(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2013 년 5 월 16 일 (16.05.2013)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2013/069962 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 5/077 (2010.01) *C12N 5/071* (2010.01)
C12N 1/38 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2012/009338

(22) 국제출원일: 2012 년 11 월 7 일 (07.11.2012)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2011-0115170 2011 년 11 월 7 일 (07.11.2011) KR

(71) 출원인: **광주과학기술원 (GWANGJU INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)** [KR/KR]; 500-712 광주광역시 북구 첨단과기로 261(오룡동 1 번지), Gwangju (KR).

(72) 발명자: **윌리암스다런 (WILLIAMS, Darren)**; 500-712 광주광역시 북구 첨단과기로 261 광주과학기술원 국제관 801 호, Gwangju (KR). **정다운 (JUNG, Da-Woon)**; 500-480 광주광역시 북구 첨단과기로 261 광주과학기술원 국제관 801 호, Gwangju (KR). **김웅희 (KIM, Woong-Hee)**; 500-480 광주광역시 북구 첨단과기로 261 광주과학기술원 국제관 801 호, Gwangju (KR).

(74) 대리인: **양부현 (YANG, Boo-Hyun)**; 151-832 서울특별시 관악구 인헌동 1659-2 청동빌딩 301 호, Seoul (KR).

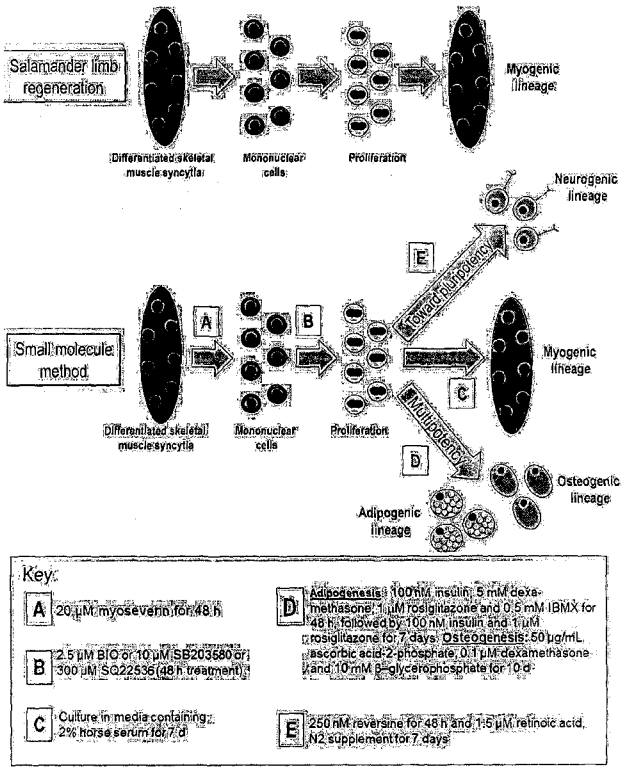
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: PREPARATION METHOD FOR MULTIPOTENT CELLS

(54) **발명의 명칭** : 다능성 세포의 제조방법



(57) **Abstract**: The present invention relates to a chemical preparation method for multipotent cells derived from skeletal muscle and a use thereof, and provides a chemical preparation method for multipotent cells derived from differentiated mammal cells, comprising the following steps: (a) obtaining differentiated cells from a mammal; and (b) treating the differentiated cells with a compound for inducing the downregulation of p21 to obtain multipotent cells. It is possible to provide myogenic lineage, adipogenic lineage, osteogenic lineage or neurogenic lineage using the preparation method for multipotent or totipotent cells of the present invention. A chemical-based approach is important for developing strategies for inducing limb regeneration in a mammal, and a novel approach to develop multipotent or totipotent cells from terminally differentiated cells is suggested.

(57) **요약서**: 본 발명은 골격근-유래된 다능성 세포의 화학적 제조방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 다음의 단계를 포함하는 포유동물 분화세포로부터 다능성 세포(multipotent cells)의 화학적 제조방법을 제공한다: (a) 포유동물부터 분화세포를 수득하는 단계; 및 (b) 상기 분화세포에 p21 하향-조절 유도 화합물을 처리하여 다능성 세포를

[다음 쪽 계속]

WO 2013/069962 A1

ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

수득하는 단계. 본 발명의 다능성 또는 전능성 세포 제조방법을 통해 근육형성 세포 리니지(myogenic lineage), 지방형성 세포 리니지(adipogenic lineage), 골형성 세포 리니지(osteogenic lineage) 또는 신경형성 세포 리니지(neurogenic lineage)를 제공할 수 있으며, 화학물질-기반된 접근방법은 포유동물에서 사지 재생을 유도하는 전략들의 개발에 중요하며, 말기 분화세포로부터 다능성 또는 전능성 세포의 개발을 위한 새로운 접근방법을 제시한다.

【명세서】

【발명의 명칭】

다능성 세포의 제조방법

【기술분야】

본 발명은 다능성 세포의 화학적 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

【배경기술】

역분화(dedifferentiation)는 분화된 세포가 하나 이상의 서로 다른 조직 형태로 분화하기 전의 '줄기세포'-유사 또는 다분화능 상태(multipotent state)를 획득하는 현상에 대한 것이다(1). 세포내 역분화와 관련된 새로운 조절인자를 발견하기 위해 저분자 라이브러리(small molecule libraries)의 표현형-기반된 스크리닝 방법을 실시하였다(2). 저분자를 이용한 세포 조작은 유전적 접근법과 비교하여 상당한 장점을 갖는다(3). 예컨대, 저분자는 일시적으로 단백질의 기능을 조절할 수 있는 고도의 기술을 제공한다. 또한, 단일 저분자는 세포 내의 복합적인 특이 타겟을 동시에 조절할 수 있는 가능성을 갖는다.

유미목 양서류(urodele amphibians)는 뛰어난 역분화능 및 조직 재생능을 갖는다(4). 예컨대, 사지 절단 후에 전체를 재생할 수 있다. 더욱이, 이러한 재생능은 동물의 전생애 동안 유지된다(5). 이러한 현상의 연구를 통해, 재생능의 분자적 기작을 이해함으로써 인간 조직 재생을 향상시킬 수 있는 접근법을 개발할 수 있다.

유미목 양서류의 사지 재생 초기에는 절단 부분을 중심으로 골격근 섬유의 역분화가 일어난다(6). 섬유 융합체(syncytia)는 세포화(cellularization)하여 아체(blastema)라 불리는 간엽 성장 영역(mesenchymal growth zone)을 구성하는 단핵 세포로 증식한다. 손실된 사지를 재생하기 위한 다분화능 세포에서 아체는 필수적이다. 그러나, 이러한 조직을 재생하는 선천적 기능은 분류학상 '고등' 척추동물에서 감소한다(7).

포유류 골격근의 역분화를 유도하기 위해 다른 실험적 접근법들이 실시되어 왔다. 예컨대, 마우스 근관(myotubes)에서 세포 주기 정지 또는 아폽토시스 후에, 바이러스성 종양유전자(oncogene)를 발현하여 세포화 및 증식을 유도하였다(8). 그러나, 이러한 역분화된 세포 중 일부는 다분화능(multipotency)을 보여주며, 간엽 리니지(mesenchmal lineage)로부터 세포로 재-분화될 수 있다(8). 유미목 양서류 사지 재생의 추출물과 함께 배양하여 마우스 근관의 역분화를 달성할 수 있으나, 세포는 본질적인 능력을 갖지는 못한다(9). 전사 억제 인자로 구성된 호메오박스(homeobox), (초기 아체 및 마우스 사지 발달에 발현하는)msx1의 유도 발현은 대체 간엽계로의 근관 역분화 및 이형분화(transdifferentiation)를 보여주었다(9, 10).

그러나, 이러한 접근법은 유전 인자의 근육 핵으로의 도입에 의존적이므로, 조직 재생을 증진하기 위한 치료로써 그 가능성이 제한적이다.

근관 역분화를 유도하기 위한 가장 최근의 접근법은 말기 분화를 유지하기 위한 특이 유전자를 타겟하는 siRNA-기반 전략이다. 본 발명진은 최근 연구에서 근관의 세포화 및 다분화능을 유도하는 저분자 및 사이클린-의존 키나제(kinase) 억제제인 p21(CDKN 1A, CIP1)의 녹아웃(knockout)을 조합하여 근관 역분화를 실시하였다(11). 사이클린-의존 키나제 억제제 2A(CDKN2A, ARF) 및 망막아종(retinoblastoma) 단백질(RB1, OSRC)의 녹아웃은 분화된 근관 핵에서 세포 주기 재진입을 유도하고 세포질 분열기작을 상향조절 및 분화능의 소실을 야기한다(12). 그러나, siRNA-기반 접근법은 치료제로써 저분자 약물과 비교하여 보다 문제될 수 있는 비-특이 세포독성(cytotoxicity) 및 그의 발생을 유도할 수 있다(13, 14).

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명의 내용】

【해결하려는 과제】

본 발명자들은 다능성 세포를 제조하기 위해 연구 노력하였다. 그 결과, 분화세포에 p21 하향-조절 유도 화합물을 처리하는 경우, 다능성 세포를 얻을 수 있었고 이들의 분화능(예컨대, 지방형성 세포군, 골형성 세포군, 근육형성 세포군 또는 신경형성 세포군로의 재분화)을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 다능성 세포(multipotent or pluripotent cells)의 화학적 제조방법을 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적은 본 발명의 방법에 따라 제조된 다능성 세포를 제공하는데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 방법에 따라 제조된 전능성 세포를 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적은 포유동물 조직 또는 기관의 재생(regeneration)방법을 제공하는데 있다.

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

【과제의 해결 수단】

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 포유동물 분화세포로부터 다능성 세포(multipotent cells)의 화학적 제조방법을 제공한다:

(a) 포유동물부터 분화세포를 수득하는 단계; 및

(b) 상기 분화세포에 p21 하향-조절 유도 화합물을 처리하여 다능성 세포를 수득하는 단계.

본 발명자들은 다능성 세포를 제조하기 위해 연구 노력하였다. 그 결과, 분화세포에 p21 하향-조절 유도 화합물을 처리하는 경우, 다능성 세포를 얻을 수 있었고 이들의 분화능(예컨대, 지방형성 세포군, 골형성 세포군, 근육형성 세포군 또는 신경형성 세포군의 역분화)을 확인하였다.

본 발명의 다능성 세포의 화학적 제조방법을 각각의 단계로 나누어 상세하게 설명하면 다음과 같다:

단계 (a): 포유동물로부터 분화세포를 수득

본 발명에 따르면, 포유동물로부터 분화세포를 수득한다.

본 명세서에서, 용어 '포유동물'은 인간, 마우스, 래트, 기니어 피그, 토끼, 원숭이, 돼지, 말, 소, 양, 영양, 개 및 고양이를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

바람직하게는, 상기 분화세포는 말기 분화세포(terminally differentiated cell)이다.

본 명세서에서, 용어 '말기 분화세포'는 발생(development) 과정 중 종점(endpoint) 단계의 세포로, 특성화된 표현형을 갖는 성숙한(mature) 세포를 말한다. 분화세포는 다른 세포 종류와 구별되는 하나 이상의 특징 또는 기능을 갖으며, 증식할 수 있는 능력이 제한적이다.

바람직하게는, 상기 분화세포는 골격근 세포, 심근 세포, 평활근 세포, 피부 세포, 연골 세포, 지방 세포 및 골세포로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 세포이고, 보다 바람직하게는 상기 분화세포는 골격근 세포, 심근 세포 및 평활근 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 세포이며, 가장 바람직하게는 상기 분화세포는 골격근 세포이다.

바람직하게는, 상기 분화세포는 결합 조직, 신경 세포, 림프 세포, 맥관 세포, 신장 세포, 췌장 세포, 폐 세포, 요도 세포, 방광 세포, 위 세포, 간 세포, 소장 세포, 대장 세포 및 식도 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 세포이다.

단계 (b): p21 하향-조절 유도 화합물을 처리하여 다능성 세포의 수득

이어, 분화세포에 p21 하향-조절 유도 화합물을 처리한다.

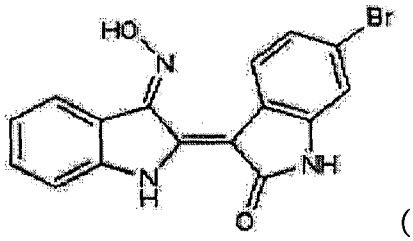
p21은 환경적 스트레스에 따른 핵 이벤트를 조절하는 과정들에서 중요한 기능을 한다. p21은 산화적 스트레스 및 DNA 손상에 따라 매우 높은 레벨로 유도된다. p21 단백질은 사이클린-의존성 키나제의 억제제로 기능하며 세포주기 진행을 효과적으로 차단하기 때문에, 노화 또는 완전 분화된 세포들에서 과다발현 된다. 본 발명에 따르면, p21 발현의 하향-

조절은 근섬유 세포화 및 세포주기 재-진입을 유도하여 유미목 양서류의 부속기관 재생의 초기 단계를 모방하도록 유도한다.

본 발명의 p21 하향-조절 유도 화합물은 p21 유전자의 발현 억제, p21 단백질의 활성 억제 또는 p21 단백질의 안정성을 감소시켜 하향-조절을 유도하는 화합물이다.

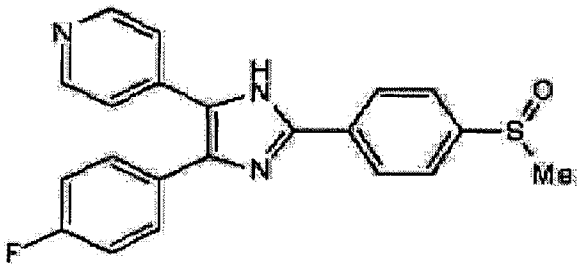
바람직하게는, 상기 p21 하향-조절 유도 화합물은 다음과 같이 4 종류의 화합물이 있다:

첫 번째, 단계 (b)에서 이용되는 p21 하향-조절 유도 화합물은 p21을 하향조절하면서 글리코겐 신타제-3 키나제(glycogen synthase-3 kinase) 단백질의 활성을 억제하는 화합물이다. 바람직하게는, 상기 첫 번째 군에 해당하는 화합물은 BIO(6-브로모인디루빈-3'-옥사임), 3F8(5-에틸-7,8-다이메톡시-1H-피롤로[3,4-c]이소퀴놀린-1,3(2H)-디원) 및 AR-A 014418(N-[(4-메톡시페닐)메틸]-N'-(5-니트로-2-디아조일)우레아)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 화합물이다. 가장 바람직하게는, 상기 첫 번째 군에 해당하는 화합물은 BIO이다. BIO의 화학 구조식은 다음과 같다:



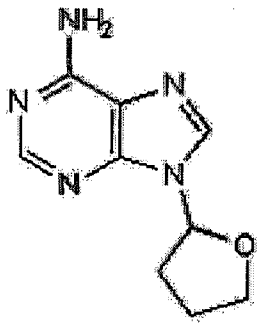
(I)

두 번째, 단계 (b)에서 이용되는 p21 하향-조절 유도 화합물은 p21을 하향조절하면서 p38 MAP(Mitogen-Activated Protein) 키나제 경로를 억제하는 화합물이다. 바람직하게는, 상기 두 번째 군에 해당하는 화합물은 CMPD-1(2'-플루오로-N-(4-하이드록시페닐)-[1,1'-바이페닐]-4-부타나마이드), EO 1428((2-메틸페닐)-[4-[(2-아미노-4-브로모페닐)아미노]-2-클로로페닐]메타논) 및 SB203580(4-[4-(4-플루오로페닐)-2-(4-메틸설피닐페닐)-1H-이미다졸-5-일]피리딘)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 화합물이고, 가장 바람직하게는, SB203580이다. SB203580의 화학구조식은 다음과 같다:



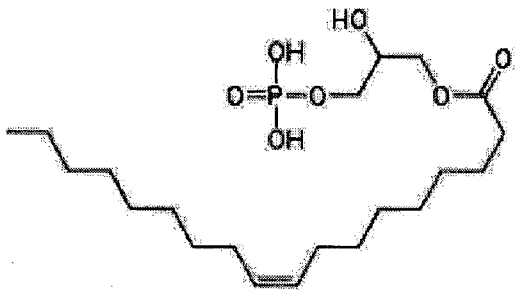
(Ⅱ)

세 번째, 단계 (b)에서 이용되는 p21 하향-조절 유도 화합물은 p21을 하향조절하면서 아데니릴 사이클라세(adenylyl cyclase)의 억제하는 화합물이다. 바람직하게는, 상기 세 번째 군에 해당하는 화합물은 BPIPP(5-(3-브로모페닐)-5,11-dihydro-1,3-다이메틸-1H-인데올[2',1':5,6]피리도[2,3-d]피리미딘-2,4,6(3H)-trione), KH7((±)-2-(1H-벤지미다졸-2-일디오)프로파노익 애시드 2-[(5-브로모-2-하이드록시페닐)메틸린]하이드라자이드) 및 SQ22536(9-(테트라하이드로-2-푸라닐)-9H-퓨린-6-아민)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 화합물이고, 가장 바람직하게는, SQ22536이다. SQ22536의 화학구조식은 다음과 같다:



(Ⅲ)

네 번째, 단계 (b)에서 이용되는 p21 하향-조절 유도 화합물은 p21을 하향조절하면서 G-단백질-결합 수용체-매개 신호전달(G-protein-coupled receptor-mediated signaling)의 활성화하는 화합물이다. 바람직하게는 LPA(Lysophosphatidic acid)이다. LPA의 화학구조식은 다음과 같다:



(Ⅳ)

보다 바람직하게는, 상기 p21 하향-조절 유도 화합물은 IO(6-

브로모인디루빈-3'-옥사임), SB203580(4-[4-(4-플루오로페닐)-2-(4-메틸설피닐페닐)-1H-이미다졸-5-일]피리딘), SQ22536(9-(테트라하이드로-2-푸라닐)-9H-퓨린-6-아민) 또는 LPA(Lysophosphatidic acid)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 화합물이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명에서 p21 발현의 하향-조절은 세포화된 근관의 증식, 세포주기로의 재-진입(re-entry) 및 분화를 유도한다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, p21 발현의 하향-조절 후에도 고유한 근전위(myogenic potential)를 유지고유한 근전위(myogenic potential)를 유지한다.

상술한 바와 같이, 본 발명은 매우 간단한 처리를 통하여 분화세포로부터 다능성 세포를 얻을 수 있다.

본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명의 방법에 의해 수득되는 다능성 세포는 단계 (a)에서 이용되는 분화세포와 동일한 리니지 또는 배엽의 세포이다. 예컨대, 분화세포로서 골격근 세포를 이용하는 경우, 본 발명에 의해 수득되는 다능성 세포는 골격근 동일한 배엽의 세포, 예컨대 골격근, 뼈, 진피, 결합 조직, 비뇨생식계, 심장, 피(림프 세포), 신장 및 비장을 구성하는 세포로 분화될 수 있는 다능성 세포이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 단계 (a)에서 이용되는 분화세포는 골격근 세포이고, 단계 (b)에서 수득한 다능성 세포는 골격근 세포, 지방세포 또는 골세포로 분화될 수 있는 다능성 세포이다.

한편, 본 발명에 따르면, 매우 흥미롭게도 분화세포로부터 간단한 처리를 통하여 전능성 세포를 얻을 수 있다. 바람직하게는, 단계 (b)의 p21 하향-조절 유도 화합물 처리 이후 역분화제를 단계 (b)에서 얻은 세포에 처리하여 전능성 세포(pluripotent cell)를 수득하는 단계를 추가적으로 포함하며, 상기 전능성 세포는 단계 (a)의 분화세포와 다른 3배엽 계통의 세포로 분화되는 능력을 갖는다.

본 발명의 용어 '역분화제(dedifferentiation agent)'는 하나 이상의 세포형태들의 역분화를 촉진하는 제제를 의미하며, 화학물질, 핵산, 펩타이드, 폴리펩타이드, 작은 유기분자, 항체, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, RNAi 컨스트럭트 및 리보자임을 포함한다. 다양한

역분화제는 완전 분화된 포유동물 세포에서 역분화를 유도하기에 충분한 시간 동안 하나 이상의 역분화 인자들과 *인 비보* 또는 *인 비트로*에서 세포와 접촉시킴으로써 역분화를 유도할 수 있다.

상기 3배엽은 내배엽, 중배엽 및 외배엽으로 구성되며, 내배엽에서는 위, 결장, 간, 췌장, 방광, 요도의 안쪽, 기도의 상피부분, 폐, 인두, 갑상선, 부갑상선 및 소장 조직을 구성하는 세포가 발생하고, 중배엽에서는 골격근, 뼈, 진피, 결합 조직, 비뇨생식계, 심장, 피(림프 세포), 신장 및 비장을 구성하는 세포가 발생하며, 외배엽에서는 중추신경계, 눈의 수정체, 두개골 및 감각, 신경절 및 신경, 색소 세포, 머리결합조직(head connective tissues), 표피, 털 및 유선을 구성하는 세포가 발생한다.

본 발명의 방법에 따르면, 단계 (a)의 분화세포는 p21 하향-조절 유도 화합물 처리 이후 역분화제의 처리에 따라, 다른 3배엽 계통으로 분화할 수 있다.

바람직한 구현예에 따르면, 골격근 유래인 C2C12 세포물은 본 발명의 저분자 처리 후, 리버신과 레티노산 및 N2 첨가제와 배양한 경우 신경 세포로 분화하여 전능성 세포의 특징을 나타낸다.

보다 바람직하게는, 상기 역분화제는 리버신(N6-사이클로헥실-N2-(4-모폴린-4-일-페닐)-9H-퓨린-2,6-다이아민), 트리코스타틴 A(trichostatin A), 발프론산(valproic acid), 부페닐(buphenyl) 및 5-아자시티딘(5-azacytidine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 화합물이다.

바람직하게는, 본 발명의 단계 (b)의 p21 하향-조절 유도 화합물 처리 이후 분화 유도제를 단계 (b)에서 얻은 세포에 처리하여 단계 (b)의 분화세포와 동일 3배엽 계통의 다른 세포 리니지(cell lineage)로 분화시키는 단계를 추가적으로 포함한다.

본 명세서에서, 용어 '분화 유도제'는 원하는 세포로 분화시키기 위해 배양배지에 포함시키는 성장인자 및 호르몬 등을 말한다.

바람직한 구현예에 따르면, 단계 (b)에서 수득한 다능성 줄기세포로부터 지방형성 세포 리니지를 수득하기 위하여 이용되는 분화 유도제는 인슐린, 덱사메타손, 로시글리타존, IBMX(isobutylmethylxanthine) 또는 이의 혼합물이다.

바람직한 구현예에 따르면, 단계 (b)에서 수득한 다능성

줄기세포로부터 골형성 세포 리니지를 수득하기 위하여 이용되는 분화 유도제는 아스코르브산-2-포스페이트, 덱사메타손, β-글리세로포스페이트 또는 이의 혼합물이다.

본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 다능성 또는 전능성 세포는 근육형성 세포 리니지(myogenic lineage), 지방형성 세포 리니지(adipogenic lineage), 골형성 세포 리니지(osteogenic lineage) 또는 신경형성 세포 리니지(neurogenic lineage)로 분화할 수 있다.

본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 제조된 다능성 세포를 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 제조된 전능성 세포를 제공한다.

본 발명의 방법에 따라 제조된 다능성 또는 전능성 세포로부터 분화된 근육형성 세포 리니지 또는 근육세포를 유효성분으로 포함하는 근질환(myopathy) 치료용 조성물을 제공할 수 있다.

본 명세서에서, 용어 '근질환' 은 근육 피로, 근위축증, 사고 또는 수술에 의한 상처 또는 근이영양증이고, 용어 '근이영양증' 은 베커형 근이영양증(Becker's muscular dystrophy), 선천성 근이영양증(congenital muscular dystrophy), 뒤셴형근이영양증(Duchenne muscular dystrophy), 원위 근이영양증(distal muscular dystrophy), 에머리-드라이푸스 근이영양증(Emery-Dreifuss muscular dystrophy), 안면견갑상완 근이영양증, 지대형 근이영양증, 근긴장성 근이영양증, 안인두성 근이영양증, 근긴장성 근이영양증, 사르코글리칸증, 척수성 근육위축 또는 BVVL(Brown-Vialetto-Van Laere syndrome)을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 방법에 따라 제조된 다능성 세포로부터 분화된 골형성 세포 리니지을 유효성분으로 포함하는 골 질환 치료용 조성물을 제공할 수 있다.

본 명세서에서, 용어 '골 질환' 은 골다공증, 청소년 골다공증, 불완전 골형성증(osteogenesis imperfecta), 과골화증, 고칼슘혈증, 부갑상선 기능항진증, 골연화증, 용해성 골질환, 골괴사증, 뼈의 파젯병,

골 발생 질환, 골 골절, 류마티스 관절염에 의한 골 손실, 염증성 류마티스 관절염, 골수염, 전이성 골질환, 치주성 골 소실, 구루병, 암에 의한 골 손실 또는 골의 노인성 손실을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 방법에 따라 제조된 다능성 또는 전능성 세포로부터 분화된 신경형성 세포 리니지 또는 신경세포를 유효성분으로 포함하는 신경질환(neurological disorder) 치료용 조성물을 제공할 수 있다.

본 명세서에서, 용어 '신경질환' 은 물리적, 대사적, 독성, 화학적 또는 면역학적인 중추신경계의 손상으로부터 유래한 신경계 질환이며, 바람직하게는 근위축성측생경화증, 다발성경화증, 알츠하이머병, 외상성 뇌손상, 뇌졸중, 허혈성 뇌질환, 간성 뇌증 및 저산소증을 포함하는 가역성 또는 대사성 뇌병증, 간질, 머리 외상, 파킨슨 질환, 알츠하이머 질환, 헌팅턴 질환, 3차 신경통, 설인 신경통, 벨 마비, 중증 경화증, 근육 이영양증, 점진성 근육 위축, 점진적 연수 유래 근육 위축, 헤르니아된, 파괴된 또는 탈출된 무척추 디스크 증후군, 경부 척추증, 집강 장애, 흉곽 아웃렛 파괴 증후군, 리드, 답손, 티크, 포르피린증 또는 길랑-바레 증후군에 의해 야기되는 말초신경병을 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

본 발명의 조성물은 (a) 상술한 다능성 또는 전능성 세포로부터 분화된 세포(예컨대, 근육형성 세포군, 골형성 세포군)의 약제학적 유효량; 및 (b) 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이다.

본 명세서에서 용어 '약제학적 유효량' 은 상술한 다능성 세포로부터 분화된 세포의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은

아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

본 발명의 약제학적 조성물은 비경구 투여할 수 있으며, 예를 들어 피하 주입, 근육 주입, 경피 투여, 관절강내 주사, 등으로 투여할 수 있다.

본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 일반적인 투여량은 성인 기준으로 1일 당 10^2-10^{10} 세포이다.

본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캅셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 포유동물 조직 또는 기관의 재생(regeneration)방법을 제공한다:

(a) 포유동물부터 분화세포를 수득하는 단계;

(b) 상기 분화세포에 p21 하향-조절 유도 화합물을 처리하여 다능성 세포를 수득하는 단계; 및

(c) 상기 다능성 세포를 원하는 조직 또는 기관으로 분화시키는 단계.

본 발명의 방법은 상기 제조방법을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

단계 (c): 다능성 세포를 원하는 조직 또는 기관으로 분화

이어, 단계 (b)에서 수득한 다능성 세포를 원하는 조직 또는

기관으로 분화시킨다.

상기 분화는 단계 (b)에서 수득한 다능성 세포의 배양배지에 원하는 조직 또는 기관의 분화유도제를 첨가하여 실시한다.

【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

(a) 본 발명은 p21 하향-조절 유도 화합물을 이용한 다능성 또는 전능성 세포의 제조방법을 제공한다.

(b) 본 발명의 다능성 또는 전능성 세포 제조방법을 통해 근육형성 세포 리니지(myogenic lineage), 지방형성 세포 리니지(adipogenic lineage), 골형성 세포 리니지(osteogenic lineage) 또는 신경형성 세포 리니지(neurogenic lineage)를 제공할 수 있다.

(c) 본 발명의 화학물질-기반된 접근방법은 포유동물에서 사지 재생을 유도하는 전략들의 개발에 중요하며, 말기 분화세포로부터 다능성 또는 전능성 세포의 개발을 위한 새로운 접근방법을 제시한다.

【도면의 간단한 설명】

도 1은 골격근 역분화 또는 분화에 사용된 저분자의 구조를 보여준다(알파벳순).

도 2a는 C2C12 분화 마우스 근관에서 저분자를 처리하여 세포 증식을 조사한 실험과정의 모식도를 보여준다. 도 2b는 C2C12 근육 세포물에 2.5 μM BIO(6-bromoindirubin-3'-oxime), 10 μM SB203580(4-[4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-1H-imidazol-5-yl]pyridine), 300 μM SQ22536(9-(Tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine) 또는 30 μM LPA(Lysophosphatidic acid)를 48 시간 동안 처리하여 DNA 합성을 유도한 결과로 FITC-BrdU 신호가 증가된 것을 확인하였다. C2C12 근육 세포물에 50 μM MLB 또는 5 μM MPc11을 48 시간 동안 처리한 결과, DNA 합성이 증가하지 않음을 보여준다. 도 2c는 C2C12 근육 세포물에 10 μM SB203580, 300 μM SQ22536, 30 μM LPA, 50 μM MLB 또는 5 μM MPc11을 48 시간 동안 처리한 결과, 세포독성을 유도하지 않음을 7-AAD 염색을 통해 보여준다. 세포독성 확인의 양성대조군으로 0.1% 트리톤 X-100을

처리하였다. 도 2d는 C2C12 근육 세포물에 2.5 μM BIO를 48 시간 동안 처리하여 세포독성이 유도되지 않음을 MTT 분석으로 확인한 결과를 보여준다. 도 2e는 C2C12 근관에 2.5 μM BIO, 10 μM SB203580, 300 μM SQ22536 또는 30 μM LPA를 48 시간 동안 처리하여 유도된 세포주기 재-진입(re-entry)을 PI(propidium iodide) 염색을 통해 세포주기의 G_2-M기의 세포함량을 유세포 분석을 실시한 결과로 보여준다. C2C12 근아세포를 양성 대조군으로 이용하였다.

도 3a은 2.5 μM BIO 또는 10 μM SB203580을 48 시간 동안 처리한 C2C12 근육 세포물의 p57 발현 감소를 확인한 웨스턴 블럿 결과를 보여준다. 300 μM SQ22536 또는 30 μM LPA를 처리한 C2C12 근육 세포물은 p57의 발현을 감소시키지 않음을 보여준다. 그러나, C2C12 근육 세포물에 BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA를 처리하였을 때, p27의 발현에 영향이 없음을 보여준다. 대조적으로, C2C12 근육 세포물에 BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA를 처리하였을 때, p21 발현이 감소한 결과를 보여준다. GAPDH 발현을 로딩 대조군으로 사용하였다. 밴드 이미지 밑에 표기된 숫자는 무처리 세포물과 비교한 밴드의 강도(intensity)를 보여준다. 도 3b는 C2C12 근육 세포물에 2.5 μM BIO, 10 μM SB203580 또는 30 μM LPA를 48시간 동안 처리하여 분화된 근육-특이 아세틸콜린 수용체의 발현(FITC-결합 α-붕가로톡신의 검출)이 감소된 것으로 역분화를 확인한 결과이다. 300 μM SQ22536, 50 μM MLB 또는 5 μM MPc11를 48시간 동안 처리한 경우, 아세틸콜린 수용체의 발현이 감소되지 않음을 보여준다. 도 3c는 C2C12 근육 세포물에 BIO, SB203580, 또는 LPA를 처리로 역분화를 유도하여 이를 FITC-결합 α-붕가로톡신 표지의 감소를 형광 마이크로플레이트 리더(reader) 분석을 통해 확인한 결과이다. 무처리 세포물과 비교하여 $p<0.05$의 신뢰도를 나타낸다. 도 3d는 분화배지에서 5 일 동안 배양 후, C2C12 근육 세포물에 2.5 μM BIO, 10 μM SB203580, 300 μM SQ22536 또는 30 μM LPA를 48 시간 동안 처리한 경우 융합지수(예컨대, 다수의 세포핵이 다핵성 근관 융합체에 포함)에 영향이 없음을 나타낸 결과이다. 대조적으로 분화배지에서 5 일 동안 배양 후, 1 μM 리버신을 48 시간 동안 처리한 경우 융합지수가 감소되었다. 무처리 세포물과 비교하여 $p<0.05$의 신뢰도를 나타낸다.

도 4는 C2C12 근육 세포물에 2.5 μM BIO, 10 μM SB203580, 300 μM SQ22536 또는 30 μM LPA를 48시간 동안 처리하고 지방세포형성 인자를 7일 동안 처리한 경우 지방세포화의 특징인 지질 축적이 유도됨을 나타낸다. 지질은 오일 레드 O(Oil Red O) 염색으로 가시화하였다. 무처리 C2C12 세포물 또는 50 μM MLB 또는 5 μM MPc11를 48시간 동안 처리한 C2C12 근육 세포물에 지방세포 형성 인자를 처리한 경우 지질 축적이 나타나지 않음을 보여준다. C2C12 근아세포에 250 nM 리버신을 처리하고 48시간 동안 지방세포화 배지에서 배양한 경우 이전 보고된 논문에서와 같이 지질 축적이 확인되었다(33). 비교를 위해 3T3-L1 지방세포의 지질 축적을 나타내었다. 도 4bi는 아디포레드(AdipoRed)™ 라벨링으로 측정한 지질축적을 나타낸다. C2C12 근육 세포물에 2.5 μM BIO, 10 μM SB203580, 300 μM SQ22536 또는 30 μM LPA를 48시간 동안 처리하고 지방세포형성 인자를 처리한 경우 지질 축적이 상당히 증가한 결과이다. 대조적으로, 무처리 C2C12 세포물 또는 50 μM MLB 또는 5 μM MPc11를 48시간 동안 처리한 C2C12 근육 세포물에 지방세포형성 인자를 처리한 경우에는 지질 축적이 증가하지 않음을 나타낸다. 결과는 무처리 세포물과 비교하여 $p<0.05$의 신뢰도를 나타낸다. 도 4bii는 C2C12 근육 세포물에 BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA를 48시간 동안 처리하고 250 nM 리버신을 처리한 후, 지방세포형성 인자를 처리하여 배양한 결과 아디포레드™ 프로브(probe)로부터 형관 신호가 증가하는 것으로 지질 축적이 증가함을 확인하였다. C2C12 근육 세포물에 MLB 또는 MPc11을 48시간 동안 처리하고 250 nM 리버신을 처리한 후, 지방세포형성 인자를 처리하여 배양한 결과, 지질 축적이 증가하지 않았다. 결과는 무처리 세포물과 비교하여 $p<0.05$의 신뢰도를 나타낸다. 도 4c는 C2C12 근육 세포물에 BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA를 48시간 동안 처리하고 지방세포형성 인자를 처리한 결과, 지방세포 특이적 기능인 인슐린-경로 매개 글루코즈 섭취능을 나타냈다. 무처리 C2C12 세포물 또는 50 μM MLB 또는 5 μM MPc11를 48시간 동안 처리한 C2C12 근육 세포물에 지방세포형성 인자와 배양한 경우, 인슐린-경로 매개 글루코즈 섭취능을 나타내지 않음을 보여준다. 결과는 인슐린-경로를 자극하지 않은 세포물과 비교하여 $p<0.05$의 신뢰도를 갖는다.

도 5a는 C2C12 근육 세포물에 2.5 μM BIO, 10 μM SB203580, 300

μM SQ22536 또는 30 μM LPA를 48시간 동안 처리하고 골형성 인자를 처리하여 골형성 전환의 특징인 무기질화(mineralization)를 유도한 결과를 나타낸다. 무처리 세포물 또는 50 μM MLB 또는 5 μM MPc11를 48시간 동안 처리한 C2C12 근육 세포물에 골형성 인자와 배양한 경우, 무기질화를 나타내지 않았다. C2C12 근아세포에 250 nM 리버신을 처리한 후, 골형성 배지에서 48 시간 동안 배양한 경우 무기질화가 형성되었으며, 이는 이전 보고와 일치한다(33). ATDC5 골형성 세포의 무기질화 비교하여 나타내었다. 도 5bi는 C2C12 근육 세포물에 BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA를 48 시간 동안 처리하고 골형성 인자를 처리한 경우, 무기질화가 상당히 증가함을 보여준다. 반대로, 무처리 C2C12 세포물, 또는 MLB 또는 MPc11를 48 시간 동안 처리한 C2C12 근육 세포물에 골형성 인자를 처리한 경우, 무처리 세포물과 비교하여 무기질화가 증가하지 않았다($p<0.05$). 도 5bii는 C2C12 근육 세포물에 BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA를 48 시간 동안 처리하고 250 nM 리버신을 48 시간 처리한 후, 골형성 인자를 첨가하여 배양한 경우, 알리자린 레드(Alizarin red) 염색을 통해 무기질화가 증가함을 보여준다. 또한, 4 처리군 간의 리버신 처리에 대한 차이는 감소하였다. MLB 또는 MPc11를 48 시간 동안 처리한 C2C12 근육 세포물에 골형성 인자를 처리한 경우 250 nM 리버신을 48 시간 처리한 후, 골형성 인자를 첨가하여 배양한 경우, 무기질화가 증가하지 않음을 보여준다. 결과는 무처리 세포물과 비교하여 $p<0.05$의 신뢰도를 갖는다. 도 5Ci는 증가된 알칼라인 포스파타제 활성은 골형성 전화의 하나의 특징이다. C2C12 세포물에 BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA를 48 시간 처리하고 골형성 인자를 처리한 후 알칼라인 포스파타제 활성 상당히 증가한 결과를 보여준다. 반대로, 무처리 C2C12 근육 세포물, 또는 MLB 또는 MPc11를 48 시간 동안 처리한 C2C12 근육 세포물에 골형성 인자를 처리한 경우, 알칼라인 포스파타제 활정이 증가하지 않음을 보여준다. 무처리, MLB 또는 MPc11 처리한 C2C12 근육 세포물은 유사한 분석값을 보여준다. 도 5cii는 C2C12 근육 세포물에 BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA를 48 시간 동안 처리하고 250 nM 리버신을 48 시간 처리한 후, 골형성 인자를 첨가하여 배양한 경우, 4 처리군 간의 알칼라인 포스파타제 활성의 차이가 줄어듬을 보여준다. 반대로, 무처리 C2C12 세포물, MLB 또는 MPc11를 48 시간 동안 처리한 C2C12 근육 세포물에

골형성 인자를 처리하고 250 nM 리버신을 48 시간 처리한 후, 골형성 인자를 첨가하여 배양한 경우, 알칼라인 포스파타제 활성을 증가시키지 않음을 보여준다. 무처리, MLB 또는 MPc11 처리한 C2C12 근육 세포물은 유사한 분석값을 보여준다.

도 6a는 C2C12 근육 세포물에 2.5 μM BIO, 10 μM SB203580 또는 300 μM SQ22536를 48 시간 동안 처리하고 신경형성 인자를 처리하고 250 nM 리버신을 48 시간 처리한 후, 신경형성 배지에서 배양하여 신경 전사인자, Hes-6의 발현을 유도을 유도한 결과이다. 반대로, 30 μM LPA, 50 μM MLB 또는 5 μM MPc11를 C2C12 근육 세포물에 48 시간 처리하고 250 nM 리버신을 48 시간 처리한 후, 신경형성 배지에서 배양한 경우, Hes-6 발현을 유도하지 않음을 보여준다. 도 6b는 C2C12 근육 세포물에 BIO를 처리하고 250 nM 리버신을 48시간 처리한 후, 신경형성 배지에서 배양한 결과 신경형성으로 보이는 형태학적 변화가 관찰되었다. 도 6c는 C2C12 근육 세포물에 BIO, SB203580 또는 SQ22536를 48 시간 처리하고 250 nM 리버신을 48 시간 처리한 후, 신경형성 인자와 배양한 경우 신경-특이적 특징인 탈분극화-의존 소포 재순환(depolarization-dependent vesicle recycling)을 확인한 결과이다. 소포 재순환은 형광 표지. FM 1-43으로 가시화하였다. 반대로, MLB 또는 MPc11를 C2C12 근육 세포물에 48 시간 처리하고 250 nM 리버신을 48 시간 처리한 후, 신경형성 인자가 포함된 배지에서 배양한 경우, 탈분극화-의존 소포 재순환을 나타내지 않았다. 도 6d는 C2C12 근육 세포물에 BIO, SB203580 또는 SQ22536를 48 시간 동안 처리하고 250 nM 리버신을 48 시간 처리한 후, 신경형성 인자를 첨가하여 배양한 경우 고농도 세포외 칼륨을 이용한 탈분극으로 FM 1-43 흡수가 증가하였다. 반대로, C2C12 근육 세포물에 MLB 또는 MPc11을 48시간 처리하고 250 nM 리버신을 48 시간 처리한 후, 신경형성 인자를 첨가하여 배양한 경우 FM 1-43 형광 신호가 증가하지 않음을 보여준다. 저농도 세포외 칼륨을 이용한 대조군과 비교하여 $p<0.05$의 신뢰도를 갖는다. FM 1-43 형광 신호의 탈분극-의존 증가를 비교하기 위해 p19 뉴런을 이용하였다. 도 6e는 C2C12 근육 세포물에 BIO, SB203580 또는 SQ22536를 48 시간 동안 처리하고 250 nM 리버신을 48 시간 처리한 후, 신경형성 인자를 포함하여 배양한 결과, 신경-특이적 특징인 글루타메이트-의존 칼슘 유입을 확인한

결과이다. 글루타메이트-의존 칼슘 유입은 형광 표지, Fluo-3로 가시화하였다. 반대로, C2C12 근육 세포물에 MLB 또는 MPc11을 48시간 처리하고 250 nM 리버신을 48 시간 처리한 후, 신경형성 인자를 포함하여 배양한 경우 글루타메이트-의존 칼슘 유입이 확인되지 않았다.

도 7는 완전히 분화된 골격근 조직으로부터 전능성 세포를 수득하기 위한 저분자 방법의 모식도를 보여준다. 최근에 발표된 결과는 도룡뇽과 같은 유미목 양서류의 사지 재생 동안 근조직의 역분화 및 본질적으로 새로운 사지(예컨대, 단분화능 세포)에 새로운 근조직을 형성함을 보여준다(31). 본 발명의 저분자 방법은 신경세포의 특징을 나타내는 세포로의 전환이 보여주듯이, 전분화능을 갖는 세포로 역분화함으로써 포유류 근육 조직에 대한 세포의 발생학적 가소성을 보다 넓힐 수 있다.

도 8a는 2.5 μM BIO를 48 시간 동안 처리한 C2C12 세포물 (증식성, 다분화능 세포) 대 리니지가 예정된 C2C12 근아세포(lineage restricted C2C12 myoblasts)간의 전체 유전자 발현 변화를 보여주는 마이크로어레이 분석결과이다. 도 8b는 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)분석에 따른 p53 신호전달에 연관된 유전자들의 발현 변화를 보여주는 결과이다.

도 9a는 증가된 FITC-BrdU 시그널이 보여주는 바와 같이, 일차 근관 배양으로부터 획득하여 2.5 μM BIO를 48 시간 동안 처리한 세포물의 DNA 합성 유도를 나타낸다. 도 9b는 FITC-결합 α-붕가로톡신(bungarotoxin) 표지에 대한 형광 마이크로플레이트 리더 어세이 결과로서, 감소된 형광 시그널이 보여주는 바와 같이, BIO를 처리한 일차 근육 세포물이 역분화가 강화되었다는 것을 확인하였다. 반면, 50 μM MLB를 48 시간 동안 처리하거나 또는 DMSO를 처리한 경우에는 역분화가 유도되지 않았다. 결과는 무처리 세포물과 비교하여 $p<0.05$의 신뢰도를 가지며, 세 개의 독립적인 실험에 대한 대표 값으로 나타냈다. 도 9c는 2.5 μM BIO를 48 시간 동안 처리한 일차 근육 세포물에 지방세포형성 인자(adipogenic factors)를 7 일 동안 처리한 경우 지방 축적이 유도되었고, 이는 지방세포형성 전환의 특징이다. 지질은 오일 레드 O(Oil Red O) 염색으로 가시화하였다. 무처리 일차 세포물, 또는 50 μM MLB 또는 DMSO를 48 시간 동안 처리한 C2C12 근육 세포물에 지방세포 형성 인자를 처리한 경우 지질

축적이 나타나지 않음을 보여준다. 도 9d는 2.5 μM BIO를 48 시간 동안 처리한 일차 근육 세포물에 지방세포 형성 인자를 처리한 경우 에피네프린-자극(지방세포-특이적 기능) 후 인슐린-감수성 유리 지방산의 방출을 보여준다. 반면, 무처리 C2C12 세포물, 또는 50 μM MLB 또는 DMSO를 48 시간 동안 처리한 C2C12 근육 세포물에 지방세포 형성 인자를 처리한 경우 이러한 지방세포-특이적 기능이 유도되지 않음을 보여준다. 결과는 에피네프린 단독 처리와 비교하여 $p<0.05$의 신뢰도를 가지며, 세 개의 독립적인 실험에 대한 대표 값으로 나타냈다. 도 9e는 2.5 μM BIO를 48 시간 동안 처리한 일차 근육 세포물에 골형성 인자를 처리한 경우, 알리자린 레드(Alizarin red) 염색이 보여주는 바와 같이 무기질화가 유의하게 증가된 것을 나타낸다. 무처리 일차 세포물, 또는 50 μM MLB 또는 DMSO를 48 시간 동안 처리한 C2C12 근육 세포물에 골형성 인자를 처리한 경우 무기질화가 증가하지 않음을 보여준다. 도 9f는 BIO를 처리한 세포물의 경우 골형성 전환의 또다른 특징인 알칼라인 포스파타제 활성이 증가한 결과를 보여준다. 알칼라인 포스파타제 활성은 AttoPhos™ 시약을 처리한 세포 용해물을 10 분 동안 인큐베이션 한 후 측정하였다. 결과는 무처리 세포물와 비교하여 증가된 활성에 대하여 $p<0.05$의 신뢰도를 가지며 세 개의 독립적인 실험에 대한 대표 값으로 나타냈다. 도 9g는 2.5 μM BIO를 48 시간 동안 처리한 일차 근육 세포물에 250 nM 리버신을 48 시간 처리하고 신경형성 인자를 처리한 경우, 신경-특이적 특징인 탈분극화-의존 소포 재순환(depolarization-dependent vesicle recycling)이 가능한 세포가 제조된다는 것을 보여준다. 신경세포 형태를 보이는 세포들은 FM 1-43 프로브로부터의 나오는 시그널이 증가하였다. 반면, BIO를 처리하는 대신 50 μM MLB 또는 DMSO를 48 시간 동안 처리한 경우 이러한 효과가 발생하지 않음을 보여준다. 결과는 무처리 세포물와 비교하여 증가된 FM 1-43 시그널에 대하여 $p<0.05$의 신뢰도를 가지며 세 개의 독립적인 실험에 대한 대표 값으로 나타냈다. 도 9h는 2.5 μM BIO를 48 시간 동안 처리한 일차 근육 세포물에 250 nM 리버신을 48 시간 처리하고 신경형성 인자를 처리한 경우, 신경-특이적 특징인 글루타메이트-의존 칼슘 유입(glutamate-dependent calcium influx)이 가능한 세포가 제조된다는 것을 보여준다. 신경세포 형태를 보이는 세포들은 Fluo-3 프로브로부터의 나오는 시그널이

증가하였다. 반면, BIO를 처리하는 대신 50 μM MLB 또는 DMSO를 48 시간 동안 처리한 경우 이러한 효과가 발생하지 않음을 보여준다. 결과는 무처리 세포물와 비교하여 증가된 Fluo-3 시그널에 대하여 $p<0.05$의 신뢰도를 가지며 세 개의 독립적인 실험에 대한 대표 값으로 나타냈다.

【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예

실험방법

세포배양

C2C12 마우스(*mus musculus*) 근아세포(myoblasts)를 이전에 보고된 방법에 따라 배양하였다(11). 근관으로 분화하기 위해, 근아세포를 콜라겐-코팅 조직 배양 플레이트(시그마, 미국)에서 배양하였다. 컨플루언트 근아세포에 10 일 동안 분화 배지(5% 호올스(horse) 혈청, 50 units/㎖ 페니실린 및 50 ㎍/㎖ 스트렙토마이신이 첨가된 DMEM)에서 배양하여 분화 유도하였다. 분화를 높이고 단핵 근아세포를 제거하기 위해, 분화배양배지에 24 시간 배양 후 50 μM AraC3 을 72 시간 동안 처리한다.

근관의 정제 배양물을 수득하기 위해, 분화된 근관 배양물에 트립신 처리하여 800 rpm 으로 10 분 동안 원심분리하고, 10 ㎖ 분화배지에 재-현탁한 후에 40 ㎛ 메쉬(BD sciences, 미국)에 2 번 분리하였다. 메쉬를 20 ㎖ 배양배지로 세척하여 근관을 수득하였다. 일반적으로, 하나의 10 ㎠ 디쉬의 근관을 얻는데, 5 개의 컨플루언트 10 ㎠ 디쉬의 분화된 C2C12 배양물이 필요하다.

3T3-L1 마우스(*mus musculus*) 배아 섬유아세포를 배양하여 보고된 방법으로 지방세포로 분화하였다(11). ATDC5 마우스(mus musculus)의 골-연골형성 전구세포(osteo-chondrogenic precursor cells)를 이전 보고된 방법으로 골아세포로 배양 및 분화하였다(11).

골격근 근관의 세포화

C2C12 근관 배양물에 20 μM 미오세버린을 48 시간 동안 처리하고 이전 보고된 방법으로 수확하였다(11).

세포화된 골격근 근관에서의 지질형성 유도

세포를 10% FBS, 100 nM 인슐린, 5 μM 덱사메사손(dexamethasone), 1 μM 로시글리타존(rosiglitazone) 및 0.5 mM IBMX(Isobutylmethylxanthine)가 첨가된 DMEM 로 48 시간 동안 배양하고, 100 nM 인슐린 및 1 μM 로시글리타존으로 7 일 동안 추가 배양하였다. 배양 배지를 매 48 시간 마다 교환하였다.

세포화된 골격근 근관에서의 골형성 유도

세포화된 골격근 근관에서의 골형성 유도는 이전에 보고된 리버신-처리 방법으로 실시하였다(33).

세포화된 골격근 근관에서의 신경형성 유도

신경형성을 유도하는 방법은 리버신-처리 C2C12 근아세포에서 뉴런을 형성한 보고를 기초로 하였다(28). 세포물을 라미닌-코팅 배양디쉬에 1.5×10^6 세포/9.6 ㎠으로 배양하였다. 저분자 처리 후에, 세포를 250 nM 리버신을 48 시간 동안 처리하고, 신경 유도 배지(N2 가 첨가된 DMEM/F12, invitrogen, 미국) 및 1.5 μM 전-트랜스(all-trans) 레티노산(retinoic acid) 11 로 7 일 동안 배양하였다.

통계 분석

3 번의 독립적인 실험의 평균값으로 맨-휘트니(Mann-Whitney) U 테스트를 통해 유의값을 결정하였다(TalkStats software; Jelsoft Enterprises). p 값은 0.05 미만의 유의성을 나타내었다. 모든 오차범위는 중간값의 표준편차값이다.

마이크로어레이

각각의 총 RNA 시료(200 ng)를 Low Input Quick Amp labeling kit (Agilenttechnologies, CA)를 이용하여 표지하고 증폭시켰다. Cy3-표지 aRNA 는 혼성화 용액(Agilenttechnologies, CA)50 μL 에 재현탁시켰다. 표지된 aRNA 를 Agilent SurePrint G3 Human GE 8x60K 어레이(Agilent technologies, CA)상에 위치시키고 Gasket 8-plex 슬라이드(Agilent technologies, CA)로 덮었다. 상기 슬라이드는 65 ℃에서 17 시간 동안 혼성화시켰다. 상기 혼성화된 슬라이드는 상온에서 2 X SSC, 0.1 % SDS 로 2 분, 1 X SSC 로 3 분 및 0.2 X SSC 로 2 분 동안 세척하였다. 상기 슬라이드를 3000 rpm 에서 20 초 동안 원심분리하여 건조시켰다.

마이크로어레이 데이터 분석

관련 소프트웨어가 장착된 Agilent 스캐너를 이용하여 어레이를 분석하였다. Feature Extraction v10.7.3.1 (Agilent technologies, CA)으로 유전자 발현 수준을 계산하였다. Robust Multi-Array Average algorithm 을 이용하여 각 유전자에 대한 상대적인 시그널 강도를 발생시켰다. GeneSpring GX 11.5.1 (Agilent technologies, CA)을 이용하는 quantilenormalization 방법을 기반으로 하여 상기 데이터를 처리하였다. 이러한 노멀라이제이션 방법은 하나의 어레이 세트에서 각각의 어레이에 대한 강도의 분포를 동일하게 하기 위하여 실시된다. 노멀라이제이션 및 로그 변환된 상기 강도 값은 GeneSpringGX 11.5.1 (Agilent technologies, CA)을 이용하여 분석하였다. 배수 변화 필터는, 상향-조절된 유전자들에 대해서는 대조군 대비 최소 200%, 하향-조절된 유전자들에서 대해서는 대조군 대비 50% 이하로 존재하는 유전자 요건을 포함한다.

마우스 일차 근아세포(mouse primary myoblasts) 분리 및 성장

마우스 일차 근아세포는 이전에 공개된 프로토콜을 이용하여 뮤린(murine) 골격 근육으로부터 정제하였다(34). 간략하게 설명하자면, BALB/c 마우스를 무병균 시설(specific pathogen-free barrier facilities)에서 사육하였다. 본 발명에서 실시한 실험의 모든 프로토콜은 광주과학기술원 동물실험윤리위원회의 허가를 받아 실시하였다. 14 일째

마우스에 CO_2 를 흡입시켜 안락사시키고 입체 해부 현미경(Carl Zeiss 2000-C)을 이용하여 비장근(gastrocnemius muscle)을 분리하였다. 근육을 멸균 배양 후드로 옮겨서 충분한 양의 PBS 로 근육이 마르지 않도록 유지하면서 날카로운 칼로 잘게 자른다. 조직 g 당 콜라게나제/디스파제/ $CaCl_2$ 용액 2 ml 씩 첨가하고 잠시 동안 추가적으로 잘게 자른다. 잘게 잘라진 조직을 37℃에서 20 분 동안 배양하고, 플라스틱 파이펫으로 뭉쳐진 부분을 부드럽게 분쇄시켰다. 세포를 350 xg 에서 5 분 동안 원심분리하여 F-10-일차 근아세포 성장 배양액 (F-10 media plus 20% fetal calf serum, 2.5 ng/mL basic fibroblast growth factor 100 U/mL penicillin 및 100 μg/mL streptomycin) 4 ml 로 재현탁시키고, 35 mm 콜라겐 코팅 배양접시에 넣는다. 48 시간 후, 접시의 성장 배양액을 흡입하여 제거하고, PBS 로 접시를 세척한다. 이때 PBS 를 약간 남긴 후 접시의 옆을 매우 세게 쳐서 세포들이 떨어지도록 한다. 이어, 현탁액에 잔존하는 세포를 새로운 콜라겐-코딩 접시에 옮기기 전에, 수득된 세포들을 콜라겐-코딩 접시에서 15 분 동안 프리-플레이팅 하였다. 이러한 과정을 매 48 시간 마다 6 일 동안 반복하여 섬유아세포(fibroblasts)를 제거하였다. 배양액을 일차 근아세포 성장 배양액(DMEM 과 F-10 배양액의 비율 1:1, 20% fetal calf serum, 2.5 ng/ml basic fibroblast growth factor 100 U/ml penicillin 및 100 μg/ml streptomycin)으로 바꾸고 적합한 세포 밀도가 되었을 때 근아세포를 실험에 이용하였다.

결과

현재 화학 생물학 연구에 있어 세포를 조작하는 화학적 접근법은 가장 중요한 분야이다. 포유류 근육에서 양서류 사지 재생의 초기 단계를 유도하기위한 저분자의 개발이 시도되었으나 완전한 역분화를 성공하지는 못했다(15, 16). 따라서, 화학 생물학 분야에서는 저분자를 이용한 포유류 근육 역분화의 증명에 관심이 많다.

BIO, SB203580, SQ22536 및 LPA 의 DNA 합성 및 세포 주기 재-진입(re-entry) 유도

본 발명에 사용한 저분자를 도 1 에 나타내었다. 도 2a 는 근육 세포물의 증식 정도를 보여준다. 본 발명에서 각 저분자의 농도는 이전에 보고된 문헌을 참고하여 활성을 갖는 농도로 실시하였다(17, 20, 21). 2.5 μM BIO(6-bromoindirubin-3'-oxime), 10 μM SB203580(4-[4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-1H-imidazol-5-yl]pyridine), 300 μM SQ22536(9-(Tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine) 또는 30 μM LPA(Lysophosphatidic acid)를 48 시간 동안 처리한 세포물은 세포물 안의 BrdU(5' -브로모-2' -데옥시우리딘) 결합(incorporation)이 증가하여 DNA 합성이 증가한 것을 보여준다(도 2b). BrdU 결합은 상대적으로 SQ22536 을 처리한 세포물에서 적게 나타났다. MPc11(F1F0 미토콘드리아 ATP 신타아제의 합성 억제제) 9 및 50 μM MLB (마그네슘 리토스퍼메이트(magnesium lithospermate) B, 천연 항산화제) 8 을 음성대조군으로 사용하였다(22, 23). 50 μM MLB 또는 5 μM MPc11 을 48 시간 동안 처리한 C2C12 근육 세포물은 증식이 증가하지 않았으며, 세포독성을 유도하지 않았다(도 2b 및 도 2c). BIO 에 의한 세포 염색으로 인해, BIO 를 처리한 세포물은 7-AAD 염색을 할 수 없다. 따라서, MTT 분석법은 BIO 가 세포독성을 유도하지 않는 것을 보여준다(도 2d). BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA 처리 시 세포 주기 재-진입하여 G_2-M 단계의 세포를 증가시킴을 핵염색을 통해 보여주었다(도 2e).

BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA 의 CDKN 발현 조절

p21(CIP1/CDKN1A), p27(CDKN1B/KIP1) 및 p57(CDKN1C/KIP2)를 포함하는 수많은 사이클린-의존 키나제 억제제(Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors, CDKN)는 골격근의 지속적인 분화양상을 보여준다(18, 24). 근육 세포물에서 BIO 또는 SB203580 의 처리는 p57 발현을 감소시킨다(도 3a). 그러나, 저분자 처리는 p27 발현에 뚜렷하게 영향을 주지 않는다(도 3a). 반면, 저분자 처리는 p21 발현을 감소시킨다(도 3a).

BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA 의 역분화 유도

근육 세포물에 BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA 를 처리한 경우, 역분화된 세포물을 가리키는 FITC-결합된 α-붕가로톡신(bungarotoxin)

표지가 감소하였다(도 3b). 반대로, SQ22536, MLB 또는 MPc11 은 FITC-결합된 α-붕가로톡신 표지를 감소시키지 않았다(도 3b). BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA 이 FITC-결합된 α-붕가로톡신 표지를 감조시킴을 형광 평판 리더 분석법을 통해 확인하였다(도 3c).

BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA 의 근전위(myogenic potential) 영향

근육 세포물의 근육을 형성하는 능력(근전위, myogenic potential)을 세포융합지수(fusion index)를 이용하여 분석하였다(11). 분화 배지에서 5 일 동안 배양 한 후에 BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA 는 융합지수에 영향을 주지 않았다(도 3d). 대조적으로, 리버신(reversine)의 처리는 세포융합지수를 감소시켰다.

BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA 의 지방세포화 유도

BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA 를 처리한 C2C12 근육 세포물에 지방세포형성 인자(adipogenic factors)의 칵테일을 처리하고 배양하여 지질 축적을 유도하였다(도 4a). C2C12 근육 세포물에 MLB 또는 MPc11 및 지방세포형성 인자를 처리한 경우, 지질 축적을 유도하지 않았다. 발명진의 이전 연구의 p21 녹아웃을 이용한 지방세포형성 전환은 리버신 처리에 의존적이였다(11). 그러나, C2C12 근육 세포물에 BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA 의 처리 후, 지방세포형성 인자를 처리하니 리버신의 처리 없이도 지질이 축적되는 것을 확인하였다(도 4Bi). 더욱이, BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA 의 처리 후, 리버신 및 지방세포형성 인자를 함께 처리한 실험군에서 지질 축적 정도가 증가하였다(도 4bii).

지방세포의 특징인 인슐린-자극에 의한 포도당의 흡수(uptake)는 형광 포도당 유사체인 2-NBDG(2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diaxol-4-yl)amino]-2-deoxyglucose)로 측정하여 알 수 있다(25). BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA 를 48 시간 동안 처리한 후에 지방세포형성 인자의 칵테일을 처리하여 배양하여 인슐린-자극 포도당 흡수를 유도하였다(도 4ci). MLB 또는 MPc11 및 지방세포형성 인자는 인슐린 감수성이 없었다. 또한, 리버신 및 지방세포형성 인자를 48 시간 동안 처리하고 BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA 를 처리하니 2-NBDG 흡수량이 증가하였다. 그러나,

인슐린-자극 및 비인슐린-자극 세포에서 2-NBDG 흡수의 차이는 유사하게 나타났다(도 4cii)

BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA 의 골형성(osteogenic) 전환

무기질화(mineralization)의 증가는 골형성(osteogenesis)의 주요한 특징이다(26). C2C12 근육 세포물에 BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA 를 처리하고, 무기질화를 유도하는 골형성 인자 칵테일과 함께 배양하였다(도 5a). MLB 또는 MPc11 및 골형성 인자를 처리한 실험군에서 무기질화가 관찰되지 않았다. BIO 또는 SB203580 을 처리한 실험군에서는 골형성 인자와 배양한 후에 LPA 또는 SQ22536 을 처리한 실험군과 비교하여 보다 많은 무기질화가 유도되었다(도 5bii). 또한, BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA 와 리버신 및 골형성 인자를 처리하니 실험군 사이의 무기질화에 차이가 감소하였다.

BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA 와 골형성 인자를 처리하여 골형성 전환을 나타내는 알칼린 포스파타제 활성을 유도하였다(도 5c i). MLB 또는 MPc11 및 골형성 인자를 처리한 C2C12 근육 세포물에서는 알칼린 포스파타제 활성이 유도되지 않았다. 알칼린 포스파타제 활성의 유도는 LPA 및 SQ22536 을 처리한 군에 비해, BIO 및 SB203580 에서 더 높게 나타났다. 또한, BIO, SB203580, SQ22536 또는 LPA 및 리버신과 골형성 인자를 처리한 실험군에서는 알칼린 포스파타제 활성 정도가 증가하였다(도 5cii). 또한, 처리 과정에서 리버신을 추가한 경우 실험군 간의 알칼린 포스파타제 활성의 차이가 감소하였다.

BIO, SB203580 및 SQ22536 의 신경형성(neurogenic) 유도

C2C12 세포물에 저분자를 처리한 후에 신경성 특징이 발생하는지 Hes-6(신경 분화를 촉진하는 전사인자로 신경화된 C2C12 근아세포(myoblast)에서 상향 조절되는 유전자)의 발현을 RT-PCR 분석법을 통해 측정하였다(도 6a). LPA, MLB 또는 MPc11 를 처리한 후에 신경 리버신 및 신경형성 인자와 배양하였을 때, Hes-6 의 발현이 상향 조절되지 않았다. 상향 조절된 Hes-6 발현은 세포물의 신경이 형성되려는 형태학상 변화를 수반한다(도 5b, 28). 탈분극(depolarization)-의존 소낭의 재순환 작용은

신경세포에 특이적인 생리학적 특징이다(도 6c). 탈분극-의존 소낭 재순환 작용의 발생을 마이크로플레이트 리더(microplate reader) 분석법으로 확인하였다(도 6d). 글루타메이트-의존 칼슘유입 또한 신경세포 특이적인 생리학적 특징이다(29). BIO, SB203580 또는 SQ22536 을 처리하고 리버신 및 신경형성인자와 배양하였을 때, 글루타메이트-의존 칼슘 유입이 확인되었다(도 6e). 반면, MLB 또는 MPc11 를 처리하고 리버신 및 신경형성인자와 7 일 동안 배양한 실험군에서는 클루타메이트-의존 칼슘 유입이 나타나지 않았다.

마이크로어레이 분석에 의한 유전자 발현 변화

마이크로어레이 분석결과는 2.5 μM BIO를 48 시간 동안 처리한 C2C12 세포물 (증식성, 다분화능 세포) 대 리니지가 예정된 C2C12 근아세포(lineage restricted C2C12 myoblasts)간의 전체 유전자 발현 변화를 보여준다. 또한 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)분석에 따른 p53 신호전달에 연관된 유전자들의 발현 변화를 보여준다(도 8a 및 도 8b).

마우스 일차 근육 세포물에서의 BIO에 의한 다능성 또는 전능성 유도

도 9a 에서 증가된 FITC-BrdU 시그널이 보여주는 바와 같이, 일차 근관 배양으로부터 획득하여 2.5 μM BIO 를 48 시간 동안 처리한 세포물의 DNA 합성 유도를 확인하였다. FITC-결합 α-붕가로톡신(bungarotoxin) 표지에 대한 형광 마이크로플레이트 리더 어세이 결과는 감소된 형광 시그널이 보여주는 바와 같이, BIO 를 처리한 일차 근육 세포물이 역분화가 강화되었다는 것을 보여준다. 반면, 50 μM MLB 를 48 시간 동안 처리하거나 또는 DMSO 를 처리한 경우에는 역분화가 유도되지 않았다(도 9b).

2.5 μM BIO 를 48 시간 동안 처리한 일차 근육 세포물에 지방세포형성 인자(adipogenic factors)를 7 일 동안 처리한 경우 지방 축적이 유도되었고, 이는 지방세포형성 전환의 특징이다. 지질은 오일 레드 O(Oil Red O) 염색으로 가시화하였다. 무처리 일차 세포물, 또는 50 μM MLB 또는 DMSO 를 48 시간 동안 처리한 C2C12 근육 세포물에 지방세포 형성 인자를 처리한 경우 지질 축적이 나타나지 않음을 보여준다(도 9c).

2.5 μM BIO 를 48 시간 동안 처리한 일차 근육 세포물에 지방세포 형성 인자를 처리한 경우 에피네프린-자극(지방세포-특이적 기능) 후 인슐린-감수성 유리 지방산의 방출을 확인하였다. 반면, 무처리 C2C12 세포물, 또는 50 μM MLB 또는 DMSO 를 48 시간 동안 처리한 C2C12 근육 세포물에 지방세포 형성 인자를 처리한 경우 이러한 지방세포-특이적 기능이 유도되지 않음을 보여준다(도 9d).

2.5 μM BIO 를 48 시간 동안 처리한 일차 근육 세포물에 골형성 인자를 처리한 경우, 알리자린 레드(Alizarin red) 염색이 보여주는 바와 같이 무기질화가 유의하게 증가된 것을 확인하였다. 무처리 일차 세포물, 또는 50 μM MLB 또는 DMSO 를 48 시간 동안 처리한 C2C12 근육 세포물에 골형성 인자를 처리한 경우 무기질화가 증가하지 않음을 보여준다(도 9e).

BIO 를 처리한 세포물의 경우 골형성 전환의 또다른 특징인 알칼라인 포스파타제 활성이 증가하였다. 알칼라인 포스파타제 활성은 AttoPhos™ 시약을 처리한 세포 용해물을 10 분 동안 인큐베이션 한 후 측정하였다(도 9f).

2.5 μM BIO 를 48 시간 동안 처리한 일차 근육 세포물에 250 nM 리버신을 48 시간 처리하고 신경형성 인자를 처리한 경우, 신경-특이적 특징인 탈분극화-의존 소포 재순환(depolarization-dependent vesicle recycling)이 가능한 세포가 제조되었다. 신경세포 형태를 보이는 세포들은 FM 1-43 프로브로부터의 나오는 시그널이 증가하였다. 반면, BIO 를 처리하는 대신 50 μM MLB 또는 DMSO 를 48 시간 동안 처리한 경우 이러한 효과가 발생하지 않음을 보여준다(도 9g).

2.5 μM BIO 를 48 시간 동안 처리한 일차 근육 세포물에 250 nM 리버신을 48 시간 처리하고 신경형성 인자를 처리한 경우, 신경-특이적 특징인 글루타메이트-의존 칼슘 유입(glutamate-dependent calcium influx)이 가능한 세포가 제조되었다. 신경세포 형태를 보이는 세포들은 Fluo-3 프로브로부터의 나오는 시그널이 증가하였다. 반면, BIO 를 처리하는 대신 50 μM MLB 또는 DMSO 를 48 시간 동안 처리한 경우 이러한 효과가 발생하지 않음을 보여준다(도 9h).

고찰

동물계에서, 유미목 양서류의 사지 재생은 조직재생의 특별한 예이다(7). 사지 재생의 초기단계는 근육의 세포화 및 세포 주기 재-집입과 관련이 있다(4,6). 최근에, 포유류의 근육에서 유사한 작용을 유도하는 siRNA-기반 접근법이 연구되었다(11, 12). 그러나, 비-특이적 세포독성 및 빈약한 생물학적 기여의 문제점을 갖고 있으므로, siRNA-기반 접근법에 비해 저분자-기반 접근법이 더 우수하다.

본 발명의 중점은 '오염시키는(contaminating)' 미분화된 근아세포를 배제한 근관의 정제 파퓰레이션의 분화이다. 본 발명의 목적을 이루기 위해, 발명진은 이전에 보고된 연속 세포 분리법(sequential cell seiving)을 이용하였다(11, 16). 발명진은 이전에 상기 방법이 정제 근관 배양물(purified myotube cultures)을 수득하는데 알맞은지 확인하였다(11). 발명진은 상대적으로 낮은 세포독성을 갖는 저분자인 미오세버린을 이용하여 세포화를 유도하였다(11,15). 저분자인 BIO 를 이용하여 글리코겐-3 키나제의 억제하고 LPA 로 G-단백질-결합 수용기-매개 신호전달을 활성화, SQ22536 을 이용한 아데니릴 사이클라제 억제 또는 SB203580 을 이용하여 p38 MAP 키나제 경로를 억제하여 근육 세포물의 세포를 세포주기로 재진입시켰다(도 2b). 이는 복합적인 생화학적 경로조절를 세포의 증식을 유도하도록 조절할 수 있음을 보여준다.

이전 연구에서, 근관에서의 siRNA-매개 유전자 녹다운 또는 바이러스성 종양형성 유전자의 발현은 증식 및 아폽토시스를 유도하였다(8, 13, 14). 그러나, BIO, LPA, SB203580 및 SQ22536 은 세포독성을 유도하지 않았다(도 2c). 또한, 증식하는 세포물의 세포 주기는 증식하는 근육 근아세포 및 정상세포와 유사하였다.(도 2d). 그러므로, 근육 세포물의 저분자, BIO. LPA, SB203580 또는 SQ22536 에 의한 증식 도입은 조직 재생능을 개선하기 위한 치료제를 개발하는데 적합함을 보여준다.

포유류 근육 세포물 증식의 유도는 p21 발현의 녹아웃과 관련이 있다(11,18) 저분자인 BIO, LPA, SB203580 또는 SQ22536 의 처리는 근육 세포물의 p21 발현을 감소시켰다(도 3a). p27 발현은 BIO 를 처리한 분화된 심근세포에서 세포주기 철회의 전환과 관련 있다(21). 그러나, 본 발명진의 결과는 포유류 근육 세포물에 저분자 처리하였을때 p27 의 발현에 극적인

영향을 주지 않음을 보여준다. 이러한 결과는 미요세버린-유래 세포물 및 분화된 심근세포 간의 생화학적 차이 때문일 것이다. 또한, 심근세포에서의 p21 발현은 측정하지 않았다(21). 게다가, 본 발명진의 결과는 세포물에서 저분자 BIO 및 SB203580 을 처리하여 p57 의 발현을 감소시킨 결과를 보여준다(도 3a). p57 은 근육 세포물에서 세포 주기 철회의 중요한 조절자는 아니지만, BIO 및 SB203580 에 의한 하향조절은 저분자가 p57 이 정지 상태(세포 주기 철회)를 유지하는데 중요한 역할을 하는 다른 조직의 역분화를 유도하는데 적절한 방법임을 말해준다.

아세틸콜린 수용체 발현은 근육 분화의 마커로 여겨진다(30). 본 발명의 결과는 BIO 를 이용한 글리코겐 신타제-3 키나제의 억제, LPA 를 이용한 G-단백질-결합 수용체-매개 신호전달의 활성화 또는 SB203580 을 이용한 p38 MAP 키나제 경로의 억제는 포유류 근육 세포물에서 아세틸콜린 수용체의 발현을 상당히 감소시킴을 보여준다(도 3b-3c). 본 발명의 결과는 세포물에서 세포 주기 재진입의 도입이 역분화의 주요한 요소임을 나타낸다. SQ22536 을 이용한 아데니릴 사이클라제의 억제는 아세틸콜린 수용체의 발현에 영향을 주지 않고 세포가 비만 형성 세포 및 골형성 세포를 형성하는 다분화능을 갖는다(도 3b-3c, 도 4 및 도 5). 이러한 결과는 미오세버린-유래 근육 세포물의 특성일 것이다. 이전 연구에서 미오세버린 단독처리 시 세포물은 역분화하지 않았지만, 아세틸콜린 수용체의 발현을 감소시킬 수 있음을 보여주었다(16, 30). 그러므로, 미오세버린-유래 근육 세포물은 본래의 근관 배양물과 비교하여 '덜 분화된(less differentiated)' 상태일 것이다.

유미목 양서류 사지의 역분화된 근육 세포는 새로운 근육 조직을 재형성한다(4). 본 발명진의 결과는 BIO, LPA, SB203580 또는 SQ22536 이 세포물이 근육 근관으로 역분화하는 것을 억제하지 않음을 보여준다(도 3d). 또한, 발명진은 지방형성 세포 및 골형성 세포로 분화하는 것을 보여줌으로써, BIO, LPA, SB203580 또는 SQ22536 의 처리에 의한 다분화능 상태를 보여준다(도 4 및 도 5). 본 발명의 결과는 근아세포 역분화 제제인 리버신과 함께 siRNA-매개 p21 녹다운을 이용하여 세포물의 역분화를 유도하였다(11). p21 녹다운만 할 경우, 다분화능 세포를 제조하는데 불충분하였다(11). 본 발명에서는 리버신 처리 없이 BIO, LPA, SB203580

또는 SQ22536 을 처리하여 다분화능 상태를 유도하였다. 이러한 저분자 방법으로 세포물의 역분화를 유도할 수 있는 결과는 복합적인 생화학적 반응을 조절하는 저분자가 siRNA 방법보다 우수함을 보여준다.

전분화능(pluripotent) 상태는 3 배엽(내배엽, 중배엽 및 외배엽) 및 그의 파생된 세포로 분화할 수 있는 능력을 갖는 세포군으로 정의된다(2). 본 발명에서, 발명진은 포유류 근육 세포물에 BIO, SB203580 또는 SQ22536 을 처리하고 리버신을 처리하여 신경세포의 특징을 갖는 세포로 분화함을 보여준다(도 6). 저분자를 처리한 세포물은 신경세포로의 형태학적 변화를 보여주었다. 사이토칼라신(cytochalasin) B 또는 DMSO(Dimethyl sulfoxide) 처리와 같은 다른 인자에 의한 세포 스트레스로부터 유도되는 '전형적인' 신경세포와 다른 형태학적인 변화를 유도하기 때문에 이는 근육 세포 내의 신경발생으로 생각된다(28). 발명진은 신경 세포로의 전환을 확인하는 기능 테스트를 실시하였다(도 6d-6e). 이전에, 이러한 테스트는 전사 억제제 및 신경-제한 억제 인자(neuron-restrictive silencer factor)에 의해 억제된 신경 유전자를 활성화 시키는 REST-VP16 컨스트럭트를 도입한 근육세포에서 신경세포 전환을 보이기 위해 사용했었다(29). LPA 처리는 신경 세포 전환능을 나타내지 않았으며, 이는 G-단백질-결합 수용체의 활성화는 근육 세포물이 전분화능이 아닌 다분화능을 갖는데 요구됨을 가리킨다.

유미목 양서류 사지 재생 과정에 있어, 최근 연구는 역분화된 근관이 계통 제한된 재생 사지에서 새로운 근육 조직을 형성함을 보여준다(31). 그러므로, 본 발명의 포유류 근육 역분화를 유도하기 위한 저분자-기반 접근법은 자연에서 관찰되는 부분적 재생보다 더 큰 발생학적 가소성 얻기 위해 성인 포유류 골격근에 허용된다. 본 발명의 저분자-기반 접근법의 구성도를 도 7 에 나타내었다. 피부의 섬유아세포는 유미목 양서류 사지 재생과정 동안 다분화능군을 구성하는 것으로 생각된다(4, 31). 그러므로, 본 발명에서 저분자 방법은 양서류 피부 섬유아세포와 유사한 방식으로 작용하여 역분화된 포유류 근육 세포를 유도한다고 설명한다.

본 발명의 역분화 근육을 유도하기 위한 저분자-기반 방법은 추가 연구에 대한 수많은 가능성을 제공한다. 예를 들면, 인간 근육 조직검사는 환자-특이 다분화능 세포를 생산하는데 활용될 수 있다. 또한, 이러한

방법은 상처 치유의 포유류 모델에 적용할 수 있다. 본 발명에 사용된 저분자(BIO, LPA, SB203580 및 SQ22536)는 p21 발현을 하향 조절한다. 머피 로지스 라지(Murphy Roths Large) 마우스는 감소된 p21 발현과 관련된 개선된 상처 치유 능력을 보여준다(32). 그러므로, 이러한 저분자는 상처 치유를 개선하고 흉터를 감소시켜 국부의 의학적 적용의 기반을 형성할 수 있다. 본 발명의 결과는 표유류의 사지 재생을 유도하는 방법의 개발에 제공하며, 완전히 분화된 포유류 조직의 전분화능 줄기세포에 대한 새로운 접근법을 제시한다.

이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

관련 정부과제 표기

1. 당뇨병 치료제 개발을 위한 인슐린양(樣) 작용 저분자 화합물의 탐색과 특성 규명

(1) 과제고유번호: NRF-2012-003460

(2) 부처명: 교육과학기술부

(3) 연구관리 전문 기관: 한국연구재단

(4) 연구사업명: 일반연구자 지원사업/신진연구자지원사업

(5) 연구과제명: 당뇨병 치료제 개발을 위한 인슐린양(樣) 작용 저분자 화합물의 탐색과 특성 규명

(6) 기여율: 1/2

(7) 주관기관: 광주과학기술원

(8) 연구기간: 2012.05.01~2015.04.30

2. 암 미세환경 제어에 의한 새로운 항암 기전 및 항암 표적 발굴

(1) 과제고유번호: NRF-2012-000462

(2) 부처명: 교육과학기술부

(3) 연구관리 전문 기관: 한국연구재단
(4) 연구사업명: 일반연구자 지원사업/여성과학자지원사업
(5) 연구과제명: 암 미세환경 제어에 의한 새로운 항암 기전 및 항암 표적 발굴
(6) 기여율: 1/2
(7) 주관기관: 광주과학기술원
(8) 연구기간: 2012.05.01~2015.04.30

참조 문헌

1. Grafi, G. (2009) The complexity of cellular dedifferentiation: implications for regenerative medicine, Trends Biotechnol 27, 329-332.
2. Lyssiotis, C. A., Lairson, L. L., Boitano, A. E., Wurdak, H., Zhu, S., and Schultz, P. G. (2011) Chemical control of stem cell fate and developmental potential, Angew Chem Int Ed Engl 50, 200-242.
3. Xu, Y., Shi, Y., and Ding, S. (2008) A chemical approach to stem-cell biology and regenerative medicine, Nature 453, 338-344.
4. Tweedell, K. S. (2010) The urodele limb regeneration blastema: the cell potential, ScientificWorldJournal 10, 954-971.
5. Bryant, S. V., Endo, T., and Gardiner, D. M. (2002) Vertebrate limb regeneration and the origin of limb stem cells, Int J Dev Biol 46, 887-896.
6. Brockes, J. P., and Kumar, A. (2002) Plasticity and reprogramming of differentiated cells in amphibian regeneration, Nat Rev Mol Cell Biol 3, 566-574.
7. Brockes, J. P., and Kumar, A. (2008) Comparative aspects of animal regeneration, Annu Rev Cell Dev Biol 24, 525-549.
8. Endo, T. (2007) Stem cells and plasticity of skeletal muscle cell differentiation: potential application to cell therapy for degenerative muscular diseases, Regen Med 2, 243-256.

9. McGann, C. J., Odelberg, S. J., and Keating, M. T. (2001) Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract, Proc Natl Acad Sci U S A 98, 13699-13704.

10. Odelberg, S. J., Kollhoff, A., and Keating, M. T. (2000) Dedifferentiation of mammalian myotubes induced by msx1, Cell 103, 1099-1109.

23

11. Jung, D. W., and Williams, D. R. (2011) Novel chemically defined approach to produce multipotent cells from terminally differentiated tissue syncytia, ACS Chem Biol 6, 553562.

12. Pajcini, K. V., Corbel, S. Y., Sage, J., Pomerantz, J. H., and Blau, H. M. (2010) Transient inactivation of Rb and ARF yields regenerative cells from postmitotic mammalian muscle, Cell Stem Cell 7, 198-213.

13. Bruna, S., Dapas, B., Farra, R., Grassi, M., Pozzato, G., Giansante, C., Fiotti, N., and Grassi, G. (2011) Improving siRNA bio-distribution and minimizing side effects, Curr Drug Metab 12, 11-23.

14. Fedorov, Y., Anderson, E. M., Birmingham, A., Reynolds, A., Karpilow, J., Robinson, K., Leake, D., Marshall, W. S., and Khvorova, A. (2006) Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype, RNA 12, 1188-1196.

15. Perez, O. D., Chang, Y. T., Rosania, G., Sutherlin, D., and Schultz, P. G. (2002) Inhibition and reversal of myogenic differentiation by purine-based microtubule assembly inhibitors, Chem Biol 9, 475-483.

16. Duckmanton, A., Kumar, A., Chang, Y. T., and Brockes, J. P. (2005) A single-cell analysis of myogenic dedifferentiation induced by small molecules, Chem Biol 12, 11171126.

17. Rhim, J. H., Jang, I. S., Song, K. Y., Ha, M. K., Cho, S. C., Yeo, E. J., and Park, S. C. (2008) Lysophosphatidic acid and adenylyl cyclase inhibitor increase proliferation of senescent human diploid

fibroblasts by inhibiting adenosine monophosphate-activated protein kinase, Rejuvenation Res 11, 781-792.

18. Pajalunga, D., Mazzola, A., Salzano, A. M., Biferi, M. G., De Luca, G., and Crescenzi, M. (2007) Critical requirement for cell cycle inhibitors in sustaining nonproliferative states, J Cell Biol 176, 807-818. 19. Cuenda, A., and Rousseau, S. (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases, Biochim Biophys Acta 1773, 1358-1375.

20. de Carne Trecesson, S., Guillemin, Y., Belanger, A., Bernard, A. C., Preisser, L., Ravon, E., Gamelin, E., Juin, P., Barre, B., and Coqueret, O. (2011) Escape from p21-mediated Oncogene-induced Senescence Leads to Cell Dedifferentiation and Dependence on Antiapoptotic Bcl-xL and MCL1 Proteins, J Biol Chem 286, 12825-12838.

21. Tseng, A. S., Engel, F. B., and Keating, M. T. (2006) The GSK-3 inhibitor BIO promotes proliferation in mammalian cardiomyocytes, Chem Biol 13, 957-963.

22. Williams, D., Jung, D. W., Khersonsky, S. M., Heidary, N., Chang, Y. T., and Orlow, S. J. (2004) Identification of compounds that bind mitochondrial F1F0 ATPase by screening a triazine library for correction of albinism, Chem Biol 11, 1251-1259.

23. Kim, S. H., Choi, M., Lee, Y., Kim, Y. O., Ahn, D. S., Kim, Y. H., Kang, E. S., Lee, E. J., Jung, M., Cho, J. W., Williams, D. R., and Lee, H. C. (2010) Natural therapeutic magnesium lithospermate B potently protects the endothelium from hyperglycaemiainduced dysfunction, Cardiovasc Res 87, 713-722.

24. Myers, T. K., Andreuzza, S. E., and Franklin, D. S. (2004) p18INK4c and p27KIP1 are required for cell cycle arrest of differentiated myotubes, Exp Cell Res 300, 365-378.

25. Jung, D. W., Ha, H. H., Zheng, X., Chang, Y. T., and Williams, D. R. (2011) Novel use of fluorescent glucose analogues to identify a new

class of triazine-based insulin mimetics possessing useful secondary effects, Mol Biosyst 7, 346-358.

26. Gregory, C. A., Gunn, W. G., Peister, A., and Prockop, D. J. (2004) An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction, Anal Biochem 329, 77-84.

27. Bae, S., Bessho, Y., Hojo, M., and Kageyama, R. (2000) The bHLH gene Hes6, an inhibitor of Hes1, promotes neuronal differentiation, Development 127, 2933-2943.

28. 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.

29. Watanabe, Y., Kameoka, S., Gopalakrishnan, V., Aldape, K. D., Pan, Z. Z., Lang, F. F., and Majumder, S. (2004) Conversion of myoblasts to physiologically active neuronal phenotype, Genes Dev 18, 889-900.

30. Rosania, G. R., Chang, Y. T., Perez, O., Sutherlin, D., Dong, H., Lockhart, D. J., and Schultz, P. G. (2000) Myoseverin, a microtubule-binding molecule with novel cellular effects, Nat Biotechnol 18, 304-308.

31. Kragl, M., Knapp, D., Nacu, E., Khattak, S., Maden, M., Epperlein, H. H., and Tanaka, E. M. (2009) Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration, Nature 460, 60-65.

32. Bedelbaeva, K., Snyder, A., Gourevitch, D., Clark, L., Zhang, X. M., Leferovich, J., Cheverud, J. M., Lieberman, P., and Heber-Katz, E. (2010) Lack of p21 expression links cell cycle control and appendage regeneration in mice, Proc Natl Acad Sci U S A 107, 5845-5850.

33. 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.

34. Springer, M., Rando, T., and Blau, H. (1997) *Current Protocols in Human Genetics: Gene delivery to muscle*, Vol. 13.4, John Wiley & Sons, New York.

【특허청구범위】

【청구항 1】

다음의 단계를 포함하는 포유동물 분화세포로부터 다능성 세포(multipotent or pluripotent cells)의 화학적 제조방법:

(a) 포유동물부터 분화세포를 수득하는 단계; 및

(b) 상기 분화세포에 p21 하향-조절 유도 화합물을 처리하여 다능성 세포를 수득하는 단계.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 분화세포는 말기 분화세포(terminally differentiated cell)인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 분화세포는 골격근 세포, 심근 세포, 평활근 세포, 피부 세포, 연골 세포, 지방 세포 및 골세포로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 분화세포는 결합 조직, 신경 세포, 림프 세포, 맥관 세포, 신장 세포, 췌장 세포, 폐 세포, 요도 세포, 방광 세포, 위 세포, 간 세포, 소장 세포, 대장 세포 및 식도 세포로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 p21 하향-조절 유도 화합물은 BIO(6-bromoindirubin-3'-oxime), SB203580(4-[4-(4-fluorophenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-1H-imidazol-5-yl]pyridine), SQ22536(9-(Tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine) 또는 LPA(Lysophosphatidic acid)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 화합물인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 단계 (b)의 p21 하향-조절 유도 화합물 처리이후 역분화제를 단계 (b)에서 얻은 세포에 처리하여 전능성 세포(pluripotent cell)를 수득하는 단계를 추가적으로 포함하며, 상기 전능성 세포는 단계 (a)의 분화세포와 다른 3배엽 계통의 세포로 분화되는 능력을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 7】

제 6 항에 있어서, 상기 역분화제는 리버신(N6-사이클로헥실-N2-(4-모폴린-4-일-페닐)-9H-퓨린-2,6-다이아민), 트리코스타틴 A(trichostatin A), 발프론산(valproic acid), 부페닐(bupheny1) 및 5-아자시티딘(5-azacytidine)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나의 화합물인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 8】

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 단계 (b)의 p21 하향-조절 유도 화합물 처리이후 분화 유도제를 단계 (b)에서 얻은 세포에 처리하여 단계 (b)의 분화세포와 동일 3배엽 계통의 다른 세포 리니지(cell lineage)로 분화시키는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 9】

제 3 항에 있어서, 상기 분화세포는 골격근 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 10】

상기 제 1 항의 방법에 따라 제조된 다능성 세포.

【청구항 11】

상기 제 6 항의 방법에 따라 제조된 전능성 세포.

【청구항 12】

다음의 단계를 포함하는 포유동물 조직 또는 기관의 재생(regeneration)방법:

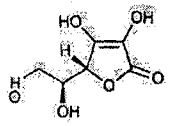
(a) 포유동물부터 분화세포를 수득하는 단계;

(b) 상기 분화세포에 p21 하향-조절 유도 화합물을 처리하여 다능성 세포를 수득하는 단계; 및

(c) 상기 다능성 세포를 원하는 조직 또는 기관으로 분화시키는 단계.

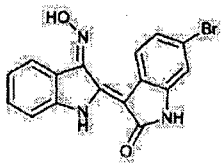
도 1

1



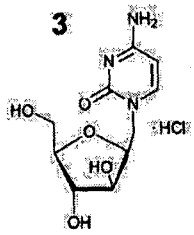
L-ascorbic acid

2



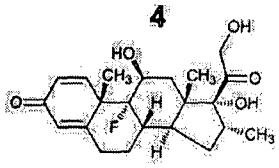
BIO

3



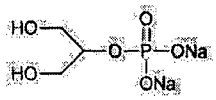
Cytosine b-D-arabinofuranoside hydrochloride (AraC)

4



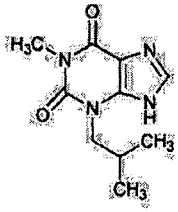
Dexamethasone

5



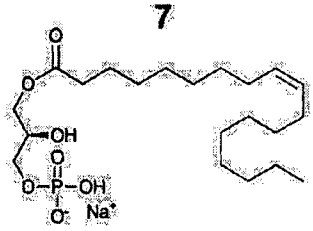
β-glycerophosphate disodium

6



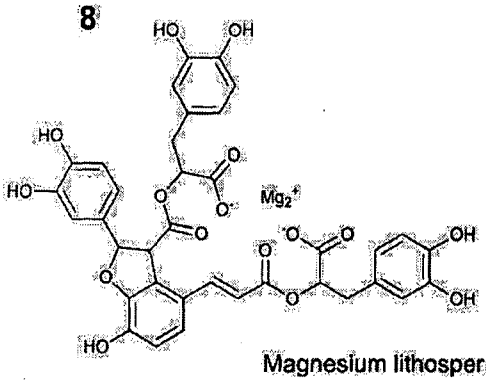
3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)

7



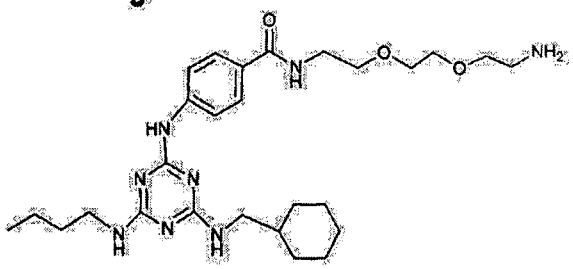
Lysophosphatidic acid

8



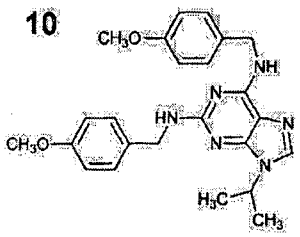
Magnesium lithospermate B

9



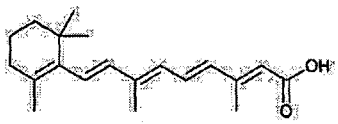
MPc11

10



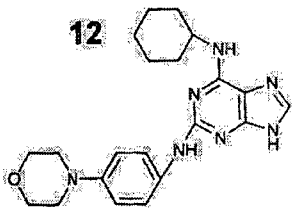
Myoseverin

11



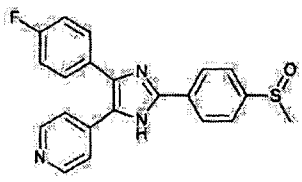
Retinoic acid

12



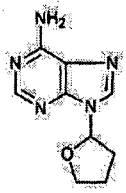
Reversine

13



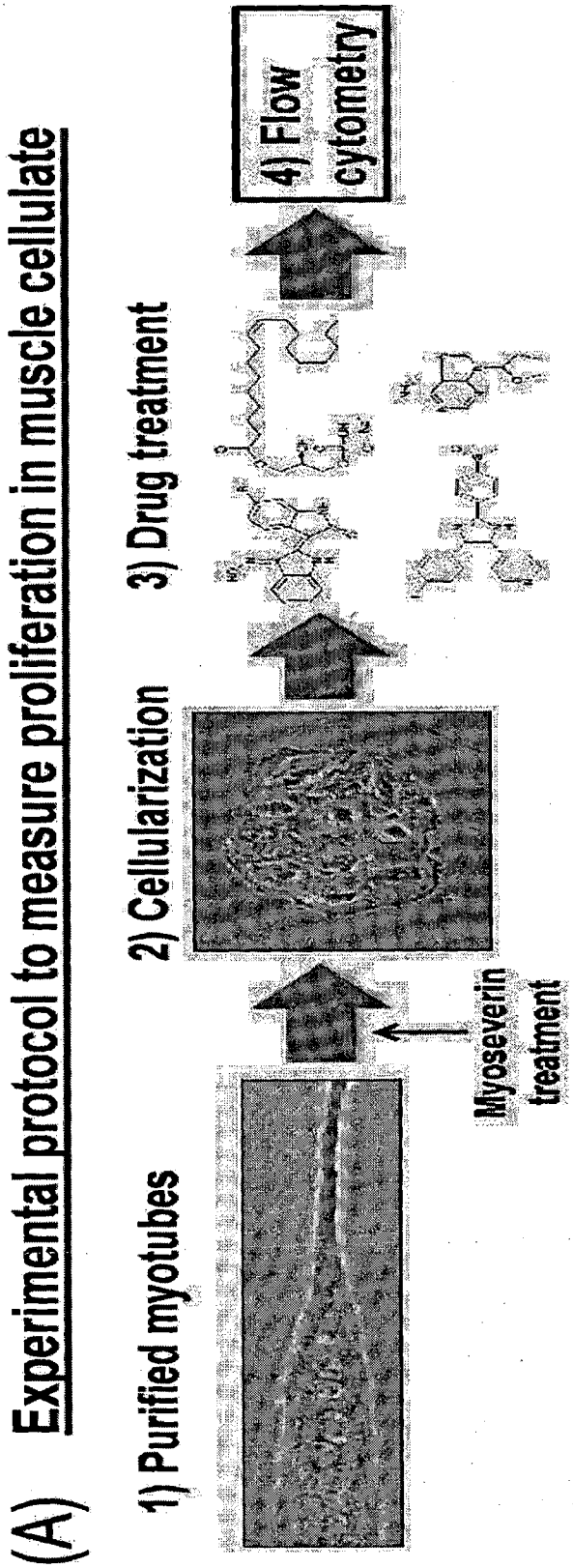
SB203580

14

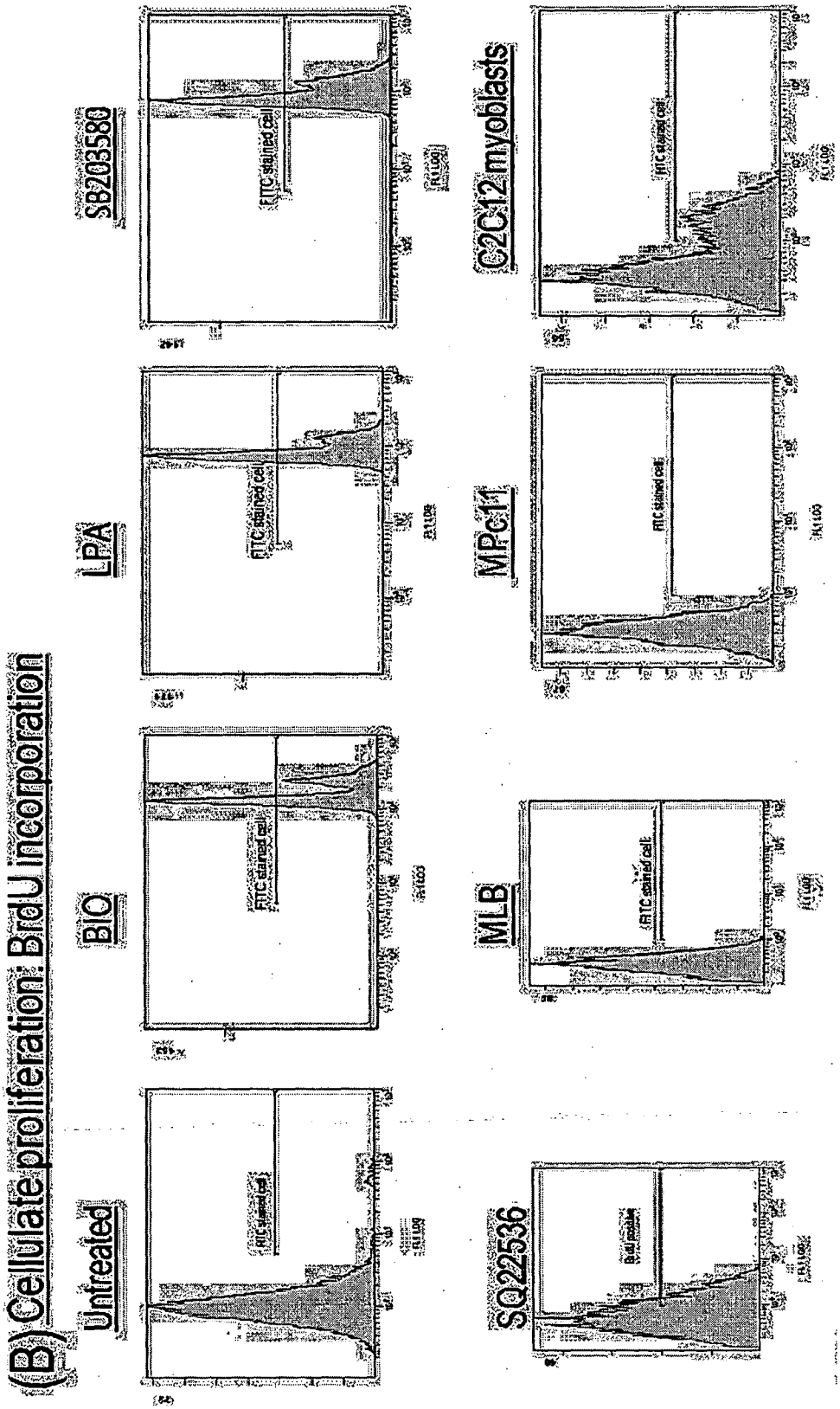


SQ22536

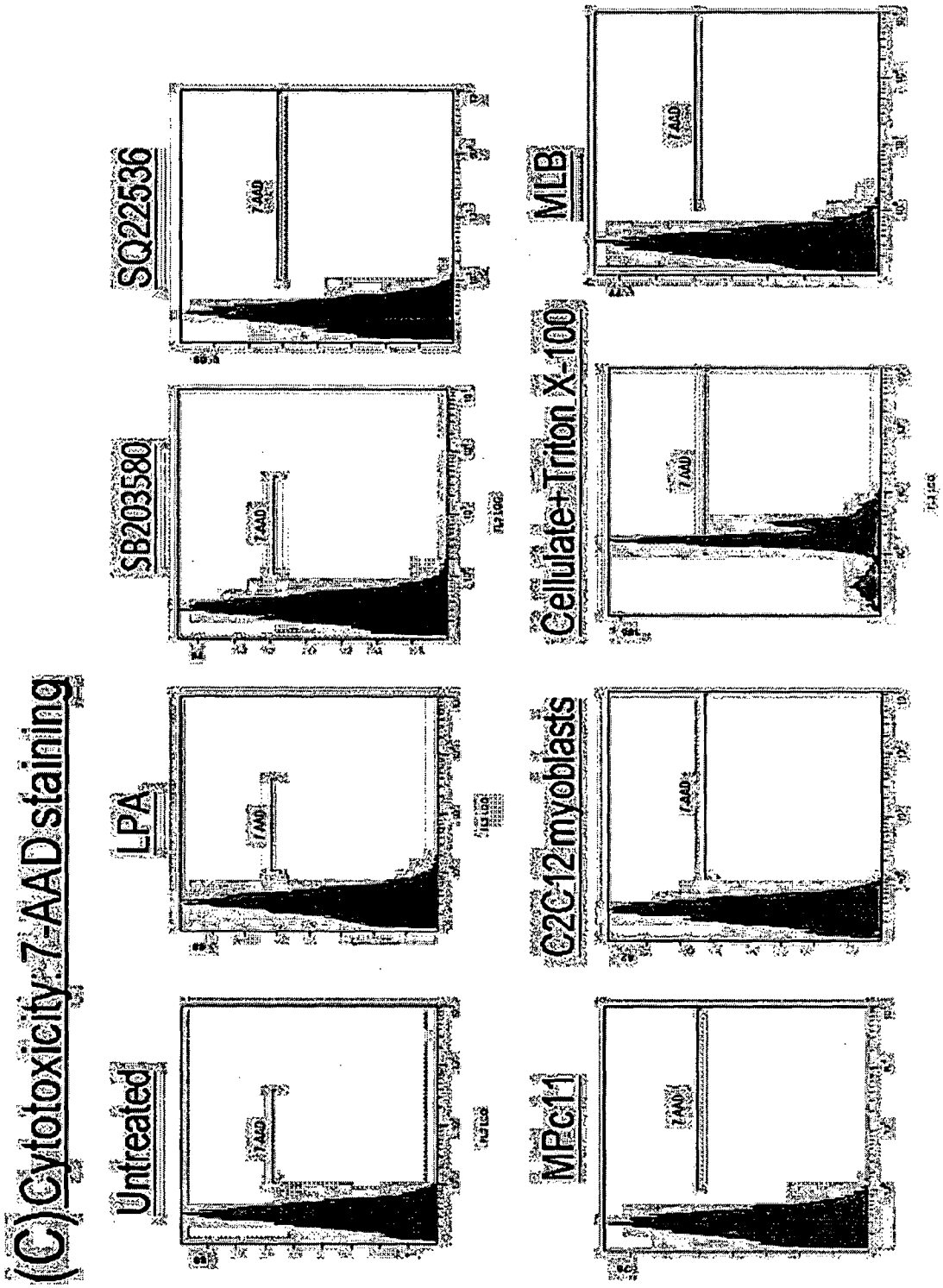
도 2a


(A) Experimental protocol to measure proliferation in muscle cellulate
1) Purified myotubes
Myoseverin treatment
2) Cellularization
3) Drug treatment
4) Flow cytometry

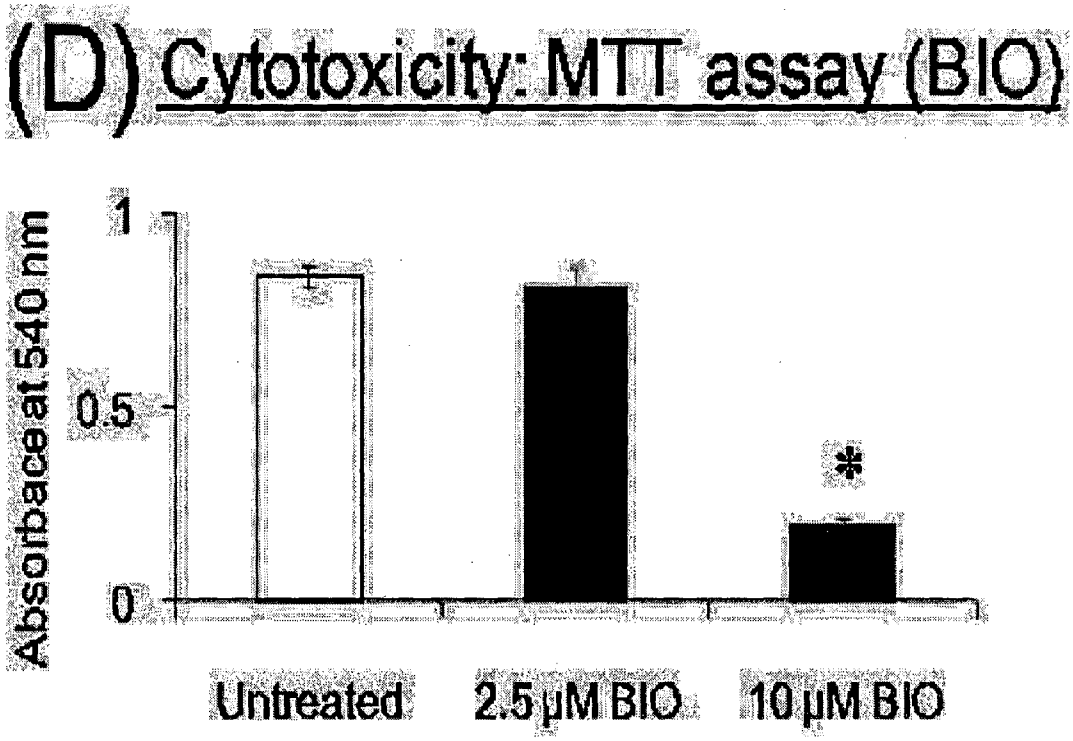
도 2b


(B) Cellular proliferation: BrdU incorporation
Untreated
BIO
LPA
SB203580
SQ22536
MLB
MPC11
C2C12 myoblasts
FITC stained cell
BrdU incorporation

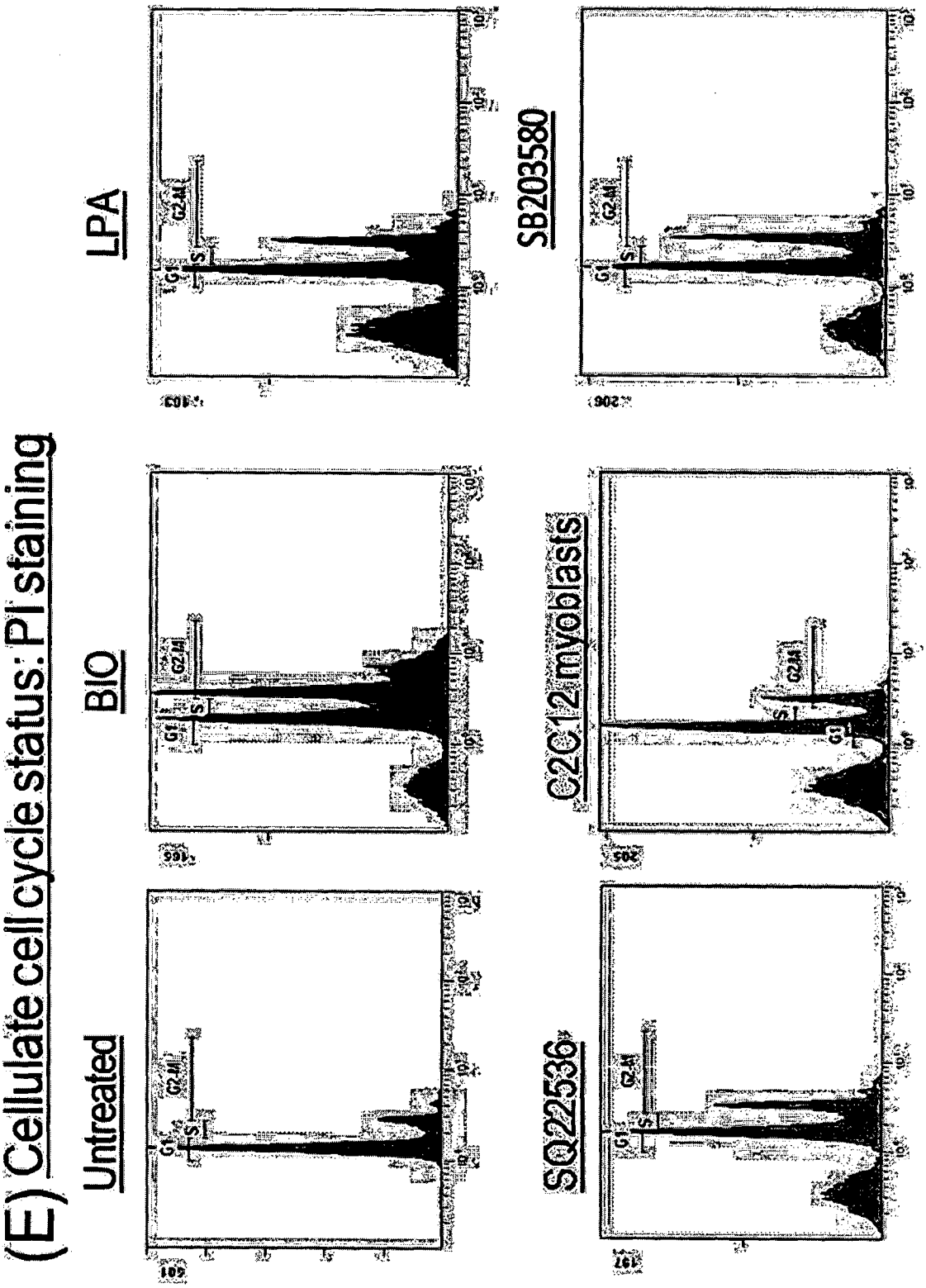
도 2c


(C) Cytotoxicity: 7-AAD staining
Untreated
LPA
SB203580
SQ22536
MRc1-1
C2C12 myoblasts
Cellulase+Triton X-100
MLB
7AAD

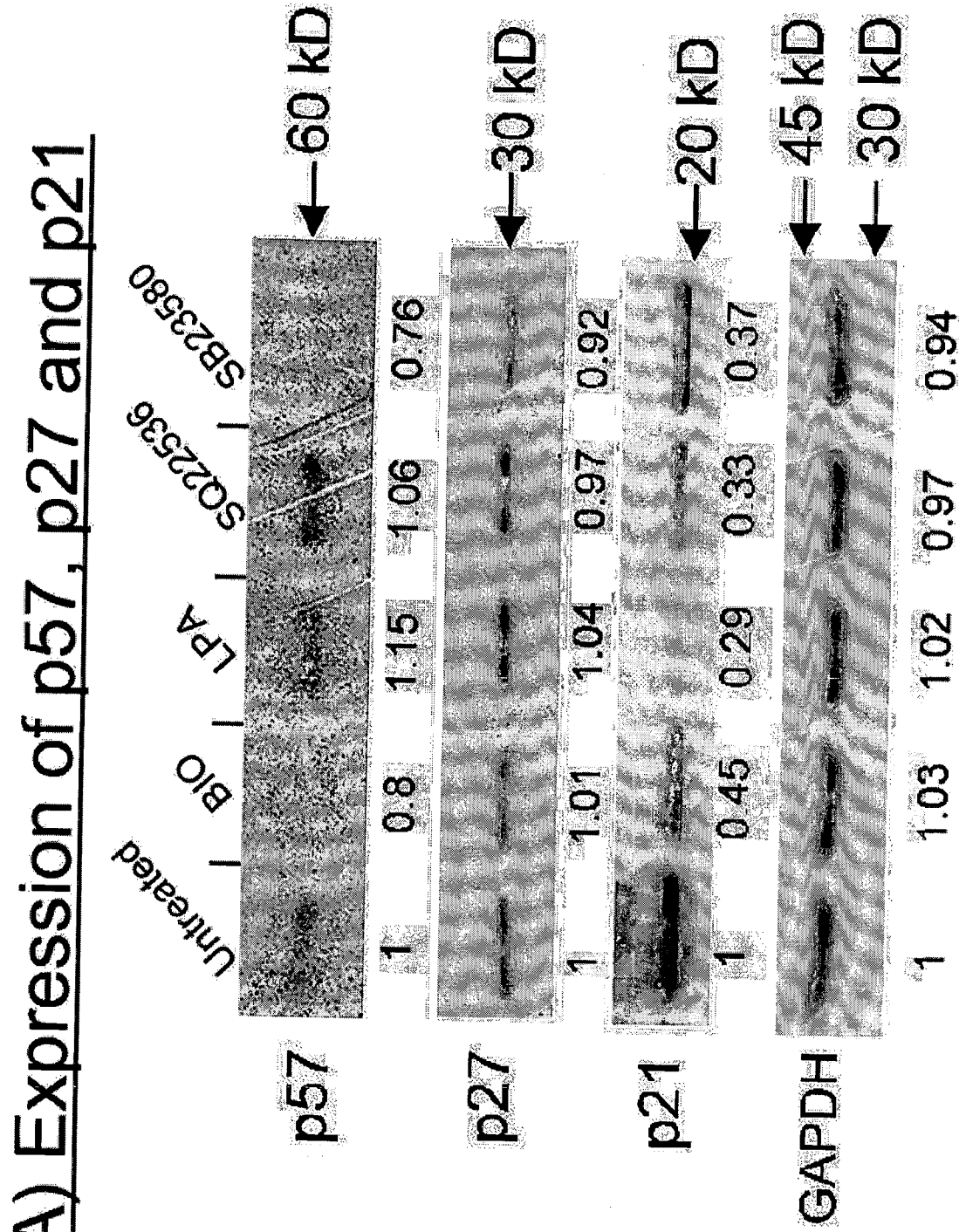
도 2d


(D) Cytotoxicity: MTT assay (BIO)
Absorbace at 540 nm
1
0.5
0
*
Untreated
2.5 μM BIO
10 μM BIO

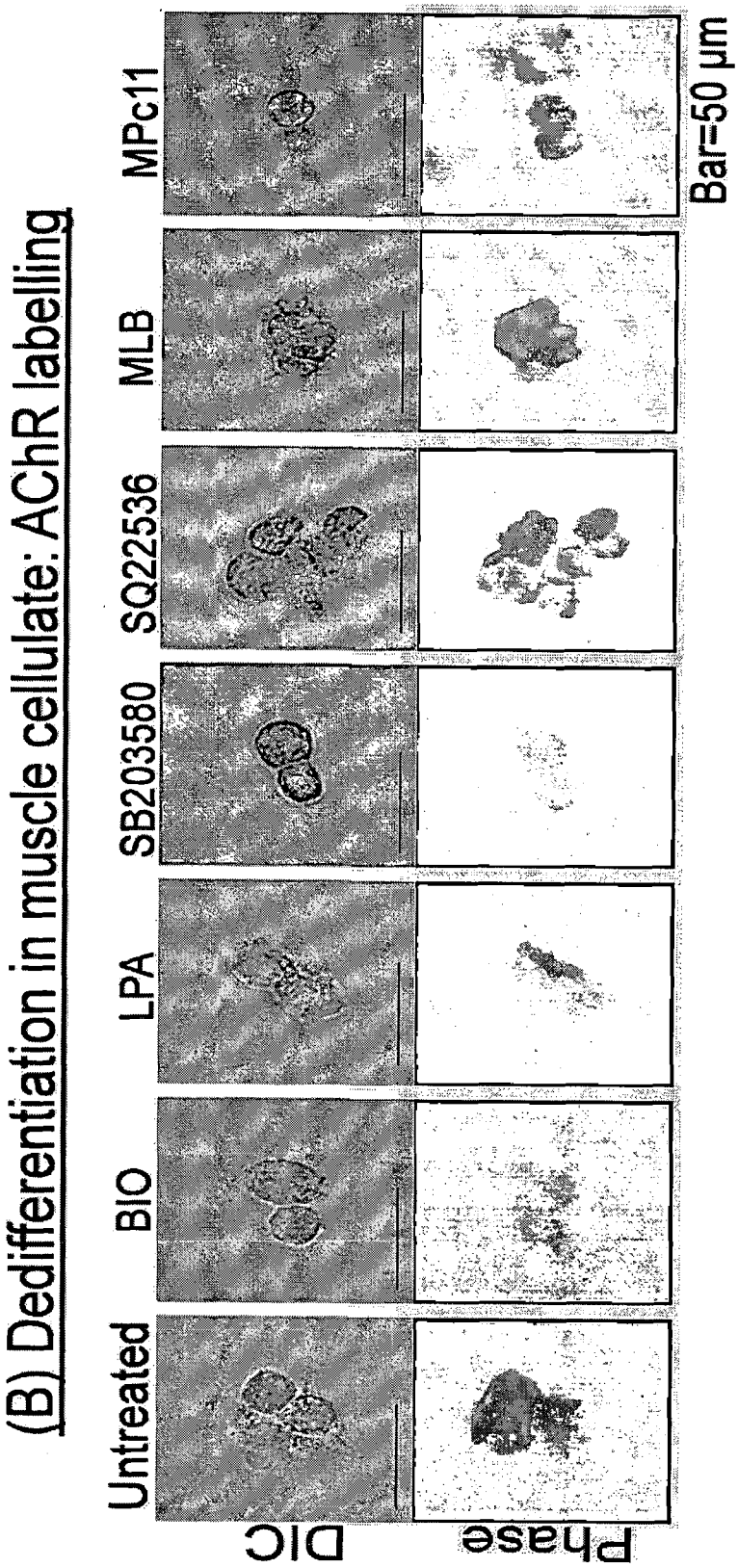
도 2e


(E) Cellulate cell cycle status: PI staining
Untreated
BIO
C2C12 myoblasts
LPA
SB203580
SQ22536
G1
S
G2/M

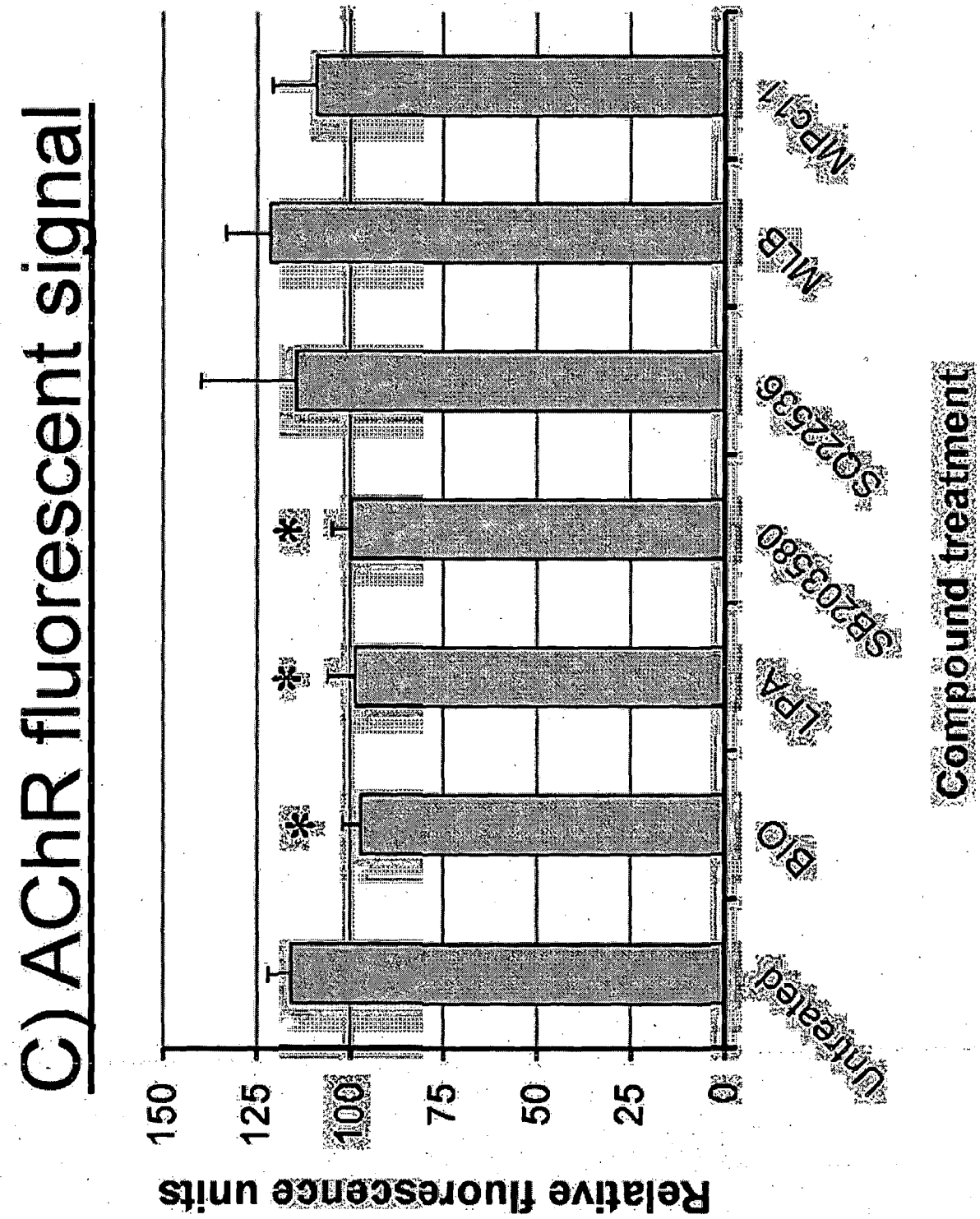
도 3a


(A) Expression of p57, p27 and p21
Untreated
Bio
LPA
SO2536
SB23580
p57
p27
p21
GAPDH
60 kD
30 kD
20 kD
45 kD
30 kD
1
0.8
1.15
1.06
0.76
1
1.01
1.04
0.97
0.92
1
0.45
0.29
0.33
0.37
1
1.03
1.02
0.97
0.94

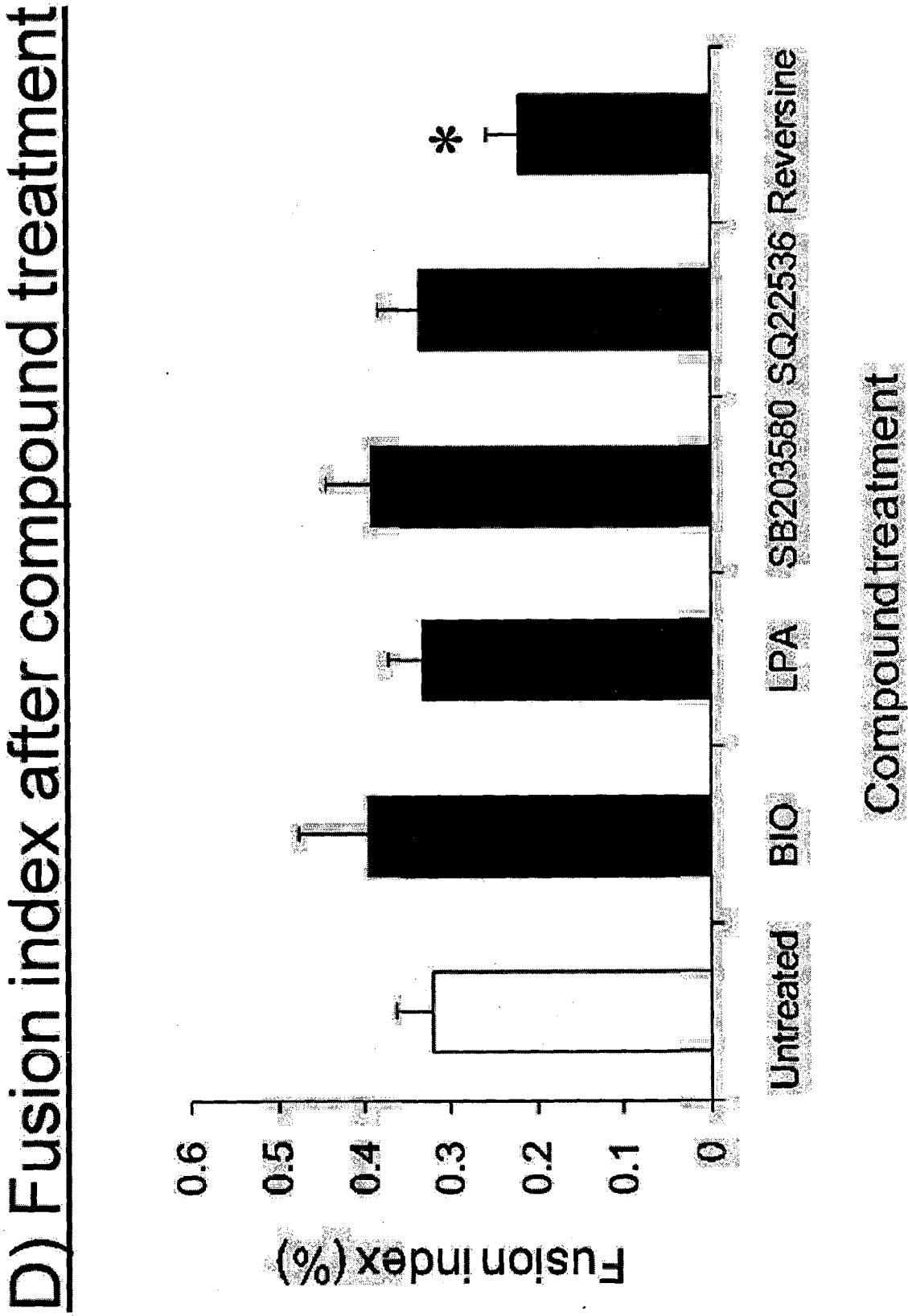
도 3b


(B) Dedifferentiation in muscle cellulate: AChR labelling
Untreated
BIO
LPA
SB203580
SQ22536
MLB
MPc11
DIC
Phase
Bar=50 μm

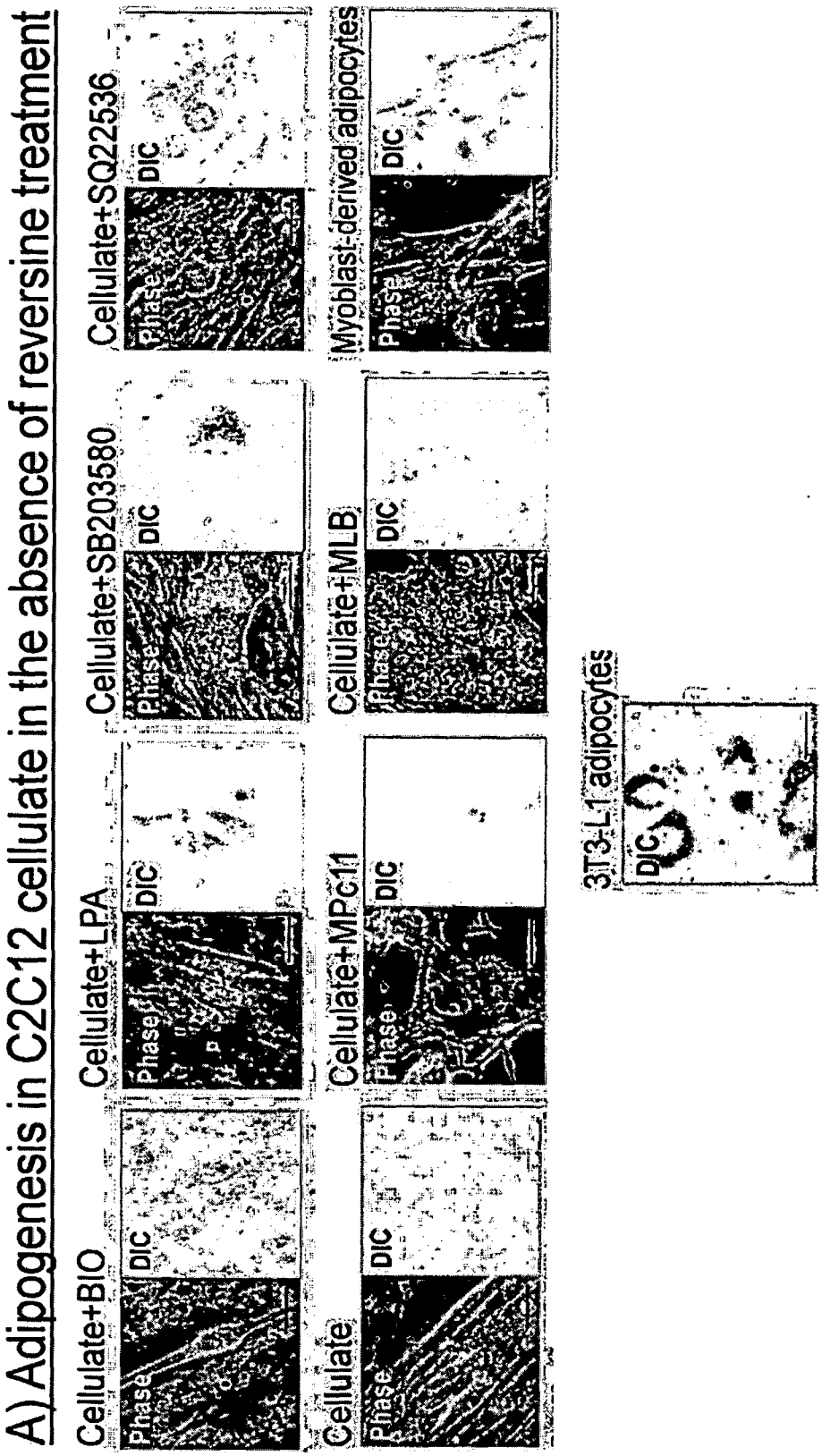
도 3c


C) AChR fluorescent signal
Relative fluorescence units
150
125
100
75
50
25
0
Unstimulated
Bio
LPA
SB203580
SQ22536
MLB
MPG1
Compound treatment

도 3d


D) Fusion index after compound treatment
Fusion index (%)
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
*
Untreated
BIO
LPA
SB203580
SQ22536
Reversine
Compound treatment

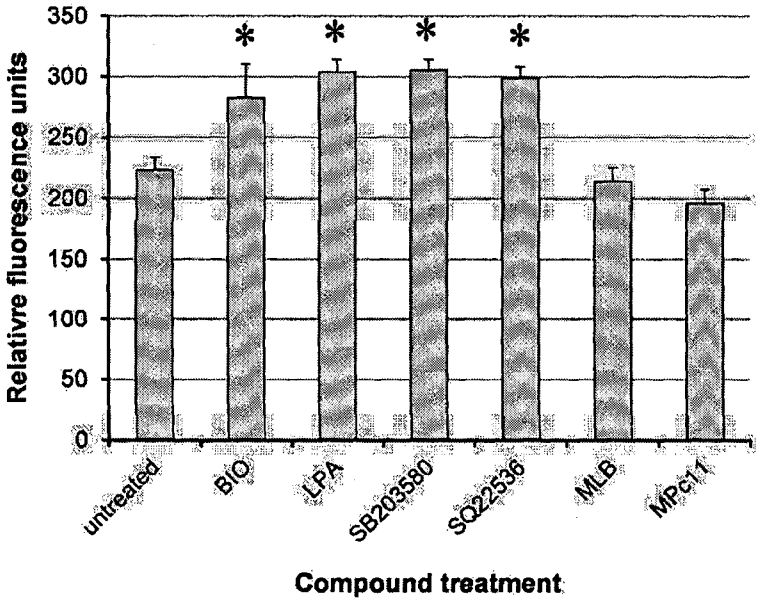
도 4a


A) Adipogenesis in C2C12 cellulate in the absence of reversine treatment
Cellulate+BIO
Cellulate+LPA
Cellulate+SB203580
Cellulate+SQ22536
Cellulate
Cellulate+MPC11
Cellulate+MLB
Myoblast-derived adipocytes
3T3-L1 adipocytes
Phase
DIC

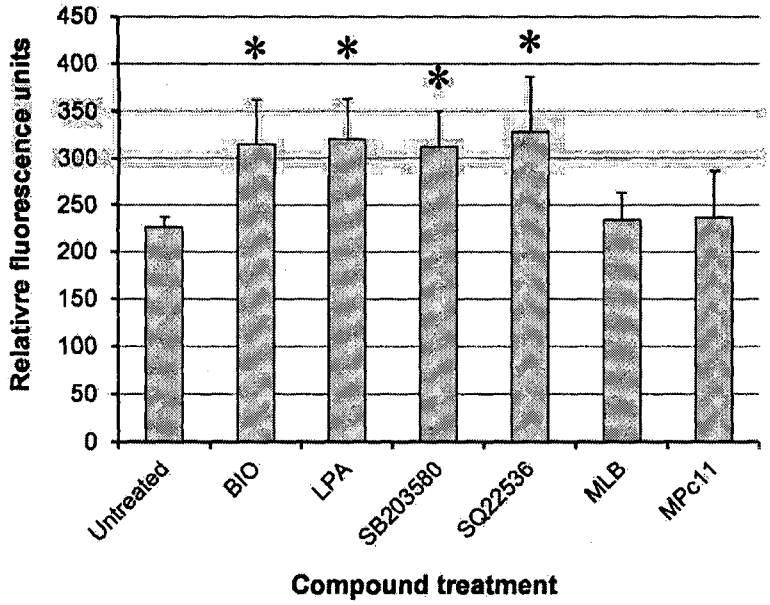
도 4b

B) Lipid accumulation in cellulate

Bi) Without reversine treatment



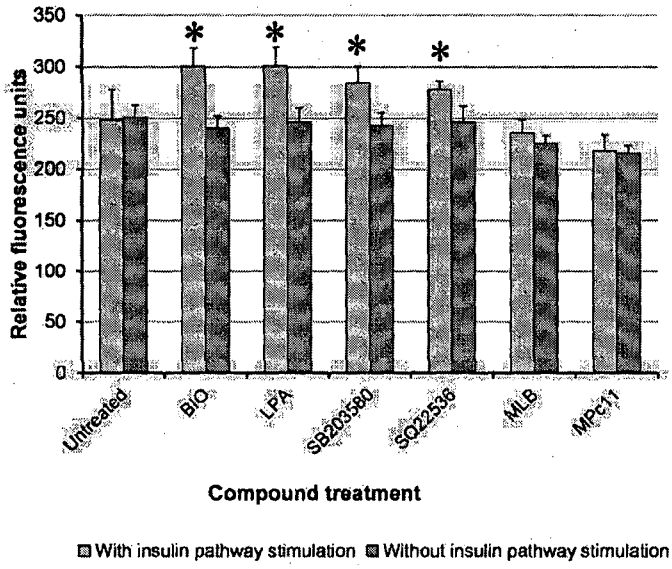
Bii) With reversine treatment



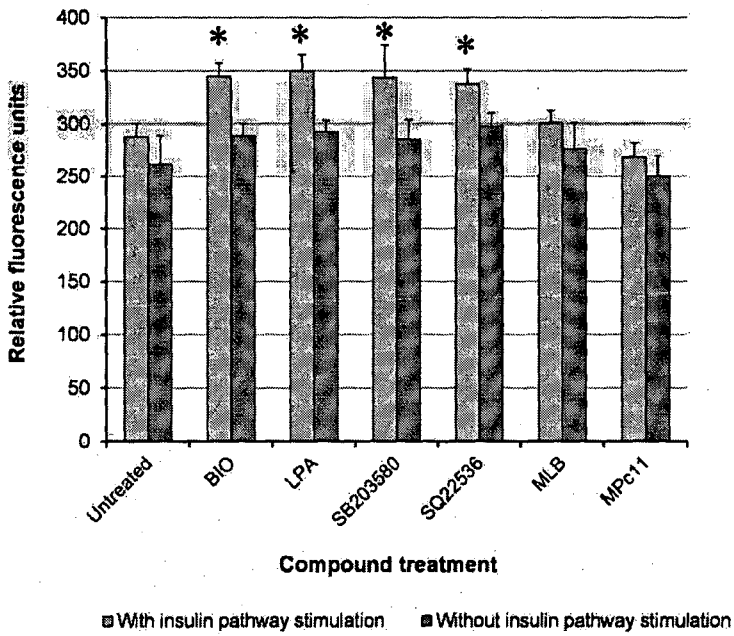
도 4c

C) Insulin pathway-mediated glucose uptake

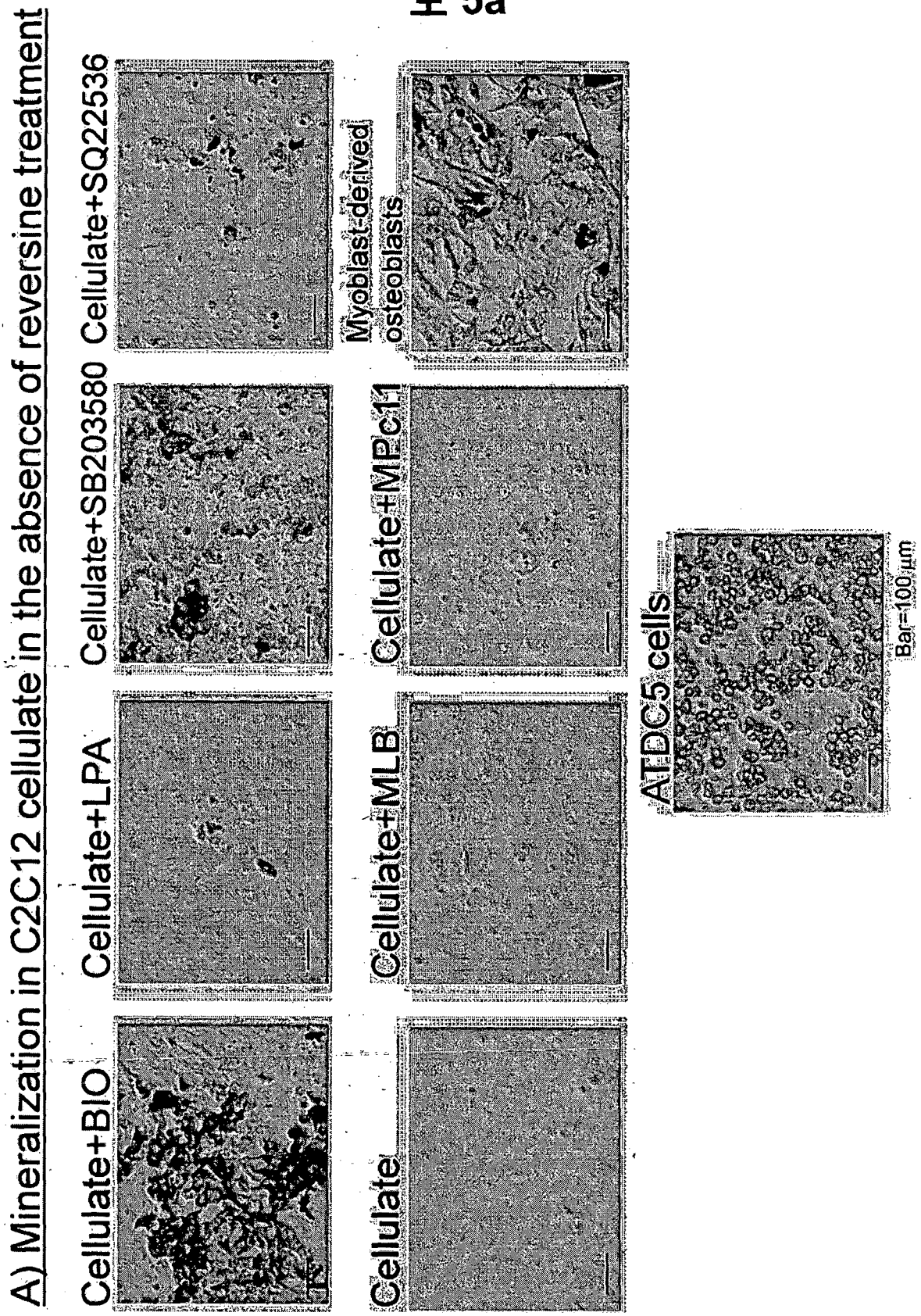
Ci) Without reversine treatment



Cii) With reversine treatment

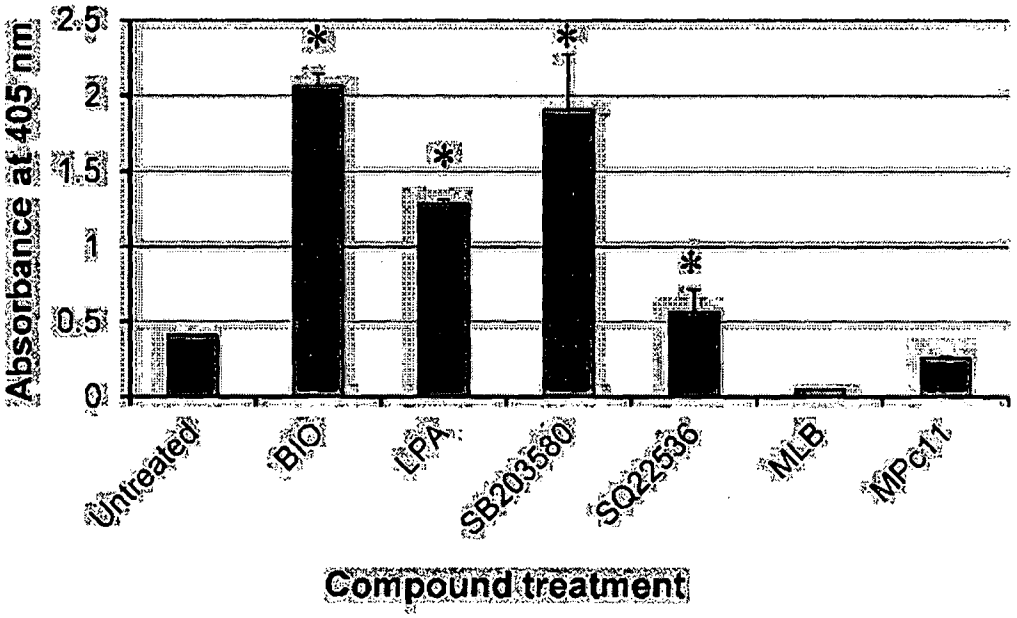


도 5a

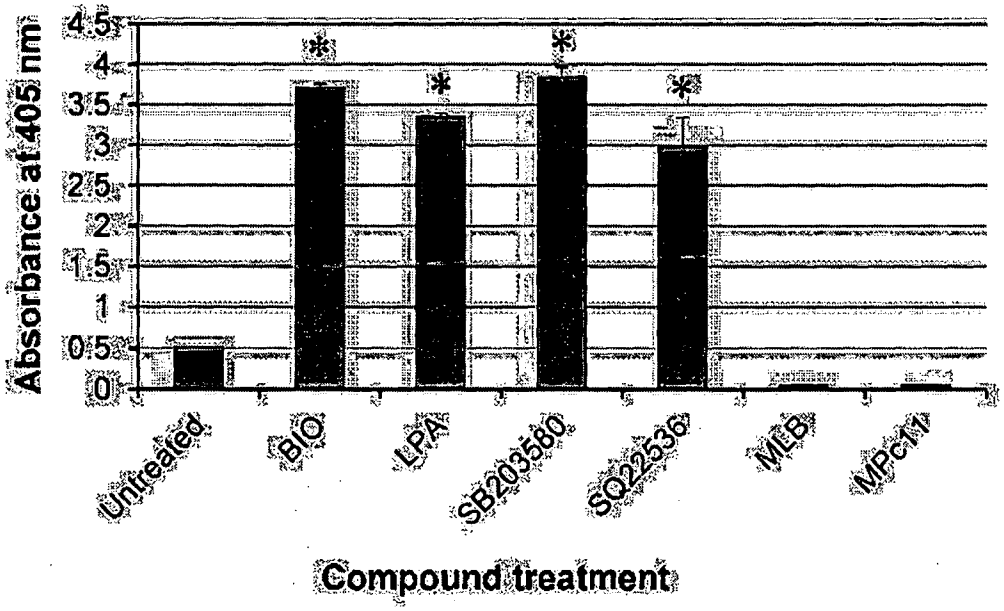

A) Mineralization in C2C12 cellulate in the absence of reversine treatment
Cellulate+BIO
Cellulate+LPA
Cellulate+SB203580
Cellulate+SQ22536
Cellulate
Cellulate+MLB
Cellulate+MPC11
Myoblast-derived osteoblasts
ATDC5 cells
Bar=100 μm

도 5b

Bi) Without reversine treatment



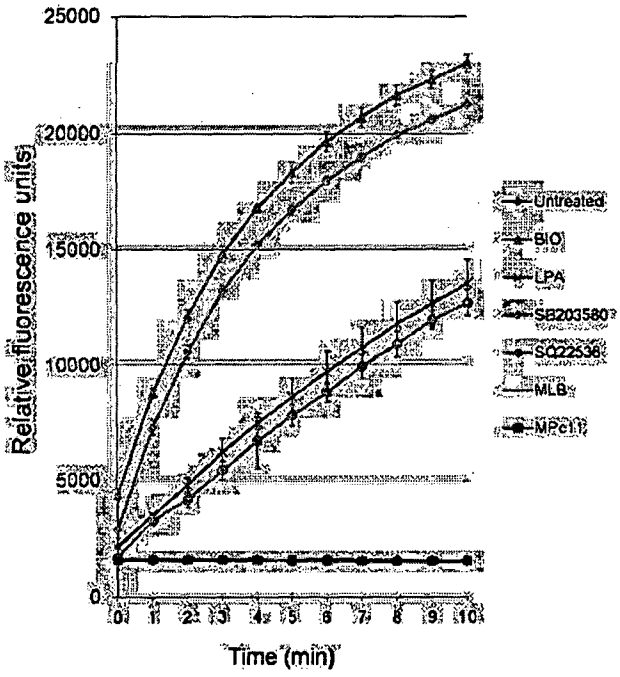
Bii) With reversine treatment



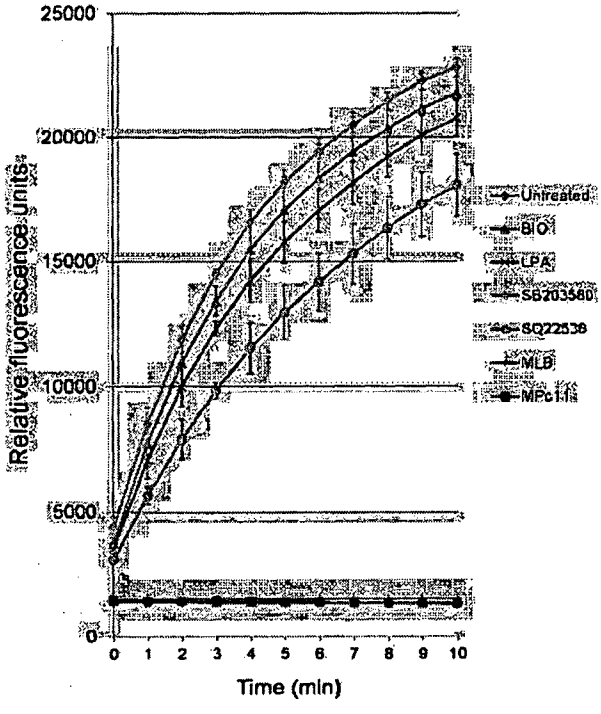
도 5c

C) Alkaline phosphate activity in cellulate

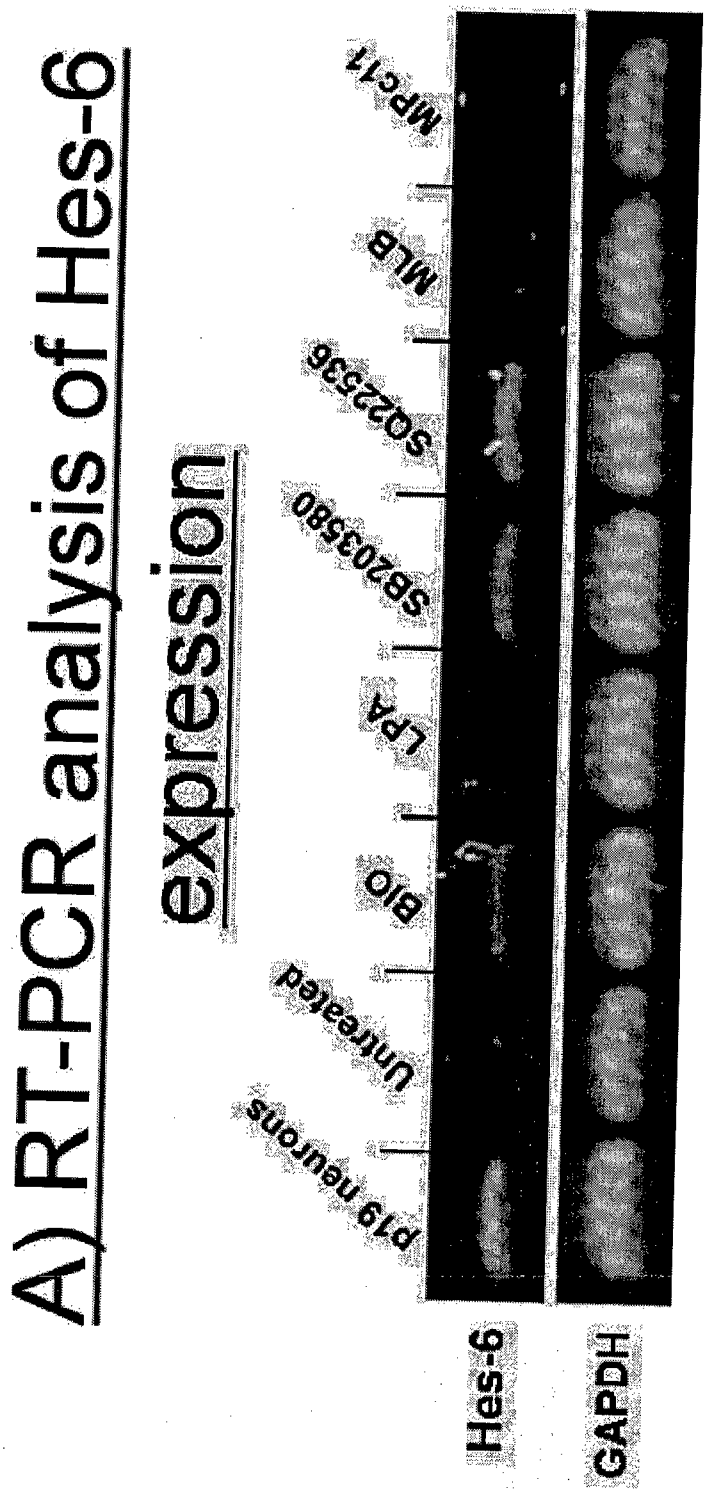
Ci) Without reversine treatment



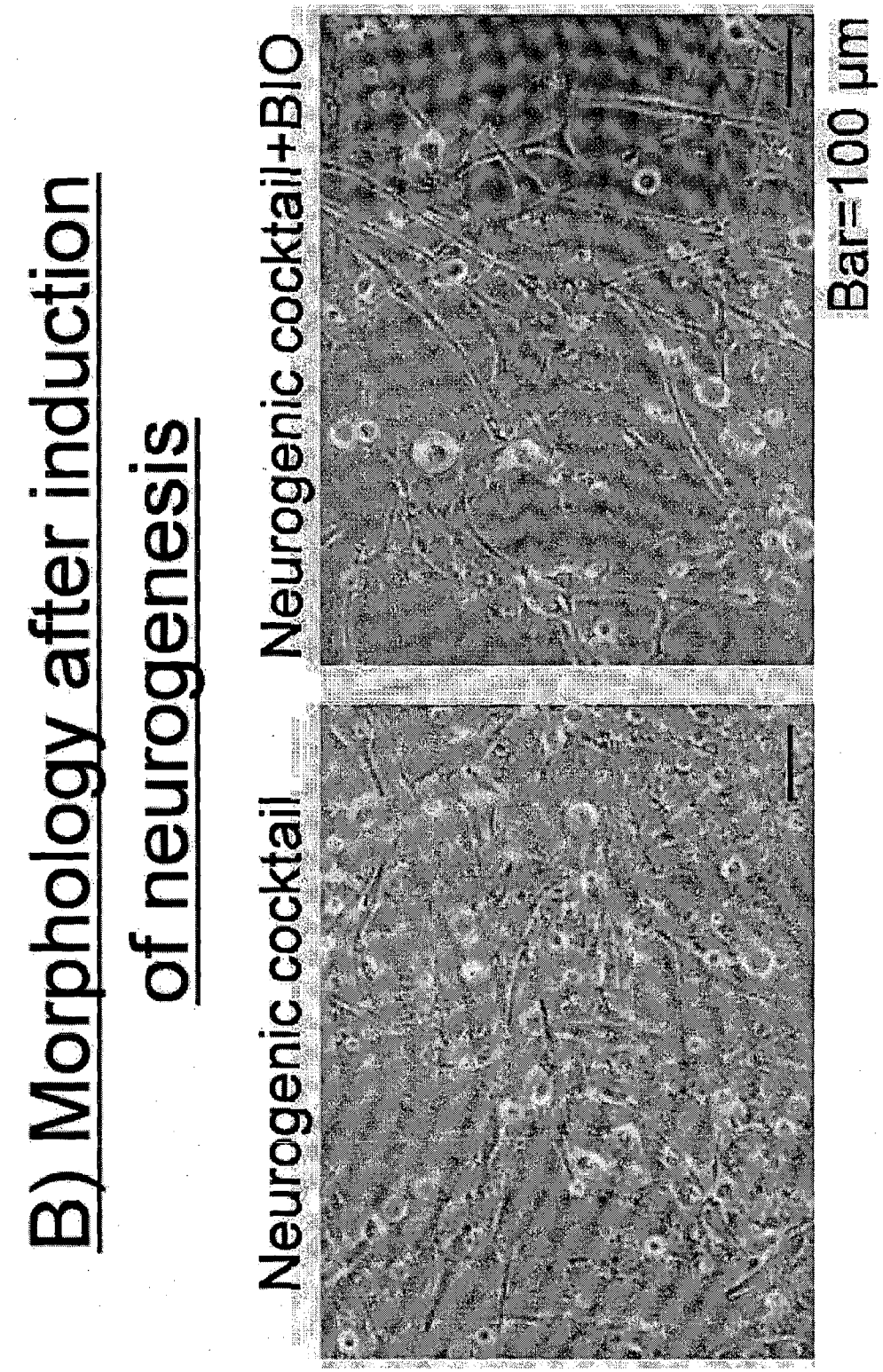
Cii) With reversine treatment



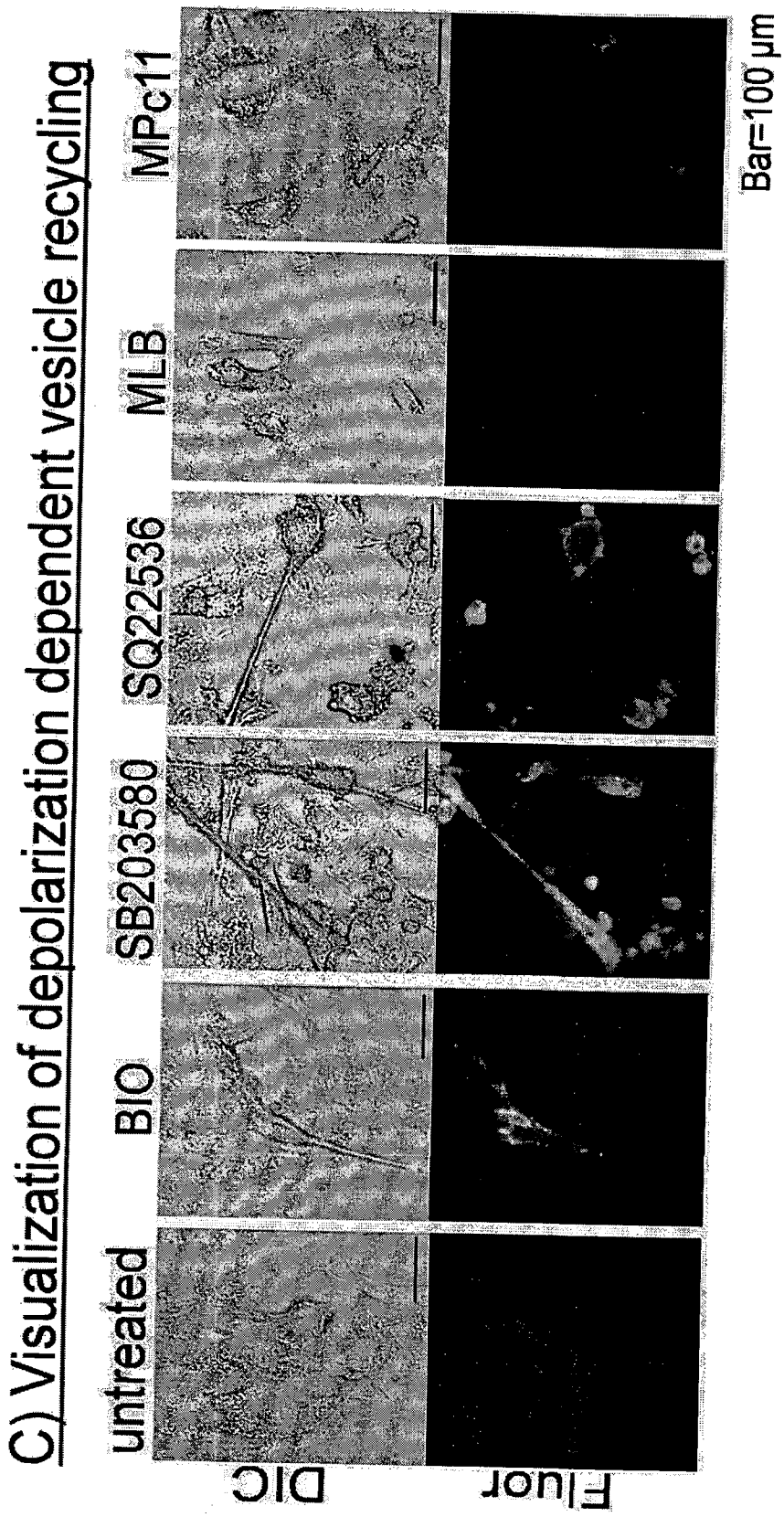
도 6a


A) RT-PCR analysis of Hes-6 expression
P19 neurons
Untreated
Bio
LPA
SB203580
SO22536
MLB
MPc11
Hes-6
GAPDH

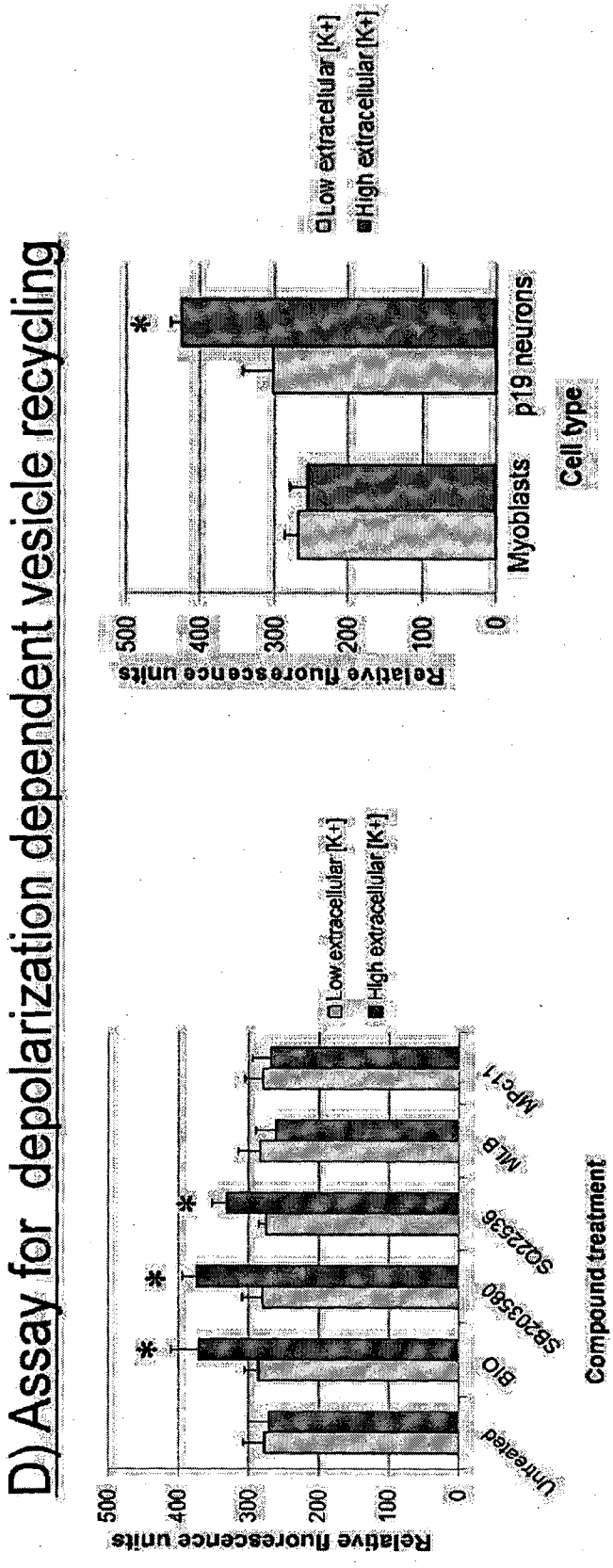
도 6b


B) Morphology after induction of neurogenesis
Neurogenic cocktail
Neurogenic cocktail+BIO
Bar=100 μm

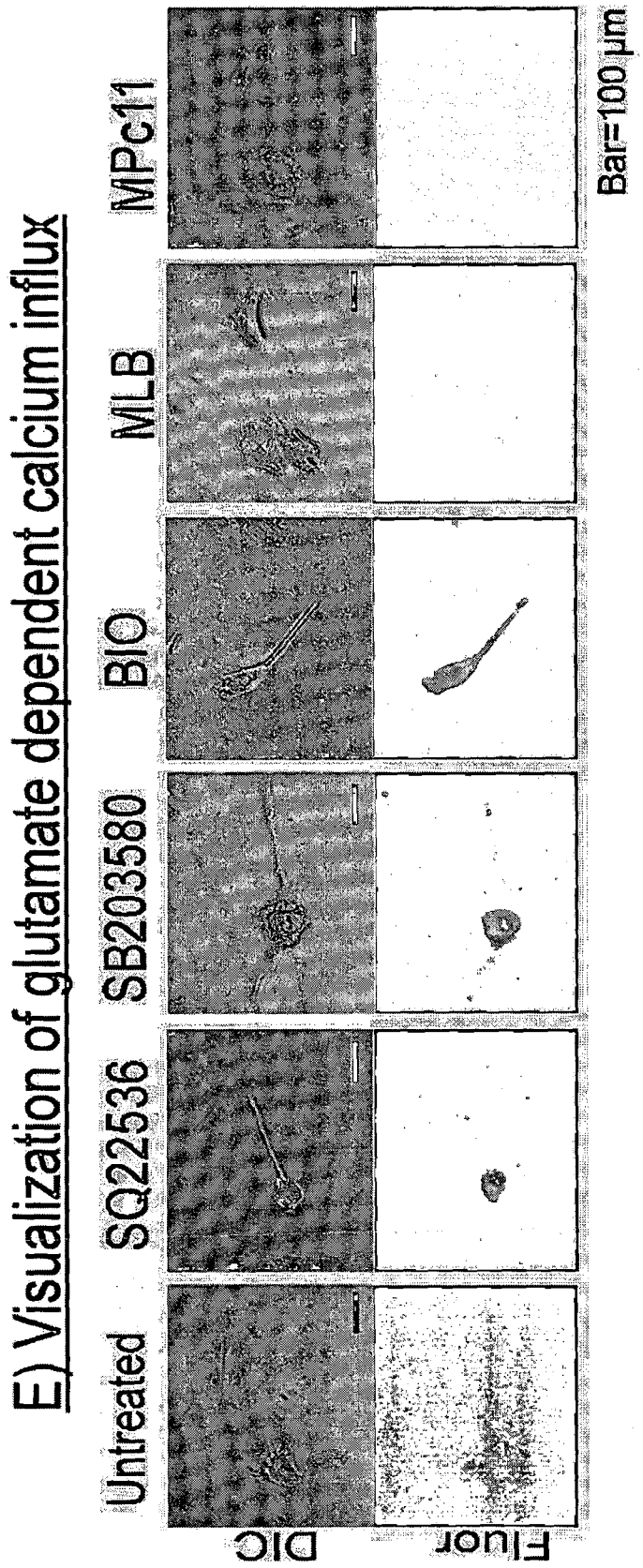
도 6c


C) Visualization of depolarization dependent vesicle recycling
untreated
BIO
SB203580
SQ22536
MLB
MPc11
DIC
Fluor
Bar=100 μm

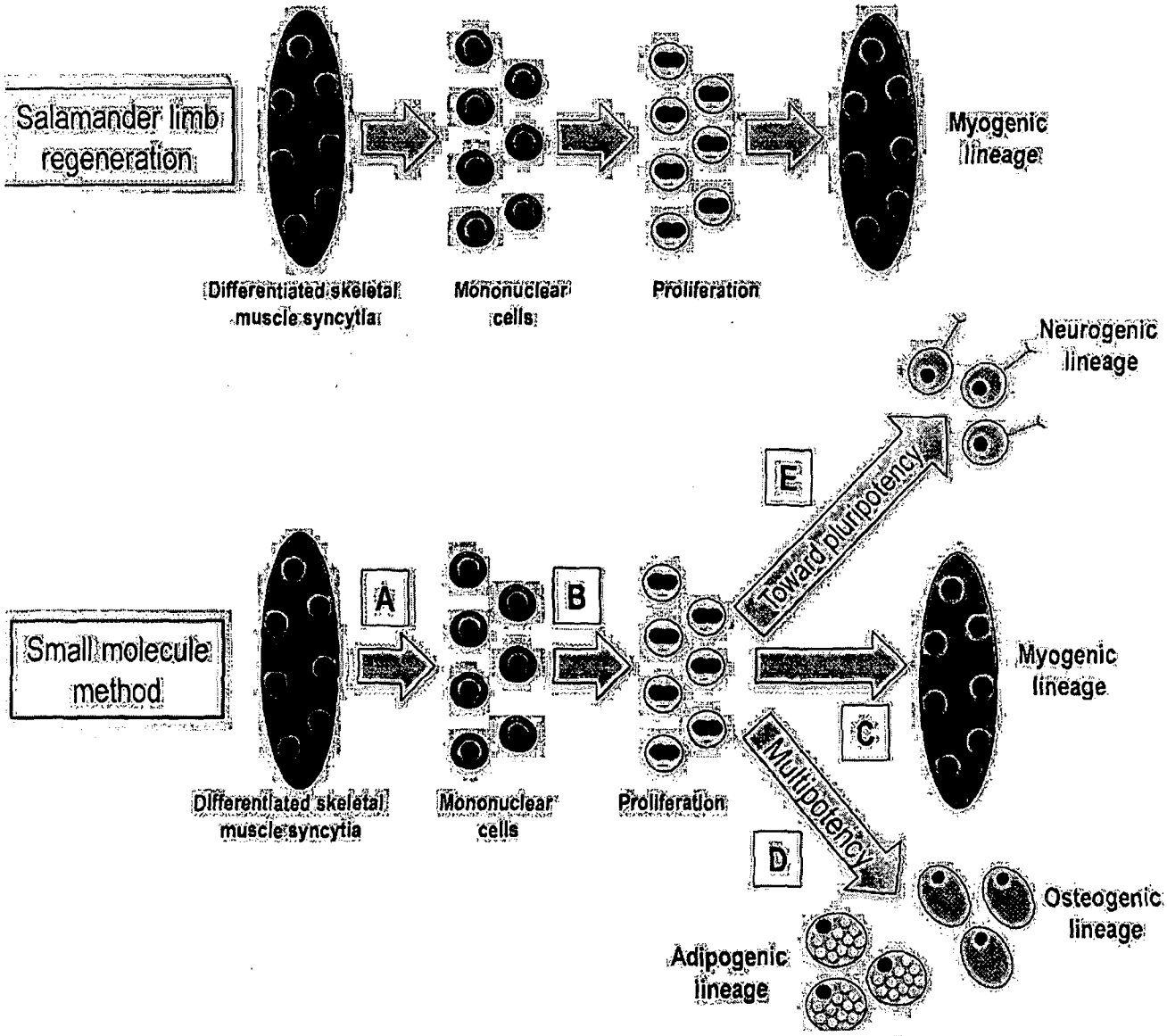
도 6d


D) Assay for depolarization dependent vesicle recycling
Low extracellular [K+]
High extracellular [K+]
Relative fluorescence units
0
100
200
300
400
500
Untreated
BIO
Sb203580
SO22536
MLB
MPC11
Compound treatment
Low extracellular [K+]
High extracellular [K+]
Relative fluorescence units
0
100
200
300
400
500
Myoblasts
p19 neurons
Cell type

도 6e


E) Visualization of glutamate dependent calcium influx
Untreated
SQ22536
SB203580
BIO
MLB
MPc11
DIC
Fluor
Bar=100 μm

도 7



Key:

A 20 μM myoseverin for 48 h

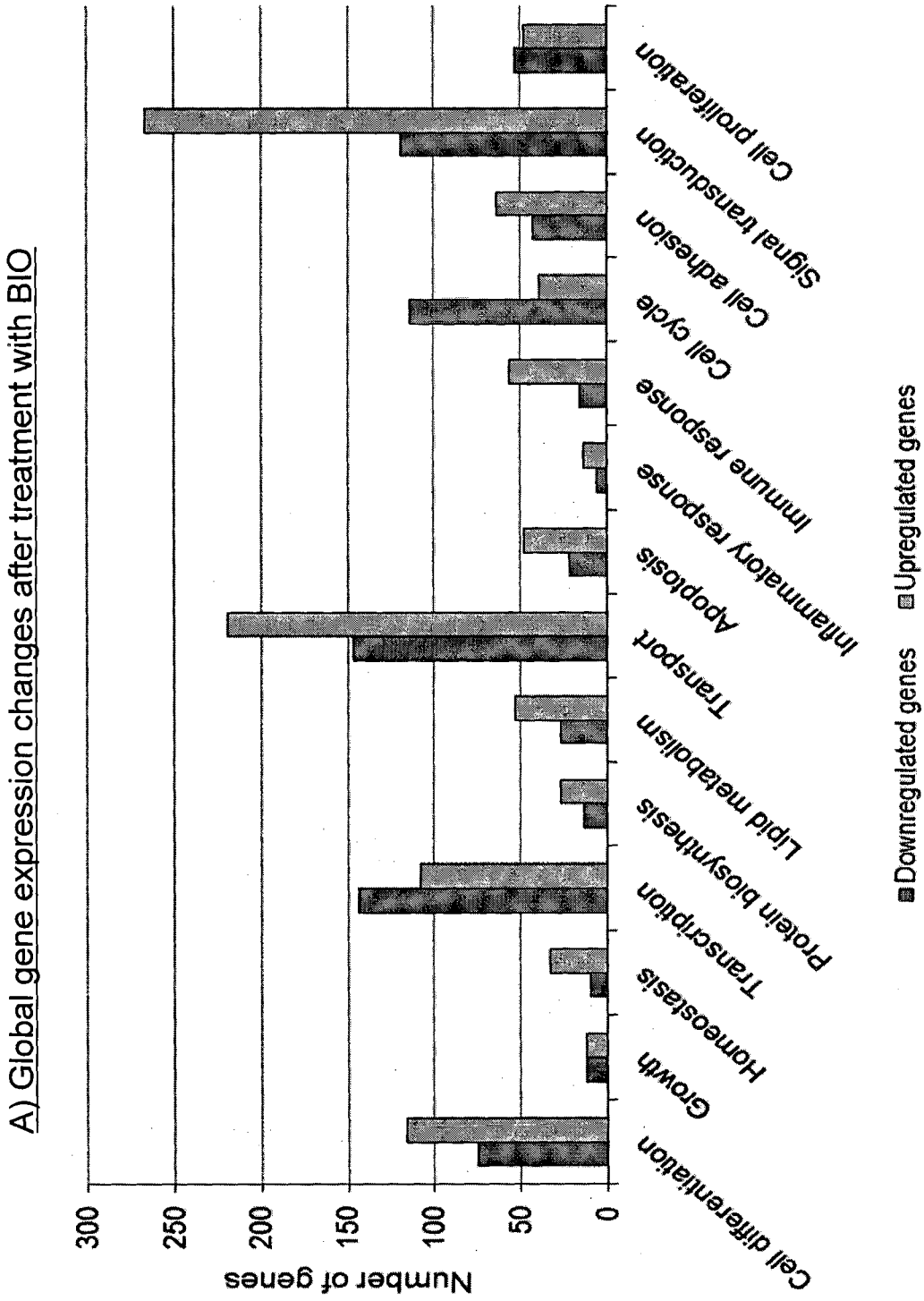
B 2.5 μM BIO or 10 μM SB203580 or 300 μM SQ22536 (48 h treatment).

C Culture in media containing 2% horse serum for 7 d

D Adipogenesis: 100 nM insulin, 5 mM dexamethasone, 1 μM rosiglitazone and 0.5 mM IBMX for 48 h, followed by 100 nM insulin and 1 μM rosiglitazone for 7 days. Osteogenesis: 50 μg/mL ascorbic acid-2-phosphate, 0.1 μM dexamethasone, and 10 mM β-glycerophosphate for 10 d

E 250 nM reversine for 48 h and 1.5 μM retinoic acid, N2 supplement for 7 days

도 8a

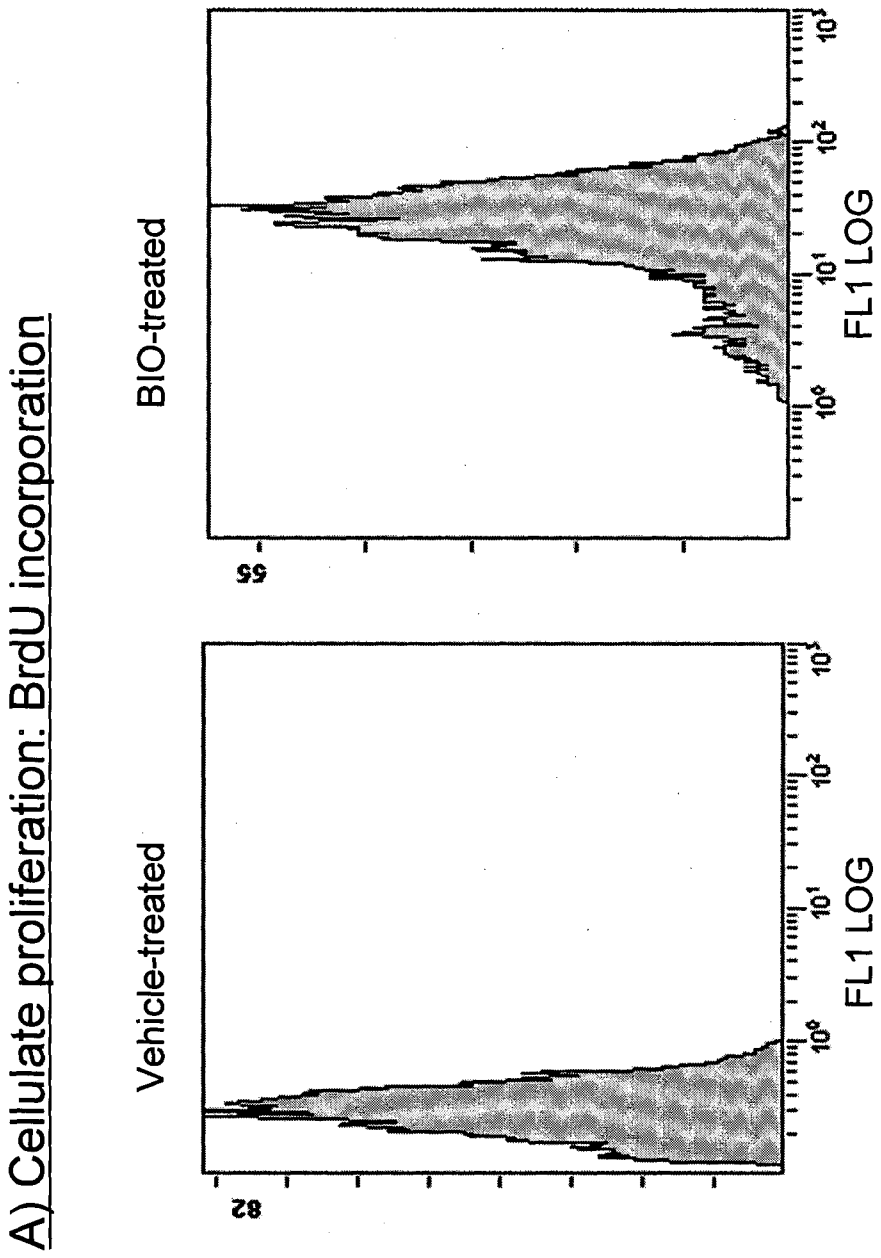

A) Global gene expression changes after treatment with BIO
Number of genes
300
250
200
150
100
50
0
Cell differentiation
Growth
Homeostasis
Transcription
Protein biosynthesis
Lipid metabolism
Transport
Apoptosis
Inflammatory response
Immune response
Cell cycle
Cell adhesion
Signal transduction
Cell proliferation
Downregulated genes
Upregulated genes

도 8b

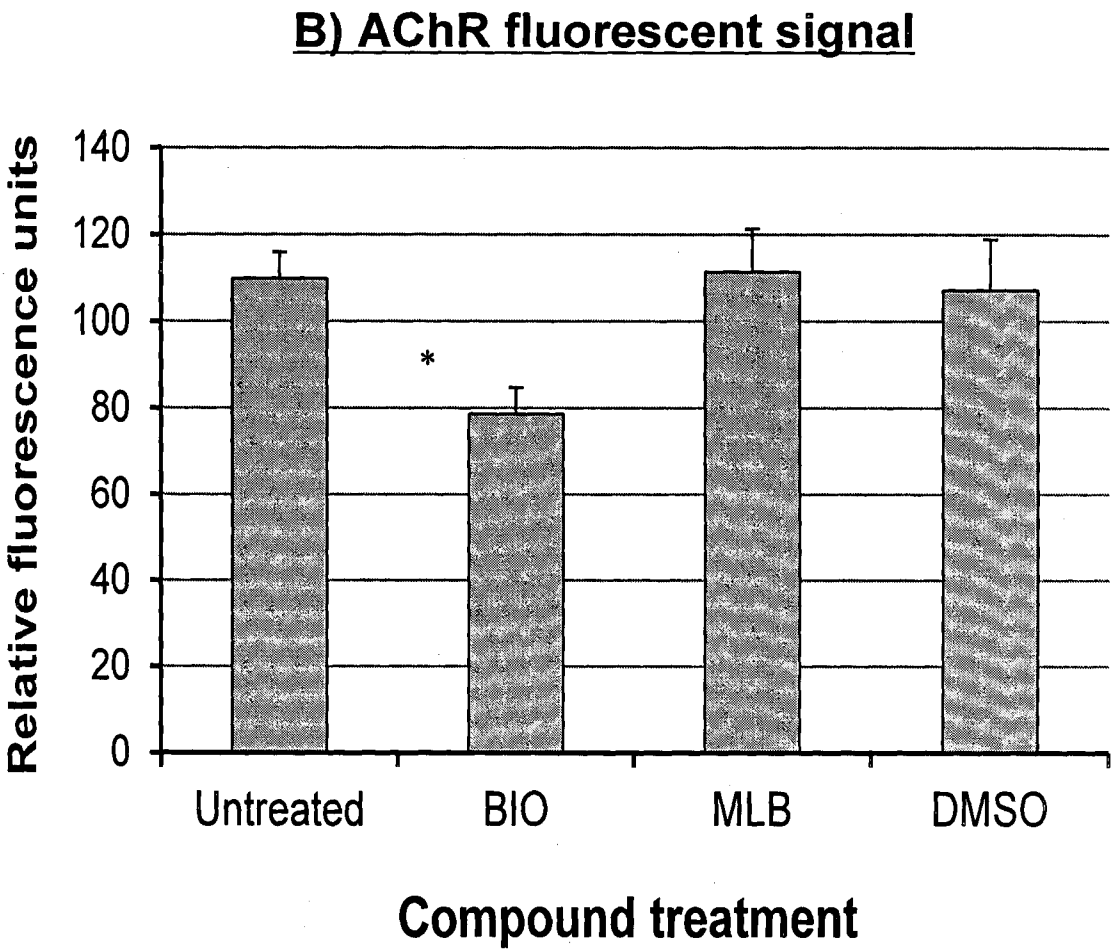
B) Changes in gene expression linked to the p53 pathway

Name	Accession no.	Fold change in expression
CHK2 checkpoint homolog (S. pombe)	NM_016681	0.421953328
Cytochrome c, somatic	NM_007808	2.374087591
Checkpoint kinase 1 homolog (S. pombe)	NM_007691	0.228833922
Cyclin E1	NM_007633	0.499833166
Cyclin-dependent kinase 1	NM_007659	0.158851448
Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	NM_008655	0.488657845
Cyclin B1	NM_172301	0.094840139
Protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform	NM_016910	0.389044944
Stratifin	NM_018754	0.427006336
Thrombospondin 1	NM_011580	0.293383948

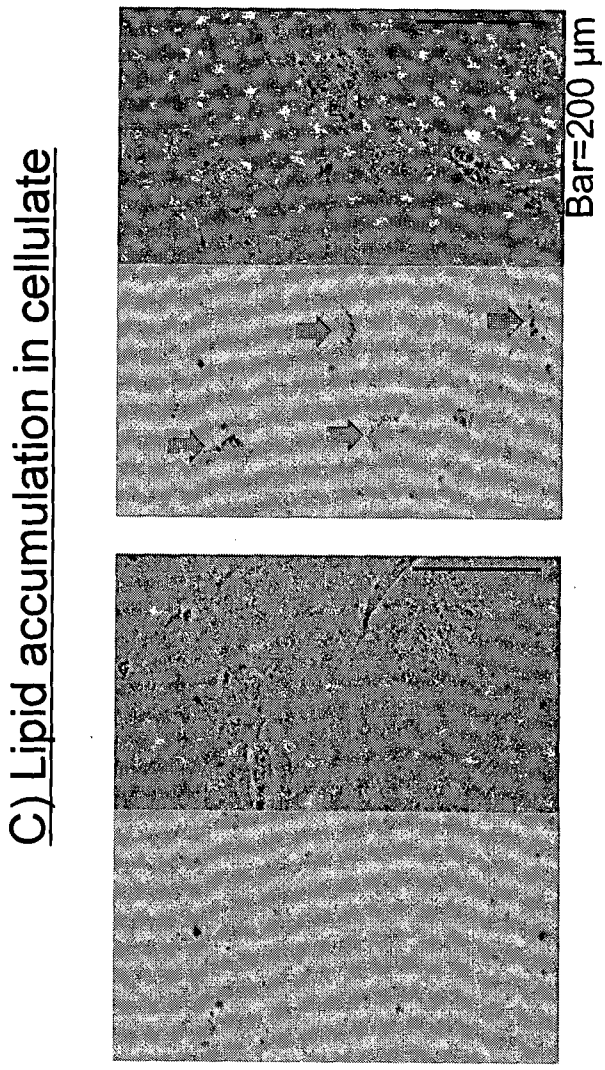
도 9a


A) Cellulate proliferation: BrdU incorporation
Vehicle-treated
82
BIO-treated
65
FL1 LOG
FL1 LOG

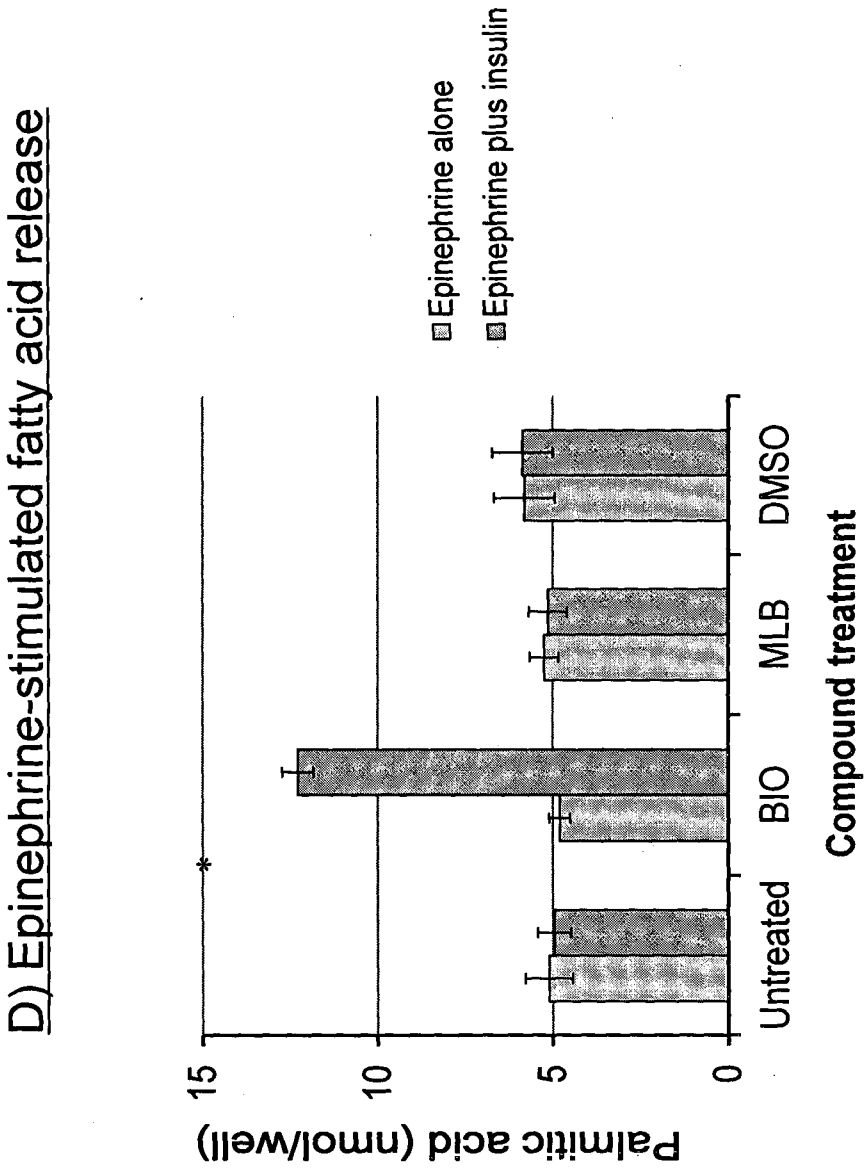
도 9b


B) AChR fluorescent signal
Relative fluorescence units
140
120
100
80
60
40
20
0
*
Untreated
BIO
MLB
DMSO
Compound treatment

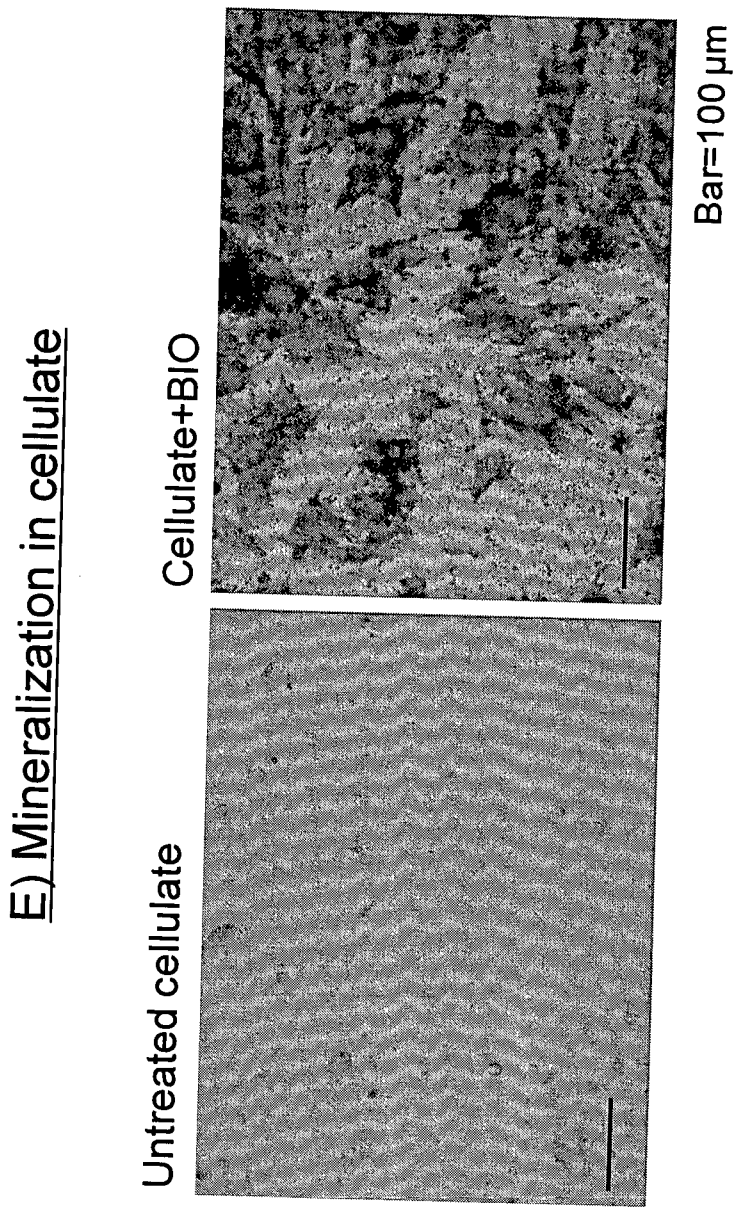
도 9c



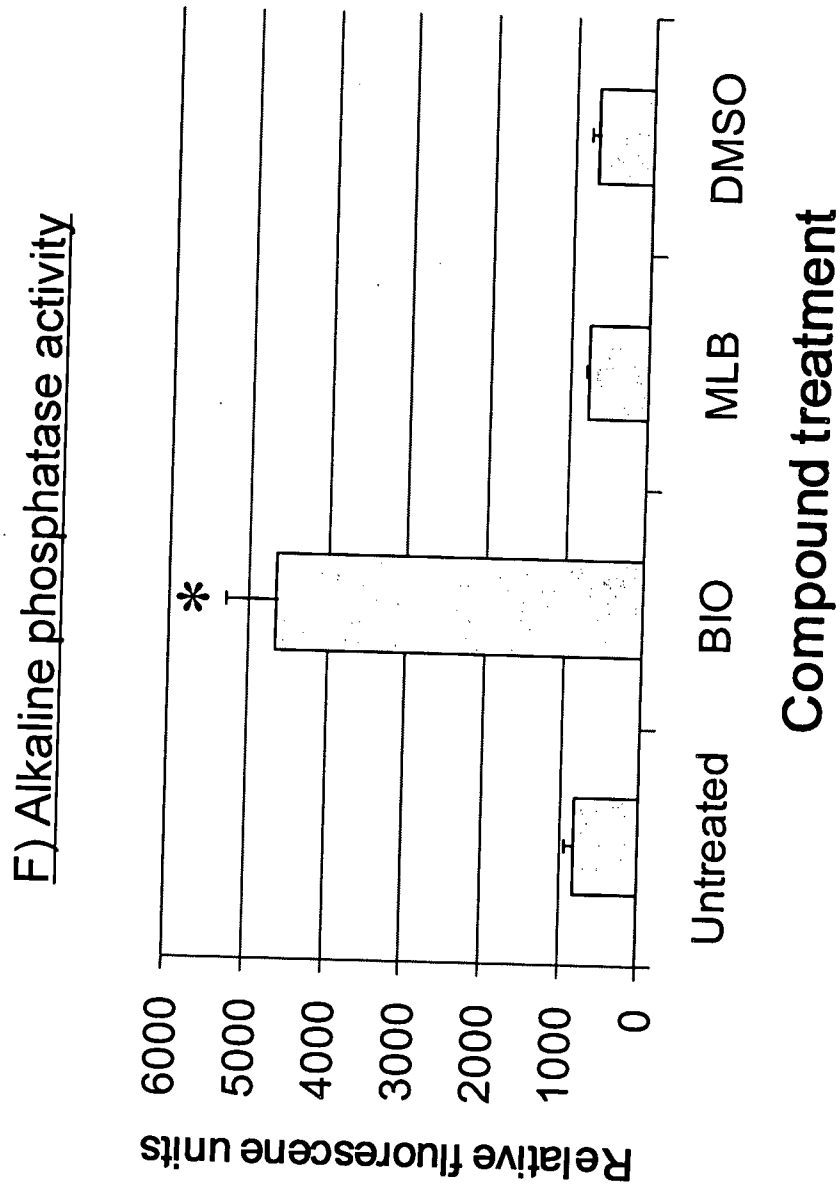
도 9d


D) Epinephrine-stimulated fatty acid release
Epinephrine alone
Epinephrine plus insulin
Palmitic acid (nmol/well)
15
10
5
0
*
Untreated
BIO
MLB
DMSO
Compound treatment

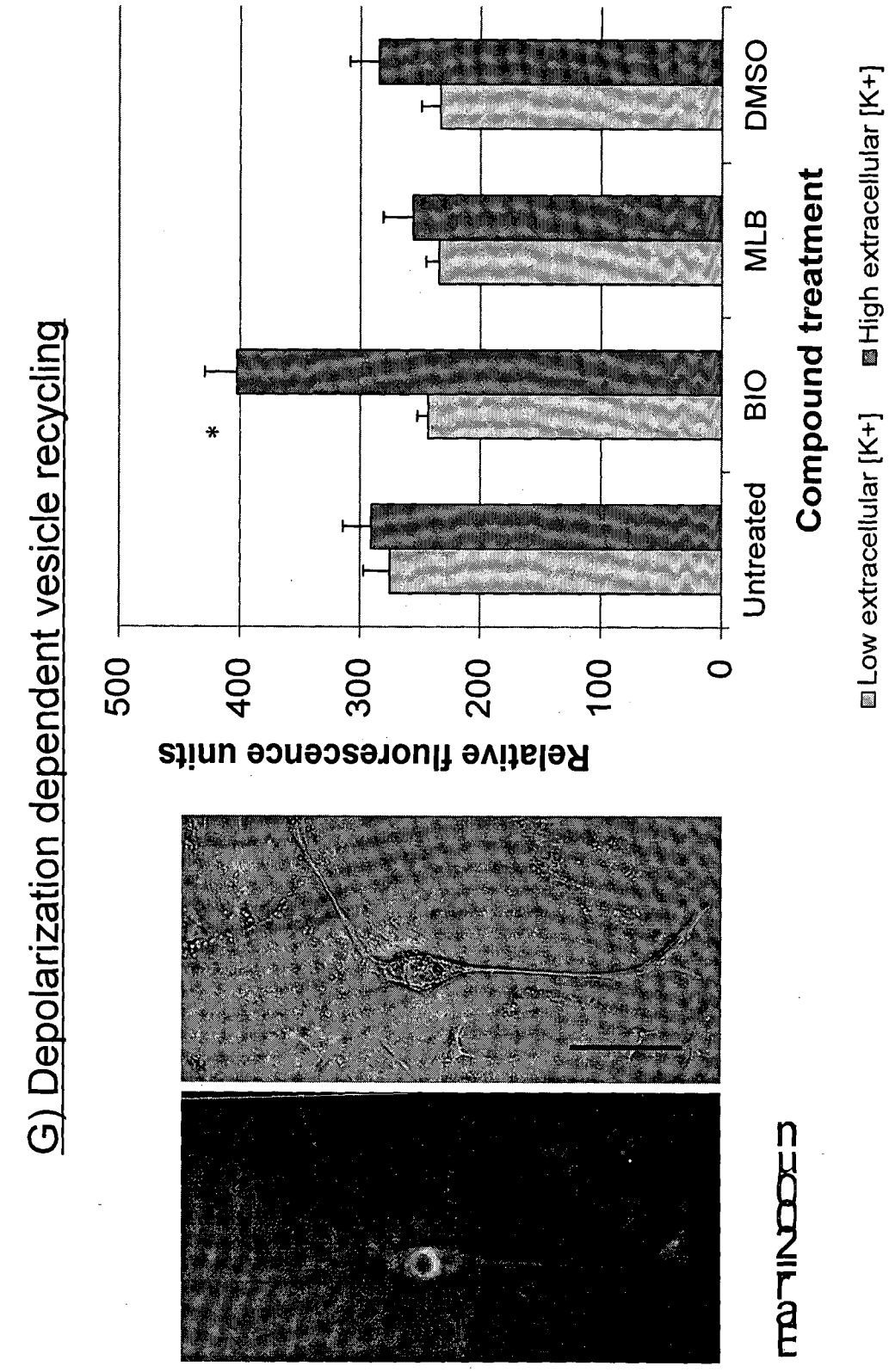
도 9e


E) Mineralization in cellulate
Untreated cellulate
Cellulate+BIO
Bar=100 μm

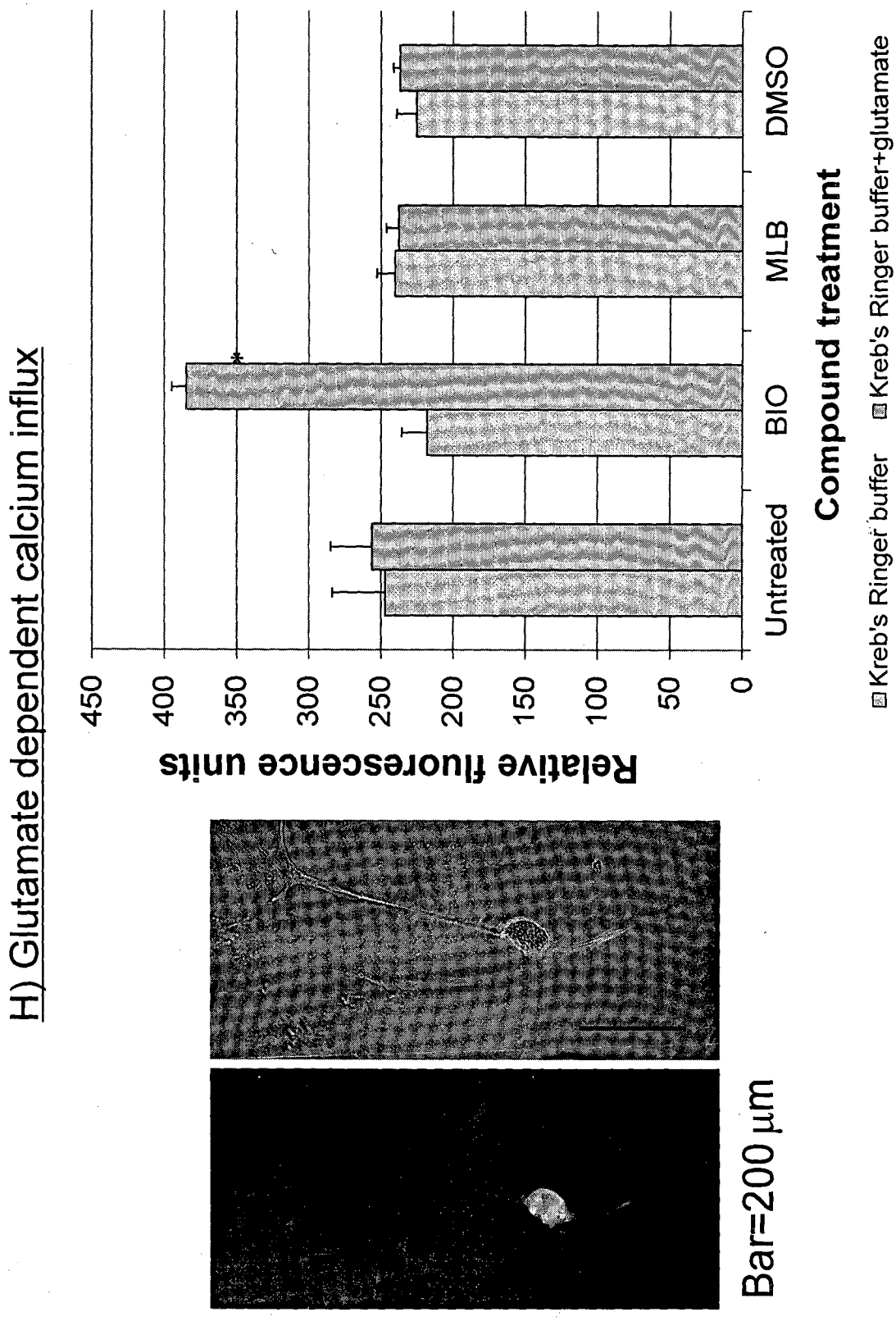
도 9f


F) Alkaline phosphatase activity
Relative fluorescene units
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
*
Untreated
BIO
MLB
DMSO
Compound treatment

도 9g


G) Depolarization dependent vesicle recycling
Relative fluorescence units
500
400
300
200
100
0
*
Untreated
BIO
MLB
DMSO
Compound treatment
Low extracellular [K+]
High extracellular [K+]
merge

도 9h


H) Glutamate dependent calcium influx
Relative fluorescence units
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
Untreated
BIO
MLB
DMSO
Compound treatment
Kreb's Ringer buffer
Kreb's Ringer buffer+glutamate
Bar=200 μm

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2012/009338

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/077(2010.01)i, C12N 1/38(2006.01)i, C12N 5/071(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/077

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: myocytes, dedifferentiation, p21, BIO, SB203580, SQ22536, LPA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JUNG, D-W. and WILLIAMS, DR., "Novel Chemically Defined Approach To Produce Multipotent Cells from Terminally Differentiated Tissue Syncytia", ACS Chemical Biology, 15 February 2011, Vol. 6, pages 553-562.	1-4,6-12
A	See abstract; figure 6; pages 554,560-561.	5
X	ZHANG, Y. et al., "Dedifferentiation and Proliferation of Mammalian Cardiomyocytes", PLoS ONE, 03 September 2010, Vol. 5, No. 9, e12559, pages 1-13.	1-4,9,10,12
A	See abstract; figure 2.	5-8,11
A	SHAN, SW. et al., "Induction of growth arrest and polycomb gene expression by reversine allows C2C12 cells to be reprogrammed to various differentiated cell types", Proteomics, 2007, Vol. 7, pages 4303-4316. See abstract.	1-12
PX	KIM, W-H. et al., "Small Molecules That Recapitulate the Early Steps of Urodele Amphibian Limb Regeneration and Confer Multipotency", ACS Chemical Biology, 23 January 2012, Vol. 7, pages 732-743. See the entire document.	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 MARCH 2013 (26.03.2013)	**26 MARCH 2013 (26.03.2013)**

Name and mailing address of the ISA/KR
Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea
Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2012/009338

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
NONE			

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2012/009338

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/077(2010.01)i, C12N 1/38(2006.01)i, C12N 5/071(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
C12N 5/077

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: myocytes, dedifferentiation, p21, BIO, SB203580, SQ22536, LPA

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	JUNG, D-W.and WILLIAMS, DR., 'Novel Chemically Defined Approach To Produce Multipotent Cells from Terminally Differentiated Tissue Syncytia', ACS Chemical Biology, 2011.2.15., 6권, 553-562면.	1-4,6-12
A	초록; 그림 6; 554,560-561면 참조.	5
X	ZHANG, Y. et al., 'Dedifferentiation and Proliferation of Mammalian Cardiomyocytes', PLoS ONE, 2010.9.3., 5권, 9호, e12559, 1-13면.	1-4,9,10,12
A	초록; 2면 참조.	5-8,11
A	SHAN, SW. et al., 'Induction of growth arrest and polycomb gene expression by reversine allows C2C12 cells to be reprogrammed to various differentiated cell types', Proteomics, 2007, 7권, 4303-4316면. 초록 참조.	1-12
PX	KIM, W-H. et al., 'Small Molecules That Recapitulate the Early Steps of Urodele Amphibian Limb Regeneration and Confer Multipotency', ACS Chemical Biology, 2012.1.23., 7권, 732-743면. 전문 참조.	1-12

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2013년 03월 26일 (26.03.2013)	**2013년 03월 26일 (26.03.2013)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 82-42-472-7140

심사관
이효진
전화번호 82-42-481-8743

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2012/009338

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일

없음