

인간 배아줄기세포로부터 분화된 세포에서 MACS 방법을 이용하여 분리한 세포의 특성에 대한 연구

제일병원 생식생물학 및 불임연구실¹, 성균관대학교 의과대학 산부인과학교실²

조재원¹ · 임천규¹ · 신미라¹ · 방경희¹ · 궁미경² · 전진현¹

Characterization of MACS Isolated Cells from Differentiated Human ES Cells

Jae Won Cho¹, Chun Kyu Lim¹, Mi Ra Shin¹, Kyoung Hee Bang¹, Mi Kyoung Koong², Jin Hyun Jun¹

¹Laboratory of Reproductive Biology & Infertility, Cheil General Hospital

²Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea

Objective: Human embryonic stem (ES) cells have a great potential in regenerative medicine and tissue engineering. The human ES cells could be differentiated into specific cell types by treatments of growth factors and alterations of gene expressions. However, the efficacy of guided differentiation and isolation of specific cells are still low. In this study, we characterized isolated cells from differentiated human ES cells by magnetic activated cell sorting (MACS) system using specific antibodies to cell surface markers.

Methods: The undifferentiated hES cells (Miz-hESC4) were sub-cultured by mechanical isolation of colonies and embryoid bodies were spontaneously differentiated with DMEM containing 10% FBS for 2 weeks. The differentiated cells were isolated to positive and negative cells with MACS system using CD34, human epithelial antigen (HEA) and human fibroblast (HFB) antibodies, respectively. Observation of morphological changes and analysis of marker genes expression were performed during further culture of MACS isolated cells for 4 weeks.

Results: Morphology of the CD34 positive cells was firstly round, and then it was changed to small polygonal shape after further culture. The HEA positive cells showed large polygonal, and the HFB positive spindle shape. In RT-PCR analysis of marker genes, the CD34 and HFB positive cells expressed endodermal and mesodermal genes, and HEA positive cells expressed ectodermal genes such as NESTIN and NF68KD. The marker genes expression pattern of CD34 positive cells changed during the extension of culture time.

Conclusion: Our results showed the possibility of successful isolation of specific cells by MACS system from undirected differentiated human ES cells. Thus, MACS system and marker antibodies for specific cell types might be useful for guided differentiation and isolation of specific cells from human ES cells.

Key Words: Human embryonic stem cells, Differentiation, MACS system, Antibody

배아줄기세포는 착상전 포배기 배아의 내세포괴 (inner cell mass)로부터 유래되며, 체외 배양 시 영속적으로 미분화 상태를 유지할 수 있고 다양한 세포로 분화할 수 있는 다분화능 (pluripotency)을 가진 세포로 알려져 있다.^{1~4} 이러한 특성 때문에 배아줄

기세포는 세포치료 및 조직공학 등 광범위한 분야에 있어서 이용 가능성이 매우 높다. 그러나, 배아줄기세포를 효과적으로 임상에 적용하기 위해서는 몇 가지 난관들을 극복해야만 한다. 주된 장애요인으로 이식이 가능한 특정 세포로의 유도 분화 효율

주관책임자: 전진현, 우) 100-380 서울특별시 중구 목정동 1-19, 제일병원 생식생물학 및 불임연구실

Tel: (02) 2000-7592, Fax: (02) 2265-5621, e-mail: junjh55@hanmail.net

*본 연구는 과학기술부 21세기 프론티어 연구개발 사업단인 세포응용연구사업단의 연구비 지원 (SC12022)으로 수행되었음.

이 낮고, 특정 세포를 순수하게 분리하는 것이 어렵다는 문제점을 들 수 있다.

특정 세포로의 분화 효율을 향상시키기 위해 여러 가지 growth factors, cytokines 등을 처리하거나 분화 관련 유전자의 발현을 조절하는 방법에 대한 연구들이 다양하게 진행되고 있다. 현재까지는 일부 제한된 세포로의 분화만이 이루어지고 있는 실정이지만, 신경세포, 심근세포, 인슐린 분비세포, 혈액세포, 내피세포 등으로의 유도 분화가 성공하였고, 최근에는 생식세포로의 분화까지도 가능한 것으로 보고되고 있다.^{5~11} 그러나 아직까지도 인간 배아줄기세포를 대상으로 진행된 연구들에서 그 분화 효율을 향상시키기 위한 노력이 계속되고 있다.

이렇게 유도 분화된 특정 세포를 순수 분리하기 위해 FACS (fluorescence-activated cell sorting)나 MACS (magnetic activated cell sorting) 방법이 사용되고 있으나, 분리하고자 하는 세포에 대한 특이 항체가 존재해야만 가능하다. FACS 방법은 형광물질이 부착된 항체를 이용하여 분리하는 방법으로 분리 특이성은 양호하나 분리 세포에 상해를 줄 가능성이 있고 고가의 장비를 이용해야 되는 단점이 있다. 반면에 MACS 방법은 자성을 지닌 bead가 부착된 항

체를 이용하여 경제적으로 특정 세포를 분리할 수 있다. MACS 방법을 사용하게 되면 대략 1시간 안에 10^{11} 개의 세포를 분리할 수 있으며, 극히 적은 수의 세포도 분리할 수 있는 장점이 있다.

본 연구에서는 이러한 MACS 방법을 이용하여 비특이적으로 분화된 인간 배아줄기세포에서 특정 세포들을 분리하고, 이들을 배양하는 과정에서 형태학적 변화와 특이 유전자의 발현 양상을 분석하였다.

연구대상 및 방법

1. 인간 배아줄기세포 계대 배양, 배아체 형성 및 분화

본 실험에 사용된 인간 배아줄기세포 (Miz-hESC4 cell line)는 CF1 mouse embryonic fibroblast (MEF) feeder (Figure 1A) 위에서 20% serum replacement (Cat. No. 10828-028, Gibco, USA)와 4 ng/ml basic FGF (Cat. No. 13256-029, Invitogen, Carlsbad, CA)가 첨가된 DMEM/F12 (Cat. No. 11330-032, Gibco, USA)을 기본 배양액으로 사용하였다. 계대 배양은 매 5~6일 간격으로 micro-tip을 이용한 물리적인 방법으로 미분화된 colony를 분리하여 실시하였다 (Figure 1B).

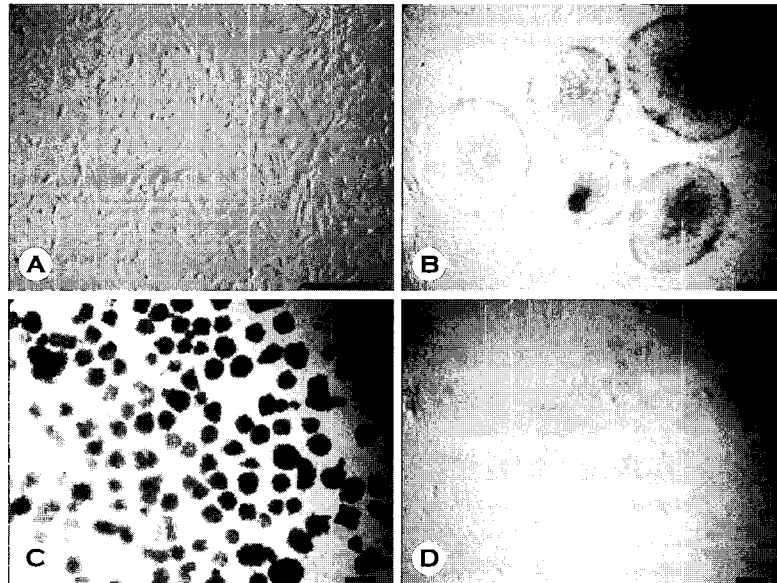


Figure 1. Microphotographs of cultured cells. (A) CF1 mouse embryonic fibroblasts (feeder cells), (B) Undifferentiated human ES cells on feeder cells, (C) Embryoid bodies (EBs) of human ES cells. (D) Spontaneously differentiated human ES cells after 2 weeks of EBs culture. Scale bars = 50 μ m.

배아줄기세포의 배아체를 형성하기 위해 적당한 크기로 나눈 colony를 bacteriological dish (#1007, Falcon, USA)에서 8일 동안 부유 배양하였다. 배아체 형성 유도에 사용한 배양액은 basic FGF를 첨가하지 않은 기본 배양액을 사용하였고, 2일 간격으로 배양액을 교환해 주었다 (Figure 1C). 부유 배양을 통해 형성된 배아체는 0.1% gelatin (Sigma, USA) 처리된 75 Easy culture flask (#156499, Nunc, Denmark)에서 10% FBS (Gibco, USA)가 첨가된 DMEM 배양액으로 2주간 배양하여 비특이적으로 분화시켰다 (Figure 1D).

2. MACS 방법을 이용한 세포 분리

배아체 형성 후 2주간 비특이적으로 분화된 세포를 CD34 (Direct CD34 Progenitor Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec, Germany), human epithelial antigen (HEA, Miltenyi Biotec, Germany), human anti-fibroblast (HFB, Miltenyi Biotec, Germany)에 대한 항체를 이용하여 MACS 방법으로 분리하였다. 비특이적으로 분화된 세포들을 PBS로 1회 세척한 후 4분간 trypsin-EDTA (0.25%/0.02%)를 처리하여 단일 세포로 분리, 수확하였다. 각각의 항체를 MACS buffer를 이용하여 1:5로 희석한 후, CD34와 HEA 항체는 30분간 냉장 상태로 처리하였으며, HFB 항체는 30분간 상온에서 처리하였다. 항체 처리 후 수확한 세포들을 양성 세포와 음성 세포로 분리하기 위하여, 자성이 있는 magnetic body에 mini-column을 설치한 후 3 ml의 MACS buffer (0.5% BSA, 2 mM EDTA in PBS pH 7.2)를 관류시켜 전세척 (pre-washing)을 실시하였다. 전세척 후 각각의 항체가 처리된 시료를 1 ml의 MACS buffer에 재부유시켜 mini-column에 충전하고, 3 ml의 MACS buffer를 3회 동안 관류시켜 항체가 부착되지 않은 음성 세포를 분리하였다. 음성 세포를 분리한 후 magnetic body에서 mini-column을 제거하고 5 ml의 MACS buffer를 2회에 걸쳐 관류시켜 양성 세포를 분리하였다. 분리한 양성 세포와 음성 세포를 농축하기 위해 MACS buffer를 이용하여 1회 원심분리 한 후 상층액을 제거하였다.

3. MACS 방법으로 분리한 세포의 배양

분리된 세포는 각각의 항체에 대한 양성과 음성 세포로 구분하여 4주 동안 DMEM-10% FBS 배양

액으로 추가 배양을 실시하였다. MACS 방법으로 분리된 각각의 항체에 대한 양성 또는 음성 세포의 배양은 0.1% gelatin이 처리된 75 Easy culture flask (#156499, Nunc, Denmark) 또는 Multidish 6 well (#140675, Nunc, Denmark)에서 배양하였다. 세포의 수가 충분한 HFA 양성 세포는 75 Easy flask에서 배양을 실시하였고, 세포 수가 적은 CD34 양성 세포와 HEA 양성 세포는 Multidish 6 well에서 배양을 실시하였다.

4. MACS 분리 배양 세포의 삼배엽성 표지 유전자 발현 양상 분석

MACS 방법을 통해 분리, 배양된 세포들의 유전자 발현 양상을 비교하기 위하여 삼배엽성 표지 유전자에 대한 RT-PCR을 실시하였다. RNeasy mini kit 250 (Qiagen, USA)를 이용하여 배아줄기세포, 배아체, MACS 방법을 통해 분리 배양된 양성 세포와 음성 세포의 total RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 MMLV (Promega, USA), 5X MMLV RT buffer, Rnasin (Promega, USA), 10 mM dNTP (Boehringer Mannheim, Germany), 10 pM Oligo-dT (Boehringer Mannheim, Germany), 3차 증류수 등을 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 역전사 (reverse transcription) 반응을 시행하였다. 역전사 반응 후 cDNA, 10X PCR buffer, 5 U/μl Taq polymerase (Boehringer Mannheim, Germany), 2 mM dNTP (Boehringer Mannheim, Germany), 3차 증류수와 각각의 유전자에 대한 primer set (Table 1)를 혼합하여 PCR을 수행하였다. 미분화 표지 유전자로는 OCT4를 사용하였으며, 내배엽성 표지 유전자로는 HNF4α, ALBUMIN, α-FETOPROTEIN, GATA4를, 중배엽성 표지 유전자로는 LMO2, FLK1, ENOLASE, GATA2, RENIN을, 외배엽성 표지 유전자로는 NESTIN, NF68KD를 사용하였다.

결 과

1. 비특이적으로 분화된 인간 배아줄기세포의 형태학적 변화

미분화 상태의 인간 배아줄기세포를 부유 배양 방법을 이용해 배아체 형성을 유도하는 과정에서, 배아체 유도 3일 후 부터는 점차적으로 밀집된 구형

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers and PCR conditions

Genes	Forward primer Reverse primer	Annealing Tm (°C)	Product Size (bp)
GAPDH	5'-AGCCACATCGCTCAGACACC-3' 5'-GTACTCAGCGCCAGCATCG-3'	60°C	302
OCT4	5'-CGTGAAGCTGGAGAAGGAGAAGCTG-3' 5'-AAGGGCCGCAGCTTACACATGTTTC-3'	62°C	246
HNF4a	5'-CTGCTCGGAGCCACCAAGAGATCCATG-3' 5'-ATCATCTGCCACGTGATGCTCTGCA-3'	60°C	371
ALBUMIN	5'-CTTCCTGGGCATGTTTTTGT-3' 5'-GGTTCAGGACCACGGATAGA-3'	62°C	401
α-FETOPROTEIN	5'-GCGTTTCTCGTTGCTTAC-3' 5'-AAGTGTCCGATAATAATGTCAG-3'	60°C	164
GATA4	5'-GACGGGTCACTATCTGTGCAAC-3' 5'-AGACATCGCACTGACTGAGAAC-3'	62°C	475
LMO2	5'-GTACTGGCAGGACTG-3' 5'-GTCATCTCATAGGCACGAATC-3'	58°C	177
FLK1	5'-ACACTGTCATCCTTACCAATCC-3' 5'-CGCACTCTTCTCCAAGT-3'	58°C	213
ENOLASE	5'-GTTCAATGTCATCAATGGCG-3' 5'-GTGAACTTCTGCCAAGCTCC-3'	60°C	477
GATA2	5'-GTCTCCAGCCTCATCTTCC-3' 5'-GACTGCCACTTTCCATCTTC-3'	60°C	110
RENIN	5'-GCTTTCTCAGCCAGGACATC-3' 5'-TATTCTTTGCCTCCCAGGTG-3'	62°C	562
NESTIN	5'-GAGAGGGAGGACAAAGTCCC-3' 5'-TCCCTCAGAGACTAGCGGCAT-3'	62°C	198
NF68KD	5'-ACGCTGAGGAATGGTTCAAG-3' 5'-TAGACGCCTCAATGGTTTCC-3'	65°C	561

으로 관찰되었으며, 배아체 유도 8일 후에는 일부의 배아체에서 포낭 (cyst) 형성을 관찰할 수 있었다. 이러한 배아체를 수확하여 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액에서 비특이적으로 분화시켰을 때 각각의 배아체가 배양용기의 바닥에 부착된 후 배아체의 외층부터 서서히 분화되는 양상을 나타내었다. 분화 초기에는 대부분의 세포들이 방추체 형태를 나타내었으며, 배양 1주 후에는 배아체의 내층까지 분화가

진행되었고, 배양 2주 후에는 세포의 수가 많이 증가하고 다양한 형태의 세포들이 관찰되었다.

2. MACS 방법으로 분리한 각각의 항체에 대한 양성 세포의 비율

인간 배아줄기세포를 2주간 비특이적으로 분화시킨 후 CD34, HEA, HFB 항체를 이용하여 MACS 방법으로 세포 분리를 3회 반복하여 실시하였다.

MACS를 실시하기 전 수확된 총 세포 수는 $6.1 \pm 1.1 \times 10^6/\text{ml}$ 였으며, 그 중 HFB 양성 세포는 $2.7 \pm 0.7 \times 10^6/\text{ml}$ 로 44.2%의 비율을 나타내었다. 그러나 CD34와 HEA 양성 세포는 분리된 세포의 수가 극히 적었으며, 총 세포 수의 1% 미만이었다.

3. MACS 방법을 통해 분리한 세포의 형태학적인 특징

분리된 세포의 형태학적인 변화를 관찰한 결과 CD34 양성 세포는 배양 초기에는 작은 구형 (Figure

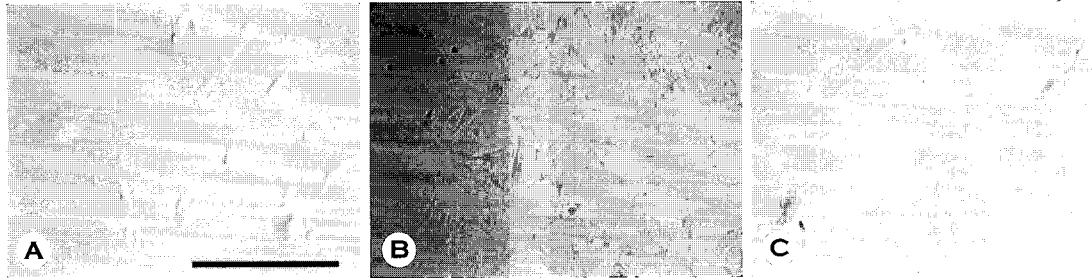


Figure 2. Microphotographs of MACS isolated cells from differentiated human ES cells. (A) CD34 positive cells show small polygonal shape (B) Human fibroblast (HFB) positive cells show typical spindle shape (C) Human epithelial antigen (HEA) positive cells show large polygonal shape. Scale bar = 50 μm .

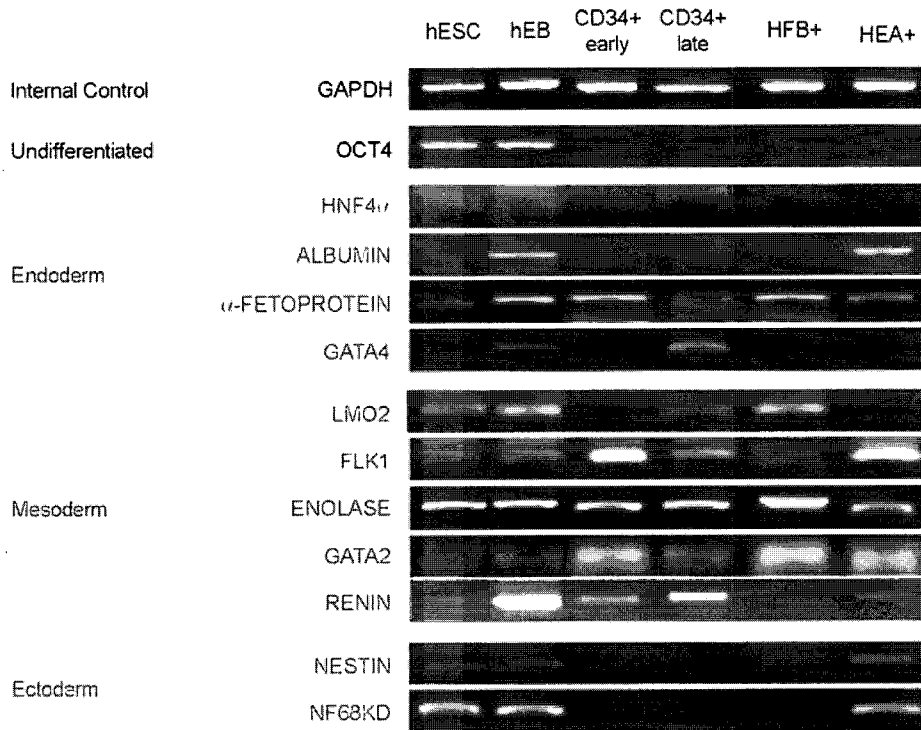


Figure 3. Marker genes expression patterns by RT-PCR in MACS isolated cells from differentiated human ES cells. Antibodies to CD34, human fibroblast (HFB) and human epithelial antigen (HEA) were used for MACS isolation. GAPDH is an internal control and OCT4 an undifferentiated marker gene. Endodermal marker genes are HNF4 α , albumin, α -FETOPROTEIN and GATA4. Mesodermal marker genes are LMO2, FLK1, ENOLASE, GATA2 and RENIN. Ectodermal marker genes are NESTIN and NF68KD.

2A)이었으나, 배양 후기에는 작은 다각형의 세포로 관찰되었다. HEA 양성 세포는 크고 넓적한 다각형의 형태를 나타냈으며 (Figure 2B), HFB 양성 세포는 전형적인 방추체 형태를 띠는 것으로 관찰되었다 (Figure 2C).

4. MACS 방법으로 분리, 배양한 세포의 특이 유전자 발현 양상

특이 유전자 발현 양상을 RT-PCR 방법으로 분석한 결과, CD34 양성 세포들은 배양 초기에 α -FETOPROTEIN, FLK1, ENOLASE, RENIN 유전자를 발현하였으며, 배양기간이 길어짐에 따라 내배엽성 유전자인 α -FETOPROTEIN은 발현되지 않고 새롭게 GATA4와 LMO2의 발현과 FLK1, ENOLASE, RENIN 유전자의 발현을 확인할 수 있었다 (Figure 3). HFB 양성 세포는 α -FETOPROTEIN, LMO2, GATA2, ENOLASE 유전자가 발현되어 이들이 내배엽 및 중배엽 유래의 세포라는 것을 알 수 있었다 (Figure 3). HEA 양성 세포는 특이하게도 내배엽성 유전자인 ALBUMIN이 발현되었으며, 외배엽 유래의 NESTIN, NF68KD가 발현되는 것을 확인함으로써 분리 배양된 HEA 양성 세포들은 내배엽 또는 외배엽 유래의 세포들로 생각된다 (Figure 3).

고 찰

인간 배아줄기세포의 임상적 이용에 있어 특정 세포로의 분화 유도 기술의 개발과 특이 세포의 순수 분리는 필수적이라 할 수 있으나, 아직까지는 그 효율성이 높지 않은 실정이다. 따라서, 배아줄기세포를 특정 세포로 분화시키고, 이들을 분리하여 이식이 가능한 세포를 효과적으로 확보할 수 있는 시스템 개발은 매우 중요한 분야이다. 본 연구에서는 비특이적으로 분화된 인간 배아줄기세포에서 MACS 방법을 이용하여 특정 세포를 분리하여 배양하는 것이 가능함을 보여주었다. 특히 MACS 방법은 경제적으로 세포에 손상을 주지 않고 특정 세포를 분리할 수 있기 때문에 배아줄기세포 연구에서 그 적용 범위가 확대될 것으로 생각된다.

본 실험에서는 미분화 상태의 인간 배아줄기세포를 자연발생적으로 비특이 세포로 분화시킨 후, 여

러 형태의 세포들 중 특정 세포를 분리하여 배양하면서 그들의 형태학적인 변화를 관찰하고 유전자 발현 양상을 분석함으로써 MACS 방법의 효율성을 검증하는데 주안점을 두었다. 현재 배아줄기세포에서 분화된 특정 세포를 분리하는 대표적인 방법으로 FACS 방법과 MACS 방법이 이용되고 있다. Kaufman 등 (2001)은 MACS 방법을 이용하여 분화된 인간 배아줄기세포로부터 hematopoietic progenitor 세포를 효과적으로 분리하여 배양하였다고 보고하였으며,¹² Levenberg 등 (2002)은 FACS 방법으로 혈관내피 (endothelial) 세포를 효율적으로 분리 배양하는데 성공하였다.¹³

Kaufman 등 (2001)은 인간 배아줄기세포를 생쥐 골수 유래의 S17 세포주 또는 난황막 혈관내피 세포주인 C166과 공동 배양하여 분화를 유도한 후, 이들 분화 세포들에 대한 FACS 분석에서 hematopoietic precursor 세포로 생각되는 CD34+/CD38- population이 약 1~2%임을 관찰하였고 이들 세포들의 colony 형성률과 특이 유전자 발현 양상을 확인하였다.¹² 본 연구에서도 이와 유사하게 비특이적으로 분화시킨 인간 배아줄기세포에서 MACS 방법으로 약 1% 정도의 CD34 양성 세포를 분리할 수 있었으나, 특이 유전자의 발현 양상은 Kaufman 등의 연구와는 다소 차이가 있었다. 이러한 이유는 초기 분화 조건의 상이함에서 기인한 것으로 생각된다. 또한, 본 연구에서 CD34 양성 세포의 유전자 발현 양상이 초기와 후기에 변화되는 것은 사용한 배양액이 10% FBS를 포함하고 있기 때문에 계속해서 세포의 분화 또는 변화가 진행되는 것과 관련이 있을 것으로 생각된다. 이러한 CD34 양성 세포의 배양기간에 따른 유전자 발현 양상의 변화는 hematopoietic lineage 세포의 분화 과정에서 나타나는 유전자 발현 양상과 유사하였다.¹²

근래에 보고된 연구 중에서 David 등 (2005)은 세포 표면 항원으로 이용할 수 있는 인간 CD4 유전자를 *Xenopus* 난자에 주입하여, CD4 유전자가 발현되는 특정 세포들을 MACS 방법으로 효율적으로 분리할 수 있음을 실험적으로 증명한 바 있다.¹⁴ 따라서, 유용한 세포 표면 항원에 대한 항체와 이를 이용한 MACS 방법으로 배아줄기세포에서 유도 분화된 특정 세포를 선택적으로 순수 분리할 수 있으며,

이는 향후 배아줄기세포를 이용한 세포치료에서 매우 유용한 방법으로 활용될 것이다.

참 고 문 헌

1. Evans MJ, Kaufman M. Establishment in culture of pluripotential stem cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-6.
2. Notarianni E, Galli C, Laurie S, Moor RM, Evans MJ. Derivation of pluripotent, embryonic stem cell lines from the pig and sheep. *J Reprod Fertil Suppl* 1991; 43: 255-60.
3. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Hearn JP. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocyst. *Biol Reprod* 1996; 55: 254-9.
4. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
5. Lee SH, Lumelsky N, Studer L, Auerbach JM, McKay RD. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 675-9.
6. Carpenter M, Rao MS, Freed W, Zeng X. Derivation and characterization of neuronal precursors and dopaminergic neurons from human embryonic stem cells in vitro. *Methods Mol Biol* 2006; 331: 153-67.
7. Schwanke K, Wunderlich S, Reppel M, Winkler ME, Matzkies M, Groos S, et al. Generation and characterization of functional cardiomyocytes from rhesus monkey embryonic stem cells. *Stem Cells* 2006; 24: 1423-32.
8. Laflamme MA, Gold J, Xu C, Hassanipour M, Rosler E, Police S, et al. Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells. *Am J Pathol* 2005; 167: 663-71.
9. Baharvand H, Jafary H, Massumi M, Ashtiani SK. Generation of insulin-secreting cells from human embryonic stem cells. *Development, Growth and Differentiation* 2006; 48: 323-32.
10. Galic Z, Kitchen SG, Kacena A, Subramanian A, Burke B, Cortado R, et al. T lineage differentiation from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 2006; 103: 11742-7.
11. Lacham-Kaplan O, Chy H, Trounson A. Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. *Stem Cells* 2006; 24: 266-73.
12. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 10716-21.
13. Levenberg S, Golub JS, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Langer R. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 4391-6.
14. David R, Groebner M, Franz WM. Magnetic Cell Sorting Purification of Differentiated Embryonic Stem Cells Stably Expressing Truncated Human CD4 as Surface Marker. *Stem Cells* 2005; 23: 477-82.

= 국문초록 =

목 적: 인간 배아줄기세포는 재생 의학이나 조직공학에 있어서 큰 잠재적인 능력을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이들은 다양한 growth factors 처리나 유전자 발현을 변화시켜 특정 세포로 유도 분화 및 분리가 가능하지만 그 효율성은 아직까지 낮은 상태이다. 본 연구에서는 인간 배아줄기세포로부터 비특이적으로 분화된 세포들을 특정 세포 표면 항체를 이용한 magnetic activated cell sorting (MACS) 방법으로 분리, 배양하여 그들의 특성을 살펴보았다.

연구방법: 미분화 배아줄기세포주 (Miz-hESC4)를 물리적인 방법으로 계대 배양하였으며, 부유 배양법으로 배아체 형성을 유도하였다. 배아체의 자발적인 분화를 위해 DMEM에 10% FBS를 첨가하여 2주 동안 배양하였다. 이렇게 분화된 세포들을 CD34, human epithelial antigen (HEA), human fibroblast (HFB)에 대한 항체를 이용한 MACS system으로 각각의 항체에 대한 양성 또는 음성 세포를 분리하였다. 이러한 MACS 분리 세포를 4주 동안 배양하면서 형태적인 변화를 관찰하고 특이 유전자의 발현 양상을 분석하였다.

결 과: 분리 배양한 CD34 양성 세포들은 배양 초기에는 둥근 형태를 나타내다가 배양 후기에는 작은 다각형의 형태로 관찰되었으며, HEA 양성 세포들은 큰 다각형의 형태를 나타내었고, HFB 양성 세포들은 전형적인 방추체 형태로 관찰되었다. 특이 유전자에 대한 RT-PCR 결과에서, CD34 양성 세포들과 HFB 양성 세포들에서는 내배엽과 중배엽 관련 유전자의 발현하는 것을 확인할 수 있었고, HEA 양성 세포들에서는 외배엽 관련 유전자인 NESTIN과 NF68KD의 발현을 관찰할 수 있었다. 배양기간이 경과함에 따라 CD34 양성 세포의 특이 유전자 발현 양상이 변화되었다.

결 론: 이상의 결과는 비특이적으로 분화된 인간 배아줄기세포로부터 특이 세포를 MACS 방법을 이용하여 성공적으로 분리할 수 있음을 보여주었다. 따라서, MACS 방법과 특이 세포에 대한 항체는 인간 배아줄기세포의 유도 분화와 특이 세포의 분리에 매우 유용할 것으로 생각된다.

중심단어: 인간 배아줄기세포, 분화, MACS 방법, 항체