가 증식 (self-renewal) 능력과 인체의 모든 세포로 분화할 수 있는 전분화능 (pluripotency)의 특징을 가진 세포로, 손상된 세포를 건강한 세포로 대체하고자 하는 세포치료 (cell therapy) 연구에 활용하기 위한 세포 공급원 (cell source)으로 제시되고 있다. 그러나 인간 배아줄기세포는 확립된 초기에 세포를 안정적으로 배양하고 유지하는 과정이 쉽지 않으며, 특히 동결보존되어 있던 세포를 해동한 후 배양할 때 자연 발생적 분화가 높기 때문에 세포주의 유지에 많은 어려움이 따른다. 본 연구에서는 동결보존되어 있던 초기 계대의 인간 배아줄기세포를 해동하여 다시 배양할 때 자연 발생적 분화 부분을 기계적 분리 방법으로 제거하여 미분화 상태의 세포를 보다 빠르게 확보하기 위한 효율적인 방법에 대해 알아보려고 하였다.

연구방법: 인간 배아줄기세포를 계대 배양한지 4일이 되는 날, 50% 이상의 자연 발생적 분화가 나타난 세포군에서 분화된 부분만을 절개용 유리 피펫 (drawn-out dissecting pasture pipette)을 사용하여 기계적인 방법으로 제거하였다. 이후 지속적으로 배양액을 교환해 주며 세포군의 제거된 부분을 7일째 되는 날까지 관찰하였다.

결과: 기계적 분리 방법을 사용하여 인간 배아줄기세포의 자연 발생적인 분화 부분을 제거한 빈 공간에 미분화 상태의 인간 배아줄기세포가 분열하여 채워지는 것을 관찰하였다. 또한, 이 실험 방법을 연속 두 번 적용하여 배양했을 때 미분화 세포로 회복되는 세포군의 비율이 조금 더 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

결론: 동결되어 있던 초기 계대 인간 배아줄기세포의 해동 후, 자연 발생적 분화에 의해 미분화 상태를 유지하는 세포의 수가 적어 계대를 유지 하기가 어려울 때 이와 같은 기계적 분리 방법을 사용하여 자연 발생적 분화 부분을 제거한 후 배양을 지속하는 것이 단기간 내에 미분화 상태를 유지하는 인간 배아줄기세포의 양적 확보를 위한 효율적인 방법이라고 사료된다.

중심단어: 인간 배아줄기세포, 동결 및 해동, 초기 계대, 기계적 분리 방법