

Feeder Free 상태에서 배양된 인간 배아 줄기세포를 이용한 중간엽 줄기세포 분화 및 단백질체학을 이용한 골수 유래 중간엽 줄기세포와의 비교

박순정^{1,*} · 전영주^{3,*} · 김주미^{1,2} · 신정민² · 채정일³ · 정형민^{1,2,†}

¹차의과학대학교 줄기세포 연구실, ²차바이오앤디오스텍, ³전북대학교 치의학전문대학원 약리학 실험실

Derivation of MSC Like-Cell Population from Feeder Free Cultured hESC and Their Proteomic Analysis for Comparison Study with BM-MSc

Soon-Jung Park^{1,*}, Young-Joo Jeon^{3,*}, Jumi Kim^{1,2}, Jeong-Min Shin², Jung-Il Chae³ and Hyung-Min Chung^{1,2,†}

¹Graduate School of Life Science, CHA Stem Cell Institute, CHA University, College of Medicine, Seoul 135-907, Korea

²CHA Biotech & Diotech Co., Ltd., Seoul 135-907, Korea

³Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

ABSTRACT

Pluripotency of human embryonic stem cell (hESC) is one of the most valuable ability of hESCs for applying cell therapy field, but also showing side effect, for example teratoma formation. When transplant multipotent stem cell, such as mesenchymal stem cell (MSC) which retains similar differentiation ability, they do not form teratoma *in vivo*, but there exist limitation of cellular source supply. Accordingly, differentiation of hESC into MSC will be promising cellular source with strong points of both hESC and MSC line. In this study, we described the derivation of MSC like cell population from feeder free cultured hESC (hESC- MSC) using direct differentiation system. Cells population, hESC-MSC and bone marrow derived MSC (BM-MSc) retained similar characteristics *in vitro*, such as morphology, MSC specific marker expression and differentiation capacity. At the point of differentiation of both cell populations, differentiation rate was slower in hESC-MSC than BM-MSc. As these reason, to verify differentially expressed molecular condition of both cell population which bring out different differentiation rate, we compare the molecular condition of hESC-MSC and BM-MSc using 2-D proteomic analysis tool. In the proteomic analysis, we identified 49 differentially expressed proteins in hESC-MSC and BM-MSc, and they involved in different biological process such as positive regulation of molecular function, biological process, cellular metabolic process, nitrogen compound metabolic process, macromolecule metabolic process, metabolic process, molecular function, and positive regulation of molecular function and regulation of ubiquitin protein ligase activity during mitotic cell cycle, cellular response to stress, and RNA localization. As the related function of differentially expressed proteins, we sought to these proteins were key regulators which contribute to their differentiation rate, developmental process and cell proliferation. Our results suggest that the expressions of these proteins between the hESC-MSC and BM-MSc, could give to us further evidence for hESC differentiation into the mesenchymal stem cell is associated with a differentiation factor. As the initial step to understand fundamental difference of hESC-MSC and BM-MSc, we sought to investigate different protein expression profile. And the grafting of hESC differentiation into MSC and their comparative proteomic analysis will be positively contribute to cell therapy without cellular source limitation, also with exact background of their molecular condition.

(Key words : Mesenchymal stem cell, Feeder-free culture, Human embryonic stem cell, Direct induction differentiation, 2D-proteomic analysis)

* 공동1저자

** 본 연구는 교육과학부 21세기 프론티어 연구개발사업 세포응용연구사업단 연구비(SC3110)의 지원으로 이루어진 것이며, 이에 감사드립니다.

† Corresponding author : Phone: +82-2-538-4104, E-mail: hmchung@cha.ac.kr

서 론

인간 배아 줄기세포는 자가 재생 능력(self-renewal)과 여러 세포로 분화할 수 있는 능력, 즉 전분화능(pluripotent)의 특징을 가지고 있는 세포이다(Thomson 등, 1998). 또한, 다양한 물질들에 의해 신체의 각 조직과 장기를 구성할 수 있는 삼배엽으로 분화할 수 있으며(Cowan 등, 2004), 이러한 능력을 이용하여 인간 배아 줄기세포는 현재 세포치료법에 있어서 세포로 작용할 수 있고, 질병으로 손상된 장기의 복원과 치료에 있어서 좋은 결과를 얻을 수 있는 중요한 원천이라고 생각되어지며(Boyd 등, 2009), 이러한 인간 배아 줄기세포와 유사한 능력을 가진 성체 줄기세포 중 중간엽 줄기세포는 골아세포, 지방세포, 연골세포로 분화가 가능한 세포로 알려져 있다(Lange 등, 2005). 또한, 성체 줄기세포를 이용하여 이식을 하였을 때 면역 거부 반응에 대한 문제점을 줄일 수 있으며, 여러 조직으로 분화가 가능하기 때문에 세포를 이용한 치료법이나 조직 재생 등과 관련되어 많은 연구가 이루어지고 있다. 그러나 성체 줄기세포로부터 이용 가능한 세포의 양은 한정적으로만 생산 가능하고 공여자가 가지고 있는 위험성으로 인해 질병이나, 노화에 영향을 줄 수 있는 문제점 등이 있다.

따라서 우수한 증식능과 전분화능을 갖는 인간 배아 줄기세포를 이용하여 중간엽 줄기세포(Boyd 등, 2009)로의 분화가 된다면, 성체 줄기세포가 가지고 있는 여러 가지 문제점과 한계점을 극복할 수 있을 것으로 판단된다. 최근, 인간 배아 줄기세포로부터 유래된 중간엽 줄기세포의 연구가 활발히 이루어지고 있으며(Hayashi 등, 2009), 특히 FACS를 이용하여 중간엽 줄기세포의 특이 마커를 이용한 분리, 배양 기술법 그리고 줄기세포에서 배상체로의 분화 이후 배상체 상태에서의 중간엽 줄기세포 특이 마커를 이용하여(Kim 등, 2007) 분리하는 방법(Boyd 등, 2007; Lian 등, 2007; Ji 등, 2008) 등으로 연구가 활발히 진행되어지고 있다. 그러나 현재까지 인간 배아 줄기세포를 배양하는 방법으로는 생쥐의 섬유아세포를 지지세포로 이용함으로써 인간에 적용 가능한 최종 임상 치료 목적으로 사용될 시 이종 간의 오염 문제의 가능성이 문제점으로 지적되고 있다. 이러한 문제점을 해결하기 위해 본 연구에서는 지지세포를 사용 없이 유지 배양된 인간 배아 줄기세포로부터 중간엽 줄기세포로의 분화 유도 기술을 개발하고, 동시에 분화된 중간엽 줄기세포에 대한 단백질 분석을 통해 성체 중간엽 줄기세포와 분화 유도된 세포의 특성을 파악하며, 세포 분화 과정에서의 일어나는 다양한 분자-세포 수준의 이해와 함께 새로운 분화 인자의 발굴 가능성을 탐색하기 위해 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

Feeder-Free System을 이용한 인간 배아 줄기세포의 배양 미분화 상태의 인간 배아 줄기세포(H9, CHA-hESC15)를 Matrigel™ hESC-qualified Matrix(BD)로 코팅된 60 mm 조직 배양 접시에 mTeSR™ medium kit(stem cell) 배

지를 이용하여 미분화 상태의 인간 배아 줄기세포를 유지 배양하였다. 24시간 간격으로 배지를 교체하고 5~6일 간격으로 새로이 코팅된 조직 배양 접시에 계대배양을 하였다.

인간 배아 줄기세포로 유래 중간엽 줄기세포로의 분화와 배양

혈관세포 성장을 위한 기본 배양액으로 알려진 EBM 배양액에(Lonza) 2% FBS가 첨가된 배양액에서 미분화 상태의 인간 배아 줄기세포를 60 mm 조직 배양 접시 내 유지 배양하면서 5일 동안 분화를 유도하고, 분화된 세포를 100 mm 조직 배양 접시에 계대배양 이후 EBM(Lonza) 2% FBS 배지 조건에서 3일에 한 번씩 계대배양하였다.

골수 유래 중간엽 줄기세포 배양

본 연구에서 BM-MSC(Lonza)는 세포 특성 및 단백질 분석을 위한 양성 대조군으로 사용되었다. BM-MSC는 100 mm 조직 배양 접시에 2×10^5 개의 세포를 3~4일에 한 번씩 MSCGM™(Lonza) 배양액으로 교체하고 7일에 한 번씩 계대배양을 하였다.

중간엽 줄기세포의 특성 분석

중간엽 줄기세포로서의 특성을 가지고 있는지 확인하기 위해 FACS 분석법을 실시하였다. FACS 분석을 위해 PBS(Gibco 1X)로 세척하고, Trypsin-EDTA(Gibco)를 이용하여 단일 세포군으로 만든 뒤 2% FBS(Gibco)가 함유된 PBS를 이용하여 분석을 실시하였다. 중간엽 줄기세포의 대표적인 양성 마커인 CD105(APC, R&D system), CD90(PE, R&D system), CD73(PE, R&D system), CD44(PE, R&D system), 미분화 인간 배아 줄기세포 마커인 SSEA-4(APC, R&D system), AP(PE, R&D system), 중간엽 줄기세포 음성 마커인 CD133(APC, R&D system), CD31(PE, R&D system), CD45(PE, R&D system)를 확인하였다.

중간엽 줄기세포에서의 지방 및 골아세포로의 분화

인간 배아 줄기세포 및 골수에서 유래된 중간엽 줄기세포를 4well plate에 6×10^5 세포를 seeding 후 분화 배양액(Stempro® adipocyte Differentiation Basal Medium)에서 3일에 한 번씩 배양액을 교체해 주고 4주 동안 배양을 하여 지방세포로 분화를 유도하였다. 분화된 세포를 Oil Red O의 염색 방법으로 지방세포를 확인할 수 있었다. 또한, 골아 세포로의 분화 유도를 위해 분화 배양액(Stempro® Osteocyte Differentiation Basal Medium)에서 3일에 한 번씩 배양액을 교체해 주고, 3주 동안 배양을 하여 골아 세포로의 분화를 유도하였다. 분화된 세포는 Vonkossa's 염색을 통하여 칼슘이 침착되는 것을 확인할 수 있었다.

2-DE 분석

2-DE(Two-dimensional gel electrophoresis)는 IEF(Isoelectric focusing)을 위한 Multiphor 시스템과 SDS-PAGE 분석을 이용하였다. Immobiline Drystrips(18 cm, pH 3 to pH 11, NL)을 200 µg의 단백질이 녹아 있는 DeStreak™ Rehydration Solution 위에 올려 rehydration(GE

Healthcare) 상태를 실온에서 12시간 동안 유지하였으며, IEF는 20°C로 유지하면서 300 V에서 1분, 3,500 V에서 90분 그리고 3,500 V에서 8시간 동안 수행하였다. IEF 이후 gel strip을 equilibration buffer(50 mM Tris-HCl pH 6.8, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS and a trace of bromophenol blue)에서 30분 동안 equilibration 시켰다. 이때, 첫 번째 equilibration buffer에 0.25% DTT를 첨가하였고, 두 번째 equilibration buffer에는 4.5% iodoacetamide를 첨가하였다. 전기영동은 12% separation gel과 4% stacking gel로 만든 SDS polyacrylamide vertical slab gel을 이용하였고, gel을 silver staining(GE Healthcare) 하여 단백질 염색하였다.

탈염색과 트립신 절단 및 단백질 추출

2-DE에 의해 분리된 단백질 spot을 gel에서 잘라내어 oxidation buffer(15 mM potassium ferricyanide and 50 mM sodium thiosulphate)를 이용하여 destaining 하였다. Destaining된 gel은 50% acetonitrile, 100 mM ammonium bicarbonate 용액 100 μ l를 사용하여 다시 팽창시켰다가 수축시켰다. 이렇게 팽창과 수축이 3번 반복된 gel을 vacuum centrifuge에서 15분 말린 후, 50 mM ammonium bicarbonate pH 8 버퍼에 trypsin이 0.05 μ g/ μ l에서 0.1 μ g/ μ l 들어 있는 용액을 넣어 트립신 digestion 시킨다. 이 트립신 용액은 실온에서 60분 동안 gel에 흡수시킨 후, 흡수되지 않은 나머지 용액은 제거하고, 50 mM ammonium bicarbonate 용액 80 μ l 넣은 후 37°C에서 16~20시간 incubation 시켰다. 잘려진 peptide를 포함하고 있는 용액을 새 튜브로 옮기고, tryptic peptides는 gel 조각으로부터 peptide를 모두 회수하기 위한 추출 과정을 3번 반복하였으며, 추출된 모든 peptide는 vacuum centrifuge에서 말려서 농축 건조시켰다. 농축 건조된 peptide는 liquid chromatography tandem mass spectrometry(LC-MS/MS) 분석을 위해 3% acetonitrile에 0.1% formic acid 용액 20 μ l와 함께 섞어 준비하였다.

LC-MS/MS 분석

Tryptic peptide는 nano LC-MS/MS로 분석을 하였으며, peptide는 nano C18 column(75 μ m \times 15 cm nano-Acquity™ UPLC™ column, waters)을 이용한 nano UPLC system(waters)으로 분리하였다. Peptide는 0.1% 포름산이 포함된 acetonitrile을 300 nL/min의 유속으로 2%에서 40%까지 점차적으로 증가시켜 분리하고 용출하였다. 분리된 peptide의 MS/MS 분석에는 nano ESI source를 이용한 Synapt™ HDMS(waters)를 사용하였다. 모든 분석을 positive ion mode와 V mode에서 이루어졌다. 분석 전에 질량분석기는 [Glu¹]fibrinopeptide를 사용하여 교정하였다. LC-MS/MS 데이터는 DDA(data dependent acquisition) mode로 수집하였다.

Database Searches

모든 MS/MS 스펙트럼은 Protein Lynx Global Server (PLGS), version 2.3(waters)를 사용하여 가공하였다. 가공된 데이터는 IPI human database를 사용하여 탐색하였다. 데이터의 탐색은 PLGS와 MASCOT DAEMON programs(<http://www.matrixscience.com>)을 사용하였다.

결 과

Feeder-Free 배양법을 이용한 인간 배아 줄기세포 분석

인간 배아 줄기세포를 Matrigel™ hESC-qualified Matrix(BD, Bioscience)가 코팅된 배양 접시에 부착 후 mTeSR™ Medium kit(Stem cell Technology)로 배양하였다. Feeder-free 상태에서 8 계대까지 콜로니의 형성과 정상적인 핵형이 유지됨을 관찰할 수 있었다. 8 계대 동안의 미분화 인간 배아 줄기세포를 FACS 분석을 통하여 SSEA-4(77.90%)와 AP(90.84%)가 지속적으로 발현되었으며, 이러한 결과 분석을 통하여 8 계대 동안의 인간 배아 줄기세포가 미분화 상태의 세포임을 확인하였다(Fig. 1).

인간 배아 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포와 성체 중간엽 줄기세포의 특성 분석

본 연구의 분화 방법을 토대로 획득된 인간 배아 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 유세포 분석 및 지방세포, 골아세포로의 분화를 유도를 통해 중간엽 줄기세포로서의 특성 분석을 실시하였다.

인간 배아 줄기세포 유래의 중간엽 줄기세포는 EBM 배지에 2% FBS가 첨가된 배양액을 이용하여 3일에 한 번씩 계대배양을 하였으며, 양성대조군인 성체 중간엽 줄기세포와 함께 형태학적 분석과 특정 마커의 발현을 분석하였다. 중간엽 줄기세포의 양성 마커인 CD44, CD105, CD73, CD90과 음성 마커인 CD45, CD31, CD44, CD133를 각각 확인하였으며, 그 결과 인간 배아 줄기세포 유래

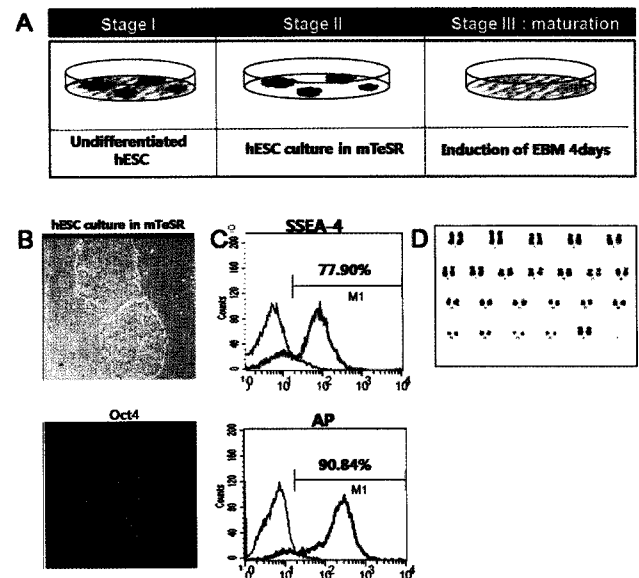


Fig. 1. Characterization of feeder-free cultured undifferentiating hESCs. (A) Experimental scheme of a direct induction system. mTeSR™: Stem Cell Technologies' Serum-Free and Feeder-Independent Medium for Human Embryonic Stem Cells, EBM: For endothelial cell culture medium generated. (B) Feeder free cultured hESCs (upper), immunostaining of feeder-free cultured undifferentiating hESCs for Oct4. (C) FACS analysis of undifferentiated cell surface makers, AP and SSEA-4, in feeder free cultured hESCs. (D) Karyotype analysis of feeder-free cultured undifferentiating hESCs.

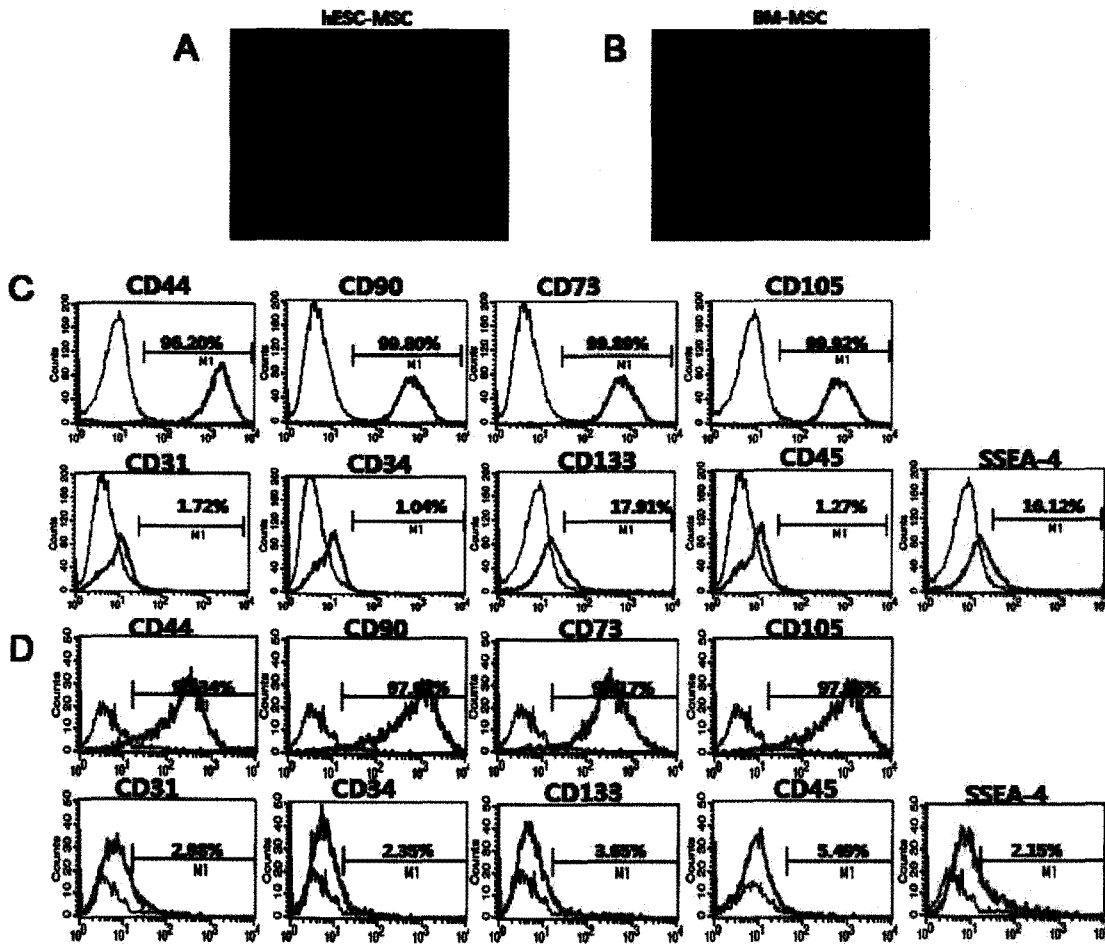


Fig. 2. Verification of mesenchymal stem cells-like cell population from feeder free cultured hESCs(hESC-MSCs). (A) The morphologies of hESCs-MSCs, (B) Human derived bone marrow-MSC. FACS analysis of human bone marrow-MSCs (C) and hESCs-MSC (D) with positive makers including CD90, CD105, CD73 and CD44, and negative makers including CD34, CD45, CD133 and CD31 of MSCs.

중간엽 줄기세포는 CD44(96.34%), CD105(95.10%), CD73 (97.17%), CD90(97.92%)를 확인하고, 음성 마커인 SSEA-4(2.15%), CD45(5.48%), CD31(2.98%), CD34(2.35%), CD133 (3.65%) 등이 현저히 낮게 발현되는 것을 확인할 수 있었 으며, 성체 중간엽 줄기세포 분석 결과 CD44 (96.20%), CD105 (91.62%), CD73(99.89%), CD90(95.99%), 음성 마커 인 CD45(1.41%), CD31(1.71%), CD34(1.33%), CD133(1.17 %), SSEA-4(17.91%)로 인간 배아 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포와 성체 유래 중간엽 줄기세포에서 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(Fig. 2). 한편, 인간 배아 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 세포분화능 분석을 위해 지방세포와 골아세포로의 분화 유도능을 성체 유래의 중간엽 줄기세포와 비교한 결과, 인간 배아 줄기세포 유래의 중 간엽 줄기세포는 골아 세포로 분화하는 시기가 약 18일 후에 분화되며, 지방세포는 30일 후에 분화가 일어나는 반면, 성체 유래 중간엽 줄기세포는 인간 배아 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포보다 빠른 14일에 지방세포와 골아 세포로 분화가 되는 것을 확인하였다. 또한, 성체 유래 중 간엽 줄기세포에서 지방세포는 모든 세포에서 지방질이 크고 선명하게 형성되는 반면, 인간 배아 줄기세포 유래

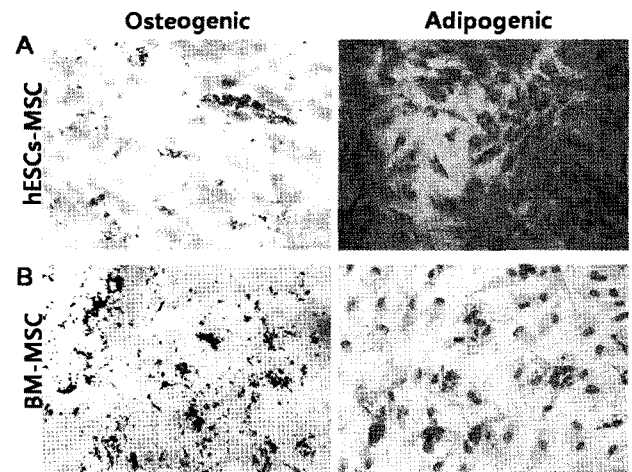


Fig. 3. Functional differentiation of hESC-MSCs into several lineages. (A) hESC-MSC differentiated into osteocytes(left), adipocytes(right) by culture in specified differentiation media. (B) Human bone marrow-MSC osteocytes(left), adipocytes(right). Adipocytes were stained for droplets by Oil red O, Osteocytes were stained for mineralization by von Kossa stain.

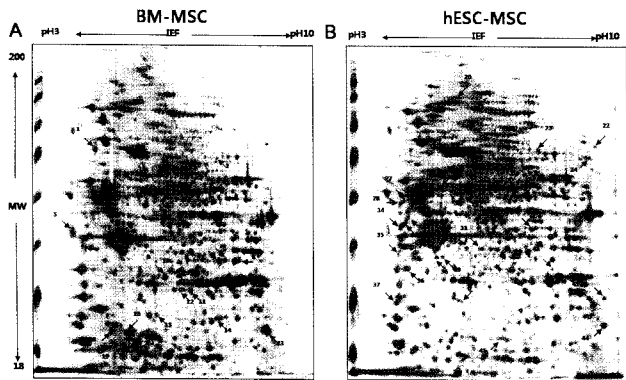


Fig. 4. Comparative protein expression profile map of hESC-MSC and BM-MSC using 2-DE gel electrophoresis. Proteins isolated from hESCs-MSC and BM-MSC was loaded to the 2-DE gel electrophoresis. First dimension was 18 cm pH 3~11 NL and second dimension was 10% gels (A: BM-MSC, B: hESCs-MSC). They were visualized by the silver staining. Proteins showing differential expression were isolated and identified using LC-MS/MS. Identified proteins were listed in Table 1. In Table 1, 19 up-regulated and 26 down-regulated proteins were listed. Arrows means specifically up-regulated proteins in hESCs-MSC and BM-MSC.

중간엽 줄기세포는 지방질이 작으며, 부분적으로 지방질이 형성되는 것을 알 수 있었다. 이와 반대로 골아세포의 분화는 다른 차이가 없이 비슷하게 분화가 진행됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

인간 배아 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포와 성체 중간엽 줄기세포의 단백질체학을 이용한 차등 단백질 분석

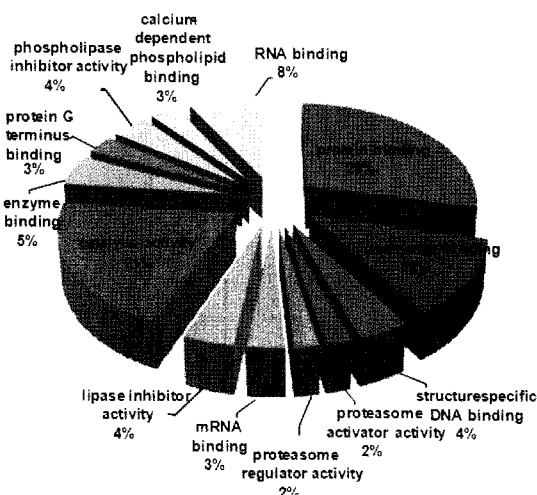
골수 유래 중간엽 줄기세포와 비교하였을 때, 인간 배아 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포가 생리학적으로 어떻게

다르며, 이때 분화에 관련된 단백질이 무엇인지 알아보기 위해 2-DE를 통하여 proteome를 분석하였다. 골수 유래 중간엽 줄기세포와 인간 배아 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 각각을 2-DE와 LC/MS를 이용하여 서로 다르게 나타나는 단백질들을 관찰하였다. 각각의 샘플에서 얻은 200 µg의 단백질을 IPG strips(pH 3~11, non-linear)을 이용하여 IEF한 후에 전기영동을 수행한 결과, 서로 다르게 증가하는 44개의 단백질들을 찾았으며 이들 단백질 중 19개는 골수 유래 중간엽 줄기세포에서 증가하였고, 나머지 25개는 인간 배아 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포에서 증가하였다(Fig. 4).

동정화된 단백질의 그룹화

각각의 세포에서 특이적으로 과발현되는 단백질에 대한 정확한 정보를 확인하고자 EXPASY(<http://www.expasy.org>) 정보를 이용하여 molecular function과 biological process별로 기능적 관여 단백질과의 상관성을 도식화하였다. 그룹화 결과, 단백질의 기능성별 작용 기작의 연관성을 볼 수 있는 molecular function 그룹화 결과 protein binding(29%), catalytic activity(21%), nucleotide binding(12%), phospholipase inhibitor activity(5%), 그리고 enzyme binding(5%) 작용 기작에 관여하는 단백질이 골수 유래 중간엽 줄기세포와 비교하였을 때, 인간 배아 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 단백질이 특이적으로 감소되는 경향이 확인되었으며, 신진 대사 기작의 연관성을 확인할 수 있는 biological process 그룹화 결과 negative regulation of biological process(18%), negative regulation of cellular process(17%), negative regulation of cellular metabolic process(10%), negative regulation of macromolecule metabolic process(10%) 그리고 positive regulation of molecular function(7%) 작용 기작에 관여하는 단백질이 골수 유래 중간엽 줄기세포와 비교하였을 때,

A Molecular Function



B Biological process

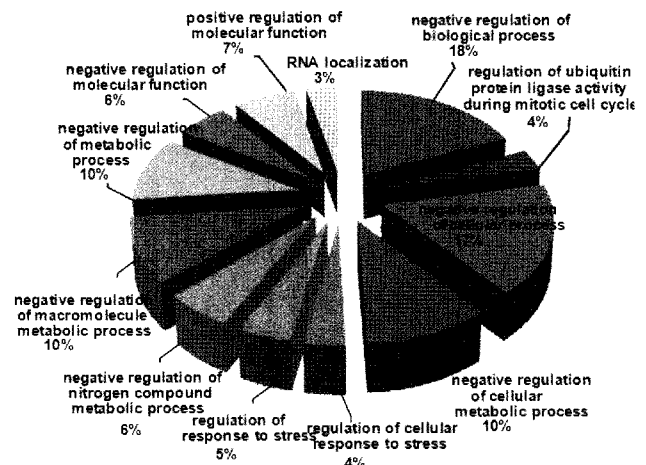


Fig. 5. Classification of differentially regulated proteins from the proteomic analysis using EXPASY(<http://www.expasy.org>). Ontological classification of differentially regulated proteins in terms of (A) Molecular function, (B) Biological process. The compositions of identified proteins are presented as percentages of all the individual identified proteins. Total 45 unique proteins are allocated to its of 13 categories with different molecular function and 12 categories with different biological processing.

인간 배아 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 단백질이 대부분 과발현됨을 확인하였다(Fig. 5).

고 찰

자가 재생능과 다분화성을 가장 대표적인 특징으로 가지는 세포인 줄기세포는 세포 대체 치료법을 이용한 근본적 치료제 제공의 가능성으로 인해 재생의학 분야에서 크게 각광을 받고 있다. 그 중 중간엽 줄기세포는 줄기세포 이식 시 형성되어질 수 있는 기형종 생식의 위험성이 없고, 이미 심혈관 질환 등에서의 치료 효과가 검증되어 임상 적용 가능한 세포군으로 인정받고 있다. 하지만 그 세포 공급원의 한계가 있어 그를 극복하기 위한 연구가 전세계적으로 널리 진행되고 있다.

본 연구에서는, 이러한 세포 공급의 한계가 없는 중간엽 줄기세포의 획득을 위해 무한 자가 증식이 가능한 인간 배아 줄기세포를 이용하여 중간엽 줄기세포로의 분화를 유도하였다. 인간 배아 줄기세포의 배양 및 분화 과정 동안의 이종간 오염을 방지하기 위해 feeder free 배양법을 이용하였으며(Wagner와 Vemuri, 2010), 보다 효과적인 분화 유도를 위한 2-D direct differentiation 방법을 도입하여 분화를 유도하였다. 인간 배아 줄기세포의 분화 방법 중 가장 널리 이용되는 방법은 배상체 형성을 통한 분화 유도이다. 하지만 배상체 형성 과정 중 자연적으로 cystic 혹은 cavity 형태의 배상체가 형성되며, 이러한 형태학적 차이로 인한 분화 효율의 차이가 보고되어 있으며, 배상체 형성 및 배양 과정 동안 일반 세포와 달리 부유 배양법을 이용해야 하므로 이에 따른 시간과 노동력은 상당량 소모된다. 이러한 배상체 형성을 통한 분화법의 단점을 극복하고, 보다 효율적인 분화 유도를 위하여, feeder free 법을 이용해 배양된 미분화 상태의 인간 배아 줄기세포에 분화 유도를 위한 배양액을 직접 첨가해 주는 2-D direct differentiation 방법을 도입하였다. 2-D direct differentiation법을 이용한 분화 과정 시 배상체 형성에서 오는 시간과 노동력 소모를 방지할 수 있었으며, 분화를 위해 배상체 형성 시 요구되는 인간 배아 줄기세포의 양보다 적은 양의 세포로도 분화 유도가 가능함을 확인할 수 있었다. 또한, 배상체 형성 시 배상체가 가지는 구상의 세포 덩어리 구조로 인해 배상체 내부의 세포에는 외부에서 주어지는 배양액의 분화 유도 인자가 잘 전달되어 지지 않는 단점을 극복할 수 있었다. 분화 유도를 위해 사용된 배양액은 EBM(endothelial basal medium)으로 혈관내피세포 배양을 위해 생성된 배양액이지만, 혈관 전구세포 등의 각종 전구세포의 배양에 또한 널리 사용되고 있다. 줄기세포의 분화에는 영향을 주는 대표적인 인자로는 성장 인자가 가장 잘 알려져 있지만, 줄기세포가 가지는 분화능은 줄기세포가 배양되고 있는 미세한 환경변화로도 분화가 가능하다. 이러한 미세 환경 변화만으로도 분화 유도가 가능한 인간 배아 줄기세포의 특징을 이용하여, 본 연구에서는 2-D 상태에서 미분화 상태 유지를 위한 배양액 제거 후, 전구세포 등의 배양을 위해 사용되는 기본 배지로의 교환이 가져오는 기초적인 미세 환경 변화가 특정 성장인자 등의 영향 없이도 분화가 가능함을 확인하였으며, 이를 이용하여 분화된 세포는 중간엽

줄기세포의 특징을 보임을 확인하였다. 분화된 인간 배아 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포는 골수 유래 중간엽 줄기세포가 가지는 형태학적 특징과 매우 유사한 형태를 보였으며(fibroblastic and spindle-like morphology), 중간엽 줄기세포 양성 마커 발현(CD73, CD90, CD105, CD44)과 지방 및 골아세포로의 분화가 가능한 특징을 보였다. 이러한 형태학적 특정 마커의 양성 발현 및 분화능의 확인은 분화된 세포가 중간엽 줄기세포의 특징을 가지고 있음을 의미하며, 이러한 특정 발현은 인간 배아 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 세포치료제로써 이용을 위한 가능성을 확인한 한 방법이라 할 수 있다. 하지만, 이러한 특성 확인만으로는 근본적인 특징 검사 및 중간엽 줄기세포로써 보일 수 있는 메커니즘에 관한 것은 확인할 수 없으므로, 본 연구에서는 이러한 인간 배아 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포의 분자 수준에서의 발현 패턴을 골수 유래 중중간엽 줄기세포와의 단백질체학을 이용한 비교 연구를 통하여 보다 깊게 알아보았다. 단백질체학을 이용한 실험 결과, 인간 배아 줄기세포와 성체 줄기세포 유래의 중중간엽 줄기세포의 단백질 발현 양상은 90% 이상 유사성을 보였으며, 각각 5,500~6,000개 정도의 단백질의 발현 양상을 확인할 수 있었다. 발현되는 전체 단백질의 발현 양상을 보다 정확하게 확인하기 위하여 이미지 분석기를 이용하여 발현량의 차이를 분석한 결과, 인간 배아 줄기세포 유래의 중간엽 줄기세포에서 44개의 단백질이 과발현됨을 확인하였으며, 44개중 최종 25개의 과발현 단백질을 동정화할 수 있었으며, 성체 줄기세포 유래의 중간엽 줄기세포에서 과발현되는 30개의 단백질 중 19개의 과발현 단백질을 동정화 하는데 성공하였다(Table 1).

이미지 분석을 통하여 전체 단백질의 발현 양상의 차이를 분석한 결과, 기존 인간 배아 줄기세포와의 단백질 발현 양상이 70% 정도의 유사성을 보인데 반해 상당한 유사성을 보임으로써 중간엽 줄기세포의 발현 단백질의 양상과 비슷함을 확인하는 결과로 중간엽 줄기세포와 유사한 성격의 세포로써의 추측을 가능하게 하였다. 하지만 두 종류의 중중간엽 줄기세포는 특정 마커 단백질의 발현양상은 비슷하나, 골아세포와 지방세포로의 분화시간과 분화효율은 각각 차이를 보였다.

이에 단백질체학 분석을 통해 동정화된 단백질들이 이런 분화 효율 인자로서의 중요한 단백질로써 역할을 하리라 추측할 수 있었으며, 이에 기존 보고서 자료에 의한 기능, 역할에 대해서 알아보았다. 먼저, 골수 유래 중간엽 줄기세포 특이적으로 과발현된 단백질 중 annexin A2는 칼슘의 존재량에 의해 발현량의 차이를 보이는 단백질로써, phospholipid-binding protein으로 널리 알려져 있으며, 다양한 세포 타입의 surface에 존재한다. 특히, 세포에 있어서 증식 능력과, 분화 능력, 혈관 신생과 세포를 활성화 시키며, 세포와 세포 사이의 상호 관계에 중요한 역할을 하는 조절 인자로 알려져 있다(Wu 등, 2010). Heat shock protein beta-1(Hsp27)은 줄기세포 분화 관련 인자로서 과발현 시 줄기세포의 증식 능력과 분화는 감소한다고 보고되어 있으며, 세포의 형태학적인 변화에 영향을 주며, 줄기세포의 분화 시 분화 이전의 전 과정에 apoptosis를 형성함으로써 산화 환원 기작을 조절하는 스위치 역할을 하는 중요한 단백질로 알려져 있다(Hoffert 등, 2004; Stolzing와 Scutt, 2006).

인간 배아 줄기세포 유래 중간엽 줄기세포 특이적으로

Table 1. Identification of up-regulated proteins in BM-MSC

Spot No.	Accession No.	Identified proteins	Seq. cov. (%)	Matched peptide	pI	Mass (Da)	Mascot score
1	IPI00182126	FK506-binding protein 9	18	13	4.91	63508	247
2	IPI00294380	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP], mitochondrial	37	26	7.56	71462	603
3	IPI00554786	Isoform 5 of thioredoxin reductase 1, cytoplasmic	42	28	6.07	55484	754
4	IPI00218343	Tubulin alpha-1C chain	8	3	4.96	50560	119
5	IPI00789155	cDNA FLJ31776 fis, clone NT2RI2008141, highly similar to CALUMENIN	23.5	11	4.3	38143	295
6	IPI00930609	Isoform 1 of phosphoserine aminotransferase	37	20	7.56	40803	400
7	IPI00930609	Isoform 1 of phosphoserine aminotransferase	15	5	7.56	40803	137
8	IPI00930609	Isoform 1 of phosphoserine aminotransferase	37	21	7.56	40803	349
9	IPI00744692	Transaldolase	12	4	6.36	37690	146
10	IPI00418169	Annexin A2 isoform 1	15	5	8.53	40676	68
11	IPI00217966	L-lactate dehydrogenase	17	6	8.61	40102	132
12	IPI00303602	Isoform 1 of axin interactor, dorsalization-associated protein	9	3	6.13	35175	82
13	IPI00295386	Carbonyl reductase [NADPH] 1	51	15	8.55	30646	402
14	IPI00010810	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	10	3	8.62	35406	44
15	IPI00793199	Annexin IV	42	19	5.84	36294	672
16	IPI00384051	Putative uncharacterized protein PSME2	51	15	6.05	28758	432
17	IPI00479722	Proteasome activator complex subunit 1	24	6	5.78	28879	115
18	IPI00020906	Inositol monophosphatase	29	6	5.16	30575	152
19	IPI00027681	Nicotinamide N-methyltransferase	24	7	5.56	30019	225
20	IPI00645078	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	23	32	5.49	118876	655
21	IPI00220834	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2	30	22	5.55	83232	412
22	IPI00008524	Isoform 1 of polyadenylate-binding protein 1	15	10	9.52	70858	162
23	IPI00375441	Isoform 1 of far upstream element-binding protein 1	12	10	7.18	67692	170
24	IPI00008557	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	17	10	9.26	63765	166
25	IPI00027834	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	13	8	8.46	64730	123
26	IPI00008475	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, cytoplasmic	4	3	5.22	57837	53
27	IPI00328319	Histone-binding protein RBBP4	10	5	4.74	47916	112
28	IPI00022694	Isoform Rpn10A of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4	5	2	4.68	40943	77
29	IPI00021808	Histidyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	10	6	5.72	57954	105

Table 1. Continued

Spot No.	Accession No.	Identified proteins	Seq. cov. (%)	Matched peptide	pI	Mass (Da)	Mascot score
30	IPI00217223	Multifunctional protein ADE2	28	19	7.44	50402	274
31	IPI00027341	Macrophage-capping protein	7	3	5.88	38784	120
32	IPI00418471	Vimentin	53	36	5.06	53677	942
33	IPI00418471	Vimentin	53	11	5.06	53677	367
34	IPI00418471	Vimentin	73	110	5.06	53677	2371
35	IPI00418471	Vimentin	49	42	5.06	53677	850
36	IPI00549248	Isoform 1 of nucleophosmin	34	29	4.64	32729	837
37	IPI00021700	Proliferating cell nuclear antigen	19	8	4.57	29098	92
38	IPI00748145	Isoform 1 of guanine nucleotide-binding protein G(i), alpha-2 subunit	13	5	5.34	41005	109
39	IPI00008552	Glutaredoxin-3	17	5	5.31	37698	67
40	IPI00024095	Annexin A3	43	18	5.63	36527	438
41	IPI00334587	Isoform 2 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	8	2	6.49	36061	73
42	IPI00797148	Isoform 2 of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	22	4	9.19	29484	220
43	IPI00027252	Prohibitin-2	35	13	9.83	33276	196
44	IPI00011253	40S ribosomal protein S3	73	37	9.68	26845	845
45	IPI00643746	High-mobility group box 1	41	4	9.91	11461	36

과발현된 단백질 중 대표적으로 Elongation factor 1-alpha 1 단백질 발현이 특이적으로 과 발현되었으며, 이는 인간 배아 줄기세포의 분화에 관여하는 단백질로 널리 알려져 있으며, 인간 중간엽 줄기세포에서 골아세포로의 분화 유도에 관여하는 중요한 유전자로써 분화 초기 단계에 발현하여 세포의 증식 능력에 중요한 역할을 한다고 보고되었다(Kim 등, 2005; Sun 등, 2006). High mobility group protein B1 단백질은 nonhistone nucleosomal protein이 주된 구성 성분으로써, 모든 동물세포에 존재하는 것으로 알려져 있으며, nuclear HMGB-1과 extracellular HMGB-1으로 구분되고, nuclear HMGB-1은 다양한 p53 등의 전사인자에 관여한다. 실제 임상 부분에서 Extracellular HMGB-1의 발현량의 증가는 류마티스 관절염이나 피부 질병에 원인이 되며, 최근에는 인간 배아 줄기세포의 미분화를 유지시켜 주는 중요한 인자로 알려져 있고, MSC에서 분화 과정 동안 조절인자의 역할을 하며, 특히 골아세포 분화에 있어서 중요한 역할을 한다고 보고되어졌다(Lange 등, 2005; Meng 등, 2008).

인간 배아 줄기세포를 이용하여 난치병 치료를 위한 세포 치료제를 만들기 위한 기본적인 배양 조건과 특성 세포로의 효율적인 분화 유도 방법 및 분리 정제 기술은 대량 생산을 위하여 개발되어야 할 부분으로써, 본 연구에서 새로운 배양 조건의 변화와 효율적인 특정세포 분화 방법은 차후, 세포치료제 개발을 위한 대량 생산 부분에 응

용되리라 기대되며, 단백질학 분석 방법을 이용하여 두 종류의 세포 주 특이적으로 과발현 또는 감소하는 단백질의 정보를 통하여 중간엽 줄기세포의 분화 조절인자로서의 가능성을 제시하였으며, 보다 효율적인 분화 배양 조건 설정 시 관련 기작에 대한 기본적인 정보로서의 활용도가 기대된다.

인용문헌

1. Boyd NL, Dhara SK, Rekaya R, Godbey EA, Hasneen K, Rao RR, West FD, Gerwe BA, Stice SL (2007): BMP4 promotes formation of primitive vascular networks in human embryonic stem cell-derived embryoid bodies. *Exp Biol Med (Maywood)* 232: 833-843.
2. Boyd NL, Robbins KR, Dhara SK, West FD, Stice SL (2009): Human embryonic stem cell-derived mesoderm-like epithelium transitions to mesenchymal progenitor cells. *Tissue Eng Part A* 15:1897-1907.
3. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, Wang S, Morton CC, McMahon AP, Powers D, Melton DA (2004): Derivation

- of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 350:1353-1356.
4. Hayashi N, Takahashi K, Abe Y, Kashiwakura I (2009): Placental/umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell-like stromal cells support hematopoietic recovery of X-irradiated human CD34+ cells. *Life Sci* 84:598-605.
 5. Hoffert JD, van Balkom BW, Chou CL, Knepper MA (2004): Application of difference gel electrophoresis to the identification of inner medullary collecting duct proteins. *Am J Physiol Renal Physiol* 286:F170-179.
 6. Ji J, Vijayaragavan K, Bosse M, Menendez P, Weisel K, Bhatia M (2008): OP9 stroma augments survival of hematopoietic precursors and progenitors during hematopoietic differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26:2485-2495.
 7. Kim J, Moon SH, Lee SH, Lee DR, Koh GY, Chung HM (2007): Effective isolation and culture of endothelial cells in embryoid body differentiated from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 16:269-280.
 8. Kim JH, Do HJ, Choi SJ, Cho HJ, Park KH, Yang HM, Lee SH, Kim DK, Kwack K, Oh SK, Moon SY, Cha KY, Chung HM (2005): Efficient gene delivery in differentiated human embryonic stem cells. *Exp Mol Med* 37:36-44.
 9. Lange C, Schroeder J, Stute N, Lioznov MV, Zander AR (2005): High-potential human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* 14:70-80.
 10. Lian Q, Lye E, Suan YK, Khia-Way TE, Salto TM, Liu TM, Palanisamy N, El-Oakley RM, Lee EH, Lim B, Lim SK (2007): Derivation of clinically compliant MSCs from CD105+, CD24- differentiated human ESCs. *Stem Cells* 25:425-436.
 11. Meng E, Guo Z, Wang H, Jin J, Wang J, Wu C, Wang L (2008): High mobility group box 1 protein inhibits the proliferation of human mesenchymal stem cells and promotes their migration and differentiation along osteoblastic pathway. *Stem Cells Dev* 17:805-813.
 12. Stolzing A, Scutt A (2006): Effect of reduced culture temperature on antioxidant defences of mesenchymal stem cells. *Free Radic Biol Med* 41:326-338.
 13. Sun HJ, Bahk YY, Choi YR, Shim JH, Han SH, Lee JW (2006): A proteomic analysis during serial subculture and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cell. *J Orthop Res* 24:2059-2071.
 14. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
 15. Wagner KE, Vemuri MC (2010): Serum-free and feeder-free culture expansion of human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 584:109-119.
 16. Wu XY, Fu ZX, Wang XH, Shen W (2010): Identification of differential proteins in colon cancer SW-480 cells with HIF1-alpha silence by proteome analysis. *Neoplasma* 57:299-305.

(접수일자: 2010. 6. 10 / 채택일자: 2010. 8. 30)