

세포외 미세환경 (Matrigel Mattress) 기반의 wnt 신호 조절을 이용한 줄기세포 유래 심근세포 분화기술

안전성평가연구소

김기석, 이수정, 이향애, 최한석

■ 권리사항

출원번호: 10-2016-0075149

출원일: 2016-06-16

■ 적용가능분야 및 목표시장

신약개발 분야 세포치료제 및 분화심근세포를 활용한 cell-based assay 시장

■ 기술 개요

- 줄기세포와 조직공학 연구에서 줄기세포의 증식 및 분화를 조절하는 것은 매우 중요한 연구주제이며, 줄기세포의 증식과 분화를 조절하기 위해 전 세계 연구자들은 지금까지 성장인자, 호르몬, 사이토카인 등을 주입하는 다양한 화학적 방법을 개발해옴
- 그러나 화학적인 방법은 효율에 한계가 있고 매우 비싸다는 문제점이 제기됨. 따라서 세포배양면의 물리적 특성에 따라 줄기세포의 거동이 달라진다는 점에 착안하여, 세포외 미세 환경을 모방할 수 있는 물리적 구조를 화학적 분화 방법과 결합해 줄기세포의 증식·분화 효율을 높이고자 함

■ 기술의 특징점

- 이에 연구진은 세포 외 미세 환경을 모사할 수 있는 Matrigel을 기반으로 하여, wnt signaling을 이용한 줄기세포 유래 심근세포 분화법을 개발함
- 즉, 분화 시작 단계에서 세포외 3차원 미세 환경을 구성해준 후 wnt 신호를 활성화 및 억제할 수 있는 small molecule들을 처리해 줌. 이는 화학적 방법에 3차원 물리적 환경을 더한 방법으로 배아 발생 과정 중 중요한 세포 신호인 wnt signaling 작용을 도와 안정적인 심근세포 분화 성공률 (92%)을 보여줌
- 최적의 물리적, 화학적 조합을 통해 세포의 화학적 신호 전달을 용이하게 함으로써, 중배엽으로의 유도를 현저히 촉진하고 심근세포로의 분화를 매우 효과적으로 유도할 수 있음 (84%)
- 본 연구진이 개발한 세포 외 미세 환경 기반의 wnt 신호 조절 심근세포 분화법은 기존의 평평한 세포 배양과는 달리 세포 간의 결합력이 높아지면서 부착, 이동, 증식이 증가되는 것으로 보이며, 심근세포 특이적인 정렬구조가 보임. 또한 Matrigel mattress 기반 심근세포 분화율이 기존에 비해 약 70% 향상된 것을 확인함

■ 기술 세부내용

- 줄기세포의 심근세포 분화에 필수적인 growth factor 이외에 세포외 미세환경이 줄기세포의 증식, 이동, 분화에 영향을 주어 분화 효율을 높인다는 연구 보고들이 있으며, 본 연구진은 3차원 미세 환경에서의 wnt 신호 조절을 이용한 분화 프로토콜 (GiMWi)을 개발함
- 세포외 미세 환경 (Extracellular Matrix (ECM)) 을 모사할 수 있는 Matrigel을 기존 GiWi 분화에 도입하여, 세포의 점착 환경을 2차원에서 3차원으로 만들어 줌으로써, 3차원 미세 환경에서의 심근세포 분화 효율도를 높임

Zhang J et al. Circ Res. 2012

MAB protocol



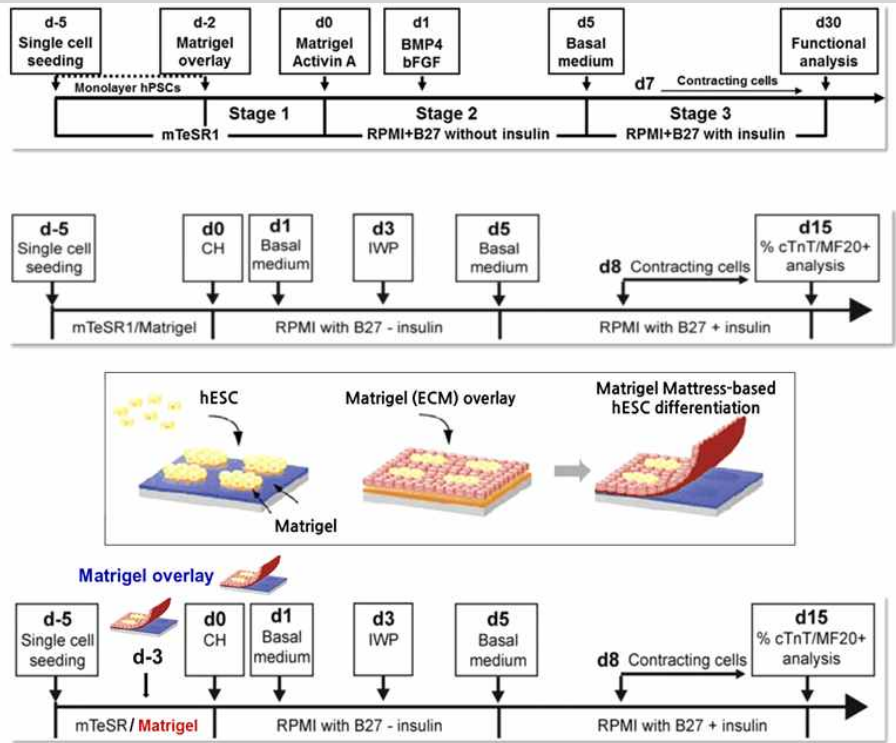
Lian X et al. Stem Cells. 2013

GiWi protocol



New Matrigel Mattress

GiMWi protocol



- GiMWi 분화방법: 분화 2일 전 mTeSR1 배지에 Matrigel를 추가하여 12-24시간 배양후 mTeSR1 배지로 분화 당일까지 안정적으로 유지시킴. 분화 당일, H9 세포주를 mTeSR1 배지에서 Matrigel이 포함된 insulin이 들어가지 않은 RPMI/B-27 배지로 옮겨주며 wnt signaling을 활성화시켜줄 수 있는 CHIR99021 (10 μ M)을 추가해줌. 분화 1일 이후 2일간 insulin이 들어가지 않은 RPMI/B-27 배지에서 유지시켜주며 분화 3일째 wnt signaling을 억제시켜줄 수 있는 IWP4 (5 μ M)를 추가해 2일간 배양함. 그 후 insulin이 들어간 RPMI/B-27 배지로 2일에 한 번씩 갈아주어 세포를 유지시키며 분화 9일경 자발적인 beating여부를 관찰함
- Extracellular Matrix Sandwich 방식을 도입한 GiMWi 방법의 분화 성공률은 92.3%로 기존의 MAB 방법 (20%)과 GiWi 방법(62.5%)에 비해 분화 성공률이 현저히 높아졌음을 확인하였으며, 안정적인 심근세포 분화 성공률을 바탕으로 Extracellular Matrix Sandwich 방식의 GiMWi 분화법을 고효율 분화기술로 확보함
- MAB, GiMWi 분화법 모두 분화 30일경 beating rate이 45 bpm으로 수렴하였으나, 분화 성공률, 분화에 필요한 기간, beating이 시작되는 시점을 고려하였을 때 높은 분화성공률, 짧은 분화기간, 빠른 박동능 시점을 보이는 GiMWi법이 가장 분화 효율이 높음을 확인함
- 3차원 미세 환경에서의 고효율 GiMWi 분화법 및 심근세포 대사를 이용한 고순도 정제 기술을 도입 후 FACS analysis를 통해 심근세포 특이적 마커인 cTnT의 발현여부를 확인한 결과, 84% 가량의 심근세포 특이적 마커가 검출됨
- GiMWi 분화법 기반 분화 심근세포에서 심근 특이적 마커 α -actinin, Myosin Heavy Chain(MYH)의 높은 발현율을 확인함
- 3차원 미세 환경에서의 GiMWi 분화법과 2차원에서의 GiWi 분화법에서 심근 특이적 마커 cTnT의 발현 양상을 확인한 결과 Matrigel 기반의 GiMWi 분화법에서 심근세포 특이적인 정렬구조를 확인할 수 있었음

■ 기술완성도(TRL) 3 단계(실험실 규모의 기본성능 검증)