

심근세포의 재생을 목표로 cell cycle mechanism 해명

-siRNA발현 adenovirus vector를 사용한 p27^{kip1}의 knock down

동경의치과대학 난치병환자연구소 genome 응용의학부문 유전생화학
동경의치과대학 대학원 질현생명화학연구부 genome 구조제어 연구부문

심근은 인간에서는 생후 1개월, Rat에서는 생후 2일에 최종분화에 들어가 증식을 정지한다고 한다. 그 후 심장의 성장은 심근세포 크기의 증가와 비심근세포(주로 fibroblast)의 증식에 의한 것이며 심근 자체는 분열능력을 상실한다. 이로 인해 심근경색 등과 같이 심근이 상해되었을 경우 심장의 일부는 수축능력을 가지지 않는 간질세포로 전환되어 심 수축력 저하를 초래하여 심부전에 이르게 된다. 이에 대하여 최근 심 조직에 증식능력을 가진 다기능성 간세포가 존재한다는 것이 알려졌으며, 이 세포는 허혈 등으로 심근장해가 발생하였을 경우 심근세포, 혈관내피세포, 혈관평활근세포 등으로 분화한다고 한다. 그러나 이 재생은 아주 미약하여 심 기능을 개선하기 전에 종종 심부전에 빠지는 경우가 많다. 종종 심부전은 예측하기 힘든 질환으로, 5년 생존율이 50% 이하이지만 현재 심근 이식 이외에는 근본적인 치료법이 없다. 그러나 심근을 재생시켜 저하된 심 기능을 개선할 수 있다면 종종 심부전에 대한 궁극적인 '심근재생요법'이 된다. 지금까지 '심근재생요법'으로 ES cell과 골수 간세포를 심근으로 분화시켜 세포를 이식하는 방법이 가장 유망하다고 알려져 있으나, 수여자와 공여자가 다른 donor 세포를 이식하기 때문에 면역 거부 반응과 이식한 세포의 심근 이외 조직에서의 분화 등의 문제를 해결해야 하는 난관이었다. 또한 ES cell을 사용하기 위해서는 윤리적인 문제도 해결해야 한다. 본 연구실에서는 부전 심근에 존재하는 심근세포 자체를 증식시키는 진정한 '심근분열 재생치료'를 위한 기술 개발을 목표로 연구를 진행시켜 왔으며, 본 고에서 최근 연구 결과를 소개하고자 한다.

(1) 심근 세포에서 cell cycle mechanism의 해석

분열 가능한 포유 동물의 cell cycle는 G0기의 정지상태에서 G1기, DNA가 합성되는 S기, G2기, 분열기인 M기를 거쳐 G1으로 돌아가 세포분열을 완결한다. 최근 cell cycle에 관한 다양한 연구가 이루어지고 있으며, cell cycle의 진행에는 cyclin과 cyclin에 결합하여 활성화되는 인산화 효소(cyclin dependent kinase, CDK)가 중요한 역할을 하고 있다는 것이 밝혀졌다. 그 중에서도 cyclin D는 cell cycle의 G1 중기에서 후기 사이에 발현하고, 3개의 family(D1~D3)가 동일한 것으로 인정되고 있다. CyclinD는 CDK4 및 CDK6 kinase와 결합하여 주로 암 억제 유전자 산물로 알려진 Rb 단백질을 인산화하여, Rb에 의해 억제된 전사인자 E2F가 활성화하여 cell cycle를 G1기에서 S기로 진행시킨다. 또한 cell cycle을 제어하는 CDK 저해인자(INK4 family, cip/kip family)로 불리는 분자도 존재하는 것이 밝혀졌다. 이에 대하여 마지막에 분화한 심근세포는 G0기에서 G1

기로 이행 또는 G1기의 진행이 불가능하여 분열되지 않는다고 생각되어, 많은 연구자들이 비증식세포인 심근세포의 증식억제 메커니즘을 밝히기 위한 연구가 이루어 졌다. 즉, 심근에서는 cyclin, CDK, E2F 등의 cell cycle를 정확하게 제어하는 인자의 발현활성이 낮게 억제된다고 생각하여 transgenic mouse 등으로 강제 발현시켜 증식을 시험하는 연구가 주류를 이루었고, CDK 저해인자의 활성이 높은 것에 기인한다고 생각하여 그 인자의 knock out 또는 knock down으로 증식유도가 일어나는지 여부를 검토한 연구였다. 예를 들면 M.H. Soonpaa는 cyclin D1의 transgenic mouse의 심근세포에서는 다핵이지만 세포질 분열이 일어나지 않는다고 보고하였다. 또한 M.D. Schneider는 E2F를 활성화 시키는 E1A와 E2F를 adenovirus vector를 사용하여 rat의 심근에 발현시킨 결과 DNA 합성이 유도되지만 세포분열은 일어나지 않아 apoptosis가 유도된다는 것을 보고하였다. 아직 증식을 완전하게 조절 가능하게 만들었다는 보고는 없었다.

(2) Cyclin D1의 핵 이행으로 심근세포의 증식유도

배양세포 수준에서 cell cycle 관련인자의 발현기능에 관하여 심근과 일반 증식세포와의 차이점을 해석하였다. 그 결과 분화한 심근 세포에서는 증식자극으로 유도된 cyclin D1은 증식세포와 같은 수준으로 발현되고 있지만 원래 기능을 나타내는 핵 내로 이행하지 않고 세포질에 국부적으로 존재한다는 것을 알 수 있었다. 그렇게 세포질에 축적된 cyclin D1은 단백질 합성을 촉진하여 세포의 비대를 가져온다. 그러나 만약 cyclin D1이 핵 내에 국부적으로 존재한다면 분열을 유도할 수 있을지도 모른다고 생각하여 cyclin D1으로 Nuclear Localizing Signal(NLS)을 첨가한(D1NLS) adenovirus vector와 CDK4를 발현하는 adenovirus vector를 제작하여 심근세포 핵에 발현시켰다(D1NLS/CDK4심근). 그 결과 그림 1A 및 B와 같이 D1NLS/CDK4 심근세포의 cell cycle는 분명히 G1기에서 S기, G2/M기로 진행하며 세포수가 거의 3배까지 증가하였다. 동시에 다 자란 rat 심근 세포에의 영향도 조사하였다. 그림 1C에 나타내는 바와 같이 rat 심장 *in situ* 심근세포에서도 cell cycle을 다시 개시한다는 것이 밝혀졌다. 그러나 그림 1B에서 알 수 있듯이 D1NLS/CDK4 심근의 증식속도는 느리고 doubling time은 약 90시간이며 세포분열은 1~2회로 정지된 것을 알 수 있다. 따라서 cyclin D 1의 핵내 발현은 증식능력을 상실한 심근세포의 분열활성을 회복할 수 있지만 초기에 분열이 억제되어, 심근세포의 재증식 정지 메커니즘을 검토하기로 하였다.

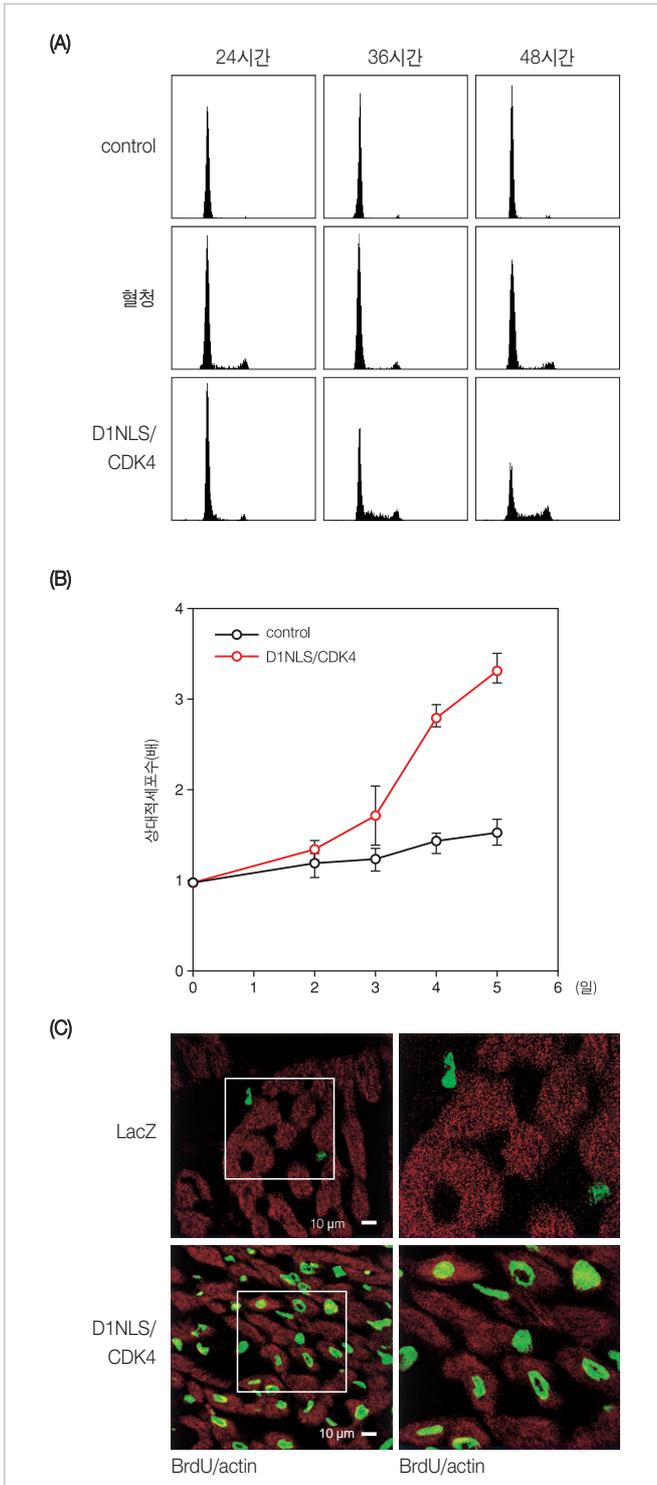


그림 1 Cyclin D1 핵 이행에 의한 세포증식유도
NLS를 첨가한 cyclin D1(D1NLS)과 CDK4를 발현하는 adenovirus를 신생아 rat 배양 심근세포에 감염시켜 경시적인 심근세포의 cell cycle 변화와 세포수를 측정하였다. (A)Laser scan cytometry(LSC)를 사용한 cell cycle해석 (세로축 : 세포수, 가로축 : DNA량) (B)일시적인 세포수의 증가 (C)Cyclin D1 핵 이행으로 다 자란 rat 심근세포에서의 DNA 합성 유도 D1NLS와 CDK4 또는 LacZ를 발현하는 바이러스를 액체 rat 심장에 주입하여 BrdU 100mg/kg를 12시간 마다 복강내에 주사하여 4일 후에 고정하여 심근 특이적 actin(빨강)의 발현과 BrdU의 도입을 면역형광염색으로 해석하였다. D1NLS와 CDK4의 발현으로 BrdU 양성(초록) 심근세포(빨강)를 많이 관찰할 수 있었다. 왼쪽 그림의 네모부분을 확대하여 오른쪽에 나타내었다.(문헌 1참조)

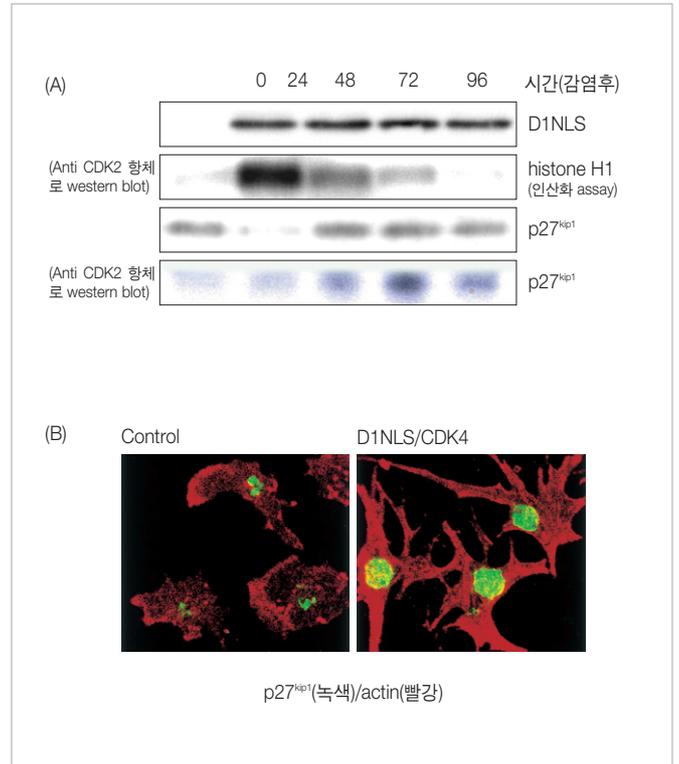


그림 2 Cyclin D1 핵 이행으로 p27^{kip1}의 발현 유도
D1NLS/CDK4 감염 신생아 rat 배양 심근세포에서 cyclin D1NLS의 발현, CDK2활성, p27^{kip1}발현의 변화(A : western blot), 감염46시간 후의 p27^{kip1}의 발현(B : 면역형광염색)(문헌 3참조)

(3) D1NLS 심근세포에서 p27^{kip1} 축적과 분열정지

우선 D1NLS 발현량과 CDK4 활성 및 G1 후기 kinase인 CDK2 활성을 측정하였다. 그 결과 D1NLS 발현, CDK4 활성이 모두 유지되었지만 CDK2 활성은 D1NLS/CDK4 감염 24시간 후에 현저하게 활성화되고 그 후 현저하게 저하하였다. 또한 CDK2 저해인자인 p27^{kip1}이 축적되었다. 세포증식이 지속되기 위해서는 cell cycle 억제인자인 CDK 저해인자 p27^{kip1}가 분해되어야 하는데, cyclin D1으로 증식 유도시킨 심근세포에서는 p27^{kip1}가 핵 내에 축적된다(그림 2).

여기에서 p27^{kip1}이 심근세포의 재증식 정지기구에 깊이 관여하고 있을 것으로 생각되어 knock down 실험을 하기 위하여 p27siRNA 발현 adenovirus vector를 제작 하였다. 우선 다카라에서 구축을 의뢰한 p27siRNA 발현 vector(3종류의 서열)에서 EcoR I /Hind III으로 hU6-p27siRNA를 잘라내어 DNA Blunting Kit(TaKaRa Code 6025)를 사용하여 말단을 평활화하였다. 이를 adenovirus genome이 삽입된 cosmid vector(pAxcw ; Adenovirus Expression Vector Kit)의 Swa I 부위에 삽입하여 Adenovirus Expression Vector Kit의 프로토콜에 따라 p27siRNA 발현 adenovirus vector를 제작하였다(p27siRNA 바이러스). 이를 배양심근세포에 감염시키면 #1, #4, #6 siRNA도 p27^{kip1}의 발현을 억제하였지만 같은 CIP/KIP인 p21의 발현은 억제하지 않았다(그림 3 A). 즉 p27^{kip1}을 특이적으로 발현 억제하는 것이 확인되었다. 그리하여 훨씬 강하게 억제 효과를 나타낸 #6을 사용하여 CDK2 활성 및 cell cycle 세포증식능력에 관하여 해석하였다. 그 결과 D1NLS/CDK4 심근에서는 24시간을 최대로 CDK2 활성은 저하하지만 p27siRNA 바이러스를 co-transfection시키면 활성이 지속되었다(그림 3). 또 D1NLS/CDK4 심근에서는 감염 후 144시

간 후부터 시간에 의존하여 증식기(SG2/M기)의 세포가 감소하였고(144시간 후에는 29%, 192시간 후에는 15%), G1기의 세포수가 증가하여 많은 세포가 G1기에 정지되는 경향이 인정되었다. P27siRNA 바이러스를 co transfection시켜 144시간 후의 증식기(SG2/M기)의 세포가 29%→35.5%, 192시간 후에는 15%→30%로 증식기 세포수가 D1NLS/CDK4 심근세포와 비교하여 많이 인정되어 재 증식 정지가 지연되는 경향이 나타났다. 또한 세포수를 측정된 결과 D1NLS/CDK4의 심근은 대조군에 비하여 약 3배 정도의 증가를 나타내었지만 p27siRNA로 p27^{kip1}의 발현을 억제하여 약 5배까지 증가하였다(그림 3C, D). 즉 p27^{kip1}을 knock down시킴으로써, D1NLS/CDK4 심근세포의 증식능력이 더욱 재활화 되었고 이는 p27^{kip1}이 재증식 정지기구의 중요한 열쇠중 하나라는 것을 알 수 있었다.

(4) 심근에서의 p27^{kip1} ubiquitination 활성의 저하

일반적인 증식세포에서 p27^{kip1}은 S/G2/M기에 F-box 단백질 Skp2를 포함하는 SCF/Skp2복합체 ubiquitin ligase에 의해 poly-ubiquitination되어 proteasome으로 분해된다. D1NLS/CDK4 심근에서 p27^{kip1} 축적 기구에 관하여 검토하였다.

우선 p27^{kip1} 단백질 양의 증가가 mRNA량의 변화에 의한 것인지를 알아보기 위하여 Northern Blot 해석을 하였지만 mRNA량에 변화는 없었고 p27^{kip1}의 축적은 전사 수준에서도 mRNA 안정성에 의한 것도 아니었다(그림 4). 다음으로 D1NLS/CDK4 심근세포에서 추출한 단백질을 조제하여 p27^{kip1}을 기질로 ubiquitination 활성을 측정하였다. 그림 4B는 그 결과를 나타낸다. 분열능력을 가지는 rat fibroblast(REF52 cell)에서는 반응 후 poly ubiquitination된 p27^{kip1}이 고분자 영역에서 보였지만 심근에서는

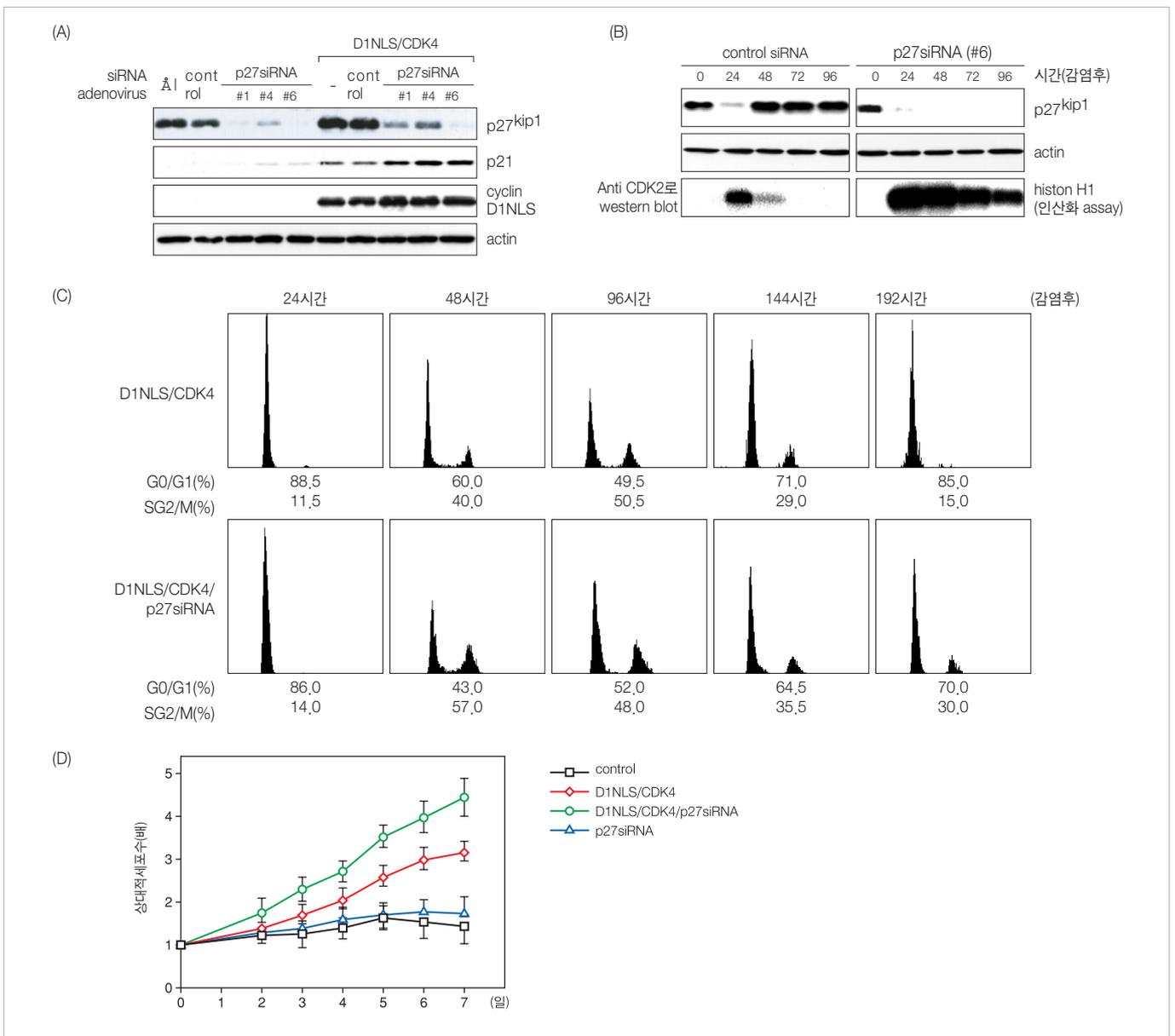


그림 3 siRNA 발현 adenovirus vector를 사용한 p27^{kip1} knock down에 의한 cell cycle, 세포증식능력을 활성화(A: western blot, B: western blot CDK2인산화 assay, C: LSC에 의한 cell cycle해석, D: 경시적 세포수 측정)(문헌 3참조)

그 활성이 현저하게 저하하였다. 이 결과는 심근세포에서 p27^{kip1}의 ubiquitination 활성이 현저하게 감소하고 또 약화되고 있다는 것을 시사한다.

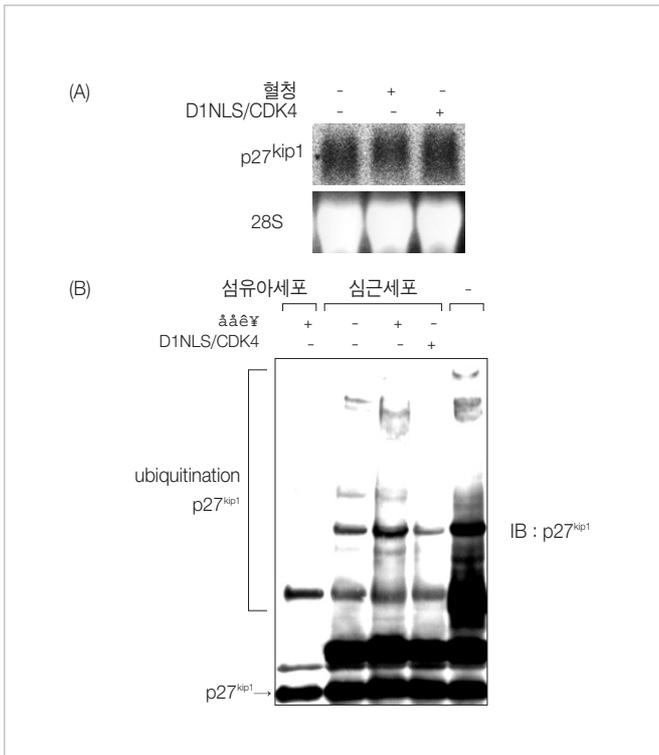


그림 4 심근세포에서 p27^{kip1} mRNA발현(A:Northern Blot), p27^{kip1}의 ubiquitination assembly(B : western blot) (문헌 3참조)

(5) 심근세포에서 p27^{kip1} 제어 메커니즘

다음으로 p27^{kip1}의 ubiquitin ligase인 skp2에 관하여 해석한 결과, 심근세포에서의 매우 낮은 단백질 발현 수준과, Skp2의 ubiquitin proteasome 분해활성을 확인하였다(그림 5A, B). 거기서 Skp2를 adenovirus vector를 사용하여 발현시켜 p27^{kip1}을 특이적으로 분해시키면 심근세포의 증식능력은 더욱 증가하였다(그림 5C). 이로 부터 마지막에 분화한 심근세포를 강제적으로 증식시키면 p27^{kip1}이 강하게 축적되어 브레이크로서 작용하는 것, 그 메커니즘에는 skp2의 과잉 ubiquitin 분해 활성이 관여하고 있다는 것을 나타내었다.

또한 발생에 따른 심근세포의 분화에서 증식정지 메커니즘에도 p27^{kip1}의 안정화에 따른 발현 유도가 관여하고 있을 가능성이 생각된다. 사실 증식능력을 남기고 있는 태생 17일째의 심근세포와 마지막 분화된 신생아 심근세포의 단백질 추출액을 사용하여 ubiquitination 활성에 관하여 비교한 결과, 태아 심근이 p27^{kip1}에 대한 ubiquitination 활성이 높았고 또한 Skp2에 관해서는 분화된 신생아 심근에서 ubiquitination 활성이 높다는 결과가 얻어졌다. 즉 심근의 발생과 분화과정에서 p27^{kip1}/Skp2의 탈제어가 심근세포의 증식정지에 중요한 역할을 하고 있을 가능성을 시사한다. 이것은 심근세포 이외의 예를 들면 신경세포 등의 마지막분화세포에서도 마찬가지로의 cell cycle억제 메커니즘이 존재할 가능성을 나타내고 있어 흥미롭다. 심근세포 분화에서 p27^{kip1}/Skp2의 탈제어 메커니즘에 관하여 더욱 상세하게 해석하여 일반적인 마지막분화기구의 해명에 다가가게 될 것이다.

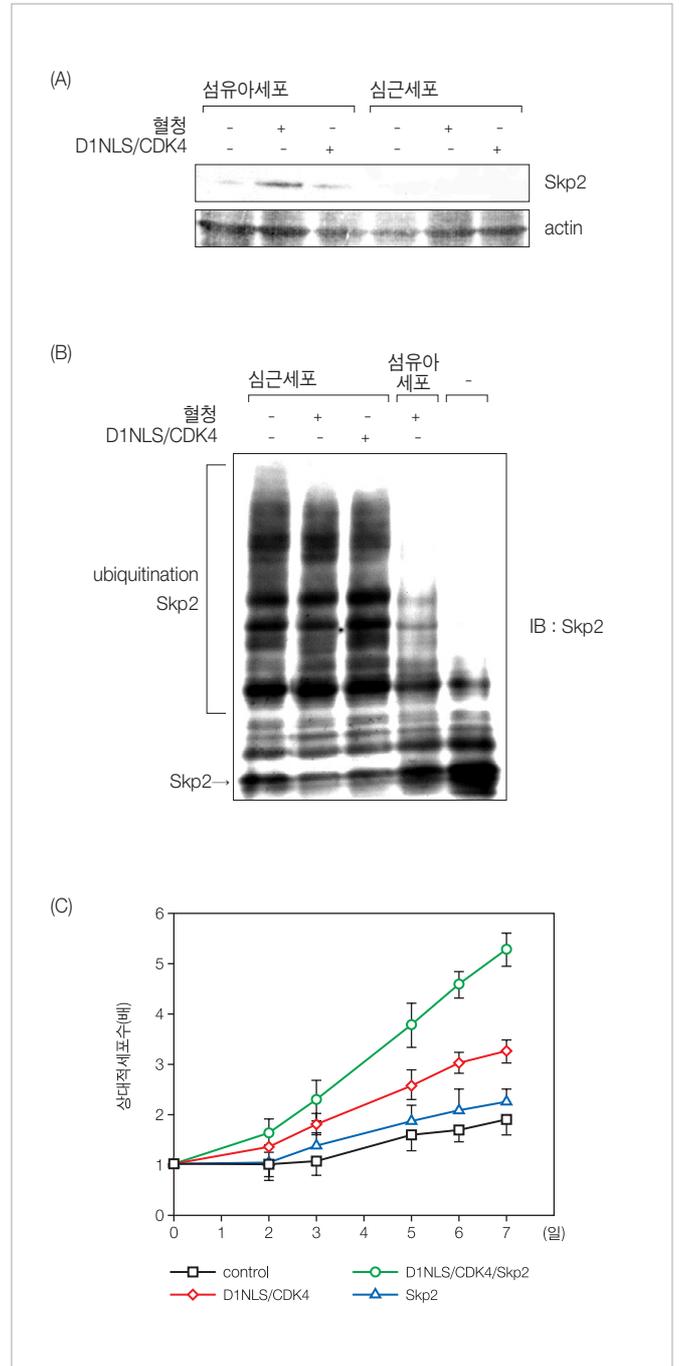


그림 5 심근세포에서 Skp2 발현(A: western blot), Skp2의 ubiquitination assembly(B : western blot), Skp2 강제 발현에 의한 증식유도(C : 세포수 측정)(문헌 3에서 참조)

결론

본 실험에서는 cyclin D1의 핵이행 제어로 p27^{kip1} 분해계의 제어가 심근세포의 증식에 중요하다는 것을 알았다. 그러나 cell cycle의 진행이 일련의 반응인 것을 생각한다면 이 외에도 심근세포의 증식을 저해하는 몇 개의 단계가 있다고 생각된다. 그것들을 하나씩 밝혀내는 과정에서 “왜 심근은 마지막분화와 함께 분열능력을 잃게 되는가” 라는 심근특이적인 메커니즘을 해명하기 위하여 심근 재생 실용화를 위한 기초적, 응용적 연구를 더욱 발전시켜 진정한 심근재생치료의 확립을 위해 도전하고자 한다.

[참고문헌]

1) Tamamori-Adachi, M. *et al.*: Critical role of cyclin D1 nuclear import in cardiomyocyte proliferation, (2003) *Circ Res.*, **92**, e12-19.
 2) Tamamori-Adachi, M. *et al.*: Expression of cyclin D1 and CDK4 causes hypertrophic growth of cardiomyocytes in culture: a possible implication for cardiac hypertrophy, (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **296**, 274-280.

3) Tamamori-Adachi, M. *et al.*: Down-regulation of p27Kip1 promotes cell proliferation of rat neonatal cardiomyocytes induced by nuclear expression of cyclin D1 and CDK4: Evidence for impaired Skp2-dependent degradation of p27 in terminal differentiation, (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 50429-50436.

저자와의 인터뷰

Q : 이번에 발표한 논문을 간단하게 설명해 주시기 바랍니다.

A : 이번 논문에서는 siRNA를 발현하는 adenovirus vector를 제작하여 p27^{Kip1}의 knock down을 통해, 심근의 재생식을 저해하고 있는 인자가 p27^{Kip1} 라는 것을 확인할 수 있었다. Skp2의 발현 실험도 논문에 정리하였다(상세한 것은 본문참조).

Q : siRNA 발현 plasmid를 구축하고, 4개월도 지나지 않아 논문을 내놓았다. 특별한 비결이 있는 건지?

A : (웃음) 이번에는 특별하다. 논문 교정에 siRNA의 실험까지 맡게 되어 서둘렀다. 예비실험은 실시하지 않고 adenovirus 구축에서 실험까지 한번에 하였다. 다카라 support system을 설계한 3종의 siRNA 서열이 모든 것에 knock down 효과가 나타난 것은 행운이었다. 다른 디자인 알고리즘으로 설계하여 동시에 adenovirus를 구축하였지만 그 쪽은 효과가 없었다. 실험을 열심히 했다가 보다는 한 번에 모든 실험과정이 끝난 것 같다.

Q : 실험에 RNAi를 도입한 것은 언제인가? 초기에 고생했던 일이 있다면?

A : RNAi는 이번이 처음이다. 하지 않으면 안 된다고 생각은 했었지만 좀처럼 손이 가지 않았다. 이번에 필요에 의해 하게 되었지만, 좋은 결과가 얻어진 것은 행운이었다.

Q : 저희 회사의 Adenovirus Expression Vector Kit를 사용하고 있는데 어떻게 사용하고 있는지?

A : 대량으로 사용한다(웃음). 실은 kit가 되기 전부터 이용하고 있다. 심근세포 등 비증식계 세포에는 현실적인 수단이 adenovirus 밖에 없는데다 CAG 프로모터에 좋은 인상을 가지고 있다. 사용법에 대한 약간의 의견은 있지만 발현 실험은 이미 잘 진행되었기 때문에 이대로 좋다고 생각한다. 다만 siRNA 발현 adenovirus의 구축은 서열에 따라 차이가 있어 주의가 필요하다. 이러한 경험에서 siRNA 발현 adenovirus는 되도록 복수의 서열, 복수의 실험을 통하여 리스크를 최소화 하고 있다.

Q : 앞으로의 연구의 방향성은?

A : 일반증식세포에서 안정적으로 고발현하고 있는 Skp2가 심근에 있어서는 분해된다. Skp2 분해 메커니즘에는 ubiquitination 스텝이 관여하는 것도 알려져 있어 다음 테마는 심근세포 중에서 Skp2를 ubiquitination하는 인자는 무엇인가를 밝히는 것이다. 그 외에도 여러 후보 유전자를 생각하고 있어서 shRNA 발현 plasmid도 대량으로 사용할 계획이다. 대량 구매시 별도의 할인 혜택이 있는지?(웃음)

오늘 귀한 이야기 감사합니다.



[인터뷰를 마치며]

사람 좋고 친절한 저자였지만 때때로 연구자 특유의 엄격함이 얼굴에 드러났다. 열심히 하는 편은 아니라고 하지만 주 6~7일은 실험을 하고 있다고 한다. '좋은 결과가 얻어진 것은 행운이다'라고 했지만 리스크를 분산하는 철저함과 서둘러서 정확한 데이터를 내는 기술이 있었기 때문이다. 바쁜 가운데 인터뷰에 응해주신 아베 선생과 연구실에 계시는 모든 분들 즐거운 시간을 보낼 수 있어 고맙게 생각한다.