

생쥐 초기 배아에서 분리한 할구를 이용한 배아줄기세포주 확립

성균관대학교 의과대학 제일병원 생식생물학 및 불임연구소실

임천규 · 성지혜 · 최혜원 · 조재원 · 신미라 · 전진현*

Establishment of Embryonic Stem Cell Line from Isolated Blastomeres from Mouse Preimplantation Embryos

Chun Kyu Lim, Ji Hye Sung, Hye Won Choi, Jae Won Cho, Mi Ra Shin, Jin Hyun Jun*

*Laboratory of Reproductive Biology & Infertility, Cheil General Hospital and Women's Healthcare Center,
Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul, Korea*

Objective: The aim of this study was to investigate whether embryonic stem (ES) cells can be established from isolated blastomeres of mouse embryos.

Methods: Blastomeres were separated from mouse (C57Bl/6J) 2- or 4-cell embryos. Isolated blastomeres or whole 4-cell embryos were co-cultured with mitosis-arrested STO feeder cells in DMEM supplemented with recombinant murine leukemia inhibitory factor and ES-qualified fetal bovine serum. After the tentative ES cell lines were maintained from isolated blastomeres or whole embryos, some of them were frozen and the others were sub-cultured continually. Characteristics of tentative ES cell lines as were evaluated for specific gene expressions with immunocytochemistry and RT-PCR.

Results: One ES cell line (3.0%) was established from isolated blastomere of 2-cell embryo and one cell line (4.0%) from isolated two blastomeres of 4-cell embryo. And five cell lines (16.7%) were established from whole 4-cell embryos. Both cell lines from isolated blastomere and whole embryo expressed mouse ES cells specific markers such as SSEA-1, Oct-4 and alkaline phosphatase. Marker genes of three germ layers were expressed from embryoid bodies of both cell lines.

Conclusion: This study suggests that mouse ES cells could be established from isolated blastomeres, although the efficiency is lower than whole embryos. This animal model could be applied to establishment of autologous human ES cells from biopsied blastomeres of preimplantation embryos in human IVF-ET program.

Key Words: Mouse ES cells, Isolated blastomere, Genes expressions, Embryoid body, Animal model

배아줄기세포 (embryonic stem cells, ES cells)는 포배기 배아의 내세포괴의 전분화능을 지닌 세포로부터 기원한 세포로 1981년에 Evans와 Kaufman에 의하여 생쥐에서의 확립이 보고된¹ 이래 햄스터, 양, 돼지, zebrafish, 토끼, 원숭이, 흰쥐 등에서의 확립이 보고되었다.²⁻⁸ 또한, 인간의 체외수정 및 배아

이식술 (in vitro fertilization and embryo transfer) 분야에서의 발전으로 Thomson 등 (1998)에 의해 최초로 인간 배아줄기세포주 (human ES cell line)가 확립되었다.⁹ 그 후 많은 연구진에 의하여 인간 배아줄기세포의 확립이 보고되었으며, 이들은 다분화능 (pluripotency)과 영속성의 특성을 가지고 있어 발생 및

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

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

*본 연구는 제일의료강학재단 연구비 지원에 의해 수행되었음.

분화에 관련된 기초 연구 뿐만 아니라 재생의학, 약물검색, 세포치료제 개발 등에서 유용한 재료로서 이용되고 있다.

현재 인간 배아줄기세포에서 분화된 세포로 치료가 가능할 것으로 예상되는 질병은 Parkinson's disease, 척수손상, Purkinje 세포손상, 당뇨병, Duchenne's muscular dystrophy, 심장병, 골형성부전증 등이 있다. 최근에는 다양한 성장인자 (growth factor)와 cytokine 등을 처리하여 배아줄기세포를 특정 세포로 분화시키기 위한 연구들이 활발하게 진행되어 신경계 세포로의 분화, 혈구계열 세포로의 분화, 골격근으로의 분화, 멜라닌 세포로의 분화 등에 성공하였다.¹⁰⁻¹⁴ 그러나 인간 배아줄기세포로부터 분화된 세포를 세포치료제로 사용하기 위해서는 이식세포에서 기인한 면역거부반응을 방지할 수 있는 방법의 개발이 필수적이다. 이러한 면역거부반응을 방지하는 방법으로 체세포 핵 이식 배아줄기세포에 대한 연구가 진행 중이지만 그 효용성에 대한 논란이 많다.

포유류의 착상전 초기 배아의 할구는 전분화능 (totipotency)을 가지고 있어 일란성 쌍둥이로 발생할 수 있으며, 이러한 할구의 발생 능력은 생쥐, 토끼, 양, 돼지만 아니라 영장류에서도 확인되었다.¹⁵⁻¹⁹ 따라서 포유류의 착상전 초기 배아의 할구는 배아줄기세포를 형성할 수 있으며, 이에 대한 동물 모델의 확립은 차후에 인간의 체외수정 및 배아이식술 과정에서 생성되는 배아에서 할구를 이용한 배아줄기세포의 확립에도 적용할 수 있다. 실제적으로 유전병의 이환이나 염색체 이상을 예방하기 위해 시행되는 착상전 유전진단 과정에서 초기 단계인 8세포기의 배아에서 하나 또는 두 개의 할구를 분리하여도 할구 생검된 배아의 발생 능력은 크게 감소하지는 않는 것으로 보고되고 있다.²⁰

본 연구에서는 이러한 착상전 배아의 할구를 이용한 배아줄기세포 확립 가능성을 확인하고자 하였다. 동물 모델을 이용하여 생쥐의 착상전 초기 배아에서 할구를 분리하여 배아줄기세포를 확립하였으며, 이러한 방법의 효율성과 분리된 할구로부터 확립된 배아줄기세포의 특성을 살펴보았다.

연구대상 및 방법

1. 생쥐 배아의 할구 분리와 배양

초기 생쥐 배아의 할구를 분리하여 포배기까지 배양하기 위하여 과배란을 유도한 C57BL/6J 생쥐로부터 2~4세포기의 배아를 회수하였다. 회수한 배아는 G1.1 배양액 (Vitrolife Inc., Sweden)에서 3~4회 수세한 후 acid Tyrode 용액으로 투명대를 제거하였다. 투명대를 제거한 배아를 G1.2 배양액에서 3~4회 수세한 후, EB-10TM 배양액 (Vitrolife Inc., Sweden)에 처리하면서 2세포기의 배아는 각각의 할구로 분리하고, 4세포기의 배아는 2개의 할구가 붙어있는 상태로 분리하였다.

2. 초기 배아의 분리된 할구와 배아를 이용한 배아줄기세포의 확립

위의 방법으로 분리된 할구 또는 배아를 유사분열적으로 불활성화된 STO 세포주와 15% ES-qualified FBS (Hyclone, USA)와 1,000 U/ml recombinant mouse leukemia inhibitory factor (ESGRO; Chemicon, USA)이 첨가된 DMEM 배양액에서 공배양하였다. 7일간 공배양한 후 내세포괴 (inner cell mass, ICM)를 영양외배엽 (trophectoderm)과 물리적으로 분리시킨 후 새로운 feeder 세포와 공배양하였다. 배아줄기세포의 계대배양은 Ca²⁺/Mg²⁺가 첨가되지 않은 PBS로 2~3회 수세한 후 trypsin/EDTA (0.25%/0.02%)를 37°C에서 5분간 처리한 뒤 세포를 분리하였다. 분리한 세포는 PBS로 수세한 후 새로운 feeder 세포와 공배양하였고, 4~5일 간격으로 반복적으로 실시하면서 배아줄기세포의 특성을 확인하였다. 대조군으로 할구를 분리하지 않은 4세포기 배아를 이용하여 동일한 방법으로 배아줄기세포를 확립하였다.

3. Alkaline phosphatase 활성의 조직화학적 관찰

계대배양 중인 배아줄기세포에서 배양 5일째에 배양액을 제거하고 PBS로 수세한 후, 90% methanol/10% formalin으로 2분간 고정하였다. 고정액을 제거하고 TBS buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4)로 수세한 후, Naphthol/Fast Red Violet solution (Fast Red Violet (FRV) solution : Naphthol AS-BI phosphate solution :

distilled water = 2:1:1)을 상온에서 빛을 차단한 상태로 15분간 처리하였다. 그리고 Naphthol/Fast Red Violet solution을 제거하고 TBS buffer로 수세한 후 PBS로 채워주고 alkaline phosphatase에 의한 발색반응을 도립현미경으로 관찰하였다.

4. 배아줄기세포 특이 항체에 대한 면역세포학적 염색

계대배양 중인 배아줄기세포를 Ca^{2+}/Mg^{2+} 가 첨가되지 않은 PBS로 2~3회 수세한 후 4% paraformaldehyde 용액으로 상온에서 20분간 고정하였다. TBS buffer로 10분간 2회 수세한 후 0.1% Triton X-100/PBS 용액으로 상온에서 10분간 permeabilization을 실시하였다. 그리고 TBS buffer로 10분간 2회 수세하고, 1% bovine serum albumin가 첨가된 PBS로 상온에서 30분간 blocking을 실시하였다. 1차 항체인 SSEA-1 (Chemicon, USA), Oct-4 (SantaCruz, USA) antibody를 각각 1:100으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후, TBS buffer로 상온에서 10분간 3회 수세하였다. 2차 항체인 FITC-labelled anti-mouse IgM와 FITC-labelled anti-rabbit IgG를 각각 1:100과 1:50으로 희석하여 상온에서 1시간 반응시킨 후 TBS

buffer로 상온에서 10분간 3회 수세하였다. TBS buffer를 제거한 후 PBS로 수세한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

5. 배아줄기세포의 단독배양과 배아체 형성

배아줄기세포를 단독배양하기 위해 feeder 세포가 없는 배양 용기에서 공배양되었던 배아줄기세포를 반복적으로 계대배양하여 feeder 세포를 제거하였다. 배아줄기세포의 단독배양은 공동배양 시와 동일한 배양액을 사용하였으며, 계대배양은 0.1% gelatin으로 코팅된 plate를 사용하여 4~5일 간격으로 실시하였다. 배아체 형성을 위해 단독배양된 배아줄기세포에 trypsin/EDTA (0.25%/0.02%)를 처리하여 수확한 후, 박테리아 배양 용기에서 1.2×10^5 cells/ml의 세포를 접종한 후 8일 동안 부유 배양하면서 15% ES qualified FBS가 첨가된 DMEM 배양액을 2일 간격으로 교체하였다.

6. 배아줄기세포 특이 유전자 발현에 대한 RT-PCR

RNeasy mini kit 250 (Qiagen, USA)를 이용하여 배아줄기세포와 배아체로부터 total RNA를 추출하였

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers and PCR conditions

Genes	Forward primer	Annealing Tm (°C)	Product size (bp)
	Reverse primer		
Nestin	5'-CCAAAGAGGTGTCCGATCAT-3'	58	213
	5'-TGACATCCTGGACCTTGACA-3'		
FGF-5	5'-TGTACTIONCAGAGTGGGCATC-3'	58	205
	5'-TCATCCGTAATTTGGCACT-3'		
Enloase	5'-CAGGCCTGTAACTTGCACA-3'	58	190
	5'-CAAGAGCCTCCTCAATCCTC-3'		
α -Globin	5'-GCTGAAGCCCTGGAAAGGAT-3'	58	232
	5'-GGCTCAGGAGCTTGAAGTTG-3'		
Gata-4	5'-CGCCGCCTGTCCGCTTCC-3'	65	193
	5'-TTGGGCTTCCGTTTTCTGGTTTGA-3'		
α -Fetoprotein	5'-CGAAACCTCCAGGCAACAAC-3'	58	160
	5'-TCATGACTTTTTCCCCATCC-3'		
Oct-4	5'-TTGGGCTAGAGAAGGATGTG-3'	58	221
	5'-CCTCAGCAAAGGGACTGAG-3'		

다. 추출된 RNA는 MMLV, 5X MMLV RT buffer, Rnasin, 10 mM dNTP, 10 pM dT, 3차 증류수를 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), 증류수와 배아줄기세포에서는 미분화 표지유전자인 Oct-4 primer와 혼합하여 PCR을 수행하였다. 그리고 배아체에서는 외배엽성 표지유전자인 nestin, fgf-5, 중배엽성 표지유전자인 enloase, α-globin, 내배엽성 표지유전자인 gata-4, α-fetoprotein 등의 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. 이들 primer에 관한 정보는 Table 1에 나타내었다. 이러한 유전자 발현 분석의 대조군으로 기존의 연구에서 보고된 생쥐 배아줄기세포와 생쥐 췌장 조직을 사용하였다.²¹

7. 생쥐 배아줄기세포의 염색체 분석

계대배양 중인 배아줄기세포주의 배양 4일째에 염색체 분석을 실시하기 위해 0.1 μg/ml의 colcemid (Gibco BRL, USA)를 37°C에서 2시간 처리하였다. Colcemid 처리 후 0.075 M KCl 용액을 37°C에서 30분 처리하였다. 그리고 Carnoy solution (methanol: acetic acid = 3:1)을 이용하여 -20°C에서 30분간 고정하였다. Carnoy solution으로 2회 수세한 후 slide glass에 metaphase spread를 준비하여 상온에서 24시간 건조시켰다. 건조 후 125 ng/ml DAPI 용액으로 염색하여 염색체의 수를 확인하였다. 분리된 할구로부터 확립된 배아줄기세포주에서는 45계대의 36개 중기염색체에서, 4세포기 배아에서 확립된 배아줄기세포주에서는 44계대의 40개 중기염색체에서 염색체의 수를 확인하였다.

결 과

1. 초기 배아에서 분리된 할구를 이용한 배아줄기세포의 확립

분리된 할구 또는 배아를 이용하여 배아줄기세포를 확립하기 위하여 각각의 세포들을 유사분열이 불활성화된 STO 지지세포주와 공배양을 실시하였다. 일차적으로 19개의 2세포기의 배아에서 각각의 할

구를 분리한 후 38개의 할구를 STO 세포주와 공배양하였다. 그 중 17개의 할구가 (44.7%) 포배기까지 발생하였고, 19개의 할구는 (50.0%) STO 세포주 위에서 세포괴 (cell mass)를 형성하였다. 배아줄기세포를 확립하기 위하여 전체 36개의 포배기 또는 세포괴 중에서 33개를 새로운 STO 세포주와 추가 배양을 실시하여 1개의 배아줄기세포주 (3.0%)를 확립하였다. 이차적으로 15개의 4세포기 배아에서 2개씩의 할구를 분리한 후 30개의 할구를 STO 세포주와 공배양을 실시하였다. 그 중 15개의 할구가 (50.0%) 포배기까지 발생하였고, 12개의 할구는 (40.0%) STO 지지세포주 위에서 세포괴를 형성하였다. 배아줄기세포를 확립하기 위하여 전체 27개의 포배기 또는 세포괴 중에서 25개를 새로운 STO 세포주와 추가 배양을 실시하여 1개의 배아줄기세포주 (4.0%)를 유지 및 계대배양하였다. 할구를 분리하지 않은 30개의 4세포기 배아를 STO 세포주와 공배양을 실시하여, 발생된 포배기 (100%) 배아에서 5개의 배아줄기세포주 (16.7%)를 확립하였다. 이와 같이 할구 또는 배아에서 확립된 배아줄기세포 중에서 2세포기의 할구에서 분리된 할구로부터 확립된 배아줄기세포와 배아로부터 확립된 5개의 배아줄기세포 중에서 4개의 배아줄기세포는 동결보존하고, 4세포기의 할구로부터 확립된 배아줄기세포주와 4세포기의 배아로부터 확립된 배아줄기세포주 중에서 하나의 세포주를 계대배양하면서 그 특성을 확인하였다.

2. Alkaline phosphatase의 활성과 배아줄기세포 특이 항체 발현에 대한 분석

초기 배아의 분리된 할구와 4세포기 배아에서 확립된 세포주에서 alkaline phosphatase의 활성에 의한 발색반응을 관찰할 수 있었다 (Figure 1). 또한, 배아줄기세포의 특이적 표지 인자인 SSEA-1와 Oct-4에 대한 면역세포학적 염색에서도 두 종류의 배아줄기세포주에서 모두 양성반응을 확인할 수 있었다 (Figure 2). 위의 결과를 통해 분리된 할구로부터 확립된 세포주는 기존에 보고되었던 배아줄기세포와 유사한 특성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

3. RT-PCR을 이용한 유전자 발현 양상 분석

배아줄기세포와 배아체에서 특이적으로 발현되는

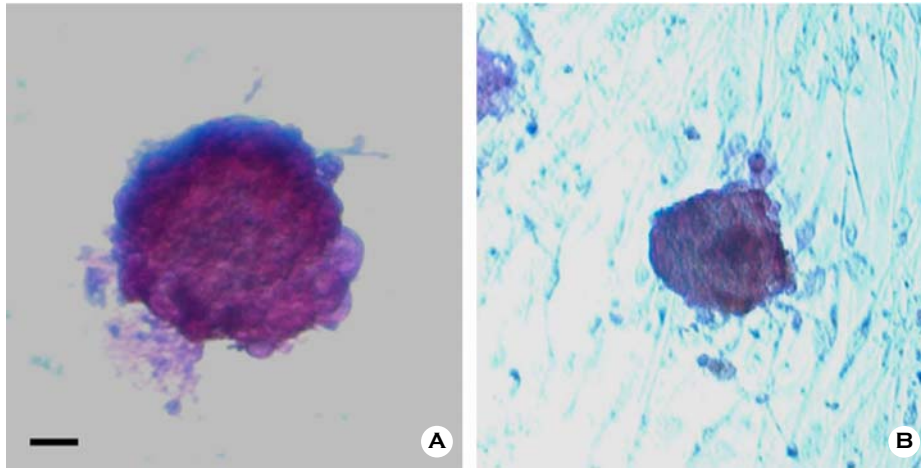


Figure 1. Expression of alkaline phosphatase in mouse embryonic stem cells established from blastomeres of 4-cell embryo (A) and mouse embryonic stem cells established from whole 4-cell embryo (B). Scale bar = 50 μ m.

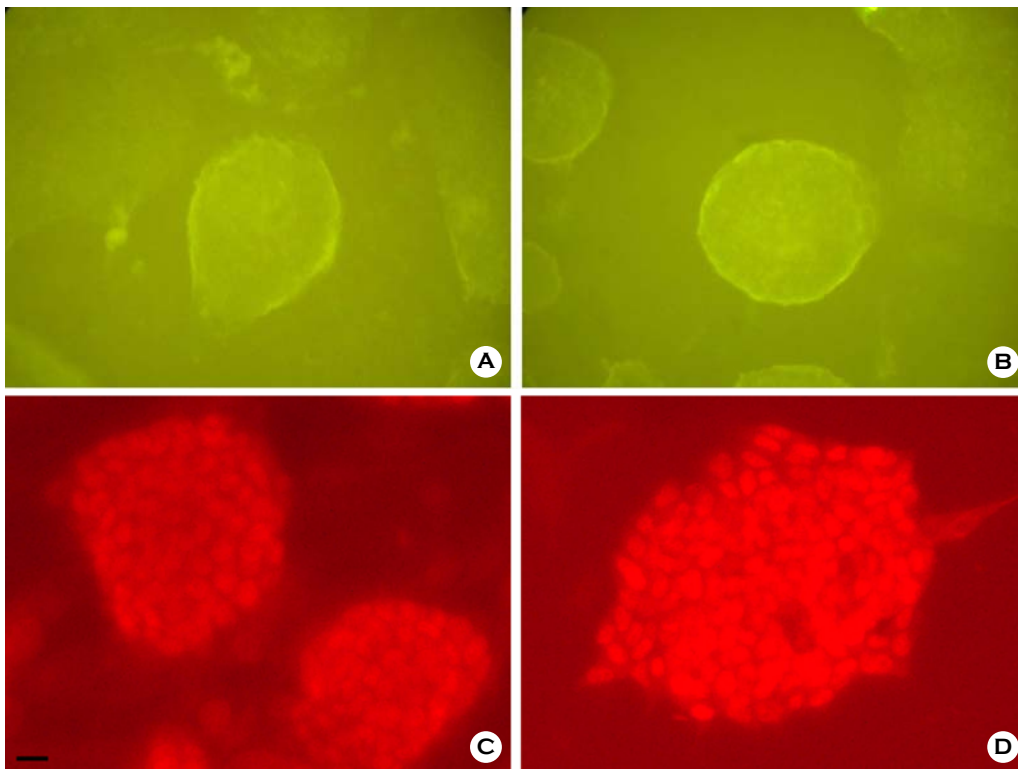


Figure 2. Immunocytochemistry in the mouse ES cells established from blastomeres of 4-cell embryo for SSEA-1 (A) and Oct-4 (C), and from whole 4-cell embryo for SSEA-1 (B) and Oct-4 (D), respectively. Scale bar = 50 μ m.

유전자들에 대한 RT-PCR 분석에서 분리된 할구와 4-세포기 배아에서 확립된 세포주에서 미분화 표지

인자인 Oct-4의 발현을 확인할 수 있었다 (Figure 3). 또한, 각각의 세포주에서 형성된 배아체에서 외배엽

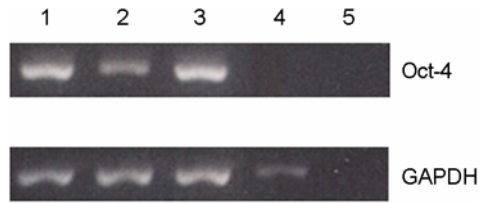


Figure 3. RT-PCR analysis for specific gene expressions, undifferentiation marker (Oct-4) in mouse ES cells. Mouse ES cells established from whole 4-cell embryo (lane 1), mouse ES cells established from blastomeres of 4-cell embryo (lane 2), mouse ES cells (lane 3, positive control), mouse pancreas (lane 4) and negative control (lane 5).

성 표지유전자인 nestin, fgf-5, 중배엽성 표지유전자인 enloase, α -globin, 내배엽성 표지유전자인 gata-4, α -fetoprotein의 발현을 관찰할 수 있었다 (Figure 4). 위의 결과에서 분리된 할구와 4세포기 배아에서 확립된 세포주는 배아체를 형성하고 삼배엽성 세포들로 분화함을 확인할 수 있었다.

4. 계대배양 중인 배아줄기세포의 염색체 분석

분리된 할구로부터 확립된 배아줄기세포주에서는 36개의 중기염색체를 관찰하여 평균 40.1 ± 1.2 개의 염색체를 확인할 수 있었다. 전체 36개의 중기염색체 중에서 15개 (41.7%)의 중기염색체에서 40개의 정상적인 염색체 수를 관찰할 수 있었고, 8개 (22.2%)의 중기염색체에서 39개 이하의 염색체를, 13개 (36.1%)의 중기염색체에서 41개 이상의 염색체를 관찰할 수 있었다. 4세포기의 배아에서 확립된 배아줄기세포주에서는 40개의 중기염색체를 관찰하여 평균 40.0 ± 1.1 개의 염색체를 확인할 수 있었다. 전체 40개의 중기염색체 중에서 16개 (40.0%)의 중기염색체에서 정상적인 40개의 염색체를, 10개 (25.0%)의 중기염색체에서 39개 이하의 염색체를, 14개 (35.0%)의 중기염색체에서 41개 이상의 염색체를 관찰할 수 있었다.

고 찰

본 연구에서는 생쥐의 2- 또는 4세포기 배아에서 분리된 할구를 feeder 세포와 공배양하여 성장시킨 후 내세포괴만을 분리하고 지속적인 계대배양을 통해 배아줄기세포를 확립하였다. 계대배양 중인 세포

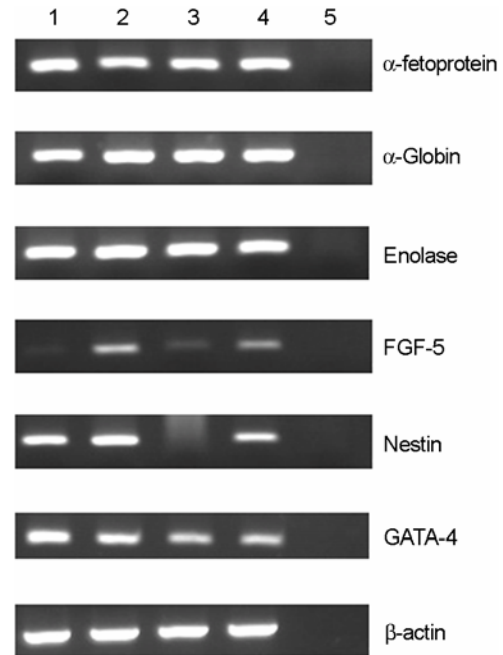


Figure 4. RT-PCR analysis for specific gene expressions, three-germ layers markers in mouse embryoid bodies cultured for 8 days. Mouse embryoid bodies of ES cells established from blastomeres of 4-cell embryo (lane 1), mouse embryoid bodies of ES cells established from whole 4-cell embryo (lane 2), mouse embryoid bodies of positive control ES cells (lane 3, 4) and negative control (lane 5).

주는 alkaline phosphatase 활성에 양성반응을 보였고, 생쥐 배아줄기세포 특이적 표지 단백질인 SSEA-1와 Oct-4에 대한 세포면역학적 염색에서 양성반응을 보였으며, 염색체의 수도 정상적으로 40개를 유지함을 확인하였다. 또한, 미분화세포에서 특이적인 Oct-4가 발현되는 것을 확인하였으며, 배아체 형성 후 삼배엽성 표지유전자들의 발현을 관찰할 수 있었다. 위의 결과들을 종합해보면 본 연구에서 생쥐 초기 배아의 할구로부터 확립한 세포주는 다분화능 (pluripotency)을 가진 배아줄기세포주일 가능성이 매우 높은 것으로 생각되며, 현재 이들의 특성을 in vivo system에서 확인하기 위해 chimera 생산과 germ line transmission에 대한 연구를 진행하고 있다.

분리된 할구들은 투명대를 제거하였기 때문에 일부는 포배기의 배아를 형성하였고, 일부의 할구들은 STO 세포주 위에서 세포괴를 형성하였다. 2세포기의 배아에서 분리된 할구의 44.7%와 4세포기의 배

아에서 분리된 할구의 50%는 포배기를 형성하였고, 각각 50%와 40%의 할구는 세포괴를 형성하였다. 2-세포기 배아에서 분리된 할구에서 확립된 배아줄기세포는 포배기를 형성한 할구에서 확립되었으나, 4-세포기 배아에서 분리된 할구에서 확립된 배아줄기세포는 STO 세포주 위에서 세포괴를 형성한 할구로부터 확립된 세포주였다. 그러므로 분리된 할구가 포배기의 배아를 형성하거나 세포괴를 형성하는 것과는 관계없이 배아줄기세포로 형성될 수 있는 것으로 생각된다. 이러한 세포괴에서의 배아줄기세포주의 확립은 최근에 보고된 포배기 이전의 상실배 단계의 배아를 이용하여 배아줄기세포주를 확립한 방법과 유사한 것으로 생각된다.²²

그러나 배아줄기세포 확립 효율은 각각 2-세포기의 배아에서 분리된 할구를 이용한 경우 3.0% (1/33)였고, 4-세포기의 배아에서 분리된 할구를 이용한 경우 4.0% (1/25)였으며, 완전한 배아를 이용한 경우는 16.7% (5/30)로 분리된 할구를 이용할 경우 완전한 배아를 이용한 경우보다는 그 효율이 다소 저조하였다. 이는 분리된 할구의 발생 능력은 완전한 배아보다는 약하고, 투명대를 제거하고 할구를 분리하는 과정이 또한 할구의 발생 능력을 감소시키는 손상을 줄 수 있기 때문인 것으로 사료된다.

본 논문을 준비하는 과정에서 최근에 129/Sv strain의 생쥐 배아에서 할구를 분리하여 green fluorescent protein (GFP)으로 표지된 기존의 생쥐 배아줄기세포주와 공동배양한 후 GFP가 발현되지 않는 세포들을 분리하여 분리된 할구에서 배아줄기세포를 효율적으로 확립하였다는 논문이 발표되었다.²³ 상기의 논문에서는 8-세포기의 배아에서 하나의 할구를 분리하여 약 10% (12/125) 정도의 효율로 배아줄기세포주 또는 영양배엽줄기세포주 (trophoblast stem cell line)를 확립하였다고 보고하였다. 이러한 결과는 본 논문에서 제시한 3~4% 정도의 할구로부터의 배아줄기세포주 확립 효율에 비해 상당히 높은 수준으로 생각되지만, 본 연구에서 사용한 outbred strain인 C57BL/6J의 유전적 배경이 129/Sv에 비해 배아줄기세포의 확립 효율이 낮다는 보고들과도 관련이 있을 것으로 생각된다.²⁴

결론적으로 본 연구에서는 효율은 다소 낮았지만 배아에서 분리된 할구를 이용하여 배아줄기세포를

확립할 수 있음을 확인하였다. 생쥐의 2-세포기 배아에서 1개의 할구 또는 4-세포기 배아에서 2개의 할구를 이용하여 배아줄기세포를 확립하였지만, 배아의 배양 조건이 향상된다면 4-세포기 이상의 배아에서 1개의 할구를 이용하여 배아줄기세포를 확립할 수 있을 것으로 사료되며, 그 효율성도 향상될 수 있을 것이다. 이러한 연구들은 인간의 체외수정 및 배아이식술에서 배아의 파괴 또는 발생 능력에 손상을 주지 않고 새로운 배아줄기세포주를 생산할 수 있는 방법을 개발하고, 궁극적으로 배아줄기세포를 이용한 세포치료법의 개발과 발전에 크게 기여할 수 있으리라 사료된다.

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. Doetschman TC, Williams P, Maeda N. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev Biol* 1988; 127: 224-7.
3. 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.
4. Wheeler MB. Development and validation of swine embryonic stem cells: a review. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6: 563-8.
5. Sun L, Bradford CS, Ghosh G, Collodi P, Bames DW. ES-like cell cultures derived from early zebrafish embryos. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1995; 4: 193-9.
6. Schoonjans L, Albricht GM, Li JL, Collen D, Moreadith RW. Pluripotent rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overt coat color chimeras following injection into blastocysts. *Mol Reprod Dev* 1996; 46: 439-43.
7. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Hearn JP. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod* 1996; 55: 254-9.
8. Vassilieva S, Guan K, Pich U, Wobus AM. Establi-

- shment of SSEA-1- and Oct-4-expressing rat embryonic stem-like cell lines and effects of cytokines of the IL-6 family on clonal growth. *Exp Cell Res* 2000; 258 (2): 361-73.
9. 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.
 10. 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.
 11. Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 2000; 28: 31-40.
 12. Nakayama N, Lee J, Chiu L. Vascular endothelial growth factor synergistically enhances bone morphogenetic protein-4-dependent lymphohematopoietic cell generation from embryonic stem cells *in vitro*. *Blood* 2000; 95: 2275-83.
 13. Hirashima M, Kataoka H, Nishikawa S, Matsuyoshi N, Nishikawa S. Maturation of embryonic stem cells into endothelial cells in an *in vitro* model vasculogenesis. *Blood* 1999; 93: 1253-63.
 14. Yamane T, Hayashi H, Mizoguchi M, Yamazaki H, Kunisada T. Derivation of melanocytes from embryonic stem cells in culture. *Dev Dyn* 1999; 216: 460-9.
 15. Rossant J. Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *J Embryol Exp Morphol* 1976; 36: 283-90.
 16. Moore NW, Adams CE, Rowson LE. Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. *J Reprod Fertil* 1968; 17: 527-31.
 17. Willadsen SM. The development capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. *J Embryol Exp Morphol* 1981; 15: 165-72.
 18. Menino AR, Wright RW. Effect of pronase treatment, microdissection, and zona pellucida removal on the development of porcine embryos and blastomeres *in vitro*. *Biol Reprod* 1983; 28: 433-46.
 19. Chan AW, Dominko T, Luetjens CM, Neuber E, Martinovich C, Hewitson L, et al. Clonal propagation of primate offspring by embryo splitting. *Science* 2000; 287: 317-9.
 20. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Toschi M, Esposito F, Fasolino MC. The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability. *Hum Reprod* 2004; 19: 1163-9.
 21. 성지혜, 윤현수, 이종수, 김철근, 김문규, 윤용달. 포유동물의 배아 및 기간세포의 분화와 세포사멸 기작: I. 생쥐 배아줄기세포의 확립과 분화유도에 미치는 생식호르몬의 영향. *발생과 생식* 2002; 6: 55-66.
 22. Tesar PJ. Derivation of germ-line-competent embryonic stem cell lines from preblastocyst mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102: 8239-44.
 23. Chung Y, Klimanskaya I, Becker S, Marh J, Lu SJ, Johnson J, et al. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* 2006; 439: 216-9.
 24. Suzuki O, Matsuda J, Takano K, Yamamoto Y, Asano T, Naiki M, et al. Effect of genetic background on establishment of mouse embryonic stem cells. *Exp Anim* 1999; 48: 213-6.

= 국문초록 =

목적: 본 연구에서는 착상전 생쥐 배아에서 분리한 할구를 이용하여 배아줄기세포주를 확립하고 그 효용성과 특성을 살펴보고자 하였다.

연구방법: 생쥐 (C57BL/6J)의 2- 또는 4-세포기 배아에서 투명대를 제거하고 할구를 분리하여 지지세포와 공동배양한 후 할구로부터 형성된 내세포괴를 분리하여 계대배양을 실시하였다. 계대배양 중인 세포주의 특성을 확인하기 위해 alkaline phosphatase 활성도와 표지 인자 및 관련 유전자 발현을 세포면역화학적 염색과 RT-PCR 방법으로 살펴보았다. 또한, 계대배양 중인 배아줄기세포주의 염색체 분석을 실시하였다.

결과: 전체적으로 2-세포기에서 분리한 할구와 4-세포기에서 분리한 할구에서 각각 3.0% (1/33)와 4.0% (1/25)의 효율로 배아줄기세포주를 확립할 수 있었다. 이는 4-세포기의 배아를 사용하였을 때의 16.7% (5/30)에 비해 현저하게 낮았다. 분리된 할구로부터 확립된 배아줄기세포주에서 SSEA-1과 Oct-4의 발현을 관찰하였고, 이들에게서 분화된 배아체에서 삼배엽성 분화 관련 유전자들의 발현도 확인할 수 있었다.

결론: 본 연구에서는 동물모델을 이용하여 착상전 초기 배아에서 분리한 할구를 이용하여 배아줄기세포를 확립할 수 있음을 확인하였다. 지속적인 관련 연구를 통해 인간의 체외수정 및 배아이식술에서 배아의 파괴 또는 발생 능력에 손상을 주지 않고 새로운 인간 배아줄기세포주를 생산할 수 있는 방법을 개발하고 실용화할 수 있을 것으로 사료된다.

중심단어: 생쥐 배아줄기세포, 분리된 할구, 유전자 발현, 배아체, 동물 모델