

Pluripotin(SC-1) 처리를 통한 단위발생 마우스 배아줄기세포 생산 효율 향상

강호인, 노상호*

서울대학교 치의학대학원 세포재프로그래밍 및 발생공학 연구실

Efficient Production of Parthenogenetic Murine Embryonic Stem Cells by the Treatment of Pluripotin (SC-1)

Hoin Kang and Sangho Roh*

Cellular Reprogramming and Embryo Biotechnology Laboratory, Dental Research Institute and CLS21, Seoul National University School of Dentistry, Seoul 110-749, Korea

ABSTRACT

Various small molecules can be used to control major signaling pathways to enhance stemness and inhibit differentiation in murine embryonic stem cell (mESC) culture. Small molecules inhibiting the fibroblast growth factor (FGF)/ERK pathway can preserve pluripotent cells from stimulation of differentiation. In this study, we aimed to evaluate the effect of pluripotin (SC-1), an inhibitor of the FGF/ERK pathway, on the colony formation of outgrowing presumptive mESCs. After plating the zona pellucida-free blastocyst on the feeder layer, attached cell clumps was cultured with SC-1 until the endpoint of the experiment at passage 10. In this experiment, when the number of colonies was counted at passage 3, SC-1-treated group showed 3.4 fold more mESC colonies when compared with control group. However, after passage 4, there was no stimulating effect of SC-1 on the colony formation. In conclusion, SC-1 treatment can be used to promote mESC generation by increasing the number of early mESC colonies.

(Key words : pluripotin (SC-1), small molecule, embryonic stem cells, mouse, FGF/ERK pathway)

서 론

착상 전 배반포로부터 획득할 수 있는 마우스 배아줄기세포 (murine embryonic stem cells; mESCs)는 모든 품종에서 가능한 것이 아니며(kawase 등, 1994), 가능한 품종의 경우에도 배양 환경에 따라 세포주 수립 성공 여부 및 효율성은 매우 다양하게 나타난다. 일반적으로 mESCs는 유사 분열이 불활성화된 섬유모세포를 영양지지세포층(feeder layer)로 하고, 소태아혈청(fetal bovine serum; FBS)이 함유된 표준화된 배양액에 leukemia inhibitory factor(LIF) 등을 첨가하여 줄기세포주 생산 유도 및 증식 배양이 이뤄지나(Niwa 등, 1998), 최근에는 타 동물종 유래 혈청 및 feeder layer 등을 배제하기 위하여 화학적 한정 배양액 내에 고농도의 LIF 및 bone morphogenetic protein-4(BMP4) 등을 첨가하는 방식으로 점차 대체되고 있다(Ying 등, 2003; Qi 등, 2004; Furue 등, 2005). LIF와 BMP4, 이 두 가지 인자는 mESCs의 자가증식능력에 주축이 되는 신호전달인자로서 LIF는 STAT 신호경로를 활성화하여 배아줄기세포의 자가증식능력을 촉진하고 중배엽 및 내배엽으로의

분화를 억제하는 역할을 하고 있으며(Ying 등, 2003), BMP4는 Id (inhibitor of differentiation) 유전자그룹의 발현을 유도하고, MAPK 신호경로 및 신경외배엽 분화를 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Ying 등, 2003; Qi 등, 2004).

이러한 주요 경로의 조절을 통한 자가증식능력의 유지와는 달리 pluripotin이라고도 불리는 SC-1은 FGF 신호경로를 억제하는 소분자 물질인데(Chen 등, 2006), 그 경로를 좀 더 세분화해서 보자면 ERK1 및 Ras GTPas-activating protein(Ras-GAP) 신호경로를 이중으로 억제하는 인자로서 mESCs의 자가증식능력을 유지하고, 분화를 억제하는 두 가지 조절기능을 다 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Chen 등, 2006). 또한 마우스 수정란 및 단위발생란의 난할기 초기배아에 SC-1을 처리할 경우 배반포 단계에서 내부세포괴(inner cell mass; ICM)의 절대 숫자에는 변화 없이 hypoblast로의 분화가 억제되고 epiblast로의 분화가 촉진된다는 보고가 있다(Versieren 등, 2012). 그러나 동 연구보고에 따르면 난할기 배아에 SC-1을 처리한 단위발생 및 수정란 유래 배반포에서 mESCs를 유도할 경우, 효율을 높이는 효과는 없는 것으로 확인되었다. 앞서 언급한 바

* 본 연구는 교육과학기술부 연구재단(Grant number 2012-0006145) 및 농림수산식품기술기획평가원(Grant number 111160-04)의 지원에 의하여 수행되었음.

* Correspondence : E-mail : sangho@snu.ac.kr

와 같이 FGF 신호경로 억제자인 SC-1이 mESC의 자가 증식능력을 유지하는 효과가 있고(Chen 등, 2006) 배반포 ICM의 hypoblast 분화를 억제하는 효과는 확인된 바 있으나(Versieren 등, 2012), 배반포 단계에서 초기 mESC colony 유도시기까지 처리할 경우 mESC 생산 효율에 어떠한 효과가 있는가는 명확히 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 배반포의 feeder layer 부착 시기부터 1~10계대 시기까지의 초기 colony 수립 시기에 처리한 소분자 억제제 SC-1이 단위 발생란 유래 mESC의 효율 향상에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

별도의 표기가 없는 한 본 연구에 사용된 시약은 Sigma-Aldrich Korea (Yong-in, Korea), 액상 배양용 맥 및 혈청은 Invitrogen Korea(Seoul, Korea)의 제품을 구매하여 사용하였으며, 마우스 과배란 처리, 난자의 회수, 단위 발생을 위한 인위적 활성화 및 배반포까지의 체외배양은 본 연구실의 표준화된 방법을 사용하여 수행하였다(Kang 등, 2012).

1. 단위발생 배반포를 이용한 배아줄기세포 생산

배아줄기세포의 생산을 위해 투명대를 제거한 단위발생 배반포를 젤라틴 코팅된 24-well plate(Nunc, Roskilde, Denmark) 위의 STO feeder layer에 각 well 당 2개씩 식립하였다. 줄기세포 생산을 위한 mESC 배양액은 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM; Life Technologies, Paisley, UK)를 기본 배양액으로 하여 15% FBS, 1% nonessential amino acid (NEAA), 0.1 mM β -mercaptoethanol 및 1,000 units/ml ESGRO™ LIF(Cemicon, Temecula, USA)가 첨가된 배양액을 대조군으로 하여 실험에 공여하였으며, 여기에 1 μ M의 SC-1(Santa Cruz Biotechnology Inc., SantaCruz, USA)을 첨가한 실험군을 SC-1 첨가군으로 하여 배양을 실시하였다. 배반포 식립 6~7일 후 ICM 유래의 증식한 세포덩어리를 0.05% trypsin-EDTA로 처리하여 가능한 한 단일세포로 분리한 후, STO feeder layer와 함께 새롭게 준비해 둔 24-well plate 위로 옮겨 계대배양하였다. 배양 후 새롭게 콜로니가 발견되면 이를 passage 0(P0)로 간주하고 미분화를 유지하는 엄격한 배양 조건 하에서 배양액을 주기적으로 교체해 주면서 콜로니의 증식을 유도하였다. 이후 표준화된 mESC 계대배양 절차에 따라 trypsin 처리와 함께 2일 간격으로 계대배양을 실시하면서 초기 배아줄기세포 콜로니의 증식을 유도하였다. 계대 시 trypsin 처리 후 새로운 배양 plate에 식립할 때는 1개의 well에서 유래한 세포를 3개의 well로 옮겨 증식배양하였다. 일반적으로 P2까지는 trypsin 처리 후에도 세포덩어리로부터 모든 세포가 단일세포로 분리되지 않는 경향이 있어, 정확한 콜로니 수의 산정을 위해

trypsin 처리 후 대부분의 세포가 단일세포로 분리되는 P3를 기준 시점으로 하여 콜로니의 수를 산정하였다.

2. 배아줄기세포 초기 콜로니의 염색 및 산정

첫 번째 실험에서는 P3를 시작으로 P8 및 P10에 두 실험군 간의 초기 콜로니 수를 산정하였으며, 두 번째 실험에서는 P3에서 P4로 계대할 때 두 실험군 간의 단위 면적 당 콜로니 수를 동일한 수준으로 조정하여 새로운 plate에 식립한 후 P10에서의 콜로니 증식 수를 산정하여 P3 이후의 증식에 SC-1이 미치는 영향을 재확인하였다. SC-1 첨가군의 경우, 배반포 식립 후부터 최종 실험 종료 시기인 P10 시기까지 첨가하여 실험을 수행하였다. 각 계대 별 mESC 콜로니 수의 산정은 alkaline phosphatase(ALP) 염색 kit(86R-1)을 이용하여 줄기세포를 염색한 후 디지털카메라가 장착된 실험현미경 하에서 각 실험군 well 별로 촬영한 후 촬영한 사진 파일을 컬러 프린터로 출력하여 붉게 염색된 미분화 상태의 배아줄기세포 콜로니의 수를 산정하였다(Fig. 1). 모든 실험은 3회 반복하여 그 평균값을 결과로 제시하였다.

결과 및 고찰

첫 번째 실험에서 P3, P8 및 P10에서의 콜로니 수를 산정한 결과는 Table 1과 같다. SC-1 처리군의 well 당 콜로니 수는 대조군에 비해 P3에서 3.4배 정도 높은 증식 효율을 나타내었으나, P8 및 P10에서는 SC-1 처리군이 대조군에 비해 2.3~2.5배 정도의 증식률 증가를 나타내어 추가적인 증식 효율 향상은 보이지 않았다. 이러한 첫 번째 실험 결과를 바탕으로 각 실험군 간의 P3 이후의 증식률의 차이 여부를 입증하기 위하여 P3에서 P4로 계대할 때 단위 면적(well) 당 콜로니의 수를 동일한 수준으로 맞추어 계대배양한 결과, SC-1 처리군과 대조군 간의 증식률의 차이는 보이지 않았다(Table 2). 이러한 결과는 배반포 시기에 처리한 SC-1이 feeder layer에 식립 후 P3 이전까지는 ICM의 전능성 유지와 관련된 신호경로에 영향을 미

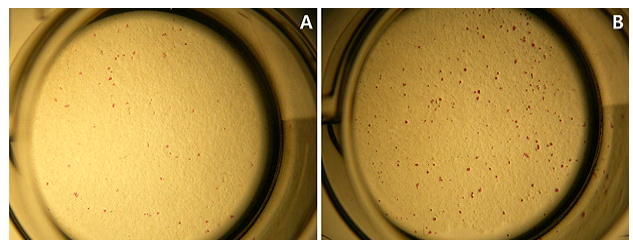


Fig. 1. Parthenogenetic murine embryonic stem cell (ESC) colonies at passage 10 after alkaline phosphatase staining. Red dots indicate ESC colonies. A: Control (no treatment) group, B: SC-1 treated group. Size of the well: 1.5 cm inner diameter.

Table 1. Comparison of the number of colonies between SC-1-treated and control (non-treated) groups

	Number of blastocysts plated per well	Passage 3	Passage 8	Passage 10
SC-1	2	63.6	149.7	161.6
Control	2	18.7	64.6	63.4
SC-1/Control	1	3.40	2.31	2.55

Table 2. Comparison of the number of colonies between SC-1-treated and control groups after passage 4

	Passage 4*	Passage 10
SC-1	59.3	190.4
Control	57.6	189.3
SC-1/Control	1.02	1.01

* When passaging presumptive embryonic stem cells at passage 3, the concentration of cells to be distributed was adjusted equally from both groups.

친 것으로 판단할 수 있으나, 이후 배아줄기세포로서의 성상을 유지하는 단일세포들은 기존의 배아줄기세포 배양 기법에 의한 전능성 관련 신호경로 조절만으로도 전능성의 유지가 가능하며, 이 때는 SC-1에 의한 신호경로 조절이 크게 효과를 발휘하지 못하는 것으로 판단할 수 있다. 따라서 P3 이후 mESCs는 LIF에 의한 STAT3 신호경로 조절을 중심으로 한 기존에 알려진 전능성 조절 기전으로 줄기세포의 증식 및 전능성 유지가 가능한 것으로 생각할 수 있다. 반면에 배반포의 feeder layer 식립 이후 P3까지의 초기 증식에 있어서는 SC-1 처리군의 콜로니 생성 비율이 대조군에 비하여 3배 이상 증가된 것을 확인할 수 있는데, 이는 앞서 언급한 SC-1의 Ras-GAP 및 ERK1 신호경로 억제 기전이 전능성 유지 및 분화 억제 유도를 통한 줄기세포 생산 효율 향상에 기여한 것으로 생각된다. 따라서 SC-1의 처리를 통해 배아줄기세포 증식효율 향상을 유도할 경우, 배반포 식립 전후로부터 P3 시기 전후까지 처리하는 것이 효율적일 것으로 생각된다.

마우스 초기배아에서 ERK1 신호 경로를 억제하면 ground state pluripotency가 촉진되어 배반포의 ICM이 hypoblast를 형성하지 못하고 전부 naïve epiblast의 성질이 유지되는 것으로 알려져 있으며, 이러한 naïve epiblast는 그 성질이 mESCs와 거의 동일한 것으로 간주되고 있다(Leitch 등, 2010). 인간배아를 이용한 연구에서도 이러한 각종 신호경로의 억제제들을 처리할 경우, 배반포 형성 비율에는 크게 차이가 없는 반면

에 ICM 내에서 *Nanog*나 *Oct4*의 발현을 증가시켜 이들 유전자가 발현되는 세포의 비율을 늘리는 것으로 확인된 바 있다(Van der Jeught 등, 2012). 이렇듯 기존의 연구 보고들이 주로 난할기 초기배아 단계에서의 신호경로 억제인자의 처리가 이후 전능성 관련 유전자 및 전능성 줄기세포 형성에 미치는 효과를 언급하거나(Leitch 등, 2010; Van der Jeught 등, 2012), 이미 수립된 mESCs의 자가 증식에 미치는 유효성에 대해 논하는 반면(Li와 Ding, 2010), 본 연구에서는 배아줄기세포로 유도하기 위해 투명대를 제거한 배반포 단계에서 Ras-GAP/ERK1 신호경로 이중 억제인자인 SC-1을 처리함으로써 이러한 신호경로 이중억제가 배반포 이후 배아에서도 효과가 있음을 확인하였다. 본 연구에서 SC-1을 처리하는 시기는 이미 hypoblast가 형성된 시기로 난할기 초기 배아에서 hypoblast 형성 억제를 통한 ground state pluripotency 유지보다는 전능성 관련인자의 발현 증가 및 ground state가 불안정하게 유지되고 있는 naïve epiblast의 성상을 지닌 세포의 분화를 초기에 억제하는 작용을 통해 이후 mESCs의 증식 및 유지를 유도하는 것으로 생각되며, 이후 P3 또는 P4를 지나 콜로니가 유지되는 잠정적인 mESCs은 증식 및 전능성 성상 유지를 위해 ERK1 경로의 제어보다는 LIF에 의한 STAT3 신호경로 활성화에 더 크게 의존적인 것으로 판단된다.

결론

본 연구에서는 배반포의 feeder layer 부착 시기부터 1~10 세대 시기까지의 초기 colony 수립 시기에 처리한 FGF/ERK 신호경로 억제 소분자 물질의 하나인 SC-1이 단위발생란 유래 mESCs의 효율 향상에 어떠한 영향을 미치는 지 확인하기 위하여 실험을 수행하였다. 그 결과, SC-1 처리군의 well 당 콜로니 수는 대조군에 비해 P3에서 3.4배 정도 높은 증식 효율을 나타내어 초기 콜로니 형성에 유효함을 확인하였으나, P8 및 P10에서는 더 이상의 추가적인 증식 효율 향상은 나타나지 않았다. 본 연구 결과, 단위 발생 유래 mESCs의 생산 효율 향상에 SC-1의 처리가 유효함을 확인하였으며, 처리시기는 배반포 식립 시기로부터 시작하여 P3 시기까지의 초기에 한정하는 것이 효율적일 것으로 생각된다.

참고문헌

- Chen S, Do JT, Zhang Q, Yao S, Yan F, Peters EC, Schöler HR, Schultz PG and Ding S. 2006. Self-renewal of embryonic stem cells by a small molecule. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103:17266-17271.
- Furue M, Okamoto T, Hayashi Y, Okochi H, Fujimoto M, Myoishi Y, Abe T, Ohnuma K, Sato GH, Asashima M and

- Sato JD. 2005. Leukemia inhibitory factor as an anti-apoptotic mitogen for pluripotent mouse embryonic stem cells in a serum-free medium without feeder cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 41:19-28.
- Kang H, Sung J, Jung HM, Woo KM, Hong SD and Roh S. 2012. Insulin-like growth factor 2 promotes osteogenic cell differentiation in the parthenogenetic murine embryonic stem cells. *Tissue Eng. Part A.* 18:331-341.
- Kawase E, Suemori H, Takahashi N, Okazaki K, Hashimoto K and Nakatsuji N. 1994. Strain difference in establishment of mouse embryonic stem (ES) cell lines. *Int. J. Dev. Biol.* 38:385-390.
- Leitch HG, Blair K, Mansfield W, Ayetey H, Humphreys P, Nichols J, Surani MA and Smith A. 2010. Embryonic germ cells from mice and rats exhibit properties consistent with a generic pluripotent ground state. *Development* 137:2279-2287.
- Li W and Ding S. 2010. Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Trends Pharmacol. Sci.* 31:36-45.
- Niwa H, Burdon T, Chambers I and Smith A. 1998. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.* 12:2048-2060.
- Qi X, Li TG, Hao J, Hu J, Wang J, Simmons H, Miura S, Mishina Y and Zhao GQ. 2004. BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:6027-6032.
- Van der Jeught M, O'Leary T, Ghimire S, Lierman S, Duggal G, Versieren K, Deforce D, Chuva de Sousa Lopes S, Heindryckx B and De Sutter P. 2012. The combination of inhibitors of FGF/MEK/Erk and GSK3 β signaling increases the number of OCT3/4- and NANOG-positive cells in the human inner cell mass, but does not improve stem cell derivation. *Stem Cells Dev.* Published online (DOI: 10.1089/scd.2012.0256).
- Versieren K, Van der Jeught M, O'Leary T, Duggal G, Gerris J, Chuva de Sousa Lopes S, Heindryckx B and De Sutter P. 2012. Effect of small molecule supplements during *in vitro* culture of mouse zygotes and parthenogenetic embryos on hypoblast formation and stem cell derivation. *Stem Cell Rev.* Published online (DOI: 10.1007/s12015-012-9382-7).
- Ying QL, Nichols J, Chambers I and Smith A. 2003. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115:281-292.

(접수: 2012. 8. 19 / 심사: 2012. 8. 20 / 채택: 2012. 9. 3)