

저분자물질을 리용하여 사람유도다능성줄기세포(hiPSC)의 산생효률을 높이기 위한 연구

백철민, 김강

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 교시하시였다.

《줄기세포도 깊이 연구할뿐아니라 임상치료에 적극 받아들여야 합니다.》

면역거절문제가 제기되지 않는 다능성줄기세포원천들을 마련하는것은 재생의료와 세포치료에서 나서는 매우 중요한 문제이다.

몇가지 전사인자유전자들을 이미 분화된 체세포에 형질도입하여 다능성줄기세포로 재프로그래밍화하면 이러한 문제를 해결할수 있다. 사람체세포의 재프로그래밍화과정은 매우 느리게 점차적으로 진행되는 과정으로서 그 효율도 대단히 낮다. 따라서 재프로그래밍화효률을 높이는것이 중요한 문제로 나선다. 재프로그래밍화효률을 높이기 위하여서는 재프로그래밍화시간을 단축하고 얻어지는 세포집락의 수를 늘여야 한다.

여러가지 저분자물질을 첨가하면 재프로그래밍화효률을 높일수 있다. 우리는 사람체세포의 재프로그래밍화효률을 높이는 몇가지 저분자물질들에 대하여 연구하였다.

재료와 방법

재료로는 사람섬유아세포(hFib)와 사람지방줄기세포(hADSC), 4가지 전사인자(Oct4, Sox2, C-Myc, Klf4)유전자가 재조합된 렌티비루스운반체, MEF(흰생쥐태아섬유아세포)영양층을 리용하였다.

시약으로는 폴리브렌, 젤라틴, 중성프로테아제, ESC배양액, DF12배양액, 소태아혈청(FBS), 비타민C, 디메틸sulfoxide(DMSO), 혈관내피증식인자(VEGF), 덱사메타존(Dex), 발프로산(VPA), 비펩수아미노산(NEAA), 혈청대용물(SR), 글루타민(Gln), 5'-아자씨티딘C(5'-azaC)를 리용하였다.

주요설비로는 무균조작대, 원심분리기, 탄산가스배양장치, 멸균기, 극동기, 전자천평, 액체질소보관함 등을 리용하였다.

먼저 0.1% 젤라틴으로 T75병을 약 10min동안 처리하였다. 체세포가 왕성하게 자랄 때까지 방치했다가 0.25% 트립신으로 처리하고 15mL들이 원심분리관에 수집하여 세포수를 측정한 다음 실험에 필요한 양만큼의 세포량을 취하였다. 감염배수를 여러가지로 하고 매 유전자들이 똑같은 양으로 들어가도록 하는데 필요한 비루스운반체량을 계산하고 각종 비루스운반체를 15mL들이 원심분리관에 넣고 혼합한 다음 려과막(구멍크기 0.45 μ m)으로 려과하여 세포조각을 비롯한 잡물질들을 제거하였다. 1×10^5 개의 세포를 이미 려과한 비루스운반체용액에 넣고 최종체적이 5mL 되게 하였다. 끝으로 5 μ L의 폴리브렌을 넣고 잘 혼합한 다음 젤라틴을 입힌 T75병에 옮겨 흔들어주고 정온기(37 $^{\circ}$ C)에서 하루밤동안 배양하였다. 감염처리 24~72h후 감염된 세포들을 소화하여 MEF영양층우에 접종하였다. 다음날 DMEM

배양액을 ESC배양액(20% KOSR, 1mmol/L L-Gln, 0.1mmol/L β -메르캅토에타놀, 1% NEAA, 4ng/mL bFGF)으로 교체하고 계속 배양하였다. 2일에 한번씩 배양액을 교체[2, 3]하였다.

감염세포를 영양층수에 접종한 날부터 시작하여 약 7일동안 저분자물질을 각이한 농도로 첨가하였다. 리용한 저분자물질은 덱사메타존(Dex), 발프로산(VPA), 5'-아자씨티딘 C(5'-azaC)[1]였다.

재프로그래밍화효율은 접종한 세포수에 대한 형성된 집락의 수로 평가하였다.

결과 및 론의

우리는 우선 배양액의 종류와 렌티비루스운반체에 감염된 세포의 접종수에 따르는 재프로그래밍화효율을 보았다.

배양액의 종류에 따르는 사람체세포의 재프로그래밍화효율은 표 1과 같다.

표 1. 배양액의 종류에 따르는 사람체세포의 재프로그래밍화효율

배양액종류	집락출현일수/d		집락수/개		재프로그래밍화효율/%	
	hFib	hADSC	hFib	hADSC	hFib	hADSC
DF12+FBS	0	20.3	0	4.5	0	0.000 05
ESC배양액	15.1*	7.5*	20.0*	120.5*	0.002*	0.012*

* $p < 0.05$, $n=5$, 1×10^5 개 세포, MEF영양층

표 1에서 보는바와 같이 DF12+FBS배양액을 리용하면 hFib를 출발세포로 하는 경우 집락이 출현하지 않았지만 hADSC를 출발세포로 하는 경우에는 몇개의 집락이 출현하였다. 그러나 모두 비전형적인 집락들이었다. 한편 ESC배양액을 리용하면 hADSC를 출발세포로 하는 경우 hFib의 경우보다 집락출현일수가 짧았고 집락수도 많았으며 따라서 재프로그래밍화효율도 높았다.

감염세포의 접종수에 따르는 사람체세포의 재프로그래밍화효율은 표 2와 같다.

표 2. 감염세포의 접종수에 따르는 사람체세포의 재프로그래밍화효율

접종수/개	집락출현일수/d		집락수/개		재프로그래밍화효율/%	
	hFib	hADSC	hFib	hADSC	hFib	hADSC
1×10^4	18.5	10.4	2	7.4	0.002	0.000 74
1×10^5	15.1	7.5*	20.0*	120.5*	0.002	0.012*
1×10^6	14.7	7.0*	28.5*	142.5*	0.000 1*	0.000 48*

* $p < 0.05$, $n=5$, MEF영양층

표 2에서 보는바와 같이 1×10^5 개 세포를 접종할 때 1×10^4 개 세포를 접종하였을 때보다 집락출현일수가 짧았으나 1×10^6 개를 접종하였을 때와는 유의한 차이가 없었다. 또한 hFib에 비하여 hADSC인 경우 재프로그래밍화효율이 높았다.

다음으로 영양층의 종류에 따르는 사람체세포의 재프로그래밍화효율을 보았는데 그 결과는 표 3과 같다.

표 3에서 보는바와 같이 1~3대(P1~P3) MEF를 리용할 때 대조보다 재프로그래밍화효율이 유의하게 높았다. MEF의 세대회수가 많아질수록 재프로그래밍화효율은 점차 떨어지는 경향을 보였지만 유의한 차이는 인정되지 않았다. 한편 hFib를 영양층으로 리용하는 경우에는 재프로그래밍화효율이 4대(P4)의 MEF를 리용할 때와 유사하였다.

표 3. 영양층의 종류에 따르는 사람체세포의 재프로그래밍화효율

종류	집락출현일수/d		집락수/개		재프로그래밍화효율/%	
	hFib	hADSC	hFib	hADSC	hFib	hADSC
MEF(P1)	15.1*	7.5*	20.0*	120.5*	0.002*	0.012*
MEF(P2)	15.8*	7.8*	19.8*	120.1*	0.001 9	0.012*
MEF(P3)	16.3*	8.0*	19.7*	119.7*	0.001 9	0.011 9*
MEF(P4)	21.4	12.5	14.5	104.7	0.001 4	0.010 5*
hFib(P1~P3)	22.1	12.2	13.8	103.5	0.001 4	0.010 4*

* $p<0.05$, $n=5$, 1×10^5 개 세포

재프로그래밍화에 미치는 요인들의 영향을 고려한 기초우에서 우리는 재프로그래밍화효율을 실질적으로 높이기 위한 연구를 하였다.

사람체세포의 재프로그래밍화효율을 높이기 위하여 이미 써오던 4가지의 전사인자유전자 외에 두가지 전사인자유전자 즉 Lin28과 Nanog를 더 첨부하여 6가지 전사인자유전자를 사용하였을 때의 재프로그래밍화효율을 보았다. 전사인자유전자의 가지수에 따르는 사람체세포의 재프로그래밍화효율은 그림 1과 같다.

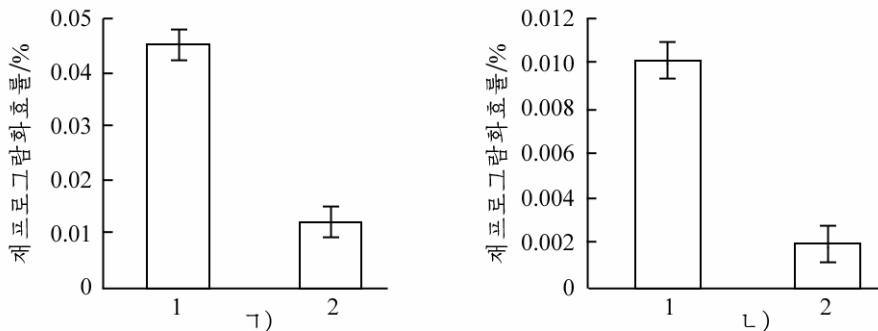


그림 1. 전사인자유전자의 가지수에 따르는 사람체세포의 재프로그래밍화효율

ㄱ) hADSC, ㄴ) hFib; 1-6가지 유전자, 2-4가지 유전자

그림 1에서 보는바와 같이 4가지 유전자를 리용하여 재프로그래밍화하였을 때보다 Lin28과 Nanog를 더 첨부하여 재프로그래밍화하였을 때 1×10^5 개의 초기세포에 한하여 재프로그래밍화효율이 유의하게 높아졌다. ($p<0.05$) 같은 조건에서 hADSC의 재프로그래밍화효율은 hFib의 경우보다 유의하게 높았다. ($p<0.05$) 이것은 Oct4와 Sox2가 과잉발현된 결과 그것들이 자동조절경로를 통하여 Nanog의 발현을 충분히 유도하였기때문이라고 볼수 있다.

다음으로 우리는 몇가지 저분자물질이 사람체세포의 재프로그래밍화에 미치는 영향을 보았다. 우리는 4가지 유전자로 사람체세포를 재프로그래밍화하는것을 대조로 하고 대조에 대하여 저분자물질들을 처리하여 재프로그래밍화효율의 높임배수를 보았다. 선정한 저분자물질들은 DNA메틸트랜스페라제저해제의 일종인 5'-azaC와 인공합성한 당질성코르티코이드인 Dex, VPA 등이다.

5'-azaC의 농도에 따르는 hFib의 재프로그래밍화효율은 그림 2와 같다.

그림 2에서 보는바와 같이 사람섬유아세포(hFib)의 재프로그래밍화효율을 높이는 5'-azaC의 작용은 뚜렷한 농도의존성을 나타내었다. 5'-azaC의 농도가 $8 \mu\text{mol/L}$ 가 될 때 그 효과가 가장 뚜렷하게 나타났는데 결과 재프로그래밍화효율은 약 8배정도 높아졌다.

저분자물질이 체세포의 재프로그래밍화효율을 높인다는것은 결국 이 물질들이 ESC관련

유전자들을 증가조절하고 체세포특이적유전자들을 감소조절한다[4, 5]는것을 보여준다.

VPA의 농도에 따르는 hFib의 재프로그래밍화효율은 그림 3과 같다.

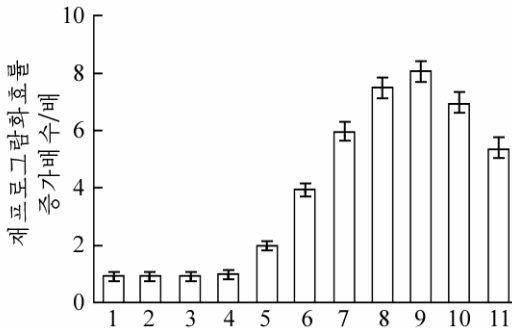


그림 2. 5'-azaC의 농도에 따르는 hFib의 재프로그래밍화효율

1-11은 5'-azaC의 농도가 각각 80, 100, 300, 600, 900, 3 000, 6 000, 7 000, 8 000, 10 000, 12 000nmol/L인 경우

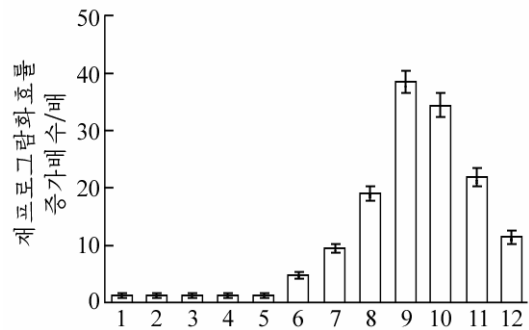


그림 3. VPA의 농도에 따르는 hFib의 재프로그래밍화효율

1-12는 VPA의 농도가 각각 50, 75, 100, 250, 500, 750, 1 000, 2 000, 3 000, 4 000, 5 000, 6 000μmol/L인 경우

그림 3에서 보는바와 같이 hFib의 재프로그래밍화효율을 높이는 VPA의 작용 역시 뚜렷한 농도의존성을 나타내었다. 특히 VPA의 농도가 3mmol/L가 될 때 그 효과가 가장 뚜렷하게 나타났는데 결과 재프로그래밍화효율이 약 40배정도 높아졌다. 이 두 물질의 농도가 한계값을 넘어서면 세포에 대하여 강한 독작용을 나타내었고 결국 효율높임배수도 급격히 떨어졌다.

여러가지 저분자물질들을 최적농도로 첨가하였을 때 저분자물질종류별 재프로그래밍화효율은 그림 4와 같다.

그림 4에서 보는바와 같이 VPA, 5'-azaC, 5'-azaC+Dex의 경우 재프로그래밍화효율이 각각 40, 8, 20배 높아졌다. Dex(1μmol/L)는 단독으로는 효과가 매우 낮았지만 5'-azaC와 함께 처리하면 5'-azaC의 효과를 2.5배이상 더 높였다.

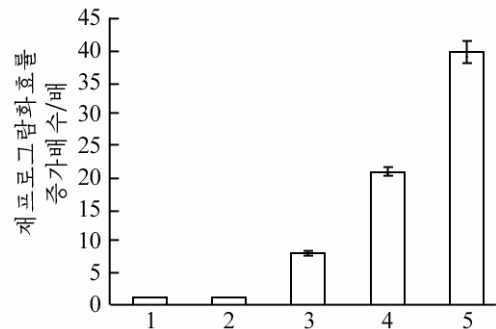


그림 4. 저분자물질종류별 재프로그래밍화효율
1-대조, 2-Dex, 3-5'-azaC, 4-5'-azaC+Dex, 5-VPA

맺는 말

hADSC를 리용하면 hFib를 리용할 때보다 재프로그래밍화효율이 5배이상 높아진다.

6가지 유전자를 리용하면 4가지 유전자를 리용할 때보다 재프로그래밍화효율이 3배이상 높아진다.

5'-아자씨티딘C(5'-azaC)는 농도가 8μmol/L일 때 산생효율을 8배이상 높인다.

발프로산(VPA)은 농도가 3mmol/L일 때 산생효율을 40배이상 높인다.

덱사메타존(Dex)은 5'-azaC의 재프로그래밍화효율높임효과를 2.5배 더 높인다.

참 고 문 헌

- [1] D. W. Huangfu et al.; Nat. Biotechnol., 26, 7, 795, 2008.
- [2] H. N. Kazim et al.; Nature Protocols, 6, 1, 78, 2011.
- [3] I. H. Park et al.; Nature Protocols, 3, 7, 1180, 2008.
- [4] M. Hosoya; Islets, 4, 3, 249, 2012.
- [5] D. W. Huangfu et al.; Nat. Biotechnol., 26, 7, 795, 2008.

주체107(2018)년 1월 5일 원고접수

Improving Efficiency of Generating Human Induced Pluripotent Stem Cells by Low-Molecular Substance

Paek Chol Min, Kim Kang

The reprogramming efficiency with hADSC is over 5 times than that with hFib.

The reprogramming efficiency with 6 genes is over 3 times than that with 4 genes.

5'-azaC increases reprogramming efficiency in concentration-dependent manner, with concentration of about 8 μ mol/L.

VPA increases reprogramming efficiency in concentration-dependent manner, with concentration of about 3mmol/L.

Dexamethasone(1 μ mol/L) improves the effect of 5'-azaC 2.5 times when they are used in combination, although dexamethasone alone hasn't a significant effect.

Key words: human induced pluripotent stem cells, low-molecular substance, concentration-dependent manner