

## 체외수정 유래 생쥐 배아줄기세포와 유사한 특성을 보유한 단위발생 유래 생쥐 배아줄기세포

마리아 기초의학연구소/마리아 생명공학연구소<sup>1</sup>, 건국대학교<sup>2</sup>, 마리아병원<sup>3</sup>

박세필<sup>1</sup> · 김은영<sup>1</sup> · 이금실<sup>1</sup> · 이영재<sup>1</sup> · 신현아<sup>1</sup>  
민현정<sup>1</sup> · 이훈택<sup>2</sup> · 정길생<sup>2</sup> · 임진호<sup>3</sup>

### Parthenogenetic Mouse Embryonic Stem Cells have Similar Characteristics to *In Vitro* Fertilization mES Cells

Sepill Park<sup>1</sup>, Eun Young Kim<sup>1</sup>, Keum Sil Lee<sup>1</sup>, Young Jae Lee<sup>1</sup>, Hyun Ah Shin<sup>1</sup>,  
Hyun Jung Min<sup>1</sup>, Hoon Taek Lee<sup>2</sup>, Kil Saeng Chung<sup>2</sup>, Jin Ho Lim<sup>3</sup>

*Maria Infertility Medical Institute / Maria Biotech<sup>1</sup>, Seoul 130-110, Kon-Kuk University<sup>2</sup>,  
College of Animal Husbandry, Maria Hospital<sup>3</sup>, Seoul 130-110, Korea*

**Objective:** This study was to compare the characteristics between parthenogenetic mES (P-mES) cells and *in vitro* fertilization mES cells.

**Materials and Methods:** Mouse oocytes were recovered from superovulated 4 wks hybrid F1 (C57BL/6xCBA/N) female mice. For parthenogenetic activation, oocytes were treated with 7% ethanol for 5 min and 5 µg/ml cytochalasin-B for 4 h. For IVF, oocytes were inseminated with epididymal sperm of hybrid F1 male mice ( $1 \times 10^6$ /ml). IVF and parthenogenetic embryos were cultured in M16 medium for 4 days. Cell number count of blastocysts in those two groups was taken by differential labelling using propidium iodide (red) and bisbenzimidazole (blue). To establish ES cells, blastocysts in IVF and parthenogenetic groups were treated by immunosurgery and recovered inner cell mass (ICM) cells were cultured in LIF added ES culture medium. To identify ES cells, the surface markers alkaline phosphatase, SSEA-1, 3, 4 and Oct4 staining were examined in replated ICM colonies. Chromosome numbers in P-mES and mES were checked. Also, *in vitro* differentiation potential of P-mES and mES was examined.

**Results:** Although the cleavage rate ( $\geq 2$ -cell) was not different between IVF (76.3%) and parthenogenetic group (67.0%), *in vitro* development rate was significantly low in parthenogenetic group (24.0%) than IVF group (68.4%) ( $p < 0.05$ ). Cell number count of ICM and total cell in parthenogenetic blastocysts ( $9.6 \pm 3.1$ ,  $35.1 \pm 5.2$ ) were significantly lower than those of IVF blastocysts ( $19.5 \pm 4.7$ ,  $63.2 \pm 13.0$ ) ( $p < 0.05$ ). Through the serial treatment procedure such as immunosurgery, plating of ICM and colony formation, two ICM colonies in IVF group (mES, 10.0%) and three ICM

주관책임자: 박세필, 우) 130-110 서울특별시 동대문구 신설동 103-11, 마리아 기초의학연구소/마리아 생명공학연구소

Tel: (02) 2250-5653, Fax: (02) 2250-5669, e-mail: sppark@mail.mariababy.com

본 연구는 보건복지부 바이오보건기술개발사업 우수 핵심사업연구비 (01-PJ10-PG8-01EC01-0010)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

This study was supported by a grant (01-PJ10-PG8-01EC01-0010) of the Korea Health 21 R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea.

colonies (P-mES, 42.9%) in parthenogenetic group were able to culture for extended duration (25 and 20 passages, respectively). Using surface markers, alkaline phosphatase, SSEA-1 and Oct4 in P-mES and mES colony were positively stained. The number of chromosome was normal in ES colony from two groups. Also, *in vitro* neural and cardiac cell differentiation derived from mES or P-mES cells was confirmed.

**Conclusion:** This study suggested that P-mES cells can be successfully established and that those cell lines have similar characteristics to mES cells.

**Key Words:** Mouse embryonic stem cells, Parthenogenesis, IVF, Inner cell mass (ICM), Immunosurgery

배아줄기세포 (embryonic stem cell)는 수정란이 자궁 내막에 착상하기 전의 매우 초기 단계인 포배기의 내부세포괴 (inner cell mass)에서 분리해낸 세포이다. 배아줄기세포는 개체를 구성하는 모든 조직으로 분화할 수 있는 무한한 잠재력 (pluripotent)을 가진 만능세포로, 분화가 억제되고 증식만이 가능한 세포를 말한다.<sup>1</sup> Evans와 Kaufman (1981)이 초기 배아 상태에서 배아줄기세포를 얻는 방법을 정립하여 보고한 이래,<sup>2</sup> 생쥐 배아줄기세포의 확립은 발생학, 유전학 연구의 획기적 발전과 형질변환 동물의 생산 및 동물 체내에서 유전자 기능의 탐구에 매우 큰 변혁을 가져오게 했으며, 인간 배아줄기세포 확립에 중요한 기본적인 기술과 지식을 제공하였다.<sup>13,13</sup> 최근에 인간 배아줄기세포의 특성 규명에 대한 연구가 진행되면서 줄기세포 분야에 대한 관심은 더욱 더 증폭되고 있지만 아직은 미약하며,<sup>4,6</sup> 생쥐 배아줄기세포에 분화 자극을 가해 특정세포로 분화시키는 분화 연구는 향후 인간의 난치병 치료에 이용되는 세포 대체요법 (cell replacement therapy)에 적용할 수 있는 기초 정보를 제공하리라 기대된다.<sup>7</sup>

모계의 염색체만을 보유한 단위발생란은 개체 발생으로는 이루어지지 않지만 단위발생으로 생산된 배반포기배로부터 배아줄기세포의 형성은 가능하다.<sup>8-12</sup> 단위발생 유래 배아줄기세포는 체외수정란에서 확립된 배아줄기세포와 유사한 특성을 보유하므로 개체 발생의 기초 연구에 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 단위발생 유래 생쥐 배아줄기세포 (parthenogenetic mouse embryonic stem cell, P-mES)에 관련된 연구는 1998년 일본의 Kanagawa 등에 의해 embryoid body 형성 가능성으로 분화능력이 있을 것으로 보고되었고,<sup>11</sup> 최근에 Cibelli 등은 영장류에서 단위발생 유래 배아줄기세포를 확립하여 체외에서 신경

세포로의 분화와 면역결핍성 쥐에 이식하였을 때 teratoma가 형성되어 내배엽 (내장과 호흡상피세포), 외배엽 (신경, melanocytes, 표피, 모세포), 중배엽 (연골, 근육, 뼈세포)으로 체내에서 분화가 이루어짐이 확인되어,<sup>12</sup> 단위발생 유래 배아줄기세포도 향후 난치병 치료 연구를 위한 배아줄기세포의 연구에서 문제가 될 수 있는 윤리적 문제를 최소화 시킬 수 있는 대체 연구 재료로서의 가능성을 시사하고 있다.

본 연구는 단위발생으로 생산된 생쥐 배반포기배로부터 제작된 배아줄기세포가 체외수정 유래 생쥐 배아줄기세포와 동일한 줄기세포의 특성을 보유하고 있는지의 여부와 분화 가능성을 조사하고자 실시하였다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

Hybrid F1 (C57BL/6x CBA/N) 암컷 쥐에 5 I.U. pregnant mare serum gonadotropin (PMSG, Sigma)를 복강에 주사한 후 48시간째에 5 I.U.의 human chorionic gonadotropin (hCG, Sigma)를 주사하였다. hCG 주사 13.5시간 후 난관 팽대부에서 과배란시킨 난자를 회수하였다.

### 2. 연구 방법

#### 1) 단위생식과 체외수정 유래의 배반포기배 생산

##### (1) 단위생식 유래의 배반포기배 생산

단위발생 유래 생쥐 배아줄기세포를 얻을 목적으로, 과배란 유도 후 회수된 난자는 0.1% hyaluronidase (Sigma)로 난구세포를 제거한 후 M16 배양액에 7% ethanol을 넣어 5분간 활성화 시킨 다음 M16 calcium free 배양액에 5 mg/ml cytochalasin B (Sigma)를

넣어 4시간 동안 활성화 시켰다. 활성이 유도된 diploid 난자만을 선택하여 4% BSA가 포함되어 있는 M16 배양액에서 4일 동안 배양하여 배반포기배를 획득하였다 (Figure 1B).

#### (2) 체외수정 유래의 배반포기배 생산

체외수정 유래 생쥐 배아줄기세포를 얻기 위해서, 과배란 유도 후 회수된 일부의 난자는 hybrid F1 (C57BL/6xCBA/N) 수컷 정소상체에서 얻은 정자를  $1 \times 10^6/\text{ml}$ 의 농도로 수정을 유도하였다. 수정 후 5시간째 새로운 M16 배양액으로 옮겨 4일 동안 배양하여 얻어진 배반포기배를 본 실험에 공시하였다 (Figure 1A).

#### 2) 내부세포피와 영양배엽세포 (trophectoderm) 핵의 differential labelling 방법

체외수정 후 또는 단위발생 후 생산된 배반포기배의 건강도를 구체적으로 조사하기 위하여, differential labelling 방법을 이용하여 내부세포피와 영양배엽세포의 세포 수를 비교하였다. 염색과정을 간단히 살펴보면, 난자의 투명대는 0.1% pronase (Sigma)로 제거하여 D-PBS (Gibco)에서 30분 동안 회복을 유도한 후 15 mM TNBS (Sigma)와 4 mg/ml PVP (Sigma)가 포함되어 있는 D-PBS 용액에서 10~15분 동안 반응시켰다. 반응이 유도된 난자는 0.1 mg/ml anti-DNP-BSA (ICN Immunobiological)이 들어 있는 37°C D-PBS 용액에서 10분 동안 배양되었고, 신선 배양액으로 충분히 세척한 후 0.01 mg/ml propidium iodide (Sigma)와 10% (v/v) guinea pig complement (Sigma)가 들어 있는 D-PBS 용액으로 옮겨 37°C에서 30분 배양되었다. 그 후 영양배엽세포가 lysis된 난자는 0.05 mM bisbenzimidazole (Sigma)가 들어 있는 absolute alcohol에 옮겨 4°C에서 밤새 저장되어졌다. 익일 난자는 absolute alcohol에서 적어도 1시간 동안 세척한 다음 slide glass 위에 올린 후 cover slip으로 덮어 mount solution을 처리하였다. 핵의 염색 유무는 UV 필터가 장착된 형광 현미경 하에서 영양배엽세포는 붉은색, 혹은 자주색으로 내부세포피는 청색으로 염색된 것을 관찰하였다 (Figure 1C, D).

#### 3) 영양배엽세포로부터 내부세포피를 회수하기 위한 면역절제술

배아줄기세포의 근간이 되는 내부세포피를 획득하기 위한 면역절제술 (immunosurgery)을 하기 위해

서, 배양 4일째 획득된 배반포기배 중 팽창배반포기배만을 선별하여 난자를 둘러싸고 있는 투명대를 0.25% pronase로 제거시키고, 단백질 분해효소의 독성을 제거시키기 위해 충분히 배양시킨 뒤 본 연구소에서 제작한 1:20의 항생취세포 항체에 30분간 노출시킴으로써 항원 항체 반응을 유지하고, 여기에 1:10의 guinea pig complement를 7분간 처리함으로써 영양배엽세포를 괴사시켰다. 이와 같이 처리된 난자는 신선 배양액내에서 2시간 이상 배양한 뒤 미세한 pipet을 이용하여 내부세포피만을 회수하였고, 회수된 내부세포피는 STO 세포 위에 놓음으로써 공동배양을 실시하였다.

#### 4) STO (mouse embryonic fibroblast) 세포의 준비

배반포기배로부터 회수된 내부세포피가 체외에서 배아줄기세포로서 분화되지 않고 증식만을 하게 하기 위해서는 분화억제와 관련된 여러 인자들을 배양시에 첨가해 주어야만 한다. STO 세포는 분화억제인자를 분비하는 세포주로서 배아줄기세포 제작시에 기저세포 (feeder cell)로 사용되는 세포이다. 또한 분화억제인자로서 배양액에 백혈병 억제인자 (leukemia inhibitory factor, LIF, Chemicon)를 첨가하였다. STO 세포는 ATCC (American Type Culture Collection)사로부터 구입되었으며, 배양용기에서 2일에 한번씩 계대되었고, 내부세포피의 배양에 사용하기 위해서 10 µg/ml mitomycin-C (Sigma)에 4시간 가량 처리한 후 이용하였다.

#### 5) 내부세포피 세포의 배양 및 계대배양

STO 세포와 공동배양된 내부세포피는 20% FBS (Hyclone), 1 mM L-glutamine (Gibco), 1% non-essential amino acid (Sigma), 0.1 mM β-mercaptoethanol (Sigma) 과 1000 units/ml의 LIF (Chemicon)가 들어 있는 DM-EM (Gibco, high glucose 4.5 g/L, no pyruvate)에서 매일 신선하게 배양되었으며, 배양 후 형성된 내부세포피 콜로니는 새로운 STO 기저세포가 들어 있는 배양접시로 옮겨 주었다. 이와 같은 내부세포피 콜로니는 여러 덩어리로 나누어 대략 6일에 한번 정도 새로운 STO 배양접시에서 배양하였다.

#### 6) 배아줄기세포 확인

##### (1) 형태학적 관찰

면역절제 후 회수된 내부세포피 세포의 발달 양상

은 현미경 하에서 매일 관찰되었다.

#### (2) Alkaline phosphatase 활성도 측정

체외수정과 단위발생에서 유래된 배아줄기세포 (Figure 1E, F)의 미분화 특성을 규명하기 위하여 미분화 세포의 표식인자로 많이 사용되는 alkaline phosphatase의 활성도를 조사하였다. 배아줄기세포로 추정되는 콜로니를 4% formaldehyde (Sigma)에서 15분 동안 고정된 후 PBS를 이용하여 세척하였다. 이후 Fast Red TR/Naphthol AS-MX (Sigma) 염색 키트로 15~30분 동안 반응시켜 그 반응 정도를 현미경 하에서 확인하였다 (Figure 2A).

#### (3) SSEA-1, 3, 4 발현 유무 확인

미분화 특성의 배아줄기세포를 인지하는 stage-specific embryonic antigen-(SSEA, DSHB) 1, 2 그리고 3을 이용하여 관찰하였다. 체외수정과 단위발생에서 유래된 배아줄기세포로 추정되는 콜로니를 0.25% trypsin-EDTA로 처리하고 cover slip에 plating한 후 48시간 배양하였다. 이후 PBS로 세척하고, SSEA-1과 SSEA-3의 염색을 실시하기 위해 고정액으로 100% ethanol을 사용하였으며, SSEA-4는 90% acetone을 사용하여 15분 동안 고정 후 PBS로 세척하였다. 일차 항체는 1:20의 농도로 37°C에서 60분 동안 반응시켰다. 일차 항체에 대한 반응 정도는 SSEA-1의 경우 rhodamine (TRITC)-conjugated goat anti-mouse IgM (1:100, Jackson)를 사용하였으며, SSEA-3와 4는 fluorescein Isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-mouse IgG (1:100, Jackson)로 37°C에서 30분 동안 반응시켜 형광 현미경 하에서 반응 정도를 관찰하였다 (Figure 2B).

#### (4) Oct-4 발현 유무 확인

미분화 특성의 배아줄기세포에서 특징적으로 발현되는 Oct-4 (ocatamer-binding transcription factor-4) 발현 여부를 면역조직화학염색 (immunohistochemical staining)으로 실시하였다. 체외수정과 단위발생에서 유래된 배아줄기세포로 추정되는 콜로니를 0.25% trypsin-EDTA로 처리하여 cover slip에 plating한 후 48시간 배양하였다. 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma)로 15분 동안 고정하고 0.5% triton X-100 (Sigma) 용액으로 10분 동안 침투시킨 후, 5% normal goat serum으로 1시간 blocking 하였다. PBS로 세척한 후 Oct-4 항체 (Santa Cruz, 1:50)를 37°C에서 60분 동안 반응

시켰다. Oct-4에 대한 반응 정도를 확인하기 위해 FITC-conjugated goat anti-mouse IgM (1:100, Jackson)을 이용하였고, 결과는 형광 현미경 하에서 확인하였다 (Figure 2C).

#### (5) 염색체 분석

체외수정과 단위발생에서 유래된 배아줄기세포의 염색체를 확인하기 위해 배아줄기세포로 추정되는 콜로니가 있는 배양접시에 colcemid (Gibco)를 첨가한 후 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 그 후 scraper를 이용하여 콜로니를 모아 15 ml cornical tube (Falcon)에 옮겨 2,300 rpm에서 8분간 원심분리를 실시하였다. 이후 배양액을 제거하고 저장용액을 37°C의 water bath에서 15~20분 동안 처리하였다. 저장 처리한 세포는 고정액 (메탄올:빙초산=3:1)에서 고정시킨 후, slide에 세포를 터트려 1시간 동안 aging 시켰고, 이후 0.05% trypsin-EDTA로 처리하여 Gimsa (Sigma) 용액으로 GTG-banding을 실시한 후 현미경에서 염색체 수를 분석하였다 (Figure 3A, B).

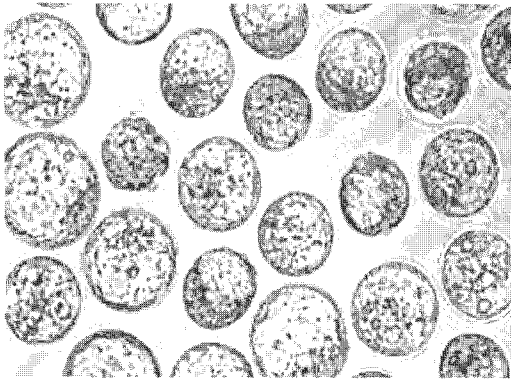
#### 7) 체외분화

##### (1) 분화 유도

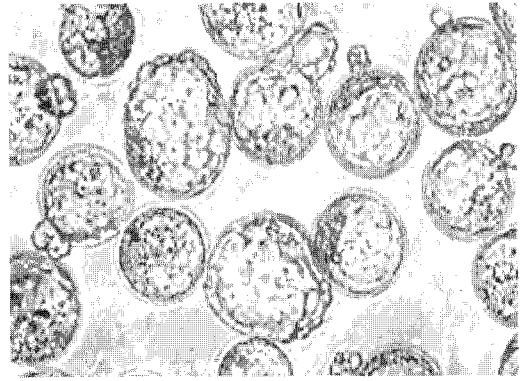
단위발생 및 체외수정 유래 배아줄기세포의 체외분화능을 조사하기 위하여, 배아줄기세포를 trypsin-EDTA로 처리한 후 부유배양하여 3배엽성의 특성을 갖는 embryoid body (EB)를 4일 동안 만든 다음, 신경세포와 심근세포로의 분화 가능성을 조사하고자  $10^{-6}$  mM retinoic acid (RA)와 0.75% dimethyl sulfoxide (DMSO)를 각각 4일간 처리하였다 (4-/4+). 분화 유도는 각각 신경세포와 심근세포 분화 배양액에 넣어 실시하였다.

##### (2) 분화 확인

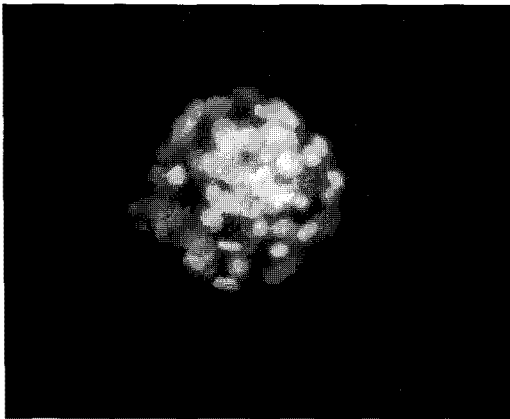
형태학적으로 신경과 심근으로 분화된 세포는 4% paraformaldehyde (PFA, Sigma)로 15분 동안 고정하고 0.5% triton X-100 (Sigma) 용액으로 10분 동안 침투시킨 후, 5% normal goat serum으로 1시간 blocking 하였다. 1차 항체로는 신경세포의 대표적인 표지 항체로서 anti-MAP2 (mouse IgG, Sigma, 1:1000)와 신경보조세포로 알려져 있는 성상교세포 (astrocyte)에 대한 표지 항체로서 anti-GFAP (rabbit IgG, DAKO, 1:200)이 쓰였다. 또한, 심근세포를 확인하기 위하여 muscle actin에 대한 특이성이 있는 anti-sarcomeric  $\alpha$ -actinin mAb's (1:100, Sigma)를 사용하였고, 일



A



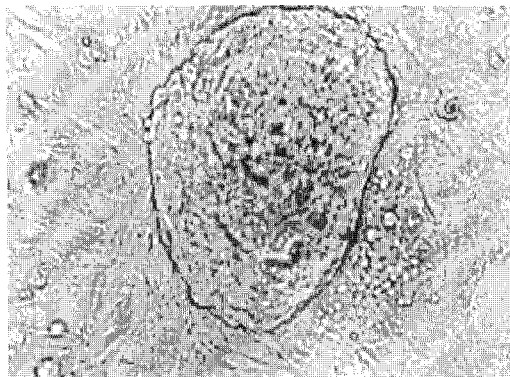
B



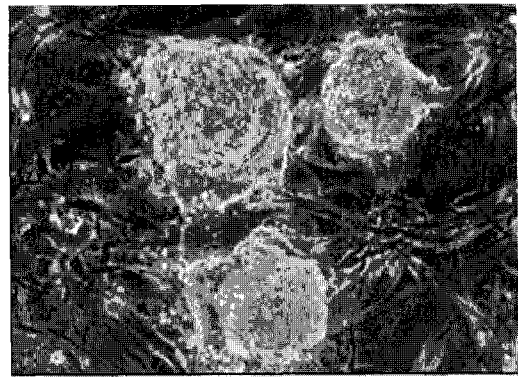
C



D

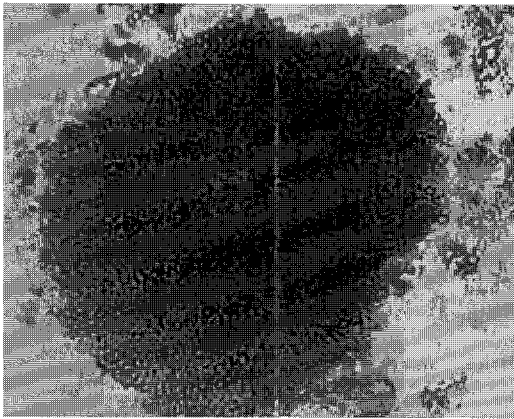


E

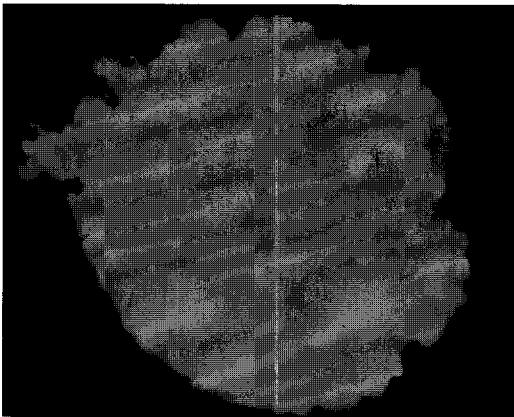


F

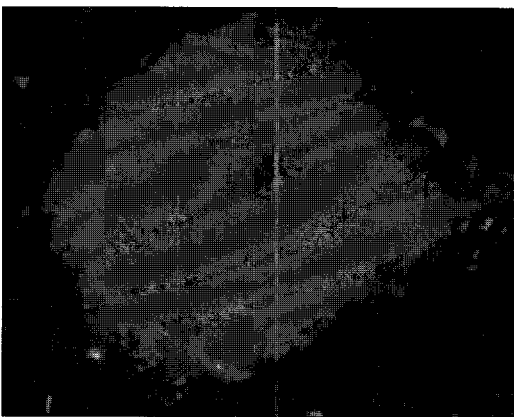
**Figure 1.** Establishment of *in vitro* fertilization mouse ES cells (mES) and parthenogenetic mouse ES cells (P-mES). *In vitro* produced mouse blastocysts by IVF (A) and parthenogenesis (B).  $\times 150$ . Differential staining of mouse blastocysts obtained after IVF (C) and parthenogenesis (D). Blue color represents ICM cell and red color is trophoblast cell. (C) ICM cell no.=25, total cell no.=62,  $\times 300$ . (D) ICM cell no.=13, total cell no.=41,  $\times 300$ . Colony of mES01 (E, 15 passages,  $\times 400$ ) and P-mES02 (F, 20 passages,  $\times 200$ ).



A



B

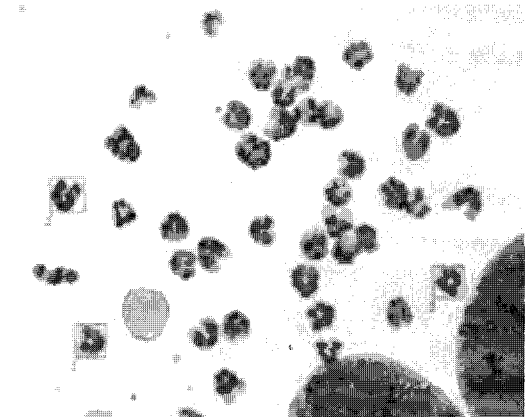


C

**Figure 2.** Characterization of mES or P-mES cells. (A) Alkaline phosphatase stained mES01 cells. (B) SS-EA-1 stained P-mES02 cells. (C) Oct4 stained P-mES02 cells.  $\times 300$ .



A



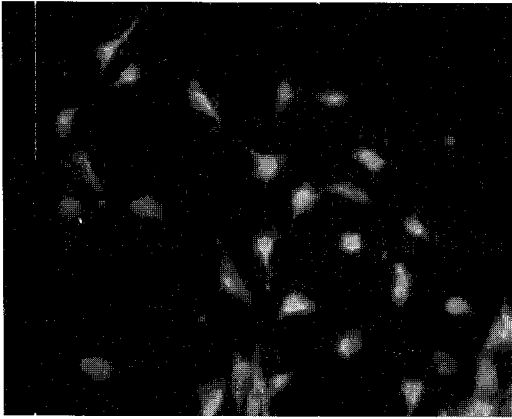
B

**Figure 3.** Metaphase spread of mES01 cells (A) and P-mES02 cells (B). P-mES02 cells have the same chromosome number as mES01 cell ( $n=40$ ).  $\times 1000$ .

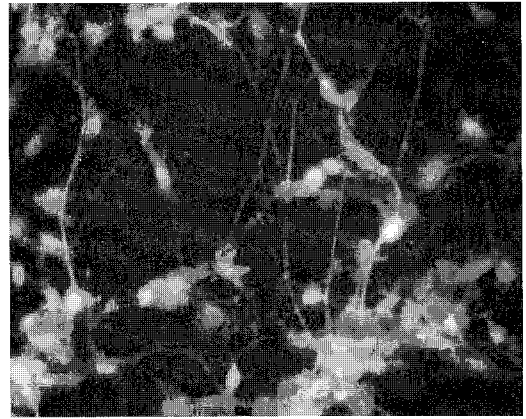
차 항체에 대한 반응 정도는 FITC-conjugated goat anti-mouse IgG (1 : 50, Jackson)와 TRITC-conjugated goat anti-mouse IgM (1 : 200, Jackson)을 각각 이용하여 실온에서 30분간 반응시켜 형광 현미경 하에서 관찰하였다.

#### 8) 분석 및 통계 방법

체외 발달 결과에 대한 통계적 분석은 Chi-square test를 이용하였고, p값이 0.05 이하인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 판정하였다. 또한 배반포 기배의 세포 수에 대한 통계는 Student's t-test로 실시하였다.



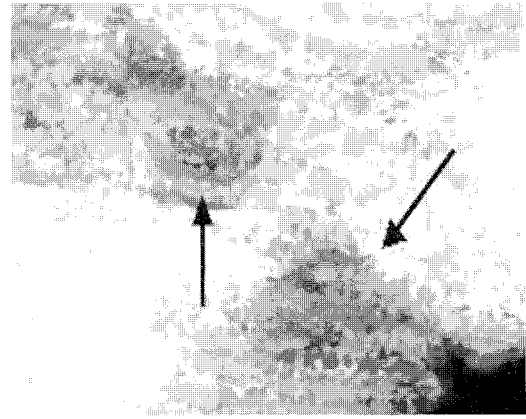
A



B



C



D

**Figure 4.** *In vitro* differentiated neural cells (A, B) and beating cardiomyocytes (C, D) from P-mES02 cells. Indirect immunostaining of GFAP for astrocyte (A), MAP2 for neuron (B), sarcomeric  $\alpha$ -actinin for cardiac cell (C). Arrows indicate the beating cardiomyocytes (D). (A~C)  $\times 300$ , (D)  $\times 1000$ .

## 결 과

본 실험은 단위발생으로 생산된 생쥐난자가 체외수정으로 생산된 생쥐난자와 비교했을 때, 정상적인 발달속도로 체외발생이 가능하며, 배반포기배 형성이 가능한지, 이로부터 배아줄기세포의 형성과 다른 조직으로의 분화가 가능한지의 여부를 조사하였다.

단위발생으로부터 얻은 생쥐난자의 난합률 (67.0%)은 체외수정으로부터 얻은 결과 (76.3%)와 유의한 차이를 나타내지 않았지만, 단위발생 유래 배반포기배의 발달률은 (24.0%) 체외수정에서 얻은 배반

포기의 발달률보다 유의하게 낮은 발달률을 보여주었다 (68.4%) ( $p < 0.05$ ). 또한 두 군에서 얻은 일부 배반포기배의 내부세포피 및 총 세포 수를 조사하였던 결과, 단위발생으로부터 얻어진 각 세포 수가 ( $n = 15$ ;  $9.6 \pm 3.1$ ,  $35.1 \pm 5.2$ ) 체외수정으로부터 얻은 각 세포 수보다 ( $n = 20$ ;  $19.5 \pm 4.7$ ,  $63.2 \pm 13.0$ ) 매우 낮다는 결과를 알 수 있었다 ( $p < 0.05$ ) (Table 1, Figure 1C, D).

단위발생에서 얻어진 총 9개의 배반포기배는 면역결핍술 후 7개의 내부세포피가 영양배엽세포로부터 성공적으로 분리되어 단층배양이 유도된 STO 세포와 공동배양된 결과 내부세포피 3개가 콜로니를 형성하였으며, 이 3개의 콜로니 (42.9%)는 각각 여

**Table 1.** *In vitro* developed blastocysts after parthenogenetic activation or *in vitro* fertilization (n=5)

Treatment	No. of Oocytes	No. (%) of $\geq 2$ -cell at day 2	No. (%) of blastocysts at day 4	Cell number of blastocysts		
				No.	ICM	Total
IVF	257	196 (76.3)	134 (68.4) <sup>a</sup>	20	19.5 $\pm$ 4.7 <sup>a*</sup> (14~26)	63.2 $\pm$ 13.0 <sup>a</sup> (46~90)
Parthenogenetic activation	385	258 (67.0)	62 (24.0) <sup>b</sup>	15	9.6 $\pm$ 3.1 <sup>b</sup> (4~14)	35.1 $\pm$ 5.2 <sup>b</sup> (25~42)

<sup>a,b</sup> Means in the same column without common superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ).

\* Mean  $\pm$  S.E.M (standard error of mean) ( $p < 0.05$ ).

**Table 2.** Mouse embryonic stem cells derived from parthenogenetic or IVF blastocyst stage embryos

Treatment	No. of immunosurgery treated blastocysts*	No. (%) of plated ICM	No. (%) of formed ICM colony	No. (%) of established mES cells
IVF	26	20 (76.9)	8 (40.0)	2 (10.0%)
Parthenogenetic activation	9	7 (77.8)	3 (42.9)	3 (42.9%)

\* Middle expanding or expanded blastocysts were treated by immunosurgery.

러 개로 나누어 재배양을 유도하였고, 재배양된 내부세포괴들은 25회 계대되는 동안 분화되지 않고 계속 성장되었다 (Figure 1F). 한편, 체외수정에서 얻은 총 26개의 배반포기배는 면역절제술 후 성공적으로 분리된 내부세포괴 20개 중 8개가 콜로니를 형성하였으며, 이 중 6개의 콜로니는 자연적 분화 (spontaneous differentiation)가 일어났지만, 2개의 콜로니 (10.0%)는 여러 개로 나누어 재배양을 유도하였고, 재배양된 내부세포괴들은 20회 계대되는 동안 분화되지 않고 계속 성장되었다 (Table 2, Figure 1E). 이러한 결과는 단위발생 유래 배아줄기세포 형성이 체외수정 유래 배아줄기세포 형성보다 용이함을 알 수 있었다.

미분화된 배아줄기세포의 표식인자로 alkaline phosphatase, SSEA-1, 3, 4 그리고 Oct4 염색을 사용하여 배아줄기세포임을 확인하였던 결과, 체외수정 및 단위발생 유래 배아줄기세포가 alkaline phosphatase (Figure 2A), SSEA-1 (Figure 2B) 그리고 Oct4 (Figure 2C)에서 강하게 염색이 되었고, SSEA-3, 4에서는 염색이 되지 않았다. 또한 체외수정 및 단위발생 유래 배아줄기세포의 염색체 수를 조사하였던 결과 두 군 모두 정상인 40개의 염색체를 갖고 있는 것을 확인하였다 (Figure 3A, B).

또한, 체외수정 및 단위발생 유래 배아줄기세포

의 체외분화능을 조사하기 위하여, EB 형성 가능성을 조사하였고, 형성된 EB로부터 각 신경세포와 심근세포로의 분화 유도인자인 RA와 DMSO를 첨가하였을 때, 신경세포 분화처리군에서는 신경세포 (Figure 4B) 및 신경보조세포 (Figure 4A)의 형성이 확인되었고, 심근세포 분화처리군에서는 분화 2주째 근 수축 현상을 보이는 콜로니의 형성이 확인되었으며, 이와 같이 근 수축을 보이는 세포는 심근세포와 관련된 항체로 염색되는 것을 확인하였다.

## 고 찰

본 실험은 단위발생 유래 배아줄기세포가 체외수정 유래 배아줄기세포와 유사한 특성을 보유한다는 것을 나타낸다. 단위발생이 유도된 난자는 체외수정란과 유사한 발달속도를 나타냈고, 상대적으로 적은 수 이기는 하지만 내부세포괴의 존재를 확인할 수 있었다. 또한 이로부터 얻어진 내부세포괴는 체외수정란보다 더 배아줄기세포 형성에 용이하였다. 일반적으로 생쥐 체외수정란을 이용해서 배아줄기세포를 얻을 수 있는 확률은 대략 10%인 것으로 알려져 있고,<sup>14</sup> 이러한 사실은 본 실험에서도 확인되었다. 본 실험에서 실시했던 체외수정란 유래 배아줄기세포의 확보는, 면역절제 후 초기에는 단위발생



유래와 유사한 ICM 콜로니 형성을 보이다가 (40.0%), 대부분이 3~4 계대 이전 단계에서 분화 양상을 보여 최종적으로 배아줄기세포로 유지되는 수는 대략 10% 정도에 머물렀다. 반면에 단위발생 유래 배아줄기세포 생산은 내부세포괴가 콜로니 형성 단계 이후 지속적으로 분화되지 않고 배양되어 최종적으로는 42.9%라는 매우 높은 수율을 나타내었다. 배아줄기세포를 확립하는데 있어 내부세포괴를 확보하는 방법은 여러 가지가 있지만, 본 실험에서는 배반포기배의 영양배엽세포를 면역적으로 제거하고 내부세포괴를 확보하는 면역절제술을 이용하였다. 본 연구에서는 면역절제술의 효율을 높이기 위해서 일차적으로 항원 항체 반응을 유기할 항생쥐 항체를 자체적으로 생산하여 면역절제술에 이용하였던 바, 건강하고 많은 세포 수를 보유하는 체외수정란은 처음에는 면역절제가 된 듯 하였으나, 배양이 길어질수록 분화 양상을 나타내어 최종적으로는 총 세포 수나 내부세포괴의 수가 적은 단위발생란보다 낮은 배아줄기세포 형성률을 나타내었다.

현재 본 연구소에서 확보하고 있는 단위발생 유래 배아줄기세포는 (P-mES01, 02, 03), 형태학적인 발달과 생쥐 배아줄기세포로서 갖추어야 할 세포 표면 표식인자 (Alkaline phosphatase 존재, SSEA-1의 염색과 Oct-4 염색)의 확인, 배아줄기세포가 보유해야 할 다능성 (pluripotency)의 확인을 위한 EB 형성능, 그리고 신경 및 심근세포로의 분화능 등 모든 특성 조사에서 체외수정 유래 배아줄기세포와 유사한 것으로 확인되었다.

수정과정을 거치지 않고 난자는 외부환경의 화학물이나 전기적 자극에 의해서 단위발생이 가능한데,<sup>10,14</sup> 최근 Cibelli 등 (2002)이 영장류의 난자를 단위발생시킨 후 배아줄기세포를 확립하였다는 보고가 있는 이래, 새로운 배아줄기세포의 확보 방법으로서는 많은 관심을 불러 일으키고 있다. 배아줄기세포 생산의 궁극적인 목적은 줄기세포를 특정 질환과 관련된 세포로 분화 유도한 뒤 이식하는 치료요법 (cell therapy)으로 난치성 질환을 치료하는데에 있다. 그러나 동종이라 하더라도 개체간 차이에 따른 면역 거부 반응이 일어날 수 있기 때문에 치료용 복제 (therapeutic cloning)로부터 생산된 배아줄기세포를 이용해야 한다고 알려져 왔다. 하지만 복제과정을

의 효율이 낮기 때문에 단위발생으로부터 배아줄기세포를 생산하는 것이 더 효율적일 것이라는 기대감이 있는 게 사실이다.<sup>14</sup> 실제로 Cibelli 등이 보고한 바에 의하면, 인간과 가장 유사한 특성을 보유한 영장류에서 단위발생 유래 배아줄기세포를 확립하여 체외에서 신경세포로의 분화가 가능하고, 줄기세포를 면역결핍성 쥐에 이식하였을 때 teratoma가 형성되어 내배엽 (내장과 호흡상피세포), 외배엽 (신경, melanocytes, 표피, 모세포), 중배엽 (연골, 근육, 뼈세포)으로 체내에서 분화가 이루어진다는 것이 확인되었다.<sup>11</sup>

본 연구에서는 생쥐에서 단위발생을 유도하여 배아줄기세포 확립 가능성을 조사하였던 바, 체외수정 유래 배아줄기세포와 유사한 특성을 갖는다는 것이 확인되었고, 체외에서 Cibelli 등 (2002)이 조사한 신경세포로의 분화능 뿐만 아니라 지금까지 보고되어 있지 않은 심근세포로의 분화 또한 유도됨을 확인하였다. 이는 단위발생 유래 배아줄기세포가 향후 난치병 치료 연구를 위한 배아줄기세포의 제작에서 문제가 될 수 있는 윤리적 문제를 최소화시킬 수 있는 대체 연구 재료로서의 이용 가능하다는 것을 시사한다고 하겠다.

## 참 고 문 헌

1. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
2. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-6.
3. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell line from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotech* 2000; 18: 399-404.
4. Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, Ben-Hur T. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotech* 2001; 19: 1134-40.
5. Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thom-

- son JA. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotech* 2001; 19: 1129-33.
6. Shuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11307-12.
  7. Campbell KHS, Wilmut I. Totipotency or multipotentiality of culture cells: applications and progress. *Theriogenology* 1997; 47: 63-72.
  8. Kaufman MH. Chromosome analysis of early post implantation presumptive haploid parthenogenetic mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1978; 45: 85-91.7.
  9. Henery CC, Kaufman MH. Cleavage rate of haploid and diploid parthenogenetic mouse embryos during the preimplantation period. *Mol Reprod Dev* 1992; 31: 258-63.
  10. Fukui Y, Sawai K, Furudate M, Sato N, Lwazumi Y, Ohasaki K. Parthenogenetic development of bovine oocytes treated with ethanol and cytochalasin B after in vitro maturation. *Mol Reprod Dev* 1992; 33: 357-62.
  11. Park JI, Yoshida I, Tada T, Takagi N, Takahashi Y, Kanagawa H. Differentiative potential of a mouse parthenogenetic embryonic stem cell line revealed by embryoid body formation in vitro. *Jpn J Vet Res* 1998; 46: 19-28.
  12. Cibelli JB, Grant KA, Chapman KB, Cunniff K, Worst T, Green HL, Walker SJ, et al. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. *Science* 2002; 295: 819.
  13. 김은영, 남화경, 이금실, 박세영, 박은미, 윤지연, 허영태, 조현정, 박세필, 정길생, 임진호. 동결-융해된 인간 배반포기배 유래의 배아줄기세포 배양. *Kor J Fertil Steril* 2001; 28: 33-40.
  14. Trounstein A. The genesis of embryonic stem cells. *Nat Biotech* 2002; 20: 237-8.