

## Reversine, Cell Dedifferentiation and Transdifferentiation

Moon Yang Soo\*

Department of Animal Science and Biotechnology, Gyeongnam National University of Science and Technology, Jinju 52725, Korea

Received February 27, 2020 / Revised April 23, 2020 / Accepted April 24, 2020

As embryonic stem cells become pluripotent, they may cause tumor development when injected into a host. Therefore, researchers are focusing heavily on the therapeutic potential of tissue-specific stem cells (adult stem cells) without resultant tumor formation. Adult stem cells can proliferate for a limited number of generations and are restricted to certain cell types (multipotent). Mature tissue cell types in mammals cannot be intrinsically dedifferentiated or transdifferentiated to adult stem cells. Hence, the technology of induced pluripotent stem cells (iPSCs) for reprogramming adult somatic cells was introduced in 2006, ushering in a new era in adult stem cell research. Although iPSCs have been widely used in the field, the approach has several limitations: instability of the reprogramming process, risk of incomplete reprogramming, and exposure to transgenes integrated into the cell genome. Two years before the introduction of the iPSC technique, the synthetic small molecule 2,6-disubstituted purine, called reversine, was introduced. Reversine can induce the dedifferentiation of committed cells into multipotent progenitor-type cells by reprogramming and converting adult cells to other cell types under appropriate stimuli. Thus, it can be used as a chemically induced multipotent cell agent to overcome the limitations of iPSCs. Also, as an alternative therapeutic approach for treating obesity, it can be used to generate beige cells by browning white adipocytes. While reversine has the potential to act as an anti-cancer agent, this review focuses on its role in differentiation, dedifferentiation, and transdifferentiation in somatic cells.

**Key words :** Dedifferentiation, reprogramming, reversine, somatic cells, transdifferentiation

### 서 론

포유동물에서 배아의 조직이나 장기는 세 종류의 배엽(germ layers) 즉, 내배엽(endoderm: 호흡기관 및 소화기관 등), 중배엽(mesoderm: 혈액, 뼈, 근육, 연골, 지방조직 등), 그리고 외배엽(ectoderm: 피부, 신경계 등)으로부터 발달하게 된다. 이들 각 배엽들에서 유래된 각각의 세포들은 그들 고유의 특성을 지니며 일생 동안 각 세포가 다른 세포로 전환되지 않는 것이 약 20여년 전까지 과학계의 정설이었다. 그러나 2000년을 전후하여 이러한 고정된 개념들은 분화(differentiation)된 한 조직의 세포가 처음 세포가 가지고 있는 기능과 조직 특이적 특성들을 상실하고, 전혀 다른 조직의 세포로 교차분화(transdifferentiation)가 될 수 있음을 연구자들에 의해 밝혀지기 시작함으로써 성체줄기세포의 연구에 새로운 전기가 마련되었다. 교차분화는 최종 분화된 특정 세포가 또 다른 성격의 세포로 분화되기 위하여 세포의 리프로그래밍

(reprogram)이 되어야 하고, 세포는 처음 가지고 있었던 세포의 특성을 상실하게 되는데 이를 역분화(dedifferentiation)라고 한다[24]. 역분화에 대한 연구는 생쥐의 체세포를 이용한 줄기세포 유도(induced pluripotent stem cells: iPSCs)로 일본 연구자들[23]에 의해 소개된 바 있으나, 특정 유전자들(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)을 도입해야 하고, 유전자들의 도입되는 위치에 따른 안전성과 리프로그래밍 과정의 불완전성 등의 문제점도 안고 있다[1]. iPSCs 발표보다 2년 앞서, Chen 등[5]은 C2C12 세포주에 작은 합성분자들을 처리하여 역분화 유도에 의한 다능성 전구세포(multipotent progenitor cell)의 형성과, 전구세포로 전환된 이들 세포에 뼈형성 배지 혹은 지방세포형성 배지에 배양하여 뼈와 지방세포로 교차분화를 유도하였다. 이들 합성분자들 중에서 교차분화가 탁월한 분자를 확인하였으며, 최종 분화된 세포(terminally differentiated cells)의 역분화와 다능성 세포로 유도되는 결과를 바탕으로 이 물질을 “reversine”이라 명명하였다[5]. 약 15년 전에 reversine이 처음 소개된 이후 약 80여편 이상의 논문이 발표되었으며, 이들 중 약 절반은 세포의 역분화, 교차분화 및 분화에 관련된 것이며, 나머지 반은 항암인자[16, 17]로서 암과 관련된 논문이다. 여기서는 reversine에 의한 세포의 역분화, 교차분화 및 분화를 중심으로 하여 최근까지 연구동향을 소개하고자 한다.

#### \*Corresponding author

Tel : +82-55-751-3262, Fax : +82-55-751-3267

E-mail : ysmoon@gntech.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 본 론

### 화학적 역분화 합성 분자, Reversine

합성유기화학의 발전과 함께 1990년대 후반 많은 합성물질들을 동시에 대량으로 시험하고 새로운 역분화 인자들을 확인할 수 있는 기술들이 확보되었다. 이들 합성물질 중의 하나가 앞에서 언급한 합성 purine analog인 reversine이며(Fig. 1), 첫 번째로 확립된 역분화 합성 분자라 할 수 있다[1]. Chen 등[5]은 약 50,000개의 각기 다른 합성 분자를 C2C12 mouse myoblasts에 4일간 처리하여 역분화를 유도하였으며, 이후 뼈 혹은 지방분화 배지를 7일간 처리에 의하여 osteoblasts와 adipocytes로 교차분화를 유도하였다. 배양된 세포에서 뼈와 지방세포 특이적 마커 유전자를 분석한 결과 2-(4-morpholinoanilino)-6-cyclohexylaminopurine analog (reversine)가 가장 강력하게 myotubes형성을 억제하고 mononucleated cell을 형성하였다. Reversine을 처리 받은 세포는 myotube형성이 완전히 사라지고 미분화된 형태의 세포 리프로그래밍 현상이 나타났다. Osteogenesis유도 조건에서는 세포의 약 35%가 alkaline phosphatase (ALP)의 활성으로 뼈의 특성을 보였으며, adipogenesis 유도 조건에서는 약 40%의 세포의 세포질에서 oil-red O 염색으로 지방구의 형성을 확인하여 지방세포의 특성을 확인하였다(Fig. 2). 섬유아세포, C2C12, 3T3-L1 등을 포함한 reversine을 전처리 받은 세포들은 세포의 형태가 급진적으로 변하는데, 최고 36배까지 크고 납작하게 배양용기에 부착된 모양을 보이면서 세포의 증식은 완전히 억제 된다[2, 15, 19,

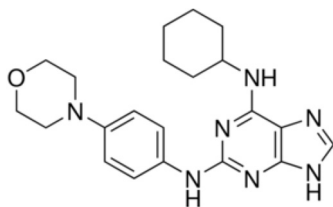


Fig. 1. Chemical structure of reversine [2-(4-Morpholinoanilino)-6-cyclohexylaminopurine] [5].

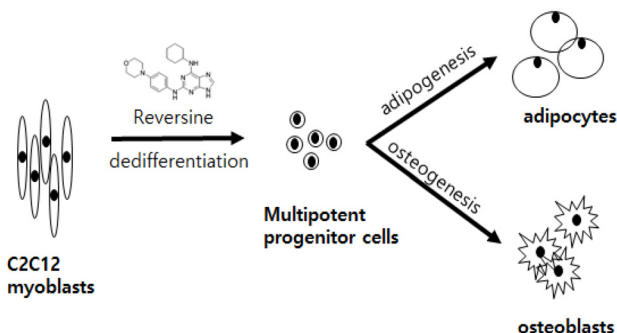


Fig. 2. Dedifferentiation and transdifferentiation of C2C12 myoblasts induced by reversine. This Fig. is based on Chen et al. [5].

20]. Reversine을 처리 받은 모든 세포가 역분화 되지는 않으며, 역분화 유도시 세포 종류에 따라 1일부터 4일까지 다양한 기간과 농도에 따라 처리되어 역분화의 비율도 다양하게 나타난다. 교차분화가 되지 않는 세포는 즉, 역분화가 되지 못한 세포는 처음 처리 받은 세포의 성질을 유지한다. 세포에 처리된 reversine이 제거되면 세포는 점차적으로 최초의 세포 형태와 세포분열로 회복된다[2].

화학적 역분화 물질로서 제시된 reversine은 유전적 방법에 의한 iPSCs와 비교될 수 있다. 세포의 역분화를 유도하기 위하여 iPSCs는 Klf4, Sox2, c-Myc, Oct4 등 외래 유전자가 대상세포의 유전체에 도입되어야 하지만, 화학적 역분화의 경우 외래유전자의 도입이 없이 reversine을 직접 대상 세포에 처리한다. 화학적 역분화 방법도 세포 종류별 처리농도, 처리시점, 처리시간 등이 확립된다면 iPSCs와 마찬가지로 운명이 결정된 세포를 역분화시켜 다양한 준줄기세포의 확보에 큰 기여를 할 것으로 기대된다.

### Reversine에 의한 역분화와 교차분화

역분화는 성체줄기세포를 이용한 재생의학분야나 양서류에서의 조직 재생능력 연구에서 주요한 과정으로 간주된다. 특정 계열의 세포로 분화가 결정된 세포가 역분화가 일어나면 분화가 덜 된 세포 혹은 줄기세포 유사 상태로 전환되어 또 다른 세포로 성격을 바꿀 수 있다. 그러나 고등 척추동물에서 역분화에 대한 잠재적 능력과 조직의 재생 능력은 진화과정에 점진적으로 감소되어 왔다[3]. 포유동물의 신경조직과 심근세포들은 조직퇴화 혹은 상처 등이 일어난 후에 거의 재생이 불가능한 것이 그 좋은 예이다. 따라서 분화된 포유동물세포의 잠재적 재생능력을 회복시키기 위한 연구가 매우 중요하다.

Reversine에 의한 역분화 효과는 세포주인 C2C12에 국한되지 않고 사람과 생쥐의 표피에서 분리한 섬유아세포(primary fibroblast)에서도 확인되었다[2]. 섬유아세포에 reversine (5  $\mu$ M)을 4일간 전처리 한 후 다능성 전구세포로 유도하였다. 역분화된 세포를 osteogenic medium에 7일간 배양하였을 때 ALP염색에서 약 45%의 세포가 뼈로 교차 분화가 일어났다. 또한 역분화된 세포를 TGF- $\beta$ 가 함유된 평활근(smooth muscle) 유도배지에 5일간 배양하였을 때 약 20%의 세포에서 교차 분화가 확인되었다. Saraiya 등[19]은 쥐의 척추디스크에서 추출한 섬유아세포(annulus fibrosus cells)에 reversine을 처리하여 다능성 세포로 역분화를 유도하고 뼈와 지방세포 등으로 교차분화를 시도하였다. 배양된 세포에 reversine (0.3  $\mu$ M)을 4일간 전처리를 하여 다능성 전구세포로 역분화를 유도한 후 지방, 뼈 그리고 연골분화를 각각의 유도배지로 배양하였을 때 각 세포들로 교차분화가 일어났다. Park 등[15]은 3T3-L1 지방전구세포에 3일간 reversine (2.5  $\mu$ M)을 처리한 후 14일간 뼈분화 유도배지로 배양하였을 때, ALP 활성증가 및 뼈 형성 마커 유전자들(osteocalcin, osteopontin, ALP)의 발현 증가가

확인되어, 지방세포에서도 reversine에 의한 뼈 세포로의 교차 분화 가능성을 제시하였다. 양의 태아유래 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cell)에 reversine (0.6 $\mu$ M)을 2일간 전처리 한 후에 5-azacytidine을 2일간 추가로 처리하여 심근세포 (cardiomyocytes)로 분화를 유도한 연구도 있다[21].

Reversine에 대한 연구는 배엽의 유래가 전혀 다른 세포로의 유도도 시도되었다. Reversine을 C2C12 myoblasts (중배엽 유래)에 처리한 후 neuroectodermal lineage (외배엽 유래)로 교차분화를 유도함으로써 reversine의 교차분화에 대한 적용 범위를 확대하였다[11]. C2C12세포에 reversine (5 $\mu$ M)을 4일간 처리한 후 신경분화 배지에 배양하여 신경세포 특이적 표지 유전자(Tuj1)와 교세포(glia cell)의 표지유전자인 GFAP의 mRNA와 단백질 수준에서 높은 발현을 보임으로서 C2C12세포에서 신경계 세포로의 교차분화를 보여주었다. 소의 섬유아 세포를 reversine으로 reprogram을 유도하여 3가지 germ layer cells로 전환시킨 연구도 발표되었다. Li 등[12]은 소의 귀 조직에서 취한 섬유아세포를 액체질소에 8년간 장기저장 후 10%FBS/DMEM 배지에서 reversine (5  $\mu$ M)을 4일간 처리하고 뼈, 지방세포, 근육세포 및 신경세포로 각각 유도하였다. Reversine을 처리 받은 섬유아세포를 신경세포 유도배지에 배양하게 되면 신경세포 표지 유전자들(MAP2, NFM, NSE, GFAP, TUJ1)이 발현되는 신경세포로 전환되었다. 섬유아세포에서 신경세포로의 전환은 약 39~53% 수준이었다. 또한 섬유아세포를 myogenic 배양액에 21일간 처리한 결과 myotube의 형성을 보여주었으며, 간원성(hepatogenic) 유도배지에 14일간 배양하였을 때는 glycogen 흡수와 입방형(cuboidal)의 간세포 모양을 보였으며, 간세포 마커 유전자 ALB, AFP 등의 발현을 나타내었다.

최근에는 세포의 미분화 상태(undifferentiated state)를 더 향상시키기 위하여 성체줄기세포인 human bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs), human adipose-derived stem cells (ASCs) 뿐만 아니라 토끼와 양의 골수세포에 reversine을 처리하여 다양한 세포로 분화능력을 향상시킬 수 있음을 보여주었다[6, 18, 21, 22]. 앞에 소개된 연구들은 운명이 결정된 세포나 성체세포에 reversine을 처리하여 역분화 유도 후 중배엽 혹은 외배엽 세포계로 교차분화를 시도하였지만, Lv 등[13]은 근육유래 줄기세포(muscle derived stem cells: satellite cells)에 reversine을 처리하여 생식세포(germ cell lineage)로 교차분화를 유도하였다. 돼지 근육유래 satellite 세포에 reversine을 4일간 처리하였을 때, C2C12세포 혹은 3T3-L1 세포에서 보고되었던 것과 유사하게 크고, 납작한 유형의 세포 변화와 더불어 약 56%의 세포증식이 감소되었다. 다능성(pluripotency)세포 마커 유전자인 Oct4유전자의 발현은 약 7배 증가한 반면 세포증식 마커 유전자인 PCNA는 크게 감소한 것으로 보아 reversine에 의한 세포의 다능성 기능의 증가와 세포증식 감소를 확인하였다. 근육유래 satellite cell에 rever-

sine을 2일간 처리한 후 20% bovine follicular fluid가 포함된 배양조건에서 10일간 추가 배양하였을 때, 크고 둥근 혹은 타원형 female germ-like cell들이 형성되었다. Germ cell marker 유전자들인 Vasa, Dazl과 oocyte marker인 Zp2, Zp3 등의 발현이 확인 되었다. 이러한 마커 유전자들의 발현 양상은 돼지의 oocytes에서와 유사한 결과임을 보여 reversine에 의한 근육 satellite cell을 이용한 돼지의 암컷 생식세포로의 교차 분화 가능성을 보여주었다. Reversine에 의한 세포의 역분화, 교차 분화, 및 분화 등에 관한 최근까지의 연구들을 Table 1에 정리 하였다.

위의 연구결과들을 종합해 보면 세포주(C2C12, 3T3-L1), 섬유아세포(primary fibroblasts), 준줄기세포(muscle satellites, mesenchymal stem cells) 등 다양한 세포에서 reversine을 처리하여 역분화 및 교차분화를 유도할 수 있음을 보여 주었다. 근육세포로 운명이 결정된 C2C12세포의 경우 reversine에 의하여 지방, 연골, 뼈와 같이 동일 배엽 유래 세포뿐만 아니라 neuron 같이 다른 배엽 유래 세포까지 교차분화가 유도됨을 볼 수 있다(Fig. 3). 여기서 reversine 처리에 대한 가장 중요한 점은 세포의 리프로그래밍에 의한 역분화와 적절한 분화조건하에서 다른 유형의 세포로 교차분화가 유도될 수 있다는 점이다. Reversine은 화학적으로 합성된 작은 분자로 쉽게 세포에 처리할 수 있고, iPSCs보다 비교적 안전하게 성체줄기세포를 유도할 수 있다는 점에서 앞으로 주목을 받을 수 있을 것으로 예상된다.

### Reversine의 작용기전

앞에 언급한 연구들에서 reversine을 처리 받은 세포는 증식이 억제되고 growth arrest와 함께 역분화가 일어나는 것을

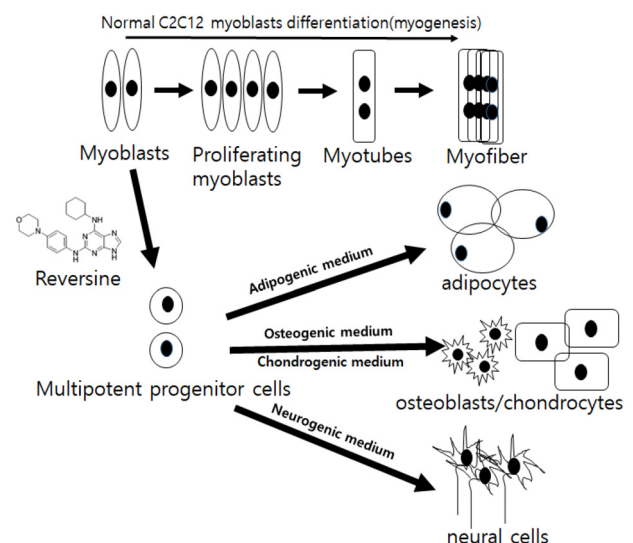


Fig. 3. Schematic representation of the pathway involving reversine-mediated dedifferentiation and subsequent trans-differentiation.

Table 1. Comparisons of reversine studies for cell dedifferentiation, transdifferentiation and differentiation

Cell types	Time point of reversine treatment and duration	Molecular function	References
Mouse C2C12 myoblasts	4 days pretreatment	-dedifferentiation -transdifferentiation (adipocytes/osteoblasts)	[5]
Human and murine fibroblasts	4 days pretreatment	-dedifferentiation -transdifferentiation (adipocytes/osteoblasts)	[2]
Porcine Muscle satellite cells	4 days pretreatment	-dedifferentiation -transdifferentiation (female germ-like cells)	[13]
Mouse C2C12 myoblasts	4 days pretreatment	-dedifferentiation -transdifferentiation (neuroectodermal lineages/neuron, glia cell)	[11]
Mouse 3T3-L1 preadipocytes	2 or 3 days pretreatment	-dedifferentiation -transdifferentiation (osteoblasts) -inhibit adipocyte differentiation	[15]
Rat annulus fibroblasts	4 days pretreatment	-dedifferentiation -transdifferentiation (adipocytes/osteoblasts/chondroblasts)	[19]
Rabbit bone marrow stem cell	1 day pretreatment In direct coculture w/ 5-azacytidine	-dedifferentiation -transdifferentiation (cardiomyocytes)	[18]
Ovine fetal mesenchymal stem cell	2 days pretreatment In direct coculture w/ 5-azacytidine	-dedifferentiation -transdifferentiation (cardiomyocytes)	[21]
Ovine fetal mesenchymal stem cell	1 day pretreatment	-dedifferentiation -transdifferentiation (adipocytes/osteoblasts)	[22]
Bovine ear fibroblast	4 days pretreatment	-dedifferentiation -transdifferentiation (adipocytes/myocytes/neuron)	[12]
Mouse 3T3-L1 mature cells	1 or 2 days after full differentiation	-promotes browning of white adipocytes (beige cells)	[8]
Mouse 3T3-L1 preadipocytes	6 days during the adipogenic induction	-stimulate adipocyte differentiation	[10]

보여 주었다. Reversine을 처음 발견한 연구팀은 C2C12 myoblast에서 일어난 역분화의 기작은 reversine이 mitogen-activated extracellular signal-regulated kinase (MEK1)과 non-muscle myosin II heavy chain (NMMII)을 모두 방해하는 dual inhibitor로 작용함을 확인하였다[4]. 즉 reversine이 세포의 운명을 결정하는 유전자(cell-fate determining genes)들의 발현을 억제함으로써 역분화(dedifferentiation)를 유도하였다고 보았다. NMMII가 blocking이 되면 reversine은 C2C12 myoblasts가 G2/M phase에 머물게 유도하고, 동시에 reversine이 MEK-dependent signaling을 억제함으로써 histone H3의 acetylation을 조절한다. Shan 등[20]은 C2C12 myoblast를 이용

한 연구에서, reversine이 cell cycle과 세포증식에 관련된 단백질들은 억제하고, 반대로 growth arrest를 유도하는데 관련된 단백질들은 증가시킴을 확인하였다. 이들 연구에 의하면 gene silencing에 일반적으로 관여하는 polycomb 유전자, 즉 polycomb repressive complex 1 (PRC1)과 Ezh2은 reversine에 의해 발현이 증가하고, 이것은 곧 근육 특이적 전사인자들인 myogenin, MyoD, Myf5들의 발현을 억제한다(Fig. 4). Polycomb 유전자들은 줄기세포의 재생과 배아발달 단계에 중요한 기능을 하며 Ezh2의 발현은 골격근의 분화를 저해하는 것으로 알려져 있다[20]. 이들 전사인자들의 발현 감소에 의해 리프로그래밍된 C2C12 세포는 growth arrest와 함께 다양한 형태의

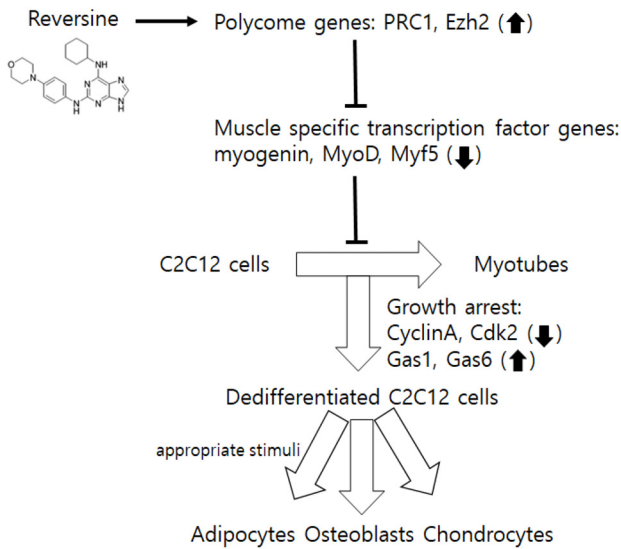


Fig. 4. Schematic representation of reversine-mediated dedifferentiation of C2C12 myoblasts. The treatment of C2C12 cells with reversine could increase polycomb genes, polycomb repressive complex 1 (PRC1) and Ezh2. The enhanced PRC1 and Ezh2 expressions are capable of silencing of transcription factor genes (myogenin, MyoD, Myf5), which are necessary for inducing and maintaining myogenic differentiation (myotube formation). Cyclin A and Cdk2 are downregulated by reversine while growth arrest specific-1 (Gas1) and -6 (Gas6) protein expressions are upregulated. The inhibited Cyclin A expression causes the cells to undergo growth arrest in G2-phase. Appropriate stimuli could be applied to induce the trans-differentiation of the reversine-mediated multipotent cells towards different lineages such as adipocytes, osteoblasts, and chondrocytes.

세포로 분화가 유도될 수 있다. 많은 세포에서 growth arrest는 세포분화를 위한 전제조건이기도 하지만 세포의 역분화를 시작하기 위한 전제조건이기도 하다[20]. C2C12에서 reversine에 의한 세포의 다양한 전환성(교차분화)은 chromatin의 histone 변형과 연관이 있다. 앞에서 언급한 것처럼 C2C12 myoblasts에 reversine을 처리한 후 신경외배엽계로 교차분화를 시킨 경우는 신경외배엽 마커 유전자들(Ngn2, Nts, Irx3, Pax7, Hes1, Hes6)의 프로모터영역에 있는 histone의 변형이 활성화 됨으로써 이들 유전자들의 뚜렷한 발현증가를 보였다고 한다[11]. 또한 환형 섬유소세포(annulus fibroblast)에 reversine을 처리하여 뼈, 지방, 연골 등의 세포들(mesenchymal lineages)로의 유도시험에서도 chromatin의 remodeling, growth arrest, cell cycle 등의 조절을 통하여 준줄기세포로의 특성을 획득하였다고 한다[19]. Reversine을 처리 받은 C2C12 세포의 miRNA 발현분석에서 근육발달에 주요 조절자 중에 하나인 muscle-specific miRNA-133a이 histone modification의 변화 즉, miR-133a promoter 상의 histone H3S10의 phosphor-

ylation, H3K14의 acetylation 등의 감소에 의해 miRNA-133a가 현저히 감소하였다[7]. 장기간 초저온에 보관된 somatic cell인 bovine fibroblasts에 reversine을 처리하고 각 세포 유형 즉, mesoblasts로부터 osteoblasts와 adipocytes, ectoderm으로부터 neurocytes, 그리고 endoderm으로부터 smooth muscle cell과 hepatocytes로 분화시킨 경우[12], reversine에 의해 fibroblast세포는 G2/M단계에서 growth arrest가 일어난다. 이러한 결과는 reversine을 처리 받은 세포에서 histone H3 lysine의 acetylation의 증가와 DNA methylation수준의 감소와 관계가 있음을 제시하였다. Reversine에 의한 세포의 역분화와 교차분화와 관련된 연구들을 종합해 보면, reversine을 처리 받은 세포는 G2/M단계에서 growth arrest가 일어나면서 역분화가 진행되는데, 이를 조절하는 유전자들 즉, 세포주기와 세포증식과 관련된 유전자들은 그 발현이 억제되고, growth arrest를 유도하는 유전자들은 증가된다. 다능성 전구 세포에서 다른 세포로 교차 분화가 일어날 때에는 chromatin remodeling 즉, 유도세포 관련 유전자들의 프로모터 부위의 histone modification의 활성이 동반됨을 알 수 있다.

#### Reversine과 지방세포분화 및 갈색지방세포화

2004년 reversine이 처음 소개된 이후 각 세포에 대한 reversine의 처리시기는 세포배양 초기에 1-4일간 이루어지고, 처리에 대한 세포의 역분화를 연구하였다. 그러나 Kim 등[10]은 지방전구세포(3T3-L1)가 100% confluence된 2일 후 지방분화 유도배지와 동시에 reversine을 6일간 처리하여 지방세포의 분화에 어떤 영향을 미치는지 분석하였다. Reversine을 처리 받은 3T3-L1세포는 지방세포분화 조건하에서 분화를 촉진하였으며, 지방세포분화 표지 유전자들인 aP2, PPAR- $\gamma$ , resistin, C/EBP $\alpha$ , adiponectin등의 발현이 증가한 반면, 지방분화를 억제하는 유전자인 pref-1은 감소하였다고 한다. 이러한 결과는 신호전달 체계의 AKT와 p70<sup>s6k</sup>의 선택적 억제에 의한 결과로 설명하였다. 또한 reversine에 의한 지방세포의 분화 촉진에 대한 것은 troglitazone에 의한 지방세포분화와 차이를 보였는데 이는 reversine이 전사인자인 PPAR- $\gamma$ 의 활성을 유도하지 않았고, troglitazone은 AKT와 p70<sup>s6k</sup>에 영향을 미치지 않았기 때문이라고 하였다. 그러나 위의 결과와 달리, 저자의 연구실과 미국 퍼듀대학에서 공동으로 실시한 연구에서는 3T3-L1 지방세포의 분화 유도과 동시에 reversine (2.5  $\mu$ M)을 함께 처리한 경우 지방세포분화가 억제되고, 지방분화 마커 유전자들(PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ , FAS, resistin)의 발현과 세포내 지방구(lipid droplets) 형성 등이 감소하였다[15]. Reversine의 처리 시기를 분화유도배지 배양 전에 2일간 reversine을 처리하여도 지방세포의 분화억제효과는 뚜렷하게 확인할 수 있었다. 3T3-L1 세포에서 reversine에 의한 지방세포분화 억제작용은 TGF- $\beta$ 1 활성화와 연관된 신호체계를 제시하였다. 여기서 상반된 두 연구 결과는 reversine 농도(10  $\mu$ M vs 2.5  $\mu$ M)와



지방세포의 분화도의 차이로 설명하기에는 부족한 면이 있기 때문에 보다 더 체계적인 연구가 필요한 것으로 사료된다. 이에 저자의 연구실에서 지방세포의 분화단계별 reversine 처리가 지방세포의 분화에 미치는 영향을 연구한 결과 reversine은 clonal expansion 단계 즉 분화유도 초기에 가장 강력하게 지방세포의 분화를 억제하였으며, 이후 reversine에 의한 분화 억제효과는 감소하였고, 처리 기간에 비례하여 분화 억제 효과도 있음을 확인할 수 있었다(Y. S. Moon, unpublished data). 최근 연구에 의하면, 완전히 분화된 3T3-L1세포에 reversine을 처리하면 백색지방세포가 갈색지방형 세포로 전환된다고 한다[8]. 지방전구세포를 지방분화유도 배지에서 분화를 유도하고, 세포들이 지방구를 충분히 형성되었을 때 reversine을 24 혹은 48시간 처리한 결과 miR-133a의 발현이 감소되었다고 한다. miR-133a의 감소는 이에 조절 받는 Prdm16의 발현을 억제하여 흰색지방이 갈색지방형 지방세포(beige adipocytes)로 유도된다고 한다. Beige 지방세포의 확인은 대표적 표지인자 UCP1와 Pgc1 $\alpha$ 의 발현 증가와 흰색지방세포의 표지 인자인 FASN, Leptin, AdipoQ 등의 발현 감소로 지방세포의 갈색지방화를 증명하였다. 이들 연구자들은 6주간 고지방 식이로 비만을 유도한 생쥐에 reversine을 복강내에 24일간 주입한 결과 마지막 6일간 뚜렷한 체중감소를 보였다고 한다. 이러한 체중감소는 reversine 주입 후 체온 증가에 의한 열발생(thermogenesis)으로 확인할 수 있었다고 한다. Reversine 처리를 받은 생쥐의 지방조직에서도 3T3-L1세포에서처럼 Ucp1, Prdm16의 증가와 miR-133a의 발현 감소를 볼 수 있어 지방세포의 갈색지방형으로의 전환을 확인하였다. 이는 reversine이 세포주에서만 국한되지 않고 포유동물에서도 흰색지방의 갈색지방형 유도로 열생산에 의한 비만억제에 쓰일 수 있는 가능성을 제시하였는데 그 의미가 크다고 할 수 있다.

## 결론 및 전망

화학적 처리방법인 reversine이나 특정 유전자 도입에 의한 iPSCs방법 모두 성체세포로부터 다능성 줄기세포의 획득과 관련된 줄기세포 연구에서 큰 진전임에는 틀림이 없다. 추가적인 연구가 더 필요하겠지만 reversine에 의한 성체세포로부터 다능성 줄기세포의 유도는 유전적 조절의 iPSCs 보다 안전하고, 간단한 방법이라 할 수 있다. 또한 reversine은 지방세포의 분화 억제 및 갈색지방화 유도에 의한 에너지 소비 축진을 유도하여 비만억제를 위한 물질로서 활용될 가능성도 있다. 최근 연구에 의하면 reversine은 fibroblast와 같은 성체세포를 다능성 전구세포로 역분화를 시키는 것 외에 세포의 성장을 멈추게(cell growth arrest) 하여 결국에 암세포를 죽게 하는 활성도 지닌 것으로 보인다. Reversine에 의한 Aurora kinase inhibitor로 작용, 그리고 histone H3의 인산화 억제 등의 기전

에 의해 다양한 종양세포의 증식을 막고 세포사멸을 유도[16, 17]하는 등의 항암 인자로서도 기대되는 물질이다. Reversine이 성체세포의 리프로그래밍에 의한 역분화 기능을 착안하여 체세포 핵 치환(somatic cell nuclear transfer, SCNT)에 적용한 보고도 있다[14]. Reversine을 미니돼지의 SCNT embryo에 처리하여 배양한 경우 배반포(blastocysts)의 형성이 크게 증가하여 체세포 핵이식이 크게 향상 되었다고 한다. 이상과 같이 reversine은 성체세포의 역분화인자, 항암인자, 항비만인자 및 SCNT 향상을 위한 물질 등으로 그 연구와 적용 범위가 확대될 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 2019년 경남과학기술대학교 동물생명산업센터의 연구비 지원에 의한 것입니다.

## The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## References

- Anastasia, L., Pelissero, G., Venerando, B. and Tettamanti, G. 2010. Cell reprogramming: expectations and challenges for chemistry in stem cell biology and regenerative medicine. *Cell Death Differ.* **17**, 1230-1237.
- Anastasia, L., Sampaoli, M., Papini, N., Oleari, D., Lamorte, G., Tringali, C., Monti, E., Galli, D., Tettamanti, G., Cossu, G. and Venerando, B. 2006. Reversine-treated fibroblasts acquire myogenic competence *in vitro* and in regenerating skeletal muscle. *Cell Death Differ.* **13**, 2042-2051.
- Brookes, J. P. and Kumar, A. 2002. Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 566-574.
- Chen, S., Takanashi, S., Zhang, Q., Xiong, W., Zhu, S., Peters, E. C., Ding, S. and Schultz, P. G. 2007. Reversine increases the plasticity of lineage-committed mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 10482-10487.
- Chen, S., Zhang, Q., Wu, X., Schultz, P. G. and Ding, S. 2004. Dedifferentiation of lineage-committed cells by a small molecule. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 410-411.
- Conforti, E., Arrigoni, E., Piccoli, M., Lopa, S., de Girolamo, L., Ibatici, A., Di Matteo, A., Tettamanti, G., Brini, A. T. and Anastasia, L. 2011. Reversine increases multipotent human mesenchymal cells differentiation potential. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* **25**, S25-33.
- Kim, M., Yi, S. A., Lee, H., Bang, S. Y., Park, E. K., Lee, M. G., Nam, K. H., Yoo, J. H., Lee, D. H., Ryu, H. W., Kwon, S. H. and Han, J. W. 2014. Reversine induces multipotency of lineage-committed cells through epigenetic silencing of

- miR-133a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **445**, 255-262.
8. Kim, S., Park, J. W., Lee, M. G., Nam, K. H., Park, J. H., Oh, H., Lee, J., Han, J., Yi, S. A. and Han, J. W. 2019. Reversine promotes browning of white adipocytes by suppressing miR-133a. *J. Cell Physiol.* **234**, 3800-3813.
  9. Kim, M., Yi, S. A., Lee, H., Bang, S. Y., Park, E. K., Lee, M. G., Nam, K. H., Yoo, J. H., Lee, D. H., Ryu, H. W., Kwon, S. H. and Han, J. W. 2014. Reversine induces multipotency of lineage-committed cells through epigenetic silencing of miR-133a. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **445**, 255-262.
  10. Kim, Y. K., Choi, H. Y., Kim, N. H., Lee, W., Seo, D. W., Kang, D. W., Lee, H. Y., Han, J. W., Park, S. W. and Kim, S. N. 2007. Reversine stimulates adipocyte differentiation and downregulates Akt and p70 (s6k) signaling pathways in 3T3-L1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **358**, 553-558.
  11. Lee, E. K., Bae, G. U., You, J. S., Lee, J. C., Jeon, Y. J., Park, J. W., Park, J. H., Ahn, S. H., Kim, Y. K., Choi, W. S., Kang, J. S., Han, G. and Han, J. W. 2009. Reversine increases the plasticity of lineage-committed cells toward neuroectodermal lineage. *J. Biol. Chem.* **284**, 2891-2901.
  12. Li, X., Guo, Y., Yao, Y., Hua, J., Ma, Y., Liu, C. and Guan, W. 2016. Reversine increases the plasticity of long-term cryopreserved fibroblasts to multipotent progenitor cells through activation of Oct4. *Int. J. Biol. Sci.* **12**, 53-62.
  13. Lv, X., Zhu, H., Bai, Y., Chu, Z., Hu, Y., Cao, H., Liu, C., He, X., Peng, S., Gao, Z., Yang, C. and Hua, J. 2012. Reversine promotes porcine muscle derived stem cells (PMDSCs) differentiation into female germ-like cells. *J. Cell Biochem.* **113**, 3629-3642.
  14. Miyoshi, K., Mori, H., Mizobe, Y., Himaki, T., Yoshida, M. and Sato, M. 2010. Beneficial effects of reversine on in vitro development of miniature pig somatic cell nuclear transfer embryos. *J. Reprod. Dev.* **56**, 291-296.
  15. Park, J. G., Lee, D. H., Moon, Y. S. and Kim, K. H. 2014. Reversine increases the plasticity of lineage-committed pre-adipocytes to osteogenesis by inhibiting adipogenesis through induction of TGF- $\beta$  pathway *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **446**, 30-36.
  16. Piccoli, M., Ghiroldi, A., Monasky, M. M., Cirillo, F., Ciconte, G., Pappone, C. and Anastasia, L. 2019. Reversine: A synthetic purine with a dual activity as a cell dedifferentiating agent and a selective anticancer drug. *Curr. Med. Chem.* doi: 10.2174/0929867326666190103120725.
  17. Piccoli, M., Palazzolo, G., Conforti, E., Lamorte, G., Papini, N., Creo, P., Fania, C., Scaringi, R., Bergante, S., Tringali, C., Roncoroni, L., Mazzoleni, S., Doneda, L., Galli, R., Venerando, B., Tettamanti, G., Gelfi, C. and Anastasia, L. 2012. The synthetic purine reversine selectively induces cell death of cancer cells. *J. Cell Biochem.* **113**, 3207-3217.
  18. Pikir, B. S., Susilowati, H., Hendrianto, E. and Abdurantam, F. 2012. Reversin increase the plasticity of bone marrow-derived mesenchymal stem cell for generation of cardiomyocyte *in vitro*. *Acta Med. Indones.* **44**, 23-27.
  19. Saraiya, M., Nasser, R., Zeng, Y., Addya, S., Ponnappan, R. K., Fortina, P., Anderson, D. G., Albert, T. J., Shapiro, I. M. and Risbud, M. V. 2010. Reversine enhances generation of progenitor-like cells by dedifferentiation of annulus fibrosus cells. *Tissue Eng. Part A*. **16**, 1443-1455.
  20. Shan, S. W., Tang, M. K., Chow, P. H., Maroto, M., Cai, D. Q. and Lee, K. K. 2007. Induction of growth arrest and polycomb gene expression by reversine allows C2C12 cells to be reprogrammed to various differentiated cell types. *Proteomics* **7**, 4303-4316.
  21. Soltani, L., Rahmani, H. R., Daliri Joupari, M., Ghaneialvar, H., Mahdavi, A. H. and Shamsara, M. 2016. Ovine fetal mesenchymal stem cell differentiation to cardiomyocytes, effects of co-culture, role of small molecules; reversine and 5-azacytidine. *Cell Biochem. Funct.* **34**, 250-261.
  22. Soltani L, Rahmani, H. R., Daliri Joupari, M., Ghaneialvar, H., Mahdavi, A. H. and Shamsara, M. 2020. Effects of different concentrations of reversine on plasticity of mesenchymal stem cells. *Indian J. Clin. Biochem.* **35**, 188-196.
  23. Takahashi, K. and Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676.
  24. Tsonis, P. A. 2004. Stem cells from differentiated cells. *Mol. Interv.* **4**, 81-83.

## 초록 : Reversine과 세포의 역분화 및 교차분화

문양수\*

(경남과학기술대학교 동물생명과학과)

배아줄기세포는 만능세포이기 때문에 동물에게 주입되면 종양으로 발달할 수도 있다. 따라서 연구자들은 종양 형성으로부터 비교적 자유로운 성체세포로부터 세포 특이적 줄기세포(성체줄기세포)를 확보하는데 관심을 두고 있다. 성체줄기세포는 제한적으로 세포분열을 할 수 있고 지정된 특정 세포로만 발달할 수 있다. 포유동물에서 각 조직의 세포들은 자연적 생리조건하에서는 역분화 혹은 교차분화에 의해 성체줄기세포로 전환되지 않는다. 따라서 일본 연구자들에 의하여 2006년 성체세포의 리프로그래밍에 의한 유도만능줄기세포(iPSCs) 기술이 소개되어 성체줄기세포 연구의 새로운 장을 열었다. 비록 연구현장에서 iPSCs 기술이 폭 넓게 이용되지만, 리프로그래밍의 안정성뿐만 아니라 유전체에 외래유전자의 도입 등의 문제점도 있다. Reversine은 iPSCs 보다 2년 앞서 발견된 작은 화학적 합성 분자인 퓨린 유사체이다. Reversine은 분화된 세포를 리프로그래밍에 의한 역분화를 유도하여 다능성 줄기세포로 전환시킬 수 있으며, 적절한 분화조건하에서 다른 세포로 교차분화를 유도할 수도 있다. 따라서 reversine은 iPSCs가 가지고 있는 문제점을 극복하고 화학적인 방법을 이용하여 성체세포를 다능성 줄기세포로 전환시킬 수 있는 물질로 활용될 수 있다. Reversine이 백색지방세포를 갈색지방형세포(beige cell)로 전변시켜 열 발산에 의한 에너지소비를 촉진함을 제시하여 항비만인자로서 그 가능성을 열어 놓았다. Reversine은 세포 역분화의 기능적 역할 이외에 항암 인자로서 또 다른 기능들이 보고되고 있어 앞으로 여러 분야에서 그 이용성이 기대 되는 물질이다.