Korean Society for
Clinical Laboratory ScienceKorean Journal of
CLINICAL LABORATORY SCIENCE

ORIGINAL ARTICLE

Biological Function of Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 6 for the Enhancement of Adipose-Derived Stem Cell Survival against Oxidative Stress

Eun-Young Koh, Ji-Eun You, Se-Hwa Jung, Pyung-Hwan Kim

Department of Biomedical Laboratory Science, Konyang University, Daejeon, Korea

지방유래 줄기세포의 생존능 향상을 위한 CEACAM 6의 생물학적 기능에 대한 연구

고은영, 유지은, 정세화, 김평환

건양대학교 임상병리학과

ARTICLE INFO

Received October 18, 2019
Revised October 21, 2019
Accepted October 22, 2019

Key words

CEACAM 6
Cell survival
Oxidative stress
Stem cell

ABSTRACT

The use of stem cells in cell-based therapy has attracted extensive interest in the field of regenerative medicine, and it has been applied to numerous incurable diseases due to the inherent abilities of self-renewal and differentiation. However, there still exist some severe obstacles, such as requirement of cell expansion before the treatment, and low survival at the treated site. To overcome these disadvantages of stem cells, we used the carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM 6) gene, which functions to increase cell-cell interaction as well as anti-apoptosis. We first confirmed whether CEACAM 6 is expressed in various cell lines at the protein level (including in stem cells), followed by evaluating and selecting the optimal transfection conditions into stem cells. The CEACAM 6 gene was transfected into stem cells to prolong cell survival and preserve from damage by oxidative stress. After confirming the CEACAM 6 expression in transfected stem cells, the cell survival was assessed under oxidative condition by exposing to hydrogen peroxide (H_2O_2) to mimic the chronic environment-induced cellular damage. CEACAM 6 expressing stem cells show increased cell viability compared to the non-CEACAM 6 expressing cells. We propose that the application of the CEACAM 6 gene is a potential option, capable of expanding and enhancing the therapeutic effects of stem cells.

Copyright © 2019 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서론

줄기세포는 조직이나 기관의 분화된 세포들 사이에 존재하는 미분화 세포로서, 끊임없이 스스로 증식하는 자가 재생능력

(self-renewal)과 신체 내의 모든 조직세포로 분화할 수 있는 능력(differentiation to specific tissue)을 가진 다분화능 세포로 알려져 있다. 인체유래 줄기세포는 배아줄기세포를 제외한 성체로부터 얻어지는 줄기세포를 의미하며, 지방, 골수, 제대혈 및 말초혈액을 포함하는 혈액 및 조직의 기저에서 기원되는 줄기세포를 모두 포함한다. 세포치료제로 가장 많이 이용되는 다분화능을 나타내는 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC) 중 지방유래 줄기세포(adipose-derived stem

* Corresponding author: Pyung-Hwan Kim
Department of Biomedical Laboratory Science, Konyang University, 158
Gwanjeodong-ro, Seo-gu, Daejeon 35365, Korea
E-mail: kimph1010@konyang.ac.kr
* ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3117-4025>

cell, ADSC)는 성체줄기세포의 한 종류로서 골수줄기세포나 제대혈 줄기세포보다 채취하기가 쉽고 대량 배양이 가능하면서도 줄기세포 함유량이 많기 때문에 지방유래 줄기세포를 의료, 미용 등 다양한 목적으로 활용하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 줄기세포 기반 세포치료제는 이미 세포이식 및 난치성 질환의 치료 등에 적용되어 그 회복 효과와 안정성을 증명하는 보고들이 점점 늘어나고 있다[1, 2]. 그러나, 이러한 긍정적인 효과에도 불구하고 줄기세포를 이용한 치료에는 줄기세포 자체의 단점들에 의해서 치료효능이 제한적일 수밖에 없다[3, 4]. 이러한 제한된 줄기세포의 주요 장애물 중 하나는 투여 및 이식된 조직에서의 생존율이 낮고 세포증식을 위한 확장 횟수가 제한적이라는 것이다. 줄기세포는 질병 영역, 특히 허혈 부위에 주사될 때, 투여 부위에서의 산화적 스트레스, 영양소 박탈, 숙주 면역 반응 및 산소 박탈과 같은 위험한 도전에 직면하게 된다. 더욱이, 효과적인 치료 효과를 달성하기 위해서는 충분한 세포수(일반적으로 치료 당 1억 내지 4억개의 중간엽 줄기세포)를 얻어야 하기에 효율적인 대량 배양법이 필요하다. 하지만, 줄기세포의 주요 단점 중 하나는 계대배양 횟수가 제한적이라는 것이다. 이를 위해서 소프트웨어적 연구뿐 아니라 하드웨어 측면에서의 연구가 요구 되어진다. 또한, 줄기세포 치료의 성공 여부를 결정짓는 중요한 요소 중 하나는 이식 또는 주사 전 시험관에서, 또는 투여된 부위에서의 높은 세포 생존율을 유지하는 것이다. 이를 위한 최근 연구에서 anti-apoptosis 및 항산화 단백질의 과발현은 다양한 스트레스에 대한 줄기세포 저항성을 촉진하여 악화된 배양 조건에서 생존력과 생존율을 증가시킨다는 보고가 있다[5, 6]. 따라서, 계대배양 횟수를 늘리고 긴 시간 동안 줄기세포의 생존력을 유지하는 것이 줄기세포의 치료효능을 높이는 방법 중 하나라 할 수 있다.

이러한 관점에서 우리는 이전 연구를 통해 유방암 유래 암줄기세포(breast cancer stem cells, BCSC)에서 carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM 6)의 생물학적 기능을 연구한 적이 있다(under submission). 이 연구에서 이 단백질은 암줄기세포의 증가된 anti-apoptosis 및 oxidative stress에 대한 내성과 세포 부착능을 강화시킨다는 사실을 밝혀냈다. CEACAM 6는 세포 부착(cell adhesion)과 연관된 중요한 단백질로 알려져 있으며, 정상세포에서 세포부착이 이뤄지지 않을 경우 세포자살(apoptosis)로 이뤄지는데, 이것을 매개하는 과정인 아노이키스(anoikis)를 억제한다는 보고가 있다[7]. 따라서, 우리는 이 유전자를 이용하여 줄기세포의 단점을 극복할 수 있는지를 평가해 보고자 하였다.

하지만, 줄기세포는 외래유전자의 transfection이 잘 안 되는 세포로 알려져 있어 효율적인 유전자 전달을 위해서는 다른 전달체가 필요하다[8]. 유전자 전달을 위한 전달체로는 바이러스성과 비바이러스성 전달체로 크게 구분할 수 있는데 바이러스 사용에 대한 안전성의 문제와 면역원성의 유발 등의 단점으로 비바이러스성 전달체 중 liposome을 사용하였다. Liposome은 세포막 성분과 유사하여 세포독성을 감소 시키고, 외래유전자의 세포내로의 도입효율을 증가시키는 전달체로 알려져 있다. 또한, 기존의 liposome에 비해 현재는 양전하를 띠는 fusion된 liposome을 사용하여 세포내 도입효율이 증가됨을 보고하고 있다[6].

따라서, 본 연구는 효율적인 유전자 전달체를 이용하여 줄기세포 내로 도입된 CEACAM 6가 oxidative stress 조건 하에서 줄기세포의 생존능에 어떠한 영향을 미치는지를 평가하여 CEACAM 6가 줄기세포의 단점을 극복할 수 있는지를 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

본 실험에 사용된 지방유래 줄기세포인 ADSC는 서울대학교 수의과대학에서 분양 받아 사용하였다[5]. 유방암유래 암줄기세포인 BCSC는 10% (v/v) FBS (Hyclone, USA)와, 1% (v/v) penicillin G-streptomycin solution (Gibco, USA), 5 µg/mL insulin (Invitrogen, USA), 20 ng/mL EGF (Gibco), 20 ng/mL b-FGF (Gibco), and 2% B27 (Invitrogen)이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's Medium/F12 medium (DMEM/F12) (Gibco)배지에, A549는 10% (v/v) FBS와 1% (v/v) penicillin/streptomycin (Hyclone)가 함유된 Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM) (Hyclone) 배지에, ADSC는 20% (v/v) FBS와 1% (v/v) penicillin/streptomycin (Hyclone)가 함유된 DMEM 배지에 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 배양하였다. ADSC는 계대수 30이 넘으면 폐기하였다.

2. Western blotting

각 세포들을 수거하여 RIPA buffer (ATTO, Japan)로 용해하였고, 용해된 세포액을 원심 분리시켜 상층액을 Pierce BCA protein assay kit (Thermo Scientific, USA)로 측정하였다. 총 단백질 20 µg을 10% SDS-PAGE에 전기영동 하였고 그 후 nitrocellulose 막으로 이전하였다. 5% skim milk로 실온에서

1시간 동안 blocking한 후 TBST로 3회 세척하였다. 1차 항체 (CEACAM 6, 1:1,250, Thermo Scientific; β -actin, 1:5,000, Santa Cruz, CA)로 4°C에서 16~18시간 반응시킨 후 TBST로 3회 세척 하였고 2차 항체(horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG, 1:5,000, Invitrogen)로 실온에서 1시간 반응시킨 후 세척 하였다. 세척 후 Pierce enhanced chemiluminescence detection substrate (Thermo Scientific)을 처리한 후, Fusion SL (Vilber Lourmat, France)을 이용하여 단백질 밴드를 확인하였다.

3. Flow cytometry analysis

BCSC, A549, ADSC를 각각 2×10^5 cells 씩 single cell로 각 tube에 준비하였다. 1차 항체(CEACAM 6, 2.5 μ g/mL final concentration)로 4°C에서 90 min 반응시킨 후 DPBS로 세척하였고 2차 항체 (goat anti-mouse IgG (H+L) Alexa fluor Plus 488, 4 μ g/mL final concentration, Thermo Scientific)로 4°C에서 30분 반응시킨 후 DPBS로 세척하였다. 최종적으로 항체를 반응 시킨 세포들과 gWiz-GFP가 발현된 ADSC는 FITC 필터를 사용하여 flow cytometer (FACS) (Novocyte 2000, ACEA Biosciences, USA)로 측정하였다. 분석은 FACS 프로그램(Novo Express 1.2.5 Software, ACEA Biosciences)으로 수행하였다.

4. DOTAP liposome 제작

Transfection에 사용하기 위한 양이온 liposome은 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) (Avanti, USA)와 cholesterol (Avanti)를 사용하며, DOTAP: cholesterol을 1:1 (50:50, % M)의 M비율로 제조하였으며, liposome의 최종 지질 농도는 1 mg/mL가 되도록 하였다. Liposome은 각각의 지질을 클로로포름, 메탄올에 용해시킨 후, 질소로 유기용매를 기화시킨 후 0.5~1시간 진공처리 해준다. 이후 DW로 용해 하였다. 제조된 liposome용액은 입자의 크기를 조절하기 위해 가압압출기로 800, 400, 200 nm의 공극을 갖는 폴리카보네이트 분리막(Whatman, USA)을 이용하여 각각 10 회 이상 가압 압출하여 200 nm까지 크기조절을 하였다.

5. Plasmid DNA (pDNA)의 transfection

ADSC를 24 well plate 에 $3 \sim 4 \times 10^4$ cells 으로 분주 후 하루 배양하였다. 본 실험에 transfection 조건을 찾기 위해 gWiz-GFP plasmid DNA을 800 ng, 1000 ng으로 고정하여

1:5, 1:10, 1:15 (pDNA:DOTAP) 비율로 실험을 진행하였다. 모든 transfection은 free DMEM에서 4시간 반응 후 혈청이 함유된 배양배지로 갈아주었다. 이후 1일 또는 2일 후 결과를 확인 하였다. 또한, transfection 1회를 한 뒤, 24시간 쯤에 한번 더 진행한 것을 transfection 2회로 진행하였고 이후 1일과 2일째 결과를 관찰하여 transfection 효율 및 GFP의 발현을 비교하였다. 이후 CEACAM 6 expression vector (Origene, USA)을 통하여 ADSC에 transfection하였다. 세포형태 및 형광발현 관찰은 ZOE fluorescent microscope (Bio-Rad, USA)로 관찰하였다.

6. H₂O₂ 농도 및 노출시간

본 실험은 [5]의 방법을 기준으로 진행하였으며 H₂O₂의 농도는 0, 20, 40, 60, 80, 100 mM로, 노출 시간은 3시간 시행하였다.

7. MTT assay

Transfection이 진행된 ADSC 24 well plate에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) (Sigma, UK) (2.5 mg/mL)용액을 300 μ L를 각 well에 가하고 2시간 동안 반응시킨 후 상층액을 제거하고 400 μ L의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 기기는 microplate reader (Versamax Microplate Reader; Associates of Cape Cod Incorporated, MA)로 측정하였다. 생존율은 대조군에 대한 백분율로 나타내었다.

8. 통계분석

통계처리를 위하여 모든 실험은 3회 이상의 독립적 반복 실험을 수행하였으며, 측정된 모든 데이터는 평균과 표준오차를 계산하여 그래프로 나타내었다. 각 실험의 유의성 검정은 대조군과 비교하여 one-way ANOVA를 이용하여 $**P < 0.02$, $***P < 0.01$ 값을 통계적으로 유의성 있는 결과로 판독하였다. 통계처리는 통계프로그램(Prism version 5.01 software, Graph Pad Software, USA)로 수행하였다.

결 과

1. 단백질에서의 세포별 CEACAM 6 발현 확인

줄기세포에 CEACAM 6의 도입을 유도하여 생물학적 기능을 평가하기 전에 세포별 CEACAM 6의 발현을 실질적인 단백질 단계에서 확인하였다. 우리의 이전 연구를 통해 유방암 암줄기

세포인 BCSC에서 이 단백질이 발현된다는 사실을 바탕으로 본 연구의 positive control세포로 사용하였다. BCSC와 폐암 세포인 A549, 줄기세포인 ADSC에서의 CEACAM 6의 발현을 확인해 보고자 western blot과 FACS를 사용하여 단백질의 발현을 비교하였다. 그 결과 Figure 1A에서 볼 수 있듯이, western blot실험을 통해서 유방암유래 암줄기세포인 BCSC에서만 발현이 됨을 확인할 수 있었고 다른 암세포나 줄기세포에서는 발현이 되지 않음을 확인할 수 있었다. 발현을 좀더 정량적으로 확인해 보고자 세포표면에 발현되는 CEACAM 6의 특징을 이용하여 세포별 세포표면에 발현된 CEACAM 6를 확인하고자 FACS를 수행하였다. 그 결과, Figure 1B에서의 FACS histogram 결과에서 볼 수 있듯, 대조군 세포인 BCSC에서의 control peak과 CEACAM 6의 peak이 오른쪽으로 이동한 것

을 확인 할 수 있는데 비해, 다른 두 세포주인 A549 및 ADSC에서는 각 control peak에 비해 CEACAM 6의 peak에 변화가 없는 것을 확인할 수 있었다. 이 단백질의 발현을 정량적으로 분석한 Figure 1C의 그래프에서도 BCSC에서의 37.81% 발현값에 비해 ADSC에서는 0.29%로 가장 낮은 발현량이 관찰되었다.

2. CEACAM 6 발현 벡터가 transfection된 ADSC에서의 CEACAM 6 발현 확인

ADSC에 CEACAM 6 발현 벡터를 전달하기 위해 먼저, transfection 조건을 선정하고자 liposome인 DOTAP을 이용한 transfection조건을 평가해 보았다. 유전자의 전달 확인을 위해서는 GFP 발현 벡터인 gWiz-GFP를 사용하였다. 먼저 pDNA:DOTAP 비율에 따른 GFP DNA 전달 효율을 확인해 보

Figure 1. Verification of CEACAM 6 expression in various cell lines at the protein level. (A) The expression confirmation of CEACAM 6 protein by western blotting. (B) Histogram peak by FACS analysis. (C) Quantitative graph of CEACAM 6 expression level analyzed by FACS. *** $P < 0.01$ for comparison of positive control BCSC versus A549 or ADSC.

고자 1:5에서 1:15까지의 비율로 ADSC에 처리해 보았다. 그 결과, Figure 2A에서 보듯이 1:5에서 가장 높은 GFP DNA 전달효율이 나타나는 것을 확인할 수 있었고 유전자의 발현 시간을 2일까지 관찰하였을 때도 1:5 비율이 가장 높은 유전자 전달 효율을 보였다. 또한, 유전자 전달효율에 따른 세포독성이 발생되는지를 평가한 실험 결과에서는 2일째 어느 정도 1:5 비율의 조건에서도 세포가 사멸된 것이 확인되었지만(1일차: 89.85%, 2일차: 68.44%) 1:10부터는(1일차: 63.61%, 2일차: 56.08%) transfection 1일차부터 급격하게 세포독성이 유발되는 것을 Figure 2B를 통해 확인할 수 있었다. 이를 통해 1:5 비율의 가장 효율적으로 DNA를 전달하는 것으로 확인되었다. DNA 대 DOTAP 비율선정 후, 다음으로는 1:5 비율을 고정하고 DNA 농도와 transfection 횟수에 따른 효율이 어떻게 달라지는지를

평가해 보았다. Figure 2C에서 보듯이, DNA 농도와 transfection 횟수에 따라 GFP의 발현이 증가함을 형광단백질의 발현으로 확인할 수 있었고, 이를 정량화한 FACS결과에서 보듯이(Figure 2D) 형광이미지 사진의 결과 경향과 유사하게 GFP의 수치가 DNA 농도 및 회수에 따라 증가하는 것을 정량적으로 확인할 수 있었다. 또한, 이 때의 세포독성 정도를 평가한 Figure 2E에서의 결과에서는 DNA 농도와 transfection 회수에 따라 GFP의 발현이 증가하지만 세포독성 또한 증가하는 것을 확인하였다. 이 결과를 바탕으로 transfection 조건은 1:5 비율로 800 ng의 DNA를 2회 transfection 하는 것으로 결정하였고 이 때, 실질적으로 CEACAM 6 벡터가 사용되었을 때 발현이 유도됨을 Figure 2F를 통해 확인할 수 있었다.

Figure 2. Decision of optimal condition for transfection of CEACAM 6 expressing vector into ADSC. (A) GFP expression analysis in ADSC according to various gWiz-GFP DNA (800 ng) vs. DOTAP liposome ratio on-time manner. (B) Cell viability according to pDNA:liposome ratio. *** $P < 0.01$ for comparison of NC versus 1:5 or 1:10 ratio. (C) GFP expression and cell images of ADSC transfected according to various transfection numbers and DNA concentration in selected 1:5 ratio. (D) GFP expression intensity by FACS analysis. (E) Cell viability of ADSC in various transfection conditions. *** $P < 0.01$ for NC versus 1:5 (800 ng) or 1:5 (1000 ng). (F) Western blotting results of CEACAM 6 expression in ADSC transfected by finally decided transfection condition.

3. 산화적 스트레스 하에서 CEACAM 6를 발현하는 ADSC의 생존능 평가

생체 내 투여된 줄기세포의 환경을 모방하기 위해 과산화수소(H_2O_2)를 사용하였다. 실험 전 세포살상을 유도하는 적정 H_2O_2 의 농도를 선정하기 위하여 다양한 농도로 ADSC에 처리하여 보았다. 그 결과, Figure 3A에서 보듯이 농도 의존적으로 농도가 높아짐에 따라 세포사멸 또한 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 이 때 처리된 대표적 H_2O_2 의 농도별 세포사멸능은 40 mM에서 18.4%, 60 mM에서 55.8% 였다(Figure 3B). 따라서, H_2O_2 60 mM을 선정하여 CEACAM 6가 발현되는 ADSC에 처리한 결과, Figure 3C에서 보듯이 CEACAM 6가 발현되지 않고 H_2O_2 가 처리된 세포에서는 CEACAM 6를 발현하는 세포에 비해 현저히 세포독성이 유도되었음을 관찰할 수 있었다. 이를 정량적으로 분석한 Figure 3D의 결과는 Figure 3C에서 관찰된 경향과 일치되게 CEACAM 6를 발현하고 있을 때 세포사멸능이 현저히 줄어들어 있음을 확인할 수 있었다. H_2O_2 처리 하에서의 CEACAM 6가 발현되지 않는 ADSC의 생존능은 40.61%, CEACAM 6를 발현하는 세포에서는 72.54%로 생존능이 향상되는 것을 확인하였다.

고 찰

세포기반 치료제의 분야에 있어 줄기세포에 대한 치료효능은 많은 다양한 연구와 보고를 통해 입증되고 있다. 특히, 최근 임상학적 보고에 의하면 줄기세포를 이용한 세포치료제는 난치성 질병 및 노화 질환 등에 활발하게 연구가 되고 있으며, 임상실험도 시도되고 있는 실정이다[9, 10]. 이러한 이유는 바로 다양한 세포로 분화 가능한 능력과 자가재생 능력을 갖춘 줄기세포의 특성 때문이다. 필요한 조직 및 기능을 복원하기 위한 줄기세포의 기능이 이러한 전임상 및 임상실험을 가능하게 했기 때문이며, 더 나아가 인공장기를 만들기 위한 재생의료 분야에서의 오가노이드 연구의 활성이 좋은 예라 하겠다[11-13]. 이렇게 보면 줄기세포의 특성처럼 줄기세포 그 자체는 모든 질병을 치료할 수 있는 만능 치료제로 여겨질 수 있지만 이 역시 세포라는 한계에 부딪히며 다양한 단점이 나타나게 된다. 치료효능을 극대화 하는데 있어 가장 주요한 단점 중 하나는 바로 세포 생존능이다. 줄기세포가 투여된 부위에서의 낮은 척박한 환경으로 인해 줄기세포는 효과를 나타내기 전 사멸에 이르게 되어 치료효과가 낮아지는 단점이 있다[14]. 세포가 생존하기 위해서는 지속적인 영양분의 공급 및 노폐물의 교환, 그리고 산소의 공급이 원활히 이루어져야 하지만 외부에서 내부로 줄기세포가 투여된

Figure 3. The enhanced cell survival of ADSC expressing CEACAM 6 under oxidative stress condition. (A) Cell morphology and (B) cell viability according to various hydrogen peroxide (H_2O_2) concentration. *** $P < 0.01$ for comparison of NC (0 mM) versus 40 mM H_2O_2 or 60 mM H_2O_2 . (C) Cell images and (D) cell viability in CEACAM 6 expressing ADSC under oxidative stress condition. *** $P < 0.01$ for NC versus CEACAM 6 expressing ADSC treated with H_2O_2 .

부위에서는 혈관의 생성부터 세포가 생존에 필요한 요소들이 현저히 부족하고 그로 인해 세포의 기능이 떨어지게 된다. 이를 극복하기 위해 세포자살 및 산화적 스트레스에 내성을 갖는 단백질의 과발현을 이용하거나 alginate 및 chitosan과 같은 천연물을 이용한 3D 배양시스템으로 hydrogel을 이용하여 줄기세포에 지속적이고 원활한 영양분의 공급을 유도해 줄기세포의 생존능의 향상, 줄기세포의 개수 또는 분화능을 유지시킴으로써 단점을 극복하고자 하는 노력들이 시도되고 있다[9, 12, 15]. 따라서, 이러한 초점에서 줄기세포의 단점을 극복하는 새로운 방법들의 개발과 노력이 요구된다.

본 연구는 이러한 관점에서 줄기세포의 단점을 극복할 수 있는 단백질의 발현을 유도하고자 하였다. 이전 우리 연구를 통해 유방암유래 암줄기세포에서 검증된 CEACAM6의 유전자를 줄기세포에 적용하여 그 효과를 평가해 보았다. CEACAM 6는 CEA family 중의 한 세포표면 단백질로 anti-apoptosis, oxidative stress에 대한 내성, 그리고 세포 부착능을 강화시켜주는 기능이 있는 단백질로 알려져 있다[7, 16, 17]. CEACAM 6는 유방암, 대장암, 폐암 같은 조직뿐 아니라 호중성 백혈구의 경우 사이토카인에 의해 활성화된 내피세포와의 접착에 관여하는 것으로 알려져 있다[18-20]. 또한, 암에서 anti-apoptosis 및 증식 촉진작용을 유도한다고 보고되어 있다[17, 21]. 따라서, 우리는 이러한 기능이 있는 이 단백질 유전자를 역이용하여 줄기세포에서의 단점을 극복하기 위한 단백질로서의 기능을 CEACAM 6가 할 수 있는지를 검증해 보고자 하였다.

가장 먼저, 사용한 줄기세포에서 실질적으로 단백질 단계에서 CEACAM 6가 발현되고 있는지를 확인하였다. Figure 1A에서 보듯이 단백질 발현 결과에서 대조군 세포로 사용된 유방암 유래 암줄기세포인 BCSC와 달리 ADSC 줄기세포에서는 단백질의 발현이 되지 않는 것을 확인하였다. 또한, CEACAM 6는 glycoposphatidyl-inositol (GPI) anchor 또는 transmembrane domain으로 세포 표면에 발현하는 단백질이다[7, 17]. 이 단백질이 발현되는 위치를 통해 세포표면에 발현되는지를 FACS를 통해 세포주 별로 CEACAM 6의 발현을 확인해 보았다. 실질적인 막 단백질로서의 발현 유무를 분석한 FACS 결과, 세포 표면에서의 발현 또한 BCSC에 비해 ADSC에서 되지 않고 있음을 확인하였고, 결국 단백질 단계에서는 CEACAM 6의 단백질이 ADSC에서 발현되지 않는 것을 확인하여 줄기세포에서 이 CEACAM 6의 기능을 평가할 수 있음을 확인하였다(Figure 1B, 1C). 또 다른 대조군 세포로 사용된 A549 폐암 세포주의 경우에는 다양한 암에서는 CEACAM 6 발현이 된다는 보고가 있지만[19, 22] 이 암세포에서는 발현이 되고는 있지만 높지 않음

을 확인하였다.

이를 토대로 우리는 ADSC에 CEACAM 6가 암세포에서의 기능 중 anti-apoptosis 및 세포증식 촉진을 유도한다는 사실을 역설적으로 ADSC에 이용하여 ADSC의 단점을 극복할 수 있는지를 평가해 보기로 하였다. 앞선 연구자들은 단백질 발현을 통한 효과를 알아보려고 발현 벡터를 이용하여 stem cell에 적용하였다[23, 24].

따라서, CEACAM 6 발현 벡터를 줄기세포에 전달하여 단백질의 발현을 유도한 뒤 기능평가를 위해 transfection을 수행하기로 하였다. 하지만, 다른 연구들에서 보고된 바에 따르면 줄기세포는 낮은 transfection 효율을 갖는 것으로 알려져 있다[25-27]. 그 이유로 첫 번째, 핵으로 가기 전 DNA의 분해가 되는 생물학적인 문제와, transfection효율이 높은 물리적 방법을 가했을 경우 낮은 세포 생존율이 문제이다. 또한 줄기세포는 transfection을 하였을 때 줄기세포 성질(stemness)을 유지하지 못하고 분화하거나 암종으로 변이될 수 있다는 보고가 있다[12, 28-30]. 이러한 문제점을 해결하기 위해 지질 성분으로 이루어진 liposome을 사용하였다. DOTAP은 cationic lipid의 일종으로 ammonium salt를 포함하고 있으며 transfection 시 효율과 안정성을 높이기 위해 cholesterol과 같은 non-cationic lipid와 함께 사용된다[31]. DOTAP은 oleoyl group이 ester 결합에 의해 연결되어 있어 세포 도입 시 세포내의 esterase에 의해 쉽게 분해되어 유전자 전달 효율이 높으며 낮은 세포독성을 나타낸다. 그러나 transfection 시 DOTAP의 비율이 과해지면 분해되지 못하고 세포 독성을 나타낼 수 있다[32, 33]. 이러한 문제를 해결하기 위해 줄기세포에 직접 transfection을 하기 전, 우리는 GFP 단백질을 발현하는 gWiz-GFP DNA를 이용하여 적정 pDNA:DOTAP의 비율을 선정하였다. 다양한 비율로 Transfection의 다양한 비율 선정 후 진행한 결과, 1:5 비율이 가장 높은 세포 생존율(89.86%)을 보였고, 이 초과비율에서는 세포독성이 현격히 유도됨을 확인하였다, 유전자 전달 후 오히려 GFP의 발현률은 2, 3일차 1:10 비율에서 감소하는 경향이 관찰되었다(Figure 2A, 2B). 이 실험을 바탕으로, DNA 농도와 외래 유전자의 발현을 높이기 위한 transfection 횟수 실험을 실시하여, 최종적으로 DNA 800 ng/사용 시 1:5 비율로 2번 transfection 시켰을 때 CEACAM 6 유전자의 발현이 잘 유도됨을 확인할 수 있었다(Figure 2F).

과산화수소 H_2O_2 는 산화성 스트레스를 발생시키는 주요 활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS) 중 하나이다. 이는 줄기세포가 치료를 위해 조직 내 투여되었을 때의 환경을 모방해줄 수 있는 물질로 항산화 효과기능을 평가할 때 많이 사용되

는 시약이다. 줄기세포 치료법에 있어 혈액공급이 원활하지 않은 허혈 환경에 노출된 줄기세포는 산화적 스트레스로 인해 세포대사와 생리기능을 감소시켜 세포사멸을 초래하게 되는데 anti-oxidative stress와 anti-apoptosis기능을 갖는 CEACAM 6가 발현될 때, 산화적 조건에서 세포사멸을 극복할 수 있는지를 평가해 보았다. 먼저, H_2O_2 에 대한 ADSC의 민감도 및 IC_{50} 을 선정하고자 다양한 농도의 H_2O_2 를 처리하였다(Figure 3A, 3B). 선정된 농도에서의 실질적인 CEACAM 6의 세포사멸 예방을 평가한 결과, 산화적 조건 하에서 이 단백질이 발현되고 있을 때는 현저하게 줄기세포의 생존능이 유지되고 있음을 확인할 수 있었다(Figure 3C, 3D). 하지만, 줄기세포에 외래 유전자를 삽입하는 것을 추가적인 실험방법이 필요하며, 삽입된 외래 유전자의 발현 기간에 따라 효과의 지속기간이 상이하게 달라질 수 있다[34]. 이를 해결하기 위해 host chromosome에 삽입시키는 방법이 도입되고 있지만 이 역시 유전적 변형을 초래할 여지는 남아 있다[35, 36].

우리의 연구는 줄기세포에서의 CEACAM 6 유전자의 생물학적 기능을 평가한 첫 보고이다. 아무리 우수한 유전 조작을 거치고 치료유전자가 발현되는 기능성 줄기세포라 하더라도 기본적으로 치료를 위해 투여된 부위에서의 낮은 생존률을 극복하지 않으면 효과를 나타낼 수 없는 치명적 단점이 있다[10]. 우리는 이를 극복해보고자 암세포에서 많이 발현된다고 알려진 CEACAM 6를 역설적으로 ADSC에 적용하였고, 산화적 조건하에서 이 유전자는 줄기세포의 생존능을 향상시키는 결과를 유도하여 향후 줄기세포의 치료부위에서의 낮은 생존률을 극복하기 위한 보조 단백질로서 줄기세포 치료제 개발에 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

세포기반 치료제에 사용되는 줄기세포는 재생능력과 다양한 세포로의 분화능력으로 인해 재생 의학 분야에서 광범위하게 관심을 끌었으며, 많은 불치병에 적용된다. 하지만, 이러한 줄기세포는 여전히 치료 전 세포증식 및 질병 투여부위에서의 낮은 생존률로 인해 충분한 치료효과가 나타나지 않는 단점이 있다. 이것을 해결하고자, 우리는 세포부착능과 항세포자살 기능을 가지고 있는 carcinoembryonic antigen (CEA) gene family의 하나인 CEACAM 6를 사용하였다. 이것을 줄기세포에 적용 전, 먼저 세포별로 이 단백질이 발현되는지를 확인하였고, 이 유전자가 발현되는 벡터를 줄기세포에 삽입시키기 위한 최적 조건을 선정하였다. 그 후, 도입된 CEACAM 6발현벡터로부터 줄기

세포에서 이 유전자가 발현되는지를 확인하였다. 그리고 인체 투여 시 발생하는 산화적 스트레스와 유사한 조건에서의 이 유전자의 기능을 평가하기 위해 과산화수소(H_2O_2)를 처리하였다. 산화적 스트레스 조건하에서 CEACAM 6가 발현되는 줄기세포는 그렇지 않은 세포에 비해 세포의 생존률이 현저히 증가하는 것을 확인하였다. 이를 통해, 이 CEACAM 6는 줄기세포의 치료 효과와 세포증식을 강화시킬 수 있는 다른 선택지로서의 가능성이 있음을 확인하였다.

Acknowledgements: We thank Dr. Je-Yoel Cho, Seoul National University, Republic of Korea, for providing adipose-derived stem cells. This research was supported by grants from the National Research Foundation (NRF) funded by the Ministry of Education (2016R1D1A1B03935498).

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Koh EY, Graduate student; You JE, Graduate student; Jung SH, Graduate student; Kim PH, Professor.

REFERENCES

- Honmou O, Onodera R, Sasaki M, Waxman SG, Kocsis JD. Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke. *Trends Mol Med*. 2012;18:292-297. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2012.02.003>.
- Henning RJ. Stem cells in cardiac repair. *Future Cardiology*. 2011;7:99-117. <https://doi.org/10.2217/fca.10.109>.
- Kim PH, Cho JY. Myocardial tissue engineering using electrospun nanofiber composites. *BMB Rep*. 2016;49:26-36. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.1.165>. PubMed PMID: 26497579.
- Mead B, Tomarev S. Evaluating retinal ganglion cell loss and dysfunction. *Exp Eye Res*. 2016;151:96-106. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.08.006>.
- Kim PH, Na SS, Lee B, Kim JH, Cho JY. Stanniocalcin 2 enhances mesenchymal stem cell survival by suppressing oxidative stress. *BMB Rep*. 2015;48:702-707. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2015.48.12.158>.
- Baek K, Tu C, Zoldan J, Suggs IJ. Gene transfection for stem cell therapy. *Current Stem Cell Reports*. 2016;2:52-61. <https://doi.org/10.1007/s40778-016-0029-5>.
- Johnson B, Mahadevan D. Emerging role and targeting of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6) in human malignancies. *Clin Cancer Drugs*. 2015;2:100-111. <https://doi.org/10.2174/2212697X02666150602215823>.
- Kim CY, Hwang IK, Kang C, Chung EB, Jung CR, Oh H, et al. Improved transfection efficiency and metabolic activity in human embryonic stem cell using non-enzymatic method. *Int J Stem Cells*. 2018;11:149-156. <https://doi.org/10.15283/ijsc18037>.

9. Raik S, Kumar A, Bhattacharyya S. Insights into cell-free therapeutic approach: role of stem cell "soup-ernatant". *Biotechnol Appl Biochem*. 2018;65:104-118. <https://doi.org/10.1002/bab.1561>.
10. Lee S, Choi E, Cha MJ, Hwang KC. Cell adhesion and long-term survival of transplanted mesenchymal stem cells: a prerequisite for cell therapy. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:632902. <https://doi.org/10.1155/2015/632902>.
11. Sachs N, de Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F, et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity. *Cell*. 2018;172:373-386. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.010>.
12. Li Z, Hu X, Zhong JF. Mesenchymal stem cells: characteristics, function, and application. *Stem Cells Int*. 2019;2019:8106818. <https://doi.org/10.1155/2019/8106818>.
13. Kratochvil MJ, Seymour AJ, Li TL, Pasca SP, Kuo CJ, Heilshorn SC. Engineered materials for organoid systems. *Nature Reviews Materials*. 2019;4:606-622. <https://doi.org/10.1038/s41578-019-0129-9>.
14. Monsel A, Zhu Y-G, Gennai S, Hao Q, Liu J, Lee JW. Cell-based therapy for acute organ injury. *Anesthesiology*. 2014;121:1099-1121. <https://doi.org/10.1097/aln.0000000000000446>.
15. Swioklo S, Constantinescu A, Connon CJ. Alginate-encapsulation for the improved hypothermic preservation of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5:339-349. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0131>.
16. Beauchemin N, Arabzadeh A. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules (CEACAMs) in cancer progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2013;32:643-671. <https://doi.org/10.1007/s10555-013-9444-6>.
17. Lin SE, Barrette AM, Chapin C, Gonzales LW, Gonzalez RF, Dobbs IG, et al. Expression of human carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 and alveolar progenitor cells in normal and injured lungs of transgenic mice. *Physiol Rep*. 2015;3. pii: e12657. <https://doi.org/10.14814/phy2.12657>.
18. Blumenthal RD, Hansen HJ, Goldenberg DM. Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (Carcinoembryonic Antigen). *Cancer Res*. 2005;65:8809-8817. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0420>.
19. Rizeq B, Zakaria Z, Ouhtit A. Towards understanding the mechanisms of actions of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 in cancer progression. *Cancer Sci*. 2018;109:33-42. <https://doi.org/10.1111/cas.13437>.
20. Pańczyszyn A, Wieczorek M. Role of CEACAM in neutrophil activation. *Advances in hygiene and Experimental Medicine (Online)*. 2012;66:574-582. <https://doi.org/10.5604/17322693.1008194>.
21. Gemei M, Mirabelli P, Di Noto R, Corbo C, Iaccarino A, Zamboli A, et al. CD66c is a novel marker for colorectal cancer stem cell isolation, and its silencing halts tumor growth in vivo. *Cancer*. 2013;119:729-738. <https://doi.org/10.1002/cncr.27794>.
22. Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;40:41-51. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.02.010>.
23. Ganapathi M, Boles NC, Charniga C, Lotz S, Campbell M, Temple S, et al. Effect of bmi1 over-expression on gene expression in adult and embryonic murine neural stem cells. *Scientific Reports*. 2018;8:7464. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25921-8>.
24. Bahmani B, Roudkenar MH, Halabian R, Jahanian-Najafabadi A, Amiri F, Jalili MA. Lipocalin 2 decreases senescence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells under sub-lethal doses of oxidative stress. *Cell Stress and Chaperones*. 2014;19:685-693. <https://doi.org/10.1007/s12192-014-0496-5>.
25. Ogle B. Electroporation can efficiently transfect hESC-derived mesenchymal stem cells without inducing differentiation. *The Open Stem Cell Journal*. 2011;3:62-66. <https://doi.org/10.2174/1876893801103010062>.
26. Rizk A, Rabie BM. Electroporation for transfection and differentiation of dental pulp stem cells. *Biores Open Access*. 2013;2:155-162. <https://doi.org/10.1089/biores.2012.0273>.
27. Park E, Cho HB, Takimoto K. Effective gene delivery into adipose-derived stem cells: transfection of cells in suspension with the use of a nuclear localization signal peptide-conjugated polyethylenimine. *Cytotherapy*. 2015;17:536-542. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.11.008>.
28. Bailey SR, Maus MV. Gene editing for immune cell therapies. *Nat Biotechnol*. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0137-8>.
29. Cho HM, Kim PH, Chang HK, Shen YM, Bonsra K, Kang BJ, et al. Targeted genome engineering to control VEGF expression in human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells: potential implications for the treatment of myocardial infarction. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6:1040-1051. <https://doi.org/10.1002/sctm.16-0114>.
30. Xu L, Wang J, Liu Y, Xie L, Su B, Mou D, et al. CRISPR-edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2019;381:1240-1247. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1817426>.
31. Olusanya TOB, Haj Ahmad RR, Ibegbu DM, Smith JR, Elkordy AA. Liposomal drug delivery systems and anticancer drugs. *Molecules*. 2018;23:907. <https://doi.org/10.3390/molecules23040907>.
32. Tao J, Ding WF, Che XH, Chen YC, Chen F, Chen XD, et al. Optimization of a cationic liposome-based gene delivery system for the application of miR-145 in anticancer therapeutics. *Int J Mol Med*. 2016;37:1345-1354. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2530>.
33. Zhang Y, Li H, Sun J, Gao J, Liu W, Li B, et al. DC-Chol/DOPE cationic liposomes: a comparative study of the influence factors on plasmid pDNA and siRNA gene delivery. *Int J Pharm*. 2010;390:198-207. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.01.035>.
34. Ramamoorth M, Narvekar A. Non viral vectors in gene therapy: an overview. *J Clin Diagn Res*. 2015;9:GE01-6. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/10443.5394>.
35. Uno N, Abe S, Oshimura M, Kazuki Y. Combinations of chromosome transfer and genome editing for the development of cell/animal models of human disease and humanized animal models. *Journal of Human Genetics*. *J Hum Genet*. 2018;63:145-156. <https://doi.org/10.1038/s10038-017-0378-7>.
36. Clément F, Grockowiak E, Zylbersztejn F, Fossard G, Gobert S, Maguer-Satta V. Stem cell manipulation, gene therapy and the risk of cancer stem cell emergence. *Stem Cell Investig*. 2017;4:67. <https://doi.org/10.21037/sci.2017.07.03>.