

사람 중간엽줄기세포 성장에 미치는 basic fibroblast growth factor의 영향

김성수¹, 최정원², 광규범², 이영돈¹, 서해영^{1,3*}

¹아주대학교 의과대학 해부학교실, ²국립보건연구원 유전체사업단 유전체형질전환 연구실, ³아주대학교 뇌질환연구센터

〈 초 록 〉

중간엽줄기세포는 중배엽유래의 세포로 분화할 수 있는 다분화능을 갖는 줄기세포로서 골수에서 쉽게 채취할 수 있다. 본 연구에서는 사람의 중간엽줄기세포를 시험관내에서 장기간 배양시 세포의 증식과 다분화능에 있어서 basic fibroblast growth factor (bFGF)의 영향을 조사하였다.

세포를 배양할 수 있는 최적의 조건을 설정하기 위하여 여러 성장인자를 시험하였다. Hepatic growth factor (HGF)와 leukemia inhibitory factor (LIF)는 골수에서 분리한 중간엽줄기세포의 증식에 별다른 영향을 주지 않았으나, bFGF는 시험관내에서 세포의 성장을 3배 정도 증가시켰으며, 그 효과에 있어서 bFGF의 농도가 10 ng/mL 이상인 경우에는 큰 차이가 없었다. 저연령층의 골수에서 추출한 중간엽줄기세포는 bFGF의 존재와 상관없이 지방세포, 뼈세포, 연골세포로 분화하는 잠재력을 유지하고 있었으며 CD9, CD13, CD15, CD90, CD137, CD140b에 양성하였고, CD14, CD34, CD45에는 음성이었으며, 정상적인 행형을 유지하고 있었다. 반면에 고령의 공여자로부터 분리한 중간엽줄기세포는 bFGF가 없을 경우 지방세포로의 분화능이 현저히 낮았으나, bFGF가 있는 경우에는 지방세포 및 뼈세포로의 분화능이 유지되었다. 또한 bFGF가 첨가된 배양액에서 증식시킨 중간엽줄기세포는 미분화상태에서도 이미 신경줄기세포의 표지자인 nestin과 신경세포의 표지자인 β -tubulin III을 발현하고 있었다. 이러한 결과는 bFGF가 사람의 중간엽줄기세포의 증식과 다분화능을 유지시키는데 중요한 성장인자로 작용함을 의미하고 있다. 또한, 중간엽줄기세포를 신경계질환의 세포치료제로서 사용하기 위해서는 미분화상태와 신경세포로 분화된 후를 구별할 수 있는 새로운 표식인자가 필요함을 제시하고 있다.

찾아보기 낱말 : 중간엽줄기세포, Basic fibroblast growth factor, Transdifferentiation

서 론

중간엽줄기세포 (mesenchymal stem cells, MSCs)는 골수에 존재하는 성체줄기세포 중 하나로서 미분화 상태에서 증식할 수 있는 능력을 가지며, 뼈세포, 연골세포 및 지방세포와 같은 중배엽성 세포로 분화할 수 있는 다중분화능 (multipotency)을 가지고 있다 (Pittenger *et al.*, 1999; Makino *et al.*, 1999). 최근 중간엽줄기세포가 심근세포 (Shumakov *et al.*, 2003)나 신경세포로 (Sanchez-Ramos *et al.*, 2000; Woodbury *et al.*, 2000) 분화 (transdifferentiation)할 수 있다는 가능성이 보고되면서, 자가 이식에 의한 세포치료제나 유전자치료제의 도구로 사용하고 자 하는 노력이 증대되고 있다. 이러한 중간엽줄기세포가 치

료제로 이용되기 위해서는 배양 조건의 표준화와 세포의 원료규격에 대한 과학적인 기준을 마련하는 것이 선행되어야 할 것이다.

중간엽줄기세포가 세포배양용기에 잘 달라붙는 성격을 이용하여 골수에서 분리하고, 다중분화능을 유지시키면서 시험관 내에서 배양시키는 조건에 대한 연구가 보고되었다. 그 중 성장인자는 중간엽줄기세포의 증식을 촉진시켜 관심의 대상이 되어왔지만, 그 효과에 있어서는 연구자간에 차이를 보이고 있다 (Bruder *et al.*, 1997). Platelet derived growth factor (PDGF)와 transforming growth factor- β (TGF- β)가 사람의 중간엽줄기세포의 콜로니 형성을 촉진시키고 (Kuznesov *et al.*, 1997), bFGF도 중간엽줄기세포의 성장을 촉진시킨다고 보고되었다 (Muraglia *et al.*, 2000). 반면에 Gronthos와 Simmons (1995)는 PDGF와 epidermal growth factor (EGF)가 콜로니 형성을 촉진시키지만, basic fibroblast growth factor (bFGF)와 TGF- β 는 효과가 없다고 보고하였다. 이러한 연구자간의 상반

* 본 연구는 식품의약품안전청의 세포치료제 안전관리사업 (04092세치안 084) 및 아주대 뇌질환연구센터 연구비 지원에 의해서 수행되었음.

* 교신저자: 서해영

Tel: 031-219-5033, Fax: 031-219-5039, E-mail: hysuh@ajou.ac.kr

된 보고는 미세한 실험조건의 차이에 기인하는 것으로 여겨지며, 따라서 그 결과 얻어지는 중간엽줄기세포의 특성도 다를 수 있음을 시사한다.

최근 중간엽줄기세포가 비중배엽성세포로 분화할 수 있는 잠재력이 있는 것이 알려지면서, 신경계질환의 세포치료제로 이용될 수 있는 가능성이 높아지고 있다. 중간엽줄기세포는 성장인자나 호르몬을 처리에 의해 일부 세포가 신경세포의 형질을 나타내었으나, 그 효율은 매우 낮은 것으로 보고되고 있다 (Sanchez-Ramos *et al.*, 2000; Woodbury *et al.*, 2000). 현재는 신경세포로의 분화 효율을 높이는 연구가 매우 활발하게 진행 중이다. 이와 병행하여 신경세포로 분화시킨 세포와 미분화상태의 중간엽줄기세포를 구별할 수 있는 표식인자를 발굴하는 것이 이 분야에서 점차 중요한 과제로 대두되고 있다.

따라서 본 연구에서는 먼저 중간엽줄기세포의 자가증식력을 촉진하고 다중분화능 유지에 필요한 성장인자를 탐색하고, 세포의 분화능을 유지하는데 성장인자의 영향을 비교 조사하였다. 또한, 중간엽줄기세포와 분화된 신경세포를 구별하는 방법으로 기존에 알려진 표식인자의 적용 가능성을 알아보았다.

재료 및 방법

1. 중간엽줄기세포의 분리 및 배양

중간엽줄기세포의 분리를 위해 10~15세의 공여자 4명 및 75세의 공여자로부터 골수를 공여받아 실험에 사용하였다. HISTOPAQUE-1077 (Sigma) 밀도구배 원심분리를 통해 약 5mL의 골수에서 단핵구세포를 분리하였다. 분리한 세포는 $1-2 \times 10^7/100$ mm dish의 밀도로 배양액 (10% FBS, 100 IU/mL penicillin과 100 µg/mL streptomycin을 포함하는 DMEM)에서 배양하였고, 4시간이 경과한 후 새로운 배양액으로 교체하여 배양용기에 달라붙지 않은 세포를 제거하였다. 세포의 배양은 매 2일마다 새로운 배양액으로 바꾸어 주면서 1~2주 동안 배양하였다. 세포가 배양용기에 80~90% 차게 되면 0.25% trypsin과 1 mM EDTA를 이용하여 배양용기에서 떼어낸 후, 새로운 배양용기에 1:20 비율로 희석하여 계대배양하였다. 이때를 중간엽줄기세포의 1차 계대배양으로 정의하였다. 나머지 세포는 10% DMSO가 포함된 배양액에서 서서히 냉동시킨 후, 최종적으로 액체질소에 보관하였다.

2. 세포의 성장속도 측정

첫 번째 계대배양 후 얻어진 세포를 96-well 배양용기에 3×10^3 /well씩 되도록 분주하고 배양액을 넣어준 후 12~16시간 동안 CO₂ 세포배양기 안에서 배양하여 세포가 배양용기에 붙도록 안정화시켰다. 성장인자에 의한 세포의 증식속도를 측정하기 위해서, basic fibroblast growth factor 10 ng/mL (bFGF;

동아제약), hepatocyte growth factor (HGF; 아주의대 이재호박사로부터 공여받음) 100 U/mL, 또는 1,000 U/mL의 leukemia inhibitory factor (LIF; GibcoBRL)를 포함하는 새로운 배양액으로 교체하였으며, 매 2일마다 새로운 배양액으로 교체하면서 6일간 배양하였다. 세포수는 trypsin을 이용하여 세포를 배양용기에서 떼어낸 후 2% trypan blue로 염색한 후, 죽은 세포는 제외하고 살아있는 세포만을 haemocytometer를 이용하여 측정하였다. bFGF의 농도에 따른 영향을 조사하기 위해서, bFGF의 농도를 10~100 ng/mL로 변화시키면서 6일간 배양하였다. 배양액은 매 2일마다 같은 농도의 bFGF를 포함하는 새로운 배양액으로 바꾸어 주었고, 2일 간격으로 위와 동일한 방법으로 살아있는 세포만을 측정하였다. 모든 실험은 각각 3번씩 수행하여 결과를 평균치±표준오차로 나타내었다.

3. 중배엽성세포로의 분화유도를 통한 다중분화능의 확인

배양한 중간엽줄기세포의 다중분화능을 확인하기 위하여 Pittenger 등(1999)의 방법에 따라 다음과 같이 분화를 유도하였다. 뼈세포로의 분화는 10% FBS, 10 mM β-glycerol phosphate, 50 µM ascorbate-2-phosphate와 10⁻⁷ M dexamethasone을 포함하는 DMEM 배지에서 14일간 배양하여 분화시킨 후 alkaline phosphatase의 활성을 측정하고, 칼슘의 축적을 von Kossa염색을 통해 확인하였다. 지방세포로의 분화는 10% FBS, 10⁻⁷ M dexamethasone과 10 µg/mL insulin을 포함하는 DMEM에서 2일간 분화를 유도한 후, 배양액을 10% FBS과 10 µg/mL insulin을 포함하는 DMEM으로 바꾼 후 2주간 배양하였다. 지방세포로의 분화는 Oil Red-O염색으로 세포 내에 축적된 지방방울을 염색하여 확인하였다. 연골세포로 분화를 유도하기 위해서는 5 × 10⁵ 정도의 세포를 300 × g에서 5분간 원심분리하여 세포덩어리를 만든 후 10 ng/mL TGF-β1을 포함하는 DMEM 배지에서 3주간 배양하였다. 분화유도된 연골 조직은 파라핀포매 과정을 거쳐 6 µm 연속절편을 제작한 후 Alcian blue염색과 nuclear fast red 대조염색을 통해 산성점액 다당류와 연골소강이 형성되는 것으로 확인하였다.

4. 유세포분석 (flow cytometry) 및 핵형 (karyotype) 분석

배양한 세포를 25 mM EDTA를 포함하는 PBS용액과 피펫을 이용하여 배양용기에서 떼어낸 후, FACS용액 (2% BSA, 0.1% sodium azide (Sigma)를 포함하는 PBS용액)으로 세척하였다. 세척된 세포를 2 × 10⁵개씩 분주하여, FITC-coupled anti-CD3, CD5, CD9, CD10, CD13, CD14, CD15, CD25, CD30, CD34, CD61, CD90, CD178 항체 또는 Phycoerythrin-coupled anti-CD105, CD117, CD140b, CD200, CD210, CD212, CD220, CD231 항체로 4°C에서 1시간 반응시킨 후, 세척하고 1% paraformaldehyde를 포함하는 FACS용액에 부유시켰다. 비특이적인 형광신호는 동형 면역글로블린의 생쥐 단클론항체와

세포를 반응시킴으로써 측정하였다. 결과는 FACS Vantage (Becton-Dickinson) 기기를 통해 10,000 이상의 신호를 모아 Cell-Quest software program (Becton-Dickson)을 이용하여 분석하였다.

핵형분석은 세포를 10 µg/mL colcemid 용액 (GibcoBRL)에서 2시간 동안 배양한 후 trypsin을 처리하여 단일세포로 분리한 후 500 × g에서 5분간 원심분리하여 세포침전물로 얻었다. 세포침전물에 0.075 M KCl 용액을 넣은 후 20분간 37°C에서 반응시킨 후, methanol:glacial acetic acid (3 : 1) 혼합액으로 고정하여 Giemsa 염색을 수행한 후 핵형을 관찰하였다.

5. RT-PCR

Trizol (Tel-Test Inc.)을 이용하여 세포에서 회수한 RNA 시료를 1st strand cDNA synthesis kit (Roche)를 이용하여 역전사시켜 cDNA를 얻은 후, nestin과 GAPDH에 특이적인 primer를 이용하여 PCR를 수행하였다. 사용한 primer의 염기서열은

다음과 같다.

Human nestin의 primer는 5'-GGCAGCGTTGGAACAGAGGTTGGA-3' (forward), 5'-CTCTAAACTGGAGTGGTCA-GGGCT-3' (reverse)이며, human GAPDH의 primer는 5'-CCACAGTCCATGCCATCACT-3' (forward), 5'-GAGCTTGA-CAAAGTGGTCGT-3' (reverse)로서 각각 718 bp와 403 bp의 PCR 산물을 agarose gel상에서 확인하였다.

6. Western 분석

배양한 세포를 scraper를 이용하여 회수한 후, 2% sodium dodecylsulfate, 10% glycerol, 50 mM DTT를 포함하는 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8 용액에 넣고 5분간 끓인 후 불용성 침전물을 제거한 후 동량의 단백질을 10% polyacrylamide-gel에서 전기영동하였다. Gel 내의 단백질을 PVDF membrane (Schleicher & Schuell)으로 옮겨준 후, 5% 탈지분유와 0.1% Tween 20이 포함된 tris-buffered saline 완충액 (TBST)으로 상

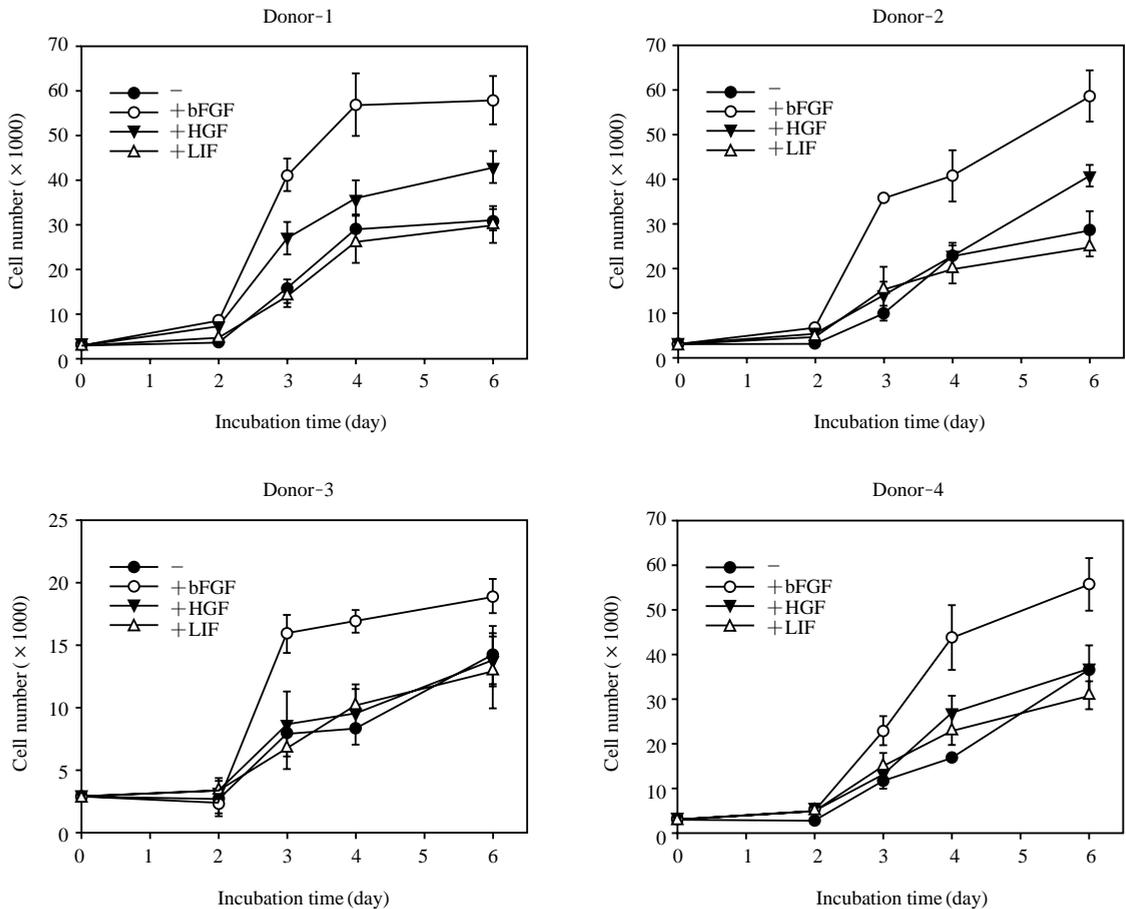


Fig. 1. bFGF enhances proliferation of MSCs *in vitro*. MSCs were isolated from 4 independent donors. Primary cultures were plated at a density of 3×10^3 cells per 96-well plate and incubated in the presence of 10 ng/mL bFGF, 100 U/mL HGF, or 1,000 U/mL LIF for 6 days. At indicated time, the total number of live cells was counted by trypan blue dye exclusion method. Experiments were carried out in duplicates and data are shown as the averages \pm S.E. of three independent experiments.

온에서 1시간 동안 반응시킨 후 anti- β -tubulin III 항체 (Tuj-1, Covance)를 1:1000으로 희석하여 4°C에서 16시간 동안 반응시켰다. TBST 용액으로 10분씩 3회 세척한 후, HRP-conjugated anti-mouse IgG (Zymed, 1:5000 희석)를 넣고 1시간 반응시켰다. TBST 용액으로 다시 3회 세척한 후 chemiluminescence kit (Supersignal, Pierce Chemical Co.)로 반응시킨 후 X-ray 필름에 감광시켰다. 양성대조군으로는 생쥐의 뇌조직 단백질을 추출하여 이용하였다.

7. 면역형광염색

배양한 세포를 poly-L-ornithine (10 μ g/mL)이 코팅된 커버글라스에 12시간 동안 부착시키고, 4% paraformaldehyde로 10분간 고정하였다. 비특이적 면역반응을 없애기 위해 1% bovine serum albumin과 10% horse serum이 포함된 용액에서 상온에서 1시간 반응시켰다. 커버글라스를 1차 항체인 anti-nestin (Chemicon, 1:500) 또는 anti- β -tubulin III (Covance, 1:500)을 포함한 0.1% Triton X-100이 들어 있는 PBS 용액으로 옮겨준 후 4°C에서 16시간 반응시켰다. 1차 항체 반응 후 0.1% Triton X-100이 들어 있는 PBS 용액으로 3회 씻어낸 다음 2차 항체로 Texas red conjugated anti-mouse IgG (Vector, 1:200)를 실온에서 30분간 반응시켰다. 대조염색으로 세포핵을 DAPI (Vector)로 염색한 후 형광현미경으로 관찰하였다.

결 과

1. 성장인자의 증식 촉진 효과

중간엽줄기세포의 성장 속도에 미치는 HGF, LIF 및 bFGF의 영향을 96-well 세포 배양판에서 확인하였다. 줄기세포의 성장을 촉진하는 것으로 기존에 알려진 농도에서 LIF나 HGF가 중간엽줄기세포의 성장에 미치는 영향은 매우 미미하였으며 (donor 1), 그 효과도 공여자에 따라 차이가 있었다. 반면에 bFGF를 배지에 첨가한 경우는 중간엽줄기세포의 수가 2~4일 사이에 현격하게 증가하였으며, 6일에 가까워지면서 이러한 증가추세는 다소 둔화되는 경향을 보였다. 그 결과 bFGF를 10 ng/mL로 처리하여 1주일 만에 세포수를 약 3배 가량 증가시킬 수 있었으며, 이러한 bFGF의 효과는 4명의 공여자로부터 유래한 모든 세포에서 공통적으로 관찰되어, 성장을 촉진시키는 효과가 매우 일관성 있음을 보여주고 있다 (Fig. 1). 또 bFGF를 10~100 ng/mL 사이에서 농도별로 처리하였을 때, 2~4일 사이에는 모든 경우 세포수가 현격하게 증가하였으며 (Fig. 2A), 10 ng/mL에 비하여 50~100 ng/mL을 처리한 경우에는 그 증가속도가 6일까지 조금 더 지속되는 경향을 보였다. 본 연구에서는 배양액을 비교적 농도의 영향이 적은 2일마다 교체해주므로, 다음 연구에 사용할 중간엽줄기세포는 배양액에 bFGF를 10 ng/mL의 농도로 첨가해주면서 증식시켰

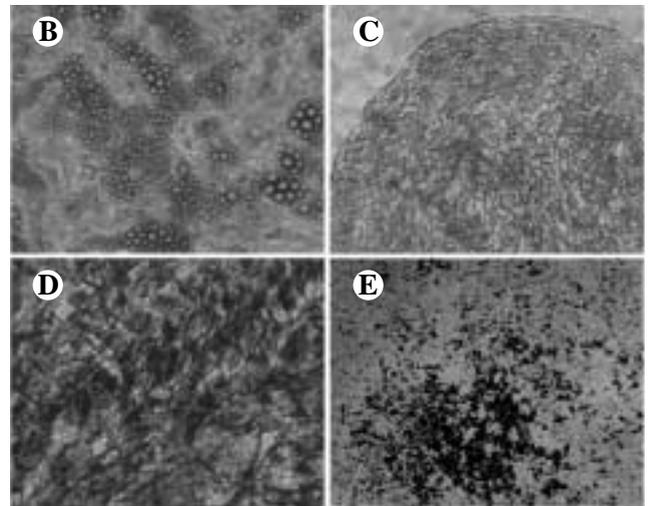
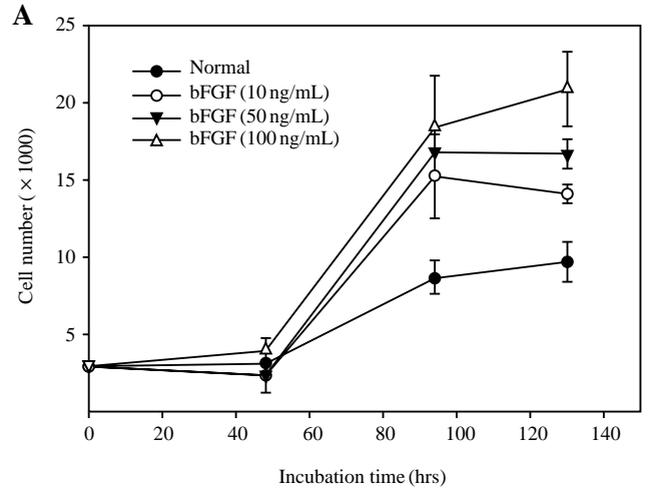


Fig. 2. Multi-lineage differentiation of MSCs. (A) MSCs were plated at various concentration of bFGF. The total number of live cells was plotted at indicated time. Experiments were carried out in duplicates and data are shown as the averages \pm S.E. of three independent experiments. (B-E) MSCs isolated from younger donors were grown to the passage 8 and were induced to differentiate into mesodermal lineage cells using various differentiation medium as described in the Materials and Methods. (B) Adipogenic induction was visualized with staining of lipid vacuoles by Oil red-O. (C) Chondrogenesis was demonstrated with increased proteoglycan-rich extracellular matrix, shown by Alcian blue staining. (D) Osteogenic differentiation was demonstrated by the increased alkaline phosphatase activity, and (E) the accumulation of minerals by von Kossa stain.

다 (Fig. 2A).

2. 중간엽줄기세포의 다중분화능 검증

배양한 중간엽줄기세포의 다중분화능을 측정하기 위하여 Pittenger 등 (1999)의 방법으로 분화를 유도하였다. 분화된 세포의 형질은 조직학적염색을 통해 확인하였다. 10~15세 공

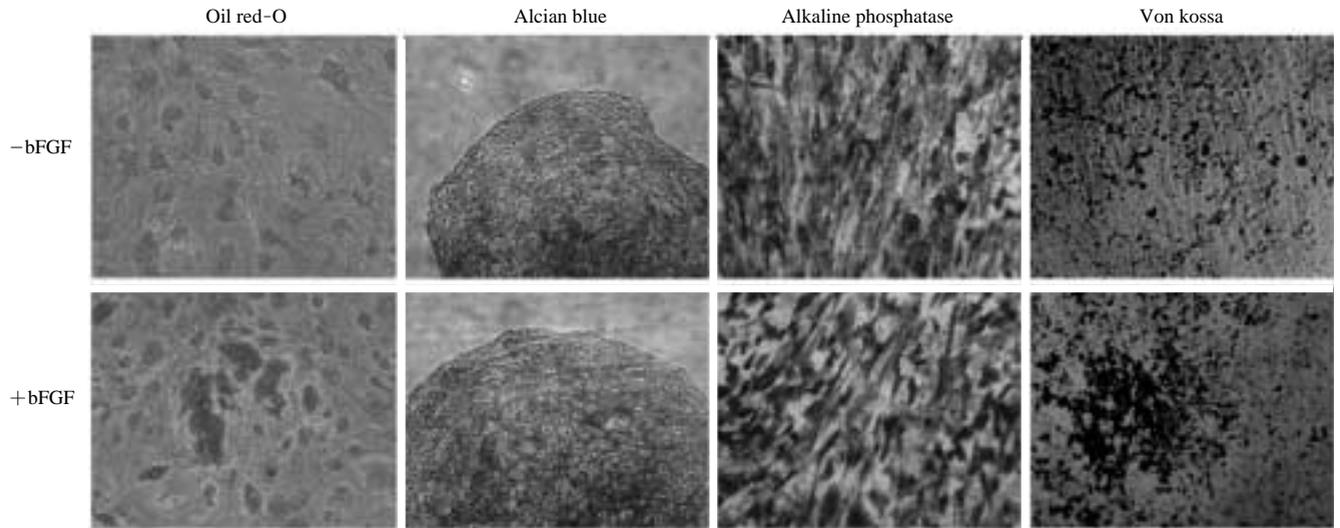


Fig. 3. Effects of bFGF on the differentiation potential of hMSCs. MSCs were isolated from 75 years old donor and expanded in the culture medium containing 10% FBS with or without 10 ng/mL bFGF after the 1st passage. The cells were induced to differentiate into mesodermal-lineage cells as described in the Materials and Methods.

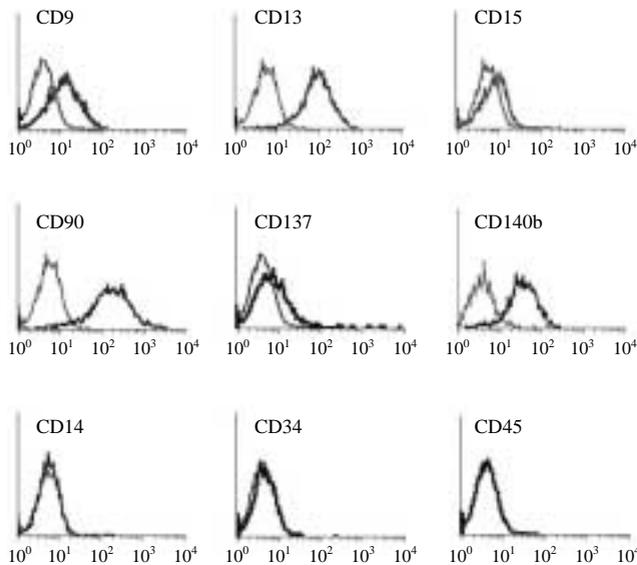


Fig. 4. Characterization of hMSCs. The cells of the 8th passage were grown to 80% confluence and harvested by using 25 mM EDTA in PBS. The cells were labeled with monoclonal antibodies specific for molecules indicated in each flow cytometric histogram. The thin and thick lines in each histogram represent the cells labeled with isotype matched Ig and specific monoclonal antibodies, respectively.

여자의 골수에서 유래한 중간엽줄기세포를 FGF가 첨가된 배양액에서 8번 계대배양을 한 후 지방세포로 분화를 유도하고 Oil Red-O 염색을 수행한 결과 60% 이상의 세포가 지방세포로 분화함을 확인하였다(Fig. 2B). 75세 공여자로부터 분리한 중간엽줄기세포를 bFGF가 첨가된 배양액에서 증식시켰을 때

는 약 30% 정도가 지방세포로 분화하였지만, 반면에 같은 세포를 bFGF가 없는 조건에서 배양하면 지방세포로의 분화하는 효율이 5% 미만으로 낮아졌다(Fig. 3). 이에 비해서 bFGF가 없는 조건에서 배양한 75세 공여자의 세포는 calcium mineral의 축적정도가 다소 감소하였지만 모든 세포에서 alkaline phosphatase의 활성이 나타나는 것으로 미루어 고령자에게서 뼈세포로 분화하는 능력은 bFGF의 영향은 받지만 그 효과는 지방세포로의 분화시보다 훨씬 낮은 것으로 나타났다(Fig. 3). 반면에 연골세포로 분화하는 능력은 연령과 bFGF의 처리여부와 큰 상관관계가 없는 것으로 나타났다. 즉 TGF- β 1이 존재하는 조건에서 3주간 분화시킨 결과, 여러층의 세포기질층과 연골소강이 관찰되었고, polyaniline alcian blue에 의해 파란색으로 염색되는 chondroitin sulfate의 존재가 확인되었다(Figs. 2C, 3). 이상의 결과는 bFGF는 중간엽줄기세포의 다중분화능을 유지하는 데 필요하며, 특히 지방세포로의 분화능을 유지하는데 결정적으로 작용함을 시사한다.

3. 중간엽줄기세포의 특이항원 표식인자 조사

bFGF가 첨가된 조건에서 장기배양한 중간엽줄기세포의 특이항원을 조사하고, 장기배양에 따른 세포의 변화가능성을 유세포분석과 핵형분석을 통해 조사하였다. 유세포분석 결과, 배양된 세포는 CD9, CD13, CD15, CD90, CD137, CD140b과 같은 표면항원을 지니고 있었고, CD14, CD34와 같은 조혈줄기세포계열 및 CD45와 같은 백혈구세포의 표면항원은 발견되지 않았다(Fig. 4). 핵형을 분석한 결과, 모든 경우에서 3염색체성(trisomy)이나, 전좌(translocation) 등의 이상증후가 발견되지 않았으며, 정상적으로 46개의 상동염색체와 성염색

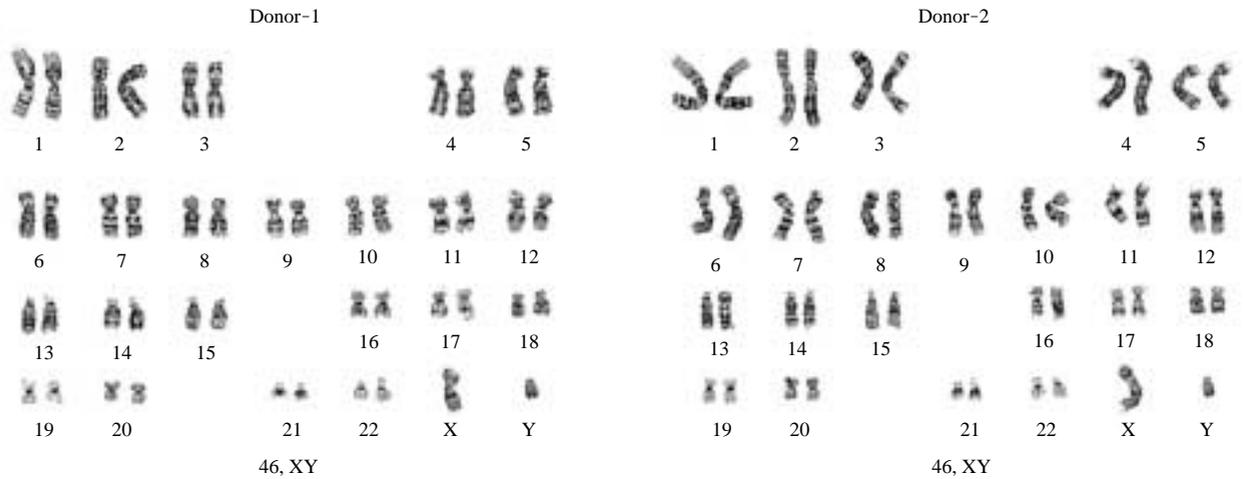


Fig. 5. Karyotyping of MSCs. The cells at passage 8 were plated on 100 mm culture dish with 10% FBS, 10 ng/mL bFGF. Cells were harvested 24 hours after treated with colcemid and cytogenetically analyzed as described in the Materials and Methods. The data are the representative examples of the 2 independent donors.

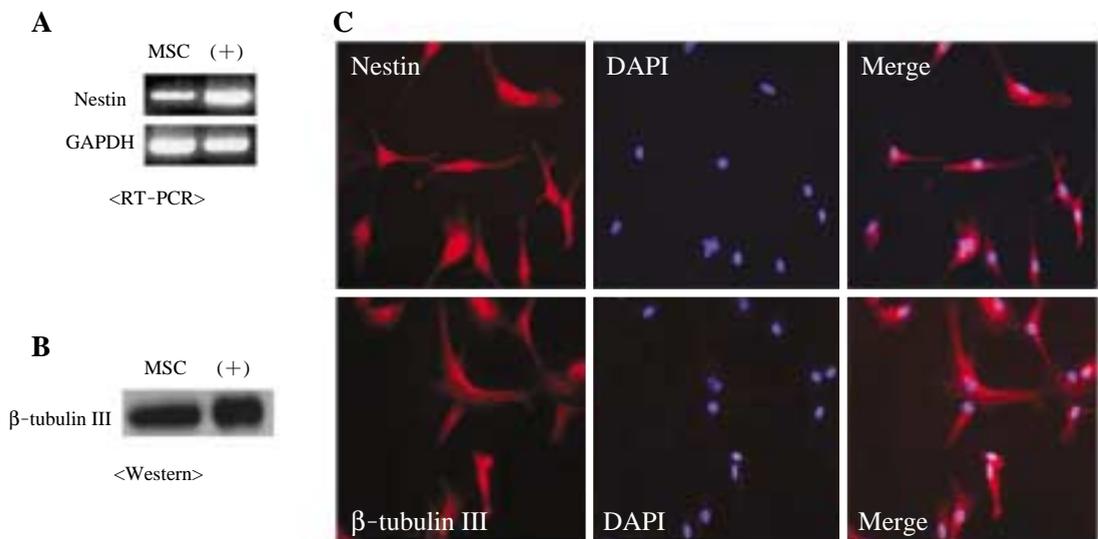


Fig. 6. Undifferentiated MSCs express nestin and β -tubulin III. Total RNA and proteins were isolated from hMSCs. (A) RT-PCR showed the expression of the human nestin gene. (B) Western analysis was carried out with 40 μ g proteins and antibody against β -tubulin III. (C) The cells were fixed and stained with anti-nestin, anti- β -tubulin III antibodies. Immunoreactivity was visualized with a Texas red-conjugated anti-mouse IgG. Immunostained cells were counterstained with DAPI.

체를 가진 것으로 나타났다(Fig. 5).

4. 중간엽줄기세포와 신경세포 표식인자의 중첩성

중간엽줄기세포가 신경세포로 분화했는지를 측정하는데 있어서 기준에 신경세포 표식자로 사용되는 기준을 적용할 수 있을 가능성에 대하여 조사하였다. 즉 bFGF가 첨가된 배양액에서 증식된 사람의 중간엽줄기세포에서, 신경세포줄기세포의 표식인자로 알려진 nestin과 신경세포 분화의 초기 표식인자

로 알려진 β -tubulin III이 발현되는지를 RT-PCR, western 분석, 및 면역형광염색기법으로 조사하였다. 그 결과 RT-PCR과 면역세포염색으로 중간엽줄기세포에는 nestin이 존재함을 확인하였고, western 분석과 면역세포염색 방법으로 β -tubulin III가 발현하고 있음을 확인하였다(Fig. 6).

고 찰

중간엽줄기세포는 분리 및 배양 방법이 비교적 간단하며,

질환이나 중앙부위로 이동하는 능력이 탁월하다. 이러한 특성은 비중배엽성 세포로 분화할 수 있는 다중분화능과 더불어, 중간엽줄기세포가 세포치료제 또는 유전자치료를 위한 도구로 적합함을 시사한다. 중간엽줄기세포가 치료제로 사용되기 위해서는, 다중분화능을 유지시키면서 시험관내에서 증식시키는 조건뿐만 아니라, 그 결과 얻어진 세포의 특성을 확인할 수 있는 정확한 지표가 먼저 확립되어야 한다.

중간엽줄기세포는 골수의 단핵구를 2~3번 정도 계대배양을 하여 조혈줄기세포를 제거시키면 플라스틱 용기에 붙어서 자라는 세포로 현재까지 알려져 있으나 (Kuznetsov *et al.*, 1997; Bruder *et al.*, 1997). 그 세포의 특성에 관해서는 연구자간에 차이가 보고되고 있어서 보다 정밀한 조사가 필요하다.

본 연구에서는 중간엽줄기세포의 증식속도가 배양액 내에 첨가되는 성장인자에 따라 증가함을 밝혔다. 즉 bFGF가 첨가된 경우 일반 배양액에 비해 성장속도가 약 3배 정도 빨랐다 (Fig. 1). 이러한 결과는 이전에 보고된 대부분의 연구결과와 일치한다 (Martin *et al.*, 1997; Kuznetsov *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 2002). 하지만 Gronthos와 Simmons (1995)는 본 연구 결과와는 달리 bFGF의 효과가 없다고 보고한 바 있다. 이러한 차이점은 미세한 실험조건의 차이, 골수유래 세포의 균질성, 고농도의 bFGF에 의한 수용체의 중합방지 (Walsh *et al.*, 2000) 등에 기인한 것으로 사료되나, 정확한 원인을 밝히기 위해서는 정밀한 연구가 필요하다.

중간엽줄기세포는 공여자의 연령에 반비례하여 골수에서의 숫자가 줄어드는 것으로 알려져 있다. 또한 고연령의 골수에서 분리한 세포는 그 분화능 또한 떨어지는 것으로 알려져 있다. 본 연구의 결과에서도 75세 고령의 공여자로부터 분리한 중간엽줄기세포는 지방세포로의 분화능은 현격히 감소되었으며, 뼈세포로의 분화능도 다소 감소되어 있음을 확인하였다 (Fig. 3). 이러한 결과는 공여자의 연령에 반비례하여 뼈세포로의 분화능이 줄어든다는 기존의 보고와도 일치한다 (Mueller & Glowacki, 2001; Stendurf *et al.*, 2003). 고령자의 경우도 bFGF가 첨가된 배지에서 배양된 중간엽줄기세포는 지방세포 및 뼈세포로 분화하는 능력이 회복되는 것은 bFGF는 분화능을 유지시킨다는 것을 의미하며, 이러한 사실은 기존의 보고와도 일치한다. bFGF는 조류의 중간엽줄기세포에서 뼈세포 및 연골세포로의 분화를 촉진시키며 (Martin *et al.*, 1998), 흰쥐의 중간엽줄기세포에서도 뼈세포로의 분화를 촉진하는 것이 보고된 바 있다 (Scutt *et al.*, 1999). bFGF가 지방세포로의 분화에 아무 영향도 미치지 않는다는 보고가 있으나 (Locklin *et al.*, 1999), Tsutsumi 등(2001)과 Neubauer 등(2004)은 bFGF가 지방세포로의 분화능 유지에 중요함을 보고하였다. 본 연구에서도 bFGF는 노인의 중간엽줄기세포가 뼈세포 및 지방세포로 분화하는 능력을 유지시키는 것으로 나타났다.

bFGF를 첨가한 배양액에서 장기간 배양된 중간엽줄기세포의 표현형을 알아보기 위해 유세포 분석을 통해 표면항원을

조사한 결과 CD9, CD13, CD15, CD90, CD137, CD140b과 같은 표면 항원 표식인자를 지니고 있었고, CD14, CD34와 같은 혈액줄기세포계열 및 CD45와 같은 백혈구세포의 항원 표식인자는 발견되지 않았다 (Fig. 4). 이러한 표면항원의 표현형은 기존의 보고 (Pittenger *et al.*, 1999; Reyes *et al.*, 2001; Majumdar *et al.*, 2003)와 유사하였다. 또한, bFGF를 첨가한 배양액에서 장기간 배양된 세포의 핵형도 정상으로 나타났다 (Fig. 5). 이와 같은 결과는 bFGF를 이용하여 중간엽줄기세포를 장기간 선택적으로 증식시킬 수 있음을 나타낸다.

중간엽줄기세포는 최근 신경세포로의 분화잠재성이 보고되면서 (Sanchez-Ramos *et al.*, 2000; Woodbury *et al.*, 2000), 신경계질환치료에 있어서 세포치료제 또는 유전자치료제의 도구로 제시되고 있다. 신경계질환치료에 있어서는 신경줄기세포나 배아줄기세포유래의 신경세포 등이 치료도구로 제시되어 왔으나, 윤리적인 문제를 야기시키거나 세포 공급원을 확보하기가 어렵고, 자기세포를 사용할 수 없다는 것이 문제점을 지적되어 왔다. 반면, 중간엽줄기세포는 채취와 증식이 비교적 쉽고, 본인의 세포를 사용하여 면역 거부반응을 일으키지 않는다는 장점을 가지고 있다. 하지만 중간엽줄기세포는 중배엽유래의 세포이므로 신경계질환에 사용하기 위해서는 외배엽유래의 신경세포로 분화되었을 때 그것을 확인할 수 있는 방법이 먼저 확립되어야 한다. 흥미롭게도 본 연구에서는 신경세포 특이적인 단백질로 알려진 β -tubulin III와 신경줄기세포의 특이적인 단백질로 알려진 nestin이 미분화상태의 중간엽줄기세포에서도 발현되고 있음을 확인하였다 (Fig. 6). 따라서, 중간엽줄기세포를 신경계질환의 세포치료제로 사용하기 위해서는 중간엽줄기세포와 신경세포를 구분할 수 있는 새로운 표식인자에 대한 연구가 더 진행되어야 할 것이다.

현재 중간엽줄기세포는 난치병의 세포치료제로서 많은 관심의 대상이 되고 있다. 본 연구에서는 bFGF가 시험관내에서 중간엽줄기세포의 증식을 촉진시키고, 또한 세포의 다중분화능을 유지시키는데 핵심적인 배양첨가물임을 규명하였다. 이 결과는 앞으로 중간엽줄기세포를 이용한 세포치료제 개발에 필수적으로 요구되는 충분한 양의 세포를 확보하는 기술의 개발에 중요한 자료로 이용될 수 있을 것이다. 또한 본 연구에서는 기존에 사용되었던 신경세포의 표식인자가 중간엽줄기세포에 내재함을 밝혔다. 이는 중간엽줄기세포가 신경세포로 분화했음을 판단하는데 새로운 과학적인 지표가 필요하다는 것을 시사하고 있다.

참 고 문 헌

Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE : Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation, *J Cell Biochem* 64: 278-294, 1997.

- Gronthos S, Simmons PJ : The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions *in vitro*, *Blood* 85: 929-940, 1995.
- Kuznetsov SA, Friedenstein AJ, Robey PG. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation *in vitro*, *Br J Haematol* 97: 561-570, 1997.
- Locklin RM, Oreffo RO, Triffitt JT : Effects of TGFbeta and bFGF on the differentiation of human bone marrow stromal fibroblasts, *Cell Biol Int* 23: 185-194, 1999.
- Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD : Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells, *J Biomed Sci* 10: 228-241, 2003.
- Makino S, Fukuda K, Miyoshi S, Konishi F, Kodama H, Pan J, Sano M, Takahashi T, Hori S, Abe H, Hata J, Umezawa A, Ogawa S : Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*, *J Clin Invest* 103: 697-705, 1999.
- Martin I, Muraglia A, Campanile G, Cancedda R, Quarto R : Fibroblast growth factor-2 supports *ex vivo* expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow, *Endocrinology* 138: 4456-4462, 1997.
- Martin I, Padera RF, Vunjak-Novakovic G, Freed LE : *In vitro* differentiation of chick embryo bone marrow stromal cells into cartilaginous and bone-like tissues, *J Orthop Res* 16: 181-189, 1998.
- Mueller SM, Glowacki J : Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges, *J Cell Biochem* 82: 583-590, 2001.
- Muraglia A, Cancedda R, Quarto R : Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model, *J Cell Sci* 113: 1161-1166, 2000.
- Neubauer M, Fischbach C, Bauer-Kreisel P, Lieb E, Hacker M, Tessmar J, Schulz MB, Goepferich A, Blunk T : Basic fibroblast growth factor enhances PPARgamma ligand-induced adipogenesis of mesenchymal stem cells, *FEBS Lett* 577: 277-283, 2004.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR : Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science* 284: 143-247, 1999.
- Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM : Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells, *Blood* 98: 2615-2625, 2001.
- Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR : Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells *in vitro*, *Exp Neurol* 247-256, 2000.
- Scutt A, Bertram P : Basic fibroblast growth factor in the presence of dexamethasone stimulates colony formation, expansion, and osteoblastic differentiation by rat bone marrow stromal cells, *Calcif Tissue Int* 64: 69-77, 1999.
- Shumakov VI, Onishchenko NA, Krashennnikov ME, Zaidenov VA, Potapov IV, Bashkina LV, Bersenev AV : Differentiation of bone marrow stromal stem cells into cardiomyocyte-like cells in different mammalian species, *Bull Exp Biol Med* 135: 393-396, 2003.
- Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M : Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells, *Bone* 33: 919-926, 2003.
- Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C, Yoshida E, Takagishi K, Kato Y : Retention of multilineage differentiation potential of mesenchymal cells during proliferation in response to FGF, *Biochem Biophys Res Commun* 288: 413-419, 2001.
- Walsh S, Jefferiss C, Stewart K, Jordan GR, Screen J, Beresford JN : Expression of the developmental markers STRO-1 and alkaline phosphatase in cultures of human marrow stromal cells: regulation by fibroblast growth factor (FGF)-2 and relationship to the expression of FGF receptors 1-4, *Bone* 27: 185-195, 2000.
- Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB : Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons, *J Neurosci Res* 61: 364-370, 2000.
- Zhang X, Sobue T, Hurley MM : FGF-2 increases colony formation, PTH receptor, and IGF-1 mRNA in mouse marrow stromal cells, *Biochem Biophys Res Commun* 290: 526-531, 2002.

— Abstract —

Effects of Basic Fibroblast Growth Factor on Proliferation of Human Mesenchymal Stem cells

Sung Soo Kim¹, Jung Won Choi², Kyu Bum Kwack²,
Young Don Lee¹, Haeyoung Suh-Kim^{1,3*}

¹Department of Anatomy, School of Medicine, Ajou University

²Division of Structural and Functional Genomic Research,
National Genome Research Institute, Seoul Korea

³Brain Disease Research Center, Ajou University, Suwon, Korea

Human mesenchymal stem cells (hMSCs) are multipotent stem cells that can differentiate into several mesenchymal lineage cells. In this study, we established conditions that allowed a long term expansion of hMSCs. To search for the optimum culture condition, growth rates of hMSCs were measured in the presence of several growth factors. Hepatic growth factor (HGF) and leukemia inhibitory factor (LIF) did not facilitate proliferation of hMSCs. In contrast, basic fibroblast growth factor (bFGF) effectively promoted growth of the cells *in vitro* by 3 fold. The growth stimulatory effect of bFGF was dependent on the concentration. The adipogenic potential was dramatically decreased in hMSCs isolated from an aged donor whereas osteogenic potential was minimally decreased. Addition of bFGF resumed the adipogenic and osteogenic differentiation potential. Thus, the cells that expanded in the presence of bFGF retained the potential to differentiate into adipogenic, chondrogenic, or osteogenic lineage cells. MSCs could be expanded for at least 8 passages with bFGF and the resulting cells retained the normal karyotype. The cells were positive for CD9, CD13, CD15, CD90, CD137, and CD140b; but negative for CD14, CD34, and CD45. Importantly, the cells were found to express a neural stem cell marker, nestin, and a neuronal marker, β -tubulin III.

The results suggest that bFGF promote proliferation while maintaining multi-lineage differentiation potency of hMSCs. Finally, we suggest that it is critical to identify novel markers other than nestin or β -tubulin III to monitor acquisition of neuronal phenotypes by hMSCs.

Key words : Mesenchymal stem cells, Basic fibroblast growth factor, Trans-differentiation