

## 생쥐 생식줄기세포의 체외 분리 및 증식

김수경·김제성<sup>†</sup>

포천중문의과대학교 생명과학전문대학원 분자발생학전공

### *In Vitro* Isolation and Proliferation of Mouse Male Germ-Line Stem Cells

S. K. Kim and K. S. Kim<sup>†</sup>

*Division of Molecular Developmental Biology,  
Pochon CHA University, Graduate School of Life Science and Biotechnology*

#### SUMMARY

Spermatogenesis, the process by which the male germ-line stem cells(GSCs; type A spermatogonia) divide and differentiate to produce the mature spermatozoa, occurs in the seminiferous tubules of the testis. The GSCs proliferate actively to produce two types of cells: other GSCs and differentiating spermatogonia. GSCs have unipotency, devoted solely to the generation of sperm. The function of GSCs has broad implications for development, disease, and evolution. Spermatogenesis is fundamental for propagation of species and the defects of this system can result in infertility or disease. The ability to identify, isolate, culture, and alter GSCs will allow powerful new approaches in animal transgenesis and human gene therapy relating to infertility. Until recently, research on stem cells in the testis has been limited because of technical difficulties in isolating and identifying these cell populations. Here, we were trying to find out optimal conditions for in vitro culture of GSCs for identifying and isolating GSCs. We collected mouse GSCs from 3-days old mouse by two-step enzyme digestion method. GSCs were plated and grown on mouse embryonic fibroblasts in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 15% fetal bovine serum, 10 mM 2-mercaptoethanol, 1% non-essential amino acids, 1 ng/ml bFGF, 10  $\mu$ M forskolin, 1500 U/ml human recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). Over a period 3~5 days, GSCs gave rise to large multicellular colonies resembling those of mouse pluripotent stem cells. After 5th passages, cells within the colonies continued to be alkaline phosphatase and Oct-4 positive and tested positive against a panel of two immunological markers(Integrin  $\alpha$ 6 and Integrin  $\beta$ 1) that have been recognized generally to characterize GSCs. SSEA-1, SSEA-3, and SSEA-4 also showed positive signals. Based on our data, these GSCs-derived cultures meet the criteria for GSCs itself and even other pluripotent stem cells. We reported here the establishment of in vitro cultures from mouse male GSCs.

(Key words : germ-line stem cells, isolation, proliferation, culture)

---

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (R01-2001-000-00144-0)의 학술연구비 지원에 의해 수행되었음.

<sup>†</sup> Correspondence : E-mail : ks66kim@chamc.co.kr

## 서 론

정자발생과정(spermatogenesis)은 줄기세포 증식과 분화의 전과정을 보여주는 전형적인 줄기세포 시스템이다. 수컷 포유류에서 성적으로 활동이 가능한 동안 정자를 계속해서 생산할 수 있는 것은 생식줄기세포(germ-line stem cells; GSCs)의 존재 때문이다(Fig. 1).

GSCs는 현재까지 알려진 바로는 분화를 통해 정자만 만들 수 있는 단일분화능을 가지고 있다. 생식줄기세포는 성숙한 정자의 생성과 줄기세포의 자가 증식 능력 사이에서 균형을 유지해야만 정상적인 정자발생과정을 유지할 수 있다. 생식줄기세포는 다른 줄기 세포들과 유사한 점이 많다. 정조세포(Spermatogonia)는 그 수가 적고 고환 내에 지지세포 사이의 안전한 곳에 휴지 상태로 존재하며, 지지세포 등 외부 신호와의 교류에 의해 증식 및 분화가 조절된다. 조혈줄기세포와 마찬가지로 생식줄기세포도 이식하면 생식줄기세포의 증식 및

분화에 의해 완전한 생식시스템의 재생이 가능하다(Brinster 등, 1994; Brinster 등, 2002).

생식줄기세포의 기능은 발생, 질병 및 진화 등과 광범위하게 연관되어 있으며, 정자 발생과정은 종 번식의 근본이다. 생식줄기세포를 체외에서 분리 및 배양하여 증식시킬 수 있다면 이로부터 남성불임 및 유전 질병과 관련된 유전자치료를 근본적으로 해결할 수 있는 방안을 제시할 수 있으며, 또한 형질전환 동물을 보다 효과적으로 생산할 수 있는 길도 열 수 있을 것으로 생각된다(Parks 등, 2003). 생식줄기세포는 우리 신체에 존재하는 모든 줄기세포를 연구하는데 좋은 실험적 대상이 될 수 있으며, 정자발생과정은 여러 가지 유용한 방법으로 많은 연구가 되어 있기 때문에 줄기세포 연구에도 충분히 응용될 수 있다.

그러나 생식줄기세포를 효과적으로 체외에서 분리하여 증식시킬 수 있는 방법이 구체적으로 제시되어 있지 않은 상황이다. 본 연구에서는 생쥐의 생식 줄기세포를 체외 배양을 통해 분리한 후 증식시킨 후 그 이용 가능성을 조사해 보았다.

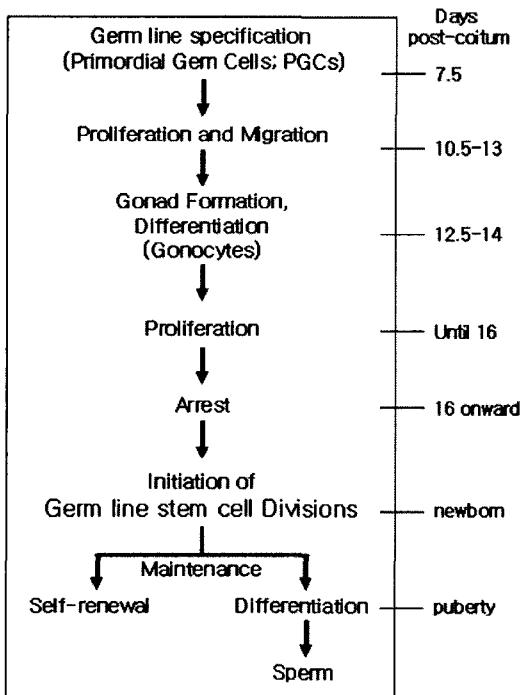


Fig. 1. Specification and initiation of male germ-line stem cell divisions.

## 재료 및 방법

### 1. 수컷 생쥐 생식줄기세포의 분리.

본 실험에 사용된 수컷 ICR 생쥐, 생후 3~5일령은 (주)대한바이오링크에서 구입하였다. 수컷 ICR 생후 3~5일령에서 생식줄기세포(germ-line stem cells)를 분리하기 위해 두 단계의 효소 처리 과정을 거쳤다(Ogawa 등, 1997). 생쥐로부터 고환을 적출하여 PBS로 옮겨 세척한 후 백막을 제거하였다. 백막이 제거된 고환은 세정관이 드러나게 되는데, 이것들을 모아 1% Collagenase(Sigma), 1% Hyaluronidase(Sigma) 농도의 배양액에 옮긴 후 15분 동안 37°C shaking water bath에서 배양하였다. PBS를 첨가 후 1,500rpm에서 4분 동안 원심분리하였다. 상층액을 제거한 후 pellet에 0.25% Trypsin(Sigma)을 넣고 15분간 37°C shaking water bath에서 배양하였다. 배양 후 trypsin반응을 억제하기 위하여 배양액[DMEM(GIBCO), 10% FBS(Hyclone), 1% Penicillin streptomycin(GIBCO)]을 첨가한 후 1,500rpm에서 4분간 원심분리하였다. 상

층액을 제거하고, pellet을 배양액을 이용하여 재부유하고 70  $\mu\text{m}$  filter로 거른 후, 1,500rpm에서 4분간 원심분리한 후 상층액을 제거하고 남은 pellet을 배양에 이용하였다.

## 2. 생식 줄기세포의 체외 배양

생식줄기세포는 0.2% gelatin을 코팅한 배양접시에 부착시켜 배양을 실시하였다. DMEM(GIBCO)에 15% fetal bovine serum(HyClone), 1% non essential amino acids(GIBCO), 0.1mM 2-mercaptoethanol, 1500 units mouse recombinant leukemia inhibitory factor(ESGRO, Chemicon), 5ng/ml of human basic FGF(R&D) 그리고 10  $\mu\text{M}$  forskolin(Sigma)을 첨가한 배양액을 이용하였으며, 배양은 5% CO<sub>2</sub>, 95% 습도가 유지된 배양기 내에서 실시하였다. 계대배양을 위해 매 5~7일 마다 생성된 생식줄기세포 colony를 0.25% trypsin을 37°C에서 5~7분간 처리한 후 pipetting으로 세포를 배양접시에서 분리하였으며, trypsin반응을 억제하기 위해 serum이 첨가된 배양액을 넣어준 후 원심분리를 1,500rpm 에서 4분간 수행하였다. 상층액은 버리고 생식줄기세포 배양액에 pellet을 재부유시키고 새로운 배양접시로 옮겨 배양을 실시하였다.

## 3. 생식줄기세포 표지인자 발현 확인

생식줄기세포 표지인자로 알려져 있는 alkaline phosphatase(AP) 의 발현 여부를 알아보기 위하여 생식줄기세포 colony를 3.7% paraformaldehyde 고정하였고, naphthol / FRV-alkaline AP substrate(Sigma)로 염색한 후 염색 여부를 확인하였다.

배아줄기세포(embryonic stem cells) 및 배아생식줄기세포(embryonic germ cell)의 표지인자로 알려져 있는 Stage Specific Embryonic Antigen-1, -2, -3 및 생식줄기세포의 표지인자로 알려져 있는 CD49f(Integrin  $\alpha 6$  chain; BD / Pharmingen) 과 CD29(Integrin  $\beta 1$  chain; BD / Pharmingen)의 발현 여부도 immunostaining으로 확인하였다. 생식줄기세포 colony 를 3.7% paraformaldehyde(Dulbecco's PBS)에 고정시킨 후 앞에서 설명한 1차 항체를 1:500 농도로 첨가하여 상온에서 두시간 배양하였다. 2차항체로는 biotinylated anti-mouse

IgM secondary antibody, ABC-AP(Vector Lab. Inc.)을 사용했다. 발색반응을 보기 위해서 AP reaction buffer에 BCIP(Sigma) and NBT(Sigma) mixture를 넣어서 발색을 확인하였다.

## 4. In situ hybridization

생식줄기세포 colony를 MEMFA(0.1M MOPS, pH 7.5, 2mM EDTA, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 3.7% formaldehyde)로 상온에서 20분 동안 고정하였다. 구체적인 in situ hybridization방법은 Song 등(1999)이 했던 순서를 따랐으며, hybridization은 55°C에서 수행하였다.

## 결 과

본 실험에서는 ICR의 고환으로부터 두 단계 효소처리를 거쳐 얻은 생식줄기세포를 배아줄기세포와 유사한 조성의 배양액으로 배양하였다. Fig. 2의 A와 B는 생식줄기세포 배양 6시간 후에 생식줄기세포 여부를 확인하기 위하여 AP staining을 실시한 것이다. Fig. 2의 A에서 보듯이 AP를 강하게 발현하는 세포들이 배양접시에 부착하여 응집하는 것을 관찰하였고, 이를 확대해서 보면 B와 같이 다수의 세포들이 군집을 이루어 증식함을 확인할 수 있었다. Fig. 2의 C와 D는 배양을 시작한 다음 날에 계대를 넘기고 2일 후에 찍은 사진이다. C에서는 100 배율로 확인하였는데, 섬유아세포(fibroblast)와 유사한 세포들이 바닥에 부착하여 있고 그 위에 여러 층으로 이루어진 세포들의 군집(colonies)들을 볼 수 있었다. 바닥에 부착한 세포들은 Sertoli cell이며, 그 위 군집들은 생식줄기세포라고 추정하였다. 생식줄기세포라고 생각되는 군집 하나를 200배율로 확대하여 보았을 때, 하나의 군집이 여러 개의 세포들로 뭉쳐져 있는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2 D). Fig. 3의 A에서 보듯이 SSEA-1,-3,-4가 생식줄기세포 colony에서만 발현되는 것을 확인하였고, 생식줄기세포의 표지인자로서 알려져 있는 Integrin  $\alpha 6$ , Integrin  $\beta 1$  도 군집에서만 발현한 것으로 관찰되어(Fig. 3 D, E) 배양된 군집을 이루는 세포들이 생식줄기세포임을 확인하였다. 줄기세포의 또 다른 표지인자로 널리

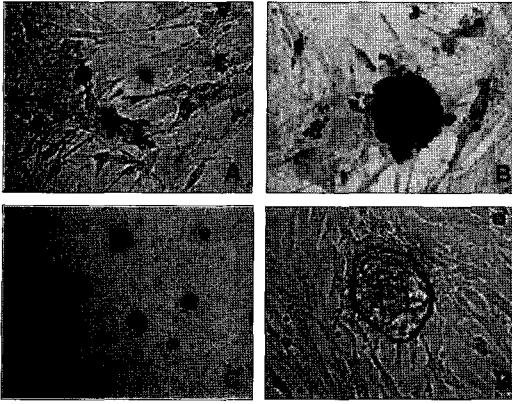


Fig. 2. The typical morphology of male germ-line stem cell colonies and expression of AP staining on colonies of male germ-line stem cells. A: Germ-line stem cells expressed AP. B: Small colony of male germ-line stem cell was stained by AP. A and B were pictured after 6hr *in vitro* culture. C: The colonies of male germ-line stem cells were on Sertoli cells (100X). D: The colony was composed of many male germ-line stem cells. This picture was enlarged from A(200X). C and D were pictured after 3 days *in vitro* culture.

알려진 Oct4도 *in situ* hybridization로 생식줄기세포에서 발현함을 확인하였다(Fig. 3 F). 이상에서 살펴본 바와 같이 생쥐 생식줄기세포를 효과적으로 분리하여 단기간 증식시킬 수 있는 조건을 확립할 수 있었다. 그러나 생식줄기세포로 증명된 세포들은 효소처리에 의해 계대를 6~7회 정도 거치면서 생식줄기세포가 모인 군집 내부가 검게 변하는 세포의 퇴행성 변화를 관찰할 수 있었으며, 또한 증식능력도 떨어지고 군집을 형성하는 비율도 줄어들어 점점 건강한 상태의 생식줄기세포의 군집을 유지할 수 없게 되었다.

## 고 찰

생식줄기세포는 잘 알려져 있는 성체줄기세포(adult stem cells)의 일종이며 자가증식과 분화를 통해 정자를 생산할 수 있는 능력을 가졌다. Fig. 1은 생쥐의 생식세포의 발생 및 분화과정을 그림으로 정리한 것인데, 원시생식세포(primordial germ cell)는 7.5dpc에 epiblast에서 출현하여 증식, 이동하여 genital ridge에 도달한 후 gonad를 형성하게 된다(12.5dpc). 그 후 gonocyte는 증식을 멈추게 되

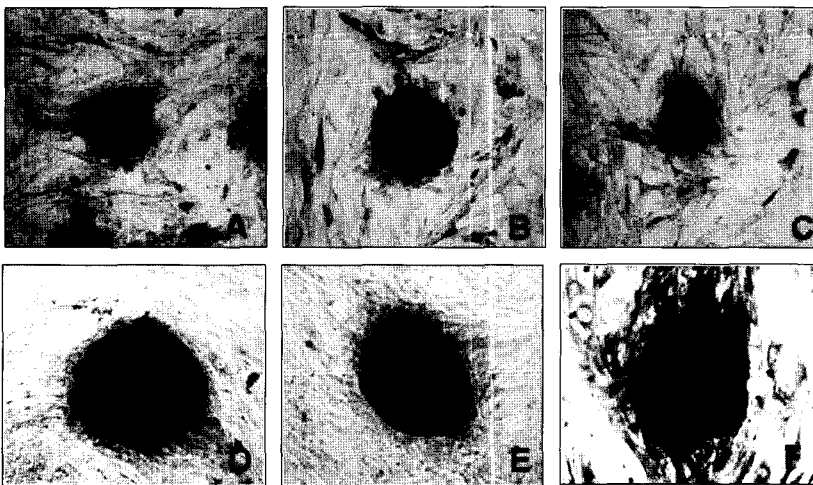


Fig. 3. Expressions of SSEA-1,-3,-4, Integrin  $\alpha 6$ ,  $\beta 1$  and Oct4 on male germ-line stem cells. A: Expression of SSEA-1 on male germ-line stem cells. B: Expression of SSEA-3 on male germ-line stem cells. C: Expression of SSEA-4 on male germ-line stem cells. D: Expression of Integrin  $\alpha 6$  on male germ-line stem cells. E: Expression of Integrin  $\beta 1$  on male germ-line stem cells. F: Expression of Oct4 on male germ-line stem cells.

고(16dpc), 출생 후 정조세포(spermatogonia)로 분화하게 된다. 정조세포는 자가증식과 분화를 통해 puberty 이후 계속 정자를 생산할 수 있게 되는 것이다(Kierszenbaum 등, 1994; Wylie, 1994).

이러한 생식 줄기세포는 줄기세포의 자가증식과 분화와 관련된 인자의 탐색 및 기전 연구에 이용되어 왔으며 인간 배아줄기세포 (embryonic stem cells; Thomson 등, 1998) 및 인간 배아생식줄기세포(embryonic germ cells; Shambloott 등, 1998)가 만들어진 후 줄기세포의 특성을 분석하기 위한 연구의 주요한 연구 분야로 진행되고 있다(Donovan 등, 2001). 또한 인간 남성의 생식세포 증식 및 분화 결여에 의한 불임의 치료와 동물에서 정자를 이용한 형질전환동물의 생산 연구 등 그 이용 가능성이 점차 확대 및 구체화되고 있다(Nagano 등, 2001; Hammer 등, 2002). 그러나 생식배아줄기세포의 체외 분리 및 증식은 여전히 어려운 사안으로 남아 있다.

Feng 등(2003)은 생쥐 생식줄기세포에 TERT 유전자를 도입하여 불사화 시킨 뒤 체외에서 장기간 증식 및 분화유도를 통하여 정자세포(round spermatid)의 생산이 가능하다고 보고하였다. 이는 생물학의 측면에서는 큰 진보임에 틀림이 없으나 불사화된 세포로부터 생산된 세포로부터 생산된 정자세포의 임상 이용은 안전성의 측면에서 많은 위험을 내포하고 있다. Kanatsu-shinohara 등(2003)은 특수하게 조절된 배양액을 이용하여 생식줄기세포의 장기간 체외배양이 가능하다고 하였으며, 이를 고환 내에 이식하여 정자로 분화를 시킬 수 있었다고 보고하였다. 본 연구에서는 생후 3~5일령의 생쥐 고환을 채취한 후 효소를 이용하여 생식줄기세포와 미성숙 Sertoli 세포의 혼합 부유액을 준비한 후 배아줄기세포 증식에 이용되는 단순배양액을 이용하여 생식줄기세포의 분리 및 증식을 시도하여 보았다. 배양 6시간 후의 세포들은 AP 발현을 나타내었으며 배양 2~3일째에 생식줄기세포는 생쥐 배아줄기세포 그리고 생쥐 배아생식줄기세포와 매우 유사한 형태의 colony를 형성하여 증식하였다(Fig. 2). 배양 시 매 5~7일째에 효소처리를 통하여 단일세포로 분리한 후 계대배양을 실시하였고, 계대 후 세포는 다시 colony를 형성하여 증식

하는 것을 관찰할 수 있었다. 배양을 시작한 후 다음 날 계대를 넘기면 생식줄기세포가 더 많은 수의 건강한 군집을 이루는 경향이 있었다. 배양한 세포 colony는 SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4를 발현하였으며(Fig. 3 A, B, C), 생식줄기세포의 표지인자로 알려진 *integrin  $\alpha 6$*  과 *integrin  $\beta 1$*  (Shinohara 등, 1999)도 발현하였다(Fig. 3 D, E). 그리고 Fig. 3의 F에서 보듯이 줄기세포의 중요한 전사요소 중 하나인 Oct-3/4(Scholer 등, 1990; Pesce 등, 1998; Kirchof 등, 2000; Pesce 등, 2001)도 발현을 나타내어 생쥐 배아줄기세포(Evans 그리고 Kaufman, 1981)와 생쥐 생식줄기세포(Matsui 등, 1992)로서의 특징을 모두 갖고 있음을 확인하였다.

본 연구진은 분리 및 증식된 생식줄기세포를 이용하여 체외분화를 유도하였으며 이를 통하여 정자세포를 생산할 수 있었다(Lee 등, 2003). 이전까지의 연구에서는 고환에 존재하는 생식줄기세포만을 분리할 수 있는 방법이 없었으나 본 연구에서는 체외배양을 통해 효과적으로 생식줄기세포를 분리할 수 있는 방법을 개발하였다. 미성숙 Sertoli 세포는 배양접시에 부착하여 fibroblast 와 유사한 모양으로 증식하였으며, 이 세포가 생식줄기세포의 증식에 미치는 영향에 관한 연구는 더 진행되어야 할 것으로 생각된다.

생식줄기세포의 증식은 평균 5~6 계대 정도까지 가능하였으며, 이 후에는 세포에 퇴행성 변화가 시작되어 사멸하는 것으로 생각된다. 세포의 장기간 증식을 유도할 수 있는 새로운 배양액 및 배양 조건의 개발이 필요할 것으로 생각된다.

## 적 요

1. 생쥐 고환으로부터 얻은 세포를 배양하여 군집을 형성하는 것을 관찰할 수 있었으며, AP, SSEA-1, -3, -4과 *Integrin  $\alpha 6$* ,  $\beta 1$  및 Oct4의 발현을 확인하였다.
2. 생쥐 생식줄기세포를 3-5일정도 배양하게 되면, 여러 층으로 이루어진 군집을 이루게 되는데 이는 생쥐 배아줄기세포나 배아생식줄기세포의 형태와 같은 것이었다.
3. 생쥐 생식줄기세포를 체외에서 효과적으로

분리, 배양할 수 있는 조건을 확립하였다.

### 참고문헌

- Brinster RL and Zimmermann JW. 1994. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 22: 11298-11289.
- Brinster RL. 2002. Germline stem cell transplantation and transgenesis. Science, 296:2174-2176.
- Donovan PJ and Geahart J. 2001. The end of the beginning for pluripotent stem cells. Nature, 414:92-97.
- Evans MJ and Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature, 292:154-156.
- Feng L, Chen Y, Dettin L, Pera RAR, Herr JC, Goldberg E and Dym M. 2002. Generation and in vitro differentiation of a spermatogonial cell line. Science, 297:392-395.
- Hammer RE and Garbers DL. 2002. Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ-line stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 99:14931-14936.
- Lee DR, Kim SK, Yang YH, Yoon TG, Cha KY and Kim KS. 2003. Establishment of mouse male germ line stem cells and *in vitro* differentiation to haploid cells. 59<sup>th</sup> Annual meeting of the American Society for Reproductive Medicine, oral presentation.
- Matsui Y, Zsebo K and Hogan BLM. 1992. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. Cell, 70:841-847.
- Nagano M, Brinster CJ, Orwig KE, Ryu B-Y, Avarbock MR and Brinster RL. 2001. Transgenic mice produced by retroviral transduction of male germ-line stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 98:13090-13095.
- Ogawa T, Arechaga JM, Avarbock MR and Brinster RL. 1997. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules. Int. J. Dev. Biol., 41:111-22.
- Parks JE, Lee DR, Hwang S and Kaproth MT. 2003. Prospects for spermatogenesis *in vitro*. Theriogenology, 59:73-86.
- Pesce M, Gross MK and Scholer HR. 1998. In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. BioEssays, 20:722-732.
- Pesce M and Scholer HR. 2001. Oct-4: Gatekeeper in the Beginnings of Mammalian Development. Stem Cells, 19:271-278.
- Scholer HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K and Gruss P. 1990. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. Nature, 344: 435-439.
- Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR and Geahart JD. 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 95:13726-13731.
- Shinohara T, Avarbock MR and Brinster RL. 1999.  $\beta 1$ - and  $\alpha 6$ -integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96:5504-5509.
- Song J, Oh SP, Schrewe H, Nomura M, Lei H, Okano M, Gridley T and Li E. 1999. The type II activin receptors are essential for egg cylinder growth, gastrulation, and rostral head development in mice. Dev. Biol., 213:157-69.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS and Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science, 282: 1145-7.
- Wylie C. 1999. Germ cells. Cell, 96:165-174.

---

(접수일: 2003. 11. 23/ 채택일: 2003. 12. 20)