생체영상과 미세가공을 이용한 면역 시스템 연구

도준상 †

Studying immune system using imaging and microfabrication

Junsang Doh

Key Words : Microfabrication (미세가공), imaging (영상), immune system (면역 시스템)

Abstract

Immune system is composed of multiple cells with distinct functions, and immune responses are orchestrated by complex and dynamic cell-cell interactions. Therefore, each cell behavior and function should be understood under right spatio-temporal context. Studying such complexity and dynamics has been challenging with conventional biological tools. Recent development of new technologies such as state of art imaging instruments and microfabrication techniques compatible with biological systems have provided many exciting opportunities to dissect complex and dynamic immune cell interactions; new microscopy techniques enable us to observe stunning dynamics of immune system in real time. Microfabrication permits us to manipulate microenvironments governing molecular/cellular dynamics of immune cells to study detailed mechanisms of phenomena observed by microscopy. Also, microfabrication can be used to engineer microenvironments optimal for specific imaging techniques. In this presentation, I am going to present an example of how these two techniques can be combined to tackle challenging problems in immunology. Obviously, this strategy can readily be applied to many different fields of biology other than immunology.

1. 서 론

어떤 한 사람의 현재의 모습은 그 사람이 타고난 유전적인 특성과 그 사람이 살아오면서 겪어온 경험이 합쳐진 것이다. 즉, 유전과 환경의 복합적인 작용으로 한 사람의 다양한 특성이 형성된다는 이야기다.

우리 몸 안에 있는 세포의 경우에도 그것은 마찬가지이다. 어떤 세포가 어떠한 형태의 모습과 기능을 하고 있는가는 자체적인 유전적인 요소도 중요하지만 그것 이상으로 그 세포를 둘러싸고있는 미세환경 (microenvironments)으로부터 받는 다양한 신호들도 중요하다. 지금까지의 생명과학의 많은 부분은 그러한 미세환경과 세포간의 상호작용에서 중요한 역할을 하는 핵심 인자들, 즉 특정 신호를 전달하는 물질이나 그러한 신호를 받았을 때 세포 내에서 반응하는 분자 등, 을 발견하고 그것들이 어떠한 기능을 가지는가에 대한 것을 밝혀내는데 초점을 맞춰왔다. 그렇지만 그러한 핵심인자들과 그 기능을 밝혀내는 것만으로는 정보가 충분하지 않다. 그러한 핵심인자들의 시공간적인 구배가 어떻게 되는가에 따라 그러한 핵심인자들의 역할이 달라질 수 있으며, 이러한 시공간적인 맥락 (context)에 따른 세포의 거동에 대한 연구가 특정 인자가 어떻게 세포에 작용하는가에 대한 연구에 있어서 필수불가결하다.

이러한 시공간적인 맥락에서의 상호작용이 특히나 중요한 분야는 면역학이다 (1). 면역세포의 역할은 우리 몸을 침입하는 병원균을 찾아내서 물리치는 것이다. 그렇기에 그들은 끊임없이 움직인다. 말초조직 (peripheral tissue)에서 병원균을 삼켜서 분해하여 병원균의 표지를 들고 오는 항원제시세포 (antigen presenting cell)와 혈관과 림프를 타고 순환하면서 림프절 (lymph node)이나 비장 (spleen)에서 항원제시세포를 만나서 활성화가 되고, 활성화 이후 감염된 말초조직으로 이동하여

† 포항공과대학교 시스템생명공학부/기계공학과
E-mail : jsdoh@postech.ac.kr
TEL : (054)279-2189 FAX : (054)279-3199

병원균과의 싸움을 지휘하는 T 세포가 이러한 면역 시스템의 역동성을 보여주는 좋은 예이다.

이러한 역동성을 가지는 면역 시스템을 이해하는데 있어서 필요한 도구는 역동성을 가지는 여러 가지 현상을 관찰할 수 있는 도구와 그렇게 관찰한 현상을 모사하여 그 중요성을 분석할 수 있는 도구이다. 전자에 해당하는 것이 이미징 기술이고 후자에 해당하는 것이 바이오멤스 기술이다.

2. Deep tissue imaging with two-photon microscopy

지금까지 개발된 여러 가지 현미경들 중 조직(tissue)에서 일어나는 세포들의 거동을 관찰하기에 가장 적합한 것은 two-photon 현미경이다. 2 차원 평면이 아닌 3 차원 공간에서 일어나는 일들을 실시간으로 관찰하는데 있어서 중요한 것 두 가지는 얼마나 깊은 곳까지 볼 수 있을 것인가와 얼마나 오랜 시간동안 볼 수 있을 것인가이다. 이 두 가지 측면에서 모두 다른 현미경과 비교하여 탁월한 기능을 가지는 것이 two-photon 현미경이다 (2).

조직내에서 일어나는 일들을 관찰하기 위해서는 원하는 대상을 조직 내의 다른 세포나 물질과 구별되도록 할 필요가 있다. 가장 많이 사용되는 방법은 우리가 관찰하고자 하는 대상에 형광물질을 붙이는 것이다. 형광 (fluorescence)은 그림 2a 에서 보는 것처럼 ground state (S0)에 있는 전자가 빛을 흡수하여 excited state(S2)로 올라갔다가 또 다른 excited state(S1)로 빛을 내지 않는 전이를 한 후 다시 ground state 로 내려가면서 실재 흡수한 빛보다는 긴 파장의 빛을 내면서 나타난다. Single-photon 을 이용한 기존의 현미경과 two-photon 을 이용한 현미경의 가장 큰 차이는 이러한 형광물질을 ground state 에서 excited state 로 올리는데 사용하는 빛의 파장이다. Single-photon 을 이용할 경우는 ground state 와 excited state 사이에 해당하는 에너지를 가지는 파장의 빛을 사용하는 반면 two-photon 을 이용할 경우 보다 긴 파장의 빛을 사용하고 대신 두 번에 나누어서 electronic transition 을 시키게 된다. 얼마나 깊은 곳을 볼 수 있을 것인가를 결정하는데 있어서 중요한 것은 사용하는 빛의 파장이다. 대부분의 조직은 빛을 산란시키는 성질이 있고, 이러한 산란은 빛의 파장이 길어질수록 그 정도가 약해지기 때문에 단파장보다는 장파장을 사용하는 것이 훨씬 유리하다. 그렇기 때문에 two-photon 을 사용하면 single-photon 을 사용하는 것보다 더 깊은 곳에서 일어나는 곳까지 볼 수 있는 장점이 있다. 이상적인 경우에 two-photon 을 사용하면 500 um 깊이에서 일어나는 사건까지 볼 수 가 있는데, 이것은 일반적인 single-photon 을 사용했을 때 50-100 um 이상까지 내려가기 힘든 것과 비교할 때 큰 장점이라고 볼 수 있다. Two-photon excitation 의 single-photon excitation 에 대한 또 다른 장점 중 하나는 3 차원상의 단 한 점만을 excited 시킬 수 있다는 것이다. 이것은 빛이 지나가는 전체공간을 excited 시키는 single-photon excitation 에 비해여 관찰하는 대상이 받는 빛의 총 양을 엄청나게 줄여주는 효과를 가진다. 그러므로 오랜 시간 형광물질을 관찰하는데 있어서 문제가 될 수 있는 phototoxicity (빛에 의한 형광물질의 산화로 인하여 발생하는 독성)나 photobleaching (빛에 의한 형광물질의 파괴)을 현저히 줄일 수 있는 장점이 있다.

Two-photon 현미경을 이용하여 얻은 영상으로부터 얻을 수 있는 가장 일차적인 정보는 다양한 종류의 세포들이 면역반응의 다양한 단계에서 어떤 방식으로 상호작용을 하는가이다. 예를 들면, T 세포와 대표적인 항원제시세포인 수지상세포 간의 상호작용의 다이네믹스 (3), 보조 T 세포 (helper T cell)와 보조 T 세포의 작용을 억제하는 것으로 알려진 조절 T 세포 (regulatory T cell)의 상호작용 (4) 등이 있다.

3. Microenvironment engineering with BioMEMS

이렇게 얻어진 현상학적인 정보들이 가지는 생물학적인 의미를 이해하는 것은 쉬운 일이 아니다. 관찰대상인 동물을 이용하여 실험을 하는 것이 가장 바람직한 방법이겠지만, 이 경우에는 실험 자체가 많은 시간과 노력이 필요하며 또 변인을 정확하게 통제하는데 어려움이 있다. 그렇기 때문에 많은 경우 동물에서 추출한 세포나 혹은 세포주를 이용하여 in vitro 상의 배양용기에서 실험을 수행한다. 이 경우의 문제는 in vivo 상에서 가지는 여러 가지 복잡한 국지 미세환경 (local microenvironments)의 특수성을 상실한다는 것이다. 이러한 in vivo 와 in vitro 의 차이를 극복하기 위하여 최근들어 많이 사용하고 있는 것이 바이오멤스 (BioMicroElectroMechanical Systems) 기술이다. 바이

오멤스 기술이 가지고 있는 가장 큰 장점은 in vitro 상에서 in vivo 와 어느 정도 유사한 미세환경을 만들고 그 속에서 세포들의 기능을 보다 in vivo 와 가까운 맥락하에서 연구할 수 있는 것을 가능하게 해 준다는 것이다. 이러한 바이오멤스 기술은 최근 10 년간 세포의 생존과 사멸 (5), 분화 (6), 이동 (7), 신호작용 (8) 등의 여러 가지 생명과학의 근본적인 문제를 푸는데 성공적으로 적용되었다.

4. Combining imaging and BioMEMS

이러한 이미징 기술과 바이오멤스 기술이 합쳐져서 면역반응에 있어서 새로운 현상을 발견하고 그 현상의 생물학적 의미를 부여한 예를 한 가지만 들어보기로 하자. Figure 1 은 two-photon 현미경을 이용하여 림프절에서 T 세포가 활성화되는 과정을 찍은 것이다 (9). 계란에서 분리한 단백질 ovalbumin 을 모델 항원으로 사용하였고, ovalbumin 에 대한 면역반응을 보이는 T 세포를 녹색 형광 물질로 염색한 후 생쥐에 주입하였다. 윗 사진들은 항원이 주입된 생쥐의 림프절에서의 T 세포들의 시간에 따른 거동을, 아랫 사진들은 항원이 주입되지 않은 생쥐의 림프절에서의 T 세포의 시간에 따른 거동을 보여준다. 두 경우의 가장 분명한 차이는 항원이 주입된 쥐의 경우 T 세포들이 커다란 덩어리를 이루고 있다는 것이다. 그렇다면 이러한 활성화과정의 T 세포들이 이러한 덩어리를 이루는 것의 생물학적인 이유는 무엇일까? 이렇게 한데 뭉치는 T 세포들이 함께 모임으로써 무엇인가 얻을 수 있는 이득이 있지 않을까? 혹은 활성화단계의 T 세포의 경우 박테리아의 경우와 마찬가지로 quorum sensing 을 하지는 않을까?

이러한 질문에 대한 답을 구하기 위하여 생각해 볼 수 있는 것은 Figure 2 와 같은 모델 시스템이다. 다양한 크기의 microwell 을 가공하고 그 안에 T 세포들을 집어넣을 경우 microwell 의 크기에 따라 그 안에 있는 T 세포의 숫자를 조절할 수 있을 것이다. 그리고 커다란 microwell 에 있는 T 세포와 작아서 단 하나의 T 세포만이 들어갈 수 있는 microwell 이 여러개 모여 있는 곳에 들어있는 T 세포를 비교하면 위의 two-photon 현미경 실험 결과에서 관찰한 여러개의 T 세포가 모여서 형성한 커다란 덩어리가 과연 직접 세포끼리의 접촉에 인한 상호작용을 위해서 필요한지 아니면 단순히 분비하는 사이토카인의 국지적인 농도를 높이는 효과만을 가지는지를 면역형광 현미경 기술을 이용하여 분석할 수 있다. 그 결과는 커다란 microwell 에 있는 T 세포가 하나의 T 세포만이 들어갈 수 있는 microwell 이 여럿 모여 있는 곳에 들어있는 T 세포보다 더 생존과 증식에 있어서 잇점을 가진다는 것이다 (10).

5. 결 론

다세포 생물에서 세포의 거동은 그 세포가 속해있는 생리학적인 맥락에서 이해하여야만 한다. 그런 측면에서 이런 in vivo imaging 과 그 결과에 대한 생물학적인 의미를 분석하고 또 세포가 속한 환경을 인위적으로 조작해 줄 수 있는 바이오멤스 기술을 함께 사용하는 것은 특정 생물학적 현상에 중요한 요소 (세포, 단백질, 유전자 등)를 밝혀내는데 초점을 맞추는 현행 생명과학적 접근방법과 서로 보완하며, 그렇게 밝혀진 중요한 요소들이 실재로 어떠한 시공간적인 분포를 가지면서 생리적인 현상으로 이어질 수 있는지를 밝히는데 중요한 역할을 할 수 있을 것이다.

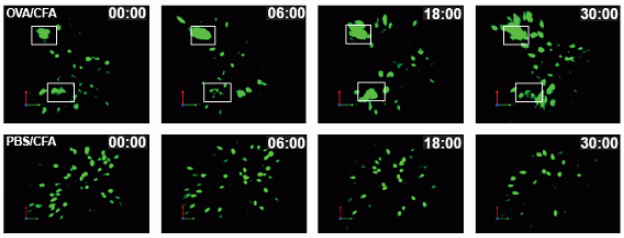

Figure 1. Two-photon 현미경을 이용하여 얻은 면역반응이 일어나거나 (윗 사진들) 일어나지 않는 (아랫 사진들) 림프절에서의 T 세포의 거동.

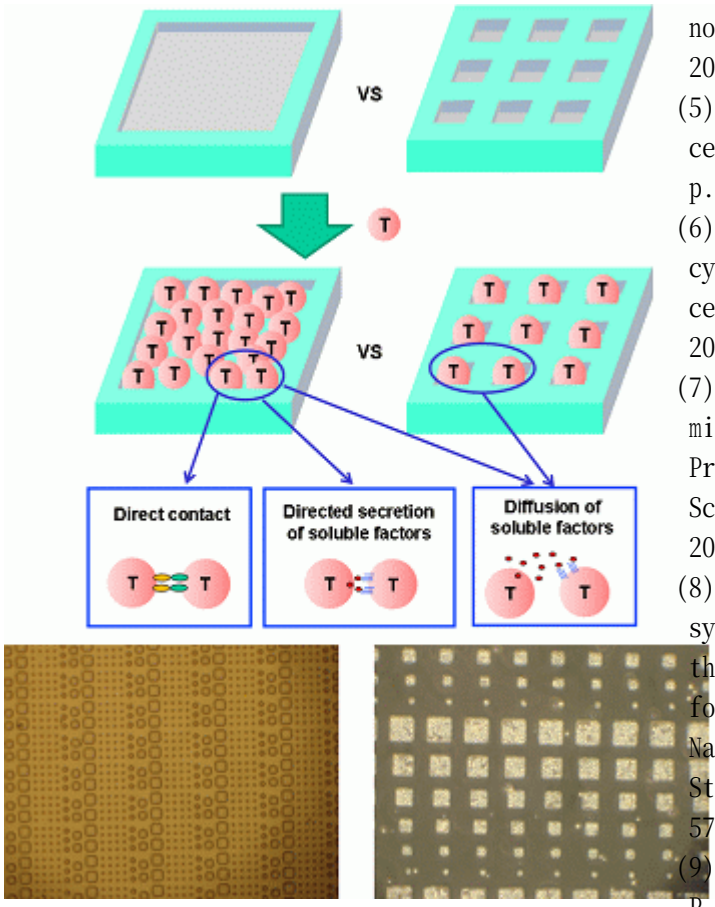

Figure 2. T 세포간의 상호작용을 연구하기 위한 microwell system.

참고문헌

(1) von Andrian, U.H. and C.R. Mackay, Advances in immunology: T-cell function and migration - Two sides of the same coin. New England Journal of Medicine, 2000. 343(14): p. 1020-1033.

(2) Cahalan, M.D., et al., Two-photon tissue imaging: Seeing the immune system in a fresh light. Nature Reviews Immunology, 2002. 2(11): p. 872-880.

(3) Mempel, T.R., S.E. Henrickson, and U.H. von Andrian, T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. Nature, 2004. 427(6970): p. 154-159.

(4) Tang, Q.Z., et al., Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. Nature Immunology, 2006. 7(1): p. 83-92.

(5) Chen, C.S., et al., Geometric control of cell life and death.Science, 1997. 276(5317): p. 1425-1428.

(6) McBeath, R., et al., Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment. Developmental Cell, 2004. 6(4): p. 483-495.

(7) Jiang, X.Y., et al., Directing cell migration with asymmetric micropatterns. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. 102(4): p. 975-978.

(8) Doh, J. and D.J. Irvine, Immunological synapse arrays: Patterned protein surfaces that modulate immunological synapse structure formation in T cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. 103(15): p. 5700-5705.

(9) C.A. Sabatos*, J. Doh*, S. Chakravarti, P.G. Pandurangi, R.S. Friedman, A.J. Tooley and M.F. Krummel, A Synaptic Basis for Paracrine Interleukin-2 Signaling in Activating T cells. Immunity (accepted).

(10) J. Doh and M.F. Krummel. (in preparation).