

Efficient generation of bovine intestinal organoids by modulating WNT signaling pathway

Kang Won Park, Hyeon Yang, Hayeon Wi, Sun A Ock, Poongyeon Lee, Bo Ram Lee*

Animal Biotechnology Division, National Institute of Animal Science, Rural Development Administration, Wanju-gun 55365, Republic of Korea

*Corresponding: Bo Ram Lee (mir88@korea.kr)

WNT 신호전달체계 조절을 통한 한우 소장 오가노이드의 효과적인 생산

박강원, 양현, 위하연, 옥선아, 이풍연, 이보람*
농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오통과

요약

체외에서 3차원 배양을 통해 형성된 오가노이드는 생체의 조직과 유사성으로 인해 중요한 모델 시스템으로 고려되고 있다. 최근 한우의 소장 조직에서 장 성체줄기세포를 포함하는 장선(Intestinal crypt)을 분리하여 매트릭스 기반 3차원 배양을 통해 확립된 소장 오가노이드 개발이 보고되었다. 하지만 매트릭스 기반에서 형성된 소장 오가노이드는 basal-out 구조로 인해 다양한 목적의 실질적 응용에 어려움이 존재한다. 본 연구는 장 상피세포에서 바이러스-숙주 상호작용을 위한 질병모델링 및 사료 효율 분석에 적용될 소장 오가노이드의 미니장기 형성능을 극대화 하고, Apical-out 구조의 차세대 오가노이드 확립을 목표로 한다. 첫째, WNT 신호전달체계 조절을 통해 소장 오가노이드의 성장을 빠르게 유도할 있는 방법이 체계적으로 연구되었다. WNT 활성제(CHIR99021)의 설정된 농도를 처리하면 정상적인 과정을 거쳐 형성된 장 상피세포의 분화 효율을 극대화 시킬 수 있다. 둘째, 소장 오가노이드 배양에서 매트릭스를 제거하면 basal-out 구조에서 Apical-out 구조로 변화하는 것을 확인하였으며, 지속배양 되었다. 이러한 결과는 소장 오가노이드의 효과적인 생산 방법을 제시하고, 실질적인 응용 연구에 사용될 무한한 가능성을 나타낸다. 결과적으로 질병모델링과 같은 다양한 목적으로 소장 오가노이드의 사용을 촉진될 것이다.

I 서론

소장은 십이지장(Duodenum), 공장 (Jejunum) 및 회장 (Ileum)으로 이뤄지며 체내에 필요한 영양소를 흡수하는 중요한 소화기관이다. 소장에는 장선(Intestinal crypt)라고 불리는 영역이 존재하며, 이 영역은 소장의 재생 및 항상성 유지를 담당하고 있다. 소장 오가노이드 확립에 대한 연구는 포유류에서 활발하게 이루어 졌지만, 축산 분야의 가축 유래 소장 오가노이드 연구는 미흡한 실정이다. 최근 국립축산과학원은 한우의 소장 오가노이드 배양을 성공적으로 확립하였다[1]. 본 연구에서는 한우의 소장 오가노이드에 대한 효과적인 분화능을 평가하고, 실질적인 적용을 위한 Apical-out 형태의 장 오가노이드를 제작하고자 실험을 진행하였다.

WNT 신호전달체계는 장 성체줄기세포의 자가 재생에 매우 중요하며, WNT 신호전달체계의 활성화는 장 오가노이드의 기능 및 항상성을 유지한다[2, 3]. 일반적으로 WNT 신호전달체계의 활성화는 WNT 리간드가 LGR5/6와 Frizzled(FZD)에 결합하면 Glycogen synthase kinase 3(GSK3)의 활성이 저해되어 β -Cartenin 인산화가 억제된다. 즉 세포질 내에 β -Cartenin 수준이 증가하고, 이들이 핵내로 이동하며 시작된다[4, 5, 6].

본 연구에서 형성된 한우 소장 오가노이드에 대해 WNT 활성제(CHIR99021)의 농도를 설정하고, 장 상피세포의 분화능을 극대화 시키는 효율적인 방법을 제시하며, 추가적으로 매트릭스가 제거된 3차원 배양을 통해 Apical-out 구조의 소장 오가노이드를 제작하고자 한다.

II 재료 및 방법

2.1 한우 소장 오가노이드의 3차원 배양

한우 소장 오가노이드는 매트릭젤 기반 3차원 배양을 통해 배양되었으며, 계대배양은 매트릭젤 돔 안에 오가노이드 100-150개 포함시킨 후 오가노이드 전용 배양액을 첨가한다. 소장 오가노이드는 37°C, 5% 이산화탄소 농도의 조건에서 배양하였다.

2.2 WNT 활성화제(CHIR99021)의 농도 설정

WNT 활성화제(CHIR99021)의 농도 설정을 위한 예비 실험을 진행하였다. 최종적으로 설정된 농도(1 μ M)을 소장 오가노이드에 처리하였으며, 오가노이드의 성장 변화를 매일 관찰하였다.

2.3 형태학적 분류 및 유전자 발현 분석

대조군과 처리군(1 μ M)의 소장 오가노이드에 대해 성장 변화 확인 및 형태학적 분류를 수행하였다. 또한 대조군의 6일차 소장 오가노이드와 처리군 3일차의 소장 오가노이드간 유전자 발현 분석을 수행하였다.

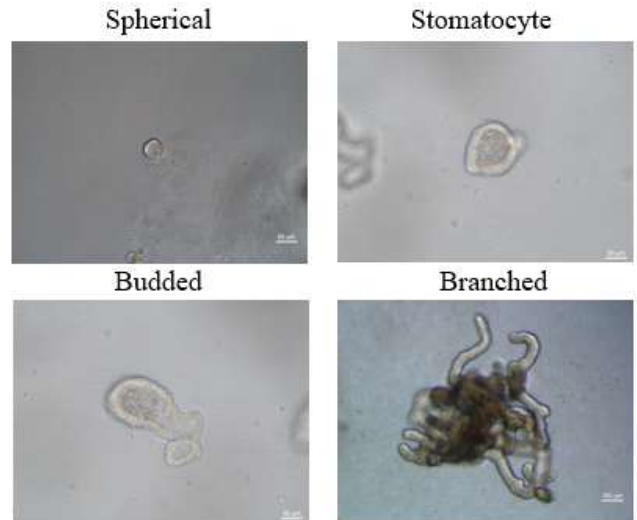
2.4 Apical-out 형태의 소장 오가노이드 제작

소장 오가노이드를 계대배양 할 때 매트릭젤을 제거한 후 오가노이드 회수 용액을 10분간 처리한다. 원심분리(1200 rpm, 5min) 후 회수된 오가노이드는 매트릭젤 돔 형성 없이 배양하였다.

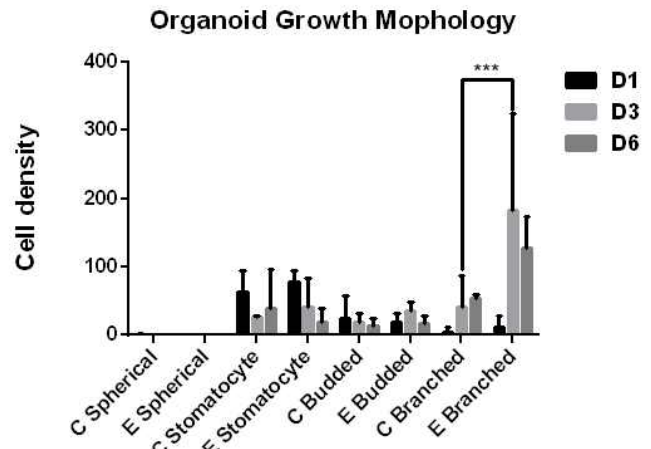
III 결과

3.1 한우 소장 오가노이드의 형태학적 분류

대조군과 처리군의 소장 오가노이드로부터 형태학적으로 분류를 통해 성장 효율을 측정하였다. 대조군은 WNT 활성화제 처리군과 비교했을 때 성장속도가 느렸으며, 배양 6일차에 Branched 형태의 소장 오가노이드가 증가하였다. 반면에, 처리군은 대조군과 비교했을 때 배양 3일차에 Branched 형태가 유의적으로 많이 나타났다. 이상의 결과로부터 WNT 활성화제(CHIR990021, 1 μ M)을 처리하면 배양 3일차에 소장 오가노이드의 미니장기 형성능이 극대화 되는 것을 확인 할 수 있었다.



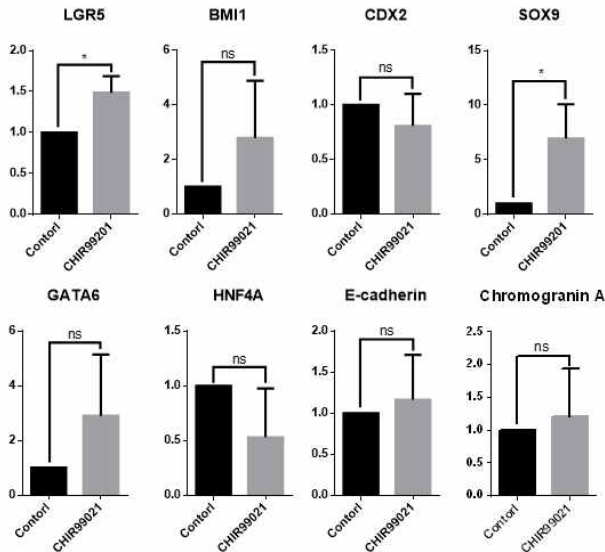
[Fig. 1] 배양에 따른 한우 소장 오가노이드의 형태학적 분류 기준. 소장 오가노이드는 Spherical, Stomatocyte, Budded, Branched 형태를 거치며 분화 및 성장이 이루어졌다.



[Fig. 2] 소장 오가노이드의 형태학적 기준에 근거하여 대조군(C)과 WNT 활성화제 처리군(E)의 배양에 따른 비교 분석. 처리군은 대조군과 비교했을 때 배양 3일차에 Branched 형태가 유의적으로 많이 나타났다.

3.2 실시간 중합효소연쇄반응

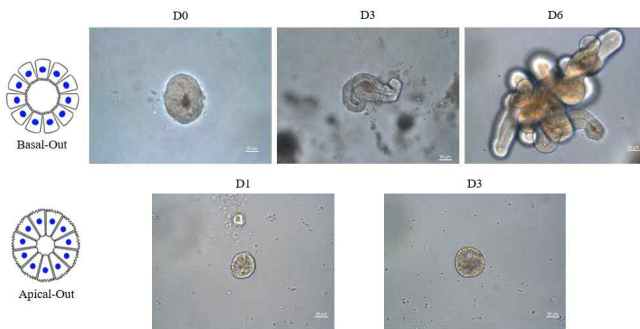
한우 소장 오가노이드의 형태학적 분류에 근거해 대조군 6일차와 처리군 3일차간 샘플에 대해 유전자 발현 분석을 수행하였다. 결과로부터 LGR5 및 SOX9 유전자는 처리군 3일차 샘플에서 대조군 6일차 샘플에 비해 유의적인 발현 차이를 나타냈으며, 반면 장 상피세포 주요 유전자인 E-cadherin, Chromogranin A 등 다수의 유전자는 비슷한 수준의 발현 패턴을 나타냈다. 이러한 결과에 근거해 WNT 활성화제 처리는 소장 오가노이드의 성장을 가속화시키는 것을 확인할 수 있었으며, 오가노이드의 미니장기 분화능이 향상되는 것이 관찰되었다.



[Fig. 3] 대조군 6일차 및 처리군 3일차간 유전자 발현 분석. 장 상피 세포 주요 유전자인 E-cadherin, Chromogranin A 등 다수의 유전자는 비슷한 수준의 발현 패턴을 나타냈다.

3.3 Apical-out 형태의 소장 오가노이드 제작

Apical-out 형태의 소장 오가노이드 제작을 위한 실험을 진행하였다. 매트릭셀 돔 없이 배양한 소장 오가노이드는 배양 3일차에 Apical-out 형태의 구조를 확인하였다. Apical-out 형태의 소장 오가노이드는 Basal-out 오가노이드와 비교했을 때 원형의 모습을 나타내며, 성장하면서 표면에 주름진 모양을 관찰할 수 있었다.



[Fig. 4] 매트릭셀 돔 형성 없이 배양한 소장 오가노이드는 배양 3일차에 Apical-out 형태를 나타낸다. Apical-out 형태의 소장 오가노이드는 원형의 모습을 나타내며, 성장하면서 표면에 주름진 모양을 관찰할 수 있었다.

Acknowledgements

This work was supported with the National Institute of Animal Science (Grant No. PJ01422201) and collaborative research program between university (2021), Rural Development Administration (RDA), Korea.

References

- [1] Lee, B.-R.; Yang, H.; Lee, S.-I.; Haq, I.; Ock, S.-A.; Wi, H.; Lee, H.-C.; Lee, P.; Yoo, J.-G. "Robust Three-Dimensional (3D) Expansion of Bovine Intestinal Organoids": An In Vitro Model as a Potential Alternative to an In Vivo System. *Animals* **2021**, *11*, 2115.
- [2] Li, Y.; Liu, Y.; Liu, B.; Wang, J.; Wei, S.; Qi, Z.; Wang, S.; Fu, W.; Chen, Y.-G. "A growth factor-free culture system underscores the coordination between Wnt and BMP signaling in Lgr5+ intestinal stem cell maintenance". *Cell discovery* **2018**, *4*, 1-9.
- [3] Krausova, M.; Korinek, V. "Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer". *Cellular signalling* **2014**, *26*, 570-579.
- [4] Merenda, A.; Fenderico, N.; Maurice, M.M. "Wnt signaling in 3D: recent advances in the applications of intestinal organoids". *Trends in cell biology* **2020**, *30*, 60-73.
- [5] Govarthanan, K.; Vidyasekar, P.; Gupta, P.K.; Lenka, N.; Verma, R.S. "Glycogen synthase kinase 3 β inhibitor-CHIR 99021 augments the differentiation potential of mesenchymal stem cells". *Cytotherapy* **2020**, *22*, 91-105.
- [6] Sanchez-Ripoll, Y.; Bone, H.K.; Owen, T.; Guedes, A.M.; Abranches, E.; Kumpfmüller, B.; Spriggs, R.V.; Henrique, D.; Welham, M.J. Glycogen synthase kinase-3 inhibition enhances translation of pluripotency-associated transcription factors to contribute to maintenance of mouse embryonic stem cell self-renewal. *PloS one* **2013**, *8*, e60148.