

体細胞融合



李元榮

(延世大 医大 微生物学科教授)

◇ 역사적 배경

1965년 2월13일 Watkins와 Harris는 비동화된 바이러스를 이용하여 종(種)을 달리하는 세포간의 융합을 성공하여 보고 하였다. 이 발표는 종래의 세포유전학에 중요한 전환점을 가져다 주었다.

자연상태에서 세포융합이란 성세포사이에 이루어지는 것이며 그 유전적 제한은 지극히 특이한 현상이다.

이에 반하여 체세포(体細胞) 융합이란 유전상 관여부에 또 각세포의 유전자 함유량에 상관없이 이루어지는 정상의 범위를 벗어나는 현상이라 할 수 있다.

물론 정상조직 내에는 핵을 여러개 함유하는 세포가 존재하지만 (예 : Megakaryocyte) 이들 다핵의 근원에 대한 설명은 세포분열없이 핵의 증식(endoreduplication)에 기인된다고 보는 이가 많다.

융합된 세포의 초기 특징은 한 세포질내에 두 개이상의 핵을 함유한다.

이와같이 핵을 많이 갖는 세포의 발견은 위의 경우에도 이미 1838년에 Muller라는 병리학자에 의해 암조직에서 발견, 보고하였다. 이후 Robin은 골수에서, Rokintasky는 결핵병변 조직에서, Virchow는 여러가지 정상 및 암조직에서 발견 보고 하였다. 위의 발견은 모두 1858년 이전에 이루어진 것이다. 위 사실을 참고하면 우리체내에서도 그것이 정상이든 병적현상이든 드물지 않게 체세포 융합이 발생되고 있다고 할 수 있다.

단지 그 발생빈도가 병변조직 특히 바이러스

감염이나 암조직에서 높다는 사실은 바이러스가 융합에 관여되어 있음이 암시되었다고 할 수 있다. 이는 바이러스에 감염된 여러조직에서 다핵세포(Multinucleated Cell)의 발현빈도가 높은 사실이 크게 뒷받침하게 되었다. 홍역, 볼거리, 유행성감기 등의 경우에 환부에서 다핵세포가 발견되고 있으며, 이들 바이러스를 배양세포에 인공 감염 시켰을때도 다핵세포가 발생되고 있음이 뒤이어 반복 확인되어 왔다. 이러한 사실들이 세포병리학적인 측면을 떠나 순수히 세포융합측면에서 관찰되기 시작한 것은 1960년부터이다. Barski, Sovieul, Confert 등은 유전형질을 달리하는 두종류의 쥐세포를 같은 용기에 동시배양 함으로써 융합세포가 생성됨을 보고하였다. 따라서 어떤 특수 융합매개체가 없이도 동시배양만으로 융합이 일어나고 있다고 생각했으나, 이듬해 이 세포들도 강력한 융합인자로 알려진 SVs라는 바이러스에 이미 감염된것들 이라고 확인되어 융합인자로서 바이러스의 역할이 재증명 된 셈이다. 이와 같은 시대에 같은 종류의 체세포융합 실험이 일본의 Okada등에 의해 상당히 깊게 연구되어왔다. 이들이 사용한 바이러스는 감염력이 있는 HVJ라는 바이러스 sendai바이러스였다. 뒤이어 1975년에 Harris와 Watkins는 종을 달리하는 세포사이에 (쥐×사람암세포) 비동화된 Sendai 바이러스를 이용하여 융합 보고하여 공인된 체세포 융합의 장을 열어 놓게 된것이다. 이들의 업적은 다음 세가지면에서 그 중요성을 찾을 수 있다.

- 1) 비동화된 바이러스도 세포융합인자로 충분하다.
- 2) 유전적 상관이 없는 세포사이에서도

융합이 일어날 수 있다. 3) 이들이 생산한 융합 세포도 거의 영구히 생존한다.

이렇게 시작된 세포융합의 기술은 우선 세포 유전연구 특히 암세포의 유전형과 표현형의 상관관계, “하이브리도마”를 이용한 단선 (單選) 항체 (Monoclonal Antibody) 생산등에 필수적으로 이용되는 수단이다.

◇ 융합인자의 발달

세포융합에 이용된 최초의 매개인자는 바이러스였고 아직도 강력한 수단으로 사용되기도 한다. 시초에는 감염력을 갖는 완전한 바이러스들을 사용하였으나 1965년에 바이러스의 감염력과 융합능력은 별개의 것으로 규명 되었다.

여러 바이러스 가운데 외피 (envelope)를 갖는 바이러스가 특출하게 융합 능력이 인정 되었는데 이는 바로 융합에 필요한 분자는 감염력을 좌우하는 핵단백 (Nucleocapsid)이 아니고 외피라는 사실때문인 것이다. 이는 외피를 갖는 모든 바이러스는 세포융합을 시킬 수 있는 잠재력을 갖는다. 이 가운데에서 융합효율이 높고 병원성이 약한 것으로 Sendai 바이러스가 거의 공식적으로 쓰이게 되었다. 이들 바이러스를 자외선이나 β -proppolacton 등으로 감염력을 제거하였을때 아주 이상적인 융합인자로 쓰인다.

바이러스 외피에 의한 세포융합은 다음과 같은 기전으로 설명되고 있다.

우선 바이러스의 외피발생과정을 보면 외피의 지질은 숙주세포의 세포막의 그것이다. 바이러스의 증식중간단계에서 바이러스의 유전인자로 바이러스 특유의 단백을 합성하여 이를 새로 증식된 새끼바이러스들이 싹이 터나갈 (budding) 숙주세포막 지질사이에 박아 넣게 된다.

따라서 바이러스 외피의 지질은 숙주의 그것과 동일한 것이며 단지 단백질만이 다를 뿐이다. 이때에 외피지질의 동질성이 세포융합에 크게 이바지하는 성질이라고 볼 수 있다. 이러한 바이러스가 세포에 접촉되어 세포막에 부착되면 바이러스 외피의 지질과 세포막의 지질은 동질이기 때문에 쉽게 융합된다.

그결과 외피와 세포막은 뒤에 남고 바이러스의 핵단백만이 세포질내에 투입되는 것이다. 이 경우 바이러스가 두개의 세포 사이에 끼었다면 같은 현상이 양쪽세포에 일어나기 때문에 결과로 작은 미세교량이 양세포간에 생긴다. 이 미세교량을 통한 두세포의 세포질의 상호 흐름은 바로 세포질의 융합 즉 세포 융합의 첫단계인 것이다. 이러한 미세교량의 생성은 바이러스의 수에 따라 양세포간에 수십개가 한꺼번에 생길 수 있기 때문에 그 효율은 그만큼 증대된다.

이들 세포질의 융합은 다핵세포를 낳게 되며 이들 다핵세포는 궁극에는 서로 세포증식 과정이 동시화되어 핵융합에 이르러 분열할 수도 있는 완전한 융합세포가 된다. 이과정은 energy를요 하며 Ca^{++} 이온의 존재를 필요로 하는 과정이다. 이때에 외피의 단백보다는 지질의 역할이 더욱 중요한것으로 고려되고 있다.

이후 근래에 와서 (1975) Pontevilo는 바이러스 대신 polyethylene glycole (PEG)를 융합인자로 보고했다. PEG에 의한 세포융합은 작용시간이 극히 짧으며 (60초) 구하기가 쉽고 감염력의 우려가 없기 때문에 오늘날에는 거의 누구나 이것을 사용하고 있다. PEG는 분자량에 따라 여러종류로 나누어지며 이들 각기의 융합효율이 평가 보고되고 있으나 그차이는 실험자의 선택에 따라 무시 될 수 있다. PEG에 의한 융합기전은 밝혀진바는 없다. 많은 사람들이 PEG의 강력한 친수성이 융합에 크게 작용 할것으로 추정하고 있다.

◇ 융합세포의 특이적 선별

두종류의 세포 (예A, B)를 융합인자로 조작하여 결과 산물을 보면 이론적으로 다음 종류의 세포들의 공존상태 일 것이다. 첫째로 우리가 원하는 융합 세포 (Heterokaryon : AXB). 둘째로 동종간에 융합세포 (Homokaryon; $A \times A$, $B \times B$). 셋째로 융합에 참여치 않은 원래의 세포들, 물론 여기에는 두가지 이상의 세포융합에 의한 다핵융합세포 (Multikaryon)도 있으나 이들은 형질 판별상 전자의 것이 준하는것으로 크게 문

제는 없다.

문제는 이들과운데 연구목적에 부합되는 것은 Heterokaryon (A×B) 뿐이다. 이들만을 특이적으로 선택하는 것은 융합을 이용하는 모든 연구 필수적인 과제인것이다. 1960년에 Barski 는 Heterokaryon을 단순히 세포의 성장특성만을 이용하여 선택하였다. 이는 광범위하게 사용되기에는 거의 불가능한 방법이었다.

이어 1964년 Littlefield가 효소표지를 이용하는 방법을 개발하여 세포융합기술의 실용성에 혁명을 가져왔다고 할수있다. 이를 간략히 설명하면 모든 세포의 생존을 위하여는 핵산을 생성해야 하는데 핵산생성의 유형은 두가지이다.

하나는 세포질내에서 Nucleoside의 전구물질을 이용하는 de novo 합성과, 또 하나는 세포의 부에는 이미 만들어진 Nucleotide를 잡아들여 이를 이용하는 Salvage pathway를 이용하는 방법이다. 이때에 de novo 합성을 차단시킨다면 세포는 Salvage path만 이용하여 사는 수 밖에 없다.

이때에 외부에서 pyrimidine과 purine의 원료로 thymidine과 hypoxanthine을 공급하면 세포는 살 수 있다. 그러나 세포는 10^{-6} 몰로 외부에서 주는 Nucleotide를 못 이용하는 변종이 발생된다. Thymidine을 운반하기 위해서는 Thymidine Kinase (TK)가 hypoxanthine을 위해선 hypoxanthine Guanine Phosphoribosyle Transferase (HGPRT)가 필요되는데 이들을 갖지 못하는 세포 즉, de novo합성에 의한 핵산만을 쓸수 밖에 없는 것이 생긴다. 바로 이점을 이용하여 융합에 사용될 세포중 하나는 TK-세포를 또다른 하나는 HGPRT-세포를 선택하여 융합 모세포로 쓴다. (주 : TK-세포는 HGPRT⁺이고 HGPRT⁻세포는 TK⁺임) 따라서 융합세포 중 Heterokaryon (TK⁻×HGPRT⁻)은 de novo 핵산합성을 막아도 (Aminopterin으로) 외부에서 Thymidine과 Hypoxanthine만 공급하면 살아 남고 그의 Homokaryon이나 융합안된 세포는 Amin-

opterin에 의해 de novo 핵산합성이 차단되었기 때문에 수주내에 죽어 없어진다. 오늘날엔 누구나 이 선택배지의 선택된 세포만을 사용하면 쉽게 Heterokaryon을 골라 낼 수 있다. 선택된 세포란 필요에 따라 누구나 조작해낼수 있다. 어느 세포든 Aminopterin으로 de novo 핵산합성을 차단시킨후 Thymidine의 analoge 인 BudR을 처리하면 TK⁻세포만 8-Azaguanine을 처리하면 HGPRT⁻만 선택할 수 있다.

또한 Hybridoma를 이용한 단선(單選 : Monoclonal) 항체 생산의 경우같이 한쪽 세포가 (B 림파구) 시험관에서 못자라는 경우는 선택이 필요치 않다. 융합되지 않는 경우도 모두 스스로 죽어 없어지기 때문이다.

◇ 융합세포의 특징과 이용

인위적으로 타종간 융합된 세포는 잠정적으로 안정화되어 있다고는 하나 궁극에는 각세포의 유전자의 비적합성 (incompatibility) 때문에 염색체가 밀려나게 된다. 이 사실은 세포유전 연구에 강력한 수단이 되기도 한다. 결론을 내리기에는 좀더 많은 연구가 있어야겠지만 사람과 쥐세포간의 융합의 경우에는 오랜시간의 융합의 경우에서 보면 오랜시간안에 걸쳐 사람에게서 유래된 염색체가 하나씩 밀려나고 있다. 이 현상은 진화역사가 길면 길수록 짧은 동물세포의 유전자에 밀려나는 것으로 동의하고 있다. 위와 같은 현상은 융합세포의 표현형과 유전형의 연구에 크게 기여될 수 있다. 이제는 융합을 이용한 어떠한 조작도 쉽게 이용될 수 있다. 새로운 숙주세포의 개발의 시도 (예 : 나균배양을 위한 Mφ×HeLa세포융합 1979. 저자등) 각종 대사산물 생산세포 효소생산등 그 범위는 한이 없으며 이용하는 이의 목적에 따라 그 다양성은 끝이 없다. 이 가운데에서도 괄목할만한 사실은 항체생산 특히 단선(單選 : mono Clonal) 항체를 생산하는 세포의 융합이다.

◇ 세포융합을 이용한 단선 (monoclonal) 항체생산

면역반응은 인간이 여러가지 감염으로부터 자신을 보호하는 가장 중요한 특수 생리현상이다. 이는 침입항원에 대하여 특이적 반응을 일으키는 것으로 이 특이성은 오랜기간 체내에 기억되어 동일 항원이 재침입시 효과적으로 대처할 수 있게 한다. 이러한 특이 반응의 주역을 담당하는 세포는 임파구(Lymphocyte)이다. 그러나 이 임파구 모두가 침입항원의 특성에 상관없이 무분별하게 반응을 일으킬 수 있는 다양성을 지닌것은 아니다. 각임파구는 이내 태아 발생초기에 특정항원만을 인지 할수 있도록 정해진 융통성이 없는 전문세포이다.

이와 같은 사실은 인체내의 면역기구내에는 지구상에 존재하는 모든 항원물질에 상응하는 수의 전문세포들이 갖고 태어난것이다. 항원물질중 특히 인체에 침입하는 항원은 극도로 세분화되어 인지되고 있다. 예컨대 한마리의 세균은 분류학적 기준에서 궁극적 기본단위이나 알려진 항원성결정용인(Antigenic determinant)만 보면 수백을 넘기때문에 면역학적 관점에서 하나의 세균은 수백항원의 복합체이다. 따라서 한마리의 세균을 담당하는 임파구도 그 항원성만큼의 전문세포들이며 이들이 선별적으로 분화되어 면역반응에 특이한 항체를 생산하는 것이다. 이와같이 하나의 감염체가 갖는 항원성이 복잡하다는 사실은 각 감염체간에 서로 같은 종류의 항원을 공유하는 기회가 커진다. 이러한 현상은 감염체가 크면 클수록 심각할 정도로 유사한것이다. 이로 인한 결과는 면역혈청분야에 선 간섭현상 혹은 비특이적 반응의 문제를 야기시키고 있다.

세균에 의한 감염보다 기생충에 의해 감염되면 이런 현상이 더욱 심각한 것도 바로 항원성의 과다에서 유래된다. (예 : 간흡충과 폐흡충의 혈청면역 검사). 이는 비슷한 감염체끼리는 많은 수의 항원물질이 서로 같고 몇개만이 확연히 다르기 때문에 전체적 결과는 잘 구분이 되지 않는다. 이때에 숫적으로는 극히 적지만 서로 상이한 항원을 담당하는 임파구를 골라내면 그 임파구는 두감염체를 명확히 구분할 수 있는 항

체만을 각기 생산할것이다. 이들을 골라내는 것이 바로 "cloning"이다. 여기에 기술적인 문제가 있었기 때문에 Köhler나 Milstein 이전에는 위의 이론이 현실화 되지 못했다. 즉 Cloning을 위해서는 꺼낸 임파구가 생체외에서 거의 영구적으로 생존해야 하는데 임파구는 체외에서 수주내에 사멸되며 Cloning이란 한개의 세포를 길러내야 하는 이는 더욱 불가능했었다. 이와같은 문제를 바로 특이항체를 생산하는 임파구의 형질에 체외에서 오래 살수 있는 암세포의 형질을 합치는 세포융합을 이용하여 해결하자는 데에서 Hybridana (즉 감각된 임파구와 임파구 종양세포 사이의 융합)가 생성된 것이다.

1975년 Milstein과 Köhler는 사상 처음으로 면역된 쥐의 비장세포 · 쥐의 임파구암세포를 융합시켜 단선허체를 생산하는 세포를 생산해 냈다. 이러한 기술의 발견은 앞서 설명한 문제를 해결해 낼 수 있는 새로운 경지를 마련하였고 이미 상당수의 단선허체가 상업화되어 쓰이고 있다. 인간의 각조직형에 따른 단선허체등 거의 매일 같이 새로운 것들이 경쟁적으로 나오고 있다.

실제 생산과정이나 생산품등의 세포생리학적, 면역학적으로 고려되어야 할 문제는 아직도 없지는 않다. 이러한 전문적인 문제는 여기서 거론하지 않기로 한다. 이러한 문제는 세계보건기구 주관하에 거의 매년 평가회의겸 Workshop이 이루어지고 있다. (첫모임 1979년 Swiss).

이제 체세포 융합을 이용하면 많은 문제를 해결할 수 있다. 이내 각종 조직항원은 단선허체로 명확하고 자세한 연구에 착수 되었고, 암의 진단 정복에도 (예 α - α -Feto-Protein, EBvirus등에 대항체생산 1981저자등) 희망적인 결과를 기대해 볼만하다. 학계뿐 아니라 이는 산업목적에서도 그 효용가치는 높이가 평가 될것이다. (예, 항인터페론, 각종 효소정제 Hormon 제정제등) 문제는 무엇을 위해 또 어떻게 이방법을 이용하느냐에 따라 체세포 융합의 가치는 크게 좌우될것이다.