

APPLICATION NOTE

Quantifying subtypes of the iPSC-derived cardiomyocytes and α -actinin fragmentation by drug treatments using automated cell imaging

자동화 세포 이미징을 사용한 역분화줄기세포 유래 심근세포
아형 분석 및 약물에 의한 알파액티닌 분절의 정량 측정

Ivy Son | Molecular Devices

Jieun An, Su-bin Kim | Nexel

Introduction

세계적으로 실험동물 사용에 대한 규제가 해마다 강화되고 있고, 유럽의 경우 일부 독성시험에 실험동물의 사용을 엄격히 규제하고 있다. 동물 세포 및 동물 모델을 대상으로 한 신약에 대한 효능 및 독성 검사 결과는 종 간의 차이로 인해 인간 심근세포를 대상으로 한 효과와는 상이한 결과를 나타낼 수 있어, 비임상 시험에 사용되는 실험동물을 대체할 수 있는 새로운 독성시험모델의 개발이 시급한 상황이다. 줄기세포의 발전과 함께 현재 인간유도만능줄기세포 유래 심근세포는 신약개발 전 주기에 활용 가능하며, 초기 약효검색, 약리 효능 연구, 안전성 연구, 대사체 연구 및 독성 평가 등 신약개발 전임상 연구 분야의 전 주기에 이용이 가능하다. 특히, Cardiosight®-S는 넥셀의 심근세포 유도 분화기술로 생산한 고순도의 인간 유도만능 줄기세포 유래 심근세포로 여러 전기생리학적 실험 장비를 통해 시험 약물의 부정맥을 확인할 수 있다는 것이 확인되어 종합적 심부정맥 평가(Comprehensive *in vitro* proarrhythmia assay; CiPA) 연구에 사용되는 심근세포 중의 하나이며, 약물의 심장 안전성 평가에 적합하게 활용될 수 있다고 검증된 심근세포이다.

하지만 *in vitro*에서 심근세포의 전기생리학적 특성변화, 근수축에 대한 약물의 영향을 측정하기 위해서는 다량의 지표가 규명된 세포를 필요로 한다. 특히 분화된 심근세포의 기능이 심방세포, 심실세포 및 결절 세포 등 다양한 세포로 분화될 수 있는 특성을 가졌기 때문이다. 이러한 이유로 심근세포의 유형에 따른 품질검증 뿐만 아니라 보다 정확한 연구를 위해서 세포의 생리적 기능 외에도 유전자 발현에 대한 기준과 표지 마커에 관한 연구가 필요하며 이를 다각적으로 조사하여 규명해야 한다.

위의 유전자 표지 마커 분석 및 약물효과와 조사를 위해 ImageXpress PICO 자동화세포이미징시스템 및 CellReporterXpress 소프트웨어를

Benefits

- 유도만능줄기세포의 심방 세포 및 심실세포의 구성 정도를 자동화 이미지 획득을 통해 확인함과 동시에 정량하여 세포주 생산의 품질 관리의 기준을 제공
- 약물이 심근에 미치는 독성에 대한 고속 스크리닝이 가능하며 이를 통해 후보 물질 선정에 기여

활용한 예시를 소개하고자 한다. 본 실험에서는 인간유도만능줄기세포 유래 심근세포의 유전자 마커의 발현 여부를 형광 표지 이미지를 획득하여 가시적으로 확인하였으며, 분석 기능을 활용한 유전자 마커 발현의 수치화 및 통계적인 유의성에 대해 비교분석 하였다. 뿐만 아니라, 기존의 전통적인 현미경 장비에서 단점으로 꼽히고 있는 좁은 영역에 한정된 선택적 이미지 획득이 아닌, 고용량의 세포이미지 촬영 및 자동화된 분석시스템을 통해 세포의 특성 및 변화를 다각적으로 수치화 함으로써 High-Content Imaging 평가 시스템으로 사용될 수 있음을 확인하였다. 위의 시스템을 이용하여 인간유도만능줄기세포에서 분화된 심방 세포와 심실세포의 아형을 분석하였으며, 심근세포의 구조적 변화를 측정 하여 약물 독성을 평가할 수 있는 가능성을 소개하고자 한다.

Methods

Cell cultures

실험에 사용된 Cardiomyocyte들은 human iPSC-derived cell 공급사인 주식회사 넥셀로부터 제공되었다. 먼저 purity test를 위해 Cardiosight®-S(#C-002) mature hiPSC-CM 및 동일세포의 생산공정에 있는 미성숙 심근세포(Immature hiPSC-CM)를 사용 하였으며, α -actinin fragmentation을 확인하기 위해 Cardisight®-S 와 Hypertrophic hiPSC-CMs(R403Q)를 사용하였다. 모든 세포주는 넥셀에서 권장하는 프로토콜에 따라 해동 및 배양하였으며, 13 mm coverslip에 각각 30,000개의 세포를 분주하여 7일 동안 배양하였다.

α -actinin fragmentation test를 위해 sarcomere 구조 손상을 유도

하는 약물(3 μ M Doxorubicin, 3 μ M Sunitinib, 200 μ M Cyclophosphamide in 0.1% DMSO)을 각각의 세포에 24시간 동안 처리하였으며, 대조군에는 0.1% DMSO를 동일한 용량으로 24시간 동안 처리하였다.

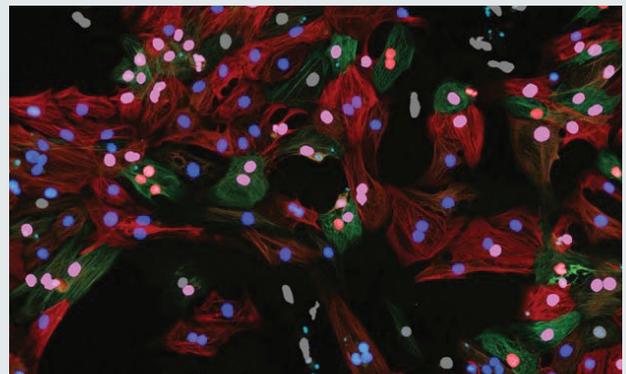
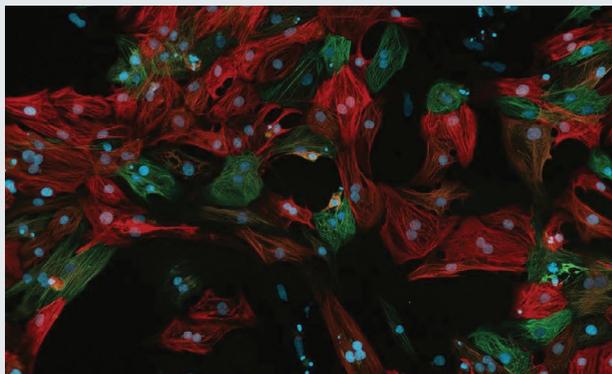
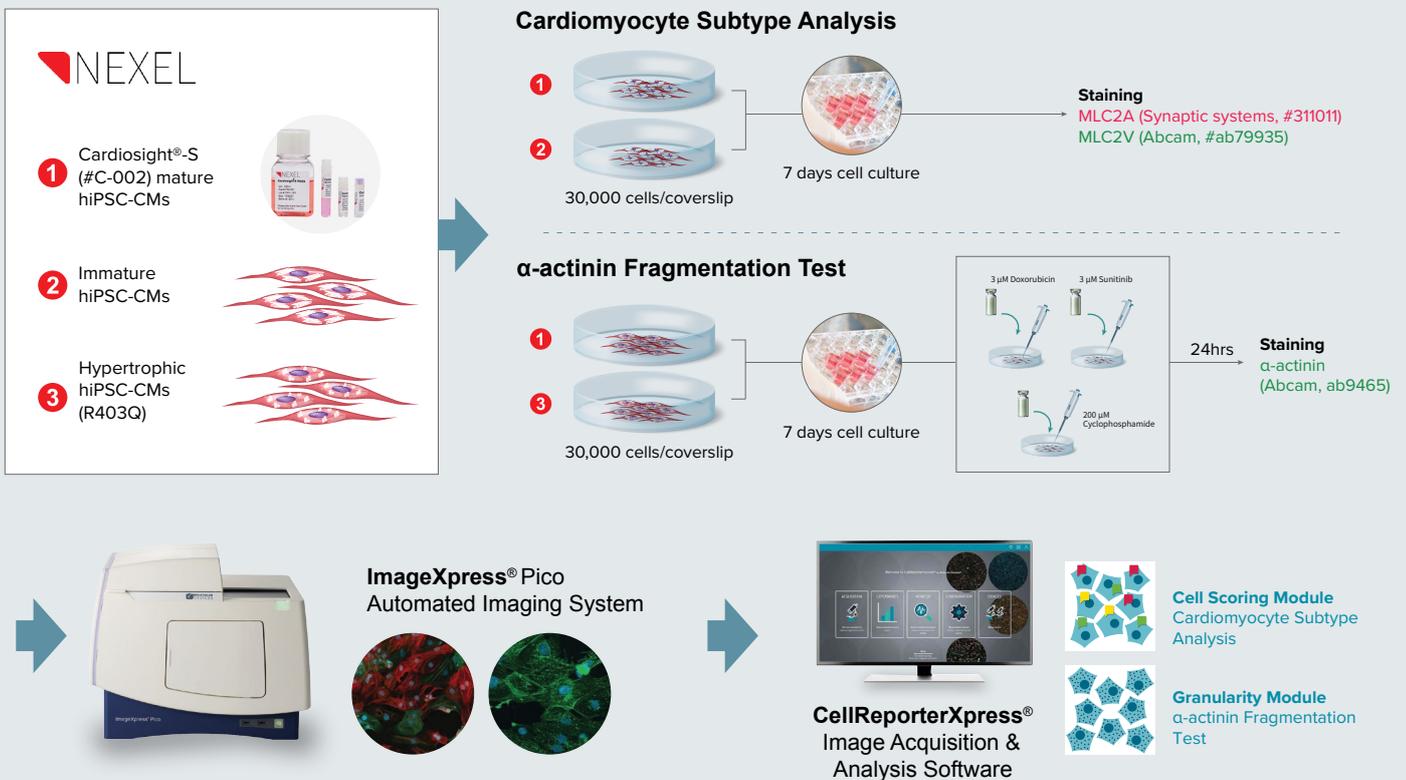
Immunostaining

Cardiomyocytes subtype analysis

심근세포의 아형 분석을 위해, 배양 7일째 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정하였으며 심방세포 항체 MLC2A(Synaptic systems, 311011) 와 심실세포 항체 MLC2V(Abcam, ab79935)를 사용하여 염색하였다.

α -actinin fragmentation test

7일째에 24시간동안 약물을 처리한 세포주를 4% 파라포름알데히드로 고정한 후, α -actinin(Abcam, ab9465)로 염색하여 확인하였다.



자동화이미징시스템을 활용한 인간유도만능줄기세포 유래 심근세포의 아형 분석 정량을 위한 염색 사진(좌, blue-nuclei, green-MLC2A, red-MLC2V)과 CellReporterXpress Cell Scoring Module을 적용한 사진(우, white overlay mask).

Cardiomyocytes subtype analysis

인간유도만능줄기세포 유래 심근세포가 심방세포 혹은 심실세포인지 알아보기 위해 ImageXpress Pico 자동화세포이미징시스템 및 CellReporterXpress 소프트웨어(Molecular Devices)를 사용하여 immunostaining 된 샘플의 이미지를 획득하고, 획득한 이미지에서 심방 세포와 심실 세포의 구성을 분석하기 위해 cell scoring module을 사용하였다. 심방세포를 표지하는 시약의 형광 시그널과 심실세포를 표지하는 시약의 형광 시그널을 일정 수준 이상으로 발현하는 세포를 설정하여 심방과 심실세포의 타입을 나누어 계수하였다.

α-actinin fragmentation test

심근세포의 sarcomere의 구조를 손상시키는 약물 3가지를 각각 처리하여 정상세포와 비후성 심근세포에서 구조의 변화를 분석하기 위해 α-actinin 구조의 이미지를 획득하고 약물에 의한 변화를 수치화 하였다. 심근세포의 sarcomere 구조가 손상될 경우 긴 섬유 형태가 짧게 끊어지는 granule의 형태로 변화된다. 짧게 변한 α-actinin의 형태를 분석할 수 있는 granularity 분석 모듈을 사용하였으며, α-actinin fragmentation의 정도를 수치화하였다.

Cardiomyocytes subtype analysis

성숙된 Cardiomyocyte는 일반적으로 심방세포에 비해 더 높은 비율의 심실세포를 포함하고 있다. Cardiosight®-S를 두 개의 배치로 나누어 배양하여 분석한 결과, 두 배치 모두 55% 이상의 심실세포(MLC2V+++/MLC2A-)와 20% 이하의 심방세포(MLC2V-/MLC2A+++)로 구성되어 있었다. 이 중, 심방세포와 심실세포의 마커들을 동시에 발현하고 있는 세포들을 각 마커의 형광 발현량(intensity)에 따라 MLC2V+++/MLC2A+와 MLC2V+/MLC2A++로 표시하였다. 그 결과, 두 가지의 타입을 동시에 가지고 있는 MLC2V+/MLC2A+ 세포들이 전체 분석 된 세포의 약 30% 정도였고, 그중 심실세포의 특성을 많이 보이는 MLC2V+++/MLC2A+ 세포가 심방세포의 특성을 보이는 세포 보다 약 3배 이상 많았다. 형광 발현량 비교로 보아, 두 가지 마커를 동시에 발현하는 세포는 장기 배양을 통해 세포의 성숙이 더 진행되면 심방세포-심실세포 전환을 통해 심실 세포로 전환될 가능성이 더 높아질 것으로 예측된다(그림 1, (a)). 미성숙 심근세포를 사용하여 심근세포의 표현형을 하나의 샘플 내에서 세가지 영역을 지정하여 확인하였다. 세 구역으로 나누어서 분석한 데이터의 평균을 확인해 보면, 41%의 심실세포(MLC2V+++/MLC2A-)와, 9%의

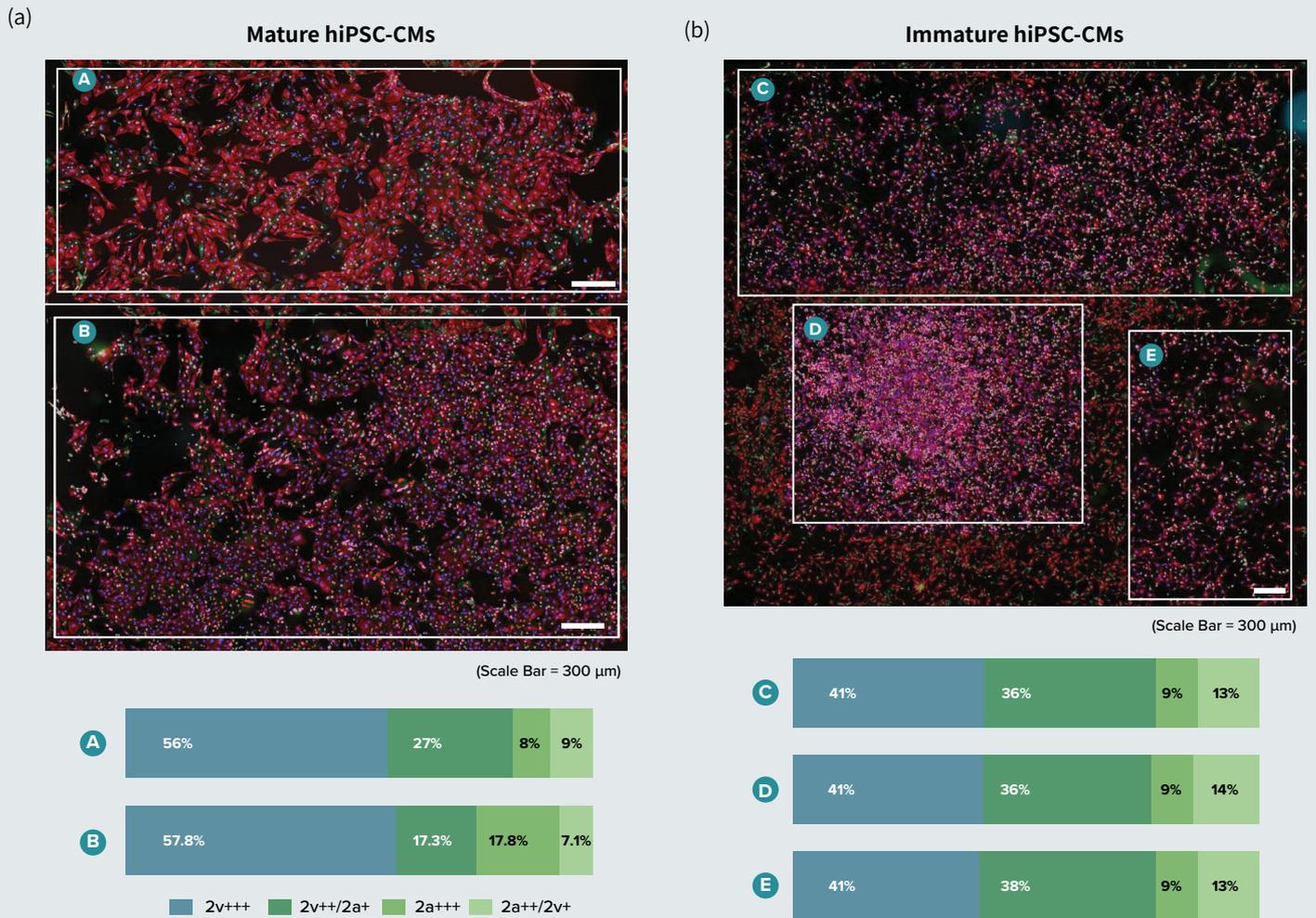


그림 1. 자동화이미징시스템을 활용한 인간유도만능줄기세포 유래 심근세포의 아형 분석. 핵은 하늘색, 심방세포 항체 MLC2A는 초록색, 심실세포 항체 MLC2V는 빨간색 형광으로 염색되었으며, CellReporterXpress의 분석 모듈을 적용하여 분석 마스크를 겹친 이미지이다. 아래에는 Batch 및 영역별로 세포의 구성 비율을 나타내는 그래프로 (a) 충분히 성숙된 인간유도만능줄기세포 유래 심근세포 (b) 미성숙 인간유도만능줄기세포 유래 심근세포이다.

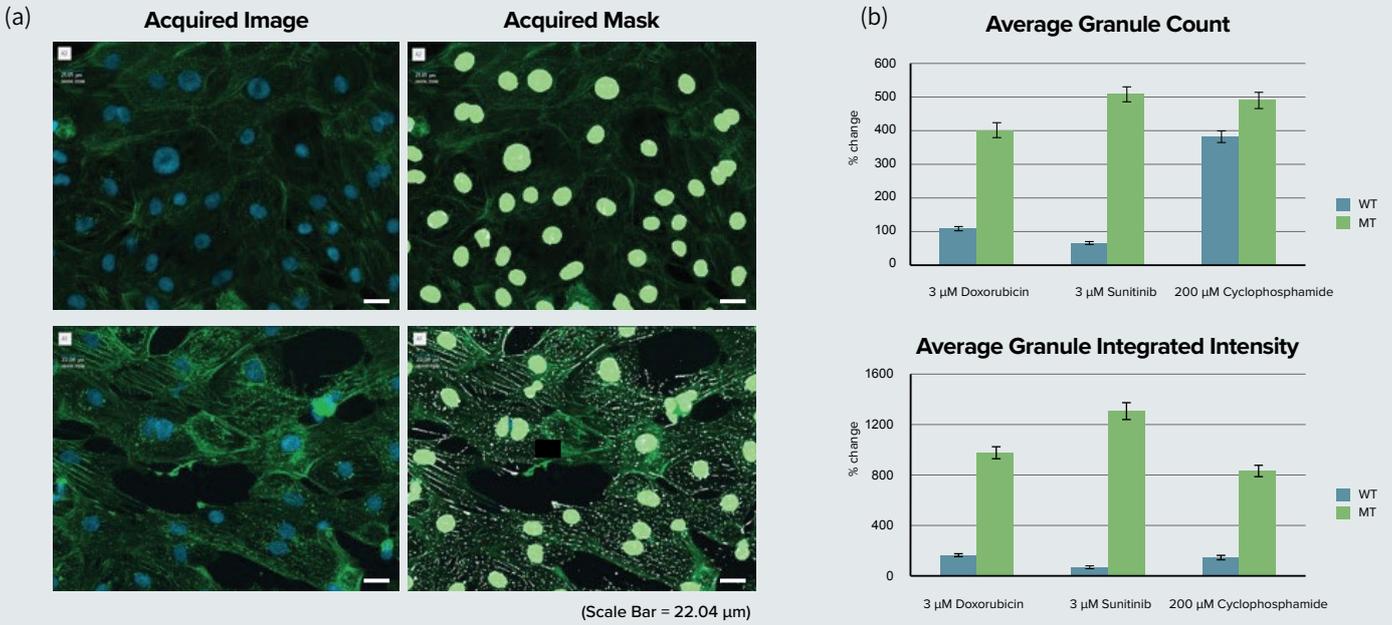


그림 2. 자동화이미징시스템을 활용한 인간유도만능줄기세포 유래 심근세포의 약물 반응에 의한 심근세포 구조체 및 α -actinin 변화 측정. (a) 좌측: 핵은 하늘색, α -actinin은 초록색으로 나타내었음. 우측: 분석마스크를 겹친 이미지. 핵은 연두색, α -actinin의 구조가 변화된 단편은 흰색으로 표시되었음. (b) 분절된 α -actinin의 갯수 및 형광 세기를 나타낸 그래프.

심방세포(MLC2V-/MLC2A+++)로 구성되어 있으며 두 가지 타입을 동시에 발현하고 있는 세포의 분포는 36.9%(MLC2V+/MLC2A+)와 13.1%(MLC2V+/MLC2A++)로 하나의 샘플 내에서 측정영역에 상관 없이 일정한 비율을 보여주고 있다(그림 1, (b)).

기존에는 촬영된 이미지만으로 결과를 해석하여 객관적인 결과 해석에 제한이 있었다. 하지만 ImageXpress Pico 자동화이미징시스템은 쉽고 빠르게 이미지 획득을 가능하게 할 뿐 아니라 소프트웨어를 통해 정량적 분석결과를 제시해 준다. 때문에 이러한 심실세포와 심방세포의 Cardiomycocytes subtype analysis 결과는 ImageXpress Pico 자동화이미징 시스템과 CellReporterXpress 분석 소프트웨어를 사용하여 심근세포의 생산과정에서 일관된 품질이 유지되고 있는지 측정할 수 있는 방안으로서의 가능성을 보여주었다.

α -actinin fragmentation test

각 그룹에서 대조군(0.1% DMSO)에 비해 약물을 처리한 그룹에서 α -actinin의 구조가 손상되면서 연결되지 않고 파편으로 쪼개진 형태의 granule처럼 보이는 현상을 발견할 수 있었다. 특히, 정상세포에서는 cyclophosphamide를 처리한 그룹에서 α -actinin이 상대적으로 더 손상을 입어 granule 개수와 granule의 형광 발현량(intensity)이 가장 높게 나타나는 것을 확인하였다. 반면, 비후성 심근세포의 경우 약물에 따른 α -actinin의 손상도의 차이는 크게 두드러지지 않지만, 전반적으로 정상세포보다 높은 값으로 α -actinin의 구조가 손상된 것을 확인하였다. 결론적으로 비후성 심근세포가 정상세포에 비해 약물에 의한 sarcomere 구조 손상에 더욱 취약한 것을 알 수 있었다(그림 2).

Conclusion

ImageXpress Pico 자동화이미징시스템을 이용하여 α -actinin 계수 및 형광 강도 분석을 통해 약물에 의한 구조적 심근 독성 변화를 쉽고 빠르게 분석 비교할 수 있었다. 기존의 이미지 기반의 분석법은 정성적인 이미지 결과제시와 한정적인 영역의 시료 이미지가 전체 시료의 결과를 대변하는 것으로 활용될 소지가 있어 이미지를 기반으로 한 결과의 신뢰성을 떨어뜨리는 요인이 되어왔다. 본 실험은 ImageXpress Pico 자동화세포 이미징시스템 및 CellReporterXpress 소프트웨어를 사용하여 기존의 촬영된 이미지를 통한 결과제시에 더하여 이미지를 기반으로 동일한 조건으로 비교 분석한 다양한 측정값을 활용한 사례를 보여 주었다. 이를 통해 세포의 구성을 객관적으로 분석하여 생산된 세포의 품질 유지를 위한 기준을 제공할 수 있었으며, 심근세포의 독성평가모델로서의 가능성을 보여주었다.