

Analysis of characteristics of human adipose derived stem cell and confirmation of differentiation capacity of mouse chondroprogenitor cells

서울대학교 의과대학 의학과 김윤명(2016-11200), 분당서울대학교병원 성형외과 허찬영(lionheo@snu.ac.kr)

ABSTRACT

Adipose derived stem cell called as ASC is a kind of adult stem cell which can be isolated and cultured in the laboratory easily. Besides adipose tissue is quite abundant in the human body and ASCs can differentiate along multiple mesenchymal cell lineages. Owing to these favorable properties, the application of ASCs for clinical use is increasing steadily.

First of all, we isolated ASCs from the human adipose tissue by two times. And we characterized each cell lines by confirming mesenchymal stem cell surface markers and stemness genes expression via flowcytometry and real-time PCR techniques. After then, we isolated chondroprogenitor cells from mouse embryo and quantified the degree of chondrogenic differentiation of those cells in different culture conditions by Alcian blue staining and glycosaminoglycan assay.

This article shows that improving chondrogenic differentiation of mouse chondroprogenitor cells is available by coculturing with human adipose derived stem cells or only adding the media in which human adipose derived stem cells have been cultured. This result shows that interaction between two kinds of cells, which can be figured out upon the concept of paracrine effects, could increase the efficiency of chondrogenesis in vitro. Furthermore, the possibility of stem cell therapy in incurable cartilage disease can be opened up by examining and applying the conclusion that we suggest via various follow-up studies.

Keywords: Adipose derived stem cell, Stem cell therapy, Surface marker, Stemness gene, Paracrine effects, Chondroprogenitor cell, Chondrogenic differentiation.

INTRODUCTION

I-1. Basic Concepts of Stem Cell Sciences

줄기세포(stem cell)란 어떤 조직의 세포로 분화할지 아직 정해지지 않은 미분화 세포로서, 스스로 재생하고(self renewal) 다른 세포로의 분화 능력을 갖는(differentiation) 세포로서 정의된다. 대부분의 인체조직에는 여러 원인으로 조직에 손상이 가해졌을 때 이를 적절히 재생하기 위한 줄기세포가 존재한다. 이것이 바로 성체줄기세포이다. 성체줄기세포는 다른 세포들과 혼재되어 존재하기 때문에, 이를 선택적으로 분리하고 *in vitro*에서 배양하는 기술이 임상적 적용에 있어 가장 기본이 된다. 본 연구는 중배엽줄기세포(mesenchymal stem cell)의 일종인 ASC에 주목하여 인간의 지방조직으로부터 ASC를 분리, 배양, 저장하고 flowcytometry와 real time PCR 기법을 통해 인간지방유래줄기세포(hASC: human Adipose derived Stem Cell)의 특이적 표면항원(surface marker) 및 유전자 발현(gene expression)을 확인하고자 한다. 이를 통해 후속 연구에 사용할 수 있는 줄기세포성이 검증된 hASC stock을 확보할 수 있다.

I-2. Current Research on Stem Cell Therapy

줄기세포의 치료효과는 지금 이순간에도 수많은 연구를 통해 다방면으로 검증되고 있다. 단순 피부 상처는 물론 심근, 신경, 연골 등 기존에는 재생이 불가능하다고 여겨졌던 조직에서도 줄기세포가 유의미한 치료 효과를 갖는다는 사실이 보고되고 있으며, 치료 방법도 단순히 세포를 주입하는 방식을 넘어 얇은 층으로 배양해 부착하거나 세포가 분비하는 물질을 주입하는 등 여러가지 방식으로 시도되고 있다. 여기서 또 하나의 핵심적인 개념이 나오는데, 바로 줄기세포의 치료효과가 줄기세포의 분화 및 증식 자체만이 아니라 그들이 분비하는 물질에 의해 나타난다는 주장이다. 이를 주변분비효과(paracrine effect)라고 하며 주입된 줄기세포가 앞서 언급된 작용을 통해 손상조직의 세포사멸과 염증반응을 억제해 섬유화를 막고, 나아가 세포분열을 촉진하고 혈류를 증가시킴으로써 정상조직으로의 재생에 기여한다는 개념이다. 최근에는 실제로 줄기세포가 조직에 주입되었을 때 평균적인 생존기간은 길지 않은 편이며, 오히려 이들이 분비하는 물질이 원래 조직에 존재하던 세포를 자극해 조직 재생을 돋는, 즉 주변분비효과의 중요성이 더욱 크다는 결과가 보고되고 있다.

I-3. Characteristics of Chondroprogenitor Cells

연골전구세포(CP cell: Chondroprogenitor cell)는 연골세포로 분화가 가능한 일종의 전구세포로 embryo의 limb bud에서 분리할 수 있다. 퇴행성관절염(osteoarthritis)을 비롯한 연골관련질환은 일단 손상이 가해지면 자체적으로 재생이 거의 이루어지지 않기 때문에 만성적인 경과를 갖는 경우가 많다. 2012년 메디포스트의 줄기세포 치료제인 카티스템(cartistem)이 식약처의 승인을 받아 현재 임상에서 적용되고 있으며, 연골결손질환에서 점차 줄기세포 치료의 적용이 늘어나고 있고 추후 전망도 밝은 편이다. 따라서 본 연구는 hASC의 주변분비효과를 검증하기 위해 먼저 mouse의 연골 조직으로부터 CP cell을 분리 배양하고 이를 앞서 분리해낸 hASC 공배양할 것이다. 나아가 *in vitro*에서 hASC의 분비체(secretome)가 CP cell의 연골세포 분화(chondrogenic differentiation)에 미치는 영향을 분석하기 위해 Alcian blue staining 및 Glycosaminoglycan(GAG) assay를 통해 CP cell의 분화도를 정량화할 것이다.

MATERIALS & METHODS

II-1. Isolation and Culture of human Adipose derived Stem Cells(hASCs)

II-2. Flowcytometry(MSC surface markers)

II-3. Real-time PCR(Stemness genes)

II-4. Isolation of mouse Chondroprogenitor(CP) Cells

II-5. Coculture of hASCs on CP cells

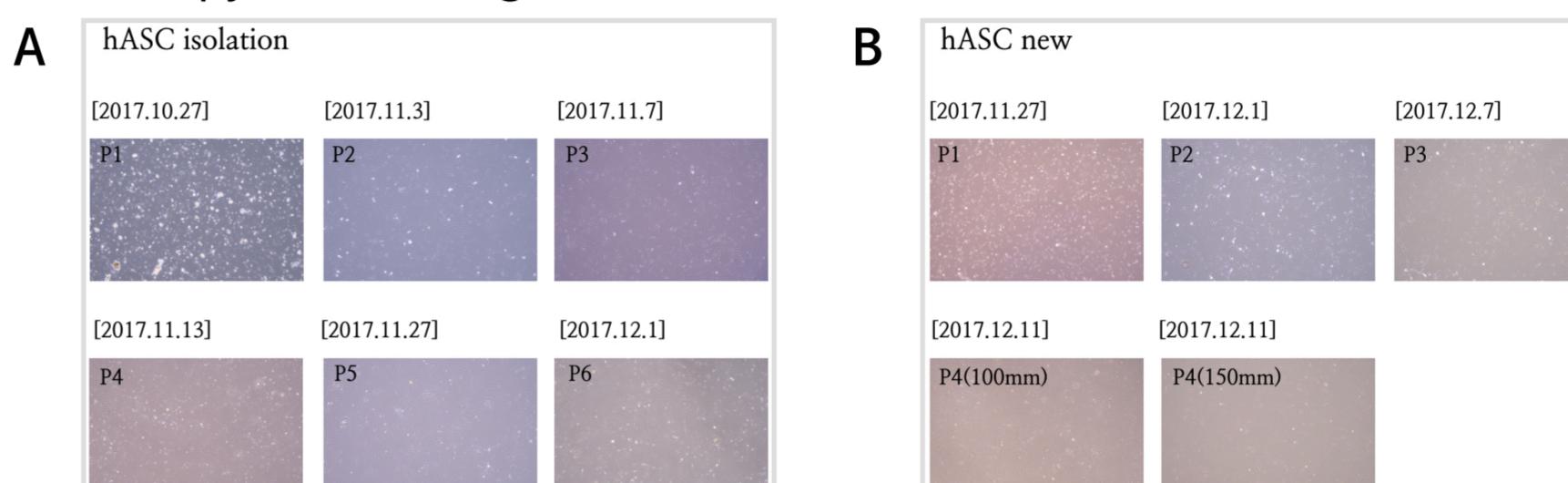
II-6. Alcian blue staining & GAG assay

RESULTS

III-1. Isolation and Culture of human Adipose derived Stem Cells(hASCs)

세포를 배양해나가며 하루 단위로 광학현미경을 사용해 40배 배율로 관찰 및 촬영을 수행하였다. 10월 25일에 분리한 cell line을 hASC isolation, 11월 22일에 분리한 cell line을 hASC new로 명명하였다. hASC는 뾰족하게 둘기를 뻗는 별모양의 특징적인 형태를 갖고. 배양 시 plate 바닥에 붙어서 자란다. 10주간의 관찰 결과 일반적으로 passage를 거듭할수록 세포의 특징적 형태가 소실되고 두꺼워지며 증식 속도가 현저히 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 흡입조직으로부터 분리한 hASC isolation과 절제조직으로부터 분리한 hASC new cell line 사이에 특징적인 차이는 관찰되지 않았다.

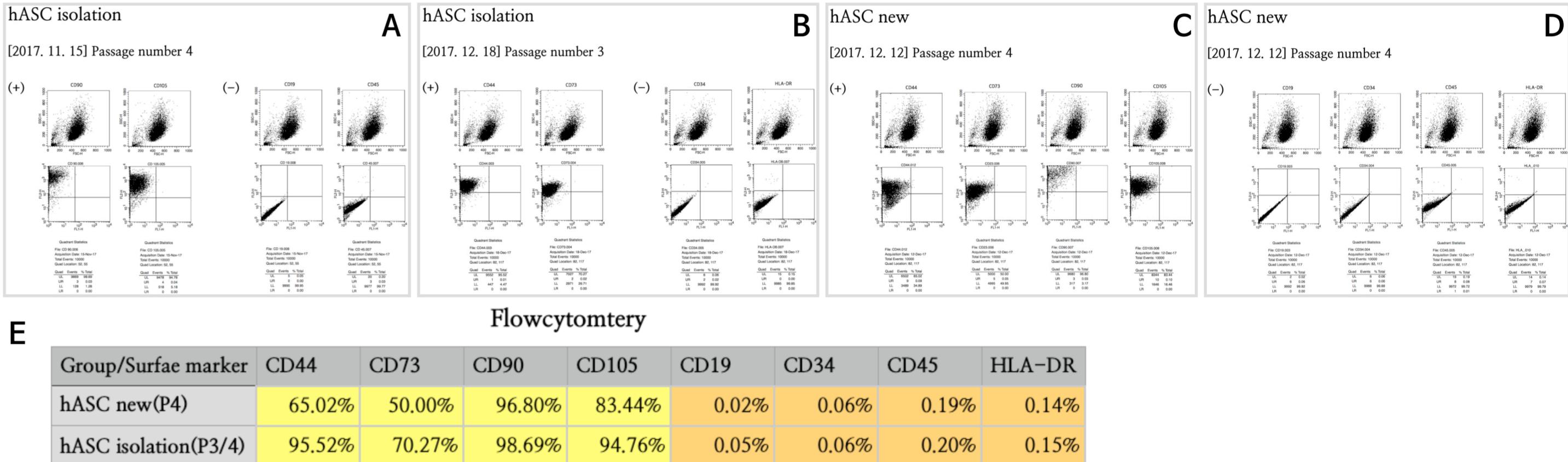
(Figure 1) hASC culture on 100/150mm plate with DMEM(10% FBS, 1% P/S) media observed daily with light microscopy at 40× magnitude



III-2. Characterization of Adipose derived Stem Cells: Flowcytometry

인간지방조직에서 분리해낸 두 종류의 cell line(hASC isolation, hASC new)에 대해서 flowcytometry를 통해 8종의 MSC surface marker(CD19, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, HLA-DR)의 발현 여부를 확인하였다. 두 cell line 모두 진행연구에서 제시된 MSC의 표면항원 발현 양상과 일치하는 결과를 보였다.

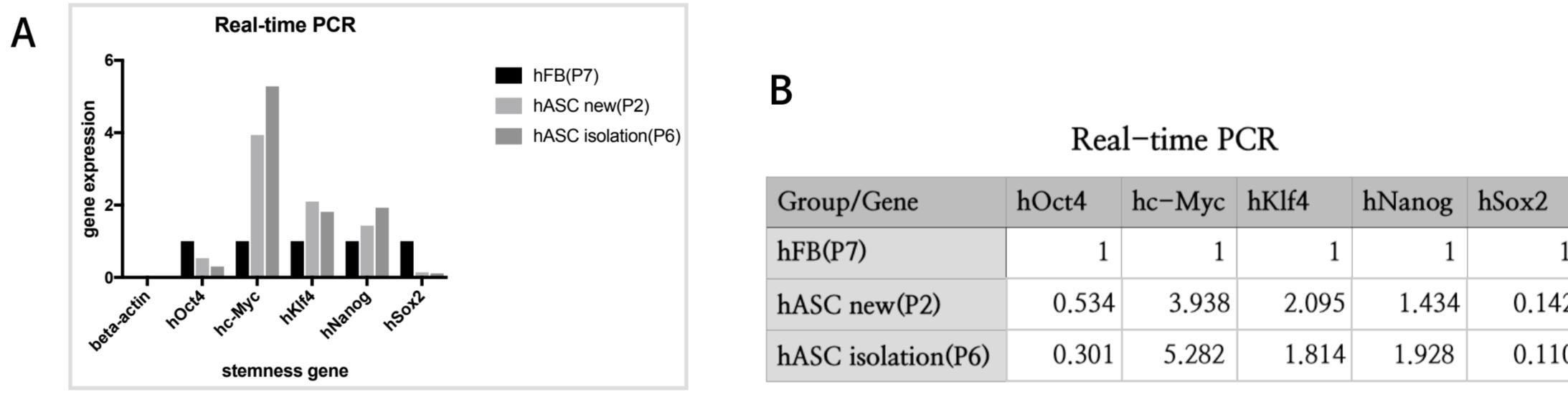
(Figure 2) Confirmation of MSC surface markers(CD19, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, HLA-DR) of two different hASC cell lines(hASC new, hASC isolation) by flowcytometry



III-3. Characterization of Adipose derived Stem Cells: Real-time PCR

인간지방조직에서 분리해낸 두 종류의 cell line(hASC isolation, hASC new)에 대해서 real-time PCR을 통해 줄기세포에서 특이적으로 발현되는 대표적인 유전자 5종인 Oct4, c-Myc, Klf4, Nanog, Sox2의 발현 양상을 확인하였다. 각 유전자의 상대적인 발현량을 계산하기 위하여 house keeping gene인 β -actin을 internal control로 삼았고, 일반세포와 발현 양상의 차이를 확인하기 위해 human fibroblast를 negative control로 채택하였다. 결론적으로 두 cell line(hASC isolation, hASC new) 모두 hFB와 비교했을 때 c-Myc, Klf4, Nanog의 발현량이 상대적으로 높고 Oct4, Sox2의 발현량은 상대적으로 낮게 나타났으며, 이는 기존에 stemness gene으로 밝혀진 유전자라고 하더라도 hASC가 특징적으로 많이 발현하지 않을 수 있음을 보여준다. 나이가 hASC의 줄기세포성을 판단할 때 Oct4, Sox2 보다는 c-Myc, Klf4, Nanog을 기준으로 삼는 것이 유리할 것이다.

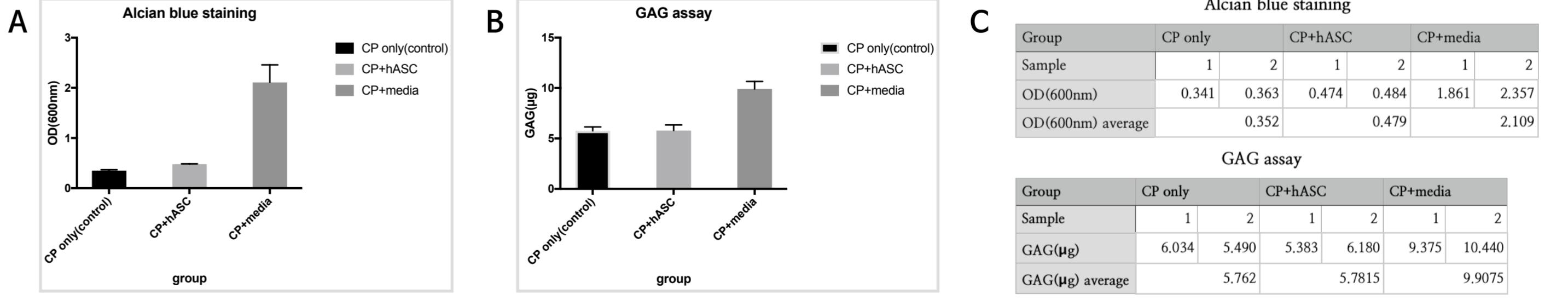
(Figure 3) Analysis of stemness gene(hOct4, hc-Myc, hKlf4, hNanog, hSox2) expression in two different hASC cell lines(hASC new, hASC isolation) by real-time PCR



III-4. Chondrogenic differentiation of CP cells mediated by paracrine pathway

세 가지 다른 배양 조건(CP only, CP+hASC, CP+media) 하에서 mouse embryo로부터 분리한 CP cell의 연골세포 분화도가 어떠한 차이를 보이는지 분석하고자 한다. 연골세포 분화도를 정량화하기 위해 Alcian blue staining, GAG assay 두 가지 기법을 채택하였다. 결론적으로 CP cell을 배양할 때 hASC를 배양한 media를 첨가하면 연골세포 분화가 유의미하게 촉진됨을 확인하였다. 반면 CP cell과 hASC를 공배양하는 것은 Alcian blue staining에서는 그 효과가 확인되었지만, GAG assay에서는 확인할 수 없었다. 따라서 두 실험결과를 종합하였을 때 CP cell의 연골세포 분화가 hASC의 측분비 효과를 통해 촉진될 수 있음을 확인하였고 그 효과는 hASC 배양액을 첨가할 때 더욱 뚜렷하게 나타나는 것으로 확인되었다.

(Figure 4) Alcian blue staining of mouse CP cells grown in three different conditions(CP only, CP+hASC, CP+media) for 7 days (Figure 5) The amount of glycosaminoglycans of mouse CP cells grown in three different conditions(CP only, CP+hASC, CP+media) for 7 days



DISCUSSION

줄기세포 치료의 도입에 있어 지방유래줄기세포의 전망은 매우 밝은 편이다. 다만 지방유래줄기세포를 임상에 적용함에 있어 어떻게 하면 치료 효과를 높이고 부작용을 최소화할 수 있을지에 대한 고민이 필요하다. 본 연구는 flowcytometry, real-time PCR, Alcian blue staining, GAG assay 등 다양한 실험기법을 활용해 다음의 결론을 제안한다. 먼저 hASC의 줄기세포성을 반영하는 MSC surface marker, stemness gene expression에 상당한 variation이 존재하며, 이는 공여자 차이, 세포배양 환경, passage number 등 다양한 요소에 기원할 것이다. 따라서 줄기세포 치료 목적으로 hASC를 사용하기 앞서 flowcytometry, real-time PCR 등의 방법을 통해 줄기세포성이 높은 세포를 선별하여 사용한다면 치료 효과를 높이는데 분명히 도움이 될 것이다.

더하여 기존에 효과적인 치료법이 없던 연골질환에 있어 줄기세포 치료의 전망이 밝다는 사실을 확인하였다. hASC의 paracrine effect가 CP cell의 연골세포 분화를 뚜렷이 촉진한다는 사실을 Alcian blue staining, GAG assay를 통해 확인하였으며, 이는 줄기세포 치료의 패러다임에 새로운 관점을 제안하는 결과이다. 직접 줄기세포를 주입하지 않더라도 그 배양액을 가함으로써 연골세포의 분화를 촉진할 수 있다면, 기존 줄기세포 치료제에 비해 생산하기 쉽고 안정성도 높은 줄기세포 배양액을 치료제로 개발할 수 있을 것이다. 나아가 줄기세포 배양액으로부터 유효 성분을 분리 정제해낸 다음 다양한 질병에 적용해보는 연구도 추후 시도해볼 수 있을 것이다. 줄기세포의 측분비 효과는 최근에 보고된 개념이며 현재도 활발히 연구가 활발히 진행되고 있는 분야이다. 본 연구를 비롯해 앞으로 줄기세포의 측분비 효과에 대한 다양한 연구가 진행된다면, 임상현장에서 보다 다양한 줄기세포 치료제가 개발되고 적용될 수 있을 것이다.

REFERENCES

- Kim, Eun-Hee, and Chan Yeong Heo. "Current applications of adipose-derived stem cells and their future perspectives." *World journal of stem cells* 6.1 (2014): 65.
- 조혜경. "인간 지방조직에서 분리된 줄기세포의 표면항원 및 다분화능 확인." *대한임상검사과학회지 (Korean Journal of Clinical Laboratory Science)* 40.2 (2008): 106-112.
- Bunnell, Bruce A., et al. "Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation." *Methods* 45.2 (2008): 115-120.
- Gronthos, Stan, et al. "Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells." *Journal of cellular physiology* 189.1 (2001): 54-63.
- Yoon, Hyung Moon, Seok-Jung Kim, and Tae-Gyun Kim. "줄기 세포를 이용한 관절 연골 손상의 치료." *Journal of Rheumatic Diseases* 19.3 (2012).
- Baraniak, Priya R., and Todd C. McDevitt. "Stem cell paracrine actions and tissue regeneration." *Regenerative medicine* 5.1 (2010): 121-143.
- Vizoso, Francisco J., et al. "Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine." *International journal of molecular sciences* 17.3 (2016): 1852.
- Gimble, Jeffrey M., Adam J. Katz, and Bruce A. Bunnell. "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine." *Circulation research* 100.9 (2007): 1249-1260.
- Yalcin, M. E., et al. "Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: implications in neo-vascularization."