

21세기 프론티어연구개발사업  
세 포 응 응 연 구 사 업

인간 배아줄기세포의 초기분화 특성분석 및 조절에 의한  
세포치료용 기능성세포 분화유도기술의 확립

Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into  
functional cells by regulation of early differentiation fate

고려대학교

교육과학기술부

## 제 출 문

교육과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 교육과학기술부 특정연구개발사업 21세기프론티어연구개발사업 중 교육과학기술부가 지원하는 세포응용연구사업단 “인간 배아줄기세포의 초기분화 특성분석 및 조절에 의한 세포치료용 기능성 세포 분화유도기술의 확립에 관한 연구”과제(SC2050)의 단계보고서로 제출합니다.

2008. 5 . 30

주관연구기관명 : 고려대학교 산학협력단

주관연구책임자 : 김 종 훈

연 구 원 : 김 슬 기

” : 김 병 각

” : 길 정 은

” : 심 중 현

” : 유 현 주

## 보고서 초록

과제관리번호	SC2050	해당단계 연구기간	2005.04.01~ 2008.03.31	단계 구분	(2단계) / (총 3단계)
연구사업명	중 사업명	21세기프론티어연구개발사업			
	세부사업명	세포응용연구사업			
연구과제명	인간 배아줄기세포의 초기분화 특성분석 및 조절에 의한 세포치료용 기능성 세포 분화유도기술의 확립				
연구책임자	김 종 훈	해당단계 참여연구원수	총 : 6 명 내부 : 1 명 외부 : 5 명	해당단계 연구비	정부: 360,000천원 기업: 0천원 계: 360,000천원
연구기관명 및 소속부서명	고려대학교 생명과학대학 생명공 학부		참여기업명	해당없음	
국제공동연구	상대국명 : 해당없음	상대국연구기관명 :			
위 탁 연 구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)				보고서 면수	63
<p>1차년도 : 배아체 (embryoid body) 형성을 통하여 인간 배아줄기세포의 각 배엽 (내, 외, 중배엽)별 분화능을 확인함으로써 국내외에서 확립된 인간 배아줄기세포주들의 초기분화특성을 비교·분석하고, 원하는 최종 목적세포의 분화유도에 적합하며 본 연구과제의 성공적인 수행에 전략적으로 유리한 인간 배아줄기세포주 선정함</p> <p>2차년도 : 성장인자 및 싸이토카인의 조합적인 처리 및 저산소 배양기법 등 다양한 배양조건을 비교·분석하고 배아체의 각 배엽 및 목적 세포에 특이적인 유전자 및 단백질의 발현 조사함으로써 신경, 간, 췌장 등 특정세포로의 분화에 관련된 중요 분화조절인자를 발굴하고 효과적인 분화기법을 확립함</p> <p>3차년도 : 분화된 세포의 기능을 분석하기 위하여 각 세포별 활성을 생체 외에서 조사하고, 실험동물모델에 이식 후 면역화학염색기법을 이용한 이식된 세포의 기간별 형태, 생존율, 종양의 발생유무를 조사함과 더불어, 이식된 세포에 의한 실험동물모델의 행동적 혹은 생리학적 활성의 회복을 검증함</p>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	인간배아줄기세포, 분화, 내배엽, 외배엽, 췌장베타세포, 간세포, 신경세포			
	영 어	human embryonic stem cell, differentiation, endoderm, ectoderm. pancreatic beta cell, hepatic cell, neuron			

# 요 약 문

## I. 제 목

인간 배아줄기세포의 초기분화 특성분석 및 조절에 의한 세포치료용 기능성 세포 분화유도 기술의 확립

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

인간 배아줄기세포의 초기분화를 능동적으로 조절함으로써 간질환, 당뇨병, 신경질환 등의 세포치료에 사용가능한 기능성세포를 효과적으로 분화시키는 분화유도기법을 개발하고자 함

- 분화단계별 최적 분화인자조합 및 적정농도 확립기술 :

배아줄기세포로부터 특정질환의 세포치료를 위한 각종 체세포를 생산하기 위해서는 목적 세포의 발생·분화 단계에 독립적 혹은 조합적으로 관여하는 것으로 알려진 “다양한 성장인자 및 분화인자의 종류”를 검색하고 최적의 “처리농도 및 처리시기”를 결정하여 효율적이고 능동적인 분화유도기법을 확립할 필요가 있음.

- 단계별 분화양상 모니터링 및 분화된 목적세포의 생체내·외 기능성 검증기술 :

배아줄기세포로부터 특정 질환의 세포치료를 위한 목적세포로의 분화과정을 면밀히 분석하기 위해서는 “분화공정의 단계별로 존재하는 전구세포들의 특성 및 유전자와 단백질의 발현 양상 등을 시기 별로 모니터링” 할 수 있는 기술이 필수적으로 요구됨. 이와 더불어 최종 분화된 목적세포 (혹은 전구세포)의 “생존율, 안전성 및 기능성을 생체 내·외에서 검증”하여 세포치료제로서의 효능성을 입증하는 기술 역시 성공적인 임상적용의 선행요건이 됨.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

○ 1차년도:

[인간배아줄기세포의 초기분화특성 파악 및 능동적 초기분화 유도]

- 1) 배아체 (embryoid body) 형성을 통한 인간 배아줄기세포의 각 배엽 (endoderm, ectoderm, mesoderm, extraembryonic tissue)별 분화능 확인
- 2) 국내외에서 확립된 인간 배아줄기세포주들의 초기분화특성 비교
- 3) 분화유도에 적합하며 연구개발에 전략적으로 유리한 인간 배아줄기 세포주 선정

○ 2차년도:

[능동적 초기분화조절 기법 개발 및 각 배엽으로부터 기능성 체세포로의 분화유도]

- 1) 배아체의 각 배엽별 특이적인 유전자 발현 조사
- 2) 성장인자 및 사이토카인의 조합적인 처리에 의한 분화유도
- 3) 저산소 배양기법 (hypoxic culture)에 따른 분화양상 조사
- 4) 특정 표지인자를 이용한 배아체 내의 각 배엽별 분포 조사
- 5) 분화과정에 관련된 유전자의 발현 분석
- 6) 분화된 세포의 표지인자분석을 통한 특성 조사
- 7) 표지인자를 이용한 분화과정에서 존재하는 전구세포의 분석
- 8) 특정세포로의 분화에 관련된 중요 분화조절인자 발굴

○ 3차년도:

[기능성 세포로의 분화유도기법 확립 및 생체 내 이식후 생존율, 기능성, 안전성 검증]

- 1) 분화된 세포의 특이-활성분석을 통한 기능성 조사
- 2) 기능성세포로의 최종분화를 위한 분화조건 개발
- 3) 실험동물모델에 이식 후 면역화학염색기법을 이용한 이식된 세포의 기간별 형태 및 생존율 조사
- 4) 실험동물모델에 이식 후 의 이식된 세포로 기인한 종양의 발생유무를 조사
- 5) 이식된 세포에 의한 실험동물모델의 행동적 혹은 생리학적 활성의 회복을 통한 기능성 검증

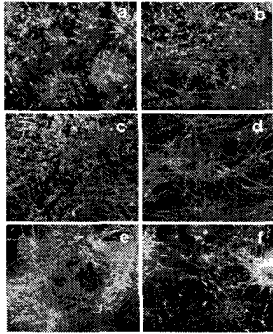
## IV. 연구개발결과

○ 연구결과

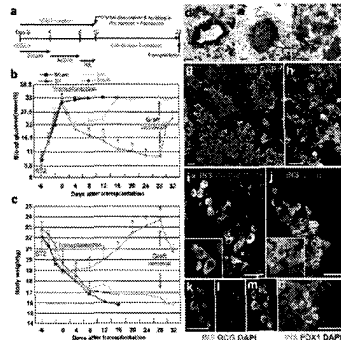
- 1) 본 과제의 성공적인 수행을 위하여 우선적으로 국내에서 확립된 인간 배아줄기세포주 2종 및 국외에서 확립된 1종의 세포주를 대상으로, 배아체 형성을 통한 각 세포주의 초기분화특성을 검증하고 비교분석 하였으며, 내배엽 (취장세포 및 간세포 분화용)과 외배엽 (신경세포 분화용)으로의 능동적인 분화유도 기법을 개발하였음
- 2) 1차 년도에 선정된 세포주를 이용하여 내배엽으로부터 취장세포의 전구세포 및 간세포로의 높은 분화수율을 나타내는 분화유도기법과 외배엽으로부터 효과적인 도파민성 신경세포 및 척수신경 회소돌기교세포의 분화유도기법, 총 4종의 기능성 체세포 분화유도기법을 개발하였음
- 3) 2차 년도에 개발한 분화기법을 발달시켜 성숙한 인슐린 분비성 취장세포로의 분화유도 기법을 확립하고 당뇨병 실험동물 모델에 이식하여 세포의 기능성을 검증하였으며, 분화 유도된

간세포를 세포활성을 이용하여 부분정제한 뒤 간질환 실험동물 모델에 이식하여 분화된 체세포의 기능성 및 안전성을 입증하였음

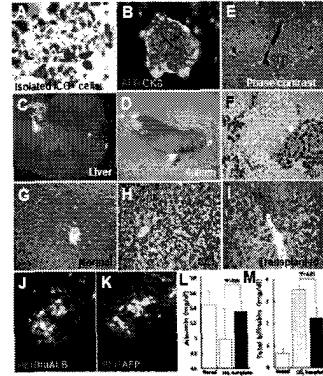
FGF4를 이용한 인간배아줄기세포로부터 신경내배엽 분화촉진 및 이로부터 도파민성 신경세포 대량생산



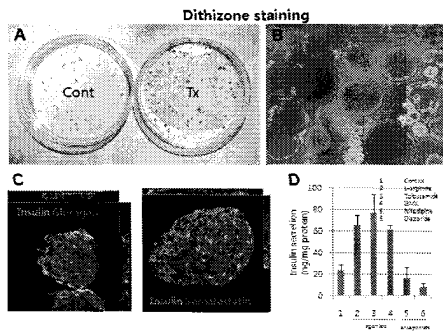
인간배아줄기세포로부터 분화 유도된 췌장전구세포의 생체 내 이식을 통한 기능성 검증: 당뇨병이 유발된 실험동물모델에서 혈당강화 효과 및 정상체중회복 효과 입증



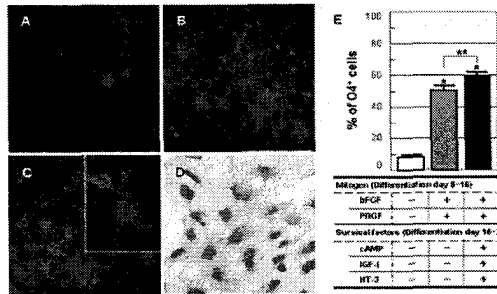
인간배아줄기세포로부터 분화된 간세포를 vital staining기법으로 부분 정제하여 간기능이 손상된 실험동물 모델에 이식함으로써 세포의 생존성 및 기능성을 검증



췌장전구세포로부터 당뇨병의 세포치료를 위한 인슐린분비성 췌장섬세포의 분화유도 성공 및 인슐린 분비능력 검증



Noggin, Sonic hedgehog, RA를 처리하여 신경계 형성과정 동안 caulization과 ventralization을 유도한 뒤, PDGF와 FGF2로 증폭된 척수소돌기아교세포의 전구세포를 분화시켜 척수신경 회소돌기아교세포 분화촉진에 성공



○ 주요연구성과

1. 인간배아줄기세포의 세포주별 분화특성 비교분석 확인 [SCI 논문게제 완료 (교신저자)]
2. 인간배아줄기세포로부터 췌장전구세포 분화 및 이식을 통한 기능성과 안전성 검증 [SCI 논문 게제 완료 (유럽당뇨학회지, 교신저자) 및 특허출원 완료 (국내 1건, 미국 1건)]
3. 인간배아줄기세포로부터 최종 성숙한 기능적 인슐린분비성-췌장 베타세포 분화유도 성공 [연구완료: SCI 논문 투고준비 중 (교신저자)]
3. 인간배아줄기세포로부터 척추신경 회소돌기아교세포로의 능동적 분화유도 성공 (특허출원 완료: 국내 1건 및 생체 내 이식 후 기능성 확인 중)
4. 인간배아줄기세포로부터 혈관내피성장 인자를 이용한 신경세포 분화유도 성공 (특허출원 완료: 국내 1건, 미국 1건)
5. 인간배아줄기세포로부터 기능성 간세포로의 능동적 분화유도 성공 [특허출원 완료: 국내 1건, 미국 1건 및 연구완료: SCI 논문 투고준비 중 (교신저자)]
6. 인간배아줄기세포 및 이로부터 유도된 신경줄기세포를 이용한 독성평가 분석

기초자료 제시 [미국독성학회지, SCI 논문계제 완료 (교신저자)]

7. 인간배아줄기세포로부터 저산소분압에 의한 분화양상 변이 분석

[연구완료: 특허출원 및 논문 투고 준비 중 (교신저자)]

## V. 연구개발결과의 활용계획

1) 난치성 질환의 일종인 파킨슨병, 당뇨병 및 간질환의 경우, “손상된 조직을 새로운 조직으로 대체하는 조직 재건방법”이 기존의 약물치료 및 외과적 수술의 한계를 극복하는 근본적인 치료방법으로 여겨지고 있으나 공여자의 부족으로 인한 조직 및 장기의 수급이 가장 문제점으로 되고 있음. 따라서 “무한증식 능력”과 “전분화 능력”을 보유하고 있는 배아줄기세포를 이용한 파킨슨병, 당뇨병 및 간질환의 세포치료기술은 기존의 문제점을 뛰어넘는 획기적인 치료요법이 될 것으로 기대되며, 치료제로서의 시장규모는 천문학적인 숫자로 예상되는 바, 그 핵심기술이 되는 “도파민성 신경세포, 채장세포 및 간세포 분화촉진기술”의 개발 및 관련된 지적재산권의 획득은 국가 경제적 소실을 막음과 동시에 막대한 경제적 파급효과를 창출할 수 있음.

2) 본 연구 과제를 통하여 도출된 간세포로의 분화 연구결과는 작년 심포지엄에 국외연자로 초빙된 간 줄기세포 분야의 권위자인 Ira Fox교수로부터 공동 출판의 제의를 받았으며, 인슐린분비성 채장세포로의 분화연구결과는 배아줄기세포 분화연구의 권위자인 미국 NIH의 Ron Mckay 박사와 함께 출판을 논의하고 있어 두 편 모두 유수의 논문에 채택될 수 있도록 추가실험을 진행하고 있음.

## S U M M A R Y

Of the many problems still to be resolved in the quest to make clinical use of human ES cells, perhaps the most fundamental is to isolate a specific cell type of clinical value in high yield. Experience with mouse ES cells suggests that this is possible but we must directly demonstrate this point in the human system. Transplantation into the blastocyst stage of embryonic development shows that mouse ES cells are pluripotent, capable of differentiating into all of the adult lineages including the germ line. For ethical reasons, the pluripotency of human ES cells cannot be defined in this way but human ES cells do form teratomas containing many different cell types. The vertebrate embryo contains three tissues ecto-, endo- and meso-derm supported by cells that do not contribute to the embryo but play critical roles, the extra-embryonic ecto- and endo-derm. In normal development these cell types emerge in a series of steps, gastrulation, where the highly ordered organ structure of the vertebrate fetus emerges. ES cells are regarded as equivalent to the inner cell mass, cells of the blastula that give rise to the major cell types of the body through the process of gastrulation. Therefore, the evaluation of capability for differentiating into all three germ-layers could be 1) a criteria for the differentiating characteristics of real human ES cells as well as 2) the first step for regulating differentiation of human ES cells.

Based on accumulated experiences and knowledges with mouse, monkey and human ES cells, we analyzed the differentiation of human ES cells from the early cell types in embryoid body (EB) to the somatic cell fates (neural, pancreatic, and hepatic) after further differentiation, systematically and effectively. To develop effective differentiation protocols for generating transplantable cells from human ES cells, culture conditions and growth factors that promote differentiation of specific germ layers and somatic cell types were investigated in specific time windows and the expression profile of genes involved in the differentiation were also examined. In this project, we demonstrated that human ES can be efficiently differentiated into dopamine neurons, pancreatic cells and hepatocytes using developmental relevant factors and showed that these somatic cells derived from human ES cells functions in animal models of diabetes and liver diseases.



# C O N T E N T S

<b>Chapter 1. Research Object and Aims</b>	page 10
Section 1. Research Object	page 10
Section 2. Research Plan	page 11
<b>Chapter 2. Current Status of Research</b>	page 13
Section 1. Research Status in Korea & Foreign Countries	page 13
Section 2. Korean Research vs Foreign Research	page 15
Section 3. SWOT analysis	page 16
<b>Chapter 3. Research Contents and Results</b>	page 17
Section 1. Research Results (1st Year)	page 17
Section 2. Research Results (2nd Year)	page 28
Section 3. Research Results (3rd Year)	page 45
Section 4. Research Achievements	page 51
<b>Chapter 4. Accomplishment of Research Objects &amp; contribution</b>	page 55
Section 1. Accomplishment of Research Objects	page 55
Section 2. Contribution to Related Researches	page 55
<b>Chapter 5. Application of Research Results</b>	page 57
<b>Chapter 6. Information Obtained From Overseas</b>	page 59
<b>Chapter 7. References</b>	page 62

## 목 차

<b>제 1 장 연구개발과제의 개요</b>	page 10
제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성	page 10
제 2 절 연구개발의 범위 및 내용	page 11
<b>제 2 장 국내외 기술개발 현황</b>	page 13
제 1 절 국내외 관련연구 개발실적	page 13
제 2 절 선진국 대비 국내 기술개발 수준	page 15
제 3 절 SWOT 분석	page 16
<b>제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과</b>	page 17
제 1 절 1차년도 연구개발 결과	page 17
제 2 절 2차년도 연구개발 결과	page 28
제 3 절 3차년도 연구개발 결과	page 45
제 4 절 연구개발 성과목록	page 51
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b>	page 55
제 1 절 목표달성도	page 55
제 2 절 관련분야 기여도	page 55
<b>제 5 장 연구개발결과의 활용계획</b>	page 57
<b>제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b>	page 59
<b>제 7 장 참고문헌</b>	page 62

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

● 인간 전분화능줄기세포의 확립 및 특성분석에 주안점을 둔 세포응용연구사업단 제 1 단계 사업으로부터 구축되어진 세포주 및 인적, 물적 연구 인프라를 근간으로 하여 세포 치료의 임상적 적용을 위한 특정세포로의 분화기술 개발이 시급히 선행되어야 함.

● 성체줄기세포와는 달리, 인체를 구성하는 모든 종류의 세포로 분화가 가능한 배아줄기세포는 그 분화 과정에서 수많은 종류의 전구세포의 단계를 거쳐 기능성세포로 성숙되므로, 분화의 시발점으로부터 성숙된 세포로의 최종 분화 시점까지 각 단계별로 보다 체계적이고 효과적인 분화기술이 요구되어짐.

● 배아의 내세포괴로부터 확립된 배아줄기세포로부터 삼배엽성 세포로의 분화특성을 파악하고 각 배엽으로의 분화를 조절하는 것은 배아줄기세포의 전능성에 대한 지표가 될과 동시에 특정세포로의 분화를 조절하는 첫 단계로서, 분화유도기술 개발 중 가장 먼저 선행되어야 할 연구임.

● 삼배엽성 세포로의 분화조절은, 배아줄기세포의 전능성에 기인하여 일어나는 원치 않는 여러 종류의 세포 분화를 억제하고, 세포치료에 적합한 특정세포로의 분화를 유도하는 목적에 필수적인 핵심기술임.

● 신경, 췌장, 간, 심장, 혈액 등, 인체를 구성하는 모든 세포들은 삼배엽성 세포의 단계를 통하여 분화되므로, 초기분화의 촉진 및 억제인자를 개발하는 본 과제의 연구개발은 사업단의 '기초기반기술연구 (분야 II-2)'와 더불어 '임상응용기술연구 (분야 III-1,2,3)'에서의 특정질병 관련 세포 분화유도기술에 대한 중요한 자료를 제공할 것임.

● 배양조건 및 계대배양 방법의 차이에 기인하여 현재 세계적으로 확립된 인간 배아줄기세포주 마다 다소 다른 분화특성을 보이고 있으므로, 국내에서 확립된 배아줄기세포에 적용 가능한, 독창적이면서도 발생학적으로 타당하여 학계의 인정을 받을 수 있는 분화유도기술의 개발이 요구됨.

● 기술경쟁력에서 선진국보다 상대적 우위를 점하고 있는 '배아줄기세포의 확립기술'에 비교하여 세포치료를 위한 실질적 핵심기술인 '특정세포로의 분화유도기술'은 국가경쟁력차원에서 충분치 못한 실정으로 이를 위한 집중적인 연구개발이 조속히 진행되어야 함.

● 본 연구자는 지난 5년간 생쥐, 원숭이 및 인간배아줄기세포를 특정세포로 분화시키는 연구를 수행하여 연구결과를 학계에 보고하고 분화유도기술에 관련된 3건의 미국특허 및

국제특허를 출원하여 선진국과의 기술경쟁력에서 뒤지지 않으며, 사업단의 1단계를 통해 조성된 기술적·사회적 연구기반위에 본 연구자가 보유하고 있는 특정세포로의 분화유도 기술을 적용하고, 나아가 이를 위한 인적자원의 교육을 시행할 것임.

● 세포치료기술은 기존의 약물치료 및 외과적 수술보다 근본적이고 능동적인 치료요법으로 현재 치료가 어려운 유전질환 및 퇴행성 질환 등 난치병의 치료에 획기적인 요법이 될 것으로 기대되며, 치료제로서의 시장규모는 천문학적인 숫자로 예상되는 바, 성공적인 세포치료를 위한 핵심기술이 되는 분화유도기술개발은 세포치료기술의 실용화를 앞당길 수 있으리라 기대됨.

● 성공적인 세포치료를 위해서는 질병과 관련된 특정세포를 대량으로 생산하여야 하며, 이론적으로 무한증식이 가능한 배아줄기세포를 통해 충분한 양의 세포를 획득할 수 있을 것으로 예상되나 이를 위해서는 특정세포로의 분화유도기술이 선행되어야 하며, 이러한 분화유도기술개발은 세계적으로 약 1억 2000 만명 이상의 환자를 치료할 수 있는 첨단의료산업의 기반이 될 잠재력을 보유하고 있음.

● 인간배아줄기세포의 잠재적 고부가가치는 세포치료의 목적 이외에도 각종 질병과 관련된 유전자의 발굴 및 분석, 환경장애물질의 독성분석, 신약 후보물질의 개발 및 테스트 등에 분석재료로 이용될 수 있으므로 본 과제로 도출될 기술은 다양한 분야의 바이오 테크 산업을 활성화하고 성장시킬 수 있는 동력이 될 것으로 예상됨.

● 전 세계적으로 인간배아줄기세포의 분화유도기술이 경쟁적으로 수행되고 있는 바, 세포치료의 실용화를 예상할 때, 분화유도기술에 관련된 연구개발의 선점 및 이의 국제특허 출원 등은 국가 전략적 차원에서 경제적 손실을 막음과 동시에 큰 부가가치를 창출할 수 있음.

## 제 2 절 연구개발의 범위 및 내용

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
인간 배아줄기세포의 초기분화특성 파악	배아체 (embryoid body) 형성을 통한 인간 배아줄기세포의 각 배엽 (endoderm, ectoderm, mesoderm, extraembryonic tissue)별 분화능 확인	인간배아줄기세포의 부유배양을 통하여 8일간 형성된 배아체를 대상으로 각 배엽별 표지 유전자 및 단백질의 발현을 분석함
	국내외에서 확립된 인간 배아줄기세포주들의 초기분화특성 비교	3종의 인간배아줄기세포에 대한 초기분화특성을 표지인자를 이용한 면역형광염색기법 및 PCR기법으로 비교 분석함
	분화유도에 적합하며 연구개발에 전략적으로 유리한 인간 배아줄기세포주 선정	배아체내에서 발현하는 각 배엽별 표지인자들을 비교분석함으로써 신경계세포로의 분화를 위한 외배엽과 간세포 및 췌장세포의 분화를 위한

		내배엽세포로의 분화에 적합한 인간배아줄기세포주를 선정함
인간배아줄기 세포의 초기분화 조절 기술 개발	배아체의 각 배엽별 특이적인 유전자 발현 조사	정상 배발생과정 중 신경외배엽 및 내배엽, 그리고 신경, 척장 및 간세포로의 전구세포 분화에 관여하는 것으로 알려진 인자 (FGFs, Serum, Activin, LiCl, Oncostatin M, Hepatocyte Growth Factor 등)들을 인간배아줄기세포의 분화과정 중 처리함으로, 처리시기 및 기간 그리고 처리농도에 따른 삼배엽성 세포, 신경세포, 척장세포, 간세포로의 분화축진을 위한 배양조건을 개발함.
	성장인자 및 싸이토카인의 조합적인 처리에 의한 분화유도 및 저산소 배양기법 (hypoxic culture) 에 따른 분화양상 조사	
	특정 표지인자를 이용한 배아체내의 각 배엽별 분포 조사 및 분화과정에 관련된 유전자의 발현 분석	
각 배엽으로부터 기능성 세포로의 분화유도	성장인자 및 싸이토카인의 조합적인 처리에 의한 분화유도 및 분화과정에 관련된 유전자의 발현 분석	내배엽으로부터 척장세포 및 간세포, 그리고 신경외배엽으로부터 척수 회소돌기아교세포의 최종분화를 위한 분화조건을 단계별로 확립하며, 이들의 분화에 관여하는 serum, activin, RA, LiCl, OSM, HGF, Noggin, Sonic hedgehog 등의 분화조절인자를 테스트함. 분화된 세포들은 인슐린 및 일부민 분비활성 등 목적세포 특이적 세포활성을 검증함.
	표지인자를 이용한 분화과정에서 존재하는 전구세포의 분석 및 특정세포로의 분화에 관련된 중요 분화조절인자 발굴	
	분화된 세포의 특이-활성분석을 통한 기능성 조사 및 기능성세포로의 최종분화를 위한 분화조건 개발	
실험동물모델 이식에 의한 생존율, 안전성 및 기능성 검증	실험동물모델에 이식 후 면역화학염색 기법을 이용한 이식된 세포의 기간별 형태 및 생존율 및 안전성 조사	분화가 종료된 세포들은 목적세포의 생체 내 기능을 평가하기에 적합한 실험동물모델에 이식하여, 세포의 활성유지를 기간별로 분석하며, 생체 내 활성의 분석이 종료되면 적출하여 조직검사를 실시하여 이식된세포의 생존율 및 종양발생유무 등의 안전성을 분석함.
	이식된 세포에 의한 실험동물모델의 행동적 혹은 생리학적 활성의 회복을 통한 기능성 검증	

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

● 현재까지 인간 배아줄기세포의 분화에 대한 국내외의 연구실적 및 학계보고는 배아줄기세포가 확립된 이후 국가별 혹은 연구기관별로 연구의 전략적 우위를 선점하기위한 치열한 경쟁으로 인해, 체계적인 분화연구보다는 성급하게 특정 발달 분화세포에 중점을 두어 진행이 되어왔으며, 그 결과 특정세포로의 분화 효율성, 즉 높은 순도 (purity)의 분화를 달성하기위해 극복해야 할 많은 문제점이 제시되어왔음.

● 특히, 췌장베타세포 및 간세포를 포함한 내배엽 유래 세포의 분화 연구는 신경계 세포 분화 연구에 치중된 외배엽 세포 분화 연구에 비하여, 성숙한 기능성세포의 낮은 분화 수율을 보이고 생체 내에서의 기능성, 생존율 및 안정성 검증에 관한 연구가 미미한 실정으로 이에 대한 연구가 시급히 요구되어지는 상황임.

● 최근까지 인간배아줄기세포의 췌장베타세포 및 간세포를 포함한 내배엽 유래세포로의 분화와 관련되어 보고되어진 국내·외의 연구개발 실적은 다음 표와 같으며, 특히 국내의 경우 인간배아줄기세포의 세포주 확립과 배양기술 및 신경세포로의 분화기술에 관련된 학계보고에 비하여, 기능성 췌장베타세포 및 간세포로의 분화기법 개발에 관련된 연구보고는 극히 미미한 실정임.

### 제 1절 국내외 관련 연구개발 실적

인간배아줄기세포로부터 췌장 및 간세포 (pancreatic cells, hepatic cells)의 분화	
<b>내배엽 유래 (Endoderm-derivatives)</b>  <b>사용세포주 (H1, H7, H9, H9.2, H13, kES-1, HSF6, HUES7, CyT203, CyT29, Miz4, Miz6)</b>	<p><b>1) 췌장세포 분화 연구 보고</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 이스라엘 Ramban Medical Center의 Skorecki 그룹 (Assady et. al., 2001)이 자발적인 분화과정에 의해 분화된 세포 중 인슐린 항체에 면역염색이 되는 세포를 발견[1].</li> <li>▶ 이스라엘 Ramban Medical Center의 Itskovitz-Eldor 그룹 (Segev et. al., 2001)이 배아체 형성기법 및 nitotinamide의 처리에 의해 인슐린, 글루카곤, 소마토스테틴 항체에 의해 면역염색이 되는 췌장세포와 유사한 세포를 분화유도[2].</li> <li>▶ 미국 Novocell 사의 Baetge 그룹 (D'Amour et. al., 2006, 2007)이 activin A와 발생학적 신호조절인자들을 처리하여 진정내배엽 및 췌장내분비세포로의 분화를 유도[3, 6].</li> <li>▶ 한국 Korea Univ.의 김종훈 교수 그룹 (Shim et. al., 2007)이 혈청과 activin A를 처리하여 췌장내분비세포로의 분화를 유도하고 in vivo에서 기능성을 검증[4].</li> <li>▶ 미국 Geron 사의 Majumdar 그룹 (Jiang et. al., 2007)이 sodium</li> </ul>

butyrate의 처리에 의해 췌장세포의 특성과 유사한 세포의 분화를 유도[5].

## 2) 간세포 분화 연구 보고

- ▶ 미국 Geron 사의 Carpenter 그룹 (Rambhatla et. al., 2003)이 sodium butyrate의 처리에 의해 간세포 (hepatocyte)의 특성과 유사한 세포의 분화를 유도[7].
- ▶ 미국 University of California의 Zern 그룹 (Shirahashi et. al., 2004)이 IMDM, serum, insulin, dexamethasone, collagen type I 등이 간세포로의 분화를 촉진시킬 수 있다고 제시[8].
- ▶ 이스라엘 Hebrew University의 Benvenisty 그룹 (Lavon et. al., 2004)이 배아체 형성기법을 통해 간세포로의 분화과정 중 발현되는 간형성 관련 유전자를 microarray기법으로 분석하고, 간세포-특이적 promoter를 사용하여 간세포의 순수정제 가능성을 제시[9].
- ▶ 일본 Okayama University의 Kobayashi 그룹 (Chen et. al., 2006)이 Acivin A, deleted varent of hepatocyte growth factor (dHGF)의 연속적인 처리로 정상 간세포의 생화학적, 구조적 특징을 지니는 세포로 분화 유도[10].
- ▶ 영국 Roslin Institute의 Cui 그룹 (Hay et. al., 2007)이 배아체 형성 없이 단층세포 배양방법을 통해 간세포 유사 세포의 분화 가능성을 제시[11].
- ▶ 이란 Royan Institute의 Shahsavani 그룹 (Baharvand et. al., 2007)이 feeder-free 배양을 통해 인간배아줄기세포를 배아체 형성 없이 aFGF, FGF4, HGF, OSM, dexamethasone의 단계적 처리로 간세포 분화를 유도할 수 있음을 제시[12].
- ▶ 중국 Peking University의 Deng 그룹 (Cai et. al., 2007)은 배아체 형성 없이 Acitivin A, FGF4, BMP2, HGF, OSM, dexamethasone의 단계별 처리로 고효율의 간세포 유사 세포 분화를 유도하였으며, 질병 동물에 세포를 이식 후 생존 여부를 확인함으로써 세포치료제로서의 이용 가능성 제시[13].
- ▶ 미국 University of califonia davis center의 Zern 그룹 (Duan et. al., 2007)이 AAT-promoter가 도입된 인간배아줄기세포에서 간세포 분화를 확인하고 이를 laser microdissection기법을 통해 분리하여, 질병 동물에 이식 후 기능을 검증[14].
- ▶ 영국 Rolsin Institute의 Cui 그룹 (Hay et. al., 2008)이 배아체 형성 없이 간세포분화 유도 가능성을 제시한 자신의 2007년 분화유도기술을 개선하여 고효율의 간세포 분화를 유도[15].

## 제 2절 선진국 대비 국내 기술개발 수준

선진국 대비 국내기술개발 수준	
<p>인간배아 줄기세포 의 확립 및 유지기술</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 인간배아의 배양기술</li> <li>▶ 인간배아로부터 배아줄기세포의 확립기술</li> <li>▶ 인간배아줄기세포의 미분화 유지 배양기술</li> <li>▶ 인간배아줄기세포의 미분화 특성 분석 기술</li> <li>▶ 인간배아줄기세포에 적합한 동결보존 기술</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 선진국 대비 90 ~ 100% 수준</li> <li>▶ 다년간 국제적으로 높은 수준에 있던 국내의 체외수정기술이 인간배아줄기세포의 확립 및 배양에 효과적으로 도입되어, 사업단의 1단계 연구지원결과 세계 어느 기관에 뒤지지 않는 기술을 보유하고 있다고 판단됨.</li> <li>▶ 미분화 유지에 관련된 세포내 신호전달 기작의 연구에 대한 생화학적, 분자생물학적 접근 방법이 요구됨.</li> </ul>
<p>인간배아 줄기세포 의 분화기법 개발 기술</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 인간배아줄기세포의 초기 분화과정에 관련된 조절인자 및 각 배엽간 신호전달 체계분석 기술</li> <li>▶ 인간배아줄기세포로부터 기능성 췌장세포로의 분화 유도기술</li> <li>▶ 인간배아줄기세포로부터 기능성 간세포로의 분화유도기술</li> <li>▶ 인간배아줄기세포로부터 분화된 세포의 활성 및 기능 분석 기술</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 선진국 대비 70 ~ 90%</li> <li>▶ 미국을 선두로 호주, 영국, 이스라엘, 일본 등에서 인간배아줄기세포로부터 특정세포, 특히 난치성질환과 관련된 세포들로의 분화유도기술이 연이어 개발되어 최근 보고되고 있는 실정임.</li> <li>▶ 국내의 경우 세포응용연구사업의 괄목한 연구성과로 신경계 및 심혈관계에 관련된 분화연구는 기술선진국대비 기술격차를 좁혀가고 있으나 내배엽계통의 연구는 활발히 진행되지 못하여, 수규모그룹에 의한 제한적인 연구성과가 도출되고 있으며, 전반적인 면에서 기술 격차를 보이고 있는 실정임.</li> </ul>
<p>분화된 기능성 세포의 분리 및 기능성 검증기술</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 인간배아줄기세포로부터 분화된 기능성 췌장세포의 순수 분리 기술</li> <li>▶ 인간배아줄기세포로부터 분화된 기능성 간세포의 순수 분리 기술</li> <li>▶ 인간배아줄기세포로부터 분화된 기능성 세포의 순수 분리 후 이식한 세포의 생체 내 생존율, 기능성 및 안전성 검증 기술</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>▶ 선진국 대비 30 ~ 40%</li> <li>▶ 미국, 중국, 영국 등에서 성숙한 기능성 췌장세포 및 간세포의 분화유도기술 개발에 이은 분화된 세포의 순수 분리정제 기술 개발 및 질병동물에 기능성 세포 이식으로, 당뇨병 및 간질환의 완화 또는 개선 가능성 제시 등, 인간배아줄기세포 유래 기능성 췌장세포 및 간세포의 세포 치료제로써의 기능성 검증이 활발해지는 것에 비하여, 국내에서는 신경세포 분화에 이은 신경계 질환에의 기능성 검증 외의 세포에 대하여는 매우 미미한 실정으로 매우 큰 격차를 보이고 있음.</li> </ul>



### 제 3절 SWOT 분석

강점	약점
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 세계 최고 수준의 인간 배아줄기세포 확립 기술 및 최근 선보인 역분화 만능 줄기세포를 확립할 수 있는 기반기술 확보로 다양한 분화능을 지닌 다수의 배아줄기세포 주를 확보하고 있음.</li> <li>• 다양한 종류의 세포 주 확보로, 분화시키고자 하는 목적 기능성 세포로의 분화 친화적인 세포 주 선별이 용이.</li> <li>• 신기술에 대한 이해 및 습득력을 갖춘 연구 인력의 풍부함.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 논문 조작 사건이후 국내 줄기세포 연구에 대한 국제 사회의 신뢰도 추락.</li> <li>• 신경계 세포 분화 연구에 치중으로 인한 내배엽 및 중배엽 유래 세포로의 분화연구 관련 지식 및 경험 부족.</li> <li>• 줄기세포 분화 연구에 핵심인 분화 관련 성장 인자, 분석 시약 및 제반기기의 높은 해외 의존으로 인한 국내 공급의 어려움.</li> <li>• 열악한 연구환경 및 연구 인력에 대한 낮은 급여 수준 등에 기인한 새로운 인력 충원의 어려움.</li> </ul>
기회요인	위험요인
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 상대적으로 많은 수의 확보된 인간 배아줄기세포 주를 이용한 다양한 목적에 맞는 분화 유도기법을 개발 할 수 있음.</li> <li>• 줄기세포로부터 특정 기능성 세포로의 순도 높은 분화를 유도하고, 분화된 세포에서 목적 세포만을 순수 분리 정제하며, 분리된 세포의 생체내 기능성 평가 기술 연구는 선진국들을 필두로 활발히 진행 되고 있지만, 그 역시 시작단계에 불과함으로 충분한 투자와 연구가 진행된다면 국내의 연구 역시 이를 추월하고 기술에 대한 우위를 점할 수 있음.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 우리나라와 경쟁관계에 있던 영국, 일본 등의 줄기세포 연구 발전을 위한 대대적인 투자를 준비 함.</li> <li>• 열악한 국내 연구 환경으로 인한 우수한 인력의 해외 유출 및 업종 전환 연구 인력의 빈번한 발생.</li> <li>• 경쟁국에 비하여 미흡한 연구비 투자 및 부족한 연구 인력에 의한 신기술 개발 시간의 지연.</li> <li>• 단기간 성과 위주의 연구비 투자로 인한, 양질의 연구개발 감소. 장기간의 꾸준한 투자가 필요함.</li> </ul>

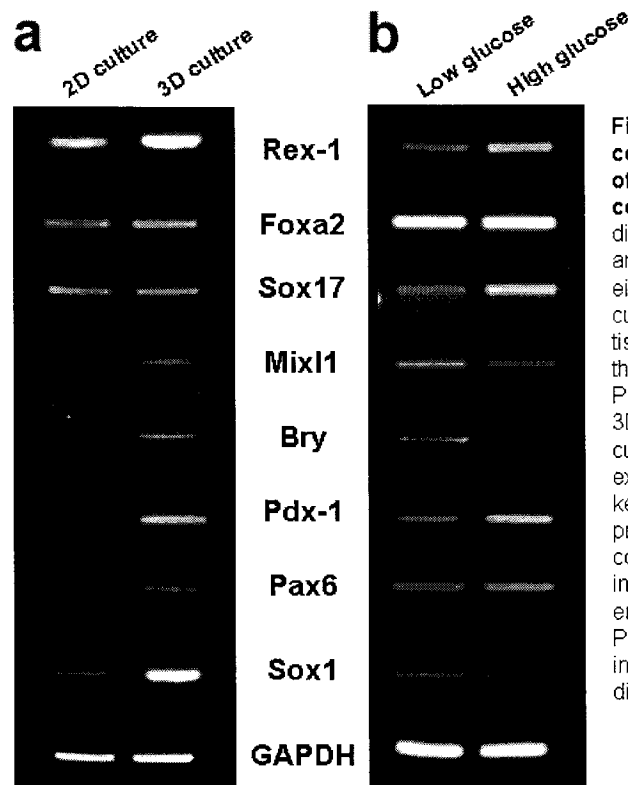
# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1절 1차년도 연구개발 결과

연구 내용	연구 결과 (세포주별 분화능 비교분석)
<p>인간배아줄기세포의 각배엽별 (내·외·중배엽) 초기분화능 확인 및 각 세포주간 분화특성 분석</p> <p>(신경세포 및 췌장세포분화에 전략적으로 유리한 세포주 선정)</p>	<div style="text-align: center;"> </div> <p><b>Fig.1 In vitro gastrulation and comparative early differentiation of three human embryonic stem cell (hESC) lines.</b> hESC lines were differentiated into embryoid bodies for 8 days in suspension culture without FGF2. Embryoid bodies were sectioned after freezing in OCT compound and immunostained with antibodies specific for each germ layers, extraembryonic tissue and primordial germ cells.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 1차 년도에는 인간배아줄기세포의 전능성을 분화유도적 관점에서 평가하기 위하여 3종의 배아줄기세포를 대상으로, 인체를 구성하는 모든 세포의 원기가 되는 내, 외, 중배엽 및 태반 등의 배아외조직 (extraembryonic tissue, primitive endoderm)으로의 분화능의 검증과 더불어 난자와 정자 등 생식세포의 원기인 원시생식세포 (primordial germ cells)로의 분화능 검증을 시도하였음.</li> <li>• 3종의 인간배아줄기세포 모두 삼배엽성세포 (endoderm, Foxa2+&amp;Sox17+; ectoderm, Nestin+&amp;Pax6+; Mesoderm, Brachyury+), 배아외조직 (AFP+&amp;GATA4+) 그리고 원시생식세포 (SSEA1+&amp;VASA+)로 분화될 수 있는 능력을 소유함을 검증하였음.</li> <li>• 3종의 인간배아줄기세포에 대한 각 배엽별 분화능을 비교 분석한 결과, 1번 세포주에서 신경질환치료를 위한 신경세포의 원기가 되는 외배엽 (Nestin+&amp;Pax6+)으로, 2번 세포주에서 당뇨병 치료를 위한 췌장소도세포의 원기가 되는 내배엽 (Foxa2+&amp;Sox17+)으로의 원활한 분화양상이 관찰 되었으므로, 추후 신경세포와 간세포 및 췌장세포의 분화유도 연구에 전략적으로 유리한 이들 2종의 세포주를 이용하였음</li> </ul>

연구 내용	연구 결과 (내배엽 분화촉진)
<p>배아체 형성과정 중 내배엽으로의 능동적 분화유도를 위한 분화조절인자 발굴 및 유전자 발현조사 (2)</p>	<div style="text-align: center;"> </div> <p><b>Fig. 3 Inhibition of mesoderm in EBs differentiated in the presence of Activin.</b> EBs were differentiated in the presence of serum for 10 days, in serum-free medium containing activin for 10 days or in serum (10%) for 4 days with passaging to either serum-free condition or the same condition with activin for the remaining 6 days. (a) RT-PCR analysis of EB of differentiated in each condition shows that serum followed by activin treatment stimulates endoderm formation but decreases mesoderm population. (b) Immunostaining demonstrates a sequential treatment of serum and activin induces endoderm (GATA4+, Sox17+ cells) formation and inhibit ectoderm (Pax6+, Nestin+ cells) differentiation.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 배아체 형성 초기 4일간 혈청의 처리 및 연이은 무혈청 배지에서의 분화에 의하여 내배엽과 중배엽으로의 분화는 충족되었으나, 궁극적인 실험목표인 췌장원기 내배엽으로의 순도 높은 분화를 유도하기 위하여, 혈청의 처리 후 무혈청 배지를 이용한 6일간의 분화과정에 activin A를 처리하였음.</li> <li>• Activin A는 정상적인 체내 배발생과정 (embryogenesis)에서 내배엽으로의 초기분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있음. 본 실험의 연구결과 배아체 형성과정 중 혈청의 처리에 연이은 Activin A처리 (S4SFactivin6)는 Mixl1-1과 Brychury의 발현을 억제하고 Foxa2와 Sox17의 발현을 유지시키는 것으로 관찰되었음 (Fig. 3a).</li> <li>• 따라서, 본 실험결과는 내배엽의 원기가 되는 mesendoderm의 세포를 더욱 분화시켜 중배엽형성을 억제하고 내배엽으로의 분화를 촉진시키는 것으로 유추됨 (Mixl1은 mesendoderm, brachyury는 mesendoderm과 mesoderm에서 발현).</li> <li>• 면역형광염색분석을 실시한 결과 혈청과 Activin을 처리한 배아체에서, 무혈청 배지에서 분화시킨 배아체보다 현저하게 증가된 내배엽성 세포 (GATA4+ &amp; Sox17+) 들이 관찰되었으며, 이러한 처리는 본 실험에서 추구하지 않는 외배엽성 (Pax6+ &amp; Nestin+) 세포들의 분화를 효과적으로 억제하는 것을 확인하였음 (Fig. 3b).</li> </ul>

배아체  
배양기법에  
따른 내배엽  
및  
췌장전구세  
포 분화특성  
비교

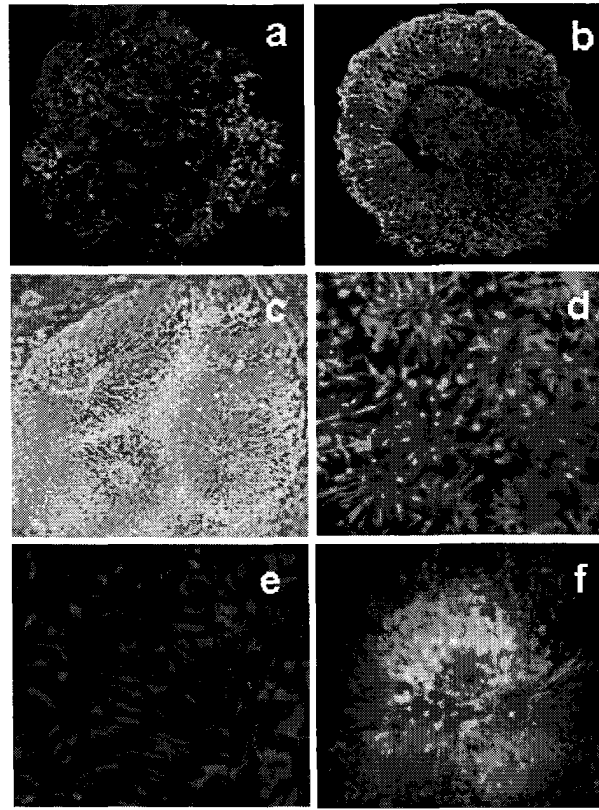


**Fig. 4 Effects of culture condition for induction of pancreatic endoderm cells.** (a) EBs were differentiated with serum and activin for 10 days either in suspension culture dishes or on tissue culture dishes for the adherent culture. RT-PCR analysis shows that 3D culture (suspension culture) increases the expression of Pdx-1, a key marker of pancreatic progenitor cells. (b) High concentration of glucose in medium also facilitates endoderm formation and Pdx-1 expression, but inhibits mesoderm differentiation.

- 보다 효율적인 분화기법을 개발하기 위하여 배아체의 생성 크기 및 배양밀도가 미치는 영향을 조사한 결과, 배아체 형성시점 (EB formation day 0)의 70-80  $\mu\text{m}$  직경의 미분화 인간배아줄기세포괴 (human ES cell clumps)를 350~400 세포괴/2827  $\text{mm}^2$  (60 mm culture dish)의 밀도로 10일간 배양하여 약 300 ~ 400  $\mu\text{m}$  직경의 배아체를 획득하는 것이 최적조건임을 확인하였다.
- 이에 더하여 부유배양 (suspension culture, 3D culture) 및 부착배양 (adherent culture, 2D culture)을 10일간의 분화기간 후 비교한 결과, 비록 중배엽성 유전자의 미미한 발현이 검출되긴 하였으나, 본 연구과제의 목적인 췌장세포의 전구세포에서 발현하는 pdx-1이 3D culture의 배양조건에서만 발현되는 것으로 분석되었다 (Fig. 4a).
- 또한 내배엽형성 및 췌장세포의 분화에 영향력을 미치는 것으로 알려진 배양액내 glucose의 농도를 비교한 결과, 저농도의 glucose (5.5 mM) 보다 고농도의 glucose (17.7 mM)를 포함하는 배양액에서 pdx-1의 발현이 증가함을 확인하여 고농도의 glucose가 췌장세포로의 분화에 보다 유리한 조건임을 발견하였다 (Fig. 4b).
- 따라서, 추후의 실험에서는 Serum/Activin의 처리와 함께 3D culture로 고농도의 glucose를 포함하는 배양액에서 췌장전구세포로의 분화를 유도하였다.

연구 내용	연구 결과 (췌장내배엽 분화촉진)																												
<p>분화조절 인자의 처리에 의한 췌장세포분화 관련 특정지표 분석</p>	<div data-bbox="491 409 1358 898" data-label="Figure"> <table border="1"> <caption>Data from Figure 5: Immunoreactive cell (%)</caption> <thead> <tr> <th>Gene</th> <th>Category</th> <th>Serum + Activin A (%)</th> <th>Serum-free (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Foxa2</td> <td>endoderm</td> <td>~12</td> <td>~3</td> </tr> <tr> <td>Sox17</td> <td>endoderm</td> <td>~18</td> <td>~6</td> </tr> <tr> <td>GATA4</td> <td>mesoderm</td> <td>~27</td> <td>~13</td> </tr> <tr> <td>Bry</td> <td>mesoderm</td> <td>~13</td> <td>~7</td> </tr> <tr> <td>Cdx-2</td> <td>Gut and pancreatic endoderm</td> <td>~13</td> <td>~3</td> </tr> <tr> <td>Pdx-1</td> <td>Gut and pancreatic endoderm</td> <td>~21</td> <td>~8</td> </tr> </tbody> </table> </div> <p data-bbox="517 904 1358 965"><b>Fig. 5 Comparative analysis for the generation of mesendoderm cells expressing genes related with endoderm formation.</b></p> <ul data-bbox="437 1077 1382 1688" style="list-style-type: none"> <li>• 위의 실험결과에 근거하여 serum과 activin의 순차적인 처리를 고농도의 glucose가 함유된 배양액에서 부유배양 (3D culture)의 방법으로 10일간 분화시킨 뒤 췌장세포로의 분화에 관련된 각종 단백질의 발현을 면역형광염색기법으로 조사하였다.</li> <li>• 본 과제의 실험결과로 도출된 내배엽 및 췌장세포 분화유도 기법은 대조군에 비교하여 내배엽 형성에 관련된 단백질들 (Foxa2, Sox17)의 발현 및 장 내배엽 (gut endoderm)과 췌장전구세포에서 각각 발현되는 cdx-2 와 pdx-1 단백질을 발현하는 세포로의 분화를 현저하게 증가시킬 수 있음을 확인하였다.</li> <li>• 췌장의 형성은 장 (gut)을 형성하는 장 내배엽 (gut endoderm)으로부터 형성되므로, 본 실험결과는 serum과 activin에 의해 형성된 장 내배엽으로부터 췌장세포로의 분화가 개시되고 있음을 시사한다.</li> </ul>	Gene	Category	Serum + Activin A (%)	Serum-free (%)	Foxa2	endoderm	~12	~3	Sox17	endoderm	~18	~6	GATA4	mesoderm	~27	~13	Bry	mesoderm	~13	~7	Cdx-2	Gut and pancreatic endoderm	~13	~3	Pdx-1	Gut and pancreatic endoderm	~21	~8
Gene	Category	Serum + Activin A (%)	Serum-free (%)																										
Foxa2	endoderm	~12	~3																										
Sox17	endoderm	~18	~6																										
GATA4	mesoderm	~27	~13																										
Bry	mesoderm	~13	~7																										
Cdx-2	Gut and pancreatic endoderm	~13	~3																										
Pdx-1	Gut and pancreatic endoderm	~21	~8																										

신경외배엽 및  
신경전구세포로  
의 능동적  
분화유도



**Fig. 7 Enhanced neural induction by FGF4.** (a) EB, control (b) EB after treatment of FGF4 for 8 days, Nestin (green) in both a and b. (c) formation of multiple neural rosettes after plating EBs on tissue culture dish. The rosettes express nestin (d). (e) expansion of neural progenitor by FGF2. (f) neural progenitor express nestin and pax6

- 인간배아줄기세포가 자체적으로 합성하여 분비하는 nodal이 신경외배엽으로의 default pathway를 간섭하는 것을 억제하기 위하여, 배발생과정 중 신경외배엽의 형성에 관여하는 FGF4를 삼배엽성 세포로의 분화과정인 배아체 형성과정 동안 처리하여 신경외배엽으로의 분화촉진을 시도하였다.
- FGF4의 처리 (Fig. 7b)는 대조군에 비하여 (Fig. 7a) 신경외배엽성 세포 (nestin+)로의 분화를 효과적으로 증가시켰으며, 배아체를 배양접시에 부착하여 더욱 분화시킬 경우 정상적인 발생과정에서 형성되는 신경관의 단면과 유사한 구조의 neural rosette이 다수 관찰되었다 (Fig. 7c and d).
- rosette은 trypsin 처리 후 연이은 FGF2의 처리에 의하여 신경전구세포의 형태로 대량증식이 가능하였다 (Fig. 7e and f; green pax6; red, nestin)

연구 내용	연구 결과 (신경외배엽으로부터 도파민성 신경세포 분화유도)
<p>신경전구세포로부터 도파민성 신경세포로의 분화유도</p>	<div data-bbox="523 383 1072 1102"> </div> <div data-bbox="1086 383 1353 1093"> <p><b>Fig. 8 Differentiation into dopaminergic neurons.</b> (a-c) neuronal differentiation, nestin, green; TuJ1, red; dapi, blue. (a) day 2, (b) day 4, (c) day 6. (d) neuroglial differentiation, TuJ1, green; GFAP, red; dapi, blue. (e,f) dopaminergic differentiation. (e) TH, red; TuJ1, green. (f) TH, green; TuJ1, red; dapi, blue. (g) expression profile of genes characteristic of undifferentiated ES cells. (h) Percentage of hES cells-derived TH neurons in the absence and presence of Shh/FGF8.</p> </div> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 6~8일간 FGF2에 의해 증식된 신경전구세포 (nestin+)를 FGF2 처리의 중지한 상태에서 8일간 신경세포로 분화유도 하였다.</li> <li>• FGF2의 중지를 시점으로 하여 신경전구세포 (nestin+)의 수가 감소하고, 신경세포 (TuJ1)의 수가 점진적으로 증가 하였다 (Fig. 8a-c; a, 분화 day 2; b, 분화 day 4; c, 분화 day 6; nestin, green; TuJ1, red)</li> <li>• FGF2의 처리를 종료한 뒤 8일간 N2 medium에서 분화를 유도한 결과, 대량의 신경세포를 획득할 수 있었으며 (Fig. 8e; TuJ1, green; TH red), 약 60%에 달하는 도파민성 신경세포 (TH+) 로의 분화수율을 나타내었다 (Fig. 8e &amp; Fig 8f; TH, green; TuJ1, red; dapi, blue).</li> </ul>

연구 내용

연구 결과  
(신경외배엽으로부터 도파민성 신경세포 분화유도)

분화과정동안의  
미분화 표지인자  
및 도파민성  
신경세포의  
분화양상

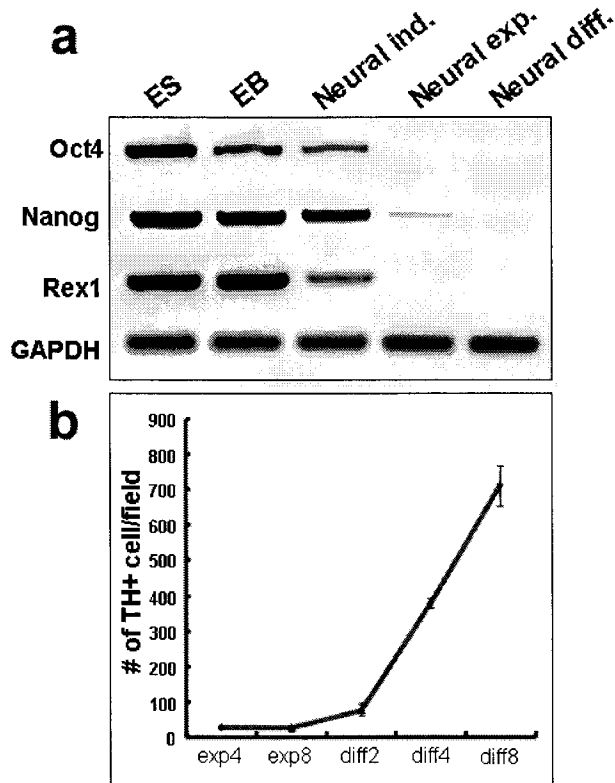


Fig. 9 Expression profiles of gene specific for undifferentiated ES cells and induction rate of dopamine neurons during neural expansion and differentiation

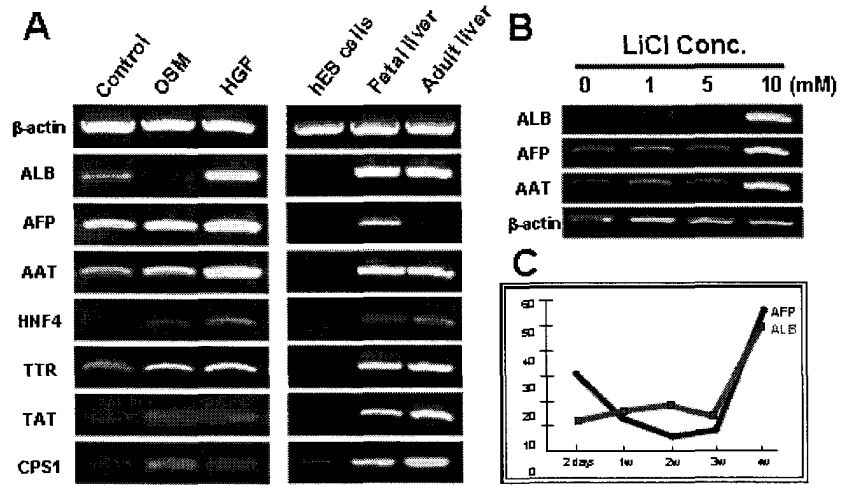
- 분화종료 후 미분화세포의 잔존여부는 이식 후의 종양발생과 밀접한 관련이 있으므로 세포이식 차원에서 심각하게 다루어야 할 사항이다. 따라서 신경세포로의 전반적인 분화과정 동안 도파민성 신경세포의 분화양상 및 분화 단계별 미분화세포의 잔존여부를 조사하였다.

- 미분화 인간배아줄기세포에 대한 특정지표인 Oct4+ 세포는 면역형광염색결과 분화종료 후 발견되지 않았으며, 분화단계별 발현양상을 RT-PCR 분석 기법으로 조사한 결과, 미분화 표지인자인 Oct4, Nanog, Rex1의 발현은 neural expansion 단계에서 급격히 감소하여 최종분화시기 (neural diff.)에는 발현되지 않았다 (Fig. 9a). 이에 반하여 도파민성 신경세포 (TH+)는 FGF2의 처리를 종료한 시점인 neural expansion 8일 (exp8) 이후 증가하기 시작하여 분화 2일 (diff2) 이후 급격히 증가하였다 (Fig. 9b).



연구 내용	연구 결과 (간세포 분화유도)
<p>LiCl에 의한 내배엽 및 간세포 (hepatocyte) 로의 능동적 분화</p>	<div data-bbox="574 291 1197 996" data-label="Image"> </div> <p data-bbox="598 1003 1165 1137"><b>Fig. 11 Differentiation of Endoderm into hepatocytes in adherent monolayer cultures.</b> LiCl-treated EBs were differentiated in the presence of HGF or OSM for 15 days and analyzed for properties characteristics for hepatocytes</p> <ul data-bbox="414 1153 1380 1803" style="list-style-type: none"> <li>• LiCl에 의해 분화 촉진된 내배엽세포들로부터 간세포 (liver cell, hepatocyte)로의 분화를 촉진시키기 위해 HGF (hepatocyte growth factor) 혹은 Oncostatin M (OSM)을 처리하여 부착배양 하였다.</li> <li>• HGF의 존재 하에서 분화된 세포들은 oval 혹은 polygonal 형태인 hepatocyte와 유사한 모양을 보였으며, 정상적인 hepatocyte와 마찬가지로 albumin (ALB)과 cytokeratin 18 (CK18)를 합성하는 능력을 소유하였다. 반면에 OSM의 처리에 의해 분화된 세포는 CK18은 발현하였으나, ALB을 합성하지 못함을 관찰하였다.</li> <li>• 분화된 hepatocyte-like cells은 정상 간세포가 소유하는 특징인 간세포-특이적 세포내 수송활성 (ICG uptake) 및 초기분화과정의 간세포가 특징적으로 소유하는 gamma glutamyltranspeptidase (GGT) 활성 역시 소유함을 확인하였다.</li> </ul>

LiCl에 의한  
내배엽 및  
간세포  
(hepatocyte)로의  
능동적 분화



**Fig. 12 Hepatocyte-specific gene expression in different culture conditions.** (A) RT-PCR analysis of LiCl-treated EBs differentiated in the presence of HGF or OSM. (B) Treatment of different concentrations of LiCl during EB formation was followed by adherent monolayer cultures. (C) Expression profiles of AFP and ALB during hepatocytic differentiation for 4 weeks

- 간세포로의 분화를 검증하기 위하여 간세포 특이적인 유전자들 (ALB, AFT, AAT, HNF4, TTR, TAT)의 발현을 조사한 결과, OSM과 HGF 처리 모두 fetal hepatocyte와 유사한 유전자 발현양상을 보였다. 그러나 OSM의 경우, 앞선 면역형광염색 결과와 동일하게 albumin (ABL)의 발현이 현저하게 낮음을 알 수 있었으며, HGF의 처리는 ALB을 포함한 모든 표지 유전자에서 fetal heptocyte와 유사하게 발현됨을 확인하였다 (Fig. 12A).

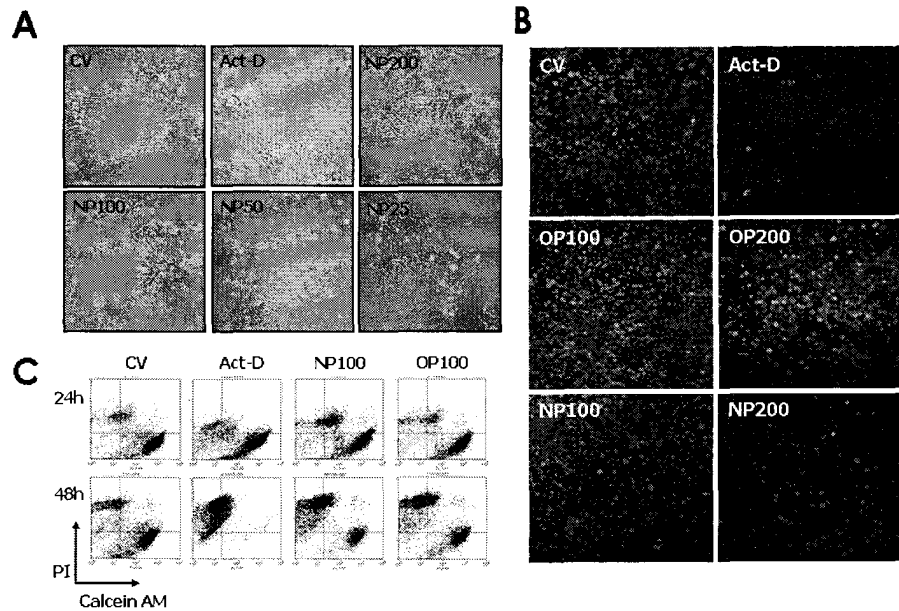
- EB형성과정 중 처리하는 LiCl의 농도는 최종 분화 후 간세포의 특정표지인자 발현에 영향을 미치는 것을 나타냈으며 (Fig. 12B), 이는 처리농도에 따라 초기 내배엽으로의 분화정도가 차이가 남에 따른 결과라고 생각되어진다.

- 간세포의 표지인자인 AFP와 ALB의 발현은 20일 정도의 분화 후 현저하게 증가됨을 보였다 (Fig. 12C). 초기 AFP의 발현이 높은 이유는 배아체 형성의 초기단계에서 형성되는 배아외조직의 일종인 Primitive endoderm에서 발현되는 AFP의 영향이라고 판단된다.

연구 내용

연구 결과 (줄기세포를 이용한 화학물 독성평가)

인간배아줄기  
세포를  
이용한  
화학물의  
세포독성평가



**Fig. 13 Effects of NP and OP on the cell viability and cytotoxicity of the human ES cells.** A, Phase contrast images of the human ES cells exposed with Act-D, NP, or OP for 48hrs. B, Fluorescence images of dead and live cells stained with calcein AM and PI. C, Representative dot plots of the calcein AM and PI staining.

- 다양한 화학물의 독성평가를 위한 인간배아줄기세포의 활용가치를 확인하기 위해 내분비계 장애물질로 알려진 노닐페놀 (Nonylphenol; NP)과 옥틸페놀 (Octylphenol; OP)이 인간배아줄기세포의 생존율과 세포독성에 미치는 영향을 확인하였음.

- NP와 OP를 처리 시 농도 의존적으로 배아줄기세포에 대한 세포독성이 나타남을 위상차현미경상에서 쉽게 확인할 수 있었으며 (Fig. 13A), Calcein AM과 PI 염색을 통한 Dead and Live cells의 population을 Flow cytometry를 이용하여 정량 분석한 결과, NP와 OP 처리 후 농도 의존적으로 살아있는 세포의 수가 감소하고 반면, 세포사가 증가하는 것을 확인하였음 (Fig. 13B and C).

연구 내용

연구 결과 (줄기세포를 이용한 화합물 독성평가)

인간배아줄기  
세포를  
이용한  
화합물의  
세포독성평가

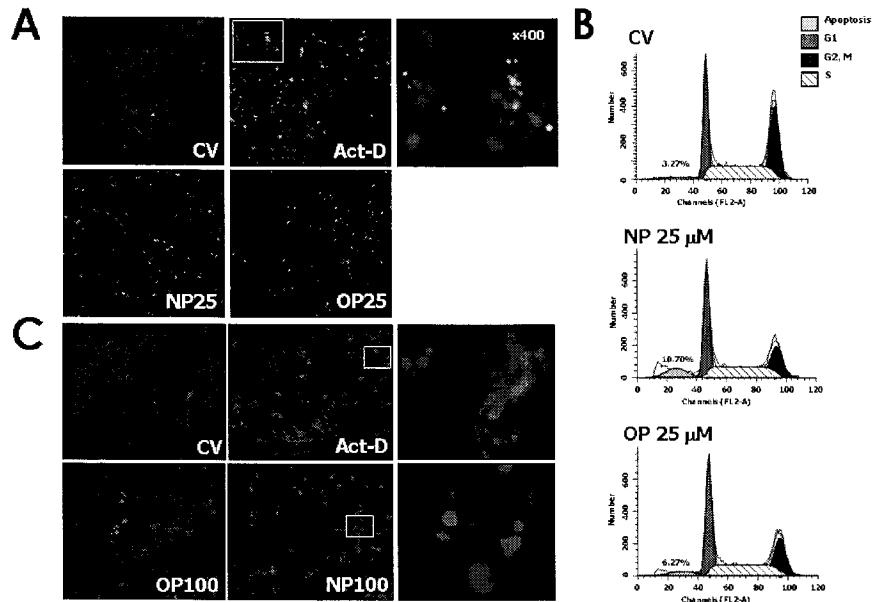


Fig. 14 Effects of NP and OP on the DNA fragmentation and Caspase-3 activation of human ES cells. A, Detection of fragmented DNA in the apoptotic human ES cells by TUNEL staining. B, The fragmented DNA content detected by flow cytometry. C, Immunofluorescence of active Caspase-3 in the apoptotic human ES cells.

- NP와 OP의 노출에 의해 나타나는 인간배아줄기세포의 세포독성이 비정상적으로 증가된 세포자연사 (apoptosis)에 의한 것임을 *in situ* TUNEL 방법을 통하여 확인하였음 (Fig. 14A).
- 세포주기 내 DNA content 변화를 Flow cytometry를 이용하여 정량 분석한 결과, NP와 OP는 G2/Mitosis 시기의 population의 감소와 함께 Fragmented DNA content가 증가를 야기함을 확인하였음 (Fig. 14B).
- 활성화된 Caspase-3에 특이적인 항체를 이용하여 면역형광염색을 시행함으로 NP와 OP에 의한 인간배아줄기세포의 세포자연사의 증가는 Caspase-3의 활성의 증가를 수반하는 것을 확인하였음 (Fig. 14C).

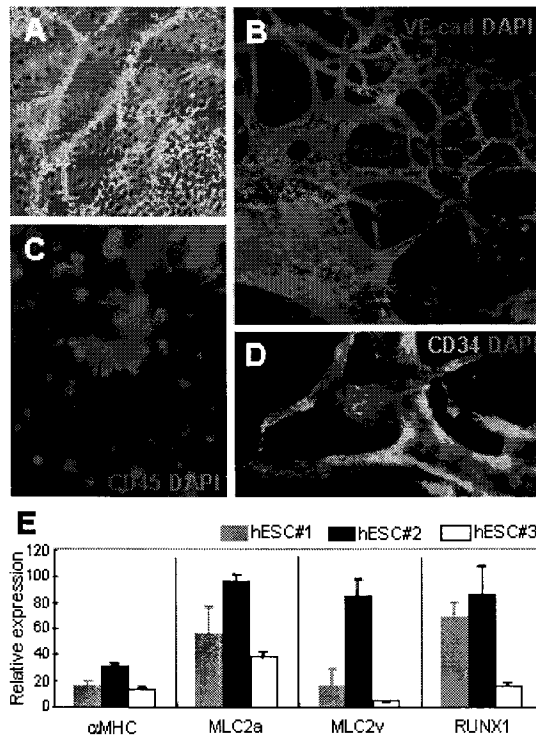
## 제 2절 2차년도 연구개발 결과

연구내용	연구결과 (세포주별 분화양상 비교분석)
<p>각기 다른 인간배아줄기세포의 최종 말단세포 분화양상 분석에 따른 신경세포 (외배엽유래) 분화에 전략적으로 유리한 세포주 선정 : hESC#1 &amp; 3</p>	<div style="text-align: center;"> </div> <p><b>Fig. 1. Developmental potentials of different hESC lines towards neuroectodermal lineages.</b> (A) A phase-contrast image of differentiated cells that migrated out of hESC#1-derived EBs. (B-D) Immunofluorescence images of hESC#1-derived differentiated cells stained for the markers of motoneurons and interneurons (B, TuJ1/Islet1), dopaminergic neurons (C, TuJ1/TH), and GABAergic neurons (D, TuJ1/GABA). (E) Relative expressions of neuronal (TuJ1, MAP2, and TH) and glial (PLP and GFAP) genes in three different hESC lines. The expression level of each gene was normalized to its corresponding GAPDH level. Bars: 100 <math>\mu</math>m (A-B), 50 <math>\mu</math>m (C-D).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 지난 1차 년도에 인간배아줄기세포의 전능성을 분화유도적 관점에서 평가하기 위하여 3종의 배아줄기세포를 대상으로, 인체를 구성하는 모든 세포의 원기가 되는 내, 외, 중배엽 및 태반 등의 배아외조직 (extraembryonic tissue, primitive endoderm)으로의 분화능을 비교 분석하였다. 그 결과, 1번 세포주가 신경질환치료를 위한 신경세포의 원기가 되는 외배엽 (Nestin+&amp;Pax6+)으로, 2번 세포주가 당뇨병 치료를 위한 췌장소도세포의 원기가 되는 내배엽 (Foxa2+&amp;Sox17+)으로의 원활한 분화양상이 관찰 된 바 있다.</li> <li>• 1차 년도의 초기분화양상 비교에 더하여, 2차 년도에는 이들 세포주들을 최종 기능성 체세포로 분화시켜 말단세포로의 분화양상을 비교분석 하였으며, 1차년도의 실험결과에서 예상된 바와 같이 1번과 3번 세포주가, 2번 세포주에 비교하여, neuron의 특이 유전자인 TuJ1과 MAP2, 도파민신경세포의 특이유전자중 하나인 TH, 그리고 glial cells의 표지유전자인 PLP와 GFAP 및 관련 단백질을 발현하는 세포들이 현저하게 높은 수율로 분화되고 있음을 확인하였다.</li> </ul>

연구 내용

연구 결과 (세포주별 분화양상 비교분석)

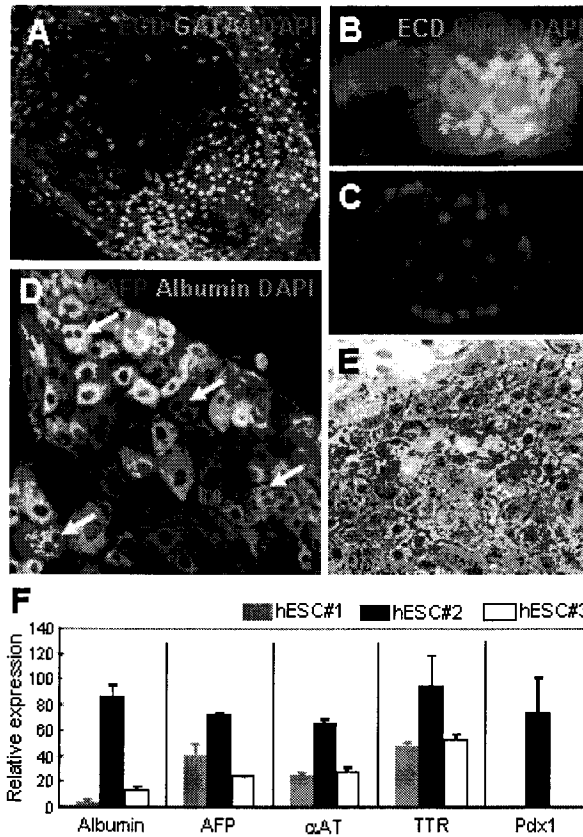
각기 다른 인간배아줄기세포의 최종 발달세포 분화양상 분석에 따른 혈관내피세포 및 혈액세포 (중배엽유래) 분화에 전략적으로 유리한 세포주 선정 : hESC#2



**Fig. 2. Developmental potentials of different hESC lines towards mesodermal lineages.** (A) A phase-contrast image of sprouting tube-like structures differentiated from hESC#2-derived EBs. (B-D) Immunofluorescence images of hESC#2-derived differentiated cells stained for VE-cad (B), CD45 (C), and CD34 (D), all of which are markers of hematopoietic or endothelial cells. (E) Relative expressions of genes associated with cardiogenesis ( $\alpha$ MHC, MLC2a, and MLC2v) and hematopoiesis (RUNX1) in the three different hESC lines. The expression level of each gene was normalized to its corresponding GAPDH level. Bars: 50  $\mu$ m.

- Fig. 1에 나타난 바와 같이 외배엽 유래의 신경세포로의 높은 분화수율을 보인 1번과 3번 세포주의 경우, 중배엽에서 분화되는 혈관내피세포 및 혈액세포로의 분화율이 2번 세포주에 비하여 현저하게 낮은 것으로 판명되었음.
- 반면 신경세포로의 낮은 분화수율을 보인 2번 세포주 (Fig.1)의 최종 분화결과, 다수의 vascular networks (Fig. 2A)와 함께, 혈관내피세포의 표지인자인 VE-cad (Fig. 2B), leukocytes progenitors의 표지인자인 CD45 (Fig. 2C) 및 hematopoietic 혹은 endothelial cells의 표지인자인 CD34 (Fig. 2D)를 발현하는 세포들이 1번과 3번 세포주에서 보다 현저하게 높은 수율로 분화되었음.
- 또한 심근세포의 분화에 관여하는 유전자 ( $\alpha$ MHC, MLC2a, MLC2v) 및 혈액형성에 관여하는 유전자 (RUNX1)의 발현 역시 2번 세포에서 1, 3번 세포에 비하여 높게 나타남이 관찰되었음 (Fig. 2E).

각기 다른 인간배아줄기세포의 최종 말단세포 분화양상 분석에 따른 **췌장세포** 및 **간세포 (내배엽유래)** 분화에 전략적으로 유리한 세포주 선정 : hESC#2



**Fig. 3. Developmental potentials of different hESC lines towards endodermal lineages.** (A-D) Immunofluorescence images of hESC#2-derived differentiated cells stained for markers of endodermal cells (A, ECD/GATA4; B, ECD/Foxa2), pancreatic progenitors (C, Pdx1), and early hepatocytes (D, AFP/albumin). Arrows in (D) indicate binucleate cells, (E) hESC#2-derived hepatocytes show  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase activity, (F) Relative expressions of hepatic (albumin, AFP,  $\alpha$ AT, and TTR) and pancreatic (Pdx1) genes in the three hESC lines. The expression level of each gene was normalized to its corresponding GAPDH level. Bars: 50  $\mu$ m.

• Fig. 1과 2의 결과와 함께, 중배엽과 내배엽이 발생과정 중 동일한 기원을 소유한다는 최근 학계의 보고에 따라, 내배엽에서 유래되는 대표적 기관인 췌장과 간을 구성하는 세포로의 분화양상을 비교해본 결과, 1번과 3번 세포주에 비교하여 2번 세포주에서 ECD와 GATA4, 그리고 Foxa2를 발현하는 (Fig. 3A, B) 내배엽성 세포 및 췌장전구세포의 표지인자인 PDX1 (Fig. 3C), AFP와 albumin을 발현하는 간세포들로의 분화수율이 현저히 높게 관찰되었으며, 일부세포에서는 간세포 특이적 효소인 GGT 활성 (Fig. 3E)이 검출되었음.

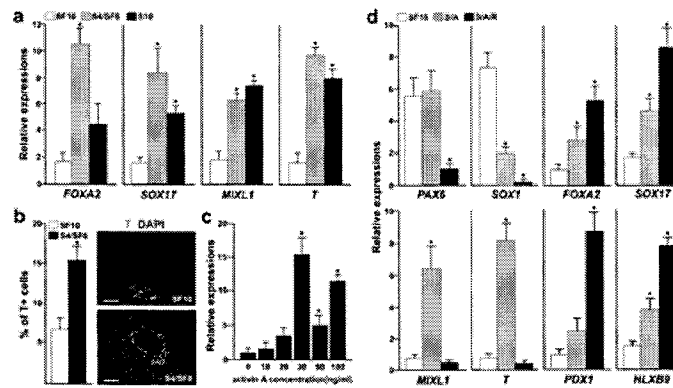
• 또한 간세포 특이적 유전자인 albumin, AFP,  $\alpha$ AT, TTR 및 췌장세포 특이적 유전자인 PDX1의 발현 역시 1, 3번 세포주에 비교하여 2번 세포주에서 현저하게 증가되어 있음이 관찰되었음 (Fig. 3F)

연구 내용

연구 결과 (췌장세포 분화유도)

인간배아줄기세포로부터 성장인자 및 사이토카인의 조합적 처리에 의한 췌장세포 분화유도 조건 개발 (1)

(표지인자 및 유전자발현분석)



**Fig. 4. Effects of serum, activin and RA on endodermal differentiation of hESCs.** a hEBs were grown in serum-free conditions for 10 days (SF10), serum-containing medium for the first 4 days followed by an additional 6 days in serum-free conditions (S4/SF6), or in serum for the entire 10 days (S10). hEBs differentiated in each condition were analysed for mesendodermal gene expressions by RT-PCR. b Percentage and representative images of T+ cells in hEBs differentiated either in SF10 or S4/SF6 culture conditions. c RT-PCR analysis of PDX1 expression in hEBs. hEBs were differentiated in serum-containing medium for the first 4 days followed by another 6 days in different concentrations of activin A without serum. d RT-PCR analysis of the gene expressions associated with neuroectoderm, mesendoderm and pancreatic endoderm development in hEBs differentiated under different culture conditions. Relative expression levels of target genes were normalised based on the signal of GAPDH and expressed as means  $\pm$  SD of triplicate experiments. \*,  $p < 0.05$  compared with the control culture (SF10). Scale bars: 50  $\mu$ m.

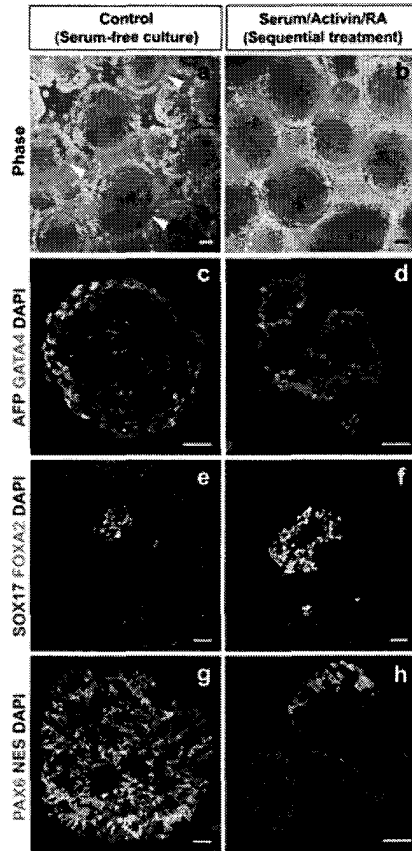
- 1차 년도에 실시한 각기 다른 인간배아줄기세포주의 초기 분화능 (내, 외, 중배엽) 비교분석 및 2차 년도 초기에 수행된 말단 분화능 (신경세포, 혈액세포, 간 및 췌장세포)(Fig. 1-3) 비교분석 결과를 토대로 하여, 내배엽성세포로의 원활한 분화특성을 보이는 2번 세포주를 대상으로 당뇨병치료에 사용될 수 있는 췌장베타세포로의 능동분화를 시도하였음
- 배아체 형성과정 중 제한적인 혈청처리 (배아체 형성 10일 중 초기 4일 처리: S4SF6)를 시행할 경우, 무혈청배지 (SF10) 및 지속적인 혈청처리 (S10)에 비교하여 내배엽 및 중내배엽 (mesendoderm) 발달에 관련된 유전자 (Foxa2, Sox17, MixL1, T)의 발현이 유의성있게 증가 하였음 (Fig. 4a,b).
- 제한적인 혈청처리 (4일) 후 나머지 6일 동안 activin을 여러 농도로 처리하였을 경우, 30 ng/ml의 농도에서 췌장세포 특이적인 PDX1의 발현이 가장 높게 나타남을 확인하였음 (Fig. 4c)
- 제한적인 혈청처리와 30 ng/ml의 activin 처리 후 연이은 retinoic acid의 처리 (2일)에 의하여 신경외배엽세포로의 분화에 관련되어 있는 PAX6와 SOX1의 유전자발현 및 중배엽 발달에 중요한 역할을 담당하는 유전자 (MIXL1, T)의 발현이 감소함과 동시에 내배엽 발달 (FOXA, SOX17) 및 췌장의 원기분화 (PDX1, HLXB9)에 관여하는 유전자들의 발현이 선택적으로 유의성 있게 증가됨을 확인하였음 (Fig. 4d).



인간배아줄기세포로부터 성장인자 및 사이토카인의 조합적 처리에 의한 **취장세포 분화유도 조건**

**개발 (2)**

(표지인자 분석)



**Fig. 5. Induction of endodermal differentiation during EB formation.** a, b Phase-contrast morphologies of EBs differentiated either in control (serum-free condition, a) or by sequential treatment with serum, activin, and RA (b). Note that control EBs show distinguishable outer layers at the periphery of the EBs (a, arrowheads). c-h Representative immunofluorescence images demonstrating the production of proteins associated with primitive and definitive endoderm (AFP/GATA4 and SOX17/FOXA2), and neuroectoderm (PAX6/NES). Note that immunoreactivity to both AFP and GATA4 are evident at the periphery of the control hEB (c), whereas many AFP-GATA4+ cells are visible inside of the serum/activin/RA-treated hEB (d). Few cells producing both SOX17 and FOXA2 are seen in the control EB (e), but a large tube-like structure producing SOX17 and FOXA2 is noted in the serum/activin/RA-treated EB (f). Serum/activin/RA treatment decreases formation of PAX6+NES+ neuroectoderm (g,h). Scale bars: 50  $\mu$ m.

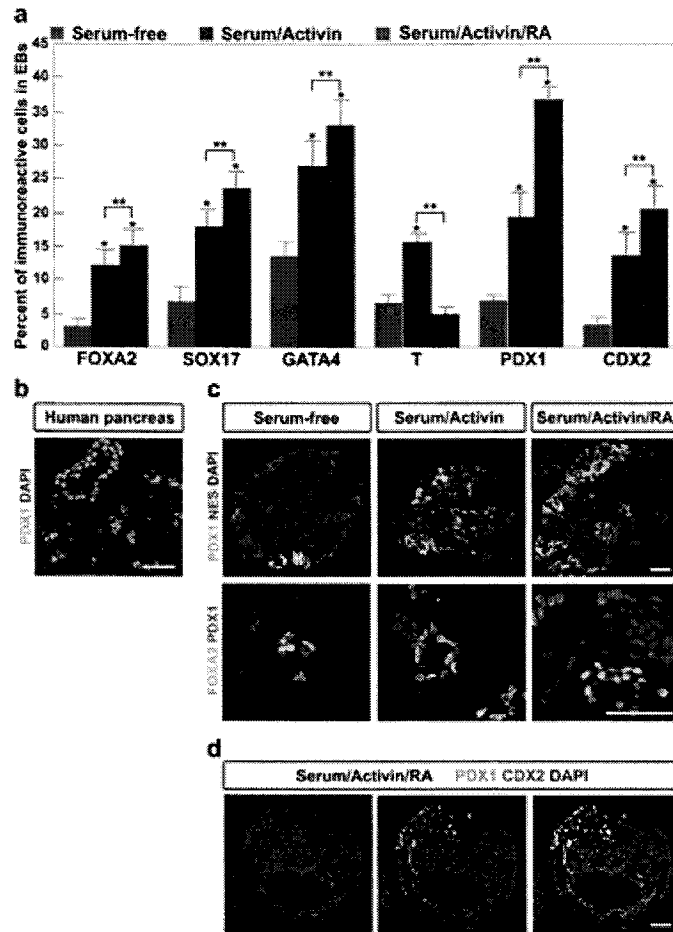
- Fig. 4의 유전자 분석결과를 바탕으로 배아체내에 형성된 세포들의 분포를 분석하였음.
- 태반형성의 원기인 배아의외조직층 (Fig. 5a, arrowheads)을 포함하는 무혈청배지에서 분화된 배아체에 비교하여, 혈청과 activin, 그리고 RA의 순차적 처리에 의하여 분화된 배아체는 배아체표면에 배아의외조직층 (AFP+GATA4+ cells)을 포함하고 있지 않음이 발견되었음 (Fig. 5a-d).
- 반면, Fig. 4의 유전자 분석결과와 동일하게 혈청/activin/RA의 자극을 받은 배아체 내에 GATA4+AFP- cells과 SOX17+FOXA2+ cells을 포함하는 내배엽성세포가 무혈청배지에서 분화된 대조군에 비하여 현저히 높게 분포하고 있음을 관찰하였으며 (Fig. 5e,f), 이와 반대로 많은 신경전구세포를 포함하고 있는 대조군에 비하여 매우 희박한 수의 신경외배엽세포 (PAX6+Nestin+ cells)을 포함하고 있음을 발견하였음 (Fig. 5g,h).
- 따라서, 종합적으로 판단할 때, 혈청과 activin, 그리고 RA의 순차적 처리에 의하여 배아의외조직 및 신경외배엽을 감소시키고, 취장의 원기인 내배엽성 세포로의 선택적 분화를 효과적으로 유도할 수 있음이 증명됨.

연구내용

연구결과 (췌장세포 분화유도)

인간배아줄기세포로부터 성장인자 및 사이토카인의 조합적 처리에 의한 췌장세포 분화유도 조건 개발 (3)

(표지인자 분석)



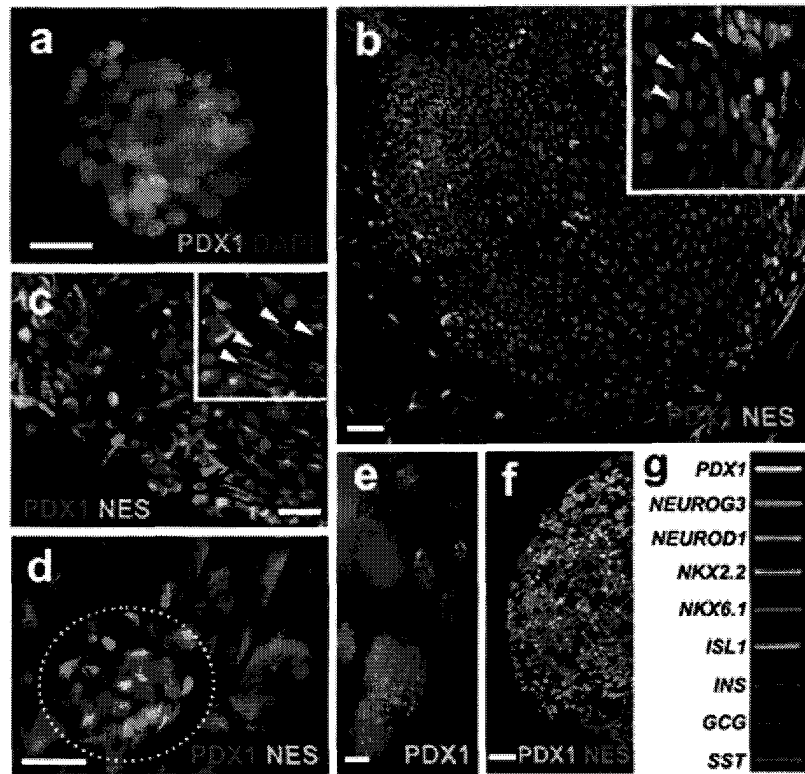
**Fig. 6.** Differentiation of PDX1+ pancreatic endoderm from hESCs. **a** Quantitative immunostaining analysis demonstrating the effectiveness of different conditions on mesendoderm and pancreatic endoderm differentiation. Quantification of cells expressing each marker is expressed as a percentage of total cells counted on DAPI. Values are expressed mean±SD (n=30). \*, p<0.05, compared with serum-free conditions; \*\*, p<0.05, compared between serum/activin and serum/activin/RA conditions. **b** Immunostaining of a frozen section of human pancreas for PDX1. **c** Production of PDX1/NES (upper panels) and FOXA2/PDX1 (lower panels) in hEBs differentiated in the indicated conditions. **d** Colocalization of CDX2 and PDX1 in serum/activin/RA-treated EBs. Scale bars: 50 μm (b, c) and 30 μm (d).

• Fig. 5의 면역화학염색 결과를 정량적으로 분석한 결과 역시 내배엽성세포들로의 분화수율이 무혈청배지, 혹은 혈청과 activin만을 처리한 배아체보다 혈청과 activin 그리고 RA의 처리에 의해 유의성 있게 증가됨을 보여주고 있음 (Fig. 6a).

• 특히, 중배엽으로의 분화 (T)를 억제하고 PDX1과 장내배엽의 표지인자인 CDX2를 발현하는 세포로의 분화가 촉진되었으며, 이들 PDX1+ 췌장전구세포가 FOXA2와 함께, 최근 췌장전구세포에서의 발현이 논란이 되고 있는 nestin을 발현하고 있음을 증명하였음 (Fig. 6c, d).

인간배아줄기세포로부터 성장인자 및 사이토카인의 조합적 처리에 의한 췌장세포 분화유도 조건 개발 (4)

(표지인자 및 유전자발현분석)



**Fig. 7.** Production of NES in PDX1+ pancreatic endoderm derived from S/A/R-treated hEBs. **a** Immunostaining for PDX1 at day 1 of differentiation after EB plating. **b-d** Immunostaining of cells that migrated from hEBs for PDX1 and NES at day 4 (**b, c**) and day 8 (**d**) of differentiation after EB plating. Arrowheads in (**b, c**, inset) indicate cells positive for PDX1 and negative for NES. Arrowheads in (**c**, inset) show cells positive for NES and negative for PDX1. The dotted circle in (**d**) shows cell clusters that produce both PDX1 and NES after 8 days of EB plating. **e** Formation of spheroids producing PDX1. **f** Immunostaining of cell clusters detached from culture plates for PDX1 and NES. **g** RT-PCR analysis showing the expression of genes associated with early and late phases of islet differentiation in cell clusters. (*NEUROG3*, neurogenin 3; *ISL1*, Islet1; *INS*, insulin; *GCG*, glucagon; *SST*, somatostatin). Scale bars: 25  $\mu$ m (**a, c, d**) and 50  $\mu$ m (**b, e, f**).

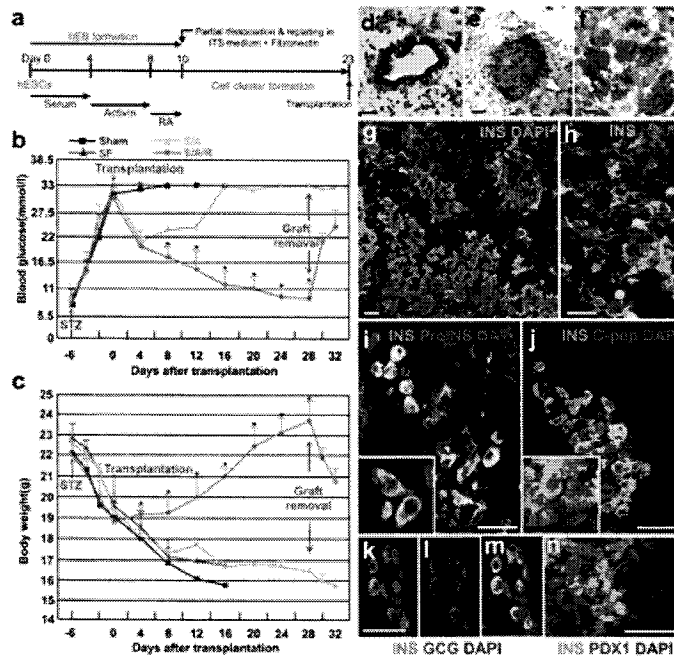
- 혈청과 activin, 그리고 RA의 순차적 처리에 의해 내배엽 및 췌장베타세포의 전구세포로의 분화가 촉진된 배아체를 인슐린 분비성 기능성 베타세포로 더욱 분화시키기 위하여, 배아체를 잘게 부순 뒤 fibronectin이 도말되어 있는 배양접시에서 추가 분화하였음.

- 추가 분화 1일째부터 PDX1 cluster가 관찰되었으며 (Fig. 7a), PDX1+NES+, PDX1+NES-, PDX1-NES+의 3종의 췌장전구세포가 관찰되었음 (Fig. 7b, c).

- 또한 이들 세포 중 췌장 랑게르한스섬과 유사한 cluster를 형성하는 세포는 PDX1+NES+ cells임을 관찰하였으며 (Fig. 7d, e, f), 이들 clusters를 따로 분리하여 유전자분석을 실시한 결과 췌장의 초기 및 후기발달에 관여하는 유전자들이 발현되고 있음을 증명함 (Fig. 7g).

인간배아줄기세포로부터 성장인자 및 사이토카인의 조합적 처리에 의한 췌장세포 분화유도 조건 개발 (5)

(표지인자, 기능성 및 특이활성 분석)



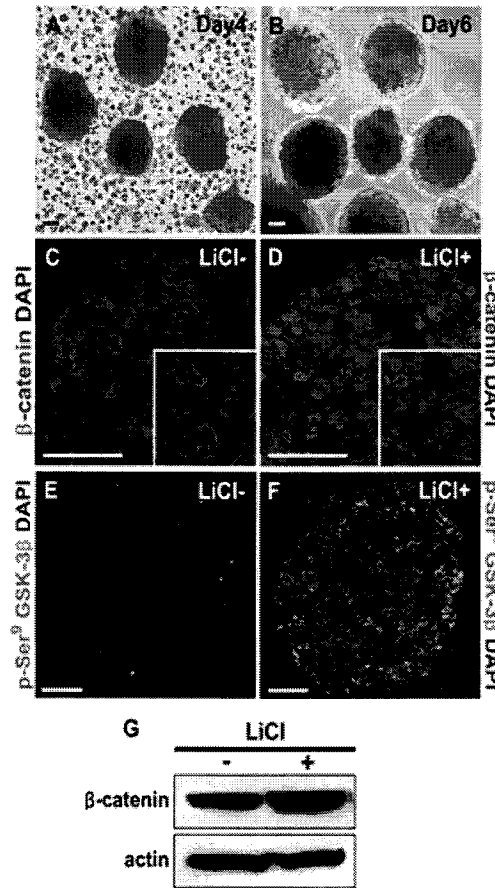
**Fig. 8.** Transplantation of hESC-derived Pdx1+ clusters into diabetic mice. **a** Schematic procedures of differentiation. **b, c** Changes of blood glucose levels (**b**) and body weight (**c**) in STZ-induced diabetic mice transplanted with cells derived under SF (n=3, red lines), S/A (n=3, yellow lines), S/A/R condition (n=6, green lines), or in sham-operated mice (n=6, blue lines). **d, e** Hematoxylin/eosin staining showing gut tube- (**d**) and islet-like structures (**e**) in histological sections of grafts. **f** Expression of proinsulin in the graft. Brown colours are positive. Cells were counterstained with hematoxylin. **g-j** Immunostaining of the grafts for insulin (INS) (**g**), insulin (INS)/human nuclei (hNuc) (**h**), insulin (INS)/proinsulin (ProINS) (**i**), and insulin (INS)/C-peptide (C-pep) (**j**). Insets in (**i, j**) are enlarged images of the cells producing insulin and proinsulin (**i**), and insulin and C-peptide (**j**). Merged double-staining (red + green) appears yellow. **k-m** Immunostaining for insulin (INS) (**k**), glucagon (GCG) (**l**), and a merged image of insulin and glucagon (**m**). **n** Immunostaining of grafts for insulin (INS) and PDX1. Scale bars: 50  $\mu$ m.

- Fig. 7d, e에서 보여진 PDX1+ clusters를 streptozotocin (STZ)를 주입함으로 췌장베타세포가 파괴된 당뇨병모델 nude mice의 kidney capsules에 이식하여 혈당과 몸무게를 시간대 별로 모니터링 하였음.

- STZ의 주입 후 증가된 혈당이 혈청과 activin, 그리고 RA의 처리 (Fig. 8a)에 의해 형성된 PDX1+ clusters를 이식함으로 인해, 이식 후 28일 간에 걸쳐 정상치에 가까운 수준으로 감소됨을 증명 하였으며, 이와 함께 당뇨병유발에 의해 감소되었던 체중도 정상체중으로 회복됨을 관찰하였음 (Fig. 8b, c). 또한 이식된 세포를 제거하면 다시 혈당이 증가함을 증명하였음 (Fig. 8b, c).

- 이식된 조직을 제거하여 면역조직화학분석을 한 결과 다량의 인슐린 합성 베타세포 및 베타세포 관련단백질을 발현하는 세포들이 관찰되었음 (Fig. 8d-n).

인간배아줄기세포로부터 성장인자 및 사이토카인의 조합적 처리에 의한 간세포 분화유도 조건 개발 (1)



**Fig. 9. Effects of LiCl on the subcellular localization of  $\beta$ -catenin during EB formation.** (A) LiCl treatment during day 2 - 4 of EB formation induced extensive cell death. (B) The surviving cells after LiCl treatment continued to proliferate and showed typical morphology of EBs after an additional 2 days of differentiation without LiCl. (C) Immunostaining and confocal analyses showing the membrane or cytoplasmic localization of  $\beta$ -catenin in control EBs (LiCl-). (D) LiCl (10 mM) treatment during EB formation (LiCl+) resulted in an overall enhanced staining and predominant nuclear localization of  $\beta$ -catenin. Insets in C and D show higher magnifications of immunostaining for  $\beta$ -catenin. (E, F) Immunostaining of the control EB (E) and LiCl-treated EB (F) with anti-phospho-serine9-GSK-3 $\beta$ . (G) Stabilization of  $\beta$ -catenin protein by LiCl-induced GSK-3 $\beta$  inactivation was confirmed by Western blot analysis showing accumulation of  $\beta$ -catenin after treatment with LiCl. Scale bars, 50  $\mu$ m.

• 웨장분화에서 개발된 혈청과 activin, 그리고 RA의 처리기법 이외에 또 다른 차원에서의 내배엽성 간세포 분화촉진을 2번 세포를 대상으로 Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway를 인위적으로 유도함으로서 시도하였음.

• LiCl를 배아체 형성과정 중 2일간 처리함으로서 많은 세포의 사멸이 유도되나 배아체 형성 6일이 되면 정상 배아체의 형태를 소유하며 (Fig. 9A, B), 이들 LiCl가 처리된 배아체의 면역화학염색 결과, Wnt signaling의 세포내 신호전달자인  $\beta$ -catenin이 LiCl의 처리에 의해 세포막 혹은 세포질에서 핵 안으로 유입됨을 증명하였음 (Fig. 9C, D).

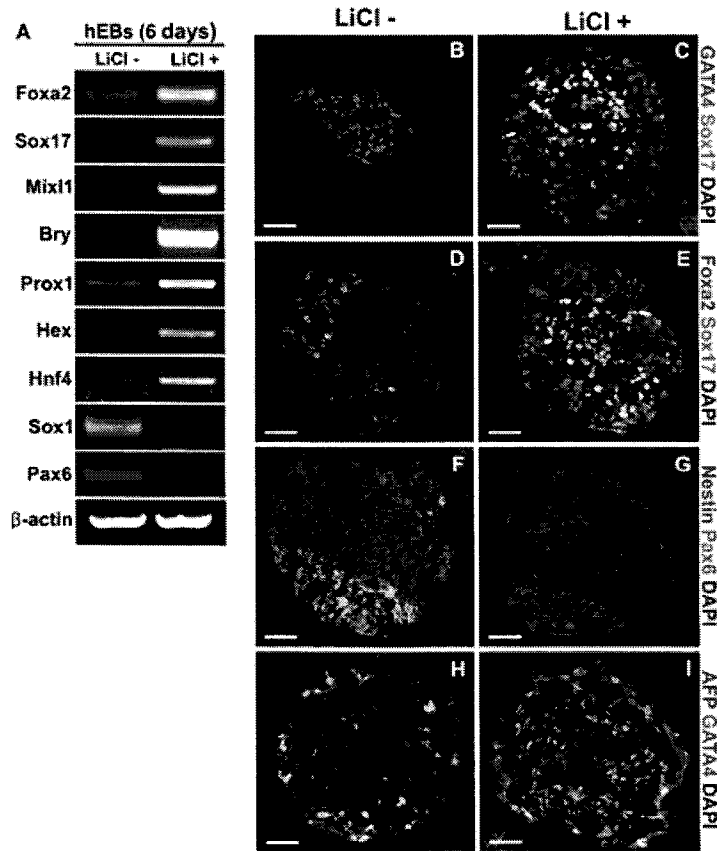
• LiCl의 처리에 의한  $\beta$ -catenin의 핵 내 유입은 정상 Wnt signaling에서 마찬가지로 GSK-3 $\beta$ 의 phosphorylation에 의한 활성억제에 의하여 유도되었음을 증명하였음 (Fig. 9E, F).

연구 내용

연구 결과 (간세포 분화유도)

인간배아줄기세포로부터 성장인자 및 사이토카인의 조합적 처리에 의한 간세포 분화유도 조건 개발 (2)

(표지인자 및 유전자발현분석)



**Fig. 10. Effects of LiCl on the embryonic germ layer formation in EBs.** (A) RT-PCR analysis of genes involved in mesendodermal differentiation [Foxa2, Sox17, Mixl1 and Brachyury (Bry)], early specification of liver (Prox1, Hex and Hnf4) and neuroectodermal development (Sox1 and Pax6). (B-I) Immunostaining analysis of day 6 EBs for the expression of proteins associated with endoderm (GATA4, Sox17 and Foxa2), neuroectoderm (Nestin and Pax6) and primitive endoderm (AFP and GATA4). Note that primitive endodermal cells expressing both AFP and GATA4 are located at the periphery surrounding the EBs. Each of these micrographs was chosen as representative from at least three independent experiments. Scale bars, 50 μm.

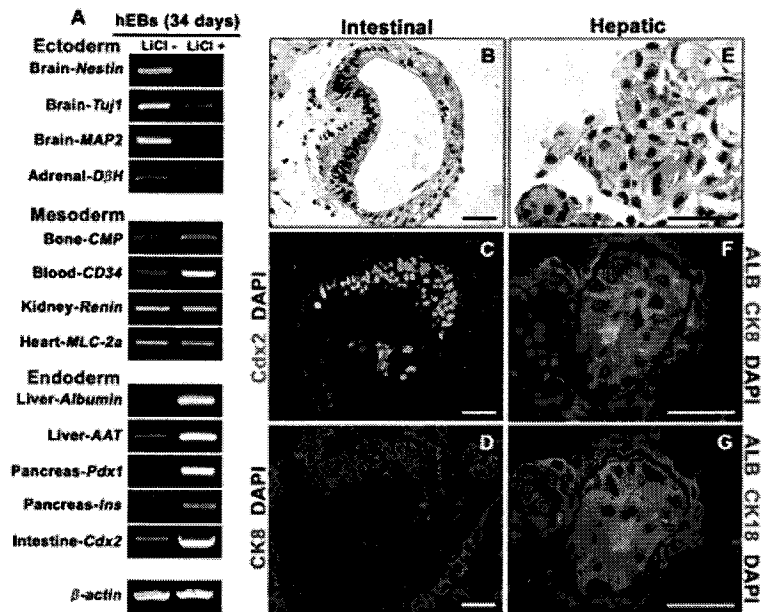
- LiCl의 처리는 배아체에서 중내배엽 (Foxa2, Sox17, Mixl1, Bry) 및 간세포전구세포 (Prox1, Hex, Hnf4)의 분화와 관련된 유전자발현을 증가시키고, 반대로 신경외배엽 (Sox1, Pax6)의 분화와 관련된 유전자의 발현을 감소시킴을 관찰하였음 (Fig. 10A).
- 배아체 형성과정 중의 LiCl 처리가 GATA4+Sox17+ 혹은 Foxa2+Sox17+의 내배엽세포로의 분화수율을 증가시킴 (Fig. 10B-E)과 동시에 Nestin+Pax6+ 신경외배엽의 분화는 억제함 (Fig. 10F, G)을 증명하였음 (배아외조직의 발현에는 변화가 없었음, Fig. 10H, I)

연구 내용

연구 결과 (간세포 분화유도)

인간배아줄기세포로부터 성장인자 및 사이토카인의 조합적 처리에 의한 간세포 분화유도 조건 개발 (3)

(표지인자 및 유전자발현분석)

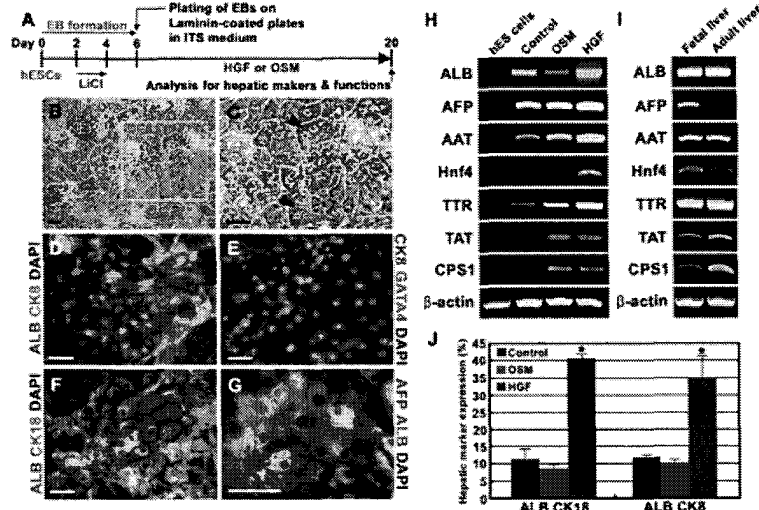


**Fig. 11. Developmental competence of LiCl-treated EBs after long-term differentiation.** (A) Expression analysis of genes specific for various germ layer derivatives after a prolonged period (total 34 days in suspension) of differentiation. For abbreviations of the various genes, see *Materials and Methods*. Note that endodermal differentiation and CD34 expression was markedly promoted in EBs treated with LiCl, compared to control EBs. (B-G) Histological and immunostaining analysis of the LiCl-treated 34-day old EBs for intestinal [Cdx2 and cytokeratin8 (CK8)] and hepatic [albumin (ALB), cytokeratin 8 (CK8) and cytokeratin 18 (CK18)] differentiation. Scale bars, 50  $\mu$ m.

- LiCl를 처리한 배아체를 34일간 장기간 분화시킨 뒤 각 배엽 (내, 외, 중배엽)에서 유래되는 각종 세포로의 분화양상을 측정하였음.
- LiCl를 처리하지 않은 대조군 배아체를 34일간 분화시킬 경우, brain과 adrenal tissue 등 외배엽성 조직에 관련된 유전자들의 발현이 증가 되었으며, 반면에 LiCl를 처리한 배아체에서는 분화 후 중배엽성 조직인 bone, blood, kidney, heart 및 내배엽성 조직인 liver, pancreas, intestine 등의 분화와 관련된 유전자들의 발현이 대조군에 비하여 증가됨을 관찰하였음 (Fig. 11A).
- 간세포로의 분화를 분석하기 위한 면역조직화학염색 결과 대조군 (0.81%)에 비하여 약 10배 정도 증가된 간세포 (Albumin+Cytokeratin 8 or 18+: Fig. 11F, G) 분화수율 (8.2%)을 보였으나, 절대적인 수율은 아직 10%가 못 미치는 낮은 분화수율을 보였음.

인간배아줄기세포로부터 성장인자 및 사이토카인의 조합적 처리에 의한 간세포 분화유도 조건 개발 (4)

(표지인자 및 유전자발현분석)



**Fig. 12. Differentiation of LiCl-treated EBs into hepatocyte-like cells.** (A) Schematic procedures of hepatic differentiation of hESCs. (B) Morphology of hepatocyte-like cells differentiated in the presence of HGF. (C) High magnification of the boxed area in B. Arrowheads indicate binucleate cells. (D-G) Immunostaining of hepatocyte-like cells for albumin (ALB) and cytochrome 8 (CK8) (D), CK8 and GATA4 (E), albumin (ALB) and cytochrome 18 (CK18) (F), albumin (ALB) and  $\alpha$ -fetoprotein (AFP) (G). (H) Expression of liver-specific genes before and after differentiation. LiCl-treated EBs were differentiated in the absence of growth factors (Control), in the presence of OSM (OSM) or in the presence of HGF (HGF). (I) RT-PCR analysis of hepatic genes in fetal and adult liver. (J) Proportions of hepatocyte-like cells expressing both albumin (ALB) and cytochrome 18 (CK18), or both albumin (ALB) and cytochrome 8 (CK8) after the differentiation of LiCl-treated EBs in the absence (control) or presence of either OSM or HGF (n = 5, \*p<0.01 versus the control). Scale bars, 50  $\mu$ m.

- 간세포로의 분화수율을 증가시키기 위하여, LiCl를 처리한 배아체를 6일간 분화시킨 뒤 laminin이 도포되어있는 배양접시에서 14일간 HGF를 처리하면서 추가 분화하였음 (Fig. 12A).
- HGF를 처리하면서 추가 분화를 유도한 결과, 간세포와 유사한 다각형모양의 세포들이 다수 관찰되었으며 (Fig. 12B), 태아 간세포에서 나타나는 binucleated cells들도 관찰되었음 (Fig. 12C, arrowheads).
- 면역화학염색 결과 ALB+CK8, CK8+GATA4+, ALB+CK18+, AFP+ALB+ 등 정상 태아간세포에서 발견되는 단백질들을 합성하는 다수의 세포들이 관찰되었음 (Fig. 12D-G).
- 유전자발현 분석결과 역시 인간배아줄기세포에서 유래된 이들 간세포들이 인간의 태아 간세포와 매우 유사한 유전자 발현 양상을 나타냄을 보여 주었음 (Fig. 12H,I).
- 간세포 분화 수율을 정량적으로 분석한 결과 대조군 혹은 oncostatin M을 처리한 세포들에 비하여 HGF를 처리하였을 경우 그 분화수율이 약 40%까지 증가함을 관찰하였음 (Fig. 12I).

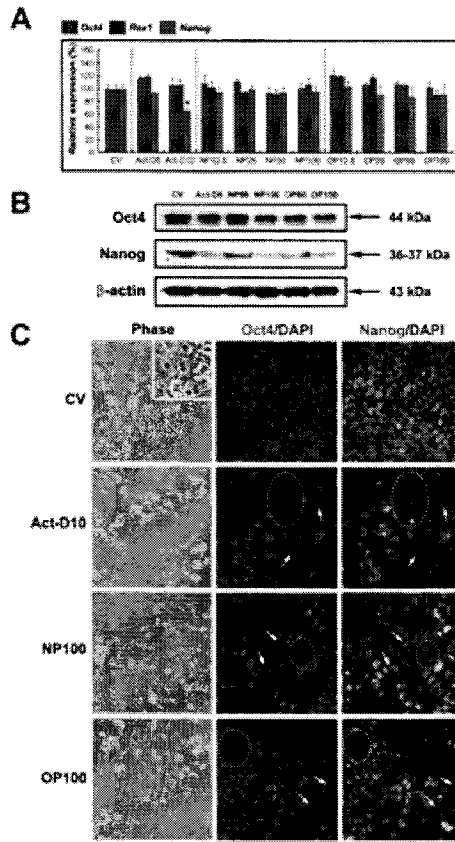


연구 내용	연구 결과 (간세포 분화유도)												
<p>인간배아줄기세포로부터 성장인자 및 사이토카인의 조합적 처리에 의한 <b>간세포 분화유도 조건 개발 (5)</b></p> <p>(특이활성 분석)</p>	<div data-bbox="478 358 1356 1120" data-label="Figure"> <table border="1"> <caption>Data from Figure 13D: Urea secretion (mM) over time</caption> <thead> <tr> <th>Day</th> <th>Urea secretion (mM)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>~0.1</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>~0.3</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>~1.8*</td> </tr> <tr> <td>13</td> <td>~1.9*</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>~2.7**</td> </tr> </tbody> </table> </div> <p><b>Fig. 13. Functional characterization of hESCs-derived hepatocyte-like cells.</b> Hepatocyte-like cells differentiated with HGF uptake indocyanine green (ICG) (A) and show <math>\gamma</math>-glutamyltranspeptidase activity (B). (C) Glycogen-specific PAS staining confirms the presence of intracellular glycogen. (D) Levels of urea secretion measured at various time points throughout the differentiation period (n = 4, *<math>p</math>&lt;0.05, **<math>p</math>&lt;0.01 versus day 0, undifferentiated hESCs). Scale bars, 50 <math>\mu</math>m.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>인간배아줄기세포로부터 분화된 간세포가 정상 간세포의 기능을 소유하고 있음을 증명하기 위하여 여러 가지 생화학적 분석을 시행하였음.</li> <li>정상 간세포와 마찬가지로 인간배아줄기세포에서 유래된 간세포는 indocyanine green (ICG)을 선택적으로 흡수하며 (Fig. 13A), gamma-glutamyl transpeptidase (GGT)의 활성을 소유하고 (Fig. 13B), 세포질 내에 glycogen을 축적하는 특성을 보유하고 있음을 증명하였음 (Fig. 13C).</li> <li>이와 더불어 urea를 분비하는 활성을 분화 단계별로 측정된 결과 LiCl를 처리한 배아체를 HGF에 노출시키는 시점인 7일 이후부터 urea의 분비활성이 급격히 증가함을 관찰하였음 (Fig. 13D).</li> </ul>	Day	Urea secretion (mM)	0	~0.1	6	~0.3	9	~1.8*	13	~1.9*	20	~2.7**
Day	Urea secretion (mM)												
0	~0.1												
6	~0.3												
9	~1.8*												
13	~1.9*												
20	~2.7**												

연구 내용

연구 결과 (줄기세포를 이용한 화합물 독성평가)

인간배아줄기세포  
및  
인간배아줄기세포  
-유래  
신경전구세포를  
이용한 **화합물  
독성평가 (1)**



**Fig. 20. Effects of NP and OP on the pluripotent status of hES cells.** (A) Semi-quantitative RT-PCR analysis of markers for the undifferentiated state. The expressions of the *Oct4*, *Rex1* and *Nanog* were normalized to a housekeeping gene GAPDH. \*,  $p < 0.05$  compared with vehicle-exposed control (CV). (B) Western blot analysis for the protein expressions of Oct4 and Nanog. Two isoforms of Oct4 (Oct4A and Oct4B) generated by alternative splicing were detected. The molecular weight (kDa) of each protein is indicated to the right of the image. (C) Phase-contrast images and immunofluorescence for Oct4 and Nanog in the hES cells after exposure to 10  $\mu$ M of Act-D or 100  $\mu$ M of NP or OP for 24 h. The inset in the top left panel shows the hES cells with prominent nucleoli and a high nuclear cytoplasmic ratio. The dotted circles in the fluorescent images indicate the cells which are negative for both Oct4 and Nanog. Arrows indicate apoptotic cells showing fragmented nuclei. Magnification, X200.

• 1차 년도에 본 과제를 통하여 분화된 세포들의 활용가치를 확대화하기 위하여 수행된 '줄기세포를 이용한 화합물의 독성평가'를 보다 구체화하기 위하여, 독성유발의 기작을 인간배아줄기세포 및 그로부터 분화된 신경전구세포를 이용하여 연구하였음.

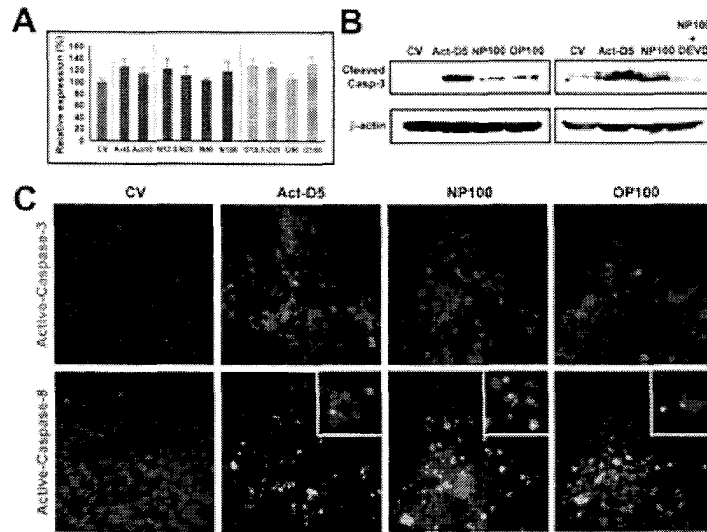
• Nonylphenol (NP) 혹은 Octylphenol (OP)의 노출에 의하여 일어나는 인간배아줄기세포의 세포독성을 평가한 결과, 이들 화합물의 노출에 의하여 줄기세포의 전능성을 나타내는 표지유전자 (*Oct4*, *Nanog*, *Rex1*)의 발현에는 유의성 있는 영향을 미치지 못함을 관찰하였음 (Fig. 20A).

• 그러나, 전능성 표지인자의 단백질의 발현 양상을 조사한 결과, OP 혹은 NP의 노출에 의하여 농도-의존적으로 *Oct4*와 *Nanog*의 단백질 발현이 감소함을 Western blot과 면역화학조직염색기법으로 확인하였음 (Fig. 20B, C).

연구 내용

연구 결과 (줄기세포를 이용한 화학물 독성평가)

인간배아줄기세포 및 인간배아줄기세포-유래 신경전구세포를 이용한 화학물 독성평가 (2)



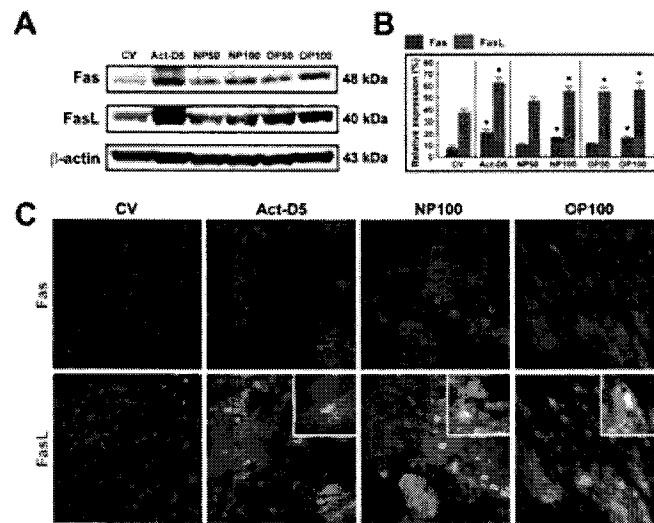
**Fig. 21.** Gene expressions and activation of Caspase-3 and Caspase-8 in hES cells after NP or OP exposure, (A) Semi-quantitative RT-PCR analysis for the expression of *Caspase-3* in hES cells exposed to different doses of NP or OP. (B) Western blot analysis of the active form of Caspase-3 in hES cells exposed to 100  $\mu$ M of NP or OP. Cells also exposed to 10  $\mu$ M of DEVD-CHO, a Caspase-3 (CPP32) inhibitor for 1 h prior to NP exposure. (C) Detection of the active Caspase-8 and -3 in hES cells exposed to 5  $\mu$ M of actinomycin-D (Act-D), or 100  $\mu$ M of NP or OP for 24 h using fluorescence microscopy. Insets in lower panels show the colocalization of the active forms of Caspase-8 and -3 in some of the apoptotic cells. Magnification, X200.

- NP와 OP의 인간배아줄기세포에 대한 세포독성을 세포자연사 (apoptosis)적 측면에서 다각도로 분석하였음.
- NP 혹은 OP의 노출에 의하여 세포질 내 Caspase-3의 활성화가 증가되는 것을 증명하였으며 (Fig. 21A, total caspase-3 expression; Fig. 21B, cleaved active caspase-3), 이러한 active caspase-3의 증가는 inhibitor의 일종인 DEVD에 의하여 억제됨을 관찰하였음 (Act: actinomycin D, positive control for apoptosis).
- Caspase-3의 cleavage를 유발하는 Caspase-8과의 연관성을 분석한 결과, NP 혹은 OP를 처리한 다수의 배아줄기세포에서 cleaved Caspase-3와 Caspase-8의 활성이 동시에 나타남을 증명함으로써 NP 혹은 OP의 처리에 의한 세포독성이 세포자연사에 의하여 일어남을 증명하였음 (Fig. 21C).

연구 내용

연구 결과 (줄기세포를 이용한 화합물 독성평가)

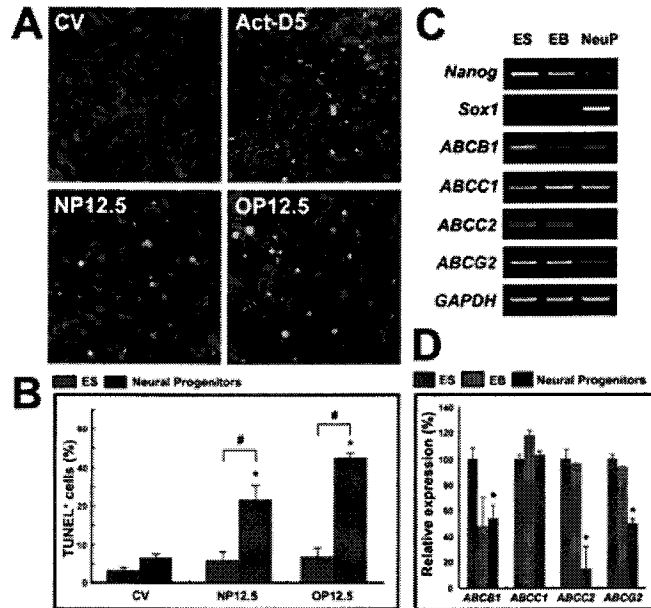
인간배아줄기세포 및 인간배아줄기세포-유래 신경전구세포를 이용한 **화합물 독성평가 (3)**



**Fig. 22.** Expressions of Fas and Fas ligand (FasL) in hES cells after NP or OP exposure. (A) Western blot analysis of Fas and FasL in hES cells exposed to different doses of NP or OP. The molecular weight (kDa) of each protein is indicated to the right of the image. (B) Measurements of signal intensities from Western blot analysis. Values are expressed as percentages of the corresponding  $\beta$ -actin expression. \*,  $P < 0.05$  compared with the corresponding vehicle-exposed control. (C) Immunofluorescence of Fas and FasL in hES cells exposed to 5  $\mu$ M of actinomycin-D (Act-D) or 100  $\mu$ M of NP or OP for 24 h. Insets in lower panels are representative fluorescent images for the cells that express both Fas and FasL. Magnification, X200.

- 세포자연사의 세포내 신호전달자인 Caspase-3와 Caspase-8 보다 upstream에 존재하는 신호유발 단백질을 구명하기 위하여, 이들 caspase들의 활성화를 유도하는 것으로 알려진 death receptor family중 Fas와 Fas ligand (FasL)의 발현양상을 NP 혹은 OP를 처리한 인간배아줄기세포에서 조사하였음.
- 대조군 (CV, control vehicle)에 비교하여 NP 혹은 OP를 처리하였을 경우 Fas와 FasL의 발현이 농도-의존적으로 증가하는 것을 관찰하였음 (Fig. 22A, B).
- 면역조직화학염색 결과 역시, 대조군에 비하여 NP 혹은 OP의 처리군에서 Fas 및 FasL의 발현이 현저히 증가함을 나타내었으며, 많은 세포들이 Fas와 FasL를 동시에 발현하고 있음을 증명하였음 (Fig. 22C).

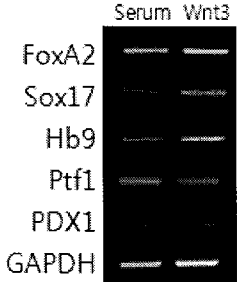
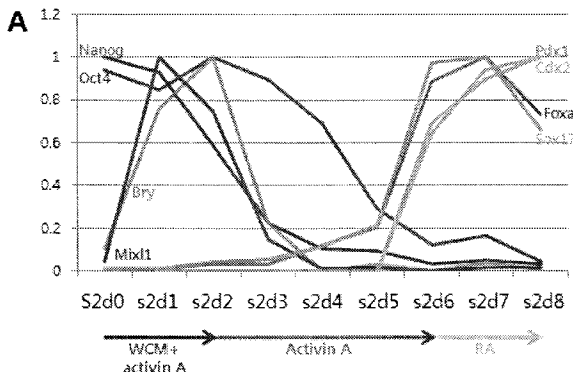
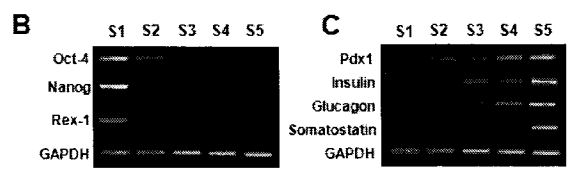
인간배아줄기세포 및 인간배아줄기세포-유래 신경전구세포를 이용한 화학물 독성평가 (4)



**Fig. 23.** NP- and OP-induced apoptosis in the neural progenitor cells derived from hES cells and the expression patterns of ABC transporter genes during the neural differentiation. (A) Detection of apoptosis by TUNEL analysis in the nestin-positive neural progenitor cells after NP or OP exposure. Magnification, X200. (B) Comparison of the incidence of apoptosis in hES cells and neural progenitor cells. Values are expressed as means  $\pm$  SE. \*,  $P < 0.05$  compared with the vehicle-exposed control (CV); #,  $P < 0.05$  compared between hES cells and neural progenitor cells. (C) Representative semi-quantitative RT-PCR product stained with ethidium bromide. RNA samples were harvested at different stages of the neural differentiation and analyzed for the gene expressions of the pluripotency (Nanog) and neural (Sox1) markers, and ABC transporters. ES, undifferentiated hES cells; EB, after 8 days of embryoid body formation; NeuP, neural progenitors after 8 days of cell expansion in N2 medium supplemented with hbFGF. (D) Expression of ABC transporter genes was analyzed by semi-quantitative RT-PCR and normalized to GAPDH. The percentage of the relative expression levels were scaled such that the expression level of the hES cells was equal to 100. \*,  $P < 0.05$  compared with hES cells.

- 인간배아줄기세포와 이로부터 분화시킨 신경줄기세포 간에 NP 혹은 OP에 대한 세포독성 민감도를 비교 분석하였음.
- 인간배아줄기세포에 비교하여, 분화된 신경줄기세포가 NP 혹은 OP에 의한 세포독성에 보다 높은 민감도를 보유하고 있음을 발견하였음 (Fig. 23A) [신경줄기세포의 경우 낮은 농도 (12.5  $\mu$ M)에서도 높은 세포자연사를 나타내었음: Fig. 23B].
- 미분화 인간배아줄기세포 (ES)에서 배아체 (EB)를 거쳐 신경줄기세포 (NeuP)로의 분화과정 동안 대표적인 multidrug resistant (MDR) ABC transports의 발현이 감소하는 것을 발견하였음 (Fig. 23C). 따라서 이러한 transporters가 인간 배아줄기세포로부터 NP 혹은 OP와 같은 화학물을 세포외로 pumping out하는 역할을 하여 신경줄기세포에 비해 미분화 줄기세포가 화학물에 대해 보다 높은 저항성을 소유하게끔 하는 것으로 사료됨.

### 제 3절 3차년도 연구개발 결과

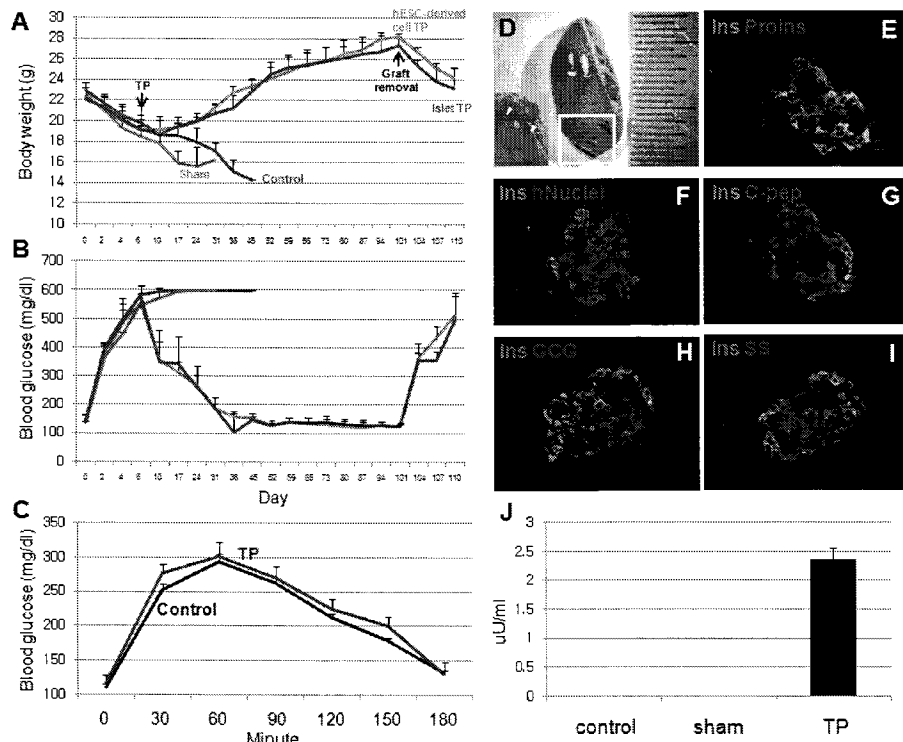
연구 내용	연구 결과 (췌장세포 분화유도)
<p>인간배아줄기세포로부터 췌장세포로의 분화유도과정 중 미분화, 췌장내배엽, 췌장내분비세포에 관여하는 유전인자들의 발현양상 분석</p>	 <p>Fig. 1 Comparison of pancreatic endodermal gene expression profiles between serum and wnt3 treatment.</p>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>2차 년도의 연구에서 췌장내배엽세포로의 분화유도에 activin, 그리고 retinoic acid와 함께 사용되었던 혈청을 wnt3a로 대체할 수 있음을 관찰하여, 3차 년도에는 wnt3a/activin/retinoic acid의 처리에 의해 췌장내배엽로의 분화를 유도하였음.</li> </ul> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="622 918 1197 1288">  </div> <div data-bbox="622 1321 1197 1489">  </div> </div> <ul style="list-style-type: none"> <li>분화 제 2단계 (S2)의 day 0 (d0)부터 8일 (d8)동안 미분화관련 유전인자와 췌장내배엽분화인자의 발현양상을 조사한 결과, 미분화 인자 (nanog, oct4)의 감소와 함께 Pdx1, Cdx2, Foxa2, Sox17등 췌장내배엽 유전인자가 증가함을 검증함 (A).</li> <li>더불어 분화단계별 stage I (S1) ~ stage 5 (S5) 유전자 발현양상을 조사한 결과, 분화 후기로 갈수록 insulin, glucagon, somatostatin 등 내분비호르몬의 발현이 증가함을 알 수 있음.</li> </ul>

연구 내용	연구 결과 (췌장세포 분화유도)																	
<p>인간배아줄기세포로부터 인슐린을 분비하는 기능성 췌장베타세포로의 분화 및 활성 분석</p>	<p style="text-align: center;"><b>Dithizone staining</b></p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="478 392 981 683"> <p><b>A</b></p> </div> <div data-bbox="997 392 1356 683"> <p><b>B</b></p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div data-bbox="478 728 726 985"> <p><b>C</b></p> </div> <div data-bbox="742 728 997 985"> </div> <div data-bbox="1021 694 1340 1030"> <p><b>D</b></p> <table border="1" style="margin-top: 10px;"> <caption>Insulin secretion (ng/mg protein)</caption> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Condition</th> <th>Insulin secretion (ng/mg protein)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="4">agonists</td> <td>1. Control</td> <td>~25</td> </tr> <tr> <td>2. L-arginine</td> <td>~65</td> </tr> <tr> <td>3. Tolbutamide</td> <td>~75</td> </tr> <tr> <td>4. IBMX</td> <td>~60</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">antagonists</td> <td>5. Nifedipine</td> <td>~15</td> </tr> <tr> <td>6. Diazoxide</td> <td>~10</td> </tr> </tbody> </table> </div> </div> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2차 년도에 분화유도에 성공한 췌장 전구세포를 bFGF+activin, FGF7, GSI+TGFbeta, Exendin4+Nicotinamide의 순차적인 처리를 통하여 성숙한 기능성 베타세포로의 분화에 성공함.</li> <li>• 인슐린 분비세포에 특이적으로 염색되는 dithizone에 반응하는 세포집합체가 대조군 (A, cont)에 비교하여, 처리군 (A, Tx)에서 현저하게 증가됨을 검증함.</li> <li>• dithizone에 염색된 세포집합체를 회수하여 (B) 공초점 현미경으로 분석한 결과, 정상췌장의 랑게르한스섬과 매우 비슷한 양상으로 insulin, glucagon, somatostatin을 합성하는 세포가 모두 세포집합체에서 발견됨을 확인함.</li> <li>• 분화된 췌장세포의 기능을 검증하기 위하여 정상 췌장베타세포의 인슐린분비에 대한 agonists와 antagonists를 처리한 결과, 대조군 (D, 1)에 비교하여 agonists를 처리한 실험군에서 인슐린분비가 촉진되며, antagonists를 처리한 실험군에서 인슐린분비가 억제됨을 보임으로서, 분화된 세포의 실질적인 인슐린 분비능력을 검증함.</li> </ul>	Group	Condition	Insulin secretion (ng/mg protein)	agonists	1. Control	~25	2. L-arginine	~65	3. Tolbutamide	~75	4. IBMX	~60	antagonists	5. Nifedipine	~15	6. Diazoxide	~10
Group	Condition	Insulin secretion (ng/mg protein)																
agonists	1. Control	~25																
	2. L-arginine	~65																
	3. Tolbutamide	~75																
	4. IBMX	~60																
antagonists	5. Nifedipine	~15																
	6. Diazoxide	~10																

연구 내용

연구 결과 (췌장세포 분화유도)

인간배아줄기세포로부터 분화된 기능성 췌장섬세포의 이식을 통한 기능성 분석



• STZ의 주입 후 증가된 혈당이 DTZ+ clusters의 이식에 의해 이식 후 13주간에 걸쳐 정상치에 가까운 수준으로 감소됨을 증명하였으며, 이와 함께 당뇨병유발에 의해 감소되었던 체중도 정상체중으로 회복됨을 관찰하였음. 또한 이식된 세포를 제거하면 다시 혈당이 증가함을 증명하였음 (A, B).

• 분화세포를 이식한 마우스에 Intraperitoneal Glucose Tolerance Testing (IPGTT)를 시행한 결과 정상마우스와 유사한 양상으로 혈당을 감소시키는 능력을 지님을 확인할 수 있었음 (C). 또한 혈청 내 insulin 농도를 ELISA를 통해 분석함으로 분화세포를 이식한 마우스에서 human insulin을 분비함을 확인하였음 (J).

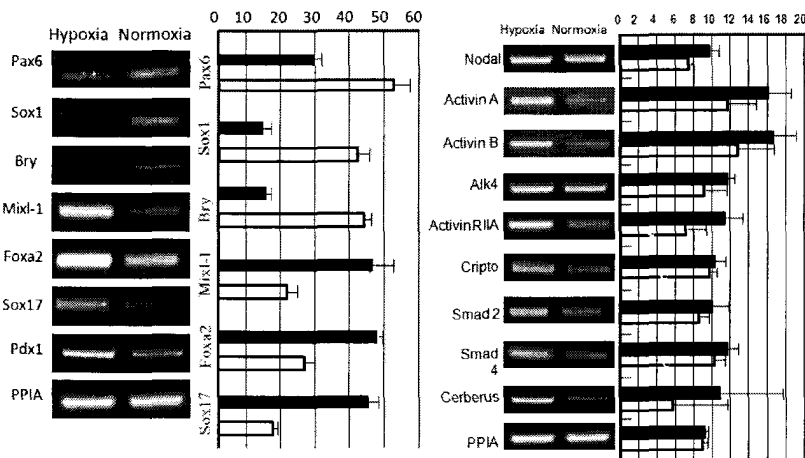
• 이식된 조직을 제거하여 면역조직화학분석을 한 결과, 다량의 인슐린을 합성하는 베타세포 및 베타세포 분화 관련 단백질을 발현하는 세포들이 이식 부위에서 확인되었으며, human Nuclei에 대한 항체를 사용하여 이들 세포가 이식한 세포임을 검증하였음 (D-I).



연구 내용

연구 결과 (취장세포 분화유도)

인간배아줄기세포로부터 취장내배엽세포로의 분화에 미치는 산소분압의 효과 분석



- 2단계 연구수행과정에서 확립된 취장 베타세포의 분화유도기법의 효율을 보다 증진시키기 위하여, 분화과정 중 세포에 처리되는 분화인자 이외에 세포에 주어지는 분화환경에 따른 각 배엽별 분화양상을 조사하였으며, 가장 유력한 조건으로서 산소의 분압을 고려하였음.

- 일반적인 배양조건에 주어지는 산소분압 (약 21%, Normoxia)에 비교하여 저산소 분압 (3%, Hypoxia)의 상태에서 배아체를 형성할 경우, Pax6 혹은 Sox1을 발현하는 신경외배엽으로의 분화가 감소됨과 동시에 Mixl-1, Foxa2, Sox17등을 발현하는 내배엽으로의 분화가 촉진되었으며, 이와 함께 취장분화개시에 중요한 역할을 하는 Pdx-1의 발현도 증가됨을 확인하였음 (좌측 그림).

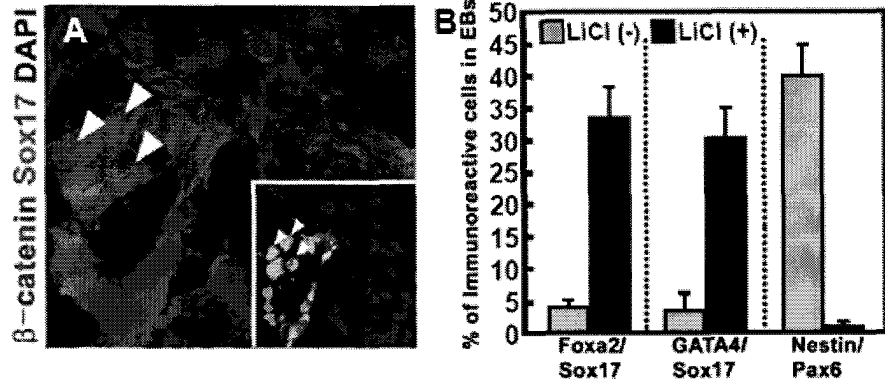
- 더불어, 내배엽으로의 분화에 중요한 역할을 하는 Nodal, Activin의 세포 내 신호전달과정에 중요한 역할을 하는 여러 신호전달 매개 단백질들의 발현도 함께 증가함이 관찰되었음 (우측 그림).

- 따라서, 2단계 연구수행과정에서 확립된 분화유도기법을 저산소 분압의 조건에서 수행할 경우 보다 높은 수율의 내배엽성 세포, 즉 취장베타세포와 간세포를 획득 할 수 있으리라 생각됨.

연구 내용

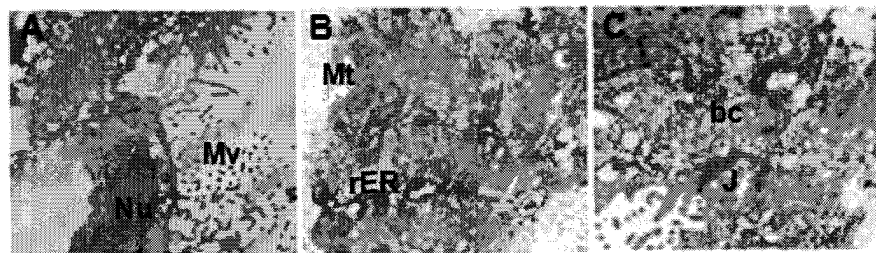
연구 결과 (간세포 분화유도)

인간배아줄기세포로부터 LiCl와 HGF를 이용한 간세포로의 분화유도 및 분화된 간세포의 미세구조 분석



- 2차 년도의 간세포 분화연구의 추가 자료로서, LiCl를 처리할 경우, Wnt3의 세포내 신호매개체인 beta-catenin이 세포막 혹은 세포질에서 핵 내로 유입됨을 증명하였으며 (A), beta-catenin의 핵 내 유입이 발견된 세포에서 내배엽의 표지인자인 Sox17이 특이적으로 발현됨을 증명함 (A, inset)으로서 LiCl가 wnt3a의 활성화와 유사하게 내배엽을 촉진시킬 수 있음을 추가적으로 검증함.

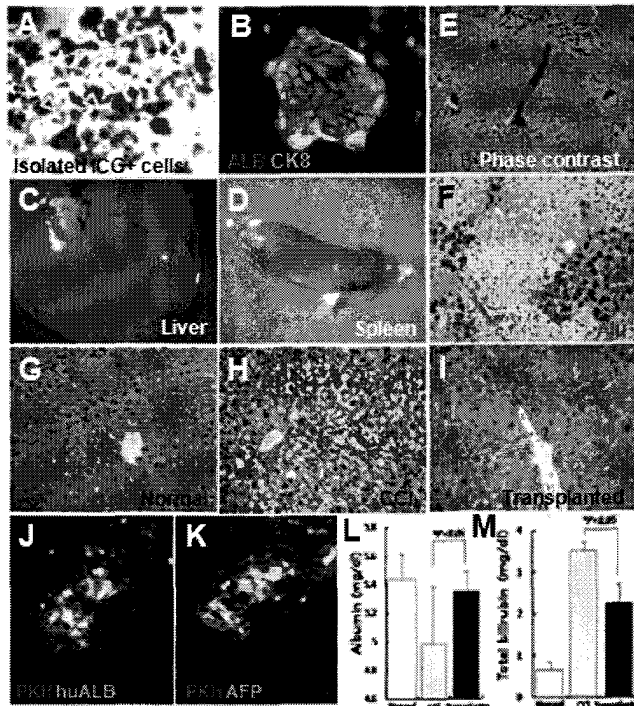
- 더불어, LiCl를 처리함으로써 배아체내의 내배엽 세포들 (Foxa2, GATA4, Sox17+ cells)이 증가되며, 신경외배엽세포들 (Nestin/Pax6+ cells)이 감소됨을 확인함.



- 간세포로의 최종분화 후, indocyanin green 염색에 의하여 간세포를 부분 정제한 뒤 전자현미경사진을 통하여 분석한 결과, 이들 세포들이 간세포의 특징인 microvilli (A, Mv)와 소포체 (B, rER)/미토콘드리아 (B, Mt)의 발달, 그리고 정상 간조직에서 보여지는 bile canaliculi (C, bc)등을 보유하고 있음을 2차 년도의 표지인자 및 세포활성 검증에 더하여 추가적으로 검증함.

연구 내용	연구 결과 (간세포 분화유도)
-------	------------------

인간배아줄기세포로부터 분화된 간세포의 이식을 통한 생체내 기능성 분석



• 2, 3차년도 연구에서 특정 표지인자 발현 유무, 세포의 활성 및 미세구조분석 등으로 증명된 인간배아줄기세포-유래 간세포를 함께 분화된 원치 않는 세포로부터 indocyanin green (ICG) 염색에 의해 부분 정제함 (A).

• 정제된 간세포의 알부민 (B, ALB)과 cytokeratin 8 (B, CK8) 발현을 재검증하고, CCl4 처리에 의해 간이 손상된 간질환 실험동물의 spleen에 이식한 뒤 일주일 후에 분석한 결과, 이식된 간세포들이 간문맥을 거쳐 간조직 내로 이동된 것을 확인하였으며 (E), 간과 spleen에서 teratoma의 형성은 관찰되지 않았음.

• 간조직으로 이동된 세포들이 인간배아줄기세포에서 유래됨을 인간세포 특이적인 Alu in situ hybridization과 PKH pre-labeling (J and K)을 통하여 검증하였으며 (F), CCl4에 손상된 간 (H)에 비하여 세포가 이식된 간 (I)은 증상 간조직과 유사한 양상을 보임을 증명함.

• 세포 이식 후, 대조군에 비하여 혈청 내 알부민의 농도가 유의하게 증가됨을 관찰하였으며 (L), bilirubin 수치는 유의하게 감소되었음을 증명하였음 (M).

## 제 4절 연구개발 성과목록

### 1. 논 문

구분	계재 년월	저자	논문명	계재 학술지명	권호 (페이지)	IF
국외	SCI	2006.9 Kim SK, Kim BK, Shim JH, Gil JE, Yoon YD, Kim JH (교)	Nonylphenol and Octylphenol-Induced Apoptosis in Human Embryonic Stem Cells Is Related to Fas-Fas Ligand Pathway	TOXICOLOGICAL SCIENCES	94 (2), 310 - 32 1	3.6
		2007.4 Shim JH, Kim SE, Woo DH, Kim SK, Oh CH, McKay R, Kim JH (교)	Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate	Diabetologia	50:1228- 1238	5.3
	비SCI					
국내	SCI	2007.1 Kim SE, Kim BK, Gil JE, Kim SK, Kim JH (교)	Comparative Analysis of the Developmental Competence of Three Human Embryonic Stem Cell Lines in Vitro	Molecules and Cells	23 (1), 49-56	1.9
	비SCI	2007.6 Kim SK, Kim JH (교)	Directed Differentiation of Pancreatic Islet and Hepatic Cells from Human Embryonic Stem Cells in Vitro	Tissue Engineering and Regenerative Medicine	4 (2), 142-149	

### 2. 특 허

구분	발명자	특 허 명	출원·등록		
			일자	국명	번호
국외	출원 Jong-Hoon Kim	Inductive effect of vascular endothelial growth factor on neural differentiation during germ layer formation of human embryonic stem cells	08-SEP-20 06	미국	60824907
	출원 Jong-Hoon Kim	Guided differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes: from endoderm specification to hepatic differentiation	08-SEP-20 06	미국	60824908

	출원	Jong-Hoon Kim	Directed differentiation of pancreatic cell fate from human embryonic stem cells	08-SEP-2006	미국	60824909
	PCT출원					
	등록					
국내	출원	김종훈/우동훈	줄기세포의 분화유도 방법	2006.11.09	대한민국	10-2006-011630
	출원	김종훈/김병각	혈관내피 성장인자를 이용한 인간배아 줄기세포로부터 도파민 신경세포로의 분화 촉진 방법	2006.11.09	대한민국	10-2006-011269
	출원	김종훈/심중현	인간 배아줄기세포로부터의 췌장 전구세포로의 분화 유도 방법	2006.11.28	대한민국	10-2006-0118102
	출원	김종훈/김정은	인간 배아줄기세포로부터 척수신경계 회소돌기 아교세포 생산을 위한 삼단계 분화기법	2007.10.05	대한민국	10-2007-0100626
	등록					

### 3. 학회발표

구분	발표제목	발표자	학술회의명칭	개최국(장소)	기간(일)	사업단사사여부	발표유형(구두, 포스터)
국제	Guided differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes: From endoderm specification to hepatic maturation	Dong-Hun Woo et al	The 5th Biannual Meeting of Pacific Rim Society for Fertility and Sterility 2006	한국(신라호텔)	2006-06-09~10		포스터
국제	Directed differentiation of human embryonic stem cells to pancreatic endoderm	Joong-Hyun Shim et al	The 5th Biannual Meeting of Pacific Rim Society for Fertility and Sterility 2006	한국(신라호텔)	2006-06-09~10		포스터
국제	Evaluation on the cytotoxicity of endocrine disruptors using undifferentiated human embryonic stem cells and neuronal progenitors: crosstalk between extrinsic and intrinsic cell death pathway	Kim SK, Shim JH, Gil JE, Woo DH, Kim JH	the 5th annual meeting of International Society for Stem Cell Research	Australia(Cairns)	2007.6.17~20		포스터
국내	Differentiation of human embryonic stem cells into pancreatic progenitors	Shim JH et al	2005 Seoul Symposium on Stem Cell Research	한국(연세대학교)	2005, 8,25-26		포스터
국내	Efficient derivation of dopaminergic neurons from human embryonic stem cells	Kim BK et al	2005 Seoul Symposium on Stem Cell Research	한국(연세대학교)	2005, 8,25-26		포스터
국내	Human embryonic stem cells differentiate into oligodendroglial progenitors	Gil JE et al	2005 Seoul Symposium on Stem Cell Research	한국(연세대학교)	2005, 8,25-26		포스터

국내	Differentiation of human embryonic stem cells into cell types of early embryo and somatic fate	Jong-Hoon Kim et al	2006 제 4차 대한줄기세포연구회 주최 워크샵	한국 (동국대 일산불교병원)	2006-02-12	○	포스터
국내	Nonylphenol and Octylphenol induces apoptosis in human embryonic stem cells through mitochondrial pathway	Suel-Kee Kim et al	2006 제 4차 대한줄기세포연구회 주최 워크샵	한국 (동국대 일산불교병원)	2006-02-12	○	포스터
국내	Comparative analysis for the early differentiating potency of human embryonic stem cell lines	Sung-Eun Kim et al	2006 제 4차 대한줄기세포연구회 주최 워크샵	한국 (동국대 일산불교병원)	2006-02-12	○	포스터
국내	Directed differentiation of human embryonic stem cells into oligodendrocytes	Gil JE, Kim BK, Woo DH, Kim SE, JH Kim	2006년 한국발생생물학회 제 22차 학술대회	한국 (서울대 학병원의학연구소)	2006-07-07	○	포스터
국내	Effect of Low O <sub>2</sub> tensions on the cytochemical and ultrastructural changes of human embryonic stem cells	Hee-Joung Lim et al	2006년 한국발생생물학회 제 22차 학술대회	한국 (서울대 학병원의학연구소)	2006-07-07	○	포스터
국내	Development of endoderm from embryonic stem cells in vitro	Kim JH	2006 대한 생화학분자생물학회 추계국제학술대회	한국 (서울교대 유문학회관)	2006. 10.26~27		구두
국내	Directed differentiation of human embryonic stem cells into mesendodermal fates	Kim JH	18th Annual meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology	한국 (COEX)	2006. 10.12~13		구두
국내	Evaluation on the cytotoxicity of nonylphenol using undifferentiated human embryonic stem cells and neural progenitors: crosstalk between extrinsic and intrinsic cell death pathways	Kim SK, Kim BK, Woo DH, Shim JH, Gil JE, Kim SE, Lim HJ, Kim JH	18th Annual meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology	한국 (COEX)	2006. 10.12~13		포스터
국내	Human embryonic stem cells: A promising tool for biotechnology and medicine	Kim JH	2006년 분자영상의학회 추계심포지움	한국 (연세대 학교 치과대학 강당)	2006-11-18		구두
국내	인간배아줄기세포로부터 능동적으로 분화유도된 간세포의 생체내외의 기능성 평가	우동훈, 김종훈	제9차 한국조직공학재생의학회 총회 및 논문발표회	한국 (서울대 학교 문화회관 중강당)	2007. 6.1	○	구두
국내	Inducing human embryonic stem cells to differentiate into insulin-producing cells and hepatic cells	JH Kim	2007 Soon Chun Hyang Stem Cell Symposium	한국 (순천향 대학교 병원)	2007. 9.15		구두
국내	Differentiation human embryonic stem cells into pancreatic endoderm	JH Kim	제 7회 발생공학 국제심포지움	한국 (제주대 국제교류회관)	2007. 10.26~27		구두
국내	Optimization of culture conditions for the directed differentiation of human	You HJ, Shim JH, Woo HD, Kim SE, Lim HJ, Kim SK, Kim JH	제 7회 발생공학 국제심포지움	한국 (제주대 국제교류회관)	2007. 10.26~27		포스터

	embryonic stem cells towards definitive endoderm			회관)			
국내	Human embryonic stem cell-derived hepatocytes have similar functions and structures with normal hepatocytes, and compensate for abnormal liver functions in CCL4-intoxicated mice	Woo DH, Kim SE, Shim JH, You HJ, Lim HJ, Kim SK, Kim JH	제 7회 발생공학 국제심포지움	한국 (제주대 국제교류회관)	2007. 10.26 ~27		포스터
국내	Differentiation to hepatoblast-like cells from human embryonic stem cells using various epigenetic signals	Kim SE, Woo DH, Kim SK, Kim JH	2007 Seoul Symposium on Stem Cell Research	한국 (고려대 인촌기념관)	2007. 11.15 -16	○	포스터
국내	The use of human embryonic stem cells and neural progenitors for in vitro cytotoxicity test of environmental contaminant	Kim SK, Woo DH, Shim JH, Kim SE, You HJ, Kim JH	2007 Seoul Symposium on Stem Cell Research	한국 (고려대 인촌기념관)	11.15 -16	○	포스터
국내	Human embryonic stem cells differentiate into pancreatic endocrine cells and normalize glycemia in an animal model of diabetes	Shim JH, You HJ, Kim SK, Kim JH	2007 Seoul Symposium on Stem Cell Research	한국 (고려대 인촌기념관)	11.15 -16	○	포스터
국내	Biological functions and structural characteristics of hepatocyte-like cells differentiated from human embryonic stem cells, and their therapeutic application to CCL4-intoxicated mice	Woo DH, Kim SE, Kim SK, Kim JH	2007 Seoul Symposium on Stem Cell Research	한국 (고려대 인촌기념관)	11.15 -16	○	포스터
국내	Optimal culture condition promoting the differentiation to definitive endoderm from human embryonic stem cells	You HJ, Shim JH, Kim SK, Kim JH	2007 Seoul Symposium on Stem Cell Research	한국 (고려대 인촌기념관)	11.15 -16	○	포스터
국내	Differentiation of human embryonic stem cells into pancreatic cell fates	Kim JH	2007 Seoul Symposium on Stem Cell Research	한국 (고려대 인촌기념관)	11.15 -16	○	포스터

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1절 목표 달성도

구분	연구개발 세부목표	추진 실적	달성도 (%)
2005	인간배아줄기세포의 초기분화특성 파악 및 능동적 초기분화 유도	본 과제의 성공적인 수행을 위하여 우선적으로 국내에서 확립된 인간 배아줄기세포주 2종 및 국외에서 확립된 1종의 세포주를 대상으로, 배아체 형성을 통한 각 세포주의 초기분화특성을 검증하고 비교분석 하였으며, 내배엽 (췌장세포 및 간세포 분화용)과 외배엽 (신경세포 분화용)으로의 능동적인 분화유도 기법을 개발하였음	100%
2006	능동적 초기분화조절 기법 개발 및 각 배엽으로부터 기능성 체세포로의 분화유도	1차 년도에 선정된 세포주를 이용하여 내배엽으로부터 췌장세포의 전구세포 및 간세포로의 높은 분화수율을 나타내는 분화유도기법과 외배엽으로부터 효과적인 도파민성 신경세포 및 척수신경 회소돌기아교세포의 분화유도기법, 총 4종의 기능성 체세포 분화유도기법을 개발하였음	100%
2007	기능성 체세포로의 분화유도기법 확립 및 생체 내 이식후 생존율, 기능성, 안전성 검증	2차 년도에 개발한 분화기법을 발달시켜 성숙한 인슐린 분비성 췌장세포로의 분화유도 기법을 확립하고 당뇨병 실험동물 모델에 이식하여 세포의 기능성을 검증하였으며, 분화 유도된 간세포를 세포활성을 이용하여 부분정제한 뒤 간질환 실험동물 모델에 이식하여 분화된 체세포의 기능성 및 안전성을 입증하였음	100%

### 제 2절 관련분야 기여도

- 난치성 질환의 일종인 파킨슨병, 당뇨병 및 간질환의 경우, “손상된 조직을 새로운 조직으로 대체하는 조직 재건방법”이 기존의 약물치료 및 외과적 수술의 한계를 극복하는 근본적인 치료방법으로 여겨지고 있으나 공여자의 부족으로 인한 조직 및 장기의 수급이 가장 문제점으로 되고 있음. 따라서 “무한증식 능력”과 “전분화 능력”을 보유하고 있는 배아줄기세포를 이용한 파킨슨병, 당뇨병 및 간질환의 세포치료기술은 기존의 문제점을 뛰어넘는 획기적인 치료요법이 될 것으로 기대되며, 치료제로서의 시장규모는 천문학적인 숫자로 예상되는 바, 그 핵심기술이 되는 “도파민성 신경세포, 췌장세포 및 간세포 분화촉진기술”의 개발 및 관련된 지적재산권의 획득은 국가 경제적 소실을 막음과 동시에 막대한 경제적 파급효과를 창출할 수 있음.



- 본 연구 과제를 통하여 도출된 간세포로의 분화 연구결과는 작년 심포지엄에 국외연자로 초빙된 간 줄기세포 분야의 권위자인 Ira Fox교수로부터 공동 출판의 제의를 받았으며, 인슐린분비성 췌장세포로의 분화연구결과는 배아줄기세포 분화연구의 권위자인 미국 NIH의 Ron Mckay 박사와 함께 출판을 논의하고 있어 두 편 모두 유수의 논문에 채택될 수 있도록 추가실험을 진행하고 있음.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 인간배아줄기세포로부터 특정세포로의 분화유도기법에 관련된 전 세계적 연구동향을 보면, 1998년 인간배아줄기세포가 확립된 이래 신경계 세포로의 분화유도에 관련된 연구보고는 현재 까지 100여편의 논문이 발표되었으나, 내장기관 계통의 세포로의 분화 연구는 매우 미진하며, 특히 간세포 및 인슐린 분비성 췌장세포로의 분화연구는 현재까지 약 10여 편에 불과한 논문만이 보고된 실정임.
- 이와 같은 사실은 인간배아줄기세포로부터 신경외배엽세포로의 분화가 특정한 인자의 처리 없이도 용이하게 일어나는 반면, 췌장세포나 간세포의 원기인 내배엽세포로의 분화는 쉽게 유도되지 않으며, 이에 대한 가장 근본적인 이유로는 여러 가지 조합적인 인자들의 처리, 특히 이들 분화인자들의 정확한 처리시점 및 최적농도 등을 포함한 매우 복합적인 요소들이 내배엽계통의 세포분화에 중요한 요소로 작용하기 때문임.
- 따라서 본 과제에서는 아직 연구보고가 많이 이루어지지 않은 내배엽계통의 세포인 간세포와 췌장세포로의 분화에 전략적인 초점을 맞추었으며, 2단계 3년간의 연구수행을 통하여 인간배아줄기세포로부터 간세포와 췌장세포로의 분화유도기법을 개발하였고, 이들 세포들의 기능을 생체 내·외에서 성공적으로 확인하였음.
- 본 연구 과제를 통하여 도출된 간세포로의 분화 연구결과는 올해 심포지엄에 국외연자로 초빙된 간 줄기세포의 권위자인 Ira Fox교수로부터 공동 출판의 제의를 받았으며, 인슐린분비성 췌장세포로의 분화연구결과는 미국 NIH의 Ron McKay 박사와 함께 출판을 논의하고 있어 두편 모두 유수의 논문에 채택될 수 있도록 최선의 노력을 다할 계획임.
- 본 2단계의 연구수행으로부터 획득한 연구결과를 토대로, 첫째, 서로 다른 기관에서 확립된 인간배아줄기세포주가 그 분화능력에서 상호간 다소 차이를 보이는 것으로 나타남에 따라, 본 과제를 통하여 확립된 분화유도기법이 모든 인간배아줄기세포주에 적용가능한지의 여부를 우선적으로 실시하고자 함. 이를 통하여 각 세포주의 분화과정 중 다소 차이가 있을 것으로 예상되는 특정 인자의 처리시점을 모니터링 하기 위한 SOP에 관련된 기준을 마련할 수 있을 것으로 판단됨.
- 더불어, 배아줄기세포의 임상적 적용에서 걸림돌이 되는 면역거부반응을 회피하기 위한 대책으로서 현재 세포캡슐화에 관련된 연구를 진행하고 있음. 캡슐화를 통한 췌장섬세포의 이식은 면역거부반응을 제어하기 위한 수단으로 당뇨병을 치료하기 위한 세포치료에 효용성이 있는 것으로 잘 알려진 바 있음. 췌장섬세포를 알지네이트 (alginate) 캡슐 등으로 감싼 후 이식을 하면 면역세포로부터의 공격에 방어됨과 동시에 인슐린은 정상적으로 캡슐을 통해 외부로 분비되도록 하는 원리임.
- 본 2단계의 2차 년도에 분화유도에 성공한 췌장 전구세포를 3차 년도에 최종 인슐린-분비성 췌

장섬세포로 성숙시키는데 성공함에 따라, 위에 언급한 캡슐화를 통한 이식기법을 줄기세포를 이용한 당뇨병 치료에 적용하기 위하여 관련 연구를 진행하고 있으며, 추후 지속적으로 면역 거부반응을 억제하기 위한 연구를 계획하고 있음. 특히 최근에 미국과 일본에서 성체피부세포를 배아줄기세포와 유사한 능력을 보유하는 환자 맞춤형 전능성 세포로 역분화 시키는데 성공함에 따라, 이들 세포들이 본 연구개발로 확립된 분화유도기법에 배아줄기세포와 유사하게 반응하여 췌장세포로 분화될 수 있는지의 여부 역시 관련 세포주가 획득되는 즉시 분석하려고 함.

- 본 연구의 수행으로 췌장세포 및 간세포로의 분화수율을 효율적으로 증가시키는데 성공하였으나, 최종분화 후에 잔존하는 원치 않는 세포를 제거하고 순도 높은 췌장세포 및 간세포를 획득하기 위한 추가 기법이 요구됨. 따라서 향후 연구수행을 통하여 췌장 및 간세포에 특이적인 세포 표면인자를 발굴하기 위한 연구를 지속할 것이며, 발굴된 표지인자를 이용하여 분리 정제된 세포들의 기능성과 안전성을 생체 내·외에서 검증하려고 함.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 국외의 경우 역시 줄기세포로부터 신경계세포로의 분화연구는 매우 활성화되어 있는 반면 간세포 및 췌장세포로의 연구개발 성과는 신경계 세포에 비교하여 매우 미진한 상황임.
- 이는 태아 및 성체 신경조직으로부터 비교적 추출이 용이한 신경줄기세포에 비교하여 조직 내에 존재하는 간 및 췌장줄기세포의 동정이 어려워 이들 줄기세포의 추출 및 체외증식이 어렵고, 인간 배아줄기세포로부터 신경외배엽으로의 효과적 분화촉진을 통한 신경세포로의 분화유도에 비교하여 간세포와 췌장세포 두 세포의 공통적 근원 세포인 내배엽으로의 분화유도에 대한 기술적인 어려움에 그 원인이 있음.
- 현재까지 발표된 논문을 검토하여, 세계적인 현시점의 “췌장세포분화 기술개발 수준”을 평가해 보면, 인간배아줄기세포로부터 내배엽을 거쳐 췌장 전구세포로까지의 분화를 효과적으로 이끌어낸 기술은 본 연구팀과 더불어 몇몇 그룹 (미국 Novocell, Geron, 중국 북경대) 에서 보유하고 있다고 사료됨. 본 과제를 통하여 도출된 인간배아줄기세포로부터 췌장세포로의 분화기술은 유럽 당뇨병학회에 보고되었으며 전 세계에서 2번째로 배아줄기세포로부터 분화된 췌장세포의 기능을 생체내에서 입증한 연구결과임.
- 배아줄기세포 분화와 관련된 특허는 2000년 이후 급격히 증가하는 양상이며, 자미국특허가 다른 출원국에 비하여 증가하고 있는 추세임. 관련 분야의 특허를 가장 많이 보유하고 있는 기관은 Geron과 MEDRA, Genetics Institute Inc 등임.
- 최근에 유전자도입으로 체세포를 전분화능 줄기세포로 역분화시키는 연구가 일본과 미국 등에서 연이어 성공하면서 전분화능 줄기세포 연구의 새로운 길을 제시하고 있음. 인간의 난자 및 배아 등의 생명윤리 문제가 첨예한 연구재료를 이용하지 않고 4종의 유전자 조작만으로 인간의 전분화능 줄기세포를 만들 수 있다는 것이 중요한 돌파기술 임. 그러나 아직까지는 인간 배아줄기세포주의 성질과 완전히 동일하지 않을 가능성이 있고, 유전자 도입시 이용된 시스템의 안전성 문제가 있으므로 추가 연구가 필요함.
- 현재 각종 줄기세포를 이용한 신경세포분화 실험은 전 세계적으로 가장 활발한 연구가 이루어지고 있는 분야이며 관련분야의 기술발전을 선도하고 있음. 아울러 이러한 신경줄기세포를 뇌신경 질환에 대한 치료제로서 사용하고자 하는 세포 이식기술 연구도 활발히 이루어지고 있으며 세계적으로 매우 경쟁이 치열한 분야임.

- 최초 인간 배아줄기세포주를 신경줄기세포로 분화 성공시켰을 당시에는 특정 타입 신경세포로의 분화 조절은 불가능할 것이라고 여겨졌으나, 미국 Studer박사팀의 연구결과를 시작으로 국내 여러 연구팀을 비롯해 세계 여러 유력 연구진들이 도파민 신경세포 등 다양한 종류의 신경세포로의 분화 조절을 성공하였음. 그러나 이러한 줄기세포 유도 신경세포들을 질환동물 모델에 이식하였을 경우에는 이식된 세포들의 생존, 질환과 관련된 증상회복 및 기형암종의 형성 등 아직 많은 문제점들을 보이고 있음. 이는 전 세계 관련 연구진들이 공통적으로 겪고 있는 문제임.
- 최근 Goldmann박사팀이 인간 배아줄기세포주로부터 도파민 신경세포를 분화시킨 후 이식하여 가능성을 확인하는 등 관련 현황 문제들의 해결에 괄목한 만한 결과를 보였음. 또한 Studer 박사팀에서 인간 배아줄기세포주로부터 유도된 신경줄기세포의 유지와 관련해 bFGF에 의존하지 않는 새로운 패러다임을 발표하여 이들과 관련된 연구를 조속히 진행할 계획임.
- 미국 Stem Cell Inc.사는 인간 신경줄기세포를 확인할 수 있는 단일클론 항체를 이용하여 태아 뇌조직에서 신경줄기세포를 분리해 내는 방법을 개발하고, 신경계질환 모델을 이용하여 전 임상시험을 실시하였음. 현재 선천성 유전성 대사성 신경계질환인 Batten 질환 환아에 대한 임상연구가 진행되고 있음.
- 척수 손상에 의한 장애 모델에서 줄기세포 이식연구는 이루어져 왔으나, 인간 배아줄기세포 유래 회돌기아교세포 및 GABA 신경세포 이식 연구는 전 세계적으로 아주 초보적인 연구단계에 불과함. 즉, 워싱턴 대학의 McDonald박사가 쥐 배아줄기세포로부터, 그리고 캘리포니아 대학의 Keirstead박사 그룹이 인간 배아줄기세포주로부터 분화된 회돌기아교세포가 척수손상 모델에 이식시 수초형성을 촉진하였다는 보고를 하였음. 척수 손상의 통증에 GABA 신경 세포 이식에 관한보고는 아직 없는 상태임.
- 신경세포의 경우 비교적 용이한 분화수율이 획득 가능함에 따라 많은 전임상 및 임상연구가 시행되고 있음. 특히 미국 Karl Johe박사팀의 Neuralstem사는 인간태아에서 추출한 신경세포를, 캘리포니아대의 Kirstead박사팀과 Geron사는 인간 배아줄기세포주에서 분화시킨 신경세포를 이용한 임상시험허가를 신청해 놓은 상태임.
- 줄기세포의 분화연구는 비교적 신경계세포의 분화에 집중하여 연구가 진행되어 왔으나, 최근 당뇨병, 허혈성 및 간질환의 세포치료에 대한 경제적 가치 및 세계적인 추세에 발맞추어 줄기세포 혹은 이종 줄기세포이식을 이용한 당뇨병 허혈성 및 간질환 세포치료 연구가 활성화되고 있음.
- 비교적 쉽게 분화되는 신경세포로에 비교하여 간세포와 췌장세포 두 세포의 공통적 근원세포인 내배엽으로의 분화유도에 대한 기술적인 어려움이 따름. 따라서 1998년 인간 배아줄기세포주가 확립된 이후 2008년 현재까지 약 10년간의 기간 동안 많은 연구 성과가 도출된 신경세포분화에 비교하여 췌장세포 분화에 관련된 연구보고는

10여 편에 불과함.

- 간세포분화의 경우는 대부분 단순한 분화시도에 대한 몇몇 연구논문만이 보고된 실정임. 아직 괄목할 만한 연구 성과는 보고된 바 없으나, 미국 오레곤 대학의 Grompe박사팀, 네브라스카 대학의 Fox박사팀이 연구개발을 선도하고 있음

## 제 7 장 참고문헌

1. Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. (2001) Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes*. **50**:1691-1687.
2. Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J. (2004). Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells*. **22**: 265-274.
3. D'Amour KA, Bang AG, Eliazer S, Kelly G, Aqulnick AD, Smart NG, Moorman MA, Kroon E, Carpenter MK, Baetge EE. (2006) Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*. **24**: 1392-1401.
4. Shim JH, Kim SE, Woo DH, Kim SK, Oh CH, McKay R, Kim JH. (2007) Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate. *Diabetologia*. **50**: 1228-1238.
5. Jiang J, Au M, Lu K, Eshpeter A, Korbitt G, Fisk G, Majumdar AS. (2007) Generation of insulin-producing islet-like clusters from human embryonic stem cells. *Stem Cells*. **25**: 1940-1953.
6. Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazer S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Aqulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE. (2008) Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cell in vivo. *Nat Biotechnol*. **26**: 443-452.
7. Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, Peng Y, Carpenter MK. (2003) Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant*. **12**: 1-11.
8. Shirahashi H, Wu J, Yamamoto N, Catana A, Wege H, Wager B, Okita K, Zern MA. (2004) Differentiation of human and mouse embryonic stem cells along a hepatocyte lineage. *Cell Transplant*. **13**: 197-211.
9. Lavon N, Yanuko O, Benvenisty N. (2004) Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. *Differentiation*. **72**: 230-238.
10. Chen Y, Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Rivas-Carrillo JD, Yamatsuji T, Shirakawa Y, Tonaka N, Basma H, Fox IJ, Kobayashi N. (2007) Instant hepatic differentiation of human embryonic stem cells using activin A and a deleted variant of HGF. *Cell Transplant*. **15**: 865-871.
11. Hay DC, Zhao D, Ross A, Mandalam R, Lebkowski J, Cui W. (2007) Direct differentiation of human embryonic stem cells to hepatocyte-like cells exhibiting functional activities. *Cloning Stem Cells*. **9**: 51-62.
12. Baharvand H, Hashemi SM, Shahsavani M. (2008) Differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatocyte-like cells in a serum-free adherent

- culture condition. *Differentiation*. **76**: 465-477.
13. Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, Meng S, Chen Y, Zhou R, Song X, Guo Y, Ding M, Deng H. (2007) Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology*. **45**: 1229-1239.
  14. Duan Y, Catana A, Meng Y, Yamamoto N, He S, Gupta S, Gambhir SS, Zern MA. (2007) Differentiation and enrichment of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cells*. **25**: 3058-3068.
  15. Hay DC, Zhao D, Fletcher J, Hewitt ZA, McLean D, Urruticoechea -Uriguen A, Black JR, Elcombe C, Ross JA, Wolf R, Cui W. (2008) Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo. *Stem Cells*. **26**: 894-902.