

Feeder-free에서 배양된 인간배아줄기세포의 직접분화유도 방법을 이용한 간엽줄기세포로의 분화

이민지¹ · 이재호² · 김주미² · 신정민² · 박순정¹ · 정선화¹ · 이경일¹ · 채정일¹ · 정형민^{1,2,†}

¹차의과학대학 의생명과학대학원 줄기세포 연구실, ²차바이오펀디오스텍

Differentiation of Mesenchymal Stem Cell-like Cell from Feeder Free Cultured Human Embryonic Stem Cells using Direct Induction System

Min-Ji Lee¹, Jae-Ho Lee², Ju-Mi Kim², Jeong-Min Shin², Soon-Jung Park¹, Sun-Hwa Chung¹, Kyung-Il Lee¹, Jung-Il Chae¹ and Hyung-Min Chung^{1,2,†}

¹Graduate School of Life Science, CHA Stem Cell Institute, CHA University, College of Medicine, 605-21 Yeoksam 1 dong, Gangnamgu, Seoul 135-907, Korea

²CHA Biotech & Diotech Co. Ltd., 606-16 Yeoksam 1 dong, Gangnamgu, Seoul 135-907, Korea

ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSCs) have the multipotent capacity and this potential can be applied for obtaining valuable cell types which can use for cell therapy on various regenerative diseases. However, insufficient availability of cellular source is the major problem in cell therapy field using adult stem cell sources. Recently, human embryonic stem cells (hESCs) have been highlighted to overcome a limitation of adult cellular sources because they retain unlimited proliferation capacity and pluripotency. To use of hESCs in cell therapy, above all, animal pathogen free culture system and purification of a specific target cell population to avoid teratoma formation are required. In this study, we describe the differentiation of a mesenchymal stem cell-like cells population from feeder-free cultured hESCs(hESC-MSCs) using direct induction system. hESC-MSCs revealed characteristics similar to MSCs derived from bone marrow, and undifferentiated cell markers were extremely low in hESC-MSCs in RT-PCR, immunostaining and FACS analyses. Thus, this study proffer a basis of effective generation of specialized human mesenchymal stem cell types which can use for further clinical applications, from xenofree cultured hESCs using direct induction system.

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

서 론

인간배아줄기세포는 배반포의 내부세포괴에서 분리 후 확립된 세포로 자가 재생 능력(self-renewal)과 전분화능(pluripotent)의 특징을 가지는 세포이다. 인간배아줄기세포의 전분화능은 신체의 각 장기와 조직을 구성하는 삼배엽성의 세포로 분화할 수 있는 능력을 의미하며, 이러한 전분화능을 이용하여 인간배아줄기세포는 오늘날의 세포치료를 위한 중요한 공급원으로 인식되고 있다(Thomson 등, 1998; Cowan 등, 2003; Horwitz, 2003). 인간배아줄기세포가 가지는 분화능과 유사한 능력을 가진 성체 줄기세포들 중 간엽줄기세포(mesenchymal stem cells)는

삼배엽성 중 중배엽성 그리고 비중배엽성세포 계통으로의 다분화능을 가지는 줄기세포로서 손상된 조직의 재생에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 그 중에서 조혈모세포, 뼈, 연골세포, 지방세포, 근육세포, 섬유세포 등으로 분화할 수 있는 능력을 가진다(Lange 등, 2005; Phinney와 Prockop, 2007). 이러한 간엽줄기세포는 체대혈과 골수 등 성체줄기세포에서 용이하게 분리할 수 있으나 그 양이 한정적인 한계점을 지닌다(Kim 등, 2004; Gothers-trom 등, 2005; Beyer 등, 2006; Hayashi 등, 2009).

따라서 인간배아줄기세포를 적절한 방법으로 분화를 유도하여 간엽줄기세포(mesenchymal stem cell-like cells)로의 분화가 이루어진다면, 세포 공급의 한계점을 극복하며 다양한 계통으로 분화 가능한 새로운 세포공급원을

* 본 연구는 교육과학기술부 21세기 프론티어 사업단 stem cell research center(SC3110) 연구비의 지원으로 이루어진 것임.

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

얻어낼 수 있을 것이다(Beyer 등, 2006; Amit 등, 2006). 배아줄기세포로부터 간엽줄기세포로의 분화 및 대량 분리에 성공한 결과가 2005년 처음 발표된 이후 지속적으로 활발한 연구가 진행되고 있다 (Lange 등, 2005; Oh 등, 2006; Lian 등, 2007; Boyd 등, 2009). 이렇게 특정세포로의 분화를 유도하는 방법에는 유전자 발현조절을 하거나, 미세 환경 조절, 성장인자와 사이토카인을 처리하는 방법과 다른 세포와의 공배양 방법뿐만 아니라 삼배엽으로 분화할 수 있는 능력을 가지는 배상체 단계를 거쳐 특정 세포로 분화를 유도하는 방법 등이 연구되고 있다(Boyd 등, 2007; Kim 등, 2007; Kim 등, 2008; Ji 등, 2008). 하지만 배상체를 형성하여 성장인자와 사이토카인을 처리하여 분화를 유도하는 부유배양의 경우 배상체의 내부 안쪽까지 동일한 양의 성장인자와 사이토카인이 침투하여 분화를 유도할 수 없다(Trounson, 등 2005).

또한 인간배아줄기세포의 일반적인 배양 방법으로 지지세포에서 분비되는 성장인자로 인해 인간배아줄기세포의 미분화 상태를 유지하며 자랄 수 있게 한다(Amit 등, 2006). 이런 공배양법은 훗날 세포치료제에 주된 공급원이 될 인간배아줄기세포를 다른 세포와 공배양함으로써 얻어질 수 있는 다른 세포원의 오염 가능성과 생쥐 유래의 지지세포 등을 사용할 경우, 이중 유래 세포나 단백질의 오염과 같은 단점을 가지고 있다(Montes 등, 2009).

그리하여 본 연구에서는 이러한 한계점을 극복하기 위해, 인간배아줄기세포를 지지세포가 없는 feeder-free 상태에서 유지 배양 후 간엽줄기세포로의 분화를 위해 VEGF, bFGF, EGF 등의 성장인자가 첨가된 EGM-2 배지를 이용하여 분화를 유도하였다. 배상체를 형성하기 전의 미분화 상태의 인간배아줄기세포에 배지의 성장인자를 직접적으로 접촉하여 배양하는 직접 유도 방법(direct induction)을 도입하여 분화 후 분리 및 계대 배양을 통해 임상적용을 위한 충분한 세포수의 간엽줄기세포를 확보할 수 있었다. 또한 기존의 레이저의 영향으로 세포의 생존능력이 감소하는 유세포 분석기와 효소를 처리하여 분리하는 MACS의 분리 방법보다 세포의 물리적인 손상을 줄이며 세포를 분리하는 방법을 구축하였다는 의의를 가진다.

따라서 본 연구 결과를 기반으로 인간배아줄기세포로부터 확립된 간엽줄기세포는 임상적용을 위한 안전성과 충분한 세포수를 확보할 수 있는 분화 방법과 간엽세포로의 분화가 용이하며, 이에 따른 질환치료에 효과적으로 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

재료 및 방법

Feeder-free 배양법을 이용한 인간배아줄기세포 배양

미분화 상태의 인간배아줄기세포(H9, hESCs)는 2% CELLstrat™ (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)으로 코팅된 60 mm 조직배양접시에 STEMPRO hESC SFM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 배지를 이용하여 배양을 하였다. STEMPRO의 배양액의 조성은 DMEM/F12+GlutaMAX (1X, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), STEMPRO hESC SFM Growth Supplement (50X) 1X, 1% 페니

실린스트렙토마이신(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1.8 % BSA, bFGF 8 ng/ml, 0.1 mM 2-메타머캡토에탄올(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 매일 배양액을 교체하며 3~5일 간격으로 새로운 CELLstrat™로 코팅된 조직배양 접시에 계대배양을 실시하였다.

미분화 인간배아줄기세포의 면역염색방법

Feeder-free 조건에서 3~5일간 배양한 미분화 인간배아줄기세포를 4% 파라포름알데하이드로 15분간 상온에서 고정시킨 다음 0.03% Triton X-100이 포함된 PBS를 세척용액으로 사용하여 세 번 세척하였다. 고정된 미분화 인간배아줄기세포에 5%의 BSA(bovine albumin serum)을 첨가하여 한 시간 동안 블로킹한 후, Oct-4(Millipore, Billerica, MA, USA), SSEA-4(Millipore, Billerica, MA, USA), TRA1-60(Millipore, Billerica, MA, USA), TRA1-81(Millipore, Billerica, MA, USA), E-cadherin(Millipore, Billerica, MA, USA)과 같은 일차항체를 12시간 4°C에서 반응시키고 세척용액을 이용하여 세 번 세척하였다. 세척 후, 이차항체들을 상온에서 1시간 동안 처리하고 세척용액을 이용하여 세 번 세척하였다. 면역 염색이 끝난 시료는 4,6-디아미디노-2-페닐린들(DAPI)이 함유되어 있는 글리세롤 마운팅 용액을 이용하여 마운팅한 뒤, LSM 510 META 공 초점 현미경(Carl Zeiss Inc, Oberkochen, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

직접적인 유도 방법(Direct Induction)을 이용한 간엽줄기세포로의 분화와 분리된 간엽줄기세포의 배양

Feeder-free 배양법을 이용하여 유지 배양한 인간배아줄기세포를 이용하여 간엽줄기세포로의 분화와 분리를 위해, 다양한 성장인자와 사이토카인이 첨가된 EGM-2 (LONZA, Basel, BS, Switzerland) 배양액에서 미분화 상태의 배아줄기세포를 10일간 배양하여 분화를 유도한 후 분화된 세포를 배양접시에 부착한 후 2~3일에 한 번씩 계대 배양하였다.

간엽줄기세포로서의 특성 분석

분화된 간엽줄기세포의 특성을 분석하기 위해 유세포 분석법을 수행하였다. 유세포 분석을 위해 세포들을 PBS (1X, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 세척 후 trypsin-EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 단일 세포군으로 만든 뒤, 2% 우테아 혈청이 함유된 PBS로 세척한다. 그 후 PE-복합화 CD90(R&D systems, Minneapolis, MN, USA), PE-복합화 CD105(R&D systems, Minneapolis, MN, USA), PE-복합화 CD44(R&D systems, Minneapolis, MN, USA), PE-복합화 CD73(R&D systems, Minneapolis, MN, USA), PE-복합화 CD34(R&D systems, Minneapolis, MN, USA), PE-복합화 CD45(R&D systems, Minneapolis, MN, USA), PE-복합화 CD133(Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany), PE-복합화 CD31(R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 상온에서 20분간 반응시킨 후 유세포 분석기를 통해 분석하였다. 측정은 FACS (Caliber Flow Cytometer, BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 사용하였으며, CELL Quest software (BD Bioscience, San Jose, CA, USA)로 분석하였다.

Table 1. Sequences of RT-PCR primers

hOct4 ₋	Sence	AAC TCG AGC AAT TTG CCA AGC TCC	328 bp
	Antisense	TTC GGG CAC TGC AGG AAC AAA TTC	
hNanog	Sence	CAA AGG CAA ACA ACC CAC TT	158 bp
	Antisense	TCT GCT GGA GGC TGA GGT AT	
hSOX2	Sence	ATG CAC CGC TAC GAC GIG A	437 bp
	Antisense	CTT TTG CAC CCC TCC CAT TT	
hβ-actin	Sence	GTGGGGCGCCCCAGGCACCAGGGC	450 bp
	Antisense	CTCCTTAATGTACGCACGATTTTC	

RT-PCR

역전사 중합효소 연쇄반응을 위해, Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 RNA를 추출하였으며, 추출된 RNA는 Maxime RT PreMixKit (iNtRON BIOTECHNOLOGY, Sungnam, Kyungki-Do, Korea)와 Mastercycler gradient (eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 합성된 cDNA를 미분화 마커인 Oct-4, Nanog, Sox2의 프라이머를 이용하여 증폭시켰으며, 증폭된 RT-PCR 산물은 1% 아가로스겔(agarose gel)을 사용하여 전기영동으로 확인하였다(Table 1).

결 과

Feeder-free 배양법을 이용하여 배양된 인간배아줄기세포의 특성분석

Feeder-free 배양법으로 인간배아줄기세포를 배양하기 위해서 인간배아줄기세포(H9 hESCs)를 CELLstrat™가 코팅된 배양접시에 부착한 후 StemPro® hESC SFM 배지를 넣고 유지 배양하였다. 인간배아줄기세포는 feeder-free 상태에서 10회 계대 배양 후 콜로니 형태의 모양과 정상적인 핵형을 유지하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1 A, B). 그리고 미분화 마커를 유세포 분석과 형광 면역 염색을 통하여 확인하였다. 그 결과 형광 면역 염색을 통해 미분화 마커인 Oct-4, SSEA-4, E-cad, TRA-1-60, TRA-1-81 발현함을 확인할 수 있었으며(Fig. 1A), 유세포 분석을 통해서 미분화 마커인 SSEA-4(98.31%)와 AP(93.3%) 발현함을 확인할 수 있었다(Fig. 1C). 따라서 feeder-free 이용한 배양법으로 인간배아줄기세포가 미분화 상태를 유지하고 있음을 확인할 수 있었다.

Feeder-free 배양법으로 배양한 인간배아줄기세포를 직접적인 유도 방법(Direct Induction)을 이용하여 간엽줄기세포로의 분화

첫 번째 단계로 인간배아줄기세포를 feeder-free 배양법을 이용하여 5일 동안 미분화 상태로 유지배양 후 간엽줄기세포로 분화를 유도하기 위해 EGM-2 배지를 넣어 모든 미분화 세포 표면에 EGM-2 배양액에 혼합되어 있는 성장인자와 사이토카인이 직접적으로 흡수될 수 있도록

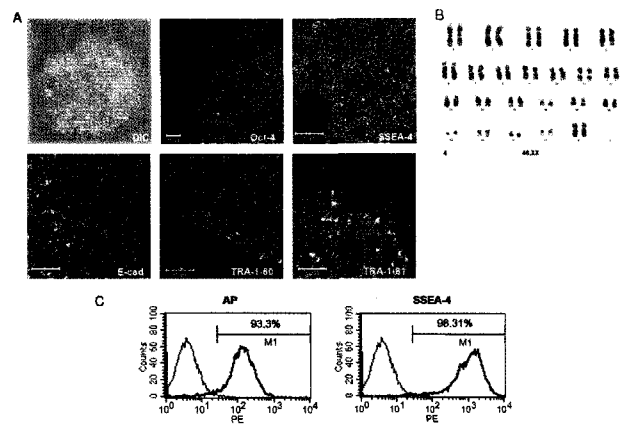


Fig. 1. Characterization of feeder-free cultured undifferentiating hESCs. (A) FACS analysis of undifferentiated cell surface makers, AP and SSEA-4, in feeder free cultured hESCs. (B) Karyotype analysis of feeder-free cultured undifferentiating hESCs. (C) Immunostaining of feeder-free cultured undifferentiating hESCs for Oct-4 (upper, middle, red), SSEA-4 (upper, right, red), E-cadherin (lower, left, red), TRA-1-60 (lower, middle, green) and TRA-1-81 (lower, right, green). DAPI were stained with blue fluorescence.

분화를 유도하여 10일 동안 배양하였다. 이때 이틀마다 새로운 EGM-2 배지로 교환하여 분화를 유도하였다 (Fig. 2A). 두 번째 단계는 형태학적으로 두 단계로 나타나는 세포군들 중, 중앙의 세포군집 형태로 존재하는 부분만을 유리 파이펫을 이용하여 분리한 후, 콜라겐이 코팅된 배양접시에 부착하였다(Fig. 2B). 마지막 세 번째 단계에서 간엽줄기세포와 유사한 형태의 세포를 확인하였다(Fig. 2A).

직접적인 유도 방법(Direct Induction)을 이용하여 분화한 인간배아줄기세포 유래 간엽줄기세포의 특성 분석

직접적인 유도 방법을 이용하여 분화한 인간배아줄기세포 유래 간엽줄기세포는 VEGF, bFGF, EGF 등의 성장 인자가 첨가된 EGM-2 배양액을 이용하여 콜라겐이 코팅된 배양접시에 부착하여 2~3일에 한 번씩 계대 배양하였으며, 양성 대조군인 골수 유래 간엽줄기세포와 형태학상 분석 및 특정 마커 발현 여부를 분석하였다. 그 결과, 양성대조군인 인간 골수 유래 간엽줄기세포와 형태학상

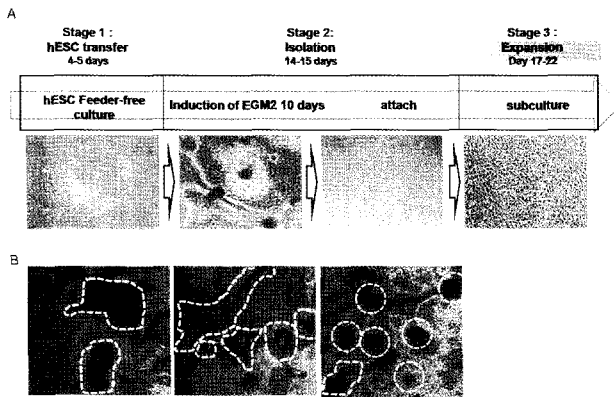


Fig. 2. Isolation of clustered cell population distinctly distinguished from feeder free cultured hESCs in EGM-2. (A) Experimental scheme of a direct induction system. (B) Morphological difference between clustered and monolayered cell population from feeder free cultured hESCs after differentiation induction in EGM-2.

으로 유사한 길쭉하고 편평한 외형의 세포를 확인할 수 있었으며, 분화 유도된 세포는 균일한 형태의 세포군 형성과 이러한 세포군이 계대 배양 후에도 세포군의 형태학적 변화 없이 일정하게 유지됨을 확인하였다(Fig. 3A). 또한 세포의 특성을 정확히 규명하기 위해 유세포 분석기를 통해 간엽줄기세포의 양성 마커인 CD44, CD90, CD105, CD73와 음성마커인 CD45, CD34, CD133, CD31을 각각 확인하였다. 그 결과 인간배아줄기세포 유래 간엽줄기세포에서 양성 마커인 CD44(99.36%), CD90(84.35%), CD105(99.53%), CD73(99.69%)가 높게 발현되는 것을 확인하였고, 대조적으로 음성 마커인 CD45(0.90%), CD34(0.75%), CD133(0.71%), CD31(2.21%)가 현저하게 낮게 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 따라서 유세포 분석

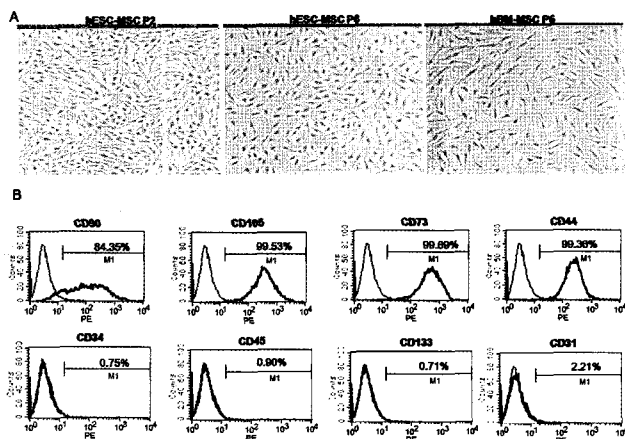


Fig. 3. Verification of mesenchymal stem cells like cell population from feeder free cultured hESCs(hESC-MSCs). (A) The morphologies of hESCs-MSCs(left and middle panel) and human bone marrow derived-MSCs(right panel). p means cell passage number. They retain similar morphology as round-spindle shape of mesenchymal stem cells (×40). (B) FACS analysis of hESC-MSCs with positive makers including CD90, CD105, CD73 and CD44, and negative makers including CD 34, CD45, CD133 and CD31 of MSCs.

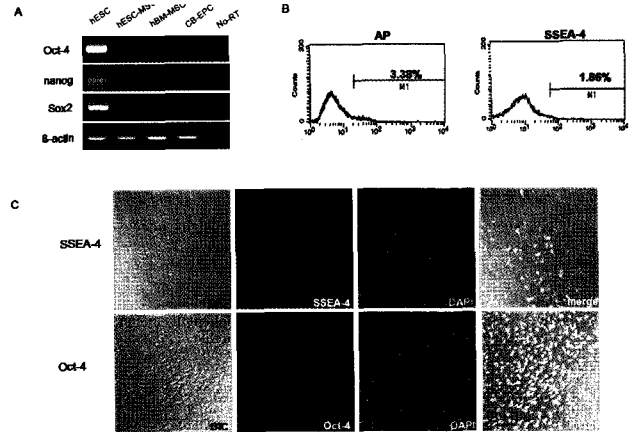


Fig. 4. The potential of hESC-MSCs as a transplantable cell source. (A) RT-PCR analysis for undifferentiating makers in hESC and hESC-MSCs. lane 1: feeder-free cultured undifferentiating hESCs (H9, control), lane 2: MSCs like cells derived from hESCs(hESC-MSCs), lane 3: MSCs derived from human bone marrow (positive control), lane 4 : EPCs derived from human cord blood (negative control), lane 5 : no RT-PCR (B) FACS analysis for undifferentiating makers in hESC-MSCs. (C) Immunohistochemistry analysis for undifferentiating makers in hESC-MSCs, SSEA-4(upper) and Oct-4 (lower).

결과, 직접적인 유도 방법으로 분화한 인간배아줄기세포 유래의 세포가 간엽줄기세포로서의 특징을 가지고 있음을 확인하였다.

직접적인 유도 방법(Direct Induction)을 이용하여 분화한 인간배아줄기세포 유래 간엽줄기세포의 이식 가능성 확인

In vivo 실험을 위한 인간배아줄기세포 유래 간엽줄기세포의 안전성을 확인하기 위해 인간배아줄기세포의 미분화 마커 발현 여부를 RT-PCR, 유세포 분석, 형광 면역염색을 통해 확인하였다. RT-PCR 수행 결과, 미분화 인간배아줄기세포에서 Oct-4, nanog, Sox2가 높게 발현되는 반면 직접 유도 방법으로 분화한 간엽줄기세포에서는 이 같은 미분화 마커의 발현이 모두 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 또한, 유세포 분석 결과에서도 AP (3.38%)와 SSEA4(1.86%)의 발현이 미분화 상태의 인간배아줄기세포보다 확실히 감소하는 것을 확인하였으며(Fig. 4B), 형광염색 결과도 미분화 마커인 SSEA-4와 Oct-4가 분석을 실시한 인간배아줄기세포 유래 간엽줄기세포 내에서는 전혀 발현되지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 4C).

고 찰

인간배아줄기세포는 인체를 구성하는 삼배엽성으로 분화할 수 있는 전분화능을 가장 큰 특징으로 가지는 세포로, 현재에는 난치병이나 유전병 또는 후천적인 질병치료에 중요한 세포치료제의 공급원으로 인식되어 그 무한한 가능성이 제시되고 있다(Horwitz, 2003).

이러한 미분화 상태의 인간배아줄기세포는 미분화 상

태에서의 기형종 형성 가능성으로 인해 세포 치료제로서의 이용을 위해 대상 질환에 적합한 세포로의 분화 연구가 주를 이루고 있다. 현재, 난치병 치료를 위한 세포치료제의 개발에는 접근이 용이한 성체줄기세포가 널리 이용되어지고 있다(Lange 등, 2005; Phinney와 Prockop, 2007).

성체 줄기세포의 가장 대표적인 세포인 간엽줄기세포는, 삼배엽성 중 중배엽에 속하는 세포로서 재대혈과 골수에서 분리가 용이하지만, 그 양이 한정적이고 계대 배양의 한계점을 지니고 있다. 성체 유래 간엽줄기세포가 가지는 많은 가능성을 극대화 시키고 그 한계점 극복을 위해 인간배아줄기세포 유래 간엽줄기세포의 분화 연구에 국내외에서 많은 연구가 진행되어지고 있다. 인간배아줄기세포의 간엽줄기세포의 분화는 세포치료제로서의 충분한 세포수를 확보할 수 있으며, 또한 미분화 인간배아줄기세포와 비교하여 배양 방법이 용이하며 안정적인 핵형 유지와 종양 형성이 억제되는 장점을 가지고 있어 그 이용가치가 무한하다(Kim 등, 2004; Gotherstrom 등, 2005; Beyer 등, 2006; Hayashi 등, 2009).

인간배아줄기세포로부터 특정세포로의 분화연구는 다양한 분화 조건 중 삼배엽성으로 모두 분화할 수 있는 배상체를 형성하여 분화하는 방법이 보편적으로 이루어지고 있다(Lee 등, 2009). 하지만 배상체 형성을 통한 분화 유도 방법은 삼배엽성의 세포가 모두 증식하게 되므로, 목적으로 하는 세포군의 분화률이 적고 또한 배상체 내부에 성장인자들이 골고루 분포하지 못해 분화효율이 낮다. 보고된 연구 중 이런 단점을 보완하기 위해 단층 배양법을 이용하여 특정세포로의 분화를 유도하고, EGM-2 배지를 이용하여 30일 배양하여 상피세포로 분화 후 epithelial-mesenchymal transition(EMT) 과정을 거쳐 간엽줄기세포로 분화를 유도하였다(Boyd 등, 2009). 분화 유도 시 사용한 EGM-2 배지는 FBS와 bFGF, VEGF, EGF 등 다양한 성장인자를 포함하고 있는 혈관 증식 배지로서 중배엽 발달과 혈관 분화, epithelial-mesenchymal transition(EMT) 영향을 미친다고 보고되었다(Kimelman 등, 1987). 그러나 기존의 배양법에 단층 배양법을 그대로 적용한다면 지지세포의 의한 이중간의 오염 발생할 수 있으며, 장기간 동일한 배양접시에서 분화 유도 방법은 미생물의 오염과 변형을 초래할 수 있다. 따라서, 본 연구는 인간배아줄기세포로부터 세포치료제의 공급원으로 사용할 수 있는 대량의 간엽줄기세포를 확보하기 위해 기본 배양 조건 시부터 이중간의 오염이 없는 feeder-free 배양법을 이용하여 10회 이상의 계대 배양을 거쳐 미분화 세포를 획득하였으며, 정상적인 핵형을 이루고 있음을 확인하였고, 또한 일반적으로 미분화 세포를 확인할 때 실시하는 형광 면역 염색법과 유세포 분석을 통해 각 Oct-4, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, E-cadherin의 염색 결과와 AP와 SSEA-4의 마커를 확인함으로써 미분화 상태를 유지하고 있음을 확인하였다. 그리고 이렇게 획득된 세포에 배상체를 형성하지 않고, 미분화 상태에서 바로 EGM-2 배지를 이용하여 직접적인 유도 방법(direct induction)으로 10일간 배양하여 빠르게 분화 유도를 하였으며, 형태학적으로 분리되는 특정 부위를 분리하여 세포의 순도를 높이며, 간엽줄기세포군의 분화 및 대량 분리에 성공하였다. 이렇게 확보된 세포를 간엽줄기세포의 대표적인 마커인 CD44, CD90, CD105, CD73으로 확인한 결과, 인간 골수 유래 간엽줄기세포와 유사한 특징을 확

인할 수 있었고, 반면에 미분화 마커인 Oct-4, AP, SSEA-4, Sox2, Nanog가 현저하게 감소함을 확인하여 전임상 실험에 적합한 세포임을 확인하였다.

인간배아줄기세포를 이용한 세포치료제로서의 난치병 치료의 성공적인 목적 달성을 위해서는 기본적인 배양 조건과 특정세포로의 효율 적인 분화유도 방법, 분리 및 정제 기술, 분화된 세포의 대량 생산에 대한 개발이 이루어져야 할 것이다. 이에 본 연구에서 수행된 결과는 기본적인 배양 조건의 변화와 효율적인 특정세포로의 분화 유도 방법으로 사용될 수 있으며, 세포치료제 개발의 대량 생산법으로의 응용이 기대될 수 있다.

인용문헌

1. Amit M, Itskovitz-Eldor J (2006): Sources, derivation, and culture of human embryonic stem cells. *Seminars in Reproductive Medicine* 24:298-303.
2. Beyer Nardi N, da Silva Meirelles L (2006): Mesenchymal stem cells: isolation, *in vitro* expansion and characterization. *Handbook of Experimental Pharmacology* 249-282.
3. Boyd NL, Dhara SK, Rekaya R (2007): BMP4 promotes formation of primitive vascular networks in human embryonic stem cell-derived embryoid bodies. *Experimental Biology and Medicine* 232:833-843.
4. Boyd NL, Robbins KR, Dhara SK (2009): Human embryonic stem cell-derived mesoderm-like epithelium transitions to mesenchymal progenitor cells. *Tissue Engineering* 15:1897-1907.
5. Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J (2004): Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *The New England Journal of Medicine* 350:1353-1356.
6. Gotherstrom C, West A, Liden J (2005): Difference in gene expression between human fetal liver and adult bone marrow mesenchymal stem cells. *Haematologica* 90:1017-1026.
7. Horwitz EM (2003): Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy. *Archives of Medical Research* 34:600-606.
8. Hayashi N, Takahashi K, Abe Y (2009): Placental/umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell-like stromal cells support hematopoietic recovery of X-irradiated human CD34+ cells. *Life Sciences* 84: 598-605.
9. Ji J, Vijayaragavan K, Bosse M (2008): OP9 stroma augments survival of hematopoietic precursors and progenitors during hematopoietic differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26: 2485-2495.
10. Kimelman D, Kirschner M (1987): Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF-beta and the identification of an mRNA coding for FGF in the early xenopus embryo. *Cell* 51:869.

11. Kim JW, Kim SY, Park SY (2004): Mesenchymal progenitor cells in the human umbilical cord. *Annals of Hematology* 83:733-738.
12. 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* Apr 16(2):269-8012.
13. Kim J, Moon SH, Lee MJ, Oh IR, Shin JM, Chung HM (2008): Optimized condition to culture of endothelial precursor cells derived from human embryonic stem cells. *Tissue Eng Regen Med* 3:467-473.
14. Lange C, Schroeder J, Stute N (2005): High-potential human mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development* 14:70-80.
15. Lian Q, Lye E, Suan Yeo K (2007): Derivation of clinically compliant MSCs from CD105+, CD24- differentiated human ESCs. *Stem Cells* 25:425-436.
16. Lee EJ, Lee HN, Kang HJ, Kim KH, Hur J, Cho HJ, Lee J, Chung HM, Cho J, Cho MY, Oh SK, Moon SY, Park YB, Kim HS (2009): Novel embryoid body-based method to derive mesenchymal stem cells from human embryonic stem cells. *Tissue Eng Part A*. Nov 7.
17. Montes R, Ligeró G, Sanchez L (2009): Feeder-free maintenance of hESCs in mesenchymal stem cell-conditioned media: distinct requirements for TGF-beta and IGF-II. *Cell Research* 19:698-709.
18. Oh SK, Choo AB (2006): Human embryonic stem cell technology: large scale cell amplification and differentiation. *Cytotechnology* 50:181-190.
19. Phinney DG, Prockop DJ (2007): Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair-current views. *Stem Cells* 25:2896-2902.
20. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
21. Trounson A (2005): Human embryonic stem cell derivation and directed differentiation. *Ernst Schering Research Foundation workshop* 27-44.
22. Wagner KE, Vemuri MC (2010): Serum-free and feeder-free culture expansion of human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 584:109-19.
(접수일자: 2009. 12. 4 / 채택일자: 2010. 3. 25)