

1. 표지

<p>2012M3A9C 6050124</p>	<p>역분화 줄기세포의 기전 연구를 위한 단일세포 내 역분화 인자 나노 전달 기술 개발 최종보고서</p>	<p>역분화 줄기세포의 기전 연구를 위한 단일세포 내 역분화 인자 나노 전달 기술 개발</p>	<p>보안 과제(○), 일반 과제() / 공개(○), 비공개() 바이오·의료기술개발사업 제5차 연도 최종보고서</p>
			<p></p>
			<p>역분화 줄기세포의 기전 연구를 위한 단일 세포 내 역분화 인자 나노 전달 기술 개발 최종보고서</p>
			<p>2017. 11 . 17 .</p>
			<p>주관연구기관 / 고려대학교 산학협력단 협동연구기관 / 한국과학기술원</p>
			<p>과 학 기 술 정 보 통 신 부 (전문기관) 한국연구재단</p>
<p>2017 과 학 기 술 정 보 통 신 부 한 국 연 구 재 단</p>			

2. 제출문

제 출 문

과학기술정보통신부장관 귀하

‘역분화 줄기세포의 기전연구를 위한 단일세포내 역분화 인자 나노전달기술 개발’ (연구개발 기간 : 2012. 10. 01.~ 2017. 09. 30.) 과제의 최종보고서 1부를 제출합니다.

2017 . 11 . 17 .

주관연구기관명 :	고려대학교 산학협력단	(대표자)	고제상 (인)
협동연구기관명 :	한국과학기술원	(대표자)	신성철 (인)
참여기관명 :		(대표자)	(인)

주관연구기관책임자: 최연호

협동연구기관책임자: 박지호

참여기관책임자:

과학기술정보통신부 소관 과학기술분야 연구개발사업 처리규정 제35조에 따라 최종보고서 열람에 동의합니다.

3. 보고서 요약서

보고서 요약서

과제 고유 번호	2012M3A9C60 50124	해당 단계 연구 기간	2015.10.01.~2 017.09.30	단계구분	2/2
연구사업명	중사업명	바이오·의료기술개발사업			
	세부사업명	세포재생기술개발사업			
연구과제명	대과제명	나노기술 기반의 선택적 역분화 인자전달을 통한 역분화 줄기세포 제작 및 기전연구			
	세부과제명	역분화 줄기세포의 기전연구를 위한 단일세포내 역분화 인자 나노 전달기술 개발			
연구책임자	최연호	해당단계 참여 연구원 수	총: 7명 내부: 7명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 256,000 천원 기업: 천원 정부 외: 천원 계: 256,000 천원
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 8명 내부: 8명 외부: 명	총 연구개 발비	정부: 736,000 천원 기업: 천원 정부 외: 천원 계: 736,000 천원
연구기관명 및 소속 부서명	고려대학교 보건과학대학 바이오융합공학과			참여기업명	
국제공동연구 위탁연구	상대국명: 연구기관명: 한국과학기술원(KAIST)			상대국 연구기관명: 연구책임자: 박지호	
요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수	

줄기세포 연구의 실용화를 위해 안전하고 효율적인 역분화 줄기세포 제작에 대한 원천기술 확보가 필요함. 본 연구에서 나노 인젝션 기술을 통해 세포에 유전물질을 전달하는 기술을 고안하고 시스템을 확립함. 이를 토대로 정량적으로 유전물질을 세포에 전달함. 또한 기존의 방식으로는 알 수 없던 정량적인 유전자 차이에 따른 단일 세포 단위의 유전자 발현 차이를 확인함. 이에 따른 발현에 최적화된 조건을 찾고 단일 세포의 역분화를 위한 단일 세포 내 정량적인 역분화 인자 전달을 통해 성공적으로 성상아교세포로의 직접 교차 분화를 유도함. 또한 나노 막대 입자를 이용하여 바이러스 도움 없이 역분화 인자를 안전하고 효율적으로 체세포 내로 전달하는 나노전달기술을 개발함. 이에 따라 다양한 나노기술을 통해 효율적인 비 바이러스 성 방법으로 특정 기관세포 제작 방향을 제시함.

4. 국문 요약문

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>역분화 줄기세포 분야는 그 시장의 규모와 성장속도가 매우 빠르게 증가하고 있음. 그러나 실용화를 위해서는 안전하고 효율적인 역분화 줄기세포의 제작에 대한 원천 기술 확보가 절실함. 이에 본연구진에서는 단일 세포내 역분화 인자를 선택적으로 전달하기 위해 나노 인젝션 시스템을 구축하고 이를 통한 다양한 역분화 인자를 단일 인간 체세포 내 전달 능력을 평가함. 이후 시스템을 최적화 한 후 역분화 인자를 단일 체세포에 전달하여 단일 체세포의 역분화 과정에서 나타나는 기전을 분석함. 또한 단일 체세포에 전달되는 양에 따른 유전자의 발현차이를 비교하여 향후 안전한 특정기관세포를 생산하기 위한 최적의 정량적인 유전물질의 양을 확인함.</p>				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 나노 인젝션을 통한 인자의 유전자 전달 방법 확립 및 세포 내 발현 확인 :모델인자의 나노 인젝터를 통한 전달방법 확립 및 세포 내 유전자 발현 평가 - 단일 세포 내 발현 유전자의 정량적 측정 :나노 인젝션을 통해 단일 세포에 들어가는 유전자의 양을 정량적으로 조절 성공 - 나노 인젝션을 통한 단일 동물 체세포 내 정량적 역분화 인자 전달 조건 최적화 :동물체세포의 역분화 시 체세포 특이마커와 전능성 마커 발현변화 조사 :전달 기술로 분화된 세포의 안전성 확인 및 기능성 세포로의 분화 유도 - 단일 체세포의 직접 교차 분화 과정 실시간 관찰 :단일 체세포에 선택적 전달을 통한 성상아교세포로의 직접 교차 분화 유도 :역분화 인자가 전달된 단일 체세포에서 나타나는 초기 발현 양상 확인 :신경세포로의 직접 교차 분화 과정에서 나타나는 유전자 발현 양상 확인 - 직접 교차 분화 과정의 정량적 기전 분석 :정량적으로 전달된 양에 따라 나타나는 단일세포 단위의 유전자 발현양상 확인 : 유전자 발현 양상 차이에 따른 성상아교세포로의 분화 시 나타나는 유전자 발현 경로 확인 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> -단일 세포 내 안정적이고 정량적인 유전자 전달을 통하여 유전자 형질 주입 조건 최적화 -나노 인젝션을 통한 단일 세포 단위 정량적 유전자 발현 양상 분석 방법 제시 -단일 세포 내 정량적인 비 바이러스성 역분화 인자 전달을 통하여 역분화 현상이 일어나는 조건을 분석 및 최적화하여 효율적인 비 바이러스성 역분화 제작 방향 제시 -정량적 역분화 인자 전달 및 단일 세포 내 역분화 인자 발현을 정량적으로 평가함으로써, 역분화 과정의 기전 규명에 대한 원천기술 개발이 될 것으로 기대됨 				
<p>핵심어 (5개 이내)</p>	<p>단일세포</p>	<p>나노인젝션</p>	<p>직접교차분화</p>	<p>정량적</p>	<p>신경세포</p>

5. 영문 요약문

< SUMMARY >

Purpose & Contents	<p>In the field of induced pluripotent stem(iPS) cell, the size of the market is growing very rapidly and its growth rate is also remarkable. However, it is urgent to secure original technology for safe and efficient production of iPS cells for practical use. In this study, we constructed Nanoinjection system to selectively transfer reprogramming factors in a single cell, and evaluated transfer ability of various reprogramming factors in a single human somatic cell. After optimizing the system, we transferred the reprogramming factors into a single somatic cell, and analyzed the mechanism of the reprogramming process in a single somatic cell. In addition, we compared the differences in the expression of genes according to the amounts transferred to a single somatic cell, and confirmed the optimal quantitative amount of genetic materials to produce safe lineage specific cells in the future.</p>				
Results	<ul style="list-style-type: none"> - Establishment of gene transfer method of factors through Nanoinjection and identification of gene expression : Establishment of transfer method of the model factor through Nanoinjector and evaluation of gene expression - Quantitative measurement of expression gene in a single cell : Quantitative control of the amount of genes in a single cell through Nanoinjection - Optimization of quantitative reprogramming factors transfer conditions in single animal somatic cells by Nanoinjection : Research changes in somatic cell specific markers and pluripotent markers expression during the differentiation of animal somatic cells : Safety confirmation of the differentiated cells by the transfer method and induction of differentiation into functional cells - Real-time observation of the direct differentiation process of single somatic cells : Induction of direct conversion into astrocytes by selective transfer to single somatic cells : Identification of early expression patterns in single somatic cells which reprogramming factors transferred : Identification of gene expression patterns in direct conversion into neurons - Quantitative mechanism analysis of direct conversion process : Identification of gene expression patterns by single-cell unit according to the amounts transferred quantitatively : Identification of gene expression pathways during differentiation into astrocyte with different gene expression patterns 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> - Optimize gene transfection conditions through stable and quantitative gene transfer in single cells - Quantitative analysis of gene expression patterns by single-cell unit through nano-injection - Analyzing and optimizing the conditions under which reprogramming occurs through the transfer of quantitative non-viral reprogramming factors in a single cell, suggesting efficient non-viral reprogramming - Expect the development of original technology for the identification of the reprogramming mechanism by quantitative evaluation of quantitative reprogramming factor transfer and expression of reprogramming factors in a single cell 				
Keywords	Single Cell	Nano-injection	Direct conversion	Quantitative	Neural Cell

6. 영문 목차

< CONTENTS >

1. The overview of research
2. The status of technology development
3. Result of the research
4. The achievement and contribution
5. The utilization plan of research
6. Technical information of overseas
7. Security level of research
8. Research facilities
9. Performance of safety measures in laboratory
10. Representative results of research
11. ETC
12. References

7. 본문 목차

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 국내외 기술 개발 현황
3. 연구 수행 내용 및 성과
4. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도
5. 연구개발성과의 활용 계획
6. 연구 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보
7. 연구개발성과의 보안등급
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전 조치 이행 실적
10. 연구개발과제의 대표적 연구 실적
11. 기타 사항
12. 참고 문헌

8. 본문

제1장. 연구개발과제의 개요

1. 연구개발 목적

단일 세포내 역분화 인자를 선택적으로 전달하기 위해 나노 인젝션 시스템을 통한 역분화 인자의 단일 인간 체세포내 전달능력 평가, 최적화를 통해 역분화 인자가 전달된 단일 체세포의 직접 교차 분화 기전을 분석하여, 향후 안전한 기관특이세포로의 분화를 유도하여 생산하기 위한 실용적 기술개발을 유도하는 것을 목표로 한다.

2. 연구개발의 필요성

역분화 줄기세포를 통한 ‘만능 질병 치료제’의 개발에 전 세계의 귀추가 주목되는 데에 반해 국내의 역분화 줄기세포 제작과 관련된 원천 기술 개발은 매우 미미한 수준이다. 기존의 제작방법은 잘 알려져 있으나, 그것의 제작 과정 기전에 관하여서는 명확히 알려진 바가 없었다.

3. 연구개발 범위

나노 인젝션을 통한 단일 동물 체세포 내 전달능력 평가

- 모델인자의 나노 인젝터를 통한 전달방법 확립 및 세포내 유전자 발현 평가
- 역분화 인자의 종류, 조합 및 양, 세포내 주입 부위 및 시간 최적화
- 동물체세포의 역분화시 체세포 특이 마커와 전능성 마커 발현 변환 조사

단일 체세포의 역분화 과정과 직접 교차 분화 기전 분석

- 실시간 역분화 관찰을 통한 체세포 특이마커와 신경 특이 마커의 발현 양상 조사

단일 인간 체세포 내 나노 기술을 통한 역분화 인자 전달 방법 확립

- 역분화 인자의 선택적 전달 평가 및 정량적 전달을 통한 세포 내 역분화 인자 발현 최적화
-

제2장. 국내외 기술 개발 현황

- 독일 University of Bielefeld의 Matthias Simonis은 2017년 1월 세포에 외부 분자를 주입할 때 nanopipette을 이용하고 분자 전달에 electrophoretic forces을 사용하여 세포 손상을 최소화하는 방법을 제시하여 Scientific Reports에 발표함.
- 서울 동국대학교의 유준상은 2017년 7월 특정 전자기장에서 유도된 AuNP 자극에 의한 생체 내 도파민 성 신경 세포로의 직접교차분화를 이용하여 쥐 파킨슨 병 모델에서 증상을 효율적으로 완화시키는 연구를 하여 Nature Nanotechnology에 발표함

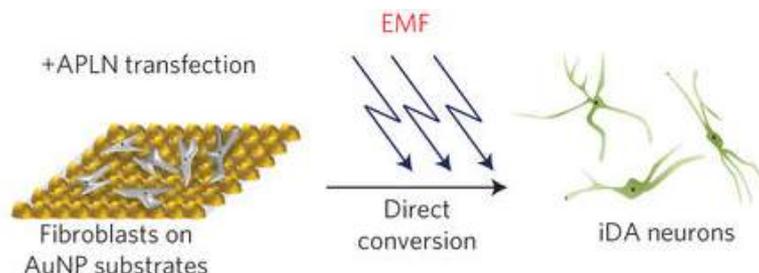


그림 1 전자기장 유도 AuNP 자화를 사용하여 fibroblast를 iDA 뉴런으로 직접교차 분화시키는 과정을 보여주는 모식도

- 중국 Ji'nan University의 Xiao-Fei Yang은 2017년 1월 virus없이 injection을 통해 살아있는 쥐의 간 세포를 인슐린 생산 세포로 생체 내에서 직접분화시킴으로써 당뇨병 치료에 대한 새로운 접근법을 제시하는 연구를 해서 Endocrine Journal에 발표함.

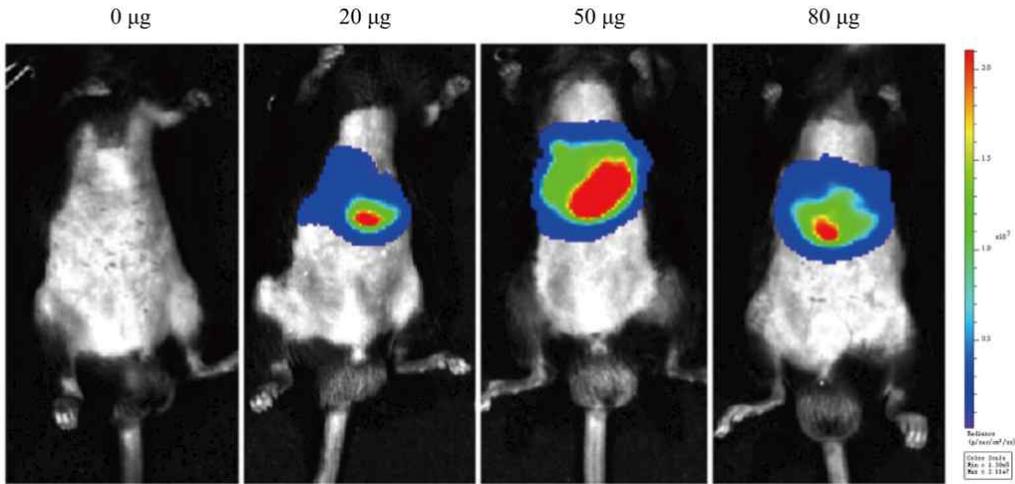


그림 2 형질 감염 24 시간 후 주입한 플라스미드 양에 따른 감염 분포 이미지

- 일본의 교토대 유도만능줄기세포 연구소는 파킨슨병 환자의 세포에서 유도만능줄기세포를 도파민을 형성하는 신경세포로 만든 후 뇌에 이식하는 임상연구를 내년 시작한다고 아사히신문이 보도했다. 파킨슨병은 신경계 퇴행성 질환으로 잘 적용될 경우 파킨슨병의 진행을 억제할 수 있을 것으로 기대된다.
- 미국의 캘리포니아 버클리대학 Kevin E. Healy 연구팀과 글래드 스톤연구소 Bruce R. Conklin 연구팀은 유도만능줄기세포를 이용하여 약 0.5mm 크기의 3차원 심장을 만들고 박동하게 만드는데 성공하고 Nature communications에 발표하였다.

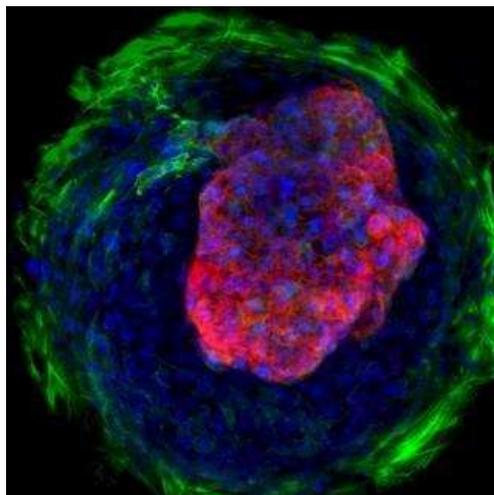


그림 3 유도만능줄기세포를 이용하여 만든 약 0.5mm 크기의 스스로 박동하는 미니 심장

3.1. 1차년도 연구개발수행 내용 및 결과

단일 세포 내 정량적 유전자 전달을 위한 나노 인젝션 시스템 및 그 조작을 위한 광학 시스템을 구축하고 나노 인젝션을 통한 단일 세포 내 모델인자 전달 및 그의 단백질 발현 양상을 평가하는 것을 목표로 실험을 진행함.

3.1.1 Nanoinjection 시스템 구축 및 단일 세포 내 모델인자 전달 방법 확립

▣ 나노선 합성 및 특성 평가와 나노프로브 조작을 위한 광학시스템 구축. 당초 계획과 달리, 나노선 및 나노프로브 기반의 실험을 진행할 경우 하나의 세포에 유전자를 전달 후, 다시 새로운 나노선 sample에 유전자를 부착하여 실험을 진행하여야 했으므로 다량의 세포 실험을 하는 것에 대한 문제점이 파악되었다. 또한, 본 방법을 통해서 정량적 물질전달 측정이 까다로워 유체역학 관점에서 정량적 측정이 가능한 Nanoinjection 시스템 개발방법으로 실험 구상을 전환하였다..(그림1)

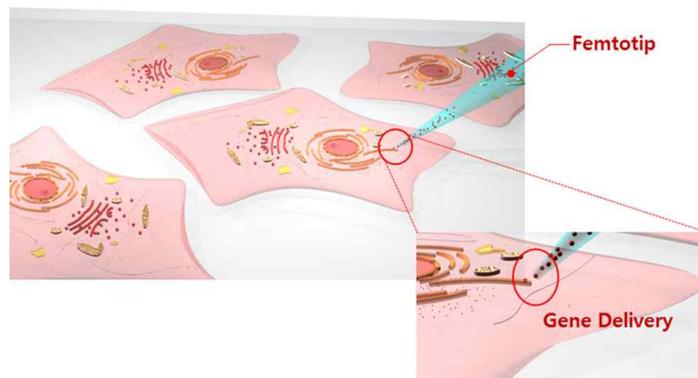


그림 1 Nanoinjector 시스템을 이용한 나노 팁 injection에 관한 모식도

Nanoinjection 시스템에서 세포와의 직접 접촉 부분은 나노단위의 내경을 갖는 팁(Femtotip)을 통해 압력방출 시스템인 Nanoinjector를 이용하여 단일 세포 내 물질전달을 시도하였다. 미세관을 통해 흐르는 점성유체의 유량 결정방정식인 Poiseuille's Law를 이용하여 Nanoinjector에 의해 가해지는 압력을 조절하여 단일 세포 내 물질 주입 총량을 정량적으로 평가할 수 있는 방법을 고안해냈다. (그림2)

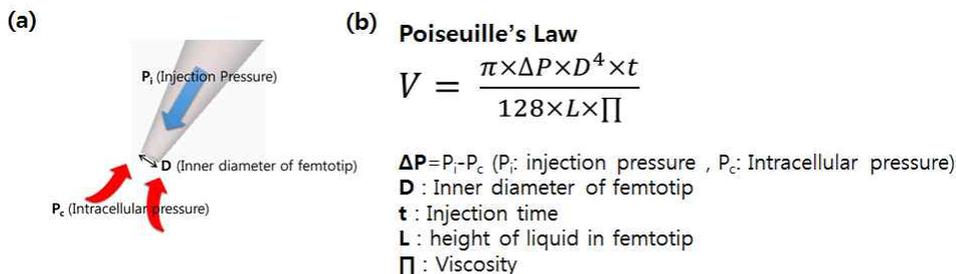


그림 2 (a) Nanoinjection 수행 시 형성되는 세포와 팁 간의 환경을 나타낸 모식도. (b)주입 물질 총량을 계산하기 위한 Poiseuille's Law

3.1.2 Gold nanoparticle 주입을 통한 정량적인 물질 전달을 위한 세포 내부 압력 조사

■ 세포 내압이 Nanoinjector를 통해 가해진 압력보다 크면, tip 내부의 금 나노입자가 세포 안으로 전달되지 않을 것이라 판단하여 압력변수를 조절해가며 실시간으로 단일 세포 내 금 나노입자 전달 여부를 확인하였다(그림3). 실험 초기에는 tip의 내경이 마이크로 단위인 것을 이용하였으며 후기 실험부터는 내경이 500nm인 Femtotip을 사용함. 이는 금 나노 입자가 Dark-field image상에서 산란되어 확인가능하다는 물리적인 현상을 이용하여 진행되었다. Nanoinjector의 설정에 따라 주입압력은 1000hPa부터 100hPa씩 줄여가며 수행하였고 이때 $1\text{hPa}=0.00102\text{N/cm}^2$ 로 계산함. 실험결과 Nanoinjector의 주입압력인 100hPa, 즉 약 0.10N/cm^2 의 압력을 가해준 시점부터 단일 세포 내 금 나노입자가 확인되지 않았으며 이를 통해 세포 내 압력은 약 0.10N/cm^2 로 추정하였다.

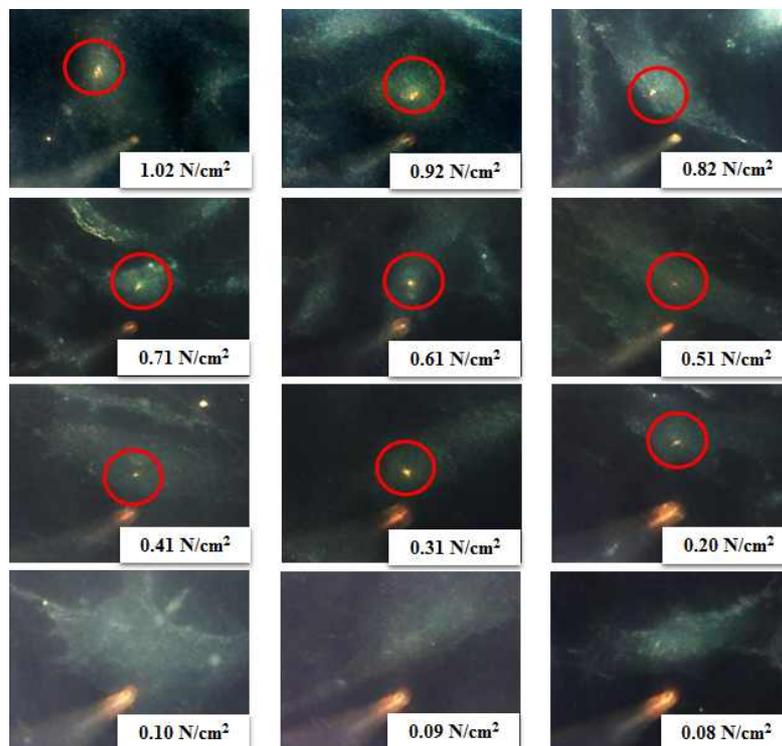


그림 3 Nanoinjection 시스템을 이용하여 단일 Huntington's disease fibroblast (HDF) cell 에 압력을 조절해가며 50nm 금 나노입자를 주입하여 세포 내압을 측정.

3.1.3 Nanoinjection을 통한 모델인자 세포내 전달 및 단백질 발현

■ 나노인젝션 시스템을 이용한 모델인자 전달 방법 확립 및 세포 내 단백질 발현 확인. 금 나노입자 전달을 통한 세포 내압 평가를 이용, pcDNA3.3_eGFP 유전자를 모델인자로 선정하여 단일 세포 내 전달을 시도함. 단일 세포 내 유전자 발현 효율을 확인하고자 Nanoinjector를 이용하여 세포 내 주입압력과 그 압력이 지속되는 시간을 조절하여 총 16가지 조건으로 실험을 진행하였다 (그림4). 120hPa/0.9sec의 주입압력과 주입시간을 설정한 환경에서 세포의 형질전환 효율이 가장 높게 나타났으며 압력에 변화를 주어도 0.3sec의 압력시간을 설정한 환경에서는 세포의 형질전환이 발생하지 않아 이는 소량 전달로 인한 단일 세포 내 유전자 비활성으로 판단하였다.

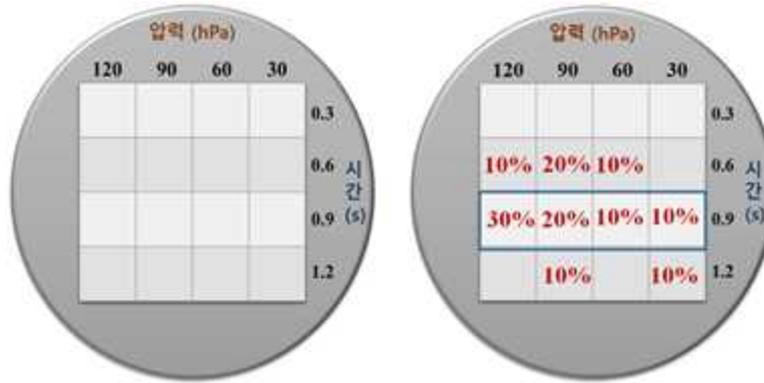


그림 4 Nanoinjection 실험 수행 조건 및 각 조건에 따른 단일세포의 형질전환 발현 효율

■ 형질전환 발현 확인은 Nanoinjection을 통한 모델인자 전달 24시간 경과 뒤 단일 세포 내 녹색형광의 발현 여부를 확인하였다 (그림5). 특정 조건에서 30%의 가장 높은 발현율을 보였으며, 낮은 발현율의 이유로는 유전자의 소량전달로 인한 세포 내 유전자 비활성 및 마이크로 단위의 내경을 가지는 tip이 세포에 물리적인 영향을 끼쳐 세포 손상으로 인한 영향인 것으로 사료되었다.

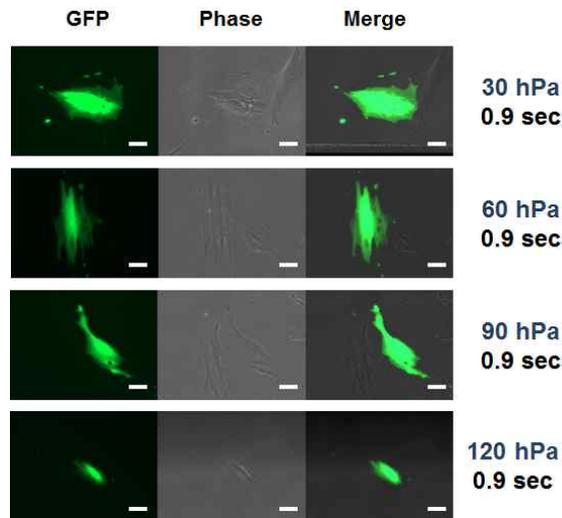


그림5 동일한 주입시간에 주입압력만 변화를 주며 단일세포의 유전자 발현양상을 확인 (Scale bar : 50 μ m)

■ 유전자가 24시간 이내에 발현된 세포는 따로 추적하여 전달된 양에 따라 그 발현 지속률을 확인하였다 (그림6). 이때, 유전자 발현이 가장 오래 지속되는 세포는 유전자 전달 후 최대 96시간까지로 나타났다. 이때, 24시간 내 발현효율이 가장 높았던 120hPa/0.9sec에서의 개체는 단시간 발현율은 가장 높지만 지속률은 떨어지는 것으로 확인되었다. 이에 비해 상대적으로 낮은 압력으로(60hPa~90hPa) 유전자가 전달된 조건에서는 비교적 지속률이 높게 유지되는 것으로 확인되었는데, 이를 통해 Nanoinjector의 주입압력이 세포의 안전성에 미치는 영향을 확인하였다 (그림7)

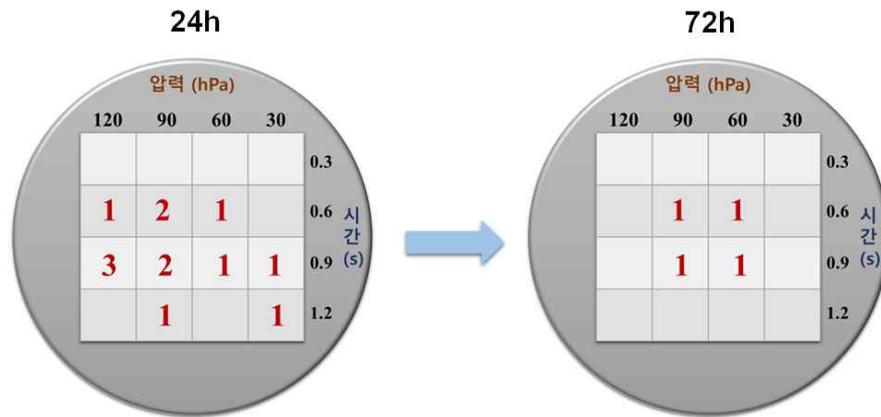


그림 6 유전자 주입 후 24시간 후(좌), 72시간 후(우)의 유전자 발현으로 인해 형광이 확인되는 개체수 변화.

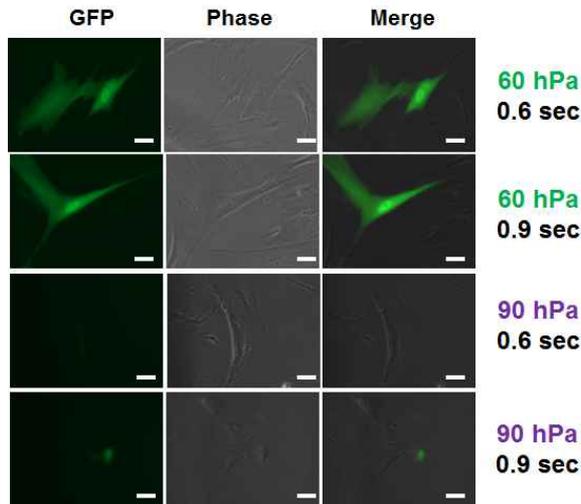


그림7 Nanoinjection 시스템을 이용하여 단일세포 단위로 유전자를 전달한 72시간 후 세포의 유전자 발현 양상. (Scale bar : 50 μ m)

그림7과 같이 유전자 전달이 진행되고 72시간이 지난 뒤 각 조건에서 형광이 유지되는 세포들을 주입압력 조건별로 나누어 봤을 때, 90hPa의 압력으로 유전자를 전달한 세포들 보다 60hPa의 압력으로 유전자를 주입한 경우가 더욱 형광이 뚜렷하게 지속되는 것을 확인하였다. 이를 통해 유전자의 단일세포 내 발현 안정성에 주입 초기 압력이 크게 작용하는 것으로 판단하였다.

3.1.4(위탁) 역분화인자를 세포내로 전달할 수 있는 나노기술 선별

■기존의 유전자 및 단백질 전달용 나노전달기술의 장단점 파악

종류	방법	장점	단점
바이러스	바이러스의 내부에 세포 내로 전달하고자하는	- 유전자 전달 효율이 가장 높음. - 유전자 발현	- 세포의 유전체에 바이러스 유전체가 안정적으로 삽입되기 때문에 유전자의 변이와 같은

	유전자를 삽입하여 세포에 처리함.	지속시간이 김.	문제가 발생할 수 있음. - 역분화 줄기세포의 생성효율이 1 % 미만으로 아주 낮음.
전기투과법	세포막에 일시적으로 전기 충격을 가하여 생성된 통로(pore)를 통해 유전자를 주입시킴.	- 줄기세포 등의 다양한 세포 내로 확실하게 유전자가 주입됨.	- 유전자가 세포 내로 이입되는 효율이 낮고 유전자 발현 기간이 짧은 편임. - <i>in vivo</i> 로 유전자를 직접 전달하는 방법에는 사용할 수 없음. - 전기충격으로 손상된 세포막에 의해 세포의 활성도가 저하됨.
리포좀	유전자와 리포좀을 혼합하여 복합체 형성 후 세포에 처리함.	- 세포의 활성도에 거의 영향을 주지 않음.	- 유전자와 결합한 리포좀의 경우 세포 내 이입경로를 통해 세포 내로 들어가기 때문에 엔도솜 내에 체류하게 되어 세포질로 유전자가 이동하기 어려움.
자성나노입자	자기적 성질을 띠는 나노입자를 유전자와 결합하여 세포에 처리함	- 자성나노입자의 자기적 성질을 이용하여 세포 내로 유전자를 효율적으로 전달할 수 있음.	- 자성나노입자는 세포 내에 이입되었을 때 소화가 되지 않으므로 세포에 장기간 축적될 경우 유전자 발현을 저해할 가능성이 있음.
Optical tweezers(광 집게)	펄스 레이저를 이용해 세포에 구멍을 뚫고 원하는 유전자를 광집게로 전달함.	- 단일세포의 유전자 조작이 가능하고 전달할 유전물질의 양과 전달시간 및 주입위치 조절 가능	- 다량의 세포에 유전자를 전달 할 수 없음.

■ 유전자를 세포 내로 전달하기 위한 기존의 나노기술은 크게 바이러스성 벡터와 비바이러스성 벡터로 나눌 수 있음. 바이러스성 벡터는 유전자 전달 효율이 높다는 장점이 있지만 숙주세포의 유전체에 바이러스 유전체가 안정적으로 삽입되어 돌연변이를 발생시킬 수 있는 가능성이 크고 역분화 줄기세포의 생성효율이 1 % 미만으로 낮다는 단점이 있음. 비바이러스성 벡터를 이용하는 방법으로는 전기투과법, 리포좀, 자성나노입자, 광집게 등 여러 가지 방법이 개발되었음. 전기투과법, 리포좀, 자성나노입자를 이용한 유전자 전달 방법은 상업적으로 생산되어 판매가 되고 있을 정도로 개발이 활발하게 이루어져 있지만 전기투과법은 전기충격으로 세포막이 손상되어 세포 활성도가 저해된다는 단점이 있음. 또한 리포좀은 높은 유전자 전달을 위해 많은 양의 리포좀을 세포에 처리하게 될 경우 전기투과법과 마찬가지로 세포 활성도를 저해시키는 단점이 있으며 다양한 세포에 유전자 전달 효율이 동일하지 않다는 한계점을 가지고 있음. 자성나노입자 같은 경우, 자기장 성질을 이용하여 유전자의 세포 내 이입을 촉진시키는 역할을 하지만 금속나노입자가 세포 내에 이입이 되면 소화되지 않고 장기간 세포 내에 축적되기 때문에 잠재적으로 유전자 발현 과정을 저해시킬 수 있을 뿐만

아니라 세포 독성을 유발할 가능성이 있음. 그리고 최근에 개발된 광집계 방법의 경우 단일 세포에 유전자를 주입하는 기술로 개발이 되었지만 다량의 세포에 유전자를 전달하는데 한계가 있기 때문에 낮은 역분화 효율을 보임. 이와 같은 조사를 바탕으로 본 연구진은 현재 활발하게 개발이 이루어지고 있는 리포솜(상업명: Lipofectamine)을 이용하되 그 단점을 보완하면서 유전자 전달 효율을 극대화시킬 수 있는 새로운 방법을 고안해 냄. 그 방법을 구체적으로 기술해 보면 근적외선 파장의 빛을 흡수 할 수 있는 금 나노막대를 합성하고 잠재적 세포독성을 최소화하기 위해 세포 내 이입을 저해시키는 물질로 금 나노막대 표면을 변형시킴. 그 다음 근적외선 영역대 파장의 빛을 금 나노막대에 조사하여 온열효과를 발생시킴. 이때 발생한 온열효과는 세포막의 인지질 이중층의 유동성에 변화를 주어 기존의 리포솜이 세포 내로 이입되는 기전 이외에 다른 기전을 이용하여 유전자 전달 효율을 극대화시킬 것임. 이 연구방법은 금 나노막대가 직접적으로 세포 내로 이입되지 않고 단지 금 나노막대의 물리적 성질만을 이용하기 때문에 세포 내로 금속나노입자가 이입되었을 때 발생할 수 있는 여러 부작용을 최소화 할 수 있음.

3.1.5(위탁) 모델인자 전달을 위한 나노입자 제조

■ 안전하고 효율적인 유전자 전달을 위하여 금 나노막대를 유전자전달시스템에 응용하기로 하였음. 금 나노막대는 CTAB을 이용하여 합성하였고 그 특성을 자외선/가시광선 분광스펙트럼, 제타 전위측정 장치, 투과전자현미경으로 분석하였음 (그림 8). 레이저 808 nm 장치를 이용하기 위해 808 nm 근처에서 파장을 흡수할 수 있는 금 나노막대를 합성하였으며 금 나노막대의 제타전위는 25 mV로 측정되었음. 실제 합성된 모양 및 크기는 투과전자현미경을 통해 측정하였으며 비율은 약 4:1이었음

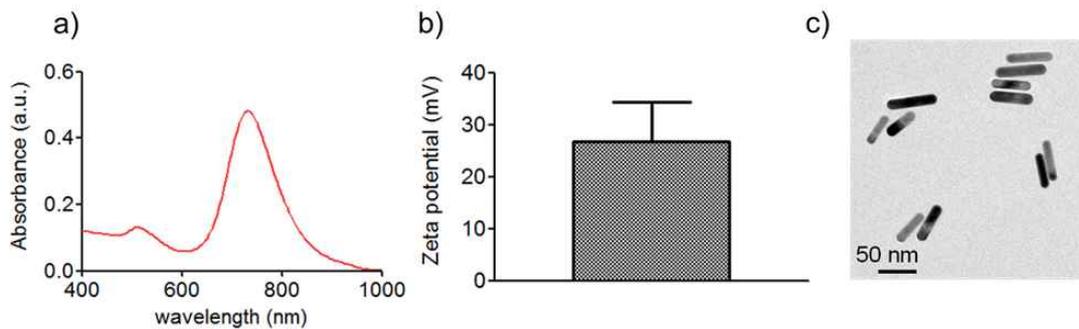


그림 8 mPEG와 NH₂- PEG로 표면이 변형된 금 나노막대의 특성 분석. (a) 금 나노막대의 흡광도 측정, (b) 코팅한 물질에 대한 금 나노막대의 표면전하 측정.

1차년도 결과 요약

- Nanoinjection 시스템 구축 및 Poiseuille's law를 통한 단일 세포 내 정량적 유전자 전달 방법 확립
- 단일 세포 내 Gold nanoparticle 주입을 통한 세포 내압 측정
- Nanoinjection 시스템을 통한 단일 세포 단위 정량적 모델인자 전달 및 단백질 발현 확인
- 유전자 및 단백질 전달용 나노전달기술의 장단점 파악
- 모델인자 전달을 위한 나노입자의 적절성 파악 및 제조

3.2. 2차년도 연구개발수행 내용 및 결과

Nanoinjection 시스템을 이용한 정량적 유전자 전달 방법을 확립하고 단일 동물 체세포 내 역분화 인자의 정량적 전달 및 실시간 역분화 과정을 관찰하는 방향으로 실험을 진행. 역분화 유전자를 단일 동물 체세포 내에 전달하는 실험을 진행하기에 앞서 역분화 과정을 관찰하기 위한 모델 세포로 Mouse embryonic Fibroblast (MEF)로 선정하여 모델 인자인 pcDNA3.3_eGFP를 전달하여 발현양상 및 나노인젝션 시스템의 정량적 전달 방법을 확립함.

3.2.1 Nanoinjection 시스템을 이용한 단일 세포 내 정량적 유전자 전달 방법 최적화

■ 세포 내압의 결정은 나노 인젝션 시스템을 통하여 단일 세포 내 주입압력을 결정하는데 가장 중요한 요인으로 작용하는 부분이기 때문에 1차년도에서 정립한 세포 내압은 재연성 및 효율 측면에서 문제가 파악되어 새로이 물리화학적 방법을 통해 접근하여 세포 내압을 결정하였다. 대기상의 물체가 형체를 유지할 수 있는 것은 물체의 내압과 대기의 압력이 평형을 이루는 것임을 감안하여 세포가 media상에서 형체를 유지하는 것 또한 세포 내압과 세포가 처한 환경의 외압이 평형을 유지하는 것이라 판단하였다. 이러한 접근 방식을 통하여 세포의 내압 = cell media 압력 + 대기압(1024hPa) 이라고 판단하였다. cell media 압력은 well에 담긴 cell media의 용량과 밀도를 통하여 약 0.4 hPa이라고 가정하고 대기압은 1024hPa이라고 설정하여 세포 내압을 약 1024.4hPa이라고 판단하였다. 이를 통해 이 이상의 압력으로 물질을 전달하여 실험을 진행하였다. 1차년도에서 수립한 방법인 Poiseuille's Law를 아래와 같이 정의 하고

$$V = \frac{\pi \times \Delta P \times D^4 \times t}{128 \times L \times \Pi}$$

- (ΔP = 주입압력 - 세포 내 압력)
- D : 사용한 팁의 내경
- t : 주입 시간
- L : 팁 내부 액체의 높이
- Π : 물질의 점성도

Table.1 Calculated injection volume UNIT : Femto Liter (fL)

	1200hPa	1400hPa	1600hPa	1800hPa	2000hPa
0.3 sec	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
0.6 sec	0.2	0.6	1	1.4	1.8
0.9 sec	0.3	0.9	1.5	2	2.7
1.2 sec	0.4	1.2	2	3	3.6

	1200hPa	1400hPa	1600hPa	1800hPa	2000hPa
0.3 sec	15	44	73	103	132
0.6 sec	30	88	146	205	264
0.9 sec	44	132	219	292	396
1.2 sec	60	176	292	438	528

표 1 & 2 Nanoinjector의 주입 압력 과 주입 시간 조절에 따른 계산된 유전자 주입총량 부피 (Table 1)과 주입 유전자 농도와 계산된 부피에 따라 결정된 각 조건별 주입 유전자 개수 (Table 2) DNA concentration : $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$

주입 압력은 1200hPa부터 2000hPa까지 200hPa씩 간격을 두고 주입 압력은 0.3 sec부터 1.2 sec까지 설정하여 0.3sec 씩 간격을 뒀. 여기에서 Poiseuille's Law를 통하여 각 주입압력 및 주입시간 조건별 유전자 전달 용량을 계산하여 정량적인 유전자 전달을 시행하였다. (표 1,2)

3.2.2 단일 세포 내 유전자 발현 효율 최적화 조건 확립

주입 압력 재설정 이후, pcDNA3.3_eGFP 발현 실험의 재연성을 획득하였으며 이를 바탕으로 단일 동물 체세포 (MEF)에 모델인자를 주입하여 단일 세포 내 유전자 발현효율 평가 및 나노 인젝션 시스템의 전달방법 확립 및 최적화 방안을 모색하였다. 이를 통해 각 조건별 유전자 발현 효율을 분석하고 계산된 DNA 전달량에 따른 세포 내 발현효율도 측정하여 양적인 부분과 전달 조건 방법에 따른 유전자 발현 효율 최적화를 탐색하였다. 그림 9의 (a) 2차원 그래프는 각 주입 조건별 세포내 유전자 발현양상을 나타낸 것이며 붉은색을 뿔수록 발현 효율이 높고 푸른색을 뿔수록 낮은 효율을 나타내게 된다. 가장 효율이 높은 곳에서는 35%의 효율을 나타낸다. 그래프 표면의 등고선은 주입된 유전자의 개수를 의미한다. 등고선과 2차원 그래프를 토대로 비교해 본 결과, 같은 양의 DNA를 주입하여도 주입압력이나 주입시간에 따라 세포 내 유전자 발현효율 양상은 다르게 나타날 수 있다는 것을 확인하였다. 그림 9의 (b)는 전달된 유전자의 개수에 따른 세포의 유전자 발현효율의 전체적인 평균을 나타내며 약 225개의 유전자가 전달 되었을 때 가장 높은 효율을 보인다. 전달된 유전자의 개수가 증가하여도 유전자의 발현효율이 그에 따라 무조건 증가하는 것이 아니라 오히려 감소하는 것으로 보아 세포 내 유전자 발현에 필요한 적정량이 존재함을 파악할 수 있다.

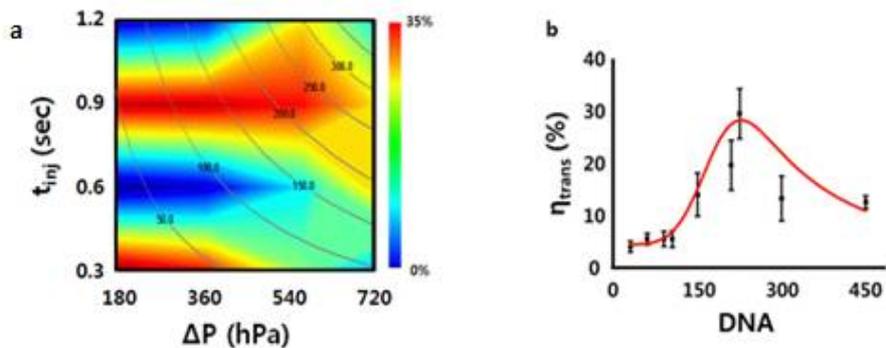


그림 9 (a) MEF의 Nanoinjection 시스템을 이용한 주입 조건별 유전자 발현 양상 및 (b) Poiseuille's Law에 따라 계산된 유전자 주입 개수에 따른 세포 내 유전자 발현효율.

3.2.3 형광강도 측정을 통한 단일 세포 내 유전자 발현량의 정량적 평가

■ 단일 세포 유전자 전달의 정확한 정량적 평가를 확인하기 위하여 유전자(pcDNA3.3_eGFP) 전달을 통한 세포 내 발현 정도를 형광 강도를 측정하여 조사하였다 (그림9). 그림 10 (a)에서 유전자가 발현된 세포들을 기준으로 전달된 유전자의 개수에 따른 형광강도 차이에 관한 정성적인 결과를 획득하였으며 이를 형광강도 수치로 나타내었을 때, 약 500개의 유전자가 전달되었을 때부터 더 이상 형광강도가 증가하지 않고 평형을 유지하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해, 그림 9의 전달된 유전자의 양이 증가하여도 유전자 발현 효율이 증가하지 않는 결과와 관련이 있음을 확인하였다.

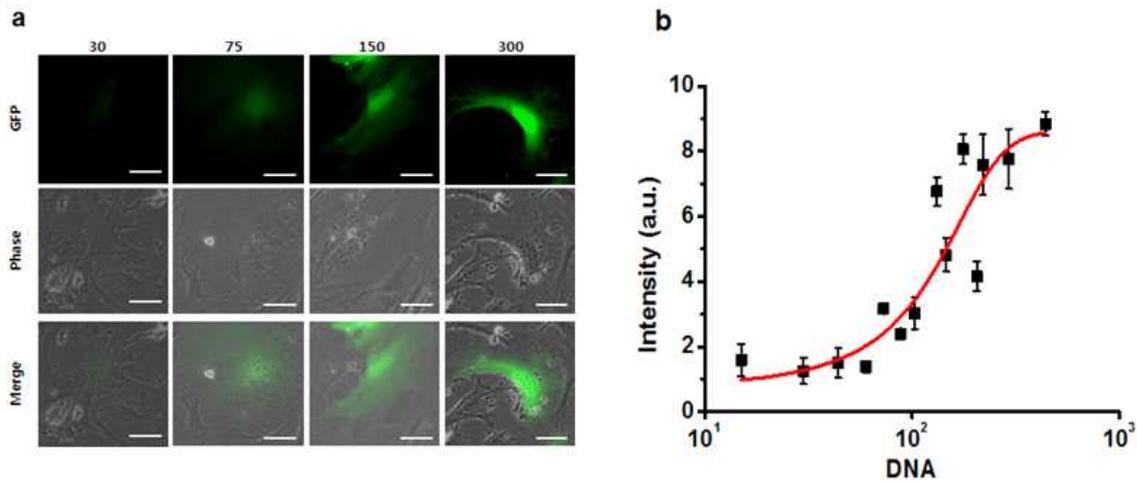


그림 10 전달된 유전자 개수에 따른 세포의 형광 이미지 (a)와 전달된 유전자 개수에 따른 형광강도를 나타낸 그래프

3.2.4 단일 세포 내 정량적 유전자 전달에 따른 세포 내 유전자 발현 지속능력 평가

■ 외부 유전자를 세포에 전달하여 세포핵에서 단백질을 생성시켜 유전자를 발현시키는 Transfection은 전달된 유전자 양의 한계가 있으므로 결국 세포 내에서 전달된 유전자를 소진하게 되면 더 이상 발현이 지속되지 않는다. 이를 위하여 각 유전자 전달량에 따른 세포 내 유전자 발현 지속률에 대한 정량적 평가를 하였으며, 그림11 (a)는 이에 따른 결과를 나타낸다. 대부분의 조건에서 48시간 내에 최대 유전자 발현량을 보이며 그 이후 점점 유전자 발현량이 소진되는 것을 보이는데, 그 결과는 약 225개의 유전자를 주입하였을 때 가장 완만하게 나타나며 이 보다 더욱 많은 유전자량을 전달하여도 더욱 발현 지속률이 완만하게 감소하지 않는다. 이는 그림9,10 의 결과와도 연결이 된다. 그림 11 (b)를 통하여 시간에 따른 발현 지속률이 세포에 영향 없이 안정적으로 유지되는 것을 관찰하였으며 그림 11 (c)를 통해 위 결과를 한번에 정리한 3D profile 데이터를 획득하였다.

3.2.5 나노 인젝션 시스템의 생체 안전성 평가

■ Nanoinjection을 시행한 직후, 세포를 동결건조한 후 SEM을 통해 세포 표면을 관찰함. Nanoinjection으로 인한 세포 표면의 어떤 상처도 발견되지 않았으며, 이를 통해 세포회복력

에 큰 영향을 끼치지 않는다는 결론을 얻음. 형광이미지를 통하여 유전자 발현도중 Live cell 과 Dead cell의 형태를 파악하고 이를 기준으로 세포상태변화를 시간에 따라 지켜봄. 그리고 이를 세포 내에 주입하여준 유전자의 양 (부피)에 따라 Cell viability를 조사한 결과 대부분 이 치명적인 손상이 없이 상태가 유지되는 것을 확인함. (그림 12)

3.2.6 나노 인젝션을 통한 단일 세포 단위 다중 유전자의 동시 발현 확인

▣ 4종류의 역분화 인자를 동시에 발현시켜야 하는 것에 대비하여 pcDNA3.3_eGFP(녹색), Td-tomato(적색), e BFP2-Nuc (청색) 의 유전자를 단일 세포에 주입하고 이의 대한 발현양상을 형광 이미지로 관찰함(그림 13). 세 유전자가 단일 세포 내에 동시에 발현되어 이들 유전자가 서로간의 Interference 없이 뚜렷하게 형광이 발현되는 것을 확인 하였다. 역분화 인자 또한 단일 세포 내로 한번에 4개의 다중 유전자 (Oct4, Sox2, Klf4, cMyc)를 발현 시켜야 하기 때문에 본 결과를 통하여 나노 인젝션 시스템을 통한 유전자 전달 방법이 다중 유전자의 안정적인 전달 및 발현에도 효용성이 있음이 확인 되었다.

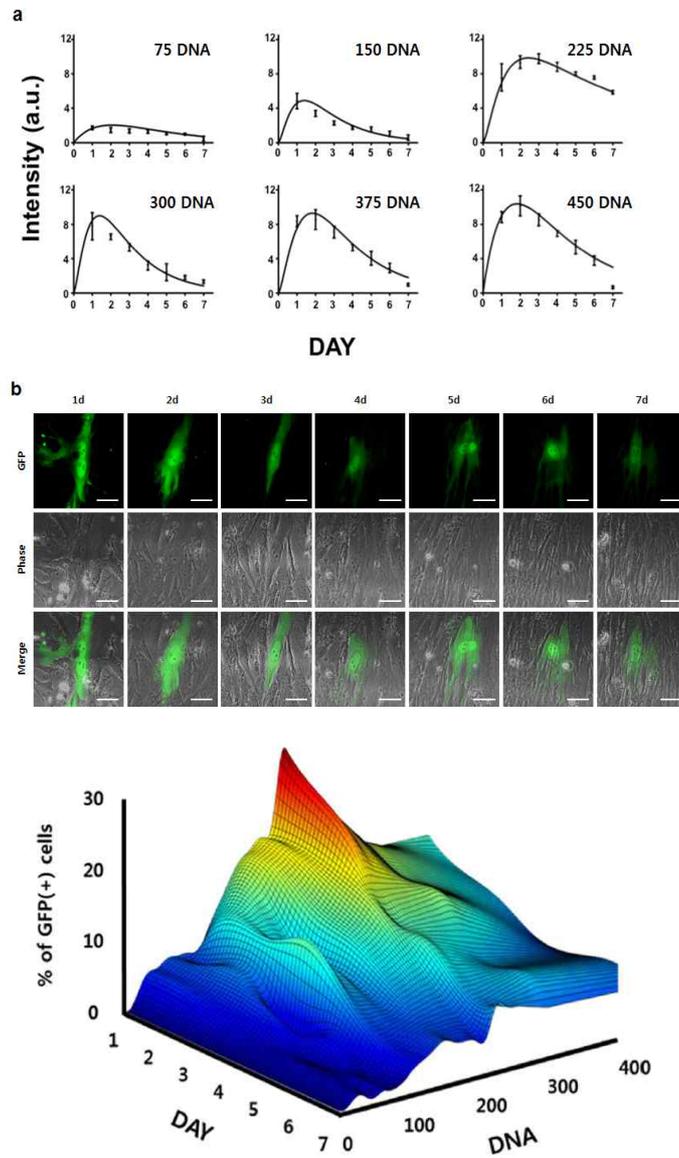


그림 11 유전자 전달량에 따른 세포 내 형광 발현 강도 (a) 와 시간에 따른 형광 발현 지속 변화 (b), 유전자 전달량과 시간의 흐름에 따른 세포 내 유전자 발현 효율 변화(c)

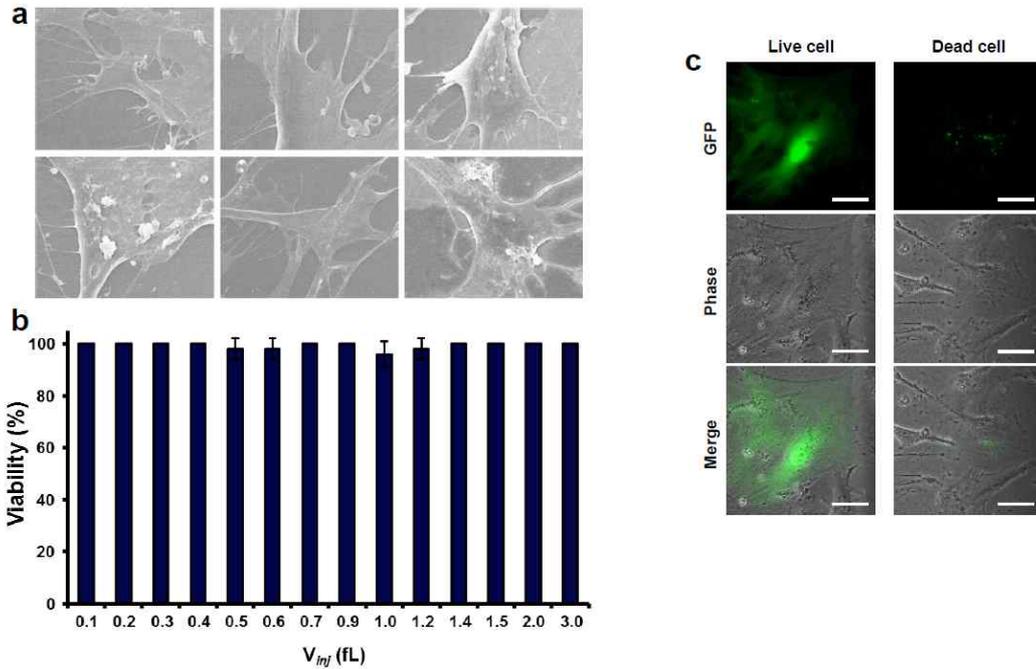


그림 12 나노 인젝터를 통해 유전자를 전달한 후 전자 현미경을 통해 세포 손상 여부를 관찰 (a), 나노인젝션 시스템의 생체 안정성 평가(b), 형광 추적을 통한 살아있는 단일 세포와 죽은 세포의 형태 비교 (c)

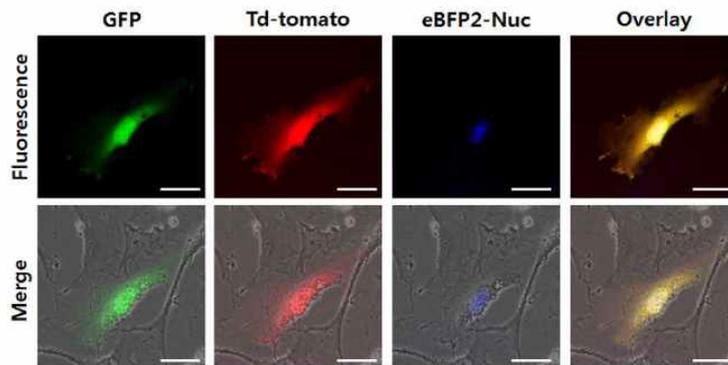


그림 13 단일 세포 내 다중 유전자 동시 발현 효용성을 형광 이미지로 확인

3.2.7 나노 인젝션 시스템을 통한 정량적 역분화 인자 전달 방법 확립

■iPS 제작 시도를 위하여 그림14 (a)와 같은 3종류의 plasmid를 Nanoinjection을 통하여 주입하고 이에 대한 형광을 확인함. GFP plasmid를 통하여 형광이 발현되면 역분화 유전자도 제대로 전달되었고 추후, 발현가능성에 대해 판단함 (그림 14b). 이 중 일부가 그림14 (c)와 같이 형태변화를 나타내어 초기 변화를 관찰 함.

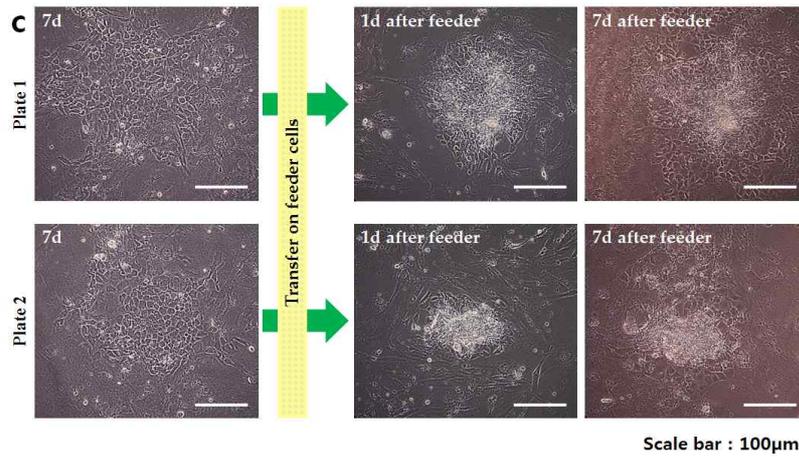
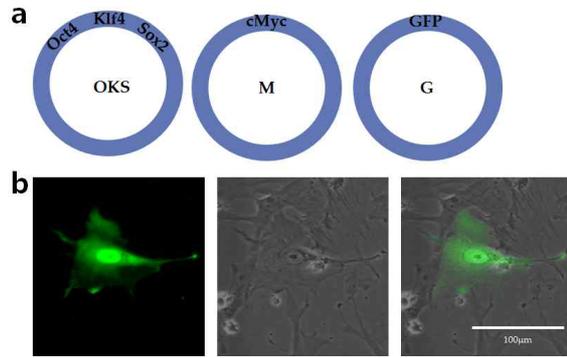


그림 14 iPS 제작을 위해 주입한 3종류의 plasmid (a), 역분화 인자 주입 후 녹색형광이 발현한 세포의 형광 이미지 (b), 역분화 유전자 주입 후 세포의 형태변화 관찰

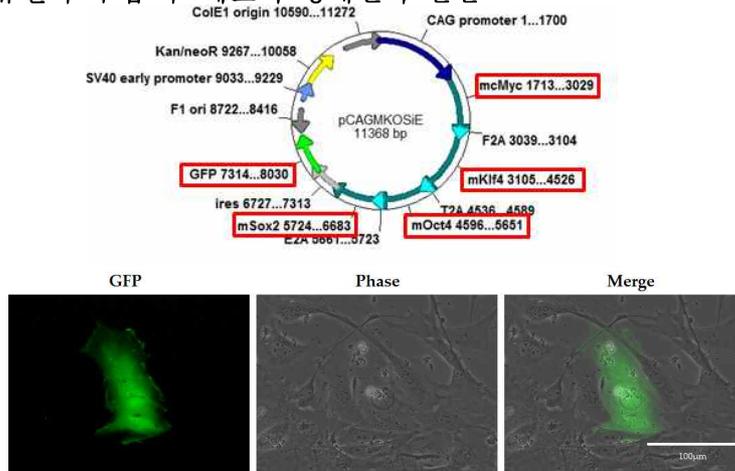


그림15 Oct4, Klf4, Sox2, cMyc, GFP 유전자가 하나의 plasmid에 들어있는 plasmid 구조 (a), (a)의 DNA를 이용하여 녹색형광이 발현된 세포의 형광 이미지 (b).

3.2.8 단일 동물 체세포의 역분화 과정 실시간 관찰

■ 앞서 그림 14 (a)에서와 같이 3종류의 plasmid를 이용하였을 때는 역분화 인자의 발현빈도가 매우 미미하며, 역분화 인자 주입 세포의 추적이 매우 어렵다고 판단되어, 역분화 인자와 GFP가 하나의 plasmid에 포함된 유전자를 사용함. 이를 이용해 역분화 유전자가 세포 내에서 작용을 하게 되면 GFP도 동시에 작용을 하게 되는 것이라, 판단함. 녹색 형광의 발현 효율은 약 30% 정도로 나타남.



역분화 효율을 높이기 위하여 기존의 Cell media 조성이 위 그림에서 설명한 4가지 Trigger chemical을 모두 사용하던 것에서 줄기세포의 Stemness를 유지시켜주는 PD 0325901의 Trigger chemical을 빼고 세포를 배양함. 추후 이는 세포가 형태변화를 일으킨 후 추가하여 상태변화를 관찰함.

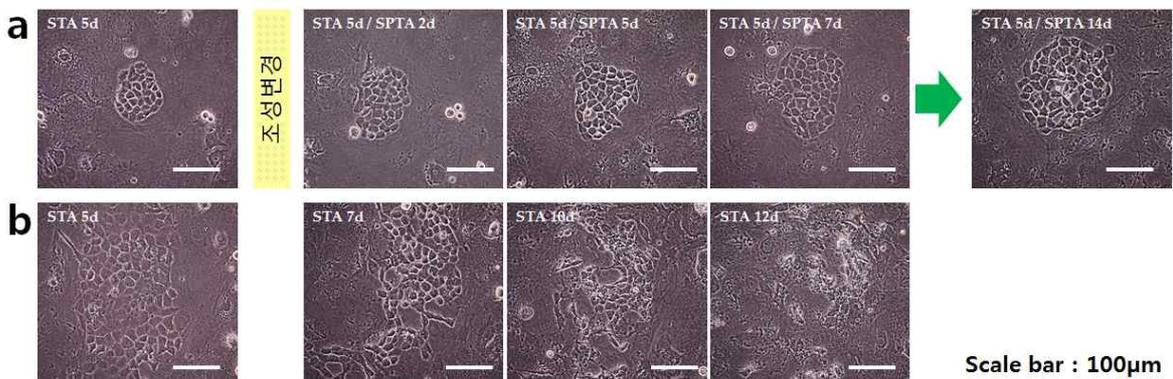


그림 16 STA 조건에서 형태변화가 일어난 뒤 SPTA로 Cell media 조성을 바꿔준 세포 (a)와 STA의 조성을 그대로 유지시켜 준 세포 (b)의 비교 이미지.

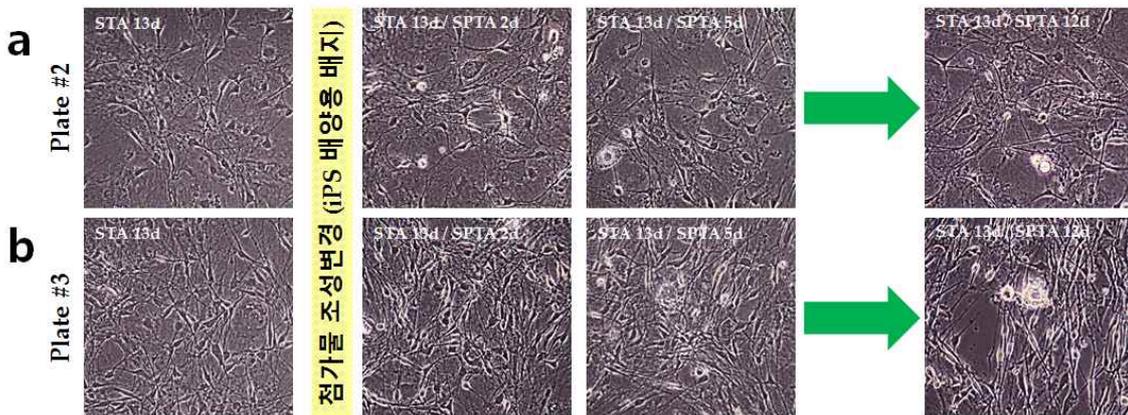


그림 17 신경세포의 형태로 변화한 세포를 관찰
그림 15를 통해 Cell media의 조건을 관찰한 경우, STA의 조건이 초기 형태변화에 도움을 주는 것으로 보이며 그림 16 (a)의 경우 STA에서 배양 5일 후 SPTA 조건으로 바뀌었음

때, 형태변화 상태를 20일 이상 유지하였으나, (b)와 같이 계속 STA의 조건에서 배양한 경우 세포가 더 이상 유지되지 못하고 소멸함. 그림 16 (a)의 경우는 형태변화만 유지할뿐 큰 증식을 보이지 못함. 이를 통해 injection을 수차례 시도하거나, 주입하는 역분화 인자 양을 증가시켜야 할 것이라 판단함.

역분화 인자 주입 후, 형태변화를 관찰 하던 중 그림 17과 같이 신경세포의 형태로 변화하는 세포를 관찰하여 후속 연구를 진행중임.

3.2.9(위탁) 다양한 역분화인자 전달을 위한 나노입자 제조

■CTAB으로 합성된 금 나노막대의 경우 세포독성을 일으킬 수 있기 때문에 세포의 활성도에 영향을 미치지 않으며 세포 내 이입을 최소화할 수 있는 mPEG와 NH₂-PEG로 금 나노막대 표면을 변형하였음. 단, mPEG보다 NH₂-PEG의 전하가 상대적으로 양전하를 띠기 때문에 세포막에 mPEG보다 근접할 수 있으며 광열효과에 의해 더 많은 영향을 끼칠 것이라 생각함. 이 변형된 금 나노막대의 특성은 흡광도와 제타전위 측정을 통해 확인하였음(그림 18). 그 결과 mPEG와 NH₂-PEG로 표면이 변형된 금 나노막대의 흡수파장은 변화가 없었으며 mPEG로 표면이 변형된 금 나노막대의 표면전하는 50 mV에서 -20 mV로 이동하였고 NH₂-PEG로 표면이 변형된 금 나노막대의 경우 2~3 mV의 표면전하를 가지는 것으로 확인되었음. 표면전하의 변화는 각각의 물질이 금 나노막대 표면에 잘 부착되었음을 나타냄.

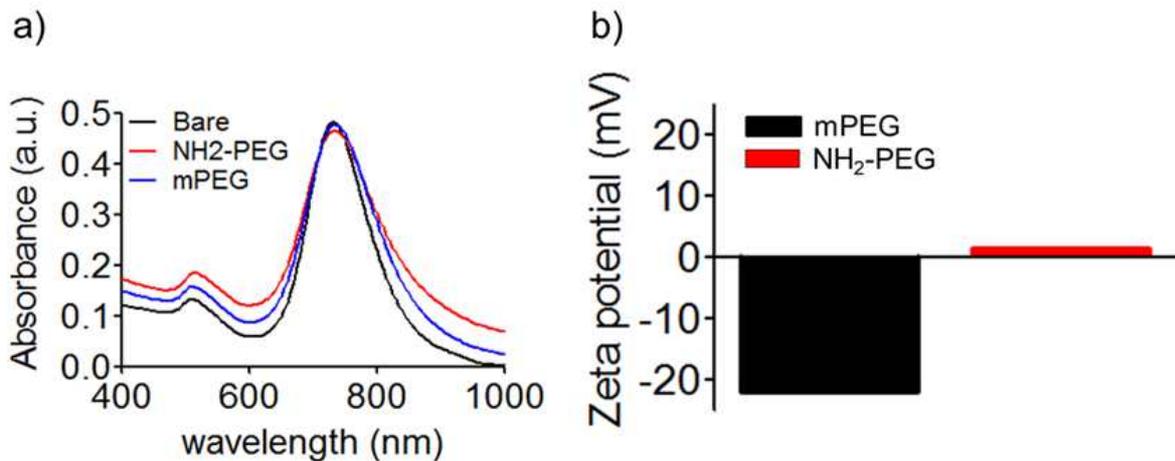


그림 18 mPEG와 NH₂-PEG로 표면이 변형된 금 나노막대의 특성 분석. (a) 금 나노막대의 흡광도 측정, (b) 코팅한 물질에 대한 금 나노막대의 표면전하 측정.

■리포펙타민의 사용방법에 제시된 농도를 이용하여 리포펙타민-플라스미드 복합체를 형성하였음. 그리고 금 나노막대와 함께 처리한 후 레이저를 10분 동안 조사하여 온도를 42도까지 높여준 후 남은 50분 동안 배양기에서 더 배양하였음. 그리고 금 나노막대와 리포펙타민-플라스미드 복합체를 씻어내고 48시간 후 eGFP 발현정도를 형광현미경과 유세포분석기를 통하여 측정하였음. 그 결과 mPEG로 코팅된 금 나노막대를 처리해준 실험군은 금 나노막대 없이 리포펙타민과 플라스미드 복합체만 처리해준 실험군에 비해 약 15 %정도 유전자 전달 효율이 증가한 것을 관찰할 수 있었음. 그에 반해 NH₂-PEG로 코팅된 금 나노막대의 경우 오히려 리포펙타민-플라스미드 복합체만 처리한 실험군에 비해 유전자 전달 효율이 감소한 것을 관찰할 수 있었음. 이와 같은 결과를 바탕으로 앞으로 실험에서는 mPEG로 코팅된 금 나노막대를 이용하여 실험할 예정임(그림 19).

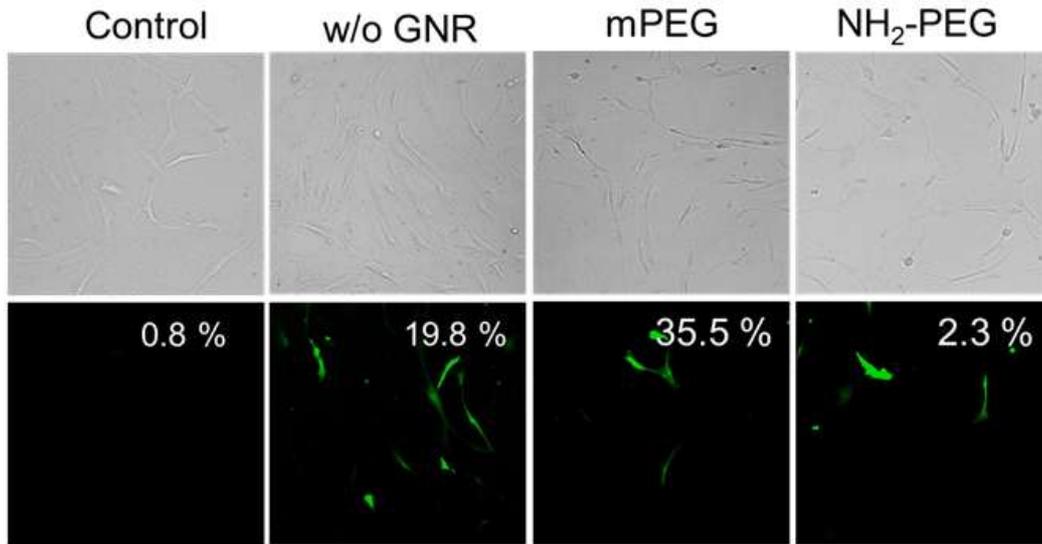


그림 19 금 나노막대의 표면물질 종류별 유전자 전달 효율 측정

3.2.10(위탁) 나노전달기술을 이용한 모델인자 및 역분화인자의 인간 체세포 내 전달 능력 평가

리포펙타민의 사용방법에서 추천하는 리포펙타민의 양을 2 μ L로 정하고, 세포의 활성도에 영향을 미치지 않는 온도(42도)를 발생시키는 금 나노막대의 농도를 2.0 O.D로 고정하여 실험하였음. 이 실험에서는 유전자 전달 효율을 가장 높여줄 수 있는 플라스미드의 양과 레이저를 쬐어주는 적정 시간을 찾기 위해 플라스미드의 양을 각각 2 μ L와 6 μ L를 이용하였으며 레이저를 쬐어주는 시간은 각각 10분, 30분, 60분으로 하였음 (그림 20a). 808 nm 레이저를 금 나노막대에 쬐어주었을 때 금 나노막대로부터 발생하는 열이 유전자 전달 효율에 영향을 미칠 수 있다는 가설을 증명하기 위해 각각의 실험 조건에서 레이저를 쬐어주지 않은 실험군과 레이저를 쬐어준 실험군을 비교하였음.

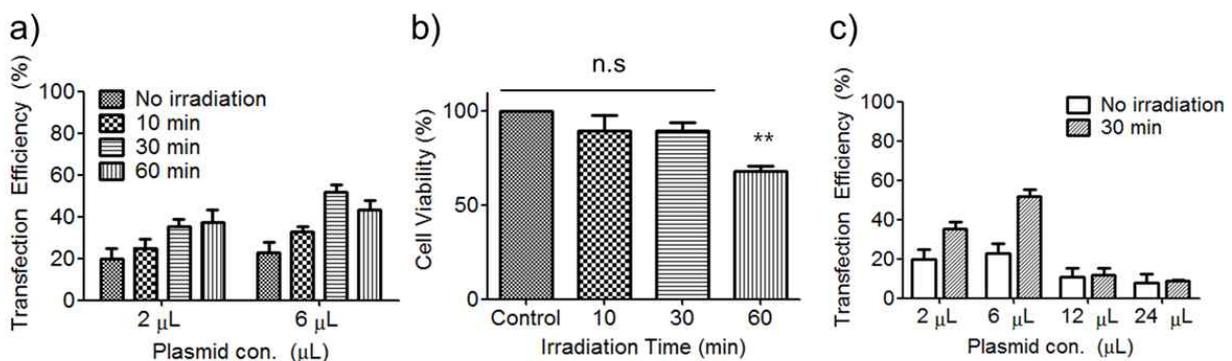


그림 20 다양한 플라스미드의 농도와 레이저를 쬐어주는 시간을 달리하여 유전자 전달 효율 분석. (a) 각 조건에 대하여 유세포분석기를 이용하여 eGFP의 형광발현 효율 측정. (b) 레이저를 쬐어주는 시간별로 세포의 활성도 변화 측정. (c) 플라스미드의 농도를 다양하게 처리하여 유전자 전달 효율 측정.

플라스미드의 양이 2 μ L인 경우, 레이저를 10분에서 60분 동안 쬐어주었을 때, eGFP 발현

효율은 유세포 분석기를 통하여 분석하였음. 유세포 분석기를 통하여 유전자 발현 효율을 측정할 때 대조군은 리포펙타민과 플라스미드를 세포에 처리하지 않은 그룹으로 eGFP를 발현하지 않은 세포들을 99.9 % 이상으로 보고 그 범위에서 벗어나서 형광을 띠기 시작하는 세포들을 유세포 분석기로 Counting하여 %로 나타냄. 그 결과 각각 25.5 %, 35.8 %, 38.2%로 각각 유전자 발현 효율이 관찰됨(그림 19a). 리포펙타민과 플라스미드는 처리하였지만 레이저를 쬐어주지 않은 실험군의 eGFP 발현 효율은 19.8 %로 10분 동안 레이저를 쬐어준 실험군과 유전자 발현 효율에서 유의한 차이가 없었음. 그러나 레이저를 각각 30분과 60분 동안 쬐어준 실험군과 대조군을 서로 비교했을 때는 유전자 발현 효율이 2배 정도 증가하였음. 플라스미드의 양이 6 μ L인 경우, 레이저를 10분에서 60분 동안 쬐어주었을 때, eGFP 발현률은 각각 32.5 %, 51.8 %, 45.8 %로 관찰되었으며 리포펙타민과 플라스미드는 처리하였지만 레이저를 쬐어주지 않은 실험군은 22.7 %의 유전자 발현 효율을 보였음. 이 결과를 분석해 봤을 때, 레이저를 10분 동안 쬐어준 실험군은 레이저를 쬐어주지 않은 실험군과 유전자 발현 효율에서 유의한 차이는 없었지만 30분 이상 레이저를 쬐어주었을 때에는 레이저를 쬐어주지 않은 실험군에 비해 유전자 발현 효율이 약 2배정도 증가하는 것을 확인 할 수 있었음. 그러나 60분 동안 레이저를 쬐어준 실험군의 경우 오히려 30분 동안 레이저를 쬐어준 실험군에 비해 유전자 발현 효율이 크게 증가하지 않는 것으로 관찰되었고, 세포 활성도를 확인해본 결과 70 % 이하로 떨어지는 것을 관찰하였음(그림 20 b). 때문에 60분 동안 레이저를 쬐어주었을 때는 세포 활성도가 낮아지기 때문에 유전자 발현효율이 증가하지 않거나 감소하는 경향을 보이는 것으로 판단되었음. 이 결과를 바탕으로 본 연구에서는 30분 동안 레이저를 쬐어주어 열을 발생시키는 조건이 세포의 활성도에 영향을 적게 미치면서 유전자 전달 효율을 높일 것으로 생각함. 그 다음 실험으로는 레이저를 쬐어주는 시간은 30분으로 정하고 플라스미드의 양을 더 다양하게 하여 유전자 발현 정도를 측정하였음(그림 20c). 그 결과 유전자의 양을 늘릴수록 유전자 발현 정도가 급격히 감소하는 현상을 관찰 할 수 있었음. 이 실험 결과를 통해 유전자와 리포펙타민의 비율이 중요할 것이라 생각하여 다음 실험은 다양한 리포펙타민의 양과 유전자의 양을 조합하여 유전자 발현 정도를 측정하였음.

■금 나노막대의 광열효과를 이용한 유전자 전달시스템의 역분화인자 전달 가능성을 측정하기 위하여 체세포를 유도만능줄기세포로 변환 할 수 있는 대표적인 유전자 OCT4, KLF4, SOX2, c-Myc 각각 3 μ L와 리포펙타민 2 μ L 혼합하여 1×10^5 cells/well에 분주하였음. 그리고 위 역분화인자의 1차 항체인 Rb-OCT4, Rb-KLF4, Mx-SOX2, Mx-cMyc을 처리하고 그 다음 형광이 달린 2차 항체를 처리한 후 형광현미경을 이용하여 단백질 발현 여부를 확인함. Mx를 표적으로 하는 2차 항체는 Alexa549 파장을 가지는 형광물질로써 녹색으로 보이며 Rb를 표적으로 하는 2차 항체는 Alexa488파장을 가지는 형광물질로써 빨간색으로 보임. 세포의 핵의 위치를 관찰하기 위하여 DAPI라는 형광물질을 사용하였으며 파랑색으로 보임. 발현된 역분화인자는 세포질에서 발현하고 그 기능은 핵에서 하기 때문에 발현이 되었다면 핵 안과 핵막 주변에서 발현이 관찰되어야함. 위의 실험결과를 살펴보면, 4 가지 유전자 모두 핵 안과 그 주변에서 발현되었음을 확인 할 수 있었음. 특히, OCT4와 KLF4가 핵 안쪽과 핵 주변에서 c-Myc과 SOX2 단백질에 비해 발현이 잘 되었다는 것을 확인할 수 있었음. 위의 실험을 바탕으로 유도만능줄기세포를 형성 할 수 있는 최적의 유전자 조합에 연구가 필요함.

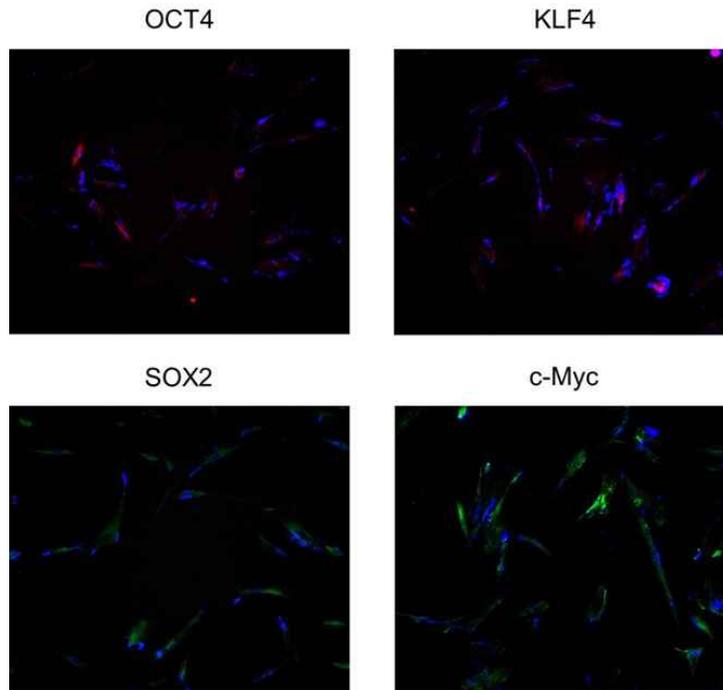


그림 21 나노전달시스템을 이용하여 역분화인자(OCT4, KLF4, SOX2, c-Myc)의 전달가능성 확인실험.

2차년도 결과 요약

- Nanoinjection 시스템을 통한 단일 동물 체세포 내 유전자 전달 방법 확립 및 최적화 (Biomaterials에 투고)
- Nanoinjection 시스템을 통한 단일 세포 단위 역분화 인자 전달 방법 확립
- 단일 동물 체세포의 역분화 과정 실시간 관찰
- 제조된 나노입자의 특성 분석과 효율성 파악
- 금 나노막대의 광열효과를 이용한 유전자 전달 가능성 파악과 효율성 증가

3.3 3차년도 연구개발수행 내용 및 결과

3.3.1 3차년도 연구 내용

1. 2차년도 수행 연구과제 중 pcDNA3.3_eGFP 유전자의 단일 세포 내 전달 방법 및 세포 내 발현 양상 평가를 통한 결과로 국제 학술지 Biomaterials (Impact Factor : 8.557) 에 2014년 10월 28일 투고하여 2015년 3월 4일 Revision을 시작하여 이에 대한 보충 실험을 진행, 2015년 7월1일 재 투고하여 2015년 7월 11일 Accept됨. 그리하여 해당년도에는 나노인젝션 시스템을 이용한 정량적 유전자 전달 방법 확립에 관한 실험을 2차년도에 비해 더욱 심도 있게 진행하였다.
2. 2차년도에 진행한 역분화 인자 전달 평가 방법은 나노 인젝션 시스템을 이용한 단일 동물 체세포 단위로 역분화 인자를 전달하여 세포의 형태변화 및 유도 만능성 줄기 세포 생성과정인 콜로니 생성 여부를 판단하는 방식으로 진행되었다. 3차년도에서는 조금 더 심층적으로 접근하여 단일 동물 체세포 내 전달된 역분화 인자의 지속성 및 소멸 여부를 정량적으로 평가하고, 역분화 인자 전달 후 시간의 흐름에 따른 세포의 줄기세포 성 특이 마커의 발현 여부를 관찰하였다.
3. 인간 체세포의 역분화 유도과정 또한 평가하기 위하여 2, 3 세부 연구팀과의 협력 연구를 통해 Human placenta cell 에 역분화 인자를 정량적으로 전달하여 전달된 역분화 인자의 지속성 및 소멸여부를 확인하고 역분화 초기 과정을 관찰하였다. (당해 3차년도 연구 목표 범위)

3.3.2 Poiseuille's Law의 실험적 검증

■ Biomaterials Revision 당시 Poiseuille's Law를 통해 계산 및 이론값을 도출하는 것에 그친 전달량 측정을 실험적으로 증명함 (그림 22). 세포 내로 전달되는 양을 직접 측정하기 어려우므로, 주입하고자 하는 유전자를 DI water에 녹여 사용한다는 것을 이용하여 무극성 용액인 Oil 상에 유전자 주입을 시도하여 생성되는 방울의 크기를 측정함으로써 Poiseuille's law를 통한 계산값의 신뢰도를 증명함. 이 과정에서 종전의 Poiseuille's law 공식도 수정 및 보완 하였으며 실제 측정값과 이론값을 비교하여 제시함(표3,4). 세포 내 유전물질 주입 시, 주입 압력에 따라 유체가 흐르는 것이 아니라 유체의 점성도에 따른 물질 확산 정도가 다르게 나타난다는 것을 확인하여 Flow rate 이라는 새로운 변수를 넣어 세포내 액과 유전물질의 점성도 차를 고려한 변수를 새로이 고려함. 해당 내용으로 2015년 7월 Biomaterials지에 논문 발표.

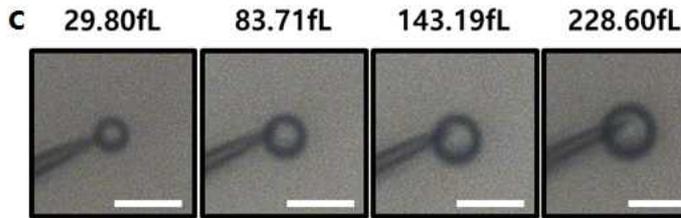
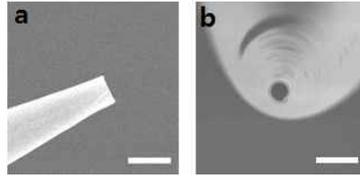


그림 22 실험에 사용된 Femtotip의 전자 현미경 이미지 (a,b)와 Nanoinjector의 압력과 시간 변수를 달리하여 실험적으로 측정된 유전자 전달량 (Scale bar : 1μm (a,b), 10μm (c)).

Table 3

Linseed Oil	1600hPa	2200hPa	2800hPa
1sec	29.08	43.86	56.04
2sec	61.95	83.71	96.73
3sec	99.17	122.33	143.19

Table 4

Linseed Oil	1600hPa	2200hPa	2800hPa
1sec	22.6	47.6	60.8
2sec	45.1	95.2	121.6
3sec	67.7	142.8	181.4

표 3&4 실험을 통해 측정된 실제 주입총량 측정값 (Table 3)과 개정된 Poiseuille's Law를 통해 계산된 주입총량 이론값 (단위 : fL)

$$V = \frac{(P_i - P_{ta})\pi D^4 t}{128KL}$$

P_{ta} : External pressure
 P_i : Injection pressure
 D : Inner diameter of Femtotip II
 L : Height of Liquid
 V : Injection volume
 K : Relative viscosity

수정된 Poiseuille's Law. Flow rate을 고려한 Relative viscosity개념을 새로 적용

3.3.3 정량적 유전자 전달에 따른 유전자 발현 확인 및 발현 효율 최적화

■Biomaterials Revision을 위해 추가 실험을 하던 중, 2차년도 성과에 비해 더욱 확실한 재연성을 획득하였고 이를 통해 나노 인젝션 시스템의 새로운 Transfection profile을 획득함 (그림 23). 본 결과 역시 유전자를 오히려 많이 주입하면 세포 내 발현 효율이 떨어진다는 것을 확인 하였으며 유전자 발현 효율 최적화를 위한 단일 세포 내 유전자 전달량 및 전달 조건을 확립함. 해당 내용으로 2015년 7월 Biomaterials지에 논문 발표.

3.3.4 단일 세포 내 발현 유전자의 정량적 평가

■나아가 전달된 유전자의 정량적 발현효율 평가를 진행하기 위하여 자체적으로 단일 세포 분석법을 고안하여 단일세포 내 전달된 유전자의 총량과 세포 내 발현량과의 상관관계를 확인함 (그림 24). 이 방법은 중합효소 연쇄반응 (Polymerase chain reaction ; PCR)을 단일 세포에 적용한 것으로 기존에 존재하던 방법인 Single cell PCR법이 수백개의 세

포를 대상으로 진행하던 것에 비해 실제로 단 하나의 세포에 적용 가능한 방법을 개발했다. 이 방법은 세포 내 전달된 유전자가 발현되어 나타나는 형광 강도가 실제 single cell PCR을 통해 나타난 Gene expression level의 경향과 일치하는 결과를 보였기 때문에 단일 세포 내 발현된 유전자의 정량을 세포 내 발현된 형광 강도를 통해 판단할 수 있다는 결과를 보여줌. 세포 내 발현된 유전자의 Gene expression level 측정을 위해서 이용되는 PCR 방법은 세포를 배양하는 과정에서 실시간으로 살아있는 세포 내 발현 유전자의 정량 측정은 불가능하나, 형광강도가 PCR을 통한 Gene expression level을 대변할 수 있음을 보여줌으로써, 형광강도를 통한 살아있는 세포 내 실시간 유전자 발현 정량을 측정할 수 있다는 데에 큰 의의가 있음.

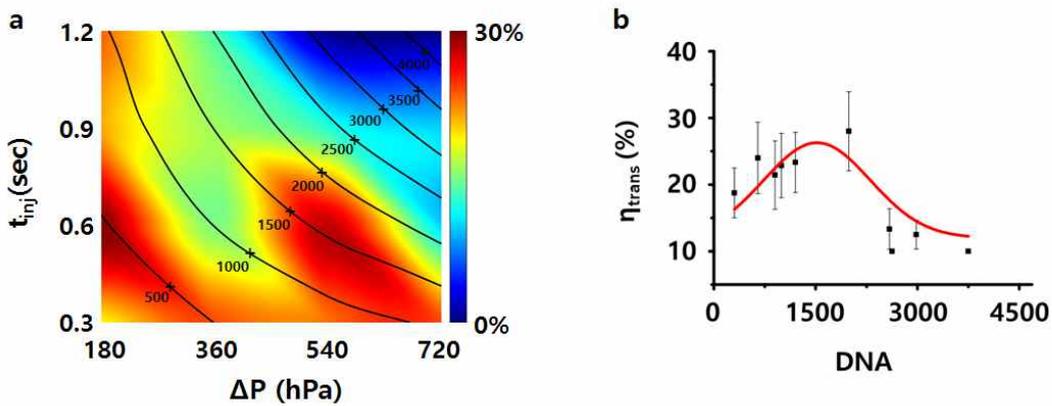


그림 23 주입 조건에 따른 단일 세포 내 유전자 발현률 (a)와 주입총량에 따른 단일 세포 내 유전자 발현률 (b). (a)의 등고선은 주입한 유전자의 총량을 나타내며 이를 통해 같은 양의 유전자를 주입하여도 주입 조건에 따라 발현효율이 달리 나타난다는 것을 확인할 수 있음.

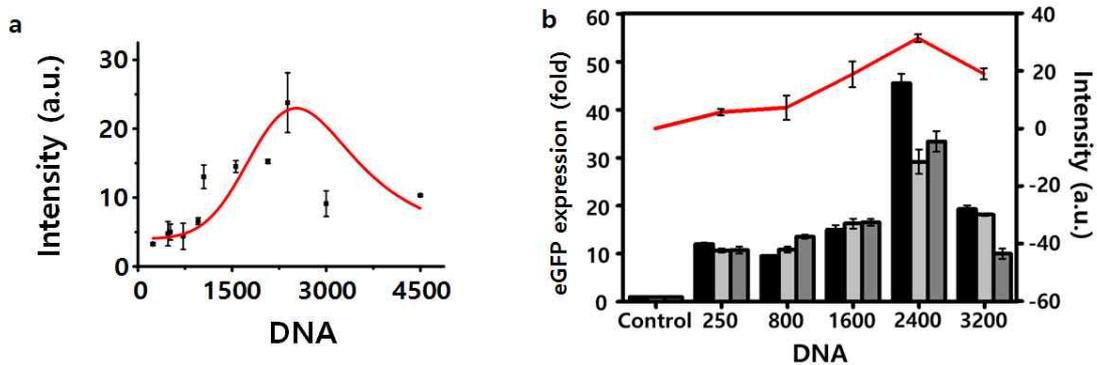


그림 24 단일 세포 내 정량적 유전자(pcDNA3.3_eGFP) 전달량에 따른 세포 내 유전자 발현 양상을 형광강도에 따라 나타낸 그래프 (a) 와 유전자 전달량에 따른 Single cell PCR 분석 그래프(b). (b)의 붉은 선은 전달량에 따른 세포 내 유전자 발현 형광 강도를 나타냄

그림 23의 (b) 그래프에서 유전자 전달량에 따른 세포 내 발현률은 최적점을 나타내며 오히려 많은 유전자량이 전달될수록 발현효율이 감소되는 것을 확인할 수 있었는데, 이는 유전자 발현 형광 강도 (그림 24 a) 에서도 같은 경향을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이를 자체적으로 고안해낸 Single cell PCR 방법을 통하여 확인했을 때, 세포 내부에서 발현되는 유전자량 역시 전달량에 따라 증가하다가 감소하는 경향을 나타내었다. 이때, Single cell PCR에 사용된 해당 단일 세포의 형광 발현 강도를 측정하여 나타내었을 때(그림 25), 이는 Single cell PCR을 통해 확인한 단일 세포 내 유전자 발현량과 경향이 정확히 일치한다는 것 또한 확인하였다. 해당 내용으로 2015년 7월 Biomaterials지에 논문 발표.

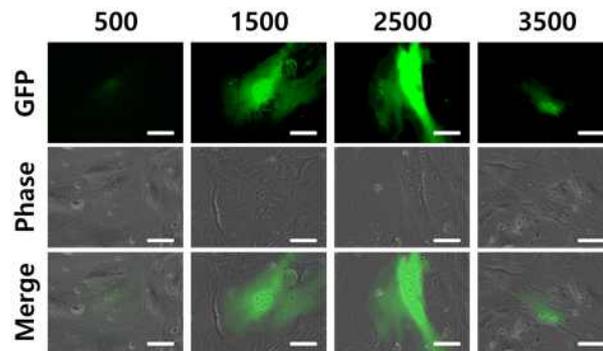


그림 25 단일 MEF 세포의 유전자 전달량에 따른 형광 발현 이미지

3.3.5 정량적 유전자 전달량에 따른 형광 발현 지속률 확인

■ 단일 세포 내 나노인젝션 시스템의 유전자 전달 효율 평가 및 안정성 평가를 위하여 단일 세포 내 유전자 발현 지속률 확인과 유전자의 정량적 전달량에 따른 형광강도 발현 양상을 함께 확인함 (그림 26)

본 지속률 확인 실험에서도 유전자 전달량이 증가할수록 형광 발현 강도 또한 점점 증가하나, 특정량 이상의 유전자를 주입시 오히려 최고 형광발현 강도가 감소한다는 것을 확인할 수 있었음(그림 26 (a)). 또, 그림 26 (a)에서, 최고 형광강도는 2500개의 유전자를 집어넣었을 때가 2000개의 유전자를 주입하였을 때 보다 높게 나타나지만, 오히려 형광 발현의 지속률은 2000개의 DNA를 주입 하였을 때가 더 높게 나타난다는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해, 세포 내 형질전환의 분석시, 형광 발현량 (형광 발현 강도) 뿐만 아니라, 지속률 또한 새로이 고려해야 정확한 기전분석이 가능하다는 것이 확인되었다. 이러한 관찰 방법은 현재 단일 세포 내 역분화 인자 발현 양상 및 지속률 관찰에도 적용되어 진행 중. 해당 내용으로 2015년 7월 Biomaterials지에 논문 발표.

3.3.6 다중 유전자의 상대적 비율에 따른 단일 체세포 내 동시 발현 양상

■ 상기 결과들이 단일 유전자의 세포 내 발현 양상을 측정해 본 것이라면, 추후 역분화 인자 주입 실험은 역분화 인자들이 4개의 서로 다른 유전자 (Oct4, Sox2, Klf4, cMyc)들이 다중으로 엮인 것이라, 이에 대해서도 위와 같은 평가를 하기 위하여 Td-tomato, eGFP, eBFP

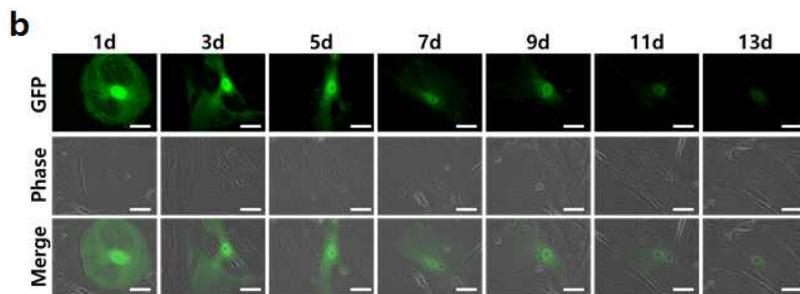
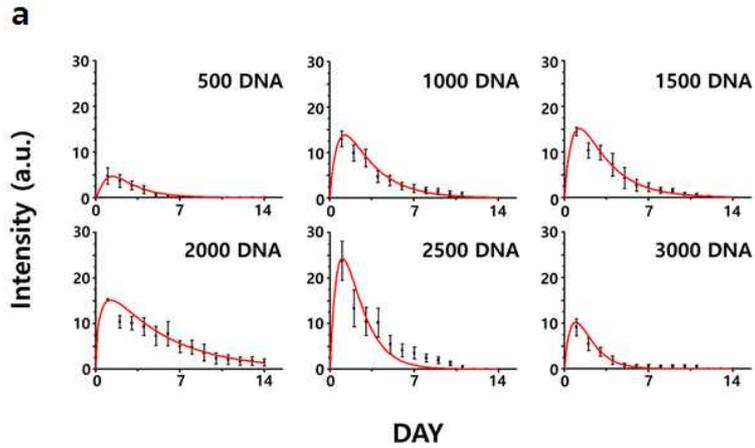


그림 26 정량적 유전자 전달량에 따른 형광발현 강도와 시간에 따른 지속률 (a), 단일 세포의 시간 변화에 따른 형광 발현 강도 변화 이미지 (b)

의 3가지 다중 유전자를 단일세포 내 나노인젝션을 통하여 동시 발현 시키는 실험을 진행하고 그 결과를 분석함. 각 유전자들의 비율을 달리하여 단일 세포 내 주입하고 그의 동시적 발현 양상을 확인하였다 (그림 27). 본 결과를 통해, 전달해 준 다중 유전자의 서로간 interference없이 단일 세포 내에서 발현이 잘되고, 전달해 준 유전자간의 비율에 따른 정량적 발현 효율을 평가할 수 있음. 4가지 역분화 인자의 단일 세포 내 발현 양상 분석에도 적용함. 해당 내용으로 2015년 7월 Biomaterials지에 논문 발표.

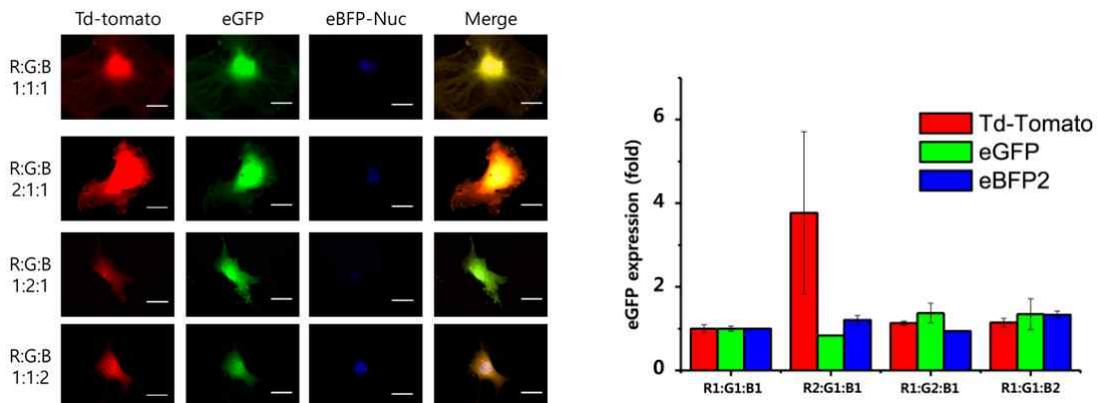


그림 27 단일 세포 내 비율을 달리하여 다중 유전자 발현 양상 확인 (좌), 주입 비율을 각각 달리하여 넣었을 시, 세 유전자의 단일 세포 내 발현 효율 확인(우).

3.3.7 나노 인젝션을 통한 단일 동물 체세포의 역분화 과정 유도

■상기 연구결과를 토대로 단일 동물 체세포 (MEF) 내 정량적으로 역분화 인자를 전달하여 역분화 초기 과정을 관찰함. 먼저 앞선 연구결과를 토대로 가장 유전자 발현이 좋은 유전자 전달량과 나노인젝션의 주입압력 및 주입시간을 적용하여 (1600hPa/0.6 sec, 1500개) MEF 내 역분화 인자 주입을 시도함. 단일 세포의 추적을 위하여 역분화 인자와 형광 유전자를 포함한 플라스미드를 세포 내 주입하여 유전자 발현 여부를 추적함(그림 28). 형광이 발현된 세포의 형태변화를 관측하고 지속된 역분화 과정을 유도하기 위하여 해당 세포를 feeder cell 위로 옮겨 형태변화를 관찰함. (그림 29)

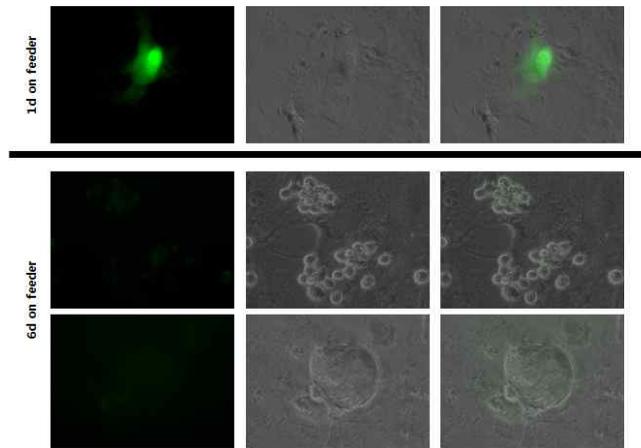


그림 28 역분화 인자 전달 후, 단일 세포의 유전자 발현 여부 및 형태변화 관찰

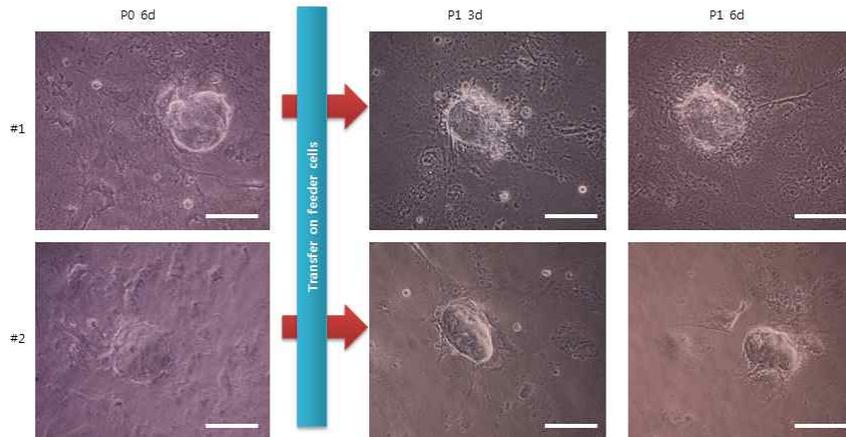


그림 29 Feeder cell 위로 옮긴 후, 시간 흐름에 따라 실시간으로 세포의 형태변화를 관측함

3.3.8 단일 동물 체세포의 역분화 시 전능성 마커 발현 조사

■상기 결과를 토대로 단일 세포 단위의 역분화 과정의 기전 분석을 위해 주입 역분화 인자의 Plasmid를 변경하여 주입해준 역분화 인자의 세포 내 지속여부를 확인하기 위하여 Immunocyto chemistry (ICC)를 실행하였다. 세포 내 전달된 유전자의 존속여부를 관찰하고 형태변화가 나타난 세포의 줄기세포성을 확인하기 위하여 Pluripotent Marker의 발현 여부를 측정함. 또한, 단일 세포 내 역분화 인자 발현의 최적화 및 효율 평가를 위해 나노 인젝션

시스템을 통한 역분화 인자의 주입 조건 및 주입량을 달리 하여 단일 세포 내 역분화 유전자 발현 효율을 정량적으로 평가하였다. (표 5)

Modified calculation		UNIT : Femto Liter(fL)		
	1200hPa	1400hPa	1600hPa	1800hPa
0.3 sec	1.6	3.45	5.3	7
0.6 sec	3.2	6.9	10.6	14
0.9 sec	4.8	10.4	15.9	20
1.2 sec	6.4	13.8	21.2	30

표 5 Poiseuille's Law를 통해 계산한 주입 조건 별 유전자 전달량

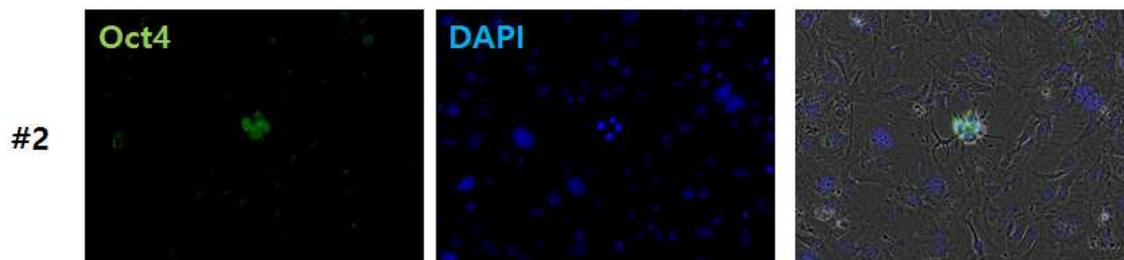
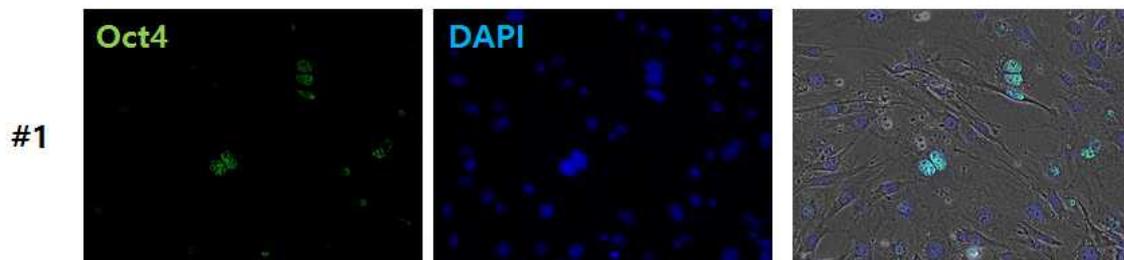


그림 30 역분화 인자 주입 2일 후, MEF 내 주입 유전자의 존속여부를 ICC를 통하여 확인

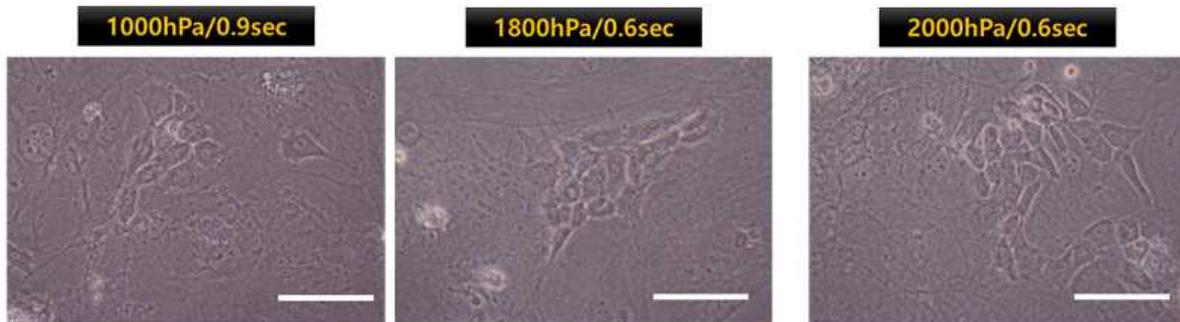


그림 31 단일 MEF 내 역분화 인자를 주입한 지 6일째, 각 주입조건 별 형태변화가 나타난 세포들 (Scale bar : 100 μ m)

역분화 인자를 MEF내 주입 후, 이의 소멸 여부를 ICC를 통하여 관찰하였으며, 주입 후 48 시간이 지난 시점에 주입하여 준 Oct4 유전자의 존재가 확인되었다. (그림 30) 위와 같은 방법을 통해 계속적으로 역분화를 주입한 단일 세포를 추적하였으며, 역분화 인자 주입 6일째에 추적한 MEF cell들에서 역분화 초기과정인 형태변화가 나타나기 시작하는 것을 확인하였다. (그림 31)

역분화 인자를 주입한 지 6일째 형태변화가 일어난 세포들로부터, 정확한 역분화 과정의 관찰을 위해, 형태변화가 나타난 세포들의 전능성 마커 확인 및 주입해준 역분화 인자의 존속 및 소멸 여부를 관찰함 (그림 32). 주입해 준 역분화 인자의 대표로 각 형태변화가 일어난 세포군에서 Oct4의 발현 여부를 확인하고, 전능성 마커인 SSEA1을 관찰하였을 때, 형태변화가 나타난 6일째까지는 주입 유전자인 Oct4의 발현이 확인이 되나, 아직 전능성 마커인 SSEA1은 확인되지 않아서 초기 약간의 형태변화가 일어나더라도 전능성은 띄지 않는 것으로 판단되었다. 역분화 인자 주입 후 6일째, 세포들의 형태변화를 확인하였으며, 또한, 이들 내에서 주입 유전자인 Oct4의 지속적인 발현은 확인되었으나 전능성 마커인 SSEA1의 발현 여부는 확인되지 않았다. 그 후, 단일 MEF cell 내 역분화 인자 주입 11일째, MEF의 조금 더 뚜렷한 형태변화가 관찰되었고 이를 대상하여 위와 마찬가지로 주입 유전자인 Oct4와 전능성 마커인 SSEA1의 발현 여부를 확인하였다.(그림 33) 형태변화가 일어난 세포에서, 전능성 마커의 발현 여부를 확인하였을 때, 6일차까지는 형태변화가 일어나더라도 전능성 마커의 발현이 확인되지 않았으나, 그 이후 지속적인 역분화 과정이 일어나, 11일 차에서는 전능성 마커의 발현이 확인되는 것을 관찰하였다. Oct4는 주입하여준 순간부터 전능성 마커가 발현되는 순간까지 지속적으로 발현이 유지되는 것을 확인함. 이를 통하여 세포의 형태변화가 일어나더라도 전능성 마커가 발현되기 까지, 반드시 중간에 특정 단계를 거쳐서 역분화 과정이 진행된다는 기전 분석이 가능함. 본 결과를 토대로 한 단일 동물 체세포의 전능성 초기 역분화 과정 중 전능성 획득 분석을 그림 34를 통하여 나타냄.

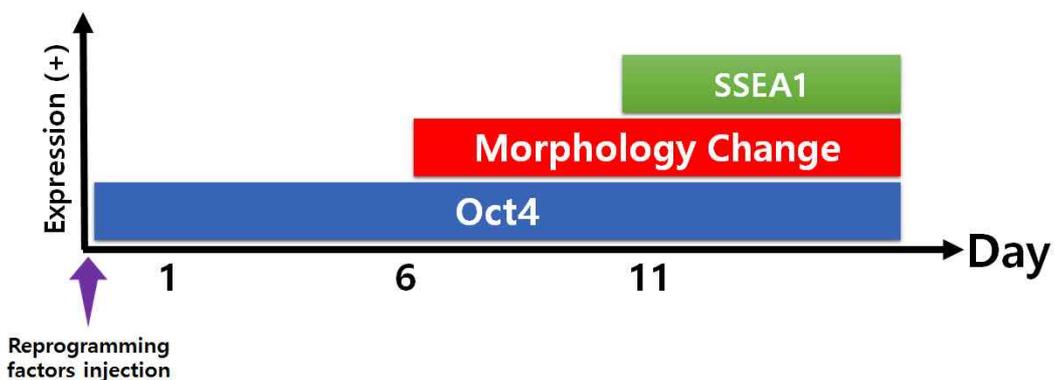
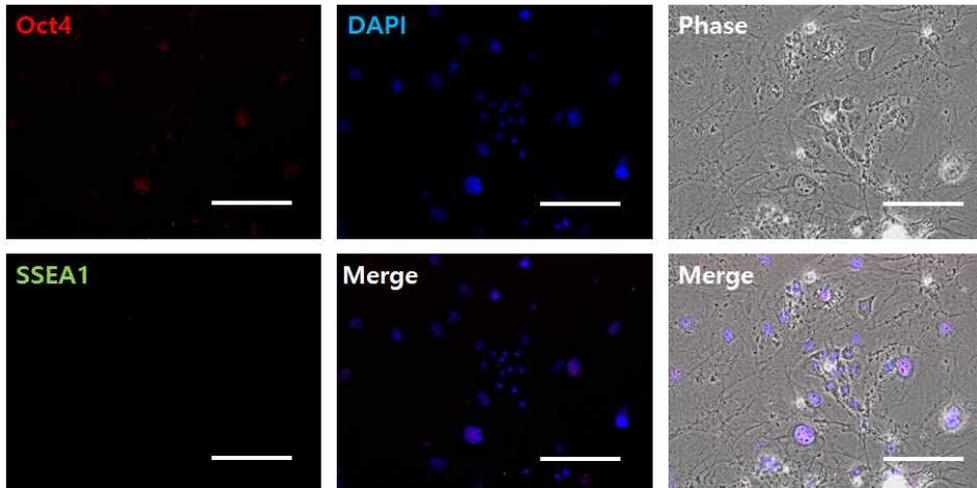


그림 34 단일 동물 체세포의 시간 변화에 따른 초기 역분화 과정의 유전자 발현 시기 분석

1000hPa / 0.9s



3.3.9 인간 태반 세포를 통한 역분화 줄기세포 제작 시도

▣ 당해 3차년도 목표와는 번외로, 2,3 세부 연구팀과 협력 연구를 시행하여 인간 체세포의 역분화 인자 전달 확인 및 초기 역분화 과정의 정량적 평가에 대한 연구를 진행함. 인간 세포 모델은 인간 태반 세포(Human placenta cell)을 선정하였으며, 단일 세포 단위로 실험을 진행하여 초기 형태변화를 관찰함 (그림 35). 본 실험에서는 Media B의 조성에서 4일에서 7일 이내로 인간 태반 세포의 형태변화가 관찰되었고 이를 통해 형태 변화가 일어난 인간 태반 세포 내 초기에 전달해 준 역분화 인자의 발현 여부를 관찰함 (그림 36). 본 연구 또한 상기 동물 체세포의 초기 역분화 과정 확립 방법과 같은 방법으로 전능성 마커의 발현 시기와 전달 유전자의 소멸 시기를 규명하기 위한 실험 진행 중에 있음.

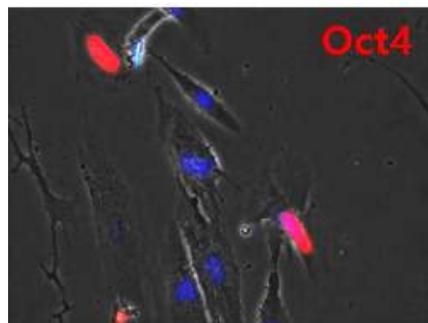


그림 36 인간 태반 세포에서 나노 기술을 통해 전달된 역분화 인자 확인

3.3.10(위탁) 나노전달기술을 이용한 인간 체세포 내 역분화인자 전달 능력 평가

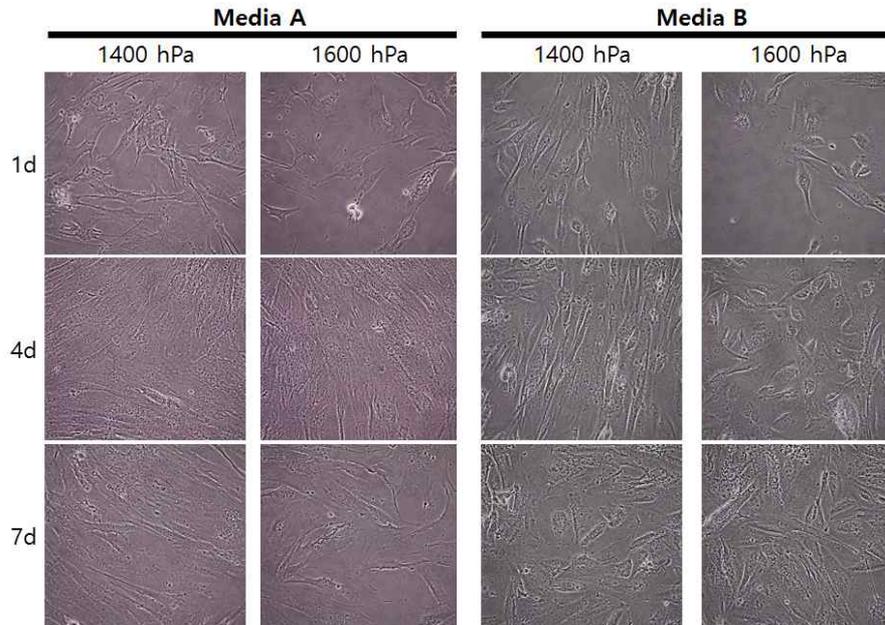


그림 35 1400hPa/0.6 sec, 1600hPa/0.6 sec 두 실험 조건으로 세포 배양 Media 조성 여부를 달리하여 시간 흐름에 따라 세포의 형태변화를 관찰

Plasmid(μ L)/Lipofectamine(μ L)	2	4	6	8
2 μ L	1:1 16.86 %	0.5:1 18.65 %	1:3 15.87 %	0.25:1 16.01 %
2 μ L + GNR + Laser	35.40 %	37.14 %	39.95 %	42.33 %
6 μ L	3:1 21.03 %	1.5:1 20.50 %	1:1 22.70 %	0.75:1 24.20 %
6 μ L + GNR + Laser	51.90 %	60.30 %	62.10 %	61.60 %
12 μ L	6:1 8.06 %	3:1 19.4 %	2:1 18.3 %	1.5:1 21.11 %
12 μ L + GNR + Laser	11.80 %	51.90 %	56.28 %	60.55 %
18 μ L	9:1 10.21 %	4.5:1 14.17 %	3:1 18.60 %	2.25:1 22.03 %
18 μ L + GNR + Laser	11.21 %	46.94 %	50.45 %	52.43 %

표 6 리포펙타민과 플라스미드의 비율 및 유전자 전달 효율

■ 유전자 전달 효율이 가장 좋은 플라스미드와 리포펙타민의 조합을 찾기 위해 리포펙타민 2, 4, 6, 8 μ L 양에 플라스미드 2, 6, 12, 18 μ L 양을 각각 혼합하여 위 표 1에 나타나있는 비율별로 실험을 진행하였음. 플라스미드 양이 6 μ L이고 리포펙타민의 양이 4, 6, 8 μ L 일 때 유전자 전달 효율은 각각 60.30 %, 62.10 %, 61.60 % 로 관찰되었으며 통계적으로 유의한

차이는 없었음. 반면 플라스미드의 양을 18 μ L로 늘려주고 리포펙타민의 양을 4, 6, 8 μ L 처리하였을 때는 오히려 6 μ L의 플라스미드를 넣어주었을 때보다 약 10 % 정도 유전자 전달 효율이 낮아지는 것을 관찰할 수 있었음 (표 6). 그 이유는 플라스미드양이 적정수준보다 세포 안으로 많이 전달되었을 때 오히려 플라스미드끼리 복합체를 형성하여 유전자 발현을 저해할 수도 있기 때문임. 위의 결과를 바탕으로 유전자 전달효율이 가장 좋다고 판단되는 플라스미드와 리포펙타민의 비율이 1:1로 관찰되었으며 그 비율로 양을 증가시키면서 유전자 발현 효율을 관찰하였음(그림 37). 그림 6을 보면 플라스미드와 리포펙타민의 양이 각각 12 μ L일 때까지 유전자 전달 효율은 60.0 % 이상을 유지하였으나 플라스미드 18 μ L 양에 리포펙타민을 18 μ L 혼합하여 세포에 처리하였을 경우 유전자 발현 효율이 약 20.0 % 정도 감소하는 것을 관찰 할 수 있었음. 유전자 전달 효율을 종합적으로 관찰했을 때 나노전달기술을 이용하여 리포펙타민의 전달 효율성을 높이기 위해서는 리포펙타민과 플라스미드의 비율과 세포에 처리해주는 양이 중요한 것으로 확인되었음.

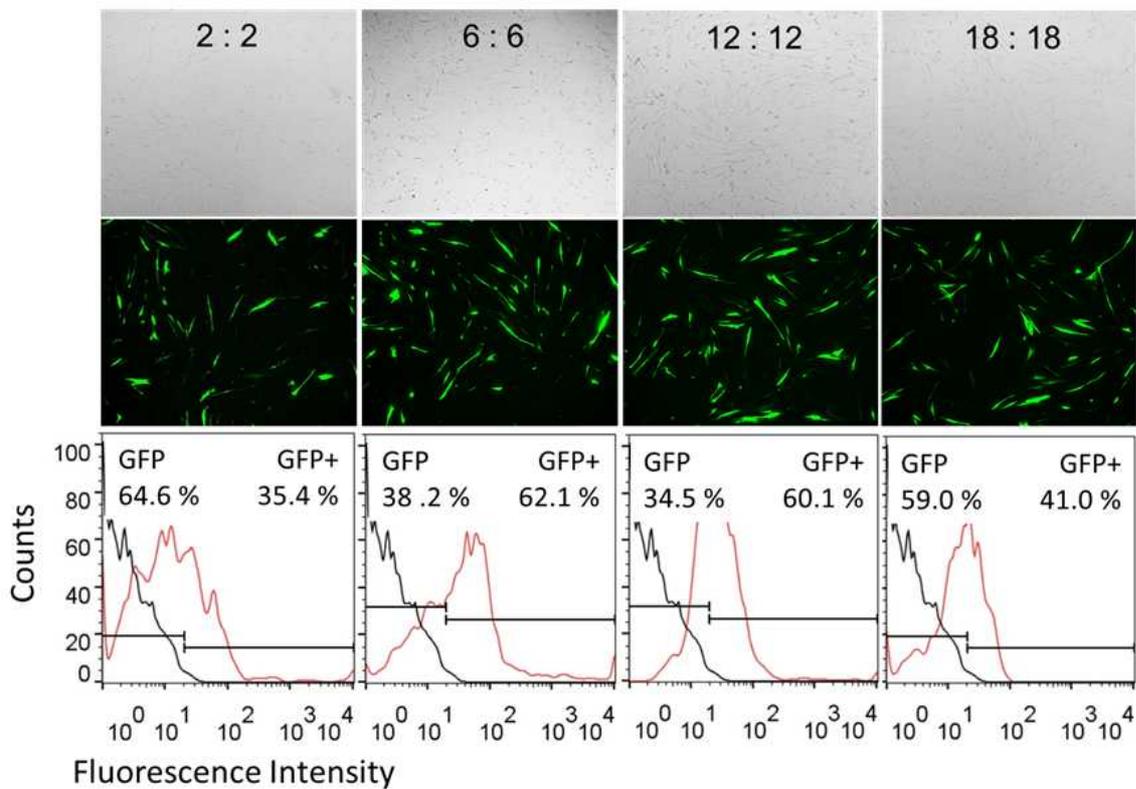
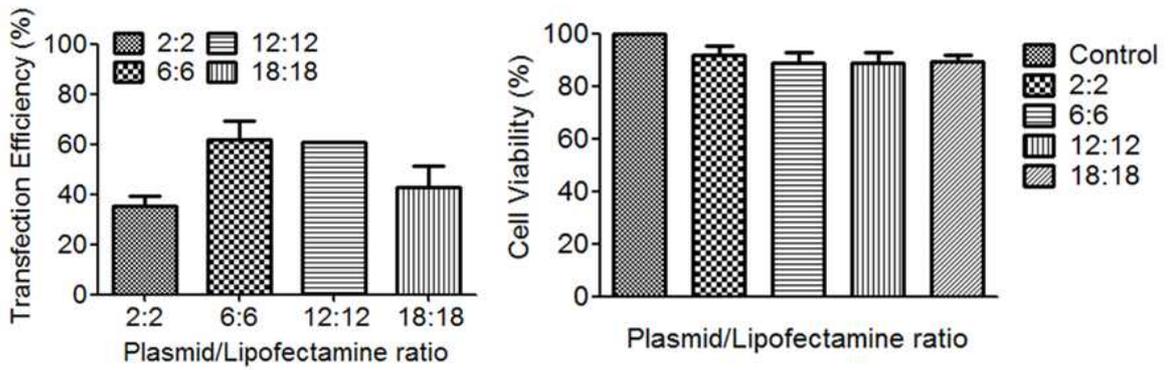


그림 37 리포펙타민과 플라스미드의 비율을 1:1로 고정시키고 양을 증가시키면서 유전자 전달 효율 측정. (a) 유세포 분석기를 이용하여 유전자 전달 효율을 분석, (b) 세포 활성도 측정. (c) 나노전달기술에 의해 유전자가 세포에 전달된 후 세포 활성도를 미분간섭현미경을 통해 관찰 (c, upper). eGFP 발현 현상은 형광현미경을 통해 관찰(c, middle). eGFP 형광발현률을 유세포 분석기를 통해 관찰(c, lower)

위의 실험결과에서 나노전달기술을 통해 유전자를 전달 할 때 리포펙타민과 플라스미드의 최적의 비율이 1:1이라는 것을 확인하였음. 위 실험결과를 바탕으로 2차년도와는 다르게 체세포를 유도만능줄기세포로 변환 할 수 있는 대표적인 유전자 OCT4, KLF4, SOX2, c-Myc을 각각 1.5 μ L씩 취하여 리포펙타민 6 μ L와 혼합한 뒤 1×10^5 cells/well에 처리하였음. 그리고 위 역분화인자의 1차 항체인 Rb-OCT4, Rb-KLF4, Mx-SOX2, Mx-cMyc을 처리하고 그 다음 형광이 달린 2차 항체를 처리하여 형광현미경을 통해 단백질 발현 여부를 확

인하였음. Mx를 표적하는 2차 항체는 Alexa549 파장을 가지는 형광물질로써 녹색으로 보이며 Rb를 표적으로 하는 2차 항체는 Alexa488파장을 가지는 형광물질로써 빨간색 보임. 파랑색은 세포의 핵을 염색하는 DAPI염색약을 처리한 결과이고 세포의 핵의 위치를 파악하기 위해 염색하였음. 만약 세포에 처리해준 역분화인자가 단백질로 발현이 잘 되었다면 핵에서 그 기능을 수행하기 때문에 핵과 핵 주변에서 강한 신호를 보이며 관찰 될 것임. 최적의 비율로 역분화인자를 처리해준 결과 4 가지 유전자 모두 핵 안과 그 주변에서 잘 발현되었음을 확인할 수 있었음 (그림 38). 이 결과를 통해 본 연구실에서 개발한 나노전달기술은 역분화세포를 생산할 수 있는 가능성이 충분하다는 것을 입증하였음.

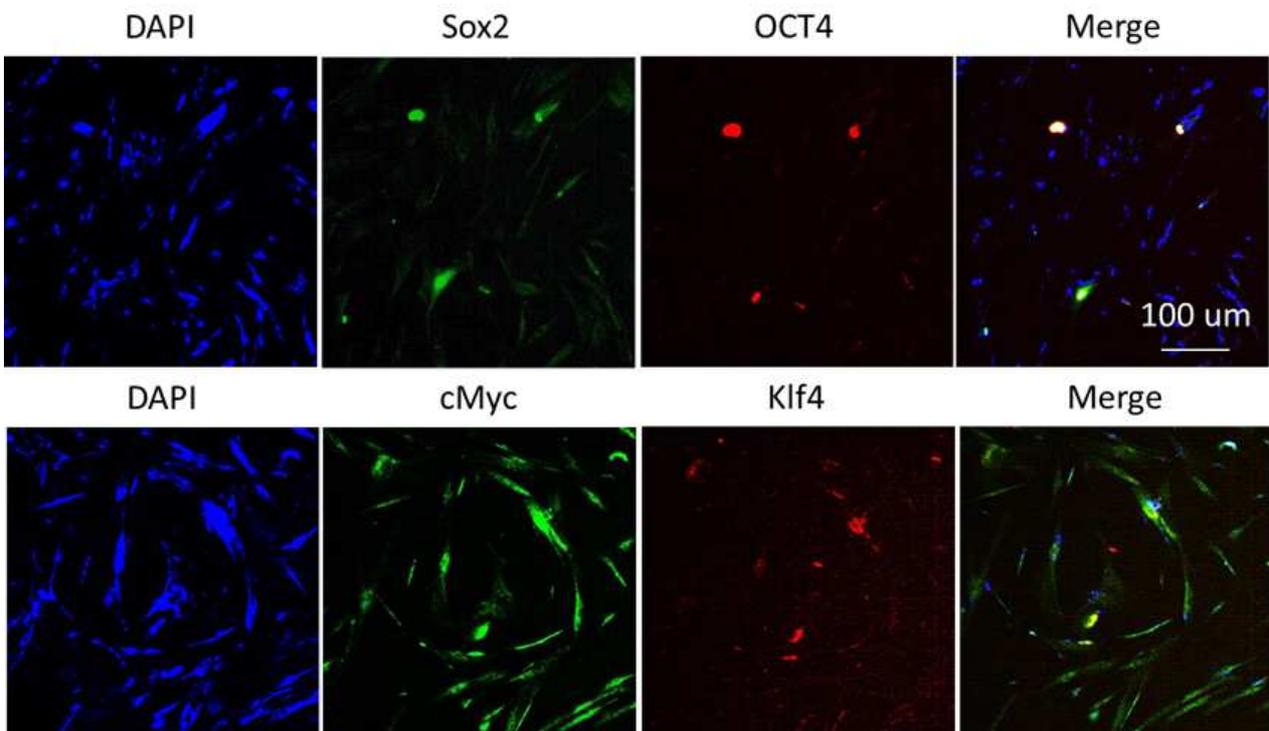


그림 38 나노전달기술을 이용하여 역분화인자(OCT4, KLF4, SOX2, c-Myc)의 전달가능성 측정

3차년도 결과 요약

- 단일 세포 내 정량적 유전자 전달 방법 정리 및 단일 세포 내 유전자 발현의 정량 분석 방법 고안 (Biomaterials에 게재)
- 단일 동물 체세포의 역분화 기전 분석 및 전능성 마커 발현 확인
- 인간 태반 세포를 기반으로 한 역분화 줄기세포 제작 시도
- 유전자 전달 효율이 가장 높은 리포펙타민과 플라스미드의 조합 조사
- 나노전달기술을 통해 역분화인자 전달 후 발현 단백질 측정

3.4 4차년도 연구개발수행 내용 및 결과

3.4.1 체세포의 역분화 과정분석

▣ 체세포에 역분화 인자(Oct4, Klf4, Sox2, cMyc)를 전달하였을 때, 특정세포로 분화되는 방법은 1) 체세포에서 바로 특정 기관 세포로 분화하는 직접 변환(Direct conversion) 2) 역분화 인자가 전달되어 부분적으로 초기 역분화 단계에 있는 세포들이 외부의 특정 자극에 의하여 특정 기관 세포로 분화하는 것을 직접 분화(Direct reprogramming) 3) 완전한 역분화 과정을 거쳐 형성된 전능성을 획득한 줄기세포가 특정 유도 방법에 의하여 특정 기관 세포로 분화하는 방법으로 나뉨.(그림 39). 직접 교차 분화 방식은 기존의 완전한 역분화 과정을 거쳐 유도 만능 줄기세포를 유도한 후 특정 기관 세포로 분화과정을 거치는 방법에 비해 빠르게 특정 기관 세포로 분화가 가능함. 게다가 분화하기 위한 과정이 단순화 된 만큼 분화를 하기위한 효율이 크게 증가할 수 있음. 또한 주로 바이러스를 이용하여 만들어지는 유도 만능 줄기세포보다 높은 안정성을 가지기 때문에 분화된 특정 기관 세포를 질병 모델에 바로 적용하는 것이 가능함. 게다가 직접 교차 분화 과정은 역분화 과정을 거치지 않는 직접 교차 변환 방법과는 다르게 역분화 과정을 거치기 때문에 역분화 과정의 기전을 분석하는 것에도 용이함. 이에 본 연구진은 확립한 나노인젝션 시스템을 직접 교차 분화에 적용하여 특정 기관 세포로 분화과정을 확인하고, 전달되는 유전자의 양을 정량적으로 조절하여 직접 교차 분화 기전을 분석함.

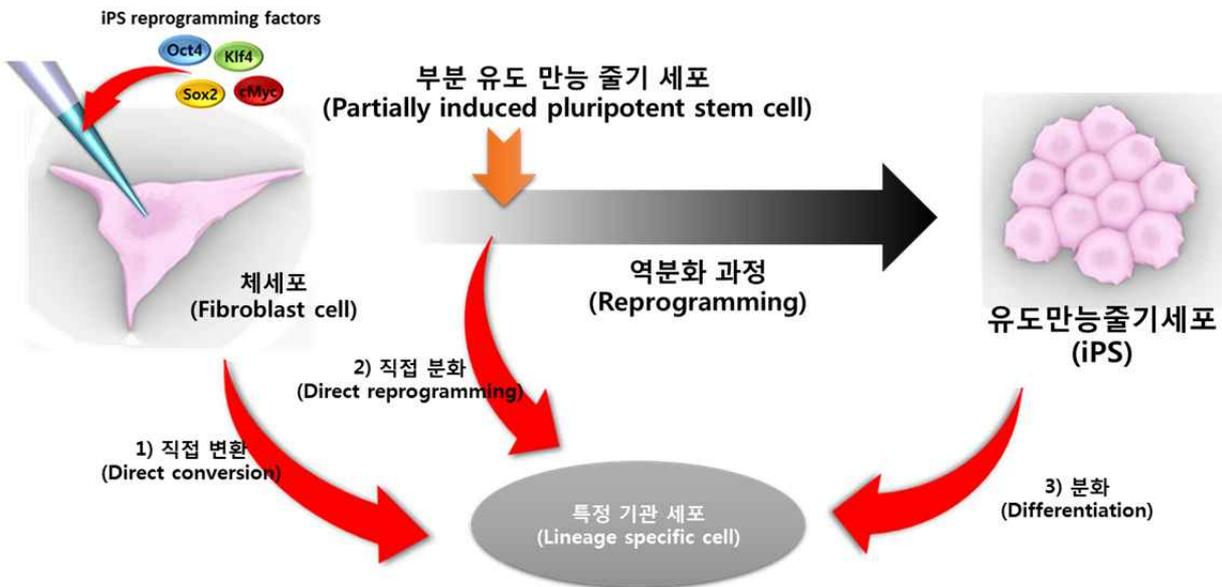


그림 39 체세포에 역분화 인자 전달시 특정 세포로 분화하기 위한 과정 모식도

3.4.2 정량적 역분화 인자 전달에 따른 유전자 별 강도 및 유지율

▣ 확립한 Nanoinjection을 통한 단일 세포 내 유전자 전달을 이용하여 단일 세포에 역분화 인자를 정량적으로 전달하였을 때, 역분화를 위한 인자마다 발현되는 세기와 유지되는 기간을 확인함. 본 연구진이 선행하여 진행했던 GFP 유전자 연구결과에 근거하여 1700DNA와 2500DNA를 기준으로 일정 간격으로 DNA양의 변화를 주고 그 발현 차이를 관찰하였음. 단일 체세포에 적은 양의 DNA를 전달하였을 때, 일부 유전자가 발현 되지 않음을 확인함. 또

한 단일 체세포 안에 일정 양 이상의 DNA가 전달되었을 때, 다른 조건에 비해 유전자가 발현되는 기간이 짧아지는 것을 확인함. 이러한 역분화 인자의 초기 발현 양상을 고려하여 정량적인 역분화 인자의 전달량이 직접 교차분화에 초기 변화 양상에 미치는 결과를 확인함.

3.4.3 체세포의 형태변화 및 역분화 과정 확인

■ 확립된 나노 인젝션 시스템의 유전자 전달 방법을 이용하여 동물의 체세포에 정량적으로 2500개의 역분화 유전인자를 주입하였을 때, 역분화 과정을 확인하고, 형광 추적을 통해 세포의 배엽성을 조사함. 완전한 역분화 과정을 위한 줄기세포 미디어에서 세포를 키웠을 때, 변화한 세포의 발현된 유전자를 분석하였음 (그림 40). 단일 세포 단위로 유전자를 전달한 후 역분화를 지켜보는 과정에서 독특한 형태로의 세포 구조적 형태변화가 일어남. 이러한 형태변화 세포들의 정체성을 파악하기 위하여 중합효소 연쇄반응을 살펴 본 결과, 형태의 변화를 보이는 세포가 각각 3배엽성 마커를 발현함을 확인하였다. 내배엽성 마커(AFP), 체세포가 아닌 중배엽성 마커(BMP4), 외배엽성 마커(Nestin, Musashi)가 전부 발현되는 것을 확인함. 이를 통해 유전자가 전달된 체세포가 부분 유도 만능 줄기세포(Partially induced pluripotent stem cell)로 역분화 하여 각각의 3배엽 상태 세포로 분화할 수 있는 기전을 확인함.

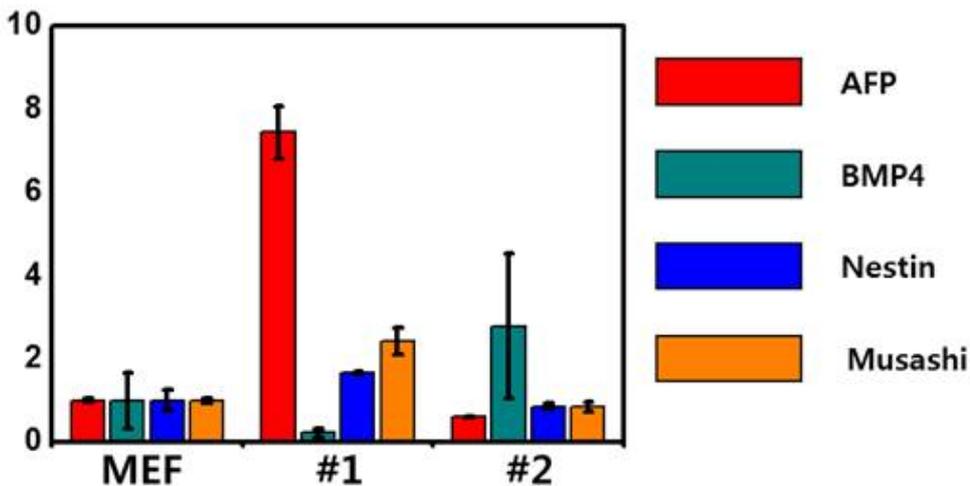


그림 40 동물 체세포에 정량적인 역분화 인자를 전달 시, 역분화 과정과 배엽성 파악을 위한 분화된 세포의 발현된 유전자의 종류에 대한 PCR 그래프

3.4.4 정량적인 역분화 인자 전달을 통한 신경줄기세포로 직접 교차분화 유도

■ 최종 목표인 신경 세포로 직접 교차 분화하는 과정을 확인하기 위해, 직접 교차 분화를 신경 세포로 유도하기 위한 특정 자극을 주기 위해 신경줄기세포에 최적화된 환경에서 역분화 인자를 전달한 체세포를 날짜에 따른 세포의 형태 변화를 확인함 (그림 41). 2500개의 DNA가 단일세포로 전달했을 때, 평균적으로 14일 이후 세포의 형태 변화가 확인됨. 14일 이후 변화된 세포를 Immunocytochemistry(ICC)를 통해 Sox1, Nestin, GFAP, Tuj1, Nurr1 같은 신경 줄기세포 형광 특이 마커를 확인하여 신경 줄기세포로 분화하는 것을 확인함 (그림 42).

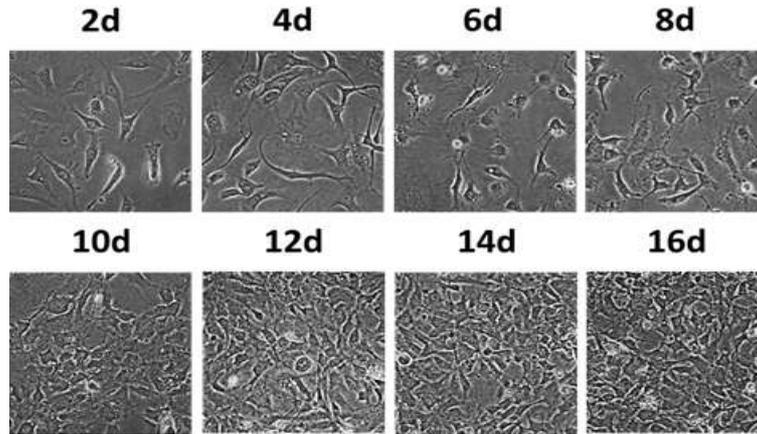


그림 41 DNA 2500개가 전달된 체세포의 날짜 경과에 따른 세포의 형태 변화

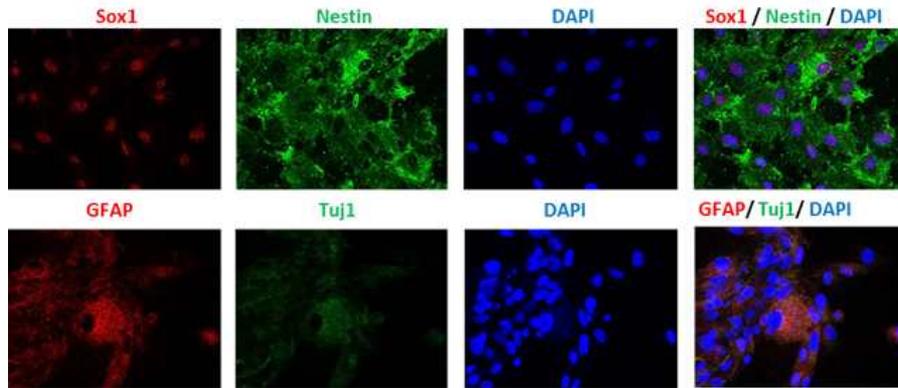


그림 42 역분화 인자 2500개가 전달되고 14일 이 경과한 세포에서 발현된 신경 줄기 세포 특이 마커의 ICC 이미지

▣ 역분화 인자가 전달된 세포에서 형태 변화한 세포들이 신경 줄기세포로 직접 교차 분화 과정을 거치는 것을 확인함. 일반적으로 세포분열을 통해 증식하는 세포에서 나타나는 Ki67 마커가 발현됨을 확인함 (그림 43). 증식은 체세포나 신경세포처럼 완전히 분화를 마친 특정 기관 세포에서 나타나지 않기 때문에 그림 42을 통해 체세포의 역분화가 진행되었음을 확인하였고, Ki67을 통해 특정 기관 세포로 완전히 분화하지 않은 신경줄기세포가 직접 교차 분화를 통해 형성되는 과정을 확인하였다.

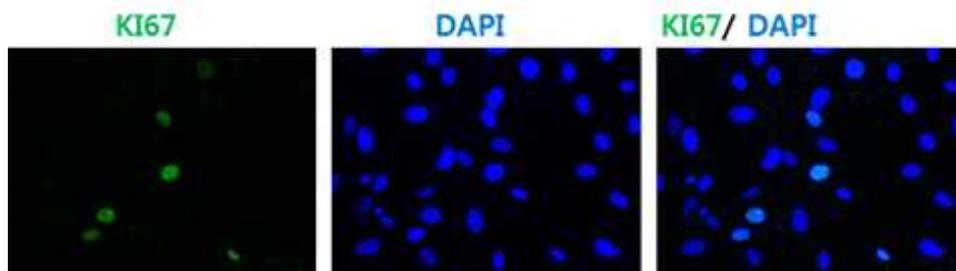


그림 43 역분화 인자 2500개 전달된 세포에서 14일 후에 발현된 증식 특이 마커 Ki67의 ICC 이미지

3.4.5 정량적인 역분화 인자 전달을 통한 신경줄기세포로 직접 교차분화 유도

■ 신경세포로 분화하는 세포의 기전을 파악하기 위해 역분화 인자가 전달된 기간에 따라 발현된 유전자의 양을 RT-PCR을 통해 확인함 (그림 44). ICC 결과를 통해 MEF에서 나타는 특이 마커인 Thy1은 유전자가 전달 된지 약 5일 후에 발현되는 형광의 세기가 절반이상 감소한 것을 확인하였고, PCR 결과 역시 발현된 유전자의 양이 절반이상 감소하는 것을 확인함. 반면 신경 줄기세포에서 나타나는 마커인 Nestin의 경우 7일 이후에 급격히 증가하는 것을 확인함. 이를 통해 MEF가 직접 교차 분화 과정을 통해 부분적 진행된 역분화 과정에서 MEF 본연의 체세포 특성을 잃고 신경 줄기 세포의 특성을 가지는 세포로 직접 교차 분화하는 과정임을 확인함.

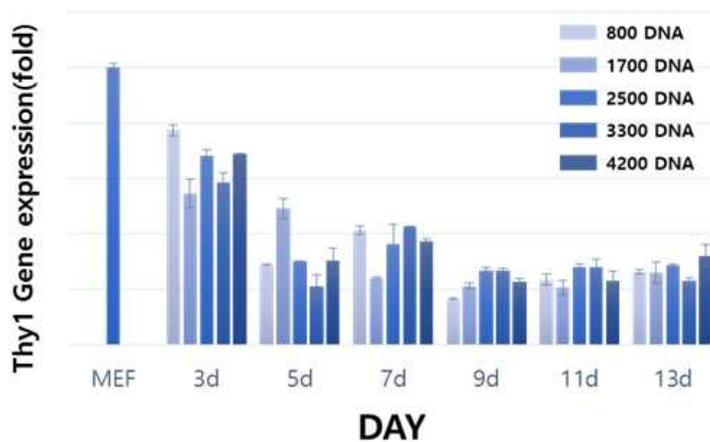


그림 44 주입 조건별 날짜 경과에 따른 MEF 특이마커(Thy1)의 발현량 감소 확인 그래프

3.4.6 정량적인 역분화 인자 전달을 통한 신경줄기세포로 직접 교차분화 유도

■ 단일 세포 내 정량적으로 역분화 인자를 주입하여 유도된 신경줄기세포의 특정 신경기관 세포로 분화능을 확인함 (그림 45). 역분화 인자 주입 14일 후, 형성된 신경줄기세포에 신경 줄기세포 특성 유지 사이토카인이 제거된 환경에서 7일 배양 후 분화 유도에 성공하였으며 이에 면역형광 염색을 통하여 GFAP만 발현하는 신경 아교세포로 분화되었음을 확인함. 이를 통해, 단일 세포 내 정량적 역분화 인자 주입을 통하여 체세포에서 특정 기관 세포로 직접 교차분화를 유도가 가능함을 확인함.

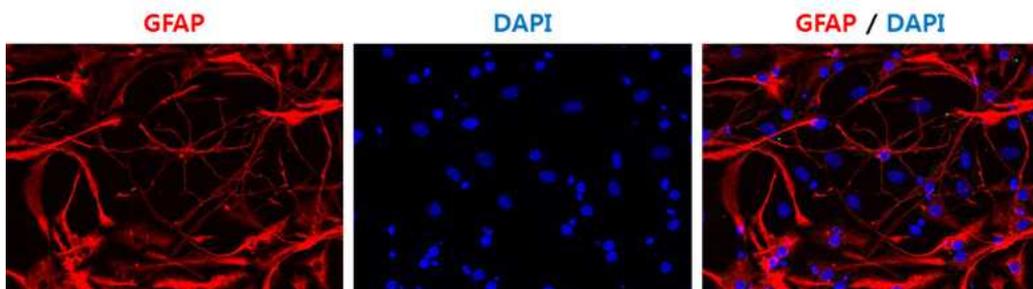


그림 45 직접 교차 분화를 통해 제작된 신경 줄기세포에서 분화된 신경아교세포의 ICC 이미지

3.4.7 (위탁) 나노전달기술을 통해 리포펙타민과 역분화인자의 조합 최적화

■ 본 연구진이 개발한 나노전달시스템을 이용하여 역분화 인자를 전달할 때 역분화 세포 생성효율이 가장 높은 조건을 조사하기 위하여 플라스미드와 리포펙타민의 다양한 조합을 설정하여 유전자 전달을 시도함 (표 1). 그리고 세포의 활성도에 영향을 미치지 않으며 역분화 세포를 생성할 수 있는 최적의 조건을 찾기 위해 유전자를 처리하는 횟수를 2회로 제한하고, 역분화 세포배양에 적합한 배양액으로 교체해주는 시기를 한정함 (그림 46). 그 결과 총 6 μ g의 플라스미드와 6 μ L의 리포펙타민을 나노전달시스템을 통해 세포에 전달하였을 때 유도만능줄기세포 콜로니가 형성되는 것을 관찰하였음.

Treatment Group	Laser irradiation time(h)	DNA conc.(μ g)	Lipofectamine conc.(μ L)	iPS colony no.
2A-L	0.5	1.5(1.0 OKC. 0.5 C)	1.5	0
2A		1.5(1.0 OKC. 0.5 C)	1.5	0
2B-L	0.5	3.0(2.0 OKC. 1.0 C)	3.0	0
2B		3.0(2.0 OKC. 1.0 C)	3.0	0
2C-L	0.5	6.0(4.0 OKC. 2.0 C)	6.0	1
2C		6.0(4.0 OKC. 2.0 C)	6.0	0

표 1 다양한 역분화 인자 비율을 이용한 역분화세포 분화효율 측정

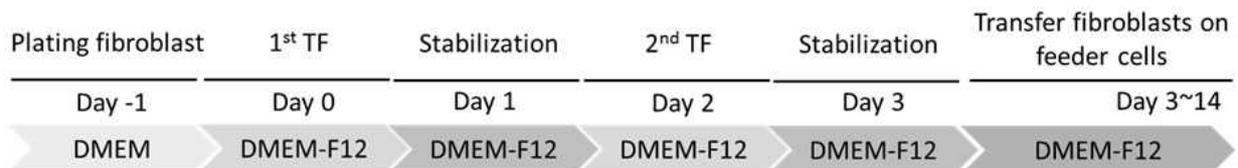


그림 46 나노전달시스템을 이용하여 역분화인자를 처리해주는 단계에 대한 모식도

3.4.8(위탁) 나노전달 기술을 통한 역분화 인자 전달 시 전달기전 분석

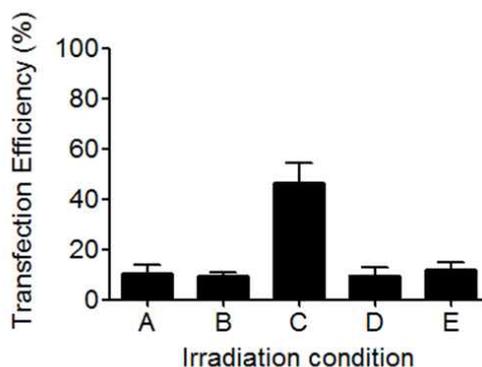


그림 47 나노전달기술을 통한 역분화 인자 전달 시 전달 기전에 대한 연구

▣ 본 연구팀에서 개발한 나노전달기술이 역분화인자와 리포펙타민을 세포내로 전달하는 기전을 연구하기 위해 역분화인자 대신 녹색형광을 발현할 수 있는 eGFP 플라스미드를 이용하여 A~E의 다양한 조건을 실험에 적용함 (그림 47). A는 금 나노막대를 세포에 먼저 처리한 후 30분 동안 레이저를 조사한 후 플라스미드와 리포펙타민을 30분 처리, B는 플라스미드와 리포펙타민을 먼저 30분 동안 처리한 후 금나노 막대를 처리한 후에 30분 동안 레이저 조사, C는 금 나노막대, 플라스미드, 리포펙타민을 한번에 처리한 후 30분 동안 레이저 조사, D는 금나노막대 없이 플라스미드와 리포펙타민만 처리, E는 아무것도 없는 배양액을 이용하였음. 그 결과 A의 조건은 D의 실험군에서 발현한 단백질의 양과 큰 차이가 없었음을 확인할 수 있었고 반대로 C의 조건에서는 단백질 발현양이 50% 가까이 높아졌음을 확인할 수 있었음. 이 결과를 바탕으로 세포막의 유동성은 광열효과가 발생한 시간에 한하여 변화가 나타나며 그 변화가 플라스미드와 리포펙타민이 효율적으로 세포내에 이입될 수 있도록 도와주는 역할을 한다는 것을 확인함. 또한 B의 조건을 살펴보면 이 조건에서의 단백질 발현양도 D의 조건과 차이가 없었다는 것을 확인할 수 있었음. 이 결과를 바탕으로 플라스미드와 리포펙타민이 세포내로 더 많은 양이 전달되기 위해서는 금 나노막대의 광열효과가 필요하다는 것을 의미함. C의 단백질 발현양은 D의 조건과 차이가 없었음을 확인되었는데 이는 금 나노막대에 의해 발생한 광열효과는 플라스미드와 리포펙타민의 고유 성질에는 영향을 미치지 않음을 의미함.

3.4.9 (위탁) 역분화 인자 전달 후 형성된 유도만능줄기세포의 특성 파악

▣ 2C-L의 조건에서 생성된 iPSc colony와 금 나노막대와 레이저를 처리하지 않은 2C그룹의 세포 형태를 관찰 하였을 때, 2C-L조건에서 iPSc colony와 유사한 모양을 가진 세포가 관찰되었음. 나노전달시스템을 통해 전달된 역분화인자에 의해 생성된 역분화세포의 특성을 파악하기 위해 체세포의 특성을 대표하는 Thy1 마커와 줄기세포의 특성을 대표하는 SSEA1 마커를 이용하여 역분화세포로의 분화 가능성을 파악함 (그림 48). 그 결과 체세포를 대표하는 Thy1마커는 시간이 지남에 따라 역분화인자를 처리하지 않은 체세포에 비해 점차 그 양이 감소함을 확인할 수 있었고 줄기세포를 대표하는 SSEA1마커는 역분화세포가 관찰되는 시점인 9일째에 역분화인자를 처리하지 않은 체세포에 비해 증가하는 것을 확인할 수 있었음.

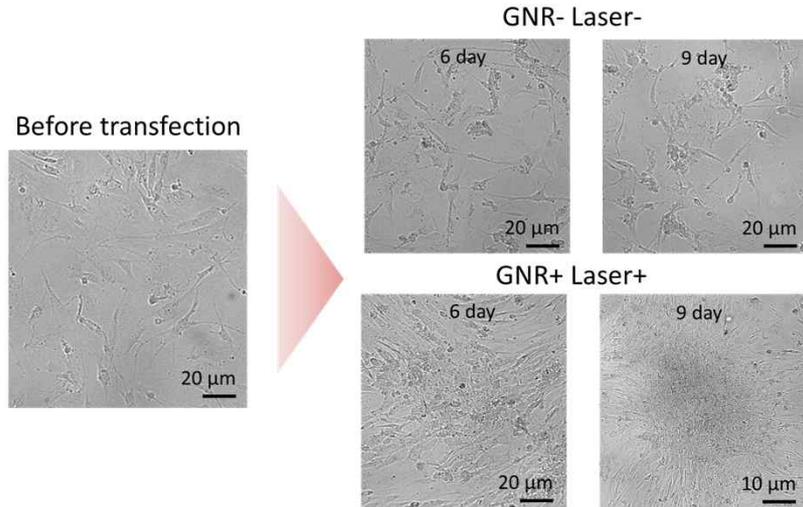


그림 48 나노전달시스템으로 전달된 역분화인자에 의한 체세포의 변화관찰

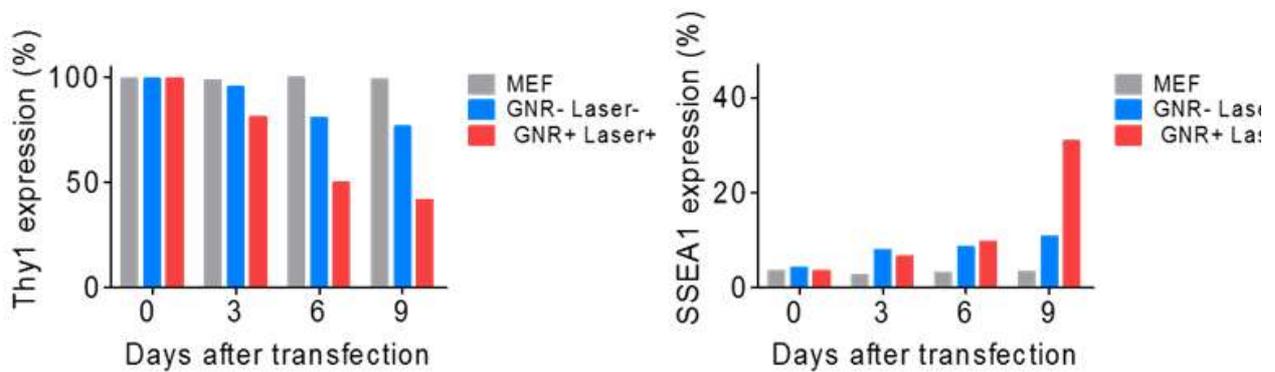


그림 49 체세포마커(Thy1)과 줄기세포마커(SSEA1)의 변화를 통해 체세포내의 변화확인

4차년도 결과 요약

- 단일 세포 내 정량적 유전자 전달 방법을 통한 직접 교차 분화 방법 확립
- 단일 체세포의 신경세포로의 직접 교차분화 유도 및 증식성 마커를 통한 확인
- 단일 동물 체세포의 직접 교차 분화 과정에서 관찰되는 신경 세포 특이마커 확인 및 신경세포 제작
- 리포펙타민과 역분화인자의 조합 최적화 및 기전분석
- 나노전달기술을 통해 역분화인자 전달 후 형성된 유도만능줄기세포의 특성 파악

3.5 5차년도 연구개발수행 내용 및 결과

3.5.1 정량적 인자 전달을 통한 신경아교세포의 직접 교차분화 과정 관찰

▣ 단일 세포내 더 많은 유전자가 전달되었음에도, 오히려 신경아교세포가 제작되지 않음. 이를 분석하기 위해 정량적으로 역분화 인자의 양의 차이를 두고 주입하여 정량적인 양 차이에 따른 신경아교세포로의 직접교차분화를 유도함. 이때 2500 개의 DNA를 주입하였을 때는 신경아교세포와 비슷한 형태의 세포가 발견되었으나 그 외의 조건에서는 뚜렷한 형태 변화가 보이지 않음. 이 과정에서 나타나는 유전자의 발현양상을 분석함 (그림 50).

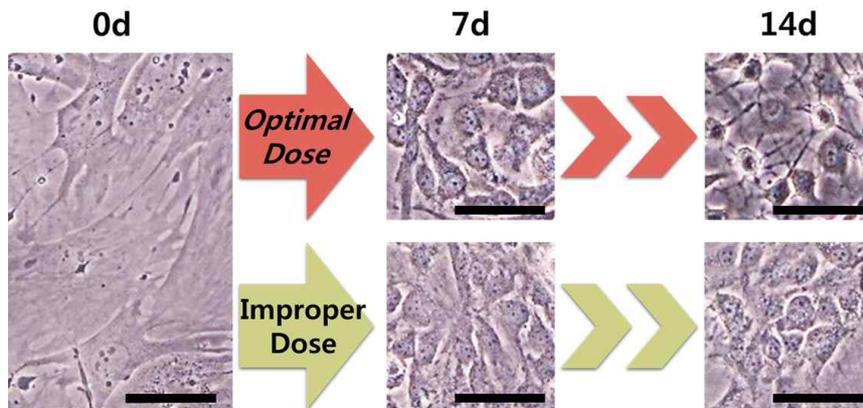


그림 50 정량적으로 전달된 유전자의 양 차이에 따른 세포의 형태 변화 이미지

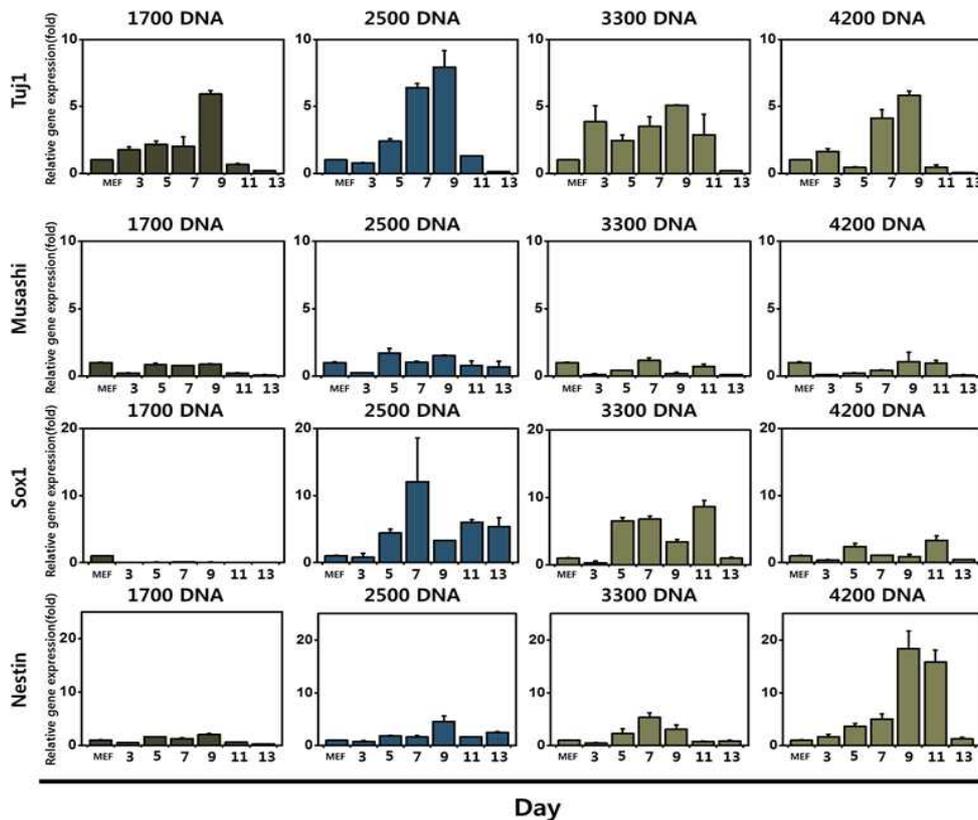


그림 51 정량적 양 차이에 따라 나타나는 신경세포 특이 마커의 발현 PCR 그래프

대부분의 신경세포 특이 마커들은 2500DNA에서 뚜렷한 형태 변화를 보이는 것과 달리 발현되지 않았거나 정량적양에 따른 경향 차이가 크게 관찰되지 않음 (그림 51). 하지만 신경아교세포의 특성마커로 알려진 GFAP 와 S100b의 경우 다른 양상을 보임. 대부분의 조건에서는 7일 이후에 발현이 감소하는 것이 확인 되었으나, 2500 DNA를 전달하였을 때에는 발현이 지속적으로 증가되는 것을 확인함 (그림 52). 이를 통해 본 연구진은 성상아교세포로의 직접 교차분화를 유도하기 위한 최적의 양이 2500 DNA 임을 확인함.

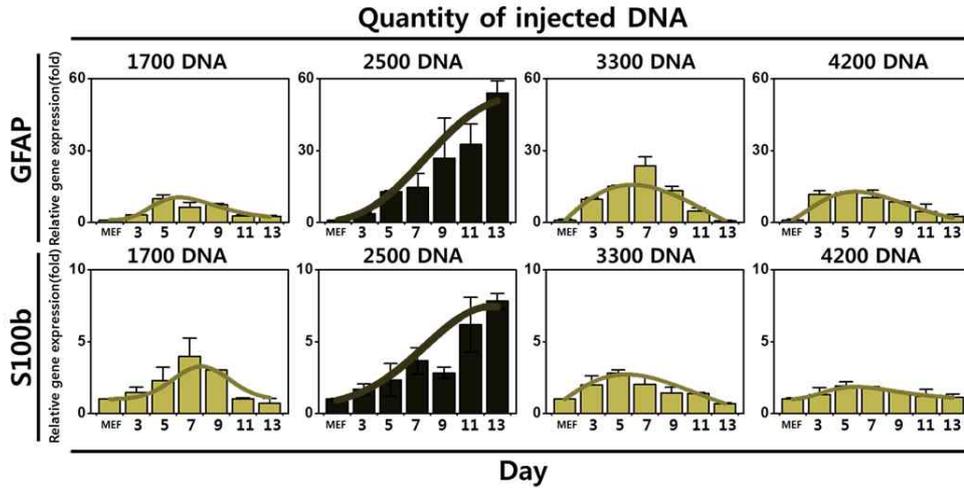


그림 52 정량적 유전자 차이에 따른 성상아교포 특이마커(GFAP,S100b)의 발현양상

3.5.2 정량적 차이에 따른 성상아교세포의 직접교차분화 경로 관찰

■ 단일 세포내 유전자의 양을 다르게 전달하였을 때, 나타나는 발현 양상이 다르고 많은 양을 전달하였을 때에는 다른 유전자가 발현되는 것을 확인하였기 때문에 양에 따른 경로의 차이가 있을 것으로 판단함. 역분화 인자 중 신경세포의 분화와 가장 연관 있는 Sox2를 기준으로 경로를 분석하였을 때, GFAP 발현을 조절하는 단백질로 예상되는 PAX6, BMP2, BMP4, BMP6 중 BMP2의 발현이 높게 나타나는 것을 확인함. 이를 통해 2500 개의 DNA가 전달 되었을 때, Sox2가 BMP2를 발현시켜 GFAP를 조절하는 것이라 판단됨 (그림 53). 많은 양의 DNA가 전달되었을 때, GFAP가 발현이 억제되고 Nestin 가 발현되는 것을 확인하여, 해당 연구진은 해외 주요 저널을 통해 많은 양의 DNA가 전달되었을 때 FGF2를 발현하여 GFAP를 억제하는 것이라 예상함.

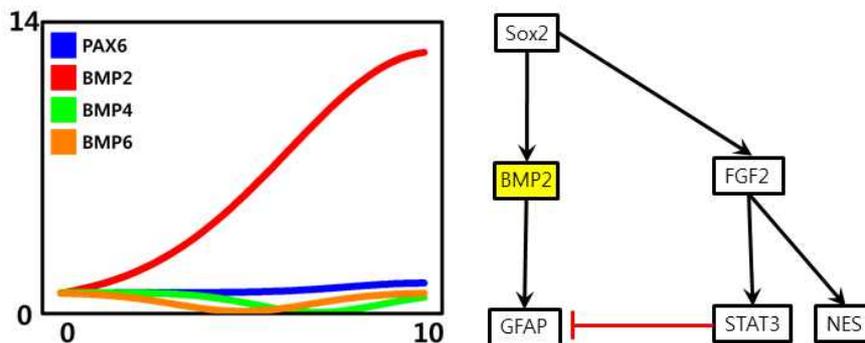


그림 53 정량적 양 차이에 따른 성상아교세포로의 직접 교차 분화 과정 예상 경로

3.5.3 단일인간체세포의 직접 교차분화를 위한 전달 조건 최적화

■ 단일 동물 체세포는 발생 초기의 동물모델에서 쉽게 얻을 수 있는 반면에 인간의 체세포는 오랜 기간 성장을 거치면서 보다 많은 passage를 거치기 때문에 단일 체세포의 리프로그래밍을 유도하기 위해서는 더 많은 양의 DNA와 시간이 필요하다 판단함. 하지만 기존의 4가지 인자를 전달하는 방식으로는 원하는 양을 전달하려면 인간 체세포에 손상이 있음을 확인함. 이에 기존에 역분화인자 중 신경세포와 가장 밀접한 Sox2만을 이용하여 Sox2의 농도를 높여 더 많은 양의 Sox2를 주입하고자 함. 앞선 단일동물체세포의 경우와 비교해 보았을 때, 초기 발현이 잘 이루어지는 조건에서 신경세포로의 직접 교차 분화가 잘 될 것이라 예상함. 이에 Sox2만을 이용하여 정량적 양 차이에 따라 초기 발현 효율과 세기를 비교해 보았을 때, 동물 체세포와 달리 3300 DNA를 전달하였을 때 가장 발현이 잘되는 것을 확인함 (그림 54). 이에 따라 후속으로 진행되는 인간체세포의 직접 교차분화 3300 DNA를 전달하여 유도하고자함.

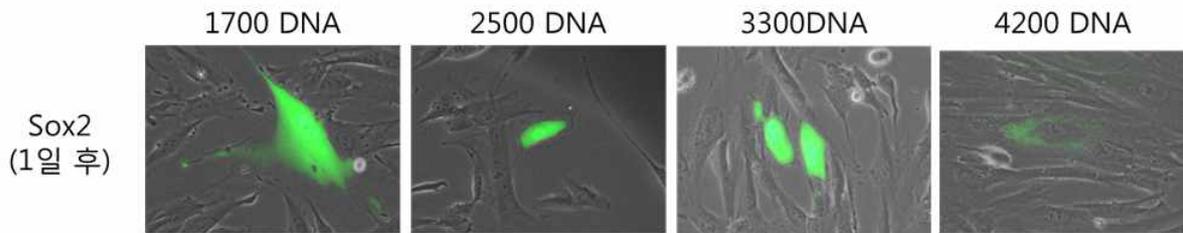


그림 54 단일 인간 체세포에 전달된 Sox2 양에 따른 형광발현 이미지

3.5.4 단일인간체세포의 직접 교차분화 과정 확인

■ 단일 인간 체세포에 Sox2 유전자를 3300개 전달하여 이때 직접 교차분화 과정에서 나타나는 변화를 관찰하였음. 유전자가 전달된 세포의 형태변화는 그림 55처럼 5일까지 뚜렷한 형태변화를 보이지 않음. 이때 세포의 특성을 확인하기 위해 Realtime RT-PCR을 통해 세포에서 발현되는 유전자를 확인함. 그 결과 초기의 Fibroblast cell 보다 Sox2가 높게 나오는 것으로 초기의 인자가 세포에 잘 전달되고 이후의 발현에 영향을 미치고 있음을 확인하였고, MEF와는 달리 Nestin, Sox1 과 Musashi1의 발현이 많이 나타남. 이러한 인자는 정상아교세포의 특이 마커가 아닌 신경세포들의 마커로 이는 단일 인간 체세포가 형태적으로 뚜렷하게 보이는 정상아교세포가 아닌 신경줄기세포로 리프로그래밍이 진행되고 있음을 의미함 (그림 56). 그림 57과 같이 유전자가 전달된 세포를 배양하였을 때, 5일 이후에도 신경세포의 대표적인 특이 마커인 Nestin과 Sox2가 잘 발현되고 있음을 형광 ICC를 통하여 확인함. 인간체세포는 동물체세포에 비해 Passage가 오래 되었기 때문에 형태적인 특징을 보이는 세포로의 분화를 위해서는 리프로그래밍 과정이 더 오래 필요할 것이라 판단됨. 이에 본 연구진에서는 세포가 가지는 안정성이 상대적으로 낮고, 리프로그래밍 과정이 더 필요할 것이라 판단하여 기존의 동물체세포에서 관찰되는 기간보다 더 길게 형태적 변화를 관찰 중에 있음.

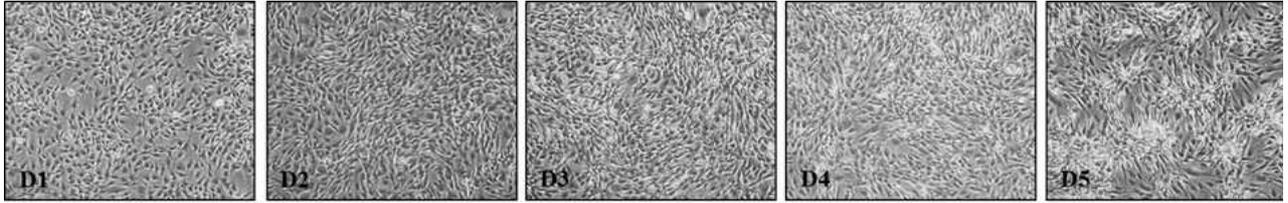


그림 55 Sox2가 전달된 단일 인간체세포의 형태 변화 이미지

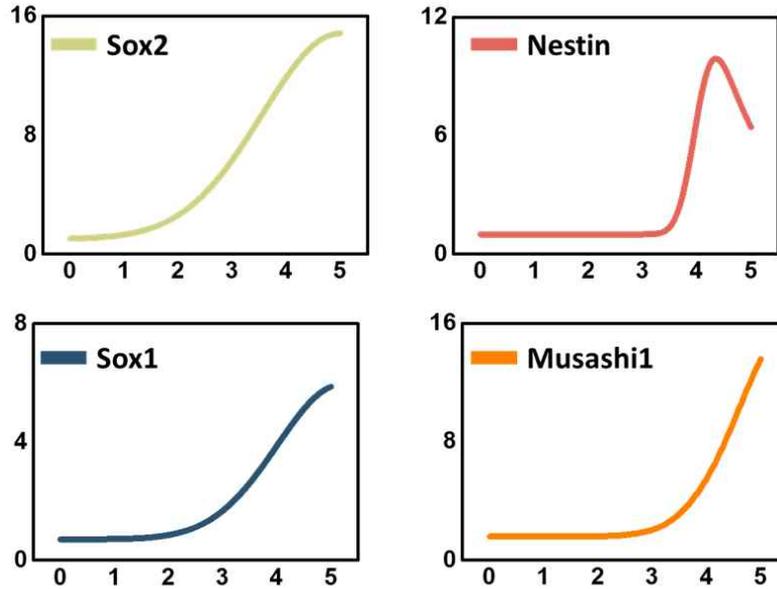


그림 56 3300개의 Sox2가 전달된 단일 인간 체세포에서 발현된 유전자의 PCR 결과 그래프

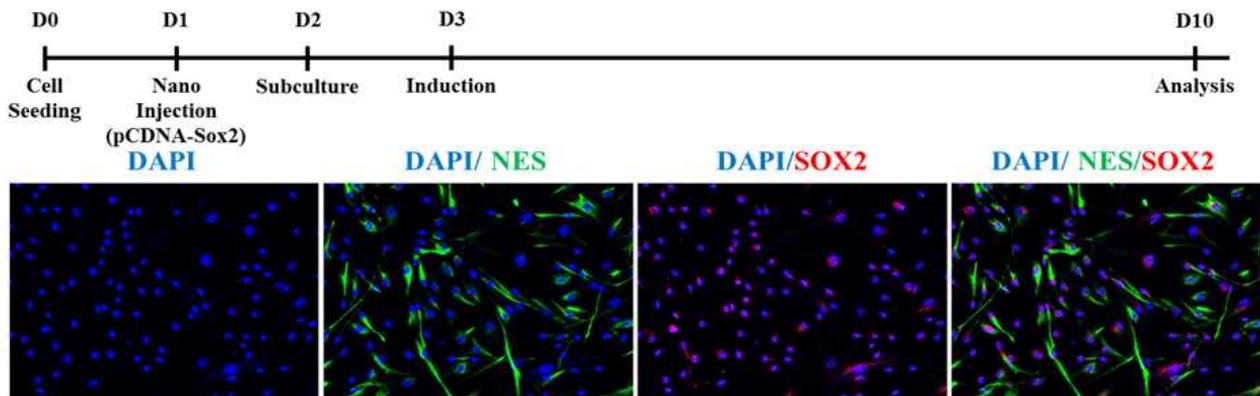


그림 57 Sox2가 전달된 단일 인간체세포에서 발현되는 신경세포 특이마커 ICC 이미지

3.5.4 단일인간체세포의 직접 교차분화 기전 분석

▣ 단일 인간 체세포가 직접 교차분화를 진행할 때 진행되는 경로를 확인함. 앞선 MEF의 연구에서 Sox2를 이용하여 GFAP로 가는 경로로 PAX6, BMP2, BMP4, BMP6 가 예상되었음. 이에 본 연구진에서는 단일 인간체세포가 직접 교차분화시 Sox2에서 GFAP를 조절하기 위한 인자중 어떤 인자가 발현되는지 PCR을 통해 확인함. 그 결과 단일 인간 체세포에 3300개의 Sox2가 전달되었을 때, 발현된 Sox2가 PAX6를 발현하는 것을 확인함 (그림 58). 이를 통해 나노인젝션을 통해 3300개의 Sox2 DNA가 전달된 단일 인간체세포를 성상아교세포로의 직접 교차분화를 유도하면 Sox2가 Pax6를 발현시키고 발현된 Pax6를 통해 성상아교세포의 특이마커인 GFAP를 발현할 것이라 예상된. 하지만 본 연구진에서는 동물체세포와 달리 동일한 인간 체세포를 얻는 것이 매우 어렵기 때문에, 이후의 질병모델이나 후속으로 진행하고자하는 연구와의 연계를 위해 특정기관세포로의 분화를 유도하는 방향이 아닌 신경줄기세포에 더 가까운 리프로그래밍을 유도할 필요가 있음. 하지만 인간체세포는 동물체세포에 비해 더 많은 Passge가 진행되어, 원하는 단계까지의 리프로그래밍이 일어나기 위한 시간이 더 필요할 것이고, 또한 세포의 안전성을 기존보다 더 확보할 필요가 있을 것이라 판단됨.

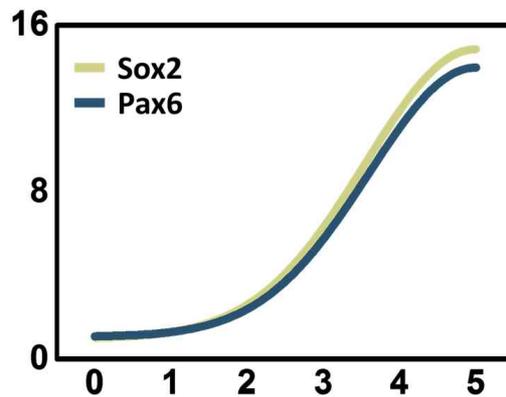


그림 58 3300개의 Sox2가 전달된 단일 인간 체세포에서 발현된 GFAP 조절 인자 PCR 결과 그래프

3.5.5(위탁) 효율적이고 안전한 역분화를 위한 동물체세포 내 역분화 인자 나노 전달 기술 최적화

▣ 본 연구진이 개발한 나노 전달 시스템을 통해 체세포로 전달된 역분화 인자 중 Oct4, Sox2, Klf4의 단백질 발현 가능성을 측정하기 위해 3일 간격으로 15일 까지 mRNA의 양을 Real-time PCR을 통해 정량하였음. 그림 59a는 나노 전달 시스템을 이용하지 않고 역분화인자를 전달한 경우이고, 그림 59b는 나노 전달 시스템을 이용하여 역분화 인자를 전달한 경우임. 두 그룹간에 mRNA의 양을 비교해 보았을 때, Oct4의 경우 mRNA의 양이 나노 전달 시스템을 통해 전달한 경우, 6일 째 최고치에 도달하였으며, 9일 째 까지 mRNA의 양이 유지되는 것을 확인할 수 있었음. 또한 Sox2와 Klf4의 경우에도 나노 전달 시스템을 사용하지 않고 역분화 인자를 체세포에 전달한 경우에 비해 나노 전달 시스템을 이용하여 역분화 인자를 체세포에 전달한 경우의 mRNA의 양이 각각 3배 이상 증가하는 것을 확인함.

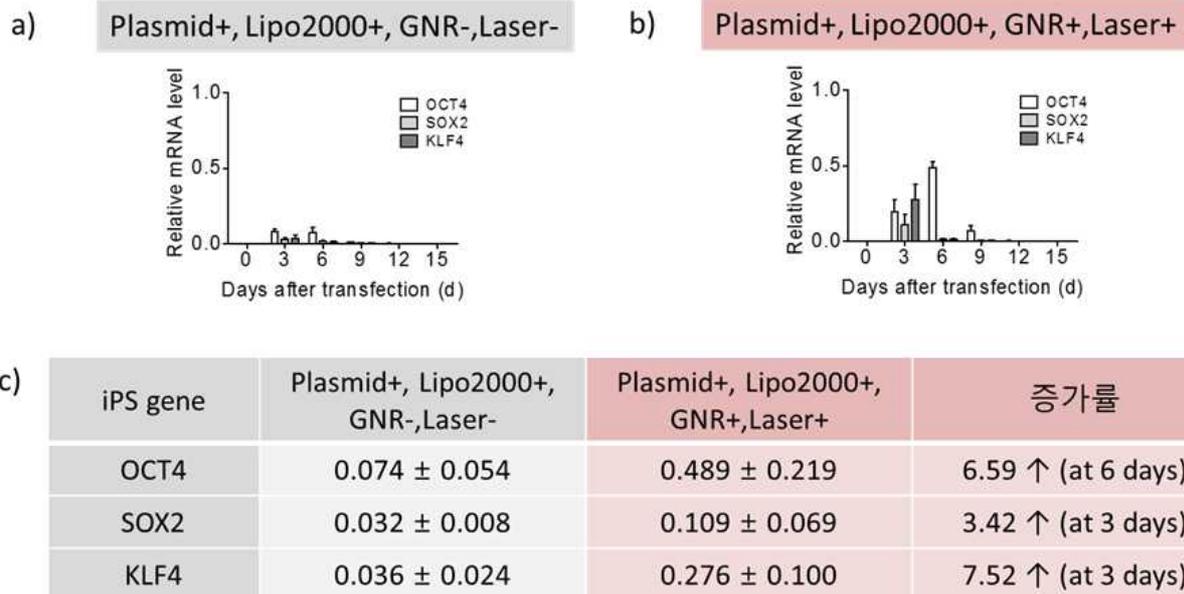
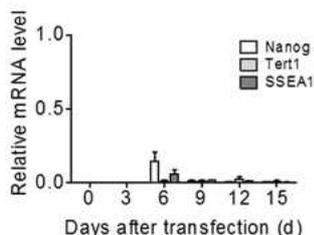


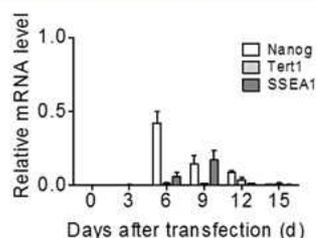
그림 59 역분화인자(OCT4, SOX2, KLF4) 전달 후, mRNA 수준에서 전달된 역분화인자가 발현되는지 확인함. **a)** 리포펙타민만을 이용하여 역분화인자를 체세포에 전달한 경우, **b)** 나노전달시스템을 통해 역분화인자를 체세포에 전달한 경우, **c)** **a)**와 **b)** 그룹의 전달효율을 비교정리.

전달된 역분화 인자를 통해 유도 만능 줄기세포로 변화가능한지 확인하기 위해 유도 만능 줄기 세포의 대표적인 특이마커인 Nanog, Tert1, SSEA1 의 mRNA양을 3일 간격으로 15일 까지 측정하였음(그림 60). 그 결과 체세포가 유도만능줄기세포로 변화할 때 가장 큰 영향을 미치는 것으로 알려진 Nanog 단백질을 발현할 수 있는 mRNA의 양이 6일 째 가장 높게 나타나는 것을 확인 하였고, mRNA의 양은 12일 까지 지속되는 것으로 관찰되었음. 또한 Nanog의 양을 대조군과 비교해 보았을 때, 나노 전달 시스템을 이용하여 역분화 인자를 전달한 체세포에서 Nanog의 양을 대조군과 비교해 봤을 때 나노 전달 시스템을 이용하여 역분화 인자를 전달한 체세포에서 Nanog가 발현될 확률이 약 12배 높은 것으로 확인되었음. 그 밖에 Tert1이나 SSEA1도 나노 전달 시스템을 통해 역분화인자를 체세포로 전달 하였을 경우, mRNA 수준에서 생성된 양이 대조군에 비해 각각 1.5배와 10배 많은 양이 생성되었음. 결과를 통해 본 연구진에서 개발한 나노전달시스템이 리포펙타민 만 단독으로 사용하여 세포 내로 유전자를 전달하는 경우 보다 확실하게 세포 내로 유전자를 전달하는 효율을 증가시켰음을 증명함.

a) Plasmid+, Lipo2000+, GNR-, Laser-



b) Plasmid+, Lipo2000+, GNR+, Laser+



iPS gene	Plasmid+, Lipo2000+, GNR-, Laser-	Plasmid+, Lipo2000+, GNR+, Laser+	증가률
Nanog	0.007 ± 0.004	0.088 ± 0.050	11.91 ↑ (at 12 days)
Tert1	0.026 ± 0.017	0.038 ± 0.015	1.45 ↑ (at 12 days)
SSEA1	0.017 ± 0.001	0.172 ± 0.003	10.00 ↑ (at 9 days)

그림 60 역분화인자(OCT4, SOX2, KLF4) 전달 후, 유도만능줄기세포로 분화가능성을 확인하기 위해 유도만능줄기세포 특이마커(Nanog, Tert1, SSEA1)의 mRNA 양을 확인함. a) 리포펙타민만을 이용하여 역분화인자를 체세포에 전달한 경우, b) 나노전달시스템을 통해 역분화인자를 체세포에 전달한 경우, c) a와 b 그룹의 전달효율을 비교정리.

5차년도 결과 요약

- 단일 체세포의 정량적 주입량 차이에 따른 직접 교차분화 과정에서 나타나는 신경아교세포 특성 마커 관찰
- 정량적 양에 따른 신경아교세포로의 직접 교차분화과정 경로(pathway) 확인
- 단일 인간 체세포의 직접 교차분화를 위한 인자 및 전달 조건 최적화
- 나노 인젝션을 통해 분화되는 인간체세포에서 발현되는 신경세포 특이 마커 확인
- 나노 전달 시스템을 통해 세포 내로 유전자를 전달하는 효율 증대

제4장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1. 목표 달성도

- 나노 기술을 이용한 정량적인 유전자 전달법을 구축하고, 안정적으로 체세포 내에 역분화인자를 전달함. 이를 통해 단일 세포 단위의 역분화 기전 분석을 위한 시스템을 구축하고 정량적 전달량 차이에 따른 단일 세포 내 유전자 발현 양상을 확인함. 이 과정에서 기존의 연구방법과는 다른 직접 교차분화로의 연구 방향을 설정하여, 많은 시행착오를 겪었지만, 기존의 역분화 보다 빠르고, 효율이 좋은 신경줄기세포의 제작하는데 성공함. 역분화 인자가 정량적으로 전달된 세포를 특정기관세포로의 분화를 유도하는 과정에서 나타는 유전자의 발현양상을 확인하였고, 이를 통해 신경아교세포를 제작하기 위한 최적의 정량적 양이 있음을 확인됨. 또한 그 과정에서 직접 교차분화 과정에서 발현되는 단백질 양상을 확인하여 분화 경로를 파악함.

2. 관련 분야 기여도

국내의 역분화 줄기세포 제작 뿐 아니라, 그 기전연구를 위한 원천기술의 개발도 미미한 실정에 본 연구를 통해 구축된 단일 세포 단위의 정량적 역분화 인자 전달 기법은 역분화 과정의 기전 분석 및 역분화 줄기세포 제작 효율 향상 등에 응용함으로써 안정적이고 효율적인 역분화 줄기세포 제작 방법을 개발하고 기전연구 원천기술을 획득하여, 국내의 연구 수준을 한층더 끌어올릴 수 있을 것임. 또한 비 바이러스성 역분화 기술을 통해 향후 임상 적용에서 우위를 선점할 수 있을 것이라 기대됨. 이 뿐만 아니라 뇌졸중, 파킨슨 병 및 척수 손상 질환 등과 같은 뇌질환의 세포 치료제와 신약 개발로도 활용되어 병원, 제약회사, 바이오벤처 회사의 새로운 기술 개발에 큰 기여를 할 것이라 판단 됨.

제5장. 연구개발성과의 활용계획

- 나노 기술을 기반으로 한 역분화 줄기세포의 제작은 역분화 과정의 명확한 기전규명에 활용될 수 있을 뿐만 아니라, 단일 세포 단위의 새로운 분석법을 제공하여 다양한 세포의 명확히 밝혀지지 않은 형질 전환 기전을 이해할 수 있는 방법으로 활용될 수 있음.

- 전달되는 정량적인 양에 따른 세포의 발현에 대한 접근 방법은 아직은 직접 단일 세포에 하나하나 전달하는 방식으로 그 효율의 한계가 있지만, 추후 자동화 시스템이나 처리하고자 하는 모든 세포에 동일한 양을 전달할 수 있는 시스템이 개발된다면, 기존의 나노 입자를 이용하는 방법이나 소분자 등을 이용하는 방법에 적용하여 전체적인 세포 발현에 관한 연구에 크게 기여할 수 있을 것이라 기대됨.

- 바이러스 도움 없이 안전하고 효율적으로 전달하여 역분화 과정의 정확한 기전을 이해하고, 안정적이고 정량적인 역분화 줄기세포 제작을 제어하여 추후 이를 통한 질병치료용 세포치료제로 활용될 수 있으며 이를 통한 경제적 수익을 창출 할 수 있는 기회를 갖출 수 있음.

- 나노 기술과 줄기세포의 융합연구를 통해 얻어진 본 연구 결과는 앞으로의 기술적 가치와 활용 가치가 매우 높아 확립된 본 기술을 통하여 국내외의 특허 출원 및 국제적 연구기업으로의 기술이전 가능성이 높음.

제6장. 연구 과정에서 수집한 해외 과학기술 정보

- 2012년, 미국, Peidong Yang 연구팀. (Nature Nanotechnology지에 발표)
나노와이어를 이용하여 단일 세포에 손상 없이 원하는 물질을 주입하고 이를 관찰하는 것을 성공.
- 2013년, 중국, Jinsong Li 연구팀. (Cell reserch지에 발표)
Zscan4 단백질은 유도만능줄기세포의 질을 향상시키고 DNA 손상을 감소시키는 것을 발견.
- 2013년, 미국 Casey C.Case 연구팀. (Stem Cells Translational medicine지에 발표)
FGF2 단백질이 Nestin 단백질의 발현을 유도하는 것을 발견
- 2014년, 일본, Takumi Era 연구팀. (PLoS One지에 발표)
TS12KOS 바이러스 벡터를 이용하여 침팬지혈액세포에서 역분화 시키는데 성공.
- 2014년, 미국, Kenneth Ndebele 연구팀 (Int J Environ Res Public Health지에 발표)
Arsenic trioxide가 유도만능줄기세포의 형태변화와 생존에 영향을 끼치는 것을 발견.
- 2014년, 미국, Jose B. Cibelli 연구팀. (Science지에 발표한 논문)
ASGF1A 가 세포의 역분화와 다기능을 유지하기 위해 필요하다는 것을 발견.
- 2014년, 이탈리아, Vania Broccoli 연구팀 (Stem Cell Reports 지에 발표)
특정 유전자를 이용하여 섬유아세포로부터 신경아교세포 제작 성공
- 2015년, 한국, 서울대학교병원 김효수 교수 연구팀 (Biomaterials지에 발표)
유도만능줄기세포에서 추출한 Zscan4 단백질을 주입한 세포가 역분화 속도가 10배 이상 증가한다는 것을 발견
- 2015, 미국, Bruce R. Conklin 과 Kevin E. Healy 연구팀.(Nature comminications지에 발표)
0.5mm 3차원의 심장을 유도만능 줄기세포를 이용하여 만들고 박동하는 데 성공.
- 2015년, 한국, 고려대학교 최연호 교수와 홍성희 교수 연구팀 공동연구. (Biomaterials지에 발표)
단일세포에 나노팁을 이용하여 정량적으로 유전자를 주입하고 그에 따른 발현량을 정량적으로 확인하는데 성공.

제7장. 연구개발성과의 보안등급

해당사항 없음

제8장. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입 기관	연구시설/연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록 번호

제9장. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전 조치 이행 실적

- 지정된 장소에서 연구 진행
- 온라인 안전교육 및 자체 안전교육을 실시
- 연구원의 건강 유지를 위한 건강 검진 참여

제10장. 연구개발과제의 대표적 연구 실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/ 기타	소속 기관명	역할	논문 게재지/ 특허 등록 국가	영향력 지수	논문 게재일 /특허 등록일	사사 여부 (단독 사사 또는 중복 사사)	특기 사항 (SCI 여부/인용 횟수 등)
1	특허	유전물질의 단일세포 내 정량적 전달 방법	고려대 학교	발명 자	대한민국		2016.02.25	중복	
2	특허	자가배열 햇스팟 형성을 이용한 동시 포획 및 탐지 방법	고려대 학교	발명 자	대한민국		2016.05.09	단독	
3	특허	금 나노입자의 광열효과를 이용한 효율적인 세포내 유전자 전달방법	KAIST	발명 자	대한민국		2017.09.06	중복	
4	논문	Spatio-temporally controlled transfection by quantitative injection into a single cell	고려대 학교	교신	BIOMATERIA LS	8.557	2015. 07	중복	SCI/1회
5	논문	Femtoliter Scale Quantitative Injection Control by Experimental and	고려대 학교	교신	BIOMEDICAL ENGINEERIN G LETTERS	0.470	2016.07	중복	비SCI
6	논문	Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells	KAIST	교신	INTERNATIO NAL JOURNAL OF NANOMEDICI NE	4.300	2014.05	중복	SCI/242회
7	논문	Surface Chemistry of Gold Nanoparticles Mediates Their Exocytosis in Macrophages	KAIST	교신	ACS NANO	1.3947	2014.06	중복	SCI/44회

제11장. 기타 사항

해당사항 없음

1. Simonis, Matthias, et al. "Survival rate of eukaryotic cells following electrophoretic nanoinjection." *Scientific reports* 7 (2017): 41277.
 2. Yoo, Junsang, et al. "Electromagnetized gold nanoparticles mediate direct lineage reprogramming into induced dopamine neurons in vivo for Parkinson's disease therapy." *Nature nanotechnology* (2017).
 3. Yang, Xiao-Fei, et al. "In vivo direct reprogramming of liver cells to insulin producing cells by virus-free overexpression of defined factors." *Endocrine journal* 64.3 (2017): 291-302.
 4. Ma, Zhen, et al. "Self-organizing human cardiac microchambers mediated by geometric confinement." *Nature communications* 6 (2015).
 5. Yan, Ruoxue, et al. "Nanowire-based single-cell endoscopy." *Nature nanotechnology* 7.3 (2012): 191-196.
 6. Aizman, Irina, Michael McGrogan, and Casey C. Case. "Quantitative Microplate Assay for Studying Mesenchymal Stromal Cell Induced Neurogenesis." *Stem cells translational medicine* 2.3 (2013): 223-232.
 7. Caiazzo, Massimiliano, et al. "Direct conversion of fibroblasts into functional astrocytes by defined transcription factors." *Stem cell reports* 4.1 (2015): 25-36.
 8. Kwon, Hyosung, et al. "Spatio-temporally controlled transfection by quantitative injection into a single cell." *Biomaterials* 67 (2015): 225-231.
 9. Kwon YW, Paek JS, Cho HJ, Lee CS, Lee HJ, Park IH, et al. Role of Zscan4 in secondary murine iPSC derivation mediated by protein extracts of ESC or iPSC. *Biomaterials*. 2015;59:102-15.
 10. Yoo, Seung Min, et al. "Electrotriggered, spatioselective, quantitative gene delivery into a single cell nucleus by Au nanowire nanoinjector." *Nano letters* 13.6 (2013): 2431-2435.
 11. O. Guillaume-Gentil, E. Potthoff, D. Ossola, P. Dorig, T. Zambelli, J.A. Vorholt, Force-controlled fluidic injection into single cell nuclei, *Small* 9 (2013) 1904e1907.
 12. Chow, Yu Ting, et al. "Single Cell Transfection through Precise Microinjection with Quantitatively Controlled Injection Volumes." *Scientific reports* 6 (2016): 24127.
 13. Grossier, R., et al. "Generating nanoliter to femtoliter microdroplets with ease." *Applied Physics Letters* 98.9 (2011): 091916.
 14. Yu, Jewon, et al. "Femtoliter scale quantitative injection control by experimental and theoretical modeling." *Biomedical Engineering Letters* 6.4 (2016): 250-255.
-

9. 뒷면지

주 의

1. 이 최종보고서는 과학기술정보통신부에서 시행한 바이오·의료기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 최종보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 과학기술정보통신부에서 시행한 사업의 연구개발 성과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.