creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

의학석사 학위논문

In vitro culture 를 이용한 골수 유래 분화 마커 음성세포의 간세포 분화

In vitro hepatocyte differentiation from the bone marrow lineage −negative cells

2014 년 02 월

서울대학교 대학원

의과학과 석사과정

손 서 연

In vitro culture 를 이용한 골수 골수 유래 분화 마커 음성세포의 간세포 분화

지도교수 이 동 섭

이 논문을 의학석사 학위논문으로 제출함

2014 년 01 월

서울대학교 대학원

의과학과

손 서 연

손서연의 의학석사 학위논문을 인준함

2014 년 01 월

위 원 장 최 은 영 (인)

부위원장 이 동 섭 (인)

위 원 김 항 래 (인)

In vitro hepatocyte differentiation from the bone marrow lineage−negative cells

by

Suh−Youn, Shon

A thesis submitted to the Department of Biomedical Science in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science in Immunology at Seoul National University College of Medicine

Jan. 2014

Approved by Thesis Committee:

Professor Eun Young Choi Chairman
Professor Dong Sup Lee Vice chairman
Professor HANG-RAE KIM

학위논문 원문제공 서비스에 대한 동의서

본인의 학위논문에 대하여 서울대학교가 아래와 같이 학위논문 제공하는 것에 동의합니다.

1. 동의사항

① 본인의 논문을 보존이나 인터넷 등을 통한 온라인 서비스 목적으로 복제할 경우 저작물의 내용을 변경하지 않는 범위 내에서의 복제를 허용합니다.

② 본인의 논문을 디지털화하여 인터넷 등 정보통신망을 통한 논문의 일부 또는 전부의 복제.배포 및 전송 시 무료로 제공하는 것에 동의합니다.

2. 개인(저작자)의 의무

본 논문의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락하는 등 동의 내용을 변경하고자 할 때는 소속대학(원)에 공개의 유보 또는 해지를 즉시 통보하겠습니다.

3. 서울대학교의 의무

① 서울대학교는 본 논문을 외부에 제공할 경우 저작권 보호장치(DRM)를 사용하여야 합니다.

② 서울대학교는 본 논문에 대한 공개의 유보나 해지 신청 시 즉시 처리해야 합니다.

논문 제목 : *In vitro* culture를 이용한 골수 유래 분화 마커 음성세포의 간세포 분화

학위구분: 의학석사
학　　과: 의과학과
학　　번: 2012-21797
연 락 처: syshon@snu.ac.kr
저 작 자: 손 서 연

제 출 일: 2014 년 01 월

서울대학교총장 귀하

초 록

서론: 간은 대사 항상성에 관여하는 중요 기관이기에, 간의 손상은 생명을 위협하기도 한다. 간은 재생이 가능한 기관이라 알려져 있음에도 간 손상에 대한 치료법은 아직 제한적이다. 성체 줄기세포는 자기 복제가 가능한 동시에 다른 세포로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있고, 피부, 장, 골수 등에 존재한다고 알려져 있다. 최근 이러한 성체 줄기세포를 이용하여 손상된 조직을 대체하고자 하는 연구들이 이루어지고 있으며, 그 예로 성체 줄기세포를 이용한 간세포 분화를 통해 손상된 간세포를 대체할 수 있는 방법을 찾고자 하는 노력들이 있다.

방법: C57BL/6J로부터 얻은 골수 세포 중 lineage-negative (lin^-) cell을 magnetic-activated cell sorting (MACS)를 통해 분리하여 type-I-A collagen이 처리된 조건에서 15 일간 배양하였다. 초기 세포 증식을 위해 마우스 혈청을 사용하였고, 간세포 분화를 위해 정상 마우스 간 조직을 이용해 획득한 liver-conditioned medium (liver-CM)과 재조합 hepatocyte growth factor (HGF)를 처리하였다. 간세포 분화의 확인은 RT-PCR과 면역형광 염색을 이용했고, EdU incorporation assay를 이용하여 증식하는 세포를 확인하였다.

결과: 마우스 혈청을 이용했을 때 세포의 증식이 일어남을 확인하였고, 이후 liver-CM과 HGF를 처리했을 때 형태학적으로 간세포 성상을 확인하였고, RT-PCR과 면역형광 염색법을 통해 albumin의 발현을 확인할 수 있었다. 골수 유래 lin^- 세포로부터

간세포로 분화되는 과정에서 afp, trop2, dlk-1 등의 마커를 발현하는 전구 세포가 후기 분화 과정에서 나타남을 확인하였고, 배양 초기 과정에서는 gata4, foxa2, sox7 등의 내배엽 세포의 마커들이 발현하며 증식하고 있음을 볼 수 있었다.

결론: 성체 줄기세포의 하나인 골수 유래의 lin^- 세포가 마우스 혈청과 liver-CM/HGF의 처리를 통해*in vitro* 상에서 간세포로 분화하는 것이 가능함을 확인하였다. 또한 분화 초기 과정에서는 내배엽 세포의 특징을 발현하는 세포의 형태를 거치는 것을 확인할 수 있었고, 이후에는 간세포 전구체 성상의 특징을 가지는 세포를 통해 간세포로 분화함을 확인하였다. 이로써 골수 유래의 미분화 세포를 이용해 *in vitro* 상에서 간세포 분화 가능성을 확인하고, 더 나아가 간세포의 재생 과정에 있어 세포 성상의 변화를 연구하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

주요어: 골수유래 분화마커 음성세포, 간세포, 내배엽, 간세포 전구체, *in vitro* 분화

학 번: 2012-21797

목 차

초록 i

목차 iii

표 및 그림 목록 iv

서론 1

실험재료 및 방법 4

1. 실험 동물

2. 골수 유래의 lineage-negative cell의 분리와 배양

3. 마우스 혈청과 liver-CM 준비

4. 면역형광 염색

5. EdU incorporation assay

6. mRNA 발현 분석

7. 통계학적 분석

결과 9

1. 골수 유래 lin^- 세포로부터 albumin을 발현하는 간세포로의 *in vitro* 분화

2. 분화 과정에서 출현하는 간세포 전구체의 확인

3. 간세포 전구체의 유래 확인

4. 분화 과정상에 있는 세포의 증식 확인

고찰 23

참고문헌..... 27

초록 (영문) 32

표 및 그림 목록

Figure 1. Hepatocyte differentiated from bone marrow lin^{-} cells by treat of mouse serum and liver-CM treat.

Figure 2. Albumin expression originated from the differentiated cells.

Figure 3. The number of albumin-positive cells increased according to the differentiation.

Figure 4. Hepatocyte precursor-like cells occurred before the hepatocyte differentiation.

Figure 5. The cells at the early stages represented endodermal markers.

Figure 6. The proliferating cells were analyzed by EdU incorporation assay.

Supplementary Figure S1. Bone marrow lin^{-} cell were isolated by MACS and propagated under mouse serum treated condition.

서 론

간은 소화에 필요한 물질 생성, glycogen 저장, 지방 대사, 해독 작용, albumin과 같은 혈청 단백 생성, urea 합성 등 다양한 작용을 수행하는 대사 항상성 유지의 중심 기관이다(1,2). 이 때문에 바이러스 감염, 자가면역질환, 유전적 질환, toxic injury 등에 따른 간 손상은 인간의 생명을 위협하게 된다(1,3). 간은 유일하게 재생이 가능한 기관이기도 하므로(1), 간이식이 치료법으로 제시되어 왔으나, 기증자의 부족, 고비용, 이식에 따른 거부반응 등 여러 단점이 있다(3).

간세포(hepatocyte)는 간의 70% 정도를 차지하고 있는 실질세포로 내분비와 외분비의 성격을 모두 갖고 있는 상피세포이다(4). 마우스에서 간은 췌장, 폐 등과 함께 foregut endoderm으로부터 유래한다. E8.5에서 ventral foregut endoderm이 발달 과정에 있는 심장과 가까이 위치하게 되고 이로부터 영향을 받아 hepatic endoderm이 발달하게 된다(4-6). 이 시기 출현하는 세포를 'hepatoblast'라 칭하며, 이는 간세포와 담관세포 모두로 분화할 수 있다(5,7-9). 한편, 손상된 간의 재생과정에 관여하는 세포로 알려진 것이 'oval cell'이다. 이 세포 역시 hepatoblast와 마찬가지로 간세포와 담관세포로 분화가 가능한 것으로 알려져 있지만(5,10,11) 분화되는 과정에서의 자세한 기전은

알려져 있지 않다.

줄기세포는 미분화 세포로, 자기 복제가 가능한 동시에 다양한 세포로의 분화가 가능하다는 특징이 있다. 줄기세포는 크게 배아 줄기세포(embryonic stem cell)와 성체 줄기세포(adult stem cell; somatic stem cell)로 분류할 수 있으며, 성체 줄기세포는 줄기세포의 특징을 보이나, 배아 줄기세포에 비해 다소 제한적인 종류의 세포로 분화가 가능한 다분화능(multipotency)을 가지고 있다(12). 성체 줄기세포는 체내에서 표피(epidermis), 장선와(intestinal crypt), 중추신경계(central nerve system), 간, 골수 등에 존재하는 것으로 알려져 있다(12). 골수는 가장 많은 성체 줄기세포를 보유하고 있다(3). 골수 유래의 줄기세포는 신경세포, 근육세포, 상피세포 등으로의 분화가 가능하다고 알려져 있다(13-20).

본 연구에서는 다분화능이 있는 성체 줄기세포 가운데 골수 유래의 세포를 이용해 *in vitro*에서 간세포로의 분화를 유도하고, 분화 과정에 있는 세포 성상의 변화를 추적하고자 하였다. 이를 위해 골수 세포 중 lineage-negative (lin^-) 세포를 MACS로 선별하여 얻었고, 배양 초기에 마우스 혈청을 이용하여 세포를 증식시킨 후, liver-CM과 재조합 hepatocyte growth factor (HGF), anti-TGFβ antibody를 이용해 albumin 생성 세포로 분화를 유도하였다. 분화 과정은 면역형광

염색법과 RT-PCR을 이용하여 증명하였고, EdU incorporation assay를 이용하여 각 단계별 세포의 증식을 확인하였다.

골수에서 추출한 lin^- 세포로부터 간세포 성상의 세포 분화가 *in vitro*에서 가능한 것을 밝혔고, 실제로 albumin을 발현하는 세포임을 확인하였다. 또한 이 세포들은 Gata4, Foxa2, Sox7 등을 발현하는 내배엽 성상의 세포들에서 비롯하여, Afp, Trop2, Dlk-1 등을 발현하는 간세포 전구체의 성상을 거쳐, albumin을 발현하는 세포로 분화되었음을 확인하였다.

실험 재료 및 방법

1. 실험 동물

C57BL/6J(B6, H-2^b) mice는 Jackson Laboratory (ME, U.S.)에서 구입하였다. 모든 동물 실험은 서울대학교 실험 동물 자원관리원의 규정을 따랐다.

2. 골수 유래의 lineage-negative cell의 분리와 배양

골수 세포는 C57BL/6J(B6, H-2b) 마우스의 대퇴골과 경골을 적출하여 얻었다. 이 가운데 lineage-negative (lin^-) 세포만을 분리하기 위하여 APC-conjugated mouse lineage antibody cocktail (BD Biosciences, NJ, USA)과 Anti-APC microbeads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany)를 사용한 magnetic activated cell sorting (MACS) 방법을 이용하였다.

세포는 type-I-A collagen (100 μg/ml; Nitta Gelain NA Inc., Osaka, Japan)을 처리한 배양 접시에서 배양하였으며, 배양액은 10% FBS (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.)와 1% antibiotics (100 U/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin)가 포함된 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) (Life Technologies)을 기본으로 하여, MEM NEAA (non-essential amino acid), 1 mM L-glutamine, 0.1 mM 2-

mercaptoethanol을 첨가하여 사용하였다. 배양 조건은 37℃, 5% CO_2이며, 3일에 한 번씩 배양액을 첨가하였다.

3. 마우스 혈청과 liver-CM 준비

정상 마우스로부터 혈액을 얻어 상온에서 2시간 동안 배양한 후 원심분리를 통해 혈청만을 획득하여 -80℃에 보관하고 사용하였다.

Liver-CM은 다음의 과정을 통해 얻었다. 정상 마우스의 간을 적출하여 3~4 mm^3의 일정한 크기로 잘라 배양 접시에 70개씩(70 pieces/well in 6-well plate) 놓고, 10% FBS, 1% antibiotics MEM NEAA, 1mM L-glutamine이 포함된 IMDM에서 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 48시간 후 간세포 배양액을 회수하여, 배양액에 남아있을 수 있는 RNA와 DNA는 RNase (10 μg/ml, Intron Biotechnology, Gyeonggi-do, Korea)와 DNase (40 μg/ml, Roche, Basel, Switzerland)를 37° C에서 1시간 동안 처리하여 제거하였다. 이렇게 얻어진 liver-CM은 원심분리로 세포 파편을 제거한 후, -80℃에 보관하고 사용하였다.

4. 면역형광 염색

배양 접시의 세포를 4% paraformaldehyde로 고정하고, blocking solution (5% BSA, 0.3% Triton X-100 in PBS)을 이용해 상온에서

blocking하였다. 일차항체는 anti-mouse Foxa2 (Abcam, Cambridge, MA, USA), anti-mouse Gata4 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-mouse Sox7 (Santa Cruz Biotechnology), anti-mouse Trop2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), A6 antibody (Dr. Valentina Factor (NIH, Bethesda)로부터 받은 것), 그리고 anti-mouse Albumin (Santa Cruz Biotechnology)을 이용하였다. 이차항체는 Alexa 488-conjugated anti-rabbit IgG (Life Technologies), Alexa 488-conjugated anti-goat IgG (Life Technologies), Alexa 488-conjugated anti-mouse IgG (Life Technologies), Alexa 546-conjugated anti-mouse IgG (Life Technologies), 그리고 Alexa 594-conjugated anti-rat IgG (Life Technologies)를 이용하였다. 염색한 세포는 공초점 현미경 (Olympus, Center Valley, PA, USA)으로 촬영하였고, FV10-ASW 2.0 Viewer (Olympus)로 분석하였다.

4. EdU incorporation assay

세포 증식을 확인하기 위해 Click-iT® EdU Alexa Fluor® 647 Imaging Kit (Life Technologies)를 이용하였다. 5μM EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine)를 48시간 동안 배양 세포에 처리하고, 앞서 설명한 면역형광 염색 방법과 같이 고정한 후, 제시된 매뉴얼에 따라 EdU 양성세포를 확인하였다.

5. mRNA 발현 분석

Total RNA는 Trizol reagent (Life Technologies)를 이용해 세포로부터 추출하였다. cDNA는 1 μg의 total RNA로부터 PrimeScript reverse transcriptase (Takara, Otsu, Shiga, Japan)를 이용하여 합성하였다. PCR에 이용한 각 유전자에 대한 primer 는 다음과 같다. *actin*, 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'과 5'-CTTCTCCAGGGAGGAAGAGG–3' ; *albumin*, 5'-GTGCAAGAACTATGCTGAGG-3'과 5'-ACTCACTGGGGTCTTCTCAT-3'; *albumin* (nested PCR), 5'-CTGTTGCTGAGACTTGCTAA-3'과 5'-AGAGTTGGGGTTGACACCTG-3'; *afp*, 5'-CACTGCTGCAACTCTTCGTA-3'과 5'-CTTTGGACCCTCTTCTGTGA-3'; *dlk-1*, 5'-TGTCAATGGAGTCTGCAAGG-3'과 5'-AGGGAGAACCATTGATCACG-3'; *sox9*, 5'-TGCAGCACAAGAAAGACCAC-3'과 5'-CCCTCTCGCTTCAGATGAAC-3'; *tbx*, 5'-TTCCCCCTTCGTGTGTTTAG-3'과 5'-GGACTTCCGTTGTTTCCA-3'; *foxa2*, 5'-GACATACCGACGCAGCTACA-3'과 5'-GGCACTGGAAAGCAGTC-3'; *gata4*, 5'-GAGTGTGTCAATTGTGGGGC-3'과 5'-CTGCTGTGCCCATAGTGAGA-3'; *gata6*, 5'-CGGAGGAAAGTACAGAC-3'과 5'-GAGTAGGGAAAGCGTGCAG-3'; *sox7*, 5'-GCAGGAAGAAACAAGGCAAG-3'과 5'-GTGGAGGGGACTAGGTGTGA-3'. PCR 결과물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. Liver-CM에서의 RNA 분석은 ExoQuick-TC™ exosome precipitation solution(System Biosciences, Mountain View, CA, USA)을 이용하여 exosome을 침전시킨

후 Trizol reagent를 사용해 RNA를 추출하여 진행하였다.

6. 통계학적 분석

증식하는 세포 또는 특정 마커를 발현하는 세포의 비율은 means ± SEM (standard errors of the mean)으로 나타냈고, 그 차이를 two-tailed test로 분석하였으며 $P < 0.05$는 통계학적으로 유의한 차이를 나타낸다.

결 과

1. 골수 유래 lin⁻ 세포로부터 albumin을 발현하는 간세포로의 *in vitro* 분화

마우스 골수 유래의 lin⁻ 세포을 이용해 간세포 분화를 유도하기 위하여, 간세포 분화에 필요한 요소들을 제공할 수 있도록 배양 조건을 확립하고자 하였다. 배양 과정에서 세포의 생존율을 높이기 위해 마우스 혈청을 초기 6일 동안 첨가하였고, 이후 간세포로 분화를 유도하기 위하여 liver-conditioned medium (liver-CM)과 재조합 hepatocyte growth factor (HGF), 그리고 anti-TGFβ antibody를 9일간 제공하였다 (Figure 1A). 간세포는 형태학적으로 상피세포의 특성을 갖고(4), 일부는 binucleate의 특징을 보이는데, 이러한 특성을 위의 조건에서 배양한 세포에서 확인할 수 있었다 (Figure 1B). 또한 이 세포들은 간세포의 특징적인 마커인 albumin을 발현하고 있는 것을 면역형광 염색으로 확인하였다 (Figure 1C). 한편, 마우스 혈청을 처리했을 때의 세포는 혈청을 처리하지 않은 세포에 비해 생존율이 높았고 증식이 증가하지만 (Figure S1), albumin 양성 세포로 분화하지는 않았다 (Figure 1B). 또한 liver-CM만 처리했을 때 세포는 빠르게 분화했으나 간세포 성상의 세포는 관찰되지 않았으며, albumin 역시 발현되지 않았다.

분화된 세포에서 관찰된 albumin 발현이 liver-CM에 남아있는 RNA에서 유래되었을 가능성을 배제하기 위하여, RNase와 DNase를 처리한 liver-CM을 이용하여 분화를 시도하였다. 먼저 Liver-CM에서 추출한 RNA로부터 albumin 유전자 발현을 확인한 결과, 음성반응을 보였으며, RNase와 DNase를 처리한 liver-CM에서도 역시 음성반응을 보였다 (Figure 2A). 그리고 RNase와 DNase를 처리한 liver-CM을 이용하여 분화시킨 세포에서도, 아무런 처리를 하지 않은 liver-CM을 사용하였을 때와 비슷한 수준으로 albumin을 발현하는 것을 면역형광 염색과 RT-PCR로 증명하였다 (Figure 2B-C). 이러한 결과들은 골수 유래 lin^- 세포가 마우스 혈청과 liver-CM이 함유된 배양조건에서 albumin을 생성하는 세포로 분화되었음을 의미한다. 다음으로 albumin을 발현하는 간세포의 분화시기를 면역형광 염색을 통해 분석한 결과, 배양 9일째부터 15일째까지 albumin을 생성하는 세포가 점차 증가하는 것을 관찰하였다 (Figure 3A). 이러한 결과는 RT-PCR을 통해 다시 한번 검증하였다 (Figure 3B). 따라서 세포 배양 초기에 마우스 혈청을 처리함으로써 세포의 생존율과 증식이 높아지고, 이후 liver-CM과 HGF, anti-TGFβ antibody를 첨가함으로써 albumin을 발현하는 간세포 성상의 세포가 분화된다는 것을 확인하였다.

2. 분화 과정에서 출현하는 간세포 전구체의 확인

마우스의 배아 발달 과정에서 간세포 전구체는 hepatoblast라 불리며 *afp, dlk-1, hex, prox1* 등을 발현하는 것으로 알려져 있다(5). 그리고 일부 연구자들은 성체에서 간 손상 후 재생 과정에서 간세포 전구체 성격의 oval cell이 특징적으로 나타난다고 보고하였으며, 이 세포들은 *afp, dlk-1, trop2* 등의 발현을 하고, A6 antibody로 염색되는 특징이 있는 것으로 알려져 있다(5,14,21). 또한 일부 연구들에서는 골수 유래의 세포 가운데 oval cell 마커를 나타내는 것이 있으며, 이들이 간세포로의 분화 가능하다는 것을 보여주고 있다(21-24). 본 연구에서는 lin^- 세포에서 albumin 생성 세포로 분화하기까지 어떠한 세포 상태를 거치는지를 밝히기 위하여 간세포 전구 세포에서 발현되는 유전자를 분석하였다. Oval cell에서 발현되는 Trop2와 A6를 면역형광 염색으로 분석한 결과, 배양 9일째 세포에서 높은 발현을 보였고, 12일째의 세포에서도 여전히 발현되고 있음을 확인하였다 (Figure 4A and 4B). 그리고 간세포 전구체에서 발현되는 유전자를 RT-PCR을 통해 분석한 결과, *afp, dlk-1, sox9,* 그리고 *tbx*의 발현이 배양 9일째와 12일째에서 가장 높은 것을 확인하였고, albumin 발현 세포가 가장 많이 나타나는 15일에는 다소 감소하는 경향을 관찰하였다 (Figure 4C). 따라서 *in vitro* 간세포 분화과정 동안 hepatoblast 혹은 oval cell을 거치는지 명확히 규정할 수는 없으나, 간세포 전구세포로부터 albumin 생성 세포가 분화됨을 확인할 수 있었다.

3. 간세포 전구체의 유래 확인

간세포 전구체가 어떤 세포로부터 유래하는지 알고자, 간세포 전구체 특이적인 유전자 발현이 주요하게 나타나는 9일 이전 과정의 세포를 분석하였다. 마우스 배아의 간 발달 과정에서, 간세포는 내배엽으로부터 유래한다(4-6). *In vitro*에서 배양한 3일에서 9일의 세포를 분석한 결과, *gata4, gata6, foxa2, sox7* 등의 내배엽 세포 특이적인 유전자 발현(25,26)이 배양 3일부터 6일까지 증가하는 반면, 9일째에서는 감소되는 것을 확인할 수 있었다 (Figure 5A). 또한 Foxa2와 Gata4가 동일한 세포에서 동시에 발현되는 것을 6일째 배양 세포에서 면역형광 염색을 통해 증명하였다 (Figure 5B). 이러한 결과는 골수 유래 lin^- 세포가 간세포로 분화하는 과정에서 내배엽 과정을 거치는 것을 보여주고, *in vitro*에서도 마우스 배아의 간 발달 과정과 유사한 과정을 거쳐 분화될 가능성이 높음을 시사한다.

4. 분화 과정상에 있는 세포의 증식 확인

내배엽, 간세포 전구체, 그리고 간세포로 이어지는 분화 과정에 있는 세포들이 실제로 증식하고 있는지 확인하기 위해 EdU incorporation assay를 하였다 (Figure 6A). EdU는 thymidine analog로, 새로 합성되는 DNA에 들어가기 때문에 S-phase의 증식 세포에서 확인할 수 있다(27). 각 시기별로 세포를 분석한 결과, 배양 3일째 세포에서는 21.51% (± 3.70%), 6일째에서는 45.63% (± 4.40%)의 세포가

EdU^+인 증식하는 세포임을 알 수 있었다 (Figure 6B). 그러나 liver-CM과 HGF, anti-TGFβ antibody가 처리되는 이후인 배양 9일째에서는 EdU^+인 세포가 15.80% (± 6.69%), 12일째에서는 3.01%(± 1.98%)로 나타나 증식하는 세포가 점차 감소함을 확인하였다. 이러한 결과는 초기 6일동안 마우스 혈청의 처리에 의해 세포의 증식이 활발하게 일어나게 됨을 뒷받침한다.

한편 분화 과정에 나타나는 특징적인 유전자를 발현하는 세포가 증식하고 있는지 확인하기 위해, 시기별로 면역형광 염색과 EdU incorporation assay를 진행하였다. 배양 3일째와 6일째에서 내배엽 세포의 마커인 Foxa2와 Sox7을 동시에 발현하는 세포들이 EdU^+인 것을 확인할 수 있었다 (Figure 6C). 내배엽 마커, Foxa2를 발현하는 세포는 3일째 (40.13% ± 3.28%)에 비해 6일째 (46.36% ± 2.38%)에서 다소 증가하는 것을 알 수 있다 (Figure 6D). Foxa2를 발현하는 세포 중 증식하고 있는 세포 ($Foxa2^+EdU^+$)는 3일째의 24.30% (± 4.97%)에서 6일째의 49.41% (± 8.96%)로 증가하는 것을 알 수 있다 (Figure 6E). 한편 배양 9일째와 12일째에서 간세포 전구체 마커인 Trop2와 A6를 발현하는 세포들을 면역형광 염색으로 확인하였고, 이 가운데 일부 세포들이 EdU^+인 증식 세포임을 알 수 있었다 (Figure 6F). 배양 9일째에 Trop2를 발현하는 세포는 전체 세포 중 47.32% (± 4.86%)를 차지하며, 이는 배양 12일째 (46.77% ± 5.87%)에도 비슷

한 수준이다 (Figure 6G). 그러나 Trop2를 발현하면서 EdU^+인 증식 세포는 배양 9일째에는 전체 Trop2 발현 세포 중 26.52% (± 9.42%)에서 배양 12일째에는 5.16% (± 3.63%)로 크게 감소하였다 (Figure 6H). 이에 따라, 마우스 혈청이 처리되는 배양 초기 6일간 내배엽 성상의 세포가 집중적으로 증식하게 되고, 이후 liver-CM과 HGF, anti-TGFβ antibody가 처리된 환경에서는 간세포 전구체를 거치면서 증식 능력을 점차 잃게 되고, 이후 albumin 생성 세포로 분화하는 단계를 거친다는 것을 증명하였다.

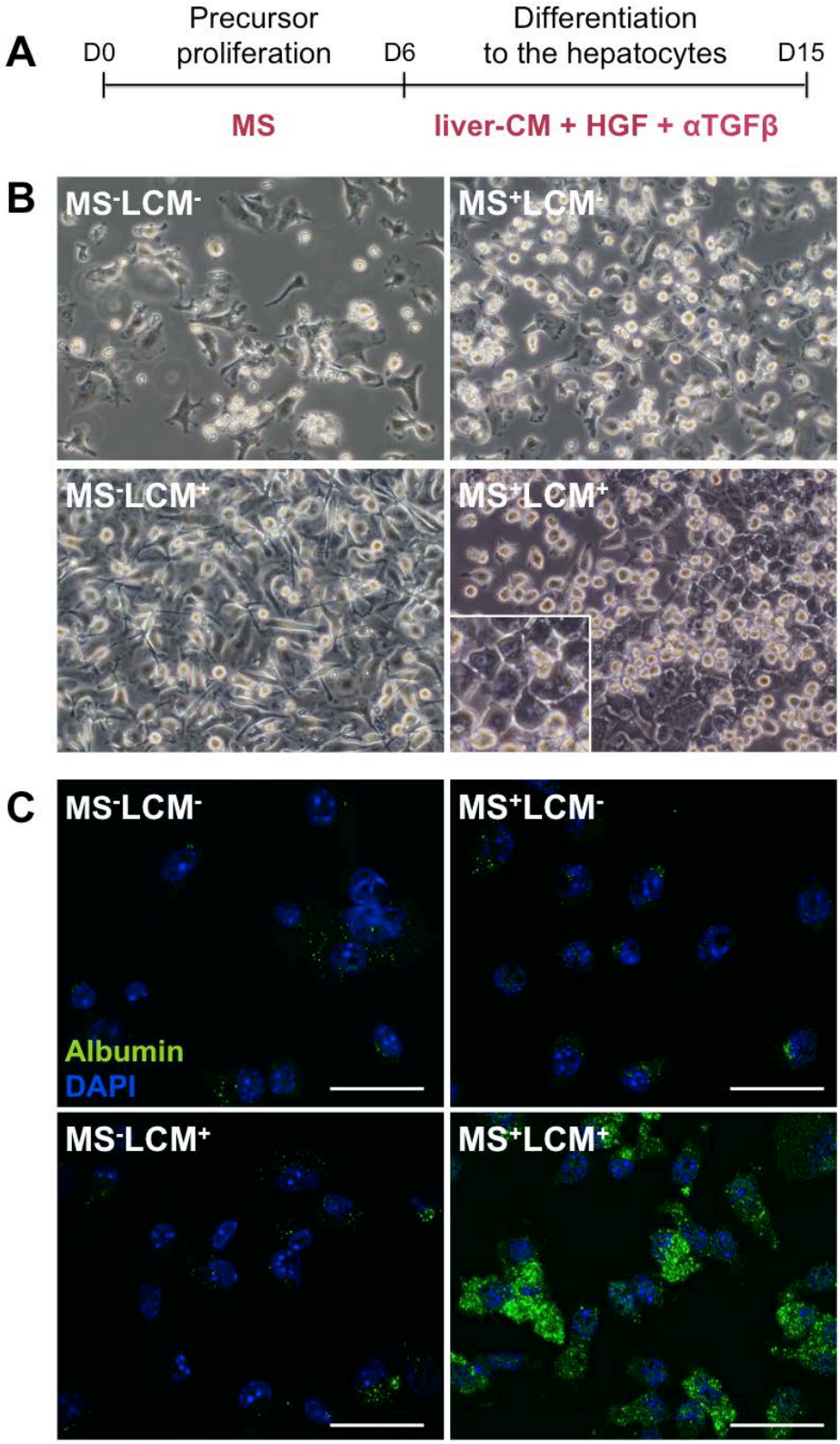

A
D0
Precursor proliferation
D6
Differentiation to the hepatocytes
D15
MS
liver-CM + HGF + αTGFβ
B
MS-LCM-
MS+LCM-
MS-LCM+
MS+LCM+
C
MS-LCM-
MS+LCM-
Albumin
DAPI
MS-LCM+
MS+LCM+

Figure 1. Hepatocyte differentiated from bone marrow lin⁻ cells by treat of mouse serum and liver-CM treat. (A) A scheme for *in vitro* differentiation of bone marrow lin⁻ cells into hepatocytes. Cells were treated with mouse serum for initial 6 days and then were cultured with liver-CM, HGF, and anti-TGFβ antibody for 9 days. (B) Cell morphologies were observed at D15 under the light microscope (original magnification, 200X). (C) Albumin expression was analyzed at D15 by confocal microscope (scale bar=50 μm). MS, mouse serum; LCM, liver-conditioned medium.

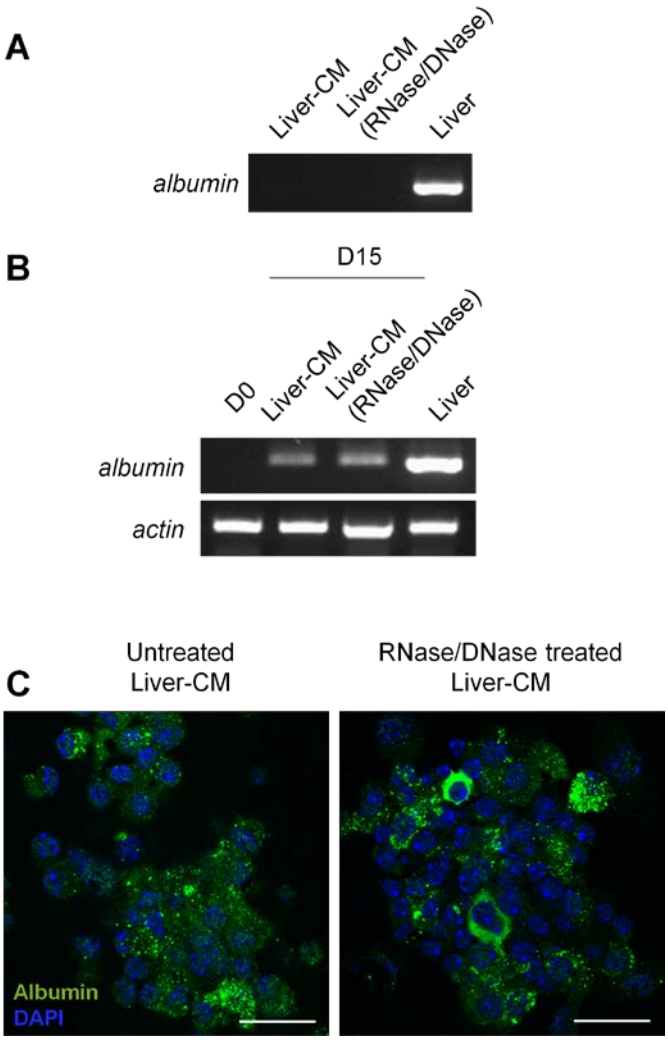


Figure 2. Albumin expression originated from the differentiated cells. Liver-CM was untreated or treated with 10 μg/ml RNase and 40 μg/ml DNase for 1hr at 37℃. Albumin expressions were detected by RT-PCR. cDNAs were prepared from (A) liver-CM and (B) D15 cells cultured in the untreated or RNase/DNase-treated liver-CM (C) Albumin representing cells at D15 were observed under confocal microscope (scale bar=50 μm)

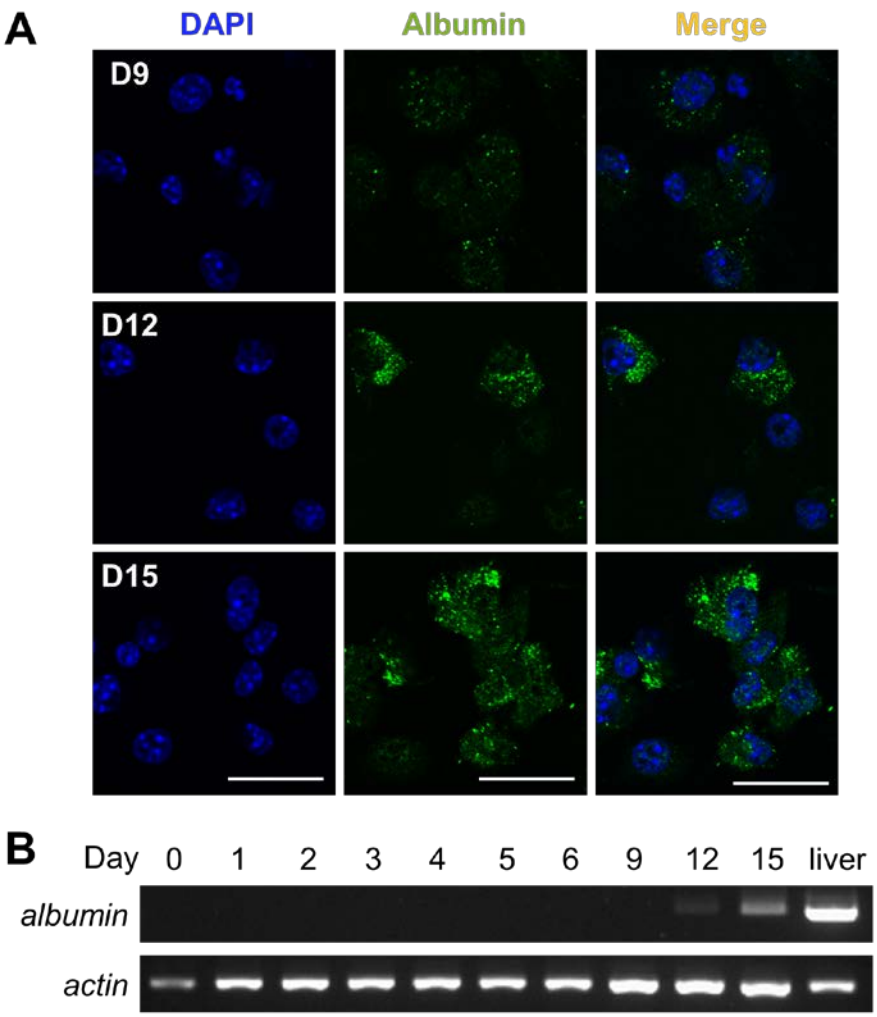


Figure 3. The number of albumin-positive cells increased according to the differentiation. (A) Albumin stained cells at the indicated days (scale bar=50 μm). (B) The albumin expression levels were analyzed by RT-PCR as the differentiation proceeded.

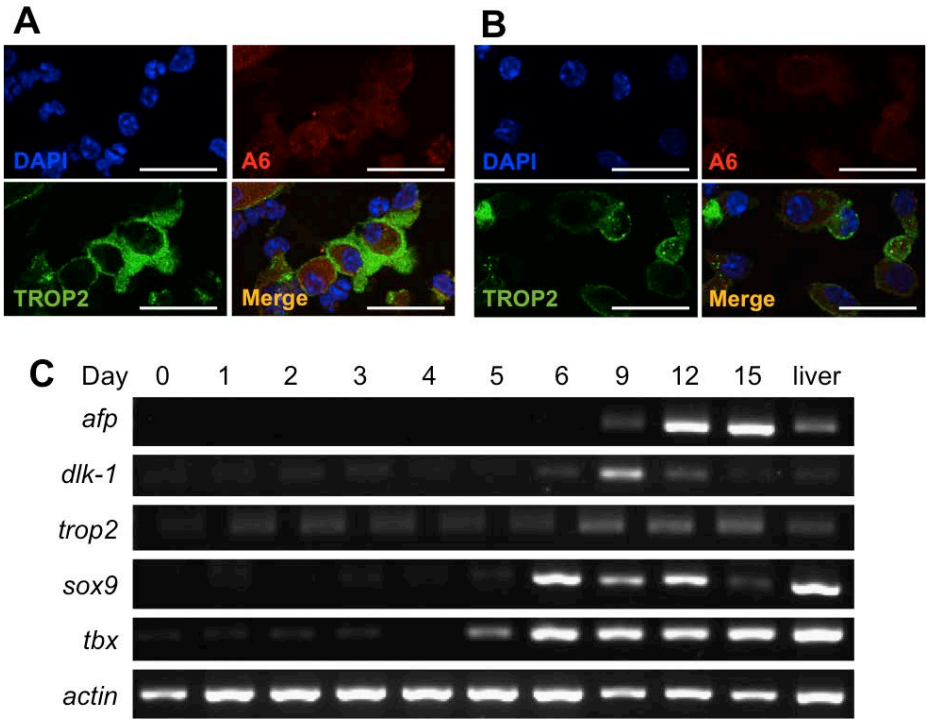


Figure 4. Hepatocyte precursor-like cells occurred before the hepatocyte differentiation. Anti-Trop2 antibody and A6 antibody staining performed for hepatocyte precursor detection in (A) D9 cells and (B) D12 cells (scale bar=50 μm). (C) Hepatocyte precursor markers in the cells on differentiation steps were detected by RT-PCR.

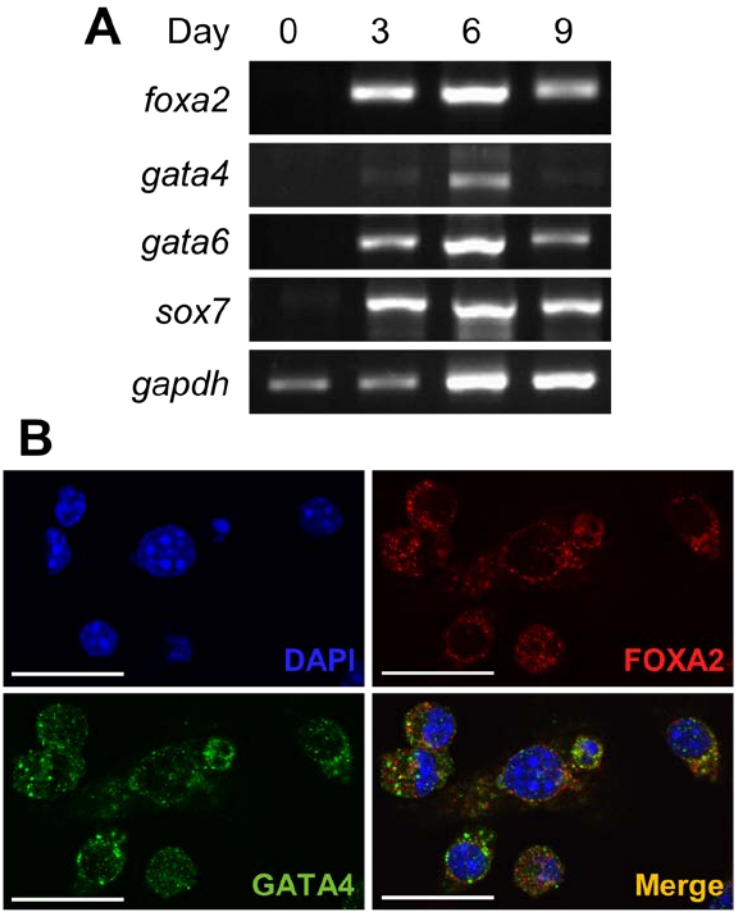


Figure 5. The cells at the early stages represented endodermal markers. (A) Endodermal markers were detected by RT-PCR at the marked days. (B) Foxa2 and Gata4 co-expressed in the same cells at D6 (scale bar=50 μm).

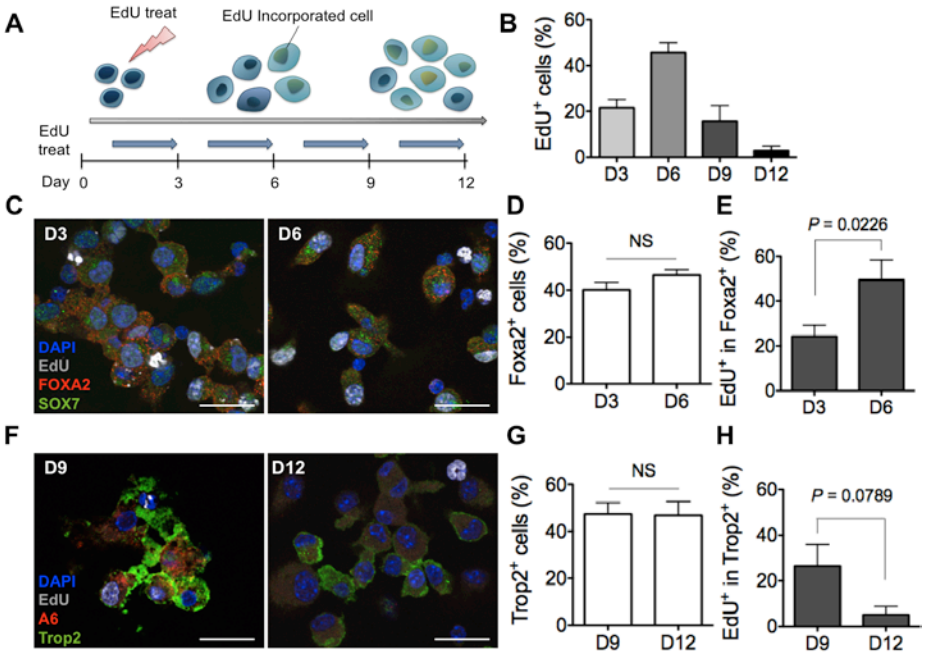
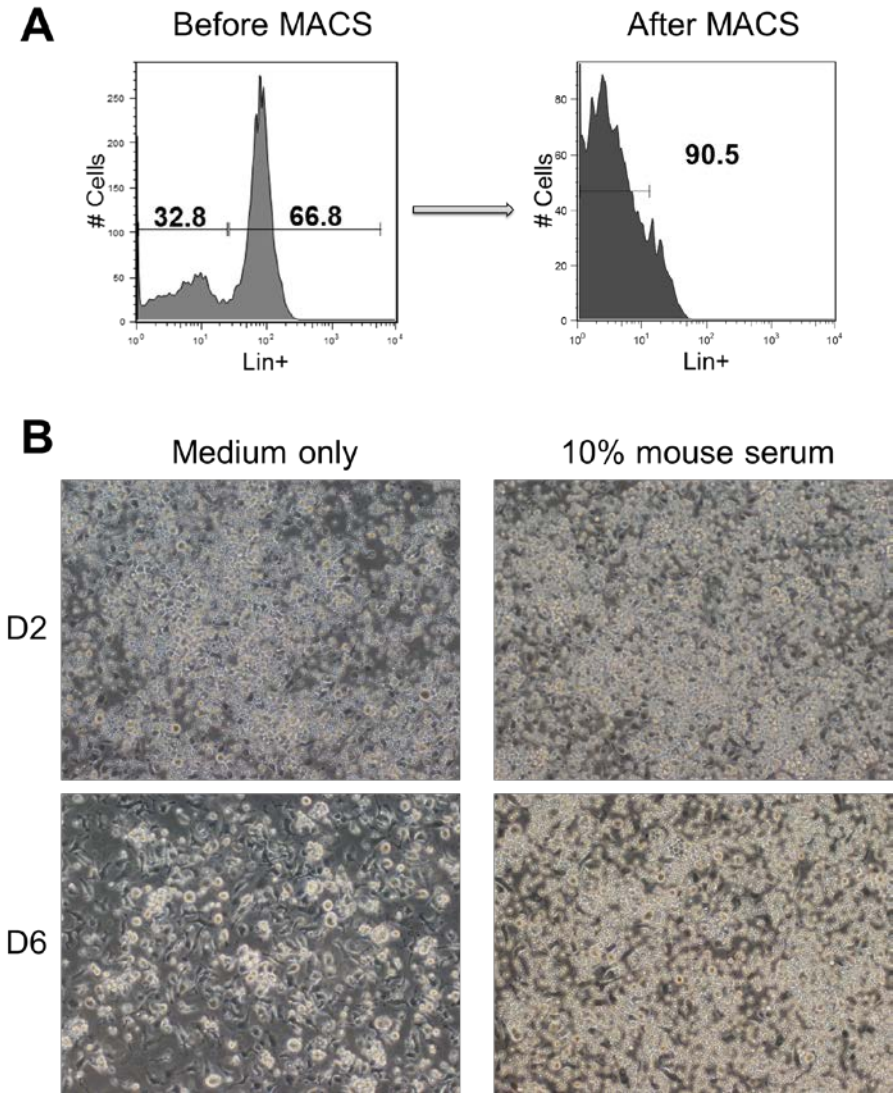


Figure 6. The proliferating cells were analyzed by EdU incorporation assay. (A) Cells were cultured with 5 μM EdU for 48hrs, and analyzed at the indicated days. (B) The number of EdU-positive cells was exhibited as the ratio to the number of total cells existed. The percentage of EdU-positive cells increased until D6 and diminished from D9. (C) Cells expressing both Foxa2 and Sox7 endodermal markers at D3 and D6 were also EdU-positive (scale bar=50 μm). (D) The percentage of Foxa2$^+$ cells slightly increased in D6, and (E) the ratio of Foxa2$^+$EdU$^+$ cells to total Foxa2$^+$ cells increased at D6 compared to at D3. (F) Cells were stained with anti-Trop2 antibody and A6 antibody, and some of the cells also represented EdU$^+$ (scale bar=50 μm). (G) The percentatge total Trop2$^+$ cells were similar between D9 and D12, but (H) the proliferating Trop2$^+$ cells indicated as EdU$^+$ decreased from D9 to D12.



Supplementary Figure S1. Bone marrow lin⁻ cell were isolated by MACS and propagated under mouse serum treated condition. (A) Lin⁻ cell were isolated from total bone marrow cells by MACS and the purity was confirmed by flow cytometry. (B) Mouse serum treat induced cell propagation, compared to untreated condition (original magnification 200X).

고 찰

본 연구에서는 골수 유래 lin^- 세포를 이용해 *in vitro*에서 간세포 분화를 유도하기 위해, 배양 초기 마우스 혈청과 이후 liver-CM 및 재조합 HGF와 anti-TGFβ antibody를 이용한 배양 조건을 확립하였다. 이러한 조건에서 15일간 배양된 세포는 albumin을 발현하는 상피세포 형태의 간세포 성상을 나타내는 것을 확인하였다. 그리고 albumin 생성 세포가 분화되기까지의 과정에서 내배엽 성상의 세포가 증식하고 있음을 밝혔고, 이후 간세포 전구 세포에서 특징적인 유전자를 발현하는 세포들이 분화함을 확인하였다.

본 연구에서 특히 주목한 것은 *in vitro* 상에서 골수 유래의 lin^- 세포로부터 간세포 성상의 세포로 분화하는 과정에서의 출현하는 세포 성상을 파악하는 것이었다. 마우스 배아의 발달 과정에 있는 간세포 분화는 내배엽으로부터 유래된다는 점에 착안하여(4,5), *in vitro* 분화 상에서도 내배엽 과정을 통해 간세포의 분화가 이루어지는지 확인하고자 하였다. 마우스 내배엽 세포에서 알려진 마커에 대해 분화 과정에 있는 세포에서의 발현을 관찰했을 때, 초기 배양 과정에서 Foxa2와 Gata4를 동시에 발현하는 내배엽 성상의 세포(25,26)가 존재함을 알 수 있었고 (Figure 5), 이러한 내배엽 성상의 세포들이 마우스 혈청이 처리되는 시기에서 증식하여 증가하고 있음을 확

인하였다 (Figure 6C-D). *In vitro*에서 간세포 분화를 유도한 다른 연구들의 사례를 볼 때, 유도만능줄기세포 (iPSC; induced pluripotent stem cell), 중간엽 줄기세포 (MSC; mesenchymal stem cell), 배아줄기세포 (ESC, embryonic stem cell) 등 연구에 사용한 세포의 유래와 관계없이 간세포 분화 과정에서 모두 내배엽 (definitive endoderm)을 거치는 것으로 나타나있다 (3,28-32). 따라서 본 연구에서 내배엽 단계를 거치는 것이 간세포 분화 과정에서 나타나는 정상적인 분화 과정임을 알 수 있다. 그러나 내배엽 성상의 세포가 본래 미분화 상태의 세포 중에 존재하다가 마우스 혈청의 처리에 의해 증식한 것인지, 혹은 lin^- 세포로부터 *in vitro* 배양 상에서 내배엽 세포로 분화한 후 증가하게 된 것인지 아직은 분명하지 않다. 따라서 이와 관련해 내배엽 성상의 세포의 유래를 파악하기 위한 추가 실험이 필요할 것으로 보인다.

내배엽 성상 세포의 출현 이후 세포는 간세포 전구체의 과정을 거치게 된다는 것을 실험에서 증명하였다. 간세포 전구체는 마우스 발달 과정에서 알려진 hepatoblast가 있으며, 이는 내배엽 세포로부터 유래하고(4-6), 간세포와 담관세포로 분화할 수 있다(5,7-9). 성체의 손상된 간의 재생 과정에서는 hepatoblast와 마찬가지로 간세포와 담관세포로 분화할 수 있다고 알려진 oval cell이 있으며(10,11), 이 세포는 간의 재생과 관련되어 있고, 골수로부터 유래되었다는 보고가

있다(21,22,34). 본 연구에서는 hepatoblast와 oval cell에서 알려진 유전자들에 대해, *in vitro*로 배양하는 세포들에서의 발현을 관찰하였고, 15일간의 분화 과정 중 후기에 마커들의 발현이 증가하는 것을 확인하였다 (Figure 4). 본 연구에서 분화된 세포가 hepatoblast에서 알려진 일부의 마커와 oval cell에서 알려진 일부 마커를 동시에 발현하고 있기 때문에, *in vitro* 분화 과정상에 있는 세포들이 oval cell 혹은 hepatoblast라고 명확하게 규정하는 것이 불가능하다는 한계점이 있다. 그러나 hepatoblast 또는 oval cell 마커를 발현하고 있는 세포가 배양 9일째까지 증식하지만 그 이후로 증식이 급감하며 (Figure 6), 그 이후 albumin의 발현이 증가하기 시작하는 것 (Figure 3)을 종합할 때, 간세포 전구체의 성격을 가진 세포가 배양 9일 이후부터 점차 증식 능력을 상실하고 간세포로 분화함을 증명한다.

지금까지의 본 연구에서는 분화 과정의 각 시기의 특징적인 유전자 발현을 확인함으로써, 골수 유래 lin^- 세포로부터 간세포로 분화하는 과정에 어떠한 세포 성상이 나타나는지 추적하였다. 그러나 실제 내배엽 세포가 간세포 전구체 성상의 세포로 변화하고, 이 세포가 간세포로 분화하게 되는지 각각의 세포 수준에서 파악한 바가 없으므로, 이에 대한 추가적인 확인이 필요할 것이다. 실제로 내배엽 성상의 세포, 간세포 전구 성상의 세포, 그리고 간세포가 각 시기에서 나타나는 비율을 보았을 때, 내배엽 성상의 세포가 3~6일째

에 약 35~48%, 간세포 전구체 성상의 세포가 9~12일째에 약 45~50%가 나타나는 반면에 (Figure 6), albumin을 발현하는 세포는 이에 미치지 못하는 약 10~15% 가량으로 나타난다. 따라서 liver-CM과 HGF, anti-TGFβ antibody에 의해 일부 간세포 전구체는 간세포로의 분화가 일어났으나, 많은 세포들이 전구 상태로 남아있을 가능성이 높을 것으로 보인다. 따라서 높은 수율의 간세포 분화를 유도하기 위한 추가적인 요소가 필요할 것으로 생각된다.

종합하면, 본 연구에서는 골수 유래 lin^- 세포가 *in vitro*에서 마우스 혈청과 liver-CM/HGF/anti-TGFβ antibody가 순차적으로 처리되는 조건 하에서 albumin을 발현하는 간세포 성상의 세포로 분화함을 증명하였고, 그 과정에서 내배엽 세포, 간세포 전구 세포, 그리고 간세포로 이어지는 분화 과정을 밝혔다. 이러한 연구가 성체의 손상된 간세포의 재생 과정을 연구하는데 있어 세포의 성상 변화를 연구하는 것에 도움이 될 것으로 생각되며, 더 나아가 세포를 이용한 손상간 치료법을 연구하는데 도움이 될 것으로 생각된다.

참고 문헌

1. Tanaka, M., Itoh, T., Tanimizu, N., & Miyajima, A. (2011). Liver stem/progenitor cells: their characteristics and regulatory mechanisms. *J Biochem, 149*(3), 231-239. doi: 10.1093/jb/mvr001
2. Taki-Eldin, A., Zhou, L., Xie, H. Y., & Zheng, S. S. (2012). Liver Regeneration after Liver Transplantation. *European Surgical Research, 48*(3), 139-153. doi: Doi 10.1159/000337865
3. Wu, X. B., & Tao, R. (2012). Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 11*(4), 360-371. doi: Doi 10.1016/S1499-3872(12)60193-3
4. Zhao, R., & Duncan, S. A. (2005). Embryonic development of the liver. *Hepatology, 41*(5), 956-967. doi: 10.1002/hep.20691
5. Zaret, K. S., & Grompe, M. (2008). Generation and regeneration of cells of the liver and pancreas. *science, 322*(5907), 1490-1494. doi: 10.1126/science.1161431
6. Gualdi, R., Bossard, P., Zheng, M., Hamada, Y., Coleman, J. R., & Zaret, K. S. (1996). Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control. *Genes Dev, 10*(13), 1670-1682.
7. Zaret, K. S. (2008). Genetic programming of liver and pancreas progenitors: lessons for stem-cell differentiation. *Nat Rev Genet, 9*(5), 329-340. doi: 10.1038/nrg2318
8. Clotman, F., Jacquemin, P., Plumb-Rudewiez, N., Pierreux, C. E., Van der Smissen, P., Dietz, H. C., Courtoy, P. J., Rousseau, G. G., & Lemaigre, F. P. (2005). Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling

modulated by Onecut transcription factors. *Genes Dev, 19*(16), 1849-1854. doi: 10.1101/gad.340305

9. Germain, L., Blouin, M.-J., & Marceau, N. (1988). Biliary Epithelial and Hepatocytic Cell Lineage Relationships in Embryonic Rat Liver as Determined by the Differential Expression of Cytokeratins, a-Fetoprotein, Albumin, and Cell Surface-exposed Components1. *Cancer Research, 48*(4909-4918), 19.

10. Fausto, N., & Campbell, J. S. (2003). The role of hepatocytes and oval cells in liver regeneration and repopulation. *Mech Dev, 120*(1), 117-130.

11. Sancho-Bru, P., Najimi, M., Caruso, M., Pauwelyn, K., Cantz, T., Forbes, S., Roskams, T., Ott, M., Gehling, U., Verfaillie, C., & Muraca, M. (2009). Stem and progenitor cells for liver repopulation: can we standardise the process from bench to bedside? *Gut, 58*(4), 594-603. doi: 10.1136/gut.2008.171116

12. Naveiras, O., & Daley, G. Q. (2006). Stem cells and their niche: a matter of fate. *Cell Mol Life Sci, 63*(7-8), 760-766. doi: 10.1007/s00018-005-5469-5

13. Dalakas, E., Newsome, P. N., Harrison, D. J., & Plevris, J. N. (2005). Hematopoietic stem cell trafficking in liver injury. *FASEB J, 19*(10), 1225-1231. doi: 10.1096/fj.04-2604rev

14. Petersen, B. E. (1999). Bone Marrow as a Potential Source of Hepatic Oval Cells. *science, 284*(5417), 1168-1170. doi: 10.1126/science.284.5417.1168

15. Alison, M. R., Poulsom, R., Jeffery, R., Dhillon, A. P., Quaglia, A., Jacob, J., Novelli, M., Prentice, G., Williamson, J., & Wright, N. A. (2000). Cell differentiation - Hepatocytes from nonhepatic adult stem cells. *Nature, 406*(6793), 257-257. doi: Doi 10.1038/35018642

16. Ferrari, G. (1998). Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors. *science, 279*(5356), 1528-1530. doi: 10.1126/science.279.5356.1528

17. Li, Y., Chen, J., Wang, L., Lu, M., & Chopp, M. (2001). Treatment of stroke in rat with intracarotid administration of marrow stromal cells. *Neurology, 56*(12), 1666-1672.

18. Lagasse, E., Connors, H., Al-Dhalimy, M., Reitsma, M., Dohse, M., Osborne, L., Wang, X., Finegold, M., Weissman, I. L., & Grompe, M. (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature Medicine, 6*(11), 1229-1234. doi: Doi 10.1038/81326

19. Miyazaki, M., Akiyama, I., Sakaguchi, M., Nakashima, E., Okada, M., Kataoka, K., & Huh, N. H. (2002). Improved conditions to induce hepatocytes from rat bone marrow cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun, 298*(1), 24-30.

20. Jang, Y. Y., Collector, M. I., Baylin, S. B., Diehl, A. M., & Sharkis, S. J. (2004). Hematopoietic stem cells convert into liver cells within days without fusion. *Nat Cell Biol, 6*(6), 532-539. doi: 10.1038/ncb1132

21. Petersen, B. E., Grossbard, B., Hatch, H., Pi, L., Deng, J., & Scott, E. W. (2003). Mouse A6-positive hepatic oval cells also express several hematopoietic stem cell markers. *Hepatology, 37*(3), 632-640. doi: 10.1053/jhep.2003.50104

22. Oh, S. H., Witek, R. P., Bae, S. H., Zheng, D., Jung, Y., Piscaglia, A. C., & Petersen, B. E. (2007). Bone marrow-derived hepatic oval cells differentiate into hepatocytes in 2-acetylaminofluorene/partial hepatectomy-induced liver regeneration. *Gastroenterology, 132*(3), 1077-1087. doi: 10.1053/j.gastro.2007.01.001

23. Okabe, M., Tsukahara, Y., Tanaka, M., Suzuki, K., Saito, S., Kamiya, Y., Tsujimura, T., Nakamura, K., & Miyajima, A. (2009). Potential hepatic stem cells reside in EpCAM+ cells of normal and injured mouse liver. *Development,*

136(11), 1951-1960. doi: 10.1242/dev.031369

24. Yanai, H., Nakamura, K., Hijioka, S., Kamei, A., Ikari, T., Ishikawa, Y., Shinozaki, E., Mizunuma, N., Hatake, K., & Miyajima, A. (2010). Dlk-1, a cell surface antigen on foetal hepatic stem/progenitor cells, is expressed in hepatocellular, colon, pancreas and breast carcinomas at a high frequency. *J Biochem, 148*(1), 85-92. doi: 10.1093/jb/mvq034

25. Futaki, S., Hayashi, Y., Emoto, T., Weber, C. N., & Sekiguchi, K. (2004). Sox7 plays crucial roles in parietal endoderm differentiation in F9 embryonal carcinoma cells through regulating Gata-4 and Gata-6 expression. *Mol Cell Biol, 24*(23), 10492-10503. doi: 10.1128/MCB.24.23.10492-10503.2004

26. Burtscher, I., & Lickert, H. (2009). Foxa2 regulates polarity and epithelialization in the endoderm germ layer of the mouse embryo. *Development, 136*(6), 1029-1038. doi: 10.1242/dev.028415

27. Buck, S. B., Bradford, J., Gee, K. R., Agnew, B. J., Clarke, S. T., & Salic, A. (2008). Detection of S-phase cell cycle progression using 5-ethynyl-2'-deoxyuridine incorporation with click chemistry, an alternative to using 5-bromo-2'-deoxyuridine antibodies. *Biotechniques, 44*(7), 927-929. doi: 10.2144/000112812

28. Ochiya, T., Yamamoto, Y., & Banas, A. (2010). Commitment of stem cells into functional hepatocytes. *Differentiation, 79*(2), 65-73. doi: 10.1016/j.diff.2009.10.002

29. Huang, P., He, Z., Ji, S., Sun, H., Xiang, D., Liu, C., Hu, Y., Wang, X., & Hui, L. (2011). Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature, 475*(7356), 386-389. doi: 10.1038/nature10116

30. Iwamuro, M., Komaki, T., Kubota, Y., Seita, M., Kawamoto, H., Yuasa, T., Shalhid, J. M., Hassan, R. A., Nakaji, S., Nishikawa, Y., Kondo, E., Yamamoto,

K., Fox, I. J., & Kobayashi, N. (2010). Hepatic differentiation of mouse iPS cells in vitro. *Cell Transplant, 19*(6), 841-847. doi: 10.3727/096368910X508960

31. Snykers, S., De Kock, J., Rogiers, V., & Vanhaecke, T. (2009). In Vitro Differentiation of Embryonic and Adult Stem Cells into Hepatocytes: State of the Art. *Stem Cells, 27*(3), 577-605. doi: Doi 10.1634/Stemcells.2008-0963

32. Shiraki, N., Yamazoe, T., Qin, Z., Ohgomori, K., Mochitate, K., Kume, K., & Kume, S. (2011). Efficient differentiation of embryonic stem cells into hepatic cells in vitro using a feeder-free basement membrane substratum. *PLoS One, 6*(8), e24228. doi: 10.1371/journal.pone.0024228

33. Chen, Y., Dong, X. J., Zhang, G. R., Shao, J. Z., & Xiang, L. X. (2007). In vitro differentiation of mouse bone marrow stromal stem cells into hepatocytes induced by conditioned culture medium of hepatocytes. *J Cell Biochem, 102*(1), 52-63. doi: 10.1002/jcb.21275

34. Theise, N. D., Badve, S., Saxena, R., Henegariu, O., Sell, S., Crawford, J. M., & Krause, D. S. (2000). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after radiation-induced myeloablation. *Hepatology, 31*(1), 235-240. doi: Doi 10.1002/Hep.510310135

Abstract

Introduction: Liver is the important organ for metabolic homeostasis, and liver injuries often threaten lives. Although the liver has the ability to regenerate, there are many limitations of therapies for curing liver damages. Adult stem cells have properties of self-renewal and differentiation, and have been identified in tissues such as epidermis, intestinal crypt, and bone marrow. Many researches for applying the adult stems cells to replace the injured or malfunctional organs have been performed. One of these cases is the research for *in vitro* hepatocytes differentiation using the adult stem cells as a therapeutic method.

Methods: Bone marrow was obtained from C57BL/6J and lineage-negative cells (lin^- cells) were isolated by MACS. The cells were cultured on type-I-A collagen treated plates for 15 days. Untreated mice serum was added for the precursor cell proliferation and normal mice liver-conditioned medium (liver-CM), recombinant mouse HGF, and anti-TGF β antibody were treated for the hepatocyte differentiation. Differentiation was confirmed by mRNA expression and immunofluorescence staining for the markers, and EdU incorporation assay was used for proliferation analysis.

Results: The precursor cells were increased in the mice serum supplemented condition, and the epithelial phenotype of hepatocyte-like cells were

differentiated as the liver-CM and hepatocyte growth factor treated. The differentiated cells expressed albumin at the RNA level and the protein level. In addition, the cells showed the hepatocyte precursor markers such as Afp, Trop2, Dlk-1 at the late stage of the differentiation. Those cells were proliferating and expressing Gata4, Foxa2, Sox7, the endodermal cell properties, at the earlier stage.

Conclusions: The bone marrow lin$^-$ cell showed differentiation *in vitro* culture by serial treat of mouse serum and liver-CM. Besides, the cells on the lineage expressed the endodermal markers at the early steps and the hepatocyte precursor markers at the later stages. These revealed that the bone marrow lin$^-$ cells could differentiate into the hepatocyte under *in vitro* culture with the major use of liver-CM, and these experiments may contribute for understanding the cell type lineage in the hepatocyte regeneration.

주요어: Bone marrow lineage-negative cell, hepatocyte, endodermal cell, hepatocyte precursors, *in vitro* differentiation

학 번: 2012-21797