



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2008년 2월
석사학위논문

태반조직으로부터 유래한
다분화능 줄기세포의 분리 및
특성화

조선대학교 대학원

의학과

송수영

태반조직으로부터 유래한
다분화능 줄기세포의 분리 및
특성화

*Isolation and characterization of placental
tissue-derived multipotent stem cell*

2008년 2월 25일

조선대학교 대학원

의학과

송수영

태반조직으로부터 유래한
다분화능 줄기세포의 분리 및
특성화

지도교수 송 창 훈

이 논문을 의학석사학위신청 논문으로 제출함.

2007년 10월

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

송 수 영

송수영의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 정 혁 印

위 원 조선대학교 교수 최 상 준 印

위 원 조선대학교 교수 송 창 훈 印

2007년 11월

조선대학교 대학원

목 차

표목차	1
도목차	2
영문초록	3
I. 서론	5
II. 연구재료 및 방법	7
III. 결과	11
IV. 고찰	13
참고문헌	18
표	23
그림	26

표 목 차

표 1 : 태반조직 간엽줄기세포의 표면항원의 발현

표 2 : 양막, 융모영양막, 탈락막 세포의 표면항원 발현

표 3 : 골수, 제대혈, 양막, 융모영양막 세포의 표면항원 발현

도 목 차

도 1 : 태반유래 간엽줄기세포

- A. 제대혈유래 간엽줄기세포
- B. 용모영양막 간엽줄기세포
- C. 양막 간엽줄기세포
- D. 제대조직 간엽줄기세포

도 2 : 분화유도

- A. 지방분화
- B. 골 분화
- C. 신경분화

도 3 : 태반조직 간엽줄기세포

- A. 양막유래 간엽줄기세포
- B. 용모영양막 유래 간엽줄기세포

도 4 : 표면항원의 발현

ABSTRACT

Isolation and characterization of placental tissue-derived multipotent stem cell

Song Soo Young

Advisor : Prof. Song Chang Hun

Department of Medicine

Graduate School of Chosun University

It is becoming increasingly evident that human adult somatic tissues can serve as a reliable source of multipotent stem cells. In this study, we isolated the fibroblast-like cells from human placenta tissues and characterized it using the FACS analysis. We confirmed the multipotentiality of cellular differentiation from placenta fibroblast-like cell into bone, adipose tissue and neuron. Placenta-derived clones were highly proliferative and immunophenotypically positive for CD13, CD29, CD44, CD54, CD73(SH3), CD90, CD105(SH2) and HLA class I, but negative for CD14, CD34, CD45 and HLA-DR. Incubation of these MSC with osteogenic agents resulted in development of osteocytes. Under proadipogenic conditions, several oil vacuoles appeared in the cells. Exposure of cells to basic fibroblast growth factor resulted in neural differentiation. Adipogenic, osteogenic and neurogenic differentiation demonstrated a multilineage capacity of the cells comparable with bone marrow derived MSC. By considering ease in collection, banking and availability, placenta-derived multipotent stem cells might offer an added therapeutic advantage compared to marrow. In addition, these multilineage cells unlike bone marrow cells, have a lower precursor frequency and a lower level of bone marrow antigen expression, and lack neural antigens. Altogether, the placental derived multipotent cells are intriguing as a potential source of cells for cellular therapeutics for stromal, bone and

neural repair.

I. 서 론

조혈모 줄기 세포가 임상적으로 활용된 것은 이미 오래 전이지만, 간엽 줄기 세포가 새롭게 관심을 모으기 시작한 것은 비교적 최근이라고 할 수 있다. 간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cell)는 일반적으로 골수에서 조혈작용을 돕는 지지세포(stroma)로 알려져 있으며, 뼈, 연골, 지방, 근육 세포를 포함한 여러 가지 중배엽성 세포로 분화하는 능력을 지닌 세포이다. 이와 유사한 특성을 가지는 중배엽성 제대혈 및 지방 유래의 줄기 세포에 관한 연구는 아직 초기 단계이며 골수 유래 중간엽 줄기 세포와는 세포학적으로 큰 유사점을 가지고 있다. 골수에서 분리한 중간엽 줄기 세포는 골격근 세포, 간세포, 신경 세포, 혈관 내피 세포, 피부 상피 세포, 내장 세포 등으로 분화할 수 있는 특성을 갖고 있음이 보고되었다.(Paolo Bianco,2001) 최근에는 간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cell)가 섬유 세포와 형태적으로 유사할 뿐만 아니라 조혈모 세포의 중요한 미세환경 역할을 한다는 연구가 보고되었다.(Marius Z. Ratajczak, 2007) 다분화능을 가진 간엽 줄기 세포가 최근 많은 관심을 모으는 배경은 조직 재생 의학의 세포 치료제로서 가능성을 가지고 있기 때문이다. 간엽 줄기 세포는 각 장기의 손상을 치료하는 세포 치료제로서 활발히 연구되고 있다.(Seung Hwan Yoon, 2007) 따라서, 연구자들은 인체의 여러 장기 및 조직들로부터 간엽 줄기 세포를 분리하기 시작하였으며, 분리한 간엽 줄기 세포를 이용한 질병치료 연구에 많은 관심과 노력을 기울이고 있다.

그러나, 간엽 줄기 세포의 분리 방법과 명칭, 특성 등이 다를 뿐만 아니라, 기원 조직의 종류에 따라 다양성이 존재한다.(Susanne Kern, 2006) 이처럼, 간엽 줄기 세포에 대한 연구자들의 견해가 다양하여 ISCT(International Society for Cellular Therapy)에서는 ‘다분화능 간엽

기질 세포'(multipotent mesenchymal stromal cells)로 명명할 것을 결정하였으며 다음과 같은 간엽 줄기 세포의 최소 정의(minimal criteria)를 제시하였다. 첫째는 배양 접시에 부착된 세포이며, 둘째는 간엽 줄기 세포 특이 표면 항원을 가지고 있어야 하며, 셋째는 다분화능을 가지고 있어야 할 것 등이었다.(M Dominici, 2006)

Susanne Kern(2006)등은 간엽 줄기 세포의 주된 공급원으로 알려진 골수 조직과 지방 조직, 그리고 제대혈로부터 유래한 다분화능 줄기 세포를 비교 분석하였다. 또한 Yumi Fukuchi (2004), Pieternella S.(2004)등은 다분화능 간엽 줄기 세포의 새로운 공급원으로서 태반 조직 유래 간엽 줄기 세포를 분리하는데 성공함으로써 골수 조직이나 제대혈 등과 함께 다분화능이 높은 간엽 줄기 세포의 공급원으로 알려지게 되었다. 따라서, 2007년 3월 이태리에서 열린 제 1 회 국제 태반 유래 간엽 줄기 세포 워크샵에서 태반 조직 유래 간엽 줄기 세포에 대한 특성과 정의가 논의되었다.(Ornella Parolini,2007)

본 연구의 목적은 분만 후 폐기되는 태반 조직으로부터 다분화능을 지닌 간엽 줄기 세포를 분리함으로써 태반 유래 간엽 줄기 세포의 임상적인 응용의 가능성을 확인하고자 하였으며, 태반과 태아막의 여러 조직학적 부위로부터 분리한 간엽 줄기 세포의 특성을 유세포 측정법에 의한 표면항원의 면역 표현형을 중심으로 비교하여, 태반 유래 간엽 줄기 세포의 조직 부위별 차이를 이해하고자 하였다.

II. 연구재료 및 방법

A. 태반조직의 분류

본 연구에서 비교 분석하고자 하는 태반 조직은 다음과 같은 분류법을 적용하였다. 즉, 1) 태반 용모 영양막 조직 2) 양막 조직 3) 제대 조직의 세부분으로 분류하였다. 태반 용모 영양막 조직은 모체 자궁벽과 접촉하는 영양막(trophoblast) 조직과 영양막 조직이 부착된 용모막 부위를 포함시켰다. 양막 조직은 양막 용모막을 분리한 다음 양막 조직만을 절제하였으며, 용모막은 포함시키지 않았다. 제대 조직은 제대를 감싸고 있는 제대 표면의 양막 조직과 와튼 젤리(Warton Jelly) 조직 및 제대동정맥 혈관을 포함한 조직으로 하였다.

B. 태반조직의 채취

1. 태반의 수거와 일차적인 처리

산모로부터 태반 조직을 연구 목적으로 사용하고자 한다는 동의서를 확보한 예를 대상으로 분만 후 태반 만출이 이루어지면 즉시 만출된 태반에 대한 무균적 처리 과정을 거친다. 태반 조직의 대사와 태반 혈관 내 혈액의 응고를 막기 위해서 항응고제가 포함된 일차 관류액으로 관류를 시키고, 일차 관류가 끝난 태반은 각각 양막 부위, 용모막 부위, 제대 부위를 채취 한 후 PBS용액에 넣어서 세포 배양실로 옮긴다.

2. 태반의 세척에 의한 혼합 혈액의 제거

배양실에 운반된 태반은 다시 혼합 혈액과 혼합 잔류 조직을 제거하기위한 태반 세척을 PBS용액으로 2회 시행한다.

C. 다분화능 줄기세포의 분리 및 배양

Trophogel을 이용한 배양 접시에 심은 태반 조직을 24시간 이내에 배지를 교환하는데, 이때 사용하는 배지는 DMEM과 함께 태반 추출액과 항산화 물질을 첨가한 복합 배지를 사용하여 간엽 줄기 세포의 증식력과 생존력을 향상시킨다. 그 다음부터는 일주일에 1회씩 교환하면서 2, 3주부터 간엽 줄기 세포 콜로니 형성을 관찰한다. 콜로니 형성이 관찰되면 이를 24웰 배양관 혹은 6웰 배양관으로 적절한 세포 밀도를 유지하면서 간엽 줄기 세포 유지 전용 배지를 이용하여 계대 배양한다.(이를 P1이라 칭한다. 세포 밀도는 대개 $3,000\text{cells}-10,000\text{cells}/\text{cm}^2$ 를 유지한다) P1에서부터 계대 배양을 하면서 (P2, P3, P4, ...) 세포수에 알맞도록 적절히 배양 접시의 면적을 늘려가며, 배지 교환은 2-3일 간격으로 하고, 필요에 따라 바이알 당 10^6 개의 세포수를 만들어 태반 조직 유래 간엽 줄기 세포를 저장한다.

D. 분화 유도

1. 골분화

태반 유래 줄기 세포가 간엽 조직 세포로 분화하는 특성을 지니는지 확인하기 위해, 골세포의 분화를 유도하였다. 골세포 분화에 사용된 배양액은 베타 글리세롤 인산(β -glycerol phosphate), 2인산 아스코르빅산(ascorbic acid 2-phosphate), 덱사메타손(dexamethasone)과 같은 조성을 지니며, 단층배양을 수행하여 분화를 유도하였다. 배양액은 일주일에 2회 교체해 주었으며, 분화 유도 배양 후 2주일된 세포를 샘플링하여 조직 화학적 분석을 수행하였다. 골세포 분화용 전용 배지 (OM)에서 2-4주간 분화 유도시킨 간엽 줄기 세포를 ALP염색법(ALP 발현정도)이나 Von Kossa염색법(calcium mineralization)

을 이용하여 골분화 정도를 확인하였다.

2. 지방 분화

태반 유래 줄기 세포가 간엽 조직 세포로 분화하는 특성을 지니는지 확인하기 위해 지방 세포의 분화를 유도하였다. 지방 세포 분화에 사용된 배양액은 덱사메타손(dexamethasone), 메틸-이소부틸잔틴(3-isobutyl-1-methyl-xanthine), 인도메타신(indomethacin), 인슐린(insulin) 같은 조성을 지니며, 단층 배양을 수행하여 분화를 유도하였다. 간엽 줄기 세포를 간엽 줄기 세포 배지에서 배양한 후, 지방 세포 분화 유도 배지에서 36시간, 지방 세포 유지 배지에서 24시간 배양한 다음 3회 반복 실시하고, 지방 세포 유지 배양액은 일주일에 2회 교체해 주었으며 오일레드 O(oil red O) 염색을 실시하였다. 분화 유도 배양 후 1주 간격으로 세포를 샘플링하여 조직 화학적 분석을 수행하였다.

3. 신경 분화

태반 조직 유래 중간엽 줄기 세포를 12웰 플레이트에 cm^2 면적당 2,500개의 농도로 파종한 후 하루 동안 배양하였다. 신경 세포로의 분화 유도를 위해 상기 세포를 염기성-섬유아세포 인자(10 ng/ml)와 우태 혈청(20% FBS)을 함유한 DMEM 배양액으로 24시간 동안 전처리를 하였다. 이를 다시 2% DMSO와 200 μM BHA가 함유된 DMEM 배양액에서 30분에서 6일 동안 반응시켜, 우선적으로 현미경하에서 형태학적으로 신경 세포로의 분화를 확인하였다. 대개는 1시간에서 6시간 이내에 반응이 최대로 이루어짐을 확인할 수 있었다.

신경 세포 분화는 4단계로 나누어 연속해서 분화 유도를 진행하였다.

각 단계마다 3일간 배양하고 그 다음 단계의 분화 배지로 교환하였다.

1단계 : 5 ng/ml bFGF, 0.5 μM retinoic acid, 1 mM 2-mercaptoethanol in IMDM(Iscove's modified Dulbecco's medium)

2단계 : 1 uM cAMP(cyclic adenosine monophosphate) in IMDM

3단계 : 10 uM hydrocortisone 1 mM cAMP in IMDM

4단계 : 20 ng/ml aFGF(acidic fibroblast growth factor), 10 ng/ml SHH (sonic hedgehog), 10 ng/ml NGF(nerve growth factor), 25 ng/ml vitronectin, 0.1 mM IBMX, 10 uM forskolin, 20 nM PMA (phorbol myristate acetate) in IMDM의 순으로 하였다.

E. 태반조직 유래 다분화능 줄기세포의 확인

태반 조직 유래 세포가 다분화능 줄기 세포의 특성을 지니고 있는지 확인하기 위해, 세포 표면 항원 발현 양상을 다음과 같이 조사하였다. 면역표현형 확인의 대상이 된 항원은 조혈 관련 항원인 CD14, CD34, CD45, 조직적합 항원인 HLA-DR(클래스 2), 인테그린 수용체 항원인 CD29, 매트릭스 수용체 관련 항원인 CD44, CD106, 그리고 중간엽 줄기 세포 특이적 발현 항원인 SH2 (CD105), SH4 (CD73)와 기타 항원인 THY-1 (CD90)이었다. 대조군으로서 FITC나 PE가 라벨된 동종 항체를 이용하였다. 시료의 준비는 다음과 같이 실시하였다. 계대 배양한 세포 (통상 4세대에서 8세대)를 $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ 개가 되도록 준비하여 1% FBS를 포함하는 PBS용액에서 4°C, 30분간 반응시켜 비특이적 반응을 줄이기 위한 블로킹(blocking) 과정을 실시한다. 이를 다시 PBS로 1회 세척한 다음, 준비된 세포를 0.1% FBS를 포함하는 PBS용액에서 상기 서술한 항체와 4°C, 30분간 반응시켰다. 항원의 발현 여부는 유세포 분석기(flow cytometer)를 이용하여 확인하였다. 태반 조직의 부위별 발현 양상을 비교하기 위하여, 태반 용모영양막 조직군과 양막 조직군을 비교 분석하였다.

III. 결 과

A. 태반조직유래 줄기세포의 배양

Trophogel을 이용한 배양 접시에 심은 태반 조직에서 배양 시작 후 2, 3주 후부터 섬유 세포양의 군집(colony)형성을 관찰하였다. 태반의 부위별 군집 발현 양상은 융모영약막 세포와 양막 세포 및 제대 조직 세포간에 발견 시기 및 형태학적 차이를 보이지 않았다. 다만, 양수로부터 분리한 군집에서 양수 유래 줄기세포 특이 형태를 관찰할 수 있었다. 태반 조직으로부터 섬유 세포 양 군집을 분리하는 평균 분리율은 50%였고, 평균 증식률은 5 계대였으며, 태반 조직 부위별 차이는 없었다.(도 1,3)

B. 분화 유도

1. 지방 분화

지방 분화 유도 배양 후 포르말린으로 고정시킨 골조직을 오일레드 O(oil red O)로 염색하였다. 그 결과 오일레드 O에 의해 붉게 염색된 지방 방울이 세포 내에 생성된 것으로 태반 조직 유래 줄기 세포가 지방 세포로 분화되었음을 확인할 수 있었다. 지방 분화의 양상은 태반 조직 부위별 차이를 보이지 않았다.(도2-A)

2. 골분화

태반에서 유래된 줄기 세포를 골로 분화 유도한 후 2주일에서 양성 소견이 관찰되었다. 또한 본 조사 염색결과, 세포의 칼슘 축적량이 증가함을 확인할 수 있었다. 이처럼 분화된 세포가 골모세포의 중요 성분인 알칼린 포스파타아제를 발현하고, 세포 외부로 칼슘을 축적하는 것을 관찰하였다. 골분화의 양상은 태반 조직 부위별 차이를 보이지 않았다.(도2-B)

3. 신경 분화

태반 조직 유래 줄기 세포의 신경 분화 확인은 신경 돌기와 축삭의 형태를 현미경 하에서 관찰함으로써 확인하였다. 신경 분화의 양상은 태반 조직 부위별 차이를 보이지 않았다.(도2-C)

C. 태반 조직 유래 다분화능 줄기 세포의 표면 항원

태반 조직으로부터 유래한 섬유 세포 양 세포의 FACS분석 결과, 태반 유래 간엽 줄기 세포의 음성 항원으로 알려진 CD14, CD34, CD45, HLA-DR의 발현 양상이 2% 이하의 음성 소견을 보이고 있었고, 계대 배양에 따른 계대수와 관계없이 유사한 결과를 보였다. 태반 유래 간엽 줄기 세포의 양성 항원인 CD73, CD90, CD105의 경우 CD 73은 95.68%, CD90은 80.39%, CD105는 45.26%의 양성소견을 보였다. 그 외 간엽 줄기 세포의 양성 지표로 널리 알려진 CD29, CD44가 각각 99.38%와 98.93%로서 높은 양성 소견을 보였다.(표1)

태반 조직의 부위별 특성을 비교한 분석에서 태반 유래 간엽 줄기 세포의 음성 항원인 CD14, CD34, CD45, HLA-DR은 양막 조직과 융모 영양막 조직에서 음성을 보임으로서 차이를 나타내지 않았다. 양성 표면 항원인 CD73, CD90, CD105, CD29, CD44에서 양군간의 약간의 차이를 보였는데, 양막 조직에서는 CD90이 63.2%로서 약간 낮은 양성을 보였고, 융모 영양막 조직에서는 CD105에서 37.81%를 보임으로서 상대적으로 낮은 발현율을 보였다.(표 2) 골수 유래 간엽 줄기 세포와 체대혈 유래 간엽 줄기 세포와의 차이를 비교한 실험에서는 음성 표면 항원의 경우 골수, 체대혈, 양막, 융모 영양막 조직 모두에서 차이를 보이지 않았으나, 양성 표면 항원의 발현 양상에서 태반 유래 간엽 줄기 세포의 양성 발현율이 골수 및 체대혈 유래 간엽 줄기 세포에 비해서 높은 양성율을 보였다. 특히 CD105의 경우 양막 조직 유래 간엽 줄기 세포의 경우 골수나 체대혈 및 융모 영양막 조직 유래 간엽 줄기 세포에 비해서 높은 양성율을 보였다.(표 3)(도 4)

IV. 고찰

간엽 줄기 세포의 다분화능에 대한 임상적인 관심이 높아지면서, 세포 치료 영역에서 다양한 조직 유래의 다분화능 간엽 줄기 세포가 분리되었으며 이들 간엽 줄기 세포는 기원 조직에 따라서 다양한 양상을 보이고 있다. Susanne Kern(2006)등은 골수 줄기 세포가 갖는 유사한 다분화능 줄기 세포로서 제대혈 및 지방 조직 유래 줄기 세포를 비교 분석하였는데, 다분화능 및 면역 표현형의 차이를 보이지 않을지라도 골수 줄기 세포는 제대혈 줄기 세포에 비해서 배양기간이 짧은 반면에, 증식률이 떨어지고, 제대혈 줄기 세포는 배양 기간이 길고 증식률이 높다는 특성을 가지고 있음을 보고하였다. 또한 골수 유래 간엽 줄기 세포는 제공자의 나이와 병력에 따라 다양한 차이를 보이고 있으며, 골수 채취를 위한 침습적인 방법도 단점으로 지적된다고 하였다. 따라서, 최근에는 제대혈 유래 간엽 줄기 세포나 지방 유래 간엽 줄기 세포를 이용한 세포 치료제의 개발이 활발히 연구되고 있는데 Yumi Fukuchi (2004), Pieternella S.(2004)등은 태반 조직으로부터 다분화능 간엽 줄기 세포를 분리함으로써 태반 유래 간엽 줄기 세포에 대한 관심이 모아지고 있다. 즉 태반은 분만 후 폐기되어지는 조직으로서 제대혈과 함께 활용 가능한 다분화능 간엽 줄기 세포 공급원으로 널리 알려지게 되었다.

본 연구에서는 태반 조직의 각 부위로부터 배양하여 분리한 세포 군집의 형태와 분리율 및 증식율을 확인하였는데, 제대혈 유래 간엽 줄기 세포에서 볼 수 있는 섬유 세포양 세포의 증식을 관찰할 수 있었다. 세포의 형태학적 특징에서 제대혈 유래 간엽 줄기 세포나 골수 유래 간엽 줄기 세포 및 섬유 세포와 유사한 형태를 보였다. 이러한 간엽 줄기 세포의 형태학적 특성으로 인하여, 흔히 섬유 세포와 명확한 구별이 어려운 점이 임상적인 활용에서 문제로 제기되기도 하였다. 섬유 세포와 간엽 줄기 세포는 형태학적인 유사점과 함께 표면 항원의 발현 양상도 매우 유사한 것으

로 보고되었다.(Suzdal'tseva YG, 2007) 따라서, 섬유 세포와 간엽 줄기 세포를 구별해 내는 표면 항원에 대한 연구가 진행되기도 하였으나 동시에 섬유 세포가 중간엽 유래의 세포들로 분화된다는 보고도 있다.(Kazuhiro Sudo, 2007)

즉, 간엽 줄기 세포는 골수(Pittenger MF,1999), 지방 조직(Zuk PA, 2002), 제대혈(Lee MW,2005; Hou L, 2003), 피부(Jean G. Toma, 2005), 태반 조직(Yumi Fukuchi, 2004; Yumi Fukuchi,2004) 등으로부터 얻을 수 있는데, 이들 조직들로부터 얻어진 세포는 배양 접시에 부착되어 계대 배양이 가능하며, 동시에 중간엽 유래 세포들로 분화가 이루어진다. 반면에, 분화가 일어나지 않는 부착 세포들은 섬유 세포라고 추정하였다. 그래서, 각 장기 조직으로부터 배양된 부착 세포들은 분화 실험에 의해 입증되지 않은 경우 섬유 세포양(fibroblastic) 세포로 간주되었다. 그러나, Kazuhiro Sudo(2007) 등의 연구에 의하여 섬유 세포 역시 다양한 세포들로 분화가 이루어지는 것으로 보아 여기에는 간엽 줄기 세포와 간엽 전구 세포들이 포함되어 있음을 제시하였다. 본 연구에서도 태반 조직으로부터 일차 배양된 섬유 세포양 세포가 과연 다분화능을 지닌 간엽 줄기 세포인가 아니면 섬유 세포인가를 확인할 수 있는 유일한 방법으로서 분화 유도를 시도하는 방법을 택하였으나, 섬유 세포가 많은 간엽 줄기 세포 혹은 전구 세포를 함유하고 있다는 연구보고에 대한 추가 연구가 필요하다고 생각된다.

이러한 관심을 반영하듯이 2007년 제 1 회 “Workshop on Placenta Derived Stem Cells”에서는 태반 유래 간엽 줄기 세포에 대한 최소한의 기준 및 정의를 설정한 바 있다.(Ornella Parolini, 2007) 그런데, 이 기준 및 정의는 다분화능 간엽 줄기 세포에 대한 ISCT(International Society for Cellular Therapy)의 정의와 동일하다. 즉, ISCT에서는 다분화능 간엽 줄기 세포의 양성 표면 항원으로서 CD105, CD73, CD90이 각각 95%이상 발현되는 경우와 음성 표면 항원인 CD45, CD34, CD14 혹은 CD11b,

CD79혹은 CD19, HLA-DR이 각각 2%이하의 발현율을 보이는 경우로 정의하였다. 또한 세포 배양시 배양 접시에 부착된 세포로서 골분화, 지방 분화, 연골 분화등의 분화능을 가지는 세포로 규정하였다. (M Dominici, 2006)

본 연구결과 태반 조직으로 분리한 배양 접시에 부착되어 계대 배양이 이루어진 섬유 세포양 세포들의 다분화능에 대한 실험은 ISCT에서 제시한 기준에 의해서 골분화, 지방 분화, 신경 분화를 확인하였으며, 골분화는 von Kossa염색법으로 골아 세포를 확인하였고 지방 세포 분화는 Oil Red O염색법으로 확인하였다. 표면 항원 발현 양상은 음성 표면 항원의 경우 모두 태반 유래 간엽 줄기 세포의 음성 표면 항원의 요건과 일치하였으나, 양성 표면 항원의 경우 CD105가 평균 45.26%, CD90이 80.39%로서 95%이상의 조건에는 약간 미치지 못하는 결과를 보였다. 이는 간엽 줄기 세포의 순도(purity)에 있어서 ISCT에서 제시한 기준에 미치지 못하는 결과로서 향후 배양 방법등의 기술적인 문제가 개선되어야 할 것으로 보인다.

본 연구에서는 태반을 발생학적 근원에 따라서 나누었는데, 즉, 태반은 양막, 융모막 및 탈락막으로 구성되었으며 탈락막은 모체측 조직이고, 양막과 융모막은 태아측 조직에 해당한다. 이 중 융모막은 수정란이 배반포 단계에서 자궁 내막에 착상할 당시에 영양막으로부터 유래하게 된 조직인 반면, 양막은 수정 후 8일째 내세포괴(inner cell mass)에 해당하는 외배엽(epiblast)로부터 유래하는 조직이다. 즉, 양막은 배아 발생이 이루어지는 동일한 조직으로부터 유래하고 있다.(Toshio Miki, 2005) 수정 후 3주째 즉, 양막 조직이 외배엽으로부터 형성된 후 2주 후에 장배형성(gastrulation)이 이루어지기 때문에 양막은 발생학적으로 초기 외배엽이지니고 있는 다분화능을 획득하고 있다.(Diwan SB,1976) 양막 세포의 특성에 관한 많은 연구들이 보고되었는데, 양막 세포는 줄기 세포의 특성 중의 하나인 MHC Class I 항원이 결핍되었으며(Akle CA,1981;Sakuragawa N, 1995) 양막 세포는 아세틸콜린, 도파민, 노르에피

네프린과 같은 신경 전달 물질을 생산하는 신경 세포로 분화가 가능하다.(Elwan MA,1997; Kakishita K, 2000) 또한, 다양한 태반 조직으로부터 다분화능 간엽 줄기 세포를 분리 하였으며,(Romanov YA, 2003 ; Fukuchi Y, 2004 ; Takahashi K, 2004) 양막 조직으로부터 다분화능을 지닌 간엽 줄기 세포가 분리됨을 확인하였다.(Tsai MS,2004 ; In't Anker PS,2003) 따라서, 본 연구에서는 태반 조직의 부위에 따른 표면 항원의 발현 양상을 비교하기 위하여 양막 조직 유래 다분화능 줄기 세포와 용모 영양막 조직 유래 다분화능 줄기 세포, 그리고 탈락막 유래 다분화능 줄기 세포를 FACS 분석하였다. 그 결과 간엽 줄기 세포의 음성 표면 항원인 CD14, CD34, CD45, HLA-DR은 양막, 용모 영양막, 탈락막 유래 세포에서 모두 2%이하의 음성 발현을 보였고, 양성 표면 항원중 CD73은 모든 조직으로부터 높은 양성 발현을 나타낸 반면에, CD105는 양막 유래 간엽 줄기 세포에서 97.95%로서 높은 양성율을 보였으나, 용모 영양막 조직에서는 37.81%, 탈락막에서는 3.61%의 낮은 발현율을 보였다. CD90은 용모 영양막 조직에서 98.5%의 높은 양성 발현을 보이는 반면, 양막 조직에서는 63.2%, 탈락막에서는 73.3%의 양성 발현율을 보였다. 그 외 CD29와 CD44는 모든 태반 조직 및 탈락막 조직으로부터 높은 양성 발현을 보였다. 또한, 태반 조직은 탈락막에 비해서 간엽 줄기 세포 양성 표면 항원의 발현율이 높게 나타남으로서 탈락막에 비해서 태반 조직이 다분화능 간엽 줄기 세포의 공급원으로 높은 순도를 보였다. 양막 조직과 용모 영양막 조직간의 표면 항원 발현의 차이는 CD105에서 현저한 차이를 보였는데, 양막에서는 97.5%의 높은 양성율을 보인 반면, 용모 영양막에서는 37.81%로서 낮은 발현율을 보였다. 또한 골수 유래 간엽 줄기 세포와 제대혈 유래 간엽 줄기 세포 및 양막 조직 간엽 줄기 세포의 표면 항원의 발현상의 차이를 비교한 결과 간엽 줄기 세포 양성 표면 항원인 CD105, CD73, CD29, CD44는 양막 세포에서 높은 양성율을 보인 반면, CD90은 양막 세포에서 비교적 낮은 양성율을 보였다. FACS분석에 의한 다분화능 간엽 줄기 세포의 표면 항원의 발현을 비교한 연구에서 태반 조직은 골수

나 제대혈 유래 간엽 줄기 세포와 유사한 특성을 보임으로서 다분화능 줄기 세포의 중요한 공급원으로 추정될 뿐만 아니라, 양막 유래 간엽 줄기 세포는 태반 조직 중에서 가장 다분화능 표면 항원의 발현율이 높게 나타나는 특성을 지니고 있음을 알 수 있었다. 이러한 표면 항원의 발현율이 양막 세포의 다분화능과 직접적인 관련성을 나타내고 있는지에 대한 연구가 있어야 하겠지만, 본 연구에서는 결론적으로 태반 유래 세포가 골, 지방, 신경 세포로의 분화능과 간엽 줄기 세포 표면 항원의 발현을 보임으로서 다분화능을 지닌 간엽 줄기 세포로서 특성을 지니고 있음이 확인되었고, 양막 세포는 골수, 제대혈, 용모 영양막, 탈락막 세포와 비교하여 높은 간엽 줄기 세포 표면 항원을 지닌 간엽 줄기 세포로 추정되었다.

참고문헌

Akle CA, Adinolfi M, Welsh KI et al. Immunogenicity of human amniotic epithelial cells after transplantation into volunteers. *Lancet* 1981;2:1003 - 1005.

Diwan SB, Stevens LC. Development of teratomas from the ectoderm of mouse egg cylinders. *J Natl Cancer Inst* 1976;57:937 - 942.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2007;9(3):301-2.

Elwan MA, Sakuragawa N. Evidence for synthesis and release of catecholamines by human amniotic epithelial cells. *Neuroreport* 1997; 8: 3435 - 3438.

Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D et al. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *STEM CELLS* 2004;22:649 - 658.

Hou L, Cao H, Wang D et al. Induction of umbilical cord blood mesenchymal stem cells into neuron-like cells in vitro. *Int J Hematol* 2003;78:256-261

In't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C et al. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 2003;102:1548 - 1549.

Jean G. Toma, Ian A. McKenzie, Darius Bagli, Freda D. Miller
Isolation and Characterization of Multipotent Skin-Derived Precursors from
Human Skin Stem Cells Jun 2005; 23: 727 - 737

Kakishita K, Elwan MA, Nakao N et al. Human amniotic epithelial cells
produce dopamine and survive after implantation into the striatum of a rat
model of Parkinson's disease: a potential source of donor for
transplantation therapy. Exp Neurol 2000;165:27 - 34.

Kazuhiro Sudo, Megumi Kanno, Kenichi Miharada, Saeri Ogawa, Takashi
Hiroshima, Kaoru Saijo, Yukio Nakamura
Mesenchymal Progenitors Able to Differentiate into Osteogenic,
Chondrogenic, and/or Adipogenic Cells In Vitro Are Present in Most
Primary Fibroblast-Like Cell Populations Stem Cells Jul 2007; 25: 1610 -
1617

Lee MW, Yang MS, Park JS et al. Isolation of mesenchymal stem cells
from cryopreserved human umbilical cord blood. Int J Hematol 2005;
81:126-130

Marius Z.Ratajczak, Ewa K. Zuba-Surma, Boguslaw Machalinski,
Magdalena Kucia. Bone-marrow-derived stem cells-our key to longevity?
J Appl Genet 48(4),2007,307-319

Ornella Parolini, Francesco Alviano, Gian Paolo Bagnara, Grozdana Bilic,
Hans Jörg Bühring, Marco Evangelista, Simone Hennerbichler, Bing Liu,
Marta Magatti, Ning Mao, Toshio Miki, Fabio Marongiu, Hideaki
Nakajima, Toshio Nikaido, C. Bettina Portmann-Lanz, Venkatachalam
Sankar, Maddalena Soncini, Guido Stadler, Daniel

Paolo Bianco, Mara Riminucci, Stan Gronthos, Pamela Gehron Robey
Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential
Applications Stem Cells May 2001; 19: 180 - 192

Pittenger MF, MackayAM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult
human mesenchymal stem cells. Science 1999;284:143-147

Pieterella S. in 't Anker, Sicco A. Scherjon, Carin Kleijburg-van der
Keur, Godelieve M.J.S. de Groot-Swings, Frans H.J. Claas, Willem E.
Fibbe, Humphrey H.H. Kanhai Isolation of Mesenchymal Stem Cells of
Fetal or Maternal Origin from Human Placenta Stem Cells Dec 2004; 22:
1338 - 1345

Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. Searching for alternative
sources of postnatal human mesenchymal stem *cells*: candidate MSC-like
cells from umbilical cord. STEM CELLS 2003;21:105 - 110

Sakuragawa N, Tohyama J, Yamamoto H. Immunostaining of human
amniotic epithelial cells: possible use as a transgene carrier in gene
therapy for inborn errors of metabolism. Cell Transplant 1995;4:343 - 346.

Seung Hwan Yoon, Yu Shik Shim, Yong Hoon Park, Jong Kwon Chung,
Jung Hyun Nam, Myung Ok Kim, Hyung Chun Park, So Ra Park,
Byoung-Hyun Min, Eun Young Kim, Byung Hyune Choi, Hyeonseon Park,
Yoon Ha Complete Spinal Cord Injury Treatment Using Autologous Bone
Marrow Cell Transplantation and Bone Marrow Stimulation with
Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor: Phase I/II Clinical
Trial Stem Cells Aug 2007; 25: 2066

Surbek, Tsuneo A. Takahashi, Heinz Redl, Norio Sakuragawa, Susanne Wolbank, Steffen Zeisberger, Andreas Zisch, Stephen C. Strom Isolation and Characterization of Cells from Human Term Placenta: Outcome of the First International Workshop on Placenta Derived Stem Cells Stem Cells 2007 November 8,

Susanne Kern, Hermann Eichler, Johannes Stoeve, Harald Klüter, Karen Bieback Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood or Adipose Tissue Stem Cells May 2006; 24: 1294 - 1301

Suzdal'tseva YG, Burunova VV, Vakhrushev IV, Yarygin VN, Yarygin KN.Capability of human mesenchymal cells isolated from different sources to differentiation into tissues of mesodermal origin. Bull Exp Biol Med. 2007 Jan;143(1):114 - 21.

Takahashi K, Igura K, Zhang X et al. Effects of osteogenic induction on mesenchymal cells from fetal and maternal parts of human placenta. Cell Transplant 2004;13:337 - 341.

Tsai MS, Lee JL, Chang YJ et al. Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. Hum Reprod 2004;19:1450 - 1456.

Toshio Miki, Thomas Lehmann, Hongbo Cai, Donna B. Stolz, Stephen C. Strom Stem Cell Characteristics of Amniotic Epithelial Cells Stem Cells Oct 2005; 23: 1549 - 1559

Yumi Fukuchi, Hideaki Nakajima, Daisuke Sugiyama, Imiko Hirose, Toshio

Kitamura, Kohichiro Tsuji Human Placenta-Derived Cells Have Mesenchymal Stem/ Progenitor Cell Potential Stem Cells Sep 2004; 22: 649 - 658

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 2002;13:4279-4295

표 1 : 태반 조직 간엽 줄기 세포의 표면 항원의 발현

FACS analysis of PL-derived cells

Immunophenotyping of Placenta-derived Cells (Source no.4)							
Antigens	CD no.	PL7-1-p6	PL8-1-p5	PL8-1-p7	PL10-1-p4	PL10-3-p4	Average
LPS-R	14	0.87	0.60	0.69	ND	ND	0.72
gp105-120	34	0.80	0.71	0.71	ND	0.77	0.75
LCA	45	ND	0.75	0.85	ND	0.81	0.80
Endoglin, SH2	105	0.87	82.02	40.02	96.26	7.14	45.26
SH-B, SH-4	73	97.53	98.88	98.00	96.16	87.84	95.68
Thy-1	90	93.83	91.29	56.05	ND	ND	80.39
beta 1 subunit	29	ND	99.42	99.34	ND	ND	99.38
VCAM-1	105	ND	0.99	0.92	ND	ND	0.96
HLA-ABC	none	98.32	99.41	99.20	ND	76.06	93.25
HLA-DR	none	0.75	0.51	0.67	ND	ND	0.64
HCAM-1	44	ND	99.00	98.86	ND	ND	98.93
HLA-DR associated protein	74	0.88	ND	ND	ND	0.87	0.88

표 2 : 양막, 용모 영양막, 탈락막 세포의 표면 항원 발현

FACS analysis of AM, EN, CT-derived cells

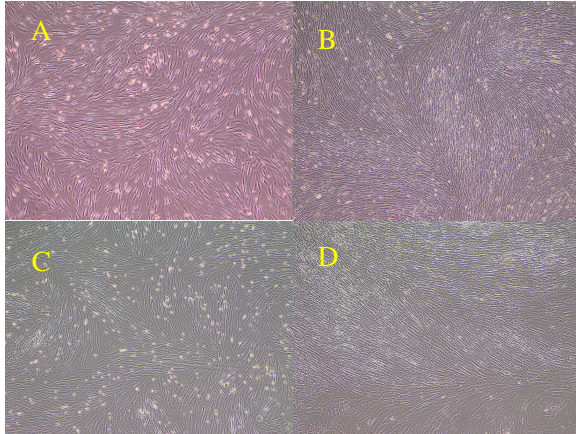
Immunophenotyping of Placenta-derived Cells				
Antigens	CD no.	AM1-1 (p5)	PL2-1 (p5)	EN1-1 (p5)
LPS-R	14	0.91	0.87	0.85
gp105-120	34	0.85	0.79	0.74
LCA	45	0.89	0.50	0.97
Endoglin, SH2	105	97.95	37.81	3.61
SH3, SH4	73	99.98	99.55	86.36
Thy-1	90	63.22	98.58	73.33
beta 1 subunit	29	100.00	100.00	96.36
VCAM-1	106	1.05	0.77	1.21
HLA-ABC	none	98.23	93.02	89.15
HLA-DR	none	0.72	0.85	0.88
HCAM-1	44	99.98	99.80	98.15
HLA-DR associated protein	74	1.07	0.78	0.75

표 3 : 골수, 제대혈, 양막, 용모 영양막 세포의 표면 항원 발현

Expression of Marker Ratio from Various Sources

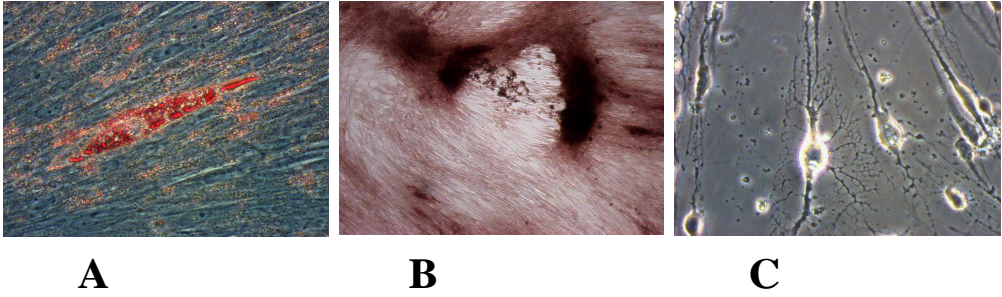
	hUSB- MSCs	hBM-MSCs	AM-Derived Cells	CT-Derived Cells
CD73	86.06 (+)	82.38 (+)	99.98 (+)	99.55 (+)
CD14	1.40 (-)	1.30 (-)	0.91 (-)	0.87 (-)
CD29	97.15 (+)	84.83 (+)	100 (+)	100 (+)
CD34	0.91 (-)	0.85 (-)	0.85 (-)	0.79 (-)
CD44	93.38 (+)	86.02 (+)	99.98 (+)	99.80 (+)
CD45	0.94 (-)	1.47 (-)	0.89 (-)	0.50 (-)
CD74	1.59 (-)	1.20 (-)	1.07 (-)	0.78 (-)
CD90	87.19 (+)	84.51 (+)	63.22 (+) *	96.58 (+)
CD105	36.47 (+/^{low})	17.34 (+/^{low})	97.95 (+)	37.81 (+) *
CD106	1.06 (-)	17.99 (+/^{low})	1.05 (-)	0.77 (-)
HLA-ABC	70.77 (+)	29.61 (+/^{low})	98.23 (+)	93.02 (+)
HLA-DR	1.32 (-)	2.36 (-)	0.72 (-)	0.85 (-)

도1. 태반 유래 간엽 줄기 세포



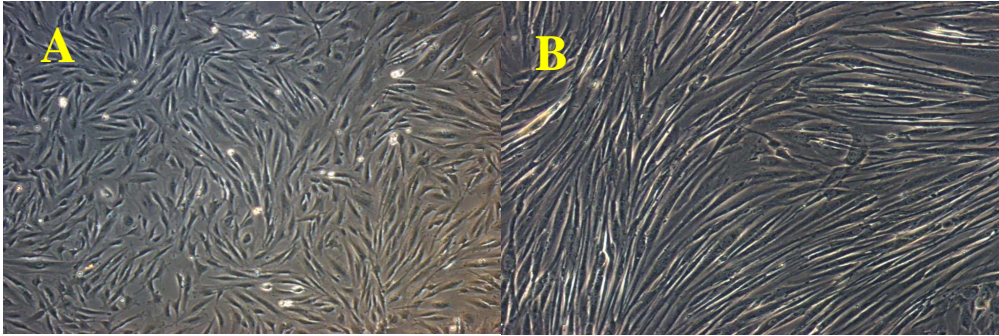
- A. 제대혈 유래 간엽 줄기 세포
- B. 용모 영양막 간엽 줄기 세포
- C. 양막 간엽 줄기 세포
- D. 제대 조직 간엽 줄기 세포

도2. 분화 유도



- A. 지방 분화
- B. 골 분화
- C. 신경 분화

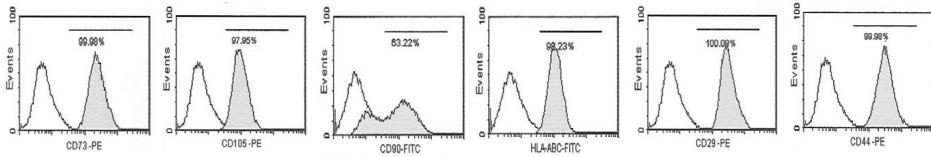
도 3 : 태반 조직 간엽 줄기 세포



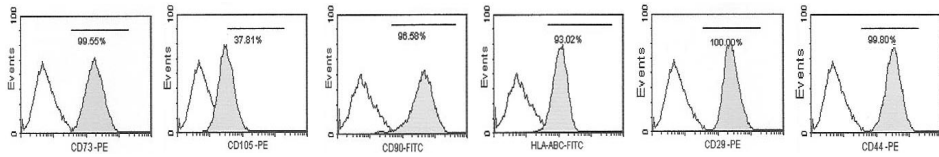
- A. 양막 유래 간엽 줄기 세포
- B. 융모 영양막 유래 간엽 줄기 세포

도 4 : 표면 항원의 발현

AM-driven cells



CT-driven cells



CD 73

CD 105

CD 90

HLA-ABC

CD 29

CD 44

저작물 이용 허락서

학 과	의학과	학 번	20057192	과 정	석사
성 명	한글: 송수영 한문: 宋 수영 영문: SONG SOOYOUNG				
주 소	광주광역시 북구 두암동 561-9				
연락처	e-mail : soo0e1@hanmail.net				
논문제목	한글: 태반조직으로부터 유래한 다분화능 줄기세포의 분리 및 특성화 영문: Isolation and characterization of placental tissue -derived multipotent stem cell				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의 (0) 반대 ()

2008년 2월

저작자: 송 수 영 (인)

조선대학교 총장 귀하