

: 배아 줄기세포의 전능성 및 기능 조절 (I)

I. 서론

배아줄기세포(Embryonic stem cells)는 배아가 자궁에 착상되기 전의 발달 단계인 배반포의 내세포덩어리(inner cell mass)에서 유래되는 세포로, 끊임없이 자가 재생(self-renewal)이 가능하며 특정 세포로 분화할 수 있는 전능성(pluripotency)의 특징이 있다. 배아줄기세포는 특정 배양 조건에서 오랜 기간 동안 미분화 상태를 유지할 수 있으며, 적절한 외부환경의 조절에 의해 특정 세포, 즉 심장세포, 근육세포, 신경세포, 혈구세포, 상피세포, 혈관평활근세포, 내배엽, 지방세포 등 생체를 구성하는 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있는 전능성을 가진 세포로 간주되고 있다(1-8). 1981년 최초로 마우스 배아줄기세포가 소개된 이후(9), 1998년에는 인간 배아줄기세포가 확립되고(10), 최근에는 체세포에 특정 전사인자를 과발현 시켜 전능성을 가지는 역분화 줄기세포(reprogrammed pluripotent stem cell, iPS: induced pluripotent stem cell)가 각광을 받으며(11) 유전공학, 발생학, 그리고 재생의학의 다양한 연구 분야에 막대한 영향을 주고 있다. 마우스와 인간 배아줄기세포는 형태나 세포 배양 및 증식에 있어서 상당한 차이점을 보이고 있다. 먼저 마우스 배아줄기세포는 원형의 덩어리형태로 증식하여 하나의 세포를 관찰하기 어렵지만, 인간 배아줄기세포는 뚜렷한 세포 경계선을 보이며 편평한 균체를 형성한다. 또 다른 차이점으로는 발현하는 특유의 표지자이다. 예를 들어, POU homeodomain containing protein Oct4, forkhead box family member FoxD3, Nanog 그리고 알칼라인 포스파 테이즈는 마우스와 인간 배아줄기세포가 미분화 상태일 때 모두 발현 되지만, stage-specific embryonic antigens (SSEA)과 같은 표지 항체는 마우스 배아줄기세포에서는 SSEA-1이 인간 배아줄기세포에서는 SSEA-3과 SSEA-4가 발현된다(12). 최근까지 배아줄기세포들은 마우스 배아 섬유아세포(mouse embryonic fibroblast, MEF)와 같은 지지세포와 함께 배양을 하여 미분화 상태를 유지하였다. 그러나 인간 세포가 동물 유래 병원체에 노출될 위험의 문제로 인하여, 최근에는 지지세포와 동물혈청 없이 혈청대체물질, 염기성 섬유아세포 성장인자 (basophilic fibroblast growth factor, bFGF) 또는 전환성장인자- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$), 뼈형성단백질 (bone morphogenetic protein, BMP) 등의 성장인자를 배양 시에 첨가함으로써 세포의 미분화 상태를 유지시키는 연구가 다양하게 진행되고 있다(13, 14). 마우스 배아줄기세포의 경우에는 지지세포 대신 백혈병 억제인자 (leukemia inhibitory factor, LIF)와 같은 분화억제 사이토카인을 첨가하여 미분화 상태로 장기간 배양이 가능하다. 반면, 인간 배아줄기세포는 LIF에 의해 세포 특성이 조절되지 않는다(15). 이러한 배아줄기세포를 이용한 연구는 초기 배아 발달, 분화 및 자가 재생 기전,



이 유 진
 전남대학교
 BK21 바이오치료 산업 인력양성 사업팀
 crony0213@hanmail.net



한 호 재
 수의생리학 박사
 전남대학교 교수
 hjhan@chonnam.ac.kr

유전자 및 단백질의 기능 그리고 신약 스크리닝 및 약물 독성 실험 등 그 범위가 매우 넓다. 위와 같은 연구를 진행하기 위해서는 먼저 전능성을 유지하면서 오랜 기간 증식을 가능하게 하는 배아줄기세포 고유한 특성이 어떠한 기전을 통해 조절이 되는지를 이해하는 것이 필수 요건이다. 특히 최근 *in vitro* 및 *in vivo* 연구를 통해, 배아줄기세포의 자가 재생과 전능성 조절에 신호전달인자, 전사조절인자, 후생학적 인자, microRNA 등에 의한 유전자 조절이 중요한 역할을 하고 있음이 강조되었다(16). 줄기세포의 성장 및 분화 등을 포함한 생리 현상들은 세포간의 유기적인 정보교환에 의하여 조절되고 유지된다. 세포들 간의 정보교환은 외부인자(신경전달물질, 호르몬, 성장인자 등)에 의한 신호가 세포 내 특이적인 수용체에 의하여 인식되어 일어나는 신호전달 과정을 통하여 전달되고 증폭됨으로써 이루어진다. 다시 말해서 줄기세포 외부 환경으로서 수용성 인자(soluble factors), 미세환경 조절 인자, 세포-세포 및 세포-세포외기질 상호작용 (cell-cell and cell-matrix interaction)이 줄기세포 자가 재생을 결정한다(17). 그러므로 새로운 배아줄기세포 활성 리간드를 탐색하고 세포수준에서의 신호전달 및 작용기전을 규명하는 것은 최적화된 줄기세포를 배양을 위한 배지 (serum free chemically defined medium) 개발은 물론이고 활용 목적에 맞는 줄기세포를 만드는데 매우 중요하다. 따라서 본 총설에서는 배아줄기세포의 기능을 조절하는 다양한 분자세포생물학적 조절 인자들과 이들의 신호전달 기전에 대해 알아보려고 한다.

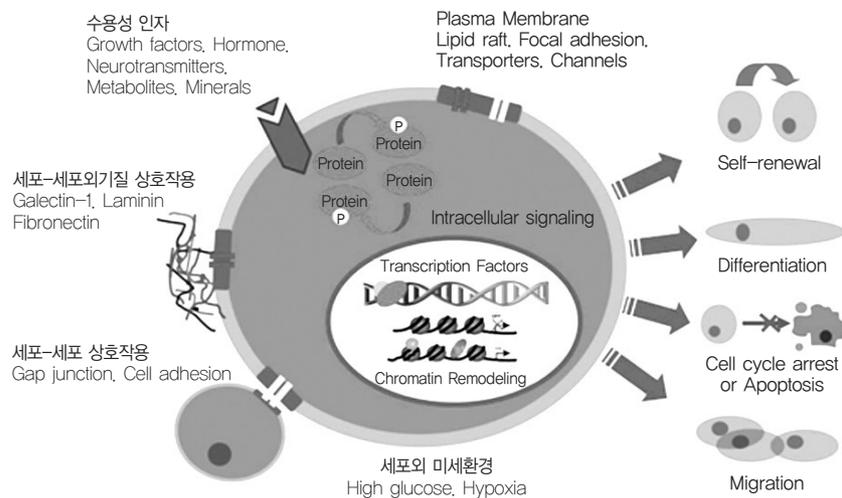


그림 1. 다양한 줄기세포 기능 조절 인자

II. 전능성 유지

1. 전사조절인자

배아 줄기세포의 자가 재생과 분화를 조절하는 전사인자는 Oct4, Sox2, Nanog 등이 있다. 외부의 자극이 있는 경우 이들 전사 인자는 유전자 발현을 On/Off 할 수 있는 ‘스위치’ 역할, 즉 자가 재생에 관련된 유전자를 활성화 시키고 분화 유전자는 억제 시킴으로써 배아줄기세포가 전능성을 유지하도록 한다. Oct4는 가장 전형적인 배아줄기세포 미분화 표지로서 이 유전자의 발현 감소는 배아줄기세포가 전능성을 잃고 분화된다는 의미이다. Oct4의 발현을 감소시키면 배아줄기세포가 영양막세포로 분화되거나 Oct4를 과발현 시키면 배아줄기세포가 원시 내배엽과 중배엽으로 분화되었다(18, 19). 한편, Oct4는 LIF에 의해 활성화되는 전사인자인 STAT3에 의해 직접적으로 조절되지 않는데(20), 이는 Oct4와 LIF가 서로 독립적으로 배아줄기세포의 기능을 조절하는 것을 의미한다. Oct4는 다른 종류의 전사인자들과 상호연관성을 가지며 배아줄기세포에서 발현되는 다양한 유전자를 조절하게 된다. 배아줄기세포에서 Oct4가 조절하는 유전자로는 Fgf4, Utf1, Opn, Rex1/Zfp42, Fbx15, Sox2 등이 있다(21). 그 중에 HMG(high mobility group) box protein Sox2와 forkhead box family member FoxD3가 대표적으로 Oct4와 기능적으로 연결되어 줄기세포의 전능성을 유지하는 중요한 역할을 한다(22). Nanog 또한 배아줄기세포의 전능성을 유지하는데 필요한 또 다른 전사인자로 알려져 있다(23). 이 단백질 또한 Oct4와 마찬가지로 LIF/STAT3 신호전달 체계와는 독립적으로 배아줄기세포의 분화 억제를 조절한다. Nanog는 배아발달에 있어서 Oct4보다 다소 늦게 발현되는 것으로 알려져 있다(24). Oct4는 내세포덩어리나 줄기세포가 영양막 세포로 분화되는 것을 억제하는 반면, Nanog는 내배엽으로의 분화를 억제한다(25). 주요 전사 인자로서 Oct4, Sox2, Nanog는 독립적으로 작용하기 보다는 세포 내 조절 중심 회로를 이루어 물리적인 상호작용을 통해 서로의 발현을 조절하며 배아 줄기세포의 미분화 유지한다고 볼 수 있다(26, 27). 최근 들어 Nanog의 전사는 Oct4와 Sox2가 Nanog의 프로모터에 결합함으로써 조절된다고 보고되었다(28). 또한 Oct4, Sox2 그리고 Nanog가 배아발달에 중요한 여러 가지 중요한 유전자의 프로모터와 결합하여 이들을 조절하는 것으로 보고되었다(29). 또한, 최근 각광을 받고 있는 역분화 줄기세포(iPS cells)는 특정 전사 인자 (Oct4, Sox2, c-Myc, Klf4)를 체세포에 주입하여 배아줄기세포의 전능성을 가진 세포로 역분화 시킨 것이다(30). 이와 같이 이들 전사 인자는 자신들의 유전자를 활성화시키는 물론 신호전달에 관여하는 다양한 유전자들을 인코딩 함으로써 줄기세포의 기능을 조절하게 된다(31). 그러나 이러한 인자들의 배아줄기세포에서의 정확한 역할에 대해서는 여전히 논쟁의 여지를 남기고 있다.

2. 후생학적 조절인자

전능성을 가진 배아줄기세포가 특정 기능을 가진 상태로 분화되는 과정은 전체적인 유전자 발현 패턴의 변화가 수반된다. 초기 줄기세포 상태에서는 활성화된 유전자가 점점 배아로 발달됨에 따라 활성이 감소되는데 이는 염색질(chromatin) 조절과 관련된 전사인자의 선택적 발현에 의한 결과이다. 즉, 유전자 전사 후 조절 단계로 유전자를 둘러싼 히스톤 단백질의 조절, DNA 메틸화 등의 후생학적 조절에 의해 배아줄기세포의 유전자 발현을 조절 할 수 있다.

특히, histone deacetylase (HDAC)과 methyl-CpG-binding protein (MECPs)는 배아줄기세포에서 발현되어 세포의 분화를 조절한다. 또한, polycomb group protein (PcG)은 배아 줄기세포의 분화 유전자를 억제하여 자가 재생과 전능성에 중요한 역할을 한다고 밝혀졌다(32). 또한 DNA methyltransferase (DNMT)에 의한 DNA 메틸화는 특정 유전자를 억제시켜 배아줄기세포의 분화를 유도하게 되는데, 분화된 배아줄기세포에서는 Oct4를 과메틸화시켜 Oct4 유전자 발현 억제시키고, 미분화 줄기세포에서는 Oct4의 메틸화가 적게 일어나 Oct4의 발현이 증가되어 배아줄기세포가 전능성을 갖도록 해준다(16).

3. microRNA(miRNA)

miRNA는 포유류에서 200여 종류가 알려져 있는 20-25 nucleotide non-coding RNA로 세포 주기조절, 세포사, 세포 분화, 줄기세포 전능성 유지를 포함한 다양한 생리학적 기능을 가지고 있다(33). 분화된 배상체(embryonic body)와 성체 조직뿐 아니라 전능성을 가진 배아줄기세포에서도 특정 miRNA가 발현되는 것으로 보아 배아줄기세포의 자가 재생에 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다(34, 35). 특히, Nanog, Oct4, Sox2의 줄기세포 전사 인자뿐 아니라 PcG와 상호작용 하며 분화와 자가 재생이 조절된다는 보고가 있다(36, 37). 배아 줄기세포에 특이적 miRNA로서 miR-290 cluster는 Oct4-메틸화를 조절하여 배아줄기세포의 분화를 유도하는데, 이로서 polycomb complex, DNA 메틸화, 그리고 miRNA가 서로 협동하며 배아줄기세포의 자가재생과 분화를 조절 하고 있다(38).

이와 같이 배아줄기세포의 기능을 조절하는데 있어서 다양한 신호전달인자와 전사조절인자들의 중요성이 강조되고 있다. 그러나 이들 인자들과 신호 전달 경로가 배아줄기세포의 상태에 따라 어떻게 발현의 양상이 달라지며, 또한 이들을 조절할 수 있는 인자를 밝혀낸다면 배아줄기세포 연구의 또 다른 장을 열 수 있을 것으로 생각된다. 그래서 배아줄기세포의 기능을 조절할 수 있는 성장 인자, 호르몬 및 신경전달물질, 세포외기질 및 간극연접, 세포외 미세환경과 이와 연관되는 신호 전달 체계에 대해 간략히 기술하고자 한다.

III. 줄기세포 기능 조절 인자

1. 성장인자

A. LIF

LIF는 배아줄기세포의 전능성을 유지하는데 가장 중요한 인자이다. LIF는 인터루킨-6(IL-6) 군으로 세포막에 위치한 두 종류의 수용체, LIF 수용체와 gp130에 삼량체로 결합하여 하위 신호전달인 janus-associated tyrosine kinases (JAK)-signal transducer and activator of transcription (STAT)과 mitogen-activated protein kinase(MAPK)의 활성을 조절함으로써 배아줄기세포의 기능을 조절한다. 이 두 신호전달계는 각각 상반된 양상을 보인다. 즉 MAPK가 배아줄기세포의 분화를 촉진하는 반면에, STAT3는 LIF가 미분화 상태를 유지하는데 있어서 중요한 신호전달물질로 간주된다(39). LIF는 또한 gp130을 통해 phosphatidylinositol-3 phosphate kinase(PI3K)를 활성화 시키는 것으로 알려져 있다.

마우스 배아줄기세포에서 LIF는 PI3K에 의존적인 Akt, GSK-3 α/β , ribosomal S6 단백질의 인산화를 유도하였고, dominantnegative p85(PI3K의 subunit)는 마우스 배아줄기세포의 자가 재생을 억제하는 것으로 나타났다(40).

또한 PI3K의 억제는 LIF에 의해 활성화 되며, 분화에 관여하는 ERK의 활성을 증가시키는 것으로 보고되었다(41). 인간 배아줄기세포 배양 시 미분화를 유지시키기 위해 첨가하는 bFGF의 작용은 PI3K/Akt 활성을 통해 줄기세포의 자가 재생을 유지시킨다는 연구 결과 역시 PI3K가 마우스와 인간 배아줄기세포의 자가 재생에 중요한 역할을 담당하고 있음을 보여주고 있다(42). gp130에 의해 활성화 되는 Src 군(Hck, cYes 등)은 non-receptor tyrosine kinase로 분화가 진행되면서 그 발현이 감소되고, Yes를 억제 시켰을 경우 Oct4, Nanog 및 alkaline phosphatase의 발현을 감소시키는 등 배아줄기세포의 미분화를 유지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(43). 이처럼 LIF에 의해 그 활성이 유도되는 다양한 신호전달계가 서로 균형을 이루면서 배아줄기세포의 고유 특성을 유지하게 된다.

Lipid rafts는 세포막에서 cholesterol이 많이 존재하는 미세부위로 수용체 매개성 신호전달을 포함한 다양한 세포 기능을 조절하고 있다. 저자들은 LIF에 의한 배아줄기세포의 self-renewal유지와 lipid rafts의 연관성에 대한 연구를 실시하였다. 배아줄기세포에 lipid rafts와 caveolae가 존재함을 면역형광염색법과 western analysis를 통해 확인하였고, sucrose gradient 분획화를 통해 gp130과 leukemia inhibitory factor receptor β (LIFR β)가 lipid rafts에 존재함을 확인할 수 있었다. 또

한 gp130과 LIFR β 의 발현이 lipid rafts를 와해시키는 methyl- β -cyclodextrin (M β CD)의 처리에 의해 억제되지만, caveolin-1 small interfering RNA (siRNA)에 의해서는 억제 되지 않았다. 게다가 LIF에 의한 STAT3와 Akt의 인산화와 c-Myc의 발현 증가가 M β CD에 의해 억제되었다. 하지만 caveolin-1 siRNA는 LIF에 의한 STAT3와 Akt의 인산화와 c-Myc의 발현에 영향을 미치지 않았고, M β CD와 caveolin-1 siRNA의 전처리로 Oct4 단백질의 발현, Oct4, Sox2, FoxD3, Rex1유전자의 전사가 감소되었다. 또한 M β CD와 caveolin-1 siRNA의 전처리는 세포주기조절단백질인 cyclinD1과 cyclin E의 발현을 감소시켰으며, proliferation index [(S + G2/M)/(G0/G1 + S + G2/M)]를 감소시켰다. 결론적으로 이 연구에서는 배아줄기세포의 자가증식능의 조절에 있어서 lipid raft/caveolae가 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다(44).

B. EGF

가. 포도당 운반체 (GLUT) 조절

상피세포성장인자(EGF)는 상피세포의 성장을 촉진하는 인자로서 세포막에 있는 EGF 수용체를 통하여 신호를 전달함으로써 세포의 분열을 유도하여 상피세포의 성장을 촉진하는 것으로 밝혀져 있다(45). 또한 내피세포의 세포증식 촉진 및 진피 구성 성분인 콜라겐을 합성하는 섬유아세포의 증식 등을 촉진 시킨다(46). 이전 연구에 의해 배아에서 EGF와 EGF 수용체가 발현되는 것이 밝혀졌으며(47), 이는 EGF 계가 자가 분비 및 주위 분비 방식으로 초기 배아 발달에 관여함을 의미한다. 또한 포도당은 착상 전 외인성 에너지 기질로서 포도당 운반체(GLUT)를 통해 배반포 안으로 들어간다(48).

저자들 실험에서 EGF는 시간 및 농도 의존적으로 2-DG 흡수를 유의성 있게 증가 시켰으며 포도당 운반체(GLUT1)의 mRNA와 단백질 양을 증가시켰다. EGF에 의해 증가된 2-DG uptake는 EGF 수용체 kinase나 tyrosine kinase의 억제제 의해 억제되었다. 이러한 결과로 보아 EGF 작용은 EGF 특이적 수용체에 결합하여 개시됨을 알았다. 또한 PLC 또는 PKC 억제제에 의해서 EGF 효과는 각각 억제되었다. EGF는 또한 IPs 형성을 증가시켰으며 PKC의 세포질에서 세포막으로의 이동을 촉진시켰는데, 이는 EGF 작용에 있어서 PLC와 PKC의 관련성을 시사한다. p38과 p44/42 MAPKs 억제제는 EGF에 의해 증가된 2-DG uptake를 억제하였으며, 실제로 EGF는 p38 MAPK와 p44/42 MAPKs의 인산화를 증가시켰다. 이들 결과들을 요약하여 EGF는 마우스 배아줄기세포에서 PKC, p38 MAPK와 p44/42 MAPKs 경로를 통해 2-DG uptake를 증가시킴을 보고하였다(49).

나. 세포증식 조절

EGF에 의한 세포의 증식에 다양한 신호전달계와 조절 기전이 관여되어 있는 것으로 알려져 있다. 이들 중 PKC는 PLC의 PIP_2 분해에 의한 DAG에 의해 활성화되어 세포증식을 포함한 여러 반응에 관여하는 것으로 보고되어 있다(50). MAPKs [p44/42 MAPKs, p38 MAPK 및 JNK(c-jun activated NH₂ terminal kinase)] 또한 PKC와 더불어 세포증식과 더불어 다양한 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다(51). 칼슘 역시 DNA 합성과 세포증식에 필수적인 조절인자 중 하나로, 핵과 세포질에 있는 칼모듈린에 의한 전사 인자를 활성화 시킨다(52).

저자들 실험에서 EGF는 시간과 농도 의존적으로 [³H]thymidine과 BrdU의 결합을 증가시켰다. AG-1478 또는 Herbimycin A로 EGF 수용체의 타이로신 카이네이즈를, 네오마이신 또는 U-73122로 PLC를, 비스인돌릴말레이미드 I 또는 스타우로스포린으로 PKC를, 니페디핀 또는 메톡시베라파밀을 이용하여 L형 Ca²⁺ 통로를 차단한 결과, EGF에 의해 유도된 [³H]thymidine 결합이 억제됨을 알 수 있었다. EGF에 의하여 PKC α , β 1, γ , δ , 그리고 ζ 는 세포막으로 이동되었고 세포 내 칼슘 농도는 증가되었다. 또한 EGF 수용체의 타이로신 카이네이즈, PLC 그리고 PKC를 억제할 때 EGF에 의하여 유도된 세포 내 칼슘 증가를 막을 수 있었다. EGF는 또한 IP₃의 농도를 증가시켰고, 이는 EGF 수용체의 타이로신 카이네이즈 억제제에 의하여 차단되었다. EGF는 H₂O₂ 형성을 증가시켰고 항산화제 전처리 시 EGF에 의한 칼슘의 증가를 억제시켰다. EGF는 p44/42 MAPK의 인산화를 유도하였고, 이는 EGF 수용체의 타이로신 카이네이즈, PLC, PKC 또는 Ca²⁺ 통로 억제제에 의하여 차단되었다. p44/42 MAPKs 억제제인 PD 98059 처리 시 EGF에 의한 [³H]thymidine 결합은 억제되었다. EGF 수용체 타이로신 카이네이즈, PKC, Ca²⁺ 통로 또는 p44/42 MAPKs를 차단시키면 EGF에 의한 세포주기조절 단백질인 cyclin D1, cyclin E, CDK 2와 CDK 4 발현 증가가 억제되었다. 이들 결과를 요약하여 EGF는 PLC/PKC, Ca²⁺ 유입 그리고 p44/42 MAPKs에 의해 마우스 배아줄기세포를 증식시킨다는 것을 보고하였다(53).

또한, 세포막의 lipid raft와 caveolae가 EGF 수용체와 같은 성장 인자의 신호전달계와 관련이 있고 최근 연구를 통해 caveolin-1은 세포 이동을 조절한다고 알려져 있다(54, 55). 저자들의 연구에서 EGF는 Src, caveolin-1, FAK, AKT, ERK 1/2 단백질을 인산화 시켰고, caveolin-1의 인산화는 AG 1478과, herbimycin A (tyrosine kinase 억제제), PP2 (Src 억제제)에 억제되었다. EGF에 의한 ERK 1/2 인산화는 PP2, M β CD (caveolae 제거제), caveolin-1 siRNA, LY-294002, Akt 억제제에 의해 차단되었다. EGF에 의한 세포이동 촉진과 MMP-2의 발현 증가는 PP2, caveolin-1, FAK siRNA, LY-294002, Akt 억제제, PD-98059 (ERK 1/2 억제제)에 의

해 감소하였다. 또한, EGF에 의한 [³H]thymidine유입과 세포수의 증가는, AG 1478, PP2, Mβ CD, caveolin-1, FAK siRNA, LY-294002, PD-98059에 의해 억제되는 것을 확인하였다. 더 나아가, EGF에 의한 원형암유전자 (c-fos, c-myc, c-Jun)와 세포주기조절단백질 발현의 증가는 caveolin-1과 FAK siRNA에 의해 차단되었다. 결론적으로, EGF에 의한 세포이동과 증식에 caveolin-1이 관여되며, 이 과정에 Src, FAK, PI3K/Akt, ERK, MMP-2 등의 신호전달물질이 연관됨을 밝혔다(56).

C. TGF-α

TGF는 포유류의 배아발달 및 기관형성에 있어서 세포 증식과 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다. TGFβ 군은 이형체인 type I과 type II 수용체를 통해 세포 내 신호전달계의 활성을 유도한다(57). 활성화된 type I 수용체는 receptor regulated Smad proteins(R-Smads: Smad2/3)를 인산화시키고, 이들은 common-partner Smad(Co-Smad: Smad4)와 복합체를 형성하여 핵으로 이동하여, TGF-β 표적 유전자의 발현을 조절한다.

TGF-β/Activin/Nodal 신호전달계는 인간 배아줄기세포의 전능성을 유지하며 Smad2/3의 활성이 이들 과정에 관여된다고 보고되었다(58). TGF α는 EGF 군으로서 EGF 수용체와 상호작용하며 배아의 배반포의 내세포덩어리와 영양막에서 생성되는 성장 인자이다(59, 60). 특히 TGF α는 원숭이 배아 줄기세포의 미분화를 유지하면서 세포 증식을 촉진시켰다(61). 저자들의 연구에서는 TGF-α는 [³H]-thymidine과 BrdU incorporation을 증가시키며 Akt, mTOR, p70S6K1, p44/42 MAPKs의 인산화를 촉진시켰다.

또한, TGF-α는 Notch와 Notch의 세포 내 도메인인 Hes-1, 그리고 Wnt1의 단백질 발현을 증가시켰다. 반면에, Akt, mTOR, p44/42 MAPKs, Notch를 억제하였을 때 TGF-α에 의한 DNA 합성 증가가 억제되었다. TGF-α는 c-jun, c-myc, c-fos의 유전자 발현 및 세포주기조절 단백질인 cyclin D/CDK 4, cyclin E/CDK 2의 발현을 증가시켰으며, p21^{cip1/waf1} 과 p27^{kip1}은 감소시켰다. 즉, TGF-α는 Akt, mTOR, Notch 신호전달계를 통해 배아줄기세포의 DNA 합성을 촉진시킴을 보고하였다(62).

D. Sonic hedgehog

Hedgehog(Hh)는 세포 증식, 분화 및 기관형성 등 배아 발달에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(63). 척추동물에서 Hh는 Sonic hedgehog(Shh), Indian hedgehog(Ihh), Desert

hedgehog(Dhh)로 나눌 수 있다. Hh의 활성화는 2종류의 수용체 시스템에 의해 이루어진다. 즉 세포막 횡단 수용체인 Patched(Ptc)와 Smoothened(Smo)로 나눌 수 있으며, Hh의 부재 시 Ptc는 Smo를 억제하고 있다. 일단 Hh이 Ptc에 결합하게 되면 세포 내 신호전달계가 활성화 되고, 결국은 전사인자인 Gli family가 Hh의 표적유전자의 발현을 조절하게 된다. Hh는 고유 신호전달계의 활성화뿐만 아니라 TGF- β , BMP, Notch 그리고 Wnt/ β -catenin 등과 같은 신호전달계와의 연결고리를 통해 배아 줄기세포의 기능을 조절한다.

저자들의 연구에서 Shh는 배아줄기세포에서 농도 의존적으로 [3 H]-thymidine 유입을 증가시켰고, 이는 Smoothened 수용체 억제제인 cyclopamine에 의해 억제되었다. Shh는 세포 내 칼슘 농도를 증가시켜 PKC α , δ , ζ 의 활성을 유도하였고 이들의 활성화로 Gli1의 유전자 발현이 증가되었다. Shh는 EGF 수용체의 활성을 증가시켰으며, 이는 matrix metalloproteinase (MMP) 억제제에 의해 차단되었다. NF- κ B의 활성이 유도되었으며, 이는 PKC와 EGF receptor tyrosine kinase 억제제에 의해 감소되었다. Shh는 또한 Notch/Hes-1, Wnt1/ β -catenin 의 단백질 수준을 증가시켰고, siRNA에 의한 Gli1 유전자의 억제는 Shh의 효과를 차단하였다.

Shh는 cyclin D1/CDK 4, cyclin E/CDK 2의 단백질 수준을 증가시켰으나, p21^{cip1/waf1}과 p27^{kip1}의 발현은 감소시켰다. 이들 단백질에 대한 Shh의 효과는 각각 PKC, EGF receptor tyrosine kinase, NF- κ B를 억제하였을 때, 그리고 Gli1 유전자의 억제에 의해 차단되었다. 이 결과를 바탕으로 Shh는 PKC와 EGF 수용체를 통한 NF- κ B의 활성화와 Gli의 증가를 통해 세포 증식을 촉진함을 알 수 있었다 (64).

E. BMP4

BMP4 또한 TGF- β 군으로 Smads의 활성화에 의해 세포의 기능을 조절하는 것으로 보고되고 있다. BMP4는 STAT3나 Erk에 직접적인 영향을 주지 않고, LIF/STAT3 신호 전달계와 독립적으로 그 역할을 하게 된다.

배아줄기세포에서 BMP4는 LIF 부재시에 세포를 중배엽과 조혈모 세포로 분화를 시켰으나, LIF와 함께 처리 시에는 배아줄기세포의 전능성을 유지시키는 것으로 밝혀졌다(65). BMP/Smads의 활성화는 배아줄기세포의 신경외배엽으로의 분화를 억제하고, LIF/STAT3는 BMP에 의해 유도될 수 있는 내 배엽과 중배엽으로의 분화를 억제한다(66). 즉 LIF/STAT3와 BMP/Smads의 활성이 서로 균형과 견제를 이루어 세포의 상태를 조절하는 것으로 보인다. 저자들이 연구한 바에 따르면 줄기세포 기능조절 인자로서 BMP4는 배아줄기세포의 [3 H]thymidine 유입과 세포주기 조절단백질인 cyclin D1 발현을

증가시켰으며 이는 BMP4 수용체 억제제인 noggin에 의해 억제되었다. BMP4에 의한 Wnt1 발현의 증가는 Smad4 siRNA에 의해 억제되었으며, BMP4에 의해 증가된 cyclin D1의 발현과 β -catenin의 활성화는 Smad4 siRNA와 Wnt1 siRNA에 의해 억제됨을 확인하였다.

Smad4, Wnt1, PI3K siRNA 처리는 배아줄기세포의 미분화 유지 유전자인 Oct4, Sox2, FoxD3의 발현과 BMP-4에 의해 증가된 세포주기 조절단백질의 발현 및 [³H]thymidine 유입을 감소시켰다. 결론적으로, 세포외 단백질 성분인 BMP4는 배아줄기세포의 BMP4 수용체를 통해 Smad, PI3K/Akt, Wnt1/ β -catenin 신호전달체계를 활성화시켜 자가 증식을 촉진시킬 뿐만 아니라 배아줄기세포의 미분화 유지 유전자인 Oct4, Sox2, FoxD3의 발현 증가를 통해 줄기세포의 다능성 유지에 기여함을 밝혀내었다(67).

- 다음 호에 계속 -