

Identification and Characterization of Secreted Phosphoprotein 2 as a Novel Bioactive Protein for Myocardial Differentiation

Sejin Jeon^{1,2*}

¹Department of Biological Sciences and Biotechnology Major in Bio-Vaccine Engineering, Andong National University, Andong 36729, Korea

²Vaccine Industry Research Institute, Andong National University, Andong 36729, Korea

Received December 5, 2022 /Revised December 14, 2022 /Accepted December 14, 2022

Despite several advances in identification of cardiac transcription factors, there are still needs to find new bioactive molecules that promote cardiomyogenesis from stem cells to highly efficient myocardial differentiation. We analyzed Illumina expression microarray data of mouse embryonic stem cells (mESCs)-derived cardiomyocytes. 276 genes were upregulated (≥ 4 fold) in mESCs-derived cardiomyocytes compared undifferentiated ESCs. Secreted phosphoprotein 2 (Spp2) is one of candidates and is known to inhibit bone morphogenetic protein 2 (BMP2) signal transduction as a pseudoreceptor for BMP2. However, its function in cardiomyogenesis is unknown. We confirmed that Spp2 expression increased during the differentiation into functional cardiomyocytes using mESCs, TC-1/Kh2 and E14. Interestingly, Spp2 secretion transiently increased 3 days after formation of embryoid bodies (EBs), indicating that the extracellular secretion of Spp2 is involved in the differentiation of ESCs into cardiomyocytes. To characterize Spp2, we performed experiments using the C2C12 mouse myoblast cell line, which has the property of shifting the differentiation pathway from myoblastic to osteoblastic by treatment with BMP2. Similar to the differentiation of ESCs, transcription of Spp2 increased as C2C12 myoblasts differentiated into myotubes. In particular, Spp2 secretion increased dramatically in the early stage of differentiation. Furthermore, treatment with Spp2-Flag recombinant protein promoted the differentiation of C2C12 myoblasts into myotubes. Taken together, we suggest a novel bioactive protein Spp2 that differentiates ESCs into cardiomyocytes. This may be useful for understanding the molecular pathways of cardiomyogenesis and for experimental or clinical promotion of stem cell therapy for ischemic heart diseases.

Key words : Cardiomyocyte differentiation, embryoid body, embryonic stem cell, secreted phosphoprotein, stem cell therapy

서 론

심부전(heart failure)은 전세계적으로 높은 사망원인 중 하나이며, 현재 치료법의 대부분은 질환의 악화를 지연시킬 뿐이며, 근원적인 치료는 어렵다. 즉, 성인의 심장은 부상 또는 질환에 의해 손상이 일어난 후 재생이 될 수 없다. 따라서, 심장 기능을 복구하기 위한 새로운 치료 전략이 광범위하게 연구되고 있다. 그 중 줄기세포와 전구세포를 이용한 재생연구는 심부전의 치료와 예방을 위

한 줄기세포 치료 연구와 임상시험까지 활발히 이루어지고 있다[6, 16, 23]. 줄기세포 또는 전구세포의 심장 내 이식을 통한 줄기세포 치료는 이식 후 기능을 하는 심근세포로의 분화되는 효율에 따라 그 성공율이 결정된다[7, 20]. 합성 및 천연물 유래의 저분자 화합물[8, 9]은 줄기세포의 분화와 자가증식을 제어하고 조절하는데 유용한 수단으로 사용되고 있다. 심근세포의 전구체 또는 심근의 주변세포에서 분비되는 체내 단백질을 발굴하는 것[1] 또한, 그 단백질의 발현 조절, 재조합단백질로의 개발을 통하여 줄기세포 치료의 효율성을 높일 가능성이 있다. 본 논문에서는 배아줄기세포의 심근세포로의 분화를 촉진하는 체내 분비 단백질을 줄기세포를 사용한 세포 스크리닝을 통해 발굴하고 그 역할을 규명하고자 한다.

Secreted phosphoprotein 2 (Spp2)는 주로 간에서 합성되며, 다양한 잘린 C-말단 산물이 순환하는 것으로 알려져 있다[5, 18, 24]. transforming growth factor-beta (TGF- β)와 bone morphogenetic protein 2 (BMP2)과 결합하여 슈도수

*Corresponding author

Tel : +82-54-820-6188, Fax : +82-54-820-6633

E-mail : sjjeon@anu.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.

용체로 작용하여 각 신호전달을 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다[4, 5, 24]. Spp2는 간에서 주로 분비되어 다양한 조직으로 순환하며[25], BMP2에 결합하여 BMP2에 의존적인 뼈 형성전달을 늦추는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 또한, Spp2는 뼈 발생 및 재생 과정뿐만 아니라, 염증질환, 암 발생과정에도 억제 역할을 할 것으로 기대하고 있다[19, 24, 25]. 그러나, 심근 형성과의 연관성은 알려진 바 없다. 본 논문에서 처음으로 심근세포로의 분화를 촉진하는 생리활성 단백질로서의 가능성을 규명하고자 한다.

재료 및 방법

마우스배아줄기세포(mESCs) 배양 조건

TC-1/Kh2 mESCs: 마우스배아섬유아세포(Mouse embryonic fibroblast, MEF)는 C57BL/6 마우스의 13.5일째 배아에서 단일세포로 분리하여 배양한 것으로, Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) (GIBCO, 11995-065) 배지에 5% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, SH30396.03)과 2 mM L-glutamine (GIBCO, 21051-024)을 첨가한 배양액

을 사용한다. 감마조사 후 배아줄기세포주의 피더(feeder) 세포로 사용한다. TC-1/KH2 마우스배아줄기세포주(mouse embryonic stem cells; mESCs)는 alpha-myosin heavy chain (a-MHC) 유전자 프로모터에 enhanced green fluorescence protein (EGFP)가 클로닝된 벡터에 의해 형질전환된 마우스배아줄기세포주로 생명공학연구소의 남기환박사님에게서 제공받았다. 벡터 DNA는 Dr. Yamashita June (Kyoto University, Japan) 에게서 제공받았다(Fig. 1A). TC-1/KH2 mESCs는 MEF feeder cell에 의존적으로 배양하며, 배지는 DMEM에 15% FBS (Hyclone, SH30070.03) 와 beta-mercaptoethanol (Sigma, M7522), 2 mM L-glutamine를 첨가하여 사용한다. TC-1/KH2 mESCs의 계대 배양은 2일에 한번씩 진행한다.

E14Tg2a.4 (E14) mESCs: 피더 세포를 사용하지 않고 독립적으로 0.1% gelatin (sigma, G9391)-coating culture dish에서 배양한다. 배양액은GMEM medium (Sigma, G5154)에 2 mM glutamine (Gibco-BRL), 1 mM sodium pyruvate (Gibco-BRL), 1× nonessential amino acids, 10% (v/v) fetal bovine serum (characterized, Hyclone), a 1:1,000 dilution of beta-mercaptoethanol stock solution을 첨가한 기본 배지에

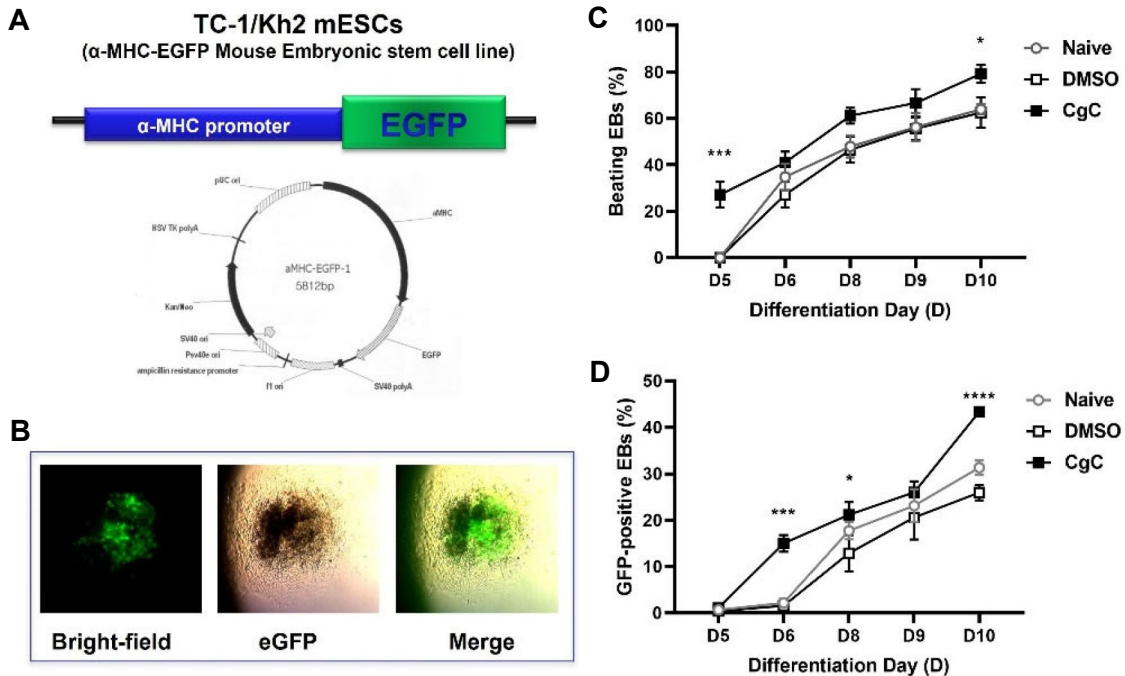


Fig. 1. Expression of EGFP under the transcriptional control of alpha-MHC promoter in differentiating EBs and schematic presentation of the *in vitro* differentiation protocol of embryonic stem cells into cardiomyocytes. (A) A DNA construct is containing 1.8 kb promoter sequence of the mouse alpha-MHC gene between the EcoRI and Sall sites of pEGFP-1 (Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA). (B) EBs expressed EGFP only when they had been differentiated into cardiomyocytes after 10 days. Cell morphology was detected under an inverted phase contrast microscope (x200). Each image is representative of at least three independent experiments. (C-D) beating scoring standard (C) and GFP-positive scoring standard (D) of differentiated embryoid bodies and cardiomyocyte differentiation effect of cardiogenol C (CgC). Data are expressed as the mean ± S.E.M (n=4). The statistical analyses were conducted using analysis of variance (2-way Dunnett's multiple comparisons test) between groups (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$, ****; $p < 0.0001$).

500-1,000 units per ml of leukocyte inhibitory factor (LIF) (Chemicon catalog # ESG1107)를 첨가한다. 분화용 배양액은 LIF만 뿐 동일한 배양액을 사용한다. E14 mESCs는 계대 배양을 24시간마다 진행한다.

배아체(Embryoid body; EB) 형성

TC-1/KH2 mESCs는 0.025% trypsin (Gibco, 15400-054)을 처리하여 단일 세포로 분리한 다음, 다시 플레이팅하여 10분간 두어 바닥에 붙는 피더 세포를 제거하고 mESCs만 모아, 분화배양액에 희석한다. 분화배양액은 DMEM에 20% FBS, 0.1 mM beta-mercaptoethanol, non-essential amino acid (Gibco, 11140), 2 mM L-glutamine를 첨가한 것이다. 한 방울당 25 μ l 부피에 750 개의 세포가 포함되도록 하는 hanging drop method[3]에 따라 배아체를 형성한다(D0~D3). 3일후 각각의 배아체를 100 mm culture dish로 옮겨 2 일간 배양한다(D3-D5). 둥글게 잘 응집된 배아체만 96 well culture plate의 각 well에 3개씩 이동시켜 지속적으로 분화를 유도하며 관찰한다(D5~10). 배아체의 박동소(beat)와 형광 발현을 지속적으로 관찰한다[14].

E14 mESCs는 배양액에 LIF만 제거하면 분화배양액이 된다. 한 방울당 25 μ l 부피에 600 개의 세포가 포함되도록 하는 배아체를 형성한다(D0~D3). 3일후 각각의 배아체를 100 mm culture dish로 옮겨 2일간 배양한다(D3-D5). 둥글게 잘 응집된 배아체만 96 well culture plate의 각 well에 1개씩 이동시켜 지속적으로 분화를 유도하며 관찰한다(D5~10). 배아체의 박동소와 형광 발현을 지속적으로 관찰한다.

마이크로어레이 분석(Microarray analysis)

Sentrix Mouse-6 Expression BeadChip arrays (47,769 probes) from Illumina®을 수행한 결과[22, 23]를 얻어 유전자 발현양상을 분석한다.

실시간 정량 PCR (Real-time qPCR)

Isol-RNA Lysis reagent (5 PRIME, 2302700)을 이용하여 분리한 Total RNA를, diethylpyrocarbonate (DEPC; Sigma Aldrich, D5758)-treated water에 녹여 사용전까지 -80°C에서 보관한다. RevertAid first-strand cDNA synthesis kit (Thermo Fisher Scientific K1622)를 사용하여 cDNA를 합성한다. 실시간 정량PCR은 KAPA SYBR® FAST Master Mix (Kapa Biosystems KK4602)를 이용하며, 7700 sequence detector (Applied Biosystems)기기를 사용한다. 상대적인 정량(2^{-CT})을 위한 대조군으로 house-keeping genes *Actb* 또는 *Gapdh*을 함께 진행한다. 사용한 대조군의 프라이머는 mouse *Gapdh* (forward; 5'-ggcaattcaacggcacagtcaag-3'와 reverse; 5'-tcgctcctggaagtgtgtatgg-3') 또는 mouse *Actb* (forward; 5'-acggccaggtcatcactattg-3'와 reverse; 5'-cagagattccata

ccaagaag-3') 이다.

웨스턴블롯팅

전체 세포 용해를 위해 RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM sodium fluoride, and 1 mM Na₃VO₄)에 protease inhibitor cocktail (Roche Life Science, 11 697 498 001)를 첨가한 용액을 사용한다. 분비된 단백질을 확인하기 위해 세포배양액은 100 kDa 컷오프와 5 kDa까지 10배 농축한다. 블롯팅은 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에 전기영동 후 polyvinylidene difluoride (PVDF) 멤브레인에 옮긴다. 멤브레인을 Tris-buffered saline (TBS; 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl)에 0.05% Tween-20을 첨가한 0.05% TBST 용액에 5% bovine serum albumin (BSA; Bovogen, BSAS 0.1) 섞어 블로킹 용액으로 사용하고, 1차 항체는 1: 1,000으로 1% BSA/TBST 용액에 희석하여 4°C에서 밤새 부드럽게 흔들면서 반응시킨다. 2차 항체는 goat anti-rabbit IgG Antibody, (H + L) horseradish peroxidase (HRP) conjugate 또는 rabbit anti-goat IgG Antibody, HRP conjugate를 이용하여 1: 3,000으로 TBST 용액에 희석하여 상온에서 1시간 부드럽게 흔들면서 반응시킨다. 면역반응 검출은 ECL Western Blot reagents (GE Healthcare Life Sciences, RPN 2106)을 이용하여, ChemiDoc XRS+ (BioRad)에서 검출하여 ImageLab Software (v6.1, BioRad)와 ImageJ (v1.53c, NIH)를 이용하여 정량화한다. 상대적인 정량을 위해 house-keeping protein β -Actin 또는 GAPDH를 함께 진행한다.

C2C12 마우스근모세포 배양 및 근육세포로의 분화

C2C12 마우스 근모세포는 DMEM 배지에 4.5 g/l glucose, 4 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin을 첨가하고 20% FBS를 첨가한 배양액을 사용한다. 이 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건을 유지하며 한 번이라도 분화한 적 없는 상태로 50~70% 밀집도로만 세포를 유지해야 한다. 성장배양액(growth medium, GM)에서 FBS의 농도가 낮아지면 분화가 유도되니 주의해야 한다.

성장배양액 조성에서 20% FBS 대신 2% horse serum으로만 대체하면 분화배양액(differentiation medium, DM)이 된다. C2C12 마우스 근모세포를 분화배양액에 노출하면 바로 분화가 진행되어 3일차부터 근관(myotube)을 관찰할 수 있으며 7일차에 박동소를 관찰할 수 있다.

통계처리

통계 분석은 GraphPad InStat software를 사용한다. 2개의 그룹을 비교할 때에는 two-tailed Mann-Whitney (*MW*) U-test를 진행하고, 3개 이상의 그룹의 데이터를 비교할 때에는 one-way ANOVA 또는 2-way ANOVA (Dunnett's

multiple comparisons test)를 진행한다. 모든 데이터는 mean ± S.E.M값으로 표시하고 *p*-value는 0.05 이하일 경우 통계학적인 유의성을 지닌다고 표시한다.

결과 및 고찰

심근세포 특이적 형광을 발현하는 배아줄기세포주의 분화 유도

줄기세포의 심근세포로의 분화를 촉진하는 체내 분비 단백질을 새롭게 발굴하기 위하여 a-MHC가 발현할 때 EGFP가 함께 발현하는 형질전환 마우스배아줄기세포주인 TC-1/KH2 mESCs를 사용하였다(Fig. 1A). TC-1/KH2 mESCs는 hanging drop 배양으로 응집된 배아체 형성을 통해 분화되었으며, 6일차부터 심근세포계열로 분화된 세포에서 형광 발현과 심근의 특징적인 박동소를 나타내었다. 본 실험에서는 96well plate에 well당 3개씩의 배아체를 5일차에 옮겨 바닥에 붙인 후 매일 형광을 발현하는 배아체 및 박동소를 확인하였다. 10일차에 가장 최대치의 형광발현과 박동소를 관찰하였다(Fig. 1B). 다음으로, 심

근세포로의 분화 활성이 알려진 저분자 화합물 중 하나인 Cardiogenol C (CgC) 3 μM 처리[26]를 통하여 박동소가 5일차부터 생기는 배아체를 발견하였으며(*p*=0.0005) (Fig. 1C), 6일차부터 형광을 발현하는 배아체의 수가 급격하게 증가하였던 것으로 보아(*p*=0.0003) (Fig. 1D), CgC에 의한 심근세포로의 분화 촉진을 확인하였다. 이를 통하여, 형질전환된 배아줄기세포주의 분화능뿐만 아니라, 분화된 심근세포의 형광발현 및 기능을 검증할 수 있었다.

배아줄기세포가 심근세포로의 분화 유도될 때 발현이 증가하는 새로운 유전자 Spp2

10일차까지 분화된 TC1/Kh2 mESC 유래 배아체와 미분화된 세포와의 유전자 발현패턴을 검증하기 위하여, Illumina 발현 마이크로어레이를 실시하였다. 발현양상이 2배 이상 차이나는 유전자 스크리닝하여 분화에 관련된 마커 유전자들의 발현양상을 확인하여 분화가 제대로 이루어졌는지 검증하였다(Fig. 2A). 그 중에서 형질감염된 EGFP의 발현도 5.98배 증가되어 있었다. 심근형성(cardiomyogenesis)에 관여하는 것으로 알려진 주요 인자들(Nkx

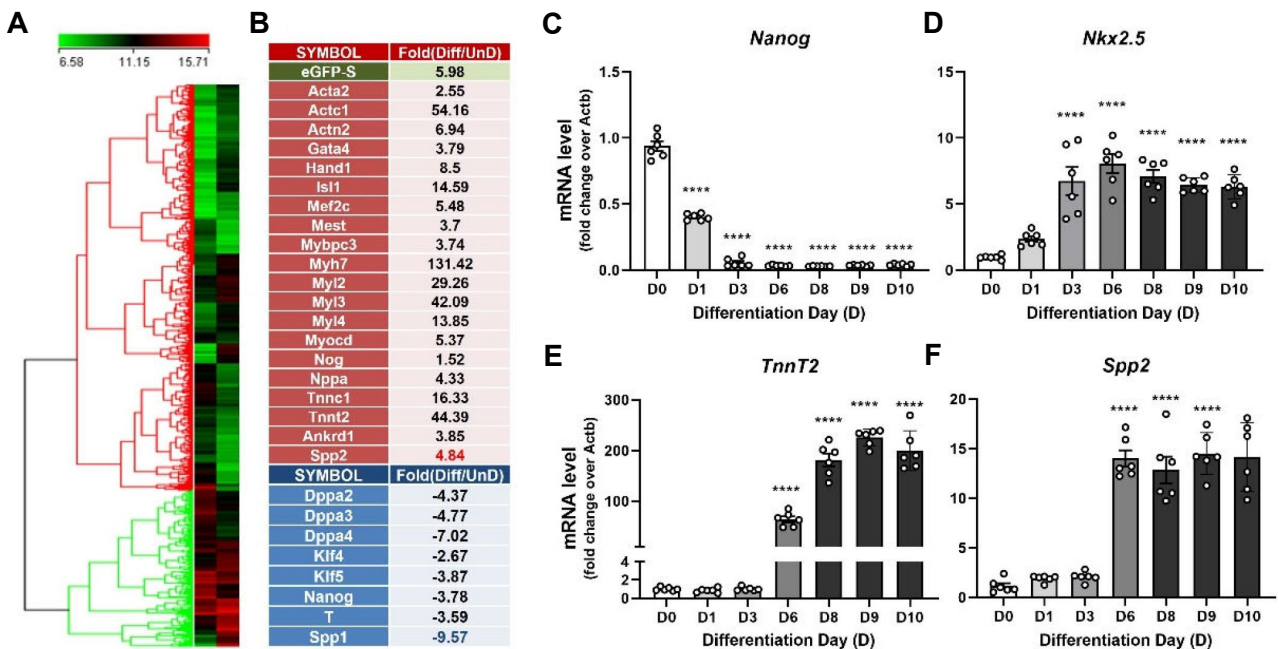


Fig. 2. Global gene expression profiles in TC-1/Kh2 mESCs-derived cardiomyocytes differentiated by EB (embryoid body) formation. (A) Hierarchical clustering of probe sets as upregulated or downregulated in mESCs-derived cardiomyocytes with an expression level at least 2-fold higher or lower than in undifferentiated mESCs. Each probe set is represented by a single row of colored boxes; each array is represented by a single column. Rectangles corresponding to intermediately expressed probe sets are colored black, upregulated probe sets are indicated with red of increasing intensity, and weakly expressed probe sets with green of increasing intensity. The dendrogram on the left of the figure represents the similarity matrix of probe sets. (B) Differentiated cardiomyocyte exhibit both distinct and shared gene expression profiles. (C-F) Verification of marker gene transcriptional levels by real-time qPCR. Among them, Nanog, stemness marker (C), Nkx2.5, cardiac transcription factor (D), TnnT2, functional cardiomyocyte marker (E) and Spp2 (F). Data are expressed as the mean ± S.E.M (n=6). The statistical analyses were conducted using analysis of variance (2-way Dunnett's multiple comparisons test) between groups (*; *p*<0.05, **; *p*<0.01, ***; *p*<0.001, ****; *p*<0.0001).

2.5, Gata4, Mef2c, Myod, TnnT2 등)[2, 11, 13]이 분화유도에 의해 발현이 유의적으로 증가한 반면에 stemness에 관여하는 주요인자들(Oct4, Nanog) [2]이 분화유도에 의해 발현이 유의적으로 감소하였다(Fig. 2B). 특히, 기존에 심근형성에 관여하는 것으로 알려지지 않았지만, 분화유도에 의해 4배 이상 발현이 증가한 유전자 276개를 후보군으로 선별하였으며, 그 중 분비신호펩타이드를 포함하는 인자들을 주요 후보군으로 선정하였다. 후보군 중 Spp2는 미분화된 줄기세포에 비해 분화된 배아체에서 4.84배 발현이 증가하였으며(Fig 2B), Spp2는 분비단백질로 알려져 있었다. 배아체 형성 방법을 통해 심근세포로의 분화가 효율적으로 이루어졌는지 검증하기 위해, 미분화 줄기세포(D0)와 배아체를 형성한 10일(D1~D10) 동안 대표적인 마커 유전자 발현을 확인하였다. stemness 유지에 필수적인 전사인자인 Nanog는 배아체 형성으로 분화를 유도한 이후 지속적으로 감소하였다($p < 0.0001$) (Fig 2C). 반면에 심장발생 특히 심근형성과정에 중추역할을 하는 전사인자인 Nkx2.5는 분화가 유도된 3일차부터 드라마틱하게 증가하여($p < 0.0001$) 지속적으로 증가된 발현을 유지하였다(Fig 2D). 기능하는 심근세포로 분화할 때 발현하는 유전자 중 하나로 근육의 수축이완적응에 필수적인 심장 특이

적 Troponin (TnnT2)는 형광 발현 및 박동소가 관찰되는 6일차부터 상당히 증가되어($p < 0.0001$) 지속적으로 발현이 유지되었다(Fig. 2E). 특히, Spp2는 분화되는 배아체에서 유의적으로 증가하였으며, 6일차에 강하게 발현이 증가되었으며($p < 0.0001$), 10일차까지 발현이 유지되었다(Fig. 2F). Spp2의 발현 양상은 Nkx2.5보다는 늦게, TnnT2과 비슷하거나 조금 빠른 시점에 발현이 증가하는 것으로 기대한다.

다른 배아줄기세포주의 심근세포로의 분화에서의 Spp2 발현 양상

형질전환된 배아줄기세포주가 아닌 다른 세포주에서도 Spp2의 발현양상을 검증할 필요가 있었다. 다른 마우스 배아줄기세포주인 E14TG2a (E14) mESCs도 역시 배아체 형성 방식으로 심근세포로의 분화를 유도하였다. 단, E14 mESCs의 증식 및 분화속도가 TC-1/Kh2 mESCs에 비해 빠르기 때문에 분화 후 5일차부터 박동소가 관찰되었다. 마커 유전자의 전사정도를 관찰한 결과, Nanog는 분화 이후 지속적으로 발현이 감소하였으며($p < 0.0001$) (Fig. 3A), Nkx2.5는 박동소가 관찰되기 전인 4일차에 일시적으로 발현이 크게 증가하였다($p = 0.0007$) (Fig. 3B). 이후 박

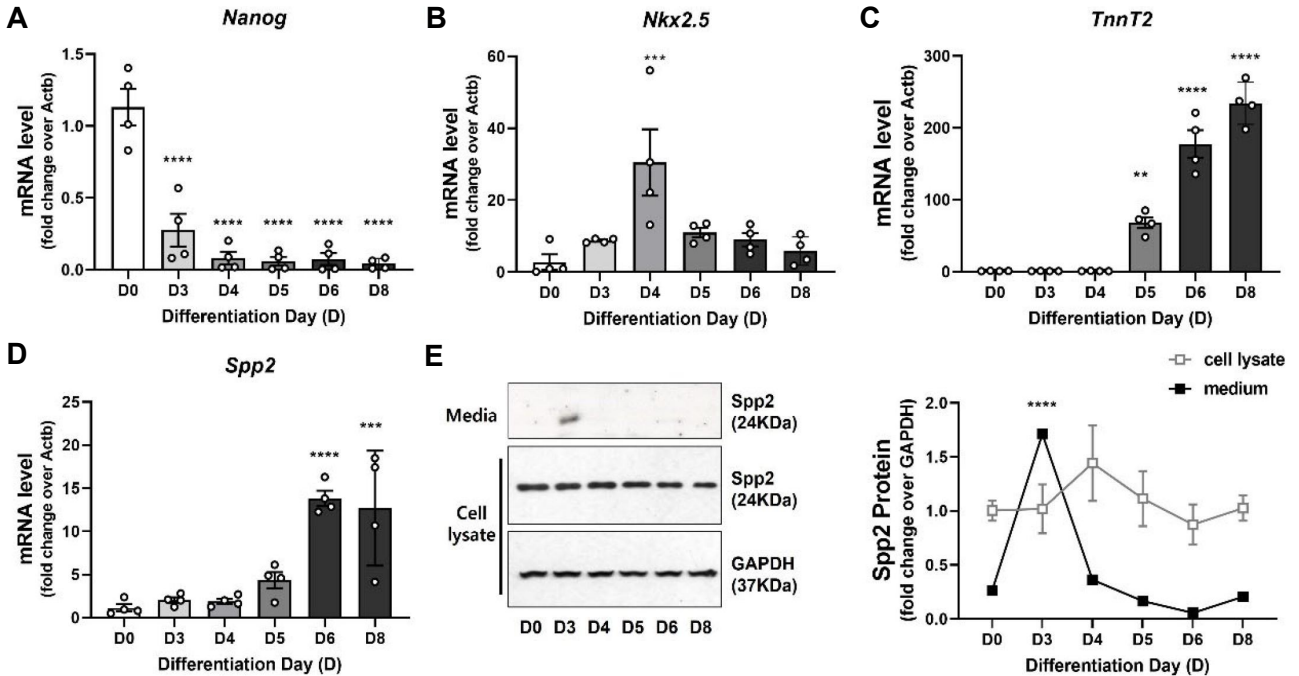


Fig. 3. Verification of expression patterns of Spp2 in cardiac differentiation from E14 mESCs. Development of contracting EBs over time in differentiating cultures of E14 mESCs. (A-D) Verification of marker gene transcriptional levels by real-time qPCR. Among them, Nanog, stemness marker (A), Nkx2.5, cardiac transcription factor (B), TnnT2, functional cardiomyocyte marker (C) and Spp2 (D). (E) Observation of the expression patterns of Spp2 in mESCs-derived cardiomyocytes during differentiating day 8 by Western blot analysis. Each image is representative of at least three independent experiments. Data are expressed as the mean \pm S.E.M (n=6). The statistical analyses were conducted using analysis of variance (2-way Dunnett's multiple comparisons test) between groups (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$, ****; $p < 0.0001$).

동소가 관찰되는 5일차부터 지속적으로 *TnnT2*의 발현이 크게 증가하는 양상을 보였으며($p < 0.0001$) (Fig. 3C), 이와 마찬가지로 *Spp2*도 6일차부터 유의적인 발현증가를 확인하였다($p < 0.0001$) (Fig. 3D). 배아줄기세포의 심근세포로의 분화에 따른 *Spp2*의 발현 증가를 검증함으로써, *Spp2*가 심근세포로의 분화과정에 관여할 가능성을 제시한다.

다음으로, *Spp2* 단백질 발현양상을 검증하였다. 흥미롭게도 전사정도의 변화와는 달리 미분화세포 및 배아체에서의 세포 내 *Spp2* 단백질 양에는 유의적인 차이가 없었으나, hanging drop 단계 3일차에서 세포 외로 분비되는 양이 일시적으로 증가되는 양상을 확인하였다($p < 0.0001$) (Fig. 3E). 이는 분화능을 지닌 줄기세포의 세포 운명을 결정하는 단계에 결정적인 역할을 할 가능성을 시사한다. *Spp2*는 BMP2의 슈도수용체로 BMP2의 신호를 억제하는 것으로 알려져 있다. BMP 신호는 발생과정의 전반에 걸쳐 세포의 운명을 결정하는데 중요한 분비 인자이며, BMP2의 경우 심장발생에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히, 심장 중배엽(cardiac mesoderm)을 심장 내막계통(endocardial lineage)로의 분화를 촉진한다[10, 14]. 이 시점에서 BMP2의 신호가 억제되는 세포는 심장 중배엽에서 심근세포로의 분화가 진행된다[28]. 이를 통하여, *Spp2*가 BMP2 신호억제에 의존적인 심근세포로의 분화 촉진 기능을 가진 것으로 기대한다.

전구체의 근육분화과정에서의 Spp2 발현

C2C12 마우스 근모세포는 근육세포의 전구체로, 근육세포로의 분화(myogenic differentiation) 또는 조골세포로의 분화(osteoblast differentiation) 기전이 비교적 자세히 연구되어 있다[12, 27]. 이 세포는 BMP2 단백질 처리에 의해 근육세포로의 분화에서 조골세포로의 분화로 분화 경로가 전환되는 특징을 가지고 있으며, BMP2 신호의 억제에 의해 정상적으로 근관 형성을 관찰할 수 있다. *Spp2*와 BMP2와의 심근세포로의 분화에 미치는 영향을 분석하기 위해, 우리는 C2C12 마우스 근모세포 세포주를 사용하여 실험을 수행하였다. C2C12 근모세포는 분화배지에서 1일차부터 근육세포로의 분화가 관찰되었으며, 3일차부터 다핵세포 형태의 근관이 관찰되었다. 특히, 7일차에는 근관의 박동소를 관찰할 수 있었다(Fig. 4A). C2C12 근모세포의 근육세포로의 분화는 mESCs의 심근세포로의 분화와 유사하게, *Spp2*의 전사가 C2C12 근모세포가 근관으로 분화됨에 따라 증가하였으나, 세포 내의 단백질 양에는 유의적인 변화가 없었다. 그러나, 분화 초기 단계인 1일차에 *Spp2*의 전사($p < 0.0001$)뿐만 아니라 단백질의 세포 외 분비($p < 0.0001$)가 극적으로 증가하였다(Fig. 4B - Fig. 4C). 이를 통하여 C2C12 근모세포의 분화초기 분화의 운명을 결정하는 시기에 분비되는 *Spp2*가 중요한 기능을 할 것으로 사료된다.

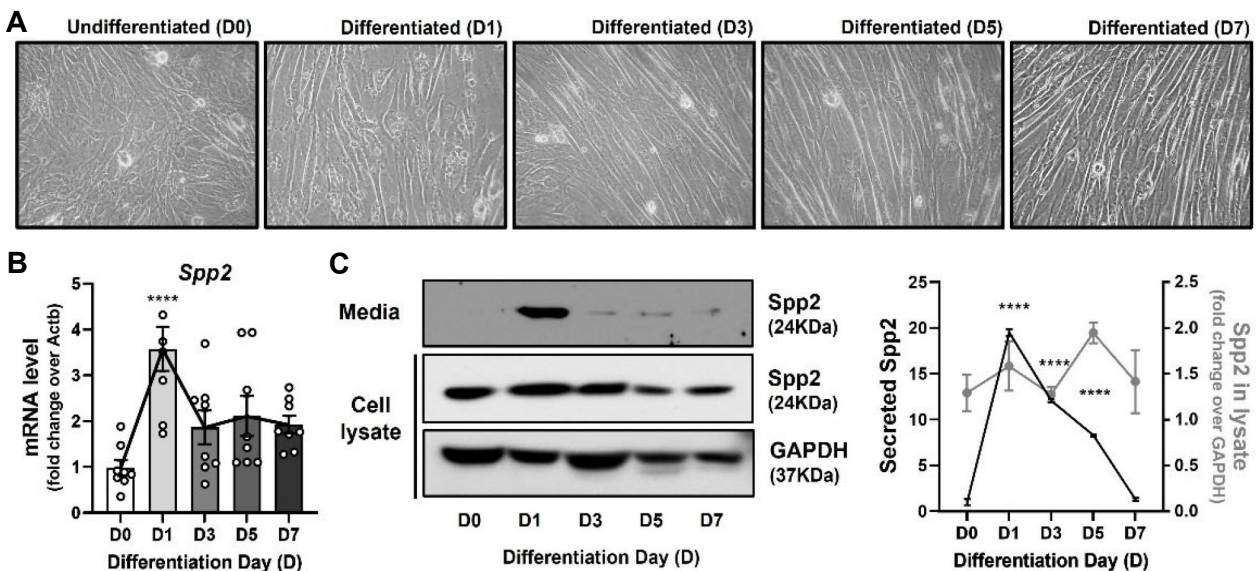


Fig. 4. Confirmation of the expression patterns of *Spp2* in myogenic differentiated C2C12 myoblasts. (A) Development of contracting C2C12 myotubes over time in differentiating cultures of C2C12 myoblasts. Each image is representative of at least three independent experiments. (B-C) Observation of the expression levels in undifferentiated C2C12 myoblasts and in differentiated C2C12 myotubes during days 7 by real-time qPCR (B), and Western blots (C). Each image is representative of at least three independent experiments. Data are expressed as the mean \pm S.E.M (n=3-8). The statistical analyses were conducted using analysis of variance (2-way Dunnett's multiple comparisons test) between groups (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ***; $p < 0.001$, ****; $p < 0.0001$).

분비단백질 Spp2 처리에 의한 근육세포로의 분화 촉진 효과

Spp2는 N-말단에 분비신호 펩타이드가 존재하기 때문에, C-말단에 Flag를 표지자로 재조합한 융합단백질을 생산할 수 있는 발현 벡터를 제작하였다. Spp2-Flag 융합단백질은 크기가 원래와 유사하며, Flag의 유무에 따라 잘려진 C-말단의 다양한 이소체를 배제할 수 있으며, Flag에 의해 분리 및 정제가 용이하다(Fig. 5A). 우선, Fig. 4에서 확인한 C2C12 근모세포의 근관으로의 분화과정 중 5일차에서의 근관세포로의 분화정도를 관찰하였다. CgC은 배아줄기세포의 심근세포로의 분화를 촉진하는 능력(Fig. 1) [26]이외에도 이미 혈통이 결정된 전구세포 유형에 근세포로의 분화에도 촉진능력이 있음을 확인하였다(Fig. 5B) [17]. 뿐만 아니라, 분화배지로의 교체와 동시에 Spp2-Flag 재조합 단백질 함께 처리한 결과, 7일차보다 이른 5일차에 박동하는 근관이 관찰되었다(Fig. 5B). 따라서, 5일차인 분화가 촉진되는 시점에서의 유전자발현 패턴을 분석함으로써 Spp2 단백질 처리의 효과를 검증하고자 하였다. *Runx2* 유전자의 경우 C2C12 근모세포에서 분화를

유도하는 시점에 BMP2를 처리할 경우 유의적으로 증가하여 골모세포의 분화로 운명을 바꾸는 역할을 수행한다 [12, 27]. Spp2 처리가 대조군에 비해 *Runx2* 발현이 유의적으로 감소($p=0.0022$)하는 것으로 보아 골모세포로서의 분화가 억제된 것을 알 수 있었으며, 이를 통하여 간접적으로 BMP2 신호의 억제를 검증하였다. 반면에, 근모세포로서의 근관 분화에 관여하는 대표 표지인자인 *Mef2c* 전사인자($p=0.0043$)와 *Myod* ($p=0.0022$), *Myogenin (Myog)* ($p=0.0022$)의 발현도 유의적으로 증가함을 확인하였다(Fig. 5C). 따라서, Spp2 처리가 대조군(naïve 와 DMSO 0.05%)에 비해 C2C12 근모세포의 근관으로의 분화를 촉진시켰음을 입증하였다. 추후에 배아줄기세포에서의 심근세포로의 분화 촉진효과를 검증할 필요성이 있으나, 본 논문의 데이터를 종합해볼 때, 심근세포로 분화시키는 새로운 생체 활성 단백질로 Spp2를 제안할 수 있다. 이는 심근형성의 분자 경로를 이해하고 허혈성 심장질환에 대한 줄기세포 요법의 실험적 또는 임상적 발전을 촉진하는 역할을 할 것으로 기대한다.

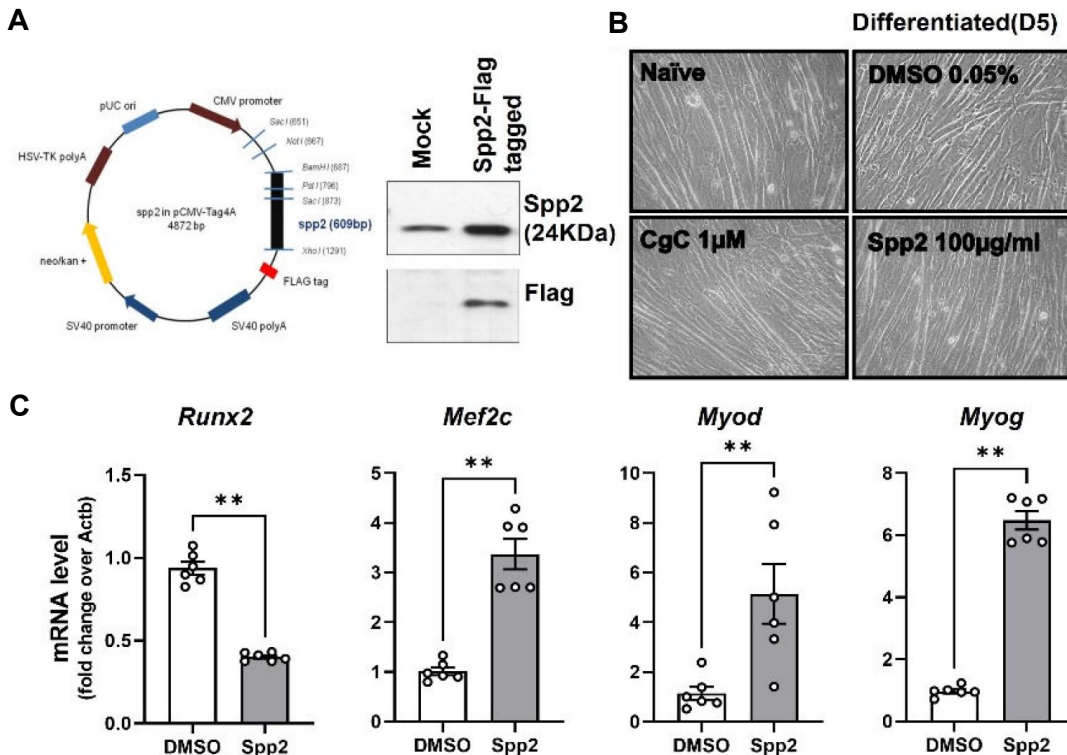


Fig. 5. Treatment with Spp2-Flag recombinant protein in myogenic differentiated C2C12 myoblasts. (A) Construct of expression vector, pCMV-Spp2-Flag and Western blots. Each image is representative of at least three independent experiments. (B) Development of contracting C2C12 myotubes over time in differentiating cultures of C2C12 myoblasts by treatment with 3 μM of CgC, 100 μg/ml of recombinant protein Spp2-Flag. Each image is representative of at least three independent experiments. (C) Observation of the marker gene expression levels in differentiated C2C12 myotubes after 5 days by real-time qPCR with and without recombinant protein Spp2-Flag treatment. Data are expressed as the mean ± S.E.M (n=6). The two-tailed Mann-Whitney (MW) U-test was used for comparisons between two groups (*; $p<0.05$, **; $p<0.01$, ***; $p<0.001$, ****; $p<0.0001$).

감사의 글

The work was supported by a Research Grant of Andong National University.

The Conflict of Interest Statement

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

References

- Behfar, A., Zingman, L. V., Hodgson, D. M., Rauzier, J. M., Kane, G. C., Terzic, A. and Puc at, M. 2002. Stem cell differentiation requires a paracrine pathway in the heart. *FASEB J.* **16**, 1558-1566.
- Beqqali, A., Kloots, J., Ward-van, Oostwaard D., Mumery, C. and Passier, R. 2006. Genome-wide transcriptional profiling of human embryonic stem cells differentiating to cardiomyocytes. *Stem Cells* **24**, 1956-1967.
- Boheler, K. R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H. T., Anisimov, S.V. and Wobus A. M. 2002. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. *Circ. Res.* **91**, 189-201.
- Brochmann, E. J., Behnam, K. and Murray, S. S. 2009. Bone morphogenetic protein-2 activity is regulated by secreted phosphoprotein-24 kd, an extracellular pseudoreceptor, the gene for which maps to a region of the human genome important for bone quality. *Metabolism* **58**, 644-650.
- Brochmann, E. J., Simon, R. J., Jawien, J., Behnam, K., Sintuu, C., Wang, J. C. and Murray, S. S. 2010. Carboxy terminus of secreted phosphoprotein-24 kDa (spp24) is essential for full inhibition of BMP-2 activity. *J. Orthop. Res.* **28**, 1200-1207.
- Dib, N., Michler, R. E., Pagani, F. D., Wright, S., Kereiakes, D. J., Lengerich, R., Binkley, P., Buchele, D., Anand, I., Swingen, C., Di, Carli, M. F., Thomas, J. D., Jaber, W. A., Opie, S. R., Campbell, A., McCarthy, P., Yeager, M., Dilsizian, V., Griffith, B. P., Korn, R., Kreuger, S. K., Ghazoul, M., MacLellan, W. R., Fonarow, G., Eisen, H. J., Dinsmore, J. and Diethrich, E. 2005. Safety and feasibility of autologous myoblast transplantation in patients with ischemic cardiomyopathy: four-year follow-up. *Circulation* **112**, 1748-1755.
- Ding, S. and Schultz, P. G. 2004. A role for chemistry in stem cell biology. *Nat. Biotechnol.* **22**, 833-840.
- Doss, M. X., Koehler, C. I., Gissel, C., Hescheler, J. and Sachinidis, A. 2004. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. *J. Cell. Mol. Med.* **8**, 465-473.
- Gonzalez, A., Rota, M., Nurzynska, D., Misao, Y., Tillmanns, J., Ojaimi, C., Padin-Iruegas, M. E., M uller, P., Esposito, G., Bearzi, C., Vitale, S., Dawn, B., Sanganal-math, S. K., Baker, M., Hintze, T. H., Bolli, R., Urbanek, K., Hosoda, T., Anversa, P., Kajstura, J. and Leri, A. 2008. Activation of cardiac progenitor cells reverses the failing heart senescent phenotype and prolongs lifespan. *Circ. Res.* **102**, 597-606.
- Jacob, G. S., Daniel, R. B., Julie, A. B., Travis, H., Bingruo, W., Thomas, C. T., Stephen, E. H., Bin, Z., Yuji, M. and Yukiko, S. 2017. BMP2 expression in the endocardial lineage is required for AV endocardial cushion maturation and remodeling. *Dev. Biol.* **430**, 113-128.
- Jamali, M., Rogerson, P. J., Wilton, S. and Skerjanc, I. S. 2001. Nkx2-5 activity is essential for cardiomyogenesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 42252-42258.
- Juan, F. S., Hristina, O. and Jelena, K. 2021. BMP2 down-regulates urokinase-type plasminogen activator via p38 MAPK: Implications in C2C12 cells myogenic differentiation. *Acta Histochem.* **123**, 151774.
- Karamboulas, C., Dakubo, G. D., Liu, J., De, Repentigny Y., Yutzey, K., Wallace, V. A., Kothary, R. and Skerjanc, I. S. 2006. Disruption of MEF2 activity in cardiomyoblasts inhibits cardiomyogenesis. *J. Cell Sci.* **119**, 4315-4321.
- Kawai, T., Takahashi, T., Esaki, M., Ushikoshi, H., Nagano, S., Fujiwara, H. and Kosai, K. 2004. Efficient cardiomyogenic differentiation of embryonic stem cell by fibroblast growth factor 2 and bone morphogenetic protein 2. *Circ. J.* **68**, 691-702.
- Keller, G. M. 1995. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7**, 862-869.
- Menasch e, P., Alfieri, O., Janssens, S., McKenna, W., Reichenspurner, H., Trinquart, L., Vilquin, J. T., Marolleau, J. P., Seymour, B., Larghero, J., Lake, S., Chatellier, G., Solomon, S., Desnos, M. and Hag ege, A. A. 2008. The Myoblast Autologous Grafting in Ischemic Cardiomyopathy (MAGIC) trial: first randomized placebo-controlled study of myoblast transplantation. *Circulation* **117**, 1189-1200.
- Mike, A. K., Koenig, X., Koley, M., Heher, P., Wahl, G., Rubi, L., Schn urch, M., Mihovilovic, M. D., Weitzer, G. and Hilber, K. 2014. Small molecule cardiogenol C upregulates cardiac markers and induces cardiac functional properties in lineage-committed progenitor cells. *Cell Physiol. Biochem.* **33**, 205-221.
- Murray, E. J., Murray, S. S., Simon, R. and Behnam, K. 2007. Recombinant expression, isolation, and proteolysis of extracellular matrix-secreted phosphoprotein-24 kDa. *Connect Tissue Res.* **48**, 292-299.
- Murray, S. S., Wang, J. C., Duarte, M. E., Zhao, K. W., Tian, H., Francis, T. and Brochmann Murray, E. J. 2015. The bone matrix protein secreted phosphoprotein 24 kD (Spp24): bone metabolism regulator and starting material for biotherapeutic materials. *Histol. Histopathol.* **30**, 531-537.
- Oh, H., Bradfute, S. B., Gallardo, T. D., Nakamura, T., Gaussin, V., Mishina, Y., Pocius, J., Michael, L. H., Behringer, R. R., Garry, D. J., Entman, M. L. and Schneider, M. D. 2003. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction.

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 12313-12318.
21. Oh, S. W., Lee, J. B., Kim, B., Jeon, S., Kim, M. K., Nam, K. H., Ha, J. R., Bhatia, M., Oh, G. T. and Kim, D. Y. 2012. Peptidomimetic small-molecule compounds promoting cardiogenesis of stem cells. *Arch. Pharm. Res.* **35**, 1979-1988.
 22. Oh, S. W., Kim, B., Jeon, S., Go, D. M., Kim, M. K., Baek, K., Oh, G. T. and Kim, D. Y. 2013. Identification and characterization of CW108F, a novel β -carboline compound that promotes cardiomyogenesis of stem cells. *Life Sci.* **93**, 409-15.
 23. Ooi, O. C., Al Habib, H. F., Almsharqi, Z. A. and El Oakley, R. M. 2006. Stem cell transplantation: potential impact on heart failure. *Cell Tissue Bank* **7**, 307-317.
 24. Sintuu, C., Murray, S. S., Behnam, K., Simon, R., Jawien, J., Silva, J. D., Duarte, M. E. and Brochmann, E. J. 2008. Full-length bovine spp24 [spp24 (24-203)] inhibits BMP-2 induced bone formation. *J. Orthop. Res.* **26**, 753-758.
 25. Turner, M. E., White, C. A., Taylor, S. M., Neville, K., Rees-Milton, K., Hopman, W. M., Adams, M. A., Anastasiades, T. and Holden, R. M. 2021. Secreted phosphoprotein 24 is a biomarker of mineral metabolism. *Calcif Tissue Int.* **108**, 354-363.
 26. Wu, X., Ding, S., Ding, Q., Gray, N. S. and Schultz, P. G. 2004. Small molecules that induce cardiomyogenesis in embryonic stem cells. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 1590-1591.
 27. Yamamoto, N., Akiyama, S., Katagiri, T., Namiki, M., Kurokawa, T. and Suda, T. 1997. Smad1 and smad5 act downstream of intracellular signalings of BMP-2 that inhibits myogenic differentiation and induces osteoblast differentiation in C2C12 myoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238**, 574-580.
 28. Yuasa, S., Itabashi, Y., Koshimizu, U., Tanaka, T., Sugimura, K., Kinoshita, M., Hattori, F., Fukami, S., Shimazaki, T., Ogawa, S., Okano, H. and Fukuda, K. 2005. Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **23**, 607-611.

초록 : 심근세포로의 분화에 관여하는 새로운 생리활성 단백질 SPP2의 발굴

전세진^{1,2*}

¹안동대학교 생명공학부 생명백신공학전공, ²안동대학교 백신산업연구소)

심장 발생과정에 관여하는 주요 전사인자들의 기능에 대한 규명 등의 발전에도 불구하고 줄기 세포에서 매우 효율적인 심근 세포로의 분화를 촉진하는 새로운 생체 활성 분자를 찾는 것이 여전히 필요하다. 마우스 배아줄기세포(mESC) 유래 심근세포의 Illumina 발현 마이크로어레이 데이터를 분석하였다. 미분화 mESCs와 비교하여 mESC 유래 심근세포에서 4배 이상 유전자 발현이 증가한 276개 유전자가 스크리닝되었다. Secreted phosphoprotein 2 (Spp2)는 후보물질 중 하나이며 bone morphogenetic protein 2 (BMP2)에 대한 슈도수용체로서 BMP2 신호 전달을 억제하는 것으로 알려져 있다. 그러나 심근 형성과의 연관성은 알려지지 않았다. 우리는 mESC 세포주인 TC-1/Kh2와 E14를 이용하여 기능성 심근세포로 분화하는 동안 Spp2 발현이 증가함을 검증하였다. 흥미롭게도, Spp2 분비는 배아체(embryoid body, EBs) 형성 후 3일차에 일시적으로 증가했는데, 이는 Spp2의 분비가 ESCs의 심근세포로의 분화에 관여함을 시사한다. Spp2의 기능을 분석하기 위해, 우리는 BMP2를 처리하면 분화 경로를 근모세포에서 골모세포로 전환되는 특성을 가진 C2C12 마우스 근모세포 세포주를 사용하여 실험을 수행하였다. mESCs의 분화와 유사하게, Spp2의 전사는 C2C12 근모세포가 근관으로 분화됨에 따라 증가하였다. 특히, 분화 초기 단계에서 Spp2의 세포의 분비가 극적으로 증가하였다. 또한, Spp2-Flag 재조합 단백질로 처리하면 C2C12 근모세포의 근관으로의 분화가 촉진되었다. 종합하면, ESCs를 심근 세포로 분화시키는 새로운 생체 활성 단백질로 Spp2를 제안한다. 이것은 심근 형성의 분자 경로를 이해하고 허혈성 심장질환에 대한 줄기세포 요법의 실험적 또는 임상적 발전을 촉진하는 역할을 할 것으로 기대한다.