

Human iPS 세포를 효율적으로 제작 Human iPS Cell Generation™ Vector Set

인간 체세포에서 유도다능성줄기세포(induced pluripotent stem cells : iPS 세포)를 생산하는 기술은 교토대학 야마나카(山中伸弥) 교수의 연구그룹에 의해서 확립되었다^{1, 2)}.

인간 iPS 세포 유도 실험에는 다카라바이오의 유전자공학 관련 제품이 매우 유용하며, 본 고에서는 Human iPS Cell Generation Vector Set (TaKaRa Code 3670)를 이용하여, iPS 세포 유도용 유전자 발현 재조합 레트로바이러스 벡터를 제작하고, 표적 세포에 co-infection시켜 iPS 세포 유도를 검증하는 일련의 실험을 소개하고자 한다.

■ Human iPS Cell Generation Vector Set

본 제품에는 아래와 같이 iPS 세포 유도용 레트로바이러스 벡터를 제조하기 위한 3종류의

벡터가 포함되어 있다.

- pDON-5 *OCT3/4-SOX2* DNA
- pDON-5 *KLF4* DNA
- pDON-5 *LIN28-NANOG* DNA

iPS 세포 유도용 유전자 중 *SOX2* 및 *KLF4*는 Human Brain PolyA⁺ RNA를 이용하여 PrimeScript RTase와 High Fidelity PCR 효소 PrimeSTAR Max DNA Polymerase를 사용하여 RT-PCR로 확보하였다. 한편, *OCT3/4*, *LIN28*, *NANOG*는 인공합성유전자를 제작하여 확보하였다. 각 유전자는 pDON-5 레트로바이러스 벡터에 클로닝하였다. 덧붙여 *OCT3/4*와 *SOX2*, *LIN28*와 *NANOG*는 각각 IRES 서열에 의해 연결되어 있기 때문에 단일 mRNA로 전사되지만, IRES를 이용하여 *SOX2* (또는 *NANOG*)는 *OCT3/4* (또는 *LIN28*)와 독립적으로 번역되어

발현된다.

각 유전자의 GenBank Accession No.는 아래와 같다.

유전자명	GenBank Accession No.
<i>OCT4</i>	NM_002701.4
<i>SOX2</i>	NM_003106.2
<i>KLF4</i>	NM_004235.3
<i>LIN28</i>	NM_024674.4
<i>NANOG</i>	NM_024865.2

■ iPS 세포 유도용 유전자 발현 재조합 레트로 바이러스 조제와 바이러스 titer 측정

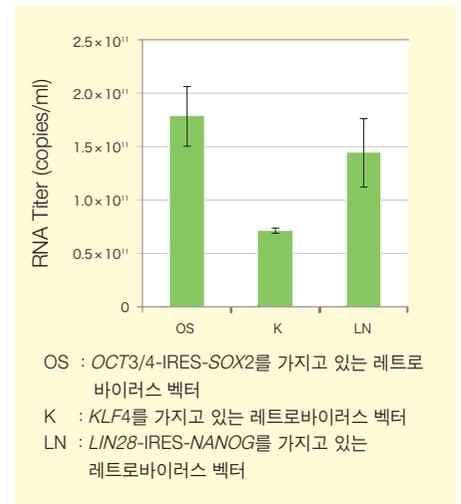


그림 2. RNA Titer 측정

【방법】

2 × 10⁶개의 G3T-hi 세포를 collagen-coated 6cm dish에 plating한 다음날, TransIT-293 (10 μl)을 이용해 Retrovirus Packaging Kit Amphi (TaKaRa Code 6161)의 구성물인 pE-amphi vector (1 μg), pGP vector (2 μg)와 상기 iPS 세포 유도용 유전자가 클로닝된 pDON-5 vector 중 하나 (2 μg)를 co-transfection하였다. 다음날 배지를 교환하고 transfection 48시간 후에 배지를 회수해 0.45 μm 필터로 여과한 바이러스액을 감염에 사용하였다. 이렇게 얻은 3종류의 iPS 세포 유도용 레트로바이러스 벡터의 RNA titer는 Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR) (TaKaRa Code 6166)와 One

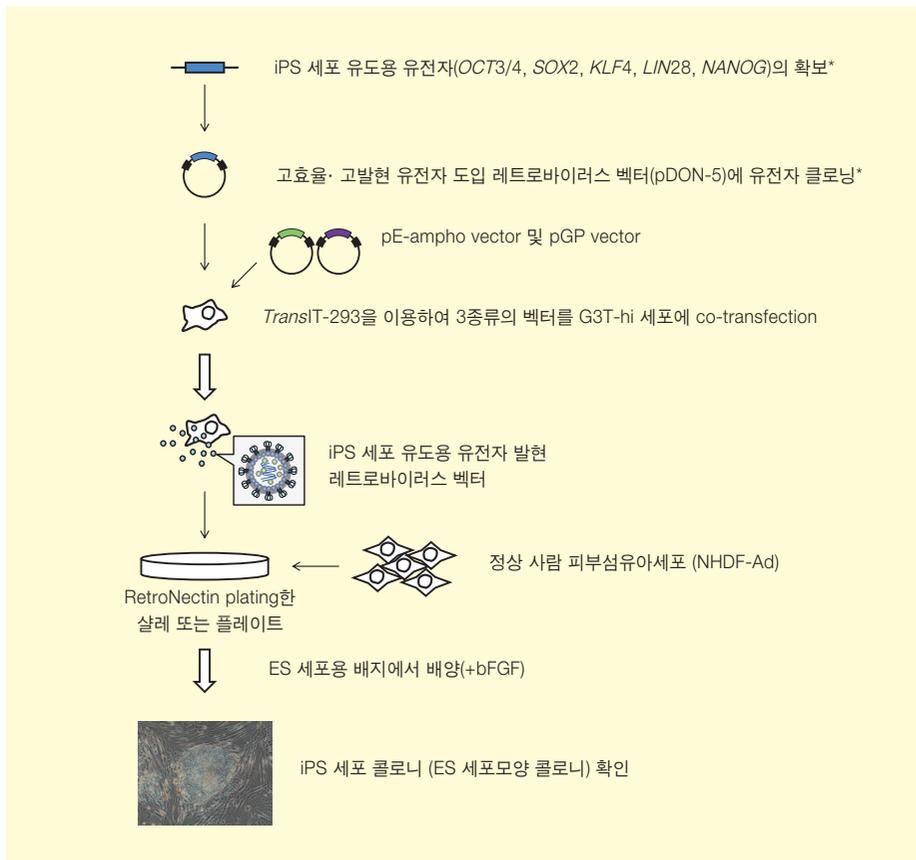


그림 1. iPS 세포 유도 실험의 개요

*본 조적은 Human iPS Cell Generation Vector Set를 이용하면 생략가능.

continued...

Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa Code RR066A)를 이용하여 측정했다. Real Time PCR기기는 Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa Code TP800)을 이용하였다.

【결과】

검량선을 기초로 각 바이러스액에 포함되어 있는 바이러스 RNA의 카피수를 산출하였다. 모든 레트로바이러스 벡터에서 1×10^{11} copies/ml 전후의 RNA titer를 얻을 수 있었다(그림 2).

■ 레트로바이러스 벡터의 감염과 iPS 세포의 유도

【방법】

원심 RetroNectin-bound virus (RBV) 감염법 (이하 : Retronectin법) 또는 polybrene법으로 정상 인간 피부 섬유아세포(성인) [Normal Human Dermal Fibroblast (NHDF-Ad)]에 3종류의 레트로바이러스 벡터(5 종류 유전자 모두 포함)를 2일 동안 2회 감염시켜, 상기 두 방법을 이용하여 iPS 세포유도효율을 비교했다. 또, Retronectin법에 대해서는 도입 유전자의 조합을 바꾸었을 경우의 iPS 세포유도효율에 대해서도 검토하였다. 각각 제작된 레트로바이러스 벡터액을 동량씩 혼합해, 10 % FBS를 포함한 DMEM으로 단계 희석하여 감염에 이용하였다. 감염 후 6 일째 감염세포를 6 well plate의 feeder cell에 2×10^4 cells/well로 seeding하였다. 그 후, 4 ng/ml bFGF를 포함한 ES 세포 배양 배지로 적절히 배지를 교환하면서 iPS 세포를 유도했다. 레트로바이러스 감염 25~30일 경과 후 TRACP & ALP double stain Kit (TaKaRa Code MK300)로 ALP (Alkaline phosphatase) 염색하여, ALP 양성으로 ES세포의 형태를 나타내는 콜로니를 iPS 세포 콜로니로 카운트하였다.

【결과】

5종류(OCT3/4-SOX2, KLF4, LIN28-NANOG) 유전자를 도입하여 iPS 세포유도를 실험한 결과, retronectin법이 polybrene법보다 iPS 세포유도효율이 평균 24배 높은 것으로 확인되었다(그림 3A). 특히 retronectin법에서는 1/100의 레트로바이러스 벡터를 이용했을 때에도 높은 유도효율을 나타냈으므로, 본

방법을 이용하면 바이러스의 농도에 영향을 받지 않는 안정된 iPS 세포를 만들 수 있다.

또한, 도입유전자 조합변화 실험에서는 iPS 세포유도에 필수적인 유전자는 OCT3/4-SOX2와 KLF4이며, LIN28-NANOG를 첨가하면 유도 효율이 높아지는 것을 확인할 수 있었다(그림 3 B).

덧붙여 이번 iPS 세포 유도 실험에서 3종의 유전자(OCT3/4-SOX2, KLF4) 도입시 최대 약 0.14 % (2×10^4 개의 감염 세포에서 28개의 iPS 세포 콜로니 생성), 5종의 유전자 (OCT3/4-SOX2, KLF4, LIN28-NANOG) 도입시에 최대 약 0.42% (2×10^4 개의 감염 세포에서 84개의 iPS 세포 콜로니 생성)와 같이 매우 높은 유도 효율을 나타냈으므로, pDON-5 벡터와 RetroNectin이 iPS 세포 유도에 매우 효과적인 방법으로 볼 수 있다.

■ iPS 세포 검증

【방법】

Retronectin법으로 얻은 iPS 세포 콜로니를 picking하여, 계능에 레트로바이러스 벡터 삽입 카피수를 Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human(for Real Time PCR) (TaKaRa Code 6167)과 CycleavePCR Core Kit (TaKaRa Code CY501)를 이용하여 측정하였다. FastPure RNA Kit (TaKaRa Code 9190)를 이용하여 RNA를 조제, RT-PCR방법으로 ES 세포 마커유전자 발현을 확인하였다. 또한 컨트롤로 3 종의 유전자를 도입하여 확립된 iPS 세포 클론 [253G1: Nakagawa, M. et al.,(2008) Nat Biotechnol, 26(1), 101-106. 교토대학에서 제공]을 이용하여 동일한 해석을 실시했다.

【결과】

표 1과 같이 이번 확립한 iPS 세포 클론(iPS-3)의 계능 삽입 카피수를 측정된 결과, 약 10.2 카피였고, 컨트롤의 253G1 클론에서는 약 19.3 카피였다. 실험 방법이 다르기 때문에 전체를 비교할 수는 없지만, pDON-5 벡터와 retronectin 조합에 의해 보다 적은 계능 삽입 카피수에서도 효율적으로 iPS 세포가 유도된다고 볼 수 있다. 또, RT-PCR을 이용해 11 종류의 ES 세포 마커유전자 발현을 확인한 결과, 원래 섬유아세포(NHDF-Ad)에는 발현되지 않았지만 iPS 세포

클론 (iPS-3, 253G1 모두)에서는 모두 발현됨을 확인하였다(그림 4). 또한, 본 실험에서 획득한 iPS 세포 클론을 이용한 면역 부전 마우스(SCID 마우스)의 기형종 형성 실험을 통해 내배엽, 중배엽, 외배엽 세포로 분화 다능성을 확인하고 있다. (데이터 생략).

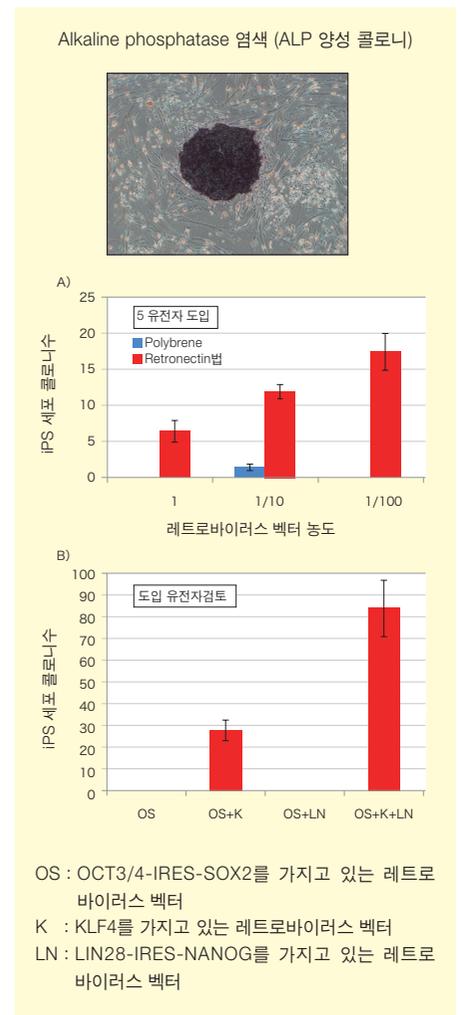


그림 3. Retronectin법과 polybrene을 이용한 iPS 세포 유도 효율 비교와 도입 유전자의 검토

표 1. iPS 세포 클론의 계능 레트로바이러스 삽입 카피수

클론명	삽입 카피수
iPS-3 (다카라바이오 획득)	10.24
253 G1 (교토대학 획득)	19.34

Human iPS 세포를 효율적으로 제작 Human iPS Cell Generation™ Vector Set

■ 다중 유전자 도입 효율의 검토

iPS 세포 유도 실험에서는 일반적으로 2종류 이상의 레트로바이러스 벡터를 세포에 감염시킨다. 이 경우, 감염 효율은 iPS 세포 유도 효율로 직결된다고 볼 수 있다. 2종류의 다른 형광단백질을 발현하는 레트로바이러스 벡터를 이용하여 retroectin법과 polybrene법으로 다중 유전자 도입 효율(1개의 세포에 2종류의 형광단백질이 도입되는 비율)을 측정하였다.

【방법】

iPS 세포 유도 실험과 동일하게 정상 인간 피부 섬유아세포(성인)에 retroectin법과 polybrene법을 이용하여 녹색 형광단백질 AcGFP1 발현 레트로바이러스 벡터와 적색 형광단백질 mStrawberry 발현 레트로바이러스 벡터로 유전자를 도입하였다. 바이러스 용액은 AcGFP1 과 mStrawberry 발현 레트로바이러스 벡터 용액을 동량으로 혼합한 후, 적절한 농도로 희석해 사용하였다. Co-infection 5일 후에 flow cytometer로 AcGFP1와 mStrawberry 두가지 모두를 발현하는 세포 집단의 비율을 측정해, 유전자 도입 효율을 산출하였다.

【결과】

4종의 다른 donor에서 유래한 사람피부 섬유아세포에서 유전자 도입 효율 평균을 그림 5에 나타냈다. Retroectin법은 polybrene법과 비교해 높은 이중형광 양성세포율을 나타냈으며, 바이러스 농도가 낮을수록 그 차이는 현저하였다. 그러므로 RetroNectin를 이용하면 소량의 바이러스 용액으로 고효율 유전자 도입이 가능하다. 결과의 그래프 오차 범위는 표준 편차를 나타내며, 결과에서 확인할 수 있듯이 오차 범위가 작고, donor에 따라 차이가 없으므로, 안정된 유전자 도입이 가능하고 할 수 있다.

■ 참고문헌

1. Takahashi, K. *et al.*, (2007) *Cell*, 131(5), 861–872.
2. Nakagawa, M. *et al.*, (2008) *Nat Biotechnol*, 26(1), 101–106.

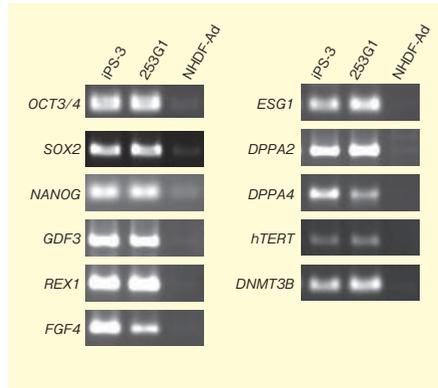


그림 4. iPS 세포 클론의 ES세포 마커 유전자 발현

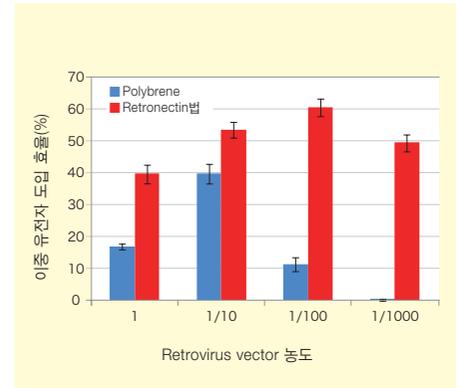


그림 5. Retroectin법과 polybrene법에 따른 이중 유전자 도입 효율의 비교
(예러 바는 4 donor의 평균치±SD를 나타낸다.)

■ 관련제품

제품명	용량	TaKaRa Code
[인간 iPS 세포 유도용 레트로바이러스 벡터 plasmid 세트]		
Human iPS Cell Generation Vector Set	각 5 µg	3670
인공합성유전자제작서비스		별도문의
[iPS 세포 유도용 유전자 발현 재조합 레트로바이러스 조제 및 바이러스 titer 측정]		
Retrovirus Packaging Kit Ampho	10회분	6161
레트로바이러스 조제세포 G3T-hi 세포 (2 × 10 ⁶ cells)	1 vial	6163
Retrovirus Constructive System Ampho	1 set	6165
TransIT-293	1 ml	V2700
Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR)	100 rxns	6166
One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit (Perfect Real Time)	100 rxns	RR066A
Thermal Cycler Dice Real Time System	1대	TP800
[레트로바이러스 벡터 감염과 iPS 세포 유도]		
RetroNectin (Recombinant Human Fibronectin Fragment)	0.5 mg (0.5 ml) ¹⁾	T100A
RetroNectin Dish (RetroNectin Pre-coated Dish, 35mm φ)	10 dishes	T110A
TRACP & ALP double-stain Kit	5 매분 (24 well plate)	MK300
[iPS 세포 검증]		
Provirus Copy Number Detection Primer Set, Human (for Real Time PCR)	100 회	6167
CycleavePCR Core Kit	50 회	CY501
FastPure RNA Kit	50 회	9190
Anti-Mouse E-cadherin (면역조직화학용), Monoclonal (Clone ECCD-2) ¹⁾	0,1 mg	M108

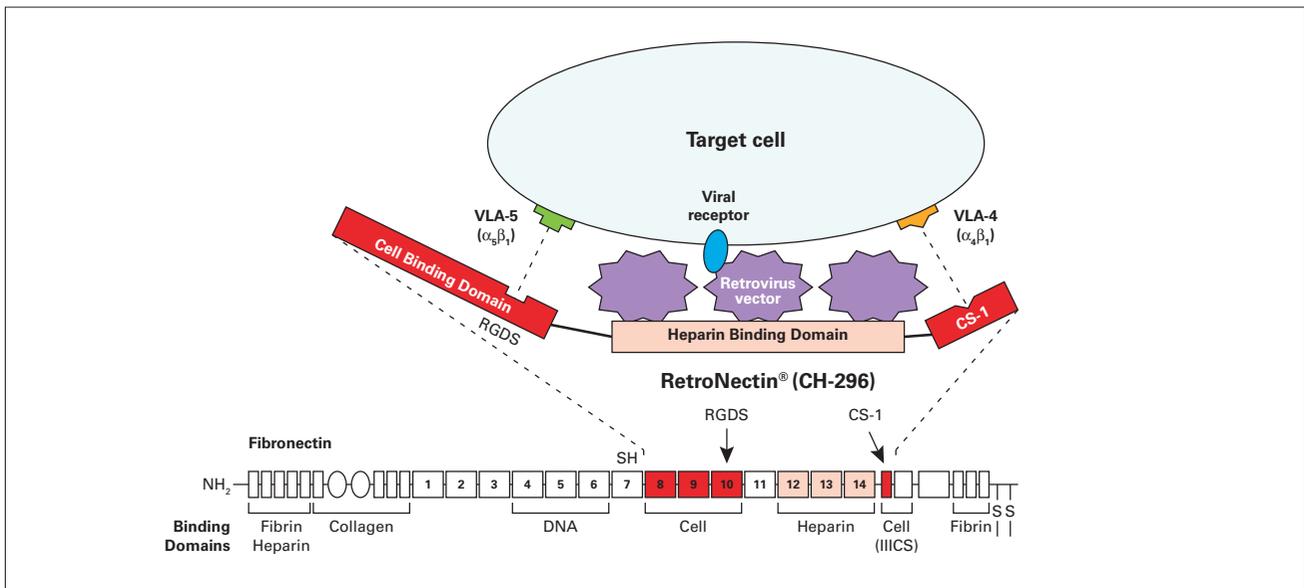
¹⁾ : iPS 세포 표면 마커 해석에 사용

* License Notice : [1], [2], [3], [4], [5], [6], [7], [9], [10]

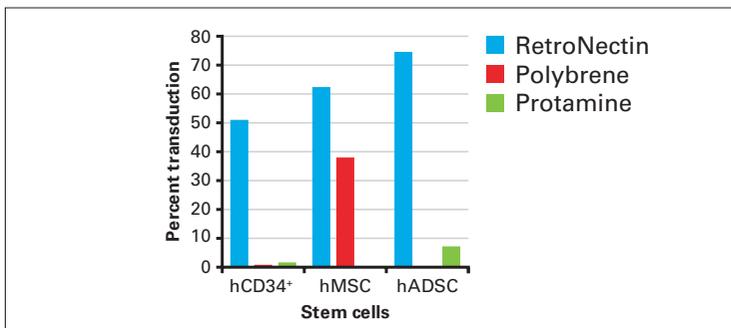
세포내 바이러스 도입효율을 높이는 획기적인 시약!

RetroNectin[®] Reagent

- Recombinant fibronectin molecule
- 감염이 어려운 세포나 줄기세포의 유전자 도입효율을 높임
- 세포와 바이러스간 접촉을 최대화하여 transduction 효율 극대화
- Lenti-X, Retro-X Expression System에 적합



〈기존 방법과 RetroNectin의 도입효율 비교〉



제품명	용량	TaKaRa Code
RetroNectin Reagent	0.5 mg	T100A
	2.5 mg	T100B
RetroNectin Precoated Dishes	10 dishes	T110A

〈RetroNectin을 이용한 효율적인 유전자 도입¹⁾〉

Cell Type	Efficiency of Gene Transfer (%)
Human CD34 ⁺ CD38 ⁻ BMC ²⁾	95.5
Human PBMC ³⁾	91.2
TF-1	97.9
SupT1	97.3
Jurkat	80.1
K-562	90.4
HL-60	86.1
Monkey CD34 ⁺ BMC	72.0
Monkey CD4 ⁺ T-cell	85.0

¹⁾ RetroNectin-Bound Virus (RBV)법을 이용

²⁾ Bone marrow cells, ³⁾ Peripheral blood mononuclear cells.